



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년03월18일  
(11) 등록번호 10-1959612  
(24) 등록일자 2019년03월12일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
B41J 2/01 (2006.01) B41J 2/175 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
B41J 2/01 (2013.01)  
B41J 2/04561 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-0006004
- (22) 출원일자 2017년01월13일  
심사청구일자 2017년01월13일
- (65) 공개번호 10-2018-0083575
- (43) 공개일자 2018년07월23일
- (56) 선행기술조사문헌  
JP2004530142 A\*  
KR1020140066521 A\*  
JP2010530221 A  
KR1020130044911 A  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자  
서울대학교산학협력단  
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
- (72) 발명자  
송준명  
서울특별시 서초구 방배로 43길 2 삼호아파트 5동 803호
- (74) 대리인  
이원희

전체 청구항 수 : 총 5 항

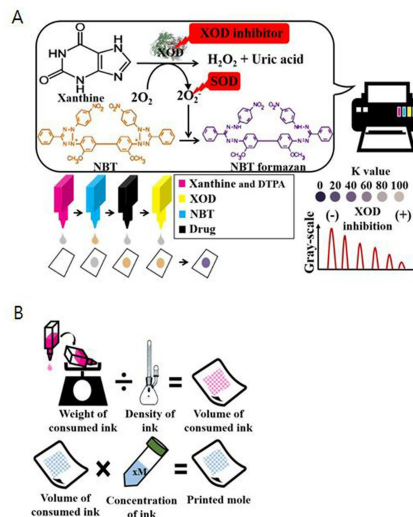
심사관 : 최창락

(54) 발명의 명칭 잉크젯 프린팅에 기반한 정량적 약효평가 방법

(57) 요약

본 발명은 잉크젯 프린팅에 기반하여 타겟 단백질 효소 등에 작용함으로써 그 활성을 저해 또는 활성화시키는 화합물의 약효를 분자수준에서 정량적으로 평가할 수 있는 분석법에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명에 따른 방법은 잉크젯 프린터 카트리지에 포함된 기질, 염료물질, 약물 후보물질 및 효소가 프린팅되어 생성되는 반응물의 부피를 정량적으로 측정함으로써 화합물의 종류 및 농도에 따라 프린팅되는 물질의 몰수를 계산할 수 있어 종래의 방법보다 더 적은 양의 시험 물질을 사용하면서도 정확하고 빠르게 정량적인 분석을 할 수 있으므로, 약효평가 분석에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류  
*B41J 2/17503* (2013.01)

공지예외적용 : 있음

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

- 1) 크산틴이 포함된 제 1카트리지, NBT(nitro blue ttrazolium)가 포함된 제 2카트리지, 약물 후보물질이 포함된 제 3카트리지 및 크산틴 산화효소가 포함된 제 4카트리지를 잉크젯 프린터에 장착하는 단계; 및
- 2) 상기 단계 1)의 카트리지를 순차적으로 잉크젯 프린팅하는 단계로, 상기 잉크젯 프린팅에 의해 젖팅되는 액적이 0.2 cm 내지 0.4 cm의 직경을 가지는 것인 단계를 포함하는 잉크젯 프린터를 이용하여 약물의 효능을 분석하는 방법.

#### 청구항 2

- 1) 크산틴 및 NBT가 포함된 제 1카트리지, 약물 후보물질이 포함된 제 2카트리지 및 크산틴 산화효소가 포함된 제 3카트리지를 잉크젯 프린터에 장착하는 단계; 및
- 2) 상기 단계 1)의 카트리지를 순차적으로 잉크젯 프린팅하는 단계로, 상기 잉크젯 프린팅에 의해 젖팅되는 액적이 0.2 cm 내지 0.4 cm의 직경을 가지는 것인 단계를 포함하는 잉크젯 프린터를 이용하여 약물의 효능을 분석하는 방법.

#### 청구항 3

삭제

#### 청구항 4

삭제

#### 청구항 5

삭제

#### 청구항 6

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 방법이 인쇄된 물질의 물수를 계산하는 단계를 더 포함하는, 잉크젯 프린터를 이용하여 약물의 효능을 분석하는 방법.

#### 청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 인쇄된 물질의 물수가, 물질의 소비된 양에 그 물질의 물 농도를 곱하여 계산되는, 잉크젯 프린터를 이용하여 약물의 효능을 분석하는 방법.

#### 청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 소비된 바이오 잉크의 양이 카트리지에서 소비된 바이오 잉크의 평균 중량을 카트리지에 충전된 바이오 잉크의 밀도로 나누어 계산되는, 잉크젯 프린터를 이용하여 약물의 효능을 분석하는 방법.

#### 청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

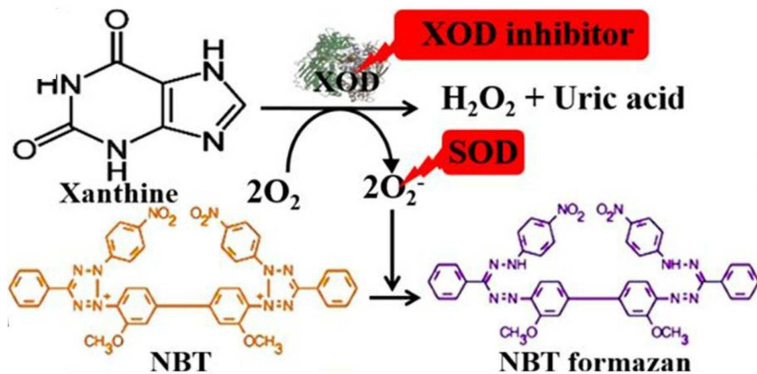
[0001] 본 발명은 잉크젯 프린팅에 기반하여 정량적으로 약물의 효능을 평가하는 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0003] 우수한 신약을 개발하기 위해서는 합성, 활성 스크리닝, 약효, 약리, 약물동태 및 안전성 등을 검정할 수 있는 기술의 확립 및 축적을 통한 체계적인 신약개발 시스템의 구축이 필수적이다. 효소는 생물학적 시스템 내 다양한 대사 과정에 관여하는 수많은 생화학 반응을 중개하는 생물학적 단백질 촉매체로서, 대사 과정의 생물학적 활성, 기관의 대사 결함 및 기관의 기능을 확인하기 위해 이들 효소를 분석하는 방법이 사용된다. ELISA 및 흡수 분석법이 효소 분석에 가장 많이 사용되고 있으나 분석의 정확도 및 재현성이 연구자의 실험 수행능력에 따라 차이가 나며, 비용이 많이 들고 시간도 오래 걸린다는 문제가 있다. 또한, 효소를 포함하는 단백질은 안정성이 낮아 분석하는 동안 물질의 안정성을 유지시켜야 한다. 이를 해결하기 위해 로봇 웰-플레이트와 같은 높은 정밀도와 재현성이 있는 다양한 자동화 기술이 개발되었으나 값이 매우 비싸다. 따라서, 쉽고 빠르면서도 값이 저렴한 효소 분석방법의 개발이 필요하다.

[0005] XOD(xanthine oxidase) 저해 어세이는 약물의 항산화 능력을 연구하는데 널리 사용되는 분석방법이다. 하기 그림 1에 나타난 바와 같이, XOD는 크산틴(xanthine)이 과산화수소 및 요산으로 전환되는데 사용되는 촉매로서, 이 과정에서 산소가 활성산소인 슈퍼옥사이드 음이온( $O_2^-$ )으로 전환된다. 생성된 슈퍼옥사이드 음이온은 황색인 NBT(nitro blue tetrazolium)를 환원시켜 보라색인 NBT 포르마잔을 생성시킨다. 이때, 약물 후보물질을 함께 첨가하고 560 nm의 파장에서 생성된 NBT 포르마잔의 흡광도를 측정하여 이의 양을 계산할 수 있다. 따라서 첨가된 약물 후보물질의 XOD 저해 효과를 통해 항산화 능력을 분석할 수 있다.

[0006] [그림 1]



[0007] 그러나, 이러한 분석방법은 연구자가 직접 분석 용액을 주입함으로써 연구자의 실험 수행능력에 따라 분석 결과가 달라지며, 많은 양의 분석 용액이 필요하기 때문에 경제적인 문제가 있다.

[0009] 잉크젯 프린팅은 노즐을 통해 잉크를 미세액적(microdroplet) 형상으로 분사함으로써 인쇄하는 기술이다. 여기

에는, 지속적으로 액적을 분사하는 연속젯팅(continuous jet, CJ)과 인가 조건을 통해서 액적이 토출되는 드랍온디맨드(drop-on-demand, DOD) 방식이 있다. 드랍온디맨드 방식 중에서는 열처리에 의한 버블스프레이를 활용한 가열방식과 압전체에 전기적 신호를 인가하여 압력을 주는 압전방식이 있다. 잉크젯 프린팅 공정은 조작이 쉽고 속도가 빨라 상용화하기에 적합하고, 전기작동기를 통해 분석하고자 하는 물질을 균일하게 분출할 수 있으며, 적은 양의 시험물질로도 시험물질의 분석이 가능하다. 또한, 기상 증착 또는 포토리소그래피(photolithography)와 달리, 생체 재료 용액을 비접촉으로 증착시킴으로써 시험물질의 고유한 형태를 유지시킬 수 있다.

[0012] 이러한 장점들로 인해 잉크젯 프린팅을 이용하여 세포 및 바이오 물질 패터닝(patterning)을 위한 세포공학적인 장치를 제작하거나 약물 전달체를 제조하는 연구 등이 활발히 진행되고 있다. 이와 관련하여, 미국특허공개 제 2009/0208577호는 잉크젯 프린팅 기기로 살아있는 세포를 스캐폴드에 패터닝하는 것을 개시하고 있으며, 대한민국 특허등록 제10-1429477호는 잉크젯 프린팅 방법을 사용하여 고분자 약물 전달체를 제조하는 방법을 개시하고 있다.

[0013]

[0014] 이에, 본 발명자들은 잉크젯 프린팅을 이용하여 정량적으로 약물의 효능을 분석할 수 있는 방법을 개발하던 중, 잉크젯 프린터 카트리지에 크산틴, NBT, 약물 후보물질, 및 크산틴 산화효소를 충전하고 이들이 프린팅되어 생성되는 반응물의 부피를 정량적으로 측정할 수 있는 분석방법을 개발하였다. 상기 분석방법은 화합물의 종류 또는 농도에 따라 프린팅되는 물질의 몰수를 계산함으로써, 약물 후보물질의 약효를 정량적으로 평가할 수 있고, 이는 종래의 방법에 의해 얻어진 결과와 유사하였다. 따라서, 본 발명의 방법은 잉크젯 프린팅 기술을 이용함으로써, 종래의 방법보다 더 적은 양의 시험 물질을 사용하면서도 정확하고 빠르게 정량적으로 약물의 효능을 분석하는데 유용하게 사용될 수 있다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0016] 본 발명의 목적은 분석에 필요한 바이오 잉크가 충전된 카트리지를 장착한 잉크젯 프린터를 이용하여 약물의 효능을 분석하는 방법을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 다른 목적은 분석에 필요한 바이오 잉크가 충전된 카트리지를 포함하는 약물의 효능을 분석하기 위한 잉크젯 프린팅 장치를 제공하는 것이다.

[0018]

**과제의 해결 수단**

[0019] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 기질이 포함된 제 1카트리지, 염료물질이 포함된 제 2카트리지, 약물 후보물질이 포함된 제 3카트리지 및 효소가 포함된 제 4카트리지를 잉크젯 프린터에 장착하는 단계; 및 상기 카트리지를 순차적으로 잉크젯 프린팅하는 단계를 포함하는 잉크젯 프린터를 이용하여 약물의 효능을 분석하는 방법을 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명은 기질 및 염료물질이 포함된 제 1카트리지, 약물 후보물질이 포함된 제 2카트리지 및 효소가 포함된 제 3카트리지를 잉크젯 프린터에 장착하는 단계; 및 상기 카트리지를 순차적으로 잉크젯 프린팅하는 단계를 포함하는 잉크젯 프린터를 이용하여 약물의 효능을 분석하는 방법을 제공한다.

[0021] 또한, 본 발명은 젯팅 디바이스, 바이오 잉크 저장 카트리지 및 드라이브 장치를 포함하고, 상기 바이오 잉크 저장 카트리지가 기질이 포함된 제 1카트리지, 염료물질이 포함된 제 2카트리지, 약물 후보물질이 포함된 제 3카트리지, 효소가 포함된 제 4카트리지로 구성된, 약물의 효능을 분석하기 위한 잉크젯 프린팅 장치를 제공한다.

[0022] 아울러, 본 발명은 젯팅 디바이스, 바이오 잉크 저장 카트리지 및 드라이브 장치를 포함하고, 상기 바이오 잉크 저장 카트리지가 기질 및 염료물질이 포함된 제 1카트리지, 약물 후보물질이 포함된 제 2카트리지, 효소가 포함된 제 3카트리지로 구성된, 약물의 효능을 분석하기 위한 잉크젯 프린팅 장치를 제공한다.

**발명의 효과**

[0024] 본 발명에 따른 방법은 잉크젯 프린터 카트리지에 포함된 기질, 염료물질, 약물 후보물질 및 효소가 프린팅되어 생성되는 반응물의 부피를 정량적으로 측정함으로써 화합물의 종류 및 농도에 따라 프린팅되는 물질의 몰수를 계산할 수 있어 종래의 방법보다 더 적은 양의 시험 물질을 사용하면서도 정확하고 빠르게 정량적인 분석을 할 수 있으므로, 약효평가 분석에 유용하게 사용될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0026] 도 1은 잉크젯 프린팅을 이용한 XOD 저해 어세이의 전체적인 개략도(A) 및 카트리지로부터 분출된 바이오 잉크의 부피를 측정하기 위한 개략도(B)를 나타낸 도이다.

도 2는 종래의 방법대로 웰-플레이트에서 XOD 저해 어세이를 이용하여 NBT 포르마잔의 최대 흡광도를 측정한 그래프이다.

도 3은 종래의 방법대로 웰-플레이트에서 XOD 저해 어세이를 이용하여 560 nm의 파장에서 SOD(A) 및 나린제닌(B)의 흡광도를 측정한 그래프이다. x축은 화합물의 농도를, y축은 항산화 특성의 지표로 사용되는 NBT 포르마잔의 흡광도를 나타낸다.

도 4는 K값과 카트리지에서 분출되는 바이오 잉크 양과의 상관관계를 확인한 그래프이다. 도 4A는 K값을 100으로 설정했을 때 직경이 0.3 cm인 반응 스팟에 완충용액(①), SOD(②), 아미노글루테치미드(③), 디트라놀(④), 나린제닌(⑤), 크산틴(⑥), NBT(⑦), XOD(⑧), NBT 및 크산틴의 혼합물(⑨) 또는 크산틴 및 XOD의 혼합물(⑩)을 포함하는 용액이 카트리지에서 분출되는 양을 확인한 그래프이다. 도 4B는 직경이 0.3 cm인 반응 스팟에 K값에 대해 완충용액, SOD, 아미노글루테치미드, 디트라놀 또는 나린제닌을 포함하는 바이오 잉크가 카트리지에서 분출되는 양을 확인한 그래프이다.

도 5는 잉크젯 프린터 각각의 카트리지에 크산틴, NBT, 시험 약물 및 XOD를 충전하여 시험 약물의 항산화 활성을 측정한 도이다(A: SOD; 및 B: 나린제닌). 보라색 스팟은 인쇄 순서에 따라 잉크젯 인쇄함으로써 반응 스팟에 형성된 NBT 포르마잔을 나타내는 사진이다.

도 6은 잉크젯 프린터 각각의 카트리지에 크산틴 및 NBT의 혼합물, 시험 약물 및 XOD를 충전하여 시험 약물의 항산화 활성을 측정한 도이다(A: SOD; 및 B: 나린제닌). 보라색 스팟은 인쇄 순서에 따라 잉크젯 인쇄함으로써 반응 스팟에 형성된 NBT 포르마잔을 나타내는 사진이다.

도 7은 잉크젯 프린터 각각의 카트리지에 크산틴 및 XOD의 혼합물, 시험 약물 및 NBT를 충전하여 시험 약물의 항산화 활성을 측정한 도이다(A: SOD; 및 B: 나린제닌). 보라색 스팟은 인쇄 순서에 따라 잉크젯 인쇄함으로써 반응 스팟에 형성된 NBT 포르마잔을 나타내는 사진이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0027] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0029] 본 발명은 1) 기질이 포함된 제 1카트리지, 염료물질이 포함된 제 2카트리지, 약물 후보물질이 포함된 제 3카트리지 및 효소가 포함된 제 4카트리지를 잉크젯 프린터에 장착하는 단계; 및 2) 상기 단계 1)의 카트리지를 순차적으로 잉크젯 프린팅하는 단계를 포함하는 잉크젯 프린터를 이용하여 약물의 효능을 분석하는 방법을 제공한다.

[0030] 본 명세서에서 사용된 용어, "바이오 잉크"는 본 발명에 따라 잉크젯 프린팅방법을 이용하여 약물의 효능을 분석할 때 프린터 카트리지에 충전되는 분석용 시약을 의미한다. 구체적으로, 상기 바이오 잉크는 카트리지에 충전될 수 있는 기질, 염료물질, 약물 후보물질 및 효소와 이들을 용해시킬 수 있는 용액을 포함할 수 있다.

[0031] 상기 잉크젯 프린팅은 염료를 분사하여 인쇄하는 기술을 모두 포함할 수 있다.

[0032] 본 발명에 따른 방법은 상기 기질, 염료물질, 약물 후보물질 또는 효소를 용액에 용해시켜 바이오 잉크를 제조하고, 이를 각각의 카트리지에 충전하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 용액은 일반적으로 기질, 염료물질, 약물 후보물질 및 효소를 용해시키는데 사용될 수 있는 물질이라면 모두 사용할 수 있다. 예를 들면, 상기 용액은 폴리에틸렌글리콜, 테트라하이드로퓨란, 디메틸아세트아미드, 디메틸포름아미드, 클로로포름, 디메틸술폰사이드, 부탄올, 아이소프로판올, 아이소부틸알콜, 테트라 부틸알콜, 아세트산, 1,4-다이옥산, 톨루엔, 오소-자이렌, 디메틸포름아마이드 등일 수 있고, 이들을 단독 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 상기 용액은 트리스 완충액, PEG-400(polyethylene glycol-400) 또는 tert-부탄올일 수 있다.



- [0033] 상기 기질은 크산틴일 수 있으며, 상기 염료물질은 NBT일 수 있다. 상기 약물 후보물질은 제한이 없으며, 고체상 약물 또는 액체상 약물일 수 있다. 상기 효소는 크산틴 산화효소일 수 있다.
- [0034] 상기 카트리지는 순차적으로 기관상에 잉크젯 프린팅할 수 있다. 상기 기관은 슬라이드 글라스, 종이, 실리콘 웨이퍼, 폴리이미드(poly imide; PI), 폴리에틸렌 테레프탈레이트(PET), 폴리스티렌(PS) 등의 고분자를 사용하여 제조된 플레이트 또는 필름 등을 사용할 수 있으며, 카트리지에 포함된 기질, 염료물질, 약물 후보물질 및 효소를 프린팅할 수 있는 것이면 제한 없이 사용될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 상기 기관은 종이일 수 있다.
- [0035] 카트리지에서 분출되는 바이오 잉크의 양은 소프트웨어에서 조절할 수 있는 분출 양의 파라미터인 K값을 조절함으로써 제어할 수 있다. K값은 카트리지에 포함되는 기질, 염료물질, 약물 후보물질 및 효소의 물리적 성질 및 화학적 성질에 따라 달라질 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, K값은 10 내지 100일 수 있다.
- [0036] 본 발명에 따른 방법은 인쇄된 물질의 몰수를 계산하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 인쇄된 물질의 몰수는 소비된 바이오 잉크의 양에 용액의 농도를 곱하여 계산될 수 있다. 상기 소비된 바이오 잉크의 양은 카트리지에서 소비된 바이오 잉크의 평균 중량을 카트리지에 충전된 바이오 잉크의 밀도로 나누어 계산될 수 있다. 상기 바이오 잉크는 상술한 바와 같이 제 1 내지 제 4카트리지에 충전되는 물질일 수 있다. 구체적으로, 상기 바이오 잉크는 기질, 염료물질, 약물 후보물질 또는 효소일 수 있다.
- [0037] 상기 잉크젯 프린팅에 의해 젯팅되는 액적의 직경은 0.1 cm 내지 0.5 cm일 수 있다. 구체적으로는, 0.2 cm 내지 0.4 cm일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 잉크젯 프린팅에 의해 젯팅되는 액적의 직경은 0.3 cm일 수 있다. 액적의 직경이 너무 작으면 일정한 양의 프린팅에 문제가 있고, 액적의 직경이 너무 크면 시료소모가 너무 많다는 문제가 있다.
- [0038]
- [0039] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 잉크젯 프린터의 카트리지에 3가지의 다른 조건으로 바이오 잉크를 충전하고 인쇄하여 인쇄 중에 소비된 카트리지 내 바이오 잉크의 양을 계산함으로써 XOD 저해 정도를 분석하여 시험 약물(나린제닌)의 항산화 활성을 측정하였다. 첫번째 조건으로 C, M, Y 및 K 카트리지를 각각 크산틴, NBT, 시험 약물 및 XOD로 충전한 카트리지를 사용하였으며, 두번째 조건으로 C, M 및 Y 카트리지를 각각 크산틴과 NBT의 혼합물, 시험 약물 및 XOD로 충전한 카트리지를 사용하였으며, 세번째 조건으로 C, M 및 Y 카트리지를 각각 크산틴과 XOD의 혼합물, 시험 약물 및 NBT로 충전한 카트리지를 사용하였다. 카트리지에서 분출되는 바이오 잉크 양은 카트리지에서 분출되는 바이오 잉크 양과 K값의 상관관계(도 4 참조)를 이용하여 카트리지에서 손실된 바이오 잉크의 평균 중량을 카트리지에 충전된 바이오 잉크의 밀도로 나누어 계산하였다. 한편, 분출된 바이오 잉크의 몰수는 분출된 바이오 잉크의 양(부피)과 바이오 잉크의 몰 농도를 곱하여 계산하였다(도 1B 참조). 또한, 분출된 바이오 잉크의 몰수/화합물의 단위/SOD의 함수를 이용하여 종이에 침전된 NBT 포르마잔 색상의 강도를 나타내는 그레이-스케일 값을 계산하고, 그레이-스케일 값을 50% 저해시키는데 필요한 시험 약물의 양을  $IM_{50}$  값으로 정의하여  $IM_{50}$  값을 통해 시험 약물의 항산화 활성을 비교하였다.
- [0040] 측정된 결과는 기존에 사용되고 있는 방법으로서 웰-플레이트에서 XOD 저해 어세이를 이용하여 항산화 활성을 측정된 결과와 유사하였다(도 3 및 도 5 내지 도 7 참조). 또한, 첫번째 및 두번째 조건은 세번째 조건에 비해 재현성이 더 우수하였으며, 분출된 바이오 잉크의 몰수에 대한 NBT 포르마잔의 그레이-스케일 강도 그래프가 더 선형적으로 나타났다(도 5 내지 도 7 참조).
- [0041] 따라서, 상기 방법은 종래의 방법보다 더 적은 양의 시험 물질을 사용하면서도 정확하고 빠르게 정량적인 분석을 할 수 있으므로, 약효평가 분석에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0043] 또한, 본 발명은 1) 기질 및 염료물질이 포함된 제 1카트리지, 약물 후보물질이 포함된 제 2카트리지 및 효소가 포함된 제 3카트리지를 잉크젯 프린터에 장착하는 단계; 및 2) 상기 단계 1)의 카트리지를 순차적으로 잉크젯 프린팅하는 단계를 포함하는 잉크젯 프린터를 이용하여 약물의 효능을 분석하는 방법을 제공한다.
- [0044] 본 발명에 따른 방법은 상기 기질 및 염료물질을 용액에 용해시켜 바이오 잉크를 제조하고, 이를 제 1카트리지에 충전하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 기질과 염료물질은 1:0.1 내지 5의 몰 농도비로 혼합될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 상기 기질과 염료물질은 1:1의 몰 농도비로 혼합될 수 있다. 상기 기질 및 염료물질은 상술한 바와 같은 특징을 가질 수 있다. 상기 용액은 일반적으로 기질 및 염료물질을 용해시키는데 사용될 수 있는 물질이라면 모두 사용할 수 있다. 상기 용액은 상술한 바와 같은 특징을 가질 수 있다. 본 발명의 일

실시예에서, 상기 용액은 트리스 완충액, PEG-400(polyethylene glycol-400) 또는 tert-부탄올일 수 있다. 또한, 상기 기질은 크산틴 일 수 있으며, 상기 염료물질은 NBT일 수 있다.

- [0045] 본 발명에 따른 방법은 상기 약물 후보물질 또는 효소를 용액에 용해시켜 바이오 잉크를 제조하고, 이를 각각의 카트리지에 충전하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 약물 후보물질은 제한이 없으며, 고체상 약물 또는 액체상 약물일 수 있다. 상기 효소는 상술한 바와 같은 특징을 가질 수 있다. 상기 용액은 일반적으로 약물 후보물질 및 효소를 용해시키는데 사용될 수 있는 물질이라면 모두 사용할 수 있다. 상기 용액은 상술한 바와 같은 특징을 가질 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 상기 용액은 트리스 완충액, PEG-400(polyethylene glycol-400) 또는 tert-부탄올일 수 있다. 또한, 상기 효소는 크산틴 산화효소일 수 있다.
- [0046] 상기 카트리는 순차적으로 기관상에 잉크젯 프린팅할 수 있다. 상기 기관은 상술한 바와 같은 특징을 가질 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 상기 기관은 종이일 수 있다.
- [0047] 본 발명에 따른 방법은 인쇄된 물질의 물수를 계산하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 인쇄된 물질의 물수는 소비된 바이오 잉크의 양에 용액의 농도를 곱하여 계산될 수 있다. 상기 소비된 바이오 잉크의 양은 카트리지에서 소비된 바이오 잉크의 평균 중량을 카트리지에 충전된 바이오 잉크의 밀도로 나누어 계산될 수 있다. 상기 바이오 잉크는 상술한 바와 같이 제 1 내지 제 4카트리지에 충전되는 물질일 수 있다. 구체적으로, 상기 바이오 잉크는 기질, 염료물질, 약물 후보물질 또는 효소일 수 있다.
- [0048] 상기 잉크젯 프린팅에 의해 젯팅되는 액적의 직경은 0.1 cm 내지 0.5 cm일 수 있다. 구체적으로는, 0.2 cm 내지 0.4 cm일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서, 잉크젯 프린팅에 의해 젯팅되는 액적의 직경은 0.3 cm일 수 있다.
- [0049] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 잉크젯 프린터의 카트리지에 3가지의 다른 조건으로 바이오 잉크를 충전하고 인쇄하여 인쇄 중에 소비된 카트리지 내 바이오 잉크의 양을 계산함으로써 XOD 저해 정도를 분석하여 시험 약물의 항산화 활성을 측정하였고, 측정된 결과는 종래의 방법으로 웰-플레이트에서 XOD 저해 어세이를 이용하여 항산화 활성을 측정한 결과와 유사함을 확인하였다.
- [0050] 따라서, 상기 방법은 종래의 방법보다 더 적은 양의 시험 물질을 사용하면서도 정확하고 빠르게 정량적인 분석을 할 수 있으므로, 약효평가 분석에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0052] 또한, 본 발명은 젯팅 디바이스, 용액 저장 카트리지 및 드라이브 장치를 포함하고, 상기 바이오 잉크 저장 카트리지가 기질이 포함된 제 1카트리지, 염료물질이 포함된 제 2카트리지, 약물 후보물질이 포함된 제 3카트리지, 효소가 포함된 제 4카트리지로 구성된, 약물의 효능을 분석하기 위한 잉크젯 프린팅 장치를 제공한다.
- [0053] 상기 기질, 염료물질, 약물 후보물질 및 효소 각각은 상술한 바와 같은 특징을 가질 수 있다. 상기 카트리는 상술한 바와 같은 특징을 가질 수 있다.
- [0054] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 잉크젯 프린터의 카트리지에 3가지의 다른 조건으로 바이오 잉크를 충전하고 인쇄하여 인쇄 중에 소비된 카트리지 내 바이오 잉크의 양을 계산함으로써 XOD 저해 정도를 분석하여 시험 약물(나린제닌)의 항산화 활성을 측정하였고 측정된 결과는 종래의 방법으로 웰-플레이트에서 XOD 저해 어세이를 이용하여 항산화 활성을 측정한 결과와 유사함을 확인하였다.
- [0055] 따라서, 상기 방법은 종래의 방법보다 더 적은 양의 시험 물질을 사용하면서도 정확하고 빠르게 정량적인 분석을 할 수 있으므로, 상기 잉크젯 프린팅 장치는 약효평가 분석에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0057] 아울러, 본 발명은 젯팅 디바이스, 용액 저장 카트리지 및 드라이브 장치를 포함하고, 상기 바이오 잉크 저장 카트리지가 기질 및 염료물질이 포함된 제 1카트리지, 약물 후보물질이 포함된 제 2카트리지, 효소가 포함된 제 3카트리지로 구성된, 약물의 효능을 분석하기 위한 잉크젯 프린팅 장치를 제공한다.
- [0058] 상기 기질, 염료물질, 약물 후보물질 및 효소 각각은 상술한 바와 같은 특징을 가질 수 있다. 상기 카트리는 상술한 바와 같은 특징을 가질 수 있다.
- [0059] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 잉크젯 프린터의 카트리지에 3가지의 다른 조건으로 바이오 잉크를 충전하고 인쇄하여 인쇄 중에 소비된 카트리지 내 바이오 잉크의 양을 계산함으로써 XOD 저해 정도를 분석하여 시험 약물(나린제닌)의 항산화 활성을 측정하였고 측정된 결과는 종래의 방법으로 웰-플레이트에서 XOD 저해 어세이를 이용하여 항산화 활성을 측정한 결과와 유사함을 확인하였다.
- [0060] 따라서, 상기 방법은 종래의 방법보다 더 적은 양의 시험 물질을 사용하면서도 정확하고 빠르게 정량적인 분석



을 할 수 있으므로, 상기 잉크젯 프린팅 장치는 약효평가 분석에 유용하게 사용될 수 있다.

[0062]

이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[0063]

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 이들에 의하여 한정되는 것은 아니다.

**실시예 1**

[0065]

**96 웰-플레이트를 이용한 XOD 저해 어세이**

[0066]

기존에 사용되고 있는 방법으로서 웰-플레이트에의 XOD 저해 어세이를 이용하여 안트라센 유도체인 나린제닌의 항산화 활성을 측정하였다. 대조군으로는 항산화 물질로 알려진 SOD를 사용하였다. XOD의 효소 활성을 억제하기 위한 상기 화합물의 IC<sub>50</sub> 값은 정량적으로 평가되었다.

[0067]

구체적으로, 0.5 M 트리스 완충액을 사용하여, 5 mM의 DTPA(diethylentriamine), 0.1 mM의 나린제닌, 5 mM의 NBT(nitro blue tetrazolium) 및 500 U/ml의 SOD(superoxide dismutase)를 포함하는 크산틴 용액을 제조하였다. NBT는 2 N의 NaOH를 첨가하여 트리스 완충액에 용해시켰다. 먼저, 5 mM의 크산틴 10 μl와 5 mM의 NBT 20 μl를 웰-플레이트에서 잘 혼합시키고 3분 동안 반응시켰다. 다양한 농도에서 SOD 또는 시험 약물의 항산화 활성을 측정하기 위해 상기의 방법으로 제조한 SOD 또는 시험 약물의 저장용액을 각 웰에 10 μl에서 100 μl 까지 첨가하고, 0.5 M 트리스 완충액을 사용하여 최종 부피를 230 μl로 하였다. SOD 및 시험 약물의 최종농도는 SOD의 경우 5 U 내지 50 U 및 나린제닌은 1 nmole 내지 10 nmole이었다. 이어서 0.1 U/ml의 XOD 20 μl를 모든 웰에 첨가하고, 반응 혼합물을 실온에서 3분 동안 둔 후, 50 μl의 3 N HCl 용액을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 이후, 다중 플레이트 판독기(Molecular Devices, Spectra MAX M5)를 사용하여 반응물에서 환원된 NBT 포르마잔의 흡광도를 측정하였다. 최종적으로 흡광도 측정에 사용한 용액의 농도는 하기 표 1과 같다.

**표 1**

[0068]

어세이에 사용한 용액의 농도

용액	크산틴 (5 mM)	NBT (5 mM)	XOD (0.1 U/ml)
어세이에 사용한 용액의 농도	$5.0 \times 10^{-8}$ mol	$1.0 \times 10^{-7}$ mol	$2.0 \times 10^{-3}$ U

[0070]

흡광도 측정 결과, NBT 포르마잔의 최대 흡수가 약 560 nm에서 관찰되어 시험 약물에 의한 XOD 효소 저해도는 560 nm 파장에서의 흡광도 값으로 분석하였다(도 2). 또한, 시험 약물의 흡광도 측정 결과를 바탕으로 시험 약물의 IC<sub>50</sub> 값을 계산하였다.

[0071]

그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 560 nm 파장에서 시험 약물의 NBT 포르마잔 흡광도는 첨가된 시험 약물의 양에 반비례하여 선형적으로 감소하였으며, 이는 SOD의 값과 유사한 경향을 보였다. 이를 통해 시험 약물에 의한 XOD 효소 활성의 저해로 인해 NBT의 양이 감소함으로써 NBT 포르마잔의 형성이 감소되었으며, 이로부터 시험 약물이 SOD와 비슷한 정도의 항산화 활성을 가짐을 알 수 있었다(도 3). 또한, 상기 흡광도 측정 결과를 바탕으로 시험 약물의 IC<sub>50</sub> 값을 계산한 결과, SOD 및 나린제닌의 IC<sub>50</sub> 값은 각각 5.2 U/ml 및 24.0 μM이었다.

**실시예 2**

[0073]

**잉크젯 프린팅을 이용한 XOD 저해 어세이**

[0074]

시중에서 판매되는 HP 데스크탑 잉크젯 프린터(HP Office Jet Pro 8100e)의 카트리지에 바이오 잉크를 충전하고 인쇄하여 인쇄 중에 소비된 카트리지 내 바이오 잉크의 양을 계산함으로써 XOD 저해 활성을 분석하였다. 실험은 하기와 같은 방법으로 최적의 반응 스팟 크기를 선정하여 인쇄된 부피당 반응 스팟의 표면 덮힘률을 측정함으로써 수행되었다.

[0076]

**<2-1> 최적의 반응 스팟 크기 선정**

[0077]

먼저, 최적의 반응 스팟 크기를 결정하기 위해  $45\pi \text{ cm}^2$ 의 전체 반응 스팟 면적을 갖는 A4 용지에, 잉크젯 프린팅 반응 스팟의 직경을 0.2 cm, 0.3 cm, 0.4 cm 또는 0.5 cm로 설정하여 손실된 카트리지의 중량과 용액 또는 시험 약물이 포함된 바이오 잉크 용액이 카트리지에서 분출되어 반응 스팟을 채울 때 반응 스팟 직경과의 함수

를 계산하였다. 각각의 스팟 크기에 대해 잉크젯 프린팅을 20회 반복적으로 실행하였고, 모든 각각의 스팟 크기에서 손실된 카트리지가 중량의 표준 편차 값을 얻었다.

[0078] 그 결과, 스팟의 직경이 0.3 cm일 때 손실된 카트리지가 중량의 분산 값이 가장 작은 표준 편차 값을 가졌기 때문에 최적의 스팟 크기로 0.3 cm를 선택하였다.

[0079]

[0080] <2-2> 카트리지에서 분출되는 바이오 잉크의 양을 측정하는 방법

[0081] 인쇄 중에 소비된 바이오 잉크의 양은, 프린팅을 20번 반복하여 얻은 카트리지에서 소비된 바이오 잉크의 평균 중량을 카트리지에 충전된 용액의 밀도로 나누어 계산하였다(도 1B 참조). 카트리지에 충전된 바이오 잉크의 밀도는 비중병(pycnometer)을 사용하여 동일한 온도 조건에서 바이오 잉크와 물의 밀도를 비교하여 측정하였으며, 하기 수학적 식 1에 측정값을 대입하여 계산하였다.

수학적 식 1

$$\text{밀도} = \frac{d_0(W-W_e)}{W_0-W_e}$$

[0082]

[0083] 상기 수학적 식 1에서, W는 카트리지에 충전된 바이오 잉크의 중량이고, W<sub>e</sub>는 비중병의 무게이며, W<sub>0</sub>은 물의 무게이고, d<sub>0</sub>는 물의 밀도이다. 잉크젯 프린터의 카트리지에서 분출되는 양은 그래픽 프로그램(Adobe Photoshop CC)을 사용하여 설정한 청록색, 자홍색, 노랑색 및 검정색(CMYK) 값에 따라 조절하였으며, 인쇄 패턴은 Microsoft PowerPoint 소프트웨어(Microsoft Inc., USA)를 사용하여 설계하였다.

[0085] <2-3> 카트리지에서 분출되는 바이오 잉크의 양과 K값의 상관관계

[0086] 카트리지에서 분출되는 바이오 잉크의 양은 점도, 표면장력 및 밀도에 영향을 받으므로 카트리지에 충전된 물질에 따라 분출되는 양이 달라진다. 어세이에 사용한 물질을 포함하는 바이오 잉크가 충전된 카트리지에서 바이오 잉크의 분출 양을 측정하기 위해 실시예 <2-1>의 결과에 따라 반응 스팟 직경을 0.3 cm로 하였으며, 0.5 M의 트리스 완충액, 500 U/ml의 SOD, 0.1 mM의 나린제닌, 5 mM의 크산틴, 5 mM의 NBT 또는 0.1 U/ml의 XOD를 포함하는 용액을 제조하였다. 각각의 용액에 180 μl의 PEG-400 및 100 μl의 tert-부탄올을 넣은 후, 최종 부피를 1 ml로 하여 바이오 잉크를 제조하였다. 카트리지에 상기 바이오 잉크를 충전하고 상기 바이오 잉크 분출 양의 파라미터인 K값을 소프트웨어를 이용하여 100으로 설정하고 분출된 바이오 잉크의 양을 실시예 <2-2>와 같은 방법으로 계산하였다. 모든 카트리지와 프린터 헤드는 100% 에탄올과 증류수로 여러 차례 철저히 씻었고, 인쇄하기 전에 공기중에 건조시켰다.

[0087] K값은 소프트웨어에서 조절할 수 있는 분출 양의 파라미터로서, K값을 조절함으로써 카트리지에서 분출되는 바이오 잉크의 양을 제어할 수 있으며 이를 통해 특정 반응 스팟에 인쇄된 물질의 물수를 자유롭게 조절할 수 있다. K값과 카트리지에서 분출되는 바이오 잉크 양과의 상관관계를 확인하기 위해 카트리지에 상기 방법으로 제조한 0.5 M의 트리스 완충액, 500 U/ml의 SOD 또는 0.1 mM의 나린제닌을 포함하는 바이오 잉크를 카트리지에 충전하고 K값을 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100으로 설정하여 바이오 잉크의 분출 양을 실시예 <2-2>와 같은 방법으로 계산하였다.

[0088] 그 결과, 도 4A에 나타낸 바와 같이, K값이 100일 때 트리스 완충액은 다른 용액 및 시험 약물에 비해 분출량이 많았다. 또한, 도 4B에 나타낸 바와 같이, K값을 100으로 설정하면 시약 용액의 분출량이 45 nL 미만이었으나, K값을 10으로 설정하면 시약 용액의 분출량이 5 nL 미만이었다. 한편, SOD와 아미노글루테치미드, 디트라놀 및 나린제닌의 분출량은 용액의 특성이 다르지만 동일한 K값에서 분출량이 거의 동일하였다. 모든 바이오 잉크 용액의 분출량은 K값에 비례하여 K값이 10에서 100으로 증가하였을 때, 약 10배 증가하였다(도 4).

[0090] <2-4> 잉크젯 프린팅을 이용한 항산화 활성 측정

[0091] 잉크젯 프린팅을 통해 XOD 저해 정도를 분석하여 나린제닌의 항산화 활성을 측정하였다. 대조군으로는 항산화 작용 활성이 알려진 SOD를 사용하였으며, 3가지의 다른 조건으로 잉크젯 프린터의 카트리지를 충전하여 물질의

항산화 활성을 비교하였다. 분자의 항산화 특성을 평가하는 정량화 지수로  $IM_{50}$ (inhibitory mole 50) 값을 새롭게 정의하여 항산화 활성을 측정하였다.

[0092] 구체적으로, 0.5 M 트리스 완충액을 사용하여 5 mM의 크산틴, 5 mM의 NBT, 0.1 U/ml의 XOD, 0.1 mM의 나린제닌 또는 500 U/ml의 SOD(superoxide dismutase)를 포함하는 용액을 제조하였다. 제조된 각각의 용액에 180  $\mu$ l의 PEG-400 및 100  $\mu$ l의 tert-부탄올을 넣은 후, 최종 부피를 1 ml로 하여 바이오 잉크를 제조하고, 3가지의 서로 다른 조건으로 잉크젯 프린터의 카트리지에 주입하였다. 최종적으로 카트리지에 주입된 용액의 농도는 하기 표 2와 같다.

표 2

카트리지에 주입된 용액의 농도

용액	크산틴 (5 mM)	NBT (5 mM)	XOD (0.1 U/ml)
카트리지에 주입된 용액의 농도	$2.3 \times 10^{-10}$ mol	$2.2 \times 10^{-10}$ mol	$4.6 \times 10^{-6}$ U

[0095] 먼저, 잉크젯 프린터의 C, M, Y 및 K 카트리지를 각각 5 mM의 크산틴, 5 mM의 NBT, 시험 약물(0.1 mM의 나린제닌 또는 500 U의 SOD) 및 0.1 U의 XOD로 충전하여 시험 약물에 대한 항산화 활성을 측정하였다. 시험 약물에 대한 K값은 10 내지 100으로 설정하였으며, 크산틴, NBT 및 XOD에 대한 K값은 <실시에 1>에서 표준화된 바와 같이 달성되도록 100으로 설정하였다. C 카트리지를 A4 용지의 반응 스팟에 5번 인쇄하고, M 카트리지를 동일한 스팟에 10번 연속으로 인쇄한 후, 혼합물을 3분 동안 두었다. 그런 다음 Y 카트리지를 동일한 스팟에 10번 인쇄하고, 3분 동안 두었다. 이후, 동일한 스팟에 K 카트리지를 10번 인쇄하고 3분 동안 두어 종이를 건조시키고, HP 스캐너를 사용하여 이미지를 스캔하였다. 종이에 침전된 NBT 포르마잔 색상의 강도는 Image J 소프트웨어로 측정하여 그레이-스케일 값으로 나타내었다. 실시예 <2-3>의 결과로 얻은 카트리지에서 분출되는 바이오 잉크 양과 K값의 상관관계를 이용하여 K값에 대한 분출된 바이오 잉크의 양을 측정하였고, 분출된 바이오 잉크의 양(부피)과 바이오 잉크의 몰 농도를 곱하여 분출된 바이오 잉크의 몰수를 계산하였다(도 1B 참조). 분출된 바이오 잉크의 몰수/화합물의 단위/SOD의 함수를 이용하여 NBT 포르마잔의 그레이-스케일 값을 계산하고, 그레이-스케일 값을 50% 저해시키는데 필요한 시험 약물의 양(몰수)을  $IM_{50}$ 으로 정의하였다.

[0096] 분석과정에서 사용하는 카트리지의 수를 줄인다면 비용 및 시간의 소모가 적으므로 두번째 조건으로 3가지 카트리지를 사용하여 항산화 활성을 측정하였다. 잉크젯 프린터의 C, M 및 Y 카트리지를 각각 5 mM의 크산틴과 5 mM의 NBT의 혼합물, 시험 약물(0.1 mM의 나린제닌 또는 500 U의 SOD) 및 0.1 U의 XOD로 충전하였으며, K 카트리지를 사용하지 않은 것을 제외하고는, 상기와 같은 방법으로 시험 약물에 대한 항산화 활성을 측정하였다.

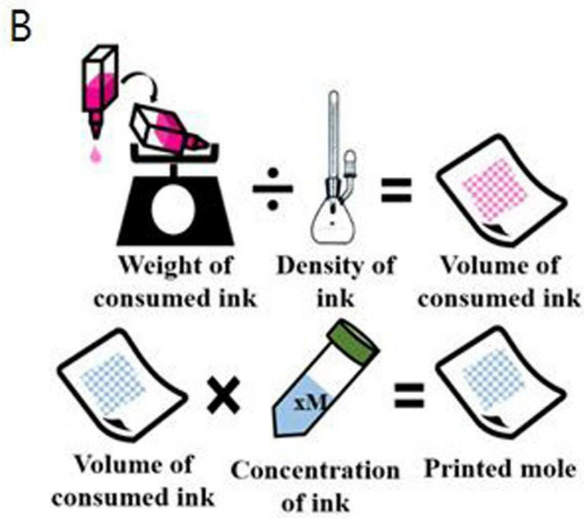
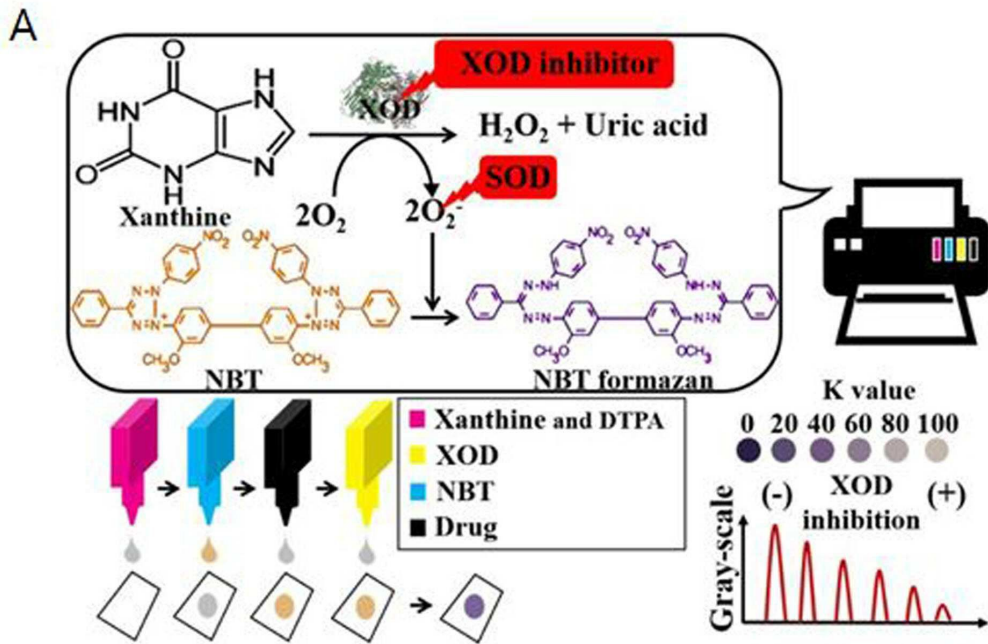
[0097] 마지막 조건으로 XOD 효소의 분출 시점을 다르게 하여 항산화 활성을 측정하였다. 잉크젯 프린터의 C, M 및 Y 카트리지를 각각 5 mM의 크산틴과 0.1 U의 XOD의 혼합물, 시험 약물(0.1 mM의 나린제닌 또는 500 U의 SOD) 및 5 mM의 NBT로 충전하였으며, K 카트리지를 사용하지 않은 것을 제외하고는, 상기와 같은 방법으로 시험 약물에 대한 항산화 활성을 측정하였다.

[0098] 그 결과, 도 5 내지 도 7에 나타낸 바와 같이, 첫번째 조건에서 SOD 및 나린제닌의  $IM_{50}$ 값은 각각 183.9 mU 및  $3.7 \times 10^{-11}$  mol이었으며(도 5), 두번째 조건에서는 각각 198.3 mU 및  $3.6 \times 10^{-11}$  mol이었고(도 6), 세번째 조건에서는 각각 224.1 mU 및  $4.2 \times 10^{-11}$  mol이었다(도 7).

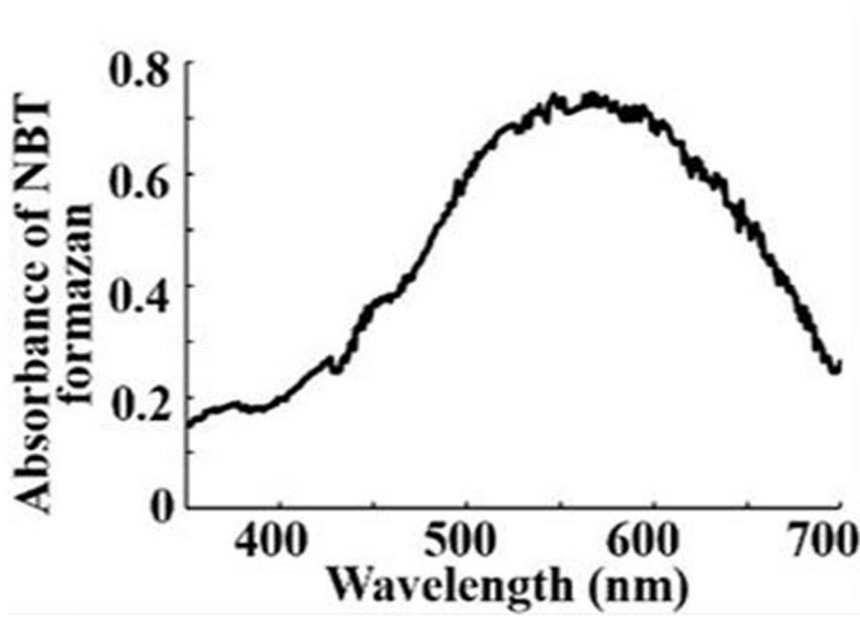
[0099] 이러한 경향은 기존에 사용되고 있는 방법으로 웰-플레이트에서 XOD 저해 어세이를 이용하여 항산화 활성을 측정된 <실시에 1>의 결과와 유사하였다. 또한, 첫번째 및 두번째 조건은 세번째 조건에 비해 재현성이 더 우수하였으며, 분출된 바이오 잉크의 몰수에 대한 NBT 포르마잔의 그레이-스케일 강도 그래프가 더 선형적으로 나타났다.

도면

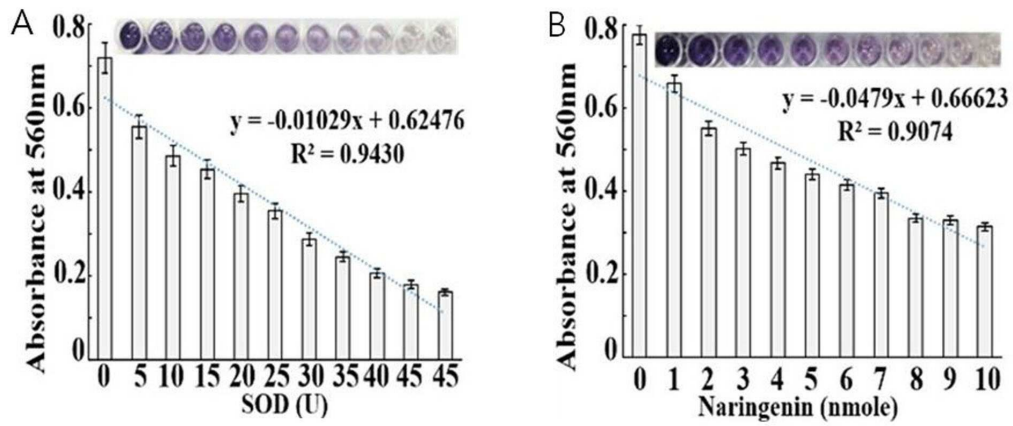
도면1



도면2

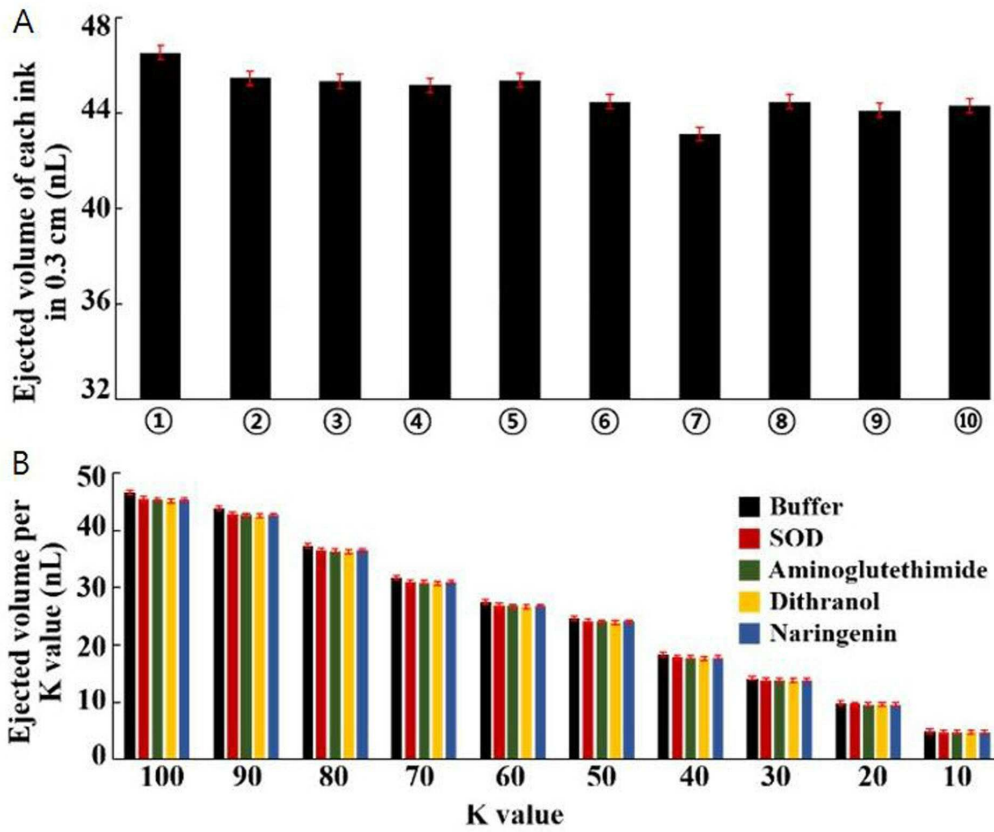


도면3

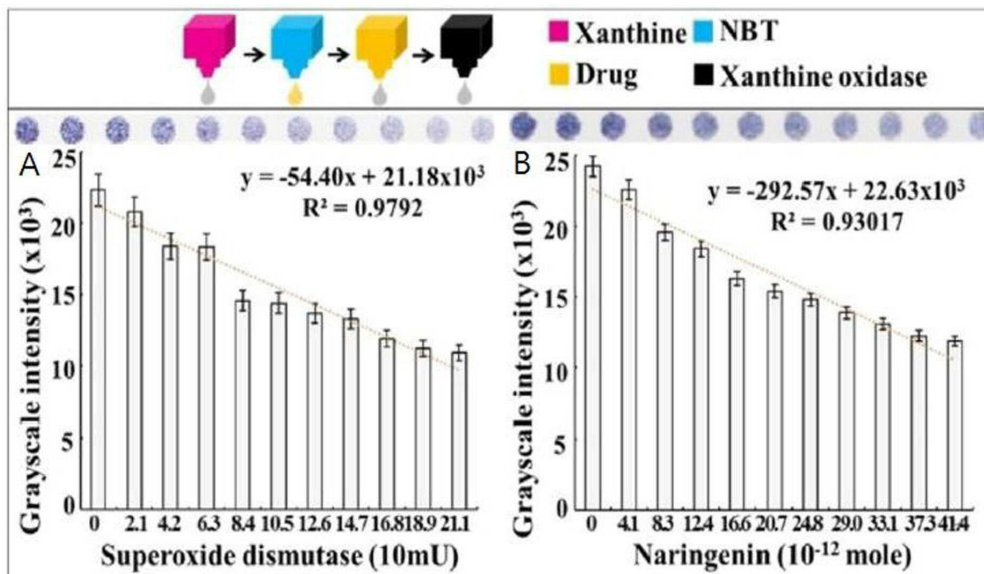




도면4

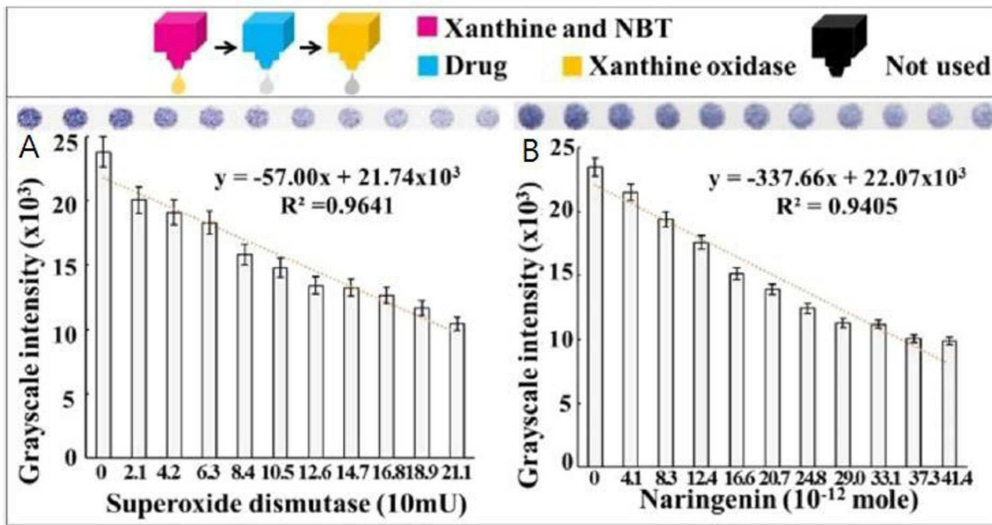


도면5





도면6



도면7

