



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년12월04일

(11) 등록번호 10-2186108

(24) 등록일자 2020년11월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61L 27/56 (2006.01) A61L 27/14 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01) A61L 27/52 (2006.01)

C08J 3/075 (2006.01) C12N 5/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61L 27/56 (2013.01)

A61L 27/14 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0117619

(22) 출원일자 2018년10월02일

심사청구일자 2018년10월02일

(65) 공개번호 10-2020-0038374

(43) 공개일자 2020년04월13일

(56) 선행기술조사문헌

Yong Seok Kim et al., "Highly conductive and hydrate PEG-based hydrogels for the potential application of a tissue engineering scaffold", Reactive and Functional Polymer, Vol.109, pp.15-22*

KR101578936 B1*

KR1020150084519 A

WO2007109134 A2

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

고원건

서울특별시 서초구 효령로 164

김중백

경기도 고양시 일산동구 노루목로 79, 403동 201호(장항동, 호수마을4단지아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인다나

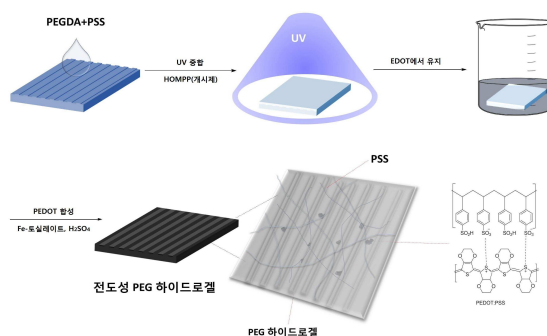
전체 청구항 수 : 총 9 항

심사관 : 이수희

(54) 발명의 명칭 마이크로 패터닝된 전도성 하이드로겔 하이브리드 시스템 스캐폴드 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 포토리소그래피를 이용하여 하이드로겔 표면에 마이크로 패터닝을 부여하고, 전도성 고분자를 반상호 침투 구조체로 중합함으로써 물리적 자극 및 전기적 자극을 동시에 부여할 수 있어, 세포와 세포 사이의 커뮤니케이션 및 세포반응에 보다 효과적으로 작용할 수 있는 스캐폴드 및 상기 스캐폴드의 제조방법에 관한 것이다.

대표도

(52) CPC특허분류

A61L 27/3826 (2013.01)
A61L 27/383 (2013.01)
A61L 27/52 (2013.01)
C08J 3/075 (2013.01)
C08J 7/18 (2013.01)
C12N 5/0068 (2013.01)
G03F 7/2012 (2013.01)
H01L 21/0274 (2013.01)
C08J 2205/022 (2013.01)

(72) 발명자

공혜연

서울특별시 서대문구 연희로12길 10-10, 301호(연
희동)

조강희

충청남도 부여군 장암면 의자로599번길 28

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

돌출부와 오목부가 반복되는 마이크로 패턴이 표면에 형성된 하이드로겔; 및
상기 하이드로겔의 마이크로 패턴 표면에 형성된 전도성 고분자를 포함하고,
상기 전도성 고분자는 반상호 침투 구조체(semi-interpenetration network)이고,
상기 마이크로 패턴의 돌출부 폭과 오목부 폭의 비율은 1 내지 3이며,
오목부 폭은 1 내지 3 μm 인 스캐폴드.

청구항 2

제 1 항에 있어서,
전도성 고분자 물질은 폴리(3,4-에틸렌디옥시티오펜):폴리스티렌설포산, 폴리피롤:폴리스티렌설포산 및 폴리티오펜:폴리스티렌설포산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 종 이상인 스캐폴드.

청구항 3

삭제

청구항 4

제 1 항에 있어서,
스캐폴드는 5-아지도-2-니트로벤조산 N-하이드록시숙신이미드 에스테르로 표면개질된 것인 스캐폴드.

청구항 5

제 1 항에 있어서,
스캐폴드의 전기전도도는 0.001 내지 0.020 S/cm인 스캐폴드.

청구항 6

제 1 항에 있어서,
하이드로겔은 폴리에틸렌글리콜, 폴리에틸렌옥사이드, 폴리하이드록시에틸메타크릴레이트, 폴리아크릴산, 폴리비닐알코올, 폴리(N-이소프로필아크릴아미드), 폴리비닐피롤리돈, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 폴리카프로락톤, 콜라겐, 젤라틴, 피브린, 히알루론산, 알지네이트, 카라기난, 키토산, 하이드록시알킬셀룰로오스, 알킬셀룰로오스, 실리콘, 고무, 아가, 카르복시비닐 공중합체, 폴리디옥솔란, 폴리아크릴아세테이트, 폴리비닐클로라이드 및 무수말레인산/비닐에테르로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 종 이상의 친수성 고분자 또는 이들의 공중합체 또는 이들의 혼합물을 포함하는 스캐폴드.

청구항 7

표면에 돌출부와 오목부가 반복되는 마이크로 패턴이 형성된 하이드로겔과 전도성 고분자 전구체 용액을 반응시

켜 상기 마이크로 패턴이 형성된 하이드로겔 상에 반상호 침투 구조체 전도성 고분자를 중합하는 것을 포함하는 스캐폴드의 제조방법으로서,

상기 마이크로 패턴의 돌출부 폭과 오목부 폭의 비율은 1 내지 3이며, 오목부 폭은 1 내지 3 μm 인 스캐폴드의 제조방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

하이드로겔의 표면에 돌출부와 오목부가 반복되는 마이크로 패턴을 형성하는 것은 포토리소그래피 또는 소프트 리소그래피로 패터닝하는 것인 스캐폴드의 제조방법.

청구항 9

제 7 항에 있어서,

마이크로 패턴이 형성된 하이드로겔 상에 전도성 고분자를 중합한 후,

상기 전도성 고분자가 중합된 하이드로겔에 NHS 작용기를 도입하고 RGD 펩타이드 용액과 반응시켜, 표면을 개질하는 것을 추가 포함하는 스캐폴드의 제조방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

전도성 고분자가 중합된 하이드로겔에 NHS 작용기를 도입하는 것은,

상기 전도성 고분자가 중합된 하이드로겔 상에 5-아지도-2-니트로벤조산 N-하이드록시숙신이미드 에스테르 함유 용액을 도포한 후, UV 광을 조사하는 것인 스캐폴드의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 마이크로 패턴된 전도성 하이드로겔 하이브리드 시스템 스캐폴드 및 상기 스캐폴드의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 조직공학은 체외에서 조직을 배양한 후 체내에 이식하여 조직을 재생 및 치료하여 생체의 기능을 유지, 복원 또는 향상을 목적으로 하는 학문이다. 조직공학에서는 체외에서 세포를 배양한 후 조직을 구축하고 세포기능 제어를 위해 인공적으로 만든 세포 외 기질(extracellular matrix) 모사체인 스캐폴드라는 지지체가 필요하다.

[0004] 세포와 세포 외 기질의 상호작용에 의해 생체조직은 형태를 유지하고 기능을 수행할 수 있다. 이러한 세포 외 기질을 체외에서 모방한 것이 스캐폴드이다. 대표적인 스캐폴드는 나노 섬유, 다공성 스폰지, 그리고 하이드로겔이 있다. 스캐폴드는 생체적합성이 우수하고 세포독성이 없어야 하며 기계적 강도 및 물리적 특성이 세포외 기질과 비슷한 성질을 나타내야 한다.

[0005] 심근세포, 신경세포 및 근육세포 등은 전기적 방식을 통하여 신호를 전달하고 이는 세포와 세포 사이의 커뮤니케이션을 가능하게 하며, 또한 세포와 세포사이의 상호작용에 긍정적인 영향을 미쳐 세포가 조직으로 분화되는 것을 도와 새로운 조직의 형성을 촉진한다. 한편, 심근 및 신경, 근육 세포들은 한번 손상이 가해지면 자가 재생이 힘든 세포로 정상 상태로 회복하기까지 오랜 시간이 걸리고 대부분 회복되지 못하는 영구적인 손상상태로 존재하며, 그에 따른 합병증으로 인한 사망률이 증가하는 추세이다. 따라서, 이러한 세포를 재생시키기 위해 조

직공학적 접근방법이 필수적이며 이러한 세포들이 올바르게 조직을 구축할 수 있도록 스캐폴드에 전기전도성을 부여해 주는 것이 필요하다. 최근 바이오메디컬 분야의 연구에서는 수화된 3 차원 구조에 전기적 기능을 결합한 전도성 하이드로겔이 큰 관심을 모으고 있다.

[0006] 하이드로겔에 전도성을 부여하는 방법으로는 크게 두가지로 나뉜다. 첫 번째로는 하이브리드 시스템으로 하이드로겔을 먼저 제조한 후 하이드로겔 내부에서 전도성 고분자를 중합하는 방법이다. 두 번째 방법은 전도성 고분자를 자기조립 하거나 또는 3 차원 가교를 할 수 있는 작용기를 부여하여 단일 전도성 고분자를 연속상으로 하는 하이드로겔을 제조하는 것이다.

[0007] 생체재료의 다양한 표면을 특히 마이크로 또는 나노 스케일로 조절하면 세포의 모폴로지, 부착, 이동 등 세포의 기능을 조절할 수 있고, 이러한 세포의 행동양상이 증식 및 분화에 긍정적인 영향을 줄 수 있다. 위상적 요소(topological cue)의 영향은 세포의 종류, 모양 및 위상 형상의 크기 등에 따라 달라질 수 있으며, 위상을 생체에 더욱 가깝게 모방할수록 형질이 체내의 세포와 비슷해진다. 마이크로-나노 제작기술(micro- and nano-fabrication)이 도래함에 따라 세포 배양 플랫폼에서도 세포의 형상, 증식 그리고 분화에 대한 다양한 위상의 효과가 연구되었다. 최근 생화학적 신호 뿐만아니라 형태학, 강도와 같은 물리적인 변수도 스캐폴드의 중요한 요소로 대두되고 있다. Wang 등은 마이크로 패턴이 골격근세포의 증식을 억제하고 분화 능력을 향상시킨다는 것을 보여주었다. 나노패턴은 세포크기보다 훨씬 작기 때문에 세포의 위치 조절이 불가능하다는 단점이 있어, 정확하게 세포의 위치를 조절하려면 마이크로 패턴이 적합하다.

[0008] Fu 등은 PDMS 상에 마이크로 패턴의 높이와 거리에 따라 골육종세포의 퍼짐양상과 부착에 영향을 대해서 연구하였고 홈의 거리가 퍼진 세포크기와 상응할 때 마이크로 패턴방향을 따라서 세포가 배열된다는 것을 보여주었다. 그러나, 이 패턴은 세포를 기하학 구조안에 가두므로 분리된 마이크로 패턴은 개개의 세포들 사이의 계면이 접촉할 수 없게 되어 세포와 세포사이의 상호작용을 약하게 만든다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0010] (비특허문헌 0001) Modulation of Alignment and Differentiation of Skeletal Myoblasts by Submicron Ridges/Grooves Surface Structure, Biotechnology and Bioengineering, 106: 285-294 (2010).

(비특허문헌 0002) Fu G, Soboyejo WO (2009) Cell/surface interactions of human osteo-sarcoma (HOS) cells and micro-patterned polydimethylsiloxane (PDMS) surfaces, Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications 29: 2011-2018.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 마이크로 패턴된 전도성 하이드로겔 하이브리드 시스템 스캐폴드 및 상기 스캐폴드의 제조방법을 제공하고자 한다.

[0012] 또한, 본 발명은 포토리소그래피(photolithography)를 이용하여 하이드로겔 표면에 마이크로 패턴을 부여하고, 전도성 고분자를 반상호 침투 구조체(semi-interpenetration network)로 중합함으로써 물리적 자극 및 전기적 자극을 동시에 부여할 수 있어, 세포와 세포 사이의 커뮤니케이션 및 세포반응에 보다 효과적으로 작용할 수 있는 스캐폴드를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 과제를 해결하기 위하여,

[0015] 본 발명은 일실시예에서,

[0016] 돌출부와 오목부가 반복되는 마이크로 패턴이 표면에 형성된 하이드로겔; 및 상기 하이드로겔의 마이크로 패턴 표면에 형성된 전도성 고분자를 포함하고, 상기 전도성 고분자는 반상호 침투 구조체(semi-interpenetration network)인 스캐폴드를 제공한다.

- [0018] 또한, 본 발명은 일실시예에서,
- [0019] 표면에 돌출부와 오목부가 반복되는 마이크로 패터닝이 형성된 하이드로겔과 전도성 고분자 전구체 용액을 반응시켜 상기 마이크로 패터닝이 형성된 하이드로겔 상에 반상호 침투 구조체 전도성 고분자를 중합하는 것을 포함하는 스캐폴드의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0021] 본 발명에 따른 스캐폴드는, 포토리소그래피(photolithography) 또는 소프트리소그래피(softlithography)를 이용하여 하이드로겔 표면에 마이크로 패터닝을 용이하게 제공할 수 있으며, 전도성 고분자를 반상호 침투 구조체(semi-interpenetration network) 중합함으로써 3 차원 수화된 하이드로겔에 전기적 기능기를 결합하여 독특한 특성을 나타내는 전도성 하이드로겔 하이브리드 시스템을 제조할 수 있다.
- [0022] 또한, 본 발명에 따른 스캐폴드는, 세포 부착이 불가능한 하이드로겔 표면을 개질함으로써 세포나 단백질과 같은 생체물질이 잘 부착되어 자랄 수 있게 하고, 체외에서 체내와 비슷한 세포 외 기질 환경을 제공할 수 있다. 뿐만 아니라, 표면 개질을 하지 않은 다른 영역에서는 단백질이나 세포 사이의 직접적인 접촉의 교란을 최소화할 수 있으며, 패터닝을 통해 세포를 원하는 형상으로 배양할 수 있고, 한 방향으로 정렬된 형태로 세포를 배양할 경우 세포의 분화 영향을 극대화시켜 조직을 구축하는데 큰 역할을 수행할 수 있다. 특히, 고분자 하이드로겔은 생체적합성이 뛰어나 면역반응을 줄일 수 있고, 다공성 구조를 가지고 있어 세포가 대사작용을 하면서 발생하는 기체 또는 수분의 확산을 활발히 할 수 있다는 장점과 약물을 내포할 수 있는 구조로 세포가 성장 및 분화하는데 필요한 인자를 탑재하고 서서히 방출할 수 있다는 장점을 가지고 있다.
- [0023] 따라서, 본 발명에 따른 마이크로 패터닝된 전도성 하이드로겔을 포함하는 스캐폴드는 세포를 규칙적으로 배양하고 세포와 세포의 커뮤니케이션에 필요한 전기적 작용기를 부여해줌으로써 조직 재생 및 장기 기능회복, 치료에 목적을 두는 조직공학 및 세포생물학에 이용할 수 있고, 더 나아가 바이오센서, 약물전달 시스템 등에도 이용이 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 본 발명의 마이크로 패터닝된 전도성 하이드로겔의 제조방법을 순차적으로 모식한 것이며, 본 발명의 마이크로 패터닝된 전도성 하이드로겔에 RGD 펩타이드를 고정할 수 있는 표면 개질의 방법을 순차적으로 도시한 것이다.
- 도 2는 본 발명의 실시예 1 내지 3에 따라 만들어진 전도성 하이드로겔의 사진이다.
- 도 3은 상기 도 2와 동일한 물질의 주사전자현미경(SEM) 이미지이다.
- 도 4는 본 발명의 마이크로 패터닝이 형성된 전도성 하이드로겔을 스캐폴드로 하여 근육세포인 C2C12를 6 일 동안 배양한 이미지이다.
- 도 5는 본 발명의 마이크로 패터닝된 전도성 하이드로겔 표면의 표면개질 전/후에 따른 표면 전기전도성을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 본 발명은 다양한 변경을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 구체적으로 설명하고자 한다.
- [0027] 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0028] 본 발명에서, "포함한다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0030] 이하, 본 발명에 대하여 구체적으로 설명하기로 한다.
- [0031] 심근세포, 신경세포 및 근육세포 등은 전기적 방식을 통하여 신호를 전달하고, 이는 세포와 세포 사이의 커뮤니

케이션을 가능하게 하며 또한 세포와 세포사이의 상호작용에 긍정적인 영향을 미쳐 세포가 조직으로 분화되는 것을 도우며 새로운 조직의 형성을 촉진한다. 한편, 심근 및 신경, 근육 세포들은 한번 손상이 가해지면 자가 재생이 힘든 세포로 정상 상태로 회복하기까지 오랜 시간이 걸리고 대부분 회복되지 못하는 영구적인 손상상태로 존재하며, 그에 따른 합병증으로 인한 사망률이 증가하는 추세이다. 따라서, 이러한 세포를 재생시키기 위해 조직공학적 접근방법이 필수적이며 이러한 세포들이 올바르게 조직을 구축할 수 있도록 스캐폴드에 전기전도성을 부여해 주는 것이 필요하다. 최근 바이오메디컬 분야의 연구에서는 수화된 3 차원 구조에 전기적 기능기를 결합한 전도성 하이드로겔이 큰 관심을 모으고 있다.

[0032] 이에, 본 발명은 포토리소그래피(photolithography) 또는 소프트리소그래피(softlithography)를 이용하여 하이드로겔 표면에 마이크로 패턴을 부여하고, 전도성 고분자를 반상호 침투 구조체(semi-interpenetration network)로 중합함으로써 물리적 자극 및 전기적 자극을 동시에 부여할 수 있어, 세포와 세포 사이의 커뮤니케이션 및 세포반응에 보다 효과적으로 작용할 수 있는 스캐폴드를 제공한다.

[0033] 구체적으로, 본 발명은 돌출부와 오목부가 반복되는 마이크로 패턴이 표면에 형성된 하이드로겔; 및 상기 하이드로겔의 마이크로 패턴 표면에 형성된 전도성 고분자를 포함하고, 상기 전도성 고분자는 반상호 침투 구조체(semi-interpenetration network)인 스캐폴드를 제공한다.

[0034] 본 발명에 따른 스캐폴드는, 포토리소그래피(photolithography)를 이용하여 하이드로겔 표면에 마이크로 패턴을 쉽게 제공할 수 있으며, 전도성 고분자를 반상호 침투 구조체(semi-interpenetration network) 중합함으로써 3 차원 수화된 하이드로겔에 전기적 기능기를 결합하여 독특한 특성을 나타내는 전도성 하이드로겔 하이브리드 시스템을 제조할 수 있다.

[0035] 또한, 본 발명에 따른 스캐폴드는, 세포 부착이 불가능한 하이드로겔 표면을 개질함으로써 세포나 단백질과 같은 생체물질이 잘 부착되어 자랄 수 있게 하고, 체외에서 체내와 비슷한 세포 외 기질 환경을 제공할 수 있다. 뿐만 아니라, 표면 개질을 하지 않은 다른 영역에서는 단백질이나 세포 사이의 직접적인 접촉의 교란을 최소화할 수 있으며, 패턴링을 통해 세포를 원하는 형상으로 배양할 수 있고 한 방향으로 정렬된 형태로 세포를 배양할 경우 세포의 분화 영향을 극대화시켜 조직을 구축하는데 큰 역할을 수행할 수 있다. 특히, 고분자 하이드로겔은 생체적합성이 뛰어나 면역반응을 줄일 수 있고, 다공성 구조를 가지고 있어 세포가 대사작용을 하면서 발생하는 기체 또는 수분의 확산을 활발히 할 수 있다는 장점과 약물을 내포할 수 있는 구조로 세포가 성장 및 분화하는데 필요한 인자를 탑재하고 서서히 방출할 수 있다는 장점을 가지고 있다.

[0036] 상기 전도성 고분자 물질은 폴리(3,4-에틸렌디옥시티오펜):폴리스티렌설포산, 폴리피롤:폴리스티렌설포산 및 폴리티오펜:폴리스티렌설포산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 종 이상일 수 있다.

[0037] 상기 마이크로 패턴의 돌출부 폭과 오목부 폭의 비율(돌출부 폭/오목부 폭)은 1 내지 3이며, 오목부 폭은 1 내지 3 μm 일 수 있다. 예를 들어, 상기 마이크로 패턴의 돌출부 폭과 오목부 폭의 비율은 1 내지 3, 1 내지 2.5, 1 내지 2.0, 1.5 내지 3.0, 또는 2.0 내지 3.0일 수 있고, 이때 오목부 폭은 1 내지 3 μm , 1 내지 2.0 μm , 또는 1 내지 1.5 μm 일 수 있고, 돌출부 폭은 1 내지 3 μm , 1.5 내지 3 μm , 또는 2.0 내지 3.0 μm 일 수 있다.

[0038] 상기 스캐폴드는 5-아지도-2-니트로벤조산 N-하이드록시숙신이미드 에스테르(5-azido-2-nitrobenzoic acid N-hydroxysuccinimide ester)로 표면개질된 것일 수 있고, 상기 표면개질 시 용매로 디메틸포름알데하이드(N,N-dimethylformaldehyde, DMF)를 포함하는 것일 수 있다. 또한, 상기 스캐폴드는 Gly-Arg-Gly-Asp-Ser(글리신-아르기닌-글리신-아스파르트산-세린, GRGDS)으로 이루어진 아미노산 서열을 사용하여 표면개질된 것일 수 있다. 상기 표면개질에 의해 마이크로 패턴이 형성된 하이드로겔의 표면에 NHS 작용기를 부여할 수 있다.

[0039] 상기 표면개질 반응에 사용되는 5-아지도-2-니트로벤조산 N-하이드록시숙신이미드 에스테르는 양쪽에 각각 상이한 두 가지의 반응 활성기를 가지고 있어, 스캐폴드 표면에서 광반응시키면 5-아지도-2-니트로벤조산 N-하이드록시숙신이미드 에스테르의 페닐 아지도 그룹이 반응성이 높은 페닐 니트렌(phenyl nitrene) 그룹으로 형성되며, 이는 고분자 표면에 화학적으로 고정시키는 작용을 한다. 또 다른 한쪽에 있는 N-하이드록시숙신이미드 에스테르 그룹은 부착시키고자 하는 단백질 또는 아미노산 서열의 NH_2 (아미노기)인 1차 아민기와 반응하여 공유결합을 형성한다. 따라서, en 개의 반응기를 가진(bifunctional) 링커(linker)인 5-아지도-2-니트로벤조산 N-하이드록시숙신이미드 에스테르를 표면개질에 사용함으로써 한쪽에는 스캐폴드 표면을 고정시킬 수 있고, 다른 한쪽에는 세포를 고정시킬 수 있는 단백질, 아미노산 등으로 개질할 수 있다.

[0040] 하이드로겔은 높은 수분 함유량과 생체적합성 및 친수성을 가지며, 투명하고, 분자량으로 물성을 쉽게 조절할

수 있는 장점을 가지고 있지만, 작용기(functional group)를 이용할 수 없고, 세포, 단백질 등이 붙을 수 없는 단점을 가지고 있어 바이오센서, 조직공학, 약물전달 디바이스 등 많은 바이오 분야 응용에 제한적이다. 그러나, 본 발명에 따른 표면개질을 통해 세포, 단백질 등을 부착시킴으로써 다양한 바이오 분야에 이용할 수 있고, 하이드로겔의 한계를 극복할 수 있다.

- [0041] 상기 스캐폴드는 전도성 고분자와 중합함으로써 전도성을 부여할 수 있고, 스캐폴드의 전기전도도는 0.001 내지 0.020 S/cm일 수 있다. 예를 들어, 상기 스캐폴드의 전기전도도는 0.001 내지 0.020 S/cm, 0.001 내지 0.015 S/cm, 0.001 내지 0.010 S/cm, 또는 0.010 내지 0.020 S/cm일 수 있다.
- [0042] 상기 하이드로겔은 다량의 수분을 함유하고 있는 3 차원 망상구조로 친수성 고분자로 이루어져 있고, 예를 들어, 하이드로겔은 폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리에틸렌옥사이드(PEO), 폴리하이드록시에틸메타크릴레이트(PHEMA), 폴리아크릴산(PAA), 폴리비닐알코올(PVA), 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)(PNIPAM), 폴리비닐피롤리돈(PVP), 폴리락트산(PLA), 폴리글리콜산(PGA) 및 폴리카프로락톤(PCL), 콜라겐, 젤라틴, 피브린, 히알루론산, 알지네이트, 카라기난, 키토산, 하이드록시알킬셀룰로오스, 알킬셀룰로오스, 실리콘, 고무, 아가, 카르복시비닐 공중합체, 폴리디옥솔란, 폴라아크릴아세테이트, 폴리비닐클로라이드, 무수말레인산/비닐에테르로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 종 이상의 친수성 고분자 또는 이들의 공중합체 또는 이들의 혼합물을 포함할 수 있다. 하이드로겔은 용이하게 조절 가능한 다공성 구조를 가지고 있어 하이드로겔에 약물 탑재가 가능하며, 기공 크기를 조절함으로써 약물 방출의 시간 및 속도를 조절할 수 있다. 또한, 높은 수분함량하고 있어 세포 및 바이오 물질들이 손상 없이 하이드로겔 내부에 내포할 수 있으며, 세포 외 기질과 물리적, 화학적인 유사성으로 인하여 높은 생체적합성을 갖는다는 특징이 있다.
- [0043] 본 발명에 따른 마이크로 패터닝된 전도성 하이드로겔을 포함하는 스캐폴드는 세포를 규칙적으로 배양하고 세포와 세포의 커뮤니케이션에 필요한 전기적 작용기를 부여해줌으로써 조직 재생 및 장기 기능회복, 치료에 목적을 두는 조직공학 및 세포생물학에 이용할 수 있고, 더 나아가 바이오센서, 약물전달 시스템 등에도 이용이 가능하다.
- [0045] 또한, 본 발명은 표면에 돌출부와 오목부가 반복되는 마이크로 패터닝이 형성된 하이드로겔과 전도성 고분자 전구체 용액을 반응시켜 상기 마이크로 패터닝이 형성된 하이드로겔 상에 반상호 침투 구조체 전도성 고분자를 중합하는 것을 포함하는 스캐폴드의 제조방법을 제공한다.
- [0046] 상기 표면에 돌출부와 오목부가 반복되는 마이크로 패터닝이 형성된 하이드로겔의 오목부, 돌출부, 및 마이크로 패터닝이 형성된 하이드로겔 내부에 전도성 고분자가 중합되는 것일 수 있고, 상기 전도성 고분자를 반상호 침투 구조로 중합함으로써 3 차원 수화된 하이드로겔에 전기적 기능을 결합하여 전도성 하이드로겔 하이브리드 시스템을 제조할 수 있다.
- [0047] 상기 하이드로겔의 표면에 돌출부와 오목부가 반복되는 마이크로 패터닝을 형성하는 것은 포토리소그래피 또는 소프트리소그래피로 패터닝하는 것일 수 있다.
- [0048] 예를 들어, 상기 마이크로 패터닝을 형성하는 방법은, 마이크로 패터닝 웨이퍼 상에 하이드로겔 전구 용액을 올린 후 UV 광을 조사함으로써 마이크로 패터닝이 형성된 하이드로겔을 제조할 수 있으며, 이때, 상기 마이크로 패터닝의 돌출부 폭과 오목부 폭의 비율(돌출부 폭/오목부 폭)은 1 내지 3이며, 오목부 폭은 1 내지 3 μm 일 수 있다. 예를 들어, 상기 마이크로 패터닝의 돌출부 폭과 오목부 폭의 비율은 1 내지 3, 1 내지 2.5, 1 내지 2.0, 1.5 내지 3.0, 또는 2.0 내지 3.0일 수 있고, 이때 오목부 폭은 1 내지 3 μm , 1 내지 2.0 μm , 또는 1 내지 1.5 μm 일 수 있고, 돌출부 폭은 1 내지 3 μm , 1.5 내지 3 μm , 또는 2.0 내지 3.0 μm 일 수 있다. 상기 마이크로 패터닝의 돌출부 폭과 오목부 폭의 비율은 상기 마이크로 패터닝 웨이퍼의 크기에 따라 조절할 수 있다.
- [0049] 예를 들어, 마이크로 패터닝을 형성하는 방법으로는, 포토리소그래피 이외에도 전자빔리소그래피, 이광자 중합반응(two-photon polymerization), 마이크로접촉 프린팅(microcontact printing), 에칭(etching), 전기방사(electrospinning) 등을 포함할 수 있으며, 이는 모양 및 차원(dimension)을 조절하여 표면의 특성에 이용될 수 있다.
- [0050] 상기 마이크로 패터닝이 형성된 하이드로겔 상에 전도성 고분자를 중합한 후, 상기 전도성 고분자가 중합된 하이드로겔에 NHS 작용기를 도입하고 RGD 펩타이드 용액과 반응시켜, 표면을 개질하는 것을 추가 포함할 수 있다. 표면 개질에 의해 세포 부착이 불가능한 하이드로겔 표면을 세포나 단백질과 같은 생체물질이 잘 부착되어 자랄 수 있게 하고, 체외에서 체내와 비슷한 세포 외 기질 환경을 제공할 수 있다.
- [0051] 상기 전도성 고분자가 중합된 하이드로겔에 NHS 작용기를 도입하는 것은, 상기 전도성 고분자가 중합된 하이드

로겔 상에 5-아지도-2-니트로벤조산 N-하이드록시숙신이미드 에스테르 함유 용액을 도포한 후, UV 광을 조사하여 표면개질하는 것일 수 있다. 또한, 전도성 고분자가 중합된 하이드로겔에 NHS 작용기를 도입하는 것은, 상기 전도성 고분자가 중합된 하이드로겔 상에 Gly-Arg-Gly-Asp-Ser(글리신-아르기닌-글리신-아스파르트산-세린, GRGDS)으로 이루어진 아미노산 서열을 사용하여 표면개질된 것일 수 있다. 상기 표면개질 시 용매로 디메틸포름알데하이드(N,N-dimethylformaldehyde, DMF)를 포함하는 것일 수 있다.

[0052] 하이드로겔은 높은 수분 함유량과 생체적합성 및 친수성을 가지며, 투명하고, 분자량으로 물성을 쉽게 조절할 수 있는 장점을 가지고 있지만, 작용기(functional group)를 이용할 수 없고, 세포, 단백질 등이 붙을 수 없는 단점을 가지고 있어 바이오센서, 조직공학, 약물전달 디바이스 등 많은 바이오 분야 응용에 제한적이다. 그러나, 본 발명에 따른 표면개질을 통해 세포, 단백질 등을 부착시킴으로써 다양한 바이오 분야에 이용할 수 있고, 하이드로겔의 한계를 극복할 수 있다.

[0054] 이하 본 발명에 따르는 실시예 등을 통해 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0056] 실시예

[0057] 본 발명에 따른 스캐폴드의 제조방법의 모식도를 도 1에 나타내었고, 이를 하기 실시예 1 내지 4에 상세히 설명하였다.

[0058]

[0059] 실시예 1: 폴리에틸렌글리콜 다이아크릴레이트(polyethylene glycol-diacrylate, PEG DA) 합성

[0060] 3구 플라스크에 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG) 10 g과 테트라하이드로퓨란(tetrahydrofuran) 100 mL를 넣고, 50℃의 항온수조에서 녹였다. 질소가스를 공급해주고 환류시킨 후, 아크릴일 클로라이드(acryloyl chloride) 4 mL를 넣었다. 5 시간 동안 스타어링(stirring)해주며 반응시켰다. 4℃에서 식힌 후 용매를 버리고, PEG DA 고체를 회수하였다.

[0062] 실시예 2: 패터닝된 PEG_PSS 반 상호 관통 중합체망 하이드로겔 형성

[0063] PEG DA 3 g을 탈이온수 3 mL에 혼합한 후 상온에서 1 시간 동안 두어 완전히 녹였다. 상기 녹인 PEG DA 용액에 개시제 HOMPP 300 μ l를 넣었다. PSS(poly(4-styrenesulfonic acid) 용액 2 mL를 전구용액에 넣고 혼합하였다. 마이크로 패터닝 웨이퍼 위에 상기 제조된 전구 용액을 0.5 mL 올린 후 365 nm 파장을 가진 UV 광을 18 Wcm⁻²의 출력으로 300 초 동안 조사하였다. 생성된 PSS PEG 하이드로겔은 마이크로 패터닝 웨이퍼의 모양대로 하이드로겔의 표면에 패터닝이 형성되었으며, 에탄올에 2 일 동안 유지하여 남은 모노머와 개시제를 제거함으로써 PSS chain 고분자가 PEG 3D 망상구조에 반 상호 관통 중합체망 형태로 내포하는 하이드로겔을 수득하였다.

[0065] 실시예 3: 하이드로겔 내에서 PEDOT 중합

[0066] 상기 실시예 2의 하이드로겔을 EDOT 용액 1.8 mL과 99.9% 에탄올 0.2 mL을 혼합한 용액에 2 시간 동안 유지한 후, 남은 EDOT 용액을 제거하였다. 철-p-톨루엔설포네이트 헥사하이드레이트[Iron(III)-p-toluenesulfonate hexahydrate] 300 mg을 99.9% 에탄올 2 mL에 녹여준 후 0.5 v/v% 황산용액을 넣어주었다. 상기 혼합액에 하이드로겔을 담그고 초음파 분산기로 15 분간 시행하여 개시하였다. 상온 및 암실에서 4 일 동안 중합을 진행하였다. 중합이 끝나면 남은 광개시제와 단량체를 제거하기 위해 에탄올에 2 일 동안 세척하였다.

[0067] 상기 수득된 하이드로겔의 사진을 도 2에 나타내었다.

[0069] 실시예 4: 마이크로 패터닝된 전도성 고분자 하이드로겔 스캐폴드의 표면개질

[0070] 5-아지도-2-니트로벤조산 N-하이드록시숙신이미드 에스테르(5-azido-2-nitrobenzoic acid N-hydroxysuccinimide ester) 4 mg을 DMF 1 mL에 녹여주었다. 마이크로 패터닝된 전도성 고분자 하이드로겔 스캐폴드 표면 위에 상기 용액 100 μ l로 덮은 후 흡후드에서 용매를 건조시켰다. 건조된 전도성 하이드로겔에 페닐아지드(phenyl azide) 작용기를 표면에 화학적으로 결합하기 위하여 365 nm 파장을 가진 UV 광을 18 Wcm⁻²의 출력으로 300 초 동안 조사하였다. 상기 하이드로겔을 DMF에 2 회 세척한 후 DPBS에 1 회 세척하였다. 표면의 NHS 작용기와 RGD 펩타이드의 NH₂ 작용기를 반응시키기 위해, RGD 펩타이드 1 mg을 DPBS 1 mL에 용해시킨 용액 100 μ l을 세척한 전도성 하이드로겔 위에 올린 후 37℃에서 24 시간 동안 인큐베이션하였다.

[0072] **실시예 5: 패터닝된 스캐폴드의 세포배양 실험**

[0073] 스캐폴드는 48 well plate에 놓아둔 후 각각 70% 에탄올 및 95% 에탄올로 세척하고 30 분간 UV로 살균하였다. high-DMEM과 FBS(10%w/v)를 넣은 미디어에서 C2C12 myoblasts를 5% CO₂, 95% air, 37℃ 환경에서 배양하였다. 세포가 폴리스티렌 배양(culture) 플라스크에 70% 차지하면 트립신(trypsin)/EDTA로 세포를 탈착시켰다. 세포를 상기 미디어에 105 cells/mL 농도로 분산시킨 후 100 μ l씩 각각의 스캐폴드 위에 떨어뜨렸다. 세포가 스캐폴드 위에 잘 붙을 수 있게 C2C12가 분주된 스캐폴드를 5% CO₂, 95% air, 37℃ 환경에서 1 시간 동안 인큐베이션한 후, 미디어 500 μ l를 각각의 well plate에 넣어주었다. 세포 배양(cell culture) 미디어는 매 2 일 마다 교체해주었다. 하이드로겔 위해 부착된 세포는 Live/Dead Viability로 시각화할 수 있으며, 이를 도 4에 나타내었다.

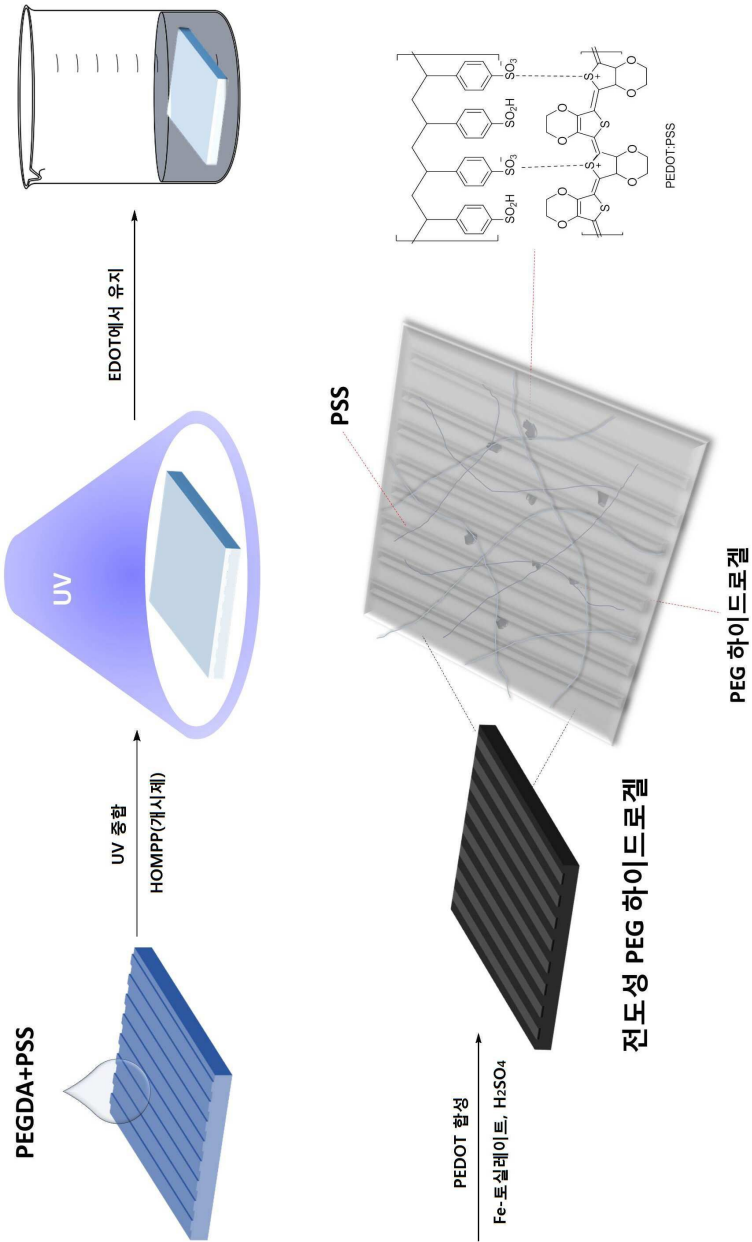
[0075] **실시예 6: 전도성 측정실험**

[0076] 상기 패터닝된 전도성 하이드로겔을 이용하여 표면개질 유무에 따른 전기전도성을 측정하여 비교하였다. 표면개질한 전도성 하이드로겔 및 표면개질하지 않은 전도성 하이드로겔을 각각 탈이온수 또는 DPBS(Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline)에 4 개씩 담근 후 상온에서 1 일 정도 팽윤시켰다. 각각의 전도성 하이드로겔은 면저항 측정기(4-point probe)로 표면의 전도도를 분석하였다. 78 mm*56 mm 유리슬라이드 글라스에 전도성 하이드로겔을 올린 후 probe stage에 샘플을 놓는다. 전압과 전류를 각각 자동으로 설정하고 기능을 sheet로 설정한 후 4 개의 탐침이 전도성 하이드로겔 표면에 닿도록 누른다. 한 개의 스캐폴드를 각각 10번씩 저항을 측정하여 평균된 값을 표면저항으로 하였다. 각 조건당 4 개의 스캐폴드를 측정하고 측정된 값을 표면저항 공식에 대입하여 저항값을 계산한 후, 평균값 및 편차를 계산하여 전기전도도를 비교하였다. 본 실시예의 측정결과는 도 5에 나타내었다.

[0077] 도 5는 탈이온수(DI) 및 PBS 용매에서 팽윤하는 CH 스캐폴드의 전기전도성을 나타낸 것으로, 표면개질하지 않은 스캐폴드는 DPBS에서 0.0131 S/cm로 가장 높았고, 탈이온수에서 0.0021 S/cm였으며, 표면개질한 스캐폴드는 DPBS에서 0.0069 S/cm, 탈이온수에서 0.0011 S/cm로 측정되었으며, 표면개질 후 전도성이 약간 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 표면개질 후에 전도도가 약간 감소하였더라도 본 실시예에 따른 스캐폴드는 전기 신호 전달에 적합하며 생리적 환경에 가까운 것을 알 수 있었다.

도면

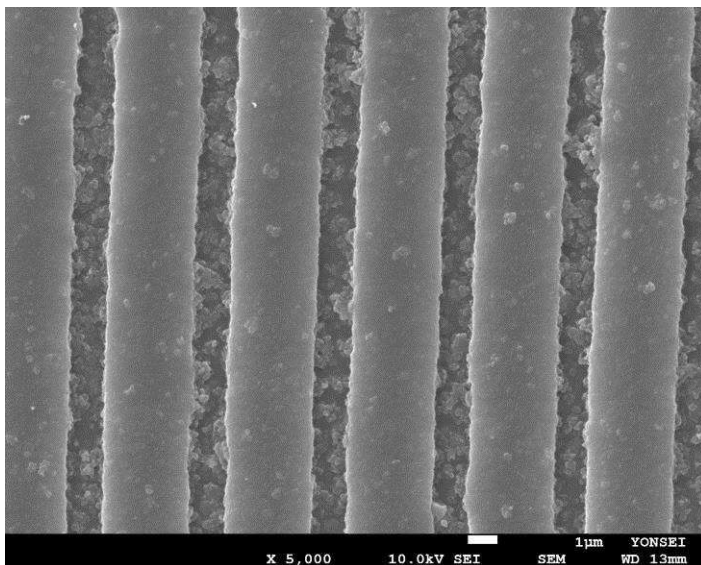
도면1



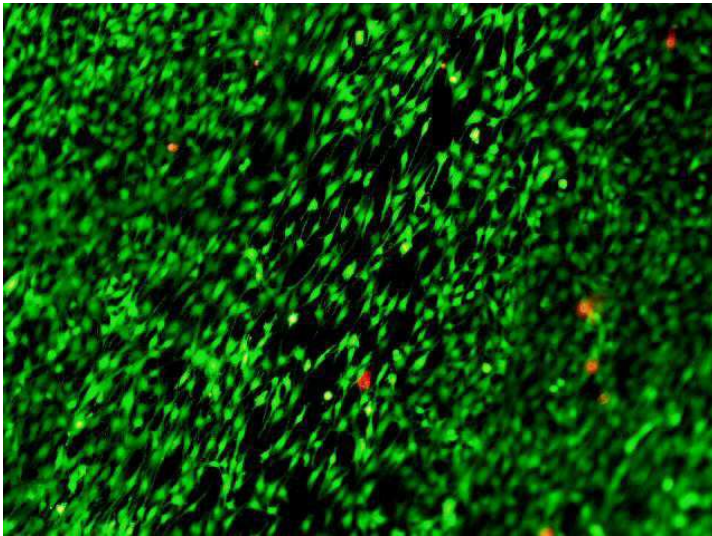
도면2



도면3



도면4



도면5

