



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0126206
(43) 공개일자 2025년08월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61L 26/00 (2006.01) A61L 27/38 (2006.01)
B33Y 70/10 (2020.01) C12N 5/077 (2010.01)
C12N 5/0786 (2010.01)

(52) CPC특허분류

A61L 26/008 (2013.01)
A61L 26/0023 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2024-0021972

(22) 출원일자 2024년02월15일

심사청구일자 2024년02월15일

(71) 출원인

강원대학교산학협력단

강원도 춘천시 강원대학길 1 (효자동)

(72) 발명자

임기택

강원도 춘천시 후석로 325 춘천포스코더샵아파트
112동 2308호

태잘 파틸

대전광역시 유성구 신성남로95번길 18 - 1

(74) 대리인

구현서

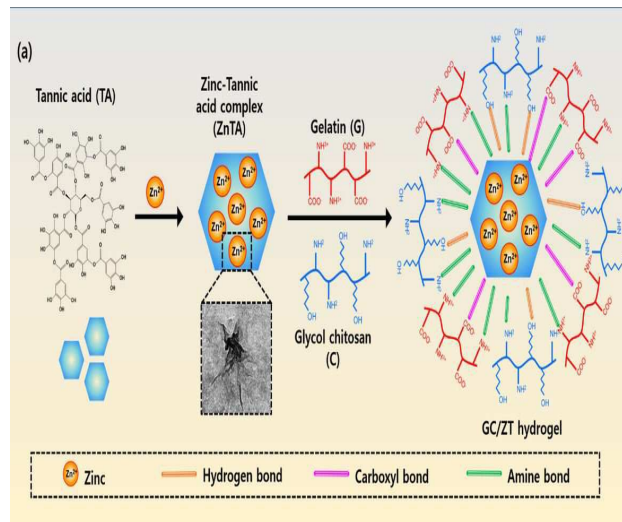
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 생리활성을 가지는 3차원 인쇄 가능한 아연 및 탄닌산 삽입된 젤라틴 글리콜 키토산 하이드로겔 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 젤라틴과 글리콜 키토산을 아세트산에 첨가하고 교반한 후, 1% 내지 4%(w/w)의 ZnTA 분말을 상기 젤라틴/글리콜 키토산 폴리머에 첨가하는 단계를 포함하는 3차원 인쇄 가능한 아연 및 탄닌산 삽입된 젤라틴 글리콜 키토산 하이드로겔을 제조하는 방법, 그 방법에 의하여 제조된 하이드로겔 및 그 용도에 관한 것이다. 본 발명의 GC/ZT 스캐폴드는 박테리아 감염과 상처 치유를 극복하기 위한 임상 적용을 위한 좋은 후보가 될 수 있다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61L 26/0038 (2013.01)
A61L 26/0085 (2013.01)
A61L 27/3804 (2013.01)
B33Y 70/10 (2023.05)
C12N 5/0645 (2025.01)
C12N 5/0656 (2013.01)
A61L 2300/21 (2013.01)
A61L 2300/216 (2013.01)
C12N 2533/30 (2024.08)

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
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	미세전류 자극을 이용한 조직공학용 3D 프린팅 전도성 하이드로겔 패치 개발
과제수행기관명	강원대학교 산학협력단
연구기간	2022.06.01 ~ 2025.05.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

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

명세서

청구범위

청구항 1

젤라틴과 글리콜 키토산을 산 용액에 첨가하고 교반한 후, 1% 내지 4%(w/w)의 ZnTA 분말을 상기 젤라틴/글리콜 키토산 폴리머에 첨가하는 단계를 포함하는 3차원 인쇄 가능한 아연 및 탄닌산 삽입된 젤라틴 글리콜 키토산 하이드로겔을 제조하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 방법에서 젤라틴은 10% w/v, 글리콜 키토산은 5% w/v 첨가하는 것을 특징으로 하는 3차원 인쇄 가능한 아연 및 탄닌산 삽입된 젤라틴 글리콜 키토산 하이드로겔을 제조하는 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항의 방법에 의하여 제조된 하이드로겔.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 하이드로겔의 저장 탄성률(storage modulus)은 1744.9 Pa 내지 12814 Pa인 하이드로겔.

청구항 5

제3항의 하이드로겔을 포함하는 항산화용 조성물.

청구항 6

제3항의 하이드로겔을 포함하는 습윤용 조성물.

청구항 7

제3항의 하이드로겔을 포함하는 항생용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 조성물은 *Bacillus subtilis* 및 *Escherichia coli*에 대한 항생 활성을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

젤라틴과 글리콜 키토산을 아세트산에 첨가하고 교반한 후, 1%(w/w)의 ZnTA 분말을 상기 젤라틴/글리콜 키토산 폴리머에 첨가하는 단계를 포함하여 제조된 하이드로겔을 포함하는 대식세포 성장용 조성물.

청구항 10

젤라틴과 글리콜 키토산을 아세트산에 첨가하고 교반한 후, 4%(w/w)의 ZnTA 분말을 상기 젤라틴/글리콜 키토산 폴리머에 첨가하는 단계를 포함하여 제조된 하이드로겔을 포함하는 인간 피부 섬유아세포(HDF; Human Dermal Fibroblast) 이동 촉진용 조성물.

청구항 11

제3항의 하이드로겔을 인간 피부 섬유아세포(HDF; Human Dermal Fibroblast)에 인 비트로에서 처리하여 상기 세포에서 PCNA, CDK4, CDK6, TGF-베타1, 피브로넥틴 또는 콜라겐 유전자의 상대적 발현을 촉진하는 방법.

청구항 12

젤라틴과 글리콜 키토산을 아세트산에 첨가하고 교반한 후, 1% 내지 4%(w/w)의 ZnTA 분말을 상기 젤라틴/글리콜 키토산 폴리머에 첨가하는 단계를 포함하여 제조된 하이드로겔을 대식세포(Macrophage)에 인 비트로에서 처리하

여 상기 세포에서 IL-4, ARG-1, VEGF, CD163, 및 IL-10 유전자의 상대적 발현을 증가시키고, TGF-베타1의 상대적 발현을 감소시켜, 대식세포를 M2 분극화를 유도하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 생리활성을 가지는 3차원 인쇄 가능한 아연 및 탄닌산 삽입된 젤라틴 글리콜 키토산 하이드로겔 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인간의 세균 감염은 인류의 건강에 심각한 위협이 되어 왔다. 박테리아는 상처와 면역력이 낮은 기관을 감염시키기 더 쉽다. 항생제는 20세기에 박테리아와 싸우기 위해 발견되었으며, 이는 항균 전략을 시작하는 데 획기적인 사건이었다. 항생제 시대는 동물에 대한 독성이 낮고 박테리아를 죽이는 효율적인 능력으로 인해 호황을 누리고 있었다. 불행하게도 박테리아가 항생제에 대한 내성과 내성을 갖게 되자 치료법은 효과가 없었다. 이러한 저항성 박테리아는 병원성이 있으며 패혈증, 수막염, 심낭염과 같은 치명적인 질병의 주요 원인이다.

[0003] 최근 세계보건기구(WHO) 연구에 따르면 내성 박테리아로 인해 매년 전 세계적으로 약 77억 명이 사망하는 것으로 추정된다. 2050년에는 그 수치가 1,000만 명에 이를 것으로 예상되며, 이는 전 세계 암으로 인한 사망자 820만 명을 넘어설 것이다. 따라서 박테리아 감염을 극복하는 것은 항생제 내성과 내성에 대한 놀라운 잠재력으로 인해 어렵고 필수적이다.

[0004] 또한 패혈증은 매년 1,100만 명의 사망자를 발생시키는 심각한 감염 관련 결과이다. 이는 패혈증 관련 사망률의 이전 추정치의 두 배이며 전 세계 모든 사망자 중 19.7%를 차지한다. 따라서, 효과적인 조직공학과 상처치유를 통해 박테리아를 성공적으로 제거할 수 있는 소재의 개발이 시급히 요구되고 있다.

[0005] 지금까지 항생제 내성 극복, 세균 부착 방지, 미생물 박멸, 생물막 형성 저해 등이 가능한 생체재료를 개발하기 위한 광범위한 연구가 진행되어 왔다.

[0006] 항균 특성이 있는 고분자 코팅, 항균 효과가 있는 금속 나노 입자, 자연에서 영감을 받은 항균 표면, 전기 신호, 빛 조사(예: NIR, UV 및 가시광선) 및 초음파로 표면을 자극하는 등 항균 표면을 만들기 위한 다양한 방법이 제안되었다.

[0007] 예를 들어, 고분자복합 폴리에틸렌글리콜-키토산 하이드로겔은 황색포도상구균에 대한 항균효과를 위해 개발되었으며, 녹농균에 대한 항균활성은 폴리에틸렌글리콜-키토산 하이드로겔이라는 고분자복합 하이드로겔을 개발함으로써 달성되었다[J. Ye, Q. Li, Y. Zhang, Q. Su, Z. Feng, P. Huang, C. Zhang, Y. Zhai, W. Wang, ROS scavenging and immunoregulative EGCG@Cerium complex loaded in antibacterial polyethylene glycol-chitosan hydrogel dressing for skin wound healing, Acta Biomaterialia 166 (2023) 155-166].

[0008] 당뇨병성 상처 치유를 목적으로 다면체 올리고머 실세스퀴옥산 - 폴리에틸렌 글리콜-하이드록시프로필트리메틸 암모늄 클로라이드 키토산(POSS-PEG-CHO)을 생산하기 위한 연구가 수행되었다. 그 하이드로겔은 대장균에 대해 탁월한 살균 특성을 나타냈으나, 그럼에도 불구하고 그람양성균인 황색포도상구균에 대해서는 효능이 떨어지는 것으로 나타났다[C. Li, T. Jiang, C. Zhou, A. Jiang, C. Lu, G. Yang, J. Nie, F. Wang, X. Yang, Z. Chen, Injectable self-healing chitosan-based POSS-PEG hybrid hydrogel as wound dressing to promote diabetic wound healing, Carbohydrate Polymers 299 (2023) 120198].

[0009] [선행 특허 문헌]

[0010] 대한민국 특허 공개번호 제10-2023-0124821호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 상기의 문제점을 해결하고, 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 항생활성과 면역 조절 활성을 가지는 신규한 스캐폴드를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 젤라틴과 글리콜 키토산을 아세트산에 첨가하고 교반한 후, 1% 내지 4%(w/w)의 ZnTA 분말을 상기 젤라틴/글리콜 키토산 폴리머에 첨가하는 단계를 포함하는 3차원 인쇄 가능한 아연 및 탄닌산 삽입된 젤라틴 글리콜 키토산 하이드로겔을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0013] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 방법에서 젤라틴은 10% w/v, 글리콜 키토산은 5% w/v 첨가하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0014] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 방법에 의하여 제조된 하이드로겔을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 하이드로겔의 저장 탄성률(storage modulus)은 1744.9 Pa 내지 12814 Pa 인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0016] 또 본 발명은 상기 본 발명의 하이드로겔을 포함하는 항산화용 조성물을 제공한다.
- [0017] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 하이드로겔을 포함하는 습윤용 조성물을 제공한다.
- [0018] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 하이드로겔을 포함하는 항생용 조성물을 제공한다.
- [0019] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 *Bacillus subtilis* 및 *Escherichia coli*에 대한 항생 활성을 가지는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0020] 또 본 발명은 젤라틴과 글리콜 키토산을 아세트산에 첨가하고 교반한 후, 1%(w/w)의 ZnTA 분말을 상기 젤라틴/글리콜 키토산 폴리머에 첨가하는 단계를 포함하여 제조된 하이드로겔을 포함하는 대식세포 성장용 조성물을 제공한다.
- [0021] 또한 본 발명은 젤라틴과 글리콜 키토산을 아세트산에 첨가하고 교반한 후, 4%(w/w)의 ZnTA 분말을 상기 젤라틴/글리콜 키토산 폴리머에 첨가하는 단계를 포함하여 제조된 하이드로겔을 포함하는 인간 피부 섬유아세포(HDF; Human Dermal Fibroblast) 이동 촉진용 조성물을 제공한다.
- [0022] 또 본 발명은 상기 본 발명의 하이드로겔을 인간 피부 섬유아세포(HDF; Human Dermal Fibroblast)에 인 비트로에서 처리하여 상기 세포에서 PCNA, CDK4, CDK6, TGF-베타1, 피브로넥틴 또는 콜라겐 유전자의 상대적 발현을 촉진하는 방법을 제공한다.
- [0023] 또한 본 발명은 젤라틴과 글리콜 키토산을 아세트산에 첨가하고 교반한 후, 1% 내지 4%(w/w)의 ZnTA 분말을 상기 젤라틴/글리콜 키토산 폴리머에 첨가하는 단계를 포함하여 제조된 하이드로겔을 대식세포(Macrophage)에 인 비트로에서 처리하여 상기 세포에서 IL-4, ARG-1, VEGF, CD163, 및 IL-10 유전자의 상대적 발현을 증가시키고, TGF- β 베타1의 상대적 발현을 감소시켜, 대식세포를 M2 분극화를 유도하는 방법을 제공한다.
- [0024] 이하 본 발명을 설명한다.
- [0025] 본 발명은 대식세포 분극화 및 조직 공학을 위한 3D 프린팅 가능성, 항균성, 항산화성, 접착성을 가지는 하이드로겔을 개발하였다.
- [0026] 본 발명에서 본 발명자들은 상처 치유 응용을 위한 강력한 항균 특성을 갖춘 아연/탄닌산(ZnTA)이 포함된 젤라틴/글리콜 키토산(이하, 'GC/ZT'이라 함) 하이드로겔을 제조했다. 하이드로겔의 점탄성과 자가치유 거동을 이해하기 위해 유변학적 특성을 조사하였다. 그 후, 3D 프린팅된 스캐폴드를 제작하고 하룻밤 냉장 및 알데히드 결합을 통해 이중 가교하여 젤라틴과 글리콜 키토산 사이의 구조를 안정화했다.
- [0027] GC/ZT 하이드로겔은 *Escherichia coli* 및 *Bacillus subtilis*에 대해 상당한 항균 효과뿐만 아니라 강력한 생물막 파괴 특성을 나타냈다. 섬유아세포와 대식세포를 이용한 시험관 내 결과에서는 GC/ZT가 ZnTA 첨가 후에도 세포독성이 무시할 만큼 미미한 것으로 나타났다. 세포는 하이드로겔의 존재 하에서 향상된 증식을 나타냈으며, 이는 qRT-PCR 및 면역세포화학 분석에 의해 확인되었다.
- [0028] 또한, ZnTA 복합체가 있는 경우 하이드로겔은 M1 및 M2 편광을 모두 나타내는 반면, 순수한 GC 하이드로겔은 M1 편광 쪽으로 더 기울어졌다.
- [0029] 또한, 동물 모델에서 GC/ZT-0과 GC/ZT-4의 상처 치유 잠재력은 유의한 결과를 보여주었다. 위에서 언급한 큰 잠재력을 위해 다기능 GC/ZT 하이드로겔 및 3D 프린팅 구조는 항균 재료, 상처 드레싱 및 임상 응용 분야로서 유

망한 네트워크를 제공한다.

[0030] 본 발명은 아연-탄닌산 복합체를 젤라틴 및 글리콜 키토산 생체고분자에 통합하여 GC/ZT 하이드로겔을 제조했다 (도 1(a)).

[0031] 이 하이드로겔은 ZnTA 복합체 존재 시 우수한 인쇄성, 접착성, 자가 치유 및 유변학적 특성을 나타냈다. 글리콜 키토산을 함유한 젤라틴은 향상된 항균 효과를 나타냈다. ZnTA는 하이드로겔의 항산화 특성, 세포 증식 및 세포 이동 능력을 향상시키기 위해 사용되었다. 또한, GC/ZT는 우수한 생체적합성과 관련 유전자 발현을 나타냈다.

[0032] 본 발명자들은 또한 샘플이 있는 상태에서 대식세포 분극화를 평가하고 스캐폴드를 이용한 상처 치유를 위한 동물 실험도 평가했다.

[0033] 본 발명의 개요는 도 1(a, b)에 제시되어 있다.

발명의 효과

[0034] 본 발명은 다기능 잠재력과 면역 조절 효과를 지닌 ZnTA 통합 천연 고분자 젤라틴/글리콜 키토산 하이드로겔은 3D 인쇄 가능한 항균 및 상처 치유 스캐폴드로 개발하였다. GC/ZT 하이드로겔은 뛰어난 유변학적 특성, 접착력, 항산화 활성, 박테리아 사멸 가능성, 세포 증식 및 M2 분극을 보여주었다. 모든 하이드로겔 중에서 GC/ZT-4 하이드로겔은 높은 접착 강도(~210 kPa)와 저장 탄성률(10 rad/s에서 12814 Pa)을 나타냈다. GC/ZT-1~4 샘플은 우수한 항산화 특성을 나타내어 감염 부위의 산화 스트레스를 줄일 수 있다. 하이드로겔의 3D 인쇄 가능성이 수행되었으며 스캐폴드는 기계적 안정성을 위한 물리적 및 화학적 가교에 기인한다. 체외 항균 실험에서는 글리콜 키토산과 ZnTA 복합체가 하이드로겔에 뛰어난 항균 효과와 생물막 제거 효과를 부여하는 것으로 나타났다. 또한, 모든 하이드로겔은 우수한 생체적합성과 향상된 세포 이동을 보여주었다. 상처 치유 유전자(콜라겐, 피브로넥틴, TGF- β 1)의 발현은 하이드로겔의 존재 하에서 상향 조절되었다. 스캐폴드에 ZnTA 입자가 존재하기 때문에 대식세포 세포의 분극이 M2 쪽으로 유도되었다. M1 분극은 우리 몸의 세포를 감염으로부터 보호하고 신체의 1차 방어선을 활성화한다. 그러나 M2는 세포 증식과 상처 치유 기능을 돕는다. GC/ZT-4 하이드로겔의 M2 분극화는 IL-4, ARG-1, VEGF, CD163, IL-10 유전자의 상향 조절을 통해 조사되었다. 또한 스캐폴드의 상처 치유 가능성을 동물 모델에서 조사한 결과 유의미한 결과가 나타났다. 결론적으로, 본 발명은 박테리아 억제, 생물막 제거, 세포 증식, 대식세포 분극화 및 상처 치유를 위한 다기능 3D 프린팅 가능한 GC/ZT 하이드로겔 디자인을 제시했다.

[0035] 따라서 본 발명의 GC/ZT 스캐폴드가 박테리아 감염과 상처 치유를 극복하기 위한 임상 적용을 위한 좋은 후보가 될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1은 GC/ZT 하이드로겔 제조 및 적용의 도식화: (a) ZnTA 복합체의 합성 및 젤라틴/글리콜 키토산에 통합하여 GC/ZT 하이드로겔 개발하는 과정이고, (b) 하이드로겔의 3D 프린팅 및 박테리아 억제, 조직 재생 및 대식세포 폴라라이제이션에 적용에 대한 그림,

도 2는 ZnTA 복합체의 물리화학적 특성 (a) SEM, (b) ZnTA 복합체의 원소 매핑 및 원자량(%), (c) TEM 및 (d) AFM은 아연 도핑된 탄닌산(ZnTA)의 형태학적 구조, (e) FTIR 스펙트럼, 및 (f(i-iv)) 다양한 결합 형성을 위한 TA 및 ZnTA의 XPS를 보여주는 그림,

도 3은 GC/ZT 스캐폴드의 물리화학적 특성을 나타낸 그림으로, (a) GC/ZT 하이드로겔 합성의 도식적 표현, (b) GC/ZT 하이드로겔의 유변학적 및 자가 치유 특성 (i) 온도 스윙, (ii) 진폭 스윙, (iii) 진동 주파수 스윙, (iv) 하이드로겔의 요변성 거동, (c) 3D 인쇄된 동결 건조 스캐폴드의 사진(인쇄 후) 이미지 및 SEM 이미지 (d) 스캐폴드의 FTIR, (e) XRD, (f) DPPH 소거 활동 스캐폴드의 (g) 접촉각 정량적 결과 및 GC/ZT 제조 필름의 이미지 및 (h) 1XPBS에서 스캐폴드의 분해 속도. 데이터는 평균±표준편차로 표시됨(*p<0.05, **p<0.01),

도 4는 GC/ZT 하이드로겔의 접착 특성을 나타낸 그림으로, (a) 다양한 천연 및 합성 플랫폼에 대한 하이드로겔 접착, (b) 수행된 랩-전단 테스트의 도식적 표현, (c) 하중-변위 곡선, (d) 접착 강도 및 (e) GC/ZT 하이드로겔의 궁극적인 접착 강도를 나타냄,

도 5는 GC/ZT 스캐폴드의 항균 특성을 나타낸 그림으로, (a,b) B. subtilis 및 E. coli의 억제율 (c) 생/사멸 분석, (d) 스캐폴드 처리된 박테리아의 한천 플레이팅, (e) GC/ZT 스캐폴드를 사용한 박테리아 배양의 SEM 이미지 (f) 크리스탈 바이올렛 염색 후 처리된 B. subtilis 및 E.coli 생물막의 현미경 이미지 및 (g) 염료를 95%

에탄올에 용해시킨 후 490 nm에서의 각각의 흡광도, (h) GC/ZT 처리 시 박테리아 성장을 억제하고 박멸하기 위한 스캐폴드와 박테리아의 가능한 상호 작용 가능성의 도식적 표현. 데이터는 평균±표준편차로 표시됨 (*p<0.05, **p<0.01).

도 6은 GC/ZT 샘플의 생체 적합성 및 HDF 세포에 대한 효과를 나타낸 그림으로, (a) HDF 세포의 세포 생존 가능성, (b) 대식세포의 세포 생존 가능성 및 (c) 샘플 존재 시 HDF 세포의 세포 이동 (d-i) q-PCR 1일 및 7일 처리 후 PCNA, CDK4, CDK6, TGF-β1, 피브로넥틴 및 콜라겐의 결과, (j) 샘플 존재 하에서 유전자의 상향 조절 및 하향 조절을 위한 세포 상호 작용의 개략도, (g) 면역형광 이미지 5일 처리 후 HDF 세포(빨간색: 피브로넥틴, 녹색: 콜라겐, 파란색: 핵)를 나타냄. 데이터는 평균 ± 표준 편차로 표시됨(*p<0.05, **p<0.01, ns. 유의하지 않음),

도 7은 인 비트로에서 대식세포 분극 조절에 있어 GC/ZT 샘플의 잠재력을 나타낸 그림으로, (a) 처리 후 대식세포의 광학 이미지 (b) IL-6, iNOS 및 IL-β1에 의한 M1 분극의 q-PCR 결과 (c) qRT-PCR IL-4, ARG-1, VEGF, CD163, IL-10 및 TGF-β1에 의한 M2 대식세포 분극 결과, (d) M1/M2 분극의 ICC 결과 및 (e) GC/ZT-0 및 GC/ZT-4 환경에서 대식세포 분극의 도식적 요약을 나타냄. 데이터는 평균 ± 표준 편차로 표시됨(*p<0.05, **p<0.01, ns. 유의하지 않음).

도 8은 14일 처리 후 GC/ZT 스캐폴드의 상처 치유 잠재력에 대한 생체 내 평가한 그림으로, (a) 상처 기저부에서 조직의 발달을 나타내는 처리 및 처리되지 않은 쥐의 H&E 염색으로 깊은 표면 표피(E)의 존재를 보여줌. 표피(D), 모낭(H), 피지선(S) 및 두꺼운 결합 조직으로 구성된 진피 내부 망상; (b) 대조군, GC/ZT-0 및 GC/ZT-4 처리 그룹에서 콜라겐 침착(청색 얼룩) 및 각질(적색 얼룩)의 존재를 보여주는 3개 그룹의 Masson 삼색 염색,

도 9는 탄닌산의 SEM 이미지,

도 10은 아연 탄닌산 복합체의 EDS 맵핑 합쳐진 이미지,

도 11은 아연 탄닌산 복합체의 맵 스펙트럼,

도 12는 탄닌산과 아연 탄닌산 복합체의 XRD 패턴,

도 13은 글리콜 키토산의 합성 반응,

도 14는 키토산과 글리콜 키토산의 FTIR 스펙트럼,

도 15는 진동 주파수 10rad/s에서 GC/ZT 하이드로겔의 저장 탄성률,

도 16 (a) GC/ZT 3D 인쇄 구조의 TGA 및 (b) DTG 곡선,

도 17은 여러 시간 간격에서 DPPH assay of GC/ZT 샘플들의 DPPH 어세이 결과,

도 18은 GC/ZT 하이드로겔로 처리된 대식세포의 생존/사멸 분석 결과,

도 19는 GC/ZT 시료 존재 시 24시간 이내에 이동된 세포의 정량적 결과를 나타낸 그림.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재된 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[0038] 실시예 1. 재료

[0039] 돼지 피부의 젤라틴(겔 강도 300, A형), 키토산(중분자량), 탄닌산, 2,2-디페닐-1-피크릴히드라질(DPPH)은 대한민국 Sigma Aldrich로부터 구입했다. 염화아연(무수)은 독일 ThermoScientific에서 구입했다. Calcein AM 염료, 요오드화 프로피듐(PI) 및 SYTO9 염색은 대한민국 서울 Invitrogen에서 구입했다. 유사하게, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 2000은 유럽 벨기에 Alfa Aesar로부터 구입하였다. 대장균(KCTC 2593)과 고초균(Bacillus Subtilis)은 Korean Collection of Type Cultures(KCTC)에서 제공받았다. WST-8 세포 생존성 키트는 Cellrix® (MediFab Co., Ltd. 대한민국)에서 구입했다. 인간 진피 섬유아세포(HDF)와 RAW 264.7 세포는 American Type Cell Culture(ATCC, USA)에서 구입했다. 모든 약품은 별도의 정제과정 없이 구매한 그대로 사용하였다.

[0040] 실시예 2. ZnTA 복합체의 합성

[0041] 4%(w/v)의 탄닌산(TA)을 균질한 혼합물이 얻어질 때까지 증류수에 혼합했다. 염화아연을 첨가하기 전에 탄닌산

용액의 pH를 1M NaOH를 사용하여 8.0으로 조정했다. 동시에 2% 염화아연 용액을 제조하고 pH를 5.5로 설정하였다. TA 용액에 ZnCl₂ 용액을 첨가하고 실온에서 1시간 동안 격렬하게 교반하였다. 이후, 분말 물질을 여러 번 세척하고 물이 증발할 때까지 40℃에서 건조시켰다. 건조 후, 결정을 막자사발과 막자로 분쇄하고 추가 사용 및 특성화를 위해 미세 분말을 수집했다.

[0042] 실시예 3. 글리콜 키토산의 제조

[0043] 글리콜 키토산은 기존 논문을 약간의 수정을 거쳐 제조되었다[M. Zhang, X.H. Li, Y.D. Gong, N.M. Zhao, X.F. Zhang, Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PEG, Biomaterials 23(13) (2002) 2641-2648].

[0044] 요약하면, 2% 아세트산에 2% 키토산 용액을 제조했다. 키토산이 완전히 용해된 후 동량의 PEG 2000을 첨가하고 상온에서 2시간 동안 교반하였다. 다음으로, 용액을 투석하여 산성 pH를 중화시킨 후 동결 건조 전에 -70℃에서 동결시켰다.

[0045] 실시예 4. 하이드로겔 제형

[0046] 젤라틴(10% w/v)과 글리콜 키토산(5% w/v)을 1% 아세트산에 첨가하고 균질한 혼합물이 얻어질 때까지 60℃에서 자석으로 교반했다. 1%, 2%, 4%(w/w)의 ZnTA 분말을 젤라틴/글리콜 키토산 폴리머에 첨가하여 GC/ZT-1, GC/ZT-2 및 GC/ZT-4 하이드로겔을 얻었다. ZnTA 입자가 없는 샘플은 GC/ZT-0으로 표시되었다. 구성 요소와 그 구성은 표 1에 요약되어 있다.

표 1

조성	Gelatin (w/v)	Glycol Chitosan (w/v)	ZnTA (w/w)	최종 부피
GC/ZT-0	10% (1 g)	5% (0.5 g)	0% (0 g)	10ml
GC/ZT-1	10% (1 g)	5% (0.5 g)	1% (1.5 mg)	10ml
GC/ZT-2	10% (1 g)	5% (0.5 g)	2% (3 mg)	10ml
GC/ZT-4	10% (1 g)	5% (0.5 g)	4% (6 mg)	10ml

[0048] 표 1은 하이드로겔 개발에서 젤라틴, 글리콜 키토산 및 ZnTA 복합체의 농도를 나타낸다.

[0049] 실시예 5. GC/ZT 하이드로겔의 3D 프린팅

[0050] 모든 하이드로겔은 노즐 온도 및 플랫폼 온도 컨트롤러가 장착된 CELLINK BIO-X로 인쇄되었다. 인쇄 내내 노즐 온도는 30℃ 이하로 유지되었고, 플랫폼 온도는 10℃로 설정되었다.

[0051] 모든 매개 변수는 표 2에 언급되어 있다. 모든 비계는 23G 바늘로 인쇄되었다. 가교를 위해 스캐폴드를 1차 가교를 위해 밤새 4℃에 보관한 다음 화학적 가교를 위해 1% 글루타르알데히드에 담갔다. 2단계 가교결합 후 스캐폴드를 여러 번 세척하여 과량의 글루타르알데히드를 제거하고 pH를 중화시켰다. 나중에 스캐폴드를 2일 동안 동결 건조(EYELA® 동결 건조 장치 2200, 일본 도쿄)하고 특성화 및 기타 실험에 사용했다.

표 2

파라미터	GC/ZT-0	GC/ZT-1	GC/ZT-2	GC/ZT4
니들 사이즈 (G)	23G	23G	23G	23G
압력(KPa)	80-90	130	160	180
속도 (mm/s)	7	7	7	6
프린트 헤드 온도 (℃)	28 ℃	28 ℃	28 ℃	28 ℃
프린트 베드 온도 (℃)	10 ℃	10 ℃	10 ℃	10 ℃

[0053] 표 2는 GC/ZT 하이드로겔의 3D 프린팅의 파라미터

[0054] 실시예 6. ZnTA 복합체와 글리콜 키토산의 물리화학적 특성 분석

[0055] ZnTA 복합체의 형태에 대한 정보를 얻기 위해 주사전자현미경(SEM; Hitachi S-4800, USA), 투과전자현미경(TEM, JEM-2100F, JEOL, Japan) 및 원자력현미경(AFM, Nanscope 5, Bruker, Germany)을 수행하였다.

- [0056] 분말 샘플을 그리드에 증착하고 금 스퍼터 코팅으로 코팅하여 SEM 이미지를 캡처했다. ZnTA 복합체에 아연의 존재는 에너지 분산 분광법(EDS, Hitachi S-4800, USA) 매핑 분석을 통해 확인되었다. 푸리에 변환 적외선 분광법(Frontier, Perkin Elmer, UK)을 사용하여 $400\text{--}4000\text{cm}^{-1}$ 범위의 아연과 탄닌산의 화학적 상호작용을 분석했으며, 4cm^{-1} 의 분해능 단계에서 32회 스캔을 수행했다. 아연 입자의 화학적 존재를 보여주기 위해 X선 광전자 분광법(XPS, K-Alpha+, 미국 메사추세츠 소재 Themofischer 제품)도 수행되었다. ZnTA 복합체의 구조적 변화는 40kV 및 30mA의 전류에서 작동되는 Cu K α 방사선을 사용하여 X선 회절계(XRD; X'Pert PRO MPD, Philips, Eindhoven, 네덜란드)로 모니터링되었다. 마찬가지로 키토산과 글리콜 키토산의 FTIR을 수행하여 화학적 변화를 분석하고 글리콜 키토산의 발달을 확인했다.
- [0057] 실시예 7. 하이드로겔 및 3D 프린팅된 스케폴드의 특성화
- [0058] GC/ZT의 유변학적 특성은 레오미터(TA Instruments, New Castle, USA)를 사용하여 분석되었다. 점도 및 전단 응력 측정은 전단 속도를 변화시켜 수행되었다. 저장 탄성률(G')과 손실 탄성률(G'')은 1Hz의 지속 주파수와 0.1%의 일정한 변형률에서 온도의 함수로 측정되었다. 3D 프린팅 구조물의 형태는 주사전자현미경(SEM, Hitachi-S4800, Tokyo, Japan)을 사용하여 1.0 kV/cm의 가속 전압으로 조사되었다. 모든 이미지는 5.0kV에서 10 μm 및 100 μm 해상도로 촬영되었다. 푸리에 변환 적외선 분광법(FTIR)(Frontier, Perkin Elmer, UK)을 사용하여 $400\text{--}4000\text{cm}^{-1}$ 범위의 GC/ZT 하이드로겔의 화학적 상호작용을 조사했으며, 4cm^{-1} 의 분해능 단계에서 32회 스캔을 수행했다.
- [0059] ZnTA 첨가 유무에 따른 중합체의 구조 변화는 40 kV 및 30 mA 전류에서 작동되는 Cu K α 방사선을 사용하여 X선 회절계(XRD; X'Pert PRO MPD, Philips, Eindhoven, 네덜란드)로 모니터링되었다. GC/ZT 인쇄 구조물의 열 안정성은 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 600 $^{\circ}\text{C}$ 까지 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 가열 속도로 질소 가스 하에서 열중량 분석기(TGA)를 통해 평가되었다. 분석은 10 mm/min의 일정한 속도로 수행되었다.
- [0060] 실시예 8. 하이드로겔의 접착성
- [0061] 유니버설 시험측정장비(UTM; MCT-1150, AND Inc., Japan)를 이용하여 램-전단 기법을 이용하여 상온에서 하이드로겔의 접착력을 조사하였다[D.K. Patel, T.V. Patil, K. Ganguly, S.D. Dutta, K.-T. Lim, Nanocellulose-assisted 3D-printable, transparent, bio-adhesive, conductive, and biocompatible hydrogels as sensors and moist electric generators, Carbohydrate Polymers 315 (2023) 120963].
- [0062] 요약하면, 도 3(a)의 개략도에 표시된 대로 동일한 무게(70mg)의 하이드로겔을 두 개의 4.5 x 1.2cm 판지 표면 사이에 끼우고 20분 동안 건조되도록 방치했다. 나중에 당기는 힘이 반대편에서 가해지고 테이터는 UTM에 의해 기록되었다.
- [0063] 실시예 9. 항산화 효율
- [0064] GC/ZT 하이드로겔의 ROS 소거 활성은 DPPH 라디칼에 대한 소거 활성을 측정하여 연구되었다. 동일한 무게의 스케폴드를 0.5ml의 0.1mM DPPH 용액에 담그고 암소에 보관했다. 샘플의 흡광도는 30분, 1시간 및 2시간 후에 UV-가시광선 분광 광도계(Tecan Infinite 200 Pro, Mannedorf, Switzerland)를 사용하여 517nm의 파장에서 측정되었다.
- [0065] 실시예 10. 습윤성(Wettability) 테스트
- [0066] GC/ZT 하이드로겔의 친수성은 정적 접촉각 장비(Phoenix-MT, Komachine, Suwon, 대한민국)를 사용하여 분석되었다.
- [0067] 물 접촉각 측정을 위해 GC/ZT-0, GC/ZT-1, GC/ZT-2 및 GC/ZT-4 하이드로겔 필름을 준비했다. ~5 μl 증류수를 필름 표면에 떨어뜨리고 접촉각을 즉시 측정했다.
- [0068] 실시예 11. 분해 연구
- [0069] 3D 프린팅 구조물의 분해를 분석하기 위해 동일한 무게의 스케폴드를 1ml 1XPBS에 담그고 100rpm 회전 조건으로 유지했다. 각각의 스케폴드를 미리 결정된 간격으로 용액에서 제거하고 무게를 기록했다.
- [0070] 샘플의 질량 손실은 아래 공식을 사용하여 계산되었다.
$$W=(W_i-W_t)/W_i \times 100\% \quad (1)$$
- [0071] 여기서, W_i = 시료의 초기 중량, W_t = 시료의 최종 중량, W = 질량 손실.

- [0072] 실시예 12. 항균 테스트
- [0073] GC/ZT 스케폴드의 고유 항균 특성을 평가하기 위해 표면 항균 활성 테스트를 수행했다.
- [0074] *Escherichia coli*와 *Bacillus subtilis*는 조사를 위한 그람 음성 및 그람 양성 모델 박테리아로 사용되었다. 실험에 사용하기 전에 성장과 유지를 위해 박테리아를 Nutrient Broth 배지에서 배양했다. 동일한 무게의 GC/ZT 스케폴드는 사용하기 전에 멸균되었다. 박테리아를 죽이는 특성을 확인하기 위해 스케폴드가 있거나 없는 배양 배지에 박테리아를 시딩했다. 12시간 동안 배양한 후 배양배지를 10^{-4} 까지 연속희석하여 100 μ l를 미리 준비된 Nutrient agar plate에 고르게 도말하였다. 결과는 SYTO9 및 PI(propidium iodide) 염색을 사용하여 배양 배지에서 살아있는 죽은 박테리아 분석으로 확인되었다.
- [0075] SEM 이미지 연구를 위해 12시간 동안 배양된 박테리아를 원심분리(10,000rpm, 5분)로 수집하고 1X PBS로 3회 세척한 후 등급별(30%, 50%, 70%, 80%) 에탄올 용액으로 탈수했다. 5분 배양. 다음으로, 100% 에탄올에 분산된 박테리아를 2분 동안 배양한 후 SEM 이미지를 위해 금으로 코팅된 유리 커버 슬립 및 스퍼터 위에 떨어뜨렸다.
- [0076] 실시예 13. 항-바이오필름(anti-biofilm) 테스트
- [0077] 바이오필름에서 *E. coli* 및 *Bacillus subtilis*에 대한 GC/ZT 샘플의 효과가 확인하였다.
- [0078] 바이오필름은 96웰 플레이트에서 현상되었다. 이를 위해 신선한 배양물을 준비하고 희석하여 OD600 = 0.1을 얻었다. 희석된 박테리아 배양물(100 μ l)을 바이오필름 형성을 위해 37°C에서 48시간 동안 96웰 플레이트에서 성장시켰다. 그런 다음 스케폴드 추출물을 배양액에 첨가하고 박테리아가 포함된 순수 배지로 설정한 것을 대조군으로 간주했다. 샘플을 6시간 동안 생물막과 상호작용하도록 허용했다. 나중에 상등액을 조심스럽게 제거하여 바이오필름이 잘 남아 있게 했다. 다음으로 0.1% 크리스탈 바이올렛 염색을 20분간 첨가했다. PBS 세척으로 얼룩을 제거하고 건조시켰다. 95% 에탄올을 사용하여 잔류된 바이오필름 염료를 용해시키고 UV 분광 광도계를 사용하여 490nm의 파장에서 흡광도를 기록했다.
- [0079] 실시 14. 세포 배양
- [0080] 인간 진피 섬유아세포(HDF) 세포와 대식세포(RAW 264.7)를 각각 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM) 및 Roswell Park Memorial Institute(RPMI) 1640 배지에서 배양했다. 작업 배지에는 10% FBS와 0.1% Anti-Anti가 보충되었으며, 세포는 37°C, 95% 공기 및 5% CO₂의 가습된 분위기에서 배양되었다. 2~3일마다 배지를 교체하고 세포주가 90% 컨플루언스에 도달하면 계대배양했다.
- [0081] 세포 생존력
- [0082] 제조된 GC/ZT 스케폴드의 세포적합성은 HDF와 대식세포를 이용한 WST-8 분석을 통해 1, 3, 5일 동안 평가되었다. 샘플을 96웰 플레이트에 캐스팅하고 1% 글루타르알데히드로 가교결합했다. 하이드로겔을 여러 번 세척하여 과량의 글루타르알데히드를 제거하고 pH를 중화시켰다. 세포를 배양하기 전에 샘플을 DMEM 배지에 보관했다. 1×10^4 HDF 세포와 대식세포를 96웰 플레이트의 샘플에 별도로 접종했다. 10% WST-8 시약이 포함된 100 μ l의 신선한 배지를 1일, 3일, 5일 후에 각 웰에 교체하고 37°C에서 다음 2시간 동안 배양했다. 흡광도는 UV-vis 분광 광도계(Tecan Infinite 200 Pro, Mannedorf, Switzerland)를 통해 450 nm에서 기록되었다.
- [0083] 세포 이동에 대한 스크래치 분석
- [0084] 하이드로겔 함유 배지가 있는 상태에서 HDF 세포를 사용하여 세포 이동을 연구했다. HDF 세포(2×10^4 개 세포/웰)를 6웰 플레이트에서 배양하고 합류할 때까지 성장하도록 두었다. 단층 세포를 1 ml 멸균 팁을 사용하여 긁어낸 후 1X PBS로 2회 세척하여 분리된 세포를 제거했다. 그런 다음 세포를 DMEM 배지가 포함된 GC/ZT 하이드로겔과 함께 배양했다. 이동하는 세포의 이미지는 광학 현미경(Zeiss Optical Microscope, Wurttemberg, Germany)으로 0시간과 24시간에 포착되었다. 세포 이동은 무세포 영역을 원래 긁힌 선과 비교하여 평가하고 ImageJ 소프트웨어(<https://ij.imjoy.io/>)를 사용하여 계산했다.
- [0085] qRT-PCR 분석
- [0086] 모든 하이드로겔은 실시간 정량 중합효소연쇄반응(qRT-PCR)을 통해 HDF 세포에서 상처 치유 관련 유전자(Fibronectin, Collagen, TGF- β 1) 및 세포 주기 조절 유전자(PCNA, CDK4 및 CDK6)의 증식을 보장하기 위해 발현 분석을 하였다.

[0087] 요약하면, HDF 세포를 DMEM 배지와 함께 6웰 배양 플레이트(2×10^4 세포)에서 배양하고 합류(80%)될 때까지 성장하도록 했다. 인큐베이션 후, 배양 배지를 50 μ l/ml 하이드로겔 함유 배지로 교체했다. 배양 배지는 3일마다 교체되었다. 1일 및 7일 배양 후, TRIzol 시약(Ambion, Life Technologies, New Zealand, USA)을 사용하여 HDF 세포에서 전체 RNA를 추출했다. 전체 RNA 농도는 NanoDrop One 리더(Thermo Scientific, USA)를 사용하여 측정했다. cDNA를 합성하기 위해 primeScript RT 마스터 믹스 시약인 SuperScript Reverse Transcriptase IV를 사용했다. RNA 추출 및 cDNA 합성은 제조업체의 지침에 따라 수행되었다. 다음으로, 하우스키핑 유전자 GAPDH 발현에 따라 정규화하여 배수 변화를 분석하고 대조군 세트와 비교하기 위해 qRT-PCR을 수행하였다. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 값을 이용하여 유전자의 변화 배수를 계산하고 그래프를 작성하였다. 상처 치유 유전자 및 세포주기 조절 유전자의 업스트림 프라이머 및 다운스트림 프라이머는 표 3에 제공된다.

표 3

[0088]

Genes	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (3'-5')
<i>GAPDH</i> (HDF)	ACCACAGTCCATGCCATCA	TCCACCACCTGTTGCTGT
<i>PCNA</i>	CAAGTAATGTCGATAAAGAGGAGG	GTGTACCGTTGAAGAGAGTGG
<i>CDK6</i>	GGATAAAGTTCCAGAGCCTGGAG	GCGATGCACTACTCGGTGTGAA
<i>CDK4</i>	CCATCAGCACAGTTCGTGAGGT	TCAGTTCGGATGTGGCACAGA
<i>Fibronectin</i>	GCCATGACAATGGTGTGAAC	GCAAATGGCACCGAGATATT
<i>Collagen A</i>	CTGACCTTCTGCGCCTGATGTCC	GTCTGGGGCACCAACGTCCAAGGG
<i>TGF-β 1</i>	TGAACCGGCTTTCTGCTTCTCATG	GCGGAAGTCAATGTACAGTGCCGC
<i>GAPDH</i> (murine)	TCCACTCTTCCACCTTC	ACCACCCTGTTGCTGTA
<i>IL-1β</i>	TGCCACCTTTTGACAGTGATG	AAGGTCCACGGGAAAGACAC
<i>IL-4</i>	CCATATCCACGGATGCGACA	AAGCCCGAAAGAGTCTCTGC
<i>IL-10</i>	GCTCTTACTGACTGGCATGAG	CGCAGCTTCTAGGAGCATGTG
<i>IL-6</i>	GTGTCCCAACATTATATGTTCAGT	TACTCGGCAAACCTAGTGCG
<i>iNOS</i>	GCACATCAAAGCGCCATAG	CGGCAAACATGACTTCAGGC
<i>CD-163</i>	GTGGTCAACTCCGCTTGGTA	CTTGGGGCACCATCTGTGAT
<i>VEGF</i>	GCAAGAGAAGACACGGTGGT	CAGGAGGTGGGGTAAGGAG
<i>Arg-1</i>	AACACGGCAGTGGCTTTAAC	GTCAGTCCCTGGCTTATGGTT
<i>TGF-β 1</i>	TGGAGCAACATGTGGAACCTC	TGCCGTACAACCTCCAGTGAC

[0089] 표 3은 여러 유전자에 대한 포워드 및 리버스 프라이머 서열로,

[0090] 표에서 *GAPDH*: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, *PCNA*: Proliferating cell nuclear antigen, *CDK6*: Cell division protein kinase 6, *CDK4*: Cyclin-dependent kinase 4, *TGF- β 1*: Transforming growth factor beta 1, *IL-1 β* : Interleukin-1 beta, *IL*: Interleukin, *iNOS*: Inducible nitric oxide synthase, *CD-163*: Cluster of Differentiation 163, *VEGF*: Vascular endothelial growth factor, *ARG-1*: arginase 1.

[0091] 상처 치유 단백질에 대한 면역세포화학 분석

[0092] 피브로넥틴 및 콜라겐 A에 대한 면역세포화학(ICC) 염색은 GC/ZT 샘플을 5일간 처리한 후 HDF 세포에서 수행되었다. 아무런 처리도 하지 않은 세포를 대조군으로 간주했다.

[0093] 처음에 하이드로겔 처리 후 세포를 얼음처럼 차가운 메탄올로 10분간 고정하고 실온에서 5분간 0.1% TritonX-100으로 투과화시켰다. 또한, 세포를 1% BSA 용액에서 배양하여 비특이적 항체 결합을 차단했다. 다음으로, 세포를 1차 항체와 함께 1시간 동안 배양하고 1X PBS로 세척했다. 세포를 추가로 1시간 동안 2차 항체와 함께 인큐베이션하고 다시 1X PBS로 3회 세척했다. 마지막으로 핵은 DAPI로 염색되었다. 염색 단계는 어두운 조건에서 지속적으로 흔들면서 수행되었다. 커버슬립이 들어 있는 세포를 이미지 캡처용 마운팅 젤이 있는 유리 슬라이드 위에 거꾸로 놓았다. 모든 샘플은 적절한 필터 설정을 사용하여 Leica microsystems 형광 현미경(Leica microsystems Suite X 소프트웨어, LAS X 버전 3.6.0.20104, 독일)에서 20X 배율로 이미지화되었다.

[0094] 대식세포 분극의 시험관 내 평가

[0095] GC/ZT 하이드로겔의 대식세포 분극 효과는 RAW 264.7 세포 존재 하에서 광학 현미경(Zeiss Optical

Microscope, USA)을 사용하여 형태학적 변화를 모니터링한 후 유전자 발현 및 면역세포화학을 통해 조사했다.

[0096] 광학 이미지의 경우, 1×10^4 세포를 24웰 배양 플레이트에서 배양하고 성장시켰다. 나중에, 원하는 기간 동안 세포를 GC/ZT 추출 배지로 처리했다. 어떠한 처리도 하지 않은 대식세포를 대조군으로 간주하였다. 이미지를 캡처하기 위해 세포를 1X PBS로 3회 세척한 후 광학현미경을 이용하여 이미지를 캡처하였다. 샘플 존재 하에서 대식세포의 유전자 발현 변화를 확인하기 위해 qRT-PCR을 수행하였다. 2×10^4 개 세포를 6웰 플레이트에서 배양하고 성장시켰다. 원하는 컨플루언스 후, 대식세포를 GC/ZT 샘플로 처리했다. 시료가 처리된 세포를 TRIzol 시약으로 채취하여 RNA를 추출하였다. cDNA는 primeScript RT 마스터 믹스 시약인 SuperScript Reverse Transcriptase IV를 사용하여 합성되었다. M1 유전자(IL-6, iNOS, IL-1 β) 및 M2 유전자(IL-4, ARG-1, VEGF, CD163, IL-10, TGF- β 1)에 대해 qRT-PCR을 수행하고 발현 수준을 다음과 같이 정규화했다. 하우스키핑 유전자 GAPDH. 결과는 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법으로 계산하여 대조군과 비교한 배수 변화를 구하고 그래프를 그렸다. 상처 치유 유전자 및 세포주기 조절 유전자의 업스트림 프라이머 및 다운스트림 프라이머는 표 3에 제공된다.

[0097] 추가 확인을 위해 ICC(면역세포화학)를 수행하여 세포 내 단백질 발현을 확인했다. ICC 염색을 위해 대식세포를 24웰 플레이트의 멸균된 유리 커버 슬립에서 배양하고(1×10^4 세포) 위에서 언급한 것과 유사한 방식으로 처리했다.

[0098] 요약하면, 더 나은 시각화를 위해 세포를 커버 유리 슬립에서 배양하고 GC/ZT 샘플이 포함된 배지로 처리했다. 아무런 처리도 하지 않은 세포를 대조군으로 간주했다. 처리 후, 대식세포를 1X PBS로 3회 세척하고 3.7% 파라포름알데히드(PFA)로 15분간 고정시켰다. 고정된 세포를 얼음처럼 차가운 메탄올로 10분 동안 투과화시켰다. Fc 차단제는 1% BSA에 희석하여 차단 용액으로 사용했다. Fc 차단제는 IgG 수용체에 의해 발생하는 항체에 대한 비특이적 결합을 방지하기 위해 사용되었다. 차단은 어두운 조건에서 25rpm으로 진탕하면서 10분간 수행되었다. 다음으로, 세포를 200 μ l 희석된 1차 항체와 함께 1시간 동안 배양하고, 1X PBS로 세척한 다음 2차 항체와 함께 배양했다. 핵을 DAPI 용액으로 2분간 염색했다. 과잉 얼룩을 1XPBS로 세척하고 유리 슬라이드의 마운팅 미디 어 한 방울 위에 놓았다. 이미지는 20X 배율의 형광 현미경을 사용하여 캡처되었다. ICC 염색 프로토콜은 투과화 단계 후 어두운 조건에서 수행되었다. 모든 항체는 미국 캘리포니아주 Santa Cruz Biotechnology Inc.에서 구입했다.

[0099] 생체 내 실험

[0100] 제작된 스캐폴드의 상처 치유 능력을 평가하기 위해 생체 내 조사가 수행되었다. 이 목적을 달성하기 위해 평균 체중이 42~52g인 수컷 암 연구소(ICR) 쥐 그룹(총 쥐 수 = 9)을 확보했다. 수술 전 4일 동안 쥐에게 음식과 물을 충분히 공급했다. 실험은 세 그룹으로 나뉘었다: 음성 대조군(처리 없음), GC/ZT-0으로 라벨링된 그룹 1, GC/ZT-4로 라벨링된 그룹 2. 각 그룹은 쥐의 중복으로 구성되었다.

[0101] 본 발명자들은 시험관 내 생물학적 조사에서 입증된 효능으로 인해 생체 내 탐사를 위해 GC/ZT-0 및 GC/ZT-4 스캐폴드를 선택했다. 모든 그룹에는 세 마리의 동일한 쥐가 있다. 즉시 등털을 제거하고 피부 표면을 깨끗이 세척하였다. 이어서, 동물을 옆으로 위치시켰다. 직경 12mm의 멸균 생검 펀치를 사용하여 등 피부의 두 층을 제거하여 원형 절개를 생성하여 전체 두께의 절제 상처를 만들었다. 쥐를 온도 $21 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도 $35 \pm 1\%$ 로 유지되는 안전한 방음실에 두었다. 12시간 명암주기를 통해 공간을 조절하였다. 거시적 수준에서 상처 치유에 대한 검사는 시술 후 7일과 14일에 수행되다. 조직병리학적 검사를 위해, 동물의 고통을 최소화하기 위해 세심한 주의를 기울여 수술 후 14일 동안 쥐를 안락사시켰다.

[0102] 채취한 시료를 3.7% 파라포름알데히드로 2일 동안 고정한 후 조직학적 염색을 실시하였다. 이어서, 12% 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)을 사용하여 4°C 의 온도에서 탈회를 수행하였다. 이후, 조직 샘플은 알코올을 이용하여 세척 및 탈수 과정을 거쳤다. 건조된 샘플을 파라핀 왁스에 넣어 얇은 절편을 만든 후 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 염색과 Masson's trichrome(MT) 염색을 사용하여 염색했다. 중국 베이징 수도의과대학 동물기관사용위원회(IACUC)는 모든 수술 절차를 승인했다. 수술 절차는 동물 실험 및 윤리 위원회(허가 번호 KQYY-202012-004)의 승인을 받았다.

[0103] 본 발명에 제시된 모든 데이터는 평균 $\pm$ 표준 편차(SD)로 표시된다. 데이터는 Student's t-test와 일원 분산 분석(ANOVA)을 사용하는 OriginPro 2019b 소프트웨어를 사용하여 통계 분석을 거쳤다. 통계적 유의성은 $*(p<0.05)$, $** (p<0.01)$ 로 표시하였고, 통계적 유의성이 없는 경우는 n.s로 표시하였다.

- [0105] 상기 실시예의 결과를 상술한다.
- [0106] ZnTA와 글리콜 키토산의 특성 분석
- [0107] 본 발명에서 본 발명자들은 아연-탄닌산 복합체를 준비하고 도 2(a-d)에 설명된 대로 SEM 이미지, EDS 매핑, AFM 및 FE-TEM 이미지를 통해 형태를 조사했다.
- [0108] TA(도 9)와 ZnTA 복합체의 SEM 이미지는 형태학적 변화를 보여준다. TA는 10 μ m~50 μ m 범위의 둥근 모양의 입자이다. ZnTA 복합체는 주변 입자에 부착된 결정되지 않은 입자 클러스터를 보여준다.
- [0109] ZnTA 입자의 복잡성을 더 깊이 이해하기 위해 TEM과 AFM을 수행했다. ZnTA 복합체의 TEM 이미지에서는 SEM 형태와 일치하는 스캐를 구조가 관찰되었다.
- [0110] ZnTA 복합체의 아연, 탄소 및 산소의 비율을 분석하기 위해 EDS를 수행했다. 도 2(b)에서 알 수 있듯이 ZnTA 복합체에는 아연 3.37%, 산소 49.85%, 탄소 원자량 46.78%가 기록되어 ZnTA 복합체 합성 시 아연 이온의 존재를 확인시켜 준다. ZnTA 복합체 EDS 매핑과 맵 스펙트럼의 병합된 이미지가 도 10 및 11에 표시된다. ZnTA 복합체의 크기는 AFM 측정을 사용하여 추가로 결정되었다. 도 2(d)는 합성된 ZnTA 나노입자의 2D 및 3D 사진을 보여준다. 이 그림은 나노입자의 위상학적 구조와 분산을 잘 시각화한다. ZnTA 입자는 100 nm 범위 내에서 관찰되었으며 TEM 이미지에서 확인된 바와 같이 불규칙한 별 형태를 나타냈다.
- [0111] 또한, 도 2(e)의 FTIR 스펙트럼은 TA와 아연 공액 TA의 분자 구조 차이를 검증했다. 순수한 탄닌산이 1700 cm^{-1} 에서 C=O 그룹의 신장을 나타내는 특징적인 피크를 나타냈다는 것이 분명하다. 방향족 C-C 연신으로 인해 1606, 1532 및 1445 cm^{-1} 의 피크도 관찰되었다. 벤젠 고리의 존재는 1174 및 1015 cm^{-1} 을 통해 관찰되는 반면, O-H 결합의 면외 및 면내 진동은 1307 및 752 cm^{-1} 에 기인한다.
- [0112] 1700, 1606, 1444 및 750 cm^{-1} 에서 TA의 특징적인 피크는 ZnTA 복합체에 유지되었다. 그러나 다른 피크에서는 약간의 이동이 관찰되었다. O-H 피크는 1313 cm^{-1} 로 이동하고 벤젠 피크는 1182 및 1020 cm^{-1} 로 이동하여 아연이 포함된 후 탄닌산의 구조 변화를 보여준다. 수산기 피크도 수정 후 3311 cm^{-1} 에서 3328 cm^{-1} 로 이동했다. 따라서 ZnTA 복합체에서 TA 피크의 이동은 아연이 탄닌산의 작용기에 접합되어 있음을 나타낸다.
- [0113] 도 12에서 볼 수 있듯이 TA의 XRD 패턴은 14.16° 및 25.05° 에서 넓은 피크를 나타내며 비정질 형태를 나타낸다. 염화아연으로 변형한 후 피크 형성은 9.88° , 20.11° , 28.87° 및 33.16° 에서 관찰되었다. TA(25.05°) 및 ZnTA(27.87°) 피크에 대한 결정화도 지수(%)는 각각 86.79% 및 45.05%로 계산되었다. 피크와 강도의 이러한 변화는 ZnTA 복합체가 성공적으로 합성되었음을 확인시켜준다. TA에 대한 아연 테코레이션을 추가로 조사하고 요소를 조사하기 위해 XPS 분석을 수행했다.
- [0114] 도 2(f(i))는 TA와 ZnTA의 넓은 스캔 스펙트럼과 ZnTA의 C1s, O1s 및 Zn 2p의 고해상도 스펙트럼을 보여준다(도 2(f(ii-iv))). 아연 피크의 존재는 Zn 2p의 고해상도 XPS 스펙트럼은 Zn 2p의 결합 에너지가 1044.28 eV와 1021.28 eV로 나누어져 있음을 보여준다. 첫 번째 피크는 Zn 2p_{1/2}에 기인하고 두 번째 피크는 Zn 2p_{3/2}에 기인한다. O1s의 XPS는 탄산 아연과 C=O에 기인한 532.09eV에서 2개의 피크로 디콘볼루션된 반면, 탄닌산의 산소에 결합된 아연에 기인한 530.53eV의 피크로 분리되었다. ZnTA 287.6 eV의 피크는 C=O에 기인하고, C-O, 284.8 eV는 C=C에 기인하며 TA에 존재하는 C-C 결합으로 인해 283.3 eV가 나타났다.
- [0115] 물에 대한 용해도와 분해성을 높이기 위해 글리콜 키토산을 합성했다(도 13). 도 14에 나타난 FTIR 스펙트럼에서 키토산은 O-H 및 N-H 신축 진동에 기인한 3314 cm^{-1} 의 특징적인 피크를 보여주었다. 2875, 894(C-H 스트레칭), 1646(아미드 I의 C=O 스트레칭), 1560(아미드 II의 N-H 굽힘) 및 1417 cm^{-1} (아미드 III)과 같은 다른 특징적인 피크도 얻어졌다. C-N 스트레칭, C-O-C 스트레칭, C-O 스트레칭의 존재는 각각 피크 1150, 1060 및 1025 cm^{-1} 에서 확인되었다. 글리콜 키토산으로 변형한 후 PEG 변형으로 인해 아미노기, 수산기 및 아미드기를 포함한 다양한 피크가 이동했다. 그러나 2875, 1150 및 1060 cm^{-1} 특성 피크가 유지되어 키토산의 무결성을 보여준다. 1649 cm^{-1} 의 아미드 I 피크와 비교하여 아미드 II 피크의 강도 감소가 관찰되었다. 이러한 스펙트럼 변화는 키토산의 -NH₂ 그룹이 PEG와 부분적으로 접목되었음을 나타낸다. 키토산이 완전히 접목되면 1571 cm^{-1} 에서 -NH₂ 그룹에 해당하는 피크가 사라지고 결국 반응이 완료된 후 단일 피크가 형성된다. 글리콜 키토산 내에서 1147 cm^{-1} 및

2878 cm^{-1} 에 위치한 피크는 각각 키토산과 PEG에서 발생하는 C-O 및 C-H 스트레칭 진동의 오버레이에 기인할 수 있다.

[0116] GC/ZT 하이드로겔 및 3D 프린팅된 스캐폴드의 특성

[0117] GC/ZT 하이드로겔의 유연학적 특성

[0118] GC/ZT 하이드로겔 및 스캐폴드의 제조 개략도는 도 3(a)에 나와 있다. 처음에는 하이드로겔을 인쇄하기 전에 유연학적 특성을 조사했다. 하이드로겔의 유연학은 하이드로겔을 사용하여 3차원 구조를 제조하는 동안 인쇄성 및 흐름의 균일성에 근본적인 영향을 미친다. 하이드로겔의 유연학적 특성은 도 3(b)에서 포괄적으로 기재된다. 하이드로겔 매트릭스 내의 점도 변화는 온도 변동과 관련하여 면밀히 조사된다(도 3(b)(i)). 25°C ~ 50°C 범위 내에서 모든 하이드로겔의 점도는 온도에 따라 달라지는 것으로 관찰된다. 온도 변화와 관련된 분석은 하이드로겔 구조 내에서 주목할만한 구조적 변형을 보여 주며, 이는 약 30°C ~ 40°C에 걸쳐 저장 탄성률의 큰 감소로 설명된다. 약 30°C에서 방울이 발생했는데, 이는 하이드로겔이 겔과 같은 상태에서 액체 상태로 전환되는 구조적 변화를 나타낸다. 하이드로겔의 점탄성(도 3(b)(iii))은 25°C에서 0.1-100 rad/s의 주파수에서 수행되었다. 하이드로겔의 저장 탄성률은 전체 진동 주파수 범위에서 손실 탄성률보다 높은 것으로 관찰되었다. 이는 하이드로겔의 안정성을 나타낸다. ZnTA가 고분자 매트릭스에 도입된 후 GC/ZT-1과 GC/ZT-2의 저장 탄성률은 약간 증가했다.

[0119] 그러나 GC/ZT-4의 경우 진동 주파수가 증가함에 따라 저장 탄성률이 크게 증가하여 하이드로겔 폴리머 사슬의 뛰어난 이동성과 하이드로겔 네트워크의 탁월한 동적 품질을 암시한다. 또한 모든 하이드로겔의 저장 탄성률 비교는 10 rad/s의 진동 주파수에서 수행되었다(도 15). ZnTA 복합체의 통합 및 연속적인 증가에 따라 저장 탄성률이 1266.4 Pa에서 1744.9 Pa, 1968.8 Pa 및 12814 Pa로 증가하는 것으로 관찰되었다. 이는 ZnTA 복합체가 상호 연결 밀도와 분자간 결합을 증가시킨다는 것을 나타낸다. 하이드로겔의 저장 탄성률의 증폭은 수소 결합과 쌍극자-쌍극자 상호작용의 존재에 기인한다.

[0120] 동작 관련 상처의 독특한 특성을 고려할 때, 드레싱 파열의 잠재적 위험을 효과적으로 해결하기 위해서는 강력한 자가 치유 특성을 지닌 상처 드레싱을 설계하는 것이 필수적이다. GC/ZT-1, GC/ZT-2 및 GC/ZT-4 내에서 금속 배위, 수소 결합, 양이온- π 상호 작용 및 π - π 상호 작용을 포함하는 특정 유형의 결합 및 물리적 상호 작용의 존재는 이론적으로 다음을 제공한다. 그들에게는 유리한 자기 치유 속성이 있다.

[0121] 하이드로겔의 자가 치유 거동을 평가하기 위해 유연학적 회복 테스트를 수행했다. 도 3(b)(ii)에 설명된 대로 변형 진폭 스위치는 GC/ZT-4의 교차점이 100%를 초과하는 것으로 나타났으며 이는 하이드로겔이 최대 100%의 전단 변형에서 안정적임을 나타낸다. 변형 후 하이드로겔의 회복 능력을 평가하기 위해 요변성 측정도 수행되었으며 그 결과는 도 3(b)(iv)에 나와 있다. 하이드로겔의 저장 탄성률은 25°C의 온도에서 1.0%, 100%, 1.0%의 뚜렷한 전단 속도로 측정되었다. 상당히 높은 전단율(100%)을 사용하여 하이드로겔의 변형을 유도하여 점도를 감소시켰다. 전단 속도가 끝나면 하이드로겔은 초기 점도의 회복을 나타낸다. 더 낮은 전단율(1%)에서 GC/ZT-0, GC/ZT-1, GC/ZT-2 및 GC/ZT-4의 저장 탄성률 값은 1281, 1752, 1939 및 3821Pa에서 각각 1233, 1468, 1588 및 3474 Pa으로 변경되었다.

[0122] 복합 하이드로겔의 회복 특성은 전단 종료 후 하이드로겔 내에서 보다 강력한 상호 작용에 의해 촉진된 가교 구조의 확립에 기인한다. 결과적으로, 본 발명에서 고안된 복합 하이드로겔이 나타내는 놀라운 회복 특성은 새로운 자가 치유 하이드로겔로서의 유망한 잠재력을 강조한다. 하이드로겔은 칭찬할 만한 효능과 함께 신속한 자가 치유 능력을 보여주었다. 이러한 자가 치유 능력은 금속 배위, 수소 결합, 양이온- π 상호 작용 및 π - π 상호 작용과 같은 내부 결합 및 기타 물리적 가교 메커니즘을 포괄하는 강력한 상호 작용을 통해 가교 구조가 형성되기 때문이다.

[0123] GC/ZT 3D 프린팅 구조의 특성

[0124] 젤라틴/글리콜 키토산은 도 3(a)의 개략도에 표시된 것처럼 간단한 교반 절차를 통해 ZnTA 복합체와 통합되었다. 모든 하이드로겔에 대해 최적화된 매개변수는 표 2에 언급되어 있다. 스캐폴드의 가교 및 동결 건조 후 샘플의 특성화가 수행되었다. 고배율과 저배율의 사진과 SEM 이미지가 도 3(c)에 나와 있다. 고배율 이미지에서 볼 수 있듯이, ZnTA가 포함된 샘플은 GC/ZT-0 샘플과 비교하여 스캐폴드의 다공성 형태를 나타낼 수 있다. GC/ZT-0, GC/ZT-1, GC/ZT-2 및 GC/ZT-4의 FTIR 스펙트럼은 도 3(d)에 나와 있다. 글리콜 키토산의 일반적인 피크는 3291 cm^{-1} (OH 신축 진동), 1631 cm^{-1} (C=O 신축 진동), 1535 cm^{-1} (N-H 굽힘 진동), 1447 cm^{-1} (-COOH기의 대

칭 신축) 및 1077cm^{-1} (C-O 신축 진동)에서 나타났다. 젤라틴/글리콜 키토산 복합체는 1631cm^{-1} 및 1406cm^{-1} (-COO- 그룹의 대칭 신장)에서 젤라틴에 해당하는 피크를 나타냈는데, 이는 글리콜 키토산이 젤라틴과 균일하게 혼합되었음을 나타낸다. 이러한 상호작용은 키토산의 암모늄($-\text{NH}_3^+$) 이온과 젤라틴의 카르복실($-\text{COO}^-$) 이온 사이의 정전기적 상호작용에서 발생할 수 있다. 이는 정전기 결합이 수소 결합을 통해 화학 결합으로 부분적으로 변형되는 것이다.

[0125] XRD 분석은 ZnTA 복합체의 혼입 후 젤라틴/글리콜 키토산 복합체의 결정질 및 비정질 특성을 특성화하기 위해 수행되었다. 도 3(e)에 표시된 것처럼 젤라틴/글리콜 키토산은 $8.2\sim 8.8^\circ$ 범위의 피크를 나타내며 이는 무정형 특성으로 인한 것이다. 그러나 21° 부근에서 피크가 나타나 ZnTA 복합체의 결합이 확인되었다. 21° 에서의 d-간격은 $4.116\text{\AA}$ 로 계산되었다. 이러한 FTIR 및 XRD 결과는 ZnTA가 젤라틴/글리콜 키토산 중합체 혼합물에 성공적으로 통합되었음을 나타낸다. GC/ZT 스캐폴드의 열 안정성을 분석하기 위해 TGA를 수행했다(도 16(a)). 가교된 GC/ZT-0의 분해는 약 300°C 에서 시작되어 450°C 까지 계속되었다. ZnTA 혼입이 스캐폴드의 열 안정성을 변경하지 않았다는 것을 나타내는 열 안정성 패턴의 중요한 변화는 관찰되지 않았다. 전반적으로, TGA 분석과 DTG 곡선은 가교된 스캐폴드가 300°C 까지 매우 안정적이라는 것을 보여준다. TGA 및 DTG 곡선은 도 16(b)에 나와 있다.

[0126] 항산화 특성

[0127] 감염된 상처는 산화 스트레스를 유발하는 과도한 자유 라디칼을 생성할 수 있다. 이는 결국 DNA 손상, 내피 기능 장애, 효소 분해, 조직 손상 및 지질 과산화로 이어질 수 있다. 항산화력이 있는 스캐폴드는 활성산소를 효과적으로 제거할 수 있으며 이는 만성 상처 치유에 도움이 된다. 좋은 항산화 잠재력을 지닌 갈산, 탄닌산과 같은 폴리페놀. 또한 ZnO는 입자 크기에 따라 항산화 특성도 나타났다. 따라서 GC/ZT 스캐폴드의 폴리페놀은 우수한 항산화 특성을 제공할 수 있을 것으로 기대된다. GC/ZT 샘플의 DPPH 라디칼 소거 가능성은 아무런 처리도 하지 않은 세트를 대조군으로 고려하여 평가되었다. 도 3(f)에 표시된 2시간의 결과는 DPPH 라디칼 소거에 대한 GC/ZT 샘플의 잠재력을 보여준다. 0% ZnTA를 함유한 GC/ZT는 자유라디칼을 감소시킬 수 없었다. 흥미롭게도 ZnTA 혼입은 라디칼 소거 활성을 극적으로 향상시켰다. 도 17에 제시된 데이터는 다양한 시간 간격으로 라디칼 소거 활동을 보여준다. 낮은 농도의 ZnTA는 GC/ZT-4만큼 효과적이었다. 그 효과는 기본적으로 ZnTA 복합체에 탄닌산이 존재하기 때문이었다. 이는 또한 아연 첨가 후에도 라디칼 소거 활성이 유지되었음을 보여준다. 따라서 하이드로겔은 라디칼 소거 활성으로 인해 상처 복구에 효과적인 잠재력을 가지고 있다.

[0128] 흡윤성 및 분해

[0129] ZnTA 입자 통합 전후의 GC/ZT 필름의 흡윤성 특성 차이를 입증하기 위해 접촉각 측정이 사용되었다. 도 3(g)에서 볼 수 있듯이 GC/ZT-0의 접촉각은 $54.2^\circ \pm 0.83$ 이다. ZnTA를 첨가하고 농도가 증가함에 따라 막의 접촉각은 $71.48^\circ \pm 0.76$, $74.31^\circ \pm 0.65$ 에서 $116^\circ \pm 0.88$ 로 증가하였다. 의심할 바 없이 접촉각의 증가는 ZnTA 입자의 존재로 인한 것이다.

[0130] 이러한 친수성 스캐폴드는 세포 접착과 증식을 향상시킬 수 있다. 따라서 위의 결과를 토대로 볼 때 GC/ZT 필름은 GC/ZT-4 필름을 제외하고는 좋은 흡윤성을 나타낼 수 있다. 이러한 결과는 또한 젤라틴/글리콜 키토산이 ZnTA 복합체의 첨가에 의해 성공적으로 변형되었음을 입증했다.

[0131] GC/ZT 스캐폴드의 분해 특성은 일정한 rpm 조건 하에서 1XPBS에서 배양한 후 체중 감소를 정량화하여 조사했다. 젤라틴의 단점은 빠른 분해 과정이다. 마찬가지로, 합성된 글리콜 키토산은 물에 노출되면 부분적으로 분해된다. 본 발명에서는 빠른 분해를 억제하기 위해 글루타르알데히드를 사용했다. 따라서 3D 프린팅된 스캐폴드는 6일간의 분해 기간 동안 안정성을 나타났다. GC/ZT-4 스캐폴드의 열화율은 4일차에 71%에 달했다. 모든 스캐폴드는 4일차까지 분해 속도가 증가하는 것으로 나타났다. 이후 속도는 상대적으로 일정하게 유지되었다. ZnTA가 통합된 스캐폴드는 GC/ZT-0 스캐폴드 그룹에 비해 더 높은 분해 속도를 나타났다. 6일째 스캐폴드의 분해율은 GC/ZT-0, GC/ZT-1, GC/ZT-2, GC/ZT-4에서 각각 36.28%, 54.2%, 68.9%, 73.01%였다. 그 결과는 도 3(h)에 나와 있다.

[0132] 하이드로겔의 접착성

[0133] 접착성 하이드로겔 드레싱은 상처 접착, 봉합, 항균 보호, 체액 봉쇄 및 지혈 촉진을 포함하는 다기능 특성을 나타낸다.

[0134] GC/ZT 하이드로겔의 접착 효능은 도 4(a)의 개략도와 같이 전단 랩 응력 테스트를 통해 평가되었다. GC/ZT 하이드

드로겔은 생물학적 조직(피부)뿐만 아니라 플라스틱, 유리, 고무 및 금속과 같은 무생물 조직을 포함하는 다양한 재료에 대한 접착성을 즉시 나타냈다(도 4(b)).

[0135] 도 4(c, d)에 나타난 정량적 결과는 모든 하이드로겔에 대해 각각 하중 및 접착 강도 대 변위 곡선을 플롯하기 위해 UTM으로 측정되었다. 하이드로겔의 접착 강도는 폴리머 매트릭스의 ZnTA 함량이 증가함에 따라 150~210kPa 범위로 크게 향상되었다. 하이드로겔의 궁극적인 접착 강도는 도 4(e)에 나와 있다. GC/ZT-4 하이드로겔은 외부 적용 표면과 하이드로겔 결합의 활성 작용기의 더 강한 상호 작용으로 인해 GC/ZT-0보다 향상된 내하중 특성을 보여주었다.

[0136] GC/ZT 하이드로겔 시스템과 관련하여 ZnTA의 비율이 높아지면 민감한 양의 폴리페놀 그룹과 아연 이온이 생성되어 동시에 가교 밀도가 보완된다. 이는 하이드로겔의 계면 접착력과 내부 응집력을 상승적으로 강화한다. 본 발명자들은 GC/ZT 하이드로겔에서 관찰된 강력한 손가락 접착성이 주로 하이드로겔 구조 내의 폴리페놀 그룹, 하이드록실 그룹 및 아미노 그룹의 존재에서 발생한다고 제안한다. 이러한 구성성분은 폴리펩티드와 단백질에서 발견되는 티올 그룹과 아민 그룹을 포함하는 피부 표면에 존재하는 하전된 작용 그룹에 대해 실질적인 친화성을 나타낸다. 수많은 하이드록실 부분을 포함하는 하이드로겔은 접착성을 촉진하기 위해 수소 결합, 정전기적 상호 작용, 이온-쌍극자 및 쌍극자-쌍극자 결합을 통해 인간 피부 펩타이드 사슬의 하전된 작용기와 크게 상호 작용할 수 있다. 이러한 GC/ZT 하이드로겔은 우수한 접착력을 갖고 있어 주변 조직에 강력하게 접착되어 후속 균열을 방지하고 출혈 종료에 대한 물리적 장벽을 제공한다.

[0137] 항균 및 항-생물막(biofilm) 특성

[0138] 박테리아는 열린 상처와 새로 생긴 상처에서 쉽게 자랄 수 있으므로 치료가 매우 중요하다. 따라서 이상적인 상처 드레싱은 박테리아의 성장을 억제하고 제거하는 강력한 항균 특성을 가져야 한다. 개발된 하이드로겔의 박테리아 사멸 효과는 그람 양성균(*Bacillus subtilis*)과 그람 음성균(*Escherichia coli*)에 대해 조사되었다.

[0139] 본 발명의 제작된 재료의 항균 잠재력을 조사하기 위해 박테리아를 스캐폴드로 12시간 동안 처리했다. 도 5(a, b)에 나타난 바와 같이 모든 스캐폴드는 뛰어난 항균성을 나타내었다. 박테리아 사멸 효율은 처리 후 박테리아 배양물의 광학 밀도를 기준으로 계산되었다. GC/ZT 스캐폴드의 항균 효율은 *B. subtilis*에 대해 80% 이상, *E. coli*에 대해 90% 이상으로 한천 플레이트 확산법(도 5(c))과 live/dead 분석(도 5(d))을 통해 확인되었다. ZnTA 첨가 스캐폴드의 항균력은 그람양성균에서는 유지되었으나 그람음성균에서는 감소하였다. GC/ZT-0에서 관찰되는 항균활성은 다음과 같다. 글리콜 키토산의 우세한 효과 GC/ZT-1,2,4에서는 GC/ZT-0 시료에 비해 활성이 약간 감소되었으나, 처리하지 않은 대조군에 비해 하이드로겔의 항균력은 GC/ZT와 GC/ZT-4의 항균 결과 변화는 기본적으로 ZnTA 입자의 존재에 따른 것으로, 도 5(e)와 같이 SEM 이미지 분석을 통해 결과를 확인하였다.

[0140] 또한 본 발명자들은 GC/ZT 스캐폴드의 생물막 억제 테스트를 분석했다. 이전 보고서에 따르면 생물막 형성은 외부 요인으로부터 박테리아를 보호하고 만성 상처에 위험한 박테리아를 안전하게 유지할 수 있다. 따라서 다양한 처리 후 생물막의 파괴가 연구를 위해 필요했다. 박테리아 사멸 가능성을 평가한 후 *B. subtilis* 및 *E. coli* 생물막에 대한 이러한 스캐폴드의 효과를 이해하기 위해 크리스탈 바이올렛 염색 분석을 수행했다. 도 5(f)에 제시된 바와 같이 크리스탈 바이올렛의 어두운 염료는 대조 박테리아 세트에서 분명히 볼 수 있다. 그러나 처리 샘플에서는 염료가 크게 감소한 것으로 나타났다. GC/ZT 처리된 생물막은 파괴되었으며 이는 현미경 이미지와 용해된 염료의 흡광도 값에 표시된다(도 5(g)). 특히, GC/ZT 샘플은 GC/ZT가 있는 경우 거의 모든 생물막 박테리아를 박멸할 수 있다. 이러한 결과는 본 발명의 GC/ZT 샘플이 주로 박테리아를 죽이고 미세 환경에 들어가 생물막 친밀성을 방해함으로써 생물막 형성을 효과적으로 방해할 수 있음을 나타낸다.

[0141] 생체 적합성, 세포 이동 및 시험관 내 조사

[0142] 시료의 생체 적합성은 조직 공학에 적용하기 위한 중요하고 필수 속성이다. GC/ZT 스캐폴드의 생체 적합성과 세포 증식은 WST-8 분석을 통해 평가되었으며 결과는 도 6(a, b)에 나와 있다.

[0143] 시료 없이 배양된 세포(HDF, 대식세포)를 대조군으로 간주하였다. 모든 샘플은 섬유아세포 및 대식세포에 대해 독성이 없는 것으로 확인되었으며, 모든 처리 후 세포의 생존율은 80% 이상으로 GC/ZT 샘플이 HDF 세포 및 대식세포에 대해 생체 적합성이 높다는 것을 확인했다. GC/ZT-1과 GC/ZT-0은 세포수에서 뛰어난 성장을 보였는데, 이는 폴리머와 ZnTA의 낮은 함량 혼입이 세포의 성장을 촉진한다는 것을 보여준다. 대식세포의 라이브/죽은 이미지는 도 18에 표시된다.

[0144] 본 발명자들은 스크래치 테스트를 사용하여 GC/ZT 샘플 침출수가 세포 이동 촉진에 미치는 영향을 조사했다. 도 6(c)에 따르면 GC/ZT-4 하이드로겔은 GC/ZT-0, GC/ZT-1, GC/ZT-2 및 대조군에 비해 HDF 세포의 이동을 크게 개

선하고 스크래치 밀봉을 야기하였다. GC/ZT-0 그룹에서 나타난 이동은 폴리머 매트릭스 자체가 HDF 세포의 이동을 촉진하는 능력을 가지고 있음을 나타낸다. 상처 치유의 수치 결과는 도 19에 나와 있다. 또한, 다른 그룹의 세포 이동은 ZnTA 복합체의 존재에 의해 영향을 받았다. 4% ZnTA를 함유한 그룹은 이동이 증가한 것으로 나타났는데, 이는 ZnTA 화합물이 세포 이동성을 증가시키는 것을 나타낸다. 따라서 GC/ZT 하이드로겔은 상처 치유 과정을 촉진하는 데 중요한 특성인 HDF 세포의 움직임을 향상시키는 능력을 가지고 있다.

[0145] 또한, 본 발명자들은 세포주기 조절 유전자와 상처 치유 유전자의 조절을 통해 본 발명 샘플이 HDF 세포의 성장과 증식에 미치는 영향을 조사했다. GC/ZT 하이드로겔 처리 후 세포주기 조절 유전자(PCNA, CDK4, CDK6)와 상처 치유 유전자(피브로넥틴, 콜라겐, TGF- β 1)의 정량적 발현을 수행했다. 모든 유전자의 발현 수준에서 유의미한 차이가 관찰되었다. 도 6에서 볼 수 있듯이 GC/ZT 존재 시 세포의 증식은 대조군과 비교하여 연구된 거의 모든 유전자에서 상향조절되었다. GC/ZT-4의 높은 증식 효능은 ZnTA와 젤라틴/글리콜 키토산의 조합에 기인한다. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)은 세포의 복제, 복구 메커니즘 및 증식에 참여하여 핵산 대사에 중요한 역할을 한다. 마찬가지로 CDK4와 CDK 6은 세포 분열에 필수적이다. 이는 세포 분열 주기 동안 G1 단계에서 S(합성) 단계로 세포 전환을 허용한다. 도 6(d-f)에 표시된 대로 GC/ZT-4 처리 샘플의 PCNA, CDK4 및 CDK6 유전자 발현의 배수 변화는 1일차에 49.5, 2.3 및 76.3이었다. 놀랍게도 PCNA 및 CDK6의 배수 변화는 3.4로 감소했으며 7일차에는 CDK4의 배수변화가 2.9배로 증가하였다. 7일차에는 GC/ZT-2의 발현이 다른 시료에 비해 상대적으로 높았다. 대조군보다 높은 수치를 보여 증식수를 확실히 알 수 있었다. 세포는 GC/ZT-4 처리에서 유의하게 더 높았다. HDF 세포에서 GC/ZT 샘플이 존재하는 경우 상처 치유 유전자의 발현을 이해하기 위해 분석도 수행되었다(도 6(g-i)).

[0146] 정량적 결과에 따르면, 시료 존재 하의 HDF 세포는 1일과 7일 배양에서 피브로넥틴, 콜라겐 및 TGF- β 1의 발현 수준이 가장 높았다. 예를 들어, 1일차 TGF- β 1의 배수 변화는 GC/ZT-0~4 샘플의 경우 각각 0.017, 0.018, 0.25 및 4.62였으며 이는 7일까지 증가했다. 발현은 GC/ZT-2 및 GC/ZT-4 하이드로겔에서 2.18 및 15.22의 배수로 상당히 상향조절되었다. TGF- β 1이라고 불리는 잘 알려진 다기능 사이토카인은 근섬유아세포의 전환분화에 관여한다. 피브로넥틴과 콜라겐의 유전자 발현도 측정되었다. 상처 치유에 대해 보고된 연구에 따르면, 상처 가장자리를 따라 존재하는 피브로넥틴은 신호 전달을 위해 세포와 분자를 고정하고 섬유아세포와 표피 세포가 상처로 이동하도록 촉진하는 섬유 네트워크의 생성을 촉진한다.

[0147] 결합 조직의 주요 구조 요소인 콜라겐 기질은 발달 프로그래밍으로 인해 섬유아세포에 의해 생성된다. 인테그린은 유형 I 콜라겐 및 기타 기질 단백질에 결합하도록 특별히 고안된 섬유아세포에서 발견되는 세포 표면 수용체이다. ZnTA 통합 폴리머의 효과를 연구하기 위해 피브로넥틴과 콜라겐의 유전자 발현을 분석했다. 흥미롭게도 도 6(h, i)에서 볼 수 있듯이 콜라겐과 피브로넥틴의 발현은 1일부터 7일까지 크게 향상되었다.

[0148] 따라서, 본 발명자들은 본 발명의 샘플이 상처 치유를 가속화하기 위해 세포 증식 및 상처 치유에 관여하는 유전자를 상향 조절하는 데 매우 효과적이라는 결론을 도출한다. 이러한 효과는 상처 치유 플랫폼으로서 가치가 있을 수 있다. 샘플과 HDF 세포의 상호 작용에 대한 도식적 표현은 도 6(j)에 나와 있다. 또한, 정량적 실시간 중합효소연쇄반응(qRT-PCR) 결과를 검증하기 위해 피브로넥틴과 콜라겐의 단백질 발현 수준을 평가했다. 도 6(k)에 나타난 바와 같이, 피브로넥틴의 강도는 GC/ZT-2 및 GC/ZT-4 처리군에서 현저하게 증가하였다. 마찬가지로, HDF 세포에 대한 GC/ZT-4의 영향은 콜라겐의 현저한 발현을 나타냈다. 이러한 결과는 qRT-PCR 결과를 반영하여 상처 치유 관련 유전자의 상향 조절을 확인하였다.

[0149] 대식세포 분극화에 대한 인 비트로 효과

[0150] 대식세포 분극이 어떻게 진행되는지에 따라 감염을 예방하고 건강한 세포 성장을 촉진하며 염증을 줄이고 조직을 변형시켜 상처 치유 과정에 크게 기여한다. 미세 환경에 따라 대식세포는 M1 및 M2 표현형으로 분극화될 수 있다. M1 대식세포에서 분비되는 인터루킨-1(IL-1)과 기타 염증 유발성 사이토카인은 박테리아에 감염된 상처를 치료할 때 상당한 염증 반응을 유발할 가능성이 있다. 반대로 인터루킨-10(IL-10)과 아르기나제-1(ARG-1)은 M2 대식세포에 의해 풍부하게 발현되며, 이는 항염증 반응을 감소시키고 세포 이동, 증식 및 피부 재생을 향상시킬 수 있다.

[0151] 대식세포 분극에 대한 GC/ZT 하이드로겔의 효과는 광학 이미지인 qRT-PCR을 통해 체계적으로 조사되었으며 ICC 이미지로 확인되었다. 초기 분석은 샘플 처리된 대식세포의 광학 이미지를 기반으로 수행되었다. 도 7(a)에 표시된 대로 GC/ZT-0 대식세포는 둥근 모양의 형태를 보여주며 ZnTA가 포함된 샘플 처리는 길쭉한 모양과 둥근 모양의 형태를 보여준다. 이전에는 형태에 따라 대식세포 분극화를 구별하는 연구가 수행되었다. 이러한 연구에 따르면 대식세포의 길쭉한 형태는 M2 분극을 나타내고 둥근 모양은 M1 분극을 나타낸다. 따라서 도 7(a)에 표시

된 대로 GC/ZT-1, GC/ZT-2 및 GC/ZT-4는 M1 및 M2 대식세포 표현형을 모두 나타낸다. M1 및 M2 대식세포의 유전자 발현 및 ICC를 하이드로겔 샘플 처리 하에 추가로 조사했다. 그 결과(도 7(b, c))에 따르면, GC/ZT-0에서 IL-6의 발현은 대조군과 다른 그룹에 비해 유의하게 증가하였다. 흥미롭게도 GC/ZT-1, GC/ZT-2 및 GC/ZT-4 그룹도 대조군에 비해 IL-6의 상향 조절을 보여주었다. 다른 M1 유전자인 iNOS 및 IL-1 β 도 분석되었으며 모든 처리에서 상향 조절이 나타났다. 이러한 결과는 ZnTA가 포함된 시료 처리의 유전자 발현이 GC/ZT-0에 비해 높은 발현을 보였다는 것을 보여주었다. iNOS(유도성 산화질소 합성효소)는 병원균 사멸에 중요한 산화질소의 공급원이다. IL-6은 대식세포 분극화를 M1 표현형에서 M2로 전환하는 역할을 한다. 또한, IL-4, CD163 및 IL-10을 포함한 M2 대식세포 마커 유전자의 발현은 대조군에 비해 GC/ZT 샘플 그룹에서 유의하게 증가했다. TGF- β 1의 발현은 하이드로겔의 존재 하에서 하향조절되었다. GC/ZT-4는 GC/ZT-0에 비해 가장 낮은 수준의 유전자 발현을 보였다. ARG-1 및 VEGF의 유전자 발현도 조사되었다. 이들 유전자의 상향조절은 GC/ZT-4 처리군에서만 관찰되었다. 다른 모든 하이드로겔은 ARG-1 및 VEGF의 발현을 하향 조절했다. 도 7(c)에서 볼 수 있듯이 젤라틴/글리콜 키토산 자체는 M2 분극을 촉진할 수 없다. 따라서 ZnTA 복합체가 대식세포의 M2 분극화를 담당한다는 것이 분명하다. 상기 결과를 확인하기 위해 M1(iNOS2, CD68) 및 M2(CD163, CD83) 마커의 단백질 발현에 대해 면역세포화학을 수행하였다. 도 7(d)에서 볼 수 있듯이 GC/ZT-4 그룹은 다른 그룹에 비해 CD163, CD83 및 iNOS 양성 수준이 현저히 높아 M2 및 iNOS의 분극이 강화되었음을 나타낸다. CD68의 단백질 발현은 GC/ZT-0 처리에서 더 높았고 GC/ZT-4 처리에서는 낮은 강도가 관찰되었다. 그 결과는 qRT-PCR 정량 데이터와 일치했다. 결과적으로 본 발명자들은 ZnTA의 투여량이 대식세포 분극을 효과적으로 조절하여 조직 재생을 촉진하거나 감염을 억제할 수 있다는 결론을 내릴 수 있다. 고농도의 ZnTA는 대식세포의 M2 분극화에 더 효과적이다. GC/ZT-0 및 GC/ZT-4 존재 하에서 유전자의 상향 조절 및 하향 조절이 도 7(e)의 개략도에 제시되어 있다.

[0152] 생체 내 상처 치유

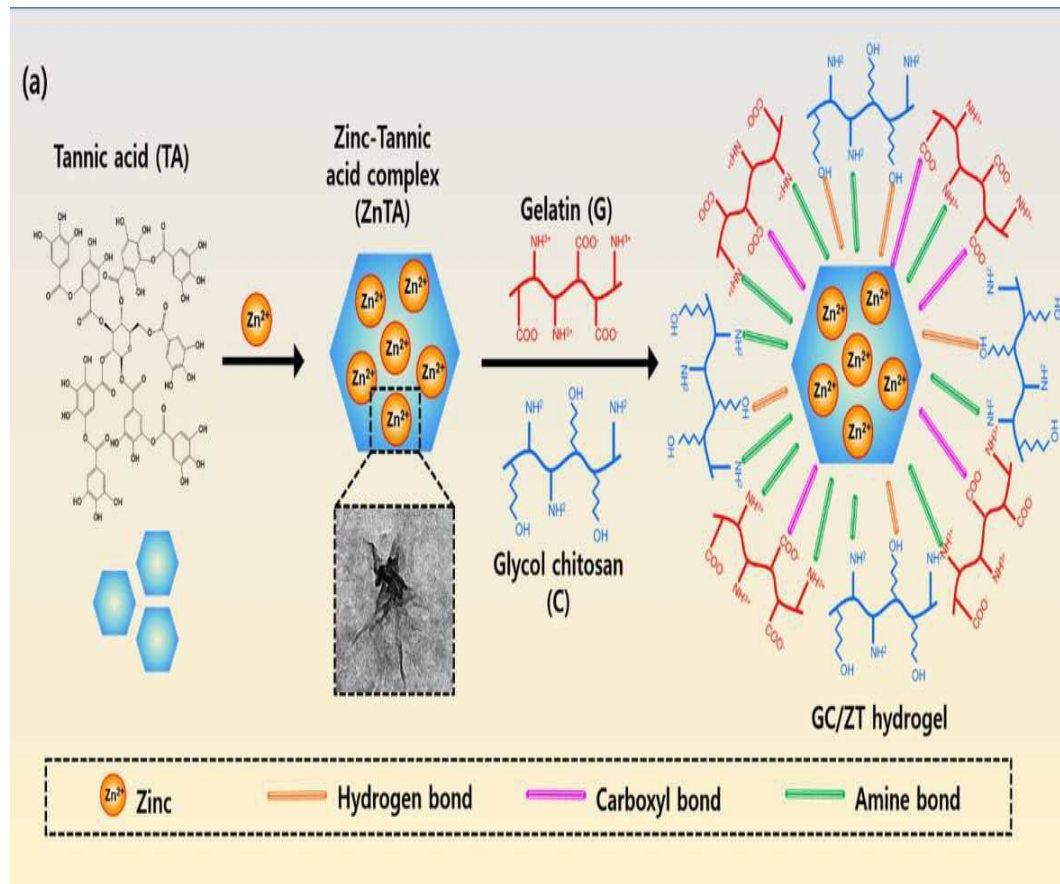
[0153] 피부 세포 증식, 이동 및 일반 세포 기능에서 GC/ZT-0 및 GC/ZT-4에 대한 긍정적인 인 비트로 결과를 고려하여, 본 발명자들은 1.2 cm 피하 피부 상처가 있는 수컷 ICR 쥐 모델에서 이를 추가로 조사했다(도 8). 연구 결과, 처리 14일 이내 상처 봉합 비율은 대조군에 비해 치료군에서 훨씬 높았다. GC/ZT-0과 GC/ZT-4에서는 상처 치유 부위가 동일하지 않았다. 14일째에는 모든 그룹의 표피가 완전히 재생되었으며, 특히 3D 프린팅된 두 그룹에서 진피 내에 모낭, 혈관과 같은 일부 피부 부속물이 형성되기 시작했다. GC/ZT-0 및 GC/ZT-4 스캐폴드의 개선된 피부 재생 효능은 시험관 내 결과에서 관찰된 바와 같이 세포 활성이 향상되어 피부 세포 증식을 촉진하고 유전자 발현을 향상시켰기 때문이다.

[0154] H&E 염색을 통해 상피화와 신조직 형성을 관찰하기 위해 스캐폴드 이식 14일 후에 상처 조직 절편의 조직학적 분석을 수행했다(도 8(a)). 우리의 결과는 손상된 표피가 모든 그룹에서 거의 치유되었음을 나타낸다. 그러나 GC/ZT 스캐폴드 처리군에서는 일정한 두께의 뚜렷한 표피층이 관찰되었다. GC/ZT-0과 GC/ZT-4를 이식한 상처는 표피 두께가 비슷했다. 또한, GC/ZT-4 샘플 이식 조직에서 각질층이 완전히 형성되면 상처 치유가 완료되었음을 의미한다. H&E 염색에서도 14일째에 새로운 조직이 형성되는 것으로 나타났다. 섬유아세포의 촘촘한 축적은 진피 내 혈관의 수를 증가시켰고, 피부구조는 블랭크보다 GC/ZT-4 처리군에서 더 빠르게 회복되었다. GC/ZT-4 처리군에서는 깊은 표피와 표피 표피에서 모낭의 형성이 뚜렷이 관찰되었다. GC/ZT-4 스캐폴드의 더 높은 재생 능력은 피브로넥틴 및 TGF- β 1을 포함한 다양한 인자의 더 큰 발현에 할당된다. 피브로넥틴과 TGF- β 1의 상향조절된 유전자 발현은 이미 시험관 내 결과에서 나타났다. 피브로넥틴이 섬유아세포, 내피 세포, 호중구 및 단핵구와 같은 면역 세포의 조직 복구, 부착 및 이동에 중요한 역할을 한다는 것은 잘 알려져 있다. 마찬가지로 TGF- β 1은 육아 조직 형성, 세포 증식, 분화, ECM 생성, 면역 반응 조절 및 상처 치유 촉진 인자에 필수적이다. 따라서 이들 유전자의 상향 조절은 생체 내 조사에서 효과적인 상처 치유의 이유가 될 수 있다.

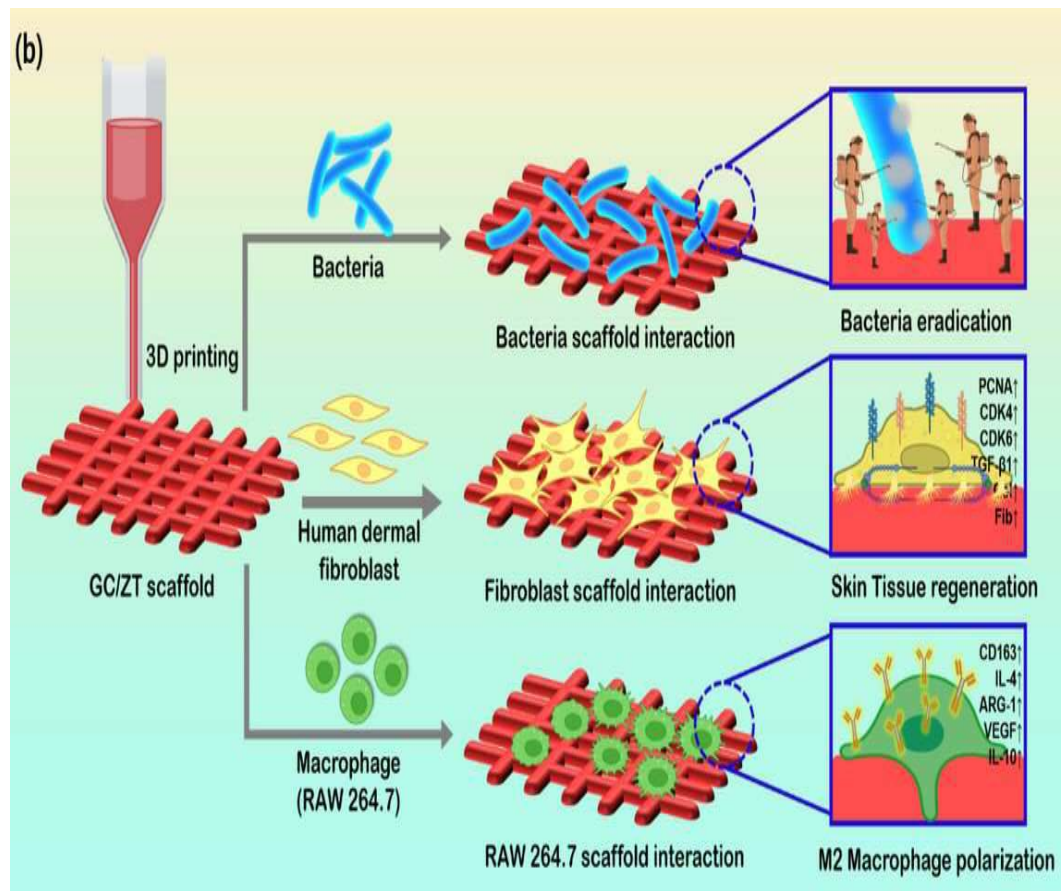
[0155] 상처 치유에서 GC/ZT 스캐폴드의 효율성을 추가로 조사하기 위해 치료 14일 후 콜라겐 침착을 조사했다. 상처 부위의 콜라겐 형성은 손상된 피부 조직을 리모델링하는 데 중요한 역할을 하며 Masson의 삼색 염색으로 평가되었다. 콜라겐은 세포외 기질의 핵심 구성 요소이며 상처 치유 단계의 조절에 중요한 역할을 한다. 도 8(b)에서 볼 수 있듯이 모든 그룹에서 콜라겐 축적을 볼 수 없었다. 대조군에서는 콜라겐 축적이 적었고, GC/ZT-0 및 GC/ZT-4 그룹에서는 더 잘 조직된 섬유 구조로 더 많은 콜라겐 축적이 나타났다. 이미지 관찰을 통해 도 8(b)에서 명확하게 알 수 있듯이 GC/ZT-4군에서 콜라겐 밀도가 GC/ZT-0군보다 높았고, 두 치료군 모두 동일 시점(14일)에서 대조군보다 높았다. 더욱이, 블랭크와는 달리 GC/ZT-0 및 GC/ZT-4 처리군에서는 콜라겐 축적이 피부 및 피하 부속기를 동반하였다. 이러한 결과를 통해 성숙 및 리모델링 단계가 달성되었음을 확인하였다.

도면

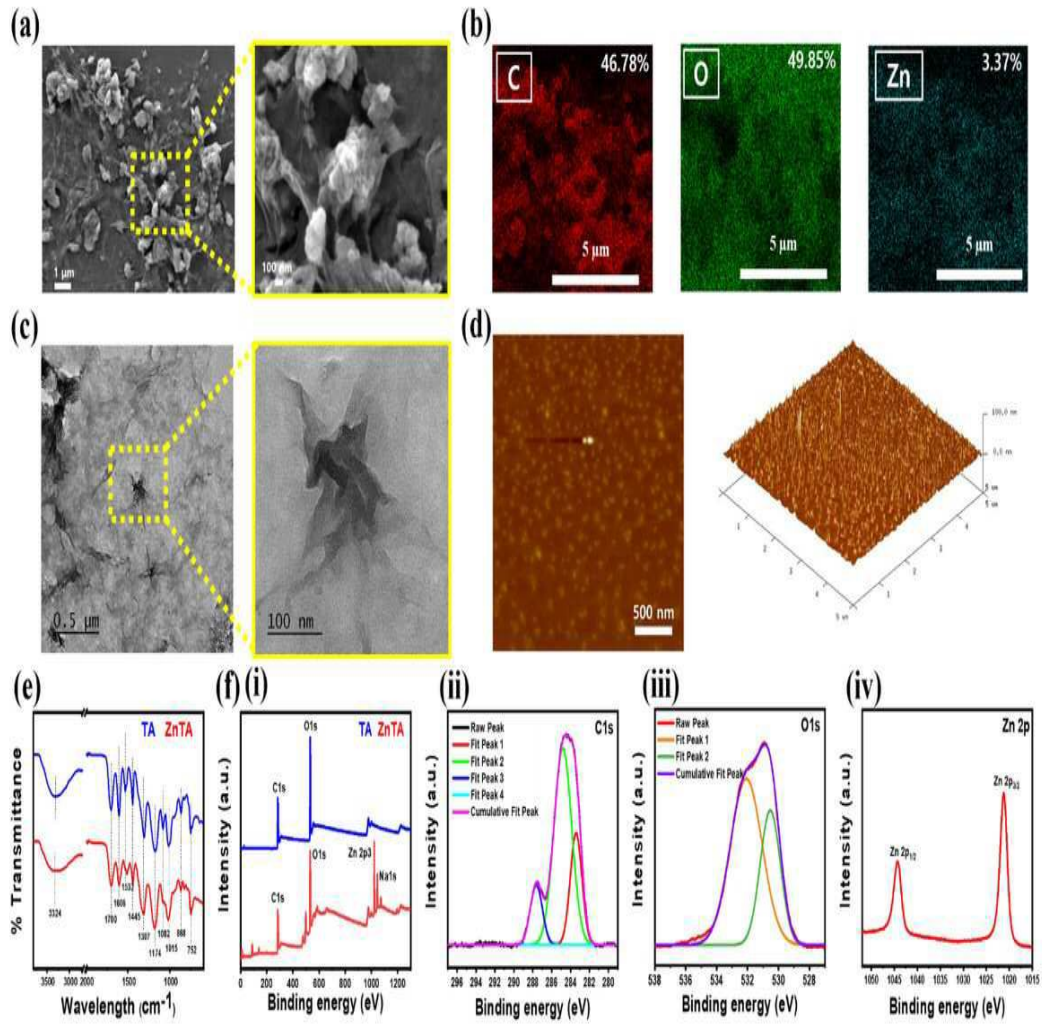
도면1a



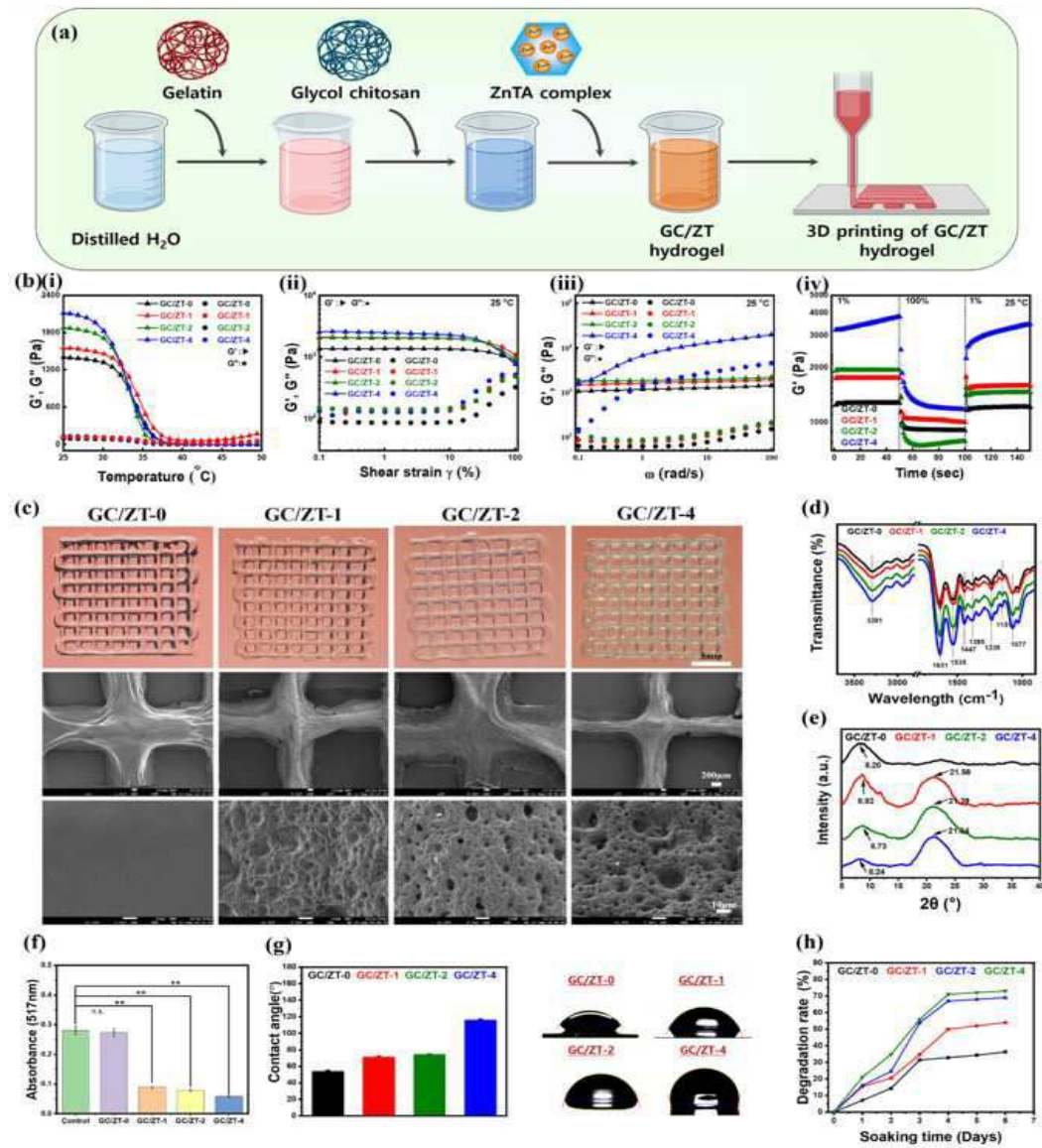
도면 1b



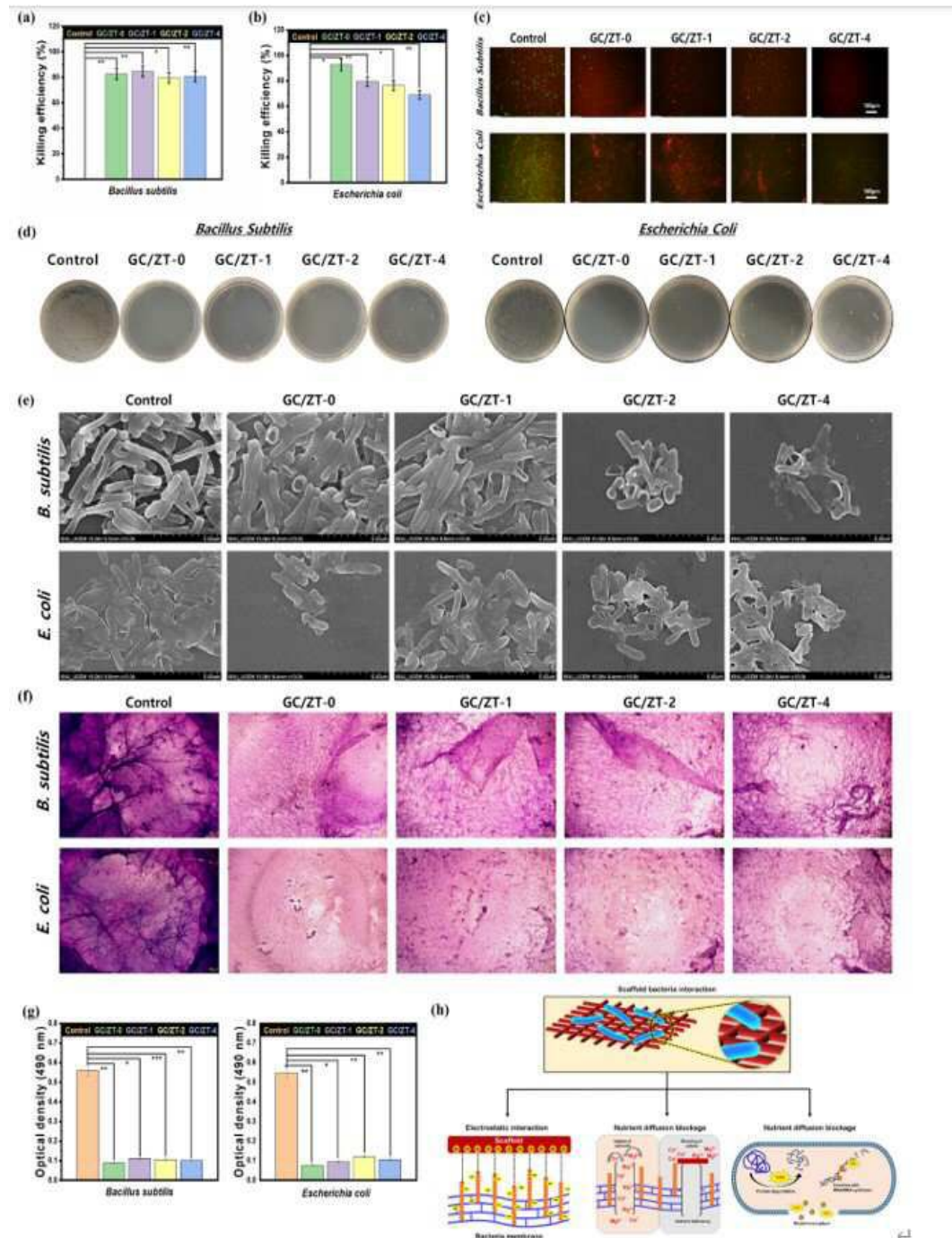
도면2



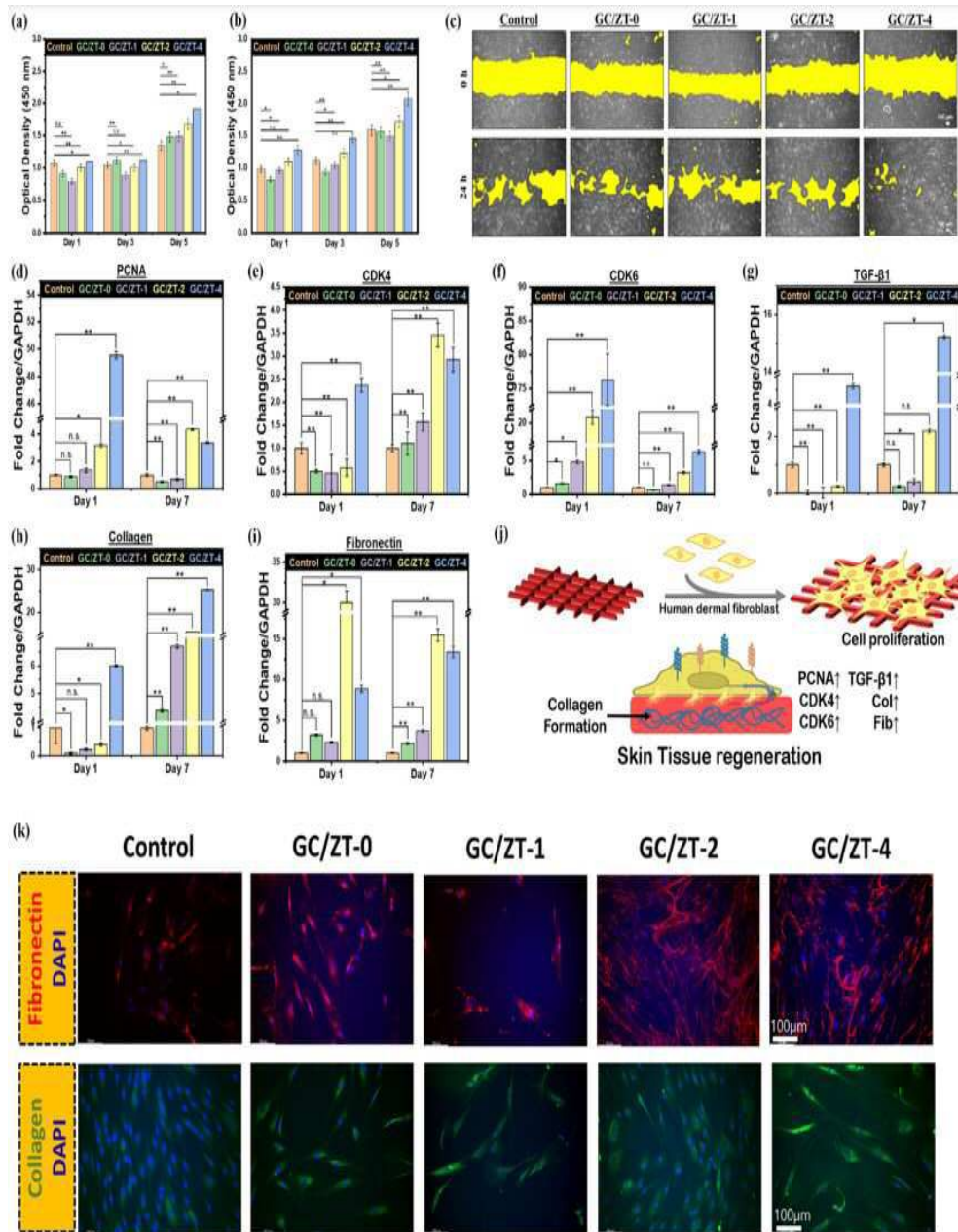
도면3



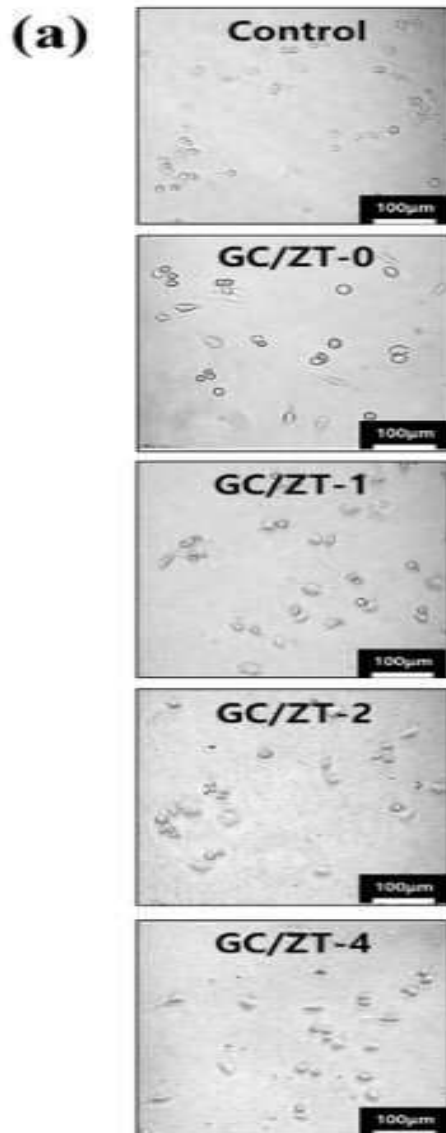
도면5



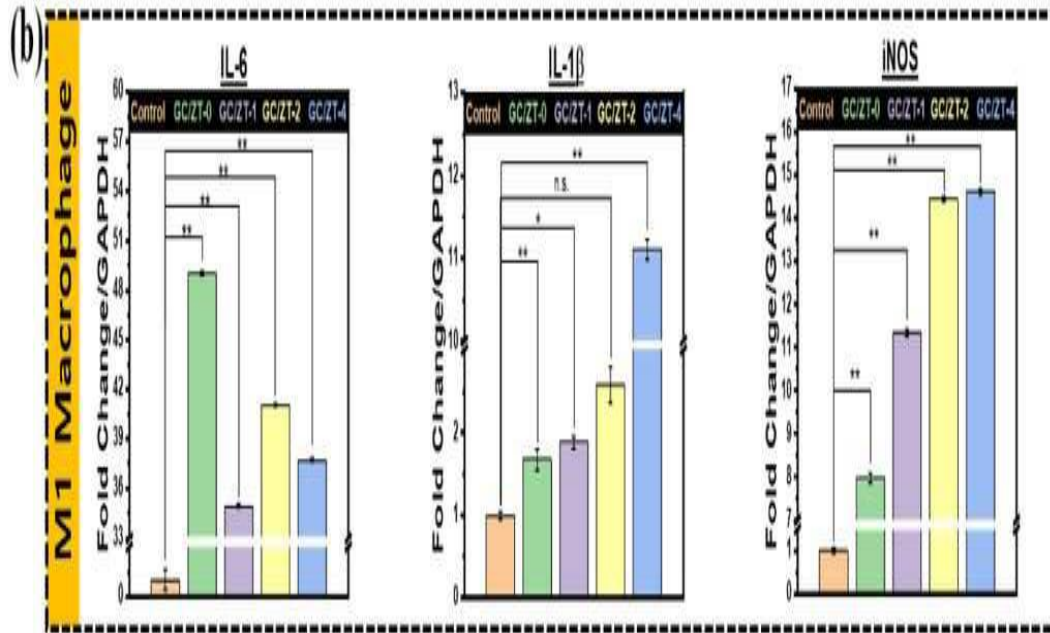
도면6



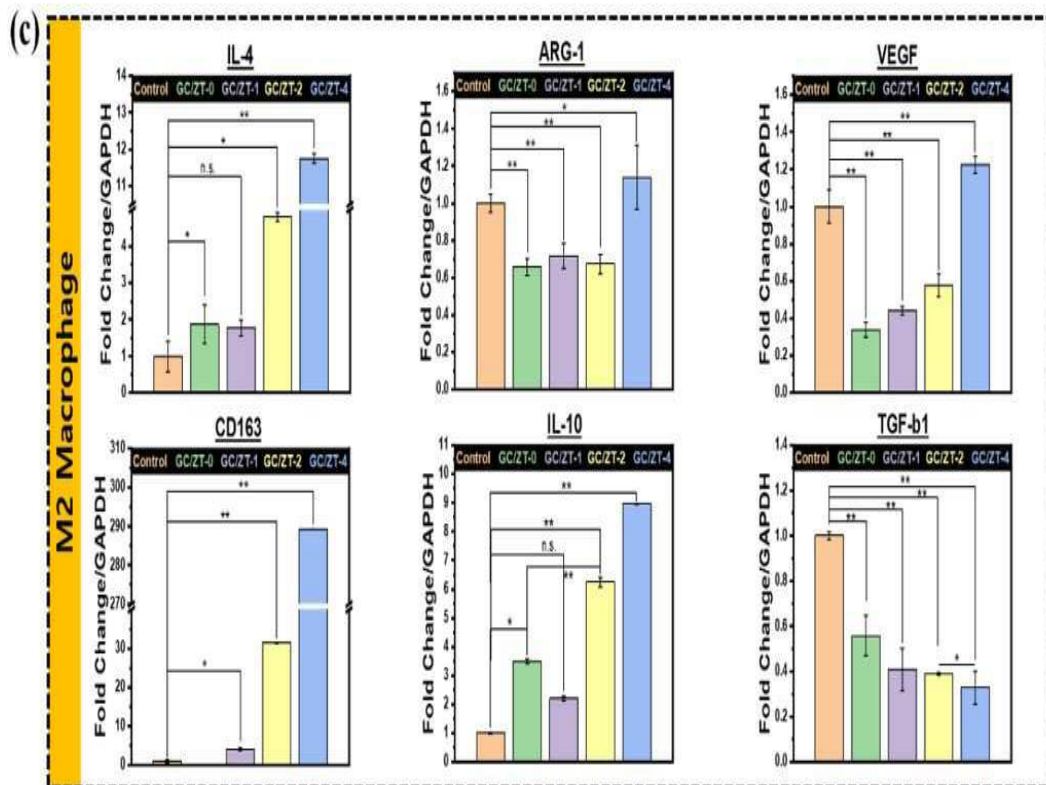
도면7a



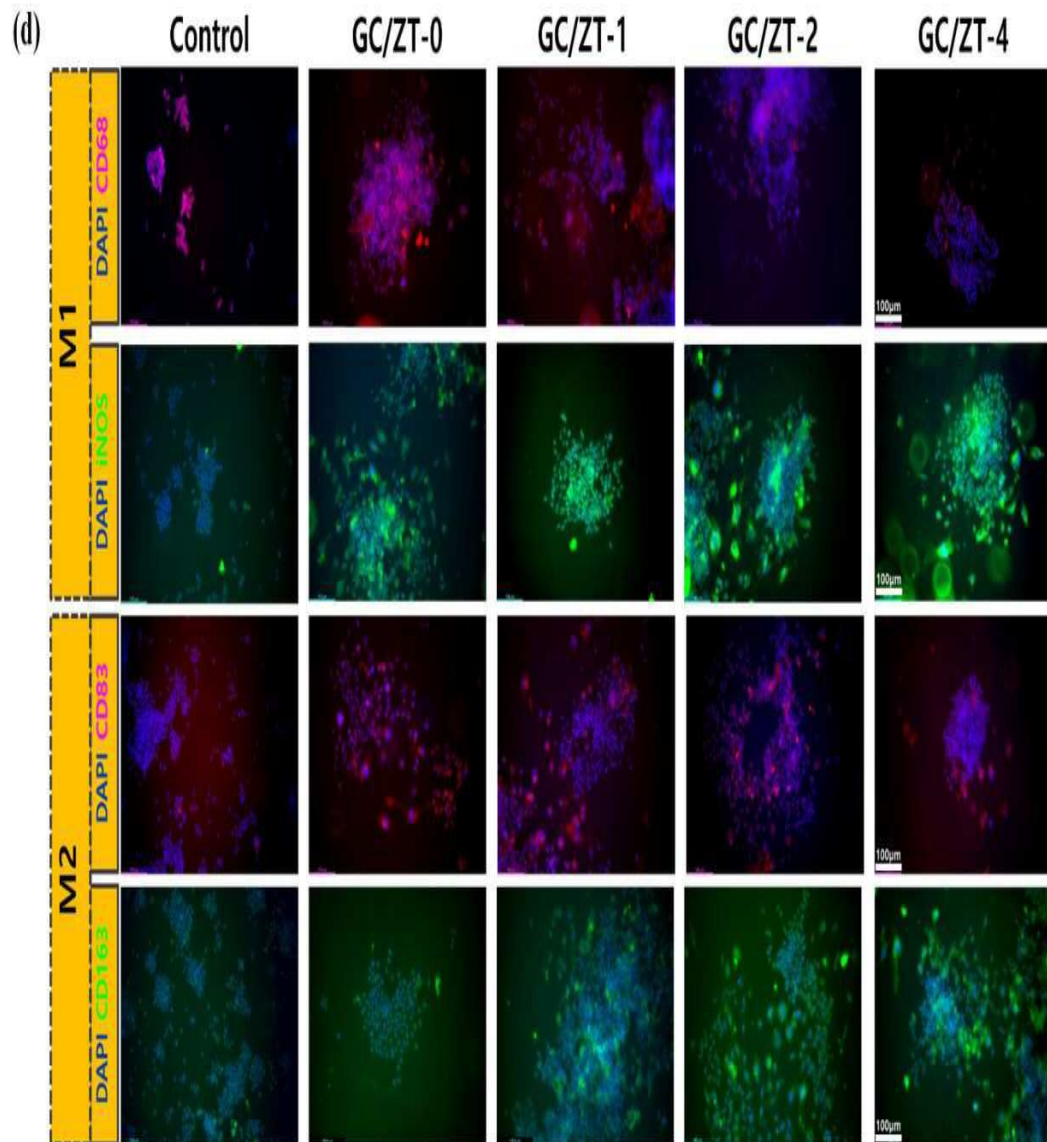
도면7b



도면7c

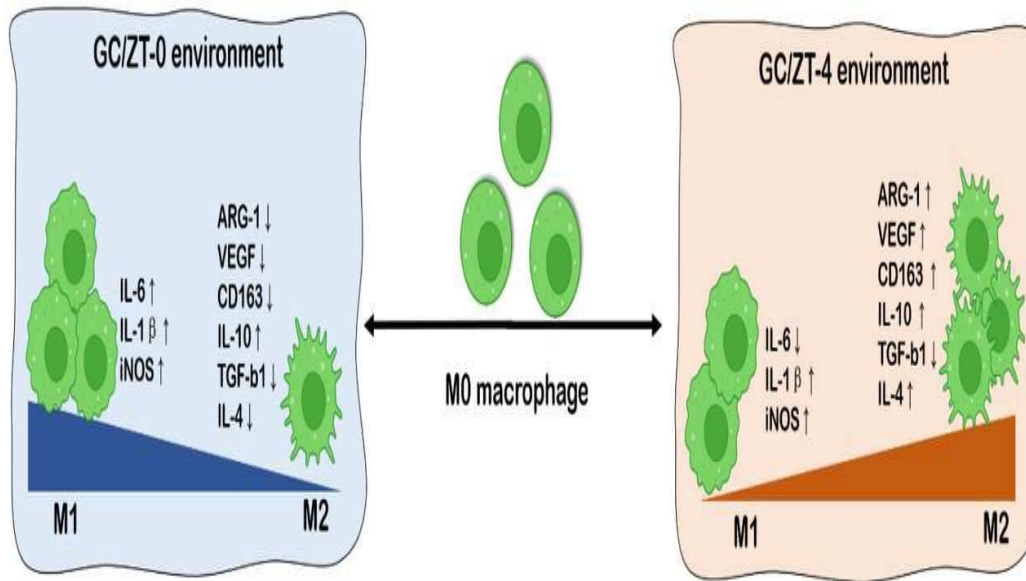


도면7d



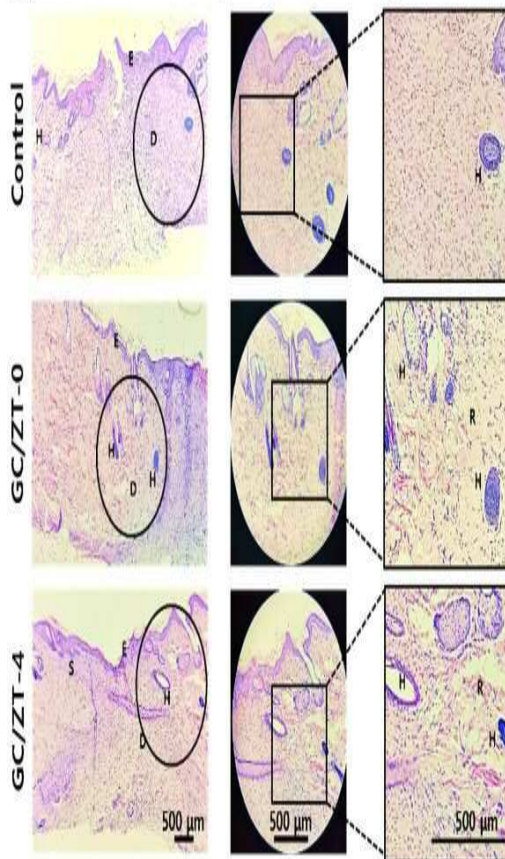
도면7e

(e)

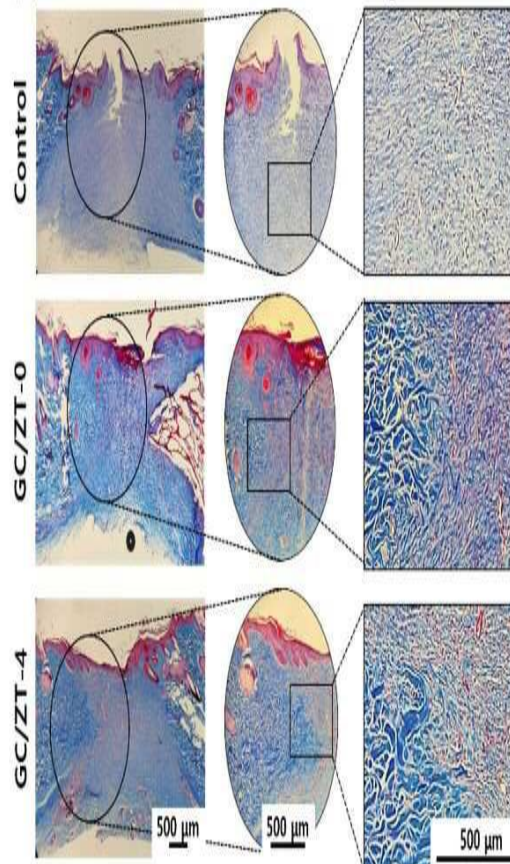


도면8

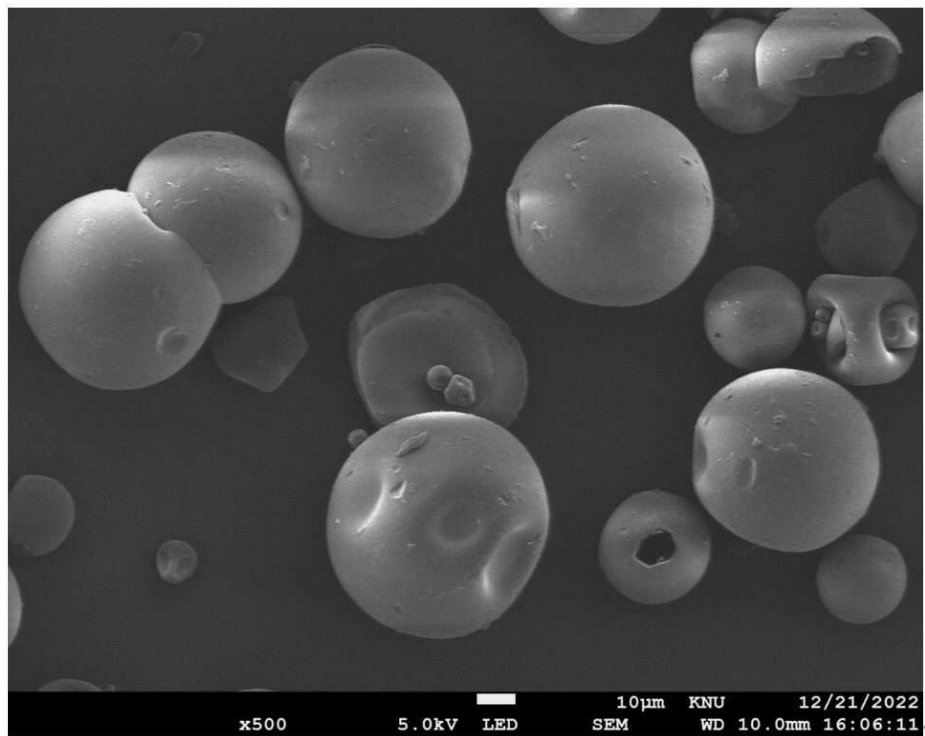
(a) Hematoxylin & Eosin staining



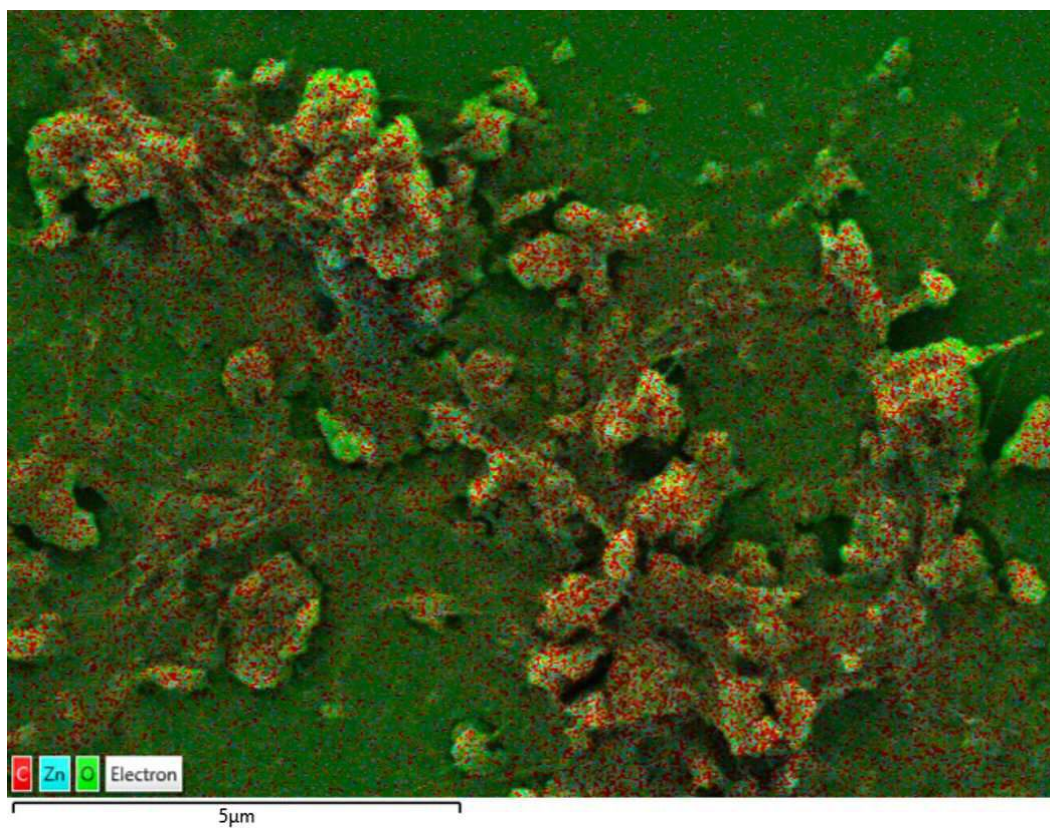
(b) Masson's Trichrome staining



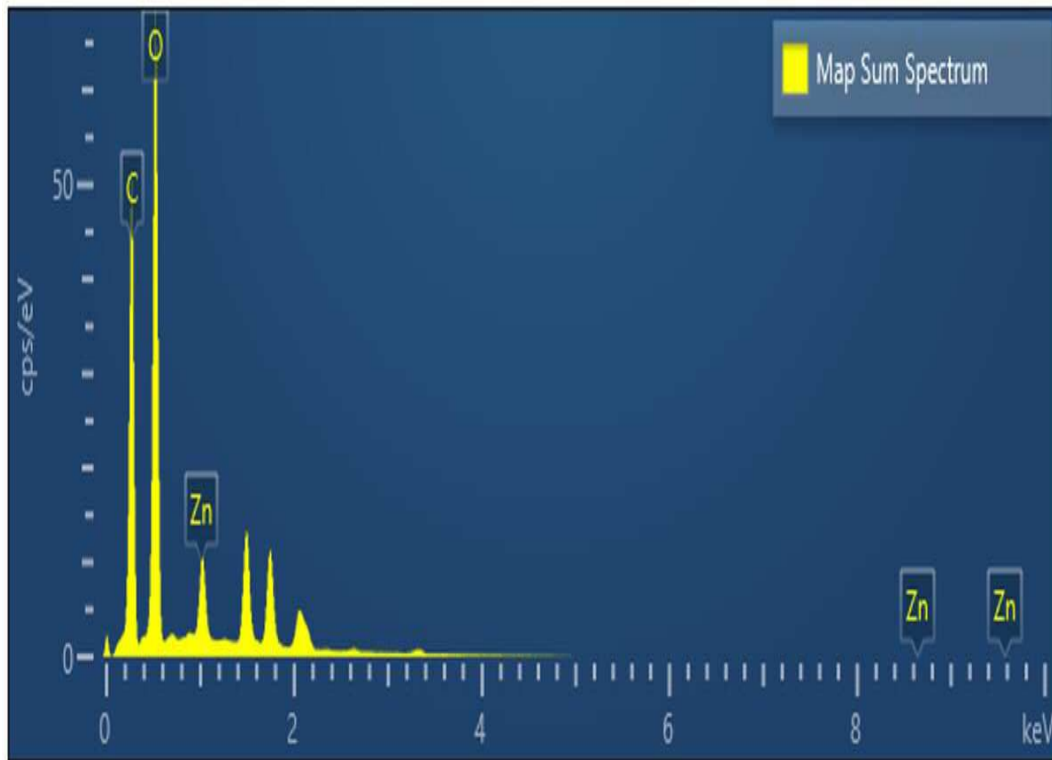
도면9



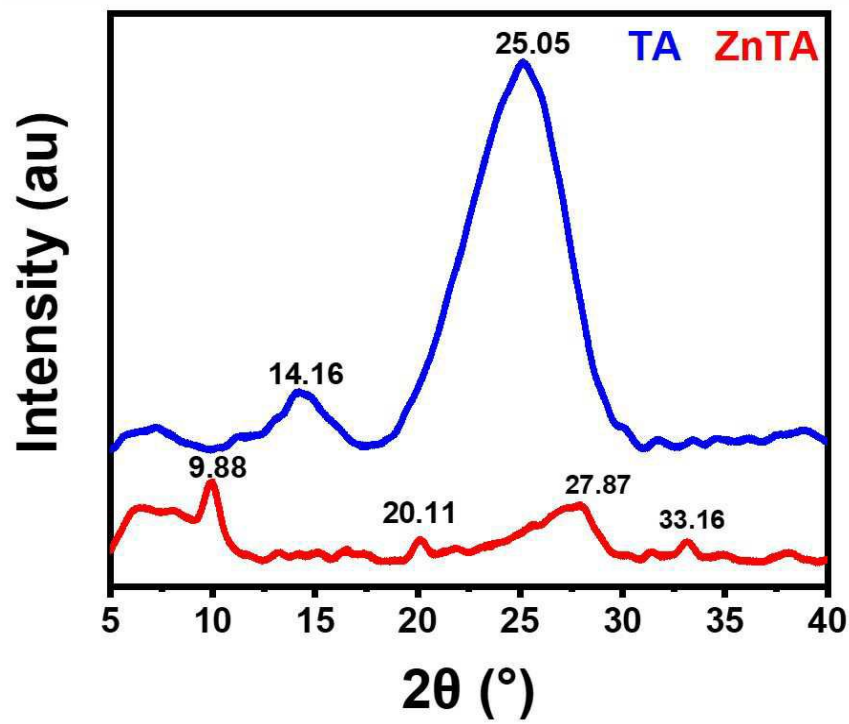
도면10



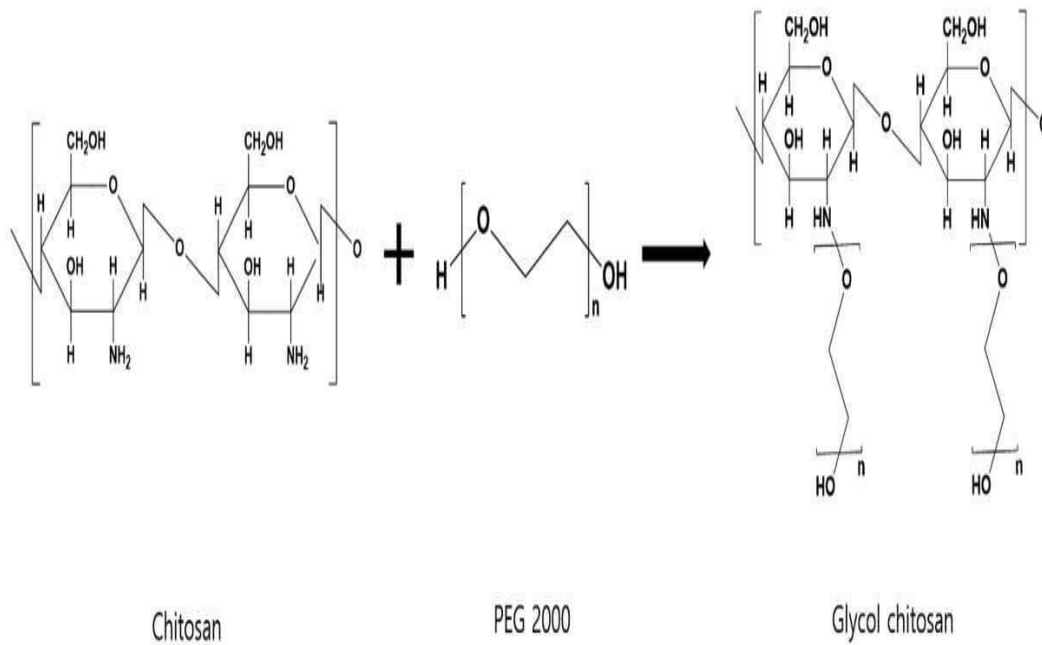
도면11



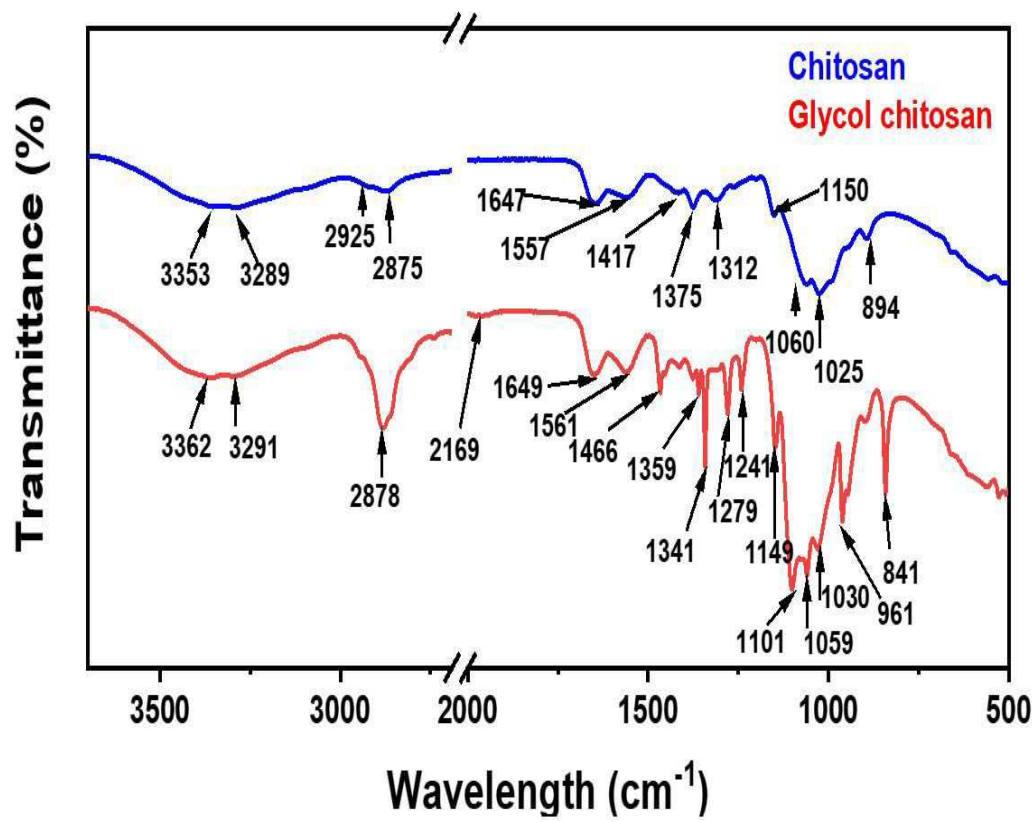
도면12



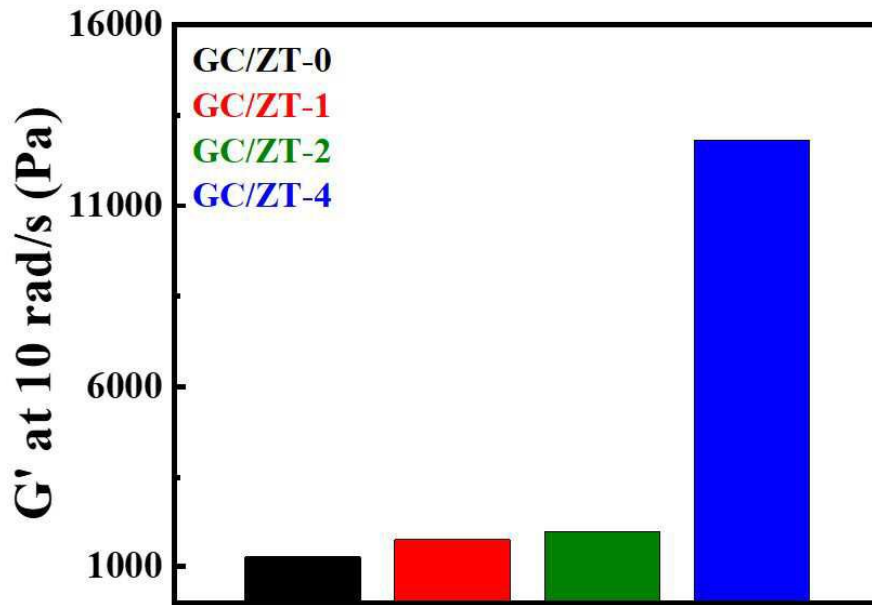
도면13



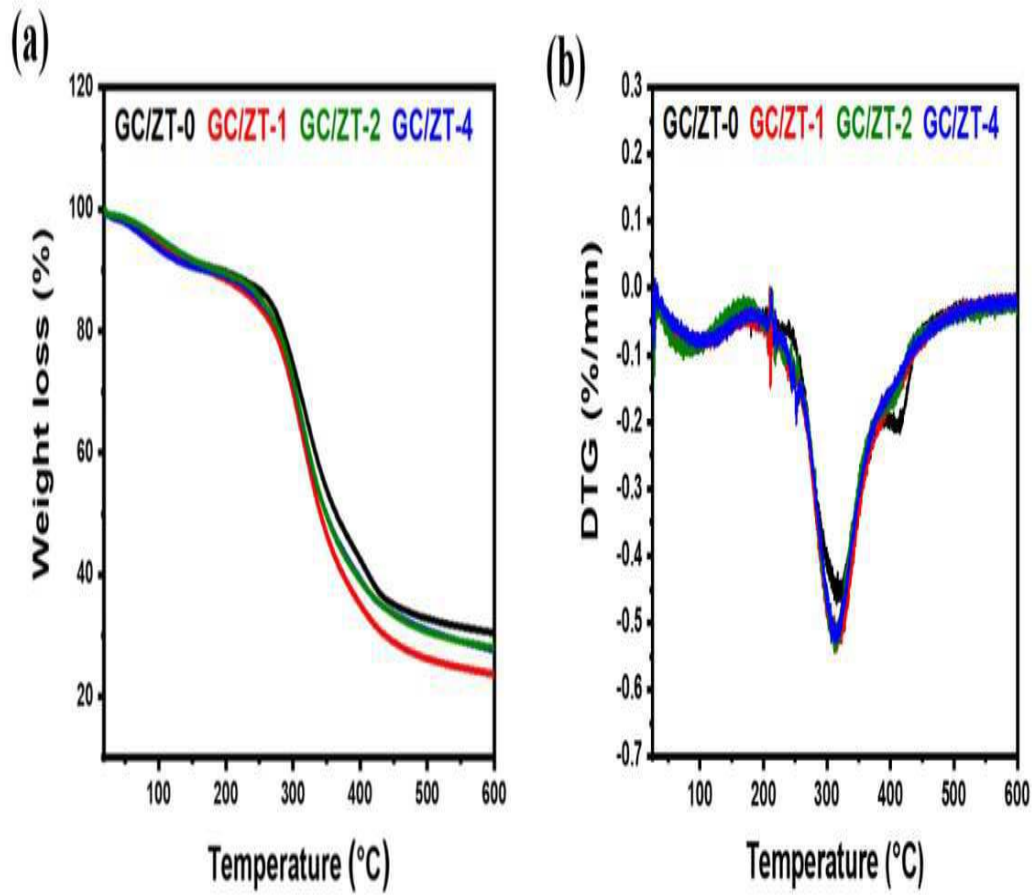
도면14



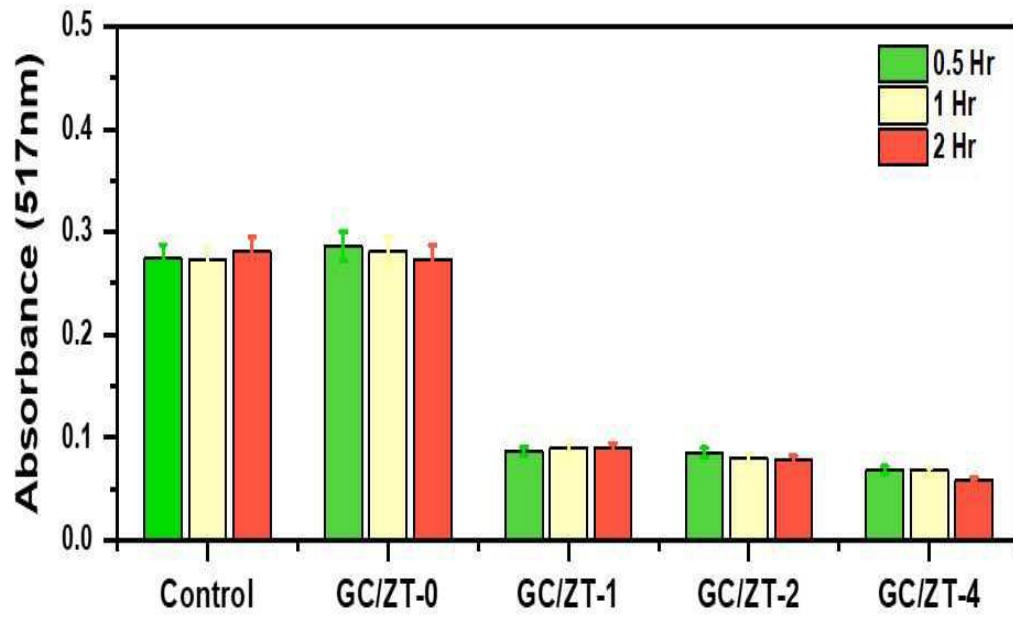
도면15



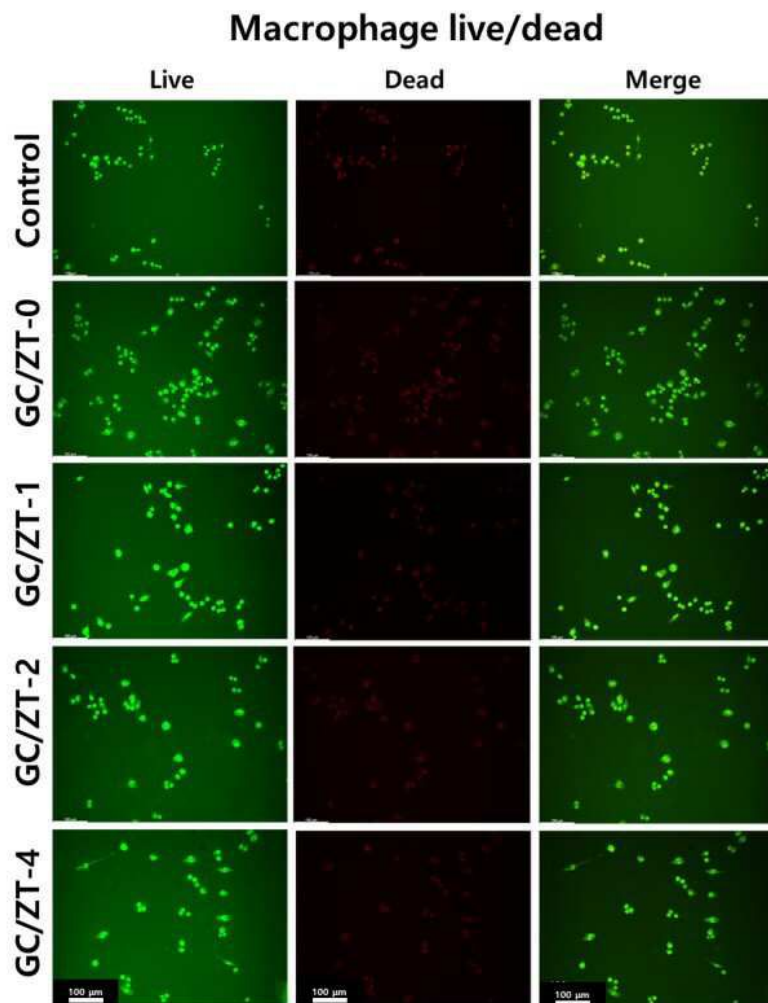
도면16



도면17



도면18



도면19

