(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0081580
(43) 공개일자 2025년06월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/56 (2006.01) *A61L 27/20* (2006.01)
A61L 27/22 (2006.01) *A61L 27/26* (2006.01)
A61L 27/52 (2006.01) *C08J 3/075* (2006.01)
C08J 3/24 (2006.01) *C08J 3/28* (2006.01)
C08L 101/00 (2006.01) *C08L 5/08* (2006.01)
C08L 89/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61L 27/56 (2013.01)
A61L 27/20 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0170066
(22) 출원일자 2023년11월29일
심사청구일자 2023년11월29일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
한양대학교 산학협력단
서울특별시 성동구 왕십리로 222(행당동, 한양대학교내)
(72) 발명자
허강무
대전광역시 유성구 어은로 57, 131동 1503호 (어은동, 한빛아파트)
신홍수
서울특별시 서초구 잠원로 37-48, 204동 302호 (잠원동, 신반포4차아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 천지

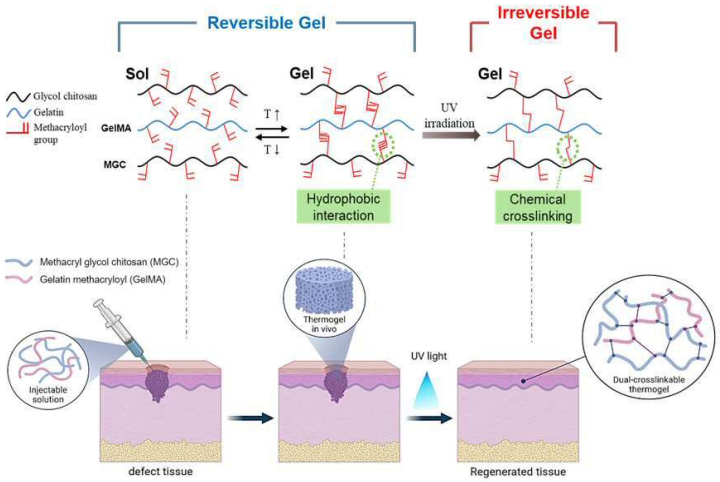
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **이중가교가 가능한 바이오하이브리드 써모젤**

(57) 요 약

본 발명의 일 실시상태에 따른 바이오하이브리드 써모젤은 우수한 온도감응성 및 기계적 물성, 세포 독성, 세포 부착성을 가짐에 따라 세포 운반체 또는 조직 공학용 스캐폴드로의 응용될 수 있다. 조직 공학을 위한 생체 재료 분야에 있어서 천연 ECM의 물리화학적, 생물학적, 형태학적 특성을 모방하는 것은 효과적인 조직 재생을 위해 필수적으로 요구되는 조건이므로, MGC/GM 하이브리드 하이드로젤은 물리화학적 특성이 광범위하게 조절 가능하여 다양한 물성을 필요로 하는 여러 조직에 따라 맞춤형으로 적용이 가능하다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61L 27/222 (2013.01)
A61L 27/26 (2013.01)
A61L 27/52 (2013.01)
C08J 3/075 (2013.01)
C08J 3/24 (2021.05)
C08J 3/28 (2013.01)
C08L 101/00 (2013.01)
C08L 5/08 (2013.01)
C08L 89/00 (2013.01)

(72) 발명자
이은진
서울특별시 동대문구 고미술로 71, 527호 (답십리동, 현대썬앤빌 청계)
김성은
대전광역시 유성구 대학로75번길 52-10, 304호 (궁동)
이영주
대전광역시 서구 대덕대로 150, 110동 506호 (갈마동, 큰마을아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711179508
과제번호	00040240
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	(재단)범부처재생의료기술개발사업단
연구사업명	범부처재생의료기술개발사업
연구과제명	맞춤형 3차원 스페로이드 기반 혈관화 복합 조직체 제작을 통한 골격계 조직 재생 및 분석 기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한양대학교산학협력단
연구기간	2022.04.01 ~ 2026.12.31

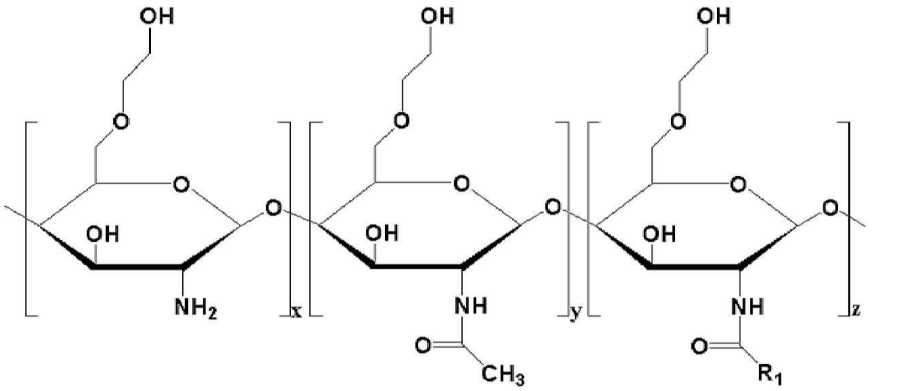
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1의 구조를 갖는 열에 의한 물리적 가교 및 화학적 가교가 가능한 이중결합 반응기를 갖는 글리콜 키토산 유도체 및 세포부착성을 가진 세포외기질 유래의 고분자 유도체를 포함하는 바이오하이브리드 써모젤:

[화학식 1]



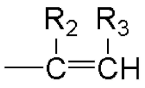
(상기 화학식 1에서,

상기 R_1은 탄소수 1 내지 18의 알케닐기, 탄소수 1 내지 18의 할로알케닐기, 탄소수 3 내지 8의 사이클로알케닐기 및 탄소수 1 내지 8의 알케닐카르보닐기로 이루어진 군에서 선택된 1종을 포함하고,

상기 x, y, z로 수식되는 세가지 단량체는 무작위적으로 배열되어 있고,

상기 x, y, z는 각 단량체의 평균 몰 분획으로서, $0.1 \leq x \leq 0.7$, $0.1 \leq y \leq 0.5$, 및 $0.1 \leq z \leq 0.7$이고, $x + y + z = 1$ 임)

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 R_1은  이고, 상기 R_2 및 R_3는 각각 독립적으로 H, 탄소수 1 내지 5의 알킬기 또는 OH이고, $0.48 \leq z \leq 0.52$인 것을 특징으로 하는 바이오하이브리드 써모젤.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 세포부착성을 가진 세포외기질이 단백질, 폴리사카라이드 (GAG), 콜라겐, 젤라틴, 히아루론산, 콘로이틴을 포함하는 것을 특징으로 하는 바이오하이브리드 써모젤.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 세포부착성을 가진 세포외기질 유래의 고분자 유도체가 젤라틴 메타크릴로일(GelMA)인 것을 특징으로 하는 바이오하이브리드 써모젤.

청구항 5

제1항에 있어서, 34° C 이하의 온도에서는 졸 상태를 유지하고, 36° C 초과의 온도에서는 젤 상태를 유지하는 거동을 보이는 것을 특징으로 하는 바이오하이브리드 써모젤.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 바이오하이브리드 써모젤에 있어서 상기 글리콜 키토산 유도체의 농도가 1 내지 10 wt%이고, 상기 세포부착성을 가진 세포외기질 유래의 고분자 유도체의 농도가 1 내지 10 wt%인 것을 특징으로 하는 바이오하이브리드 써모젤.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 바이오하이브리드 써모젤에 있어서 상기 글리콜 키토산 유도체의 농도가 2 내지 4 wt%이고, 상기 세포부착성을 가진 세포외기질 유래의 고분자 유도체의 농도가 2 내지 4 wt%인 것을 특징으로 하는 바이오하이브리드 써모젤.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 글리콜 키토산 유도체와 상기 세포부착성을 가진 세포외기질 유래의 고분자 유도체의 중량비가 0.5:1 내지 2:1 인 것을 특징으로 하는 바이오하이브리드 써모젤.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 화학적 가교는 광가교이고, 광가교 반응 후 30% 내지 80%의 가교도를 갖는 것을 특징으로 하는 바이오하이브리드 써모젤.

청구항 10

제1항에 있어서, 80 내지 10,000 Pa의 저장 탄성률을 갖는 것을 특징으로 하는 바이오하이브리드 써모젤.

청구항 11

제1항에 있어서, 중량평균분자량이 200 내지 5,000,000인 것을 특징으로 하는 바이오하이브리드 써모젤.

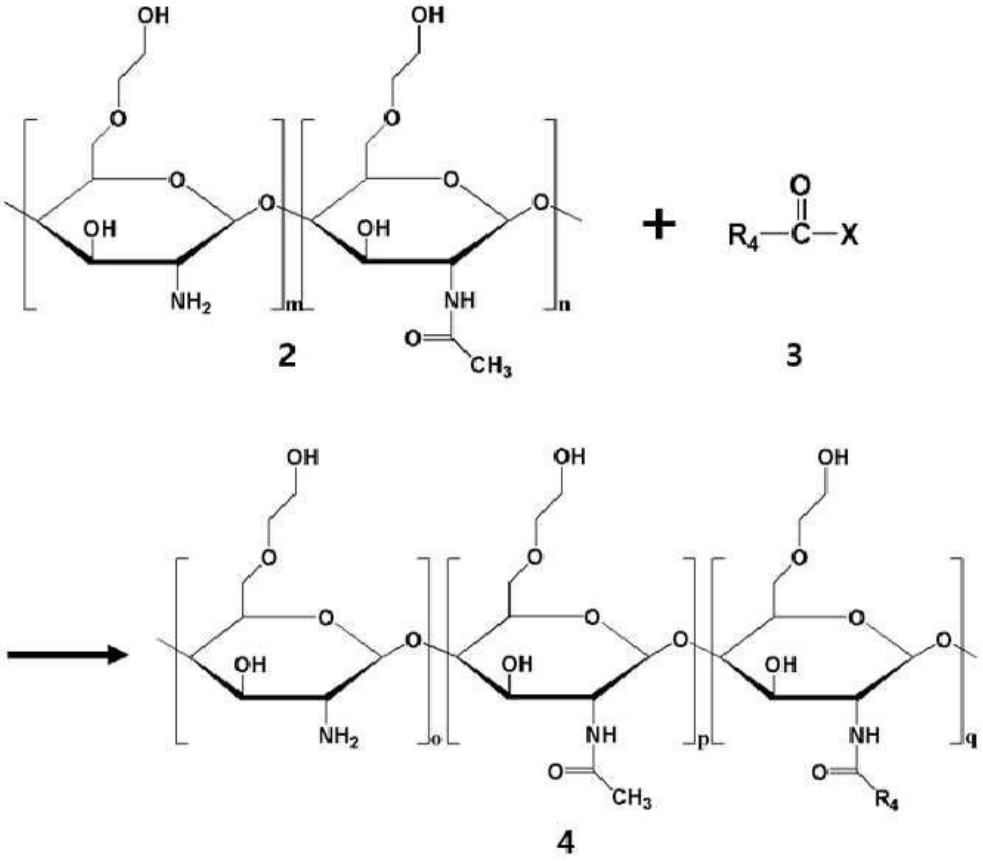
청구항 12

하기 반응식 1에 따라 화학식 2의 N-아세틸화된 글리콜 키토산 유도체와 화학식 3의 R_4COX 유도체를 반응시켜 화학식 4와 같이 열에 의한 물리적 가교 및 화학적 가교가 가능한 이중결합 반응기를 갖는 글리콜 키토산 유도체를 제조하는 단계; 및

상기 글리콜 키토산 유도체와 세포부착성을 가진 세포외기질 유래의 고분자 유도체를 혼합하는 단계;

를 포함하는 바이오하이브리드 써모젤을 제조하는 방법:

[반응식 1]



(상기 반응식 1에서,

상기 R_4는 탄소수 1 내지 18의 알케닐기, 탄소수 1 내지 18의 할로알케닐기, 탄소수 3 내지 8의 사이클로알케닐기 및 탄소수 1 내지 8의 알케닐카르보닐기로 이루어진 군에서 선택된 1종을 포함하고,

상기 X는 이탈기이고,

상기 m, n로 수식되는 두가지 단량체는 무작위적으로 배열되어 있고,

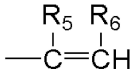
상기 m, n은 상기 화학식 2의 각 단량체의 평균 몰 분획으로서, $0.1 \leq m \leq 0.7$, $0.3 \leq n \leq 0.9$이고, $m + n = 1$이고,

상기 o, p, q로 수식되는 세가지 단량체는 무작위적으로 배열되어 있고,

상기 o, p, q는 상기 화학식 4의 각 단량체의 평균 몰 분획으로서, $0.1 \leq o \leq 0.7$, $0.1 \leq p \leq 0.5$, 및 $0.1 \leq q \leq 0.7$이고, $o + p + q = 1$ 임)

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 X는 하이드록시기; 할로젠 치환기; 탄소수 1 내지 4의 알콕시기; 또는 -O-C(=O)-R_4이고,

상기 R_4는  이고, 상기 R_5는 $-CH_3$이고, 상기 R_6는 H인 것을 특징으로 하는 바이오하이브리드 써모젤을 제조하는 방법.

청구항 14

제1항의 바이오하이브리드 써모젤을 포함하는 주입형 조직공학 스캐폴드 시스템.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 우수한 생체적합성과 세포부착성, 조절 가능한 기계적 특성을 가지는 새로운 주입형 스캐폴드용 바이오하이브리드 써모겔에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 조직 공학 분야의 궁극적인 목표는 조직, 또는 장기의 손상을 복구하여 질병의 근본적인 원인을 해결하는 것이다. 손상 부위를 대체할 장기를 환자에게 직접 이식하는 재생 공학 연구가 지속적으로 이루어졌으나, 장기 이식의 경우 증가하는 수요에 비하여 공급되는 재료의 양이 제한적인 문제가 있었다. 최근, 다공성이며 높은 생체적합성을 가지는 생분해성 3차원 구조체인 스캐폴드를 이용하는 조직 공학적 접근법이 기존의 조직 재생 및 장기 이식의 한계를 극복할 수 있는 전략으로 주목받고 있다. 글리콜 키토산 유도체 기반의 온도감응성 하이드로젤은 젤화에 요구되는 고분자 농도가 낮으며 우수한 생분해성, 가역적이고 빠른 젤화 반응과 같은 다양한 이점을 가져 조직 공학을 위한 유망한 생체 재료로 평가되어 왔다.

[0003] 그러나 글리콜 키토산 유도체 기반의 온도감응성 하이드로젤은 세포 부착성이 낮다는 문제를 가지며, 이러한 세포와의 상호작용 부족은 세포의 성장, 증식 및 조직화 능력을 제한하기 때문에 조직 공학을 위한 스캐폴드로의 응용에는 한계가 있었다. 이에 따라, 세포 부착성이 높은 글리콜 키토산 유도체 기반의 온도감응성 하이드로젤의 개발이 필요한 실정이었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

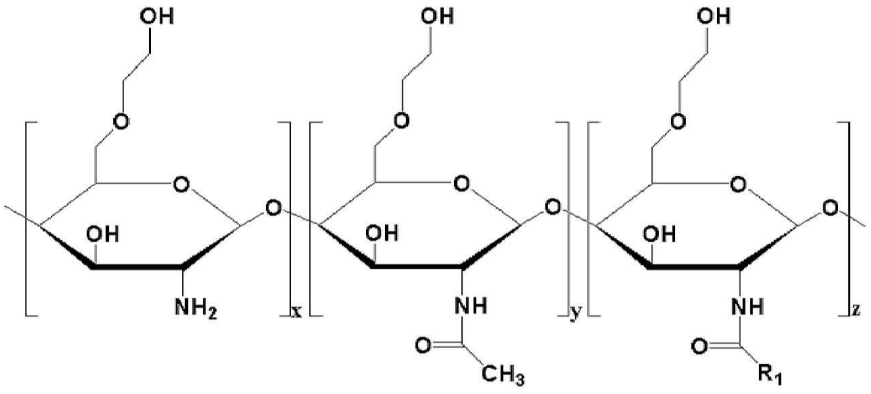
[0004] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 주입형 스캐폴드로의 응용을 위해 조정 가능한 기계적 물성, 향상된 세포 부착성 및 세포 친화성을 갖는 바이오하이브리드 써모겔을 제공하는 것이다. 구체적으로 열에 의한 물리적 가교 및 화학적 가교가 가능한 이중결합 반응기를 갖는 글리콜 키토산 유도체 및 세포 부착성이 우수한 세포외기질 고분자 유도체를 포함하는 바이오하이브리드 써모겔에 관한 것이다.

[0005] 다만, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 상기 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 하기의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명의 일 실시상태는 하기 화학식 1의 구조를 갖는 열에 의한 물리적 가교 및 화학적 가교가 가능한 이중결합 반응기를 갖는 글리콜 키토산 유도체 및 세포부착성을 가진 세포외기질 유래의 고분자 유도체를 포함하는 바이오하이브리드 써모겔을 제공한다:

[0007] [화학식 1]

[0008] 

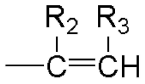
[0009] (상기 화학식 1에서,

[0010] 상기 R_1은 탄소수 1 내지 18의 알케닐기, 탄소수 1 내지 18의 할로알케닐기, 탄소수 3 내지 8의 사이클로알케닐

기 및 탄소수 1 내지 8의 알케닐카르보닐기로 이루어진 군에서 선택된 1종을 포함하고,

[0011] 상기 x, y, z로 수식되는 세가지 단량체는 무작위적으로 배열되어 있고,

[0012] 상기 x, y, z는 각 단량체의 평균 몰 분획으로서, $0.1 \leq x \leq 0.7$, $0.1 \leq y \leq 0.5$, 및 $0.1 \leq z \leq 0.7$이고, $x + y + z = 1$ 임)

[0013] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 제1항에 있어서, 상기 R_1은  이고, 상기 R_2 및 R_3는 각각 독립적으로 H, 탄소수 1 내지 5의 알킬기 또는 OH이고, $0.48 \leq z \leq 0.52$일 수 있다.

[0014] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 세포부착성을 가진 세포외기질 유래의 고분자 유도체가 단백질, 폴리사카라이드 (GAG), 콜라겐, 젤라틴, 히아루론산, 콘로이틴을 포함할 수 있다.

[0015] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 세포부착성을 가진 세포외기질 유래의 고분자 유도체가 젤라틴 메타크릴로일(GelMA)을 포함할 수 있다.

[0016] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 34° C 이하의 온도에서는 졸 상태를 유지하고, 36° C 초과의 온도에서는 젤 상태를 유지하는 거동을 보일 수 있다.

[0017] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 바이오하이브리드 써모젤에 있어서 상기 글리콜 키토산 유도체의 농도가 1 내지 10 wt%이고, 상기 세포부착성을 가진 세포외기질 유래의 고분자 유도체의 농도가 1 내지 10 wt%일 수 있다.

[0018] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 바이오하이브리드 써모젤에 있어서 상기 글리콜 키토산 유도체의 농도가 2 내지 4 wt%이고, 상기 세포부착성을 가진 세포외기질 유래의 고분자 유도체의 농도가 2 내지 4 wt%인 것일 수 있다.

[0019] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 글리콜 키토산 유도체와 상기 세포부착성을 가진 세포외기질 유래의 고분자 유도체의 중량비가 0.5:1 내지 2:1일 수 있다.

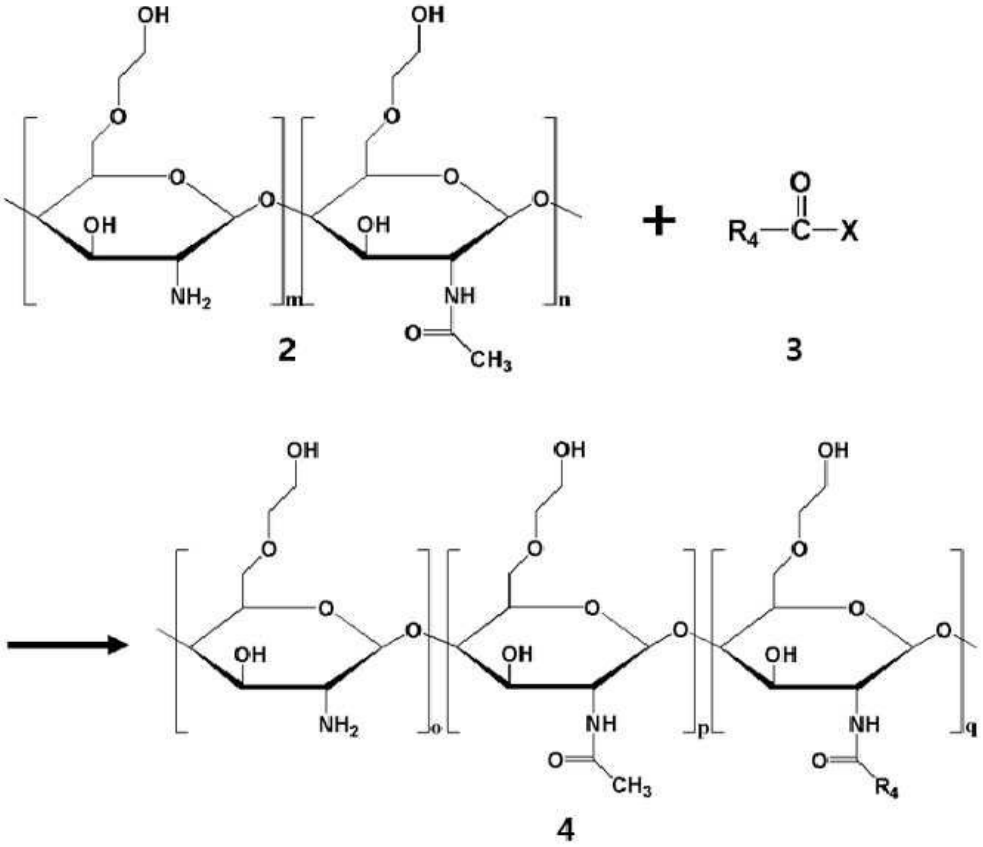
[0020] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 화학적 가교는 광가교이고, 광가교 반응 후 30% 내지 80%의 가교도를 갖는 것일 수 있다.

[0021] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 80 내지 10,000 Pa의 저장 탄성률을 갖는 것일 수 있다.

[0022] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 중량평균분자량이 200 내지 5,000,000인 것일 수 있다.

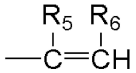
[0023] 본 발명의 일 실시상태는 하기 반응식 1에 따라 화학식 2의 N-아세틸화된 글리콜 키토산 유도체와 화학식 3의 R_4COX 유도체를 반응시켜 화학식 4와 같이 열에 의한 물리적 가교 및 화학적 가교가 가능한 이중결합 반응기를 갖는 글리콜 키토산 유도체를 제조하는 단계; 및 상기 글리콜 키토산 유도체와 세포부착성을 가진 세포외기질 유래의 고분자 유도체를 혼합하는 단계;를 포함하는 바이오하이브리드 써모젤을 제조하는 방법을 제공한다:

[0024] [반응식 1]



[0025]

[0026] (상기 반응식 1에서, 상기 R_4는 탄소수 1 내지 18의 알케닐기, 탄소수 1 내지 18의 할로알케닐기, 탄소수 3 내지 8의 사이클로알케닐기 및 탄소수 1 내지 8의 알케닐카르보닐기로 이루어진 군에서 선택된 1종을 포함하고, 상기 X는 이탈기이고, 상기 m, n로 수식되는 두가지 단량체는 무작위적으로 배열되어 있고, 상기 m, n은 상기 화학식 2의 각 단량체의 평균 몰 분획으로서, $0.1 \leq m \leq 0.7$, $0.3 \leq n \leq 0.9$이고, $m + n = 1$ 이고, 상기 o, p, q로 수식되는 세가지 단량체는 무작위적으로 배열되어 있고, 상기 o, p, q는 상기 화학식 4의 각 단량체의 평균 몰 분획으로서, $0.1 \leq o \leq 0.7$, $0.1 \leq p \leq 0.5$, 및 $0.1 \leq q \leq 0.7$이고, $o + p + q = 1$ 임)

[0027] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 X는 하이드록시기; 할로젠 치환기; 탄소수 1 내지 4의 알콕시기; 또는 -O-C(=O)-R_4이고, 상기 R_4는  이고, 상기 R_5는 $-CH_3$이고, 상기 R_6는 H인 것일 수 있다.

[0028] 본 발명의 일 실시상태는 상기 바이오하이브리드 써모젤을 포함하는 주입형 조직공학 스캐폴드 시스템을 제공한다.

발명의 효과

[0029] 본 발명의 일 실시상태에 따른 바이오하이브리드 써모젤은 우수한 온도감응성 및 기계적 물성, 세포 독성, 세포 부착성을 가짐에 따라 세포 운반체 또는 조직 공학용 스캐폴드로의 응용될 수 있다. 조직 공학을 위한 생체 재료 분야에 있어서 천연 ECM의 물리화학적, 생물학적, 형태학적 특성을 모방하는 것은 효과적인 조직 재생을 위해 필수적으로 요구되는 조건이므로, MGC/GM 하이브리드 하이드로젤은 물리화학적 특성이 광범위하게 조절 가능하여 다양한 물성을 필요로 하는 여러 조직에 따라 맞춤형으로 적용이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0030] **도 1**은 주사 가능한 스캐폴드로서 이중 가교 가능한 MGC/GM 바이오하이브리드 써모젤의 모식도를 나타낸다.

도 2는 메타크릴 글리콜 키토산(MGC)의 합성과정을 나타낸다.

도 3은 GC 및 MGC의 (a) ^{1}H-NMR 및 (b) ATR-FTIR 특성 분석을 나타낸다.

도 4는 (a) MGC의 졸-젤 전이 다이어그램 및 (b) MGC/GM의 젤-졸-젤 전이 다이어그램과 같이 MGC 및 MGC/GM의 온도에 민감한 거동을 나타낸다.

도 5는 (a) MGC47, (b) MGC50, (c) MGC53, (d) MGC47/GM, (e) MGC50/GM 및 (f) MGC53/GM의 온도 의존적 유변학적 거동을 나타낸다.

도 6은 튜브 틸팅 방법에 의해 결정된 MGC50 및 MGC50/GM의 상전이 거동을 보여주는 사진이다.

도 7은 (a) UV 가교 MGC의 ATR-FTIR 스펙트럼, (b) 메타크릴 그룹의 흡수 밴드의 디콘볼루션, (c) 다양한 조사 시간(0, 15, 30 및 45분)에 따른 MGC50의 가교 정도를 나타낸다.

도 8은 (a) 37° C에서 MGC50 및 MGC50/GM의 프리퀀시 스윕, (b) 37° C에서 증가하는 조사 시간(0, 15, 30 및 45분)에 따른 MGC50 및 MGC50/GM의 평균 저장 탄성률 등의 UV 가교 하이드로젤의 기계적 특성을 나타낸다.

도 9는 조사 시간(15분, 30분, 45분)이 증가함에 따라 광가교된 MGC50 및 MGC50/GM의 팽윤 특성을 나타낸다.

도 10은 조사 시간(30분 및 60분)이 증가함에 따라 광가교 결합된 (a) MGC50 및 (b) MGC50/GM의 단면 형태에 대한 SEM 이미지를 나타낸다.

도 11은 메타크릴레이트 글리콜 키토산과 젤라틴 메타크릴로일의 생체 적합성을 나타낸다.

도 12는 MGC50 하이드로젤 내 캡슐화된 세포의 생존율을 나타낸다.

도 13은 MGC50/GM 하이드로젤 내 세포 회전타원체의 접착을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

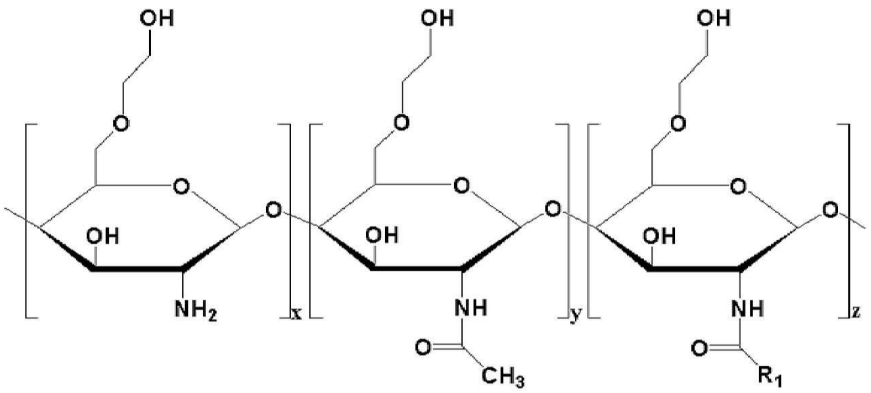
[0031] 본 명세서에 있어서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함" 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0032] 본 명세서에서, "A 및/또는 B"는 "A 및 B, 또는 A 또는 B"를 의미한다.

[0033] 이하, 본 발명에 대하여 더욱 상세하게 설명한다.

[0034] 본 발명의 일 실시상태는 하기 화학식 1의 구조를 갖는 열에 의한 물리적 가교 및 화학적 가교가 가능한 이중결합 반응기를 갖는 글리콜 키토산 유도체 및 세포부착성을 가진 세포외기질 유래의 고분자 유도체를 포함하는 바이오하이브리드 써모젤을 제공한다:

[0035] [화학식 1]



[0036] .

[0037] (상기 화학식 1에서,

[0038] 상기 R_1은 탄소수 1 내지 18의 알케닐기, 탄소수 1 내지 18의 할로알케닐기, 탄소수 3 내지 8의 사이클로알케닐기 및 탄소수 1 내지 8의 알케닐카르보닐기로 이루어진 군에서 선택된 1종을 포함하고,

[0039] 상기 x, y, z로 수식되는 세가지 단량체는 무작위적으로 배열되어 있고,

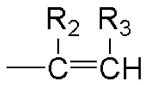
[0040] 상기 x, y, z는 각 단량체의 평균 몰 분획으로서, $0.1 \leq x \leq 0.7$, $0.1 \leq y \leq 0.5$, 및 $0.1 \leq z \leq 0.7$이고, x + y + z

= 1 임)

[0041] 본 발명의 일 실시상태는 상기 글리콜 키토산 유도체 및 세포부착성을 가진 세포외기질 유래의 고분자 유도체를 포함하는 바이오하이브리드 써모겔을 제공한다. 본 발명의 글리콜 키토산 유도체는 이중 가교가 가능한 것으로, 물리적 가교 및 화학적 가교가 가능한 것일 수 있다. 상기 물리적 가교는 열가교일 수 있고, 상기 화학적 가교는 광가교일 수 있다.

[0042] 세포외기질 성분은 세포부착성과 생체적합성이 우수하여 조직공합 스케폴드로 많이 사용되나, 물성 조절이 어렵고, 자체적으로는 온도감응성과 같은 기능성이 없어 주입형 스케폴드로 직접 사용이 어렵다. 이러한 단점을 글리콜 키토산 유도체와 하이브리드화 시켜 글리콜 키토산의 기계적 성질을 가지면서 세포부착성 및 생체적합성이 우수한 바이오하이브리드 써모겔을 제조하였다.

[0043] **도 1**은 주사 가능한 스캐폴드로서 이중 가교 가능한 MGC/GM 바이오하이브리드 써모겔의 모식도를 나타낸다. 본 발명은 MGC와 젤라틴 메타크릴로일(gelatin methacryloyl, GelMA) 간의 하이브리드에 관한 것일 수 있다. 젤라틴 메타크릴레이트로도 자주 언급되는 젤라틴 메타크릴로일(GelMA)은 대부분의 메타크릴아미드 그룹과 소수의 메타크릴레이트 그룹을 포함하는 젤라틴 유도체이다. 콜라겐의 가수분해 산물이기도 한 젤라틴은 세포 부착을 촉진하는 RGD(Arginine, glycine, aspartate) 서열을 가져 천연 ECM과 유사한 특성을 구현할 수 있다. GelMA는 세포 부착성과 생체적합성이 높으며, MGC와 마찬가지로 UV 노광으로 인한 자유 라디칼 중합을 통해 기계적 물성을 조절할 수 있으며 빠른 젤화가 가능하다는 특징을 가진다. **도 1**과 같이 본 발명의 GelMA의 메타크릴로일기와 MGC의 메타크릴로일기간의 소수성 상호작용을 통하여 온도에 따른 졸-젤 전이를 보이고, 메타크릴로일기의 이중 결합이 광 가교 반응으로 공유 결합을 형성하면서 비가역적인 겔을 형성한다. 열가교에 의하여 소수성 상호작용이 증가하고, 광가교에 의하여 알케닐기간에 공유결합이 발생한다.

[0044] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 R_1은  이고, 상기 R_2 및 R_3는 각각 독립적으로 H, 탄소수 1 내지 5의 알킬기 또는 OH인 것일 수 있다.

[0045] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 R_2는 $-CH_3$이고, 상기 R_3는 H인 것일 수 있다.

[0046] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, $0.48 \leq z \leq 0.52$인 것일 수 있다.

[0047] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 z는 0.30, 0.31, 0.32, 0.33, 0.34, 0.35, 0.36, 0.37, 0.38, 0.39, 0.40, 0.41, 0.42, 0.43, 0.44, 0.45, 0.46, 0.47, 0.48, 0.49 또는 0.50 이상이거나, 0.50, 0.51, 0.52, 0.53, 0.54, 0.55, 0.56, 0.57, 0.58, 0.59, 0.60, 0.61, 0.62, 0.63, 0.64, 0.65, 0.66, 0.67, 0.68, 0.69 또는 0.70 이하일 수 있다. 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 z는 0.47, 0.48, 0.50, 0.52 또는 0.53일 수 있다.

[0048] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 세포부착성을 가진 세포외기질 유래의 고분자 유도체가 단백질, 폴리사카라이드 (GAG), 콜라겐, 젤라틴, 히아루론산, 콘로이틴을 포함할 수 있다. 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 세포부착성을 가진 세포외기질 유래의 고분자 유도체가 젤라틴 메타크릴로일(GelMA)을 포함할 수 있다.

[0049] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 34° C 이하의 온도에서는 졸 상태를 유지하고, 36° C 초과의 온도에서는 젤 상태를 유지하는 거동을 보일 수 있다.

[0050] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 바이오하이브리드 써모겔에 있어서 상기 글리콜 키토산 유도체의 농도가 1 내지 10 wt%이고, 상기 젤라틴 메타크릴로일의 농도가 1 내지 10 wt%인 것일 수 있다. 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 바이오하이브리드 써모겔에 있어서 상기 글리콜 키토산 유도체의 농도가 2 내지 4 wt%이고, 상기 젤라틴 메타크릴로일의 농도가 2 내지 4 wt%인 것일 수 있다. 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 바이오하이브리드 써모겔에 있어서 상기 글리콜 키토산 유도체의 농도가 3 wt%이고, 상기 젤라틴 메타크릴로일의 농도가 3 wt%인 것일 수 있다.

[0051] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 광가교 반응 후 30% 내지 80%의 가교도를 갖는 것일 수 있다. 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 광가교 반응 후 40% 내지 70%의 가교도를 갖는 것일 수 있다. 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 광가교 반응 후 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44% 또는 45% 이상의 가교도를 갖거나, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74% 또는 75% 이하의 가교도를

가질 수 있다.

[0052] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 글리콜 키토산 유도체와 상기 세포부착성을 가진 세포외기질 유래의 고분자 유도체의 중량비가 0.5:1 내지 2:1일 수 있다. 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 글리콜 키토산 유도체와 상기 세포부착성을 가진 세포외기질 유래의 고분자 유도체의 중량비가 1:1일 수 있다.

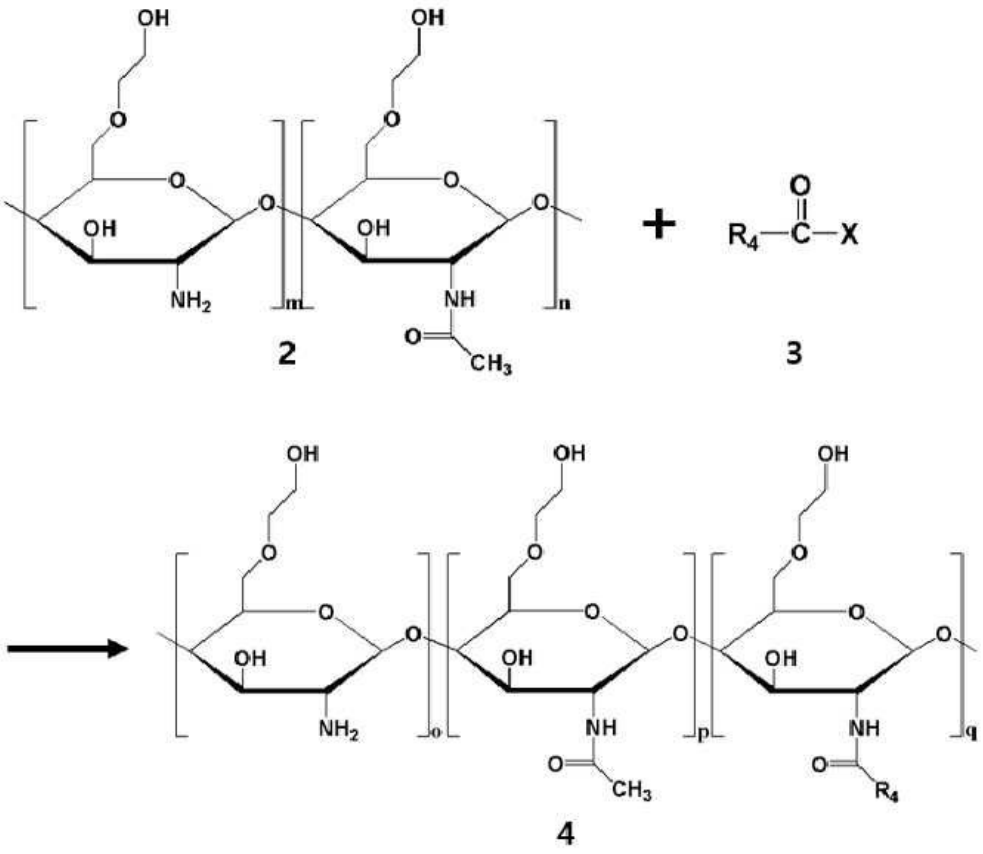
[0053] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 화학적 가교는 광가교이고, 광가교 반응 후 30% 내지 80%의 가교도를 갖는 것일 수 있다.

[0054] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 80 내지 10,000 Pa의 저장 탄성률을 갖는 것일 수 있다. 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 100 내지 10,000 Pa, 500 내지 10,000 Pa, 800 내지 10,000 Pa, 1,000 내지 10,000 Pa, 2,000 내지 10,000 Pa, 4,000 내지 10,000 Pa, 6,000 내지 10,000 Pa, 7,000 내지 10,000 Pa, 8,000 내지 10,000 Pa 또는 9,000 내지 10,000 Pa의 저장 탄성률을 갖는 것일 수 있다. 본 발명의 바이오하이브리드 써모젤은 가교 유무와 가교도 조절에 따라 수십 Pa에서 10,000 Pa까지 조절이 가능하다. 가교가 안된 바이오하이브리드 써모젤은 수십 Pa의 저장 탄성률을 가진다. 본 발명의 바이오하이브리드 써모젤은 필요에 따라 다양한 응용을 통해 다양한 물성을 맞출 수 있는 효과가 있다.

[0055] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 중량평균분자량이 200 내지 5,000,000인 것일 수 있다.

[0056] 본 발명의 일 실시상태는 하기 반응식 1에 따라 화학식 2의 N-아세틸화된 글리콜 키토산 유도체와 화학식 3의 R_4COX 유도체를 반응시켜 화학식 4와 같이 열에 의한 물리적 가교 및 화학적 가교가 가능한 이중결합 반응기를 갖는 글리콜 키토산 유도체를 제조하는 단계; 및 상기 글리콜 키토산 유도체와 세포부착성을 가진 세포외기질 유래의 고분자 유도체를 혼합하는 단계;를 포함하는 바이오하이브리드 써모젤을 제조하는 방법을 제공한다:

[0057] [반응식 1]



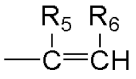
[0058]

[0059] (상기 반응식 1에서, 상기 R_4는 탄소수 1 내지 18의 알케닐기, 탄소수 1 내지 18의 할로알케닐기, 탄소수 3 내지 8의 사이클로알케닐기 및 탄소수 1 내지 8의 알케닐카르보닐기로 이루어진 군에서 선택된 1종을 포함하고, 상기 X는 이탈기이고, 상기 m, n로 수식되는 두가지 단량체는 무작위적으로 배열되어 있고, 상기 m, n은 상기 화학식 2의 각 단량체의 평균 몰 분획으로서, $0.1 \leq m \leq 0.7$, $0.3 \leq n \leq 0.9$이고, $m + n = 1$ 이고, 상기 o, p, q로

수식되는 세가지 단량체는 무작위적으로 배열되어 있고, 상기 o, p, q는 상기 화학식 4의 각 단량체의 평균 몰 분획으로서, $0.1 \leq o \leq 0.7$, $0.1 \leq p \leq 0.5$, 및 $0.1 \leq q \leq 0.7$이고, $o + p + q = 1$ 임)

[0060] 출발물질로 N-아세틸화된 글리콜 키토산 유도체는 5번 위치의 아민기의 일부가 N-아세틸화가 된 것으로, 공지된 방법을 이용하여 직접 제조하거나 시판되는 것을 구입하여 사용한다. 직접 제조할 경우, 글리콜 키토산을 아세틸화제와 반응시켜 N-아세틸화된 글리콜 키토산 유도체를 제조한다. 상기 아세틸화제로는 아세트산 무수물 및 아세트산 클로라이드 중에서 선택 사용할 수 있으며, 바람직하기로, 아세트산 무수물을 사용한다. 이때 반응은 -10 내지 60 ℃이며, 바람직하게는 15 내지 50 ℃이고, 반응시간은 10 내지 50 시간이며, 바람직하게는 18 내지 30 시간 동안 수행한다.

[0061] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 X는 하이드록시기; 할로젠 치환기; 탄소수 1 내지 4의 알콕시기; 또는 $-O-C(=O)-R_4$인 것일 수 있다.

[0062] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 R_4는  이고, 상기 R_5 및 R_6은 각각 독립적으로 H, 탄소수 1 내지 5의 알킬기 또는 OH인 것일 수 있다.

[0063] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 R_5는 $-CH_3$이고, 상기 R_6는 H인 것일 수 있다.

[0064] 본 발명의 일 실시상태는 상기 바이오하이브리드 써모젤을 포함하는 주입형 조직공학 스캐폴드 시스템을 제공한다.

[0066] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명에 따른 실시예들은 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 아래에서 기술하는 실시예들에 한정되는 것으로 해석되지 않는다. 본 명세서의 실시예들은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0068] **실시예**

[0069] **재료**

[0070] 글리콜 키토산(GC, DP≥400)은 와코 퓨어 케미컬 인더스트리즈(Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)(일본)에서 구입하였다. 메타크릴산 무수물(Methacrylic anhydride)(94%)는 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)(인도)에서 구입했다. 메탄올과 아세톤은 삼전화학(한국)에서 구입해 사용하였다. 투석막(molecular weight cut-off: 12-14 kDa)은 Spectrum Laboratory(미국)에서 구입했다. 중수(D_2O)와 DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline), 광개시제인 2-히드록시-2-메틸프로피오페논(2-Hydroxy-2-methylpropiophenone)(Darocur 1173)은 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)(미국)에서 구입하였다. 젤라틴 메타크릴로일(GelMA, degree of methacrylation≥90%)는 3D Materials(한국)에서 구입하였으며 0.20㎛ 필터를 이용해 여과 및 정제하였다. 다른 시약은 별도의 정제 과정 없이 사용되었다.

[0072] **실시예 1. 메타크릴 글리콜 키토산(MGC)의 합성 및 분석**

[0073] 메타크릴 글리콜 키토산(MGC)은 글리콜 키토산(GC)의 N-메타크릴화(N-methacrylation) 반응을 통해 합성되었다. 2 g의 GC를 200 ml의 증류수에 녹인 뒤 80 ml의 메탄올을 첨가하여 충분히 용해시킨다. 40 ° C의 질소 환경에서 미리 계산된 함량의 메타크릴 무수물을 첨가하고 24시간 동안 교반 하에 반응을 진행하였다. 합성된 고분자는 과량의 아세톤에 침전하여 정제되었으며, 고분자 침전물은 투석막(MWCO, 12-14 kDa)을 이용하여 3차 증류수에 48시간 동안 투석하였다. 이후 동결 건조하여 파우더 상태의 MGC를 얻었다. GC와 MGC의 화학적 조성은 ^{1}H-NMR과 ATR-FTIR 분석을 통해 확인하였다. 400MHz의 공명 주파수로 작동하는 AVANCE III 400(BRUKER, 독일)을 이용해 ^{1}H-NMR 스펙트럼을 얻었다. 각 고분자 시료는 0.5 wt%의 농도로 D_2O에 용해되었으며, 4.80 ppm의 D_2O 피크를 기준 피크로 설정하였다. GC와 MGC의 ATR-FTIR 스펙트럼은 Nicolet iS 5(Thermo Scientific, USA)를 통해 얻었

다. 각 고분자 시료는 파우더 형태로 준비되었으며, ATR-FTIR 분석은 4000-750cm^{-1} 주파수 범위에서 8cm^{-1}의 분해능, 32회 스캔을 통해 진행하였다.

[0074] 서로 다른 치환율을 가지는 온도감응성 하이드로젤 MGC는 **도 2**에서 나타낸 바와 같이 GC의 *N*-메타크릴화를 통해 합성하였다. 글루코사민 잔기에 대한 메타크릴산 무수물의 반응 몰비를 1.2, 1.4, 또는 1.6으로 서로 다르게 설정하여 치환율을 조절하였다. 소수성이며 이중결합을 가져 광가교가 가능한 메타크릴기를 GC의 자유 아민 그룹(free amine group)에 도입하였다. 합성된 MGC의 화학적 조성은 ^{1}H-NMR과 ATR-FTIR 스펙트럼 분석을 통해 확인하였다(**도 3**의 a). NMR 스펙트럼의 4.8ppm에서 나타난 D_2O 피크를 참조로 하였다. 글루코피라노실 고리의 H_2-H_8에 해당하는 특성 피크가 3.5 - 4.0 ppm에서 관찰되었다. GC와 비교했을 때 MGC의 스펙트럼에서 새롭게 도입된 메타크릴기의 비닐 양성자에 해당하는 5.6, 5.8 ppm의 피크가 확인되었다. 또한 2.0 ppm에서 메타크릴기의 메틸 양성자에 해당하는 특성 피크가 관찰되었으며, 이를 통해 *N*-메타크릴화 반응이 성공적으로 진행되었음을 확인하였다. MGC의 치환율(degree of methacrylation, DM)은 글루콜피라노실 고리의 양성자와 메타크릴기의 양성자 피크를 적분한 값을 상대적으로 비교하여 계산하였다. 결과적으로 하기 **표 1**에 나타낸 바와 같이 47.3%, 50.4%, 53.4%의 치환율을 가지는 MGC가 합성됨을 확인하였다. 하기 **표 1**에서 MA/NH_2는 메타크릴산 무수물과 글리콜 키토산에서의 글루코사민 잔기의 공급 몰 비율을 나타내고, DM은 ^{1}H-NMR 분석에서의 피크 적분값을 바탕으로 계산한 N-메타크릴화의 정도(Degree of N-Metacrylation)를 나타내고, $T_{gel}{}^{c}$는 튜브 틸팅법(폴리머 농도 3wt%, PBS)에 의하여 측정한 졸-젤 전이 온도를 나타내고, $T_{gel}{}^{d}$는 레오미터(폴리머 농도 3wt%, PBS)에 의하여 측정된 졸-젤 전이 온도를 나타낸다.

[0075] **[표 1]**

샘플	MA/NH_2[a]	DM[b] (%)	졸-젤 전이 온도	
			T_{gel}[c] (℃)	T_{gel}[d] (℃)
MGC47	1.2	47.3	Sol	Sol
MGC50	1.4	50.4	39.6±1.0	39.2
MGC53	1.6	53.4	25.0±1.1	27.3

[0076]

[0077] ATR-FTIR 스펙트럼을 통해 GC와 다양한 치환율의 MGC의 특성을 분석하였다(**도 3**의 b). 3400 cm^{-1}에서 -OH 기의 신축 진동에 의한 넓은 밴드가 나타났으며, 같은 위치에 N-H 신축 진동 밴드가 중첩되어 나타났다. 2870 cm^{-1}의 피크는 C-H 신축 진동에 의한 흡수 피크, 1655 cm^{-1}의 피크는 C=O 신축 진동에 의한 피크에 해당한다. 1056 cm^{-1}에서 C-O 신축 진동으로 인한 피크가 확인되었다. 특히 GC 스펙트럼에서 발견된 1587 cm^{-1}의 1차 아민의 굽힘 진동 피크가 MGC의 스펙트럼에서 사라진 반면, 1716 cm^{-1}의 C=C에 의한 흡수 피크 및 1617 cm^{-1}의 C=O에 의한 흡수 피크가 새롭게 나타났다. 결과적으로 *N*-메타크릴화 반응을 통해 GC의 아미노기에 메타크릴기가 치환되며 MGC가 성공적으로 합성되었음을 확인하였다.

[0079] **실시예 2. 바이오하이브리드 온도감응성 하이드로젤 MGC/GM 제조**

[0080] 바이오하이브리드 온도감응성 하이드로젤인 MGC/GM은 다양한 치환율의 MGC 고분자 수용액(PBS, 3 wt%) 1 mL에 30 mg의 젤라틴 메타크릴로일(GelMA, GM)을 물리적으로 혼합하여 제조하였다. 모든 고분자는 0.20 μm 필터를 통해 여과 과정을 거친 뒤 동결 건조하여 파우더 상태를 얻어 사용하였다. 먼저 4℃에서 DPBS(pH 7.4, 0.01M) 1 mL에 MGC 30 mg을 녹였다. 이후 32℃에서 MGC 고분자 용액 1 mL에 파우더 상태의 GM 30 mg을 녹여 MGC, GM의 농도가 각각 3 wt%, 총 고분자 농도가 6 wt% 인 바이오하이브리드 온도감응성 하이드로젤 MGC/GM을 제조하였다. 제조된 모든 고분자 샘플은 사용 전까지 빛이 차단된 상태로 보관하였다.

[0082] **실시예 3. 온도감응성 졸-젤 전이 온도 측정**

[0083] 다양한 치환율의 MGC와 MGC/GM 용액의 졸-젤 전이 온도는 튜브-틸팅(tube-tilting) 방법으로 측정하였다. 각 시료는 PBS 용액(pH 7.4, 0.01M)에 충분히 용해시킨 고분자 수용액 상태로 사용하였다. Multi-Blok® heater(Lab-Line Instruments, 미국)를 통해 0.2° C/min의 속도로 온도를 상승시키며 1분 동안 샘플을 기울여 관찰했을 때, 흐르지 않는 온도를 기준으로 졸-젤 전이 온도를 결정하였다. 실험은 3회 측정되었으며 각 데이터는 표준 편차를 갖는 평균 값으로 표시하였다.

[0084] 온도감응성 하이드로젤 MGC는 소수성의 메타크릴기의 도입으로 인해 온도가 높아질 경우 소수성 상호작용 기반의 졸-젤 전이 특성을 보인다. MGC, MGC/GM 하이브리드 용액(PBS, pH 7.4)의 치환율 또는 하이브리드 여부에 따른 온도감응성 상전이 온도를 측정하였다. 먼저 치환율에 따른 MGC의 온도감응성을 평가하기 위해 치환율이 47.3%, 50.4%, 53.4%인 MGC를 PBS에 3wt%로 녹여 온도감응성 졸-젤 전이 온도를 관찰하였다(**도 4**의 a). MGC47은 측정 온도 범위인 15-45° C 내에서 항상 유동성을 갖는 액체 졸 상태를 유지하였다. 이는 소수성 메타크릴기의 도입량이 낮아 젤을 형성하기 위한 소수성 상호작용의 힘이 약하기 때문일 것으로 사료된다. 반면 MGC50의 졸-젤 전이 온도는 39.6±1° C 로, MGC53의 졸-젤 전이 온도는 25.0±1.1° C 로 관찰되었다. 이는 MGC의 치환율이 높아짐에 따라 메타크릴기의 도입량이 증가하고 온도 상승에 따른 소수성 상호작용이 증진됨으로 인해 더 낮은 온도에서 젤화가 일어남을 의미한다.

[0085] 젤라틴 또한 조직 재생을 위한 온도감응성 하이드로젤을 제조하는데 널리 사용되어 왔다. 젤라틴은 온도가 높아지면 물에 용해되며 유연한 코일 형태를 나타내며, 온도가 낮아지면 삼중 나선 구조의 형성으로 인해 젤화를 일으킨다(Zhang et al., 2019). 따라서 온도가 높아질수록 소수성 상호작용이 촉진되어 젤을 형성하는 MGC와 온도가 낮아지면 수소 결합으로 인해 젤을 형성하는 GM, 서로 반대의 온도감응성을 갖는 두 고분자의 하이브리드 샘플은 MGC의 치환율에 따라 다른 상전이 거동을 보였다(**표 2**). **표 2**에서 T_{gel}^{a}는 튜브 틸팅법(폴리머 농도 3wt%, PBS)에 의하여 측정한 전이 온도를 나타내고, T_{gel}^{b}는 레오미터(폴리머 농도 3wt%, PBS)에 의하여 측정된 전이 온도를 나타낸다.

[0086] **[표 2]**

샘플	폴리머 농도		젤-졸 전이 온도		졸-젤 전이온도	
	MGC (wt%)	GelMA (wt%)	T_{gel}^{a}(°C)	T_{gel}^{b}(°C)	T_{gel}^{a}(°C)	T_{gel}^{b}(°C)
MGC47/GM	3.0	3.0	28	26.7	Sol	Sol
MGC50/GM	3.0	3.0	32	29.3	36	36.4
MGC53/GM	3.0	3.0	Gel	Gel	Gel	Gel

[0087]

[0088] MGC의 치환율이 체온 근처에서의 젤화 여부에 결정적인 영향을 미치기 때문에 주입형 하이드로젤로의 응용을 위해서는 치환율의 최적화 과정이 필수적이다. MGC47, MGC50, 그리고 MGC53을 3wt%의 농도로 PBS에 녹인 후 MGC, GM의 농도가 각각 3 wt%, 총 고분자 농도는 6 wt%가 되도록 파우더 상태의 GM을 첨가해 하이브리드한 후 온도감응성을 평가했다(**도 4**의 b). MGC47/GM은 저온에서 유동성이 없는 고체 젤 상태이나 28° C 이상에서는 유동성을 갖는 액체 졸 상태로 상전이가 일어나는 졸-젤 거동을 보였다. 반면 MGC50/GM의 경우 32° C 이하에서는 GM의 수소 결합으로 인해 젤 상태를 유지하나, 32-36° C 온도 범위 내에서는 수소 결합이 약해지며 졸 상태를 갖는다. 36° C 이상의 온도에서는 MGC의 소수성 상호작용으로 인해 다시 젤을 형성하는 젤-졸-젤 거동이 관찰되었다. 한편, MGC53/GM의 경우 측정 온도 범위인 20-45° C 내에서 항상 유동성이 없는 젤 상태를 유지하였다.

[0090] **실시예 4. 유변학적 특성 평가**

[0091] 다양한 치환율의 MGC와 MGC/GM의 유변학적 특성을 분석하기 위해 온도조절기가 장착된 HR-10 레오미터(TA Instruments, 미국)를 사용하였다. 각 시료는 PBS 용액(pH 7.4, 0.01M)에 충분히 용해시킨 고분자 수용액 상태로 사용하였다. 직경 40 mm, 간격 1000 μm 인 두 티타늄 평형 플레이트 사이에 측정하고자 하는 MGC와 MGC/GM 수용액을 위치시켰다. 고분자 용액의 저장 탄성률(elastic modulus, G')과 손실 탄성률(loss modulus, G'')은

8 Pa의 일정한 응력 하에서 1 Hz의 주파수로 측정되었다. 측정 조건으로 사용된 응력 및 주파수는 스트레스 스윕(stress sweep)과 프리퀀시 스윕(frequency sweep)을 통해 최적화되었으며 승온 속도는 3° C/min, 온도범위는 15-45° C로 설정했다.

[0092] 합성한 MGC 온도감응성 하이드로젤과 MGC/GM 하이브리드 온도감응성 하이드로젤의 유변학적 특성은 **도 5**에서 나타낸 바와 같이 레오미터(rheometer)를 통해 측정되었다. 분석을 위해 서로 다른 치환율의 MGC를 PBS에 3wt%로 녹인 수용액 상태의 샘플을 준비하였다. 측정 온도 범위인 15-45° C 내에서 온도를 높일 때 각 고분자 샘플의 저장 탄성률(G')과 손실 탄성률(G'')을 분석하였다. 그래프 상에서 G'과 G''이 교차하는 지점의 온도를 샘플의 상전이 온도라고 정의하였다. MGC 단독 샘플인 MGC47은 측정 범위인 15-45° C 내에서 항상 흐르는 졸 거동을 보였다. MGC50과 MGC 53의 상전이 온도는 각각 39.2° C, 27.3° C 로 측정되었다. 따라서 MGC의 치환율이 높아질수록 상전이 온도는 낮아지는 결과를 보였다. 한편 MGC/GM 하이브리드 샘플의 경우 튜브-틸팅 분석 결과와 마찬가지로 MGC의 치환율에 따라 서로 다른 거동이 확인되었다. MGC47/GM은 26.7° C부터 흐르기 시작하는 젤-졸 거동, MGC50/GM은 29.3° C부터 흐르기 시작하며 36.4° C에서 다시 젤을 형성하는 젤-졸-젤 거동, MGC53/GM은 측정 범위인 15-45° C 내에서 항상 흐르지 않는 젤 거동을 보였다. 주입형 바이오하이브리드 온도감응성 하이드로젤로 사용하기 위해서는 크게 두 가지 조건을 만족해야 한다. 첫 번째로 체온 이하에서 젤화가 일어나야 하며, 두 번째로는 상온 이상에서 졸 상태를 갖는 온도 구간이 존재해야 한다. 결과적으로 MGC50/GM 하이브리드 샘플은 두 조건을 모두 만족하며 주입형 온도감응성 하이드로젤로서 사용이 가능하다(**도 6**).

[0094] **실시예 5. 하이드로젤의 광가교 및 기계적 특성 분석**

[0095] 각 시료는 광개시제 0.1%(v/v)를 포함하는 PBS에 녹인 고분자 수용액 상태로 사용하였다. 원통형의 실리콘 몰드(직경 20 mm, 두께 1 mm)를 이용해 MGC50, 또는 MGC50/GM 고분자 수용액을 자외선(365 nm, 20 mW/cm^2)에 15-45분 동안 노출시켜 가교시켰다. 이후 ATR-FTIR 분석을 통해 UV 노출 시간에 따른 메타크릴기의 해당 피크 변화를 확인하였다. 광가교 된 하이드로젤의 기계적 강도를 측정하기 위해 레오미터를 이용하여 프리퀀시 스윕을 진행하였다. 플레이트 크기는 20 mm이며 37° C에서 0.1 %의 일정한 변형률, 0.1부터 10 Hz의 주파수 범위 내에서 광가교 된 하이드로젤의 저장 탄성률(G')을 측정하였다.

[0096] MGC와 MGC/GM은 UV에 노출되면 추가적인 화학적 가교 반응을 일으키며 기계적 특성이 강화된 투명한 젤을 형성할 수 있다. MGC50, MGC50/GM 주입형 하이드로젤을 0분, 15분, 30분, 그리고 45분동안 UV에 노출시켜 광가교 반응을 진행시켰다. 이후 화학적으로 가교된 MGC 및 MGC/GM의 ATR-FTIR 스펙트럼을 분석하여 UV 노출 시간에 따른 메타크릴기의 해당 피크 변화를 관찰하였다(**도 7**의 a). ATR-FTIR 스펙트럼에서 단일 가우시안 그래프를 얻기 위해 디콘볼루션(deconvolution) 과정을 수행하였다. **도 7**의 b에 나타낸 바와 같이 UV 노출 시간이 증가할수록 1716cm^{-1}에서 탄소-탄소 이중결합, 즉 메타크릴기의 해당 피크가 점차 감소하는 것으로 관찰되었다. **도 7**의 c는 다양한 조사 시간(0, 15, 30 및 45분)에 따른 MGC50의 가교 정도를 나타낸다. UV 노출 시간에 따른 가교도는 하기 수학식 1을 이용하여 계산하였다.

[0097] **[수학식 1]**

[0098] $$\text{Degree of crosslinking (DC)} = 1 - \frac{A_t}{A_0}$$

[0099] 이 식에서 A_0는 가교 전 흡수 피크의 적분값이고, A_t는 UV 노출 시간에 따른 흡수 피크의 적분값이다.

[0100] 하이드로젤의 내부 구조가 파괴되지 않는 선형 점탄성 영역(LVR) 내에서 저장 탄성률(G')의 주파수 의존성은 재료의 기계적 특성을 나타낸다. 생체 재료의 적용 가능성을 파악하기 위해 천연 조직과의 통합에서 요구되는 생체적합성 외에도 물리적 지지를 제공하기 위한 하이드로젤의 기계적 성질에 대한 분석이 요구된다(Basu, Saha, & Saha, 2019). 화학적으로 가교된 MGC 및 MGC/GM 주입형 하이드로젤의 기계적 강도는 프리퀀시 스윕을 통해 측정하였다(**도 8**). UV 노출 시간이 증가함에 따라 MGC, MGC/GM 하이브리드 하이드로젤 모두 저장 탄성률(G'), 기계적 강도가 크게 증가하였음을 확인하였다. 여기서, MGC/GM의 하이브리드 하이드로젤은 최대 10,000 Pa의 저장 탄성률을 보였다. 이는 광가교 시간이 증가함에 따라 화학적 가교 반응이 더 활발히 이루어져 가교 밀도가 높아졌기 때문이다. 하이드로젤의 저장 탄성률은 MGC보다 MGC/GM 하이브리드 하이드로젤이 전체 측정 범위 내에서 더 높은 값을 보였다. 이는 GM과의 하이브리드로 인해 물리적 상호작용뿐만 아니라 반응할 수 있는 메타크릴기의 함량이 더욱 높아져 보다 높은 밀도의 화학적 가교를 형성할 수 있기 때문이다. 따라서 물리적, 화학적 가교

가 모두 가능한 MGC/GM 이중가교 하이드로젤은 UV 노출 시간에 따라 저장 탄성률이 크게 증가하며, MGC/GM 하이브리드 하이드로젤이 MGC 단독 하이드로젤보다 현저히 높은 저장 탄성률을 갖는 것으로 관찰되었다. 스캐폴드와 같은 조직 공학을 위한 하이드로젤은 천연 ECM의 기계적 물성을 모방하고, 손상된 조직을 대체하며 기계적 지지를 제공하거나 재생을 촉진하는 특성이 요구된다(Aldana, Houben, Moroni, Baker, & Pitet, 2021). 조직의 저장 탄성률은 뇌와 같은 부드러운 기관의 경우 약 100 Pa, 근육 조직의 경우 수만 Pa, 연골이나 뼈의 경우 그 이상으로 다양하며(Levental, Georges, & Janmey, 2007; Xu et al., 2018), 대부분의 조직 및 기관이 100-10,000 Pa 사이의 저장 탄성률을 가짐을 고려했을 때 MGC/GM 하이드로젤의 물성이 최대 약 10,000 Pa까지 조절 가능함은 큰 이점이 될 수 있다. 결과적으로 MGC/GM 하이브리드 하이드로젤은 UV 노출 시간을 조절함에 따라 원하는 기계적 물성의 제어가 가능하며, 적용이 필요한 조직에 요구되는 물성에 따라 맞춤형의 기계적 물성을 갖는 스캐폴드를 제작할 수 있음을 의미한다.

[0102] **실시예 6. 팽윤 거동 분석**

[0103] MGC와 MGC/GM의 가교 시간에 따른 팽윤 거동을 분석하기 위해 15분, 30분, 45분 동안 광가교 된 하이드로젤의 무게 변화를 관찰하였다. 동결 건조된 시료의 무게를 먼저 측정하여 건조된 하이드로젤의 무게(W_d)를 측정하였다. 이후 각 하이드로젤을 37° C에서 48시간 동안 DPBS에 담가 팽윤시켰다. 과량의 DPBS를 조심스럽게 제거한 후 팽윤된 하이드로젤의 무게(W_s)를 측정하였다. 하이드로젤의 팽윤율은 하기 수학식 2를 이용하여 계산하였다. 실험은 3회 측정되었으며 각 데이터는 표준 편차를 갖는 평균 값으로 표시하였다.

[0104] **[수학식 2]**

[0105] $$\text{Swelling ratio} = \frac{W_s - W_d}{W_d}$$

[0106] 화학적으로 가교된 MGC와 MGC/GM의 팽윤 거동을 분석하기 위해 37° C에서 48시간 동안 DPBS에 담근 후 무게 변화를 관찰하였다. **도 9**에 나타낸 바와 같이 MGC 하이드로젤과 MGC/GM 하이드로젤 모두 UV 조사 시간이 증가할수록 팽윤율이 감소하는 경향을 보였으며, 가장 오래 UV에 노출시킨 45분 가교 샘플의 경우가 MGC, MGC/GM 하이드로젤 모두 가장 낮은 팽윤율을 보였다. 이는 UV 가교 시간이 증가함에 따라 화학적 가교 반응이 더 활발히 이루어져 가교 밀도가 증가하였고, 따라서 팽윤이 억제되었음을 입증한다. 또한 MGC 단독 하이드로젤에 비하여 MGC/GM 하이브리드 하이드로젤의 경우가 보다 낮은 팽윤율을 보였다. 이는 앞서 기술한 GM과의 하이브리드를 통한 사슬 엉킴의 증가, 소수성 상호작용의 증가 뿐만 아니라 반응기인 메타크릴기의 함량 증가로 인한 가교 밀도 상승 때문인 것이다.

[0108] **실시예 7. SEM 형태 분석**

[0109] MGC와 MGC/GM의 가교 시간에 따른 형태학적 분석을 위해 SEM 형태 분석을 진행하였다. 10 kV에서 작동시킨 장방출 주사 전자 현미경(FE-SEM, S-4800, Hitachi, 일본)을 이용하여 하이드로젤의 단면 형태를 관찰하였다. 각 시료는 3차 증류수에 충분히 용해시켰으며 UV에 각각 30분 또는 60분 동안 노출시킨 후 37° C에서 1시간 동안 보관하였다. 액체질소를 통해 급냉시키고 48시간 동안 동결 건조하여 파우더 상태의 시료를 얻었다. 동결건조 된 시료는 형태학적 분석을 진행하기 전 플라즈마 스퍼터를 이용해 아르곤 가스 하에서 60초 동안 백금으로 코팅되었다. 코팅이 완료된 시료의 형태학적 특성은 300 배율 및 1,000 배율로 관찰되었다.

[0110] 산소 및 영양소를 비롯한 다양한 생체활성 물질의 높은 투과성, 세포의 부착과 생존력은 스캐폴드의 다공성 및 넓은 표면적에 의존한다는 연구 결과가 있었다(Grenier et al., 2019; Sherbiny & Yacoub, 2013). 높은 생체적합성과 세포 생존율을 위해 스캐폴드용 재료에는 상호 밀접하게 연결된 다공성 구조가 요구된다. 또한 스캐폴드 기공의 크기가 너무 작을 경우 세포의 침투, ECM 생성, 또는 신생 혈관 형성을 억제할 수 있다. 반면 기공의 크기가 너무 클 경우 부피에 비하여 표면적이 감소하기 때문에 세포의 부착 및 증식을 위한 충분한 지지력을 제공하지 못할 수 있다. MGC와 MGC/GM의 UV 가교 시간에 따른 형태학적 분석을 위해 광가교 후 SEM 형태 분석을 진행하였다. 동결건조 된 하이드로젤 샘플의 단면 형태는 **도 10**에서 나타낸 바와 같이 관찰되었다. MGC 하이드로젤의 경우 기공의 모양과 크기가 균일하지 않은 다공성 구조가 관찰되었다. 반면 GelMA와 하이브리드를 진행한 하이드로젤의 경우 상대적으로 뚜렷한 기공 구조를 가짐을 확인하였다. 또한 MGC/GM 하이드로젤에서 UV 노출 시간이 30분인 경우 약 50-60 μm, 60분 노출시켰을 경우 약 40-50 μm의 평균 기공 크기를 갖는 형태임을 관찰할

수 있었다. 이는 GelMA의 하이브리드 및 UV 노출 시간의 증가로 인해 상대적으로 높은 가교 밀도를 가지는 하이드로젤이 형성되었음을 입증한다. 결과적으로 UV 가교 시간을 조절함에 따라 원하는 다공성을 갖는 하이드로젤을 형성할 수 있음을 확인하였다.

[0112] **실시예 8. MGC 및 GelMA의 생체 적합성**

[0113] 표준 배양 조건(5% CO_2 및 37℃)에서 10% FBS 및 1% P/S가 함유된 기본 배지(basal medium)에서 hDFBs를 배양하고 DPBS 및 트립신/EDTA를 사용해 배양 플라스크에서 분리하여 1 x 10^4 cells/mL 농도의 세포 현탁액을 준비하였다. 그 후 세포 현탁액 1 mL를 24 well plate의 각 well에 분주하고 24시간 동안 배양하였다.

[0114] 4℃에서 24시간 동안 회전을 통해 배지에 0.5mg/mL의 각 MGC50 및 GelMA를 용해하고 0.2 μm 필터로 여과했다. 조건 배지를 2일마다 각각 1 mL씩 새로 교체하였다. 24 well plate에 분주한 세포를 1일과 3일 동안 배양하고 각 well에 30분 동안 LIVE/DEAD® viability kit의 용액을 처리한 후 형광 현미경(Eclipse Ti2, Nikon; Tokyo, Japan)을 사용하여 관찰했다. 나머지 각 그룹은 500 μL의 MTT 용액(기본 배지에 0.4 mg/mL)으로 배지를 새로 교체하여 37℃에서 1시간 동안 처리하였다. 각 그룹의 포르마잔(formazans)을 용해하기 위해 400 μL의 DMSO를 첨가하고 분광 광도계 (Varioskan LUX, Thermo Scientific; Waltham, MA, USA)로 540 nm의 파장에서 광학 밀도를 측정하였다.

[0115] MGC50과 GelMA의 생체 적합성은 **도 11**과 같이 Live and dead assay 및 MTT 분석으로 확인했다. 그 결과, 각 고분자 용해 배지를 처리한 후 1일 동안 hDFB의 생존율이 대조군 그룹과 비슷하게 안정적으로 유지되었으며 모든 그룹에서 3일 동안 각 well을 채울 정도로 세포가 증식했다(**도 11**의 a). 마찬가지로 각 고분자 용해 배지를 하루 동안 처리한 후, 광학 밀도는 대조군과 비슷했다. 3일 배양 후 모든 그룹에서 광학 밀도가 증가했으며, 그 중 GelMA 용해 배지로 처리한 그룹의 광학 밀도는 MGC50 용해 배지로 처리한 그룹보다 유의미하게 높았다(**도 11**의 b). 예를 들어, MGC50과 GelMA 용해 배지로 처리한 후 3일간 배양한 경우, 광학 밀도는 각각 0.39 ± 0.02 및 0.46 ± 0.04로 분석됐다. 이는 MGC50과 GelMA가 세포에 해를 끼칠 만큼 독성이 강하지 않다는 것을 나타낸다.

[0117] **실시예 9. MGC50/GM 하이드로젤 내 캡슐화된 세포의 생존율**

[0118] MGC50과 GelMA를 DPBS에 용해하고 필터링 후 동결 건조했다(0.2 μm 필터). 2-하이드록시-2-메틸프로피오페논(2-hydroxy-2-methylpropiophenone) (광개시제)을 DPBS에 0.1 v/v%로 혼합하고, 동결 건조된 MGC50을 준비된 DPBS (3% w/v)에 4℃에서 2일간 녹였다. MGC50/GM 하이드로젤의 경우, 동결 건조된 GelMA를 MGC50 용액(3% w/v)에 추가로 37℃에서 1일간 녹였다.

[0119] 0.1 v/v% 광개시제를 첨가한 MGC50 또는 MGC50/GM 용액에 5 x 10^5 cells/mL의 농도로 hDFBs를 혼합하였다. 용액을 PTFE (polytetrafluoroethylene) 몰드(직경 8mm, 깊이 2mm, 원통형)에 분주하고 젤화를 위해 15초 동안 자외선(300mW/cm^2)에 노출시켰다. 이후 세포가 담지된 하이드로젤을 24 well plate에 1 mL의 배양 배지와 함께 배양하고 배지를 격일로 교체하였다. 1일과 3일 동안 배양된 세포가 담지된 하이드로젤을 30분 동안 LIVE/DEAD® viability kit의 용액으로 처리하고 형광 현미경을 사용하여 관찰하였다. Live/dead images에서 세포 생존율은 하기 수학식 3에 의해 계산되었다.

[0120] **[수학식 3]**

[0121] $$\text{Cell viability (\%)} = \frac{(Live\ cells)}{(total\ number\ of\ cells)} \times 100$$

[0122] 15초 동안 자외선에 노출된 세포가 담지된 하이드로젤의 저장 탄성률은 0.4N의 axial force와 1%의 strain 하에서 레오미터(HR10, TA Instruments; New Castle, DE, USA)를 사용하여 측정하였다.

[0123] 세포를 젤에 담지한 후 live and dead assay 분석 결과, MGC50 및 MGC50/GM 하이드로젤 내에 담지된 hDFB가 균일하게 분포되어 있으며, 대부분의 세포가 3일 동안 15초의 UV 조사된 젤 안에서 살아 있는 것으로 나타났다(**도 12**의 a). 예를 들어, MGC50 및 MGC50/GM 하이드로젤 내 hDFB의 세포 생존율은 3일 배양 후 각각 91.93 ± 1.32% 및 98.85 ± 1.00%였다(**도 12**의 b). 1일 및 3일 배양 후 MGC50 하이드로젤의 저장 모듈러스는 각각

400.06 ± 19.62 및 384.41 ± 21.53 Pa이었고 이는 1일 및 3일 배양 후 저장 모듈러스가 각각 442.64 ± 7.34 및 444.52 ± 8.91인 GelMA 하이드로젤보다 낮았다(**도 12**의 c). 이 결과는 같은 부피에 더 많은 고분자가 용해되어 있기 때문일 수 있다.

[0125] **실시예 10. MGC50/GM 하이드로젤 내 세포 스페로이드의 접착력**

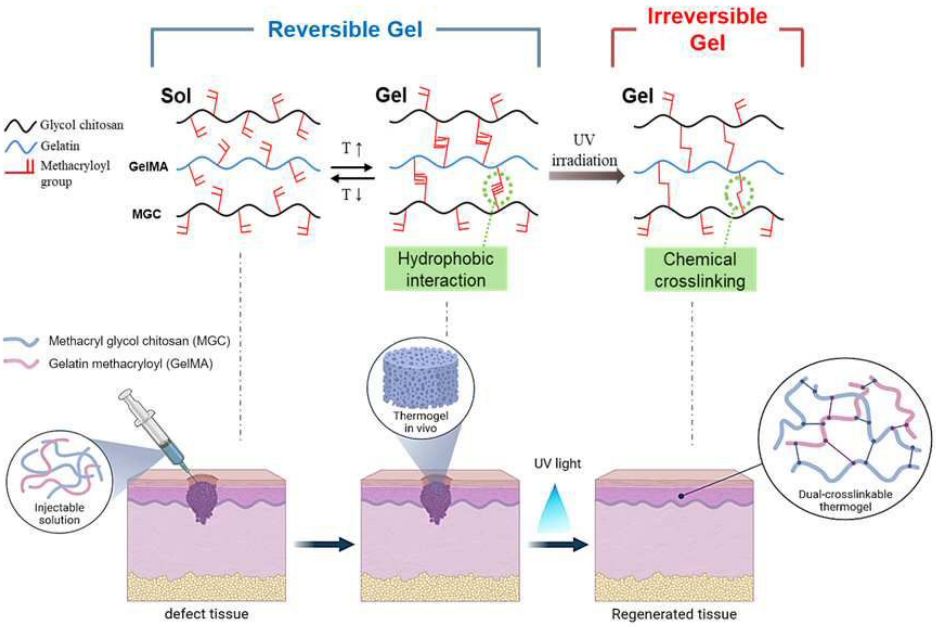
[0126] 표준 배양 조건(5% CO_2 및 37℃)에서 10% FBS 및 0.5% P/S가 함유된 배양 배지에서 hADSCs를 배양하고 DPBS 및 트립신/EDTA를 사용해 배양 플라스크에서 분리하였다. 1 × 10^6 hADSC를 6000 wells (167 cells per well)의 Labsphero™ 에 분주하고 24시간 배양하여 세포가 스페로이드를 형성하도록 하였다.

[0127] 앞서 기술한 대로 MGC50 및 MGC50/GM 용액을 준비하였다. 그 다음 240개의 스페로이드가 캡슐화된 하이드로젤 용액 100 μL를 맞춤형 PTFE(polytetrafluoroethylene) 몰드에 분주하였다(40,000 cells의 하이드로젤 총 세포수). 용액에서 스페로이드를 부드럽게 섞어주고 용액을 15초 동안 자외선(300mW/cm^2)에 노출시켜 젤화를 진행하였다. 이미징을 위해 하이드로젤 내의 스페로이드는 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)를 사용하여 4℃에서 1시간 동안 고정하고 37℃에서 1시간 동안 Alexa Fluor™ 488 Phalloidin (1:100 in DPBS)으로 염색되었다. 염색된 샘플은 형광 현미경(fluorescence microscope)을 사용하여 관찰하였다.

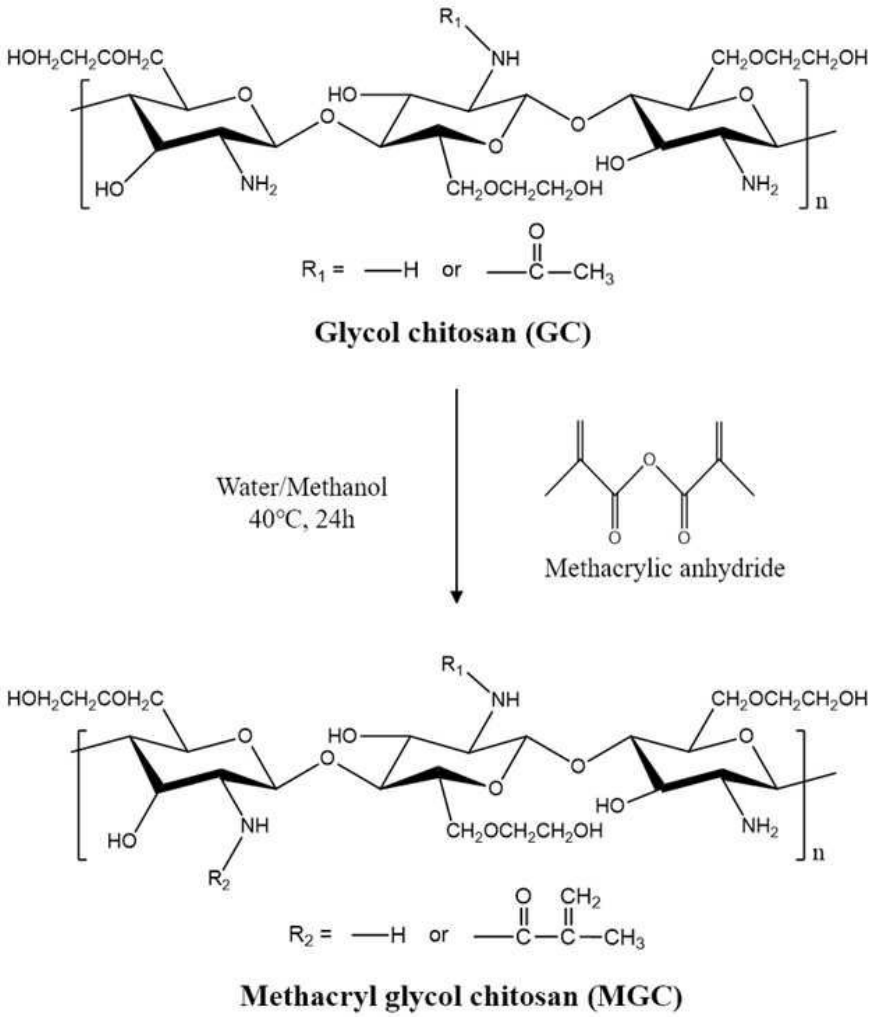
[0128] ADSC 스페로이드를 캡슐화한 후 F-액틴 스테이닝(F-actin staining) 결과, 스페로이드에서 세포 발아(cell sprouting)는 MGC50/GM 하이드로젤 내에서만 발견되었다(**도 13**). MGC50/GM 하이드로젤에서만 세포 발아가 관찰되는 것은 RGD 펩티드가 존재하여 세포 접착 특성을 가진 GelMA가 혼합되어 있기 때문일 수 있다. 그러므로, 광가교 MGC50/GM 하이드로젤 내 스페로이드의 세포는 높은 세포 생존력을 보이며 발아할 수 있음을 관찰했다.

도면

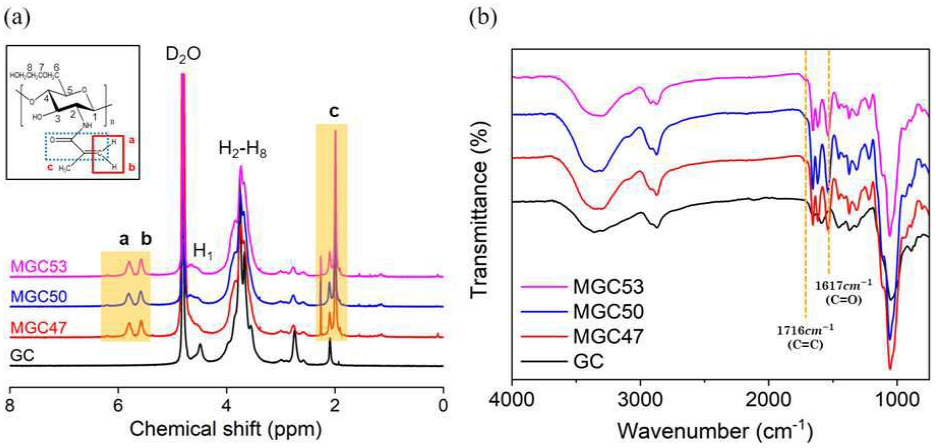
도면1



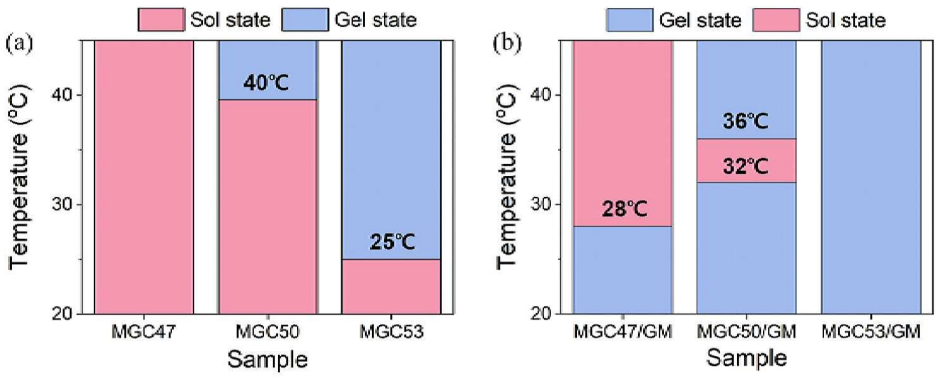
도면2


Glycol chitosan (GC)
Water/Methanol
40°C, 24h
Methacrylic anhydride
Methacryl glycol chitosan (MGC)

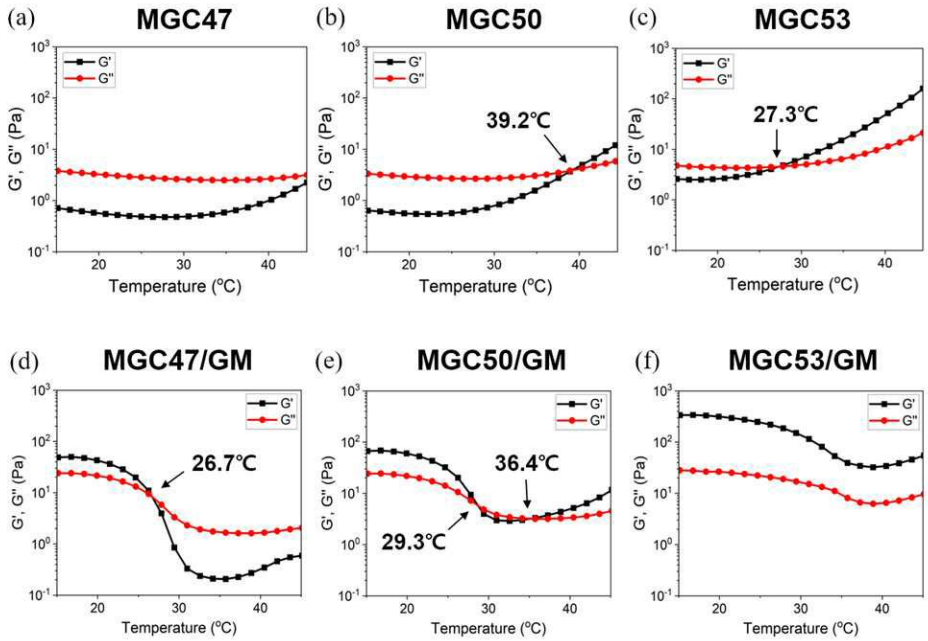
도면3


(a)
(b)
D2O
H2-H8
H1
a b
c
MGC53
MGC50
MGC47
GC
Chemical shift (ppm)
Transmittance (%)
1617cm-1 (C=O)
1716cm-1 (C=C)
Wavenumber (cm-1)

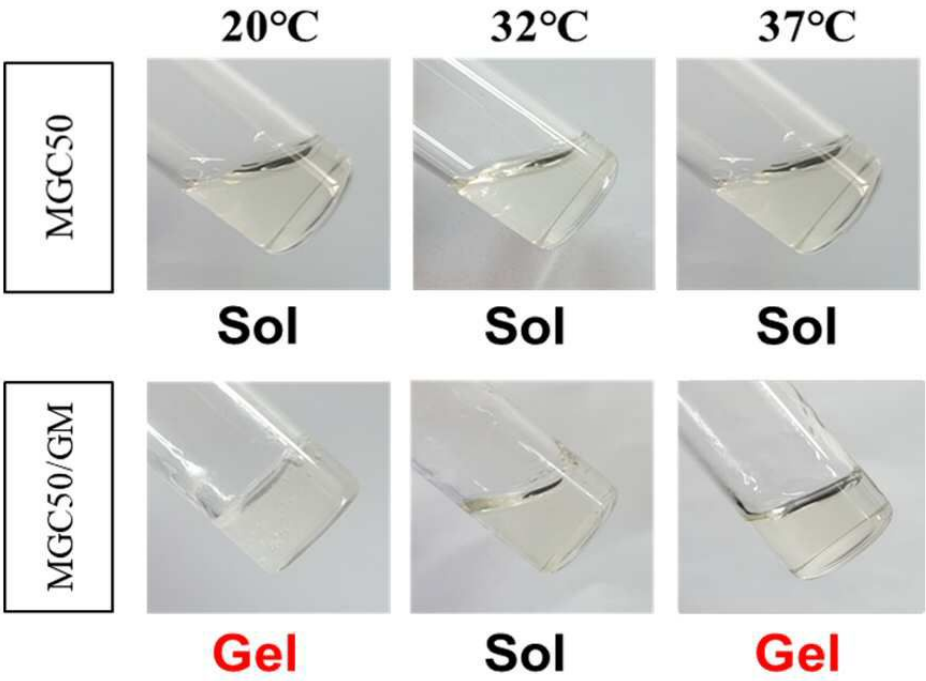
도면4


(a)
Sol state
Gel state
Temperature (°C)
40
30
20
40°C
25°C
MGC47
MGC50
MGC53
Sample
(b)
Gel state
Sol state
Temperature (°C)
40
30
20
36°C
32°C
28°C
MGC47/GM
MGC50/GM
MGC53/GM
Sample

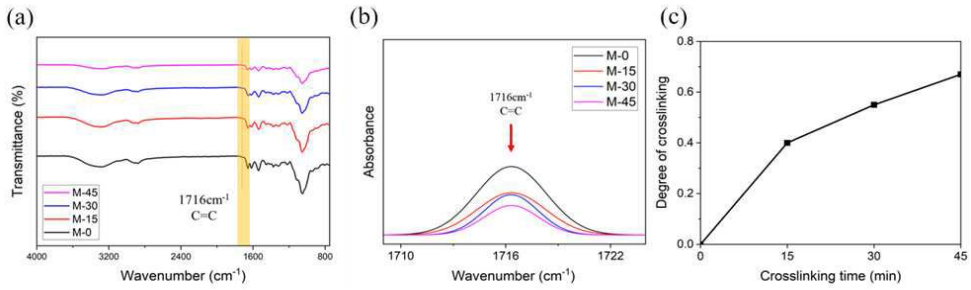
도면5


(a)
MGC47
(b)
MGC50
(c)
MGC53
G'
G''
G', G'' (Pa)
Temperature (°C)
39.2°C
27.3°C
(d)
MGC47/GM
(e)
MGC50/GM
(f)
MGC53/GM
26.7°C
36.4°C
29.3°C

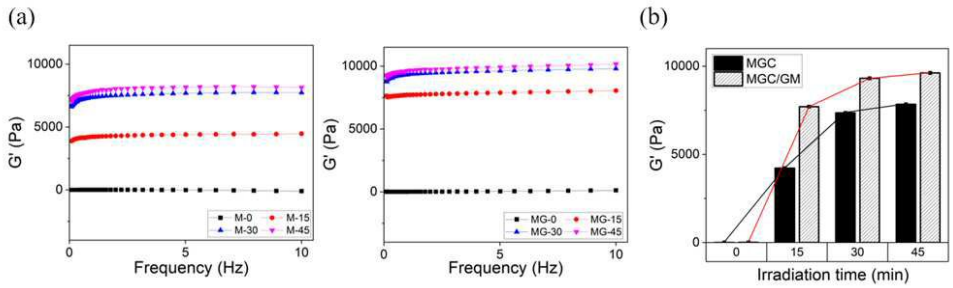
도면6


20℃
32℃
37℃
MGC50
Sol
Sol
Sol
MGC50/GM
Gel
Sol
Gel

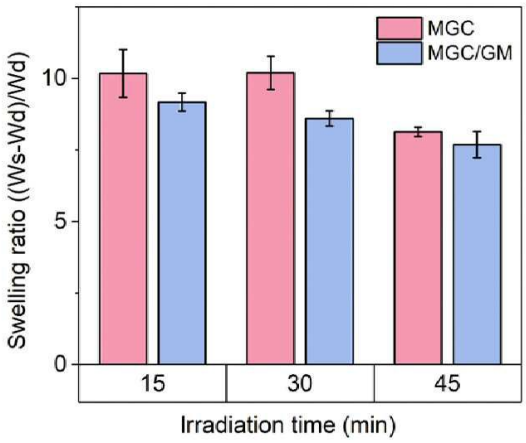
도면7


(a)
Transmittance (%)
M-45
M-30
M-15
M-0
1716cm-1
C=C
Wavenumber (cm-1)
(b)
Absorbance
M-0
M-15
M-30
M-45
1716cm-1
C=C
Wavenumber (cm-1)
(c)
Degree of crosslinking
Crosslinking time (min)

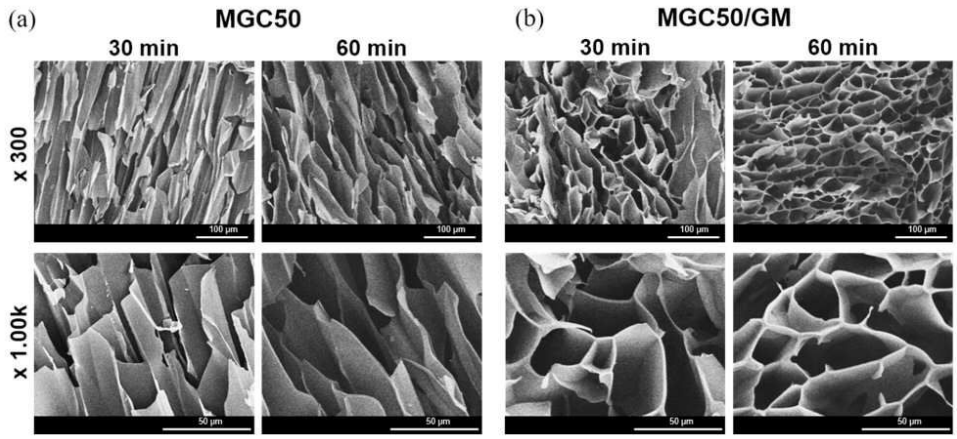
도면8


(a)
G' (Pa)
M-0
M-15
M-30
M-45
Frequency (Hz)
G' (Pa)
MG-0
MG-15
MG-30
MG-45
Frequency (Hz)
(b)
G' (Pa)
MGC
MGC/GM
Irradiation time (min)

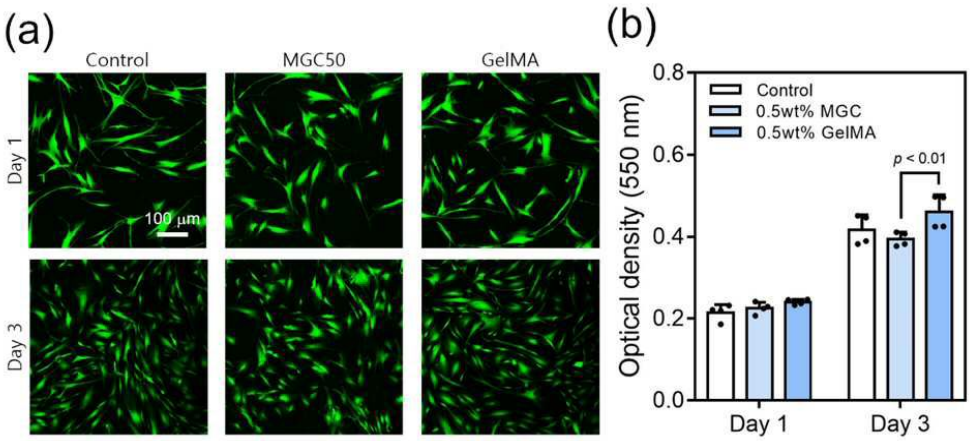
도면9



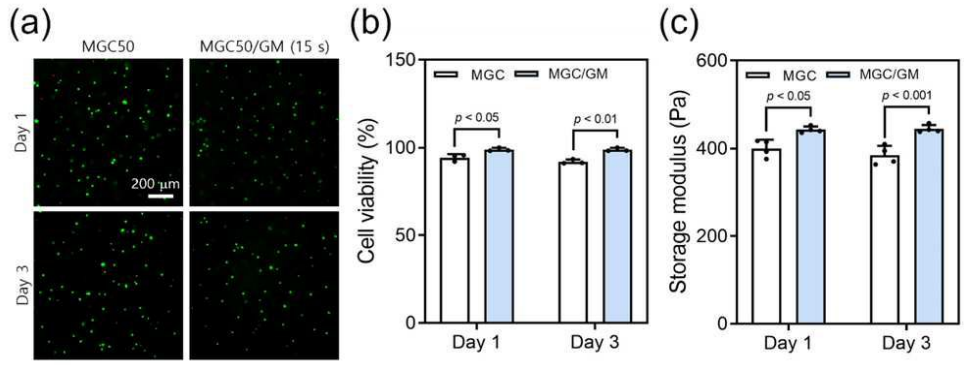
도면10



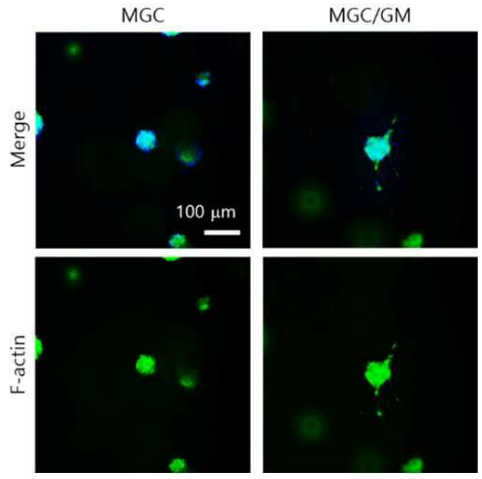
도면11



도면12


(a)
MGC50
MGC50/GM (15 s)
Day 1
Day 3
200 μm
(b)
MGC
MGC/GM
p < 0.05
p < 0.01
Cell viability (%)
150
100
50
0
Day 1
Day 3
(c)
MGC
MGC/GM
p < 0.05
p < 0.001
Storage modulus (Pa)
600
400
200
0
Day 1
Day 3

도면13


MGC
MGC/GM
Merge
F-actin
100 μm