



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년07월10일

(11) 등록번호 10-2831575

(24) 등록일자 2025년07월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61L 27/48 (2006.01) A61F 2/12 (2006.01)
A61L 27/36 (2006.01) A61L 27/52 (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01) A61L 27/56 (2006.01)
A61L 27/58 (2006.01) A61L 31/12 (2006.01)
A61L 31/14 (2006.01) A61L 31/16 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61L 27/48 (2013.01)
A61F 2/0063 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-7007679

(22) 출원일자(국제) 2016년08월17일

심사청구일자 2021년08월17일

(85) 번역문제출일자 2018년03월16일

(65) 공개번호 10-2018-0125937

(43) 공개일자 2018년11월26일

(86) 국제출원번호 PCT/US2016/047282

(87) 국제공개번호 WO 2017/031167

국제공개일자 2017년02월23일

(30) 우선권주장

62/206,011 2015년08월17일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

US20130230601 A1

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 7 항

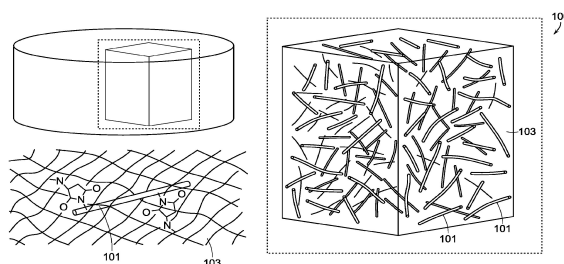
심사관 : 이수희

(54) 발명의 명칭 조직 치유용 섬유-하이드로겔 복합체 외과용 메쉬

(57) 요약

현재 개시된 조성물 및 방법은 외과용 스캐폴드 또는 메쉬와 일체화된 하이드로겔 또는 나노섬유-하이드로겔 복합체에 대해 제공된다. 이물질 반응을 감소시키고, 조직-물질 계면을 관리하며, 대상체의 주위 조직과 외과용 메쉬의 융합을 개선하기 위한 목적으로 관상의 복합체로 구성된 외과용 스캐폴드 디바이스가 개시된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61F 2/12 (2025.01)
A61L 27/3633 (2013.01)
A61L 27/52 (2013.01)
A61L 27/54 (2013.01)
A61L 27/56 (2013.01)
A61L 27/58 (2013.01)
A61L 31/129 (2013.01)
A61L 31/145 (2013.01)
A61L 31/148 (2013.01)

(72) 발명자

삭스, 저스틴

미국, 메릴랜드 21218, 볼티모어, 클락 106, 노쓰
 찰스 스트리트 100, 테크놀로지 벤처스

리, 시아오웨이

미국, 메릴랜드 21104, 토슨, 캠벌리 서클 씨6 705

초, 브라이언, 호네워

미국, 메릴랜드 21212, 볼티모어, 던커크 로드 62

마오, 하이-치엔

미국, 메릴랜드 21212-1228, 볼티모어, 노쓰 찰스
 스트리트 6129

(56) 선행기술조사문헌

US20120040461 A1
 US20100331980 A1
 US20050255327 A1
 US20130052254 A1

명세서

청구범위

청구항 1

관상의 스캐폴드 복합체를 포함하는 외과용 스캐폴드 디바이스로서,

하이드로겔 물질에 공유적으로 연결된 100 nm 내지 8000 nm의 평균 직경을 갖는 폴리머 섬유를 포함하며,

- a) 상기 폴리머 섬유는 상기 하이드로겔 물질 전반에 걸쳐 분산되어 있고;
- b) 상기 스캐폴드 복합체는 반응된 가교결합 모이어티를 포함하며;
- c) 상기 스캐폴드 복합체는 상기 스캐폴드 복합체의 표면 상에 또는 그 안에 존재하는 복수의 기공을 포함하며, 상기 기공은 cm^2 당 적어도 50 기공의 농도로 존재하며, 상기 기공의 적어도 80%는 적어도 5 마이크론인 평균 기공 직경을 가지며;
- d) 상기 외과용 스캐폴드 디바이스는 피부, 근막, 흉막, 경막, 심낭막, 힘줄주위조직, 골막, 신경주막, 혈관 벽, 및 림프 벽으로부터 선택된 장기 또는 조직에 이식하기에 적합한 기하구조로 구성되며;
- e) 상기 외과용 스캐폴드 디바이스는 시트로서 구성되며; 그리고
- f) 상기 하이드로겔 물질은 하이알루론산을 포함하며, 상기 폴리머 섬유는 폴리카프로락톤을 포함하는, 외과용 스캐폴드 디바이스.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 폴리카프로락톤은 표면이 말레이미드기로 작용화된 것인, 외과용 스캐폴드 디바이스.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 폴리머 섬유 상에서 상기 말레이미드기의 표면 밀도는 10 nmol/mg 섬유 내지 160 nmol/mg 섬유인, 외과용 스캐폴드 디바이스.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 반응된 가교결합 모이어티는 반응된 말레이미드기를 포함하는, 외과용 스캐폴드 디바이스.

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 시트의 제3 치수(third dimension)는 1 cm 미만인, 외과용 스캐폴드 디바이스.

청구항 7

수술 과정에 있는 대상체에 사용하기 위한 의료 기기로서,

상기 대상체에게 투여될 때 피부, 근막, 흉막, 경막, 심낭막, 힘줄주위조직, 골막, 신경주막, 혈관 벽, 림프 벽을 포함하는 하나 이상의 조직의 보강 및/또는 재생을 제공하거나, 또는 상기 대상체에게 투여될 때 의료 임플란트 또는 유방 임플란트 또는 조직 익스팬더(expander)의 보강 또는 적용범위(coverage)를 제공하기 위해 제1항의 외과용 스캐폴드 디바이스를 포함하는, 의료 기기.

청구항 8

외과용 디바이스로서,

i) 하이드로겔 물질에 공유적으로 연결된 100 nm 내지 8000 nm의 평균 직경을 갖는 폴리머 섬유를 포함하는 판상의 스캐폴드 복합체로서;

상기 폴리머 섬유는 상기 하이드로겔 물질 전반에 걸쳐 분산되어 있고,

상기 스캐폴드 복합체는 반응된 가교결합 모이어티를 포함하며,

상기 스캐폴드 복합체는 상기 스캐폴드 복합체의 표면 상에 또는 그 안에 존재하는 복수의 기공을 포함하며, 상기 기공은 cm^2 당 적어도 50 기공의 농도로 존재하며, 상기 기공의 적어도 80%는 적어도 5 마이크로론인 평균 기공 직경을 가지며,

상기 하이드로겔 물질은 하이드알루론산을 포함하며, 상기 폴리머 섬유는 폴리카프로락톤을 포함하는, 판상의 스캐폴드 복합체;

ii) 외과용 메쉬 물질로서; 상기 외과용 메쉬 물질은 상기 판상의 스캐폴드 복합체에 공유적으로 또는 비-공유적으로 연결되며, 상기 외과용 메쉬 물질은 상기 판상의 스캐폴드 복합체의 전부 또는 부분 위에 배치된 외과용 메쉬 물질

을 포함하는 외과용 디바이스.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 교차참조

[0002] 본원은 "조직 복원용 복합 재료"로 명칭이 붙여져, 2015년 8월 17일 출원된 미국 가출원 번호 62/206,011에 대해 35 U.S.C. § 119(e) 하에서 우선권의 이점을 주장한 국제 특허 출원이다. 본원은 또한 2015년 8월 17일 출원되고 "조직 복원용 복합 재료"로 명칭이 붙여진 국제 특허 출원 PCT/US15/45494에 관련된다. 이들 관련된 출원의 내용은 그것의 전체로 본 명세서에 참고로 편입된다.

[0003] 본 개시내용은 연조직 재생을 증진하면서 연조직 결함을 치유하는 복합 재료 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0004] 관련 기술의 설명

[0005] 외상성 상해, 종양 절제 또는 선천성 기형으로 인한 연조직 결함은 종래의 수단으로 치료하기가 어렵다. 조직 재배열 또는 조직 전달을 포함한 현재의 치료법은 공여체 부위 결함을 야기한다. 다른 요법, 예컨대 보철 이식물은 섬유증과 캡슐화로 이어진다. 조직 내성장을 증진시키는 기존의 전략은 또한 연조직 결함의 치료에 부적절하다. 현재의 무세포성 기질은 이상적인 재건을 위해 요구되는 연질 3차원 조직보다는 조직의 평평하고 섬유성 시트화를 초래한다. 마지막으로, 지방 이식술은 연조직 결함을 회복시킬 수 있지만, 가변성인 이식 생존율과 제한된 복원 용적으로 인해 그것의 광범위한 사용이 방해받고 있다. 연조직 재건에 대한 이상적인 접근법은 생체 내 지방 조직 또는 근막과 같은 연조직의 재생을 촉진하고 그 다음 재생을 증진하기 위해 조직의 이식이 따르는 것이다. 그러나 지방 조직 또는 근막성 재생은 세포가 신규한 조직에 부착하고, 이동하고, 증식하고, 분화하고 그리고 조직화하는데 적합한 매트릭스를 요구한다. 대부분의 원상태 세포외 기질 (ECM)은 치유 부위에서 누락되어 있다. 따라서, 손실된 조직의 용적을 즉시 회복시킬뿐만 아니라 미세환경을 재조정하고, 숙주세포 침투를 지원하며, 연조직의 재생을 촉진하는 합성 매트릭스를 재현하는 것은 지방질 또는 근막성 조직-계 재건을 사용하여 연조직 결함을 치유할 때 필수적인 과제로 된다.

[0006] 하이드로겔은 연조직 재건을 위한 재료로서 몇 가지 이점을 제공한다. 그러나, 충분한 기계적 특성을 달성하기 위해서는, 더 높은 가교결합하는 밀도가 일반적으로 요구된다. 그러나, 이들 조건하에서, 숙주 조직 세포 (예를 들면, 지방세포 전구세포 및 내피 전구세포)는 스캐폴드에 침투하여 성장할 수 없다. 분해성 하이드로겔의 경우, 숙주 조직의 내부성장이 너무 느리게 발생하거나 또는 적어도 섬유 물질의 흡수보다 느린 페이스로 발생하기 때문에 흉터 및 섬유질 조직 형성이 전형적이다.

[0007] 최근에, 기능화된 나노섬유는 다양한 세포 활동을 지지하도록 ECM 모방체로 기능하도록 개발되었다. FDA에 따르는 합성 생분해성 폴리- α -에스테르, 예컨대 폴리카프로락톤 (PCL) 또는 폴리(락타이드-코-글라이콜라이드) (PLGA)는 전기방사와 같은 공지된 공정을 통해 나노섬유를 생성하는데 사용될 수 있다. 이들 폴리머로부터 제조

된 생분해성 봉합사 및 이식물은 생체적합성에 대한 그것의 탁월한 실적으로 인해 임상적으로 널리 사용되어 왔다. 줄기 세포 공학 적용을 위한 다양한 직경과 형태학의 다양한 나노섬유가 개발되어 왔다. 그러나 이들 나노섬유는 거시적 구조를 제공하지 않아, 이들을 3D 스캐폴드로서 사용하기 어렵게 한다.

[0008] 이러한 종래의 방법 및 시스템과 관련된 다양한 문제가 주어지면, 연조직 결함을 치유하기 위한 개선된 해결책이 당해 분야에서 여전히 필요하다. 본 개시내용은 당해 분야에 인지된 다양한 문제를 극복하는 이 요구에 대한 해결책을 제공한다.

발명의 내용

[0009] 본 발명은 개선된 특성 (예를 들면, 하기에 더 상세히 기술된 바와 같이, 연조직의 재건을 위한 개선된 품질)을 보유하는 폴리머 섬유 성분을 갖는 스캐폴드 복합체의 확인에 적어도 부분적으로 기초한다.

[0010] 특정 측면에서, 본 발명은 상호침투 구조를 갖고, 따라서 통합된 망상조직을 형성하는 외과용 메쉬 시트 주위에 형성된 나노섬유-하이드로겔 복합체로 구성된 판상의 시트 스캐폴드를 제공한다.

[0011] 다른 측면에서, 본 발명은 표면 작용화된 전기방사 섬유 시트 및 하이드로겔로부터 제조된 나노섬유-하이드로겔 복합체로 구성되고, 반면에 섬유와 하이드로겔 망상조직 사이에 계면 결합이 도입되고, 따라서 통합된 망상조직을 형성하는, 판상의 시트 스캐폴드를 제공한다.

[0012] 추가의 측면에서, 본 발명은 외과용 메쉬 시트 및 하이드로겔 복합체로 구성되고, 반면에 외과용 메쉬 표면과 하이드로겔 망상조직 사이에 계면 결합이 도입되고, 따라서 통합된 망상조직을 형성하는, 판상의 시트 스캐폴드를 제공한다.

[0013] 일 측면에서, 본 발명은 하이드로겔 물질에 공유결합된 약 100 nm 내지 약 8000 nm의 평균 직경을 갖는 폴리머 섬유를 포함하는 스캐폴드 복합체를 제공하고, 여기서 섬유 대 하이드로겔 물질의 비는 성분-질량 기준으로 약 1:10 내지 약 10:1, 또는 농도 기준으로 약 1 내지 50 mg/mL이다.

[0014] 일 구현예에서, 본 폴리머 섬유는 생체적합성 생분해성 폴리에스테르를 포함한다. 선택적으로, 본 폴리머 섬유는 폴리카프로락톤을 포함한다.

[0015] 또 다른 구현예에서, 본 하이드로겔 물질은 기능성 망상조직으로 본 복합체에 존재한다.

[0016] 추가 구현예에서, 섬유 대 무수 하이드로겔 물질의 비는 약 1:10 내지 약 10:1이다.

[0017] 또 다른 구현예에서, 본 폴리머 섬유는 부직포 폴리머 섬유를 포함한다.

[0018] 특정 구현예에서, 본 폴리머 섬유는 전기방사 폴리카프로락톤 섬유를 포함한다. 선택적으로, 본 폴리머 섬유는 폴리(락트산-코-글라이콜산), 폴리(락트산), 및/또는 폴리카프로락톤, 또는 이들의 조합을 포함하는 합성 폴리머성 물질을 포함한다.

[0019] 일 구현예에서, 본 복합체는 실질적으로 생체적합성으로 제형화된다. 선택적으로, 본 폴리머 섬유는 실크, 콜라겐, 키토산, 및/또는 이들의 조합을 포함하는 생물학적 폴리머성 물질을 포함한다.

[0020] 일 구현예에서, 본 하이드로겔 물질은 하이알루론산을 포함한다. 선택적으로, 본 하이드로겔 물질은 폴리(에틸렌 글리콜), 콜라겐, 텍스트란, 엘라스틴, 알기네이트, 피브린, 알기네이트, 하이알루론산, 폴리(비닐 알코올), 그것의 유도체, 또는 이들의 조합을 포함하는 하이드로겔 물질을 포함한다.

[0021] 특정 구현예에서, 본 하이드로겔 물질은 가공된 조직 세포의 기질을 포함한다.

[0022] 일 구현예에서, 본 가공된 조직 세포의 기질은 지방 조직으로부터 유도될 수 있다.

[0023] 또 다른 구현예에서, 본 스캐폴드 복합체는 부직포 폴리카프로락톤 섬유를 포함한다.

[0024] 일 구현예에서, 본 하이드로겔 물질은 폴리카프로락톤 섬유의 외면 중 적어도 일부분을 실질적으로 덮는 하이알루론산을 포함한다.

[0025] 특정 구현예에서, 본 하이드로겔 물질은 본 폴리머 섬유의 외면에 결합된다.

[0026] 또 다른 구현예에서, 본 스캐폴드 복합체는 폴리머 섬유와 하이드로겔 물질 사이에 결합을 도입하기에 효과적인 양으로 존재하는 가교결합 모이어티를 추가로 포함한다.

[0027] 특정 구현예에서, 본 스캐폴드 복합체는 본 스캐폴드 복합체의 표면 상이나 또는 그 내에 존재하는 복수의 기

공을 포함하고, 여기서 본 기공은 표면의 cm^2 당 적어도 약 50 기공의 농도로 존재하고, 그리고 여기서 기공의 적어도 80%는 표면 상에 평균 기공 직경이 적어도 약 5 마이크로미터인 것을 갖는다.

[0028] 추가 구현예에서, 본 스캐폴드 복합체는 폴리카프로락톤 섬유와 하이알루론산 사이에 가교결합을 유도하기에 효과적인 양으로 존재하는 가교결합 모이어티를 추가로 포함한다.

[0029] 선택적으로, 본 스캐폴드 복합체는 인간 대상체에 존재하는 표적 조직으로 이식될 때 조직 성장 및 세포 침투를 증진한다.

[0030] 특정 구현예에서, 본 스캐폴드 복합체는 인체 조직으로 이식될 때 실질적으로 생분해성이다.

[0031] 일 구현예에서, 본 스캐폴드 복합체는 인체 조직으로 이식될 때 실질적으로 비-생분해성이다.

[0032] 또 다른 구현예에서, 본 스캐폴드 복합체는 세포, 소분자, 핵산, 및 폴리펩타이드로부터 선택된 치료제를 추가로 포함한다.

[0033] 본 발명의 또 다른 측면은 본 발명의 스캐폴드 복합체를 포함하는 이식가능 생체적합물질을 제공한다.

[0034] 특정 구현예에서, 본 이식가능 물질은 실질적으로 무세포성이고 및/또는 실질적으로 폴리펩타이드가 없다.

[0035] 일 구현예에서, 본 이식가능 물질은 주사로 투여를 위해 제형화된다.

[0036] 또 다른 구현예에서, 본 이식가능 물질은 피하 투여를 위해 제형화된다.

[0037] 본 발명의 추가의 측면은 본 발명의 이식가능 물질을 함유하는 키트를 제공한다.

[0038] 본 발명의 추가의 측면은 수술 과정을 받은 대상체에서 조직 형태를 유지하기 위한 의료 기기를 제공하며, 이것은 대상체에게 투여될 때 조직 형상의 유지를 제공하기에 효과적인 양으로 본 발명의 스캐폴드 복합체 및/또는 이식가능 물질을 포함한다.

[0039] 본 발명의 또 다른 측면은 조직 또는 연골 치유를 위한 임플란트를 제조하기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은: 복수의 기공을 생성하도록 배향된 폴리머 섬유를 포함하는 무세포성의 3차원 스캐폴드를 제공하는 단계로, 여기서 본 폴리머 섬유의 적어도 일부는 다른 폴리카프로락톤 섬유에 가교결합된 단계; 복합체를 형성하도록 본 폴리머 섬유 상에 하이드로겔 물질을 포함하는 조성물을 배치하는 단계; 및 상기 복합체를 반응시키거나 안정화하여 안정화된 임플란트를 형성하는 단계를 포함하고, 이로써 임플란트를 제조한다.

[0040] 선택적으로, 상기 조직은 연조직을 포함한다.

본 발명의 또 다른 측면은 판상의 스캐폴드 복합체를 포함하는 외과용 스캐폴드 디바이스로서,

하이드로겔 물질에 공유적으로 연결된 100 nm 내지 8000 nm의 평균 직경을 갖는 폴리머 섬유를 포함하며,

a) 상기 폴리머 섬유는 상기 하이드로겔 물질 전반에 걸쳐 분산되어 있고;

b) 상기 스캐폴드 복합체는 반응된 가교결합 모이어티를 포함하며;

c) 상기 스캐폴드 복합체는 상기 스캐폴드 복합체의 표면 상에 또는 그 안에 존재하는 복수의 기공을 포함하며, 상기 기공은 cm^2 당 적어도 50 기공의 농도로 존재하며, 상기 기공의 적어도 80%는 적어도 5 마이크로미터인 평균 기공 직경을 가지며;

d) 상기 외과용 스캐폴드 디바이스는 피부, 근막, 흉막, 경막, 심낭막, 힘줄주위조직, 골막, 신경주막, 혈관벽, 및 림프 벽으로부터 선택된 장기 또는 조직에 이식하기에 적합한 기하구조로 구성되며;

e) 상기 외과용 스캐폴드 디바이스는 시트로서 구성되며; 그리고

f) 상기 하이드로겔 물질은 하이알루론산을 포함하며, 상기 폴리머 섬유는 폴리카프로락톤을 포함하는, 외과용 스캐폴드 디바이스를 제공한다.

상기 폴리카프로락톤은 표면이 말레이미드기로 작용화된 것일 수 있다.

상기 폴리머 섬유 상에서 상기 말레이미드기의 표면 밀도는 10 nmol/mg 섬유 내지 160 nmol/mg 섬유일 수 있다.

상기 시트의 제3 치수(third dimension)는 1 cm 미만일 수 있다.

본 발명의 또 다른 측면은 수술 과정에 있는 대상체에 사용하기 위한 의료 기기로서,

상기 대상체에게 투여될 때 피부, 근막, 흉막, 경막, 심낭막, 힘줄주위조직, 골막, 신경주막, 혈관 벽, 림프 벽을 포함하는 하나 이상의 조직의 보강 및/또는 재생을 제공하거나, 또는 상기 대상체에게 투여될 때 의료 임플란트 또는 유방 임플란트 또는 조직 익스펜더(expander)의 보강 또는 적용범위(coverage)를 제공하기 위해 상기 외과용 스캐폴드 디바이스를 포함하는, 의료 기기를 제공한다.

[0041] 본 발명의 추가의 측면은 조직 또는 연골 치유를 위한 임플란트를 제조하기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은: 복수의 기공을 생성하도록 배향된 폴리머 섬유를 포함하는 무세포성의 3차원 스캐폴드를 제공하는 단계; 복합체를 형성하도록 본 폴리머 섬유 상에 하이드로겔 물질을 포함하는 조성물을 배치하는 단계; 및 상기 복합체를 반응시키거나 안정화하여 안정화된 임플란트를 형성하는 단계를 포함하고 여기서 상기 폴리머 섬유의 적어도 일부분은 상기 하이드로겔 물질에 가교결합된다.

[0042] 특정 구현예에서, 본 3차원 스캐폴드는 반응성 폴리카프로락톤 섬유를 포함한다.

[0043] 본 발명의 추가의 측면은 조직 또는 연골 치유를 위한 임플란트를 제조하기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은: 복수의 기공을 생성하도록 배향된 폴리머 섬유를 포함하는 무세포성의 3차원 스캐폴드를 제공하는 단계; 복합체를 형성하도록 본 폴리머 섬유 상에 하이드로겔 물질을 포함하는 조성물을 배치하는 단계; 및 상기 복합체를 반응시키거나 안정화하여 안정화된 임플란트를 형성하는 단계를 포함하고 여기서 상기 폴리머 섬유의 적어도 일부분은 상기 하이드로겔 물질에 가교결합된다.

[0044] 본 발명의 추가의 측면은 외상성 상해 또는 수술 개입으로부터 유래하는 조직 결함을 해소하기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은 조직을 부풀게 하는 단계를 포함하며, 상기 조직을 부풀게 하는 단계는 유효량의 본 발명의 스캐폴드 복합체를 조직 내로 이식하는 단계를 포함하고 이로써 조직을 부풀게 한다.

[0045] 본 발명의 또 다른 측면은 노화-관련된 질환, 장애 또는 병태로부터 유래하는 조직 결함을 감소하거나 역전하기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은 조직을 포함한 조직을 부풀게 하는 단계를 포함하며, 상기 조직을 부풀게 하는 단계는 유효량의 본 발명의 스캐폴드 복합체를 조직 내로 이식하는 단계를 포함하고 이로써 조직을 부풀게 한다.

[0046] 선택적으로, 본 조직 결함은 늑막 조직, 근육 조직, 피부, 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0047] 적어도 일 측면에서, 본 발명은 겔과 상기 겔 내에 배치된 적어도 1종의 나노구조를 포함하는 복합 재료를 제공한다. 상기 겔은 하이드로겔 또는 임의의 다른 적합한 겔일 수 있다. 상기 나노구조는 나노섬유 또는 임의의 다른 적합한 나노구조일 수 있다. 상기 나노구조는 상기 겔에 공유결합될 수 있다. 상기 나노구조는 폴리카프로락톤 (PCL) 또는 임의의 다른 적합한 물질로 제조될 수 있다.

[0048] 적어도 또 다른 측면에서, 본 발명은 연조직 결함에 복합 재료를 적용하는 단계를 포함하는 연조직 결함을 치유하기 위한 방법을 제공하고, 여기서 상기 복합 재료는 겔과 상기 겔 내에 배치된 나노구조를 포함한다.

[0049] 또 다른 측면에서, 본 발명은 겔을 제공하는 단계 및 상기 겔 내에 나노섬유를 배치하는 단계를 포함하는 연조직 결함 w를 치유하는데 사용하기 위한 복합 재료를 제조하는 방법을 제공한다.

[0050] 또 다른 측면에서, i) 하이드로겔 물질에 작동가능하게 연결된 약 100 nm 내지 약 8000 nm의 평균 섬유 직경을 갖는, 폴리머 섬유 시트 (선택적으로 부직포 및/또는 전기방사 폴리머 섬유 시트)를 포함하는 판상의 스캐폴드 복합체; 및 ii) 외과용 메쉬 물질을 포함하는 수술 도구가 제공된다.

[0051] 적용가능하거나 또는 구체적으로 부인되지 않는 경우, 본 명세서에 기재된 구현예 중 임의의 하나는 비록 구현예가 본 발명의 상이한 측면으로 기술되더라도, 임의의 다른 하나 이상의 구현예와 조합될 수 있는 것으로 고려된다.

[0052] 이들 및 다른 구현예는 하기 상세한 설명에 개시되어 있거나 이로부터 명백하고 이에 의해 포괄된다.

도면의 간단한 설명

[0053] 오로지 기재된 특정 구현예에만 본 발명을 제한하기 위한 것으로 의도되지 않고, 예로써 제공된 하기 상세한 설명은 수반되는 도면들과 연계하여 가장 잘 이해될 수 있다.

도 1A는 본 개시내용에 따른 복합체의 구현예의 구조를 예시하며, 겔에 배치된 나노구조, 그리고 특히, 상기 겔 내 작용기 상기 나노구조의 공유결합을 도시한다.

- 도 1B는 도 1에서 예시된 바와 같은 완전히 팽윤된 복합체의 광학 현미경 이미지를 도시한다;
- 도 1C는 도 1에서 예시된 바와 같은 수화된 복합체의 거시적 외관의 이미지이다;
- 도 1D는 도 1에서 예시된 바와 같은 탈수된 복합체의 주사 전자 현미경사진 (SEM) 이미지를 도시하며, ECM에 초고-구조적 유사성을 밝힌다;
- 도 2A는 HA 하이드로겔 단독에 대해 플롯된 도 1의 복합체의 구현예의 응력-변형 곡선을 도시하며, 동일한 가교 결합하는 밀도에서 하이드로겔에 비교될 때 개선된 탄성 계수를 밝힌다;
- 도 2B는 도 2A의 복합체의 구현예가 규칙적 하이드로겔에 비교하여 기계적 완전성의 유사한 정도의 강건성을 보유한다는 것을 보여주는 피로 시험을 도시한다;
- 도 3A 및 3B는 4일 동안 나노섬유-HA 하이드로겔 복합체에서 배양된 ASC의 위상차 이미지 (도 3B)를 갖는 형광 및 오버레이 (도 3A)를 도시한다;
- 도 3C 및 3D는 4일 동안 규칙적 HA 하이드로겔에서 배양된 ASC의 위상차 이미지 (도 3D)를 갖는 형광 및 오버레이 (도 3C)를 도시한다;
- 도 4A 및 4B는 정렬된 650-nm 나노섬유를 따라 회전타원체로부터 이동하는 ASC를 대조하는 위상차 이미지 (도 4B)를 갖는 형광 이미지 및 오버레이 (도 4A)를 도시한다.
- 도 5A는 랫트 서혜 지방 패드 아래 원 위치에서 나노섬유-하이드로겔 복합체의 외관을 나타내는 사진이다;
- 도 5B는 이식 2주 후에 수확된 복합체 주위의 조직으로부터의 절편의 H&E 염색 이미지를 도시하고; 그리고
- 도 5C는 세포 침투를 보여주는, 4주에서의 복합체-조직 계면으로부터 수집된 조직 절편의 H&E 염색 이미지를 도시한다.
- 도 6A는 폴리카프로락톤 (PCL) 섬유-HA 하이드로겔 복합체에 대한 합성 반응식을 도시한다.
- 도 6B는 PCL 섬유와 HA 사슬 망상조직 사이의 계면 결합을 갖는 복합 구조의 도식적 실례를 도시한다.
- 도 6C는 동일한 치수 (기준자 = 5 mm)로 새롭게 제조된, 원통형 섬유-HA 하이드로겔 복합체 (좌측) 및 HA 하이드로겔 (우측)의 일반적인 외관을 나타내는 광학 이미지를 도시한다.
- 도 6D는 동결건조 및 재수화 후 동일한 세트 샘플의 광학 이미지를 도시한다.
- 도 6E는 HA 하이드로겔의 단면의 SEM 이미지 (기준자 = 40 μm)를 도시한다.
- 도 6F는 PCL 섬유-HA 하이드로겔 복합체의 단면의 SEM 이미지 (기준자 = 100 μm)를 도시한다.
- 도 6G는 탈세포화된 원상태 지방 조직의 단면의 SEM 이미지 (기준자 = 10 μm)를 도시한다.
- 도 7A는 HA 하이드로겔의 압축 탄성율을 보강하는 것에 대한 섬유 직경 및 계면 결합의 효과를 도시한다. HA 하이드로겔 및 복합체는 4.5 mg/ml의 HA를 기준으로 제조되었다. 응력 값은 50%의 변형률에서 측정되었다. * $p < 0.05$ (스튜던트-t 시험).
- 도 7B는 PEG 하이드로겔의 압축 탄성율을 보강하는 것에 대한 섬유 직경 및 계면 결합의 효과를 도시한다. PEG 하이드로겔 및 복합체는 PEGSH 30mg/ml 및 PEGDA 20mg/ml를 기준으로 제조되었으며, 1.0- μm PCL 섬유가 섬유-PEG 하이드로겔 복합체를 합성하는데 사용되었다. 응력 값은 50%의 변형률에서 측정되었다. * $p < 0.05$ (스튜던트-t 시험).
- 도 8A는 HA 하이드로겔의 전단 저장 탄성율을 보강하는 것에 대한 계면 결합 밀도 및 섬유 직경의 효과를 도시한다. * $p < 0.05$ (스튜던트-t 시험).
- 도 8B는 PEG 하이드로겔의 전단 저장 탄성율을 보강하는 것에 대한 계면 결합 밀도 및 섬유 직경의 효과를 도시한다. 전단 저장 탄성률의 값은 1-Hz 주파수에서 측정되었다. * $p < 0.05$ (스튜던트-t 시험).
- 도 8C는 HA 하이드로겔의 전단 저장 탄성율을 보강하는 것에 대한 계면 결합 밀도 및 섬유 직경의 효과를 도시한다. 전단 저장 탄성률의 값은 1-Hz 주파수에서 측정되었다. * $p < 0.05$ (스튜던트-t 시험).
- 도 8D는 HA 하이드로겔의 전단 저장 탄성율을 보강하는 것에 대한 계면 결합 밀도 및 섬유 직경의 효과를 도시한다. 전단 저장 탄성률의 값은 1-Hz 주파수에서 측정되었다. * $p < 0.05$ (스튜던트-t 시험).

도 9A는 HA 하이드로겔의 전단 저장 탄성률에 대한 섬유-장입 양의 효과를 도시한다. HA 하이드로겔 및 복합체는 10-mg/ml의 HA를 사용하여 합성되었다. 전단 저장 탄성률은 1-Hz 주파수에서 측정되었다. 청색 화살표는 SH 그룹 대 (DA+MAL) 그룹의 1 대 2의 물비를 갖는 양자 복합체에 대한 조건을 나타낸다. *p < 0.05 (스튜던트-t 시험).

도 9B는 HA 하이드로겔의 전단 저장 탄성률에 대한 섬유-장입 양의 효과를 도시한다. HA 하이드로겔 및 복합체는 4.5-mg/ml의 HA를 사용하여 합성되었다. 전단 저장 탄성률은 1-Hz 주파수에서 측정되었다. 청색 화살표는 SH 그룹 대 (DA+MAL) 그룹의 1 대 2의 물비를 갖는 양자 복합체에 대한 조건을 나타낸다. *p < 0.05 (스튜던트-t 시험).

도 10A는 상이한 주파수 하에서 섬유-HA 하이드로겔 복합체의 기계적 강도를 도시한다. HA 하이드로겔과 복합체의 전단 저장 탄성률은 장입한 전단의 상이한 주파수에 대해 측정된다.

도 10B는 상이한 재수화 하에서 섬유-HA 하이드로겔 복합체의 기계적 강도를 도시한다. 재수화 전후 복합체의 압축 응력에 대한 비교 (변형 = 40%).

도 10C는 상이한 환형 장입 하에서 섬유-HA 하이드로겔 복합체의 기계적 강도를 도시한다. HA 하이드로겔 및 대응하는 복합체의 압축 응력은 환형 장입에 대해 측정된다 (변형 = 25%).

도 11A는 27일째에 HA 하이드로겔에서 인간 지방질-유래된 줄기세포 (hASC)의 이동 능력을 도시한다. HA 하이드로겔 대조 및 2개의 복합체가 선택되어 대략 1.9 kPa의 유사한 압축 탄성률을 나타냈다. hASC의 F-액틴 및 핵은 각각 Alexa Fluor® 568 팔로이딘 (적색) 및 DAPI (청색)로 염색되었다. 나노섬유는 Alexa Fluor® 647 (백색)로 표지되었다. 기준자 = 100 μ m.

도 11B는 27일째에 나노섬유-HA 하이드로겔 복합체에서 인간 지방질-유래된 줄기세포 (hASC)의 이동 능력을 도시한다. HA 하이드로겔 대조 및 2개의 복합체가 선택되어 대략 1.9 kPa의 유사한 압축 탄성률을 나타냈다. hASC의 F-액틴 및 핵은 각각 Alexa Fluor® 568 팔로이딘 (적색) 및 DAPI (청색)로 염색되었다. 나노섬유는 Alexa Fluor® 647 (백색)로 표지되었다. 기준자 = 100 μ m.

도 11C는 27일째에 RGD-나노섬유-HA 하이드로겔 복합체에서 인간 지방질-유래된 줄기세포 (hASC)의 이동 능력을 도시한다. HA 하이드로겔 대조 및 2개의 복합체가 선택되어 대략 1.9 kPa의 유사한 압축 탄성률을 나타냈다. hASC의 F-액틴 및 핵은 각각 Alexa Fluor® 568 팔로이딘 (적색) 및 DAPI (청색)로 염색되었다. 나노섬유는 Alexa Fluor® 647 (백색)로 표지되었다. 기준자 = 100 μ m.

도 11D는 27일째에 RGD-나노섬유-HA 하이드로겔 복합체에서 인간 지방질-유래된 줄기세포 (hASC)의 이동 능력을 도시한다. HA 하이드로겔 대조 및 2개의 복합체가 선택되어 대략 1.9 kPa의 유사한 압축 탄성률을 나타냈다. (d) 및 (e)에서 황색 화살표는 섬유 또는 섬유 클러스터에 부착하는 세포를 나타낸다. hASC의 F-액틴 및 핵은 각각 Alexa Fluor® 568 팔로이딘 (적색) 및 DAPI (청색)로 염색되었다. 나노섬유는 Alexa Fluor® 647 (백색)로 표지되었다. 기준자 = 20 μ m.

도 11E는 27일째에 나노섬유-HA 하이드로겔 복합체에서 인간 지방질-유래된 줄기세포 (hASC)의 이동 능력을 도시한다. HA 하이드로겔 대조 및 2개의 복합체가 선택되어 대략 1.9 kPa의 유사한 압축 탄성률을 나타냈다. (d) 및 (e)에서 황색 화살표는 섬유 또는 섬유 클러스터에 부착하는 세포를 나타낸다. hASC의 F-액틴 및 핵은 각각 Alexa Fluor® 568 팔로이딘 (적색) 및 DAPI (청색)로 염색되었다. 나노섬유는 Alexa Fluor® 647 (백색)로 표지되었다. 기준자 = 20 μ m.

도 11F는 인간 지방질-유래된 줄기세포 (hASC)의 이동 능력을 도시한다. PCL 섬유와 HA 사슬 망상조직 사이에 계면 결합을 갖는 복합 구조 내 hASC 회전타원체의 도식적 실례가 도시되어 있다.

도 12A는 30일 안에 이식된 섬유-HA 하이드로겔 복합체 및 HA 하이드로겔에 의해 매개된 조직 재생을 도시한다. 서혜 지방 패드 하에 이식 전 (삽입물) 및 후 복합체의 거시적 이미지 (기준자 = 2 mm)가 도시되어 있다. 백색 별표는 이식된 매트릭스를 나타낸다.

도 12B는 30일 안에 이식된 섬유-HA 하이드로겔 복합체 및 HA 하이드로겔에 의해 매개된 조직 재생을 도시한다. 서혜 지방 패드 하에 이식 전 (삽입물) 및 후 HA 하이드로겔의 거시적 이미지 (기준자 = 2 mm)가 도시되어 있다. 백색 별표는 이식된 매트릭스를 나타낸다.

도 12C는 30일 안에 이식된 섬유-HA 하이드로겔 복합체 및 HA 하이드로겔에 의해 매개된 조직 재생을 도시한다.

(i) 원상태 지방 조직, (ii) 모의 수술 후 치유된 조직, (iii, v) 섬유-HA 하이드로겔 이식된 조직, 및 (iv, vi) HA 하이드로겔 이식된 조직의 14일째 및 30일째의 H&E 및 메이슨의 트리크롬 염색된-이미지가 도시되어 있다. 이미지에서, H = HA 하이드로겔, C = 섬유-HA 하이드로겔 복합체, B = 갈색 지방 조직, 황색 화살표 = 혈관. 기준자 = 200 μm .

도 12D는 30일 안에 이식된 섬유-HA 하이드로겔 복합체 및 HA 하이드로겔에 의해 매개된 조직 재생을 도시한다. (i) 원상태 지방 조직, (ii) 모의 수술 후 치유된 조직, (iii, v) 섬유-HA 하이드로겔 이식된 조직, 및 (iv, vi) HA 하이드로겔 이식된 조직의 14일째 및 30일째의 H&E 및 메이슨의 트리크롬 염색된-이미지가 도시되어 있다. 메이슨의 삼원색인 염색으로부터 청색 염색은 검사된 조직 내 총 콜라겐을 나타낸다. 이미지에서, H = HA 하이드로겔, C = 섬유-HA 하이드로겔 복합체, B = 갈색 지방 조직, 황색 화살표 = 혈관. 기준자 = 200 μm .

도 13A는 PAA-그래프팅 방법을 통한 MAL을 갖는 표면-개질된 섬유를 제조하는 개략도를 도시한다.

도 13B는 3 및 10 % (v/v)의 아크릴산으로 PAA-그래프팅 후 섬유 상의 카복실 기의 평균 밀도를 도시한다 (*p < 0.05, n = 6).

도 14는 4.5 mg/ml HA-SH로 제조된 SH 대 DA의 다양한 물비를 갖는 HA 하이드로겔의 전단 저장 탄성율을 도시한다.

도 15A는 다양한 양의 섬유로부터 섬유-HA 하이드로겔 복합체의 전단 저장 탄성율을 도시한다. 섬유의 평균 직경은 686 nm이고, 섬유 상의 MAL 표면 밀도는 100 nmol/mg였고, 그리고 복합체는 4.5 mg/ml의 HA-SH 및 5 mg/ml의 PEGDA로 제조되었다. 청색 화살표는 SH 그룹 대 (DA+MAL) 그룹의 1 대 2의 물비를 나타낸다. *p < 0.05 (n = 3).

도 15B는 다양한 양의 장입된 섬유를 갖는 섬유-PEG 하이드로겔 복합체의 전단 저장 탄성율을 도시한다. *p < 0.05 (n = 3).

도 16은 HA 하이드로겔 및 나노섬유-HA 하이드로겔 복합체의 평균 기공 크기가 그것의 단면의 SEM 이미지를 기준으로 추정되었다는 것을 도시한다 (*p < 0.05).

도 17A는 14일째에 섬유-HA 하이드로겔 복합체를 통해 세포 침투 및 조직 내-성장을 도시한다. 절단된 조직은 총 콜라겐 (청색)에 대해 H&E에 의해 염색되었다. 표시: C = 섬유-HA 하이드로겔 복합체, 황색 화살표 = 혈관. 기준자 = 50 μm .

도 17B는 14일째에 섬유-HA 하이드로겔 복합체를 통해 세포 침투 및 조직 내-성장을 도시한다. 절단된 조직은 총 콜라겐 (청색)에 대해 메이슨의 트리크롬에 의해 염색되었다. 표시: C = 섬유-HA 하이드로겔 복합체, 황색 화살표 = 혈관. 기준자 = 50 μm .

도 17C는 30일째에 섬유-HA 하이드로겔 복합체를 통해 세포 침투 및 조직 내-성장을 도시한다. 절단된 조직은 총 콜라겐 (청색)에 대해 H&E에 의해 염색되었다. 표시: C = 섬유-HA 하이드로겔 복합체, 황색 화살표 = 혈관. 기준자 = 50 μm .

도 17D는 30일째에 섬유-HA 하이드로겔 복합체를 통해 세포 침투 및 조직 내-성장을 도시한다. 절단된 조직은 총 콜라겐 (청색)에 대해 메이슨의 트리크롬에 의해 염색되었다. 표시: C = 섬유-HA 하이드로겔 복합체, 황색 화살표 = 혈관. 기준자 = 50 μm .

도 18은 탈세포화된 지방 조직 (상부 패널) 및 섬유-HA 하이드로겔 복합체 (하부 패널)의 단면의 SEM 이미지를 도시한다.

도 19A는 4일째에 HA 하이드로겔 ($G' = 24.85 \mu 2.92 \text{ Pa}$)에서 hASC의 이동 능력을 도시한다. HA 하이드로겔은 2.5 mg/ml의 HA-SH 및 5.0 mg/ml의 PEGDA로 제작되었다. 기준자 = 100 μm .

도 19B는 4일째에 1.0- μm 섬유-HA 하이드로겔 복합체 ($G' = 32.29 \mu 2.16 \text{ Pa}$)에서 hASC의 이동 능력을 도시한다. 복합체는 2.5 mg/ml의 HA, 5.0 mg/ml의 PEGDA 및 10 mg/ml 섬유로 제작되었다. 기준자 = 100 μm .

도 19C는 4일째에 286-nm 섬유-HA 하이드로겔 복합체 ($G' 39.56 \mu 1.26 \text{ Pa}$)에서 hASC의 이동 능력을 도시한다. 복합체는 2.5 mg/ml의 HA, 5.0 mg/ml의 PEGDA 및 10 mg/ml 섬유로 제작되었다. 기준자 = 100 μm .

도 20A는 주사가능 제형을 도시한다. 섬유-하이드로겔 복합체는 주사가능 적용을 위해 제형화될 수 있다.

도 20B는 주사 후 즉시 안정한 주사가능 복합체를 도시한다.

도 20C는 형상 및 용적 유지를 갖는 물에 비-분산성으로 남은 주사가능 복합체를 도시한다.

도 20D는 30일째에 주사가능 섬유-HA 하이드로겔 복합체를 통한 세포 침투 및 조직 내-성장을 도시하며, 광범위한 세포 개질 및 지방세포 형성을 보여준다. 절단된 조직은 H&E에 의해 염색되었다. 표시: c = 섬유-HA 하이드로겔 복합체.

도 21은 섬유질 외과용 메쉬 및 나노섬유-하이드로겔 복합체로 구성된 복합체 외과용 스캐폴드 디바이스의 구조 및 제조 반응식을 도시한다. 우하측에서의 삽입물은 동결건조되고 그리고 최초 수화된 상태로 다시 재수화된 복합체 메쉬의 광학 이미지를 나타낸다.

도 22는 복합체 나노섬유-하이드로겔 시트 스캐폴드의 구조 및 제조 반응식을 도시한다. 표면 작용화 나노섬유 시트는 추가의 마이크로섬유 메쉬없이 사용된다. 무작위 또는 정렬된 나노섬유 시트는 저온 밀링 단계없이 PCT/US15/45494에 기술된 바와 동일한 방법을 사용하여 작용화된다. 그런 다음 온전한 시트를 사용하여 복합체 시트 스캐폴드를 형성한다.

도 23은 동결건조된 형태 (좌측) 및 재수화된 형태 (우측)로 복합체 나노섬유 시트의 광학 이미지를 도시한다.

도 24는 복합체 극세사-하이드로겔 시트 스캐폴드의 구조 및 제조 반응식을 도시한다. 표면 작용화된 마이크로섬유 시트는 추가의 나노섬유 메쉬없이 사용된다. 편직 또는 직조되거나 또는 부직포 마이크로섬유 메쉬 시트는 PCT/US15/45494에 기술된 바와 동일한 방법을 사용하여 작용화된다. 그런 다음 마이크로섬유 시트를 사용하여 복합체 시트 스캐폴드를 형성한다.

도 25는 재수화된 형태로 복합체 마이크로섬유 시트의 광학 이미지를 도시한다. 이 스캐폴드 배치구성은 나노섬유 성분 없이 제조되었다. 섬유 없는 HA 하이드로겔은 마이크로섬유 메쉬 주위에 주조되었다.

도 26A 및 26B는 랫트 생체내 모델에서 복벽을 따라 외과용 메쉬의 배치를 도시한다. 수술 과정을 도시하는 도면 (도 26A) 및 설치류에 메쉬 이식의 이미지를 도시하는 도면 (도 26B)이 구체적으로 제시되어 있다.

도 27A 및 27B는 생체 내 이식 후 4일에 모의 수술 대조군 (최상부 행), 미코팅된 폴리프로필렌 메쉬 (가운데 행), 및 복합체 메쉬 (바닥 행)의 조직학적 평가를 도시한다. 대표적인 헤마톡실린 및 에오신 (H&E; 도 27A) 및 메이슨의 트리크롬-염색된 (도 27B) 연속적인 조직 단면을 5× 배율 (좌측 열) 및 20× 배율 (중간 및 우측 열)로 이미지화했다. 증가된 세포 침투는 대조군 및 단지 메쉬 만의 군과 비교할 때 복합체 메쉬 군에서 관찰되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0054] 본 발명은 연조직의 재건을 위한 방법에 사용하기 위한 하이드로겔 및 나노구조를 포함하는 복합 재료에 관한 것이다. 본 발명은 또한 그 안에 배치된 하이드로겔 및 나노구조를 포함하는 조성물을 사용하여 연조직 손상을 치유하거나 또는 재건하는 방법에 대한 것이다. 다른 측면에서 본 발명은 또한 연조직 재건에 사용하기 위한 조성물을 제조하는 방법에 관한 것으로 여기서 본 조성물은 그 안에 배치된 하이드로겔 및 나노구조를 포함한다.

[0055] 본 명세서에서 제공된 복합체 시트 스캐폴드의 하나의 이점은 이물질 반응을 감소하고, 염증을 감소하고 그리고 조직-물질 계면을 개선하여, 궁극적으로 대상체의 주위 조직과 외과용 메쉬의 동화를 개선하는 이들 스캐폴드의 경향이다. 본 명세서에서 기재된 스캐폴드는 기재된 그 자체로 그리고 달리는 당해 분야에서 공지된 또는 인정된 것과 같은 다양한 적용을 위해 사용될 수 있다.

[0056] 본 복합체 시트 스캐폴드의 적어도 3개의 구별되는 배치구성이 본 명세서에서 제공된다. 외과용 메쉬, 하이드로겔 및 나노섬유를 포함하는 제1 배치구성에서, 본 배치구성은 주위 조직으로부터의 세포 침투를 촉진하고 임플란트 및 조직의 융합을 개선하기 위해 스캐폴드의 능력을 최대화하도록 설계되었으며, 모 특히 출원 PCT/US15/45494에서 정의된 나노섬유-하이드로겔 복합체의 전체 이점이 실현되어 진다. 대안적인 배치구성으로는, 외과용 메쉬 및 하이드로겔 (나노섬유 없음)만으로 구성된 간단한 배치구성이다. 이 대안적인 배치구성은 여전히 마이크로섬유 외과용 메쉬의 양호한 기계적 특성을 유지한다. 최종 배치구성은 별도의 외과용 메쉬 없이 하이드로겔에 연결된 나노섬유의 판상의 매트릭스이다. 이 배치구성은 메쉬-나노섬유-하이드로겔 조성물의 큰 인장 강도를 갖지 않지만 생산하기가 간단하고 그리고 영구적 외과용 메쉬와 비교하여 나노섬유 및 하이드로겔 성분의 재흡수성으로 인해 반흔 형성을 덜 유도할 것이다. 따라서, 이 배치구성은 높은 인장 강도가 요구되지 않지만 최소 반흔 형성이 필요한 상황 예컨대 경막 또는 늑막 치유에서 이상적일 것이다. 중요하게는, 통합된

망상 구조는 모든 예시된 배치구성의 공통된 특징이다.

- [0057] 하기는 본 발명을 실시하는데 있어 당해 분야의 숙련자에게 도움을 주기 위해 제공된 발명의 상세한 설명이다. 당해 분야의 숙련자는 본 발명의 사상 또는 범위를 벗어나지 않으면서 본 명세서에 기재된 구현예에 변형 및 변경을 가할 수 있다. 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어들은 본 발명이 속하는 당해 분야의 숙련자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 발명의 설명에 사용된 용어는 단지 특정한 구현예를 설명하기 위한 것이며, 본 발명을 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 본 명세서에 언급된 모든 공보, 특허 출원, 특허, 도 및 다른 참조는 그 전문이 참조로 명확히 편입된다.
- [0058] 비록 본 명세서에서 기재된 것과 유사한 또는 동등한 임의의 방법 및 물질이 또한 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 물질이 이제 기술된다. 본 명세서에 언급된 모든 간행물은 간행물이 인용된 것과 관련하여 방법 및/또는 물질을 개시하고 기재하기 위해 본 명세서에 참고로 편입된다.
- [0059] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술 및 과학 용어들은 본 발명이 속하는 당해 분야의 숙련자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 그 전체 개시내용이 본 명세서에 참고로 편입된, 하기 참조는 본 발명에서 사용된 많은 용어들의 일반적인 정의를 (본 명세서에서 달리 정의되지 않는 한) 숙련된 당업자에게 제공한다: 문헌 [Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994)]; 문헌 [The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988)]; 문헌 [The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991)]; 및 문헌 [Hale & Marham, the Harper Collins Dictionary of Biology (1991)]. 일반적으로, 기재된 또는 본 명세서에 고유한 분자 생물학 방법의 절차 등은 당해 분야에서 사용된 일반적인 방법이다. 이러한 표준 기술은 예를 들면 문헌 [Sambrook et al., (2000, Molecular Cloning--A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratories)]; 및 문헌 [Ausubel et al., (1994, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New-York)]과 같은 참조 매뉴얼에서 발견될 수 있다.
- [0060] 달리 구체화되지 않는 한, 하기 용어들은 아래에 이들에 대해 간주된 의미를 가질 수 있다. 그러나, 당해 분야의 숙련자에 의해 공지되거나 이해되는 다른 의미도 가능하고, 그리고 본 발명의 범위 내로 된다는 것이 이해되어야 한다. 본 명세서에 언급된 모든 공보, 특허 출원, 특허, 및 다른 참조는 그 전문이 참조로 편입된다. 충돌이 있는 경우, 정의를 포함한 본 명세서가 우선할 것이다. 또한, 물질, 방법 및 실시에는 단지 예시적인 것이며 제한하는 것으로 의도되지 않는다.
- [0061] **정의**
- [0062] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "스캐폴드 복합체"는 2가지 성분: 폴리머 섬유 및 하이드로겔 물질의 임의의 공유 회합을 포함한다. 본 스캐폴드 복합체는, 성분 사이의 상호작용이 화학적, 생화학적, 생체물리학적, 물리적, 또는 생리적 이점을 초래한다는 것을 의미하는, "기능성 망상조직"에 폴리머 섬유 및 하이드로겔 물질을 함유한다. 또한, 기능성 망상조직은 세포, 생물학적 물질 (예를 들면, 폴리펩타이드, 핵산, 지질, 탄수화물), 치료 화합물, 합성 분자, 및 기타 동종의 것을 포함하는 추가의 성분을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 본 스캐폴드 복합체는 인간 대상체에 존재하는 표적 조직에 이식될 때 조직 성장 및 세포 침투를 증진한다.
- [0063] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "하이드로겔"은 "겔"의 유형이고, 그리고 상당한 양의 물 (예를 들면, 비-물 분자의 단위 당 50%, 60% 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 99% 초과)을 흡수하여 탄성 겔을 형성할 수 있는 공유 또는 비-공유 가교결합에 의해 함께 유지된 거대분자 (예를 들면, 친수성 폴리머, 소수성 폴리머, 그것의 블렌드)의 3차원 망상조직을 구성하는, 수팽윤성 폴리머 매트릭스를 지칭한다. 본 폴리머 매트릭스는 임의의 적합한 합성 또는 자연 발생 폴리머 물질로 형성될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "겔"은 액체 매질의 용적에 걸쳐 있고 표면 장력 효과를 통해 그것을 포획하는 고체 3차원 망상조직을 지칭한다. 이 내부 망상 구조는 물리적 결합 (물리적 겔) 또는 화학적 결합 (화학적 겔) 뿐만 아니라 연장하는 유체 내에서 손상되지 않은 결정 또는 기타 접합으로부터 발생할 수 있다. 사실상 임의의 유체는 물 (하이드로겔), 오일 및 에어 (에어로겔)를 포함한 중량제로 사용될 수 있다. 중량과 용적 모두에 있어서, 겔은 조성물에서 주로 유체이며, 따라서 그것의 구성요소 액체의 밀도와 유사한 밀도를 나타낸다. 하이드로겔은 물을 액체 매질로 사용하는 겔 유형이다.
- [0064] "소수성" 및 "친수성" 폴리머의 정의는 100% 상대 습도에서 폴리머에 의해 흡수된 수증기의 양을 기준으로 한다. 이 분류에 따르면, 소수성 폴리머는 100% 상대 습도 ("rh")에서 최대 1% 물만을 흡수하는 반면, 중간 정도 친수성 폴리머는 1-10% 물을 흡수하고, 친수성 폴리머는 10% 초과 물을 흡수할 수 있으며, 흡습성 폴리머

는 20% 초과 물의 흡수한다. "수팽윤성" 폴리머는 수성 매질에 액침에 의해 그 자체 중량의 적어도 50%보다 많은 물의 양을 흡수하는 것이다.

[0065] 본 명세서에서 용어 "가교결합된"은 공유 또는 비공유결합을 통해 일어나든 또는 직접적일 수 있거나 가교결합제를 포함하든 간에 분자내 및/또는 분자간 가교결합을 함유하는 조성물을 지칭한다. "비공유" 결합은 수소 결합 및 정전기적 (이온성) 결합 모두를 포함한다.

[0066] 용어 "폴리머"는 선형 및 분지형 폴리머 구조를 포함하고 또한 (가교결합될 수 있거나 아닐 수 있는) 가교결합된 폴리머 뿐만 아니라 코폴리머를 포괄하고, 따라서 블록 코폴리머, 교대 코폴리머, 랜덤 코폴리머, 및 기타 동종의 것을 포함한다. 본 명세서에서 "올리고머"로 언급된 화합물들은 약 1000 Da 이하, 바람직하게는 약 800 Da 이하의 분자량을 갖는 폴리머이다. 폴리머 및 올리고머는 자연 발생일 수 있거나 또는 합성 공급원으로부터 획득될 수 있다.

[0067] 특정 구현예에서, 외과용 메쉬가 이용된다. 일부 구현예에서, "외과용 메쉬"는 수술 중에 기관 및 다른 조직에 대한 영구적 또는 일시적인 지지체로서 사용되는 느슨하게 직조된 시트를 지칭한다. 외과용 메쉬는 무기 및/또는 생물학적 재료로 만들 수 있으며 다양한 수술에 사용될 수 있다.

[0068] 연조직 재건

[0069] 종양의 절제, 외상성 상해, 노화 또는 선천성 기형으로부터의 파괴적인 연조직 손실은 매년 수백만 명의 사람들에게 영향을 준다. 피부, 지방 및 근육을 포함한 조직의 손실은 종래의 수단으로는 치료하기 어려운 주요 기능성 및 미적 장애로 이어진다. 예를 들어, 매년 미국에서 300,000건 이상의 부분적인 유방절제술이 시행되어, 유방 연조직의 손실로 인한 흉터 흉터를 초래한다. 연조직 복원을 위한 현존하는 선택에는 상당한 단점이 있다. 자가조직 플랩은 공여부 부위 결손을 남기는 너무 긴 수술 과정에서 신체의 또 다른 부위로부터 연조직을 이동하는 것을 요한다 문헌 [LoTempio 2010. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 126(2), 393-401; Patel 2012. *Annals of Plastic Surgery*, 69(2), 139-144]. 보철 이식물은 섬유증 및 캡슐화를 초래하는 이물질 반응이 일어나기 쉽다 {문헌 [Calobrace 2014 *Plastic and Reconstructive Surgery*, 134(1 Suppl), 6S-11; Tsoi 2014. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 133(2), 234-249]}. 지방흡입 중에 수확된 지방세포의 배치를 포함한 지방 이식은 작은 용적으로 제한되고 그리고 좋지 못한 이식 생존으로 방해받는다 {문헌 [Kakagia 2014 *Surgical Innovation*, 21(3), 327-336; Largo 2014 *British Journal of Plastic Surgery*, 67(4), 437-448]}. 마지막으로, 주사가능 하이드로겔 연조직 충전제가 사용될 수 있지만 이들은 단지 더 작은 결합에 대해 적합하고 이들이 제공하는 용적 회복은 일시적이다 {문헌 [Young 2011. *Acta Biomaterialia*, 7(3), 1040-1049; Varma 2014 *Acta Biomaterialia*, 10(12), 4996-5004]}. 조직 공학기술 해법의 새로운 세대는 재건 부위에 지방 조직과 같은 연조직을 재생하기 위한 주형으로 하이드로겔 스캐폴드를 사용하는 데 초점을 맞추는 것을 제안하였다.

[0070] 연조직 재건에 대한 현행 조직 공학기술 접근법

[0071] 지방질-유래된 줄기세포 (ASCs)는 연조직 결합을 둘러싼 상처 부위에서 확인된 간엽 줄기세포 (MSC)의 유형이다 {문헌 [Salibian 2013 *Archives of plastic surgery* 40.6: 666-675]}. 그들은 적절한 매트릭스 미세환경으로 지지될 때, 지방과 같은 연조직으로 분화될 수 있다. 다른 MSC는 연조직 예컨대 근육, 경질 및 흉막을 재구성하기 위해 적합한 미세환경으로 이동할 수 있다. 따라서 치유 부위를 기능성 물질로 채우는 전략은 내인성 MSC를 사용하여 신규한 조직의 재생을 가능하게 할 가능성이 있다. 하이드로겔은 연조직의 것에 유사한, 3차원 (3D) 성질 및 탄성 특성으로 인해 조직 결합의 재생을 위한 스캐폴드 매트릭스로 널리 연구되어 왔다. 주위 조직으로부터의 물리적 스트레스에 대항하여 그것의 용적 및 형태를 유지하면서, 원상태 지방 조직 (~2 kPa)의 것에 유사한 모듈러스를 갖는 하이드로겔 스캐폴드를 생성하기 위해 다양한 방법이 사용되어 왔다 {문헌 [Alkhouli 2013 *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 305(12), E1427-35; Sommer 2013 *Acta biomaterialia* 9.11 (2013): 9036-9048]}. 이것은 더 높은 가교결합하는 밀도 및 더 작은 평균 기공 크기를 요구하여 {문헌 [Ryu 2011 *Biomacromolecules* 12.7 (2011): 2653-2659; Khetan 2013 *Nature Materials*, 12(5), 458-465; Li 2014 *Journal of Neurotrauma*, 31(16), 1431-1438]}. 낮은 세포 침투 및 좋지 못한 재생을 초래한다. 하이드로겔 스캐폴드가 세포 침투를 증진시키는 능력은 성공적인 연조직 복원의 핵심이다. 혈관 침투의 부족은 큰-용적 지방 이식 및 다른 조직 공학기술 시도의 실패 원인이다. 현재 이용가능한 물질은 연조직을 재생하기 위해 조기 혈관형성 및 ASC 분화를 증진하면서 연조직 결합에서 용적 손실을 채울 수는 없다.

[0072] 하이드로겔 매트릭스

[0073] 지난 몇 년에 걸쳐, Li 및 Wen은 줄기 세포 이식을 위해 최적화된 기공 크기와 모듈러스 (10 - 100 Pa)를 가진

라미닌-유래된 루프 펩타이드 (CCRRIKVAVWLC, 10 μ M)와 접합된 하이알루론산 (HA) 하이드로겔을 개발했다. 그들은 이 하이드로겔이 분화된 세포로부터 나온 강력한 신경 줄기세포 (NSC) 이동과 신경 돌기를 지지한다는 것을 보여주었다 {문헌 [Li 2014 *Journal of Neurotrauma*, 31 (16), 1431-1438]}. 외상성 뇌 손상에 대한 랫트 제어된 피질 손상 (CCI) 모델에서, 이 하이드로겔은 CCI 손상 후 3일에 주입되었을 때, 이식 후 4주에서 6개월에 병변 부위 (> 10 mm)를 채우는 상당한 맥관구조 망상구조 형성을 촉진시켰다. 이 개선된 혈관신생은 이 하이드로겔이 조직-분비된 성장 인자, 특히 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)를 보유하고 및 제시하는 능력에 기인한다. 문헌 보고서는 또한 3-10 이당류 단위의 작은 HA 분해 단편이 내피 세포 증식, 이동, 소관 형성 및 혈관신생의 강력한 조절물질임을 밝혀냈다 {문헌 [Slevin 2002 *Journal of Biological Chemistry*, 277 (43), 41046-41059]}. 최근 연구에서, CCI 손상 후에 뇌 병변 부위에 인간 태아 조직 유래된-NSC 회전타원체를 전달하는데 이 HA 하이드로겔의 유효성이 시험되었다. 이 HA 하이드로겔은 이식 후 스캐폴드 매트릭스 내부에서 강력한 혈관 형성을 전달했다. 재생된 혈관은 병변 안으로 성장하여 이식된 매트릭스를 통해 침투하여 뉴런 전구체 생존과 성장을 지지했다. 비록 이들 연구가 지방 조직 재생을 위한 것이 아니지만, 이들 결과는 숙주 혈관 내성장을 증진시키는데 이 최적화된 HA 하이드로겔 조성물의 특유의 능력을 확인시켜 주었다. 보다 중요하게는, 하이드로겔 매트릭스는 하이드로겔 매트릭스 내부에서 강력한 세포 이동을 가능하게 하기에 충분히 다공성이다. 그러나, 이 HA 하이드로겔을 연조직 재건을 위해 직접적으로 사용하는 것은, 그것의 기계적 특성이 이식 부위의 완전성을 유지하기에 충분히 높지 않기 때문에 실행 가능하지 않다 — 주위 지방 조직은 10-배보다 더 높은 모듈러스를 가진다. 그것의 모듈러스를 개선하기 위해 가교결합하는 밀도를 증가하는 것은 세포 침투 및 이동에 대해 투과성을 저조하게 만들 것이다. 벌크 하이드로겔의 평균 공극 크기를 상당히 감소시키지 없이 기계적 특성을 증가시키는 신규한 전략이 필요하다. 지방 조직으로부터 유래된 및/또는 유래될 수 있는 세포의 기질과 같은 가공된 조직 세포의 기질을 함유하고 및/또는 이로부터 단리된 하이드로겔 물질이 제공된다.

[0074] 스캐폴드 복합체.

[0075] 복합체가, 예를 들면, 주사로 또는 이식으로 투여되는 인간 대상체의 조직 내로 함입되는 의료 기기를 사용하기에 적합한 스캐폴드 복합체가 본 명세서에 제공된다. 본 스캐폴드 복합체는 약 10nm 내지 약 10,000 nm, 예컨대 약 100nm 내지 약 8000nm, 또는 약 150nm 내지 약 5,000nm, 또는 약 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1,000, 1,500, 2,000, 2,500, 3,000, 3,500, 4,000, 4,500, 5,000, 5,500, 6,000, 6,500, 7,000, 7,500, 또는 8,000의 평균 직경을 일반적으로 갖는 폴리머 섬유를 함유한다. 본 명세서에서 제공된 바와 같은, 폴리머 섬유 대 하이드로겔 물질의 비는 당해 분야에서 공지된 임의의 수단으로 결정될 수 있다. 예를 들면, 폴리머 섬유 대 하이드로겔 물질의 비는 성분-질량 기준으로 약 1:100 내지 약 100:1, 예컨대 약 1:50 내지 약 50:1, 또는 1:10 내지 약 10:1, 예컨대 1:5 내지 약 5:1, 예컨대 약 1:3 내지 약 3:1이다. 폴리머 섬유 대 하이드로겔 물질의 비는 또한 농도 기준으로, 예를 들면, 하이드로겔 물질의 용적 당 제공된 폴리머 섬유의 중량으로 제공된다. 예를 들면 농도는 약 1 내지 50mg/mL이다. 하이드로겔 물질은 일반적으로 폴리머 섬유 상에 배치되는데, 예컨대 폴리머 섬유의 외면 (또는 조성물 및 형상에 의존하여, 외면)에 결합된다. 스캐폴드 복합체는 일반적으로 균일한 고품 물질이 아니다. 대신에, 스캐폴드 복합체는 스캐폴드 복합체의 표면 상에 또는 그 내에 존재하는 복수의 기공을 함유한다. 기공의 존재, 크기, 분포, 빈도 및 다른 파라미터는 스캐폴드 복합체를 생성하는 동안 조절될 수 있다. 기공 크기는 1, 2, 3, 4 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 70, 80, 90 또는 100 마이크론을 포함하여 약 1 마이크론 이하에서 최대 100 마이크론까지 될 수 있고, 그리고 이들의 크기는, 예를 들면, 기공 중 적어도 40%, 예컨대 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 95% 초과가 요망된 크기로 또는 요망된 크기 범위 내로 되도록 협소하게 맞추어질 수 있다.

[0076] 본 발명의 스캐폴드 복합체는 인간 대상체의 조직 내로 편입하기에 적합하고, 따라서 이들은 일반적으로, 그 안에서 및/또는 이에 의해 병리생리학적 반응을 유도하지 않는 생물학적 시스템 (예컨대 인간 대상체에서 발견됨)과 상호작용할 수 있음을 의미하는, "생체적합성"이다. 일부 구현예에서 스캐폴드 복합체는 조직에 내구성 있게 유지되도록 제공된다. 대안적으로, 상기 스캐폴드 복합체는 인간 대상체에서 일시적으로 유지되며, 실질적으로 생분해성으로 제공된다. 바람직하게는, 폴리머 섬유는 생체적합성 생분해성 폴리에스테르를 함유한다. 바람직한 구현예에서, 폴리머 섬유는 폴리카프로락톤을 함유한다.

[0077] 본 명세서에서 제공되는 바와 같이, 폴리머 섬유 및 하이드로겔을 함유하는 복합체의 상호작용의 한 바람직한 형태는 폴리머 섬유와 하이드로겔 물질 사이의 결합을 도입하기 위한, 예를 들면 폴리카프로락톤 섬유와 하이알루론산 사이의 가교결합을 유도하기에 효과적인 양으로 일반적으로 존재하는 가교 결합 부분을 포함한다.

[0078] 연조직 복원을 위한 스캐폴드 디자인

- [0079] 복합체 개념은 물질-보강 기전으로 널리 사용되고 있다. 예를 들면, 하이드로겔에 수산화인회석 입자를 첨가하면 그것의 강성도를 증가할 수 있고 {문헌 [Wu2008 *Materials Chemistry and Physics* 107.2 (2008): 364-369]}, 그리고 복합체 인장 탄성률은 연신된 입자에 대해 더욱더 증가한다 {문헌 [Yusong2007 *Journal of Materials Science*, 42(13), 5129-5134]}. 전기방사 나노섬유 메쉬는 원상태 ECM과의 그것의 지형학적 유사성으로 인해 조직 공학기술 기제로 널리 사용되어 왔다. 특정한 관심의 대상 중, 지방 조직의 탈세포화된 ECM은 본질적으로 고도로 섬유질이며 다공성이다 (도 6G) {문헌 [Young 2011. *Acta Biomaterialia*, 7(3), 1040-1049]}. 몇 개의 최근 연구는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리아크릴아미드, 또는 알기네이트 하이드로겔에 단편화된 폴리(락타이드) (PLA) 또는 키토산 섬유를 도입함에 의해 섬유질 성분을 재구성하려는 시도를 해왔다 {문헌 [Coburn 2011 *Smart Structures and Systems*, 7(3), 213; #37; Zhou 2011 *Colloids and SurfacesB: Biointerfaces*, 84(1), 155-162; Shin 2015 *Journal of Materials Chemistry*]}. 단편화된 섬유는 하이드로겔 전구체 용액과 혼합되어 겔화 과정 중에 하이드로겔에 혼입되어 3D 구조를 만든다. 이들 섬유-포매된 하이드로겔은 대응하는 하이드로겔보다 개선된 기계적 특성을 나타내었다. 그러나 *생체내*에서 숙주세포 침투를 시험하는 것에 대한 보고는 없었다. 또한, 이들 하이드로겔은 비-분해성이고, 지방세포 접착 및 분화를 위한 접착성 리간드가 필요하다.
- [0080] **나노섬유-하이드로겔 복합체 디자인**
- [0081] 하이드로겔 상에서 높은 다공성을 유지하면서 섬유-보강 효과를 달성하기 위해, 다른 스캐폴드와 비교하여 우수한 특성을 제공하는 전기방사 섬유-하이드로겔 복합체가 제공된다. 이전에 보고된 {문헌 [Coburn 2011 *Smart Structures and Systems*, 7(3), 213]} 나노섬유와 하이드로겔 매트릭스를 블렌딩하는 것을 넘어, 섬유 표면과 하이드로겔 가교결합 망상구조 사이의 계면 결합이 여기에 도입된다 (도 6). 그와 같은 복합체 디자인은 고형 섬유 성분으로부터의 보다 강력한 기계적 보강을 허용할 뿐만 아니라, 벌크 기계적 특성 및 하이드로겔 상의 평균 기공 크기/다공성의 독립적인 조정을 가능하게 하여, 최적의 세포 침투 특성 및 구조적 완전성을 모두를 가능하게 한다. 섬유가 ASC 및 내피 전구체를 위한 바람직한 세포 부착 기질로서 이용될 수 있고, 따라서 세포 이동 및 ASC 분화를 지지하는 가이드로서 작용할 수 있다는 것이 추가로 고려된다.
- [0082] **혁신**
- [0083] 특정 측면에서, 핵심 혁신은 나노섬유 표면과 하이드로겔 망상구조 사이의 계면 결합을 통한 나노섬유-하이드로겔 복합체 디자인이다 (도 6A). 이 조작된 복합체는 하이드로겔 상에서 평균 기공 크기를 상당히 감소시키지 않으면서 하이드로겔의 기계적 특성을 급격하게 개선하는 잠재력을 가지고 있다. 계면 결합의 도입은 2가지 성분의 단지 물리적 블렌딩과 비교하여 우월한 기계적 강화 효과를 제공할 수 있다. 이 연구는 블렌드와는 대조적으로 전기방사 폴리카프로락톤 (PCL) 섬유-HA 하이드로겔 복합체로 달성가능한 기계적 특성 (압축 및 전단 탄성률)의 범위를 보여줄 것이다. 제2의 혁신은 연조직 결합을 회복시키는 그와 같은 나노섬유-하이드로겔 복합체의 실증이다. 예비 특성규명은 복합체가 지방 조직과 구조적 특성을 공유한다는 것을 실증했다 (도 6) {문헌 [Christman, 2012 US 20120264190 A1; Young 2011. *Acta Biomaterialia*, 7(3), 1040-1049]}. 이 복합체는 연조직 재생에 중요한 구조적 완전성과 기계적 특성을 제공한다는 가설을 제기했다. 이 연구는 또한 하이드로겔에 비해 복합체의 다능성 및 효율성을 실증했다.
- [0084] 특정 측면에서, 핵심 혁신은 누락된 근막, 경질 또는 흉막에 있는 것과 같은 판상의 연조직 결합을 재건하는데 적합한 플랫폼 시트로 나노섬유-하이드로겔 복합체의 배치구성이다 (도 23).
- [0085] 특정 측면에서, 핵심 혁신은 외과용 메쉬와 통합된 하이드로겔 또는 나노섬유-하이드로겔 복합체의 조성물이다. 수득한 조성물은 외과용 메쉬의 강한 인장 강도로부터 이점을 가지면서 하이드로겔의 낮은 염증성 프로파일 및 우월한 조직 내성장을 유지한다.
- [0086] 특정 측면에서, 핵심 혁신은 우선적인 세포 이동을 증진할 수 있는 선형으로 배향된 나노섬유를 가진 나노섬유-하이드로겔 복합체의 배치구성이다 (도 4). 이 구성은 근막 및 경막과 같은 조직에서 분명한 것처럼 단일 축을 따라 조직 재생을 유도하는데 이상적이다.
- [0087] 이 프로젝트의 성공적인 완료는 누락된 연조직 구조의 복원, 특히 강하고 유연한 재료의 시트를 달성하고, 혈관 망상구조를 구축하고, 조직 치유 부위 완전성을 유지하고, 세포 이동 및 조직화를 증진하고, 그리고 숙주세포를 모집하는 것이 모두 지속가능한 조직 회복에 결정적인 아주 큰 판상의 결합 다양성에 대한 상용 해결책을 제공한다. 이 복합체 디자인에 사용된 물질 성분, 즉 HA 하이드로겔 및 생분해성 폴리에스테르 섬유에 대한 광범위한 임상 기록은 조직 혼용성에 대한 이들 예비 데이터와 함께, 우월한 조직 혼용성과 임상 번역을 위한 간단한

조절 승인 경로를 제안했다.

특징:

일부 구현예에서, 본 발명은 하이드로겔 성분에서 나노섬유와 폴리머 망상구조 사이의 계면 결합을 제공한다. 이것은 "진정한" 복합체의 형성에 중요하다. 이러한 섬유와 하이드로겔을 배합하는 것은 동일한 정도의 기계적 향상을 제공하지 않는다는 것이 실증되었다. 나노섬유-하이드로겔 블렌드의 사용에 대한 이전의 보고가 또한 있다. 환언하면, 계면 결합은 본 기술로부터 이 신규한 연구를 중요하게 차별화시킨다. 더욱이, 본 계면 결합은 본 원고에서 나타난 바와 같은 공유결합 및 2차 결합 예컨대 수소 결합 및 정전 전하 상호작용을 포함할 수 있다.

일부 구현예에서, 본 발명은 경질, 흉막 및 근막과 같은 판상의 조직을 재건하는데 적합한 형태로 하이드로겔에 결합된 나노섬유의 판상의 시트를 제공한다. 선택적으로, 나노섬유는 바람직한 방향을 따라 세포 내성장을 증진하도록 정렬된다.

다른 구현예에서, 본 발명은 강한 외과용 메쉬의 편입에 의해 보강된 판상의 하이드로겔 또는 판상의 나노섬유-하이드로겔 복합체를 제공한다. 수득한 물질은 개선된 염증성 프로파일 및 우월한 조직 혼용성 및 하이드로겔에 의해 제공된 내 성장을 유지하면서 복벽 치유와 같은 적용에서 유리할 수 있는 외과용 메쉬의 인장 강도로부터 유익할 수 있다.

이것은 또한 등방성 보강을 입증하는 현장에서 최초 연구이다 - 복합체는 임의의 기하학의 용적측정 결합을 대체하는 데 필요에 따라 모든 방향에서 강하다. 나노섬유 매트 또는 작은 수의 정렬된 필라멘트로 디자인은 본질적으로 이방성이다. 이 디자인은 등방성 및 이방성 재료 모두를 형성할 수 있다.

적어도 특정 측면에 대해, 본 명세서에 제시된 연구는 복합체의 형성을 위해 사용되는 성분을 세포 이동 및 숙주 조직 내성장을 위한 충분한 기공 크기 및 다공성을 갖는 하이드로겔 망상조직과 50 nm 내지 10 μ m의 범위인 직경을 갖는 폴리머 섬유를 느슨하게 포함하는 나노섬유인 것으로 한정한다.

겔/하이드로겔 성분

본 발명의 하이드로겔 복합체는 임의의 유형의 적합한 하이드로겔 성분을 포함할 수 있다. 본 발명은 당해 분야에 공지된 임의의 적합한 하이드로겔 성분을 포함하는, 임의의 적합한 겔 성분을 포함하는 나노구조/겔 복합체를 고려하다. 겔 및/또는 하이드로겔은 임의의 적합한 합성 또는 자연 발생 물질로 형성될 수 있다.

예를 들면, 겔 및/또는 하이드로겔의 폴리머 성분은 셀룰로오스 에스테르, 예를 들면, 셀룰로오스 아세테이트, 셀룰로오스 아세테이트 프로피오네이트 (CAP), 셀룰로오스 아세테이트 부티레이트 (CAB), 셀룰로오스 프로피오네이트 (CP), 셀룰로오스 부티레이트 (CB), 셀룰로오스 프로피오네이트 부티레이트 (CPB), 셀룰로오스 디아세테이트 (CDA), 셀룰로오스 트리아세테이트 (CTA), 등을 포함할 수 있다. 이들 셀룰로오스 에스테르는 미국 특허 번호 1,698,049, 1,683,347, 1,880,808, 1,880,560, 1,984,147, 2,129,052, 및 3,617,201에 기재되어 있으며, 그리고 당해 분야에서 공지된 기술을 사용하여 제조될 수 있거나 상업적으로 수득될 수 있다. 본 명세서에서 적합한 상업적으로 입수가능한 셀룰로오스 에스테르는 테네시주 킹즈포트 소재의 Eastman Chemical Company로부터 모두 이용가능한 CA 320, CA 398, CAB 381, CAB 551, CAB 553, CAP 482, CAP 504를 포함한다. 그와 같은 셀룰로오스 에스테르는 전형적으로 약 10,000 내지 약 75,000 사이의 수 평균 분자량을 갖는다.

셀룰로오스 에스테르는 그리고 셀룰로오스와 셀룰로오스 에스테르 모노머 단위의 혼합물을 포함한다; 예를 들면, 상업적으로 입수가능한 셀룰로오스 아세테이트 부티레이트는 셀룰로오스 아세테이트 모노머 단위뿐만 아니라 셀룰로오스 부티레이트 모노머 단위 및 비에스테르화된 셀룰로오스 단위를 함유한다.

본 발명의 겔/하이드로겔은 또한, 일반적으로 아크릴산, 메타크릴산, 메틸 아크릴레이트, 에틸 아크릴레이트, 메틸 메타크릴레이트, 에틸 메타크릴레이트, 및/또는 다른 비닐 모노머로부터 형성된, 아크릴레이트 폴리머와 같은 다른 수팽윤성 폴리머를 포함할 수 있다. 적합한 아크릴레이트 폴리머는 상기에 지시된 바와 같이 Rohm Pharma (독일)로부터 상표명 "Eudragit" 하에 이용가능한 이들 코폴리머이다. Eudragit 시리즈 E, L, S, RL, RS 및 NE 코폴리머는 유기 용매, 수성 분산물에 용해시키거나, 또는 건조 분말로 이용가능하다. 바람직한 아크릴레이트 폴리머는 메타크릴산과 메틸 메타크릴레이트의 코폴리머, 예컨대 Eudragit L 및 Eudragit S 시리즈 폴리머이다. 특히 바람직한 이러한 코폴리머는 Eudragit L-30D-55 및 Eudragit L-100-55 (후자 코폴리머는 물로 재구성될 수 있는 Eudragit L-30D-55의 분무 건조된 형태임)이다. Eudragit L-30D-55 및 Eudragit L-100-55 코폴리머의 분자량은 대략 135,000 Da으로, 대략 1:1의 유리 카복실 기 대 에스테르 기의 비를 갖는다. 코폴리머

는 5.5 이하의 pH를 갖는 수성 유체에서 일반적으로 불용성이다. 또 다른 특히 적합한 메타크릴산-메틸 메타크릴레이트 코폴리머는 Eudragit S-100으로, 이것은 유리 카복실 기 대 에스테르 기의 비가 대략 1:2인 점에서 Eudragit L-30D-55와 다르다. Eudragit S-100은 5.5 이하의 pH에서 불용성이지만, 그러나 Eudragit L-30D-55와 달리, 5.5 내지 7.0의 범위인 pH를 갖는 수성 유체에는 난용성이다. 이 코폴리머는 pH 7.0 및 그 초과에서 가용성이다. Eudragit L-30D-55와 Eudragit S-100의 것 사이에서 pH-의존적 용해도 프로파일을 갖는, Eudragit L-100은 또한, 그것이 불용성인 한, 6.0 아래의 pH에서 사용될 수 있다. Eudragit L-30D-55, L-100-55, L-100, 및 S-100은 유사한 pH-의존적 용해도 특징을 갖는 다른 허용가능한 폴리머로 대체될 수 있음이 당해 분야의 숙련가에 의해 인정될 것이다.

[0099] 임의의 본 명세서에 기재된 겔/하이드로겔 조성물은 활성제를 함유하고 이로써 여기에 활성제-전달 관계로 체표면 (예를 들면, 조직 치유의 부위)에 적용될 때 활성제 전달 시스템으로서 작용할 수 있도록 변형될 수 있다. 본 발명의 본 하이드로겔 조성물 안으로 "장입된" 활성제의 방출은 전형적으로 물의 흡수와 팽창-제어된 확산 기전을 통한 제제의 탈착 모두를 포함한다. 활성제-함유 하이드로겔 조성물은 예로써, 경피 약물 전달 시스템, 상처 드레싱, 국소 약제학적 제형, 이식된 약물 전달 시스템, 경구 복용 형태, 및 기타 동종의 것에서 이용될 수 있다.

[0100] 본 하이드로겔 조성물에 함입되어 (예를 들면, 약물의 전신 투여에 적합한 경피, 경구, 또는 다른 복용 형태로) 전신으로 전달될 수 있는 적합한 활성제는, 비제한적으로: 각성제; 진통제; 마취제; 항관절염 제제; 항천식약 제제를 포함한 호흡 약물; 항신생물성 약물을 포함한 항암제; 항콜린제; 항경련제; 항우울제; 항당뇨제; 지사제; 구충제; 항히스타민제; 항고지혈증 제제; 혈압강하 제제; 항-감염제 예컨대 항생제 및 항바이러스제; 항염증 제제; 항편두통 제제; 항구토제; 항과민성증 약물; 가려움약; 항정신병; 해열제; 진경제; 항결핵성 제제; 항궤양 제제; 항바이러스제; 항불안제; 식욕 억제제; 주의력 결핍 장애 (ADD) 및 주의력 결핍 과잉행동 장애 (ADHD) 약물; 칼슘 채널 차단제, 항협심증 제제, 중추신경계 (CNS) 제제, 베타-차단제 및 항부정맥제를 포함한 심혈관 제제; 중추신경계 자극제; 충혈제거제를 포함한 기침 및 감기 제제; 이뇨제; 유전 물질; 약초의 요법; 호르몬 분해 효소; 최면약; 혈당강화제; 면역억제성 제제; 류코트리엔 억제제; 유사분열 억제제; 근육 이완제; 마약 길항제; 니코틴; 영양제, 예컨대 비타민, 필수 아미노산 및 지방산; 안과 약물 예컨대 항녹내장 제제; 부교감제; 펩타이드 약물; 정신흥분제; 진정제; 프로세스토젠, 에스트로젠, 코르티코스테로이드, 안드로젠 및 동화작용 제제를 포함한 스테로이드; 흡연 중단 제제; 교감신경모방; 신경안정제; 및 일반적인 관상동맥, 주변 및 뇌를 포함한 혈관확장제를 포함한다. 본 접촉제 조성물이 유용한 특이적인 활성제는, 비제한적으로, 아나바신, 캅사이신, 이소소르바이드 디니트레이트, 아미노스티그민, 니트로글리세린, 베라파밀, 프로프라놀롤, 실라보린, 포리돈, 클로니딘, 사이티신, 페나제팜, 니페디핀, 플루엑시진, 및 살부타몰을 포함한다.

[0101] 국소 약물 투여 및/또는 약물투여된 쿠션 (예를 들면, 약물투여된 패드)을 위해, 적합한 활성제는, 예로써, 하기를 포함한다:

[0102] 정균 및 살균 제제: 적합한 정균 및 살균 제제는, 예로써 다음을 포함한다: 할로젠 화합물 예컨대 요오드, 아이오도포비돈 복합체 (즉, PVP와 요오드의 복합체, 또한 일명 "포비딘" 및 Purdue Frederick으로부터 상표명 Betadine으로 이용가능함), 아이오다이드 염, 클로르아민, 클로로헥시딘, 및 나트륨 차아염소산염; 은 및 은-함유 화합물 예컨대 설파디아진, 은 단백질아세틸탄네이트, 질산은, 은 아세테이트, 은 락테이트, 은 설페이트 및 은 염화물; 유기주석 화합물 예컨대 트리-n-부틸주석 벤조에이트; 아연 및 아연 염; 산화제, 예컨대 과산화수소 및 칼륨 과망간산염; 아릴 수은 화합물, 예컨대 페닐수은 보레이트 또는 메르브로민; 알킬 수은 화합물, 예컨대 티오머살; 페놀, 예컨대 티몰, o-페닐 페놀, 2-벤질-4-클로로페놀, 헥사클로로펜 및 헥실레조르시놀; 및 유기 질소 화합물 예컨대 8-하이드록시퀴놀린, 클로르퀴날돌, 클리오퀴놀, 에타크리딘, 헥세티딘, 클로르헥세딘, 및 암바존.

[0103] 항생제: 적합한 항생제는, 비제한적으로, 린코마이신 계열의 항생제 (스트렙토마이세스 린콜렌시스로부터 본래 회수된 항생제의 부류를 지칭함), 테트라사이클린 계열의 항생제 (스트렙토마이세스 아우레오파시엔스로부터 본래 회수된 항생제의 부류를 지칭함), 및 황-기재 항생제, 즉, 설펜아미드를 포함한다. 린코마이신 계열의 예시적인 항생제는, 예를 들면, 미국 특허 번호 3,475,407, 3,509,127, 3,544,551 및 3,513,155에서 기재된 바와 같은 린코마이신, 클린다마이신, 관련된 화합물, 및 이들의 약리적으로 허용가능한 염 및 에스테르를 포함한다. 테트라사이클린 계열의 예시적인 항생제는 테트라사이클린 자체, 클로르테트라사이클린, 옥시테트라사이클린, 테트라사이클린, 데메클로사이클린, 롤리테트라사이클린, 메타사이클린 및 독시사이클린 및 그것의 약제학적으로 허용가능한 염 및 에스테르, 특히 산 부가 염 예컨대 하이드로클로라이드 염을 포함한다. 예시적인 황-기재 항생제는, 비제한적으로, 설펜아미드 설파세트아미드, 설파벤즈아미드, 설파디아진, 설파독신, 설파메라진, 설파

파메타진, 설파메티졸, 설파메톡사졸, 및 이들의 약리적으로 허용가능한 염 및 에스테르, 예를 들면, 설파세트아미드 나트륨을 포함한다.

[0104] 통증 완화 제제: 적합한 통증 완화 제제는, 비제한적으로, 아세트아미도유게놀, 알파돌론 아세테이트, 알파살론, 아미카인, 아몰라논, 아밀로카인, 베녹시네이트, 베크시카인, 비펜아민, 부피바카인, 부레타민, 부타카인, 부타벤, 부타닐리카인, 부탈리탈, 부톡시카인, 카티카인, 2-클로로프로카인, 신코카인, 코카에틸렌, 코카인, 사이클로메티카인, 디부카인, 디메티소퀸, 디메토카인, 디페라돈, 디클로닌, 에크고니딘, 에크고닌, 에틸아미노벤조에이트, 에틸 염화물, 에티도카인, 에톡사드롤, .베타.-유카인, 유프로신, 페날코민, 포모카인, 헥소바르비탈, 헥실카인, 하이드록시디온, 하이드록시프로카인, 하이드록시테트라카인, 이소부틸 p-아미노벤조에이트, 켄타민, 류시노카인 메실레이트, 레복사드롤, 리도카인, 메피바카인, 메프릴카인, 메타부톡시카인, 메토헥시탈, 메틸 염화물, 미다졸람, 미르테카인, 내페인, 옥타카인, 오르토카인, 옥세타자인, 파르에톡시카인, 페나카인, 펜사이클리딘, 페놀, 피페로카인, 피리도카인, 폴리도카놀, 파라목신, 프릴로카인, 프로카인, 프로파니디드, 프로파노카인, 프로파라카인, 프로피포카인, 프로포폴, 프로폭시카인, 슈도코카인, 피로카인, 리소카인, 살리실 알코올, 테트라카인, 티알바르비탈, 티미탈, 티오부타바르비탈, 티오펜탈, 툴리카인, 트리메카인, 졸라민, 및 이들의 조합을 포함하는, 국부 마취제이다. 테트라카인, 리도카인 및 프릴로카인이 본 명세서에서 통증 완화 제제로 지칭된다.

[0105] 약물 전달 시스템으로 본 하이드로겔 조성물을 사용하여 전달될 수 있는 다른 국소 제제는 하기를 포함한다: 항진균제 예컨대 운테실렌산, 톨나프테이트, 미코나졸, 그리세오펜빈, 케토코나졸, 사이클로피록스, 클로트리마졸 및 클로로자일레놀; 각질용해약 제제, 예컨대 살리실산, 락트산 및 우레아; 수포제 예컨대 칸타리딘; 항여드름제 예컨대 유기 퍼옥사이드 (예를 들면, 벤조일 과산화물), 레티노이드 (예를 들면, 레티노산, 아다팔렌, 및 타자로텐), 설폰아미드 (예를 들면, 나트륨 설파세트아미드), 레조르시놀, 코르티코스테로이드 (예를 들면, 트리암시놀론), 알파-하이드록시 산 (예를 들면, 락트산 및 글라이콜산), 알파-케토 산 (예를 들면, 글라이옥살산), 및 아젤라산, 클린다마이신, 에리트로마이신, 메클로사이클린, 미노사이클린, 나디폴록사신, 세팔렉신, 독시사이클린, 및 오픈록사신을 포함하는, 여드름의 치료에 대해 구체적으로 지시된 항균제; 피부 미백 및 표백제, 예컨대 하이드로퀴논, 코지산, 글라이콜산 및 다른 알파-하이드록시 산, 알토칼핀, 및 특정 유기 퍼옥사이드; 살리실산, 이미퀴모드, 디니트로클로로벤젠, 디부틸 스쿼르 산, 포도필린, 포도필로톡신, 칸타리딘, 트리클로로아세트산, 블레오마이신, 사이도포비르, 아데포비르, 및 그것의 유사체를 포함하는, 사마귀 치료용 제제; 및 항-염증제 예컨대 코르티코스테로이드 및 비스테로이드 항-염증성 약물 (NSAID), 여기서 상기 NSAID는 케토프로펜, 플루르바이프로펜, 이부프로펜, 나프록센, 페노프로펜, 베녹사프로펜, 인도프로펜, 파이프프로펜, 카프로펜, 옥사프로진, 프라노프로펜, 수프로펜, 알미노프로펜, 부티부펜, 펜부펜, 및 티아프로펜산을 포함한다.

[0106] 상처 드레싱을 위해, 적합한 활성제는 상처의 치료에 유용한 것들이고, 그리고, 비제한적으로 정균 및 살균 화합물, 항생제, 통증 완화 제제, 혈관확장제, 조직-치유 향상제, 아미노산, 단백질, 단백질 분해 효소, 사이토카인, 및 폴리펩타이드 성장 인자를 포함한다.

[0107] 일부 활성제의 국소 및 경피 투여를 위해, 그리고 상처 드레싱에서, 피부 안으로 또는 피부를 통한 제제의 침투 속도를 고양하기 위해 본 하이드로겔 조성물 안으로 투과 증강제를 함유하는 것이 필요하거나 또는 바람직할 수 있다. 적합한 증강제는, 예를 들면, 하기를 포함한다: 설폭사이드 예컨대 디메틸설폭사이드 (DMSO) 및 데실메틸설폭사이드; 에테르 예컨대 디에틸렌 글리콜 모노에틸 에테르 (트랜스큐틀로 상업적으로 이용가능함) 및 디에틸렌 글리콜 모노메틸 에테르; 계면활성제 예컨대 나트륨 라우레이트, 나트륨 라우릴 설페이트, 세틸트리메틸암모늄 브로마이드, 벤즈알코늄 염화물, 폴록사머 (231, 182, 184), 트윈 (20, 40, 60, 80) 및 레시틴 (미국 특허 번호 4,783,450); 1-치환된 아자사이클로헥탄-2-온, 특히 1-n-도데실사이클라자-사이클로헥탄-2-온 (캘리포니아주 엘바인 소재의 Nelson Research & Development Co.로부터 상표명 Azone으로 이용가능함; 미국 특허 번호 3,989,816, 4,316,893, 4,405,616 및 4,557,934 참조); 알코올 예컨대 에탄올, 프로판올, 옥탄올, 데칸올, 벤질 알코올, 및 기타 동종의 것; 지방산 예컨대 라우르산, 올레산 및 팔레르산; 지방산 에스테르 예컨대 이소프로필 미리스테이트, 이소프로필 팔미테이트, 메틸프로피오네이트, 및 에틸 올레이트; 폴리올 및 이들의 에스테르 예컨대 프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜, 글리세롤, 부탄디올, 폴리에틸렌 글리콜, 및 폴리에틸렌 글리콜 모노라우레이트 (PEGML; 예를 들면, 미국 특허 번호 4,568,343 참조); 아미드 및 다른 질소성 화합물 예컨대 우레아, 디메틸아세트아미드 (DMA), 디메틸포름아미드 (DMF), 2-피롤리돈, 1-메틸-2-피롤리돈, 에탄올아민, 디에탄올아민 및 트리에탄올아민; 테르펜; 알카논; 및 유기 산, 특히 살리실산 및 살리실레이트, 시트르산 및 석신산. 2종 이상의 증강제의 혼합물이 또한 사용될 수 있다.

[0108] 특정한 다른 구현예에서, 겔 (예를 들면, 하이드로겔 성분) 및 나노구조를 포함하는 본 발명의 복합체 조성물은

또한 추가의 선택적인 첨가제 성분을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 당해 기술에 공지되어 있고, 그리고 예를 들면, 충전제, 보존제, pH 조절물질, 연화제, 증점제, 안료, 염료, 굴절 입자, 안정화제, 강인화제, 탈착제, 약제 (예를 들면, 항생제, 혈관신생 프로모터, 항진균제, 면역억제제, 항체, 및 기타 동종의 것), 및 투과 증강제를 포함할 수 있다. 이들 첨가제, 및 이들의 양은 이들이 본 하이드로겔 조성물의 요망된 화학적 및 물리적 특성을 상당히 방해하지 않는 그와 같은 방식으로 선택된다.

[0109] 흡수제 충전제는 유익하게는 접착제가 피부 또는 다른 체표면 상에 있을 때 수화의 정도를 조절하기 위해 함유될 수 있다. 그와 같은 충전제는 미세결정성 셀룰로오스, 탈크, 락토오스, 카올린, 만니톨, 콜로이드 실리카, 알루미나, 산화아연, 산화티타늄, 규산마그네슘, 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 소수성 전분, 황산칼슘, 칼슘스테아레이트, 인산칼슘, 인산칼슘 이수화물, 직조된 및 부직포 종이 및 먼 물질을 포함할 수 있다. 다른 적합한 충전제는 불활성, 즉, 실질적으로 비-흡착제이고, 그리고, 예를 들면, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리우레탄 폴리에테르 아마이드 코폴리머, 폴리에스테르 및 폴리에스테르 코폴리머, 나일론 및 레이온을 포함한다

[0110] 본 조성물은 또한 하나 이상의 보존제를 포함할 수 있다. 보존제는, 예로써, p-클로로-m-크레졸, 페닐에틸 알코올, 페녹시에틸 알코올, 클로로부탄올, 4-하이드록시벤조산 메틸에스테르, 4-하이드록시벤조산 프로필에스테르, 벤즈알코늄 염화물, 세틸피리디늄 염화물, 클로로헥시딘 디아세테이트 또는 글루코네이트, 에탄올, 및 프로필렌 글리콜을 포함한다.

[0111] 본 조성물은 또한 pH 조절 화합물을 포함할 수 있다. pH 조절물질로서 유용한 화합물은, 비제한적으로, 글리세롤 완충액, 시트레이트 완충액, 보레이트 완충액, 인산염 버퍼, 또는 시트르산-인산염 버퍼를 포함하고, 또한 본 하이드로겔 조성물의 pH가 개체 체표면의 것과 양립가능한 것을 공고히 하기 위해 포함될 수 있다.

[0112] 본 조성물은 또한 적합한 연화제를 포함할 수 있다. 적합한 연화제는 시트르산 에스테르, 예컨대 트리에틸시트레이트 또는 아세틸 트리에틸시트레이트, 타르타르산 에스테르 예컨대 디부틸타르트레이트, 글리세롤 에스테르 예컨대 글리세롤 디아세테이트 및 글리세롤 트리아세테이트; 프탈산 에스테르, 예컨대 디부틸 프탈레이트 및 디에틸 프탈레이트; 및/또는 친수성 계면활성제, 바람직하게는 친수성 비-이온성 계면활성제, 예컨대, 예를 들면, 당의 부분적인 지방산 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 지방산 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 지방 알코올 에테르, 및 폴리에틸렌 글리콜 소르비탄-지방산 에스테르를 포함한다.

[0113] 본 조성물은 또한 증점제를 포함할 수 있다. 본 명세서에서 바람직한 증점제는 자연 발생 화합물 또는 그것의 유도체이고, 그리고, 예로써: 콜라겐; 갈락토만난; 전분; 전분 유도체 및 가수분해물; 셀룰로오스 유도체 예컨대 메틸 셀룰로오스, 하이드록시프로필셀룰로오스, 하이드록시에틸 셀룰로오스, 및 하이드록시프로필 메틸 셀룰로오스; 콜로이드성 규산; 및 당류 예컨대 락토오스, 사카로오스, 푸룩토오스 및 글루코스를 포함한다. 합성 증점제 예컨대 폴리비닐 알코올, 비닐피롤리돈-비닐아세테이트-코폴리머, 폴리에틸렌 글리콜, 및 폴리프로필렌 글리콜이 또한 사용될 수 있다.

[0114] 특정 구현예에서, 하이드로겔 및 나노구조를 포함하는 본 발명의 하이드로겔 복합체는 혈관신생을 증진하는 성분을 추가로 포함한다. 본 발명 이전에 임상적으로 관련된 연조직 재생을 달성하는 것에 대한 과제는 재생된 조직이 바람직하게는 다시 혈관을 발달시켜야한다는 것이다. 따라서, 연조직 재생을 증진하는 임의의 물질은 바람직하게는 혈관신생을 또한 조장하여야 한다. 이것을 달성하기 위한 하나의 방법은 혈관신생 및 조직 형성을 증진하는 성장 인자를 풍부하게 하고 그리고 보유하도록 성장 인자 결합 부위로 작용할 수 있는, 헤파린-함유 하이드로겔 성분의 사용을 통한 것이다.

[0115] 다양한 다른 구현예에서, 본 발명의 복합체 재료는 이들이 하이드로겔 물질로서 하이알루론산 (HA)에 기반될 수 있다. HA는 하이드로겔 성분을 형성하는 반복하는 이당류 단위를 갖는 비-황산화된, 선형 다당류이다. HA는 또한 인간 조직에서 세포외 기질의 비-면역원성인 원상태 성분이고, 미적 및 복원 절차에서 진피 충전제로 널리 사용된다.

[0116] HA의 분해는 그 발현이 조직 손상 및 염증의 부위에서 증가되는 원상태 하이알로니다제에 의해 용이하게 된다. 중요하게는, 연구는 3-10 이당류 단위의 작은 HA 분해 단편이 내피 세포 증식, 이동, 소관 형성 및 혈관신생의 강력한 조절물질임을 나타냈다. HA의 이들 생물학적 기능은 Ras 및 PKC가 관여하는 경로에서 CD44를 통해 매개되는 것으로 생각된다. 항-CD44 항체를 이용한 CD44/HA 상호작용의 봉쇄는 시험관내에서 인간 미세혈관 내피 세포의 증식과 이동을 감소시켰다. HA 하이드로겔은 세포 및 조직 손상의 다양한 모델에서 세포 전달을 위한 잠재적인 매트릭스로서 조사되어왔다. 이들 하이드로겔은 세포에 대한 보호성 및 지지성 스캐폴드로서 역할을 할 수 있으며 또한 흉터를 줄일 수 있다. 따라서, HA는 세포 침투를 증진하고 혈관신생을 증진함으로써 조직 재생을

향상시키는 데 중요한 역할을 한다고 여겨진다.

- [0117] 첫째, 본 물질은 원상태 지방 조직의 것에 유사한 3차원적 완전성과 일관성을 갖는다. 이것은 누락된 연조직 용적의 기존의 복원에 적합하게 한다. 두 번째로, 물질은 바람직하게는 지방세포 및 내피 전구체의 이동을 위한 기질로서 작용할 수 있는 복수의 가요성 나노섬유로 침착될 수 있다. 셋째로, 본 물질은 이들 전구체 세포가 이것 주변에 섬유질 캡슐을 형성하기보다는 스캐폴드 안으로 빠르게 침투하고 통합할 수 있도록 하기에 충분한 다공성을 가진다. 넷째로, HA 하이드로겔 성분은 압축성 및 용적의 팽창을 제공하면서 또한 중요한 혈관신생 신호를 제공한다. 다섯째로, 나노섬유 및 하이드로겔 성분은 이들을 재생된 연조직에 의해 대체될 수 있게 하는 생분해성이다. 여섯째로, 모든 성분 물질은 수많은 FDA-승인된 디바이스에서 강력한 안전 기록을 보유하고 있어, 임상 번역에 대한 규제 장애를 잠재적으로 감소시킨다.
- [0118] 본 발명의 겔/하이드로겔/나노구조 복합체는 또한 표피 성장 인자 (EDF), PDGF, 및 신경 성장 인자 (NGF's)를 비롯한, 수많은 성장 인자와 같은 조직-치유 제제를 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 조성물은 EGF를 포함할 수 있다. 표피 성장 인자 (EGF)는 실험실에서 마우스의 피부 상처가 마우스가 상처를 핥게 할 때 더 빠르게 치유된 것처럼 보인 관찰 후 발견되었다. 이것은 단순히 타액에 일부 방부제 (예컨대 리소자임)로 인한 것이 아니다. 현재 EGF로 공지된 특이적인 성장 인자가 원인으로 밝혀졌다. EGF는 유로가스트론과 동일하며 혈관신생 특성을 가지고 있다. 형질전환 성장 인자-알파 (TGF- α)는 매우 유사하며, 동일한 수용체에 결합하고, 상피 세포 재생 (표피화)을 자극하는데 더욱더 효과적이다.
- [0119] 따라서, EGF/TGF를 포함하는 본 발명의 하이드로겔은 상처 치유의 촉진과 화상, 켈로이드 반흔 형성 (특히 화상에 대해)의 감소, 피부 생착 드레싱, 및 만성 다리 궤양의 치료에 유익하게는 사용될 수 있다.
- [0120] 본 발명에서 유용한 조직-치유하는 제제는 표피 성장 인자 (EDF), PDGF, 및 신경 성장 인자 (NGF's)를 비롯한 수많은 성장 인자를 포함한다. 일반적으로, 성장-증진 호르몬은 1 내지 4개의 조직 사이에 영향을 미칠 것이다. 그러한 단백질로부터 개발된 많은 생성물은 다른 징후가 있지만 한 종류 또는 또 다른 종류의 상처 치유에 대해 목표로 한다. 가장 중요한 조직 성장 인자 중 일부는 아래에서 더 자세히 기재된다.
- [0121] 본 발명의 겔/나노구조 조성물은 조직 치유 방법 및 본 발명의 기타 적용에 유용할 수 있는 하나 이상의 성장 인자를 또한 포함할 수 있다.
- [0122] 예를 들면, 본 발명은 본 발명의 조성물에 PDGF를 포함하는 것을 고려한다. 혈소판-유래된 성장 인자 (PDGF)는 거의 모든 중간엽-유래된 세포, 즉 혈액, 근육, 뼈, 연골, 및 결합 조직 세포에 대한 미토겐이다. 이것은 AA 또는 BB 호모다имер로, 또는 AB 이종이량체로 존재하는 이량체성 당단백질이다. 많은 성장 인자와 같이, PDGF는 이제 인자의 더 큰 계열의 구성원인 것으로 고려된다. PDGF에 더하여, 이 계열은 동종이량체성 인자 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)와 태반 성장 인자 (PIGF), VEGF/PIGF 이종이량체, 및 결합 조직 성장 인자 (CTGF), 인간 혈관 내피 세포와 섬유아세포에 의해 분비된 PDGF-유사 인자를 포함한다. NGF와 함께, TGF- β 및 당단백질 호르몬 예컨대 인간 융모막 생식선자극성 호르몬 (hCG)인 PDGF는 이제 시스테인-매듭 성장 인자 상과의 구성원으로 분류된다. 이들 인자 모두는 본 발명의 하이드로겔과 조합하여 사용될 수 있다.
- [0123] PDGF는 혈소판에 의해 생성되고 응고 과정에서 방출된다. 그것은 이들 세포에서 유래한 성장 인자 중 단지 하나일 뿐이다. PDGF는 손상 부위에 섬유아세포와 백혈구를 끌어당기고, 뿐만 아니라 대체 결합 조직 (주로 섬유아세포 및 평활근 세포)의 성장을 자극한다. 그것은 콜라겐을 생산하는 세포를 포함하여 다양한 세포에서 세포 분열을 자극하고, 그래서 혈관신생을 촉진한다. 그것은 또한 세포분화, 혈관수축, 화학주성, 효소 활성화 및 칼슘 동원을 자극한다.
- [0124] 혈소판 유래된 성장 인자는 본 발명의 조성물을 사용하여 특정 치료 동안 뼈 및 연조직 재생을 회복시키고 만성 및 급성 상처의 치유 과정을 촉진시키는데 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 하이드로겔/나노구조 조성물은 유익하게는 혈소판 유래된 성장 인자 각테일을 포함할 수 있다.
- [0125] 본 발명의 하이드로겔/나노구조 조성물은 예를 들면 PDGF 유전자의 국부 전달을 위한 유전자 요법에 사용될 수 있다. 상처를 둘러싼 생존가능한 조직에서 유래되고, 증식하고 그리고 매트릭스 안으로 이동하여, 플라스미드 유전자 전달 및 발현을 위한 표적으로 작용하는, PDGF를 코딩하는 플라스미드 DNA는 하이드로겔 매트릭스 및 육아조직 섬유아세포에 편입된다.
- [0126] 본 발명의 하이드로겔/나노구조 조성물은 또한 혈관신생을 증진하기 위해 VEGF를 포함할 수 있다. 혈관 내피 성장 인자 (VEGF--혈관 투과도 인자로도 공지됨)는 또 다른 혈관 성장 인자이고, 그리고 다작용성 혈관신생 사이토카인이다. 그것은 미세혈관 수준에서 내피 세포의 증식을 자극함에 의해 간접적으로 및 직접적으로 모두 혈관

신생 (혈관 성장)에 기여하여, 이들이 이동하게 하고 그것의 일반적인 발현을 변화되도록 한다. VEGF는 또한 이들 내피 세포를 과투과성으로 만들어, 이들이 혈관 공간 외부로 혈장 단백질이 방출되도록 하여 본 영역에 변화를 야기하여, 혈관 신생에 기여한다.

[0127] 본 발명의 조성물은 또한 FGF를 포함할 수 있다. 섬유아세포 성장 인자 (FGF)는 실제로 헤파린-결합 성장 인자 계열에 속하는 적어도 19 14 18 kD 펩타이드의 계열이고 배양된 섬유아세포 및 혈관 내피 세포에 대한 미토겐성이다. 이들은 또한 생체내에서 혈관신생이고 그리고 이 혈관신생특성은 TNF에 의해 향상된다. FGF는 EGF와 유사한 방식으로 사용될 수 있다. FGF-2로도 공지된, bFGF는 인간 거대핵세포형성을 조절하는 데 관여하며 FGF는 내피 세포 형성을 자극하고 결합 조직 치유를 돕는 데 효과적인 것으로 나타났다.

[0128] 하이드로겔/나노구조 조성물은 또한 창상 치유 및 상피 세포 파괴를 포함하는 다른 장애에 사용하기 위한, FGF-7로도 공지된 케라틴생성세포 성장 인자 (KGF)를 포함할 수 있다.

[0129] 형질전환 성장 인자 (TGF's)는 다양한 세포주를 형질전환하는 능력이 있으며, 그리고 예를 들면, 제한된 수의 생성보다 많은 배양에서 성장하는 능력, 단일층보다는 다층 층으로 성장, 및 비정상 핵형의 취득을 부여할 수 있다. 적어도 5개 구성원의 TGF 계열이 있으며, 가장 널리 연구된 두 가지는 TGF-알파 및 TGF-베타이다. 전자는 섬유아세포 및 내피 세포, 혈관 신생에 대해 미토겐성이며 골 흡수를 증진한다. 조성물은 또한 TGF를 포함할 수 있다. TGF-베타는 세포 조절의 일반적인 매개체, 세포 성장의 강력한 억제제이고 그리고 많은 세포 유형의 증식을 억제한다. TGF-베타는 다른 펩타이드 성장 인자의 미토겐성 효과를 길항할 수 있고 또한 많은 종양 세포주의 성장을 억제할 수 있다. TGF-베타는 또한 혈관신생 효과를 가지며 섬유아세포에서 콜라겐 형성을 증진한다. 본 발명의 하이드로겔에 대한 적응증은 만성 피부 궤양, 예컨대 당뇨 환자에서의 신경영양성 발 궤양을 포함한다. 다른 영역으로는 상처 치유, 뼈 치유 및 면역억제성 질환을 포함한다.

[0130] 본 발명의 하이드로겔/나노구조 조성물은, 예를 들면 적합한 세포를 수반하기 위해 사용될 수 있다. 이들은 효능을 최대화하기 위해, 상처 또는 다른 적합한 영역에 도포하기 직전에 겔에 혼입될 수 있다. 적합한 세포는 주로 진피 및 표피 형성을 담당하는 자가조직 섬유아세포 및 케라틴생성세포를 포함한다. 하나의 세포 유형을 각각 포함하는 별도의 겔은 연속적으로 또는 함께 적용될 수 있거나, 또는 하나의 겔은 양자 세포 유형을 포함할 수 있지만, 이것은 일반적으로 덜 바람직하다.

[0131] 본 발명의 하이드로겔/나노구조 조성물은, 예를 들면 콜라겐을 유용하게 포함할 수 있다. 이 형태에서 콜라겐은 유용한 구조적 기능을 제공하지는 않지만, 이것은 주로 단백질 분해 활성이 바람직하지 않게 높은 희생 단백질로서 작용하여 이로써, 예를 들면 건강한 조직의 쇠약화를 방지하는데 도움이 된다.

[0132] 하이드로겔/나노구조 조성물은 또한 특정 효소를 포함할 수 있다. 효소는 급성 및 만성 상처 모두의 죽은 조직 제거술에 사용된다. 죽은 조직 제거술은 상처로부터 생존할 수 없는 조직과 외래물질의 제거이며 상처-치유 과정에서 자연 발생 현상이다. 염증성 상태 동안, 중성구 및 대식세포는 상처 부위에서 "사용된" 혈소판, 세포 잔해, 및 무혈관 손상된 조직을 소화시키고 제거한다. 그러나 상당한 양의 손상된 조직의 축적으로, 이 자연적 과정이 압도되고 불충분해진다. 괴저성 조직의 축적은 그런 다음 상처에 상당한 식세포를 요구하고 상처 치유를 지연한다. 결과적으로, 괴저성 조직의 죽은 조직 제거술은 국소 요법의 특별한 목적이며 최적의 상처 관리의 중요한 요소이다.

[0133] 예를 들면, 죽은 조직 제거술의 선택적 방법을 제공하기 위한 국소 도포를 위해 효소가 본 발명의 하이드로겔 안으로 편입될 수 있다. 적합한 효소는 다양한 공급원, 예컨대 크릴, 크랩, 파파야, 소 추출물, 및 박테리아로부터 유래될 수 있다 상업적으로 입수가능한, 적합한 효소는 콜라겐분해효소, 파파인/우레아, 및 피브리놀라이신과 테옥시리보뉴클레아제 조합을 포함한다.

[0134] 본 발명에서 사용하기 위한 효소는 일반적으로 두 가지 방식 중 하나로 작용한다: 죽은 조직 (예를 들면, 피브린, 박테리아, 백혈구, 세포 잔해, 장액 삼출물, DNA)의 성분을 직접 소화시킴에 의함; 또는 무혈관 조직을 근원적인 상처 층에 고정시키는 콜라겐 "앵커"를 용해함에 의함.

[0135] 본 발명의 하이드로겔은, 요망하는 경우, 일반적으로 항미생물 효과 및 악취 조절을 발휘하는 Dakin 용액을 포함할 수 있다. 죽은 조직 제거 제제로서, Dakin 용액은 그것의 세포독성 특성 때문에 비-선택적이다. Dakin 용액은 단백질을 변성시켜 상처에서 쉽게 제거되도록 한다. 죽은 조직의 완화는 또한 다른 방법에 의한 죽은 조직 제거술을 용이하게 한다. Dakin 용액을 포함하는 하이드로겔은 목표가 죽은 조직 제거술이면 매일 2회로 변화될 수 있다. Periound 피부 보호는 일반적으로, 예를 들면 연고, 액체 피부 장벽 막 드레싱, 또는 고형 피부 장벽 웨이퍼와 함께 제공되어야 한다.

- [0136] 본 발명의 겔은 주사기나 벨로우즈 팩 (단일 용량 전달 시스템) 또는 다회용량 시스템, 예컨대 가압 전달 시스템을 통해 또는 "캔 안의 팩" 유형 시스템 (예컨대 W098/32675에 공개된 것)을 통한 전달과 같은 임의의 적합한 방법에 의해 전달될 수 있다. 벨로우즈 팩의 예는 공개된 영국 디자인 번호 2082665에 도시되어 있다.
- [0137] 이와 같이, 본 발명은 또한 상처의 치료를 위한 본 발명에 따른 겔을 포함하는 단일 용량 전달 시스템으로 확장된다. 본 발명은 또한, 압력의 해제에 의해 이들로부터 분무를 형성할 수 있는 에어로졸 용기 내에, 본 발명에 따른 겔 및 본원 발명에 따른 가압된 하이드로겔을 포함하는 가압된 전달 시스템으로 확장된다. 이러한 전달 수단의 사용은 환자가 누워있을 때 환자의 등과 같이 직접적인 적용에 의해 도달하기 어려운 환자의 영역으로 겔이 전달될 수 있게 한다.
- [0138] 특정 구현예에서, 본 발명의 하이드로겔 조성물을 생물의학적 전극 및 다른 전기 요법 상황에서 사용하기 위해, 즉 전극 또는 다른 전기 전도성 부재를 체표면에 부착시키기 위해 전기 도전성을 부여하는 것이 유리할 수 있다. 예를 들면, 본 하이드로겔 조성물은 경피 신경 자극 전극, 전기외과적 복귀 전극 또는 EKG 전극을 환자의 피부 또는 점막 조직에 부착하는데 사용될 수 있다. 이들 적용은 전도성 종을 함유하도록 본 하이드로겔 조성물의 변형을 포함한다. 적합한 전도성 종은 이온 전도성 전해질, 특히 피부 또는 다른 체표면에 적용하기 위해 사용된 전도성 접착제의 제조에 정상적으로 사용된 것들이고, 이온화가능 무기 염, 유기 화합물, 또는 양자의 조합을 포함한다. 이온 전도성 전해질의 예는, 비제한적으로, 황산암모늄, 암모늄 아세테이트, 모노에탄올아민 아세테이트, 디에탄올아민 아세테이트, 나트륨 락테이트, 나트륨 시트레이트, 마그네슘 아세테이트, 황산마그네슘, 아세트산나트륨, 염화칼슘, 마그네슘 염화물, 황산칼슘, 리튬 염화물, 리튬 퍼클로레이트, 나트륨 시트레이트 및 칼륨 염화물, 및 산화환원 쌍 예컨대 제이철 및 제일철 염 예컨대 셀레이트 및 글루코네이트의 혼합물. 바람직한 염은 칼륨 염화물, 염화나트륨, 황산마그네슘, 및 마그네슘 아세테이트이고, 그리고 칼륨 염화물이 EKG 적용에 가장 바람직하다. 비록 사실상 임의의 양의 전해질이 본 발명의 접착제 조성물에 존재할 수 있지만, 바람직하게는, 존재하는 임의의 전해질은 본 하이드로겔 조성물 중 약 0.1 내지 약 15 wt. %의 범위인 농도로 된다. 생물의학 전극을 제작하는 것에 대한 Nielsen 등의 미국 특허 번호 5,846,558에 기재된 절차가 본 발명의 하이드로겔 조성물과 함께 사용하기에 적합할 수 있고, 그 특허의 개시내용은 제조 세부사항과 관련하여 참조로 편입된다. 당해 분야의 숙련가에 의해 인정되는 바와 같이, 다른 적합한 제작 절차가 또한 사용될 수 있다.
- [0139] **가교결합**
- [0140] 특정 적용의 경우, 특히 높은 응집성 강도가 요망될 때, 본 발명의 겔/하이드로겔의 폴리머는 공유적으로 가교결합될 수 있다. 본 개시내용은 겔/하이드로겔 성분의 폴리머 사이에서 가교결합이 요망될 수 있을 뿐만 아니라 본 발명의 복합 재료의 겔/하이드로겔의 폴리머와 나노구조 성분 사이에서 가교결합이 요망될 수 있다는 것을 고려한다. 본 발명은 폴리머를 서로 가교결합시키고 본 발명의 나노구조 성분과 겔/하이드로겔의 폴리머를 가교결합시키기 위한 임의의 적당한 수단을 고려한다. 겔/하이드로겔 폴리머는 다른 폴리머 또는 나노구조에, 분자 내로 또는 분자간으로 또는 공유결합을 통해 공유적으로 가교결합될 수 있다. 전자의 경우에, 폴리머를 서로 또는 나노구조에 연결하는 공유결합은 없는 반면, 후자의 경우에는, 폴리머를 서로 또는 나노구조에 연결하는 공유 가교결합이 있다. 가교결합은 열, 방사선 또는 화학적 경화 (가교결합) 체제를 사용하는 것을 포함하여, 임의의 적당한 수단을 사용하여 형성될 수 있다. 가교결합의 정도는 압축하에 저온 유동을 제거하거나 또는 적어도 최소화하기에 충분해야 한다. 가교결합은 또한 가교결합하는 공정에서 이용된 "가교결합제"인 제3 분자의 사용을 포함한다.
- [0141] 열적 가교결합을 위해, 자유 라디칼 중합 개시제가 사용되고, 그리고 비닐 중합에서 통상적으로 사용된 임의의 공지된 자유 라디칼-발생 개시제일 수 있다. 바람직한 개시제는 유기 퍼옥사이드 및 아조 화합물이고, 일반적으로 중합성 물질의 약 0.01 wt. % 내지 15 wt. %, 바람직하게는 0.05 wt. % 내지 10 wt. %, 더 바람직하게는 약 0.1 wt. % 내지 약 5% 및 가장 바람직하게는 약 0.5 wt. % 내지 약 4 wt. %의 양으로 사용된다. 적합한 유기 퍼옥사이드는 디알킬 퍼옥사이드 예컨대 t-부틸 과산화물 및 2,2비스(t-부틸퍼옥시)프로판, 디알릴 퍼옥사이드 예컨대 벤조일 과산화물 및 아세틸 과산화물, 페에스테르 예컨대 t-부틸 퍼벤조에이트 및 t-부틸 퍼-2-에틸헥사노에이트, 페디카보네이트 예컨대 디세틸 퍼옥시 디카보네이트 및 디사이클로헥실 퍼옥시 디카보네이트, 케톤 퍼옥사이드 예컨대 사이클로헥산온 과산화물 및 메틸에틸케톤 과산화물, 및 하이드로퍼옥사이드 예컨대 큐멘 하이드로퍼옥사이드 및 tert-부틸 하이드로퍼옥사이드를 포함한다. 적합한 아조 화합물은 아조 비스 (이소부티로니트릴) 및 아조 비스 (2,4-디메틸발레로니트릴)을 포함한다. 열적으로 가교결합하기 위한 온도는 실제 성분 의존할 것이고 당해 분야의 숙련가에 의해 쉽게 추론될 수 있지만, 전형적으로 약 80 C. 내지 약 200 C.의 범위에

다.

[0142] 가교결합은 또한, 전형적으로 광개시제의 존재에서 방사선으로 달성될 수 있다. 방사선은 자외선, 알파, 베타, 감마, 전자 빔, 및 x-선 방사선이지만, 자외선 방사선이 바람직하다. 유용한 광감작제는 "수소 추출" 유형의 삼중항 감작제이고, 그리고 벤조페논 및 치환된 벤조페논 및 아세토페논 예컨대 벤질 디메틸 케탈, 4-아크릴옥시 벤조페논 (ABP), 1-하이드록시-사이클로헥실 페닐 케톤, 2,2-디에톡시아세토페논 및 2,2-디메톡시-2-페닐아세토-페논, 치환된 알파-케톨류 예컨대 2-메틸-2-하이드록시프로피오페논, 벤조인 에테르 예컨대 벤조인 메틸 에테르 및 벤조인 이소프로필 에테르, 치환된 벤조인 에테르 예컨대 아니소인 메틸 에테르, 방향족 설포닐 염화물 예컨대 2-나프탈렌 설포닐 염화물, 광활성 옥심 예컨대 1-페닐-1,2-프로판디온-2-(0-에톡시-카보닐)-옥심, 알킬- 및 할로젠-치환된 티옥산톤스를 포함한 티옥산톤 예컨대 2-이소프로필티옥산톤, 2-클로로티옥산톤, 2,4 디메틸 티옥사논, 2,4 디클로로티옥사논, 및 2,4-디에틸 티옥사논, 및 아실 포스핀 옥사이드를 포함한다. 200 내지 800 nm, 바람직하게는, 200 내지 500 nm의 파장으로 갖는 방사선이 본 명세서에서의 사용에 대해 바람직하고, 낮은 강도 자외선 빛은 대개의 경우 가교결합을 유도하기에 충분하다. 그러나, 수소 추출 유형의 광감작제로는, 충분한 가교결합을 달성하기 위해 더 높은 강도 UV 노출이 필요할 수 있다. 그와 같은 노출은 수은 램프 프로세서 예컨대 PPG, Fusion, Xenon, 및 다른 것으로부터 이용가능한 것에 의해 제공될 수 있다. 가교결합은 또한 감마 방사선 또는 전자 빔으로 조사함에 의해 유도될 수 있다. 적절한 조사 파라미터, 즉, 가교결합을 효과하게 하기 위해 사용된 방사선의 유형 및 용량은 당해 분야의 숙련자에게 분명할 것이다.

[0143] 적합한 화학적 경화제로, 또한 일명 화학적 가교결합하는 "프로모터"는, 비제한적으로, 폴리메르캅탄 예컨대 2,2-디머캅토 디에틸에테르, 디펜타에리트리톨 헥사(3-머캅토프로피오네이트), 에틸렌 비스(3-머캅토아세테이트), 펜타에리트리톨 테트라(3-머캅토프로피오네이트), 펜타에리트리톨 테트라티오글라이콜레이트, 폴리에틸렌 글리콜 디머캅토아세테이트, 폴리에틸렌 글리콜 디(3-머캅토프로피오네이트), 트리메틸올 에탄 트리(3-머캅토프로피오네이트), 트리메틸올에탄 트리티오글라이콜레이트, 트리메틸올프로판 트리(3-머캅토프로피오네이트), 트리메틸올프로판 트리티오글라이콜레이트, 디티오에탄, 디- 또는 트리티오프로판 및 1,6-헥산 디티올을 포함한다. 가교결합하는 프로모터는 비가교결합된 친수성 폴리머에 첨가되어 이들의 공유 가교결합을 증진하거나, 또는 비가교결합된 친수성 폴리머와 상보적 올리고머의 블렌드에 첨가되어 2개 성분 사이의 가교결합을 제공한다.

[0144] 본 폴리머 및/또는 나노구조는 또한 상보적 올리고머와 혼합물에 앞서 가교결합될 수 있다. 그와 같은 경우에, 다작용성 코모노머와 폴리머에 대한 모노머성 전구체를 혼합하고 공중합함에 의해 폴리머를 가교결합된 형태로 합성하는 것이 바람직할 수 있다. 모노머성 전구체 및 대응하는 폴리머 생성물의 예는 아래와 같다: 폴리(N-비닐 아미드) 생성물에 대한 N-비닐 아미드 전구체; 폴리(N-알킬아크릴아미드) 생성물에 대한 N-알킬아크릴아미드; 폴리아크릴산 생성물에 대한 아크릴산; 폴리메타크릴산 생성물에 대한 메타크릴산; 폴리(아크릴로니트릴) 생성물에 대한 아크릴로니트릴; 및 폴리(비닐피롤리돈) (PVP) 생성물에 대한 N-비닐 피롤리돈 (NVP). 중합은 벌크, 현탁액, 용액, 또는 에멀전에서 수행될 수 있다. 용액 중합이 바람직하고, 극성 유기 용매 예컨대 아세트산에틸 및 저급 알칸올 (예를 들면, 에탄올, 이소프로필 알코올, 등)이 특히 바람직하다. 친수성 비닐 폴리머의 제조를 위해, 합성은 상기에 기재된 바와 같은 자유 라디칼 개시제의 존재에서 자유 라디칼 중합 방법을 통하여 전형적으로 일어날 것이다. 다작용성 코모노머는, 예를 들면, 비스아크릴아미드, 디올 예컨대 부탄디올 및 헥산디올의 아크릴 또는 메타크릴 에스테르 (1,6-헥산 디올 디아크릴레이트가 바람직함), 다른 아크릴레이트 예컨대 펜타에리트리톨 테트라아크릴레이트, 및 1,2-에틸렌 글리콜 디아크릴레이트, 및 1,12-도데칸디올 디아크릴레이트를 포함한다. 다른 유용한 다작용성 가교결합하는 모노머는 올리고머성 및 폴리머 다작용성 (메트)아크릴레이트, 예를 들면, 폴리(에틸렌 옥사이드) 디아크릴레이트 또는 폴리(에틸렌 옥사이드) 디메타크릴레이트; 폴리비닐성 가교결합제 예컨대 치환된 및 비치환된 디비닐벤젠; 및 이중작용성 우레탄 아크릴레이트 예컨대 EBECRYL 270 및 EBECRYL 230 (각각, 1500 중량 평균 분자량 및 5000 중량 평균 분자량의 아크릴화된 우레탄으로 -- 양자는 조지아주 서머나 소재의 UCB로부터 이용가능함), 및 이들의 조합을 포함한다. 만일 화학적 가교결합제가 이용되는 경우, 사용된 양은 바람직하게는 가교결합제 대 친수성 폴리머의 중량 비가 약 1:100 내지 1:5의 범위로 되도록 될 것이다. 더 높은 가교 밀도를 달성하기 위해, 요망하는 경우, 화학적 가교결합은 방사선 경화와 조합된다.

[0145] **나노구조**

[0146] 본 발명의 나노구조 성분은 섬유, 필라멘트, 메쉬 부분, 분지형 필라멘트 또는 망상조직, 시트, 또는 형상화된 입자를 포함한 임의의 적합한 형태로 될 수 있다. 본 나노구조는 또한 본 발명의 나노구조와 하이드로겔의 폴리머 사이의 공유 또는 비공유 가교결합을 용이하게 하기 위한 임의의 적합한 화학적 작용기를 포함할 수 있다.

나노구조를 제작하고 기능화하기 위한 방법, 기술, 및 물질은 당해 분야에서 잘 알려져 있다.

- [0147] 특정 구현예에서, 본 발명의 나노구조를 제조하기 위하여 미세제작 방법이 사용된다. 다양한 구현예에서, 개시된 디바이스는 임의의 적합한 미세제작 기술을 사용하여 조립 및/또는 제조될 수 있다. 그와 같은 방법 및 기술은 당해 분야에 널리 공지되어 있다.
- [0148] 본 명세서에 개시된 나노구조를 제조하는데 사용될 수 있는 미세제작 공정은 리소그래피; 에칭 기술, 예컨대 레이저, 플라즈마 에칭, 포토리소그래피, 또는 화학적 에칭 예컨대 습성 화학적, 건조, 및 포토레지스트 제거; 또는 3차원 인쇄 (3DP), 스테레오리소그래피 (SLA), 선택적 레이저 소결 (SLS), 탄도 입자 제작 (BPM) 및 융합 침착 모델링 (FDM)을 포함한 고체 유리 형태 기술에 의하는 것; 미세가공에 의하는 것; 실리콘의 열적 산화; 전기도금 및 무전해 도금; 확산 공정, 예컨대 붕소, 인, 비소, 및 안티몬 확산; 이온 주입; 필름 증착, 예컨대 증발 (필라멘트, 전자 빔, 플래시, 및 투영법과 단차 피복성), 스퍼터링, 화학적 기상 증착 (CVD), 에피택시 (증기상, 액상, 및 분자 빔), 전기도금, 스크린 인쇄, 적층 또는 이들의 조합에 의한 것을 포함한다. 문헌 [Jaeger, Introduction to Microelectronic Fabrication (Addison-Wesley Publishing Co., Reading Mass. 1988)]; 문헌 [Runyan, et al., Semiconductor Integrated Circuit Processing Technology (Addison-Wesley Publishing Co., Reading Mass. 1990)]; 문헌 [Proceedings of the IEEE Micro Electro Mechanical Systems Conference 1987-1998]; 문헌 [Rai-Choudhury, ed., Handbook of Microlithography, Micromachining & Microfabrication (SPIE Optical Engineering Press, Bellingham, Wash. 1997)] 참조. 주형으로서 사용되는 물질의 선택은 표면이 어떻게 분지 구조를 형성하도록 구성되어 지는가를 결정한다.
- [0149] 예를 들면, 포토리소그래픽 공정과 반도체 산업으로부터 유래된 방법을 이용한 마이크로 전자 기계적 시스템 (MEMS)의 제작을 위한 최첨단 공정이 사용될 수 있다. 더욱 최근에 개발된 방법은 "소프트 리소그래피" (문헌 [Whitesides et al, Angew chem. Int ed, 37; 550-575, (1998)]) 및 미세유체 텍토닉 (Beebe 등의 미국 특허 번호 6,488,872, 문헌 [Nature; 404:588-59 (2000)])를 포함한다. 폴리머 마이크로디바이스 제작의 검토 및 다른 논의는 문헌 [Madou, M. J. Fundamentals of Microfabrication: The Science of Miniaturization; 2nd ed.; CRC Press: Boca Raton, 1997]; 문헌 [Becker, H., and Locascio, L. E. "Polymer microfluidic devices." Talanta, 56(2):267-287, 2002]; 문헌 [Quake, S. R., and Scherer, A. "From micro- to nanofabrication with soft materials." Science, 290(5496):1536-1540, 2000]; 및 문헌 [Whitesides, G. M., and Stroock, A. D. "Flexible methods for microfluidics." Physics Today, 54(6):42-48, 2001]을 포함하고, 이들 각각은 본 명세서에 참고로 편입된다.
- [0150] 본 발명의 나노구조는 또한 정전기 방사 (또한 일명 전기방사)에 의해 제작될 수 있다. 섬유를 형성할 수 있는 액체 및/또는 용액의 전기방사의 기술은 잘 알려져 있고, 수많은 특허, 예컨대, 예를 들면, 미국 특허 번호 4,043,331 및 5,522,879에 기재되어 있다. 전기방사의 공정은 일반적으로 전기장으로 액체의 도입을 포함하고, 그래서 액체는 섬유를 생산하도록 야기된다. 이들 섬유는 일반적으로 수집을 위한 끌리는 전기 전위에서 권덕터로 연신된다. 액체를 섬유로 전환하는 동안, 섬유는 경화 및/또는 건조된다. 이 경화 및/또는 건조하는 단계는 액체의 냉각에 의해, 즉 액체가 실온에서 정상적으로 고체인 곳에서; 예를 들면 탈수 (물리적으로 유도된 경화)에 의한 용매의 증발로; 또는 경화 기전 (화학적으로 유도된 경화)에 의해 야기될 수 있다.
- [0151] 정전기 방사의 공정은 전형적으로, 예를 들면, 미국 특허 번호 4,043,331에서 개시된 바와 같이 매트 또는 다른 부직포 물질을 생성하기 위한 섬유의 사용에 대한 것이다. 직경이 50 nm 내지 5 마이크로미터의 범위인 나노섬유는 부직포 또는 정렬된 나노섬유 메쉬로 전기방사될 수 있다. 작은 섬유 직경에 기인하여, 전기방사된 직물은 본질적으로 매우 높은 표면적과 작은 공극 크기를 가지고 있다. 이들 특성은 전기방사 직물을 막, 조직 스캐폴딩, 및 다른 생물의학적 적용을 포함하는 수많은 적용에 대한 잠재적인 후보로 만든다.
- [0152] 정전기적으로 방사된 섬유는 매우 얇은 직경을 갖도록 생산될 수 있다. 전기방사 섬유의 직경, 일관성 및 균일성에 영향을 미치는 파라미터는 섬유-형성 조합에서의 폴리머성 물질 및 가교결합제 농도 (장입), 인가된 전압 및 바늘 수집기 거리를 포함한다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 나노섬유는 약 1nm 내지 약 100 μ m 범위인 직경을 갖는다. 다른 구현예에서, 나노섬유는 약 1nm 내지 약 1000nm 범위인 직경을 갖는다. 또한, 나노섬유는 적어도 약 10 내지 적어도 약 100의 범위인 중형비를 가질 수 있다. 섬유의 매우 작은 직경 때문에, 섬유는 단위 질량당 높은 표면적을 가진다. 질량비에 대한 이 높은 표면적은 섬유-형성 용액 또는 액체가 액체 또는 용매화된 섬유-형성 물질로부터 고체 나노섬유로 몇 초 이내에 전환되도록 허용한다.
- [0153] 본 발명의 나노섬유/나노구조를 형성하는데 사용된 폴리머성 물질은 가교결합제와 양립가능한 임의의 섬유 형성 물질로부터 선택될 수 있다. 의도된 적용에 따라, 섬유-형성 폴리머성 물질은 친수성, 소수성 또는 양친매성일

수 있다. 추가로, 섬유-형성 폴리머성 물질은 열적으로 반응성 폴리머성 물질일 수 있다

- [0154] 합성 또는 천연, 생분해성 또는 비-생분해성 폴리머가 본 발명의 나노섬유/나노구조를 형성할 수 있다. "합성 폴리머"는 합성으로 제조되고 비-자연 발생 모노머성 단위를 포함하는 폴리머를 지칭한다. 예를 들면, 합성 폴리머는 비-천연 모노머성 단위 예컨대 아크릴레이트 또는 아크릴아미드 단위를 포함할 수 있다. 합성 폴리머는 전형적으로 전통적 중합 반응, 예컨대 첨가, 축합, 또는 자유 라디칼 중합에 의해 형성된다. 합성 폴리머는 또한 비-천연 모노머성 단위 (예를 들면 합성 펩타이드, 뉴클레오타이드, 및 당류 유도체)와 조합하여 천연 모노머성 단위, 예컨대 자연 발생 펩타이드, 뉴클레오타이드, 및 당류 모노머성 단위를 갖는 것들을 포함할 수 있다. 이들 유형의 합성 폴리머는 표준 합성 기술에 의해, 예컨대 고상 합성에 의해, 또는 허용되는 경우 재조합으로 생산될 수 있다.
- [0155] "천연 폴리머"는 자연적으로, 재조합으로, 또는 합성으로 제조되고 그리고 폴리머 골격 내에 자연적으로 발생한 모노머성 단위로 구성되는 폴리머를 지칭한다. 일부 경우에, 천연 폴리머는 변형, 가공, 유도, 또는 그렇지 않으면 처리되어 천연 폴리머의 화학적 및/또는 물리적 특성을 변화시킬 수 있다. 이들 사례에서, 용어 "천연 폴리머"는 천연 폴리머에 대한 변화 (예를 들면, "유도된 천연 폴리머" 또는 "탈글리코실레이트화된 천연 폴리머")를 반영하도록 변형될 것이다.
- [0156] 나노섬유 물질은, 예를 들면, 첨가 폴리머 및 축합 폴리머 모두 재료 예컨대 폴리올레핀, 폴리아세탈, 폴리아미드, 폴리에스테르, 셀룰로오스 에테르 및 에스테르, 폴리알킬렌 설파이드, 폴리아릴렌 옥사이드, 폴리설폰, 변형된 폴리설폰 폴리머 및 이들의 혼합물을 포함할 수 있다. 이들 일반적인 부류 내의 예시적인 물질은 폴리에틸렌, 폴리(.엡실론.-카프로락톤), 폴리(락테이트), 폴리(글라이콜레이트), 폴리프로필렌, 폴리(비닐염화물), 폴리메틸메타크릴레이트 (및 다른 아크릴 수지), 폴리스티렌, 및 그것의 코폴리머 (ABA 유형 블록 코폴리머를 포함함), 폴리(비닐리덴 플루오라이드), 폴리(비닐리덴 염화물), 폴리비닐 알코올을 가교결합된 및 비-가교결합된 형태에서 다양한 정도의 가수분해 (87% 내지 99.5%)로 포함한다. 예시적인 첨가 폴리머는 유리질인 경향이 있다 (실온보다 더 큰 Tg). 이것은 폴리비닐염화물과 폴리메틸메타크릴레이트, 폴리스티렌 폴리머 조성물, 또는 폴리비닐리덴 플루오라이드와 폴리비닐 알코올 물질에 대한 혼합물이나 결정도가 낮은 경우이다.
- [0157] 본 발명의 일부 구현예에서 나노섬유/나노구조 물질은 폴리아미드 농축 폴리머이다. 더 많은 특정 구현예에서, 폴리아미드 농축 폴리머는 나일론 폴리머이다. 용어 "나일론"은 모든 장쇄 합성 폴리아미드에 대한 속명이다. 또 다른 나일론은 소량의 물의 존재에서 엡실론 카프로락탐의 중축합에 의해 제조될 수 있다. 이 반응은 선형 폴리아미드인 나일론-6 (환형 락탐으로부터 제조됨--엡실론-아미노카프로산으로도 공지됨)을 형성한다. 추가로, 나일론 코폴리머가 또한 고려된다. 코폴리머는 다양한 디아민 화합물, 다양한 이산 화합물 및 다양한 환형 락탐 구조를 반응 혼합물에 배합시키고 그 다음 무작위로 배치된 모노머성 물질로 폴리아미드 구조로 나일론을 형성함에 의해 제조될 수 있다. 예를 들면, 나일론 6,6-6,10 물질은 헥사메틸렌 디아민과 이산의 C6 및 C10 블렌드로부터 제조된 나일론이다. 나일론 6-6,6-6,10은 엡실론 아미노카프로산, 헥사메틸렌 디아민 및 C6과 C10 이산 물질의 블렌드의 공중합에 의해 제조된 나일론이다.
- [0158] 블록 코폴리머가 또한 나노섬유 물질로서 사용될 수 있다. 나노섬유의 제조를 위한 조성물을 준비함에 있어서, 용매계는 양자 블록이 용매에서 가용성이 되도록 선택될 수 있다. 하나의 예는 메틸렌 염화물 용매 내의 ABA (스티렌-EP-스티렌) 또는 AB (스티렌-EP) 폴리머이다. 이러한 블록 코폴리머의 예는 스티렌/부타디엔 및 스티렌/수소화된 부타디엔(에틸렌 프로필렌)을 포함한 AB 및 ABA 블록 폴리머의 Kraton-유형, 엡실론-카프로락탐/에틸렌 옥사이드의 Pebax-유형 및 폴리에스테르/에틸렌 옥사이드와 에틸렌 옥사이드 및 이소시아네이트의 폴리우레탄의 Sympatex-유형이다.
- [0159] 첨가 폴리머 예컨대 폴리비닐리덴 플루오라이드, 신디오택틱 폴리스티렌, 비닐리덴 플루오라이드와 헥사플루오로프로필렌의 코폴리머, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 아세테이트, 비정질 첨가 폴리머, 예컨대 폴리(아크릴로니트릴) 및 아크릴산 및 메타크릴레이트와 그것의 코폴리머, 폴리스티렌, 폴리(염화비닐) 및 그것의 다양한 코폴리머, 폴리(메틸 메타크릴레이트) 및 그것의 다양한 코폴리머는 이들이 낮은 압력 및 온도에서 가용성이기 때문에 상대적으로 쉽게 용액 회전될 수 있다. 폴리에틸렌 및 폴리프로필렌과 같은 고도로 결정성 폴리머는 이들이 용액 회전되는 경우 일반적으로 더 높은 온도 및 고압 용매를 필요로 한다.
- [0160] 나노섬유는 또한 2종 이상의 폴리머성 물질을 포함하는 폴리머 조성물로부터 폴리머 혼합물, 합금 포맷으로, 또는 가교결합된 화학적으로 결합된 구조로 형성될 수 있다. 2개의 관련된 폴리머 재료는 나노섬유에 유익한 특성을 제공하도록 블렌딩될 수 있다. 예를 들면, 고분자량 폴리비닐염화물은 저분자량 폴리비닐염화물과 블렌딩될 수 있다. 유사하게, 고분자량 나일론 물질은 저분자량 나일론 물질과 블렌딩될 수 있다. 또한, 상이한 종의 일

반적인 폴리머 속이 블렌딩될 수 있다. 예를 들면, 고분자량 스티렌 물질은 저분자량, 고충격 폴리스티렌과 블렌딩될 수 있다. 나일론-6 물질은 나일론 코폴리머 예컨대 나일론-6; 6,6; 6,10 코폴리머와 블렌딩될 수 있다. 또한, 낮은 정도의 가수분해를 갖는 폴리비닐 알코올 예컨대 87% 가수분해된 폴리비닐 알코올은 98 내지 99.9% 이상 사이의 가수분해 정도를 갖는 완전히 또는 초 가수분해된 폴리비닐 알코올과 블렌딩될 수 있다. 혼합물 내 이들 물질의 전부는 적절한 가교결합하는 기전을 사용하여 가교결합될 수 있다. 나일론은 아미드 연결 내 질소 원자와 반응성인 가교결합제를 사용하여 가교결합될 수 있다. 폴리비닐 알코올 물질은 하이드록실 반응성 물질 예컨대 모노알데하이드, 예컨대 포름알데하이드, 우레아, 멜라민-포름알데하이드 수지 및 그것의 유사체, 붕산, 및 다른 무기 화합물, 디알데하이드, 이산, 우레탄, 에폭시, 및 다른 공지된 가교결합제를 사용하여 가교결합될 수 있다. 가교결합 시약은 폴리머 사슬 사이에서 반응하고 공유결합을 형성하여 분자량, 내약품성, 전체 강도 및 기계적 열화에 대한 내성을 실질적으로 개선한다.

[0161] 생분해성 폴리머는 또한 본 발명의 나노구조의 제조에 사용될 수 있다. 생분해성 물질로서 연구되어 진 합성 폴리머 부류의 예는 폴리에스테르, 폴리아미드, 폴리우레탄, 폴리오르토에스테르, 폴리카프로락톤 (PCL), 폴리이미노카보네이트, 지방족 카보네이트, 폴리포스파젠, 폴리무수물, 및 그것의 코폴리머를 포함한다. 예를 들면, 이식가능 의료 기기와 연계하여 사용될 수 있는 생분해성 물질의 구체적인 예는 폴리락타이드, 폴리글라이콜라이드, 폴리디옥사논, 폴리(락타이드-코-글라이콜라이드), 폴리(글라이콜라이드-코-폴리디옥사논), 폴리무수물, 폴리(글라이콜라이드-코-트리메틸렌 카보네이트), 및 폴리(글라이콜라이드-코-카프로락톤)을 포함한다. 다른 생분해성 폴리머와 이들 폴리머의 블렌드가 또한 사용될 수 있다.

[0162] 일부 구현예에서, 나노섬유는 비-생분해성 폴리머이다. 비-생분해성은 일반적으로 비-효소적으로, 가수분해적으로 또는 효소적으로 분해될 수 없는 폴리머를 지칭한다. 예를 들면, 비-생분해성 폴리머는 프로테아제에 의해 야기될 수 있는 열화에 대해 저항성이다. 비-생분해성 폴리머는 천연 또는 합성 폴리머를 포함할 수 있다.

[0163] 나노섬유를 형성하는 조성물 내에 가교결합제의 함입은 나노섬유가 광범위한 지지 표면과 양립가능하게 한다. 가교결합제는 단독으로 또는 다른 물질과 조합하여 사용되어 요망된 표면 특징을 제공할 수 있다.

[0164] 적합한 가교결합제는 방사선, 전기 또는 열 에너지와 같은 에너지원에 노출될 때 다른 물질과 공유결합을 형성할 수 있는 적어도 2종의 잠재적 반응성 활성화가능 기를 갖는 모노머성 (소분자 물질) 또는 폴리머성 물질을 포함한다. 일반적으로 잠재적 반응성 활성화가능 기는 인접한 화학 구조에 대해 얻어진 공유결합을 갖는 활성 종을 생성하도록 특정한 인가된 외부 에너지 또는 자극에 반응하는 화학적 독립체이다. 잠재적 반응성 기는 저장 조건 하에서 그것의 공유결합을 유지하지만 외부 에너지 공급원에 의한 활성화시 다른 분자와 공유결합을 형성하는 기이다. 일부 구현예에서, 잠재적 반응성 기는 자유 라디칼과 같은 활성 종을 형성한다. 이들 자유 라디칼은 외부로 인가된 전기, 전기화학 또는 열에너지의 흡수에 의한 케톤의 니트렌, 카빈 또는 여기 상태를 포함할 수 있다. 공지된 또는 상업적으로 입수가능한 잠재적 반응성 기의 다양한 예는 미국 특허 번호 4,973,493; 5,258,041; 5,563,056; 5,637,460; 또는 6,278,018에 보고되어 있다.

[0165] 예를 들면, Aldrich Chemicals, Produits Chimiques Auxiliaires et de Syntheses, (프랑스 롱쥬외 소재), Shin-Nakamura Chemical, Midori Chemicals Co., Ltd. or Panchim S. A. (프랑스)로부터 이용가능한 트리클로로메틸 트리아진에 기반한 상업적으로 입수가능한 다작용성 광가교결합제가 사용될 수 있다. 8개의 화합물은 2,4,6-트리스(트리클로로메틸)-1,3,5-트리아진, 2-(메틸)-4,6-비스(트리클로로메틸)-1,3,5-트리아진, 2-(4-메톡시나프틸)-4,6-비스(트리클로로메틸)-1,3,5-트리아진, 2-(4-에톡시나프틸)-4,6-비스(트리클로로메틸)-1,3,5-트리아진, 4-(4-카복실페닐)-2,6-비스(트리클로로메틸)-1,3,5-트리아진, 2-(4-메톡시페닐)-4,6-비스(트리클로로메틸)-1,3,5-트리아진, 2-(1-에텐-2'-퓨릴)-4,6-비스(트리클로로메틸)-1,3,5-트리아진 및 2-(4-메톡시스티릴)-4,6-비스(트리클로로메틸)-1,3,5-트리아진을 포함한다.

[0166] 사용 방법 및 예시적인 구현예

[0167] 본 발명의 겔/하이드로겔/나노구조 조성물은 유익하게는 수많은 조직 치유 상황에서뿐만 아니라 기타 적용, 예컨대 카테터와 다른 수술 도구 및 이식물에 대한 코팅물에 사용될 수 있다. 본 발명의 겔/하이드로겔/나노구조 조성물은 또한 본 명세서에서 기재된 활성제, 예컨대 항생제, 성장 인자, 및 면역억제성 제제를 전달하기 위해 사용될 수 있다.

[0168] 특정 구현예에서, 본 발명은 연조직 결함에 복합 재료를 적용하는 단계를 포함하는 연조직 결함을 치유하기 위한 방법을 제공하고, 여기서 상기 복합 재료는 겔 및 상기 겔 내에 배치된 나노구조를 포함한다.

[0169] 본 명세서에서 기재된 하이드로겔/나노구조 조성물의 유리한 특성은: 1) 용이한 특성규명 및 품질관리를 제공하

고; 2) 존재하는 조직 매트릭스와 융합되고; 3) 직접적으로 새로 형성된 매트릭스에 편입되고; 4) 직접적으로 세포 및 생체활성 인자를 포함하고; 5) 생체적합성을 유지하고; 6) 생체 재흡수를 제어하고; 7) 나노구조로 인한 더 큰 구조적 강성/경직성에 기인하여 복잡한 해부상의 형상으로 쉽게 주조되고; 그리고 8) 원상태 조직 예컨대 관절 연골의 기계적 특성을 나타내는 능력을 포함한다는 것이 인정될 것이다.

[0170] 하나의 적용에 있어서, 본 발명의 하이드로겔/나노구조 복합체 조성물은 연골 조직을 치유하기 위해 사용될 수 있다. 연골 치유를 위한 현재 생물학적으로-기초된 수술 과정은 자가조직 연골세포 이식, 드릴링, 마모 연골 성형술, 미세골절, 및 모자이크 관절성형술을 포함한다. 모든 이들 절차는 종종 골관절염 및 류마티스성 관절염에서 나타난 바와 같은 연골 삭박 관절 표면이 아닌, 단지 국소 관절 연골 손상만 치료한다. 또한, 그들은 연골 결함을 채우기 위해 환자로부터 수확된 연골 조직 플러그 또는 팽창된 연골세포를 사용한다. 이들 조직 또는 연골세포는 존재하는 연골 매트릭스와 통합되고 정상 연골의 생체 기계적 특성을 갖는, 새로 합성된 하이알린 연골과 같은 전적으로 새로운 물질을 합성함으로써 결함을 채울 것으로 기대된다. 그러나 이러한 절차 전부는 관절이 골관절염으로 되기 쉽다는 섬유연골 증후군에 대한 추가의 기계적 손상이 있는 진정한 하이알린 연골보다 회복 조직 (섬유연골)의 형성을 증진한다. 더욱이, 치유 물질로서 내인성 연골의 이용가능성은 환자에게 그 자체의 위험 및 이환율을 제시하는 그것의 취득으로 인해 상당히 제한적이다. 전술한 논의로부터 분명한 바와 같이, 본 명세서에서 개시된 수득한 하이드로겔/나노구조 조성물은 연골 퇴행성 질환을 앓고 있는 환자에서 유망한 신규한 치료법을 위한 실제적인 물질을 제시한다.

[0171] 본 명세서에서 기재된 바와 같이, 본 하이드로겔/나노구조 조성물은 임의의 수의 합성 조직 이식 또는 증강뿐만 아니라 다른 임상 적용에 적합한 광범위한 다양한 특성을 갖는 것으로 제조될 수 있다. 이미 기술된 바와 같이, 본 물질은 손상 또는 질환의 결과로서 생성된 연골 결손을 치료하는데 사용될 수 있다. 이렇게 치유될 수 있는 손상으로 인한 결함은 스포츠- 또는 사고-관련된 것일 수 있으며 표층 연골 층만 포함할 수 있거나 밑에 있는 연골 뼈를 포함할 수 있다. 본 명세서에 기재된 조성물을 사용하여 치유될 수 있는 질환으로 인한 결함은 골관절염 및 류마티스성 관절염으로부터 유래된 것들을 포함한다. 손상이나 질환에 무관하게 이러한 결함은 성숙한 또는 성장판 연골에 있을 수 있다. 합성 성장판 연골에 대한 하이드로겔에 대한 제형은 성장하는 동안 생체적합 물질의 제어된 생체 재흡수를 허용하기 위해 비치환된 스캐폴드 물질의 함입을 요구할 수 있다.

[0172] 본 명세서에서 기재된 하이드로겔/나노구조 조성물이 유용할 수 있는 또 다른 분야는 두경부의 연조직 뿐만 아니라 연골성의 치유, 재건 또는 증강이다. 연조직 증대 및 두경부 재건을 위한 생체적합물질의 이용가능성은 플라스틱 및 재건 수술 분야에서 근본적인 과제로 남아 있다. 적절한 생물학적 적합성과 수명을 갖는 물질이 개발을 위해 상당한 연구와 투자가 이루어졌다. 이 연구의 결과는 기대되지 않았다. 면역적격 동물에 넣을 때, 현재 제안된 물질의 구조적 완전성은 골격이 흡수되어 실패한 것으로 나타났다. 더욱이, 종래의 합성 물질은 탁월한 수명을 제공하지만, 특정 불가피한 함정을 제시한다. 예를 들면, 실리콘은 안전성과 장기간 면역 관련 효과의 우려로 가득 차 있었다. 합성 폴리머 PTFE (고어텍스)와 실라스틱은 적은 조직 반응성을 제공하지만 조직 융합을 제공하지 않으며 이물질 감염과 압출의 장기적인 위험을 나타낼 수 있다. 본원에 기재된 물질은 두경부의 연조직 결함의 증강 또는 치유를 위한 합성 연조직 스캐폴드 물질을 제조하는데 유용할 것이다. 특히, 비-염증성, 비-면역원성이고 그리고 적절한 정도의 점탄성을 갖는 것으로 제조될 수 있는 하이드로겔/나노구조 조성물 (본 명세서의 설명 참조)은 효과적인 이식가능 스캐폴드 물질로서 사용될 수 있다.

[0173] 또한, 본 하이드로겔/나노구조 조성물은, 예를 들면, 외상성 상해 또는 선천성 비정상에 이차적인 연골성 또는 골의 결함을 치유하기 위한 두경부의 재건 절차에서 빈번하게 사용되는 연골 이식물을 제조하기 위한 신규한 생체적합성 및 생체 순응성 물질로서 사용될 수 있다. 귀에 특이적인 적용은 외상성 상해, 신생물 (즉, 편평상피세포 암종, 기저 세포 암종, 및 흑색종), 및 선천성 결함 예컨대 미세증으로 인한 연골성 결함을 치유하기 위해 종종 착수되는 귀성형술 및 귀의 재건을 포함한다. 코에 특이적인 적용은 코 및 비강 격막의 성형 및 재건 절차를 포함한다. 배양기 증대, 틸, 실드 및 스프레더 이식은 미용 성형술에서 빈번하게 사용된다. 외상성 상해, 신생물, 자가면역 질환 예컨대 베게너 육아종증, 또는 선천성 결함에 따른 비강 재건은 연골을 치유해야 한다. 중격 천공은 관리하기가 어렵고 종종 치료에 실패한다. 자가조직 또는 공여체 연골은 종종 이용할 수 없기 때문에 연골 이식은 이들 적용에 이상적이다. 목에 특이적인 적용은 후두기관 재건을 포함하며, 소아에서는 일반적으로 이환율이 없지 않은 늑골 연골을 수확해야 한다. 귀 및 중격 연골은 종종 이 적용에 부적절하다. 본 명세서에 개시된 하이드로겔로부터 제조된 합성 연골성 물질은 시약 농도, 치환 및 가교결합 속도와 같은 하이드로겔 합성의 파라미터를 변경하는 것에 기초하여 전술한 각각의 적용에 적합하도록 합성될 수 있다. 후두기관 재건은 성대문밀 또는 기관 협착증으로 인한 기도 협착의 경우 일반적으로 수행된다. 병인은 외상성 (즉, 삼관 외상성 상해 또는 기관절제술)이거나 특발성일 수 있다. 다른 가능성은 턱과 뺨 증대를 포함하고, 그리고 수많은 두개

안면 적용에 부가하여 아래 눈꺼풀의 안검외반 치유에 사용한다. 이들 적용은 관절 연골의 정확한 기계적 특성을 갖는 연골을 필요로 하지 않을 수 있다는 것에 유의해야 한다. 세포 군집 또는 생체활성제의 함입이 또한 바람직할 수 있다.

[0174] 본 명세서에서 기재된 하이드로겔/나노구조 조성물은 외피로 덮기와 감염을 유발하는 비강 내 유체의 만성적 저류를 방지하기 위해, 정상적으로 지나치게 공격성 외과적 절제술 이후에 비강의 치유 및 협착에 사용될 수 있다. 또 다른 유망한 적용은 심혈관 수술과 같은 수술 과정 동안에 예를 들면 삽관에 기인한 후두기관 손상의 결과로서 소아와 성인 모두의 후두기관 재건이다. 본 명세서에 기재된 바와 같은 하이드로겔/나노구조 조성물은 암의 목 절제술에 따른 경동맥을 보호하기 위해 환상의 고리 대체물을 제공하기 위해 또한 사용될 수 있다 -- 본 발명의 조성물은 피부 장벽의 손실에 대한 경동맥에 대해 보호성 장벽으로서 경동맥과 피부 사이에 위치될 수 있다. 절제된 신경의 신경 재생산 동안의 보호성 코팅으로서 -- 종종 섬유질 조직은 신경의 재생산보다 빨리 형성되어 신경의 최종적인 형성을 방지한다. 본 발명의 사전-주조 튜브의 하이드로겔/나노구조 조성물 내에 신경 단부의 배치는 재생산 부위로부터 섬유질 조직 형성을 배제할 수 있다.

[0175] 본 발명의 하이드로겔/나노구조 조성물은 또한 임의의 내부 또는 외부 기관의 연조직 결함의 치유를 위해 사용될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 물질은 턱과 뺨의 증대를 위해 사용될 수 있고, 그리고 수많은 두개안면 적용에 부가하여 아래 눈꺼풀의 안검외반 치유에 사용한다. 두정부 이외의 부위에서의 미용 및 재건 목적을 위해, 예를 들면 유방 확대술을 위한 유방 보형물로서, 예를 들면 유방 또는 목에서 림프절 제거 후 (즉, 암으로 인한) 남은 공동을 채우고, 림프를 봉합하고 그리고 감염 및 다른 합병증으로 이어질 수 있는 절제 부위로 조절되지 않는 유체 배출을 완화시키기 위한 상처 밀봉제로서 사용한다.

[0176] 상기 사용에 부가하여, 본 명세서에서 기재된 하이드로겔/나노구조 조성물은 연골의 인공 형태의 합성을 위해 상기에 기재된 것과 유사한 전략 및 방법론을 사용하여, 비제한적으로, 뼈, 힘줄, 인대, 반월판 및 추간판을 포함하는 합성 정형외과 조직을 생산하기 위해 다른 조직 공학기술 적용에 사용될 수 있다. 본 하이드로겔/나노구조 조성물 또한 연골의 인공 형태의 합성을 위해 상기에 기재된 것과 유사한 전략 및 방법론을 사용하여 비제한적으로 성대, 유리체, 심장판막, 간, 췌장 및 신장을 포함하는 합성 비-정형외과 조직을 제조하는데 사용될 수 있다.

[0177] 본 명세서에 개시된 하이드로겔/나노구조 조성물이 사용될 수 있는 또 다른 분야는 복부 또는 위장 기관의 반흔 조직 또는 협착의 형성을 치료 또는 예방하는데 필요한 위장관 적용에 있다. 흉터 및/또는 협착 형성의 치료 및 예방에 유용하도록 설계되거나 의도된 것으로, 일반적으로 일명 "하이드로겔"인, 임상 및 FDA 승인의 다양한 단계에 있는 수많은 제품이 이미 있다. 본 발명의 물질은 본 명세서에서 개시된 것이 하이드로겔 물질에 지지, 형상 및 강도를 제공할 수 있는 나노구조를 포함할 수 있다는 점에서 다른 공지된 하이드로겔보다 우월하다. 본 명세서에 개시된 하이드로겔/나노구조 조성물은 이미 공지된 하이드로겔이 사용되거나 사용되도록 의도된 것과 유사한 용도로 사용될 수 있으며, 이는 하기를 포함한다: 위장관의 협착 또는 흉터의 치료용. 치료는 흉터 예방을 위해 예상되는 협착 부위에 또는 좁아진 GI 관을 확대하기 위해 치료 후 기존 협착 부위에 하이드로겔 물질을 주입하는 것을 포함하여 협착이 재발하는 것을 방지한다.

[0178] 본 발명의 물질은 또한 식도 협착의 치료를 위해 사용될 수 있다. 식도 협착은 위식도 역류 질환 (GERD)의 일반적인 합병증이다. GERD는 식도로 역류하고 식도 라이닝 세포를 손상시키는 산, 담즙 및 다른 해로운 위 내용물에 의해 야기된다. 대략 7-23%의 GERD 환자가 식도 협착, 또는 식도의 섬유질 흉터로 발전한다. 식도 흉터는 또한 바렛 식도를 치료하기 위해 사용되는 절제 요법에 의해 야기될 수 있다. 이러한 절제 요법의 주요 합병증은 절제 손상이 식도 벽으로 너무 깊게 확장되어 식도 반흔 또는 협착을 초래한다는 것이다. 식도 협착은 정상적인 삼키는 것을 방해하고 환자 이환율의 주요 원인이다. 본 명세서에서 기재된 물질은 GERD, 바렛 식도 및 식도 절제 요법으로 인한 식도 협착을 치료하거나 예방하기 위해 사용될 수 있다.

[0179] 본 발명의 복합 재료는 또한 크론병의 치료에 사용될 수 있다. 크론병은 장의 내장을 막거나 좁히는 협착이나 흉터를 유발하여 정상적인 장 기능을 방해한다. 본 물질은 이러한 협착을 치료하거나 예방하는데 유용할 수 있다.

[0180] 복합 재료는 또한 원발성 경화 담관염 (PSC)을 치료하기 위한 방법에 사용될 수 있다. PSC는 간 담관의 드문 질환이다. 담관은 간에서 분기하는 네트워크를 형성하고 간과 담즙의 담낭을 십이지장으로 배출시키는 총 담관으로 결합되는 2개의 주요 분지를 통해 간을 빠져나간다. 담관은 직경이 매우 좁아서 그것의 가장 큰 말단 부분에서 단지 최대 2mm까지만 측정할 수 있지만, 이들은 여전히 정상적으로 수 리터의 담즙을 간에서 십이지장으로 매일 배출해야 한다. 이들 덕트의 임의의 차단은, 많은 독소 그리고 특별히 해모글로빈 분해 생성물이 체내에

축적되게 하는 황달로 알려진 심각한 상태를 초래할 수 있다. PSC는 소장내 간을 연결하는 상지에서 기재된 간 외 담관에서 그리고 간 내의 담관의 흉터 또는 구조화 질환이다. PSC의 담관 협착은 본 하이드로겔/나노구조 조성물로 치료 또는 예방될 수 있다.

[0181] 본 발명의 복합 재료는 또한 만성 췌장염을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 만성 췌장염은 췌관의 흉터 또는 협착에 의해 복잡해질 수 있는 췌장의 만성 염증성 질환이다. 이들 협착은, 정상적으로 도관의 시스템 또는 배출 도관을 통해 소장 안으로 췌장을 빠져나가야 하는 췌장 액의 배출을 차단한다. 췌장 액은 많은 소화 효소와 정상적인 소화 및 영양소 흡수에 중요한 다른 요소를 함유한다. 만성 췌장염에 의한 췌관의 막힘 또는 협착은 췌장이 자가분해하고 생명을 위협하는 복부 감염 및 농양을 형성하는 종종 합병증을 초래할 수 있다. 만성 췌장염의 췌장 협착은 본 하이드로겔로 치료 또는 예방될 수 있다.

[0182] 현재 기재된 조성물은 또한 담석-유도 담관 및 췌관 협착의 치료에 사용될 수 있다. 담석은 매우 흔한 장애이며, 이것의 주요한 합병증은 담관 및 췌관 협착의 형성이며, 이것은 본 하이드로겔로 치료 또는 예방될 수 있다. 허혈성 장 질환의 치료용. 장은 그것의 혈액 공급이 손상될 때 흉터 또는 협착의 형성을 일으키기 쉽다. 손상된 혈류는 허혈로 지칭되며 심혈관 질환, 죽상경화증, 저혈압, 저혈당증, 신장 또는 간장병-유발 저알부민혈증, 혈관염, 약물 유도 질환 및 다수의 기타를 포함하는 많은 병리학에 의해 야기될 수 있다. 모든 이들 병인의 최종 결과는 장을 차단하고 그것의 정상 기능을 방해하는 장 협착을 초래할 수 있다. 본 하이드로겔/나노구조 복합체는 허혈성 장 협착을 치료 또는 예방하기 위해 사용될 수 있다.

[0183] 본 발명의 조성물은 또한 방사선-유도된 장 협착의 치료에 사용될 수 있다. 암에 대한 방사선 요법은 수많은 병적상태와 관련되며, 이들 중 중요한 것은 장 협착 형성이다. 본 하이드로겔 복합체는 방사선-유도된 장 협착을 치료 또는 예방하기 위해 사용될 수 있다.

[0184] 합성 조직을 제조하거나 또는 원상태 조직을 치유하는 것에 더하여, 본 명세서에 개시된 하이드로겔/나노구조 복합체는 또한 수술에 사용되는 비-생물학적 구조 또는 디바이스에 대해 또는 그렇지 않으면 생체내 이식, 예컨대 외과용 기기, 또는 세라믹 또는 금속 보철에 대해 코팅을 제공하기 위해 사용될 수 있다. 그와 같은 코팅은 비-생물학적 디바이스 재료와 생체 조직 사이에 장벽을 제공한다. 비-생물학적 디바이스에 대한 장벽으로서의 하이드로겔의 역할은, 비제한적으로: 1) 디바이스 표면에서 단백질 오염 또는 혈전증으로 이어질 수 있는, 비-생물학적 디바이스의 표면 상에 거대분자 및/또는 세포의 흡수의 방지; 2) 달리 비-생물학적으로 양립가능한 물질로 만들어진 디바이스에 대한 무독성, 비-염증성, 비-면역원성, 생물학적으로 양립가능한 표면의 제시; 3) 디바이스 기능 예컨대 글루코스 센서에 대한 글루코스의 확산, 압력 센서에 대한 기계력의 전달, 또는 혈관 이식편이나 스텐트의 내피화와의 혼용성; 4) MEMS 기반 인공 네프론에서 존재하는 크기 장벽에 전하 장벽을 제공하는 것과 같은 디바이스 기능의 향상; 5) 생리적으로 양립가능한 수성 환경 내에 포획된 생존가능한 세포 군집의 비-생물학적 디바이스로의 편입; 및 6) 디바이스의 혈관 형성, 상피화 또는 내피화를 촉진하도록 설계된 성장인자, 항-바이러스제, 항생제 또는 부착 분자와 같은 약물 또는 생체활성 인자의 함유를 포함한다.

[0185] 전술한 바에 기초하여, 본 발명의 하이드로겔/나노구조 복합체는 당뇨병의 관리용 이식가능 글루코스 센서를 포함하는 다양한 이식가능 디바이스에 비-알러지항원성 코팅을 제공하는데 사용될 수 있다. 또한, 본 하이드로겔/나노구조 복합체는: MEMS-기반 인공 네프론의 개발을 위한 전하 장벽; 포매된 신장 세포 예컨대 발세포가 MEMS-기반 인공 네프론 디자인에 편입될 수 있는 수성의 생리적으로 양립가능한 환경; 및 비제한적으로, 약물 전달, 기계적 감지, 및 생체-검출 시스템으로서를 포함하는 다양한 목적으로 설계된 이식가능한 MEMS 디바이스용 코팅을 제공하는데 사용될 수 있다.

[0186] 개시된 하이드로겔/나노구조 복합체, 및 특히 하이알루로난-기반 하이드로겔은 또한 실리콘-기반 디바이스에, 예를 들면 하이드록시페닐 코팅된 표면 화학작용을 제공하기 위해 실리콘 표면에 타이라민의 1급 아민의 1차 공유결합을 통해 공유결합될 수 있다. 이것은 유리 아민으로 변형된 DNA를 실리콘 표면에 결합시키기 위해 사용된 동일한 화학작용을 사용할 수 있다. 그런 다음, HA-기반 하이드로겔은 상기 기재된 그것의 바람직한 가교결합 방식에서 사용된 동일한 페록시다아제 유도된 화학작용에 의해 하이드록시페닐 코팅된 표면에 공유적으로 커플링된다.

[0187] 본 하이드로겔/나노구조 복합체는 또한 비-생물학적 심혈관 디바이스 예컨대 카테터, 스텐트 및 혈관 이식편을 코팅하기 위해 사용될 수 있다. 이들은 그것의 생물학적 비혼용성 때문에 통상적으로 사용되지 않지만 현재 사용중인 디바이스에 비해 우수한 디자인 특징을 갖는 물질로 만들어진 디바이스를 포함할 것이다. 생체활성 인자는 하이드로겔, 따라서 이식된 디바이스의 내피화 또는 상피화를 증진하기 위해 본 하이드로겔에 편입될 수 있다.

- [0188] 비록 본 발명의 하이드로겔/나노구조 복합체의 특정한 실시예 및 용도가 본 명세서에서 기재되지만, 이러한 특정 용도는 제한하는 것으로 의미되지 않는다. 본 발명의 하이드로겔/나노구조 복합체는 공지된 하이드로겔에 대해 일반적으로 사용되는 임의의 적용을 위해 사용될 수 있고, 그리고 특히 신체의 어디든 연조직의 치유 및/또는 재생에 유용하다.
- [0189] 이제 유사한 참조 번호가 대상 개시내용의 유사한 구조적 특징 또는 측면을 나타내는 도면을 참조할 것이다. 설명 및 실례의 목적상, 그리고 비제한적으로, 본 개시내용에 따른 생분해성 복합체의 구현예의 예시적인 도면이 도 1A에 도시되어 있으며, 일반적으로 참조 부호 100으로 지정된다. 본 명세서에 기재된 시스템 및 방법은 연조직 결함의 치유를 향상시키기 위해 사용될 수 있다.
- [0190] 일반적으로 도 1A-1D를 참조로 하면, 생분해성 복합체(100)는 겔(103) 및 나노섬유(101) 양자의 이점을 조합하는 나노섬유(101) 보강된 겔(103)을 포함할 수 있다. 겔(103)은 임의의 적합한 물질, 예컨대, 비제한적으로, 하이드로겔을 포함할 수 있다. 나노섬유(101)는 임의의 적합한 나노물질, 예를 들면, 폴리카프로락톤 (PCL) 또는 임의의 다른 적합한 물질로 제조될 수 있고 그리고 임의의 적합한 형상 및/또는 크기를 취할 수 있다. 복합체(100)는 (예를 들면, 완전성 및 조직 지지를 유지하기 위해) 충분한 기계적 특성을 유지하면서 (예를 들면, 세포 부착과 이동을 조정하기 위해) 고다공도를 포함한다.
- [0191] 적어도 일부 구현예에서, 나노섬유(101)는 하나 이상의 폴리머 사슬을 형성하는 하이드로겔(103)에 공유적으로 접합된다. 나노섬유(101)에 하이드로겔(103)의 공유결합은 단독으로 또는 단순한 블렌드로 사용된 구성요소 물질에 비해 우월한 이상적 특성의 조합된 세트를 갖는 물질을 초래할 수 있다.
- [0192] 도 2A는 HA 하이드로겔 단독에 대해 플롯된 도 1의 복합체의 구현예의 응력-변형 곡선을 도시하며, 동일한 가교 결합하는 밀도에서 하이드로겔에 비교될 때 개선된 탄성 계수를 밝힌다. 도시된 바와 같이, 시험 복합체(100) (4.5 mg/ml HA, 10 mg/ml PEG-DA, 6.75 mg/ml PCL 섬유)의 탄성 계수는 750 Pa이었고, 동일한 밀도에서의 하이드로겔 단독은 320 Pa이었다. 도 2B는 도 1에서 설명된 바와 같은 복합체가 규칙적 하이드로겔에 비교하여 기계적 완전성의 유사한 정도의 강건성을 보유한다는 것을 보여주는 피로 시험을 도시한다.
- [0193] 도 3A-3B를 참조하면, 복합체(100)는 지방질-조직 유래된 줄기세포 (ASC) 이동을 지지하는 것으로 도시되어 있다. 지방흡인 흡인물로부터 GFP-표지된 ASC는 회전타원체로 성장되었고 그 다음 복합체 또는 하이드로겔 안으로 씨딩되었다.
- [0194] 도 3A 및 3B는 4일 동안 나노섬유-HA 하이드로겔 복합체에서 배양된 ASC의 위상차 이미지 (도 3B)를 갖는 형광 및 오버레이 (도 3A)를 도시한다. 세포는 연장된 긴 과정과 궤적으로 외측으로 이동했다. 그에 반해서, 도 3C 및 3D에 도시된 HA 하이드로겔 단독으로 배양된 ASC는 상당한 세포 이동을 나타내지 않았다.
- [0195] 도 4A 및 4B는 정렬된 650-nm 나노섬유(101)를 따라 회전타원체로부터 이동하는 ASC를 대조하는 위상차 이미지 (도 4B)를 갖는 형광 이미지 및 오버레이 (도 4A)를 도시하여, 나노섬유(101)의 존재에 대해 그것의 강한 이동성 반응을 나타낸다.
- [0196] 실시예 1: 복합체 외과용 스캐폴드 디바이스의 제조.
- [0197] 나노섬유는 PCL (폴리카프로락톤, Sigma Aldrich로부터의 80k)을 전기방사함에 의해 생산되었다. 나노섬유는 랜덤 메쉬로 방사되었다. 방사하는 파라미터는 표적 금속판으로부터 15cm 이격한 27 게이지 뚫힌 바늘을 통해 0.6 ml/h의 유량으로 90%/1% w/w DCM-DMF 내 10%wt PCL 용액이었다. 상기 표적 판이 -3 kV의 전압으로 음으로 편향되면서, 바늘 전압은 +10 kV였다. 1 mL의 용액이 각각의 나노섬유 시트에 대한 라운드 당 방사되었다.
- [0198] 섬유는 그런 다음 다단계 공정으로 작용화되었다. 간단하게는, 섬유는 섬유 표면에 반응성 기를 가지도록 플라즈마-처리되었으며, 여기에 아크릴산이 UV 광개시제에 의해 접합되었다. 아크릴레이트 기는 그런 다음 EDC 및 디아지민과 반응되어 1급 아민을 형성하였다. 이들 아민은 그런 다음, 하이드로겔 내의 티올 기와 쉽게 반응할 수 있는 말레이미드 기를 부착하기 위해 SMCC와 반응될 수 있었다.
- [0199] 복합체 외과용 메쉬는 10 mg/ml의 작용화된 분산된 나노섬유와 함께 5.4 mg/ml의 티올레이트화된 하이알루론산 (220 KDa, 티올화 정도 25%) 및 5.4 mg/ml의 PEG-디아크릴레이트 (PEG-DA)를 갖는 복합체 겔 제형을 사용하여 제조되었다. 사용된 폴리프로필렌 외과용 메쉬는 Ethicon Prolene Soft (제품 코드 SPMH)였다. 메쉬는 사용 전에 연속하는 에탄올 침지로 세정하고 생체안전성 캐비닛에서 건조되도록 하였다. 1 × 2cm 직사각형의 메쉬를 2.5 × 4.5cm 테플론 몰드의 바닥에 몰드 당 두 개씩 넣었다.
- [0200] 500 μ L의 복합체 분취량을 (양자 메쉬에 대해) 각각의 몰드 안으로 피펫팅하고 그런 다음 플라스틱 조각을 메

쉬 위에 위치되도록 하고 아래로 눌러 복합체를 펼친다. 메쉬는 37℃ 인큐베이터에서 밤새워 젤화되도록 하였다. 젤화된 메쉬를 제거하고 최종 생성물로서 동결건조시켰다 (도 21 참조). 메쉬는 그런 다음 사용하기 전에 재수화될 수 있었다.

[0201] 특정 구현예에서, 작용화된-섬유 메쉬는 60mg 또는 그 미만의 조각으로 절단되었다. 60mg의 샘플은 에탄올에 침지되고 그 다음 액체 질소로 부분적으로 채워진 세라믹 모르타르에 첨가된다. 섬유 샘플은 매우 단단해 질 것이다. 강성/경직성을 유지하기에 충분히 샘플을 냉각시킨 상태에서 섬유 시트는 가위로 $\sim 5\text{mm} \times 5\text{mm}$ 조각으로 절단된다. 전체 시트가 절단되었을 때, 섬유는 모르타르가 액체 질소로 부분적으로 채워지도록 유지하면서, ~ 20 분 동안 모르타르와 막자로 분쇄되었다. 섬유 슬러리를 그런 다음 에탄올에 붓는다. 약 1mg의 계면 활성제가 슬러리에 첨가되어 섬유 얽힘을 방지한다. 현탁액은 300G에서 수 분 동안 원심 분리되고 상청액은 버려진다. 섬유는 밤새 건조되도록 한다. 그런 다음 섬유는 정확한 농도의 섬유가 현탁될 수 있도록 2차 원심관에 계량된다. 섬유는 살균하기 위해 에탄올에 침지되고, 원심 분리되고, 그리고 상청액이 버려지고 생체안전성 캐비닛에서 밤새 건조시킨다. 섬유는 그런 다음 탈이온수에서 요망된 농도, 일반적으로 15 mg/mL로 재현탁된다.

[0202] 하이드로겔 복합체를 형성하기 위해, 1 mL의 섬유-현탁액을 사용하여 1 바이알의 HA-SH를 재수화하여, 15 mg/mL 섬유와 10 mg/mL의 하이알루론산의 용액을 얻는다. 이 용액 900 μL 에 100 μL 의 10% PEG-DA 모액을 첨가하여 13.6 mg/mL 섬유, 9 mg/mL HA-SH, 및 10 mg/mL PEG-DA의 최종 농도를 얻는다. 이것은 초기 생체내 실시예를 위한 제형이지만, 다른 제형은 구성요소 농도를 변화시킴으로써 제조되었다.

[0203] 수득한 복합체는 섬유가 없는 투명한 하이드로겔과는 대조적으로 색상이 우유빛 백색이었다 (도 1C). 복합체 겔은 그것의 형상을 유지하고 취급성이 양호했지만 하이드로겔-단독 군은 찢어지기 쉽다. 하이드로겔에서 섬유는 분산되어 수십 내지 수백 마이크론의 길이 범위로 된다 (도 1B). 파열된 동결건조된 샘플 복합체의 단면의 SEM 이미지는 섬유와 하이드로겔 성분 사이의 밀접한 회합뿐만 아니라 분산된 섬유의 고밀도를 나타낸다 (도 1D).

[0204] 물질 및 방법

[0205] 티올레이트화된 하이알루론산 (HA)은 ESI BIO (캘리포니아주 앨러미다 소재)로부터 구매되었다. 폴리(에틸렌 글리콜) 디아크릴레이트는 Laysan Bio, Inc (앨라배마주 아랍 소재)로부터 구매되었다. 하기는 Sigma로부터 수득되었다; 폴리(ϵ -카프로락톤), 에틸아미노-말레이미드, 아크릴산, 톨루이딘 블루 0, N-하이드록시석신이미드 (NHS), 시스테인, 소 혈청 알부민 (BSA), 아세트산 및 Triton™ X-100. 돌베코 변형 이글 배지 (DMEM), 우태 혈청 (FBS), 페니실린/스트렙토마이신, Alexa Fluor® 568 팔로이딘 및 4',6-디아미디노-2-페닐인돌 (DAPI)은 Invitrogen Life Technologies로부터 구매되었다. 에틸(디메틸아미노프로필) 카보디이미드 (EDC)는 AnaSpec, Inc. (캘리포니아주 프리몬트 소재)으로부터 수득되었다. 모든 다른 화학물질 및 시약은 분석적 등급이었다.

[0206] 레올로지 실험용 PCL 나노섬유의 전기방사:

[0207] 2개의 상이한 직경의 PCL 섬유를 제작하기 위해, 11.0 및 8.5 % (w/v) PCL 용액을 각각 디클로로메탄과 디메틸포름아미드 (9:1, v/v)의 혼합물 및 클로로포름과 메탄올 (3:1, v/v)의 혼합물에서 제조하였다. 각각의 균질한 PCL 용액을 27 G의 금속 바늘을 갖는 주사기에 장입하였다. 그런 다음, 전기방사는 다음의 파라미터로 수행되었다; 1.0 ml/h의 공급 속도, 15 kV의 금속 바늘에 대해 인가된 양성 전압, 및 바늘의 단부에서 바닥 사이의 거리 12 cm. 섬유의 형태학은 전계-방출 스캐닝 전자현미경 (FESEM, JEOL 6700F)을 사용하여 관측되었고 섬유의 직경은 ImageJ 소프트웨어 (US National Institutes of Health, 메릴랜드주 베세즈다 소재)를 사용하여 FESEM 이미지로 측정되었다.

[0208] 생체내 복합체용 전기방사:

[0209] 방사 조건: 디클로로메탄과 디메틸포름아미드 (9:1, w/w)의 용매 혼합물 내 16% w/v PCL (95% 45,000 Mn PCL, 5% 80,000 Mn PCL, 모두 Sigma로부터 구입). 섬유는 1000 rpm으로 회전하는, 접지된 휠의 면으로부터 10cm 떨어져 있는 뚫힌 27 게이지 바늘을 통해 5.25 ml/h의 속도로 방사되었다. 인가 전압은 15 kV였고 전기방사 펄프는 2 mm/sec (약 4 h)에서 140 패스에 대해 85mm 이동 거리를 가로질러 앞뒤로 점방식으로 되었다. 섬유 시트는 그런 다음 기능화를 위해 14cm-직경 개별 시트로 절단되었다.

[0210] MAL로 표면-기능화된 섬유의 제조:

[0211] MAL로 섬유에 대해 표면-기능화하기 위해, 섬유의 표면은 최소 변형으로 문헌 [Interface Focus 2011, 1, 725-733]에 따라 폴리(아크릴산) (PAA)을 그래프팅함에 의해 카복실기가 유도되었다. 간단히, 섬유는 실온에서 10 분 동안 산소 분위기로 280 mmHg 하에서 플라즈마-처리되어 섬유의 표면 상에 자유 라디칼을 유도했다. 그런 다

음 0.5 mM NaIO₃ 내에 3 또는 10 % (v/v) 아크릴산 용액 10 mL 안에 70 mg의 섬유가 UV (36 mW/cm², DYMAX Light Curing Systems 5000 Flood, 코네티컷주 토링턴 소재)에 90초 동안 섬유 표면 상의 PAA (PAA-섬유)의 광-중합을 위해 노출되었다. 실온에서 20분 동안 PAA-섬유를 인큐베이팅한 후, PAA-섬유는 20 mL의 탈이온수로 3회 세정하여 미반응된 아크릴산을 제거하였다. PAA-섬유를 완전히 공기-건조한 후, PAA-섬유 상의 카복실 기의 밀도는 톨루이딘 블루 0 (TBO) 검정에 의해, TBO가 1:1의 몰비로 섬유 상의 카복실 기와 상호작용한다는 가정으로 결정되었다 [문헌 [J Biomed Mater Res 2003, 67, 1093-1104]]. 간단히, PAA-섬유 (1 × 1cm²)는 20 μL의 50% (v/v) 에탄올 침지 후 0.1 mM의 NaOH (pH 10) 내 0.5 mM TBO 용액 1 mL 안에 완전히 액침시키고 실온에서 5시간 동안 온화하게 흔들면서 반응시켰다. 이들을 0.1 mM NaOH (pH 10)로 세정한 후, PAA-섬유의 표면 상에 흡착된 TBO는 실온에서 1시간 동안 격렬히 흔들면서 1 mL의 50 % (v/v) 아세트산을 사용하여 탈착하였다. 그런 다음 상청액의 광학 밀도를 마이크로플레이트 판독기 (BioTeck Synergy2, 버몬트주 위누스키 소재)를 사용하여 633 nm에서 측정하였다. 50 % (v/v) 아세트산 내 TBO를 표준으로 사용하였다.

[0212] PAA-섬유를 분쇄하여 다음 파라미터를 갖는 극저온 밀 (Freezer/Mill 6770, SPEX SamplePrep, 뉴저지주 메터친 소재)을 사용하여 섬유 단편을 제조하였다; 밀링을 위한 1분 및 액체 질소에서의 냉각을 위한 3분의 10 사이클. PAA-섬유 단편을 50-ml 원뿔형 튜브에 수집한 후, PAA-섬유 단편을 이소프로필알코올과 증류수 (1:1, v/v)의 혼합물 10 ml에 완전히 분산시켜 섬유 표면 상의 아미노에틸-MAL로 변형시켰다. 간단히, PAA-섬유는 NHS 및 EDC가 첨가되어 섬유 상의 PAA의 카복실 기를 활성화시켰다. 카복실 기 대 NHS 및 EDC의 몰비는 각각 1 대 4 및 4였다. 활성화는 실온에서 부드럽게 흔들면서 수행하였다. 1시간 후, 아미노에틸-MAL을 카복실 기-활성화된 섬유에 카복실 기 대 아미노에틸-MAL의 몰비 1 대 2로 첨가하였다. 그런 다음 반응을 실온에서 12시간 동안 부드럽게 흔들면서 수행하였다. MAL로 표면-기능화된 섬유를 증류수로 3회 세정한 후 동결건조시켰다. 여기서 섬유 상의 MAL의 밀도는 섬유 표면 상의 모든 카복실 기가 MAL로 완전히 치환되었다는 가정에서 되었다.

[0213] 섬유-HA 하이드로겔 복합체의 제조:

[0214] 섬유-HA 하이드로겔 복합체를 제조하기 위하여, 티올레이트화된 HA 및 PEGDA를 각각 12.5 mg/mL 및 100 mg/mL의 요망된 농도로 PBS (pH 7.4)에 완전히 용해시켰다. 25 mg/mL의 요망된 농도를 갖는 MAL-섬유를 PBS (pH 7.4)에 완전히 분산시켰다. 나노섬유, HA, PEG-DA, 및 PBS의 현탁액이 그런 다음 연속으로 첨가되어 제형의 요망된 최종 농도에 도달한다. 복합체 전구체 용액을 균질하게 혼합한 후, 레올로지성 연구를 위해, 100 μL의 복합체 전구체 용액을 주형 (직경 = 8 mm)에 부었고 그리고 37°C에서 2시간 동안 겔화를 위해 인큐베이션하였다. 200 μL의 전구체 용액을 원통형 테플론 주형 (직경 = 6.35 mm, h = 6.35 mm)에 첨가하고 상기와 같이 인큐베이션하였다. FESEM을 사용하여 섬유-HA 하이드로겔 복합체 및 HA 하이드로겔의 단면의 형태학을 관찰하기 위해, 중요한 지점 건조 (Samdri-795, Tousimis, 메릴랜드주 록빌 소재) 또는 화학적 건조 (HDMS) 어느 하나 전에 연속 에탄올을 세정 (50%, 70%, 80%, 90%, 100%, 및 100% 에탄올에서 각각 10분)함에 의해 복합체 및 HA 하이드로겔을 탈수하였다. 본 샘플은 액체 질소 내에서 동결-파쇄되어 내부 공극 구조를 나타내었다. 구조는 백금 (Hummer 6.2 Sputter System, Anatech UDA, 캘리포니아주 헤이워드 소재)의 10-nm 층으로 스퍼터 코팅하고 그런 다음 전계-방출 SEM (JEOL 6700F, 일본 도쿄 소재)으로 이미지화했다.

[0215] 생체내 동물 연구를 위한 복합체의 제조를 위해, 티올레이트화된 HA를 PBS 내에 12.5 mg/mL로 재구성하였다. PEG-DA는 PBS 내에서 100 mg/mL로 용해하였다. MAL-섬유는 멸균된 PBS 내에서 25mg/mL로 재현탁하였다. 섬유는 먼저 HA 용액과 조합시키고 10분 동안 반응되도록 하고 그리고 나서 PEG-DA와 조합시켜 요망된 최종 농도를 얻었다. 현탁액은 그런 다음 생체내 샘플을 위해 원통형 테플론 주형 (McMaster-Carr, 뉴저지주 로빈스빌 소재) 안으로, 11.125mm의 직경과 3mm의 높이 원통형 주형으로 300 μL로 즉시 피펫팅되었다. 겔은 그런 다음 37°C 인큐베이터에 넣어 밤새 겔화했다.

[0216] 섬유 상의 HA와 MAL의 티올 기들 사이의 계면 결합의 효과를 확인하기 위해, 섬유 상의 MAL을 켄칭된 섬유-HA 하이드로겔 복합체를 제조하기 위해 시스테인을 사용하여 켄칭하였다. 간단히, 1 mg의 섬유를 PBS (pH 8.0) 내 1 mL의 시스테인 용액에 분산시켰고 그런 다음 MAL 대 시스테인의 몰비는 1 대 2였다. 실온에서 12시간 동안 부드럽게 흔들면서 MAL을 켄칭한 후, MAL-켄칭된 섬유는 1 mL의 증류수로 5회 세정하여 미반응된 시스테인을 제거하고 동결건조하였다.

[0217] 섬유-HA 하이드로겔 복합체의 기계적 특성:

[0218] 압축 시험. 본 하이드로겔 전구체 현탁액은 압축 시험을 위해 원통형 테플론 주형 (McMaster-Carr, 뉴저지주 로빈스빌 소재) 안으로, 6.35mm의 직경과 6.35mm의 높이 원통형 주형으로 200 μL로 피펫팅되었다. 겔은 그런 다음 37°C 인큐베이터에 넣어 밤새 겔화했다. 겔은 그것의 주형으로부터 제거하고 Endura TEC 기계적 테스터 ELF

3200 시리즈, BOSE ElectroForce, 미네소타 주 에텐 프래리 소재)로 2개의 평행한 플레이트 사이에 국한되지 않은 단일축 압축을 통해 즉시 시험되었다. 샘플은 10% 내지 20% 변형의 응력-변형 곡선의 선형 부분의 기울기로부터 결정된 탄성 계수로 50% 변형률로 압축되었다. 샘플은 각각 3회 시험되고 평균 압축 탄성률을 결정하기 위해 그룹당 3개의 샘플이 시험되었다. 재수화된 섬유-HA 하이드로겔 복합체의 압축 탄성율을 측정하기 위해, 복합체를 동결건조시키고 37°C에서 24시간 동안 1 mL의 PBS (pH 7.4)로 재수화하였다. 피로-시험의 경우, 압축 샘플을 0.1 Hz에서 0%부터 25%까지의 변형률로 반복적으로 순환시켰다.

[0219] 레올로지성 시험. 다양한 섬유-HA 복합체의 전단 저장 탄성률 (G')은 평행한 플레이트 ($\phi = 8\text{mm}$)를 갖는 진동 유량계 (ARES-G2 Rheometer, TA Instruments, 델라웨어주 뉴캐슬 소재)를 사용하여 측정되었다. 진동 주파수 스윙이 10%의 일정한 변형률로 1 Hz에서 10 Hz까지 G' 의 변화를 모니터링하기 위해 사용되었다.

[0220] 섬유-HA 하이드로겔 복합체에서 hASC의 이동:

[0221] 인간 지방질-유래된 줄기세포 (hASCs)를 10%의 FBS, 1%의 페니실린/스트렙토마이신, 및 1 ng/ml의 bFGF를 함유하는 고포도당 DMEM에서 배양하였다. 최적 성장을 위해 배양 배지를 매주 3회 교환하였다. hASC 회전타원체를 제조하기 위해, 50 μL 의 hASC 용액 (5.6×10^5 세포/ml)을 주조된 마이크로-성형된 아가로스 겔 (MicroTissues® 3D Petri Dish® 마이크로-성형 회전타원체, 96-웰)에 부어 hASC 회전타원체를 제조하고 그리고 37°C에서 24 시간 동안 부드럽게 흔들면서 인큐베이션하였다.

[0222] HA 및 PEGDA는 PBS (pH 7.4)에 HA에 대해 4.5 및 2.5 mg/ml와 PEGDA에 대해 5.0 mg/ml의 최종 농도로 완전히 용해되었다. 50% (v/v) 에탄올 20 μL 로 미리-적신 섬유를 10.0 mg/ml의 최종 농도로 PEGDA에 완전히 분산시키고 그런 다음 HA를 섬유와 PEGDA의 혼합물에 첨가했다. 30 μL 의 복합체 전구체 용액을 96-웰 조직 배양판의 각 웰에 붓고 조직 배양판의 표면상의 hASC 회전타원체에 도달하는 것을 피하기 위해 37°C에서 1 시간 동안 가교결합하도록 인큐베이션하였다. 그런 다음, 3 ~ 5개의 hASC 회전타원체를 갖는 복합체 전구체 용액 50 μL 를 각각의 웰에 부었다. 37°C에서 1시간 동안 가교결합시킨 후, 200 μL 의 새로운 배지를 각각의 웰에 첨가하고 배지를 며칠마다 교환하였다. 복합체 내부의 hASC 회전타원체로부터 이동된 세포를 관찰하기 위해, F-액틴과 hASC의 핵은 각각 Alexa Fluor® 568 Phalloidin과 DAPI로 염색되었다. 간단히, 배양 4일 후, hASC 회전타원체를 가진 복합체는 4% (v/v) 파라포름아미드 100 μL 로 실온에서 밤새 고정되었다. 그런 다음 PBS (pH 7.4)로 3회 세척한 후, 복합체를 밤새 4°C에서 비-특이적 염색을 억제하기 위해 PBS 내 1% (w/v) BSA 100 μL 로 인큐베이션하고 PBS로 3회 세정하였다. 그 뒤에, 복합체를 실온에서 1시간 동안 PBS 내 0.1% (v/v) Triton-X 100 100 μL 로 인큐베이션하였다. PBS로 3회 세정한 후, 100 μL 의 160 nM Alexa Fluor® 568 Phalloidin을 각각의 복합체에 첨가하고 실온에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 그런 다음, 상청액을 제거한 후, 복합체를 100 μL 의 0.5 $\mu\text{g/ml}$ DAPI로 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. PBS로 3회 세척한 후, 이동된 hASC를 Alexa Fluor® 568 Phalloidin에 대해 ex. 561 nm 및 em. 570-600 nm 및 DAPI에 대해 ex. 405 nm 및 em. 385-420 nm에서 공초점 레이저 스캐닝 현미경 (CLSM, Carl Zeiss LSM780, 독일)을 사용하여 관측하였다.

[0223] 생체내에서 섬유-하이드로겔 복합체의 성능:

[0224] 티올레이트화된 HA를 PBS 내에 12.5mg/mL로 재구성하였다. PEG-DA는 PBS 내에 100mg/mL로 용해하였다. MAL-섬유는 멸균된 PBS 내에 25mg/mL로 재현탁하였다. 섬유는 먼저 HA 용액과 조합시키고 10분 동안 반응되도록 하고 그리고 나서 PEG-DA와 조합시켜 요망된 최종 농도를 얻었다. 현탁액은 그런 다음 원통형 테플론 주형 (McMaster-Carr, 뉴저지주 로빈스빌 소재) 안으로, 11.125mm의 직경과 3mm의 높이 원통형 주형으로 300 μL 로 즉시 피펫팅되었다. 겔은 그런 다음 37°C 인큐베이터에 넣어 밤새 겔화했다. 지방 조직의 2kPa 강성도와 일치하도록 2개의 제형이 선택되었다. HA-단독 제형은 10mg/mL PEG-DA 및 9mg/mL HA-SH이었고, HA-섬유 복합체 제형은 5mg/mL PEG-DA, 5mg/mL HA-SH, 및 12.5mg/mL 분산된 나노섬유였다.

[0225] 복합체 나노물질 스캐폴드의 생체적합성을 연구하기 위해, 이들을 스프래그-다우리 랫트의 서혜 지방 패드 아래에 이식하고 다양한 시간의 길이에 대해서 관측했다. 휘발성 마취하에 1cm 절개가 서혜 주름 양측으로 바로 근접하여 만들어졌다. 피하 조직의 비절개박리 후, 서혜 지방 패드가 노출되었다. 그것은 전기지침술을 사용하고 공급 혈관을 주의 깊게 보존하면서 세심한 지혈과 함께 상승되었다. 스캐폴드는 동물의 우측에 있는 지방 패드 아래에 이식되었다. 좌측은 임플란트를 받지 않았고 모의 수술 대조로 작용하였다. 양면은 표준 층상 방식으로 폐쇄되었다. 동물은 7, 14, 30, 및 90일 동안 관찰되었다. 수집 시점에서 동물을 희생시키고 스캐폴드가 있는 그리고 없는 서혜 지방 패드를 노출시키고 4% PFA에 고정시켰다. 표준 헤마톡실린 및 에오신 염색을 위해 시료를 매립하고 절단하였다.

- [0226] 통계적인 분석
- [0227] 모든 결과는 평균 값과 표준 편차로 표시된다. 한 쌍의 그룹 사이의 통계적 유의성은 SigmaPlot 12.0 소프트웨어 (SPSS)로 일원 변량분석을 수행함으로써 결정되었다; $p < 0.05$ 의 값은 통계적으로 상당하다고 간주되었다.
- [0228] 본 명세서에 개시된 바와 같은 복합체(100)의 구현예를 제조하기 위한 임의의 다른 적합한 방법이 본 명세서에서 고려된다.
- [0229] 실시예 2: 나노섬유-하이드로겔 복합체의 압축 시험.
- [0230] 압축 시험을 위해, 섬유-하이드로겔 샘플은 직경 8.5mm와 높이 ~4mm의 원통형으로 형성되었으며, 37°C에서 주형에서 밤새 경화되도록 하였다. 탄성 계수는 Bose EnduraTEC ELF 3200 (미네소타주 에덴 프레리 소재)으로 압축 시험을 통해 결정하였다. 샘플은 두 개의 평행한 플레이트 사이에서 단일축 압축을 받아, 50% 변형률로 압축되었다. 탄성 계수는 초기 선형 영역의 기울기를 측정함에 의하여 결정되었다. 섬유가 있고 그리고 없는, 동일한 하이드로겔 제형을 갖는 2개의 샘플 군이 시험되었다. 하이드로겔-단독 샘플은 4.5mg/mL의 티올레이트화된 하이알루론산 (Gylcosan Glycosil) 및 10mg/mL PEG-DA (폴리에틸-글리콜 디아크릴레이트, 분자량 3350)로 형성되었다. 섬유-하이드로겔 복합체 군은 동일한 하이드로겔 농도를 가졌지만 추가로 티올레이트화된 하이알루론산과 쉽게 반응할 수 있는 말레이미드 기로 작용화된 표면을 갖는 6.75mg/mL의 PCL 나노섬유를 갖는다.
- [0231] 대표적인 응력-변형 흔적은 도 2A에서 볼 수 있다. 하이드로겔-단독 군은 320 Pa의 탄성 계수를 가졌고 반면 섬유-하이드로겔 복합체는 750 Pa의 더 높은 계수를 가졌다. 섬유-하이드로겔 복합체의 증가된 강성도는 모든 변형률 값에서 더 높은 응력 값에서 볼 수 있다. 작용화된 나노섬유의 존재는 물질의 강도 및 강성도를 크게 증가시켰다. 따라서, 복합체의 전체 구조는 표적 조직과 일치하는 강성도를 가질 수 있지만, 하이드로겔 성분은 나노섬유의 이점 없이 동일한 강성도를 달성하는 데 필요한 밀도보다 더 낮은 가교결합 밀도를 가질 수 있다. 이것은 주어진 임플란트 강성도에 대해 더 나은 세포 반응을 초래해야 한다.
- [0232] 샘플 군은 그런 다음 0.1Hz에서 25% 변형률로 반복된 압축 (20 사이클)을 통하여 시험되었다. 대표적인 흔적은 도 2B에서 볼 수 있다. 이것은 하이드로겔과 복합체가 반복된 압축을 견딜 수 있다는 것과 복합체가 섬유가 없는 군보다 지속적으로 뻣뻣하다는 것을 보여준다.
- [0233] 실시예 3: 세포-물질 상호작용.
- [0234] 복합체 하이드로겔에 대한 세포 반응에 대해 시험하기 위해, 지방질-유래된 줄기세포 (ASC)의 이동 가능성은 섬유가 있는 그리고 없는, 하이드로겔의 다양한 제형에서 시험되었다.
- [0235] ASC는 GFP를 발현하도록 형질감염되었고, 그런 다음 마이크로티슈 주형에 의해 만들어진 알기네이트 주형에 밤새 세포를 씨딩하여 회전타원체 클러스터로 형성되었다. 세포는, 회전타원체가 이동하는 세포가 쉽게 측정될 수 있는 구별되는 지점 공급원이므로, 세포 운동성을 더 잘 평가할 수 있도록 회전타원체로 씨딩되었다. 회전타원체는 96-웰 플레이트에 피켓팅되어 경화되기 전에 하이드로겔에 혼합되었다. 그런 다음 세포는 다음 며칠에 걸쳐 이미지화되어 그것의 이동을 관찰하였다. 하이알루론산 및 PEG-DA의 농도가 각각 증가하는 기공 크기로 인해, 낮아짐에 따라 세포는 점진적으로 더 이동할 수 있었다. 동일한 하이드로겔 밀도 (4.5mg/mL 하이알루론산 및 2.5mg/mL PEG-DA)에서, 세포는 (도 3C 및 3D에서 나타낸 바와 같이) 없는 것보다 분산 나노섬유 (12mg/mL, 도 3A 및 3B)를 갖는 샘플에서 보다 잘 이동할 수 있었다. 이것은 작용화된 나노섬유의 존재가 나노섬유의 기계적 특성을 개선시켰을뿐만 아니라 세포 이동을 개선하는 데 도움이 될 수 있음을 나타낸다.
- [0236] ASC가 나노섬유의 존재에 의해 강하게 영향을 받았다는 것을 명확하게 입증하기 위해, ASC 회전타원체는 하이드로겔 없이 정렬된 나노섬유 시트에서 배양되었다. 96시간 후, 세포 (도 3C 및 3D에서 녹색)는 정렬된 나노섬유의 동일한 축을 따라 회전타원체 밖으로 명백히 이동했다 (도 3D에 도시됨).
- [0237] 실시예 4: 나노섬유-하이드로겔 복합체의 조직 적합성.
- [0238] 복합체 나노물질 스캐폴드의 생체적합성을 연구하기 위해, 이들을 스프래그-다우리 랫트의 서혜 지방 패드 아래에 이식하고 다양한 시간의 길이에 대해서 관측했다. 휘발성 마취하에 1cm 절개가 서혜 주름 양측으로 바로 근접하여 만들어졌다.
- [0239] 도 5A는 랫트 서혜 지방 패드 아래 원 위치에서 나노섬유-하이드로겔 복합체의 외관을 나타내는 사진이다. 도 5B는 이식 2주 후에 수확된 복합체 주위의 조직으로부터의 절편의 H&E 염색 이미지를 도시한다. 호산성의 짙은 분홍색으로 염색된 간엽 세포의 엽상체는 나노물질로 이동하는 것으로 보인다 (연분홍색으로 염색됨).

[0240] 도 5C는 세포 침투를 보여주는, 4주에서의 복합체-조직 계면으로부터 수집된 조직 절편의 H&E 염색 이미지를 도시한다. 이식 부위를 둘러싸고 있는 간엽 조직은 에오신으로 진한 핑크색으로 염색된다. 나노물질은 연분홍색으로 보인다. 침윤하는 핑크색 간엽 세포는 계면뿐만 아니라 맑은 둥근 공포가 있는 추정 지방세포에서 볼 수 있다.

[0241] 피하 조직의 비절개박리 후, 서혜 지방 패드가 노출되었다. 그것은 전기지침술을 사용하고 공급 혈관을 주의 깊게 보존하면서 세심한 지혈과 함께 상승되었다. 스캐폴드는 동물의 우측에 있는 지방 패드 아래에 이식되었다. 좌측은 임플란트를 받지 않았고 모의 수술 대조로 작용하였다. 양면은 표준 층상 방식으로 폐쇄되었다. 동물은 2, 4, 및 6주 동안 관찰되었다. 수집 시점에서 동물을 희생시키고 스캐폴드가 있는 그리고 없는 서혜 지방 패드를 노출시키고 4% PFA에 고정시켰다. 표준 헤마톡실린 및 에오신 염색을 위해 시료를 매립하고 절단하였다. 조기의 시점 (2 주)에서, 상처 베드로부터의 간엽 세포가 물질에 침투되어 물질이 원상태 세포 내 성장을 가능하게 하는 충분한 다공성을 갖는다는 것을 시사한다 (도 5B에서 어두운 분홍색 염색).

[0242] 중요하게는 세포 내-성장은 외인성 성장 인자의 부재에서도 달성되었다. 물질을 단순히 둘러싸는 것보다 물질에 침윤하는 세포의 존재는 이 복합체 나노물질을 현재 사용하는 다른 부원형자 물질과 구별한다. 후자의 물질은 섬유질 캡슐에 의해 벽으로 분리되어 있고 따라서 연조직 재건에 덜 바람직하다. 후기 시점 (4주)에서, 세포 내 성장은 발생기 지방세포 분화를 나타낼 수 있는 액포 영역의 출현으로 더욱더 분명해진다 (도 5C에서는 어두운 분홍색 염색 및 투명한 원).

[0243] 실시예 5: 섬유-HA 하이드로겔 복합체의 디자인

[0244] 섬유는 원상태 세포의 기질에서 종종 볼 수 있는 섬유질 구조를 형성할 수 있어, 세포 이동을 돕고 하이드로겔의 초기에 낮은 기계적 특성을 보강한다. 하이드로겔과 섬유 사이의 계면 결합을 도입함으로써 (도 6A, 도 6B), 복합체는 세포 이동을 상당히 방해하는 평균 기공 크기 및 다공성을 감소시킴이 없이 강화된다 (도 6). 하이드로겔과 섬유의 표면 사이의 계면 결합의 밀도를 조절함에 의해 기계적 성질이 조정될 수 있다는 것이 또한 기대되었다. 여기에서 표면-기능화된 섬유는 말레이미드 (MAL)로 제조되어 티올레이트화된 하이알루론산 (HA-SH)과 계면 결합을 도입하였다 (도 6). 전기방사 폴리(ϵ -카프로락톤) (PCL) 섬유의 표면은 O_2 플라즈마로 처리되어 폴리(아크릴산) (PAA)을 그래프팅하기 전에 그것의 표면에 자유 라디칼을 유도했다. 카복실기는 커플링 시약, NHS 및 EDC에 의해 활성화되고, 그런 다음 N-(2-아미노에틸)말레이미드가 활성화된 카복실기와 반응되었다 (도 13). 그 뒤에, MAL-작용화된 섬유가 섬유-하이드로겔 복합체를 제조하기 위해 HA-SH 및 PEGDA로 구성된 하이드로겔 전구체 용액에 도입되었다. HA의 티올기는 섬유 상의 MAL 기 및 PEG 링커의 DA 기 모두와 반응함에 의해 겔을 형성하는데 이용되었다. 흥미롭게도, 섬유-하이드로겔 복합체의 단면은 유사한 가교결합 밀도를 갖는 HA 하이드로겔의 단면과 비교하여 고다공도를 갖는 섬유질 3D 구조를 나타냈다 (도 6). 수득한 복합체는 복합체의 폭과 높이 모두에 걸쳐 나노섬유의 고른 분배를 나타내어, 등방성 보강을 가능하게 했다. 또한, 재수화된 섬유-HA 하이드로겔 복합체는 동결건조 후 99.34%의 용적 회복율을 보인 반면 HA 하이드로겔은 70.17%의 용적 회복율을 보였다 (도 6D).

[0245] 실시예 6: 섬유-HA 하이드로겔 복합체의 압축 탄성율

[0246] 먼저, 복합체는 반응성기가 물 기준으로 동일할 때 (전단 하에서) 그것의 최대 강성도를 갖는 것으로 확인되었다. HA 상의 티올기는 나노섬유 상의 MAL 기 또는 PEG-DA 상의 아크릴레이트기와 반응할 수 있으므로, SH 대 (DA+MAL)의 물비가 대략 1 대 1일 때, 겔은 최적의 전단 저장 탄성률을 나타냈다. 따라서 이 비는 모든 차후의 연구에서 유지되었다. 겔은 HA 하이드로겔 및 섬유-HA 하이드로겔 복합체의 탄성 계수를 평가하기 위해 국한되지 않은 압축 시험을 거쳤다 (도 7). 작용화된 나노섬유의 보강 효과는 50%로 변형되었을 때의 압축 응력에서 볼 수 있다 (도 7A). 압축 응력은 하이드로겔-단독군보다 1.0- μ m 섬유군에서 3.1배 더 커, 기계적 보강의 효과를 나타냈다. 286-nm 섬유군은 50% 변형률에서 4.2배 더 높은 압축 응력으로 더욱더 확연한 보강 효과를 보였다. 흥미롭게도, 286-nm 섬유의 보강 효과는 겔화 전에 말레이미드가 케칭될 때 하이드로겔보다 단지 1.3배로 크게 감소되어, 하이드로겔에 대한 섬유의 계면 결합이 작용화된 섬유의 보강 효과에 결정적임을 확인했다. 또한, 286-nm 섬유가 복합체를 형성하기 전에 작용화되지 않았을 때, 보강 효과는 사라졌고, 하이드로겔 단독보다 겨우 조금 뻣뻣한 복합체를 초래했다. 동일한 보강 효과는 더 높은 농도의 HA 및 PEG-DA와 복합체를 배합함에 의해 더 뻣뻣한 겔을 제형화할 때도 볼 수 있다 (도 7). 계면 결합은 또한, 나노섬유 표면에 점진적으로 더 많은 말레이미드기를 첨가하는 것은 계면 결합의 중요성의 더 많은 증거를 제공하는 점진적으로 뻣뻣한 물질을 초래하기 때문에, 복합체 겔의 그것의 보강에서 용량-반응을 나타낸다. 복합체는 또한 탈수 및 재수화 전후의 기계적 특성에서의 변화에 대해 시험되었다. 2개의 상이한 말레이미드 밀도의 작용화된 나노섬유

가 있는 겔과 없는 겔이 압축하에 기계적으로 시험되었다. 겔을 그런 다음 동결건조하고, 그 다음 완전히 재수화시키고 압축에 대해 다시 시험하였다. 모든 샘플은 재수화 후에 그것의 강성도를 유지하여, 복합체가 동결건조된 제품으로 임상적으로 사용하기에 적합할 수 있음을 나타냈다. HA-단독 겔은 외견상으로 그것의 강성도를 유지했지만, 겔 자체는 탈수-재수화 과정 동안에 섬유-함유 군과 달리 상당히 결속되었다. 복합체 겔은 또한 도 10에 도시된 대표적인 흔적을 사용하여, 피로-효과에 대해 시험하기 위해 주기적 하중을 가했다. 25% 변형률까지 반복된 하중을 가하면, 복합체 겔은 경시적으로 그것의 강성도를 유지하고 하이드로겔 단독보다 일관되게 단단하였다.

[0247] 실시예 7: 섬유-HA 하이드로겔 복합체의 전단 저장 탄성률

[0248] 더 높은 압축 탄성률에 더하여, 섬유-HA 하이드로겔 복합체는 HA 하이드로겔 단독보다 상당히 더 높은 전단 저장 탄성률을 보였다 (도 8A). 286-nm 섬유를 가진 복합체의 전단 저장 탄성률은 686-nm 섬유를 가진 복합체의 것보다 더 높았다 (도 8C). 또한 복합체의 전단 저장 탄성률은 압축 시험 하에서의 계수와 유사하게, 286-nm 섬유 상에 말레이미드 표면 밀도를 증가시킴으로써 증가함이 확인되었다 (도 8D). 그것의 표면에 62 nmol/mg MAL을 갖는 섬유를 도입함으로써, 복합체는 HA 하이드로겔 단독의 것에 비교해 그것의 전단 저장 탄성률에서 1.3-배의 증가를 나타냈다. 또한, 그것의 섬유 상에 147 nmol/mg MAL을 갖는 복합체의 전단 저장 탄성률은 62nmol/mg MAL 기의 계수보다 1.8-배 증가하여, 섬유 상의 MAL 표면 밀도에서 대응하는 2.4-배 증가에 대한 명확한 용량 반응을 보여 주었다. 섬유 상의 MAL 기가 겔화 전에 켄칭될 때, 전단 저장 탄성률은 압축 시험에서 나타낸 것과 유사하게, 비켄칭된 섬유의 것에 비교하여 상응하게 감소하였다. 추가로, 복합체의 전단 저장 탄성률은 주파수가 10 Hz로 증가할 때 유지되었으며 HA 하이드로겔 단독 및 켄칭된 섬유를 갖는 복합체 모두 1 Hz에서의 전단 저장 탄성률보다 10 Hz에서 감소하는 전단 저장 탄성률을 나타냈다. 복합체의 전단 저장 탄성률은 섬유의 표면적 (직경)에 무관하게 섬유 상의 MAL 표면 밀도가 증가함에 따라 증가하여, 이전에 관측된 강성도에 대한 섬유 직경의 효과가 말레이미드 밀도의 함수일 수 있음을 나타낸다 (도 8D). 선형 회귀는 MAL 표면 밀도와 $R^2=0.93$ 의 전단 저장 탄성률 사이의 상관관계로부터 얻어졌다. 또한, 하이드로겔 성분에 대한 작용화된 섬유의 중량 비가 증가함에 따라 복합체의 전단 저장 탄성률이 증가하기 때문에, 복합체는 섬유 장입에 대한 용량 반응을 나타냈다 (도 9).

[0249] 실시예 8: 시험관내 섬유-HA 하이드로겔 복합체에서 세포 이동

[0250] (i) 이들이 동일한 기계적 특성을 가질 때, 세포 이동에 대한 공간성을 제공하는, 더 큰 기공 크기를 갖는 복합체의 더 높은 다공성, 및 (ii) 본질적으로 세포 이동을 유도할 수 있게 하는, 복합체 내의 ECM-모방 섬유질 구조 때문에, HA 하이드로겔에 비교하여 섬유-HA 하이드로겔 복합체가 세포 이동을 향상했다는 가설을 제기했다. 따라서, 현재의 가설을 입증하기 위해, 모델 세포로 인간 지방줄-유래된 줄기세포 (hASC)의 회전타원체를 씨딩하고 그리고 모방된 조직을 HA 하이드로겔과 복합체 내에서 덩어리로 나누고 그런 다음 hASC 회전타원체를 27일 동안 배양하였다 (도 11). ASC는 지방 조직에서의 그것의 존재 및 혈관신생과 지방세포 형성 모두에서의 중요성 때문에 선택되었다. 비록 복합체가 HA 하이드로겔에 유사한 영율인 1.9kPa를 가지지만, 복합체의 기공 크기는 HA 하이드로겔보다 2.08-배 더 크다 (도 16). 그러므로, hASC가 HA 하이드로겔에서 임의의 세포 이동 없이 그것의 회전타원체 형상을 유지하는 반면에(도 11A), 보다 큰 기공이 세포가 이동하도록 수용할 수 있기 때문에 hASC가 복합체 내부에서 3-차원으로 이동했다는 것이 명확하게 관측되었다 (도 11B-11E). 특히, 섬유가 세포 부착 펩타이드, RGD로 변형되었을 때, 복합체에 대해 세포 이동이 현저히 향상되었다 (도 11C). 그러나 생체 내 환경에서, 국부 환경으로부터 복합체로 인자의 확산은, 이 차이를 줄이기 위해 추가의 접착 단서를 제공해야 한다. 일부 사례에서, 부분적인 섬유가 PCL 섬유 사이의 소수성 상호작용으로 인해 겔화 동안 약간의 군집을 형성하고, 그리고 이것은 복합체 내부에서 섬유 군집을 우선적으로 잡는 세포의 본체로 관측되었다 (도 11D 및 11E). 더욱이, 동일한 HA 및 PEG-DA 농도 (도 19)에서, 복합체는 섬유가 없는 군과 비교하여 향상된 세포 이동을 나타내어, 나노섬유 자체가 다공성에 무관하게 세포 이동을 본질적으로 유도할 수 있음을 나타냈다.

[0251] 실시예 9: 조직 반응 및 숙주 조직 침투

[0252] 이들 복합체 이식물의 치료 가능성을 결정하기 위해, 복합체 이식물을 랫트 지방패드 모델에서 생체내 시험했다. 임플란트 군의 제형은 복합체 겔 및 표적 지방 조직과 동일한 초기 2kPa 강성도를 달성하도록 제형화되었다. 따라서, HA-겔 단독 임플란트의 제형은 섬유-복합체 군의 강성도를 맞추기 위해 티올레이트화된 HA 및 PEG-DA 모두의 더 높은 농도를 가졌다. 더 높은 농도에도 불구하고, HA-단독 이식물은 연구 과정에서 그것의 형상 및 용적을 유지할 수 없었다. 4주 후의 전체 관찰에서, HA-단독 이식물은 신장되었고 용적에서는 상당히 더 작았다. 그것의 전체 외관 및 그것의 조직학적 침투의 결여를 고려할 때, HA-단독 시스템은 세포 침투를 촉진하

고 예정된 형상을 유지할 수 있도록 최적화될 수 없다. 그러나 섬유-겔 복합체 이식물은 생체내 90일 후에 전체 관찰하에서 그것의 최초 형상을 잘 유지했다. 그러나, 조직학적 관찰하에서 복합체는 철저하게 침윤되어 임플란트와 원상태 조직 사이의 경계가 결정되기 어려워졌다.

[0253] 서혜 지방 패드가 미세수술 기술을 사용하여 노출되어 상승되고 그리고 사전-형상화된 복합체가 그 아래에 배치되는, 루이스 랫트의 연조직 결합 모델이 개발되었다. 이 명확한 모델은 Aim 3 가설의 모든 요소와 R21 연구가 적용될 수 있는 척도를 다루는데 이상적이다. 비록 이것이 큰 결함을 복원하는 데 대한 그와 같은 복합체의 능력을 직접적으로 증명하지는 않지만, 이것은 원리의 증거를 확립하고 복합체 디자인의 모든 필수 기능성을 확인하고, 그리고 보다 임상적으로 관련된 모델에서 큰 결함 회복을 시험하기 위한 더 큰 동물 모델에 대한 기초를 마련한다.

[0254] 시험 연구에서, PCL 나노섬유-HA 하이드로겔 복합체 및 HA 하이드로겔을 8-12 주령의 수컷 루이스 랫트의 서혜 지방 패드 아래에 유사한 모듈러스로 이식하였다 (시점 당 $n = 3$). HA 하이드로겔 및 복합체 군 모두 이식 후 14일과 30일에 양호한 조직 적합성을 보였다 (도 12, POD 14, POD 30에서의 유사한 관찰, POD = 수술 후 날짜). POD 30에서 조직학은 모의 수술 군보다 더 높은 수준의 염증 반응을 나타내지 않았다. H&E와 메이슨의 트리크롬 염색은 복합체를 통한 원상태 지방에 의한 격막구분 및 세포 침투, 주변 주위의 모세혈관 형성, 원상태 지방의 지방세포뿐만 아니라 선상의 재생을 나타냈다 (도 12). HA 하이드로겔 대조는 다른 한편으로 세포 침투가 결여되었고 섬유화 조직의 얇은 시트와 이물질 반응을 형성하였다. 이 HA 하이드로겔은 충분한 기계적 특성을 보장하기 위해 2 kPa로 제조되었다. 이 결과는 세포 침투에 대한 스캐폴드의 다공성의 중요성을 강조한다.

[0255] 조기의 시점 (2주)에서, 상처 베드로부터의 간엽 세포가 물질에 침투되는 것이 발견되어, 물질이 원상태 세포 내성장을 가능하게 하는 충분한 다공성을 갖는다는 것을 시사한다 (도 12에서 어두운 분홍색 염색). 중요하게는, 외인성 성장 인자의 부재에서도 세포 내성장이 달성되었다. 물질을 단순히 둘러싸는 것보다 물질에 침투하는 세포의 존재는 이 복합체 나노물질을 현재 사용하는 다른 부원형자 물질과 구별한다. 후자의 물질은 섬유질 캡슐에 의해 벽으로 분리되어 있고 따라서 연조직 재건에 덜 바람직하다. 후기 시점 (4주)에서, 세포 내성장은 발생기 지방세포 분화를 나타낼 수 있는 액포 영역의 출현으로 더욱더 분명해진다.

[0256] 실시예 10: hepatocyte-like 제형

[0257] 복합체 제형은 또한 하이알루론산에 접합된 hepatocyte-like 제형으로 제조되었다. 이 제형은 상기 사전형성된 스캐폴드와 동일하게 생체내에서 시험되었다. 조직은 7일, 14일, 30일 및 90일에 수확되었다 ($n=3$). 많은 관련된 성장 인자는 hepatocyte-like 접합 도메인, 예컨대 bFGF, PDGF, 및 VEGF를 갖는다. 접합된 hepatocyte-like는 두 가지 목적으로 작용할 수 있다; 첫째, 주사 부위에 존재하는 많은 내인성 성장 인자를 결합시킬 수 있으며, 재생하는 조직에 국부적인 저장소 및 끌어당기는 신호 역할을 한다. 두 번째로, hepatocyte-like 복합체는 스캐폴드에 성장 인자를 미리 장입하여 재생을 보다 강력하게 하기 위해 사용될 수 있다. hepatocyte-like 스캐폴드는 비hepatocyte-like 복합체 스캐폴드와 비교하여 7일 및 14일에 향상된 혈관신생을 보였으나, 30일 및 90일에는 유사한 결과를 보였다.

[0258] 실시예 11: 주사가능 제형

[0259] 하이드로겔-나노섬유 복합체는 또한 주사가능 변이체로 제형화되었다. 생체 내에서 사용된 사전-형성된 복합체에 대해 사용된 것과 동일한 조성물 200 μ L (5 mg/mL 티올레이트화된 HA, 5 mg/mL PEG-DA, 12.5 mg/mL 섬유)를 혼합하고, 8-10분 동안 주사기에 부분적으로 셋팅되도록 하였다. 이때, 복합체는 외과용 바늘을 통해 주입될 수 있는 점성의 유동성 액체이다 (도 20). 일단 주입되면 복합체는 역전될 때도 그것의 형상을 유지하며, 그리고 물에 잠긴 때에도 비-분산형이고, 형상-유지 및 비/저-팽윤성이다. 주사가능 복합체의 생체적합성을 시험하기 위해, 현탁액은 그런 다음 21-게이지 바늘을 통해 랫트의 서혜 지방 패드에 주입된다. 조직은 그런 다음 7일, 14일, 30일 및 90일에 수확되었고 ($n=3$), 이전의 실시예와 동일하게 분석되었다. 복합체는 용적을 유지하면서 그리고 섬유성 캡슐화를 일으키지 않으면서 30일에 광범위한 세포 재건을 실증했다. 초기 단계 지방세포는 복합체 물질 내에서 전개하는 것으로 명확히 관찰될 수 있다.

[0260] 실시예 12: 현존하는 외과용 메쉬의 현존하는 직조된 폴리프로필렌 구성요소를 전적으로 제거하기 위한 나노섬유 시트의 사용

[0261] 상기 실시예 중 일부에서, 나노섬유 복합체 기술을 사용하여 현존하는 외과용 메쉬 물질을 보강하고 향상시켰다. 대안적으로, 기재된 공정 동안 제조된 나노섬유 시트는 또한 현존하는 외과용 메쉬의 현존하는 직조된 폴리프로필렌 구성요소를 전적으로 제거하기 위한 사용될 수 있었다. 직조된 폴리프로필렌 필라멘트 대신에, 부직포 나노섬유 메쉬가 일부 적용에서 외과용 메쉬에 대한 시트 구조 및 완전성을 제공할 수 있다는 것이

합리적으로 되었다. 이들은 정렬된 나노섬유 시트 또는 랜덤 섬유 시트로 구성될 수 있다.

- [0262] 예로서, 복합체 나노섬유 외과용 메쉬는 10 mg/ml의 작용화된 분산된 나노섬유와 5.4 mg/ml의 티올레이트화된 하이알루론산 (220 KDa, 25%의 티올화도) 및 5.4 mg/ml의 PEG-디아크릴레이트 (PEG-DA)를 갖는 복합체 겔 제형을 사용하여 제조되었다. 복합체 겔은 (폴리프로필렌 필라멘트의 대신에) 전기방사 PCL 나노섬유의 부직포 메쉬를 함침하는 상호침투성 하이드로겔 망상조직으로서 형성되었다. 나노섬유 메쉬는 나노섬유 표면에 말레이미드기를 포함하도록 미리 작용화되어, 섬유가 주변 하이드로겔과 직접적으로 결합될 수 있어, 섬유-하이드로겔 계면에서 적층분리에 저항성인 강한 제형을 가능하게 한다. 나노섬유 메쉬의 $1 \times 2\text{cm}$ 직사각형을 $2.5 \times 4.5\text{cm}$ 테플론 주형의 바닥에, 주형당 2개로 넣었다. 500 μL 분취량의 복합체를 (두 개의 메쉬에 대해) 각각의 주형 안으로 피펫팅한 다음 플라스틱 조각을 메쉬 위에 놓고 아래로 눌러 복합체를 펼친다. 메쉬를 37°C의 인큐베이터에서 밤새워 젤화되도록 하였다. 그런 다음 젤화된 메쉬를 최종 생성물로서 동결건조시켰다. 메쉬는 그런 다음 사용하기 전에 재수화될 수 있다.
- [0263] 이 복합체 제형은 폴리프로필렌 메쉬와 함께 사용될 수 있거나 또는 나노섬유 메쉬는 대안적으로 개별적으로 사용될 수 있다. 본 시트는 상기 실시예의 것보다 덜 경질이었으나, 기타 적용, 예컨대 상처 드레싱 또는 경막 치유에 적합한 취급성 및 강도 특징을 보유하였다 (도 22 참조).
- [0264] 실시예 13: 폴리(아크릴산) 사슬로 그래프팅한 부직 마이크로섬유 메쉬 또는 직조된 폴리프로필렌의 직접적인 표면 플라즈마 처리
- [0265] 대안적인 배치구성에서, 직조된 폴리프로필렌 또는 부직 마이크로섬유 메쉬는 PCT/US15/45494에 기재된 방법을 사용하여 직접적으로 표면 플라즈마 처리되고 폴리(아크릴산) 사슬로 그래프팅될 수 있다. 마이크로섬유 시트는 상기 실시예12에서 사용된 나노섬유 메쉬를 대체하는데 사용될 수 있다. 그와 같은 마이크로섬유 시트는 도 24에서 나타낸 바와 같이 통합된 가교결합된 망상 구조를 형성하는데 사용될 수 있다.
- [0266] 예로서, 복합체 외과용 마이크로섬유 메쉬는 적절한 양의 작용화된 마이크로섬유 시트 (Ethicon Prolene Soft, 제품 코드 SPMH)와 함께 5.4 mg/ml의 티올레이트화된 하이알루론산 (220 KDa, 25%의 티올화도) 및 5.4 mg/ml의 PEG-디아크릴레이트 (PEG-DA)를 갖는 복합체 겔 제형을 사용하여 제조된다. 마이크로섬유 메쉬는 섬유 표면에 말레이미드기를 포함하도록 미리 작용화되어, 섬유가 주변 하이드로겔과 직접적으로 결합될 수 있다. 복합체 겔이 형성되고 마이크로섬유 상의 작용기와 가교결합되었다. Prolene Soft 섬유 메쉬의 $1 \times 4\text{cm}$ 직사각형을 $2.5 \times 4.5\text{cm}$ 테플론 주형의 바닥에, 주형당 2개로 넣었다. 500 μL 분취량의 티올레이트화된 HA와 PEG-DA 혼합물 (상기에 기재됨)을 이들이 혼합된 직후 각각의 주형 안으로 피펫팅하였다. 메쉬를 37°C의 인큐베이터에서 밤새워 젤화되도록 하였다. 그런 다음 젤화된 메쉬를 최종 생성물로서 동결건조시켰다. 메쉬는 그런 다음 사용하기 전에 재수화될 수 있다 (도 25 참조).
- [0267] 실시예 14: 복합체 외과용 메쉬의 생체내 생체적합성 및 조직 통합
- [0268] 6주에서 8주령의 스포래그-다우리 랫트를 무작위로 분류했다. 3-cm 종방향 복부 정중선 절개부위를 표시하고 피부를 통해 복벽 근육조직의 수준까지 내려가는 절개를 하였다. 상지안면 절개는 ~2cm 양측으로 계속되었다. $1 \times 2\text{cm}$ 외과용 메쉬 (폴리프로필렌, 폴리프로필렌 및 복합체 겔, 또는 나노섬유 및 복합체 겔)을 랫트의 우측 복부 위 피하 면에 이식하였다. 메쉬는 4-0 Vicryl 봉합사를 사용하여 온-레이 방식으로 원위치에 봉합되었다. 피부는 차단된 4-0 Vicryl 봉합사로 폐쇄되었다. 동일한 랫트의 왼쪽 복부는 모의 수술을 받았다. 3마리 랫트 각각은 비변형된 Prolene 외과용 메쉬 및 나노섬유-하이드로겔 망상조직을 갖는 복합체 외과용 메쉬로 이식되었다. 랫트를 3일과 14일에 안락사시켰다; 복벽과 이식된 메쉬의 일괄 절제를 통해 조직 샘플이 채취이식되었다. 도 26-28은 그러한 외과용 배치의 설계와 결과를 보여준다.
- [0269] 실시예 15: 실시예 5-14의 논의
- [0270] 하이드로겔은 세포 이동을 용이하게 하는 그것의 3D 수화된 환경 및 고다공도에 기인하여 조직 결합의 재생용 충전제 물질로서 널리 연구되어 졌다. 그러나, 하이드로겔은 체액과 내부 및 외부 응력에 의해 쉽게 분해되고 그리고 붕괴될 수 있기 때문에, 하이드로겔의 상대적으로 약한 기계적 특성이 조직 재생의 전체 기간 동안 그것의 용적을 유지하기에 불충분하기 때문에, 하이드로겔은 용적의 결합에 대한 좋지 못한 대체물인 것으로 판명되었다. 하이드로겔의 기계적 특성을 개선하기 위해, 이 분야의 주요 전략은 (i) 하이드로겔 전구체의 농도를 증가시키고, (ii) 하이드로겔 내부의 가교결합하는 망상조직의 밀도를 증가시키고, (iii) 예컨대 수산화인회석 입자를 매립하거나 섬유 시트로 라미네이팅함에 의해 보강하는 물질을 도입하는 것으로 되었다. [문헌 [Mater Chem Physics, 2008, 107, 364-369, Biomaterials 2006, 27, 505-518, Acta Biomaterialia 2010, 6, 1992-

2002]]. 불행하게도, 이들 매우 강화된 전략은 본질적으로 수득한 하이드로겔의 평균 기공 크기와 다공성을 감소시켜, 세포가 이들 하이드로겔로 이동하지 못하도록 막았다. 따라서 빠른 세포 침투를 허용하는 것보다 고다공도를 여전히 유지할 수 있는 신규한 기전에 의해 하이드로겔을 강화시키는 것이 추구되었다. 복합 재료는 다공성을 포함하여 하이드로겔 상을 거의 온전하게 남기면서 전체 하이드로겔 복합체를 강화시킬 수 있는 작용화된 나노섬유를 도입하는 것으로 설계되었다. 수득한 섬유-하이드로겔 복합체는 두 가지 핵심 성분 때문에 이전의 연조직 복합체보다 개선된다. 첫째, 나노섬유는 등방성 강화를 달성하기 위해 하이드로겔 내의 높은 장입 수준에서 균일하게 분산되는 것이 필요했다. 조직-공학기술 분야는 일반적으로 전기방사된 나노섬유를 평평한 시트 또는 섬유 매트로 이용했다. 이들은 그런 다음 전형적으로 하이드로겔 전구체 용액으로 매트를 함침함에 의해 복합체로 제조된다.

[0271] 이것은 하이드로겔 전반에 걸쳐 나노섬유의 분산을 크게 구속하고 복합체의 기하형상을 2D 시트 또는 튜브로 제한한다. 이들 기하학적 구조는 특정 적용 예컨대 신경 치유 또는 상처 드레싱에 유용하지만, 용적의 결합을 요구하기에는 좋지 못하다. 섬유 시트를 냉동 밀링함에 의해, 평균 섬유 길이를 수용액에서 현탁액으로 남아있게 하는 충분히 짧은 길이로 감소시키는 것이 가능하였다. 따라서, 샘플은 그런 다음 하이드로겔 전구체 용액으로 쉽게 피펫팅되어 겔화 전에 하이드로겔 용적 전반에 걸쳐 나노섬유 단편의 균일한 분산물을 형성한다. 용액은 그런 다음 주사가능한 제형으로 직접적으로 사용될 수 있으며, 대부분의 전자방사된 나노섬유 메쉬의 제한된 평면 기하구조와는 달리, 어떤 임의의 기하학적 구조의 스캐폴드 겔을 형성하기 위해 주형에 첨가될 수 있다. 하이드로겔 내의 분산된 섬유의 복합체 구조는 또한 세포와 기질의 섬유질 구조를 반복하여 (도 6G), 복합체 내에서의 세포 이동을 보조할 수 있는 접착 부위를 제공한다.

[0272] 두 번째로, 하이드로겔 내에 나노섬유를 단순히 분산시키는 것은 강한 복합체를 형성하기에 불충분하다. 이들 데이터는 단지 나노섬유를 포함하는 것만으로 복합체의 탄성 계수가 거의 개선되지 않으며 계면 접합이 도입되었을 때에만 개선이 이루어짐을 나타낸다. 하이드로겔과 섬유 성분 사이에 강한 결합을 형성하지 않으면서 물과 하이드로겔 성분이 보다 단단한 물질로 하중을 이동함이 없이 섬유 성분을 지나 미끄러질 수 있기 때문에 계면 결합이 필요하다. 더욱이, 이러한 이질적인 물질들 간의 계면은 복합체에서 적층분리 및 파괴를 이어질 수 있다. 또한, PCL의 초기 소수성은 섬유가 우선적으로 함께 응집되어 현탁액에서 침강하는 응고를 형성하기 때문에 수용액에서 분산되기 어렵게 만든다. 플라즈마 처리 및 차후의 카복실산 기 및 아민 기로 작용화는 섬유의 친수성을 크게 증가시키고 분산을 허용한다. 기계적 특성에서 극적인 증가는 섬유 표면상의 말레이미드 기와 하이드로겔 분자 상의 티올 기 사이에서 계면 결합이 일어날 때만 발생했다. 이 공유-강도 결합은 압축 또는 인장 도중 섬유에 하중을 보다 효율적으로 전달하여, 보다 단단하고 강한 물질로 이어진다. 또한 복합체는 말레이미드 밀도가 증가함에 따라 탄성 계수가 증가하는 강한 추세를 보여, 강화 기전에서의 그것의 탁월함뿐만 아니라 보강재의 조절가능한 특성을 역설한다.

[0273] 본 연구에서, 섬유의 총 표면적, 섬유 표면의 기능성 말레이미드 기의 밀도, 및 하이드로겔에 장입된 섬유를 포함하여 다양한 인자에 의해 섬유-하이드로겔 복합체의 기계적 특성을 조정하는 것이 가능하다는 것이 확인되었다. 먼저, 섬유의 더 작은 직경을 갖는 복합체는 더 큰 직경의 섬유를 갖는 복합체보다 더 높은 압축 및 전단 저장 탄성률을 나타냈다 (도 7A 및 도 8C). 유사하게, 문헌에서, 글루타르알데하이드를 사용하여 플라즈마 활성화된 단일 초고-고분자-중량 폴리에틸렌 (UHMWPE) 섬유 (~25 μ m)는 60개의 UHMWPE 섬유 다발의 것에 비교하여 폴리(비닐 알코올) 하이드로겔에서 계면 전단 강도의 대략 2.36-배수 증가를 나타냈다 [문헌 [Acta Biomaterialia 2014, 10, 3581-3589]]. 따라서, 섬유 직경을 감소시키고 그리고 따라서 섬유 비 표면적을 증가시키는 것이 복합체의 기계적 특성을 개선시키는데 효과적일 수 있다는 것이 가능하다. 그러나, 각각의 섬유 그룹은 섬유 상에 약간 상이한 MAL 표면 밀도 (대략 10-15nmol/mg)를 가지므로 섬유 표면적의 효과 만이 결정적으로 결정될 수는 없다. 그러므로, 두 번째로 복합체는 동일한 직경 섬유로 되지만, 섬유 상에 다양한 MAL 표면 밀도로 제조되었다 (도 8). 복합체의 압축 및 전단 저장 탄성률은 섬유 상의 MAL 표면 밀도가 증가함에 따라 증가되었다. 계면 결합이 없는 복합체는 추가의 MAL 콘주게이션 단계 없이, PAA 단계를 통해 변형된 섬유를 사용함에 의해 (섬유 상의 카복실 기) 그것의 압축 탄성률의 약간의 향상만을 나타냈다는 것이 확인되었다 (도 7). 계면 결합의 중요성은 추가로 겔화 전에 시스테인으로 섬유 상의 MAL 기를 켄칭함으로써 확인되었다. 시스테인은 말레이미드 기에 용융하고 섬유와 하이드로겔 사이의 계면 결합을 방지하여, 섬유가 그렇지 않으면 계면-결합 군과 동일하게 가공되었기 때문에 계면 결합의 효과만을 분리하는 것을 허용한다. 흥미롭게도, MAL-켄칭된 섬유를 갖는 복합체의 기계적 특성은 극적으로 감소하였으며 (도 7A 및 도 8B), MAL-켄칭된 섬유 군은 HA의 농도가 10mg/ml일 때 HA 하이드로겔-단독의 것보다 낮은 압축 탄성률을 나타냈다 (도 7). 이전의 연구 [문헌 [Acta Biomaterialia 2014, 10, 3581-3589]]에서 볼 수 있듯이, MAL-켄칭된 섬유는 섬유와 하이드로겔의 계면에서 쉽게 적층분리됨으로써 전체 복합체를 약화시킬 가능성이 있다. 또한, 작용기를 갖지 않는 섬유는 겔화 동안 하나의 성분으로 구

성되거나 또는 임의의 이물질이 없는 순수한 하이드로겔에 비해 겔화를 억제하는 이물질로서 작용할 수 있다 [문헌 [JMC B 2015, DOI: 10.1039/C3TB21830A, Journal of Biomedical Materials Research Part A 2010, 95 (2), 564-573]]. 더욱이, 다양한 MAL 표면 밀도를 갖는 복합체에 의한 계면 결합의 밀도와 전단 저장 탄성률 사이의 상당한 상관관계가 확인되었다 (도 8C). 이들 연구는 하이드로겔의 기계적 특성이 계면 결합에 의해 보강되고 조정될 수 있다는 강한 증거를 제공한다. 셋째로, 하이드로겔에 대한 섬유층의 중량 비를 증가함에 따라 복합체의 전단 저장 탄성률이 향상되었다 (도 9). 이로써, 본 중량 비는 섬유-하이드로겔 복합체의 기계적 특성을 조정하는데 사용될 수 있는 또 다른 변수라는 것이 확인되었다. 그러나, 여기서 섬유 장입이 증가함에 따라, 전단 저장 탄성률 증가가 평탄해지기 시작하고 본 중량 비의 0.6 이상으로 더욱 약간 감소되었다는 것이 확인되었다. 이 포화 효과에 대한 하나의 가능성은 복합체의 계면 결합의 밀도가 MAL을 갖는 과잉의 섬유가 HA의 티올기의 큰 분획과 어떻게 반응하여, 이들이 겔화를 위해 PEGDA와 반응하는 것을 방지하는지에 의해 줄어들었다는 것일 수 있다. HA 하이드로겔의 최고 전단 저장 탄성률은 HA-SH 및 PEGDA의 각각의 작용기의 등물 양으로 얻어질 뿐만 아니라 HA-SH 또는 DA 중 어느 하나의 과잉량으로 감소하는 전단 저장 탄성률을 고려하면 (도 14A), 증가하는 섬유의 양에 따른 섬유 상의 과잉의 MAL은 복합체 내에서 SH-대-DA 결합을 혼란시킬 수 있다.

[0274] 일반적으로, 이식된 생체적합물질은 조직 결합을 재생하는 동안 수많은 내부 및 외부 응력을 견뎌야 한다. 비록 응력이 심하지 않고 연속적이지 않지만, 응력 저항 시험은 이러한 응력을 모방하기 위해 반복 조건과 고주파수 (10Hz) 하에서 수행되었다 (도 10 및 도 8). HA 하이드로겔 및 섬유-HA 하이드로겔 복합체는 모두 반복 압축 변형 동안 임의의 손상 또는 그것의 기계적 강도의 감소 없이 견뎌냈다. 현저하게, 계면 결합을 갖는 복합체는 주파수 10Hz에서 그것의 전단 저장 탄성률을 유지하는 반면, HA 하이드로겔 및 계면 결합이 없는 복합체의 전단 저장 탄성률은 10Hz에서 줄어들었다. 이 추세는 분산된 섬유와의 계면 결합이 복합체의 기계적 특성의 보강에 결정적이라는 것을 나타낸다. 또한, 섬유-HA 복합체는 동결건조 및 후속 재수화를 거친 후 그것의 치수 및 그것의 영 모듈러스를 유지한 반면 HA-단독 겔은 실질적으로 동일한 공정 하에서 수축했다 (도 6C 및 도 10). 탈수 및 재수화 후의 이 형상, 용적, 및 강성도 유지는, 복합체의 동결건조된 형태를 갖는 것이 상품의 살균 및 저장을 용이하게 하기 때문에, 이 기술의 임상 번역에 중요한 특징이다.

[0275] 연조직 재건을 위해, 이상적인 이식된 스캐폴드는 결합 공동을 즉시 채울 것이지만, 스캐폴드 안으로 신체 자신의 세포가 성장하고, 적절한 조직 표현형으로 증식하고 분화하기 위한 기질로서 또한 역할을 하여, 결국 인공 스캐폴드를 정상적인 건강한 조직으로 대체한다. 따라서, 관련된 세포가 하이드로겔 또는 복합체 스캐폴드 내에서 이동할 수 있다는 것이 결정적으로 중요하다 관련된 세포 유형이 스캐폴드 내에서 이동하는 잠재력을 결정하기 위해, hASC 회전자원체를 HA 하이드로겔 및 섬유-HA 하이드로겔 복합체 내에 씨딩하고 그것의 세포 이동을 평가했다. HA 하이드로겔은 세포 이동을 위한 견인력을 제공하기에는 너무 부드럽기 때문에 hASC는 HA 하이드로겔-단독 내부에서 이동할 수 없었다 (도 11A) [문헌 [Biomaterials 2015, 42, 134-143]]. 흥미롭게도, 비록 복합체의 전단 저장 탄성률은 HA 하이드로겔의 전단 저장 탄성률과 유사하지만, hASC는 복합체의 내부의 회전자원체로부터 상당히 이동할 수 있었다 (도 11). 하나의 가설은 복합체 내부의 섬유가 지방 조직의 원상태 ECM의 피브릴 성분과 유사하게 세포 이동을 유도하는 접착 부위를 제공할 수 있다는 것이다. 정렬된 섬유 및 무작위 섬유가 다양한 세포 유형에서 세포 부착, 증식, 분화 및 이동에 핵심 인자가 될 수 있다는 것이 이전에 실증되었다 [문헌 [Biomaterials 2005, 26, 2537-2547/2006, 27, 6043-6051/2009, 30, 556-564/2010, 31, 9031-9039, Acta Biomaterialia 2013, 9, 7727-7736]]. 특별히, 세포는 그것의 세포골격이 밀에 있는 섬유와 함께 정렬되고 이를 따르기 때문에, 섬유를 가이드 매트릭스로 인식하였다는 것이 관측되었다 [문헌 [Biomaterials 2006, 30, 6043-6051/2009, 30, 556-564]]. 그러나, 복합체 내부의 섬유의 직경은, 세포가 1000-nm 또는 286-nm 나노섬유가 있는 복합체에서 견고하게 이동함에 따라, 이동하는 세포에 영향을 미치지 않는다 (도 19).

[0276] 벤치톱 시험 및 시험관내 세포 배양에서 볼 수 있는 다공성 및 세포 이동 효과는 복합체의 생체내 시험 동안 심오한 차이를 나타냈다. 섬유 없이 지방-모방하는 2 kPa의 강성도로 제형화된 하이드로겔은 세포 침투를 위한 다공성이 너무 낮았다. 세포 반응은 이물질 반응의 전형적인 침투 또는 재건의 결여로, 콜라겐의 두꺼운 층으로 하이드로겔을 차단했다. 그러나, 나노섬유-하이드로겔 복합체는 이물질 반응 없이 세포 내성장, 혈관형성 및 세포 재건을 용이하게 하기 위해 충분한 다공성을 갖는다. 이것은 신체의 용적의 결합을 궁극적으로 신체 자신의 조직으로 채울 영구적인 전망을 제공한다. 결과는 숙주 조직과의 보다 단단한 계면을 형성할 수 있고 강력한 지방 생성의 징후를 보이는 주사가능한 제형에서 더욱더 확인하였다.

[0277] 결론:

[0278] 하이드로겔 내의 작용화된 나노섬유의 분산은 2개 성분의 조합된 강도를 갖는 복합 구조를 형성한다. 나노섬유와 하이드로겔 성분 사이의 계면 결합은, 조직 및 세포 내성장을 용이하게 하기 위한 고다공도 및 기공 크기를

유지하면서, 강한 복합체를 제조하는 데 핵심이다. 수득한 복합체 특성은 섬유 직경, 섬유 장입 수준, 말레이미드 밀도 수준 및 하이드로겔 성분의 장입 수준을 변화시킴으로써 쉽게 조절될 수 있다. 이는 목표한 전체 강성에서 낮은 가교결합 및 보다 높은 다공성을 허용하여, 세포 침투 및 차후의 조직 재형성을 증가시킨다. 섬유 자체는 또한 원상태 ECM에서 볼 수 있는 것과 유사한 부착 부위를 제공함으로써 세포 이동을 직접적으로 개선할 수 있다. 수득한 복합체 임플란트는 원상태 지방 조직의 강도와 일치하도록 조정될 수 있지만, 세포 침투 및 재건을 위한 투과도를 여전히 유지한다. 이 신규한 복합체는 어떤 임의의 형상의 용적의 결합을 즉시 채울 정도로 충분히 강하다. 본 복합체 임플란트는 그런 다음 신체 자신의 세포가 복합체에 침투하여 혈관을 형성하고, 지방세포와 같은 세포로 분화되도록 허용하는 스캐폴드 역할을 한다. 초기 결합 공동이 정상적인 건강한 조직으로 완전히 대체될 때까지, 조직 재형성 중에 스캐폴드가 느리게 분해되어 질 것이다. 복합 구조는 재건 및 미적 수술 잠재성에 대한 큰 잠재성을 가지고 있다.

[0279] 실시예 16. 의료 기기의 생산 및 사용

[0280] 합성 및 생물학적 메쉬는 일반적인 수술, 재건 수술, 신경외과, 비뇨기과, 부인과 수술, 정형외과 수술 및 미용 수술에 광범위한 적용가능성을 가진다. 이들 메쉬는 신체 전체에 걸쳐 조직을 강화하거나 대체하는 데 사용된다. 이들 메쉬의 주요 한계는 이물질의 반응, 혈종 형성 및 다른 합병증 중 감염으로 이어지는 신체와의 그것의 좋지 못한 통합이다. 기존의 합성 메쉬와 비교하여 신체의 조직과의 통합이 크게 개선된 나노섬유-하이드로겔 복합 재료가 제공된다. 이 재료는 조직 보강 및 대체를 위한 메쉬로서 역할을 하기 위해 평평한 시트로 생산되고 이용된다. 또한 그것의 생체적합성과 통합 가능성을 개선시키기 위한 종래의 메쉬에 대한 부속물로 유용하다.

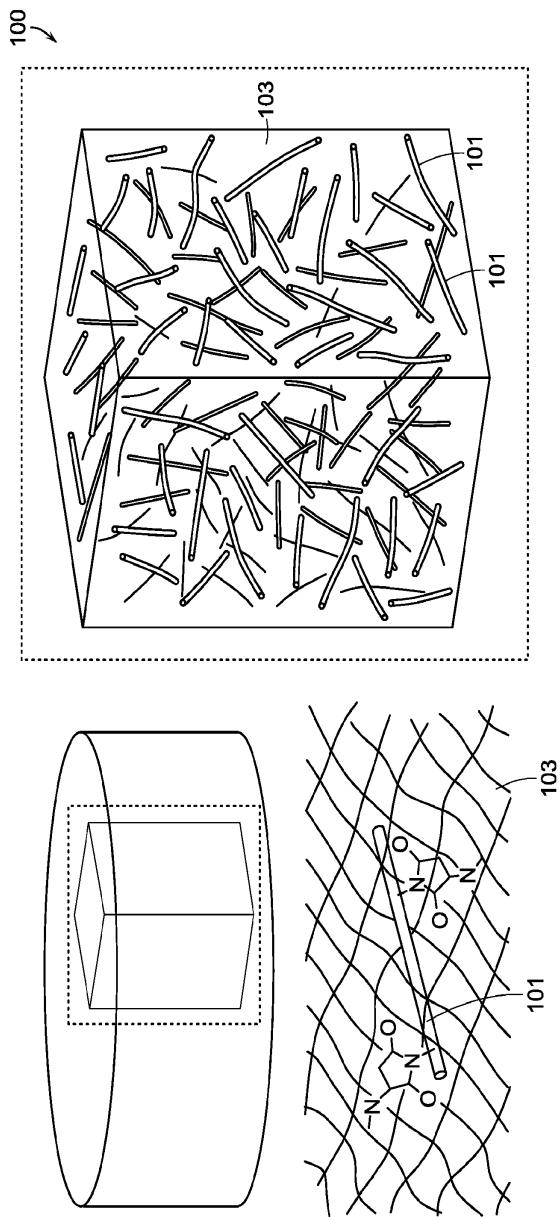
[0281] 본 발명의 스캐폴드 복합체는 외과용 메쉬 물질과 연계함에 의해 수술 도구에 편입된다. 예를 들면, 수술 도구는 i) 하이드로겔 물질에 작동가능하게 연결된 약 100nm 내지 약 8000nm의 평균 직경을 갖는 폴리머 섬유를 포함하는 "판상의" 스캐폴드 복합체; 및 ii) 외과용 메쉬 재료를 함유한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "판상의" 스캐폴드 복합체는 일반적으로 평면이고 가요성이며, 외과용 메쉬와 연계할 수 있는 충분한 표면을 갖는다. 예시적인 외과용 메쉬는 폴리글락틴 910, 폴리프로필렌, 폴리글리콜 산, 폴리테트라플루오로에틸렌 (ePTFE), 폴리글락틴-흡수성을 갖는 폴리프로필렌, 폴리글레카프론 25를 갖는 폴리프로필렌, 셀룰로오스를 갖는 폴리프로필렌, ePTFE를 갖는 거대다공성 폴리프로필렌을 포함한다. 그와 같은 의료 기기는 (예를 들면, 수술 치료의 부위에서) 조직 결합의 부위 또는 그 근위에서 인간 대상으로 쉽게 이식 (즉, 삽입)될 수 있는 크기와 형상의 것이다. 본 스캐폴드 복합체는 외과용 메쉬와 공유적으로 또는 비-공유적으로 연계되어 진다.

[0282] **균등물**

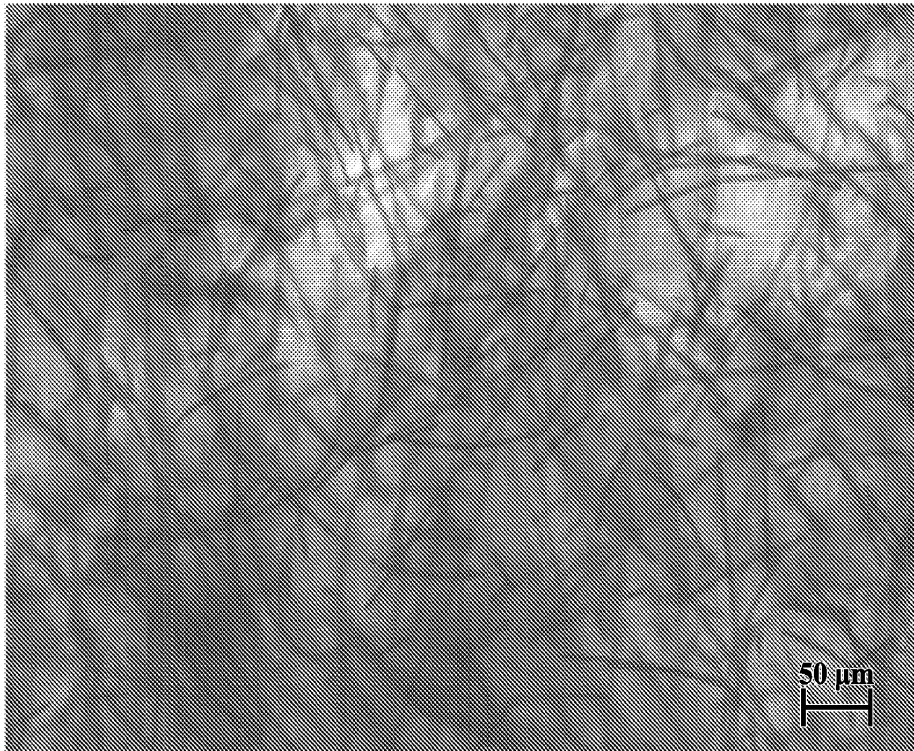
[0283] 본 명세서에 기재된 상세한 실시예 및 구현에는 예로써 단지 설명하기 위해 주어진 것이고, 본 발명을 결코 제한하는 것으로 간주되지 않는다고 이해되어야 한다. 이들의 관점에서 다양한 변형 또는 변경이 당해 분야의 숙련자에게 제안될 것이며, 본원의 사상 및 영역 내에 포함되며 첨부된 청구항들의 범위 내로 고려된다. 예를 들면, 성분의 상대적인 양은 요망된 효과를 최적화하기 위해 변화될 수 있고, 추가 성분이 첨가될 수 있고 및/또는 유사한 성분이 기재된 성분 중 하나 이상에 대해 치환될 수 있다. 본 발명의 시스템, 방법 및 공정과 관련된 추가의 유리한 특징 및 기능성은 첨부된 청구항들로부터 분명해질 것이다. 또한, 당해 분야의 숙련가는 일상적인 실험과정 미만을 사용하여 본 명세서에서 기재된 본 발명의 특정 구현에 대한 많은 균등물을 인식하거나 또는 확인할 수 있을 것이다. 그와 같은 균등물은 하기 청구항들에 포함되는 것으로 의도된다.

도면

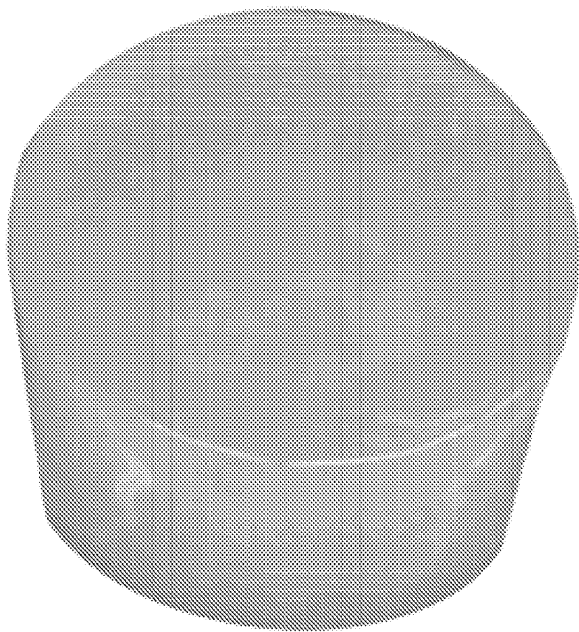
도면1a



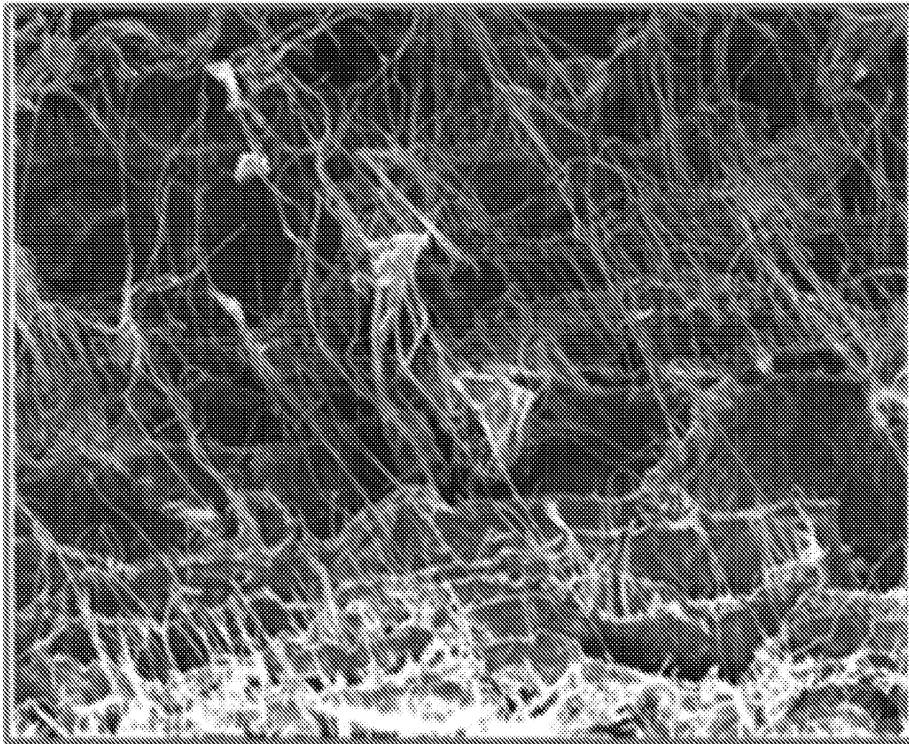
도면1b



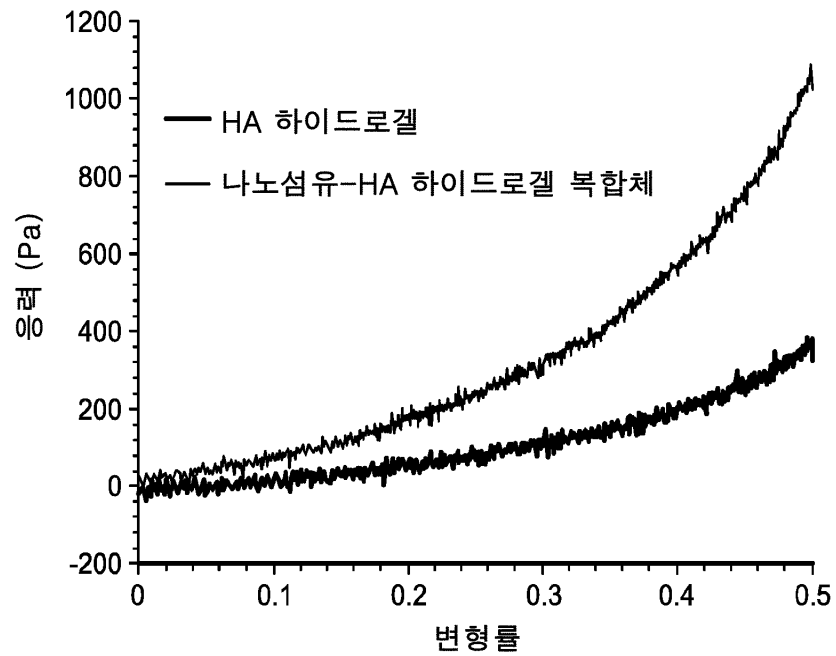
도면1c



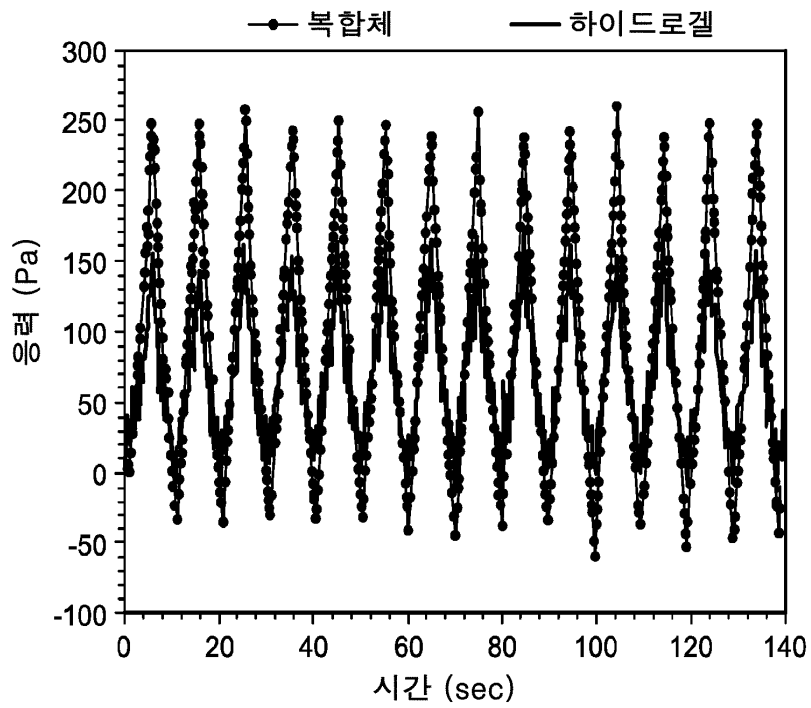
도면1d



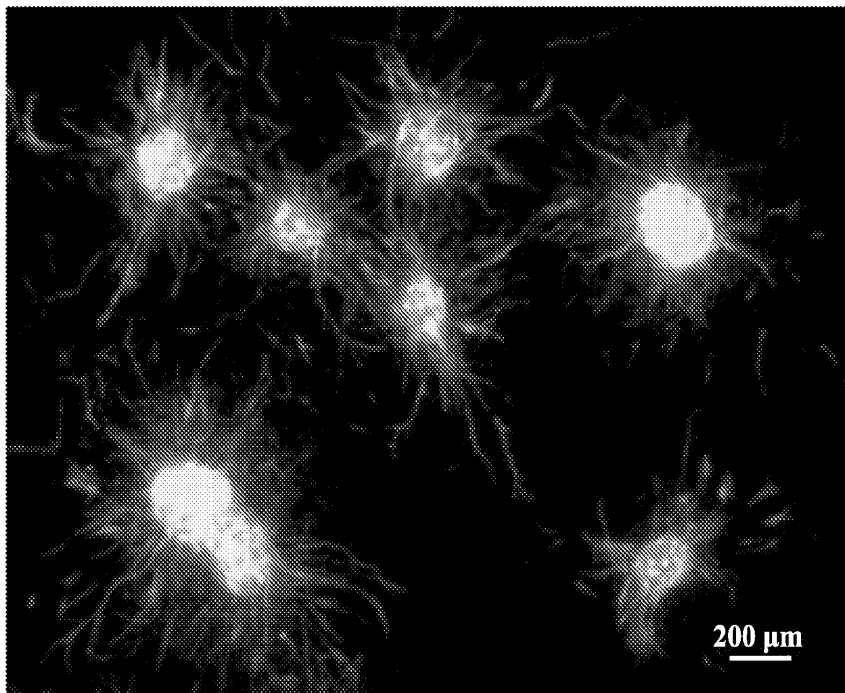
도면2a



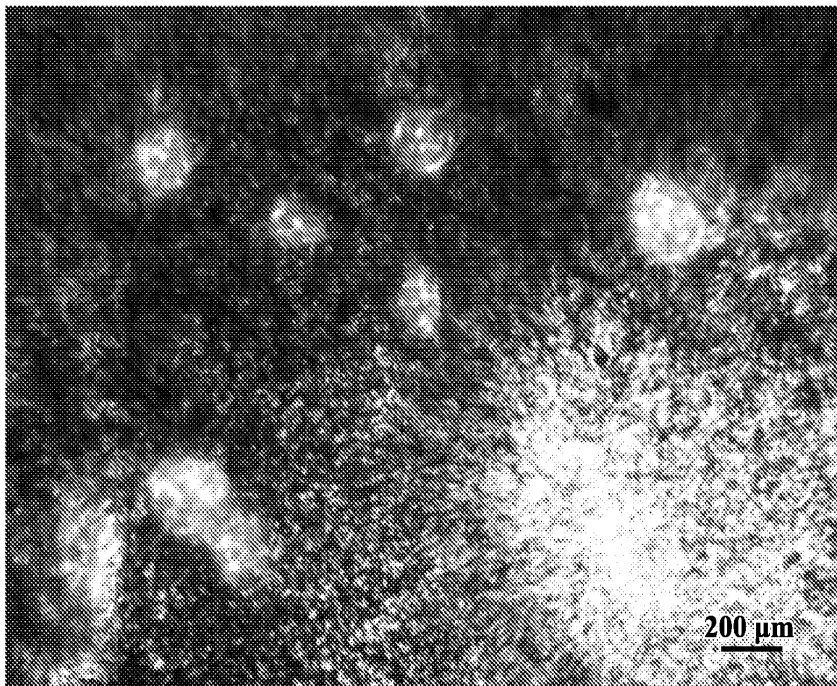
도면2b



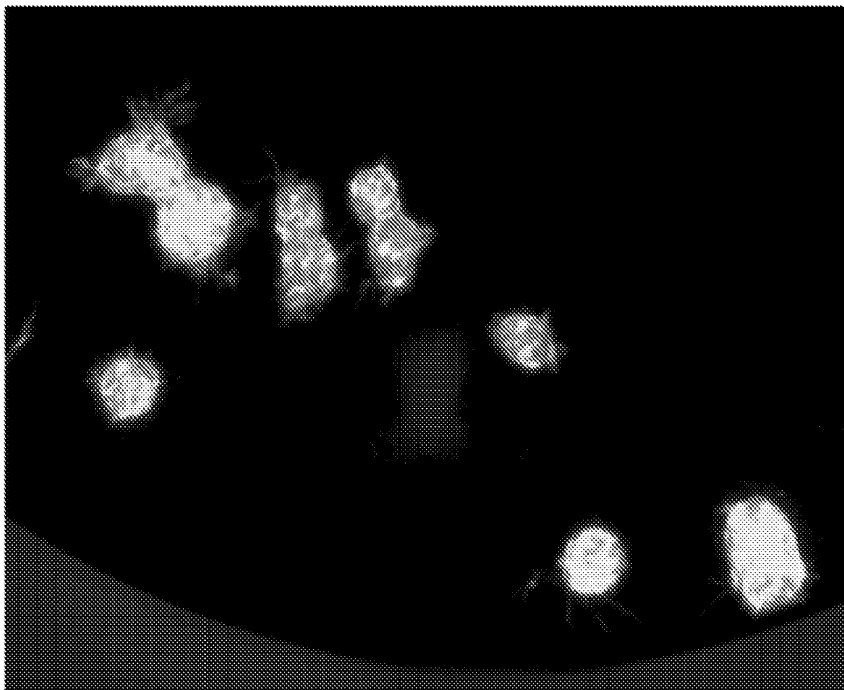
도면3a



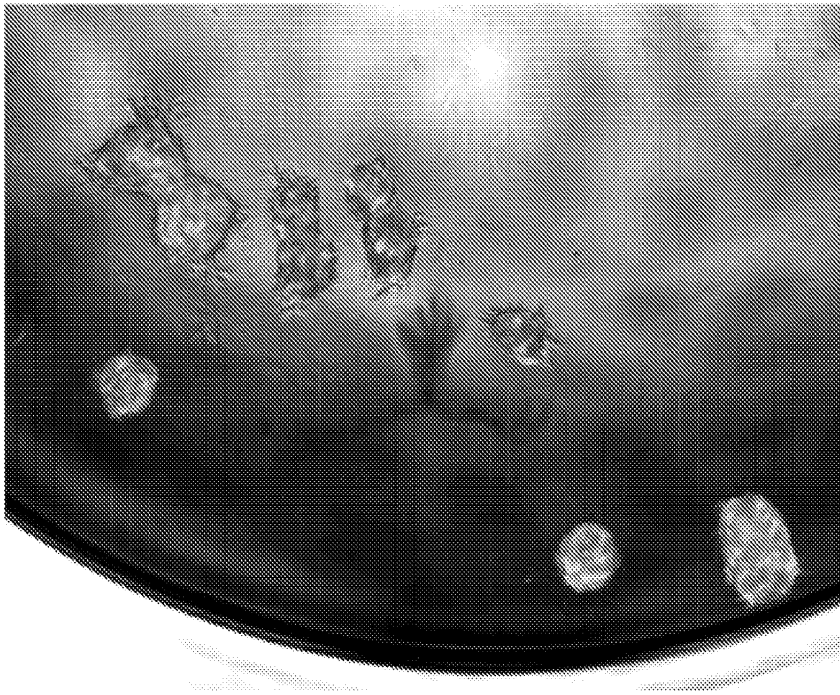
도면3b



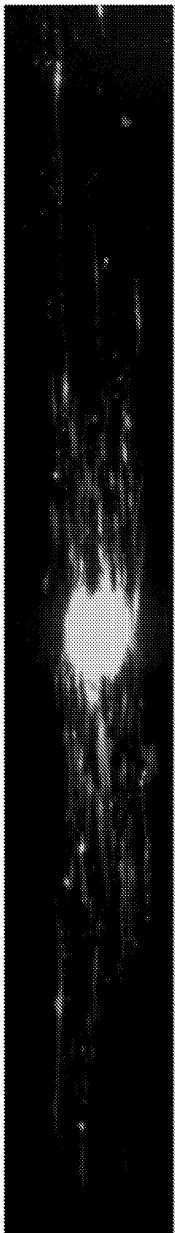
도면3c



도면3d



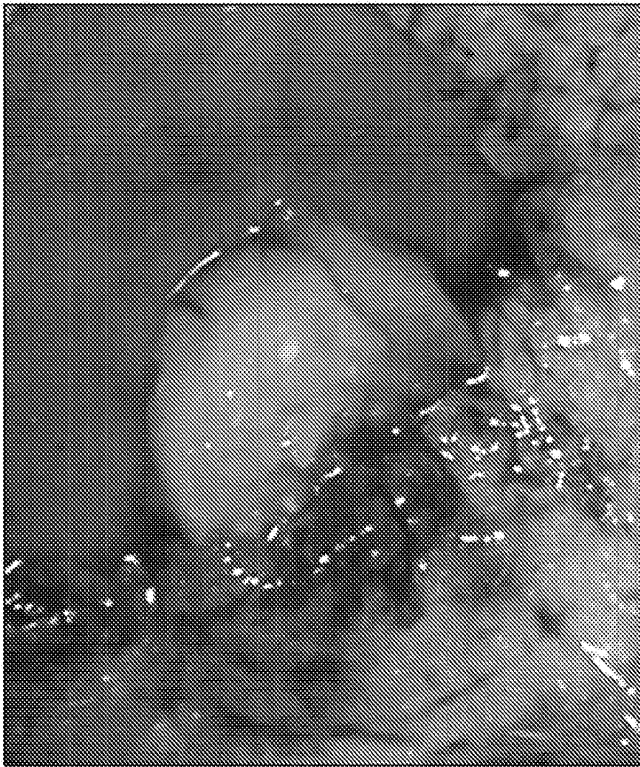
도면4a



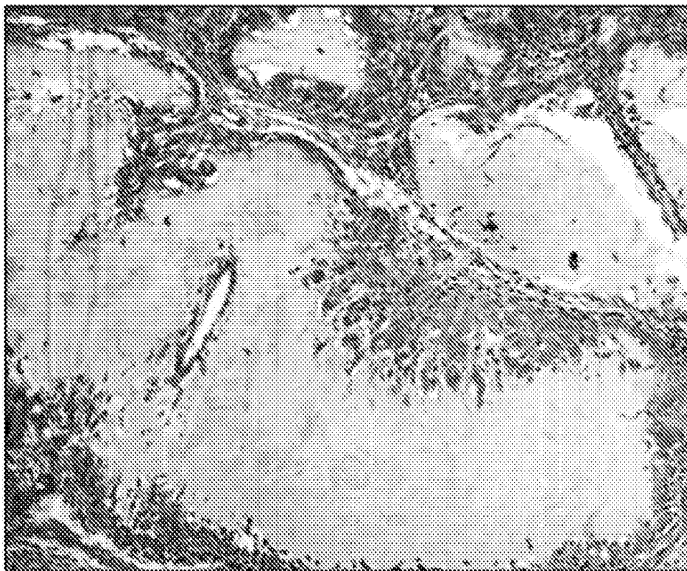
도면4b



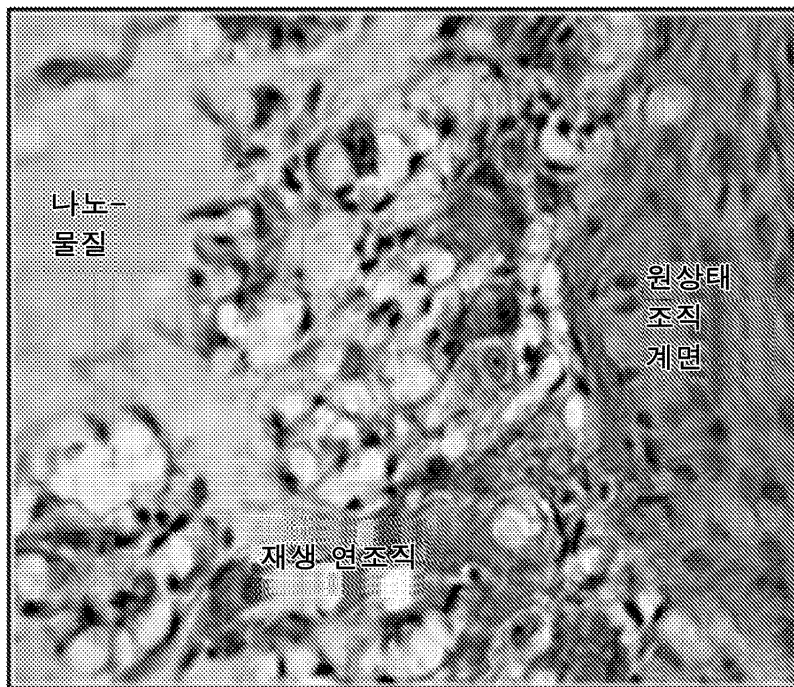
도면5a



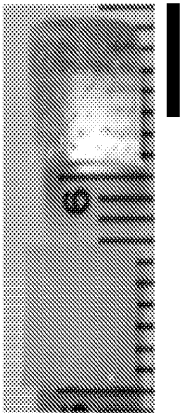
도면5b



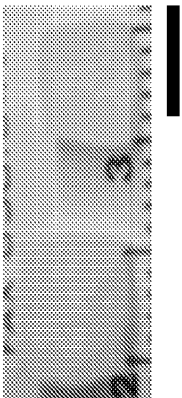
도면5c



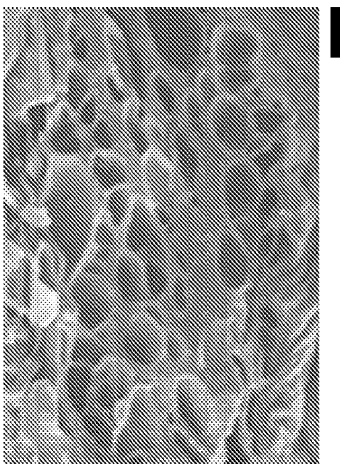
도면6c



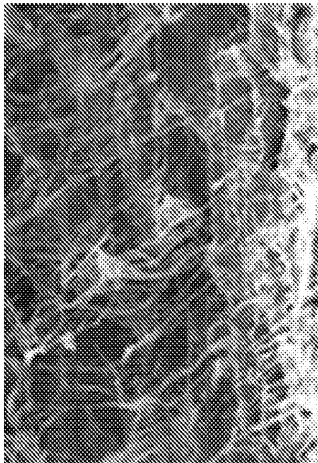
도면6d



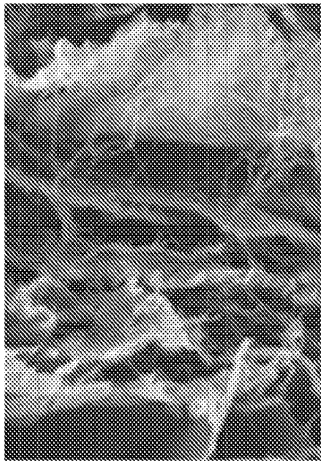
도면6e



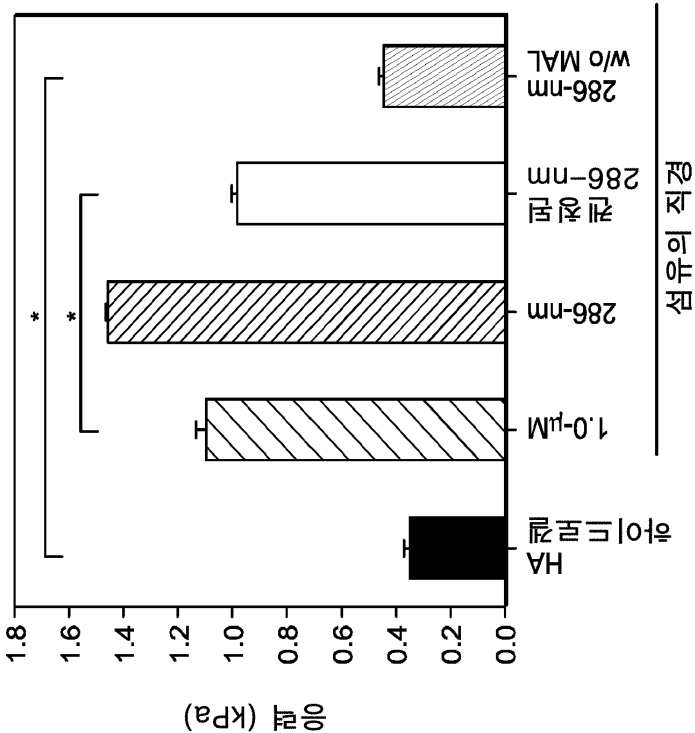
도면6f



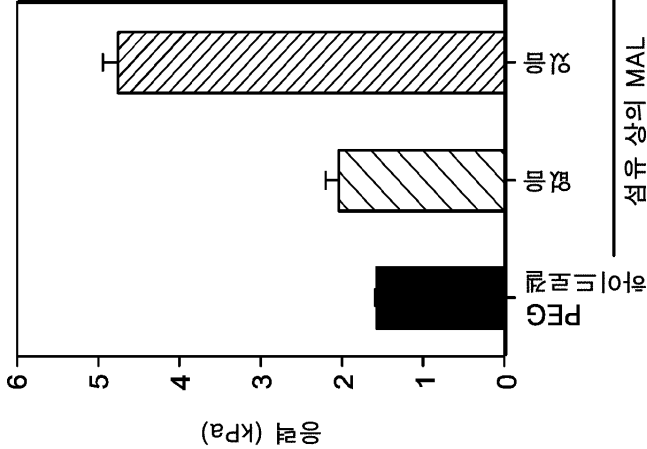
도면6g



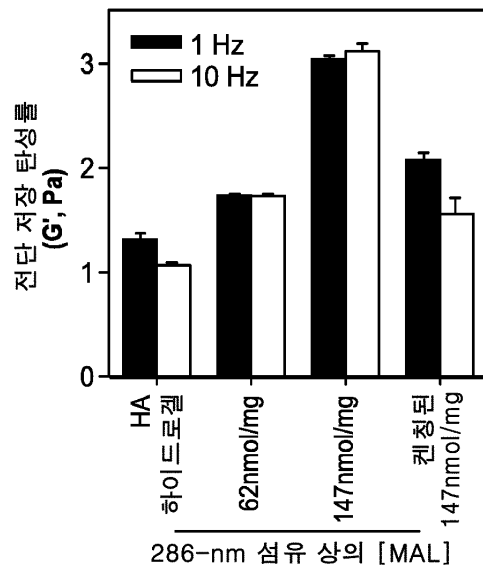
도면7a



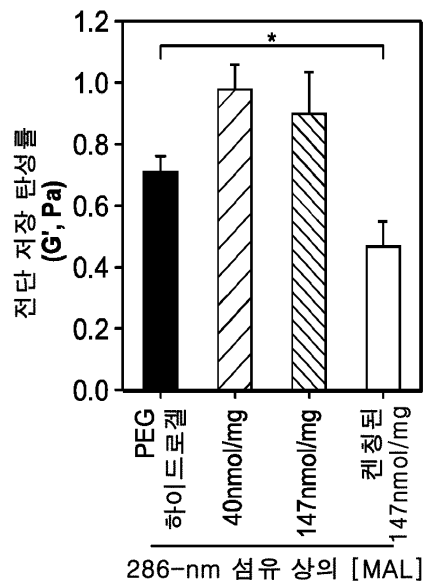
도면7b



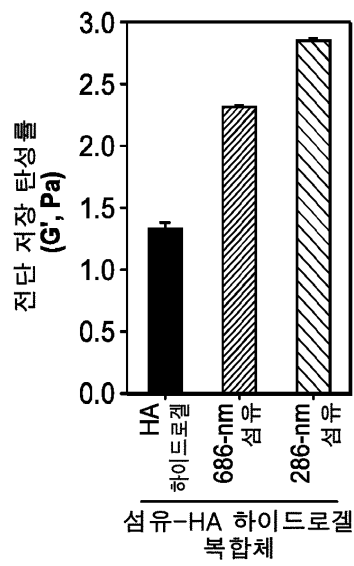
도면8a



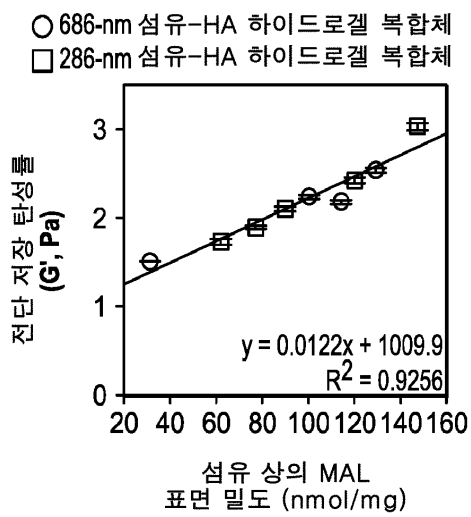
도면8b



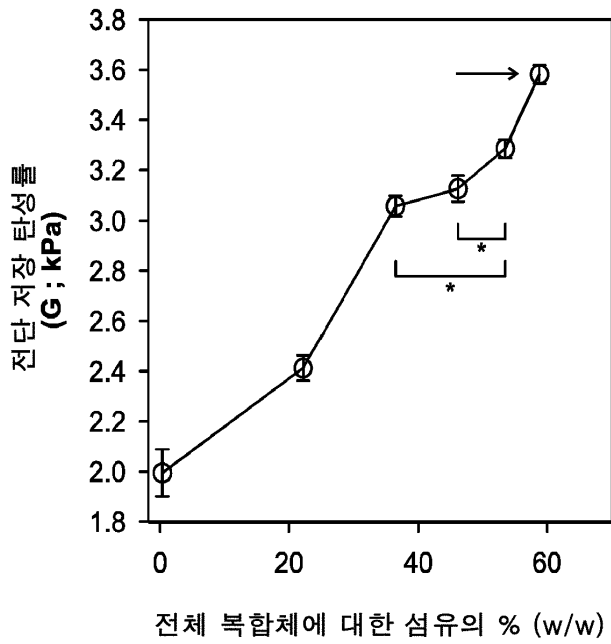
도면8c



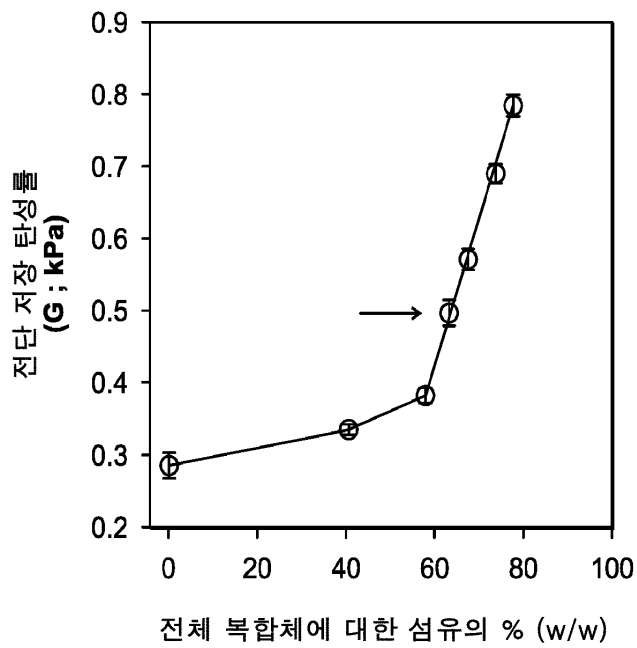
도면8d



도면9a

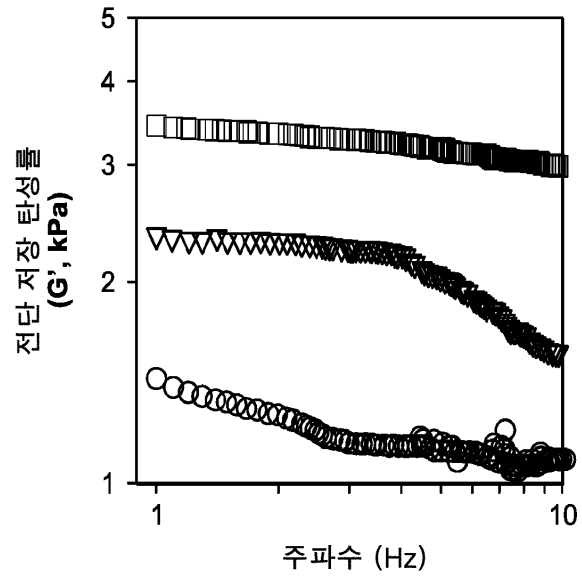


도면9b

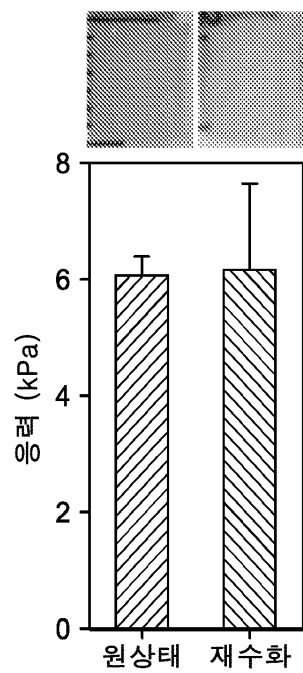


도면10a

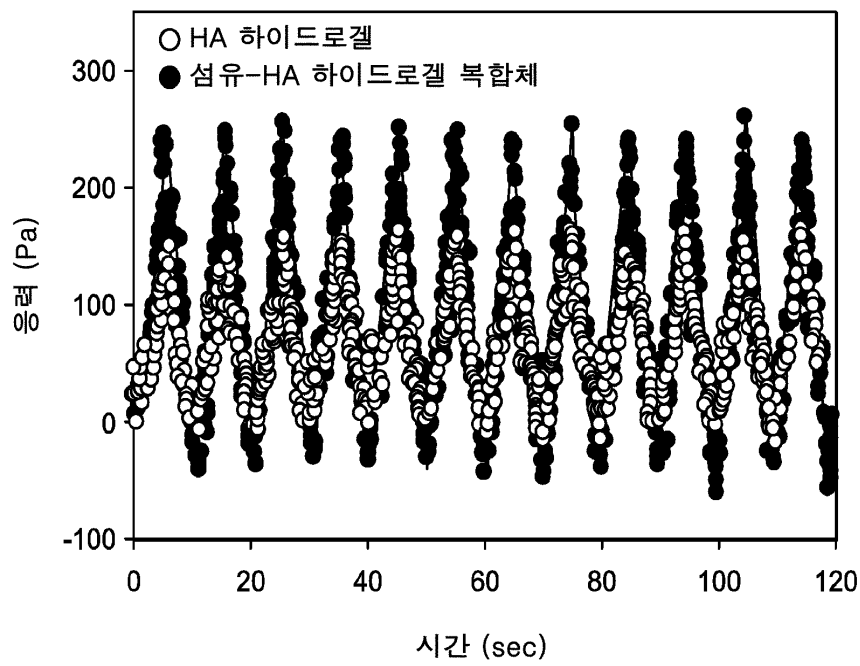
- HA 하이드로겔
- ▽ 686-nm 섬유-HA 하이드로겔 복합체
- 286-nm 섬유-HA 하이드로겔 복합체



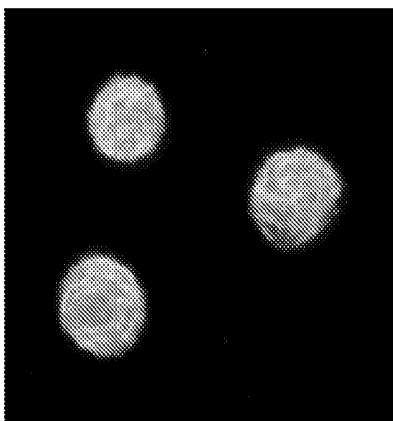
도면10b



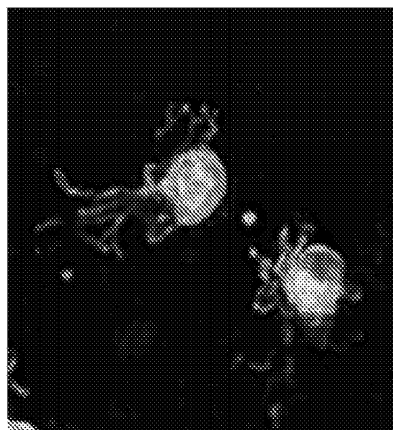
도면10c



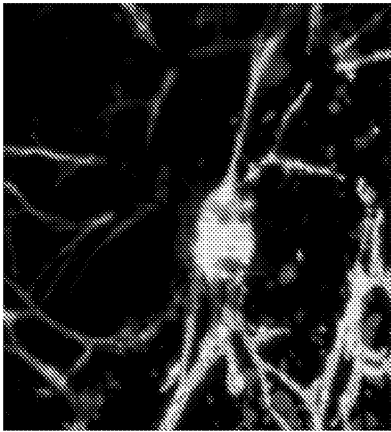
도면11a



도면11b



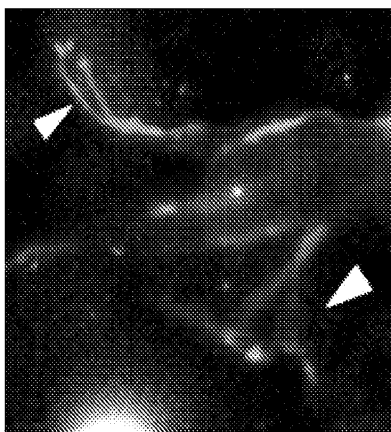
도면11c



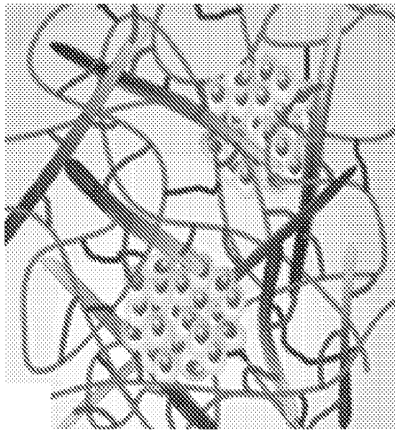
도면11d



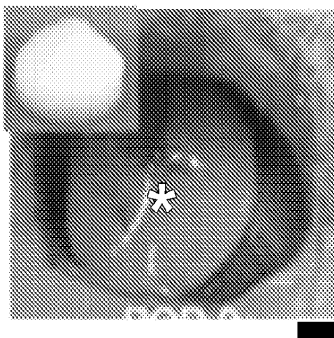
도면11e



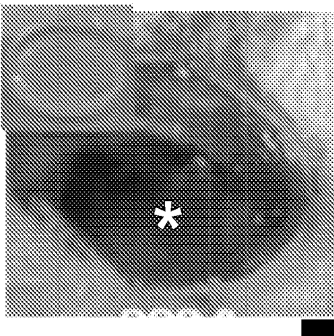
도면11f



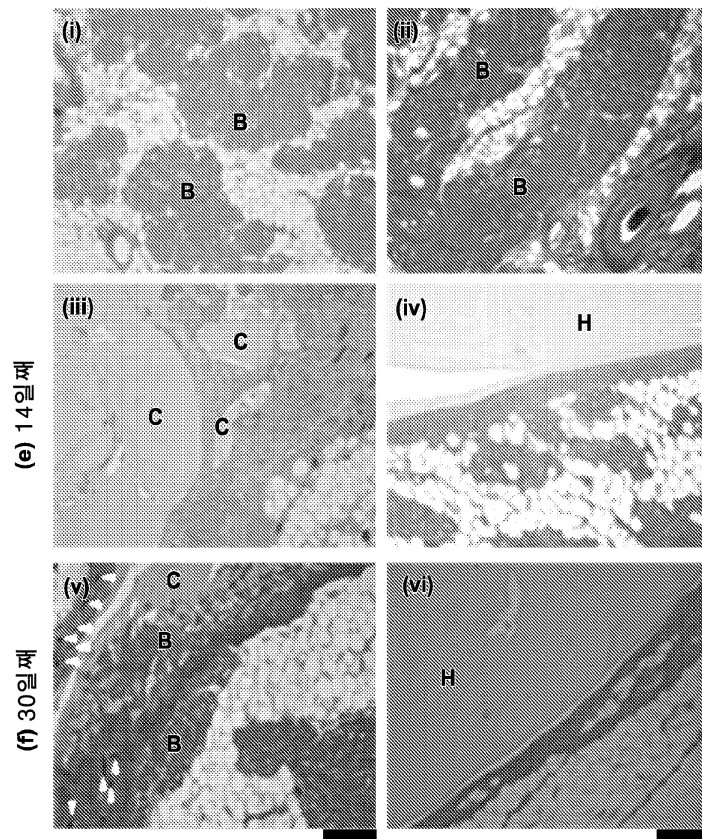
도면12a



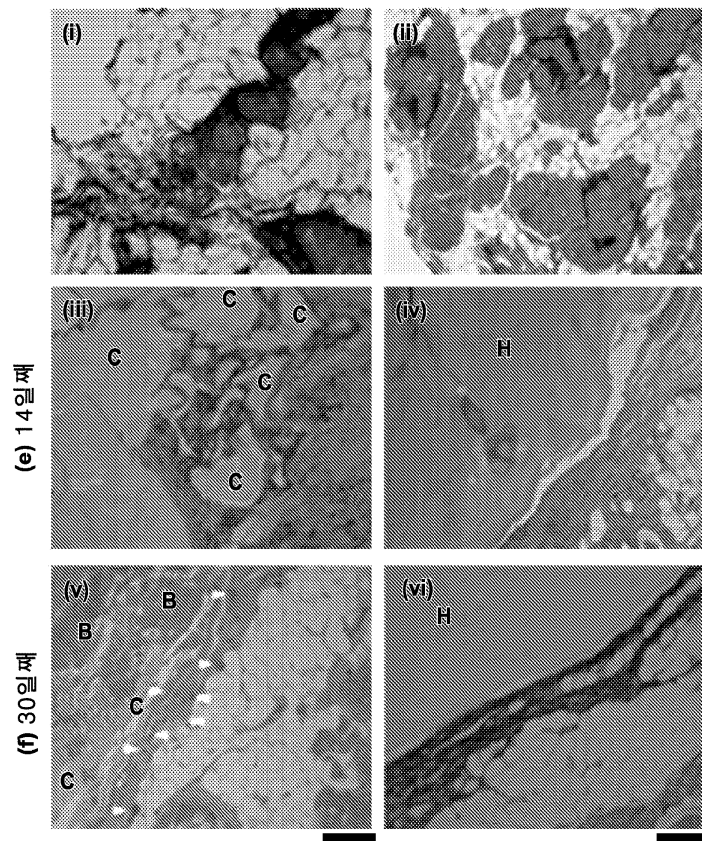
도면12b



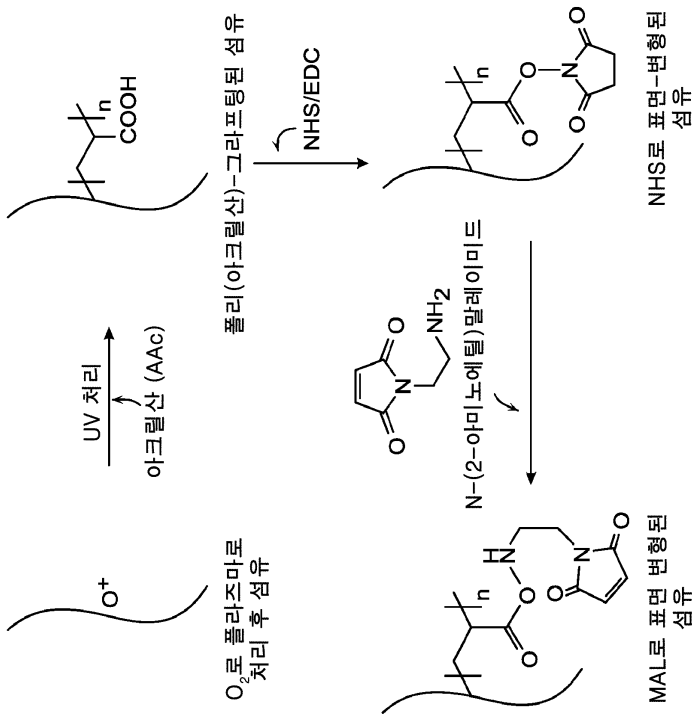
도면12c



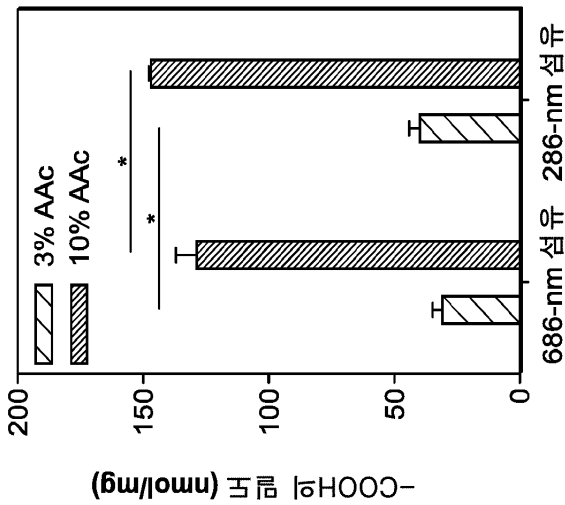
도면12d



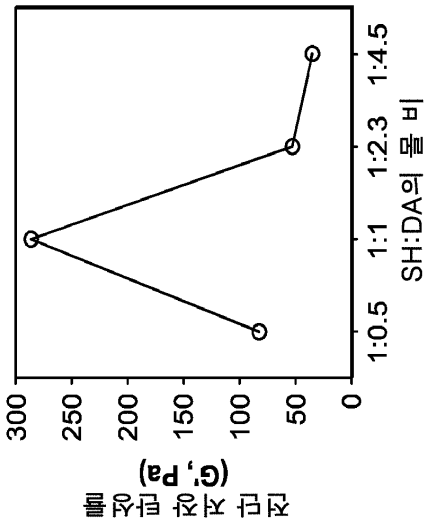
도면13a



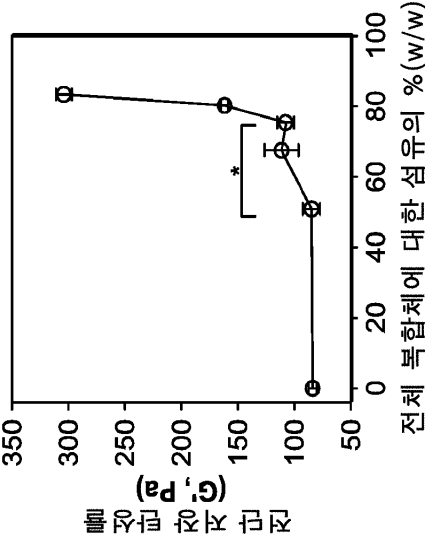
도면13b



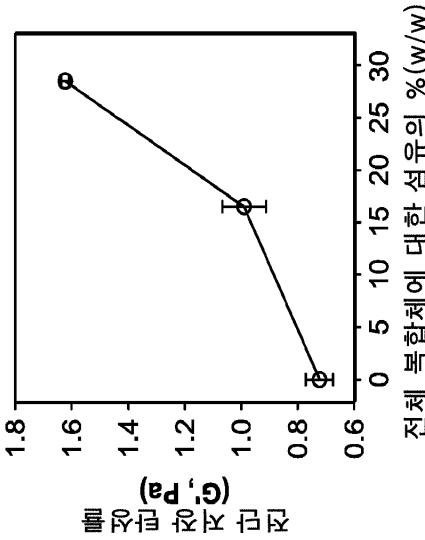
도면14



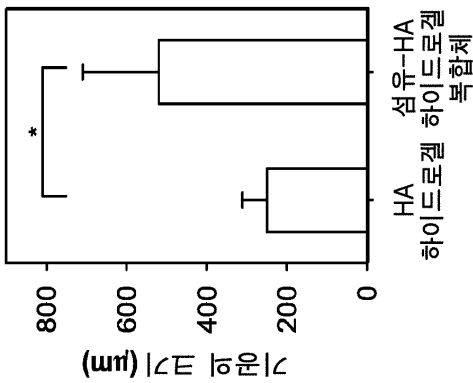
도면15a



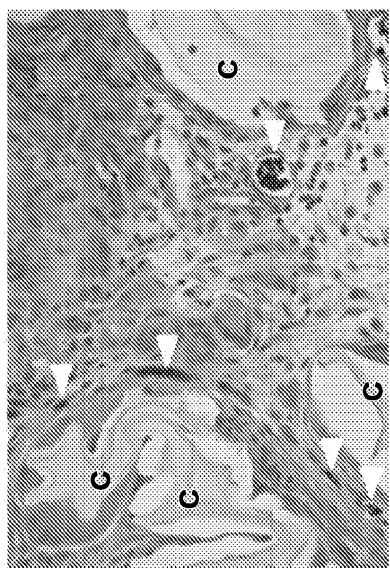
도면15b



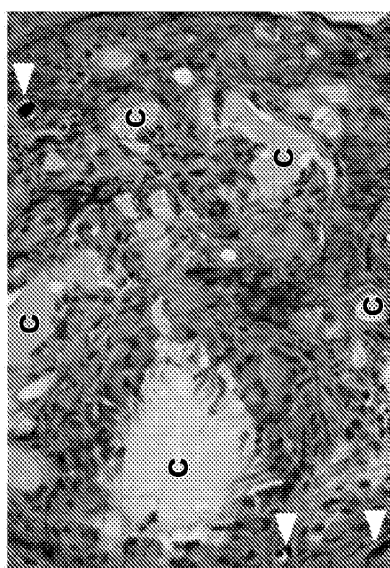
도면16



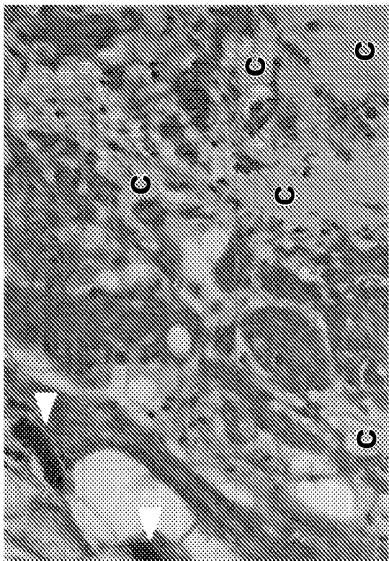
도면17a



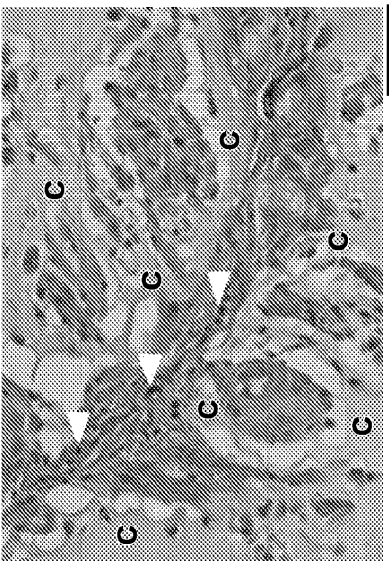
도면17b



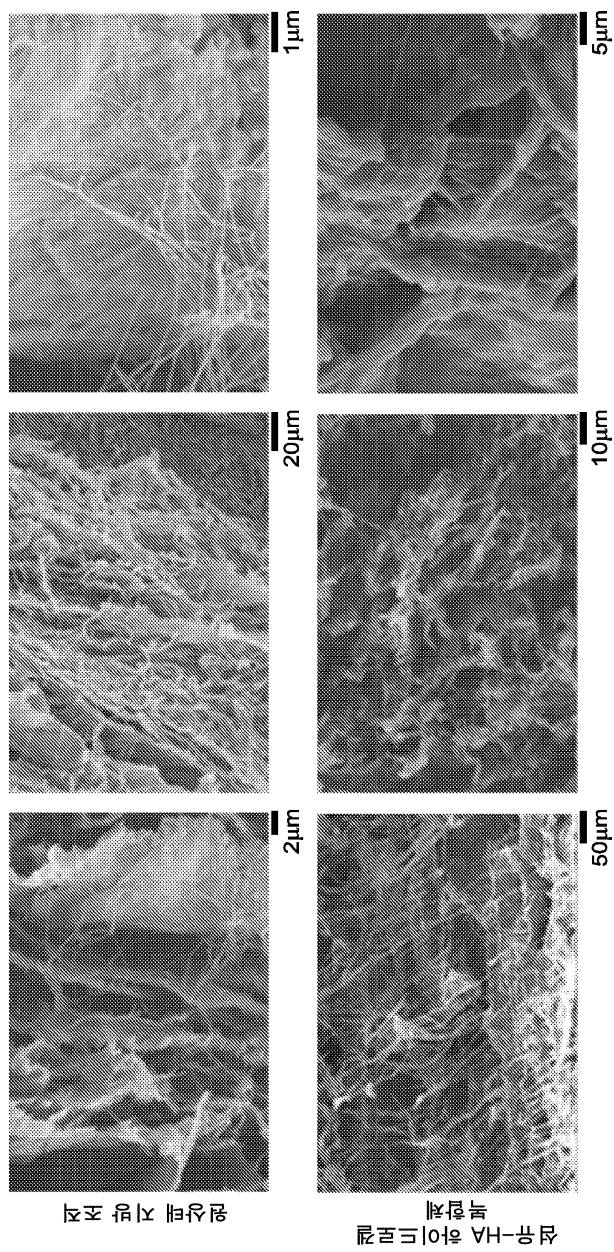
도면17c



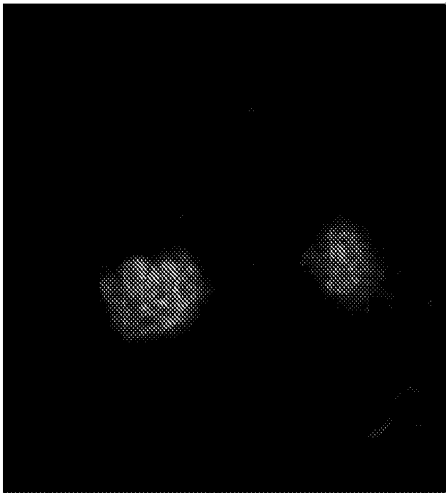
도면17d



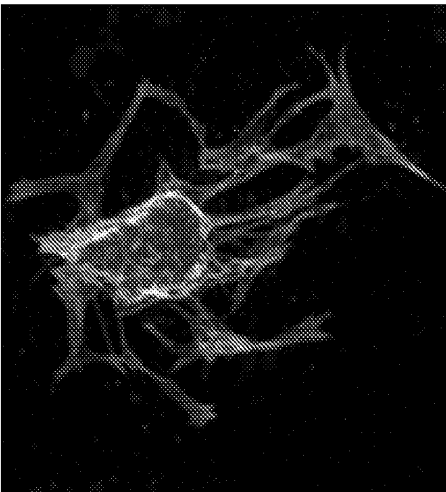
도면18



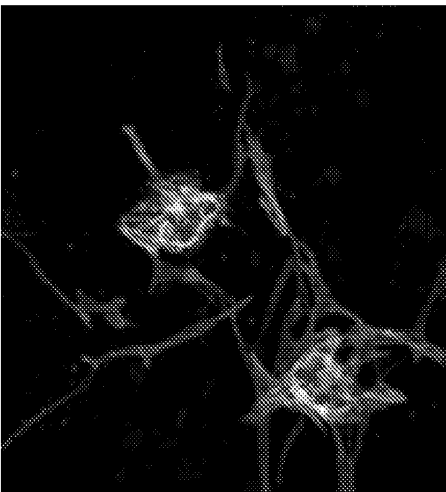
도면19a



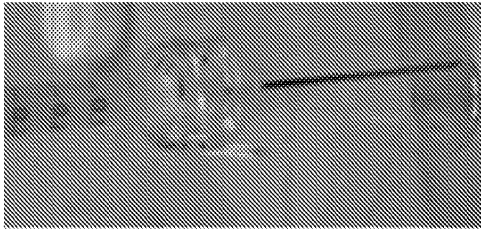
도면19b



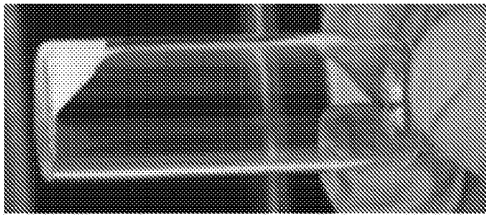
도면19c



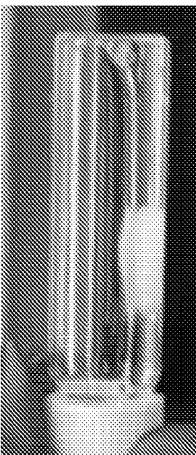
도면20a



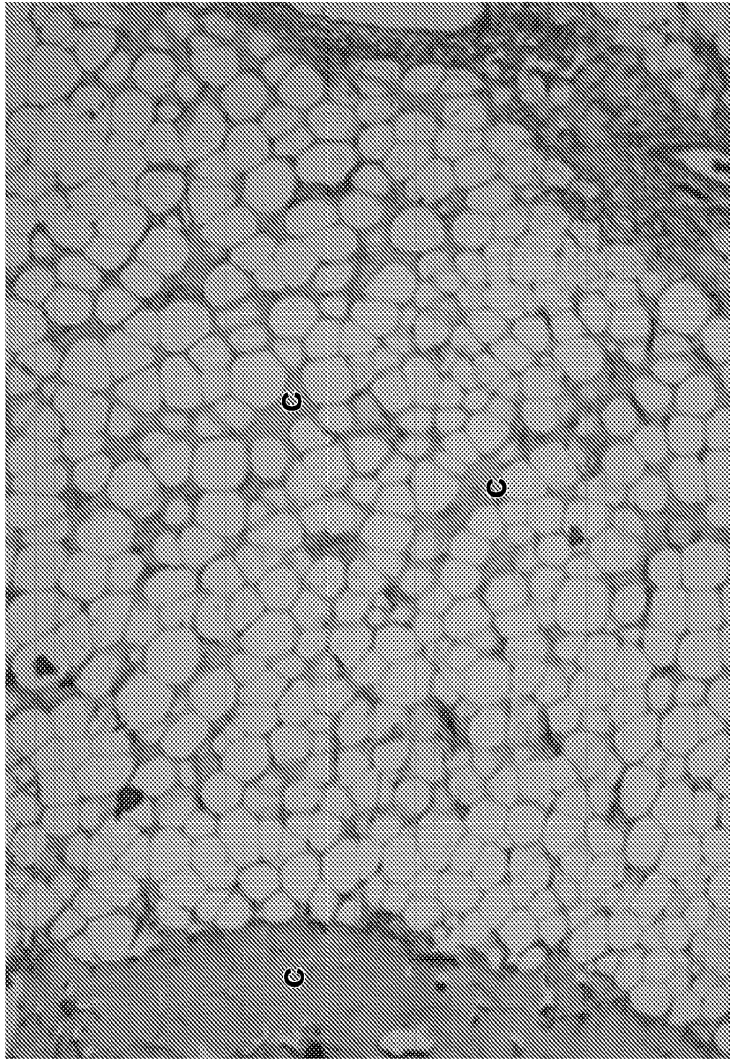
도면20b



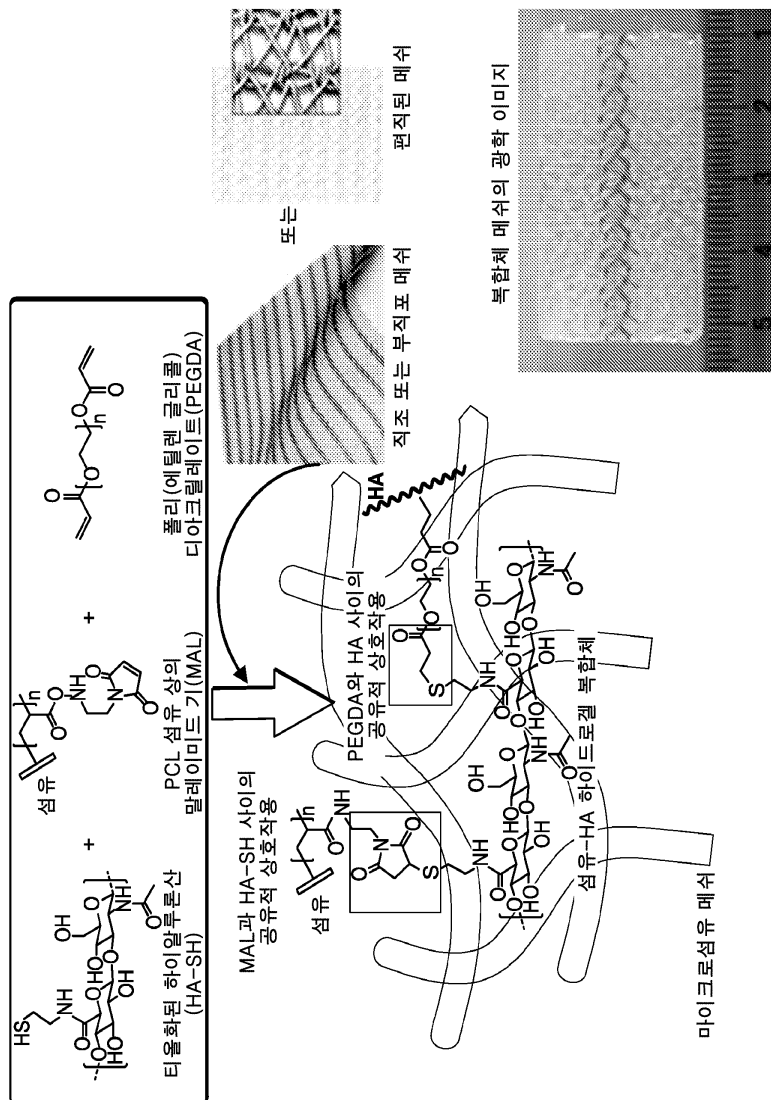
도면20c

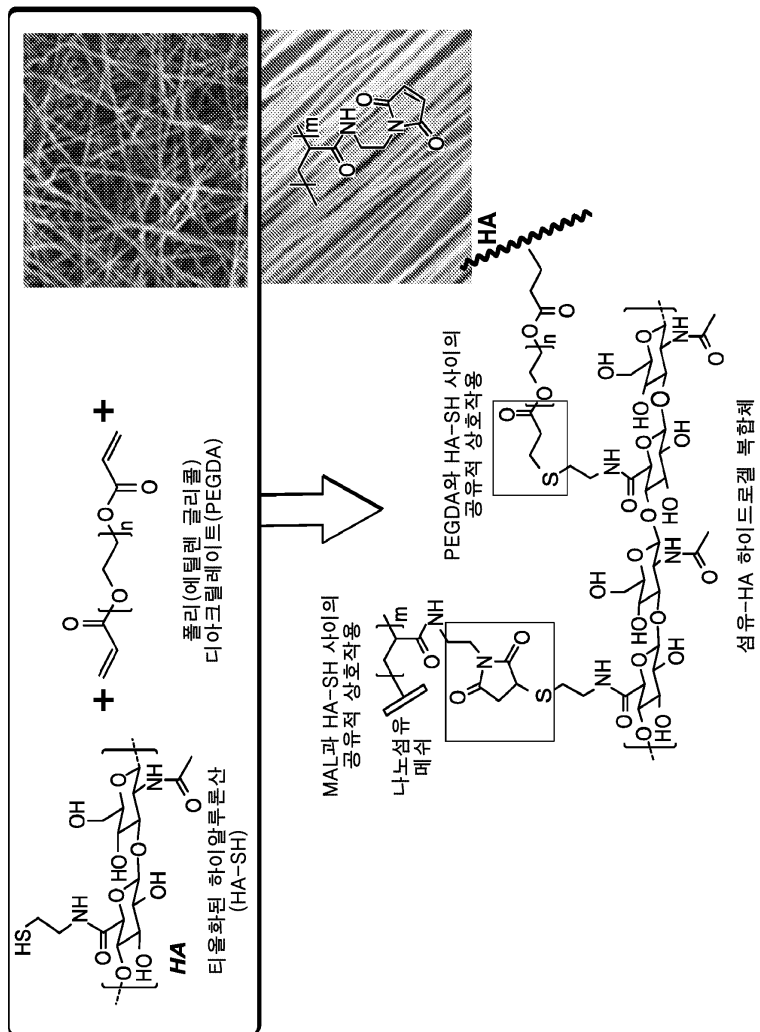


도면20d

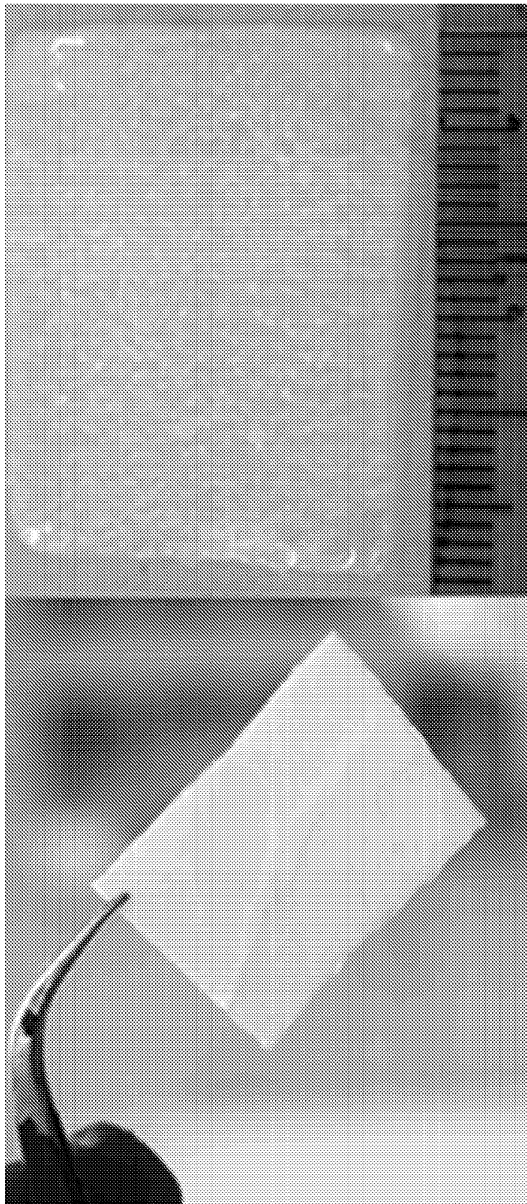


도면21

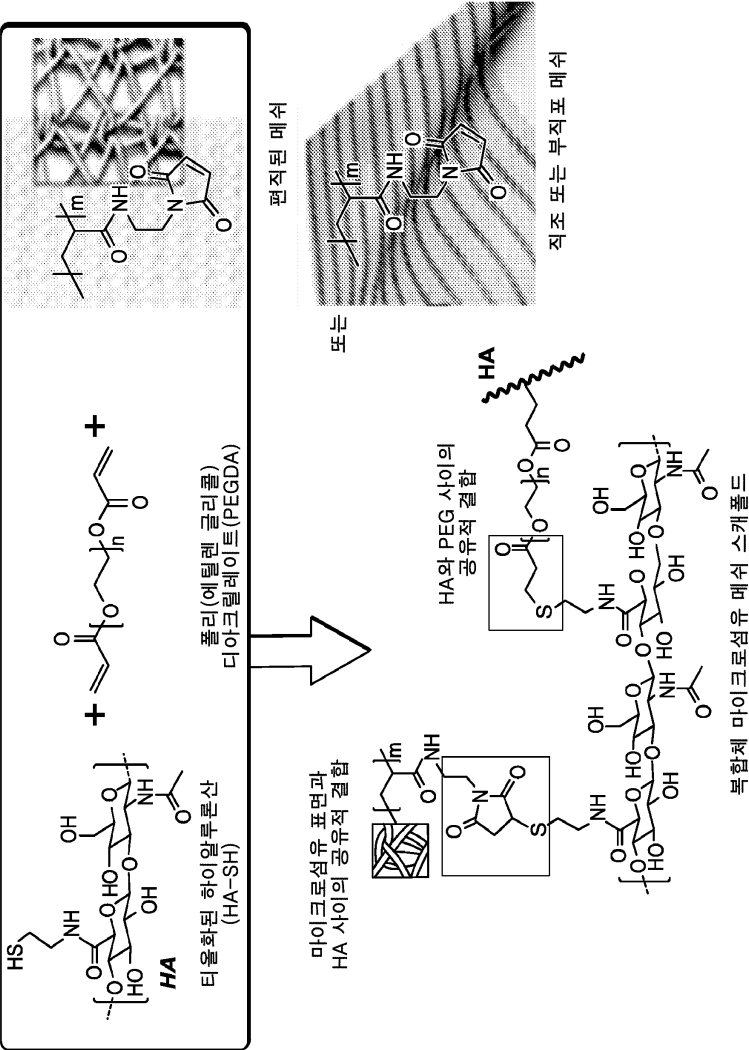




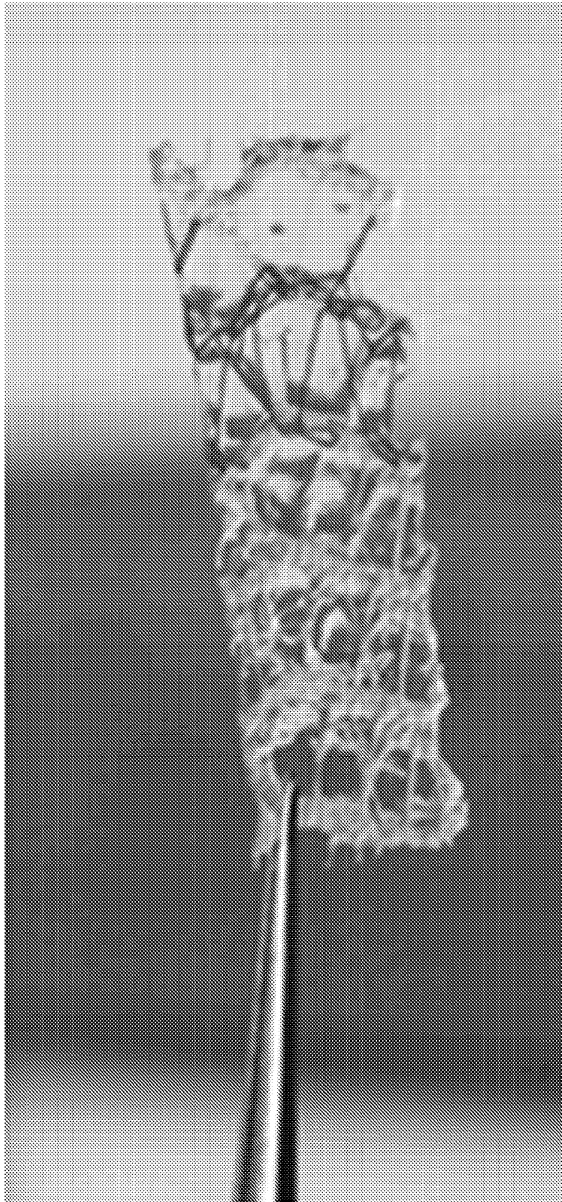
도면23



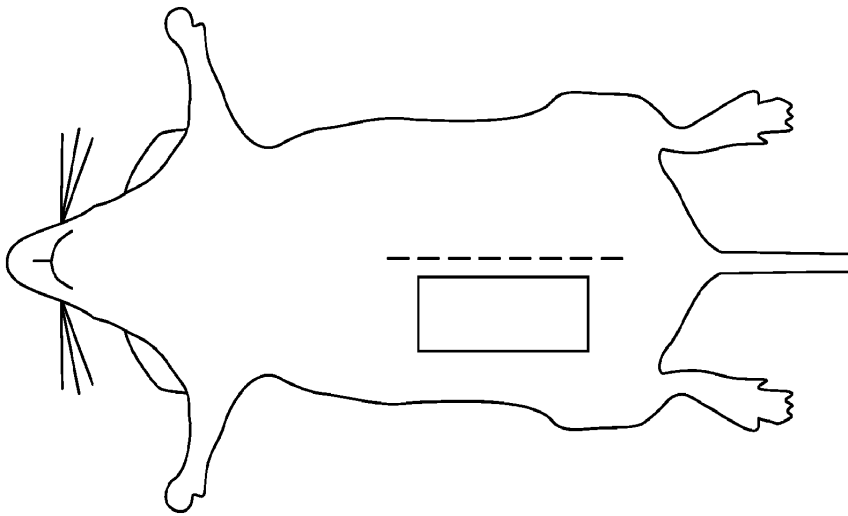
도면24



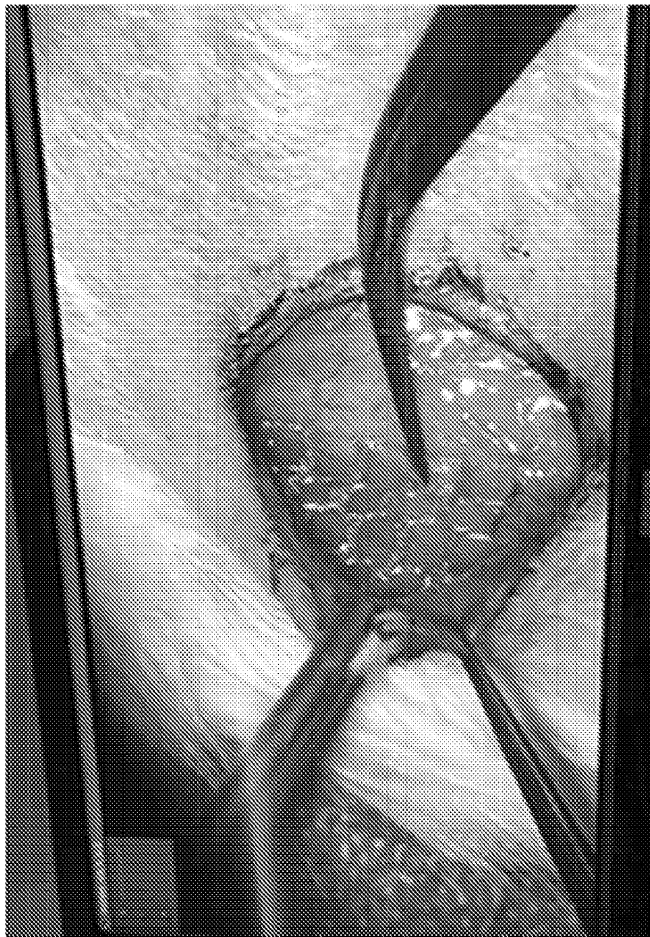
도면25



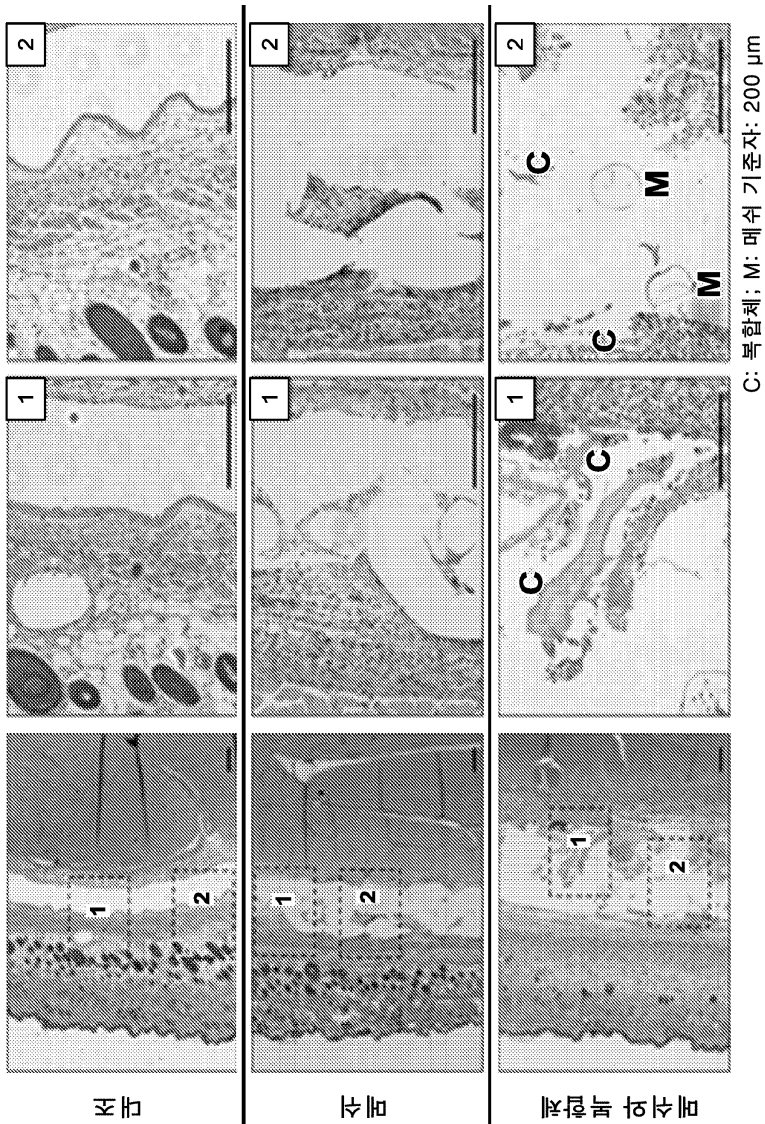
도면26a



도면26b



도면27a



도면27b

