

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0088139

(43) 공개일자 2024년06월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61L 26/00 (2006.01) D01D 5/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61L 26/0085 (2013.01)

A61L 26/0019 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0173566

(22) 출원일자 2022년12월13일

심사청구일자 2022년12월13일

기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인

국립부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교내 (대연동)

(72) 발명자

정원교

부산광역시 남구 분포로 111, 141동 2004호

스리 랑가 데니야 돈 파타벤디지 밀란 파툼 찬디카

부산광역시 남구 유엔평화로41번길 95, 401호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

위병갑

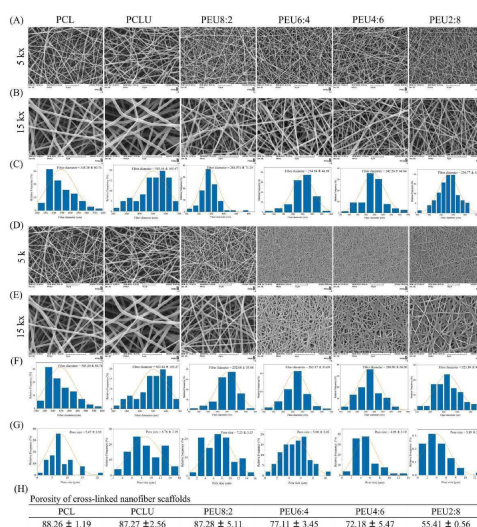
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 우스닌산을 포함하는 피부 재생용 나노파이버 스캐폴드

(57) 요약

본 발명은 폴리카프로락톤(poly(ϵ -caprolactone; PCL); 탈세포화 세포외기질 (decellularized extracellular matrix; dECM)); 및 우스닌산 (usnic acid; UA);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 안정성, 반결정 구조를 지녔으며, *Candida albicans* 등의 균/박테리아에 대한 뛰어난 항균 효능 및 인간 유래 섬유아세포에 대한 우수한 적합성을 갖는다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61L 26/0057 (2013.01)

D01D 5/003 (2013.01)

A61L 2400/12 (2013.01)

(72) 발명자

김태희

부산광역시 남구 용소로64번길 66, 303호

김세창

경상북도 경주시 외동읍 순금4길 12-10, 102호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345350472
과제번호	2021R1A6A1A03039211
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명	해양바이오닉스융합기술센터
기 여 율	1/2
과제수행기관명	부경대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711164032
과제번호	2019R1A2C1007218
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	해양수산물 유래 세포외기질 발현 조절 유효물질 탐색 및 약물전달 소재 적용기술

개발

기 여 율	1/2
과제수행기관명	부경대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

폴리카프로락톤(poly(ϵ -caprolactone; PCL);
탈세포화 세포외기질 (decellularized extracellular matrix; dECM)); 및
우스닌산 (usnic acid; UA);
을 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 및 탈세포화 세포외기질을 8 내지 2 : 2 내지 8의 중량비로 포함하는 것인, 나노파이버 스캐폴드.

청구항 4

제 1 항에 있어서,
상기 나노파이버 스캐폴드는 가교 결합된 것인, 나노파이버 스캐폴드.

청구항 5

폴리카프로락톤, 탈세포화 세포외기질 및 우스닌산을 혼합하는 단계(단계 1);
상기 혼합물을 전기방사하여 나노파이버 매트 제조하는 단계(단계 2);
상기 나노파이버 매트를 가교 결합시키는 단계(단계 3); 및
상기 가교 결합된 나노파이버 매트를 동결건조하는 단계(단계 4);
를 포함하는, 나노파이버 스캐폴드의 제조방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서,
상기 단계 1에서 폴리카프로락톤 및 탈세포화 세포외기질을 8 내지 2 : 2 내지 8의 중량비로 혼합하는 것인, 나노파이버 스캐폴드의 제조방법.

청구항 7

제 5 항에 있어서,
상기 단계 3에서 상기 나노파이버 매트를 에탄올 중의 EDC 및 NHS에 침지하여 가교결합시키는 것인, 나노파이버 스캐폴드의 제조방법.

청구항 8

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 따른 나노파이버 스캐폴드를 포함하는, 상처 드레싱.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 폴리카프로락톤(poly(ϵ -caprolactone; PCL); 탈세포화 세포외기질 (decellularized extracellular matrix; dECM)); 및 우스닌산(usnic acid; UA);을 포함하는 나노파이버 스캐폴드 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 미생물 군집, 생물막 형성 및 후속 감염은 독소를 포함한 다양한 물질을 생성하여 상처 치유를 지연시키며 재생 과정을 복잡하게 할 수 있다. 상처 감염을 피하고 감염된 병원체를 박멸하기 위해 제작된 피부재생용 지지체는 우수한 항균 활성을 가져야 한다.

[0003] 우스닌산(Usnic acid, UA)은 바다 이끼류의 2차 대사산물로 다양한 병원체에 대해 강력한 항균 활성을 갖는 분자이다. 또한 항산화, 항염, 항바이러스, 섬유아세포 이동, 성장 인자 방출 강화 및 상처 치유 특성과 같은 독특한 생물학적 및 생리학적 활성으로 인해 약리학 및 조직 공학 응용 분야에서 상당한 잠재력을 가지고 있다. 그러나 물에 대한 용해도가 낮아 사용 가능성이 다소 제한적이기에 전달 범위를 개선하기 위해 UA는 리포솜, 형태, 필름 및 나노입자와 같은 다양한 전달 시스템에 탑재되어 활용 중이다.

[0004] 탈세포화는 글리코사미노글리칸, 콜라겐, 프로테오글리칸 및 성장인자와 같은 중요한 생리활성 분자와 핵심 형태학적, 구조적, 기계적 및 생화학적 특성을 유지하면서 세포를 제거하는 기술로, 탈세포화 세포외기질(Decellularized extracellular matrix, dECM)은 생체 적합성, 고유한 특성 및 수많은 생물학적 특성으로 인해 조직 공학에서 광범위하게 사용되고 있으나 구조적 및 기계적 특성의 손실과 용해도의 증가로 인해 피부재생용 나노섬유 스캐폴드 제작에 단독으로는 적용되지 않고 있다.

[0005] 전기방사 기술을 활용해 제작된 나노파이버는 상호 연결된 다공성 구조 측면에서 천연 ECM과 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 있습니다. PCL은 널리 사용되는 반결정성 지방족 폴리에스테르로 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.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2010-0133117호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이에, 본 발명의 발명자들은 우스닌산과 돼지 피부 유래 탈세포화 세포외 기질을 활용한 폴리카프로락톤 기반의 나노파이버를 제조하고 이의 구조적 특성, 항균활성 및 피부 재생 능력을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0008] 이에 따라, 본 발명은 폴리카프로락톤(poly(ϵ -caprolactone; PCL); 탈세포화 세포외기질 (decellularized extracellular matrix; dECM)); 및 우스닌산(usnic acid; UA);을 포함하는 나노파이버 스캐폴드 및 이의 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 폴리카프로락톤(poly(ϵ -caprolactone; PCL); 탈세포화 세포외기질 (decellularized extracellular matrix; dECM)); 및 우스닌산(usnic acid; UA);을 포함하는 나노파이버 스캐폴드를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 폴리카프로락톤, 탈세포화 세포외기질 및 우스닌산을 혼합하는 단계(단계 1); 상기 혼합물을 전기방사하여 나노파이버 매트 제조하는 단계(단계 2); 상기 나노파이버 매트를 가교 결합시키는 단계(단계 3); 및 상기 가교 결합된 나노파이버 매트를 동결건조하는 단계(단계 4);를 포함하는, 나노파이버 스캐폴드의 제조방법을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 나노파이버 스캐폴드를 포함하는 상처 드레싱을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명의 피부재생용 PCL/dECM/UA 나노파이버는 전기방사 기술을 활용하여 제작될 수 있어 상업적인 생산이 가능하다. 또한, 본 발명의 나노파이버는 균일한 나노섬유 구조, 우수한 유체 흡수 및 보유, 적절한 방출 속도, 높은 기계적 안정성, 열 안정성, 반결정 구조를 지녔으며, *Candida albicans* 외 4종의 균/박테리아에 대한 뛰어난 항균 효능 및 인간 유래 섬유아세포에 대한 우수한 적합성을 나타낸다. 생체 내 전층 절제 상처 치유 마우스 모델을 통해 제작된 하이드로겔이 21일째까지 상처 봉합을 크게 개선하며 상처 부위 조직의 조직 형태학적 평가에서 빠른 재생피화, 분화된 진피 및 표피가 최소한의 흉터 조직이 남아있음을 확인하였다. 따라서 제작된 나노파이버는 우수한 항균 활성 및 피부 재생 효능을 나타내어 상처 치유 응용 분야에 적용 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 폴리카프로락톤(PCL), 폴리카프로락톤/우스닌산(PCLU), 혼합 비율별 폴리카프로락톤/우스닌산/탈세포화 세포외기질(PEU) 나노파이버의 형태학적 분석 결과를 나타낸 것이다: 나노파이버의 (A) 5 kx 및 (B) 15 kx 확대된 SEM 이미지 및 (C) 해당하는 나노파이버 지름 분포 (도수 분포), 가교 결합 후의 나노파이버의 (D) 5 kx 및 (E) 15 kx 확대된 SEM 이미지 및 (F) 해당하는 나노파이버의 지름 분포, (G)가교 결합된 스캐폴드의 기공 크기 분포, 및 (H) 다공성.

도 2는 폴리카프로락톤(PCL), 폴리카프로락톤/우스닌산(PCLU), 혼합 비율별 폴리카프로락톤/우스닌산/탈세포화 세포외기질(PEU) 나노파이버의 물리화학적 특성을 분석한 결과이다: 순수 PCL, dECM, 및 UA 및 PCLU 및 PEU 나노파이버 스캐폴드의 (A) FTIR 스펙트럼, (B) X-선 회절 프로파일, (C) thermogravimetric analysis, (D) differential scanning calorimetry. (E) 나노파이버 스캐폴드의 기계적 특성화 결과: (a) 일반적 응력-변형, (b) 인장 강도, (c) 최대 하중에서의 변형, 및 (d) 파열시 변형.

도 3은 폴리카프로락톤(PCL), 폴리카프로락톤/우스닌산(PCLU), 혼합 비율별 폴리카프로락톤/우스닌산/탈세포화 세포외기질(PEU) 나노파이버의 친수성, 팽윤성, 분해속도 및 약물방출량에 대해 분석한 결과이다: 나노파이버 PCL, PCLU, 및 4개의 다른 PEU 나노파이버 스캐폴드 물 접촉각의 (A) 사진 및 변화 및 (B) 12초 동안의 변화, (C) 0 내지 48시간 동안의 팽윤성, (D) 0 내지 2시간 동안의 팽윤성, (E) 분해속도 및 (F) UA 방출 프로파일.

도 4는 폴리카프로락톤(PCL), 폴리카프로락톤/우스닌산(PCLU), 혼합 비율별 폴리카프로락톤/우스닌산/탈세포화 세포외기질(PEU) 나노파이버의 (A) 항균 효능을 확인하기 위한 디스크 확산 항균 실험 결과 및 (B) 박테리아 및 진균 병원균에 대한 저해를 나타낸 그래프이다.

도 5는 (A) 다른 유형의 나노파이버 스캐폴드와 함께 인큐베이션한 미생물 세포의 출현 및 소실을 나타낸 아가 플레이트의 사진 및 (B) 가시화된 미생물 세포의 감소를 나타낸 그래프이다.

도 6은 폴리카프로락톤(PCL), 폴리카프로락톤/우스닌산(PCLU), 혼합 비율별 폴리카프로락톤/우스닌산/탈세포화 세포외기질(PEU) 나노파이버의 생물막 형성 억제 효능에 대해 분석한 결과이다: (A) *P. aeruginosa* 및 *K. pneumoniae*의 생물막 형성 동안 나노파이버 스캐폴드에 노출된 미생물 세포의 출현 및 소실을 보이는 아가 플레이트 사진. (B) *P. aeruginosa*, 및 *K. pneumoniae*의 생물막 저해율을 나타낸 그래프. (C) 나노파이버 스캐폴드 상에 형성된 *P. aeruginosa* 및 *K. pneumoniae*의 생물막 구조를 보이는 SEM 현미경 사진.

도 7은 나노파이버 스캐폴드 상에 분주 후 1일 및 5일째의 (A) HDF 및 (B) HaCaT 세포의 세포독성 및 세포 증식을 확인한 MTT 검정 결과를 나타낸 것이다. (C) 나노파이버 스캐폴드 상에 분주 후 1일 및 5일째의 FDA 및 PI 염색된 생세포/죽은세포의 현미경 사진이다. Tissue culture plate (TCP)는 대조이다.

도 8은 폴리카프로락톤(PCL), 폴리카프로락톤/우스닌산(PCLU), 혼합 비율별 폴리카프로락톤/우스닌산/탈세포화 세포외기질(PEU) 나노파이버의 전층 절개 상처 유도형 마우스 모델 내 피부재생효능 검토 결과이다: (A) 수술 후 0, 7, 14, 및 21일에 나노파이버 스캐폴드가 처리된 ICR 마우스의 전체 두께 절제 상처 회복 사진, (B) 수술 후 평균 상처 봉합을 나타낸 image J (image analysis software) 측정 결과. (C) H&E 염색된 나노파이버 스캐

폴드의 현미경 사진으로, 화살표는 피지선 (se), 모낭 (hf), 모근 (hr), 및 피하지방층 (s)을 나타낸 것이다. (D) Masson's trichrome 염색된 나노파이버 스캐폴드의 현미경 사진. (E) 흉터의 (a) 평균 너비 및 (b) 두께 및 (c) 표피의 두께.

도 9는 개방 환경에 노출된 (A) dECM, (B) PEU4:6 나노파이버 매트 및 (C) 가교 결합된 dECM 나노파이버 매트 SEM 현미경 사진이다.

도 10은 *P. aeruginosa* 및 *K. pneumoniae*에 대한 나노파이버 스캐폴드의 항박테리아 활성을 나타낸 것이다: (A) 박테리아 병원균에 대한 저해 영역 및 (B) 다른 유형의 나노파이버 스캐폴드와 인큐베이션된 박테리아의 출현 및 소실을 나타낸 아가 플레이트의 사진.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에 서 설명하는 실시예에 의해 본 발명이 한정되지 않으며 본 발명은 후술할 청구 범위에 의해 정의될 뿐이다.
- [0015] 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.
- [0017] 본 발명은 폴리카프로락톤(poly(ϵ -caprolactone; PCL); 탈세포화 세포외기질 (decellularized extracellular matrix; dECM)); 및 우스닌산 (usnic acid; UA);을 포함하는 나노파이버 스캐폴드에 관한 것이다.
- [0018] 상기 나노파이버 스캐폴드는 폴리카프로락톤 및 탈세포화 세포외기질의 나노파이버에 우스닌산이 함유된 형태일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0019] 상기 나노파이버 스캐폴드는 전기방사에 의해 제조될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0020] 상기 나노파이버 스캐폴드는 상기 폴리카프로락톤 및 탈세포화 세포외기질을 8 내지 2 : 2 내지 8의 중량비로 포함할 수 있으며, 예를 들어, 상기 폴리카프로락톤 및 탈세포화 세포외기질을 8 : 2, 6 : 4, 4 : 6 또는 2 : 8의 부피비로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0021] 상기 나노파이버 스캐폴드는 가교 결합된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0022] 상기 나노파이버 스캐폴드는 폴리카프로락톤, 탈세포화 세포외기질 및 우스닌산을 혼합하는 단계(단계 1); 상기 혼합물을 전기방사하여 나노파이버 매트를 제조하는 단계(단계 2); 상기 나노파이버 매트를 가교 결합시키는 단계(단계 3); 및 상기 가교 결합된 나노파이버 매트를 동결건조하는 단계(단계 4))를 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0023] 이하, 본 발명의 나노파이버 스캐폴드의 제조방법을 바탕으로, 본 발명의 나노파이버 스캐폴드를 설명한다.
- [0024] 먼저, 본 발명의 나노파이버 스캐폴드의 제조방법은 폴리카프로락톤, 탈세포화 세포외기질 및 우스닌산을 혼합하는 단계 (단계 1)을 포함한다.
- [0025] 상기 단계 1에서 상기 폴리카프로락톤 및 탈세포화 세포외기질을 8 내지 2 : 2 내지 8의 중량비로 혼합할 수 있으며, 예를 들어, 상기 폴리카프로락톤 및 탈세포화 세포외기질을 8 : 2, 6 : 4, 4 : 6 또는 2 : 8의 부피비로 혼합할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0026] 다음으로, 본 발명의 나노파이버 스캐폴드의 제조방법은 상기 혼합물을 전기방사하여 나노파이버 매트를 제조하는 단계(단계 2); 상기 나노파이버 매트를 가교 결합시키는 단계(단계 3); 및 상기 가교 결합된 나노파이버 매트를 동결건조하는 단계(단계 4);를 포함한다.
- [0027] 상기 단계 2에서, 전기방사는 본 분야에서 일반적으로 사용되는 기술을 사용하여 실시될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0028] 상기 단계 3에서, 상기 나노파이버 매트를 에탄올 중의 EDC 및 NHS에 침지하여 가교 결합시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0030] 또한, 본 발명은 본 발명의 나노파이버 스캐폴드를 포함하는 상처 드레싱에 관한 것이다.

[0032] 실시예

[0033] 재료준비

[0034] 순수 PCL, 우스닌산(UA), 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC), *N*-hydroxysuccinimide (NHS), fluorescein diacetate (FDA), propidium iodide (PI), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), 1, 1, 1, 3, 3, 3-hexafluoro-2-propanol (HFIP)은 Sigma-Aldrich(USA)에서 구입하였다. Dulbecco's minimum Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), 페니실린/스트렙토마이신 및 트리핀 (250 U/mg)은 GIBCO제(Invitrogen Corporation, USA)에서 구입하였다. Potato dextrose broth (PDB), tryptic soy broth (TSB), 및 brain heart infusion (BHI)는 Difco Laboratory Inc. (Detroit, MI, USA)에서 구입하였다. 본 발명에서 사용된 그 외 화학물질 및 용매는 모두 분석 등급이며 물은 탈이온화하였다.

[0036] 실시예 1.

[0037] dECM의 제조 및 분리

[0038] dECM(decellularized extracellular matrix)을 돼지 피부로부터 추출하였다. 우선, 피부의 하측부에 부착된 지방은 물리적으로 제거하고 증류수로 세척하였다. 그런 다음 피부를 잘게 잘라 37 °C에서 6시간 동안 0.25 % Trypsin-EDTA에 담겼다. 인큐베이션 후, 돼지 피부로부터 잔해를 제거하고 PBS (phosphate-buffered saline)로 세척한 후, 1% Triton X-100 및 25 mM EDTA가 함유된 PBS에 24시간 동안 침지하였다. 그런 다음, 돼지 피부를 4 °C에서 24시간 동안 PBS로 세척하고 4% EtOH 중의 0.1% 과아세트산으로 멸균하였다. 그런 다음, 돼지 피부를 증류수로 여러 번 세척하고 동결건조한 후, 펩신을 포함하는 1 M 아세트산에 7일간 용해시켰다. 혼합물의 pH를 냉조건 하에서 NaOH 용액을 사용하여 7.4로 조절하고 다시 동결건조한 후 나노파이버 스캐폴드의 제조를 위해 HFIP에 용해시켰다.

[0040] 복합 나노파이버 매트 제조

[0041] dECM 10% (w/v) 및 PCL 10% (w/v)을 HFIP에 용해하여 제조하고 우스닌산 (UA) (3 mg/mL)의 존재 하에서 다른 질량비 (100:0, 80:20, 40:60, 60:40, 20:80, 및 0:100)로 PCL 및 dECM을 혼합하였다. 용액을 다른 작동 조건 하에서 높은 전압 전원 공급기를 갖는 syringe pump (KD Scientific Inc., Holliston, MA, USA)를 사용하여 22-게이지 니들을 통해 알루미늄 호일로 싸여진 스테인레스 스틸 회전 수집기로 전기방사하였다 (표 1). 나노파이버 매트 30분 동안 EDC (20 mM) 및 NHS (5 mM)이 함유된 순수 에탄올에 완전히 침지하고 순수 에탄올로 세척한 후 동결건조였다.

표 1

Scaffold name	Composition (PCL:dECM) (%)	UA (mg/mL)	Flow rate (mL/h)	Voltage (kV)	Distance (cm)	Collector (RPM)
PCL	100:0	0	2	9.5	10	200
PCLU	100:0	3	2	9.5	10	200
PEU2:8	20:80	3	2	9.7	10	200
PEU4:6	40:60	3	2	9.7	10	200
PEU6:4	60:40	3	2	10	10	200
PEU8:2	80:20	3	2	10.5	10	200

[0042]

[0044] 실험예 1.

[0045] Scanning Electron Microscopy (SEM)

[0046] SEM을 사용하여 나노파이버 스캐폴드의 표면 형태를 분석하였다. 전기방사된 복합 나노파이버 스캐폴드를 Emi-Tech K500X를 사용하여 실버층으로 스퍼터링 코팅하고 5 kV의 가속 전압에서 SEM (FE-SEM, Hitachi S-2700,

Japan)을 통해 가시화하였다. 평균 섬유 직경을 image analysis software (ImageJ Wayne, Rasband)로 분석하였다. 게다가, 가교 결합된 스캐폴드의 기공 크기 분포를 image analysis software (ImageJ Wayne, Rasband)로 평가하고 다공성을 액상 변위법을 사용하여 연구하였다.

[0048] **FTIR에 의한 화학 분석**

[0049] FTIR (Fourier-transform infrared spectrometer) 분석을 순수 UA 및 나노파이버 dECM, PCL, PCLU, PEU 2:8, PEU 4:6, PEU 6:4, 및 PEU 8:2 샘플의 화학적 특성화에 사용하였다. 모든 스펙트럼은 FTIR (JASCO (FT-4100), Tokyo, Japan) spectrometer를 사용하여 실온에서 $4000\text{--}650\text{ cm}^{-1}$ 의 주파수 범위에서 4 cm^{-1} 간격으로 기록하였다.

[0051] **X-ray diffraction analysis (XRD)**

[0052] 순수 UA, PCL, 및 복합 나노파이버 스캐폴드를 36 kV 및 200 mA에서 발생된 CuK α 방사선으로 $6^\circ/\text{min}$ 의 스캐닝 속도로 10 내지 60° 의 회절각 (2θ) 범위에서 X-ray diffraction analysis (Philips X'pert MPD diffractometer, Eindhoven, Netherland)으로 특성화하였다.

[0054] **Thermal properties analysis**

[0055] 50 내지 700°C 온도 범위 내의 질소 가스 하에서 $10^\circ\text{C}/\text{min}$ 의 일정한 가열 속도에서 순수 UA, PCL, 및 복합 나노파이버 스캐폴드의 열 특성을 thermogravimetric (TGA) Pyris 1 TGA analyzer (Perkin Elmer TGA-7, Waltham, MA, USA)로 측정하였다. 용융 특성을 실온 내지 250°C 의 온도 범위에서 $50\text{ mL}/\text{min}$ 의 아르곤 가스 흐름 하에서 $10^\circ\text{C}/\text{min}$ 의 일정한 가열 속도에서 differential scanning calorimetry (DSC) (Perkin Elmer, Diamond, Waltham, MA, USA)를 사용하여 분석하였다.

[0057] **복합 스캐폴드의 기계적 특성**

[0058] 제조된 나노파이버 스캐폴드의 인장 강도를 universal tensile machine (LR5K Plus, Lloyd Instruments)을 사용하여 확인하였다. 직사각형 스트립 ($15\text{ mm} \times 5\text{ mm} \times T$; T 는 두께임)을 올려놓고 실온에서 $1\text{ mm}/\text{min}$ 의 크로스헤드 스피드를 적용시켰다. 각 그룹 당 3개의 독립적인 샘플을 분석에 사용하였다.

[0060] **스캐폴드의 접촉각**

[0061] 나노파이버 스캐폴드를 평평한 표면 상에 수평으로 올려놓고, 및 DMEM (FBS free) 액적을 실온에 위치시켰다. 디지털 카메라로 촬영하고 그룹 당 3개의 독립적인 사진을 사용하여 접촉각을 image analysis software (ImageJ Wayne, Rasband)으로 분석하였다.

[0063] **복합 스캐폴드의 팽윤성**

[0064] 제조된 나노파이버 스캐폴드를 팽창 상태의 평형에 이를 때까지 37°C 에서 1X PBS (pH 7.4)에 침지시켰다. 일정 시간 간격으로 나노파이버 스캐폴드를 수집하여 과량의 PBS 및 표면 습기를 블롯팅 페이퍼로 제거하고 실온에서 1분 동안 두었다. 그런 다음 평형 팽창 비율을 하기 식에 따라 계산하였다. 하기 식에서 W_d 및 W_s 는 각각 건조 중량 및 팽창 상태의 중량이다.

[0065]
$$\text{Swelling (\%)} = [(W_s - W_d) / W_d] \times 100$$

[0067] **인 비트로 분해 특성**

[0068] 제조된 나노파이버 스캐폴드를 37°C 에서 1X PBS (pH 7.4)에 침지시켰다. 일정 시간 간격으로 잔여 샘플을 꺼내

탈이온수로 세척하고 동결건조시켰다. 중량 손실을 하기 식에 따라 계산하였다. 식에서 W_i 및 W_t 는 각각 초기 건조 중량 및 다른 시간에서의 중량이다.

[0069] $\text{Degradation (\%)} = [(W_i - W_t) / W_i] \times 100$

[0071] 인 비트로 방출 특성

[0072] 우스닌산(UA)의 방출 특성을 확인하였다. 제조된 나노파이버 스캐폴드를 1X PBS (pH 7.4)에 침지시키고, 방출 배지를 설정된 시간 간격에 빼내어 280 nm에서 마이크로플레이트 reader (Gen 5™ ELISA BioTek, USA)를 분석하였다. 방출된 UA를 하기 식에 따라 계산하였다. 식에서 W_i 및 W_t 는 각각 스캐폴드 내 UA의 초기량 및 특정 시간에 방출된 양을 의미한다.

[0073] $\text{Release (\%)} = [(W_i - W_t) / W_i] \times 100$

[0075] 세포 배양 및 세포독성

[0076] 습윤한 5% CO₂ 대기 및 37℃에서 10% FBS, 100 units/mL의 페니실린, 및 0.1 mg/mL의 스트렙토마이신이 보충된 DMEM 내에서 HDF 섬유아세포 및 HaCaT 각질세포를 사용하여 세포 배양 연구를 실시하였다.

[0077] 48-웰 마이크로플레이트로 옮기기 1시간 전에 나노파이버 스캐폴드를 8 mm 지름의 생검 펀치를 사용해 구멍을 뚫어 UV 조사에 노출시켰다. 스캐폴드 상의 세포양립성(Cytocompatibility), 세포 부착, 및 증식을 분주 후 1일 및 5일에 MTT 분석을 사용하여 연구하였다. 우선, 1×10^4 cells의 세포를 8 mm 스캐폴드 위에 위치시키고 37℃의 습윤 환경에서 인큐베이션하였다. 분주 후 1일 및 5일에, 세포-배양된 나노파이버 스캐폴드를 1 X PBS (pH 7.4)를 사용하여 세척하고 MTT (1mg/mL)가 보충된 DMEM에 동일한 환경에서 3시간 동안 인큐베이션하였다. 그런 다음 인큐베이션된 용액을 흡입하고 37℃에서 30분 동안 DMSO로 재-인큐베이션시켰다. 용액의 흡광도를 540 nm에서 마이크로플레이트 reader (Gen 5™ ELISA BioTek, USA)를 사용하여 측정하였다.

[0079] 형광 검정

[0080] 나노파이버 스캐폴드 상에서의 세포독성, 세포 부착, 증식, 및 이동을 연구하기 위해, 생세포/죽은 세포 염색을 나노파이버 스캐폴드에 세포를 분주한 후 1일 및 5일에 37℃에서 15분 동안 FBS가 없는 배지 중의 FDA (5 μg/mL) 및 PI (20 μg/mL)를 사용하여 실시하였다. FDA 및 PI로 세포를 염색한 후, 용액을 흡입하고 1XPBS (pH 7.4)로 2회 세척한 후 생세포의 녹색 형광 및 죽은 세포의 빨간색 형광을 형광 현미경 (Leica DMI300B Microsystems, Wetzlar, Germany)을 사용하여 검출하였다.

[0082] 항균 활성

[0083] *Pseudomonas aeruginosa* (PA01 KCTC 1637), *Staphylococcus aureus* (KCTC 1916), *Cutibacterium acnes* (KCTC 3314), 및 *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352)의 박테리아 배양물을 Korean Collection for Type Cultures (KCTC, Daejeon, Korea)에서 구입하였다. *Streptococcus mutans* (KCCM 40105), *Staphylococcus epidermidis* (KCCM 40003), 및 fungal 균주 *Candida albicans* (KCCM 11282)은 Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM, Sudaemun Seoul, Korea)에서 구입하였다. *C. albicans*의 배양을 위한 성장 배지는 5% 글루코스가 보충된 PDB이고, 아가 배지는 PDA이다. *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, 및 *S. epidermidis*은 성장 배지로 TSB를 사용하고 아가 배지는 tryptic soy agar (TSA)를 사용했다. *C. acnes*의 성장 및 배양은 10% CO₂ 습윤 대기의 CO₂ 인큐베이터 (NAPCO 5400; General Laboratory Supply, Pasadena, USA)에서 1% 글루코스 및 BHA (brain heart infusion agar)가 보충된 BHI에서 실시하였다. 모든 박테리아 균주 및 *C. albicans*의 성장 온도는 37℃이었다.

[0085] **항박테리아 및 항진균 활성**

[0086] 박테리아 및 진균성 병원균에 대한 나노파이버 스캐폴드의 항균 활성을 고형 아가 표지 및 액상 성장 배지에서 디스크 확산을 실시하여 확인하였다. 밤새 성장시킨 박테리아 병원균 및 *C. albicans*의 배양물을 0.05 (박테리아 접종물의 Mcfarland 표준과 동일함)의 등가 OD₆₀₀ 수치로 희석하고 면봉을 사용하여 TSA (박테리아 배양용) 및 PDA (진균 세포 배양용) 플레이트의 표지로 분주하였다(100 µL). 세포 배양물의 스프레딩은 아가 플레이트 상에 규칙적인 박테리아 배양을 형성하여 실시하였다. 8 mm 지름의 나노파이버 스캐폴드를 박테리아 또는 진균 세포 배양물을 포함하는 아가 플레이트의 표면에 위치시키고, 37℃에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 지름의 억제를 측정하였다.

[0087] 2 개의 나노파이버 스캐폴드 (8 mm 지름)를 박테리아 또는 진균 세포 배양물을 함유하는 24-웰 마이크로플레이트 상에 위치시켰다. 마이크로플레이트를 37℃에서 진탕시키면서(150 rpm) 박테리아 세포 배양은 24시간 동안, *C. albicans* 세포 배양은 48시간 동안 인큐베이션하였다. 24-웰 마이크로플레이트에서 글루코스 (1 %)가 보충된 BHI 중의 *C. acnes* 세포 배양물을 나노파이버 스캐폴드와 함께 37℃, 10% CO₂ 습윤 대기의 CO₂ 인큐베이터 (NAPCO 5400; General Laboratory Supply, Pasadena, USA)에서 무산소 조건 하에서 48시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션한 후, 세포 배양물 (100 µL)을 TSB (박테리아 배양용) 및 PDB (*C. albicans*)로 계열 희석하였다(10⁻⁸ 희석). 희석된 세포 배양물 (100 µL)을 TSA 및 PDA 아가 플레이트상에 평판도말한 후, 박테리아 세포는 37℃에서 24시간 동안 *C. albicans* 세포는 48시간 동안 인큐베이션하여 성장시켰다. *C. acnes* 박테리아 세포 배양은 BHA 상에 평판도말하고 37℃, 무산소 조건 하에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. 각 아가 플레이트 상의 콜로니의 총 수를 세어 colony-forming unit (CFU)를 측정하였다.

[0089] **항-생물막 검증**

[0090] 나노파이버 스캐폴드의 *P. aeruginosa*, 및 *K. pneumoniae*에 대한 생물막 저해 특성을 확인하였다. 8 mm 지름의 나노파이버 스캐폴드를 생물막 저해 활성을 확인하기 위해 사용하였다. 나노파이버 스캐폴드의 생물막 저해 활성은 표면에 부착된 세포의 CFU를 측정하여 확인하였다. 나노파이버 스캐폴드를 24-웰 마이크로타이터 플레이트의 바닥에 위치시키고 희석된 (이의 각 성장 배지에 1:100 희석) 세포 배양물을 분주하였다. 마이크로타이터 플레이트를 정적 조건 하에서 37℃에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 자유-부동성 부유 세포 배양물을 폐기하고 나노파이버 스캐폴드를 멸균 성장 배지로 3회 세척하고 원심분리 튜브 (1.5 mL)로 옮겼다. 나노파이버 스캐폴드를 함유한 원심분리 튜브를 500 µL의 TSB (박테리아) 및 PDB (*C. albicans*)로 재현탁하였다. 튜브를 5분간 볼텍싱한 후 10분간 초음파처리하였다. 원심분리 튜브로부터의 세포 현탁액 (100 µL)을 각각의 멸균 성장 배지로 10⁻⁸ 희석까지 희석하였다. 희석된 세포 배양물(100 µL)을 아가 플레이트 상에 평판도말하고 37℃에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. 생물막의 저해 백분율을 하기 식에 따라 계산하였다. 하기 식에서, N_c는 대조군의 미생물 콜로니의 평균 수를 나타내며, N_{si}는 실험 그룹의 미생물 콜로니의 평균 수를 나타낸다.

[0091]
$$\text{Inhibition (\%)} = (N_c - N_{si}) / N_c \times 100$$

[0093] **인 비보 상처 치유 모델**

[0094] 나노파이버 스캐폴드의 인 비보 상처 치유 특성을 제어된 환경 (상대 습도: 40-70%, 온도: 20-24 °C) 하에서 7일간 적응시킨 30 g 체중의 8주령 일반 수컷 ICR 마우스를 사용하여 평가하였다 (그룹 당 6마리). 모든 마우스를 이소프로판올 중의 20% 이소플루란을 포함하는 챔버에 20분간 넣어 마취시키고 수술 내내 마스크를 씌었다. 털을 면도하고 포비돈-요오드 및 70% 에탄올로 소독한 후 등 피부에 전체 두께 2.25 cm² 정사각형 절제 상처를 냈다. 제조된 PCL, PCLU, PCL: dECM 4:6 (PE 4:6), 및 PEU 4:6 나노파이버 스캐폴드를 봉합선을 사용하여 위치시켰다. 수술 후 모든 실험 그룹의 상처 부위를 디지털 카메라로 0, 7, 14, 및 21일에 촬영하고, 상처 봉합을 image analysis software (ImageJ Wayne, Rasband)로 측정하고 초기 상처 크기의 상대 백분율로 플롯팅하였다. 조직형태학 평가를 위해 수술 후 21일에 마우스를 희생시키고 상처 부위 및 조직 주위를 수집하였다.

[0096] 조직형태학 분석

[0097] 수집된 조직 샘플을 10% 포르말린 용액을 사용하여 1일 동안 고정시킨 후, 알코올 및 자일렌을 연속적으로 사용하여 탈수시키고 tissue processor (Leica TP1020, Leica Biosystems, Nussloch, Germany)를 사용하여 왁스를 침윤시켰다. 끼워진 조직 (Leica EG1160, Leica Biosystems, Nussloch, Germany)을 5 μ m로 절개하고, 글라스 슬라이드에 올려놓고 자일렌으로 탈왁스화시킨 후 알코올 및 그 후 물을 통해 탈수시켰다. 핵을 헤마톡실린으로 염색하고, 과량의 헤마톡실린을 물로 세척하고 ECM 및 세포질을 에오신으로 대조염색하였다. 염색된 조직을 등급 알코올을 100%까지 적용하여 탈수시키고 자일렌으로 세척하고 마운팅 배지를 사용하여 커버-슬립에 위치시켰다.

[0098] 또한 절개된 조직을 Masson's trichrome staining (Masson's Trichrome stain kit; KTMRT, American MasterTech, Lodi, CA, USA)으로 염색하여 콜라겐 퇴적을 평가하였다. 우선, 탈파라핀화된 절개물을 60 °C의 미리 가열된 Bouin's fluid에 60분간 침지시키고, 흐르는 수돗물에 세척하고 작동 Weigert's 헤마톡실린으로 5분간 염색하고 수돗물로 세척하였다. 그런 다음, Biebrich scarlet에 15분간 함침하고 수돗물로 세척하고 phosphotungstic/phosphomolybdic acid과 함께 10분간 인큐베이션한 후 5분간 아닐린 ब्ल로에 함침하고 증류수로 세척한 후, transferred to 1% 아세트산으로 옮기고 앵솔루트 에탄올로 탈수하고 마운팅 배지를 사용하여 커버-슬립에 위치시켰다. 마지막으로, 염색된 절개물을 광학 현미경 (Leica Microsystems UK Ltd, Milton Keynes, UK)을 사용하여 관찰하고 대표 사진을 촬영하였다.

[0100] 통계 분석

[0101] 모든 정량 데이터는 신선한 시약을 사용하여 실시한 3회의 독립적인 실험으로부터의 평균 $\pm$ 표준 편차 (SD)로 나타났다. 그룹 사이의 유의차는 GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)을 사용하는 Duncan's test에 따라 one-way ANOVA를 사용하여 평가하였다. *p < 0.05 및 **p < 0.01는 대조에 비해 통계학적 유의성을 갖는 것으로 선별되었다.

[0103] 실험예 2.

[0104] 전기방사된 나노파이버의 형태학적 특성화

[0105] 무-비드, 무작위 배열된, 매끄럽고 균질하게 분포된 나노파이버 구조물을 중합체 용액 농도와 관계없이 전압, 드럼 콜렉터와 바늘 사이의 거리 및 중합체 용액의 흐름 속도와 같은 작동 조건을 조절하여 수득하였다. 도 1A, B, 및 C는 순수 PCL 및 PCLU 나노파이버가 PEU 나노파이버보다 큰 평균 지름 (각각 345.20 $\pm$ 80.74 nm 및 503.44 $\pm$ 105.47 nm)을 가짐을 보인다. 복합 PEU 나노파이버는 PCL 및 dECM의 조합에 따라 (20%, 40%, 60%, 80%, 및 100%의 dECM 조합) 각각 284.94 $\pm$ 71.29 nm, 254.88 $\pm$ 46.98 nm, 242.26 $\pm$ 66.66 nm, 및 230.77 $\pm$ 42.10 nm의 다른 평균 파이버 지름을 나타냈다. dECM의 증가는 중합체 혼합물의 점도를 감소시키므로 dECM 함량의 증가는 파이버 지름을 감소시켰다. dECM은 물에 높은 가용성, 습도에 대한 높은 민감성 (공개된 환경에서 촬영된 dECM 및 a PEU4:6 나노파이버의 SEM 현미경 사진, 도 9), 및 즉각적인 분해성을 가지고 있으므로, 매우 짧은 시간 동안 소량의 100% 에탄올-기반 EDC/NHS만이 UA-혼합된 중합체 용액에서 최소한의 효과를 갖는 표면 가교결합을 제공할 수 있었다. 도 1D, E, 및 F는 가교 결합 후에 스캐폴드의 나노파이버 구조에서 형태학적 변화를 나타냈다. 파이버의 형태는 상대적으로 낮은 dECM 함량 (PEU8:2)에서는 변화 없이 유지되었지만, 파이버 연결의 최소 융합을 보였다. 고함량의 dECM을 갖는 PEU 스캐폴드는 형태학적 변화를 보였으나, dECM-단독 나노파이버는 짧은 기간 동안 소량의 가교 결합 용액에만 노출되었을 때도 연결 및 서로 융합된 파이버 모두를 갖는 더 큰 형태학적 변화를 보였다 (도 9C). dECM 함량이 증가할수록 가교 결합된 PEU 스캐폴드의 기공 크기 (도 1F)가 감소하는지를 확인하였으며, PEU2:8는 더 작은 기공 크기 (3.89 $\pm$ 2.52 μ m) 및 PEU4:6 및 PEU6:4는 평균 기공 크기 (각각 4.95 $\pm$ 2.19 μ m 및 5.00 $\pm$ 2.05 μ m)를 보였다. 이러한 기공 크기는 피부 세포에 제공하기에 충분히 크다. 게다가, PEU2:8는 상당히 낮은 다공성을 가지며, PEU4:6 및 PEU6:4 둘 다는 수용하는 세포에 적당한 다공성을 갖는다 (도 1G). 종합하면, 이러한 결과들은 이들의 섬유상 및 다공성 구조 때문에 PEU4:6 및 PEU6:4가 가장 ECM과 유사한 특성을 가짐을 나타내는 것으로, 이는 세포 활성화 및 피부 조직 재생에서의 적용을 용이하게 한다.

[0107] FTIR spectroscopy

[0108] PCL, dECM, UA, 및 가교 결합된 복합 PEU 나노파이버 스캐폴드의 FTIR 스펙트럼, 및 특징적인 흡광 밴드에서의 시프트를 도 2A에 나타냈다. PCL 스펙트럼은 2938 cm^{-1} 및 2862 cm^{-1} (각각 비대칭 및 대칭 -CH 스트레칭), 1721 cm^{-1} (카르보닐 C=O 스트레칭), 및 1237 cm^{-1} 및 1165 cm^{-1} (각각 비대칭 및 대칭 C-O-C 스트레칭)에서 특징적인 피크를 나타냈다. dECM의 IR 스펙트럼은 각각 아미드 A (N-H 스트레칭 진동), 아미드 B (H-H 스트레칭 진동), 아미드 I (N-H 진동에 결합된 C=O 스트레칭 진동), 아미드 II (N-H bending 진동), 및 아미드III (N-H deformation 및 C-N 스트레칭)에 상응하는 3406 cm^{-1} , 3154 cm^{-1} , 1635 cm^{-1} , 1522 cm^{-1} , 및 1233 cm^{-1} 에서 5개의 특징적인 밴드를 보였다. FTIR 스펙트럼에서 확인된 이러한 피크들은 콜라겐 FTIR 스펙트럼에서의 피크와 거의 일치하였다(T. Riaz et al., Applied Spectroscopy Reviews, 53 (2018) 703-746). UA 스펙트럼은 1687 cm^{-1} (사이클릭 케톤기와 결합된 C=O 스트레칭), 1632 cm^{-1} (비방향족 케톤), 및 1282 cm^{-1} 및 1042 cm^{-1} (각각 반대칭 및 대칭 C-O-C 아릴 알킬 에테르 모드)에서 특징적인 흡광 밴드를 보였다. 나노파이버 PCLU 스캐폴드에서의 UA에 의한 피크는 PCLU에 존재하는 UA의 양이 PCL에서보다 상당히 낮아서 보이지 않았으며, 이는 복합 중합체 필름이 중합체와 관련된 피크의 강도를 감소시키고 UA의 피크가 사라지게 만드는 이전 연구와 일치하는 것으로, 수소 결합을 형성한다는 가설을 이끌어 냈다. 그러나, 본 발명자의 이전 연구는 UA-키토산 나노입자의 UA와 관련된 피크는 보이는 채로 유지되었으며, 나노입자 내의 키토산에 따라 UA의 더 큰 비율을 사용하기 때문에 키토산 피크의 날카로움이 감소하였음을 입증하였고, 이는 결합 형성뿐만 아니라 물질 농도 및 대표적인 진동 피크 오버랩핑이 진동 피크의 출현 및 소실에 영향을 미칠 수 있음을 제시하는 것이다. 복합 PEU 나노파이버 스캐폴드에 대하여, dECM과 관련된 흡광 피크의 강도가 복합체 내의 dECM 함량의 감소에 따라 감소하는 반면 UA와 관련된 피크는 PCL 및 dECM의 높은 강도에 의해 사라졌으며, 이는 또한 이전 가설과 일치하는 것이다(C. Pagano et al., Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 178 (2019) 488-499). 그러나, dECM과 관련된 흡광 피크의 강도는 복합 나노파이버 PEU 스캐폴드 내의 dECM 함량이 감소할수록 감소한 반면, UA와 관련된 피크는 PCL 및 dECM의 높은 강도 때문에 사라졌으며, PCL, dECM 및 UA를 나타내는 모든 복합 PEU 나노파이버 스캐폴드 모두에서의 반대칭 C-O-C 스트레칭 진동에 상응하는 잔여 피크가 약한 가교 결합 처리 이후에도 복합 PEU 나노파이버 스캐폴드 내에 잘 분포되어 있다.

[0110] X-선 회절 분석

[0111] 도2B는 순수 UA 및 전기방사된 PCL, dECM, PCLU, 및 복합 PEU 스캐폴드의 X-선 회절 패턴을 나타낸 것이다. PCL 나노파이버는 $2\theta = 21^\circ$ 에서 날카로운 회절 피크 및 23° 에서 상대적으로 낮은 강도의 피크를 보였으며, 이는 사방정계 단위 세포 파라미터를 갖는 폴리에틸렌-유사 구조의 (110) 및 (200) 반영에 상응하는 것으로, PCL이 반-결정 특성을 가짐을 확인한 것이다. dECM은 주로 콜라겐으로 이루어진 복합 구조로, X-선 회절 패턴에서 특이적인 날카로운 피크를 갖지 않고 $2\theta = \sim 22^\circ$ 에서 넓은 피크를 갖는 무정형 물질이다. UA 분말은 이전 연구 결과와 유사한 특징적인 날카로운 피크를 보였으며, 이는 특유의 결정 성질을 나타내는 것이다. 가교 결합된 복합 나노파이버 PEU 스캐폴드는 $2\theta = 21^\circ$ 에서 2개의 특징적인 PCL 피크 및 23° 에서의 낮은 강도 피크만을 가졌으며, 스캐폴드 내의 dECM 함량이 증가할수록 강도가 감소되며, 이는 복합 나노파이버 스캐폴드의 결정성 정도의 감소가 무정형 dECM의 도입에 의한 것임을 입증하는 것이다. 이러한 결과는 전기방사된 PCL-콜라겐 나노파이버에서의 이전 연구 결과와 일치하는 것이다(D. Chen et al., International journal of nanomedicine, 14 (2019) 2127). 복합 스캐폴드에서 특징적인 UA 회절 피크는 없었지만, 복합 스캐폴드 내의 UA의 제한된 이용가능성에 의한 최소한의 회절이 있었다.

[0113] 열 거동 분석

[0114] TGA (도 2C)를 PCL, dECM, UA, 및 복합 PEU 나노파이버 스캐폴드의 열 분해 거동을 평가하기 위해 실시하였다. 이전 연구와 유사하게, PCL은 $\sim 370^\circ\text{C}$ 에서 시작하여 $\sim 470^\circ\text{C}$ 에서 종료되며 숯 잔여물이 없는 적합한 단발 열 분해 프로파일(90% 중량 손실)을 보였다. dECM은 2-단계의 분해를 보였다: $\sim 200^\circ\text{C}$ 까지 결합된 물의 손실에 의한 $\sim 40\%$ 중량 손실 및 단백질 사슬의 파괴 및 펩티드 결합의 파괴의 결과로서 $\sim 200^\circ\text{C}$ 내지 $\sim 500^\circ\text{C}$ 에서 거의 30%의 중량 손실. UA는 2-단계의 중량 손실을 보였다: 280°C 까지 $\sim 30\%$ 중량 손실 후 가장 많은 숯 잔여물을 유지하면서 낮은 속도로 중량 손실. 열 분해 프로파일에서, 순수 PCL, dECM, UA, 및 복합 PEU2:8, PEU4:6, PEU6:4,

및 PEU8:2 나노파이버 스캐폴드의 550 °C에서의 잔여물 백분율은 각각 0%, 35%, 38%, 26%, 18%, 12%, 및 8%이며, 이는 복합 PEU 스캐폴드가 순수 물질 사이에 있음을 나타내는 것이다. 그러므로, 복합 PEU 스캐폴드의 분해 프로파일은 순수 물질의 열 프로파일의 조합이며, 복합 PEU 시스템 내의 dECM의 증가는 열 안정성을 증가시키고, PEU4:6 및 PEU8:2 둘 다는 가장 높은 열 안정성을 보였다.

[0116] DSC 분석

[0117] dECM, PCL, 및 UA 나노파이버 블렌드의 혼화성 및 균질성을 DSC 분석으로 확인하였다. 이론적으로, 완전한 혼화성 및 균질성 복합체는 복합체에 사용된 각 순수 물질의 혼합된 상 및 다른 상 전이의 형성 대신 단일-상 전이를 형성한다. 결과(도 2D)는 각각 약 59 °C, 60 °C, 및 206 °C의 녹는점을 갖는 PCL, dECM, 및 UA이 각각 ~41 °C, ~41 °C, 및 194 °C에서 고형상에서 액상으로 바뀌기 시작함을 보였다. HFIP 에서 블렌드 용액으로부터 전기 방사된 복합 PEU2:8, PEU4:6, PEU6:4, 및 PEU8:2 나노파이버는 각각 ~57 °C, ~57 °C, 58 °C, 및 58 °C의 단일 흡열성 피크를 보였으며, 이들 모두는 순수 PCL 및 dECM의 흡열성 피크와 거의 유사하다. UA의 녹는점에 해당하는 피크는 사라졌으며, 이는 복합 파이버 내에 UA가 극히 적게 존재하기 때문일 것이다. 이러한 결과는 HFIP 내의 모든 복합 PEU 블렌드가 전기방사 단계에서 응고 공정 동안 상 분리가 일어나지 않음을 제시하는 것이다. 종합하면, PEU4:6 및 PEU2:8가 추가적인 dECM 특성을 가지고 있어 상처 치유에 사용될 수 있음이 입증되었다.

[0119] 기계적 특성

[0120] 조직이 재생되기 전에 세포에 기본적인 생물역학적 체력을 공급하는 것이 중요하므로 나노파이버 스캐폴드의 기계적 완전성은 조직 재생에 적용하기 위해 필수적이다. 나노파이버 PCL, PCLU, 및 다른 dECM 함량을 갖는 PEU 스캐폴드의 기계적 특성을 분석하여, 일반적 인장 응력-변형 곡선 (도 2E.a), 인장 강도 (도 2E.b), 최대 중량에서의 변형 (도 2E.c), 및 최대 확장에서의 변형 (도 2E.d)을 플롯팅하였다. 도 2E의 a 및 b는 순수 PCL로 구성된 나노파이버 스캐폴드가 가장 높은 연장성 및 가장 낮은 인장 강도를 갖는다. 반대로, 가장 높은 PCL 조성을 포함하는 PEU 복합 나노파이버 스캐폴드 (PEU8:2)는 가장 높은 인장 강도 (8.2 ± 0.6 MPa) 및 연장성 (1.5 ± 0.1 mm/mm)을 갖는 반면, 뒤이은 복합 나노파이버 PEU 스캐폴드는 dECM 함량의 증가에 따라 8.2 ± 0.6 MPa, 5.5 ± 0.7 MPa, 및 3.7 ± 0.2 MPa의 감소된 평균 인장강도 및 1.2 ± 0.0 mm/mm, 1.1 ± 0.0 mm/mm, 및 0.6 ± 0.1 mm/mm 연장성을 가지며, 이는 dECM이 콜라겐과 유사하게 낮은 기계적 안정성을 가짐을 나타낸다. 가장 높은 dECM 함량을 갖는 스캐폴드 (PEU2:8)는 가장 낮은 기계적 안정성을 가지며, 이는 PEU2:8이 피부 조직 재생에 적합한 기계적 강도를 제공할 수 없음을 나타내는 것이다.

[0122] 물 접촉각

[0123] 복합 나노파이버 스캐폴드의 친수성 성질이 물 흡수에 가장 중요한 특성 중 하나이기 때문에, PCL, PCLU, 및 복합 PEU 나노파이버 스캐폴드의 습윤성을 물 접촉각을 사용하여 확인하였다. 도 3A 및 B는 PCL, PCLU, 및 복합 PEU 나노파이버 스캐폴드의 물 접촉각의 사진 및 시간에 따른 접촉각을 나타낸 것이다. dECM 함량이 증가함에 따라 표면 구조가 변화되었지만, 나노파이버 PEU8:2, PEU6:4, PEU4:6, 및 PEU2:8 스캐폴드는 각각 0초에서 순수 PCL 나노파이버 스캐폴드 ($122.1 \pm 4.1^\circ$)보다 더 낮은 $67.5^\circ \pm 2.9^\circ$, $47.4^\circ \pm 4.0^\circ$, $49.8^\circ \pm 4.5^\circ$, 및 $43.1^\circ \pm 4.1^\circ$ 의 물 접촉각을 보였고, 물 접촉각은 급격히 0으로 감소하였는데, 이는 복합 PEU 나노파이버, 특히 PEU2:8, PEU4:6, 및 PEU6:4이 높은 dECM 함량 및 고도로 상호연결된 기공 구조에 의해 높은 친수성 성질을 가짐을 나타내는 것이다. PEU6:4, PEU4:6, 및 PEU2:8은 또한 PEU8:2보다 더 빠른 물 침투성을 보였으며, 이는 이들이 높은 침윤성을 가짐을 의미하는 것이다.

[0125] 팽윤성

[0126] 조직-공학적 피부 대체재의 팽창 능력은 상처 부위에서 수분이 있는 환경을 제공하는 동안 세포의 이동 및 증식을 자극하는 중요 성분인 삼출물을 흡수하는데 중요하다. PCL, PCLU, 및 모든 PEU 복합 나노파이버 스캐폴드의 팽창 비율을 도 3C, 및 D에 나타냈다. 복합 PEU 나노파이버 스캐폴드는 순수 PCL 및 PCLU 나노파이버 스캐폴드에 비해 더 높은 팽창 비율(300% 이상)을 보였으며, 이는 PEU 복합 스캐폴드가 주로 콜라겐으로 이루어지며 높은 수분 흡수 능력을 갖는 dECM을 포함하기 때문이다. 복합 PEU 스캐폴드의 팽창 거동은 2시간 이내에 거의 정상

상태에 도달했으나, PEU 스캐폴드의 팽창 비율은 dECM 함량이 증가함에 따라 팽창 능력이 증가하는 경향을 보였다. PCLU의 팽창 비율은 2시간 이내에 이른 정상 상태에 도달했으며, 이는 UA가 비수용성 물질이지만 스캐폴드 내에 분포된 UA에 의한 규칙적인 기공 분포 및 물 접촉 특성의 변화에 의한 것으로 보인다. 반대로, PEU 나노파이버 스캐폴드, 특히 PEU4:6 및 PEU2:8는 상대적으로 높은 팽윤성을 가지며 정상 팽창 상태에 일찍 도달하였으며, 이는 주로 dECM 내의 단백질-기반 중합체의 분자 및 구조적 특성에 의한 것이다.

[0128] 인 비트로 분해

[0129] 제조된 나노파이버 스캐폴드는 또한 성공적인 조직 재생을 가능하게 하고 생체 조직을 구조물로 대체할 수 있게 하는 적합한 분해 특성을 가져야 한다. 가중 분석 (도 3E)은 순수 PCL 및 PCLU 나노파이버 스캐폴드가 거의 분해되지 않음을 보였다. 그러나, dECM 함량의 증가에 따라 이들의 분해율이 증가하였다. PEU8:2 나노파이버 스캐폴드는 가장 낮은 분해율($2.3\% \pm 0.8\%$)을 보였으며, PEU2:8은 PEU8:2 스캐폴드보다 10배 이상의 가장 높은 분해율을 보였다; 그러나, PEU6:4 및 PEU4:6는 중간 정도의 분해율을 보였다. 높은 분해율은 비-가교 결합된 dECM의 방출 및 사용된 제한된 가교 결합의 의한 표면 분해에 의한 것이고, 낮은 분해율은 PCL 스캐폴드 내에 더 많이 갇혀있음을 나타내는 것이다.

[0131] 인 비트로 방출 특성

[0132] 도 3F에서 볼 수 있는 바와 같이, PCLU 스캐폴드가 14일째에도 $23.0 \pm 0.7\%$ 에 달하여 가장 낮은 방출 특성을 갖는 것으로 관찰되었으며, 이는 PCL이 밀집된 결정질 구조여서 UA를 견고하게 잡고 있기 때문이다. 그러나, PEU 스캐폴드가 함유하고 있는 dECM의 양 때문에 제어된 방출 거동을 가짐을 발견하였다. PEU 중합체 매트릭스의 분해 및 팽창 능력뿐만 아니라 파이버로부터의 약물 확산도 UA의 방출 메커니즘에 기인한 것이다. 처음에는, UA가 모든 PEU 스캐폴드에서 초기에 방출된 후, 지속적으로 방출되었다. PEU2:8은 가장 높은 초기 방출을 보였으며 (40.7 ± 2.4 on day 1), 이는 PCL 및 dECM 사이의 물리적 상호작용의 느슨해짐 및 dECM의 높은 팽창 및 분해에 기인한 것이다. 반대로, PEU4:6 및 PEU6:4은 14일 동안 더 제어되고 지속적인 방출을 보였으며, 이는 높은 안정성을 갖는 저-분해성 합성-천연 물질의 형성때문이다.

[0134] 항박테리아 및 항진균 활성

[0135] 디스크 확산 검정 결과는 UA-통합 스캐폴드의 존재 하에서 모든 유형의 박테리아 및 진균 병원균이 저해된 클리어 존을 보였으며, 나노파이버 스캐폴드 내의 dECM 함량이 증가할수록 저해 영역의 지름이 증가하였다. 실험한 병원균 중에서, *C. acnes* 및 *S. mutans*가 UA-통합된 PCLU 및 PEU 스캐폴드 둘 다에서 더 큰 저해 영역을 보였으며 (도 4A), 이는 UA가 우수한 항박테리아 활성을 가짐을 나타내는 것이다. *C. acnes*에 대한 저해 영역의 지름은 가장 높은 dECM 농도 (PEU2:8)에서 33.60 ± 1.9 mm인 반면, *S. mutans*은 25.47 ± 0.3 mm이었다. PCL (대조) 및 PCLU (0.3% UA 함유)와 비교했을 때, *C. acnes*에 대한 PEU 2:8 나노파이버 스캐폴드의 저해 영역이 2배 및 3배 더 넓었다. 반대로, PCL (UA를 함유하지 않음)에서는 저해 영역이 관찰되지 않았다. dECM 농도가 증가할수록, *S. epidermidis*, *S. aureus*, 및 *C. albicans*에 대한 나노파이버 스캐폴드의 항균 효과가 증가하였으며, 저해 영역의 지름은 대조 PCL 스캐폴드에 비해 1 내지 3 mm 범위였는데, 이는 UA의 가용성을 증가시킴을 입증하는 것이다. 각 나노파이버 스캐폴드의 저해 영역을 나타내는 아가 플레이트의 대표 사진을 도4A에 나타냈다.

[0136] 병원균에 대한 나노파이버 스캐폴드의 항균 효과를 액상 브로스 배지 및 대표적인 아가 플레이트에서 실험하였으며, 박테리아 및 균주 세포 배양의 출현 및 소실 (도 5A)뿐만 아니라 CFU 수 (도 5B)도 나타냈다. 모든 나노파이버 PEU 스캐폴드는 병원균에 대해 완전한 살균 효과를 보였다. 특히 PCLU도 병원균을 완전히 살균시켰으며, 이는 UA가 유의적으로 방출되지 않더라도 높은 항박테리아 효과를 가짐을 입증하는 것이다. 유사하게, *S. epidermidis* 세포의 완전한 살균도 dECM을 포함하지 않는 나노파이버 스캐폴드를 제외한 모든 유형의 나노파이버 스캐폴드에서 관찰되었다. *S. aureus* 및 *C. albicans* 세포에 대해서는 완전히 살균되지 않았지만, dECM-의존 방식으로 세포들이 상당히 살균되어 0.34 내지 1.1 (*C. albicans*) 및 1.5 내지 2.4 (*S. aureus*)의 log CFU를 보였다.

[0137] 상기 결과에 근거하여, dECM 농도의 증가로 인해 대조군에 비해 병원균에 대한 더 높은 항균 효과를 보이는 것으로 결론내었다. dECM 고함량에 의한 높은 항균 효과는 나노파이버 스캐폴드 내의 dECM 고함량이 증가된 팽창,

표면 침식 및 분해에 의해 수반되는 높은 방출 특성을 야기함을 제시한다. 그러나, PCLU의 항박테리아 효과는 극소량의 방출 및 파이버 분해에도 불구하고 UA의 항박테리아 효과를 명확하게 하는 것이다. 이전 연구들에서 UA-로딩 나노파이버, UA 캡슐화 나노물질 및 하이드로겔이 본 발명과 유사한 항 박테리아 효과를 보임을 나타냈었다.

[0139] 항-생물막 형성

[0140] 의료용 제품을 비롯한 생물/비생물 표면 상에 미생물의 생물막의 형성은 미생물 감염의 주요 원천으로 인간의 건강에 심각한 위협이 되고 있다. 생물막은 자가-생산한 세포외 중합체 물질로 캡슐화된 미생물 세포의 동종 집단으로 만들어졌다. 미생물 생물막은 장벽으로 작용하고 숙주 면역 반응에 대항하여 보호하므로 감염 치료에 큰 장애물 중 하나로, 항균 치료의 실패 요인이 된다. 상처 부위에 발견되는 것과 같은 병원성 미생물에 의한 생물막 형성은 상처 감염 치료 실패의 주요 원인이다. 본 발명에서는 *P. aeruginosa* 및 *K. pneumoniae* (PMID:26500905 및 18158583)와 같은 화상 상처 감염과 관련된 미생물 병원균의 생물막 형성에 대한 PEU 나노파이버 스캐폴드의 저해 능력을 확인하였다. 항균 검정을 통해 나노파이버 스캐폴드가 *C. acnes*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, 및 *S. mutans*에 대해 효과적인 항박테리아 및 항진균 활성을 가짐을 확인하였다. 그러나, 나노파이버 스캐폴드는 *K. pneumoniae* 및 *P. aeruginosa*에 대해서는 항박테리아 효과를 보이지 않았다(도 10). 그러므로, 나노파이버 PEU 스캐폴드의 항-생물막 효능을 시험하기 위해 *K. pneumoniae* 및 *P. aeruginosa* 박테리아 균주만을 사용하였다. 그 결과, 대조 (PCL)에 비해, 모든 유형의 나노파이버 스캐폴드가 항-생물막 특성을 나타냈다(도 6A 및 B). 모든 나노파이버 스캐폴드는 *K. pneumoniae* 및 *P. aeruginosa*에 대해 각각 60%-68% 및 70%-80%의 생물막 저해율을 보였다. 생물막 구조를 SEM을 사용해 실험하여 나노파이버 스캐폴드의 생물막 저해 활성을 확인하였다. SEM 결과는 모든 나노파이버 스캐폴드가 대조 스캐폴드에 비해 표면에 상당히 더 적은 *K. pneumoniae* 및 *P. aeruginosa* 세포가 부착되어 있음을 보였다(도 6C). 그러므로, 상기 결과들로부터 UA-통합 나노파이버 스캐폴드가 인간에게 주로 상처 감염을 일으키는 박테리아 병원균에 대해 항-생물막 특성을 가짐을 확인할 수 있었다.

[0142] 인 비트로 생체적합성

[0143] 나노파이버 스캐폴드 상에서 시간의 함수로서 세포 생존성 및 증식은 조직 공학 적용을 위한 스캐폴드의 세포 양립성 및 적합성의 지표이다. MTT 분석을 통해 나노파이버 스캐폴드가 조직 공학에 적용되기 위한 기본적인 세포양립성 필요조건을 충족하는지를 확인하였다. 순수 PCL, PCLU, 및 복합 PEU 나노파이버 상에서 배양 후 1일 및 5일에 FDF 및 HaCaT 세포의 부착 및 증식을 각각 도 7A 및 B에 나타냈다. 1일에, 복합 나노파이버 PEU 스캐폴드는 조직 배양 플레이트 (TCP) 및 순수 PCL 및 PCLU 나노파이버 스캐폴드 보다 더 많은 세포수를 보였으며, 이는 dECM-통합 스캐폴드가 세포 부착 및 상장에 천연 ECM-유사 구조 및 특성을 제공하고 있음을 나타낸다. 이는 dECM의 구조 단백질에 존재하는 세포 부착 모티프가 세포-ECM 및 세포-세포 상호작용을 촉진하기 때문이다. PCLU 또한 PCL 보다 조금 더 많은 세포수를 보였는데, 이는 UA의 존재에 의해 달성된 증가된 습윤성(도 3) 및 생물학적 특성에 의한 것일 수 있다. UA가 배양 배지 안에서 즉시 날카로운 결정을 형성하여 세포 손상을 일으키기 때문에 UA 단독으로는 세포에 매우 독성을 나타내지만, 중합체 물질과 통합될 경우 독성을 나타내지 않게 되었다. 5일에는, 복합 PEU 스캐폴드의 dECM 조성이 증가함에 따라, 세포 증식도 상당히 증가하였으며, 이는 dECM 함량의 증가가 인테그린 수용체 및 다른 물리학적 및 생화학적 신호의 가능성을 증가시켜 세포 부착을 촉진하고, 세포의 생존, 증식, 및 이동을 야기하는 세포 내의 생물학적 시그널 및 세포-세포, 세포- dECM, 및 세포-수용성 분자 상호작용을 활성화하고, UA의 가용성을 증가시켰기 때문이다.

[0144] 스캐폴드의 생체적합성을 생세포/죽은 세포 표지를 위해 FDA 및 PI 염색을 사용하여 추가 평가하였다. 도 7C는 1일 및 5일에 나노파이버 스캐폴드 상에서 배양된 세포의 현미경 이미지를 나타낸 것이다. HDF 및 HaCaT 세포를 분주하고 하루 뒤에, 모든 나노파이버 스캐폴드의 표면 전체에 세포가 부착하고 확산되었으나, PCL에서는 PEU에 비해 적은 수의 세포가 부착되었다. PEU 스캐폴드 상의 세포수는 dECM 함량의 증가에 따라 증가하였다. dECM-함유 스캐폴드 상의 증가된 세포수는 MTT 분석 결과와 일치하는 것으로, dECM이 세포 부착을 촉진함을 입증한다. 5일 후에는, 생세포 밀도가 증가하였으나, PEU 스캐폴드에서 dECM 함량에 따른 죽은 세포의 수는 미미하였으며, 이는 나노파이버 스캐폴드가 세포에 독성을 보이지 않고 인테그린 수용체 및 콜라겐과 같은 dECM의 성분에 의해 제공되는 다양한 물리적 및 생물학적 신호에 의해 세포 증식 및 이동이 촉진됨을 나타낸다. 게다가, PCLU 나노파이버는 PCL 나노파이버에 비해 더 많은 세포 성장 및 증식을 보이고 있으며, 이는 UA가 세포 증식을 촉진함을

나타내는 것이다.

[0146] 상처 봉합의 육안적 관찰

[0147] 도 8A 및 B는 0, 7, 14, 및 21일에 여러 그룹 (즉, 비처리, 순수 PCL, PCLU, PE4:6, 및 PEU4:6 나노파이버 스캐폴드)에서 절개 후 전체-두께 상처 부위의 이미지 및 분석을 나타낸 것이다. 동물이 조직학적 평가를 위해 희생되기 전까지 수술 후 부작용이나 합병증을 보이거나 죽은 경우는 없었다. 나노파이버 처리 여부와 상관없이, 모든 상처는 단계적으로 수축하였으며 수술 후 21일 이내에 완전히 회복되었으나, 대조군은 시간이 지나도 더 넓은 흉터가 생겼다. PE4:6 및 PEU4:6이 처리된 상처는 다른 대체물로 처리된 상처보다 더 빨리 봉합되었으며, PEU4:6가 처리된 상처는 가장 빠른 상처 봉합을 보였다. 대조군에 비해($60.8\% \pm 10.0\%$, $19.8\% \pm 1.70\%$, 및 $9.9\% \pm 5.0\%$), 7, 14, 및 21일에 PEU4:6-처리군의 상처 영역은 $42.1\% \pm 13.8\%$, $7.2\% \pm 3.4\%$, 및 $1.3\% \pm 1.0\%$ 감소하였으며 PE4:6-처리군에서는 $51.3\% \pm 8.2\%$, $11.6\% \pm 1.4\%$, 및 $2.7\% \pm 2.0\%$ 감소하였다. PCLU가 처리된 상처 또한 빠르게 회복되었으나, 다만 PE4:6-처리군 및 PEU4:6-처리군보다는 느렸지만 순수 PCL처리군보다는 빨랐다. UA-통합 나노파이버 및 비통합 나노파이버를 비교했을 때, PEU4:6 나노파이버가 더 빠른 상처 봉합을 보였으며, 이는 UA가 뛰어난 생물학적 활성 및 항균 및 상처 회복 특성을 갖는 해양-유래 화합물로서 상처 회복을 증가시킴을 나타낸다. 이러한 발견들에 따라, 직접 국소 투여 및 다른 기술을 통한 투여도 상처 회복을 가속화시킬 수 있다. 또한, dECM-통합 PE4:6 그룹이 대조 및 PCL-처리군에 비해 상당히 빠른 상처 봉합을 보였다. 이는 피부 유래 dECM이 세포 부착, 증식, 분화, 및 이동과 같은 세포 기능을 증가시키고 정확하게 조절하는 콜라겐, 라미닌 및 피브로넥틴과 같은 단백질뿐만 아니라 클리코사미놀글리칸과 같은 다당류의 복합 원천이기 때문이다. 종합하면, 이러한 결과들은 나노파이버 스캐폴드 내의 dECM이 상처 조직 재생에 유용하고 UA가 상처 회복을 가속화시키도록 지지함을 입증한다.

[0149] 조직학적 분석

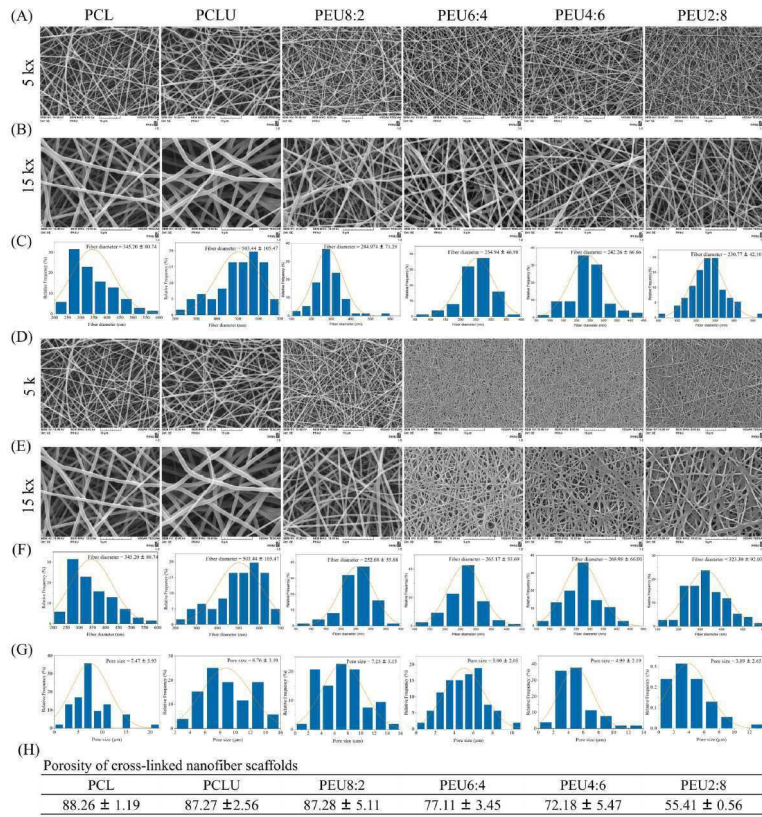
[0150] 피부 조직 재생에서의 복합 나노파이버 스캐폴드의 영향력을 확인하기, 헤마톡실린 및 에오신 (H&E) 염색으로 상처를 염색한 후 21일째에 상처 부위의 중앙의 조직형태학 시험을 실시하였다 (도 8C). 대조군을 비롯한 모든 그룹은 다양한 정도의 잔여 흉터 및 개조된 조직을 갖기는 하지만 완전히 재-상피화되었다. 대조군의 상피화는 손상 후 21일에 거의 완료되었지만 ($20.00 \pm 2.94 \mu\text{m}$ 두께), 처리군에 비해 흉터 조직이 얇고 ($0.33 \pm 0.05 \text{ mm}$ 두께) 넓었다 ($3.45 \pm 0.25 \text{ mm}$ 의 너비) (도 8E). PEU4:6로 처리된 상처는 대조군 및 다른 처리군에 비해 더 빠른 흉터 조직 형성 및 과립화 조직 성숙을 보였다. 게다가, 대조, PCL, 및 PCLU 그룹에 비해, PE4:6 그룹에서는 좁은 흉터 조직 ($1.39 \pm 0.44 \text{ mm}$ 너비), 명확히 보이는 각질층을 갖는 전체 재-상피화, 과립층, 및 흉터 주위의 개조된 조직에서 유극층을 수반한 주목할만한 상처 회복을 보였다. 다른 그룹과는 반대로, PEU4:6 그룹은 좁은 흉터 ($1.10 \pm 0.24 \text{ mm}$ 너비) (도 8E), 및 밀집된 피지샘, 땀샘 및 모낭을 갖는 완전히 분화된 밀집된 피부를 보였으며, 이는 빠른 회복을 의미하는 것이다. 이러한 결과는 UA-통합 PE4:6 나노파이버 스캐폴드 (PEU4:6)가 상처 회복 과정을 뒷받침하고 흉터 형성을 예방하면서 회복 시간을 최소화함을 나타내는 것이다.

[0151] 또한, 도8D는 각 그룹의 Masson's trichrome-염색 조직의 현미경 사진을 나타낸 것이다. 손상 후 21일째에, 대조군의 흉터 조직 상의 콜라겐 증착은 적고 얇았다. 그러나, 모든 나노파이버-처리군은 비교적 밀집된 콜라겐 증착 및 두꺼운 과도형 콜라겐 파이버를 보였다. 다양한 그룹 중에서, PEU4:6 그룹은 가장 높은 밀도의 과도형 콜라겐의 콜라겐 증착을 보였다. 이러한 발견은 H&E 염색 결과와 유사한 것으로, PEU4:6-처리군이 빠른 상처 회복 능력을 가지며 PEU4:6가 상처 회복 과정을 가속화시킴을 나타내는 것이다.

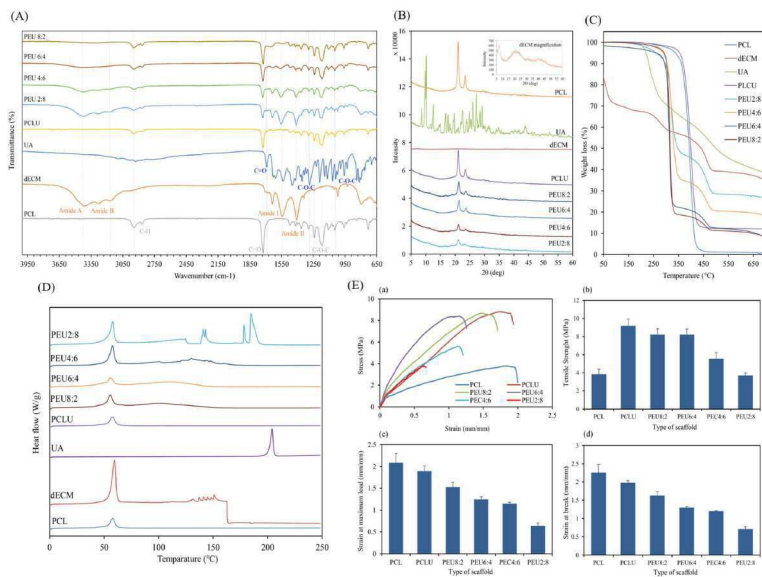
[0153] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

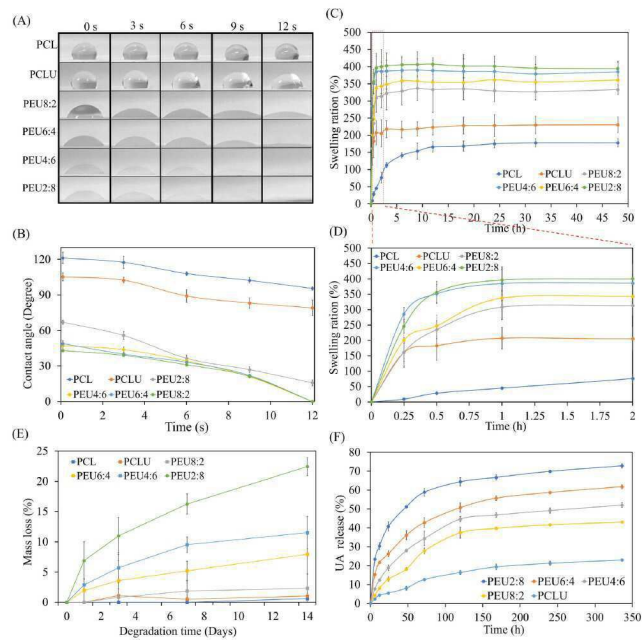
도면1



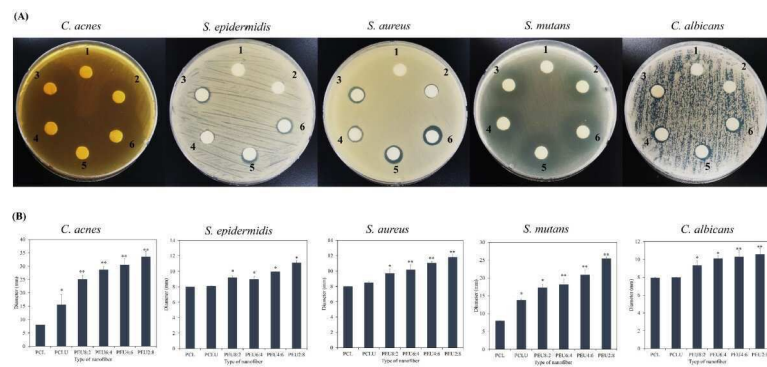
도면2



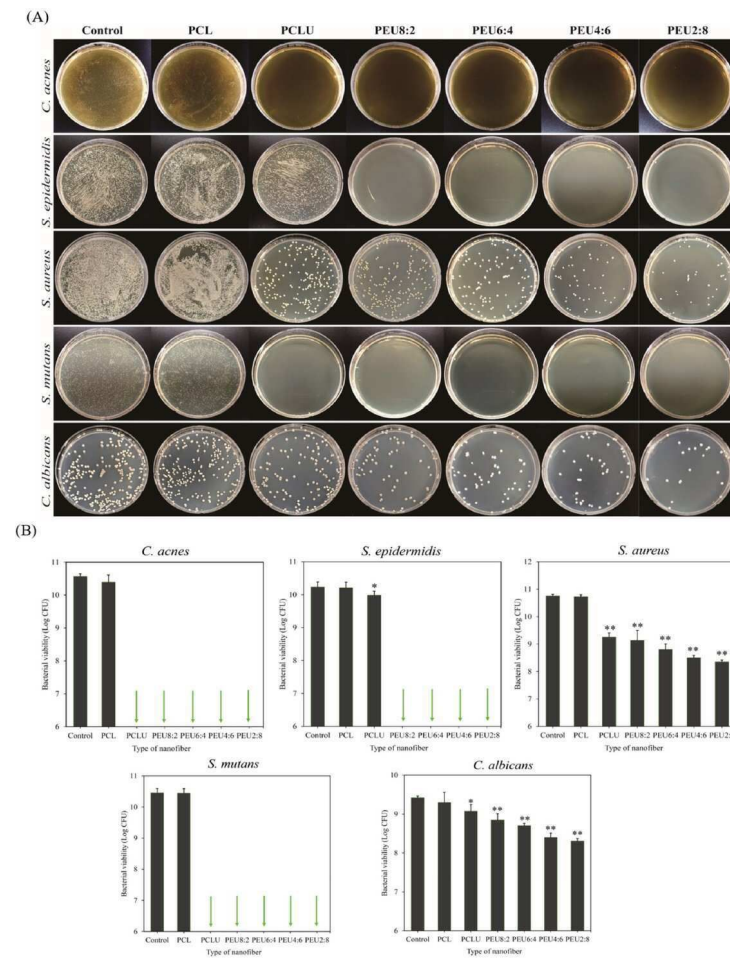
도면3



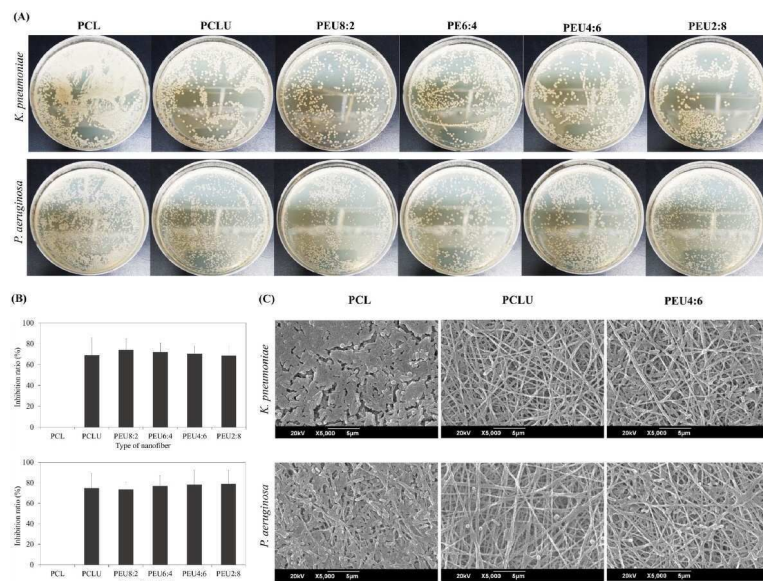
도면4



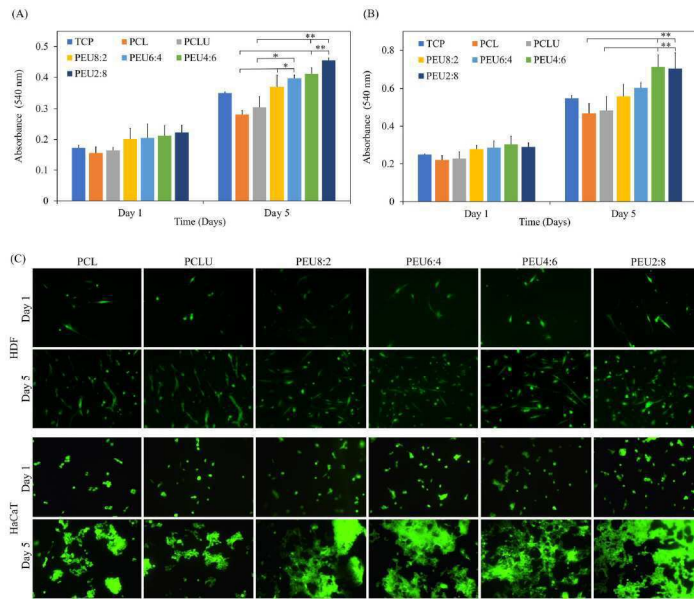
도면5



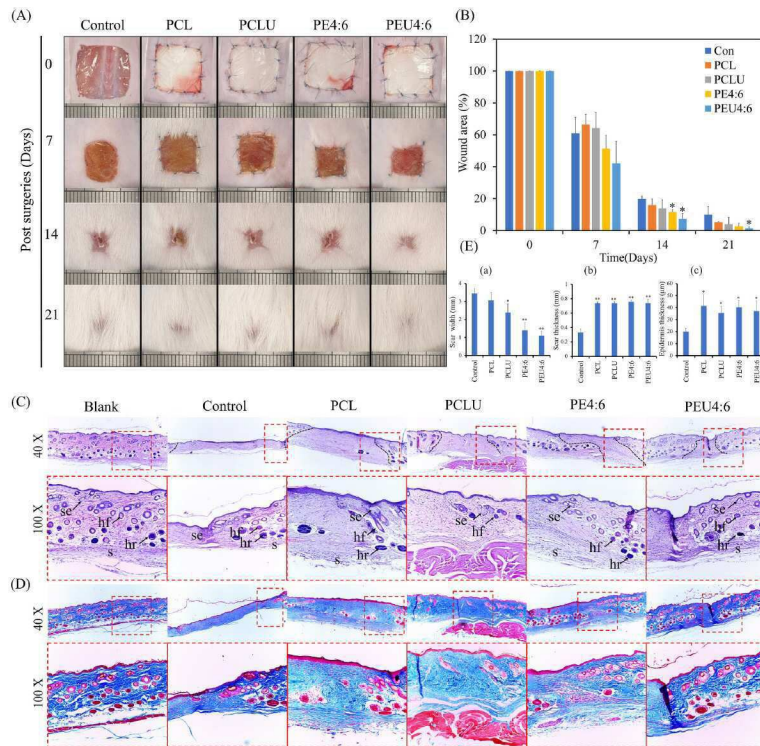
도면6



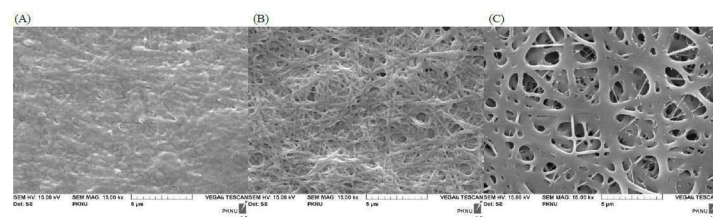
도면7



도면8



도면9



도면10

