



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0017314

(43) 공개일자 2024년02월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/6816 (2018.01) C12Q 1/6883 (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6816 (2018.05)

C12Q 1/6883 (2022.01)

(21) 출원번호 10-2023-0082305

(22) 출원일자 2023년06월27일

심사청구일자 2023년06월27일

(30) 우선권주장

1020220094939 2022년07월29일 대한민국(KR)

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

한국과학기술연구원

서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)

(72) 발명자

장우영

서울특별시 용산구 이촌로54길 16, 901호 (이촌동, 정우맨션)

황장선

서울특별시 성동구 왕십리로 385, 810호 (하왕십리동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

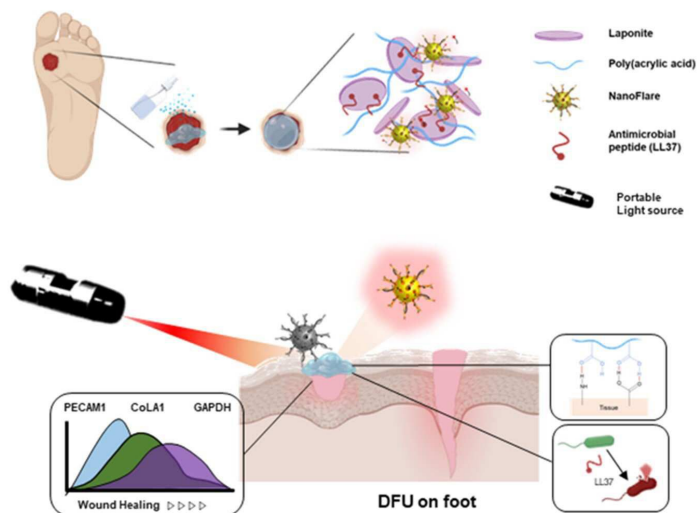
특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 분사 가능한 하이드로젤을 포함하는 나노센서를 이용한당뇨성 상처 치유 모니터링 시스템

(57) 요약

본 발명은 상처 치료 모니터링이 가능한 나노플래어 및 분사 가능한 하이드로젤을 포함하는 나노센서, 이의 제조 방법 및 이를 이용한 당뇨성 상처치유 실시간 모니터링 시스템에 관한 것으로, 본 발명에 따르면 당뇨성 상처 부위에 도포가 쉬운 분사형 하이드로젤을 포함하여 재생 촉진, 항균작용, 치유 과정 모니터링 나노센서에 관한 것으로, 상기 하이드로젤은 분사형으로 불규칙한 당뇨성 상처부위에 적용이 용이하며 다양한 재생 촉진 인자들을 함유하여 뛰어난 생체 적합성, 항균작용, 상처 치유 효과를 제공한다. 뿐만 아니라, 치유 과정을 실시간으로 모니터링할 수 있기 때문에 재생의학에 유용하게 사용될 수 있으며 광범위한 활용도를 제공할 수 있다.

대표도 - 도1

(52) CPC특허분류

C12Q 2563/107 (2013.01)
C12Q 2563/155 (2013.01)
C12Q 2600/106 (2013.01)

(72) 발명자

정다운

경상북도 포항시 남구 청암로 77, 4동 205호 (지곡동, 포항공과대학교대학원아파트)

류진

서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동, 한국과학기술연구원)

정영미

서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동, 한국과학기술연구원)

장세윤

서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동, 한국과학기술연구원)

노순중

서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동, 한국과학기술연구원)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711187387
과제번호	2022R1A2C2092726
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	태반을 추출물을 이용한 당뇨병성 족부궤양 치료에 관한 연구 및 mRNA 나노센서를 이
용한 그 유효성 검증	
기 여 율	50/100
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711194708
과제번호	00211412
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	고탄성 고분자 다공성 공배양 박막을 이용한 전도성및 최소 침습성 심근패치 개발
기 여 율	50/100
과제수행기관명	한국과학기술연구원
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

고분자 전해질 및 클레이 입자를 포함하는 분사 가능한 하이드로젤; 및 나노플레이어;를 포함하고,
상기 분사 가능한 하이드로젤은 고분자 전해질 및 클레이 입자가 네트워크를 형성한 것을 특징으로 하는 상처치유 모니터링용 나노센서.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 고분자 전해질은 폴리아크릴산, 폴리메타크릴산, 폴리스티렌설포네이트, 알지네이트 및 헤파린으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 당뇨성 상처치유 모니터링용 나노센서.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 고분자 전해질의 중량평균 분자량은 5,000 내지 1,000,000 g/mol인 것을 특징으로 하는 당뇨성 상처치유 모니터링용 나노센서.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 클레이 입자는 라포나이트, 스펙타이트, 벤토나이트 및 버미큘라이트로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 당뇨성 상처치유 모니터링용 나노센서.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 나노플레이어는 금 나노입자를 포함하는 중심부; 인식 서열 및 플레어 서열을 포함하는 플레어부를 함유하고,

상기 인식 서열은 표적 유전자에 상보적으로 결합하고,

상기 플레어 서열은 인식 서열에 상보적으로 결합하고,

상기 플레어부는 상기 중심부의 표면에 형성되는 것을 특징으로 하는 당뇨성 상처치유 모니터링용 나노센서.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 인식 서열은 표적 유전자를 인식하는 염기서열의 3' 말단에 티올 변형된 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 상처치유 모니터링용 나노센서.

청구항 7

제 5 항에 있어서,

상기 표적 유전자는 PECAM1, COL1A1 및 GAPDH로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 상처치유 모니터링용 나노센서.

청구항 8

제 5 항에 있어서,

상기 인식 서열은 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 9 및 서열번호 10으로 표시된 1종 이상의 염기서열인 것을 특징으로 하는 상처치유 모니터링용 나노센서.

청구항 9

제 5 항에 있어서,

상기 플레어 서열은 5' 말단에 형광염료를 포함하는 것을 특징으로 하는 상처치유 모니터링용 나노센서.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

상기 플레어 서열은 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 11 및 서열번호 12로 표시되는 1종 이상의 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 상처치유 모니터링용 나노센서.

청구항 11

제 1 항에 있어서,

상기 나노플레어는 플레어부가 표적 유전자와 결합하여 상처치유의 정도를 측정하는 것을 특징으로 하는 상처치유 모니터링용 나노센서.

청구항 12

제 1 항에 있어서,

상기 나노센서는 스프레이로 도포 가능한 것을 특징으로 하는 당뇨성 상처치유 모니터링용 나노센서.

청구항 13

제 1 항에 있어서,

상기 나노센서는 재생 촉진 펩타이드를 추가로 포함하는 스프레이형 하이드로젤.

청구항 14

청구항 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 나노센서를 포함하는 당뇨성 상처치유 모니터링 시스템.

청구항 15

고분자 전해질 및 클레이 입자를 혼합하여 분사 가능한 하이드로젤 용액을 제조하는 단계; 및

상기 하이드로젤 용액과 나노플레어를 혼합하여 복합화시키는 단계를 포함하는 당뇨성 상처치유 모니터링용 나노센서의 제조방법.

청구항 16

제 15 항에 있어서,

상기 하이드로젤 용액을 제조하는 단계에서, 고분자 전해질은 클레이 입자 10 mg 당 1 내지 20 중량비로 혼합하는 것을 특징으로 하는 당뇨성 상처치유 모니터링용 나노센서의 제조방법.

청구항 17

청구항 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 나노센서를 상처 부위에 도포하는 단계; 및

상기 도포된 나노센서 내의 인식 서열이 상처 부위 내 표적 유전자와 결합하여 플레어 서열에 포함된 형광염료에 따른 생체 내 형광 이미지를 통해 상처치유 정도를 측정하는 단계를 포함하는 상처치유 모니터링 방법.

청구항 18

제 17 항에 있어서,

상기 나노센서를 당뇨성 상처 부위에 도포하는 단계는 하이드로젤과 나노플레어를 포함하는 나노센서를 분사하

여 도포하는 것을 특징으로 하는 당뇨병 상처치유 모니터링 방법.

청구항 19

제 17 항에 있어서,

상기 당뇨병 상처치유 정도를 측정하는 단계는 나노플래어의 서열에 포함된 형광염료의 형광의 강도를 측정하는 것을 특징으로 하는 당뇨병 상처치유 모니터링 방법.

청구항 20

제 17 항에 있어서,

상기 당뇨병 상처치유 정도를 측정하는 단계는 상기 나노센서 및 휴대용 형광 현미경을 이용하는 것을 특징으로 하는 당뇨병 상처치유 모니터링 방법.

청구항 21

제 20 항에 있어서,

당뇨성 상처 상처치유 정도를 측정하는 단계는 휴대용 형광 현미경을 이용하여 타겟 (COL1A1, PECAM1)의 적색 형광 및 레퍼런스 (GAPDH)의 근 적외선 형광의 비율로 나타내는 것을 특징으로 하는 당뇨병 상처치유 모니터링 방법.

청구항 22

제 21 항에 있어서,

상기 상처치유 정도를 측정하는 단계에서, 상기 상처치유 정도는 2일 내지 7일에 PECAM1/GAPDH 나노센서의 상처치유 지수가 1.2 이상인 경우 정상세포의 염증 반응 단계이고, 1.2 이하인 경우 당뇨 세포의 염증 반응 단계인 것을 특징으로 하는 상처치유 모니터링 방법.

청구항 23

제 21 항에 있어서,

상기 상처치유 정도를 측정하는 단계에서, 상기 상처치유 정도는 2일 내지 7일에 COL1A1/GAPDH 나노센서의 상처치유 지수가 1.5 이상인 경우 정상세포의 증식 단계이고, 1.5 이하인 경우 당뇨 세포의 증식 단계인 것을 특징으로 하는 상처치유 모니터링 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 당뇨병 상처 치료 모니터링이 가능한 나노플래어 및 분사 가능한 하이드로젤을 포함하는 나노센서, 이의 제조방법 및 이를 이용한 상처치유 실시간 모니터링 시스템에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 상처 치유는 손실된 피부 또는 조직을 재생하기 위한 인체 치유 능력을 조절하는 것이다. 상처 치유는 항상성/응고, 염증, 증식/재상피화 및 리모델링 등 4단계를 포함 한다. 상처는 다양한 원인에 의해 유발 되며 창상, 자상, 염증성 상처 등 으로 구별 된다. 일반적인 상처 회복의 분석은 전적으로 형태, 모양, 색 등의 시각적 요인에 의해 결정된다. 또한, 상처액(wound fluid)의 특정 대사 산물이나 바이오마커를 조사하기 위한 정량적 중합 효소 연쇄반응(qPCR)과 같은 시간 소모적이고 파괴적인 방법을 통해 수행된다.

[0003] 나노센서(nanosensors)는 나노물질의 고유한 물리 화학적 특성에 의존하여 더 빠르고, 더 저렴하고, 더 민감하고 정확한 의료 진단을 가능하게 한다. 나노 물질의 특성에 따라 검출 방법은 본질적으로 전기화학적, 광학적 또는 화학적, 방법을 이용할 수 있다.

[0004] 기존의 몇 가지 연구는 상처 치유 과정의 한 단계에 초점을 맞춘 상처액의 특정 대사산물 및 바이오마커를 대상으로 하거나 상처의 크기, 온도, 냄새, 색 드에 의하여 한다. 만성 상처를 포함 하는 일반적인 상처 치유에는

다양한 세포가 관여 한다. 이런 다양한 세포는 고유한 바이오마커를 포함한다. 상처 치유 과정의 전체 흐름은 상처 치유의 4 단계에서 다양한 바이오마커에 대한 기초적 분석을 통해서 드러낼 수 있고, 침습적인 방법을 사용한다는 점에서 기존의 연구의 한계를 알 수 있다. 당뇨병 상처 치유는 일반 상처 치유와 같으나 고농도의 당으로 인해 특정단백질(예)사이토 카인, 성장인자의 활성의 변화가 생기고 이에 따라 염증기가 지연 되어 이로 인해 증식/표피가 완전 하지 못하여 되어 만성으로 진행된다.

[0005] 특히, 당뇨 상처 치유의 핵심 단계는 염증 단계와 증식/재상피화 단계이다.

[0006] 염증 단계에서 상피화 단계까지 핵심적인 세포는 대식 세포이다. 대식세포는 M1형 (염증성) M2(조직재생성)으로 나뉘고 M2 대식세포의 활성 변화는 당뇨병 상처에서 염증 단계의 지표, 상처재생의 지표가 될 수 있다. 따라서, 당뇨 상처 치유 과정의 모니터링에 대한 평가를 위한 광학센서를 이용하여 피부층 또는 상처 부위를 통해 확산되고, 목적 세포의 mRNA 바이오커를 표적화 및 정량화하며, 비침습적으로 상처치유를 객관적으로 관찰 할 수 있는 방법에 대한 연구가 필요한 실정이다.

[0007] 창상 피복제는 습윤 환경 유지, 상처 부위 보호, 삼출물의 흡수, 흉터 억제, 상처 회복 촉진 등의 효능을 가진 의료용 제제이다. 하이드로젤을 창상 피복제로 이용할 경우, 신축성이 뛰어나고, 거즈, 폼형 창상 피복제보다 접착성이 높다는 장점을 지닌다. 또한, 창상에서 방출되는 삼출물을 흡수하며 치유하기에 적합한 습윤 환경을 장시간 유지할 수 있으며, 사용 중 교체 과정에서 재생된 피부조직을 손상시키거나 통증을 유발하지 않는다. 따라서, 최근에는 우수한 습윤환경 조성 능력과 창상 치유 능력을 제공하는 하이드로젤형의 드레싱에 대한 연구가 활발해지고 있는 추세이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 실시간으로 당뇨병 상처 치유 과정을 모니터링하는 동시에 재생을 촉진할 수 있는 분사 가능한 물질의 생체적합한 하이드로젤을 제작하며 상기 하이드로젤에 재생 촉진 펩타이드와 나노플레이어를 복합화함으로써 생체적합성이 뛰어나며, 우수한 당뇨병 상처 치유 능력을 제공하는 동시에 실시간으로 치유 과정을 모니터링하는 나노센서를 제공하는 것에 있다. 본 발명을 통해 개발된 창상 부위에 손쉽게 재생 하이드로젤을 적용할 수 있는 분사형 하이드로젤은 다양한 부위에 적용 가능하기 때문에 넓은 활용도를 제공한다고 할 수 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 고분자 전해질 및 클레이 입자를 포함하는 분사 가능한 하이드로젤; 및 나노플레이어;를 포함하고, 상기 분사 가능한 하이드로젤은 고분자 전해질 및 클레이 입자가 네트워크를 형성한 것을 특징으로 하는 당뇨병 상처치유 모니터링용 나노센서를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 서술한 나노센서를 포함하는 당뇨병 상처치유 모니터링 시스템을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 고분자 전해질 및 클레이 입자를 혼합하여 분사 가능한 하이드로젤 용액을 제조하는 단계; 및 상기 하이드로젤 용액과 나노플레이어를 혼합하여 복합화시키는 단계를 포함하는 당뇨병 상처치유 모니터링용 나노센서의 제조방법을 제공한다.

[0012] 또한, 상기 서술한 나노센서를 당뇨병 상처 부위에 도포하는 단계; 및 상기 도포된 나노센서 내의 인식 서열이 당뇨병 상처 부위 내 표적 유전자와 결합하여 플레어 서열에 포함된 형광염료에 따른 생체 내 형광 이미지를 통해 당뇨병 상처치유 정도를 측정하는 단계를 포함하는 당뇨병 상처치유 모니터링 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따른 당뇨병 상처 모니터링용 나노센서는 금 나노입자 상에 mRNA 검출용 바이오마커와 결합할 수 있는 인식부위, 플레어부를 포함하여 당뇨병 상처 치유의 과정의 객관적인 지표를 제공하고, 나노플레이어 내에 형광표지자를 포함하여 실시간 형광을 통해 직접적인 당뇨병 상처 치료 과정의 모니터링할 수 있으며, 정상군과 환자군(만성상처)에서 상처 치유의 전과정을 실시간으로 모니터링하여 평가할 수 있다.

[0014] 또한, 본 발명은 나노센서의 보관 및 전달용 하이드로젤을 이용하여 빠른 당뇨병 상처 회복과 안정한 형광 방출, 정량 도포 등에 의한 체계적인 형광 계산법을 제공할 수 있다.

[0015] 또한, 본 발명에 따른 나노센서는 자체 제작된 이동식 형광 현미경을 통하여 당뇨병 상처 회복 단계 바이오마커

(COL1A1, PECAM1, GAPDH)의 비율에 의한 정량적 계산법으로 당뇨병 상처 회복을 숫자로 객관화 할 수 있는 이점이 있다.

[0016]

또한, 본 발명은 당뇨병 상처 부위에 도포가 쉬운 분사형 하이드로젤을 포함하여 재생 촉진 및 치유 과정 모니터링 나노센서에 관한 것으로, 상기 하이드로젤은 분사형으로 불규칙한 상처부위에 적용이 용이하며 다양한 재생 촉진 인자들을 함유하여 뛰어난 생체 적합성 및 상처 치유 효과를 제공한다. 뿐만 아니라, 치유 과정을 실시간으로 모니터링할 수 있기 때문에 재생의학에 유용하게 사용될 수 있으며 광범위한 활용도를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017]

도 1은 본 발명에 따른 스프레이형 하이드로젤 나노플레어의 합성, 정량 및 진단에 대한 모식도이다. 하이드로젤 나노플레어는 당뇨병 상처부위에 스프레이 형식으로 도포하고 휴대용 형광 현미경을 이용하여 염증기 마커(PECAM1)와 증식기 마커(COL1A1)의 유전자 발현량을 레퍼런스 유전자(GAPDH)의 비율로 계산하여 그 값을 산출하며 특히 당뇨병 상처 발생 후 4-7일 사이의 각 바이오마커의 형광값에 의하여 당뇨병 상처 치유효과를 예측하였다.

도 2는 인식 서열(R), 플레어 서열(F), 타겟 서열(T)에 대한 2차 구조를 선택한 모식도이다: (A)는 COL1A1을 타겟으로 하는 나노플레어에 대한 R-T 이중가닥의 가능한 2차 구조이고, (B)는 COL1A1을 타겟으로 하는 나노플레어에 대한 R-F 이중가닥의 가능한 2차 구조이고, (C)는 PECAM1을 타겟으로 하는 나노플레어에 대한 R-F 이중가닥의 가능한 2차 구조이고, (D)는 GAPDH를 타겟으로 하는 나노플레어에 대한 R-F 이중가닥의 가능한 2차 구조이다. (F)는 나노 플레어의 인식부위, 타겟 부위, 플레어 부위 각각의 결합력에 관한 표이다(human, mouse 타겟 각각에 대한 결합력). (G)는 본 발명에 따른 바이오마커(인간 및 마우스의 COL1A1, PECAM1, GAPDH)의 프라이머 서열에 대한 정보이다. (H)는 본 발명에 따른 바이오마커(인간 및 마우스의 COL1A1, PECAM1, GAPDH)의 인식 부위 및 플레어 부위의 mRNA 서열에 대한 정보이다.

도 3은 본 발명에 따른 나노플레어 다른 시점에서의 (A) COL1A1-NF로 표지된 NDF의 공초점 형광 이미지, (B) COL1A1-NF로 표지된 고당 조건에서 NDF의 공초점 형광 이미지이다.

도 4는 본 발명에 따른 나노플레어 다른 시점에서의 (A) PECAM1-NF로 표지된 THP-1의 공초점 형광 이미지, (B) PECAM1-NF로 표지된 고당 조건에서 THP-1의 공초점 형광 이미지이다.

도 5는 (A) THP-1세포에 IL-4, IL-10 처리후 M2형 대식세포로 변화를 형광 염색하여 공초점 형광 이미지이고, (B)는 이를 분석한 도표이다. 본 발명에 따른 나노플레어 다른 시점에서의 (C) PECAM1-NF로 표지된 M2형 THP-1의 공초점 형광 이미지이고, (D) PECAM1-NF로 표지된 고당 조건에서 M2형 대식세포의 공초점 형광 이미지이다.

도 6은 본 발명에 따른 스프레이형 하이드로젤 제조에 대한 실험 결과이다: (A)는 라포나이트와 PAA의 분자량에 따른 젤 형성화이고, (B,C)는 레오미터를 통한 각각 합성된 스프레이형 하이드로젤의 탄성(회복력) 비교를 한 실험이고, (D)는 스프레이형 하이드로젤의 분사 실험이고, (E)는 스프레이형 하이드로젤의 생체 부착능 실험이다.

도 7은 본 발명에 따른 나노플레어의 최적화에 대한 실험결과이다: (A)는 COL1A1 나노 플레어에 대한 농도 고정 표적 서열 형광 분석표이고, (B)는 PECAM1 나노 플레어, (C)는 GAPDH 나노 플레어, (D)는 COL1A1-NF에 대한 타겟과 비타겟에 대한 감도이고, (E)는 PECAM1-NF, (F)는 GAPDH-NF에 대한 그래프이다($n=3$, 값은 평균 $\pm$ s.d.). (G)는 NDF 세포에서 COL1A1-NF와 다양한 성장인자에 의한 형광값의 비율과 RT-PCR의 결과 비교이고, (H)는 NDF 세포에서 고당 조건에서 COL1A1-NF와 다양한 성장인자에 의한 형광값의 비율과 RT-PCR의 결과 비교이고, (I)는 THP-1 세포에서 PECAM1-NF 다양한 성장인자에 의한 형광값의 비율과 RT-PCR의 결과 비교이고, (J) THP-1 세포에서 고당 조건일 때 PECAM1-NF 다양한 성장인자에 의한 형광값의 비율과 RT-PCR의 결과 비교이고, (K)는 M2로 변환된 대식세포에서 PECAM1-NF 다양한 성장인자에 의한 형광값의 비율과 RT-PCR의 결과 비교이고, (L) M2로 변환된 대식세포에서 고당 조건일 때 PECAM1-NF 다양한 성장인자에 의한 형광값의 비율과 RT-PCR의 결과 비교이다.

도 8은 본 발명에 따른 복합 하이드로젤의 (A, B) 성분에 따른 탄성 (회복력) 비교이고, (C) SEM 이미지이고, (D) 각성분에 따른 NDF 세포의 독성을 확인한 형광 (live&dead) 이미지 및 분석표이고, (E)는 동세포에 각각의 성분을 처리한 후 스크래치 에세이 이미지이다. (F)는 각성분에 대한 박테리아감수성 (E.coli) 그래프 및 이를 이용한 CFU (콜로니 수) 변화 그래프이다.

도 9는 본 발명에 따른 스프레이형 나노플레어의 최종 평가로 (A)는 각각 성분의 UV-VIS 그래프이고, (B)는 완성된 스프레이형 나노플레어의 이미지이고, (C)는 스프레이형 나노플레어의 실험실 상에서 방출 효과에 대한 그

래프이다.

도 10은 본 발명에 따른 상처 치유 모니터링 시스템을 정상 및 당뇨병 상처 마우스 모델에 적용한 동물 실험 결과이며, (A)는 동물 실험 모식도이고, (B)는 상처 크기의 변화 그래프이고, (C,D)는 상처 부위의 광학 및 형광 사진이고, (E)는 상처 부위의 시간에 따른 COL1A1 형광 발현양 (COLA1/GAPDH) 그래프이고, (F)는 당뇨 모델에서 상처 부위의 시간에 따른 COL1A1 형광 발현양 (COLA1/GAPDH) 그래프이고, (G)는 상처 부위의 시간에 따른 PECAM1 형광 발현양 (PECAM1/GAPDH) 그래프이고, (H)는 당뇨 모델에서 상처 부위의 시간에 따른 PECAM1 형광 발현양 (PECAM1/GAPDH)을 도식화한 그래프이다.

도 11은 본 발명에 따른 상처 치유 모니터링 시스템을 정상 및 당뇨병 상처 마우스 모델에 적용한 동물 실험 결과이며, (A)는 정상 마우스와 당뇨병 상처 마우스의 혈당 비교 그래프이고, (B)는 정상 마우스와 당뇨병 상처 마우스의 상처 치유 10일 후 비교 사진이고, (C)는 형광 분석에 사용한 상처 범위의 사진이고, (D)는 정상 및 당뇨병 상처 마우스에서 염증 등으로 인하여 잘 낫지 않는 상처의 PECAM1-NF에 의한 형광 사진이고, (E)는 정상 및 당뇨병 상처 마우스에서 시간에 따른 상처 회복 그래프이고, (F)는 정상, 당뇨병, 염증을 가지는 마우스에서 실험에서 제7, 10일차의 PECAM1 형광 발현양 그래프이고, (G)는 생존 혹은 사망한 마우스에서의 상처 형광 이미지이고, (H)는 이에 대한 비교 그래프이다.

도 12는 본 발명의 스프레이형 하이드로젤 처리 후 4-7일간의 PECAM1/GAPDH (염증기), COLA1/GAPDH (증식기)를 표준화한 그래프로써 WHI (wound healing index)로 나타내었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 이하, 본 발명에 대해 상세하게 서술한다.

[0020] 본 발명은 고분자 전해질 및 클레이 입자를 포함하는 분사 가능한 하이드로젤; 및 나노플레이어;를 포함하고, 상기 분사 가능한 하이드로젤은 고분자 전해질 및 클레이 입자가 네트워크를 형성한 것을 특징으로 하는 당뇨병 상처치유 모니터링용 나노센서를 제공한다.

[0021] 본 발명에 따른 나노센서는 하이드로젤을 활용함으로써 분사 가능한 물성을 제공하며, 나노플레이어와 재생 촉진 펩타이드의 복합화를 통해 실시간 당뇨병 상처 치유 과정 모니터링이 가능한 재생 촉진 하이드로젤 창상 피복제 일 수 있다.

[0022] 또한, 본 발명에 따른 나노센서는 당뇨병 상처치유 과정의 모니터링에 의한 객관적인 지표를 제공하는 것으로, 나노플레이어를 분사 가능한 스프레이형 하이드로젤과 같이 사용되어 표적 세포 또는 mRNA 분화 성장을 직접 모니터링할 수 있다. 또한, 표적 유전자 발현의 관찰에 의한 질병의 직접적인 모니터링이 가능하다. 더불어, 암세포의 성장, 감염 등에 직접적인 증거를 제시할 수 있다. 상기 나노센서는 스프레이로 도포 가능한 것이다.

[0023] 더불어, 본 발명에 따른 나노센서는 살아있는 조직 또는 세포의 상태를 관찰할 수 있는 것이다.

[0024] 상기 고분자 전해질은 폴리아크릴산, 폴리메타크릴산, 폴리스티렌설포네이트, 알지네이트 및 헤파린으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0025] 상기 고분자 전해질의 중량평균 분자량은 5,000 내지 1,000,000 g/mol일 수 있다. 구체적으로, 상기 고분자 전해질의 중량평균 분자량은 10,000 내지 1,000,000 g/mol, 30,000 내지 800,000 g/mol 또는 50,000 내지 500,000 g/mol일 수 있다.

[0026] 상기 클레이 입자는 수팽윤성 규산염 입자이다. 구체적으로, 상기 클레이 입자는 라포나이트, 스�멕타이트, 벤토나이트 및 버미큘라이트로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 클레이 입자는 라포나이트일 수 있다.

[0027] 상기 클레이 입자는 원반상, 판상, 구상, 입상, 입방상 또는 침상의 형태를 가질 수 있다.

[0028] 또한, 상기 클레이 입자는 평균 직경이 1 내지 1000 nm일 수 있다. 구체적으로, 상기 클레이 입자는 평균 직경이 1 내지 200 nm 또는 1 내지 25 nm일 수 있다.

[0029] 상기 나노플레이어는 금 나노입자를 포함하는 중심부; 인식 서열 및 플레어 서열을 포함하는 플레어부를 함유하고, 상기 인식 서열은 표적 유전자에 상보적으로 결합하고, 상기 플레어 서열은 인식 서열에 상보적으로

결합하고, 상기 플레어부는 상기 중심부의 표면에 형성되는 것일 수 있다.

- [0030] 상기 나노플레어는 플레어부가 표적 유전자와 결합하여 형광이 발광하게 되고 바이오마커의 비율로 당뇨병 상처치유의 정도를 측정할 수 있다. 구체적으로, 상기 나노플레어는 플레어부의 인식 서열이 표적 유전자에 상보적으로 결합하여 상처치유의 정도를 측정할 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 나노플레어는 표적 유전자의 농도, 발현 시기에 따라 형광 신호가 변화하여 상처치유의 정도를 측정할 수 있다.
- [0031] 상기 금 나노입자는 금 나노입자의 평균 직경은 5 nm에서 60 nm일 수 있다.
- [0032] 상기 금 나노입자는 금 나노입자 표면이 구연산염(citrate)이 결합된 구조일 수 있다.
- [0033] 상기 금 나노입자는 금 나노입자는 3차 증류수에 분산되어 있을 수 있다.
- [0034] 상기 인식 서열은 표적 유전자에 상보적으로 결합하고, 상기 인식 서열은 표적 유전자를 인식할 수 있는 염기서열을 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 인식 서열은 표적 유전자를 인식하는 염기서열의 3 ‘말단에 티올 변형된 서열을 포함할 수 있다.
- [0035] 상기 표적 유전자는 PECAM1, COL1A1 및 GAPDH로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 인식 서열은 표적 유전자를 인식하는 염기서열인 것으로, 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 9 및 서열번호 10으로 표시된 1종 이상의 염기서열일 수 있다. 보다 구체적으로, 서열번호 9 및/또는 서열번호 10으로 표시된 염기서열은 GAPDH를 인식하는 염기서열로, 참조 유전자(reference gene)으로서 표적 유전자의 발현을 정량적으로 평가할 수 있도록 한다.
- [0036] 상기 플레어 서열은 14 내지 18개의 뉴클레오티드로 구성될 수 있다.
- [0037] 상기 플레어 서열은 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 11 및 서열번호 12로 표시되는 1종 이상의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [0038] 상기 플레어 서열은 5 ‘ 말단에 형광염료를 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 형광염료는 Cy3, Cy5, FAM, FITC, Cy5.5, RITC, TAMRA 및 Texas red로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0039] 상기 나노센서는 재생 촉진 펩타이드 및 성장인자 중 어느 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다.
- [0040] 상기 재생 촉진 펩타이드는 LL37 펩타이드, CW49 펩타이드, Ap-57 펩타이드 및 SubstanceP로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0041] 상기 성장인자는 인슐린, hGH, TGF- β 4, IL-6, FGF2, PDGF, VEGF, TNF- α , EGF, IGF, KGF 및 SDF-1으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0043] 또한, 본 발명은 상기 서술한 나노센서를 포함하는 당뇨병 상처치유 모니터링 시스템을 제공한다.
- [0044] 상기 당뇨병 상처치유 모니터링 시스템은 상기 나노센서를 도포 가능한(스프레이형) 하이드로젤과 나노플레어를 포함하여 상처 부위에 도포한 후 당뇨병 상처 부위 내 표적 유전자와 상기 나노센서 내의 인식 서열이 결합하여 플레어 서열에 포함된 형광염료에 따른 생체 내 형광의 비율을 통해 당뇨병 상처치유 정도를 측정할 수 있다.
- [0046] 또한, 본 발명은 고분자 전해질 및 클레이 입자를 혼합하여 분사 가능한 하이드로젤 용액을 제조하는 단계; 및 상기 하이드로젤 용액과 나노플레어를 혼합하여 복합화시키는 단계를 포함하는 당뇨병 상처치유 모니터링용 나노센서의 제조방법을 제공한다.
- [0047] 본 발명에서 분사 가능한(스프레이형) 하이드로젤 제작을 위해 고분자 전해질, 클레이 입자, 및 염의 함유량을 조절함으로써 분사 가능한 물성을 얻었다. 클레이 입자, 예를 들어 BYK 사의 라포나이트는 단면은 양으로, 한편, 표면은 음으로 대전되어 있는 원반상 입자로서, 나트륨 이온을 통해 층상 구조를 형성하고 있다. 상기 라포나이트 입자에 물을 첨가하면, 나트륨 이온에 물 분자가 수화되어 층이 박리된다. 또한, 라포나이트 입자의 양으로 대전되어 있는 단면과 라포나이트 입자의 음으로 대전되어 있는 표면이 정전 상호작용에 의해 결합되고, 그 결과, 라포나이트 입자는 하우스오브 카드 구조를 형성하여, 수분산액의 점성을 높일 수 있다.
- [0048] 한편, 클레이 입자가 물에 분산된 상태에서 고분자 전해질을 첨가하면, 새로이 클레이 입자와 고분자 전해질 간의 상호작용이 발생하여, 고분자/클레이 네트워크가 구축되고, 고분자 전해질의 체인 길이와 함유량에 따라 다

양한 역학 물성의 고분자/나노 미립자 컴포짓 하이드로젤이 형성된다.

- [0049] 상기 하이드로젤 용액을 제조하는 단계에서, 고분자 전해질은 클레이 입자 10 mg 당 1 내지 20 중량비로 혼합할 수 있다. 구체적으로, 고분자 전해질은 클레이 입자 10 mg 당 3 내지 15 중량비, 3 내지 12.5 중량비 또는 6 내지 12.5 중량비로 혼합할 수 있다.
- [0050] 상기 나노플레이어는 인식 서열 및 플레어 서열을 혼합하여 플레어부를 제조하는 단계; 및 상기 제조된 플레어부를 금 나노입자와 혼합한 혼합물을 -30 내지 -10℃의 온도에서 1시간에서 3시간 동안 보관한 후 염과 반응시켜 나노플레이어를 형성하는 단계를 거쳐 제조될 수 있다.
- [0051] 상기 플레어부를 제조하는 단계는 인식 서열 및 플레어 서열을 1:1 내지 10:1, 1:1 내지 5: 1 또는 3:1 내지 5:1의 몰 비율로 혼합할 수 있다.
- [0052] 상기 플레어부를 제조하는 단계는 인식 서열 및 플레어 서열을 반응시켜 이중가닥(duplex)을 형성한 후 인식 서열을 활성화시킬 수 있다. 구체적으로, 상기 인식 서열은 티올 변형되어 활성화될 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 활성화는 트리스(2-카르복시에틸)포스핀(Tris(2-carboxyethyl)phosphine: TCEP), 디티오프레이톨(dithiothreitol, DTT) 및 머캅토에탄올(mercaptoethanol)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 처리하여 수행할 수 있다.
- [0053] 상기 플레어부를 제조하는 단계는 플레어 서열과 형광염료를 혼합하여 플레어 서열의 말단에 형광염료를 결합시킨 플레어 서열을 첨가할 수 있다. 구체적으로, 상기 형광염료는 Cy3, Cy5, FAM, FITC, Cy5.5, RITC, TAMRA 및 Texas red로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0054] 상기 나노플레이어를 형성하는 단계는 상기 혼합물을 최종 염의 농도가 0.2 내지 0.5M 또는 0.2 내지 0.4M에 도달할 때까지 염을 첨가할 수 있다. 구체적으로, 상기 나노플레이어를 형성하는 단계는 염의 농도가 목표 농도에 도달할 때까지 20분 내지 40분 간격으로 염을 첨가할 수 있다. 상기 염은 염화나트륨일 수 있다.
- [0055] 상기 나노플레이어를 형성하는 단계는 혼합물에 추가로 초음파 처리할 수 있다. 상기 초음파 처리 조건은 30 내지 90 kHz, 35 내지 85 kHz 또는 37 내지 80 kHz 강도로 10초 내지 60초 동안 조사하는 것일 수 있다.
- [0056] 추가적으로, 상기 나노플레이어를 형성하는 단계 이후에 반응이 완료된 혼합물을 원심분리를 이용하여 분리하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 원심분리는 10,000 내지 15,000 g 조건에서 10 내지 60분, 10,000 내지 20,000 rpm 조건에서 10 내지 60분 동안 3회 이상 반복적으로 수행할 수 있다.
- [0057] 상기 복합화시키는 단계는 고분자 전해질 10 μ l을 기준으로 10 내지 50 μ l 또는 15 내지 30 μ l의 나노플레이어를 혼합할 수 있다. 상기 나노플레이어는 하이드로젤 용액을 기준으로 최종 나노플레이어의 농도 OD 0.1~ 2의 비율로 혼합한 것일 수 있다.
- [0058] 상기 복합화시키는 단계는 재생 촉진 펩타이드 및 성장인자 중 어느 하나 이상을 추가로 혼합할 수 있다.
- [0059] 상기 재생 촉진 펩타이드는 LL37 펩타이드, CW49 펩타이드, Ap-57 펩타이드 및 SubstanceP 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0060] 상기 성장인자는 인슐린, hGH, TGF- β 4, IL-6, FGF2, PDGF, VEGF, TNF- α , EGF, IGF, KGF 및 SDF-1으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0061] 구체적으로, 상기 복합화시키는 단계는 고분자 전해질 10 μ l을 기준으로 0.5 내지 10 μ l 또는 1 내지 5 μ l의 재생 촉진 펩타이드를 혼합할 수 있다. 이때, 재생 촉진 펩타이드는 1 내지 5 mg/ml의 농도의 수용액 또는 수분산액일 수 있다.
- [0062] 구체적으로, 상기 복합화시키는 단계는 고분자 전해질 10 μ l을 기준으로 0.5 내지 10 μ l 또는 1 내지 5 μ l의 성장인자를 혼합할 수 있다. 이때, 성장인자는 1 내지 5 mg/ml의 농도의 수용액 또는 수분산액일 수 있다.
- [0064] 또한, 상기 서술한 나노센서를 당뇨병 상처 부위에 도포하는 단계; 및 상기 도포된 나노센서 내의 인식 서열이 당뇨병 상처 부위 내 표적 유전자와 결합하여 플레어 서열에 포함된 형광염료에 따른 생체 내 형광 이미징을 통해 상처치유 정도를 측정하는 단계를 포함하는 상처치유 모니터링 방법을 제공한다.
- [0065] 본 발명에 따른 나노센서를 이용한 당뇨병 상처치유 모니터링 방법은 다양한 상처의 모니터링이 가능하여 실시

간 약물반응 및 환자상태를 파악하여 적절한 치료방법을 제시할 수 있다.

- [0066] 상기 나노센서를 당뇨성 상처 부위에 도포하는 단계는 분사 가능한 하이드로겔과 나노플레어를 포함하는 나노센서를 분사하여 도포할 수 있다.
- [0067] 상기 당뇨성 상처치유 정도를 측정하는 단계는 나노플레어의 서열에 포함된 형광염료의 형광이 강도를 측정할 수 있다. 구체적으로, 상기 당뇨성 상처치유 정도를 측정하는 단계는 체외 형광 검출기를 이용하여(808 nm 레이저) 나노플레어에 포함된 형광염료의 형광의 강도를 측정할 수 있다.
- [0068] 상기 형광염료는 Cy3, Cy5, FAM, FITC, Cy5.5, RITC, TAMRA 및 Texas red로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0069] 또한, 상기 상처치유에서 세포 증가를 측정하는 단계는 서열번호 9 및/또는 서열번호 10으로 표시된 염기서열은 GAPDH를 인식하는 염기서열로, 참조 유전자(reference gene)으로서 표적 유전자의 발현을 정량적으로 평가 및 전체 세포 활성도를 평가할 수 있도록 한다.
- [0070] 상기 당뇨성 상처치유 정도를 측정하는 단계는 상기 나노센서 및 휴대용 형광 현미경을 이용할 수 있다.
- [0071] 구체적으로, 상기 당뇨성 상처치유 정도를 측정하는 단계는 휴대용 형광 현미경을 이용하여 타겟 (COL1A1, PECAM1)의 적색 형광 및/또는 레퍼런스 (GAPDH)의 근 적외선 형광의 비율로 나타낼 수 있다. 상기 형광의 비율은 당뇨성 상처 치유 지수로 나타낼 수 있다.
- [0072] 상기 상처치유 정도를 측정하는 단계에서, 상기 상처치유 정도는 2일 내지 7일에 PECAM1/GAPDH나노센서의 상처치유 지수가 1.2 이상인 경우 정상세포의 염증 반응 단계이고, 1.2 이하인 경우 당뇨성 세포의 염증 반응 단계일 수 있다.
- [0073] 또한, 상기 상처치유 정도를 측정하는 단계에서, 상기 상처치유 정도는 2일 내지 7일에 COLA1/GAPDH나노센서의 상처치유 지수가 1.5 이상인 경우 정상세포의 증식 단계이고, 1.5 이하인 경우 당뇨성 세포의 증식 단계일 수 있다.
- [0075] 이하에서는 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0077] 재료 및 방법

- [0078] 성장 인자(FGF2, TGF β 1, TNF- α , IL-6, PDGF)는 Sigma-Aldrich(미국)에서 구입하였다. PureLinkTMRNA 미니 키트 및 트리스(2-카복시에틸)포스핀(Tris(2-carboxyethyl)phosphine: TCEP)은 Thermo Fisher Scientific에서 구입하였다. 13 nm 시트레이트 캡핑된 GNP을 사용하였다. 모든 DNA 올리고는 HPLC 정제를 갖춘 바이오니아에서 구입하였다.
- [0079] 스트렙토조토신은 Sigma Aldrich(미국)에서 구입하였다. 성장인자는 다음과 같이 구매하였다: TNF- α , TGF β 1, FGF2, IL-4, IL-6, IL-10: Abclonal; PDGF: Peprotech). 모든 처방대상 동물용 의약품은 고려대학교 실험동물 연구센터에서 수의사의 처방전을 발급받아 구입하였다. 아이소플루레인 (isoflurane)은 Troikaa(인도)에서 구입하였다. 알파락손은 (주)케어사이드(대한민국)에서 구입하였다. 자일라진(xylazine)은 한국엘랑코동물약품(주)(대한민국)에서 구입하였다. 케토프로펜은 유니바이오테크(대한민국)에서 구입하였다. 엔로플록사신은 Bayer(독일)에서 구입하였다. 휴대용 형광 검출기는 AnMo Electronics Corporation(대만)의 Dino-Lite를 구입하였다. 기타 화학물질 및 제제는 특별히 언급된 것을 제외하고는 모두 Sigma-Aldrich(미국)에서 구입하였다. 라포나이트 RD는 BYK사 (독일)의 제품을 사용하였고, 폴리아크릴산는 Sigma-Aldrich(미국)에서 구입하였다. 박테리아 실험을 위해서는 E.coli DH5 α 스트레인을 이용하였다. LL37 펩타이드는 InvivoGen(미국)에서 구입하였다.

[0080] 1) 세포 유지

- [0081] 인간 단핵구 세포(THP-1)는 한국세포주은행에서 분양받았고, RPMI 1640으로 유지되었다. NDF는 PromoCell에서 분양받았고, DMEM으로 유지되었다. 모든 세포는 37°C에서 5% CO₂ 존재 하에 1% 항생제(100U/ml 및 스트렙토마이신 100g/ml)와 열 불활성화 10% 소 태아 혈청 (FBS)이 보충된 배지에서 유지되었다.

- [0082] Human dermal fibroblast (HDF)를 이용한 스크래치 실험은 위와 동일한 배지 조건에서 진행 되었다. 박테리아는 E.coli DH5 α 스트레인을 이용하였다.
- [0083] 2) 표적 서열의 선택을 위한 qPCR 분석
- [0084] 세포를 자극 없이 2.0×10^4 개의 밀도로 6-웰 플레이트에 접종하고 80%의 컨플루언시에 도달하도록 배양되었다. 성장 인자 자극 연구를 위해, 세포는 먼저 1일 동안 성장 인자의 첨가 전에 1% FBS가 포함된 DMEM 에서 24시간 동안 기아상태에 놓였다. 그런 다음, AccuPrep[®] Universal RNA Extraction Kit를 사용하여 총 RNA 추출을 위하여 세포를 수확하였다. 1 µg의 RNA는 CellScript TM cDNA Master Mix를 이용하여 역전사되었고, CFX96 Touch System (Bio-Rad)을 사용하여 cDNA 상에서 실시간 qPCR이 수행되었다. 프라이머는 바이오니아에서 구입하였다. mRNA 발현은 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법을 이용하여 GAPDH 발현으로 정규화되었다. 각 실험은 동일하게 세 번 수행되었다.
- [0085] 3) NF 설계 및 합성
- [0086] 도 2의 (h)는 5' 말단이 형광 염료로 변형된 티올 변형 인식 서열(R이라 명명)과 플레어 서열(F라 명명)을 나열 하였다. 인식 서열들은 표적 서열에 상보적이다. NF의 감도와 안정성을 최적화하기 위해 우리는 모든 R-F 이중 체의 예측된 자유 에너지 변화를 $\geq 20\text{kcal/mol}$ 로, R-T(인식-타겟)를 $\leq 60\text{kcal/mol}$ 로 설정하였다.
- [0087] 인식 가닥(30 µL, 100 µM)과 플레어 가닥(10 µL, 100 µM)을 서로 다른 몰비(3:1, v/v) 로 95 °C에서 4 °C까지 1시간 이상 어닐링하였다. 생성된 R-F 이중체를 마이크로 바이오-스핀 6 컬럼(Micro Bio-Spin 6 Columns, Bio-Rad)으로 정제하기 전에 50mM TCEP를 실온에서 1시간 동안 처리하여 티올 변형된 인식 가닥을 활성화시켰다. 정 제된 R-T 이중가닥을 13 nm 시트레이트 캡핑된 GNP(1 mL, 5 nM)에 첨가하였다. 다음으로 혼합물을 -20°C에서 2 시간 동안 보관한 다음 최종 NaCl 농도가 0.3M에 도달할 때까지 30분마다 50 µL의 1M NaCl을 추가하였다. NaCl 을 각각 첨가한 후 용액을 30초 동안 초음파 처리하였다. 밤새 교반한 후, 30분 동안 14,000g에서 원심분리 후 기능화된 GNP 또는 NF가 유도되었다. NF는 PBS에서 0.05% Tween-20으로 두 번 세척되었다. 이들의 농도는 520 nm에서 흡광도에 의해 결정되었다(Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific). NF의 유체역학적 크기와 제타 전위는 동적 광산란 시스템(Zetasizer, Malvern, UK)을 사용하여 측정되었다.
- [0088] 4) 표적 유전자의 세포적 발현을 정량화하기 위한 NF
- [0089] 48-웰 플레이트 내 세포는 1% FBS가 포함된 DMEM에서 24시간 동안 기아상태에 놓였다. 추후 FGF2, TNF-α, IL-6, PDGF 를 NDF, THP-1 , M2-like THP-1 세포에 배지를 각각 추가되었다. 2일 후, 세포를 PBS로 세척하고 NF를 함유하는 5% FBS 배지를 공급하였다(농도는 O.D 0.1이었다). 16시간 후, 세포를 Hoechst 33342로 염색하고 레이저 스캐닝 공초점 형광 현미경 관찰(LSM 800, Carl Zeiss)을 실시하였다.
- [0090] 5) THP-1 인간 단핵구의 M2-like 대식세포로의 분화
- [0091] 24-웰 플레이트에 THP-1 세포를 자극 없이 2.0×10^4 개의 밀도로 접종한 후 열 불활성화된 10% 소 태아 혈청과 1% 항생제(페니실린-스트렙토마이신) 용액을 첨가한 RPMI 1640 배지로 유지하였다. 여기에 각 10ng/mL의 IL-4와 IL-10을 6일 동안 처리하여 M2-like 대식세포로의 분화를 유도하였다. 실험군은 다음과 같다: 무처리군, 50mM 포도당을 함께 처리한 군, IL-4 및 IL-10으로 M2-like 대식세포로의 분화를 유도한 군, 50mM 포도당+IL-4, IL-10 처리군으로 총 4군이다. M2-like 대식세포로의 분화는 M2 대식세포 마커인 CD206을 세포 면역형광염색법 (immunocytochemistry)으로 염색하여 관찰하였다. CD206은 녹색 형광(FITC)으로 염색되었으며, 핵은 청색 (DAPI)로 염색되었다. 관찰은 레이저 스캐닝 공초점 형광 현미경(LSM 800, Carl Zeiss)으로 시행하였다.
- [0092] 6) 일반 마우스 모델에서 NF 신호의 모니터링
- [0093] 실험동물로는 4주령의 C57BL/6 수컷 마우스를 사용한다. 마우스의 평균 몸무게는 약 20-25g이다. 동물을 기입된 용량의 알파락손 (30-60mg/kg), 자일라진(10mg/kg)으로 복강주사하여 마취를 유도하고 2% 아이소플루레인을 2L/min의 산소에 희석시켜 호흡마취 시킨다. 기입된 용량의 진통제(케토프로펜 5mg/kg), 항생제(엔로플록사신 10mg/kg) 를 외과적 수술 이전 피하주사한다. 심마취 확인 후 등 쪽 피부 수술부위를 제모 및 소독하고, 6mm 생 검 펀치를 이용하여 등 쪽 피부에 2개의 상처를 생성한다. 피부 제거시 부착된 결합 조직의 완전한 제거와 플랩 노출을 위해 주의를 기울였다. 시료는 나노센서(PECAM1-Cy3 혹은 COL1A1-Cy3, GAPDH-Cy5는 두 개의 상처에 모두 국소 할당함)를 혼합한 하이드로젤로 한다. 대조군의 경우에는 나노센서를 멸균 생리식염수에 희석한다. 해부학 적 위치의 결과로 개별 상처의 가변성을 없애기 위해 시료를 실험 그룹의 2개의 상처 스팟에 각각 할당하고, 국

소 도포 순서는 일관적으로 이루어졌다. 전반적으로, 시료의 국소 도포는 각 상처에 넘치지 않게 균등하게 분포되었다. 시료를 도포한 후, 마취 상태의 마우스를 37 °C로 예열한 히팅 패드에 노출시켜 시료가 상처에 잘 흡수 되도록 하였다. 이후 휴대용 형광 검출기로 옮겨서 형광 파장 532nm(Cy3), 633nm(Cy5)로 각각 셋팅하여 이미징 하였다. 이미지는 지속적인 마취 하에 획득되었다. 이미징은 카메라와 마우스 간의 간격이 고정 되게 하고 형광 세기도 일정하도록 고정 하여 진행하였다. 수술 직후 기입된 용량의 진통제(케토프로펜 5mg/kg), 항생제(엔로플록사신 10mg/kg)를 피하주사하였다. 수술 후 첫 형광 측정 이후 2, 4, 7, 10일차에 동일한 과정을 같은 시간에 반복하여 형광 이미지를 획득하였다. 실험 실시일(1일차), 2, 4, 7, 10일차에 상처의 크기가 측정 및 기록되었다. 실험 10일차에 모든 측정이 끝나면 마우스를 이산화탄소를 이용하여 안락사 한 후 상처 조직을 채취하여 분석하였다.

[0094] 7) 당뇨병 상처 마우스 모델에서 NF 신호의 모니터링

[0095] 동물은 일반 마우스 모델에서와 동일한 마우스를 사용하였다. 마취 과정 및 상처 유발 과정은 일반 마우스에서와 동일한 프로토콜을 사용하여 시행되었다. 기입된 용량의 스트렙토조토신을 마우스의 복강내 접종하여 당뇨병화하였다: 스트렙토조토신은 췌장의 베타 세포를 파괴하여 1형 당뇨를 유발하였다. 용량은 50 mg/kg로 50 μ l씩 5일 동안 처리하였으며 음용수로 10% sucrose 용액을 제공 하였다.

[0096] 해당 약품은 사용직전에 50 mM 구연산나트륨 버퍼(pH 5.4)에 용해 하여 사용하였다. 스트렙토조토신 접종 전에 해당 약품을 위의 버퍼에 용해시켜 6mg/ml이 되게 하였다. 25G 실린지를 사용하여, 스트렙토조토신 용액을 50mg/kg의 용량으로 복강주사하였다. 마우스를 케이지에 다시 위치시킨 후 일반 사료와 10% sucrose 을 주었다. 6일째 되는 날에, 10% sucrose 을 일반 음용수로 교체하였다.

[0097] 2주째 되는 날에 모든 마우스를 16시간 동안 단식시켰다. 채혈 침으로 미정맥에서 혈액을 채취한 후, 혈당 측정기로 혈당을 측정하였다. 혈당을 측정할 때는 2% 아이소플루레인을 2L/min의 산소에 희석시켜 호흡마취를 지속시킨 상태로 진행하였다. 혈당 측정은 2, 3, 4주차에 각 1회씩 시행하였다. 기초혈당이 >250mg/dl 이상 유지되는 것이 확인되면 당뇨가 유발된 것으로 간주하였다. 통상적으로 접종 3주차 내에 ~50%의 마우스에서 심각한 1형 당뇨가 유발되었다(보통 300-600 mg/dl의 혈당을 나타낸다). 이때, 18mg/dl의 혈당 = 1mM 로 간주하였다.

[0098] 4주차째, 일반 마우스에서의 실험 과정과 마찬가지로 마우스 등을 제모 및 소독 후, 6mm 생검 펀치로 2개의 상처를 생성하였다. 시료의 국소 적용 및 이미징은 일반 마우스에서와 유사하게 시행되었다. 모든 동물실험은 대한민국 고려대학교 동물실험윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committees, IACUC)의 승인을 득한 뒤 진행되었다(승인번호: KOREA-2022-0102).

[0099] 8) 하이드로젤의 분석

[0100] 하이드로젤의 물성은 레오미터 (Anton Parr, AT)를 이용하여 수행되었고, 350 μ l의 하이드로젤 용액을 25mm 평행 판 아래에 놓고 0.5 mm 갭에서의 물성을 측정하였다. 스트레인 1%의 조건으로 angular frequency에 따른 modulus가 측정되었고, 리커버리 테스트의 경우 2분 동안 500 %의 스트레인, 3분 동안 0.5%의 스트레인을 가하며 회복 탄력성을 확인하였다. 리커버리 테스트의 경우 스트레인 진동수는 6.3 rad/s 로 고정되었다. SEM 분석을 위해 각각의 하이드로젤은 하루동안 동결 건조 후에 백금 스퍼터링 처리를 통해 모폴로지 분석이 수행되었다.

[0101] 스크래치 어세이는 12웰 기준으로 0.1×10^6 /well 농도로 씨딩되었고 HDF 배지에 하루 동안 인큐베이션 하였다. 하루가 지나고 200 μ l 파이프 팁으로 스크래치 후 DPBS로 워싱 후, 다시 배지를 넣고 transwell (포어사이즈 0.4 μ m) insert에 하이드로젤을 넣은 후 세포의 마이그레이션 상태를 20 시간 후에 광학 현미경으로 관찰하였다.

[0102] 9) 하이드로젤의 최종합성 (LL37, PAA, 나노센서)

[0103] 본 발명의 복합화 하이드로젤에 있어서 전해질 고분자, 클레이 입자, 및 나노센서와 재생 촉진 인자의 바람직한 조합으로는, 전해질 고분자 5wt% 25 μ l, 클레이 입자 20 mg/ml 용액 1 ml, 나노센서 50 μ l (OD 10), 재생 촉진 펩타이드 LL37 1 mg/ml 스탁 솔루션의 5 μ l이다. 상기 전해질 고분자의 수용액, 클레이 입자 분산액 및 나노센서, LL37 수용액 또는 수분산액을 혼합시키고 잘 섞어줌으로써 젤화를 용이하게 유도할 수 있다. 하이드로젤에서의 나노센서의 방출률을 확인하기 위해 transwell (0.4 μ m 포어사이즈)에 하이드로젤을 넣은 후 일정 시간 후 (1, 3, 5, 7일)에 나노센서 520nm 파장대에서의 흡광도 양을 나노드롭(Nanodrop)으로 측정하여 방출된 나노센서의 양을 정량화하였다. 하이드로젤의 물성 강화를 위해 PBS 완충용액을 넣어줄 경우 그 양에 따라 하이드

로젤의 투명도가 바뀌는 것을 UV-VIS Spectrometer의 흡광도 측정을 통해 분석하였다.

[0104] 10) 통계 분석

[0105] 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 소프트웨어가 데이터의 통계분석 및 도의 작성을 위하여 사용되었다. 통계적 검정(t-검정 또는 일원 분산 분석(ANOVA))은 p 값 유의성을 얻기 위해 수행되었다. 달리 명시되지 않는 한 데이터는 평균 $\pm$ 표준 편차(Standard deviation, SD), 평균의 퍼센트(%) 혹은 퍼센트 포인트(%p)로 표시되었다. 표본의 크기를 미리 결정하기 위한 통계적 방법은 사용되지 않았다. 모든 세포 배양 실험은 최소 두 번의 독립적인 반복 실험을 진행하였다. 모든 생체 내 실험은 최소 5마리의 개체에서 독립적으로 수행되었다. 본 표본 크기는 통계 분석을 수행하기에 충분하였다.

[0107] <실시예 1> 상처 치유의 여러 단계와 관련된 RNA 바이오마커의 스크리닝

[0108] 2가지의 바이오마커를 선정하였고 상처 치유 4단계 중 구별이 가능한 염증기, 증식/표피기를 대상으로 실험을 진행하였다. 본 발명에서는 두 가지 유형의 세포(즉, 대식세포, 섬유아세포)에 대한 각각 1개의 mRNA 마커들을 식별하였다. 상피 mRNA 마커는 FSP1 다음으로 COL1A1의 발현이 섬유아세포에서 특징적이었고, PECAM1은 본 발명에서 좀더 염증기와 상처 치유관계를 자세히 증명하였고, GAPDH는 공동으로 사용하였고, 발현을 비교하여 표적 세포에서 강한 발현을, 다른 유형의 세포에서 약한 발현을 갖는 하나의 후보 마커를 식별하였다. 세포 유지를 위해서 NDF PromoCell, THP-1 한국세포주 은행(서울대병원)에서 구입하여 계대 3과 10 사이에 사용했다. 모든 세포는 DMEM으로 유지되었다. 37°C에서 5% CO₂ 존재하에 1% 항생제(페니실린 100U/ml 및 스트렙토마이신 100 μ g/ml)와 열 불활성화 10% 소 태아 혈청(FBS)이 모든 배지에 보충되었다.

[0109] PECAM1은 백혈구 이동 및 염증성 혈관 반응을 조절하고 혈관신생, 세포자멸사, 혈소판 응집 및 혈전증을 포함한 생물학적 기능과도 연관이 있으며 특히, 대식세포에 많이 발현 하여 조직재생의 중추적인 역할을 하는 대식세포의 활성을 나타낼수 있다. 따라서 본 연구에서는 PECAM1은 대식세포(염증기) 대한 표적 바이오마커 유전자로서 선택되었다.

[0110] COL1A1은 type 1 콜라겐을 만들며 섬유아세포에서 방출하는 결합 조직을 이루는 가장 중요한 단백질중 하나이고, 상처 치유 및 섬유화 등에 관여한다. 따라서 증식기 및 표피기의 바이오마커로 선택되었다.

[0112] <실시예 2> 나노플래어(NF) 설계, 합성 및 특성화

[0113] 상처 치유의 각 단계 중 염증 단계, 증식단계에 해당하는 표적 유전자를 확인한 후, 본 발명에서는 이들 mRNA 바이오마커를 표적으로 하는 나노플래어를 다음과 같이 합성하였다. 나노플래어는 13 nm 금 나노 입자(GNP) 코어와 주변 핵산 이중가닥으로 구성되었다. 이중가닥은 인식 서열(R이라 명명)과 플래어 서열(F라 명명)을 포함한다. 이들의 혼성화 효율을 확인하여 R/F 비율을 최적화하였다. 본 발명에서는 혼성화 효율과 조립 비용의 균형을 맞추기 위해 후속 합성에 있어 3:1 R/F 비율을 선택하였다.

[0114] 하기 도 2는 티올 변형 인식 서열(R이라 명명)과 5' 말단이 형광 염료로 변형된 플래어 서열(F라 명명)을 나열한 것으로, 인식 서열들은 표적 서열에 상보적이다. 나노플래어의 감도와 안정성을 최적화하기 위해 하기 도 2(f)에 나타난 바와 같이 모든 R-F 이중가닥의 예측된 자유 에너지 변화를 $\geq 30\text{kcal/mol}$ 로, R-T(인식-타겟)를 $\leq 65\text{kcal/mol}$ 로 설정하였다.

[0115] 인식 가닥(30 μ L, 100 μ M)과 플래어 가닥(10 μ L, 100 μ M)을 서로 다른 볼륨비(3:1 v/v)와 10x PBS (1:1 v/v) 존재 하에서 95-85-75-65-55-40-25-4°C에서 실온(RT)까지 1시간 이상 어닐링하였다. 생성된 R-F 이중가닥을 마이크로 바이오-스핀 6 컬럼(Micro Bio-Spin 6 Columns, Bio-Rad)으로 정제하기 전에 50mM TCEP를 실온에서 1시간 동안 처리하여 티올 변형된 인식 가닥을 활성화시켰다. 정제된 R-T 이중가닥을 13 nm 시트레이트 캡핑된 GNP(1000 μ L, 5 nM in DI water)에 첨가하였다. 다음으로 혼합물을 -20° C에서 2시간 동안 보관한 다음 최종 NaCl 농도가 0.3M에 도달할 때까지 30분마다 50 μ L의 1M NaCl을 추가하였다. NaCl을 각각 첨가한 후 용액을 30초 동안 초음파 처리하였다. 밤새 교반한 후, 30분 동안 14,000g에서 원심분리 후 기능화된 나노플래어가 유도되었다. 나노플래어는 PBS에서 0.05% Tween-20으로 두 번 세척되었다. 0.05% Tween-20 in PBS buffer에 보관되었다. 최종적으로 이들의 농도는 520 nm에서 흡광도에 의해 결정되었다.

[0116] 위에서 언급한 바와 같이, PECAM1, COL1A1는 면역세포(염증), 섬유아세포(섬유조직형성, 증식)에 대한 표적 바

이오마커로서 선택되었다. 따라서 본 발명에서는 최적화된 합성 프로토콜을 사용하여 이러한 유전자를 표적으로 하는 나노플레어를 합성하였다. GAPDH 참조 유전자를 인식하는 나노플레어 또한 제어 신호뿐만 아니라 세포 정량화 역할을 하기 위해 동일한 프로토콜로 합성되었다. 도 7을 살펴보면, 모든 나노플레어는 각각의 표적 서열에 대해 우수한 감도를 보였다. 예를 들어, 도 7(d)를 보면 COL1A1-NF가 표적 서열을 만났을 때 형광 강도의 25배 이상의 변화가 있었다. 형광 신호는 $0.01-1 \mu\text{M}$ ($R^2 = 0.97$) 범위에서 표적 서열의 농도와 선형 상관관계를 나타내었다. 한편, PECAM1-NF (도 7(e)) 및 GAPDH-NF(도 7(f))은 0.01 과 $1 \mu\text{M}$ 사이의 표적 반응성과 좋은 상관관계(각각 $R^2 = 0.95$ 및 0.98)를 갖는 더 나은 감도를 보였다. 모든 나노플레어는 만족스러운 선택성, 모니터링 창 및 특이성을 보였다.

[0118] <실시예 3> GAPDH 정규화로 표적 유전자를 모니터링하기 위해 나노플레어를 사용한 성장 인자 스크리닝

[0119] 도 3 내지 도 5와 같이 세 가지 유형의 세포에 영향을 미치는 성장 인자의 자극 효과와 고당 조건에서 이를 분석하기 위해 나노플레어의 능력을 추가로 조사하였다. 세포(NDF, THP-1)를 자극 없이 2×10^4 의 밀도로 6웰 플레이트에 접종하고 80%의 컨플루언시에 도달하도록 배양하였다. 그런 다음 FGF2 (40 ng/mL), TGF β 1 (40 ng/mL), TNF- α (40 ng/mL), IL-6(40 ng/mL), PDGF(20 ng/mL)와 나노센서를 각각 OD 0.1되게 첨가하고 2일간 배양하였다. 다른 세트의 실험에서는 동일한 성장인자와 글루코스 50 mM 이 되게 하여 수행하였다. 이후 PureLink™ RNA 미니 키트(Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 총 RNA 추출을 위해 세포를 수확하였다. $0.5 \mu\text{g}$ RNA는 cellsafe mastermix(Cellsafe)를 사용하여 역전사되었다. Cellsafe qPCR master mix를 사용하여 cDNA 상에서 실시간 qPCR이 수행되었다. 도 2와 같이 프라이머는 바이오니아에서 구입하였다. mRNA 발현은 2- $\Delta\Delta\text{Ct}$ 방법을 이용하여 GAPDH 발현으로 정규화되었다. 각 실험은 동일하게 세 번 수행되었다. 성장 인자 자극 연구를 위해, 세포는 먼저 2일 동안 성장 인자의 첨가 전에 1% FBS가 포함된 DMEM에서 24시간 동안 기아상태에 놓였다.

[0120] 도 7(g) (정상), 도 7(h) (고당 조건)에서 이미징 (COLA1/GAPDH)을 통한 섬유아세포(NDF)에서 COL1A1 발현은 무처리군에 비해 TGF β 1(155%, 120%), FGF2(90%, 85%), PDGF(135%, 105%), DPIL-6 (95%, 70%), TNF- α (30%, 40%)로 변하는 것을 확인하였다. qPCR 결과에서도 COL1A1 발현은 TGF β 1(290%-정상, 150%-고당), FGF2(77%, 80%), PDGF(105%, 80%) 및 IL-6(100%, 80%), TNF- α (90%, 70%)에 의해 COL1A1 발현량의 변화가 확인되었다. 또한, 고당조건에서 COL1A1의 발현은 정상 조건 보다 현저히 떨어지는 것을 확인 하였다.

[0121] 도 7(i) (정상), 도 7(j) (고당 조건)에서, 무처리군에 비해 THP-1에서 PECAM1의 발현에 대한 qPCR 분석은 FGF2 (130%-정상, 140%-고당 조건), TGF β 1 (900%, 250%), PDGF (190%, 120%) 및 IL-6 (120%, 85%), TNF- α (1180%, 30%)로 나타났고 이미징을 통한 PECAM1의 발현량은 FGF2 (150%-정상, 110%-고당 조건), TGF β 1 (250%-정상, 110%-고당 조건), PDGF (140%, 95%) 및 IL-6 (170%, 50%), TNF- α (120%, 60%)로 변화된 나노플레어 신호를 관찰하였다. 또한, 고당조건에서 PECMA1의 발현은 정상보다 현저히 떨어지는 것을 확인 하였다. 따라서 qPCR과 나노플레어 결과는 상당히 일치하였다.

[0122] 도 7(k) (정상), 도 7(l) (고당 조건)에서, 무처리군에 비해 M2 like 대식세포 에서 PECAM1의 발현에 대한 qPCR 분석은 FGF2 (20%-정상, 30%-고당 조건), TGF β 1 (600%, 70%), PDGF (130%, 80%) 및 IL-6 (180%, 85%), TNF- α (1180%, 80%)로 나타났고 이미징을 통한 PECAM1의 발현량은 FGF2 (80%-정상, 80%-고당 조건), TGF β 1 (140%-정상, 60%-고당 조건), PDGF (130%, 70%) 및 IL-6 (120%, 60%), TNF- α (90%, 85%)로 변화된 나노플레어 신호를 관찰하였다. 또한, 고당조건에서 PECMA1의 발현은 정상보다 현저히 떨어지는 것을 확인 하였다. 따라서 qPCR과 나노플레어 결과는 상당히 일치하였다.

[0123] 종합하면, 이러한 결과들은 다양한 유형의 피부 관련 세포에서 표적 유전자의 동적 변화를 모니터링하는데 있어 나노플레어의 효능을 확인시켜 주는 것뿐만 아니라 고당 조건에서 표적 유전자의 발현이 낮은 것을 증명하였다.

[0124] 도 3은 상기 5종의 성장 인자(FGF2, TGF β 1, TNF- α , IL-6, PDGF)에 대하여 NDF 세포에서 나노플레어를 이용하여 COL1A1 mRNA를 레이저 스캐닝 공초점 형광 현미경 기법(LSCM)으로 관찰한 것이다. 도 4는 상기 5종의 성장 인자(FGF2, TGF β 1, TNF- α , IL-6, PDGF)에 대하여 THP-1 세포에서 나노플레어를 이용하여 PECAM1 mRNA를 레이저 스캐닝 공초점 형광 현미경 기법(LSCM)으로 관찰한 것이다. 도 5는 본 발명에 사용된 M2-like 대식 세포로 분화된 THP-1 세포에서의 형태 변화를 확인한 (a) 형광 이미지, (b) CD206 형광 발현, (c,d) THP-1 세포에서의 나노센서에 한 형광 이미지 및 그래프이다. 무처리 대조군(No treat)과 비교하였을 때, IL-4, IL-10을 처리한 세포에서는 CD206 발현이 증가하였다(2.7배). 그러나 IL-4, IL-10 및 포도당을 함께 첨가하였을 때는 IL-4와

IL-10을 단독으로 처리하였을 때보다 CD206 발현이 유의수준으로 감소한 것을 확인할 수 있었다(1.83배). M2 대식세포는 항염 작용을 하는 것으로 알려져 있고, CD206은 M2-like 대식세포의 마커(marker)이다. 고당 조건에서는 일반 조건에 비하여 M2-like 대식세포로 분극되는 비율이 감소하는 것으로 확인되었으며, 이는 고당 조건에서의 항염증 기능이 및 조직 재생 기능이 저해됨을 나타낸다.

[0126] <실시예 4> 스프레이형 하이드로젤의 제조

[0127] 본 발명에 사용된 나노 무기입자는 클레이 입자로서 구체적으로는 수팽윤성 규산염 입자이다. 나노클레이는 층상 규산염 형태이며, 시판품으로 용이하게 구할 수 있는 라포나이트 XLG, RD 이며, 넓은 범위로 스펙타이트, 벤토나이트, 버미큘라이트 등을 포함한다. 클레이의 입자 형상으로는 원반상, 판상, 구상, 입상, 입방상, 침상 등을 들 수 있으며, 직경 5 nm 내지 1000 nm의 원반상 또는 판상인 것이 사용되었다.

[0128] 본 발명에 사용된 전해질 고분자는 음이온성 전해질 고분자이고, 바람직하게는 유기산염 구조 또는 유기산 음이온 구조를 가지는 전해질 고분자로 구체적으로는 카르복실기를 갖는 고분자이다. 폴리아크릴산의 완전 중화물을 또는 부분 중화물 중 어느 것이나 사용할 수 있지만, 나노클레이 분산액이 pH에 따라 침전물을 형성하여 불투명한 상이 되기 때문에 pH 7 조건인 중성화 조건에서 제작되었다.

[0129] 시판품으로 구매할 수 있는 전해질 고분자는 시판품에 기재되어 있는 중량평균분자량으로서 바람직하게는 5천 내지 1000만이고, 보다 바람직하게는 10만 내지 300만이다. 전해질고분자는 카르복시 음이온 구조를 가지며 완전 중화 또는 부분 중화 폴리아크릴산염인 것을 이용하였다.

[0130] 도 6(a)를 보면, 라포나이트 수용액 농도 20 mg/ml 용액 1ml 당 폴리아크릴산 5 wt% 용액 25 μ l 넣어 줄 경우, 폴리아크릴산 분자량이 5천 이하일 때, 오히려 수용액의 점도가 낮아지는 분산이 잘 되는 경향을 보인 반면, 폴리아크릴산 분자량이 10만 이상일 경우 폴리머가 가교제 역할을 하여 하이드로젤 매트릭스가 형성되었다. 도 6(b) 및 (c)를 보면, 폴리아크릴산 용액의 양과 PBS 완충 용액을 넣어주는 양에 따라 하이드로젤의 물성이 달라졌으며, 원하는 물성에 따라 첨가해주는 양은 달라질 수 있다. 도 6(c)에서 0.5%의 스트레인과 500% 스트레인이 교대로 작용할 경우 스트레인이 없어질 때 젤 상태로 회복이 빠르게 잘 되는 것을 확인하였다.

[0131] 도 6(d)를 보면, 폴리아크릴산의 분자량이 24만 이상일 경우 물성이 더 높고 형태 유지가 잘되는 하이드로젤이 형성되었지만, 분사하였을 경우 넓은 면적에 도포가 균일하게 되기 어려우며 분사력에 차이점이 있음을 확인하였다. 도 6(d)는 폴리아크릴산의 분자량과 넣어주는 양에 따른 하이드로젤의 물성 변화를 보여주는데, 분자량이 24만인 폴리아크릴산을 사용할 경우 10만인 전해질 고분자를 사용하였을 때보다 높은 물성을 보이는 것을 보여준다. 하지만 24만의 분자량을 쓸 경우 분사에 적합하지 않은 물성이 얻어졌다.

[0133] <실시예 5> 복합화 하이드로젤의 제작

[0134] 본 발명의 복합화 하이드로젤에 있어서 전해질 고분자, 클레이 입자 및 나노센서와 재생 촉진 인자의 바람직한 조합으로는, 전해질 고분자 5wt% 25 μ l, 클레이 입자 20 mg/ml 용액 1 ml, 나노센서 50 μ l (OD 10), 재생 촉진 펩타이드 LL37 1 mg/ml 스탁 솔루션의 5 μ l이다. 상기 전해질 고분자의 수용액, 클레이 입자 분산액 및 나노센서, LL37 수용액 또는 수분산액을 혼합시키고 잘 섞어줌으로써 젤화를 용이하게 유도할 수 있다. 도 8(a) 및 (b)는 복합화 하이드로젤의 물성 측정 데이터와 분사 가능한 물성임을 보여주며, 도 8(c)는 복합화 하이드로젤의 동결건조 후의 이미지로 기공을 갖는 매트릭스를 이루고 있는 하이드로젤임을 확인할 수 있다.

[0135] 도 8(d)는 제조된 복합화 하이드로젤이 뛰어난 세포 적합성을 보이고 세포 독성이 없음을 보여준다. 도 8(e)는 LL37 펩타이드의 재생 촉진 효과를 보여주는 것으로 스크래치 후에 human dermal fibroblast의 마이그레이션이 LL37이 함유된 하이드로젤에서 증가하는 것을 보여준다. LL37 펩타이드는 재생 촉진 역할 뿐만 아니라 항박테리얼 펩타이드로도 잘 알려져 있고, 따라서 도 8(f)에서 본 발명을 통해 만들어진 하이드로젤도 항박테리아 효과가 있다는 것을 확인하였다. 박테리아의 생장은 34% 이상 감소시켰으며, 박테리아를 죽이는 항균효과는 약 62% 정도 있음을 확인하였다.

[0136] PBS 완충 용액의 넣어주는 양에 따라 하이드로젤의 물성이 달라짐과 동시에 젤의 투명도도 달라지는데, 도 9(a)를 보면, UV-VIS 흡광그래프를 통해 투명도가 얼마나 달라지는지 확인할 수 있다. 또한 LL37을 넣어 준 하이드로젤의 경우 물성이 감소하는 경향은 보였지만 여전히 도 9(b)와 같이 하이드로젤을 잘 형성하는 것을 볼 수 있었고, 나노센서의 방출물 확인을 위해 시간에 따라 하이드로젤의 520 nm에서의 흡광도를 나노드랍을 이용하여

측정한 결과, 도 9(c)와 같이 7일이 지나면 약 50%의 나노센서가 방출되는 것을 확인하였다.

[0138] <실시예 6> 정상 및 당뇨병 상처 마우스에서 휴대용 형광 검출기를 이용한 상처 치유 모니터링

[0139] 정상 및 당뇨병 상처 마우스 모델에서 당뇨병 상처치유 모니터링 시스템의 유효성 검증을 실시하였다. 마우스는 C57BL/6 품종을 사용하였으며, 마우스 등에 상처가 생기기 전에 알파살론(30-60mg/kg)을 사용하여 마취되었다. 상처는 6mm 생검 펀치를 사용하여 생성되었으며 각 마우스는 2개의 상처 스팟을 갖는다. 피부를 제거할 때 부착된 결합 조직의 완전한 제거와 플랩 노출을 위해 주의를 기울였다. 해부학적 위치의 결과로 개별 상처의 가변성을 없애기 위해 시료(나노플래어를 혼합한 하이드로젤로, GAPDH-Cy5는 모든 스팟에 할당, PECAM1-Cy3 및 COL1A1-Cy3은 각각의 스팟에 할당)를 실험 그룹의 2개의 상처 스팟에 국소 할당하였다. 국소 도포 순서는 개체별로 일관적으로 이루어졌다. 대조군의 경우 실험의 균일성을 위해 상처 부위의 수 및 나노플래어의 적용은 동일하게 하였으나 하이드로젤 대신 PBS를 처리하였다. 각 시료는 0.D 1의 최종 농도에서 스팟당 10 μ L로 분사 처리하였다. 전반적으로, 국소 적용은 각 상처 스팟에 균등하게 분포되었다. 시료를 도포한 후 마우스를 적외선 가열램프에 10분간 노출시켜 상처 스팟에 잘 흡수되도록 하였다. 시료는 첫 형광 측정 이후 2, 4, 7, 10 일차에 각 상처에 넘치지 않게 균등하게 분포되었다. 시료를 도포한 후, 마취 상태의 마우스를 37 $^{\circ}$ C로 예열한 히팅 패드에 노출시켜 시료가 상처에 잘 흡수되도록 하였다. 이후 휴대용 형광 검출기로 옮겨서 형광 측정을 하였다. 측정시, 마우스 전체를 덮는 시야(16cm), 높이 거리 및 광학적 이득은 측정 내내 일정하게 유지되었다. 마지막에 각 관심 영역의 평균 Cy5, Cy3 형광 강도가 기록되었다. 수술 직후부터 기입된 용량의 진통제(케토프로펜 5mg/kg), 항생제(엔로플록사신 10mg/kg)를 피하주사하였다. 상처는 10일 동안 자연치유되도록 방치되었다. 상처의 크기는 실험 실시일(1일차), 2, 4, 7, 10일차에 측정 및 기록되었다. 상처 생성 및 첫 형광 측정 이후 2, 4, 7, 10일차에 동일한 과정을 같은 시간에 반복하여 형광 이미지를 획득하였다. 실험 10일차에 모든 측정이 끝나면 마우스를 이산화탄소를 이용하여 안락사한 후 상처 조직을 채취하여 분석하였다. 당뇨병 상처 마우스 모델에서 나노플래어 신호의 모니터링을 위해, C57BL/6 마우스는 아이소플루레인을 사용하여 마취되었다. 모든 동물실험은 대한민국 고려대학교 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committees, IACUC)의 승인을 득한 뒤 진행되었다(승인번호: KOREA-2022-0102).

[0140] 도 10(a)는 실시예 4의 진행 과정을 도식화한 것이다. 도 10(b)는 정상 마우스와 당뇨병 상처 마우스 모델에서 시료(PBS 혹은 하이드로젤을 나노플래어와 혼합한 것)를 적용함에 따라 상처의 크기를 측정 및 기록한 것이다. 실험 10일차에, 정상 마우스와 당뇨병 상처 마우스에서 모두 PBS 처리군과 하이드로젤 처리군 간에 유의한 차이($p < 0.0001$)를 보였다. 정상 마우스군에서, PBS 처리군에 비하여 하이드로젤 처리군에서는 14.06 %p의 상처 크기 감소를 보였고, 당뇨병 상처 마우스에서는 8.49 %p의 상처 크기 감소를 보였다. 또한, 하이드로젤 처리군에서 비교하면, 정상 마우스에서 당뇨병 상처 마우스보다 더 큰 상처 크기 감소(8.02 %p)를 보였다.

[0141] 도 10(a) 내지 (h)에서는 시간에 따른 정상 마우스와 당뇨병 상처 마우스에서의 정량화된 형광 신호를 나타내고 있다. 수집된 나노플래어 형광 신호는 이미지 J 프로그램을 통하여 정량화되었다. 평균 형광 값은 형광 신호에서 배경 신호를 뺀으로써 도출되었으며, PECAM1, COL1A1 신호를 참조 유전자인 GAPDH로 정규화한 값인 Cy3/Cy5 값으로 나타냈다. 도 10(e)와 도 10(f)는 정상 및 당뇨병 상처 마우스에서의 하이드로젤 처리군과 대조군(PBS 처리군) 사이의 COL1A1 형광 신호의 변화를 나타냈다. 정상 상처에서는 대조군(PBS 처리군)에 비하여 하이드로젤 처리군에서 관찰 7일차부터 COL1A1 발현량이 대폭 증가하는 것을 보이고 있다. 당뇨병 상처에서도 대조군에 비하여 하이드로젤 처리군에서 4일차부터 COL1A1의 발현이 크게 증가하였다. 도 10(g)와 도 10(h)에서는 정상 및 당뇨병 상처 마우스에서의 하이드로젤 처리군과 대조군(PBS 처리군) 사이의 PECAM1 형광 신호의 변화를 나타냈다. 도 10(g)에서는 정상 상처에서 하이드로젤 처리군에서 PECAM1 발현량의 최고점이 4일차에 나타난 것을 확인할 수 있다. 반면에 대조군에서는 PECAM1 발현량의 최고점은 4-7일차로, 하이드로젤 처리군에서 더 빠른 PECAM1 발현이 나타난 것을 확인하였다. 도 10(h)에서는 당뇨 상처에서의 PECAM1 발현량을 나타내고 있는데, 대조군에서는 PECAM1 발현량이 거의 1에 가까우며 변동폭이 높지 않은 반면, 하이드로젤 처리군에서는 2일차부터 증가하여 7일차까지 PECAM1 발현량이 증가한 것을 확인할 수 있다.

[0142] 도 11은 정상 및 당뇨병 상처 마우스에서의 상처 회복 양상을 나타낸 것이다. 도 11(a)에 의하면 정상 마우스에 비하여 스트렙토토신을 처리한 당뇨군에서 혈당이 유의수준으로 증가한 것을 확인할 수 있다(150mg/dl, 320mg/dl). 도 11(b)에 의하면, 실험 10일차에 정상 마우스에서의 상처에 비하여 당뇨병 상처 마우스에서는 상처에 궤양이 생기고 잘 회복되지 않은 모습을 보였다. 도 11(c)는 상처 부위의 형광 측정시 측정 부위를 이물질 등을 제외한 상처 기저부(wound bed)로 한정하여 설정한 것을 나타냈다. 도 11(d)는 정상 마우스와 당뇨병 상처

마우스에서, 잘 낫지 않는 감염된 상처에서 발현되는 PECAM1을 상처 치유 모니터링 시스템을 이용하여 형광 관찰한 것이다. 도 11(e)는 정상 마우스, 당뇨병 상처 마우스, 각 마우스 모델에서 잘 낫지 않는 상처를 별도로 측정하여 상처의 크기를 분석한 것이다. 상처의 크기는 wound closure(%)로 나타냈으며, 상처의 크기를 초기 상처의 크기로 나눈 값을 사용하였다. Wound closure 수치가 작을수록 회복이 더 많이 일어난 것으로 간주한다. 측정 7일차와 10일차를 살펴보면, 7일차에서는 정상 대조군의 상처의 평균 wound closure (66.17%)에 비해서 하이드로젤을 처리한 정상 상처의 wound closure 수치(39.30%)가 더 작았다. 7일차의 당뇨 상처에서도 대조군 당뇨 상처의 wound closure 수치(71.07%)보다 하이드로젤을 처리한 당뇨 상처의 수치(38.63%)가 더 작음으로, 정상 및 당뇨병 상처 모델 모두 하이드로젤에 의하여 상처 회복이 촉진됨을 나타냈다. 측정 10일차의 wound closure 수치를 살펴보면 정상 대조군(27.30%), 정상 하이드로젤(18.67%), 당뇨 대조군(34.97%), 당뇨 하이드로젤(28.53%)로, 정상과 당뇨병 상처 마우스 모델에서 대조군에 비해 하이드로젤에 의하여 상처 회복이 촉진됨을 본 실시예를 통하여 확인하였다. 감염 등으로 인하여 잘 낫지 않는 상처(IWH, Impaired Wound Healing)의 경우도 정상 마우스에서는 대조군(7일차: 83.92%; 10일차: 69.25%)에 비하여 하이드로젤(7일차: 62.46%; 10일차: 55.82%)에 의한 상처 회복이 촉진되었지만, 당뇨병 상처 마우스에서 잘 낫지 않는 상처(IDWH, Impaired Diabetic Wound Healing)에서는 하이드로젤을 처리하였음에도 상처 회복이 지연된 현상을 나타내었다(82.93%). 당뇨병 상처 마우스에서 IDWH의 회복 지연은 도 11(e)에서 확인할 수 있는데, 정상(NWH), 당뇨(DWH), 정상군에서 잘 낫지 않는 상처(IWH)의 경우에는 측정 7일차와 10일차에 발현된 PECAM1의 형광 세기가 서로 군간에 유사하지만(7일차, NWH: 1.14배; DWH: 1.86배; IWH: 2.57배. 10일차, NWH: 0.96배; DWH: 1.54배; IWH: 2.37배), IDWH의 경우는 측정 7일차와 10일차에 높은 PECAM1 발현율(7일차: 3.01배, 10일차: 6.58배)을 보이며 염증 반응이 측정 10일차까지도 지속되고 있음을 본 실시예를 통하여 확인하였다.

[0143] 도 11(g) 내지 (h)는 본 상처 치유 모니터링 시스템의 형광 신호가 개체가 생존하여 있는 상태에서만 특이적으로 발현된다는 것을 나타낸다. 도 11(g)에서, COL1A1과 PECAM1 형광 신호는 마우스가 생존한 상태(normal wound)에서는 발현되지만, 마우스가 사망한 상태(dead wound)에서는 발현되지 않음을 나타낸다. 이를 도식화한 것이 도 11(h)이며, 마우스가 생존한 상태에 비하여 마우스가 사망한 상태에서는 형광 신호가 음의 값을 가지며 나타나지 않는 것을 보여 줌으로써, 본 상처 치유 모니터링 시스템은 특이성을 지니며 생존한 개체에서 특이적으로 응용이 가능함을 나타내었다.

[0144] 도 12에서 WHI (wound healing index)로 변환하여 분석하면, 염증기인 4-7일 사이 염증기의 상태를 나타내는 PECAM1의 경우 (PECAM1/GAPDH)의 형광시그널이 정상일 경우 1.2 이상, 당뇨일 경우 1.2 이하로 나타났다. 또한 성장-표피기를 나타내는 COLA1 (COL1A1/GAPDH)의 형광 시그널 값은 정상일 경우 1.5 이상이고, 당뇨의 경우 1.5 이하인 것으로 나타났다. 이러한 수치로 염증기 (상처 발생 4일부터 7일사이)에서의 상처 치료 예측이 가능할 것으로 판단된다.

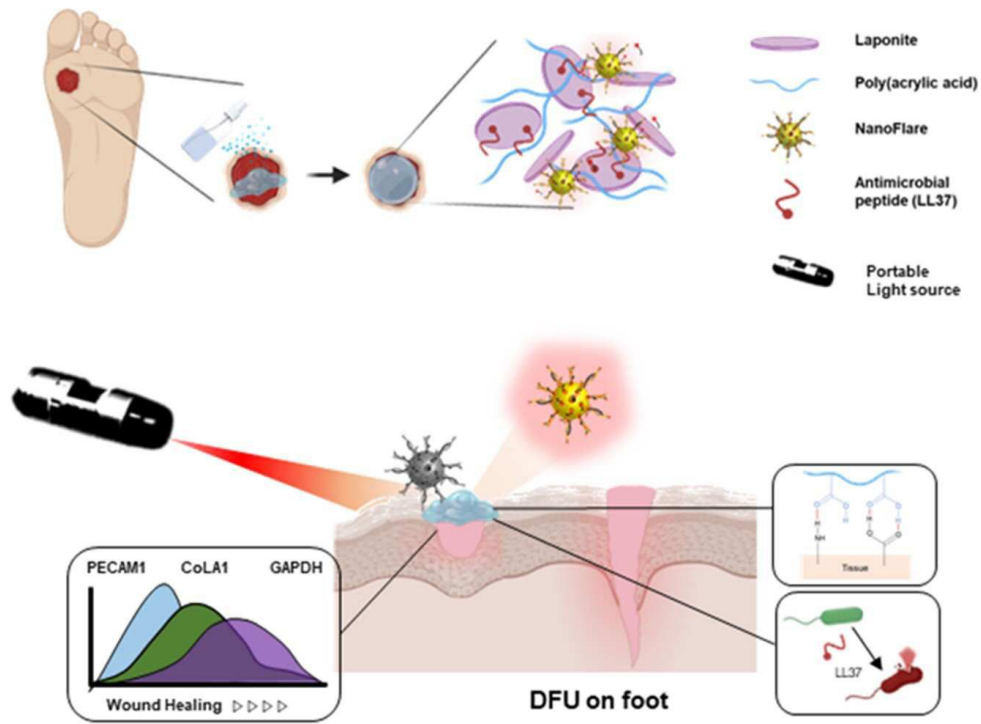
[0145] 위 사항을 종합하면, 정상 및 당뇨병 상처 모두에서 본 상처 치유 모니터링 시스템을 통하여 실시간으로 형광 신호를 통하여 mRNA의 발현량을 확인 가능하며, 하이드로젤에 의하여 상처 회복 속도, 활발한 염증기-혈관 신생 및 콜라겐 생성이 가속화됨을 확인할 수 있다.

[0147] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술한 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

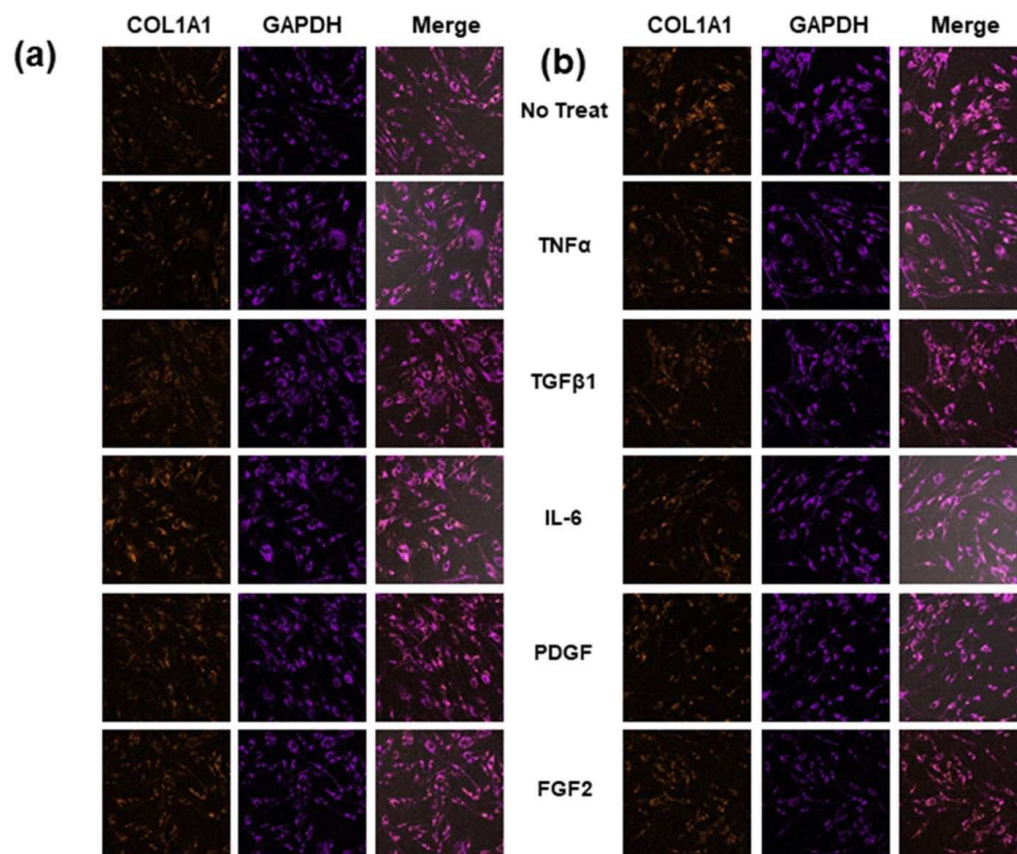
[0148] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

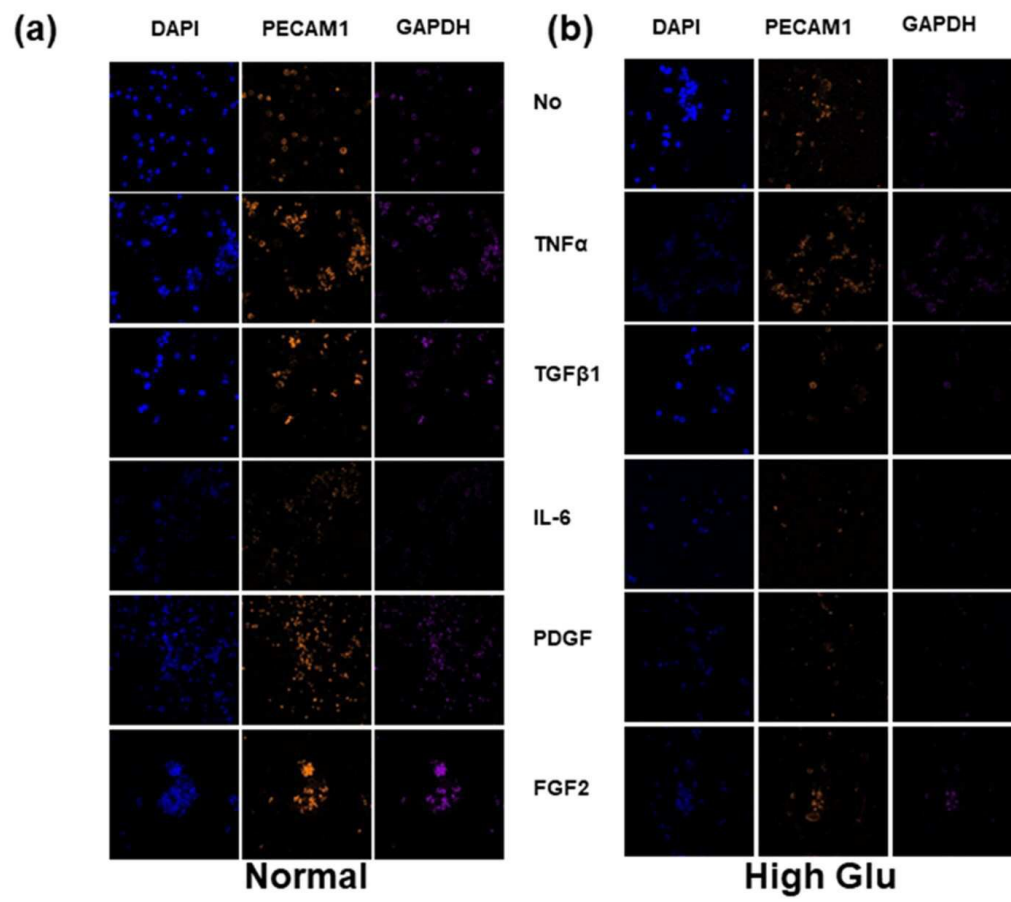
도면1



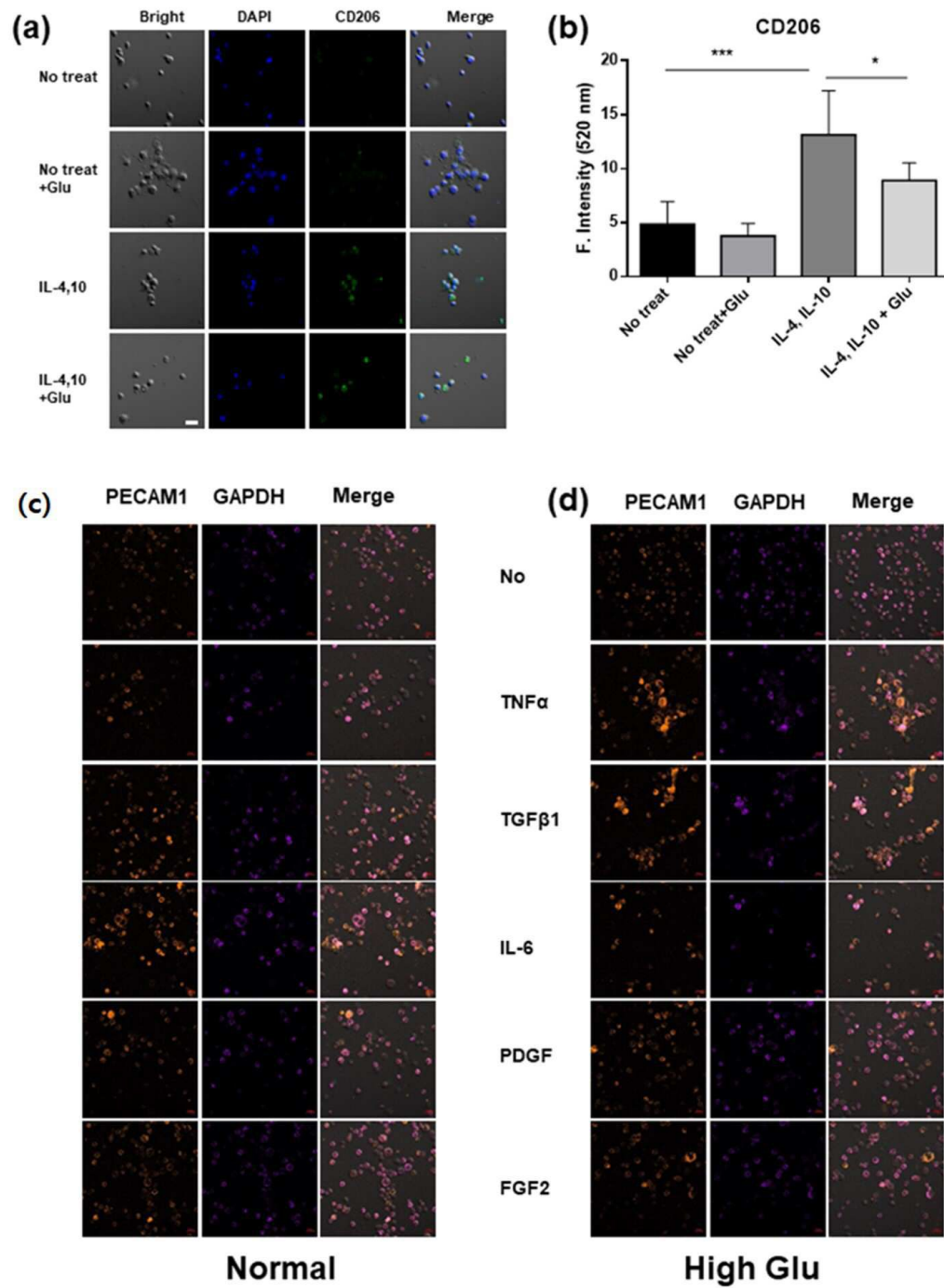
도면3



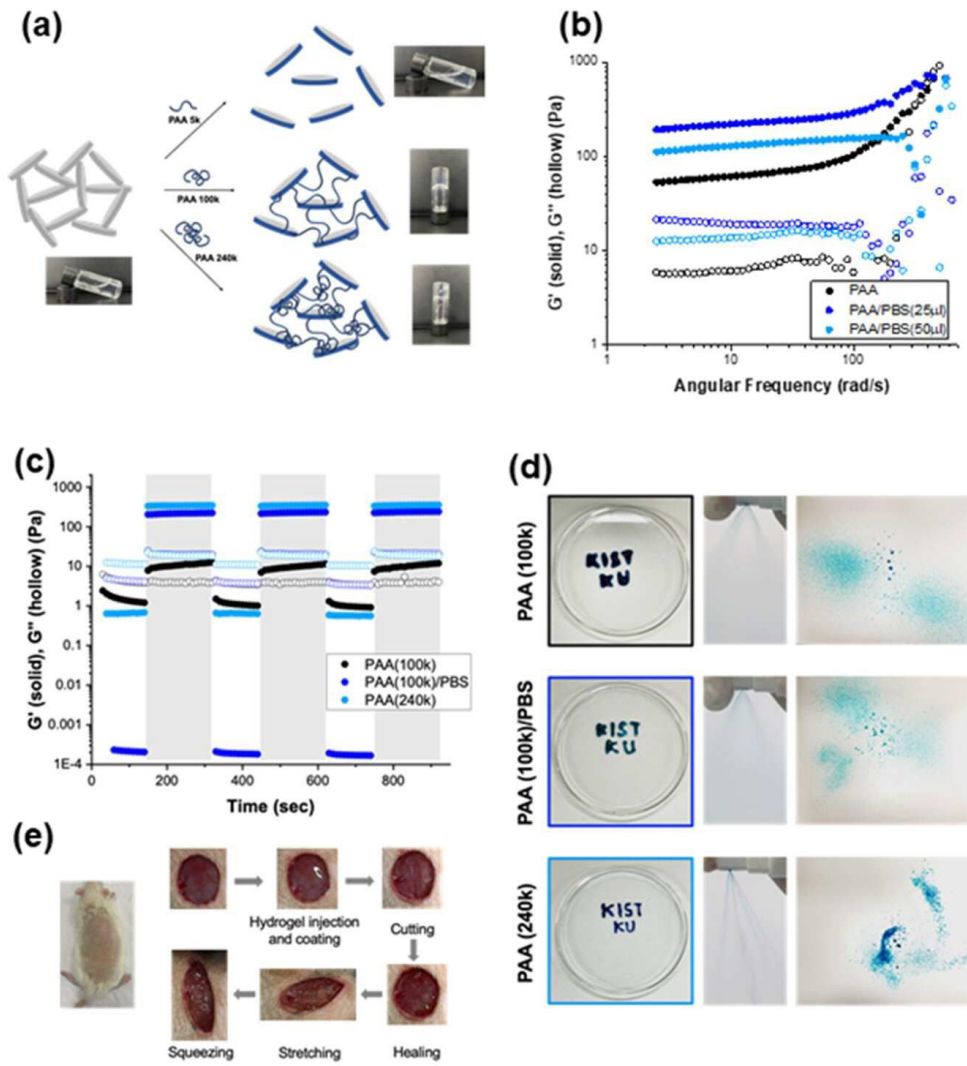
도면4



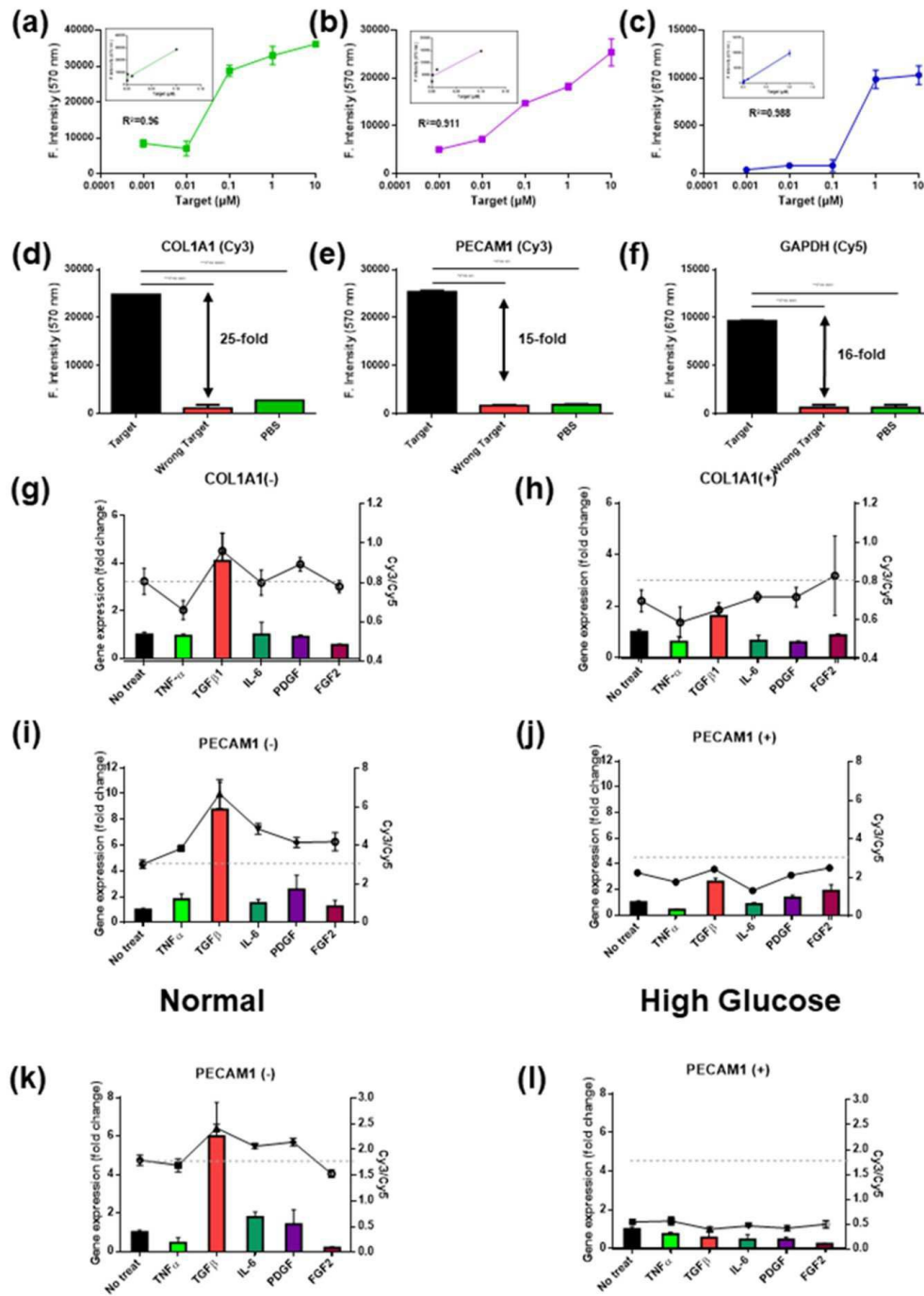
도면5



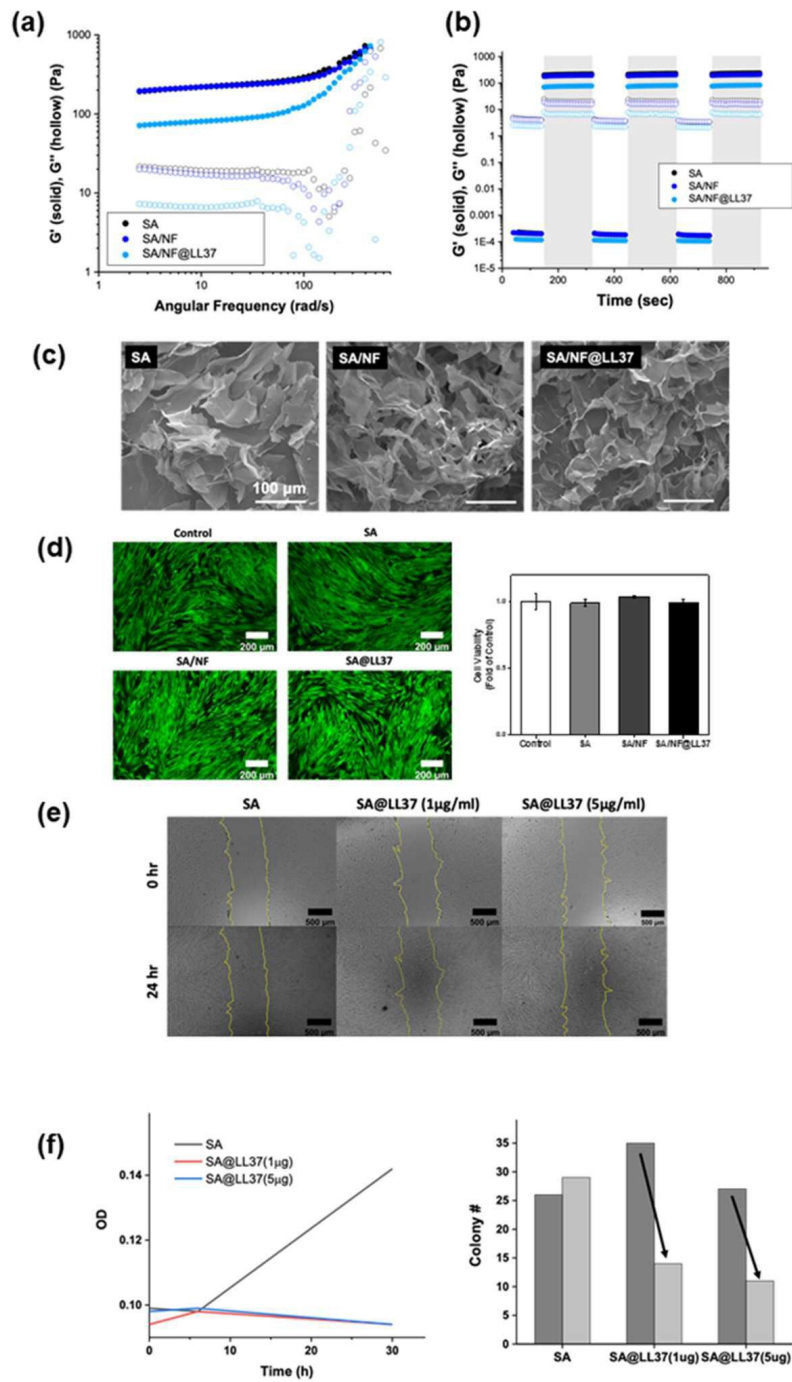
도면6



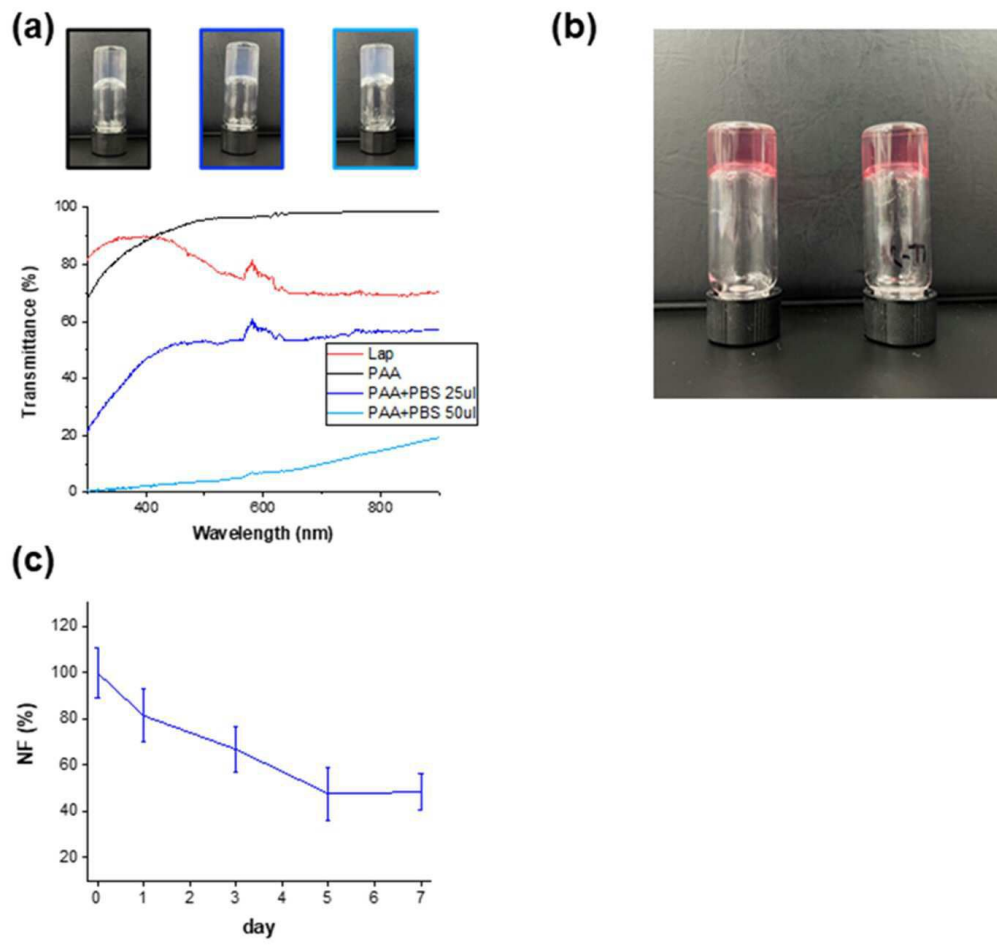
도면7



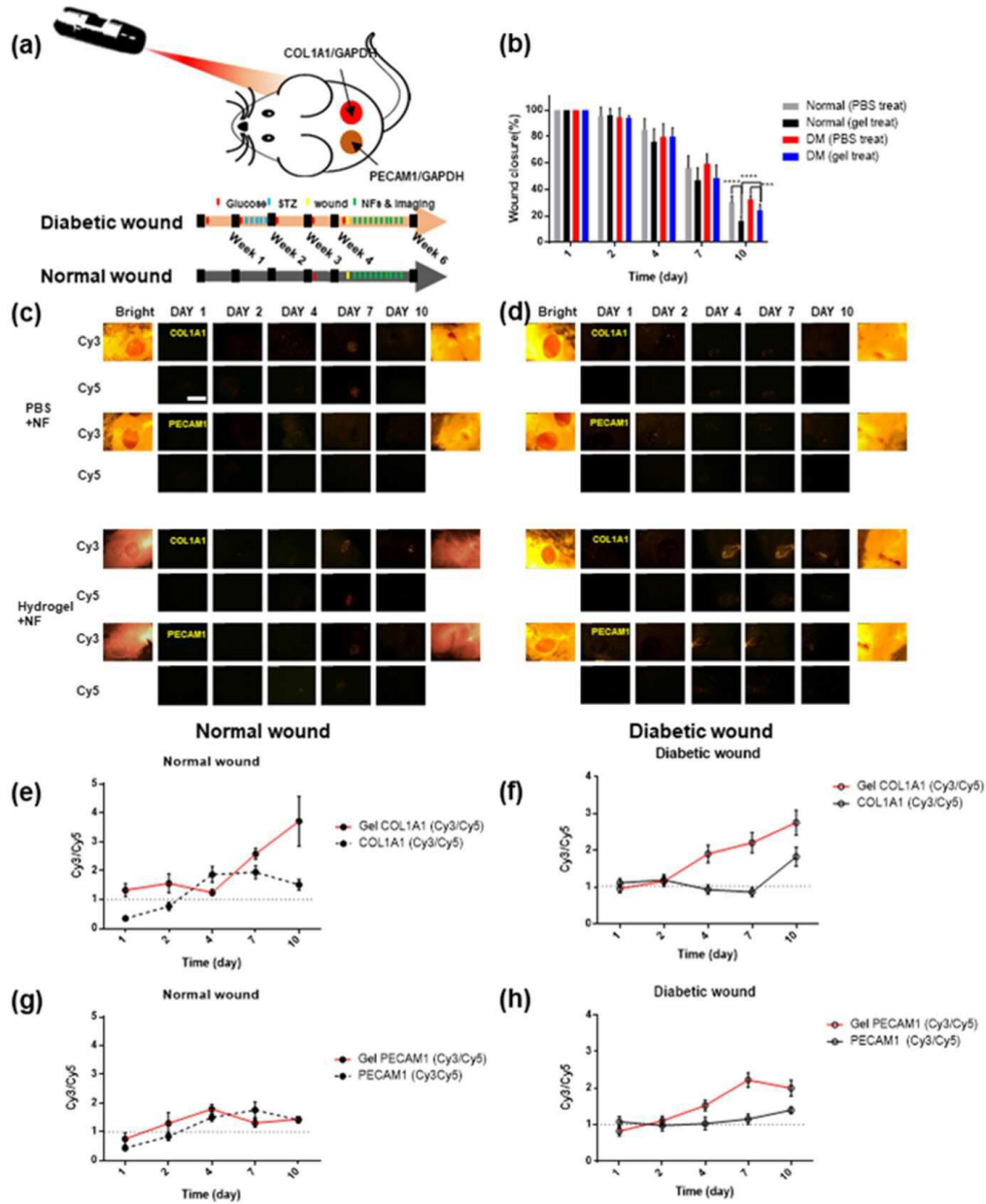
도면8



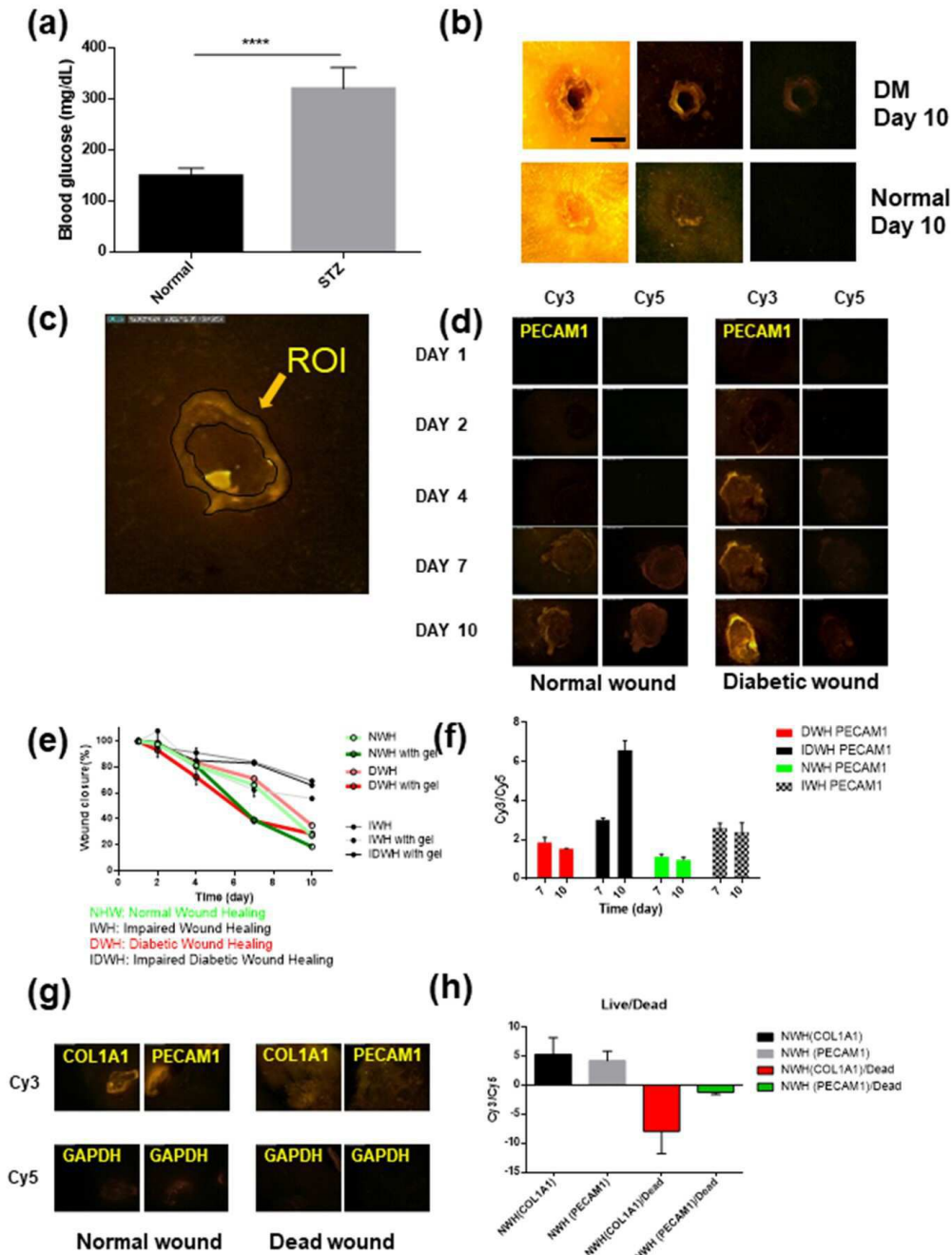
도면9



도면10



도면11



도면12

Days at 4-7	정상	당뇨
Inflammation (PECAM1/GAPDH)	1.2 이상	1.2 이하
Proliferation (COLA1/GAPDH)	1.5이상	1.5 이하

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.