



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0090755
(43) 공개일자 2017년08월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C09D 11/02 (2014.01) C09D 11/10 (2014.01)
(52) CPC특허분류
C09D 11/02 (2013.01)
C09D 11/10 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0011488
(22) 출원일자 2016년01월29일
심사청구일자 2016년01월29일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
박용두
서울특별시 강북구 삼양로19길 113, 115동 804호 (미아동, 삼각산아이원아파트)
이재연
서울특별시 중랑구 용마산로115길 127, 101동 2102호 (망우동, 한일써너스빌리젠시1단지)
(74) 대리인
특허법인 무한

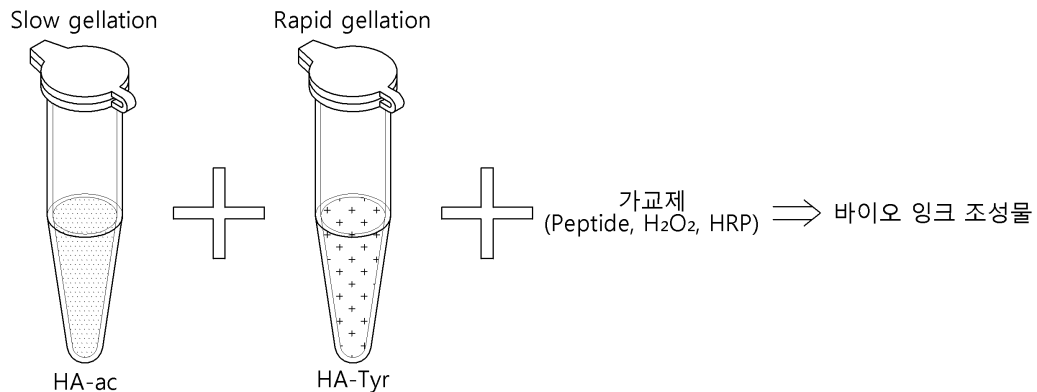
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 기능성 수화젤 기반의 초고속 경화 바이오 잉크 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은, 아크릴기를 포함하는 제1 하이드로젤 및 페놀기를 포함하는 제2 하이드로젤을 포함하는 바이오 잉크 조성물에 관한 것으로서, 보다 자세하게는, 성장인자 및 세포의 활성을 유지하는 동시에 경화속도를 단축하여 빠르게 3차원 구조를 형성할 수 있는, 바이오 잉크 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C09D 4/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 H114C2143

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 고려대학교 산학협력단

연구사업명 질환극복기술개발

연구과제명 바이오프린팅 기반 결손부 맞춤형 턱뼈 재생치료제 개발 및 임상 진입 중개연구

기 여 율 1/1

주관기관 서울아산병원

연구기간 2014.11.01 ~ 2018.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

아크릴기를 포함하는 제1 하이드로젤 및 페놀기를 포함하는 제2 하이드로젤을 포함하는, 바이오 잉크 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 제1 하이드로젤은 2 내지 15 중량%로 포함되고, 상기 제2 하이드로젤은 1 내지 10 중량%로 포함되는 것인, 바이오 잉크 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 제1 하이드로젤 및 제2 하이드로젤의 혼합 비율은 1:1 내지 7:1 인 것인, 바이오 잉크 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

MMP에 의하여 절단 가능한 아미노산 서열과 말단에 시스테인을 포함하는 펩타이드; 과산화수소; 및 HRP (Horseradish peroxidase);를 더 포함하는, 바이오 잉크 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 과산화수소의 농도는 0.05 내지 0.1 mM 인 것인, 바이오 잉크 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 제1 하이드로젤은 아크릴화-히알루론산 (HA-ac)이고, 상기 제2 하이드로젤은 타이라민화-히알루론산 (HA-Tyr) 인 것인, 바이오 잉크 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 아크릴화-히알루론산 (HA-ac)의 분자량은, 10kDa 내지 800kDa 인 것인, 바이오 잉크 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 바이오 잉크 조성물의 경화 후 경도는, 1×10^4 Pa 내지 1×10^6 Pa 인 것인, 바이오 잉크 조성물.

청구항 9

아크릴기를 포함하는 제1 하이드로젤 용액을 준비하는 단계;

페놀기를 포함하는 제2 하이드로젤 용액을 준비하는 단계;

상기 제1 하이드로젤 용액 및 제2 하이드로젤 용액을 혼합하는 단계; 및

상기 혼합물에, MMP에 의하여 절단 가능한 아미노산 서열과 말단에 시스테인을 포함하는 펩타이드, 과산화수소, 및 HRP (Horseradish peroxidase)를 첨가하는 단계;를 포함하는, 바이오 잉크 조성물 제조방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 제1 하이드로젤 용액을 준비하는 단계는, 아크릴기를 포함하는 제1 하이드로젤을 2 내지 15 중량%로 버퍼 용액에 용해하는 단계를 포함하고,

상기 제2 하이드로젤 용액을 준비하는 단계는, 페놀기를 포함하는 제2 하이드로젤을 1 내지 10 중량%로 버퍼 용액에 용해하는 단계를 포함하는 것인, 바이오 잉크 조성물 제조방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 제1 하이드로젤 용액 및 제2 하이드로젤 용액을 혼합하는 단계는,

상기 제1 하이드로젤 용액 및 제2 하이드로젤 용액을 1:1 내지 7:1 비율로 혼합하는 것인, 바이오 잉크 조성물 제조방법.

청구항 12

제9항에 있어서,

상기 과산화수소의 농도는 0.05 내지 1 mM 인 것인, 바이오 잉크 조성물 제조방법.

청구항 13

제9항에 있어서,

상기 제1 하이드로젤은 아크릴화-히알루론산 (HA-ac)이고, 상기 제2 하이드로젤은 타이라민-히알루론산 (HA-Tyr) 인 것인, 바이오 잉크 조성물 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 기능성 수화젤 기반의 초고속 경화 바이오 잉크 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는, 아크릴기를 포함하는 제1 하이드로젤 및 페놀기를 포함하는 제2 하이드로젤을 포함하는 바이오 잉크 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0001]

[0002] 3D 프린팅 기술이 발달함에 따라, 의료분야에서도 보청기나 치과 보철물 등과 같이 주문 제작이 필요한 제품을 제조하기 위해 3D 프린팅 기술을 이용되고 있다. 특히, 3D 프린팅의 주 방법인 적층 조형 방식은 환자 개개인에 대한 맞춤화가 필요한, 맞춤형 보청기, 치과 임플란트, 외과 임플란트와 같은 소형 의료품 제작에 널리 이용된다. 이러한 적층조형 기술은 자연 세포조직에서 찾아볼 수 없는 조직 고정을 위한 생체 적합 물질이나 골격의 삽입 없이 세포 배양체를 구성할 수 있는 특성 또한 갖고 있으므로, 활용 가능성이 높다. 비생물학적으로 응용하기 위해 설계된 3D 프린팅 기술에는 일반적으로 살아있는 세포 및 생체 물질과 호환되지 않는 유기용제나 가교제 등이 사용된다. 하지만, 3D 바이오 프린팅 기술에 있어서, 생물학적 재료와 잘 호환될 뿐 아니라 원하는 기계적, 기능적 특성을 가진 조직구조를 제공할 수 있는 물질을 찾는 것이 주요한 쟁점 중 하나이다.

[0003] 현재 자연적으로 유도된 중합체(동물 또는 인체조직에서 얻어진 alginate, gelatin, collagen, chitosan, fibrin and hyaluronic acid)나 합성 분자(polyethylene glycol)가 재생의학 분야에서 널리 사용되고 있다. 예를 들어, 인공혈관용 소재의 경우 혈관 내벽의 물성 및 화학적 특성, 물질전달 체계 등을 고려하여 열에 대해 안정적이고, 소독이 간편하며 뛰어난 소수성을 가진 Polytetrafluoroethylene (PTFE) 소재를 이용한다. 또한, 손상된 뼈나 경조직을 대체하고자 할 경우에는 스테인리스 스틸 또는 티타늄 소재를 이용하거나, 피부 재생에 이용하는 경우는 키토산(chitosan) 또는 콜라겐(collagen) 등의 바이오 소재를 이용하여 3D 프린팅 할 수 있다. 특히, 생체적합성이 뛰어난 키토산은 뼈세포의 활성을 자극하는 성질을 이용하여 뼈와 임플란트의 결합력을 높이는 코팅용으로 사용되고 있으며, 인산칼슘계 세라믹 물질인 수산화인회석(Hydroxyapatite)은 뼈 성장을 촉진하고 생체적합성과 골전도성이 좋아 골 대체물질로 활용되고 있다. 또한, 합성과정에서 친수성 및 흡수성의 합성 하이드로겔은 고유의 물리적 특성을 쉽게 제어할 수 있으므로 3D 바이오 프린팅 재생의학 분야에 활용도가 높아지고 있다. 하지만, 이러한 하이드로겔은 대부분 기계적 하중을 견디기 어려우며, 경화시간이 느려 특정 구조를 빠르게 형성하기 어렵다는 단점이 있다.

[0004] 한편, 조직공학 및 재생의학 분야에서는 치료 물질인 세포 및 성장인자들의 적절한 전달을 통하여 손상된 조직과 재생을 복원하기 위하여, 줄기세포의 생착률 및 분화 조정능을 생체 내에서 극대화시키기 위해 지지체를 이용한 다양한 방법에 관한 연구가 진행되고 있다. 효과적인 조직 재생을 위해서는 손상된 조직에 혈관이 생성되어야 하므로, VEGF(Vascular endothelial growth factor), FGF(Fibroblast growth factor), PDGF(Platelet-derived growth factor) 이나 EGF(Epidermal growth factor) 등의 다양한 성장인자를 포함시켜 혈관생성을 촉진시키는 기술들에 관한 연구가 필요하며, 예를 들면, 생체 내 활성에 따라 성장인자의 방출 정도가 조절되는 스마트 방출 지지체에 관한 기술이 재생의학 분야에서 유용하게 활용되고 있다. 특히, 이러한 지지체를 3D 프린팅 기술의 바이오 잉크에 적용하는 경우, 성장인자 및 세포의 활성을 유지할 수 있는 장기구조 재건 연구에도 활용될 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은, 성장인자 및 세포의 활성을 유지하는 동시에 경화속도를 단축하여 빠르게 3차원 구조를 형성할 수 있도록, 아크릴기를 포함하는 제1 하이드로겔 및 페놀기를 포함하는 제2 하이드로겔을 포함하는 바이오 잉크 조성물 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0006] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명의 제1 측면은, 아크릴기를 포함하는 제1 하이드로겔 및 페놀기를 포함하는 제2 하이드로겔을 포함하는, 바이오 잉크 조성물을 제공한다.

[0008] 일 실시예에 따르면, 상기 제1 하이드로겔은 2 내지 15 중량%로 포함되고, 상기 제2 하이드로겔은 1 내지 10 중량%로 포함되는 것일 수 있다.

[0009] 일 실시예에 따르면, 상기 제1 하이드로겔 및 제2 하이드로겔의 혼합 비율은 1:1 내지 7:1 인 것일 수 있다.

[0010] 일 실시예에 따르면, 상기 바이오 잉크 조성물은, MMP에 의하여 절단 가능한 아미노산 서열과 말단에 시스테인을 포함하는 펩타이드, 과산화수소, 및 HRP (Horseradish peroxidase)를 더 포함하는 것일 수 있다.

- [0011] 일 실시예에 따르면, 상기 과산화수소의 농도는 0.05 내지 0.1 mM 인 것일 수 있다.
- [0012] 일 실시예에 따르면, 상기 제1 하이드로젤은 아크릴화-히알루론산 (HA-ac)이고, 상기 제2 하이드로젤은 타이라민화-히알루론산 (HA-Tyr) 인 것일 수 있다.
- [0013] 일 실시예에 따르면, 상기 아크릴화-히알루론산 (HA-ac)의 분자량은, 10 kDa 내지 800 kDa 인 것일 수 있다.
- [0014] 일 실시예에 따르면, 상기 바이오 잉크 조성물의 경화 후 경도는, 1×10^4 Pa 내지 1×10^6 Pa 인 것일 수 있다.
- [0015] 본 발명의 제2 측면은, 아크릴기를 포함하는 제1 하이드로젤 용액을 준비하는 단계; 페놀기를 포함하는 제2 하이드로젤 용액을 준비하는 단계; 상기 제1 하이드로젤 용액 및 제2 하이드로젤 용액을 혼합하는 단계; 및 상기 혼합물에, MMP에 의하여 절단 가능한 아미노산 서열과 말단에 시스테인을 포함하는 펩타이드, 과산화수소, 및 HRP (Horseradish peroxidase)를 첨가하는 단계;를 포함하는 바이오 잉크 조성물 제조방법을 제공한다.
- [0016] 일 실시예에 따르면, 상기 제1 하이드로젤 용액을 준비하는 단계는, 아크릴기를 포함하는 제1 하이드로젤을 2 내지 15 중량%로 버퍼용액에 용해하는 단계를 포함하고, 상기 제2 하이드로젤 용액을 준비하는 단계는, 페놀기를 포함하는 제2 하이드로젤을 1 내지 10 중량%로 버퍼용액에 용해하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.
- [0017] 일 실시예에 따르면, 상기 제1 하이드로젤 용액 및 제2 하이드로젤 용액을 혼합하는 단계는, 상기 제1 하이드로젤 용액 및 제2 하이드로젤 용액을 1:1 내지 7:1 비율로 혼합하는 것일 수 있다.
- [0018] 일 실시예에 따르면, 상기 과산화수소의 농도는 0.05 내지 1 mM 인 것일 수 있다.
- [0019] 일 실시예에 따르면, 상기 제1 하이드로젤은 아크릴화-히알루론산 (HA-ac)이고, 상기 제2 하이드로젤은 타이라민-히알루론산 (HA-Tyr) 인 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명은, 아크릴기를 포함하는 제1 하이드로젤 및 페놀기를 포함하는 제2 하이드로젤을 포함하는 바이오 잉크 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 성장인자 및 세포의 활성을 유지하는 동시에 경화속도를 단축하여 빠르게 3차원 구조를 형성할 수 있으므로, 바이오 프린팅에 적용하여 적층으로 쌓아 구조물을 형성할 수 있고 프린팅 이후에도 구조물을 지탱할 수 있을 정도로 강도를 조절하는 것이 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오 잉크 조성물의 제조방법을 나타낸 모식도이다.
- 도 2는, 본 발명의 일 실시예에 따른 펩타이드 및 이를 포함하는 하이드로젤의 모식도이다.
- 도 3은, 본 발명의 일 실시예에 따른 과산화수소 농도에 대한 세포 독성 실험을 나타내는 사진이다.
- 도 4는, 본 발명의 일 실시예에 따른 각 구성요소의 농도 및 비율에 따른 젤화 시간을 나타낸 것이다.
- 도 5는, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오 잉크의 레올로지 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 각 도면에 제시된 동일한 참조 부호는 동일한 부재를 나타낸다.
- [0023] 아래 설명하는 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있다. 아래 설명하는 실시예들은 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 이들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0024] 실시예에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 실시예를 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0025] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일

반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

- [0026] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조 부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0027] 본 발명의 제1 측면은, 아크릴기를 포함하는 제1 하이드로젤 및 페놀기를 포함하는 제2 하이드로젤을 포함하는, 바이오 잉크 조성물을 제공한다.
- [0028] 본 발명에서 사용되는 "하이드로젤"이란, 약물전달체계 또는 생체 조직적 합성재료 등의 의료용 재료로 사용 가능한 수팽윤성 고분자를 의미한다. 이러한 수팽윤성 고분자는 물을 흡수하나 물에 용해되지 않는 고분자 즉 충분한 양의 수분을 보유하고 있는 친수성 고분자를 말하며, 이는 히알루론산(hyaluronic acid, HA), 콜라겐 등의 천연고분자와 폴리비닐알코올(poly(vinyl alcohol), PVA), 폴리하이드록시에틸메타아크릴레이트(poly(hydroxyethylmethacrylate), PHEMA) 등의 합성 고분자 등을 이용하여 제조할 수 있다.
- [0029] 본 발명에서 사용될 수 있는 하이드로젤은, 바람직하게는, 히알루론산 기반의 하이드로젤이다. 상기의 히알루론산은 생분해성, 생체적합성 재료로써 약 1,000 내지 10,000,000 g/mole의 넓은 분자량 범위를 갖는 천연고분자이다. 이러한 히알루론산은 결합 조직의 세포외 기질(Extracellular matrix, ECM)의 주요 구성성분으로 독특한 점탄성 특성과 생물학적 기능으로 관절염 치료, 안과수술, 약물전달과 조직공학적 응용에 유용한 재료로써 연구되고 있으며, 조직의 수화를 조절하고 ECM 내의 콜라겐섬유와 수화된 네트워크를 이루고 있으며, 또한 상처치유와 그 과정에서 세포의 이동성과 분화에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.
- [0030] 본 발명의 바이오 잉크 조성물은, 아크릴기를 포함하는 제1 하이드로젤을 포함한다. 제1 하이드로젤의 아크릴기는, C' 말단에 시스테인 아미노산을 갖는 폴리펩타이드와 결합할 수 있으며, 보다 상세하게는 시스테인의 SH기와 아크릴기가 아마이드 결합을 형성할 수 있다. 하이드로젤에 아크릴기를 도입하기 위하여, HOBT (1-hydroxybenzotriazole hydrate), EDC(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide), ADH (adipic acid dihydrazide), 및 NAS (N-Acryloxysuccinimide)로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나 이상이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 예를 들면, 히알루론산에 HOBT와 EDC, ADH (adipic acid dihydrazide)를 반응시키고 투석 후 NAS (N-Acryloxysuccinimide)를 반응시켜, 하이드로젤에 아크릴을 도입할 수 있다. 상기 아크릴기가 도입된 제1 하이드로젤의 분자량은 10kDa 내지 800kDa일 수 있으며, 바람직하게는 50kDa 내지 300kDa 일 수 있다.
- [0031] 본 발명의 바이오 잉크 조성물은, 페놀기를 포함하는 제2 하이드로젤을 포함한다. 페놀기를 포함하는 제2 하이드로젤은 과산화수소 및 HRP (호스래디시 퍼옥시데이즈: horseradish peroxidase)와 반응하여 경화될 수 있다. 하이드로젤에 페놀기를 도입하기 위하여, 타이라민(Tyramine), 하이드록시페닐아세트산, 하이드록시프로피온산 및 이의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나가 사용될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 예를 들면, 히알루론산에 페놀기를 갖는 타이라민(Tyramine)도입하는 경우에는, EDC·HCL (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide, hydrochloride) 와 NHS (N-hydroxysuccinimide) 를 이용하여 히알루론산의 카르복실기와 타이라민의 아민그룹이 결합하도록 유도할 수 있다. 상기 페놀기가 도입된 제2 하이드로젤의 분자량은 50kDa 내지 300kDa 일 수 있으며, 바람직하게는, 90 kDa 내지 200kDa 일 수 있다.
- [0032] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 제1 하이드로젤은 아크릴화-히알루론산 (HA-ac)이고, 상기 제2 하이드로젤은 타이라민화-히알루론산 (HA-Tyr) 인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0033] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 제1 하이드로젤은 2 내지 15 중량%로 포함되고, 상기 제2 하이드로젤은 1 내지 10 중량%로 포함되는 것일 수 있다. 상기 제1 하이드로젤의 함량은 분자량에 따라서 달라질 수 있으며, 예를 들면, 50 kDa 인 경우에는 8 내지 12 중량%, 230 kDa 인 경우에는 3 내지 5 중량%, 또는 800 kDa 인 경우에는 2 내지 3 중량%로 포함될 수 있다. 또한, 제2 하이드로젤은 1 내지 10 중량%로 포함될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 제1 하이드로젤 및 제2 하이드로젤의 혼합 비율은 1:1 내지 7:1 인 것일 수 있다. 상기 제1 하이드로젤 및 제2 하이드로젤의 혼합 비율에 따라서 경화되는 시간이 달라질 수 있으며, 예를 들면, 제1 하이드로젤 및 제2 하이드로젤의 혼합 비율이 1:1인 경우 경화 시간이 100 내지 120초일 수 있으며, 제1 하이드로젤 및 제2 하이드로젤의 혼합 비율이 7:1 인 경우 3 내지 10초 일 수 있다.
- [0035] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 바이오 잉크 조성물은, MMP에 의하여 절단 가능한 아미노산 서열과 말단에

시스테인을 포함하는 펩타이드, 과산화수소, 및 HRP (Horseradish peroxidase)를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0036] 본 발명의 바이오 잉크 조성물에 포함될 수 있는, 상기 MMP에 의하여 절단 가능한 아미노산 서열과 말단에 시스테인을 포함하는 펩타이드로서, 이는 기능성 펩타이드 C 말단에 Cysteine이 추가된 합성 펩타이드이다. 상기 펩타이드를 구성하는 아미노산의 수에는 제한이 없으나, 바람직하게는 10 내지 300개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드가 바람직하다. 본 발명에서 사용될 수 있는 펩타이드는, 예를 들면, 티모신 베타-4 유래 Ac-SDKP 펩타이드, (AcSDKPDGPQGIWQC), Substance P (RPKPQQFFGLMC), BMP-7 펩타이드 (GQGFSPYKAVFSTQC), Osteopontin (PSKSNEASHDMDMDDC)의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, 또는 플라스민에 의하여 절단 가능한 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드일 수 있다

[0037] 본 발명에서 사용된 용어, "MMP"는 세포의 기질을 용해하는 효소로, 체내에 존재하는 4대 단백분해효소 (seminethreonine-, aspartic-, cysteine-, metalloproteinase)의 하나이며, 본 발명에서 사용된 용어, "플라스민"은 혈액 속에 존재하는 단백질 분해효소로서 예컨대, 혈액응고에 관여하는 피브리원을 용해하는 단백분해효소이다. 또한, 본 발명에서 사용된 용어, "티모신 베타-4(Thymosin beta-4)"는 4.9 kDa 크기의 43개의 아미노산으로 구성된 생체 내에 존재하는 아주 작은 크기의 단백질로서 상기의 티모신 베�타-4 단백질은 날개의 분리된 형태의 G-액틴(Gactin)과 결합하여 G-액틴이 결합된 형태인 F-액틴(F-actin)을 형성하는 것을 막아주는 기능을 담당하며 이러한 G-액틴과 F-액틴의 전환을 조절하여 액틴세포골격(actin cytoskeleton)의 구조를 변경하고 세포의 이동을 조절하는 역할을 하는 단백질이다.

[0038] 본 발명에서 사용될 수 있는 펩타이드는, 티모신 베타-4 유래 Ac-SDKP 펩타이드와 MMP 또는 플라스민에 의해 절단 가능한 펩타이드 사이에 펩티다제(peptidase) 절단을 위한 D(Aspartic acid, Asp) 아미노산이 더 포함할 수 있으며, 이로 인하여, 인체 내에서 프로틸 엔도펩티다제 혹은 Asp-N-like protease에 의해 절단되어 Ac-SDKP 펩타이드가 방출 될 수 있다. 또한, 상기 MMP 또는 플라스민에 의해 절단 가능한 펩타이드는 당업계에서 MMP 또는 플라스민의 절단부위로 알려진 어떤 펩타이드 서열도 가능하며, 예를 들면 MMP의 경우 GPQGIWQ, 플라스민의 경우 LKMKPM 일 수 있다. 특히, MMP 절단부위를 갖는 경우 MMP에 의해 절단되어 Ac-SDKP 펩타이드를 타겟부위에 효과적으로 방출시킬 수 있다. 그리고, 상기 티모신 베타-4 유래 Ac-SDKP 펩타이드는 아세틸화된 것이 바람직하다.

[0039] 본 발명의 일측에 따른, 티모신 베타-4 유래 Ac-SDKP 펩타이드(Ac-SDKP-D-GPQG-IWQ-C, MW 1529.6) 는 말단의 시스테인 아미노산으로 인하여, 아크릴기를 포함하는 제1 하이드로젤과 결합할 수 있으며, 과산화수소 및 HRP는 페놀기를 포함하는 제2 하이드로젤과 결합할 수 있으므로, 이들은 제1 하이드로젤 및 제2 하이드로젤의 가교제로서의 역할을 수행한다.

[0040] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 과산화수소의 농도는 0.05 내지 0.1 mM 인 것일 수 있다. 과산화수소는 세포 독성을 갖는 물질로서, 0.1mM 보다 높은 농도에서는 세포의 생존율이 저하될 수 있으며, 0.05mM 보다 낮은 농도로 포함되는 경우에는 젤의 경화가 적절하게 이뤄지지 않을 수 있다는 문제점이 있다.

[0041] 또한, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 HRP는 세포 독성을 크게 갖는 물질은 아니지만, 농도에 따라서 젤의 경화시간에 영향을 줄 수 있는 바, 1unit 내지 10unit 으로 포함되는 것이 바람직하다.

[0042] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 바이오 잉크 조성물은 가교제로 PEG(Poly Ethylene Glycol), 또는 티올레이트 폴리 에틸렌 클리콜 PEG-SH₄를 더 포함할 수 있다.

[0043] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 바이오 잉크 조성물의 경화 후 측정되는 경도는, 1x10⁴ Pa 내지 1x10⁶ Pa 인 것일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오 잉크 조성물의 경도는 하이드로젤의 농도, 혼합 비율, 과산화수소의 농도 등을 이용하여 조절할 수 있으며, 프린팅 이후에도 구조물을 지탱할 수 있는 강한 강도를 가질 수 있도록 조절하는 것 또한 가능하다.

[0044]

[0045] 본 발명의 제2 측면은, 아크릴기를 포함하는 제1 하이드로젤 용액을 준비하는 단계; 페놀기를 포함하는 제2 하이드로젤 용액을 준비하는 단계; 상기 제1 하이드로젤 용액 및 제2 하이드로젤 용액을 혼합하는 단계; 및 상기 혼합물에, MMP에 의하여 절단 가능한 아미노산 서열과 말단에 시스테인을 포함하는 펩타이드, 과산화수소, 및 HRP (Horseradish peroxidase)를 첨가하는 단계;를 포함하는 바이오 잉크 조성물 제조방법을 제공한다.

[0046] 도 1은, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오 잉크 조성물의 제조방법을 나타낸 모식도 이다.

- [0047] 본 발명의 바이오 잉크 조성물 제공방법은, 아크릴기를 포함하는 제1 하이드로젤 용액과 폐놀기를 포함하는 제2 하이드로젤 용액을 각각 준비하는 단계를 포함한다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 제1 하이드로젤을 준비하는 단계는, 아크릴기를 포함하는 제1 하이드로젤을 2 내지 15 중량%로 버퍼용액에 용해하는 단계를 포함하고, 상기 제2 하이드로젤을 준비하는 단계는, 폐놀기를 포함하는 제2 하이드로젤을 1 내지 10 중량%로 버퍼용액에 용해하는 단계를 포함하는 것일 수 있다. 상기 제1 하이드로젤 또는 제2 하이드로젤이 버퍼 용액에 각각 용해되는 함량은 하이드로젤의 분자량에 따라 달라질 수 있다. 예를 들면, 하이드로젤이 50 kDa인 경우에는 8 내지 12 중량%, 230 kDa인 경우에는 3 내지 5 중량 %, 또는 800 kDa인 경우에는 2 내지 3 중량 %로 포함될 수 있다.
- [0048] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 제1 하이드로젤 용액 및 제2 하이드로젤 용액을 혼합하는 단계는, 상기 제1 하이드로젤 용액 및 제2 하이드로젤 용액을 1:1 내지 7:1 비율로 혼합하는 것일 수 있다. 상기 제1 하이드로젤 및 제2 하이드로젤의 혼합 비율에 따라서 경화되는 시간이 달라질 수 있으며, 예를 들면, 제1 하이드로젤 및 제2 하이드로젤의 혼합 비율이 1:1인 경우 경화 시간이 100 내지 120초일 수 있으며, 제1 하이드로젤 및 제2 하이드로젤의 혼합 비율이 7:1 인 경우 3 내지 10초 일 수 있다.
- [0049] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 과산화수소의 농도는 0.05 내지 1 mM 인 것일 수 있다. 과산화수소는 세포 독성을 갖는 물질로서, 0.1mM 보다 높은 농도에서는 세포의 생존율이 저하될 수 있으며, 0.05mM 보다 낮은 농도로 포함되는 경우에는 젤의 경화가 적절하게 이뤄지지 않을 수 있다는 문제점이 있다.
- [0050] 또한, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 HRP는 세포 독성을 크게 갖는 물질은 아니지만, 농도에 따라서 젤의 경화시간에 영향을 줄 수 있는 바, 1unit 내지 10unit 으로 포함되는 것이 바람직하다.
- [0051] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 제1 하이드로젤은 아크릴화-히알루론산 (HA-ac)이고, 상기 제2 하이드로젤은 타이라민-히알루론산 (HA-Tyr) 인 것일 수 있다.
- [0052] <제조예 1: 아크릴화 하이드로젤의 제조>
- [0053] 히알루론산(Lifecore Biomedical Co., Chaska, MN, USA)을 증류수 40 ml에 용해시켜 0.25 mmole의 히알루론산 용액을 만든 후, EDC(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide) (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) (0.24 g, 1.25 mmole), HOBT(1-hydroxybenzotriazole hydrate) (Fluka Chemical Co., Buchs, Switzerland) (0.17 g, 1.25 mmole)의 존재 하에 아디프산 디하이드라지드(adipic acid dihydrazide) (Fluka Chemical Co., Buchs, Switzerland) (2.2 g, 12.5 mmole)와 상온에서 8시간 동안 반응시킨다. 이어서, 투석 막(MWCO 14,000, SpectraPor; Rancho Dominguez, CA, USA)을 사용하여 상기에 제조된 반응물을 100 mM의 NaCl용액에서 2.5일 동안 투석시킨 후, 증류수에서 다시 1일 동안 투석시킨다. 투석시킨 반응물에 NAS(NAcryloxysuccinimide) (Polyscience, Inc., Warrington, PA, USA) (0.5 g, 3 mmole)을 첨가하여 12시간 동안 반응시킨다. 상기의 제조된 반응물을 100 mM의 NaCl용액에서 2.5일 동안 투석시킨 후, 증류수에서 다시 1일 동안 투석시킨다. 이어서, 3일 동안 동결건조 하여 분말상태의 아크릴화된 히알루론산을 얻어낸다. 이 후, 하이드로젤 용액의 제조를 위해 아크릴화된 히알루론산을 트리에탄올아민-완충 용액 (TEA; 0.3 M, pH 8)에 넣고 용해시켰다.
- [0054] 하이드로젤 용액을 젤화하려면, 가교제인 티올레이티드 폴리 에틸렌 글리콜 PEG-SH4 (MW 10,000)을 아크릴 그룹과 티올 그룹의 몰 비가 1:1이 되게 첨가시킨다. 이어서, 펩타이드(Ac-SDKP-D-GPQG-IWGQC, MW 1529.6) 고정화를 위해 생리식염수에 녹인 펩타이드 용액을 반응 혼합물과 혼합시켜 용액상태에서 젤 형태로 제조할 수 있다.
- [0055] 도 2는, 본 발명의 일 실시예에 따른 펩타이드 및 이를 포함하는 하이드로젤의 모식도이다.
- [0056] <실시예 1: 기능성 수화젤 기반의 초고속 경화 바이오 잉크의 세포 독성 실험>
- [0057] 상기 제조예를 통하여 합성한 50kDa의 히알루론산 HA-ac를 10wt%로 TEA 버퍼에 용해하고, HA-tyr 은 3 중량%로 PBS에 용해하였다. 두 용액을 HA-ac : HA-tyr = 7:1 비율로 섞어주고 이 혼합물에 fibroblast을 1×10^6 /100ul 추가하였다. 세포가 섞여있는 용액에 히알루론산에 결합된 아크릴기를 고려하여 MMP-senstive peptide를 계산한 후에 첨가해주었고 (예: 합성을 통해 17% 아크릴기가 붙은 HA-ac 로 10wt% 100ul 하이드로젤을 만들기 위해서는 가교제인 MMP-senstive peptide를 2.7mg를 20ul 의 TEA 버퍼에 녹여 HA-ac 7.3mg/80ul 와 섞어주어야 함), HRP는 1.25unit 으로 고정하여 주고, H2O의 농도는 1.2mM, 0.6mM, 0.1mM, 0.06mM 으로 각각 첨가한 후 경화시켰다. 경화 된 바이오 잉크 수화젤은 DMEM (FBS10%, antibiotic 1%) 배지에서 3일 동안 배양 후 Live

and Dead kit을 이용하여 세포 독성 실험을 실시하였다.

[0058] 도 3은, 본 발명의 일 실시예에 따른 과산화수소 농도에 대한 세포 독성 실험을 나타내는 사진이다.

[0059] 도 3을 참고하면, 과산화수소의 농도가 1.2mM 또는 0.06mM 인 경우에 세포의 생존률이 저하되어 있는 것을 알 수 있다.

[0060] <실시예 2: 기능성 수화젤 기반의 초고속 경화 바이오 잉크의 경화 속도 테스트>

[0061] 분자량을 230kDa 또는 50kDa 로 갖는 히알루론산을 준비하여, 제1 하이드로젤과 제2 하이드로젤의 농도, 비율, 과산화수소 농도, HRP 농도에 따른 젤화 시간(gelation time)을 테스트 하였다. 분자량을 230kDa 또는 50kDa 갖는 HA-ac을 2.2mg의 TEA 버퍼 90ul에 용해하고, 가교제인 MMP sensitive peptide는 0.8mg의 TEA 버퍼 10ul 용해하였다. HA-tyr는 3mg를 준비하여 PBS 100ul에 용해하였다. 과산화수소는 200ul의 최종 젤 용액 내에서 각각 1mM, 5mM, 10mM 이 되도록 준비하고, HRP 는 5unit 과 10unit/200ul gel 의 농도로 PBS 에 용해하여 준비하였다. 준비된 용액들을 각각의 비율에 따라 혼합하였다. (예를 들면, 1:1로 혼합되는 경우, HA-ac 90ul + MMPs 10ul + HA-tyr 80ul + H₂O₂ 10ul + HRP 10ul 를 혼합하였으며, 4:1로 혼합하는 경우에는 HA-ac 144ul + MMPs 16ul + HA-tyr 32ul + H₂O₂ 4ul + HRP 4ul 로 혼합하였다.)

[0062] 도 4는, 본 발명의 일 실시예에 따른 각 구성요소의 농도 및 비율에 따른 젤화 시간을 나타낸 것이다.

[0063] 도 4를 참고하면, 230kDa의 HA-ac 3wt% 와 3%의 HA-tyr 을 1:1로 섞어주고, 과산화수소 5mM 에 HRP 5unit를 혼합하였을 경우에 젤화 시간은 30초 였다. 젤화 시간을 단축하기 위하여 과산화수소와 HRP 의 농도를 10mM 과 10unit 으로 혼합하였을 경우에는, 젤화 시간은 5초 이내로 단축되었으며, 반대로 과산화수소와 HRP 농도를 각각 1mM 과 5unit 으로 혼합하였을 경우에는 젤화 시간이 1분 30초로 증가되었다. 50kD의 HA-ac를 사용한 경우, 6wt% 의 하이드로젤 용액으로 준비한 후에 3% HA-tyr을 1:1 로 섞어주고, 과산화수소 5mM 에 HRP 5unit를 혼합하였을 경우에 젤화 시간은 2분 이상 소요되었고, 매우 소프트 한 상태의 젤이 형성되었다. 반면에, HA-ac의 함량을 12wt%로 포함하는 하이드로젤 용액을 준비하여, 과산화수소 5mM 에 HRP 5unit를 혼합하였을 경우에 젤화 시간은 5초 이내로 단축되었으며 강도 또한 매우 강한 것으로 측정되었다. HA-ac 와 HA-tyr의 혼합 비율을 1:1에서 3:1 로 조정하고, 세포 독성을 최소화하기 위하여 과산화수소의 농도를 1mM로 감소시키고, 반면 HRP 농도를 10unit로 하여 혼합하였을 경우에는 젤화 시간이 10초 이내였고 강도 또한 강한 것으로 측정되었다.

[0064] <실시예 3: 기능성 수화젤 기반의 초고속 경화 바이오 잉크의 경화 속도 테스트>

[0065] 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오 잉크의 물리적 특성을 측정하기 위하여 레오미터 (rheometer)를 실시하였다. 제1 하이드로젤과 제2 하이드로젤은, 각각 HA-ac 10wt%와 HA-tyr 3%로 준비하였고, 7:1의 비율로 혼합하였다. 과산화수소는 0.1mM 과 0.6mM 두 종류로 준비하여 혼합되었으며, HRP 의 농도는 1.25unit /200ul 로 고정하였다. 준비된 용액들은, 레오미터 측정 바로 직전에 혼합하였으며, 회전형 레오미터를 이용하여 37도 상에서 수화 젤을 형성시키며 값을 모니터 하였다.

[0066] 도 5는, 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오 잉크의 레올로지 그래프이다.

[0067] 도 5를 참고하면, 각각의 하이드로젤 용액의 물리적 특성을 분석한 결과, 과산화수소의 농도가 다른 두 조건 모두 측정 시작하자마자 젤화가 급속도로 이루어지며 1×10^4 Pa 이상의 단단한 강도의 수화젤이 형성되었다.

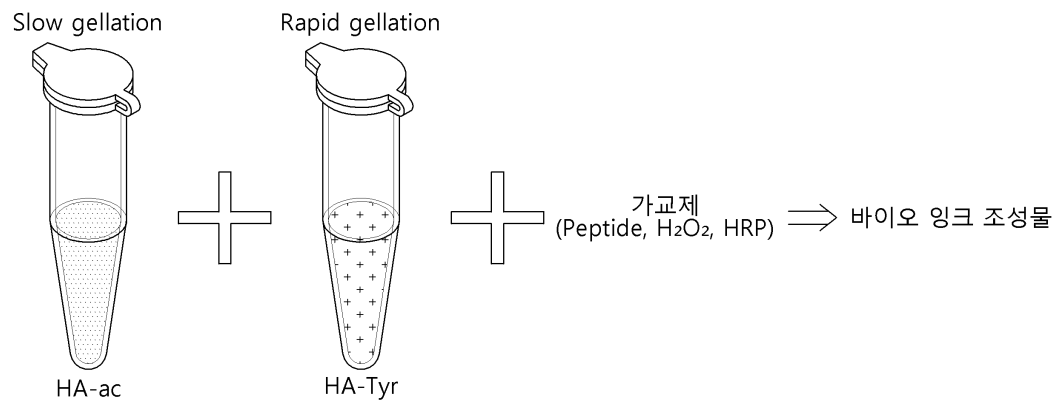
[0068] 따라서 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오 잉크 조성물은, 바이오 프린팅에적용하더라도 빠른 젤화 시간으로 인하여 프린팅을 적층으로 쌓는 것이 가능하고, 프린팅 이후에도 구조물을 지탱할 수 있는 강도를 가질 수 있도록 조절하는 것이 가능하다.

[0069] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기의 기재로부터 다양한 수정 및 변형이 가능하다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

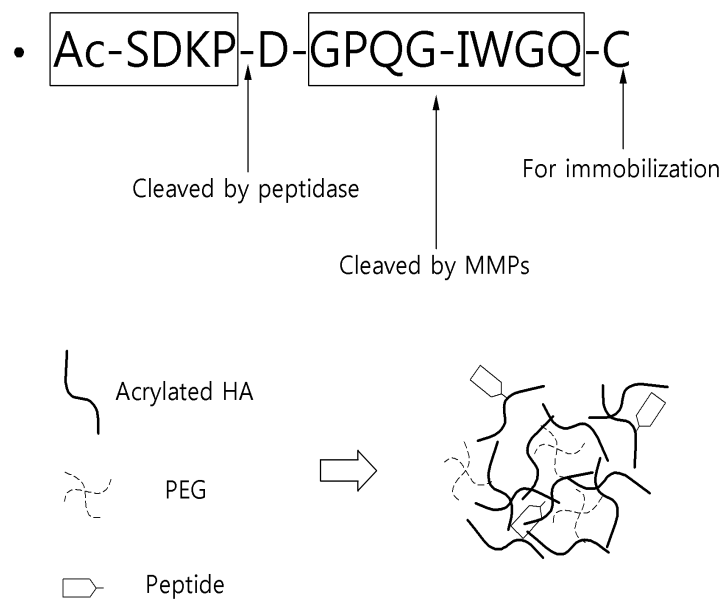
[0070] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 특허청구범위의 범위에 속한다.

도면

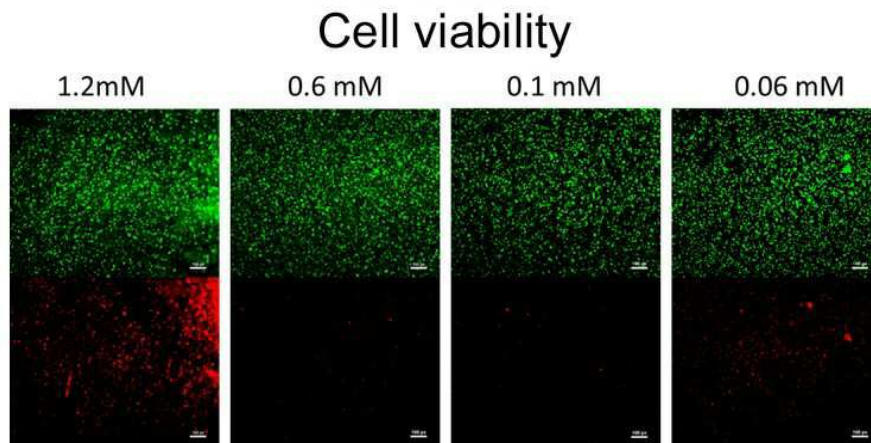
도면1



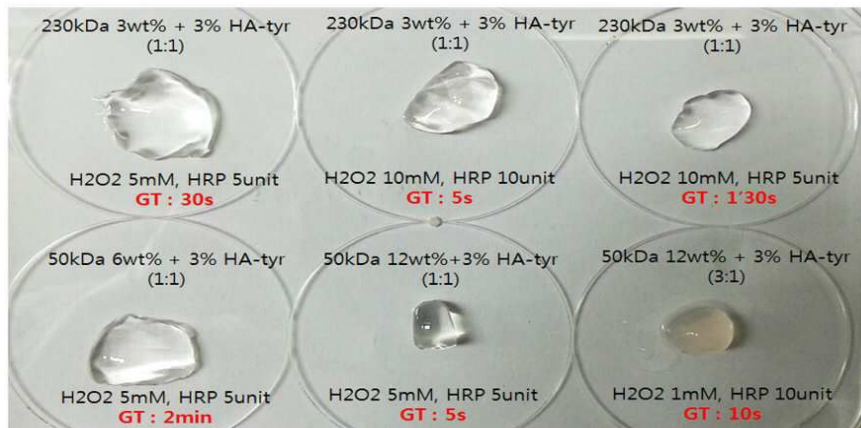
도면2



도면3



도면4



* GT ; Gelation time

도면5

