



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0128785
(43) 공개일자 2021년10월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C09D 11/10 (2014.01) B29C 48/00 (2019.01)
B29C 64/106 (2017.01) B33Y 10/00 (2015.01)
B33Y 70/00 (2020.01) C09D 11/101 (2014.01)

(52) CPC특허분류

C09D 11/10 (2013.01)
B29C 48/022 (2019.02)

(21) 출원번호 10-2020-0046877

(22) 출원일자 2020년04월17일

심사청구일자 2021년07월02일

(71) 출원인

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

(72) 발명자

신관우

서울특별시 강남구 선릉로 221 도곡렉슬아파트
404동 1204호

김나희

서울특별시 광진구 광나루로56길 32, 204-2102
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

윤대웅

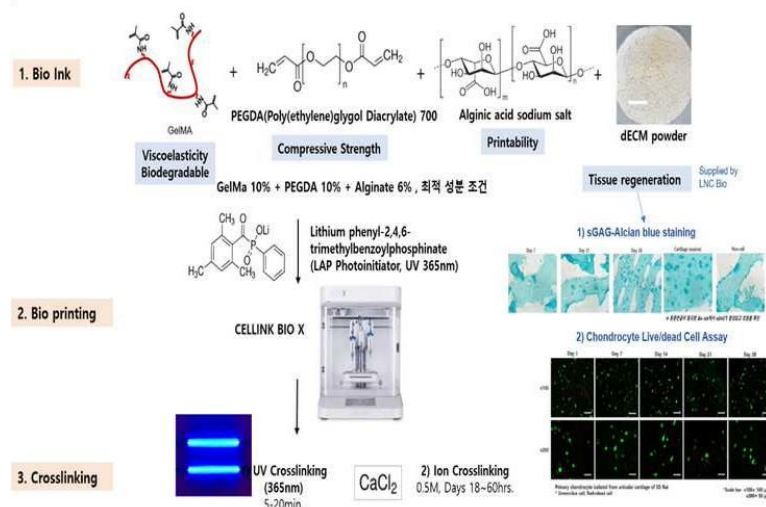
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 연골 모사체 제조용 바이오 잉크 조성물 및 이를 이용한 연골 모사체의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 연골 모사체 제조용 바이오 잉크 조성물 및 이를 이용한 연골 모사체의 제조방법에 관한 것으로서, 상기 바이오 잉크 조성물을 이용하면 단순화된 공정을 이용하여 3D 프린팅만으로도 연골 모사체 제조 공정을 제공할 수 있고, 이로부터 강도 및 형태 유지 정도가 우수한 연골 모사체를 생산할 수 있으므로, 이를 효과적으로 연골 모사체의 제조에 이용할 수 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

B29C 64/106 (2021.08)

B33Y 10/00 (2013.01)

B33Y 70/00 (2013.01)

C09D 11/101 (2013.01)

(72) 발명자

김창호

서울특별시 노원구 노원로 29 우성아파트 2동 605호

김형구

서울특별시 노원구 한글비석로14길 37

이솔

서울특별시 동대문구 답십리로38길 14

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345315497
과제번호	2018R1A6A1A03024940
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공분야 대학중점연구소지원사업
연구과제명	분자 자가 조립 기반 기능성 인공세포 구현
기 여 율	1/2
과제수행기관명	서강대학교 산학협력단
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711110551
과제번호	2019R1A2C2084638
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	바이오 분자 소재의 다차원 계층 구조 연구
기 여 율	1/2
과제수행기관명	서강대학교 산학협력단
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

젤라틴 메타크릴레이트(Gelatin Methacrylate; GelMA), 알지네이트(Alginic acid sodium salt), 폴리에틸렌글리콜디아실레이트(polyethyleneglycoldiacrylate; PEGDA) 및 탈세포화된 세포외 기질(decellularized extracellular matrix; dECM)을 포함하는 연골 모사체 제조용 바이오 잉크 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, GelMA는 젤라틴:MAA(Methacrylic Anhydride)를 5:1 내지 40:1의 중량비로 혼합하여 제조된 것인, 바이오 잉크 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, dECM은 입자의 크기가 200 μm 이하인 것인, 바이오 잉크 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 바이오 잉크 조성물은 GelMA 5.0 내지 20.0 중량%, 알지네이트 3.0 내지 12.0 중량%, PEGDA 5.0 내지 20.0 중량% 및 dECM 0.5 내지 2.0 중량%를 포함하는 것인, 바이오 잉크 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 바이오 잉크 조성물은 광개시제를 추가적으로 포함하는 것인, 바이오 잉크 조성물.

청구항 6

다음의 단계를 포함하는 연골 모사체 제조방법:

젤라틴 메타크릴레이트(Gelatin Methacrylate; GelMA), 알지네이트(Alginic acid sodium salt), 폴리에틸렌글리콜디아실레이트(polyethyleneglycoldiacrylate; PEGDA) 및 탈세포화된 세포외 기질(decellularized extracellular matrix; dECM)을 혼합하는 바이오 잉크 제조 단계;

바이오 잉크를 압출하여 구조체를 형성하는 압출 단계; 및

구조체를 경화시키는 경화 단계.

청구항 7

제6항에 있어서, GelMA는 젤라틴:MAA를 5:1 내지 40:1의 중량비로 혼합하여 제조된 것인, 연골 모사체 제조방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 바이오 잉크 제조 단계는 GelMA 5.0 내지 20.0 중량%, 알지네이트 3.0 내지 12.0 중량%, PEGDA 5.0 내지 20.0 중량% 및 dECM 0.5 내지 2.0 중량%를 혼합하는 단계인 것인, 연골 모사체 제조방법.

청구항 9

제6항에 있어서, 바이오 잉크 제조 단계는 광개시제를 추가적으로 혼합하는 것인, 연골 모사체 제조방법.

청구항 10

제6항에 있어서, 경화 단계는 다음의 단계로 이루어지는 것인, 연골 모사체 제조방법:

구조체에 UV를 조사하여 경화시키는 UV 경화 단계; 및

구조체에 이온 용액을 접촉시켜 경화시키는 이온 경화 단계.

청구항 11

제10항에 있어서, 이온 경화 단계는 구조체를 Ca^{2+} 이온 용액에 침지하는 것인, 연골 모사체 제조방법.

청구항 12

젤라틴 메타크릴레이트(Gelatin Methacrylate; GelMA), 알지네이트(Alginic acid sodium salt), 폴리에틸렌글리콜디아실레이트(polyethyleneglycoldiacrylate; PEGDA) 및 탈세포화된 세포외 기질(decellularized extracellular matrix; dECM)을 포함하는 연골 모사체 제조용 바이오 잉크 조성물로 제조된 연골 모사체.

청구항 13

제12항에 있어서, GelMA는 젤라틴:MAA를 5:1 내지 40:1의 중량비로 혼합하여 제조된 것인, 연골 모사체.

청구항 14

제12항에 있어서, 바이오 잉크 조성물은 GelMA 5.0 내지 20.0 중량%, 알지네이트 3.0 내지 12.0 중량%, PEGDA 5.0 내지 20.0 중량% 및 dECM 0.5 내지 2.0 중량%를 포함하는 것인, 연골 모사체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 연골 모사체 제조용 바이오 잉크 조성물 및 이를 이용한 연골 모사체의 제조방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 젤라틴 메타크릴레이트(Gelatin Methacrylate; GelMA) 및 탈세포화된 세포외 기질(decellularized extracellular matrix; dECM)을 포함하는 연골 모사체 제조용 바이오 잉크 및 이를 이용하여 3D 프린팅된 연골 모사체의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 연골의 수요 및 연골을 만들기 위한 다양한 시도에 따라, 3D 프린팅(3 dimensional Printing) 기술과 합성 소재를 사용하여 바이오 잉크(Bio Ink)를 제조하고, 이를 이용하여 연골 모사체를 인쇄하는 연구가 알려져 있다.

[0003] 실제로 중국에서 귀 연골 모사체를 필요로 하는 환자들에게 3D 프린팅 구조물을 이식(PCL(Polycaprolactone) grid + PGA(polyglycolic acid) filaments + PLA(Polylactic acid) coat))한 사례가 있었다. 3D 바이오프린팅하는 것은 비교적 구현이 쉽고 비용이 높지 않아 랩 규모(Lab scale)에서 시도가 용이하였다(Ref 1, EBioMedicine, 2018, 28, 287-302).

[0004] 이와 같이 생체 적합성은 확인이 되었으나 연골 모사체 제작에 대한 여러 공정의 복잡성 등의 어려움이 발견되었고, 3D 바이오 잉크만을 가지고 3D 구조체인 연골 모사체를 제작할 수 있도록 공정의 단순화가 필요할 것으로 판단되었다.

[0005] 기존의 연골 수술에서는 자가 연골을 이식하는 방식을 이용하였고, 이러한 방식은 자가 연골 채취 및 채취된 연골의 이식 등 여러 차례의 수술과 이에 따른 부담이 발생한다는 단점이 있다.

[0006] 때문에 연골 수술에 다른 보형물을 이용하여 성형하는 수술이 시도되었고, 예를 들어, 성형외과에서 코 보형물로 사용하는 메드포어(Medpore)가 이에 해당하고, 이는 폴리에틸렌 합성소재이며 독성이 함유되어 있어서, 생체 소재가 아닌 이상 분해성(degradable)이 낮고, 또한 부작용 사례들이 나타나기도 하였다(Archives of Aesthetic Plastic Surgery, 2011, 17, 63-68).

[0007] 따라서 생체 적합성이 보장된 생체성분 폴리머를 이용하여 보형물의 제조에 사용될 3D 프린팅 잉크를 제작할 필요성이 제시되었다. 연골 모사체 제작에 3D 프린팅 공정이 들어가 전체 공정이 단순화되더라도 가공에 필요한 이외의 여러 공정들이 포함되어 전체적인 공정의 복잡성이 발생하기 때문에, 필요한 모든 성분을 포함하며 구조체 특유의 강도 특성을 가지며 세밀한 구조체 모양을 바로 만들어낼 수 있도록 연골 모사체 제작 공정을 단순화시킬 수 있는 바이오 잉크를 제작함으로써 3D 프린팅 기술을 이용한 연골 모사체의 제작에 활용할 필요가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 이에 본 발명자들은 젤라틴 메타크릴레이트(Gelatin Methacrylate; GelMA) 및 탈세포화된 세포외 기질(decellularized extracellular matrix; dECM)을 포함하는 연골 모사체 제조용 바이오 잉크 조성물을 도출함으로써, 단순화된 공정을 이용하여 3D 프린팅만으로도 연골 모사체 제조 공정을 제공하고 이로부터 생산된 연골 모사체의 강도 및 형태 유지력이 우수한 것을 확인하였다.
- [0009] 이에, 본 발명의 목적은 GelMA, 알지네이트(Alginic acid sodium salt), 폴리에틸렌글리콜디아실레이트(polyethyleneglycoldiacrylate; PEGDA) 및 dECM을 포함하는 연골 모사체 제조용 바이오 잉크 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 다음의 단계를 포함하는 연골 모사체 제조방법을 제공하는 것이다:
- [0011] GelMA, 알지네이트, PEGDA 및 dECM을 혼합하는 바이오 잉크 제조 단계;
- [0012] 바이오 잉크를 압출하여 구조체를 형성하는 압출 단계; 및
- [0013] 구조체를 경화시키는 경화 단계.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 GelMA, 알지네이트, PEGDA 및 dECM을 포함하는 연골 모사체 제조용 바이오 잉크 조성물로 제조된 연골 모사체를 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 목적은 GelMA, 알지네이트, PEGDA 및 dECM을 포함하는 바이오 잉크 조성물의 연골 모사체 제조 용도에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

- [0016] 본 발명은 연골 모사체 제조용 바이오 잉크 조성물 및 이를 이용한 연골 모사체의 제조방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 바이오 잉크 조성물은 단순화된 공정을 이용하여 3D 프린팅만으로도 연골 모사체 제조 공정을 제공한다.
- [0017] 본 발명자들은 도 1과 같이 젤라틴 메타크릴레이트(Gelatin Methacrylate; GelMA), 알지네이트(Alginic acid sodium salt), 폴리에틸렌글리콜디아실레이트(polyethyleneglycoldiacrylate; PEGDA) 및 탈세포화된 세포외 기질(decellularized extracellular matrix; dECM)을 포함하는 바이오 잉크 조성물을 제조하고, 이를 이용하여 3D 프린팅을 수행함에 있어서 UV 경화 및 이온 경화 단계를 수행함으로써, 실제 연골과 유사한 특성의 연골 모사체를 제조하였다.
- [0018] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.
- [0019] 본 발명의 일 양태는 GelMA, 알지네이트, PEGDA 및 dECM을 포함하는 연골 모사체 제조용 바이오 잉크 조성물이다.
- [0020] GelMA는 젤라틴:MAA(Methacrylic Anhydride)를 5:1 내지 40:1, 5:1 내지 30:1, 5:1 내지 20:1, 5:1 내지 10:1, 10:1 내지 40:1, 10:1 내지 30:1 또는 10:1 내지 20:1, 예를 들어, 10:1의 중량비로 혼합하여 제조된 것일 수 있다. 젤라틴:MAA의 중량비는 10:1로 적용되었을 때 바이오 잉크를 이용하여 제조된 구조체의 탄성 및 강도가 가장 우수하게 나타났다.
- [0021] dECM은 입자의 크기가 200 μm 이하, 150 μm 이하, 120 μm 이하, 100 μm 이하 또는 80 μm 이하인 것일 수 있고, 예를 들어, 75 μm 이하인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0022] dECM의 입자의 크기는 작을수록 바이오 잉크 내에서의 용해도 및 분산력을 높일 수 있다. 또한, 바이오 잉크로서 3D 프린팅에 사용되는 공정에 활용되기 위하여 노즐을 통해 압출되는 경우, 노즐의 압출구 내경의 크기에 영향을 주거나, 압출구를 막거나, 압출된 필라멘트 두께(filament thickness)의 값에 영향을 주는 경우를 방지하기 위하여 입자의 크기가 작을 필요가 있다. 노즐의 압출구 크기에 따라 요구되는 dECM 입자의 크기는 상이할 수 있으나, 작을수록 유리하다.
- [0023] 본 발명의 일 구현예에서, 0.4 mm 지름의 노즐을 사용하는 경우 바이오 잉크 내의 dECM 입자는 75 내지 106 μm 인 것이 공정의 수행에 있어서 적절하였다. 입자 크기를 과도하게 줄이는 공정은 수율이 좋지 않을 수 있으므로, 결과물의 특성에 큰 차이가 발생하지 않는 경우 노즐의 크기에 따라 적절히 조절할 수 있다.

- [0024] 바이오 잉크 조성물은 GelMA를 5.0 내지 20.0 중량%, 5.0 내지 18.0 중량%, 5.0 내지 15.0 중량%, 5.0 내지 12.0 중량%, 8.0 내지 20.0 중량%, 8.0 내지 18.0 중량%, 8.0 내지 15.0 중량% 또는 8.0 내지 12.0 중량%, 예를 들어, 10.0 중량% 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0025] 본 발명자들은 바이오 잉크를 이용하여 형성된 구조체에서 연골세포가 자랄 수 있는 하이드로겔의 특성을 구현하고자 하였다. GelMA가 20.0 중량% 이상일 때에는 경화된 하이드로겔의 기공 크기가 작아지기 때문에 세포배양 실험에서 생존률이 높지 않다는 기존의 연구결과를 확인하였으므로, GelMA의 함량을 20.0 중량%를 초과하지 않는 범위 내에서 조절하였다.
- [0026] 바이오 잉크 조성물은 알지네이트를 3.0 내지 12.0 중량%, 3.0 내지 10.0 중량%, 3.0 내지 8.0 중량%, 3.0 내지 6.0 중량%, 5.0 내지 12.0 중량%, 5.0 내지 10.0 중량%, 5.0 내지 8.0 중량% 또는 5.0 내지 6.0 중량%, 예를 들어, 6.0 중량%인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0027] 바이오 잉크 조성물은 PEGDA를 5.0 내지 20.0 중량%, 5.0 내지 18.0 중량%, 5.0 내지 15.0 중량%, 5.0 내지 12.0 중량%, 8.0 내지 20.0 중량%, 8.0 내지 18.0 중량%, 8.0 내지 15.0 중량% 또는 8.0 내지 12.0 중량%, 예를 들어, 10.0 중량% 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0028] 바이오 잉크 조성물은 dECM을 0.5 내지 2.0 중량%, 0.5 내지 1.8 중량%, 0.5 내지 1.5 중량%, 0.5 내지 1.2 중량%, 0.5 내지 1.0 중량%, 0.8 내지 2.0 중량%, 0.8 내지 1.8 중량%, 0.8 내지 1.5 중량%, 0.8 내지 1.2 중량% 또는 0.8 내지 1.0 중량%, 예를 들어, 1.0 중량% 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 바이오 잉크 조성물 중 dECM의 함량이 높을수록, 이를 이용하여 제조한 구조체에 세포배양 실험을 수행하였을 경우 세포의 생존율이 높을 것으로 예상되었다. 그러나 dECM의 함량이 과도하게 높을 경우, 이를 포함하는 바이오 잉크의 물성 변화로 인하여 인쇄 조건의 세팅에 부적합한 조성물로 제조될 수 있다.
- [0029] 바이오 잉크 조성물은 광개시제를 추가적으로 포함하는 것일 수 있고, 바이오 잉크 조성물은 광개시제를 0.1 내지 1.0 중량%, 0.1 내지 0.5 중량%, 0.2 내지 1.0 중량% 또는 0.2 내지 0.5 중량%, 예를 들어, 0.2 내지 0.3 중량% 포함되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 광개시제는 인체에 유독할 수 있으므로 가능한 한 적게 포함되는 것이 좋고, 1.0 중량% 이내로 사용하는 것이 일반적이다.
- [0030] 광개시제는 LAP(Lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate, LAP Photoinitiator)인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0031] 본 발명의 다른 양태는 다음의 단계를 포함하는 연골 모사체 제조방법이다:
- [0032] GelMA, 알지네이트, PEGDA 및 dECM을 혼합하는 바이오 잉크 제조 단계;
- [0033] 바이오 잉크를 압출하여 구조체를 형성하는 압출 단계; 및
- [0034] 구조체를 경화시키는 경화 단계.
- [0035] GelMA는 젤라틴:MAA(Methacrylic Anhydride)를 5:1 내지 40:1, 5:1 내지 30:1, 5:1 내지 20:1, 5:1 내지 10:1, 10:1 내지 40:1, 10:1 내지 30:1 또는 10:1 내지 20:1, 예를 들어, 10:1의 중량비로 혼합하여 제조된 것일 수 있다. 젤라틴:MAA의 중량비는 10:1로 적용되었을 때 바이오 잉크를 이용하여 제조된 구조체의 탄성 및 강도가 가장 우수하게 나타났다.
- [0036] 연골 모사체 제조방법은 dECM을 분쇄하는 분쇄 단계를 더 포함할 수 있다. 분쇄 단계는 dECM의 입자 크기를 감소시키기 위하여 볼 밀링(ball milling) 공정을 이용하여 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 볼 밀링 공정 이후 원하는 크기의 입자를 필터링을 통해 얻을 수 있다.
- [0037] dECM은 입자의 크기가 200 μm 이하, 150 μm 이하, 120 μm 이하, 100 μm 이하 또는 80 μm 이하인 것일 수 있고, 예를 들어, 75 μm 이하인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0038] 바이오 잉크 조성물은 GelMA를 5.0 내지 20.0 중량%, 5.0 내지 18.0 중량%, 5.0 내지 15.0 중량%, 5.0 내지 12.0 중량%, 8.0 내지 20.0 중량%, 8.0 내지 18.0 중량%, 8.0 내지 15.0 중량% 또는 8.0 내지 12.0 중량%, 예를 들어, 10.0 중량% 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0039] 바이오 잉크 조성물은 알지네이트를 3.0 내지 12.0 중량%, 3.0 내지 10.0 중량%, 3.0 내지 8.0 중량%, 3.0 내지 6.0 중량%, 5.0 내지 12.0 중량%, 5.0 내지 10.0 중량%, 5.0 내지 8.0 중량% 또는 5.0 내지 6.0 중량%, 예를 들어, 6.0 중량%인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0040] 바이오 잉크 조성물은 PEGDA를 5.0 내지 20.0 중량%, 5.0 내지 18.0 중량%, 5.0 내지 15.0 중량%, 5.0 내지 12.0 중량%, 8.0 내지 20.0 중량%, 8.0 내지 18.0 중량%, 8.0 내지 15.0 중량% 또는 8.0 내지 12.0 중량%, 예를 들어, 10.0 중량% 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0041] 바이오 잉크 조성물은 dECM을 0.5 내지 2.0 중량%, 0.5 내지 1.8 중량%, 0.5 내지 1.5 중량%, 0.5 내지 1.2 중량%, 0.5 내지 1.0 중량%, 0.8 내지 2.0 중량%, 0.8 내지 1.8 중량%, 0.8 내지 1.5 중량%, 0.8 내지 1.2 중량% 또는 0.8 내지 1.0 중량%, 예를 들어, 1.0 중량% 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 바이오 잉크 조성물 중 dECM의 함량이 높을수록, 이를 이용하여 제조한 구조체에 세포배양 실험을 수행하였을 경우 세포의 생존율이 높을 것으로 예상되었다.
- [0042] 바이오 잉크 제조 단계는 GelMA, 알지네이트, PEGDA 및 dECM의 순서로 혼합하는 것이 바람직하다. GelMA와 알지네이트는 이온결합으로 인하여 물 속에서 잘 혼합될 것으로 예상된다. 알지네이트를 PEGDA 이후에 첨가할 경우, 알지네이트가 혼합물 속에 효과적으로 혼합되지 못할 수 있다. dECM은 파우더 제형이므로 고분자들이 잘 섞인 상태에서 마지막으로 첨가하여 혼합할 수 있다.
- [0043] 바이오 잉크 조성물은 광개시제를 추가적으로 포함하는 것일 수 있고, 바이오 잉크 조성물은 광개시제를 0.1 내지 0.5 중량%, 예를 들어, 0.2 내지 0.3 중량% 포함되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0044] 광개시제는 LAP(Lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate, LAP Photoinitiator)인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 광개시제는 다른 물질의 용해도에 큰 영향을 미치지 않으므로, 바이오 잉크 제조 단계에서 혼합 순서에 제약을 받지 않는다.
- [0045] 압출 단계는 온도 28 내지 35℃, 압력 65 내지 75 kPa, 인쇄 속도 4 내지 8 mm/s, 인쇄 높이 0.2 내지 0.8 mm 조건으로 수행되는 것일 수 있고, 바람직하게는 온도 30℃, 압력 72 kPa, 인쇄 속도 6 mm/s, 인쇄 높이 0.5 mm 조건으로 수행되는 것일 수 있다. 알지네이트가 증가하면 그만큼 바이오잉크 자체 점도(Viscosity)도 증가하고 바이오 잉크로부터의 최종산물 경도도 증가하기 때문에, 바이오잉크의 조성에 따라 압출 단계의 수행 조건, 특히 압력 조건이 달라질 수 있다.
- [0046] 본 발명의 일 구현예에서, 알지네이트가 4%인 경우 이를 포함한 바이오 잉크를 압출하는 압력은 40 내지 42 kPa 였고, 알지네이트가 6%인 경우 이를 포함한 바이오잉크를 압출하는 압력은 72 kPa로 증가하였다.
- [0047] 구체적으로, 알지네이트가 4%, 온도가 29℃일 때 바이오 잉크 조성물의 점도가 너무 높아져서 부드럽게 인쇄되지 않고 끊어지는 현상이 발생하였다. 이를 해소하기 위하여, 온도를 30℃로 높이고 알지네이트의 함량을 6%로 증가시키는 방법을 적용해 볼 수 있다. 온도가 30℃일 때 바이오 잉크 조성물의 점성이 가장 적당하여 안정적인 구조체를 인쇄할 수 있었다.
- [0048] 경화 단계는 다음의 단계로 이루어지는 것일 수 있다:
- [0049] 구조체에 UV를 조사하여 경화시키는 UV 경화 단계; 및
- [0050] 구조체에 이온 용액을 접촉시켜 경화시키는 이온 경화 단계.
- [0051] 이온 경화 단계는 구조체를 Ca^{2+} 이온 용액에 침지하는 것일 수 있다.
- [0052] UV 경화 단계는 UV를 1 내지 30분, 5 내지 30분, 10 내지 30분, 15 내지 30분, 20 내지 30분, 1 내지 20분, 5 내지 20분, 10 내지 20분 또는 15 내지 20분, 예를 들어, 20분 동안 조사하여 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0053] 이온 경화 단계는 0.2 내지 0.8 M의 Ca^{2+} 이온 용액에 10 내지 48시간, 10 내지 36시간, 10 내지 24시간, 10 내지 18시간, 12 내지 48시간, 12 내지 36시간, 12 내지 24시간, 12 내지 18시간, 16 내지 48시간, 16 내지 36시간, 16 내지 24시간 또는 16 내지 18시간, 예를 들어, 18시간 동안 침지시켜 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이온 경화 단계의 수행시간이 길수록 구조체가 더 단단해질 것이라고 예상할 수 있으나, 너무 길 경우 바이오 잉크의 조성물 중 알지네이트가 녹아 나올 수 있다.
- [0054] 상기 Ca^{2+} 이온 용액은 알지네이트를 경화시킬 수 있고, 예를 들어, CaCl_2 인 것일 수 있다.
- [0055] 본 발명의 또 다른 양태는 GelMA, 알지네이트, PEGDA 및 dECM을 포함하는 연골 모사체 제조용 바이오 잉크 조성물로 제조된 연골 모사체이다.

- [0056] GelMA는 젤라틴:MAA를 5:1 내지 40:1, 5:1 내지 30:1, 5:1 내지 20:1, 5:1 내지 10:1, 10:1 내지 40:1, 10:1 내지 30:1 또는 10:1 내지 20:1, 예를 들어, 10:1의 중량비로 혼합하여 제조된 것일 수 있다. 젤라틴:MAA의 중량비는 10:1로 적용되었을 때 바이오 잉크를 이용하여 제조된 구조체의 탄성 및 강도가 가장 우수하게 나타났다.
- [0057] dECM은 입자의 크기가 200 μm 이하, 150 μm 이하, 120 μm 이하, 100 μm 이하 또는 80 μm 이하인 것일 수 있고, 예를 들어, 75 μm 이하인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0058] 바이오 잉크 조성물은 GelMA를 5.0 내지 20.0 중량%, 5.0 내지 18.0 중량%, 5.0 내지 15.0 중량%, 5.0 내지 12.0 중량%, 8.0 내지 20.0 중량%, 8.0 내지 18.0 중량%, 8.0 내지 15.0 중량% 또는 8.0 내지 12.0 중량%, 예를 들어, 10.0 중량% 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0059] 바이오 잉크 조성물은 알지네이트를 3.0 내지 12.0 중량%, 3.0 내지 10.0 중량%, 3.0 내지 8.0 중량%, 3.0 내지 6.0 중량%, 5.0 내지 12.0 중량%, 5.0 내지 10.0 중량%, 5.0 내지 8.0 중량% 또는 5.0 내지 6.0 중량%, 예를 들어, 6.0 중량%인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0060] 바이오 잉크 조성물은 PEGDA를 5.0 내지 20.0 중량%, 5.0 내지 18.0 중량%, 5.0 내지 15.0 중량%, 5.0 내지 12.0 중량%, 8.0 내지 20.0 중량%, 8.0 내지 18.0 중량%, 8.0 내지 15.0 중량% 또는 8.0 내지 12.0 중량%, 예를 들어, 10.0 중량% 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0061] 바이오 잉크 조성물은 dECM을 0.5 내지 2.0 중량%, 0.5 내지 1.8 중량%, 0.5 내지 1.5 중량%, 0.5 내지 1.2 중량%, 0.5 내지 1.0 중량%, 0.8 내지 2.0 중량%, 0.8 내지 1.8 중량%, 0.8 내지 1.5 중량%, 0.8 내지 1.2 중량% 또는 0.8 내지 1.0 중량%, 예를 들어, 1.0 중량% 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 바이오 잉크 조성물 중 dECM의 함량이 높을수록, 이를 이용하여 제조한 구조체에 세포배양 실험을 수행하였을 경우 세포의 생존율이 높을 것으로 예상되었다. 그러나 dECM의 함량이 과도하게 높을 경우, 이를 포함하는 바이오 잉크의 물성 변화로 인하여 인쇄 조건의 세팅에 부적합한 조성물로 제조될 수 있다.
- [0062] 바이오 잉크 조성물은 광개시제를 추가적으로 포함하는 것일 수 있고, 바이오 잉크 조성물은 광개시제를 0.1 내지 1.0 중량%, 0.1 내지 0.5 중량%, 0.2 내지 1.0 중량% 또는 0.2 내지 0.5 중량%, 예를 들어, 0.2 내지 0.3 중량% 포함되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 광개시제는 인체에 유독할 수 있으므로 가능한한 적게 포함되는 것이 좋고, 1% 이내로 사용하는 것이 일반적이다.
- [0063] 광개시제는 LAP(Lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate, LAP Photoinitiator)인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

- [0064] 본 발명은 연골 모사체 제조용 바이오 잉크 조성물 및 이를 이용한 연골 모사체의 제조방법에 관한 것으로서, 상기 바이오 잉크 조성물을 이용하면 단순화된 공정을 이용하여 3D 프린팅 과정만으로도 연골 모사체 제조 공정을 제공할 수 있고, 이로부터 강도 및 형태 유지 정도가 우수한 연골 모사체를 생산할 수 있으므로, 이를 효과적으로 연골 모사체의 제조에 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0065] 도 1은 GelMA 바이오 잉크 제조 및 바이오 3D 프린팅 공정을 나타낸 모식도이다.
- 도 2a는 볼 밀링(ball milling) 공정 전의 탈세포화된 세포외 기질(decellularized extracellular matrix, dECM) 파우더 입자 크기를 나타낸 사진이다.
- 도 2b는 볼 밀링 공정 후의 dECM 파우더 입자 크기를 나타낸 사진이다.
- 도 3은 볼 밀링 전, 볼 밀링 후 106 μm 필터링, 및 75 μm 필터링 처리한 dECM 파우더 입자 크기를 각각 나타낸 사진이다.
- 도 4는 볼 밀링 여부에 따른 dECM 파우더의 수중분산력을 측정한 그래프이다.
- 도 5a는 본 발명의 실시예에 따른 바이오 잉크로 3D 프린팅하여 경화시킨 격자 무늬 구조체의 사진이다.
- 도 5b는 본 발명의 실시예에 따른 바이오 잉크로 3D 프린팅하였을 경우 압력 조건에 따른 구조체의 필라멘트 두

께(filament thickness)를 나타낸 그래프이다.

도 6은 GelMA 바이오 잉크(Ctrl)와 dECM 포함 GelMA 바이오 잉크(dECM)에 대하여 강도(viscosity)를 측정한 결과 그래프이다.

도 7은 dECM을 넣은 바이오 잉크(녹색 G' , G'')와 넣지 않은 하이드로겔(주황색 G' , G'')의 탄성(G' , Storage modulus) 및 점성(G'' , Loss modulus) 측정값을 나타낸 그래프이다.

도 8은 바이오 잉크로 제조한 구조체의 강도를 측정한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0066] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.
- [0067] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 "%"는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량)%, 고체/액체는 (중량/부피)%, 그리고 액체/액체는 (부피/부피)%이다.
- [0069] 연골을 구현하여 연골 모사체를 제조하기 위해서는 3D 프린팅이 가능한 점도(Printability)가 필요하고, 압출(extrusion) 방식으로 적층되었을 때 안정적인 구조물을 유지해야 한다. 실제 사람 연골의 영률(Young's modulus)을 측정한 논문(Ann Biomed Eng, 2016, 44, 3460-3467)에 의하면, 연골 구획마다 나눈 값들의 평균값이 1.66 ± 0.63 MPa 범위를 나타내고 있다.
- [0070] dECM을 포함한 바이오 잉크를 사용하여 한번의 3D 프린팅으로 연골 모사 구조체를 만들 경우, 경화 후의 구조체는 영률이 연골과 비슷하게 단단해야 하고 바로 연골 특유의 물리적 특성에 해당하는 강도를 갖게 하여, 2차적인 공정의 필요 없이 바로 구조체를 사용할 수 있도록 공정을 단순화하기 위한 바이오 잉크 조성을 확인하였고 이를 참고하여 비교하였다.
- [0071] 또한 사람의 신체 연골 부위마다 영률이 다를 수 있기 때문에 측정된 신체 부위의 연골 강도에 따라서 바이오 잉크 조건이 변화될 수 있다.
- [0072] 상기와 같은 조건에 부합하는 연골을 구현하기 위하여, 생체적합성이 이미 검증되었고 연골 프린팅에 적절하며, 프로테오글리칸을 합성할 수 있는 생체 소재 하이드로겔(Hydrogel)인 GelMA(Gelatin Methacrylate)를 선택하였다.
- [0073] GelMA-알지네이트 혼합물의 최적 농도 값을 시험하였을 때 각각 10% 및 4%(w/v)인 혼합물의 점도가 상온에서 압출 방법으로 인쇄하기 적절한 것으로 나타났다. 그러나 이 혼합물은 경화 후 연골의 압축강도를 재현하기에는 부족하였으므로, PEGDA의 농도를 10%로 설정하여 압축강도의 강화를 계획하였고, 알지네이트는 압출 인쇄 시 인쇄적성(printability)을 더욱 높이기 위해 6%(w/v)까지 높였을 때 상온 인쇄가 불가능한 것을 확인하였다(200kPa~). 이에 온도를 실온이 아닌 30℃로 높였을 때 인쇄적성이 적절(끊어지지 않고 무너지지 않는 점도)하여 바이오 잉크 조성물의 조건 및 인쇄 조건의 설정에 참고하였다.
- [0074] 따라서 GelMA 10%, 단단한 정도를 구현하기 위한 소재인 PEGDA(Poly ethylene glycol diacrylate) 10%, 점성을 높이기 위한 생체 소재 고분자인 알지네이트(Alginate) 6%를 기본 바이오 잉크 조성으로 하였다. 출력된 연골 모사체가 사람 연골의 경도를 가지며 3D 바이오 프린터 잉크로 사용되는 것에 이상이 없는 최적화된 성분비를 확립하였고, dECM 파우더를 1%(w/v) 첨가하여 바이오 잉크를 제조함으로써 3D 프린팅 공정을 단순화하고 공정을 최적화하였다.
- [0076] **실시예 1: 바이오 잉크의 제조**
- [0077] **1-1. dECM의 분쇄**
- [0078] 탈세포화된 세포외 기질(decellularized extracellular matrix, dECM, (주)엘앤씨바이오)에 대하여 볼 밀링(ball milling) 공정을 수행하였다. 제공받은 dECM 파우더는 입자의 크기가 1 mm에 달하는 것도 있어 0.4 mm 지름의 22G 노즐(nozzle)을 사용하여 인쇄 시 노즐의 압출구가 막힐 가능성이 있으므로, 볼 밀링을 사용하여 75 um 크기까지 줄여 바이오 잉크 내에서의 용해도를 높였다.

- [0079] 구체적으로, 100 ml 규격의 지르코니아(Zirconia, ZrO_2 94.8%, Density: 5.89 g/cm^3) 단지(Jar)에 dECM 파우더, 15 mm의 지르코니아 볼(Ball) 20개, 에탄올 60 mL 정도를 넣고 도 2a 및 2b와 같이 3 내지 5일 동안 습식(wet) 볼 밀링을 진행하였다.
- [0080] 도 3에서 확인할 수 있듯이, dECM 파우더에 대하여 볼 밀링 후 106 μm , 75 μm 규격의 체(Seive)를 사용해 필터링하고 75 내지 106 μm 의 입자 크기에 해당하는 파우더를 얻었다.
- [0081] 볼 밀링 후, UV-흡광도(absorbance) 스펙트럼을 측정하여 dECM 파우더의 수중분산력을 확인하였다.
- [0082] 도 4에서 확인할 수 있듯이, 음파처리(Sonication)하였을 때 볼 밀링한 2% 파우더(BM)의 경우 농도가 낮음에도 불구하고 볼 밀링 하지 않은 8% 파우더(No BM)보다 더 큰 흡광도(보라색) 값을 나타내고 물 속에 분산된 입자가 더 많은 것을 확인하였다(흡광도는 물농도에 비례함).
- [0083] 이와 같이 볼 밀링 공정을 통하여 dECM을 마이크로 입자 사이즈로 분쇄함으로써 dECM의 잉크 내 분산력을 증대시키고, 이를 이용하여 연골 모사체를 3D 프린팅할 경우 해상도가 향상된 구조물을 만들 수 있을 것으로 예상되었다.
- [0085] **1-2. GelMA(Gelatin/MAA) 하이드로겔(Hydrogel)의 제조**
- [0086] 젤라틴(gelatin) 및 MAA(Methacrylic Anhydride)를 10:1의 중량비로 혼합하여 50°C 조건에서 60 내지 90분 동안 반응시키고, 반응 용매로 쓰인 DPBS(w/o Ca^{2+} , Mg^{2+})를 이용하여 10%로 희석하였다. 이후 막 튜브(12 내지 14 kDa/DIW)를 이용하여 5일 동안 37°C 조건에서 투석하고, 7일 동안 동결건조시켜 250 mL의 젤라틴-MMA 용액으로부터 약 1.2 g의 스펀지 제형의 젤라틴 메타크릴레이트(Gelatin Methacrylate; GelMA)를 수득하였다.
- [0088] **1-3. 바이오 잉크의 조성 탐색**
- [0089] 바이오 잉크의 제조를 위하여 GelMA 70%(g/ml) 1 ml(delonized water; diw), LAP(Lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate, LAP Photoinitiator, UV 365 nm) 1.75%(g/ml) 1 ml(diw), 알지네이트 14%(g/ml) 2 ml(diw), PEGDA 70%(g/ml) 1 ml(diw) 및 dECM(powder) 7%(g/ml) 1 ml(diw)를 순서대로 혼합하였다. GelMA 하이드로겔(Hydrogel) 잉크에 쓰일 dECM은 볼 밀링 공정과 음파처리를 통하여 분산력을 극대화한 후 고분자를 첨가하여 혼합하였다.
- [0090] 구체적으로, GelMA 70%(g/ml) 1 ml(diw)를 먼저 녹이고 다른 화합물의 용해도에 큰 영향이 없는 광개시제인 LAP 1.75%(g/ml) 1 ml(diw)를 첨가하였다. 다음 알지네이트 14%(g/ml) 2 ml(diw)를 첨가하였고, 이는 이온결합(COO^- , NH_3^+)으로 인하여 GelMA와 물 속에서 잘 섞일 것으로 예상하였다. PEGDA 70%(g/ml) 1 ml(diw)를 첨가한 다음 알지네이트를 첨가하면 알지네이트가 혼합물 속에 잘 섞여 들어가지 못하는 것을 관찰한 바 있어, PEGDA 고분자를 알지네이트 다음 순서로 첨가하였다. 고분자들이 잘 섞인 후 파우더를 첨가하면 잘 혼합될 것이라고 판단하여 마지막으로 dECM(powder) 7%(g/ml) 1 ml(diw)를 첨가하였다. 결과적으로, 바이오 잉크 7 mL를 제조하였고 나머지 용량은 diw로 충당하였다.
- [0092] **실시예 2: 프린팅 후 경화시킨 구조체의 특성 확인 및 보완**
- [0093] **2-1. 구조체의 특성 확인**
- [0094] 3D 바이오 프린팅의 수행에 있어서, 압출 압력의 크기, 인쇄 속도 등에 따라 출력된 구조체의 필라멘트 두께(filament thickness)가 달라진다. 필라멘트 두께는 추후 인쇄된 구조체의 해상도에 영향을 미치므로, 가장 간단한 격자 무늬의 구조체를 인쇄하여 시험하였다. 압력과 속도의 변화에 따른 필라멘트 두께의 변화 양상을 참고하여 아래와 같이 조건화하였다.
- [0095] 1-3의 바이오 잉크 시료의 조성을 기준으로 dECM을 0.8 w/v% 넣은 시료를 이용하여 격자 무늬의 구조체를 프린팅하고 특성을 확인하였다. 프린팅은 가장 대중화되어 있는 방식인 압출 기반 3D 바이오프린팅(Extrusion-3D Bioprinting) 기술이 사용된 BIO X(cellink) 프린터를 사용하여 수행되었고, 압출 압력 조건은 각각 38, 40,

42 및 45 kPa로 설정하였으며, 22G 노즐을 이용하여 인쇄 높이 0.6 mm, 인쇄 속도 10 내지 14 mm/s, 29℃ 조건에서 2개의 층으로 인쇄하였다. 바이오 잉크는 제조 후 2시간 이내에 인쇄에 사용하였다.

[0096] 격자 무늬의 구조체를 3D 프린터로 인쇄하고 나서, 상기 구조체를 20분 동안 UV 경화(crosslinking)시키고 이어서 CaCl_2 0.5 M 용액으로 16시간 동안 이온 경화시켰다. 인쇄 온도와 높이, 속도를 동일하게 설정하고 압력에만 변화를 주었을 경우의 필라멘트 두께 측정 결과를 나타내었다.

[0097] 도 5a 및 5b에서 확인할 수 있듯이, 38 kPa 에서는 얇은 필라멘트를 인쇄할 수 있으나 최종 격자 무늬 구조체에 선 끊김 현상이 많이 발생하였다. 40 내지 42 kPa에서는 끊김 현상이 있으나 격자 무늬에서 무너지지 않는 모습을 보여 적절한 압력이라 판단하였다.

[0098] 그러나 그 이상의 압력에 해당하는 45 kPa에서는 필라멘트가 너무 두꺼워 격자 무늬에서 무너지는 모습이 관찰되었으므로, 적절한 압력은 40 내지 42 kPa인 것으로 판단하였다.

[0100] 2-2. 바이오 잉크의 프린팅 조건 탐색

[0101] 1-3의 바이오 잉크를 사용하였을 경우의 끊김 현상을 개선하기 위하여, 알지네이트의 함량을 6%로 상승시키고 인쇄 온도 조건을 30℃로 변경하였다.

[0102] 구체적으로, 바이오 잉크의 제조를 위하여 GelMA 70%(g/ml) 1 ml(diw), LAP(Lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate, LAP Photoinitiator, UV 365 nm) 1.75%(g/ml) 1 ml(diw), 알지네이트 14%(g/ml) 3 ml(diw), PEGDA 70%(g/ml) 1 ml(diw) 및 dECM(powder) 7%(g/ml) 1 ml(diw)를 순서대로 혼합하여 바이오 잉크 7 mL를 제조하였다.

[0103] 바이오 잉크로 사용할 수 있으려면 증가하는 전단속력(Shear rate) 또는 전단응력(Shear stress)에서 감소하는 성향인 비뉴턴 유체(Non Newtonian fluid)의 성질을 가져야 한다. 이는 바이오 잉크 시료에 대하여 경화 없이 25℃에서 측정하였으며, dECM 파우더(1%(w/v))를 포함하지 않은 시료를 대조군(Ctrl)으로 설정하였다.

[0104] 도 6에서 확인할 수 있듯이, 바이오 잉크는 dECM의 함유 여부와 관계없이 강도가 감소하는 경향성을 보여주었으므로 바이오 잉크로 사용 가능성을 확인하였다.

[0105] 이어서 바이오 잉크 시료의 조성을 기준으로 dECM을 0.57 w/v% 넣은 하이드로겔(녹색, G' (dECM), G'' (dECM) 바이오 잉크)과 넣지 않은 하이드로겔(주황색 G' , G'')의 탄성(G' , Storage modulus), 점성(G'' , Loss modulus) 값을 측정하였다.

[0106] 도 7에서 확인할 수 있듯이, dECM을 함유하지 않은 경우에 비하여 함유하였을 때 약간 더 높은 탄성 및 점성 값이 관찰되었다. 이것은 바이오 프린터를 이용하여 구조체를 프린팅함에 있어서, 바이오 잉크가 dECM을 함유한 경우 더 강한 강도로 압출해야 함을 나타내고 있어 프린팅 조건 설정 시 참고하여 압력 조건을 보완하였다.

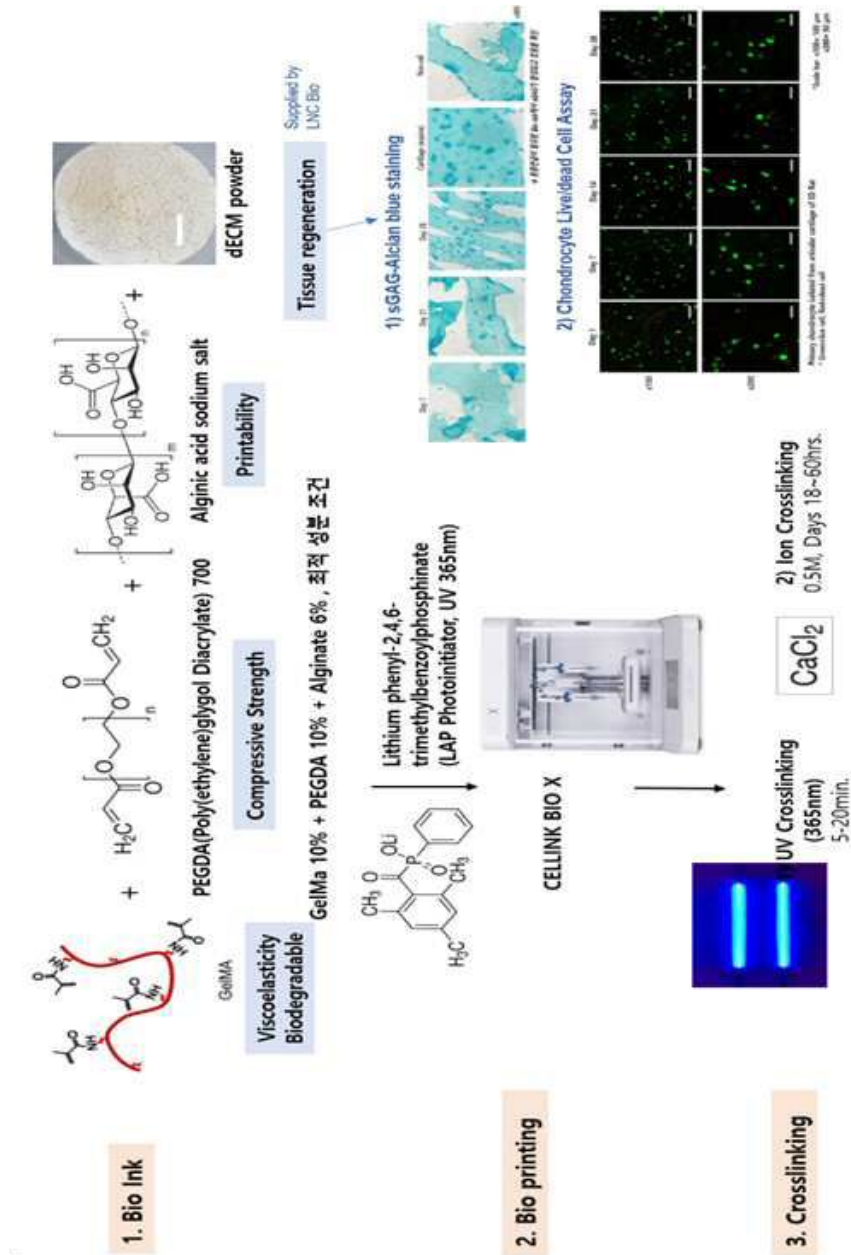
[0108] 2-3. 연골 모사체 제조를 위한 바이오 잉크의 최적 조성

[0109] 2-2의 바이오 잉크 조성물의 인쇄는 노즐 22 G, 온도 30℃, 압력 72 kPa, 인쇄 속도 6 mm/s, 인쇄 높이 0.5 mm 조건으로 수행하였다. 이후 UV 365 nm 조건으로 20분 동안 경화시키고, 이온 경화(Ion crosslinking, CaCl_2 0.5 M)를 통하여 18시간 동안 경화시켜 구조물을 만든 후 강도를 측정하였다.

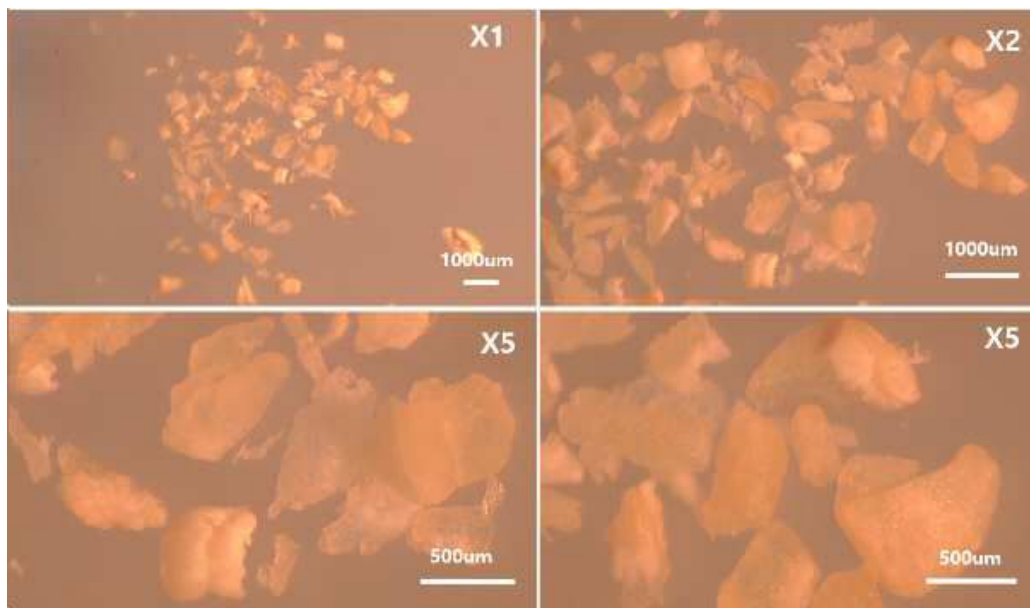
[0110] 도 8에서 확인할 수 있듯이, 측정 결과값이 1.747 MPa로 나타났다. 인쇄 시 30℃에서 점성이 적당하여 인쇄하기에 적절하고, 안정적인 구조물을 인쇄할 수 있었다. 3D 프린팅 구조물을 제작함에 있어서 경화 후 구조물의 영률 값 또한 연골(1.66 ± 0.63 MPa)과 비슷한 강도를 가지는 것으로 확인하였으므로, 바이오 잉크의 최적 조성을 이와 같이 확립하였다.

도면

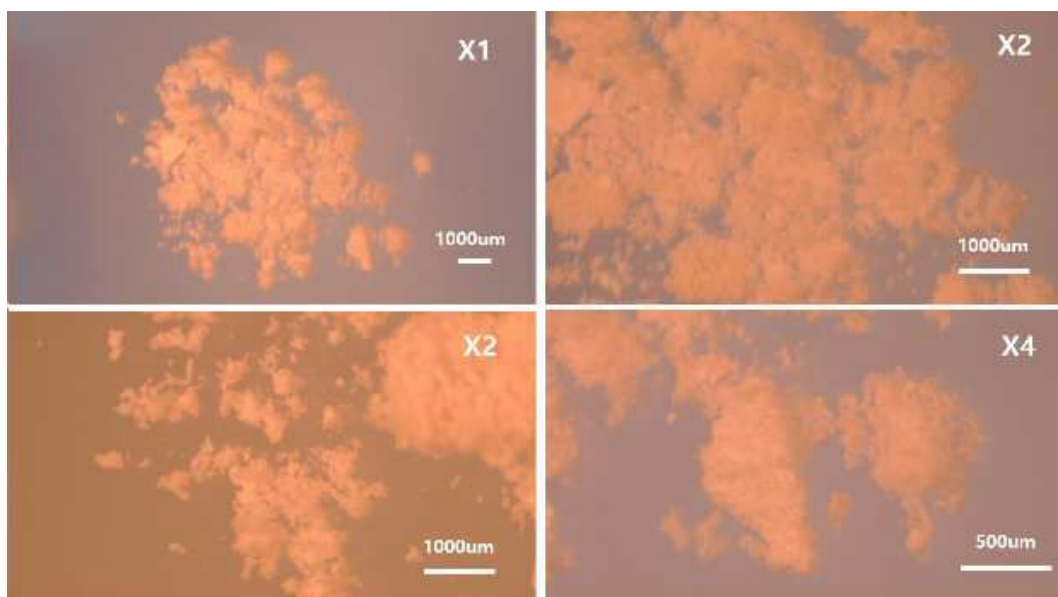
도면1



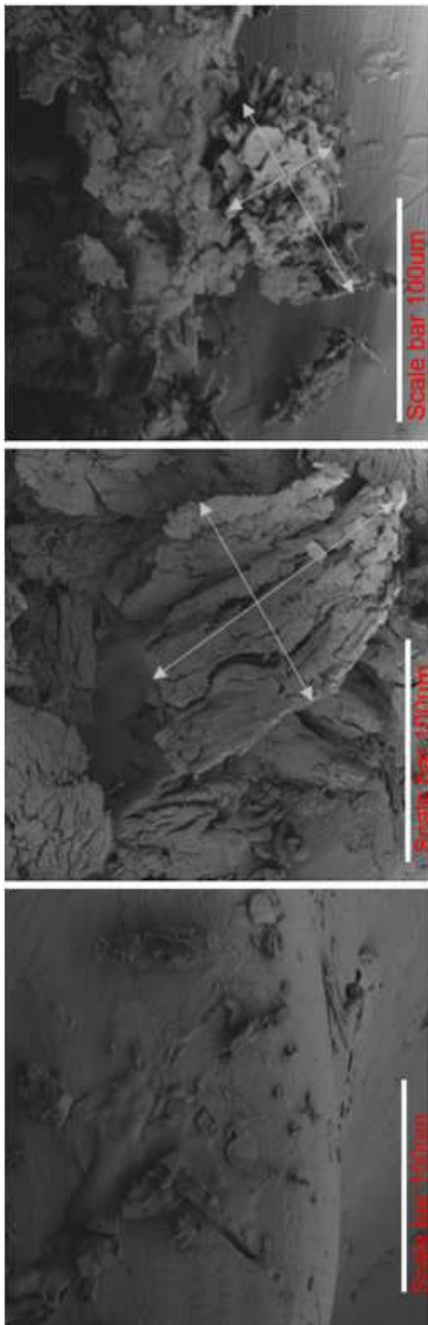
도면2a



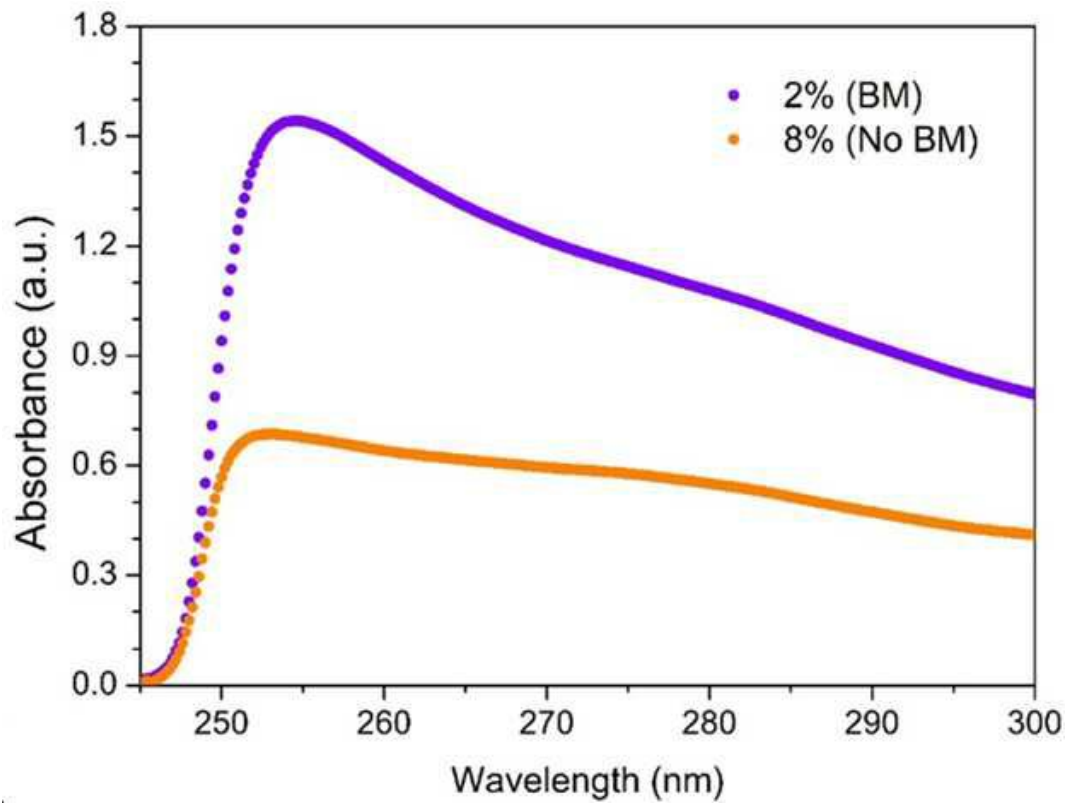
도면2b



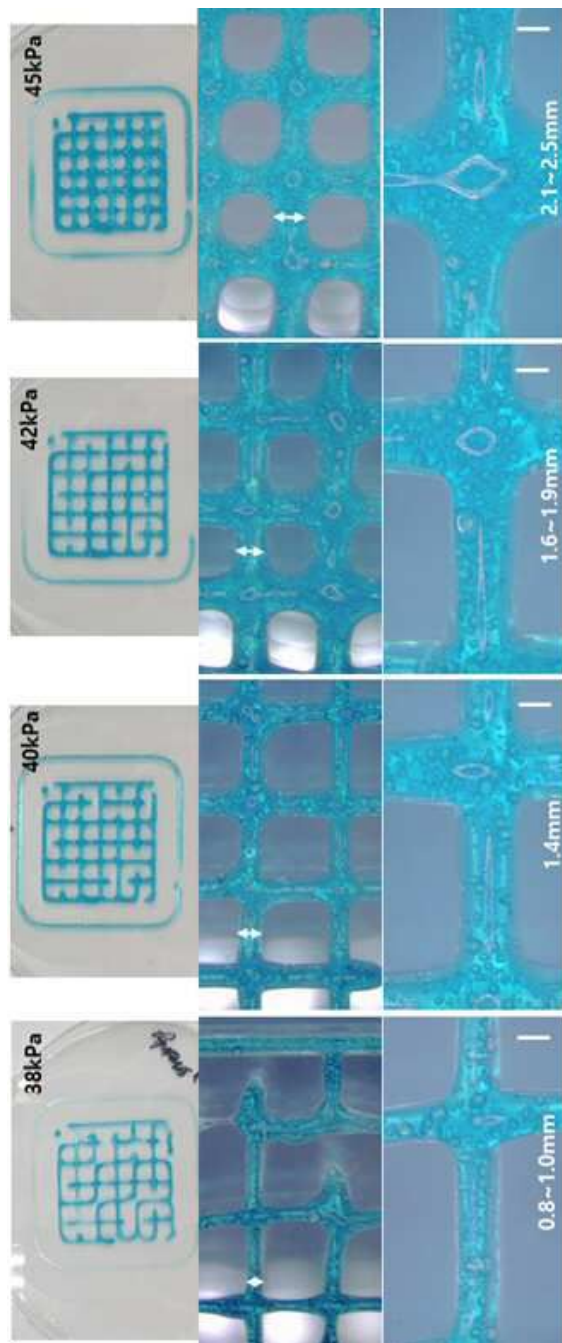
도면3



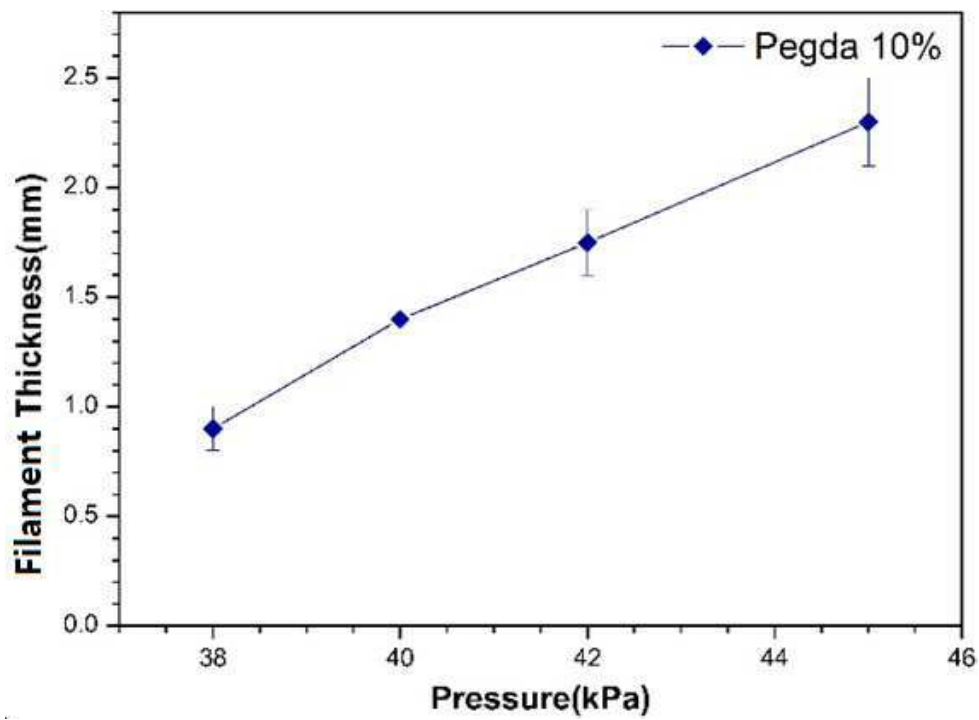
도면4



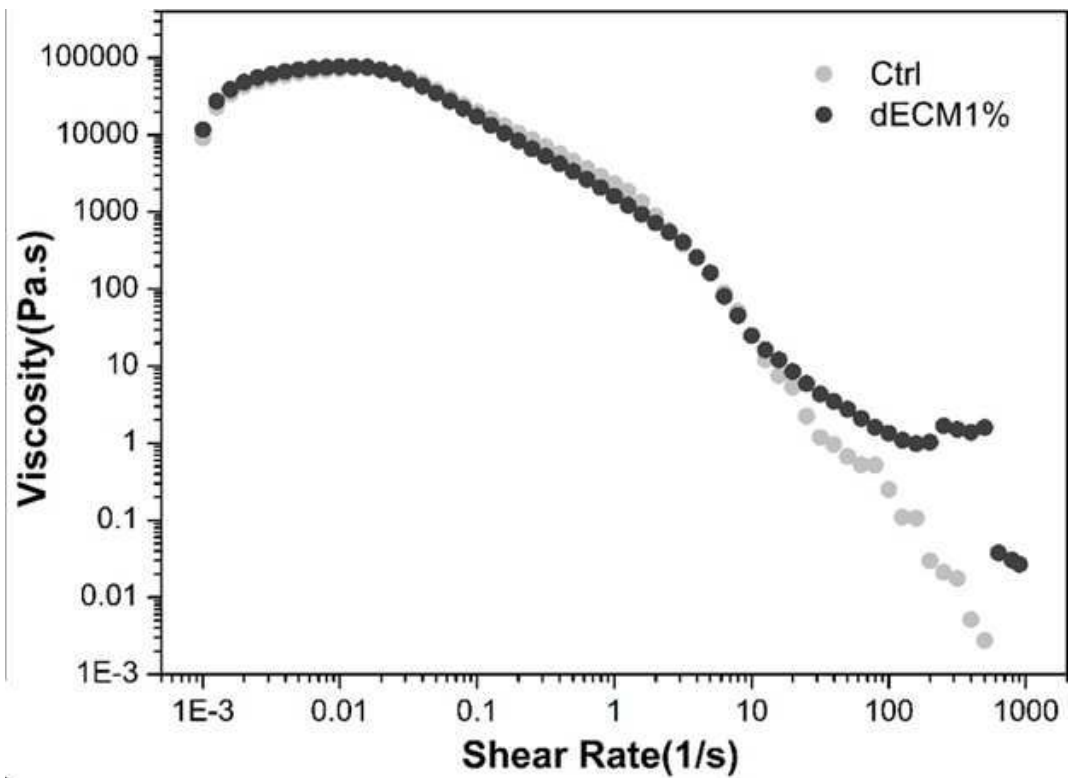
도면5a



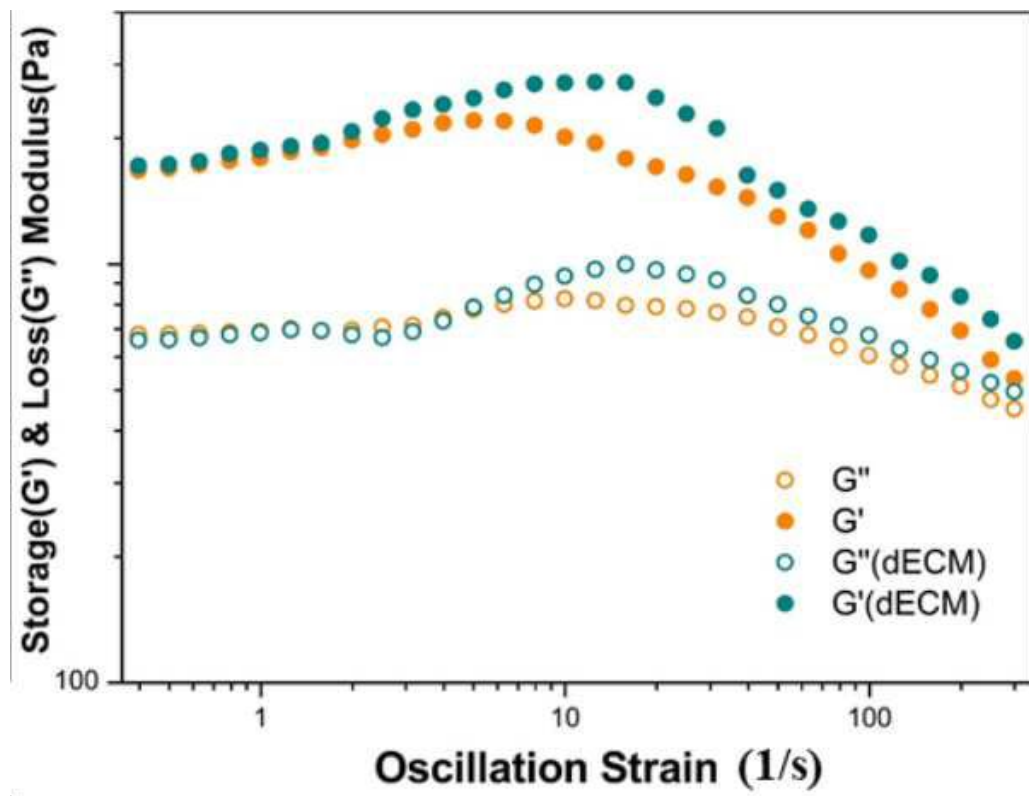
도면5b



도면6



도면7



도면8

