(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0109139
(43) 공개일자 2020년09월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C09D 11/101 (2014.01) *A61K 9/06* (2006.01)
A61L 27/16 (2006.01) *A61L 27/38* (2006.01)
A61L 27/52 (2006.01) *C09D 11/033* (2014.01)
C09D 11/107 (2014.01)
(52) CPC특허분류
C09D 11/101 (2013.01)
A61K 9/06 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0028270
(22) 출원일자 2019년03월12일
심사청구일자 2019년03월12일

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
차채녕
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
홍지수
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(74) 대리인
리앤목특허법인

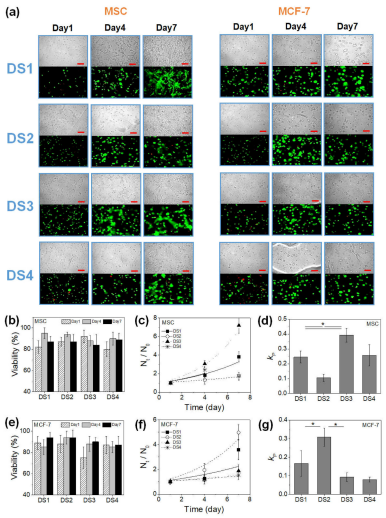
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 **바이오 프린팅용 잉크 조성물 및 그로부터 형성된 하이드로젤**

(57) 요 약

광경화성 작용기를 갖는 모노머 또는 매크로머; 및 아크릴성 초분기 폴리글리세롤(acrylic hyperbranched polyglycerol: AHPG); 을 포함하는 바이오 프린팅용 잉크 조성물 및 이로부터 형성된 하이드로젤이 개시된다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
A61L 27/16 (2013.01)
A61L 27/38 (2013.01)
A61L 27/52 (2013.01)
C09D 11/033 (2013.01)
C09D 11/107 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345297406
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명 바이오프린팅 기술 적용한 다기능성 하이드로젤 생체조직 모델 개발 및 이를 이용한 폴리아스파트아미드 기반 나노치료제 효능 검증
기 여 율 3/10
과제수행기관명 울산과학기술원
연구기간 2019.03.01 ~ 2020.02.29
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711087167
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 해외우수기관유치(R&D)
연구과제명 UNIST-WFIRM-UniBasel 생체장기모사 연구센터
기 여 율 3/10
과제수행기관명 울산과학기술원
연구기간 2019.01.01 ~ 2019.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711081457
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 바이오,의료기술개발(R&D)
연구과제명 조직 재건용 바이오잉크 기술 개발
기 여 율 4/10
과제수행기관명 울산과학기술원
연구기간 2019.01.01 ~ 2019.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

광경화성 작용기를 갖는 모노머 또는 매크로머, 및

아크릴성 초분기 폴리글리세롤(acrylic hyperbranched polyglycerol: AHPG)을 포함하는 바이오 프린팅용 잉크 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 아크릴성 초분기 폴리글리세롤의 농도가 조성물 총 중량에 대하여 0.1 % 내지 5 % (w/v)인 바이오 프린팅용 잉크 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 광경화성 작용기를 갖는 모노머 또는 매크로머의 농도가 조성물 총 중량에 대하여 1% 내지 30 % (w/v)인 바이오 프린팅용 잉크 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 광경화성 작용기를 갖는 모노머 또는 매크로머; 및 아크릴성 초분기 폴리글리세롤의 농도가 조성물 총 중량에 대하여 5 내지 30 % (w/v)인 바이오 프린팅용 잉크 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 아크릴성 초분기 폴리글리세롤의 분자량이 2000 내지 15000 Da인 바이오 프린팅용 잉크 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 아크릴성 초분기 폴리글리세롤은 초분기 폴리글리세롤에 아크릴기가 에스테르 결합에 의하여 연결된 것인 바이오 프린팅용 잉크 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 아크릴기는 아크릴레이트 또는 메타크릴레이트인 바이오 프린팅용 잉크 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 조성물이 수성 용매를 더 포함하는 바이오 프린팅용 잉크 조성물.

청구항 9

8항에 있어서, 상기 수성 용매가 인산 완충 생리식염수(phosphate buffered saline: PBS)인 바이오 프린팅용 잉크 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 조성물이 광개시제를 더 포함하는 바이오 프린팅용 잉크 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 아크릴성 초분기 폴리글리세롤은 다가알코올에 글리시돌을 반응시켜 초분기 폴리글리세롤을 제조하고, 제조된 상기 초분기 폴리글리세롤의 OH 말단에 아크릴기를 갖는 화합물을 반응시켜 제조된 것인 바이오 프린팅용 잉크 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 다가알코올은 3가 내지 5가의 알칸올인 바이오 프린팅용 잉크 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 아크릴기를 갖는 화합물과 반응하는 상기 초분기 폴리글리세롤의 OH 말단이 전체 말단 OH의 5 내지 80%인 바이오 프린팅용 잉크 조성물.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 광경화성 작용기를 갖는 모노머가 아크릴아미드, 또는 메타크릴아미드인 바이오 프린팅용 잉크 조성물.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 광경화성 작용기를 갖는 매크로머는 분자량이 400 내지 50000 Da인 바이오 프린팅용 잉크 조성물.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 광경화성 작용기를 갖는 매크로머는 폴리(에틸렌 글리콜)메타크릴레이트(PEGMA) 또는 메타크릴성 젤라틴(methacrylic gelatin: MGel)인 바이오 프린팅용 잉크 조성물.

청구항 17

제1항에 있어서, 상기 바이오 프린팅용 잉크 조성물이 전단-감소(shear-thinning) 특성을 갖는 것을 특징으로 하는 바이오 프린팅용 잉크 조성물.

청구항 18

광경화성 작용기를 갖는 모노머 또는 매크로머; 및 아크릴성 초분기 폴리글리세롤(acrylic hyperbranched glycerol: AHPG); 를 포함하는 바이오 프린팅용 잉크 조성물에 광을 조사하여 가교된 하이드로젤.

청구항 19

제18항에 있어서, 하이드로젤이 약물을 더 포함하는 하이드로젤.

청구항 20

제18항에 있어서, 상기 하이드로젤이 세포를 더 포함하고, 조직 공학용 세포배양용 스캐폴드로서 사용되는 하이드로젤.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 바이오 프린팅용 잉크 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근 디지털 광 처리(DLP: Digital Light Processing), 스테레오리소그래피(SLA: stereolithography) 및 압출 적층(Extrusion Procesing)과 같은 미세 가공 기술이 발전하면서 복잡한 조직 구조 및 약물 전달 시스템과 같은 응용 분야에서 소형화된 생체 적합성 연성 물질을 엔지니어링하는데 관심이 증가하고 있다. "바이오 프린팅(bioprinting)" 또는 "바이오가공기술(biofabrication)"으로 종종 집합적으로 지칭되는 이 기술은 환자 맞춤형 재생 의학이 미래의 의료 패러다임으로 환영받고 있기 때문에 의생명 공학 분야에서 특히 매력적이라고 여겨진다. 공학 구조 및 약물 방출 동력학의 생물학적 기능을 제어하면서 원하는 구조와 분해능을 갖춘 조직 구조 및 약물 전달 시스템을 신속하게 생산하는 것이 점점 더 중요 해지고 있다.

[0003] 그러나, 고분자 기반 재료의 미세 가공은 주로 구조 지지체로 사용되는 고온 용융 압출을 통한 폴리락트산(PLA) 및 아크릴로 니트릴-부타디엔-스티렌 (ABS)과 같은 통상적인 열가소성 재료에 집중되었고, 이는 조직 공학 및 약물 전달 응용에 필요한 민감한 생물학적 물질을 캡슐화하기에 적합하지 않다.

[0004] 바이오가공기술 (biofabrication)의 성숙화와 함께, 초점은 이제 "바이오잉크(bioink)" 개발로 향하고 있다. 바이오잉크는 프린터의 가교 결합 방식을 통해 적시에 프린팅시 고체 구조로 전환될 수 있을 뿐만 아니라, 제작된 구조체는 함유된 생체물질의 보호 및 적절한 미세 환경을 제공해야 한다. 이러한 이유로, 다양한 하이드로젤 기반 구조물 제작을 위한 바이오가공기술이 활발히 개발되고 있다. 하이드로젤은 재생 의학의 다양한 응용 분야에서 세포와 조직을 지지하기 위한 스캐폴드로서 널리 사용된다. 그들의 기계적 성질은 유해한 외부 환경으로부터 보호하면서 다양한 세포 기능을 최적화하기 위해 조절성 물리적 신호를 제공하도록 조정될 수 있다. 나아가, 하이드로젤은 부착을 위한 중합체 네트워크를 향한 그들의 친화력을 향상시키기 위해 세포인식분자, 예를 들어, 세포외기질(ECM) 단백질, 및 세포 부착 펩타이드를 제시하도록 가공될 수 있다.

[0005] 현재 주로 이루어지는 하이드로젤 바이오가공기술 연구는 빠른 물리적 가교 결합 능력을 가진 천연 고분자를 이용하여, 압출 기반 디스펜스 시스템을 통해 하이드로젤을 제조하는 것이다. 예를 들어, 알지네이트 (alginate) 하이드로젤은 압출된 알지네이트 수용액을 칼슘 이온을 이용한 가교를 통해 프린팅될 수 있다. 아가로오스(agarose) 하이드로젤은 프린팅하기 전에 고온에서 액체 상태로 유지되는 압출된 용액의 물리적 가교를 유도하기 위해 온도를 낮춤으로써 제조될 수 있다.

[0006] 이러한 유형의 제작은 단순한 가교 결합 메커니즘으로 인하여 일반적으로 간단하게 제작할 수 있으나, 다양한 소재 특성을 제어하는 용이하지 않다. 만약 하이드로젤 특성 조절을 위해 천연 고분자에 대한 화학적 변형을 한다면, 이로 인해 의도하지 않게 미세 가공 공정에 중요한 요소인 유체 역학 및/또는 가교 결합 효율이 바뀔 수 있기 때문이다. 최근에는 의생명공학 분야에서 다양한 광 가교 결합된 하이드로젤의 사용으로 인해, DLP 및 SLA와 같은 광경화계 프린팅 시스템이 더 많이 도입되어 마이크로미터 스케일 하이드로젤 구조물을 생성시키는데, 이는 상업적으로 입수가능한 모노머 및 광반응성 작용기(photolabile functional group)를 보유한 매크로머, 예를 들어 폴리에틸렌글리콜 다이아크릴레이트 (poly(ethylene glycol) diacrylate (PEGDA)), 메타크릴 알지네이트 (methacrylic alginate), 메타크릴 젤라틴 (methacrylic gelatin (MGel)), 등을 이용하여 만들어진다. 고분자에 광결합 능력을 부여하는 것은 비교적 간단한 과정으로, 이는 압출-기반 시스템보다 다양한 고분자에 더 적용가능한 장점이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 한 측면은 새로운 바이오 프린팅용 잉크 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 다른 한 측면은 상기 바이오 프린팅용 잉크 조성물에 광을 조사하여 가교된 하이드로젤을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 일 측면에 따르면,

[0010] 광경화성 작용기를 갖는 모노머 또는 매크로머, 및

[0011] 아크릴성 초분기 폴리글리세롤(acrylic hyperbranched ploygIycerol: AHPG)을 포함하는 바이오 프린팅용 잉크 조성물이 제공된다.

[0012] 다른 일 측면에 따르면,

[0013] 광경화성 작용기를 갖는 모노머 또는 매크로머; 및 아크릴성 초분기 폴리글리세롤(acrylic hyperbranched ploygIycerol: AHPG);을 포함하는 바이오 프린팅용 잉크 조성물에 광을 조사하여 가교된 하이드로젤이 제공된다.

발명의 효과

[0014] 일 구현예에 따른 바이오 프린팅용 잉크 조성물은 AHPG의 분자량 (M_W) 및 아크릴레이트 치환도(DS: degree of substitution)를 조절함으로써 다양한 범위의 기계적 성질을 갖는 하이드로젤을 생성시킬 수 있으며, 상기 바이오 프린팅용 잉크 조성물에 약물을 캡슐화하는 경우 약물 전달 시스템에 사용될 수 있고, 상기 바이오 프린팅용

잉크 조성물에 세포를 캡슐화하는 경우 생물의학 응용을 위한 소형 조직 구조체(miniaturized tissue constructs)로서 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 (a) 아크릴성 초분기형 폴리글리세롤 (AHPG) 가교제의 합성, (b) AHPG 아크릴레이트의 치환도 (DS) 변화에 의한 하이드로젤의 가교 밀도 제어 및 (c)~(f) 각종 물질에 있어서 전단 속도에 따른 전단 점도 변화를 나타낸 도면이다.

도 2는 다양한 농도, 분자량 (2000 (2K), 5000 (5K), 15000 (15K) g/mol) 및 아크릴레이트 DS를 갖는 AHPG와 가교된 폴리에틸린글리콜 메타아크릴레이트 (PEGMA) 하이드로젤 및 폴라아크릴아미드 (PAAm) 하이드로젤의 탄성 계수(Elastic modulus) (*E*)를 나타내는 도면이다.

도 3은 다양한 AHPG 농도 및 아크릴레이트 DS를 갖는 하이드로젤의 탄성 계수 (Elastic modulus) (*E*)를 나타내는 도면이다.

도 4는 하이드로젤에 캡슐화된 약물의 누적 약물 방출 프로파일 등을 나타내는 도면이다.

도 5는 (a), (b) 다양한 아크릴레이트 DS (AHPG 농도비 (Φ_{AHPG})= 0.1)를 갖는 MGel-AHPG5K 하이드로젤에 캡슐화된 세포에 대한 이미지, (b)~(g) 생존력, 증식 속도 등을 나타낸 도면이다.

도 6은 DLP 프로젝션 프린팅을 통한 AHPG-가교 하이드로젤의 미세제작 등을 개략적으로 도시한 도면이다.

도 7은 HPG에 있어서. (a) ^{13}C-NMR 스펙스럼 (b) ^{1}H-NMR 스펙스럼 및 (c) 다양한 분자량에 따른 피크의 적분값을 나타내는 도면이다.

도 8은 AHPG의 ^{1}H-NMR 스펙트럼을 나타내는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 일 측면에 따른 바이오 프린팅용 잉크 조성물은 광경화성 작용기를 갖는 모노머 또는 매크로머; 및 아크릴성 초분기 폴리글리세롤(acrylic hyperbranched polyglycerol: AHPG);을 포함한다.

[0017] 일 구현예에 따르면, 상기 바이오 프린팅용 잉크 조성물에서 아크릴성 초분기 폴리글리세롤의 농도는 총 부피에 대하여 0.1 % (w/v) 내지 5 % (w/v) 일 수 있다. 상기 아크릴성 초분기 폴리글리세롤의 농도는 3 % (w/v) 내지 10 % (w/v)일 수 있다.

[0018] 일 구현예에 따르면, 상기 광경화성 작용기를 갖는 모노머 또는 매크로머의 농도는 총 부피에 대하여 1 % (w/v) 내지 30 % (w/v)일 수 있다. 상기 광경화성 작용기를 갖는 모노머 또는 매크로머의 농도는 4 % (w/v) 내지 20 % (w/v), 예를 들면, 4 % (w/v) 내지 15 % (w/v), 또는 10 % (w/v) 내지 20 % (w/v)일 수 있다.

[0019] 일 구현예에 따르면, 상기 광경화성 작용기를 갖는 모노머 또는 매크로머; 및 아크릴성 초분기 폴리글리세롤의 농도는 총 부피에 대하여 5 내지 30 % (w/v)일 수 있으며, 예를 들면 8 내지 25 % (w/v), 또는 5 내지 15 % (w/v)일 수 있다.

[0020] 일 구현예에 따르면, 상기 아크릴성 초분기 폴리글리세롤의 분자량은 2000 내지 15000 Da, 예를 들면, 2000 내지 10000 Da, 또는 5000 내지 15000 Da 일 수 있다.

[0021] 일 구현예에 따르면, 바이오 프린팅용 잉크 조성물의 상기 아크릴성 초분기 하이드로젤 글리세롤에서 초분기 하이드로젤 글리세롤 모이어티는 다가알코올에 글리시돌을 반응시켜 제조된 분자량 1700 내지 15000 Da, 예를 들면 1700 내지 10000 Da, 또는 4000 내지 15000 Da인 것일 수 있다. 다가알코올은 알킬기에 OH기가 2 개 이상 결합된 화합물을 의미하며, 다가알코올은 예를 들어 3가 알코올 또는 4가 알코올일 수 있다. 다가알코올의 비제한적인 예로서 트리메틸올 에탄, 트리메틸올 프로판, 펜타에리트리톨, 디(트리메틸올 프로판) 등이 있다.

[0022] 일 구현예에 따르면, 바이오 프린팅용 잉크 조성물의 상기 아크릴성 초분기 폴리글리세롤은 다가알코올에 글리시돌을 반응시켜 제조된 초분기 폴리글리세롤의 OH 말단에 아크릴기를 갖는 화합물을 반응시켜 제조된 것이고, 예를 들어 초분기 폴리글리세롤(hyperbranched ploygiycerol: HPG)의 OH기의 5 내지 80 %가 아크릴기로 치환된 것일 수 있다. 즉, 아크릴기에 의한 초분기 폴리글리세롤(HPG) OH기의 치환도(Degree of Substitution: DS)가 5 내지 80%임을 의미한다. 바람직하게는 상기 치환도 DS는 10 내지 70%일 수 있다.

[0023] 일 구현예에 따르면, 상기 아크릴기는 아크릴레이트 또는 메타크릴레이트일 수 있다.

[0024] 상기 광경화성 작용기를 갖는 모노머는 특별히 제한되지는 않으며, 일 구현예에 따르면, 상기 광경화성 작용기를 갖는 모노머는 수용성일 수 있고, 예를 들어, 아크릴아미드일 수 있다.

[0025] 상기 광경화성 작용기를 갖는 매크로머의 분자량은 400 내지 50000 Da일 수 있다.

[0026] 상기 광경화성 작용기를 갖는 매크로머는 특별히 제한되지는 않으며 예를 들어, 폴리(에틸렌 글리콜) 메타크릴레이트(PEGMA)일 수 있다. 상기 PEGMA의 분자량은 400 내지 5000 Da일 수 있으며, 예를 들면 700 내지 2000 Da, 또는 1000 내지 4000 Da일 수 있다. PEGMA의 분자량이 400 Da 미만일 경우, 수성 용매에 대한 용해도가 급격히 떨어지고, 5000 Da을 초과하는 경우, 분자 유동성이 떨어지고 작용기 수가 줄어들어 젤 형성이 용이하지 않다.

[0027] 일 구현예에 따르면, 상기 광경화성 작용기를 갖는 수용성 매크로머는 메타크릴성 젤라틴(methacrylic gelatin: MGel)일 수 있다. 메타크릴성 젤라틴은 젤라틴에 메타크릴기를 결합시킨 것으로서, 구체적 제조 방법은 공지되어 있으므로 생략한다.

[0028] 일 구현예에 따르면, 상기 조성물은 수성 용매를 더 포함할 수 있으며, 상기 수성 용매는 예를 들어 pH 7.0 ~ 8.0, 바람직하게는 7.4의 인산 완충 생리식염수(phosphate buffered saline: PBS)일 수 있다.

[0029] 일 구현예에 따르면, 상기 바이오 프린팅용 잉크 조성물은 전단-감소(shear-thinning) 특성을 보인다. 따라서, 3D 프린터의 잉크로 사용하는 경우 노즐에서의 분사가 원활하므로 막힘 현상생이 현저히 줄어들고, 분사된 잉크의 점도는 분사되기 전 점도로 복귀한다.

[0030] 일 구현예에 따르면, 상기 조성물이 광개시제를 더 포함할 수 있고, 상기 광개시제는 특별히 제한되지는 않으며, 일 구현예에 따르면, 2-히드록시-4'-(2-히드록시에톡시)-2-메틸프로피오페논일 수 있다.

[0031] 다른 일 측면에 따른 하이드로젤은

[0032] 광경화성 작용기를 갖는 모노머 또는 매크로머; 및 아크릴성 초분기 폴리글리세롤(acrylic hyperbranched polyglycerol: AHPG); 을 포함하는 바이오 프린팅용 잉크 조성물에 광을 조사하여 가교 결합이 형성되어 만들어진다.

[0033] 일 구현예에 따르면, 상기 바이오 프린팅용 잉크 조성물은 수성 용매를 더 포함할 수 있고, 상기 수성 용매는 예를 들어, 인산 완충 생리식염수(phosphate buffered saline: PBS)일 수 있다.

[0034] 일 구현예에 따르면, 상기 광은 UV일 수 있고, 상기 UV의 파장은 200 내지 450nm일 수 있고, 조사 시간은 10초 내지 5분일 수 있다. 상기 UV의 파장이 200nm 미만이면 에너지가 너무 강하고, 450nm 초과이면 가교가 일어나기에 너무 작은 에너지로서 바람직하지 않다. 조사 시간은 10초 미만이면 충분한 가교가 이루어지지 않고, 5분을 초과이면 추가로 첨가될 수 있는 약물, 세포 등에 악영향을 미치므로 바람직하지 않다.

[0035] 일 구현예에 따르면, 상기 바이오 프린팅용 잉크 조성물이 약물을 더 포함할 경우 상기 하이드로젤은 약물 전달 시스템에 사용될 수 있다.

[0036] 일 구현예에 따르면, 상기 바이오 프린팅용 잉크 조성물이 세포를 더 포함하는 경우 상기 하이드로젤은 경우 생물의학 응용을 위한 조직 공학용 세포배양용 스캐폴드로서 사용될 수 있다.

[0038] 다양한 단량체 시스템으로 만들어진 하이드로젤의 기계적 특성을 보다 정교하게 제어하기 위해 과분지 폴리글리세롤 (hyperbranched polyglycerol: HPG) 가교제를 기반으로 하는 하이드로젤 시스템을 개발하였다. HPG는 친수성, 생체적합성 및 간단한 합성 경로와 같이 생물 의학 응용 분야에 매우 적합한 몇 가지 특성을 가지고 있다. 또한, 분자량 및 분지도는 점탄성 특성을 조정하기 위해 합성 동안 쉽게 조절될 수 있다.

[0039] HPG 분자상에 다수의 히드록시기가 있으므로, 가교 결합 반응에 필요한 반응성 작용기의 치환도를 제어하는 것도 가능하다. 여기서, 다양한 수의 아크릴레이트가 HPG 상의 히드록시기의 화학적 변형을 통해 결합되어 광가교력이 부여된 아크릴성 HPG (AHPG)을 개발하였다. 친수성/소수성 균형, 및 생성되는 하이드로젤의 기계적 특성에 대한 AHPG의 분자량을 사실상 조절하는 아크릴레이트의 DS의 영향은 다양한 모노머에서 탐구되어 궁극적으로 하이드로젤 물리적 특성에 영향을 미치는 최적의 물리적 상호 작용을 위한 특정 모노머에 대한 폴리머성 가교제의 물리적 특성을 조절할 필요성을 입증한다.

[0040] 이러한 기계적 조절능 및 광가교 결합으로 DLP 프로젝션 프린팅 시스템을 사용하여 복합한 구조 및 다양한 기계적 성질을 지닌 AHPG-가교 마이크로젤 (마이크로미터 크기 하이드로젤)을 생성시킴으로써 AHPG-가교 하이드로젤이 바이오프린팅 응용을 위한 다목적 바이오잉크 재료로 입증했다.

[0041] **광가교가능한 AHPG의 합성**

[0042] 분기(branch)의 순차적 생성 (generation 횟수로 표현)을 통해 합성되는, 정확한 분자량과 잘 정의된 형태를 지닌 전통적인 덴드리머와는 달리, 초분기 고분자(hyperbranched polymer)는 랜덤 브랜칭 포인트를 생성하는 모노머의 원-팟 (one-pot) 중합에 의해 개발되어 다분기 거대 분자를 생성하기 위한 보다 확장가능하고 실용적인 경로를 제공한다. 그 중에서, HPG는 친수성 및 생체 적합성은 물론 손쉬운 제조 방식과 같은 생체 공학 분야에 중요한 관심을 불러 일으키고 있다. 즉, HPG는 일반적으로 폴리 옥시에테르 골격으로 인해 분지된 폴리(에틸렌 글리콜)로 간주된다. 또한, 이들의 다가 하이드록시기는 원하는 기능을 부여하기 위한 화학적 변형의 수단을 제공한다. 여기서, 다양한 분자량 (M_W)을 갖는 HPG를 합성하고 이들의 히드록시기를 광불안정 아크릴기와 결합시켰다. 다음으로 아크릴성 HPG을 다기능 가교제로 사용하여 다양한 기계적 성질을 가진 하이드로젤을 제조했다(도 1(b)). 통상적인 선형 고분자의 경우, 작용기의 수는 종종 대부분 말단 그룹으로 제한된다. 반면, HPG와 같은 분지된 고분자는 주어진 분자량에서 반응성 작용기로 전환될 수 있는 다수의 작용기를 함유한다. 더욱이, 초분기의 고분자의 분자 역학은 체인 얽힘이 현저히 적어 동일한 분자량에서 선형 고분자보다 작용기의 첨가에 의한 영향이 적을 것이다. 즉, 초분기의 고분자 상의 각 사슬의 길이는 동일한 M_W에서의 선형 고분자의 길이보다 짧다.

[0043] HPG는 단량체로서 글리시돌의 음이온성 개환 중합을 통해 합성되었다 (도 1(a)). 모노머에 대한 TMP의 비율에 의해 M_W를 효율적으로 제어할 수 있었다. 3 개의 상이한 M_W를 갖는 HPG를 합성하였다; 1751, 4553, 14418 g mol-1, 또는 GPC로부터 측정한 바로서 2230, 4350 및 14300이며, 이들은 양호한 일치를 보였다. 여기서는 편의상 각각 '2K', '5K'및 '15K'로 표시한다. 또한, TMP 대 염기성 활성제 즉, NaH의 비는 분지도를 일정하게 유지하고 분지의 길이만을 제어하기 위해 일정하게 유지되었다. HPG 분지의 길이를 조절하는 것은 모노머, 또는 매크로머 간의 상호 작용을 조절하여 생성된 하이드로젤의 다양한 기계적 성질을 유도할 것으로 기대된다.

[0044] 동일한 범위에서 선형 고분자와 비교하여 HPG와 같은 초분기의 고분자의 M_W를 조절하는 것은 또한 점탄성 특성의 훨씬 작은 변화를 야기할 것으로 예상되며, 이는 잉크 재료의 유체 특성을 제어하는 것이 중요한 바이오프린팅 응용에서 중요한 인자이다. 다양한 M_W를 갖는 HPG의 점탄성 특성의 변화를 평가하기 위해, 점도 대 전단 속도를 측정하였다. 대조군으로, 비슷한 M_W의 선형 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG)도 탐구했다. 전단 속도가 증가함에 따라, 모든 HPG에 대해 특징적인 전단-감소(shear-thinning) 거동이 보이는데, 여기서 모든 HPG에 대해 전단 속도가 0.03에서 0.6 s^{-1}로 증가할 때 동일 속도에서 전단 점도에 급격한 감소가 있다 (도 1(c)). 또한, 감소는 전단 속도의 동일 지역에서 발생했다. 반면 선형 PEG의 경우, 전단 점도는 모든 전단 속도에서 일반적으로 더 높았고, 전단 속도 감소는 더 완만하였다(도 1(d)). 또한, 더 빠른 전단 속도에서 점도는 HPG보다 M_W에 따라 다양했다. 이 결과는 사슬 이완이 보다 쉽게 일어나고 HPG에 대한 M_W에 의한 점도가 각각의 선형 고분자보다 덜 영향을 미친다는 것을 의미하며, 이는 점탄성 거동에 영향을 주지 않으면서 M_W 및 HPG 농도를 보다 광범위하게 제어할 수 있게 한다.

[0045] 도 1은 (a) 아크릴성 초분기 폴리글리세롤 (AHPG) 가교제의 합성, (b) AHPG 아크릴레이트의 치환도 (DS) 변화에 의한 하이드로젤의 가교 밀도 제어 및 (c)~(f) 각종 물질에 있어서 전단 속도에 따른 전단 점도 변화를 나타낸 도면이다.

[0046] 도 1에서 (a)는 먼저 트리메틸올 프로판으로 글리시돌을 음이온성 개환 중합으로 HPG를 합성하고, HPG의 히드록시기 및 아크릴로일 클로라이드 사이의 친핵 반응으로 아크릴성 초분기형 폴리글리세롤 (AHPG)를 얻었는 과정을 개략적으로 나타내었다.

[0047] 도 1에서 (b)는 AHPG의 아크릴레이트의 치환도 (degree of substitution:DS)를 변화시킴으로써 하이드로젤의 가교 밀도 제어가 가능할 수 있음을 나타내는 모식도이다.

[0048] 도 1에서 (c)는 다양한 M_W을 갖는 HPG에 대해서 전단 속도에 따른 전단 점도 변화를 측정한 것을 나타내고, (d)는 다양한 M_W을 갖는 PEG에 대해서 전단 속도에 따른 전단 점도 변화를 측정한 것을 나타낸 그래프이다.

(c) 및 (d)에서 가로축은 전단 속도이고, 세로축은 전단 점도를 나타낸다.

[0049] 도 1에서 (e)는 20 % (w/v) PEGMA이고, 다양한 아크릴레이트 DS를 갖는 3 % AHPG5K에 대해서, 전단 속도에 따른 전단 점도 변화를 측정한 것을 나타내고, (f)는 20 % (w/v) PEGMA이고, 다양한 농도를 갖는 AHPG5K (DS3)에 대해서, 전단 속도에 따른 전단 점도 변화를 측정한 것을 나타낸 그래프이다. (e) 및 (f)에서 가로축은 전단 속도이고, 세로축은 전단 점도를 나타낸다.

[0050] 궁극적으로, HPG는 다양한 수의 아크릴레이트와 결합되어 히드록시기의 친핵성 치환을 통해 아크릴성 HPG ('AHPG')가 된다 (도 1(a)). HPG의 주어진 M_W에서, 아크릴레이트의 치환도 (DS)가 조절되었다; 편의상 히드록시기 10 %, 30 %, 50 % 및 70 %를 각각 'DS1', 'DS2', 'DS3', 및 'DS4'로 표기한다 (도 2). AHPG로 가교된 하이드로젤의 기계적 성질은 농도를 변화시키지 않고 아크릴레이트 DS로 조절할 수 있다고 가정했다. 이것은 또한 M_W 또는 아크릴레이트 DS를 사용하여 생성된 하이드로젤의 기계적 성질을 제어하려고 시도하더라도, 다양한 전구체 용액의 점탄성 특성이 대체로 일정하게 유지될 수 있음을 보장한다.

[0052] **AHPG-가교 하이드로젤의 기계적 성질**

[0053] AHPG로 가교된 하이드로젤은 광가교 결합을 통해 제조되었으며, 이들의 기계적 강성을 측정하여 AHPG, M_W 및 아크릴레이트 DS의 물리적 성질이 다른 단량체와의 가교 결합 반응 및 이어서 하이드로젤 역학에 미치는 영향을 평가하였다. 비전통적인 분자 구조(즉, 초분기)로, 아크릴레이트 DS로부터 발생하는 다양한 친수성-소수성 균형을 변화시키면서(즉, 친수성 폴리옥시에틸렌 주쇄 및 소수성 아크릴레이트), AHPG는 상이한 유형의 모노머에 상당한 영향을 미친다는 가설을 세웠다. 따라서, 널리 사용되는 세 가지 다른 유형의 모노머로 만든 하이드로젤을 연구했다; 작은 분자 (예를들어, 아크릴아미드), 매크로머 (예를들어, 폴리(에틸렌 글리콜) 메타크릴레이트 (PEGMA)) 및 단백질 (예를들어, 메타크릴성 젤라틴 (MGel)). 하이드로젤 강성은 압축 탄성 계수를 계산하여 평가하였다.

[0054] 도 2에서 (a) 내지 (f)는 다양한 농도 및 아크릴레이트 DS를 갖는 AHPG와 가교된 PEGMA 하이드로젤의 탄성 계수 (Elastic modulus) (E)를 나타내는 도면이고, (g) 내지 (i)는 다양한 농도 및 아크릴레이트 DS를 갖는 AHPG와 가교된 PAAm 하이드로젤의 탄성 계수 (E)를 나타내는 도면이다.

[0055] AHPG의 M_W는 (a), (d) 및, (g)에서 2K이고, (b), (e), 및 (h)에서 5K이고, (c), (f), 및 (i)에서 15K이다. (a) 내지 (c) 에 대한 PEGMA의 농도는 10 % (w/v)이고 (d) 내지 (f)에 대한 PEGMA의 농도는 20 % (w/v)이다. (g) 내지 (i)에 대한 PAAm의 농도는 20 % (w/v)이다. (a) 내지 (i)에서 가로축은 아크릴레이트의 치환도를 나타내고, 세로축은 모듈러스를 나타낸다.

[0056] *매크로머 - 폴리(에틸렌 글리콜) 메타크릴레이트 (PEGMA)*

[0057] 먼저, AHPG로 가교된 PEGMA 하이드로젤을 개발하고 이의 탄성 계수를 얻었다(도 2(a) 및 2(c)). PEGMA의 농도는 10 % (w/v)에서 조절되었고, 반면 AHPG의 농도는 10 % (w/v) PEGMA의 경우 0.5 % (w/v) 내지 3 % (w/v)로 조절되었고, 또는 20 % (w/v) PEGMA의 경우 1 % (w/v) 내지 5 % (w/v)로 조절되었다. 낮은 M_W AHPG인 2K에서, AHPG의 아크릴레이트 DS가 DS3로 증가할 때까지 하이드로젤은 형성되지 않았고, 계수는 DS3보다 DS4에서 더 컸다 (도 (2a)). 반면, AHPG5K에서, 하이드로젤의 계수는 일반적으로 더 컸고 하이드로젤은 AHPG2K보다 더 낮은 농도 및 아크릴레이트 DS에서 형성되었다 (도 (2b)). 이는 주어진 농도에서, 증가된 가교 효율로 이끄는 매크로머 사슬과 상호 작용하는데 상당한 가지 길이가 필요하다는 것을 제안한다. 동일한 M_W에서 선형 고분자와 비교할 때, 초분기의 고분자 보다 컴팩트해서 다른 고분자 사슬과 물리적으로 상호 작용하기 쉽지 않음을 강조되어야 한다. 흥미롭게도, 아크릴레이트 DS가 특정값 이상으로 증가했을 때 탄성 계수가 감소했다; 3 % (w/v)는 DS4, 1 % (w/v)는 DS3. 더 높은 아크릴레이트 DS에서 소수성이 증가함에 따라, 친수성 매크로머 간의 물리적 결합이 감소되어 가교 반응의 정도가 감소될 수있다. AHPG의 M_W가 15K로 추가로 증가하면, DS2까지, 특히 3 % AHPG에서 탄성 계수가 증가한다 (도 2(c)). 그러나, 탄성 계수는 더 높은 아크릴레이트 DS에서 더 급격하게 감소했는데, 이는 더 높은 아크릴레이트 DS를 가진 AHPG로 증가된 소수성은 PEGMA와 AHPG 사이의 불충분한 물리적 결합을 일으키기 쉽고, 체인 구조의 유연성과 이동성이 감소한 더 높은 분자량에서는 더욱 그러하며, 나아가 가교 결합의 정도를 감소시킨다는 것을 나타낸다. 이러한 설명은 더 높은 아크릴레이트 DS 및 농도에서 AHPG로 가교 된 하이드로젤에 대해 나타난 불투명도 및 미시적 이질성의 증가에 의해 뒷받침되었으며, 이는 하이드로젤 네트워크 내

에서 상당한 상분리가 있음을 시사한다. 이러한 결과는 AHPG로 하이드로젤의 기계적 성질을 제어 할뿐만 아니라 하이드로젤 제조를 위한 매크로머 조건을 선택할 때, AHPG 가교제의 물리적 성질, 즉 사슬 길이 및 친수성-소수성 균형을 고려하는 것이 중요하다는 것을 의미한다.

[0058] PEGMA의 농도가 20 % (w/v) 로 증가하면, 탄성 계수의 범위는 훨씬 더 커졌으며, 하이드로젤은 10 % (w/v) PEGMA에서 하이드로젤보다 낮은 아크릴레이트 DS 및 AHPG 농도에서도 형성되었다(도 2(d) 및 2(f)). AHPG2K를 사용하면, 하이드로젤은 모든 아크릴레이트 DS에서 생성되었고 탄성 계수는 모든 농도에서 아크릴레이트 DS와 함께 1 에서 5 % (w/v)까지 증가했다 (도 2(d)). 또한, 더 높은 M_W의 AHPG, 5K 및 15K에서 아크릴레이트 DS 및 농도에 의한 탄성 계수는 10 % (w/v) PEGMA 하이드로젤보다 훨씬 더 증가했다 (도 2(e) 및 2(f)). 이러한 결과는 AHPG의 분지된 고분자성 사슬이 증가된 양의 매크로머를 광범위하게 혼입하여 하이드로젤 네트워크를 형성할 수 있음을 입증한다. 10 % (w/v) PEGMA 하이드로젤과 유사하게, 탄성 계수는 AHPG의 보다 높은 농도 및 M_W에서 임계 아크릴레이트 DS 초과시 감소하였는데, 이는 또한 PEGMA와 AHPG 사이의 가교 정도에 따라 감소된 사슬 움직임과 증가된 소수성의 역할을 확인시켜준다.

[0059] PEGMA-AHPG 하이드로젤 전구체 용액에 대한 점도 대 전단 속도 곡선을 측정하여 AHPG의 M_W 및 농도가 유체 거동에 미치는 영향을 평가 하였다. (도 1(e) 및 1(f)). 전단 속도 변화에 따른 점도 변화는 심각한 영향을 받지는 않았으며, AHPG의 M_W 및 아크릴레이트 DS에 상관없이, 명확한(well-defined) 전단-감소 거동이 관찰되었다. 이러한 결과는 또한 초분기의 고분자성 가교제의 사용이 전단-감소 거동을 갖는 일관된 유체 특성을 갖는 바이오잉크를 이용하여 하이드로젤의 기계적 성질을 조절할 수 있음을 입증하며, AHPG가 미세제작(microfabrication)을 위한 효과적인 잉크 재료로 될 수 있음을 검증했다.

[0061] *작은 분자성 모노머 - 아크릴아미드*

[0062] 아크릴아미드 모노머 및 가교제의 공중합으로 제조되는 폴리아크릴아미드 (PAAm) 하이드로젤은, 젤 전기 영동, 의학 임플란트, 및 약물 전달 시스템 같은 여러 생물 의학 응용에서 오랫동안 활용되어 왔다. 따라서, PAAm 하이드로젤을 제조하기 위한 아크릴 아미드 모노머에 대한 가교제로서 AHPG가 추가로 연구되었으며, 그 기계적 특성이 평가되었다(도 2(g) 및 2(i)). AHPG2K 및 5K의 경우, AHPG 농도에 의해 조절되는 탄성 계수의 범위는 유사하였으며, 하이드로젤 제조를 위한 최소 아크릴레이트 DS는 DS2에서 동일했다(도 2(g) 및 2(h)). 이 결과는 보다 큰 매크로머보다 큰 유동성을 갖는 아크릴아미드와 같은 작은 분자성 모노머가 AHPG 가교제와 보다 쉽게 상호 작용할 수 있어, 이 범위 내의 AHPG M_W의 변화가 가교에 유의미한 영향을 미치지 않는다는 것을 의미한다.

[0063] 그러나 AHPG의 M_W를 15K까지 추가로 증가시키면, 모든 농도에서 기계적 성질에서 현저한 감소가 있었고 아크릴레이트 DS가 50 % 이상, 최대 80 %까지 급격히 감소했다(도 2(i)). 이러한 현저한 저하는 PAAm 사슬 성장을 방해하는 AHPG의 더 큰 크기에 기인한 것일 수 있으며, 이미 고분자성 사슬 구조를 보유한 PEGMA같은 매크로머에는 필요하지 않은 과정이다. AHPG의 관점에서 보았을 때, AHPG의 더 긴 사슬의 제한된 유동성 및 병진(translational) 이동성은 성장하는 PAAm 사슬과의 상호 작용보다는 사슬 얽힘을 통한 자기 결합을 선호하는 것으로 생각된다. 이것은 탄성 계수가 DS1에서 가장 높고 아크릴레이트 DS와 함께 감소한다는 사실에 의해 또한 뒷받침되는데, 이는 증가된 소수성으로 인해 더 높은 아크릴레이트 DS를 갖는 AHPG가 성장하는 PAAm 사슬로부터 분리된 결과일 수 있다.

[0065] *다가 매크로머 - 메타크릴성 젤라틴*

[0066] 도 3에서, (a) 및 (b)는 MGel의 농도가 4 % (w/v)이고, AHPG 농도는 0.1 % (w/v) 내지 1 % (w/v)로 변함에 따라 아크릴레이트 DS를 갖는 MGel 하이드로젤의 탄성 계수를 나타낸 것이고, (c) 및 (d)는, 전체 고분자 농도는 10 % (w/v)로 일정하고, AHPG의 분율(Φ_{AHPG})이 변함에 따라 아크릴레이트 DS를 갖는 MGel 하이드로젤의 탄성 계수를 나타낸 것이다. AHPG의 M_W는 (c)에서 2K, (a) 및 (d)에서 5K, (b) 및 (e)에서 15K이다.

[0067] 주 사슬에 다수의 작용기를 갖는 고분자는 다양한 치환도로 가교 가능한 작용기와 결합 될 수 있다. 이러한 유형의 "다가 (multivalent)"고분자는 초과 임계 농도에서 그 자체로 하이드로젤을 형성 할 수 있고, 더 낮은 농도에서 다른 가교제와 가교결합되거나 하이브리드화되어 하이드로젤을 형성할 수 있다. AHPG의 가교 능력을 더

평가하기 위해 모델 매크로머로서 다중 메타크릴기 (MGel)를 함유하는 광 가교가능 젤라틴을 AHPG와 가교시켜 하이드로젤을 개발하였고, 그 기계적 특성을 유사하게 평가 하였다 (도 5). 광가교가능 MGel-계 하이드로젤은 조직 공학 응용을 위한 스캐폴드 물질로서 널리 사용된다. 단백질로서의 젤라틴의 양친매성 특성으로, AHPG의 아크릴레이트 DS가 또한 하이드로젤 물리적 특성을 제어하는데 중요한 역할을 할 수 있음을 제시한다.

[0068] 메타크릴성 젤라틴(MGel)의 평균 분자량은 400 내지 50000 Da 범위일 수 있으며, 예를 들어, 3000 내지 50000 Da 일 수 있고, 보더 구체적으로는 10000 내지 40000 Da일 수 있다.

[0069] 첫째, MGel 농도는 자체에 의한 하이드로젤 형성에 대한 임계 농도(5 % (w/v))보다 낮은 4 % (w/v)로 유지되었고, AHPG를 순수하게 가교제로서 평가하기 위해 AHPG의 농도는 0.5 내지 3 % (w/v)로 조절되었다 (도 3(a) 및 3(b)). 흥미롭게도, 하이드로젤은 AHPG의 M_W가 2K 일 때 모든 조건에서 형성되지 않았다. 또는 5K AHPG의 경우, 모든 조건에서 하이드로젤이 형성되었지만, 탄성 계수는 모두 1kPa 이하로 매우 낮았으며 AHPG의 농도 및 아크릴레이트 DS의 영향을 크게 받지 않았는데, 이는 가교 밀도가 불충분했음을 입증한다 (도 3(a)). AHPG의 Mw를 15K로 증가시켰을 때, 탄성 계수가 크게 증가했고 AHPG 농도 및 아크릴레이트 DS에 대한 의존성이 있었다 (도 3(b)). 이러한 결과는 가교 결합 반응의 정도를 극대화하기 위해 2 개의 고분자성 시스템 사이의 광범위한 물리적 상호 작용의 중요성을 강조한다; 더 긴 분지는 MGel 사슬과보다 광범위하게 결합할 수 있어 보다 효과적인 가교 반응을 유도할 수 있다.

[0070] 한편으로 전체 고분자 농도는 10 % (w/v)로 일정하게 유지하는 반면, AHPG 의 분율 (Φ_{AHPG})을 0.1 내지 0.3로 변화시켰다. AHPG2K의 경우, 탄성 계수는 모든 Φ_{AHPG} 에 대해 예상대로 아크릴레이트 DS와 함께 증가하였다 (도 3(c)). 그러나, 탄성 계수는 모든 아크릴레이트 DS에서 Φ_{AHPG} 와 함께 감소하였다. 반면, AHPG5K의 경우, 탄성 계수는 AHPG2K-가교 하이드로젤보다 컸으며, 모든 아크릴레이트 DS에서 0.1 내지 0.2의 Φ_{AHPG} 와 함께 증가하였고 (도 3(d)), 이는 AHPG의 증가된 사슬 길이가 MGel과의 물리적 상호 작용을 개선시키는 것을 도와 더 큰 가교 결합을 유도한다는 것을 시사한다. 0.3의 가장 높은 Φ_{AHPG}에서 탄성 계수는 아크릴레이트 DS에 연속적으로 증가하지 않고, DS3 위에서 감소를 보인다는 것을 주목하여야 하는데, 이는 가교 정도에 대한 소수성의 현저한 증가의 부작용을 가리킨다. AHPG2K와 마찬가지로, Φ_{AHPG}=0.2에서 AHPG5K (DS4)로 얻은 가장 높은 탄성 계수를 제외하고, 다른 모든 조건의 탄성 계수는 동일한 고분자 농도 10 % (w/v) (4.5kPa)에서 순수한 MGel 하이드로젤의 탄성 계수보다 낮았다. 이것은 더 높은 M_W 에서도 MGel과 AHPG5K 사이의 가교 반응은 MGel 자체만큼 정도로 효과적이지는 않음을 보여주며, 이는 MGel과 AHPG5K 사이의 물리적 결합이 불충분하다는 것을 시사한다.

[0071] 놀랍게도, AHPG15K로 가교된 하이드로젤의 탄성 계수는 모든 조건에서 AHPG5K를 갖는 것보다 현저히 더 컸다; DS1에서 6-배까지 증가하고, DS2에서 20-배까지 증가하고, DS3에서 10-배까지 증가하는데, 이는 분명 사슬 길이의 효과를 입증한다 (도 3(e)). DS1에서 DS2로의 탄성 계수의 증가는 더 많은 아크릴레이트기로 증가된 가교 밀도의 효과를 입증했다. 또한, 탄성 계수는 DS2에서 Φ_{AHPG}와 함께 증가하는데, 이는 AHPG의 증가 된 부분이 눈에 띄는 상 분리없이 MGel과 안정적으로 혼합될 수 있음을 나타낸다. 이러한 결과는 AHPG2K 및 5K의 결과와 비교하여, AHPG의 증가된 사슬 길이가 MGel과의 물리적 결합을 촉진하는 것을 도왔으며, 이는 매우 더 큰 정도의 가교 반응을 유도한다. 탄성 계수는 모든 Φ_{AHPG}에서 DS2 내지 DS4에서 상당히 감소했음을 주목하여야 하며, 이는 또다시 증가된 소수성이 안정한 공존을 방해하고 충분한 가교를 막았음을 강조한다. 또한, MGel-AHPG 전구체 용액의 점도는 AHPG의 M_W 및 아크릴레이트 DS에 의해 유사하게 영향받지 않으며 전단-감소 거동이 입증되었다.

[0072] 위 결과를 모두 고려하면, AHPG-가교 하이드로젤의 기계적 성질은 M_W 및 소수성에 의해 조절되는 가교 고분자의 물리적 성질의 중요성을 드러내는데, 이는 다른 모노머성 시스템에 대해 가교 정도를 나타내는 반면에 전구체 용액의 점탄성 특성은 유지한다는 것을 의미한다.

[0074] **AHPG-가교 하이드로젤의 확산 특성**

[0075] 도 4에서, (a) 내지 (d)는 PEGMA-AHPG5K 하이드로젤의 누적 약물 방출 프로파일 (M_t/M_∞)로서, (a) 및 (b)는 동일 농도 (3 % (w/v))에서 아크릴레이트 DS를 변화시키거나 또는 동일 DS (DS3)에서 농도를 변화시킨 PAAm-AHPG5K 하이드로젤에 대한 것이고, (c) 및 (d)는 동일 농도 (3 % (w/v))에서 아크릴레이트 DS를 변화시키거나 또는 동일 DS (DS3)에서 농도를 변화시킨 PEGMA-AHPG5K 하이드로젤에 대한 것이다. (e) 내지 (h)는 확산-기준

Ritger-Peppas 모델 (식 (5))을 (a) 내지 (d)의 프로파일을 적용하여 반응속도 상수 (k) 및 지수 (n)를 얻은 것을 나타낸다.

[0076] 다양한 AHPG와 가교된 PEGMA, PAAm 및 MGel 하이드로젤의 팽윤비를 측정하였으며, 팽윤비 변화는 도 2 및 4에 나타난 대응하는 탄성 계수와 반비례적으로 잘 대응한다는 것을 확인하였다. 고무-탄성 이론에 따르면, 이는 AHPG 가교에 의해 생성된 고분자성 네트워크가 매우 탄성적임을 입증한다. AHPG-가교 하이드로젤의 확산 특성을 추가로 특성화하기 위해, AHPG-가교 하이드로젤로부터의 시간-의존성 약물 방출 거동을 측정하였다. 모델 단백질인 소 혈청 알부민 (BSA)을 다양한 아크릴레이트 DS 또는 농도에서 AHPG와 가교된 PEGMA 또는 PAAm 하이드로젤에 캡슐화하고, BSA 방출량을 시간에 따라 측정 하였다.

[0077] PAAm-AHPG 하이드로젤의 경우, 방출 프로파일 (즉, 누적 방출 대 시간)은 하이드로젤의 가교 밀도에 대한 예상된 의존성을 나타내었으며, 여기서 방출 속도 상수 (k)는 아크릴레이트 DS (도 4(a) 및 4(e)) 또는 농도 (도 4(b) 및 4(f))를 통해 증가하는 가교 밀도와 함께 감소하였는데, 이는 두 방법 모두 고분자성 네트워크의 메쉬 크기를 조절하여 캡슐화된 약물 방출을 조절하는데 효과적임을 가리킨다. PEGMA 하이드로젤의 경우, AHPG의 아크릴레이트 DS를 조절함으로써 약물 방출의 유사한 조절이 입증되었다 (도 4(c) 및 4(g)). 그러나, AHPG의 농도가 1 % (w/v)에서 5 % (w/v)로 증가할 때 약물 방출 속도가 오히려 증가하였으며, 이는 PAAm-AHPG 하이드로젤에 대한 결과와 반대였다 (도 4(d) 및 4(h)). 이러한 흥미로운 결과는 유사한 성질(즉, HPG는 분기된 PEG로 간주됨)을 갖는 AHPG의 증가하는 양과 결합된 PEGMA의 친수성 및 항-오염성 특성으로부터 온 것일 수 있고 이러한 점이 단백질 약물 방출을 촉진하는 것을 도왔을 수 있다. 두 하이드로젤 시스템에서, 지수 (n)는 매크로머의 유형과 DS와 AHPG의 농도에 관계없이 일관되게 0.2 내지 0.3였는데, 이는 하이드로젤로부터의 전형적인 Fickian 확산에 의한 약물 방출 거동보다 친수성 때문에 시간 의존성이 적고 초기 폭발 방출이 더 큰 유사(pseudo) Fickian 확산을 한다는 것을 의미한다.

[0078] 전체적으로, AHPG-가교 하이드로젤로부터의 약물 방출 거동은 AHPG 자체의 물리적 성질 (예를들어, 친수성, 분기(branch) 유무)이 주로 약물 방출 메카니즘을 좌우하고, 나아가 조절가능한 방출 속도를 갖는 약물 전달 시스템으로서의 능력을 입증하는 것이다.

[0079] **AHPG-가교 하이드로젤의 생체적합성**

[0080] 도 5에서, (a)는 다양한 아크릴레이트 DS (Φ_{AHPG} = 0.1)를 갖는 MGel-AHPG5K 하이드로젤에 캡슐화된 MSC (왼쪽) 및 MCF-7 세포 (오른쪽)의 광학 및 형광 현미경 이미지를 나타낸다. 세포는 살아있는 (녹색) 세포 및 죽은 (적색) 세포를 확인하도록 형광 탐침으로 표지되었다. (b) 및 (e)는 7 일까지의 배양 동안 다양한 시점에서의 세포 생존률을 나타내고, (c) 및 (f)는 시간 경과에 따른 살아있는 세포의 표준화된 수를 측정한 것(N_t/N_0)을 나타낸다(N_t: 시간, t에서 살아있는 세포의 수, N_0: 초기의 살아있는 세포의 수). (d) 및 (g)는 증식 속도 (k_P)를 나타내는데, 이를 얻기 위해 (c) 및 (f)에 지수함수 모델(power-law model)을 적용했다 ($*p<0.05$, $n=6$).

[0081] 조직 공학을 위한 세포 배양 플랫폼으로서의 AHPG-가교 하이드로젤의 적용은 다양한 아크릴레이트 DS 및 농도로 AHPG-가교 하이드로젤 내에 세포를 캡슐화하고 그들의 생존력 및 증식을 측정함으로써 조사되었다. 여기서, AHPG 가교된 MGel 하이드로젤이 사용되었는데 젤라틴은 세포 활동에 필요한 세포-접착 및 분해 특성을 제공하기 때문이다. 간질 줄기 세포 (MSC)와 유방암 세포 (MCF-7)의 두 가지 세포 유형을 다양한 아크릴 레이트 DS를 가진 MGel-AHPG5K 하이드로젤에 캡슐화했다. 전체 고분자 농도는 10 % (w/v)이나, 반면 AHPG의 분율, Φ_{AHPG}은, 0.1 또는 0.2로 조절하였다.

[0082] 세포 유형에 관계없이, 캡슐화된 세포의 생존률은 배양 기간 동안 높게 (80 % 이상) 유지되었는데(도 5(a), 5(b) 및 5(e)), 이는 아크릴 레이트 DS에 의해 제어되는 가교 밀도에 관계없이 이러한 하이드로젤 시스템의 생체적합성을 입증한다. 그러나, 증식에 대한 하이드로젤의 기계적 성질의 영향은 세포 유형에 더 의존적이었다. MSC의 경우, 증식은 2상(biphasic)이었다; 증식 속도 (k_P)는 낮은 DS (DS1) 및 높은 DS (DS3)에서 더 컸고, 중간 DS (DS2) 및 가장 큰 DS (DS4)에서 더 낮았다 (도 5(c) 및 5(d)). 더 낮은 아크릴레이트 DS (DS1)에서의 더 큰 증식은 증가된 배지 투과(media perfusion) 및 공간의 가용성(availability)에 기인하는 것으로 생각되고 반면 더 높은 아크릴레이트 DS (DS3)에서 증가된 기계적 강도(rigidity)는 하이드로젤의 낮은 투과성에도 불구하고 기계적 변환을 통한 증식을 촉진시켰다고 생각된다. 그러나 이러한 기계적 효과는 가장 높은 아크릴레이트 DS (DS4)에서 하이드로젤 투과성의 추가 감소를 보상할 수 없어 증식은 감소된다.

[0083] 흥미롭게도, MCF-7 세포는 동일한 하이드로젤 조건 하에서 다른 증식 거동을 보였다. 증식 속도 (k_P)의 경향은

MSCs의 것과 반대였다; k_P 는 DS2에서 최대였고, 더 낮은 (DS1) 및 더 높은 (DS3, DS4) 아크릴레이트 DS 모두에서 감소하였다(도 5(f) 및 5(g)). 증식이 더 낮은 아크릴레이트 DS에서 향상되지 않고 더 높은 아크릴레이트 DS에서의 것과 유사하였다는 사실은 증가한 확산 및 가용 공간이 증식을 증대시키는데 중요한 인자가 아닐수도 있다는 것을 가리킨다. DS1로부터 DS2까지의 k_P 에서 실질적인 증가는 증가한 기계적 성질이 MCF-7 세포의 증식을 향상시켰다는 것을 시사하나, 증가하는 아크릴레이트 DS와 함께 k_P 에서의 후속적인 감소는 이들의 증식 능력에 대한 최적 기계적 환경이 있음을 또한 시사한다. DS3 및 DS4에서의 k_P의 감소는 또한 세포가 또한 하이드로젤의 감소한 투과성에 매우 민감하다는 것을 시사한다. 0.2의 더 높은 Φ_{AHPG} 에서 AHPG로 가교된 MGel 하이드로젤을 이용하여 동일한 세포 연구를 수행하였으며, 젤 조건에 상관없이 생존력은 잘 유지되었고, k_P 에서 유사한 2 상 경향(biphasic trend)이 또한 입증되었다. 그러나, k_P 값은 모든 조건에서 일반적으로 더 낮았으며, 더 높은 Φ_{AHPG} 에서 세포 성장에 대한 감소한 투과성 및 가용 공간에 기인하는 듯 하다.

[0084] **DLP 프로젝션 프린팅을 통한 세포 함유 마이크로젤의 미세제작(Microfabrication)**

[0085] 도 6에서, (a)는 DLP 프로젝션 프린팅을 통해 AHPG-가교 하이드로젤을 미세제작하는 것을 모식적으로 나타낸 것이다. (b)는 DLP 프린팅으로 다양한 모양의 으로 마이크로젤을 제작할 수 있음을 나타낸 것이고, (c)는 DLP 프린팅으로 많은 수의 어레이로 마이크로젤을 제작할 수 있음을 보여준다. (d)는 마이크로젤 구조가 AHPG의 아크릴레이트 DS에 의하여 제어되는 기계적 성질에 상관없이 잘 유지됨을 보여준다.

[0086] 본 발명의 일 구현예에 따른 AHPG-계 하이드로젤은 이상적인 바이오잉크 재료로서 조망될 수 있다. 또한, 전구체 용액의 일정한 유체 특성은 이들의 인쇄능(printability)에 심각한 영향을 미침이 없이 하이드로젤의 기계적 성질을 조절할 수 있게 한다.

[0087] 미세조직 구조물을 개발하기 위한 기계적으로 조절가능한 바이오잉크로서의 실행가능성을 입증하기 위해, DLP-계 프로젝션 프린팅 장치를 도입하여 마이크로미터-스케일 해상도로 여러 모양을 갖는 세포 함유 AHPG-가교 마이크로젤 어레이(array)를 만들었다 (도 6). 도 5에서 도시된 바와 같은, 다양한 아크릴레이트 DS를 갖는 MGel-AHPG 하이드로젤을 사용하였다. DLP 프린팅 기술은 디지탈 마이크로미러 장치(digital micromirror device: DMD)을 이용하는데 이는 바이오잉크로 마운트된 시료 스테이지 상에 현미경 렌즈를 통해 마이크로패턴된 UV 광을 반사하는데 사용된다 (도 6(a)).

[0088] 마이크로미러의 위치를 조절함으로써, 가교광의 선택 패턴만이 시료를 향하게 되고, 동일 패턴을 갖는 마이크로젤을 제작하게 된다. 상이한 복잡성을 갖는 다양한 형태를 갖는 MGel-AHPG 마이크로젤을 성공적으로 제작하였다 (도 6(b)). 프로그램가능한 자동화 공정이 가능한 DMD 기술로, 제작이 간소화되어 단일 플랫폼에서 MGel-AHPG 마이크로젤의 다중 어레이를 개발하였는데, 이 동안 이들의 크기, 모양 및 공간을 조절하고, 다중 제작 단계 동안 시료 스테이지의 위치를 조절하였으며, 이는 효율적인 대규모-스케일 생산 가치를 입증한다 (도 6(c)). 마이크로젤의 모양 및 구조는 AHPG의 아크릴레이트 DS에 의해 조절되는 젤 물리적 특성에 상관없이 잘 유지되었다 (도 6(d)). AHPG-가교 바이오 잉크의 프린트능(printability)을 추가로 입증하기 위해, DLP 프린팅으로 PAAm-AHPG 및 PEGMA-AHPG 마이크로젤을 유사하게 제작하였으며, 초기 마이크로젤 해상도는 잘 유지됨에도 불구하고, PAAm 및 PEGMA 하이드로젤에 대한 더 큰 팽창도 때문에 시간 경과로 작은 뒤틀림이 발생함을 확인하였다.

[0089] AHPG-가교 하이드로젤의 생체적합성을 평가하기 위해, MGel-AHPG 마이크로젤 어레이 내에 세포를 캡슐화하고 이들의 생존력 및 성장을 평가하였다. 이 경우 아크릴레이트 DS에 상관없이, 마이크로젤 내의 세포는 우수한 생체적합성을 보였는데, 모든 조건에서 80 %를 넘는 세포 생존률을 보임을 확인하였다. 또한, 세포는 배양 4 일 후에 마이크로젤 내에서 시간이 지남에 따라 증식을 계속하며, 경향은 도 5에 표시된 결과와 유사하다. 도 5의 대규모-스케일 하이드로젤에서의 세포와 다르게, 상기 캡슐화된 세포는 더 작은 마이크로젤 밖으로 더 쉽게 이동하여, 주위 조직-배양 영역으로 퍼질수 있음을 관찰하였다. 이는 증식이 가장 높았던 DS2에서 더욱 명백한데, 이는 세포 운동성(migration) 및 증식 모두가 이 기계적 환경에서 개선되었음을 가리킨다. 이것은 세포 함유 마이크로젤이 조직 구조물의 주사가능한 형태로 활용될 수 있음을 또한 시사한다.

[0090] 요약하면, 이러한 결과들은 DLP-계 프린팅의 효율성과 결합하여 AHPG-가교 하이드로젤의 조절가능한 물리적 특성이 조직 공학 응용을 위한 다수의 세포 함유 마이크로젤 구조물을 생성시킬 수 있음을 입증한다.

[0091] **결론**

[0092] 다른 모노머성 시스템으로 제조된 하이드로젤의 기계적 특성을 조절하기 위해, 초분기의 글리세롤 (HPG)에 기초

하는 물리적으로 조절가능한 가교제, 즉 아크릴성 HPG (AHPG)을 개발하였다. 다양한 모노머 및 매크로머 사이의 상호 작용은 AHPG의 M_W 및 아크릴레이트 DS를 제어함으로써 효과적으로 변조될 수 있으며, 다양한 범위의 기계적 성질을 갖는 하이드로젤을 생성시키고, 다른 모노머성 시스템에 대한 하이드로젤의 기계적 물성을 결정하는데 있어서 가교 고분자의 물리적 성질의 중요성을 알 수 있다. AHPG 가교제에 의해 부여된 하이드로젤의 이러한 조절가능한 기계적 물성은 (1) 약물 방출 속도를 조절할 수 있는 약물 전달 시스템 및 (2) 가변적인 기계적 미세환경(variable mechanical microenvironment)을 제공하는 3D 세포-배양 플랫폼으로서 활용될 수 있다. 광가교력 및 조절가능한 물리적 특성으로 인하여, AHPG-가교 하이드로젤용 전구체 용액은 마이크로미터-스케일 해상도를 갖는 생체적합성 세포 함유 하이드로젤 및 DLP-계 프로젝션 프린팅 기술을 통한 설계(architecture)를 제작하는 "바이오잉크"로서 사용되며, 이는 생물의학 응용을 위한 소형 조직 구조물로서의 가능성을 입증한다.

[0093] 종합하면, 조절가능한 M_W 및 아크릴레이트 DS를 갖는 AHPG 가교제는 다양한 기계적 성질을 갖는 다양한 하이드로젤 시스템을 제작하기 위한 적합한 플랫폼을 제공할 수 있으며, 바이오프린팅 응용을 위한 생체반응성(bioactive) 잉크로서 적용될 수 있을 것으로 기대된다.

[0095] 이하의 실시예를 통하여 본 발명이 더욱 상세하게 설명된다. 단, 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로서 이들만으로 본 발명의 범위가 한정되는 것이 아니다.

[0096] **실시예**

[0097] ***아크릴성 초분기형 폴리글리세롤 (AHPG)의 합성:***

[0098] 건조 다이글라임 (0.6 mL, Sigma Aldrich)에서 개시제로서 트리메틸올 프로판 (TMP, 2 mmol, Sigma Aldrich)을 먼저 소듐 하이드라이드 (0.5 mmol, 미네럴 오일의 60% 현탁액, Sigma Aldrich)와의 반응으로 활성화시켜 히드록시기를 탈수소화해서 알콕사이드 형태를 생성시켰다. 다분산도를 낮추고 원하지 않는 고리화를 방지하기 위해 TMP에서 히드록시기는 부분적으로 탈수소화되었다. 활성화된 상기 개시제에, 모노머로서 글리시돌 (Sigma Aldrich)을 전자 주사기 펌프 (KDS Legato 100, KD Scientific)를 통해 12 시간 동안 천천히 첨가하고, 95 ° C에서 계속 교반하였다. 모노머 첨가 완료 후 추가적으로 3 시간 동안 상기 혼합물을 95 ° C에서 더 반응시켰다. 다음으로, 상기 혼합물을 50 ° C까지 냉각시키고 메탄올(Samchun Chemicals, Korea) 20 mL에 용해된 염산 (5 mmol)을 첨가하여 반응을 중지시켰다. 3번 침전시켜 조생성물을 얻었고 디에틸 에티르로 세척하였다. 개시제(TMP)에 대한 모노머 (glycidol)의 주입 몰비를 변화시킴으로써 3 개의 다른 분자량 (M_W)을 갖는 HPG를 제조하였다; 13.5, 67.5, 및 200. HPG의 화학 구조는 ^{13}C-NMR 분광학으로 확인하였다(도 7).

[0099] 다음 식을 이용하여 ^{13}C-NMR 스펙트럼으로부터 중합도 (*DP*), 및 분지도 (*DB*), 수 평균 분자량 (M_n), 및 HPG 분자당 히드록시기의 수 (n_{OH})를 계산하였으며,

$$DB = \frac{2D}{2D + L_{13} + L_{14}} \quad (1)$$

$$DP = \frac{T + L_{13} + L_{14} + D}{T - D} f_c \quad (2)$$

$$M_n = DP \times M_n(\text{glycidol}) + M_n(\text{TMP}) \quad (3)$$

$$n_{OH} = \frac{2T + L_{13} + L_{14}}{T + L_{13} + L_{14} + D} \times \frac{M_n(\text{HPG}) - M_n(\text{TMP})}{M_n(\text{glycidol})} \quad (4)$$

[0100]

[0101] 여기서 *D*, L_{13}, L_{14}, 및 *T* 는 각각 ^{13}C-NMR 스펙스럼에서 HPG의 수지상, 선형 1,3-단위, 선형 1,4-단위, 및 말단 탄소에 대한 분수 피크 강도에 대응하며, fc는 코어 분자, TMP의 기능성(functionality)이며, 3이다 (도 7). 다

르게는 분자량은 젤투과 크로마토그래피로 측정될 수 있다 (Agilent 1200S).

[0102] 변하는 M_w를 갖는 HPG (20 % (w/v))의 유변학적 거동은 회전 디스크 레오미터(rotating-디스크 rheometer: Kinexus, Malvern)를 이용하여 변하는 전단 속도에 반응하는 전단 점도의 변화를 측정함으로써 평가되었다. 회전하는 전단 속도는 0.01 내지 100 s^{-1} 로 조절되었다. 대조군으로서, 비슷한 분자량을 갖는 선형 폴리(에틸렌 글리콜)(Sigma Aldrich)을 동일 농도에서 시험하였다.

[0103] HPG에 아크릴기를 접합시키기 위해, 먼저 HPG 및 트리에틸아민 (Sigma Aldrich)을 디메틸 술폭산 (Samchun Chemicals, Korea)에 용해시키고, 다음으로 아크릴로일 클로라이드를 적가하였다. 혼합물을 건조 N_2 하에서 24 시간 동안 교반하였다. 생성된 불용성 염을 여과해서 제거하고, 건조 디에틸 에티르 (Samchun Chemicals, Korea)에서 침전시켜 조생성물을 얻었다. 탈이온수에 대한 대량 투석(extensive dialysis) 및 동결 건조로 최종 생성물, 아크릴성 HPG ('AHPG')를 얻었다. HPG 상의 아크릴레이트의 치환도 (DS)는 HPG의 히드록시기에 대한 아크릴로일 클로라이드의 주입 몰비를 변화시킴으로써 조절되었다; 0.1, 0.3, 0.5, 및 0.7. AHPG의 아크릴레이트 치환의 존재 및 치환도는 ^{1}H-NMR 스펙스럼으로 평가되었다 (도 8).

[0105] ***AHPG-가교 하이드로젤 제작:***

[0106] 광개시제로서 2-히드록시-4'-(2-히드록시에톡시)-2-메틸프로피오페논(Sigma Aldrich) 0.2 % (w/v)와 함께 다양한 농도의 모노머 및 AHPG를 인산 완충 생리식염수(phosphate buffered saline: PBS, pH 7.4)에 첨가하여 하이드로젤 전구체 용액을 먼저 제조하였다.

[0107] 사용된 모노머는 폴리(에틸렌 글리콜) 메타크릴레이트 (PEGMA, M_n 500, Sigma Aldrich), 아크릴아미드 (Sigma Aldrich), 및 메타크릴성 젤라틴 (methacrylic gelatin: MGel)이다.

[0108] PEGMA 및 아크릴아미드의 경우, 이들의 농도는 10 % (w/v) 또는 20 % (w/v)였고, 반면 AHPG 농도는 1 % (w/v) 내지 5 % (w/v)였다. MGel의 경우, 농도는 4 % (w/v)로 고정시켰고 반면 AHPG 농도는 0.5 % (w/v) 내지 3 % (w/v)였다. 다르게는, 전체 폴리머 농도는 10 % (w/v)로 유지시키고 반면 MGel 및 AHPG의 비를 변화시켰다; 9:1, 8:2, 및 7:3.

[0109] 각각의 전구체 용액을 1 mm 스페이서로 2 개의 유리 플레이트 사이에 위치시키고, UV로 2 분 동안 조사하여 (세기: 200 mW, 방출 필터: 250-450 nm, 거리: 5 cm, Model S1500, Omnicure®), 하이드로젤을 형성시켰다. 디스크 모양 하이드로젤 시료를 펀칭하고(8 mm 직경) 특성 분석 전에 PBS에서 37 ° C에서 24 시간 동안 인큐베니션하였다.

[0111] ***AHPG-가교 하이드로젤의 물성:***

[0112] AHPG-가교 하이드로젤의 탄성 계수는 일축 압축(uniaxial compression) 강도 실험으로부터 얻은 스트레스-스트레인 관계로부터 계산하였다 (Model 3343, Instron). 간략하게, 하이드로젤 디스크를 1 mm min^{-1}의 속도로 압축하고, 탄성 계수는 곡선이 선형으로 남아 있는(즉, 탄성 영역) 초기 10 % 스트레인에서 스트레스-스트레인 곡선의 기울기로 계산되었다. 하이드로젤의 팽윤율(팽윤비)은 팽윤된 하이드로젤 대 건조된 젤 메시의 중량비로서 계산하였다.

[0114] ***약물 방출 역학(drug release kinetics):***

[0115] 다양한 AHPG-가교 하이드로젤로부터 시간 의존성 약물 방출 거동을 평가하였다. 모델 약물로서 소 혈청 알부민 (3 mg ml^{-1}, BSA, Sigma Aldrich)을 하이드로젤 제조 전에 젤 전구체 용액에 혼입시킴으로써 하이드로젤에 캡슐화하였다. 상술한 바와 같이 하이드로젤 디스크 (8 mm)를 제조하고, 각각의 하이드로젤 디스크를 37 ° C에서1 mL PBS에서 인큐베이션하였다. 지정된 시점에서, 주변 PBS로 방출된 BSA의 양을 상업적으로 이용 가능한 단백질 검정 키트(BCA™ 단백질 Assay, Thermo Fisher)를 사용하여 측정하였다. 시간에 따른 누적 약물 방출 프로파일을 도시하고, 다음의 Ritger-Peppas 모델을 적용 하였으며,

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 \cdot t^n \quad (5)$$

[0116]

[0117] 여기서 M_t은 시간, t에서 방출된 약물의 양이고, M_∞은 캡슐화된 약물의 총량이고, k_1은 반응속도 상수이며, n은 방출 메카니즘과 관련된 지수이다.

[0119] ***3D 세포 배양:***

[0120] AHPG-가교 하이드로젤에서 3D 세포 배양을 수행하여 캡슐화된 세포의 생존력 및 증식을 평가하였다. 간략하게, 세포를 2 X 10^6 세포 mL^{-1}로 전구체 용액에 현탁시켰다. 상술한 바와 같이 하이드로젤 디스크를 제조하고 (두께: 0.3 mm, 직경: 5 mm), 10 % 태아 소 혈청 및 1 % 페니실린 /스트렙토마이신을 보충한 세포 배양 배지 (Dulbecco's Modified Eagle Medium)에서 37 ° C에서 5 % CO_2대기에서 인큐베이션하였다. 7 일까지 다양한 시점에, 캡슐화된 세포의 생존력을 LIVE/DEAD Cell Viability Assay (Thermo Fisher)을 사용하여 다음의 제조사의 지시에 따라 얻었다.

[0121] 캡슐화된 세포의 증식 속도 (k_P)는 여러 시점에서 살아있는 세포의 수를 헤아리고, 다음의 거듭제곱 방정식으로 시간 (t)에 따른 생존 세포 (N_t/N_0)의 정규화된 수의 도표를 작성하여 계산할 수 있는데,

$$\frac{N_t}{N_0} = 2^{k_p \cdot t} \quad (6)$$

[0122]

[0123] N_t 은 시간, t에서 살아 있는 세포의 수이고, N_0는 젤화후 바로 측정한 세포의 초기수이다 (t=0). 2 가지 세포 유형, MCF-7 (인간 유방 선암 세포) 및 D1 (쥐 간엽 줄기 세포)을 ATCC®로부터 구입하여 사용하였다.

[0124] ***DLP 프로젝션 프린팅을 이용한 세포 함유 마이크로젤(cell-laden microgels) 제조:***

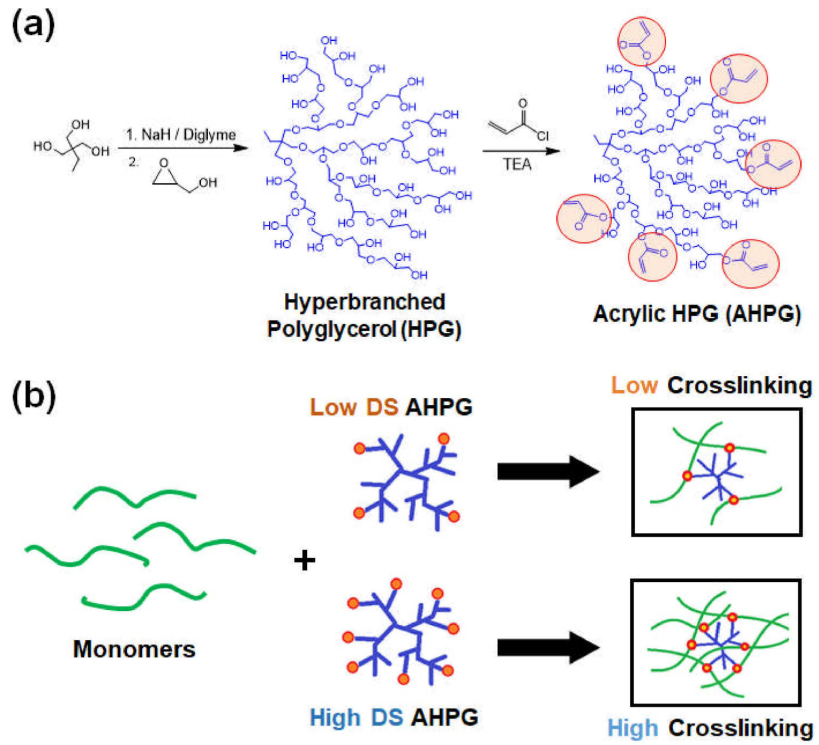
[0125] 미세한 디지털 광 공정(digital light processing: DLP) 프로젝션 프린팅을 이용하여 마이크로 스케일에서 원하는 모양을 갖는 AHPG-가교 하이드로젤을 개발하였다. 이러한 시스템은 (1) 디지털 마이크로미로 장치(Digital Micromirror Device: DMD) 칩 (Texas Instruments), (2) DMD 조절 소프트웨어 (DMD LightCrafter), 및 (3) UV LED 광 (Thorlabs)으로 구성되며, 도립 현미경(Eclipse Ti-E, Nikon) 상에 조립되어 있어 제조하는 동안 동시에 모니터가 가능하다.

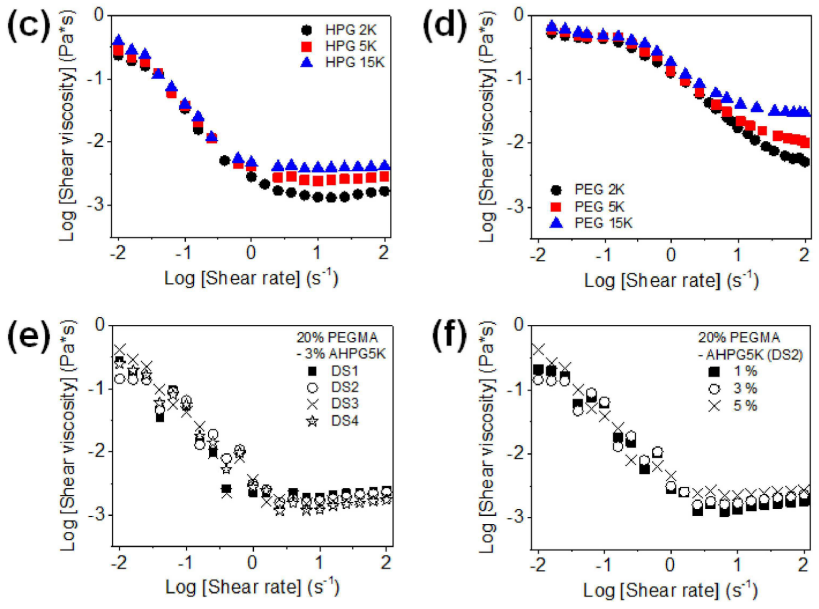
[0126] 전형적인 제조 공정의 경우, 2 개의 글래스 슬라이드 사이의 젤 전구체 용액은 시료 스테이지에 놓인다. DMD 칩에서 반사된 UV 광(출력 파워: 4.5 mW)은 20X 대물렌즈 (S Plan Fluor ELWD, Nikon)를 통해 45 초 동안 시료 스테이지로 보내져서, 마이크로젤을 형성한다. Lab VIEW를 이용하여 마이크로젤의 원하는 모양 및 크기의 이미지를 생성시켰고, 다음으로 DMD 조절 스프트웨어로 전달하였다. 세포 함유 마이크로젤을 배양하여 상술한 바와 같이 생존력 및 증식을 분석하였다.

[0127] 이와 같이 본 발명을 일 실시예를 참고로 하여 설명하였으나 이는 예시적인 것에 불과하며 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 실시예의 변형이 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서, 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

도면

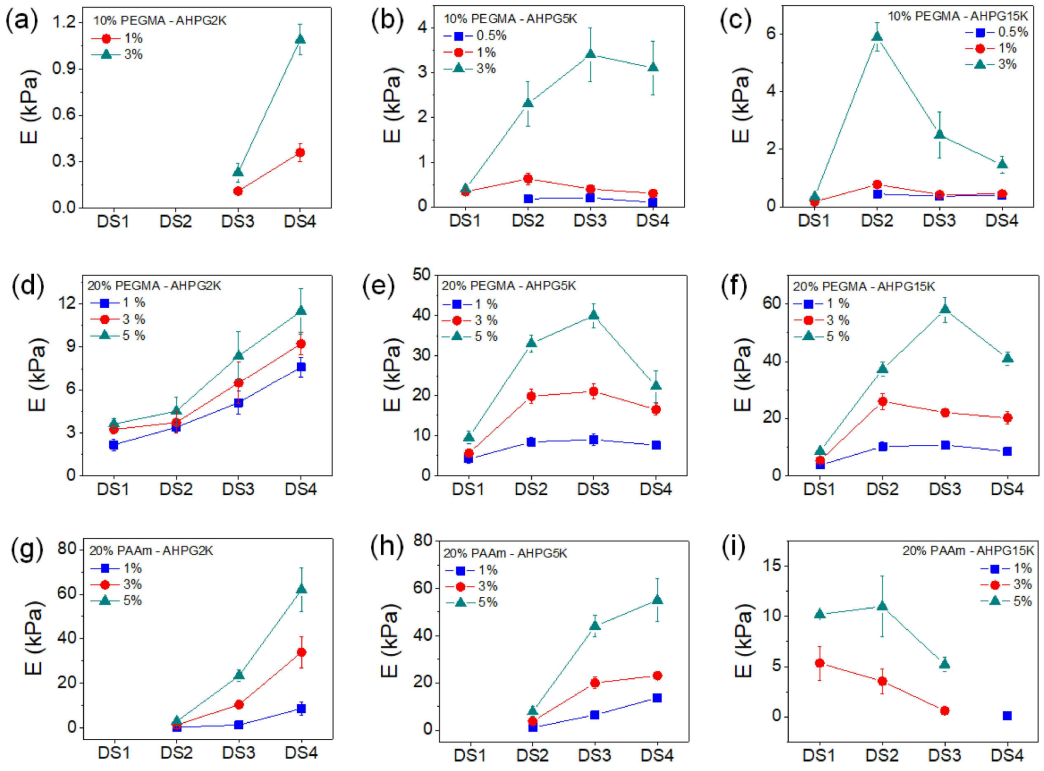
도면1


(a)
1. NaH / Diglyme
2.
TEA
Hyperbranched Polyglycerol (HPG)
Acrylic HPG (AHPG)
(b)
Low DS AHPG
Low Crosslinking
Monomers
High DS AHPG
High Crosslinking

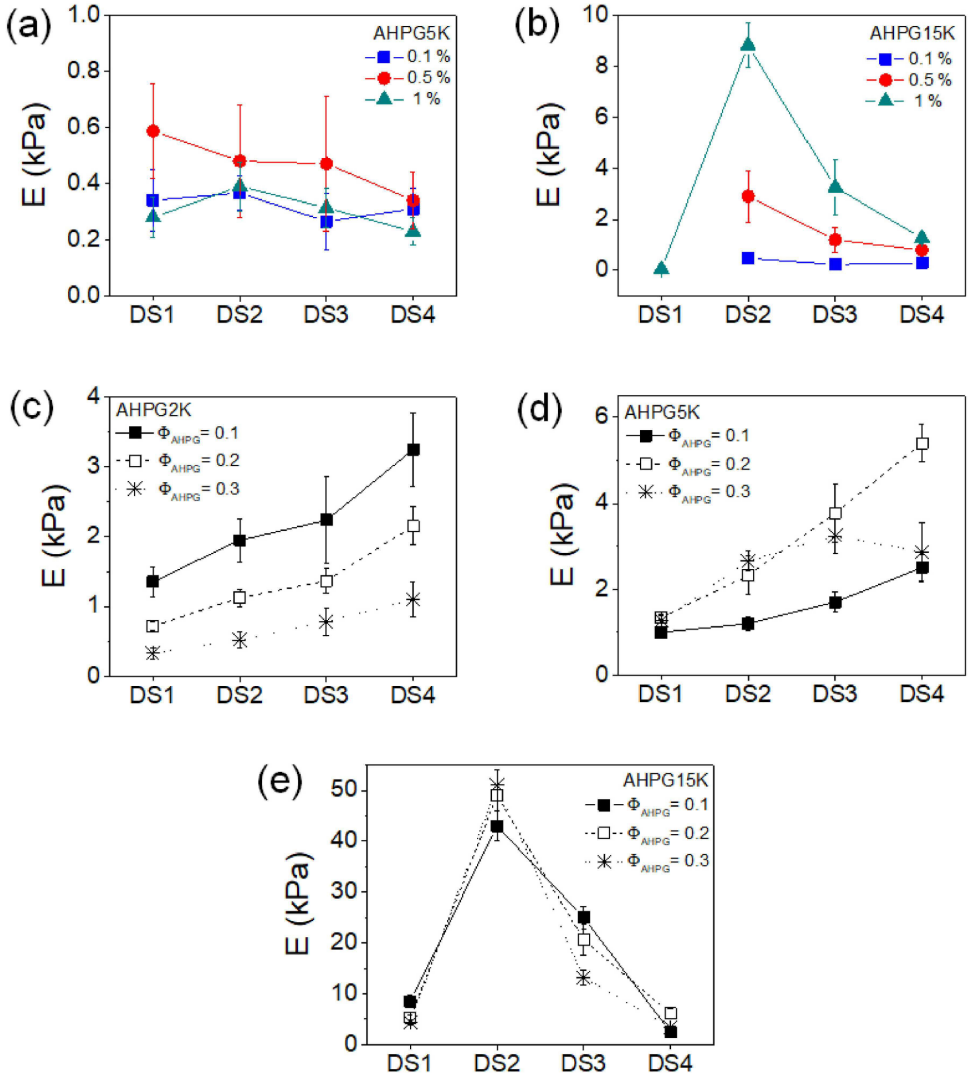

(c)
HPG 2K
HPG 5K
HPG 15K
Log [Shear viscosity] (Pa*s)
Log [Shear rate] (s-1)
(d)
PEG 2K
PEG 5K
PEG 15K
Log [Shear viscosity] (Pa*s)
Log [Shear rate] (s-1)

(e)
20% PEGMA
- 3% AHPG5K
DS1
DS2
DS3
DS4
Log [Shear viscosity] (Pa*s)
Log [Shear rate] (s-1)
(f)
20% PEGMA
- AHPG5K (DS2)
1 %
3 %
5 %
Log [Shear viscosity] (Pa*s)
Log [Shear rate] (s-1)

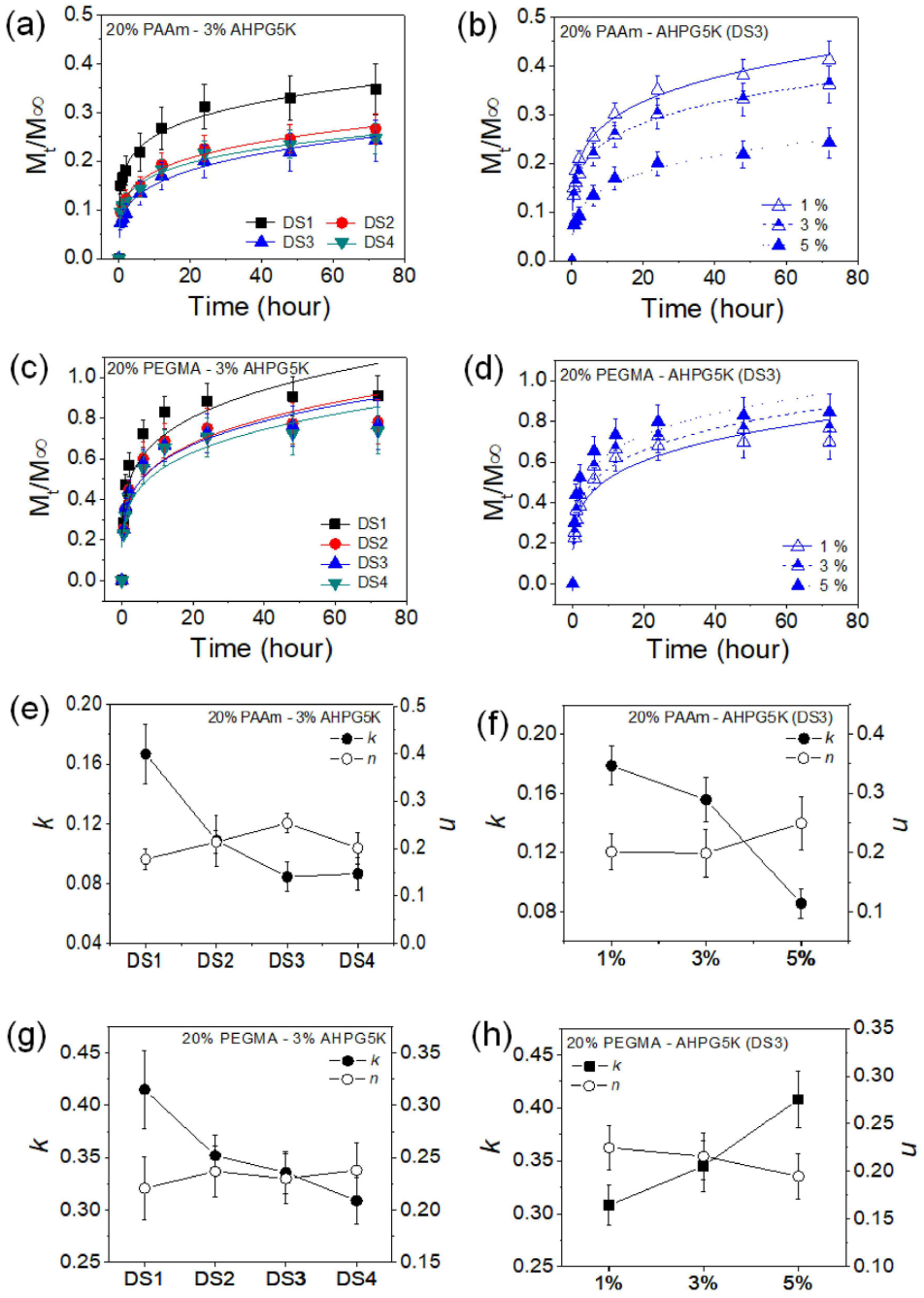
도면2


(a)
10% PEGMA - AHPG2K
1%
3%
E (kPa)
DS1 DS2 DS3 DS4
(b)
10% PEGMA - AHPG5K
0.5%
1%
3%
(c)
10% PEGMA - AHPG15K
0.5%
1%
3%
(d)
20% PEGMA - AHPG2K
1 %
3 %
5 %
(e)
20% PEGMA - AHPG5K
(f)
20% PEGMA - AHPG15K
(g)
20% PAAm - AHPG2K
1%
3%
5%
(h)
20% PAAm - AHPG5K
(i)
20% PAAm - AHPG15K

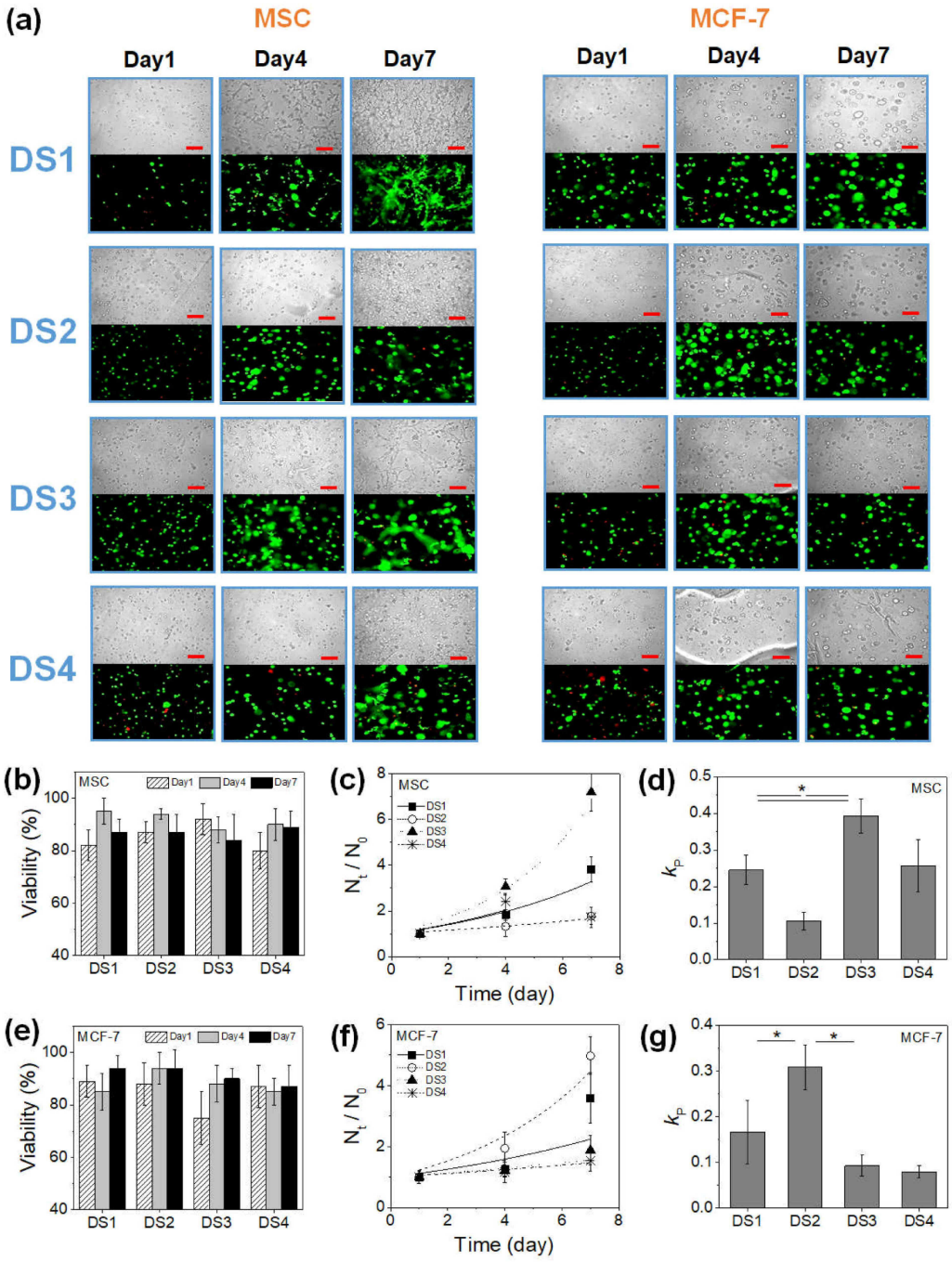
도면3


(a)
AHPG5K
0.1 %
0.5 %
1 %
E (kPa)
DS1
DS2
DS3
DS4
(b)
AHPG15K
0.1 %
0.5 %
1 %
E (kPa)
DS1
DS2
DS3
DS4
(c)
AHPG2K
Φ_{AHPG}= 0.1
Φ_{AHPG}= 0.2
Φ_{AHPG}= 0.3
E (kPa)
DS1
DS2
DS3
DS4
(d)
AHPG5K
Φ_{AHPG}= 0.1
Φ_{AHPG}= 0.2
Φ_{AHPG}= 0.3
E (kPa)
DS1
DS2
DS3
DS4
(e)
AHPG15K
Φ_{AHPG}= 0.1
Φ_{AHPG}= 0.2
Φ_{AHPG}= 0.3
E (kPa)
DS1
DS2
DS3
DS4

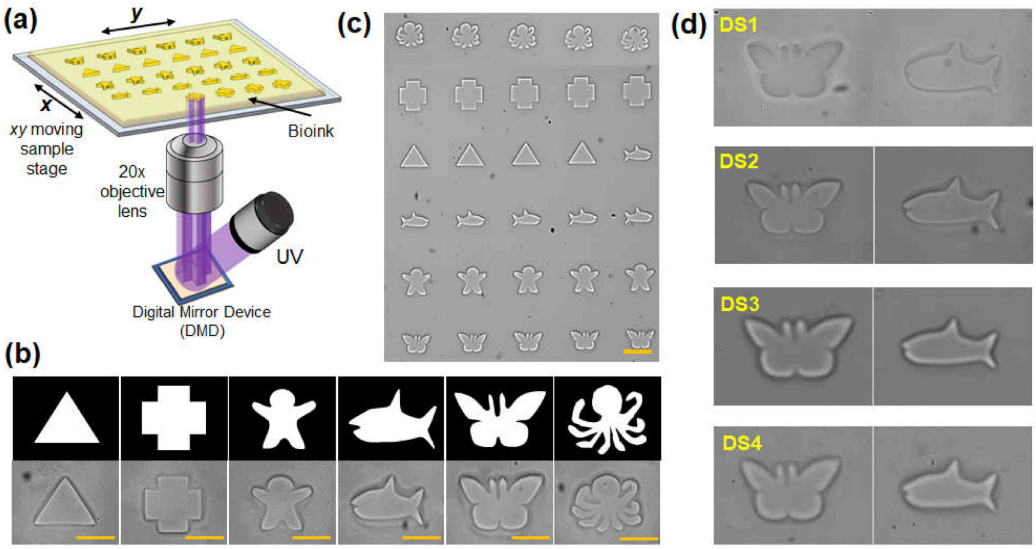
도면4


(a)
20% PAAm - 3% AHPG5K
DS1
DS2
DS3
DS4
Mt/M∞
Time (hour)
(b)
20% PAAm - AHPG5K (DS3)
1 %
3 %
5 %
Mt/M∞
Time (hour)
(c)
20% PEGMA - 3% AHPG5K
DS1
DS2
DS3
DS4
Mt/M∞
Time (hour)
(d)
20% PEGMA - AHPG5K (DS3)
1 %
3 %
5 %
Mt/M∞
Time (hour)
(e)
20% PAAm - 3% AHPG5K
k
n
DS1
DS2
DS3
DS4
(f)
20% PAAm - AHPG5K (DS3)
k
n
1%
3%
5%
(g)
20% PEGMA - 3% AHPG5K
k
n
DS1
DS2
DS3
DS4
(h)
20% PEGMA - AHPG5K (DS3)
k
n
1%
3%
5%

도면5

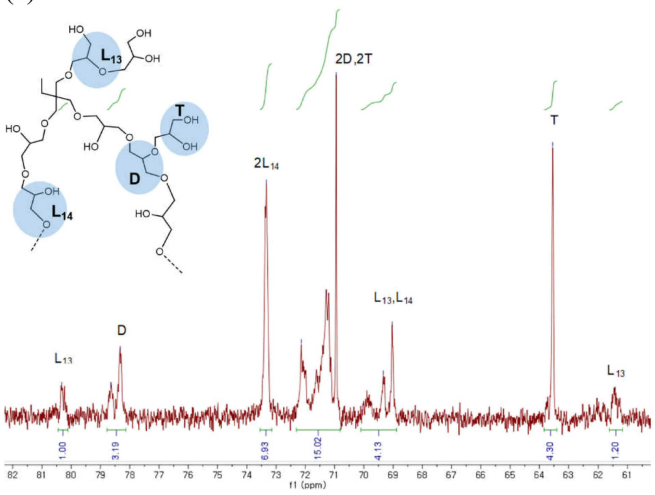

(a)
MSC
MCF-7
Day1
Day4
Day7
DS1
DS2
DS3
DS4
(b)
MSC
Viability (%)
(c)
MSC
N_t / N_0
Time (day)
(d)
MSC
K_P
(e)
MCF-7
Viability (%)
(f)
MCF-7
N_t / N_0
Time (day)
(g)
MCF-7
K_P

도면6

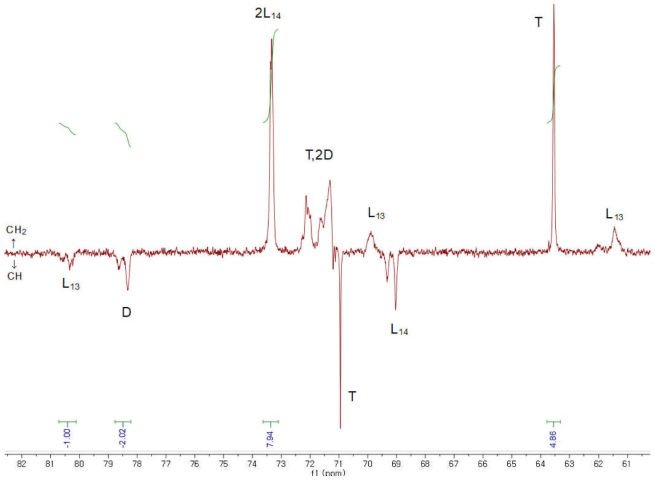

(a)
y
x
xy moving sample stage
Bioink
20x objective lens
UV
Digital Mirror Device (DMD)
(b)
(c)
(d)
DS1
DS2
DS3
DS4

도면7

(a)



(b)



(c)

	L_{13}	2 L_{14}	T	D	DP	DB	M_n
HPG 2K	1	6.4	3.57	2.2	21.83	0.51	1752
HPG 5K	1	5.94	3.32	2.72	50.05	0.58	4553
HPG 15K	1	4.24	2.03	1.92	192.82	0.55	14418

도면8

	a	b, c, d
AHPG DS1	1	0.0012
AHPG DS2	1	0.0041
AHPG DS3	1	0.0071
AHPG DS4	1	0.0144

