



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년10월06일

(11) 등록번호 10-2162386

(24) 등록일자 2020년09월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C08L 33/14 (2006.01) C08F 2/48 (2006.01)

C08J 3/075 (2006.01) C08J 3/24 (2006.01)

C08L 101/12 (2006.01) C08L 25/18 (2006.01)

C08L 65/00 (2006.01) C08L 89/00 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01) D01D 5/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C08L 33/14 (2013.01)

C08F 2/48 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0073100

(22) 출원일자 2019년06월19일

심사청구일자 2019년06월19일

(56) 선행기술조사문헌

ACS BIOMATERIALS SCIENCE & ENGINEERING 2018 4  
(5), 1558-1567 1부.\*D.N. HEO, S.J. LEE, R. TMSINA, ET  
AL., MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING C 99  
FEBRUARY 2019 1부.\*

MATERIALS 2014, 7(4), 3106-3135 1부.\*

KR1020150084519 A\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

울산과학기술원

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

(72) 발명자

차채녕

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

김선태

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

(74) 대리인

리앤목특허법인

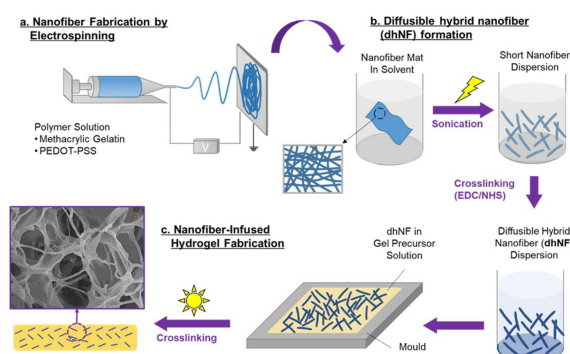
전체 청구항 수 : 총 20 항

심사관 : 나수연

(54) 발명의 명칭 수분산성 나노 섬유 및 그로부터 제조된 복합체 하이드로젤

**(57) 요약**

광경화성 작용기를 갖는 제1 친수성 고분자 및 전기 전도성 고분자를 포함하는 나노 섬유, 상기 나노 섬유 및 용매를 포함하는 나노 섬유 조성물, 상기 나노 섬유 조성물을 포함하는 젤 전구체 용액에 광을 조사하여 형성되는 하이드로젤 및 나노 섬유 제조방법이 개시된다.

**대표도 - 도1**

(52) CPC특허분류

*C08J 3/075* (2013.01)  
*C08J 3/24* (2013.01)  
*C08L 101/12* (2013.01)  
*C08L 25/18* (2013.01)  
*C08L 65/00* (2013.01)  
*C08L 89/00* (2013.01)  
*C12N 5/0068* (2013.01)  
*D01D 5/003* (2013.01)  
*C12N 2533/30* (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                                                                        |
|-------------|------------------------------------------------------------------------|
| 과제고유번호      | 1345297406                                                             |
| 부처명         | 교육부                                                                    |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단                                                                 |
| 연구사업명       | 개인기초연구(교육부)(R&D)                                                       |
| 연구과제명       | 바이오프린팅 기술 적용한 다기능성 하이드로젤 생체조직 모델 개발 및 이를 이용한 폴리아스파르트아미드 기반 나노치료제 효능 검증 |
| 기 여 율       | 5/10                                                                   |
| 과제수행기관명     | 울산과학기술원                                                                |
| 연구기간        | 2019.03.01 ~ 2020.02.29                                                |

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                                                |
|-------------|------------------------------------------------|
| 과제고유번호      | 1711056855                                     |
| 부처명         | 과학기술정보통신부                                      |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단                                         |
| 연구사업명       | 개인기초연구(미래부)                                    |
| 연구과제명       | 심장 조직 공학을 위한 하이브리드 나노섬유 기반 다기능성 나노복합체 하이드로젤 개발 |
| 기 여 율       | 3/10                                           |
| 과제수행기관명     | 울산과학기술원                                        |
| 연구기간        | 2017.07.01 ~ 2018.06.30                        |

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                                  |
|-------------|----------------------------------|
| 과제고유번호      | 1711087167                       |
| 부처명         | 과학기술정보통신부                        |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단                           |
| 연구사업명       | 해외우수기관유치(R&D)                    |
| 연구과제명       | UNIST-WFIRM-UniBase1 생체장기모사 연구센터 |
| 기 여 율       | 2/10                             |
| 과제수행기관명     | 울산과학기술원                          |
| 연구기간        | 2019.01.01 ~ 2019.12.31          |

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

광경화성 작용기를 갖는 제1 친수성 고분자 및 전기 전도성 고분자를 포함하는 나노 섬유; 및 용매;를 포함하는 나노 섬유 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 나노 섬유의 길이는 5 내지 20 $\mu$ m인 나노 섬유 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 광경화성 작용기를 갖는 제1 친수성 고분자는 폴리(에틸렌 글리콜)메타크릴레이트(PEGMA) 또는 메타크릴성 젤라틴(methacrylic gelatin: MGel)인 나노 섬유 조성물.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 전기 전도성 고분자는 분자량이 5,000 내지 100,000 Da인 나노 섬유 조성물.

#### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 전기 전도성 고분자는 폴리(3,4-에틸렌디옥시티오펜) 폴리스티렌 술포네이트(poly(3,4-ethylenedioxythiophene) polystyrene sulfonate(PEDOT:PSS))인 나노 섬유 조성물.

#### 청구항 6

제1항에 있어서,

상기 나노 섬유는 화학적 가교 반응에 의하여 서로 연결된 나노 섬유 조성물.

#### 청구항 7

제6항에 있어서,

상기 화학적 가교 반응은 상기 광경화성 작용기를 갖는 제1 친수성 고분자의 카르복실기 및 아민기가 연결되어 아마이드 결합을 형성하는 반응인 나노 섬유 조성물.

#### 청구항 8

삭제

#### 청구항 9

광경화성 작용기를 갖는 제2 친수성 고분자 및 제1항의 나노 섬유 조성물을 포함하는 젤 전구체 용액에 광을 조사하여, 나노 섬유에 포함된 상기 광경화성 작용기를 갖는 제1 친수성 고분자 및 상기 광경화성 작용기를 갖는 제2 친수성 고분자가 가교된 하이드로젤.

#### 청구항 10

제9항에 있어서,

상기 광경화성 작용기를 갖는 제2 친수성 고분자는 폴리(에틸렌 글리콜)메타크릴레이트(PEGMA) 또는 메타크릴성 젤라틴(methacrylic gelatin: MGel)인 하이드로젤.

#### 청구항 11

제9항에 있어서,

상기 광경화성 작용기를 갖는 제2 친수성 고분자의 농도가 4%(w/v) 초과 내지 10%(w/v)인 하이드로젤.

#### 청구항 12

제9항에 있어서,

상기 하이드로젤이 세포를 더 포함하고, 조직 공학용 세포배양 스캐폴드로서 사용되는 하이드로젤.

#### 청구항 13

제9항에 있어서,

상기 하이드로젤이 전기가 3차원 공간으로 통할 수 있는 하이드로젤.

#### 청구항 14

광경화성 작용기를 갖는 제1 친수성 고분자 및 전기 전도성 고분자를 용매에 녹여 전구체 용액을 제조하는 단계,

상기 전구체 용액을 전기 방사하여 나노 섬유를 제조하는 단계,

상기 나노 섬유를 절단하는 단계 및

상기 절단된 나노 섬유를 화학적 가교 반응에 의하여 연결시키는 단계를 포함하는 나노 섬유 제조방법.

#### 청구항 15

제14항에 있어서,

상기 전구체 용액을 제조하는 단계에서 상기 용매는 알칸올 및 물을 포함하는 나노 섬유 제조방법.

#### 청구항 16

제15항에 있어서,

상기 알칸올 및 물의 부피비가 2:1 내지 3:1인 나노 섬유 제조방법.

#### 청구항 17

제15항에 있어서,

상기 알칸올이 할로젠화 알칸올인 나노 섬유 제조방법.

#### 청구항 18

제14항에 있어서,

상기 나노 섬유를 절단하는 단계가 극초음파 처리에 의한 것인 나노 섬유 제조방법.

#### 청구항 19

제18항에 있어서,

극초음파 처리에 의해 상기 나노 섬유를 절단하는 단계가 10 초 내지 30 분 동안 수행되는 나노 섬유 제조방법.

#### 청구항 20

제14항에 있어서,

상기 전구체 용액을 제조하는 단계에서, 상기 광경화성 작용기를 갖는 제1 친수성 고분자의 농도가 5 내지 30%(w/v)인 나노 섬유 제조방법.

## 청구항 21

제16항에 있어서,

상기 전구체 용액을 제조하는 단계에서, 상기 전기 전도성 고분자의 농도는 전체 고분자 함량의 0.1 내지 10 wt%인 나노 섬유 제조방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 수분산 가능한 얇은 나노 섬유 및 그로부터 형성된 하이드로젤에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 조직 공학에서 스캐폴드로서 널리 사용되고 있고, 천연 세포외 기질(ECM)을 매우 유사하게 모방함에도 불구하고, 다기능성을 부여하고 물성을 조절하도록 하이드로젤을 설계하는 것은 아직 매우 힘들다.

[0003] 친수성 고분자의 가교를 통해 제작되는 하이드로젤은 조절가능한 탄성 및 높은 수분 함량으로 인해 약물 전달체 및 세포 배양 플랫폼으로서 매우 매력적이기 때문에 다양한 생명공학 분야에 이용된다. 그러나, 하이드로젤은 일반적으로 낮은 기계적 강도 및 광학 및 전기 성질의 부족 같은 결점이 있는데, 이러한 이슈를 극복하기 위한 여러 설계 전략이 추진되고 있다. 예를 들어, 상호 침투하는 네트워크(Interpenetrating Network, IPN) 형성 및 모노머/매크로머 혹은 가교제 농도 변화를 통한 가교 밀도 조절을 통해 하이드로젤의 기계적 성질은 개선되거나 또는 조절될 수 있다. 그러나, 이런 방법들은 하이드로젤의 고분자 네트워크에 비가역적 변화를 동반하며, 따라서, 하이드로젤의 여러 성질들의 원하지 않는 변화가 수반되는 경우가 많다.

[0004] 나노물질을 필러를 도입한 나노복합체 하이드로젤 제작법 또한 광범위하게 채택되고 있다. 무기(예를 들어 칼슘 포스페이트, 나노클레이), 금속(예를 들어 금, 은, 산화철) 유기(예를 들어 그래핀 옥사이드, 카본 나노튜브, 고분자) 등 다양한 소재로부터 제조된 나노물질이 사용되고 있다. 나노입자 기반 복합체 하이드로젤은 독특한 물리화학적 및 생물학적 특징을 도입하는데 있어 하이브리드화된 고분자성 네트워크보다 특유의 장점을 가지는데, 이는 일반적인 고분자에는 보이지 않는 물리적, 화학적 성질들을 보유하기 때문이다. 예를 들어 전자기적 성질 및 광학적 성질(예를 들어 전도도, 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance), 근적외선 흡수) 및 생물학적 효과(예를 들어 항균 효과, 골유도)등이 있다. 이러한 매력적인 특성에도 불구하고 이들 다양한 나노물질의 생명공학 응용 연구는 상대적으로 유년기이기 때문에 기초연구가 활발히 진행되고 있으며, 특히 전임상, 임상 단계에서의 약동학(pharmacokinetic) 및 독성학(toxicology) 평가가 이루어져야 한다.

[0005] 더욱 최근에는, 생물의학 응용을 위해, 나노 섬유를 하이드로젤과 통합하여 복합 구조를 생성시키는 하이브리드화 전략이 연구되고 있다. 간단한 제작 경로, 높은 다공성 및 표면적, 다양한 고분자 소스, 및 조절 가능한 크기 같은 속성들 때문에, 전기방사를 통해 제작된 나노 섬유는 인기 있는 스캐폴드 물질로서 조직 공학 응용에서 한 부류를 이룬다. 그러나, 소형 크기로 인해, 나노 섬유는 내재적인 기계적 약점을 가지고 개별적으로 나노 섬유를 다루는 것은 불가능하며, 따라서, 나노 섬유는 일반적으로 전기방사 동안 수집기 상에 집적된 매트(또는 '시트') 형태로 사용된다. 이러한 매트와 같은 형태는 용매에 분산되지 않기 때문에, 하이드로젤과의 유기적인 하이브리드화를 통한 소재 특성들의 시너지 창출이 불가능하며, 단순 임베딩만 가능하다. 또한, 친수성 고분자 기반 나노섬유는 물에 녹기 때문에 항상 수분이 존재하는 하이드로젤 내부에서 쉽게 녹아 도입하기 어렵다 (참고로, 많은 종류의 생체적합성 고분자는 친수성이므로, 친수성 고분자 기반 나노섬유를 사용하지 못할 경우, 소재 선택의 범위가 매우 한정적일 수 밖에 없다).

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0006] 한 측면은 생체적합성 친수성 고분자 및 전도성 고분자를 포함하는 새로운 나노 섬유를 제공하는 것이다.

- [0007] 다른 한 측면은 상기 섬유 및 용매를 포함하는 새로운 나노 섬유 조성물을 제공하는 것이다.
- [0008] 또 다른 한 측면은 상기 새로운 나노 섬유 조성물을 사용하여 제조된 하이드로젤을 제공하는 것이다.
- [0009] 또 다른 한 측면은 새로운 나노 섬유의 제조 방법을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0010] 일 측면에 따르면,
- [0011] 광경화성 작용기를 갖는 제1 친수성 고분자 및 전기 전도성 고분자를 포함하는 나노 섬유가 제공된다.
- [0012] 다른 일 측면에 따르면,
- [0013] 상기 나노 섬유 및 용매를 포함하는 나노 섬유 조성물이 제공된다.
- [0014] 또 다른 일 측면에 따르면,
- [0015] 광경화성 작용기를 갖는 제2 친수성 고분자 및 상기 나노 섬유 조성물을 포함하는 젤 전구체 용액에 광을 조사하여, 나노 섬유에 포함된 광경화성 작용기를 갖는 제1 친수성 고분자와 상기 광경화성 작용기를 갖는 제2 친수성 고분자가 가교된 하이드로젤이 제공된다.
- [0016] 또 다른 일 측면에 따르면,
- [0017] 광경화성 작용기를 갖는 제1 친수성 고분자 및 전기 전도성 고분자를 용매에 녹여 전구체 용액을 제조하는 단계,
- [0018] 상기 전구체 용액을 전기 방사하여 나노 섬유를 제조하는 단계,
- [0019] 상기 나노 섬유를 절단하는 단계 및
- [0020] 상기 절단된 나노 섬유를 화학적 가교 반응에 의하여 연결시키는 단계를 포함하는 나노 섬유 제조방법이 제공된다.

### 발명의 효과

- [0021] 일 구현예에 따른 고분자 및 나노 섬유의 하이브리드화된 네트워크로 이루어진 다기능 "헤테로스케일(heteroscale)" 하이드로젤은 불활성 환경에 다양한 기능을 부여하도록 개발되어 천연 ECM과 더 유사해졌다.
- [0022] 고분자만으로 제조되는 통상적인 하이드로젤과 다르게, 상기 하이드로젤 시스템은 생체기능성 젤라틴 및 전기 전도성 PEDOT:PSS를 포함하는 확산성 하이브리드 나노 섬유(diffusible hybrid nanofiber, dhNF)가 주입된다.
- [0023] dhNF는 (1) 전기방사에 의한 연속 나노 섬유 생성, (2) 상기 나노 섬유를 마이크로-스케일 길이로 커팅, 및 (3) 수성 안정성을 위한 공유결합적 가교에 의하여 개발되었다. 젤라틴 상의 메타크릴기 존재는 dhNF의 하이드로젤로의 공유결합적 혼입을 가능하게 한다.
- [0024] dhNF-하이드로젤은 복합적 효과를 통해 dhNF 농도에 따라 개선된 기계적 물성을 보이나, 분자 단위로 제어된 가교 밀도를 갖는 일반적인 하이드로젤에서 보통 보여지는 투과성 및 팽윤도의 상당한 감소로 이어지지 않는다.
- [0025] 임피던스 분석으로 평가된 전기 전도도는 PEDOT:PSS 함량에 따른 현저한 증가를 보였다. 하이드로젤 내부 3D(3차원) 세포 배양 연구를 통해, 하이드로젤에 dhNF를 도입함으로써 개선된 기계적 및 전기적 성질을 통해 세포의 생존율 및 증식을 촉진하였음을 입증한다. dhNF 하이드로젤은 더 높은 PEDOT:PSS 함량을 갖는 조건에서 외부 전기 자극에 대한 전도성이 높았고, 세포 표현형의 추가적 변형 결과를 가져왔다.
- [0026] 종합하면, 본 발명의 dhNF-하이드로젤은 복잡한 3D 세포 배양 플랫폼에 기능적 다양성을 효과적으로 부여할 수 있어서 세포 생리학을 더욱 잘 이해할 수 있고 다양한 생명공학 분야에 응용할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0027] 도 1은 본 발명의 일 구현예에 따른 하이드로젤의 제작 과정을 개략적으로 나타낸 도면이다.
- 도 2는 본 발명의 일 구현예에 따른 나노 섬유의 두께 및 나노 섬유 중의 전기 전도성 고분자의 농도를 나타내는 도면이다.

도 3은 본 발명의 일 구현예에 따른 나노 섬유를 주사전자현미경(Scanning Electron Microscope: SEM) 이미지를 나타내는 도면이다.

도 4는 본 발명의 일 구현예에 따른 나노 섬유 조성물에서 나노 섬유가 화학적 가교 반응에 의하여 서로 연결되는 것을 나타내는 도면이다.

도 5는 본 발명의 일 구현예에 따른 하이드로젤의 거시적 이미지, 탄성 계수 및 팽윤비를 나타낸 도면이다.

도 6은 본 발명의 일 구현예에 따른 하이드로젤의 SEM 이미지를 나타낸 도면이다.

도 7은 본 발명의 일 구현예에 따른 하이드로젤의 임피던스를 나타내는 그래프이다.

도 8은 본 발명의 일 구현예에 따른 하이드로젤에 캡슐화된 중간엽 줄기세포 (Mesenchymal Stem Cells: MSC)의 형광 이미지를 보여주는 도면이다.

도 9는 본 발명의 일 구현예에 따른 하이드로젤 내부 배양된 MSC의 시간에 따른 세포 증식을 나타내는 그래프이다.

도 10은 본 발명의 일 구현예에 따른 전기 자극을 받은 하이드로젤 내부 배양된 MSC 및 섬유 아세포 (fibroblasts)의 형광 이미지를 보여주는 도면이다.

도 11은 합성된 메타크릴성 젤라틴(MGel)의  $^1\text{H-NMR}$ 을 보여주는 스펙트럼이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 일 측면에 따른 나노 섬유는 광경화성 작용기를 갖는 제1 친수성 고분자 및 전기 전도성 고분자를 포함한다. 상기 나노 섬유는 본 명세서에서 확산성 하이브리드 나노 섬유(diffusible hybrid nanofiber: dhNF)라고도 한다.
- [0029] 일 구현예에 따르면, 상기 나노 섬유의 길이는 5 내지 20 $\mu\text{m}$ 일 수 있다. 상기 나노 섬유는 후술하는 절단하는 공정(예를 들어, 극초음파 처리에 의한 절단)을 거치게 되며, 이러한 공정에 의한 경우 상기 섬유의 길이는 상기와 같은 범위를 가지게 된다.
- [0030] 일 구현예에 따르면, 상기 광경화성 작용기를 갖는 제1 친수성 고분자는 생체적합성의 바이오고분자일 수 있으며, 예를 들어, 폴리(에틸렌 글리콜)메타크릴레이트(PEGMA) 또는 메타크릴성 젤라틴(methacrylic gelatin: MGel)일 수 있다.
- [0031] 일 구현예에 따르면, 전기 전도성 고분자는 제1 친수성 고분자와 함께 수용액 상에서 공존이 가능한 수분산성일 수 있다. 예를 들어, 상기 전기 전도성 고분자는 poly(3,4-ethylenedioxythiophene):polystyrene sulfonate(PEDOT:PSS) 또는 acid-doped polyaniline일 수 있다.
- [0032] 일 구현예에 따르면, 전기 전도성 고분자는 분자량이 5,000 내지 100,000 Da일 수 있다. 분자량이 5,000 보다 작을 경우, 전도성 및 기계적 물성이 만족스럽지 않고, 100,000을 초과할 경우 점도가 높고 수분산성이 낮아져 가공이 어렵다.
- [0033] 일 구현예에 따르면, 상기 나노 섬유는 화학적 가교 반응에 의하여 나노 섬유에 포함된 고분자들이 서로 연결되어 있다.
- [0034] 일 구현예에 따르면, 상기 화학적 가교 반응은 상기 광경화성 작용기를 갖는 제1 친수성 고분자의 카르복실기(carboxylate) 및 아민(amine)기가 연결되어 아마이드(amide) 결합을 형성하는 반응일 수 있다. 예를 들어, 상기 카르복실기 및 아민기는 상기 제1 친수성 고분자의 말단에 존재할 수 있다.
- [0035] 상기 화학적 가교 반응은 예를 들어, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카보이미도(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide: EDC) 및/또는 N-히드록시석신이미드(N-hydroxysuccinimide: NHS)를 activator로 사용하여, 수행될 수 있다.
- [0036] 다른 일 구현예에 따른 나노 섬유 조성물은 상기 나노 섬유 및 용매를 포함한다.
- [0037] 일 구현예에 따르면, 상기 용매는 수성 용매일 수 있으며, 예를 들어 인산 완충 생리식염수(phosphate buffered saline: PBS)일 수 있다.
- [0038] 또 다른 일 측면에 따른 하이드로젤은 광경화성 작용기를 갖는 제2 친수성 고분자 및 상기 나노 섬유 조성물을

포함하는 젤 전구체 용액에 광을 조사하여, 상기 광경화성 작용기를 갖는 제1 친수성 고분자 및 상기 광경화성 작용기를 갖는 제2 친수성 고분자가 가교된 것일 수 있다. 상기 가교는 광에 의한 가교일 수 있으며, 예를 들어, UV에 의한 가교일 수 있다. 상기 가교에 의하여, 상기 나노 섬유 조성물은 잘 분산되며 하이드로젤에 합체된다.

[0039] 일 구현예에 따르면, 상기 광경화성 작용기를 갖는 제2 친수성 고분자는 폴리(에틸렌 글리콜)메타크릴레이트(PEGMA) 또는 메타크릴성 젤라틴(methacrylic gelatin: MGel)일 수 있으며, 예를 들어, 제2 친수성 고분자는 메타크릴성 젤라틴일 수 있다.

[0040] 일 구현예에 따르면, 상기 광경화성 작용기를 갖는 제2 친수성 고분자는 용매에 분산된 상태일 수 있으며, 이 경우 상기 광경화성 작용기를 갖는 제2 친수성 고분자의 농도는 4% 초과 내지 10%일 수 있다. 상기 용매는 수성 용매일 수 있으며, 예를 들어 인산 완충 생리식염수(PBS)일 수 있다. 상기 농도가 4% 이하인 경우, 가교 밀도가 임계점보다 낮아 하이드로젤 형성이 되지 않는다. 상기 농도가 10%를 초과하는 경우, 점도가 높아지는 등 젤 제조에 어려움이 있다.

[0041] 일 구현예에 따르면, 상기 하이드로젤은 세포를 더 포함할 수 있고, 이 경우 조직 공학용 세포배양용 스캐폴드로서 사용될 수 있다. 또한, 전기 전도성 고분자를 포함하므로, 하이드로젤에서 2차원적으로는 물론이고 3차원적인 공간 상으로도 전기가 흐를 수 있다.

[0042] 또 다른 일 측면에 따른 나노 섬유 제조방법은 광경화성 작용기를 갖는 제1 친수성 고분자 및 전기 전도성 고분자를 용매에 녹여 전구체 용액을 제조하는 단계, 상기 전구체 용액을 전기 방사하여 나노 섬유를 제조하는 단계, 상기 나노 섬유를 절단하는 단계 및 상기 절단된 나노 섬유를 화학적 가교 반응에 의하여 연결시키는 단계를 포함한다.

[0043] 일 구현예에 따르면, 상기 용매는 알칸올 및 물을 포함할 수 있다.

[0044] 일 구현예에 따르면, 상기 알칸올 및 물의 비는 2:1 내지 3:1일 수 있다. 상기 혼합 용매의 비가 상기 범위일 때, 상기 제1 친수성 고분자 및 전기 전도성 고분자를 모두 완전히 용해시키고, 적당한 점도를 유지하고, 시기 적절한 증발을 유도할 수 있다.

[0045] 일 구현예에 따르면, 상기 알칸올은 할로겐화 알칸올일 수 있으며, 예를 들어, 2,2,2-트리플루오로에탄올(2,2,2-trifluoroethanol: TFE)일 수 있다.

[0046] 일 구현예에 따르면, 상기 나노 섬유를 절단하는 단계는 극초음파 처리에 의한 것일 수 있다.

[0047] 일 구현예에 따르면, 상기 나노 섬유를 극초음파 처리로 절단하는 단계는 10 초 내지 30 분 동안 수행될 수 있다. 10초 미만인 경우 생성된 나노 섬유 길이가 너무 길어 수분산성이 떨어질 수 있으며, 30 분 보다 길더라도 주어진 극초음파 세기에서는 나노 섬유 길이가 더 짧아지지 않는다.

[0048] 일 구현예에 따르면, 상기 전구체 용액을 제조하는 단계에서, 상기 광경화성 작용기를 갖는 제1 친수성 고분자의 농도는 5 내지 30%(w/v)일 수 있다.

[0049] 일 구현예에 따르면, 상기 전기 전도성 고분자의 농도는 전체 고분자 함량의 0.1 내지 10 wt%일 수 있다. 상기 광경화성 작용기를 갖는 제1 친수성 고분자의 농도 및 상기 전기 전도성 고분자의 농도가 상기 범위일 때, 전구체 용액의 물성(점도, 휘발성)이 최적화되어 나노 섬유가 제조가 용이하며 생성된 나노 섬유를 포함하는 하이드로젤의 물성 또한 최적이 된다.

[0050] 먼저 전기방사를 통해 친수성 및 광가교성 바이오고분자 및 전도성 고분자(예를 들어, PEDOT:PSS)로 이루어진 나노 섬유가 제조되고, 마이크로미터-길이의 절단되고, 화학적으로 가교되어 최종적으로 확산성 하이브리드 나노 섬유(diffusible hybrid nanofiber: dhNF)가 된다. dhNF는 복합체 하이드로젤 제작을 위한 헤테로스케일 보강 요소로서 용해(dissolution)없이 수성 전구체 용액 내에 잘 분산되어 하이드로젤에 합체된다.

[0051] 생성된 dhNF-주입된 하이드로젤은, 나노 섬유와 고분자로 구성된 네트워크로 이루어져 있으며, dhNF 농도 및 PEDOT:PSS 함량에 의해서 기계적 강도 및 전기 전도도 모두 향상되며 조절 가능해진다. 이러한 성질들은 내부 배양된 세포의 생존율 및 증식을 개선시키는 것을 직접적으로 돕고, 또한 향상된 전도도에 의해 매개되는 외부 전기 자극을 더욱 효율적으로 증폭한다.

[0052] 나노 섬유 및 하이드로젤이 보유한 고유의 특성들을 하나의 복합 구조로 통합시키는 것은 이들의 약점을 최소화하는 반면 이들의 특성들을 조합하여 시너지화할 것으로 기대된다(고분자성 네트워크는 유지하면서도 나노 섬유

의 도입을 통해 다기능성이 부여된 하이드로젤). 또한, 생리학적 관점에서, 천연 ECM은 분자 스케일의 고분자(예를 들어 프로테오글리칸)와 나노 스케일 섬유(섬유질 콜라겐)로 "헤테로스케일화(heteroscaled)"되어 있기 때문에, 나노 섬유 주입은 조직 공학 스케폴드 용도로서 분자 수준으로 가교되어 제조된 통상적인 하이드로젤보다 천연 ECM을 더 가깝게 모방할 것이다.

[0053] 나노 섬유 매트 또는 전기방사 후 나노 섬유 매트로부터 절단된 짧은 나노 섬유를 하이드로젤에 간단히 삽입함으로써 하이드로젤 내로 나노 섬유를 함체시키는 개념을 소개한 여러 논문들이 예전에 보고되었다. 그러나, 이러한 접근법들은 다기능 성질을 갖는 더욱 확장 가능한 복합 하이드로젤을 개발하기 위해서 해결될 필요가 있는 여러 한계들을 가진다.

[0054] 첫째, 수성 환경에서 나노 섬유의 용해를 막기 위해 나노 섬유는 poly(lactic acid)(PLA) 및 polycaprolactone(PCL) 같은 잘 알려진 소수성 고분자로 제조된다. 특히 많은 바이오고분자가 친수성이라는 사실을 고려할 때 이는 다양한 생체활성 나노 섬유를 제작하는데 사용되는 소재군 범위를 심각하게 제한한다.

[0055] 둘째, 나노 섬유는 대부분 연속적으로 제작된 긴 섬유 형태이므로 용액 상에서 균질하게 분산되기 어려우며, 이로 인해 하이드로젤 네트워크 내에 나노 섬유를 균질하게 분산시키는 것이 어렵다.

[0056] 셋째, 다른 물성(예를 들어 용매 적합성(solvent compatibility), 친수성/소수성 균형)을 갖는 고분자를 결합시키는 것은 기술적으로 어렵기 때문에 나노 섬유는 일반적으로 단일 유형의 고분자로 제조된다.

[0057] 본 발명에서, 친수성이고 생체적합성인 바이오고분자 및 전도성 고분자로 이루어진 다기능 하이브리드 나노 섬유는, 전기방사를 통해 합성되고 다음으로 하이드로젤 구조에 통합되도록 마이크로미터 길이 스케일을 갖는 확산형으로 절단된다. 또한, 수성 환경에서 용해를 막기 위해 짧은 나노 섬유는 추가적으로 화학적으로 가교된다. 생성된 "확산성 하이브리드" 나노 섬유(dhNF)는 젤 전구체 용액 내로 용이하게 분산되면서도 이들의 섬유 형태를 유지하며 상분리없이 하이드로젤 네트워크 내에 안정적으로 통합되는데, 이는 이들의 친수성 및 가교 때문이다. 나노 섬유-주입된 하이드로젤은 내부 배양된 세포의 생체활성을 증가시키면서 향상된 기계적 성질 및 전기 전도도를 가진다.

[0058] 나아가, 이 전략은 보통 반응 작용기의 부족으로 인한 하이드로젤에 화학적으로 결합될 수 없는 전도성 고분자의 혼입을 가능하게 한다. 더욱 중요하게는, 이 방법을 통해 더 높은 전도성 고분자 함량을 하이드로젤 내부에 도입할 수 있어, dhNF-하이드로젤을 통해 전기 자극을 더욱 효율적으로 전달하여 내부 배양된 세포에 영향을 미칠 수 있고, 나아가 dhNF-하이드로젤의 다양한 특성을 조절할 수 있다.

[0059] 도 1은 본 발명의 일 구현예에 따른 하이드로젤의 제작 과정을 개략적으로 나타낸 도면이다. 도 1을 참조하면, 생체활성 및 전도성 고분자로 이루어진 하이브리드 나노 섬유는 전기방사로 제조되어(a), 다음으로 마이크로미터-스케일 길이로 절단되고 carbodiimide coupling 반응을 통해 가교되어 dhNF가 된다(b). 마지막으로, dhNF이 분산된 젤-전구체 용액은 가교되어 dhNF-하이드로젤이 된다(c).

#### [0060] 확산성 하이브리드 나노 섬유(dhNF)의 제작

[0061] 전기방사를 통해 전개되는 다기능 나노 섬유(multifunctional nanofiber)는 메타크릴성 젤라틴(MGel) 및 PEDOT:PSS, 전도성 고분자 시스템을 포함한다. 상기 메타크릴성 젤라틴(MGel)은 세포인식 고분자로 많이 연구되고 있으며 라디칼 공중합할 수 있는 메타크릴성 작용기를 주는 친수성 고분자다. 상기 PEDOT:PSS는 공액 고분자(conjugate polymer)인 PEDOT 및 음이온성 고분자인 PSS로 이루어진 전도성 고분자 시스템이다(도 1).

[0062] 타 공액 고분자와 다르게, PEDOT:PSS는 어느 정도의 생체적합성 및 친수성을 가지는데, 이는 음이온성 PSS의 존재 때문이며, 이로써 이를 생명공학 응용에 더 적합하다.

[0063] MGel을 PEDOT:PSS와 하이브리드화하기 위해, TFE(2,2,2-trifluoroethanol) 및 물의 2 용매 시스템이 사용되며 이들의 조성은 최적화되어(예를 들어, 7:3 비) 두 고분자 모두를 완전히 용해시키고, 적당한 점도를 유지하고, 시기 적절한 증발을 유도하였다.

[0064] 도 2는 본 발명의 일 구현예에 따른 섬유의 두께 및 섬유 중의 전기 전도성 고분자의 농도를 나타내는 도면이다. 도 2a는 PEDOT:PSS 함량을 갖는 나노 섬유 두께를 아나내고, 도 2b는 나노 섬유 내의 황 함량으로 분석된 PEDOT:PSS 농도를 나타낸다.

[0065] 전도도를 제어하기 위해 나노 섬유에서 PEDOT:PSS의 양을 변화시켰다. SEM 이미지는 PEDOT:PSS의 양이 나노 섬유 형성 및 두께에 최소 영향을 미침을 보여준다(도 2a). PEDOT:PSS 함량은 특징적인 어두운 컬러로 잘 눈에 띄

며, 추가적으로 EDX 분석으로 얻은 증가하는 황 함량으로 확인되었다(도 2b).

- [0066] 도 3은 본 발명의 일 구현예에 따른 섬유의 SEM 이미지를 나타내는 도면으로서, 다른 시간대에서 초음파처리 컷팅에 의한 짧은 나노 섬유 형성의 SEM 이미지를 나타낸다. 그래프는 짧은 나노 섬유의 평균 길이와 초음파처리 시간을 나타낸다(스케일 바: 10  $\mu\text{m}$ ).
- [0067] 전기방사로 제작된 나노 섬유는 수집기 플레이트 상에 퇴적된 길고 연속적인 섬유이다. 이러한 나노 섬유 '매트'는 수성 환경 내에서 고른 분포 및 분산이 이루어지지 않는다. 따라서, 나노 섬유 매트는 추가적으로 용매에 잠긴 나노 섬유 매트에 극초음파처리를 통해 컷팅에 의해 마이크로미터-스케일 길이를 갖는 짧은 나노 섬유로 가공된다(도 3).
- [0068] 극초음파처리는 단지 2 분만에  $17(\pm 3) \mu\text{m}$  길이를 갖는 짧은 나노 섬유의 분산이 용이하게 생성되게 하며, 극초음파처리 30 분까지 시간이 증가하면, 나노 섬유 길이는  $7(\pm 2) \mu\text{m}$ 까지 더 감소한다. 추가적인 공정에 의한 길이 감소는 보이지 않았는데, 이는 주어진 극초음파처리 세기에서 최소 길이에 도달하였다는 것을 의미한다.
- [0069] 나노 섬유는 친수성 고분자로 이루어지기 때문에 수성 용액에 쉽게 용해되어, 수성 배지를 포함하는 임의의 응용 분야에서 실현 불가능하게 된다. 따라서, 수성 배지에서 나노 섬유 구조를 안정적으로 보존하고 3D(3차원) 세포 배양 플랫폼으로서 하이드로젤에서 장기간 포함되도록 하기 위해, 짧은 나노 섬유는 추가적으로 화학적으로 가교되어 결국 "확산성" 하이브리드 나노 섬유(dhNF)로 전개된다(도 1b).
- [0070] 젤라틴은 카복실레이트기 및 아민기를 가지며(이는 아스파르트산 및 글루탐산, 및 라이신의 말단에도 있다), carbodiimide coupling 반응을 통해 아마이드 형성을 가능하게 한다.
- [0071] 도 4는 본 발명의 일 구현예에 따른 섬유 조성물에서 섬유가 화학적 가교 반응에 의하여 서로 연결되는 것을 나타내는 도면이다. 도 4를 참조하면, 짧은 나노 섬유는 carbodiimide coupling 반응을 통해 공유결합으로 가교되어 수성 용액에 용해없이 분산되며, 가교없는 나노 섬유는 쉽게 용해됨을 알 수 있다.
- [0072] 수성 완충 용액에 나노 섬유를 분산시킴으로써 가교를 진행하였고, 고전단 응력(예를 들어 극초음파처리) 적용 후 안정성을 측정하였다(도 4). 비가교 섬유의 경우 즉시 분해되어 용해되었으나, 가교된 dhNF는 구조를 완전히 유지하면서도 용액 내에 안정적으로 분산되어 있었는데, 이는 가교 반응 정도가 이들의 수성 안정성에 충분하다는 것을 확인시켜준다.
- [0073] 또한, PEDOT:PSS는 반응에 참여하지 않았음에도 가교된 나노 섬유로부터 PEDOT:PSS는 확산되어 나오지 않았는데 이는 추가적으로 젤라틴과 PEDOT:PSS 간에 상당한 물리적 결합이 있음을 입증한다.
- [0074] 도 5는 본 발명의 일 구현예에 따른 하이드로젤의 거시적 이미지, 탄성 계수 및 팽윤비를 나타낸 도면이다. 도 5a는 하이드로젤의 거시적 이미지를 나타내고, 도 5b는 변하는 dhNF 농도 및 PEDOT:PSS 함량에 따른 탄성 계수를 나타내고, 도 5c는 변하는 dhNF 농도 및 PEDOT:PSS 함량에 따른 dhNF-하이드로젤 팽윤비를 나타낸다(\* $p < 0.05$ ,  $n=6$ ).
- [0075] **dhNF-주입된 하이드로젤의 물성**
- [0076] *기계적 성질.*
- [0077] dhNF의 복합 효과를 평가하기 위해 dhNF가 주입된 하이드로젤을 제작하여 이의 기계적 성질 및 전기 성질을 측정하였다. 하이드로젤의 주어진 고분자 농도에서(즉 8 %(w/v) MGel), dhNF의 농도를 3 %(w/v)까지 조절하였다.
- [0078] 또한, 주어진 dhNF 농도에서, PEDOT:PSS 함량을 전체 고분자 함량으로부터 5 wt%까지 조절하였고, P0, P1, P2.5 및 P5로 표기하였다. dhNF 상의 메타크릴성 작용기 존재로 인하여, 이들은 하이드로젤 내에 공유결합적으로 합체할 것이 예상되었다. 예상한대로 dhNF-하이드로젤은 dhNF 농도와 함께 불투명성이 증가함을 보였고, PEDOT:PSS 함량과 함께 어두워짐을 보였다(도 5a).
- [0079] dhNF-하이드로젤의 기계적 성질은 일축 압축(uniaxial compression) 실험으로부터 얻은 탄성 계수로 평가되었다. 계수는 PEDOT:PSS 함량과 관계없이 dhNF 농도 3 %까지 함께 증가했는데(도 5b), 이는 dhNF가 하이드로젤 형성에 영향을 미치지 않고 성공적으로 하이드로젤 내에 주입되어 기계적 성질을 증가시키는데 기여함을 알 수 있다.
- [0080] 흥미롭게도, 주어진 dhNF 농도에서 계수는 2상 경향(biphasic trend)을 보였는데, 여기서 계수는 P0 내지 P1에서 감소하였으나, PEDOT:PSS 함량 P1 내지 P5에서 추가적 증가와 함께 증가하였다. P0 내지 P1에서 초기 감소는

화학 결합에 포함된 MGeI의 감소된 양에 기인하는 듯하나, PEDOT:PSS에서의 후속적 증가는 증가한 물리적 상호 작용을 통해 복합 구조를 강화시켰을 가능성이 있다.

[0081] 탄성 네트워크에서 예상되었던 바와 같이 하이드로젤의 팽윤비는 dhNF 농도와 함께 감소하였고 PEDOT:PSS 함량과 함께 역2상 경향을 보였다(도 5c). 그러나, 3 %까지 dhNF 농도 증가에 따른 팽윤비에서 전반적인 감소는 탄성 계수에서 증가보다 훨씬 작았다; 탄성 계수가 450 % 증가하는 동안 팽윤비는 단지 34 %만 감소함.

[0082] 이러한 결과는 추가적으로 하이드로젤 내에 dhNF를 합체시키는 중요성을 강조하는데, 왜냐하면 하이드로젤 자체의 가교 밀도를 조절하는 통상적인 방법은 보통 팽창에서의 더 큰 감소의 결과를 가져오기 때문이며, 이는 내부 배양된 세포의 생체활성에 중요한 하이드로젤 내에서의 확산 및 사용가능한 공간을 심하게 제한한다. SEM으로 시각화된 하이드로젤의 내부 구조를 통해 dhNF가 고분자 네트워크에 잘 연결되어 있음을 보여주며(즉 dhNF는 고분자 네트워크로부터 분리되지 않았다), 네트워크의 다공성은 가장 높은 3 % dhNF 농도에서 제외하고는 심각하게 영향을 받지 않았는데, 여기서 기공은 증가된 양의 dhNF에 의해 부분적으로 덮혀있다(도 6). 도 6은 본 발명의 일 구현예에 따른 하이드로젤의 SEM 이미지를 나타낸 도면으로서, P0.8에서 변하는 dhNF 농도에 따른 dhNF-하이드로젤의 SEM 이미지를 나타낸다(스케일 바: 5  $\mu$ m). 이러한 관찰은 dhNF의 도입은 하이드로젤의 팽윤 특성보다 기계적 물성에 훨씬 큰 영향을 미침을 알 수 있다.

[0083] MGeI 상의 메타크릴성 작용기 존재로 인하여 dhNF가 하이드로젤에 공유결합적으로 연결될 수 있음을 추가적으로 설명하기 위해, 더 낮은 MGeI 농도를 사용하여 극히 낮은 기계적 강도를 갖는 하이드로젤 내로 dhNF를 도입하여, 하이드로젤 구조 유지 여부를 파악하였다. dhNF 없는 하이드로젤은 수성 용액에서 1 일 이내에 쉽게 분해되었다. 반면, dhNF를 포함하는 것은 하이드로젤 구조를 유지하는 결과를 보였다. 이는 dhNF와 하이드로젤의 고분자성 네트워크 간의 공유 결합적 연결을 입증한다.

[0084] 전기 전도도.

[0085] 생명공학에 응용되는 하이드로젤 소재의 가장 큰 단점 중 하나는 전기 전도도의 부족인데, 소수성이고(즉 전자가 풍부한 공액  $\delta$  전자계) 반응성 작용기가 없는 전도성 고분자를 수성 조건인 하이드로젤에 도입하는 것은 기술적으로 난해하기 때문이다.

[0086] 환원된 그래핀 옥사이드 및 금 나노입자 같은 전도성 나노물질을 합체시키는 것이 연구되었으나, 이들의 화학적 특성 및 구조적 특징은 실제 생체 조직과 매우 이질적이며, 세포의 미세환경을 정확히 구현하지 못한다. 따라서, 전도성 고분자로 이루어진 생체적합성 나노 섬유를 활용하는 것은, 하이드로젤 시스템에 전기 전도도를 부여하는 보다 생리학적으로 더 유사한 방법인데, 이는 심장을 통과하는 전기 신호의 신속한 중계를 담당하는 purkinje fiber로 불리는 전도성 섬유 네트워크로부터 얻은 단서이다.

[0087] 도 7은 본 발명의 일 구현예에 따른 하이드로젤의 임피던스를 나타내는 그래프이다. 도 7a는 변하는 dhNF 농도에 따른 dhNF-하이드로젤의 임피던스(P 0.5에서)를 나타내고 도 7b는 PEDOT:PSS 함량에 따른 dhNF-하이드로젤의 임피던스를 나타내는 그래프이다(2 % dhNF에서).

[0088] dhNF-하이드로젤의 전기 전도도를 평가하기 위해, dhNF에서 PEDOT:PSS 함량의 dhNF 농도를 변화시키면서 임피던스를 측정하였다(도 7a 및 7b). 주어진 dhNF 농도에서 dhNF 농도 및 PEDOT:PSS 함량을 증가시키면, dhNF-하이드로젤의 임피던스는 상당히 감소하는데, 이는 PEDOT:PSS의 존재가 실제로 하이드로젤의 고 수화된 환경의 저항을 낮추는 것을 돕는다는 것을 입증한다. 나아가, 이러한 결과는 추가적으로 하이드로젤 내의 dhNF의 양이 전도도를 향상시키기에 매우 충분함을 증명한다.

[0089] 또한 건조 상태에서의 dhNF 자체의 임피던스는 주파수 증가에 따라 감소하였으며, 매우 높은 주파수에 접근할수록 0에 수렴하였으나, dhNF-하이드로젤의 임피던스는 주파수에 따른 감소폭이 현저히 낮음을 보여주었고, 또한, 고 주파수에서도 높은 값을 유지하였음이 주목할만 한데, 이는 하이드로젤의 고도의 저항성 환경을 가리킨다. 따라서, dhNF의 존재가 하이드로젤의 전기 저항을 상당히 낮출 수 있다는 사실은 dhNF에 의한 하이드로젤의 상당한 전기전도성 증가를 증명한다.

[0090] dhNF-주입된 하이드로젤의 생체활성

[0091] 3D 배양에서 세포 생존율 및 증식.

[0092] dhNF에서 dhNF 농도 및 PEDOT:PSS 함량의 효과에 반응하는 중간엽 줄기 세포(MSC)의 생존율 및 증식을 측정함으로써 dhNF-주입된 하이드로젤의 생체적합성을 측정하였다. dhNF 농도에 상관없이, 세포 생존율은 80 %를 초과하

여 높게 유지되었으며, 1일에 초기 생존율은 낮았지만 PEDOT:PSS 함량에 따라 상당히 증가하였다(도 8).

- [0093] 도 8은 본 발명의 일 구현예에 따른 하이드로젤에 배양된 MSC의 형광 이미지를 보여주는 도면으로서, dhNF에서 변화하는 PEDOT:PSS 함량을 갖는 dhNF-하이드로젤에 캡슐화된 MSC의 형광 현미경 이미지(1 % dhNF)이다. 살아있는 세포(녹색) 및 죽은 세포(적색)를 시각화하기 위해 형광으로 세포를 표지하였다.
- [0094] 2 % 및 그 이하의 dhNF 농도에서, 하이드로젤 내의 세포는 시간에 따라 상당한 퍼짐(spreading)을 보여주었고 증식하였다. dhNF 없는 하이드로젤과 비교하여, dhNF 포함으로 세포 증식은 상당한 증가를 보였다. 또한, 동일 PEDOT:PSS 함량에서 1 %에서 2 %로 dhNF 농도 증가는 낮은 팽창도를 가짐에도 불구하고 세포 증식을 향상시켰다. 이러한 결과는 하이드로젤의 증가된 기계적 강도에 의한 외부의 물리적 신호가 내부 배양된 세포에 영향을 미친 것이다.
- [0095] 도 9는 본 발명의 일 구현예에 따른 하이드로젤에 캡슐화된 MSC의 시간에 따른 세포 증식을 나타내는 그래프이다. 변하는 dhNF 농도(도 9a는 1 %, 도 9b는 2 %)에 따른 dhNF-하이드로젤에 대해 시간에 대한 세포 증식을 측정하였다. 도 9c의 증식 속도( $k_p$ )를 얻기 위해 도 9a 및 도 9b의 그래프에 power-law 기반 수학적 모델을 적용하였다(\* $p < 0.05$ ,  $n=6$ ). dhNF 없는 하이드로젤을 대조군으로 실험하였다.
- [0096] dhNF에서 PEDOT:PSS의 존재는 하이드로젤의 기계적 성질을 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라, PEDOT:PSS의 높은 전자 밀도는 하이드로젤 합성 동안 생성된 과량의 라디칼 및 활성 산소를 감소시켜 세포 생존율을 향상시킬 수도 있다.
- [0097] 또한, PEDOT:PSS에 의한 증가된 이온 전도도 및 하이드로젤을 통하는 투과성은 추가적으로 세포 활동성을 향상시킬 수 있다. dhNF 농도가 3 %까지 추가적으로 증가했을 때 세포 증식이 상당하였음을 주목하여야 하는데, 이는 하이드로젤 투과성(permeability)에서의 감소가 내부 배양된 세포의 이용가능한 공간 및 확산을 제한하기에 상당히 충분함을 암시한다.
- [0098] 전기 자극의 효과.
- [0099] 역동적 조건 하에서 생존율, 증식, 및 방향 정렬 같은 다양한 세포 활동성을 연구하기 위해 기계적 및 전기 자극 같은 외부힘의 적용이 광범위하게 채택되고 있다. 전기 자극 연구의 경우, 대부분 전도성 기재의 표면 상에 배양된 세포에 도입되었다.
- [0100] 3D 연구는 광범위하게 수행되고 있지 않은데, 이는 주로 조절가능한 역학(mechanics), 적당한 투과성 및 전기 전도도 등 3D 세포 배양에 모두 결정적인 요소를 포함하는 스케폴드 소재의 부족 때문이다. 본 발명에서 개발된 dhNF-하이드로젤은 상기 특성을 모두 가지며, 전기 자극에 대한 최적의 3D 세포 환경을 제공할 것으로 예상된다.
- [0101] 도 10은 본 발명의 일 구현예에 따른 하이드로젤 내부 배양된 전기 자극을 받은 MSC 및 섬유 아세포의 형광 이미지로서, dhNF에 변하는 PEDOT:PSS 함량을 갖는 dhNF-하이드로젤에 캡슐화된 전기 자극을 받은 MSC 및 섬유 아세포의 형광 현미경 이미지(1 % dhNF)를 보여준다. 살아 있는 세포(녹색) 및 죽은 세포(적색)를 시각화하기 위해 세포를 형광 표지하였다(스케일 바: 100  $\mu\text{m}$ ). 파란색 화살표는 상호 연결된 번들(bundle)의 정렬된 세포를 가리킨다.
- [0102] 도 10에 나타난 바와 같은 dhNF-하이드로젤 내부 배양된 MSC에 펄스 전기 신호를 이용하여 전기 자극(electrical stimulation:ES)을 주었다. 흥미롭게도, 분명히 ES 없는 조건에 비해 세포 증식은 매우 억제되었고 생존율 또한 시간에 따라 감소하였다. 세포 활동에서의 이러한 감소는 PEDOT:PSS를 포함한 dhNF-하이드로젤에서 더 두드러졌는데, 이는 dhNF-하이드로젤 내에서 발생한 증가된 전위로부터 기인한 것을 의미한다.
- [0103] 이전의 연구는 외부 ES에 반응으로 MSC의 감소된 증식 능력 및 증가된 세포사멸(apoptosis)을 유사하게 입증한다.
- [0104] 전위를 중계하는데 있어서 dhNF-하이드로젤의 능력을 추가적으로 입증하기 위해, 다른 세포 유형, 섬유 아세포를 실험하였다. 유사하게, dhNF-하이드로젤 내부 배양된 섬유 아세포는 시간에 따라 증식하였으며, ES 없는 PEDOT:PSS를 갖는 dhNF에서 더욱 그러하였다. 그러나, MSC와 다르게, 섬유 아세포는 1일에 더 큰 증식을 보였으며, ES이 있는 dhNF-하이드로젤 내에서 시간에 따라 더욱 명백한 세포 퍼짐을 보였다.
- [0105] 또한, dhNF에서 PEDOT:PSS 함량이 높은 경우, 하이드로젤 구조를 통해 상호연결된 더 두꺼운 번들(bundle)에서 더욱 정렬된 세포가 있었고, 반면 PEDOT:PSS이 없는 하이드로젤에서, 세포는 대부분 많은 상호작용없이 근처에

서 개별적인 퍼짐을 보였다.

[0106] 종합하면, 이러한 결과는 dhNF-하이드로젤이 부여된 생체적합성과 전기전도성이 높은 미세환경이 상당히 향상되어, 3D의 ES 하에서 더욱 다양하고 복잡한 세포 생리학 탐구를 가능하게 함을 분명히 입증한다.

[0107] 이하의 실시예를 통하여 본 발명이 더욱 상세하게 설명된다. 단, 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로서 이들만으로 본 발명의 범위가 한정되는 것이 아니다.

## [0108] 실시예

### [0109] 메타크릴성 젤라틴(MGel)의 합성

[0110] 젤라틴(10g, 돼지 껍질 유래, 젤 세기 300, Sigma Aldrich), 4-디메틸아미노피리딘(1 g, Sigma Aldrich) 및 4-메톡시페놀(0.1 g, Sigma Aldrich)을 50 ° C에서 100 mL 디메틸 술폭사이드에 용해시켰다. 글리시딜 메타크릴레이트(4 mL, Sigma Aldrich)를 상기 혼합물에 천천히 첨가하고, 건조 N<sub>2</sub> 하에서 50 ° C에서 48 시간 동안 계속 반응시켰다.

[0111] 젤라틴에서 글리시딜 메타크릴레이트 대 잔여 아미노산의 주입 물 비는 0.32:1였다. dialysis 및 동결건조를 거치는 정제로 생성물을 얻었다. <sup>1</sup>H-NMR(400-MR DD2, Agilent)에서 메타크릴성 피크 확인으로 합성되었음을 확인하였다(도 11).

### [0112] 확산성-하이브리드 나노 섬유(dhNF)의 합성

[0113] 상기 합성한 메타크릴성 젤라틴(MGel) 및 폴리(3,4-에틸렌디옥시싸이오펜): 폴리(스티렌술포네이트)(PEDOT:PSS, Sigma Aldrich)를 5 %(v/v) 에틸렌 글리콜(Sigma Aldrich)[PEDOT:PSS에 대한 도펀트로서]이 보충된 2,2,2-트리플루오로에탄올(TFE)/물(7:3 부피비)에 용해시켰다. MGel 농도는 18 %(w/v)였고, PEDOT:PSS 농도는 전체 고분자 함량의 5 wt%까지 조절되었다.

[0114] 1 시간 동안 극초음파처리를 하여(5 초 펄스 on, 5 초 펄스 off) PEDOT:PSS를 완전히 용해시켰다. 전기 방사를 위해, 26 G 바늘을 갖는 시린지에 상기 용액을 로딩하고, 전기 시린지 펌프(NanoNC, Korea)를 사용하여 0.5 mL h<sup>-1</sup> 유속으로 방출하였다. 인가 전압 및 바늘 및 알루미늄 수집기 플레이트 사이의 거리는 각각 12 kV 및 15 cm 였다. 나노 섬유는 수집기에 연속적으로 퇴적되었고, 나노 섬유 매트는 진공에서 24 시간 동안 건조되었다.

[0115] 건조된 나노 섬유 매트(15 mg)를 2 mL 에탄올에 침지시키고, 펄스 모드(출력 파워: 65 W, 주파수: 20 kHz, 펄스: 5 초 on, 5 초 off)로 5 분 동안 극초음파 처리하여(VCX130, Sonic), 짧은 나노 섬유 현탁액을 제조하였다.

[0116] 다음으로, 짧은 나노 섬유를 95% 에탄올에서 5 mM 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카보이미도(EDC, Sigma Aldrich) 및 2 mM N-히드록시석신이미드(NHS, Sigma Aldrich)로 48 시간 동안 처리하였다. 섬유 응집을 방지하기 위해 2 시간마다 30 분 동안 간헐적 초음파처리를 하였다.

[0117] 가교후, dhNF를 이소프로판올로 3 번 세척하고, 원심분리로 수집하여, 진공에서 건조시켰다. dhNF를 스톱 용액으로서 포스페이트 완충 식염수(PBS, pH 7.4)에 60 mg mL<sup>-1</sup>으로 분산시켰다.

### [0118] dhNF-주입된 하이드로젤의 제작

[0119] 광개시제 0.2 % Irgacure®2959가 보충된, 8 % MGel 및 dhNF(0 내지 3 %)로 이루어진 젤 전구체 용액을 1 mm 스페이서의 2 개 글래스 플레이트 사이에 위치시켰다. 상기 용액을 UV(800 mW cm<sup>-1</sup>)로 처리하여 가교 반응을 유도하였다. UV 노출 시간은 dhNF의 PEDOT:PSS 함량에 의존하는데, 더 긴 UV 노출은 더 높은 PEDOT:PSS 함량의 하이드로젤을 형성하는데 요구되었다(예를 들어 0.2 %에 대해 80 초, 0.5 %에 대해 100 초, 0.8 %에 대해 120 초). 하이드로젤 디스크를 홀 펀치(직경 8 mm)로 절단하여, 추가적 분석 전에 PBS에서 배양하였다.

[0120] 별도로, 4 %의 더 낮은 MGel 농도로 dhNF-하이드로젤을 제조하여, 공유 결합을 확인하기 위해 37 ° C PBS에서 이들의 구조 유지 여부를 확인하였다. 4 %에서 MGel 하이드로젤은 구조적 약함으로 인하여 PBS에서 쉽게 분해되었다.

### [0121] 기계적 특성 파악

[0122] 만능 재료 시험기(Model 3343, Instron)를 사용하여 1 mm min<sup>-1</sup> 속도로 각각의 하이드로젤 디스크를

압축하였다. 응력-변형률 그래프를 얻어 그래프가 직선인 초기 10 % 변형률(탄성 영역)에서 기울기로서 탄성 계수를 계산하였다. 완전 팽창한 하이드로젤 대 건조된 고분자 메쉬(mesh)의 무게비로 팽윤비를 측정하였다.

[0123] **미세 구조적 특성 파악**

[0124] 나노 섬유 및 나노 섬유-주입된 하이드로젤의 상세한 구조적 특징을 SEM(S-4800, Hitachi)으로 모니터하였다. 나노 섬유의 경우, 섬유 매트 및 dhNF는 제작 후 진공에서 건조시켰다.

[0125] 하이드로젤의 경우, 먼저 액체 질소에서 냉동시키고, 단면을 노출시키기 위해 깨뜨리고, 동결건조시켰다. SEM 이미지 해상도를 증가시키기 위해 건조 시료를 Pt로 스퍼터 코팅하였다. 나노 섬유에서 PEDOT:PSS 양을 정량하기 위해, SEM에서 빌트-인 에너지 분산형 X-선(EDX) 시스템을 사용하여 EDX 분석을 수행하여 황 함량을 측정하였다. BSE(back scatter electron) 탐지로 저진공에서 EDX를 수행하였다.

[0126] **전도도 특성 파악**

[0127] 임피던스 분석기(4294A, Agilent)를 사용하여 나노 섬유 및 나노 섬유-주입된 하이드로젤에 대한 임피던스 측정을 수행하였다. 전기방사로 제조된 나노 섬유의 경우 나노 섬유 매트를 진공에서 완전히 건조시키고, 1cm X 1cm 조각으로 잘라서, 임피던스 분석기에 연결된 2개의 금속 탐침 사이에 위치시켰다.

[0128] 나노 섬유-주입된 하이드로젤의 경우, 하이드로젤을 진공 하에서 30 분 동안 건조시켜 표면에서 과량의 물을 제거하고, 분석기 금속 탐침에 연결된 2개의 Pt-코팅된 커버슬립 사이에 위치시켰다. 100 Hz 내지 1 Mhz 주파수 범위에서 임피던스를 측정하였다.

[0129] **체외 세포 실험**

[0130] 3D 세포 캡슐화를 위해, 세포를  $1 \times 10^6$  세포  $\text{mL}^{-1}$ 로 젤 전구체 용액에 분산시키고, 2개의 글래스 플레이트(0.4 mm 스페이서) 사이에 위치시키고, UV로 1 분 동안 광가교시켰다.

[0131] 하이드로젤을 작은 디스크(6 mm 직경)로 절단하고 세포 배지에서 배양하였다. 2D 및 3D 모두 용으로, 하이드로젤을 세포 배양 배지에서 37 ° C에서 5 %  $\text{CO}_2$ 로 배양하였다. 여기에 쥐골수 중간엽 줄기 세포('MSC', ATCC®) 및 섬유 아세포('NIH-3T3', ATCC®)를 사용하였다. 모든 세포 유형에 대해, 세포 배지는 10 % 태아 소혈청(bovine serum albumin) 및 1 % 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 Dulbecco's Modified Eagle Medium을 사용하였다.

[0132] LIVE/DEAD Cell Viability Assay(Thermo Fisher)를 사용하여 세포 생존율을 측정하였다. 각각의 하이드로젤 시료를 calcein-AM 및 ethidium homodimer-1로 처리하여 살아 있는 세포(녹색) 및 죽은 세포(적색)를 각각 형광으로 표지하였다. 역형광현미경(XDS-3FL, Optika) 하에서 세포를 관찰하여, 살아있는 세포 및 죽은 세포 개수를 측정하였다. 생존율은 살아 있는 세포의 퍼센트로 보고하였다(평균±표준 편차,  $n=5$ ).

[0133] 세포 증식을 정량화하기 위해, MTT 분석을 수행하였다. 각각의 하이드로젤 디스크를 세포 배양 배지 0.1 mL가 있는 96-well plate의 각 well에 위치시켰다. 다음으로, MTT 용액(0.5 % 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드(MTT), Sigma Aldrich) 0.01 mL를 첨가하고 37 °C에서 4 시간 동안 배양하였는데, 그 동안 MTT는 살아 있는 세포에 의해 MTT 포르마잔으로 변환된다. MTT 정지 용액(물/디메틸포름아마이드 50:50에 20 % 소듐 도데실 설페이트) 0.1 mL를 첨가하여 반응을 정지시키고 MTT 포르마잔을 용해시켰다. MTT 포르마잔의 양은 570 nm에서 흡수 특성을 이용하여 분광광도계로 측정하였다(Multiskan GO, Thermo Fisher)(평균±표준 편차,  $n=5$ ).

[0134] **전기 자극**

[0135] 하이드로젤 내에서 배양된 세포에 전기 자극을 적용하였다. 2 개의 탄소 전극을 글래스 페트리 디쉬 바닥에 1.5 cm 떨어뜨려 부착시켰다. 탄소 전극은 백금 전선을 통해 함수 발생기(33220A, Agilent)에 연결되어 있다.

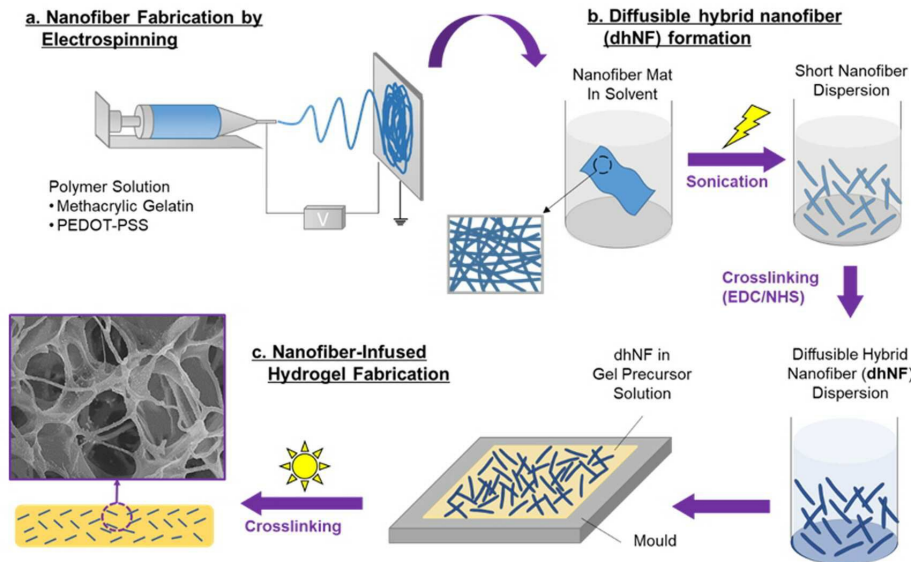
[0136] 세포를 하이드로젤 시료를 세포 배양 배지에 침지된 전극 사이에 위치시킨 후, 펄스 전기장(스퀘어, 2 ms, 5  $\text{Vcm}^{-1}$ , 1 Hz)을 연속적으로 가하였다. 지정된 시간에, 추가적 분석(예를 들어 생존율, 증식, 퍼짐)을 위해 시료를 취했다.

[0137] 이와 같이 본 발명을 일 실시예를 참고로 하여 설명하였으나 이는 예시적인 것에 불과하며 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 실시예의 변형이 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서, 본

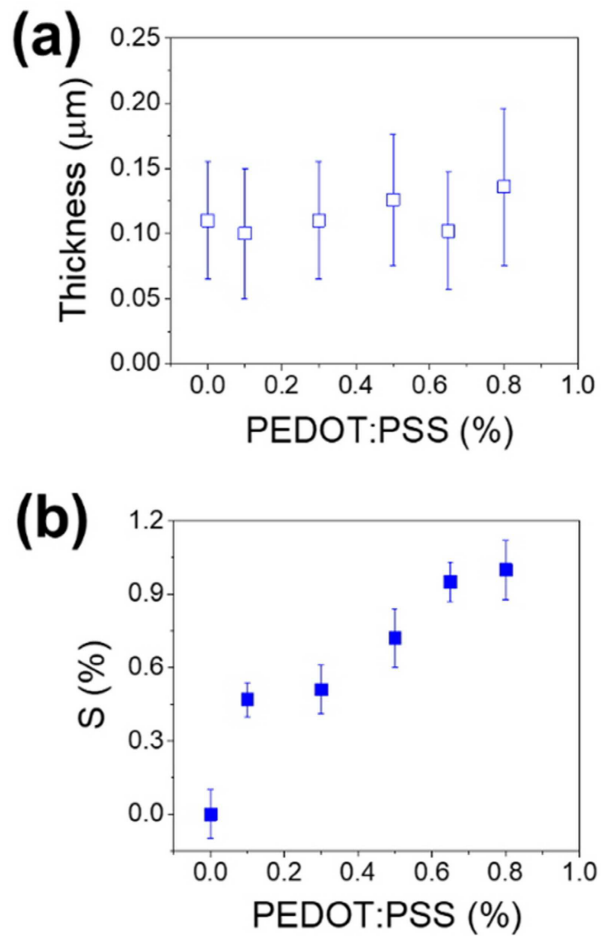
발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

## 도면

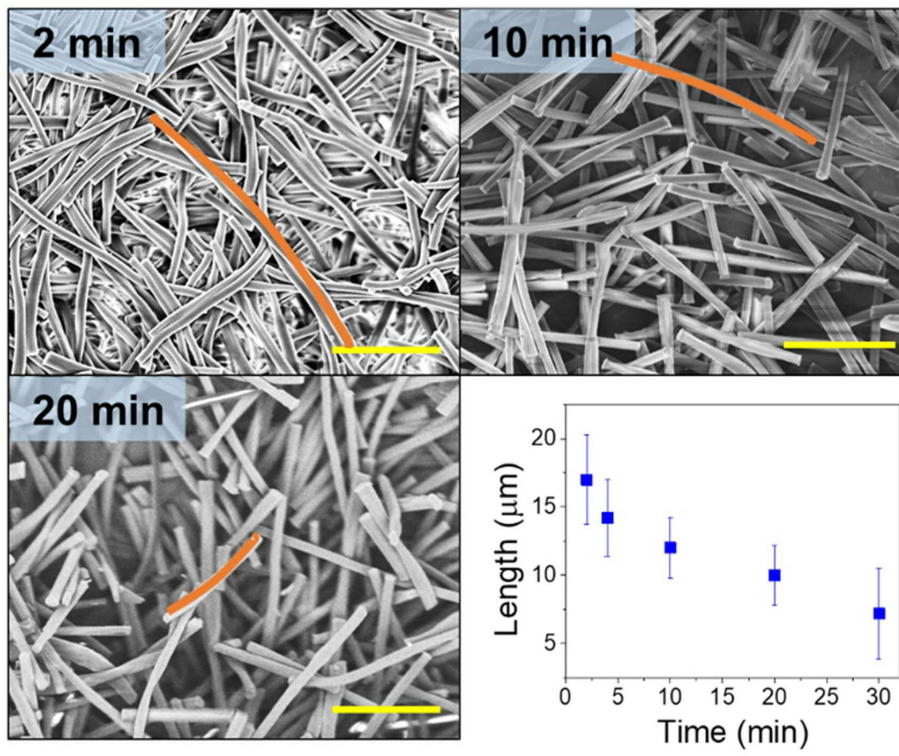
### 도면1



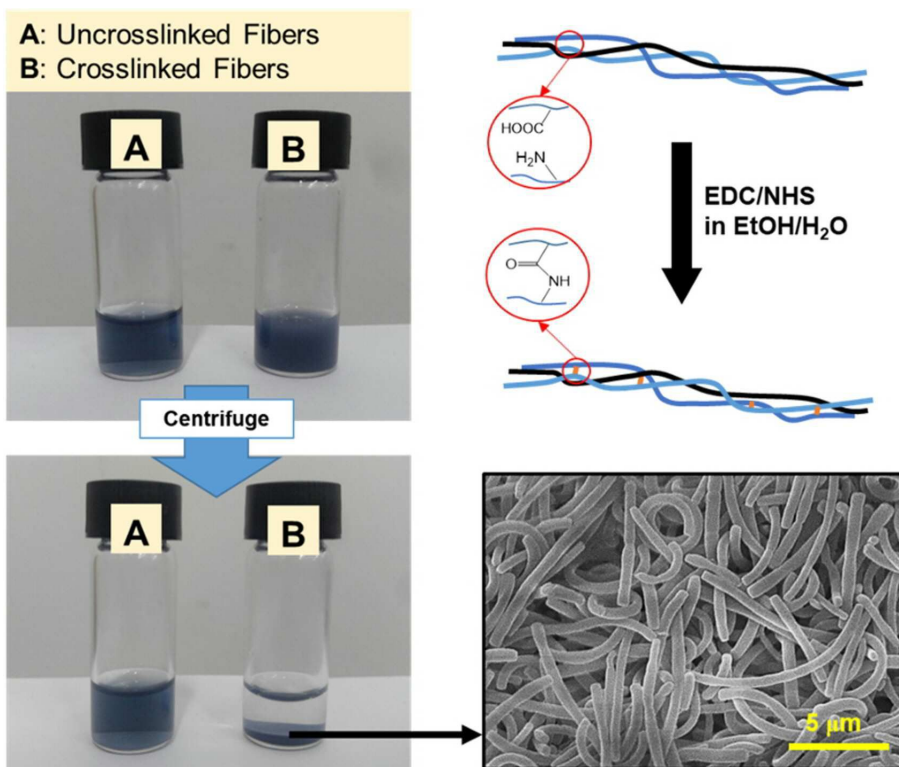
### 도면2



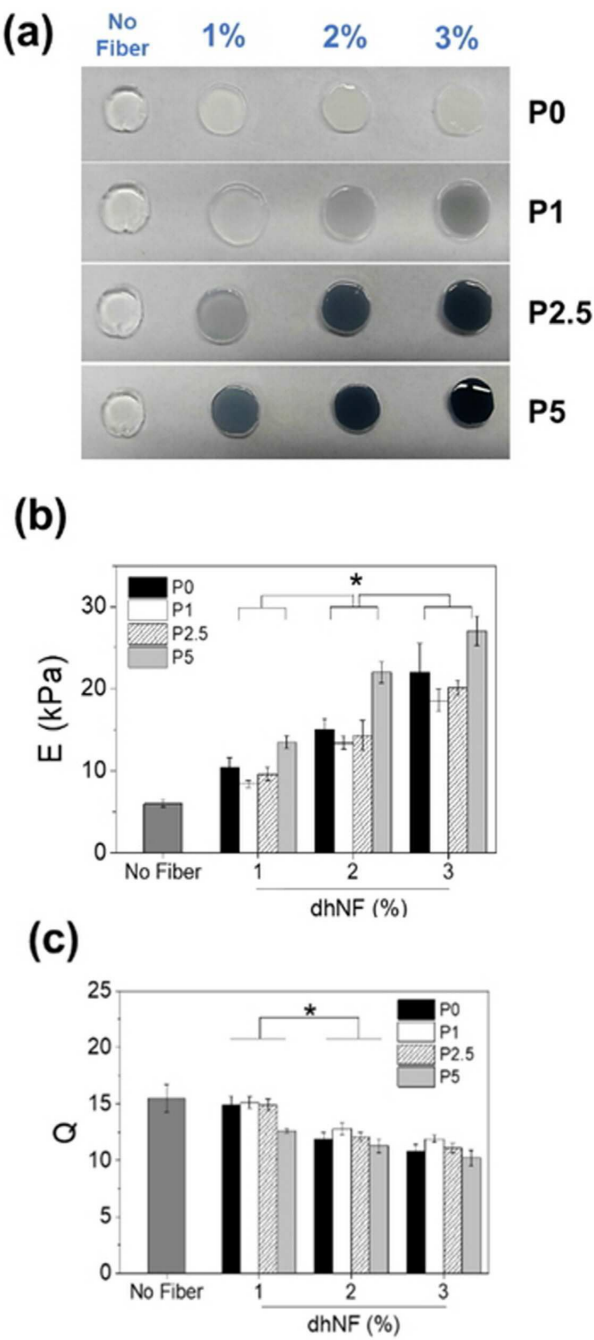
도면3



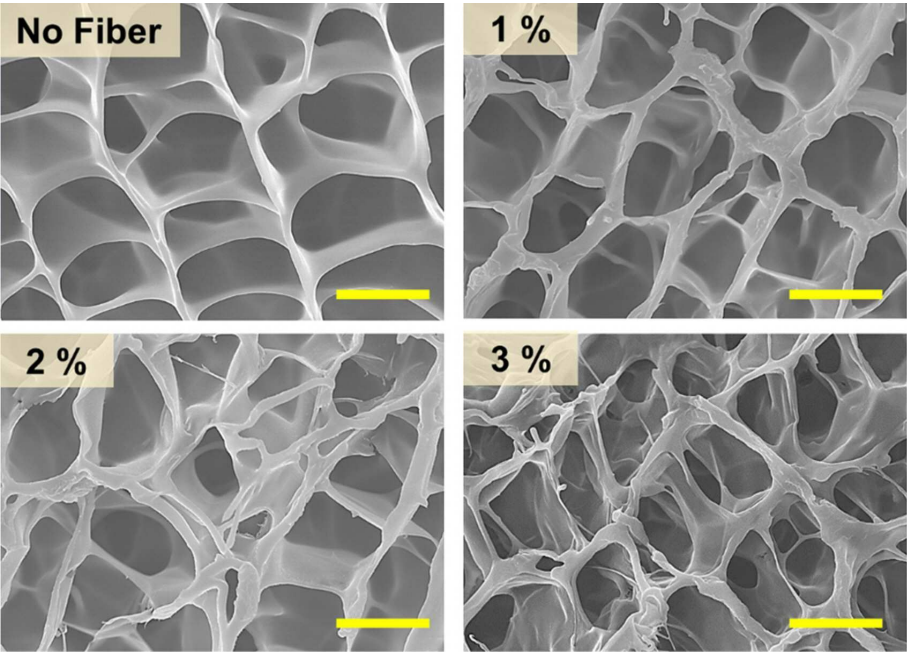
도면4



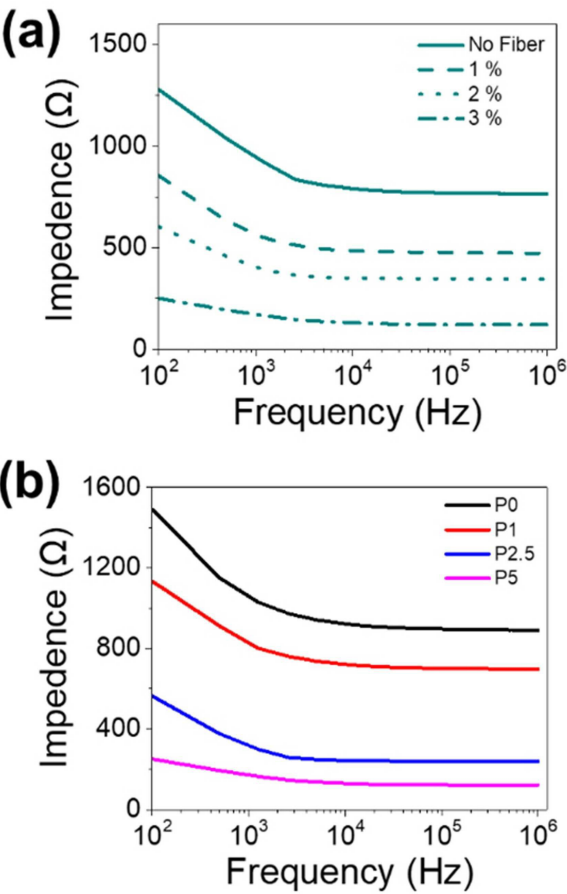
도면5



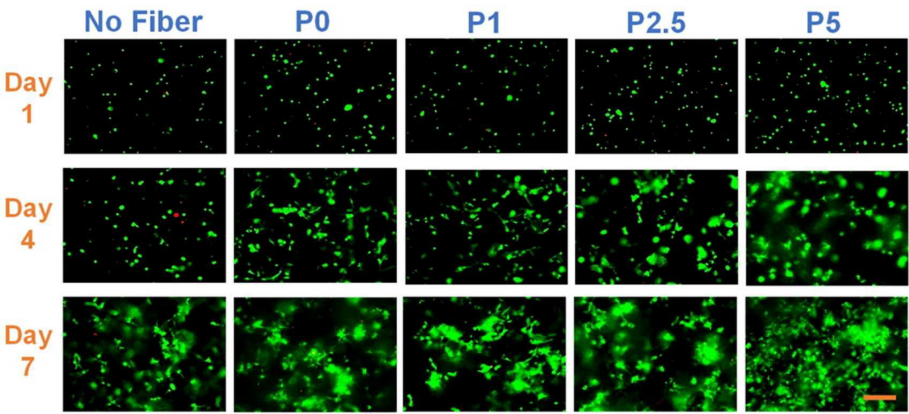
도면6



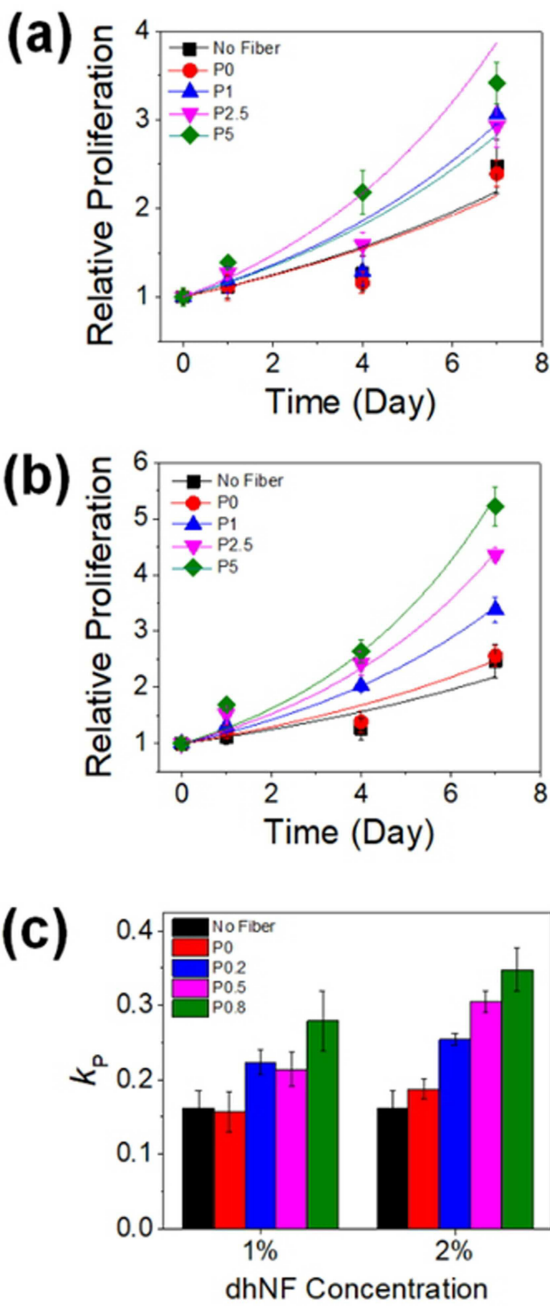
도면7



도면8

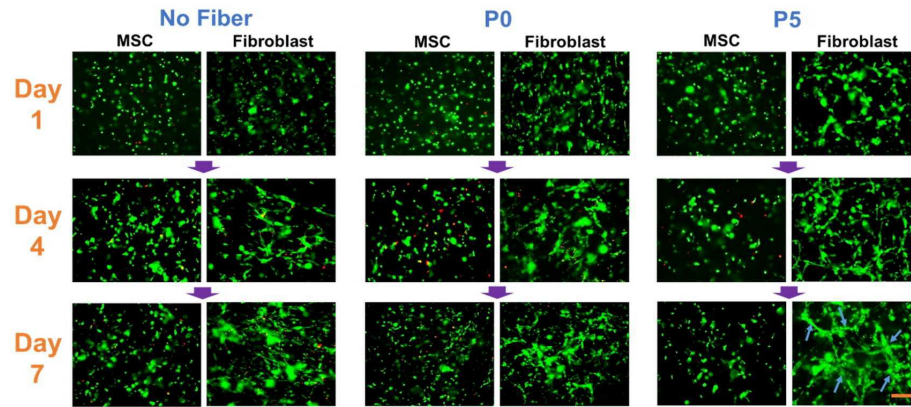


도면9



도면10

# Electrical Stimulation



도면11

