



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0122247

(43) 공개일자 2023년08월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61L 27/52 (2006.01) A61L 27/40 (2006.01)

A61L 27/56 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61L 27/52 (2013.01)

A61L 27/40 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0018669

(22) 출원일자 2022년02월14일

심사청구일자 2022년02월14일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

성균관대학교산학협력단

경기도 수원시 장안구 서부로 2066 (천천동, 성균관대학교내)

(72) 발명자

김성재

경기도 화성시 동탄순환대로 881-10 (영천동, 동탄역 푸르지오), 708동 1304호

알루르 수브라마니안 시바쿠마르

경기도 화성시 큰재봉길 7

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

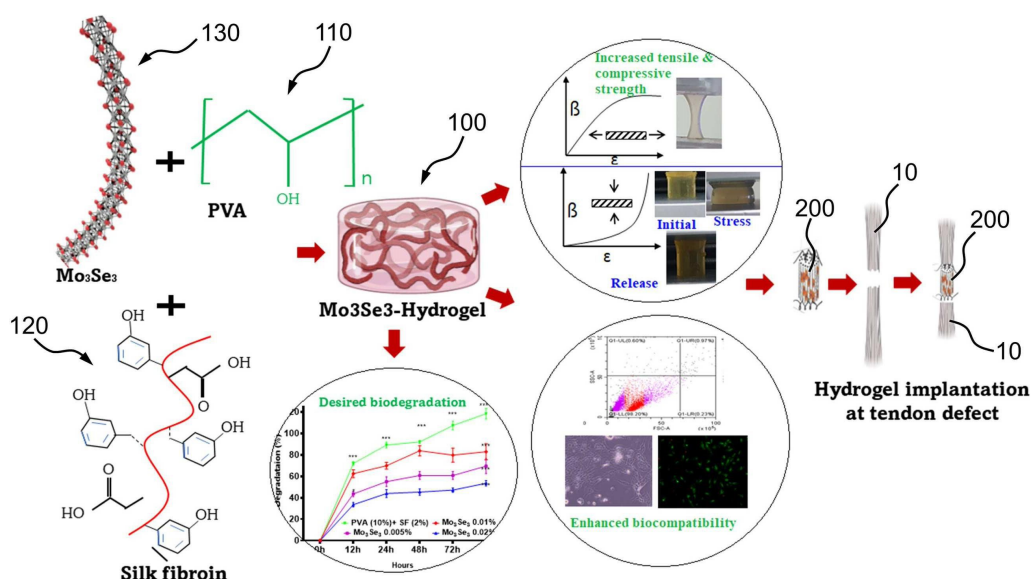
한상수

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 나노와이어 하이드로겔 및 재생 스카폴드

(57) 요약

본 발명은 유기물로 이루어진 하이드로겔 및 무기물로 이루어지고 가교에 의해 하이드로겔에 결합되는 나노와이어를 포함하여 다공성 구조를 가지는 것을 특징으로 하는 나노와이어 하이드로겔 및 재생 스카폴드를 제공한다.

대표도

(52) CPC특허분류

A61L 27/56 (2013.01)
A61L 2400/12 (2013.01)
A61L 2430/02 (2013.01)
A61L 2430/10 (2013.01)
A61L 2430/30 (2013.01)

오승배

경기도 수원시 장안구 율전로64번길 41-21, 203호
 (율전동)

(72) 발명자

마리아도스 아로키아 비자야 아난드

경기도 화성시 큰재봉길 7

최재영

경기도 수원시 권선구 칠보로 102, 104동 1702호(
 호매실동, 한양수자인파크원)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711146947
과제번호	2019R1F1A1059300
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공분야기초연구사업
연구과제명	세포외기질을 모사하여 힘줄의 재생을 촉진하는 나노신물질 스카폴드의 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	한림대학교
연구기간	2019.06.11 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711133313
과제번호	2020R1A2C2010984
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	표면결함 없는 무기분자선 개발을 통한 반도체 집적화 한계 극복기술 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	성균관대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

유기물로 이루어진 하이드로겔; 및

무기물로 이루어지고 가교에 의해 상기 하이드로겔에 결합되는 나노와이어를 포함하여 다공성 구조를 가지는 것을 특징으로 하는 나노와이어 하이드로겔.

청구항 2

제1 항에 있어서,

상기 나노와이어는 다수의 몰리브덴(Mo: molybdenum)과 다수의 셀레늄(Se: selenium)으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 나노와이어 하이드로겔.

청구항 3

제2 항에 있어서,

상기 나노와이어는 Mo_3Se_3 인 것을 특징으로 하는 나노와이어 하이드로겔.

청구항 4

제2 항에 있어서,

상기 다수의 셀레늄 중 서로 마주보도록 배열되는 한 쌍의 셀레늄 간의 거리는 0.6nm이고,

상기 한 쌍의 셀레늄 사이에는 상기 다수의 몰리브덴 중 어느 하나의 몰리브덴이 배열되는 것을 특징으로 하는 나노와이어 하이드로겔.

청구항 5

제1 항에 있어서,

상기 하이드로겔은,

폴리비닐알코올(PVA: Poly (vinyl alcohol)); 및

상기 폴리비닐알코올에 혼합되는 실크 피브로인섬유(SF: Silk Fibroin);를 포함하는 것을 특징으로 하는 나노와이어 하이드로겔.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 나노와이어는 음전하를 띄고,

상기 하이드로겔은 암모니아 양이온의 양전하를 띄며,

상기 암모니아 양이온은 상기 나노와이어와 정전기 상호작용(electrostatic interaction)을 일으키는 것을 특징

으로 하는 나노와이어 하이드로겔.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 나노와이어는 물에 0.005% 내지 1%의 농도로 분산되는 것을 특징으로 하는 나노와이어 하이드로겔.

청구항 8

제1 항에 있어서,

상기 나노와이어 하이드로겔의 압축강도(compressive strength)는 100kPa 내지 600 kPa인 것을 특징으로 하는 나노와이어 하이드로겔.

청구항 9

제1 항에 있어서,

상기 나노와이어 하이드로겔의 인장강도(tensile stress)는 50kPa 내지 500 kPa인 것을 특징으로 하는 나노와이어 하이드로겔.

청구항 10

제1 항에 있어서,

상기 나노와이어 하이드로겔의 팽윤비(Swelling ratio)는 22% 내지 50%인 것을 특징으로 하는 나노와이어 하이드로겔.

청구항 11

제1 항에 있어서,

상기 나노와이어 하이드로겔의 분해율(degradation)은 40% 내지 120%인 것을 특징으로 하는 나노와이어 하이드로겔.

청구항 12

제 1 항에 있어서,

상기 나노와이어 하이드로겔의 수분흡수율(water absorption)은 40% 내지 60%인 것을 특징으로 하는 나노와이어 하이드로겔.

청구항 13

제1 항에 따른 나노와이어 하이드로겔로 이루어진 재생 스카폴드.

청구항 14

제13 항에 있어서,

상기 재생 스카폴드는 생체적합성(biocompatibility)을 가지는 것을 특징으로 하는 재생 스카폴드.

청구항 15

제13 항에 있어서,

상기 재생 스카폴드는 신체의 결손 부위에 이식되는 것을 특징으로 하는 재생 스카폴드.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 나노와이어 하이드로겔 및 재생 스카폴드에 관한 것으로, 보다 상세하게는 기계적 특성, 세포외 기질(ECM: extracellular matrix), 팽창 특성, 분해 특성, 세포독성, 항균활성, 생체적합성 등을 향상시키는 나노와이어 하이드로겔 및 재생 스카폴드에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 실크 피브로인(SF)과 폴리(비닐알코올)(PVA) 기반 나노생체물질은 재생의학 분야에서 각별한 관심을 받고 있다.
- [0004] 그러나, SF-PVA 기반 나노생체물질은 기계적 강도, 취성 및 상용성이 불량하기 때문에 어려울 뿐만 아니라 원하는 형태로 제조하는 것이 제조 공정 역시 복잡하다.
- [0005] 특히, 생체 재료를 이식할 때 뼈/힘줄 결합 부위에서 세균 감염이 종종 발생하고, 정형외과에서 생체물질 관련 감염의 상당 부분은 황색 포도상구균과 표피 포도상구균에 의해 발생하며 치료가 복잡한 경우가 많다.
- [0006] 이에 따라 신체에 이식될 시, 생체적합성 및 항균활성이 뛰어나고, 기계적 특성도 향상된 나노생체물질에 대한 연구개발이 필요한 실정이다.
- [0008] (특허문헌 1) 공개특허공보 제10-2021-0120520호(2021.10.07.)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 상기와 같은 문제를 해결하기 위한 본 발명의 목적은 폴리비닐알코올(PVA) 및 실크 피브로인섬유(Silk Fibroin)를 포함하는 하이드로겔에 나노와이어(Mo_3Se_3)를 결합시켜 기계적 특성, 세포외 기질(ECM: extracellular matrix), 팽창 특성, 분해 특성, 세포독성, 항균활성, 생체적합성 등을 향상시키는 나노와이어 하이드로겔 및 재생 스카폴드를 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 기술적 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 기술적 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기와 같은 목적을 달성하기 위한 본 발명의 구성은 유기물로 이루어진 하이드로겔; 및 무기물로 이루어지고 가교에 의해 상기 하이드로겔에 결합되는 나노와이어를 포함하여 다공성 구조를 가지는 것을 특징으로 하는 나노와이어 하이드로겔을 제공한다.

- [0015] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 나노와이어는 다수의 몰리브덴(Mo: molybdenum)과 다수의 셀레늄(Se: selenium)으로 이루어지는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0016] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 나노와이어는 Mo_3Se_3 인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0017] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 다수의 셀레늄 중 서로 마주보도록 배열되는 한 쌍의 셀레늄 간의 거리는 0.6nm이고, 상기 한 쌍의 셀레늄 사이에는 상기 다수의 몰리브덴 중 어느 하나의 몰리브덴이 배열되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0018] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 하이드로겔은, 폴리비닐알코올(PVA: Poly (vinyl alcohol)); 및 상기 폴리비닐알코올에 혼합되는 실크 피브로인섬유(SF: Silk Fibroin);를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 나노와이어는 음전하를 띄고, 상기 하이드로겔은 암모니아 양이온의 양전하를 띄며, 상기 암모니아 양이온은 상기 나노와이어와 정전기 상호작용(electrostatic interaction)을 일으키는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 나노와이어는 물에 0.005% 내지 1%의 농도로 분산되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 나노와이어 하이드로겔의 압축강도(compressive strength)는 100kPa 내지 600 kPa인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 나노와이어 하이드로겔의 인장강도(tensile stress)는 50kPa 내지 500 kPa인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 나노와이어 하이드로겔의 팽윤비(Swelling ratio)는 22% 내지 50%인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 나노와이어 하이드로겔의 분해율(degradation)은 40% 내지 120%인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 나노와이어 하이드로겔의 수분흡수율(water absorption)은 40% 내지 60%인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0026] 또한, 상기와 같은 목적을 달성하기 위한 본 발명의 구성은 전술한 바에 따른 나노와이어 하이드로겔로 이루어진 재생 스카폴드를 제공한다.
- [0027] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 재생 스카폴드는 생체적합성(biocompatibility)을 가지는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 재생 스카폴드는 신체의 결손 부위에 이식되는 것을 특징으로 할 수 있다.

발명의 효과

- [0030] 상기와 같은 구성에 따르는 본 발명의 효과는, 폴리비닐알코올(PVA) 및 실크 피브로인섬유(Silk Fibroin)을 포함하는 하이드로겔에 나노와이어(Mo_3Se_3)를 결합시켜 기계적 특성, 세포외 기질(ECM: extracellular matrix), 팽창 특성, 분해 특성, 세포독성, 항균활성, 생체적합성 등을 향상시킬 수 있다.
- [0032] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 특허청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0034] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 나노와이어 하이드로겔 및 재생 스카폴드가 형성되는 과정을 나타낸 개념도이다.

도 2의 (a), (b), (c), (d)는 본 발명의 일실시예에 따른 나노와이어 하이드로겔을 점진적으로 상세하게 나타낸 개념도이다.

도 3의 (a) 내지 (f)는 본 발명의 일실시예에 따른 나노와이어 하이드로겔에 적용되는 나노와이어와 관련된 단결정 LiMo_3Se_3 나노로드 및 수계에 분산된 Mo_3Se_3 나노와이어의 SEM 이미지와 TEM 이미지의 다른 배율을 나타낸 이미지이다.

도 4의 (a) 내지 (f)는 본 발명의 일실시예에 따른 나노와이어 하이드로겔에 적용되는 Mo_3Se_3 의 AFM 이미지의 다른 배율을 나타낸 이미지이다.

도 5는 본 발명의 일실시예에 따른 Mo_3Se_3 의 농도별 나노와이어 하이드로겔의 단면 및 다른 배율을 나타낸 이미지이다.

도 6은 본 발명의 일실시예에 따른 Mo_3Se_3 의 농도별 나노와이어 하이드로겔의 과상수에 따른 투과율을 ATR방법으로 FTIR분석한 그래프이다.

도 7의 (a) 내지 (f)는 본 발명의 일실시예에 따른 나노와이어 하이드로겔의 압축강도, 인장강도, 팽윤비, 수분 흡수율 및 분해율을 나타낸 그래프이다.

도 8의 (a), (b), (c), (d), (e)는 본 발명의 일실시예에 따른 나노와이어 하이드로겔에 적용되는 Mo_3Se_3 의 농도별 세포독성을 MTT 기반으로 분석한 그래프 및 이미지이다.

도 9의 (a) 내지 (d)는 본 발명의 일실시예에 따른 나노와이어 하이드로겔에 적용되는 Mo_3Se_3 의 농도별 생체 적합성을 확인하기 위한 이미지 및 그래프이다.

도 10의 (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g)는 본 발명의 일실시예에 따른 나노와이어 하이드로겔에 적용되는 Mo_3Se_3 의 농도에 따른 글리세르알데히드-3-인산탈수소효소 (GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)의 상관관계 및 콜라겐의 mRNA 풍부도를 나타낸 그래프이다.

도 11은 본 발명의 일실시예에 따른 나노와이어 하이드로겔에 적용되는 Mo_3Se_3 의 농도별 황색포도상구균에 대한 항균 활성화 정도를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 이하에서는 첨부한 도면을 참조하여 본 발명을 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 따라서 여기에서 설명하는 실시예로 한정되는 것은 아니다. 그리고 도면에서 본 발명을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.

[0036] 명세서 전체에서, 어떤 부분이 다른 부분과 "연결(접속, 접촉, 결합)"되어 있다고 할 때, 이는 "직접적으로 연결"되어 있는 경우뿐 아니라, 그 중간에 다른 부재를 사이에 두고 "간접적으로 연결"되어 있는 경우도 포함한다. 또한 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 구비할 수 있다는 것을 의미한다.

[0037] 본 명세서에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 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.

[0038] 이하 첨부된 도면을 참고하여 본 발명의 실시예를 상세히 설명하기로 한다.

[0039] 1. 나노와이어 하이드로겔(100)

[0040] 이하, 도 1 및 도 2를 참고하여 본 발명의 일 실시예에 따른 나노와이어 하이드로겔을 설명하도록 한다.

[0041] 도 1은 본 발명의 일실시예에 따른 나노와이어 하이드로겔 및 재생 스카폴드가 형성되는 과정을 나타낸 개념도이다. 도 2의 (a), (b), (c), (d)는 본 발명의 일실시예에 따른 나노와이어 하이드로겔을 점진적으로 상세하게

나타낸 개념도이다.

- [0042] 도 1 및 도 2를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 나노와이어 하이드로겔(100)은 폴리비닐알코올(110)(PVA)과 실크 피브로인섬유(120)(Silk Fibroin)로 이루어진 하이드로겔 및 나노와이어(130)를 포함하고, 다공성 구조를 가진다.
- [0043] 일반적으로 하이드로겔은 유기물만으로 이루어지고, 전술한 바와 같이 폴리비닐알코올(110)(PVA) 및 실크 피브로인섬유(120)(Silk Fibroin)를 포함한다.
- [0044] 도 1 및 도 2를 참조하면, 폴리비닐알코올(110)(PVA)은 유기물로서, 방직 및 제지 산업에서 접착제, 코팅제로 사용되며, 화장품에도 널리 사용되는 물질이다. 재건 수술의 삼입 보형물 및 색전제로도 사용된다.
- [0045] 상기한 폴리비닐알코올은 폴리초산비닐을 메틸알코올 용액으로 수산화나트륨을 가해, 30~50℃로 가수분해하면, 백색의 고체가 되어 침전된다.
- [0046] 도 1 및 도 2를 참조하면, 실크 피브로인섬유(120)(Silk Fibroin)는 유기물로서, 폴리비닐알코올(110)에 혼합된다.
- [0047] 나노와이어(130)는 무기물로 이루어지고 가교에 의해 하이드로겔에 결합된다.
- [0048] 구체적으로 나노와이어(130)는 다수의 몰리브덴(Mo: molybdenum)과 다수의 셀레늄(Se: selenium)으로 이루어진다.
- [0049] 보다 상세하게 본 발명에서 나노와이어(130)는 Mo_3Se_3 이고, 수계 분산된 Mo_3Se_3 의 농도는 0.005% 내지 1%의 범위를 가지며, 추가적으로 실제 Mo_3Se_3 는 1% 이상의 농도로도 분산이 가능하다.
- [0050] 특히, 나노와이어 하이드로겔(100)에 Mo_3Se_3 를 혼합할 때 Mo_3Se_3 의 농도가 상기 농도 범위 중 0.01%일 경우가 후술하는 이유로 인해 기계적 특성, 생체적합성 등이 우수한 것으로 나타났다.
- [0051] 도 2의 가장 우측에 도시된 바와 같이 다수의 셀레늄(Se) 중 서로 마주보도록 배열되는 한 쌍의 셀레늄(Se) 간의 거리는 0.6nm이다.
- [0052] 이때, 한 쌍의 셀레늄(Se) 사이에는 다수의 몰리브덴(Mo) 중 어느 하나의 몰리브덴(Mo)이 배열된다.
- [0053] 또한, 도 2의 가장 우측에 도시된 바와 같이 나노와이어(130)는 음전하를 띄고, 하이드로겔은 암모니아 양이온(NH_3^+)의 양전하를 띤다.
- [0054] 상기한 암모니아 양이온(NH_3^+)은 음전하를 띄는 나노와이어(130)와 정전기 상호작용(electrostatic interaction)을 일으키게 되어 기계적 특성을 향상시킨다.
- [0055] 상기한 하이드로겔 및 나노와이어(130)는 젤화(gelatin)되어 있다.
- [0057] 이하, 도 3 내지 도 11을 참조하여 본 발명의 일 실시예에 따른 나노와이어 하이드로겔(100)의 기계적 특성 및 생체적합성에 대하여 구체적으로 설명하도록 한다.
- [0058] 도 3의 (a) 내지 (f)는 본 발명의 일 실시예에 따른 나노와이어 하이드로겔에 적용되는 나노와이어와 관련된 단결정 LiMo_3Se_3 나노로드와 수계 분산된 Mo_3Se_3 나노와이어의 SEM 이미지와 TEM 이미지의 다른 배율을 나타낸 이미지이다.
- [0059] 단결정 LiMo_3Se_3 나노막대가 도 3의 (a), (b)에 도시되고, 수계 분산된 Mo_3Se_3 나노와이어에 대한 다른 배율의 SEM 및 TEM 이미지가 도 3의 (c), (d), (e), (f)에 도시된다.
- [0060] 도 3의 (c)와 (d)는 물에 분산된 Mo_3Se_3 -체인나노와이어의 SEM 이미지이고, 도 3의 (e)는 물에 분산된 Mo_3Se_3 -사슬나노와이어(e)의 TEM 이미지이고, 도 3의 (f)는 젤라틴이 분산된 Mo_3Se_3 -사슬나노와이어의 TEM 이미지이다.
- [0061] 도 4의 (a) 내지 (f)는 본 발명의 일 실시예에 따른 나노와이어 하이드로겔에 적용되는 Mo_3Se_3 의 AFM 이미지의 다른 배율을 나타낸 이미지이다.
- [0062] 도 4의 (a) 내지 (f)에는 Mo_3Se_3 - SCAC 스캐폴드 필름이 조개진 운모에 증착된 AFM 이미지를 서로 다른 배율로

나타낸 것이다.

- [0063] 도 5는 본 발명의 일실시예에 따른 나노와이어 하이드로겔에 적용되는 Mo_3Se_3 의 농도에 따른 나노와이어 하이드로겔의 단면 및 다른 배율을 나타낸 이미지이다.
- [0064] 도 5의 (a)는 FE-SEM 기법으로 PVA(10%) + SF(2%)의 단면 및 기공을 분석하여 각각 다른 배율로 나타낸 이미지이고, 도 5의 (b)는 Mo_3Se_3 (0.02%)의 단면 및 기공을 분석하여 각각 다른 배율로 나타낸 이미지이며, 도 5의 (c)는 Mo_3Se_3 (0.01%)의 단면 및 기공을 분석하여 각각 다른 배율로 나타낸 이미지이고, 도 5의 (d)는 Mo_3Se_3 (0.005%)의 단면 및 기공을 분석하여 각각 다른 배율로 나타낸 이미지이다.
- [0065] 상기 Mo_3Se_3 의 농도에 따라 다공성 구조의 크기가 달라지는 것을 알 수 있고, 상기 다공성 구조는 세포의 기질인 ECM(Extracellular Matrix)과 유사한 형태를 갖음으로서, 상기 ECM의 역할인 세포 사이에 겔과 단백질이 채워져 세포의 분화와 증식을 촉진시키는 역할을 수행한다.
- [0066] 즉, 적절한 크기의 다공성 구조는 뼈, 연골 및 힘줄의 형성을 촉진하며 도5를 통해 알 수 있듯이 Mo_3Se_3 의 농도가 0.01%일 때 ECM구조를 가장 잘 모사하는 것으로 볼 수 있다.
- [0067] 도 6은 본 발명의 일실시예에 따른 나노와이어 하이드로겔에 적용되는 Mo_3Se_3 의 농도별 나노와이어 하이드로겔의 파상수에 따른 투과율을 ATR방법으로 FTIR분석한 그래프이다.
- [0068] 도 6에는 각각 PVA(10%) + SF(2%)의 샘플에 대한 FTIR 분석 결과, Mo_3Se_3 (0.02%)의 샘플에 대한 FTIR 분석 결과, Mo_3Se_3 가 0.01% 첨가된 나노와이어 하이드로겔 샘플에 대한 FTIR 분석 결과 및 Mo_3Se_3 가 0.005% 첨가된 나노와이어 하이드로겔 샘플에 대한 FTIR 분석 결과가 도시되며, 파상수(wavenumber)에 따른 투과율(transmittance)로 나타난다.
- [0069] 상기 샘플의 FTIR 분석은 물질의 성질을 알아보기 위한 기법으로 도6에는 하이드로겔에 Mo_3Se_3 가 혼합되어도 PVA(10%) + SF(2%)의 샘플의 분석 결과와 파상수별 투과율이 유사하게 나와 하이드로겔에 Mo_3Se_3 가 혼합되어도 뼈, 연골 및 힘줄 형성을 촉진하는 역할을 수행할 수 있음을 알 수 있다.
- [0070] 도 7의 (a) 내지 (f)는 본 발명의 일실시예에 따른 나노와이어 하이드로겔의 압축강도, 인장강도, 팽윤비, 수분흡수율 및 분해율을 나타낸 그래프이다.
- [0071] 도 7의 (a)를 참조하면, 나노와이어 하이드로겔의 압축강도(compressive strength)는 100kPa 내지 600 kPa이다.
- [0072] 구체적으로 압축강도는 PVA(10%) + SF(2%), Mo_3Se_3 (0.005%)의 샘플, Mo_3Se_3 (0.01%)의 샘플 및 Mo_3Se_3 (0.02%)의 샘플의 순서대로 커지는 것을 확인할 수 있다.
- [0073] 도 7의 (b)를 참조하면, 나노와이어 하이드로겔의 인장강도(tensile stress)는 50kPa 내지 500 kPa이다.
- [0074] 구체적으로 인장강도는 Mo_3Se_3 (0.02%)의 샘플이 가장 큰 것을 확인할 수 있다.
- [0075] 다만, Mo_3Se_3 (0.01%)의 샘플, Mo_3Se_3 (0.005%)의 샘플 및 PVA(10%) + SF(2%)의 샘플에 대한 인장강도는 Mo_3Se_3 (0.02%)의 샘플보다 작은 반면, 서로 선형적으로 형성되고, 허용 인장강도는 PVA(10%) + SF(2%)의 샘플, Mo_3Se_3 (0.005%)의 샘플 및 Mo_3Se_3 (0.02%)의 샘플과 Mo_3Se_3 (0.01%)의 샘플의 순서대로 커지는 것을 확인할 수 있다.
- [0076] 도 7의 (c)를 참조하면, 나노와이어 하이드로겔의 팽윤비(Swelling ratio)는 22% 내지 50%이다.
- [0077] 구체적으로 팽윤비는 Mo_3Se_3 (0.02%)의 샘플, Mo_3Se_3 (0.005%)의 샘플, Mo_3Se_3 (0.01%)의 샘플 및 PVA(10%) + SF(2%)의 샘플의 순서대로 커지는 것을 확인할 수 있다.
- [0078] 도 7의 (d)를 참조하면, 나노와이어 하이드로겔의 수분흡수율(water absorption)은 40% 내지 60%이다.
- [0079] 구체적으로 수분흡수율은 PVA(10%) + SF(2%)의 샘플을 기준으로 Mo_3Se_3 (0.005%)의 샘플과 Mo_3Se_3 (0.01%)의 샘플

이 비슷한 수준으로 나타났고, 상대적으로 $\text{Mo}_3\text{Se}_3(0.02\%)$ 의 샘플이 가장 낮은 수준으로 나타났다.

- [0080] 도 7의 (e) 및 (f)를 참조하면, 나노와이어 하이드로겔의 분해율(degradation)은 40% 내지 120%이다.
- [0081] 분해율은 PVA(10%) + SF(2%), $\text{Mo}_3\text{Se}_3(0.01\%)$ 의 샘플, $\text{Mo}_3\text{Se}_3(0.005\%)$ 의 샘플 및 $\text{Mo}_3\text{Se}_3(0.02\%)$ 의 샘플의 순서대로 작아지는 것을 확인할 수 있다.
- [0082] 즉, 무기물인 Mo_3Se_3 가 혼합되면 인장력, 압축력 등 기계적 물성치가 점차 향상되고, 생체 내 분해 시간도 지연시킬 수 있으며 Mo_3Se_3 가 0.01% 이상이 되기 전까지는 수분함유도 역시 PVA(10%) + SF(2%) 수준으로 유지하는 것으로 나타나고 있다.
- [0083] 도 8의 (a) 내지 (e)는 본 발명의 일실시예에 따른 나노와이어 하이드로겔에 적용되는 Mo_3Se_3 의 농도별 세포독성을 MTT 기반으로 분석한 그래프 및 이미지이다.
- [0084] 도 8의 (a)에는 각각 대조군(CON), $\text{Mo}_3\text{Se}_3(0.02\%)$ 의 샘플, $\text{Mo}_3\text{Se}_3(0.01\%)$ 의 샘플 및 $\text{Mo}_3\text{Se}_3(0.005\%)$ 의 샘플의 세포 생존능력(cell viability)을 확인하기 위한 MTT 기반 세포독성을 분석한 실험 결과가 도시된다.
- [0085] 또한, 도 8의 (b)는 대조군의 건구 세포의 이미지이고, 도 8의 (c)는 $\text{Mo}_3\text{Se}_3(0.02\%)$ 의 건구 세포의 이미지이며, 도 8의 (d)는 $\text{Mo}_3\text{Se}_3(0.01\%)$ 의 이미지이고, 도 8의 (e)는 $\text{Mo}_3\text{Se}_3(0.005\%)$ 의 건구 세포의 이미지이다.
- [0086] 구체적으로 상기한 실험을 진행하기 위해 인간 골수 줄기 세포(hBMSc)를 사용하여 건구 세포를 분화시켰다. 인간 골수 줄기 세포(hBMSc)는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium, 10% fetal bovine serum, 100 U/ml의 항생제 용액(Penicillin, Streptomycin, Amphotericin B)으로 구성된 TEN-1/Tenocyte Culture Media(Zen-Bio, USA)에서 습한 분위기에서 성장시켰다.
- [0087] 또한, 37° C에서 5% CO_2 텐구 분화 배지를 2일마다 교체한 후 계대 2-5를 MTT 분석을 사용하여 세포 대사 활성에 사용하였다. 혼합 Mo_3Se_3 -PVA-SF-NWH는 직접 접촉 방법을 사용하여 세포 독성에 대한 테스트가 수행되었다.
- [0088] Mo_3Se_3 -PVA-SF-NWH는 성장하기 전에 밤새 자외선 아래에서 살균된다.
- [0089] 세포 시딩을 위해 Mo_3Se_3 -PVA-SF-NWH(0.02%, 0.1% 및 0.005%)를 48웰 플레이트에 시딩했고, 대조군으로는 블랭크 웰을 사용하였다.
- [0090] 4 x 10⁴개 세포/ml의 세포를 웰에 접종하였다. 24시간 배양 후, 각각은 5 mg/mL MTT 용액의 100 μL 을 잘 추출한다.
- [0091] 4시간 배양 후 상층액을 조심스럽게 제거한 후 포르마잔 결정을 용해시키기 위해 1mL의 DMSO를 적용하였다. plateshaker에서 10분간 흔든 후 100 μL 의 용액을 96-well plate에 붓고 microplate reader(Epoch, BioTeck, South Korea)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0092] 이로부터 PVA(10%) + SF(2%)에 무기물인 Mo_3Se_3 가 0.01% 농도가 될때까지 혼합되어도 독성에 대한 세포의 생존력이 큰 변화가 없는 것을 알 수 있다.
- [0093] 도 9의 (a) 내지 (d)는 본 발명의 일실시예에 따른 나노와이어 하이드로겔에 적용되는 Mo_3Se_3 의 농도별 생체적합성을 확인하기 위한 이미지 및 그래프이다.
- [0094] 비형광 세포 투과성 칼세인 AM은 효소 전환을 사용하여 강한 형광성 칼세인으로 전환된다.
- [0095] Ethidium homodimer-1(EthD-1)은 손상된 세포막을 통과한 후 핵산에 부착된 결과, 죽은 세포에서 단색의 붉은 빛이 난다.
- [0096] 2mM 칼세인 AM 및 4mM EthD-1을 Mo_3Se_3 -PVA-SF-NWH에 직접 적용했습니다. 하이드로겔을 실온에서 30분간 방치한 후 형광현미경(Eclipse 80i, Nikon, Tokyo, Japan)을 사용하여 사진을 촬영하였다.
- [0097] 세포 내 에스테라제 활성의 존재는 살아있는 세포를 식별하는 데 사용된다.
- [0098] 그 결과 하이드로겔 내 Mo_3Se_3 의 농도가 0.01%가 될때까지 일반 하이드로겔과 그 결과에 큰 차이가 없었다.

- [0099] 도 10의 (a) 내지 (g)는 본 발명의 일실시예에 따른 나노와이어 하이드로겔에 적용되는 Mo_3Se_3 의 농도에 따른 글리세르알데히드-3-인산탈수소효소 (GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)의 상관관계 및 콜라겐의 mRNA 풍부도를 나타낸 그래프이다.
- [0100] Col 1A, Col 3A1 및 Scleraxis의 단백질 발현 수준을 평가하기 위해 RIPA 버퍼를 사용하여 실험 세포에서 총 단백질을 추출한 후 Bio-Rad 단백질 분석 키트를 사용하여 단백질 농도를 평가한다.
- [0101] 25mg의 단백질 샘플을 Laemmli 완충액에 용해시키고 4% 아크릴아미드와 6% 아크릴아미드 스테킹 젤을 사용하여 분리한다.
- [0102] 그런 다음, 이를 200mA에서 60분 동안 PVDF 멤브레인에 옮긴다.
- [0103] 실온에서 0.5M Tris 완충 식염수, pH 7.4, 0.05% Tween-20(TBST)에 5% 탈지분유를 사용하여 실온에서 2시간 동안 차단한 후 면역블롯을 Col 1A, Col 3A1 및 Scleraxis primary와 함께 40C에서 밤새 인큐베이션했습니다.
- [0104] 항체(1:5000 희석) TBST 세척 후, 이들 막을 HRP-접합된 이차 항체(1:2000 희석)에서 60분 동안 인큐베이션한다.
- [0105] 다음, 강화된 화학발광 분석 키트를 사용하여 단백질 밴드를 관찰한 다음 Image J 소프트웨어를 사용하여 정량화한 후 밴드 상대 밀도 비율을 GAPDH의 상대 밀도 비율과 비교하였다.
- [0106] TriZol 시약을 사용하여 모든 실험 그룹에서 전체 세포 RNA를 추출했다. 제조된 RNA의 정제도는 nano-drop plate로 확인하였다. 그런 다음 cDNA(Complementary DNA) 합성 키트(Bio-Rad)를 사용하여 2 μ g의 total RNA를 사용하여 cDNA를 합성했다. 그런 다음 cDNA를 주형으로 사용하여 각 유전자를 증폭했다. 증폭에는 10ng 양의 각 시료의 total RNA에 해당하는 cDNA가 사용되었고, collagen 1A, Collagen 3A1, SCX 및 GAPDH를 하우스키핑 유전자로 사용하여 수행했다.
- [0107] 상기 하우스키핑 유전자는 뼈, 근육, 힘줄 등의 재생에 필요한 대표적 유전자이다. 도10에 도시되어 있듯이 Mo_3Se_3 의 농도가 0.01%가 될 때까지 하우스키핑 유전자 생성에 큰 영향이 발생하지 않고 오히려 mRNA 측면에서는 Mo_3Se_3 의 농도가 0.01%에서 하우스키핑 유전자의 생성이 오히려 제고됨을 알 수 있다.
- [0108] 도 11은 본 발명의 일실시예에 따른 나노와이어 하이드로겔에 적용되는 Mo_3Se_3 의 농도별 항생포도상구균에 대한 항균 활성화 정도를 나타낸 도면이다.
- [0109] 생체 재료를 이식하는 동안 박테리아 감염의 위험은 상당한 제한 사항이다.
- [0110] 특히, 깊은 조직 위치와 관련된 미생물 때문에 임플란트 또는 장치 부위의 감염은 일반적으로 치료하기 어렵다.
- [0111] 이를 바탕으로 도 11에 도시된 Mo_3Se_3 -PVA-SF-NWH의 항균 활성을 CFU 생존 계수 분석을 사용하여 S. aureus에 대해 테스트했다.
- [0112] Mo_3Se_3 -PVA-SF-NWH의 24시간 처리 후, 용량 의존적으로 항균 활성을 유의하게 감소시켰다. 유사하게, Mo_3Se_3 -PVA-SF-NWH는 항균 활성을 향상시킬 수 있다.
- [0113] 도11에도 Mo_3Se_3 가 함유될 때 유의미한 박테리아 감염 비활성화 효과가 있음을 도시하고 있다.

[0115] 2. 재생 스카폴드(200)

- [0116] 이하, 도 1 내지 도 11을 참고하여 본 발명의 일 실시예에 따른 재생 스카폴드를 설명하도록 한다.
- [0117] 도 2를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 재생 스카폴드(200)는 전술한 바에 따른 나노와이어 하이드로겔로 이루어진다.
- [0118] 상기 재생 스카폴드는 생체적합성(biocompatibility)을 가진다.
- [0119] 상기 재생 스카폴드는 신체의 결손 부위에 이식된다.
- [0120] 구체적으로 재생 스카폴드(200)는 도 2에 도시된 바와 같이 힘줄(10)의 결손 부위에 이식되도록 적용된 후 시간이 경과하면, 힘줄(10)와 친화적으로 결합된다.

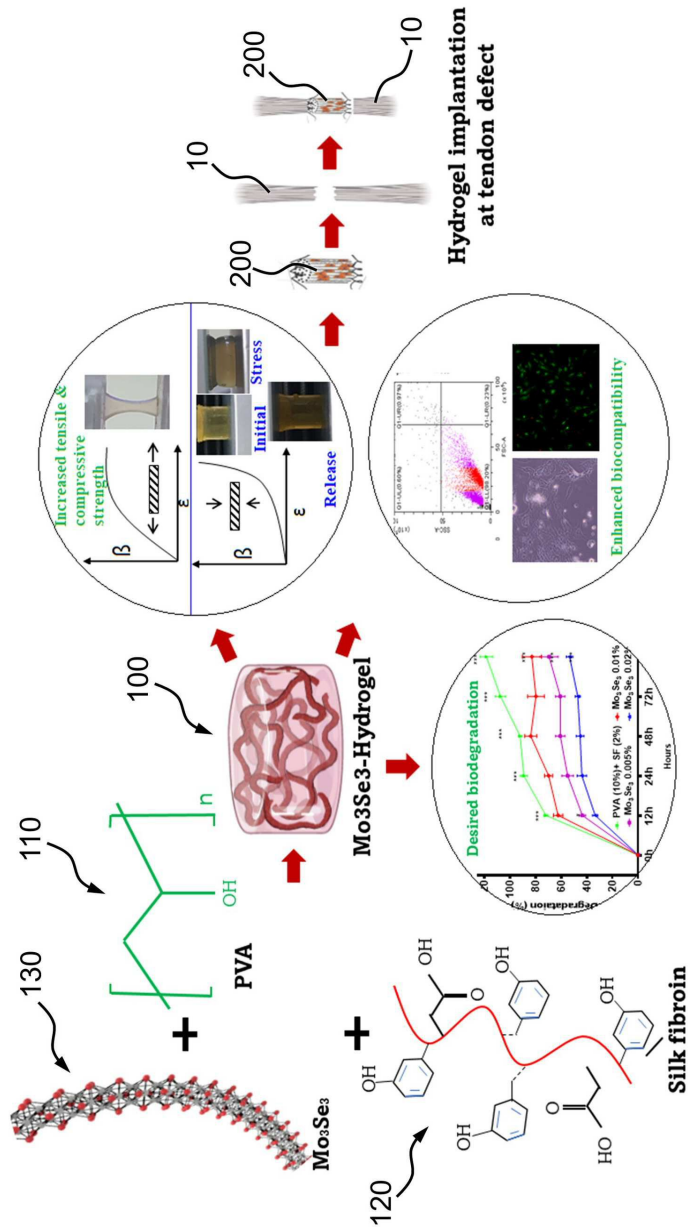
- [0121] 본 발명에서는 재생 스카폴드(200)가 힘줄(10)에 적용되는 것으로 설명하고 있으나, 재생 스카폴드(200)는 힘줄(10) 이외에도 인대, 뼈, 근육, 조직 등을 포함하는 모든 신체에 적용 가능하다.
- [0123] 전술한 본 발명의 나노와이어 하이드로겔은 폴리비닐알코올(PVA)에 실크 피브로인섬유(Silk Fibroin)가 혼합된 하이드로겔에 나노와이어(Mo_3Se_3)를 결합시켜 기계적 특성, 세포외 기질(ECM: extracellular matrix), 팽창 특성, 분해 특성, 세포독성, 항균활성, 생체적합성 등을 향상시킬 수 있다.
- [0124] 또한, 본 발명의 재생 스카폴드는 생체적합성을 가지는 나노와이어 하이드로겔로 이루어져 신체의 결손 부위에 이식됨에 따라 재생 치료의 효과를 극대화시킬 수 있다.
- [0126] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.
- [0127] 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.

부호의 설명

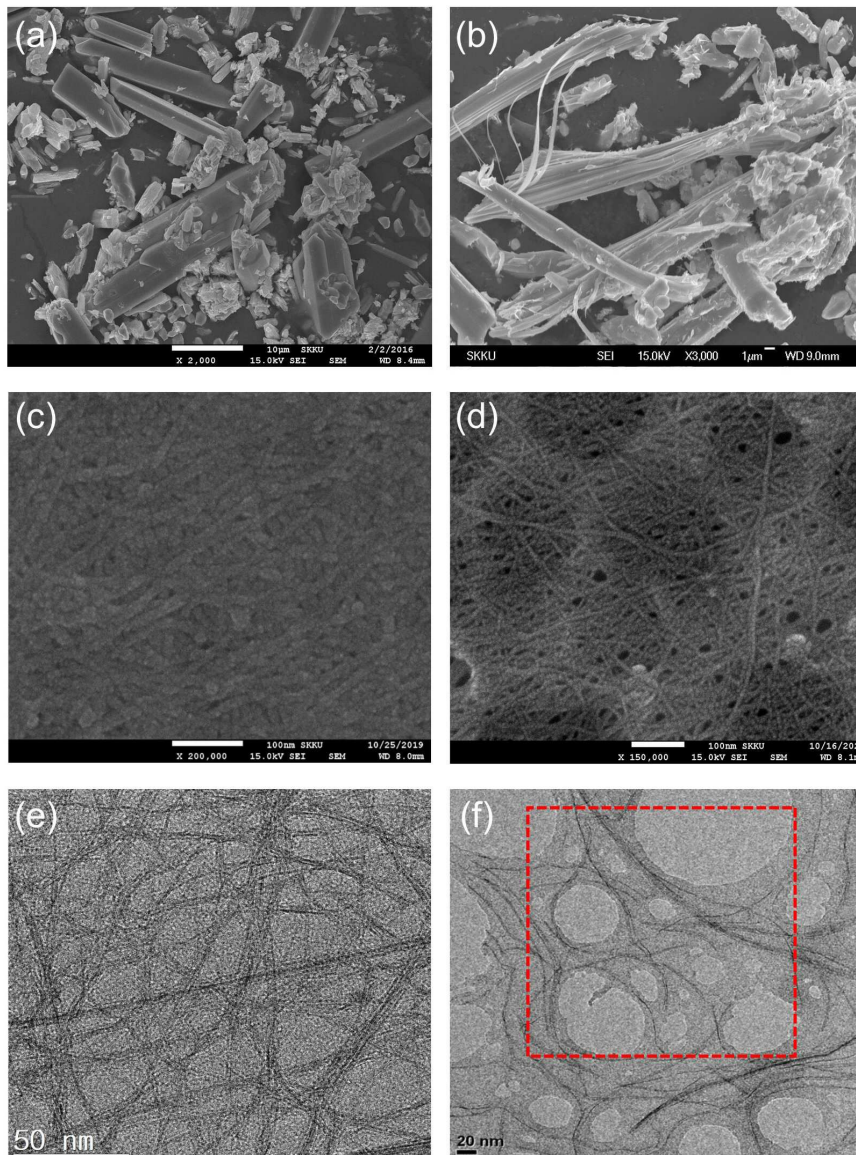
- [0129] 10: 힘줄
 100: 나노와이어 하이드로겔
 110: 폴리비닐알코올(PVA)
 120: 실크 피브로인섬유(Silk Fibroin)
 130: 나노와이어
 200: 재생 스카폴드

도면

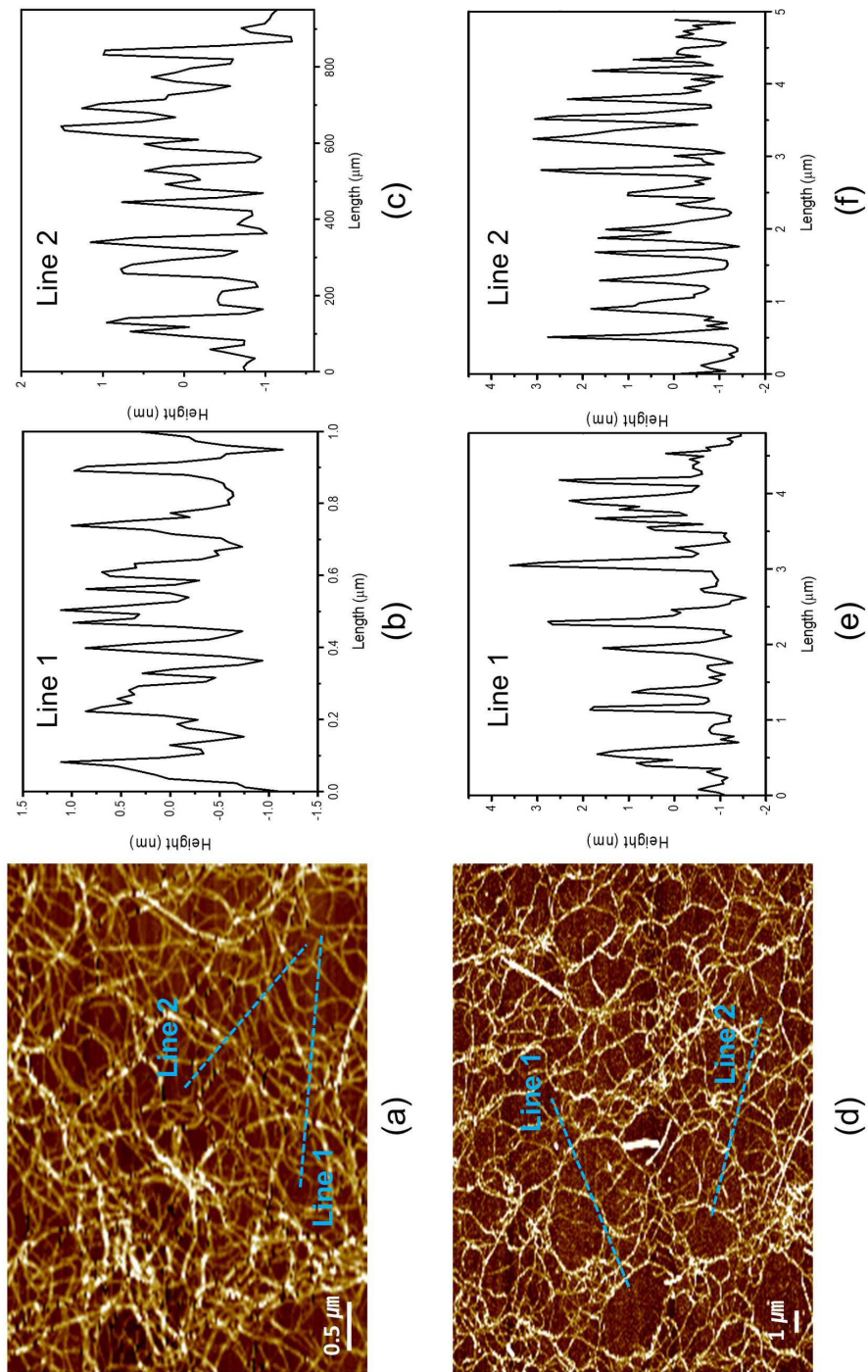
도면1



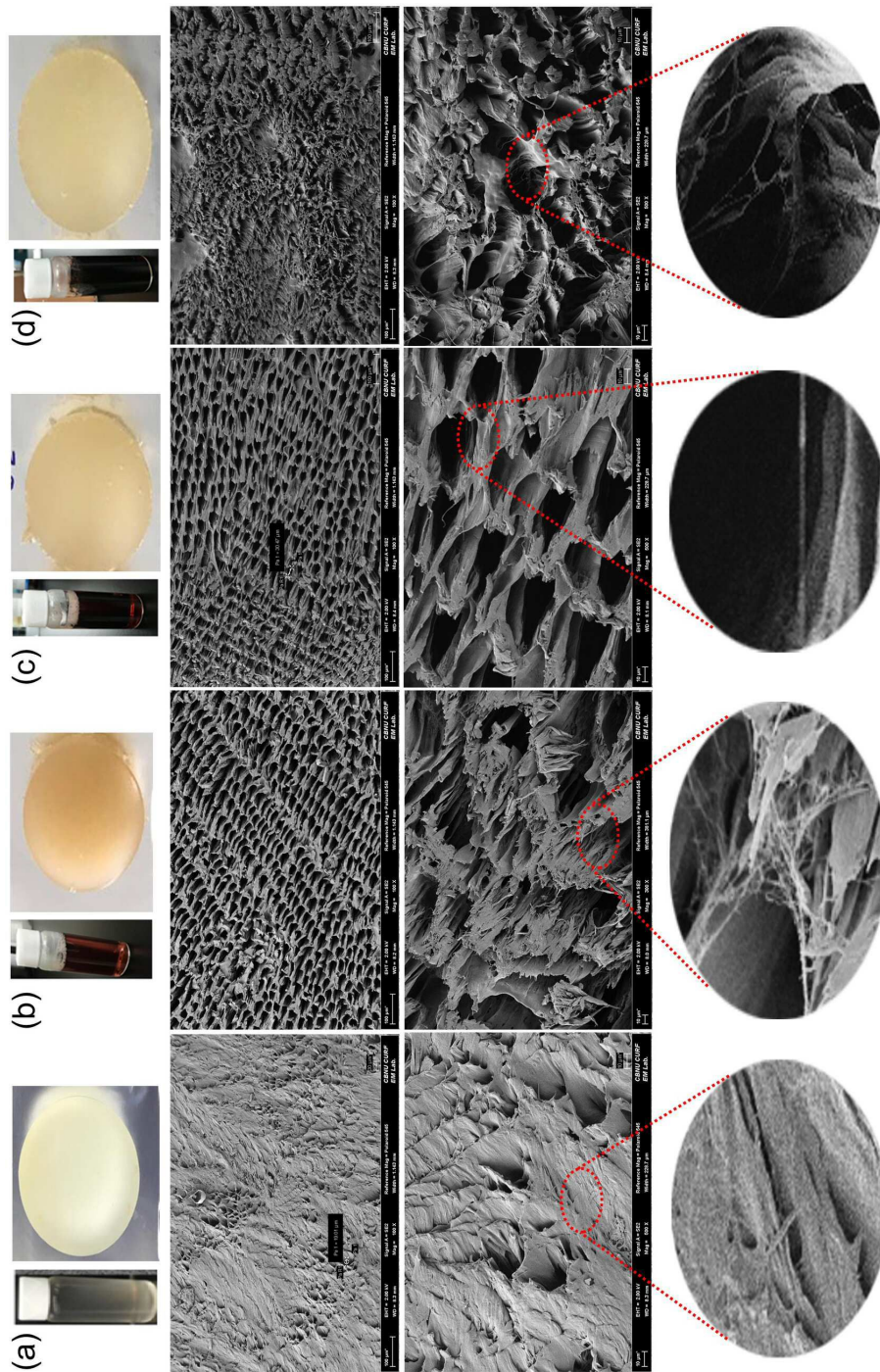
도면3



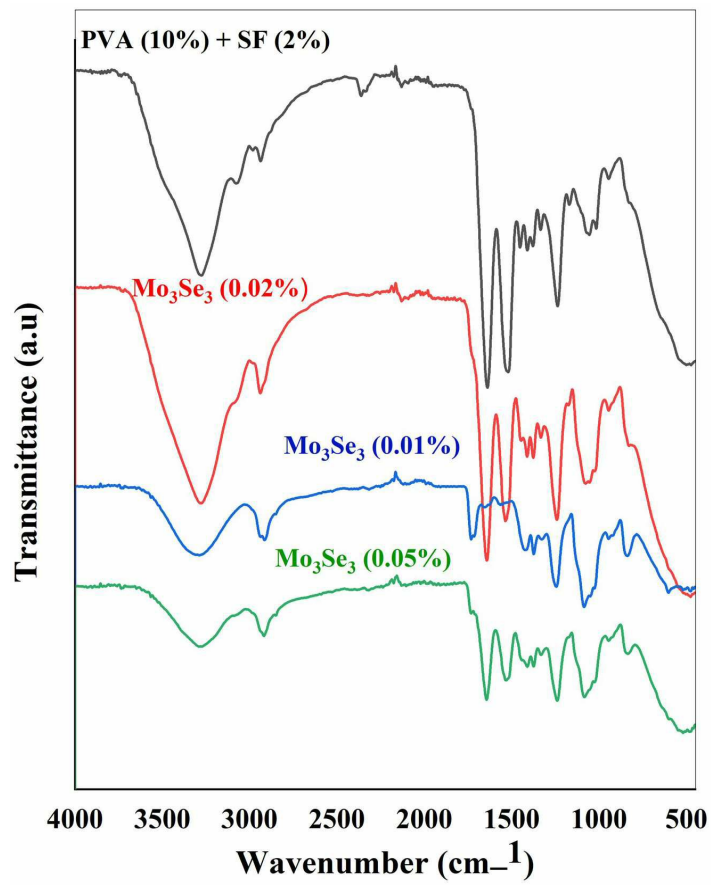
도면4



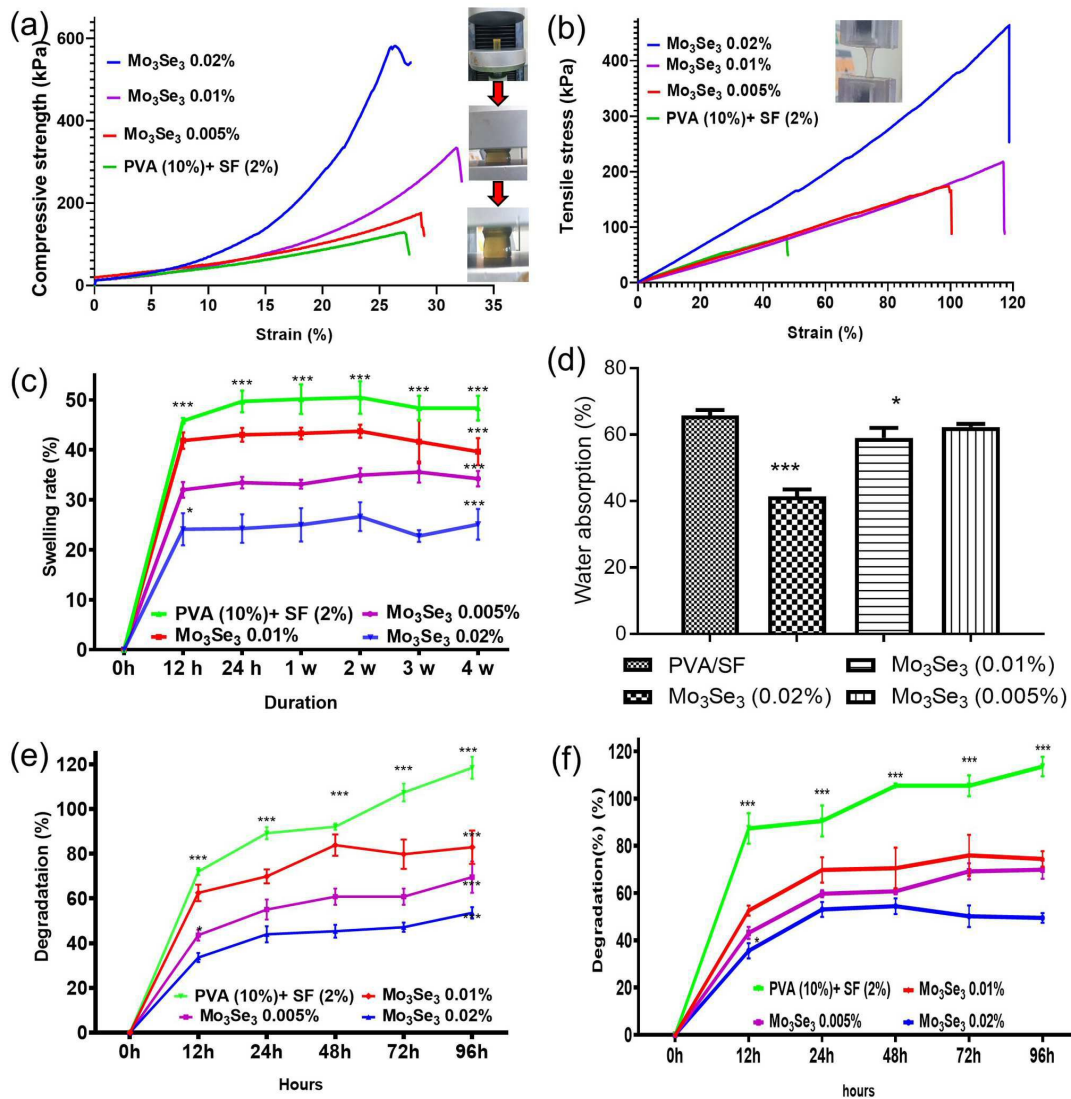
도면5



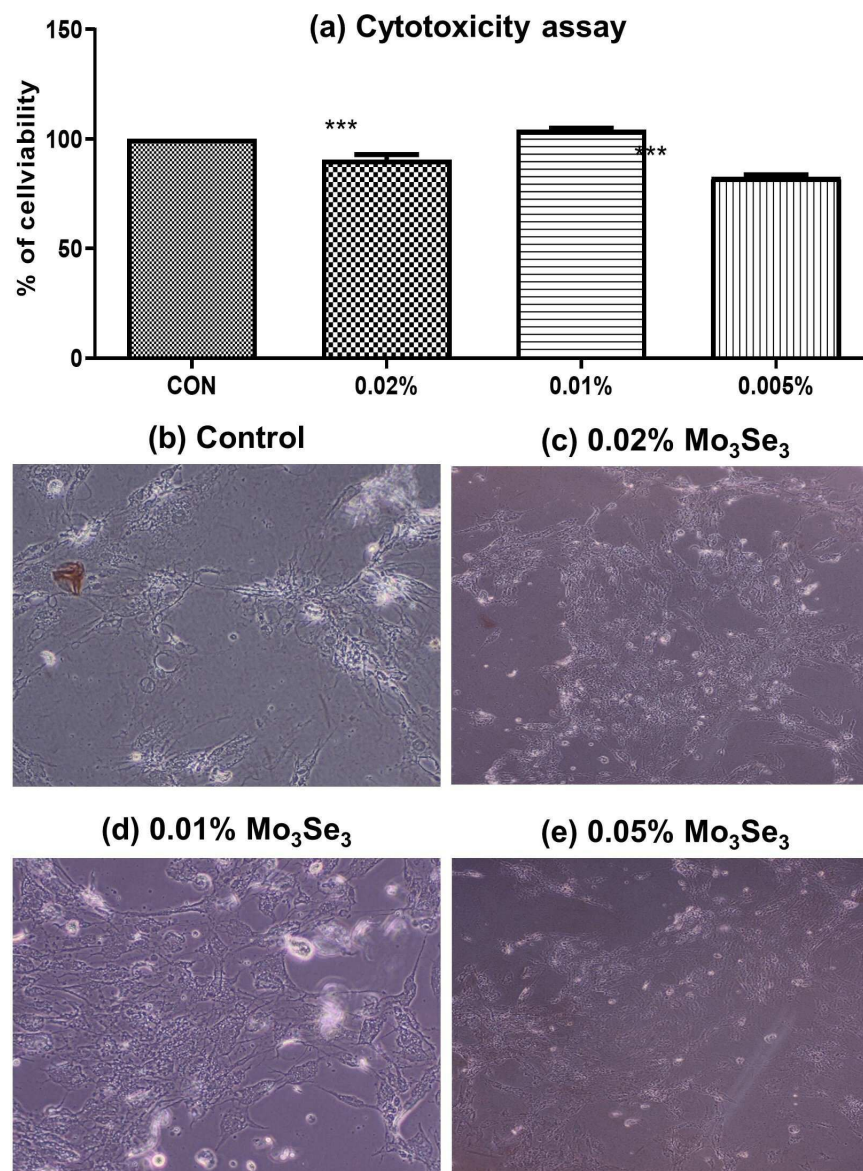
도면6



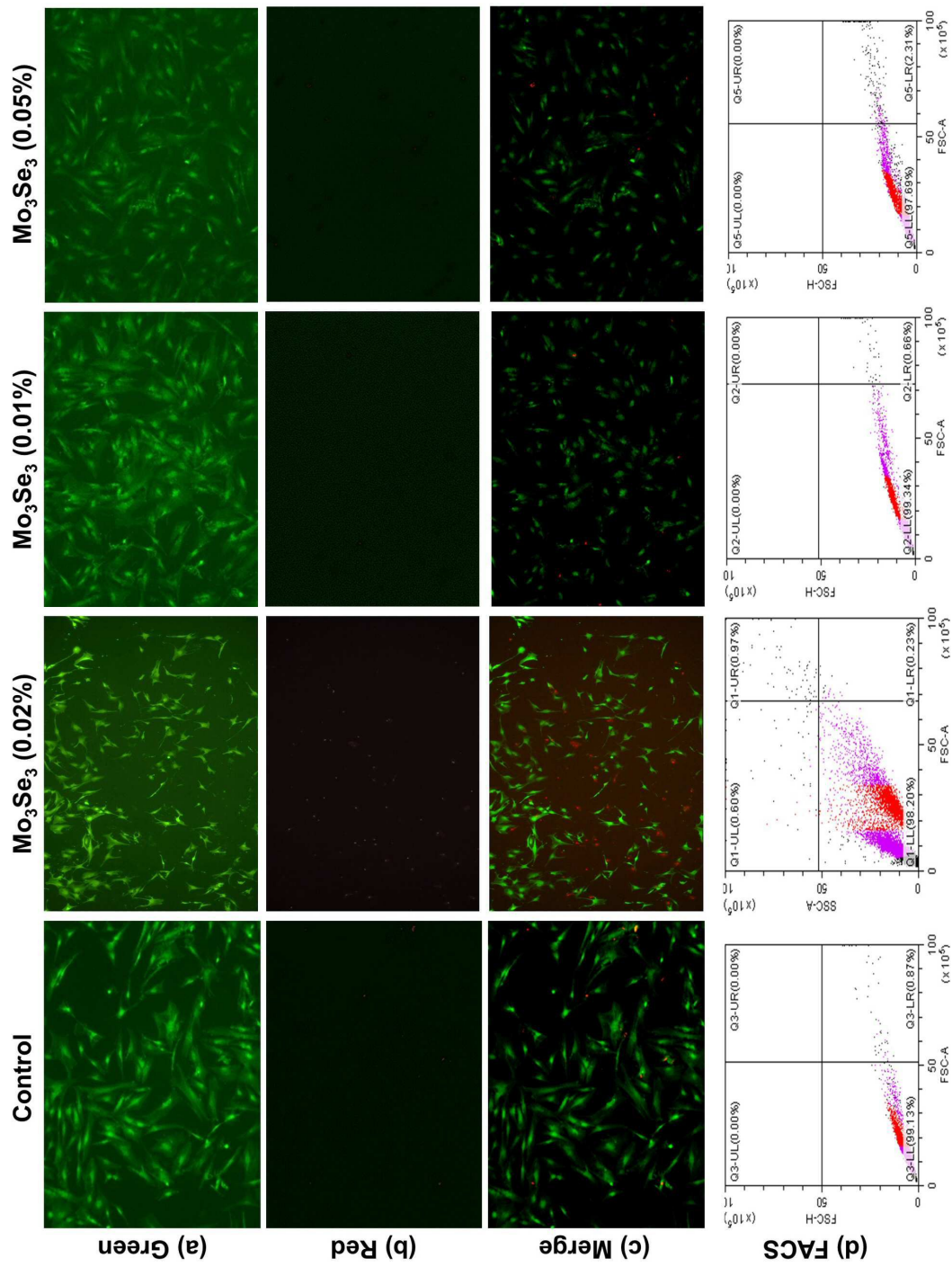
도면7



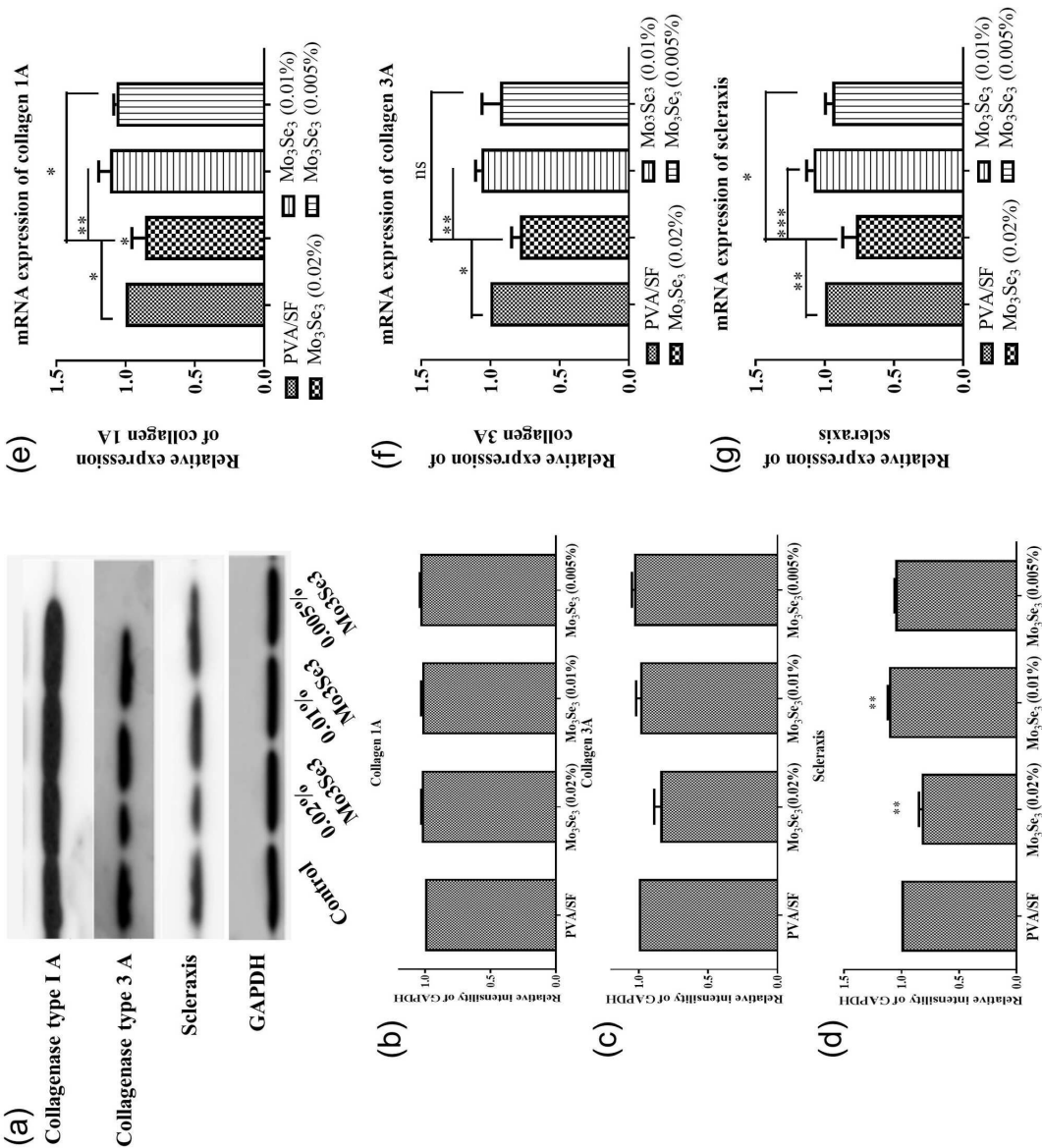
도면8



도면9



도면10



도면11

