



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0065107
(43) 공개일자 2022년05월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C09D 11/04 (2006.01) A61L 27/38 (2006.01)

A61L 27/52 (2006.01) A61L 27/56 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C09D 11/04 (2013.01)

A61L 27/3826 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0150610

(22) 출원일자 2020년11월12일

심사청구일자 2020년11월12일

(71) 출원인

부산대학교 산학협력단

부산광역시 금정구 부산대학교63번길 2 (장전동, 부산대학교)

아주대학교 산학협력단

경기도 수원시 영통구 월드컵로 206 (원천동)

인천대학교 산학협력단

인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)

(72) 발명자

한동욱

부산광역시 금정구 금강로 225, 210동 203호 (장전동, 벽산블루밍디자인시티)

강문성

부산광역시 금정구 부산대학교 63번길 2 현대스타원룸 201호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 천지

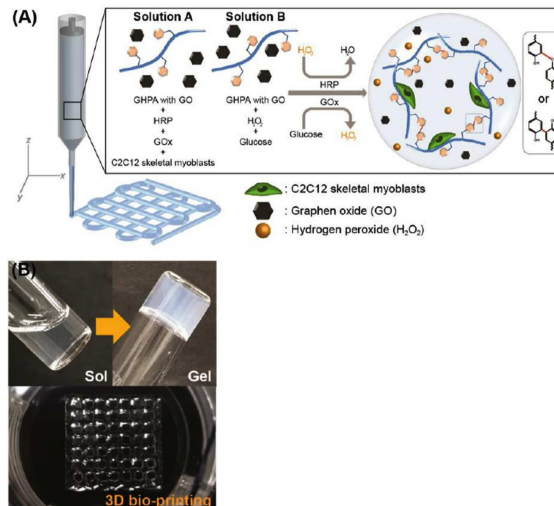
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 3D 프린팅용 바이오 잉크 및 이를 이용한 구조체의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 GO 복합 젤라틴 기반 하이드로겔, HRP(Horseradish Peroxidase), 과산화수소(Hydroxyperoxide, H_2O_2), GOx(Glucose Oxidase), 글루코스(Glucose)를 포함하는 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물 및 이를 이용한 구조체의 제조방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61L 27/52 (2013.01)

A61L 27/56 (2013.01)

(72) 발명자

박경민

인천광역시 연수구 해송로 70, 2017동 1002호 (송도동, 송도웰카운티2단지)

강전일

인천광역시 연수구 인천타워대로132번길 9 롯데몰 송도 캐슬파크 B동 2021호

박기동

서울특별시 서초구 서초동 1333 신동아아파트

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711111950
과제번호	2019R1A4A1024116
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기초연구실지원사업(R&D)
연구과제명	탈모증 치료용 마이크로니들 어레이 기반 모낭 줄기세포 전달 시스템 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	부산대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711114118
과제번호	2018R1A2B2004529
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구사업(R&D)
연구과제명	활성산소 제어 고분자 하이드로젤을 이용한 생체활성 바이오잉크 소재 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	아주대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

GO 복합 젤라틴 기반 하이드로겔, HRP(Horseradish Peroxidase), 과산화수소(Hydroxyperoxide, H_2O_2), GOx(Glucose Oxidase), 글루코스(Glucose)를 포함하는 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물은 1제와 2제를 혼합하여 제조된 것이고,

상기 1제는 GO 복합 젤라틴 기반 하이드로겔, HRP 및 GOx를 포함하고,

상기 2제는 GO 복합 젤라틴 기반 하이드로겔, 과산화수소 및 글루코스를 포함하는 것을 특징으로 하는 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 HRP는 상기 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물에 20 내지 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 첨가되는 것인 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 1제는 GO 복합 젤라틴 기반 하이드로겔, HRP 및 GOx를 1: 0.01 ~ 1: 0.01 ~ 1의 중량비율로 포함하고,

상기 2제는 GO 복합 젤라틴 기반 하이드로겔, 과산화수소 및 글루코스를 1: 0.01 ~ 1: 0.01 ~ 1의 중량비율로 포함하는 것인 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물은 세포를 더 포함하는 것인 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 세포는 줄기세포(stem cell), 조골세포(osteoblast), 근아세포(myoblast), 건세포(tenocyte), 신경아세포(neuroblast), 섬유아세포(fibroblast), 신경교아세포(glioblast), 배세포(germ cell), 간세포(hepatocyte), 신장세포(renal cell), 지대세포(Sertoli cell), 연골세포(chondrocyte), 상피세포(epithelial cell), 심혈관 세포, 각질세포(keratinocyte), 평활근세포(smooth muscle cell), 심장근세포(cardiomyocyte), 신경교세포(glia cell), 내피세포(endothelial cell), 호르몬 분비세포, 면역세포, 췌장섬 세포(pancreatic islet cell)

및 신경세포(neuron)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 세포는 10^4 내지 10^8 cells/ml의 농도로 포함되는 것인 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 젤라틴 기반 하이드로겔은 GHPA 하이드로겔(Gelatin hydroxyphenylpropionic acid Hydrogel)인 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물.

청구항 9

제5항에 있어서,

상기 세포는 근아세포(myoblast)인 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물.

청구항 10

제1항에 따른 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물로 구조체를 제조하는 단계를 포함하는 구조체의 제조방법.

청구항 11

a) 제2항에 따른 1제와 2제를 혼합하여 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물을 제조하는 단계; 및

b) 상기 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물로 구조체를 제조하는 단계;

를 포함하는 구조체의 제조방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 a) 단계는 3 내지 10 분 동안 1제와 2제를 혼합하는 것이고,

상기 b) 단계는 상기 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물을 프리-겔(Pre-gel) 상태로 프린트하여 구조체를 제조하는 것이며,

상기 b) 단계를 거쳐 제조된 구조체는 5 내지 20 분 후 겔화되는 것을 특징으로 하는 구조체의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 GO 복합 젤라틴 기반 하이드로겔과 HRP를 이용한 3D 인쇄에 적합한 인쇄적성(Printability)을 가지는 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물 및 이를 이용한 구조체의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 3D 바이오 프린팅 기술은 다종의 세포, 생체 재료 및 바이오 분자를 이용하여 컴퓨터 디자인된 3차원 구조물의

제작하는 기술이다.

- [0003] 3D 바이오 프린팅 기술은 바이오 잉크를 이용하여 3D 프린터를 이용한 3차원 구조체를 제조하는데, 바이오 잉크란, 살아있는 세포 혹은 바이오 분자를 포함하며, 바이오 프린팅 기술에 응용하여 필요로 하는 구조물을 제작할 수 있는 소재를 통칭하는 용어이다.
- [0004] 이와 같은 바이오 잉크는 3차원 가공을 위한 물리적 성질과 제조된 3차원 구조체가 생물학적 기능을 할 수 있도록 우수한 세포 친화성을 가져야 한다.
- [0005] 특히, 상기 두 가지 물성은 바이오 잉크에서 요구되는 필수적인 요소에 해당되므로 이를 만족시키기 위해 다양한 조성의 바이오 잉크와 최종 산물이 3차원 구조체의 목적에 적합한 환경을 제공하는 바이오 잉크를 개발하기 위해 활발한 연구가 진행되고 있다.
- [0006] 바이오 잉크에 사용되는 소재로서는 생체적합성이 우수한 소재로서, 고분자 하이드로겔이 널리 사용되고 있으며, 대표적으로는 젤라틴, 피브린, 콜라겐 등을 이용한 고분자 하이드로겔이 널리 사용되고 있다.
- [0007] 상기와 같은 생체적합성을 가지는 하이드로겔을 사용하는 경우에도, 바이오 잉크의 조성과 환경에 따라, 최종적으로 얻어진 3차원 구조체(장치)의 활성이 다르게 발현될 수 있는 바, 바이오 잉크의 기본 물성을 만족하면서도, 최종적으로 얻어진 구조체의 활성까지 담보할 수 있는 기술에 대한 연구가 계속되고 있다.
- [0008] 이와 관련하여, 'Multiphoton imaging of myogenic differentiation in gelatin-based hydrogels as tissue engineering scaffolds, Kim et al. Biomaterials Research. 2016, Vol. 20, No. 2'에서는 GHPA(Gelatin hydroxyphenylpropionic acid)를 기반으로 하는 하이드로겔이 C2C12 근아세포의 분화를 촉진하기에 적절함을 개시하고 있는 바, GHPA를 기반으로 하는 하이드로겔의 근아세포를 포함하는 생체재료에의 활용가능성을 개시하고 있다.
- [0009] 'In situ forming gelatin/graphene oxide hydrogels for facilitated C2C12 myoblast differentiation, Lee et al. Applied Spectroscopy Reviews. 2016, VOL. 51, NOS. 7-9, 527-539'에서는, 그래핀 산화물을 포함하는 젤라틴 기반의 하이드로겔이 C2C12 근아세포 (Myoblast)의 분화를 촉진함을 개시하고 있는 바, 근아세포의 분화를 위한 생체재료로서 젤라틴 기반의 하이드로겔을 사용하는 경우, 그래핀 옥사이드를 추가하여 사용하는 것이 적합함을 개시하고 있다.
- [0010] 또한, 'Stimulated Myogenic Differentiation of C2C12 Murine Myoblasts by using Graphene Oxide, Kim et al. Journal of the Korean Physical Society, Vol. 67, No. 11, December 2015, pp. 1910~1914'에서는 그래핀 산화물이 젤라틴의 C2C12 근아세포의 분화를 효과적으로 자극함을 개시하고 있다.
- [0011] 그러나, 상기 논문에는 근아세포의 자극에 적합한 생체재료의 조성만을 개시하고 있을 뿐, 바이오 잉크로 사용하여 3D 프린팅에 적합한 물리적 특성을 함께 겸비하는 바이오 잉크 내지 생체재료에 대해서는 개시하고 있지 않다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0012] (비특허문헌 0001) Multiphoton imaging of myogenic differentiation in gelatin-based hydrogels as tissue engineering scaffolds, Kim et al. Biomaterials Research. 2016, Vol. 20, No. 2 (2016.01.04)
- (비특허문헌 0002) In situ forming gelatin/graphene oxide hydrogels for facilitated C2C12 myoblast differentiation, Lee et al. Applied Spectroscopy Reviews. 2016, VOL. 51, NOS. 7-9, 527-539 (2016.03.17)
- (비특허문헌 0003) 'Stimulated Myogenic Differentiation of C2C12 Murine Myoblasts by using Graphene Oxide, Kim et al. Journal of the Korean Physical Society, Vol. 67, No. 11, December 2015, pp. 1910~1914 (2015.12.06)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 본 발명은 3D 프린팅에 사용하기 적합한 바이오 잉크를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0014] 본 발명은 특히, 3D 프린팅 시 프리-겔화 상태로 인쇄가 가능하여, 인쇄 시에 입체 형상이 무너지지 않고 유지되어 3D 구조체를 인쇄하기에 적합한 특성을 가지는 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0015] 본 발명은 세포 분화를 촉진하는 효과를 가지며, 세포생존율이 우수한 특성을 가지는 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0016] 본 발명은 또한, 상기의 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물을 이용하여 입체형상의 구조체를 제조하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0017] 상기와 같은 과제를 해결하기 위한 본 발명에 따른 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물은 GO 복합 젤라틴 기반 하이드로겔, HRP(Horseradish Peroxidase), 과산화수소(Hydroxyperoxide, H_2O_2), GOx(Glucose Oxidase), 글루코스(Glucose)를 포함한다.
- [0018] 본 발명에 있어서, 상기 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물은 1제와 2제를 혼합하여 제조된 것이고, 상기 1제는 GO 복합 젤라틴 기반 하이드로겔, HRP 및 GOx를 포함하고, 상기 2제는 GO 복합 젤라틴 기반 하이드로겔, 과산화수소 및 글루코스를 포함할 수 있다.
- [0019] 보다 상세하게는, 상기 1제는 GO 복합 젤라틴 기반 하이드로겔, HRP 및 GOx를 1: 0.01 ~ 1: 0.01 ~ 1의 중량비율로 포함하고, 상기 2제는 GO 복합 젤라틴 기반 하이드로겔, 과산화수소 및 글루코스를 1: 0.01 ~ 1: 0.01 ~ 1의 중량비율로 포함할 수 있다.
- [0020] 본 발명에 있어서, 상기 HRP는 상기 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물에 20 내지 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 첨가될 수 있다.
- [0021] 본 발명에 있어서, 상기 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물은 세포를 더 포함할 수 있다.
- [0022] 상세하게는, 상기 세포는 줄기세포(stem cell), 조골세포(osteoblast), 근아세포(myoblast), 건세포(tenocyte), 신경아세포(neuroblast), 섬유아세포(fibroblast), 신경교아세포(glioblast), 배세포(germ cell), 간세포(hepatocyte), 신장세포(renal cell), 지대세포(Sertoli cell), 연골세포(chondrocyte), 상피세포(epithelial cell), 심혈관세포, 각질세포(keratinocyte), 평활근세포(smooth muscle cell), 심장근세포(cardiomyocyte), 신경교세포(glial cell), 내피세포(endothelial cell), 호르몬 분비세포, 면역세포, 췌장섬세포(pancreaticislet cell) 및 신경세포(neuron)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있으며, 보다 상세하게는, 상기 세포는 근아세포(myoblast)일 수 있다.
- [0023] 또한, 상기 세포는 10^4 내지 10^8 cells/ml의 농도로 포함될 수 있다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 상기 젤라틴 기반 하이드로겔은 GHPA 하이드로겔(Gelatin hydroxyphenylpropionic acid Hydrogel)일 수 있다.
- [0025] 본 발명은 또한, 본 발명에 따른 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물로 구조체를 제조하는 단계를 포함하는 구조체의 제조방법을 제공한다.
- [0026] 본 발명에 따른 제조방법에 있어서, 상술한 1제와 2제를 혼합하여 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물을 제조하는 단계 및 b) 상기 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물로 구조체를 제조하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0027] 구체적으로는, 상기 a) 단계는 3 내지 10 분 동안 1제와 2제를 혼합하는 것이고, 상기 b) 단계는 상기 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물이 프리-겔(Pre-gel) 상태에서 프린트하여 구조체를 제조하는 것이며, 상기 b) 단계를 거쳐 제조된 구조체는 5 내지 20 분 후 겔화되는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0028] 본 발명에 따른 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물은 입체 형상의 구조체를 제조하기에 적합한 특성을 가진다.

[0029] 특히, 본 발명에 따른 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물은 입체 형상의 구조체 제조 시, 프리-겔화 상태를 가져 입체 형상으로 적층하기에 적합한 물성을 가져 3D 인쇄적성(Printability)이 우수한 효과를 가진다.

[0030] 본 발명은 또한, 인조장기 등과 같은 생체조직을 인쇄하는 경우에도 세포의 분화를 촉진하며, 세포생존율이 우수한 특성을 가진다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 본 발명에 따른 바이오 잉크를 이용하여 구조체를 제조하는 과정을 나타낸 모식도(A)와 1제와 2제를 혼합하여 얻어진 졸 상태, 시간이 경과하여 프리-겔 상태 및 이를 이용하여 3D 프린팅한 결과를 촬영한 사진(B)이다;

도 2는 본 발명에 따른 바이오 잉크(C)와 페트롤롤젤(A)을 이용하여 격자 입방체를 3D 프린팅한 결과물을 촬영한 사진과 페트롤롤젤 격자 입방체의 광학 현미경 사진(B)이다;

도 3은 GHPA와 GO 복합 GHPA 하이드로겔의 물리, 화학적 특성 분석 결과 그래프이다;

도 4는 본 발명에 따른 바이오 잉크로 3D 프린팅된 구조체의 배양조건에서의 시간 경과에 따른 외관변화를 촬영한 사진이다;

도 5는 세포 함유 3D 프린팅된 구조체의 3D 프린팅 직후의 디지털 형광 현미경 사진을 나타낸 사진이다;

도 6은 GO/GHPA 하이드로겔 매트릭스 내에 캡슐화된 C2C12 세포의 7일 동안의 모폴로지와 생존여부를 확인한 결과를 나타낸 사진이다;

도 7은 생존 세포의 정량화 결과를 %시그널 및 형광 강도로 나타낸 그래프이다;

도 8은 C2C12 세포의 증식력 결과를 나타낸 그래프이다;

도 9는 C2C12 세포 함유 GHPA와 C2C12 세포 함유 GO/GHPA를 배지에서 배양한 후의 Confocal 현미경 사진이다;

도 10은 도 9에서 배양된 C2C12 세포 함유 GO/GHPA의 공초점 레이저 주사 현미경(Confocal microscope)을 이용한 3D 사진이다;

도 11은 도 9에서 배양된 C2C12 세포 함유 GHPA와 C2C12 세포 함유 GO/GHPA의 세포 면적당 MHC-양성 비율을 나타낸 그래프이다;

도 12는 도 9에서 배양된 C2C12 세포 함유 GHPA와 C2C12 세포 함유 GO/GHPA에서의 분화된 C2C12 세포의 웨스턴 블롯 결과를 나타낸 사진이다;

도 13은 HRP 농도가 상이한 3D 바이오 잉크를 이용하여 인쇄된 구조체 및 세포 주입 후의 구조체 사진이다;

도 14는 본 발명에 따른 3D 바이오 잉크를 이용하여 인쇄된 구조체의 시간경과에 따른 변화를 관찰한 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 이하, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 각 구성을 보다 상세히 설명하나, 이는 하나의 예시에 불과할 뿐, 본 발명의 권리범위가 다음 내용에 의해 제한되지 아니한다.

[0033] 본 발명은 인공장기 등의 입체 형상의 생물학적 구조체를 제조하기 위한 바이오 잉크에 관한 것이다.

[0034] 구체적으로 본 발명은, GO 복합 젤라틴 기반 하이드로겔, HRP(Horseradish Peroxidase), 과산화수소(Hydroxyperoxide, H_2O_2), GOx(Glucose Oxidase), 글루코스(Glucose)를 포함한다.

[0035] 본 발명에 따른 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물은 각 구성성분을 혼합한 후, 초기에 일정시간 동안 프리-겔(Pre-gel) 상태로 유지됨으로써, 입체 형상의 구조체를 제조하기 위해, 인쇄층을 적층할 때, 인쇄층이 무너지지 않고 유지되게 되어 3D 인쇄적성이 우수한 특성을 가진다.

[0036] 상기 프리-겔 상태란, 졸과 겔 상태의 중간 상태로서, 완전히 겔화되지 않은 상태에서 일정 형태로 유지될 수 있는 물성을 가지는 상태를 의미한다.

[0037] 상기 GO 복합 젤라틴 기반 하이드로겔이란, 젤라틴 기반의 하이드로겔에 그래핀 옥사이드(GO)를 복합화한 것을

의미한다.

- [0038] 구체적으로, 상기 하이드로겔이란 물을 분산매로 하여 친수성 고분자가 물리적 또는 화학적 결합으로 3차원 가교를 형성하고 있는 네트워크를 가져, 수중에서 물에 용해되지 않고 물을 함유할 수 있는 흡습성 물질을 의미한다. 하이드로겔은 상기 특성을 가질 수 있는 것이면 어떠한 고분자든 사용이 가능하며, 바이오 잉크로의 생체 적합성을 고려하여 사용가능한 물질로는, 젤라틴, 피브린 등의 물질에 기반한 하이드로겔이 사용되고 있다.
- [0039] 본 발명에서는 젤라틴 기반의 하이드로겔을 GO와 복합화한 하이드로겔을 사용하는데, 구체적으로, 상기 젤라틴 기반의 하이드로겔은 바이오 잉크로 사용될 수 있는 것이면 특별히 제한되지 않고 사용이 가능하다. 상세하게는, GHPA(Gelatin-hydroxyphenylpropionic acid) 하이드로겔일 수 있다.
- [0040] 본 발명에 따른 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물은, 1제와 2제를 혼합하여 제조된 것으로서, 상기 1제는 GO 복합 젤라틴 기반 하이드로겔, HRP 및 GOx를 포함하고, 상기 2제는 GO 복합 젤라틴 기반 하이드로겔, 과산화수소 및 글루코스를 포함하는 것일 수 있다.
- [0041] 상기와 같이 2 이상의 가교 반응 효소를 이용한 이중 효소 매개 가교 반응을 통해 제조됨으로써 3D 프린팅하기에 적합한 특성을 가진다. 특히, 본 발명에서, 가교 가능한 상태의 GO 복합 젤라틴 기반 하이드로겔은 졸-겔 상변이를 나타냄에 따라, 입체 형상의 구조체로 3D 프린팅하는 과정에서 인쇄한 부분이 무너지지 않고 형태를 유지하게 되고, 구조체를 특정 시간 내에 인쇄한 후, 일정시간이 경과하면 완전 겔화되어 구조체로 고정된다.
- [0042] 본 발명에 따른 바이오 잉크 조성물의 상기 1제는 GO 복합 젤라틴 기반 하이드로겔 외에 HRP(Horseradish Peroxidase) 및 GOx(Glucose Oxidase)를 포함한다.
- [0043] 상기 HRP는 서양무 과산화효소로도 불리우는 과산화효소로서, 서양무(Horseradish)의 뿌리에서 발견되는 효소이다. 상기 HRP는 과산화수소에 의한 유기 기질의 산화를 촉진하는 효소이다.
- [0044] 후술할 바와 같이, GOx에 의해 형성된 과산화수소에서 유래된 라디칼을 공급받아 HRP가 산화반응을 통한 가교 반응을 매개한다.
- [0045] 구체적으로, 상기 HRP는 상기 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물에 20 내지 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 첨가되는 것일 수 있다. 바람직하게는, 30 내지 40 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 첨가될 수 있다.
- [0046] 상기 함량보다 과량으로 첨가되는 경우에는, 빠른 가교 반응으로 인해 노즐이 막혀 구조체 제작이 불가능하거나 불균일한 해상도의 구조체가 제작되는 문제가 있고, 상기 함량보다 소량으로 첨가되는 경우에는 느린 가교 반응에 의해 형태를 잡지 못하고 구조체를 제작하지 못하거나 낮은 해상도의 구조체가 제작되는 문제가 있다.
- [0047] 상기 GOx(Glucose Oxidase)는 글루코스 산화 효소로서, 노타틴(Notatin)으로도 알려진 산화 환원 효소이다. 글루코스를 글루코닉산(Gluconic acid)와 과산화수소(H_2O_2)로 전환시킴으로써, 과산화수소를 형성한다.
- [0048] 상기 1제는 GO 복합 젤라틴 기반 하이드로겔 외에 효소 성분만을 포함하도록 구성하여, 1제 내에서의 자체 가교 반응이 일어나지 않도록 구성하고, 3D 프린팅을 위해 1제와 혼합되는 2제에 각 효소와 반응하는 과산화수소와 글루코스를 포함하도록 구성한다.
- [0049] 본 발명에 따른 바이오 잉크 조성물의 상기 2제는 GO 복합 젤라틴 기반 하이드로겔 외에 과산화수소(Hydroxyperoxide, H_2O_2) 및 글루코스(Glucose)를 포함한다.
- [0050] 상기 2제의 성분은 상술한 바와 같이 1제에 포함된 효소와 반응하는 물질이 포함된 것으로, 2제 또한, 2제 내에서의 자체 가교 반응이 일어나지 않도록 상기 물질과 반응하는 효소 성분은 포함하지 않는다.
- [0051] 구체적으로 상기 1제는 GO 복합 젤라틴 기반 하이드로겔, HRP 및 GOx를 1: 0.01 ~ 1: 0.01 ~ 1의 중량비율로 포함할 수 있다. 보다 바람직하게는, 1: 0.05 ~ 0.5 : 0.05 ~ 0.5의 중량비율로 포함할 수 있다.
- [0052] 상기 비율보다 HRP를 과량으로 포함하고 GOx를 소량으로 포함하는 경우에는 가교 반응이 빠르게 일어나 불균일한 겔 형성 및 노즐이 막힘이 발생할 수 있는 문제가 있고, 또한, GOx/글루코스에 의한 과산화수소 발생이 느려서 과산화수소의 발생량 및 방출량이 감소하는 문제가 있고, 상기 비율보다 HRP를 소량으로 포함하고, GOx를 과량으로 포함하는 경우에는 느린 가교 반응으로 인쇄물 낮은 해상도, 낮은 안정성과 과산화수소의 발생량 및 방출량이 과다한 문제가 있다.
- [0053] 또한, 상기 2제는 GO 복합 젤라틴 기반 하이드로겔, 과산화수소 및 글루코스를 1: 0.01 ~ 1: 0.01 ~ 1의 중량비

율로 포함할 수 있고, 보다 바람직하게는, 1: 0.05 ~ 0.5 : 0.05 ~ 0.5의 중량비율로 포함할 수 있다.

- [0054] 상기 비율보다 과산화수소를 과량으로 포함하고 글루코스를 소량으로 포함하는 경우에는 초기 가교 반응이 촉진되어 상기 거론된 빠른 겔화에 의한 노즐 막힘 및 불 균일한 겔 형성이 유발될 수 있다. 또한 잔존하는 과산화수소의 양이 증가하여 담지 되는 세포에 대한 독성을 유발할 수 있다.
- [0055] 상기 비율보다 과산화수소를 소량으로 포함하고, 글루코스를 과량으로 포함하는 경우에는 초기 가교 반응이 느려져 상기 거론된 느린 겔화에 의한 낮은 출력물의 해상도 및 세포 배양 배지 내 구조 불안정성이 유발될 수 있으며, GOx/글루코스 반응에 의한 과산화수소 발생이 증가하여 담지 되는 세포에 독성을 일으킬 수 있는 문제가 있다.
- [0056] 상기 1제와 상기 2제를 혼합하여 얻어진 본 발명에 따른 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물은 일정시간 충분히 혼합한 후에, 프리-겔(Pre-gel) 상태를 가진다.
- [0057] 구체적으로, 상기 1제와 상기 2제를 3 내지 10 분 동안 혼합하여 교반함으로써 상기 1제와 상기 2제의 반응물이 충분히 반응하여 일부 가교 구조를 형성하여 프리-겔 상태로 제조된다. 이는 완전히 겔화된 상태가 아니고 어느 정도 유동성을 가지면서도, 각 레이어가 서로 분리되지 않고 하나의 구조체로 안정적으로 형성할 수 있게 한다.
- [0058] 바람직하게는, 4 내지 8 분 동안 충분히 혼합 및 교반하여 본 발명에 따른 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물을 제조할 수 있다.
- [0059] 상기 시간보다 긴 시간 동안 혼합 및 교반하는 경우에는, 3D 프린팅 시의 구조체의 물리적인 특성이 저하될 수 있고, 인쇄 시의 각 층이 분리될 수 있는 문제점이 있다.
- [0060] 상기 시간보다 짧은 시간 동안 혼합 및 교반하는 경우에는, 상기 1제와 상기 2제의 반응물이 충분히 혼합하여 반응하지 않으므로, 가교 반응도가 떨어져, 3D 인쇄적성이 저하되는 문제가 있을 수 있다.
- [0061] 상기 1제와 상기 2제를 혼합하는 단계를 거친 후에는 프리-겔 상태의 조성물을 3D 프린팅하여 구조체를 제조하게 된다.
- [0062] 한편, 상기 3D 프린팅하여 구조체를 제조하는 과정은 8 분 이내에 수행할 수 있다. 바람직하게는, 6분 이내에 수행할 수 있다. 상기 시간보다 긴 시간 동안 인쇄하는 경우에는, 인쇄 시 적층된 각 층 간의 분리가 일어날 수 있는 문제가 있을 수 있다.
- [0063] 상기 구조체는 5 내지 20 분 후 겔화되는 것일 수 있고, 바람직하게는, 7 내지 18 분 후 겔화되는 것일 수 있다.
- [0064] 상기 시간보다 오랜 시간 동안 방치하는 경우에는, 특별히 문제점은 없으나, 구조체의 물성에 큰 변화가 없어, 공정시간이 지연되는 문제점이 있고, 상기 시간보다 짧은 시간 동안 방치하는 경우에는, 구조체가 충분히 겔화되지 않아 충분한 강도와 물리적, 기계적 특성을 갖지 못하는 문제점이 있을 수 있다.
- [0065] 본 발명에 따른 3D 프린팅용 바이오 조성물은 세포를 더 포함할 수 있다. 본 발명은 특히, 세포를 포함(함유)하여 제조된 3D 구조체의 생체적합성이 우수하며, 세포 활성화 등의 특징이 우수한 특성을 가진다.
- [0066] 구체적으로, 상기 세포는 줄기세포(stem cell), 조골세포(osteoblast), 근아세포(myoblast), 건세포(tenocyte), 신경아세포(neuroblast), 섬유아세포(fibroblast), 신경교아세포(glioblast), 배세포(germ cell), 간세포(hepatocyte), 신장세포(renal cell), 지대세포(Sertoli cell), 연골세포(chondrocyte), 상피세포(epithelial cell), 심혈관세포, 각질세포(keratinocyte), 평활근세포(smooth muscle cell), 심장근세포(cardiomyocyte), 신경교세포(glial cell), 내피세포(endothelial cell), 호르몬 분비세포, 면역세포, 췌장섬세포(pancreatic islet cell) 및 신경세포(neuron)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 것일 수 있다.
- [0067] 바람직하게는, 근아세포(myoblast)일 수 있고, 보다 바람직하게는 C2C12 세포일 수 있다.
- [0068] 본 발명의 일 실시예에서는 본 발명에 따른 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물이 근아세포의 골격근 세포 조직으로의 분화를 촉진할 수 있음을 확인하였는 바, 골격근 치료 등의 의학적인 용도로 사용하기에 적합함을 확인하였다.
- [0069] 다만, 이는 하나의 실시예에 불과할 뿐 이에 제한되지 않고 다양한 방법으로 활용될 수 있다.
- [0070] 한편, 본 발명에 따른 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물이 상기 세포를 포함하는 경우, 상기 세포는 10^4 내지 10^8

cells/ml의 농도로 포함될 수 있다. 바람직하게는, 5×10^5 내지 5×10^6 cells/ml의 농도로 포함될 수 있다.

- [0071] 상기 농도보다 높은 농도로 포함되는 경우에는, 세포대사에 의해 소모되는 과산화수소의 양이 많아지고 세포의 공간 차지로 인해 겔의 가교 반응이 저하되는 문제가 있고, 상기 농도보다 낮은 농도로 포함되는 경우에는, 적절한 세포간 상호작용을 유도하지 못하여 세포 거동이 저하되는 문제가 있다.
- [0072] 또한, 상술한 바와 같이 본 발명에 따른 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물을 이용한 구조체의 제조방법을 제공한다.
- [0073] 상기의 구조체는 바이오 잉크를 이용한 3D 프린팅 기술에서 기대되는 바와 같이, 인조 장기, 생체 조직 등을 의미한다.
- [0074] 구체적으로, 본 발명에 따른, 구조체의 제조방법은 a) 제2항에 따른 1제와 2제를 혼합하여 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물을 제조하는 단계 및 b) 상기 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물로 구조체를 제조하는 단계를 포함한다.
- [0075] 보다 상세하게는, 상기 a) 단계는 3 내지 10 분 동안 1제와 2제를 혼합하는 것이고, 상기 b) 단계는 상기 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물이 프리-겔(Pre-gel) 상태에서 프린트하여 구조체를 제조하는 것이며, 상기 b) 단계를 거쳐 제조된 구조체는 5 내지 20 분 후 겔화되는 것일 수 있다.
- [0076] 상기 구조체의 제조방법에 관해서는, 상술한 3D 프린팅용 바이오 잉크 조성물에 관한 설명을 참조할 수 있다.
- [0077] 이하, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 실시예에 대하여 상세히 설명하나, 이는 하나의 예시에 불과할 뿐, 본 발명의 권리범위가 다음 내용에 의해 제한되지 아니한다.

[0078] 1. GO-혼합 하이드로겔(GO/GHPA) 바이오 잉크의 제조

- [0079] HPA (Hydroxyphenylpropionic acid)을 DW/DMF를 3:2의 부피비로 혼합한 혼합 용매에 용해시킨 후, 카르복실기의 활성화를 위해 15분 동안 EDC/NHS 반응시켰다. 활성화된 용액을 증류수에 용해된 젤라틴과 40 °C에서 24시간 동안 반응시켰다. 정화를 위해, 얻어진 용액을 NaCl 용액과 증류수/에탄올로 처리한 후, 여과하여 동결건조시켜 GHPA 하이드로겔을 제조하였다. HPA의 대체율은 UV 분광기(Jasco, V-750 UV/vis/NIR, Japan)를 이용하여 측정하였다. GHPA 폴리머는 증류수(1 mg/mL)에 용해시킨 후, 275 nm 파장에서의 흡수율을 측정하였다.
- [0080] GO/GHPA 바이오 잉크는 다음과 같은 방법으로 제조하였다. GHPA 하이드로겔을 UV로 10 분 동안 멸균한 후, 37 °C에서 4 시간 동안 3 중량%의 멸균된 PBS (phosphate-buffered saline)에 녹였다. 100 ppm GO(Graphene Oxide) 용액 (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO)을 용해된 GHPA 하이드로 겔에 1 : 9의 부피비로 첨가하고 GO/GHPA 프리-겔(Pre-Gel)을 2개의 표본으로 나눴다. HRP와 GOx를 A 용액에 첨가하고 (GO/GHPA : HRP : GOx = 8:1:1), H₂O₂와 포도당을 B 용액에 첨가했다(GO / GHPA : H₂O₂ : Glucose = 8:1:1). A 및 B 용액 각각은 볼텍싱(Vortexing) 및 피펫팅(Pipetting)을 통해 균일하게 혼합하였다.

[0081] 2. 바이오 잉크의 물리화학적 특성 확인

- [0082] GHPA와 GO/GHPA 하이드로겔의 주사 전자 현미경(Scanning Electron Spectroscopy, SEM)을 통한 광학 현미경 이미지를 촬영하였다.
- [0083] GHPA와 GO/GHPA 바이오 잉크를 제조하였다. 건조과정 중의 모폴로지의 변형을 방지하기 위해 바이오 잉크를 동결건조하였다. 동결건조된 하이드로겔의 단면을 자른 후, 이온 스퍼터링을 이용하여 금/백금 스퍼터링 코팅을 진행하였다. 이어서, 이의 내부구조를 SEM으로 확인하였다.
- [0084] GHPA와 GO/GHPA 하이드로겔의 조성 상의 특성을 평가하기 위해, FT-IR 분광법(Fourier Transform infrared, Nicolet560, Nicolet Co., Madison, WI) 및 라만 분광법을 수행하였다. FT-IR 스펙트럼은 400-4000 cm⁻¹의 파장, 분해능(Resolution) 1.0 cm⁻¹의 조건에서 흡광모드로 측정하였다. 라만 스펙트럼은 5 mW, 파장 514.5 nm인 아르곤 이온 레이저(Ar-ion laser of wavelength 514.5 nm at a power of 5 mW)로 라만 분광계(Micro Raman PL Mapping System, Dongwoo Optron Co., Gwangju, Korea)를 이용하여 측정하였다.
- [0085] GO/GHPA와 GHPA를 확인하기 위해, 라만 분광법과 FT-IR 분광법을 수행하여 그 결과를 도 3의 (B)와 (C)에 나타냈다.

[0086] 도 3의 (B)는 GO/GHPA와 GHPA 하이드로겔의 라만 스펙트럼을 나타낸다. GO/GHPA와 GHPA 하이드로겔은 925cm^{-1} 과 1037cm^{-1} 에서 피크를 나타낸다. 이는 페닐알라닌, 프롤린과 젤라틴의 아미노산 잔기에 할당된 피크이다. GO/GHPA의 라만 피크는 1354cm^{-1} 와 1594cm^{-1} 에서 주요하게 관찰되며, 이는 GO의 G 밴드와 D 밴드와 대응된다. 1354cm^{-1} 에서의 D 밴드와 1594cm^{-1} 에서의 G 밴드는 sp^3 탄소원자의 진동과 sp^2 탄소원자의 산란에 각각 할당된 피크이다.

[0087] 도 3의 (C)는 GHPA와 GO/GHPA 하이드로겔의 FT-IR 스펙트럼을 나타낸다. GHPA 하이드로겔의 FT-IR 피크는 (검은색 선) 고주파수 영역에 나타나는 경향을 보인다. 1634cm^{-1} 에서의 뾰족한 피크는 C=C 방향족성 결합을 의미한다. 1540cm^{-1} 에서의 또 다른 뾰족한 피크는 N-H 굽힘과 C-N 스트레칭 진동에 할당된다. 1390cm^{-1} , 1240cm^{-1} 및 1067cm^{-1} 에서의 피크는 각각 C-O 결합, 에폭시 스트레칭 및 알콕시 스트레칭 진동을 의미한다. GHPA 하이드로겔의 피크와 대비하여, GO/GHPA 하이드로겔의 피크는 GO의 특정 화학적 작용기의 존재를 의미한다. 3492cm^{-1} 과 1711cm^{-1} 에서의 피크는 각각 히드록실기의 O-H 스트레칭과 카보닐기의 C=O 이중결합을 의미한다. 2928cm^{-1} 와 2865cm^{-1} 의 흡수는 메틸렌기의 C-H 스트레칭 진동을 나타낸다.

[0088] 이를 통해, GHPA와 GO/GHPA 하이드로겔의 존재를 확인할 수 있다.

[0089] 3. GO/GHPA 하이드로겔의 유변학적 분석

[0090] 하이드로겔의 탄성 모듈러스(G')와 점성 모듈러스(G'')를 측정하기 위해, $200\mu\text{L}$ 의 하이드로겔을 증류수로 적셔진 용매 트랩이 있는 20mm 의 플레이트 위에 준비하였다.

[0091] GO의 함량에 따른 점탄성 계수는 37°C 의 온도에서 주파수 0.1Hz 및 0.1% 스트레인 조건에서 동적 시간 스위프 모드로 측정하였다.

[0092] 도 3의 (D)를 참고하면, 매트릭스 내의 GO의 함유는 하이드로겔의 기계적 특성에 영향을 미치지 않았다. 유변학적 분석 결과와 유사하게, 동일한 다공 구조체가 하이드로겔 매트릭스 내에서 관찰되었는 바, GO를 함유함에 따라 세포 활성화에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다.

[0093] 4. GO/GHPA 하이드로겔의 In vitro 열화 거동 확인

[0094] GO/GHPA 하이드로겔의 단백질 분해는 중량 측정을 통해 확인하였다. 하이드로겔 ($100\mu\text{L}$)을 마이크로 튜브에 준비하고 초기 하이드로겔 중량 (W_i)을 측정하였다. 그 후, 37°C 에서 0.01mg/mL 의 콜라게나아제가 있는 조건과 없는 조건에서 각각 $200\mu\text{L}$ 의 DPBS에 침지하였다. 소정의 시간이 경과한 후, 마이크로 튜브에서 배지를 제거한 후 분해된 하이드로겔 (W_d)의 무게를 측정하였다. 무게 측정 후, 마이크로 튜브에 신선한 배지를 추가하였다. 남아 있는 하이드로겔의 중량은 다음 식을 이용하여 계산하였다:

[0095] $\text{Hydrogel weight (\%)} = (W_d/W_i) * 100$

[0096] 해당 연구에서 GO/GHPA 하이드로겔의 단백질 분해성은 0.01mg/mL 콜라게나아제 2형(collagenase type II)을 이용하여 평가하였다.

[0097] 콜라게나아제와 함께 배양된 두 그룹 모두에서 24시간 내에 완전한 분해가 나타났다(도 3의 (F) 참고). 이는 GHPA는 단백질 분해 특성을 가지며, HPA 모이머티와의 화학적 결합과 GO 결합 후에도, 미세환경에서의 세포 거동을 규율하는데 중요함을 의미한다.

[0098] 5. 바이오 잉크의 열화 및 열 안정성 확인

[0099] 배양접시는 전자 저울을 이용하여 미리 무게를 측정하였다. 그 후, 각 접시에 2mL 의 용액과 함께 GO/GHPA 바이오 잉크를 로딩한 후, 37°C 에서 2 시간동안 배양하였다. 겔화된 후, 하이드로겔 함유 플레이트의 무게를 재고, 2mL PBS를 첨가하여 21 일 동안 배양하였다. 일정 시간 경과 후, PBS를 완전히 제거한 후의 하이드로겔 함유 접시의 중량을 측정하였다. 열화정도는 초기 하이드로겔 함유 접시와 남은 하이드로겔의 중량의 비율로 평가하였다.

[0100] GHPA와 GO/GHPA 하이드로겔의 열적 안정성은 열중량 분석(thermogravimetric analysis) (TGA, DSC 8000, Perkin Elmer, Waltham, MA)을 통해 평가하였다. 하이드로겔은 초기 상태에서 중량을 측정한 후, 질소 분위기

하에서, 10 °C/min의 가열속도로 상온에서 700 °C까지 가열하였다.

[0101] 세포 배양 환경을 모방하기 위해, 인쇄된 구조체는 최소한의 중량 손실로 이의 구조적 안정성을 유지해야 한다. GO/GHPA와 GHPA 하이드로겔의 열적 안정성을 평가하기 위해 열 중량 분석(Thermogravimetric analysis, TGA)을 수행하였다.

[0102] 도 3의 (A)를 참고하면, GO/GHPA와 GHPA 하이드로겔의 분해와 급격한 중량 손실은 약 300 °C에서 관찰되었다. GO/GHPA와 GHPA 하이드로겔의 총 중량 손실은 각각 61.1%와 67.8%였다. 중량손실 차이는 GO/GHPA 하이드로겔에서의 GO 입자의 열 안정성에 기인한다. 따라서, TGA 프로파일은 GO 입자가 GO/GHPA 하이드로겔 내에 잘 분산되어 있음을 암시하고, GHPA 와 GO/GHPA 하이드로겔이 배양 조건의 온도에서 열적으로 안정함을 암시한다.

[0103] 6. C2C12 근아세포(myoblast) 배양

[0104] C2C12 근아세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD)에서 구매하여, 10 % FBS(fetal bovine serum, Welgene) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신 솔루션(P/S, Sigma-Aldrich Co.)를 사용하여 75-T 플라스크에서 배양하였다. 세포는 37 °C의 온도, 5% 이산화탄소가 포함된 가습분위기에서 유지되었다. 계대배양은 트립신-EDTA 용액(Welgene)을 이용하여 80% 가득찬 정도(confluency)마다 수행되었다. 배양배지는 48 시간마다 교체되었다.

[0105] 7. GO/GHPA의 3D 바이오 프린팅

[0106] 압출타입의 3D 바이오 프린터(In-vivo, Rokit, Seoul, Korea)를 준비하여, 격자 입방체 3D 모델(A lattice cuboid 3D model, 2 cm x 2 cm x 0.2 cm)을 제조하고, NewcreatorK 소프트웨어(Rokit, Seoul, Korea)를 사용하여 g-code 파일로 분리하였다. 인쇄 속도, 유속, 노즐과 베드 사이의 거리, Z 홉과 같은 인쇄 매개 변수는 3D 인쇄 전에 최적화되었다. 최소 전단 응력과 최적화된 인쇄적성을 위해 노즐 게이지는 600 μm로 설정되었다. 압출 시 프리-겔화 상태 바이오 잉크의 적절한 점도를 유지하기 위해 디스펜서와 베드의 온도는 5 °C로 설정하였다. 조성물 용액은 인쇄 공정 중에 반경화 상태를 유지하기 위해 10 mL의 주사기 내에서 혼합하였다. 5 분 내에 커버글래스 (Marienfeld, Thuringia, Germany) 상에 4 층을 인쇄한 후, 인쇄된 구조체를 6-well 플레이트로 옮겼다. 상온에서 안정화를 위해 30분이 경과한 후, 신선한 배지를 플레이트에 추가하였다. 인쇄적성을 평가하기 위해, 세포 함유 인쇄(Cell-laden printing) 전에 바셀린 프로토타입 모델과 비-세포 함유 모델을 인쇄하였다.

[0107] 8. 세포생존율 및 증식력 확인

[0108] 세포생존율은 Live/dead viability kit (Molecular Probes, Eugene, OR)를 이용하여 확인하였다. 1일, 3일, 5일 동안 배양 후, 세포가 도입된 하이드로겔을 live and dead cell assay 용액(2 μM calcein AM 및 4 μM ethidium homodimer-1)에서 상온의 어두운 조건 하에 30분 간 배양하였다. 염색된 샘플은 형광 현미경(fluorescence microscope, IX 81, Olympus, Tokyo, Japan) 및 공초점 레이저 주사 현미경(confocal microscope, LSM 800, Zeiss, Oberkochen, Germany)을 사용하여 관찰하였다. 살거나 죽은 세포들로부터의 형광 시그널은 ImageJ software (NIH, Bethesda, MD)를 이용하여 정량화하였다.

[0109] 세포 증식력은 높은 수용해성의 테트라졸륨 염(tetrazolium salt, WST-8, 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt)을 포함하는 Cell Counting Kit-8 (Dojindo, Kumamoto, Japan)를 이용하여 측정하였다. 상기 테트라졸륨 염은 미토콘드리아 탈수소효소에 의해 노란색 포르마잔 염료로 환원되었다. 1일, 3일, 5일 및 7일 간 배양한 후, 세포들은 WST-8 용액 내에서 37 °C, 5% 이산화탄소가 포함된 가습 분위기 하에서 4시간 동안 배양되었다. 450 nm 에서의 흡광도를 ELISA reader (SpectraMax® 340, Molecular Device Co., Sunnyvale, CA)를 이용하여 측정하였다. 세포 증식력은 상층액의 광학 밀도 비율로 계산되었다.

[0110] 9. 근성 분화와 면역 염색

[0111] GO/GHPA 하이드로겔 구조체는 생장 배지에서 8일 간 배양되었다. 양성 대조군으로서, GHPA 하이드로겔 배지는 생장 배지에서 24시간 동안 배양한 후, 분화배지(DMEM supplemented with 2% HS 및 1% P/S; HS: horse serum, Welgene)로 교체하였다. 신선한 배지를 48시간 마다 첨가하였다. 캡슐화된 셀의 분화는 면역 형광 염색을 통해 평가하였다. 8일 간의 배양 후, 세포를 3.7% 파라포름알데히드(paraformaldehyde, Sigma-Aldrich Co.)로 10 분간 고정하였다. 고정 후, 세포를 5 분동안 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich Co.) 용액과 2% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich Co.) 용액에 30분 동안 2% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich Co.) 용액에 처리하

여 투과성화 및 비선택적 반응을 차단시켰다. Anti-myosin heavy chain (anti-MHC) 마우스 단일 클론 항체 (500 ng/mL)를 첨가하고, 4 °C의 냉장고에서 밤새 반응시켰다. 반응시킨 후, 세포를 FITC 표지된 염소 항-마우스 IgG 항체와 함께 1 : 1000 PBS (Abcam) 및 165 nM TRITC- 표지된 팔로이딘 (molecular probe) 존재 하에 30 분 동안 어두운 상온의 조건에서 배양하였다. 핵은 동일한 조건 하에서 300 nM 4',6-diamidino-2-phenylindole (Sigma-Aldrich Co.)로 대조 염색시켰다. 모든 과정 마다, 샘플은 PBS로 두번 세척하였다. 형광 현미경을 사용하기 위해, 형광 현미경(fluorescence microscope)와 공초점 레이저 주사 현미경(confocal microscope)를 사용하였다.

10. 웨스턴 블롯

8일 간 하이드로겔에서 배양한 후, 구조체를 0.9%의 NaCl 농도에서 55 mM의 소듐 시트레이트와 20 mM EDTA로 용해시킨 후, 세포 분리를 위해, 상온에서 10분동안 피펫을 이용하여 취하였다. C2C12 근아세포는 차가운 PBS 로 2번 세척한 후, 얼음처럼 차가운 RIPA lysis buffer(Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA)를 첨가하였다. 5분 후, 세포를 긁어 내고, 용해물을 4°C의 온도에서 14,000 x g로 20분간 원심분리하였다. 용해물로부터 단백질을 추출하고, BCA™ protein assay를 이용하여 제조업체의 프로토콜에 따라(Pierce, Rockford, IL) 단백질의 농도를 측정하였다. 면역 분석 블록을 위해, 동일한 양의 단백질(40 µg)을 4/20 폴리아크릴아미드-SDS겔 (Daichi Pure Chemicals Co, Ltd, Tokyo, Japan)에서 1시간 동안 30 mA를 가하고, PVDF 멤브레인에 50 분 동안 35mA로 블롯팅하였다. 블로킹 버퍼 (Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan)로 25 °C에서 1시간 동안 블롯을 차단한 후, 1:500의 비율로 희석된 토끼 다중 클론 항-MyoD 및 마우스 항- myogenin Ab와 함께 배양하였다. 참고로, 마우스 단일 클론 Ab에서 글리세릴알데히드-3-포스포이트 탈수효소(GAPDH)를 1:5000로 희석하여 4°C에서 밤새 사용하였다. 블롯은 염소 항-토끼 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) 또는 염소 항-마우스 (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England) 2차 Ab와 함께 horseradish peroxidase-접합시킨 후 1:2000 희석하여 배양하였다. 단백질 표현형은 Chemilumi-one chemiluminescent kit (Nacalai Tesque Inc.)와 X-ray film (Fujifilm, Tokyo, Japan)를 사용하여 확인하였다.

11. 통계학적 분석

모든 변수는 각 실험마다 3개의 독립적인 배양조건에서 실험되었고, 2번 반복하였다(n=6). 정량적 데이터는 평균±표준편차(SD)로 표현되었다. 데이터는 통계분석에 앞서 Levene 테스트를 이용하여 등분산 검정을 수행하였다. 일원 분산 분석(ANOVA; SAS Institute Inc., Cary, NC)을 이용하여 통계적 비교를 수행한 후, 다중 비교를 위한 Bonferroni test를 수행하였다. P < 0.05는 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

12. HRP 농도에 따른 인쇄적성 및 겔 안정성 평가

HRP 농도에 따른 3D 바이오 잉크의 인쇄적성과 겔 안정성 평가를 진행하였다.

상기 제조방법과 동일한 조건과 방법으로 3D 바이오 잉크를 제조하되, HRP의 농도를 각각 i) 20 µg/ml, ii) 35 µg/ml, iii) 50 µg/ml로 하여 3D 바이오 잉크를 제조한 후, 이를 이용하여 구조체를 인쇄한 후, 여기에 세포를 주입하였다.

분해되거나 변형된 구조체를 제외하고는 1, 2, 9, 16일 경과에 따른 구조체의 PBS에 넣고, 37°C, 습한 조건에서의 구조체의 변화를 관찰하였다.

도 13은 HRP 농도를 달리하여 제조된 3D 바이오 잉크를 이용하여 인쇄한 구조체 및 세포가 주입된 구조체의 사진이다.

도 14는 본 발명에 따른 3D 바이오 잉크로 인쇄된 구조체의 세포 주입 후 시간 경과에 따라 구조체의 변화를 관찰한 사진이다.

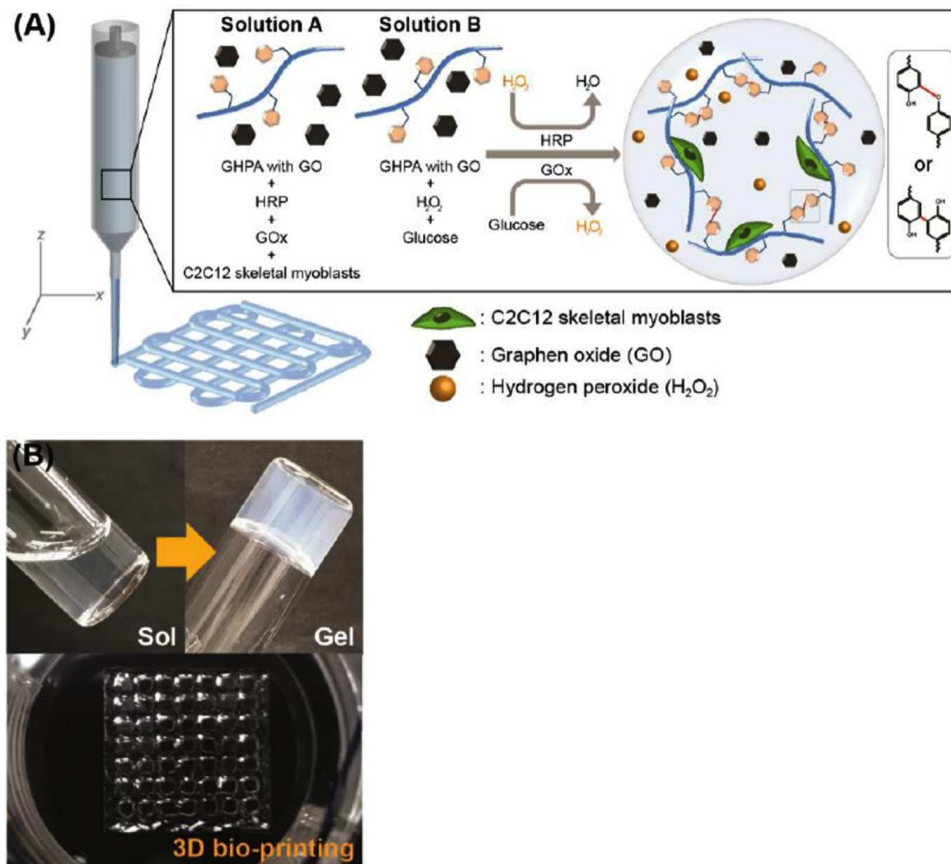
도 13을 참고하면, HRP 농도가 20 µg/ml인 경우, 겔화 속도가 늦어짐에 따라 분해되는 것을 확인할 수 있고, HRP 농도가 50 µg/ml인 경우에는 너무 빠른 겔화 속도로 인해, 이종으로 분해된 겔이 관찰되었다.

도 14에서 확인할 수 있는 바와 같이, HRP 농도가 35 µg/ml인 경우, 분해나 변형없이 겔이 형성되었고, 16일 동안 관찰한 결과, 분해되지 않는 것을 확인할 수 있다.

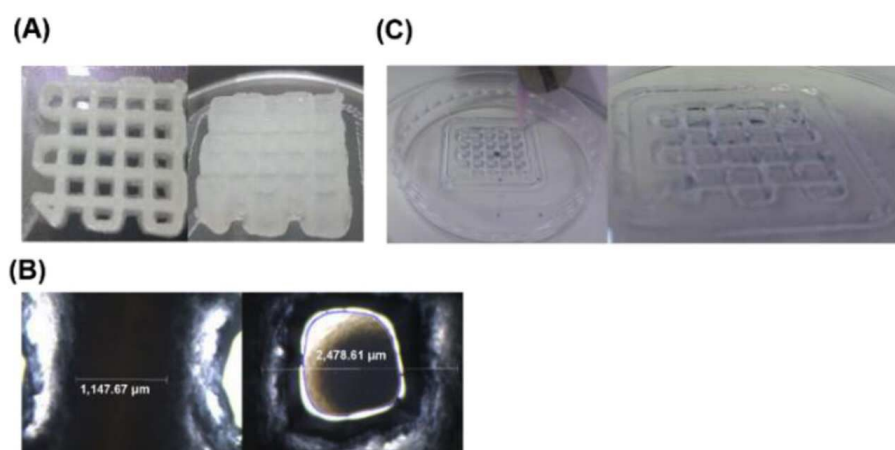
전체적으로, GO/GHPA 바이오 잉크는 이종 효소 매개 가교반응을 통해 성공적으로 제조되었다. GO의 함유는 바이오 잉크의 열적 및 기계적 특성을 저하시키지 않았고 기존의 3D 미세구조를 변형시키지 않았다. 이를 통해, GO/GHPA 매트릭스는 세포에게 적합한 미세 환경을 제공함으로써 3D 세포 엔지니어링에 적합할 것으로 예상된다.

도면

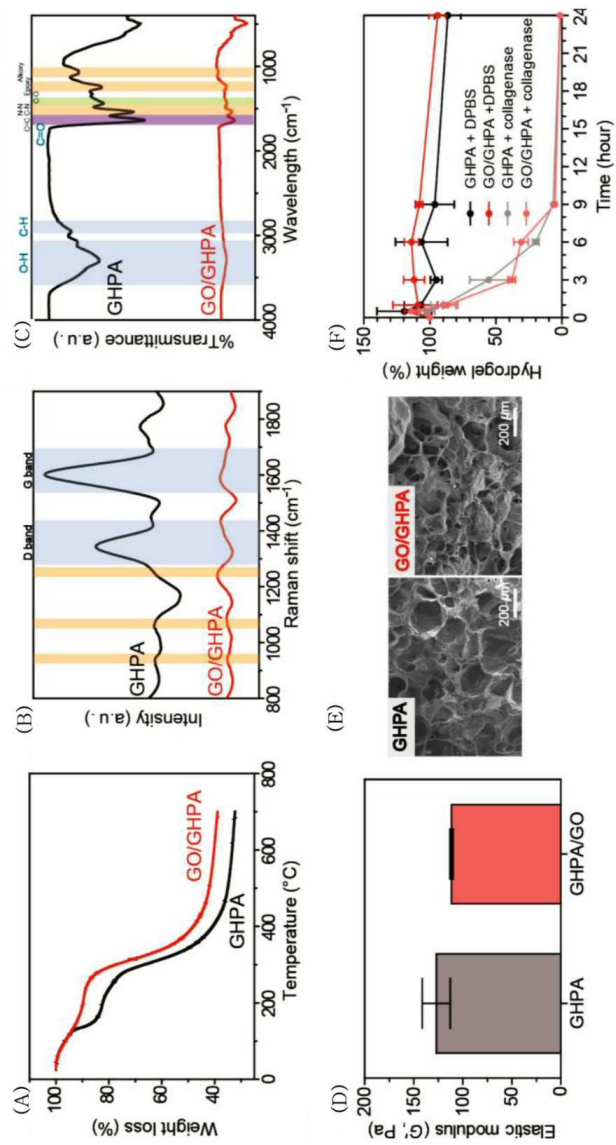
도면1



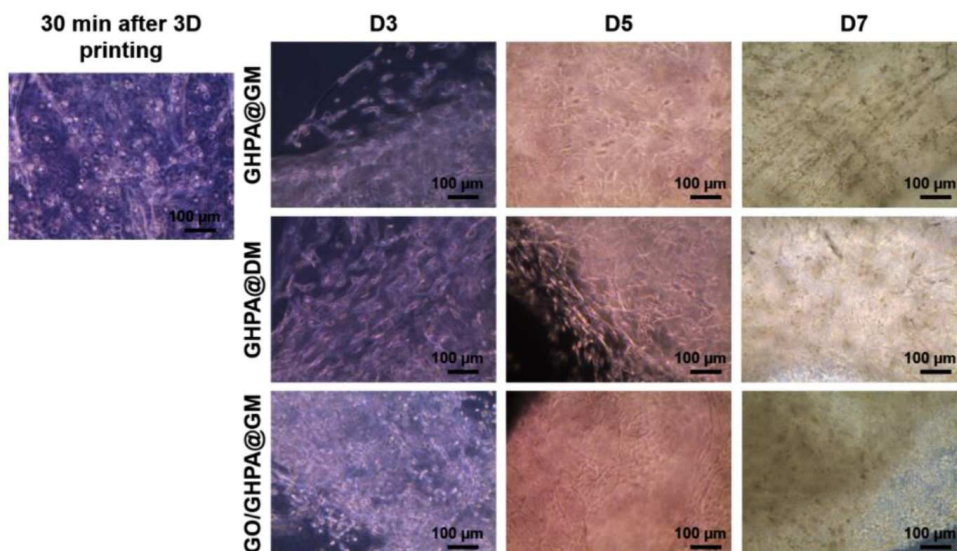
도면2



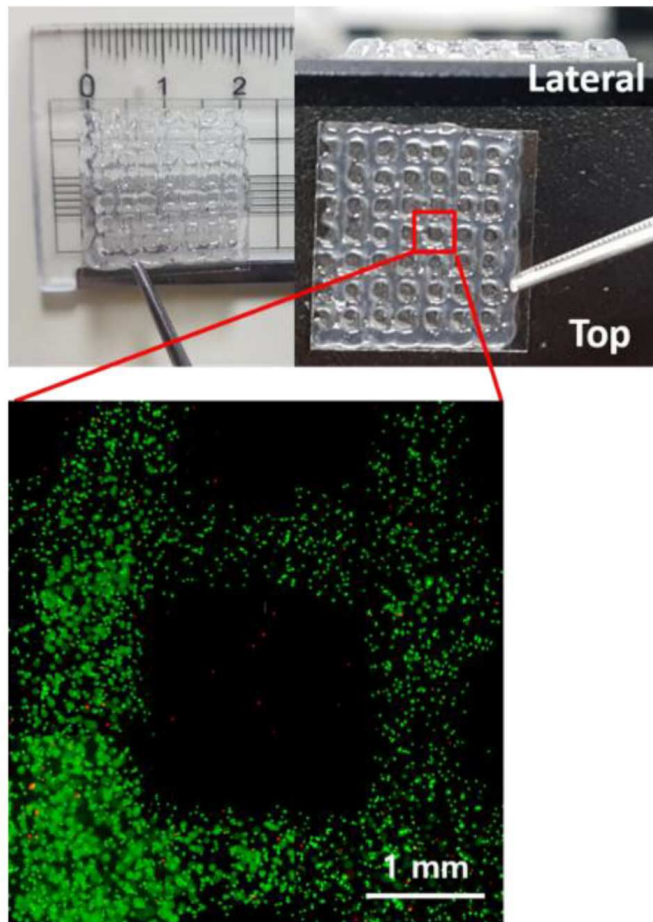
도면3



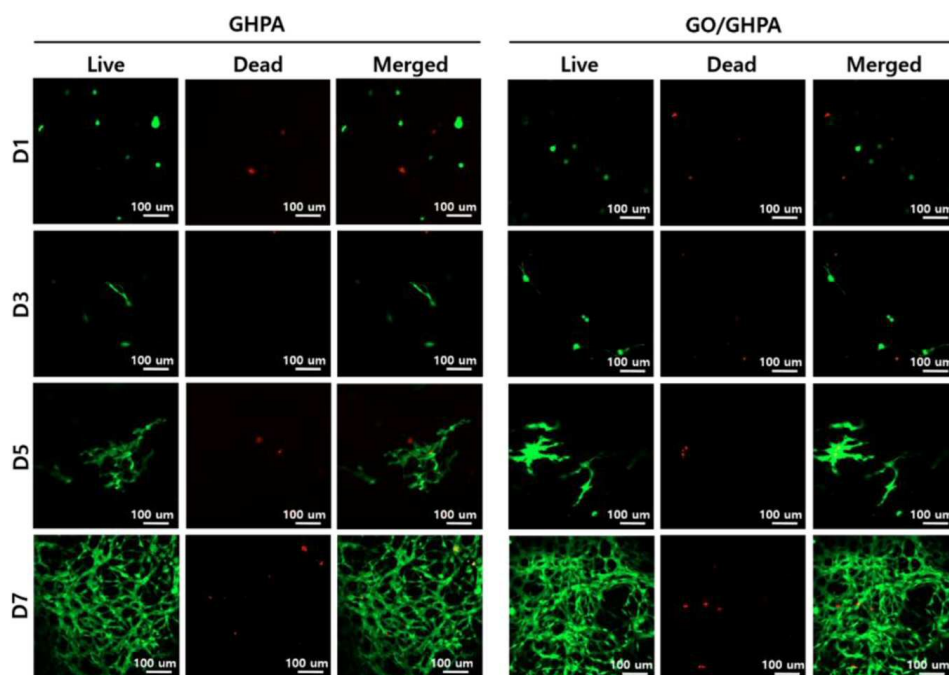
도면4



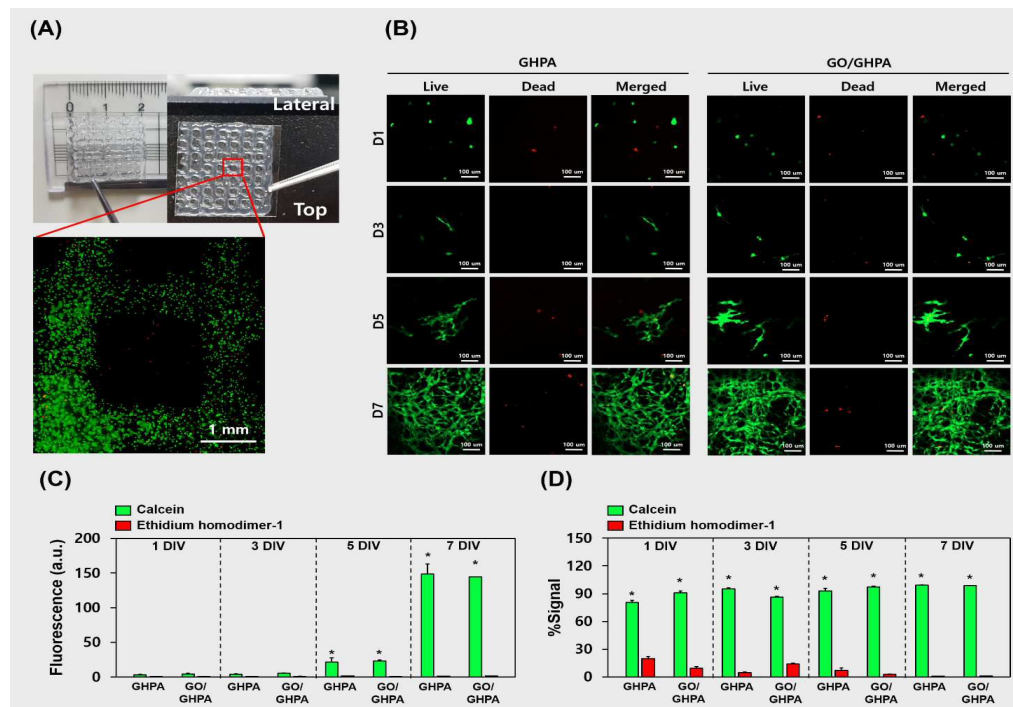
도면5



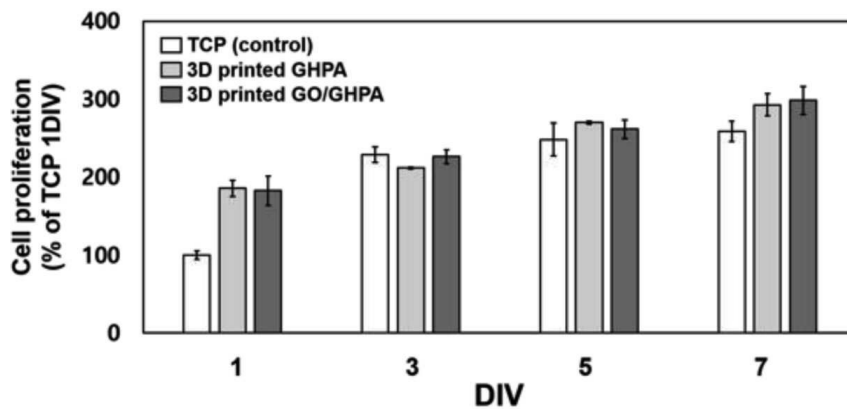
도면6



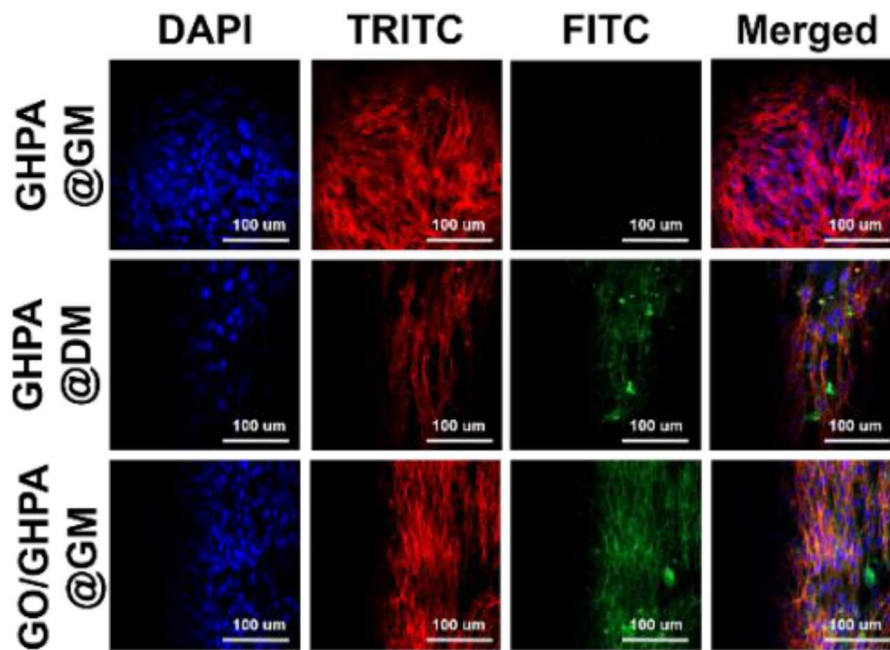
도면7



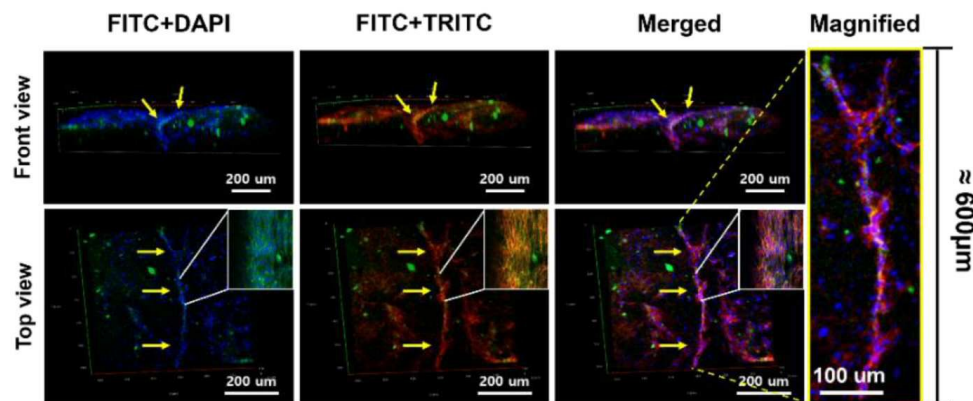
도면8



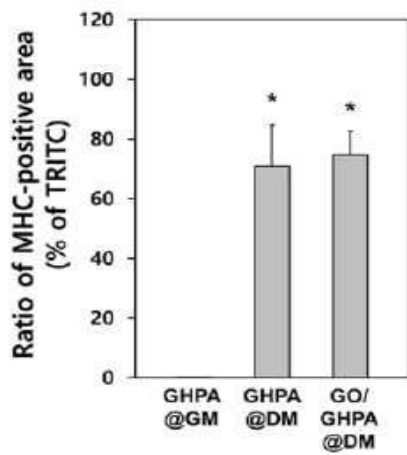
도면9



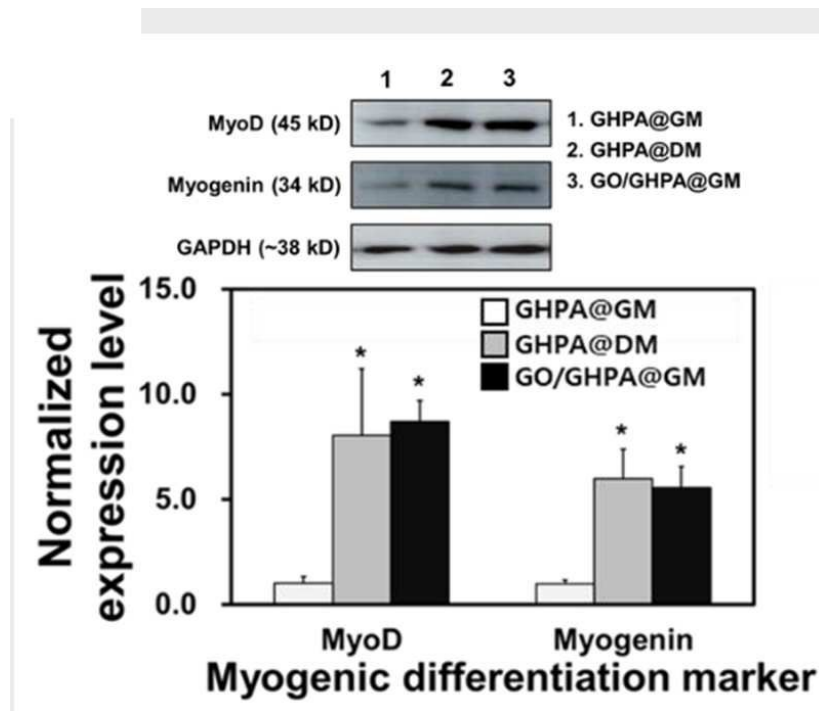
도면10



도면11



도면12



도면13



도면14

