

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2018년 1월 18일 (18.01.2018) **WIPO | PCT**



(10) 국제공개번호  
**WO 2018/012702 A1**

(51) 국제특허분류:

*A61L 27/18* (2006.01) *A61F 13/00* (2006.01)  
*A61L 27/54* (2006.01) *A61F 11/00* (2006.01)  
*D01D 5/00* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2017/002262

(22) 국제출원일: 2017년 3월 2일 (02.03.2017)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:  
10-2016-0088071 2016년 7월 12일 (12.07.2016) KR  
10-2017-0018835 2017년 2월 10일 (10.02.2017) KR

(71) 출원인: 아주대학교산학협력단 (AJOU UNIVERSITY  
INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUN-

DATION) [KR/KR]; 16499 경기도 수원시 영통구 월드컵로 206 (원천동), Gyeonggi-do (KR).

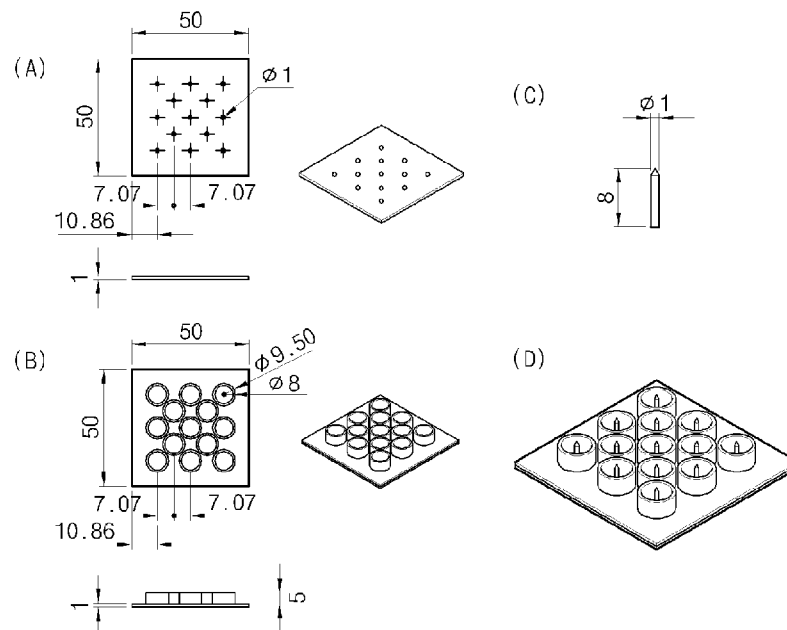
(72) 발명자: 정연훈 (CHOUNG, Yun-Hoon); 05507 서울시 송파구 올림픽로 435, 226동 504호, Seoul (KR). 정종훈 (CHUNG, Jong Hoon); 06592 서울시 서초구 서초중앙로 29길 28, 307동 1410호, Seoul (KR). 선우훈 (SEON-WOO, Hoon); 08753 서울시 관악구 신림로 68길 29-14, 801호, Seoul (KR). 장경제 (JANG, Kyoung-Je); 05669 서울시 송파구 가락로 23길 16-16, 202호, Seoul (KR). 신범용 (SHIN, Beomyong); 16239 경기도 수원시 팔달구 팔달문로 131번길 20, 3045호, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 특허법인 태백 (TAEBAEK INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 08506 서울시 금천구 가산디지털1로 151 이노플렉스 1차 601호, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT,

(54) Title: PCL PATCH TISSUE REGENERATION SCAFFOLD AND METHOD FOR MANUFACTURING SAME

(54) 발명의 명칭: PCL 패치 조직재생 지지체 및 그 제조방법



(57) Abstract: The present invention relates to a PCL patch tissue regeneration scaffold and a method for manufacturing same and, more particularly, provides a method for manufacturing a PCL patch tissue regeneration scaffold, wherein the method comprises: a step for preparing a solution by adding polycaprolactone (PCL) and an acid to an organic solvent, and then stirring; a step for preparing an electrospinning solution by adding a growth factor to the solution, and then stirring; and a step for collecting nanofibers in a fusiform arrangement in a collector by connecting the prepared electrospinning solution to a syringe pump, and then operating an electrospinning machine. A PCL patch tissue regeneration scaffold according to the present invention may be usefully used for the treatment of acute and chronic tympanic membrane perforation. In particular, the PCL patch tissue regeneration scaffold can reduce the preference given to surgery in treatment methods that rely on surgery to treat chronic tympanic membrane perforation, and enable a high rate of tympanic membrane recovery. Moreover, the PCL and patch tissue regeneration scaffold can be applied to the regeneration and treatment of other



AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

damaged tissue, and by mimicking the tissue structure of other parts of the body, enable the development and application of various tissue regeneration scaffolds.

(57) 요약서: 본 발명은 PCL 패치 조직재생 지지체 및 그 제조방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 유기용매에 폴리카프로락톤(PCL) 과 산을 첨가한 후 교반하여 용액을 준비하는 단계; 상기 용액에 성장인자를 첨가한 후 교반하여 전기방사 용액을 준비하는 단계; 및 상기 준비된 전기방사 용액을 시린지 펌프에 연결한 후 전기방사 장치를 가동하여 컬렉터에 방추형으로 배열된 나노섬유를 포집하는 단계를 포함하는, PCL 패치 조직재생 지지체의 제조방법을 제공한다. 본 발명에 따른 PCL 패치 조직재생 지지체는 급성 및 만성고막 천공의 치료에 유용하게 이용될 수 있으며, 특히 만성고막 천공 치료를 위해 수술에 의존하는 치료법에서 수술의 비중을 줄이고 높은 고막 회복율을 나타낼 수 있다. 또한 PCL 및 패치 조직재생 지지체는 손상된 다른 조직의 재생 및 치료에 응용할 수 있으며, 인체의 다른 부위의 조직구조를 모사하여 다양한 조직재생 지지체의 개발 및 응용이 가능하다.

## 명세서

### 발명의 명칭: PCL 패치 조직재생 지지체 및 그 제조방법 기술분야

- [1] 본 발명은 PCL 패치 조직재생 지지체 및 그 제조방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 성장인자 방출형의 폴리카프로락톤(Polycaprolactone; 이하 'PCL') 패치 조직재생 지지체 및 그 제조방법에 관한 것이다.

### 배경기술

- [2] 만성중이염(만성고막천공)은 고막천공이 지속되는 질환으로 이비인후과 영역에서 가장 흔한 청력손상의 원인 중 하나이지만 아직까지도 대부분의 치료적 방법을 수술적 방법(고막재생술)에 의존하고 있다.
- [3] 고막천공은 크게 급성과 만성으로 나눌 수 있는데, 급성 고막천공은 천공의 크기가 크지 않을 경우 자연적으로 재생될 가능성이 높으나, 3개월 이상 되는 만성고막천공(만성중이염)은 대부분 자연적으로 치유되지 않으며, 오래되는 경우 이루, 화농, 청력소실, 안면신경마비, 또는 뇌 농양 등의 합병증을 유발할 수 있다.
- [4] 이러한 만성중이염의 치료를 위해서는 일반적으로 고막재생술 이라는 수술적 방법을 사용하게 되는데, 비용이 많이 들고, 1시간 이상의 수술시간과 마취가 요하는 등의 복잡한 술식을 요하며, 입원이 필요하고, 재발율이 10% 이상에 달하는 등의 많은 문제점을 가지고 있다.
- [5] 통계청 발표에 의하면 2009년부터 2013년까지 중이염에 의한 환자 수는 평균 170만명 정도이며, 진료비 또한 약 1700억원 규모로 형성되어 있음이 조사되었다.
- [6] 이러한 수술적 방법의 문제점을 극복하고자 많은 방법이 연구되어오고 있는데, 그 중 가장 고전적인 방법이 paper patch technique이다. 즉, 천공부위에 종이 패치를 잘라 붙이는 것으로 고막천공 변연의 세포가 종이패치를 지지대로 삼아 자랄 수 있게 하는 역할을 해주는 치료법이다. 일반적으로 작은 천공 크기의 급성고막천공에 효과가 있으나 만성고막천공에는 전혀 효과가 없는 것으로 알려져 있다. 즉, 비생체적합성 물질로 인하여 염증을 유발하고 성공률이 10%에 미치지 못하는 것으로 알려졌다.
- [7] 이러한 paper patch technique 외에 만성고막 천공 치료를 위하여 패치형태의 스캐폴드를 적용하는 연구중, 성장인자를 포함하는 키토산 패치를 제작한 뒤, 이를 만성 동물모델에 적용하여 치료효과를 확인하는 시도가 보고되었다. 키토산 패치에 성장인자를 담지시켜 서방성을 가지도록 하였고, 이를 통해 만성고막천공 동물모델에서 높은 치유율을 보이는 것이 확인되었다. 상기 키토산 패치에 담지시킨 상피성장인자(epidermal growth factor; 이하 'EGF')등은 줄기세포의 증식에 영향을 주는 요소로 알려져 있으며, 이를 담지한 패치는

고막천공의 변연에 남아있는 줄기세포를 자극하여 만성고막천공 치료에 영향을 주는 것으로 보고되어 있다. 다만, 상기 키토산 패치는 미 식약청 FDA로부터 승인받지 못하여 임상에 쉽게 적용하기 위한 다양한 시도들이 이루어지지 않은 문제점이 있다.

- [8] 인체의 모든 세포는 세포외기질(extracellular matrix; 이하 'ECM')이 제공하는 다양한 환경 속에 있으며, 세포외 기질은 각각의 특징적인 나노 구조를 갖는 것으로 보고되고 있다. 최근 보고된 연구에 따르면 인 비트로(in vitro) 실험에서 세포가 부착하여 자라는 기질의 표면 나노구조에 의해서 세포의 모양, 이동성 뿐만 아니라 기능까지 조절 될 수 있음이 확인되었다. 따라서, 고막조직의 경우에도 적절한 나노환경을 제공할 경우, 고막줄기세포가 나노구조의 모양이나 배치에 반응하여 그 모양이나 이동성, 그리고 기능까지 변화할 수 있음을 시사하고 있다.
- [9] 나노섬유를 가장 쉽게 제조할 수 있는 방법으로 전기방사법이 있으며, 이는 균일하고 연속적이며, 조성비에 따라 다양한 특성을 발휘할 수 있는 나노섬유를 제조할 수 있는 방법이다. 이 때, 전기방사법에서 방사된 나노섬유를 획득하는 부분을 컬렉터라고 부르며, 컬렉터의 형태에 따라 수득하는 나노섬유의 특성을 조절 할 수 있다. 국내외의 활발한 연구를 통해 전기방사를 통해 얻어진 나노구조에서도 세포의 특성이 조절됨을 발견 하였다.
- [10] 다만, 약물전달체 및 다양한 의료용 분야 연구에 사용될 수 있는 생분해성과 생체적합성이 우수한 고분자를 전기방사법을 통해 방추형의 조직재생 지지체를 제조하는 방법에 대해서는 전무한 상황이다.

## 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

- [11] 본 발명의 목적은 간편하고 효율적이며 재발율이 적은 만성고막 천공의 비수술적 치료방법으로 사용될 수 있는 PCL 패치 조직재생 지지체 및 그 제조방법을 제공하는 데에 있다.

### 과제 해결 수단

- [12] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 유기용매에 폴리카프로락톤(PCL)과 산을 첨가한 후 교반하여 용액을 준비하는 단계; 상기 용액에 성장인자를 첨가한 후 교반하여 전기방사 용액을 준비하는 단계; 및 상기 준비된 전기방사 용액을 시린지 펌프에 연결한 후 전기방사 장치를 가동하여 컬렉터에 방추형으로 배열된 나노섬유를 포집하는 단계를 포함하는, PCL 패치 조직재생 지지체의 제조방법을 제공한다.
- [13] 또한 본 발명은 유기용매에 폴리카프로락톤(PCL) 및 폴리에틸렌글라이콜(PEG)과 산을 첨가한 후 교반하여 폴리카프로락톤-폴리에틸렌글라이콜 공중합체 용액을 준비하는 단계; 상기 용액에 성장인자를 첨가한 후 교반하여 전기방사 용액을 준비하는 단계; 및 상기

준비된 전기방사 용액을 펌프에 연결한 후 전기방사 장치를 가동하여 컬렉터에 방추형으로 배열된 나노섬유를 포집하는 단계;를 포함하는, PCL 및 PEG 패치 조직재생 지지체의 제조방법을 제공한다.

[14] 또한 본 발명은 방추형으로 배열된 나노섬유로서, 폴리카프로락톤을 포함하는, PCL 패치 조직재생 지지체를 제공한다.

[15] 또한 본 발명은 방추형으로 배열된 나노섬유로서, 폴리카프로락톤 및 폴리에틸렌글라이콜을 포함하는, PCL 및 PEG 패치 조직재생 지지체를 제공한다.

[16] 또한 본 발명은 상기 PCL 패치 조직재생 지지체를 포함하는, 만성고막 천공의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[17] 또한 본 발명은 PCL 및 PEG 패치 조직재생 지지체를 포함하는, 만성고막 천공의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

### 발명의 효과

[18] 본 발명에 따른 PCL 패치 조직재생 지지체는 만성고막 천공의 치료에 유용하게 이용될 수 있으며, 특히 만성고막 천공 치료를 위해 수술에 의존하는 치료법에서 수술의 비중을 줄이고 높은 고막 회복율을 나타낼 수 있다. 또한 PCL 패치 조직재생 지지체는 손상된 다른 조직의 재생 및 치료에 응용할 수 있으며, 인체의 다른 부위의 조직구조를 모사하여 다양한 조직재생 지지체의 개발 및 응용이 가능하다.

### 도면의 간단한 설명

[19] 도 1은 컬렉터의 하판 설계도(a), 컬렉터 하판에 원기둥형 컬렉터를 배치한 도면(b), 컬렉터 하판에 부착시킬 한쪽 끝이 뾰족한 금속 기둥의 디자인(c), 및 모든 구성요소를 결합하여 모델링한 모습을 나타낸 방추형 패턴 패치 제작을 위한 전기방사용 컬렉터(d)를 나타낸 도면;

[20] 도 2는 전기방사된 방추형 PCL 패치의 전자현미경 이미지를 나타낸 것으로서, 방추형 PCL 패치를 200 배율로 촬영한 사진(a), 방추형 PCL 패치를 3000배로 확대하여 촬영한 사진(b), 방추형 PCL 패치를 300,000배로 확대하여 촬영한 사진(c), 및 300,000배로 촬영한 사진을 이미지 분석하여 나노섬유 가닥의 두께를 측정한 사진(d)으로 나타낸 도면;

[21] 도 3은 전기방사된 방추형 PCL 및 PEG 패치의 전자현미경 이미지를 나타낸 것으로서, 방추형 PCL 및 PEG 패치를 200 배율로 촬영한 사진(a), 방추형 PCL 및 PEG 패치를 3000배로 확대하여 촬영한 사진(b), 방추형 PCL 및 PEG 패치를 300,000배로 확대하여 촬영한 사진(c), 및 300,000배로 촬영한 사진을 이미지 분석하여 나노섬유 가닥의 두께를 측정한 사진(d)으로 나타낸 도면;

[22] 도 4는 EGF가 담지된 PCL 패치 지지체에서의 TM 세포의 형태를 관찰한 도면;

[23] 도 5a 및 도 5b는 전기방사를 이용하여 제조된 방추형 PCL 패치에서의 고막줄기세포(TM cell)의 세포증식시험결과를 나타낸 것으로서, PCL과

IGFBP2를 담지한 PCL 패치에서의 고막줄기세포 증식결과 및 PCL과 EGF를 담지한 PCL 패치에서의 고막줄기세포 증식결과를 나타낸 도면;

- [24] 도 6은 전기방사를 이용하여 제조된 방추형 PCL 및 PEG 패치에서의 고막줄기세포(TM cell)의 세포증식시험결과를 나타낸 것으로서, 실시예 4와 비교예 5 내지 7에 따라 제조된 패치 상에서의 고막줄기세포 증식결과를 나타낸 도면;
- [25] 도 7은 만성고막천공 동물모델에서의 패치 적용 시험 결과를 나타낸 것으로서, 방추형 PCL 패치를 적용시켜 치료된 시험군의 고막 사진(a 내지 e)이며, 아래의 표는 대조군과 EGF-R(EGF가 포함된 랜덤형) PCL 패치, EGF-N(EGF가 포함된 방추형) PCL 패치의 치료율을 표로 나타낸 도면; 및
- [26] 도 8은 만성고막천공 동물모델에서의 패치 적용 시험 결과를 나타낸 것으로서, 방추형 PCL 패치를 적용시켜 치료된 시험군의 고막 사진(a 내지 e)이며, 아래의 표는 대조군과 EGF-R(EGF가 포함된 랜덤형) PCL 패치, EGF-N(EGF가 포함된 방추형 패턴) PCL 패치의 치료율을 표로 나타낸 도면이다.

### 발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [27] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [28] 본 발명의 발명자들은 전기방사법을 이용하여 컬렉터의 형태에 따라 수득하는 나노섬유의 특성을 조절함으로써 나노구조에서도 세포의 특성이 조절될 수 있음을 발견하였고, 특히 PCL 패치가 담지하고 있는 성장인자와 방추형으로 배열된 PCL 패치 지지체가 만성 고막 치료에 효과가 있음을 밝혀내어 본 발명을 완성하였다.
- [29] 본 발명은 유기용매에 폴리카프로락톤(PCL)과 산을 첨가한 후 교반하여 용액을 준비하는 단계; 상기 용액에 성장인자를 첨가한 후 교반하여 전기방사 용액을 준비하는 단계; 및 상기 준비된 전기방사 용액을 시린지 펌프에상기 컬렉터는 침을 내부에 수용하는 원통형태로 연결한 후 전기방사 장치를 가동하여 컬렉터에 방추형으로 배열된 나노섬유를 포집하는 단계를 포함하는, PCL 패치 조직재생 지지체의 제조방법을 제공한다.
- [30] 상기 폴리카프로락톤은 카프로락톤(CL)으로부터 중합되는 폴리에스터 계열의 생분해성 고분자이다. 폴리카프로락톤(PCL)은 생분해성과 생체적합성이 우수한 고분자로 알려져 있으며, 이 때문에 약물 전달체 및 다양한 의료용 분야 연구에 사용될 수 있다.
- [31] 상기 용액을 준비하는 단계는 유기용매에 폴리카프로락톤과 산을 첨가한 후 24 내지 48시간 동안 200 내지 500 rpm 속도로 교반하는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [32] 상기 유기용매 내 폴리카프로락톤의 농도는 70 내지 90 mg/ml일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [33] 상기 유기용매는 트리플루오로에탄올(2,2,2-trifluoroethanol),

클로로포름(chloroform), 디클로로메탄(dichloromethane), 테트라하이드로퓨란(tetrahydrofuran), 디메틸포름아마이드(dimethylformamide), 및 디메틸설폭사이드(dimethylsulfoxide)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [34] 상기 산은 아세트산, 포름산, 프로피온산, 및 젖산으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [35] 상기 성장인자는 상피 성장인자(EGF), 섬유아세포 성장인자(FGF), 인슐린양 성장인자 결합단백질(IGFBP), 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [36] 상기 상피 성장인자(EGF)는 DNA, RNA, 단백질, 히알루론산과 피브로넥틴의 합성을 촉진시키는 역할을 한다. 상기 EGF는 고막천공이 치유되는 초기에 많이 발견되며 상기 EGF가 헤파린과 결합된 성장인자는 고막천공의 치유에 중요한 역할을 수행할 수 있다.
- [37] 상기 섬유아세포 성장인자(FGF)는 섬유아세포의 이동을 돕고 세포를 증식시키며 회복시킬 수 있다.
- [38] 상기 인슐린양 성장인자 결합단백질(IGFBP)은 세포 사멸을 방지하고 세포 내 기질에 따라 성장을 촉진시키거나 분화를 촉진시킬 수 있다.
- [39] 상기 전기방사 용액을 준비하는 단계는 용액에 성장인자를 0.16 내지 16  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 첨가하는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [40] 상기 전기방사 용액을 준비하는 단계는 상기 용액에 성장인자를 첨가한 후 0 내지 10°C에서 20 내지 30분 동안 교반하는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [41] 상기 나노섬유를 포집하는 단계는 준비된 전기방사 용액을 시린지 펌프에 연결한 후 0.2 ~ 3.0  $\mu\text{l}/\text{hr}$ 의 속도로 방출하여 전기방사 장치를 가동하는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [42] 상기 나노섬유는 평균두께가 200 내지 800 nm일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [43] 상기 컬렉터는 침을 내부에 수용하는 원통형대로 이루어진 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [44] 도 1을 참조하면, 상기 컬렉터는 대전된 나노섬유를 포집하는 역할을 수행하며, 전도성이 우수한 구리 파이프와 그 가운데 끝이 날카로운 금속성 바늘로 구성되어 있다.
- [45] 또한 본 발명은 유기용매에 폴리카프로락톤(PCL) 및 폴리에틸렌글라이콜(PEG)과 산을 첨가한 후 교반하여 폴리카프로락톤-폴리에틸렌글라이콜 공중합체 용액을 준비하는 단계; 상기 용액에 성장인자를 첨가한 후 교반하여 전기방사 용액을 준비하는 단계; 및 상기 준비된 전기방사 용액을 펌프에 연결한 후 전기방사 장치를 가동하여 컬렉터에 방추형으로 배열된 나노섬유를 포집하는 단계;를 포함하는, PCL 및 PEG 패치

- 조직재생 지지체의 제조방법을 제공한다.
- [46] 상기 용액을 준비하는 단계는 유기용매에 폴리카프로락톤 및 폴리에틸렌글라이콜과 산을 첨가한 후 24 내지 48시간 동안 200 내지 500 rpm 속도로 교반하는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [47] 상기 유기용매 내 폴리카프로락톤의 농도는 100 내지 160 mg/ml일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [48] 상기 유기용매 내 폴리에틸렌글라이콜의 농도는 40 내지 100 mg/ml일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [49] 상기 유기용매는 트리플루오로에탄올(2,2,2-trifluoroethanol), 클로로포름(chloroform), 디클로로메탄(dichloromethane), 테트라하이드로퓨란(tetrahydrofuran), 디메틸포름아마이드(dimethylformamide), 및 디메틸설폭사이드(dimethylsulfoxide)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [50] 상기 산은 아세트산, 포름산, 프로피온산, 및 젖산으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [51] 상기 성장인자는 상피 성장인자(EGF), 섬유아세포 성장인자(FGF), 인슐린양 성장인자 결합단백질(IGFBP), 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [52] 상기 전기방사 용액을 준비하는 단계는 용액에 성장인자를 0.16 내지 16  $\mu\text{g/ml}$ 로 첨가할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [53] 상기 전기방사 용액을 준비하는 단계는 상기 용액에 성장인자를 첨가한 후 0 내지 10°C에서 20 내지 30분 동안 교반하는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [54] 상기 나노섬유를 포집하는 단계는 준비된 전기방사 용액을 펌프에 연결한 후 0.2 ~ 3.0  $\mu\text{l/hr}$ 의 속도로 방출하여 전기방사 장치를 가동하는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [55] 상기 나노섬유는 평균두께가 200 내지 800 nm일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [56] 상기 컬렉터는 침을 내부에 수용하는 원통형대로 이루어진 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [57] 또한 본 발명은 방추형으로 배열된 나노섬유로서, 폴리카프로락톤을 포함하는, PCL 패치 조직재생 지지체를 제공한다.
- [58] 상기 PCL 패치 조직재생 지지체는 성장인자를 더 포함할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [59] 상기 PCL 패치 조직재생 지지체는 폴리카프로락톤 및 성장인자를  $10^4$  내지  $10^6$  : 1의 중량비로 포함할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [60] 상기 성장인자는 상피 성장인자(EGF), 섬유아세포 성장인자(FGF), 인슐린양 성장인자 결합단백질(IGFBP), 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느

하나일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[61] 상기 나노섬유는 평균두께가 200 내지 800 nm일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[62] 또한 본 발명은 방추형으로 배열된 나노섬유로서, 폴리카프로락톤 및 폴리에틸렌글라이콜을 포함하는, PCL 및 PEG 패치 조직재생 지지체를 제공한다.

[63] 상기 PCL 및 PEG 패치 조직재생 지지체는 성장인자를 더 포함할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[64] 상기 PCL 및 PEG 패치 조직재생 지지체는 폴리카프로락톤 및 성장인자를 ( $7 \times 10^4 \sim 7 \times 10^6$ ): 1의 중량비로 포함할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[65] 상기 PCL 및 PEG 패치 조직재생 지지체는 폴리에틸렌글라이콜 및 성장인자를 ( $3 \times 10^4 \sim 3 \times 10^6$ ): 1의 중량비로 포함할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[66] 상기 PCL 및 PEG 패치 조직재생 지지체는 폴리카프로락톤 및 폴리에틸렌글라이콜을 (2 ~ 4): 1의 중량비로 포함할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[67] 상기 성장인자는 상피 성장인자(EGF), 섬유아세포 성장인자(FGF), 인슐린양 성장인자 결합단백질(IGFBP), 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[68] 상기 나노섬유는 평균두께가 200 내지 800 nm일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[69] 또한 본 발명은 상기 PCL 패치 조직재생 지지체를 포함하는, 만성고막 천공의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[70] 또한 본 발명은 PCL 및 PEG 패치 조직재생 지지체를 포함하는, 만성고막 천공의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[71] 상기 조성물은 약학 조성물 또는 건강기능식품일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[72] 상기 약학조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[73] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물은 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다.

[74] 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지

부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

- [75] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [76] 상기 약학조성물의 유효성분인 화합물의 사용량은 환자의 나이, 성별, 체중, 질환에 따라 달라질 수 있으나, 0.001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.01 내지 10 mg/kg을 일일 1회 내지 수회 투여할 수 있다.
- [77] 상기 약학 조성물의 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [78] 상기 약학 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 기관지내 흡입, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [79] 또한, 상기 건강기능식품은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽 또는 음료의 형태로 제공될 수 있으며, 상기 건강기능식품은 유효성분인 본 발명에 따른 화합물 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적 예를들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [80] 상기 건강기능식품에 함유된 화합물의 유효용량은 상기 약학조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.
- [81] 상기 건강기능식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등을 들 수 있다.

#### 발명의 실시를 위한 형태

- [82] 이하, 하기 실시예에 의해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.
- [83]
- [84] <실시예 1>
- [85] 22 gage의 니들 말단과 컬렉터 사이의 거리는 10 cm로 고정하였고,

전압발생장치로 18 kV의 전압을 발생시켰다.

- [86] 트리플루오로에탄올(TFE) 2 ml에 160 mg의 폴리카프로락톤(PCL)과 아세트산(Acetic acid) 40  $\mu$ l를 첨가한 용액을 제조하였다. 이후 PCL이 TFE에 완전히 용해 될 수 있도록 24 내지 48시간 동안 300 rpm의 속도로 교반시켜 용액을 준비하였다.
- [87] PCL이 완전히 용해되었음을 확인한 뒤 1.6  $\mu$ g의 EGF를 용액에 첨가하였다. 이후, EGF가 PCL과 잘 혼합될 수 있도록 4°C에서 20분 동안 교반시켜 전기방사 용액을 준비하였다.
- [88] 상기 준비된 전기방사 용액을 시린지에 넣고 시린지 펌프를 연결하여 0.6  $\mu$ l/hr의 속도로 방사하였다.
- [89] 도 1에 나타낸 바와 같이 방추형 패턴 패치의 형태로 포집이 가능하도록, 전도성이 좋은 구리 파이프와 그 가운데 끝이 날카로운 금속성 바늘로 구성되어있는 컬렉터를 이용하였고, 1.6 kV/cm의 전기장이 생성되도록 조건을 조절하여 전기방사 장치를 작동시킴으로써 방추형으로 배열된 PCL 패치 조직재생 지지체를 제조하였다. 이하 실시예 1에 따라 제조된 PCL 패치 조직재생 지지체를 'EGF-A'로 명명하였다.

[90]

[91] <실시예 2>

- [92] EGF 대신에 IGFBP을 1.6  $\mu$ g 첨가한 것을 제외하고는, 상기 실시예 1과 동일한 조건으로 방추형으로 배열된 PCL 패치 조직재생 지지체를 제조하였다. 이하 실시예 2에 따라 제조된 PCL 패치 조직재생 지지체를 'IGFBP-A'로 명명하였다.

[93]

[94] <실시예 3>

- [95] EGF와 IGFBP을 각각 1.6  $\mu$ g 및 1.6  $\mu$ g 첨가한 것을 제외하고는, 상기 실시예 1과 동일한 조건으로 방추형으로 배열된 PCL 패치 조직재생 지지체를 제조하였다. 이하 실시예 3에 따라 제조된 PCL 패치 조직재생 지지체를 'EGF/IGFBP-A'로 명명하였다.

[96]

[97] <실시예 4>

- [98] 22 gage의 니들 말단과 컬렉터 사이의 거리는 10 cm로 고정하였고, 전압발생장치로 18 kV의 전압을 발생시켰다.
- [99] 트리플루오로에탄올(TFE) 2 ml에 280 mg의 폴리카프로락톤(PCL, MW: 80,000, Sigma Aldrich), 및 120 mg의 폴리에틸렌글라이콜(PEG, MW: 3,350, Sigma Aldrich)과 아세트산(Acetic acid, Sigma Aldrich) 40  $\mu$ l를 첨가한 용액을 제조하였다. 이후 PCL과 PEG가 TFE에 완전히 용해될 수 있도록 24 내지 48시간 동안 300 rpm의 속도로 교반시켜 용액을 준비하였다.
- [100] PCL과 PEG가 완전히 용해되었음을 확인한 뒤 4  $\mu$ g의 EGF를 용액에 첨가하였다. 이후, EGF가 PCL 및 PEG와 잘 혼합될 수 있도록 4°C에서 20분 동안

교반시켜 전기방사 용액을 준비하였다.

[101] 상기 준비된 전기방사 용액을 시린지에 넣고 시린지 펌프를 연결하여 0.6  $\mu\text{L/hr}$ 의 속도로 방사하였다.

[102] 도 1에 나타낸 바와 같이 방추형 패턴 패치의 형태로 포집이 가능하도록, 전도성이 좋은 구리 파이프와 그 가운데 끝이 날카로운 금속성 바늘로 구성되어있는 컬렉터를 이용하였고, 1.6 kV/cm의 전기장이 생성되도록 조건을 조절하여 전기방사 장치를 작동시킴으로써 방추형으로 배열된 PCL 및 PEG 패치 조직재생 지지체를 제조하였다. 이하 실시예 4에 따라 제조된 PCL 및 PEG 패치 조직재생 지지체를 'PCL/PEG/EGF-A'로 명명하였다.

[103]

[104] <비교예 1>

[105] 성장인자인 EGF를 첨가하지 않고 전기방사 시 일반적으로 사용되는 컬렉터를 이용한 것을 제외하고는 상기 실시예 1과 동일한 조건이었으며, 이하 'PCL-R'로 명명하였다.

[106]

[107] <비교예 2>

[108] 성장인자인 EGF를 첨가하지 않은 것을 제외하고는 상기 실시예 1과 동일한 조건이었으며, 이하 'PCL-A'로 명명하였다.

[109]

[110] <비교예 3>

[111] 전기방사 시 일반적으로 사용되는 컬렉터를 이용한 것을 제외하고는 상기 실시예 1과 동일한 조건이었으며, 이하 'EGF-R'로 명명하였다.

[112]

[113] <비교예 4>

[114] 전기방사 시 일반적으로 사용되는 컬렉터를 이용한 것을 제외하고는 상기 실시예 2와 동일한 조건이었으며, 이하 'IGFBP-R'로 명명하였다.

[115]

[116] <비교예 5>

[117] 전기방사 시 일반적으로 사용되는 컬렉터를 이용한 것을 제외하고는 상기 실시예 4와 동일한 조건이었으며, 이하 'PCL/PEG/EGF-R'로 명명하였다.

[118]

[119] <비교예 6>

[120] 성장인자인 EGF를 첨가하지 않고 전기방사 시 일반적으로 사용되는 컬렉터를 이용한 것을 제외하고는 상기 실시예 4와 동일한 조건이었으며, 이하 'PCL/PEG-R'로 명명하였다.

[121]

[122] <비교예 7>

[123] 성장인자인 EGF를 첨가하지 않은 것을 제외하고는 상기 실시예 4와 동일한

조건이었으며, 이하 'PCL/PEG-A'로 명명하였다.

[124]

[125] <실험예 1> 고막재생용 방추형 PCL 패치 지지체의 형태학적 분석

[126] 방사 조건을 달리하여 제조된 고막재생용 방추형 PCL 패치 지지체의 표면 특성을 분석하기 위하여 주사전자현미경(SUPRA, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 주사전자현미경 분석(scanning electron microscopy; 이하 'SEM')을 수행하였다.

[127] 도 2(a) 내지 도 2(d)는 침을 내부에 수용하는 원통형 컬렉터에서 얻어진 방추형 PCL 패치의 주사전자현미경 이미지를 나타낸 것이다. 도 2(a)를 참조하면, 200 배율로 촬영한 사진을 통해 각각의 나노섬유 가닥이 정중앙을 향하고 있는 모습을 확인할 수 있었다.

[128] 도 2(b) 및 도 2(c)는 시료의 특정 부분을 무작위로 확대하여 얻었다. 대부분의 나노섬유 가닥이 직선으로 뻗어 있음을 확인할 수 있었다.

[129] 도 2(d)를 참조하면, 각각의 나노섬유 가닥의 두께는 300 nm를 넘지 않는 결과를 나타내었다.

[130]

[131] <실험예 2> 고막재생용 방추형 PCL 및 PEG 패치 지지체의 형태학적 분석

[132] 방사 조건을 달리하여 제조된 고막재생용 방추형 PCL 및 PEG 패치 지지체의 표면 특성을 분석하기 위하여 주사전자현미경(SUPRA, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 주사전자현미경 분석(scanning electron microscopy; 이하 'SEM')을 수행하였다.

[133] 또한, 도 3(a) 내지 도 3(d)는 침을 내부에 수용하는 원통형 컬렉터에서 얻어진 방추형 PCL 및 PEG 패치의 주사전자현미경 이미지를 나타낸 것이다.

[134] 도 3(a)를 참조하면, 200 배율로 촬영한 사진을 통해 각각의 나노섬유 가닥이 정중앙을 향하고 있는 모습을 확인할 수 있었다.

[135] 또한, 도 3(b) 및 도 3(c)는 시료의 특정 부분을 무작위로 확대하여 얻은 이미지로서, 대부분의 나노섬유 가닥이 직선으로 뻗어 있음을 확인할 수 있었다.

[136] 또한, 도 3(d)를 참조하면, 각각의 나노섬유 가닥의 두께는 300 nm를 넘지 않는 결과를 나타내었다.

[137]

[138] <실험예 3> PCL 나노패턴패치의 In Vitro 검사

[139] 인 비트로 검사를 위해 쥐 고막에서 채취한 쥐 섬유아세포 및 줄기세포 계대2(rat fibroblast passage 2; 아주대 이비인후학과 제공, 이하 "TM 세포")를 사용하였다. 냉동되어 있던 TM 세포를 해동한 뒤 DMEM low glucose, 10% FBS(Fatal Bovine Serum), 1% 페니실린을 혼합하여 만든 배지에 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 7 ~ 10시간 동안 배양하였다. TM 세포의 배양밀도가 컨플루언트(confluent)해진 것을 확인한 뒤 트립신 EDTA를 이용해 배양 플레이트에서 분리하였다.

- [140] 이때 실험군은 실시예 1에 의해 제조된 EGF가 포함된 방추형패치(EGF-A), 비교예 1에 의해 제조된 PCL을 부직포모양으로 방사한 나노패턴패치(PCL-R), 비교예 2에 의해 제조된 방추형으로 배열된 나노패턴패치(PCL-A), 및 비교예 3에 의해 제조된 EGF가 포함된 랜덤패치(EGF-R)로 하여 인 비트로 검사를 수행하였다.
- [141] 이후 96웰 플레이트에 상기 네 종류의 패치를 6 mm의 지름을 갖는 원형으로 제조하여 각각의 플레이트에 고정시켰다. 이후 96 웰 플레이트에 웰당  $1 \times 10^3$  개의 TM 세포를 각각 시딩하였다.
- [142] 이후 1일, 3일, 5일 간격으로 WST 시험법으로 세포의 활성을 측정하였다. 또한 실시예 2에 의해 제조된 IGFBP를 패치에 포함시켜서 상기한 것과 같은 과정의 실험을 반복하였다.
- [143] 실시예 1에 따른 EGF가 포함된 패치에 대하여 TM 세포의 부착 모양을 형광현미경을 통해 분석하였다. 이는 EGF가 포함된 나노섬유가 EGF 모양에 어떠한 역할을 부여하는지 조사함과 동시에, 나노패턴 패치에서 패턴의 영향을 예측하기 위해 실시하였다.
- [144] 도 4를 참조하면, Random은 랜덤모양으로 방사된 패치를 뜻하며, Aligned는 방추형으로 배열되게 제작된 패치를 의미하고, w/o EGF는 EGF가 함유되지 않았음을 의미하며, w EGF는 EGF가 함유되었음을 의미한다.
- [145] 도 4를 참조하면, EGF를 함유하고 있는 패치에서 TM 세포의 형태가 길쭉하게 늘어지는 현상을 관찰할 수 있었다. 또한 방추형 패턴이 세포를 중심(Centroid)방향으로 배열되게 하는 것을 확인할 수 있었고, 이러한 현상은 EGF가 함유되어 세포의 형태가 길쭉한 실험군에서 더 뚜렷하게 관찰되었다.
- [146] 도 5a 및 도 5b는 고막 줄기세포를 5일간 패치위에서 배양하여 세포의 활성도를 측정하는 방식으로 세포의 증식을 확인한 결과를 나타낸 것으로서, 실시예 1 및 실시예 2에 따라 제조된 EGF와 IGFBP를 포함하는 PCL 패치에서 유사한 실험결과를 관찰할 수 있었으며, 두 시험 모두 1일, 및 3일에서는 두드러진 차이를 나타내지 않음을 확인 할 수 있었고, 양쪽 실험 모두 5일차가 되어야 뚜렷한 차이를 나타내었다. 즉, 실시예 1 및 실시예 2에 따라 제조된 EGF 및 IGFBP를 포함하는 방추형 PCL 패치위에서의 세포 증식이 가장 활발해 짐을 관찰하였다.
- [147]
- [148] <실험예 4> PCL 및 PEG 나노패턴패치의 In Vitro 검사
- [149] 인 비트로 검사를 위해 쥐 고막에서 채취한 줄기세포 계대2(rat fibroblast passage 2; 아주대 이비인후학과 제공, 이하 "TM 세포")를 사용하였다. 냉동되어 있던 TM 세포를 해동한 뒤 DMEM low glucose, 10% FBS(Fatal Bovine Serum), 1% 페니실린을 혼합하여 만든 배지에 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 7 ~ 10시간 동안 배양하였다. TM 세포의 배양밀도가 컨플루언트(confluent)해진 것을 확인한 뒤 트립신 EDTA를 이용해 배양 플레이트에서 분리하였다.

- [150] 이때 실험군은 EGF가 포함된 PCL 및 PEG 방추형 나노패턴패치(실시예 4, PCL/PEG/EGF-A), EGF가 포함된 PCL 및 PEG를 부직포 모양으로 방사한 나노패치(비교예 5, PCL/PEG/EGF-R), EGF가 포함되지 않은 PCL 및 PEG를 부직포 모양으로 방사한 나노패치(비교예 6, PCL/PEG-R), 및 EGF가 포함되지 않은 PCL 및 PEG 방추형 나노패턴패치(비교예 7, PCL/PEG-A)로 하여 인 비트로 검사를 수행하였다.
- [151] 이후 96웰 플레이트에 상기 네 종류의 패치를 6 mm의 지름을 갖는 원형으로 제조하여 각각의 플레이트에 고정시켰다. 이후 96 웰 플레이트에 웰당  $1 \times 10^3$  개의 TM 세포를 각각 분주하였다.
- [152] 이후 1일, 3일, 7일 간격으로 WST 시험법으로 세포의 활성을 측정하였다.
- [153] 도 6은 고막 줄기세포를 1일, 3일, 7일 동안 패치 상에서 배양하여 세포의 활성도를 측정하는 방식으로 세포의 증식을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [154] 도면을 참조하면, 실시예 4 및 비교예 5에 따라 제조된 EGF를 포함하는 PCL 및 PEG 패치와 비교예 6 및 비교예 7에 따라 제조된 EGF를 포함하지 않은 PCL 및 PEG 패치에서, 1일, 3일, 7일에서 EGF를 포함하는 패치 상에서 세포 부착 및 증식이 빠른 점을 관찰하였다.
- [155] 그러나, 실시예 4와 비교예 5에 따라 제조된 EGF를 포함하는 PCL 및 PEG 패치를 비교하면, 비교예 5에 따라 제조된 패치에서 세포의 부착이 떨어나는 경향이나, 7일차에서의 세포 증식은 실시예 4에 따라 제조된 EGF를 포함하는 PCL 및 PEG 패치에서 더 우수한 경향을 보인 점을 고려하였을 때, 실시예 4에 따라 제조된 EGF를 포함하는 PCL 및 PEG 나노패턴패치 상에서 세포 증식이 빠른 점을 관찰하였다.
- [156]
- [157] <실험예 5> PCL 패치 지지체를 만성 고막동물모델에 적용
- [158] 만성고막천공 모델은 Choung's COM model 1 방법(Choi SJ, et al. TERM 2011)을 이용하여 Sprague-Dawley 쥐에서 8 주 이상 천공이 지속되는 고막을 만들었다. 실험군은 EGF 및 IGFBP-2를 포함하는 랜덤패치와 방추형패치를 접합시키고 대조군은 어떠한 처치도 시행하지 않았다. 고막천공의 크기는 내시경을 이용하여 사진을 촬영한 상태에서 고막은 긴장부(pars tensa)에 대한 천공 크기의 상대적 비율(%)로 표시하여 매주 크기의 변화를 측정하였다. 패치 접합 이후 8주간 관찰하여 고막의 치유율을 비교하였다.
- [159] 이 후 8주간 패치에 의한 치료효과를 관찰한다. 관찰 도중에 패치가 떨어지면 새롭게 패치를 붙여주며 관리 하였고, 마지막 8주차에 패치를 제거하여 천공부위를 관찰하였다.
- [160] 도 7은 만성고막 천공 동물모델에서의 PCL 패치 적용 결과를 나타낸 것으로서, 각각의 주황빛을 띄는 원형의 사진이 동물모델 각각의 고막 사진이며, 각각의 고막의 좌측하단에 보이는 어두운 색을 띄는 원이고막 천공을 나타낸다.
- [161] 도 7(a)는 회복이 이루어지지 않아 천공이 계속 유지 되되는 결과이며, 도 7(b)

내지 도 7(e)는 회복이 이루어져 천공이 대부분 사라진 모습을 볼 수 있다.

[162] 아무 처리도 하지 않은 대조군에서는(도 7(a) 참조), 21.4%(2/14)의 고막이 회복되는 것을 관찰 할 수 있었다. 비교예 3에 의해 제조된 EGF 랜덤PCL 패치를 적용한 실험군은 32.4%(12/37)의 고막 회복률을 보였으며, 실시예 1에 의해 제조된 EGF방추형 PCL 패치를 적용한 실험군은 48.4%(16/33)의 고막 회복률을 보이는 것으로 관찰되었다.

[163] 도 8은 만성고막 천공 동물모델에서의 IGFBP를 담지한 PCL 패치 적용 결과를 나타낸 것으로서, 아무 처리도 하지 않은 대조군에서는(도 8(a) 참조), 21.4%(2/14)의 고막이 회복되는 것을 관찰 할 수 있었다. 비교예 4에 의해 제조된 IGFBP 랜덤패치를 적용한 실험군은 32.4%(5/18)의 고막 회복률을 보였으며, 실시예 2에 의해 제조된 IGFBP 방추형패치를 적용한 실험군은 35.0%(7/20)의 고막 회복률을 보이는 것으로 관찰되었다. 이를 통해 PCL 패치가 담지하고 있는 성장인자(EGF 및 IGFBP)와, 패치 지지체의 방추형 패턴 구조가 만성 고막 치료에 효과가 있음을 확인하였다.

[164] 이상과 같이, 본 발명은 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 본 발명은 이것에 의해 한정되지 않으며 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 본 발명의 기술 사상과 아래에 기재될 청구범위의 균등 범위 내에서 다양한 수정 및 변형이 가능함은 물론이다.

## 청구범위

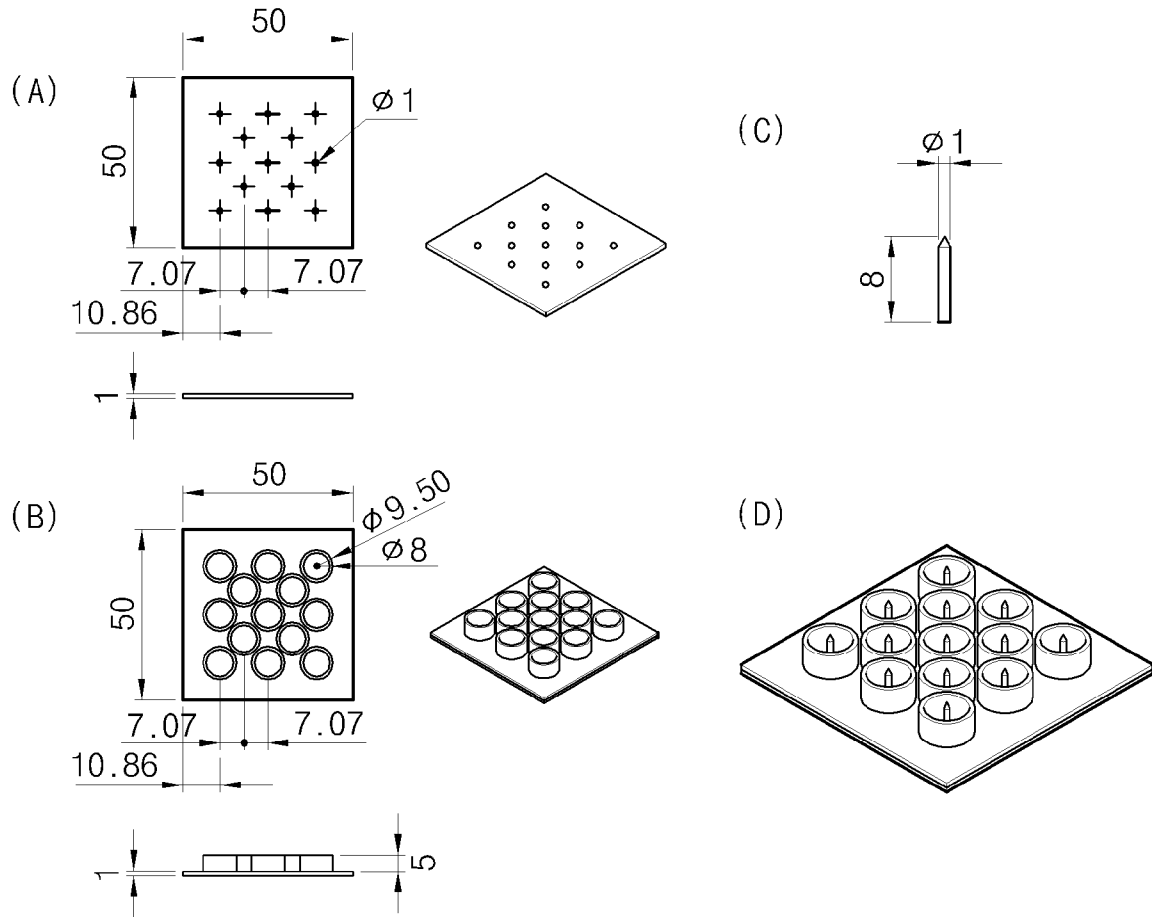
- [청구항 1] 유기용매에 폴리카프로락톤(PCL)과 산을 첨가한 후 교반하여 용액을 준비하는 단계;  
상기 용액에 성장인자를 첨가한 후 교반하여 전기방사 용액을 준비하는 단계; 및  
상기 준비된 전기방사 용액을 시린지 펌프에 연결한 후 전기방사 장치를 가동하여 컬렉터에 방추형으로 배열된 나노섬유를 포집하는 단계를 포함하는, PCL 패치 조직재생 지지체의 제조방법.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서,  
상기 용액을 준비하는 단계는,  
유기용매에 폴리카프로락톤과 산을 첨가한 후 24 내지 48시간 동안 200 내지 500 rpm 속도로 교반하는 것을 특징으로 하는, PCL 패치 조직재생 지지체의 제조방법.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서,  
상기 유기용매 내 폴리카프로락톤의 농도는,  
70 내지 90 mg/ml인 것을 특징으로 하는, PCL 패치 조직재생 지지체의 제조방법.
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서,  
상기 유기용매는,  
트리플루오로에탄올(2,2,2-trifluoroethanol), 클로로포름(chloroform), 디클로로메탄(dichloromethane), 테트라하이드로퓨란(tetrahydrofuran), 디메틸포름아마이드(dimethylformamide), 및  
디메틸설폭사이드(dimethylsulfoxide)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는, PCL 패치 조직재생 지지체의 제조방법.
- [청구항 5] 청구항 1에 있어서,  
상기 산은,  
아세트산, 포름산, 프로피온산, 및 젖산으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는, PCL 패치 조직재생 지지체의 제조방법.
- [청구항 6] 청구항 1에 있어서,  
상기 성장인자는,  
상피 성장인자(EGF), 섬유아세포 성장인자(FGF), 인슐린양 성장인자 결합단백질(IGFBP), 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는, PCL 패치 조직재생 지지체의 제조방법.
- [청구항 7] 청구항 1에 있어서,  
상기 전기방사 용액을 준비하는 단계는,  
용액에 성장인자를 0.16 내지 16  $\mu\text{g/ml}$ 로 첨가하는 것을 특징으로 하는, PCL 패치 조직재생 지지체의 제조방법.

- [청구항 8] 청구항 1에 있어서,  
상기 전기방사 용액을 준비하는 단계는,  
상기 용액에 성장인자를 첨가한 후 0 내지 10°C에서 20 내지 30분 동안  
교반하는 것을 특징으로 하는, PCL 패치 조직재생 지지체의 제조방법.
- [청구항 9] 청구항 1에 있어서,  
상기 나노섬유를 포집하는 단계는,  
준비된 전기방사 용액을 시린지 펌프에 연결한 후 0.2 ~ 3.0  $\mu\text{l/hr}$ 의 속도로  
방출하여 전기방사 장치를 가동하는 것을 특징으로 하는, PCL 패치  
조직재생 지지체의 제조방법.
- [청구항 10] 청구항 1에 있어서,  
상기 나노섬유는,  
평균두께가 200 내지 800 nm인 것을 특징으로 하는, PCL 패치 조직재생  
지지체의 제조방법.
- [청구항 11] 청구항 1에 있어서,  
상기 컬렉터는,  
침을 내부에 수용하는 원통형태로 이루어진 것을 특징으로 하는, PCL  
패치 조직재생 지지체의 제조방법.
- [청구항 12] 유기용매에 폴리카프로락톤(PCL) 및 폴리에틸렌글라이콜(PEG)과 산을  
첨가한 후 교반하여 폴리카프로락톤-폴리에틸렌글라이콜 공중합체  
용액을 준비하는 단계;  
상기 용액에 성장인자를 첨가한 후 교반하여 전기방사 용액을 준비하는  
단계; 및  
상기 준비된 전기방사 용액을 펌프에 연결한 후 전기방사 장치를  
가동하여 컬렉터에 방추형으로 배열된 나노섬유를 포집하는 단계;  
를 포함하는, PCL 및 PEG 패치 조직재생 지지체의 제조방법.
- [청구항 13] 청구항 12에 있어서,  
상기 용액을 준비하는 단계는,  
유기용매에 폴리카프로락톤 및 폴리에틸렌글라이콜과 산을 첨가한 후 24  
내지 48시간 동안 200 내지 500 rpm 속도로 교반하는 것을 특징으로 하는,  
PCL 및 PEG 패치 조직재생 지지체의 제조방법.
- [청구항 14] 청구항 12에 있어서,  
상기 유기용매 내 폴리카프로락톤의 농도는,  
100 내지 160 mg/ml인 것을 특징으로 하는, PCL 및 PEG 패치 조직재생  
지지체의 제조방법.
- [청구항 15] 청구항 12에 있어서,  
상기 유기용매 내 폴리에틸렌글라이콜의 농도는,  
40 내지 100 mg/ml 인 것을 특징으로 하는, PCL 및 PEG 패치 조직재생  
지지체의 제조방법.

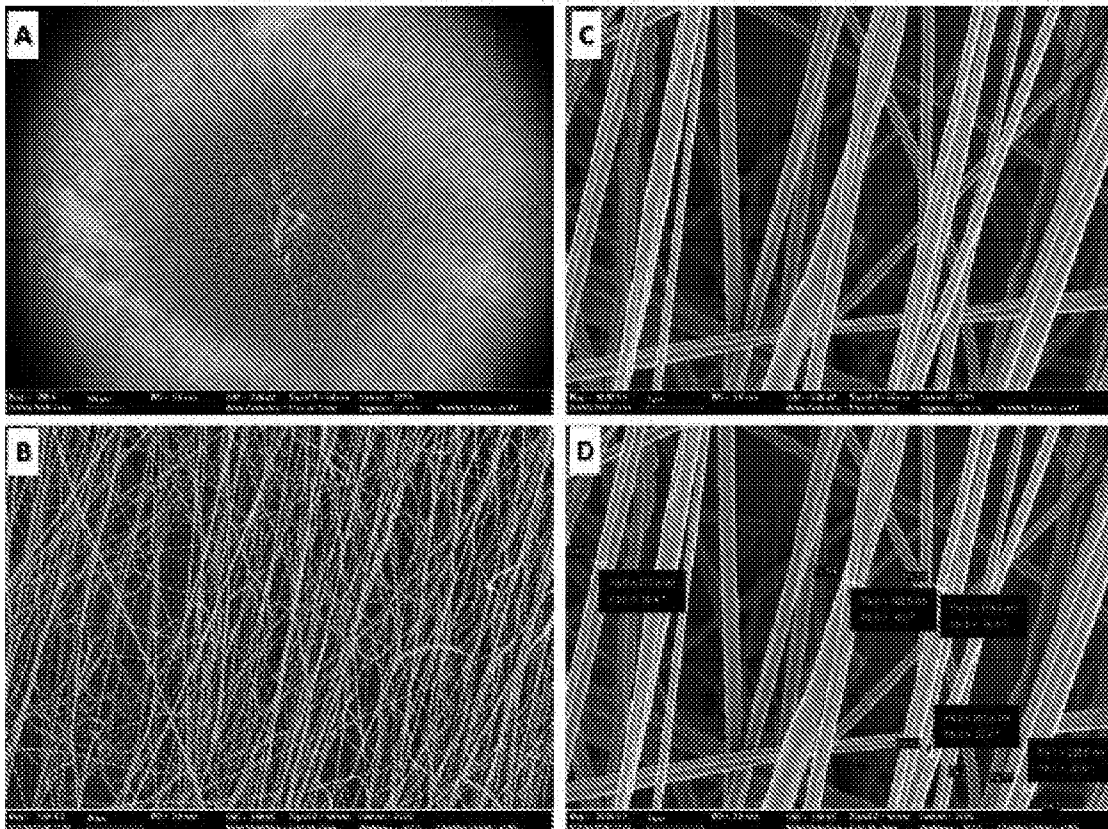
- [청구항 16] 방추형으로 배열된 나노섬유로서, 폴리카프로락톤을 포함하는, PCL 패치 조직재생 지지체.
- [청구항 17] 청구항 16에 있어서,  
상기 PCL 패치 조직재생 지지체는,  
성장인자를 더 포함하는, PCL 패치 조직재생 지지체.
- [청구항 18] 청구항 17에 있어서,  
상기 PCL 패치 조직재생 지지체는,  
폴리카프로락톤 및 성장인자를  $10^4$  내지  $10^6$  : 1의 중량비로 포함하는 것을 특징으로 하는, PCL 패치 조직재생 지지체.
- [청구항 19] 청구항 17에 있어서,  
상기 성장인자는,  
상피 성장인자(EGF), 섬유아세포 성장인자(FGF), 인슐린양 성장인자 결합단백질(IGFBP), 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는, PCL 패치 조직재생 지지체.
- [청구항 20] 청구항 16에 있어서,  
상기 나노섬유는,  
평균두께가 200 내지 800 nm인 것을 특징으로 하는, PCL 패치 조직재생 지지체.
- [청구항 21] 방추형으로 배열된 나노섬유로서, 폴리카프로락톤 및 폴리에틸렌글라이콜을 포함하는, PCL 및 PEG 패치 조직재생 지지체.
- [청구항 22] 청구항 21에 있어서,  
상기 PCL 및 PEG 패치 조직재생 지지체는,  
성장인자를 더 포함하는, PCL 및 PEG 패치 조직재생 지지체.
- [청구항 23] 청구항 22에 있어서,  
상기 PCL 및 PEG 패치 조직재생 지지체는,  
폴리카프로락톤 및 성장인자를  $(7 \times 10^4 \sim 7 \times 10^6)$  : 1의 중량비로 포함하는 것을 특징으로 하는, PCL 및 PEG 패치 조직재생 지지체.
- [청구항 24] 청구항 22에 있어서,  
상기 PCL 및 PEG 패치 조직재생 지지체는,  
폴리에틸렌글라이콜 및 성장인자를  $(3 \times 10^4 \sim 3 \times 10^6)$  : 1의 중량비로 포함하는 것을 특징으로 하는, PCL 및 PEG 패치 조직재생 지지체.
- [청구항 25] 청구항 22에 있어서,  
상기 PCL 및 PEG 패치 조직재생 지지체는,  
폴리카프로락톤 및 폴리에틸렌글라이콜을  $(2 \sim 4)$  : 1의 중량비로 포함하는 것을 특징으로 하는, PCL 및 PEG 패치 조직재생 지지체.
- [청구항 26] 청구항 16 내지 청구항 20 중 어느 한 항에 따른 PCL 패치 조직재생 지지체를 포함하는, 만성고막 천공의 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 27] 청구항 21 내지 청구항 25 중 어느 한 항에 따른 PCL 및 PEG 패치

조직재생 지지체를 포함하는, 만성고막 천공의 예방 또는 치료용 조성물.

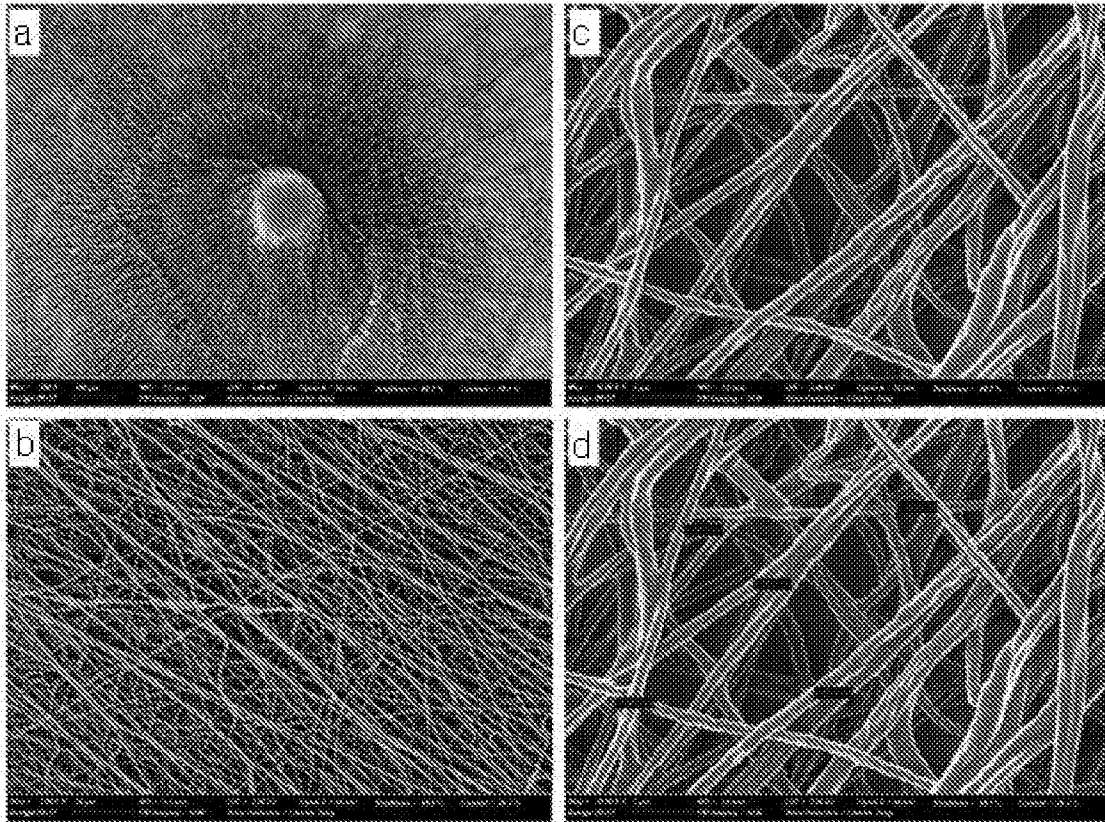
[도1]



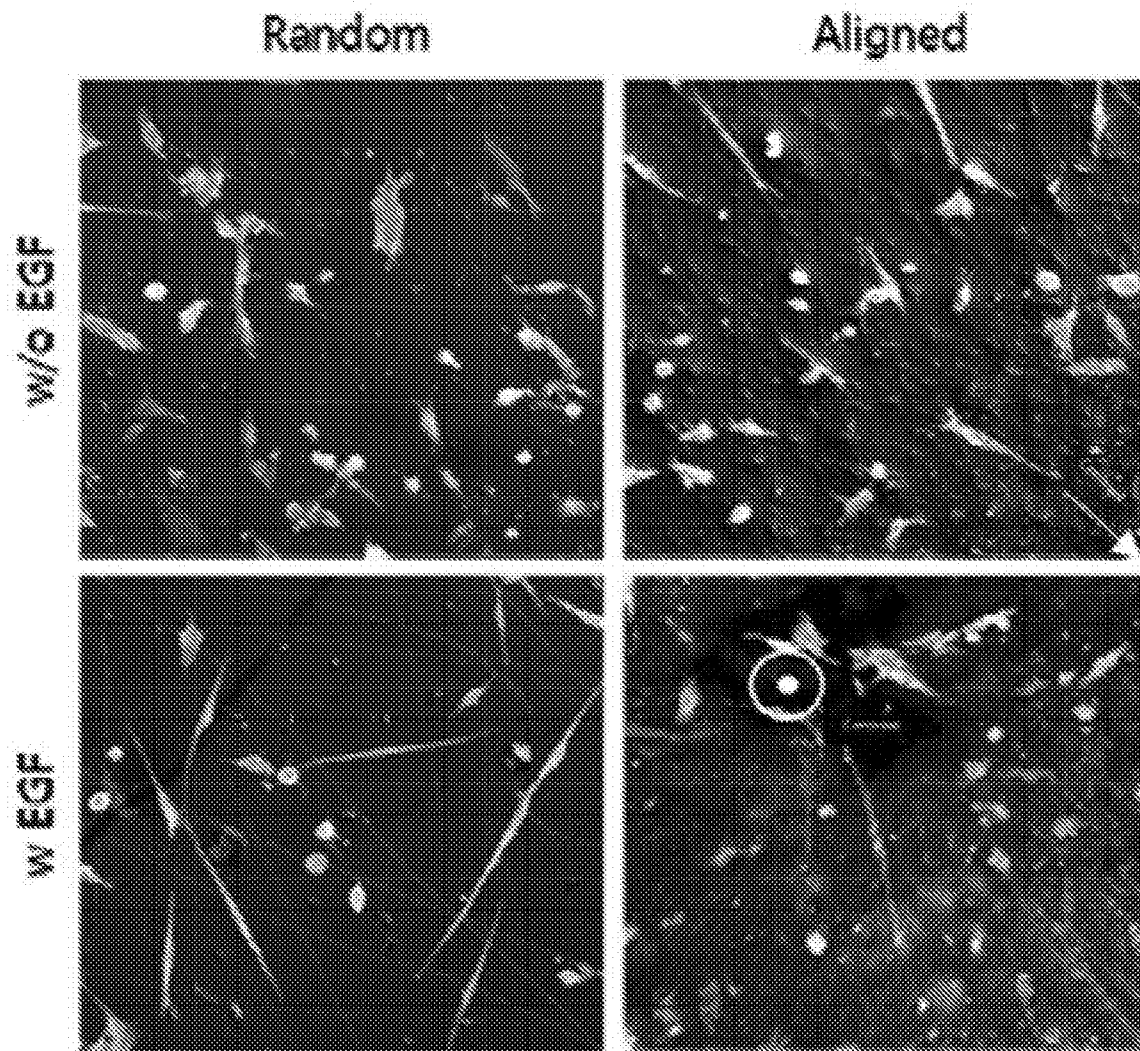
[도2]



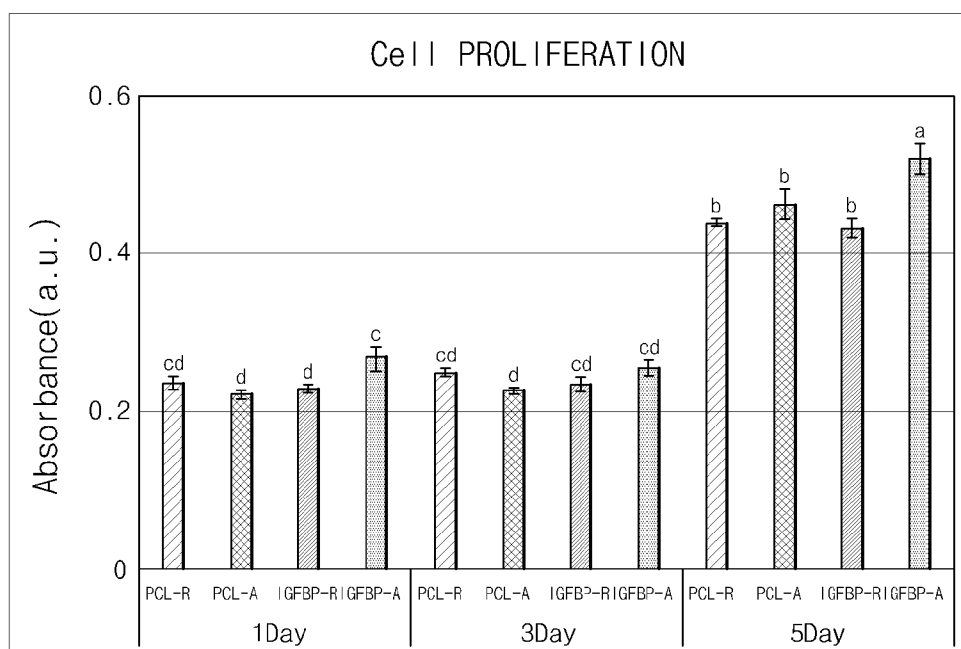
[도3]



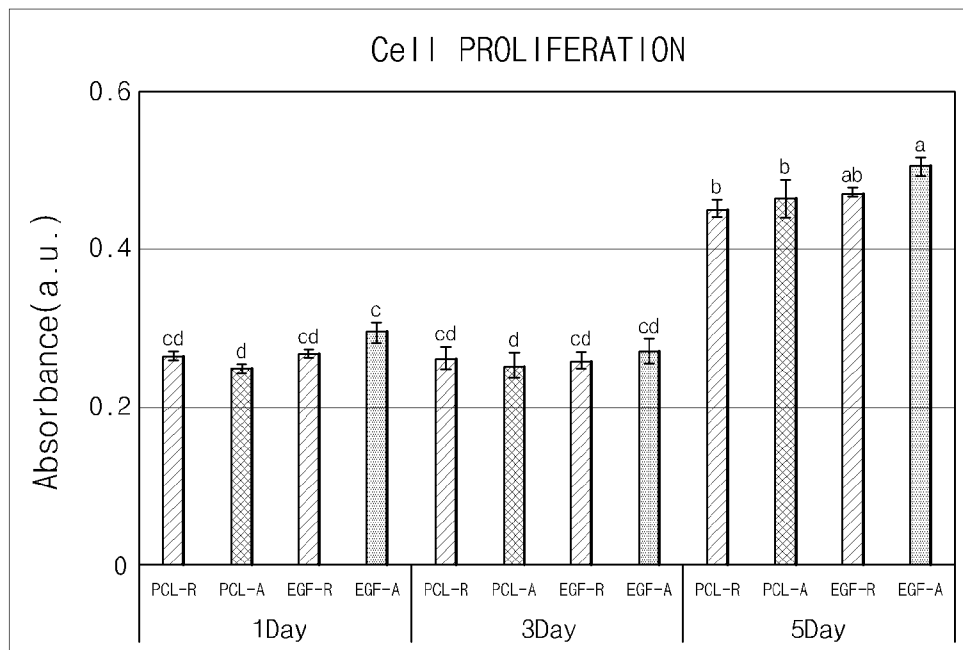
[도4]



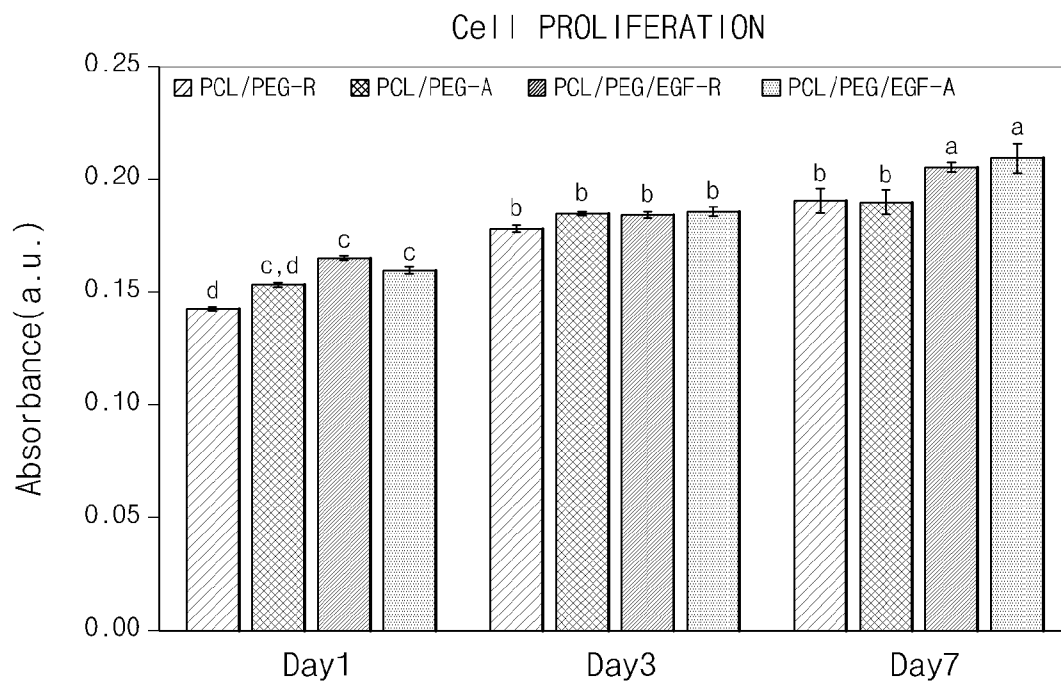
[도5a]



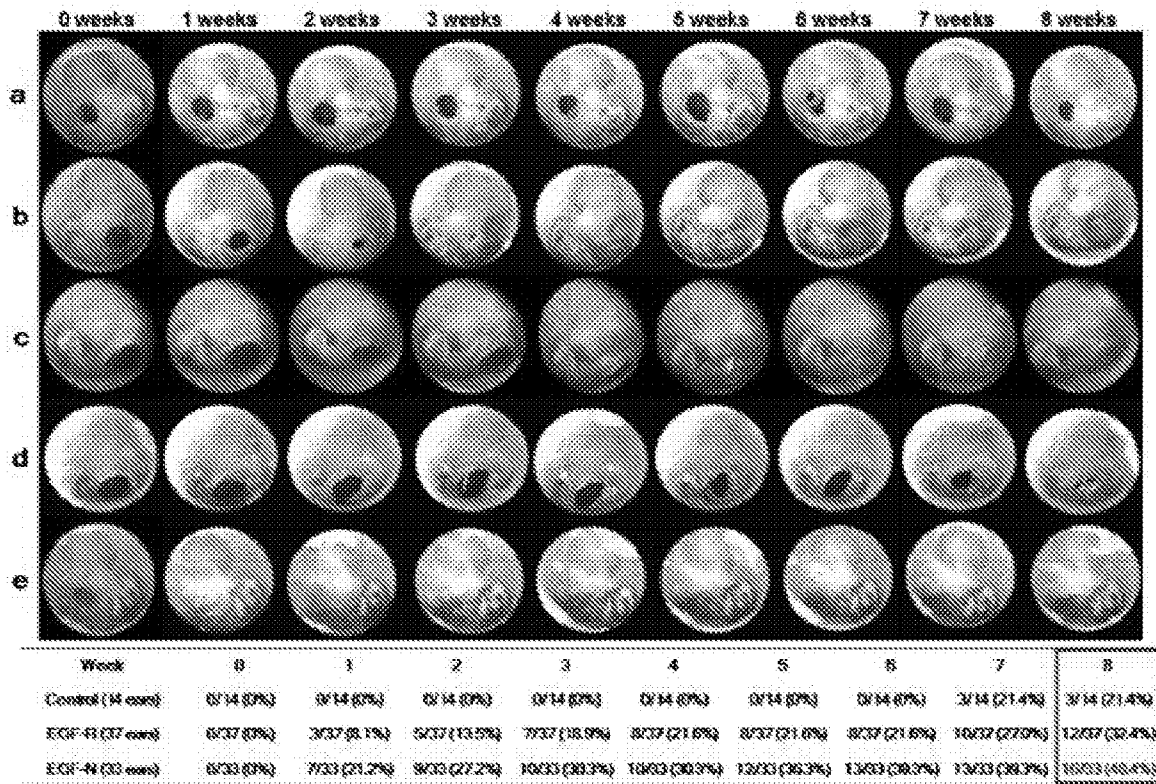
[도5b]



[도6]

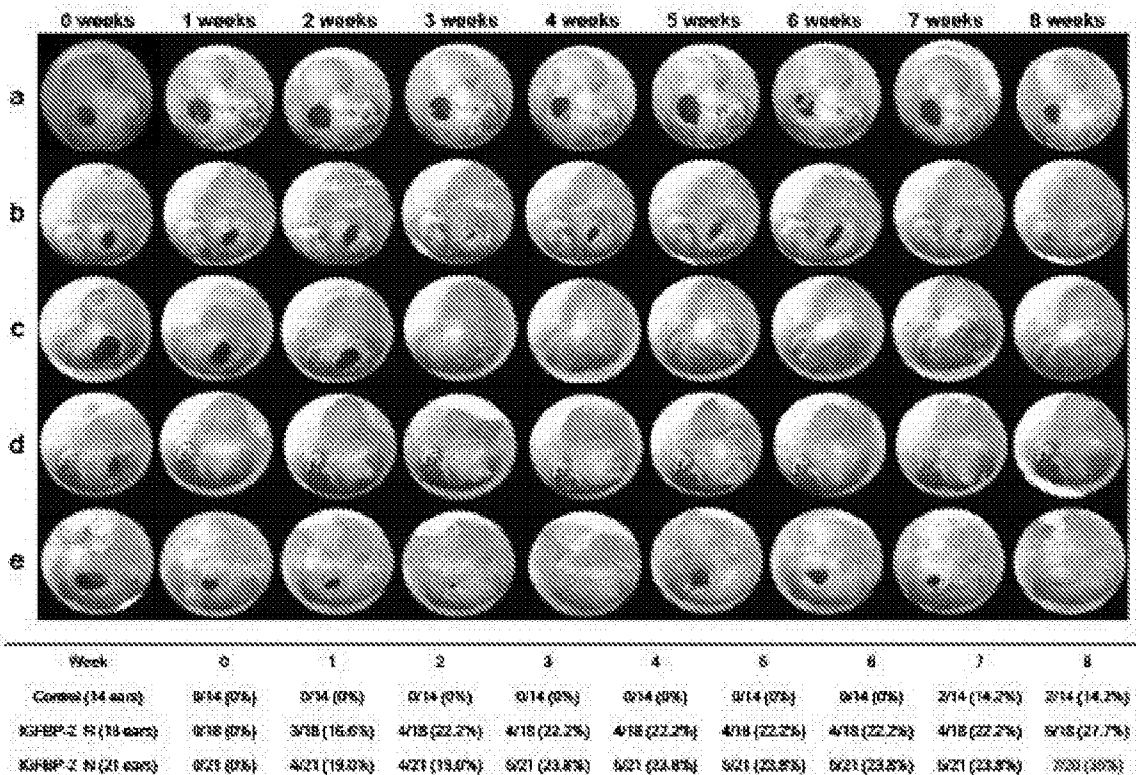


[도7]



(a-e) Serial images of chronic TM perforations: (a) chronic TM perforation that is not healed, (b) chronic TM perforation healed by EGF random patch, and (c-e) chronic TM perforations healed by EGF-nano pattern patch.

[도8]



(a-e) Serial images of chronic TM perforations: (a) chronic TM perforation that is not healed, (b) chronic TM perforation healed by IGFBP-2 random patch, and (c-e) chronic TM perforations healed by IGFBP-2-nano pattern patch. \*,  $p < 0.05$ , Mann-Whitney U test

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/002262

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*A61L 27/18(2006.01)i, A61L 27/54(2006.01)i, D01D 5/00(2006.01)i, A61F 13/00(2006.01)i, A61F 11/00(2006.01)i*

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61L 27/18; D01D 5/00; C12N 5/00; A61L 15/12; D04H 1/4382; A61L 15/00; A61L 27/00; A61L 27/14; A61F 2/18; A61L 27/54; A61F 13/00; A61F 11/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) &amp; Keywords: PCL, PEG, neogenesis, eardrum, electric radiation

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                               | Relevant to claim No. |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y         | WO 2015-040554 A1 (AZIENDA OSPEDALIERO-UNIVERSITARIA PISANA)<br>26 March 2015<br>See claims 11-17; figures 1-2, 4.               | 1-10,12-27            |
| A         |                                                                                                                                  | 11                    |
| Y         | JP 5424561 B2 (SUNSTAR SUISSE SA.) 26 February 2014<br>See paragraphs [0010]-[0019], [0030].                                     | 1-10,12-27            |
| Y         | KR 10-2008-0013224 A (NANOPHIL CO., LTD. et al.) 13 February 2008<br>See claim 10; figures 1-2.                                  | 12-15,21-25,27        |
| A         | KR 10-2015-0084519 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) 22 July 2015<br>See the entire document.      | 1-27                  |
| A         | KR 10-1636778 B1 (PUSAN NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION) 06 July 2016<br>See the entire document. | 1-27                  |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&amp;” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 JUNE 2017 (27.06.2017)

Date of mailing of the international search report

27 JUNE 2017 (27.06.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office  
Government Complex-Daejeon, 189 Sconsa-ro, Daejeon 302-701,  
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2017/002262**

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member                                                   | Publication<br>date                                  |
|-------------------------------------------|---------------------|---------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| WO 2015-040554 A1                         | 26/03/2015          | EP 3047016 A1<br>JP 2016-533189 A<br>US 2016-0228606 A1                   | 27/07/2016<br>27/10/2016<br>11/08/2016               |
| JP 5424561 B2                             | 26/02/2014          | CA 2630783 A1<br>EP 1964582 A1<br>US 2009-0246259 A1<br>WO 2007-063820 A1 | 07/06/2007<br>03/09/2008<br>01/10/2009<br>07/06/2007 |
| KR 10-2008-0013224 A                      | 13/02/2008          | NONE                                                                      |                                                      |
| KR 10-2015-0084519 A                      | 22/07/2015          | KR 10-1685248 B1                                                          | 09/12/2016                                           |
| KR 10-1636778 B1                          | 06/07/2016          | NONE                                                                      |                                                      |

**A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))**

A61L 27/18(2006.01)i, A61L 27/54(2006.01)i, D01D 5/00(2006.01)i, A61F 13/00(2006.01)i, A61F 11/00(2006.01)i

**B. 조사된 분야**

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61L 27/18; D01D 5/00; C12N 5/00; A61L 15/12; D04H 1/4382; A61L 15/00; A61L 27/00; A61L 27/14; A61F 2/18; A61L 27/54; A61F 13/00; A61F 11/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC  
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) &amp; 키워드: PCL, PEG, 조직재생, 고막, 전기방사

**C. 관련 문헌**

| 카테고리* | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재                                              | 관련 청구항           |
|-------|-------------------------------------------------------------------------|------------------|
| Y     | WO 2015-040554 A1 (AZIENDA OSPEDALIERO-UNIVERSITARIA PISANA) 2015.03.26 | 1-10, 12-27      |
| A     | 청구항 11-17; 도면 1-2, 4 참조.                                                | 11               |
| Y     | JP 5424561 B2 (SUNSTAR SUISSE SA) 2014.02.26                            | 1-10, 12-27      |
|       | 단락 [0010]-[0019], [0030] 참조.                                            |                  |
| Y     | KR 10-2008-0013224 A ((주)나노필 등) 2008.02.13                              | 12-15, 21-25, 27 |
|       | 청구항 10; 도면 1-2 참조.                                                      |                  |
| A     | KR 10-2015-0084519 A (연세대학교 산학협력단) 2015.07.22                           | 1-27             |
|       | 전문 참조.                                                                  |                  |
| A     | KR 10-1636778 B1 (부산대학교 산학협력단) 2016.07.06                               | 1-27             |
|       | 전문 참조.                                                                  |                  |

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

\* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&amp;” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2017년 06월 27일 (27.06.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 06월 27일 (27.06.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청  
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,  
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

한인호

전화번호 +82-42-481-3362



| 국제조사보고서에서<br>인용된 특허문헌 | 공개일        | 대응특허문헌                                                                    | 공개일                                                  |
|-----------------------|------------|---------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| WO 2015-040554 A1     | 2015/03/26 | EP 3047016 A1<br>JP 2016-533189 A<br>US 2016-0228606 A1                   | 2016/07/27<br>2016/10/27<br>2016/08/11               |
| JP 5424561 B2         | 2014/02/26 | CA 2630783 A1<br>EP 1964582 A1<br>US 2009-0246259 A1<br>WO 2007-063820 A1 | 2007/06/07<br>2008/09/03<br>2009/10/01<br>2007/06/07 |
| KR 10-2008-0013224 A  | 2008/02/13 | 없음                                                                        |                                                      |
| KR 10-2015-0084519 A  | 2015/07/22 | KR 10-1685248 B1                                                          | 2016/12/09                                           |
| KR 10-1636778 B1      | 2016/07/06 | 없음                                                                        |                                                      |