



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0139789
(43) 공개일자 2022년10월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C08L 89/00 (2006.01) B29C 64/129 (2017.01)
B33Y 70/00 (2020.01) C08B 37/00 (2006.01)
C08J 3/075 (2006.01) C08L 5/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C08L 89/00 (2013.01)
B29C 64/129 (2017.08)
(21) 출원번호 10-2022-0022358
(22) 출원일자 2022년02월21일
심사청구일자 2022년02월21일
(30) 우선권주장
1020210045585 2021년04월08일 대한민국(KR)

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)
(72) 발명자
문서형
인천광역시 미추홀구 인하로 100, C호관 204호(용현동)
양윤정
인천광역시 미추홀구 인하로 100, 2S122(용현동)
(74) 대리인
김순웅

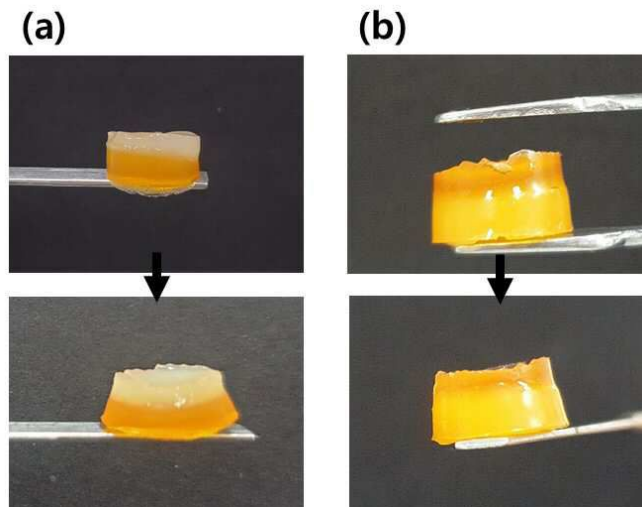
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 온도 변화 및 이중 광가교를 이용한 4D 하이드로겔 구조체 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 절단된 실크 피브로인 및 카라지난을 포함하는 제1 혼합물로 이루어진 제1층; 및 메타크릴레이트기가 고정화된 절단된 실크 피브로인 및 카라지난을 포함하는 제2 혼합물로 이루어진 제2층;을 포함하는 4D 하이드로겔 구조체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

대표도 - 도12



(52) CPC특허분류

B33Y 70/00 (2013.01)
C08B 37/0042 (2013.01)
C08J 3/075 (2013.01)
C08L 5/00 (2013.01)

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	70/100
과제수행기관명	인하대학교산학협력단
연구기간	2020.05.27 ~ 2021.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711132864
과제번호	2020R1C1C1006737
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	핵공시스템을 모방한 선택적 분자 확산 제어 하이드로젤의 개발 및 응용
기 여 율	30/100
과제수행기관명	인하대학교 산학협력단
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

절단된 실크 피브로인 및 카라지난을 포함하는 제1 혼합물로 이루어진 제1층; 및

메타크릴레이트기가 고정화된 절단된 실크 피브로인 및 카라지난을 포함하는 제2 혼합물로 이루어진 제2층;을 포함하는 4D 하이드로겔 구조체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 절단된 실크 피브로인의 중량평균 분자량은 20kDa 내지 300kDa인 것인 4D 하이드로겔 구조체.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 메타크릴레이트기가 고정화된 절단된 실크 피브로인의 중량평균 분자량은 100kDa 내지 300kDa인 것인 4D 하이드로겔 구조체.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 카라지난은 카파 카라지난 또는 아이오타 카라지난인 것인, 4D 하이드로겔 구조체.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 절단된 실크 피브로인과 카라지난 또는 메타크릴레이트기가 고정화된 절단된 실크 피브로인과 카라지난은 각각 1: 0.01 내지 5의 중량비로 혼합된 것인, 4D 하이드로겔 구조체.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 제1 혼합물 또는 제2 혼합물은 용매, 광 개시제, 산화제, 계면활성제, 가소제, 중합방지제, 소포제, 희석제, 열안정제 및 점도 조절제로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나를 더 포함하는 것인, 4D 하이드로겔 구조체.

청구항 7

(a) 절단된 실크 피브로인 및 카라지난을 포함하는 제1 혼합물을 제조하는 단계;

(b) 메타크릴레이트기가 고정화된 절단된 실크 피브로인 및 카라지난을 포함하는 제2 혼합물을 제조하는 단계; 및

(c) 상기 제1 혼합물을 3D 프린팅하여 제1 혼합물로 이루어진 제1 층에 상기 제2 혼합물을 3D 프린팅하여 제2 혼합물로 이루어진 제2 층을 융합시키는 단계;를 포함하는 4D 하이드로겔 구조체의 제조방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 제1 혼합물의 제조는,

(a-1) 실크 피브로인을 임의로 절단하여 절단된 실크 피브로인을 제조하는 단계;

(a-2) 상기 절단된 실크 피브로인 및 카라지난을 혼합하여 제1 혼합물을 제조하는 단계; 및

(a-3) 상기 제1 혼합물을 겔화시키는 단계;를 포함하는 4D 하이드로겔 구조체의 제조방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 제2 혼합물의 제조는,

(b-1) 실크 피브로인을 임의로 절단하여 절단된 실크 피브로인을 제조하는 단계;

(b-2) 상기 절단된 실크 피브로인에 메타크릴레이트기를 고정화하는 단계;

(b-3) 상기 메타크릴레이트기가 고정화된 절단된 실크 피브로인에 카라지난을 혼합하여 제2 혼합물을 제조하는 단계; 및 (b-4) 상기 제2 혼합물을 겔화시키는 단계;를 포함하는 4D 하이드로겔 구조체의 제조방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 (a-3) 단계는,

상기 제1 혼합물을 50 내지 70℃에서 녹인 후, 20 내지 30 ℃로 온도를 낮추어 겔화시키는 단계인 것인, 4D 하이드로겔 구조체의 제조방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 (b-1) 단계는,

5 M 내지 15 M 리튬브로마이드(LiBr) 용액에 실크 단백질을 30 분 내지 20 시간 동안 침지시켜 절단된 실크 피브로인 수용액을 제조하는 단계인 것인, 4D 하이드로겔 구조체의 제조방법.

청구항 12

제9항에 있어서,

상기 (b-2) 단계는,

상기 절단된 실크 피브로인에 글리시딜 메타크릴레이트, 메타크릴 무수물, 메타크릴 산, 메틸 메타크릴레이트 및 부틸 메타크릴레이트로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 메탈로일 반응기와 반응시켜 메타크릴레이트기를 고정화하는 단계인 것인, 4D 하이드로겔 구조체의 제조방법.

청구항 13

제9항에 있어서,

상기 (b-4) 단계는,

상기 제2 혼합물을 50 내지 70℃에서 녹인 후, 20 내지 30 ℃로 온도를 낮추어 겔화시키는 단계인 것인, 4D 하이드로겔 구조체의 제조방법.

청구항 14

제7항에 있어서,

상기 (c) 단계에서, 제1 혼합물 및 제2 혼합물을 3D 프린팅 하는 도중 또는 3D 프린팅이 완료된 후 광을 조사하여, 제1 혼합물로 이루어진 제1층 및 제2 혼합물로 이루어진 제2층을 제조하는 것인, 4D 하이드로겔 구조체의 제조방법.

청구항 15

제7항에 있어서,

상기 (c) 단계에서, 제1 층에 조사된 광은 400 내지 500 nm 파장을 갖는 청색광이며, 제2 층에 조사된 광은 200 내지 400 nm 파장을 갖는 자외선인 것인, 4D 하이드로겔 구조체의 제조방법.

청구항 16

메타크릴레이트기가 고정화된 절단된 실크 피브로인 및 카라지난을 포함하는 4D 프린팅용 잉크 조성물.

청구항 17

청구항 제16항의 4D 프린팅용 잉크 조성물을 포함하는 4D 생체 소재.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 온도 변화 및 이중 광가교를 이용한 4D 하이드로겔 구조체 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 구체적으로 단백질과 당을 포함하는 4D 하이드로겔 구조체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 대표적인 천연단백질 중 하나인 실크 단백질(silk protein)은 누에에서 추출한 천연 고분자 물질로 중심부에 두 가닥으로 존재하는 실크 피브로인(silk fibroin) 성분과 그 주위를 감싸고 있는 세리신(sericin)으로 구성되어 있다. 이 중 친수성이며 점착성을 갖는 단백질인 세리신은 정련과정을 통해 제거되며, 의료용 소재로는 일반적으로 실크 피브로인 소재가 섬유소재 및 봉합사와 같은 소재로 많이 이용되어 왔다. 특히, 실크 피브로인은 우수한 생체적합성 및 세포적합성을 갖는 소재로 체내에서 염증반응을 거의 일으키지 않으며, 섬유아세포나 각질 세포 등에 세포의 부착 및 증식이 뛰어난 특성을 갖는다.

[0004] 특히 실크 단백질은 천연 생체적합성 소재 중 비교적 높은 기계적 강도와 면역 반응으로 섬유 소재 뿐만 아니라 의료용 소재로 이용되어 왔다. 이러한 실크 단백질은 결정성이 높아 보통 물에 녹지 않으므로, 별도의 용해공정을 통해 실크 피브로인 수용액이 제조된다. 실크 피브로인 수용액은 가공방법에 따라 필름, 스펀지, 하이드로겔 등의 형태로 성형될 수 있으며, 다양한 형태의 실크 피브로인 기반소재에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0005] 최근 다품종 소량생산이 가능한 3D바이오 프린팅의 개발로 다양한 3차원 인공 구조체(세포지지체)가 제조되고 있는데, 실크 단백질이 하나의 소재원으로서 사용되고 있다. 3D 바이오 프린팅은 살아있는 세포를 바이오 잉크와 함께 프린트하여, 인체에 이식 가능한 3 차원 인공 구조체 또는 지지체를 만드는 기술로써, 이러한 바이오 프린팅 기술은 원하는 모양 및 구조를 제작할 수 있다는 장점이 있다. 이로 인해, 이식용 장기 부족 문제에 대한 효과적인 해결책으로 전망되고 있다. 그러나, 3D 바이오 잉크 조성물로서 실크 단백질을 포함하는 경우 실크 단백질의 용해도를 높이기 위해 저분자화 시키면 용해도가 높아짐에 따라 점도가 낮아져 3D 프린팅 시에 구조체가 유지되지 않는 문제가 있었다.

[0006] 이와 관련하여, 3D 프린팅용 잉크 조성물의 점도를 높이기 위해서 다양한 화학적 첨가제를 이용하여 점도와 프린팅 가능성(printerability)을 유도한 바 있으나 고점도의 잉크의 경우, 첨가물이 잉크 안에 고르게 퍼지기에는 한계가 있으며 이러한 자극이 부피가 큰 삼차원 제조물 내부까지 잘 이루어지지 않는다는 문제가 있었다.

[0007] 따라서, 3D 프린팅용 잉크 조성물로 3D 프린팅 시에 구조 안정성이 우수한 3D 프린팅 잉크 개발이 필요한 실정이다.

[0008] 한편, 4D 프린팅은 3D 프린팅에 자가 변환 및 자가 조립 등의 개념이 더해진 것으로 3D 프린터로 출력된 구조체가 주변 환경에 반응하면서 시간에 따라 변화하는 개념을 추가하고 있다. 현재 4D 프린팅에 사용되고 있는 자기형상기억 소재는 주로 메탈 또는 합성폴리머가 대부분으로, 단백질 또는 천연 당을 기반으로 한 소재의 적용이 상대적으로 적다. 생체친화적이고 생분해가 가능한 단백질 또는 천연 당 기반 소재는 세포 지지체 및 오가노이드 제작에도 용이하게 사용될 수 있다.

[0009] 따라서, 바이오 잉크로 출력된 세포 지지체에서 바이오 잉크에 포함된 세포가 성장하는 동안 세포 배열의 방향성에 따라 스스로 모양의 변화가 필요로하거나, 세포가 원하는 조직으로 부분 확대 증식, 분화될 수 있도록 미세한 공간을 제공하기 위해서 4D 구조체로의 발전 가능한 4D 프린팅 바이오 잉크 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0011] (비특허문헌 0001) Bandyopadhyay, A., & Mandal, B. B. (2020). A three-dimensional printed silk-based biomimetic tri-layered meniscus for potential patient-specific implantation. *Biofabrication*, 12(1).
- (비특허문헌 0002) Kim, S.H., Yeon, Y.K., Lee, J.M. et al. Precisely printable and biocompatible silk fibroin bioink for digital light processing 3D printing. *Nat Commun* 9, 1620 (2018).

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 본 발명자들은 저점도 단백질(실크)의 프린팅을 가능하게 하고, 의료용 소재(피부 조직)에 맞는 기계적 물성을 제공할 수 있는 4D 프린팅 잉크 조성물을 개발하고자 예의 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 실크 피브로인(silk fibroin)에 온도 반응성을 갖는 카라지난(carrageenan)을 포함하는 잉크 조성물을 제조하였다.
- [0013] 따라서, 본 발명의 일 목적은 상기 잉크 조성물로 두가지의 광 가교를 이용하는 변형가능한 삼차원 구조체인 4D 하이드로겔 구조체를 제공하는데 있다.
- [0014] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 4D 하이드로겔 구조체의 제조방법을 제공하는데 있다.
- [0016] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제(들)로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제(들)는 이하의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0018] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 절단된 실크 피브로인 및 카라지난을 포함하는 제1 혼합물로 이루어진 제1층; 및 메타크릴레이트기가 고정화된 절단된 실크 피브로인 및 카라지난을 포함하는 제2 혼합물로 이루어진 제2층;을 포함하는 4D 하이드로겔 구조체를 제공한다.
- [0019] 상기 절단된 실크 피브로인의 중량평균 분자량은 20kDa 내지 300kDa인 것일 수 있다.
- [0020] 상기 메타크릴레이트기가 고정화된 절단된 실크 피브로인의 중량평균 분자량은 100kDa 내지 300kDa인 것일 수 있다.
- [0021] 상기 카라지난은 카파 카라지난 또는 아이오타 카라지난인 것일 수 있다.
- [0022] 상기 절단된 실크 피브로인과 카라지난 또는 메타크릴레이트기가 고정화된 절단된 실크 피브로인과 카라지난은 각각 1: 0.01 내지 5의 중량비로 혼합된 것일 수 있다.
- [0023] 상기 제1 혼합물 또는 제2 혼합물은 용매, 광 개시제, 산화제, 계면활성제, 가소제, 중합방지제, 소포제, 희석제, 열안정제 및 점도 조절제로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0024] 또한, 본 발명은, (a) 절단된 실크 피브로인 및 카라지난을 포함하는 제1 혼합물을 제조하는 단계; (b) 메타크릴레이트기가 고정화된 절단된 실크 피브로인 및 카라지난을 포함하는 제2 혼합물을 제조하는 단계; 및 (c) 상기 제1 혼합물을 3D 프린팅하여 제1 혼합물로 이루어진 제1 층에 상기 제2 혼합물을 3D 프린팅하여 제2 혼합물로 이루어진 제2 층을 융합시키는 단계;를 포함하는 4D 하이드로겔 구조체의 제조방법을 제공하는 것일 수 있다.
- [0025] 상기 제1 혼합물의 제조는, (a-1) 실크 피브로인을 임의로 절단하여 절단된 실크 피브로인을 제조하는 단계; (a-2) 상기 절단된 실크 피브로인 및 카라지난을 혼합하여 제1 혼합물을 제조하는 단계; 및 (a-3) 상기 제1 혼

합물을 겔화시키는 단계;를 포함하는 것일 수 있다.

- [0026] 상기 제2 혼합물의 제조는, (b-1) 실크 피브로인을 임의로 절단하여 절단된 실크 피브로인을 제조하는 단계; (b-2) 상기 절단된 실크 피브로인에 메타크릴레이트기를 고정화하는 단계; (b-3) 상기 메타크릴레이트기가 고정화된 절단된 실크 피브로인에 카라지난을 혼합하여 제2 혼합물을 제조하는 단계; 및 (b-4) 상기 제2 혼합물을 겔화시키는 단계;를 포함하는 것일 수 있다.
- [0027] 상기 (a-3) 단계는, 상기 제1 혼합물을 50 내지 70℃에서 녹인 후, 20 내지 30 ℃로 온도를 낮추어 겔화시키는 단계인 것일 수 있다.
- [0028] 상기 (b-1) 단계는, 5 M 내지 15 M 리튬브로마이드(LiBr) 용액에 실크 단백질을 30 분 내지 20 시간 동안 침지시켜 절단된 실크 피브로인 수용액을 제조하는 단계인 것일 수 있다.
- [0029] 상기 (b-2) 단계는, 상기 절단된 실크 피브로인에 글리시딜 메타크릴레이트, 메타크릴 무수물, 메타크릴 산, 메틸 메타크릴레이트 및 부틸 메타크릴레이트로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 메탈로일 반응기와 반응시켜 메타크릴레이트기를 고정화하는 단계인 것일 수 있다.
- [0030] 상기 (b-4) 단계는, 상기 제2 혼합물을 50 내지 70℃에서 녹인 후, 20 내지 30 ℃로 온도를 낮추어 겔화시키는 단계인 것일 수 있다.
- [0031] 상기 (c) 단계에서, 제1 혼합물 및 제2 혼합물을 3D 프린팅 하는 도중 또는 3D 프린팅이 완료된 후 광을 조사하여, 제1 혼합물로 이루어진 제1층 및 제2 혼합물로 이루어진 제2층을 제조하는 것일 수 있다.
- [0032] 상기 (c) 단계에서 제1 층에 조사된 광은 400 내지 500 nm 파장을 갖는 청색광이며, 제2 층에 조사된 광은 200 내지 400 nm 파장을 갖는 자외선일 수 있다.
- [0033] 또한, 본 발명은 메타크릴레이트기가 고정화된 절단된 실크 피브로인 및 카라지난을 포함하는 4D 프린팅용 잉크 조성물을 제공하는 것일 수 있다.
- [0034] 또한, 본 발명은 상기 4D 프린팅용 잉크 조성물을 포함하는 4D 생체 소재를 제공하는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0036] 본 발명의 4D 하이드로겔 구조체에 사용된 잉크 조성물은 저분자의 실크 피브로인을 포함하여 물, 생리식염수에 대한 실크 피브로인의 용해도가 우수하며, SO_4^{2-} 잔기가 많은 카라지난을 포함하여 세포의 생육에 도움을 줄 수 있다.
- [0037] 또한, 본 발명의 4D 하이드로겔 구조체에 사용된 잉크 조성물은 카라지난의 온도 반응성을 이용하여 액체 상태의 잉크를 반고체 상태로 겔화시킬 수 있어 4D 하이드로겔 구조체를 제조 시에 구조체가 안정적으로 유지될 수 있다.
- [0038] 또한, 본 발명의 4D 하이드로겔 구조체에 사용된 잉크 조성물은 3D 프린팅 하는 도중 또는 3D 프린팅이 완료된 후에 광을 조사시키는 경우, 카라지난의 물리적 가교 결합 뿐만 아니라 실크 피브로인 간의 광 가교 기반의 공유 가교 결합으로 인해 이중 가교(dual crosslinking)되어 신체 결손이 있는 생체조직에 4D 하이드로겔 구조체를 적용하는 경우 조직을 안정적으로 재생시킬 수 있는 효과가 있다.
- [0039] 또한, 본 발명의 4D 하이드로겔 구조체는 메타크릴레이트기가 고정화된 실크 피브로인을 사용함으로써 3D 프린팅 하는 도중 또는 3D 프린팅 완료된 후에 이중 광을 조사시키는 경우, 카라지난과 혼합된 실크 피브로인 간의 광 가교 기반의 공유 가교 결합과 더불어 실크 피브로인에 고정화된 메타크릴레이트 간의 광 가교 기반의 공유 가교 결합으로 인해 이중 광 가교(dual photo-crosslinking)에 의한 물성이 다른 복합 하이드로겔로 이루어진 4D 구조체를 제작할 수 있다.
- [0040] 또한, 본 발명은 복합 3D 하이드로겔 구조체로부터 4D 하이드로겔 구조체로의 유도를 가능하게 함으로써 신체 결손이 있는 생체조직에 4D 프린팅된 구조체를 적용하는 경우, 바이오잉크로 출력된 세포 지지체에서 바이오잉크에 포함된 세포가 자라는 중 세포 배열의 방향성에 따라 스스로 모양의 변화가 필요로하거나, 세포가 원하는 조직으로 부분 확대 증식, 분화될 수 있도록 미세한 공간을 제공이 가능하다. 더 나아가 복합 4D 하이드로겔 구조체는 면의 조직 강성을 다르게 나타내어, 하나의 구조체에서 두 가지 혹은 그 이상의 특이적 조직 강성을 띄

는 세포들이 자랄 수 있는 환경을 제공할 것이다.

[0042] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 특허청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0044] 도 1은 카라지난의 농도 변화 및 온도 반응성에 따른 잉크 조성물의 결과를 확인한 것이다.

도 2는 본 발명에 따른 3D 프린팅용 잉크 조성물을 이용하여 3D 프린팅 시에, 카라지난의 농도 변화, 3D 프린팅의 니들 사이즈(needle size) 및 속도 변화에 따라 출력되는 선의 두께를 측정한 그래프를 나타낸 것이다.

도 3은 실시예 1에 따라 제조된 3D 프린팅용 잉크 조성물을 이용하여 3D 프린팅 시에, 25 게이지 니들 사이즈를 사용한 경우의 프린팅 속도 변화 변화에 따라 출력되는 선의 두께를 측정한 그래프 및 두께를 확인하기 위한 이미지를 나타낸 것이다.

도 4는 실시예 2 및 비교예 2에서 제조된 잉크 조성물로 3D 프린팅하여 출력된 3D 구조체를 확인하기 위한 이미지이다.

도 5는 실시예 2에서 제조된 잉크 조성물로 3D 프린팅하여 출력된 3D 구조체의 압력을 가한 후에도 원래 형태가 유지되는 우수한 물리적 강도를 나타내기 위한 이미지이다.

도 6은 실시예 1 내지 3 및 비교예 1에 따라 제조된 잉크 조성물을 이용하여 제작한 3D 하이드로겔 구조체의 인장강도 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 실시예 1 내지 3 및 비교예 1에 따라 제조된 잉크 조성물을 이용하여 제작한 3D 하이드로겔 구조체의 기공 크기를 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 실시예 1 내지 3 및 비교예 1에 따라 제조된 잉크 조성물을 이용하여 제작한 3D 하이드로겔 구조체의 표면 친수성을 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 실시예 1 내지 3 및 비교예 1에 따라 제조된 잉크 조성물을 이용하여 제작한 3D 하이드로겔 구조체에서 배양한 세포의 초기 부착성과 세포 분화능을 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 실시예 1 내지 3 및 비교예 1에 따라 제조된 잉크 조성물을 이용하여 제작한 3D 하이드로겔 구조체의 생체분해속도를 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 실시예 1 및 실시예 4에 따라 제조된 잉크 조성물을 이용하여 제작한 3D 복합 하이드로겔 구조체를 나타내는 이미지로, 팽윤 정도에 따른 4D 하이드로겔 구조체의 모양변화를 보여주는 사진이다.

도 12는 실시예 5 및 비교예 3에 따라 제조된 잉크 조성물을 이용하여 제조된 4D 복합 하이드로겔 구조체를 나타낸 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 하기의 설명에서는 본 발명의 실시예를 이해하는데 필요한 부분만이 설명되며, 그 이외 부분의 설명은 본 발명의 요지를 흐트리지 않는 범위에서 생략될 수 있다는 점에 유의하여야 한다.

[0046] 이하에서 설명되는 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 아니 되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념으로 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다. 따라서 본 명세서에 기재된 실시예와 도면에 도시된 구성은 본 발명의 바람직한 실시예에 불과할 뿐이고, 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원시점에 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.

[0048] 이하, 본 발명을 자세히 설명한다.

- [0049] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 절단된 실크 피브로인 및 카라지난을 포함하는 제1 혼합물로 이루어진 제1층; 및 메타크릴레이트기가 고정화된 절단된 실크 피브로인 및 카라지난을 포함하는 제2 혼합물로 이루어진 제2층;을 포함하는 4D 하이드로겔 구조체를 제공한다.
- [0050] 본 발명에서, 상기 제1 혼합물 또는 제2 혼합물은 잉크 조성물을 의미하는 것일 수 있다.
- [0051] 또한, 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 절단된 실크 피브로인 및 카라지난을 포함하는 제1 혼합물을 제조하는 단계; (b) 메타크릴레이트기가 고정화된 절단된 실크 피브로인 및 카라지난을 포함하는 제2 혼합물을 제조하는 단계; 및 (c) 상기 제1 혼합물을 3D 프린팅하여 제1 혼합물로 이루어진 제1 층에 상기 제2 혼합물을 3D 프린팅하여 제2 혼합물로 이루어진 제2 층을 융합시키는 단계;를 포함하는 4D 하이드로겔 구조체의 제조 방법을 제공한다.
- [0053] 이하에서는 상기 4D 하이드로겔 구조체의 제조방법을 기초로 본 발명에 대해 구체적으로 설명한다.
- [0054] 본 발명의 4D 하이드로겔 구조체의 제조방법은,
- [0055] 먼저, (a) 단계는, 절단된 실크 피브로인 및 카라지난을 포함하는 제1 혼합물을 제조한다.
- [0056] 이때, 상기 제1 혼합물은, (a-1) 실크 피브로인을 임의로 절단하여 절단된 실크 피브로인을 제조하는 단계; (a-2) 상기 절단된 실크 피브로인 및 카라지난을 혼합하여 제1 혼합물을 제조하는 단계; 및 (a-3) 상기 제1 혼합물을 겔화시키는 단계;를 포함하여 제조되는 것일 수 있다.
- [0057] 상기 (a-1) 단계는, 실크 피브로인을 임의로 절단(random cleavage)하여 절단된 실크 피브로인을 준비하는 단계이다.
- [0058] 상기 절단된 실크 피브로인을 준비하는 것은, 상기 실크 피브로인의 분자량이 높아 물, 식염수 등에 대한 용해도가 낮기 때문에 상기 실크 피브로인의 용해도를 높이기 위해 실크 피브로인을 임의로 절단하여 저분자화 시켜 준비하는 것일 수 있다.
- [0059] 상기 절단된 실크 피브로인의 제조방법은 본 기술분야에서 공지된 방법으로 수행될 수 있으며, 예컨대 염화칼슘(CaCl_2):정제수(DI water): 에탄올을 1:8:2 비율로 사용하여 실크 피브로인을 고체에서 액체화하는 용해(dissolving) 과정인 임의 절단을 통해 저분자화된 절단된 실크 피브로인을 제조할 수 있다. 이때, 임의로 절단을 하는 시간, 즉 용매에 실크 피브로인을 침지시키는 시간에 따라 다양한 분자량이 결정되며, 침지 시간을 증가시킬수록 저분자의 실크 피브로인을 수득할 수 있다.
- [0060] 본 발명에서는 상기 절단된 실크 피브로인의 중량평균 분자량이 20 kDa 내지 300 kDa, 바람직하게는 40 kDa 내지 100 kDa 일 수 있다. 상기 절단된 실크 피브로인의 중량평균 분자량이 20kDa 미만인 경우에는 잉크 조성물의 점도가 낮아 3D 프린팅 시 구조체를 안정적으로 형성하기 어렵고, 광 개시제를 통한 광 가교 반응의 효율이 저하될 수 있다. 상기된 실크 피브로인의 중량평균 분자량이 300kDa를 초과하는 경우에는 혼합물 제조 시 물, 식염수 등에 대한 용해도가 저하될 수 있다.
- [0061] 상기 (a-2) 단계는, 절단된 실크 피브로인 및 카라지난을 혼합하여 제1 혼합물을 제조하는 단계이다.
- [0062] 상기 제1 혼합물을 제조하는 것은, 상기 절단된 실크 피브로인의 물, 식염수 등에 대한 용해도가 높아짐에 따라 3D 프린팅용 잉크 조성물의 점도가 낮아지는 것을 방지하기 위해 절단된 실크 피브로인에 온도 반응성이 우수한 카라지난을 혼합하여 혼합물을 제조하는 것일 수 있다.
- [0063] 상기 카라지난으로는 카파 카라지난, 아이오타 카라지난, 람다 카라지난을 사용할 수 있다. 상기 카라지난은 SO_4^{2-} 잔기가 많아 세포의 생육에 도움을 줄 뿐만 아니라 온도 반응성이 있어 액체 상태의 잉크 조성물을 반고체인 페이스트(paste)상태로 제조할 수 있다.
- [0064] 상기 카라지난 중 람다 카라지난은 SO_4^{2-} 잔기 3개를 포함하고 있으나, 겔화에 관여하지 않아 겔화되는 성질이 없기 때문에, 본 발명에서 사용되는 카라지난은 겔화에 관여를 하면서 세포 부착성을 향상시킬 수 있는 SO_4^{2-} 잔기 1개 포함하고 있는 카파 카라지난 또는 SO_4^{2-} 잔기 2개 포함하고 있는 아이오타 카라지난을 사용하는 것이 바람직

하다.

- [0065] 특히 카파 카라지난 또는 아이오타 카라지난 중 SO_4^{2-} 잔기를 더 많이 포함하고 있는 아이오타 카라지난을 사용하는 것이 더 바람직하다.
- [0066] 상기 절단된 실크 피브로인과 카라지난은 1: 0.01 내지 5의 중량비로 혼합되어 제1 혼합물을 제조할 수 있으며, 보다 바람직하게는 1: 0.01 내지 2의 중량비로 혼합되어 혼합물을 제조할 수 있고, 보다 더 바람직하게는 1: 0.01 내지 0.05의 중량비로 혼합되어 제1 혼합물을 제조할 수 있다. 이 때, 상기 카라지난의 중량비가 0.01 미만이면 온도 반응성에 의한 겔화가 진행되지 않으며, 점도가 너무 낮아져 잉크 조성물로 3D 프린팅 시에 구조체를 안정적으로 형성하기 어렵다. 상기 카라지난의 중량비가 5 초과인 경우에는 혼합물 제조 시 물, 식염수 등에 녹지 않아 실크 피브로인과 섞이지 않을 수 있다.
- [0067] 상기 제1 혼합물 제조 시 용매, 광 개시제, 산화제, 계면활성제, 가소제, 중합방지제, 소포제, 희석제, 열안정제 및 점도 조절제로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나를 더 포함할 수 있다.
- [0068] 상기 용매는 물, 식염수 등일 수 있다.
- [0069] 상기 광 개시제는 소듐 퍼설파이드(sodium persulfide), 트리스(비피리딘)루테늄(II) 클로라이드(Tris(bipyridine)ruthenium(II) chloride), 리튬 아릴포스포네이트(lithium arylphosphinate: LAP), 2,2-디메톡시-2-페닐아세토폰(dimethoxy-2-phenylacetophenone), 벤질디메틸케탈(benzyl dimethyl ketal), 에틸벤조인 에테르(ethylbenzoin ether), 이소프로필벤조인 에테르(isopropylbenzoin ether), 2,2-디에톡시아세토폰(2,2-diethoxyacetophenone), 2-히드록시-2-메틸-1-페닐프로판-1-온(2-hydroxy-2-methyl-1-phenylpropan-1-one), 1-히드록시시클로헥실페닐케톤(1-hydroxycyclohexylphenylketone), 2-히드록시-4'-(2-히드록시에톡시)-2-메틸프로피오페논(2-Hydroxy-4'-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenone), 벤질벤조에이트(benzyl benzoate), 에오신 Y(eosin Y), 리보플라빈(riboflavin), 로즈벵갈(rose bengal), 및 벤조일 이소부틸 에테르(benzoyl isobutyl ether)로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있으며, 바람직하게는 소듐 퍼설파이드(sodium persulfide), 트리스(비피리딘)루테늄(II) 클로라이드(Tris(bipyridine)ruthenium(II) chloride) 중 적어도 하나일 수 있고, 보다 더 바람직하게는 소듐 퍼설파이드(sodium persulfide) 및 트리스(비피리딘)루테늄(II) 클로라이드(Tris(bipyridine)ruthenium(II) chloride)를 혼합하여 사용할 수 있다.
- [0070] 상기 광 개시제로서 소듐 퍼설파이드(sodium persulfide), 트리스(비피리딘)루테늄(II) 클로라이드(Tris(bipyridine)ruthenium(II) chloride) 중 적어도 하나를 혼합하는 경우, 상기 소듐 퍼설파이드는 1 mM 내지 500 mM, 트리스(비피리딘)루테늄(II) 클로라이드(Tris(bipyridine)ruthenium(II) chloride)는 0.01 mM 내지 10 mM의 농도로 혼합될 수 있다.
- [0071] 또한, 본 발명은 온도반응에 의한 조성물의 균질한 겔화를 유도하여 점도를 증가시켜 균질한 바이오 잉크를 만들고, 출력하면서 혼합물에 포함되어있는 상기 광 개시제로 소듐 퍼설파이드(sodium persulfide) 및 트리스(비피리딘)루테늄(II) 클로라이드(Tris(bipyridine)ruthenium(II) chloride)를 동시에 사용 하는 경우, 소듐 퍼설파이드가 산화제로서 전자수용체 역할을 하며, 트리스(비피리딘)루테늄(II) 클로라이드가 촉매 역할을 하여 실크 피브로인의 타이로신의 산화 방향족 잔기(oxide aromatic residue)를 바꿔 다이타이로신(dityrosine) 공유결합을 유도하여 출력물의 구조적 안정성과 물성을 증가시킬 수 있다.
- [0072] 상기 (a-3) 단계는 제1 혼합물을 겔화시키는 단계이다.
- [0073] 상기 제1 혼합물을 겔화시키는 것은, 상기 혼합물에 열을 주어 혼합물에 포함된 카라지난이 녹은 후, 혼합물의 온도를 낮추어 카라지난이 페이스트(paste)형태로 되어 혼합물이 겔화되는 것일 수 있다.
- [0074] 구체적으로, 상기 제1 혼합물을 겔화시키는 것은, 먼저 혼합물을 50 내지 70℃에서 10 내지 60분, 바람직하게는 55 내지 65℃에서 10 내지 30분 동안 열을 주어 제1 혼합물 내 포함된 카라지난을 완전히 녹인다. 이후, 50 내지 70℃, 바람직하게는 55 내지 65℃의 제1 혼합물을 실온, 바람직하게는 20 내지 30℃로 온도를 낮추어 혼합물을 겔화시킨다.
- [0075] 상기 50 내지 70℃, 바람직하게는 55 내지 65℃의 온도에서 혼합물에 포함된 카라지난은 줄 상태(helical dimer)이며, 20 내지 30℃로 온도를 서서히 낮추면 겔 상태(aggregation of double helics)로 될 수 있다.
- [0076] 이와 같은 카라지난의 온도 반응성 때문에 제1 혼합물 또는 이를 포함하는 3D 프린팅용 잉크 조성물에 카라지난

을 포함하는 경우 3D 프린팅 시에 잉크가 퍼짐 없고, 인장강도가 우수하며, 구조체를 안정적으로 적층할 수 있는 인쇄적성(printability)을 확보할 수 있다.

- [0078] 다음으로, (b) 메타크릴레이트기가 고정화된 절단된 실크 피브로인 및 카라지난을 포함하는 제2 혼합물을 제조한다.
- [0079] 이때, 상기 제2 혼합물은, (b-1) 실크 피브로인을 임의로 절단하여 절단된 실크 피브로인을 제조하는 단계; (b-2) 상기 절단된 실크 피브로인에 메타크릴레이트기를 고정화하는 단계; (b-3) 상기 메타크릴레이트기가 고정화된 절단된 실크 피브로인에 카라지난을 혼합하여 제2 혼합물을 제조하는 단계; 및 (b-4) 상기 제2 혼합물을 겔화시키는 단계;를 포함하여 제조되는 것일 수 있다.
- [0080] 상기 (b-1) 단계는 실크 피브로인을 임의로 절단하여 절단된 실크 피브로인을 제조하는 단계이다.
- [0081] 상기 실크 피브로인의 분자량이 높아 물, 식염수 등에 대한 용해도가 낮기 때문에 상기 실크 피브로인의 용해도를 높이기 위해 실크 피브로인을 임의로 절단하여 저분자화 시켜 준비하는 것일 수 있다.
- [0082] 상기 절단된 실크 피브로인의 제조방법은 본 기술분야에서 공지된 방법으로 수행될 수 있으며, 예컨대 리튬브로마이드(LiBr) 용액을 사용하여 실크 피브로인을 고체에서 액체화하는 용해(dissolving) 과정인 임의 절단을 통해 저분자화된 절단된 실크 피브로인을 제조할 수 있다. 이때, 임의 절단 과정에 사용되는 용매인 리튬브로마이드(LiBr) 용액의 농도 및 임의로 절단을 하는 시간, 즉 용매에 실크 피브로인을 침지시키는 시간에 따라 다양한 분자량이 결정되며, 침지 용매의 농도가 높을 수록, 침지 시간을 증가시킬수록 저분자의 실크 피브로인을 수득할 수 있다.
- [0083] 본 발명에서는 상기 절단 과정에 사용되는 용매인 리튬브로마이드(LiBr)의 농도는 5 M 내지 15 M, 바람직하게는 9 M 내지 10 M 일 수 있다. 침지시간은 30분 내지 20 시간, 바람직하게는 1시간 내지 6시간 일 수 있다.
- [0084] 상기 리튬브로마이드 농도 범위 및 침지시간 범위 내에서, 중량평균 분자량이 100 kDa 내지 300 kDa, 바람직하게는 150 kDa 내지 250 kDa인 절단된 실크 피브로인을 수득할 수 있다. 상기 절단된 실크 피브로인의 중량평균 분자량이 100kDa 미만인 경우에는 잉크 조성물의 점도가 낮아 3D 프린팅 시 구조체를 안정적으로 형성하기 어렵고, 광 개시제를 통한 광 가교 반응의 효율이 저하될 수 있다. 상기된 실크 피브로인의 중량평균 분자량이 300kDa를 초과하는 경우에는 혼합물 제조 시 물, 식염수 등에 대한 용해도가 저하될 수 있다.
- [0085] 상기 (b-2) 단계는 절단된 실크 피브로인에 메타크릴레이트기를 고정화하는 단계이다.
- [0086] 상기 절단된 실크 피브로인에 메타크릴레이트기를 고정화하는 것은, 추가적인 광가교를 유발하기 위해서 상기 절단된 실크 피브로인에 메타크릴레이트기를 고정화하는 반응이 필요할 수 있다.
- [0087] 구체적으로, 상기 절단된 실크 피브로인에 메타크릴레이트기를 고정화하는 것은, 상기 절단된 실크 피브로인이 녹아있는 용액에 메타크릴레이트기를 고정화시킬 수 있는 메타크릴로일(methacryloyl) 반응기를 첨가하여 진행한다.
- [0088] 상기 메타크릴로일(methacryloyl) 반응기로는, 글리시딜 메타크릴레이트(glycidyl methacrylate, GMA), 메타크릴 무수물(methacrylic anhydride, MAA), 메타크릴 산(methacrylic acid, MAA), 메틸 메타크릴레이트(Methyl methacrylate, MMA) 및 부틸 메타크릴레이트(butyl methacrylate, BMA)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있으며, 바람직하게는 글리시딜 메타크릴레이트(glycidyl methacrylate, GMA) 또는 메타크릴 무수물(methacrylic anhydride, MAA)일 수 있고, 보다 더 바람직하게는 글리시딜 메타크릴레이트(glycidyl methacrylate, GMA)를 사용할 수 있다.
- [0089] 상기 (b-3) 단계는 상기 메타크릴레이트기가 고정화된 절단된 실크 피브로인에 카라지난을 혼합하여 제2 혼합물을 제조하는 단계이다.
- [0090] 상기 메타크릴레이트기가 고정화된 절단된 실크 피브로인은 앞선 염화칼슘(CaCl_2):정제수(DI water): 에탄올을 1:8:2 비율로 사용하여 절단된 실크 피브로인 보다 물, 식염수 등에 대한 용해도가 낮아짐에 따라 3D 프린팅용 잉크 조성물로 사용 시에 최적 농도가 낮음을 확인할 수 있다. 이에 따라 3D 프린팅용 잉크 조성물로 사용하는 경우, 점도가 낮아지는 것을 방지하기 위해 메타크릴레이트기가 고정화된 실크 피브로인에 온도 반응성이 우수한 카라지난을 혼합하여 제2 혼합물을 제조할 수 있다.

- [0091] 상기 카라지난으로는 카파 카라지난, 아이오타 카라지난, 람다 카라지난을 사용할 수 있다. 상기 카라지난은 SO_4^{2-} 잔기가 많아 세포의 생육에 도움을 줄 뿐만 아니라 온도 반응성이 있어 액체 상태의 잉크 조성물을 반고체인 페이스트(paste)상태로 제조할 수 있다.
- [0092] 상기 카라지난 중 람다 카라지난은 SO_4^{2-} 잔기 3개를 포함하고 있으나, 겔화에 관여하지 않아 겔화되는 성질이 없기 때문에, 본 발명에서 사용되는 카라지난은 겔화에 관여를 하면서 세포 부착성을 향상시킬 수 있는 SO_4^{2-} 잔기 1개 포함하고 있는 카파 카라지난 또는 SO_4^{2-} 잔기 2개 포함하고 있는 아이오타 카라지난을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0093] 특히 카파 카라지난 또는 아이오타 카라지난 중 SO_4^{2-} 잔기를 더 많이 포함하고 있는 아이오타 카라지난을 사용하는 것이 더 바람직하다.
- [0094] 상기 제조된 메타크릴레이트기가 고정화된 실크 피브로인과 카라지난은 1: 0.01 내지 5의 중량비로 혼합되어 혼합물을 제조할 수 있으며, 보다 바람직하게는 1: 0.1 내지 3의 중량비로 혼합되어 혼합물을 제조할 수 있고, 보다 더 바람직하게는 1: 0.1 내지 0.6의 중량비로 혼합되어 혼합물을 제조할 수 있다. 이 때, 상기 카라지난의 중량비가 0.01 미만이면 온도 반응성에 의한 겔화가 진행되지 않으며, 점도가 너무 낮아져 잉크 조성물로 3D 프린팅 시에 구조체를 안정적으로 형성하기 어렵다. 상기 카라지난의 중량비가 5 초과인 경우에는 혼합물 제조시 물, 식염수 등에 녹지 않아 실크 피브로인과 섞이지 않을 수 있다.
- [0095] 또한, 상기 제2 혼합물 제조 시 용매, 광 개시제, 산화제, 계면활성제, 가소제, 중합방지제, 소포제, 희석제, 열안정제 및 점도 조절제로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나를 더 포함할 수 있다.
- [0096] 상기 상기 제2 혼합물 제조 시 용매, 광 개시제, 산화제, 계면활성제, 가소제, 중합방지제, 소포제, 희석제, 열안정제 및 점도 조절제의 구체적인 예는 상술한 제1 혼합물의 용매, 광 개시제, 산화제, 계면활성제, 가소제, 중합방지제, 소포제, 희석제, 열안정제 및 점도 조절제의 구체적인 예와 동일하다.
- [0097] 상기 (b-4) 단계는 제2 혼합물을 겔화시키는 단계이다.
- [0098] 상기 제2 혼합물을 겔화시키는 것은, 상기 혼합물에 열을 주어 혼합물에 포함된 카라지난이 녹은 후, 혼합물의 온도를 낮추어 카라지난이 페이스트(paste)형태로 되어 혼합물이 겔화되는 것일 수 있다.
- [0099] 구체적으로, 상기 제2 혼합물을 겔화시키는 것은, 먼저 혼합물을 50 내지 70℃에서 10 내지 60분, 바람직하게는 55 내지 65℃에서 10 내지 30분 동안 열을 주어 제2 혼합물 내 포함된 카라지난을 완전히 녹인다. 이후, 50 내지 70℃, 바람직하게는 55 내지 65℃의 제2 혼합물을 실온, 바람직하게는 20 내지 30℃로 온도를 낮추어 혼합물을 겔화시킨다.
- [0100] 상기 50 내지 70℃, 바람직하게는 55 내지 65℃의 온도에서 혼합물에 포함된 카라지난은 줄 상태(예컨대, helical dimer)이며, 20 내지 30℃로 온도를 서서히 낮추주면 겔 상태(aggregation of double helics)로 될 수 있다.
- [0101] 이와 같은 카라지난의 온도 반응성 때문에 제2 혼합물 또는 이를 포함하는 3D 프린팅용 잉크 조성물에 카라지난을 포함하는 경우 3D 프린팅 시에 잉크가 퍼짐 없고, 인장강도가 우수하며, 구조체를 안정적으로 적층할 수 있는 인쇄적성(printability)을 확보할 수 있다.
- [0103] 다음으로, (c) 상기 제1 혼합물을 3D 프린팅하여 제1 혼합물로 이루어진 제1 층에 상기 제2 혼합물을 3D 프린팅하여 제2 혼합물로 이루어진 제2 층을 융합시킨다.
- [0104] 구체적으로, 상기 (c) 단계는, 제1 혼합물을 3D 프린팅하는 도중 또는 3D 프린팅이 완료된 후 광을 조사하여 제1 혼합물로 이루어진 제1 층을 제조하고, 상기 제1 층에 제2 혼합물을 3D 프린팅하는 도중 또는 3D 프린팅이 완료된 후에 광을 조사하여 제2 혼합물로 이루어진 제2 층을 적층시켜 복합 3D 하이드로겔 구조체를 제조하는 것일 수 있다. 이때 상기 제1 층 및 제2 층의 프린팅하는 순서는 반대로 이루어질 수도 있다.
- [0105] 상기 제1 층에 조사된 광은 400 내지 500 nm 파장을 갖는 청색광일 수 있으며, 이 때, 광을 조사시키는 것은 잉

크 조성물 내 포함된 실크 피브로인 간의 광 가교 반응을 시키기 위한 것일 수 있다.

[0106] 3D 프린팅 하는 도중 또는 3D 프린팅이 완료된 후 광을 조사함으로써, 카라지난의 열-가역(thermo-reversible)으로 인한 겔화 뿐만 아니라, 절단된 실크 피브로인끼리의 광 가교 반응으로 인해 이중 가교(double crosslinking)되어 인장강도와 같은 물성이 우수한 효과가 있으며, 안정적으로 구조체를 형성할 수 있다.

[0107] 상기 제2 층에 조사된 광은 200 내지 400 nm 파장을 갖는 자외선일 수 있으며, 이 때, 광을 조사시키는 것은 잉크 조성물 내 포함된 메타크릴레이트기가 고정화된 절단된 실크 피브로인 간의 광 가교 반응을 시키기 위한 것일 수 있다.

[0108] 3D 프린팅 하는 도중 또는 3D 프린팅이 완료된 후 광을 조사함으로써, 카라지난의 열-가역(thermo-reversible)으로 인한 겔화 뿐만 아니라, 메타크릴레이트기가 고정화된 절단된 실크 피브로인끼리의 광 가교 반응으로 인해 이중 가교(double crosslinking)되어 인장강도와 같은 물성이 우수한 효과가 있으며, 안정적으로 구조체를 형성할 수 있다.

[0110] 마지막으로, 본 발명은 상기 제조된 복합 3D 하이드로겔 구조체를 30 내지 50℃, 바람직하게는 30 내지 40℃의 생체조건과 비슷한 환경인 생리식염수에 1 내지 3시간, 바람직하게는 2시간 동안 침지시켜 4D 하이드로겔 구조체로 제조할 수 있다. 상기 침지 시간이 늘어날 수록 복합 3D 하이드로겔 구조체부터 복합 4D 구조체로의 변화 양상이 두드러진다.

[0112] 상기와 같은 본 발명의 4D 하이드로겔 구조체는, 저점도의 실크 피브로인 및 카라지난을 포함하는 용액에 빛 반응 관련 촉매 및 전자수용체를 첨가하여 균질한 바이오 잉크를 만들고, 이후에 온도반응을 유도하여 3D 프린팅 전 점도를 증가시킬 수 있다. 이와 더불어 프린팅 시에 두 가지 광 가교를 유도하여 빠른 적층이 가능하게 한다. 본 발명에서는 1) 실크 타이로신에 의한 다이타이로신 가교로 450 nm의 청색광을 통해 공유결합을 유도하는 방법과 2) 메틸아크릴레이트가 고정화된 실크 타이로신에 UV를 조사하여 공유결합을 유도하는 두 가지 광 가교 방법을 사용하였다. 이는 삼차원 소재의 깊은 곳 까지 빛이 각기 다르게 침투할 수 있어 목적에 맞는 또는 깊이에 따른 가교정도 및 기계적 강도 제어에 용이하게 쓰일 수 있다. 또한 수분을 함유하는 성질이 이에 따라 달라짐으로서 3D 적층 후에 수화에 의한 4D 변화를 유도할 수 있다는 큰 장점이 있다.

[0114] 또한, 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 제조방법으로 제조된 메타크릴레이트기가 고정화된 절단된 실크 피브로인 및 카라지난을 포함하는 4D 프린팅용 잉크 조성물을 제공한다.

[0115] 본 발명에 따른 4D 프린팅용 잉크 조성물은 인쇄적성이 우수하여 별도의 합성 폴리머 계열의 지지체 없이 원하는 디자인의 모양대로 제작할 수 있고 세포 적합성, 세포 성장 및 분화가 가능하다는 점에서 우수한 바이오 잉크로 활용할 수 있다.

[0117] 또한, 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 4D 프린팅용 잉크 조성물을 포함하는 4D 생체 소재를 제공한다.

[0118] 구체적으로, 본 발명은 상술한 4D 프린팅용 잉크 조성물로 3D 프린팅하여 출력된 4D 생체 소재를 제공한다.

[0120] 이상의 설명은 본 발명의 기술 사상을 일 구현예를 이용하여 설명한 것으로서, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 갖는 자라면 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 다양한 수정 및 변형이 가능할 것이다. 따라서, 본 발명에서 설명된 실시예는 본 발명의 기술 사상을 한정하기 위한 것이 아니라 설명하기 위한 것이고, 이런 실시예에 의하여 본 발명의 기술 사상의 범위가 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 보호범위는 청구범위에 의하여 해석되어야 하며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 기술 사상은 본 발명의 권리범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

- [0122] **실시예**
- [0123] **실시예 1**
- [0124] 염화칼슘 : 정제수 : 에탄올을 1: 8: 2의 몰비율로 혼합한 용액에 누에고치 유래의 실크 단백질을 3 시간 동안 침지시켜 절단된 실크 피브로인 수용액을 제조하고, 이를 동결건조 시킨 후 스펀지 형태의 절단된 실크 피브로인을 수득한다. pH7.4인 인산완충생리식염수(phosphate buffer saline) 1ml에 절단된 실크 피브로인 0.2g, 아이오타 카라지난(CAS NO.9062-07-1, SIGMA-ALDRICH) 0.01g, 소듐 퍼셀페이트 100 mM, 트리스(비피리딘)루테늄(II) 클로라이드 1mM을 혼합하여 제1 혼합물을 제조하였다. 제조된 제1 혼합물에 포함된 카라지난을 녹이기 위해 60 °C 중탕으로 3분간 녹여준다. 카라지난이 녹은 후 졸 상태인 제1 혼합물을 실온에서 약 20분 동안 식혀 겔화된 제1 혼합물을 제조하였다.
- [0126] **실시예 2**
- [0127] 상기 실시예 1에서, 아이오타 카라지난 0.01g 대신 0.02g을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 조건 및 방법으로 수행하였다.
- [0129] **실시예 3**
- [0130] 상기 실시예 1에서, 아이오타 카라지난 0.01g 대신 0.03g을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 조건 및 방법으로 수행하였다.
- [0132] **실시예 4**
- [0133] 9.3 M 리튬브로마이드(LiBr) 용액에 누에고치 유래의 실크 단백질을 1 시간 동안 침지시켜 절단된 실크 피브로인 수용액을 제조하고, 이를 글라이시딜메타크릴레이트 (glycidyl methacrylate, GMA)와 60 °C에서 6시간 동안 교반하여 실크 피브로인에 메타크릴레이트기를 고정화시킨 후, 동결건조 시켜 스펀지 형태의 메타크릴레이트기가 고정화된 실크 피브로인을 수득한다. pH7.4인 인산완충생리식염수(phosphate buffer saline) 1ml에 메타크릴레이트기가 고정화된 실크 피브로인 0.05g, 아이오타 카라지난(CAS NO.9062-07-1, SIGMA-ALDRICH) 0.005g, 2-히드록시-4'-(2-히드록시에톡시)-2-메틸프로피오페논(2-Hydroxy-4'-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenone 0.05 % (w/v) 을 혼합하여 제2 혼합물을 제조하였다. 제조된 제2 혼합물에 포함된 카라지난을 녹이기 위해 60 °C 중탕으로 3분간 녹여준다. 카라지난이 녹은 후 졸 상태인 제2 혼합물을 실온에서 약 20분 동안 식혀 겔화된 제2 혼합물을 제조하였다.
- [0135] **실시예 5**
- [0136] 상기 실시예 3에 따라 제조된 제1 혼합물을 3D 프린팅하여 형성된 제1 혼합물로 이루어진 하나의 층에 청색광 빛을 조사하여 제1 층을 제조한다. 이후 실시예 4에 따라 제조된 제2 혼합물을 3D 프린팅하여 형성된 제2 혼합물로 이루어진 하나의 층에 자외선을 조사하여 제2 층을 적층하여 복합 3D 하이드로겔 구조체를 제작하였다. 이후, 복합 3D 하이드로겔 구조체를 37 °C 생리식염수에 2시간 동안 침지시켜 4D 하이드로겔 구조체로 유도됨을 확인하였다.
- [0138] **비교예**
- [0139] **비교예 1**
- [0140] 상기 실시예 1에서, 혼합물 제조 시에 pH7.4인 인산완충생리식염수(phosphate buffer saline) 1ml에 절단된 실크 피브로인 0.2g과 아이오타 카라지난(CAS NO.9062-07-1, SIGMA-ALDRICH) 0.01g을 혼합하는 대신 pH7.4인 인산완충생리식염수(phosphate buffer saline) 1ml에 절단된 실크 피브로인 0.2g을 투입하는 것을 제외하고는 실시예1과 동일한 조건 및 방법으로 수행하였다.

[0142] **비교예 2**

[0143] 4%(w/v)로 아이오타 카라지난(CAS NO.9062-07-1, SIGMA-ALDRICH)을 정제수에 첨가하고, 카라지난을 녹이기 위해 60 °C 오븐에 20 분 동안 넣어 두었다. 카라지난이 녹은 후 졸 상태인 혼합물을 실온에서 약 20분 동안 식혀 겔화된 3D 프린팅용 잉크 조성물을 제조하였다.

[0145] **비교예 3**

[0146] 상기 실시예 1에 따라 제조된 제1 혼합물을 3D 프린팅하여 형성된 제1 혼합물로 이루어진 하나의 층에 청색광 빛을 조사하여 제1 층을 제조한다. 이후, 실시예 3에 따라 제조된 제1 혼합물을 3D 프린팅하여 형성된 제1 혼합물로 이루어진 하나의 층에 청색광을 조사하여 제2 층을 적층하여 복합 3D 하이드로겔 구조체를 제작하였다. 이후, 복합 3D 하이드로겔 구조체를 37 °C 생리식염수에 2시간 동안 침지시켜 4D 하이드로겔 구조체로 유도됨을 확인하였다.

[0148] **실험예**

[0149] **실험예 1: 카라지난의 농도 변화 및 온도 반응성에 따른 잉크 조성물**

[0150] 실시예 1 내지 3 및 비교예 1에 따라 제조된 잉크 조성물의 카라지난 농도 변화 및 온도 반응성을 확인하기 위해, 잉크 조성물을 제조하고 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0151] 도 1(a)는 실시예 1 내지 3 및 비교예 1에 따라 제조된 혼합물을 60 °C 오븐에 20 분 동안 넣었을 때의 시료의 이미지이고, 도 2(a)는 실시예 1 내지 3 및 비교예 1에 따라 제조된 혼합물을 60 °C 오븐에 20 분 동안 넣은 후 실온에서 20분 동안 식힌 후의 시료의 이미지이다.

[0152] 상기 도 1(a) 및 도 1(b)를 참고하면, 카라지난이 함유되지 않은 비교예 1의 경우 온도 변화에 반응성을 나타내지 않는 졸 상태인 것을 확인할 수 있으며, 카라지난을 포함하는 경우 겔화되어 시료를 뒤집어도 떨어지지 않는 겔 형태로 변한 것을 확인하였다. 또한 카라지난의 농도가 증가될수록 잉크 조성물의 점도가 높아지는 것을 확인하였다.

[0153] **실험예 2 : 3D 프린팅 시의 출력 두께 측정**

[0154] 실시예 1 내지 3 및 비교예 1에 따라 제조된 잉크 조성물을 이용하여 3D 프린팅 시에, 카라지난의 농도 변화, 3D 프린터의 니들 사이즈(needle size) 및 속도 변화에 따라 출력되는 선의 두께를 측정하고, 그 결과를 표 1 및 도 2에 나타내었다.

[0155] 또한, 실시예 1에 따라 제조된 3D 프린팅용 잉크 조성물을 이용하여 3D 프린팅 시에, 25 게이지 니들 사이즈를 사용한 경우의 프린팅 속도 변화 변화에 따라 출력되는 선의 두께를 측정한 그래프 및 두께를 확인하기 위한 이미지를 도 3에 나타내었다.

[0156] 도 2(a) 내지 도 2(c)는 3D 프린터의 니들 사이즈 및 속도 변화에 따른 결과를 나타낸 것으로서, 도 2(a)는 니들 사이즈가 23게이지(23G)도 2(b)는 니들 사이즈가 25게이지(25G), 도 2(c)는 니들 사이즈가 27게이지(27G)인 경우 출력되는 선의 두께를 측정한 그래프이다.

표 1

[0157]

샘플	니들 사이즈	프린팅 속도			
		1 mm/s	3 mm/s	5 mm/s	7 mm/s
실시예 1 (SF95CG5)	23 G	NA*	0.52 (±0.01)	0.46 (±0.01)	0.45 (± 0.01)
	25 G	0.49 (±0.01)	0.41 (±0.01)	0.39 (±0.02)	0.32 (±0.01)
	27 G	0.42 (±0.02)	0.39 (±0.02)	0.36 (±0.01)	0.31 (±0.02)
실시예 2 (SF91CG9)	23 G	0.45 (±0.01)	0.39 (±0.02)	0.32 (±0.01)	0.31 (±0.01)
	25 G	0.41 (±0.02)	0.33 (±0.01)	0.31 (±0.01)	0.3 (±0.01)
	27 G	0.31 (±0.01)	0.3 (±0.01)	0.22 (±0.01)	0.21 (±0.01)

실시예 3 (SF87CG13)	23 G	0.41 (± 0.02)	0.4 (± 0.02)	0.3 (± 0.02)	0.25 (± 0.01)
	25 G	0.34 (± 0.01)	0.33 (± 0.01)	0.28 (± 0.01)	0.21
	27 G	0.3 (± 0.01)	0.24 (± 0.01)	0.2 (± 0.01)	NA*

[0158] 상기 표 1 및 도 2에서 “NA” 는 적절한 인쇄물을 만들 수 없는 것을 의미한다.

[0159] 상기 표 1 및 도 2를 참고하면, 본 발명에 따른 3D 프린팅용 잉크 조성물은 카라지난의 농도가 증가될수록(잉크 조성물의 점도가 증가될수록), 니들 사이즈가 작을수록, 프린터 속도가 높을수록 출력되는 선의 두께가 얇아져 프린팅되는 두께의 경향성을 확인할 수 있었다.

[0160] 또한 도 3을 참고하면, 프린팅 속도가 커질수록 출력되는 선의 두께가 얇아 지는 것을 확인할 수 있었다.

[0162] 실험예 3: 3D 프린팅 출력

[0163] 실시예 2 및 비교예 2에서 제조된 잉크 조성물로 3D 프린팅하여 출력된 3D 구조체를 촬영한 이미지를 도 4에 나타내었다.

[0164] 도 4(a)는 비교예 2에서 제조된 잉크 조성물로 3D 프린팅하여 출력된 3D 구조체를 나타낸 이미지이고, 도 4(b) 내지 도 4(d)는 실시예 2에 따라 제조된 제1 혼합물(잉크 조성물)로 3D 프린팅하여 출력된 3D 구조체를 확인하기 위한 이미지이다. 도 5는 도 4(b) 에서 출력된 3D 구조체의 압력에 의한 원형 회복력을 보여줌으로써 구조체의 물성이 우수함을 보여주는 이미지이다.

[0166] 실험예 4: 인장강도 측정

[0167] 실시예 1 내지 3 및 비교예 1에 따라 제조된 잉크 조성물을 테플론 몰드를 사용하여 3D 하이드로겔 구조체(5*20 mm의 직사각형 구조체)를 제조하고, 인장강도를 측정하였다.

[0168] INSTRON 34SC-1 장치를 이용하여, 그립 사이의 거리는 10mm, 크로스 헤드의 속도는 5mm/min으로 인장강도 및 신율을 측정하였으며, 그 결과를 도 5 내지 도 6 및 표 2에 나타내었다.

표 2

	Tensile strain (mm/mm)	Tensile stress (kPa)	Stiffness modulus (kPa)
비교예 1 (SF20)	0.28 (± 0.02)	42.38 (± 1.53)	149.23 (± 7.57)
실시예 1(SF20CG1)	0.26 (± 0.04)	64.72 (± 7.18)	249.03 (± 31.09)
실시예 2(SF20CG2)	0.27 (± 0.03)	66.65 (± 3.10)	251.52 (± 26.18)
실시예 3 (SF20CG3)	0.31 (± 0.06)	58.41 (± 4.38)	193.40 (± 36.05)

[0170] 도 6(a) 를 참고하면, 실크 피브로인만 포함하는 비교예 1(SF20)보다 실크 피브로인 및 카라지난을 포함하는 실시예 1 내지 실시예 3(SF20CG1~SF20CG3)의 인장강도가 더 높은 것을 확인할 수 있었다.

[0171] 또한, 도 6(b) 및 표 2를 참고하면, 실크 피브로인만 포함하는 비교예 1(SF20)보다 실크 피브로인 및 카라지난을 포함하는 실시예 1 내지 실시예 3(SF20CG1~SF20CG3)의 tensile stress 와 stiffness modulus 값이 증가한 것을 알 수 있다.

[0172] 따라서, 3D 프린터를 이용하여, 카라지난의 농도를 조절함으로써 표적 조직의 강성에 따라 다양한 물성을 가지는 3D 구조체 제조가 가능함을 기대할 수 있다.

[0174] 실험예 5: 3D 구조체의 단면 기공 크기 비교

[0175] 실시예 1 내지 3 및 비교예 1에 따라 제조된 잉크 조성물을 3D 프린터를 이용하여 실린더 모양의 3D 하이드로겔 구조체 (11*5 mm의 원기둥 구조체) 를 제조하고 동결건조하여 자른 단면을 주사 전자 현미경(SEM)으로 관찰한

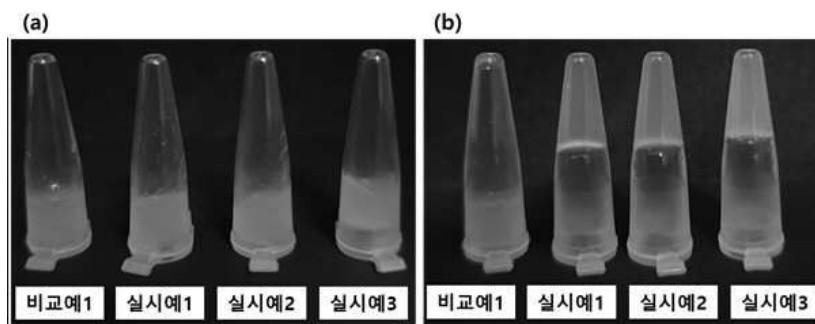
이미지로 기공 크기를 비교하였다.

- [0176] HITACHI S-4300SE 장치를 이용하여 300배율로 관측한 이미지로부터 실시예 1 내지 3 및 비교예 1의 기공크기를 제어 분포도를 도 7에 나타내었다. 평균 기공 크기는 비교예 1에 비해 ($36.1\ \mu\text{m}$) 실시예 1 내지 3 의 것 ($86.7\ \mu\text{m}$ 내지 $90.9\ \mu\text{m}$) 이 크다. 카라지난의 존재가 기공의 크기는 증가시키는 것을 알 수 있다.
- [0177] 3D 세포 지지체가 가지는 기공의 크기 중 동물 세포의 재생에는 $20\ \mu\text{m}$ 내지 $125\ \mu\text{m}$, 유골세포의 내증식에는 $40\ \mu\text{m}$ 내지 $100\ \mu\text{m}$, 뼈의 재생에는 $100\ \mu\text{m}$ 내지 $350\ \mu\text{m}$ 의 기공의 크기가 필요로 하다. 따라서, 전체적인 기공의 크기가 $50\ \mu\text{m}$ 이하인 비교예 1로부터 제작된 3D 하이드로겔 구조체보다 실시예 1 내지 3의 조성물로부터 제작된 3D 하이드로겔 구조체가 세포 지지체로써 사용이 될 때 세포가 살아가는데 보다 더 긍정적인 환경을 제공할 수 있다.
- [0179] 실험예 6: 3D 하이드로겔의 표면 친수성 비교
- [0180] 실시예 1 내지 3 및 비교예 1에 따라 제조된 잉크 조성물을 3D 프린터를 이용하여 실린더 모양의 3D 하이드로겔 구조체 ($11 \times 2\ \text{mm}$ 의 원기둥 구조체)를 제조하고 그 위에 물을 $10\ \mu\text{l}$ 떨어뜨려 컨택트 앵글 실험을 통해 표면 친수성을 도 8에서 나타내었다.
- [0181] 실시예 1 내지 3에 따라 제조된 잉크 조성물로 제작된 3D 하이드로겔 구조체의 컨택트 앵글 (64.6° 내지 75.5°)이 비교예 1에 따라 제조된 잉크 조성물로 제작된 3D 하이드로겔의 컨택트 앵글 (88.2°)보다 작은 값을 가지기 때문에 표면 친수성이 높은 것을 확인할 수 있다. 이는 카라지난이 단위체 당 두개의 황산기를 지니기 때문에 하이드로겔 구조체의 표면 친수성을 증대시킬 것이다.
- [0182]
- [0183] 실험예 7: 3D 세포 지지체로서의 세포 부착 및 생존능 비교
- [0184] 실시예 1 내지 3 및 비교예 1에 따라 제조된 잉크 조성물을 96 well plate 안에 3D 하이드로겔을 제조하고 그 위에 인간 keratinocyte HaCaT 세포를 3일 동안 배양하였다.
- [0185] 세포를 시딩 후 24 시간이 지났을 때의 표면 초기 부착능은 도 9(a)에서, 3일 동안의 세포 생존능은 9(b)에서 나타내었다.
- [0186] 세포의 초기 부착능은 실시예 1 내지 3에서와 비교예 1에서 큰 차이를 보이지 않지만, 배양한지 3일 째에 세포의 분실시예 1 내지 3에서 비교예 1에 비해 최대 37 % 증가한 것을 확인할 수 있다. 따라서 동물세포의 세포막에 존재하는 글라이코사미노글리칸과 유사한 구조를 가지는 카라지난이 함유된 3D 세포 지지체가 세포 성장에 유리할 것임을 확인할 수 다.
- [0188] 실험예 8: 3D 하이드로겔의 생분해속도 비교
- [0189] 실시예 1 내지 3 및 비교예 1에 따라 제조된 잉크 조성물을 3D 프린터를 이용하여 실린더 모양의 3D 하이드로겔 구조체 ($11 \times 5\ \text{mm}$ 의 원기둥 구조체)를 제조하고 생리식염수에 담귀 37°C 에서 배양하면서 생분해속도를 비교한 것을 도 10에 나타내었다.
- [0190] 실시예 1 내지 3에 따라 제조된 잉크 조성물의 3D 하이드로겔 구조체가 비교예 1에 따라 제조된 잉크 조성물의 3D 하이드로겔 구조체보다 3 주 동안 본 형태를 잘 유지하는 것을 확인할 수 있다. 세포 지지체를 대체하는 세포가 성장하는 속도에 맞춰 세포 지지체로써의 안정성이 향상됨을 확인할 수 있다.
- [0192] 실험예 9: 3D 복합 하이드로겔의 제조
- [0193] 실시예 1 및 실시예 4에 따라 제조된 잉크 조성물을 테플론 몰드를 사용하여 3D 복합 하이드로겔 구조체($5 \times 20\ \text{mm}$ 의 직사각형 구조체)를 제조하는 과정을 도 11(a)에 나타내었다.
- [0194] 실시예 1 및 실시예 4는 복합 구조체를 이룰 때 흐트러짐 없이 안정한 하이브리드 하이드로겔로의 형태를 유지하는 것을 도 11(b) 내지 도 11(g)을 통해 알 수 있다.

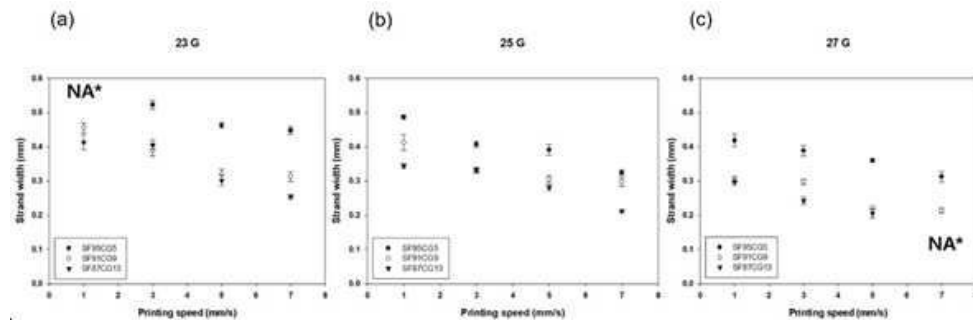
- [0196] 실험예 10: 4D 복합 하이드로겔의 제조
- [0197] 실시예 5 및 비교예 3에 따라 제조된 4D 복합 하이드로겔 구조를 도 12에 나타내었다.
- [0198] 상기 실시예 3로 이루어진 하나의 층을 이루는 조성물에 청색광 빛을 조사하여 제조한 3D 하이드로겔과 실시예 4로 이루어진 하나의 층을 이루는 조성물에 자외선을 조사하여 제조한 3D 하이드로겔을 융합하여 복합 3D 하이드로겔을 제작하였다. 이 복합 3D 하이드로겔을 37 °C 생리식염수에 2시간 하여 4D 하이드로겔로 유도됨을 도 12(a)를 통해 확인되었다.
- [0200] 상기 실시예 1로 이루어진 하나의 층을 이루는 조성물에 청색광 빛을 조사하여 제조한 3D 하이드로겔과 실시예 3로 이루어진 하나의 층을 이루는 조성물에 청색광을 조사하여 제조한 3D 하이드로겔을 융합하여 복합 3D 하이드로겔을 제작하였다. 이 복합 3D 하이드로겔을 37 °C 생리식염수에 2시간 하여 4D 하이드로겔로 유도됨을 도 12(b)를 통해 나타내었다.
- [0201] 따라서, 비교예 3에 따라 제조된 4D 구조체로의 형태 변화보다 실시예 5에 따라 제조된 4D 구조체로의 형태 변화가 더 큰 것을 도 12(a) 와 도 12(b) 비교를 통해 확인하였다. 이로부터 4D 구조체를 제조할 때, 실시예 1 내지 3 에 따라 제조된 잉크의 조성물 내에서 혼합하여 복합 4D하이드로겔을 제조하는 것보다 실시예 4에 따라 제조된 잉크 조성물의 추가로 사용하여 실시예 1 내지 3에 따라 제조된 잉크의 조성물 중 하나와 함께 복합 4D 하이드로겔을 제작하는 효과가 더 우수하다.
- [0203] 지금까지 본 발명에 따른 4D 프린팅용 잉크 조성물의 제조방법 및 이에 따라 제조된 4D 프린팅용 잉크 조성물에 관한 구체적인 실시예에 관하여 설명하였으나, 본 발명의 범위에서 벗어나지 않는 한도 내에서는 여러 가지 실시 변형이 가능한 자명하다.
- [0204] 그러므로 본 발명의 범위는 설명된 실시예에 국한되어 정해져서는 안 되며, 후술하는 특허청구범위뿐만 아니라 이 특허청구범위와 균등한 것들에 의해 정해져야 한다.
- [0205] 즉, 전술된 실시예는 모든 면에서 예시적인 것이며, 한정적인 것이 아닌 것으로 이해되어야 하며, 본 발명의 범위는 상세한 설명보다는 후술될 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 그 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등과 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

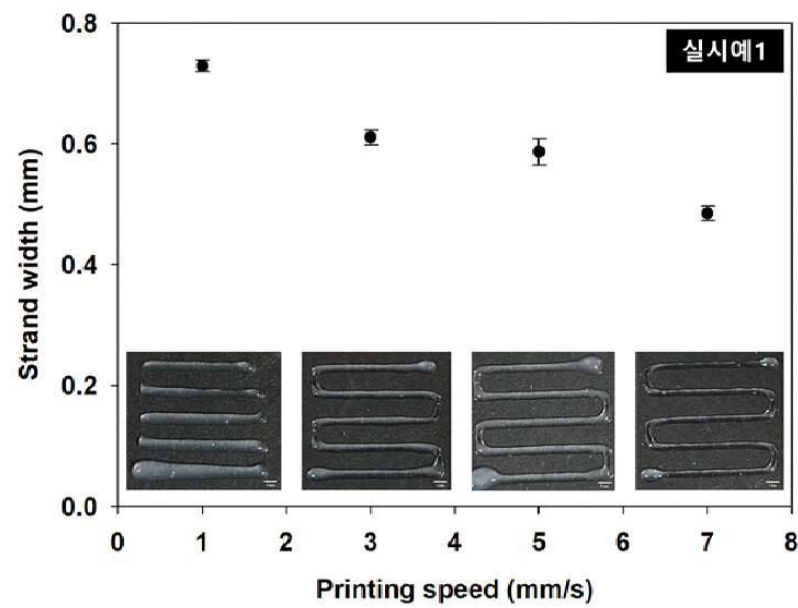
도면1



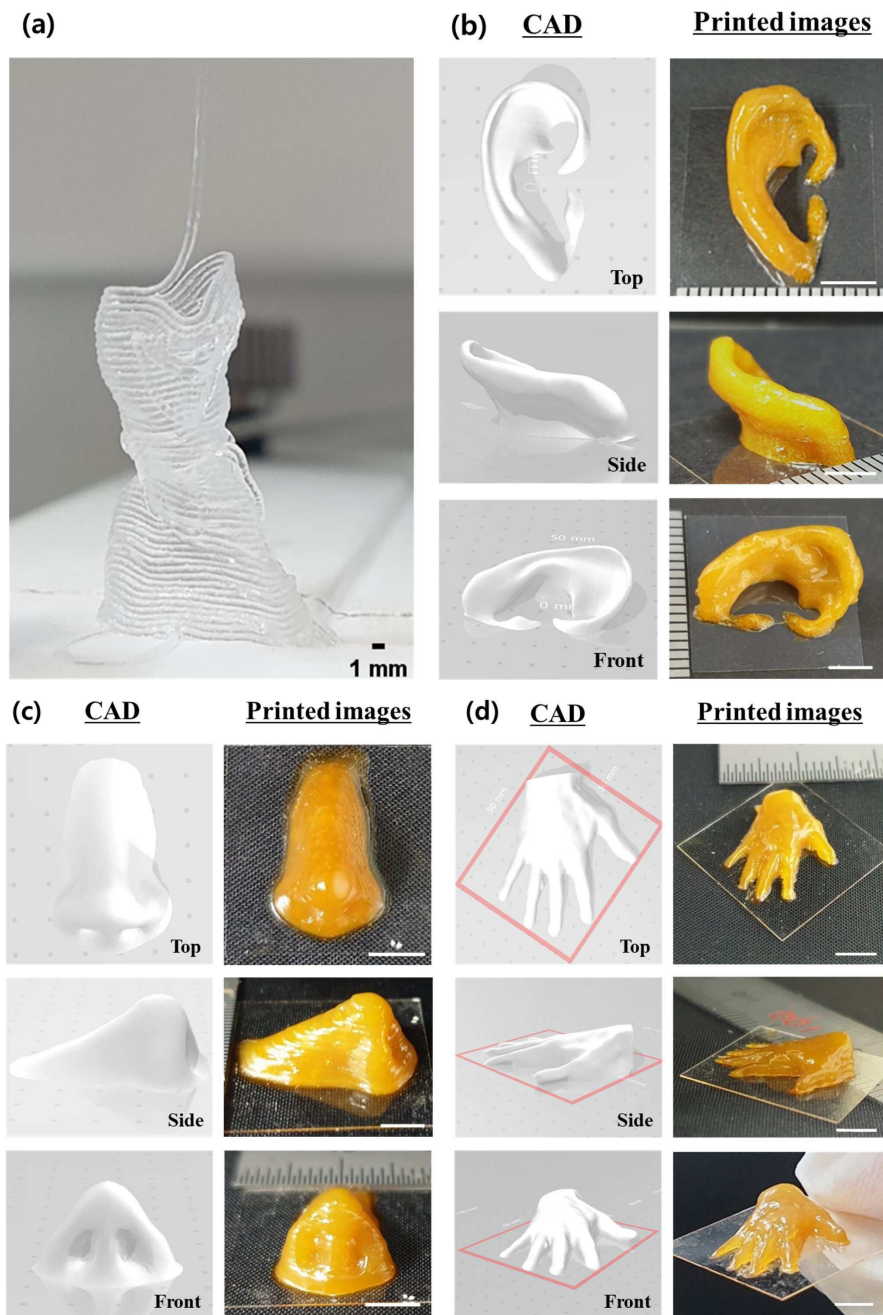
도면2



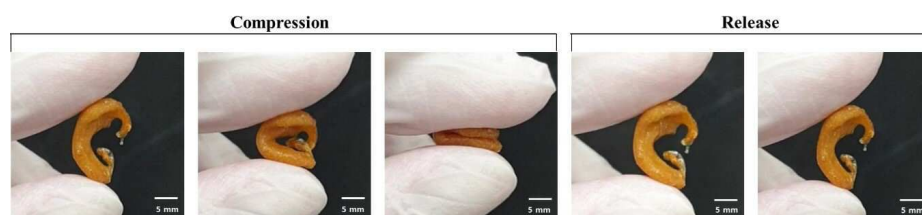
도면3



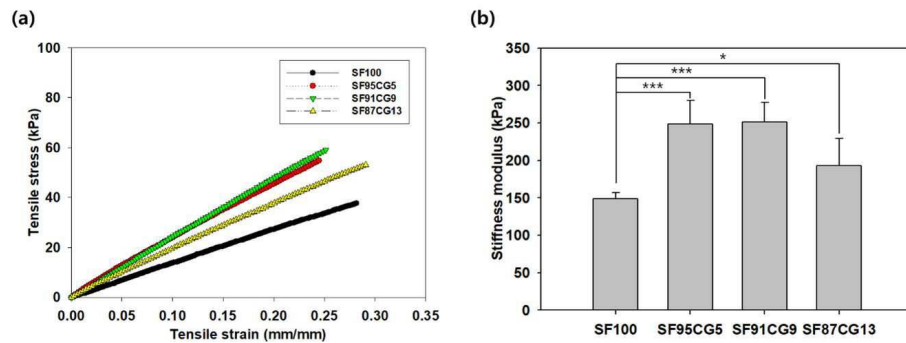
도면4



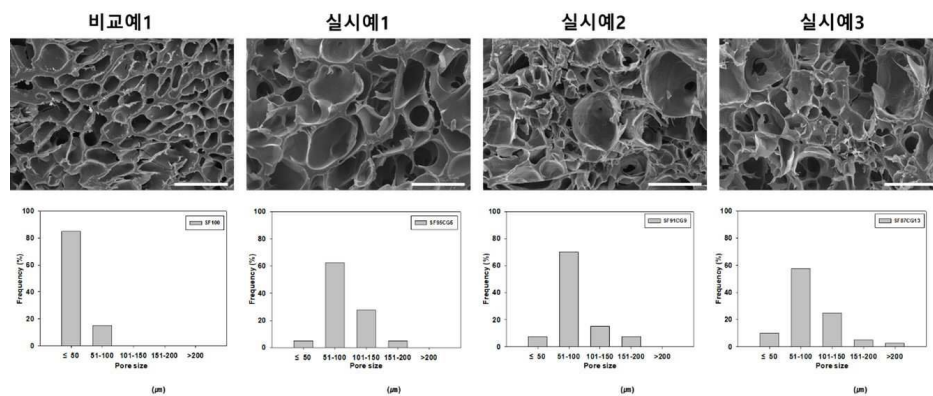
도면5



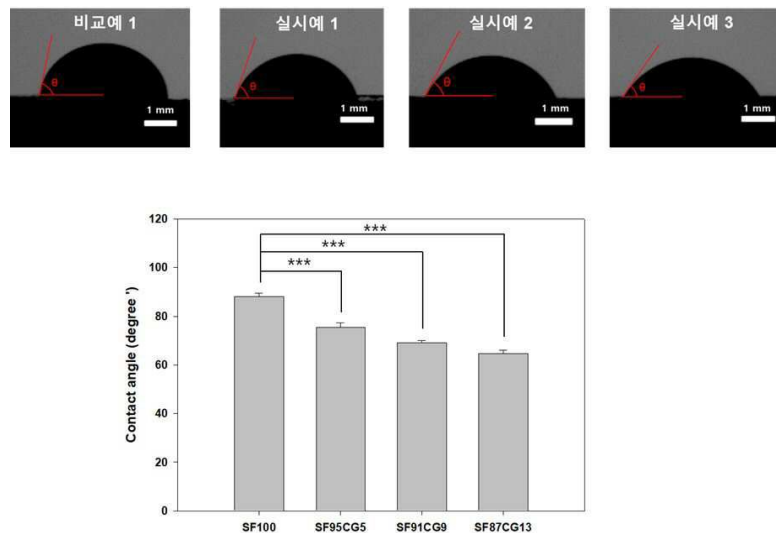
도면6



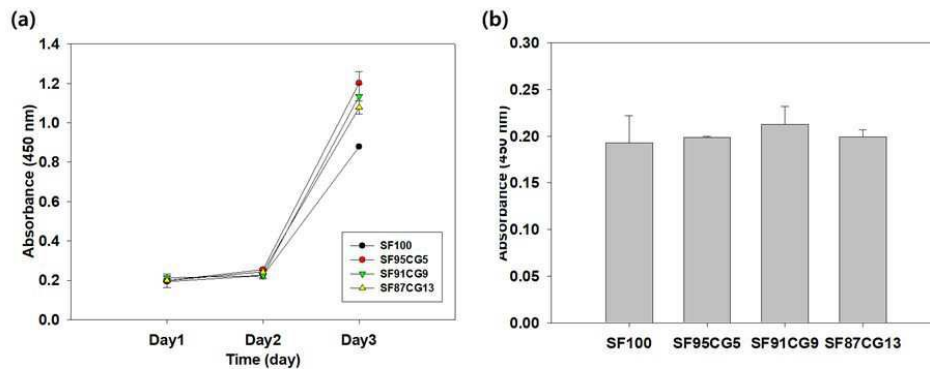
도면7



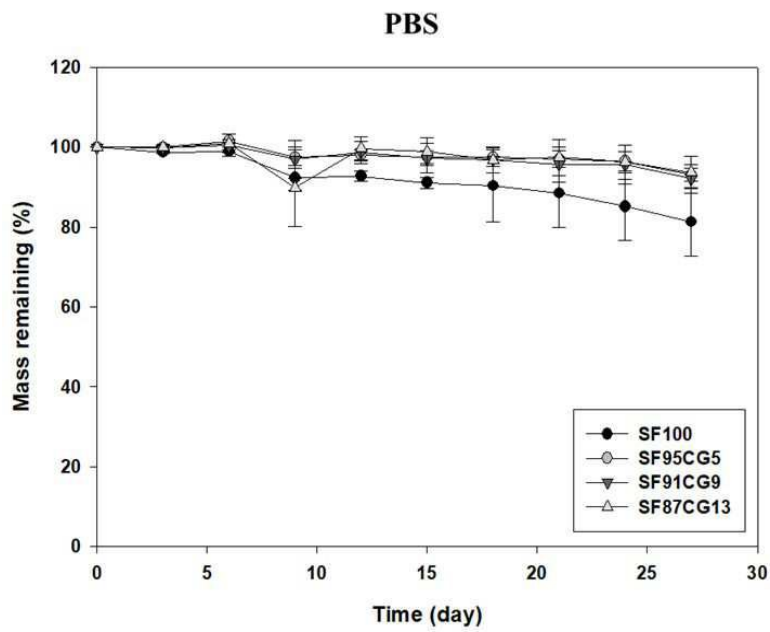
도면8



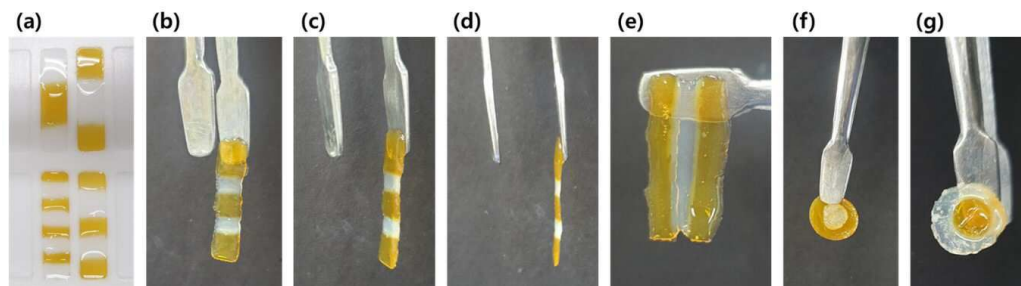
도면9



도면10



도면11



도면12

