

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0116244

(43) 공개일자 2023년08월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61L 27/44 (2006.01) A61C 13/00 (2017.01)

A61C 13/09 (2006.01) A61K 6/80 (2020.01)

A61L 27/26 (2006.01) A61L 27/36 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01) B33Y 70/10 (2020.01)

B33Y 80/00 (2015.01)

(52) CPC특허분류

A61L 27/446 (2013.01)

A61C 13/0019 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0012931

(22) 출원일자 2022년01월28일

심사청구일자 2022년01월28일

(71) 출원인

울산과학기술원

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

(72) 발명자

강현욱

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50 울산과학기술원

한중혁

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50 울산과학기술원

(74) 대리인

특허법인지원

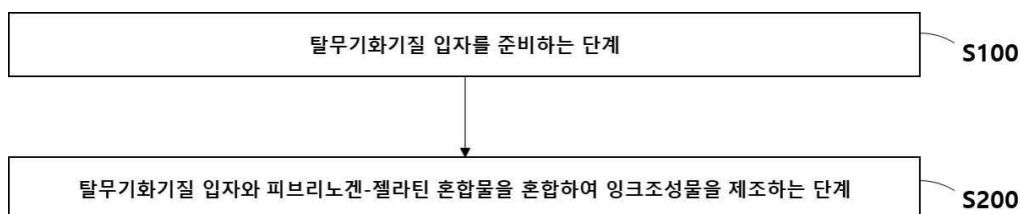
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 탈무기화기질을 포함한 생체유래 재생재 입자 기반 바이오잉크

(57) 요약

본 발명은 바이오잉크에 관한 것으로, 보다 상세하게 임상적의미 수준의 크기, 환자별 형태(모양) 및 높은 재생 능력(regenerative capacity)을 갖는 3D 치아 구조의 제작이 가능한 바이오잉크에 관한 것이다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61C 13/09 (2013.01)
A61K 6/80 (2020.01)
A61L 27/26 (2013.01)
A61L 27/3608 (2013.01)
A61L 27/3834 (2013.01)
B33Y 70/10 (2023.05)
B33Y 80/00 (2013.01)
A61L 2430/12 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711133517
과제번호	2021R1A2C201280811
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	핵심연구(개인)
연구과제명	정밀 3차원 줄기세포-스페로이드 프린팅 기술을 이용한 고효율 이중 채널 이식체 제
작 기술 개발	
기 여 율	1/2
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711128165
과제번호	2018K1A4A3A01063890
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	해외우수연구기관유치사업
연구과제명	UNIST-WFIRM-UniBase1 생체장기모사 연구센터
기 여 율	1/2
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

탈무기화기질 입자(Demineralized Matrix Particle); 및
피브리노겐-젤라틴 혼합물을
포함하는 바이오잉크.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 탈무기화기질 입자는 탈회상아질기질 입자(Demineralized Dentin Matrix Particle; DDMP) 또는 탈회골기질 입자(Demineralized Bone Matrix Particle)인 것인,
바이오잉크.

청구항 3

제1항에 있어서,
상기 탈무기화기질 입자의 농도는 1% w/v 내지 10% w/v인 것인,
바이오잉크.

청구항 4

제1항에 있어서,
치수강줄기세포(dental pulp stem cells, DPSC)를 더 포함하는 것인,
바이오잉크.

청구항 5

탈무기화기질 입자(Demineralized Matrix Particle)를 준비하는 단계; 및
상기 탈무기화기질 입자와 피브리노겐-젤라틴 혼합물을 혼합하여 잉크조성물을 제조하는 단계를 포함하는,
바이오잉크의 제조방법.

청구항 6

제5항에 있어서,
상기 탈무기화기질 입자는 탈회상아질기질 입자(Demineralized Dentin Matrix Particle; DDMP) 또는 탈회골기질 입자(Demineralized Bone Matrix Particle)인 것인,

바이오잉크의 제조방법.

청구항 7

제5항에 있어서,
상기 탈무기화기질 입자의 농도는 1 %w/v 내지 10 %w/v인 것인,
바이오잉크의 제조방법.

청구항 8

제5항에 있어서,
상기 피브리노젠-젤라틴 혼합물은 히알루로산 용액에 젤라틴과 피브리노젠을 용해시킨 후 글리세롤을 추가 용해시켜 제조되는 것인,
바이오잉크의 제조방법.

청구항 9

제5항에 있어서,
상기 잉크조성물과 치수강줄기세포(dental pulp stem cells, DPSC)를 혼합하는 단계를 더 포함하는 것인,
바이오잉크의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 바이오잉크에 관한 것으로, 보다 상세하게 임상적 의미 수준의 크기, 환자별 형태(모양) 및 높은 재생 능력(regenerative capacity)을 갖는 3D 치아 구조의 제작이 가능한 바이오잉크에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 병원에서 치아 손실을 치료하기 위하여 비생물학적(non-biological) 치과용 임플란트가 일반적으로 이용된다. 그러나, 치과용 임플란트와 사람의 치아조직 사이의 생리학적 특성(physiological properties)의 차이는 치조골(alveolar bone) 손실과 치주염(periodontal inflammation)을 동반하는 임플란트 주위염(peri-implantitis)을 발생시킨다. 약 64%가 치아 임플란트 수술 이후 2개월 이내에 치조골 손실을 경험하는 것으로 알려져있다. 따라서, 생체소재(biomaterials)와 치아 세포(dental cells)를 사용하는 생체공학 3D 조직 구조는 가 두개안면(craniofacial)과 치아 조직(dental tissues)을 재생하는데 이용되어왔다. 많은 연구자들은 치아 조직 재생은 조직 공학 접근방식(tissue engineering approaches)에 의하여 달성할 수 있다고 보고하였다. 그러나, 임상적 의미를 갖는 크기, 환자별 형태(모양) 및 높은 재생능력(regenerative capacity)을 갖는 3D 치아 구조는 제작하는 것은 어려운 과제이다.

[0004] 이와 관련하여, 최근 3차원 바이오프린팅 기술(3D bioprinting technology)이 여러 연구자들의 관심을 끌고 있다. 3차원 바이오프린팅 기술은 다양한 형태의 살아있는 세포, 생체분자(biomolecules) 및 생체소재를 이용하여 3D 자유형상 세포 구조(3D freeform cellular constructs)를 제작할 수 있다. 이를 통하여, 마이크로 해상도 수준에서 환자 맞춤형 및 매크로 크기 수준의 제작이 가능하다. 또한, 생기능성 소재(biofunctional materials)와 살아있는 세포는 조직 재생을 개선하는 기술에 이용될 수 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0006] (비특허문헌 0001) Li, R.; Guo, W.; Yang, B.; Guo, L.; Sheng, L.; Chen, G.; Li, Y.; Zou, Q.; Xie, D.; An, X.; et al. Human treated dentin matrix as a natural scaffold for complete human dentin tissue regeneration. *Biomaterials* 2011, 32, 4525-4538.
- (비특허문헌 0002) Chen, G.; Chen, J.; Yang, B.; Li, L.; Luo, X.; Zhang, X.; Feng, L.; Jiang, Z.; Yu, M.; Guo, W.; et al. Combination of aligned PLGA/Gelatin electrospun sheets, native dental pulp extracellular matrix and treated dentin matrix as substrates for tooth root regeneration. *Biomaterials* 2015, 52, 56-70.
- (비특허문헌 0003) Athirasala, A.; Tahayeri, A.; Thirivikraman, G.; Franca, C.M.; Monteiro, N.; Tran, V.; Ferracane, J.; Bertassoni, L.E. A dentin-derived hydrogel bioink for 3D bioprinting of cell laden scaffolds for regenerative dentistry. *Biofabrication* 2018, 10, 024101.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 목적은 임상적의미 수준의 크기, 환자별 형태(모양) 및 높은 재생능력(regenerative capacity)을 갖는 3D 치아 구조의 제작이 가능한 바이오잉크를 제공하는 것이다.
- [0008] 또한, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 기술적 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 기술적 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오잉크는 탈무기화기질 입자(Demineralized Matrix Particle); 및 피브리노겐-젤라틴 혼합물을 포함한다.
- [0011] 상기 탈무기화기질 입자는 탈회상아질기질 입자(Demineralized Dentin Matrix Particle; DDMp) 또는 탈회골기질 입자(Demineralized Bone Matrix Particle)일 수 있다.
- [0012] 상기 탈무기화기질 입자의 농도는 1% w/v 내지 10% w/v일 수 있다.
- [0013] 상기 바이오잉크는 치수강줄기세포(dental pulp stem cells, DPSC)를 더 포함할 수 있다.
- [0015] 또한, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오잉크의 제조방법은 탈무기화기질 입자(Demineralized Matrix Particle)를 준비하는 단계; 및 상기 탈무기화기질 입자와 피브리노겐-젤라틴 혼합물을 혼합하여 잉크조성물을 제조하는 단계를 포함한다.
- [0016] 상기 탈무기화기질 입자는 탈회상아질기질 입자(Demineralized Dentin Matrix Particle; DDMp) 또는 탈회골기질 입자(Demineralized Bone Matrix Particle)일 수 있다.
- [0017] 상기 탈무기화기질 입자의 농도는 1 %w/v 내지 10 %w/v일 수 있다.
- [0018] 상기 피브리노겐-젤라틴 혼합물은 히알루론산 용액에 젤라틴과 피브리노겐을 용해시킨 후 글리세롤을 추가 용해시켜 제조되는 것일 수 있다.
- [0019] 상기 바이오잉크의 제조방법은 상기 잉크조성물과 치수강줄기세포(dental pulp stem cells, DPSC)를 혼합하는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0021] 본 발명의 바이오잉크는 우수한 해상도를 가지는 것이며, 우수한 적층성으로 인하여 2D 인쇄뿐만 아니라, 3D 인쇄에서 뛰어난 인쇄성을 제공하는 효과가 있다.
- [0022] 또한, 본 발명의 바이오잉크는 잉크내 세포의 생존율이 우수하고, 우수한 치아 조직 재생효과로 인하여 치아 조직 재생에 있어서 우수한 생체소재를 제공하는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0024] 도 1a 및 도 1b는 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오잉크의 제조방법의 순서도를 도시한 것이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 탈회상아질기질 입자(Demineralized Dentin Matrix Particle; DDMp) 표면의 SEM 이미지를 도시한 것이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 탈회상아질기질 입자(DDMp)의 입자 크기를 도시한 것이다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오잉크의 현미경 이미지를 도시한 것이다.
- 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오잉크의 점도를 도시한 것이다.
- 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오잉크의 압축계수를 도시한 것이다.
- 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오잉크의 세포 생존율 형광이미지를 도시한 것이다.
- 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오잉크의 세포 생존율 계산 결과를 도시한 것이다.
- 도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오잉크의 세포 생존율 형광이미지를 도시한 것이다.
- 도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오잉크의 세포 증식분석 결과를 도시한 것이다.
- 도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오잉크의 알리자린 레드 염색결과와 현미경 이미지를 도시한 것이다.
- 도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오잉크의 광학밀도 측정결과를 도시한 것이다.
- 도 13은 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오잉크의 2D 인쇄성 시험의 현미경 이미지를 도시한 것이다.
- 도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오잉크의 2D 인쇄성 시험의 수치 측정결과를 도시한 것이다.
- 도 15는 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오잉크의 3D 인쇄성 시험의 현미경 이미지를 도시한 것이다.
- 도 16은 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오잉크의 3D 인쇄성 시험의 적층 높이 측정결과를 도시한 것이다.
- 도 17은 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오잉크의 3D 구조물 인쇄를 위한 인쇄코드를 도시한 것이다.
- 도 18은 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오잉크의 3D 구조물을 도시한 것이다.
- 도 19는 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오잉크의 3D 치아 형상 세포 구조 인쇄의 모식도를 도시한 것이다.
- 도 20는 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오잉크의 3D 치아 형상 세포 구조의 인쇄 과정 사진 이미지를 도시한 것이다.
- 도 21은 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오잉크의 3D 치아 형상 세포 구조의 결과물 사진 이미지를 도시한 것이다.
- 도 22는 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오잉크의 3D 치아 형상 세포 구조 내 세포 생존율 형광 이미지를 도시한 것이다.
- 도 23은 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오잉크의 3D 치아 형상 세포 구조 내 치형성 분화분석 평가를 위한 알리자린 염색 결과를 도시한 것이다.
- 도 24는 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오잉크의 3D 치아 형상 세포 구조 내 치형성 분화분석 평가를 위한

RT-qPCR 분석 결과를 도시한 것이다.

도 25는 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오잉크의 3D 치아 형상 세포 구조 내 치형성 분화분석 평가를 위한 AP 염색 및 DSPP의 면역염색 분석 결과를 도시한 것이다.

도 26은 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오잉크의 3D 치아 형상 세포 구조의 압축 계수 측정 결과를 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 이하, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 실시예에 대하여 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다.
- [0027] 이하, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오잉크에 대하여 상세히 설명한다.
- [0028] 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오잉크는 탈무기화기질 입자(Demineralized Matrix Particle); 및 피브리노겐-젤라틴 혼합물을 포함한다.
- [0029] 상기 바이오잉크는 생체소재로서 적합한 잉크조성물일 수 있으며, 상기 바이오잉크에서 상기 탈무기화기질 입자는 용질이고, 상기 피브리노겐-젤라틴 혼합물은 용매일 수 있다.
- [0030] 상기 탈무기화기질 입자는 탈회상아질기질 입자(Demineralized Dentin Matrix Particle; DDMp) 또는 탈회골기질 입자(Demineralized Bone Matrix Particle)일 수 있으며, 상기 탈회상아질기질 입자(DDMp)는 사람의 치아로부터 분리된 것일 수 있으며, 보다 구체적으로, 사람의 치아로부터 치주(tooth periodontium) 및 치수(pulp)를 제거함으로써 분리된 것일 수 있다.
- [0031] 상기 탈무기화기질 입자의 농도는 1% w/v 내지 10% w/v일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 탈무기화기질 입자의 농도는 상기 바이오잉크의 전체 부피 1 mL를 기준으로 상기 탈무기화기질 입자의 함량이 10 내지 100 mg일 수 있다.
- [0032] 상기 바이오잉크는 치수강줄기세포(dental pulp stem cells, DPSC)를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0034] 도 1a 및 도 1b는 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오잉크의 제조방법의 순서도이다.
- [0035] 도 1a를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오잉크의 제조방법은 탈무기화기질 입자(Demineralized Matrix Particle)를 준비하는 단계(S100); 및 상기 탈무기화기질 입자와 피브리노겐-젤라틴 혼합물을 혼합하여 잉크조성물을 제조하는 단계(S200)를 포함한다.
- [0036] S100에서, 상기 탈무기화기질 입자는 탈회상아질기질 입자(Demineralized Dentin Matrix Particle; DDMp) 또는 탈회골기질 입자(Demineralized Bone Matrix Particle)일 수 있으며 일 수 있으며, 상기 탈회상아질기질 입자(DDMp)는 사람의 치아로부터 분리된 것일 수 있으며, 보다 구체적으로, 사람의 치아로부터 치주(tooth periodontium) 및 치수(pulp)를 제거함으로써 분리된 것일 수 있다.
- [0037] S200에서, 상기 잉크조성물에서 상기 탈무기화기질 입자의 농도는 1 %w/v 내지 10 %w/v인 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 탈무기화기질 입자의 농도는 상기 바이오잉크의 전체 부피 100 mL를 기준으로 상기 탈무기화기질 입자의 함량이 1 내지 10 g일 수 있다.
- [0038] S200에서, 상기 피브리노겐-젤라틴 혼합물은 히알루로산 용액에 젤라틴과 피브리노겐을 용해시킨 후 글리세롤을 추가 용해시켜 제조되는 것일 수 있다.
- [0040] 또한, 도 1b를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오잉크의 제조방법은 상기 잉크조성물과 치수강줄기세포(dental pulp stem cells, DPSC)를 혼합하는 단계(S300)를 더 포함하는 것일 수 있으며, 보다 구체적으로, 탈무기화기질 입자를 준비하는 단계(S100); 상기 탈무기화기질 입자와 피브리노겐-젤라틴 혼합물을 혼합하여 잉크조성물을 제조하는 단계(S200); 및 상기 잉크조성물과 치수강줄기세포(dental pulp stem cells, DPSC)를

혼합하는 단계(S300)를 포함하는 것일 수 있다.

[0042] 또한, 본 발명의 일 실시예에 따른 3D(Three-Dimensional) 치아 구조는 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오잉크로 제조되는 것일 수 있으며, 보다 상세하게는 상기 바이오잉크 및 폴리카프로락톤(polycaprolactone; PCL)을 이용하여 제조되는 것일 수 있으며, 보다 구체적으로, 3D 프린팅 시스템을 이용하여 상기 바이오잉크 및 폴리카프로락톤(polycaprolactone; PCL)의 공동 인쇄에 따라 제조되는 것일 수 있다.

[0044] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 본 실시예는 본 발명의 이해를 위한 하나의 실시예일 뿐이며, 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

[0046] 제조예 1. 탈회상아질기질 입자의 제조

[0047] 탈회상아질기질 입자(Demineralized Dentin Matrix Particle; DDMp)는 사람의 치아를 이용하여 제조되며, 경북대학교 임상연구윤리위원회(IRB; Institutional Review Board)(KNU 2017-78)의 검토 및 승인 받은 절차에 따라 제조하였다. 보다 구체적으로, 사람의 치아에서 치주(tooth periodontium) 및 치수(pulp)를 제거하고, 상아질(dentin)을 4 °C에서 4주 동안 단백질분해효소 억제제(Roche, Basel, Switzerland)를 함유한 0.5 M EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid) 용액(pH 8.0)(Sigma, St. Louis, MO, USA)으로 탈회(decalcified)하였다. 이후, 상아질을 파쇄하여 상아질 입자를 제조하였다. 상아질 입자는 동결 분쇄(Spex Industries, Metuchen, NJ, USA)하고 100 μm 공극 메쉬로 체거름하였다.

[0048] 체거름 된 탈회상아질기질 입자(DDMp)를 70 % v/v 에탄올(Samchun chemical, Seoul, Korea)(diluted in distilled water(DW))로 2 시간 동안 4 °C에서 살균처리하고 탈이온수(DI water)로 2회 세척된다. 이후, 탈회상아질기질 입자(DDMp)는 잔여 에탄올을 제거하기 위하여 성장 배지에 침지(soak)하여, 탈회상아질기질 입자(DDMp)를 준비한다.

[0050] 제조예 2. 피브리노겐-젤라틴 혼합물의 제조

[0051] 히알루론산(hyaluronic acid; HA)(Sigma, St. Louis, MO, USA) 3 mg/mL을 변형된 EMEM(Eagle's minimal essential medium)(Gibco, Waltham, MA, USA)을 용해하여 히알루로산 용액을 제조하였다. 이후, 젤라틴(gelatin)(Sigma, St. Louis, MO, USA) 27.5 mg/mL과 피브리노겐(fibrinogen)(Sigma, St. Louis, MO, USA) 5 mg/mL을 히알루론산 용액 3 mg/mL에 용해한 후, 글리세롤(glycerol)(Sigma, St. Louis, MO, USA) 4% v/v로 추가로 용해하여 피브리노겐-젤라틴 혼합물을 제조하였다.

[0052] 제조된 피브리노겐-젤라틴 혼합물은 멸균여과(0.45 μm filter; Millipore, Danvers, MA, USA)하고, 사용시까지 -20 °C에서 동결하여 저장하였다. 동결된 피브리노겐-젤라틴 혼합물을 37 °C 수조(JEIO tech, Dajeon, Korea)에서 용융(melt) 하여 이용하였다.

[0054] 비교예 1. 피브리노겐-젤라틴 혼합물로만 구성된 바이오잉크

[0055] 상기 제조예 2에서 제조된 피브리노겐-젤라틴 혼합물로만 구성된 바이오잉크를 준비한다.

[0057] 실시예 1. DDMp 기반 바이오잉크의 제조

[0058] 상기 제조예 1에서 제조된 탈회상아질기질 입자(DDMp)와 상기 제조예 2에서 제조된 피브리노겐-젤라틴 혼합물을 혼합하여, 전체 1 mL 기준 상기 탈회상아질기질 입자(DDMp) 10 mg을 혼합하여, DDMp 1% w/v 농도의 바이오잉크를 준비한다.

[0060] 실시예 2. DDMp 기반 바이오잉크의 제조

[0061] 상기 실시예 1과 동일하게 실시하되, 전체 1 mL 기준 상기 탈회상아질기질 입자(DDMp) 30 mg을 혼합하여, DDMp 3% w/v 농도의 바이오잉크를 준비한다.

[0063] 실시예 3. DDMp 기반 바이오잉크의 제조

[0064] 상기 실시예 1과 동일하게 실시하되, 전체 1 mL 기준 상기 탈회상아질기질 입자(DDMp) 50 mg을 혼합하여, DDMp 5% w/v 농도의 바이오잉크를 준비한다.

[0066] 실시예 4. DDMp 기반 바이오잉크의 제조

[0067] 상기 실시예 1과 동일하게 실시하되, 전체 1 mL 기준 상기 탈회상아질기질 입자(DDMp) 100 mg을 혼합하여, DDMp 10% w/v 농도의 바이오잉크를 준비한다.

[0069] 상기 비교예 1, 실시예 1 내지 4에 따른 바이오잉크의 DDMp 농도를 하기 표 1에 정리하였다.

표 1

구분	DDMp 농도(%w/v)
비교예	-
실시예 1	1
실시예 2	3
실시예 3	5
실시예 4	10

[0072] 실험예 1. 모폴로지 및 크기 분석

[0073] 상기 제조예 1에서 제조된 탈회상아질기질 입자(DDMp)의 모폴로지(morphology) 및 크기(size)를 주사전자현미경(SEM)(S-4800; Hitachi High-Technologies, Tokyo, Japan)를 이용하여 분석하였다. DDMp는 카본 테이프(carbon tape)에 고정되며, 스퍼터 코팅기(sputter coater)(E-1045; Hitachi High-Technologies Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 50 초(s) 동안 20 mA에서 플루토늄(plutonium)으로 코팅되었다. SEM 이미지는 5.0 kV에서 관찰되었으며, 관찰된 DDMp의 모폴로지 SEM 이미지를 도 2에 도시하였다(도 2의 (a)는 DDMp 모폴로지 SEM 이미지이며, 도 2의 (b)는 도 2의 (a)의 확대된 이미지(x50)이다). DDMp의 입자 크기는 ImageJ software(NIH, Bethesda, MD, USA)를 이용하여 측정하였으며, 측정된 결과를 도 3에 도시하였다.

[0074] 도 2를 참조하면, 제조예 1에서 제조된 DDMp는 마이크로 크기 수준의 불규칙한 다각형 형상을 가지고 있음을 확인할 수 있으며(도 2의 (a) 참조), 2 내지 4 μm 직경의 상아세관(dentinal tubule) 구조를 표면에서 잘 유지하고 있음을 확인할 수 있다(도 2의 (b) 참조).

[0075] 도 3을 참조하면, 상기 제조예 1에서 제조된 DDMp의 평균 크기는 대략 48.13 μm 이며, 20 내지 60 μm 크기의 입자가 전체의 62.73%를 차지한다

[0077] 실험예 2. 바이오잉크의 물성 분석

[0078] 상기 비교예 1, 상기 실시예 1 내지 4에서 제조된 바이오잉크에 대한 물성을 분석하였다.

[0079] 상기 실시예 1에서 제조된 바이오잉크에 대한 현미경 이미지를 도 4에 도시하였다. 도 4를 참조하면, 바이오잉크 내 입자(DDMp)가 응집되지 않고, 균일하게 분포되어 있음을 확인할 수 있다.

[0081] 상기 비교예 1, 상기 실시예 1 내지 4에서 제조된 바이오잉크의 유변학적(rheological) 특성은 전단 스윕 분석(shear sweep analysis)을 통해 측정하였으며, 전단 스윕 분석은 HAAKE MARS III Rheometer (Thermo

Scientific, Karlsruhe, Germany)에서 18 °C의 20 mm 직경을 플레이트를 이용하여 0.1 내지 100 s⁻¹에서 수행하였다. 이를 통하여 점도(viscosity)를 측정하였으며, 측정 결과를 도 5에 도시하였다. 도 5에서 상기 비교예 1에 따른 바이오잉크는 “0% w/v”, 상기 실시예 1에 따른 바이오잉크는 “1% w/v”, 상기 실시예 2에 따른 바이오잉크는 “3% w/v”, 상기 실시예 3에 따른 바이오잉크는 “5% w/v”, 상기 실시예 4에 따른 바이오잉크는 “10% w/v” 으로 표시하였다.

[0082] 도 5를 참조하면, 상기 비교예 1, 상기 실시예 1 내지 4에서 제조된 바이오잉크는 DDMP의 농도가 증가함에 따라 점도(viscosity)는 증가하였으며, DDMP 농도가 증가함에 따라 전단률(shear rate)의 증가하고 점도는 감소하는 전단박화(shear-thinning) 특성이 강화되었다.

[0084] 상기 비교예 1, 상기 실시예 1 내지 4에서 제조된 바이오잉크의 압축계수(compressive modulus)를 측정하였으며, 측정 결과를 도 6에 도시하였다. 도 6의 압축계수는 바이오잉크(비교예 1, 실시예 1 내지 4)를 인쇄하여 가교(crosslink)한 후, 바이오입시 편칭(biopsy punching)을 통하여 직경 5mm, 높이 1mm의 원통형 시료(cylindrical samples)를 준비하였다. 각 바이오잉크의 원통형 시료를 범용 테스트 기계(Instron Model 3342; Illinois ToolWorks Inc., MA, USA)에 위치시킨 후, 각 시료를 1 mm/min의 속도로 점진적으로 압축하고 그에 상응하는 힘(force)과 거리(distance)를 기록하였다. 응력-변형률 곡선(strain-stress curve)을 그린 후, 10% 변형율(strain)을 기준으로 기울기를 계산하여 압축 계수를 측정하였다. 도 6에서 X축의 “DDMP Concentration” 기준으로, 상기 비교예 1에 따른 바이오잉크는 “0%”, 상기 실시예 1에 따른 바이오잉크는 “1%”, 상기 실시예 2에 따른 바이오잉크는 “3%”, 상기 실시예 3에 따른 바이오잉크는 “5%”, 상기 실시예 4에 따른 바이오잉크는 “10%” 으로 표시하였다.

[0085] 도 6(** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.)을 참조하면, DDMP 농도에 따라 바이오잉크의 압축계수(compressive modulus)는 증가하며, 10% w/w DDMP 바이오잉크(실시예 4)의 압축계수는 피브리노겐-젤라틴 혼합물(0% w/w)(비교예 1)보다 약 16.3 배 이상 크다.

[0087] 준비예. 치수강줄기세포(DPSC)

[0088] 치수강줄기세포(dental pulp stem cells, DPSC)(Lonza, Walkersville, MD, USA)는 성장 배지 alpha MEM(Welgene, Kyungsan, Korea)에서 배양되었으며, 생리적 조건(37 °C, 5% CO₂) 하에서 10% 소태아혈청(fetal bovine serum)(Capricorn, Hesse, Germany)과 1% v/v 페나실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin)(P/S; Capricorn, Hesse, Germany)을 보충하였다. 성장 배지(medium)는 3일마다 교체하였다. DPSC는 Tryple™ Select (1X) (Gibco, Waltham, MA, USA)로 분리되어 70~80% 포화(confluency)까지 계대배양하였다.

[0090] 비교예 2. DPSC를 포함하는 피브리노겐-젤라틴 혼합물로만 구성된 바이오잉크

[0091] 상기 준비예에서 배양된 DPSC와 상기 비교예 1에서 제조된 바이오잉크(피브리노겐-젤라틴 혼합물)(3×10^6 cells/mL)를 균일하게 혼합하여 DPSC를 포함하는 바이오잉크를 제조하였다.

[0093] 실시예 5. DPSC를 포함하는 DDMP 기반 바이오잉크의 제조

[0094] 상기 준비예에서 배양된 DPSC와 상기 실시예 1에서 제조된 바이오잉크(3×10^6 cells/mL)를 균일하게 혼합하여 DPSC를 포함하는 DDMP 기반 바이오잉크를 제조하였다.

[0096] 실시예 6. DPSC를 포함하는 DDMP 기반 바이오잉크의 제조

[0097] 상기 준비예에서 배양된 DPSC와 상기 실시예 2에서 제조된 바이오잉크(3×10^6 cells/mL)를 균일하게 혼합하여 DPSC를 포함하는 DDMP 기반 바이오잉크를 제조하였다.

[0099] 실시예 7. DPSC를 포함하는 DDMp 기반 바이오잉크의 제조

[0100] 상기 준비예에서 배양된 DPSC와 상기 실시예 3에서 제조된 바이오잉크(3×10^6 cells/mL)를 균일하게 혼합하여 DPSC를 포함하는 DDMp 기반 바이오잉크를 제조하였다.

[0102] 실시예 8. DPSC를 포함하는 DDMp 기반 바이오잉크의 제조

[0103] 상기 준비예에서 배양된 DPSC와 상기 실시예 4에서 제조된 바이오잉크(3×10^6 cells/mL)를 균일하게 혼합하여 DPSC를 포함하는 기반 DDMp 바이오잉크를 제조하였다.

[0105] 상기 비교예 2, 실시예 5 내지 8에 따른 바이오잉크의 DDMp 농도를 하기 표 2에 정리하였다.

표 2

구분	DDMp 농도(%w/v)
비교예 2	-
실시예 5	1
실시예 6	3
실시예 7	5
실시예 8	10

[0108] 실험예 3. DDMp 바이오잉크의 세포적합성(cytocompatibility)

[0109] 상기 비교예 2, 실시예 5 내지 8의 바이오잉크 내 DPSC의 생존율을 분석하기 위하여, 바이오잉크의 생존/사멸 염색(live and dead staining)(L3224, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 7일 동안 수행하였다. 상기 비교예 2, 실시예 5 내지 8의 바이오잉크를 분석용액(0.2% v/v calcein AM(ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) and 0.05% v/v ethidium homodimer-1(ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) in PBS)으로 1 시간 동안 상온에서 염색된 후 형광 현미경(Leica DM2500, Leica Microsystems AG, Wetzlar, Germany)으로 이미지화 하여, 이미지 결과를 도 7(scale bar: 200 μ m)에 도시하였다. 세포 생존률(Cell viability)은 생존 세포 및 사멸 세포의 전체 세포 수(total cell count)를 집계한 후, 생존 세포의 수를 전체 세포 수로 나누어 계산하였으며, 그 결과를 도 8에 도시하였다.

[0110] 도 7에서, 상기 비교예 2에 바이오잉크는 “Gelatin mixture”, 상기 실시예 5에 따른 바이오잉크는 “1 %w/v”, 상기 실시예 6에 따른 바이오잉크는 “3 %w/v”, 상기 실시예 7에 따른 바이오잉크는 “5 %w/v”, 상기 실시예 8에 따른 바이오잉크는 “10 %w/v” 으로 표시하였다.

[0111] 도 8에서 X축의 “DDMp Concentraion(% w/v)” 기준으로, 상기 비교예 2에 따른 바이오잉크는 “0”, 상기 실시예 1에 따른 바이오잉크는 “1”, 상기 실시예 2에 따른 바이오잉크는 “3”, 상기 실시예 3에 따른 바이오잉크는 “5”, 상기 실시예 4에 따른 바이오잉크는 “10” 으로 표시하였다.

[0112]

[0113] 도 7을 참조하면, 생존/사멸 염색 결과는 7일 차에서 DDMp 농도에 관계없이 DPSC의 대부분이 모든 바이오잉크그룹에 생존하였음을 확인할 수 있다.

[0114] 도 8을 참조하면, 염색의 정량 결과, 모든 그룹에서 세포 생존율(cell viability)이 95% 이상임을 확인할 수 있다.

[0116] 한편, 도 7에서의 상기 실시예 8에 따른 바이오잉크(DDMp 10 %w/v)의 1일차(Day 1), 5일차(Day 5), 10일차(Day 10)에서의 각각의 형광이미지(scale bars: 20 μ m)를 도 9에 도시하였다. 도 9을 참조하면, 바이오잉크의 DDMp(white dot lines) 표면과 주변에서 DPSC 밀도가 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있다.

- [0118] 상기 비교예 2, 상기 실시예 5 내지 8의 바이오잉크 내에서 DPSC의 증식 분석(proliferation assay)을 수행하였다. 증식 분석(proliferation assay)은 AlamarBlue[®] Cell Viability Reagent (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 1일, 3일, 5일 및 7일차에 수행하였다. 상기 비교예 2, 상기 실시예 5 내지 8의 바이오잉크는 인큐베이터에서 성장 배지에 의해 희석된 10% v/v 알라마르 블루 염색약(alarmar blue dye)에서 3 시간 동안 배양하였다. 96-웰 플레이트에 100 μ L 분석 용액을 분주(sampling)한 후, 각각의 형광세기(excitation: 544 nm/ emission: 599 nm)를 마이크로플레이트리더(microplate reader) (Synergy NEO2 Hybrid Multi-Mode Reader; Bio-Tek, Winooski, VT, USA)로 측정하였다. 측정된 데이터는 1일차(Day 1)에 수집된 시료의 데이터로 정규화하였으며, 증식분석 결과를 도 10에 도시하였다.
- [0119] 도 10에서, 상기 비교예 2에 따른 바이오잉크는 “Gelatin mixture”, 상기 실시예 5에 따른 바이오잉크는 “1 %w/v”, 상기 실시예 6에 따른 바이오잉크는 “3 %w/v”, 상기 실시예 7에 따른 바이오잉크는 “5 %w/v”, 상기 실시예 8에 따른 바이오잉크는 “10 %w/v” 으로 표시하였다.
- [0120] 도 10(** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)을 참조하면, 모든 바이오잉크 그룹은 7일 동안 확산을 지속하였다. 그러나, DDMp 농도가 증가함에 따라 DPSC 확산률(proliferation rate)은 감소하였다.
- [0122] **실험예 4. DDMp 기반 바이오잉크 내 DPSC의 치형성분화 분석**
- [0123] DDMp 기반 바이오잉크에서의 DPSC의 치형성분화(Odontogenic Differentiation)를 분석하였다. 치형성분화 분석을 위하여, 상기 비교예 2, 상기 실시예 5 내지 8에 따른 바이오잉크를 시료로서 이용하였으며, 시료를 15일 동안 분화배지(1% v/v P/S를 함유한 StemMACs OsteoDiff media(Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Germany))에서 배양하며, 동시에 알리자린 레드(alizarin red)와 알칼라리성 인산가수분해효소(AP) 염색을 수행하였다. 이때, 아프로티닌(aprotinin) (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 10 μ g/mL 농도로 배지에 첨가하여 과도한 바이오잉크 분해를 방지하였다.
- [0125] 알리자린 레드 염색을 위하여 시료는 4% 포르말데하이드 용액(formaldehyde solution (Junsei, Tokyo, Japan))에 15 일 동안 고정되고, 2차 증류수(double distilled water)로 2% w/v 희석된 알리자린 레드S(alizarin red S (Sigma, St. Louis, MO, USA) 용액으로 pH 4.3에서 20 분 동안 염색되었다. 무기질 침착(mineral deposition)을 정량화하기 위하여, 염색된 시료를 10 mM 인산나트륨 완충용액(sodium phosphate buffer)(Sigma, St. Louis, MO, USA) (pH 7.0)에서 10% 세틸피리디늄클로라이드(cetylpyridinium chloride)(Sigma, St. Louis, MO, USA) 용액으로 밤새(overnight)(12 시간) 탈염하였다. 각 탈염된 시료(DPSC가 포함된 DDMp 바이오잉크)의 광학밀도(optical density)는 550 nm에서 마이크로 플레이트를 이용하여 측정하였다. 탈염후, 시료를 현미경으로 관찰하였다.
- [0126] 알리자린 레드 염색된 시료(상기 비교예 2, 상기 실시예 5 내지 8에 따른 바이오잉크)의 현미경 이미지 (Scale bar: 500 μ m)를 도 11에 도시하였다. 도 11에서, DDMp 바이오잉크로 상기 비교예 2에 따른 바이오잉크는 “Gelatin mixture”, 상기 실시예 5에 따른 바이오잉크는 “1 %w/v”, 상기 실시예 6에 따른 바이오잉크는 “3 %w/v”, 상기 실시예 7에 따른 바이오잉크는 “5 %w/v”, 상기 실시예 8에 따른 바이오잉크는 “10 %w/v” 으로 표시하였다.
- [0127] 도 11을 참조하면, Bright filed 결과에서 DDMp 농도가 증가함에 따라 무기질 결절(mineral nodules) 형성(도 11의 'white arrowhead' 표시)이 증가함을 나타내는 것을 확인할 수 있으며, 이러한 경향은 Alizarin red staining 결과에서 관찰된다. DDMp 농도가 증가함에 따라 무기질 침착(mineral deposition)이 증가하는 것을 확인할 수 있다.
- [0129] 알리자린 레드 염색된 시료(상기 비교예 2, 상기 실시예 5 내지 8에 따른 바이오잉크)의 광학밀도 측정결과를 도 12(* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)에 도시하였다. 도 12에서 X축의 “DDMp Concentraion(% w/v)” 기준으로, 상기 비교예 2에 따른 바이오잉크는 “0”, 상기 실시예 5에 따른 바이오잉크는 “1”, 상기 실시예 6에 따른 바이오잉크는 “3”, 상기 실시예 7에 따른 바이오잉크는 “5”, 상기 실시예 8에 따른 바이오잉크는 “10” 으로

표시하였다.

[0131] 도 12 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)를 참조하면, 염색된 시료(상기 비교예 2, 상기 실시예 5 내지 8에 따른 바이오잉크)의 정량화 결과는 이러한 경향을 보다 명확하게 확인할 수 있다. 도 12에서, DDMP 농도가 증가함에 따라 광학밀도는 증가하고, 3%, 5% 및 10% w/w DDMP 바이오잉크(실시예 6 내지 8에 따른 바이오잉크)는 피브리노젠-젤라틴 혼합물 그룹(0% w/v concentration)(비교예 2에 따른 바이오잉크) 보다 현저히 높은 무기화(mineralization)를 보여준다.

[0133] 실험예 5. DDMP 바이오잉크의 2D 인쇄성 평가

[0134] 상기 비교예 1, 실시예 1 내지 4에 따른 바이오잉크의 2D 인쇄성(printability)을 평가하였다. 2D 인쇄성 시험은, 바이오잉크를 인쇄할 수 있는 바이오 인쇄 시스템을 직접 제작하여, 인쇄 시스템은 모션 제어(motion control)를 위한 3축 스테이지(three-axis stage); 다양한 종류의 세포와 생체소재를 전달할 수 있는 멀티 카트리리지 공급 모듈(multi-cartridge dispensing modules); 및 온도, 습도, 청결을 위한 인클로저(enclosure)로 구성된다.

[0135] 2D 인쇄성 시험에서, 선 패턴(line patterns)은 300 μm 노즐로 인쇄 속도(5-320 mm/min)를 달리하여 인쇄하였으며, 선 폭(width)과 높이(height)를 측정하였다.

[0136] 2D 인쇄성 시험 결과에 대한 현미경(Leica Dml-1, Leica Microsystems AG, Wetzlar, Germany) 이미지를 도 13에 도시하였다. 도 13에서 Y축의 “DDMP Concentration(% w/v)” 기준으로, 상기 비교예 1에 따른 바이오잉크는 “0”, 상기 실시예 1에 따른 바이오잉크는 “1”, 상기 실시예 2에 따른 바이오잉크는 “3”, 상기 실시예 3에 따른 바이오잉크는 “5”, 상기 실시예 4에 따른 바이오잉크는 “10”으로 표시하였다.

[0137] 도 13을 참조하면, 인쇄 속도(Printing speed)가 증가할수록 인쇄된 선폭은 점차적으로 감소하는 것을 확인할 수 있다. 특히, DDMP 농도가 증가할 수록, 연속적인 선 패턴은 점차적으로 안정적으로 인쇄되었다. 피브리노젠-젤라틴 혼합물 그룹(0% w/v DDMP; 비교예 1)는 160 mm/min 인쇄 속도에서 끊어진 선을 인쇄하였으나, 10% w/v DDMP 바이오잉크 그룹은 320 mm/min 인쇄속도에서도 연속적인 선을 인쇄하였다.

[0138] 2D 인쇄성 시험에서, 도 13의 바이오잉크의 인쇄된 현미경 이미지로부터 선 패턴(line pattern)의 높이(heights)와 폭(widths)을 ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA)을 이용하여 측정하고, 선 패턴의 종횡비(aspect ratios)는 높이(height)를 폭(width)로 나누어 계산하였으며, 그 결과를 도 14에 도시하였다. 도 14에서 상기 비교예 1에 따른 바이오잉크는 “0 %w/v”, 상기 실시예 1에 따른 바이오잉크는 “1 %w/v”, 상기 실시예 2에 따른 바이오잉크는 “3 %w/v”, 상기 실시예 3에 따른 바이오잉크는 “5 %w/v”, 상기 실시예 4에 따른 바이오잉크는 “10 %w/v”으로 표시하였다.

[0139] 도 14를 참조하면, 도 14의 (a)(* $p < 0.5$; *** $p < 0.001$)는 최소 선 폭(Min. line width)을 정리한 것으로, 연속된 선 패턴으로부터, 피브리노젠-젤라틴 혼합물(비교예 1)의 최소 선폭은 360 μm 이며, 10% w/v DDMP 바이오잉크(실시예 4)의 최소 선폭은 252 μm 인 것을 확인할 수 있으며, 이는 이러한 결과는 10% w/v DDMP 바이오잉크(실시예 4)의 인쇄 해상도(resolution)가 다른 바이오잉크 보다 높은 것을 의미한다.

[0140] 도 14의 (b)는 인쇄된 선 폭(Line width)을 정리한 것이며, 도 14의 (c)는 인쇄된 선 높이(Line height)를 정리한 것이다. 도 14의 (b)와 도 14의 (c)에서, 측정된 선 폭과 선 높이에서의 모든 그룹은 인쇄 속도가 증가할수록 감소하는 경향을 보였다. DDMP 농도가 증가함에 따라 인쇄된 선폭은 감소하였으며 선 높이는 증가하였다. 이를 기반으로 도 14의 (d)에서 종횡비(aspect ratio)의 계산 결과를 정리하였으며, 도 14의 (d)에서 DDMP 농도가 증가함에 따라 인쇄된 선폭은 감소하였으며 선 높이는 증가하는 것을 재확인할 수 있으며, 특히, 320 mm/min 인쇄 속도에서, 10% DDMP 바이오잉크(실시예 4)의 종횡비는 0.707이며, 피브리노젠-젤라틴 혼합물(비교예 1)의 종횡비는 0.326임을 확인할 수 있다.

[0142] 실험예 6. DDMP 바이오잉크의 3D 인쇄성 평가

[0143] 상기 비교예 1, 실시예 1 내지 4에 따른 바이오잉크의 3D 인쇄성(printability)을 평가하였다. 3D 인쇄성 시험은, 바이오잉크를 인쇄할 수 있는 바이오 인쇄 시스템을 직접 제작하여, 인쇄 시스템은 모션 제어(motion

control)를 위한 3축 스테이지(three-axis stage); 다양한 종류의 세포와 생체소재를 전달할 수 있는 멀티 카트리리지 공급 모듈(multi-cartridge dispensing modules); 및 온도, 습도, 청결을 위한 인클로저(enclosure)로 구성된다.

- [0144] 3D 인쇄성 시험은 선 패턴의 다중층의 적층 테스트를 수행하였으며 DDMp 기반 바이오잉크의 적층 테스트를 위하여, 바이오 프린터를 이용하여 다층 적층(layer-by-layer) 공정은 400 μm 폭과 150 μm 두께의 라인 패턴을 미리 결정된 수(number)로 적층하였다. 인쇄된 시료를 이미지화한 후, 시료의 적층 높이는 ImageJ software를 이용하여 측정하였다. 인쇄성 테스트에서, DDMp 바이오잉크는 300 μm 노즐을 통하여 34.3 $\mu\text{L}/\text{min}$ 속도로 압출되었다.
- [0145] 3D 인쇄성 시험에 대한 현미경 이미지(scale bar: 5 mm)를 도 15에 도시하였다. 도 15에서 Y축의 “DDMp Concentraion(% w/v)” 기준으로, 상기 비교예 1에 따른 바이오잉크는 “0”, 상기 실시예 1에 따른 바이오잉크는 “1”, 상기 실시예 2에 따른 바이오잉크는 “3”, 상기 실시예 3에 따른 바이오잉크는 “5”, 상기 실시예 4에 따른 바이오잉크는 “10”으로 표시하였다.
- [0146] 도 15를 참조하면, 적층 두께는 모든 그룹에서 적층된 층의 수가 증가할수록 연속적으로 증가하는 것을 확인할 수 있다. 또한, DDMp는 적층된 두께에 영향을 미친다. DDMp 농도가 증가할수록 두께는 증가하는 것을 확인할 수 있다.
- [0147] 3D 인쇄성 시험에서 DDMp 기반 바이오잉크(비교예 1, 실시예 1 내지 4)의 적층 횟수(Number of stacked layers)에 따른 적층 높이를 측정하여 도 16에 도시하였다. 도 16에서 상기 비교예 1에 따른 바이오잉크는 “0 %w/v”, 상기 실시예 1에 따른 바이오잉크는 “1 %w/v”, 상기 실시예 2에 따른 바이오잉크는 “3 %w/v”, 상기 실시예 3에 따른 바이오잉크는 “5 %w/v”, 상기 실시예 4에 따른 바이오잉크는 “10 %w/v”으로 표시하였다.
- [0148] 도 16(** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)을 참조하면, 피브리노겐-젤라틴 혼합물(0% w/v)(비교예 1)과 1% w/v DDMp 바이오잉크(실시예 1)은 현저한 차이를 보이지 않았으나, 3% w/w DDMp 이상(실시예 2 내지 4)에서는 DDMp 농도가 증가할수록 적층 높이가 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있다.
- [0149] 또한, 도 17(scale bar: 10 mm)에서와 같은 인쇄코드(printing)를 이용하고, 상기 실시예 4에 따른 바이오잉크를 이용하여 다층 적층된 하이드로겔 구조를 제조하였다. 다층 적층(layer-by-layer) 공정은 2 cm 높이와 150 μm 두께의 치아모양의 다공성 패턴을 이용하여 수행하였으며, 수행결과를 도시한 도 18(scale bar: 10 mm)을 참조하면, 인쇄된 하이드로겔 구조는 20층의 적층 과정에서 붕괴 없이 기공(pores)을 적절하게 유지하고 있는 것을 확인할 수 있다.

[0151] 적용례. 3D 치아 형상의 바이오 인쇄

- [0152] 상기 실시예 8의 바이오잉크(DPSC가 포함된 DDMp 기반 바이오잉크)(10 w/v DDMp) 및 PCL의 공동인쇄를 통하여 조립되는 3D 치아 형상 세포 구조를 조사하였다.
- [0153] 3D 치아 형상 세포 구조의 3D-CAD 모델은 환자 맞춤형 형상의 구조로 인쇄되도록 설정되었다. 모션 프로그램은 사내 컴퓨터 지원 제조 소프트웨어와 3D-CAD 모델로 준비되었다. 모션 프로그램은 바이오프린터로 설치되고, 도 19에서의 모식도를 참조하여, 3D 세포의 구조는 DPSC가 포함된 DDMp 기반 바이오잉크(10% w/v, 3×10^6 cells/mL)(실시예 8) 및/또는 PCL(polycaprolactone)을 이용하여 두께 150 μm 의 레이어(layer)를 사전 정의된 방식으로 순차적으로 추가하는 자동화된 공정을 통해 제작하였다. 바이오잉크의 인쇄는 300 μm 노즐을 이용하여 0.5735 $\mu\text{L}/\text{s}$ 의 분사속도(dispensing rate)와 50 mm/min의 인쇄속도로 수행되었다. PCL의 인쇄는 300 μm 노즐을 이용하여 200 Kpa, 85 $^{\circ}\text{C}$ 에서 수행하였다. 바이오잉크(적용례 1)는 3mm의 높이로만 형성되고, 바이오잉크/PCL 하이브리드 구조는 2 cm 높이를 가진다. 인쇄과정에서 인클로저(enclosure)는 18 $^{\circ}\text{C}$ 로 유지된다. 이후에, 구조물은 상온에서 45분 동안 트롬빈(thrombin)(10 U/mL)용액과 가교결합(crosslinked) 되고, 인큐베이터에서 배양된다.
- [0154] 도 20에서와 같이, PCL 인쇄를 통하여 2 cm 높이의 3D 치아 모양 스캐폴드는 제조하였으며, DPSC를 포함한 DDMp 바이오잉크(실시예 8)는 스캐폴드 내부에 인쇄하였다. 제조된 3D 치아 형상 세포 구조는 도 21에 도시하였다. 도 20을 참조하면, PCL 스캐폴드 내부에 인쇄된 DDMp 바이오잉크의 패턴은 안정적으로 유지되었다.

[0156] 실험예 7. 3D 치아 형상 세포 구조 내 DPSC의 생존율 분석

- [0157] 상기 적용례에서 인쇄된 3D 치아 형상 세포 구조(스캐폴드) 내부에서의 DPSC의 생존율(viability)을 평가하였으며, 동시에, 대조군(control group)으로서 DPSC가 포함된 피브리노겐-젤라틴 혼합물(비교예 2)을 이용하여 적용례와 동일한 방식으로 인쇄된 3D 치아 형상 세포 구조(스캐폴드)에 대해서도 생존율을 평가하였다.
- [0158] 각각의 시료(적용례 및 대조군)의 생존/사멸 염색(live and dead staining)(L3224, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 7일 동안 수행하였다. 시료를 분석용액(0.2% v/v calcein AM(ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) and 0.05% v/v ethidium homodimer-1(ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) in PBS)으로 1 시간 동안 상온에서 염색된 후 형광 현미경(Leica DM2500, Leica Microsystems AG, Wetzlar, Germany)으로 이미지화 하였으며, 이미지 결과를 도 22(scale bar: 500 μ m)에 도시하였다.
- [0159] 도 22를 참조하면, 대부분의 DPSC는 피브리노겐-젤라틴 혼합물("Fibrinogen-gelatin mixture")(0% w/v DDMp; 비교예 2)과 DDMp 바이오잉크("DDMp bio-ink")(10 %w/v; 실시예 8)의 두 그룹 모두에서 생존하였음을 확인할 수 있으며, 이는 도 7의 결과와 일치한다.
- [0161] **실험예 8. 3D 치아 형상 세포 구조 내 DPSC의 치형성 분화 분석**
- [0162] 상기 적용례에서 인쇄된 3D 치아 형상 세포 구조(스캐폴드) 내부에서의 DPSC의 치형성 분화(odontogenic differentiation)를 평가하였으며, 동시에, 대조군(control group)으로서 DPSC가 포함된 피브리노겐-젤라틴 혼합물(비교예 2)을 이용하여 적용례와 동일한 방식으로 인쇄된 3D 치아 형상 세포 구조(스캐폴드)에 대해서도 치형성 분화를 평가하였다.
- [0164] 각각의 시료(적용례 및 대조군)를 15일 동안 분화배지(1% v/v P/S를 함유한 StemMACs OsteoDiff media(Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Germany))에서 배양하며, 동시에 알리자린 레드(alizarin red) 염색을 수행하였다. 이때, 아프로티닌(aprotinin)(Sigma, St. Louis, MO, USA)을 10 μ g/mL 농도로 배지에 첨가하여 과도한 바이오잉크 분해를 방지하였다. 알리자린 레드 염색을 위하여 시료는 4% 포름알데하이드 용액(formaldehyde solution (Junsei, Tokyo, Japan)에 15 일 동안 고정되고, pH 4.3에서 20 분 동안 2차 증류수(double distilled water)로 2% w/v 희석된 알리자린 레드S(alizarin red S (Sigma, St. Louis, MO, USA) 용액으로 염색되었다. 무기질 침착(mineral deposition)을 정량화하기 위하여, 염색된 시료를 10 mM 인산나트륨 완충용액(sodium phosphate buffer)(Sigma, St. Louis, MO, USA) (pH 7.0)에서 10% 세틸피리디늄클로라이드(cetylpyridinium chloride)(Sigma, St. Louis, MO, USA) 용액으로 밤새(overnight)(12 시간) 탈염하였다. 각 탈염된 시료의 광학밀도(optical density)는 550 nm에서 마이크로 플레이트를 이용하여 측정하였다. 탈염후, 시료를 현미경으로 관찰하였다.
- [0165] 알리자린 레드(alizarin red) 염색 결과를 도 23에 도시하였다. 도 23을 참조하면, 피브리노겐-젤라틴 혼합물("Fibrinogen-gelatin mixture")(0% w/v DDMp; 비교예 2)보다 DPSC가 포함된 DDMp 기반 바이오잉크("DDMp bio-ink")(10 %w/v; 실시예 8)에서 상당히 높은 무기화(mineralization)를 보여준다. 이러한 결과는 도 8의 결과와 일치한다.
- [0167] 치형성 분화의 특이 표지(specific markers)로, DSPP(dentin sialo-phosphoprotein) 및 DMP-1(dentin matrix acidic phosphoprotein) 발현 수준을 RT-qPCR을 통하여 측정하였다. 각각의 시료(적용례 및 대조군)를 bioMasher-II(Optima, Tokyo, Japan)를 이용하여 파괴되었다. 각각의 시료는 Trisure (Bioline, London, UK)로 10분 동안 처리하고, RNA를 분리하기 위하여 30초 동안 볼텍싱하였다. 각 RNA 샘플(sample)에 대한 cDNA는 helixcriptTM Thermo Reversed Transcriptase (Nanohelix, Daejeon, South Korea)를 이용하여 합성하였다. Biometra Professional TRIO Thermo-cycler (Analytik Jena AG, Jena, Germany)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 이후, 프라이머(Primer)(표 3)와 혼합된 cDNA를 Roche SYBR Light Cyclers 480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)에서 light cyclers 480 II (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)를 이용하여 증폭시켰다. DSPP와 DMP-1의 발현수준은 DDCt법(DDCt method)에 따라 GAPDH(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)로 정규화될 수 있으며, 상술한 RT-qPCR 과정은 3회 실시하였으며, RT-qPCR 결과를 도 24에 도시하였다.

표 3

Genes	Primer Sequences	
GAPDH	Forward (5' → 3')	GAA-GGT-GAA-GGT-CGG-AGT
	Reverse (3' → 5')	GAA-GAT-GGT-GAT-GGG-ATT-TC
DMP-1	Forward (5' → 3')	CAA-GAC-AGT-GCC-CAA-GAT-AC
	Reverse (3' → 5')	TTC-CCT-CAT-CGT-CCA-ACT
DSPP	Forward (5' → 3')	CTG-GTG-CAT-GAA-GGT-GAT-AG
	Reverse (3' → 5')	CCC-TCT-TCG-TTT-GCT-AAT-GT

[0169] 도 24(*** $p < 0.001$)를 참조하면, 적용례에서 인쇄된 3D 치아 형상 세포 구조("DDMp bio-ink")(10 %w/v; 실시예 8)는 대조군보다 DSPP 발현이 22.86 배, DMP-1 발현이 59.76배 높은 것을 확인할 수 있으며, 이는 통계적 유의성(Statistical significance) 또한 관찰되었다.

[0171] 각각의 시료(적용례 및 대조군)를 15일 동안 분화배지(1% v/v P/S를 함유한 StemMACs OsteoDiff media(Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Germany))에서 배양하며, 동시에 알칼라리성 인산가수분해효소(AP) 염색을 수행하였다. 이때, 아프로티닌(aprotinin)(Sigma, St. Louis, MO, USA)을 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 배지에 첨가하여 과도한 바이오잉크 분해를 방지하였다. AP 염색은 REPROCELL Stengent® Alkaline Phosphatase (AP) Staining Kit II (Stengent, Cambridge, MA, USA)를 이용하여 제조사의 지침을 따라 수행하였다. 특히, 시료는 2~5 분(min) 동안 고정하고, 5 내지 15 분(min) 동안 상온의 암실(dark)에서 AP 염색 용액으로 염색하였다. 이후, 시료를 PBS로 2회 세척하였다. 염색된 시료를 현미경으로 이용하여 이미지화하였다

[0172] DSPP(dentin sialo-phosphoprotein)의 면역염색(immunostaining)을 수행하였다. 시료(적용례)를 15일 동안 분화배지(1% v/v P/S를 함유한 StemMACs OsteoDiff media(Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Germany))에서 배양하며, 배양된 시료는 1일 동안 4% PFA로 고정된다. 시료는 5 분 동안 PBS(Sigma, St. Louis, MO, USA)에서 0.1% Triton X-100(Sigma, St. Louis, MO, USA)로 투과되었으며, 1 시간 동안 5% 소혈청알부민(bovine serum albumin)(Sigma, St. Louis, PA, USA)으로 차단되었다. 시료는 밤새(overnight) 4 °C DSPP 항체 용액(dilution ratio 1:500; SantaCruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)에서 배양되었다. 시료는 4 °C, 밤새(overnight) PBS로 세척되었다. 2차 항체, Goat Anti-mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 488 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), PBS(1:1000)로 희석되며, 상온에서 1 시간 동안 시료를 배양하였다. 시료는 PBS로 3회 세척한 후, 1:1000로 희석된 Hoechst 33258 (Sigma, St. Louis, MO, USA)에서 3분 동안 배양되었다. 이후, 시료는 형광현미경을 이용하여 관찰하였다.

[0173] AP 염색 및 DSPP의 면역염색 관찰결과를 도 25에 도시하였다.

[0174] 도 25(Scale bars: 100 μm)를 참조하면, AP 발현(도 25의 (a))와 DSPP 발현(도 25의 (b))이 바이오잉크 내 DDM 입자 주변에서 높은 것을 확인할 수 있다.

[0176] 실험예 9. 3D 치아 형상 세포 구조의 물성 분석

[0177] 폴리카프로락톤(PCL)(s; MW 43000; Polysciences Inc, Warrington, FL, USA)과 DPSC가 포함된 DDMp 기반 바이오잉크(실시예 8)를 공동 인쇄하여 제조한 5 x 5 x 5 mm^3 의 3D 하이브리드 구조를 시료로 하여, 범용 테스트 기계(Instron Model 3342; Illinois ToolWorks Inc., MA, USA)에 위치시킨 후, 각 시료를 1 mm/min의 속도로 점진적으로 압축하고 그에 상응하는 힘(force)과 거리(distance)를 기록하였다. 응력-변형률 곡선(strain-stress curve)을 그린 후, 10% 변형률(strain)을 기준으로 기술기를 계산하여 압축 계수를 측정하였다. 대조군으로서, DPSC가 포함된 DDMp 기반 바이오잉크(실시예 8)로만 인쇄하여 제조한 5 x 5 x 5 mm^3 의 하이드로겔 구조("DDMp bio-ink"), PCL로만 인쇄하여 제조한 5 x 5 x 5 mm^3 의 PCL 스케폴드("PCL only")에 대해서도 동일한 방법으로 압축 계수를 측정하였다.

[0179] 측정결과를 도 26에 도시하였다.

[0180] 도 26(** $p < 0.001$)를 참조하면, PCL-DDMp 바이오잉크 하이브리드 구조("PCL-DDMp bio-ink") 대략 30 MPa의 압축 계수를 가지는 것을 보여주며, PCL 스캐폴드("PCL only")와 유사하다. 반면, DDMp 바이오잉크로 구성된 하이드로겔 구조("DDMp bio-ink")는 대략 25 KPa의 압축 계수를 가지는 것이며, 이는 하이브리드 구조("PCL-DDMp bio-ink")에 비하여 1165배 낮은 것이다. 이러한 결과는 3D 치아 모양 세포 구조의 기계적 특성이 주로 PCL 구조에 의해 결정되는 것임을 보여준다.

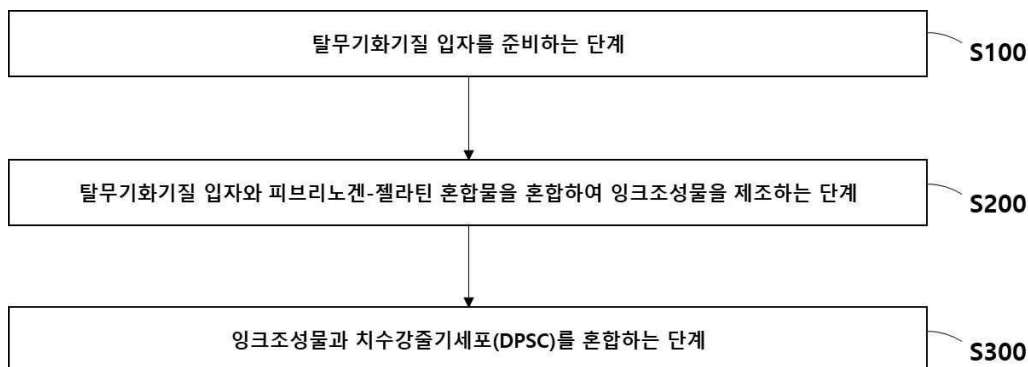
[0182] 이상에서 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본 발명의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본 발명의 권리범위에 속하는 것이다.

도면

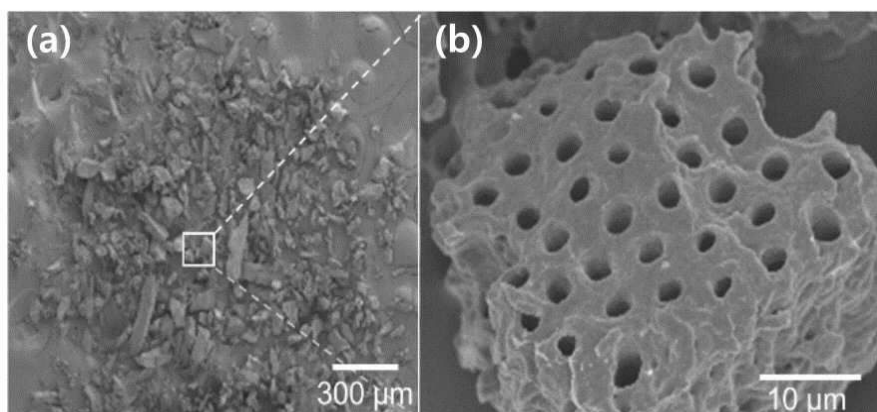
도면1a



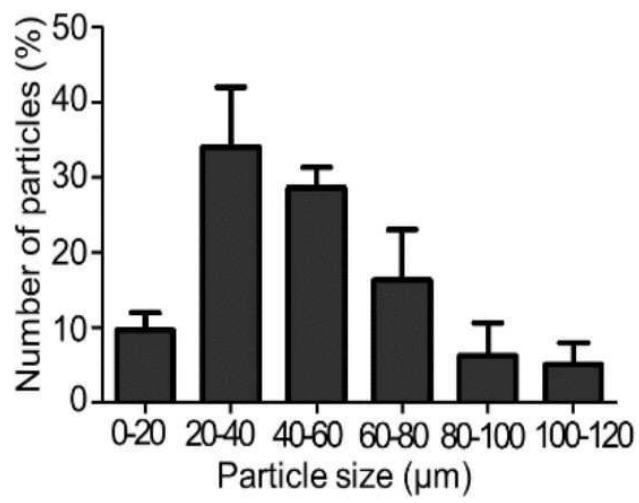
도면1b



도면2



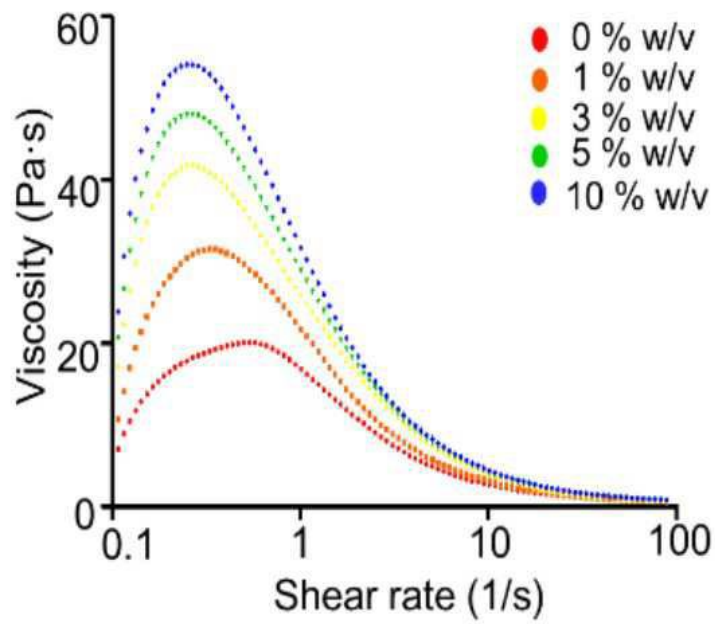
도면3



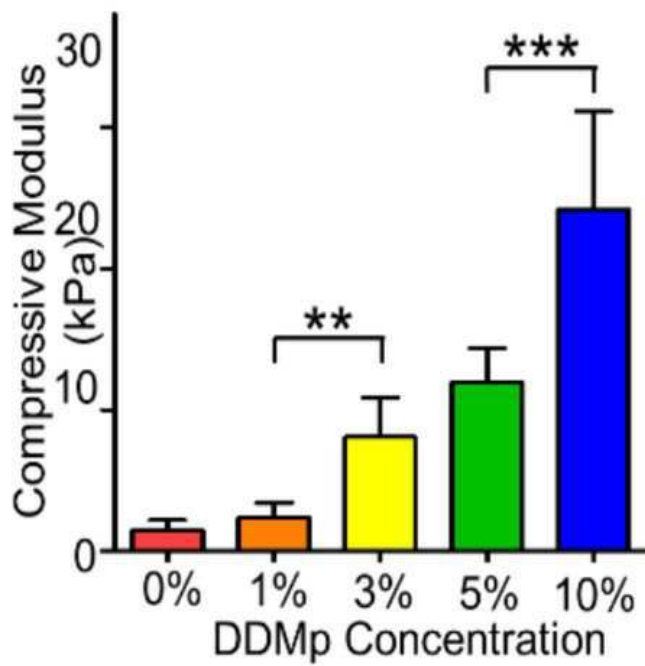
도면4



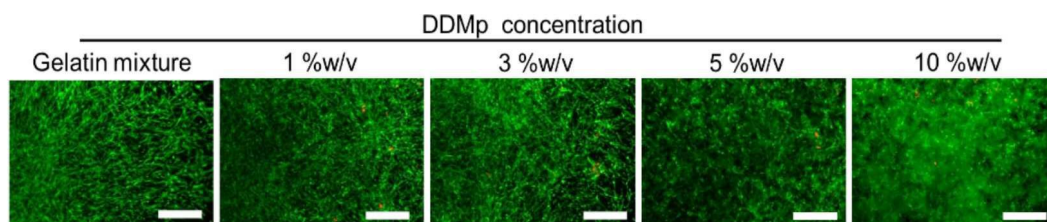
도면5



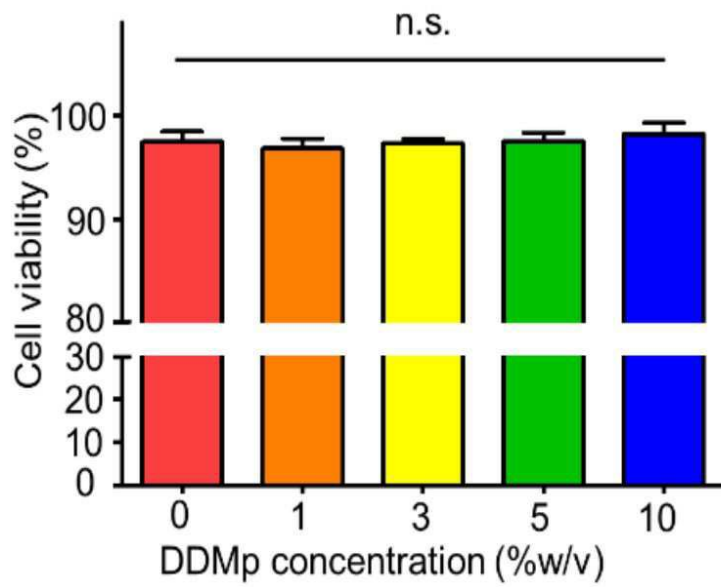
도면6



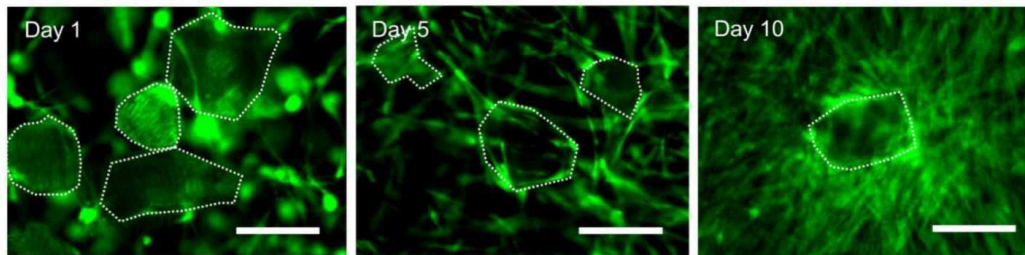
도면7



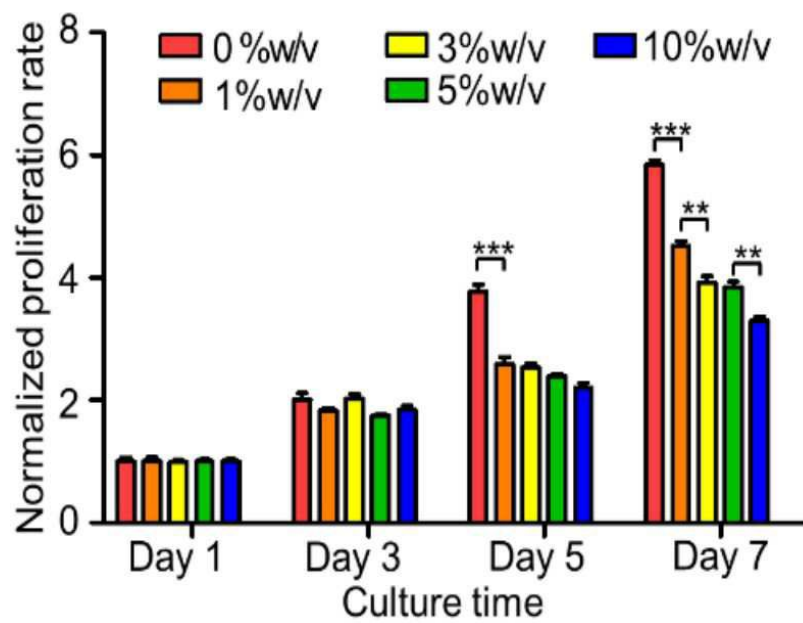
도면8



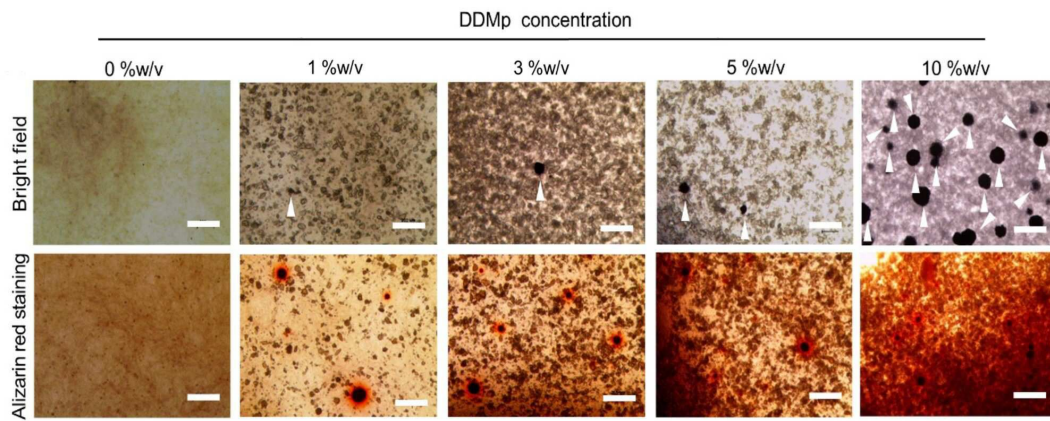
도면9



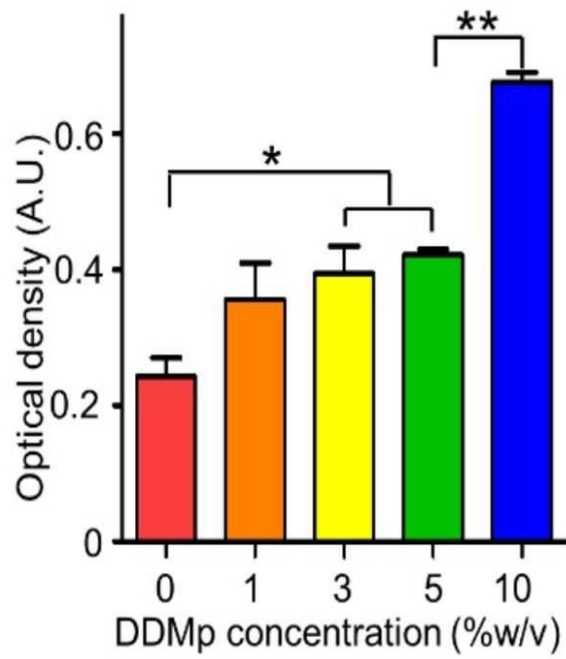
도면10



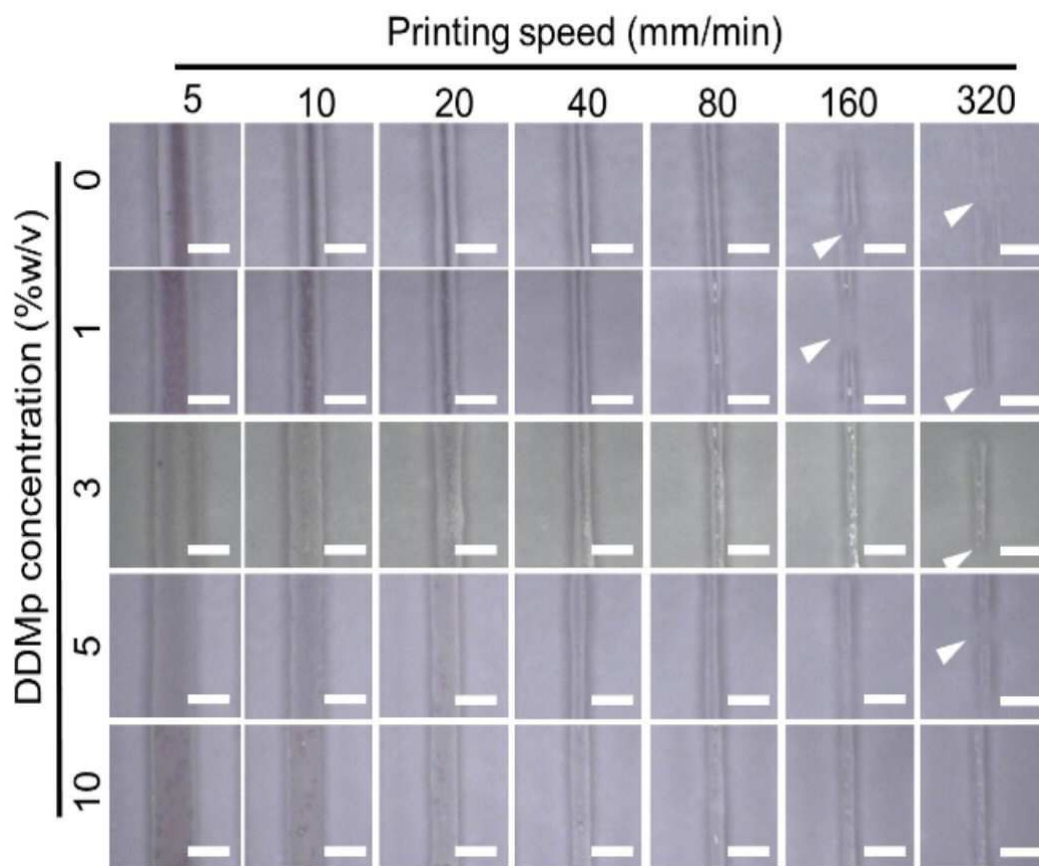
도면11



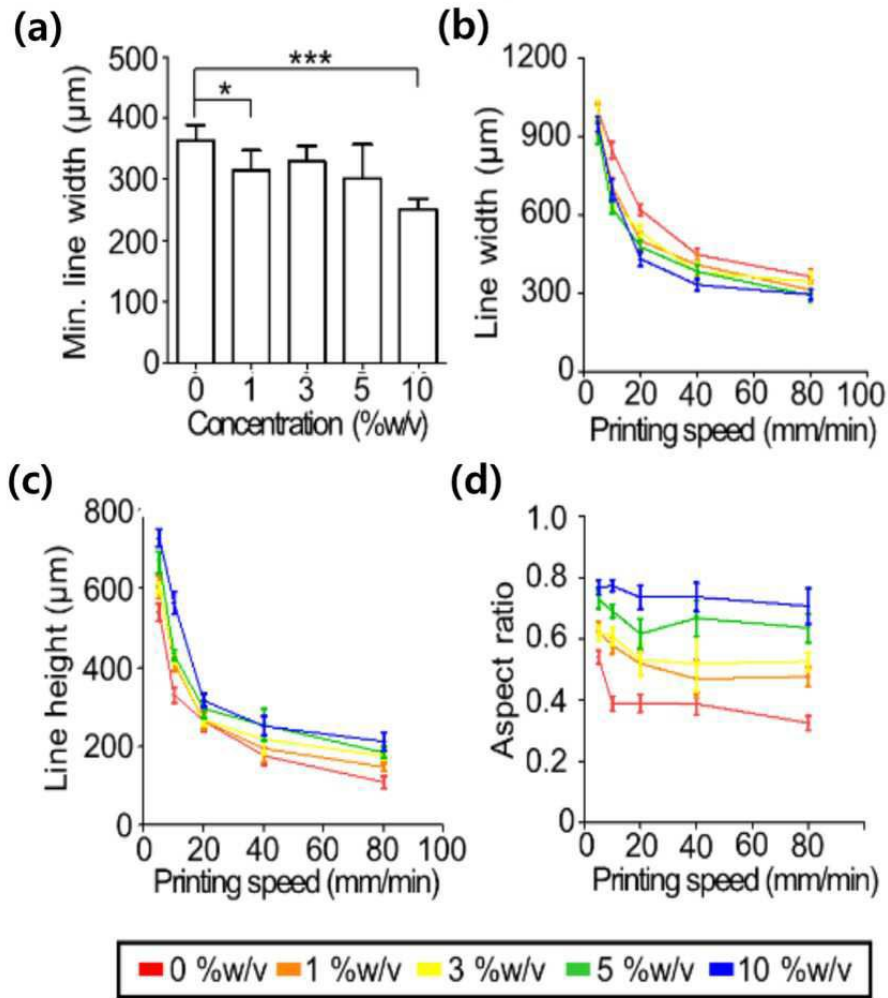
도면12



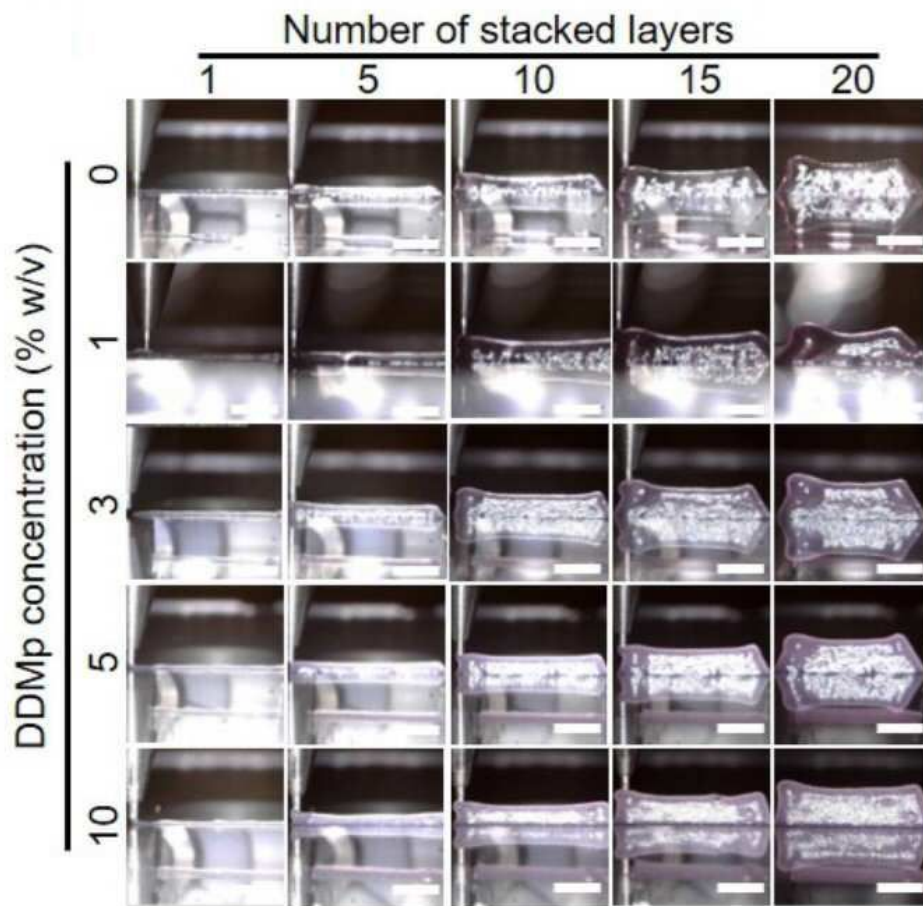
도면13



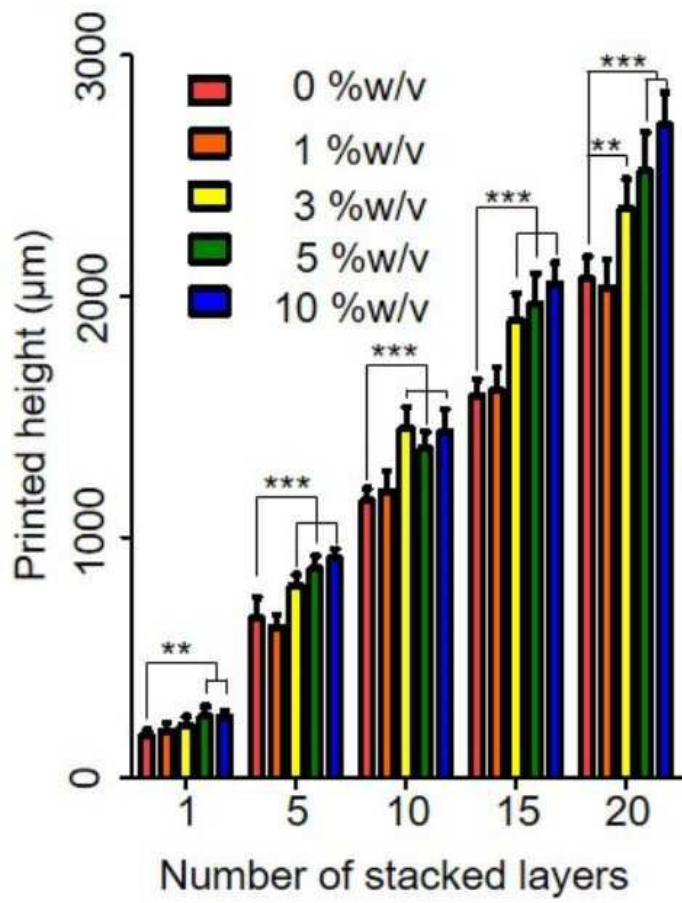
도면14



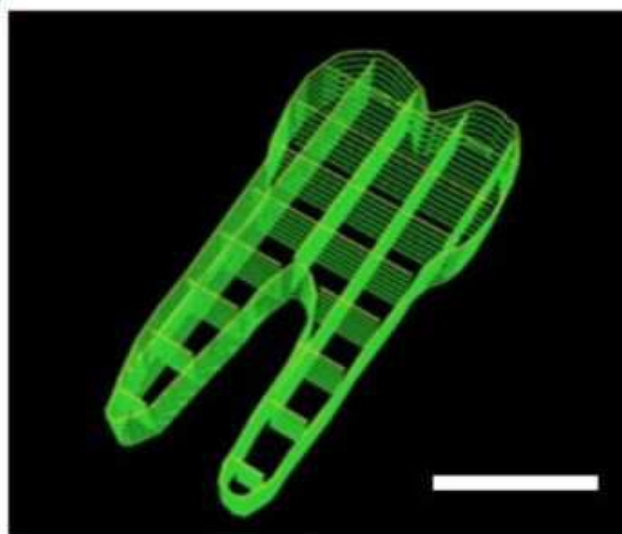
도면15



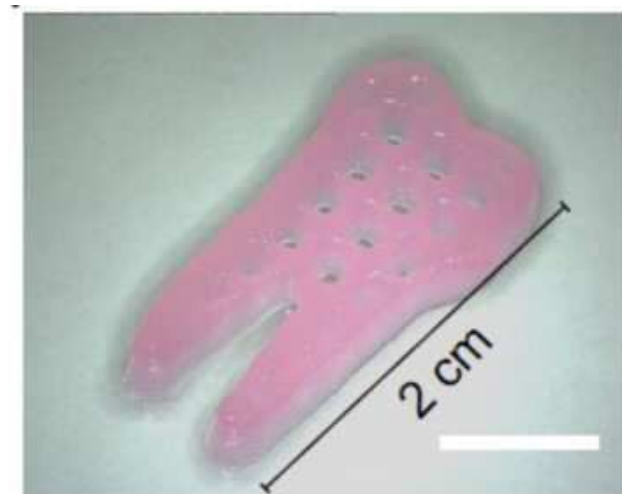
도면16



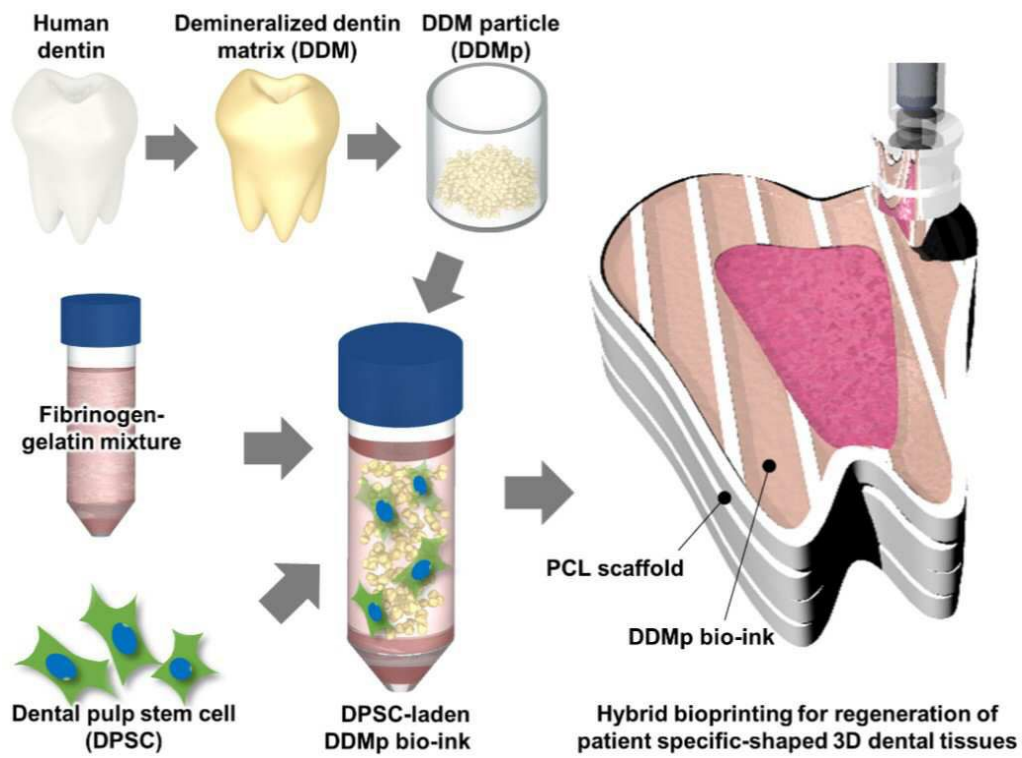
도면17



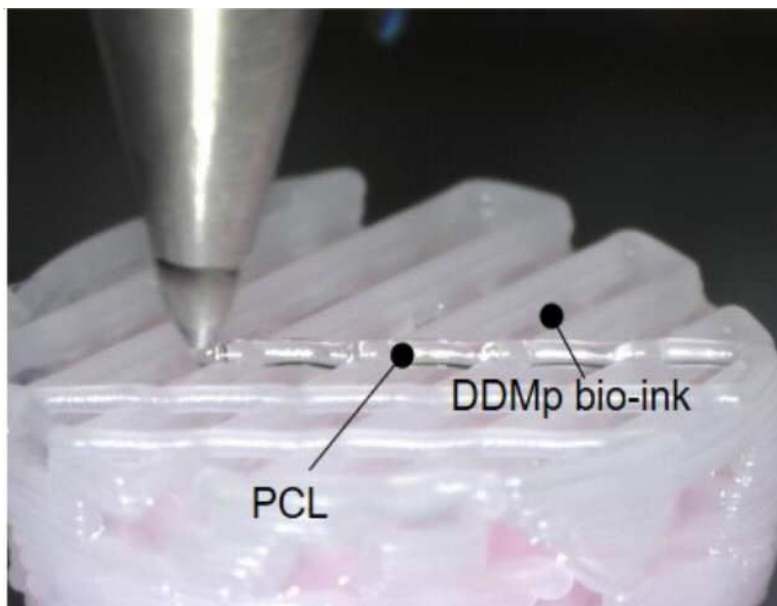
도면18



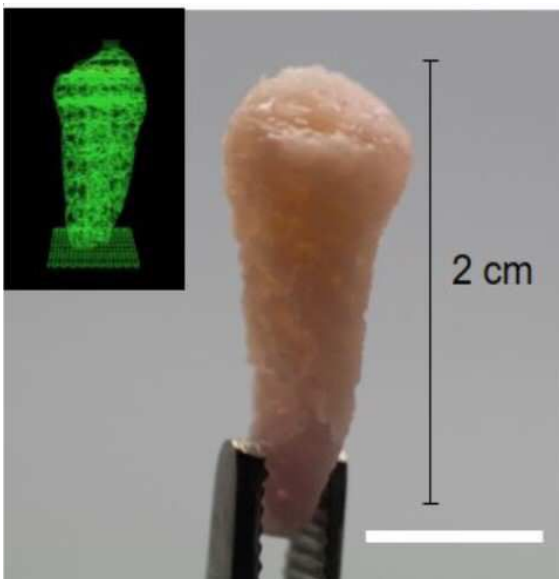
도면19



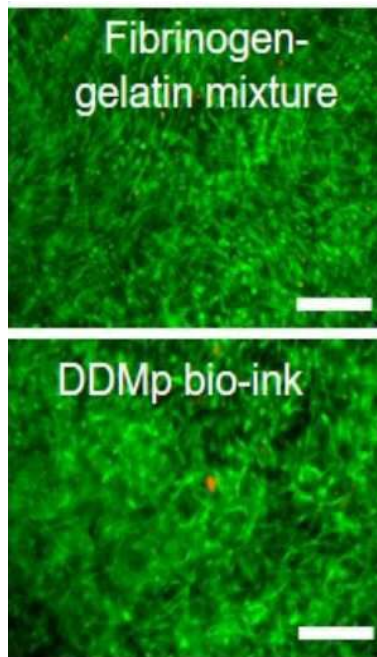
도면20



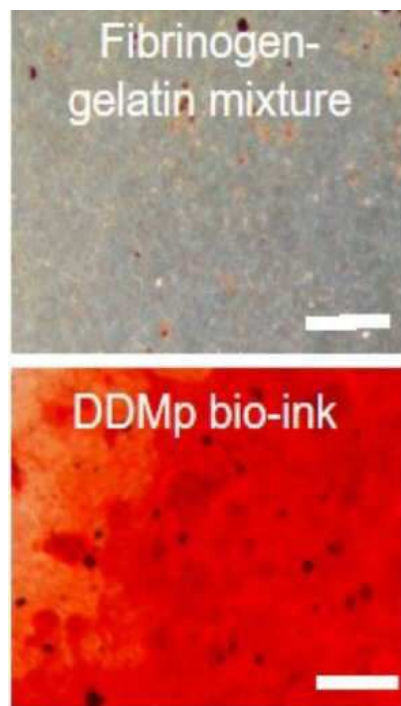
도면21



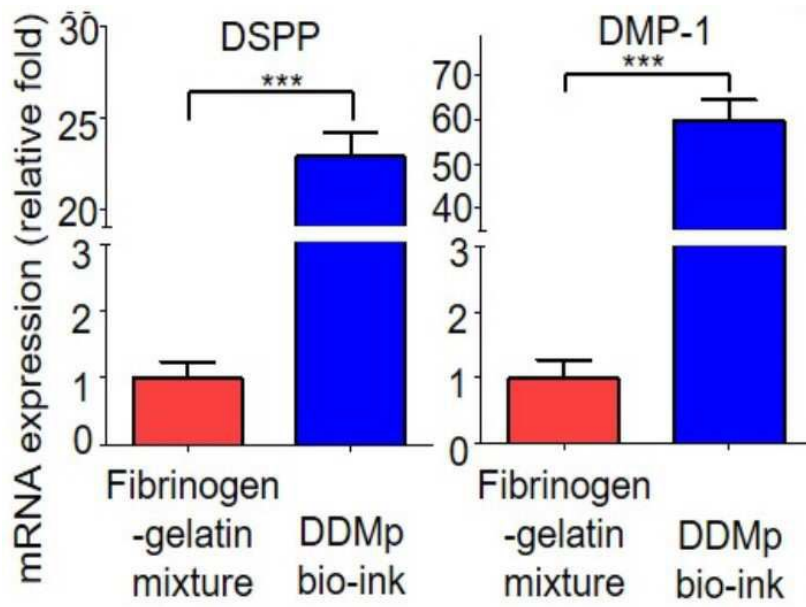
도면22



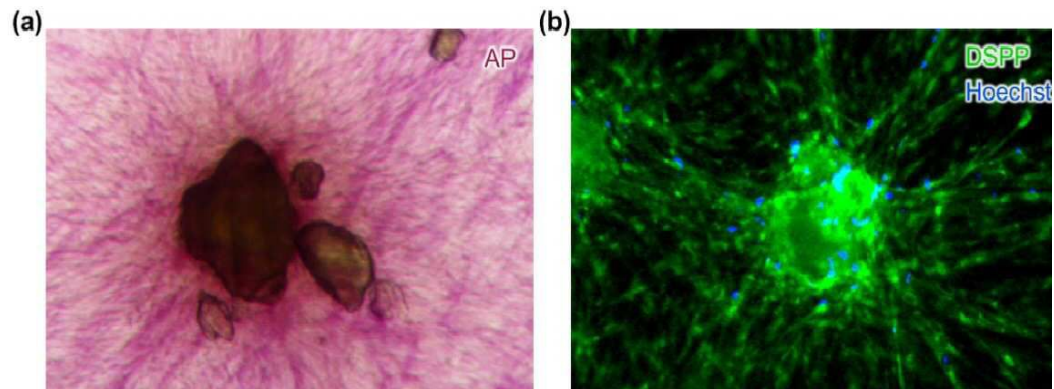
도면23



도면24



도면25



도면26

