

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2024년 7월 4일 (04.07.2024)



(10) 국제공개번호  
WO 2024/143784 A1

- (51) 국제특허분류: A61L 15/22 (2006.01) D04H 1/728 (2012.01)  
A61L 15/42 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2023/014358
- (22) 국제출원일: 2023년 9월 21일 (21.09.2023)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2022-0185655 2022년 12월 27일 (27.12.2022)KR
- (71) 출원인: 부경대학교 산학협력단 (PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 48513 부산광역시 남구 용소로 45, Busan (KR).
- (72) 발명자: 정원교 (JUNG, Won-Kyo); 48516 부산광역시 남구 분포로 111, 141동 2004호, Busan (KR). 김태희 (KIM, Tae-Hee); 48502 부산광역시 남구 용소로 64번길 66, 303호, Busan (KR).
- (74) 대리인: 위병갑 (WIE, Byoung-Gap); 06141 서울특별시 강남구 테헤란로33길7, 대영빌딩 7층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH,

KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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).

규칙 4.17에 의한 선언서:

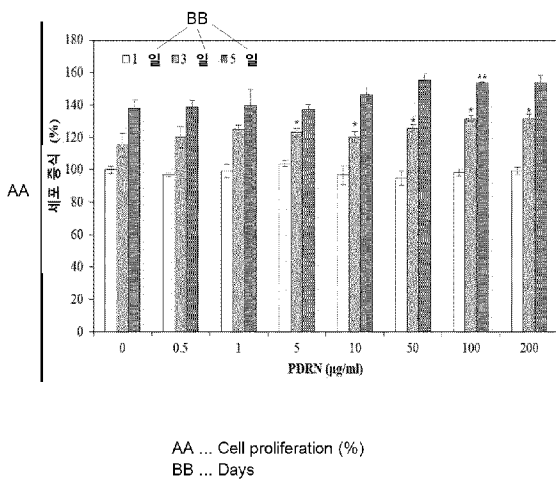
— 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(54) Title: NANOFIBROUS SCAFFOLD FOR SKIN REGENERATION, COMPRISING POLYDEOXYRIBONUCLEOTIDE DERIVED FROM PATIRIA PECTINIFERA

(54) 발명의 명칭: 별불가사리 유래 폴리데옥시리보뉴클레오티드를 포함하는 피부 재생용 나노파이버 스캐폴드



(57) Abstract: The present invention relates to a nanofibrous scaffold and a preparation method therefor, the nanofibrous scaffold comprising: poly(ε-caprolactone) (PCL); gelatin; and polydeoxyribonucleotide (PDRN) derived from *Patiria pectinifera*. The nanofibrous scaffold of the present invention has a uniform nanofiber structure, excellent fluid absorption and retention, an adequate release speed, high mechanical stability, thermal stability, and thus is suitable for a dressing for healing wounds.

(57) 요약서: 본 발명은 폴리카프로락톤(poly(ε-caprolactone); PCL); 젤라틴; 및 별불가사리(*Patiria pectinifera*) 유래 폴리데옥시리보뉴클레오티드(Polydeoxyribonucleotide; PDRN);을 포함하는 나노파이버 스캐폴드 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 본 발명의 나노파이버 스캐폴드는 균일한 나노섬유 구조, 우수한 유체 흡수 및 보유, 적절한 방출 속도, 높은 기계적 안정성, 열 안정성을 가지고 있어, 상처 치유용 드레싱으로서 적합하다.

WO 2024/143784 A1

## 명세서

발명의 명칭: 별불가사리 유래 폴리데옥시리보뉴클레오티드를 포함하는 피부 재생용 나노파이버 스캐폴드

### 기술분야

- [1] 본 발명은 폴리카프로락톤(poly( $\epsilon$ -caprolactone; PCL); 젤라틴; 및 별불가사리 (*Patiria pectinifera*) 유래 폴리데옥시리보뉴클레오티드 (Polydeoxyribonucleotide; PDRN);을 포함하는 나노파이버 스캐폴드 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

### 배경기술

- [2] 드레싱(dressing)은 화상이나 찰상, 욕창 및 외상에 의한 피부결손 부위인 상처면을 피복하여 치유속도를 향상시키기 위해 사용되는 방법으로, 1962년 Winter에 의한 돼지 찰상의 상피형성 속도가 습윤 환경이 건조 환경에 비해 2배 이상 빠르다는 발표 이후 습윤 드레싱제(wet dressing)가 속속 개발, 출시되고 상처의 처치 방법도 다양하게 전개되고 있다.
- [3] 습윤 드레싱은 상처면을 밀폐시켜 습윤 상태를 유지시켜주기 위한 것으로, 친수성 고분자 및 소수성 고분자를 다양하게 개발 조합하여 필름상(film), 시트상(sheet), 부직포상, 스폰지(sponge), 폼상(foam), 로프상(lope), 펠렛상(pellet), 분말상(powder) 등의 다양한 형태로 빠르게 발전하고 있다.
- [4] 이러한 상처치유에 사용되는 소재로는 상처면으로부터 배출되는 다량의 삼출물을 흡수, 함유할 수 있는 제품으로 친수성 고분자가 공유결합 내지는 비공유결합으로 가교되어져 만들어진 3차원 망상구조물의 형태를 가져야 하며, 구성물질의 친수성으로 인해 수용액 내 및 수성 환경하에서 많은 양의 수분을 흡수하여 팽윤되지만 가교 구조에 의해 용해되지 않는 성질을 가져야 한다.
- [5] 따라서 구성성분이나 제조방법에 따라 다양한 방법이 제시되고 있으나 비공유결합에 의한 물리적 가교의 경우 물성의 저하가 발생하기 쉽고, 화학적 가교의 경우 가교제에 의한 피부 독성이 있는 것으로 알려져 있으며, 초음파나 방사선 가교에 의한 방법 등이 있으나 장비나 고비용의 한계가 있는 것이 현실적인 상황이다.
- [6] 전기방사 기술을 활용해 제작된 나노파이버는 상호 연결된 다공성 구조 측면에서 세포외기질(Extracellular matrix; ECM)과 유사한 구조적 특성을 가지고 있기 때문에 피부 조직 공학 응용 분야에서 상당한 주목을 받고 있다. 전기방사는 기계적 특성, 생분해성 및 생체적합성과 같은 고유한 특성으로 인해 폴리카프로락톤(polycaprolactone, PCL)을 비롯한 다양한 합성 고분자와 함께 사용할 수 있습니

다. PCL은 널리 사용되는 반결정성 지방족 폴리에스터로 미국 식품의약국(FDA)에서 생물의학 용도로 승인한 제품이다. 그러나 소수성과 세포에 대한 낮은 반응으로 인해 콜라겐, 젤라틴, 알지네이트, 키토산과 같은 다양한 천연 고분자와 혼합사용함으로써 생물학적, 기계적 특성을 조절하고 조직재생에 적합한 구조적 기능을 부여한다.

- [7] 한편, 폴리데옥시리보뉴클레오티드(Polydeoxyribonucleotides, PDRN)는 분자량이 50~1,500 kDa 범위인 활성 혼합물로 무지개 송어(*Oncorhynchus mykiss*) 또는 연어(*Oncorhynchus keta*)의 정자 세포에서 주로 추출 및 정제된다. PDRN은 현재 식품의약품안전청의 허가를 받은 DNA 유래 의약품의 일종으로 조직수복 및 상처치료를 많이 시행되고 있다. PDRN은 혈관 신생 촉진, 항 세포 사멸, 항염증 및 조직 복구 활성을 포함한 여러 효능을 나타낸다. 그러나, 이러한 조직 복구와 관련된 생물학적 효과에도 불구하고 PDRN의 추출 원료로는 *O. mykiss* 및 *O. keta*만 활용되고 있는 실정이다.

## 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

- [8] 이에, 본 발명의 발명자들은 별불가사리(*Patiria pectinifera*)로부터 DNA 중합체로서 뛰어난 피부재생 효능을 지닌 폴리데옥시리보뉴클레오티드(Polydeoxyribonucleotide; PDRN)를 분리하고, 이를 이용하여 제조한 나노파이버의 구조적 특성 및 피부 재생 능력을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [9] 이에 따라, 본 발명은 별불가사리(*Patiria pectinifera*) 유래 폴리데옥시리보뉴클레오티드(Polydeoxyribonucleotide; PDRN)를 포함하는 나노파이버 스캐폴드 및 이의 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

### 과제 해결 수단

- [10] 본 발명은 폴리카프로락톤(poly( $\epsilon$ -caprolactone; PCL); 젤라틴; 및 별불가사리(*Patiria pectinifera*) 유래 폴리데옥시리보뉴클레오티드(Polydeoxyribonucleotide; PDRN);를 포함하는 나노파이버 스캐폴드를 제공한다.
- [11] 또한, 본 발명은 별불가사리(*Patiria pectinifera*)로부터 폴리데옥시리보뉴클레오티드(Polydeoxyribonucleotide; PDRN)를 분리하는 단계(단계 1); 상기 폴리데옥시리보뉴클레오티드를 폴리카프로락톤 및 젤라틴과 혼합하는 단계(단계 2); 및 상기 혼합물을 전기방사하여 나노파이버 매트를 제조하는 단계(단계 3);를 포함하는, 나노파이버 스캐폴드의 제조방법을 제공한다.
- [12] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 나노파이버 스캐폴드를 포함하는 상처 드레싱을 제공한다.

### 발명의 효과

- [13] 본 발명은 미활용 자원이자 해적 생물인 별불가사리(*Patiria pectinifera*)로부터 뛰어난 피부재생 효능을 지닌 폴리데옥시리보뉴클레오티드(Polydeoxyribonucleotide; PDRN)를 확보하고 이를 피부 재생용 나노파이버 스캐

폴드에 적용시킴으로써, 미활용 해양 생명 자원의 조직공학적 활용가능성과 별 불가사리 PDRN을 활용한 피부조직재생용 의료기기로서 새로운 활용 가능성을 제공하였다.

### 도면의 간단한 설명

- [14] 도 1은 아가로스 겔 전기영동을 사용하여 *P. pectinifera* 유래 PDRN의 분자량 분포를 확인한 결과를 나타낸 것이다. Lane A: DNA marker; Lane B: PDRN from *P. pectinifera* (20 µg).
- [15] 도 2는 HDF에서 *P. pectinifera* 유래 PDRN에 의한 증식 효과를 나타낸 것이다. \*  $p < 0.10$  및 \*\*  $p < 0.05$ 은 비처리 그룹에 비해 통계학적으로 유의차가 있는 것으로 간주하였다.
- [16] 도 3은 HDF에서 *P. pectinifera* 유래 PDRN에 의한 증식 효과를 나타낸 FDA/PI 염색 결과를 나타낸 것이다.
- [17] 도 4는 *P. pectinifera* 유래 PDRN의 HaCaT에 대한 세포독성을 확인한 MTT 검정 결과를 나타낸 그래프이다. \*  $p < 0.10$  및 \*\*  $p < 0.05$ 은 비처리 그룹에 비해 통계학적으로 유의차가 있는 것으로 간주하였다.
- [18] 도 5는 *P. pectinifera* 유래 PDRN의 HaCaT에 대한 세포독성을 확인한 FDA/PI 염색 결과를 나타낸 것이다.
- [19] 도 6은 콜라겐 생성 효과 of *P. pectinifera* 유래 PDRN의 HDF에서의 콜라겐 0 효과를 확인한 Picro-Sirius red 염색 결과를 나타낸 그래프이다. \*  $p < 0.05$  및 \*\*  $p < 0.10$ 은 비처리 그룹에 비해 통계학적으로 유의차가 있는 것으로 간주하였다.
- [20] 도 7a 및 7b는 24시간 동안 *P. pectinifera* 유래 PDRN의 세포 이동에 대한 효과를 나타낸 것이다: (A) 세포 이동 분석 결과의 대표 이미지 및 (B) 상처 치유 속도 그래프. <sup>a</sup> $p < 0.05$ 는 각 그룹에서 초기 스크래치 상처 영역에 비해 통계학적으로 유의차가 있는 것으로 간주하였으며, <sup>b</sup> $p < 0.05$ 은 비처리 그룹에 비해 통계학적으로 유의차가 있는 것으로 간주하였다.
- [21] 도 8은 *P. pectinifera*로부터 추출된 PDRN의 HDF 내 피부 재생과 관련된(A) 여러 단백질 (I형 콜라겐, III형 콜라겐,  $\alpha$ -SMA)의 발현 및 (B) 작용기전에 대한효과를 나타낸 것이다.
- [22] 도 9는 전기방사를 사용한 나노파이버의 제조 공정을 나타낸 모식도이다.
- [23] 도 10은 SEM 현미경 사진 및 상응하는 나노파이버 지름 분포 (분포의 백분율 및 빈도)를 나타낸 것이다: (a) P10G0, (b) P8G2, (c) P6G4, (d) P4G6, (e) P2G8, 및 (f) P0G10 나노파이버.
- [24] 도 11은 PCL/Gel 나노파이버의 기계적 특성을 나타낸 것이다: (A) 일반 응력-변형 곡선, (B) 인장 강도, (C) 최대 하중에서의 변형, 및 (D) 최대 연장에서의 변형. <sup>#</sup> $p < 0.05$ 은 P10G0 나노파이버에 비해 통계학적으로 유의차가 있는 것으로 간주하였다.

- [25] 도 12는 제조된 나노파이버 ( $n > 3$ )의 물 접촉각의 (A) 대표 이미지 및 (B) 동역학적 물 접촉각을 나타낸 그래프이다.  $*p < 0.05$ 는 동시간대에 POG10 나노파이버 그룹에 비해 통계학적으로 유의차가 있는 것으로 간주하였다.
- [26] 도 14는 SEM 현미경 사진 및 및 상응하는 나노파이버 지름 분포 (분포의 백분율 및 빈도)를 나타낸 것이다: (a) P, (b) PG, 및 (c) PGP 나노파이버.
- [27] 도 15는 나노파이버의 기계적 특성을 나타낸 것이다: (A) 일반 응력-변형 곡선, (B) 인장 강도, (C) 최대 하중에서의 변형 및 (D) 최대 연장에서의 변형.  $*p < 0.05$ 은 P 나노파이버에 비해 통계학적으로 유의차가 있는 것으로 간주하였다.
- [28] 도 16은 37°C의 1X PBS (pH 7.4) 중에서 PGP 나노파이버의 PDRN 방출 프로파일을 나타낸 것이다. 데이터는 평균  $\pm$  표준편차로 나타냈다 ( $n = 4$ ).
- [29] 도 17은 순수 PCL, 젤라틴, PDRN 및 제조된 나노파이버의 FTIR 스펙트럼 및 피크 강도에서의 시프트 및 혼합 비율에 따른 위치를 나타낸 것이다. (a) 순수 PCL (검은색), (b) 순수 젤라틴 (노란색), (c) PDRN (갈색), (d) P(회색), (e) PG(파란색), 및 (f) PGP(녹색) 나노파이버.
- [30] 도 18은 순수 물질 및 제조된 나노파이버의 열중량 분석 결과를 나타낸 그래프이다.
- [31] 도 19는 순수 물질 및 제조된 나노파이버의 시차주사열량 (differential scanning calorimetry; DSC) 곡선을 나타낸 것이다.
- [32] 도 20은 순수 물질 및 제조된 나노파이버의 X-선 회절 프로파일을 나타낸 것이다.
- [33] 도 21은 제조된 나노파이버 ( $n > 3$ )의 물 접촉각의 (A) 대표 이미지 및 (B) 동역학적 물 접촉각을 나타낸 그래프이다.  $*p < 0.05$ 은 동시간대에 P 나노파이버 그룹에 비해 통계학적으로 유의차가 있는 것으로 간주하였다.
- [34] 도 22는 PBS (pH 7.4) 중에서 96시간 동안 37°C에서의 제조된 나노파이버의 팽윤성을 나타낸 것이다. 데이터는 평균  $\pm$  표준편차로 나타냈다 ( $n = 4$ ).
- [35] 도 23은 제조된 나노파이버에서 배양된 (A) HDF 및 (B) HaCaT의 직접 세포독성 및 증식을 확인한 MTT 검정 결과를 나타낸 것이다.  $*p < 0.05$ 은 비처리 그룹에 비해 통계학적으로 유의차가 있는 것으로 간주하였다.
- [36] 도 24는 FDA/PI 염색을 사용한 간접 세포독성 분석을 통해 제조된 나노파이버의 HDF 세포 생존도에 대한 효과를 확인한 것이다.
- [37] 도 25는 FDA/PI 염색을 사용한 간접 세포독성 분석을 통해 제조된 나노파이버의 HaCaT 세포 생존도에 대한 효과를 확인한 것이다.
- [38] 도 26은 MTT 검정을 사용한 간접 세포독성 분석을 통해 제조된 나노파이버의 (A) HDF 및 (B) HaCaT의 세포 생존도에 대한 효과를 확인한 것이다.  $*p < 0.05$ 은 비처리 그룹에 비해 통계학적으로 유의차가 있는 것으로 간주하였다.
- [39] 도 27은 ICR 마우스의 원형 전체-두께 절개 상처 유도 및 제조된 나노파이버의 드레싱 적용 실험 스케줄을 나타낸 모식도이다.

- [40] 도 28은 ICR 마우스의 직사각형 전체-두께 절개 상처 유도 및 제조된 나노파이버의 드레싱 적용 실험 스케줄을 나타낸 모식도이다.
- [41] 도 29는 수술 후 21일째에 비처리군과 비교한 원형 전체-두께 상처 모델에서 제조된 나노파이버의 효과를 나타낸 것이다: (A) 상처봉합 동역학의 대표 이미지 및 (B) 수술 후 시간에 따른 평균 상처 봉합. 오류 바는 표준편차 ( $n \geq 3$ )를 의미한다.
- [42] 도 30은 수술 후 28일째에 비처리군과 비교한 직사각형 전체-두께 상처 모델에서 제조된 나노파이버의 효과를 나타낸 것이다: (A) 상처봉합 동역학의 대표 이미지 및 (B) 수술 후 시간에 따른 평균 상처 봉합. 오류 바는 표준편차 ( $n \geq 3$ )를 의미한다.
- [43] 도 31a 및 31b는 21 일에 원형 전체-두께 상처 모델에서 나노파이버의 상처 봉합을 나타낸 것이다. (A) 상처난 후 21일째의 마우스 피부 조직의 H&E, Masson's trichrome, 및 Picro-Sirius Red 염색 결과. Scale bar 600  $\mu\text{m}$  at 2X 및 100  $\mu\text{m}$  at 10X. (B) 21일째에서 원형 전체-두께 상처 모델의 상대적인 상처 길이 및 (C) 상처 두께. 오류 바는 표준편차 ( $n \geq 3$ )를 의미한다. \*  $p < 0.05$ 는 비처리 (blank) 그룹에 비해 통계학적으로 유의차가 있는 것으로 간주되었다.
- [44] 도 32a 및 32b는 28 일에 직사각형 전체-두께 상처 모델에서 나노파이버의 상처 봉합을 나타낸 것이다. (A) 상처난 후 28일째의 마우스 피부 조직의 H&E, Masson's trichrome, 및 Picro-Sirius Red 염색 결과. Scale bar 1000  $\mu\text{m}$  at 1X 및 200  $\mu\text{m}$  at 5X. (B) 28일째에서 직사각형 전체-두께 상처 모델의 상대적인 상처 길이 및 (C) 상처 두께. 오류 바는 표준편차 ( $n \geq 3$ )를 의미한다. \*  $p < 0.05$ 는 비처리 (blank) 그룹에 비해 통계학적으로 유의차가 있는 것으로 간주되었다.
- [45] 도 33은 (A) 원형 및 (B) 직사각형 전체-두께 상처 모델의 피부 재생과 관련된 여러 단백질 (I형 콜라겐, III형 콜라겐,  $\alpha$ -SMA)의 발현에 대한 PGP 나노파이버의 효과를 나타낸 것이다.  $\beta$ -actin은 웨스턴 블롯 분석 결과의 정량화를 위한 세포유지유전자(Housekeeping gene)로서 사용되었다.

### 발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [46] 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 의해 본 발명이 한정되지 않으며 본 발명은 후술할 청구 범위에 의해 정의될 뿐이다.
- [47] 덧붙여, 본 발명에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시 예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 본 발명의 명세서 전체에서 어떤 구성요소를 '포함'한다는 것은 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있다는 것을 의미한다.
- [48] 본 발명은 폴리카프로락톤(poly( $\epsilon$ -caprolactone; PCL); 젤라틴; 및 벌불가사리 (*Patiria pectinifera*) 유래 폴리데옥시리보뉴클레오티드(Polydeoxyribonucleotide; PDRN);를 포함하는 나노파이버 스케폴드 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

- [49] 상기 나노파이버 스캐폴드는 전기방사에 의해 제조될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [50] 상기 나노파이버 스캐폴드는 상기 폴리카프로락톤 및 젤라틴을 8 내지 2:2 내지 8의 중량비로 포함할 수 있으며, 예를 들어, 상기 폴리카프로락톤 및 젤라틴을 8:2, 6:4, 4:6 또는 2:8의 중량비로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [51] 상기 나노파이버 스캐폴드는 상기 폴리카프로락톤, 젤라틴 및 폴리데옥시리보뉴클레오티드를 4 내지 8:2 내지 6:0.005 내지 0.1의 중량비로 포함할 수 있으며, 예를 들어, 6:4:0.02의 중량비로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [52] 상기 젤라틴은 본 분야에서 상처 드레싱에 사용되는 젤라틴이라면 제한없이 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [53] 상기 나노파이버 스캐폴드는 별불가사리(*Patiria pectinifera*)로부터 폴리데옥시리보뉴클레오티드(Polydeoxyribonucleotide; PDRN)를 분리하는 단계(단계 1); 상기 폴리데옥시리보뉴클레오티드를 폴리카프로락톤 및 젤라틴과 혼합하는 단계(단계 2); 및 상기 혼합물을 전기방사하여 나노파이버 매트를 제조하는 단계(단계 3)를 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [54] 이하, 본 발명의 나노파이버 스캐폴드의 제조방법을 바탕으로, 본 발명의 나노파이버 스캐폴드를 설명한다.
- [55] 먼저, 본 발명의 나노파이버 스캐폴드의 제조방법은 별불가사리(*Patiria pectinifera*)로부터 폴리데옥시리보뉴클레오티드(Polydeoxyribonucleotide; PDRN)를 분리하는 단계(단계 1)를 포함한다.
- [56] 다음으로, 본 발명은 폴리데옥시리보뉴클레오티드를 폴리카프로락톤 및 젤라틴과 혼합하는 단계(단계 2)를 포함한다.
- [57] 상기 단계 2에서 상기 폴리카프로락톤 및 젤라틴을 8 내지 2:2 내지 8의 중량비로 혼합할 수 있으며, 예를 들어, 상기 폴리카프로락톤 및 젤라틴을 8:2, 6:4, 4:6 또는 2:8의 중량비로 혼합할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [58] 또한 상기 단계 2에서 상기 폴리카프로락톤, 젤라틴 및 폴리데옥시리보뉴클레오티드를 4 내지 8:2 내지 6:0.005 내지 0.1의 중량비로 혼합할 수 있으며, 예를 들어, 6:4:0.02의 중량비로 혼합할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [59] 다음으로, 본 발명의 나노파이버 스캐폴드의 제조방법은 상기 혼합물을 전기방사하여 나노파이버 매트를 제조하는 단계(단계 3)를 포함한다.
- [60] 상기 단계 3에서, 전기방사는 본 분야에서 일반적으로 사용되는 기술을 사용하여 실시될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [61] 또한, 본 발명은 본 발명의 나노파이버 스캐폴드를 포함하는 상처 드레싱에 관한 것이다.

## 발명의 실시를 위한 형태

[62] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예에는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[63] <실시예>

[64] 물질

[65] 별 불가사리 (*P. pectinifera*)는 동삼어촌계(대한민국 부산광역시 영도구)로부터 제공받았다. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), phosphate-buffered saline (PBS), 및 0.25% trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)는 Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, Inc., Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. 3-(4,5-Dimethyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO), fluorescein diacetate (FDA), PCL, 및 propidium iodide (PI)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. rabbit monoclonal antibodies against anti-COL type I (ab90395) 및 Collagen III (ab7778) 및 anti- $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) mouse monoclonal (ab7817) antibody는 Abcam (Cambridge, UK)에서 구입하였다. phosphorylated (p)-c-Jun N-terminal kinases (p-JNK; #9251), 및 p-p38 (#9211)는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. Mouse monoclonal antibodies against glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; sc-25778), extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 (sc-514302), p-ERK 1/2 (sc-7383), 및 JNK (sc-7345), rabbit polyclonal antibody against p38 (sc-7149), 및 goat IgG donkey polyclonal secondary antibody (sc-2020)는 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)에서 구입하였다. goat polyclonal secondary antibodies against rabbit IgG (G21234) 및 mouse IgG (G21040)는 Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, Inc., Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. 그외 본 발명에서 사용된 일반적인 분석 등급 화학물질 및 시약은 상업적으로 구입가능한 것이다.

[66] 실시예 1

[67] ***P. pectinifera*** 으로부터 PDRN 추출물의 제조

[68] PDRN (Polydeoxyribonucleotide; 폴리 데옥시 리보 뉴클레오티드)은 AccuPrep Genomic DNA extraction kit (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 *P. pectinifera* (별불가사리)로부터 추출하였다. 우선, *P. pectinifera*를 수돗물로 3회 세척하여 표면에 붙어있는 착생식물, 소금 및 모래를 제거하고 신선한 물로 다시 한번 조심스럽게 세척하였다. -20 °C에서 냉동한 *P. pectinifera*를 동결건조한 후 분말이 되도록 균질화하였다. 분쇄된 *P. pectinifera* (1 g)를 Proteinase K (2 mg/ml) 및 RNase A (2 mg/ml)를 함유하는 60 °C의 4 ml TL 버퍼에서 2시간 동안 추출하였다. 그런 다음, 추출물을 4 ml의 GB 버퍼 및 8 ml 무수 에탄올에 첨가하고 파이프트로 혼합한 후, 추출물을 바인딩 컬럼 튜브로 옮기고 8,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. W1 및 W2 버퍼를 바인딩 컬럼 튜브에 첨가하고 8,000 rpm에서 각각 1분간 원심분리하였다. 그런 다음, 원심분리(13,000 rpm, 1min)하여 바인딩 컬럼 튜브에

서 에탄올을 완전히 제거하였다. PDRN의 용출을 위해, EA 버퍼를 바인딩 컬럼 튜브에 첨가하고 8,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. 마지막으로, PDRN 용출액을 동결건조하고 사용 전까지 -20 °C에 보관하였다.

[69] ***P. pectinifera*** 유래 PDRN의 특성화

[70] PDRN의 순도를 260 nm 및 280 nm의 흡광도 비율에 근거하여 계산하고 DNA 함량을 260 nm에서의 흡광도를 사용하여 확인하였다.

[71] 단백질 함량은 bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Thermo, Rockford, IL, USA)를 사용하여 측정하였다. 우선, 180  $\mu$ l의 작동 시약 용액 내의 20  $\mu$ l의 각 추출물을 37 °C에서 30 분간 인큐베이션하였다. 흡광도는 562 nm에서 microplate reader (PowerWave XS2, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)를 사용하여 측정하였다. 우혈청 알부민 표준 곡선을 제작하여 단백질 함량을 계산하였다. 탄수화물 함량은 Dubois 등의 문헌에 기재된 내용에 따라 측정하였다. 100  $\mu$ l의 각 추출물을 100  $\mu$ l의 5% 페놀 및 500  $\mu$ l의 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>와 혼합하고 실온에서 20분간 반응시켰다. 흡광도를 490 nm에서 microplate reader를 사용하여 측정하였다. 글루코스 표준 곡선을 제작하여 당 함량을 계산하였다. 폴리페놀 함량은 이전 문헌에 공개된 프로토콜에 따라 측정하였다. 250  $\mu$ l의 7.5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>을 100  $\mu$ l의 각 추출물에 첨가하고 실온에서 5분간 반응시켰다. 그런 다음, 300  $\mu$ l의 1N Folin-Ciocalteu reagent를 첨가하고 암 조건에서 30분간 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 흡광도를 765 nm에서 microplate reader를 사용하여 측정하였다. 갈산 표준 곡선을 제작하여 폴리페놀 함량을 계산하였다.

[72] 아가로스 분말을 Tris-acetate-EDTA (TAE) 버퍼에 용해하고 가열하였다. 가열된 아가로스 용액을 몰드에 붓고 실온까지 식혀 투명한 겔을 제조하였다. 그런 다음 2% 아가로스 겔을 캐소드쪽에 근접한 겔의 로딩 웰을 갖는 TAE 버퍼 내에 잠긴 전기영동 챔버로 천천히 옮겼다. 아가로스 겔을 빛으로부터 멀리 떨어져 100 V의 전압을 인가하여 1시간 동안 전기영동하였다. 겔을 UNOK-8000 Gel Manager System (Biotechnology, Seoul, Korea)을 사용하여 브롬화 에티듬으로 염색한 후 시각화하고 mRNA 발현을 Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)로 정량하였다.

[73] 세포 배양

[74] 인간 피부 섬유아세포 (HDF) 및 인간 각질세포 (HaCaT)를 American Type of Culture Collection (ATCC, Manassas, VA)에서 입수하였다. 세포를 10% 열-불활성화 FBS가 보충된 DMEM에서 성장시켰다. 세포를 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>의 습식 대기 하에서 인큐베이션하였다. 세포가 70% 내지 80%의 밀도에 이를 때까지 배양하였다.

[75] PDRN의 세포독성

[76] HDF 및 HaCaT를 24-웰 플레이트에서 500  $\mu$ l의 배양 배지에 1 X 10<sup>5</sup> cells/well의 밀도로 각각 접종하였다. 다음 날에 세포에 다양한 농도의 PDRN를 처리한 후,

세포를 추가로 24시간 동안 인큐베이션하였다. MTT 용액 (1 mg/ml in PBS)을 각 웰의 20  $\mu$ l/100  $\mu$ l의 배양 배지에 첨가하였다. 2시간 동안 인큐베이션한 후, 상층액을 제거하고 포르마잔 크리스탈을 DMSO에 용해시켰다. 그런 다음, 흡광도를 540 nm에서 PowerWave XS2 microplate reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)를 사용하여 측정하였다. 데이터는 3회 반복 실험의 가시화된 세포의 생존율  $\pm$  표준 편차의 백분율로 표시하였다

[77] 생세포/죽은세포 염색

[78] 접종 후 1 및 3일 동안 샘플 또는 용출액이 처리된 HDF 및 HaCaT 세포의 생세포/죽은세포 및 세포 증식을 관찰하기 위해, HDF 및 HaCaT를 37 °C에서 15분간 무혈청 배지 중의 FDA (10  $\mu$ g/ml) 및 PI (20  $\mu$ g/ml)로 염색하였다. 그런 다음 염색된 세포를 PBS로 세척하여 비처리된 FDA 및 PI 및 잔여물을 제거하였다. FDA는 생세포에서는 녹색 형광으로 나타나고 PI는 죽은 세포에 대하여 빨간색으로 나타나고, 형광 현미경 (Leica DMI3000B)으로 정량분석하였다.

[79] **In vitro** 세포이동 분석

[80] HDF를 6-웰 플레이트에 4 X 10<sup>5</sup> cells/well의 밀도로 2 ml의 배양 배지에 접종하였다. 세포를 24시간 동안 인큐베이션하여 약 90%의 밀도로 부착시켰다. 세포를 플레이트에 부착시킨 후, 2 mm 너비 플라스틱 파이펫 팁으로 상처 선을 만들고 부착되지 않은 세포를 PBS로 세척하였다. 그런 다음, 세포에 농도별 PDRN을 처리 한 후 세포가 이동하게 하였다. Zeiss Axio Observer A1 microscope (Carl Zeiss, Inc., Oberkochen, Germany)를 사용하여 시점마다 50X의 배율로 사진을 촬영하고 ProgRes CapturePro 2.10.0.1 software (Jenoptik Laser Optik System GmbH, Jena, Germany)를 사용하여 공정을 실시했다.

[81] 콜라겐 생성 효능 분석

[82] 콜라겐 생성을 Picro-Sirius red 염색으로 평가하였다. HDF를 피크르산 (1.3% in water, Sigma)의 포화 수용액에 용해된 Sirius red (0.1%, Sigma)으로 만들어진 염색 용액과 2시간 동안 인큐베이션하고 PBS로 3회 세척한 후, 탈수시켰다. 염색된 결정을 0.1 M NaOH에 용해시킨 다음, PowerWave XS2 microplate reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 데이터는 3회 반복 실험의 가시화 세포의 콜라겐 평균 생성률  $\pm$  표준편차의 백분율로 나타냈다.

[83] 웨스턴 블롯 분석

[84] HDF에서의 PDRN의 세포 증식 효과를 평가하기 위해, HDF를 약 2 X 10<sup>6</sup> 세포의 밀도로 100 cm<sup>2</sup> 디쉬에 성장시켰다. 세포를 다양한 농도의 PDRN으로 처리하고 24시간 동안 인큐베이션하여 콜라겐 발현 수준을 확인하고, 30분 동안 인큐베이션하여 Smad2/3 및 mitogen-activated protein kinase (MAPK) 경로의 활성화 정도를 분석하였다.

- [85] In vivo 분석을 위해, 마우스를 희생시킨 후 피부 조직을 제거한 후, 조직 샘플을 추후 분석까지 질소 가스 탱크에 보관하였다. 냉동된 조직 샘플을 용해 버퍼 내에서 Tissue Lyser (SpeedMill PLUS, Jena, Germany)로 균질화하였다. 표본을 30 cycles/second로 5분간 스틸 비드를 사용하여 파괴하였다.
- [86] 샘플을 용해 버퍼 (20 mM Tris-HCl at pH 7.4, 5 mM EDTA, 10 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 100 mM NaF, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1% NP-40, 10 mg/ml aprotinin, 10 mg/ml leupeptin, 및 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)에 30분간 용해시킨 후, 4 °C에서 13,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 잔해를 제거하였다. 세포 용해물의 단백질 농도를 Pierce BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, Inc., Grand Island, NY, USA)로 측정하였다. 그런 다음, 30 µg의 단백질을 10% SDS-PAGE를 사용하는 전기영동을 통해 분리하고 Amersham Protran Premium 0.45-µm 니트로셀룰로오스 블롯팅 멤브레인 (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA)으로 옮겼다. 멤브레인을 실온에서 2시간 TBS-T (25 mM Tris-HCl at pH 7.4, 137 mM NaCl, 2.65 mM KCl, 0.05% Tween-20) 중의 5% 탈지분유로 차단시킨 후 4 °C에서 일차 항원 (1:1,000 희석)과 함께 24시간 동안 인큐베이션하였다. 그런 다음 TBS-T로 세척하고, 멤브레인을 이차 항체 (1:5,000 희석)와 함께 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 밴드를 CAS-400SM Davinch-Chemi image™ system (Young Hwa Scientific Co. LTD., Seoul, Korea)를 사용하여 시각화시키고, Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 단백질 발현을 정량하였다. 또한, 인 비트로 및 인 비보 분석을 위해 웨스턴 블롯을 3회 반복하여 실시하였다.
- [87] <결과>
- [88] ***P. pectinifera*** 으로부터의 PDRN의 특성화
- [89] *P. pectinifera*로부터 추출된 PDRN의 순도 및 DNA 농도는 각각  $1.24 \pm 0.01$  및  $176.67 \pm 5.20$  µg/ml이었다. PDRN의 화학 조성은 표 1에 나타냈으며, 약간 높은 함량의 단백질을 포함하고 있다. 이러한 결과는 다량의 물, 단백질 및 지질 및 소량의 탄수화물로 구성된 *P. pectinifera*의 일반 성분과 유사하다. 또한, 아가로스 전기영동을 통해 *P. pectinifera* 유래 PDRN이 작은 염기쌍 범위 (< 400 bp)를 가짐을 확인하였다 (도 1).
- [90] 나노파이버 제조시 사용된 HFIP의 *P. pectinifera*로부터 추출된 PDRN의 안정성에 대한 효과를 확인하기 위해, 두 용매 (DW 및 HFIP) 중의 PDRN의 순도 및 DNA 농도를 흡광도 수치에 기반하여 비교하였다. 용매의 종류에 관계없이, *P. pectinifera*로부터 추출된 PDRN의 순도 및 DNA 농도는 유지되었다 (표 2). 이러한 결과는 *P. pectinifera*로부터 추출된 PDRN이 HFIP에 의해 영향을 받지 않음을 나타내는 것으로, HFIP을 전기방사 기술을 통한 나노파이버 제조용 용매로서 선택하여 사용하였다.
- [91] [표 1]

[92]

성질	샘플 (1 mg/ml)	P.pectinifera로부터 채취한 PDRN
	순수도	1.24 ± 0.01
합량 (µg/ml)	DNA 농도 (µg/ml)	176.67 ± 5.20
	단백질	63.40 ± 13.00
	탄수화물	27.44 ± 1.69
	폴리페놀	12.44 ± 0.61

[93]

[표 2]

[94]

조건	용매	중류수		3-핵사플루오로-2-프로판올	
	PDRN	-	+	-	+
성질	A260	0.06 ± 0.001	0.14 ± 0.005	0.08 ± 0.005	0.14 ± 0.003 †
	A280	0.10 ± 0.001	0.12 ± 0.004	0.07 ± 0.004	0.12 ± 0.001 †
	순수도	-	1.21 ± 0.003	-	1.21 ± 0.042 †
	DNA 농도 (µg/ml)	-	190.00 ± 15.61	-	155.00 ± 13.92 †

중류수에 PDRN가 비교하여 유의미하지 않음

[95] **In vitro** 세포독성 및 증식 활성

[96] *P. pectinifera* 유래 PDRN의 *In vitro* 세포독성 및 증식 활성을 MTT 검정 및 FDA/PI 염색을 사용하여 평가하였다. MTT 검정을 위해 HDF 및 HaCaT 세포를 증가되는 농도의 PDRN로 1, 3, 및 5일 동안 처리하고 FDA/PI 염색을 위해 1 및 3일 동안 증가되는 농도의 PDRN을 처리하였다. HDF 세포에서, PDRN (5-200 µg/ml)은 처리 3일 후에 세포 증식을 상당히 증가시켰으며, 50 µg/ml PDRN의 처리시 가장 높은 증식을 보였다 (도 2 및 3). 또한, PDRN 5, 10, 및 50 µg/ml의 농도에서 HDF의 증식을 유도하였다. 반면에, PDRN은 HaCaT 세포에 독성을 보이지 않았으나 유의한 증식 효과도 보이지 않았다 (도 4 및 5). 이러한 결과에 근거하여, 상기 농도 (5-50 µg/ml)의 PDRN은 HaCaT 세포에 독성을 보이지 않으면서 HDF 세포에 증식 효과를 보인다는 결론을 내렸다.

[97] 콜라겐 생성에 대한 효과

[98] *P. pectinifera* 유래 PDRN의 콜라겐 생성에 대한 효과를 조사하기 위해, HDF에 증가하는 농도의 *P. pectinifera* 유래 PDRN (0-200 µg/ml)을 1, 3, 및 5일 동안 처리하고 Picro-Sirius red 염색을 실시하였다. 그 결과 50-200 µg/ml PDRN가 HDF 세포에서 콜라겐 생성을 증가시켰다. 이러한 결과는 *P. pectinifera* 유래 PDRN이 고농도 콜라겐 생산에 영향을 미침을 입증하는 것이다; 그러나, 50-200 µg/ml 사이의 유의차는 보이지 않았다 (도 6).

[99] **In vitro** 세포이동 촉진 효과

[100] *In vitro* 세포이동 분석을 실시하여 PDRN이 세포 이동을 촉진하는지를 확인하였다. 도 7에 도시된 바와 같이, 비처리군에서 스크래치 낸 상처 영역은 72시간 후에도 완전히 커버되지 않은 반면, PDRN은 투여량에 의존하여 세포 이동을 촉진시켰다. 또한, 고농도 (50-200 µg/ml) PDRN-처리군에서의 상처 영역은 농도 사

이의 유의차를 보이지 않았다. 특히, PDRN은 세포독성 없이 세포 이동 및 콜라겐 생성을 자극하였다. 이를 종합하여, 50 µg/ml 이하의 농도 범위를 추후 실험을 위해 선택하였다.

[101] 상처 치유 관련 단백질 발현에 대한 효과

[102] *P. pectinifera*로부터 추출된 PDRN의 HDF 세포 내 I형 콜라겐, III형 콜라겐, 및 α-SMA와 같은 상처 치유와 관련된 단백질 발현에 대한 효과를 확인하기 위해 웨스턴 블롯 분석하였다. HDF 세포를 *P. pectinifera*로부터 추출된 PDRN (0-50 µg/ml)로 5일간 처리하였다. 도 8A는 PDRN이 HDF 세포에서 III형 콜라겐 발현을 상당히 증가시키고 투여량 의존적으로 α-SMA 발현을 가속화시킴을 보였다. 이러한 결과는 *P. pectinifera*로부터 추출된 PDRN이 상처 치유와 관련된 단백질의 발현을 촉진함을 나타낸다.

[103] Smad2/3 및 MAPK 경로에서의 효과

[104] 상처 치유 및 세포 이동과 관련된 단백질 발현의 PDRN의 작용 기전을 확인하기 위해, *P. pectinifera*로부터 추출된 PDRN의 MAPK 및 Smad2/3 경로의 활성화에 대한 효과를 웨스턴 블롯 분석으로 평가하였다. PDRN은 비처리된 세포에 비해 ERK 및 Smad2/3의 인산화를 현저하게 증가시켰다 (도 8B). 이러한 결과는 PDRN은 ERK 및 Smad2/3의 인산화를 활성화하여 상처 치유와 관련된 단백질의 발현을 증가시킴을 제시하는 것이다.

[105] 실시예 2.

[106] PG 및 PGP 나노파이버의 제조

[107] 젤라틴 10% (w/v)(G1890, Sigma-Aldrich, USA), PDRN 0.02% (w/v), 및 PCL 10% (w/v) 용액을 1, 1, 1, 3, 3, 3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) (Sigma-Aldrich, USA)에 각각 용해시켜 제조하였다. Syringe pump (KD Scientific Inc., Holliston, MA, USA), 고압전력 공급기, 알루미늄 호일로 싸인 스테인레스-스틸 로테이팅 콜렉터 및 다른 작동 조건을 갖는 24-게이지 니들을 사용하여 전기방사를 실시하였다 (표 3 및 4 및 도 9). 제조된 나노파이버를 사용 전까지 -80 °C 냉동고에 보관하고, 이들 중 일부는 목적에 따라 동결건조하였다.

[108] [표 3]

[109]

스캐폴드 종류(PCL : 겔)	약어	유속 (ml/h)	전압 (kV)	거리 (cm)	콜렉터RPM
10:0	P10G0	0.4	9.5	10	200
8:2	P8G2	0.4	10	10	200
6:4	P6G4	0.4	10.5	10	200
4:6	P4G6	0.4	10.5	10	200
2:8	P2G8	0.4	11.2	10	200
0:10	P0G10	0.4	11.5	10	200

[110] [표 4]

[111]

스캐폴드 종류(PCL : 겔 : PDRN)	약어	유속 (ml/h)	전압 (kV)	거리 (cm)	클렉터RPM
10:0:0	P	0.4	9.5	10	200
6:4:0	PG	0.4	10.5	10	200
6:4:0.02	PGP	0.4	11.0	10	200

[112] 나노파이버의 특성화

[113] Emi-Tech K500X를 사용하여 나노파이버에 은 박막으로 스퍼터링 코팅한 후 표면 형태를 5 kV에서 field emission scanning electron microscopy (FE-SEM, Hithachi S-2700, Japan)로 확인하였다. 평균 섬유 지름 및 기공 크기를 이미지 분석 소프트웨어 (ImageJ Wayne, Rsband)로 측정하였다.

[114] 나노파이버의 습윤 거동을 contact angle analyzer (SEO Phoenix MT, Suwon, Gyeonggi-do, Korea)을 사용하여 평가하였다. 액적의 부피는 2  $\mu$ l이었으며 접촉각은 5군데의 분리된 임의의 위치에서 측정하여 평균을 냈다. 테스트 용액은 혈청이 포함되지 않은 DMEM 배지를 사용하였다. 동일 크기의 나노파이버를 대기 온도(~296 K)에서 샘플 스테이지에 올려놓고 접촉각을 측정하였다. 시간에 따라 디지털 카메라로 사진을 촬영하고 image processing software (Image Pro 300)을 사용하여 분석하였다.

[115] 나노파이버의 인장 강도를 universal tensile machine (LR5K Plus, Lloyd Instruments)으로 측정하였다. 덤벨 형태의 스트립 (15 mm X 5 mm x T; where T was thickness)으로 자른 각 샘플을 인장 테스트의 그립핑 유닛에 수직으로 올려놓고 실온에서 파괴될 때까지 1 mm/min의 크로스헤드 속도를 적용시켰다.

[116] 복합 스캐폴드의 흡수 능력을 평가하기 위해, 각각 다른 스캐폴드를 정사각형 (15 mm X 15 mm)으로 잘라 실온에서 평형화될 때까지 PBS (pH 7.4)에 함침시켰다. 나노파이버의 인 비트로 팽창 거동을 측정하기 위해, 과량의 물과 표면 습기를 플롯팅 페이퍼로 제거하고 1분간 더 그대로 두어 표면 수분을 제거한 후 중량을 측정했다. 나노파이버의 평형-팽창 백분율을 식 (Swelling (%) =  $[(W_s - W_d) / W_d] \times 100$ )에 따라 계산하였다. 상기 식에서  $W_d$  및  $W_s$ 는 각각 나노파이버의 건조 및 팽창 상태를 의미한다.

[117] Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy (FT-4100, JASCO)을 사용하여 순수 PCL, 순수 젤라틴, 순수 PDRN, P 나노파이버, PG 나노파이버, 및 PGP 나노파이버의 기능기를 분석하였다. IR 스펙트럼은 4  $cm^{-1}$ 의 해상도에서 650-4000  $cm^{-1}$ 의 주파수에서 30회 스캔의 평균을 나타냈다.

[118] Thermogravimetric 분석 (TGA)를 30  $^{\circ}C$  내지 700  $^{\circ}C$ 의 스캔 범위 및 지속적인 질소 하의 20  $^{\circ}C$ 의 변함없는 가열 속도로 Pyris 1 TGA analyzer (PerkinElmer TGA-7, Waltham, MA, USA)을 사용하여 실시하였다. 열량측정을 10 ml/min의 속도로 흐르는 질소 하에서 differential scanning calorimetry (DSC)을 사용하여 실시하였다. 표본을 밀봉된 알루미늄 팬에 넣었다. 유리 변이 온도 ( $T_g$ ) 및 용융 온도 ( $T_m$ )에 도

달할 때까지 가열 사이클을 실시하였다. 사이클 동안, 샘플을 30 °C로부터 180 °C 까지 10 °C의 속도로 가열하였다. 그런 다음 샘플을 기하급수적인 감소 속도로 질소를 사용하여 냉각하였다.

- [119] Cu-K $\alpha$  방사선으로 X-ray diffraction (X'Pert3-Powder, PANalytical, Netherland)을 사용하여 나노파이버의 X-ray diffraction (XRD) 분석을 실시하였다. 5 내지 90°의 범위 내에서 2.4° min<sup>-1</sup>의 스캐닝 속도로 회절 강도를 기록하였다.
- [120] **갈산 함유 PG 나노파이버의 방출 프로파일**
- [121] 갈산 함유 PG 나노파이버로부터 방출된 갈산을 37 °C의 PBS 용액 (pH 7.4) 내에서 14일 동안 갈산을 방출시키고 4 °C, 10,000 g에서 10분간 원심분리하여 잔여물을 제거하였다. 그런 다음 갈산 함유 PG 나노파이버로부터의 갈산을 Folin-Ciocalteu 방법을 통해 분석하였다. 우선, 20  $\mu$ l의 필름 용액을 100  $\mu$ l의 1 N Folin-Ciocalteu reagent 및 80  $\mu$ l의 7.5% 탄산나트륨과 혼합한 후, 실온에서 10분간 인큐베이션하고, 765 nm에서 PowerWave XS2 microplate reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 표준 곡선을 PBS 중의 갈산 용액을 사용하여 구성하였다.
- [122] **PGP 나노파이버의 PDRN 방출 프로파일**
- [123] PGP 나노파이버로부터 PDRN 방출을 37 °C에서 PBS 용액 (pH 7.4) 중에 14일간 실시하고 4 °C에서 10분간 10,000 g로 원심분리하여 잔여물을 제거하였다. 그런 다음 PGP 나노파이버로부터 방출된 PDRN을 총 DNA 함량을 측정하여 분석하였다. 우선, 1  $\mu$ l의 방출된 용액을 49  $\mu$ l의 DW와 혼합한 후, 실온에서 10분간 인큐베이션하고 260 nm에서 PowerWave XS2 microplate reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)을 사용하여 흡광도를 측정하였다.
- [124] **나노파이버의 직접 및 간접 세포독성**
- [125] 직접 세포독성 테스트를 위해, 나노파이버 (P, PG, 및 PGP)를 세포 실험하기 전에 각 측면에서 UV 광에 적어도 1시간 동안 노출시켰다. 나노파이버의 생체적 합성은 ISO 10993-5 표준에 기반한 직접 접촉 테스트를 사용하여 평가하였다. 세포-나노파이버 접촉 세포독성을 평가하기 위해, 세포를 배양하고 12-웰 플레이트에 접종하고 37 °C에서 24시간 동안 배양하였다. 그런 다음 나노파이버를 8 mm 지름의 디스크로 자르고 세포 단층의 표면에 위치시켰다. 24시간 동안 추가 인큐베이션한 후, 광학 현미경을 사용하여 일반적인 형태에 대해 세포를 분석하고 비-접촉 그룹과 비교하였다.
- [126] 간접 세포독성을 위해, 인 비트로 실험을 위한 나노파이버 (P, PG, 및 PGP)의 용출 용액을 ISO10993-12:2014 (*Biological evaluation of medical devices-Sample preparation and reference materials*)에 따라 제조하였다. 우선, 30 X 30 mm의 나노파이버를 1.5 ml DMEM에 위치시킨 후 37 °C에서 1일 및 3일 동안 인큐베이션하였다. 멸균을 위해 용액을 0.20  $\mu$ m syringe filter (Sartorius, Göttingen, Germany)로 여과하고 사용 전까지 4 °C 챔버에 보관하였다.
- [127] **통계 분석**

- [128] 모든 정량 데이터는 신선한 시약을 사용하여 적어도 3회 독립 실험의 평균  $\pm$  S.D.로 나타냈다. 그룹간 관찰된 차이의 통계학적 유의성은 분산 분석 (analysis of variance; ANOVA) 및 뒤이은 Duncan's multiple range test로 평가하였다. 모든 통계학적 분석은 SPSS Statistics 12.0 software (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하여 실시하였다. 각 특징은 통계학적 유의차를 나타내는 것으로 간주하였다.
- [129] <결과>
- [130] **PCL/Gel 나노파이버의 표면 형태 분석**
- [131] PCL/Gel 혼합 용액을 최적의 전기방사 조건 하에서 스테인레스-스틸 드럼으로 전기방사하였다 (표 3). P2G8 및 P0G10 나노파이버를 제외하고, 다른 블렌드 비율로 제조된 나노파이버는 밀집되고 비드가 없는 미세구조로 성공적으로 제조되었다 (도 10). P2G8 및 P0G10 나노파이버의 경우, 다공성 및 섬유 형태에 상당한 손실을 보였다. 젤라틴 비율의 증가에 따라 파이버 직경이 다르게 영향을 받았다 (P10G0, P8G2, P6G4, P4G6, P2G8, 및 P0G10 나노파이버에 대해 각각  $582.88 \pm 202.65$ ,  $444.61 \pm 124.64$ ,  $435.65 \pm 149.87$ ,  $686.13 \pm 218.35$ ,  $703.01 \pm 124.64$ , 및  $1370.93 \pm 492.57$  nm).
- [132] **PCL/Gel 나노파이버의 인장 강도**
- [133] 응력-변형 곡선 (도 11A), 인장 강도 (도 11B), 최대 하중에서의 변형 (도 11C), 및 최대 연장에서에서의 변형 (도 11D)과 같은 나노파이버의 기계적 특성을 도 22에 나타냈다. P0G10 나노파이버는 가장 낮은 유연성 및 탄성,  $0.50 \pm 0.17$  MPa의 가장 낮은 인장 강도,  $3.54 \pm 1.35$  (%)의 가장 낮은 최대 하중에서의 가장 낮은 변형, 및  $12.66 \pm 6.00$  (%)의 가장 낮은 파열에서의 연장을 보였다. P8G2 및 P6G4은 인장 강도가 각각  $2.95 \pm 0.34$  및  $1.50 \pm 0.10$  MPa으로 증가하였다. PCL/Gel 혼합 비율이 4:6으로 변화되었으며, 최대 하중 및 최대 연장에서에서의 완전한 파괴 후에 P10G0 나노파이버 ( $1.15 \pm 0.06$  MPa)보다 인장 강도의 급작스런 감소 ( $0.77 \pm 0.14$  MPa)가 관찰되었다.
- [134] **PCL/Gel 나노파이버의 접촉각**
- [135] 나노파이버의 표면 습윤성은 세포 부착, 성장, 증식 및 이동에 관련된 중요한 특성이고, 나노파이버의 설계 및 표면 구조와 관련된 물질 화학에 의해 영향받을 수 있다. 나노파이버의 친수성을 확인하기 위해, 나노파이버 및 배양 배지 사이에 접촉각을 측정하였다. 시간에 따른 접촉각의 이미지 및 그래프를 도 12에 나타냈다. 합성 중합체 PCL은 자연적으로는 소수성이나, 콜라겐, 젤라틴과 같은 천연 중합체 친수성이다. P10G0 및 P8G2 나노파이버는 높은 초기 접촉각을 갖는다 (각각  $125.77 \pm 5.00^\circ$  및  $128.53 \pm 5.28^\circ$ ). P6G4 나노파이버는 높은 초기 접촉각을 가지며 ( $120.09 \pm 10.68^\circ$ )  $92.68 \pm 13.97^\circ$ 로 상당히 감소하였다. 반면에, P4G6, P2G8, 및 P0G10 나노파이버는 낮은 초기 접촉각을 갖는다 (각각  $94.82 \pm 8.71^\circ$ ,  $88.99 \pm 3.44^\circ$  및  $40.43 \pm 7.53^\circ$ ). 특히, P0G10의 접촉각은 다른 나노파이버에 비해 거의 0에 가깝게 감소하였다 ( $40.43 \pm 7.53^\circ$ 에서부터  $15.16 \pm 1.95^\circ$ 까지). 이러한 결과는 나노파이버에 젤라틴의 첨가로 나노파이버의 표면 습윤성이 증가됨을

나타내며, 이는 세포 부착, 증식 및 이동의 유도를 야기하였다. 종합하면, 추후 실험을 위해 피부-조직 공학에 사용하기에 적합한 기계적 특성, 표면 형태 및 표면 습윤성 특성을 갖는 P6G4 (PG) 나노파이버와 젤라틴의 영향을 확인하기 위한 젤라틴 미첨가군으로 P10G0 (P) 나노파이버를 선택하였다.

[136] **갈산 함유 PG 나노파이버의 약물 방출 능력**

[137] PG 나노파이버에서의 PDRN의 함유량을 결정하기 위해, 갈산 함유 PG 나노파이버를 사용하여 약물 방출 테스트를 실시하였다. PG 나노파이버로부터 갈산의 방출율은 7일간의 25%로 지속적으로 증가하였으며, pH 7.4에서 PBS 용액에서 37°C에서 3.57% 비율로 갈산을 꾸준히 방출하였다(도 13). 그러므로, 인 비트로 실험(50 µg/ml)을 위한 농도와 일치하기 위해 PG 나노파이버에서 PDRN의 함유량을 200 µg/ml으로 선택하였다.

[138] **PGP 나노파이버의 표면 형태 분석**

[139] PCL/Gel/PDRN 혼합 용액을 최적 전기방사 조건 하에서 스테인레스-스틸 드럼으로 전기방사하였다(표 4). 다른 혼합 비율로 제조한 나노파이버를 밀집되고 비드가 없는 나노구조로 성공적으로 제조하였다(도 14). 도 25C에 도시된 바와 같이, PGP 나노파이버의 표면 형태(파이버 지름 =  $334.63 \pm 98.09$  nm)는 P 및 PG 나노파이버보다 더 밀집되고 더 통합되어 있다.

[140] **PGP 나노파이버의 인장 강도**

[141] 응력-변형 곡선(도 15A), 인장 강도(도 15B), 최대 하중에서의 변형(도 15C) 및 최대 연장에서의 변형(도 15D)과 같은 나노파이버의 기계적 특성을 도 26에 나타냈다. P 나노파이버는  $1.15 \pm 0.06$  MPa의 인장 강도,  $475.85 \pm 75.16\%$ 의 최대 하중에서의 가장 높은 변형, 및  $620.84 \pm 58.16\%$ . P8G2의 최대 연장에서 가장 높은 변형을 보였다. P 나노파이버와 비교했을 때, PGP 나노파이버의 인장 강도는  $1.80 \pm 0.16$  MPa로 증가하고, 최대 하중에서의 변형( $102.52 \pm 3.61\%$ ) 및 최대 연장에서의 변형( $116.44 \pm 0.50\%$ )은 감소하였다. 이러한 결과는 PDRN의 추가가 인장강도, 최대 하중에서의 변형 및 최대 연장에서의 변형과 같은 기계적 특성에 영향을 미치지 않음을 나타낸다.

[142] **PGP 나노파이버의 PDRN 방출 능력**

[143] 도 16에 도시된 바와 같이, PGP 나노파이버로부터 방출된 PDRN은 갈산 함유 PG 나노파이버의 경우와 유사하였다. PGP 나노파이버로부터의 PDRN의 방출율은 7일 동안 지속적으로 증가하였으며, pH 7.4에서 37 °C PBS 중의 3.09%의 비율로 꾸준히 PDRN이 방출되었다. 따라서, PGP 나노파이버로부터 PDRN의 지속적인 방출이 7일까지 유지됨이 확인되었다.

[144] **FT-IR 분석**

[145] 순수 PCL, 순수 젤라틴, PDRN 및 제조된 나노파이버의 FT-IR 스펙트럼을 도 17에 나타냈다. PCL 중합체의 비대칭 및 대칭 C-H 스트레칭 진동의 중요 피크가 각각  $2994$  및  $2866$   $\text{cm}^{-1}$ 에 나타났다.  $1722$   $\text{cm}^{-1}$ 에서의 강한 피크는 에스테르기에서

의 카르보닐 밴드 (C=O)의 스트레칭 진동을 나타내며, 1293  $\text{cm}^{-1}$ 에서의 피크는 결정상에서 C-O, 및 C-C의 스트레칭에 의한 것이다. 1239 및 1165  $\text{cm}^{-1}$ 에서의 다른 유의한 피크는 각각 에테르 (C-O-C)의 비대칭 및 대칭 진동에 상응하는 것이다 (도 17의 a).

[146] 도 17의 b에서, 젤라틴 내의 C=O 및 C-N 기의 스트레칭 진동을 나타내는 아미드 I 밴드는 1630  $\text{cm}^{-1}$ 에서 기록되었으며, 1440  $\text{cm}^{-1}$ 에서의 약한 밴드는 지방족 C-H 밴딩 진동을 나타내는 것이다. 1524 및 1237  $\text{cm}^{-1}$ 에서의 밴드는 각각 N-H 밴딩 및 C-N 스트레칭의 스트레칭 진동을 나타내는 것으로, 각각 젤라틴 내의 아미드 II 및 아미드 III의 특징적인 밴드에 기인한 것이다. 또한, PDRN의 FT-IR 스펙트럼은 DNA의 여러 특징적인 피크를 보였다.

[147] 도 17의 c에서 볼 수 있는 바와 같이, PDRN의 FT-IR 스펙트럼의 3개의 주요 영역은 하기 DNA 분자 진동과 관련된 투과 피크 성분의 세트로 이루어져 있다. DNA 핵염기 영역 (1800-1500  $\text{cm}^{-1}$ )은 DNA 염기와 관련되어 있으며, 1660, 1588, 및 1532  $\text{cm}^{-1}$ 에서 관찰되는 3개의 피크를 포함한다; 염기-당 영역 (1500-1250  $\text{cm}^{-1}$ )은 염기의 진동에서의 흡광도에 해당하는 것으로 1462, 1398, 및 1287  $\text{cm}^{-1}$ 에서 관찰되는 3개의 피크를 포함한다. 포스페이트 DNA 골격 영역 (1250-650  $\text{cm}^{-1}$ )은 포스페이트 골격 영역을 나타내며 1033, 1020, 981, 및 788  $\text{cm}^{-1}$ 에서 기록된 4개의 피크를 포함한다. 구아닌 염기 고리(C6=C6)에서 카르보닐기의 면내 스트레칭 진동의 피크는 1660  $\text{cm}^{-1}$ 에서 발견되었으며, 시토신 단일-가닥 또는 이중-가닥의 면내 진동은 1532  $\text{cm}^{-1}$ 에서 나타났다. 또한, 핵산 (구아닌 및 아데닌)에서 이미다졸 고리의 -C=N 고리 진동에 해당하는 피크는 1588  $\text{cm}^{-1}$ 에서 나타났다. 염기 당의 영역에서, 1462  $\text{cm}^{-1}$ 에서의 피크는 A-형 또는 B-형 DNA의 데옥시아데노신 N1=C6-N6을 나타내며, 1398  $\text{cm}^{-1}$ 에서의 피크는 A-형 DNA 형태를 나타내는 모든 염기에서의 C3'-endo 의 당에 기인한 진동을 의미한다. 세 번째 피크는 핵산에서의 포스포디에테르 골격의 -PO<sub>2</sub> 진동으로서의 진동을 보이는 것으로, 1287  $\text{cm}^{-1}$ 에서 기록되었다. 데옥시리보스 C-O 스트레칭 진동에 해당하는 피크는 1033  $\text{cm}^{-1}$ 에서 나타났다. 1020  $\text{cm}^{-1}$ 에서의 강한 피크는 푸라노오스 진동을 나타내는 것이고, 그 다음으로 강한 981  $\text{cm}^{-1}$ 에서의 피크는 DNA 데옥시리보스-포스페이트 골격의 C-C 스트레칭에 기인한 것이다. 788  $\text{cm}^{-1}$  근처에서 나타난 약한 진동은 deoxy c3'-endo-O-P-O와 관련된 것으로, A형 DNA 형태를 나타낸다. 순수 PCL, 순수 젤라틴 및 PDRN의 모든 특징적인 피크를 표 5에 나타냈다.

[148] [표 5]

[149]

그룹	파수 (cm <sup>-1</sup> )	대응
PCL	2994	비대칭 C-H 스트레칭 진동
	2866	대칭 C-H 스트레칭 진동
	1722	에스터 그룹에서의 카보닐 밴드(C=O) 스트레칭 진동
	1293	Stretching of C-O and C-C in crystalline phase
	1239	에테르(C-O-C) 비대칭 진동
	1165	에테르(C-O-C) 대칭 진동
젤	1630	아민 I, C=O 및 C-N 스트레칭
	1524	Amide II, N-H bending
	1440	지방족 C-H
PDRN	1800-1500 DNA 핵산 영역	1669 구아닌 염기 고리(C6=O6)에서 카르보닐기의 평면 내 스트레칭 진동
		1588 핵산(구아닌 및 아데닌)에서 이머다졸 고리의 -C=N 고리 진동
		1532 사이토신 단일 가닥 또는 이중 가닥의 평면 내 진동
PDRN	1500-1250 염기-당 개체	1462 A- 또는 B-형태의 N1=C6-N6의 디옥시아데노신(dA) 진동
		1398 모든 염기의 잔기에 대한 C3'-엔도(A형 구조)
		1287 핵산의 포스포디에스테르 골격의 PO2 진동과 같은 진동
		1033 디옥시리보스 C-O 스트레칭 진동
	1250-650 인산염 DNA 백본 영역	1020 퓨라노스 진동
	981 DNA 디옥시리보스-위산 골격 백부의 C-C 스트레칭	
	788 테루시 C3'-엔도-O-P-O (A 형태 가능)	

[150] 열역학 분석

[151]

도 18은 30 내지 700 °C에서 순수 PCL, 순수 젤라틴, PDRN, 및 제조된 나노파이버의 TGA 결과를 나타낸 것이다. 순수 PCL은 약 380 °C에서 시작되는 1개의 분해 단계만을 나타냈다. 순수 젤라틴의 TGA 곡선은 두 구간의 분해를 보였다. 약 80-90 °C에서 발생한 첫 번째 분해 구간은 흡수되고 결합된 물의 손실 때문이고 약 260 °C에서의 두 번째 분해 구간은 단백질 사슬의 펩티드 결합의 분해를 비롯한 젤라틴의 다른 규모의 열 분해때문이다. 도 18에 도시된 바와 같이, PDRN의 온도기록 또한 두 개의 분해 구간을 보였다: 100 °C 이하의 첫 번째 구간 및 220 °C 이상의 두 번째 구간. 첫 번째 구간은 느슨하거나 단단히 결합되어 있던 물의 손실 때문이고 두 번째 구간은 증가된 온도에서 시작되는 장쇄 DNA의 단축에 의한 것이다. 게다가, TGA 결과는 700 °C에서 잔여물로서 남아있는 순수 젤라틴, PDRN, PG 및 PGP 나노파이버의 비율이 각각 약 18.84%, 33.68%, 6.59%, 및 7.38%임을 입증하였다. 나노파이버에 젤라틴 및 PDRN의 첨가로 인해 잔여 중량이 증가하고 분해 시작 온도가 감소하였다. 또한, PGP 나노파이버의 온도기록은 거의 PG 나노파이버와 거의 중복되었으며, 이는 PDRN의 소량 첨가로는 열 분해에 영향을 주지 않음을 나타내는 것이다.

[152]

PCL, 순수 젤라틴, PDRN, 및 제조된 나노파이버의 열 효과를 DSC 측정으로 확인하였다 (도 19). 가열하는 동안, 55.3 °C에서 피크가 나타났으며, 이는 PCL의 녹는점을 나타낸다. 결정화 비율  $X_c$ 는 식 ( $X_c = \text{enthalpy of melting from DSC tests} / \text{reference enthalpy of PCL}, 142 \text{ J/g} \times 100$ 의 수치를 가짐)에 따라 계산한 결과 48.36%이었다. 이 수치는 PCL의 반결정질 성질을 나타낸다. 유사하게, 제조된 나노파이버는 P, PG, 및 PGP 나노파이버에 대해 각각 56.1 °C, 55.1 °C, 및 55.8 °C에서 피크를 보였다. 블렌드의 결정화 비율  $X_c$ 는 P, PG, 및 PGP 나노파이버에 대해 각각 48.45%, 30.16%, 및 32.24%이었다. 이러한 발견은 Gel 및 PDRN의 통합이 결

정화 비율  $X_c$ 가 감소하더라도 PCL 매트릭스의 녹는점에 유의미한 영향을 주지 않음을 입증하는 것이다.

[153] **XRD 분석**

[154] 순수 PCL, 순수 젤라틴, PDRN, 및 제조된 나노파이버의 회절 패턴을 도 20에 나타냈다. PCL의 XRD 프로파일은  $2\theta = 21.7^\circ$  및  $24.26^\circ$ 의 각에서 2개의 특유의 피크를 보였으며, 이는 각각 PCL의 반결정질 성질의 (110) 및 (200) 결정학적 평면을 나타내는 것이다. 순수 젤라틴에서는 구별되는 회절 피크는 관찰되지 않았다. PDRN의 XRD 스펙트럼은  $2\theta = 20.5^\circ$ 의 회절각 주변에서 넓게 튀어나와 있는 것을 보이는데, 이는 이중 헬릭스의 염기쌍 거리에 해당하는 것이다. 제조된 나노파이버에서,  $2\theta = 21.7^\circ$  및  $24.26^\circ$ 의 각에서의 피크는 PCL 결정의 회절에 의한 것으로, 젤라틴 및 PDRN의 증가에 따라 낮은 강도를 가지며, 반결정질의 약화 및 이의 무정형 성질의 증가를 나타내는 것이다.

[155] **PGP 나노파이버의 접촉각**

[156] P, PG, 및 PGP 나노파이버의 친수성을 확인하기 위해, 제조된 나노파이버 및 배양 배지 사이의 접촉각을 측정하였다. 대표 이미지 및 시간에 따른 접촉각을 도 21에 나타냈다. PGP 나노파이버는 P 및 PG 나노파이버에 비해 0에 가까운 접촉각 ( $90.17 \pm 4.78^\circ$  내지  $53.47 \pm 15.35^\circ$ )에서의 감소를 보였으며, 이는 PGP 나노파이버가 친수성이고 고도의 상호연결된 기공 구조를 가짐을 나타내는 것이다. 이러한 결과는 주위의 유체 내에서 세포 부착 및 분자의 빠른 흡수때문에 세포가 좀 더 쉽게 나노파이버에 부착될 수 있어 PGP 나노파이버가 *In vitro* 세포 부착, 증식 및 이동에 적용될 수 있음을 나타낸다.

[157] **팽윤성**

[158] 상처 치유 과정 동안, 손상된 부위로부터 흘러나온 삼출물이 세포 이동 및 증식을 촉진하고 손상되거나 괴사한 조직에서의 세포 대사 및 산 자기분해를 제공하는 필수적인 상처 치유 인자의 확산을 증가시킨다. 이러한 사실에 근거하여, 높은 물 흡수량을 갖는 나노파이버는 상처 베드로부터의 삼출물을 흡수하고 영양분의 공급을 증가시킬 수 있어 드레싱제로 적합하다. 제조된 모든 나노파이버가 3시간의 인큐베이션 시간 내에 200% 이상의 물 흡수량을 가지며 평형을 달성함을 확인하였다 (도 22). 젤라틴 및 PDRN의 존재로 인해 물 흡수량 및 보유 시간이 증가하였다. 그러나, 나노파이버의 섬유상 나노구조 및 기공 성질은 더 많은 침윤이 가능하게 하여 팽창성이 제한된다. 제조된 나노파이버의 특성화 결과에 기반하여, PGP 나노파이버가 *In vivo* 피부 조직 재생을 더 빠르게 촉진할 수 있다는 가설을 세웠다.

[159] **제조된 나노파이버의 직접 세포독성**

[160] MTT 분석을 사용하여 제조된 나노파이버의 HDF 및 HaCaT에 대한 직접 세포독성을 평가하였다. ISO10993-5:2014 표준 (*Biological evaluation of medical devices - in vitro cytotoxicity test*)에 따르면, 제조된 나노파이버는 플레이트된-배

양 그룹에 비해 나노파이버 유형에 관계없이 세포 생존에 영향을 주지 않는 것으로 확인되었다(도 23).

[161] 나노파이버의 간접 세포독성

[162] ISO10993-5:2014 표준 (*Biological evaluation of medical devices - in vitro cytotoxicity test*)에 따라, 1일 및 3일 동안 제조된 나노파이버의 용출 용액을 제조하고 HDF 및 HaCaT에서 MTT 분석 및 FDA 및 PI 형광에 의한 생세포/죽은세포 염색을 실시하여 간접 세포독성을 연구하였다. MTT 결과는 제조된 나노파이버의 용출 용액이 세포독성이 없음을 나타냈다 (도 24, 25, 및 26). 생세포/죽은세포 염색 결과도 MTT 분석 결과와 유사하게 세포독성이 없음을 입증하였다.

[163] 실시예 3

[164] 원형 전체-두께 절개 상처 모델을 사용한 *In vivo* 실험

[165] 나노파이버 (P, PG, 및 PGP)의 상처 치유 능력을 확인하기 위해, 7주령 수컷 ICR 마우스를 인 비보 상처 치유 모델로 사용하였다. ICR 마우스를 제어된 환경 (상대습도: 40-70%; 온도: 20-24 °C에서 12시간 광/암 사이클을 유지하였다. 모든 동물을 이소프로판올 중의 20% 이소플루란이 있는 챔버에 20분간 두어 마취시키고 페이스마스크를 통해 유지시켰다. ICR 마우스의 상처 치유를 평가하기 위해, 등 표면 털을 면도하고 포비돈-요오드 및 70% 에탄올로 피부 표면을 소독한 후 생검 펀치를 사용하여 등쪽 피부에 원형의 전체-두께 피부 절개 상처(5 mm)를 냈다. 그런 다음 나노파이버 (5 mm)를 상처에 위치시키고 바이오 글루로 고정하였다. 0, 4, 7, 11, 14, 17, 및 21일에, 상처 봉합을 촬영하고 조직 검사를 위해 동물을 희생시켰다. 동물 실험 과정은 도 27에 도시하였다.

[166] 직사각형 전체-두께 절개 상처 모델을 이용한 인 비보 실험

[167] 나노파이버 (P, PG, 및 PGP)의 상처 치유 능력을 확인하기 위해, 7주령 수컷 ICR 마우스를 인 비보 상처 치유 모델로 사용하였다. ICR 마우스를 제어된 환경 (상대습도: 40-70%; 온도: 20-24 °C에서 12시간 광/암 사이클을 유지하였다.

[168] 모든 동물을 이소프로판올 중의 20% 이소플루란이 있는 챔버에 20분간 두어 마취시키고 페이스마스크를 통해 유지시켰다. ICR 마우스의 상처 치유를 평가하기 위해, 등 표면 털을 면도하고 포비돈-요오드 및 70% 에탄올로 피부 표면을 소독한 후 생검 펀치를 사용하여 등쪽 직사각형 전체-두께 피부 절개 상처(15 X 15 mm)를 냈다. 그런 다음 나노파이버 (15 X 15 mm)를 상처에 위치시키고 봉합선으로 고정하였다. 0, 4, 7, 11, 14, 17, 21 및 28일에, 상처 봉합을 촬영하고 조직 검사를 위해 동물을 희생시켰다. 동물 실험 과정은 도 28에 도시하였다.

[169] 조직학적 분석

[170] 헤마톡실린 및 에오신 (H&E)을 사용하여 조직학적 분석을 실시하였다. 14일 후에 동물을 희생시키고, 조직을 수집하여 포르말린 고정, 가공, 함침 및 절개하였다. 절개된 조직을 5-mm 두께 슬라이드로 나눈 후 헤마톡실린으로 3분간 염색하였다. 그런 다음 슬라이드를 에오신 Y로 45초간 염색하였다. 그 후, 섹션을 저농도의 에탄올에서 고농도의 에탄올을 이용하여 탈수시키고 자일렌으로 투명화

하였다. 마지막으로, 조직을 MM24 마운팅 배지 (Leica Leica Biosystems, Wetzlar, Germany)로 봉합하고 광학현미경으로 분석하였다.

[171] Picro-Sirius Red 염색을 위한 절제된 조직을 상기와 같이 준비하고, 조직 슬라이드를 헤마톡실린으로 8분간 염색하고 증류수로 세척한 후, Picro-Sirius Red로 60분간 염색하였다. 섹션을 산성화된 물로 세척하고 저농도의 에탄올에서 고농도에의 에탄올을 이용하여 탈수시킨 후 자일렌으로 투명화하였다. 마지막으로, 조직 슬라이드를 MM24 마운팅 배지로 봉합하고 극성 필터를 갖는 광학 현미경으로 분석하였다.

[172] <결과>

[173] 피부 상처의 봉합

[174] PGP 나노파이버의 상처 치유 활성을 평가하기 위해, 5 mm 직경의 원형의 전체-두께 상처를 8주령 수컷 ICR 마우스의 등 부위에 만들었다. 제조된 나노파이버로 치료하거나 치료하지 않은 상처는 모두 3주 내에 거의 완전히 나았다 (도 29). 4, 7, 11, 14, 17, 및 21일 후에 처리되지 않은 상처의 봉합은 각각 70%, 42%, 26%, 21%, 14%, 및 12%였으며, PGP 그룹에서는 각각 67%, 35%, 16%, 13%, 8% 및 6%이었다. 따라서, PGP 나노파이버가 원형 전체-두께 모델에서 가장 좋은 상처 치유 효과를 보였다.

[175] 게다가, 직사각형 전체-두께 (15 mm X 15 mm) 상처 모델도 사용하여 8주령 수컷 ICR 마우스의 등 부위의 상처 축소, 봉합 및 상처 크기의 회복 효과를 평가하였다. 상처는 4주동안 3일 또는 4일 간격으로 관찰하고 상처 영역을 측정하였다. 그 결과, 모든 그룹에서 상처는 거의 회복되었지만 4주 후 초기 상처 치유 및 상처 봉합은 대조군에 비해 PGP 군에서 촉진되었다 (도 30).

[176] 피부 상처의 재-상피화

[177] 수술 후 21일째에 마우스의 피부에 H&E, Masson's trichrome, 및 Picro-Sirius Red 염색을 사용하여 조직학적 검사를 실시하여 상처 부위의 피부 조직 복원에 대한 나노파이버의 효과를 확인하였다 (도 31). H&E 염색 분석 결과는 비처리(blank) 그룹의 피부 조직 복원이 불완전함을 보였다. 나노파이버가 이식된 그룹 또한 완전히 낫지는 않았지만, 비처리 그룹에 비해 상처가 더 빨리 봉합되고 더 많은 혈관, 모낭, 및 피지샘이 형성된 더 진전된 피부 복원을 보였다. 특히, PGP 그룹은 가장 우수한 재생 활성을 보였다. 상처 부위에서 콜라겐 섬유의 조직학적 외향을 평가한 Masson's trichrome 및 Picro-Sirius 염색 결과에 따르면, 비처리 (blank) 그룹은 PGP 그룹에 비해 상처 부위에 낮은 밀도의 콜라겐 섬유를 보였다. 게다가, 콜라겐 섬유의 증착이 나노파이버가 이식된 그룹에서 작고 더 두꺼웠다.

[178] 상처 부위의 조직 복원에 대한 나노파이버의 효과를 확인하기 위해, 수술 후 28일째에 피부 조직에 H&E, Masson's trichrome, 및 Picro-Sirius Red 염색으로 조직학적 염색을 실시하였다 (도 32). H&E 염색 분석 결과는 비처리(blank) 그룹의 피부 조직 복원이 불완전함을 보였다. 나노파이버가 이식된 그룹 또한 완전히 낫지는 않았지만, 비처리 그룹에 비해 상처가 더 빨리 봉합되고 더 많은 혈관, 모낭,

및 피지샘이 형성된 더 진전된 피부 복원을 보였다. 특히, PGP 그룹은 가장 우수한 재생 활성을 보였다. 상처 부위에서 콜라겐 섬유의 조직학적 외향을 평가한 Masson's trichrome 및 Picro-Sirius 염색 결과에 따르면, PGP 그룹은 다른 그룹에 비해 상처 부위에서 더 높은 콜라겐 섬유 밀도를 보였다. 게다가, 콜라겐 섬유의 증착이 나노파이버가 이식된 그룹에서 작고 더 두꺼웠다. 그러므로, 이러한 결과는 PGP 나노파이버가 상처 치유를 촉진할 수 있음을 나타낸다.

[179] 전체-두께 상처 모델에서 상처 치유에 관련된 단백질의 발현

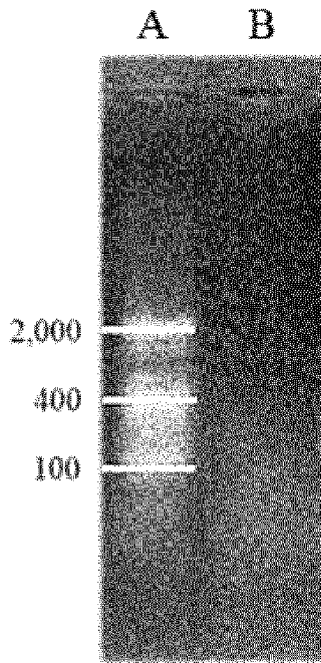
[180] 원형 및 직사각형 전체-두께 상처 모델에서 각각 수술 후 21일 및 28일에 피부 조직에 웨스턴 블롯 분석을 실시하여 I형 콜라겐, III형 콜라겐, 및  $\alpha$ -SMA와 같은 상처 치유와 관련된 단백질의 발현에 대한 PGP 나노파이버의 효과를 확인하였다. 도 33에서 볼 수 있는 바와 같이, 원형 전체-두께 상처 모델에서 COL I의 발현 수준이 다른 그룹에 비해 PGP 그룹에서 상당히 증가하였다. 그러나, 직사각형 전체-두께 상처 모델에서는 단백질 발현 수준에서 차이를 보이지 않았다.

[181] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구 범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

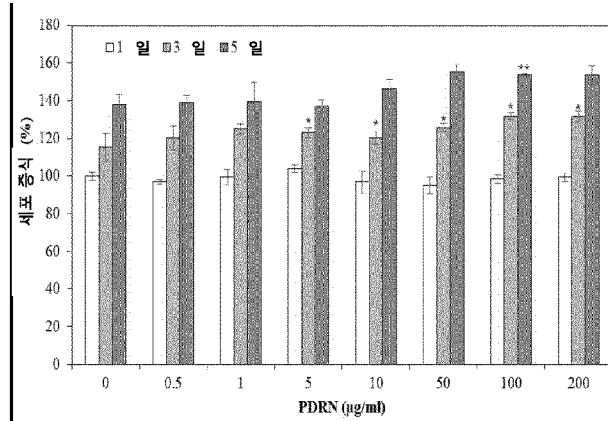
## 청구범위

- [청구항 1] 폴리카프로락톤(poly( $\epsilon$ -caprolactone; PCL); 젤라틴; 및 별불가사리 (*Patiria pectinifera*) 유래 폴리데옥시리보뉴클레오티드 (Polydeoxy-ribonucleotide; PDRN); 를 포함하는, 나노파이버 스캐폴드.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서, 상기 나노파이버 스캐폴드는 전기방사에 의해 제조된 것인, 나노파이버 스캐폴드.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서, 상기 폴리카프로락톤, 젤라틴 및 폴리데옥시리보뉴클레오티드를 4 내지 8 : 2 내지 6 : 0.005 내지 0.1의 중량비로 포함하는 것인, 나노파이버 스캐폴드.
- [청구항 4] 별불가사리 (*Patiria pectinifera*)로부터 폴리데옥시리보뉴클레오티드 (Polydeoxy-ribonucleotide; PDRN)를 분리하는 단계(단계 1); 상기 폴리데옥시리보뉴클레오티드를 폴리카프로락톤 및 젤라틴과 혼합하는 단계(단계 2); 및 상기 혼합물을 전기방사하여 나노파이버 매트 제조하는 단계(단계 3); 를 포함하는, 나노파이버 스캐폴드의 제조방법.
- [청구항 5] 제 4 항에 있어서, 상기 단계 2에서 상기 폴리카프로락톤, 젤라틴 및 폴리데옥시리보뉴클레오티드를 4 내지 8 : 2 내지 6 : 0.005 내지 0.1의 중량비로 혼합하는 것인, 나노파이버 스캐폴드의 제조방법.
- [청구항 6] 제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 따른 나노파이버 스캐폴드를 포함하는, 상처 드레싱.
- [청구항 7] 제 6항의 상처 드레싱을 상처에 도포하는 단계;를 포함하는 상처 처치 방법.
- [청구항 8] 제 7항에 있어서, 상기 상처 처치방법은 상처 부위 피부의 재생을 촉진하여 상처를 치유하는 것인, 상처 처치 방법.

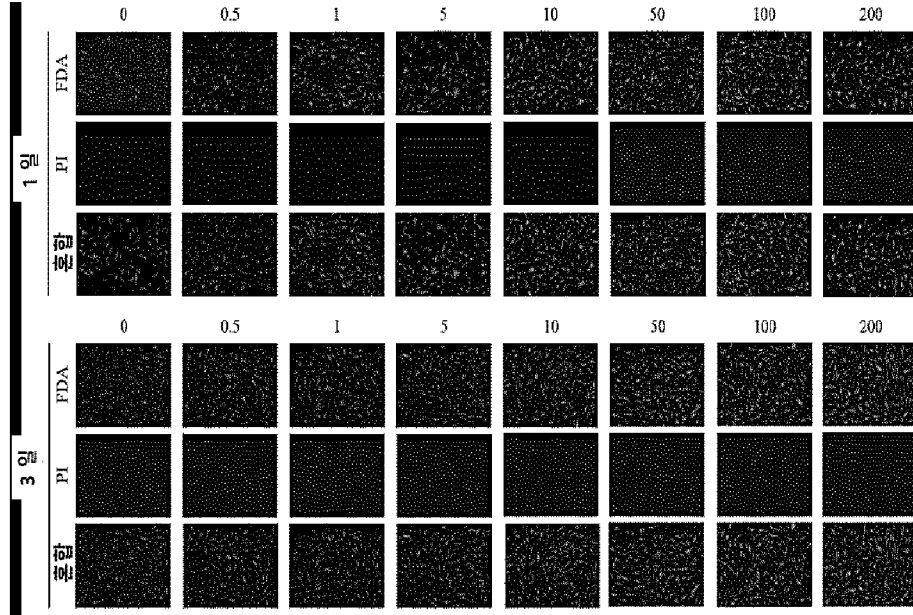
[도1]



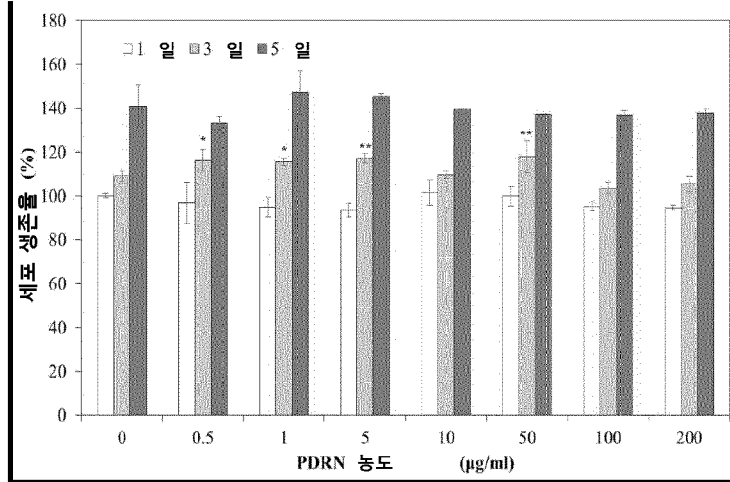
[도2]



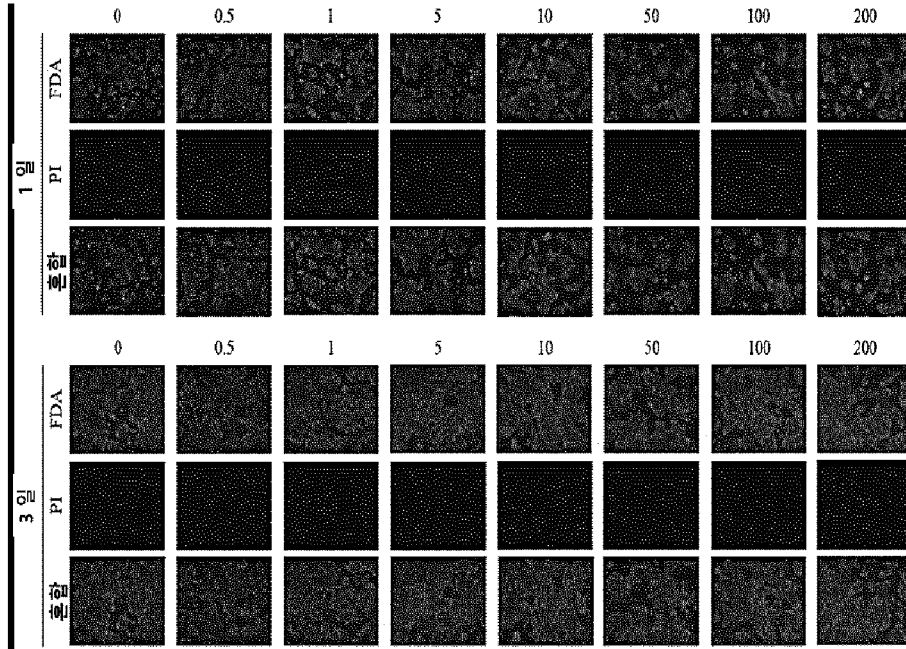
[도3]



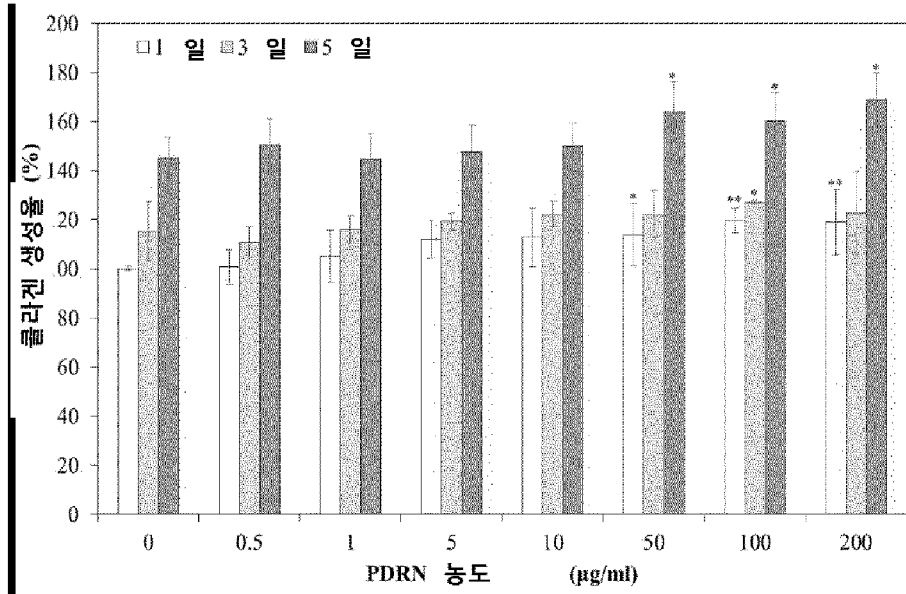
[도4]



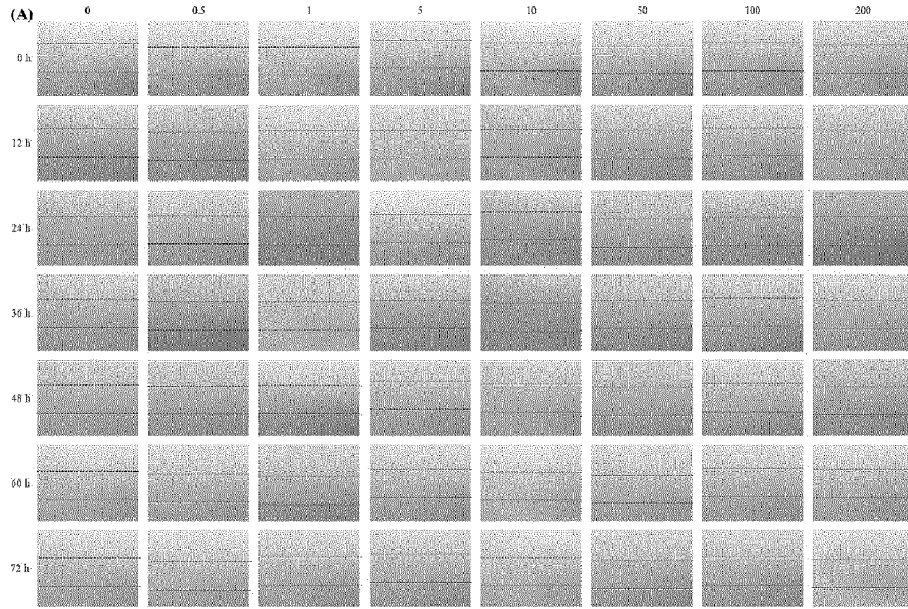
[도5]



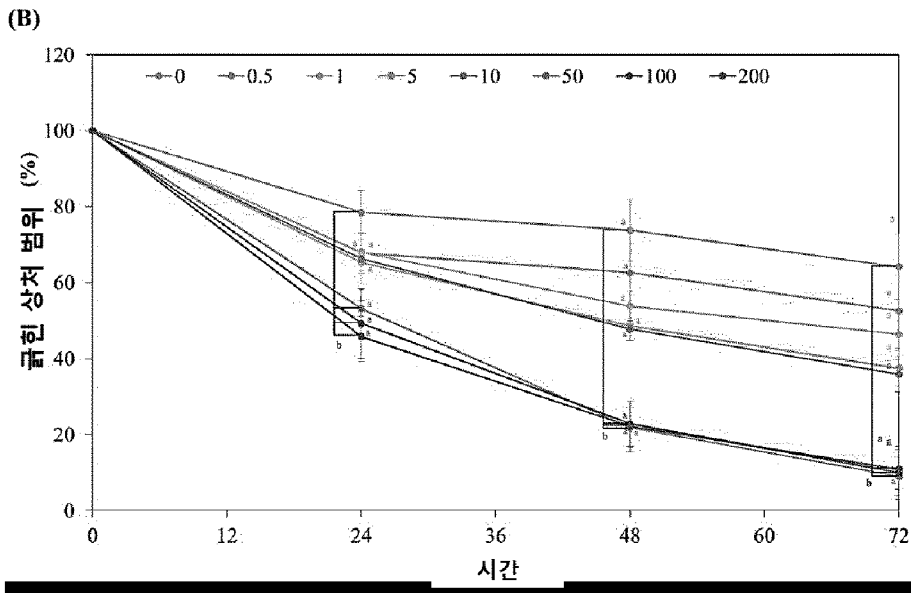
[도6]



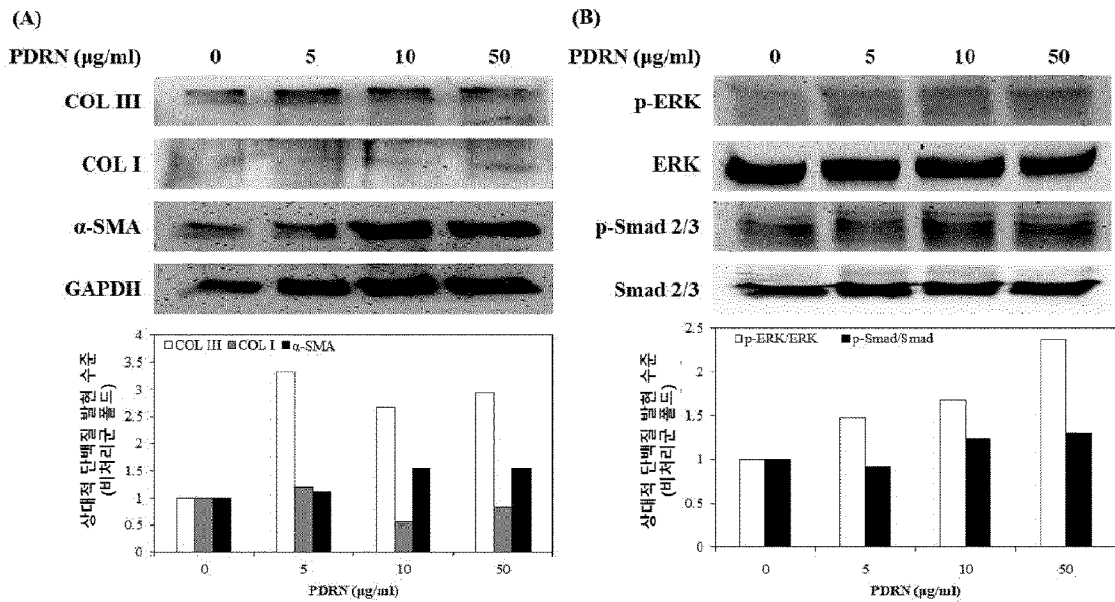
[도7a]

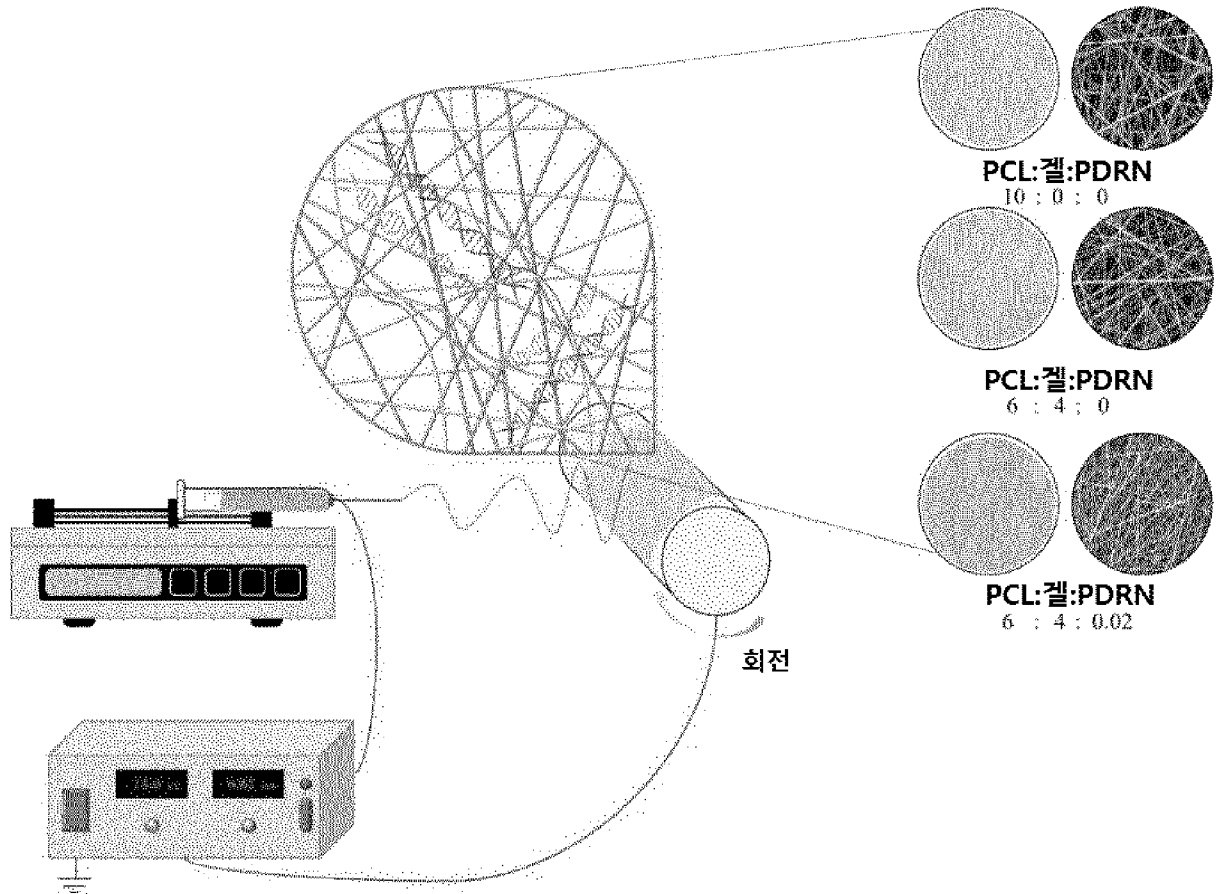


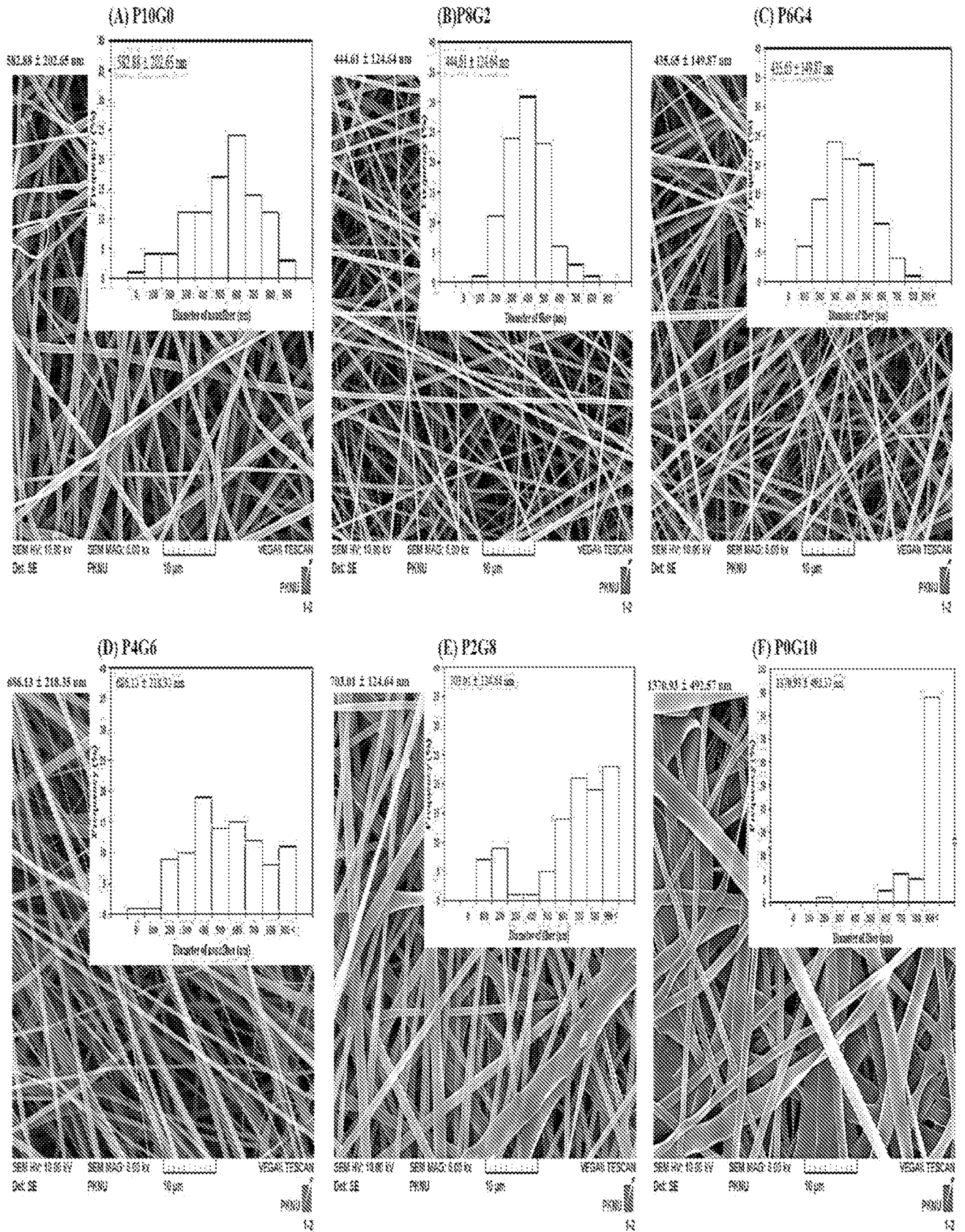
[도7b]

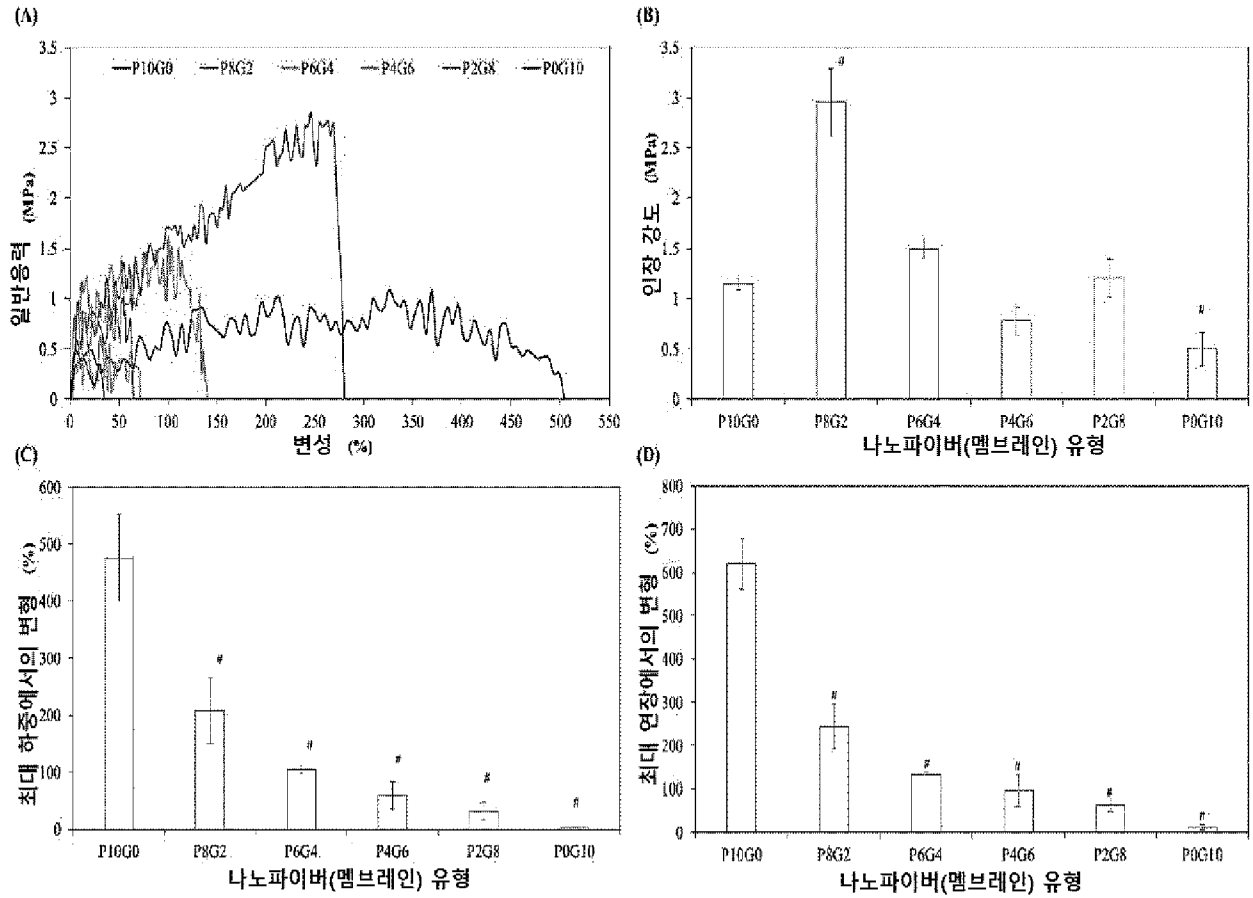


[도8]





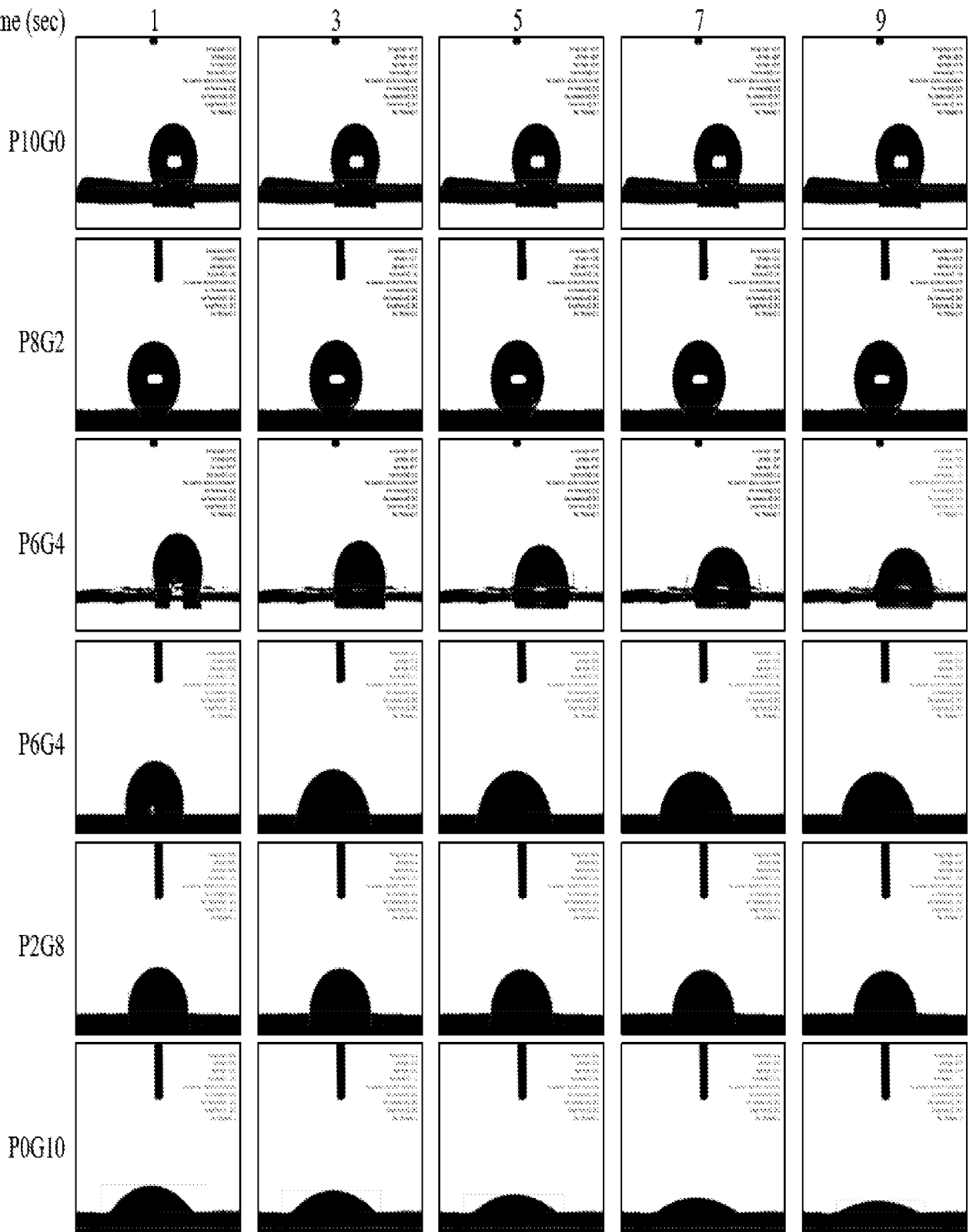




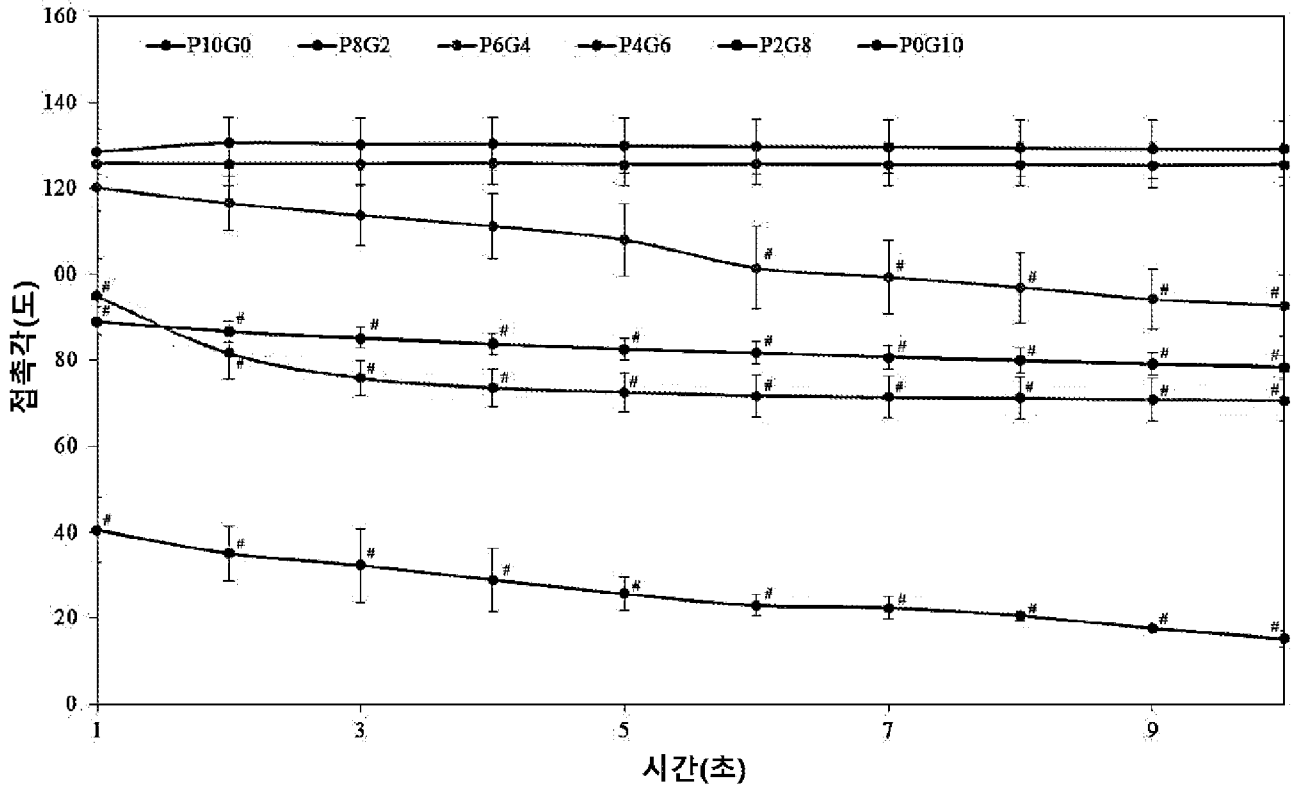
[도 12a]

(A)

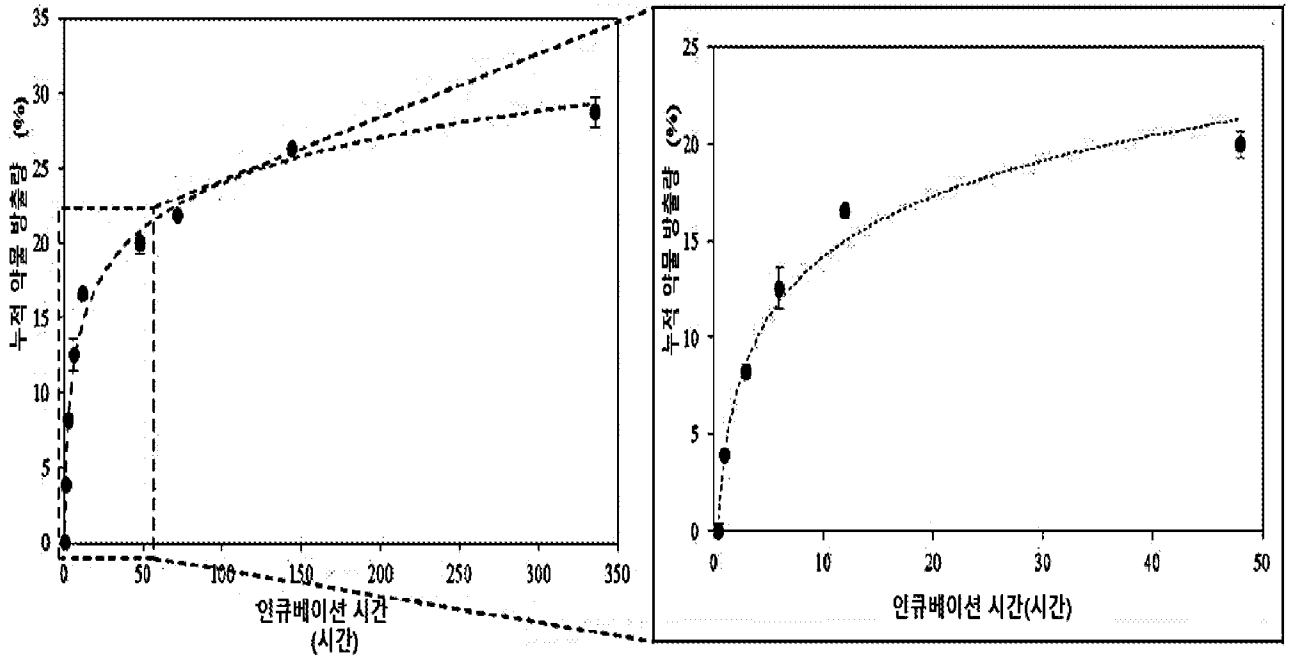
Time (sec)

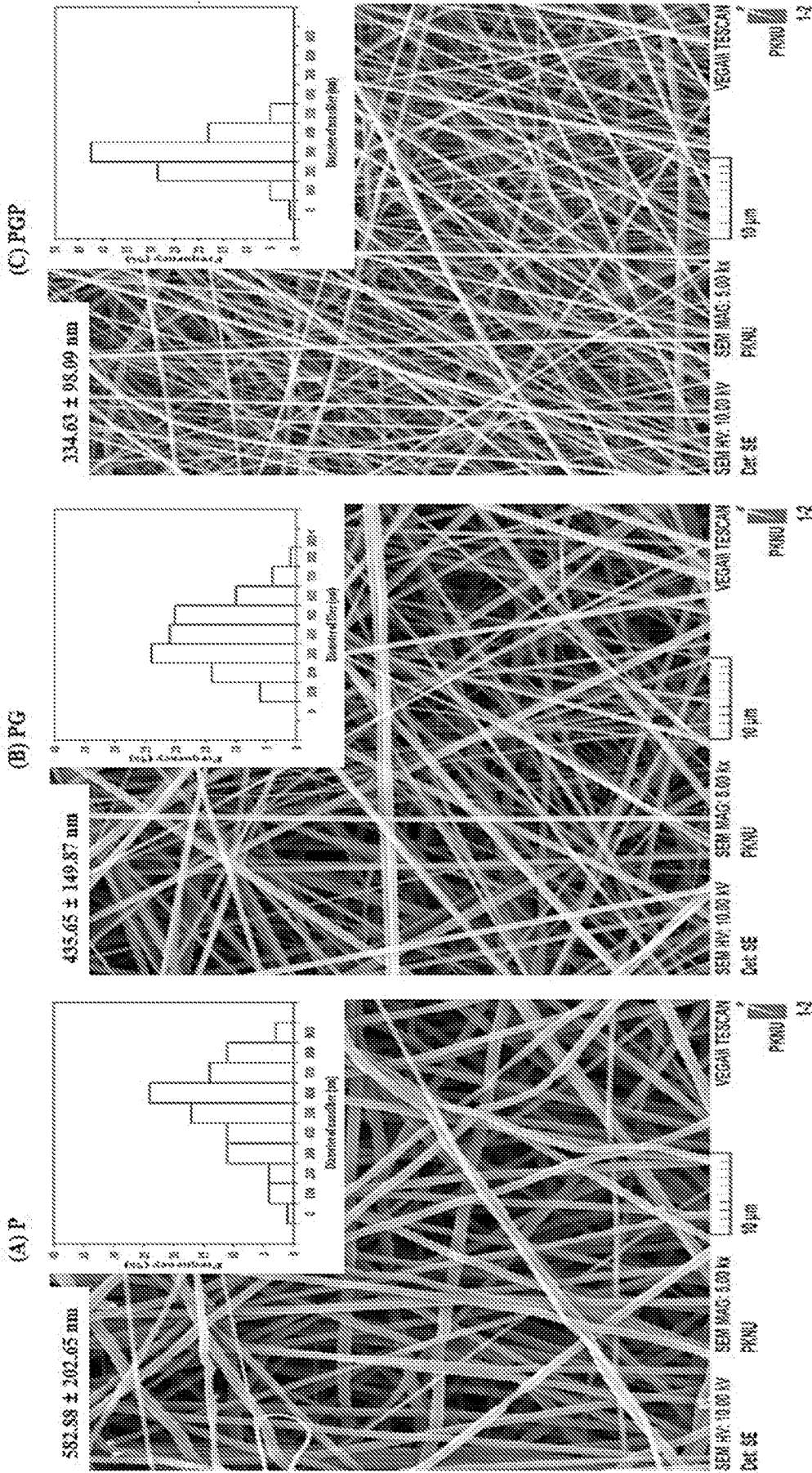


(B)

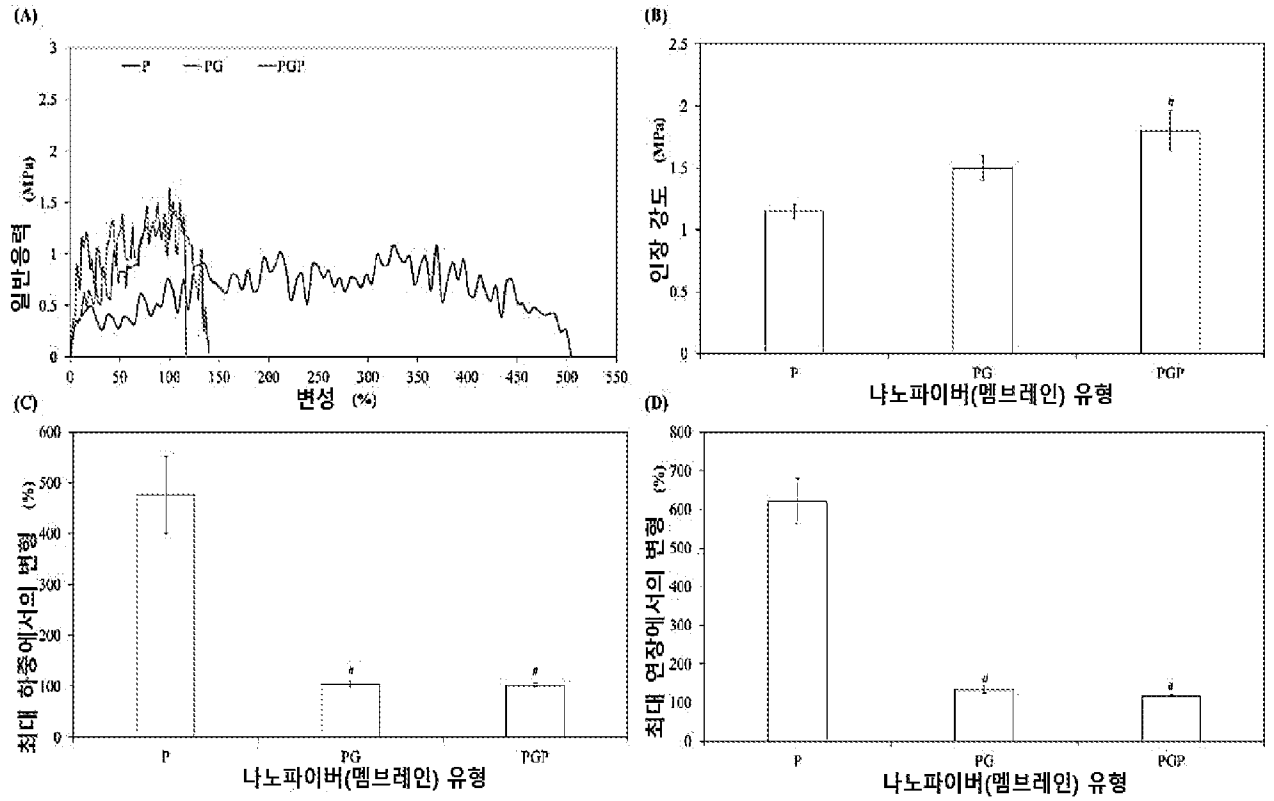


[도 13]

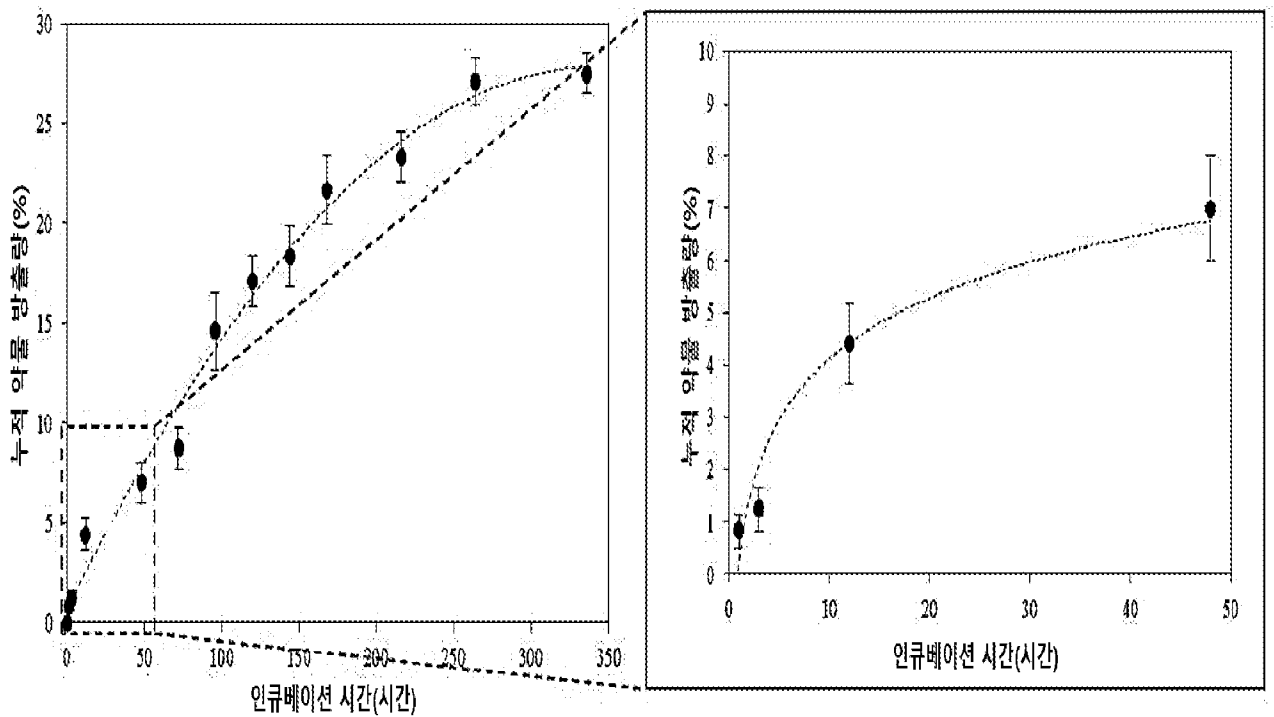




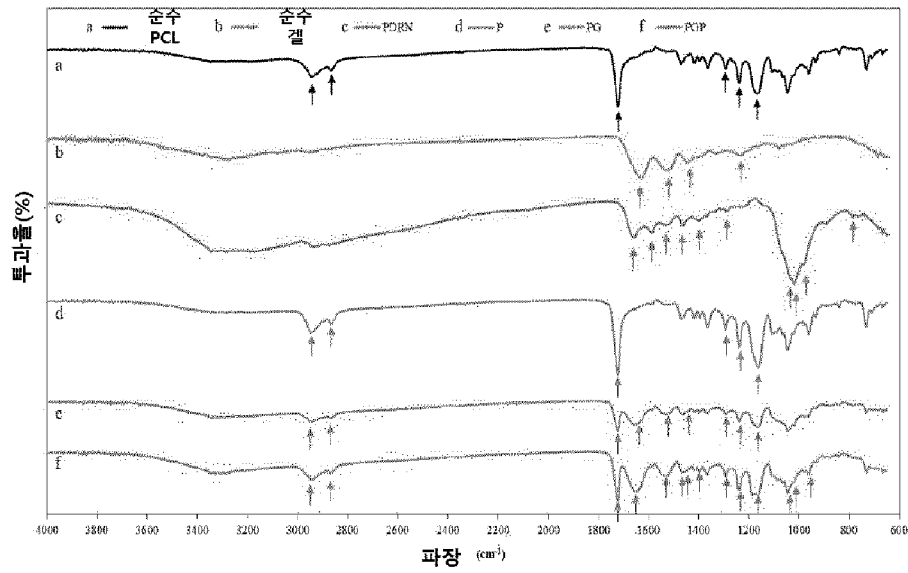
[도15]



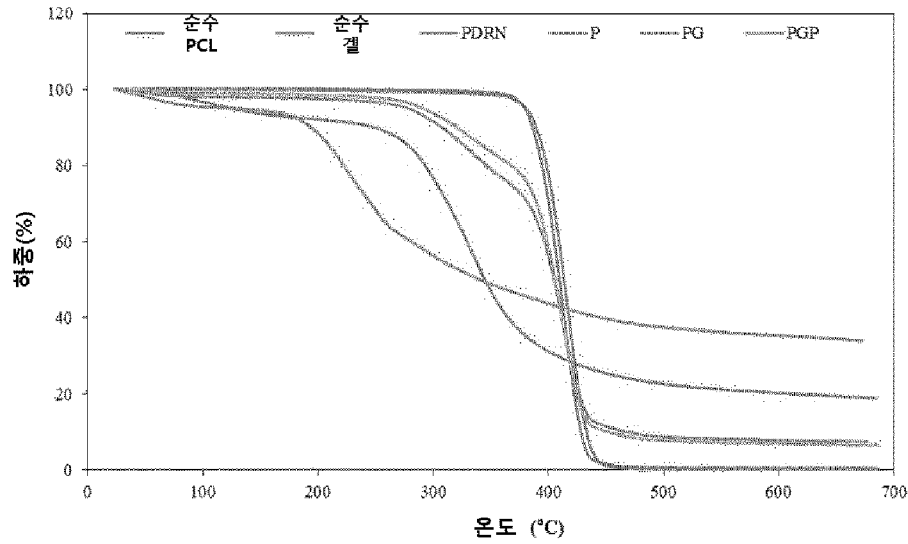
[도16]



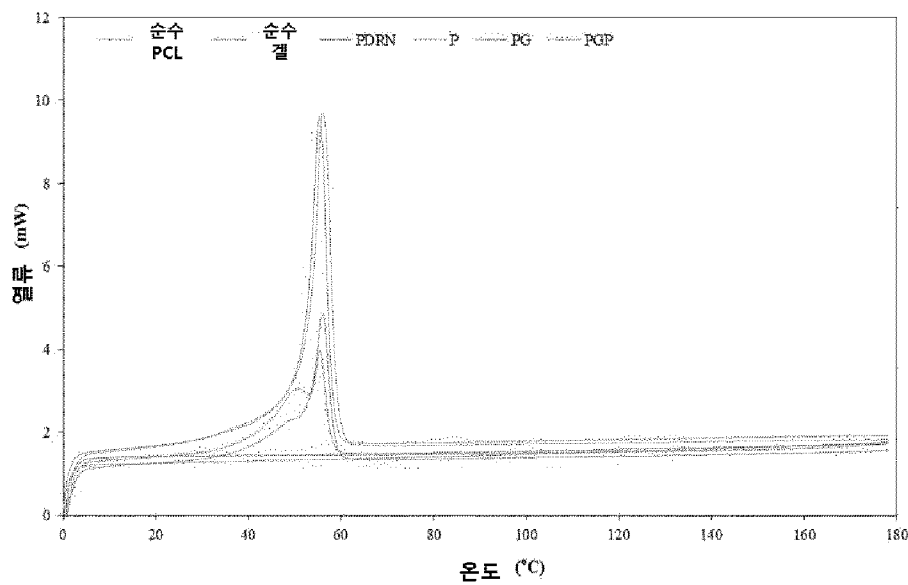
[도17]

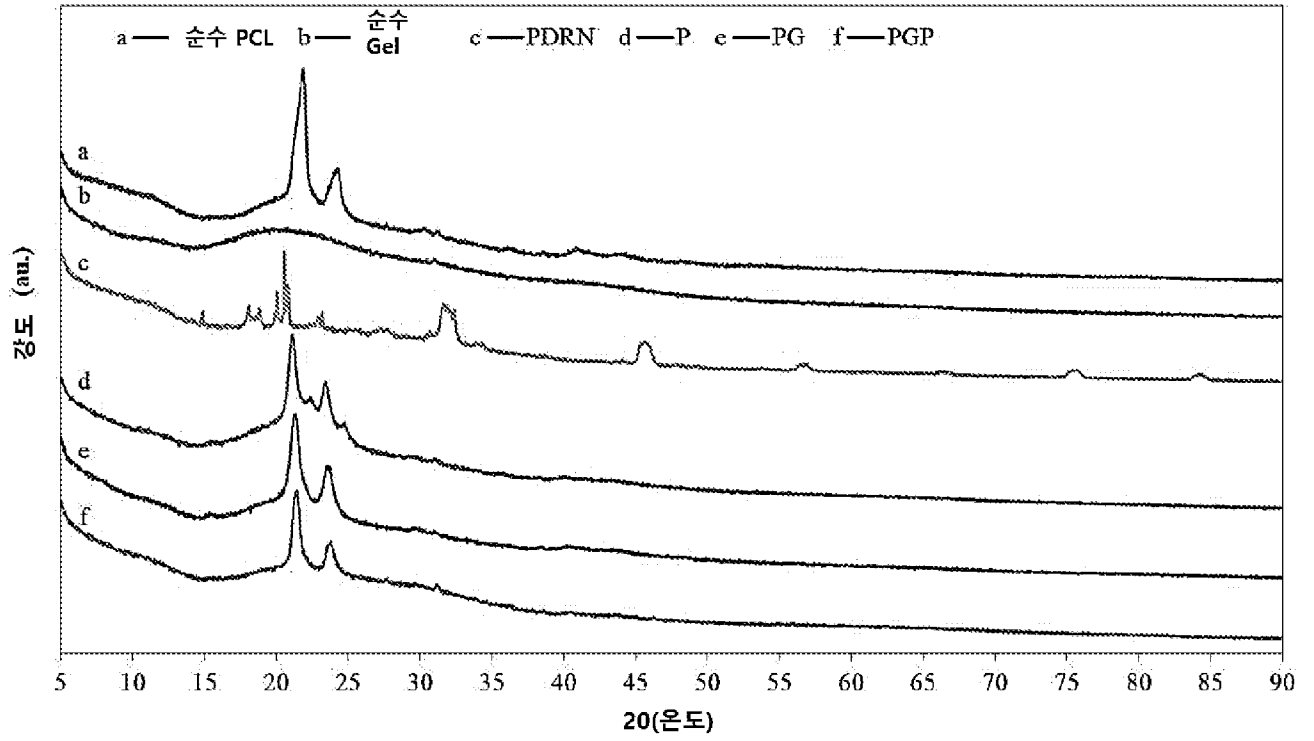


[도18]

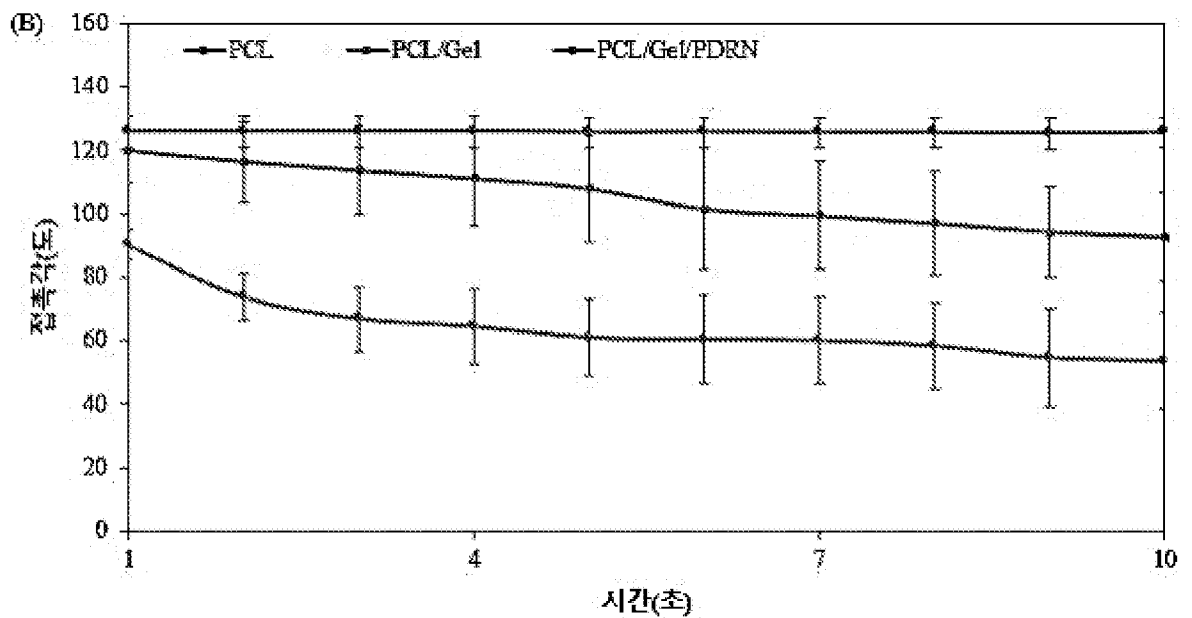
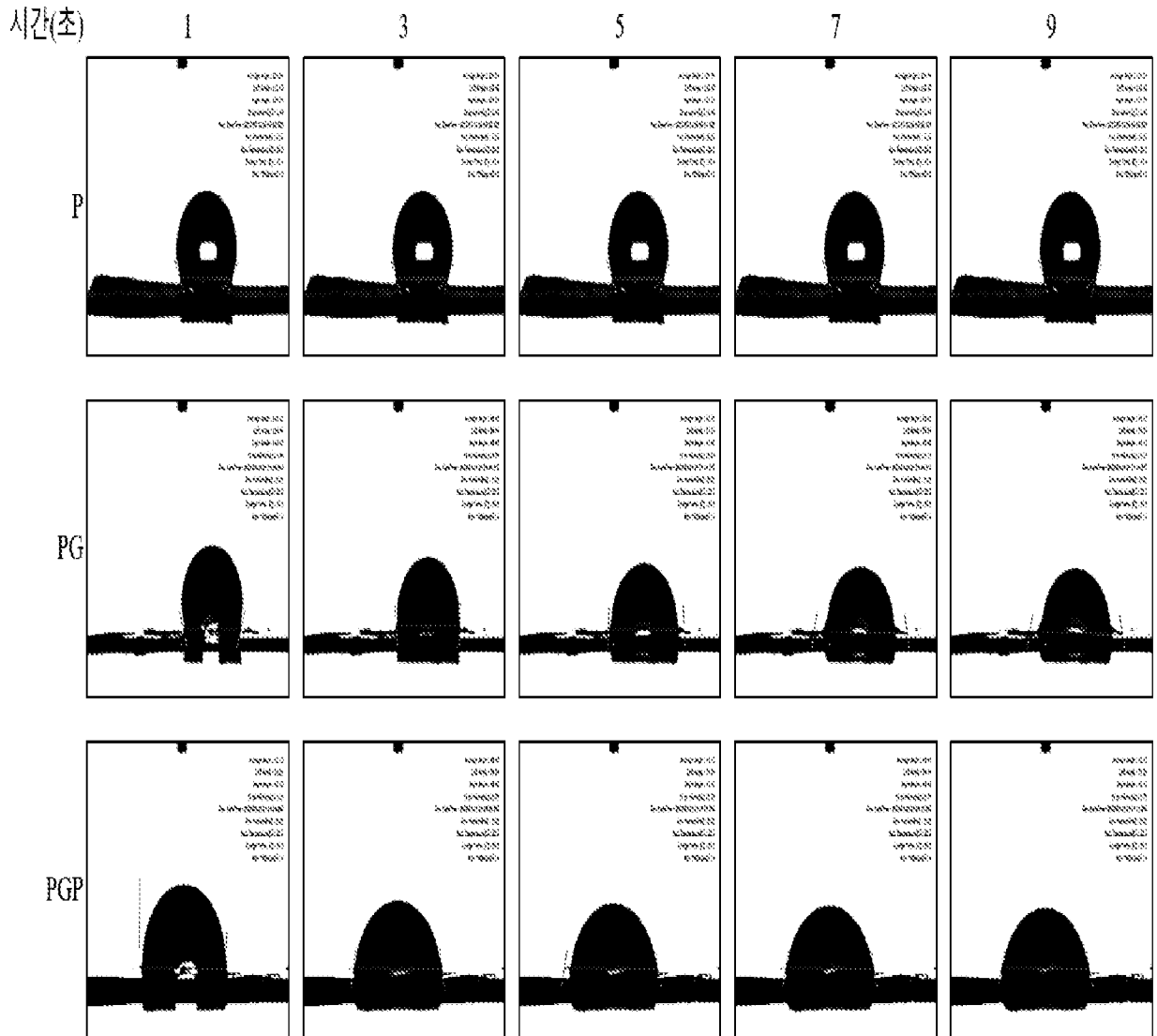


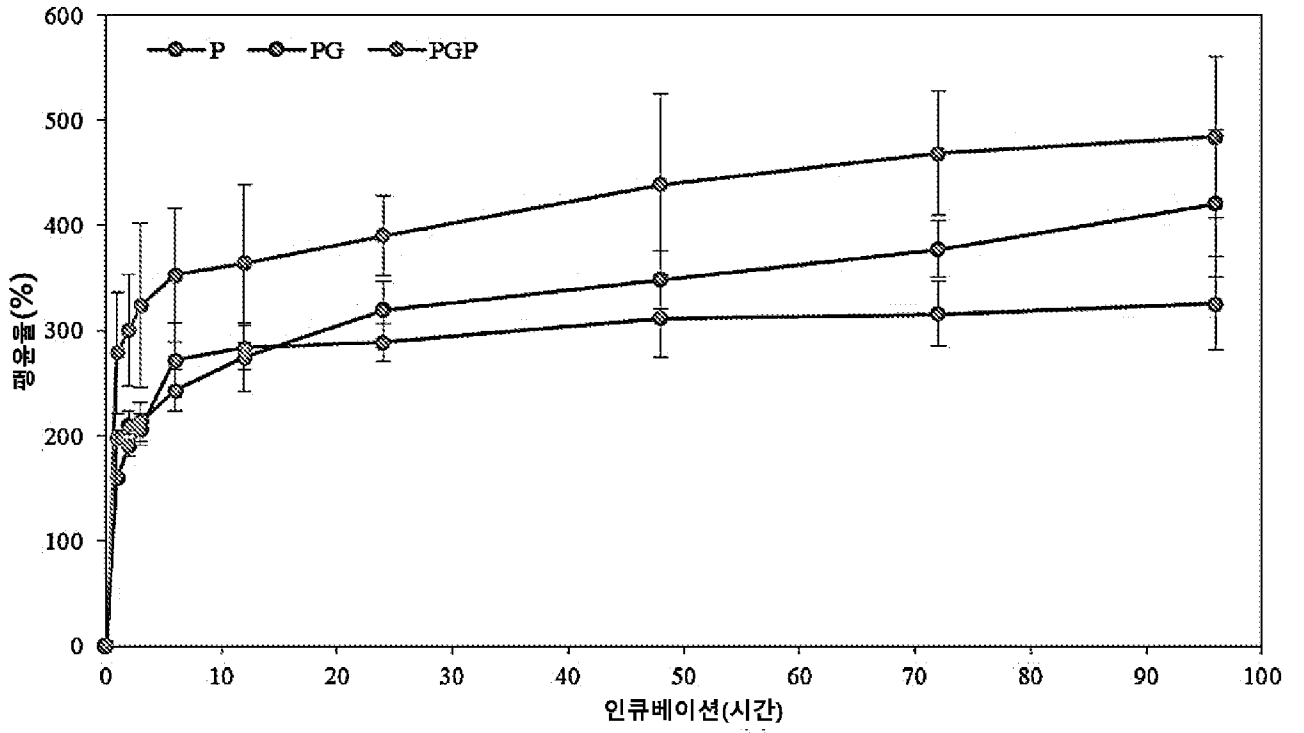
[도19]





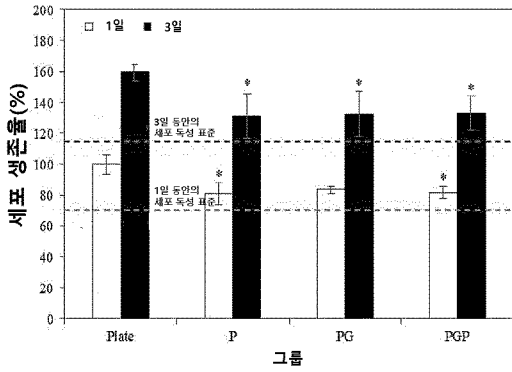
(A)



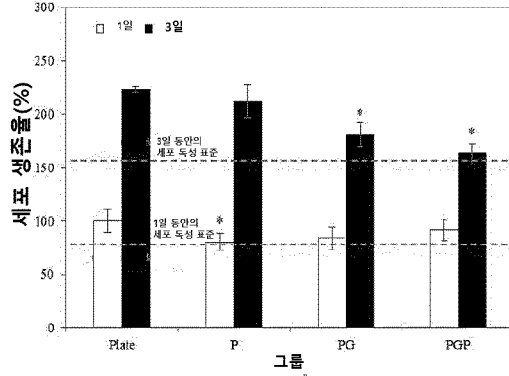


[도23]

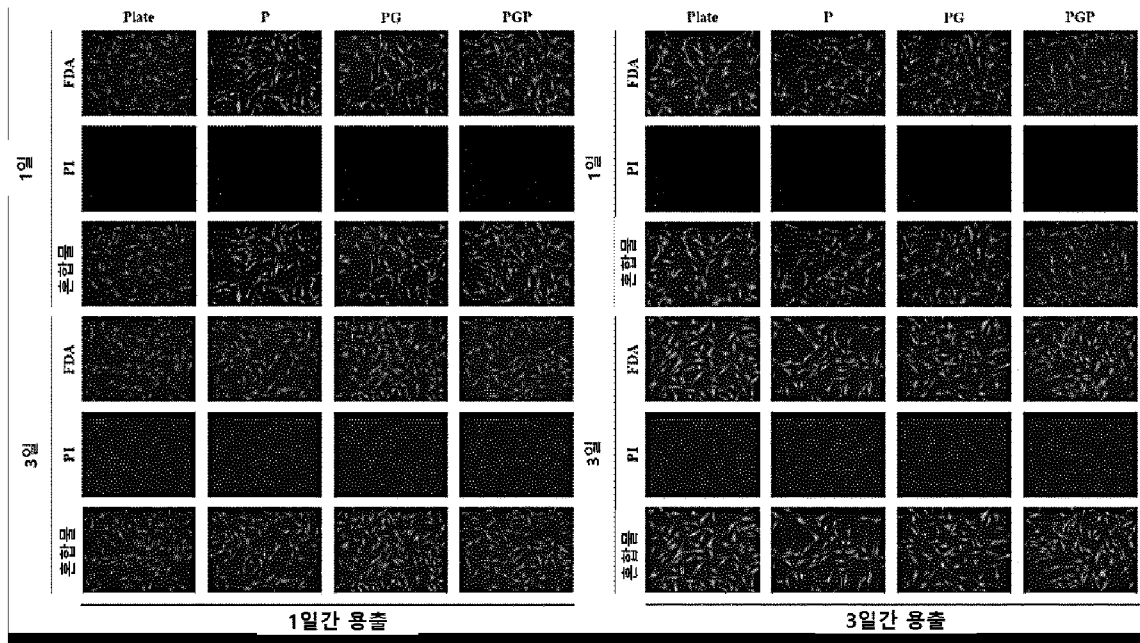
(A)



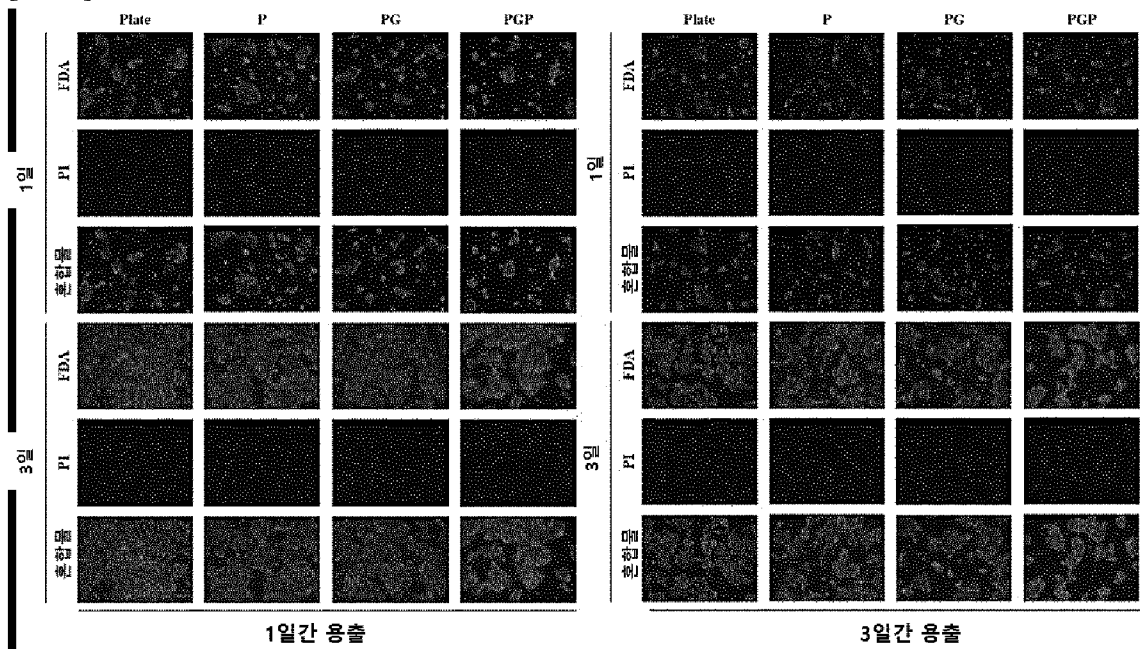
(B)



[도24]

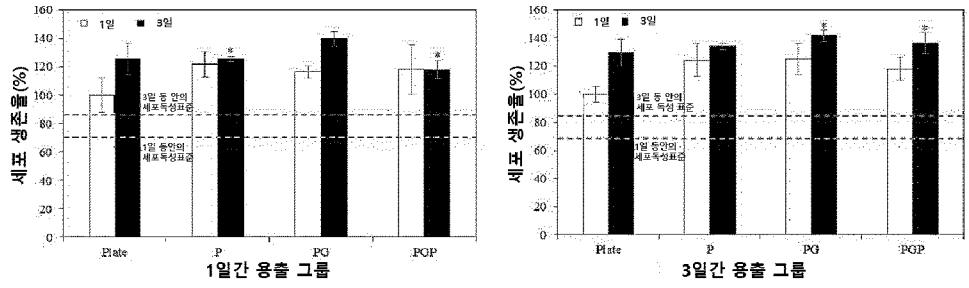


[도25]

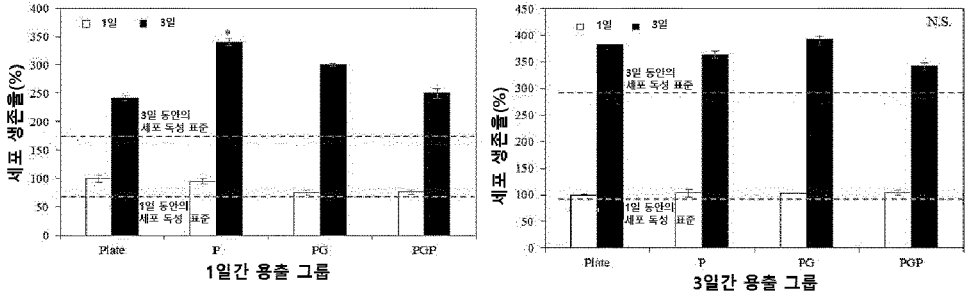


[도26]

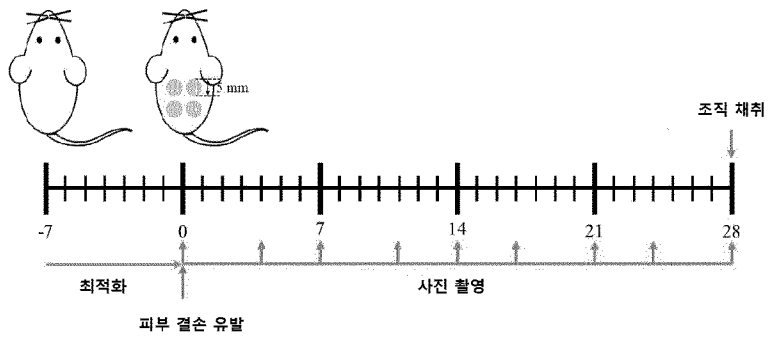
(A) HDE



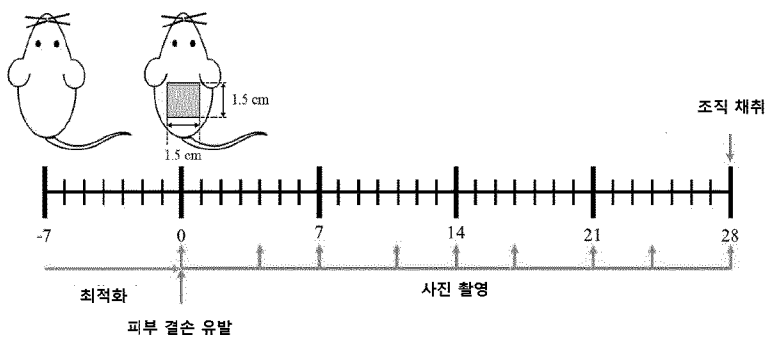
(B) HaCaT



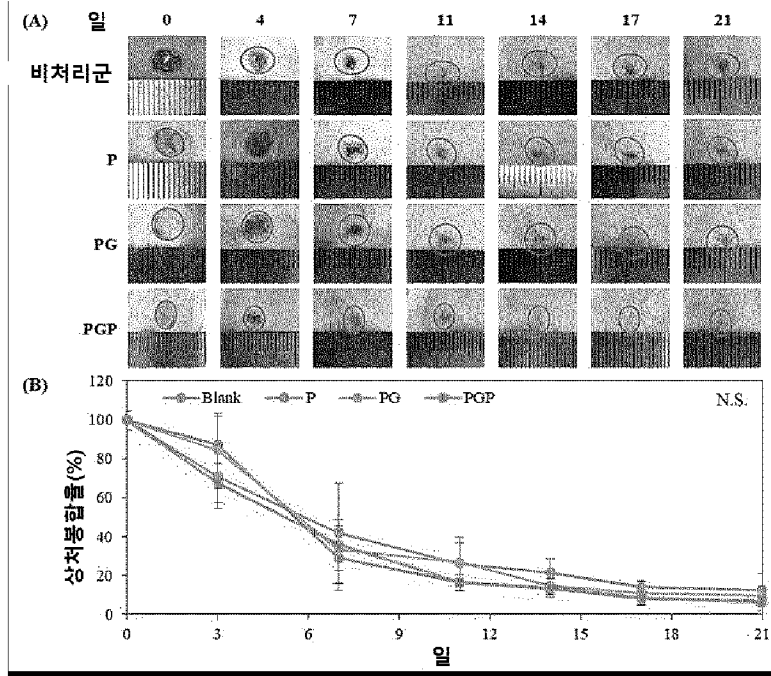
[도27]



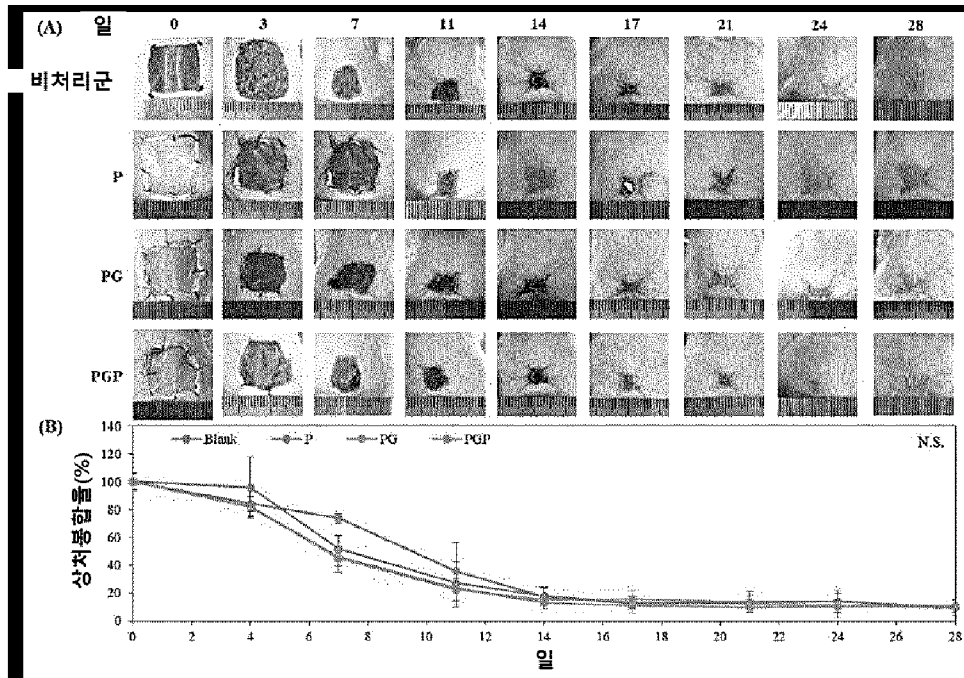
[도28]



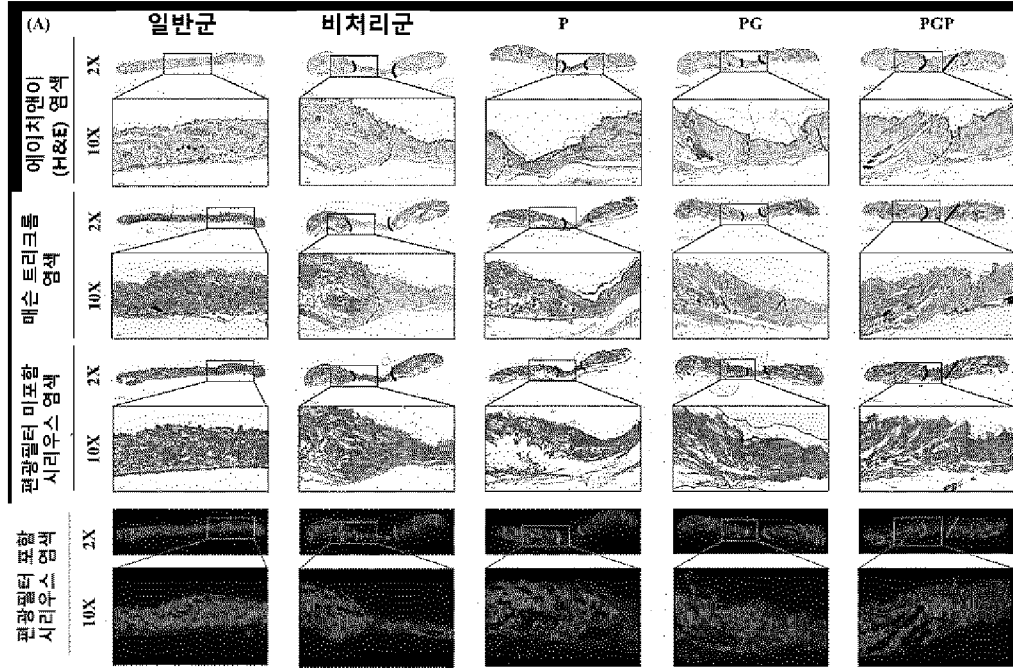
[도29]



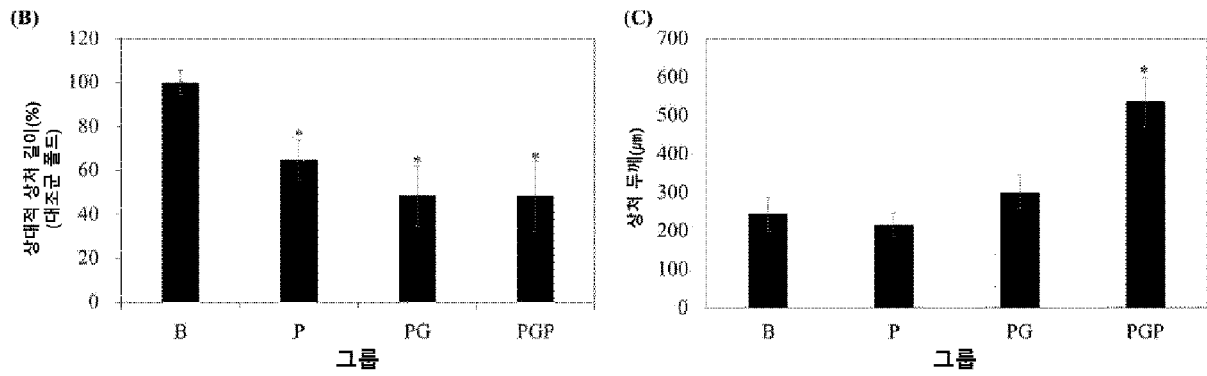
[도30]



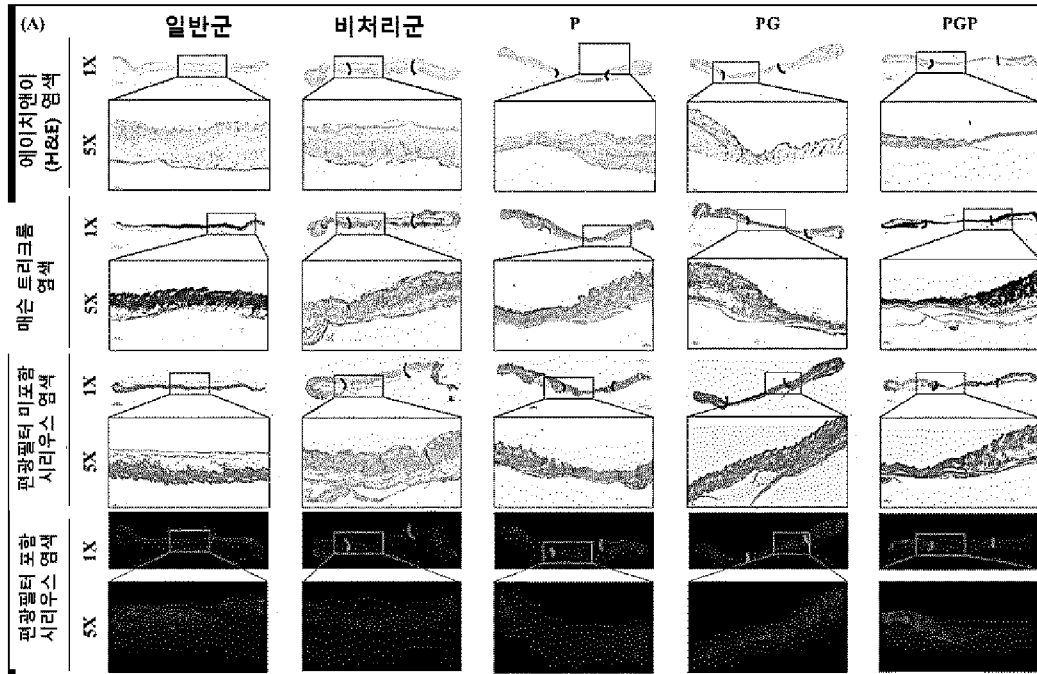
[도31a]



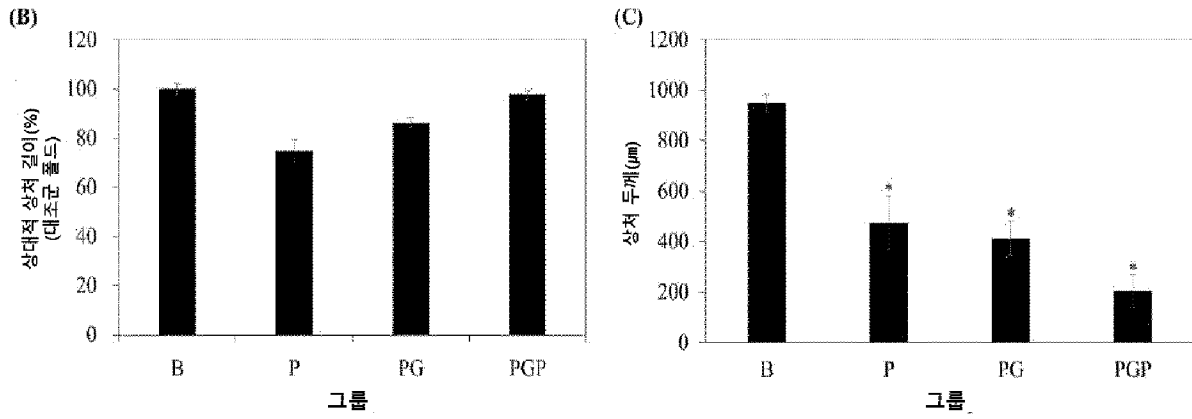
[도31b]



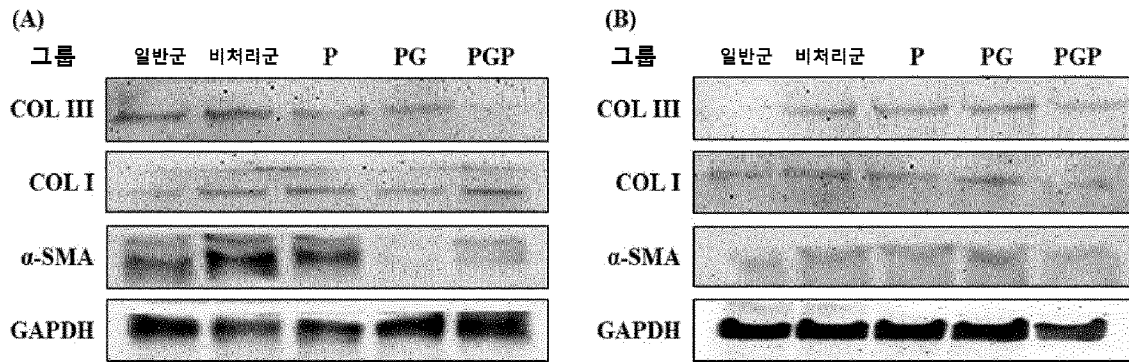
[도32a]



[도32b]



[도33]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/014358

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
A61L 15/22(2006.01)i; A61L 15/42(2006.01)i; D04H 1/728(2012.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
A61L 15/22(2006.01); A61F 2/28(2006.01); A61K 35/52(2006.01); A61K 8/98(2006.01); A61L 15/28(2006.01); A61L 27/44(2006.01); A61L 27/56(2006.01); A61Q 19/00(2006.01); C07K 1/14(2006.01); C07K 14/435(2006.01)		
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) & keywords: 별불가사리(patiria pectinifera), 폴리카프로락톤(polycaprolactone), 폴리데옥시리보뉴클레오티드(polydeoxyribonucleotide), 젤라틴(gelatin)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2020-0112256 A (SOONCHUNHYANG UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION) 05 October 2020 (2020-10-05) See claim 1.	1-3,6-8
A		4-5
Y	KR 10-2018-0048520 A (BNC KOREA, INC. et al.) 10 May 2018 (2018-05-10) See claim 1.	1-3,6-8
A	KR 10-2017-0096842 A (NAM, Gi Jong et al.) 25 August 2017 (2017-08-25) See entire document.	1-8
A	KR 10-2308773 B1 (MARINE ESSENCE BIOSCIENCES CORPORATION OF USA) 06 October 2021 (2021-10-06) See entire document.	1-8
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
11 January 2024		11 January 2024
Name and mailing address of the ISA/KR		Authorized officer
Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208		
Facsimile No. +82-42-481-8578		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/KR2023/014358**

<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2011-525495 A (INNOVACTIV INC.) 22 September 2011 (2011-09-22) See entire document.	1-8
-----		

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

International application No.

**PCT/KR2023/014358**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2020-0112256	A	05 October 2020	KR	10-2552694	B1	05 July 2023
KR	10-2018-0048520	A	10 May 2018	None			
KR	10-2017-0096842	A	25 August 2017	None			
KR	10-2308773	B1	06 October 2021	CN	111012803	A	17 April 2020
				ES	2906715	T3	20 April 2022
				JP	2020-058786	A	16 April 2020
				JP	6933394	B2	08 September 2021
				KR	10-2020-0029362	A	18 March 2020
JP	2011-525495	A	22 September 2011	CA	2765373	A1	21 January 2010
				CA	2765373	C	04 October 2016
				EP	2309976	A1	20 April 2011
				US	2011-0311640	A1	22 December 2011
				US	8834936	B2	16 September 2014
				WO	2010-006412	A1	21 January 2010

<b>A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))</b> A61L 15/22(2006.01)i; A61L 15/42(2006.01)i; D04H 1/728(2012.01)i		
<b>B. 조사된 분야</b> 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61L 15/22(2006.01); A61F 2/28(2006.01); A61K 35/52(2006.01); A61K 8/98(2006.01); A61L 15/28(2006.01); A61L 27/44(2006.01); A61L 27/56(2006.01); A61Q 19/00(2006.01); C07K 1/14(2006.01); C07K 14/435(2006.01) 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) & 키워드: 별불가사리(patiria pectinifera), 폴리카프로락톤(polycaprolactone), 폴리데옥시리보뉴클레오티드(polydeoxyribonucleotide), 젤라틴(gelatin)		
<b>C. 관련 문헌</b>		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y A	KR 10-2020-0112256 A (순천향대학교 산학협력단) 2020.10.05 청구항 1	1-3,6-8 4-5
Y	KR 10-2018-0048520 A (주식회사 한국비엔씨 등) 2018.05.10 청구항 1	1-3,6-8
A	KR 10-2017-0096842 A (남기종 등) 2017.08.25 전체 문헌	1-8
A	KR 10-2308773 B1 (미국 마린 에센스 바이오사이언시즈 코퍼레이션) 2021.10.06 전체 문헌	1-8
A	JP 2011-525495 A (INNOVACTIV INC.) 2011.09.22 전체 문헌	1-8
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일	
2024년01월11일(11.01.2024)	2024년01월11일(11.01.2024)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관	
대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)	김태운	
팩스 번호 +82-42-481-8578	전화번호 +82-42-481-3326	

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2020-0112256 A	2020/10/05	KR 10-2552694 B1	2023/07/05
KR 10-2018-0048520 A	2018/05/10	없음	
KR 10-2017-0096842 A	2017/08/25	없음	
KR 10-2308773 B1	2021/10/06	CN 111012803 A	2020/04/17
		ES 2906715 T3	2022/04/20
		JP 2020-058786 A	2020/04/16
		JP 6933394 B2	2021/09/08
		KR 10-2020-0029362 A	2020/03/18
JP 2011-525495 A	2011/09/22	CA 2765373 A1	2010/01/21
		CA 2765373 C	2016/10/04
		EP 2309976 A1	2011/04/20
		US 2011-0311640 A1	2011/12/22
		US 8834936 B2	2014/09/16
		WO 2010-006412 A1	2010/01/21