



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0070008
(43) 공개일자 2017년06월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61L 27/56 (2006.01) A61L 27/18 (2006.01)
A61L 27/24 (2006.01) A61L 27/36 (2006.01)
A61L 27/48 (2006.01) A61L 27/52 (2006.01)
A61L 27/58 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61L 27/56 (2013.01)
A61L 27/18 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-7007215

(22) 출원일자(국제) 2015년08월17일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2017년03월15일

(86) 국제출원번호 PCT/US2015/045494

(87) 국제공개번호 WO 2016/025945

국제공개일자 2016년02월18일

(30) 우선권주장

62/038,030 2014년08월15일 미국(US)

(71) 출원인

더 존스 홉킨스 유니버시티

미국, 매릴랜드 21218, 볼티모어, 3400 엔. 찰스 스트리트

(72) 발명자

지양, 슈에송

미국 매릴랜드 21218 볼티모어 클라크 106 노스 찰스 스트리트 3400 테크놀로지 벤처스

레디, 사생크

미국 매릴랜드 21201 볼티모어 유니트 416 노스 찰스 스트리트 1209

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인씨엔에스

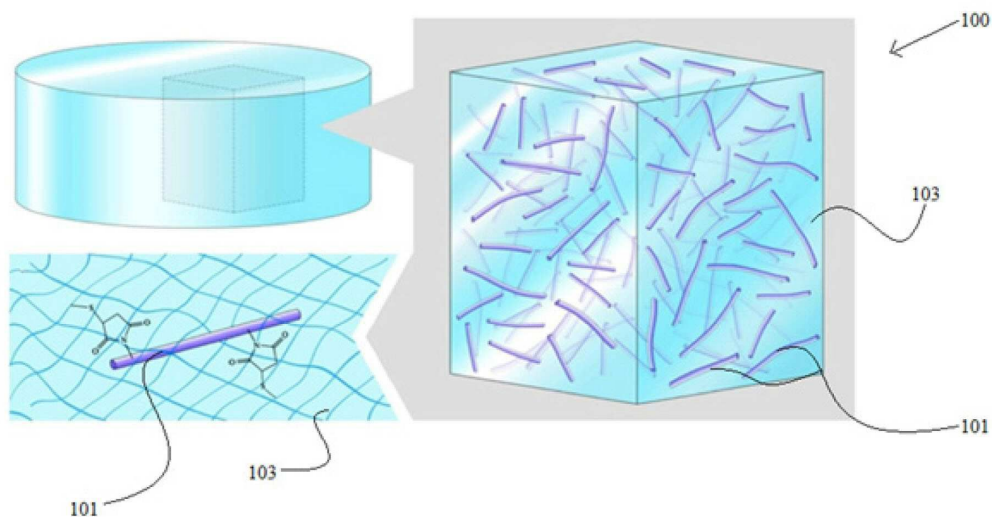
전체 청구항 수 : 총 40 항

(54) 발명의 명칭 조직 복원용 복합 재료

(57) 요약

복합 재료는 겔 및 겔 내에 배치 된 하나 이상의 나노 구조체를 포함 할 수 있다. 연조직 결함을 치유하는 방법은 연조직 결함에 복합 재료를 적용하는 단계를 포함 할 수 있으며, 상기 복합 재료는 겔 및 상기 겔 내에 배치 된 나노 구조체를 포함한다. 연조직 결함을 치료하는데 사용하기 위한 복합 재료를 제조하는 방법은 겔을 제공하고 겔 내에 나노 섬유를 배치하는 단계를 포함할 수 있다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61L 27/24 (2013.01)
A61L 27/3633 (2013.01)
A61L 27/48 (2013.01)
A61L 27/52 (2013.01)
A61L 27/54 (2013.01)
A61L 27/58 (2013.01)
A61L 2300/64 (2013.01)
A61L 2400/06 (2013.01)
A61L 2430/06 (2013.01)

(72) 발명자

브랜데이저, 제럴드

미국 매릴랜드 21218 볼티모어 클라크 106 노스 찰스 스트리트 3400 테크놀로지 벤처스

마오, 하이-관

미국 매릴랜드 21212-1228 볼티모어 노스 찰스 스트리트 6129

삭스, 저스틴

미국 매릴랜드 21218 볼티모어 클라크 106 노스 찰스 스트리트 3400 테크놀로지 벤처스

리, 시아오웨이

미국 버지니아 23228 헨리코 노스 본 코트 7711에이

펑, 케빈

미국 매릴랜드 21218 볼티모어 클라크 106 노스 찰스 스트리트 3400 테크놀로지 벤처스

마틴, 러셀

미국 매릴랜드 21211 볼티모어 크레스몬트 에비뉴 2911

명세서

청구범위

청구항 1

약 100nm 내지 약 8000nm의 평균 직경을 가지며, 하이드로겔 물질에 공유결합되는 중합체 섬유를 포함하고, 상기 섬유와 하이드로겔 물질의 비는 성분-질량 기준으로 약 1:10 내지 약 10:1, 또는 농도 기준으로 약 1 내지 50 mg/mL인 스캐폴드(scaffold) 복합체.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 중합체 섬유가 생체적합(biocompatible) 생분해성 폴리에스테르를 포함하는 것인 스캐폴드 복합체.

청구항 3

제1항에 있어서,
상기 중합체 섬유가 폴리카프로락톤(polycaprolactone)을 포함하는 것인 스캐폴드 복합체.

청구항 4

제1항에 있어서,
상기 하이드로겔 물질이 기능성 네트워크(functional network) 내 복합체(complex)에 존재하는 것인 스캐폴드 복합체.

청구항 5

제1항에 있어서,
상기 섬유와 무수(anhydrous) 하이드로겔 물질의 비가 약 1:10 내지 약 10:1인 것인 스캐폴드 복합체.

청구항 6

제1항에 있어서,
상기 중합체 섬유가 부직(non-woven) 중합체 섬유를 포함하는 것인 스캐폴드 복합체.

청구항 7

제1항에 있어서,
상기 중합체 섬유가 전기방사(electrospun) 폴리카프로락톤 섬유를 포함하는 것인 스캐폴드 복합체.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 중합체 섬유가 폴리(락틱-코-글리콜릭산)(poly(lactic-co-glycolic acid)), 폴리락틱산(poly(lactic acid)) 및/또는 폴리카프로락톤(polycaprolactone) 또는 이들의 조합을 포함하는 합성 중합체 재료를 포함하는 중합체 섬유를 포함하는 것인 스캐폴드 복합체.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 스캐폴드 복합체가 실질적으로 생체적합하게 조제된 것인 스캐폴드 복합체.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 중합체 섬유가 실크, 콜라겐, 및 키토산 또는 이들의 조합으로부터 선택된 생물학적 중합체 물질을 포함하는 것인 스캐폴드 복합체.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 하이드로겔 물질이 히알루론산(hyaluronic acid)을 포함하는 것인 스캐폴드 복합체.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 하이드로겔 물질이 폴리(에틸렌글리콜), 콜라겐, 텍스트란, 엘라스틴, 알진산염, 피브린, 알지네이트, 히알루론산, 폴리(비닐알콜), 이들의 유도체 또는 이들의 조합을 포함하는 하이드로겔 물질을 포함하는 것인 스캐폴드 복합체.

청구항 13

제1항에 있어서,

상기 하이드로겔 물질이 가공된 조직 세포의 기질을 포함하는 것인 스캐폴드 복합체.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 가공된 조직 세포의 기질이 지방 조직으로부터 유래된 것인 스캐폴드 복합체.

청구항 15

제1항에 있어서,

상기 스캐폴드 복합체가 부직 폴리카프로락톤 섬유를 포함하는 것인 스캐폴드 복합체.

청구항 16

제1항에 있어서,

상기 하이드로겔 물질이 상기 폴리카프로락톤 섬유의 외부 표면의 적어도 일부분을 실질적으로 피복하는 히알루론산을 포함하는 것인 스캐폴드 복합체.

청구항 17

제1항에 있어서,

상기 하이드로겔 물질이 상기 중합체 섬유의 외부 표면에 결합된 것인 스캐폴드 복합체.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 스캐폴드 복합체가 중합체 섬유 및 하이드로겔 물질 사이의 결합을 도입하는데 효과적인 양으로 존재하는 가교 모이어티(moiety)를 더 포함하는 것인 스캐폴드 복합체.

청구항 19

제1항에 있어서,

상기 스캐폴드 복합체가 상기 스캐폴드 복합체의 표면(on) 또는 표면 내(within)에 존재하는 다수의 기공을 포함하며, 상기 기공은 상기 표면의 cm^2 당 적어도 약 50개의 기공 농도로 존재하고, 상기 표면 상의 기공의 적어도 80% 이상의 평균 기공 직경이 적어도 약 5 마이크론 이상인 것인 스캐폴드 복합체.

청구항 20

제1항에 있어서,

상기 스캐폴드 복합체가 폴리카프로락톤 섬유와 히알루론산 사이의 가교를 도입하는데 효과적인 양으로 존재하는 가교 모이어티를 더 포함하는 것인 스캐폴드 복합체.

청구항 21

제1항에 있어서,

상기 스캐폴드 복합체가 인간 대상에 존재하는 표적 조직 내로 이식될 때 조직 성장 및 세포 침윤을 촉진하는 것인 스캐폴드 복합체.

청구항 22

제1항에 있어서,

상기 스캐폴드 복합체가 인간 조직 내로 이식될 때 실질적으로 생분해성인 것인 스캐폴드 복합체.

청구항 23

제1항에 있어서,

상기 스캐폴드 복합체가 인간 조직 내로 이식될 때 실질적으로 난생분해성(non-biodegradable)인 것인 스캐폴드 복합체.

청구항 24

제1항에 있어서,

세포, 소분자, 핵산 및 폴리펩티드로부터 선택된 치료제를 더 포함하는 것인 스캐폴드 복합체.

청구항 25

제1항에 따른 스캐폴드 복합체를 포함하는 이식 가능한 생체재료.

청구항 26

제25항에 있어서,

상기 이식 가능한 생체재료가 실질적으로, 무세포이고, 그리고/또는 폴리펩티드가 포함되지 않은 것인 이식 가능한 생체재료.

청구항 27

제25항에 있어서,

상기 이식 가능한 생체재료가 주사(injection)에 의한 투여용으로 조제된 이식 가능한 생체재료.

청구항 28

제25항에 있어서,

상기 이식 가능한 생체재료가 피하(subdermal) 투여 으로 제조된 이식 가능한 생체재료.

청구항 29

제25항 내지 제28항 중 어느 하나의 이식가능한 재료를 포함하는 키트(kit).

청구항 30

제1항의 스캐폴드 복합체 또는 제25항의 이식 가능한 재료를 대상에 투여할 때 조직 형태의 유지를 제공할 수 있는 효과적인 양을 포함하는, 외과 수술을 받는 대상의 조직 형태를 유지하기 위한 의료장치

청구항 31

다수의 공극을 생성하도록 배향된 중합체 섬유를 포함하는 무세포, 3차원 스캐폴드를 제공하는 단계로서, 상기 중합체 섬유의 적어도 일부는 다른 폴리카프로락톤 섬유와 가교결합되고, 복합체를 형성하기 위해 상기 중합체 섬유상에 하이드로겔 물질을 포함하는 조성물을 배치하는 단계; 및

상기 복합체를 반응 또는 안정화시켜 안정화 된 임플란트를 형성하여 임플란트를 제조하는 단계

를 포함하는 조직 또는 연골 수복을 위한 임플란트의 제조방법

청구항 32

제31항에 있어서,

상기 조직이 연조직을 포함하는 것인 제조방법.

청구항 33

다수의 공극을 생성하도록 배향된 중합체 섬유를 포함하는 무세포, 3차원 스캐폴드를 제공하는 단계로서, 상기 중합체 섬유의 적어도 일부는 다른 폴리카프로락톤 섬유와 가교결합되는 단계;

복합체를 형성하기 위해 상기 중합체 섬유상에 하이드로겔 물질을 포함하는 조성물을 배치하는 단계; 및

상기 복합체를 반응 또는 안정화시켜 안정화 된 임플란트를 형성하여 임플란트를 제조하는 단계

를 포함하는 조직 또는 연골 수복을 위한 임플란트의 제조방법.

청구항 34

제33항에 있어서,

상기 중합체 섬유가 폴리카프로락톤을 포함하는 제조방법.

청구항 35

제33항에 있어서,

상기 하이드로겔 물질이 히알루론산을 포함하는 제조방법.

청구항 36

제33항에 있어서,

상기 3차원 스캐폴드가 반응성 폴리카프로락톤 섬유를 포함하는 제조방법.

청구항 37

다수의 공극을 생성하도록 배향된 중합체 섬유를 포함하는 무세포, 3차원 스캐폴드를 제공하는 단계로서, 상기 중합체 섬유의 적어도 일부는 다른 폴리카프로락톤 섬유와 가교결합되는 단계;

복합체를 형성하기 위해 상기 중합체 섬유상에 하이드로겔 물질을 포함하는 조성물을 배치하는 단계; 및

상기 복합체를 반응 또는 안정화시켜 안정화 된 임플란트를 형성하여 임플란트를 제조하는 단계

를 포함하는 조직 또는 연골 수복을 위한 임플란트의 제조방법.

청구항 38

조직을 팽창시키는 단계를 포함하고, 상기 조직을 팽창시키는 단계는 제1항에 따른 스캐폴드 복합체 유효량을 조직내로 이식하여 조직을 팽창시키는 단계를 포함하는 외상 또는 외과 수술로 인한 조직 결함의 치유 방법.

청구항 39

조직을 팽창시키는 단계를 포함하고, 상기 조직을 팽창시키는 단계는 제1항에 따른 스캐폴드 복합체 유효량을 조직내로 이식하여 조직을 팽창시키는 단계를 포함하는 노화와 관련된 질병, 장애 또는 질환으로 인한 조직 결함을 감소 또는 역전시키는 방법.

청구항 40

제38항 또는 제39항에 있어서,

상기 조직 결함은 늑막 조직, 근육 조직, 피부 또는 이들의 조합을 포함하는 것인 방법.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 본 발명은 연조직 복원을 촉진시키면서 손실된 연조직량을 회복시키는 복합 재료 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 본 발명은 "Composite Materials for Tissue Restoration"과 같은 명칭으로 2014.8.15일자로 출원된 미국 가출원 62/038,030에 대하여 35 U.S.C. § 119(e) 하에서 우선권을 주장하는 국제출원으로, 이는 전체적으로 본 명세서에 참조로 편입된다.

[0003] 외상, 종양 절제수술 또는 선천성 기형으로 인한 연조직 결함은 상용화된 수단으로 치료하기 어렵다. 조직 전위(rearrangements) 또는 조직 이식을 포함하는 현재의 치료법은 공여(donor) 부위의 결함의 원인이 된다. 인공 임플란트와 같은 다른 치료법은 섬유증 및 피포(encapsulation)를 일으킨다. 조직 내 성장을 촉진시키는 기존의 전략은 연조직 결함의 치료에는 부적합하다. 현재의 무세포 기질(매트릭스, matrix)는 이상적인 재건을 위해 요구되는 연질의 3차원 조직인 아닌, 평평하고 섬유증성 시트(fibrotic sheet)의 조직을 형성한다. 마지막으로 지방 이식술은 연조직 결손을 회복시킬 수 있으나, 변동이 심한 이식 생존율(graft survival)과 제한된 부피 복원력으로 광범위한 사용에 방해가 되고 있다. 연조직 재생을 위한 이상적인 접근방법은 생체 내 지방 조직과 같은 연조직의 재생을 유도한 후, 재생을 촉진하기 위한 조직을 이식하는 것이다. 그러나 지방조직의 재생은 세포가 부착, 이주, 증식, 분화 및 새로운 조직을 형성하기에 적합한 매트릭스를 필요로 한다. 많은 본래의 세포외기질(ECM)이 회복 부위에서 손실된다. 따라서, 손상된 조직량을 즉시 회복할 뿐만 아니라 미세환경을 재조정하여, 숙주 세포 침윤을 돕고 및 연조직의 재생을 촉진하는 합성 매트릭스를 재현하는 것은 지방 조직 기반 복원을 이용하여 연조직 결함을 복구할 때 필수적이다.

[0004] 하이드로겔은 연조직 복원을 위한 충전재로서 몇 가지 장점을 제공한다. 그러나 충분한 기계적 특성을 얻기 위해서는 일반적으로 보다 높은 가교 밀도가 요구된다. 그러나 이러한 조건에서 숙주 조직 세포(예를 들어 지방세포 전구세포 및 내피 전구세포)는 침투하여 스캐폴드(scaffold)로 성장할 수 없다. 분해가능한 하이드로겔의 경우 숙주 조직의 내부 성장이 지나치게 느리게 발생하거나, 또는 적어도 섬유 물질의 흡수보다 느리게 발생하기 때문에 흉터 및 섬유 조직의 형성이 전형적이다.

[0005] 최근에는, 기능화된 나노섬유가 다양한 세포활동을 지원하기 위한 ECM 유사체로서 개발되었다. 폴리카프로락톤(polycaprolactone, PCL) 또는 폴리락타이드글리콜라이드공중합체(poly(lactide-co-glycolide), PLGA)와 같은 FDA-준수 생분해성 합성 폴리- α -에스테르(poly- α -esters)는 전기방사법(electrospinning)으로 알려진 공정을 통해 나노섬유를 생성하는데 사용될 수 있다. 이러한 중합체로 제조된 생분해성 봉합사 및 임플란트는 생체적합성에 대한 실적으로 인하여 임상적으로 널리 사용되고 있다. 줄기 세포 공학에 응용하기 위해 다양한 직경 및 구조(topographies)를 갖는 다양한 나노 섬유가 개발되었다. 그러나 이러한 나노섬유는 거시적 구조를 제공하지 않으므로, 3D 스캐폴드로 사용하기 어렵다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 이러한 종래의 방법 및 시스템과 관련된 다양한 문제들이 주어짐에 따라, 연조직 결함을 치료하기 위한 개선된 해결책이 당업계에 여전히 요구된다. 본 개시는 당해 기술분야에 알려져 있는 다양한 문제점을 해결하고자 하는 요구에 대한 해결책을 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0007] 본 발명은 적어도 부분적으로 개선된 특징을 포함하는 중합체 섬유 성분을 포함하는 스캐폴드 복합재료를 식별하는 것에 기초한다(예를 들어 후술되는 바와 같이, 연조직 복원을 위해 개선된 특성).
- [0008] 본 발명의 일 측면에 따르면, 약 100nm 내지 약 8000nm의 평균 직경을 가지며, 하이드로겔 물질에 공유결합되는 중합체 섬유를 포함하고, 상기 섬유와 하이드로겔 물질의 비는 성분-질량 기준으로 약 1:10 내지 약 10:1, 또는 농도 기준으로 약 1 내지 50 mg/mL인 스캐폴드(scaffold) 복합재료가 제공된다.
- [0009] 하나의 구현예로서, 상기 중합체 섬유가 생체적합 생분해성 폴리에스테르를 포함할 수 있다. 선택적으로 상기 중합체 섬유는 폴리카프로락톤을 포함할 수 있다.
- [0010] 또 다른 구현예로서, 하이드로겔 물질이 기능성 네트워크(functional network) 내 복합재료에 존재할 수 있다.
- [0011] 추가적인 구현예로서, 상기 섬유와 무수(anhydrous) 하이드로겔 물질의 비가 약 1:10 내지 약 10:1일 수 있다.
- [0012] 또 다른 구현예로서, 상기 중합체 섬유가 부직(non-woven) 중합체 섬유를 포함할 수 있다.
- [0013] 특정한 구현예로서, 중합체 섬유가 전기방사(electrospun) 폴리카프로락톤 섬유를 포함할 수 있다. 상기 중합체 섬유가 폴리락틱-co-글리콜릭산(poly(lactic-co-glycolic acid)), 폴리락틱산(polylactic acid) 및/또는 폴리 카프로락톤(polycaprolactone) 또는 이들의 조합을 포함하는 합성 중합체 재료를 포함하는 중합체 섬유를 포함할 수 있다.
- [0014] 하나의 구현예로서, 상기 복합재료가 실질적으로 생체적합하게 제조될 수 있다. 선택적으로 상기 중합체 섬유가 실크, 콜라겐, 키토산 및/또는 이들의 조합을 포함하는 생물학적 중합체 물질을 포함할 수 있다.
- [0015] 하나의 구현예로서, 상기 하이드로겔 물질이 히알루론산(hyaluronic acid)을 포함할 수 있다. 선택적으로 상기 하이드로겔 물질이 폴리에틸렌글리콜, 콜라겐, 텍스트란, 엘라스틴, 알진산염, 피브린, 알지네이트, 히알루론산, 폴리비닐알콜, 이들의 유도체 또는 이들의 조합으로 이루어진 하이드로겔 물질을 포함할 수 있다.
- [0016] 특정한 구현예로서, 상기 하이드로겔 물질이 가공된 조직 세포외 기질을 포함할 수 있다.
- [0017] 하나의 구현예로서, 상기 가공된 조직 세포외 기질이 지방 조직으로부터 유래된 것일 수 있다.
- [0018] 다른 구현예로서, 상기 스캐폴드 복합재료가 부직 폴리카프로락톤 섬유를 포함할 수 있다.
- [0019] 하나의 구현예로서, 상기 하이드로겔 물질이 상기 폴리카프로락톤 섬유의 외부 표면의 적어도 일부분을 실질적으로 피복하는 히알루론산을 포함할 수 있다.
- [0020] 특정한 구현예로서, 상기 하이드로겔 물질이 상기 중합체 섬유의 외부 표면에 결합된 것일 수 있다.
- [0021] 다른 구현예로서, 상기 스캐폴드 복합재료가 중합체 섬유 및 하이드로겔 물질 사이의 결합을 도입하는데 효과적인 양으로 존재하는 가교 모이어티(moiety)를 더 포함할 수 있다.
- [0022] 특정한 구현예로서, 상기 스캐폴드 복합재료가 상기 스캐폴드 복합재료의 표면 또는 표면 내에 존재하는 다수의 공극을 포함하며, 상기 공극은 상기 표면의 cm^2 당 적어도 약 50개의 공극의 농도로 존재하고, 상기 표면상의 공극의 적어도 80%이상의 평균직경이 적어도 5마이크론 이상일 수 있다.
- [0023] 추가적인 구현예로서, 상기 스캐폴드 복합재료가 폴리카프로락톤 섬유와 히알루론산의 가교를 유도하는데 효과적인 양으로 존재하는 가교 모이어티를 더 포함할 수 있다.
- [0024] 선택적으로, 상기 스캐폴드 복합재료가 인간 개체에 존재하는 표적 조직내로 이식될 때 조직 성장 및 세포 침윤을 촉진할 수 있다.
- [0025] 특정한 구현예로서, 상기 스캐폴드 복합재료가 인간 조직내로 이식될 때 실질적으로 생분해성일 수 있다.

- [0026] 하나의 구현예로서, 상기 스캐폴드 복합재료가 인간 조직내로 이식될 때 실질적으로 난생분해성(non-biodegradable)일 수 있다.
- [0027] 다른 구현예로서, 상기 스캐폴드 복합재료가 세포, 소분자, 핵산 및 폴리펩티드로부터 선택된 치료제를 더 포함할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 본 발명의 스캐폴드 복합재료를 포함하는 이식 가능한 생체재료가 제공된다.
- [0029] 특정한 구현예로서, 상기 이식 가능한 생체재료가 실질적으로, 무세포이고, 그리고/또는 폴리펩티드가 포함되지 않을 수 있다.
- [0030] 하나의 구현예로서, 상기 이식 가능한 생체재료가 주사에 의한 투여가 가능하도록 제조될 수 있다.
- [0031] 다른 구현예로서, 상기 이식 가능한 생체재료가 피하(subdermal) 투여 용으로 제조될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 본 발명의 이식 가능한 재료를 포함하는 키트(kit)가 제공된다.
- [0033] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 외과 수술을 받는 대상의 조직 형태를 유지하기 위한 의료장치이며, 본 발명의 스캐폴드 복합재료 및/또는 이식 가능한 재료를 대상에 투여할 때 조직 형태의 유지를 제공할 수 있는 효과적인 양으로 포함하는 의료장치가 제공된다.
- [0034] 본 발명의 다른 또 하나의 측면에 따르면, 조직 또는 연골 수복을 위한 하기 단계를 포함하는 임플란트의 제조방법이 제공된다: 다수의 공극을 생성하도록 배향된 중합체 섬유를 포함하는 무세포, 3차원 스캐폴드를 제공하는 단계로서, 상기 중합체 섬유의 적어도 일부는 다른 폴리카프로락톤 섬유와 가교결합되는 단계; 복합재료를 형성하기 위해 상기 중합체 섬유상에 하이드로겔 물질을 포함하는 조성물을 배치하는 단계; 및 상기 복합재료를 반응 또는 안정화시켜 안정화 된 임플란트를 형성하여 임플란트를 제조하는 단계를 포함하는 제조방법이 제공된다.
- [0035] 선택적으로 상기 조직이 연조직을 포함할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 하기의 단계를 포함하는 조직 또는 연골 수복을 위한 임플란트의 제조방법이 제공된다: 다수의 공극을 생성하도록 배향된 중합체 섬유를 포함하는 무세포, 3차원 스캐폴드를 제공하는 단계; 복합재료를 형성하기 위해 상기 중합체 섬유상에 하이드로겔 물질을 포함하는 조성물을 배치하는 단계; 및 상기 복합재료를 반응 또는 안정화시켜 상기 중합체 섬유의 적어도 일부가 상기 하이드로겔 물질에 가교 결합되는 안정화 된 임플란트를 형성시키는 단계를 포함하는 제조방법이 제공된다.
- [0037] 특정한 구현예로서, 상기 3차원 스캐폴드가 반응성 폴리카프로락톤 섬유를 포함한다.
- [0038] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 하기의 단계를 포함하는 조직 또는 연골 수복을 위한 임플란트의 제조방법이 제공된다: 다수의 공극을 생성하도록 배향된 중합체 섬유를 포함하는 무세포, 3차원 스캐폴드를 제공하는 단계; 복합재료를 형성하기 위해 상기 중합체 섬유상에 하이드로겔 물질을 포함하는 조성물을 배치하는 단계; 및 상기 복합재료를 반응 또는 안정화시켜 상기 중합체 섬유의 적어도 일부가 상기 하이드로겔 물질에 가교 결합되는 안정화 된 임플란트를 형성시키는 단계를 포함하는 제조방법이 제공된다.
- [0039] 본 발명의 추가적인 측면에 따르면, 외상 또는 외과 수술로 인한 조직 결함의 해결 방법이 제공되며, 상기 방법은 조직을 팽창시키는 단계를 포함하고, 상기 조직을 팽창시키는 단계는 본 발명에 따른 스캐폴드 복합재료 유효량을 조직내로 이식하여 조직을 팽창시키는 단계를 포함한다.
- [0040] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 노화와 관련된 질병, 장애 또는 질환으로 인한 조직 결함을 감소 또는 역전시키는 방법이 제공되며, 상기 방법은 조직을 팽창시키는 단계를 포함하고, 상기 조직을 팽창시키는 단계는 본 발명에 따른 스캐폴드 복합재료 유효량을 조직내로 이식하여 조직을 팽창시키는 단계를 포함한다.
- [0041] 선택적으로, 상기 조직 결함은 늑막 조직, 근육 조직, 피부 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0042] 본 발명의 적어도 하나의 측면에 따르면, 겔 또는 겔 내에 배치된 하나 이상의 나노구조체를 포함하는 복합 재료를 제공한다. 상기 겔은 하이드로겔 또는 임의의 다른 적합한 겔일 수 있다. 상기 나노구조체는 나노섬유 또는 임의의 다른 적합한 나노구조체일 수 있다. 상기 나노구조체는 겔에 공유결합될 수 있다. 상기 나노구조체는 폴리카프로락톤(PCL) 또는 임의의 다른 적합한 물질로 제조될 수 있다.
- [0043] 본 발명의 적어도 다른 측면에 따르면, 연조직 결함에 복합 재료를 도포하는 단계를 포함하는 연 조직 결함 치

료 방법을 제공하며, 여기서 상기 복합재료는 겔 및 상기 겔 내에 배치된 나노구조체를 포함한다.

[0044] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 겔을 제공하고 상기 겔 내에 나노섬유를 배치하는 단계를 포함하는 연조직 결합 치료용 복합재료의 제조방법이 제공된다.

[0045] 적용가능한 경우 또는 특별하게 부인되지 않는 경우라면 본 발명에 기술된 어떠한 하나의 측면은 상기 측면이가 본 발명의 다른 측면으로 설명되더라도, 어떠한 다른 하나 이상의 측면과 결합될 수 있는 것으로 고려된다.

[0046] 상기 및 다른 실시태양은 하기 상세한 설명에 기재되어 있거나, 이로부터 명백하고, 이들에 포함된다.

발명의 효과

[0047] 하이드로겔 내의 작용화 된 나노 섬유의 분산은 두 가지 성분의 결합 된 강도를 갖는 복합 구조를 형성한다. 나노 섬유와 하이드로겔 성분 사이의 계면 결합은 강한 복합재료를 만드는 데 중요하며, 다공성 및 공극 크기를 유지하면서 조직 및 세포 내부 성장을 촉진한다. 생성된 복합 재료 특성은 섬유 직경, 섬유 부하 수준, 말레이미드 밀도 수준 및 하이드로겔 성분의 부하 수준을 변화시킴으로써 쉽게 조정할 수 있다. 이는 표적화된 전체 강성에서 보다 낮은 가교 결합 밀도보다 높은 다공성을 허용하여 세포 침투 및 후속 조직 재형성을 증가시킨다. 섬유 자체는 또한 천연 ECM에서 보이는 것과 유사한 접착 부위를 제공함으로써 세포 이동을 직접적으로 개선할 수 있다. 생성된 복합재 임플란트는 고유 지방 조직의 강성과 일치하도록 조정될 수 있지만 세포 침투 및 개조에 대한 투과성을 유지한다. 이 새로운 합성물은 임의의 형태의 용적 결합을 즉시 채울 정도로 강하다. 이 복합재 임플란트는 신체 자신의 세포가 복합재료에 침투하여 혈관을 형성하고 지방 세포와 같은 세포로 분화되도록 허용하는 발판 역할을 한다. 초기 결합 공극이 정상적이고 건강한 조직으로 완전히 대체 될 때까지 조직 리모델링 중 발판은 천천히 분해된다. 복합 구조는 재건 및 미적 수술 가능성을 위한 큰 가능성을 가지고 있다.

도면의 간단한 설명

[0048] 이하의 상세한 설명은 예시로서 주어진 것으로, 설명된 특정 구현으로만 본 발명을 제한하려는 것이 아니며, 첨부된 도면과 함께 이해될 수 있다.

도 1a는 본 발명에 따른 복합재료의 실시 태양의 구조를 도시한 것으로서, 겔 내에 배치된 나노구조체 및 특히 겔 중의 관능기에 대한 나노구조체의 공유결합을 나타낸 것이다.

도 1b는 도 1에 나타난 완전히 팽창된 복합재료의 광학 현미경 이미지를 나타낸 것이다.

도 1c는 도 1에 나타난 수화된 복합재료의 거시적 외관(macroscopic appearance)을 나타낸 것이다.

도 1d는 도 1에 나타난 바와 같이 탈수화된 복합재료의 주사전자현미경(SEM) 사진을 나타낸 것으로, ECM과 유사한 초미세 구조를 나타낸다.

도 2a는 HA 하이드로겔만 사용된 경우에 대하여 도 1에 나타난 복합재료 구현의 응력-변형 곡선을 나타낸 것으로, 동일한 가교 결합 밀도에서 하이드로겔에 비해 향상된 탄성 모듈러스를 나타낸다.

도 2b는 도 2a에 나타난 복합재료 구현의 피로 시험을 나타낸 것으로, 일반 하이드로겔에 비해 기계적 온전성(integrity)의 강인함 정도가 유사함을 나타낸다.

도 3a 및 3b는 4일 동안 나노 섬유-HA 하이드로겔 복합재료에서 배양 된 ASC의 위상 콘트라스트(phase contrast) 이미지(도 3B)를 갖는 형광 및 오버레이(overlay) (도 3a)를 도시한다;

도 3c 및 3d는 4일 동안 보통의 HA 하이드로겔에서 배양된 ASC의 위상 콘트라스트 이미지(도 3d) 및 형광 및 오버레이 (도 3c)를 도시한다;

도 4a 및 도 4b는 정렬된 650 nm 나노 섬유를 따라 회전 타원체로부터 이동하는 ASC를 대조하는 위상 콘트라스트 이미지(도 4b) 및 형광 및 오버레이 (도 4a)를 도시한다.

도 5a는 쥐의 사타구니 지방 패드에서의 나노 섬유-하이드로겔 복합재료의 in situ 외관을 나타내는 사진이다.

도 5b는 이식 후 2주 후에 채워진 복합재료 주위의 조직으로부터의 박편 H&E 염색(staining) 이미지를 도시한다.

도 5c는 4주 후에 복합 조직 계면으로부터 수집된 조직 박편 H&E 염색 이미지를 나타내며, 세포 침윤(infiltration)을 나타낸다.

도 6a는 폴리카프로락톤(PCL) 섬유-HA 하이드로겔 복합재료에 대한 합성 스킴을 나타낸다.

도 6b는 PCL 섬유와 HA 사슬 네트워크 사이의 계면 결합을 갖는 복합 구조의 개략도를 도시한다.

도 6c는 동일한 치수(스케일 바=5mm)를 갖는 새로이 제조된 원통형(cylindrical) 섬유-HA 하이드로겔 복합재료 (좌측) 및 HA 하이드로겔(우측)의 일반적인 모습을 나타내는 광학 이미지를 도시한다.

도 6d는 동결 건조(lyophilization) 및 재수화 후의 동일한 샘플 세트의 광학 이미지를 나타낸다.

도 6e는 HA 하이드로겔(스케일 바=40 μ m)의 단면의 SEM 이미지를 나타낸다.

도 6f는 PCL 섬유-HA 하이드로겔 복합재료 (스케일 바=100 μ m)의 단면의 SEM 이미지를 나타낸다.

도 6g는 탈세포화(decellularized) 된 천연 지방 조직의 단면의 SEM 이미지 (스케일 바= 10 μ m)를 나타낸다.

도 7a는 HA 하이드로겔의 압축 탄성 모듈러스(compressive modulus) 강화에 미치는 섬유 직경 및 계면 결합의 영향을 도시한다. HA 하이드로겔 및 복합재료는 4.5mg/ml의 HA를 기준으로 제조되었다. 응력의 값은 변형률의 50 %에서 측정되었다. * $p < 0.05$ (Student-t test).

도 7b는 PEG 하이드로겔의 압축 탄성 모듈러스에 대한 섬유 직경 및 계면 결합의 효과를 나타낸다. PEG 하이드로겔 및 복합재료는 PEGSH 30mg/ml 및 PEGDA 20mg/ml를 기준으로 제조되었으며 1.0 μ m PCL 섬유는 섬유-PEG 하이드로겔 복합재료를 합성하는 데 사용되었다. 응력(stress)의 값은 50 %의 변형률(strain)에서 측정되었다. * $p < 0.05$ (Student-t test).

도 8a는 HA 하이드로겔의 전단 저장 모듈러스(shear storage modulus) 강화에 대한 계면 결합 밀도 및 섬유 직경의 영향을 도시한다. * $p < 0.05$ (Student-t test).

도 8b는 PEG 하이드로겔의 전단 저장 모듈러스 강화에 대한 계면 결합 밀도 및 섬유 직경의 영향을 나타낸다. 전단 저장 모듈러스의 값은 1 Hz 주파수(frequency)에서 측정되었다. * $p < 0.05$ (Student-t test).

도 8c는 HA 하이드로겔의 전단 저장 모듈러스 강화에 대한 계면 결합 밀도 및 섬유 직경의 영향을 도시한다. 전단 저장 모듈러스의 값은 1 Hz 주파수에서 측정되었다. * $p < 0.05$ (Student-t test).

8d는 HA 하이드로겔의 전단 저장 모듈러스 강화에 대한 계면 결합 밀도 및 섬유 직경의 영향을 도시한다. 전단 저장 탄성률의 값은 1 Hz 주파수에서 측정되었다. * $p < 0.05$ (Student-t test).

도 9a는 HA 하이드로겔의 전단 저장 모듈러스에 대한 섬유-부하(load) 량의 영향을 도시한다. HA 하이드로겔 및 복합재료는 10mg/ml의 HA를 사용하여 합성 하였다. 전단 저장 모듈러스는 1Hz 주파수에서 측정되었다. 파란색 화살표는 SH 그룹 대 (DA + MAL) 그룹의 물비가 1 대 2 인 두 복합 재료에 대한 조건을 나타낸다. * $p < 0.05$ (Student-t test).

도 9b는 HA 하이드로겔의 전단 저장 모듈러스에 대한 섬유-부하 량의 영향을 도시한다. HA 하이드로겔 및 복합재료는 4.5 mg/ml의 HA를 사용하여 합성되었다. 전단 저장 모듈은 1Hz 주파수에서 측정된다. 파란색 화살표는 SH 그룹 대 (DA + MAL) 그룹의 물비가 1 대 2 인 두 복합 재료에 대한 조건을 나타낸다. * $p < 0.05$ (Student-t test).

도 10a는 상이한 주파수 하에서 섬유-HA 하이드로겔 복합재료의 기계적 강도를 나타낸다. HA 하이드로겔 및 복합재료의 전단 저장 모듈러스는 전단 부하의 다른 주파수에 대해 측정된다.

도 10b는 상이한 재수화 하에서 섬유-HA 하이드로겔 복합재료의 기계적 강도를 도시한다. 재수화 전후의 복합재료의 압축 응력 비교(변형률 = 40 %).

도 10c는 상이한 순환 하중 하에서 섬유-HA 하이드로겔 복합재료의 기계적 강도를 나타낸다. HA 하이드로겔 및 상응하는 복합재료의 압축 응력은 주기적 하중 (변형률 = 25 %)에 대해 측정된다.

도 11a는 27 일째, HA 하이드로겔에서의 인간 지방 유래 줄기 세포 (hASCs)의 이동 능력을 도시한다. HA 하이드로겔 대조군 및 2가지 복합재료는 약 1.9 kPa의 유사한 압축 모듈러스를 나타내도록 선택되었다. F-액틴과 hASC의 핵은 각각 Alexa Fluor® 568 phalloidin (적색)과 DAPI (청색)로 염색되었다. 나노 섬유는 Alexa Fluor® 647 (흰색)으로 표지되었다. 스케일 바=100 μ m.

도 11b는 27 일째, 나노 섬유-HA 하이드로겔 복합재료에서 인간 지방 유래 줄기 세포의 이동 능력을 도시한다. HA 하이드로겔 대조군 및 2 가지 복합재료는 약 1.9 kPa의 유사한 압축 모듈러스를 나타내도록 선택되었다. F-

액틴과 hASC의 핵은 각각 Alexa Fluor® 568 phalloidin (적색)과 DAPI (청색)로 염색되었다. 나노 섬유는 Alexa Fluor® 647 (흰색)으로 표지되었다. 스케일 바=100 μ m.

도 11c는 27 일째, RGD-나노 섬유-HA 하이드로겔 복합재료 중의 인간 지방 유래 줄기 세포 (hASC)의 이동 능력을 도시한다. HA 하이드로겔 대조군 및 2 가지 복합재료는 약 1.9 kPa의 유사한 압축 모듈러스를 나타내도록 선택되었다. F-액틴과 hASC의 핵은 각각 Alexa Fluor® 568 phalloidin (적색)과 DAPI (청색)로 염색되었다. 나노 섬유는 Alexa Fluor® 647 (흰색)으로 표지되었다. 스케일 바=100 μ m.

도 11d는 27 일째, RGD-나노 섬유-HA 하이드로겔 복합재료에서 인간 지방 유래 줄기 세포 (hASC)의 이동 능력을 도시한다. HA 하이드로겔 대조군 및 2 가지 복합재료는 약 1.9 kPa의 유사한 압축 모듈러스를 나타내도록 선택되었다. (D)와 (E)의 노란색 화살표는 섬유 또는 섬유 클러스터에 부착하는 세포를 나타낸다. F-액틴과 hASC의 핵은 각각 Alexa Fluor® 568 phalloidin (적색)과 DAPI (청색)로 염색되었다. 나노 섬유는 Alexa Fluor® 647 (흰색)으로 표지되었다. 스케일 바=20 μ m.

도 11e는 27 일째, 나노 섬유-HA 하이드로겔 복합재료에서 인간 지방 유래 줄기 세포 (hASCs)의 이동 능력을 도시한다. HA 하이드로겔 대조군 및 2가지 복합재료는 약 1.9 kPa의 유사한 압축 모듈러스를 나타내도록 선택되었다. (D)와 (E)의 노란색 화살표는 섬유 또는 섬유 클러스터에 부착하는 세포를 나타낸다. F-액틴과 hASC의 핵은 각각 Alexa Fluor® 568 phalloidin (적색)과 DAPI (청색)로 염색되었다. 나노 섬유는 Alexa Fluor® 647 (흰색)으로 표지되었다. 스케일 바=20 μ m.

도 11f는 인간 지방 유래 줄기 세포 (hASCs)의 이동 능력을 나타낸다. PCL 섬유와 HA 사슬 네트워크 사이의 계면 결합을 갖는 복합 구조에서의 hASCs 회전 타원체의 개략도가 도시되어 있다.

도 12a는 30일 이내에 이식 된 섬유-HA 하이드로겔 복합재료 및 HA 하이드로겔에 의해 매개되는 조직 재생을 나타낸다. 사타구니 지방 패드 (스케일 바=2mm) 하의 (삽입, insets) 전 이식 후 복합재료의 육안으로 보이는 이미지가 표시된다. 하얀 별은 이식 된 매트릭스를 나타낸다.

도 12b는 30 일 이내에 이식 된 섬유-HA 하이드로겔 복합재료 및 HA 하이드로겔에 의해 매개되는 조직 재생을 나타낸다. 사타구니 지방 패드(스케일 바=2mm) 하의 (삽입, insets) 전 및 이식 후 HA 하이드로겔의 육안으로 보이는 이미지가 표시된다. 하얀 별은 이식 된 매트릭스를 나타낸다.

도 12c는 30 일 동안 이식 된 섬유-HA 하이드로겔 복합재료 및 HA 하이드로겔에 의해 매개되는 조직 재생을 나타낸다. 천연 지방 조직 (i), (ii) sham 수술(sham surgery) 후 치유 된 조직, (iii, v) 섬유-HA 하이드로겔 이식 된 조직 및 (iv, vi) HA 하이드로겔 이식 된 조직의 14 일, 30 일 경과의 H & E 및 Masson의 삼색 염색 이미지가 표시된다. 이미지에서 H = HA 하이드로겔, C = 섬유 -HA 하이드로겔 복합재료, B = 갈색 지방 조직, 노란색 화살표 = 혈관. 스케일 바 = 200 μ m.

도 12d는 30 일 동안 이식 된 섬유-HA 하이드로겔 복합재료 및 HA 하이드로겔에 의해 매개되는 조직 재생을 나타낸다. 천연 지방 조직 (i), (ii) sham 수술 후 치유된 조직, (iii, v) 섬유-HA 하이드로겔 이식 된 조직 및 (iv, vi) HA 하이드로겔 이식 된 조직의 14 일, 30 일 경과 의 H & E 및 Masson의 삼색 염색 이미지가 표시된다. Masson의 삼색성 염색에서 파란색 얼룩은 검사 조직의 총 콜라겐을 나타낸다. 이미지에서 H = HA 하이드로겔, C = 섬유 -HA 하이드로겔 복합재료, B = 갈색 지방 조직, 노란색 화살표 = 혈관. 스케일 바 = 200 μ m.

도 13a는 PAA-그래프트 방법을 통해 MAL로 표면 개질 된 섬유를 제조하는 개략도를 도시한다.

도 13b는 3 및 10% (v/v)의 아크릴산 (* p <0.05, n = 6)으로 PAA- 그래프트 한 후의 섬유상의 카르복실기의 평균 밀도를 나타낸다.

도 14는 4.5mg/ml HA-SH로 제조된 SH 대 DA의 다양한 몰 비를 갖는 HA 하이드로겔의 전단 저장 모듈러스를 나타낸다.

도 15a는 다양한 양의 섬유로부터 제조된 섬유-HA 하이드로겔 복합재료의 전단 저장 모듈러스를 나타낸다. 섬유의 평균 직경은 686nm이고, 섬유상의 MAL 표면 밀도는 100 nmol/mg이고, 복합재료는 4.5 mg/ml의 HA-SH와 5mg/ml의 PEGDA로 제조되었다. 파란색 화살표는 SH 그룹 대 (DA + MAL) 그룹의 몰비의 1 ~ 2를 나타낸다. *p <0.05 (n = 3).

도 15b는 다양한 양으로 부하 된 섬유를 갖는 섬유-PEG 하이드로겔 복합재료의 전단 저장 탄성 모듈러스를 나타낸다. * p <0.05 (n = 3).

도 16은 HA 하이드로겔 및 나노 섬유-HA 하이드로겔 복합재료의 평균 기공 크기가 단면의 SEM 이미지(* p < 0.05)에 기초하여 추정된 것을 나타낸다.

도 17a는 14 일째에 섬유-HA 하이드로겔 복합재료를 통한 세포 침투 및 조직 성장을 나타낸다. 박편 조직은 전체 콜라겐 (청색)에 대해 H & E로 염색되었다. 표시: C = 섬유-HA 하이드로겔 복합재료, 노란색 화살표 = 혈관. 스케일 바 = 50 μ m.

도 17b는 14 일째에 섬유-HA 하이드로겔 복합재료를 통한 세포 침투 및 조직 성장을 도시한다. 박편 조직은 Masson 's 3색 염색에 의해 전체 콜라겐 (청색)에 대해 염색되었다. 표시: C = 섬유-HA 하이드로겔 복합재료, 노란색 화살표 = 혈관. 스케일 바 = 50 μ m.

도 17c는 30 일째 섬유-HA 하이드로겔 복합재료를 통한 세포 침투 및 조직 성장을 도시한다. 박편 조직은 전체 콜라겐 (청색)에 대해 H & E로 염색되었다. 표시: C = 섬유-HA 하이드로겔 복합재료, 노란색 화살표 = 혈관. 스케일 바 = 50 μ m.

도 17d는 30 일째, 섬유-HA 하이드로겔 복합재료를 통한 세포 침투 및 조직 성장을 나타낸다. 박편 조직은 전체 콜라겐 (파란색)에 대해 Masson 's 3색 염색에 의해 염색되었다. 표시: C = 섬유-HA 하이드로겔 복합재료, 노란색 화살표 = 혈관. 스케일 바 = 50 μ m.

도 18은 탈 세포화 된 지방 조직 (상부 패널) 및 섬유-HA 하이드로겔 복합재료 (하부 패널)의 단면의 SEM 이미지를 나타낸다.

도 19a는 4 일째에, HA 하이드로 겔에서의 hASC의 이동 능력을 나타낸다 ($G' = 24.85 \mu$ 2.92 Pa). HA 하이드로 겔은 2.5mg/ml의 HA-SH 및 5.0mg/ml의 PEGDA로 제조되었다. 스케일 바=100 μ m.

19b는 4 일째에, 1.0- μ m 섬유 HA 하이드로겔 복합재료 ($G' = 32.29 \mu$ 2.16 Pa)에서 hASC의 이동 능력을 나타낸다. 복합재료는 2.5mg/ml의 HA, 5.0mg/ml의 PEGDA 및 10mg/ml 섬유로 제조되었다. 스케일 바 = 100 μ m.

도 19c는 4 일째, 286-nm 섬유-HA 하이드로겔 복합재료 ($G' = 39.56 \mu$ 1.26 Pa)에서 hASC의 이동 능력을 나타낸다. 복합재료는 2.5mg/ml의 HA, 5.0mg/ml의 PEGDA 및 10mg/ml 섬유로 제조되었다. 스케일 바 = 100 μ m.

도 20a는 주사용 배합물(formulation)을 나타낸다. 섬유-하이드로겔 복합재료는 주사용 용도로 제형화할 수 있다.

도 20b는 주사용 복합재료가 주사 직후 안정한 것을 나타낸다.

도 20c는 주사용 복합재료가 형상 및 체적을 유지하며 물에 비분산성인 상태를 도시한다.

도 20d는 30 일째에 주사 가능한 섬유-HA 하이드로겔 복합재료를 통한 세포 침투 및 조직 성장을 나타내며, 광범위한 세포 리모델링 및 지방 세포 형성을 보여준다. 박편 조직은 H & E에 의해 염색되었다. 표시: c = 섬유-HA 하이드로겔 복합재료.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0049] 본 발명은 연조직 복원을 위한 방법에 사용하기 위한 하이드로겔 및 나노 구조체를 포함하는 복합 재료에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 하이드로겔 및 그 내부에 배치 된 나노 구조체를 포함하는 조성물을 사용하여 연조직 손상을 복구 또는 복원하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명의 다른 양태는 하이드로겔 및 그 안에 배치 된 나노 구조체를 포함하는 연조직 복원에 사용하기 위한 조성물을 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0050] 다음은 본 발명을 실시 할 때 당업자를 돕기 위해 제공되는 본 발명의 상세한 설명이다. 당업자는 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않으면서 본 명세서에 기술된 구현 예에 변형 및 변경을 가할 수 있다. 달리 정의되지 않는 한, 본 발명에서 사용 된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 발명의 설명에 사용된 용어는 특정 구현 예를 설명하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명을 한정하려는 것은 아니다. 본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특허출원, 등록특허, 도 및 기타 참고 문헌은 그 전체가 참조로서 명시적으로 포함된다.

[0051] 본 발명에 기술 된 것들과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 재료 또한 본 발명의 실시 또는 실험에 사용될 수 있으나, 바람직한 방법 및 재료가 이하에 기술된다. 본 명세서에 언급 된 모든 간행물은 상기 간행물이 인용된 방법 및/또는 재료를 개시하고 이를 기술하기 위해 참고 문헌으로 포함된다.

- [0052] 다르게 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 갖는다. 다음의 참고 문헌(본원에 참고로 인용 됨)은 본 발명에서 사용된 많은 용어(본원에 달리 정의되지 않는 한)의 일반적인 정의를 당업자에게 제공한다: Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); 및 Hale & Marham, the Harper Collins Dictionary of Biology (1991). 일반적으로, 본 명세서에 기재된 또는 본래의 분자 생물학적 방법의 절차는 당 업계에서 사용되는 일반적인 방법이다. 이러한 표준 기술은 참고 매뉴얼, 예를 들어 Sambrook et al., (2000, Molecular Cloning--A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratories); 및 Ausubel et al., (1994, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New-York) 등에 기재되어 있다.
- [0053] 달리 명시되지 않는 한, 다음 용어는 아래와 같은 의미를 가질 수 있다. 그러나, 당업자에 의해 공지되거나 이해되는 다른 의미도, 본 발명의 범위 내에서 가능하다는 것을 이해해야 한다. 본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허 및 기타 참고 문헌은 그 전체가 참고로 인용된다. 충돌되는 경우, 정의를 포함한 본 발명이 우선한다. 또한, 재료, 방법 및 실시예는 단지 예시적인 것이며 제한하려는 것은 아니다.
- [0054] **정의**
- [0055] 본 발명에서 사용된 "스캐폴드 복합체"는 두 성분, 즉 중합체 섬유 및 하이드로겔 물질의 임의의 공유 결합을 포함한다. 상기 스캐폴드 복합체는 성분간의 상호작용으로 화학적, 생화학적, 생물물리학적, 물리적, 생리학적 이점을 일으키는 것을 의미하는 "기능성 네트워크" 내의 중합체 섬유 및 하이드로겔 물질을 포함한다. 또한, 기능성 네트워크는 세포, 생물학적 물질(예를 들어, 폴리펩타이드, 핵산, 지질, 탄수화물), 치료 화합물, 합성 분자 등을 포함하는 추가 성분을 포함 할 수 있다. 특정 구체 예에서, 스캐폴드 복합체는 인간 대상체에 존재하는 표적 조직 내로 이식 될 때 조직 성장 및 세포 침윤을 촉진한다.
- [0056] 본 명세서에서 사용된 용어 "하이드로겔"은 일종의 "겔"이며, 탄성 겔을 형성하기 위해 실질적으로 필요한 물의 양 (예: 비-물 분자 단위(unit of non-water molecule) 당 50 %, 60 % 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % 또는 99 이상)을 흡수할 수 있는 공유 또는 비공유 가교 결합에 의해 결합된 거대 분자 (예: 친수성 중합체, 소수성 중합체, 이들의 혼합물)의 3차원 네트워크로 이루어진 수 팽윤성 중합체 매트릭스를 지칭한다. 상기 중합체 매트릭스는 임의의 적합한 합성 또는 자연 발생 중합체 물질로 형성 될 수 있다. 본 발명에서 사용되는 용어 "겔"은 액체 매질의 부피를 채우는(spans) 고체 3차원 네트워크를 지칭하며, 표면 장력 효과를 통해 액체 매질의 부피를 흡수(ensnares)한다. 이러한 내부 네트워크 구조는 물리적 결합 (물리적 겔) 또는 화학적 결합 (화학 겔)뿐만 아니라 연장 유체 내에서 그대로 남아있는 결정체 또는 다른 접합부로부터 발생할 수 있다. 물 (하이드로겔), 오일 및 에어 (에어로겔)를 포함하여 거의 모든 유체는 익스텐더(extender)로 사용할 수 있다. 중량과 체적 모두에 있어서, 겔은 조성이 거의 유체이며, 따라서 이의 구성 액체와 유사한 밀도를 나타낸다. 하이드로겔은 물을 액체 매질로 사용하는 겔이다.
- [0057] "소수성" 및 "친수성" 중합체의 정의는 상대 습도 100 %에서 고분자가 흡수하는 수증기의 양을 기준으로 한다. 이 분류에 따르면, 소수성 중합체는 100% 상대 습도("rh")에서 최대 1 %의 물만 흡수하지만, 중간 정도의 친수성 중합체는 1-10%의 물을 흡수하고 친수성 중합체는 10% 이상의 물을 흡수 할 수 있으며 흡습성 중합체는 20% 이상의 물을 흡수할 수 있다. "수 팽윤성" 중합체는 수성 매질에 담그면 자체 중량의 50% 이상을 흡수할 수 있다.
- [0058] 본 명세서에서 "가교 결합 된"은 공유결합 또는 비공유결합을 통해 발생한 분자 내 및/또는 분자간 가교결합을 포함하는 조성물을 지칭하며, 직접 또는 가교결합제를 포함할 수 있다. "비공유 결합"은 수소 결합과 정전 결합 (이온 결합)을 모두 포함한다.
- [0059] 용어 "중합체"는 선형 및 분지형 중합체 구조를 포함하며, 또한 가교 결합 된 중합체뿐만 아니라 블록 공중합체, 교대 공중합체, 랜덤 공중합체 등을 포함하는 공중합체(가교 결합되거나 결합되지 않을 수도 있음)를 포함한다. 본원에서 "올리고머"로 지칭되는 화합물은 약 1000 Da 미만, 바람직하게는 약 800 Da 미만의 분자량을 갖는 중합체다. 중합체 및 올리고머는 자연 발생적이거나 합성 원료로부터 획득될 수 있다.
- [0060] **연조직 복원**
- [0061] 종양 적출, 외상, 노화 또는 선천성 기형에 의한 파괴적인 연조직 손실은 매년 수백만 명의 사람들에게 영향을 미친다. 피부, 지방 및 근육을 포함한 조직의 손실은 종래의 수단으로는 치료하기 어려운 주요 기능 및 심미적

장애를 유발한다. 예를 들어, 미국에서는 매년 300,000 건 이상의 부분 유방 절제술을 시행하여 유방 연조직의 유실로 인한 유방 흉터의 손상을 초래한다. 연조직 복원을 위한 기존 옵션에는 중대한 결점이 있다. 자가 조직 플랩 (autologous tissue flaps)은 장기간의 수술 과정에서 신체부위의 다른 부분으로부터 연조직을 이동시켜야 하며 이는 제공 부위의 결손을 가져온다{LoTempio 2010. Plastic and Reconstructive Surgery, 126(2), 393-401; Patel 2012. Annals of Plastic Surgery, 69(2), 139-144}. 인공 삽입물은 섬유증과 캡슐화를 일으키는 이물질 반응이 일어나기 쉽다 {Calobrace 2014 Plastic and Reconstructive Surgery, 134(1 Suppl), 6S-11; Tsoi 2014. Plastic and Reconstructive Surgery, 133(2), 234-249}. 지방 흡입 중에 채취 된 지방 세포의 배치와 관련된 지방 이식은 적은 양으로 제한되며 이식 조직의 생존율이 저조하다{Kakagia 2014 Surgical Innovation, 21(3), 327-336; Largo 2014 British Journal of Plastic Surgery, 67(4), 437-448}. 마지막으로 주입 가능한 하이드로겔 연질 조직 필러를 사용할 수 있지만, 이는 보다 작은 결합에만 적합하며, 제공하는 복원 부피가 일시적이다{Young 2011. Acta Biomaterialia, 7(3), 1040-1049; Varma 2014 Acta Biomaterialia, 10(12), 4996-5004}. 새로운 조직 공학은 하이드로겔을 복원부위에서 지방조직과 같은 연조직을 재생시키기 위한 템플릿으로 사용하는 것에 집중하도록 제한되었다.

[0062] **연조직 복원에 대한 현재의 조직 공학적 접근**

[0063] 지방 조직 유래 줄기 세포 (ASCs)가 연조직 결손 주위의 상처 부위에서 확인되었다{Salibian 2013 Archives of plastic surgery 40.6: 666-675}. 이는 적합한 매트릭스 미세 환경으로 뒷받침 될 때 지방과 같은 연조직으로 분화 될 수 있다. 따라서 치료(복구) 부위를 기능성 물질로 채우는 전략은 내인성(endogenous) ASC를 사용하여 새로운 조직의 재생을 가능하게 할 잠재성이있다. 하이드로겔은 부드러운 조직과 유사한 3 차원 (3D) 성질 및 탄성 특성으로 인해 조직 결합의 재생을 위한 스캐폴드 매트릭스로 널리 연구되어왔다. 주변 조직으로부터의 물리적 스트레스에 대해 체적 및 형태를 유지하면서 천연 지방 조직(~2 kPa)과 유사한 모듈러스를 갖는 하이드로겔 지지체를 생성하기 위해 다양한 방법이 사용되어 왔다 {Alkhouli 2013 American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism, 305(12), E1427-35; Sommer 2013 Acta biomaterialia 9.11 (2013): 9036-9048}. 이것은 보다 높은 가교 결합 밀도 및 보다 작은 평균 공극 크기를 필요로 하여, 낮은 세포 침윤 및 재생 불량을 초래한다{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}. 하이드로겔 스캐폴드가 세포 침윤 (infiltration)을 촉진시키는 능력은 성공적인 연조직 복원의 핵심이다. 혈관 침윤의 부족은 대용량 지방 이식 및 기타 조직 공학 시도의 실패 원인이다. 연조직 결손으로 손실된 양을 채우며, 조기 혈관 신생 및 ASC 분화를 촉진하여 연조직을 재생할 수 있는 현재 사용 가능한 재료는 없다.

[0064] **하이드로겔 매트릭스**

[0065] 지난 몇 년 간, Li와 Wen은 기공 크기와 탄성율(modulus)(10 - 100 Pa)이 줄기 세포 이식을 위해 최적화 된 라미닌 유도 루프 펩타이드(CCRRIKVAWLC, 10 μm)가 결합된 히알루론산 (HA) 하이드로겔을 개발했다. 그들은 이 하이드로겔이 강력한 신경줄기세포 (NSC) 이동과 분화 된 세포로부터의 신경 돌기의 발아를 지지한다는 것을 보여 주었다{Li 2014 Journal of Neurotrauma, 31(16), 1431-1438}. 생쥐의 외상성 뇌 손상에 대한 제어 대뇌 피질 (CCI) 모델에서, 이 하이드로겔은 CCI 손상 후 3 일부터 주입하여, 주입 후 4 주에서 6 개월에 병변(lesion) 부위 (> 10 mm)를 채우는 중요한 혈관 네트워크 형성을 촉진시켰다. 이러한 개선된 혈관 신생은 이 하이드로겔이 조직 분비 성장 인자, 특히 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)를 보유 및 발현하는 능력에 기인한다. 문헌에서는 또한 3-10 이당류 단위의 작은 HA 분해 단편이 내피 세포 증식, 이동, 세관 형성 및 혈관 형성의 강력한 조절자 (regulator)임을 밝혀냈다{Slevin 2002 Journal of Biological Chemistry, 277(43), 41046-41059}. 최근 연구에서, CCI 손상 후에 뇌 손상 부위에 인간 태아 조직 유래 NSC 스페로이드(spheroid)를 전달하는 HA 하이드로겔의 효과가 실험되었다. 이 HA 하이드로겔은 이식 수술 후 스캐폴드 매트릭스 내부에서 강력한 혈관 형성을 나타냈다. 재생된 혈관은 병변 부위 내로 성장하여 이식된 매트릭스를 통해 침투하여 신경원 전구세포의 생존과 성장을 지지했다. 이러한 연구는 지방 조직 재생을 위한 것이 아니지만, 이러한 결과는 숙주 혈관 내성장을 촉진시키는 데있어서 최적화 된 HA 하이드로겔 조성물의 독특한 능력을 확인시켜 주었다. 보다 중요하게는, 하이드로겔 매트릭스는 충분히 다공성이므로 하이드로겔 매트릭스 내에서 견고한 세포 이동을 가능하게 한다. 그러나, 이 HA 하이드로겔을 연조직 재건을 위해 직접 사용하는 것은 불가능하며, 이는 HA 하이드로겔의 기계적 특성이 임플란트 부위의 완전성을 유지하기에 충분히 높지 않기 때문으로, 주위의 지방 조직은 10 배 이상 높은 탄성율(modulus)을 갖는다. 탄성율(modulus)을 향상시키기 위해 가교결합 밀도를 향상시키는 것은 세포 침윤 및 이동을 위한 투과성을 악화시킬 수 있다. 벌크 하이드로겔의 평균 공극 크기를 크게 감소시키지 않으면서 기계적 성질을 증가시키는 새로운 전략이 필요하다. 지방조직으로부터 유래되거나 및/또는 유래될 수 있는 세포의

매트릭스와 같은, 가공된 세포 외 매트릭스를 함유하고, 그리고/또는 이로부터 분리된 하이드로겔 물질이 제공된다.

[0066] **스캐폴드 복합체**

[0067] 본 발명은 복합체가 투여되는 인간 대상의 조직 내로, 예를 들어 주사 또는 이식에 의해 투여되는 의료 장치로의 사용에 적합한 스캐폴드 복합체를 제공한다. 스캐폴드 복합체는 일반적으로 약 10nm 내지 약 10,000nm, 예를 들어 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 갖는 중합체 섬유를 포함한다. 본 발명에서 제시하는 것과 같이, 중합체 섬유와 하이드로겔 물질의 비는 당 업계에 공지된 임의의 수단으로 결정될 수 있다. 예를 들어 중합체 섬유와 하이드로겔 물질의 비는 성분-질량 기준으로 약 1:100 내지 약 100:1, 예를 들어 약 1:50 내지 약 50:1, 또는 1:10 내지 약 10:1, 예를 들어 1:5 내지 약 5:1, 예를 들어 약 1:3 내지 약 3:1이다. 하이드로겔 물질에 대한 중합체 섬유의 비는 또한, 농도 기준(예: 하이드로겔 물질의 부피 당 중합체 섬유의 주어진 중량)으로 제공될 수 있다. 예를 들어, 농도는 약 1 내지 50mg/mL이다. 하이드로겔 물질은 일반적으로 중합체 섬유의 외면 (또는 조성물 및 모양에 의존하는 외부 표면)에 결합되는 것과 같이 중합체 섬유 상에 배치된다. 스캐폴드 복합체는 일반적으로 균일한 고체 물질이 아니다. 대신, 스캐폴드 복합체는 스캐폴드 복합체의 표면에 또는 내부에 존재하는 다수의 공극을 함유한다. 공극의 존재, 크기, 분포, 빈도 및 다른 파라미터는 스캐폴드 복합체의 생성 중에 조절될 수 있다. 공극 크기는 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100 마이크로미터를 포함하여 약 1 마이크로미터로부터 100 마이크로미터까지일 수 있고, 그 크기는 예를 들어, 기공의 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % 또는 95 % 초과와 같은 적어도 40 %가 원하는 크기 또는 원하는 크기 범위 내에서 면밀하게 조절될 수 있다.

[0068] 본 발명의 스캐폴드 복합체는 인간 대상의 조직 내로 편입하기에 적합하며, 따라서 일반적으로 "생체 적합성"이며, 이는 대상 내에서, 그리고/또는 그에 따른 병리 생리학적 반응을 유도하지 않고, 생물학적 시스템(예: 인간 대상에서 발견된)과 상호 작용할 수 있음을 의미한다. 일부 실시태양에서, 스캐폴드 복합체는 조직 내에서 지속적으로 보유될 수 있도록 제공된다. 대안적으로, 스캐폴드 복합체는 인간 대상에 일시적으로 보유되며, 실질적으로 생분해성으로 제공된다. 바람직하게는, 중합체(polymeric) 섬유는 생체적합성 생분해성 폴리에스테르를 포함한다. 바람직한 구현 예에서, 중합체 섬유는 폴리카프로락톤을 함유한다.

[0069] 본 명세서에서 제공되는 것과 같이, 중합체 섬유와 하이드로겔을 함유하는 복합체의 상호 작용의 한 바람직한 형태는 일반적으로 중합체 섬유와 하이드로겔 물질 사이의 결합을 도입하는데 효과적인 양, 예를 들어 폴리카프로락톤 섬유와 히알루론산 간의 가교 결합 유도할 수 있는 양으로 존재하는 가교 결합 모이어티(moiety)를 포함한다.

[0070] **연조직 복원을 위한 스캐폴드 디자인**

[0071] 복합 재료(composite)의 개념은 재료 강화 메커니즘으로 널리 사용되고 있다. 예를 들어 하이드록시아파타이트 입자를 하이드로겔에 첨가하면 강성이 증가하고(Wu 2008 Materials Chemistry and Physics 107.2 (2008): 364-369), 복합 재료의 인장 탄성률은 신장된 입자에 대해 더욱 증가한다(Yusong 2007 Journal of Materials Science, 42(13), 5129-5134). 일렉트로스핀(Electrospun) 나노 섬유 메쉬는 네이티브 ECM과의 형태적(topographical) 유사성으로 인해 조직 공학용 기질로 널리 사용되고 있다. 특히 관심의 대상이 되는, 지방 조직의 탈 세포화된 ECM은 매우 섬유성(fibrous)이며 다공성이다(도 6G) {Young 2011. Acta Biomaterialia, 7(3), 1040-1049}. 폴리에틸렌글리콜 (PEG), 폴리아크릴아미드 또는 알기네이트 하이드로겔에 단편화된 폴리락티드 (PLA) 또는 키토산 섬유를 도입함으로써 섬유 성분을 재현(recapitulate)하기 위해 최근 몇몇 연구가 시도되었다(Coburn 2011 Smart Structures and Systems, 7(3), 213; #37; Zhou 2011 Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 84(1), 155-162; Shin 2015 Journal of Materials Chemistry). 단편화된 섬유는 하이드로겔 전구체 용액과 혼합되어 겔화 공정 중에 하이드로겔에 혼입되어 3D 구조를 생성한다. 이러한 섬유-혼입된 하이드로겔(fiber-embedded hydrogels)은 대응하는 하이드로겔보다 향상된 기계적 특성을 나타내었다. 그러나, 생체 내(in vivo)에서 숙주 세포 침윤을 시험하는 연구는 없었다. 또한, 이들 하이드로겔은 분해되지 않으며 지방 세포 접착 및 분화를 위한 접착성 리간드를 필요로 한다.

[0072] **나노섬유-하이드로겔 복합체 디자인**

[0073] 하이드로겔 상에서 높은 다공성을 유지하면서 섬유 강화 효과를 얻기 위해, 다른 스캐폴드와 비교하여 우수한

특성을 제공하는 전기 방사(electrospun) 섬유-하이드로겔 복합체가 제공된다. 종래 보고 된(Coburn 2011 Smart Structures and Systems, 7(3), 213) 나노 섬유와 하이드로겔 매트릭스의 혼합을 넘어, 섬유 표면과 하이드로겔 가고 결합 네트워크 사이의 계면 결합이 제공된다(도 6). 이러한 복합체 형태는 고체 섬유 성분으로부터의 보다 강력한 기계적 보강을 가능하게 할뿐만 아니라, 벌크(bulk) 기계적 성질 및 하이드로겔 상의 평균 공극 크기/다공성의 독립적인 조절을 가능하게 하여 최적의 세포 침투 특성 및 구조적 완전성을 가능하게 한다. 섬유가 ASC 및 내피 전구 세포를 위한 바람직한 세포 부착 기질로서 사용될 수 있고, 따라서 세포 이동 및 ASC 분화를 지지하는 가이드로서 작용할 수 있다고 생각된다.

[0074] **이노베이션(Innovation)**

[0075] 특정 측면에서 중요한 이노베이션은 나노 섬유 표면과 하이드로겔 네트워크 사이에 계면 결합을 갖는 나노 섬유-하이드로겔 복합 재료 디자인이다(도 6A). 이러한 조작된 복합 재료는 하이드로겔 상에서 평균 기공 크기를 현저히 감소시키지 않으면서 하이드로겔의 기계적 특성을 대폭 향상시킬 수 있는 잠재력을 지닌다. 계면 결합의 도입은 두 성분이 단지 물리적으로 혼합(blend)되었을 때와 비교하여 우수한 기계적 강화 효과를 제공할 수 있다. 이 연구는 혼합하는 경우에 반하여 전기방사 폴리카프로락톤(PCL) 섬유-HA 하이드로겔 복합 재료로 얻을 수 있는 기계적 특성 (압축 및 전단 탄성률(modulus))의 범위를 제공한다. 두 번째 이노베이션은 연조직 결합을 회복시키는 나노 섬유-하이드로겔 복합 재료의 입증이다. 예비 특성 분석(characterization)은 복합 재료가 지방 조직과 구조적 특성을 공유함을 보여주었다(도 6) {Christman, 2012 US 20120264190 A1; Young 2011. Acta Biomaterialia, 7(3), 1040-1049}. 이 복합 재료가 연조직 재생에 중요한 구조적 온건성(integrity)과 기계적 특성을 제공한다는 가설이 제기되었다. 이 연구는 또한, 하이드로겔에 비한 복합 재료의 융통성과 효율성을 입증하였다.

[0076] 이 프로젝트가 성공적으로 완료되면 특히 혈관 조직 구축, 조직 치료 부위의 온건성 유지, 세포 이동과 조직 촉진 및 숙주 세포 모집이, 모두 지속 가능한 조직 복원에 결정적인 역할을 하는 보다 크게 손상된 연조직의 복구에 보편화된 해결책을 제공할 것이다. 이 복합 재료 디자인에 사용된 재료 구성, 즉, HA 하이드로겔 및 생분해성 폴리에스테르 섬유에 대한 광범위한 임상 기록은 조직 적합성에 대한 예비 자료와 함께 우수한 조직 적합성 및 임상적 해석을 위한 간단한 승인(regulatory approval) 경로를 제시한다.

[0077] **특징:**

[0078] 일부 구현에서, 본 발명은 하이드로겔 성분 중의 나노 섬유와 중합체 네트워크 사이의 계면 결합을 제공한다. 이것은 "진정한" 복합 재료 형성에 있어서 중요하다. 이러한 섬유 및 하이드로겔을 혼합하는 것은 동일한 정도의 기계적 향상을 제공하지 않는다는 것이 증명되었다. 나노 섬유-하이드로겔 혼합물의 사용에 대한 이전 보고도 있다. 즉, 계면 결합은 이러한 새로운 연구를 종래 기술과 차별화시킨다. 또한, 계면 결합은 본 명세서에서 보여지는 공유 결합과, 수소 결합 및 정전기적 상호 작용과 같은 2 차 결합을 포함할 수 있다.

[0079] 이것은 당해 기술 분야에 있어서 등방성 강화를 수행하는 최초의 작업으로, 상기 복합 재료는 임의의 형태(geometry)의 체적 결합을 대체하는 데 필요한 모든 방향에서 더 강하다. 나노 섬유 매트(mat) 또는 배열된 필라멘트의 수가 적은 디자인은 본질적으로 비등방성이다. 이 디자인은 등방성 및 비등방성 재료를 모두 형성할 수 있다.

[0080] 본 명세서에서 제시된 연구는 적어도 특정 측면에 대해, 세포 이동 및 숙주 조직내 성장을 위한 충분한 기공 크기 및 다공도를 갖는 하이드로겔 네트워크가 될 수 있는 복합 재료의 형성에 사용되는 성분, 및 직경이 50nm 내지 10 μ m인 폴리머 섬유를 대략적으로 포함하는 나노섬유를 정의한다.

[0081] **겔/하이드로겔 성분**

[0082] 본 발명의 하이드로겔 복합 재료는 임의의 유형의 적합한 하이드로겔 성분을 포함할 수 있다. 본 발명은 당 업계에 공지된 임의의 적합한 하이드로겔 성분을 포함하는 임의의 적합한 겔 성분을 포함하는 나노 구조체/겔 복합 재료를 고찰한다. 겔 및/또는 하이드로겔은 임의의 적합한 합성 물질 또는 자연 발생 물질로 형성될 수 있다.

[0083] 예를 들어, 겔 및/또는 하이드로겔의 중합체 성분은, 예를 들어 셀룰로오스 아세테이트, 셀룰로오스 아세테이트 프로피오네이트(CAP), 셀룰로스 아세테이트 부티레이트(CAB), 셀룰로오스프로피오네이트(CP), 셀룰로오스 부티레이트(CB), 셀룰로오스프로피오네이트부티레이트(CPB), 셀룰로오스 디아세테이트(CDA), 셀룰로오스트리아세테이트(CTA)등과 같은 셀룰로오스 에스테르를 포함할 수 있다. 이러한 셀룰로오스 에스테르는 미국 특허 제 1,698,049, 1,683,347, 1,880,808, 1,880,560, 1,984,147, 2,129,052, 및 3,617,201 호에 기재되어 있고, 당

업계에 공지된 기술을 사용하여 제조되거나 상업적으로 수득 될 수 있다. 본 명세서에 적합한 상업적으로 입수 할 수 있는 셀룰로오스 에스테르는 이스트만 케미칼 캄파 니(Eastman Chemical Company, Kingsport, Tenn)로부터 입수 할 수 있는 CA 320, CA 398, CAB 381, CAB 551, CAB 553, CAP 482, CAP 504를 포함한다. 이와 같은 셀룰로오스 에스테르는 전형적으로 약 10,000 내지 약 75,000의 수평균 분자량을 갖는다.

[0084] 셀룰로오스 에스테르는 셀룰로오스 및 셀룰로오스 에스테르 단량체 유닛의 혼합물을 포함하며; 예를 들어 시판 되는 셀룰로오스 아세테이트 부티레이트는 셀룰로오스 아세테이트 단량체 유닛뿐만 아니라 셀룰로오스 부티레이트 단량체 유닛 및 비에스테르화 셀룰로오스 유닛을 포함한다.

[0085] 본 발명의 겔/하이드로겔은 또한 예를 들어, 아크릴 산, 메타크릴산, 메틸아크릴레이트, 에틸아크릴레이트, 메틸메타크릴레이트, 에틸메타크릴레이트 및/또는 다른 비닐 단량체로부터 일반적으로 형성된 아크릴레이트 중합체와 같은 다른 수 팽윤성 중합체를 포함할 수 있다. 적합한 아크릴레이트 중합체는 상기한 바와 같이 Rohm Pharma(독일)의 상표명 "Eudragit"로 입수 가능한 공중 합체이다. Eudragit 시리즈 E, L, S, RL, RS 및 NE 공중 합체는 유기 용매, 수성 분산액 또는 건조 분말로 가용화되어 있다. 바람직한 아크릴레이트 중합체는 Eudragit L 및 Eudragit S 시리즈 중합체와 같은 메타크릴산 및 메틸메타크릴레이트의 공중합체이다. 특히 바람직한 공중합체는 Eudragit L-30D-55 및 Eudragit L-100-55 (후자의 공중합체는 물로 재구성 될 수 있는 Eudragit L-30D-55의 분무 건조 된 형태이다)이다. Eudragit L-30D-55 및 Eudragit L-100-55 공중합체의 분자량은 약 135,000 Da이며, 프리(free) 카르복실기 대 에스테르기의 비는 약 1:1이다. 공중 합체는 일반적으로 5.5 미만의 pH를 갖는 수성 유체에 불용성이다. 또 다른 특히 적합한 메타크릴산-메틸메타크릴레이트 공중 합체는 Eudragit L-30D-55와는 상이한 프리 카르복시기와 에스테르기의 비가 약 1:2인 Eudragit S-100이다. Eudragit S-100은 5.5 미만의 pH에서는 용해되지 않지만, Eudragit L-30D-55와는 달리 5.5 내지 7.0의 pH를 갖는 수성 유체에는 잘 용해되지 않는다. 이 공중 합체는 pH 7.0 이상에서 용해된다. Eudragit L-100은 Eudragit L-30D-55와 Eudragit S-100 사이의 pH 의존성 용해도 프로파일을 가지고 있으며 pH 6.0 이하에서는 불용성이다. Eudragit L-30D-55, L-100-55, L-100 및 S-100은 유사한 pH 의존성 용해도 특성을 갖는 다른 허용 가능한 중합체로 대체 될 수 있음이 당업자에 의해 인식 될 것이다.

[0086] 본 명세서에서 기술된 임의의 겔/하이드로겔 조성물은 활성제(active agent)를 함유하도록 변형 될 수 있고, 이에 따라 활성제 전달 관계에서(in active agent-transmitting relation) 신체 표면(예를 들어, 조직 복구 부위)에 도포될 때 활성제 전달 시스템으로서 작용할 수 있다. 본 발명의 하이드로겔 조성물에 "적재/부하 된 (loaded)" 활성제의 방출은 전형적으로 물의 흡수 및 팽창-제어 된 확산 메카니즘을 통한 작용제의 탈착을 포함한다. 활성제-함유 하이드로겔 조성물은 예로서, 경피 약물 전달 시스템, 상처 드레싱(dressing), 국소 억제학적 제제, 이식 된 약물 전달 시스템, 경구 투여 형태 등으로 사용될 수 있다.

[0087] 본 발명의 하이드로겔 조성물에 혼입 될 수 있고 시스템적으로 전달 될 수 있는(예를 들어, 약물의 전신 투여에 적합한 경피, 경구 또는 다른 투여 형태) 적합한 활성제는 다음을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다 : 체력회복제(analeptic agent); 진통제; 마취제; 항응고제; 항척식제를 포함한 호흡기 약물; 항신생물제(antineoplastic)를 포함한 항암제; 항콜린제; 항경련제; 항울제; 항당뇨병제; 설사약; 구충제(anthelmintic); 항히스타민제; 항고지혈증제; 항고혈압제; 항생제 및 항바이러스제와 같은 항 감염제; 항염증제; 편두통제; 항 구역질약(antinauseants); 항 파킨슨증 치료제; 항 가려움제; 항정신병제; 해열제; 진정제; 항결핵약; 항 케양제; 항바이러스제; 불안 완화제; 식욕 억제제; 주의력 결핍 장애 (ADD) 및 주의력 결핍 과다 장애 (ADHD) 약물; 칼슘 채널 차단제, 항협심제, 중추신경계 (CNS) 제제, 베타 차단제 및 항부정맥제를 포함하는 심혈관 제제; 중추 신경계 자극제(stimulants); 충혈완화제(decongestants)를 포함하는 기침과 감기 제제; 이뇨제; 유전 물질; 허브 요법; 호르몬제(hormonolytic); 최면제(hypnotics); 혈당강하제; 면역 억제제; 류코트리엔 억제제; 유사 분열 억제제; 근육 이완제; 마약 길항제; 니코틴; 비타민, 필수 아미노산 및 지방산과 같은 영양제; 녹내장 치료제와 같은 안과용 약물; 부교감신경억제제; 펩티드 약물; 정신 자극제; 진정제; 프로게스테론, 에스트로겐, 코르티코스테로이드, 안드로겐 및 동화 작용제를 포함한 스테로이드; 금연 보조제; 교감 신경흥분제; 신경안정제(tranquilizer); 및 일반적인 관상 동맥, 말초 및 대뇌 혈관을 포함하는 혈관확장신경제. 추가적인 조성물이 유용한 특정 활성제는 아나바신, 캅사이신, 이소소르비드디나이트레이트, 아미노스티그민, 니트로글리세린, 베라파밀, 프로프라놀롤, 실라보린, 포리돈, 클로니딘, 시티신, 페나제팜, 니페디핀, 플루아지진(fluacizin) 및 살부타몰을 포함한다.

[0088] 국소 약물 투여 및/또는 약제 쿠션(예: 약용 풋 패드)의 경우, 적합한 활성 제제는 예로서 다음을 포함한다:

[0089] 정균제(세균발육 저지제) 및 살균제: 적합한 정균제 및 살균제는 예를 들면 할로젠 화합물, 예컨대 요오드, 요

오드 포비돈 착물(즉, "포비딘"으로도 불리우는 PVP 및 요오드의 복합체, 상품명 Betadine, Purdue Frederick), 요오드화물염, 클로라민, 클로로 헥시딘 및 차아염소산나트륨; 설과디아진, 은 단백질 아세틸 타닌 산(acetyltannate), 질산은, 아세트산은, 젖산은, 황산은 및 염화은과 같은 은 및 은 함유 화합물; 트라이 -n- 부틸틴 벤조에이트와 같은 유기 주석 화합물; 아연 및 아연 염; 과산화수소 및 과망간산 칼륨과 같은 산화제; 페닐수은보레이트 또는 메르프로핀과 같은 아릴 수은 화합물; 티오메르살과 같은 알킬 수은 화합물; 페놀, 예컨대 티몰, o-페닐 페놀, 2-벤질-4-클로로페놀, 헥사클로로펜 및 헥실레조르시놀; 8-히드록시퀴놀린, 클로르퀴날 돌, 클리오퀴놀, 에타크리딘, 헥세티딘, 클로르헥세딘, 및 암바존과 같은 유기 질소 화합물을 포함한다.

[0090] 항생제: 적절한 항생제에는 린코마이신 계열의 항생제 (원래 스트렙토마이 세스 링킨시스(streptomyces lincolnensis)에서 회수한 항생제의 부류), 테트라 사이클린 계열의 항생제 (원래 스트렙토마이세스 아우레오파 시엔스(streptomyces aureofaciens)에서 회수된 항생제의 부류를 말함) 및 황계 항생제, 즉 설펜아미드 (sulfonamides) 등이 있다. 린코 마이신 류의 예시적인 항생제는 린코 마이신, 클린다마이신이며, 예를 들어, 미국 특허 제 3,475,407 호, 제 3,509,127 호, 제 3,544,551 호 및 제 3,513,155 호에 개시된 화합물 및 이들의 약리학적으로 허용되는 염 및 에스테르이다. 테트라사이클린 계열의 예시적인 항생제는 테트라 사이클린 그 자체, 클로르테트라사이클린, 옥시테트라사이클린, 테트라사이클린, 데메클로사이클린, 물리테트라사이클린, 메 타사이클린 및 독시사이클린 및 이들의 약학적으로 허용되는 염 및 에스테르, 특히 하이드로 클로라이드 염과 같은 산 부가염을 포함한다. 예시적인 황계 항생제는 설펜아미드 설펜아세트아미드, 설펜벤즈아미드, 설펜디아 진, 설펜독신, 설펜메라진, 설펜메타진, 설펜메티졸, 설펜메톡사졸, 및 그의 약학적으로 허용되는 염 및 에스테 르, 예를 들어 설펜세트아미드 나트륨을 포함한다.

[0091] 통증 완화제: 적합한 통증 완화제는 아세트아미도에우게놀, 알파도론아세테이트, 알파사론, 아뮤카인, 아몰라논, 아미로카인, 베녹시네이트, 베크시카인, 바이페나민, 부피바케인, 부레타민, 부타카인, 부타벤, 부타 닐리카인, 부타리탈, 부톡시카인, 카르티카인, 2-클로로프로카인, 신코카인, 코카에틸렌, 코카인, 사이클로메틸 카인, 디부카인, 디메티소킨, 디메소카인, 디페라돈, 디크로닌, 에크고닌, 에크고닌, 에틸아미노벤조에이트 , 에틸클로라이드, 에티도카인, 에톡사드롤, 베타-유카인, 유프로신, 페날코민, 포모카인, 헥소바르비탈, 헥실카 인, 하이드록시디온, 하이드록시프로카인, 하이드록시테트라카인, 이소부틸 p-아미노벤조에이트, 켄타민, 유시 노카인 메실레이트, 레복사드롤, 리도카인, 메피바카인, 메프릴카인, 메타부톡시카인, 메쏘헥시탈, 메틸클로라 이드, 미다졸람, 미르테카인, 나에파인, 옥타카인, 오르쏘카인, 옥세타자인, 파렌톡실카인, 페나카인, 펜실클리 딘, 페놀, 피페로카인, 피리도카인, 폴리도카놀, 프라목신, 프릴로카인, 프로카인, 프로파니디드, 프로파노카인, 프로파라카인, 프로피포카인, 프로포폴, 프로록시카인, 슈도코카인, 피로카인, 리소카인, 살리실 알콜, 테트라카인, 티알바르비탈, 티미탈, 티오부타 바르비탈, 티오펜탈, 툴리카인, 트리메카인, 졸라민, 및 이 들의 조합을 포함한다. 테트라카인, 리도카인 및 프릴로카인은 본원에서 통증 경감(완화)제로 언급된다.

[0092] 본 발명의 하이드로겔 조성물을 약물 전달 시스템으로 사용하여 전달 될 수있는 다른 국소 제제는 다음을 포함 한다 : 항진균제, 예컨대 운데실렌산, 토르 나프테이트, 미코나졸, 그리세오폴빈, 케토코나졸, 시클로피록스, 클로 트리마졸 및 클로록실레놀; 각질 용해제(keratolytic agents), 예컨대 살리실산, 젖산 및 우레아; 칸타리 딘과 같은 피부자극제(vessicants); 아젤라익 산, 클리다마이신, 에리트로마이신, 메클로사이클린, 미노사이클 린, 나디플록사신, 세팔레신, 독시사이클린 및 오픈록사신을 포함하는 여드름의 치료를 위해 구체적으로 지시된 항균제, 유기과산화물(예를 들어 벤조일 퍼옥사이드), 레티노이드(예: 레티노산, 아다팔렌 및 타자로텐), 설펜 아미드(예: 소듐 설펜세트아미드), 레조르시놀, 코르티코스테로이드(예: 트리암시놀론), 알파-히드록시산(예: 탁 틱산 및 글리콜릭 산) 및 알파-케토산(예: 글리옥실릭산)을 포함하는 항여드름제(anti-acne agents); 하이드로 퀴논, 코직산(kojic acid), 글리콜산 및 다른 알파-히드록시산, 아르토키아민 및 특정 유기 과산화물과 같은 피부 미백 및 표백제; 사마귀 치료제, 예를 들어, 살리실산, 이미퀴모드, 디니트로클로로벤젠, 다이뷰틸스쿠알렌산, 포도필린, 포도필로톡신, 칸타리딘, 트리클로로아세트산, 블레오마이신, 시도포비르, 아데포비르 및 이의 유사 체(analogs)를 포함하는 사마귀 치료제; 코르티코스테로이드 및 비스테로이드 항염증제(NSAIDs)와 같은 항염증 제, 이때 비 스테로이드 계 항염증제 (NSAIDs)는 케토프로펜, 플루르비프로펜, 이부프로펜, 나프록센, 페노프로 펜, 베녹사프로펜, 인도프로펜, 피르프로펜, 카르프로펜, 옥사프로진, 프라노프로펜, 수 프로펜, 알미노프로펜, 부티부펜, 펜부펜 및 티아프로페닉 산을 포함한다.

[0093] 상처 드레싱의 경우, 적합한 활성제는 상처의 치료에 유용한 것들이며, 정균 및 살균 화합물, 항생제, 통증 완 화제, 혈관 확장제, 조직 치유 증진제, 아미노산, 단백질, 단백질 분해 효소, 사이토카인 및 폴리펩티드 성장 인자를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0094] 몇몇 활성제의 국소 및 경피 투여 및 상처 드레싱에 있어서, 피부 내로 또는 피부를 통한 제제의 침투 속도를

증가시키기 위해 침투 증강제를 하이드로겔 조성물에 혼입시키는 것이 필요하거나 바람직 할 수 있다. 적합한 증강제는 예를 들어, 다음을 포함한다: 디메틸설폭시드 (DMSO) 및 데실메틸설폭 시드와 같은 설폭시드; 디에틸렌글리콜모노에틸에테르 (Transcutol로서 상업적으로 입수 가능) 및 디에틸렌글리콜모노메틸에테르와 같은 에테르; 소듐 라우레이트, 소듐 로릴 설페이트, 세틸 트리메틸 암모늄 브로마이드, 벤즈알코늄 클로라이드, 폴록사머 (231, 182, 184), 트윈 (Tween) (20,40,60,80) 및 레시틴 (미국 특허 제 4,783,450)과 같은 계면활성제; 1-치환된 아자사이클로헥탄-2-온, 특히 1-n-도데실사이클라자-사이클로헥탄-2-온 (미국 캘리포니아 주 엘바인의 넬슨 리서치 앤드 캄파 니 (Nelson Research & Development Co.)로부터 아존 (Azone)이라는 상표명으로 입수 가능; 미국 특허 제 3,989,816 호, 제 4,316,893 호, 4,405,616 호 및 4,557,934 호); 에탄올, 프로판올, 옥탄올, 데칸올, 벤질 알콜 등의 알콜; 라우린 산, 올레산 및 발레르 산과 같은 지방산; 지방산 에스테르, 예컨대 이소 프로필 미리스테이트, 이소 프로필 팔미테이트, 메틸프로피온네이트 및 에틸 올레에이트; 프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜, 글리세롤, 부탄디올, 폴리에틸렌 글리콜 및 폴리에틸렌 글리콜 모노라우레이트 (PEGML; 미국 특허 제 4,568,343 호 참조)와 같은 폴리에틸렌 및 그의 에스테르; 우레아, 디메틸아세트아미드 (DMA), 디메틸 포름아미드(DMF), 2- 피롤리돈, 1-메틸-2-피롤리돈, 에탄올아민, 디에탄올아민 및 트리에탄올아민과 같은 다른 질소 화합물 및 아미드; 테르펜; 알카논; 및 유기산, 특히 살리실산 및 살리실레이트, 구연산 및 숙신산이 포함된다. 둘 이상의 증강제의 혼합물이 또한 사용될 수 있다.

[0095] 특정 다른 구현에서, 겔 (예를 들어, 하이드로겔 성분) 및 나노 구조를 포함하는 본 발명의 복합 재료 조성물은 추가의 임의의 첨가제 성분을 또한 포함 할 수 있다. 이러한 성분은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 충전제, 방부제, pH 조절제, 연화제, 증점제, 안료, 염료, 굴절 입자, 안정제, 강화제, 디태키퍼 (detackifier), 약제 (예: 항생제, 혈관 신생 촉진제, 항진균제, 면역 억제제, 항체 등) 및 침투 촉진제를 포함할 수 있다. 이들 첨가제 및 그의 양은 하이드로겔 조성물의 원하는 화학적 및 물리적 특성을 현저하게 방해하지 않는 방식으로 선택된다.

[0096] 접착제가 피부 또는 다른 신체 표면 상에 있을 때 수화의 정도를 조절하기 위해 흡수성 충전제가 포함될 수 있다. 이러한 충전제는 미세 결정질 셀룰로오스, 탈크, 락토오스, 카올린, 만니톨, 콜로이드 실리카, 알루미늄, 산화 아연, 산화 티탄, 규산 마그네슘, 규산 알루미늄 알루미늄, 소수성 전분, 황산 칼슘, 스테아르산 칼슘, 인산 칼슘, 인산 칼슘 2 수화물, 부직물 및 직물 페이퍼 및 먼 재료를 포함한다. 다른 적합한 충전제는 불활성, 즉 실질적으로 비 흡착성이며, 예를 들어 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리우레탄 폴리에테르 아미드 공중합체, 폴리에스테르 및 폴리에스테르 공중합체, 나일론 및 레이온을 포함한다.

[0097] 상기 조성물은 또한 하나 이상의 방부제를 포함 할 수 있다. 방부제는 예를 들어 p- 클로로 -m- 크레졸, 페닐에틸알콜, 페녹시에틸알콜, 클로로부탄올, 4-하이드록시 벤조산메틸에스테르, 4-하이드록시벤조산프로필에스테르, 벤즈알코늄클로라이드, 세틸피리디늄클로라이드, 클로로헥시딘 아세테이트 또는 글루코네이트, 에탄올 및 프로필렌 글리콜 등이 있다.

[0098] 상기 조성물은 또한 pH 조절 화합물을 포함할 수 있다. pH 조절제로서 유용한 화합물은 글리세롤 완충액, 시트르산 완충액, 보레이트 완충액, 포스페이트 완충액 또는 시트르산 포스페이트 완충액을 포함할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 이는 포함되어 하이드로겔 조성물의 pH와 개인의 신체 표면을 양립가능하게(compatible) 할 수 있다.

[0099] 상기 조성물은 또한 적절한 연화제를 포함 할 수 있다. 적합한 연화제는 시트르산 에스테르, 예컨대 트리에틸시트레이트 또는 아세틸 트리에틸시트 레이트, 타르타르산 에스테르, 예를 들어 디부틸타르타레이트, 글리세롤 에스테르, 예컨대 글리세롤 디아세테이트 및 글리세롤 트리아세테이트; 디부틸 프탈레이트 및 디에틸 프탈레이트와 같은 프탈산 에스테르; 및 / 또는 친수성 계면활성제, 바람직하게는 친수성 비이온성 계면활성제, 예를 들어 당의 부분 지방산 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 지방산 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 지방 알콜 에테르 및 폴리에틸렌 글리콜 소르 비탄 - 지방산 에스테르를 포함한다.

[0100] 상기 조성물은 또한 증점제를 포함 할 수 있다. 본 발명에서 바람직한 증점제는 자연 발생 화합물 또는 이의 유도체이고, 예를 들어 콜라겐; 갈락토 만난; 전분; 전분 유도체 및 가수분해물; 셀룰로오스 유도체, 예컨대 메틸셀룰로스, 히드록시 프로필 셀룰로오스, 히드록시 에틸 셀룰로오스 및 히드록시 프로필 메틸 셀룰로오스; 콜로이드 이달 규산; 및 락토즈, 사카로스, 프락토오스 및 글루코스와 같은 당류를 포함한다. 폴리비닐알콜, 비닐피롤리돈 - 비닐아세테이트 - 공중합체, 폴리에틸렌 글리콜 및 폴리프로필렌 글리콜과 같은 합성 증점제가 또한 사용될 수 있다.

[0101] 특정 구현 예에서, 하이드로겔 및 나노 구조체를 포함하는 본 발명의 하이드로겔 복합체는 혈관 신생을 촉진시

키는 성분을 추가로 포함한다. 본 발명에 앞서 임상적으로 관련된 연조직 재생을 달성하기 위한 도전 과제는 재생 조직이 바람직하게 재 - 혈관화 되어야한다는 것이다. 따라서, 연조직 재생을 촉진시키는 물질은 바람직하게는 혈관 신생을 촉진해야 한다. 이를 달성하는 한 가지 방법은 혈관 신생 및 조직 형성을 촉진시키는 성장 인자를 풍부하게 하고 유지하기 위한 성장 인자 결합 부위로서 작용할 수 있는 헤파린 함유 하이드로겔 성분의 사용을 통한 것이다.

[0102] 다양한 다른 구현 예에서, 본 발명의 복합 재료는 하이드로겔 재료로서 히알루론산 (HA)을 기초로 할 수 있다. HA는 히드로겔 성분을 형성하며, 반복된 이당류 단위를 갖는 비 황산산화된, 선형 폴리사카라이드이다. HA는 또한 인간 조직에서 세포 외 기질의 비면역원성 성분이며, 심미적 및 재건 과정에서 피부 필러로 널리 사용된다.

[0103] HA의 분해는 조직 손상 및 염증 부위에서 발현이 증가되는 천연 히알루로니다제에 의해 촉진된다. 중요한 것은, 연구에 의하면 3-10 이당 단위의 작은 HA 분해 단편이 내피 세포 증식, 이동, 세관 형성 및 혈관 신생의 강력한 조절 자임이 밝혀졌다. HA의 이러한 생물학적 기능은 Ras 및 PKC가 관여하는 경로에서 CD44를 통해 매개되는 것으로 생각된다. 항 CD44 항체를 이용한 CD44/HA 상호 작용의 봉쇄는 체외(in vitro)에서 인간 미세 혈관 내피 세포의 증식과 이동을 감소시켰다. HA 하이드로겔은 세포 및 조직 손상의 다양한 모델에서 세포 전달을 위한 잠재적인 매트릭스로서 연구되어왔다. 이러한 하이드로겔은 세포를 보호하고 지지하는 스캐폴드 역할을 할 수 있으며 흉터를 줄일 수 있다. 따라서, HA는 세포 침윤을 촉진하고 혈관 신생을 촉진함으로써 조직 재생을 향상시키는 데 중요한 역할을 한다고 여겨진다.

[0104] 첫째, 이 물질은 3 차원적 완전성 및 고유 지방 조직과 유사한 정합성(consistency)을 지니고 있다. 이는 누락된 연조직 부피의 기성 수복에 적합하다. 두 번째로, 이 물질은 바람직하게는 지방 세포 및 내피 전구 세포의 이동을 위한 기질로서 작용할 수 있는 다수의 가요성 나노 섬유로 침착(deposit) 될 수 있다. 셋째, 이 물질은 전구체 세포가 주변에 섬유질 캡슐을 형성하기 보다는 기질에 빠르게 침투하고 스캐폴드에 통합될 수 있도록 충분한 다공성을 가지고 있다. 넷째, HA 하이드로겔 성분은 압축성 및 부피 팽창을 제공하면서 중요한 혈관 신생 신호를 제공한다. 다섯째, 나노 섬유 및 하이드로겔 성분은 생분해성이어서 재생된 연조직으로 대체 될 수 있다. 여섯째, 모든 구성 재료는 수많은 FDA 승인된 장치(device)에서 강력한 안전 기록을 보유하고 있어 잠재적으로 임상적 해석의 규제 장애를 줄여준다.

[0105] 본 발명의 겔/하이드로겔/나노 구조 복합 재료는 또한 표피 성장 인자 (EDF), PDGF 및 신경 성장 인자 (NGF 's)를 포함하는 다수의 성장 인자와 같은 조직 복구제를 포함 할 수 있다. 예를 들어, 조성물은 EGF를 포함 할 수 있다. 표피 성장 인자 (Epidermal Growth Factor, EGF)는 실험용 쥐의 피부 상처를 생쥐가 핏을 때 더 빠르게 치유 된 것처럼 보이는 관찰 후에 발견되었다. 이것은 단지 타액의 일부 살균제 (예: 리소자임) 때문만은 아니다. 현재 EGF로 알려진 특정 성장 인자가 원인으로 밝혀졌다. EGF는 우로가스트론(urogastrone)과 동일하며 혈관 신생 특성을 가지고 있다. 형질 전환 성장 인자 - 알파 (TGF- α)는 매우 유사하여 동일한 수용체에 결합하며, 상피 세포 재생 (상피화)을 촉진하는데 더욱 효과적이다.

[0106] 따라서, EGF / TGF를 포함하는 본 발명의 하이드로겔은 상처 치유 촉진 및 화상, 켈로이드 흉터 형성 (특히 화상)의 감소, 피부 생착 드레싱 및 만성 다리 궤양의 치료에 유리하게 사용될 수 있다.

[0107] 본 발명에 유용한 조직 치료제는 표피 성장 인자 (EDF), PDGF 및 신경 성장 인자 (NGF 's)를 포함하는 다수의 성장 인자를 포함한다. 일반적으로 성장 촉진 호르몬은 1 ~ 4 개의 조직 사이에 영향을 준다. 이러한 단백질로부터 개발된 많은 제품은 다른 적응증이 있지만, 한 종류 또는 다른 종류의 상처 치료를 목표로 한다. 가장 중요한 조직 성장 인자의 일부는 아래에서 더 자세히 설명된다.

[0108] 본 발명의 겔/나노 구조체 조성물은 조직 수리 방법 및 본 발명의 다른 용도에 유용한 하나 이상의 성장 인자를 또한 포함할 수 있다.

[0109] 예를 들어, 본 발명은 본 발명의 조성물에 PDGF를 포함한다. 혈소판 - 유도 성장 인자 (PDGF)는 거의 모든 중간엽 유래 세포, 즉 혈액, 근육, 뼈, 연골 및 결합 조직 세포에 대한 분열 촉진제이다. 그것은 AA 또는 BB 동종 이량체 또는 AB 이종 이량체로 존재하는 이량성 당단백질이다. 많은 성장 인자와 마찬가지로, PDGF는 이제 더 큰 인자의 패밀리로 간주된다. PDGF 이외에, 이 패밀리는 동종 이량체 인자 혈관 내피 세포 성장 인자 (VEGF) 및 태반 성장 인자 (PIGF), VEGF / PIGF 이종 이량체 및 결합 조직 성장 인자 (CTGF), 인간 혈관 내피 세포에서 분비되는 PDGF-유사 인자 및 섬유 아세포를 포함한다. NGF와 함께, TGF- β . 및 인간 생식선 자극 호르몬 (hCG)과 같은 당단백 호르몬으로, PDGF는 현재 시스테인-노트(cystein-knot) 성장 인자 슈퍼패밀리(superfamily)의 일원으로 분류된다. 이들 인자 모두는 본 발명의 하이드로겔과 함께 사용될 수 있다.

- [0110] PDGF는 혈소판에 의해 생성되고 혈액 응고 과정에서 방출된다. 그것은 이러한 세포에서 유래한 성장인자 중 하나일뿐이다. PDGF는 손상 부위에 섬유 아세포와 백혈구를 끌어들이고, 대체 결합 조직 (주로 섬유 아세포와 평활근 세포)의 성장을 자극한다. 그것은 콜라겐을 생산하는 세포를 포함하여 다양한 세포에서 세포 분열을 자극하여 혈관 신생을 고무시킨다. 그것은 또한 체세포 분열의 유도, 혈관 수축, 백혈구의 주화성, 효소 활동 및 칼슘 동원을 자극한다.
- [0111] 혈소판 유래 성장 인자는 본 발명의 조성물을 사용하여 특정한 치료가 이루어지는 동안 뼈 및 연조직 재생장을 회복시키고 만성 및 급성 상처의 치유 과정을 촉진 시키는데 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 하이드로겔/나노 구조체 조성물은 유리하게는 혈소판 유도 성장 인자 혼합제(cocktail)를 포함할 수 있다.
- [0112] 본 발명의 하이드로겔/나노 구조 조성물은 예를 들어, PDGF 유전자의 국소 전달을 위한 유전자 치료에 사용될 수 있다. PDGF를 코딩하는 플라스미드 DNA는 하이드로겔 매트릭스에 혼입되고, 상처를 둘러싼 살아있는 조직에서 기원하는 과립 화 조직 섬유 아세포가 증식하고 매트릭스 내로 이동하여 플라스미드 유전자 전달 및 발현을 위한 표적으로 작용한다.
- [0113] 본 발명의 하이드로겔 / 나노 구조체 조성물은 또한 혈관 형성을 촉진시키는 VEGF를 포함 할 수 있다. 혈관 내피 성장 인자 (VEGF: Vascular permeability factor)는 또 다른 혈관 성장 인자이며, 다기능 혈관 신생 사이토카인이다. 그것은 미세 혈관 수준에서 내피 세포의 증식을 자극하여 간접적으로 그리고 직접적으로 혈관 신생 (혈관 성장)에 기여하고, 이들을 이동하도록 하여 이들의 일반적인 발현을 변경시킨다. VEGF는 또한 내피 세포를 과다 투과성으로 만들어 혈관 밖 혈장 단백질을 방출시켜 해당 영역의 변화를 유발하여 혈관 신생에 기여한다.
- [0114] 본 발명의 조성물은 또한 FGF를 포함 할 수 있다. 섬유 아세포 성장 인자 (Fibroblast Growth Factor, FGF)는 실제로 헤파린 결합 성장 인자 패밀리에 속하는 적어도 19 14 18 kD 펩타이드의 패밀리이며, 배양된 섬유 아세포 및 혈관 내피 세포에 대해 유사 분열 촉진 유발성이다. 그들은 또한 생체 내에서 혈관 신생되며, 이 혈관 신생은 TNF에 의해 강화된다. FGF는 EGF와 유사한 방식으로 사용될 수 있다. bFGF는 FGF-2로도 알려져 있으며 인간의 거대핵세포형성(megakaryocytopoiesis)을 조절하는 데 관여하며 FGF는 내피 세포 형성을 자극하고 결합 조직 복구를 돕는 데 효과적이다.
- [0115] 하이드로겔/나노 구조 조성물은 또한 처상 치유 및 상피 세포 파괴를 포함하는 다른 장애에 사용하기 위한 FGF-7로도 알려진 케라티노 사이트 성장 인자 (KGF)를 포함 할 수 있다.
- [0116] 형질 전환 성장 인자 (Transforming Growth Factors, TGF)는 다양한 세포주를 형질 전환시킬 수 있는 능력이 있으며, 예를 들어 제한된 수의 세대 이상의 배양에서 성장할 수 있는 능력, 단층보다는 다중층으로의 성장 및 비정상 핵형의 습득 능력을 수여할 수 있다. TGF 패밀리의 적어도 5 멤버가 있으며, 가장 널리 연구 된 두 가지는 TGF-알파와 TGF-베타이다. 전자는 섬유 아세포 및 내피 세포 (혈관 신생)에 대해 분열 촉진 작용을 하며 골흡수를 촉진한다. 조성물에 TGF도 포함될 수 있다. TGF-베타는 세포 조절의 일반적인 매개체이며, 세포 성장의 강력한 억제제이고, 많은 세포 유형의 증식을 억제한다. TGF- 베타는 다른 펩타이드 성장 인자의 유사분열촉진 효과를 길항할 수 있고, 또한 많은 종양 세포주의 성장을 억제 할 수 있다. TGF-β는 또한 혈관 신생 효과를 가지며, 섬유 아세포에서 콜라겐 형성을 촉진한다. 본 발명의 하이드로겔에 대한 적응증은 만성 피부 궤양, 예컨대 당뇨병 환자에서의 신경영양성 발궤양을 포함한다. 다른 영역으로는 상처 치료, 뼈 복구 및 면역 억제 질환을 포함한다.
- [0117] 본 발명의 하이드로겔/나노 구조체 조성물은 예를 들어 적합한 세포를 운반하는데 사용될 수 있다. 이들은 효능을 최대화하기 위해 상처 또는 다른 적합한 영역에 도포하기 직전에 겔에 혼입 될 수 있다. 적합한 세포는 주로 자가유래의 섬유 아세포 및 케라티노사이트를 포함하며, 주로 진피 및 표피 형성을 담당한다. 하나의 세포 유형을 각각 포함하는 분리 된 겔은 연속적으로 또는 함께 적용될 수 있거나, 하나의 겔은 두 세포 유형 모두를 포함할 수 있지만, 일반적으로 덜 바람직하다.
- [0118] 본 발명의 하이드로겔/나노 구조 조성물은 예를 들어 콜라겐을 유용하게 포함 할 수 있다. 이 형태에서, 콜라겐은 유용한 구조적 기능을 제공하지는 않지만, 예를 들어 단백질 분해 활성이 바람직하지 않게 높아지는 경우 희생 단백질로 주로 사용되어 건강한 조직의 깃무름(maceration)을 방지하는 데 도움이 된다.
- [0119] 하이드로겔/나노 구조 조성물은 또한 특정 효소를 포함 할 수 있다. 효소는 급성 및 만성 상처의 괴사 조직 제거(debridement)에 사용된다. 괴사조직제거는 상처에서 생존할 수 없는 조직과 이물질을 제거하는 것이며, 상처 치료 과정에서 자연적으로 발생하는 현상이다. 염증성 시기(phase) 동안 호중구와 대식세포는 상처 부위로부터

"사용된" 혈소판, 세포 파편 및 무혈관성 손상 조직을 소화시키고 제거한다. 그러나 상당량의 손상된 조직이 축적되면 자연적 과정은 압도되고 불충분해진다. 괴사 조직의 축적은 상처에 상당한 식세포의 요구를 가하고, 상처 치유를 지연시킨다. 결과적으로 괴사 조직의 조직 절제는 국소 요법의 특별한 목적이며 최적의 상처 관리의 중요한 구성 요소이다.

[0120] 예를 들어, 효소는 국소 적용을 위해 본 발명의 하이드로겔에 혼입되어 선택적 괴사조직제거(debridement)를 제공할 수 있다. 적합한 효소는 크릴, 크랩, 파파야, 우유(bovine extract) 및 박테리아와 같은 다양한 공급원으로부터 유래될 수 있다. 상업적으로 입수 가능한 적절한 효소는 콜라게나제, 파파인/우레아 및 피브리노리신과 테옥시리보뉴클레아제 조합을 포함한다.

[0121] 본 발명에서 사용하기 위한 효소는 일반적으로 2 가지 방식 중 하나에서 작용한다: 탈락(slough) 성분(예를 들어, 피브린, 박테리아, 백혈구, 세포 파편, 장액성 삼출물, DNA)을 직접 소화시킴으로써; 무혈관 조직을 밑에 있는 상처 부위에 고정시키는 콜라겐 "앵커(anchor)"를 용해시킴으로써 작용한다.

[0122] 본 발명의 하이드로겔은 필요하다면 항균 효과 부가 및 악취 조절을 위해 일반적으로 Dakin 용액을 포함할 수 있다. 괴사조직제거제로 Dakin 용액은 세포 독성 때문에 비선택적이다. Dakin 용액은 단백질을 변성시켜 상처에서 쉽게 제거되도록 한다. 탈락(slough)의 완화는 또한 다른 방법에 의한 괴사조직제거를 용이하게 한다. Dakin 용액을 포함하는 하이드로겔은 목표가 괴사조직제거인 경우 1 일 2 회 교체할 수 있다. 페리와운드(Periwound) 피부 보호는 일반적으로 연고, 액체 피부 장벽 필름 드레싱 또는 고체 피부 장벽 웨이퍼와 함께 제공되어야 한다.

[0123] 본 발명의 겔은 주사기(syringe) 또는 벨로우즈 팩(bellows pack) (단일 투여 전달 시스템) 또는 가압 전달 시스템과 같은 다회 시스템 또는 "bag in the can"형 시스템을 통한 전달과 같은 임의의 적합한 방법에 의해 전달될 수 있다(W098 / 32675에 공개된 것과 같은). 벨로우즈 팩의 예는 영국 디자인 번호 2082665에 공개되어 있다.

[0124] 이와 같이, 본 발명은 또한 상처의 치료를 위한 본 발명에 따른 겔을 포함하는 싱글 도스(single dose) 전달 시스템에까지 확장된다. 본 발명은 또한 본 발명에 따른 겔을 포함하는 가압 전달 시스템으로 확장되고, 에어로졸 용기 내 본 발명에 따른 가압된 하이드로겔을 용기로부터 압력의 방출하여 분무를 형성할 수 있다. 이러한 전달 수단의 사용은 환자가 누워있을 때 환자의 등과 같이 직접 적용하여 도달하기 어려운 환자의 영역으로 겔을 전달할 수 있게 한다.

[0125] 특정 구현 예에서, 본 발명의 하이드로겔 조성물을 생체 전극 및 다른 전기 치료 환경에서 사용하기 위해, 즉 신체 표면에 전극 또는 다른 전기 전도성 부재를 부착시키기 위해 전기적으로 도전성으로 만드는 것이 유리할 수 있다. 예를 들어, 하이드로겔 조성물은 경피 신경 자극 전극, 전기 수술 복귀 전극 또는 EKG 전극을 환자의 피부 또는 점막 조직에 부착하는데 사용될 수 있다. 이러한 용도는 전도성 종(species)을 함유하도록 하는 하이드로겔 조성물의 개질을 포함한다. 적합한 전도성 종은 이온 전도성 전해질, 특히 피부 또는 다른 신체 표면에 적용하기 위해 사용되는 전도성 접착제의 제조에 통상적으로 사용되는 것들이며, 이온화 가능한 무기 염, 유기 화합물 또는 이들의 조합을 포함한다. 이온 전도성 전해질의 예로는 암모늄 설페이트, 암모늄 아세테이트, 모노에탄올아민 아세테이트, 디에탄올아민 아세테이트, 락트산 나트륨, 시트르산 나트륨, 마그네슘 아세테이트, 마그네슘 설페이트, 나트륨 아세테이트, 칼슘 클로라이드, 마그네슘 클로라이드, 칼슘 설페이트, 리튬 클로라이드, 과염소산 리튬, 구연산 나트륨 및 염화칼륨, 및 산화 환원 쌍, 예컨대 설페이트 및 글루코네이트와 같은 제 1 철 및 제 2 철염 혼합물을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직한 염은 염화칼륨, 염화나트륨, 황산 마그네슘 및 아세트산 마그네슘이며, 염화칼륨은 EKG 용도에 가장 바람직하다. 실질적으로 임의의 양의 전해질이 본 발명의 접착제 조성물에 존재할 수 있지만, 존재하는 임의의 전해질은 약 0.1 내지 약 15 중량%의 농도로 존재하는 것이 바람직하다. Nielsen et al.의 미국 특허 제 5,846,558호에 생체 의학적 전극을 제조하기 위한 과정이 개시되어 있으며, 이는 본 발명의 하이드로겔 조성물과 함께 사용하기 위해 조정될 수 있으며, 상기 특허의 개시 내용은 제조 세부 사항과 관련하여 참조로 포함된다. 당업자라면 알 수 있는 바와 같이, 다른 적절한 제조 과정이 또한 사용될 수 있다.

[0126] 가교결합

[0127] 특정 응용 분야, 특히 높은 응집력이 요구되는 경우, 본 발명의 겔/하이드로겔의 중합체는 공유 결합으로 가교결합될 수 있다. 본 발명은 겔/하이드로겔 성분의 중합체 사이에서 가교가 바람직할 수 있지만, 겔/하이드로겔의 중합체와 본 발명의 복합 재료의 나노 구조 성분 사이에서 가교가 또한 바람직할 수도 있음을 고려한다.

본 발명은 중합체를 서로 가교 결합시키고 본 발명의 나노 구조 성분과 겔/하이드로겔 중합체를 가교 결합시키는 임의의 적합한 수단을 고려한다. 겔/하이드로겔 중합체는 다른 중합체 또는 나노 구조에 분자 내 또는 분자간 또는 공유 결합을 통해 공유적으로 가교 결합 될 수 있다. 전자의 경우, 중합체를 서로 또는 나노 구조에 연결시키는 공유 결합은 없지만, 후자의 경우, 중합체를 서로 또는 나노 구조에 결합시키는 공유 결합이 있다. 가교 결합은 열, 방사선 또는 화학적 경화(가교 결합제)를 사용하는 것을 포함하는 임의의 적합한 수단을 사용하여 형성 될 수 있다. 가교 결합의 정도는 압축 하에 저온 유동(cold flow)을 없애거나 적어도 최소화하기에 충분해야 한다. 가교 결합은 또한 가교 결합 공정에서 이용되는 "가교제"인 제 3 분자의 사용을 포함한다.

[0128] 열 가교 결합을 위해, 자유 라디칼 중합 개시제가 사용되며, 이는 비닐 중합에 통상적으로 사용되는 공지된 임의의 자유 라디칼 생성 개시제 일 수 있다. 바람직한 개시제는 유기 과산화물 및 아조 화합물이며, 일반적으로 중합성 물질의 약 0.01 중량% 내지 15 중량%, 바람직하게는 0.05 중량% 내지 10 중량%이고, 더욱 바람직하게는 약 0.1 중량 % 내지 5중량%이며, 가장 바람직하게는 약 0.5 중량 % 내지 4중량%이다. 적합한 유기 과산화물은 t-부틸퍼옥사이드 및 2,2bis(t-부틸퍼 옥시) 프로판과 같은 디알킬퍼옥사이드, 벤조일퍼옥사이드 및 아세틸퍼옥사이드와 같은 디아실퍼옥사이드, t-부틸퍼벤조에이트 및 t-부틸퍼-2-에틸헥사노에이트와 같은 퍼에스테르, 디세틸 퍼옥시 디카보네이트 및 디시클로헥실퍼옥시디카보네이트 등의 퍼디카보네이트, 시클로 헥사노퍼옥사이드, 메틸에틸케톤퍼옥사이드 등의 케톤퍼옥사이드, 큐멘하이드로퍼 옥사이드, tert-부틸하이드로퍼옥사이드 등의 하이드로퍼옥사이드 등을 들 수 있다. 적합한 아조 화합물은 아조비스(이소 부티로 니트릴) 및 아조 비스(2,4- 디메틸 발레로니트릴)를 포함한다. 열 가교 결합을 위한 온도는 실제 성분에 의존 할 것이며, 당업자는 용이하게 추론 할 수 있지만, 전형적으로 약 80 내지 약 200의 범위이다.

[0129] 가교 결합은 또한 방사선에 의해, 전형적으로 광개시제의 존재 하에서 수행 될 수 있다. 방사선은 자외선 방사선이 바람직하지만, 자외선, 알파, 베타, 감마, 전자 빔 및 엑스레이 방사선 일 수 있다. 유용한 광 증감제는 "수소 분리반응(hydrogen abstraction)" 유형의 삼중선 증감제(triplet sensitizers)이며, 벤질 디메틸 케탈, 4- 아크릴 옥시 벤조 페논 (ABP), 1- 히드 록시 - 시클로 헥실 페닐 케톤, 2,2- 디에톡시 아세토 페논 및 2,2- 디메톡시 아세토 페논과 같은 벤조 페논 및 치환 된 벤조 페논 및 아세토 페논, 벤조인 메틸 에테르 및 벤조인 이소 프로필 에테르와 같은 벤조인 에테르, 아니 소인 메틸 에테르와 같은 치환 된 벤조인 에테르, 방향족 술폰닐 클로라이드, 예컨대 2-나프탈렌 술폰닐 클로라이드, 1- 페닐-1,2-프로판디온-2-(0-에 톡시-카르보닐)-옥심 등의 광활성 옥심, 2-이소프로필티옥산톤, 2- 클로로티옥산톤, 2,4 디메틸티옥사논, 2,4 디클로로티옥사논 및 2,4- 디에틸티옥사논, 및 아실 포스핀 옥사이드와 같은 알킬 및 할로젠 치환 티옥산톤을 포함하는 티옥산톤을 포함한다. 200 내지 800nm, 바람직하게는 200 내지 500nm의 파장을 갖는 방사선이 본 발명에서 사용하기에 바람직하고, 낮은 강도의 자외선은 대부분의 경우 가교 결합을 유도하기에 충분하다. 그러나, 수소 광감작제 유형의 광광제를 사용하면, 충분한 가교 결합을 달성하기 위해 더 높은 강도의 UV 노출이 필요할 수 있다. 이러한 노출은 PPG, 퓨전 (Fusion), 크세논 (Xionon) 및 다른 것들로부터 이용 가능한 것과 같은 수은 램프 프로세서에 의해 제공될 수 있다. 가교 결합은 또한 감마선 또는 전자 빔을 조사함으로써 유도 될 수 있다. 적합한 조사 매개 변수, 즉 가교 결합을 수행하기 위해 사용된 방사선의 유형 및 투여량은 당업자에게 명백할 것이다.

[0130] 화학적 가교 결합 "촉진제"로도 지칭되는 적합한 화학 경화제는 2,2- 다이머 캅토 다이에틸에터, 다이펜타에리트리톨 헥사 (3-머캅토프로피오네이트), 에틸렌 비스 (3-머캅토아세테이트), 펜타에리트리톨 테트라 (3- 메르캅토프로피오네이트), 펜타에리트리톨 테트라티오글리콜레이트, 폴리에틸렌 글리콜 디메르캅토아세테이트, 폴리에틸렌 글리콜 디(3-메르캅토프로피오네이트), 트리메틸올에탄 트리(3-메르캅토프로피오네이트), 트리메틸올레탄 트리티오글리콜레이트, 트리메틸올프로판 트리 (3-메르캅토 프로피오네이트), 트리메틸올프로판 트리티오글리콜레이트, 디티오에탄, 디- 또는 트리티오프로판 및 1,6-헥산 디티 올 등을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 가교 결합 촉진제는 가교 결합된 친수성 중합체에 첨가되어 그 공유 가교 결합을 촉진시키거나 또는 가교 결합되지 않은 친수성 중합체와 상보적 올리고머의 혼합에 첨가되어 두 성분 사이에 가교 결합을 제공한다.

[0131] 중합체 및/또는 나노 구조체는 또한 상보적 올리고머와 혼합하기 전에 가교 결합될 수 있다. 이러한 경우에, 중합체에 다작용성 코모노머와 함께 단량체성 전구체를 혼합하고 공중합시킴으로써 가교 결합된 형태로 중합체를 합성하는 것이 바람직 할 수 있다. 모노머 전구체 및 상응하는 중합체 생성물의 예는 다음과 같다: 폴리 (N- 비닐 아미드) 생성물을 위한 N- 비닐 아미드 전구체; 폴리(N- 알킬 아크릴 아미드) 생성물을 위한 N-알킬 아크릴 아미드; 폴리 아크릴산 생성물을 위한 아크릴산; 폴리메타크릴산 생성물을 위한 메타크릴산; 폴리(아크릴로 니트릴) 생성물을 위한 아크릴로 니트릴; 및 폴리(비닐피롤리돈)(PVP) 제품을 위한 N-비닐피 롤리돈(NVP)을 포함한다. 중합은 벌크, 현탁액, 용액 또는 에멀전으로 수행될 수 있다. 용액 중합이 바람직하고, 에틸 아세테이트 및 저급 알칸올 (예: 에탄올, 이소 프로필 알콜 등)과 같은 극성 유기 용매가 특히 바람직하다. 친수성 비닐 중

합체의 제조를 위해, 합성은 전형적으로 전술한 자유 라디칼 개시제의 존재 하에 자유 라디칼 중합 방법을 통해 일어날 것이다. 다작용성 코모노머는 예를 들어 비스 아크릴 아미드, 부탄디올 및 헥산 디올 (1,6- 헥산디올 디아크릴 레이트가 바람직 함)과 같은 디올의 아크릴 또는 메타크릴 에스테르, 펜타 에리트 리톨 테트라 아크릴 레이트 및 1,2- 에틸렌 글리콜 디아크릴레이트와 같은 다른 아크릴레이트 및 1,12- 도데칸디올 디아크릴레이트를 포함한다. 다른 유용한 다작용성 가교 단량체는 폴리 (에틸렌 옥사이드) 디아크릴레이트 또는 폴리 (에틸렌 옥사이드) 디메타크릴레이트와 같은 올리고머 및 중합체 다작용성 (메트) 아크릴레이트; 치환 및 비치 환 된 디 비닐벤젠과 같은 폴리비닐 가교제; 및 EBECRYL 270 및 EBECRYL 230 (각각 1500 중량 평균 분자량 및 5000 중량 평균 분자량의 아크릴화 된 우레탄, 각각 둘 모두, Smyrna의 UCB로부터 입수 가능함) 및 이들의 조합과 같은 이 관능성 우레탄 아크릴 레이트를 포함한다. 화학적 가교제가 사용되는 경우, 사용되는 양은 가교제 대 친수성 중합체의 중량비가 약 1: 100 내지 1:5의 범위 인 것이 바람직 할 것이다. 보다 높은 교차 결합 밀도를 달성하기 위해, 필요하다면, 화학적 가교는 방사선 경화와 조합된다.

[0132] 나노구조

[0133] 본 발명의 나노 구조 성분은 섬유, 필라멘트, 메쉬 섹션, 분지형 필라멘트 또는 네트워크, 시트 또는 성형 입자를 포함하는 임의의 적합한 형태 일 수 있다. 나노 구조는 또한 나노 구조와 본 발명의 하이드로겔의 중합체 사이의 공유 결합 또는 비공유 결합을 용이하게 하기 위한 임의의 적합한 화학적 작용기를 포함 할 수 있다. 방법, 기술 및 물질은 나노 구조를 제조하고 기능화 하기 위한 당 업계에 잘 알려져 있다.

[0134] 특정 구현 예에서, 미세 제조 방법은 본 발명의 나노 구조를 제조하는데 사용된다. 다양한 구현 예에서, 개시된 장치는 임의의 적합한 마이크로 제조 기술을 사용하여 조립 및/또는 제조 될 수 있다. 이러한 방법 및 기술은 당업계에 널리 공지되어 있다.

[0135] 본 명세서에 개시된 나노 구조를 제조하는데 사용될 수있는 미세 가공 공정은 리소그래피; 레이저, 플라즈마 에칭, 포토 리소그래피 또는 습식 케미컬, 건조 및 포토 레지스트 제거와 같은 화학적 에칭과 같은 에칭 기술; 3 차원 인쇄 (3DP), 광 조형 기술 (SLA), 선택적 레이저 소결 (SLS), 탄도 입자 제조 (BPM) 및 용착 모델링 (FDM)을 포함한 고체 자유 형태 기술(solid free form technique); 마이크로 머시닝; 실리콘의 열 산화; 전기 도금 및 무전해 도금; 봉소, 인, 비소 및 안티몬 확산과 같은 확산 공정; 이온 주입; 스퍼터링, 화학 기상 증착 (CVD), 에피 택시 (기상, 액상 및 분자 빔), 전기 도금, 스크린 인쇄, 라미네이션 또는 증착(필라멘트, 전자빔, 플래쉬, 및 웨도잉 및 스텝 커버리지)과 같은 박막 증착 (film deposition) 그 조합을 포함한다. (Jaeger, Introduction to Microelectronic Fabrication (Addison-Wesley Publishing Co., Reading Mass. 1988); Runyan, et al., Semiconductor Integrated Circuit Processing Technology (Addison-Wesley Publishing Co., Reading Mass. 1990); Proceedings of the IEEE Micro Electro Mechanical Systems Conference 1987-1998; Rai-Choudhury, ed., Handbook of Microlithography, Micromachining & Microfabrication (SPIE Optical Engineering Press, Bellingham, Wash. 1997) 참조). 물드로 사용되는 재료를 선택하면 표면이 어떻게 분지 (branching) 구조를 형성하도록 구성되어 있는지 결정된다.

[0136] 예를 들어, 포토 리소그래피 프로세스 및 반도체 산업으로부터 유도된 방법을 이용하는 마이크로 전자 기계 시스템 (MEMS)의 제조를 위한 최첨단 공정이 사용될 수 있다. 보다 최근에 개발 된 방법은 "소프트 리소그래피"(Whitesides et al, Angew chem. Int ed, 37, 550-575, (1998)) 및 미세 유체 구조 (Beebe et al., Nature, 404 : 588-59 (2000))이다. 중합체 마이크로 디바이스 제조에 대한 리뷰 및 기타 논의는 Madou, M. J. Fundamentals of Microfabrication: The Science of Miniaturization; 2nd ed.; CRC Press: Boca Raton, 1997; Becker, H., and Locascio, L. E. "Polymer microfluidic devices." Talanta, 56(2):267-287, 2002; Quake, S. R., and Scherer, A. "From micro- to nanofabrication with soft materials." Science, 290(5496):1536-1540, 2000; and Whitesides, G. M., and Stroock, A. D. "Flexible methods for microfluidics." Physics Today, 54(6):42-48, 2001을 포함하고, 이들 각각은 본 명세서에 참고로 인용된다.

[0137] 본 발명의 나노 구조는 또한 정전 방사(electrospinning)로 제조될 수 있다(또는 electrospinning). 섬유를 형성 할 수 있는 액체 및 / 또는 용액의 전기 방사의 기술은 예를 들어, 미국 특허 4,043,331 및 5,522,879에 잘 알려져 있다. 전기 방사 공정은 일반적으로 액체를 전기장으로 도입하여 액체가 섬유를 생성하도록 한다. 이러한 섬유는 일반적으로 포집할 수 있는 전지적 전위를 갖는 도체에 이끌린다. 액체를 섬유로 전환시키는 동안, 섬유는 경화 및/또는 건조된다. 이러한 경화 및/또는 건조는 액체의 냉각에 의해 야기 될 수 있는데, 즉 액체는 일반적으로 실온에서 고체이고; 예를 들어 탈수 (물리적으로 유도 된 경화)에 의한 용매의 증발; 또는 경화 메카니즘 (화학적으로 유도 된 경화)에 의해 형성 될 수 있다.

- [0138] 전기 방사 공정은 예를 들면, 미국 특허, 제 4,043,331 호에 기재된 것과 같이 전형적으로 섬유를 사용하여 매트 또는 다른 부직 재료를 제조하는 것에 관한 것이다. 50 나노 미터에서 5 마이크로 미터 직경의 나노 섬유는 부직포 또는 정렬된 나노 섬유 메쉬로 전기 방사 될 수 있다. 섬유 직경이 작기 때문에 전기 방사 된 섬유는 본질적으로 매우 높은 표면적과 작은 공극 크기를 가지고 있다. 이러한 특성으로 인해 전기 방사 섬유는 멤브레인, 조직 스캐폴딩 및 기타 생체 의학 응용 프로그램을 비롯한 다양한 응용 분야에서 잠재적인 후보가 된다.
- [0139] 전기로 방사된 섬유는 매우 얇은 직경을 갖도록 제조 될 수 있다. 전기 방사 섬유의 직경, 일관성 및 균일성에 영향을 미치는 파라미터는 섬유 형성 조합에서의 중합체 재료 및 섬유 형성 중 (가해진) 가교제 농도, 인가 된 전압 및 니들 콜렉터 거리(needle collector distance)를 포함한다. 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 나노 섬유는 약 1nm 내지 약 100 μ m 범위의 직경을 갖는다. 다른 구체 예에서, 나노 섬유는 약 1 nm 내지 약 1000 nm 범위의 직경을 갖는다. 또한, 나노 섬유는 적어도 약 10 내지 약 100의 범위의 중형비를 가질 수 있다. 섬유의 직경이 매우 작기 때문에, 섬유는 질량 단위 당 높은 표면적을 갖는다. 이와 같이 질량에 대한 높은 표면적 비는 섬유 형성 용액 또는 액체가 액체 또는 용매화 된 섬유 형성 재료로부터 고체 나노 섬유로 몇 초 이내에 변형되도록 한다.
- [0140] 본 발명의 나노 섬유/나노 구조를 형성하는데 사용되는 중합체 물질은 가교제와 상용성인 임의의 섬유 형성 물질로부터 선택 될 수 있다. 의도된 적용 예에 따라, 섬유-형성 중합체 물질은 친수성, 소수성 또는 양친매성 일 수 있다. 추가로, 섬유-형성 중합체 물질은 열적 반응성 중합체 물질 일 수 있다.
- [0141] 합성 또는 천연, 생분해성 또는 비생분해성 중합체는 본 발명의 나노 섬유/나노 구조체를 형성 할 수 있다. "합성 중합체"는 합성적으로 제조되고 비-천연 발생 단량체 단위를 포함하는 중합체를 나타낸다. 예를 들어, 합성 중합체는 아크릴레이트 또는 아크릴아미드 단위와 같은 비-천연 모노머 단위를 포함 할 수 있다. 합성 중합체는 전형적으로 첨가, 축합 또는 자유 라디칼 중합과 같은 전통적인 중합 반응에 의해 형성된다. 또한, 합성 중합체는 천연 펩타이드, 뉴클레오타이드 및 사카라이드 모노머 유닛과 같은 천연 모노머 유닛 (예 : 합성 펩타이드, 뉴클레오타이드 및 사카라이드 유도체)를 비-천연 모노머 유닛(예를 들어 합성 펩타이드, 뉴클레오타이드, 및 당 유도체)와의 조합으로 포함 할 수 있다. 이러한 유형의 합성 중합체는 고체상 합성과 같은 표준 합성 기술에 의해 또는 허용되는 경우 재조합에 의해 제조 될 수 있다.
- [0142] "천연 중합체"는 자연적으로, 재조합 적으로 또는 합성으로 제조되고 중합체 주쇄가 자연 발생 단량체 단위로 이루어진 중합체를 나타낸다. 일부 경우에, 천연 중합체는 천연 중합체의 화학적 및/또는 물리적 특성을 변화시키도록 변형, 가공, 유도체화 또는 다르게 처리 될 수 있다. 이 경우 "천연 중합체"라는 용어는 천연 중합체 (예: "유도체화 된 천연 중합체"또는 "탈글리콜화 된 천연 중합체")의 변화를 반영하도록 수정된다.
- [0143] 예를 들어, 나노 섬유 물질은 폴리올레핀, 폴리 아세탈, 폴리 아미드, 폴리 에스테르, 셀룰로오스 에테르 및 에스테르, 폴리 알킬렌 설파이드, 폴리아릴렌 옥사이드, 폴리 설편, 개질 된 폴리 설편 중합체 및 이들의 혼합물과 같은 부가 중합체 및 축 중합체 재료 모두를 포함 할 수 있다. 이러한 일반적인 분류 내의 예시적인 재료는 폴리에틸렌, 폴리(ϵ -카프로락톤), 폴리(락테이트), 폴리글리콜레이트, 폴리프로필렌, 폴리(비닐클로라이드), 폴리메틸메타크릴레이트 (및 기타 아크릴 수지), 폴리스티렌 및 이들의 공중합체(ABA 유형 블록 공중 합체 포함), 폴리(비닐리덴플루오라이드), 폴리(비닐리덴클로라이드), 가교 결합 형태 및 비가 교 형태의 다양한 가수 분해도 (87 % 내지 99.5 %)의 폴리 비닐 알코올이 포함된다. 예시적인 부가 중합체는 유리질인 경향이 있다 (실온보다 큰 Tg). 이는 폴리비닐클로라이드 및 폴리메틸메타크릴레이트, 폴리스티렌 중합체 조성물 또는 합금 또는 폴리비닐리덴플루오 라이드 및 폴리비닐알콜 물질에 대한 결정성이 낮은 경우이다.
- [0144] 본 발명의 일부 구현 예에서, 나노 섬유/나노 구조 물질은 폴리 아미드 축합 중합체이다. 보다 특정한 구현에서, 폴리아미드 축합 중합체는 나일론 중합체이다. 용어 "나일론"은 모든 장쇄 합성 폴리 아미드의 일반적인 이름이다. 다른 나일론은 소량의 물의 존재 하에서 엡실론 카프로 락탐의 중축 합에 의해 제조 될 수 있다. 이 반응은 선형 폴리 아미드 인 나일론 -6 (엡실론 - 아미노 카프로 산으로도 알려진 환상 락탐으로 만든)을 형성한다. 또한, 나일론 공중 합체도 고려된다. 공중 합체는 다양한 디아민 화합물, 다양한 이산 화합물 및 다양한 시클릭락탐 구조를 반응 혼합물에 혼합 한 다음 폴리아미드 구조 내에 랜덤하게 위치된 모노머 물질로 나일론을 형성시킴으로써 제조 될 수 있다. 예를 들어, 나일론 6,6-6,10 물질은 헥사 메틸렌 디아민과 C6 및 C10 이산의 혼합물로 제조 된 나일론이다. 나일론 6-6,6-6,10은 ϵ 아미노카프로산, 헥사 메틸렌 디아민 및 C6과 C10 이 산 물질의 블렌드의 공중합에 의해 제조된 나일론이다.
- [0145] 블록 공중 합체 또한 나노 섬유 재료로서 사용될 수 있다. 나노 섬유의 제조를 위한 조성물을 제조함에 있어서,

용매 시스템은 두 블록이 용매에 용해 될 수 있도록 선택 될 수 있다. 일례는 메틸렌 클로라이드 용매 중 ABA (스티렌-EP-스티렌) 또는 AB (스티렌-EP) 중합체이다. 이러한 블록 공중 합체의 예로는 Kraton 유형의 AB 및 ABA 블록 중합체, 예컨대 스티렌/부타디엔 및 스티렌/수소화 된 부타디엔(에틸렌 프로필렌), Pebax 유형의 앱실론- 프롤 락탐/에틸렌 옥사이드 및 Sympatex-형 폴리 에스테르/에틸렌 옥사이드, 및 에틸렌 옥사이드 및 이소시아네이트의 폴리우레탄등을 포함한다.

[0146] 폴리비닐리덴플루오 라이드, 신디오택틱폴리스티렌, 불화비닐리덴과 헥사플루오로프로필렌의 공중합체, 폴리비닐알코올, 폴리비닐아세테이트, 폴리(아크릴로니트릴) 및 이와 아크릴산 및 메타크릴레이트와의 공중 합체와 같은 무정형 첨가 중합체, 폴리스티렌, 폴리(염화 비닐) 및 이의 다양한 공중합체, 폴리(메틸메타크릴레이트) 및 이의 다양한 공중 합체는 낮은 압력 및 온도에서 용해되기 때문에 비교적 쉽게 용액 스핀(solution spun)될 수 있다. 폴리에틸렌 및 폴리프로필렌과 같은 고 결정성 중합체는 일반적으로 용액 스핀 될 경우 보다 고온 및 고압 용매가 필요하다

[0147] 나노 섬유는 또한 중합체 혼합물, 합금 형태 또는 가교화 된 화학적으로 결합된 구조로 2종 이상의 중합체 물질을 포함하는 중합체 조성물로부터 형성 될 수 있다. 나노 섬유에 유리한 특성을 제공하기 위해 2개의 관련된 중합체 물질을 배합 할 수 있다. 예를 들어, 고분자량 폴리비닐클로라이드는 저분자량 폴리비닐 클로라이드와 블렌딩 될 수 있다. 유사하게, 고분자량 나일론 물질은 저 분자량 나일론 물질과 블렌딩 될 수 있다. 또한, 일반적인 고분자 속의 상이한 종을 블렌딩 할 수 있다. 예를 들어, 고 분자량 스티렌 재료는 저 분자량, 고 충격 폴리스티렌과 블렌딩 될 수 있다. 나일론 -6 물질은 나일론 -6; 6,6; 6,10 공중합체와 같은 나일론 공중 합체와 블렌딩 될 수 있다. 또한, 이러한 87 % 가수 분해 된 폴리 비닐 알코올과 같이 가수분해도가 낮은 폴리 비닐 알코올을 98 내지 99.9 % 또는 그 이상의 가수 분해도를 갖는 완전히 또는 수퍼(super) 가수 분해 된 폴리비닐알코올과 혼합할 수 있다. 혼합물 내의 모든 물질은 적절한 가교 메커니즘을 사용하여 가교 결합 될 수 있다. 나일론은 아마이드 결합의 질소 원자와 반응하는 가교 결합제를 사용하여 가교 결합 될 수 있다. 폴리비닐알코올 재료는 모노알데히드와 같은, 포름알데히드와 같은 히드록실 반응성 재료, 우레아, 멜라민- 포름 알데히드 수지 및 그 유사체, 붕산, 및 무기 화합물, 알데히드, 이산, 우레탄, 에폭시, 기타 공지의 가교제, 를 사용하여 가교 결합 될 수 있다. 가교제는 중합체 사슬 사이에서 반응하고 공유결합을 형성하여 분자량, 내약품성, 전체 강도와 기계적 붕괴(degradation)에 대한 저항성을 향상시킬 수 있다.

[0148] 생분해성 중합체 또한 본 발명의 나노 구조의 제조에 사용될 수 있다. 생분해성 재료로서 연구 된 합성 중합체 부류의 예는 폴리에스테르, 폴리아미드, 폴리우레탄, 폴리오르토에스테르, 폴리카프로락톤 (PCL), 폴리이미노카보네이트, 지방족 카보네이트, 폴리포스파젠, 폴리안하이드라이드 및 이들의 공중합체를 포함한다. 예를 들어, 이식형 의료 장치와 관련하여 사용될 수 있는 생분해성 물질의 특정 예는 폴리락티드, 폴리글리콜라이드, 폴리디옥사논, 폴리(락티드-코-글리콜라이드), 폴리(글리콜리드-코-폴리디옥사논), 폴리안하이드 라이드, 폴리(글리콜라이드-코-트리 메틸렌 카보네이트) 및 폴리(글리콜라이드-코-카프로락톤)을 포함한다. 이들 중합체와 다른 생분해성 중합체와의 블렌드가 또한 사용될 수 있다.

[0149] 일부 구현 예에서, 나노 섬유는 비생분해성 중합체이다. 비생분해성이란 일반적으로 비효소적인 것으로, 가수 분해적 또는 효소적으로 분해 될 수없는 중합체를 지칭한다. 예를 들어, 비생분해성 중합체는 프로테아제에 의해 야기 될 수 있는 분해에 내성이 있다. 비생분해성 중합체는 천연 또는 합성 중합체를 포함 할 수 있다.

[0150] 나노 섬유를 형성하는 조성물 내에 가교 결합제를 포함시킴으로써 나노 섬유가 넓은 범위의 지지체 표면과 상용성을 갖게한다. 가교 결합제는 단독으로 또는 다른 재료와 함께 사용되어 원하는 표면 특성을 제공 할 수 있다.

[0151] 적합한 가교제는 방사선, 전기 또는 열 에너지와 같은 에너지 원에 노출 될 때 다른 물질과 공유 결합을 형성 할 수있는 적어도 2 개의 잠재 반응성 활성화 가능한 기를 갖는 단량체성(소분자 물질) 또는 중합체성 물질을 포함한다. 일반적으로 잠재(latent) 반응 활성 그룹은 인접한 화학 구조와의 공유 결합을 통해 활성 종을 생성 하기 위해 특정하게 적용되는 외부 에너지 또는 자극에 반응하는 화학 물질이다. 잠재 반응성 그룹은 저장 조건 하에서 공유 결합을 유지하지만 외부 에너지 원에 의한 활성화시 다른 분자와 공유 결합을 형성하는 그룹이다. 일부 구체 예에서, 잠재 반응성 그룹은 자유 라디칼과 같은 활성 종을 형성한다. 이러한 자유 라디칼은 외부에서 인가 된 전기, 전기 화학적 또는 열적 에너지의 흡수에 따라 니트렌, 카르빈 또는 케톤의 여기 상태를 포함 할 수 있다. 공지 된 또는 상업적으로 이용 가능한 잠재 반응성 그룹의 다양한 예가 미국 특허 4,973,493; 5,258,041; 5,563,056; 5,637,460; or 6,278,018. 호에 보고 되어 있다.

[0152] 예를 들어, Aldrich Chemicals, Produits Chimiques Auxiliaires et de Syntheses, (Longjumeau, France), Shin-Nakamura Chemical, Midori Chemicals Co., Ltd. or Panchim S. A. (France) 에서 입수 할 수 있는 트리

클로로메틸트리아진을 기본으로하는 상업적으로 입수 가능한 다기능 광가교 결합제를 사용 할 수 있다. 8 종의 화합물로는 2,4,6-트리스(트리클로로 메틸)-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-카복시페닐)-2,6-비스(트리클로로메틸)-1,3,5-트리아진, 2-(4-메톡시페닐)-4,6-비스(트리클로로 메틸)-1,3,5-트리아진, 2-(1-에텐-2,2'-푸틸)-4,6-비스(트리클로로 메틸)-1,3,5-트리아진 및 2-(4-메톡시스티릴)-4,6-비스(트리클로로 메틸)-1,3,5-트리아진을 포함한다.

[0153] **사용 방법 및 예시적인 구현**

[0154] 본 발명의 겔/하이드로겔/나노 구조-체 조성물은 카테타, 다른 외과 용 장치 및 임플란트에 코팅을 제공하는 것과 같은 응용뿐만 아니라 수많은 조직 치료 상황에서 유리하게 사용될 수 있다. 본 발명의 겔/하이드로겔/나노 구조체 조성물은 또한 항생제, 성장 인자 및 면역 억제제와 같이 본 명세서에 기재된 활성제를 전달하는데 사용될 수 있다.

[0155] 특정 구현 예에서, 본 발명은 연조직 결합에 복합 재료를 적용하는 것을 포함하는 연조직 결합 치료 방법을 제공하며, 상기 복합 재료는 겔 및 상기 겔 내에 배치된 나노 구조체를 포함한다.

[0156] 본 명세서에 기술 된 하이드로겔/나노 구조체 조성물의 유리한 특성은 하기의 능력을 포함한다: 1) 용이한 특성 부여 및 품질 제어 제공; 2) 기존의 조직 매트릭스와 통합; 3) 새로 형성된 매트릭스에 대한 직접적인 편입; 4) 세포 및 생리활성 인자의 직접 포함; 5) 생체 적합성 유지; 6) 생체 재흡수 조절; 7) 나노 구조로 인해 구조적 강성(rigidity)이 높아 복잡한 해부학적 형태로의 쉬운 주조; 및 8) 관절 연골과 같은 천연 조직의 기계적 성질 발현.

[0157] 일 적용에서, 본 발명의 하이드로겔/나노 구조체 복합체 조성물은 연골 조직을 복구하는데 사용될 수 있다. 연골 회복을 위한 현재의 생물학적 기반 외과 수술은 자가 연골 세포 이식, 시추(drilling), 마모 연골 성형술, 미세 골절 및 모자이크 인공 관절 성형술을 포함한다. 이 모든 절차는 심각한 관절염 및 류마티스 성 관절염에서 볼 수 있는 것과 같이 병소의 관절연골 손상(focal articular cartilage injuries)만 치료하고 연골이 벗겨진(denuded) 관절 표면은 치료하지 않는다. 또한, 연골 결함을 채우기 위해 연골 조직 플러그(plugs) 또는 환자로 부터 채취되어 확장된 연골 세포를 사용한다. 이러한 조직 또는 연골 세포는 기존의 연골 기질과 통합되고 정상 연골의 생체 역학적 특성을 갖는 새로 합성된 연골과 같은 완전히 새로운 물질을 합성함으로써 결함을 채울 것으로 예상된다. 그러나 그러한 절차는 관절이 골관절염에 걸리도록 하는 것으로 생각되는 섬유연골에 대한 기계적 손상이 있는 히알린 연골(hyaline cartilage)보다는 회복력있는 조직(섬유연골, fibrocartilage)의 형성을 촉진한다. 또한, 내인성 연골의 수리 재료로서의 이용 가능성은 환자에게 취득 과정에서의 자체 위험 및 환자의 사망률로 인해 상당히 제한적이다. 전술한 논의로부터 명백한 바와 같이, 본원에 개시된 하이드로겔/나노 구조체 조성물은 연골 퇴행성 질환을 앓고있는 환자에서 유망한 새로운 치료법을 위한 실효성있는 물질을 제시한다.

[0158] 본원에 기술 된 바와 같이, 본 발명의 하이드로겔/나노 구조체 조성물은 임의의 수의 합성 조직 이식 또는 증강뿐만 아니라 다른 임상 적용에 적합한 광범위한 특성을 갖는 것으로 제조 될 수 있다. 이미 기술 된 바와 같이, 본 물질은 상해 또는 질병의 결과로서 생성 된 연골 결손을 치료하는데 사용될 수 있다. 이렇게 수리 될 수 있는 손상으로 인한 결함은 스포츠 또는 사고와 관련 될 수 있으며 표재성 연골층만 관련되거나 밑에 있는 연골 뼈도관련될 수 있다. 본원에 기술 된 조성물을 사용하여 수복 할 수있는 질병으로 인한 결함은 골관절염 및 류마티스 성 관절염으로부터 생성된 것들을 포함한다. 부상이나 질병에 관계없이 이러한 결함은 성숙한 또는 성장판 연골에 있을 수 있다. 합성 성장판 연골을 위한 하이드로겔의 조제는 성장하는 동안 생체 물질의 생흡수(bioresorption)를 조절하기 위해 치환되지 않은 스캐폴드 물질을 포함해야 할 수 있다.

[0159] 본 명세서에 기술된 하이드로겔/나노 구조 조성물이 사용될 수 있는 또 다른 영역은 머리와 목의 연조직뿐만 아니라 연골 조직의 수리, 재건 또는 증강이다. 연조직 증대 및 두경부 재건을 위한 생체 적합 물질의 이용 가능성은 외과 및 재건 수술 분야에서 근본적인 과제로 남아 있다. 생물학적 적합성과 수명이 적절한 물질을 개발하기 위해 상당한 연구와 투자가 이루어졌다. 이 연구의 성과는 기대되지 않았다. 면역능력이 있는 동물에 배치하면 현재 제안 된 재료의 뼈대가 흡수되어 실패하는 것으로 나타났다. 또한, 기존의 합성 물질은 우수한 수명을 제공하지만, 피할 수 없는 결함을 갖는다. 예를 들어, 실리콘은 안전성과 장기적 면역 관련 영향에 대한 우려로 가득 차 있다. 합성 고분자 PTFE (gortex)와 실라스틱은 조직 반응성은 적지만 조직 통합을 제공하지 않으며 이 물질 감염과 구축(extrusion)의 장기적인 위험을 나타낼 수 있다. 이 명세서에 기술 된 물질은 머리와 목의 연조직 결함의 증강 또는 수리를 위한 합성 연조직 스캐폴드 재료를 제조하는데 유용 할 것이다. 특히, 비-염증성이고 비-면역 원성이고 적절한 점탄성 정도를 갖는 것으로 제조 될 수 있는 하이드로겔/나노 구조체 조성물(본

원의 설명 참조)은 효과적인 이식 가능한 스캐폴드 재료로서 사용될 수 있다.

[0160] 또한, 본 발명의 하이드로겔/나노 구조 조성물은 예를 들어, 선천성 이상, 외상 또는 외상에 이차적인 연골 또는 뼈 결손을 치료하기 위해 머리 및 목의 재건 과정에서 자주 사용되는 연골 임플란트를 제조하기 위한 신규한, 생체적합성 및 생체 부작용이 적은 물질로서 사용될 수 있다. 귀에 대한 특유의 용도로는 외상, 신생물(즉, 편평 세포 암종, 기저 세포 암종 및 흑색 종) 및 소이증(microtia)과 같은 선천성 결함으로 인한 연골 결손을 치료하기 위해 종종 수행되는 이두 성형 및 귀에 의한 재건이 포함된다. 코와 관련된 응용 분야로는 코와 코 중격의 성형 및 재건 절차가 있다. 매부리코(Dorsal hump augmentation), 팁(tip), 쉴드(shield) 및 퍼짐이식(spreader graft)은 미용 성형술에서 자주 사용된다. 외상, 신생물, 베게너(Wegeners) 육아 종증과 같은 자가면역 질환 또는 선천성 결함에 후속되는 비강 재건은 연골 수복이 요구된다. 중격 천공은 다루기가 어렵고 종종 치료에 실패한다. 연골 이식은 이러한 적용에 이상적이거나, 자기유래 또는 도너 연골이 종종 이용 가능하지 않다. 목구멍(throat)에 특유한 응용에는 후두부 기관지 재건술이 포함되며, 어린이의 경우 보통 사망률이 없지 않은 늑골 연골을 채취해야 한다. 컷바퀴연골 및 코 중격 연골은 종종 이 적용에 부적절하다. 본 명세서에 개시된 하이드로겔로부터 제조된 합성 연골 물질은 시약 농도, 치환 및 가교 결합 속도와 같은 하이드로겔 합성의 파라미터 조절에 기초하여 전술한 각각의 용도에 적합하도록 합성될 수 있다. 후두 기관의 재건은 일반적으로 성대문밀 협착증 또는 기관 협착증에 대해 수행된다. 병인은 외상(즉, 삼관 외상 또는 기관 절제술)이거나 특발성일 수 있다. 다른 가능성으로는 턱과 뺨의 증가와 하안검의 안검외반 보수의 외과 수술에 사용되는 것뿐만 아니라 수많은 두개 및 안면(craniofacial) 적용에 사용된다. 이러한 적용은 관절 연골의 정확한 기계적 특성의 연골이 필요하지 않을 수 있다. 세포 집단 또는 생활성체(bioactive agents)의 포함도 바람직할 수 있다.

[0161] 본원에 기술된 하이드로겔/나노 구조체 조성물은 또한 일반적으로 지나치게 공격적인 외과적 절제술 이후에 비강의 수리 및 협착에 대해 사용될 수 있으며, 이는 감염 및 딱지(encrustation)를 유발하는 비강 내 유체의 만성적인 고임(pooling)을 방지한다. 또 다른 유망한 응용 분야는 심혈관 수술과 같은 수술 과정에서 삼관에 의한 후두 기관 손상의 결과로서 어린이와 성인 모두의 후두 기관 재건이다. 본원에 기술된 바와 같은 하이드로겔/나노 구조체 조성물은 또한 암의 목 절제술 후 경동맥을 보호하기 위해 윤상 고리(cricoid ring) 교체체를 제공하는데 사용될 수 있으며, 본 발명의 조성물은 피부 장벽 상실에 대하여 경동맥의 보호 장벽으로서 경동맥과 피부 사이에 위치될 수 있다. 절개된 신경의 신경 세포 재증식 동안의 보호 코팅으로서 종종 섬유 조직은 신경 세포 재생산보다 빨리 형성되어 최종 형성을 방해한다. 본 발명의 하이드로겔/나노 구조 조성물 프리 캐스트 튜브 내에 신경 말단을 배치하는 것은 신경 증식 부위로부터 섬유 조직 형성을 배제할 수 있다.

[0162] 본 발명의 하이드로겔/나노 구조체 조성물은 또한 임의의 내부 장기 또는 외부 장기의 연조직 결손의 치료에 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 물질은 다수의 두개 안면 도포 이외에, 턱 및 뺨의 보강 및 하안검의 안검외반 보수에 사용될 수 있다. 머리와 목 이외의 부위에서 미용 및 재건 목적으로, 예를 들어 유방 확대술을 위한 유방 보형물, 유방의 림프절 제거 후(즉 암으로 인한) 빈 공간을 채우기 위한 상처 밀폐제로 사용하여 림프관을 봉합하고 절제 부위로 유체가 배수가 되어 감염이나 다른 합병증을 일으킬 수 있는 위험을 줄일 수 있다.

[0163] 상기 용도 이외에, 본원에 기술된 하이드로겔/나노 구조 조성물은 연골의 인공 형태의 합성과 관련하여 상술된 유사한 전략 및 방법을 사용하여 뼈, 힘줄, 인대, 반월판 및 추간판을 포함하지만 이에 제한되지 않는 합성 정형 외과 조직을 제조하기 위해 다른 조직 공학 응용에 사용될 수 있다. 상기 하이드로겔/나노 구조체 조성물은 또한 인공 형태의 합성을 위한 상기 기술된 바와 유사한 전략 및 방법을 사용하여 성대, 유리체, 심장 판막, 간, 췌장 및 신장을 포함하는 연골 합성 비 정형 외과(non-orthopaedic) 조직을 제조하는데 사용될 수 있다.

[0164] 본원에 개시된 하이드로겔/나노 구조체 조성물이 사용될 수 있는 또 다른 분야는 복부 또는 위장관의 흉터 조직 또는 협착의 치료 또는 예방이 필요한 위장관 응용 분야에 있다. 임상 및 FDA 승인의 다양한 단계에 이미 많은 제품이 있으며, 이들은 일반적으로 "하이드로겔"이라고 불리며 흉터 및/또는 협착 형성을 치료하고 예방하는데 유용하도록 고안되었다. 본 발명의 물질은 하이드로겔 물질에 지지체, 형태 및 강도를 제공할 수 있는 나노 구조체를 포함할 수 있다는 점에서 다른 공지된 하이드로겔보다 우수하다. 본원에 개시된 하이드로겔/나노 구조체 조성물은 이미 공지된 하이드로겔이 사용되거나 사용되도록 의도된 것과 유사한 용도로 사용될 수 있는데, 예를 들면 위장관의 협착 또는 흉터 치료를 포함한다. 치료는 흉터 예방을 위한 예상되는 협착 부위에 하이드로겔 물질을 주입하거나 협착이 다시 생기는 것을 방지하기 위해 협착된 위장관을 확대하기 위해 치료 후 기존 협착 부위에 주입하는 것을 포함한다.

[0165] 본 발명의 물질은 또한 식도 협착의 치료에 사용될 수 있다. 식도 협착은 위식도 역류 질환(GERD)의 일반적인 합병증이다. 위식도 역류는 산, 담즙 및 기타 해로운 위 내용물이 식도로 환류되어 식도 내벽을 손상시켜 발생

한다. 위식도 역류 질환 환자의 약 7-23%가 식도 협착이나 식도 섬유 성 흉터를 만든다. 식도 흉터는 바렛 식도 (Barrett's esophagus) 치료에 사용되는 절제 요법으로도 발생할 수 있다. 이러한 절제 요법의 주요 합병증은 절제 손상이 식도 벽으로 너무 깊게 확장되어 식도 흉터 또는 협착을 초래한다는 것이다. 식도 협착은 정상적인 삼키는 것을 막고 환자 사망률(patient morbidity)의 주요 원인이다. 본 명세서에 설명 된 재료는 위식도 역류, 바렛 식도 및 식도 절제 요법으로 인한 식도 협착을 치료하거나 예방하는 데 사용할 수 있다.

[0166] 본 발명의 복합 재료는 또한 크론 병의 치료에 사용될 수 있다. 크론 병 (Crohn 's disease)은 장의 관강을 막거나 좁아서 정상적인 장 기능을 방해하는 협착이나 흉터를 유발한다. 본 물질은 이러한 협착을 치료하거나 예방하는데 유용 할 수 있다.

[0167] 상기 복합 재료는 또한 1차 경화성 담관염 (PSC)을 치료하는 방법에 사용될 수 있다. PSC는 간 담관의 드문 질환이다. 상기 담관(bile ducts)은 간 내의 분지 네트워크를 형성하고 총 담관으로 결합되는 두 개의 주요 가지를 통해 간을 빠져 나가 담즙의 간과 쓸개를 배우고 십이지장으로 배출된다. 담관은 직경이 매우 좁아서 가장 큰 말단 부분에서 최대 2mm까지 측정 할 수 있지만 보통 수 리터의 담즙을간에서 십이지장으로 배출해야한다. 이 관이 막히면 황달이라는 심각한 상태가 되어 많은 독소, 특히 헤모글로빈 분해 생성물이 몸에 축적 될 수 있다. PSC는 간과 소장을 연결하는 위에서 언급한 간 내의 및 간 외의 담관의 흉터 또는 구조 질환이다. PSC의 담관 협착은 본 발명의 하이드로겔/나노 구조체 조성물로 치료 또는 예방 될 수 있다.

[0168] 본 발명의 복합 재료는 또한 만성 췌장염의 치료에 사용될 수 있다. 만성 췌장염은 췌장의 만성 염증성 질환으로 췌장의 흉터 또는 협착으로 인해 복잡해질 수 있다. 이러한 협착(bile duct strictures)은 췌장액의 배액을 차단하는데, 췌장액은 일반적으로 췌장 시스템을 통해 췌장을 빠져 나와 소장으로 배출되어야 한다. 췌장에는 많은 소화 효소와 정상적인 소화 및 영양소 흡수에 중요한 다른 요소가 포함되어 있다. 만성 췌장염으로 인한 췌관의 막힘 또는 협착은 췌장 자가분해(pancreas autodigests)가 일어나고 생명을 위협하는 복부 감염 및 농양을 형성하는 중대한 합병증을 초래할 수 있다. 이러한 만성 췌장염의 췌장 협착은 본 발명의 하이드로겔로 치료 또는 예방 될 수 있다.

[0169] 본 명세서에 기술 된 조성물은 또한 담석 유발성 담관 및 췌장 관저 협착의 치료에 사용될 수 있다. 담석은 매우 흔한 질환으로, 담즙관과 췌장관의 협착이 주요 합병증으로 하이드로 겔로 치료하거나 예방할 수 있다. 허혈성 장 질환 치료용. 창자는 혈액 공급이 원활하지 않을 때 상처나 협착이 생기기 쉽다. 손상된 혈류 (Compromised blood flow)는 허혈이라고 불리며 심혈관 질환, 죽상 동맥 경화증, 저혈압, 저혈당증, 신장 또는 간 질환으로 유발되는 저 알부민 혈증, 혈관염, 약물 유발 질환 및 기타 많은 병리학으로 인해 발생할 수 있다. 이러한 모든 병인의 최종 결과는 창자를 차단하고 정상적인 기능을 방해하는 장 협착을 초래할 수 있다. 본 발명의 하이드로겔/나노 구조체 복합체는 허혈성 장 협착을 치료 또는 예방하는데 사용될 수 있다.

[0170] 본 발명의 조성물은 또한 방사선-유도 된 장 협착의 치료에 사용될 수 있다. 암에 대한 방사선 요법은 수많은 병적 상태와 관련이 있으며, 특히 중요한 것은 장 협착의 형성이다. 본 발명의 하이드로겔 복합체는 방사선에 의해 유발 된 장 협착을 치료 또는 예방하는데 사용될 수 있다.

[0171] 합성 조직을 제조하거나 천연 조직을 수리하는 것 이외에, 본 명세서에 개시된 하이드로겔/나노 구조체 복합체는 또한 외과용 기구와 같은 생체 내 이식을 위해 수술 또는 기타에서 사용되는 세라믹 또는 금속 보철과 같은 비 생물학적 구조물 또는 장치용 코팅을 제공하는데 사용될 수 있다. 이러한 코팅은 비-생물학적 장치 재료와 살아있는 조직 사이에 장벽을 제공 할 것이다. 비 생물학적 장치의 장벽으로서의 하이드로 겔의 역할에는 다음과 같은 것들이 포함 되나 이에 국한되지는 않는다: 1) 비 생물학적 장치의 표면에서 단백질 파울링 또는 혈전증을 유발할 수 있는 거대 분자 및/또는 세포의 흡수 방지; 2) 비 생물학적으로 양립가능한(compatible) 물질로 만들어진 장치에 대한 비독성, 비염증성, 비면역원성, 생물학적으로 양립가능한 표면의 제시; 3) 포도당 센서에 대한 포도당의 확산, 압력 센서에 대한 기계적 힘의 전달 또는 혈관 이식편 또는 스텐트의 내피화와 같은 장치 기능과의 양립가능성; 4) MEMS 기반의 인공 네프론에서 기존 크기의 장벽에 전하 장벽을 제공하는 것과 같은 장치 기능의 향상; 5) 생리 학적으로 적합한 수용성 환경 내에 포획 된 생존 가능한 세포 집단의 비 생물학적 장치로의 통합; 및 6) 성장 인자, 항 바이러스제, 항생제 또는 장치의 혈관 형성, 상피화 또는 내피화를 촉진하도록 고안된 부착 분자와 같은 약물 또는 생체 활성 인자의 내포를 포함한다.

[0172] 전술한 내용에 기초하여, 본 발명의 하이드로겔/나노 구조체 복합체는 당뇨병 관리 용 이식형 포도당 센서를 포함하는 다양한 이식 가능한 장치에 비 알레르기성 코팅을 제공하는데 사용될 수 있다. 또한, 하이드로겔/나노 구조 합성물은 다음을 제공하는데 사용될 수 있다: MEMS 기반 인공 네프론의 개발을 위한 전하 장벽; 족세포 (podocytes)와 같은 내장된 신장 세포가 MEMS 기반의 인공 네프론 디자인에 통합 될 수있는 생리 학적으로 적합

한 수계 환경; 및 약물 전달, 기계적 감지 및 생체 감지 시스템을 포함하는 다양한 목적으로 설계된 이식 가능한 MEMS 장치용 코팅을 포함한다.

- [0173] 개시된 하이드로겔/나노 구조체 복합체, 특히 히알루론산 기반 하이드로겔은 또한 실리콘 기반 장치, 예를 들어 실리콘 기반 장치에 히드록시 페닐 코팅된 표면 화학을 제공하기 위해 티라민의 1 급 아민을 실리콘 표면에 최초로 공유 결합시킴으로써 공유 결합 될 수 있다. 이것은 자유 아민으로 변형 된 DNA를 실리콘 표면에 결합시키는 데 사용되는 것과 동일한 화학 작용을 사용할 수 있다. 그 다음 HA-기초 히드로 겔은 전술한 바람직한 가교 결합 방식에서 사용된 동일한 과산화물 구동 화합물에 의해 히드록시 페닐 코팅 된 표면에 공유 결합된다.
- [0174] 하이드로겔/나노 구조 복합체는 또한 카테터, 스텐트 및 혈관 이식편과 같은 비 생물학적 심혈관 기기 코팅에 사용될 수 있다. 여기에는 생물학적 비호환성(incompatibility) 재료로 제조되기 때문에 통상적으로 사용되지 않지만 현재 사용 중인 장치에 비해 우수한 디자인 특성을 갖는 우수한 디자인을 갖는 장치가 포함된다. 생리 활성 인자가 하이드로겔의 내피 또는 상피화를 촉진하기 위해 하이드로겔에 통합 될 수 있으며, 따라서 이식 된 장치의 상피화를 촉진 할 수 있다.
- [0175] 본 발명의 하이드로겔/나노 구조체 복합체의 특정 예 및 용도가 본 명세서에 기재되어 있지만, 이러한 특정 용도로 제한하려는 것이 아니다. 본 발명의 하이드로겔/나노 구조체 복합체는 공지된 하이드로겔에 대해 일반적으로 사용되는 임의의 응용에 사용될 수 있으며, 특히 신체의 어느 곳에서나 연조직의 수리 및/또는 재생에 유용하다.
- [0176] 유사한 도면 부호가 본 명세서의 유사한 구조적 특징 또는 양상을 나타내는 도면을 참조 할 수 있다. 제한이 아닌 설명 및 예시의 목적으로, 본 발명에 따른 생분해성 복합 재료의 실시 양태에 대한 도해가 도 1에 도시되어 있다. 본원에 기재된 시스템 및 방법은 연조직 결손의 치유를 향상시키는데 사용될 수 있다.
- [0177] 일반적으로 도 1 및 도 2를 참조하면, 도 1a 내지 도 1d에 도시 된 바와 같이, 생분해성 복합 재료(100)는 겔(103)과 나노 섬유(101)의 장점을 결합한 나노 섬유(101) 보강 겔(103)을 포함 할 수 있다. 겔(103)은 하이드로겔(이에 제한되지 않음)과 같은 임의의 적합한 물질을 포함 할 수 있다. 나노 섬유(101)는 임의의 적합한 나노 물질, 예를 들어 폴리카프로 락톤(PCL) 또는 임의의 다른 적합한 물질로 제조 될 수 있으며, 임의의 적합한 형상 및/또는 크기를 취할 수 있다. 복합 재료(100)는 (예컨대, 완전성 및 조직 지지체를 유지하기 위해) 충분한 기계적 성질을 유지하면서 높은 다공성 (예를 들어, 세포 집착 및 이동을 조정)을 포함한다.
- [0178] 적어도 일부 구현시 예에서, 나노 섬유(101)는 하나 이상의 중합체 사슬을 형성하는 하이드로겔(103)에 공유 결합된다. 하이드로겔(103)을 나노 섬유(101)에 공유 결합시키는 것은 단독으로 또는 단순한 블렌드로서 사용되는 구성 물질보다 이상적인 특성의 결합 세트를 갖는 물질을 초래할 수 있다.
- [0179] 도 2a는 도 1의 복합체의 구현 예의 응력-변형 곡선을 도시한다. 1은 HA 하이드로 겔 단독에 대해 플롯팅되어, 동일한 가교 결합 밀도에서 하이드로겔에 비해 향상된 탄성 모듈러스를 나타낸다. 도시된 바와 같이, 복합 재료 100(4.5mg/ml HA, 10mg/ml PEG-DA, 6.75mg/ml PCL 섬유)의 탄성률은 750 Pa였고, 동일한 밀도에서 하이드로겔 단독은 320Pa였다 도 2b는 도 1에 도시 된 복합 재료의 피로(fatigue) 시험을 나타내는 것을 도시한다. 도 1은 일반적인 하이드로겔에 비해 기계적 온건성의 견고함이 비슷한 정도를 유지한다
- [0180] 도 3a-3b에서, 복합 재료(100)는 지방 조직 유래 줄기 세포(ASC)의 이동을 지지하는 것으로 나타났다. 지방 흡입된 흡인물에서 GFP로 표지된 ASC는 회전 타원체로 성장한 다음 복합 재료 또는 하이드로겔로 씨드(seed)되었다.
- [0181] 도 3A 및 3B는 4일 동안 나노 섬유-HA 하이드로겔 복합체에서 배양 된 ASC의 위상 콘트라스트 이미지(도 3B)와 형광 및 오버레이(도 3A)를 도시한다. 세포는 확장된 긴 경로와 궤적으로 바깥쪽으로 이동했다. 대조적으로, HA는 도 3c 및 도 3d에 도시 된 바와 같이 HA 하이드로겔 단독으로 배양된 ASCs는 현저한 세포 이동을 나타내지 않았다.
- [0182] 도 4a 및 도 4b는 정렬된 650 nm 나노 섬유(101)를 따라 회전 타원체로부터 이동하는 ASC를 대조하는 위상 콘트라스트 이미지(도 4b)를 갖는 형광 이미지 및 오버레이(도 4a)를 도시하며, 나노 섬유(101)의 존재에 대한 그들의 강한 이동 반응을 나타낸다.
- [0183] 실시예 1: 나노 섬유 - 하이드로겔 복합재료의 제조.
- [0184] 나노 섬유는 PCL(폴리카프로락톤, Sigma Aldrich의 80k)을 전기 방사하여 제조되었다. 나노 섬유는 무작위 메쉬(random mesh)로 방사되었다. 방사 파라미터는 90%/1%w/w DCM-DMF중의 PCL의 10%wt 용액으로 표적 금속 플레이

트로부터 15cm 떨어진 27 게이지 블런트 니들(gauge blunt needle)을 통해 0.6ml/hr의 유속에서 수행하였다. 니들 전압은 + 10kV이고, 표적 플레이트는 -3kV의 전압으로 음성으로 바이어스되었다. 회 당 1mL의 용액을 방사시켰다.

- [0185] 이후 섬유는 다단계 공정으로 기능화된다. 간단히 말하면, 섬유는 섬유 표면 상에 작용기를 갖도록 플라즈마 처리되고, 여기에 아크릴산이 UV 광중합개시에 의해 컨쥬게이트 된다. 이후 아크릴레이팅기는 1 차 아민을 형성하기 위해 EDC 및 디아지민(diazimine)과 반응시킨다. 이후, 이들 아민을 하이드로겔 내의 티올기와 쉽게 반응할 수 있는 말레이미드 그룹에 부착시키기 위해 SMCC와 반응시킬 수 있다.
- [0186] 상기 기능화 된 섬유 메쉬는 60mg 또는 이하의 섹션(section)으로 절단되었다. 60mg의 샘플을 에탄올에 담긴 다음 액체 질소로 부분적으로 채워진 세라믹 모르타르(mortar)에 첨가하였다. 섬유 샘플은 매우 견고(rigid)해질 것이다. 견고성을 유지할 수 있도록 상기 샘플을 충분히 냉각시킨 상태에서, 상기 섬유 시트는 가위로 5mmx5mm 섹션으로 절단되었다. 전체 시트가 절단되었을 때, 섬유는 액체 질소로 부분적으로 가득 채워진 모르타르와 폐슬(pestle)로 약 20 분 동안 분쇄되었다. 이후 상기 섬유 슬러리를 에탄올에 붓는다. 섬유질 엉힘(entanglement)을 방지하기 위해 ~ 1mg의 계면 활성제가 슬러리에 첨가되었다. 상기 현탁액을 300G에서 수 분 동안 원심 분리하고 상등액은 버려진다. 상기 섬유를 밤새 건조된다. 이후 섬유를 정밀한 농도의 섬유가 현탁될 수 있도록 2차 원심분리 튜브에 계량한다. 상기 섬유는 에탄올에 담가서 살균하고, 원심 분리하여, 상등액을 버리고 생안전성(biosafety) 캐비닛에서 하룻밤 된다. 이후 상기 섬유는 일반적으로 15mg/mL인, 원하는 농도로 탈이온수에서 재현탁시킬 수 있다.
- [0187] 하이드로겔 복합재료를 형성하기 위해 섬유 현탁액 1 mL를 사용하여 글리코 실 히알루론산 1 바이알을 재수화시켜, 15mg/mL 섬유 및 10mg/mL 히알루론산을 제조한다. 이 용액 900 μ L에 최종 농도가 13.6mg/mL 섬유, 9mg/mL 히알루론산 및 10mg/mL PEG-DA가 되도록, 10% PEG-DA 원액 100 μ L를 첨가한다. 이것은 최초의 생체 내 실시예에 대한 조제이지만, 다른 조제는 성분 농도를 변화시킴으로써 제조되었다.
- [0188] 생성 된 복합재료는 섬유가 없는 투명한 하이드로겔과는 반대로 유백색이었다(도 1c). 복합 겔은 형태를 유지하고 취급성이 좋은 반면, 하이드로겔 단독 군은 파단되기 쉬웠다. 하이드로겔 내의 섬유는 수십 마이크로에서 수백 마이크로의 길이로 분산되어 있었다(도 1B). 절단, 동결 건조(lyophilized)된 샘플 복합재료 단면의 SEM 이미지는 분산된 섬유의 고밀도뿐만 아니라 섬유와 하이드로겔 성분 사이의 밀접한 관계를 보여준다(도 1d).
- [0189] 재료 및 방법
- [0190] 재료
- [0191] 티올레이티드(Thiolated) 히알루론산(HA)은 ESI BIO (Alameda, CA)에서 구입하였다. 폴리(에틸렌 글리콜)디아크릴 레이트는 Laysan Bio, Inc (Arab, AL)로부터 구입하였다. 이하는 Sigma 에서 구입하였다; 폴리(e-카프로락톤), 에틸아미노-말레이미드, 아크릴산, 톨루이딘블루 0, N-히드록시석신이미드 (NHS), 시스테인, 소 혈청 알부민 (BSA), 아세트산 및 Triton TM X-100. Dulbecco 수정 이글 배지(DMEM), 태아 소 혈청(FBS), 페니실린/스트렙토마이신, Alexa Fluor[®] 568 Phalloidin 및 4',6-다이아미디오-2-페닐리돌(DAPI)는 Invitrogen Life Technologies에서 구입하였다. 에틸(디메틸아미노프로필)카르보디이미드(EDC)는 AnaSpec, Inc. (Fremont, CA)로부터 입수 하였다. 모든 다른 화학 물질 및 시약은 분석용 등급(analytical grades)이었다.
- [0192] 방법
- [0193] 레올로지 실험을위한 PCL 나노 섬유의 전기방사:
- [0194] 두 가지 다른 직경의 PCL 섬유를 제조하기 위해, 디클로로메탄과 디메틸포름아미드(9:1, v/v)의 혼합물 및 클로로포름과 메탄올의 혼합물(3:1, v/v)내 11.0 및 8.5(w/v) PCL 용액을 제조하였다. 각각의 균일한 PCL 용액에 27 G의 금속 니들을 가진 주사기에 장입하였다. 이후, 전기 방사를 다음의 파라미터로 수행하였다; 공급 속도 1.0ml/h, 금속 니들에 15 kV의 양의 전압 인가 및 바닥과 니들 끝 사이의 거리 12cm. 섬유의 모폴로지(morphology)는 전계방출주사전자 현미경(FESEM, JEOL 6700F)을 사용하여 관찰하였고, ImageJ software(US National Institutes of Health, Bethesda, MD)를 사용하여 FESEM 이미지로 섬유 직경을 측정하였다.
- [0195] 생체 내 복합재료를 위한 전기방사 :
- [0196] 방사 조건: 디클로로메탄 및 디메틸포름아미드(9:1,w/w)의 용매 혼합물 중 16%w/vPCL (95% 45.000 MnPCL, 5% 80,000 Mn PCL, 모두 Sigma로부터 구입). 상기 섬유는 1000rpm으로 회전하는 접지된 휠의 표면으로부터 10cm 떨어진

여져있는 27 게이지 니들을 통해 5.25ml/hr의 속도로 방사되었다. 인가된 전압은 15kV 였고 전기방사 펌프는 2mm/초 (약 4 시간)에서 앞뒤로 가로 질러 140회 통과하는 동안 85mm 이동 거리를 움직였다. 이후 상기 섬유 시트는 기능화를 위해 직경 14cm의 개별 시트로 절단했다.

[0197] MAL로 표면 기능화된 섬유의 제조:

[0198] MAL로 섬유 표면을 기능화하기 위해 사소한 변경을 한 문헌[Interface Focus 2011, 1, 725-733]을 따라 폴리(아크릴산)(PAA) 그래프트에 의해 섬유 표면에 카르복실기가 유도되었다. 간단히 말하면, 섬유는 섬유 표면에 자유 라디칼을 유도하기 위해 280 mmHg에서 산소 분위기로 실온에서 10분 동안 플라즈마 처리된다. 이후 0.5 mM NaIO₃ 내 3 또는 10%(v/v) 아크릴산 용액 10 ml 내의 섬유 70 mg을 섬유 표면에 PAA의 광중합(PAA- 섬유)을 위해 UV (36mW/cm², DYMAX Light Curing Systems 5000 Flood, Torrington, CT)에 90 초 동안 노출시켰다. 실온에서 20분 동안 PAA-섬유를 인큐베이션한 후, PAA-섬유를 20ml의 탈이온수로 3 회 세척하여 미반응 아크릴산을 제거 하였다. PAA-섬유를 완전히 공기 건조(air-drying)시킨 후, TBA가 섬유상의 카르복실기와 1:1의 몰비로 상호 작용한다는 가정하에 톨루이딘 블루 0 (TBO) 분석에 의해 PAA-섬유상의 카르복실기 밀도를 측정 하였다 [J Biomed Mater Res 2003, 67, 1093-1104]. 간단히 말하면, PAA 섬유(1x1 cm²)를 50%(v/v) 에탄올 20 μl에 적신 후, 0.1 mM NaOH (pH 10)의 0.5 mM TBO 용액에 완전히 담갔다가 부드럽게 흔들어 주면서 실온에서 5 시간동안 반응시켰다. 0.1 mM NaOH (pH 10)로 세척 한 후, 50%(v/v) 아세트산 1 ml를 사용하여 PAA 섬유의 표면에 흡수된 TBO를 제거하고, 실온에서 1시간 동안 격렬히 흔들었다. 이어서 상등액의 광학 밀도를 microplate reader(BioTeck Synergy2, Winooski, VT)를 사용하여 633 nm에서 측정 하였다. TBO 50%(v/v) 아세트산을 표준 용액으로 사용하였다.

[0199] PAA-섬유는 섬유 절편을 제조하기 위해 cryogenic mill(Freezer/Mill 6770, SPEX SamplePrep, Metuchen, NJ)을 사용하여 이하의 파라미터로 분쇄하였다; 밀링을 위한 1분 및 액체 질소 냉각을 위한 3분의 10 사이클, PAA 섬유 조각을 50 ml 코니칼 튜브에 수집한 후, PAA 섬유 조각을 이소프로필알콜과 증류수(1:1, v/v)의 혼합물 10 ml에 완전히 분산시켜, 섬유 표면에 아미노에틸-MAL을 갖도록 변형시켰다. 간단하게 말하면, PAA-섬유에 NHS 및 EDC를 첨가하여 섬유상의 PAA의 카르복실기를 활성화시켰다. NHS 및 EDC에 대한 카르복실기의 몰비는 각각 1 내지 4 및 4였다. 활성화는 실온에서 부드럽게 흔들어서 수행 하였다. 1 시간 후, 아미노에틸-MAL을 아미노에틸-MAL에 대해 카르복실기의 1 내지 2의 몰비로 카르복실기 활성화된 섬유에 첨가하였다. 이후, 반응은 실온에서 12 시간 동안 부드럽게 흔들어서 수행하였다. MAL로 표면 기능화 된 섬유는 증류수로 3 회 세척한 후 동결 건조시켰다. 여기서, 섬유상의 MAL의 밀도는 섬유 표면상의 모든 카르복실기가 MAL로 완전히 치환되었다고 가정한 것이다.

[0200] 섬유-HA 하이드로겔 복합 재료의 제조:

[0201] 섬유-HA 하이드로겔 복합재료를 제조하기 위해, 티올레이티드 HA 및 PEGDA를 PBS(pH 7.4)에 각각 12.5mg/mL 및 100mg/mL의 원하는 농도로 완전히 용해시켰다. 원하는 농도가 25 mg/mL 인 MAL 섬유를 PBS(pH 7.4)에 완전히 분산시켰다. 이후 나노 섬유, HA, PEG-DA 및 PBS의 현탁액을 조제의 원하는 최종 농도에 도달하도록 연속하여 첨가하였다. 유동학적(rheological) 연구를 위해, 복합 재료 전구체 용액을 균질하게 혼합하고, 복합 전구체 용액 100 μL를 몰드 (φ=8 mm)에 붓고 겔화를 위해 37°C 에서 2 시간 동안 배양하였다. 압축 연구(compression studies)를 위해 200 μL의 전구체 용액을 원통형 테프론 몰드(φ = 6.35 mm, h = 6.35 mm)에 넣고 위와 같이 배양하였다. FESEM을 사용하여 섬유-HA 하이드로겔 복합재료와 HA 하이드로겔의 단면 morphology를 관찰하기 위해, 임계점 건조(Samdri-795, Tousimis, Rockville, MD) 또는 화학 건조 (HDMS)하기 전에 복합재료와 HA 하이드로겔을 연속하여 에탄올 세척 (50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % 및 100 % 에탄올)하였다. 시료는 내부 기공 구조를 밝히기 위해 액체 질소에서 동결 파쇄되었다. 상기 구조는 백금 (Hummer 6.2 Sputter System, Anatech UDA, Hayward, CA)의 10 nm 층으로 스퍼터 코팅 한 다음, 전계 방출 SEM (JEOL 6700F, Tokyo Japan)을 사용하여 이미지화하였다.

[0202] 동물 생체 내 연구를 위한 복합재료의 제조. 티올레이티드 HA를 PBS 중에서 12.5mg/mL로 재구성 하였다. PEG-DA를 PBS에서 100mg/mL로 용해시켰다. MAL 섬유는 살균된 PBS에서 25mg/mL로 재현탁시켰다. 섬유를 먼저 HA 용액과 혼합하고 10 분 동안 반응시킨 후 원하는 최종 농도를 얻기 위해 PEG-DA와 혼합하였다. 이후, 상기 현탁액을 즉시 피펫으로, 직경 11.125 mm 및 높이 3 mm의 생체 시료용 원통형 몰드로 300 μL의 원통형 테프론 몰드 (McMaster-Carr, Robbinsville, NJ)에 넣었다. 이후 상기 겔을 겔화하기 위해 밤새 37°C 배양기에 넣었다.

[0203] 섬유에 대한 HA의 티올기 및 섬유상 MAL 사이의 계면 결합의 효과를 확인하기 위해, 켄칭된 섬유-HA 하이드로겔

복합재료를 제조하기 위해 시스테인을 사용하여 섬유상의 MAL을 토크시켰다. 간단히 말하면, 1mg의 섬유를 PBS (pH 8.0) 중의 시스테인 용액 1ml에 분산시키고, MAL 대 시스테인의 물 비는 1 내지 2였다. 12 시간 동안 실온에서 완만하게 흔들어 MAL을 토크시킨 후, MAL-토크 섬유를 증류수 1ml로 5 회 세척하여 미반응 시스테인을 제거하고 동결 건조시켰다.

[0204] 섬유-HA 하이드로겔 복합 재료의 기계적 특성:

[0205] 압축 실험. 하이드로겔 전구체 현탁액을 압축 테스트를 위해 직경 6.35 mm 및 높이 6.35 mm의 원통형 몰드에 200 μ L를 넣은 원통형 테프론 몰드 (McMaster-Carr, Robbinsville, NJ)에 피펫팅했다. 이후 상기 겔을 밤새 겔화하기 위해 37 °C 배양기에 넣었다. 겔을 몰드에서 꺼내어, Endura TEC mechanical tester 9ELF 3200 Series, BOSE ElectroForce, Eden Prairie, MN)를 사용하여 2 개의 평행한 플레이트 사이의 일축 압축을 통해 즉시 테스트하였다. 상기 샘플을 10%에서 20% 변형까지의 응력-변형 곡선의 선형 부분의 기울기로부터 결정된 탄성 모듈러스로 50% 변형까지 압축 하였다. 상기 샘플을 각각 3회 시험하고 평균 압축 탄성 모듈러스를 결정하기 위해 그룹당 3개의 샘플을 시험하였다. 재수화 된 섬유-HA 하이드로겔 복합재료의 압축 모듈러스를 측정하기 위해, 복합재료를 동결 건조시키고 37 에서 24 시간 동안 PBS (pH 7.4) 1ml로 재수화 하였다. 피로 시험(fatigue-test)의 경우 압축 샘플을 0.1Hz에서 0%에서 25%까지 반복하여 변형 시켰다.

[0206] 레올로지컬 실험. 다양한 섬유-HA 복합재료의 전단 저장 모듈러스(G')는 평행판 ($\phi=8\text{mm}$)을 갖는 진동 레오 미터(oscillating rheometer)(ARES-G2 Rheometer, TA Instruments, New Castle, DE)를 사용하여 측정되었다. 진동 주파수 스위프(Oscillatory frequency sweep)은 10%의 일정한 변형률로 1Hz에서 10Hz까지 G' 의 변화를 관찰하기 위해 사용되었다.

[0207] 섬유 -HA 하이드로겔 복합재료에서 hASC의 이동 :

[0208] 인간의 지방 유래 줄기 세포(hASCs)를 FBS 10%, 페니실린/스트렙토 마이신 1% 및 bFGF 1ng/ml를 함유하는 고 포도당(glucose) DMEM에서 배양하였다. 최적의 배양을 위해 매주 3 회, 배양액을 교환하였다. hASC 스페로이드(spheroid)를 제조하기 위해 casted micro-molded agarose gel(MicroTissues® 3D Petri Dish® micro-mold spheroids, 96-holes)에 50 μ L의 hASC 용액(5.6×10^5 cells / ml)을 넣고, 37 에서 24 시간 동안 부드럽게 흔들었다.

[0209] HA 및 PEGDA는 완충액 (pH 7.4)에 완전히 용해하였고, 최종 농도는 4.5 및 2.5 mg / ml HA 및 5.0 mg / ml PEGDA였다. 50 % (v / v) 에탄올 20 μ L로 미리 적신 섬유를 10.0mg / ml의 최종 농도로 PEGDA에 완전히 분산시킨 다음, HA를 섬유와 PEGDA의 혼합물에 첨가하였다. 30 μ L의 복합 재료 전구체 용액을 96- 웰 조직 배양 플레이트의 각 웰에 붓고 조직 배양 플레이트 표면상의 hASCs 스페 로이드에 도달하는 것을 피하기 위해 37 에서 1 시간 동안 가교 결합시켰다. 이어서, 3 ~ 5 개의 hASCs 회전타원체(spheroids)가 포함 된 복합 전구체 용액 50 μ L를 각 웰에 부었다. 37 에서 1 시간 가교 결합시킨 후, 200 μ L의 신선한 배지를 각 웰에 첨가하고 배지를 며칠마다 교환하였다. 복합재료 내부의 회전타원체에서 hASCs 마이그레이션 된 세포를 관찰하기 위해, FAS - 굴지와 hASCs의 핵은 각각 Alexa Flour® 568 Phalloidin과 DAPI로 염색되었다. 간단히 말해서, 배양 4 일 후, hASCs 회전 타원체를 갖는 복합재료를 100 % 4 % (v / v) 파라포름아미드로 실온에서 하룻밤 동안 고정시켰다. 그런 다음 PBS (pH 7.4)로 3 번 세척 한 후, 복합재료를 밤새 4 ° C에서 비특이적인 염색을 억제하기 위해 1 % (w / v) BSA 100 μ L와 PBS로 인큐베이션하고 PBS로 세 번 세척하였다. 이어서, 복합재료를 실온에서 1 시간 동안 PBS 중의 0.1 % (v / v) 트리톤 -X100 100 μ L와 함께 인큐베이션 하였다. PBS로 3 회 세척 한 후 160 nM Alexa Fluor® 568 Phalloidin 100 μ L를 각 복합재료에 첨가하고 실온에서 4 시간 동안 배양했다. 그런 다음, 상등액을 제거한 후, 복합재료를 0.5 μ g / ml DAPI 100 μ L와 함께 실온에서 1 시간 동안 배양했다. PBS로 3 번 세척 한 후, 이동 된 hASC를 공 촛점 레이저 스캐닝 현미경 (CLSM, Carl Zeiss LSM780, Germany)을 사용하여 관찰 하였다. 561 nm와 em. Alexa Fluor® 568 Phalloidin의 경우 570-600 nm. 405 nm 및 em. DAPI는 385-420 nm이다.

[0210] 생체 내 섬유 - 하이드로겔 복합재료의 성능 :

[0211] 티올레이트 처리 된 HA는 PBS 중에서 12.5mg / mL로 재구성되었다. PEG-DA를 PBS에서 100mg / mL로 용해시켰다. MAL 섬유는 멸균 PBS에서 25mg / mL로 재현탁시켰다. 섬유를 먼저 HA 용액과 혼합하고 10 분 동안 반응시킨 후 원하는 최종 농도를 얻기 위해 PEG-DA와 혼합하였다. 그런 다음 현탁액을 직경이 11.125mm이고 높이가 3mm 인 원통형 몰드에 300 μ L와 함께 원통형 테프론 몰드 (McMaster-Carr, NB Robbinsville, NJ)에 즉시 피펫팅(pipetted) 했다. 그 다음 겔을 밤새 겔화 하기 위해 37°C 배양기에 넣었다. 2 가지 조제가 지방 조직의

2kPa 강성과 일치하도록 선택되었다. HA- 단독 배합물은 10mg / mL PEG-DA 및 9mg / mL HA-SH이었고, HA- 섬유 복합 제제는 5mg / mL PEG-DA, 5mg / mL HA-SH 및 12.5mg / mL 분산 나노 섬유였다.

[0212] 복합 나노 물질 지지체의 생체 적합성을 연구하기 위해, Sprague-Dawley 쥐의 사타구니 지방 패드(pad) 아래에 이식하고 다양한 길이의 시간 동안 관찰했다. 휘발성 마취(volatile anesthesia) 하에서 1cm 절개가 사타구니 주름 바로 옆에 만들어졌다. 피하 조직의 무딘 절개 후, 사타구니 지방 패드가 노출되었다. 그것은 전기 소작기를 사용하여 피딩 베슬(feeding vessels)을 조심스럽게 보존하면서 세심한 지혈과 함께 상승되었다. 스캐폴드는 동물의 오른쪽에 있는 지방 패드 아래에 이식되었다. 왼쪽은 임플란트를 받지 않았고 가짜 수술 컨트롤(sham surgery control)로 사용되었다. 양측은 표준 계층화 된 방식으로 폐쇄되었다. 동물은 7, 14, 30, 90 일 동안 관찰되었다. 수집 시점에서 동물을 희생시키고 스캐폴드가 있거나 없는 사타구니 지방 패드를 4 % PFA에 노출시키고 고정시켰다. 표준 헤마톡실린 및 에오신 염색을 위해 표본을 매립하고 절편화 하였다.

[0213] 통계 분석

[0214] 모든 결과는 평균값과 표준 편차로 표현된다. 한 쌍의 그룹 사이의 통계적 유의성은 SigmaPlot 12.0 소프트웨어 (SPSS)로 일원 분산 분석 (One Way ANOVA)을 수행하여 결정된다. $p < 0.05$ 의 값은 통계적으로 유의하다고 간주되었다.

[0215] 본 명세서에 개시된 복합재료 (100)의 실시 양태를 제조하기 위한 임의의 다른 적합한 방법이 본원에서 고려된다.

[0216] 실시예 2: 나노 섬유 - 하이드로겔 복합재료의 압축 시험.

[0217] 압축 시험을 위해 섬유 - 하이드로겔 샘플을 직경 8.5mm, 높이 4mm의 원통형으로 성형하여 37°C의 금형에 하룻밤 놓아두었다. 탄성 계수는 Bose EnduraTEC ELF 3200 (Eden Prairie, MN)으로 압축 시험을 통해 결정 하였다. 샘플은 50 % 변형으로 압축 된 두 개의 평행 판 사이에서 일축 압축을 받았다. 탄성 계수는 초기 직선 영역의 기울기를 측정하여 결정되었다. 섬유가 있거나 없는 동일한 하이드로겔 제제로 2 개의 샘플 그룹을 시험 하였다. 하이드로 겔 - 전용 샘플은 4.5mg / mL의 티올화 히알루론산 (Glycosan Glycosil) 및 10mg / mL PEG-DA (폴리에틸글리콜 디아크릴레이트, 분자량 3350)로 형성되었다. 섬유 - 하이드로겔 복합재료 그룹은 동일한 하이드로겔 농도를 가졌지만 부가적으로 티올레이트 처리된 히알루 론산과 쉽게 반응 할 수있는 말레이미드 그룹으로 표면 처리 된 표면을 갖는 6.75mg / mL의 PCL 나노 섬유를 갖는다.

[0218] 대표적인 응력 - 변형률 흔적(trace)는 Fig. 2A.에서 확인할 수 있다. 하이드로겔 - 전용 그룹은 320 Pa의 탄성 계수를 가졌지만, 섬유 - 하이드로겔 복합재료는 750 Pa의 높은 모듈러스를 가졌다. 섬유 - 하이드로겔 복합재료의 증가 된 강성은 모든 변형률 값에서 높은 응력 값으로 확인할 수 있다. 기능화 된 나노 섬유의 존재는 재료의 강도 및 강성을 크게 증가시켰다. 따라서, 복합재의 전체 구조는 표적 조직과 일치하는 강성을 가질 수 있지만, 나노 섬유의 혜택 없는 하이드로겔 성분은 동일한 강성을 달성하는 데 필요한 밀도보다 낮은 가교 결합 밀도를 가질 수 있다. 이것은 주어진 임플란트 강성에 대해 더 나은 세포 반응을 가져온다.

[0219] 그 후, 샘플 그룹을 0.1Hz에서 25 % 변형 (20 사이클)으로 반복 압축하여 시험 하였다. 대표적인 흔적을 Fig. 2B.에서 확인할 수 있다. 이는 하이드로겔 및 복합 재료가 반복적인 압축을 견딜 수 있으며, 복합 재료가 섬유가 없는 그룹보다 지속적으로 강경하다는 것을 보여준다.

[0220] 실시예 3: 세포 - 물질 상호 작용.

[0221] 복합 하이드로겔에 대한 세포 반응을 시험하기 위해, 지방 유래 줄기 세포 (ASC)의 이동 가능성을 섬유를 포함 하거나 포함하지 않는 하이드로겔의 다양한 제형에서 시험 하였다.

[0222] ASCs는 트랜스펙션되어(transfected) GFP를 표현하도록 하였고, Microtissues 금형에 의해 만들어진 알지네이트 주형에 하룻밤 세포를 시딩하여 회전 타원체 클러스터로 형성하였다. 세포는 회전 타원체 가 이동 세포를 쉽게 측정 할 수있는 구별 포인트(distinct point) 공급원이기 때문에 세포 운동성을 더 잘 평가하기 위해 회전 타원체로 시딩(seeded)되었다. 회전 타원체는 96- 웰 플레이트로 피펫팅되기 전에 하이드로겔에 혼합되어 세팅되었다. 세포는 다음 며칠 동안 이미징되어 그들의 이동을 관찰하였다. 각각 증가하는 공극 크기로 인해 히알루론산과 PEG-DA의 농도가 낮아짐에 따라 세포는 점진적으로 더 이동할 수 있었다. 동일한 하이드로겔 밀도 (4.5 mg / mL 히알루 론산 및 2.5 mg / mL PEG-DA)에서, 세포는 분산 나노 섬유 (12 mg / mL,도 3A 및 3B)를 갖는 샘플에서 갖지 않는 샘플(도 3c 및도 3d)에 비해 보다 잘 이동할 수 있었다. 이것은 기능화 된 나노 섬유의 존재가 나노 섬유의 기계적 특성을 향상 시켰을뿐만 아니라 세포 이동을 개선하는 데 도움이 될 수 있음을 나타낸다.

- [0223] ASC가 나노 섬유에 의해 강하게 영향을 받았다는 것을 명확히 증명하기 위해 ASC 회전 타원체(spheroids)는 하이드로겔 없이 정렬된 나노 섬유 시트에서 배양되었다. 96 시간 후에, 세포 (도 3C 및 3D의 녹색)는 정렬된 나노 섬유의 동일 축을 따라 회전 타원체 밖으로 명확하게 이동했다 (도 3D에 도시 됨).
- [0224] 실시 예 4 : 나노 섬유 - 하이드로겔 복합재료의 조직 적합성.
- [0225] 복합 재료 나노 물질 스펙폴드의 생체 적합성을 연구하기 위해, 이들을 Sprague-Dawley 쥐의 사타구니 지방 패드 아래에 이식하고 다양한 길이의 시간 동안 관찰했다. 휘발성 마취 하에서 1cm 절개가 사타구니 주름 바로 옆에 만들어졌다.
- [0226] 도 5a는 쥐의 사타구니 지방 패드에서 나노 섬유 - 하이드로겔 복합 재료의 인시투(in situ) 내 모습을 보여주는 사진이다. 도 5B는 이식 후 2 주에 채취된 복합재료 주위의 조직으로부터의 섹션의 H & E 염색 이미지를 도시한다. 호산성 염(fronds of eosinophilic)의, 짙은 분홍색 염색된 중간엽 세포는 나노 물질로 이동하는 것으로 나타났다 (밝은 핑크색으로 염색 됨).
- [0227] 도 5C는 4 주에 복합 조직 계면으로부터 수집된 조직 절편의 H & E 염색 이미지를 도시하며, 세포 침윤을 나타낸다. 이식 부위를 둘러싸고있는 간엽 조직은 에모신(emosin)이 있는 진한 분홍색을 나타낸다. 나노 물질은 연 분홍색으로 보인다. 분홍색 중간엽 세포를 투명한 둥근 액포가 있는 추정 지방 세포(putative adipocytes)뿐만 아니라 계면에도 볼 수 있다.
- [0228] 피하 조직의 무딘 절개 후, 사타구니 지방 패드가 노출되었다. 그것은 전기 소작기를 사용하고 피딩 베슬(feeding vessels)을 조심스럽게 보존하면서 세심한 지혈과 함께 상응되었다. 비계는 동물의 오른쪽에있는 지방 패드 아래에 이식되었다. 왼쪽은 임플란트를 받지 않았고 가짜 수술 컨트롤(sham surgery control)로 사용되었다. 양측은 표준 계층화 된 방식으로 폐쇄되었다. 동물은 2, 4, 6 주 동안 관찰되었다. 수집 시점에서 동물을 희생시키고 스펙폴드가 있거나없는 사타구니 지방 패드를 4 % PFA에 노출시키고 고정시켰다. 표준 헤마톡 실린 및 에오신 염색을 위해 표본을 매립하고 절편화 하였다. 초기 시점 (2 주)에서, 상처 베드로부터의 중간엽 세포가 물질에 침윤하여 물질이 천연 세포 내 성장을 가능하게하는 충분한 다공성을 갖는다는 것이 밝혀졌다 (도 5B에서 어두운 분홍색 염색).
- [0229] 중요하게는 외인성 성장 인자가 없는 경우에도 세포 내 성장이 달성되었다. 물질을 단순히 둘러싸기보다는 물질에 침윤하는 세포의 존재가 복합재료 나노 물질을 현재 사용중인 다른 이물성형술(alloplastic) 물질과 차별화시킨다. 현재 사용 중인 후자의 물질은 섬유성 캡슐에 의해 둘러싸여있어 연조직 재건에 덜 바람직하다. 후기 시점 (4 주)에서, 세포 내 성장은 초기 지방 세포 분화를 나타내는 액포 영역의 출현으로보다 명백해진다 (도 5C에서는 어두운 분홍색 염색 및 투명한 원).
- [0230] 실시예 5: 섬유-HA 하이드로겔 복합재료의 디자인
- [0231] 섬유는 세포 외 이주를 돕고 하이드로겔의 초기 낮은 기계적 성질을 보장하면서 종종 원시 세포 외 매트릭스에서 볼 수 있는 섬유 구조를 형성할 수 있다. 하이드로겔과 섬유 사이의 계면 결합을 도입함으로써 (도 6A, 도 6B), 복합재료는 세포 이동을 현저하게 방해하는 평균 공극 크기 감소 및 다공성(도 6) 감소 없이 강화된다. 하이드로겔과 섬유 표면 사이의 계면 접합 밀도를 조절함으로써 기계적 성질을 조정할 수 있을 것으로 기대되었다. 여기에서 표면 기능화된 섬유는 말레이 미드 (MAL)로 제조되어 티올화 된 히알루론산(HA-SH)으로 계면 결합을 도입하였다 (도 6). 전기방사된 폴리 (ε- 카프로 락톤) (PCL) 섬유의 표면을 O₂ 플라즈마로 처리하여 폴리 (아크릴산) (PAA)를 그래프팅하기 전에 자유 라디칼을 표면에 유도했다. 카르복실기는 시약, NHS 및 EDC를 커플링하여 활성화시킨 다음 N-(2-아미노에틸)말레이미드를 활성화 된 카르복실기와 반응시켰다 (도 13). 이어서, 섬유 - 하이드로겔 복합재료를 제조하기 위해 HA-SH 및 PEGDA로 구성된 하이드로겔 전구체 용액에 MAL-작용화 된 섬유를 도입 하였다. HA의 티올기는 섬유상의 MAL 기와 PEG 링커의 DA 기 모두와 반응하여 겔을 형성하는데 사용되었다. 흥미롭게도, 섬유 - 하이드로겔 복합재료의 단면은 유사한 가교 밀도를 갖는 HA 하이드로겔의 단면과 비교하여 높은 다공성을 갖는 섬유질 3D 구조를 나타냈다(도 6). 생성된 복합 재료는 복합 재료의 너비와 높이에 나노 섬유가 균일하게 분포되어 등방성 보강을 가능하게 했다. 또한 재수화된 섬유-HA 하이드로겔 복합재료는 동결 건조 후 99.34 %의 부피 회복을 보인 반면 HA 하이드로겔은 70.17 %의 부피 회복을 보였다 (도 6D).
- [0232] 실시예 6 : 섬유-HA 하이드로겔 복합재료의 압축 모듈러스
- [0233] 첫째, 복합재료는 반응기가 물 기준으로 동일할 때 최대 강성 (전단 하에서)을 갖는 것으로 확인되었다. HA상의

티올기는 나노 섬유상의 MAL 기 또는 PEG-DA상의 아크릴 레이트기와 반응 할 수 있으므로, SH 대 (DA + MAL)의 물비가 약 1 대 1 일 때, 겔은 최적 전단 저장 탄성률. 따라서 비율은 모든 후속 연구에서 유지되었다. 겔은 HA 하이드로겔 및 섬유-HA 하이드로겔 복합체의 탄성 계수를 평가하기 위해 제한되지 않은 압축 시험을 거쳤다 (도 7). 기능화 된 나노 섬유의 보강 효과는 50 %로 변형되었을 때의 압축 응력에서 볼 수 있다 (도 7A). 1.0- μ m 섬유 그룹에서 압축 응력은 하이드로겔 전용 그룹보다 3.1 배 더 크며 기계적 보강 효과를 나타낸다. 286 nm 섬유 그룹은 50 % 변형에서 4.2 배 더 높은 압축 응력으로 훨씬 더 현저한 보강 효과를 보였다. 흥미롭게도 286 nm 섬유의 보강 효과는 겔화 전에 말레이미드 그룹을 케칭할 때 하이드로겔보다 1.3 배로 크게 감소되어 섬유의 하이드로겔에 대한 계면 결합이 보강 효과에 결정적임을 확인했다. 더욱이, 합성물을 형성하기 전에 286 nm 섬유가 기능화되지 않았을 때, 보강 효과는 사라졌고, 복합 재료는 하이드로겔 단독보다 간신히 강경한 정도였다. 고농축 HA와 PEG-DA 복합재료를 조제하여 더 강경한 겔을 만들 때도 동일한 보강 효과가 나타난다 (도 7). 계면 결합은 또한 나노 섬유 표면에 점자적으로 더 많은 말레이미드 그룹을 첨가하면 점자적으로 더 강경한(딱딱한) 물질을 생성하기 때문에 복합 재료 겔의 강경함은 용량-반응성을 나타내어 계면 결합의 중요성에 대한 더 많은 증거를 제공한다. 복합재료는 또한 탈수 및 재수화 전후의 기계적 성질의 변화를 시험하였다. 두 가지 다른 말레이미드 밀도의 기능화된 나노 섬유가 있거나 없는 겔은 압축 하에서 기계적으로 테스트되었다. 이어서, 겔을 동결 건조시킨 다음, 완전히 재수화시키고 압축을 다시 시험 하였다. 모든 샘플은 재수화 후에 강성(stiffness)을 유지하였으며, 복합 재료가 동결 건조 된 제품으로 임상적으로 사용하기에 적합 함을 나타내었다. HA 단독 겔은 겔보기에도 강성을 유지했지만 겔 자체는 탈수 - 재수화 과정에서 섬유 함유 그룹과 달리 크게 압축되었다. 복합 겔은 또한 도 10에 표시된 대표적인 흔적을 사용하여 피로 효과를 테스트하기 위해 주기적으로 부하를 가했다. 25 % 변형까지 반복적으로 부하를 가하면 합성 겔은 시간이 지남에 따라 강성을 유지하고 하이드로겔 단독보다 강경해졌다.

[0234] 실시 예 7 : 섬유-HA 하이드로겔 복합재료의 전단 저장 탄성률

[0235] 더 높은 압축 계수에 더하여, 섬유-HA 하이드로겔 복합재료는 HA 하이드로겔 단독보다 유의하게 더 큰 전단 저장 탄성률을 보였다 (도 8A). 286 nm 섬유 복합 재료의 전단 저장 탄성률은 686 nm 섬유 복합 재료의 전단 저장 탄성률보다 높았다 (도 8C). 또한 복합 재료의 전단 저장 탄성률은 압축 시험 하의 탄성 계수와 유사하게 286 nm 섬유의 말레이미드 표면 밀도를 증가시킴으로써 증가함이 확인되었다 (도 8D). 표면에 62 nmol / mg MAL의 섬유를 도입함으로써, 복합 재료는 HA 하이드로겔 단독의 것보다 전단 저장 탄성률이 1.3 배 증가한 것으로 나타났다. 또한, 섬유에 147nmol / mg MAL을 함유한 복합 재료의 전단 저장 탄성률은 62nmol / mg MAL 그룹의 모듈러스보다 1.8 배 증가하여 MAL 표면의 2.4 배 증가에 대한 명확한 투여량 반응을 보여 주었다. 섬유상의 MAL 기가 겔화 전에 케칭 될 때, 전단 저장 모듈은 압축 시험에서 볼 수있는 것과 유사하게 케칭되지 않은 섬유의 MAL 그룹에 비해 감소 하였다. 또한 복합 재료의 전단 저장 탄성률은 주파수가 10 Hz로 증가 할 때 유지되었으며 HA 하이드로겔 단독 및 케칭 된 섬유 복합 재료는 1 Hz에서의 전단 저장 모듈보다 10 Hz에서 감소하는 전단 저장 모듈을 나타냈다. 복합 재료의 전단 저장 탄성률은 섬유의 표면적 (지름)에 관계없이 섬유의 MAL 표면 밀도가 증가함에 따라 증가하여 이전에 관찰 된 섬유 직경이 강성에 미치는 영향이 말레이 미드 밀도의 함수 일 수 있음을 나타낸다 (도 8D). 선형 회귀는 MAL 표면 밀도와 $R^2 = 0.93$ 의 전단 저장 탄성률 사이의 상관 관계로부터 얻어졌다. 또한 복합 재료는 하이드로겔 성분에 대한 기능화 된 섬유의 중량비가 증가함에 따라 복합 재료의 전단 저장 탄성률이 증가함에 따라 섬유 부하에 대한 투여량 반응을 나타냈다 (도 9).

[0236] 실시 예 8 : 시험 관내 섬유-HA 하이드로겔 복합재료에서의 세포 이동

[0237] 섬유-HA 하이드로겔 복합재료는 (i) 더 큰 기공을 가지며 보다 높은 기공도를 갖는 복합재료가동일한 기계적 성질을 가질 때 세포 이동에 대한 공간 성을 제공함, 및 ii) 복합 재료 내 ECM 모방 섬유 구조가 본질적으로 세포 이동을 유도 함과 같은 이유로 HA 하이드로겔에 비해 세포 이식을 증가 시킨다는 가설을 세웠다. 따라서 현재의 가설을 증명하기 위해 HA 하이드로겔 및 복합 재료 내에 모델 세포인 인간 지방 줄기 세포 (hASCs)의 회전 타원체(spheroid)를 시딩하고 조직 덩어리를 모방한 후 hASCs 회전 타원체 를 27 일 동안 배양 하였다 (도 11). ASC는 지방 조직에서의 존재 및 혈관 신생 및 지방 세포 형성 모두에서의 중요성 때문에 선택되었다. HA 하이드로겔에 대한 복합 재료의 영율은 1.9kPa이지만 HA의 하이드로겔보다 2.08 배 더 크다 (도 16). hASCs가 HA 하이드로겔에서 세포 이동없이 그들의 회전 타원체 모양을 유지하는 동안 (도 11A-11E) 복합재료 내부에서 hASC가 3 차원 적으로 이동했다는 것이 명확하게 관찰되었다. 특히, 복합재료에 대해 세포 접착 펩타이드, RGD로 섬유를 변형 시켰을 때 세포 이동이 현저히 향상되었다 (도 11C). 그러나 생체 내 환경에서, 국소 환경으로부터 복합 재료로 인자의 확산은 추가적인 접착 단서(adhesive cue)를 제공하고, 이러한 차이를 감소시킨다. 어떤 경우에는 부분적 섬유가 PCL 섬유 사이의 소수성 상호 작용으로 인해 겔화 동안 약간의 군집을 형성하고, 복합재료 내

부에서 섬유 집합체를 우선적으로 잡는 세포체가 관찰되었다 (도 11D 및 11E). 또한, 동일한 HA 및 PEG-DA 농도 (도 19)에서, 복합재료는 섬유가 없는 그룹과 비교하여 향상된 세포 이동을 나타내어 나노 섬유 자체가 다공성에 관계없이 세포 이동을 본질적으로 유도 할 수 있음을 보여 주었다.

[0238] 실시예 9: 조직 반응 및 숙주 조직 침윤

[0239] 이러한 복합 재료 임플란트의 치료 잠재성을 결정하기 위해, 복합 재료 임플란트를 쥐 지방패드 모델의 in vivo 테스트를 수행하였다. 임플란트 그룹의 제제는 복합 겔 및 표적 지방 조직과 동일한 초기 강성 2kPa를 달성하도록 제형화되었다. 따라서, HA-겔 단독 임플란트의 제형은 섬유-복합재료 그룹의 강성을 맞추기 위해 티올레이티드 HA 및 PEG-DA 모두의 농도가 더 높았다. 더 높은 농도에도 불구하고, HA 단독 임플란트는 연구 과정에서 모양과 부피를 유지할 수 없었다. 4 주후의 총 관찰에서, HA 단독 임플란트는 한계점에 다다랐고(stretched out), 부피는 상당히 줄어들었다. 그들의 외형과 침윤의 조직학적(histological) 결여를 고려할 때, HA 단독 시스템은 세포 침윤을 촉진하고 미리 결정된 모양을 유지함에 있어서, 최적화 될 수 없다. 그러나 섬유-겔 복합 재료 임플란트는 생체 내 90일 후에 육안 관찰 시 원래 모양을 잘 유지하였다. 그러나 조직학적 관찰 하에서는 현저하게 복합 재료가 깊숙이 침투되어 임플란트와 원 조직 사이의 경계를 결정하기 어려워졌다.

[0240] 사타구니 지방 패드가 미세 수술 기술을 사용하여 노출 및 상승되고 미리 성형 된 복합 재료가 밑에 배치되는 루이스 래트(Lewis rat) 연조직 결함 모델이 개발되었다. 잘 정의된 이 모델은 Aim 3 가설(Aim 3 hypothesis)의 모든 요소와 R21 연구가 적용될 수 있는 척도를 다루는데 이상적이다. 이것이 대형 결함을 복원하는 복합 재료의 능력을 직접적으로 입증하지는 않지만, 원리의 증명을 확립하고 복합 재료 디자인의 모든 필수 기능을 확인하며, 더 큰 동물 모델의 결함을 보다 임상적으로 테스트하기 위한 토대를 마련 할 것이다.

[0241] 시험 연구에서, PCL 나노 섬유-HA 하이드로겔 복합 재료 및 HA 하이드로겔을 8-12주령 수컷 루이스 래트의 사타구니 지방 패드 아래에 비슷한 계수로 이식하였다(n= 시점(time point)당 3). HA 하이드로겔 그룹과 복합 재료 그룹 모두 이식 후 14 일과 30 일에 우수한 조직 적합성을 보였다(도 12, POD 14, POD 30에서 유사 관찰한 결과, POD=수술 후 날짜). POD 30의 조직학(Histology)은 삼 수술(가짜 수술) 그룹보다 더 높은 수준의 염증 반응을 나타내지 않았다. H&E와 Masson의 삼색 염색은 사이막 형성 및 복합재료를 통한 천연지방의 세포 침윤, 주위 모세 혈관 형성 및 천연 지방의 지방세포 부분과 같은 선상(glandular)의 재생을 보여준다(도 12). 한편, HA 하이드로겔 대조군은 세포 침윤이 부족하고, 섬유화 조직의 얇은 시트 및 이물 반응을 형성하였다. 이 HA 하이드로 겔은 충분한 기계적 특성을 보장하기 위해 2 kPa로 준비되었다. 이 결과는 세포 침윤을 위한 스캐폴드의 다공성의 중요성을 강조한다.

[0242] 초기의 시점(2 주)에서, 상처 베드(bed)로부터의 중간엽성(mesenchymal) 세포가 물질에 침투되어 물질이 천연 세포 내 성장을 가능하게 하는 충분한 다공성을 갖는다는 것이 밝혀졌다(도 12에서 어두운 분홍색 염색). 중요하게도, 외인성 성장 인자가 없는 경우에도 세포 내 성장이 달성되었다. 물질을 단순히 둘러싸기보다는 물질에 침투하는 세포의 존재로, 이러한 복합 재료 나노 물질은 현재 사용 중인 다른 세포질 물질과 구별된다. 후자의 물질은 섬유성 캡슐에 의해 둘러싸여 있어 연조직 재건에 덜 바람직하다. 이후의 시점(4 주)에, 세포 내 성장은 초기 지방 세포 분화를 나타내는 액포 부분의 출현으로 더욱 명백해진다.

[0243] 실시예 10: 헤파린화 제제

[0244] 복합 재료 제제는 또한, 히알루론산에 컨주게이트(conjugate)된 헤파린으로도 제조되었다. 이 제제는 상기의 미리 형성된 스캐폴드와 동일하게 생체 내 시험을 수행하였다. 조직은 7일, 14일, 30일 및 90일에 채취되었다(n=3). bFGF, PDGF 및 VEGF와 같은 많은 성장 관련 인자는 헤파린-결합 도메인(heparin-binding domain)을 갖는다. 컨주게이트된 헤파린은 두 가지 과정을 수행할 수 있다. 첫째, 그것은 주입 부위에 존재하는 많은 내인성 성장 인자를 결합시킬 수 있으며, 재생하는 조직에 국부적인 저장(reservoir) 및 효과적인 신호 역할을 한다. 두 번째로, 헤파린화 된 복합 재료는 성장인자의 재생을 더 촉진하도록 스캐폴드를 미리 가하는 용도로 사용될 수 있다. 헤파린화 된 스캐폴드는 비헤파린화 복합재료 스캐폴드와 비교하여 7 일 및 14 일에 향상된 혈관 신생을 보였으나, 30 일 및 90 일에는 유사한 결과를 보였다.

[0245] 실시예 11: 주사용 제제

[0246] 상기 하이드로겔-나노 섬유 복합재료는 또한, 주사 가능한 변형체(variant)로 제형화 되었다. 생체 내(5 mg/mL 티올레이티드 HA, 5 mg/mL PEG-DA, 12.5mg/mL 섬유)에 사용된 예비 성형 복합체에 사용된 것과 동일한 조성물 200 μ L를 혼합하고, 8-10분 동안 주사기에 부분적으로 채워두었다. 이 때 상기 복합 재료는 점성, 유동성 액체이며 수술용 바늘을 통해 주입할 수 있다(도 20). 일단 주입되면 복합 재료는 역으로 되었을 때 모양이 유지되

고, 물에 잠겨있을 때 비분산, 형태 유지 및 비 팽창한다. 주사 가능한 복합 재료의 생체적합성을 테스트하기 위해 현탁액을 21 가우지 니들(gauge needle)을 통해 쥐의 사타구니 지방 패드에 주입하였다. 상기 조직을 7일, 14일, 30일 및 90일에 채취하고 (n=3), 이전의 실시예와 동일하게 분석하였다. 복합 재료는 부피를 유지하면서 섬유성 봉입을 일으키지 않으며, 30 일에 광범위한 세포 리모델링을 나타내었다. 초기 단계의 지방 세포 분화는 복합 재료 내에서 분명하게 확인할 수 있다.

[0247] 실시예 12 : 실시예 5-11에 대한 분석

[0248] 하이드로겔은 3D 수화 환경 및 높은 다공성으로 인해 세포 이동을 촉진하는 조직 결합의 재생을 위한 충전제로서 널리 연구되어왔다. 그러나, 하이드로겔은 체액 및 내부 붕괴에 의해 쉽게 분해되고 붕괴 될 수 있기 때문에, 하이드로겔의 상대적으로 약한 기계적 성질이 조직 재생의 전체 기간 동안 부피를 유지하기에 불충분하기 때문에, 체적 결합에 대한 대체물로는 부족한 것으로 판명되었다 외부 응력. 하이드로겔의 기계적 성질을 개선하기 위해, 이 분야의 주요 전략은 (i) 하이드로겔 전구체의 농도를 증가시키고, (ii) 하이드로겔 내부의 가교 결합 네트워크의 밀도를 증가시키고, (iii) 예를 들어 하이드 록시 아파타이트 입자를 매립하거나 또는 섬유 시트로 라미네이션함으로써 형성 될 수 있다. [Mater Chem Physics, 2008, 107, 364-369, Biomaterials 2006, 27, 505-518, Acta Biomaterialia 2010, 6, 1992-2002]. 불행하게도, 이러한 매우 강화된 전략은 본질적으로 생성된 하이드로겔의 평균 공극 크기와 다공성을 감소시켜 세포가 이러한 하이드로겔로 이동하지 못하도록 막았다. 따라서, 빠른 세포 침투를 허용하는 보다 높은 다공성을 여전히 유지할 수있는 새로운 메커니즘에 의해 하이드로겔을 강화시키는 것이 추구되었다. 다공성을 포함하여 하이드로겔 상을 거의 남기지 않고 전체 하이드로겔 복합재료를 강화시킬 수있는 작용화 된 나노 섬유를 도입함으로써 복합 재료를 설계 하였다. 생성된 섬유 - 하이드로겔 복합재료는 두 가지 핵심 구성 요소로 인해 이전 연조직 합성물을 개선한다. 첫째, 나노 섬유는 등방성 강화를 달성하기 위해 하이드로겔 내의 고하중 수준에서 균일하게 분산 될 필요가 있다. 조직-엔지니어링 분야는 일반적으로 전기 방사된 나노 섬유를 평평한 시트 또는 섬유 매트로 사용했다. 이들은 일반적으로 매트 에 하이드로겔 전구체 용액을 함침시켜 복합재료로 만든다.

[0249] 이것은 하이드로겔 전체에 나노 섬유의 분산을 크게 제한하고 복합 재료의 형상을 2D 시트 또는 튜브로 제한한다. 이러한 형상은 신경 수리 또는 상처 드레싱과 같은 특정 용도에 유용하지만, 용적 결합을 보수하기에는 좋지 않은 선택이다. 섬유 시트를 극저온분쇄(cryomilling)함으로써, 수용액에서 현탁액으로 존재하게 할 수 있는 충분히 짧은 길이로 평균 섬유 길이를 감소시킬 수 있었다. 따라서 시료를 하이드로겔 전구체 용액으로 쉽게 피펫팅하여 겔화 전에 하이드로겔 체적 전체에 나노 섬유 조각이 균일하게 분산되도록 하였다. 그 용액은 주사 가능한 제형으로 직접 사용될 수 있으며, 대부분의 전자 방사 된 나노 섬유 메시의 제한된 평면 기하 구조와는 달리 임의의 형상의 스캐폴드 겔을 형성하기 위해 몰드에 첨가 될 수 있다. 하이드로겔 내의 분산 된 섬유의 복합 구조는 또한 세포 외 매트릭스의 섬유 구조를 반복하고 (도 6G), 복합재료 내에서의 세포 이동을 보조 할 수 있는 접착 부위를 제공한다.

[0250] 둘째, 하이드로겔 내에 나노 섬유를 단순히 분산시키는 것은 강한 복합재료를 형성하기에 불충분하다. 이 데이트는 나노 섬유 자체를 포함하는 것만으로 복합 재료의 탄성 계수가 거의 향상되지 않으며 계면 결합이 도입되었을 때 개선이 이루어짐을 나타냈다. 하이드로겔과 섬유 성분 사이에 강한 연결을 형성하지 않으면 물과 하이드로겔 성분이 섬유 성분을 지나쳐 지나갈 수 있기 때문에 계면 결합이 필요하다. 더욱이, 이와 같은 이질적인 물질들간의 계면은 복합재료의 박리 및 파괴를 초래할 수있다. 또한, PCL의 초기 소수성은 섬유가 우선적으로 응집되어 현탁액에서 떨어지는 응고를 형성하기 때문에 수용액에서 분산되기 어렵게 만든다. 플라즈마 처리 및 카복실산 그룹 및 아민 그룹으로의 후속 관능화는 섬유의 친수성을 크게 증가시키고 분산을 허용한다. 기계적 특성의 극적인 증가는 섬유 표면의 말레이미드 그룹과 히알루론산 분자의 티올 그룹 사이에서 계면 결합이 일어날 때만 발생했다. 이 공유 결합은 압축 또는 인장 중에 섬유에 부하를 보다 효율적으로 전달하여 더 강하고 강건한 재료를 만든다. 또한 복합 재료는 보강재의 조정 성질뿐만 아니라 보강 메커니즘의 중요성을 강조하면서 말레이미드 밀도가 증가함에 따라 탄성 계수가 증가하는 강한 경향을 보여준다.

[0251] 이 연구에서, 섬유의 전체 표면적, 섬유 표면상의 기능적 말레이미드 그룹의 밀도, 및 섬유 표면상의 기능적 말레이미드 그룹의 밀도, 및 하이드로겔에 부하된 섬유의 양을 포함하는 다양한 요인에 의해 섬유 - 하이드로겔 복합재료의 기계적 성질을 조절하는 것이 가능하다는 것이 확인되었다. 첫째, 섬유 직경이 작은 복합 재료는 섬유 직경이 큰 복합 재료보다 압축 및 전단 저장 탄성률이 높았다 (도 7A 및 도 8C). 유사하게, 글루타르 알데히드를 사용하여 플라즈마 활성화 된 단일 초고 분자량 폴리에틸렌 (UHMWPE) 섬유 (~ 25 μm)는 폴리비닐 알콜 하이드로겔에서 계면 전단 강도의 약 2.36 배 증가를 보였다 그것에 60의 UHMWPE 섬유 다발 [Acta Biomaterialia 2014, 10, 3581-3589]을 넣었다. 따라서, 섬유 직경을 감소시키고 섬유 비 표면적을 증가시키는 것이 복합재료

의 기계적 특성을 개선 시키는데 효과적 일 수 있다. 그러나 각 섬유 그룹은 섬유상에 약간 다른 MAL 표면 밀도 (약 10-15nmol / mg)를 가지므로 섬유의 표면적 효과만이 결정적으로 결정될 수는 없다. 따라서 두 번째로, 복합 재료는 동일한 지름의 섬유로 제조되었지만 섬유상에 다양한 MAL 표면 밀도가 있도록 제조되었다 (도 8). 복합 재료의 압축 및 전단 저장 탄성률은 섬유의 MAL 표면 밀도가 증가함에 따라 증가했다. 계면 결합이 없는 복합재료는 PAA 단계 (섬유상의 카르복실기)를 통해 변형된 섬유를 사용하여 압축 강도를 약간 향상시켰지만 (도 7), 그 이상의 MAL 접합 단계는 확인되지 않았다. 계면 결합의 중요성은 추가로 겔화 전에 시스테인으로 섬유상의 MAL기를 켄칭시킴으로써 확인되었다. 시스테인은 말레이 미드 그룹에 컨주게이트 되고 섬유와 하이드로겔 사이의 계면 결합을 방지하는 것 외에는 계면 접합 그룹과 동일하게 섬유가 처리 되었기 때문에 계면 결합 효과를 격리 할 수 있다. 흥미롭게도, MAL- 켄칭 된 섬유와의 복합재료의 기계적 특성은 MAL- 켄칭 된 섬유 그룹이 HA 하이드로겔 단독의 것보다 낮은 압축 모듈러스를 나타내는 것으로 극적으로 감소되었다 (도 7A 및도 8B) HA는 10mg / ml이었다 (도 7). 이전 연구 [Acta Biomaterialia 2014, 10, 3581-3589]에서 볼 수 있듯이 MAL로 소멸 된 섬유가 섬유와 하이드로겔의 계면에서 쉽게 박리됨으로써 전체 복합재료를 약화시킬 가능성이 있다. 또한, 작용기를 갖지 않는 섬유는 겔화 동안 하나의 성분으로 구성되거나 또는 이물질이 없는 순수한 하이드로겔에 비해 겔화를 억제하는 이물질로서 작용할 수 있다 [JMC B 2015, DOI : 10.1039 / C3TB21830A, Journal of Biomedical Materials Research Part A 2010, 95 (2), 564-573]. 또한, 다양한 MAL 표면 밀도를 갖는 복합재에 의한 전단 저장 탄성률과 계면 접합 밀도 사이의 유의한 상관 관계가 확인되었다 (도 8C). 이 연구는 하이드로겔의 기계적 성질이 계면 결합에 의해 강화되고 조절될 수 있다는 강력한 증거를 제공한다. 셋째, 하이드로겔에 대한 섬유의 중량비가 증가함에 따라 복합 재료의 전단 저장 탄성률이 향상되었다 (도 9). 따라서, 상기 중량비는 섬유 - 하이드로겔 복합재료의 기계적 성질을 조정하는데 사용될 수 있는 또 다른 변수라는 것이 확인되었다. 그러나, 여기서 섬유 함량이 증가함에 따라 전단 저장 탄성률의 증가가 평탄해지기 시작하고 중량비의 0.6 이상에서 약간 감소되었다는 것이 확인되었다. 이러한 포화 효과에 대한 하나의 가능성은 복합재료의 계면 결합 밀도가, MAL을 갖는 과량의 섬유가 HA의 티올 그룹의 큰 분획과 어떻게 반응하여 겔화를 위한 PEGDA와 이들의 반응을 억제함에 의해, 감소 될 수 있다는 것이다. HA 하이드로겔의 가장 높은 전단 저장 모듈러스가 HA-SH 및 PEGDA의 각각의 관능성 그룹의 등몰량뿐만 아니라 과량의 HA-SH 또는 DA를 갖는 감소된 전단 저장 모듈러스 (도 14a)에 의해 얻어짐을 고려하면, 증가하는 섬유량을 갖는 섬유상의 과량의 MAL은 복합재 내부의 SH-DA 결합을 혼란시킬 수 있다.

[0252] 일반적으로, 이식된 생체 재료는 조직 결합 재생 시 수많은 내외부 응력을 견뎌야한다. 응력은 심각하거나 연속적이지는 않지만, 반복 응력 및 고주파 (10Hz)에서 응력을 모방하기 위해 응력 저항 시험을 수행했다 (도 10 및도 8). HA 하이드로겔 및 섬유-HA 하이드로겔 복합재료는 모두 반복적인 압축 변형 동안 기계적 강도의 손상 또는 감소없이 견딘다. 현저하게, 계면 결합을 갖는 복합재료는 주파수의 10Hz에서 전단 저장 모듈러스를 유지하는 반면, HA 하이드로겔 및 계면 결합이 없는 복합재의 전단 저장 모듈은 10Hz에서 감소되었다. 이러한 경향은 분산 섬유와의 계면 결합이 복합재료의 기계적 성질을 보장하는 데 중요하다는 것을 나타낸다. 또한 섬유-HA 복합 재료는 동결 건조 및 후속 재수 화를 거친 후 치수(dimention) 및 영 모듈러스를 유지하는 반면, HA 단독 겔은 실질적으로 동일한 공정에서 수축했다 (도 6C 및도 10). 탈수 및 재수화 후의 모양, 부피 및 강성 유지는 동결 건조된 형태의 복합재료가 상업적 제품의 살균 및 저장을 용이하게 하므로이 기술의 임상 해석에 중요한 특징이다.

[0253] 연조직 재건을 위해, 이상적인 이식된 스캐폴드는 결합 공극(void)을 즉시 채울 것이지만, 자가 조직이 스캐폴드 내부로 성장할 수 있는 기질로도 작용하고, 적절한 조직 표현형으로 증식 및 분화하여 궁극적으로 인공 스캐폴드를 정상인 건강한 조직으로 대체 할 수 있도록 한다. 따라서 관련 세포가 하이드로겔 또는 복합 재료 스캐폴드내에서 이동할 수 있다는 것이 매우 중요하다. 관련 세포 유형이 복합 재료 스캐폴드 내에서 이동하는 잠재력을 결정하기 위해 hASC 회전 타원체를 HA 하이드로겔 및 섬유-HA 하이드로겔 복합재료 내에 시딩하고 세포 이동을 평가하였다. HA 하이드로 겔이 세포 이동을 위한 견인력을 제공하기에는 너무 부드럽기 때문에 hASCs는 HA 하이드로겔 단독의 내부에서는 이동할 수 없었다 (도 11A) [Biomaterials 2015, 42, 134-143]. 흥미롭게도 복합 재료의 전단 저장 탄성률은 HA 하이드로겔의 전단 저장 탄성률과 유사하지만 hASC는 복합 재료 내부의 회전 타원체로부터 현저하게 이동할 수 있었다 (도 11). 하나의 가설은 복합재료 내의 섬유가 지방 조직의 천연 ECM의 피 브릴 성분과 유사하게 세포 이동을 유도하는 접착 부위를 제공 할 수 있다는 것이다. 정렬된 및 랜덤 섬유가 다양한 세포 유형에서 세포 부착, 증식, 분화 및 이동에 중요한 요소가 될 수 있다는 것이 이전에 입증되었다 [Biomaterials 2005, 26, 2537-2547 / 2006, 27, 6043-6051 / 2009, 30, 556-564 / 2010, 31, 9031-9039, Acta Biomaterialia 2013, 9, 7727-7736]. 특히, 세포는 섬유를 가이드 매트릭스(matrix)로 인식하였으며, 그 세포 골격은 밑에 있는 섬유와 정렬되고 따라 갔다 [Biomaterials 2006, 30, 6043-6051 / 2009, 30,

556-564]. 그러나 복합 재료 내부의 섬유 직경은 1000 nm 또는 286 nm 나노 섬유 복합 재료에서 모두 견고하게 이동하면서 이동하는 세포에 영향을 미치지 않았다 (도 19).

[0254] 벤치 탑 테스트 및 시험 관내 세포 배양에서 볼 수 있는 다공성 및 세포 이동 효과는 복합재료의 생체 내 시험 동안 큰 차이를 나타냈다. 섬유 없이 지방을 모방 한 2 kPa의 강성으로 제형화 된 하이드로겔은 세포 침투를 위해 너무 낮은 다공성을 가졌다. 세포 반응은 콜라겐의 두꺼운 층으로 벽을 세워 하이드로겔을 분리하였고, 외부 이물질 반응의 전형적인 침투(infiltration) 또는 개조(remodeling)가 없었다. 그러나, 나노 섬유 - 하이드로겔 복합재료는 이물 반응없이 세포 내 성장, 혈관 형성 및 세포 개질을 촉진하기에 충분한 다공성을 가졌다. 이것은 신체의 용적 결합을 궁극적으로 신체의 자체 조직으로 채울 영구적 인 장래성을 제공한다. 결과는 주사용 조직과 더 단단한 인터페이스를 형성 할 수 있는 주사 가능한 제제에서 더욱 두드러졌으며 견고한 지방 생성의 징후를 보였다.

[0255] 결론:

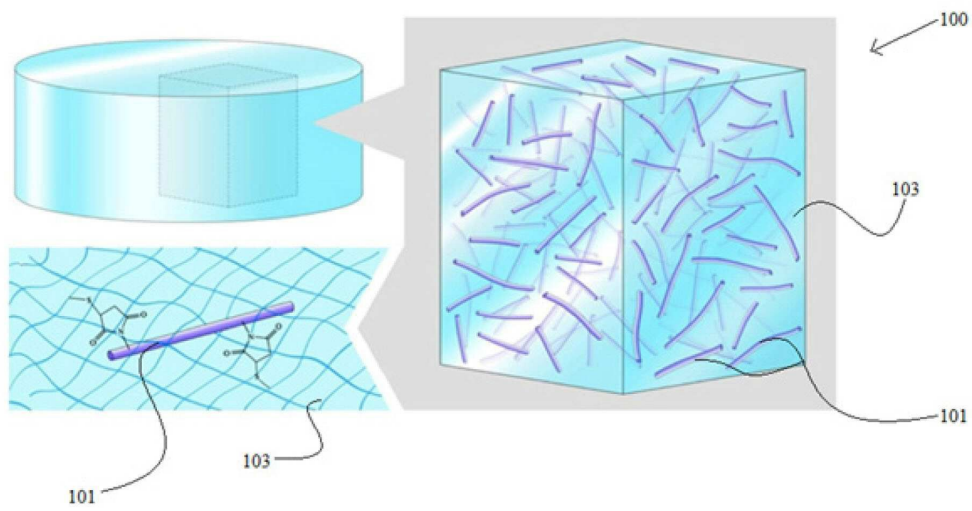
[0256] 하이드로겔 내의 작용화 된 나노 섬유의 분산은 두 가지 성분의 결합 된 강도를 갖는 복합 구조를 형성한다. 나노 섬유와 하이드로겔 성분 사이의 계면 결합은 강한 복합재료를 만드는 데 중요하며, 다공성 및 공극 크기를 유지하면서 조직 및 세포 내부 성장을 촉진한다. 생성된 복합 재료 특성은 섬유 직경, 섬유 부하 수준, 말레이미드 밀도 수준 및 하이드로겔 성분의 부하 수준을 변화시킴으로써 쉽게 조정할 수 있다. 이는 표적화된 전체 강성에서 보다 낮은 가교 결합 및보다 높은 다공성을 허용하여 세포 침투 및 후속 조직 재형성을 증가시킨다. 섬유 자체는 또한 천연 ECM에서 보이는 것과 유사한 접착 부위를 제공함으로써 세포 이동을 직접적으로 개선할 수 있다. 생성된 복합재 임플란트는 고유 지방 조직의 강성과 일치하도록 조정될 수 있지만 세포 침투 및 개조에 대한 투과성을 유지한다. 이 새로운 합성물은 임의의 형태의 용적 결합을 즉시 채울 정도로 강하다. 이 복합재 임플란트는 신체 자신의 세포가 복합재료에 침투하여 혈관을 형성하고 지방 세포와 같은 세포로 분화되도록 허용하는 발판 역할을 한다. 초기 결합 공극이 정상적이고 건강한 조직으로 완전히 대체 될 때까지 조직 리모델링 중 발판은 천천히 분해된다. 복합 구조는 재건 및 미적 수술 가능성을 위한 큰 가능성을 가지고 있다.

[0257] 균등물

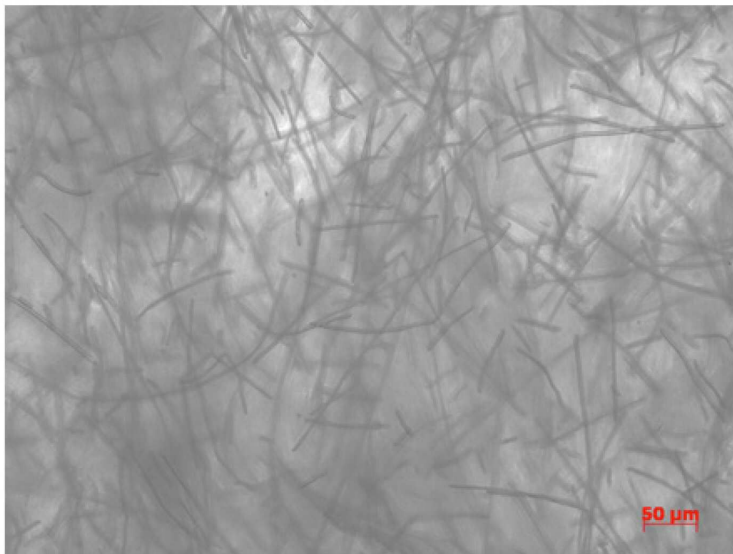
[0258] 본 명세서에 기재된 상세한 실시예 및 수구현 예는 단지 예시적인 목적을 위해 제시된 것이며 본 발명을 결코 제한하는 것으로 간주되지 않는다. 이에 대한 다양한 수정 또는 변경은 당업자에게 제안 될 것이며 본원의 정신 및 범위 내에 포함되며 첨부된 청구 범위의 범주 내에서 고려된다. 예를 들어, 성분의 상대적인 양은 원하는 효과를 최적화하기 위해 변화될 수 있고, 추가의 성분이 첨가 될 수 있고 및 / 또는 유사한 성분이 설명된 성분 중 하나 이상으로 대체될 수있다. 본 발명의 시스템, 방법 및 프로세스와 관련된 추가적인 유리한 특징 및 기능은 첨부 된 청구 범위로부터 명백해질 것이다. 또한, 당업자는 일상적인 실험만을 사용하여 본 명세서에 기술된 본 발명의 특정 실시예에 대한 다수의 균등 물을 인식 할 수 있거나 또는 확인할 수 있을 것이다. 이러한 균등 물은하기 청구 범위에 포함되는 것으로 의도된다.

도면

도면1a



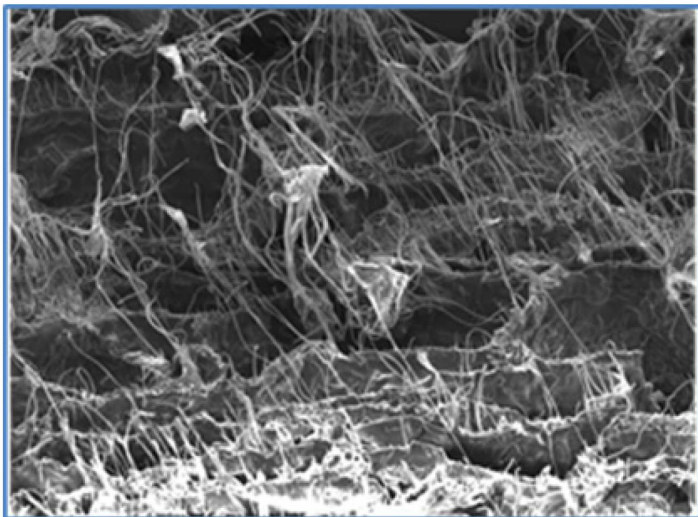
도면1b



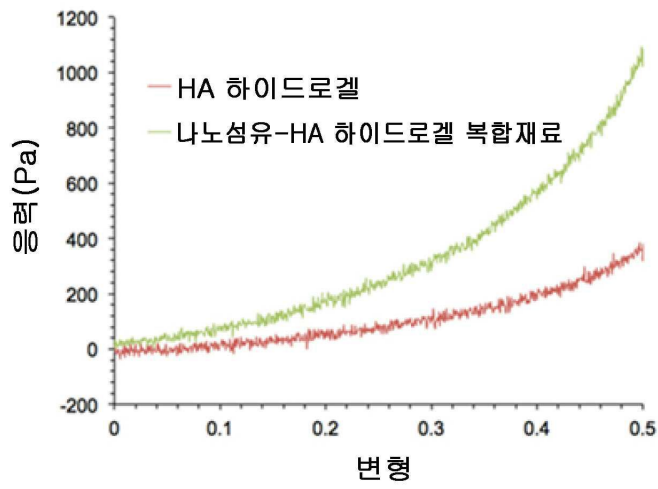
도면1c



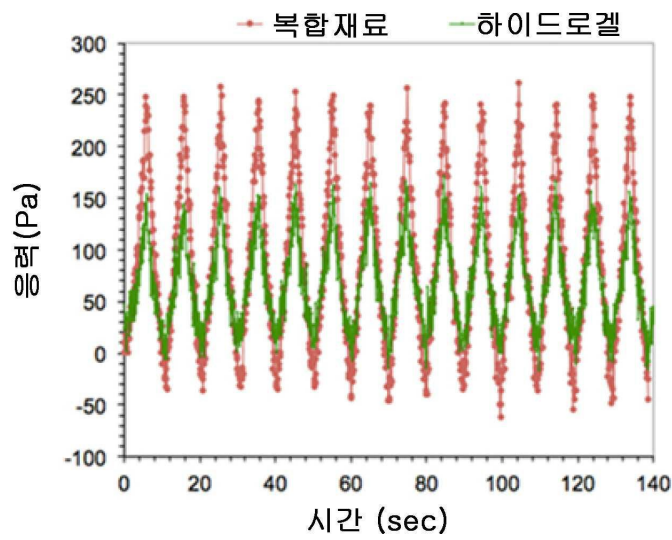
도면1d



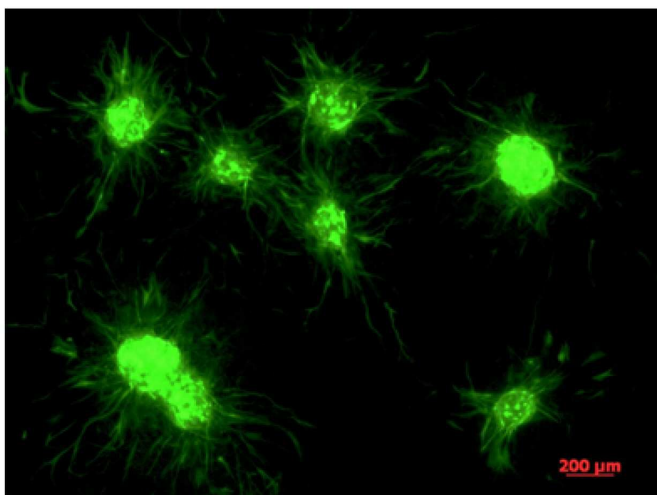
도면2a



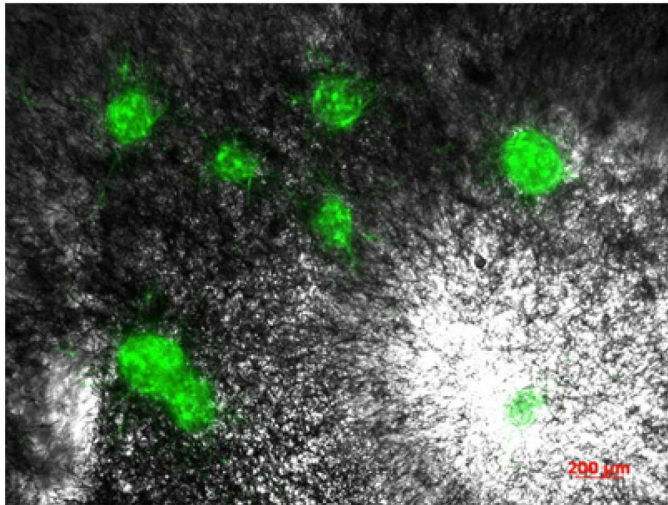
도면2b



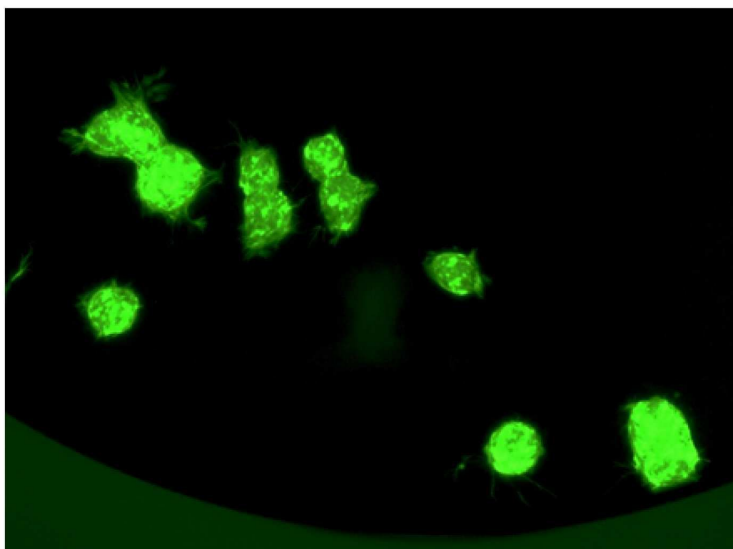
도면3a



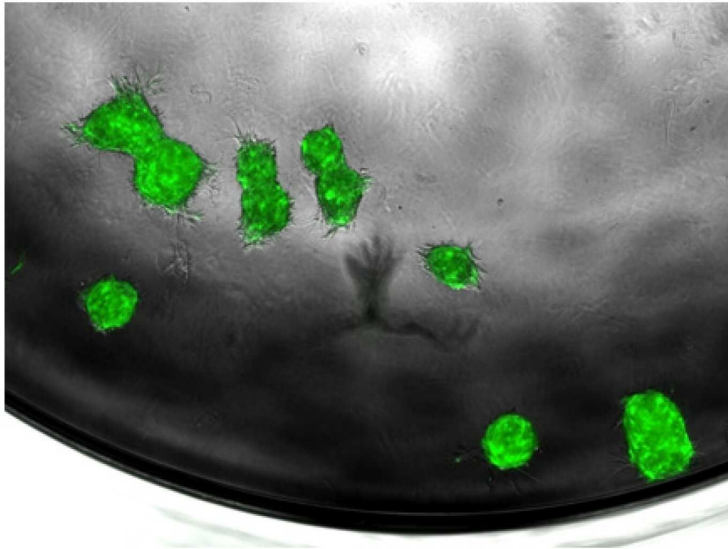
도면3b



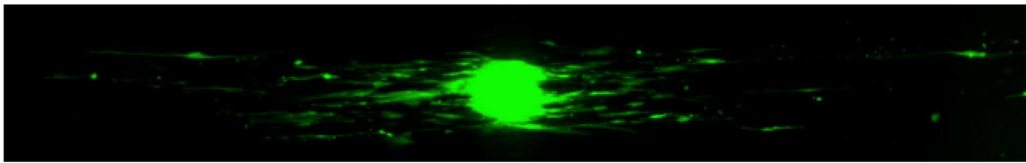
도면3c



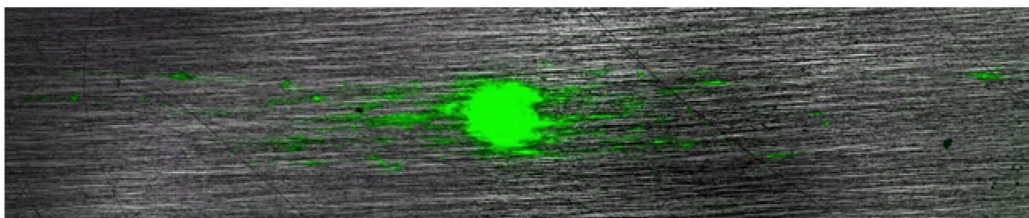
도면3d



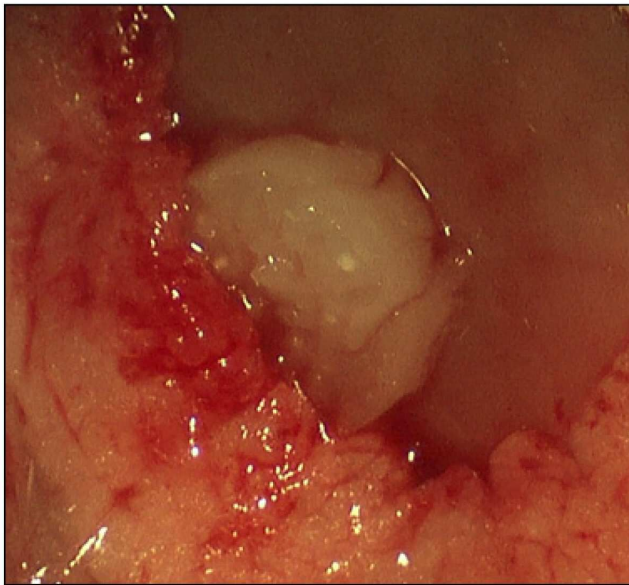
도면4a



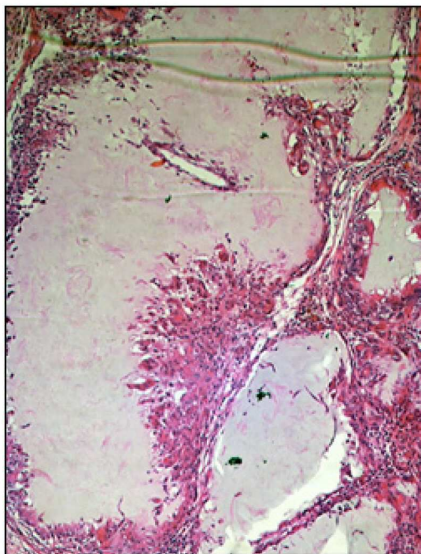
도면4b



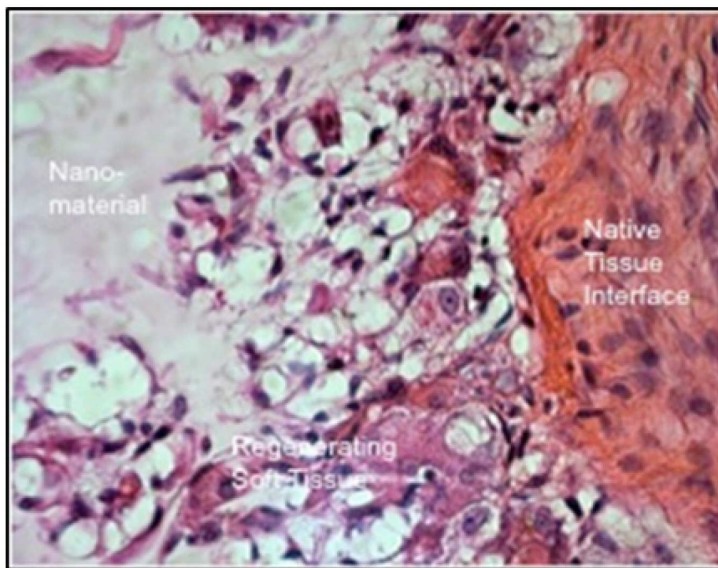
도면5a



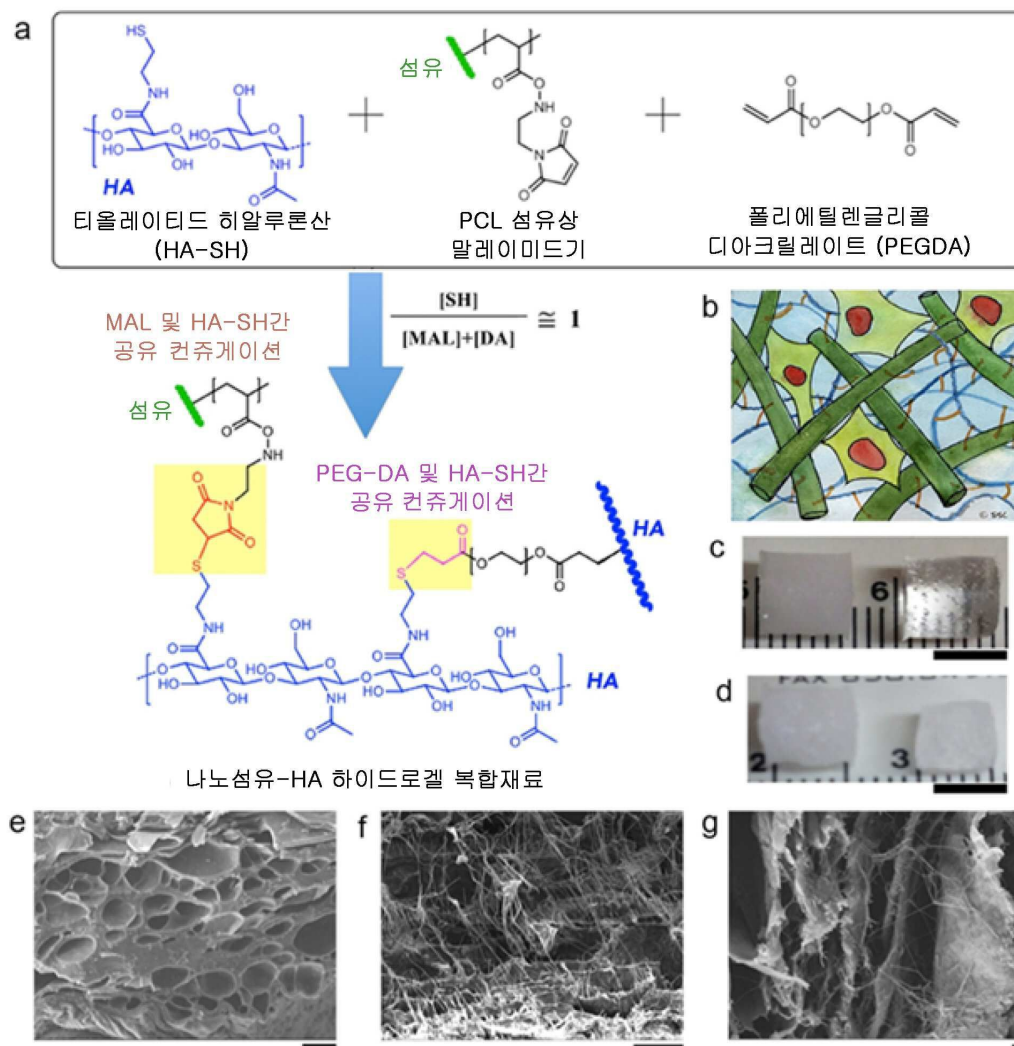
도면5b



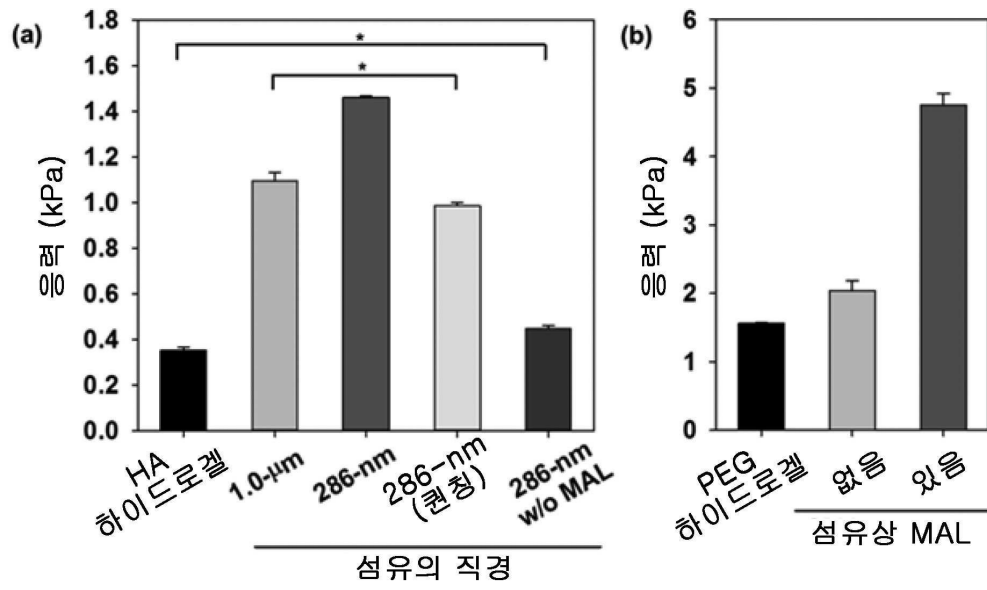
도면5c



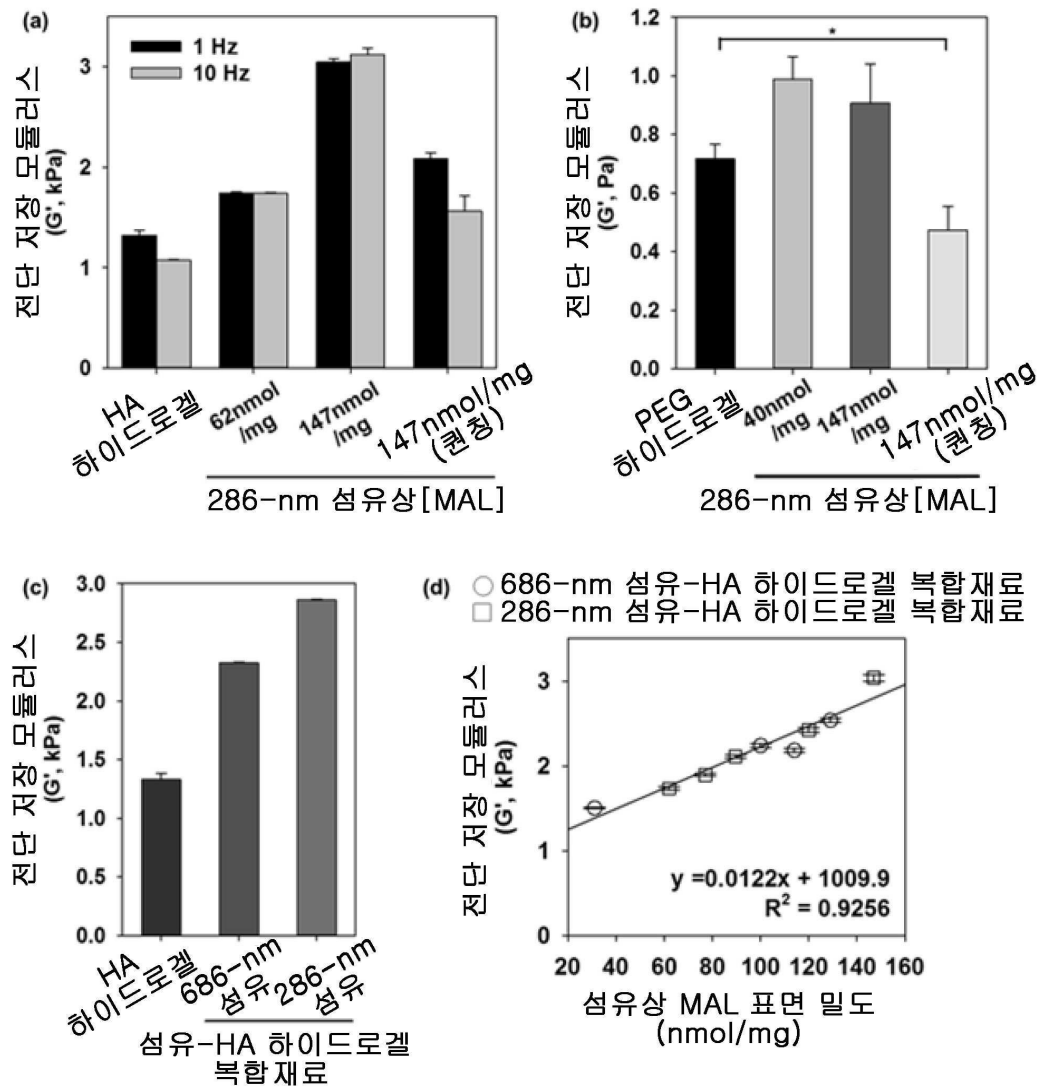
도면6



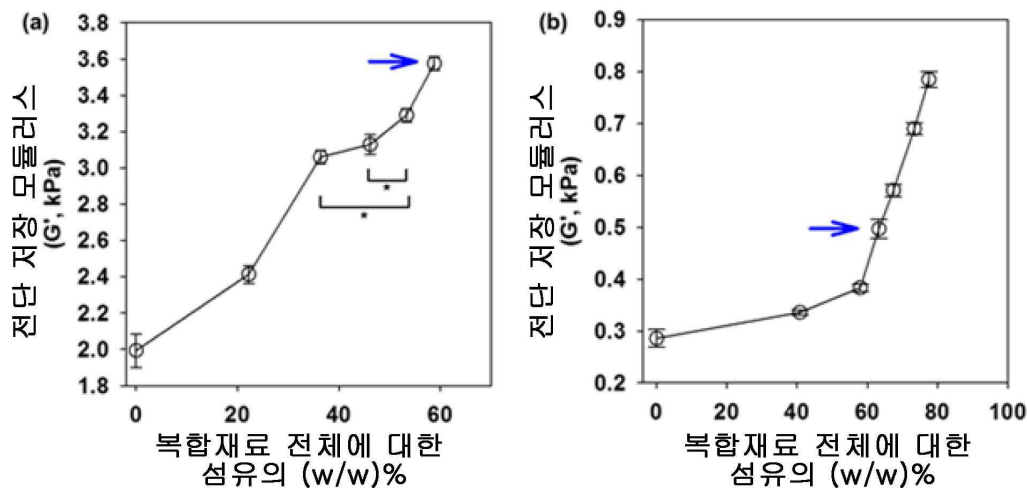
도면7



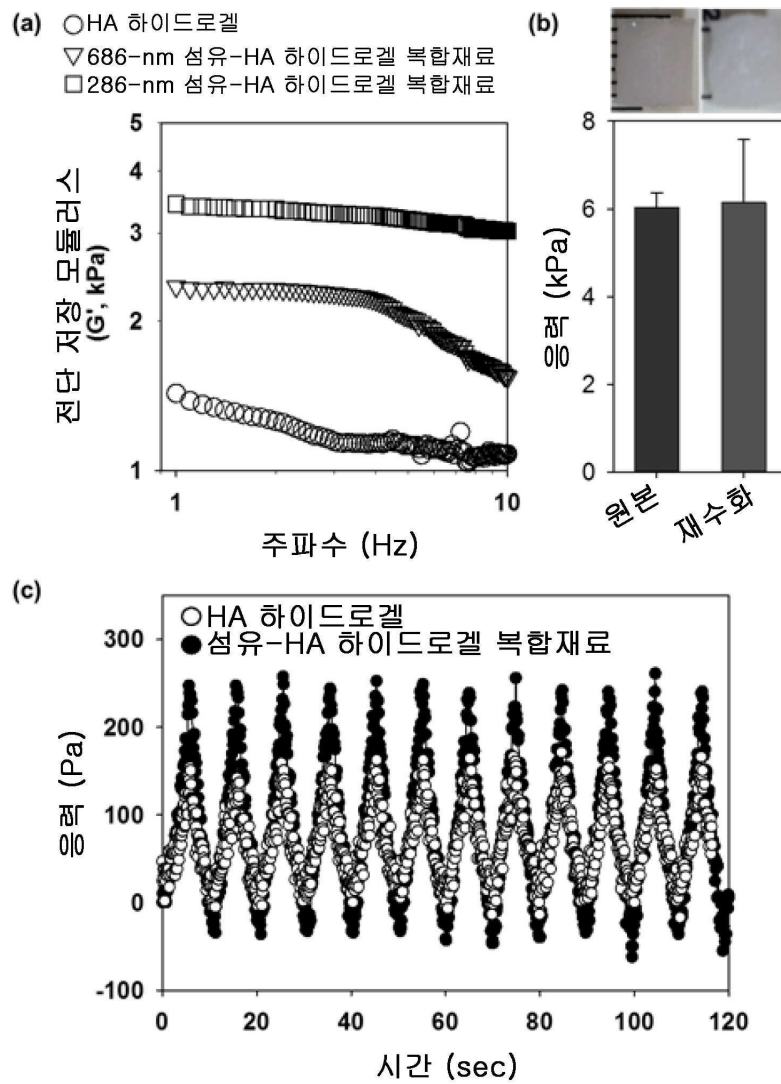
도면8



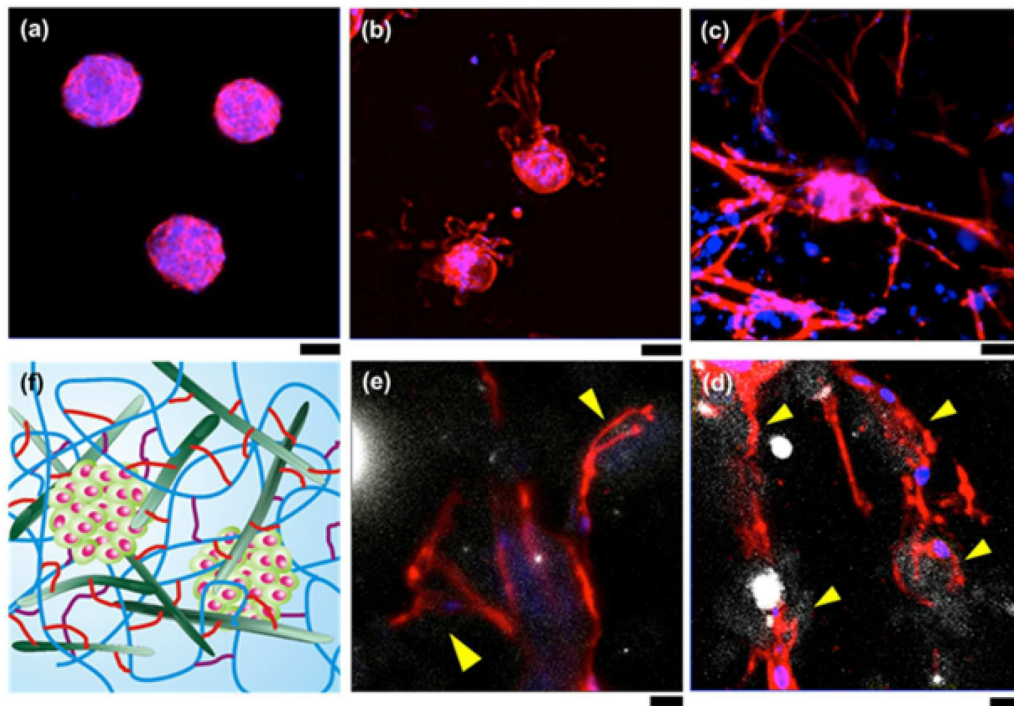
도면9



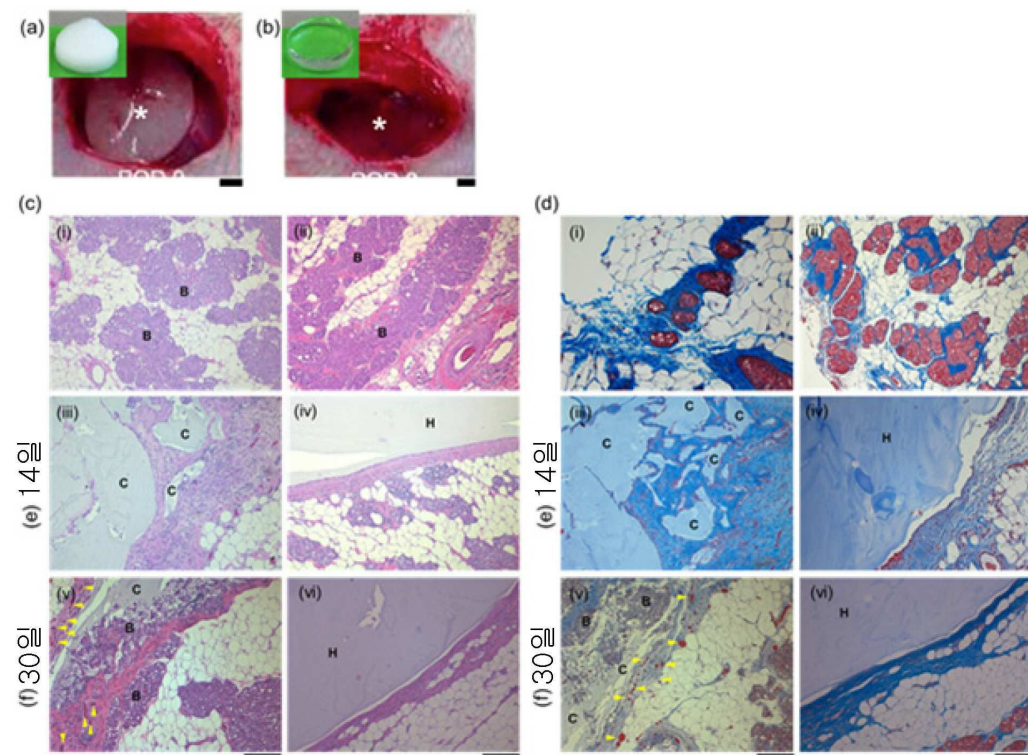
도면10



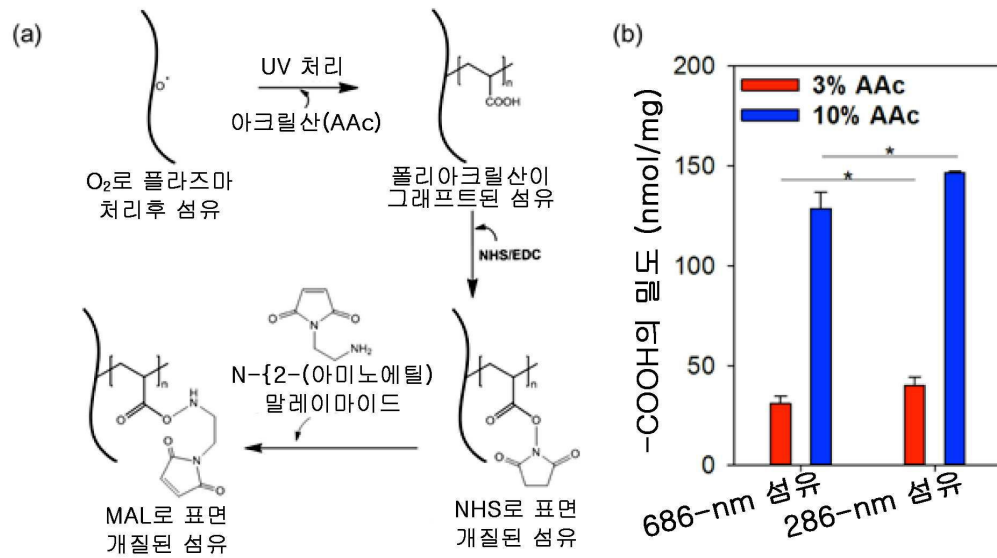
도면11



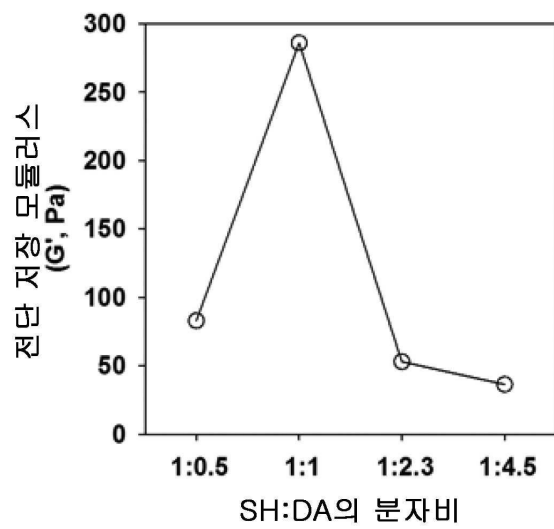
도면12



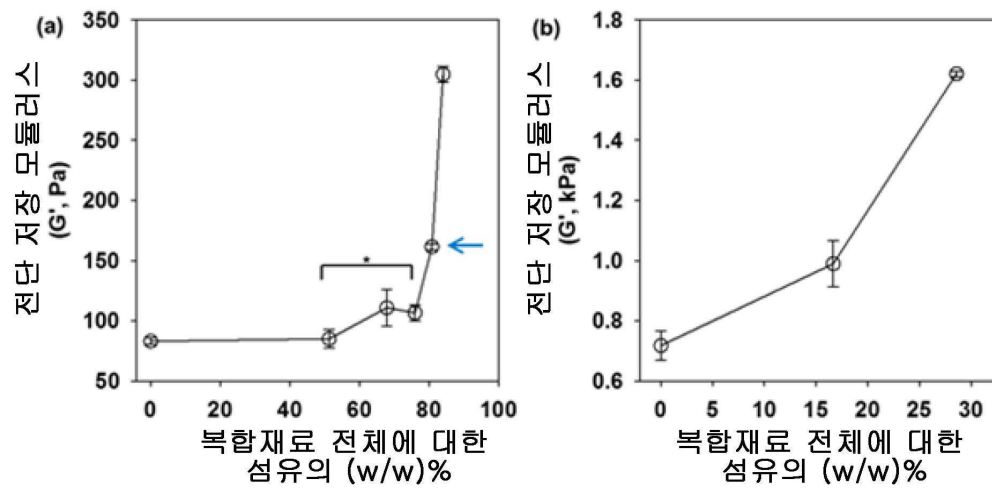
도면13



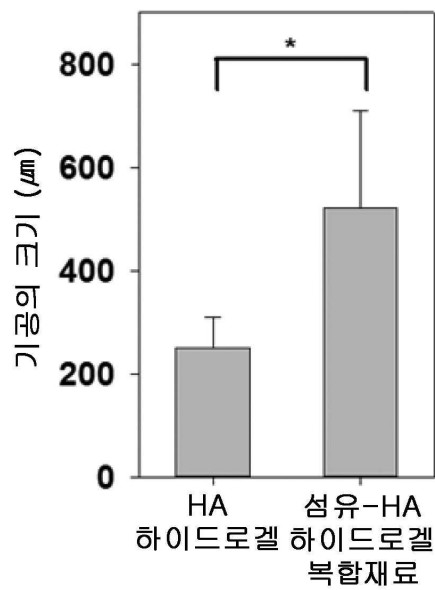
도면14



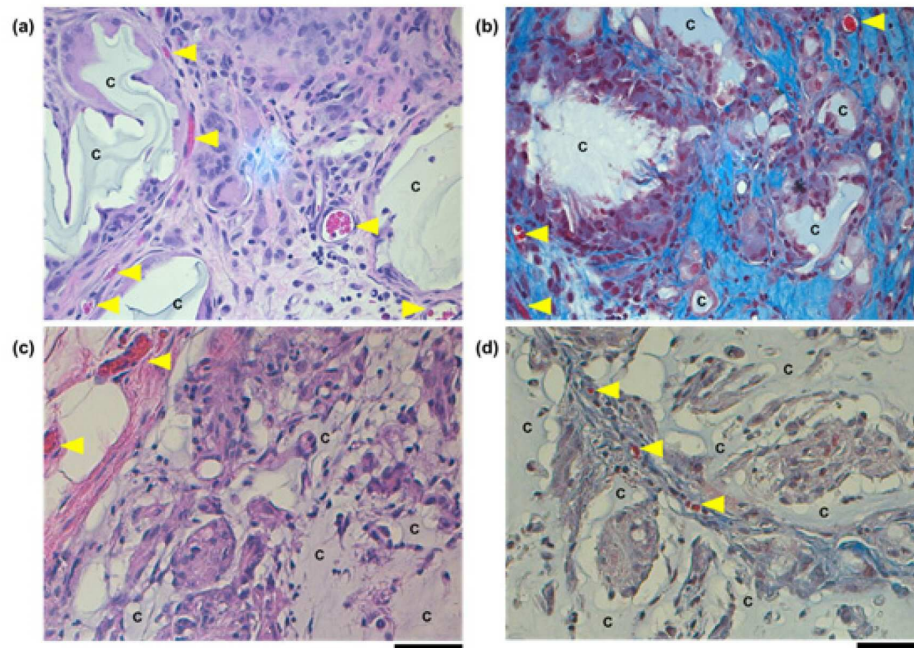
도면15



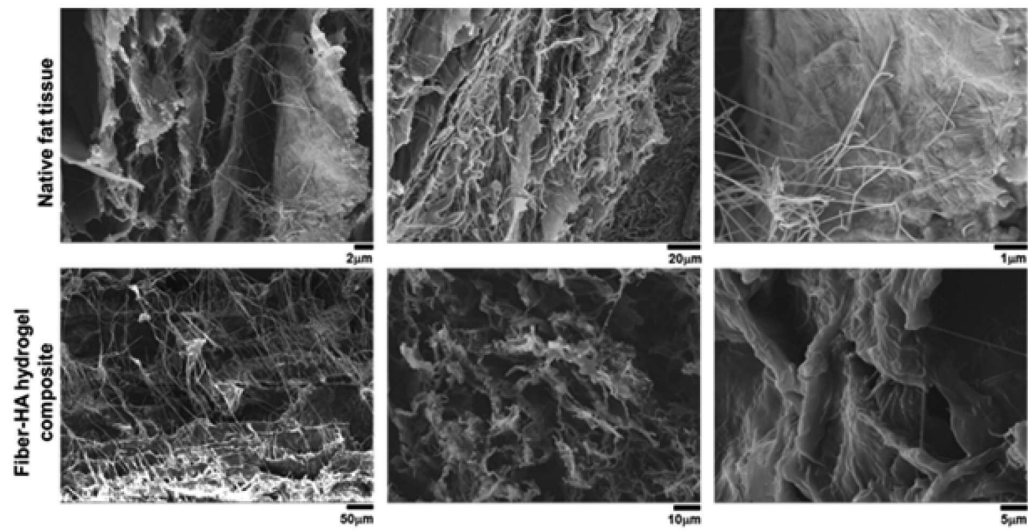
도면16



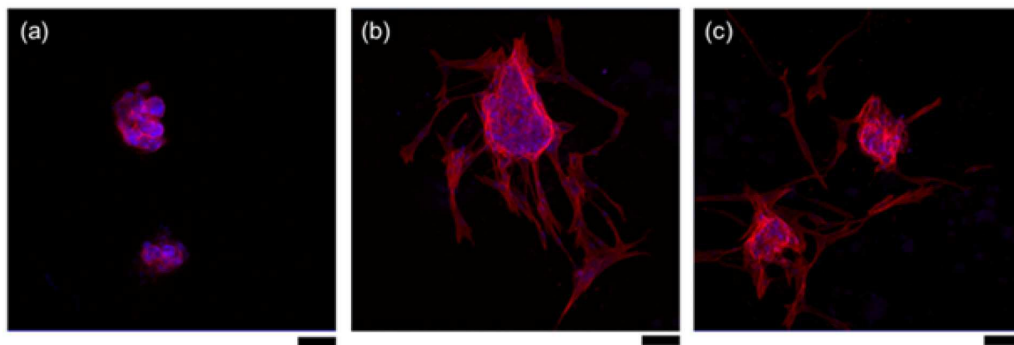
도면17



도면18



도면19



도면20

