



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0043187  
(43) 공개일자 2024년04월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 9/70 (2006.01) A61K 31/12 (2006.01)  
A61K 41/00 (2020.01) A61K 47/34 (2017.01)  
A61P 31/04 (2006.01) D01D 5/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류  
A61K 9/70 (2021.05)  
A61K 31/12 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0121579  
(22) 출원일자 2022년09월26일  
심사청구일자 2022년09월26일

(71) 출원인  
강원대학교산학협력단  
강원도 춘천시 강원대학길 1 (효자동)

(72) 발명자  
임기택  
강원도 춘천시 후석로 325 춘천포스코더샵아파트 112동 2308호

뎀 두타 사안  
강원도 춘천시 강원대학길 1 강원대학교 농업생명과학대학 1호관 307동 206호

테갈 브이. 파틸  
강원특별자치도 춘천시 강원대학길 1, 농업생명과학대학 1호관 307동 206호 (효자동)

(74) 대리인  
구현서

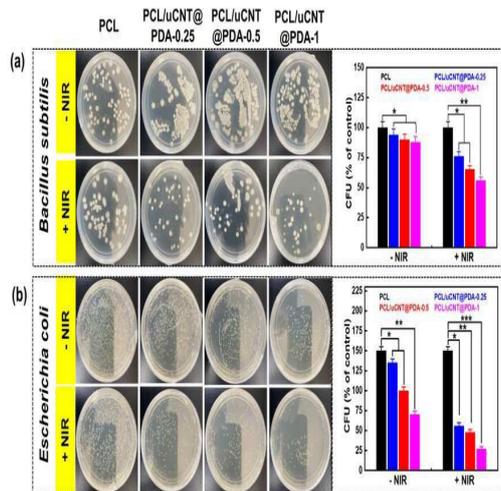
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 폴리도파민을 가지는 압축해제된 탄소나노튜브 및 폴리카프로락톤을 포함하는 나노섬유 및 그 응용

(57) 요약

본 발명은 폴리도파민을 가지는 압축해제된 탄소나노튜브를 폴리카프로락톤에 가하여 제조된 나노섬유 및 그 나노섬유의 상세한 특성, 형태학적 조사 및 항균 특성에 관한 것으로 본 발명의 나노 섬유는 낮은 전력 밀도에서 우수한 광열 특성을 나타내고, 근적외선이 없을 때 ROS 소거 활성과 근적외선이 있을 때 자유 라디칼 생성을 나타내고, 항균 활성을 가지고 있어서, 박테리아 감염 상처 치유 및 생체의학 용도로 활용될 수 있다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

A61K 41/0052 (2013.01)

A61K 47/34 (2013.01)

A61P 31/04 (2018.01)

D01D 5/003 (2013.01)

D10B 2401/13 (2013.01)

D10B 2509/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345306818
과제번호	2019R1D1A3A03103828
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	지역대학우수과학자지원사업(후속연구지원)
연구과제명	줄기세포 다분화 증진용 3D 나노하이브리드-멀티채널 자동화 바이오리액터 기술개발
기여율	50/100
과제수행기관명	강원대학교 산학협력단
연구기간	2019.11.01 ~ 2022.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345280875
과제번호	2018R1A6A1A03025582
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공분야 대학중점연구소지원사업
연구과제명	강원지역 산림바이오매스 유래 '나노셀룰로오스 융복합 응용연구 허브' 구축
기여율	5/100
과제수행기관명	강원대학교 산림과학연구소
연구기간	2018.06.01 ~ 2027.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345354507
과제번호	2022R1I1A3063302
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	지역대학우수과학자지원사업
연구과제명	미세진류 자극을 이용한 조직공학용 3D 프린팅 전도성 하이드로겔 패치 개발
기여율	45/100
과제수행기관명	강원대학교 산학협력단
연구기간	2022.06.01 ~ 2023.02.28

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

폴리도파민을 가지는 압축해제된 탄소나노튜브를 폴리카프로락톤에 가하여 제조된 나노섬유.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 폴리도파민을 가지는 압축해제된 탄소나노튜브는 0.25% 내지 1% w/v 첨가된 것으로 하는 나노섬유.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 나노섬유는 전기방사를 통해서 얻어진 것을 특징으로 하는 나노섬유.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 나노섬유는 항산화 활성을 가지는 것을 특징으로 하는 나노섬유.

#### 청구항 5

제4항에 있어서, 상기 나노섬유에서 상기 폴리도파민을 가지는 압축해제된 탄소나노튜브는 0.5% 내지 1% w/v 첨가된 것을 특징으로 하는 나노섬유.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 상기 나노섬유는 근적외선 처리시에 광열 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 나노섬유.

#### 청구항 7

제6항에 있어서, 상기 나노섬유에서 상기 폴리도파민을 가지는 압축해제된 탄소나노튜브는 0.25% 내지 1% w/v 첨가된 것을 특징으로 하는 나노섬유.

#### 청구항 8

제1항에 있어서, 상기 나노섬유는 항균 활성을 가지는 것을 특징으로 하는 나노섬유.

#### 청구항 9

제8항에 있어서, 상기 나노섬유에서 상기 폴리도파민을 가지는 압축해제된 탄소나노튜브는 0.25% 내지 1% w/v 첨가된 것을 특징으로 하는 나노섬유.

#### 청구항 10

제1항의 나노섬유에 근적외선 처리하여 상기 나노섬유의 항균 활성을 증가시키는 방법.

#### 청구항 11

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 나노섬유는 약물을 담지하는 것을 특징으로 하는 나노섬유.

#### 청구항 12

제1항의 나노섬유에 근적외선 처리하여 상기 나노섬유로부터 반응성 산소 래디칼을 생성시키는 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

본 발명은 약물 담지가 가능한 CNT/PDA 나노섬유 지지체 및 그 응용에 관한 것으로 더욱 상세하게는 상처 치유

를 위한 향상된 IR 유발 살균 효능 및 조정 가능한 기계적 특성을 가지는 커큐민 방출 생리활성 전기방사 압축되지 않은 CNT/PDA 나노섬유에 관한 것이다.

**배경 기술**

- [0002] 박테리아는 어떤 환경에서도 적응하고 번식하는 능력으로 잘 알려져 있다. 그들은 오염된 물, 먹을 수 있는 물, 건, 의약품 등을 통해 체내에 들어와 심각한 감염을 일으킬 수 있다. 세균 감염을 근절하기 위해서는 보다 효과적이고 안전한 치료법이 개발되어 실제 적용되어야 한다.
- [0003] 지난 몇 년 동안 근적외선(NIR) 광 유도 광열 및 항균 활성에 대한 ROS 생성 효과가 유망한 전략으로 인식되었다. 이러한 광열 물질은 적절한 파장의 빛에 노출되면 여기되어 격자에 진동을 생성하여 열을 생성한다. 생성된 열은 세균막과 단백질 구조를 파열시킬 수 있다. 지금까지 근적외선 반응 물질을 합성하고 항균 및 광촉매 물질 합성, 약물 전달, 암 치료, 바이오이미징, 형상 기억 고분자 합성 및 4D 프린팅에서의 응용을 결정하기 위해 상당한 노력을 기울였다.
- [0004] 그러나 인간 세포를 NIR 반응성 물질로 처리할 때 고려해야 할 중요한 예방 조치는 전력 밀도가 인간 세포에 해를 끼치지 않아야 한다는 것이다. NIR 광선(NIR-I, 650-950 nm; NIR-II, 1000-1700 nm)은 조직 침투 깊이가 높고 유기체의 혈액 및 체수분에서 낮은 흡수를 나타낸다. 또 감광성 물질이 특정 파장의 빛에 노출되면 이러한 물질이 많은 수의 전자-정공 쌍을 생성하여 수산화 라디칼( $\cdot\text{OH}$ ), 일중항 산소( $^1\text{O}_2$ ) 또는 슈퍼옥사이드 라디칼( $\cdot\text{O}_2^-$ )을 생성할 수 있고, 이것은 대사 경로를 방해하여 박테리아를 효과적으로 죽일 수 있다. 열 생산 및 ROS 생성과 같은 여러 박테리아 사멸 전략의 통합은 여러 면에서 유익한 것으로 간주되었다. 이러한 메커니즘은 살균 효율성을 개선하고 박테리아를 죽이는 데 필요한 시간과 항균제의 반복 투여 필요성을 줄일 수 있다.
- [0005] 최근에는 Au NBPs@SiO<sub>2</sub>, MoS<sub>2</sub>-PEI, Au@Ag NPs, TiO<sub>2</sub>-FeS<sub>2</sub>를 포함한 일부 복합 구조가 제작되어 이들의 NIR 반응성 및 항균 활성이 연구되고 있다. 그럼에도 불구하고, 이러한 고가의 금속계 재료는 고가의 금속 사용으로 인한 환경 문제와 높은 비용으로 인해 제한적인 장점이 있다. 또한 귀금속과 귀금속은 제한된 가용성으로 인해 값이 비싸다.
- [0006] 한편 약물인 커큐민은 매우 효과적인 자연 유래 화합물이다. 그러나 수용성이 약하고 생체이용률이 낮아 더 많은 응용이 제한될 수 있다. 따라서 효율적인 약물 전달 운반체는 커큐민 전달을 위해 설계해야 한다.
- [0007] [선행 특허 문헌]
- [0008] 대한민국 특허공개번호 10-2015-0071965

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0009] 본 발명은 상기의 문제점을 해결하고, 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 NIR 광 반응성 재료를 제조하고, 그것의 항균 및 약물 전달 응용 분야에 대한 잠재력을 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

- [0010] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 폴리도파민을 가지는 압축해제된 탄소나노튜브를 폴리카프로락톤에 가하여 제조된 나노섬유를 제공한다.
- [0011] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 폴리도파민을 가지는 압축해제된 탄소나노튜브는 0.25% 내지 1% w/v 첨가된 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0012] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 나노섬유는 전기방사를 통해서 얻어진 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 나노섬유는 항산화 활성을 가지는 것이 바람직하고, 상기 나노섬유에서 상기 폴리도파민을 가지는 압축해제된 탄소나노튜브는 0.5% 내지 1% w/v 첨가된 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 나노섬유는 근적외선 처리시에 광열 효과를 나타내는 것이 바람직하

고, 상기 나노섬유에서 상기 폴리도파민을 가지는 압축해제된 탄소나노튜브는 0.25% 내지 1% w/v 첨가된 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

- [0015] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 나노섬유는 평균 활성을 가지는 것이 바람직하고, 상기 나노섬유에서 상기 폴리도파민을 가지는 압축해제된 탄소나노튜브는 0.5% 내지 1% w/v 첨가된 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0016] 또 본 발명은 본 발명의 나노섬유에 근적외선 처리하여 상기 나노섬유의 평균 활성을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [0017] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 나노섬유는 약물을 담지하는 것을 특징으로 하고, 상기 약물은 커큐민인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0018] 또 본 발명은 본 발명의 나노섬유에 근적외선 처리하여 상기 나노섬유로부터 반응성 산소 래디칼을 생성시키는 방법을 제공한다.
- [0019] 이하 본 발명을 설명한다.
- [0020] 본 발명은 NIR 광 반응성 재료를 만들고 항균 및 약물 전달 응용 분야에 대한 잠재력을 분석하는 데 중점을 두었다(도 1).
- [0021] 본 발명의 개발된 하이브리드 PCL/uCNT@PDA 나노섬유는 나노섬유의 약물 방출 거동을 이해하기 위해 커큐민 약물과 함께 성공적으로 설계되었다. 하이브리드 물질은 근적외선의 존재 및 부재하에서 커큐민의 지속 방출에 가장 적합한 시스템이었다. 또한, PCL/uCNT@PDA 나노섬유의 상세한 특성, 형태학적 조사 및 항균 특성을 광범위하게 조사하였다. 또한, 인간 진피 섬유아세포(HDF)를 모델 세포주로 선택하여 나노섬유의 세포독성을 조사하여 제조된 나노섬유의 생물 의학 분야의 잠재력을 탐구했다.
- [0022] 현재, 세균 감염으로부터 상처를 효과적으로 보호하는 것은 다제내성 세균 표현형의 증가로 인해 잠재적인 위협으로 간주된다. 따라서 박테리아 감염 상처의 체계적인 치유를 위한 대체 전략을 개발하는 것이 시급하다. 이와 관련하여 근적외선(NIR) 반응성 광열 작용제(PTA)가 과학계에서 상당한 관심을 받았다. 그러나 성공적인 임상 적용을 위해서는 생체 적합성이 높은 효과적인 PTA를 개발하는 것이 바람직하다.
- [0023] 본 발명에서 우리는 박테리아와 싸우기 위해 홍합에서 영감을 얻은 NIR 반응 압축되지 않은 CNT(uCNT) 기반 나노복합체를 보고한다. 홍합에서 영감을 얻은 폴리도파민(PDA) 코팅의 변형은 uCNT의 NIR 반응성과 생체 적합성을 개선했다. 808 nm NIR 광 조사에서 친환경 합성 uCNT@PDA는 우수한 광열 특성과 강한 분산 안정성을 나타냈다. uCNT@PDA(250 µg/ml)의 온도는 808nm NIR 광(1.0W/cm<sup>2</sup>, 10분) 노출 시 28° C에서 68° C로 증가했다.
- [0024] 제작된 uCNT@PDA를 폴리카프로락톤(PCL)으로 전기방사하여 PCL/uCNT@PDA 나노섬유를 형성하였다. 나노섬유 매트 는 낮은 전력 밀도(0.5 W/cm<sup>2</sup>) NIR 조사에서 제어된 광열 가열을 보여주었으며 최대 20 MPa(PCL/uCNT@PDA-1)까지 강력한 기계적 강도를 나타냈다. 전자 스핀 공명(ESR) 분광법 측정은 NIR 조사 시 라디칼 생성의 향상을 보여주었다. 또한, 광열 효과 및 ROS 생성을 이용하여 나노섬유는 Bacillus subtilis(그람 양성) 및 대장균(그람 음성)에 대해 현저한 항균 효능을 나타내었고 NIR 빛의 존재하에 나노섬유 매트에서 curcumin의 제어된 방출을 나타냈다.
- [0025] 본 발명의 제작된 PCL/uCNT@PDA 매트는 인간 진피 섬유아세포에 대해 생리활성, 항산화 및 무독성이다. 따라서 우리는 개발된 uCNT@PDA가 잠재적인 PTA이고 PCL/uCNT@PDA의 조합이 상처 베드에서 박테리아 오염을 근절하기 위한 다목적 플랫폼을 제공할 수 있고 피부 재생을 위한 이상적인 상처 드레싱 재료로 사용될 수 있을 것으로 기대한다.
- [0026] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0027] uCNT 및 uCNT@PDA의 특성화
- [0028] uCNT@PDA의 합성은 도 2(a)에 개략적으로 나와 있다.
- [0029] uCNT는 원 포트 합성 방식을 사용하여 MWCNT에서 성공적으로 합성되었다. 특성화 기술을 사용하여 합성을 확인했다. 도 2(b)는 MWCNT, uCNT 및 uCNT@PDA의 TEM 이미지를 보여준다. 긴 온전한 로드(rod)를 가진 특징적인 속이 빈 MWCNT 튜브가 관찰되었다.

[0030] MWCNT의 벽은 uCNT를 얻기 위해 산화에 의한 압축 해제 처리 후에 열렸다. 그러나 얻어진 TEM 결과는 합성된 uCNT가 높은 중형비를 가지고 있음을 보여주며, 이는 생물학적 응용에서 매우 중요한 특성으로 여겨진다. PDA로 변형된 uCNT의 TEM 이미지의 변화는 uCNT 구조에 PDA 코팅이 증착되었음을 나타낸다. MWCNT, uCNT 및 uCNT@PDA의 형태는 SEM(도 2(c)) 분석을 사용하여 확인되었으며, 여기서 MWCNT가 uCNT로 절단되는 것이 명확하게 관찰되었다. uCNT의 무작위 도메인이 명확하게 관찰되었으며, 이는 MWCNT의 성공적인 압축 해제에 대한 강력한 증거이다.

[0031] uCNT@PDA의 SEM 이미지에서 유기 부분의 응집이 분명했다. PDA 분자는 uCNT 표면에 균일하게 분산되고 집중되었다. EDS 매핑 분석을 사용하여 원소 분산을 얻었으며(도 2(d)), 모든 산소 모이어티가 표면에 유의하게 위치하고 잘 분산된 것으로 관찰되었다. EDS 매핑의 합 스펙트럼은 표 1에 나와 있다. 그러나 EDS 매핑 이미지에서는 C, N 및 O의 분산도 관찰되었다. 이것은 uCNT의 개선된 옥시-작용기가 uCNT 표면에서 PDA의 성공적인 제조에 유리함을 나타낸다.

표 1

[0032]

Map Sum Spectrum					
Element	Line Type	Apparent Concentration	Wt%	Wt% Sigma	Atomic %
C	K series	170.47	82.52	0.11	86.20
N	K series	9.59	3.28	0.11	2.94
O	K series	36.69	13.50	0.05	10.59
S	K series	1.51	0.70	0.03	0.27
Total:			100.00		100.00

[0033] 표 1은 EDS mapping of uCNT@PDA 물질의 EDS 맵핑

[0035] FTIR 및 라만 분석 결과는 MWCNT가 uCNT로 성공적으로 절단되었다는 강력한 증거를 제공했다. 도 2(e, f)에 제시된 FTIR 및 라만 분석에 따르면, uCNT는 여러 위치에서 절단 후 형성되었으며, 이는 원하는 화학 조성 변화를 일으킬 수 있다.

[0036] 원소 조성은 원소 분석을 통해 확인되었으며, 산소 밀도가 개선된 것으로 확인되었으며, 이는 의심할 여지 없이 압축 해제 과정 후에 더 많은 옥시 작용기가 생성되었음을 나타낼 수 있다. 원소 분석 결과는 표 2에 나와 있다. 개선된 산소 모이어티는 제타 전위를 향상시킬 수 있는 산소 라디칼 및 전하의 형성을 담당했다. uCNT의 FTIR 스펙트럼에서 3408  $\text{cm}^{-1}$ (-OH), 1706  $\text{cm}^{-1}$ (-C=O), 1015  $\text{cm}^{-1}$ (C-O-C)의 진동 대역이 관찰된 반면, -OH의 진동 대역은 그룹은 uCNT@PDA의 스펙트럼에서 거의 사라졌다. 1621  $\text{cm}^{-1}$  및 1500  $\text{cm}^{-1}$ 에서 새로운 강렬한 피크가 나타났는데, 이는 페닐 그룹의 특성 흡수에 기인한다. 이는 uCNT 표면에 PDA가 존재함을 명확히 나타내며, 이러한 PDA 구조는 uCNT의 수산기와 결합되어 있다.

[0037]

표 2

[0038]

Material	EA		N2 adsorption	
	C (%)	O (%)	BET <sup>S/A</sup> (m <sup>2</sup> /g)	Pore diameter (nm)
MWCNT	96.3	1.83	186.3	7.9
uCNT	94.9	3.1	174.9	9.98
uCNT@PDA	97.1	1.49	169.3	6.83

[0039] 표 2는 원소 분석 및 N2 흡착 분석 결과

[0040] # EA를 수행하여 압축해제 후 산소밀도의 개선을 체크함(H(%)=C+O)

- [0041] # BETS/A(표면적) 및 N2 수착 분석을 통해 측정된 기공 직경 측정
- [0043] 모든 대표적인 진동 대역이 확인되었으며 보고된 FTIR 피크 값과 잘 일치했다. 1288  $\text{cm}^{-1}$  및 1382  $\text{cm}^{-1}$ 의 다른 대표적인 피크는 각각 PDA 카테콜 그룹의  $\text{CH}_2$  및 OH의 가위질에 할당되었다. 이러한 피크는 쉽게 볼 수 없었으며 이는 IR 광선에 대한 흑색 물질의 약한 반응으로 인해 발생할 수 있다. FTIR 분석 결과는 uCNT 및 uCNT@PDA의 성공적인 합성을 확인하기 위한 재생 가능한 정보를 제공한다.
- [0044] 라만 분광법은 탄소질 물질을 특성화하는 데 매우 중요한 기술이다.
- [0045] MWCNT, uCNT 및 uCNT@PDA의 라만 스펙트럼은 도 2(f)에 나와 있다. 본 발명에서는 1000 $\text{cm}^{-1}$ 에서 1700 $\text{cm}^{-1}$  사이의 영역에서 두 개의 대표적인 피크가 명확하게 관찰되었다. 1348 $\text{cm}^{-1}$ 의 피크는  $\text{sp}^3$  탄소 원자의 무질서한 경계 때문에 D-band에 대한 것이고 1598 $\text{cm}^{-1}$  부근의 Raman 피크는 G-band에 대한 것으로 방향족 구조의  $\text{sp}^2$  혼성화 탄소 원자의 라만 활성 진동 때문이다.
- [0046] 일반적으로 D-밴드와 G-밴드의 강도 비율은 흡착제의 탄소 함유 결함 정도를 평가하는 데 사용할 수 있다. D- 및 G-밴드의 강도 비율( $I_D/I_G$ ) MWCNT, uCNT, uCP에 대해 G-band를 계산하였고, 대표적인  $I_D/I_G$  값은 각각 1.08, 1.25, 1.004였다. uCNT의  $I_D/I_G$  비율은 성공적인 unzipping 과정으로 인한 uCNT 표면의 화학적 및 구조적 변형으로 인해 MWCNT보다 높았다. 또한, MWCNT, uCNT, uCNT@PDA의 라만 스펙트럼에서 2D 피크가 관찰되었는데, 이는 약 2670  $\text{cm}^{-1}$ 에서 D-band 피크의 배음(overtone)에 기인한다. 이 대표적인 피크는 탄소 재료의 이중 공명 전이에 기인하며 결함이 있는 경우에만 라만 활성인 표면 개질이다. 이 대표적인 피크는 라만 스펙트럼에서 매우 강한 것으로 관찰되었다. MWCNT 및 uCNT@PDA의 라만 스펙트럼에서 훨씬 덜 강렬한 반면, 표면에 이중 작용기 형성의 명확한 표시인 uCNT. 라만 분석 결과는 FTIR 결과와 유사했다.
- [0047] 또한, 넓고 강렬한 D-밴드 밴드는 샘플에 비정질 물질이 있음을 나타낸다. 이러한 결과는 XRD 패턴에서 넓은 피크의 존재와 일치했다. 각 스펙트럼의 라만 피크는 매우 넓고 압축을 풀고 PDA를 제작한 후 좁아졌다. 이러한 결과는 uCNT@PDA 및 uCNT에 대한 넓은 XRD 피크가 XRD 패턴에서 명확하게 관찰된 XRD 결과(도 2(g))의 결과와 일치했다. 따라서 이것은 합성 물질의 비정질 특성을 확인하는 증거를 제공했다.
- [0048] 전하 정보는 제타 전위 분석을 사용하여 얻었다(도 2(h)). 여기에서 uCNT의 전하는 표면에 다양한 카르복실산 작용기가 형성되기 때문에 양으로 대전된 MWCNT에서 매우 음으로 변했다. 도파민은  $\pi$ - $\pi$  적층을 통해 CNT의 측면과 강한 상호 작용을 하는 것으로 잘 알려져 있으며, 이는 알칼리 조건에서 도파민의 자발적인 자체 중합에 매우 유용하다. uCNT와 uCNT@PDA가 MWCNT보다 물에서 더 나은 분산을 보였다는 점에 주목하는 것이 중요하다. 특히, uCNT 표면에 농축된 PDA의 균일한 분산은 재료의 추가 적용성에 필요한 원하는 특성을 향상시키는 데 도움이 된다. 특성화 결과를 기반으로 uCNT 및 uCNT@PDA의 합성이 성공적으로 결정되었다.
- [0049] 나노섬유의 특성화
- [0050] uCNT@PDA(0.25, 0.5, 1%)를 PCL 용액에 첨가하여 전기방사에 의해 나노섬유 매트를 제조하였다. 표면 형태는 SEM 분석을 사용하여 관찰되었으며, 나노섬유의 직경은 Murphy et al.에 의해 보고(Murphy, R.; Turcott, A.; Banuelos, L.; Dowey, E.; Goodwin, B.; Cardinal, K. O. H., SIMPoly: A Matlab-Based Image Analysis Tool to Measure Electrospun Polymer Scaffold Fiber Diameter. *Tissue Eng Part C Methods* **2020**, *26* (12), 628-636)된 알고리즘을 사용하여 계산되었다.
- [0051] 그 결과를 도 3(a)에 나타내었다. SIMPoly MATLAB 방법을 사용하여 나노섬유의 크기를 결정했다. 순수한 PCL과 uCNT@PDA가 포함된 PCL 나노섬유의 표면 모양은 거의 유사했으며 약간 거친 질감이 나타났는데, 이는 나노섬유의 전기방사 중 DMF 용액의 증발로 인한 것일 수 있다. 순수한 PCL 나노섬유의 직경은  $32.3 \pm 9.4$  nm였다. uCNT@PDA의 통합 후, PCL/uCNT@PDA 나노섬유의 직경은 uCNT@PDA의 농도가 증가함에 따라  $47.1 \pm 18.9$  nm에서  $32. \pm 11.4$  nm로 증가했다. 그러나 PCL에서 얻은 나노섬유의 균일성은 하이브리드 나노섬유보다 더 큰 것으로 관찰되었다.
- [0052] 또한 PCL이 탑재된 uCNT@PDA 샘플의 FTIR 스펙트럼(도 3(b))이 기록되었으며 PCL 소재의 대표 밴드 위치가 PCL이 탑재된 탄소 소재에서 PCL의 진동 밴드와 잘 일치했다. PCL이 장착된 uCNT@PDA 샘플의 XRD 분석이 수행되었

으며 모든 PCL이 장착된 샘플(0.25%- 1.0%)에 대해 XRD 패턴이 기록되었다. 흥미롭게도 XRD 피크는 PCL의 XRD 패턴과 일치했다.

[0053] 요약하면, 순수 PCL 및 uCNT@PDA가 포함된 나노섬유에 대한  $5^{\circ}$  ~ $30^{\circ}$  범위의  $2\theta$ 에서 XRD 패턴이 도 3(c)에 나와 있다. 순수 PCL은 각각 110 및 200 반사로 인해  $2\theta = 21.4^{\circ}$  및  $23.6^{\circ}$ 의 브래그 각도에서 두 개의 두드러진 특성 피크를 나타냈다. 이러한 날카로운 피크는 PCL의 결정질 특성을 나타낸다.

[0054] 또한, PCL/uCNT@PDA 나노섬유의 결정질 특성은 PCL 나노섬유보다 낮았다. 따라서 각 피크의 강도가 낮다. PCL/uCNT@PDA-0.25의 경우 피크의 강도가 가장 낮아 결정화도의 감소를 나타냈다. 결정도의 감소는 비정질 영역의 확장을 나타내며, 이 현상은 순수 PCL과 그 복합 필름의 생분해성에 더욱 영향을 미쳤다. 그러나 uCNT@PDA의 함량을 증가시키면 결정도가 어느 정도 증가하였고, 이는 PCL/uCNT@PDA-0.5 및 PCL/uCNT@PDA-1의 강도 피크에 반영되었다. 이는 PCL과 uCNT@PDA 합성물 사이에 일부 상호 작용이 발생했음을 보여준다.

[0056] 기계적 테스트

[0057] 기계적 테스트는 PCL, PCL/uCNT@PDA-0.25, PCL/uCNT@PDA-0.5 및 PCL/uCNT@PDA-1 샘플의 필름에 대해 수행되었다. 단축 응력 하에서의 기계적 특성은 도 4(a)에 나와 있다. 기계적 성질은 uCNT@PDA의 존재에 의해 영향을 받았다. PCL/uCNT@PDA-1은 순수 PCL 필름에 비해 파단신율이 향상됨을 보여주었다. 이는 PCL과 uCNT@PDA 사이의 가능한 강력한 상호 작용 때문이었다. 높은 농도의 uCNT@PDA는 PCL을 더 단단하게 만들었다. 반면에 낮은 농도는 필름의 인성과 기계적 특성을 감소시킬 수 있다. 도 4(b)에서 보는 바와 같이 PCL/uCNT@PDA-1 필름의 탄성계수는 다른 시료보다 높았다.

[0059] TGA

[0060] PCL/uCNT@PDA 복합 필름의 열적 안정성을 분석하기 위해 TGA를 수행했다. PCL의 분해는 약  $230^{\circ}\text{C}$ 에서 시작되어  $400$ - $410^{\circ}\text{C}$  범위에서 종료된다. PCL의 중량 손실은 약  $410^{\circ}\text{C}$ 에서 90%로 관찰되었다. 다양한 농도의 uCNT@PDA가 로딩된 PCL/uCNT@PDA 필름에 대해서도 유사한 열 열화 경향이 관찰되었다. 그러나 모든 PCL/uCNT@PDA 분해에 대한 개시 온도는 PCL보다 약간 낮았고(도 4(c)), 이 분해 개시 온도는 PCL에 비례했다. TGA 분석은 uCNT@PDA 로딩된 샘플이  $230^{\circ}\text{C}$  이하에서 상당히 안정한 것으로 나타났으며, 이는 생물의학 분야에서의 적용에 유리할 수 있다.

[0061] 분해

[0062] PCL 기반 나노섬유의 분해는 NaOH를 포함하는 완충용액에서 연구되었다. 도 4(d)에서 볼 수 있듯이 PCL/uCNT@PDA-1 나노섬유는 PCL 지지체보다 더 높은 분해율을 보였다. PCL/uCNT@PDA 나노섬유는 9일 이내에 22%, 40%, 50%의 질량 손실을 보였다. 3D 프린팅된 지지체 및 나노섬유와 같은 PCL 지지체의 분해율도 매우 낮고 분자량에 따라 2년 이상 소요된다.

[0063] 따라서 uCNT@PDA를 PCL 지지체에 통합하면 분해성이 향상될 것으로 예상된다. 따라서 하이브리드 PCL/uCNT@PDA 나노섬유의 분해 속도는 PCL 나노섬유의 분해 속도에 비해 증가할 것이다. 이 특성은 상처 치유 응용 분야에서 나노 섬유 사용의 장려한다.

[0064] 물 접촉각

[0065] 생물의학 분야에서는 친수성 물질을 사용하는 것이 소수성 물질을 사용하는 것보다 유리하다. 친수성 표면은 나노섬유의 세포 부착, 퍼짐 및 증식에 필수적인 역할을 한다. PCL의 젖음성과 uCNT@PDA의 영향을 이해하기 위해 PCL/uCNT @PDA 나노섬유의 물 접촉각을 결정하였다. 결과는 도 4(e)에 나와 있다. PCL은 소수성이다. 그러나 생체 적합성이 있어 생물 의학 분야에서 널리 사용된다. 순수 PCL 나노섬유의 접촉각은  $121.34^{\circ}$ 로 소수성 표면 특성을 확인했다. uCNT@PDA의 혼입은 접촉각을  $20$ - $25^{\circ}$  감소시켰고 PCL보다 더 낮은 소수성을 나타냈다. 도 4(e)에서 보는 바와 같이 나노섬유의 접촉각은 uCNT@PDA의 첨가량이 증가함에 따라  $103^{\circ}$ ,  $99^{\circ}$ ,  $96^{\circ}$ 로 감소하였다. 따라서 개별 나노섬유는 uCNT@PDA의 농도에 따라 물에 대한 친화도가 증가하는 것으로 나타났다. 이는 uCNT@PDA가 PCL의 소수성을 감소시켰기 때문일 수 있다. 이러한 결과는 또한 제조된 물질의 관계가 세포와 함께 증가하고 세포가 부착 및 증식하는 데 도움이 된다는 것을 보여준다.

[0067] 항산화 분석

[0068] 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) 분석에서 DPPH 자유 라디칼은 전자 또는 수소 원자를 받아 중화될 수 있으며 용액의 색상이 보라색에서 노란색으로 변한다. 도 4(f)에서, PCL/uCNT@PDA 나노섬유의 DPPH 소거효율은 uCNT@PDA의 양에 의존함을 알 수 있다. uCNT@PDA의 양을 증가시켜 DPPH 소거 효율을 향상시켰다. 초기 30분에 순수 PCL은 0.11% ROS 소거 활성을 보인 반면 PCL/uCNT@PDA-0.25, PCL/uCNT@PDA-0.5 및 PCL/uCNT@PDA-1은 23.75%, 32.93 및 46.14%를 나타냈다. 각각 uCNT@PDA의 포함에 기인할 수 있는 항산화 활성. 항산화 활성의 비율은 시간이 지남에 따라 증가했으며, PCL은 8.9% ROS 소거를 나타내었고, 나노섬유에서 uCNT@PDA 함량이 증가함에 따라 72.71%, 75.29% 및 75.34%를 나타냈다.

[0069] 상처 부위가 과도한 ROS를 생성하여 산화 스트레스를 유발할 수 있다는 것은 잘 알려져 있다. catechol 그룹의 존재로 인해 uCNT@PDA는 우수한 항산화 및 자유 라디칼 소거 활성을 나타냈다. 따라서 PCL/uCNT@PDA-0.5 및 PCL/uCNT@PDA-1 나노섬유 매트는 우수한 항산화 능력을 나타내어 상처 치유 및 항균 활성을 위한 상처 드레싱 재료로서 큰 잠재력을 가질 것이다.

[0071] 나노섬유 매트와 광열 성능

[0072] 광열 변환 능력을 평가하기 위해 uCNT, uCNT@PDA 및 PCL/uCNT@PDA 샘플에 NIR 광을 조사하였다. 도 5(a)는 NIR 레이저 광(0.5 W/cm<sup>2</sup>)을 조사했을 때 농도가 다른 uCNT의 온도 상승을 보여준다. NIR 광을 5분간 조사한 후 50 µg/ml 및 250µg/ml의 uCNT에 대해 온도가 27.9°C에서 31.8°C 및 37°C로 증가하였다. 유사하게, 250 µg/ml의 uCNT 및 uCNT@PDA 분산액의 온도도 1.0 W/cm<sup>2</sup> 전력 밀도 NIR 광 조사 후 65°C 및 70°C로 증가했다(도 5(b)). 이러한 결과는 uCNT 및 uCNT@PDA 나노섬유가 높은 광열 변환 능력을 가짐을 의미한다.

[0073] uCNT@PDA가 포함된 PCL 나노섬유의 광열 효과는 5분 동안 다른 전력 밀도(0.5 및 1.0 W/cm<sup>2</sup>)를 갖는 808 nm NIR 광을 사용하여 감지되었다. 도 5(c,d)의 그래프는 조사 시간에 따른 나노섬유의 온도 증가를 보여준다. 대조군으로 간주되는 PCL 나노섬유는 0.5 및 1.0 W/cm<sup>2</sup> power NIR 조명에서 무시할 수 있는 온도 증가를 보였다. 이에 비해 PCL/uCNT@PDA-0.25 나노섬유는 0.5 및 1.0 W/cm<sup>2</sup> power NIR light를 5분간 연속 조사한 후 24°C에서 52°C 및 83.9°C로 온도가 급격하고 현저하게 증가하였다. 유사하게, PCL/uCNT@PDA-1 복합재료의 온도도 5분 이내에 0.5 및 1.0 W/cm<sup>2</sup> power NIR 광에서 67.4 °C 및 115 °C로 증가했다. 이러한 결과는 제조된 나노섬유가 광열 효과를 나타내며 항균 및 암 치료를 포함한 다양한 응용 분야에 사용될 수 있음을 보여준다.

[0075] 라디칼 생성

[0076] ESR은 NIR 빛이 있거나 없는 PCL/uCNT@PDA 나노섬유 샘플의 자유 라디칼 생성을 평가하는 데 사용되었다. 샘플의 ESR 스펙트럼은 각각 2.0149, 2.0046 및 2.0050의 g-인자 값과 함께 3340, 3355 및 3376G에서 강한 신호를 보여주었다. 흥미롭게도 샘플은 도 5(e)와 같이 더 강한 신호를 표시했다. NIR 처리된 나노섬유 없이는 ESR 신호가 감지되지 않았으며, 이는 나노섬유에서 자유 라디칼이 생성되지 않았음을 시사한다. 그러나 처리된 샘플의 ESR 신호는 높은 자유 라디칼 농도의 생성을 명확하게 보여준다.

[0077] NIR 조사는 약물 방출을 유발함

[0078] 커큐민은 광범위한 항균, 항염, 항산화 특성을 포함한 의약 특성과 상처 치료에 널리 알려져 있다. 커큐민의 제어 방출은 소수성 특성과 물에 대한 낮은 용해도 때문에 특히 어렵다. 2% Tween 20 및 PBS 혼합 용액에서 나노섬유의 방출 프로파일을 조사했다. NIR이 있는 상태에서 PCL/uCNT@PDA 나노섬유에서 curcumin이 방출되는 것을 이해하기 위해 제작 과정에서 3% curcumin이 PCL/uCNT@PDA 용액에 통합되었다. NIR 처리가 있거나 없는 나노섬유에서 방출되는 약물의 양이 계산되었다. 매트에서 빛을 이용한 방출 메커니즘은 다른 시점에서 각 관독 전에 5분 동안 NIR 빛을 조사하여 결정되었다.

[0079] 도 6(b)는 PCL 및 PCL/uCNT@PDA 나노섬유에서 NIR에 의해 유발된 커큐민 방출 패턴을 보여준다. 근적외선이 있는 상태에서 커큐민 방출은 근적외선을 조사하지 않은 경우에 비해 거의 가속도를 나타내지 않았다. 로딩된 커큐민의 80%가 2주 이내에 PCL/uCNT@PDA/Cur 나노섬유에서 방출되는 것으로 관찰되었다. 4일 후에 약물 방출의

꾸준한 감소가 관찰되었다. 처음 24시간 동안의 커큐민 방출 경향은 폭발적이었고 다음 1주 동안은 느린 방출이 뒤따랐다. NIR에 의해 유발된 약물 전달에서 방출된 약물의 양은 NIR 빛이 없는 약물 전달보다 약 10% 더 높았다. pH 7.5에서 320시간 동안 방출된 함량은 일반 방출의 경우 76%, 근적외선 조사 방출의 경우 82%였다.

[0080] PCL 스캐폴드에서 소수성 약물의 방출 메커니즘은 주로 확산이다. 폴리머 분해 속도와 약물-폴리머 및 약물-매질 상호작용은 약물 방출에 상당한 영향을 미친다. 결과는 NIR 조사 시 증가된 커큐민 방출과 NIR 세트가 없을 때 약간 더 낮은 방출을 보여주었다. 나노섬유에 의해 제어되는 활성화된 약물 방출은 잠재적인 치료 성공을 제공할 수 있다.

[0081] 항균 분석

[0082] 단일 근적외선 광조사로 제조된 나노섬유에 대한 항균 성능을 평가하기 위해 제조된 나노섬유에 808 nm 레이저 (0.5 W/cm<sup>2</sup>, 10 min) 광을 조사하고 표준 표면 도금 방법을 사용하여 박테리아 콜로니를 계수하여 *B. subtilis* 및 *E. coli*에 대한 세균 생존 실험을 수행하였다.

[0083] 도 7(a,b)에서 보는 바와 같이 PCL/uCNT@PDA 나노섬유 매트는 808 nm 근적외선을 조사했을 때 *B. subtilis*와 *E. coli*에 대해 살균 효과를 보였다. PCL 나노섬유의 경우 NIR 처리 여부에 관계없이 살균 효과가 관찰되지 않았다. PCL/uCNT@PDA-0.25, 0.5, 1의 살균 효과는 각각 NIR 빛의 존재하에 *B. subtilis*에 대해 각각 24%, 35%, 44%까지 증가하였고(도 7(a)), *E. coli*(도 7(b))에 대해서는 각각 63%, 68%, 및 82%까지 증가하였다.

[0084] uCNT@PDA의 양을 증가시키면 항균 활성이 향상되었다. 박테리아 배양에서 열과 ROS의 생성은 이 물질의 살균 효과에 대한 가능한 이유이다. 이 매트의 항균성을 더 가시화하기 위해 SEM을 사용하여 모든 샘플에서 NIR로 처리한 박테리아의 막 무결성 형태를 관찰했다. 도 8에서 보는 바와 같이 PBS와 PCL 나노섬유의 근적외선 처리 후 세균막은 누출이나 파열 없이 온전한 상태를 유지하였다. 대조적으로, PCL/uCNT@PDA-0.25, PCL/uCNT@PDA-0.5 및 PCL/uCNT@PDA-1 나노섬유는 박테리아 수축을 보였다.

[0085] 어떤 경우에는 박테리아의 세포 내용물이 방출되어 외막이 비어 있다. 이것은 박테리아의 사멸을 확인했다. *B. subtilis*에 대한 살균 효과는 *E. coli*에 대한 것보다 더 강력하였다. 그러나 전반적으로 거의 모든 박테리아가 줄어들어 세포 손상의 초기 단계이다. 모든 나노섬유 중 PCL/uCNT@PDA-1이 최고의 살균 효능을 보였다. uCNT@PDA의 광열 특성은 박테리아에 광열 효과가 있어 박테리아 막의 투과성을 변화시키고 효소 및 기타 단백질을 변성시킬 수 있다. uCNT@PDA에 의해 생성된 ROS는 또한 손상된 세균막의 투과성과 열 민감성을 증가시킬 수 있다. 이 두 가지 처리법은 서로를 보완하고 상승적인 살균 효과를 달성했다. 고온에서의 항균성 평가와 나노섬유에 대한 NIR 조사로 인한 ROS 생성은 이러한 결론을 확인시켜준다.

[0086] 항균막 활성

[0087] NIR 처리를 하거나 처리하지 않은 PCL/uCNT@PDA 나노섬유의 생물막 분해 특성을 조사하였다. 도 9에 제시된 결과는 NIR 처리하지 않은 나노섬유와 비교할 때 생물막이 발달된 나노섬유의 근적외선 처리가 생물막의 성장을 감소시킴을 보여준다. 생물막을 크리스탈 바이올렛으로 염색한 후 NIR 처리된 웰에는 박테리아가 거의 포함되어 있지 않은 것으로 관찰되었다. 따라서, 웰 내에 유지된 염료는 대조군 세트보다 비교적 낮았다. 결과는 PCL/uCNT@PDA 나노섬유의 NIR 처리가 상당한 항균막 활성을 나타냄을 시사한다.

[0088] uCNT@PDA의 농도가 증가함에 따라 나노섬유의 바이오필름 분해 성능이 증가하였다. 흥미롭게도 PCL/uCNT@PDA-1 나노섬유에서 가장 높은 항생물막 활성이 관찰되었다. *B. subtilis*와 *E. coli*의 생물막은 PCL/uCNT@PDA-1 나노섬유의 근적외선 처리로 인해 각각 40%와 50% 억제되었다. 대조적으로, 대조 시료의 항생물막 활성은 *B. subtilis*의 경우 1%, *E. coli*의 경우 4%였다. PCL/uCNT@PDA-0.25에 의한 생물막 열화는 NIR 처리 시 단지 25% 및 19%의 백분율 감소가 관찰되었을 때 가장 작았다. 적절한 항균 활성은 α-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@Au/PDA 나노 입자를 NIR 빛으로 처리했지만 높은 전력 밀도(2.0 W/cm<sup>2</sup>)로 처리했을 때 얻어졌다. 따라서 개발된 NIR 반응성 물질은 표면과 상처에서 발생하는 생물막을 분해하는 유망한 접근 방식이다. 따라서 PCL/uCNT@PDA 나노섬유는 NIR 빛을 조사할 때 쉽게 분해되고 생물막 형성을 억제할 수 있다.

[0090] 세포독성 및 Live/Dead 분석

[0091] 1, 3 및 5일 동안 WST-8 분석을 사용하여 HDF 세포에 대한 PCL/uCNT@PDA 나노섬유의 부작용을 확인하기 위해 세포 생존율을 평가하였고, 그 결과를 도 10(a)에 나타내었다. PCL/uCNT@PDA-1 및 PCL/uCNT@PDA-0.5 샘플이 PCL

샘플에 비해 세포 생존율이 감소했음에도 불구하고 개별 표면에서 세포 증식의 일관된 증가가 관찰되었다. PCL을 대조군으로 고려할 때, PCL/uCNT@PDA-0.5 및 PCL/uCNT@PDA-1은 HDF 세포와의 양호한 생체적합성 및 생존력을 나타내었다. PCL/uCNT@PDA-0.5 및 PCL/uCNT@PDA-1은 세포 성장에 대해 PCL/uCNT@PDA-0.25보다 덜 호환되는 것으로 관찰되었다. 3일 후, uCNT@PDA가 포함된 샘플에서 증식 속도가 증가했다.

[0092]

3일과 6일의 Live/Dead 이미지를 위해 나노섬유의 배양된 세포를 acridine orange 및 ethidium bromide 염색 용액으로 염색했다. 3일과 6일에 나노섬유를 사용한 HDF의 Live/Dead 분석은 도 10(b)에 나와 있다. 이미지는 나노섬유에 시드된 거의 모든 세포가 살아 있음을 보여준다(녹색). 6일째에도 나노섬유에서 세포가 생존하여 제작된 PCL/uCNT@PDA 나노섬유가 생체적합성이며 HDF 세포에 독성 효과가 없음을 나타낸다. 또한, 배양된 HDF 세포 형태는 방추형 형태와 유사하여 세포가 건강하고 나노섬유 방향으로 따라가며 퍼짐을 나타낸다. 따라서 나노섬유는 생의학 분야와 상처 치유 분야에 응용 가능성이 있다.

### 발명의 효과

[0094]

본 발명은 친환경적인 one-pot 방식을 사용하여 uCNT를 성공적으로 합성했다. 제조된 uCNT를 PDA로 변형하고 PCL에 통합하여 PCL/uCNT@PDA 나노섬유를 개발하였다. PCL/uCNT@PDA 합성물은 최소 시간(5분) 동안 낮은 전력 밀도에서 우수한 광열 특성을 나타냈다. 또한, 나노섬유는 근적외선이 없을 때 ROS 소거 활성과 근적외선이 있을 때 자유 라디칼 생성을 보였다. 근적외선 레이저 조사 시 그람 양성균과 그람 음성균에 대한 항균 효과가 향상되었다. 또한, 처리되지 않은 PCL/uCNT@PDA 나노섬유는 항생물막 활성에 대해 덜 효과적인 것으로 밝혀졌다. 그러나 나노섬유에 근적외선을 조사하면 항균성이 크게 향상되었다. NIR 광 조사시 나노 섬유에 의해 열이 생성되었다. 증가된 온도는 박테리아를 죽이고 박테리아 생물막을 분해했다. PCL/uCNT@PDA 나노섬유에서 가장 높은 항균 활성이 관찰되었다. PCL/uCNT@PDA 나노섬유로부터의 커큐민 방출은 근적외선의 존재 및 부재하에서 유사한 방출 특성을 나타냈다. 더욱이, 나노섬유의 세포 생존율은 현저한 세포독성을 나타내지 않았다. 이러한 결과를 바탕으로 본 발명의 개발된 하이브리드 소재는 박테리아 감염 상처 치유 및 생체의학 용도로 활용될 수 있으며, 근적외선을 이용하여 다양한 물체의 표면에 존재하는 박테리아를 죽일 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0095]

도 1은 (a) uCNT@PDA 나노섬유 및 NIR 효과의 합성, (b) 전기방사 나노섬유의 제조, (b) NIR 광원의 존재하에서 PCL/uCNT@PDA 나노섬유에 의한 박테리아 사멸.

도 2는 (a) uCNT@PDA의 합성 계획; (b) TEM 및 (c) MWCNT, uCNT 및 uCNT@PDA의 SEM 이미지; (d) C, N, O 및 S의 조성을 나타내는 uCNT@PDA의 EDS; (e) FT-IR 스펙트럼, (f) 라만 스펙트럼, 각각의 (g) XRD 패턴 및 (h) 제타 전위에 의한 uCNT 및 uCNT@PDA의 특성화.

도 3 (a) PCL 및 PCL/uCNT@PDA 나노섬유의 FE-SEM 형태, 그들의 직경 및 (b) FTIR 스펙트럼 및 (c) XRD 패턴.

도 4는 PCL 및 PCL/uCNT@PDA 필름의 기계적 특성: (a) 대표적인 응력-변형률 곡선, (b) 탄성 계수, (c) TGA 곡선, (d) 열화 연구, (e) 물 접촉각, 및 (f) DPPH 분석.

도 5는 광열 특성 (a) 0.5W/cm<sup>2</sup>에서 uCNT의 여러 농도, (b) 1.0w/cm<sup>2</sup> 전력 밀도에서 uCNT 및 uCNT@PDA의 온도 증가, (c,d) 0.5W/cm<sup>2</sup> 및 1.0 W/cm<sup>2</sup>에서 나노섬유의 온도 변화 및 적외선 열 이미지 (e) 808 nm NIR 레이저 광 조사가 있거나 없는 PCL/uCNT@PDA-0.5 나노섬유의 ESR 스펙트럼.

도 6은 (a) NIR 빛이 없고 (b) NIR 빛이 있을 때 Curcumin 방출의 거동,

도 7은 제작된 나노섬유의 NIR 반응성 항균 특성. (a) Bacillus sp. 및 (b) 24시간 배양 후 E.coli 및 24시간 배양 후 집락 형성 단위(cfu). 데이터는 3중 실험의 평균 ± SD, \*\*\*p<0.001에서 통계적 유의성.

도 8은 PCL/uCNT@PDA 나노섬유에 0.5 W/cm<sup>2</sup> 레이저 광(808 nm) NIR 조사 후 B. subtilis 및 E.coli 사멸의 SEM 이미지.

도 9는 제작된 나노섬유의 NIR 반응성 항균 바이오필름 특성. (a) Bacillus sp. 및 (b) E. coli 및 각각의 OD 값. 데이터는 3회 반복 실험의 평균 ± SD, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001에서 통계적 유의성.

도 10은 (a) 1일, 3일 및 5일 동안 WST 분석에서 평가된 가공된 나노섬유 존재에서 HDF의 세포 생존력, (b) 3일

및 6일 배양 후 PCL 및 PCL/uCNT@PDA 나노섬유의 라이브/데드 분석 . 데이터는 3회 반복 실험의 평균 ± SD, \*\*\*p<0.001에서 통계적 유의성, n.s.-유의하지 않음.

도 11은 2% Tween 20 및 PBS 용액 혼합물에서 커큐민의 보정 곡선.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0096] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재한 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.
- [0097] 본 발명에서 특별하게 언급되지 않는 한 모든 화학 물질은 받은 대로 사용되었다. Multiwalled CNT(MWCNT)는 Applied Carbon Nano(ACN)(대한민국)로부터 받았다. 시약 황산(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)(95.0%), 염산(HCl)(35.0%) 및 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)(30%)는 Wako Chemicals(대한민국)에서 구입했다. 과망간산칼륨(KMnO<sub>4</sub>)과 디메틸포름아미드(DMF)는 Daejung Chemicals(대한민국)에서 구입했다. Dopamine hydrochloride, Tris(hydroxymethyl)aminomethane(Tris buffer), curcumin, 5,5-Dimethyl-1-pyrroline N-oxide(DMPO), sodium nitrate와 같은 화학물질은 Sigma-Aldrich(USA)에서 구입했다.
- [0098] PCL/uCNT@PDA 합성물을 제조하기 위해 평균 분자량 80,000g/mole의 Polycaprolactone(PCL; ≥95%, Sigma-Aldrich, CAS: 24980-41-4)을 사용했다. 대한민국 BIO-RAD에서 Tween 20을 받았다.
- [0100] 실시예 1: 압축 해제된(unzipped) MWCNT(uCNT)의 합성
- [0101] uCNT의 합성은 이전에 보고된 절차(Wang, C.; Li, Y.-S.; Jiang, J.; Chiang, W.-H., Controllable Tailoring Graphene Nanoribbons with Tunable Surface Functionalities: An Effective Strategy toward High-Performance Lithium-Ion Batteries. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2015**, 7 (31), 17441-17449)를 참조하여 수행되었다.
- [0102] 요약하면, MWCNT 1.0g을 황산 100ml와 질산나트륨 10.0g의 혼합물에 분산시키고 빙욕에서 2시간 동안 교반했다. 다음으로, 생성된 혼합물에 과망간산칼륨 5.0g을 서서히 첨가하였다.
- [0103] Kosynkin, D. V.; Higginbotham, A. L.; Sinitskii, A.; Lomeda, J. R.; Dimiev, A.; Price, B. K.; Tour, J. M., Longitudinal unzipping of carbon nanotubes to form graphene nanoribbons. *Nature* **2009**, 458 (7240), 872-876에 기재된 바와 같이, CNT의 압축 해제는 고온 조건에서 농축된 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액에 KMnO<sub>4</sub>를 첨가함으로써 시작된다. MWCNT의 압축 해제는 MWCNT의 내부 C-C 결합이 끊어진 후 추가로 순차적으로 늘어나고 끊어짐으로써 조절할 수 있다. 또한 생성된 용액을 70oC에서 2시간 동안 계속 교반하면서 처리했다. 망간 산화물의 침전을 방지하기 위해 산화된 물질을 과산화수소수로 처리한 후 증류수로 반복 세척하였다. 얻어진 고체 생성물을 50℃의 열풍 오븐에서 48시간 동안 건조시켰다. MWCNT는 위의 절차를 사용하여 성공적으로 압축을 풀고 uCNT로 표시했다.
- [0105] 실시예 2: uCNT@PDA의 제조
- [0106] uCNT를 사용한 폴리도파민(PDA)의 제조는 uCNT와 도파민 염산염의 중량비를 1:1로 유지하여 이전에 보고된 절차(Wan, Q.; Tian, J.; Liu, M.; Zeng, G.; Huang, Q.; Wang, K.; Zhang, Q.; Deng, F.; Zhang, X.; Wei, Y., Surface modification of carbon nanotubes via combination of mussel inspired chemistry and chain transfer free radical polymerization. *Applied Surface Science* **2015**, 346, 335-341)를 사용하여 수행되었다. 이 합성에서 uCNT 분말(0.5g)을 초음파 처리를 사용하여 Tris 완충액(100mL, 10mM, pH 8.5)에 분산시켰다. uCNT를 균일하게 분산시킨 후, 도파민 염산염(0.5g)을 분산액에 첨가하고 실온에서 밤새 교반하였다. 합성된 uCNT@PDA를 8000rpm에서 10분 동안 원심분리하여 반응 혼합물로부터 분리하였다. 생성된 생성물을 증류수와 에탄올로 3회 더 세척하고 40℃에서 밤새 건조시켰다.
- [0108] 실시예 3: 전기방사 나노섬유의 제조
- [0109] 평균 분자량이 80,000g/mol인 폴리카프로락톤을 사용하여 PCL/uCNT@PDA 나노섬유를 제조하였다. 본 발명에서는 다양한 양의 uCNT@PDA(0.25%, 0.5% 및 1% w/v)를 사용하여 다양한 농도의 PCL/uCNT@PDA 나노섬유를 합성했다.

원하는 양의 uCNT@PDA를 초음파 처리를 통해 디메틸포름아미드(DMF)에 분산시켜 균질한 흑색 분산액을 얻었다. 또한, 15%(wt.%) PCL 용액은 DMF 용매 중 PCL을 70°C에서 연속 교반하면서 첨가하여 제조하였다. PCL의 균일한 혼합물을 제조한 후, uCNT@PDA 분산액(0.25%, 0.5% 및 1%)을 PCL 용액에 적가하고 생성된 혼합물을 균일한 혼합물이 얻어질 때까지 교반 조건 하에 유지하였다.

[0110] PCL/uCNT@PDA 용액의 전기방사는 전기방사 장치를 이용하여 수행하였고, PCL/uCNT@PDA를 10 cm<sup>3</sup> 플라스틱 주사기에 넣고, 나노섬유의 용이한 제거를 위해 수집기를 알루미늄 호일로 감쌌다. 중합체 용액을 2.0 ml/h 및 16.0 kV/cm 전압의 일정한 유속으로 21 게이지 바늘을 사용하여 주사기를 통해 펌핑하였다. 컬렉터 롤러와 니들 팁 사이의 거리는 약 15cm로 유지되었다. 전기방사 매트는 40-50% 습도의 실온에서 제조되었다. 제작된 나노섬유는 uCNT@PDA의 첨가량에 따라 PCL, PCL/uCNT@PDA-0.25, PCL/uCNT@PDA-0.5, PCL/uCNT@PDA-1로 명명하였다.

[0112] 실시예 4: PCL/uCNT@PDA-Cur의 제조

[0113] 본 발명에서는 PCL/uCNT@PDA 용액에 3% 커큐민을 첨가하고 밤새 교반하여 균일한 용액을 얻었다. 생성된 샘플은 앞서 언급한 매개변수와 유사한 매개변수를 사용하여 전기방사되었다. 제조된 나노섬유는 PCL/uCNT@PDA-Cur로 표기하였다.

[0115] 실시예 5: 특성화

[0116] 합성된 물질의 특성화는 전통적인 특성화 기술을 사용하여 형태 및 물리화학적 특성을 확인하기 위해 수행되었다.

[0117] MWCNT, uCNT, uCNT@PDA의 형태 및 구조적 특성을 투과전자현미경(TEM, JEM2100F, Jeol, Japan)을 통해 조사하고 고품질의 TEM 이미지를 수집하였다. 또한, 주사전자현미경(SEM; Hitachi S-4800, USA)을 통해 제작된 시료와 나노섬유의 형태를 평가하였다. uCNT와 uCNT@PDA의 원소 조성은 EDS mapping analysis를 통해 확인하였다. 푸리에 변환 적외선 분광법(FTIR, Perkin-Elmer, UK)을 사용하여 샘플의 유기 작용기 간의 작용화(결합 정보)를 조사했다. 중적외선 영역(4000-500cm<sup>-1</sup>)을 사용하여 FTIR 스펙트럼을 수집했다.

[0118] 또한 532.04 nm의 여기 파장을 이용하여 비기능화 물질과 기능화 물질을 분석하여 라만 분광기법(SENTERRA)을 통해 원하는 기능화를 확인하였다. 탄소질 물질의 결합 및 흑연화 구조를 연구하고, 압축 해제 과정에서 구조적 변화를 추가로 확인하기 위해 라만 분광법을 수행하였다. X선 회절 패턴(XRD)은 Cu K $\alpha$  방사선을 사용하여 15-30° 범위에서 Panalytical, X'pert Pro 회절계를 사용하여 기록되었다.

[0119] 분산액의 제타 전위는 25° C의 온도에서 동적 광산란 분석기(Malvern Palanytical ZSP)를 통해 결정되었다. PCL/uCNT@PDA 나노섬유의 특성화는 또한 앞서 언급한 매개변수에 따라 FE-SEM, FTIR 및 XRD에 의해 수행되었다. 제조된 물질의 열적 안정성은 열중량 분석기를 통해 평가하였고, 샘플은 질소 분위기 하에서 30~800°C 범위에서 10°C/min의 승온 속도로 분석하였다. 기계적 물성을 분석하기 위해 PCL과 PCL/uCNT@PDA의 두꺼운 필름을 제조하였다. 인장 시험은 Universal Testing Machine(UTM; MCT-1150, AND Inc., Japan)을 사용하여 10mm/min의 일정한 속도로 수행하였다. 전기방사된 나노섬유의 친수성은 정적 접촉각 기기(Phoenix-MT)를 사용하여 평가하였다. 표면 습윤성을 나타내는 접촉각은 탈이온화된 물방울을 멤브레인 표면에 직접 증착하여 계산되었다.

[0121] 실시예 6: 분해 연구

[0122] PCL 복합 나노섬유의 분해를 분석하기 위해 4개의 나노섬유를 모두 15 × 5 mm<sup>2</sup> 조각으로 절단하고 5 ml의 0.1 mM NaOH 용액에 담그었다. 시험관을 진탕 조건 하에 37°C의 수조에 넣었다. NaOH 용액에서 4개의 나노섬유 각각을 소정의 간격으로 제거하였다. 나노섬유를 탈이온수로 세척하고 열풍 오븐에서 건조시켰다. 건조된 샘플의 중량(Wt)을 기록하고 다음 공식을 사용하여 샘플의 질량 손실(W)을 계산했다.

[0123] 
$$W=(W_i -W_t)/W_i \times 100 \quad (1)$$

- [0124] 여기서  $W_i$  및  $W_i$ 는 각 샘플의 초기 및 말기 중량임.
- [0126] 실시예 7: 막의 항산화 효율
- [0127] 시편의 항산화 효율은 Gharibi, R.; Yeganeh, H.; Rezapour-Lactoe, A.; Hassan, Z. M., Stimulation of Wound Healing by Electroactive, Antibacterial, and Antioxidant Polyurethane/Siloxane Dressing Membranes: In Vitro and in Vivo Evaluations. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2015**, *7* (43), 24296-24311의 프로토콜을 사용하여 안정한 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 자유 라디칼을 소거하는 능력을 측정하여 테스트했다.
- [0128] 일반적으로 1.0 mg의 제조된 나노섬유를 500  $\mu$ L 에탄올의 100  $\mu$ M DPPH( $100 \times 10^{-6}$  M) 용액에 첨가하였다. 그 후 그 혼합물을 암실에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 그런 다음 UV-vis 분광광도계(Infinite® M Nano 200 Pro; TECAN, Switzerland)를 사용하여 517 nm에서 과장 스캐닝을 수행하였다. DPPH 열화는 다음 방정식을 사용하여 계산되었다.
- [0129] DPPH 소거 =  $(A_B - A_S)/A_B \times 100\%$  (2)
- [0130] 여기서  $A_B$  및  $A_S$ 는 각각 블랭크(DPPH + 에탄올) 및 샘플(DPPH + 에탄올 + 샘플)의 흡광도 값임.
- [0131] 실시예 8: 시험관 내 광열 성능
- [0132] uCNT, uCNT@PDA 및 PCL/uCNT@PDA 나노섬유의 시험관 내 광열 성능은 나노섬유를 808 nm NIR 레이저 광에 노출시켜 체계적으로 연구한다. 광열 특성을 평가하기 위해 물에 다양한 농도의 uCNT 분산액을 사용했다. 실험 온도는 30초에 기록되었고, 이후 최대 5분까지 1분 간격으로 기록되었다. uCNT, uCNT@PDA 및 나노섬유의 광열 효과는 서로 다른 레이저 출력(0.5 및 1.0 W/cm<sup>2</sup>)을 조사하여 연구했다.
- [0134] 실시예 9: 약물 전달
- [0135] PCL/uCNT@PDA-Cur 나노섬유를 pH 7.4의 완충용액(PBS 중 2% Tween 20)에 담갔다. 결정된 시간 간격으로 UV-Vis 분석을 위해 배지를 수집하고 즉시 새로운 완충 용액으로 교체했다. NIR 유발 약물 방출 거동을 연구하기 위해 동일한 무게의 PCL/uCNT@PDA-Cur 나노섬유를 pH 7.4의 완충액에 담그었다. NIR 조사의 유무에 관계없이 약물 방출이 기록되었다. 약물 전달에 대한 NIR 효과를 결정하기 위해 특정 시간 간격으로 기록된 모든 관독 전에 버퍼 용액의 샘플에 레이저 광을 조사했다.
- [0136] 방출된 커큐민은 UV-Vis 분석을 위해 수집되었다. 누적 방출 약물은 다음을 사용하여 계산되었다.
- [0137] 약물 방출(%) =  $(D_{released})/D_{total} \times 100\%$  (3)
- [0138] 여기서  $D_{released}$ 는 방출된 Curcumin의 총량이고  $D_{total}$ 은 나노섬유에 포함된 약물의 양임. 방출된 커큐민의 함량은 다양한 농도에서 검량선에 따라 계산되었다(도 11). 정확한 분석을 위해 위의 실험을 반복(n=3)하였다.
- [0139] 실시예 10: 시험관내 항균 활성 분석
- [0140] 시험관 내 항균 분석은 표준 항균 프로토콜(Sun, J.; Song, L.; Fan, Y.; Tian, L.; Luan, S.; Niu, S.; Ren, L.; Ming, W.; Zhao, J., Synergistic Photodynamic and Photothermal Antibacterial Nanocomposite Membrane Triggered by Single NIR Light Source. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2019**, *11* (30), 26581-26589)을 기반으로 수행되었다.
- [0141] 대표적으로 그람 양성 Bacillus subtilis(B. subtilis)와 그람 음성 Escherichia coli(E. coli)가 현재 테스트에 채택되었다. 모든 균주는 NIR이 있거나 없는 PCL 및 모든 PCL/uCNT@PDA 샘플을 포함하여 3개의 개별 실험 그룹에서 테스트되었다(각 실험 그룹에 대해 n=3). B. subtilis와 E. coli 박테리아는 모두 멸균 영양 브로스에서 하룻밤 동안 37° C에서 호기적으로 배양되었고 박테리아 농도는 사용 전에 결정되었다. 테스트할 샘플을 웰 플레이트로 옮기기 전에 자외선 아래에서 1시간 동안 멸균했다. 모든 막을 1.0 ml의 세균 현탁액(OD600=0.1)을 함유하는 12-웰 배양 플레이트에 침지시켰다. 그런 다음 처리 세트에 808 nm NIR 빛을 10분 동안 조사하고 1시간 동안 인큐베이션했다. 추가 그룹은 대조군과 동일한 방법으로 방사선 조사 없이 처리하였다. 이후, 현탁액을 37

℃에서 하룻밤 동안 한천 플레이트에서 배양하여 콜로니 수를 관찰하였다. 항균 특성은 계수된 콜로니 수에 의해 결정되었다. 근적외선 처리된 세포의 형태를 관찰하기 위해 박테리아를 2.5% glutaraldehyde와 2.5% paraformaldehyde의 1:1 비율로 고정하였다. 또한, 박테리아는 일련의 농도(10, 30, 50, 70, 80, 90 및 100%)의 에탄올 용액으로 탈수되었다. 이후, 세포를 운모 필름에 펴고 건조시킨 후 분석할 때까지 4° C에서 보관하였다. 분석 전에 샘플은 SEM 검사를 위해 금 스퍼터링되었다.

[0143] 실시예 11: 항-생물막(Anti-biofilm) 활성

[0144] 항-생물막 활성을 조사하기 위해 유사한 박테리아, 즉 B.subtilis 및 E.coli를 사용하였다. 실험에 앞서, 샘플을 동일한 치수로 절단하고 살균을 위해 UV 광선으로 처리하였다. 그런 다음 나노섬유 매트릭스를 멸균 24웰 플레이트로 옮겼으며, 각 웰에는 멸균 영양 배지 배양 배지 1ml가 들어 있다. B. subtilis 및 E. coli의 배양액(OD600 = 0.1)에서 150 μl의 부피를 영양 브로쓰가 포함된 웰에 별도로 추가했다. 플레이트를 생물막 발달의 형성을 위해 37° C에서 추가로 인큐베이션하였다. 필요한 생물막 형성 후 배양물을 NIR 빛으로 처리하고 NIR 처리하지 않은 나노 섬유를 대조군으로 사용했다.

[0145] 정량적 분석을 위해 NIR 처리된 나노섬유와 처리하지 않은 나노섬유를 조심스럽게 새로운 24웰 플레이트로 옮기고 크리스탈 바이올렛 분석을 사용하여 정량을 수행했다. 나노섬유 매트릭스와 웰에 형성된 생물막을 멸균 PBS 완충액(pH 7.4)으로 3회 부드럽게 행구었다. 생물막을 실온에서 15분 동안 0.4% 크리스탈 바이올렛(500 μl) 염료로 염색했다. 웰과 나노섬유의 얼룩을 PBS 버퍼로 부드럽게 세척(3회)하여 결합되지 않은 과도한 색상을 제거했다. 나노섬유 상의 바이오필름에 의해 유지된 크리스탈 바이올렛은 500 μl의 33% 아세트산에 용해되었고, 흡수는 620nm에서 측정되었다. 웰에 남아있는 얼룩은 이미지를 캡처하기 위해 세척 후 오븐에서 공기 건조되었다.

[0147] 실시예 12: 시험관내 분석

[0148] 세포 배양

[0149] 인간 진피 섬유아세포(HDF)(ATCC No. PCS-201-012) 세포를 10% FBS 및 1% P/S 항생제가 보충된 DMEM 배지에서 배양하였다. 이어서, HDF 세포를 컨플루언스(confluence)까지 성장시킨 후 트립신 처리에 의해 분리하고 샘플에 과중하기 전에 혈구계를 사용하여 계수하였다.

[0150] 나노섬유의 세포독성

[0151] HDF 세포의 생체적합성을 비교하기 위해 제작된 나노섬유(PCL, PCL/uCNT@PDA-0.25, PCL/uCNT@PDA-0.5, PCL/uCNT@PDA-1)에서 HDF 세포의 세포 생존율을 평가하였다. 0.5 x 0.5 cm를 96웰 배양 플레이트에 넣고 UV 처리한 후 사용 96-웰 배양 플레이트에 1.5 x 10<sup>4</sup> cells/well씩 과중하여 나노섬유에 세포를 과중한 후 1, 3, 5 일에서 생존을 확인하였다.

[0152] PCL 나노섬유에 과중한 세포를 대조군으로 간주 분석을 위해 오래된 배지를 새로운 배지(100 μl)로 교체하고 각 샘플에 WST-8(10 μl) 염료를 첨가하고 배양 37° C에서 2시간 동안 formazan을 형성한다. WST-8 키트 용액에는 tetrazolium salt가 포함되어 있으며, 이는 살아있는 세포가 있는 경우 주황색 formazan 염료로 전환된다. 따라서 더 많은 수의 살아있는 세포가 많은 양의 formazan 염료를 생성하여 도움 세포 생존율을 분석하기 위해 2시간 배양 후 시료의 광학 밀도를 UV-Vis 분광광도계(Infinite® M Nano 200 Pro; TECAN, 스위스)로 450nm 파장에서 측정했다.

[0153] PCL/uCNT@PDA-0.25, PCL/uCNT@PDA-0.5 및 PCL/uCNT@PDA-1 샘플의 결과를 대조군(PCL)과 비교하였다. 모든 결과는 삼중으로 수행되었으며(n=3), 데이터는 평균 OD ± 표준 편차로 표시된다.

[0154] 살아있는/죽은 분석

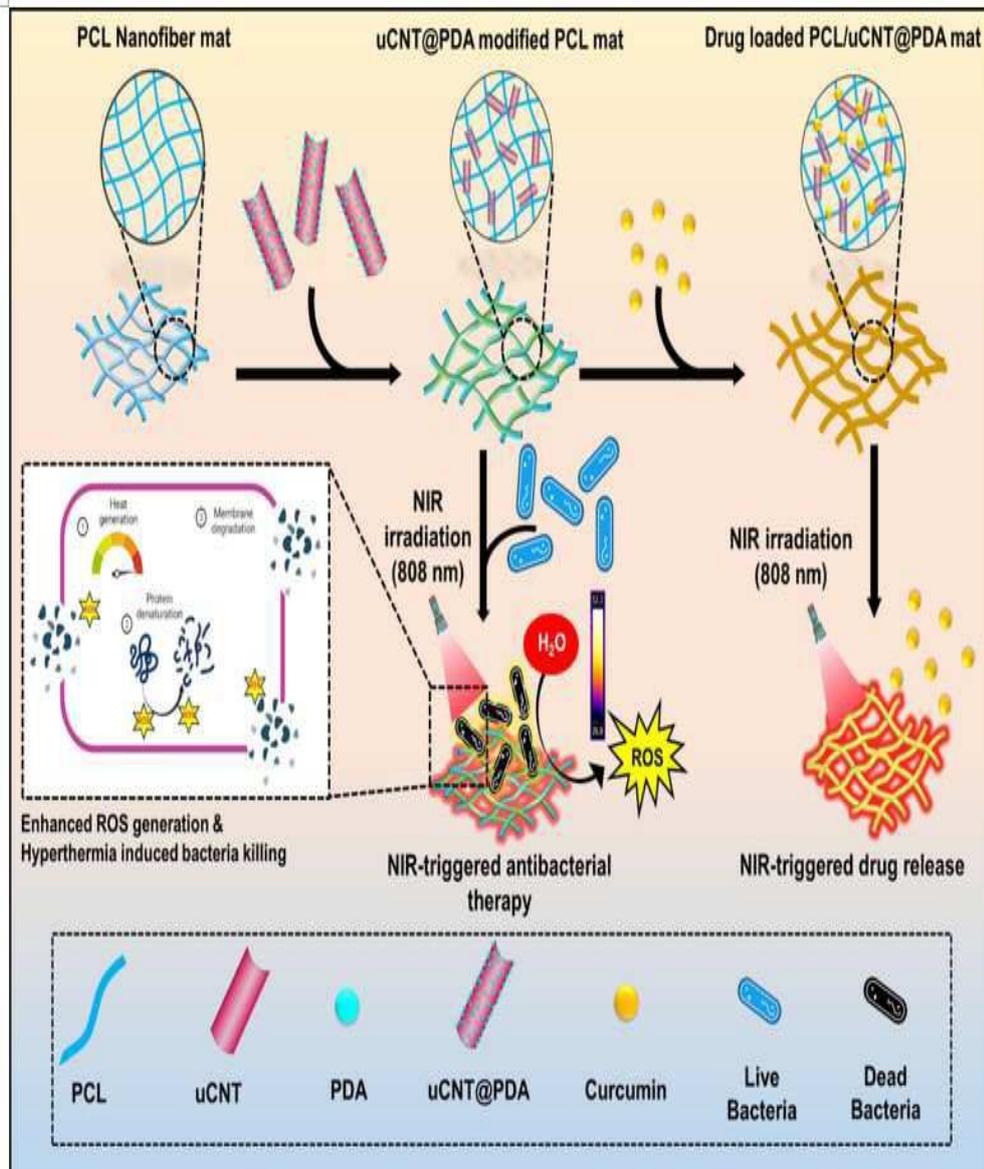
[0155] 멸균된 나노섬유 매트릭스를 96-웰 플레이트에 삽입하고 HDF 세포(1 x 10<sup>4</sup> cells/well)를 그 위에서 배양하고 37° C에서 인큐베이션했다. 세포를 3일 및 6일 동안 DMEM 배지에서 성장시켰다. 분석을 위해 세포를 1X PBS로 세척하고 1 μl의 acridine orange와 ethidium bromide 염료 용액을 1:1 비율로 처리했다. 도립 형광 현미경(DMi8 시리즈, Leica Microsystems, Germany)으로 3일 및 6일에 이미지를 캡처했다.

[0156] 본 발명의 통계 분석은 OriginPro 9.0 소프트웨어를 사용하여 계산되었다. 대조군과 치료군 사이의 통계적 유의

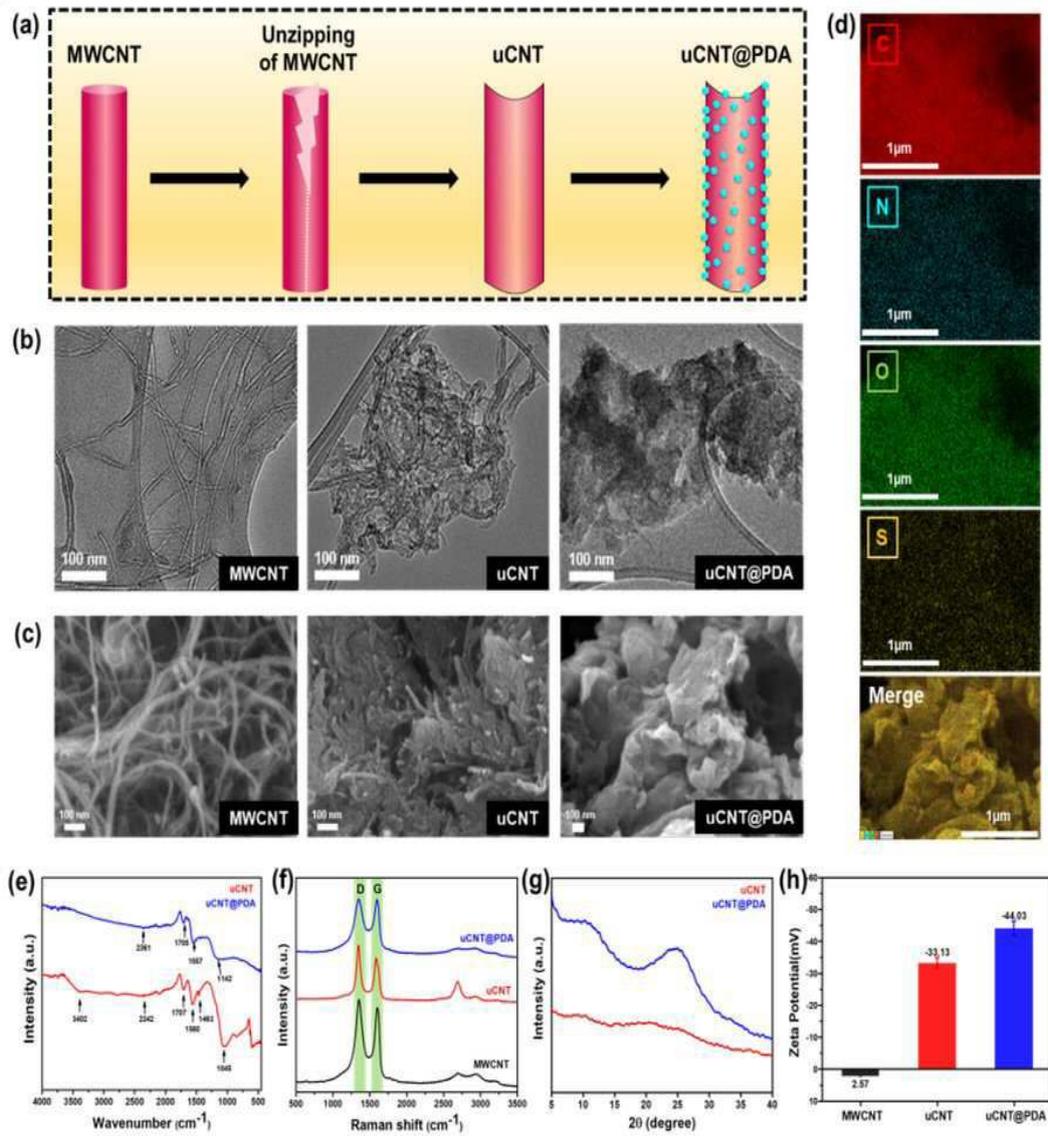
성은 일원 ANOVA를 사용하여 결정되었다. 데이터는 평균  $\pm$  표준 편차(SD)로 표시된다. 차이는 \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ 에서 유의한 것으로 간주되었다.

도면

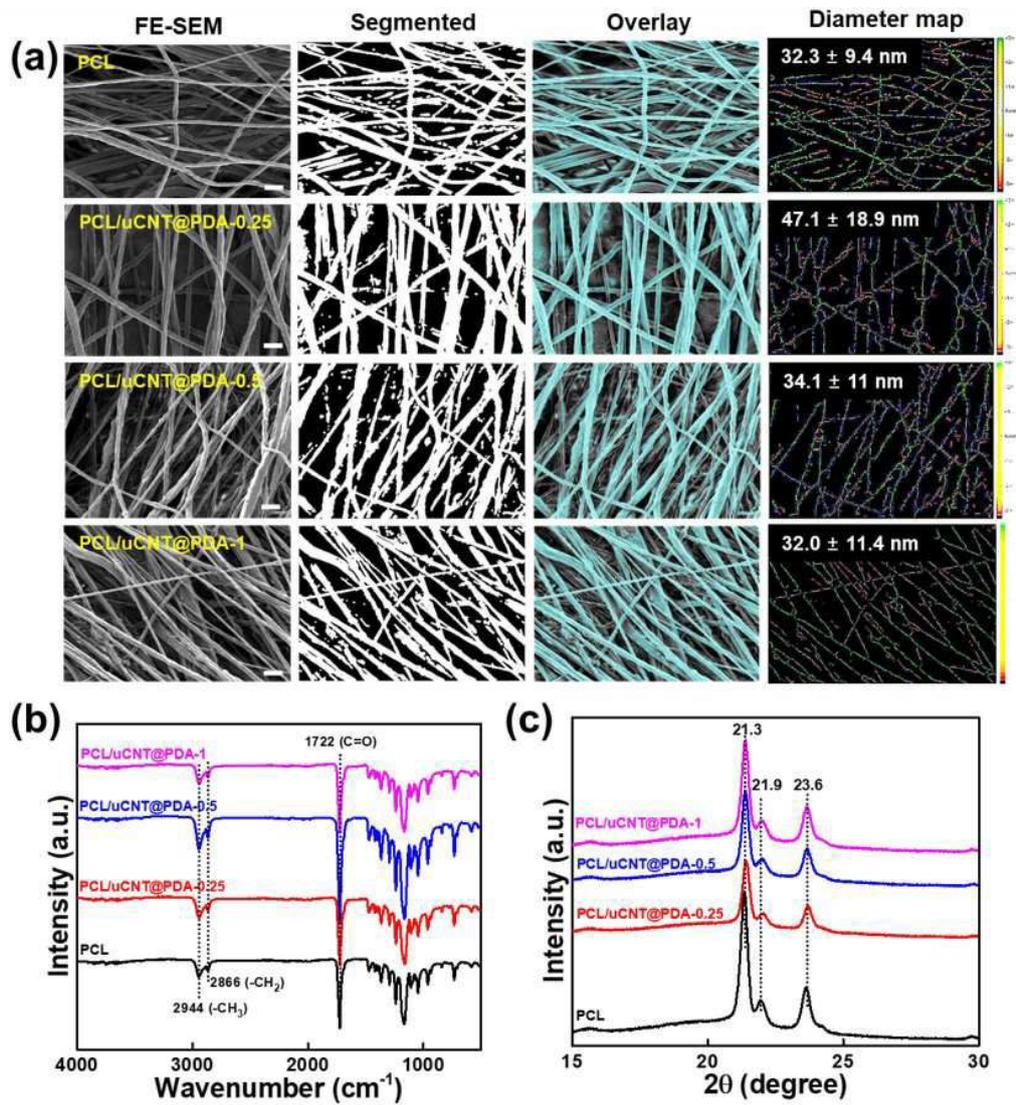
도면1



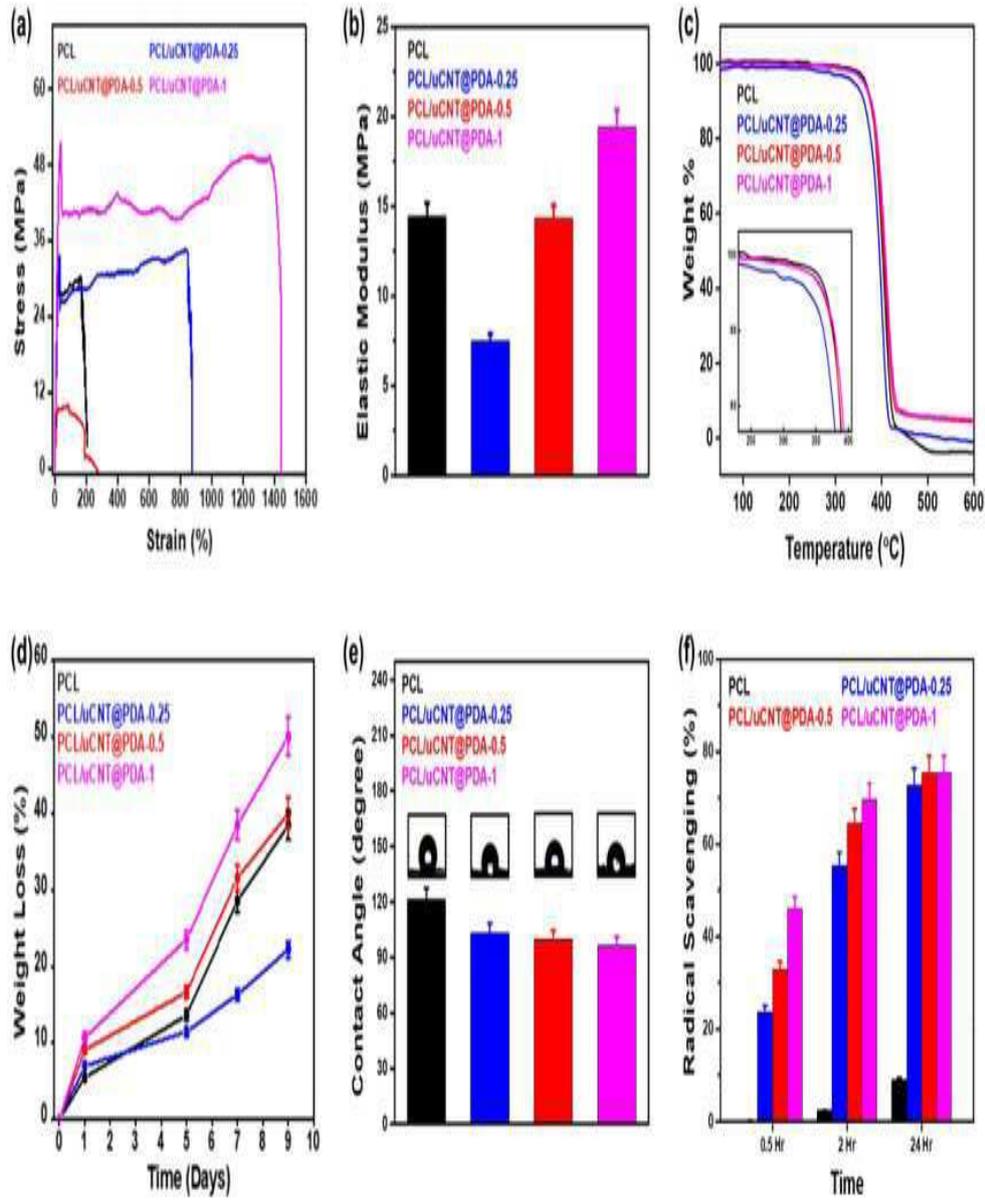
도면2



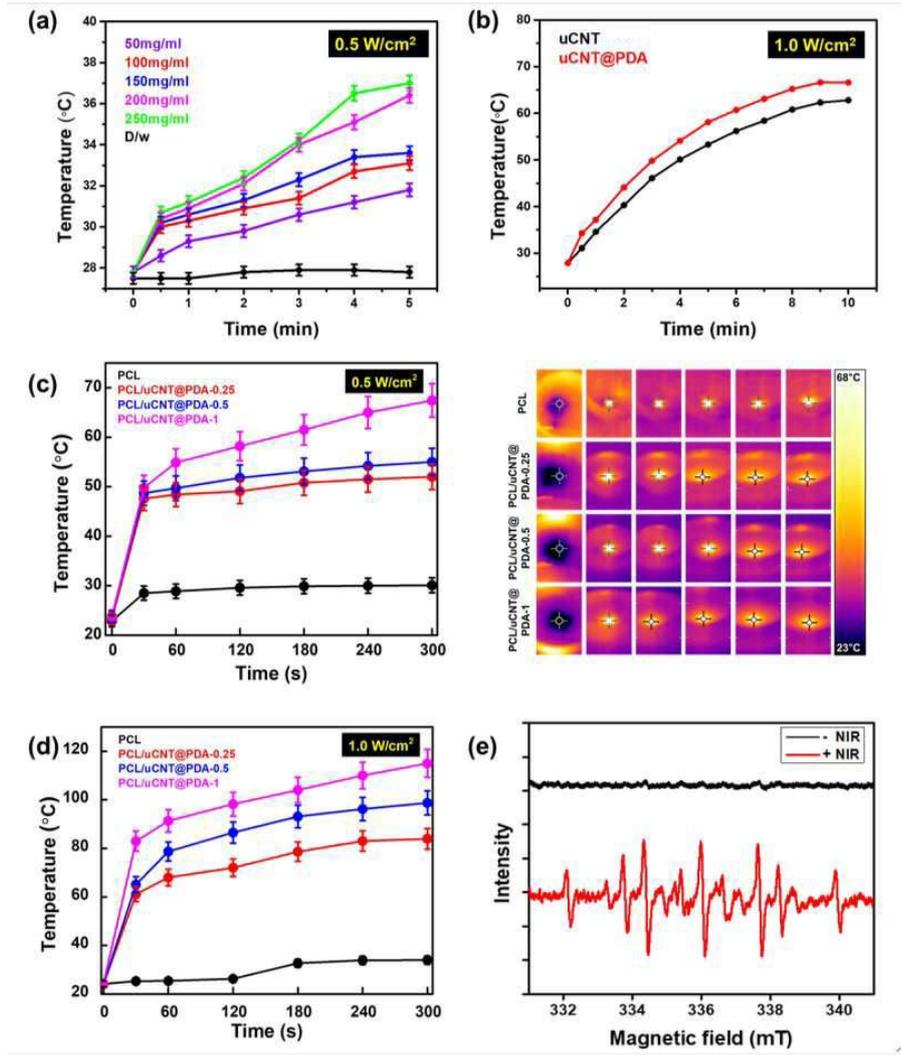
도면3



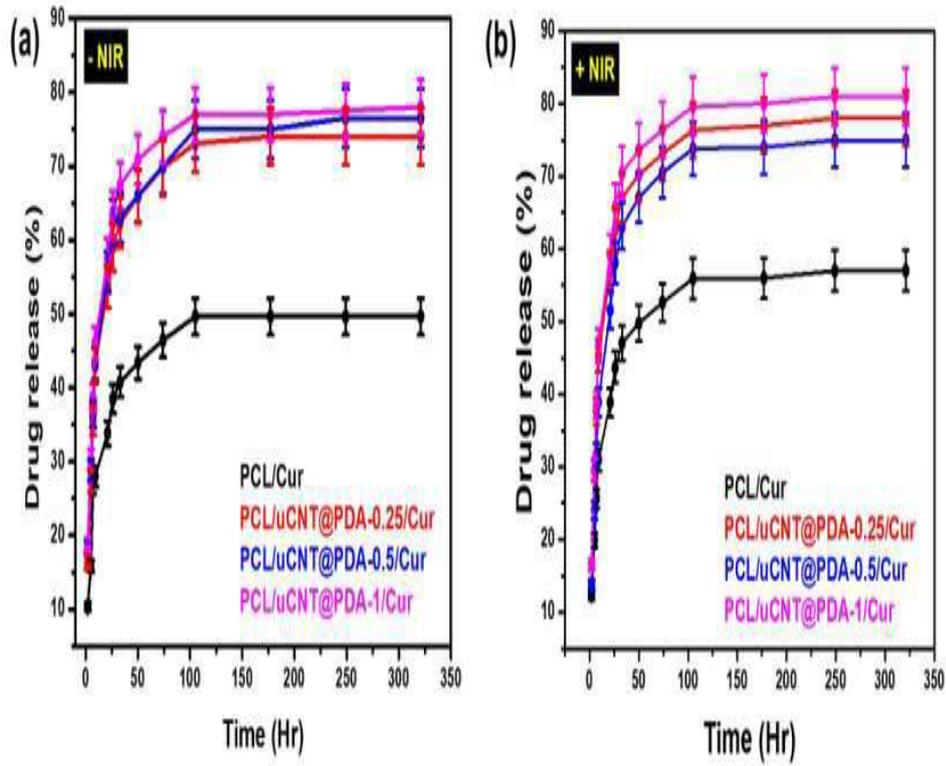
도면4



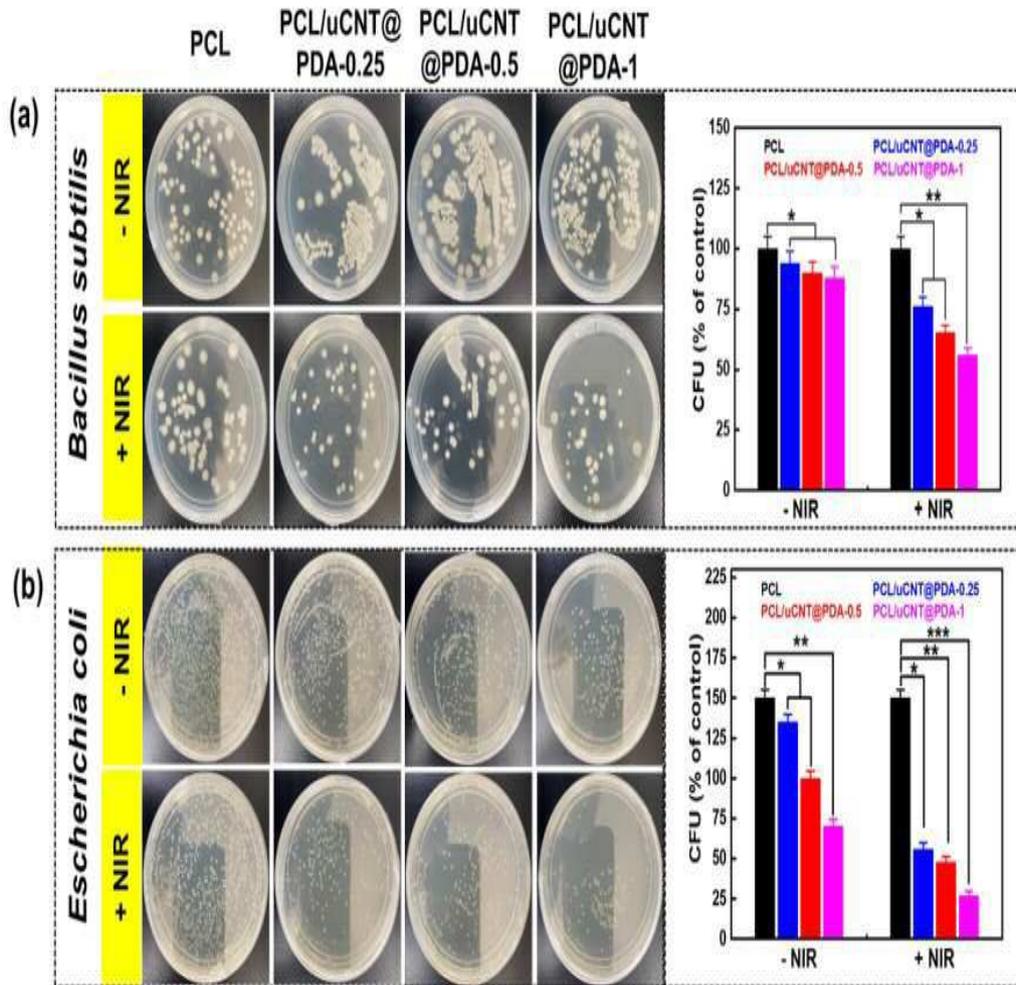
도면5



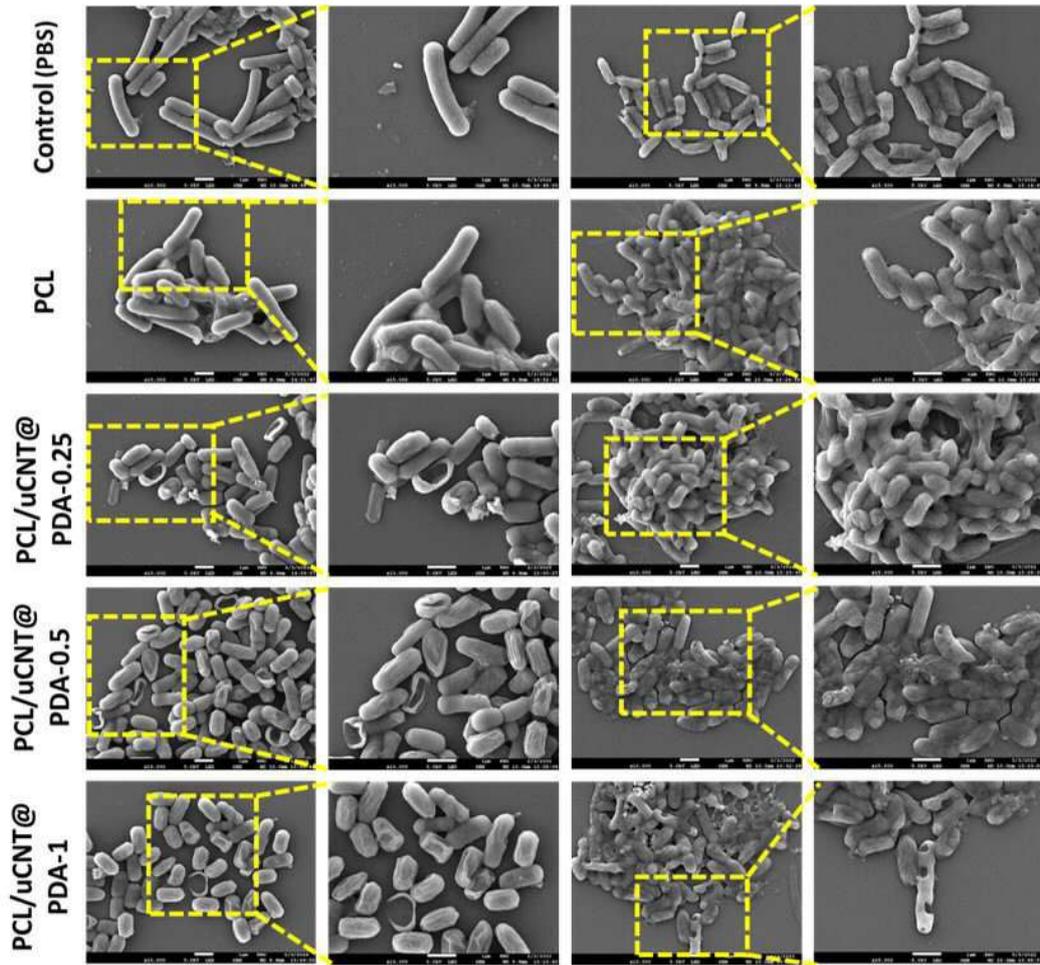
도면6



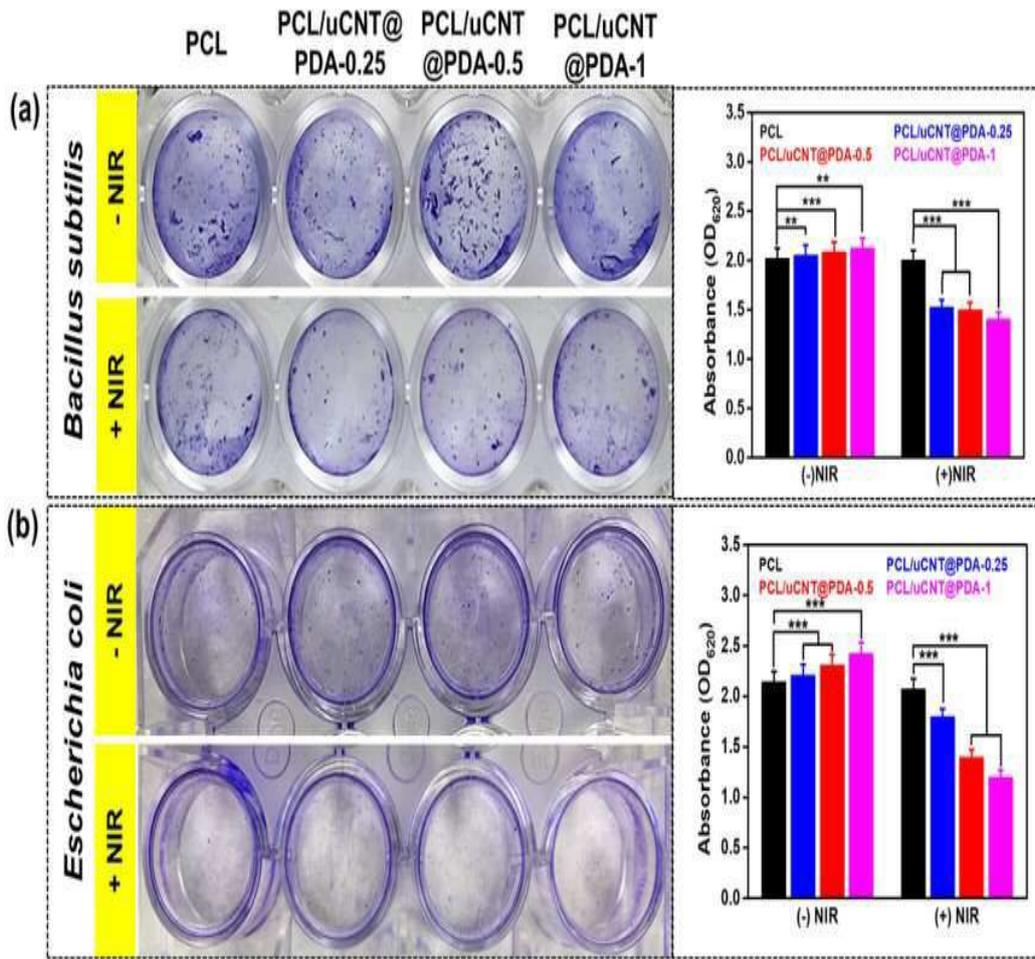
도면7



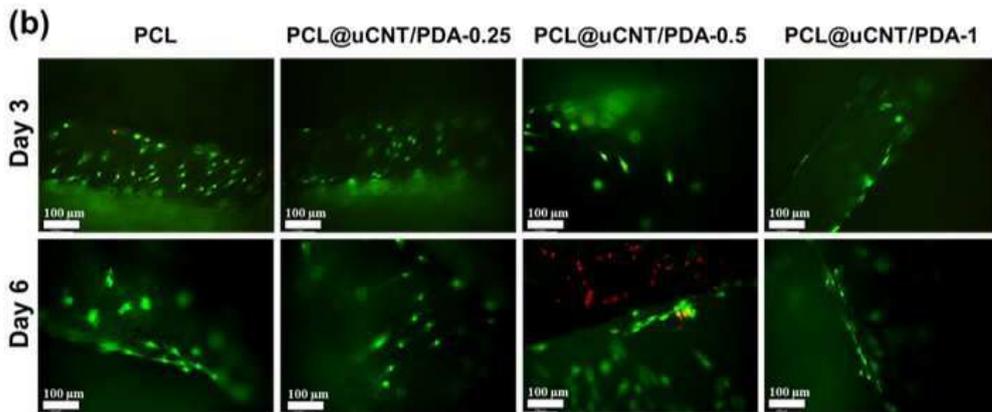
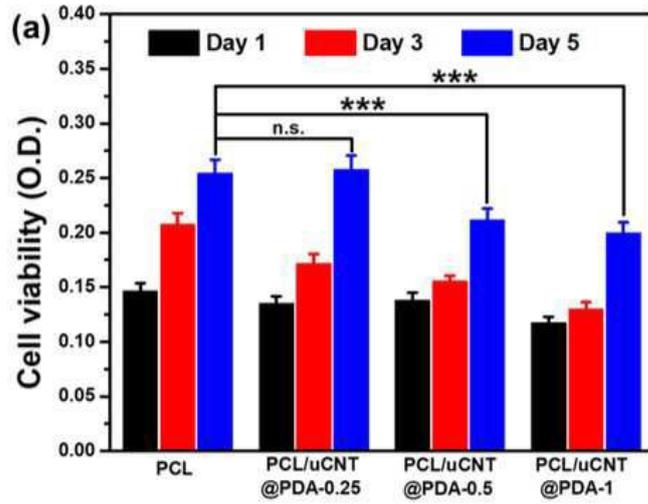
도면8



도면9



도면10



도면11

