(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0007808
(43) 공개일자 2015년01월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/56 (2006.01) *A61L 27/14* (2006.01)
A61F 2/10 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0082308
(22) 출원일자 2013년07월12일
심사청구일자 2014년07월25일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
(72) 발명자
신화성
인천 연수구 먼우금로 126, 210동 1201호 (동춘동, 현대대림2차아파트)
정상명
서울 강남구 논현로51길 25, 304호 (도곡동, 현대그린아파트)
김대승
서울 관악구 관악로6길 28, 가동 201호 (봉천동, 현대아트빌라)
(74) 대리인
김순웅

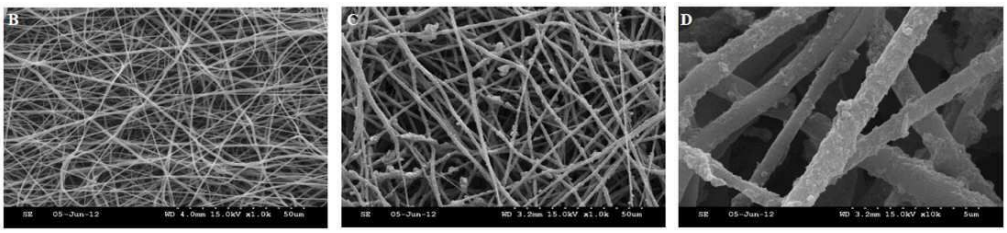
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **나노섬유 및 나노입자를 포함하는 인공피부 및 충전제용 복합지지체, 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 생분해성 나노섬유 및 이에 부착된 약물 전달용 양전하성 나노입자를 포함하는 인공피부 및 충전제용 복합지지체, 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 복합지지체는 세포 부착능력이 높고 세포독성이 낮으며, 전달하는 약물을 서서히 방출하기 때문에 인공피부 및 충전제로서 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 D11008112H320000150
부처명 국토해양부
연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원
연구사업명 해양생명공학 기술개발
연구과제명 해양유래 동물세포 배양공학을 이용한 재생의학용 복합ECM개발
기 여 율 1/1
주관기관 인하대학교 산학협력단
연구기간 2012.10.01 ~ 2013.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

1) 양전하성 고분자를 유기산 수용액에 용해시켜 양전하성 고분자 용액을 제조한 후, 여기에 초음파처리와 함께 겔화제를 첨가하여 양전하성 나노입자를 제조하는 단계;

2) 생분해성 고분자를 유기용매에 용해시켜 생분해성 나노섬유를 제조하는 단계; 및

3) 상기 2)단계에서 제조된 생분해성 나노섬유에 1)단계에서 제조된 양전하성 나노입자를 투입하여 흡착시켜 나노입자-나노섬유 복합지지체를 제조하는 단계를 포함하는, 인공피부 및 충전제용 복합지지체의 제조방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 1)단계에서 양전하성 고분자는 키토산, 셀룰로오스, 셀룰로오스 아세테이트, 젤라틴, 세라믹, 및 폴리-L-리신으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 인공피부 및 충전제용 복합지지체의 제조방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 1)단계에서 유기산 수용액은 젖산, 아세트산, 프로피온산, 포름산, 아스코르브산, 및 주석산으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 인공피부 및 충전제용 복합지지체의 제조방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 1)단계에서 겔화제는 트리폴리포스페이트(tripolyphophate, TPP)인 것을 특징으로 하는, 인공피부 및 충전제용 복합지지체의 제조방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 1)단계에서 양전하성 고분자 용액과 겔화제는 1~10:1의 부피비로 혼합되는 것을 특징으로 하는, 인공피부 및 충전제용 복합지지체의 제조방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 1)단계에서 제조된 양전하성 나노 입자는 입자의 크기가 0.1~800nm인 것을 특징으로 하는, 인공피부 및 충전제용 복합지지체.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 2)단계에서 생분해성 나노 섬유는 폴리카프로락톤(PCL), 폴리락트산(PLA), 폴리글리콜산(PGA), 폴리(D,L-락트산-co-글리콜산)(poly(D,L-lactide-co-glycolide); PLGA), 디올/이애시드계 지방족 폴리에스테르, 폴리에스테르-아미드/폴리에스테르-우레탄, 폴리(발레로락톤), 폴리(하이드록시 부티레이트), 폴리(하이드록시 발레레이트), 폴리안하이드리드, 폴리오르토에스터(polyorthoesters), 폴리비닐알콜, 폴리에틸렌글리콜, 폴리우레탄, 폴리아크릴산 및 폴리-N-이소프로필아크릴아미드로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 인공피부 및 충전제용 복합지지체의 제조방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 2)단계에서 유기용매는 THF(tetrahydrofuran), DMF(dimethylformamide), DMSO(dimethylsulfoxide), 클로로포름, 디클로로메탄, 헥산, 디에틸에테르, 및 아세토니트릴로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 인공피부 및 충전제용 복합지지체의 제조방법.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 유기용매는 THF과 DMF를 5~10:1~5의 부피비로 혼합한 혼합용매인 것을 특징으로 하는, 인공피부 및 충전제용 복합지지체의 제조방법.

청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 2)단계는 드로잉(drawing), 템플레이트 합성(template synthesis), 상분리(phaseseparation), 자기 조합(self assembly), 전기방사(electrospinning)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 방법을 이용하여 생분해성 나노섬유를 제조하는 것을 특징으로 하는, 인공피부 및 충전제용 복합지지체의 제조방법.

청구항 11

청구항 1 내지 10 중 어느 하나의 방법으로 제조된, 생분해성 나노섬유 및 이에 부착된 약물 전달용 양전하성 나노입자를 포함하는 인공피부 및 충전제용 복합지지체.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 생분해성 나노섬유 및 이에 부착된 약리물질 전달용 양전하성 나노입자를 포함하는 인공피부 및 충전제용 복합지지체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 인체 내 기관이나 조직이 손상될 경우에 세포, 약물 지지체 등을 제공하여 효과적으로 조직을 재생하여야 하는데, 조직 재생용 지지체는 첫째, 임플란트 부위에서 물리적으로 안정해야 하고, 둘째, 재생 효능을 조절할 수 있는 생리 활성을 나타내어야 하며, 셋째, 새로운 조직을 형성한 후에는 생체 내에서 분해되어야 하고 넷째, 분해산물이 독성을 갖지 않아야 한다. 이와 같은 조직 재생용 지지체는 종래 일정한 강도와 형태를 갖는 고분자를 이용한 스폰지 타입, 매트릭스 형태의 나노 섬유 또는 젤 타입의 세포 배양 지지체로 제조되며, 이러한 조직 재생용 지지체(scaffold)는 특정 깊이 또는 높이를 갖는 3차원 형상의 조직을 만들기 위해 중요한 역할을 한다. 이러한 조직 재생의 뼈대로서 기능하는 지지체(scaffold)를 이식하고 자기치유능력(self-healing power)을 이용하여 생체 내에서 조직을 재생하는 기술은 재생의료 또는 조직 공학이라고 불린다. 조직 공학의 일례로 관절 연골을 재생하는 방법을 들 수 있으며, 상기 관절 연골 재생 방법은 연골 세포를 지지체로 하는 인공 보철물을 형성한 후 이 인공 보철물을 손상 부위에 이식함으로써, 손상 관절 부위에서 연골 세포가 재생되도록 하는 것이다.

[0003] 전기방사는 세포외 지지체와 같은 섬유상 매트의 제조에 대한 방법 중 가장 간단한 방법 중 하나이다. 전기방사는 마이크로미터에서 나노미터로의 기공 직경의 감소를 가능케한 이래로 생체고분자에 대한 새로운 방향을 제시하였으며, 이로 인해 부피 또는 질량비에 대한 표면적의 증가 및 고분자의 기계적 특성을 현저하게 증가시켰다. 전기방사법의 장점은 나노미터에서 마이크로미터 단계의 매우 가는 섬유의 제조가 가능하며 넓은 표면적, 다양한 분야로의 활용 가능성, 우수한 기계적 특성 및 제조의 용이성으로 인해 다양한 조직공학 분야에서 시도되고 있다. 전기방사 지지체의 경우 충분한 기계적 특성을 가진다면 세포의 성장이 용이하다.

[0004] 한편, 키토산은 글루코사민(glucosamine)의 피라노오스(pyranose) 단위체가 β-1,4 결합된 것으로서, 글루코사민 잔기가 5,000 개 이상 결합된 분자량이 100 만 이상이고 다가의 양이온을 가진 다당류(polysaccharide) 계열의 생체고분자물질로 게 껍질이나 새우와 같은 갑각류 및 오징어를 포함하는 수산계로부터 추출할 수 있으며, 그 분자 구조로 볼 때 다당류의 일종인 셀룰로오스와 유사한 구조로서, 생체 친화성이 우수하여 면역 반응시 거부 반응이 일어나지 않기 때문에 의약 산업에 응용되고 있고, 최근 미국의 FDA에서 식품으로서 인증을 받은 후, 키토산은 21세기의 중요한 생물산업 및 생체의료용 물질로 응용되고 있다.

[0005] 현재 약리물질을 전달하기 위해서는 약물을 습포에 적셔 사용하거나 약리물질 자체를 상처부위에 투여하는 형식이 있으나 그러한 방법으로는 지속적인 약물 전달을 할 수 없으며 습윤상태로 인한 보관의 용이성도 떨어진다는 단점이 있다.

[0006] 이에 본 발명자들은 약리물질을 양전하성 나노입자에 담지하고, 양전하성 나노입자를 생분해성 나노섬유에 결합하여 복합지지체를 제조하였으며, 제조된 복합지지체는 세포부착능력이 높고 세포독성이 낮으며, 전달하는 약리물질을 서서히 방출함으로써 인공피부 및 충전제로서 유용하게 이용할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였

다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 생분해성 나노섬유 및 이에 부착된 약물 전달용 양전하성 나노입자를 포함하는 인공피부 및 충전제용 복합지지체를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 복합지지체의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 생분해성 나노섬유 및 이에 부착된 약물 전달용 양전하성 나노입자를 포함하는 인공피부 및 충전제용 복합지지체를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 복합지지체의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명의 생분해성 나노섬유 및 이에 부착된 약물 전달용 양전하성 나노입자를 포함하는 복합지지체는, 세포 부착능력이 높고 세포독성이 낮으며, 전달하는 약리물질을 서서히 방출하기 때문에 인공피부 및 충전제로서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 키토산(CS) 나노입자의 SEM 이미지를 나타낸 도이다.

도 2는 나노섬유와 복합지지체의 SEM 이미지를 나타낸 도이다.

도 3은 키토산 나노입자의 세포독성을 MTT 어세이로 나타낸 도이다.

도 4는 후코이단-키토산 나노입자에 의한 세포활성 변화를 MTT 어세이를 통해 나타낸 도이다.

도 5는 나노입자가 세포로 침투하는 것을 형광사진을 통해 나타낸 도이다.

도 6은 본 발명의 나노입자-나노섬유 복합지지체의 부착능력 및 세포활성을 MTT 어세이를 통해 나타낸 도이다.

도 7은 본 발명의 나노입자-나노섬유 복합지지체에 부착된 세포의 SEM 이미지를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명은,

[0014] 1) 양전하성 고분자를 유기산 수용액에 용해시켜 양전하성 고분자 용액을 제조한 후, 여기에 초음파처리와 함께 겔화제를 첨가하여 양전하성 나노입자를 제조하는 단계;

[0015] 2) 생분해성 고분자를 유기용매에 용해시켜 생분해성 나노섬유를 제조하는 단계; 및

[0016] 3) 상기 2)단계에서 제조된 생분해성 나노섬유에 1)단계에서 제조된 양전하성 나노입자를 투입하여 흡착시켜 나노입자-나노섬유 복합지지체를 제조하는 단계를 포함하는, 인공피부 및 충전제용 복합지지체의 제조방법을 제공한다.

[0017]

[0018] 이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명한다.

[0019] 본 발명에 따른 복합지지체는 생분해성 나노섬유에 양전하성 나노입자를 투입하여 흡착시켜 제조된 것을 특징으로 한다.

[0020] 본 발명에 따른 복합지지체의 제조방법을 단계별로 상세히 설명하면 다음과 같다.

[0021] 상기 1)단계는 양전하성 나노입자를 제조하는 단계로, 양전하성 고분자를 유기산 수용액에 넣어 양전하성 고분자 용액을 준비한다. 이 용액에 초음파처리와 함께 겔화제를 첨가하여 양전하성 나노입자를 생성한다. 이 때 양전하성 고분자 용액과 겔화제는 1~10:1의 부피비로 혼합되는 것이 바람직하다.

[0022] 상기 양전하성 고분자는 키토산, 셀룰로오스, 셀룰로오스 아세테이트, 젤라틴, 세라믹, 폴리-L-리신 등이 바람직하며, 보다 바람직하게는 키토산을 이용한다. 키토산은 글루코사민(glucosamine)의 피라노오스(pyranose)단위체가 β-1,4 결합된 것이며 특별히 한정되지 않는다.

[0023] 상기 유기산 수용액은 젖산(lactic acid), 아세트산(acetic acid), 프로피온산(propionic acid), 포름산(formic acid), 아스코르브산(ascorbic acid) 및 주석산(tartaric acid) 등이 바람직하며, 보다 바람직하게는 아세트산이다.

[0024] 상기 양전하성 고분자 수용액에서의 양전하성 고분자의 농도는 특정 범위로 한정되지 않으나, 바람직하게는 0.01%(W/V) 이상으로 하며, 최대로 양전하성 고분자 수용액 제조시에 사용하는 각 유기산에 대한 양전하성 고분자의 용해도 범위까지 용해되도록 한다. 양전하성 고분자 수용액의 농도는 수용액 제조시에 사용하는 유기산의 농도에 따라 달라지는데, 예를 들어 초산 수용액의 농도가 증가하면 양전하성 고분자의 용해도도 증가한다. 따라서, 양전하성 고분자 수용액에서의 양전하성 고분자의 최대 농도는 사용된 유기산에 대한 양전하성 고분자의 용해도 범위까지이다.

[0025] 상기 겔화제(gelling agent)는 트리폴리포스페이트(TPP; tripolyphosphate)가 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 트리폴리포스페이트는 나트륨 염(sodium salt)의 형태로 존재하는 화합물이며, 종래부터 해산식품(sea food), 육류식품, 가금류식품 및 애완동물용 식품의 식품보존료 등의 다양한 용도로 사용되어 왔고, 미국식품의약국(United States Food and Drug Administration)은 트리폴리포스페이트를 인체에 안전한 화합물로 인정하고 있다. 상기 트리폴리포스페이트 수용액이 첨가된 양전하성 고분자 수용액을 잘 혼합되도록 교반한다. 교반 시 조건은 특별하게 한정되지 않으나 본 발명의 구체적인 일 실시예에 의하면, 37℃, 300 rpm에서 30분간 교반한다. 원심분리는 통상적인 원심분기기를 이용하여 행하며 15,000 rpm에서 30분 정도 원심분리를 행한다. 원심분리한 후에 상등액을 제거한 후 동결건조함으로써 양전하성 나노입자의 분말을 제조한다.

[0026] 상기 양전하성 나노입자는, 1 ㎛ 미만의 평균 입자 크기를 나타내고, 바람직하게는 0.1 내지 800nm 이며, 더욱 바람직하게는 30 내지 50 nm의 평균 입자 크기를 갖는다. 양전하성 나노입자의 평균 크기는 양전하성 나노입자들의 군의 평균 직경이며 이는 본 기술 분야의 숙련자에게 공지된 표준 절차들에 의해 측정될 수 있다. 한편, 양전하성 나노입자들의 전하 크기는 0 mV 에서 + 60 mV 까지 다양할 수 있다.

[0027] 상기 양전하성 나노입자는 담지하고 있는 약물을 서서히 방출할 수 있으므로 지속적인 약물 전달효과를 기대할 수 있으며, 또한 세포질을 통해 세포 안으로 침투할 수 있으므로 세포 내에서 지속적인 약물전달을 기대할 수 있다.

[0028] 상기 2)단계는 생분해성 나노섬유를 제조하는 단계로, 생분해성 고분자를 유기용매에 용해시키고 전기방사하여 생분해성 나노섬유를 제조한다.

[0029] 상기 생분해성 나노섬유는 3차원 세포배양이 가능한 다공성 지지체로서, 생분해성 나노섬유가 교차되서 망상구조를 이루는 것을 의미한다. 상기 생분해성 고분자는 바람직하게 폴리카프로락톤(PCL), 폴리락트산(PLA), 폴리글리콜산(PGA), 폴리(D,L-락트산-co-글리콜산)(poly(D,L-lactide-co-glycolide); PLGA), 디올/이애시드계 지방족 폴리에스테르, 폴리에스테르-아미드/폴리에스테르-우레탄, 폴리(발레로락톤), 폴리(하이드록시 부티레이트), 폴리(하이드록시 발레레이트), 폴리안하이드리드, 폴리오르토에스터(polyorthoesters), 폴리비닐알콜, 폴리에틸렌글리콜, 폴리우레탄, 폴리아크릴산 및 폴리-N-이소프로필아크릴아미드이며, 더욱 바람직하게는 폴리카프로락톤(PCL)이다.

[0030] 본 발명에서의 나노섬유는 아스펙트 비율(직경에 대한 길이의 비율)이 높은 구조적 특성으로 인하여 비표면적이 높아, 즉 나노섬유 내에서 세포가 접촉할 수 있는 면적이 넓어 세포 배양에 용이할 뿐만 아니라, 본 발명의 나노섬유는 선형의 나노섬유가 교차되어 있어 나노섬유 내의 구멍이 매끄럽게 연결되어 있고, 이를 통해 세포 배양에 필요한 영양분, 산소 등이 상하좌우로 공급되기에 용이한 구조를 가진다. 세포 지지체에 있어, 교차되어 망상구조를 이루는 선형 나노섬유의 직경은 제조되는 지지체의 비표면적, 세포와의 접촉용이성, 생성되는 구멍의 크기 등을 종합적으로 고려하면 직경이 50 내지 2,000 nm인 것이 더욱 바람직하다.

[0031] 상기 유기용매는 THF(tetrahydrofuran), DMF(dimethylformamide), DMSO(dimethylsulfoxide), 클로로포름, 디클로로메탄, 헥산, 디에틸에테르, 아세토니트릴 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 본 발명에서는 THF 및 DMF의 혼합용매가 바람직하고, 이 때 혼합비율은 5~10:1~5의 부피비가 바람직하며, 7:3의 부피비가 더욱 바람직하다.

[0032] 상기 나노섬유를 제조할 시 드로잉(drawing), 템플레이트 합성(template synthesis), 상분리(phaseseparation), 자기 조합(self assembly), 전기방사(electrospinning) 등을 사용할 수 있으며, 본 발명에서는 전기방사 방법을 이용하여 수행한다. 전기방사는 나노섬유를 연속적이고 대량으로 생산할 수 있는 방법으로 바늘(모세관 튜브, 또는 노즐)을 통해 밀리미터 직경의 액체 분사물(jet)을 방출시켜 나노섬유로 된 부직포를 생산하는 공정이다. 상기 전기방사는 공정 조건을 조절하여 수nm~수천nm 크기의 다양한 직경을 가지는 나노섬유를 제조할 수 있으며, 부피 대비 표면적비가 높을 뿐만 아니라 제조된 막의 공극률이 매우 높은 장점이 있다. 이러한 전기방사의 구체적인 공정조건은 본 발명에서 특별히 한정하지 않으며, 이 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의해 적절히 채택될 수 있다. 상기 바늘의 내경이 0.3~0.7 mm 이고, 바늘과 수집기 사이의 전압을 10~25 kV으로 작용하여 전기방사를 수행이 가능하며, 바람직하게는 18~24 게이지의 바늘을 사용한다.

[0033] 상기 3)단계는 나노입자-나노섬유 복합체를 제조하는 단계로, 상기 1)단계에서 회수된 양전하성 나노입자를 상기 2)단계에서 제조된 생분해성 나노섬유에 투입하여 흡착시켜 제조한다.

[0034] 상기 방법으로 제조된 생분해성 나노섬유 및 이에 부착된 약물 전달용 양전하성 나노입자를 포함하는 복합지지체는, 세포의 부착능력 및 세포 활성이 우수하기 때문에, 근육, 피부, 힘줄, 연골, 인대, 뼈, 기관, 경막, 혈관 등의 3차원 작용성 조직의 충전제로서 이용될 수 있다. 이러한 방법으로 제조된 세포 지지체는, 근육 또는 힘줄의 수축과 관련된 기계적 응력을 견디면서, 근육 또는 힘줄에 부착되어서 세포의 성장을 촉진시킬 수 있다.

[0035] 상기한 바와 같이, 본 발명의 생분해성 나노섬유 및 이에 부착된 약물 전달용 양전하성 나노입자를 포함하는 복합지지체는, 세포 부착능력이 높고 세포독성이 낮으며, 전달하는 약리물질을 서서히 방출하기 때문에 인공피부 및 충전제로서 유용하게 사용될 수 있다.

[0036] 이하, 본 발명의 실시예에 의거하여 보다 구체적으로 설명한다. 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0037] **실시예 1. 나노입자-나노섬유 복합 지지체의 제조**

[0038] **1. 키토산 나노입자 형성**

[0039] 키토산을 1.75% 아세트산 용액에 용해시켜 2~5 mg/ml의 키토산 용액을 준비하였다. 이 키토산 용액을 40W의 출력으로 초음파처리(sonication) 하는 중에 1mg/ml의 농도로 증류수에 용해시킨 TPP(tripolyphosphate) 용액을 2ml/hr 의 속도로 첨가하였다(후코이단(Fucoidan)을 포함시킬 경우, 후코이단 및 TPP가 각각 0.66 mg/ml씩 들어간 용액을 이용). 키토산 용액의 부피 : TPP 용액의 부피가 5:1이 될 때까지 첨가한 후, 1시간~1시간 30분 동안 반응시키고 3,000 xg의 원심분리를 통해 회수하였다. 회수한 나노입자를 에탄올에 다시 풀어서 동결건조를 통해 회수하였으며, 이를 SEM(Scanning electron microscopy)으로 확인하였다. 이의 결과를 도 1에 나타내었다.

[0040] 도 1에 나타낸 바와 같이, 평균 40 nm 정도의 균일한 구형을 띄는 나노입자의 SEM 이미지를 확인하였다.

[0041] **2. 나노섬유의 제조**

[0042] 나노섬유는 전기방사 방법을 이용해서 제조하였고, 용매는 THF(tetrahydrofuran)과 DMF(dimethylformamide)를 7:3의 부피비로 혼합시켜 사용하였다. 상기 혼합용매에 15% (w/v)의 PCL(polycaprolactone)을 용해시킨 후 18G

바늘(needle)을 통해 1ml/hr의 속도로 분사시켰으며, 분사되는 동안 바늘과 집전체(collector) 사이에 15 cm의 거리를 두고 15 kV의 전압을 걸어서 나노섬유 형태로 제조하였다.

[0043] **3. 나노입자-나노섬유 복합 지지체(complex electrospun scaffold)의 제조**

[0044] 10 ml 키토산 용액으로부터 생성된 나노입자를 회수한 뒤, 10ml의 에탄올에 다시 풀어서 500ul씩 24웰 크기의 나노섬유 샘플에 투입하였다. 나노입자를 투입한 후 24웰 플레이트를 4℃에서 밤사이에 보관하여 흡착시켰으며, 이를 SEM으로 확인하였다. 이의 결과를 도 2에 나타내었다.

[0045] 도 2에 나타낸 바와 같이, 나노섬유과 그 나노섬유에 나노입자를 부착시킨 복합지지체의 형태를 SEM 이미지로 확인하였다.

[0046] **실험예 1. 키토산 나노입자의 세포독성**

[0047] 키토산 나노입자가 세포에 미치는 영향을 알아보기 위해 세포독성 실험을 수행하였다. 10 ml 키토산 용액에서부터 생성된 나노입자를 원심분리 및 동결건조로 회수한 뒤, 10 ml PBS에 분산시키고 그 용액을 배지에 0 ug/ml, 100 ug/ml, 200 ug/ml, 300 ug/ml의 농도가 되도록 배지와 섞은 후 96웰 플레이트에 부착시킨 세포에 처리하였다. 나노입자를 처리한 후 1, 3, 5일의 시점에서 MTT 어세이를 통해 세포독성을 확인하였다. 이의 결과를 도 3에 나타내었다.

[0048] 도 3에 나타낸 바와 같이, 키토산 나노입자를 첨가할 경우 대조군과 비교하여 유의한 MTT 값의 변화가 관찰되지 않음을 확인하였다. 이는 키토산 나노입자가 세포의 활성 및 성장에 큰 영향을 주지 않는 다는 것을 보여주며 이를 통해 순수하게 약물의 효과만 세포에 영향을 주는 유용물질 전달체로서의 가능성을 확인하였다.

[0049] **실험예 2. 나노입자의 약물 방출**

[0050] 키토산 나노입자에 담지되어있는 물질의 방출 여부를 알아보기 위해 후코이단(fucoidan)을 키토산 나노입자에 담지하여 $1x10^3$ 세포/웰의 접종농도를 갖는 섬유아세포(fibroblast)에 처리하였고, 후코이단을 처리하지 않은 대조군 및 후코이단을 배지에 녹여 한번에 처리한 경우와 비교하였다. 이를 확인하기 위하여 나노입자를 처리한 시점에서 1, 3, 5일에 세포활성변화를 MTT 어세이를 수행하였다. 이의 결과를 도 4에 나타내었다.

[0051] 도 4에 나타낸 바와 같이, 후코이단을 담지한 키토산 나노입자의 경우는 대조군 및 후코이단을 배지에 녹여 한번에 처리한 경우의 중간 형태의 세포활성을 갖게 됨을 확인할 수 있었다. 또한 세포의 농도 및 MTT가 세포에 의해 변환된 보라색 포마잔(formazan)을 비교할 경우, 나노입자를 이용하였을 때 대조군과 비슷한 모습을 띄나 포마잔이 더 적음을 확인하였다.

[0052] **실험예 3. 나노입자의 침투 확인**

[0053] 나노입자가 세포내로 침투하는 정도를 확인하기 위하여, FITC로 표지된 키토산을 제조하였다. 즉, 키토산을 0.1M 아세트산에 용해시켜 만든 0.25% 키토산(CS; chitosan) 용액과, 키토산 용액 농도의 최소 1.5배의 농도가 되도록 과량의 FITC(fluorescein isothiocyanate)를 용해시킨 메탄올 용액을 동일한 부피로 혼합하여 키토산을 FITC로 표지하였다. 그 후 상온에서 1시간 동안 반응시켜 중화시킨 후 48시간 동안 투석을 수행하여 잔여 색소 및 용매를 제거하고 동결건조를 통해 FITC로 표지된 키토산 나노입자를 회수하였다. FITC가 표지된 키토산으로 구성한 나노입자를 부착시킨 섬유아세포에 처리하고 그 후 5일 째, 나노입자를 확인하기 위해 형광현미경을 이용해 FITC의 형광을 확인하였다. 이의 결과를 도 5에 나타내었다.

[0054] 도 5에 나타낸 바와 같이, 형광사진에서 나노입자가 다수의 세척과정 후에도 세포부분에 남아있는 것을 확인할 수 있어, 나노입자가 세포질을 통해 세포 안으로 들어감을 확인하였다.

[0055] **실험예 4. 나노입자-나노섬유 복합지지체의 세포내 역할**

[0056] 복합지지체에서의 세포의 부착능력 및 세포활성을 확인하기 위하여 PCL(polycaprolactone), PCL+CS(chitosan), 일반세포배양 플레이트(TCPS; tissue culture polystyrene)에서 MTT 어세이를 수행하였다. 부착능력을 확인하기 위해 $3x10^3$ 세포/웰의 농도로 복합지지체 위에 세포를 접종하여 2시간, 24 시간에서 MTT 어세이를 진행하였으며, 세포활성 변화를 확인하기 위해 세포를 $1x10^3$ 세포/웰의 농도로 복합지지체에 접종하여 1,3,5일째 MTT 어세이를 통해 그 변화를 확인하였다. 이의 결과를 도 6에 나타내었다.

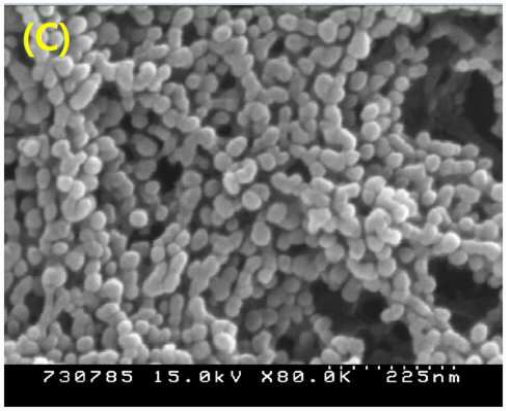
[0057] 도 6에서 나타낸 바와 같이, 부착능력과 관련하여 키토산 나노입자의 유무에 따른 세포의 부착 정도는 크지 않았으며, 일반 세포배양 플레이트(TCPS)보다는 부착 정도가 큰 것을 확인하였다. 세포활성 관련하여 PCL+CS에서 좀더 낮은 값을 나타내는 것을 확인하였다.

[0058] 또한, 상기 나노입자-나노섬유 복합지지체에 부착된 세포를 SEM으로 관찰하였으며, 이의 결과를 도 7에 나타내었다.

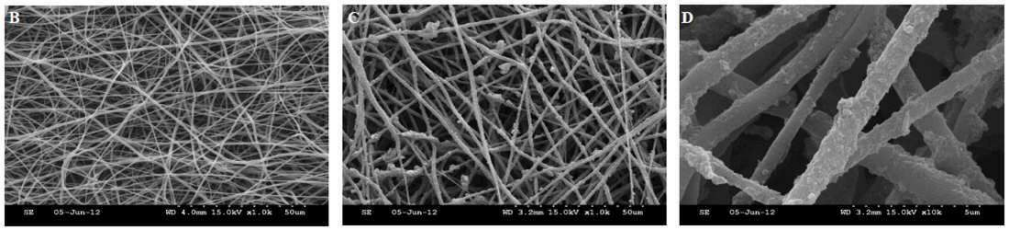
[0059] 도 7에 나타낸 바와 같이, 세포가 부착되어 있는 모습은 나노입자가 부착된 경우(도 7A) 및 나노입자가 부착되지 않은 대조군(도 7C)의 경우 큰 차이가 없음을 알 수 있었다. 또한, 배양 5일 후 나노섬유에 부착되어 있던 나노입자가 배지 내로 퍼져나가 나노섬유에 남아있는 양이 줄어든 것을 확인하였다(도 7B).

도면

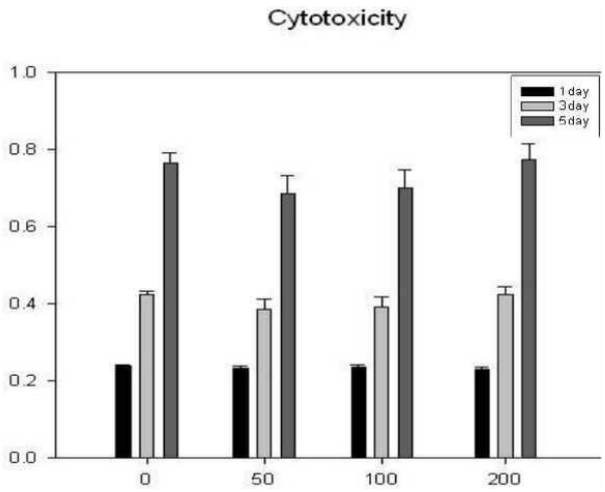
도면1



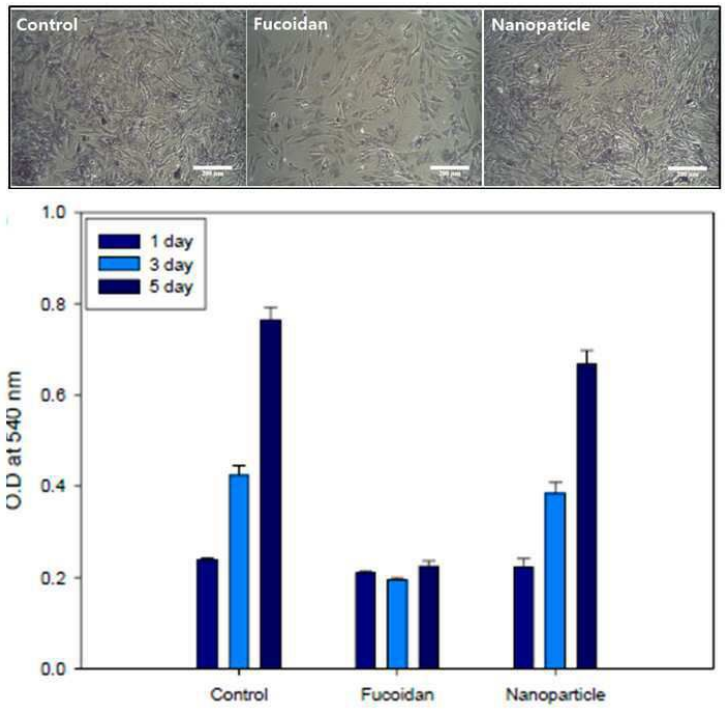
도면2



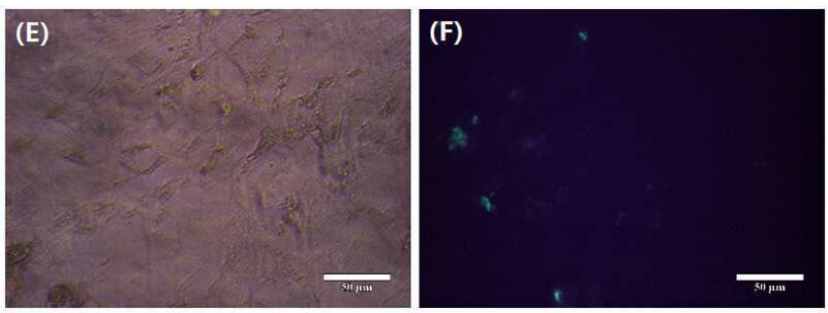
도면3


Cytotoxicity
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
1 day
3 day
5 day
0
50
100
200

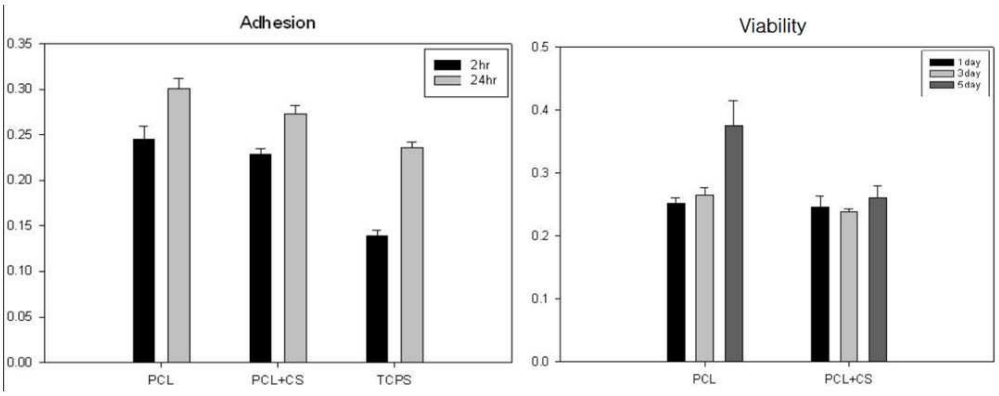
도면4


Control
Fucoidan
Nanopaticle
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
O.D at 540 nm
1 day
3 day
5 day
Control
Fucoidan
Nanoparticle

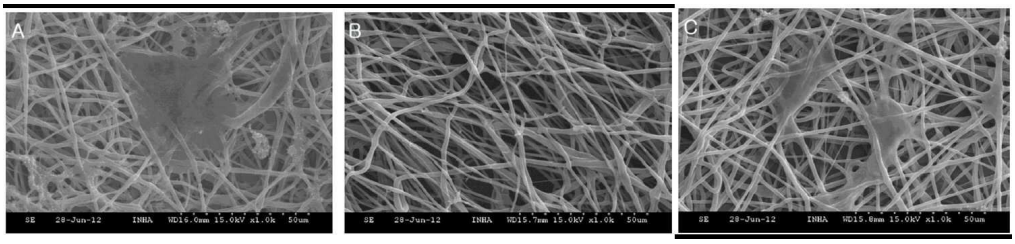
도면5


(E)
(F)

도면6


Adhesion
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
2hr
24hr
PCL
PCL+CS
TCPS
Viability
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
1 day
3 day
5 day
PCL
PCL+CS

도면7


A
B
C