

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0170540

(43) 공개일자 2023년12월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61L 27/22 (2006.01) *A61L 27/52* (2006.01)*B33Y 10/00* (2015.01) *B33Y 30/00* (2015.01)*B33Y 70/00* (2020.01) *C09D 11/04* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61L 27/227 (2013.01)*A61L 27/52* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0125260

(22) 출원일자 2022년09월30일

심사청구일자 2022년09월30일

(30) 우선권주장

1020220070884 2022년06월10일 대한민국(KR)

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)

(72) 발명자

양윤정

인천광역시 미추홀구 인하로 100, 2호관 2남122호

문서형

인천광역시 미추홀구 인하로 100, C호관 204호

(74) 대리인

특허법인정진

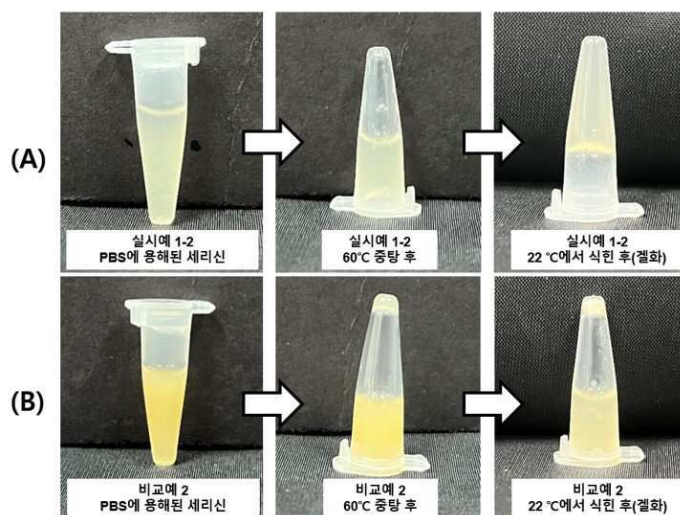
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 셀프 스탠딩이 가능한 세리신 기반의 3D 프린팅 바이오 잉크의 제조방법 및 이로부터 제조된 세리신 기반의 3D 프린팅 바이오 잉크

(57) 요약

본 발명은 a) 분자량이 40 kDa 내지 245 kDa인 세리신 및 완충액을 혼합하여 혼합액을 제조하는 단계; b) 상기 혼합액을 45 °C 내지 80 °C에서 중탕함으로써 상기 세리신을 용해하여 용해액을 제조하는 단계; 및 c) 상기 용해액을 10 °C 내지 40 °C의 온도에서 겔화시키는 단계;를 포함하는 것을 그 특징으로 함으로써, 셀프 스탠딩(self-standing)이 가능하고, 기계적 물성이 우수한 3D 프린팅 바이오 잉크를 제조할 수 있는 세리신 기반 3D 프린팅 바이오 잉크의 제조방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

B33Y 10/00 (2013.01)

B33Y 30/00 (2013.01)

B33Y 70/00 (2023.05)

C09D 11/04 (2013.01)

A61L 2400/06 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711160920
과제번호	2020R1C1C1006737
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	핵공시스템을 모방한 선택적 분자 확산 제어 하이드로젤의 개발 및 응용
기 여 율	40/100
과제수행기관명	인하대학교 산학협력단
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1525013430
과제번호	202201289
부처명	해양수산부
과제관리(전문)기관명	해양수산과학기술진흥원
연구사업명	해양수산부산물 바이오 소재화 기술개발
연구과제명	해양수산부산물 바이오 소재화 기술개발
기 여 율	40/100
과제수행기관명	인하대학교 산학협력단
연구기간	2022.04.01 ~ 2022.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1525010552
과제번호	202003542
부처명	해양수산부
과제관리(전문)기관명	해양수산과학기술진흥원
연구사업명	해양바이오전락소재개발및상용화지원(R&D)
연구과제명	해양유래 고분자 소재 기반 3D 바이오 잉크 개발
기 여 율	20/100
과제수행기관명	인하대학교 산학협력단
연구기간	2020.05.27 ~ 2021.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

- a) 분자량이 40 kDa 내지 245 kDa인 세리신 및 완충액을 혼합하여 혼합액을 제조하는 단계;
b) 상기 혼합액을 45 °C 내지 80 °C에서 중탕함으로써 상기 세리신을 용해하여 용해액을 제조하는 단계; 및
c) 상기 용해액을 10 °C 내지 40 °C의 온도에서 겔화시키는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 세리신 기반 3D 프린팅 바이오 잉크의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 a) 단계 이전에, 누에고치를 90 °C 내지 140 °C에서, 30분 이상 3시간 미만 동안 오토클레이브 시킴으로써 분자량 40 kDa 내지 245 kDa인 세리신을 추출하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 세리신 기반 3D 프린팅 바이오 잉크의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 c) 단계 이후에, d) 상기 겔화된 하이드로겔에 광가교제를 혼합하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 세리신 기반 3D 프린팅 바이오 잉크의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 완충액은 pH가 3 내지 8인 것을 특징으로 하는 세리신 기반 3D 프린팅 바이오 잉크의 제조방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 완충액은 증류수(distilled water), 4-(2-하이드록시에틸)피페라진-1-에탄설향산(4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid), N-(2-하이드록시에틸)피페라진-N'-(2-에탄설향산)(N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)) 및 인산 완충액(PBS, Phosphate Buffer Saline)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 세리신 기반 3D 프린팅 바이오 잉크의 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 혼합액 중 상기 세리신의 농도가 5 %(w/v) 내지 20 %(w/v)인 것을 특징으로 하는 세리신 기반 3D 프린팅 바이오 잉크의 제조방법.

청구항 7

제3항에 있어서,

상기 광가교제는 루테니움(Ru(II)), 팔라듐(Pd(II)), 구리(Cu(II)), 니켈(Ni(II)), 망간(Mn(II)), 및 철(Fe(III))로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 광 반응성 금속 리간드를 포함하는 것을 특징으로 하는 세리신 기반 3D 프린팅 바이오 잉크의 제조방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 제조방법으로 제조된 세리신 기반 3D 프린팅 바이오 잉크.

청구항 9

- i) 제8항의 바이오 잉크를 3D 프린터에 충전하는 단계; 및
- ii) 상기 바이오 잉크를 출력하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 3D 프린팅 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 3D 프린팅 방법은, 상기 ii) 단계와 동시 또는 그 이후에

- iii) 상기 바이오 잉크에 300 nm 내지 500 nm 파장의 광을 조사하는 단계;를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 3D 프린팅 방법.

청구항 11

제9항의 3D 프린팅 방법으로 형성된 세포 전달용 구조체.

청구항 12

제9항의 3D 프린팅 방법으로 형성된 약물 전달용 구조체.

청구항 13

제9항의 3D 프린팅 방법으로 형성된 조직공학용 지지체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 셀프 스탠딩이 가능한 세리신 기반의 3D 프린팅 바이오 잉크의 제조방법 및 이로부터 제조된 세리신 기반의 3D 프린팅 바이오 잉크에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 물체의 디지털 설계 및 제작을 가능하게 하는 광반응 및 잉크 기반 인쇄 기술로서 적층 가공을 한 3D 프린팅 기술에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 이와 같은 기술이 의료분야에 접목되면서 환자를 위한 맞춤형 의료 기기, 약물 방출 캡슐과 같은 생체 의료장치 분야 뿐만 아니라 인간 장기 모방과 같은 조직 공학 분야 및 재생 의학 분야 등 다양한 분야의 의료기술에 대대적인 변화를 주도하고 있다.

[0003] 특히, 잉크에 세포를 포함하여 인쇄하는 기술을 3D 바이오-프린팅이라고 하며, 이와 같은 기술은 환자의 요구 사항을 기반으로 필요할 때 소량 또는 단일 부품을 생산할 수 있다는 점에서 생체의료기기 및 조직 공학에서 상당한 주목을 받고 있다.

[0004] 상기 바이오-프린팅은 그 프린팅 방식에 따라 잉크젯(inkjet) 프린팅, 압출-기반(extrusion-based) 프린팅, 레이저-보조(Laser-assisted) 프린팅 및 광 조형-기반(Stereo lithography-based) 프린팅으로 구분된다. 이와 같은 바이오-프린팅에는 바이오 잉크가 사용되는데, 상기 바이오 잉크는 인쇄적성(printability), 겔화(gelation) 특성, 생분해성(biodegradability), 세포적합성(cell-compatibility), 세포 성장(proliferation)과 분화(differentiation)를 조절할 수 있는 특성을 가져야 한다.

[0005] 한편, 상기 바이오 잉크의 일 재료로 사용되는 대표적인 천연 단백질 중 하나인 실크 단백질(silk protein)은 누에에서 추출한 천연 고분자 물질로 중심부에 두가닥으로 존재하는 실크 피브로인(silk fibroin)이라는 물에 용해되지 않는 섬유단백질과 그 주위를 감싸고 있는 세리신(sericin)이라는 물에 녹는 단백질로 구성되어 있다. 일반적으로 세리신은 정련과정을 통해 제거되며, 우수한 생체적합성 및 세포적합성을 갖는 실크 피브로인이 의료용 소재 및 3D 프린팅 분야에서 사용되고 있다. 이와 관련하여, 대한민국 등록특허 제10-1881587호에는 광중합형 3D 프린팅에 사용되는 실크 피브로인 구조체에 대하여 개시되어 있다.

[0006] 하지만, 최근 연구에 따르면 세리신은 높은 감염 저항성, UV 및 산화 저항성, 인간 피부 케라티노사이트

(keratinocyte)에서 UVB에 의해 유도된 세포사멸의 억제능, 우수한 상처 치료능, 높은 생체 적합성을 갖는 것으로 밝혀져 이에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 또한, 생체 의학 및 조직공학 응용 분야에서 세리신을 이용한 하이드로 글루 등이 연구되고 있으나, 세리신은 일반적으로 역학적 성질이 약하고 부서지기 쉬운 성질로 인하여 고분자 재료로의 사용이 어려우며, 겔화의 정도를 조절하기가 어렵고, 생물학적 특성 및 기계적 물성을 원하는 정도로 조절하기가 어려운 소재로 알려져 있어, 이와 같은 특성들을 조절하기 위한 연구가 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1881587호(2018.07.18)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 상기와 같은 문제를 해결하기 위하여 본 발명은 천연 단백질인 세리신을 단독으로 포함에도 불구하고, 셀프 스탠딩(self-standing)이 가능하고, 기계적 물성이 뛰어나며 생체 적합성 또한 우수한 세리신 기반의 3D 프린팅 바이오 잉크의 제조방법을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 상기 제조방법으로 제조된 세리신 기반의 3D 프린팅 바이오 잉크를 제공하는 것을 그 목적으로 한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 상기 3D 프린팅 바이오 잉크를 이용한 3D 프린팅 방법을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 상기 3D 프린팅 방법으로 형성된 세포 전달용 구조체를 제공하는 것을 그 목적으로 한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 상기 3D 프린팅 방법으로 형성된 약물 전달용 구조체를 제공하는 것을 그 목적으로 한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 상기 3D 프린팅 방법으로 형성된 조직공학용 지지체를 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 세리신 기반 3D 프린팅 바이오 잉크의 제조방법은 a) 분자량이 40 kDa 내지 245 kDa인 세리신 및 완충액을 혼합하여 혼합액을 제조하는 단계; b) 상기 혼합액을 45 °C 내지 80 °C에서 중탕함으로써 상기 세리신을 용해하여 용해액을 제조하는 단계; 및 c) 상기 용해액을 10 °C 내지 40 °C의 온도에서 겔화시키는 단계를 포함하는 것을 그 특징으로 한다.
- [0015] 본 발명의 세리신 기반 3D 프린팅 바이오 잉크는 전술한 제조방법으로 제조되는 것을 그 특징으로 한다.
- [0016] 본 발명의 3D 프린팅 방법은 i) 상기 바이오 잉크를 3D 프린터에 충전하는 단계; 및 ii) 상기 바이오 잉크를 출력하는 단계;를 포함하는 것을 그 특징으로 한다.
- [0017] 본 발명의 세포 전달용 구조체는 상기 3D 프린팅 방법으로 형성되는 것을 그 특징으로 한다.
- [0018] 본 발명의 약물 전달용 구조체는 상기 3D 프린팅 방법으로 형성되는 것을 그 특징으로 한다.
- [0019] 본 발명의 조직공학용 지지체는 상기 3D 프린팅 방법으로 형성되는 것을 그 특징으로 한다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명의 세리신 기반 3D 프린팅 바이오 잉크의 제조방법은 별도의 추가 구성 없이 세리신을 단독으로 포함함에도 불구하고 프린팅에 적합한 점도의 바이오 잉크를 제조함으로써 압출 시 셀프 스탠딩(self-standing)이 가능하고, 이를 통해 3차원 구조체 출력의 적층 가능성이 향상되며, 기계적 물성이 우수하여 3D 바이오 프린팅 기술에서의 활용도가 우수한 세리신 기반 3D 프린팅 바이오 잉크를 제조할 수 있는 이점이 있다.
- [0021] 또한, 본 발명의 세리신 기반 3D 프린팅 바이오 잉크는 상기 제조방법으로 제조됨으로써, 셀프 스탠딩(self-standing)이 가능하고, 기계적 물성 및 생체 적합성이 우수한 이점이 있다.

- [0022] 또한, 본 발명의 3D 프린팅 방법은 상기 3D 프린팅 바이오 잉크를 사용함으로써, 셀프 스탠딩(self-standing)이 가능하고, 기계적 물성이 우수한 구조체를 제조할 수 있는 이점이 있다.
- [0023] 또한, 본 발명의 세포 전달용 구조체는 상기 3D 프린팅 방법으로 형성됨으로써, 보다 안정적이고 효과적으로 세포를 전달할 수 있으며, 이를 통해 체내 조직 재생 또는 상처 치료 등의 효과가 우수한 이점이 있다.
- [0024] 또한, 본 발명의 약물 전달용 구조체는 상기 3D 프린팅 방법으로 형성됨으로써, 보다 안정적이고 효과적으로 약물을 전달할 수 있으며, 이를 통해 약물 본연의 효과를 보다 향상시킬 수 있는 이점이 있다.
- [0025] 또한, 본 발명의 조직공학용 지지체는 상기 3D 프린팅 방법으로 형성됨으로써, 기계적 물성의 향상으로 인해 구조적 안정성이 우수하여 신체 기능의 유지, 향상 또는 복원 효과가 우수한 이점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [0026] 도 1은 본원발명의 실시예 1-2 및 비교예 2의 각 단계별 겔화 정도를 비교한 도이다. 도 1의 (A)는 실시예 1-2의 각 단계별 겔화 정도를 비교한 도이며, (B)는 비교예 2의 각 단계별 겔화 정도를 비교한 도이다.
- 도 2는 본원발명의 실험예에서 사용된 Inverted tube test에 따른 바이오 잉크의 겔화 평가 기준을 나타낸 도이다. 도 2의 (A)는 완전 겔화(Gel)된 상태, (B)는 부분 겔화(Semi-gel)된 상태, (C)는 겔화되지 않은(Sol) 상태를 나타낸 도이다.
- 도 3은 본원발명의 실험예에서 사용된 점도(인쇄적성) 평가 기준을 나타낸 도이다. 도 3의 (A)는 겔화가 온전히 이루어져 바이오 잉크로의 사용에 적합한 점도를 가져 상대적으로 우수한 인쇄적성을 지니는 기준이며, (B)는 겔화가 온전히 이루어지지 않아 낮은 점도를 가짐으로써 바이오 잉크로의 사용에 부적합한 점도를 가져 상대적으로 낮은 인쇄적성을 지니는 기준이고, (C)는 겔화가 과도하게 이루어져, 바이오 잉크로의 사용에 부적합한 점도를 가져 상대적으로 낮은 인쇄적성을 지니는 기준을 나타내는 도이다.
- 도 4는 본원발명의 실험예 3의 실험결과를 나타낸 도이다.
- 도 5는 본원발명의 실험예 6의 실험결과를 나타낸 도이다.
- 도 6은 본원발명의 실험예 7에서 블루라이트를 조사하는 과정의 이미지이다.
- 도 7은 본원발명의 실험예 7의 실험결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] 본 발명에서 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0028] 본 발명에서 “바이오 잉크”라 함은, 살아있는 세포 혹은 바이오 분자를 포함하며, 3D 바이오 프린팅 기술에 응용하여 필요로 하는 구조물을 제작할 수 있는 소재를 통칭한다.
- [0030] 이하, 본 발명에 대하여 더욱 상세히 설명한다.
- [0032] 본 발명의 한 양태에 따른 세리신 기반 3D 프린팅 바이오 잉크의 제조방법은 a) 분자량이 40 kDa 내지 245 kDa 인 세리신 및 완충액을 혼합하여 혼합액을 제조하는 단계; b) 상기 혼합액을 45 ℃ 내지 80 ℃에서 중탕함으로써 상기 세리신을 용해하여 용해액을 제조하는 단계; c) 상기 용해액을 10 ℃ 내지 40 ℃의 온도에서 겔화시키는 단계를 포함하는 것을 그 특징으로 함으로써, 이와 같은 온도 반응성 겔화를 통해 세리신을 단독으로 포함함에도 불구하고 종래의 천연 단백질을 이용한 바이오 잉크 보다 그 점성을 증가시킴으로써 3D 바이오 프린팅에 적합한 점도의 잉크를 제조하여 압출 시 셀프 스탠딩(self-standing)이 가능함으로 3차원 구조체 출력의 적층 가능성이 향상됨으로써 3D 바이오 프린팅 기술에서의 활용도가 우수한 바이오 잉크를 제조할 수 있는 이점이 있다. 또한, 상기 제조방법은 압출 기반 프린터(extrusion-based printer)뿐만 아니라, DLP(digital light processing), 광 조형 프린터(stereolithography) 및 잉크젯(inkjet) 프린터에 이르기까지 다양한 형태의 3D 프린터기에 적용 가능한 바이오 잉크를 제조할 수 있는 이점이 있다.

- [0034] 상기 세리신(sericin)은 누에로부터 얻을 수 있는 천연 고분자 단백질인 “실크 단백질”을 구성하고 있는 친수성 단백질로 누에고치실 중량의 약 30%를 차지한다. 일반적으로는 정련이라는 과정을 통해 폐기되는 성분이나, 본 발명에서는 세리신의 자기 조립성(self-assembly), 높은 생물활성, 혈관형성능(angiogenic property)에 주목하여 이를 추출하여 사용하였다. 특히, 본 발명의 3D 프린팅 바이오 잉크의 제조방법은 별도의 추가적인 고분자 물질의 첨가 없이 세리신을 단독으로 사용함으로써, 상기와 같은 세리신의 이점을 극대화하였으며, 제조 방법을 간소화시킴으로써 제조 효율성을 향상시켰다.
- [0036] 상기 a) 단계는 분자량이 40 kDa 내지 245 kDa인 세리신 및 완충액을 혼합하는 단계로서, 이와 같이 분자량이 40 kDa 내지 245 kDa인 세리신을 사용함으로써, 별도의 추가 고분자를 첨가하지 않고 세리신을 단독으로 포함함에도 불구하고 3D 바이오 프린팅에 적합한 점도의 잉크를 제조하여, 압출시 셀프 스탠딩(self-standing)이 가능함으로 3차원 구조체 출력의 적층가능성이 우수한 이점이 있다. 상기 세리신의 분자량은 바람직하게는 40 kDa 내지 200 kDa일 수 있으며, 보다 바람직하게는 40 kDa 내지 150 kDa일 수 있다. 세리신의 분자량이 상기 바람직한 범위를 만족하는 경우, 3D 바이오 프린팅에 보다 적합한 점도를 갖는 바이오 잉크를 제조함으로써 셀프 스탠딩(self-standing)이 보다 용이할 수 있는 이점이 있다.
- [0037] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 상기 a) 단계 이전에, 누에고치를 90 °C 내지 140 °C에서, 30분 이상 3시간 미만 동안 오토클레이브 시킴으로써 분자량 40 kDa 내지 245 kDa인 세리신을 추출하는 단계를 더 포함할 수 있다. 이 때, 상기 시간 범위는 바람직하게는 40분 내지 2시간일 수 있으며, 보다 바람직하게는 45분 내지 1시간 30분일 수 있다.
- [0038] 이와 같이, 상기 조건을 모두 만족하는 경우 본원발명에서 목적하는 분자량의 세리신을 우수한 효율로 추출할 수 있는 이점이 있다.
- [0040] 본 발명의 일 실시형태에 따르면 상기 완충액은 pH가 3 내지 8일 수 있다. 상기 완충액의 pH가 상기 범위를 만족하는 경우, 이 후 진행되는 c) 겔화 단계에서 온도 반응성 겔화가 용이하게 이루어질 수 있으며, 이를 통해 3D 프린팅 바이오 잉크의 점도가 보다 향상되는 등 기계적 물성이 보다 향상될 수 있는 이점이 있다.
- [0041]
- [0042] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 상기 완충액은 증류수(distilled water), 4-(2-하이드록시에틸)피페라진-1-에탄설폰산(4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid), N-(2-하이드록시에틸)피페라진-N'-(2-에탄설폰산)(N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)) 및 인산 완충액(PBS, Phosphate Buffer Saline)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 인산 완충액을 포함할 수 있다. 이와 같이, 상기 완충액이 전술한 완충액들 중 하나 이상을 포함하는 경우 후에 진행되는 c) 겔화 단계에서 온도 반응성 겔화가 용이하게 이루어질 수 있으며, 이를 통해 3D 프린팅 바이오 잉크의 점도가 보다 향상되는 등 기계적 물성이 보다 향상될 수 있는 이점이 있다.
- [0044] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 상기 a) 단계에서 제조된 혼합액 중 상기 세리신의 농도는 5 %(w/v) 내지 20 %(w/v)일 수 있고, 바람직하게는 5 %(w/v) 내지 15 %(w/v) 일 수 있으며, 보다 바람직하게는 5 %(w/v) 내지 12 %(w/v)일 수 있다. 이와 같이 상기 세리신의 농도가 상기 범위 내로 포함되는 경우 완충액에 대한 세리신의 용해도가 향상될 수 있고, 3D 바이오 프린팅 특히, 압출-기반의 3D 바이오 프린팅에 사용되기 적합한 정도의 우수한 점성 및 겔화가 보다 용이하게 이루어질 수 있는 이점이 있다.
- [0046] 상기 b) 단계는 상기 a) 단계에서 제조된 혼합액을 45 °C 내지 80 °C에서 중탕함으로써 상기 세리신을 용해하여 용해액을 제조하는 단계로, 상기 온도 범위는 바람직하게는 50 °C 내지 70 °C일 수 있고, 보다 바람직하게는 55 °C 내지 65 °C일 수 있다. 이 때, 상기 온도 범위 미만일 경우 세리신의 용해도가 저하될 수 있으며, 상기 온도 범위를 초과하는 경우 오히려 세리신 고유의 효과가 저하될 수 있고, 그 다음 단계인 c) 단계의 겔화에 장시간이 소요됨으로써 제조 공정 상의 효율성이 저하될 수 있는 문제가 있다.

- [0048] 상기 c) 단계는 상기 b) 단계에서 제조된 용해액을 10 ℃ 내지 40 ℃의 온도에서 겔화시키는 단계로서, 상기 b) 단계에서 다소 고온에서 용해시킨 세리신이 포함된 용해액의 온도를 낮춰 줌으로써 온도 변화에 따른 자연스러운 겔화를 유도하는 단계이다. 이 때 상기 온도범위는 바람직하게는 15 ℃ 내지 30 ℃일 수 있고, 보다 바람직하게는 20 ℃ 내지 25 ℃일 수 있다. 상기 온도범위를 만족하는 경우, 3D 바이오 프린팅에 사용하기 적절한 점도를 갖도록 겔화가 이루어지는 이점이 있으며, 상기 범위를 벗어나는 경우 세포 생장이 저하됨으로써 겔화가 이루어지지 않는 문제가 있다.
- [0050] 본 발명의 일 실시형태에 따른 하이드로겔의 제조방법은 상기 c) 단계 이후에 d) 상기 겔화된 하이드로겔에 광가교제를 혼합하는 단계를 더 포함할 수 있다. 이와 같이, 광가교제를 더 포함하는 경우, 3D 프린팅 진행 시 광가교를 통한 이중 가교 효과를 기대할 수 있고, 이를 통해 3D 바이오 프린팅을 통해 형성된 입체 구조체의 기계적 물성이 보다 향상될 수 있는 이점이 있다.
- [0051] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 상기 광가교제는 루테니움(Ru(II)), 팔라듐(Pd(II)), 구리(Cu(II)), 니켈(Ni(II)), 망간(Mn(II)), 및 철(Fe(III))로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 광 반응성 금속 리간드를 포함할 수 있으며, 바람직하게는 트리스(비피리딘)루테니움([Ru(II)bpy₃]Cl₂)을 포함할 수 있다.
- [0052] 또한, 상기 광가교제와 함께 전자 수용체를 제공하기 위한 촉매를 더 포함할 수 있는데 이에 한정되는 것은 아니나, 일 예를 들면 과황산 나트륨(sodium persulfate), 과아이오딘산염(periodate), 과브로민산염(perbromate), 과염소산염(perchlorate), 비타민(B12), 펜타아민클로로코발트(Pentaaminechlorocobalt(III)), 암모늄 세륨 질산염(ammonium cerium(IV) nitrate), 옥살산(oxalic acid), 및 이디티에이(EDTA)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 과황산 나트륨을 포함하는 것일 수 있다.
- [0054] 본 발명의 다른 양태는 전술한 본 발명의 제조방법을 통해 제조된 세리신 기반 3D 프린팅 바이오 잉크에 관한 것으로서, 이와 같이 제조된 바이오 잉크는 셀프 스탠딩(self-standing)이 가능하고, 기계적 물성이 우수한 구조체를 제조할 수 있는 등 바이오 잉크로의 활용성이 우수한 이점이 있다. 또한, 상기 3D 프린팅 바이오 잉크는 압출 기반 프린터(extrusion-based printer)뿐만 아니라, DLP(digital light processing), 광 조형 프린터(stereolithography) 및 잉크젯(inkjet) 프린터에 이르기까지 다양한 형태의 3D 프린터기에 적용 가능한 이점이 있다.
- [0056] 본 발명의 다른 양태는 i) 상기 바이오 잉크를 3D 프린터에 충전하는 단계; 및 ii) 상기 바이오 잉크를 출력하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 3D 프린팅 방법에 관한 것으로, 이와 같은 방법으로 3D 프린팅을 실시하는 경우 이로부터 형성된 3D 구조체들은 셀프 스탠딩(self-standing)이 가능하며, 기계적 물성이 우수하고, 생체 적합성이 우수한 이점이 있다.
- [0058] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 상기 3D 프린팅 방법은 상기 ii) 단계와 동시 또는 그 이후에 iii) 상기 바이오 잉크에 300 nm 내지 500 nm 파장의 광을 조사하는 단계;를 더 포함할 수 있으며, 상기 파장 범위는 바람직하게는 350 nm 내지 500 nm일 수 있고, 보다 바람직하게는 400 nm 내지 500 nm일 수 있다. 이와 같이, 광 조사 단계를 더 포함함으로써 추가적인 광 가교를 진행하는 경우 세리신에 포함된 타이로신 잔기들 사이의 가교결합을 유도하여 매우 짧은 시간(예를 들면, 5초 이내)의 겔화를 통해 고해상도로의 적층이 가능하여, 3차원 그물망 형태의 구조체의 제조가 가능하고, 상기 구조체의 기계적 물성이 보다 향상될 수 있는 이점이 있다.
- [0060] 본 발명의 다른 양태는 상기 3D 프린팅 방법으로 형성된 세포 전달용 구조체에 관한 것이다. 이 때, 상기 “세포 전달”이라 함은 조직재생 또는 상처 치료 등의 목적으로 하이드로겔 내의 세포를 적용 부위로 전달하는 것을 의미한다. 상기 세포 전달용 구조체는 상기 3D 프린팅 방법으로 형성됨으로써, 체내에 세포를 안정적으로 전달할 수 있는 이점이 있다.
- [0062] 본 발명의 다른 양태는 상기 3D 프린팅 방법으로 형성된 약물 전달용 구조체에 관한 것으로, 본 발명의 약물 전

달용 구조체는 그 기계적 물성이 우수하여, 체내 표적 부위에 약물을 안정적으로 전달할 수 있는 이점이 있다.

[0064] 본 발명의 다른 양태는 상기 3D 프린팅 방법으로 형성된 조직공학용 지지체에 관한 것으로, 상기 조직공학용 지지체는 생체 조직의 대용품을 만들어 이식함으로써 신체의 기능을 유지, 향상 또는 복원하는 것을 목적으로 하는 조직 공학(tissue engineering) 분야에서 사용될 수 있는 모든 지지체를 포함할 수 있다. 본 발명의 조직공학용 지지체는 그 기계적 물성이 우수하여, 체내에 적용되는 지지체의 내구성이 향상되는 이점이 있다.

[0066] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시하나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범주 및 기술사상 범위 내에서 다양한 변경 및 수정이 가능함은 당 업자에게 있어서 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속하는 것도 당연한 것이다. 이하의 실시예 및 비교예에서 함량을 나타내는 "%" 및 "부"는 특별히 언급하지 않는 한 중량 기준이다.

[0068] 제조예 1: 오토클레이브를 이용한 세리신(sericin)의 추출

[0069] 작은 조각으로 자른 누에고치를 증류수와 1:30(w:v)의 비율로 혼합한 후, 121 °C에서 각각 30분, 1시간, 3시간 동안 오토클레이브 시킴으로써 세리신이 추출된 용액을 제조하였다. 상기 용액의 불순물을 제거한 후, -80 °C에서 24시간 동안 동결 및 5일 동안 건조시킴으로써 최종적으로 세리신을 추출하였다. 이 때, 상기 세리신의 추출 수율은 77 내지 99% 였으며, 추출 시간 별 각각의 분자량은 30분의 경우 135 내지 245 kDa, 1시간의 경우 48 내지 100 kDa, 3시간의 경우 8 내지 35 kDa 이었다.

[0071] 제조예 2: 알칼리 추출법을 이용한 세리신(sericin)의 추출

[0072] 작은 조각으로 자른 누에고치를 0.02M의 탄산 나트륨 수용액(sodium carbonate solution, NaCO₃, #497-19-8, OCI)과 1:4(w:v)의 비율로 혼합한 후 1시간 동안 끓여 세리신이 추출된 용액을 제조하였다. 상기 용액의 불순물을 제거한 후, 증류수 버킷에서 4 °C의 조건으로 투석을 진행하였하였으며, 투석이 완료된 용액을 -80 °C에서 24시간 동안 동결 및 5일 동안 건조 시킴으로써 최종적으로 세리신을 추출하였다. 이 때, 상기 세리신의 추출 수율은 67 내지 98% 였으며, 이 때 추출된 세리신의 분자량은 3 내지 13 kDa이었다.

[0074] 실시예 1: 3D 프린팅 바이오 잉크의 제조

[0075] 상기 제조예 1에서 오토클레이브를 1시간 적용하여 추출된 세리신(분자량 48 kDa 내지 100 kDa)을 이용하여 바이오 잉크를 제조하였다.

[0076] 상기 오토클레이브로 추출된 제조예 1의 세리신 각각을 PBS(Phosphate-buffered saline)에 5 %(w/v)(실시예 1-1), 10 %(w/v)(실시예 1-2), 20 %(w/v)(실시예 1-3)의 농도가 되도록 각각 넣어 준 후, 60 °C에서 중탕하여 세리신을 용해시켰다. 이와 같이 용해시킨 세리신 용액 각각을 시린지(syringe)에 옮긴 후, 22 °C에서 20분 동안 식히면서 온도 변화에 따른 겔화를 진행시킴으로써 바이오 잉크를 제조하였다. 이 때, 상기 실시예 1-2의 바이오 잉크를 제조하는 각 단계별 겔화 정도를 도 1의 (A)에 개시하였다.

[0078] 실시예 2: 3D 프린팅 바이오 잉크의 제조

[0079] 상기 실시예 1에서 오토클레이브를 1시간 적용하여 추출된 제조예 1의 세리신 대신, 오토클레이브를 30분 적용하여 추출된 제조예 1의 세리신(분자량 135 kDa 내지 245 kDa)을 사용하고, 상기 세리신을 PBS에 용해시킬 때 그 농도가 5%(w/v)가 되도록 혼합한 것을 제외하고는 상기 실시예 1과 동일한 구성 및 방법으로 바이오 잉크를 제조하였다.

[0081] 비교예 1: 3D 프린팅 바이오 잉크의 제조

[0082] 상기 실시예 1에서 오토클레이브를 1시간 적용하여 추출된 제조예 1의 세리신 대신, 오토클레이브를 3시간 적용하여 추출된 제조예 1의 세리신(분자량 8 kDa 내지 35 kDa)을 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예와 동일한 구성 및 방법으로 바이오 잉크를 제조하였다.

[0084] **비교예 2: 3D 프린팅 바이오 잉크의 제조**

[0085] 상기 실시예 1에서 제조예 1의 세리신 대신 제조예 2의 세리신(분자량 3 kDa 내지 13 kDa)을 이용한 것을 제외하고는 동일한 구성 및 방법으로 바이오 잉크를 제조하였다. 이 때, 상기 비교예 2의 바이오 잉크를 제조하는 각 단계별 겔화 정도를 도 1의 (B)에 개시하였다.

[0087] **실험예 1: 겔화 및 점도(인쇄 적성) 평가**

[0088] 시린지(syringe)에 담긴 상기 실시예 및 비교예에서 제조된 각각의 바이오 잉크의 겔화 정도 및 이들을 압출할 때 압출-기반(extrusion-based) 프린팅에 적합한 점도를 갖는지 확인하였으며, 그 결과를 하기 표 1에 기재하였고, 평가 기준은 하기와 같다. 이 때, 상기 겔화 평가는 Inverted tube test를 통해 진행하였다.

[0089] **<겔화 평가 기준>**

[0090] 완전 겔화(gel): 바이오 잉크가 담긴 용기를 뒤집어도 흐르지 않는 상태(도 2의 (A) 참조)

[0091] 부분 겔화(semi-gel): 바이오 잉크가 담긴 용기를 뒤집었을 때, 일부만 흐르는 상태(도 2의 (B) 참조)

[0092] 겔화되지 않음(sol): 바이오 잉크가 담긴 용기를 뒤집었을 때 전체적으로 흐르는 상태, 겔화 유도 전과 동일한 액체 상태로 겔화되지 않음(도 2의 (C) 참조)

[0093] **<점도(인쇄 적성) 평가 기준>**

[0094] 적합: 바이오 잉크가 니들로부터 압출 시 올곧게 나오는 형태(도 3의 (A) 참조)

[0095] 부적합(점성 부족): 겔화가 온전히 이루어지지 않아 점도가 낮아, 바이오 잉크가 니들로부터 압출 시 방울 방울 액체 형태로 떨어지는 형태(도 3의 (B) 참조)

[0096] 부적합(과도한 겔화): 과도한 겔화로 인해 잉크가 니들로부터 압출시 올곧지 않게 나오며 상당한 압력을 필요로 하는 형태(도 3의 (C) 참조)

표 1

[0098]

		세리신 농도 %(w/v)	겔화 정도	점도 (인쇄 적성)
실시예 1	실시예 1-1	5	semi-gel	적합
	실시예 1-2	10	gel	적합
	실시예 1-3	20	gel	부적합 (과도한 겔화)
실시예 2	실시예 2	5	semi-gel	적합
비교예 1	비교예 1-1	5	sol	부적합 (점성 부족)
	실시예 1-2	10	sol	부적합 (점성 부족)
	실시예 1-3	20	sol	부적합 (점성 부족)
비교예 2	비교예 2-1	10	sol	부적합 (점성 부족)
	비교예 2-2	20	sol	부적합 (점성 부족)

[0100] 상기 표 1을 참고하면, 본원발명에서 제시한 분자량을 만족하는 실시예 1 및 2의 경우 겔화 정도 및 점도(인쇄 적성)가 3D 바이오 프린팅을 수행하기에 가장 적합한 것을 확인할 수 있었다. 특히, 본원발명에서 바람직한 실시형태로 제시한 세리신의 농도 범위를 만족하는 실시예 1-1, 1-2 및 2의 점성이 3D 바이오 프린팅을 수행하기에 보다 적합한 것을 확인할 수 있었다. 그 중에서도, 실시예 1-2의 바이오 잉크가 겔화 정도 및 점도(인쇄 적성) 모두에서 가장 바람직한 효과를 보이는 것을 확인하였다.

[0101] 반면, 본원발명에서 제시한 분자량보다 작은 분자량의 세리신을 사용한 비교예 1의 경우 겔화가 이루어지지 않는 것을 확인할 수 있었으며, 오토클레이브를 사용하지 않은 추출방법으로 추출된 세리신의 경우(비교예 2) 그 점성이 좋지 못한 것을 확인할 수 있었다.

[0103] 실험예 2: 온도에 따른 세리신의 용해도 평가

[0104] 상기 실시예 1-2에서 중탕 온도만을 변경(비교예 3)하여 용해도 차이를 비교하였으며, 그 결과를 하기 표 2에 기재하였다. 이 때, 용해도 평가 기준은 하기와 같다.

[0105] <용해도 평가 기준>

[0106] 완전히 용해됨: 육안으로 확인 시, 고형분의 세리신이 확인되지 않음.

[0107] 용해되지 않음: 육안으로 확인 시, 용해되지 않은 고형분의 세리신이 확인됨.

표 2

	세리신 농도 %(w/v)	중탕 온도 (℃)	용해도
실시예 1-2	10	60	완전 용해
비교예 3	10	22	용해되지 않음

[0111] 상기 표 2를 참고하면, 본원발명에서 제시하는 중탕 온도를 만족하는 실시예 1-2의 경우, 본원발명에서 제시하는 중탕 온도 범위를 벗어나는 비교예 3의 경우보다 세리신의 용해도가 우수한 것을 확인할 수 있었다.

[0113] 실험예 3: 온도에 따른 세리신의 점도 및 유체 성질 평가

[0114] 상기 실시예 1-2에서 제조된 3D 프린팅 바이오 잉크에 대하여, 온도반응성에 의한 겔화가 진행되는지 확인하기 위해 상기 실시예 1-2의 바이오 잉크의 제조 공정 상에서의 각 온도(60 ℃ 및 22 ℃)에서의 용액의 점도를 측정하였으며, 그 결과를 도 4에 기재하였다.

[0115] 도 4를 참고하면, 60 ℃에서 중탕한 후 22 ℃로 온도를 낮춰 온도반응성 겔화를 유도하였을 때, 그 점성이 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 각각의 온도 상태에서의 용액의 유체 특성을 확인한 결과 60 ℃로 중탕했을 때의 용액의 점도(도 4의 파란선 참조)는 전단 속도(shear rate)가 증감함에도 불구하고 점도(shear viscosity)가 거의 일정하게 유지되는 뉴턴 유체의 특성(Newtonian properties)을 보이는 반면, 온도 반응성 겔화를 위해 22 ℃로 온도를 낮췄을 경우(도 4의 붉은선 참조), 용액은 전단 속도(shear rate)가 증감하면서 점도(shear viscosity)가 감소하는 전단 담화(shear thinning) 특성을 보이는 것을 확인할 수 있었다.

[0116]

[0118] 실험예 4: 완충액의 pH에 따른 겔화 평가

[0119] 상기 실시예 1-2에서 완충액의 PBS 대신 각각 포름산 완충액(Formic acid buffer, pH 2.0, 비교예 4) 및 트리스 완충액(Tris buffer, pH 9.5, 비교예 5)으로 변경한 것을 제외하고는 동일한 구성 및 방법으로 3D 프린팅 바이오 잉크를 제조하여 겔화 정도를 평가하였으며, 그 결과를 하기 표 3에 개시하였다. 이 때, 겔화 평가는 Inverted tube test를 통해 진행되었으며, 그 평가 기준은 상기 실험예 1에서와 동일하다.

표 3

[0121]

	완충액 종류 (pH)	겔화 정도
실시예 1-2	PBS (7.4)	gel (완전 겔화)
비교예 4	포름산 (2.0)	semi-gel (부분 겔화)
비교예 5	트리스 (9.5)	semi-gel (부분 겔화)

[0123] 상기 표 3을 참고하면, 본 발명에서 제시한 pH 범위를 만족하는 완충액을 사용한 실시예 1-2의 경우, pH 범위를 벗어나는 완충액을 사용한 비교예 4 및 비교예 5의 경우 보다 겔화 정도가 가장 우수하여 3D 프린팅에 가장 적합한 겔화 정도를 보이는 것을 확인할 수 있었다.

[0125] **실험예 5: 광조사에 따른 겔화 평가**

[0126] 상기 실시예 및 비교예 각각에서 세리신을 PBS에 용해시킬 때, 1 mM의 트리스(비피리딘)루테니움(II)(Tris(bipyridine)ruthenium(II)) 및 50 mM의 과황산 나트륨(sodium persulfate, SPS)를 추가로 혼합한 것을 제외하고는 동일한 구성 및 방법으로 바이오 잉크를 제조한 후, 이를 니들에 주입하였다. 바이오 잉크를 니들로부터 압출한 후, 450 nm의 블루라이트를 압출된 잉크에 조사하였고, 최종 생성물의 겔화 정도를 평가하였다. 겔화 평가 결과는 하기 표 3에 기재하였으며, 이 때, 겔화 평가는 Inverted tube test 를 통해 진행하였고, 그 평가 기준은 상기 실험예 1과 동일하다.

표 4

[0128]

		세리신 농도 %(w/v)	[Ru(bpy) ₃ Cl ₂] (mM)	SPS (mM)	광 조사 시간(s)	겔화 정도
실시예 1	실시예 1-1-1	5	1	50	5	gel
					20	gel
	실시예 1-2-1	10	1	50	5	gel
					20	gel
실시예 2	실시예 2-1	5	1	50	5	gel
					20	gel
비교예 1	비교예 1-1-1	5	1	50	5	sol
					20	sol
	비교예 1-2-1	10	1	50	5	semi-gel
					20	semi-gel
비교예 2	비교예 2-1-1	10	1	50	5	sol
					20	sol
	비교예 2-2-1	20	1	50	5	sol
					20	sol

[0130] 상기 표 4를 참고하면, 본원발명에서 제시하는 조건을 모두 만족하는 실시예 1 및 2의 경우 광 가교에 따른 겔화 역시 가장 우수하게 진행되는 것을 확인되었다. 특히, 실시예 1-1-1의 경우 상기 실험예 1(실시예 1-1에 해당)에서 보다 광 가교 과정을 통해 겔화가 보다 용이하게 이루어 지는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해, 본원 발명에서 제시한 조건을 모두 만족하는 경우 온도 반응에 따른 겔화와 함께 광 가교반응을 추가로 진행시킴으로써 겔화를 촉진하고, 보다 우수한 기계적 물성을 갖는 바이오 잉크를 제조할 수 있음을 확인하였다.

[0131] 반면, 본원발명에서 제시하는 분자량을 벗어나는 비교예 1 및 2의 경우 광 가교를 추가적으로 진행한다고 하더라도 겔화가 여전히 제대로 이루어지지 않는 것을 확인할 수 있었다.

[0133] 실험예 6: 과황산 나트륨(SPS) 농도에 따른 겔화 특성 확인

[0134] 상기 실시예 1-2-1 및 비교예 2-1-1의 바이오 잉크를 제조하는 공정 중, 과황산 나트륨(SPS)의 농도를 변화시킨 것을 제외하고는 동일한 방법 및 구성으로 바이오 잉크를 제조하였으며, 이와 같이 제조된 각각의 바이오 잉크들의 SPS 농도는 하기 표 5에 기재하였다. 또한, 이와 같이 제조된 각각의 바이오 잉크를 니들에 주입하여, 바이오 잉크를 압출한 후 450 nm의 블루라이트를 상기 압출된 바이오 잉크에 조사하여 최종 겔화를 평가하였으며, 그 결과를 도 5에 개시하였다.

표 5

		세리신 농도 %(w/v)	[Ru(bpy) ₃ Cl ₂] (mM)	SPS (mM)	광 조사 시간(s)
실시예 2-1	(1)	10	1	50	5
	(2)	10	1	100	5
	(3)	10	1	150	5
	(4)	10	1	200	5
비교예 1-1	(1)	10	1	50	5
	(2)	10	1	100	5
	(3)	10	1	150	5
	(4)	10	1	200	5

[0138] 상기 표 5 및 도 5를 참고하면, 본원발명의 조건을 만족하는 실시예(도 5의(A) 참조)의 경우 단 5초의 짧은 조사 시간에도 불구하고 겔화가 제대로 이루어진 것을 확인할 수 있었다. 특히, SPS의 농도는 광 조사에 따른 다 이티로신 가교 속도 및 그 정도에 영향을 미치는 중요한 요소로 평가되는데, 바이오 잉크로 사용되는 경우 SPS의 농도가 낮은 것이 유리하다. 이와 같은 점에서, 본 발명의 조건을 만족하는 실시예의 바이오 잉크의 경우, 5 초라는 동일한 광 조사 시간에도 불구하고 보다 낮은 SPS 농도에서의 겔화 역시 높은 농도의 SPS를 포함할 때의 겔화에 견주어 뒤쳐지지 않는 우수한 겔화 성능을 보여주는 것을 확인하였다.

[0139] 반면, 본원발명에서 제시한 조건을 만족하지 못하는 비교예(도 5의 (B) 참조)의 경우 SPS의 농도에 상관 없이 광 조사에 따른 가교 현상이 제대로 이루어지지 않음으로써 겔화 역시 제대로 이루어지지 않는 것을 확인할 수 있었다.

[0141] 실험예 7: 3차원 구조체의 출력

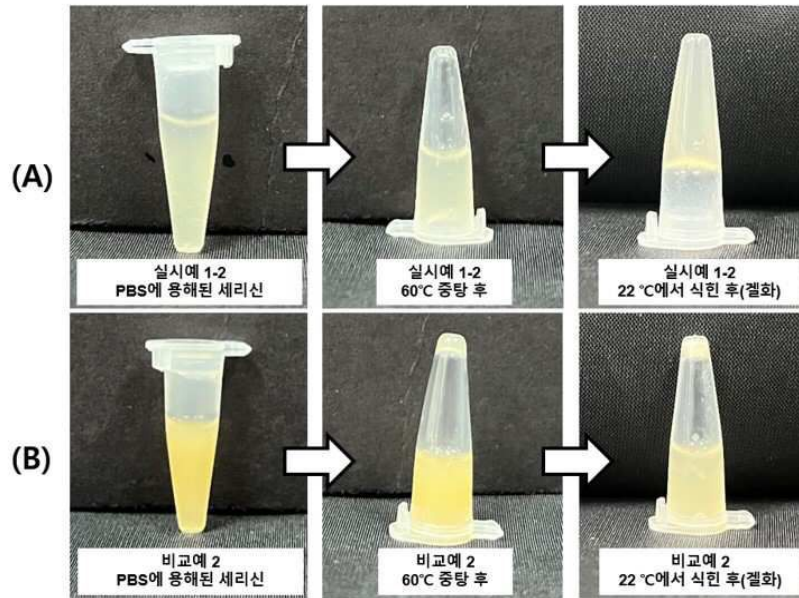
[0142] 상기 실험예 5의 실시예 1-2-1의 바이오 잉크를 시린지에 담아 압출-기반의 3D 프린터(extrusion based 3D printer)로 3차원 구조체를 출력하였다. 잉크가 출력됨과 동시에 450 nm의 블루라이트를 조사(도 6 참조)하였으며, 그 결과를 도 7에 기재하였다.

[0143]

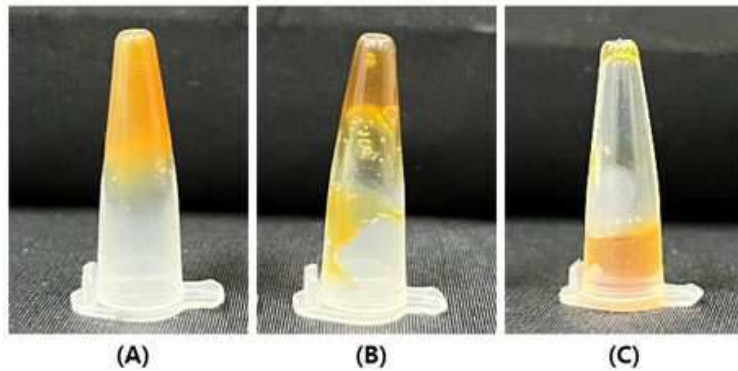
도 7을 참고하면, 본원발명의 조건을 만족하는 실시예 1-2-1의 바이오 잉크로 압출되고, 광 조사 단계를 더 포함하여 3차원 입체 구조체를 출력하는 경우, 초 단위의 빠른 속도로 겔화가 이루어지며 이를 통해 빠른 시간 내에 3차원 입체 구조체의 적층이 가능한 것을 확인하였으며, 그 물성 또한 우수한 것을 확인할 수 있었다.

도면

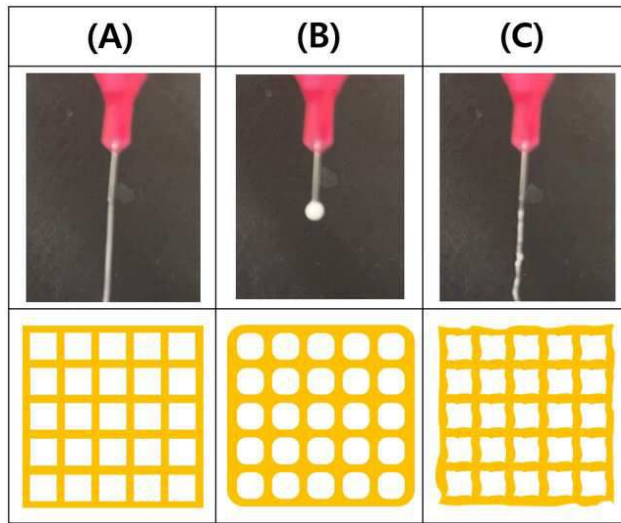
도면1



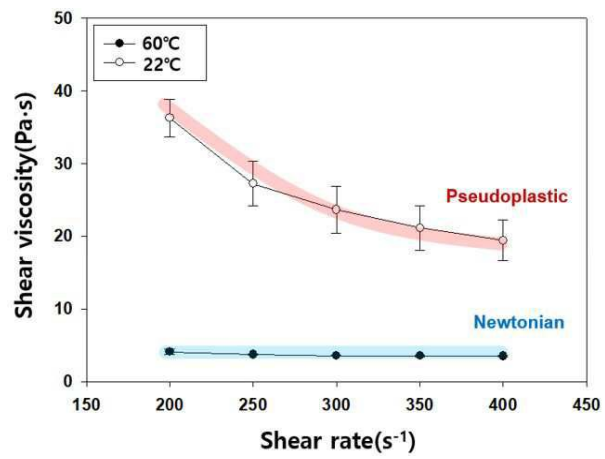
도면2



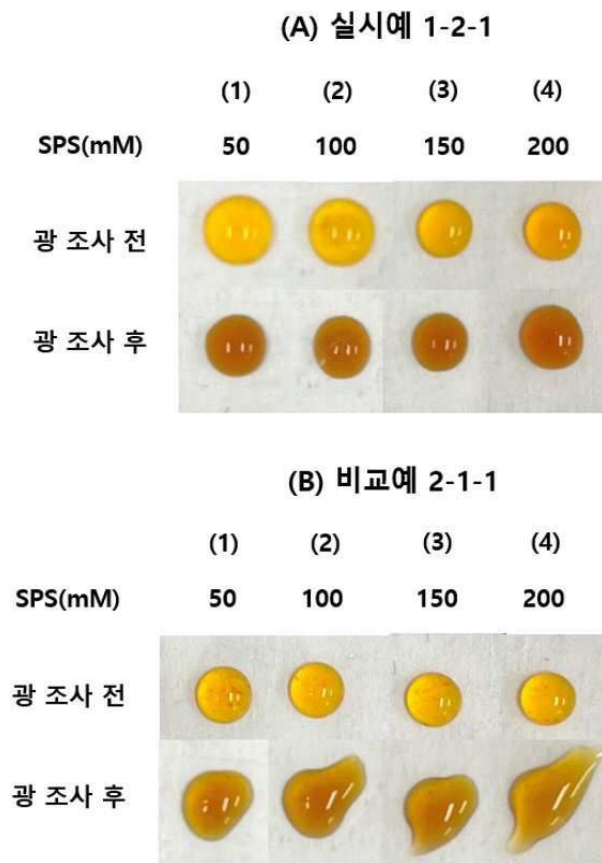
도면3



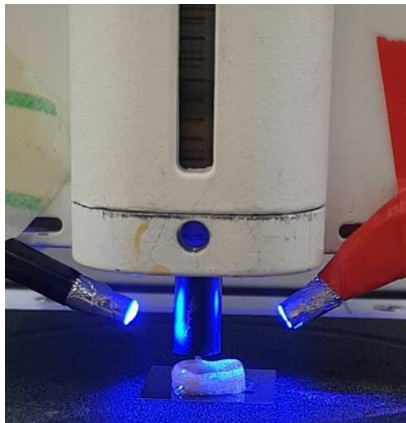
도면4



도면5



도면6



도면7

