(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년11월19일
(11) 등록번호 10-2180865
(24) 등록일자 2020년11월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C09D 11/101 (2014.01) *B33Y 70/00* (2020.01)
C08F 2/50 (2006.01) *C08F 289/00* (2006.01)
C08K 3/04 (2006.01) *C08K 9/04* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C09D 11/101 (2013.01)
B33Y 70/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0120465
(22) 출원일자 2019년09월30일
심사청구일자 2019년09월30일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020180112436 A
(뒷면에 계속)
전체 청구항 수 : 총 17 항

(73) 특허권자
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
박찬흠
강원도 춘천시 방송길 70, 107동 3701호(온의동, 온의 롯데캐슬 스카이클래스)
김순희
강원도 춘천시 삭주로 40-1, 203호(교동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인(유)화우

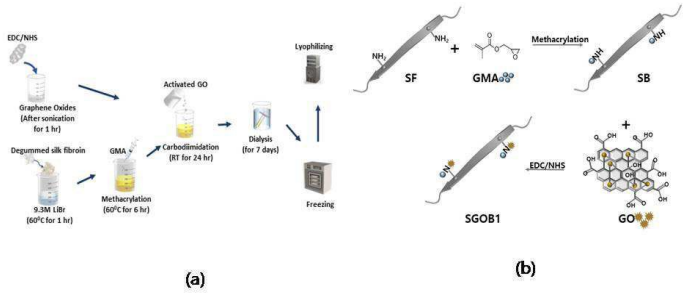
심사관 : 김계숙

(54) 발명의 명칭 **전기전도성을 갖는 광가교 바이오 잉크 조성물 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 생체적합성과 전기전도성을 동시에 갖는 바이오잉크 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 실크피브로인(Silk fibroin, SF), 메타크릴레이트(methacrylate) 화합물 및 그래핀 산화물(Graphene Oxide, GO)이 중합된 고분자 중합체;와 광개시제(photo initiator);를 포함하며, 세포적합성이 높아 의료용 재료로 활용될 수 있으며, 신경세포 또는 근육세포 등 전기전도성을 요구하는 세포를 포함하여 다양한 조직공학용 지지체 재료의 제조에 활용될 수 있는 장점이 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C08F 2/50 (2013.01)
C08F 289/00 (2013.01)
C08K 3/042 (2017.05)
C08K 9/04 (2013.01)

(72) 발명자
올라툰지 아지테루
강원도 춘천시 봉의산길22번길 15-1(봉의동)
이옥주
강원도 춘천시 동면 춘천로449번길 26-6, 302호
이영진
충청남도 서산시 성연면 성연3로 36, 510동 201호 (이안아파트)
서예빈
강원도 춘천시 후만로 37, 607동 203호(후평동, 주공6단지아파트)
이지승
경기도 부천시 조종로85번길 31, 2층 201호 (원미동, 공원빌라)
홍희선
강원도 춘천시 영서로2141번길 33, 103-808 (퇴계동, 중앙하이츠빌1단지아파트)
임태현
서울특별시 중랑구 중랑천로 286, 101동 703호 (묵동, 묵동아이파크아파트)
이한나
강원도 춘천시 춘천로281번길 6, 가동 201호 (후평동)
서예지
서울특별시 용산구 효창원로70길 4, 하늘채빌딩 6층 (효창동)

(56) 선행기술조사문헌
CN109833516 A
JP2019135003 A
KR1020170052800 A
KR1020170035572 A

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2015R1A4A1041631
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기초연구실지원사업
연구과제명	3D 프린팅 기반 휴먼온어칩 융합연구실
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한림대학교
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

실크피브로인(Silk fibroin, SF), 메타크릴레이트(methacrylate) 화합물 및 그래핀 산화물(Graphene Oxide, GO)이 중합된 고분자 중합체;와

광개시제(photo initiator);를 포함하는, 바이오 잉크 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 고분자 중합체는,

SF의 아미노산 잔기에 적어도 하나 이상의 메타크릴레이트 화합물과 적어도 하나 이상의 GO가 공중합된 것을 특징으로 하는, 바이오 잉크 조성물.

청구항 3

용매에 실크피브로인(SF)을 용해시키는 제1단계 ;

실크피브로인(SF) 용액에 메타크릴레이트 화합물을 투입한 후, 교반하여 개질된 실크피브로인(SB)을 제조하는 제2단계;

상기 제2단계를 통해 얻어진 개질된 실크피브로인(SB)과 그래핀 산화물(GO)을 혼합한 후, 교반하여 고분자 중합체(SGOB1)를 제조하는 제3단계;

상기 제3단계를 통해 얻어진 고분자 중합체(SGOB1)가 포함된 용액을 건조한 후, 분말화시키는 제4단계; 및

물에 상기 고분자 중합체(SGOB1) 분말과 광개시제를 혼합하는 제5단계;를 포함하는 바이오 잉크 조성물의 제조방법

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 제1단계는,

분쇄된 누에고치를 0.05M $NaCO_3$ 수용액에 넣고 끓인 후 세척을 통해 세리신을 제거함으로써 실크피브로인을 얻는 정련단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는, 바이오 잉크 조성물의 제조방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 제1단계는,

상기 정련단계를 거친 실크피브로인을, 9.3M 브롬화리튬(LiBr)용액에 0.05 ~ 0.35 g/ml 농도로 용해시킨 후, 60 ℃온도로 가열하는 과정을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 바이오 잉크 조성물의 제조방법.

청구항 6

제3항에 있어서,

상기 제2단계의 메타크릴레이트 화합물은, 글리시딜메타크릴레이트(glycidyl methacrylate: GMA) 또는 메타크릴 무수물(methacrylic anhydride; MA)인 것을 특징으로 하는, 바이오 잉크 조성물의 제조방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 제2단계는,

실크피브로인이 용해된 용액에 글리시딜메타크릴레이트(glycidyl methacrylate: GMA) 4~6 mL를 혼합한 후, 50 ~ 70 ℃의 온도에서 200~400rpm의 속도로 교반하되는 것을 특징으로 하는, 바이오 잉크 조성물의 제조방법.

청구항 8

제3항에 있어서, 상기 제3단계의 그래핀 산화물(GO)은,

0.25 ~ 3.5%의 농도로 물에 분산된 후, 초음파 처리된 것을 특징으로 하는, 바이오 잉크 조성물의 제조방법.

청구항 9

제3항에 있어서, 상기 제3단계의 그래핀 산화물(GO)은,

1-ethyl-3-(3-dimethylamino propyl) carbodiimide hydrochloric acid(EDC)를 0.15~1.96g를 반응시킨 후, 상온에서 0.21~2.8g의 N-hydroxysuccinimide(NHS)을 혼합하여 반응시키고, mercaptoethanol 용액을 추가로 더 혼합하여 GO의 카르복실기가 활성화되도록 하는 것을 특징으로 하는, 바이오 잉크 조성물의 제조 방법.

청구항 10

제3항에 있어서, 상기 제3단계는,

상기 개질된 실크피브로인(SB)과 그래핀 산화물(GO)를 1:1의 부피비로 혼합하여 carbodiimidation 반응을 수행하는 것을 특징으로 하는, 바이오 잉크 조성물의 제조방법.

청구항 11

제3항에 있어서,

상기 제3단계와 제4단계 사이에, 고분자 중합체가 포함된 용액을 12 ~ 14 kDa cutoff 투석튜브에 넣은 후, 불순물을 제거하는 것을 특징으로 하는, 바이오 잉크 조성물의 제조방법.

청구항 12

제3항에 있어서, 상기 제4단계는,

상기 고분자 중합체가 포함된 용액을 -90 ~ -70℃ 온도로 동결하는 단계; 및

-90 ~ -70℃ 온도에서 40 ~ 60 시간 동안 동결건조하는 것을 특징으로 하는, 바이오 잉크 조성물의 제조방법.

청구항 13

제3항에 있어서, 상기 광개시제는,

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 선택되는 적어도 하나 이상을 포함하는, 바이오 잉크 조성물의 제조방법.

청구항 14

제3항에 있어서, 상기 제5단계를 거쳐 얻어진 바이오 잉크 조성물에는, 고분자 중합체 분말 15~25 wt% 및 광개시제 0.2~0.4 wt%가 포함되는 것을 특징으로 하는, 바이오 잉크 조성물의 제조방법

청구항 15

제3항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 실크피브로인(SF)를 대신하여 히알루론산, 콜라겐, 알지네이트, 녹말, 키토산, 젤라틴, 덱스트린, 셀룰로오스, 알긴산, 콘드로이틴 설페이트, 헤파린 및 헤파란으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 사용하는 것을 특징으로 하는, 바이오 잉크의 제조방법

청구항 16

제1항 또는 제2항에 기재된 바이오 잉크 조성물을 사용하여 fused deposition modeling(FDM) 방식 또는 Digital light processing(DLP) 방식의 3D 바이오 프린터를 통해 구조체를 제조하는 방법.

청구항 17

제3항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 방법으로 제조된 바이오 잉크 조성물을 사용하여 fused deposition modeling(FDM) 방식 또는 Digital light processing(DLP) 방식의 3D 바이오 프린터를 통해 구조체를 제조하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 전기전도성을 갖는 바이오 잉크 조성물 및 이의 제조방법, 그리고 이를 사용하여 구조체를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 그래핀은 2004년 Dr. Geim과 Dr. Novoselov가 스카치 테이프를 이용하여 흑연으로부터 얻어내어 우수한 전기적 성질이 최초로 보고된 이후 트랜지스터, 고분자 복합체 등 여러 분야에서 그래핀 기반 소재 응용 연구가 진행되고 있다.

[0003] 그래핀을 대량 생산할 수 있는 방법으로 흑연으로부터 화학적 산화를 통한 그래핀(Graphene Oxide: GO) 제조 방법을 들 수 있는데, 공정비용이 낮고 다양한 환원 방법으로 표면 성질을 제어할 수 있는 장점이 있다.

[0004] 이때 얻어진 그래핀 표면에 층간 삽입되었던 산화물의 영향으로 표면에 수산기 (-OH)와 에폭시기 (>O)가 결합되어 가장자리에 카르복실기 (-COOH)가 결합된 형태로 존재하게 되며, 이로 인해 친수성이 높아지지만 그래핀의 높은 전기전도 특성을 상실하게 된다. 하지만, 높은 열이나 환원제 처리를 통해 GO가 환원(reduction Graphene Oxide: rGO)될 경우에는, oxygen-containing groups들이 제거가 되어 그래핀 고유의 뛰어난 물리적 특성을 복원시킬 수 있다.

[0005] 이러한 rGO는 중간엽줄기세포의 분화에 적절한 것으로 보고되었다. 그러나 생명공학의 응용에 있어서 물에 대한 용해도는 매우 중요한데, rGO는 특성상 소수성을 띄므로 생체재료로의 제작 및 적용에 있어서 문제가 될 수 있으며, 분화 이외에 다양한 화합물, 재료, 단백질, 성장인자등을 결합하기 위한 사이트가 부족한 단점도 있다.

[0007] 3차원 프린팅 (3D printing) 기술은, 컴퓨터 이용 설계 (CAD)로 제작된 도면을 바탕으로 3차원 형상을 구현하는 기술로서 프린팅에 사용되는 재료 및 프린터 구동원리에 따라 광중합 방식, 재료 압출 방식, 접착제 분사방식, 재료분사방식, 고에너지 직접조사방식, 분말 적층 용융방식, 시트 라미네이션 방식 등으로 분류될 수 있다 (ASTM, F2792-12a).

[0008] 3차원 프린팅 기술이 점차 발전함에 따라 좀 더 정밀하고 세밀한 3차원 형상을 제조할 수 있게 되면서, 이를 의료·바이오 분야에 접목시켜 의료기기 부품이나 실제 인간의 조직을 그대로 모방하여 신체 장기 재생을 위해 활용되고 있다. 즉, 3차원 프린팅 기술은 조직공학용 지지체는 물론 수술 시뮬레이션 및 수술 임플란트 제작, 개인별 맞춤형 보형물 제작, 인공 혈관, 인공 장기 등으로 활용될 수 있도록 연구개발이 되고 있다.

[0009] 이 중에서도 세포를 포함하여 함께 프린팅 할 수 있는 기법은 '바이오프린팅' 이라 불리우며, 잉크젯 프린팅, 압출방식, 레이저 방식 혹은 광중합 방식으로 출력 가능하다. 광중합 방식은 다시 SLA(stereolithography apparatus)와 DLP(digital light processing) 방식으로 구분되는데, SLA는 광경화성 수지가 들어있는 수조에 저전력, 고밀도의 UV 레이저를 주사하여 수지를 경화시켜 모델을 조형하는 방식이고, DLP는 DMD(Digital micromirror device) 칩을 이용해 이미지의 고정밀 표시를 구현하는 기술로 광원으로 레이저 대신 digital light projector를 이용한다. 따라서 DLP의 경우에는 한층을 한꺼번에 경화할 수 있어 출력시간을 단축시킬 수 있다.

[0010] 통상적으로 세포를 포함하여 3D 프린팅을 가능하게 하는 재료를 바이오잉크라고 칭하며, 바이오잉크로는 하이드로젤, 마이크로 캐리어, 세포가 제거된 세포외 기질, 또는 세포집합체 등을 재료로 사용할 수 있다. 이중 하이드로젤은 생체적합성이 우수하고 인체의 조직과 유사한 구조를 가지며, 세포 및 생리활성물질의 캡슐화가 용이하다.

[0011] 세포를 포함하는 3차원 인쇄된 구조체가 구조적 측면과 생물학적 측면에서 기능을 발휘하기 위하여 바이오잉크

는, 인쇄적성, 세포적합성, 생분해성, 젤화 특성/기계적 물성, 그리고 세포의 성장과 분화를 조절할 수 있는 특성을 가져야 한다. 즉, 출력된 구조물은 재생기간 동안 원하는 모양을 유지해야 하고, 생체 내에서 적절한 속도로 분해되어야 한다.

[0012] DLP 프린팅에 적용하기 위한 바이오잉크로 천연 유래(gelatin methacryloyl;GelMA, collagen methacryloyl;collagen MA) 또는 합성 하이드로젤(poly(ethylene glycol) diacrylate;PEGDA, polyvinyl alchohol methacrylate;PVAMA 등)의 하이드로젤이 개발되어 사용되고 있으나, 생체적합성, 프린팅 적합성, 기하학적 정밀성 등 물리적 및 생물학적 측면에서 한계가 있다.

[0013] 본 발명의 발명자들은 DLP 바이오 프린터에 적용 가능한 실크피브로인(silk fibroin)의 바이오잉크를 개발하여, 이의 광조형성, 프린팅성, 세포적합성 등을 확인하였다(등록특허 제10-1983741호).

[0015] 최근 전기전도성 물질을 이용하여 생체재료를 개발하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 신경세포, 심근세포, 근육세포, 줄기세포 등은 전기장에 직접적인 반응을 하고, 혈관형성, 세포분열, 신경세포신호, 신경발아, 상처 치료 등 영향을 미친다. 따라서 전기전도성 스캐폴드는 내인성 및 외인성 전계를 전기 감응 세포내로 유도함으로써 세포 분화를 촉진시킬 수 있는 기능이 있어야 한다.

[0016] 이러한 종래의 기술을 토대로 본 발명자는 실크피브로인을 이용하여 GO를 rGO로 제조하였으며, 광가교가 가능한 하이드로젤 형태의 바이오잉크를 제조하여 본 발명은 완성하였다.

[0017] 본 발명에 따른 바이오잉크는 실크피브로인으로 인하여 생체적합성이 향상되고, 친수성이 증진되며, 이에 따른 용해도가 향상되어, 반응중 도입되는 광가교 그룹으로 인하여 광조형 프린팅이 가능하다. 또한, 완성된 rGO는 전기전도성을 갖기 때문에 전기 감응세포의 성장을 촉진할 수 있다. 본 명세서에서는 실크피브로인으로 제작된 rGO의 물리적 특성, 전기적 특성을 확인하였으며, 전기 감응 세포를 포함하여 3D 프린팅을 진행함으로써, 세포 적합성과 분화정도를 확인하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0018] (특허문헌 0001) 등록특허 제10-1983741호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0019] 본 발명에서는, 그래핀 산화물(Graphene Oxide: GO)을 유독한 화학적 처리 또는 고온 어닐링을 하지 않고 단지 천연 단백질 고분자인 실크 피브로인(silk fibroin: SF)으로 화학적 개질하여 환원된 그래핀 산화물(reduction Graphene Oxide: rGO)을 제조하고, 이를 포함하는 바이오 잉크를 제공하고자 한다.

[0020] 또한, 본 발명은 SF의 생체적합성과 GO의 전기전도성을 동시에 갖는 바이오잉크의 제조방법을 제공하고자 한다.

[0021] 본 발명에 따른 바이오 잉크는 SF과 GO의 복합체를 포함함으로써, 신경세포의 성장을 촉진시킬 수 있다.

과제의 해결 수단

[0022] 분 발명의 일 실시 형태에 따른 바이오 잉크 조성물은, 실크피브로인(Silk fibroin, SF), 메타크릴레이트(methacrylate) 화합물 및 그래핀 산화물(Graphene Oxide, GO)이 중합된 고분자 중합체;와 광개시제(photo initiator);를 포함한다.

[0023] 이때 사용되는 고분자 중합체는, SF의 아미노산 잔기에 적어도 하나 이상의 메타크릴레이트 화합물과 적어도 하나 이상의 GO가 공중합된 것이 바람직하다.

[0024] 본 발명의 다른 실시 형태로, 이러한 바이오 잉크 조성물의 제조 방법을 들 수 있는데, 용매에 실크피브로인(SF)을 용해시키는 제1단계; 실크피브로인(SF) 용액에 메타크릴레이트 화합물을 투입한 후, 교반하여 개질된 실크피브로인(SB)를 제조하는 제2단계; 상기 제2단계를 통해 얻어진 개질된 실크피브로인(SB)에 그래핀 산화물(GO)을 투입한 후, 교반하여 고분자 중합체(SGOB1)를 제조하는 제3단계; 상기 제3단계를 통해 얻어진 고분자 중

합체(SGOB1)가 포함된 용액을 건조하여 분말화시키는 제4단계; 및 물에 상기 고분자 중합체(SGOB1) 분말과 광개시제를 혼합하는 제5단계;를 포함한다.

[0025] 상기 제1단계는, 분쇄된 누에고치를 0.05M $NaCO_3$ 수용액에 넣고 끓인 후 세척을 통해 세리신을 제거함으로써 실크피브로인만을 얻는 정련단계;를 포함한다.

[0026] 또한, 상기 제1단계는 정련단계를 거친 실크피브로인을, 9.3M 브롬화리튬(LiBr)용액에 0.05 ~ 0.35g/ml 농도로 용해시킨 후, 60℃의 온도로 가열하는 과정을 더 포함할 수 있다.

[0027] 상기 제2단계의 메타크릴레이트 화합물은, 글리시딜메타크릴레이트(glycidyl methacrylate: GMA) 또는 메타크릴 무수물(methacrylic anhydride; MA)이 사용될 수 있으며, 좀 더 구체적으로는 상기 제1단계에서 얻어진 실크피브로인이 용해된 용액에 글리시딜메타크릴레이트(glycidyl methacrylate: GMA) 4 ~ 6mL를 혼합한 후, 50 ~ 70℃의 온도에서 200 ~ 400rpm의 속도로 교반하되, 상기 GMA의 농도가 352mM 이하인 것이 바람직하다.

[0028] 상기 제3단계의 그래핀 산화물(GO)은, 0.25 ~ 3.5wt%의 농도로 물에 분산된 후, 초음파 처리되는 것이 바람직하다. 또한, 이러한 그래핀 산화물(GO)에 1-ethyl-3-(3-dimethylamino propyl) carbodiimide hydrochloric acid(EDC)를 0.15 ~ 1.96g을 반응시킨 후, 상온에서 0.21 ~ 2.8g의 N-hydroxysuccinimide(NHS)을 혼합하여 반응시키고, mercaptoethanol 용액을 추가로 더 혼합하는 과정을 통해 상기 제3단계가 수행될 수 있다.

[0029] 특히 상기 제3단계에서는, 개질된 실크피브로인(SB)과 그래핀 산화물(GO)을 1:1의 부피비로 혼합하여 carbodiimidation 반응이 수행되는 것이 바람직하며, 상기 제3단계와 제4단계 사이에, 고분자 중합체가 포함된 용액을 12 ~ 14kDa cutoff 투석튜브에 넣은 후, 불순물을 제거하는 과정을 추가로 더 수행하는 것이 더욱 바람직하다.

[0030] 상기 제4단계의 분말화 과정은, 상기 고분자 중합체가 포함된 용액을 -90 ~ -70℃ 온도로 동결하는 단계; 및 -90 ~ -70℃ 온도에서 약 40 ~ 60시간 동안 동결건조하는 것이 바람직하다.

[0031] 상기 제5단계에서 혼합되는 광개시제는, 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 선택되는 적어도 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0032] 이렇게 제1단계 내지 제5단계의 과정을 거쳐 얻어지는 바이오 잉크 조성물에는, 고분자 중합체 분말 15 ~ 25wt% 및 광개시제 0.2 ~ 0.4wt%가 포함될 수 있다.

[0033] 또한, 이러한 바이오 잉크 조성물의 제조 과정 중에서, 상기 실크피브로인(SF)를 대신하여 히알루론산, 콜라겐, 알지네이트, 녹말, 키토산, 젤라틴, 덱스트린, 셀룰로오스, 알긴산, 콘드로이틴 설페이트, 헤파린 및 헤파란으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 사용하는 것도 가능하다.

[0034] 본 발명의 또 다른 실시 형태로, 앞서 설명한 바이오 잉크 조성물을 사용하여 fused deposition modeling(FDM) 방식 또는 Digital light processing(DLP) 방식의 3D 바이오 프린터를 통해 구조체를 제조하는 방법을 들 수 있으며, 이러한 바이오 잉크 조성물의 제조 방법으로 제조된 바이오 잉크 조성물을 사용하여 fused deposition modeling(FDM) 방식 또는 Digital light processing(DLP) 방식의 3D 바이오 프린터를 통해 구조체를 제조하는 방법을 더 포함한다.

발명의 효과

[0035] 본 발명의 생체적합성과 전기전도성을 갖는 광가교 바이오잉크는 누에고치유래 실크단백질과 그래핀 산화물(Graphene Oxide: GO)을 화학적으로 결합시킨 환원된 그래핀 산화물(reduction Graphene Oxide: rGO)로 메타크릴레이트계 화합물의 도입과 프린팅시 혼합되는 광개시제를 통하여 광가교가 가능하며, GO를 함유시킬 실크피브로인(silk fibroin: SF)는 FDA승인을 받은 재료로 세포적합성이 높아 의료용 재료로 활발히 활용되어오고 있으며, 우수한 강도를 나타낸다. 따라서 신경세포 또는 근육세포등 전기전도성을 요구하는 세포를 포함하여 다양한 조직공학용 지지체 재룟로 활용이 가능하다.

[0036] 본 발명에서 제시하는 방법으로 3D 프린팅시에 구조체가 적절하게 제조되므로 스캐폴드 제작에 유용하다. GO를 단순히 물리적으로 혼합하거나 각 주요 성분을 반응시키는 순서에 따라 그래핀 산화물의 분산도 및 용해도가 떨어질 수 있어 결과적으로 3차원 프린터를 통한 구조체 제작 결과에 영향을 준다.

[0037] 다만, 본 발명의 효과들은 이상에서 언급한 효과로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 아래의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도 1(a)는 본 발명에 따른 바이오 잉크 조성물의 제조 과정을 도식적으로 나타낸 그림이고, 도 1(b)는 본 발명의 원료물질로부터 고분자 중합체가 형성되는 과정을 도식적으로 나타낸 그림이다.

도 2는 본 발명으로 만들어진 바이오잉크의 FT-IR을 통한 관능기 분석 결과이다.

도 3은 바이오잉크에서 SF와 GO의 결합정도를 TNBS 어세이를 통해 분석한 결과이다.

도 4는 바이오잉크에서 실제 결합된 그래핀 산화물의 양을 확인하기 위한 TGA 분석 결과이다.

도 5는 바이오잉크의 물에 대한 용해도 및 분산도를 측정한 결과이다.

도 6은 바이오잉크의 프린팅 가능성을 보여주는 결과이다.

도 7은 바이오잉크로 제작된 하이드로젤의 향상된 강도를 나타내는 결과이다.

도 8은 바이오잉크로 제작된 하이드로젤의 전기전도도을 측정한 결과로, 8(a)는 하이드로젤의 전기전도성 측정을 위한 셀을 레진으로 3D 프린팅하여 제작하여 하이드로젤을 장착한 모습이고, 8(b)는 이러한 하이드로젤의 전기전도도 측정결과이다.

도 9(a)와 9(b)는 각각 바이오잉크로 제작된 하이드로젤이 전도체로서의 기능성을 3.5V의 전압에서 LED 회로에서 확인한 결과로, 고분자 중합체의 농도가 각각 0.25wt%, 2.5wt%이다.

도 10은 바이오잉크 내에 전기 감응 세포(Neuro2a)를 포함하여 하이드로젤 프린팅 후 세포 증식도를 확인한 결과이다.

도 11은 바이오잉크내에 전기 감응 세포(Neuro2a)가 포함된 바이오 잉크 조성물에 포함된 하이드로젤 프린팅 후 세포의 생존도를 날짜별(Day 0 내지 7: 도 11)로 확인한 결과이다.

도 12는 하이드로젤 내에 파종된 Neuro2a 세포에서 alpha-tubulin의 발현 여부를 분화인자가 들어가지 않은 성장배양액내에서 확인한 결과이다.

도 13은 하이드로젤 내에 파종된 Neuro2a 세포에서 alpha-tubulin의 발현 여부를 신경세포분화인자가 들어간 분화배양액내에서 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 이하에서는 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.

[0040] 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.

[0041] 한편, 본 발명에서 개시되는 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술되는 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 할 수 없다.

[0042] 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 출원에 기재된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[0044] 상술한 바와 같은 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 실시 형태로는 바이오 3D 프린팅에 사용될 수 있는 전기전도성을 갖는 바이오잉크를 들 수 있다.

[0045] 이러한 바이오잉크는, 실크 피브로인(silk fibroin: SF), 그래핀 산화물 (Graphene Oxide: GO)과 메타크릴레이트(methacrylate) 화합물이 중합된 고분자 중합체; 및 광개시제;를 포함하며, 상기 고분자 중합체는 SF의 아미노산 잔기에 하나 이상의 methacrylate계 화합물과 하나 이상의 GO가 공중합 되어 형성된 것이 바람직하다.

[0046] 도 1(b)에 제시된 것처럼, SF의 아민 그룹과 GMA의 에폭시그룹간의 친핵체첨가 반응으로 개질된 실크피브로인인 SB를 제조한다. 한편, EDC로 GO의 카르복실그룹을 활성화시킨 후, NHS하에서 상기 개질된 실크피브로인인 SB와 반응시켜 고분자 중합체인 SGOB1를 제조하며, 이러한 고분자 중합체와 광 개시제를 포함하는 전기전도성을 갖는 광가교 바이오 잉크 조성물을 제조한다.

[0047] 본 발명의 또 다른 실시 형태로 이러한 전기전도성을 갖는 바이오 잉크의 제조 방법을 들 수 있는데, 도 1(a)에 제시된 것처럼 용매에 실크피브로인(SF)을 용해시키는 제1단계; 실크피브로인(SF) 용액에 메타크릴레이트 화합물을 투입한 후, 교반하여 개질된 실크피브로인(SB)를 제조하는 제2단계; 상기 제2단계를 통해 얻어진 개질된 실크피브로인(SB)에 그래핀 산화물(GO)을 투입한 후, 교반하여 고분자 중합체(SGOB1)를 제조하는 제3단계; 상기 제3단계를 통해 얻어진 고분자 중합체(SGOB1)가 포함된 용액을 건조하여 분말화시키는 제4단계; 및 물에 상기 고분자 중합체(SGOB1) 분말과 광개시제를 혼합하는 제5단계;를 포함한다.

[0048] 상기 제1단계는, 실크피브로인(SF) 용액을 제조하는 단계로, 약 40g의 잘게 잘려진 누에고치를 1L의 0.05M $NaCO_3$ solution에 넣고 약 30분간 끓인 후 세척을 통해 세리신을 제거함으로써 SF만을 얻는 정련단계를 거친다.

이후, 9.3M 브롬화리튬(LiBr)용액에 SF를 20g 용해시킨 후, 40 ~ 80분 동안 50 ~ 70℃ 온도로 가열할 수 있다. 이러한 SF의 용액화 과정은 반드시 LiBr을 사용해야만 하는 것은 아니며, 염화칼슘($CaCl_2$) 역시 사용 가능하다.

[0049] 상기 제2단계는, SF가 용해된 용액에 4~6mL(352 mM)의 글리시딜메타크릴레이트(glycidyl methacrylate: GMA)를 투입한 후, 50 ~ 70 ℃ 온도에서 약 2 ~ 4시간 동안 약 200 ~ 400rpm의 회전속도로 교반하는 것이 바람직하다.

[0050] 상기 제2단계에서 GMA가 6mL를 초과하여 사용될 경우에는 그래핀 산화물의 결합력이 저하될 수 있고, 4mL 미만으로 사용될 경우에는 GMA처리시 광가교능이 저하될 수 있으므로, 바람직하지 않다. 또한, 이때 사용되는 GMA의 농도가 352mM 이하인 것이 더욱 바람직하며, SF에 광가교 그룹을 도입하기 위해 사용되는 methacrylate 화합물은 GMA 외에도 메타크릴 무수물(methacrylic anhydride: MA) 역시 사용 가능하다.

[0051] 상기 제3단계는, 광경화 그룹이 도입된 SF에 GO를 도입하는 단계로, 0.25 ~ 3.5wt%의 농도로 GO를 물에 분산시킨 후, 약 1시간 동안 초음파 세척한다. 여기에 1-ethyl-3-(3-dimethylamino propyl) carbodiimide hydrochloric acid(EDC)를 0.15 ~ 1.96g(좀 더 바람직하게는, 0.15g, 1.4g 혹은 1.96g)을 넣어 반응시켜 GO의 카르복실기가 활성화되도록 한다. 이후 상온에서 0.21 ~ 2.8g의 N-hydroxysuccinimide(NHS)을 첨가하여 약 30분간 저어주면서 반응 중간물의 안정성을 높여주는 것이 바람직하며, 반응을 종료시키기 위하여 2mL의 mercaptoethanol solution을 넣어준다.

[0052] 이렇게 카르복실기가 활성화된 GO와 앞선 제2단계에서 준비된 개질된 실크피브로인(SB)을 1:1의 부피비로 혼합하여 carbodiimidation reaction을 통한 아마이드 결합의 개시를 유도한다. 이 반응은 상온에서 24시간 유지시키며, 상기 제3단계 후에 제조된 고분자 중합체가 포함된 용액을 투석 튜브에 넣고, 물에 침지시켜 불순물을 제거하는 투석단계를 더 포함할 수 있다.

[0053] 상기 투석단계는, 제조된 고분자 중합체가 포함된 용액을 12 ~ 14 kDa cutoff 투석튜브에 넣은 후, 물에 3 ~ 7일간 침지시켜 불순물을 제거하는 것이 바람직하다.

[0054] 상기 제4단계는, 상기 고분자 중합체가 포함된 용액을 -90 ~ -70℃ 온도로 10 ~ 14시간 동안 동결한 다음, 상기 동결 온도와 동일한 온도에서 약 40 ~ 60시간 동안 동결건조 하는 것이 바람직하다. 투석된 용액은 miracloth에 통과시켜 걸러주고 5일간 동결 건조 시킨다.

[0055] 이러한 투석시간이 6일 미만일 경우 제조된 중합체 내 포함된 이온 성분의 제거가 충분하지 못하여 생체 적합성이 저하되거나 프린팅으로 제조된 구조체의 기계적 강도가 저하되며, 투석시간이 8일을 초과하게 되는 경우 시간 초과에 따른 이익이 없어 경제성이 저하된다.

[0056] 사용되는 GO의 농도는 다양하게 변화시킬 수 있으나 젤레이션의 효율성에 따라 약 3.5wt% 이내로 제한하는 것이 바람직하다.

[0057] 상기 제5단계는, 바이오잉크 제조 과정의 마무리 단계로, 광개시제를 혼합하는 단계이다. 광개시제는 빛 혹은 광에 노출될 경우, 바이오잉크 내에서 라디칼 반응을 일으켜 광가교 그룹간의 공유결합을 형성시킴으로써 하이드로젤의 광가교를 유도한다.

[0058] 화학적으로 안정하고 인체에 독성이 없는 화합물이면 특별히 한정되지 않고 사용 가능하고, 바람직하게는, 벤질디메틸케탈(benzyl dimethyl ketal), 아세토페논(acetophenone), 벤조인메틸에테르(benzoin methyl ether), 디

에톡시아세토페논(diethoxyacetophenone), 벤조일 포스핀 옥사이드(benzoyl phosphine oxide) 및 1-하이드록시 사이클로헥실 페닐 케톤(1-hydroxycyclohexyl phenyl ketone)으로 이루어진 군 중에서 선택된 적어도 하나 이상이 사용될 수 있다.

[0059] 특히 본 발명에 따른 바이오잉크에 포함될 수 있는 광개시제로는, 자유 라디컬계이며 생체적합한 광개시제가 바람직한데, 4-(2-히드록시에톡시)페닐-(2-히드록시-2-프로필)케톤(Irgacure 2959)을 포함한 알파 히드록시알킬페논류(irgacure 184, Irgacure 651 포함), 리튬 페닐-2,4,6-트리메틸벤조일포스피네이트(lithium phenyl-(2,4,6-trimethyl benzoyl) phosphinate, LAP)와 같은 제1형 광개시제를 300~400nm 광원에서 사용될 수 있고, 가시광선 영역(400~700nm)의 광원을 사용할 경우에는 에오신 와이(Eoxin-Y), 로즈벵갈(rose bengal), 리보플라빈(riboflavin vitamin B2)과 같은 제2형 광개시제가 사용될 수 있다. 그러나 3D 프린팅의 빠른 출력에 적용하기 위하여 300-400nm 파장의 광원과 함께 상기 제1형 광개시제를 사용하는 것이 바람직하다.

[0060] 이상에서는 본 발명에서 바이오잉크의 기반을 이루는 재료로 실크피브로인을 중심으로 설명하였으나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니며, 생체적합성과 친수성을 지닌 히알루론산, 콜라겐, 알지네이트, 녹말, 키토산, 젤라틴, 덱스트린, 셀룰로오스, 알긴산, 콘드로이틴 설페이트, 헤파린 및 헤파란으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상이 상기 실크피브로인을 대체하여 대신 사용되는 것도 가능하다.

[0061] 본 발명에 따른 전기전도성을 갖는 바이오잉크는 광원을 처리할 수 있는 모든 3D 바이오 프린터에 사용될 수 있으며, 바람직하게는 DLP(Digital light processing) 방식의 3D 바이오 프린터에 사용될 수 있다.

[0062] 이하에서는 이상의 내용을 하기 실시예/비교예/실험예를 통해 보다 상세하게 설명하고자 한다. 다만, 이러한 설명은 본 발명을 좀 더 쉽게 이해할 수 있도록 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들로 한정되는 것은 아님을 밝혀둔다.

[0064] **[제조예] 실크에서 실크피브로인(SF) 용액을 제조**

[0065] 40g의 잘게 잘려진 누에고치를 1L의 0.05M $NaCO_3$ solution에 넣고 30분간 끓인 후 세척을 통해 세리신을 제거함으로써 실크피브로인만을 얻는 정련단계를 거친다. 9.3M 브롬화리튬(LiBr)용액에 실크 피브로인 20g을 용해시킨 후, 60분간 60℃온도로 가열한다.

[0067] **[실시예 1] 실크피브로인(SF), 메타크릴레이트 화합물(GMA), 그래핀 산화물 (GO)의 순서로 중합된 고분자 중합체 제조(SGOB1)**

[0068] 먼저, SF에 광경화 그룹을 도입하기 위해, 실험예 1에서 얻어진 SF에 5mL (352 mM)의 glycidyl methacrylates(GMA)를 투입한 후, 60℃ 온도에서 2 ~ 4시간 동안 200 ~ 400rpm의 회전속도로 교반하며 충분히 반응을 시킨다(개질된 실크피브로인 SB 제조).

[0069] GO를 도입하는 단계로, 각각 0.25wt%(0.25%SGOB1), 2.5wt%(2.5%SGOB1), 3.5wt%(3.5%SGOB1)의 농도로 그래핀 산화물을 물에 분산시킨 후, 1시간 동안 초음파 세척 과정을 수행한다. 여기에 1-ethyl-3-(3-dimethylamino propyl) carbodiimide hydrochloric acid(EDC)를 각각 0.15g(0.25%SGOB1), 1.4g(2.5%SGOB1), 1.96g(3.5%SGOB1)씩 넣어 반응시켜 GO의 카르복실기가 활성화되도록 하였다.

[0070] 반응 직후 0.21g(0.25%SGOB1), 2g(2.5%SGOB1), 2.8g(3.5%SGOB1)의 N-hydroxysuccinimide(NHS)을 첨가하여 30분간 저어주면서 반응 중간물의 안정성을 높여준다. 반응을 정지시키기 위하여 2mL의 mercaptoethanol solution을 넣어준다.

[0071] 이렇게 카르볼실기가 활성화된 GO 각각에 광경화 그룹이 도입되어 개질된 실크피브로인(SB)를 1:1의 부피비로 넣어주어 carbodiimidation reaction을 통해 아마이드 결합의 개시를 유도한다. 이 반응은 상온에서 24시간 유지시킨다.

[0073] **[비교예 1] 실크피브로인(SF)에 그래핀 산화물(GO)을 결합시킨 중합체 제조 (SGO)**

[0074] 광경화 그룹이 도입되지 않은 SF에 GO를 직접 도입하여 중합체를 제조하였으며, 앞서 실험예 2의 2.5%SGOB1의 제조 과정과 동일하되, SF에 glycidyl methacrylates(GMA)를 투입하는 과정 없이 직접 SF와 카르복실기가 활성화된 GO를 1:1의 부피비율로 혼합하여 carbodiimidation reaction을 통한 아마이드 결합의 개시를 유도한다. 이 반응은 상온에서 24시간 유지시킨다.

[0076] **[비교예 2] 실크피브로인(SF), 그래핀 산화물(GO), 메타크릴레이트 화합물(GMA)의 순서로 중합된 고분자 중합체**

제조(SGOB2)

[0077] 앞서 비교예 1에서 제조된 SGO에 메타크릴레이트 화합물을 사용하여 광가교그룹을 도입하였으며, 비교예 1의 SGO 용액에 6mL(424 mM)의 GMA를 투입한 후, 60℃ 온도에서 2 ~ 4시간 동안 200 ~ 400rpm의 회전속도로 교반하여 충분히 반응을 시킨다.

[0078] **[비교예 3] 실크피브로인(SF)에 메타크릴레이트계 화합물(GMA)을 중합시킨 고분자 중합체 제조(SB)**

[0079] 앞선 제조예에서 제조된 SF에 실시예 1과 동일한 방식으로 광가교 그룹을 도입하는 하여 시료(SB)를 제조하였으며, SF 용액에 6mL(424 mM)의 GMA를 투입한 후, 60℃ 온도에서 2 ~ 4시간 동안 200 ~ 400rpm 회전속도로 교반하며 충분히 반응을 시킨다.

[0081] **[제조예 2] 바이오잉크 제조 및 3D 프린팅 단계**

[0082] 실시예 1 및 비교예 1 내지 3에서 제조된 시료 각각에 대해서 동결 건조 단계를 동일하게 수행하였다. 상기 실시예 1 및 비교예 1 내지 3에서 제조된 모든 고분자 중합체들(SGOB1, SGO, SGOB2, SB)은 반응 후 12 ~ 14kDa cutoff 투석튜브에 넣은 후, 물에 6일간 침지시켜 불순물을 제거하였다.

[0083] 투석된 용액은 miracloth에 통과시켜 걸러주고 걸러준 용액은 -80℃ 온도로 10 ~ 14시간 동안 동결한 다음, 동결온도와 동일 온도하에서 40 ~ 60시간 동안 동결건조 한다. 실시예 1에서 제조된 SGOB1 시료의 경우, 사용된 GO의 양에 따라 0.25%SGOB1, 2.5%SGOB1, 3.5%SGOB1로 각각 구분하였다.

[0084] 바이오잉크로 프린팅 하기 직전 단계로 SGOB1, 또는 SGOB2 용액을 20%의 농도로 제조하고 여기에 광개시제 LAP가 0.3%(w/v) 포함되도록 섞어준다.

[0085] 바이오잉크로 DLP (digital light processing)을 시행하는 단계로, 상기의 용액을 DLP 프린터 bath에 넣고 출력을 수행하였다.

[0087] **[실험예 1] 바이오잉크 내 그래핀 산화물과 실크피브로인 용액의 화학적 결합 여부 분석**

[0088] 바이오 잉크 조성물 내에 포함된 물질의 메타크릴레이션 반응이 성공적으로 수행되었는지 여부를 확인하기 위하여 동결건조된 스폰지 형태의 시료에 대해서 FT-IR을 측정하였고 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0089] 실크피브로인의 결합은 실크피브로인의 amide I (1645 cm^{-1}), II(1513cm^{-1}), III(1229cm^{-1})로 확인된다. 실크피브로인에 그래핀 산화물의 도입은 amide III 밴드 및 OH밴드 크기의 감소로 이어진다. SB, SGOB1 및 SGOB2에서 에폭시 그룹의 감소를 통해 메타크릴레이션 결과를 확인할 수 있었다.

[0091] NMR 분석으로 메타크릴레이트 비닐그룹을 나타내는 피크(6.5 ~ 7ppm)와, 메틸그룹을 나타내는 피크(2.69 ~ 2.91ppm)를 확인하였고 하기의 표 1에 정리하였다.

표 1

[0092]

시료명	Methacrylated vinyl group	Methacrylated methyl group
SF	0.00	0.00
SGO	0.00	0.00
SGOB2	0.02	0.01
SB	0.18	0.16
SGOB1	0.19	0.11

[0093] 각 시료는 1mL D_2O에 5mg의 건조된 재료를 용해시켜 0.45㎛ 필터에 걸러 700㎕ NMR 튜브에 넣어 준비하였고 600 MHz H-NMR로 분석하였다. GMA와 같은 메타크릴레이트 화합물이 처리되지 않은 그룹인 SF, SGO에는 해당 피크가 나타나지 않았으며, SB, SGOB1, SGOB2의 경우에만 피크가 확인되었다. 특히 SGOB1의 경우에는 상기 표 1에서 확인되듯이, GMA의 결합정도가 상대적으로 높음을 알 수 있다.

[0095] 바이오 잉크 조성물 내에서 실크피브로인과 그래핀 산화물의 결합 정도를 TNBS 어세이를 통해 분석하였으며, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0096] TNBS 어세이는 샘플내의 1차 아민기를 정량하는데 사용되며, 각 시료는 10mg/ml의 저장용액에서 100㎕을 취하여 0.1 M sodium bicarbonate(pH=8.5) 1mL(반응버퍼)에 희석시켰다. 반응버퍼 내에 TNBS를 0.01%(w/v)로 준비

한다. 여기서 500㎕을 취하여 워킹용액 250㎕과 혼합하고 37℃에서 2시간 배양한다. 250㎕의 10wt% SDS와 125㎕의 1N HCl로 혼합물을 섞어 반응을 정지시킨 후, 355nm의 파장에서 흡광도를 측정하였으며, 이를 1차 아민기로 해석하였다. 도 3의 결과에서 확인되듯이, 실크피브로인(SF)과 비교하여 SGO, SGOB2, SGOB1, SB 순으로 흡광도가 낮아졌으며, SGOB1그룹에서 상당량의 SF-GMA 결합이 존재함을 알 수 있었다.

[0098] 도 4는 바이오 잉크 조성물 내에서 실제 결합된 그래핀 산화물의 양을 확인하기 위한 TGA 분석 결과이다. 질소 분위기(100mL/min) 및 10℃/min의 승온 속도 하에서 측정하였다. 그래핀 산화물(GO), SB, SGOB1 각각에서 60.21wt%, 66.31wt%, 61.45wt%의 감소가 확인되었으며, 이를 통하여 SGOB1 내에 약 4.8wt%의 그래핀 산화물이 함유되어있음이 확인할 수 있었다.

[0100] **[실험예 2] 바이오잉크 내에서 그래핀 산화물의 용해도 및 분산도 측정**

[0101] 도 5는 바이오 잉크 조성물의 물에 대한 용해도 및 분산도를 관찰한 결과이다. 물에 순수 GO(I) 혹은 rGO(II)를 분산시킨 경우, SB내에 GO를 단순 분산시킨 경우(III), 0.25% SGOB1(IV), 2.5% SGOB1(V), 3.5% SGOB1(VI)을 0.05%로 용해시킨 후 60분 동안의 변화를 관찰한 결과이다(단, (III)의 경우에는 0.001% GO와 0.049% SB를 혼합하였음). 도 5a는 혼합 즉시(t = 0min), 도 5b 내지 도 5d는 각각 혼합 후 20분(t = 20min), 40분(t = 40min) 및 60분(t = 60min) 경과 후 관찰한 결과이다. 시료 (I) 내지 (III)은 바닥에 침전되었으나, 시료 (IV) 내지 (VI)는 농도와 관계없이 용매상에 고르게 분산된 것을 확인할 수 있다.

[0103] **[실험예 3] 바이오잉크의 프린팅 가능성 측정**

[0104] 도 6은 각 시료인 바이오 잉크 조성물의 프린팅 가능성을 보여주는 결과이다. SGOB1의 경우에는 농도가 증가할수록 고에너지량의 UV를 처리하여 프린팅을 완성할 수 있었다. 이는 바이오잉크의 농도가 증가할수록 광가교사이트가 증가하였기 때문인 것으로 해석된다. 반면 SGOB2 바이오잉크의 경우는 UV 조사량의 증가와 무관하게 프린팅이 되지 않았으며, 이는 SGOB2에 GMA의 결합이 잘 이루어지지 않았기 때문인 것으로 해석된다.

[0106] **[실험예 4] 바이오잉크로 제작된 하이드로젤의 강도 측정**

[0107] 제조예에서 제조된 바이오 잉크 조성물 시료를 사용하여 DLP 프린팅으로 출력된 하이드로젤의 샘플(직경 10mm, 높이 10mm) 각각에 대해서 10kg 로드셀을 이용하여 압축강도를 측정하였고(압축속도 = 5mm/min), 인장강도는 덤벨 모양의 시편(길이 7mm, 두께 1.5mm)을 출력하여 측정하였다(인장속도 = 5mm/min).

[0108] 이렇게 측정된 인강강도와 압축강도 결과는 각각 도 7(a)와 7(b)에 제시하였다. SGOB1의 경우에는 농도가 증가함에 따라 인장강도(a)와 압축강도(b) 모두 공통적으로 증가하였으며, SB 바이오 잉크 조성물 대비 인장강도는 약 2.6배, 압축강도는 약 1.3배 증가하였다.

[0110] **[실험예 5] 바이오잉크로 제작된 하이드로젤의 전기전도성 측정**

[0111] SGOB의 전기전도성을 측정하기 위하여 증류수에 바이오잉크를 준비하고 DLP 프린팅하여 하이드로젤을 제작하였다(직경 5mm, 두께 5mm). 프린팅 직후의 하이드로젤을, 4개의 프로브가 장착된 셀 내에 장착한 후, 즉시 하이드로젤의 전기 전도성을 측정하였으며, 측정 툴을 도 8(a)에 나타내었다.

[0112] 전기전도성은 20Hz ~ 1kHz의 범위에서 frequency sweep하면서 측정하였고, 그 결과를 도 8(b)에 제시하였다. SGOB 시료의 경우에는 frequency를 높일수록 전기전도성이 증가하였고, SGOB1 내의 GO농도가 높아질수록 전기전도성이 증가하였다.

[0113] 도 9는 바이오잉크로 제작된 하이드로젤이 전도체로서의 기능성을 3.5V의 전압에서 LED 회로에서 확인한 결과이다. 하이드로젤은 가로, 세로, 높이 10mm x 5mm x 3mm의 크기로 프린팅 되었다. SGOB1 하이드로젤을 통하여 전기가 잘 흐르는 것을 LED 램프가 켜짐을 통해 알 수 있다.

[0115] **[실험예 6] 바이오잉크로 제작된 하이드로젤의 세포적합성 측정**

[0116] 바이오 잉크 조성물 내에 세포(Neuro2a)를 포함시킨 후, 하이드로젤 프린팅 하여 세포 증식도를 측정하기 위해 CCK-8 assay를 시행하였고, 그 결과를 도 10에 나타내었다. 세포(1x10^7 cells/mL)를 혼합하기 전 바이오잉크는 60℃에서 30분 동안 저온멸균하였다.

[0117] 세포 프린팅 후 성장배양액(10% FBS, 1% Sodium Pyruvate, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% non-essential amino acid가 함유된 Welgene's High Glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM))에서 30℃, 5% CO2에서 배양하였으며, CCK-8 용액을 4시간 처리후에 증식률을 7일간 측정하였다.

[0118] 7일간 세포증식률은 그래핀 산화물이 포함되거나 포함되지 않은 그룹 모두에서 비슷한 수준으로 증가하는 것을 볼 수 있었으며, 이러한 시료 범위 내로 포함된 그래핀 산화물의 농도 범위에서는 세포 독성에 영향을 주지 않았음을 확인할 수 있었다.

[0119] 도 11은 바이오 잉크 조성물 내에 세포(Neuro2a)를 포함하여 하이드로젤 프린팅 후 세포의 생존도를 Live/Dead assay로 확인한 결과를 도시한 것이다. 앞서 설명한 배양 조건과 동일하며, 7일간 하이드로젤 내에서 죽은 세포(빨간색)는 거의 발견되지 않았으며 살아있는 세포(녹색)가 점차 증가하는 것을 확인할 수 있다(D0: 배양 시작 시, D1, D3, D5 및 D7은 각각 배양 기간(D1은 배양 1일 경과, D7은 배양 7일 경과를 의미함. 이하에서도 동일함)을 의미한다.

[0121] **[실험예 7] 바이오잉크로 제작된 하이드로젤의 신경세포 분화능 확인**

[0122] 하이드로젤 내에 파종된 Neuro2a 세포에서 alpha-tubulin의 발현 여부를 분화인자가 들어가지 않은 성장배양액 내에서 확인하였다. 프린팅, 세포혼합, 배양조건은 앞선 실험예 6과 동일하다.

[0123] 하이드로젤은 10㎛로 동결박절하였으며 통상적인 면역형광염색법을 시행하였다. mouse monoclonal alpha-tubulin antibody를 1차 항체 (1:150 diluted)로, goat anti-mouse FITC conjugated 2차 항체 (1:200 diluted)를 사용하였고, 결과를 도 12에 나타내었다.

[0124] 성장배양액 내에 그래핀 산화물이 포함된 경우가, 그렇지 않은 경우에 비해 alpha-tubulin 발현정도가 높음을 알 수 있다.

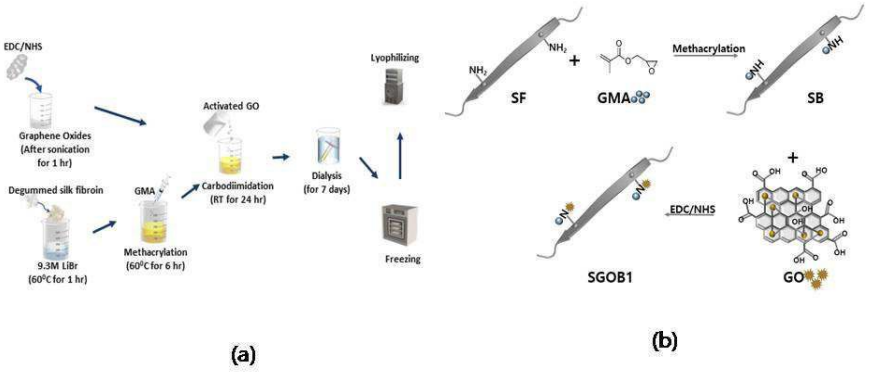
[0126] 도 13에는 하이드로젤 내에 파종된 Neuro2a 세포에서 alpha-tubulin의 발현 여부를 신경세포분화인자가 들어간 분화배양액 내에서 확인한 결과를 정리하였다.

[0127] 분화배양액의 조성은 1% FBS, 1% Sodium Pyruvate, 1% Non-essential amino acid, 1% Penicillin-Streptomycin, and 10 μRetinoic acid이 함유된 DMEM 이고, 상기와 같은 조건에서 배양 및 분석하였다.

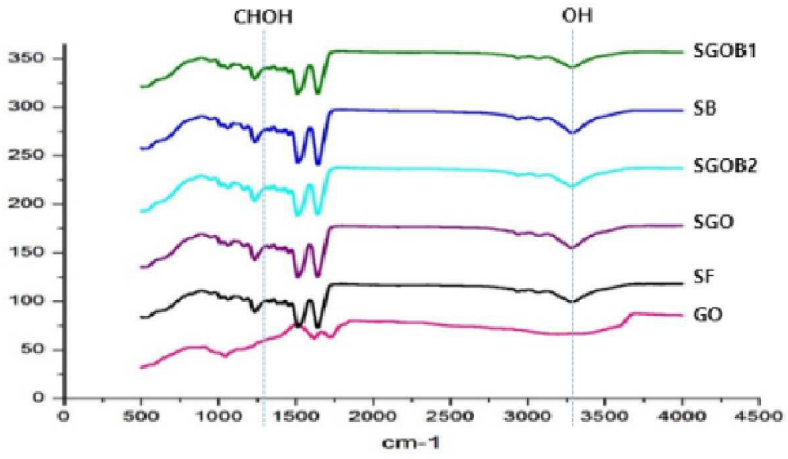
[0128] 그래핀 산화물이 포함된 경우가 그렇지 않은 경우에 비해 alpha-tubulin 발현정도가 높았으며 그 정도는 성장배양액으로 배양했을 때보다 더 향상되었다.

도면

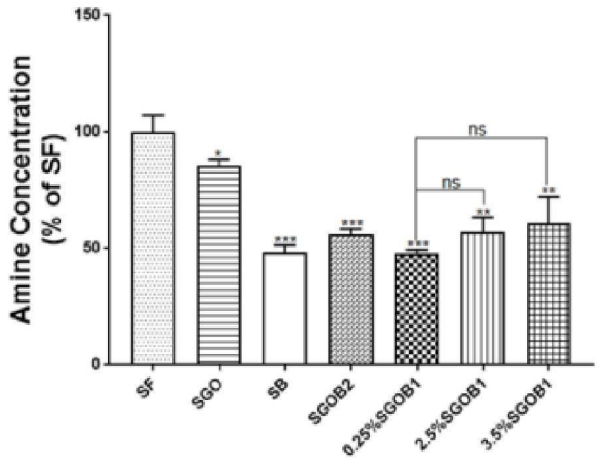
도면1



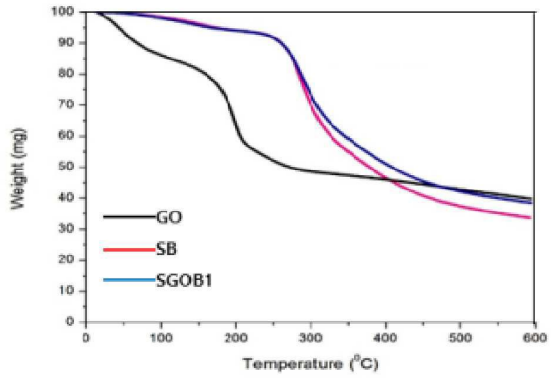
도면2


CHOH
OH
SGOB1
SB
SGOB2
SGO
SF
GO
350
300
250
200
150
100
50
0
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500
4000
4500
cm-1

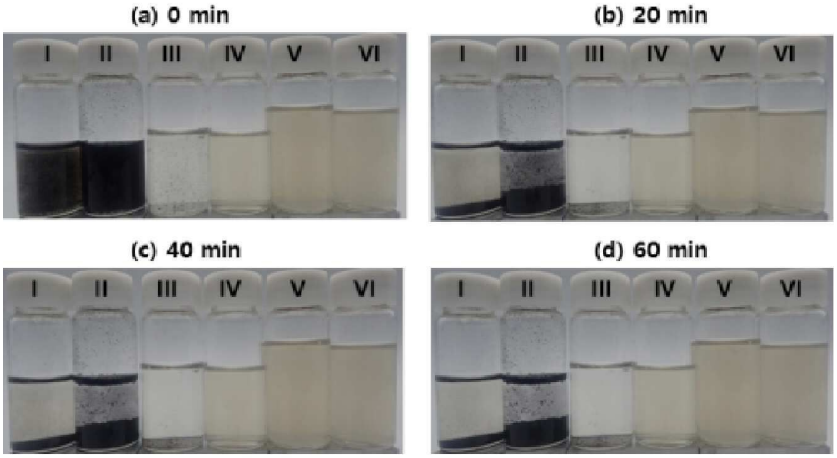
도면3


Amine Concentration (% of SF)
150
100
50
0
ns
ns
*
***
***
***
**
**
SF
SGO
SB
SGOB2
0.25%SGOB1
2.5%SGOB1
3.5%SGOB1

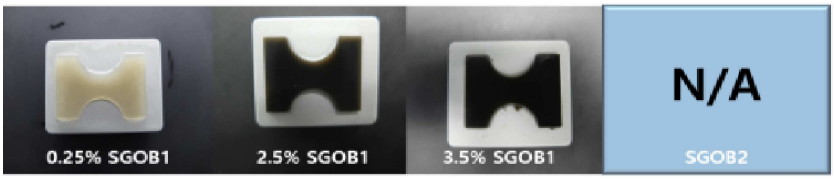
도면4


Weight (mg)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
GO
SB
SGOB1
0
100
200
300
400
500
600
Temperature (°C)

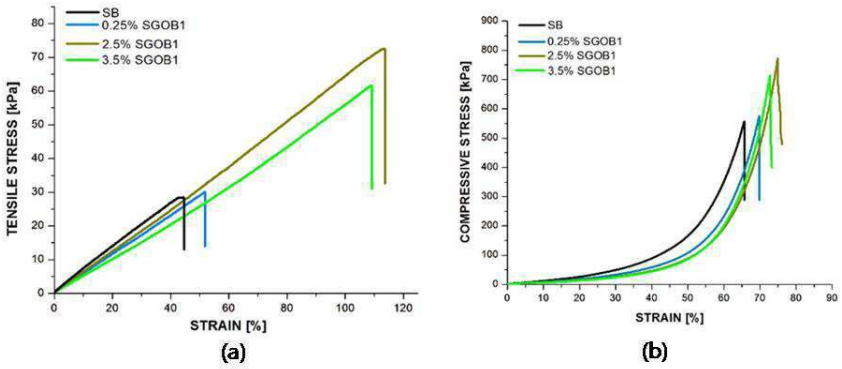
도면5


(a) 0 min
(b) 20 min
(c) 40 min
(d) 60 min
I
II
III
IV
V
VI

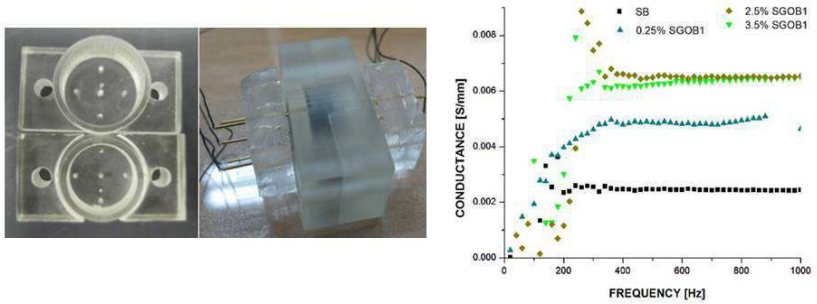
도면6


0.25% SGOB1
2.5% SGOB1
3.5% SGOB1
N/A
SGOB2

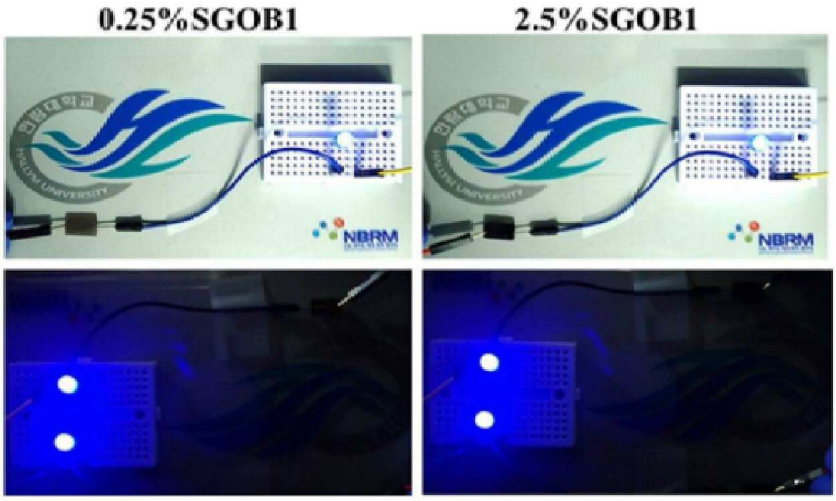
도면7


SB
0.25% SGOB1
2.5% SGOB1
3.5% SGOB1
TENSILE STRESS [kPa]
STRAIN [%]
(a)
COMPRESSIVE STRESS [kPa]
STRAIN [%]
(b)

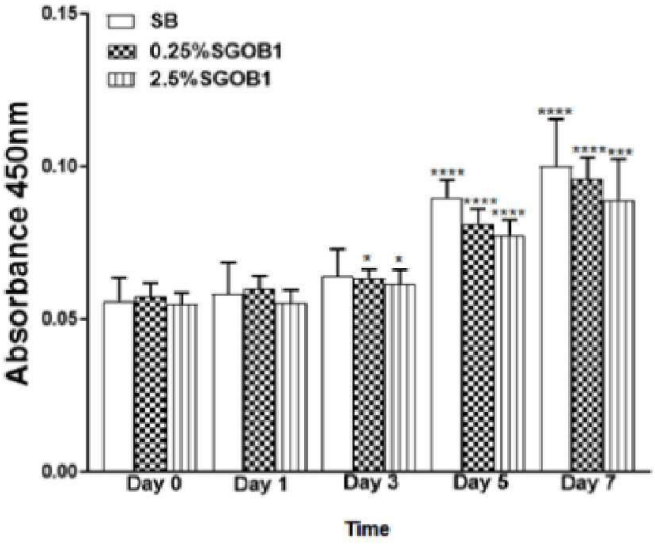
도면8


SB
0.25% SGOB1
2.5% SGOB1
3.5% SGOB1
CONDUCTANCE [S/mm]
0.000
0.002
0.004
0.006
0.008
0
200
400
600
800
1000
FREQUENCY [Hz]
(a)
(b)

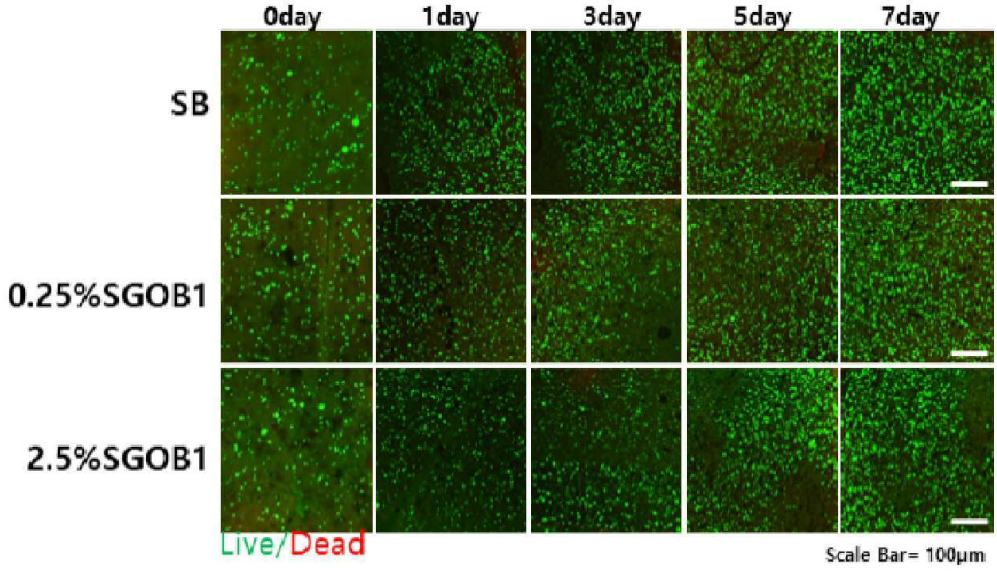
도면9


0.25%SGOB1
2.5%SGOB1
NBRM
NBRM

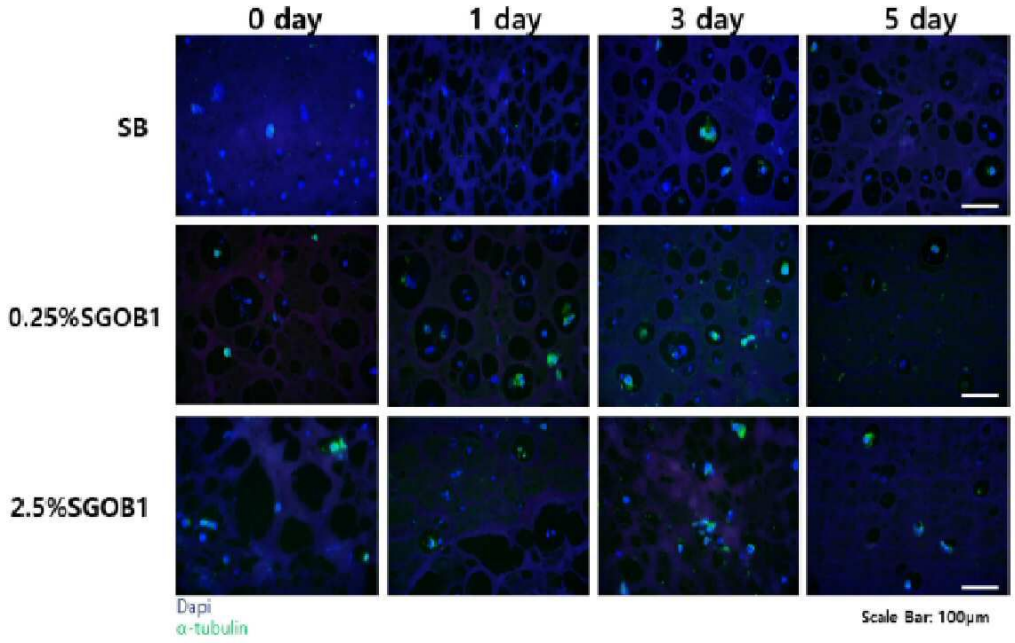
도면10


SB
0.25%SGOB1
2.5%SGOB1
Absorbance 450nm
0.15
0.10
0.05
0.00
Day 0
Day 1
Day 3
Day 5
Day 7
Time

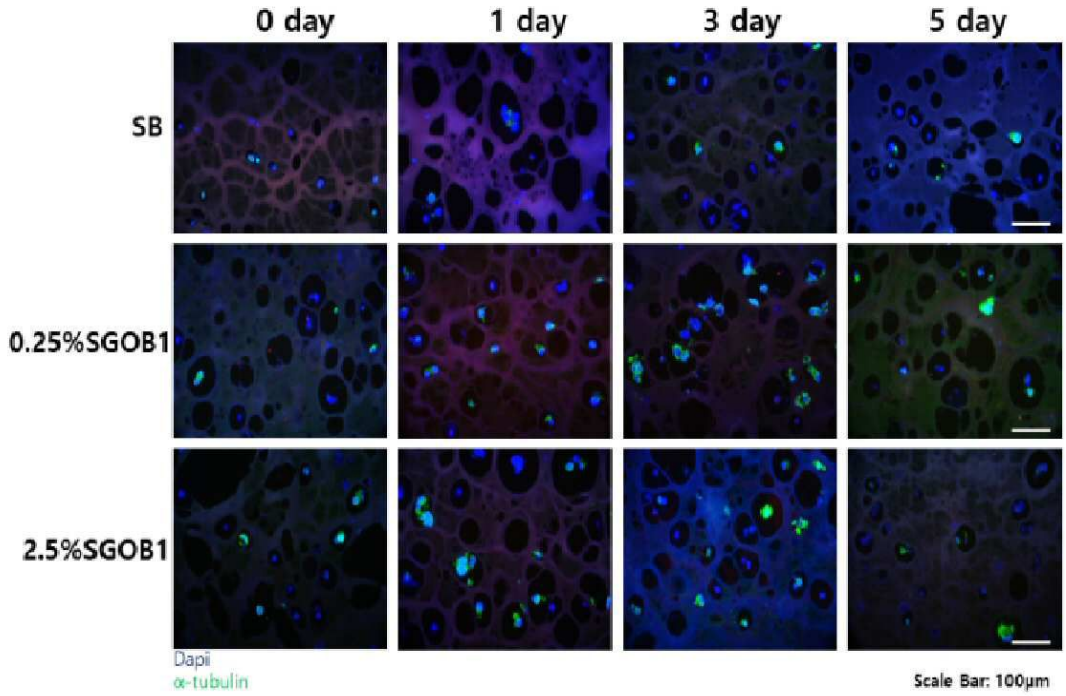
도면11


0day
1day
3day
5day
7day
SB
0.25%SGOB1
2.5%SGOB1
Live/Dead
Scale Bar= 100μm

도면12


0 day
1 day
3 day
5 day
SB
0.25%SGOB1
2.5%SGOB1
Dapi
α-tubulin
Scale Bar: 100μm

도면13


0 day
1 day
3 day
5 day
SB
0.25%SGOB1
2.5%SGOB1
Dapi
α-tubulin
Scale Bar: 100μm