



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0167117
(43) 공개일자 2024년11월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61L 27/22 (2006.01) B33Y 80/00 (2015.01)
C07K 14/435 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61L 27/22 (2013.01)
B33Y 80/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0064723

(22) 출원일자 2023년05월19일

심사청구일자 2023년05월19일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

박찬흠

강원도 춘천시 방송길 70, 107동 3701호 (온의동,
온의 롯데캐슬 스카이크래스)

김순희

강원도 춘천시 서부대성로 34, 105동 104호 (요선
동, 한신희플러스아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인(유)화우

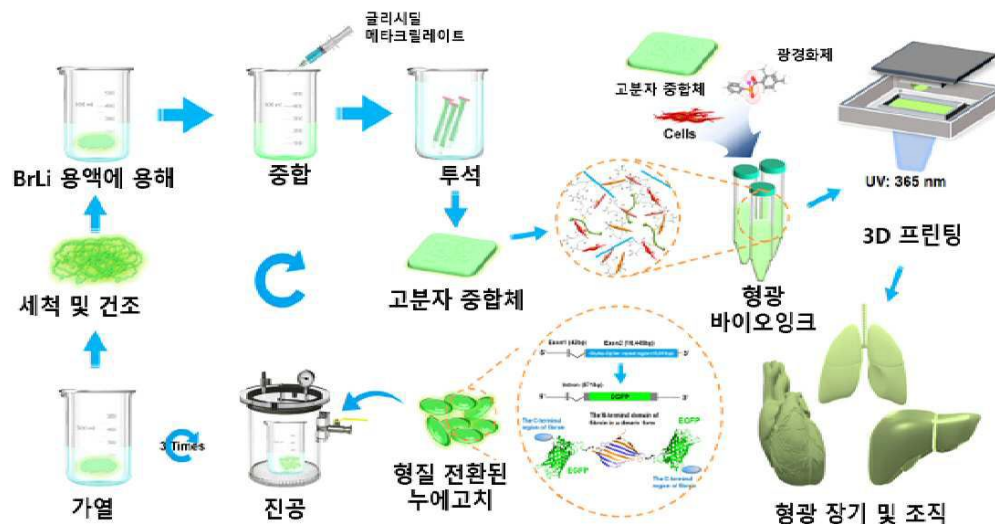
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **형광 바이오잉크의 제조방법 및 이에 따라 제조된 형광 실크 피브로인을 포함하는 바이오잉크**

(57) 요약

본 발명은, 형질 전환된 누에고치로부터 세리신 단백질 및 불순물을 제거하여 형광 실크 피브로인을 수득하는 제1 단계; 상기 형광 실크 피브로인과 브롬화리튬 용액을 혼합하여 형광 실크 피브로인 용액을 제조하는 제2 단계; 상기 형광 실크 피브로인 용액과 글리시딜메타크릴레이트를 혼합하여 중합체 조성물을 제조하는 제3 단계; 상기 중합체 조성물을 물에서 투석하여 불순물을 제거하는 제4 단계; 상기 제4 단계에서 불순물이 제거된 중합체 조성물을 건조하여 건조 중합체를 제조하는 제5 단계; 및 상기 건조 중합체, 광개시제 및 용매를 혼합하여 형광 바이오잉크를 제조하는 제6 단계;를 포함하는, 바이오잉크의 제조방법 및 이에 따라 제조된 형광 바이오잉크에 관한 것으로, 세포 적합성 및 기계적 특성이 향상된 형광 바이오잉크 및 형광 바이오 구조체를 제공할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 14/43586 (2013.01)

(72) 발명자

이지승

경기도 부천시 조종로85번길 31, 2층 201호 (원미동, 공원빌라)

이영진

충청남도 서산시 성연면 성연3로 36, 510동 201호 (이안 서산테크노밸리)

이옥주

강원도 춘천시 동면 춘천로449번길 26-6, 302호

이한나

강원도 춘천시 춘천로281번길 6, 가동 201호 (후평동)

올라튼지 아지테루

강원도 춘천시 봉의산길22번길 15-1 (봉의동)

이중섭

경기도 성남시 중원구 성남대로 1000, 318동 1401호 (여수동, 센트럴타운)

최규영

서울특별시 중구 다산로32길 13, 5동 1503호 (신당동, 남산타운아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711114252
과제번호	2020R1A2C3010040
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	하이브리드 3D 프린팅 미세혈관 기반 실시간 모니터링 종양 전이 칩 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한림대학교산학협력단
연구기간	2020.03.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

형질 전환된 누에고치로부터 세리신 단백질을 제거하여 형광 실크 피브로인을 수득하는 제1 단계;
상기 형광 실크 피브로인과 브롬화리튬 용액을 혼합하여 형광 실크 피브로인 용액을 제조하는 제2 단계;
상기 형광 실크 피브로인 용액과 글리시딜메타크릴레이트를 혼합하여 중합체 조성물을 제조하는 제3 단계;
상기 중합체 조성물을 물에서 투석하여 불순물을 제거하는 제4 단계;
상기 제4 단계에서 불순물이 제거된 중합체 조성물을 건조하여 건조 중합체를 제조하는 제5 단계; 및
상기 건조 중합체, 광개시제 및 용매를 혼합하여 형광 바이오잉크를 제조하는 제6 단계;를 포함하는, 형광 바이오잉크의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 제1 단계는,
탄산수소나트륨과 알칼레이즈(alcalase)가 포함된 수용액에 형질 전환된 누에고치를 투입하고 30~60℃에서 8~48 시간 동안 가열하는 가열 단계; 및
상기 가열 단계를 통해 얻어진 형광 실크 피브로인을 세척한 뒤 건조하는 건조 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는, 형광 바이오잉크의 제조방법.

청구항 3

제2항에 있어서,
상기 가열 단계에서 적어도 1회 이상 진공이 가해지는 것을 특징으로 하는, 형광 바이오잉크의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,
상기 제2 단계는,
형광 실크 피브로인을 브롬화리튬 용액에 0.05~0.35 g/ml의 농도로 혼합하여 용해시키는 단계인 것을 특징으로 하는, 형광 바이오잉크의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서,
상기 제2 단계에서 혼합은 30~60℃에서 2~5시간 동안 교반하여 수행되는 것을 특징으로 하는, 형광 바이오잉크의 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 제3 단계는,

형광 실크 피브로인 용액에 글리시딜메타크릴레이트를 141~705 mM 농도로 혼합하는 단계인 것을 특징으로 하는, 형광 바이오잉크의 제조방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 제3 단계에서 혼합은 30~60℃에서 3~8시간 동안 500~1,500 rpm의 속도로 교반하여 수행되는 것을 특징으로 하는, 형광 바이오잉크의 제조방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 제3 단계와 제4 단계 사이에,

중합체 조성물을 필터로 여과하는 단계가 추가로 더 수행되는 것을 특징으로 하는, 형광 바이오잉크의 제조방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 제4 단계는,

중합체 조성물을 투석튜브에 넣고, 물에 2~6일간 침지시켜 불순물을 제거하는 것을 특징으로 하는, 형광 바이오잉크의 제조방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 제5 단계는,

중합체 조성물을 동결건조하는 단계를 포함하는, 형광 바이오잉크의 제조방법.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 제6 단계는,

건조 중합체 5~40 %(w/v), 광개시제 0.05~0.7 %(w/v) 및 잔량의 용매를 혼합하는 단계인 것을 특징으로 하는, 형광 바이오잉크의 제조방법.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 광개시제는 리튬 페닐-2,4,6-트리메틸벤조일포스피네이트(lithium phenyl-(2,4,6-trimethyl benzoyl) phosphinate, LAP), 벤질디메틸케탈(benzyl dimethyl ketal), 아세토페논(acetophenone), 벤조인메틸에테르(benzoin methyl ether), 디에톡시아세토페논(diethoxyacetophenone), 벤조일 포스핀 옥사이드(benzoyl phosphine oxide) 및 1-하이드록시사이클로헥실 페닐 케톤(1-hydroxycyclohexyl phenyl ketone)으로 이루어진 군 중에서 선택된 적어도 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는, 형광 바이오잉크의 제조방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 형광 바이오잉크.

청구항 14

제13항의 형광 바이오잉크를 3D 프린팅으로 인쇄하여 제조된 형광 바이오 구조체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 형광 바이오잉크의 제조방법 및 이에 따라 제조된 형광 실크 피브로인을 포함하는 바이오잉크에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 형질 전환 누에고치로부터 수득된 형광 실크 피브로인을 포함하여, 형광을 유지하면서 광경화 특성을 가지고, 세포 적합성 및 기계적 특성을 향상시킨 형광 바이오잉크의 제조방법 및 이에 따라 제조된 형광 바이오잉크에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 바이오잉크는 현탁 세포를 3D 바이오 프린팅 공정에 사용하기 위한 생체 재료로, 세포, 사이토카인 또는 세포 대체물을 생체 적합성 고분자 재료와 조합하여 얻어지며 3D 프린팅을 통해 원하는 형태와 크기로 제조할 수 있어 다양한 손상 부위에 적용 가능한 장점이 있다.

[0004] 이러한 바이오잉크는 생체에 적용되기 때문에 생체적합성이 우수한 고분자 재료를 기반으로 하는데, 예를 들어, 젤라틴, 피브린, 키토산, 콜라겐, 알지네이트, 히알루론산과 같은 천연 고분자나 폴리카프로락톤(PCL), 폴리에틸렌글리콜(PEG) 및 폴리락트산과 같은 합성 고분자 등이 사용될 수 있다.

[0005] 생체적합성 천연 고분자로 누에 고치에서 얻어진 실크 피브로인(SF)의 사용이 대두되었는데, 실크 피브로인은 생체적합성이 우수하고, 저렴하며, 기계적 특성 및 분해 특성이 용이하게 제어 가능하므로 상처 드레싱, 혈관 보철물 및 인공장기 이식 등의 분야에서의 사용이 급부상하고 있으며, 의학 연구에서의 활용 또한 활발하게 이루어지고 있다.

[0006] 실크 피브로인을 다양한 조직공학물로 제작하기 위해서는 재생 실크 피브로인 용액(regenerated silk fibroin)으로 제작하는 과정이 포함되며, DLP(digital light processing) 방식의 프린터와 같은 광경화성 바이오 프린터에 적용하기 위하여 이 재생 실크 피브로인 용액에 광경화 그룹을 도입(silk fibroin metacrylates)하는 단계가 필요하다.

[0007] 최근에는 GFP(green fluorescent protein) 형질 전환 누에고치에서 수득한 형광 실크 피브로인을 이용하여 용액, 필름, 나노막 등의 다양한 조직 공학물을 제작하는 기술이 개발되었고, 이를 이용하여 세포 이동을 추적하거나 동물에 이식한 뒤 이식 재료를 모니터링 하는 수단으로 사용되는 등 사용 범위가 확대되고 있다.

[0008] 그러나, 형질 전환 누에고치를 이용한 광경화성 바이오잉크는 개발된 바 없으며, 바이오잉크가 아니더라도 기존의 방법으로 형광 실크 피브로인에 광경화 사이트를 도입하면 형광이 현저히 약해지기 때문에 생산이나 활용에 제한이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) 등록특허 제10-1640499호(2016.07.12 등록)
(특허문헌 0002) 등록특허 제10-1983741호(2019.05.23 등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명에서는 형질 전환 누에고치로부터 수득된 형광 실크 피브로인을 포함하여, 형광 발현을 유지하면서 빛에 가교되고, 형광 실크 피브로인의 정련과정 및 광 가교 물질을 결합시키는 과정에서 소실될 수 있는 형광이 최소화되며, 세포 적합성 및 기계적 특성을 향상시킨 형광 바이오잉크의 제조방법 및 이에 따라 제조된 형광 바이오잉크를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상술한 바와 같은 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 실시예는, 형질 전환된 누에고치로부터 세리신 단백질 및 불순물을 제거하여 형광 실크 피브로인을 수득하는 제1 단계; 상기 형광 실크 피브로인과 브롬화리튬 용액을 혼합하여 형광 실크 피브로인 용액을 제조하는 제2 단계; 상기 형광 실크 피브로인 용액과 글리시딜메타크릴레이트를 혼합하여 중합체 조성물을 제조하는 제3 단계; 상기 중합체 조성물을 물에서 투석하여 불순물을 제거하는 제4 단계; 상기 제4 단계에서 불순물이 제거된 중합체 조성물을 건조하여 건조 중합체를 제조하는 제5 단계; 및 상기 건조 중합체, 광개시제 및 용매를 혼합하여 형광 바이오잉크를 제조하는 제6 단계;를 포함하는, 형광 바이오잉크의 제조방법에 관한 것이다.
- [0014] 상기 제1 단계는, 탄산수소나트륨과 알칼레이즈(alcalase)가 포함된 수용액에 형질 전환된 누에고치를 투입하고 30~60℃에서 8~48시간 동안 가열하는 가열 단계; 및 상기 가열 단계를 통해 얻어진 형광 실크 피브로인을 세척한 뒤 건조하는 건조 단계;를 포함할 수 있다.
- [0015] 상기 가열 단계는 상압에서 수행될 수 있으며, 상압 가열 과정 중에 반응기 내 압력을 낮추는 감압 가열 단계가 적어도 1회 이상 포함하는 것이 더욱 바람직하다.
- [0016] 상기 제2 단계는, 형광 실크 피브로인을 브롬화리튬 용액에 0.05~0.35 g/ml의 농도로 혼합하여 용해시키는 단계일 수 있다.
- [0017] 상기 제2 단계에서 혼합은 30~60℃에서 2~5시간 동안 교반하여 수행될 수 있다.
- [0018] 상기 제3 단계는, 형광 실크 피브로인 용액에 글리시딜메타크릴레이트를 141~705 mM 농도로 혼합하는 단계일 수 있다.
- [0019] 상기 제3 단계에서 혼합은 30~60℃에서 3~8시간 동안 500~1,500 rpm의 속도로 교반하여 수행될 수 있다.
- [0020] 상기 제3 단계와 제4 단계 사이에, 중합체 조성물을 필터로 여과하는 단계가 추가로 더 수행될 수 있다.
- [0021] 상기 제4 단계는, 중합체 조성물을 투석튜브에 넣고, 물에 2~6일간 침지시켜 불순물을 제거하는 것일 수 있다.
- [0022] 상기 제5 단계는, 중합체 조성물을 동결건조하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0023] 상기 제6 단계는, 건조 중합체 5~40 % (w/v), 광개시제 0.05~0.7 % (w/v) 및 잔량의 용매를 혼합하는 단계일 수 있다.
- [0024] 상기 광개시제는 리튬 페닐-2,4,6-트리메틸벤조일포스피네이트(lithium phenyl-(2,4,6-trimethyl benzoyl) phosphinate, LAP), 벤질디메틸케탈(benzyl dimethyl ketal), 아세토페논(acetophenone), 벤조인메틸에테르(benzoin methyl ether), 디에톡시아세토페논(diethoxyacetophenone), 벤조일 포스핀 옥사이드(benzoyl phosphine oxide) 및 1-하이드록시사이클로헥실 페닐 케톤(1-hydroxycyclohexyl phenyl ketone)으로 이루어진

군 중에서 선택된 적어도 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0025] 본 발명의 다른 실시예는 본 발명의 일 실시예에 따른 방법으로 제조된 형광 바이오잉크에 관한 것이고, 또 다른 실시예는 이를 3D 프린팅으로 인쇄하여 제조된 형광 바이오 구조체에 관한 것이다.

발명의 효과

[0027] 본 발명의 형광 바이오잉크 제조방법에 따라 제조된 형광 바이오잉크는 형광 특성이 있어 의학 연구에서 세포, 조직, 기관 등의 관찰을 보다 용이하게 할 수 있다.

[0028] 또한, 실크 피브로인을 정련하거나, 실크 피브로인에 광 가교 물질을 결합시키는 과정에서의 형광 소실이 최소화 또는 방지되어, 형광 발현이 잘 유지되면서도 광 가교 특성이 도입되어 바이오잉크를 비롯한 다양한 소재로써 응용될 수 있는 장점이 있다.

[0029] 또한, 형광 바이오잉크를 사용하여 제조된 하이드로젤의 형광 특성이 체내에서도 약 8주 이상 지속되는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 일 실시예에 따른 형광 바이오잉크를 이용하여 장기나 조직을 제조하는 과정을 도식화한 것이다.

도 2는 형질 전환 누에고치(EGFP)와 실크 누에고치(B. mori)의 형광 현미경 사진이다.

도 3은 실험예 2에서 각 샘플을 형광 현미경으로 촬영한 사진이다.

도 4(i) 및 4(ii)는 형광 스펙트럼 측정 결과이다.

도 5는 진공 여부에 따른 형광 실크 피브로인의 사진이다.

도 6은 각 샘플을 핵자기공명 분광법으로 분석한 스펙트럼이다.

도 7(a) 및 7(b)는 각 바이오잉크로 제조된 하이드로젤의 압축 강도 및 인장 강도 측정 결과이다.

도 8(A)는 인공 장기의 CAD 설계 도면이고, 8(B)~8(D)는 실시예 1의 바이오잉크를 이용하여 3D 프린팅 된 각종 인공 장기의 사진이다.

도 9는 바이오잉크 내에서의 세포 증식 실험 결과를 형광 현미경으로 촬영한 사진이다.

도 10은 체외세포 증식 실험 결과를 형광 현미경으로 촬영한 사진이다.

도 11은 체내세포 증식 실험 결과를 형광 현미경으로 촬영한 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 통해 상세히 설명하기에 앞서, 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정하여 해석되어서는 아니 되며, 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야 함을 밝혀둔다.

[0033] 본 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 “포함” 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0034] 본 명세서 전체에서, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 “%”는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량)%, 고체/액체는 (중량/부피)%, 그리고 액체/액체는 (부피/부피)% 를 의미한다.

[0035] 각 단계들에 있어 식별부호는 설명의 편의를 위하여 사용되는 것으로 식별부호는 각 단계들의 순서를 설명하는 것이 아니며, 각 단계들은 문맥상 명백하게 특정 순서를 기재하지 않는 이상 명기된 순서와 다르게 실시될 수 있다. 즉, 각 단계들은 명기된 순서와 동일하게 실시될 수도 있고 실질적으로 동시에 실시될 수도 있으며 반대의 순서대로 실시될 수도 있다.

[0036] 이하에서는, 본 발명의 실시예를 살펴본다. 그러나 본 발명의 범주가 이하의 바람직한 실시예에 한정되는 것은

아니며, 당업자라면 본 발명의 권리범위 내에서 본 명세서에 기재된 내용의 여러 가지 변형된 형태를 실시할 수 있다.

- [0037] 본 발명은 형광 바이오잉크의 제조방법 및 이에 따라 제조된 형광 바이오잉크에 관한 것이다.
- [0038] 본 발명의 바이오 잉크는 다양한 방식의 3D 프린터에 적용되어 사용될 수 있다. 예를 들어, DLP(digital light processing) 방식의 3D 프린터를 적용하여 사용될 수 있다.
- [0039] DLP 방식의 3D 프린터는 마스크 투영 이미지 경화 방식으로 구조체를 제조하는 장치이다. 여기서, DLP 방식은 일반적으로 액체 상태의 광경화성 수지가 담긴 수조에 빔 프로젝터를 사용하여 조형하고자 하는 형상으로 빛을 투사하고, 투사한 형상으로 수지를 경화시켜 적층하는 방식으로 구조체를 제조하는 3D 프린팅 방식이다. 이와 같은 DLP 방식의 3D 프린팅 기술은 빔 프로젝터에서 나오는 이미지를 마스크 단위(2D)로 투사하기 때문에 지지대와 같은 별도의 부재료 없이도 출력이 가능할 뿐만 아니라 표면 조도가 우수하고 프린팅 과정 중 소음이 발생되지 않는 장점이 있다.
- [0040] 특히 DLP 방식의 3D 프린팅의 경우 액체 상태의 수지를 잉크로 사용하여 면 단위 조형방식을 통해 구조체가 성형됨으로서 작업 속도가 균일하고 빠른 속도로 조형할 수 있어 세포의 손상률이 저하될 수 있다. 또한, 세포 적합성이 우수하고, 매우 세밀한 표면 조도를 갖는 정밀한 구조체를 프린팅할 수 있어, 3D 바이오 프린팅 방식에 적용시 착용감이 우수한 개인별 맞춤 보형물을 제조할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 형광 바이오잉크는 피브로인(fibroin), 그 중에서도 누에고치에서 수득할 수 있는 실크 피브로인(silk fibroin)을 베이스로 하여 제조된 고분자 중합체를 포함한다.
- [0042] 피브로인은, 가교 결합을 빠르게 형성하여 우수한 기계적 특성을 유지할 수 있고, 하이드로겔로 형성시 안정성이 우수하며, 세포가 프린팅 된 이후에 세포의 부착 및 분화에 적합한 미세환경을 조성할 수 있는 장점이 있다. 뿐만 아니라, 세포 적합성이 우수하고, 프린팅 후 압축 강도, 인장강도 및 저장 탄성률이 뛰어나며, DLP 방식의 3D 프린터에도 적용할 수 있다.
- [0043] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오잉크의 제조방법 및 이에 따라 제조된 바이오잉크를 이용하여 형광을 띠는 장기나 조직을 제조하는 과정을 도식화한 것이다.
- [0044] 본 발명의 일 실시예에 따른 형광 바이오잉크의 제조방법은 형질 전환된 누에고치로부터 세리신 단백질 및 불순물을 제거하여 형광 실크 피브로인을 수득하는 제1 단계; 상기 형광 실크 피브로인과 브롬화리튬 용액을 혼합하여 형광 실크 피브로인 용액을 제조하는 제2 단계; 상기 형광 실크 피브로인 용액과 글리시딜메타크릴레이트를 혼합하여 중합체 조성물을 제조하는 제3 단계; 상기 중합체 조성물을 물에서 투석하여 불순물을 제거하는 제4 단계; 상기 제4 단계에서 불순물이 제거된 중합체 조성물을 건조하여 건조 중합체를 제조하는 제5 단계; 및 상기 건조 중합체, 광개시제 및 용매를 혼합하여 형광 바이오잉크를 제조하는 제6 단계;를 포함한다.
- [0045] 본 발명의 일 실시예 따르면, 실크 피브로인을 정련하거나, 실크 피브로인에 광 가교 물질을 결합시키는 과정에서 형광 소실이 최소화 또는 방지되어, 형광 발현이 잘 유지되면서도 광 가교 특성이 도입되어 바이오잉크 및 다양한 소재로써 응용될 수 있는 장점이 있다.
- [0046] 상기 제1 단계는 형질 전환된 누에고치로부터 세리신 단백질 및 불순물을 제거하여 형광 실크 피브로인을 수득하는 단계이다.
- [0047] 상기 형질 전환된 누에고치는 복미산 해파리의 녹색 형광 유전자를 건사의 주성분인 피브로인 유전자에 삽입한 후, 이를 미세주사장치로 누에알에 주입해 만든 것일 수 있다. 본 발명에서는 "GFP(green fluorescent protein) 형질 전환 누에고치"라 한다. 이러한 형질 전환 누에에서 뽑은 녹색 형광 실크는 특정 파장의 빛을 비추면 어둠 속에서 영롱한 녹색 형광을 나타내며, 자연광에서도 옅은 녹색을 띤다. 또한 정련을 해도 녹색형광이 그대로 유지되고, 이러한 녹색 형광 유전자는 다음 세대까지 전달되는 특징이 있다.
- [0048] 본 단계는 누에고치에서 실크 피브로인 외의 다른 성분들을 제거하여 실크 피브로인을 수득하기 위해 수행되는 단계로, 탄산수소나트륨과 알칼레이즈(alcalase)가 포함된 수용액에 형질 전환된 누에고치를 투입하고 30~60℃에서 8~48시간 동안 가열하는 가열 단계; 및 상기 가열 단계를 통해 얻어진 형광 실크 피브로인을 세척한 뒤 건조하는 건조 단계;를 포함한다.
- [0049] 상기 가열 단계는 정련제로써 탄산수소나트륨과 알칼레이즈가 포함된 수용액에 누에고치를 투입하고 가열하는 단계로, 알칼레이즈의 활성화에 의해 세리신 단백질이 제거되고, 다른 불순물들이 함께 제거될 수 있으며, 탄산수

소나트륨은 이러한 작용이 보다 낮은 온도에서도 효과적으로 일어나도록 돕는 기능을 수행한다.

- [0050] 이 단계에서 사용되는 알칼레이스로 예를 들어 엔도캡티테이스(endopeptidase)가 사용될 수 있다.
- [0051] 정련제 용액, 즉 탄산수소소나트륨과 알칼레이즈가 포함된 수용액에 알칼레이즈는 0.5~5.0 mL/L의 농도로, 탄산수소소나트륨은 0.03~0.1 M의 농도로 포함될 수 있다.
- [0052] 상기 가열 단계에서 가열은 누에고치를 정련제 용액에 침지시킨 뒤 30~60℃에서 8~48시간 동안 가열하여 수행될 수 있다. 이때, 가열 온도가 너무 낮은 경우에는 알칼레이즈의 활성화가 이루어지지 않아 세리신 단백질을 제거가 원활하지 않고, 가열 온도가 너무 높은 경우에는 형광 단백질의 변성이 일어날 수 있으므로, 상술한 온도 범위에서 가열이 수행되는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 40~50℃에서 수행되는 것이 좋다.
- [0053] 또한, 가열 시간이 상기 범위 미만이면 세리신 단백질이 완전히 제거되지 않을 수 있고, 상기 범위를 초과하면 형광 단백질이 변성될 수 있으므로, 상술한 시간동안 가열이 이루어지는 것이 바람직하며, 이러한 부작용을 더욱 효과적으로 방지하기 위해 8~36시간, 나아가서는 8~24시간 동안 가열이 이루어지는 것이 바람직하다.
- [0054] 이와 같이 가열 단계에서는 효소의 활성화를 위해 열을 가하는 작업이 이루어지는데, 고온에서의 작업이 지속되면 형광 단백질이 손상되는 문제가 있어, 본 발명에서는 상대적으로 낮은 온도에서 작업을 진행한다. 따라서, 세리신 단백질 및 각종 불순물의 제거가 완전히 이루어지지 않는 단점이 있는데, 가열 단계 중 진공을 가해주면 정련제 용액이 누에고치에 보다 깊숙하고 균일하게 침투되어 세리신 단백질 제거 효율이 향상되므로, 상술한 문제가 보완되어 세리신 단백질 및 각종 불순물이 완전히 제거되는 효과를 얻을 수 있다.
- [0055] 따라서, 가열 단계에서 적어도 1회 이상 감압 조건이 유지되는 것이 바람직하며, 이 때 가해주는 압력은 1.0×10^{-5} torr(gauge pressure) 이하인 것이 바람직한데, 압력이 이러한 범위 내일 때 효소 활성을 효과적으로 향상시킬 수 있는 장점이 있기 때문이다.
- [0056] 또한, 감압조건이 유지되는 시간은 3~5분인 것이 바람직하다. 진공이 가해지는 시간이 상기 범위 미만인 경우에는 세리신 단백질 및 불순물 제거 효율 향상 효과가 미미하고, 상기 범위를 초과하는 경우에는 실크 피브로인의 분자가 파괴되고 소실되어 형광이 사라지는 문제가 발생하기 때문이다.
- [0057] 여기서의 시간은 진공압이 가해지는 시간의 총 합이 아니라, 진공압이 가해지는 각 회차별 시간으로, 예를 들어, 진공압이 3회 가해지는 경우, 각 회차별로 상술한 시간 동안 진공압이 가해진다는 것을 의미한다.
- [0058] 또한, 가열 단계 중 단속적으로 진공이 가해지지 않고 지속적으로 진공이 가해지는 경우에는 단순히 세리신 단백질 제거 효율이 향상되는 것이 아니라, 재료 자체의 물리적 특성 및 분자 구조의 변화로 인한 생산품 품질 저하나 불량 발생할 수 있으므로, 이와 같이 가열 중 감압 조건은 단속적으로 가해지는 것이 바람직하다.
- [0059] 가열 단계에서 진공은 적어도 1회 이상 가해지는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 3~5회에 걸쳐 가해질 수 있다. 이와 같이 진공압을 다회에 걸쳐서 가해주면 더욱 균일한 효소작용이 일어나, 세리신 단백질의 제거 효율이 향상될 수 있기 때문이다. 또한, 진공이 가해지는 횟수가 5회를 초과하는 경우에는 분자 구조의 변화 및 이에 따른 재료의 물리적 특성 변화로 인해 생산품의 품질이 불량해질 수 있으므로, 상술한 횟수로 진공이 가해지는 것이 바람직하다.
- [0060] 진공이 다회에 걸쳐서 수행될 경우에 각 회차는 균일한 간격으로 수행될 수 있고, 또는 불균일한 간격으로 수행될 수도 있다. 이는 작업 환경이나 작업 진행 현황 등 상황에 따라 적절하게 선택될 수 있다.
- [0061] 건조 단계는 가열 단계를 통해 얻어진 형광 실크 피브로인을 세척한 뒤 건조하는 단계로, 세척은 증류수를 이용하여 적어도 1회 이상 수행될 수 있고, 건조는 상온($25 \pm 10^\circ\text{C}$)의 음지에서 자연건조 방식으로 수행될 수 있다.
- [0062] 상기 제2 단계는, 제1 단계에서 얻어진 형광 실크 피브로인과 브롬화리튬 용액을 혼합하여 형광 실크 피브로인 용액을 제조하는 단계이다.
- [0063] 제1 단계, 즉 정련 공정을 통해 얻어진 형광 실크 피브로인은 물이나 묽은 산, 염기 등 묽은 수용액에 용해되지 않는 성질이 있어, 제2 단계에서 브롬화리튬 용액과 혼합하여 실크 피브로인을 용액화한다.
- [0064] 이 단계에서 형광 실크 피브로인을 브롬화리튬 용액에 0.05~0.35 g/ml의 농도로 혼합되고 가열 및 교반되어 용액화될 수 있다. 형광 실크 피브로인은 묽은 수용액에서는 용해가 잘 되지 않으므로, 이 때 사용되는 브롬화리튬 용액으로 8.0~10.0 M 농도의 브롬화리튬 수용액을 사용할 수 있고, 바람직하게는 8.7~9.5 M 농도의 브롬화리튬 수용액을 사용하는 것이 바람직하다.

- [0065] 이 단계에서 혼합은 30~60℃로 가열하며 2~5시간 동안 교반하여 수행될 수 있고, 더욱 바람직한 가열 온도는 40~50℃일 수 있다.
- [0066] 이 단계를 통해 형광 실크 피브로인이 포함된 용액, 즉 형광 실크 피브로인 용액이 제조될 수 있다.
- [0067] 상기 제3 단계는 제2 단계에서 얻어진 형광 실크 피브로인 용액과 글리시딜메타크릴레이트를 혼합하여 중합체 조성물을 제조하는 단계이다.
- [0068] 이 단계는 형광 실크 피브로인의 아미노산 잔기에 메타크릴레이트기를 중합시켜 고분자 중합체를 제조하는 단계로, 이 단계에서 바람직하게는 형광 실크 피브로인에 포함된 아미노산의 잔기에 2개의 메타크릴레이트계 화합물이 중합되어 고분자 중합체가 형성될 수 있다. 이렇게 형성된 고분자 중합체를 광개시제와 혼합하여 광(light)에 노출시키면 경화반응을 일으켜 하이드로겔을 형성할 수 있다.
- [0069] 여기서 아미노산 잔기는 형광 실크 피브로인에 포함된 각종 아미노산의 분자 구성 중 H, OH가 이탈한 구성 단위를 의미하며, 넓은 의미로는 펩타이드나 단백질을 구성하는 각각의 아미노산을 의미한다.
- [0070] 이때 사용되는 메타크릴레이트계 화합물로 글리시딜메타크릴레이트가 사용되는 것이 바람직하며, 이 경우, 상기 글리시딜 메타크릴레이트의 에폭시 고리가 끊어지면서 형광 실크 피브로인 분자 내 라이신기의 아민, 구체적으로는 α -나선 또는 β -시트의 라이신기의 아민에 메타크릴레이트기가 중합된 고분자 중합체(SGMA)가 제조될 수 있다. 이렇게 얻어진 고분자 중합체는 광경화 특성을 지니며, 광경화시 압축강도, 인장강도 및 저장 탄성률 등의 기계적 물성이 우수한 하이드로겔 구조체가 형성될 수 있다.
- [0071] 이 단계에서 형광 실크 피브로인 용액에 혼합되는 글리시딜메타크릴레이트의 농도는 141~705 mM일 수 있고, 이 농도 범위 내에서 혼합될 때 미반응 물질 비율 증가에 의한 중합체 조성물의 특성 저하 및 경제성 저하 등의 문제가 최소화될 수 있으므로, 제2 단계에서 얻어진 형광 실크 피브로인 용액에 상술한 농도의 글리시딜메타크릴레이트를 혼합하여 반응시키는 것이 바람직하다.
- [0072] 이 단계에서 혼합은 30~60℃에서 3~8시간 동안 500~1,500 rpm의 속도로 교반하여 수행될 수 있으며, 바람직하게는 35~55℃에서 5~8시간 동안 상기 속도로 교반하여 수행될 수 있다.
- [0073] 반응 온도가 낮거나, 반응 시간이 짧거나, 교반 속도가 느린 경우에는 형광 실크 피브로인과 글리시딜메타크릴레이트의 반응이 둔화되어 결합 효율이 저하될 수 있고, 반응 온도가 높은 경우에는 단백질 구조의 변성이 일어날 수 있으며, 교반 속도가 빠른 경우에는 기포 생성으로 인한 물성 저하가 야기될 수 있으므로, 상술한 반응 조건에서 교반이 수행되는 것이 바람직하다.
- [0074] 다음으로, 제3 단계에서 얻어진 중합체 조성물 내의 불순물을 제거하기 위한 투석 단계인 제4 단계가 수행되는 데, 제4 단계에 앞서 투석시의 부하를 저감시키고, 투석에 의한 불순물 제거 효율을 향상시키기 위해 제3 단계와 제4 단계 사이에, 중합체 조성물을 필터로 여과하는 단계가 추가로 더 수행될 수 있다.
- [0075] 상기 제4 단계는 제3 단계에서 얻어진 중합체 조성물을 물에서 투석하여 불순물을 제거하는 단계이다.
- [0076] 이 단계에서는 중합체 조성물을 투석튜브에 넣고, 물에 2~6일간 침지시켜 불순물을 제거하는 공정이 수행될 수 있다. 이러한 투석 공정을 통해 제3 단계에서 얻어진 중합체 조성물 내의 불필요한 이온 성분이 제거될 수 있다.
- [0077] 이때 사용되는 투석튜브로 이온 성분은 통과하고 고분자 중합체는 통과하지 못하는 크기의 투석튜브를 사용할 수 있으며, 예를 들어 12 ~ 14 kDa cutoff 투석튜브를 사용하여, 투석튜브에 중합체 조성물을 투입하고 물, 바람직하게는 증류수에 투석 튜브를 침지하여 투석 과정을 진행할 수 있다.
- [0078] 제4 단계가 진행되는 기간은 2~6일일 수 있으며, 이 기간이 짧은 경우에는 불순물인 이온 성분이 충분히 제거되지 않아서 바이오잉크로 제조된 구조체의 기계적 물성이 저하되거나 생체 적합성이 저하되는 문제가 발생할 수 있고, 이 기간이 긴 경우에는 추가된 기간에 따른 투석 효율 향상의 정도가 미미하여 생산성이 떨어지므로, 상술한 기간동안 제4 단계가 수행되는 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는 3~6일일 수 있다.
- [0079] 상기 제5 단계는 제4 단계를 통해 불순물이 제거된 중합체 조성물을 건조하여 건조 중합체를 제조하는 단계이다.
- [0080] 이 단계는 제4 단계를 통해 정제된 고분자 중합체의 유통 및 저장성을 향상시키기 위해 수행되는 단계로, 고분자 중합체에 화학적 안정성을 부여하기 위해서 상기 고분자 중합체가 포함된 용액을 동결건조하는 것이 바람직

하다.

- [0081] 구체적으로, 제4 단계를 통해 불순물이 제거된 중합체 조성물을 일차적으로 동결시킨 뒤, 이를 동결건조하는 것이 바람직하다.
- [0082] 동결건조 전 진행되는 동결 단계에서는 $-90 \sim -70$ °C 온도로 10 ~ 14시간에 걸친 동결 작업이 수행될 수 있고, 동결건조 단계에서는 같은 온도에서 40~160시간 동안 동결건조하는 작업이 수행될 수 있다.
- [0083] 이러한 단계를 통해 얻어진 건조 중합체는 그대로 저장, 사용될 수 있고, 필요에 따라서는 파쇄나 분쇄 등의 가공을 거쳐 분말화된 후 저장, 사용될 수도 있다.
- [0084] 상기 제6 단계는 건조 중합체, 광개시제 및 용매를 혼합하여 형광 바이오잉크를 제조하는 단계이다.
- [0085] 구체적으로, 건조 중합체 5~40 %(w/v), 광개시제 0.05~0.7 %(w/v) 및 잔량의 용매를 혼합하여 형광 바이오잉크를 제조할 수 있으며, 제조 중 경화를 방지하기 위해 빛이 차단된 공간에서 작업이 진행되는 것이 바람직하다.
- [0086] 건조 중합체는 상기 제5 단계를 통해 얻어진 것으로, 상기 중량 미만으로 포함되는 경우에는 프린팅시 충분한 기계적 물성 확보가 곤란하고, 상기 중량을 초과하여 포함되는 경우에는 바이오잉크의 흐름성 저하로 인해 인쇄성이 불량해질 수 있으므로 상술한 중량 범위 내에서 포함되는 것이 바람직하다.
- [0087] 광개시제는 광 조사시 라디칼 반응을 개시하여 건조 중합체의 경화 반응을 개시하는 물질로, 리튬 페닐-2,4,6-트리메틸벤조일포스피네이트(lithium phenyl-(2,4,6-trimethyl benzoyl) phosphinate, LAP), 벤질디메틸 케탈(benzyl dimethyl ketal), 아세토펜론(acetophenone), 벤조인메틸에테르(benzoin methyl ether), 디에톡시아세토펜론(diethoxyacetophenone), 벤조일 포스핀 옥사이드(benzoyl phosphine oxide) 및 1-하이드록시사이클로헥실 페닐 케톤(1-hydroxycyclohexyl phenyl ketone)으로 이루어진 군 중에서 선택된 적어도 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0088] 용매는 가용성 및 흐름성 확보를 위한 것으로, 물 기반의 용매가 사용될 수 있으며, 예를 들어 물, DMEM이나 PBS와 같은 배지용액 등이 용매로 사용될 수 있다.
- [0089] 본 발명은, 앞서 설명한 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 형광 바이오잉크 및 이를 3D 프린팅으로 인쇄하여 제조된 형광 바이오 구조체를 포함한다.
- [0090] 이하, 본 발명의 일 실시예를 통해 본 발명의 구체적인 작용과 효과를 설명하고자 한다. 다만, 이는 본 발명의 바람직한 예시로서 제시된 것으로, 실시예에 따라 본 발명의 권리범위가 한정되는 것은 아니다.

[0092] [제조예 1]

[0093] 실시예 1 제조

- [0094] 먼저, 농촌진흥청에서 입수한 형질 전환 누에고치(enhanced green fluorescence protein B. mori; EGFP)를 적절한 크기로 슬라이스하여 준비하고, 0.04M의 탄산수소나트륨과 1.5 mL/L의 세린 엔도펩티데이스가 포함된 수용액에 슬라이스된 누에고치를 침지시켜, 40°C에서 1일간 가열하였다. 가열시 8시간 간격으로 총 3차례 진공을 가했으며, 각 회차별로 1.0×10^{-5} torr의 진공압이 3분동안 인가되었다. 이어서, 증류수에 수회 세정한 뒤 실온의 암실에서 자연건조시켜 정련 완료된 형광 실크 피브로인(실시예 1a)을 수득하였다.
- [0095] 다음으로, 형광 실크 피브로인 7.55g을 9.5M의 브롬화리튬 수용액 100mL에 투입하고, 42°C에서 3시간 동안 가열하여 형광 실크 피브로인 용액을 제조하였다.
- [0096] 상기 형광 실크 피브로인 용액에 6mL의 GMA(Glycidyl methacrylate)를 투입하고 40°C에서 6시간 동안 800rpm으로 교반하여 중합체 조성물을 제조한 뒤, 미라클로스(miracloth)(Calbiochem, SanDiego, CA) 필터로 여과하고, 투석튜브에 넣어 증류수에 3일간 침지시켜 이온 및 불순물이 제거된 중합체 조성물을 수득하였다. 투석이 끝난 용액을 -80°C 에서 12시간 동안 동결하고 동일 온도에서 5일간 동결건조하여 실시예 1의 건조 중합체를 제조하였다.

[0098] 비교예 1 제조

- [0099] 농촌진흥청에서 입수한 실크 누에고치(*Bombyx mori*; *B. mori*) 40g을 0.05M의 탄산수소나트륨 1L에 투입하고 (감압 조건 없이 상압에서) 100℃에서 1시간 동안 가열한 뒤 물로 수회 세정하고 오븐에서 24시간 동안 건조하여 실크 피브로인(비교예 1a)을 수득하였다.
- [0100] 수득된 실크 피브로인 7.5g을 9.3M의 브롬화리튬 수용액 100mL에 투입하고 60℃에서 1시간 동안 교반하여 실크 피브로인 용액을 제조하고, 여기에 6 mL의 GMA를 투입하고 60℃에서 6시간 동안 1,000 rpm의 속도로 교반하여 중합체 조성물을 제조하였다.
- [0101] 이렇게 제조된 중합체 조성물을 미라클로스 필터로 여과하고, 투석튜브(12-14 kDa, Spectrumlabs, USA)에 넣어 증류수에 7일간 침지시켜 이온 및 불순물이 제거된 중합체 조성물을 동결건조하여 건조 중합체를 제조하였다.
- [0103] 비교예 2 제조
- [0104] 2.5g의 젤라틴(type A, 300 bloom, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 증류수 00mL에 투입하고 50℃로 가열하며 교반시켜 용해시킨 뒤, 1M의 염산 수용액을 투입하여 pH를 3.5로 조절하였다. 다음으로, 여기에 GMA 5mL를 0.5 mL/min의 속도로 투입한 후 50℃에서 24시간 동안 유지시켰으며, 이를 투석튜브에 넣고 증류수에 침지시켜 40℃ 온도를 유지시키며 7일간 투석시켜 이물질을 제거한 후 동결건조시켜 비교예 2의 건조 중합체를 제조하였다.
- [0106] **[실험예 1]**
- [0107] 형광 현미경을 이용하여 실시예 1의 원료인 형질 전환 누에고치(EGFP)와 비교예 1의 원료인 실크 누에고치(*B. mori*)를 관찰하고 촬영하여 도 2에 도시하였다. 광원으로 일반광 및 블루라이트가 각각 조사되었으며, 나이트 필터를 사용하였다.
- [0108] 도 2를 참조하면, 일반광 하에서는 두 종의 누에고치가 비슷한 외관을 나타내나, 블루 라이트를 조사하면 EGFP만 밝게 빛나는 것을 확인할 수 있다.
- [0110] **[실험예 2]**
- [0111] 실시예 1, 비교예 1 및 비교예 2와 GMA와 합성하기 전의 피브로인인 실시예 1a, 비교예 1a를 준비하고, 실험예 1과 동일한 방법으로 형광 현미경을 이용하여 촬영하고 그 결과를 도 3에 도시하였다.
- [0112] 도 3을 참조하면, 형광으로 형질 전환된 누에고치를 사용한 실시예 1 및 실시예 1a가 다른 샘플들에 비해 현저히 밝게 빛나는 것을 확인할 수 있다.
- [0114] **[실험예 3]**
- [0115] 형광 스펙트로미터 Synergy H1 (BioTek, Santa Clara, CA, USA)를 사용하여 실시예 1, 비교예 1, 비교예 2, 실시예 1a 및 비교예 1a의 형광 스펙트럼을 측정하여 그 결과를 도 4(i) 및 도 4(ii)에 도시하였다. 이 때, 488nm의 여기파장 및 507nm의 방출파장에서의 형광을 기록하였다.
- [0116] 도 4(i) 및 도 4(ii)를 참조하면, 형질 전환 누에고치(EGFP)를 원료로 하여 제조된 실시예 1과 실시예 1a가 다른 샘플들에 비해 형광 강도가 높게 나타남을 확인할 수 있다.
- [0118] **[실험예 4]**
- [0119] 실시예 1a 제조 방법과 동일한 방법을 이용하여 형광 실크 피브로인을 제조하되, 가열시 별도의 진공압이 가해지지 않은 상태로 가열한 샘플을 제조하고, 각 샘플의 형광 현미경 관찰 이미지를 도 5에 도시하였다.
- [0120] 도 5를 참조하면, 진공이 가해진 경우에 표면이 더 매끄러운 형광 실크 피브로인이 얻어짐을 확인하였다. 표면이 매끄러울수록 세리신 단백질이 더 잘 제거되었음을 의미하므로, 본 실험 결과를 통해 제1 단계, 즉 정련 과정에서 가열할 때 진공압을 가해주면 보다 효과적으로 세리신 단백질이 제거되어 더 순수한 형광 실크 피브로인

을 수득할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[실험예 5]

실크 피브로인과 GMA의 결합 여부를 Bruker DPX FT-NMR을 사용하여 프로톤 핵자기공명 분광법으로 확인하여 그 결과를 도 6에 도시하였다. 구체적으로, 비교예 1a, 비교예 1, 실시예 1a 및 실시예 1을 준비하고, 각 샘플 1mg을 1mL의 중수에 용해시켜 시료로 사용하였으며, 측정 주파수는 600 MHz(자기장 9.4 T)로 설정되었고, 스펙트럼 기준선 보정 및 적분 피크 측정을 위해 ACD/NMR Processor Academic edition 소프트웨어를 사용하였다.

도 6을 참조하면, 비교예 1과 실시예 1은 실크 피브로인과 GMA의 공유결합에 의해 메타크릴레이트화된 비닐기와 메틸 신호가 관찰되어, 실크 피브로인과 GMA가 잘 결합되었음을 확인할 수 있었다.

[제조예 2]

실시예 1, 비교예 1 및 비교예 2의 건조 중합체 각각을 이용한 실시예 1, 비교예 1 및 비교예 2의 바이오잉크를 제조하였다.

구체적으로, 건조 중합체 20 %(w/v), 광경화제인 리튬 페닐-2,4,6-트리메틸벤조일포스피네이트(lithium phenyl-(2,4,6-trimethyl benzoyl) phosphinate, LAP) 0.3 %(w/v) 및 잔량의 DMEM 용매(Welgene, KR)를 혼합하여 형광 바이오잉크를 제조하였다.

[실험예 6]

일체형 압축시험기(QM100S, QMESYS, KR)를 사용하여 제조예 2에서 제조된 실시예 1, 비교예 1 및 비교예 2의 바이오잉크로 제조된 하이드로겔의 강도를 측정하였다.

압축강도는 지름 11.2 mm, 높이 10mm의 원통으로 하이드로겔 샘플을 제조하고, 5 mm/min의 압축 속도 조건에서 측정하여 그 결과를 도 7(a)에 도시하였고, 인장강도는 길이 16×7×2 mm의 오목한 기둥 모양 하이드로겔 샘플을 제조하고, 5 mm/min의 인장 속도 조건에서 측정하여 그 결과를 도 7(b)에 도시하였다.

도 7(a) 및 7(b)를 참조하면, 전체 샘플은 압축 강도에 있어서 유사한 패턴을 나타냈고, 인장 강도의 경우, 비교예 2가 제일 높은 인장 강도를 나타내나 파단 신호는 실시예 1이 제일 우수한 것을 확인할 수 있었다.

[실험예 7]

UV Digital Micro-mirror Device제 (Texas Instruments, USA), UV-LED (365 nm, LG이노텍, KR), 및 두 개의 UV 등급 이쌍곡면 렌즈가 있는 렌즈 모듈로 구성된 DLP 시스템을 사용하고, 실시예 1의 바이오잉크를 이용하여 다양한 인체 장기를 3D 프린팅하고 각각의 일반광(Bright field) 및 형광(Fluorescence) 이미지를 촬영하여 도 8(A)에 설계 도면인 CAD 이미지와 함께 도시하였다. 또한, 각 장기를 두께 0.5mm인 토르소 커버로 덮고 형광 투과성을 관찰하여 도 8(B)에 나타냈다. 또한 한립대 로고 형태로 인쇄하여 도 8(C)에 도시하였고, 인간 뇌 형상으로 인쇄된 구조체를 일반광 하에서 촬영하여 도 8(D)에 도시하였다.

도 8(A), (C) 및 (D)를 참조하면 본 발명의 형광 바이오잉크를 이용하여 뇌, 귀, 손, 폐를 비롯하여 복잡한 구조를 갖는 다양한 기관을 정밀하게 제조할 수 있음을 확인할 수 있었고, 도 8(B)를 참조하면 토르소 커버의 존재 하에서도 형광이 잘 관찰되는 것을 확인할 수 있었다.

[제조예 3]

바이오잉크의 세포 적합성을 확인하기 위해 먼저 세포를 배양하였다. 구체적으로, 세포 독성 및 세포 증식 실험에 사용될 세포로 HeLa cell 및 NIH3T3 cell을 사용하였으며, 이는 ATCC(Manassas, Virginia)에서 구입하였다. 세포는 DMEM(dulbecco's modified Eagle medium) 배지에서 10 %(v/v) FBS(fetal bovine serum), 1 %(v/v) 페니실린 스트렙토마이신 첨가한 배양액을 사용하여 37℃ 습윤한 CO₂(5% CO₂) 에서 배양하였고, 배지는 3일마다 교

환하였다.

[실험예 8]

제조예 2에서 제조된 각 바이오잉크와 제조예 3에서 배양된 세포를 혼합하고, DAPI 염색법을 이용하여 바이오잉크 내에서의 세포 증식을 관찰하였다. 0, 3, 5, 7일의 배양 기간동안 관찰하였으며 공광학현미경(K1-fluo, Nanoscope Systems, KR)으로 촬영하여 도 9에 도시하였다. 실험 결과, 하이드로겔 내부에 포집된 세포들은 모두 생존하고, 조사 기간 내내 성장함을 확인할 수 있었으며, 각 하이드로겔별 증식도 차이는 무의미한 것으로 판단된다.

[실험예 9]

비세포층인 상부층 및 세포층인 하부층의 이차원 층형 하이드로겔 구조를 DLP 방식으로 3D 인쇄하여 체외 세포 추적 실험을 수행하였다. 하부층으로는 비교예 2의 바이오잉크와 제조예 3에서 배양된 세포가 혼합된 바이오잉크를 사용하였고, 이때 배양 세포로 PKH26(적색 형광, Sigma-Aldrich, USA)으로 라벨링된 것을 사용하였다.

상부층으로는 실시예 1의 바이오잉크를 적용하여 시편 1을 제조하였고, 상부층으로 비교예 2의 바이오잉크를 적용하여 시편 2를 제조하였으며, 제조 후 0, 3, 5 및 7일이 경과한 시점에서 형광 이미지를 촬영하여 도 10에 도시하였다.

도 10을 참조하면, 시편 1의 경우에는 시간이 경과함에 따라 적색 점으로 표시된 세포가 형광색을 띠는 상부층에서 서서히 증가하는 것을 확인할 수 있으나, 시편 2의 경우에는 상부층과 하부층을 구분해주는 특징이 없어서 세포의 이동 및 증식을 구별할 수 없었다.

따라서, 본 실험 결과를 통해 바이오잉크의 형광 특성이 구역을 구분해주는 기능을 수행하므로 체외에서의 세포 이동 관찰을 보다 손쉽게 만들어줄 수 있음을 확인할 수 있었다.

[실험예 10]

먼저 실시예 1의 바이오잉크와 비교예 1의 바이오잉크에 각각 PKH26으로 라벨된 NIH3T3 세포주를 혼합하고, 세포가 혼합된 실시예 1의 바이오잉크를 3D 프린팅하여 시편 3을, 비교예 1의 바이오잉크를 3D 프린팅하여 시편 4를 제조하였다.

다음으로, 8주령의 암컷 쥐 4마리(BALB/C-nude mice; Central Lab. Animal Inc., KR)를 마취시켜 준비하고, 4개의 피하 주머니를 형성한 뒤, 두 개의 주머니에 시편 3을, 나머지 두 개의 주머니에는 시편 4를 이식하였다.

이식 4주차에 하나의 시편 3과 시편 4를 제거하고, 이식 8주차에 나머지 시편 3과 시편 4를 제거하였으며, 제거된 시편은 4% 농도의 파라포름알데하이드 용액에서 24시간 동안 고정되고, 30% 농도의 수크로스 용액에 침지되었다가 1% 농도의 폴리비닐 알콜 용액에 침지되어 4℃에서 1일간 저장되었다.

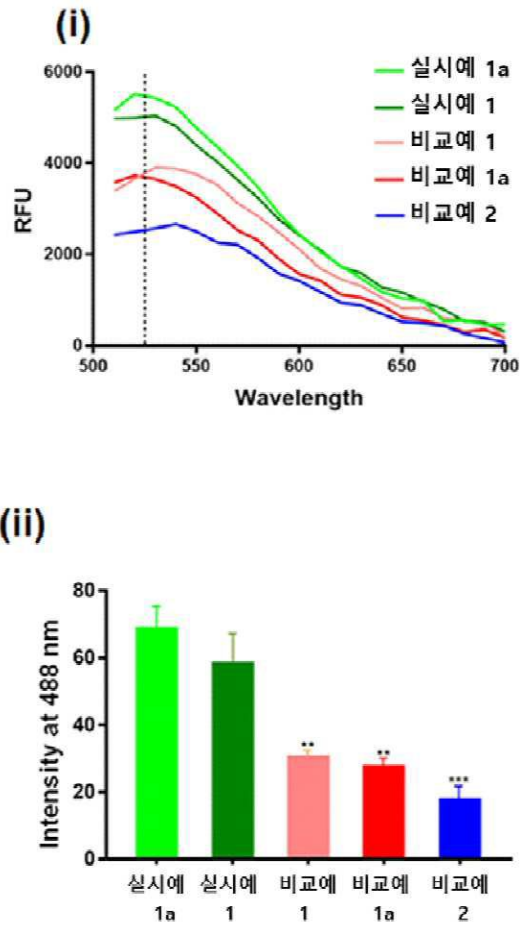
이후, OCT 컴파운드(Leica Biosystems, AU)에 내장되어 -80℃에서 보관되었고, 냉동 시편을 가로방향으로 절단하여 두께 14 μ m의 커팅 시편을 제조하였으며, PKH26으로 라벨링된 세포를 관찰하기 위해 커팅 시편을 DAPI로 염색한 뒤 이를 형광 현미경으로 관찰하여 그 결과를 도 11에 도시하였다. 도 11에서, 시편 3으로부터 얻어진 커팅 시편은 실시예 1로, 시편 4로부터 얻어진 커팅 시편은 비교예 1로 표시하였다.

실험 결과, 실시예 1에서는 이식 4주 후에는 인접한 조직으로의 세포 이동이 적게 관찰되었고, 8주 후에는 이동한 세포 수가 증가하였으며, 하이드로겔의 분해 증거인 포어 크기의 증가 현상이 용이하게 관찰된 반면, 비교예 1에서는 이러한 변화를 용이하게 관찰하기 어려웠다.

본 실험 결과, 일 실시예에 따라 제조된 형광 바이오잉크를 사용하는 경우, 바이오 잉크가 형광 특성을 지니기 때문에 생체 내에서의 세포 이동 속도, 이동한 세포의 위치, 포어 크기 등의 관찰이 용이한 장점이 있었으며, 이러한 형광 특성이 체내에서 최소 8주 이상 유지됨을 확인할 수 있었다.

본 발명은 상술한 특징의 실시예 및 설명에 한정되지 아니하며, 청구범위에서 청구하는 본 발명의 요지를 벗어남이 없이 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 누구든지 다양한 변형 실시가 가능하

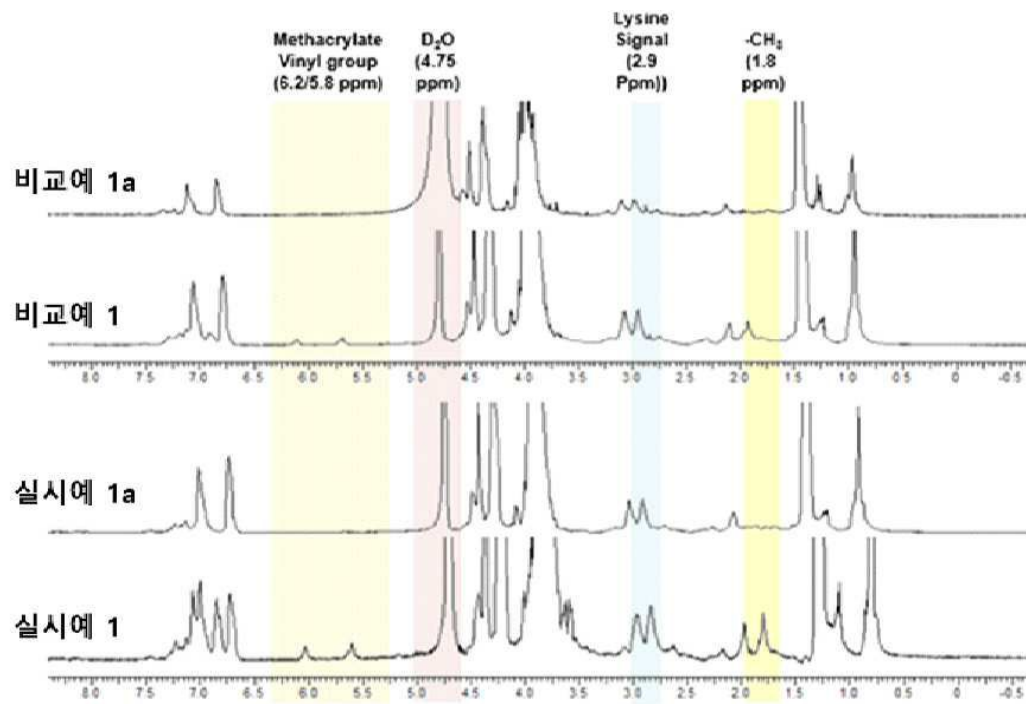
도면4



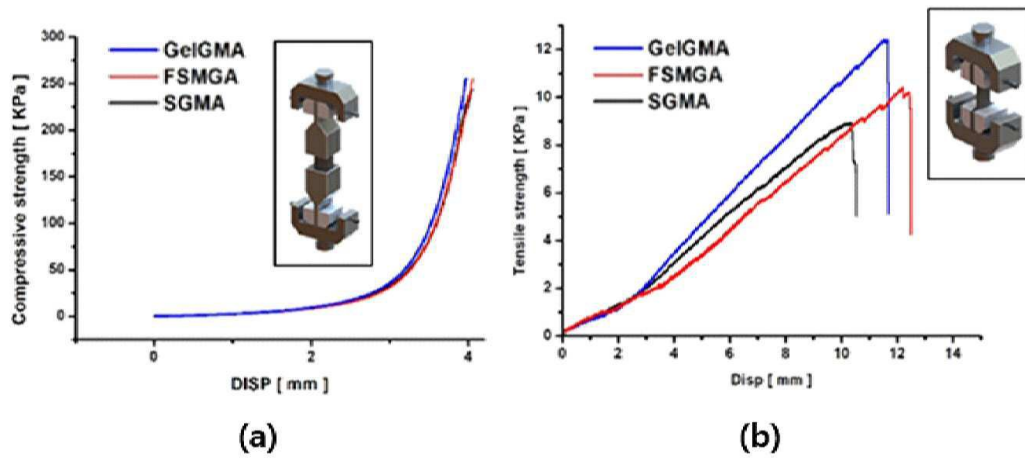
도면5

배울	X 40	X 100
비교예 1 (진공 없음)		
실시예 1 (진공 있음)		

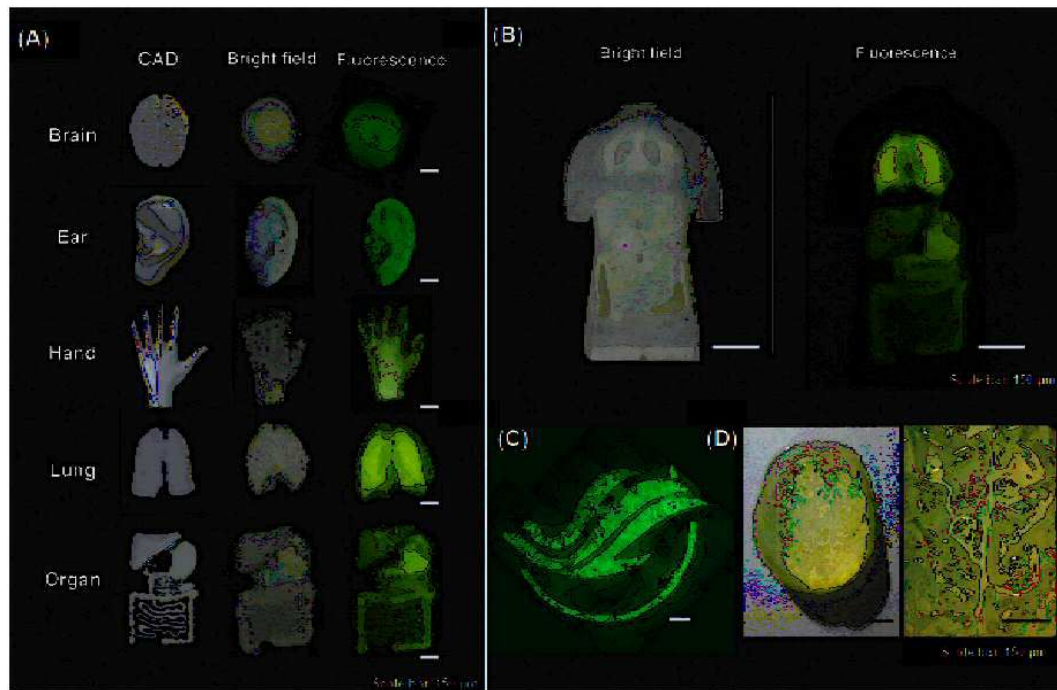
도면6



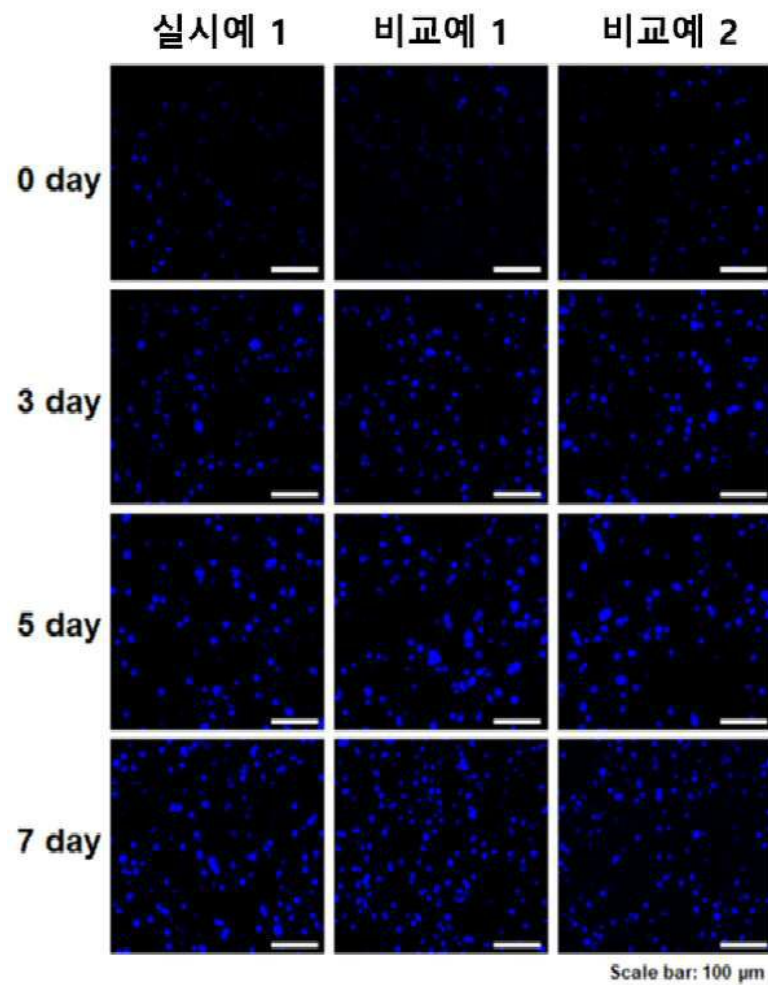
도면7



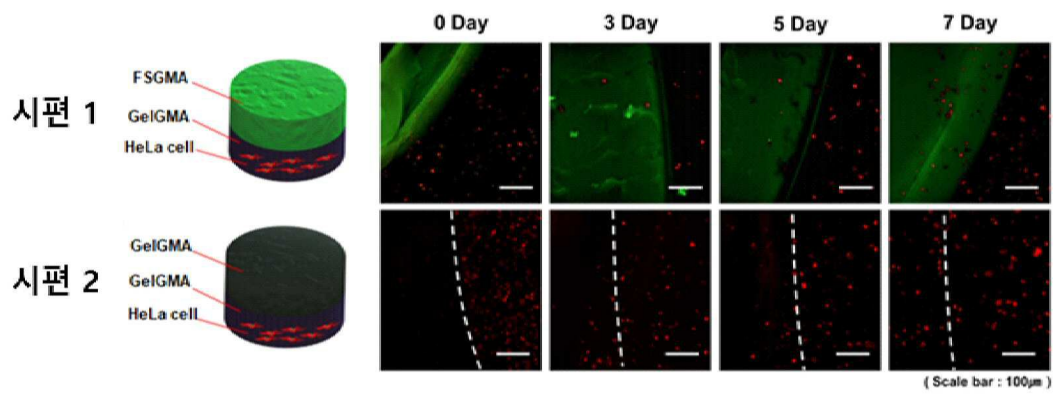
도면8



도면9



도면10



도면11

