(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0116941
(43) 공개일자 2015년10월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 11/08 (2006.01) *A61L 27/14* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0041717
(22) 출원일자 2014년04월08일
심사청구일자 2014년04월08일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
(72) 발명자
육지호
서울특별시 강서구 등촌로 163 등촌아이파크아파트 120동 1203호
신화성
인천 연수구 먼우금로 126, 210동 1201호 (동춘동, 현대대림2차아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

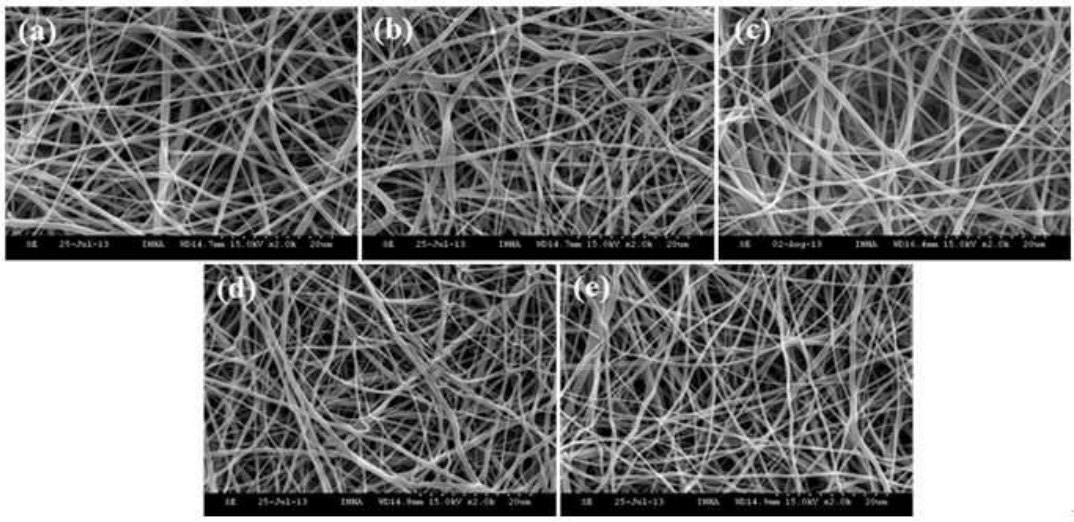
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **PVP-b-PCL 블록 공중합체를 포함하는 친수성 나노섬유 세포지지체**

(57) 요 약

본 발명은 PVP-*b*-PCL 블록 공중합체를 포함하는 친수성 나노섬유 세포지지체 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 PVP-*b*-PCL 블록 공중합체를 포함하는 친수성 나노섬유 세포지지체는 세포 독성이 없으며, 표면이 친수화 되어 세포 부착 및 증식을 증가시키는 우수한 효과를 가지고 있으므로 3차원적으로 인공 피부 조직을 재구성하거나, 탈세포화를 통해 피부 세포 유래 세포 외 기질 (extracellular matrix, ECM) 바이오 소재의 개발에 이용될 수 있으며, 다양한 분야에서 조직공학용 세포지지체로 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

조성주

인천 남구 경인남길 36, 401호 (용현동, 원진주택)

정상명

서울 강남구 논현로51길 25, 304호 (도곡동, 현대그린아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2013R1A1A2006392

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기본연구

연구과제명 RAFT-ROP 이작용기성 개시제를 이용한 다양한 블록 공중합체의 합성 및 이의 응용

기 여 율 1/1

주관기관 인하대학교 산학협력단

연구기간 2013.06.01 ~ 2014.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

PVP-*b*-PCL(poly(N-vinylpyrrolidone)-*b*-poly(ε -caprolactone)) 블록 공중합체를 포함하는 나노섬유 세포지지체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 나노섬유 세포지지체는 생분해성 고분자를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 나노섬유 세포지지체.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 생분해성 고분자는 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), 폴리우레탄 및 폴리-N-이소프로필아크릴아미드로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 나노섬유 세포지지체.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 생분해성 고분자와 PVP-*b*-PCL 블록 공중합체는 85~95:5~15의 중량비로 포함되는 것을 특징으로 하는, 나노섬유 세포지지체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 세포지지체는 친수성인 것을 특징으로 하는, 나노섬유 세포지지체.

청구항 6

(a) PVP-*b*-PCL 블록 공중합체 및 생분해성 고분자를 유기용매에 용해시키는 단계; 및

(b) 상기 (a) 단계의 혼합물을 전기 방사하여 나노섬유 매트를 제조하는 단계;를 포함하는, PVP-*b*-PCL 블록 공중합체를 포함하는 친수성 나노섬유 세포지지체의 제조 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 (a)단계에서 생분해성 고분자는 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), 폴리우레탄 및 폴리-N-이소프로필아크릴아미드로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 친수성 나노섬유 세포지지체의 제조 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 (a)단계에서 유기용매는 테트라히드로퓨란, 디메틸포름아미드, 디클로로메탄, 클로로포름, 아세톤, 디옥산, 트리플루오르에탄, 헥사플루오로이소프로판, 및 이들의 혼합 용매로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 친수성 나노섬유 세포지지체의 제조 방법.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 (b)단계에서 전기방사는 10~20 kV의 전압 세기하에서 수행되는 것을 특징으로 하는, 친수성 나노섬유 세포지지체의 제조 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 PVP-*b*-PCL 블록 공중합체를 포함하는 친수성 나노섬유 세포지지체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 생체조직공학이란 생체에서 완전히 흡수되고 세포와 친화력이 있는 고분자 지지체와 세포를 생체 조직에 이식함으로써 새로운 실질 조직을 복원, 재생, 대체하여 정상적인 기능을 유도하는 일련의 기법이다. 이는 세포배양학, 재료공학, 이식수술 분야의 다학제간 조합이며, 이러한 조직공학기법을 이용하여 원하는 조직을 얻을 수 있고, 지지체의 모양에 따라 그 모양을 마음대로 주조할 수 있다. 조직공학분야에 있어서 세포 및 지지체의 생물학적 신호는 매우 중요한 요소이며, 사용되는 생체재료 지지체의 역할은 생체 내에서 세포가 잘 정착하여 배양될 수 있도록 도와줄 수 있어야 하고 고유의 표현형을 유지하면서 생체 재료 지지체에 골고루 분포되어야 하며, 분리된 세포가 생체 내에서 세포 외 기질 (extracellular matrix, ECM)을 풍부하게 분비함으로써 분화된 조직의 재생을 촉진시켜야 한다. 또한, 체내에 이식된 후에도 주변 조직과 융화가 잘 되고 일정 기간이 지나면 안전하게 흡수, 분해하는 생체 적합성을 가져야 한다.

[0003] 효과적인 조직 재생을 위한 이상적인 지지체에는 체내 하중을 견뎌내야 할 충분한 기계적 강조, 세포들의 접착 및 성장이 가능한 표면 화학적 성질, 기공의 마이크로와 매크로적인 구조, 크기 및 형태 등이 필수 조건으로 요구된다. 지지체는 파종된 세포와 조직 주변으로부터 이동되는 세포 성장에 중요한 역할을 수행한다. 인체 내 대부분의 세포는 부착세포로서 만일 부착할 곳이 없으면 세포는 성장하지 못하고 사멸한다. 이러한 세포의 특성으로 인하여 세포 치료에 많은 어려움이 있으며, 이를 해결하기 위해 지지체가 도입되어 널리 사용되고 있다.

[0004] 상기 조직공학 지지체에 이용된 고분자는 크게 천연 고분자와 합성 고분자로 나눌 수 있으며, 이들은 적합한 물리화학적, 생물학적, 기계적인 특성을 가지고 있다. 천연 고분자는 콜라겐, 히알루론산, 알지네이트, 젤라틴, 잔탄검, 케라틴, 소장 점막하조직 (small intestinal submucosa) 등이 있으며, 이들은 우수한 생체 적합성과 이식 후 낮은 면역 반응을 가지고 있다. 그러나, 천연 고분자는 개별적으로 쓰일 경우 충분한 기계적 특성을 가지고 있지 못한 단점이 있다.

[0005] 합성 고분자는 poly(lactic acid)(PLA), poly(glycolic acid)(PGA), poly(lactic-co-glycolic acid)(PLGA), poly(e-caprolactone)(PCL) 등 주로 소수성 폴리에스테르이다. 그 중 α-하이드록시산 계열인 PGA, PLA 및 그들의 공중합체인 PLGA는 미국 FDA의 승인을 받은 합성고분자로서 조직공학적 다공성 지지체, 약물전달시스템 등의 생체재료로 널리 이용되고 있으며, 높은 생체적합성과 가공성을 가지고 있다. 하지만, 생체활성물질의 결여와 소수성으로 인해 세포부착에 어려움이 있으며 가수분해 과정 중 생성되는 산분해물이 조직주변의 pH를 감소시켜 염증을 유발하는 단점이 있다.

[0006] 한편, 세포지지체로 주로 이용되는 PCL과 같은 생분해성 고분자의 나노섬유 지지체의 경우 고분자 자체의 소수성에 의한 초기 세포 접착의 한계점을 가지고 있다.

[0007] 이에 본 발명자들은 상기한 바와 같은 문제점을 해결한 새로운 나노섬유 세포지지체를 개발하기 위한 연구를 수행한 결과, PVP-*b*-PCL 블록 공중합체를 포함하는 나노섬유 세포지지체가 표면이 친수화되어 세포 부착 및 증식을 증가시키는 우수한 효과를 가지고 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 PVP-*b*-PCL 블록 공중합체를 포함하는 친수성 나노섬유 세포지지체 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 PVP-*b*-PCL 블록 공중합체를 포함하는 친수성 나노섬유 세포지지체 및 이의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에 따른 PVP-*b*-PCL 블록 공중합체를 포함하는 친수성 나노섬유 세포지지체는 세포 독성이 없으며, 표면이 친수화 되어 세포 부착 및 증식을 증가시키는 우수한 효과를 가지고 있으므로 3차원적으로 인공 피부 조직을 재구성하거나, 탈세포화를 통해 피부 세포 유래 세포 외 기질 (extracellular matrix, ECM) 바이오 소재의 개발에 이용될 수 있으며, 다양한 분야에서 조직공학용 세포지지체로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 본 발명의 PCL/PVP-*b*-PCL 나노섬유를 SEM을 통해 관찰한 결과를 나타낸 도이다[PCL/PVP-b-PCL (w/w): (a) 100/0, (b) 90/10, (c) 85/15, (d) 80/20, (e) 70/30].

도 2는 본 발명의 PCL/PVP-*b*-PCL 나노섬유의 함량에 따른 접촉각을 나타낸 도이다.

도 3 은 용출 실험 후 본 발명의 PCL/PVP-*b*-PCL 나노섬유 표면의 변화를 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명의 PCL/PVP-*b*-PCL 나노섬유가 세포 부착에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명의 PCL/PVP-*b*-PCL 나노섬유 처리시 세포의 부착형태를 나타낸 도이다.

도 6은 본 발명의 PCL/PVP-*b*-PCL 나노섬유의 세포 독성을 측정한 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 본 발명의 PCL/PVP-*b*-PCL 나노섬유가 세포 활성에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

도 8은 본 발명의 PCL/PVP-*b*-PCL 나노섬유가 세포 분포에 미치는 영향을 형광 핵염색을 통해 관찰한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세히 설명한다.

[0013] 본 발명은 PVP-*b*-PCL 블록 공중합체를 포함하는 친수성 나노섬유 세포지지체를 제공한다.

[0014] 상기 세포지지체는 PVP-*b*-PCL 블록 공중합체와 함께 생분해성 고분자를 함께 포함한다. 상기 고분자는 PCL, PLA, PGA, PLGA, 디올/다이애시드계 지방족 폴리에스테르, 폴리에스테르-아미드/폴리에스테르-우레탄, 폴리(발레로락톤), 폴리(하이드록시 부티레이트), 폴리(하이드록시 발레레이트), 폴리안하이드리드, 폴리오르토에스터(polyorthoesters), 폴리우레탄, 폴리-*N*-이소프로필아크릴아미드 및 이들의 유도체 또는 이들의 공중합체 등을 포함하며, 바람직하게는 PCL이다.

[0015] 상기 생분해성 고분자와 PVP-*b*-PCL 블록 공중합체는 99:1~70:30의 중량비로 혼합될 수 있으며, 바람직하게는 85~95:5~15의 중량비로 혼합될 수 있다. 상기 비율로 혼합하여 제조시 세포배양에 가장 적절한 친수성을 나타낼 수 있다.

[0016] 또한, 본 발명은 (1) PVP-*b*-PCL 블록 공중합체 및 생분해성 고분자를 유기용매에 용해시키는 단계, 및 (2) 상기 (1) 단계의 혼합물을 전기 방사하여 나노섬유 매트를 제조하는 단계;를 포함하는, PVP-*b*-PCL 블록 공중합체를 포함하는 친수성 나노섬유 세포지지체의 제조 방법을 제공한다.

[0017] 보다 구체적으로는, 생분해성 고분자, 바람직하게는 PCL을 유기용매에 녹이고, 일정량의 PVP-*b*-PCL 블록 공중합체를 첨가한다. 상기 용액을 충분히 혼합한 후, 전기방사 장치를 이용하여 나노섬유 매트로 제작한다. 이때, 바늘은 15~20 게이지, 집전장치 (collector)와의 거리는 10~20 cm, 전기방사 전압 세기는 10~20 kV가 바람직하다.

[0018] 상기 유기 용매는 테트라히드로퓨란, 디메틸포름아미드, 디클로로메탄, 클로로포름, 아세톤, 디옥산, 트리플루오르에탄, 헥사플루오로이소프로판, 및 이들의 혼합 용매 등을 포함한다.

[0019] 본 발명의 PVP-*b*-PCL 블록 공중합체를 포함하는 세포지지체는 세포 독성이 없으며, 표면이 친수화 되어 세포 부착 및 고농도 배양 조건에서 세포 증식을 증가시키는 우수한 효과를 가지고 있다. 또한, 본 발명의 PVP-*b*-PCL 블록 공중합체를 포함하는 친수성 PCL 세포 지지체는 세포 지지체가 구성하는 배양 환경에서 세포가 안정적으로 생장하며 조직을 만드는데 기여하기 때문에, 이를 이용하여 인공 조직 및 탈세포화 과정을 거쳐 복합 ECM으로 이용할 수 있다. 따라서, 본 발명의 PVP-*b*-PCL 블록 공중합체를 포함하는 세포지지체는 조직공학용 세포지지체로 유용하게 이용할 수 있다.

[0020] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예 및 실험예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예 및 실험예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예 및 실험예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0021] **실시예 1. PVP-*b*-PCL 블록 공중합체를 포함하는 세포지지체의 제조**

[0022] 1-1. PVP-*b*-PCL 블록 공중합체의 합성

[0023] $[CL]_0/[VP]_0/[HECP]_0/[DPP]_0/[V\text{-}70]_0$=200/200/1/2/0.4의 반응물 투입비로 다음과 같이 합성하였다: ε-caprolactone (CL, 3.05 mL, 27 mmol), 이중개시제인 2-hydroxyethyl 2-(ethoxycarbonothioylthio)propanoate) (HECP, 0.0328 g, 0.14 mmol) 및 diphenyl phosphate) (DPP, 0.0688 g, 27 mmol)를 3 mL의 아니솔(anisole)에 녹인 후 상기 혼합물을 30℃에서 6시간 동안 교반하였다. 그 후 2,2'-아조비스(4-메톡시-2,4-디메틸발레로니트릴)(2,2'-azobis(4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitrile) (V70, 0.0170 g 0.055 mmol)을 녹인 *N*-비닐피롤리딘(*N*-vinylpyrrolidone) (VP, 2.94 mL, 27 mmol) 용액을 반응중인 혼합물에 주입하여 30℃에서 12시간 동안 교반하였다. 이후 반응물을 디에틸 에테르에 침천시켜 여과한 후 진공오븐에서 24시간 동안 건조 시켜 PVP-*b*-PCL 블록 공중합체를 회수하였다. 중합 된 PVP-*b*-PCL 블록 공중합체의 분자량은 Mn=26,300 g/mol, 분자량분산도(PDI)는 1.04 인 것으로 겔 투과 크로마토그래피 (GPC)를 통하여 확인하였으며, 핵자기공명분광 분석 (^{1}H-NMR)을 통하여 측정한 PVP-*b*-PCL 블록 공중합체의 PVP와 PCL의 블록의 비율은 1:1.35임을 확인하였다.

[0024] 1-2. 전기방사

[0025] PCL(Mw = 80,000 g/mol, Sigma Aldrich)과 상기 실시예 1-1에서 제조한 PVP-*b*-PCL 블록 공중합체를 무게비율로 각각 100/0, 90/10, 85/15, 80/20, 70/30 (w/w) 의 비율별로 혼합하여 각각의 실험군이 비슷한 섬유 직경을 갖도록 각각 11.0%, 11.5%, 12.3%, 13.0%, 15.0%의 농도로 방사용액을 제조하여 전기방사를 통해 나노섬유를 제조하였다. 전기방사 용매로 THF/DMF (1/1 v/v) 혼합용매를 이용하였다. 전기방사시 전압은 13 kV, 콜렉터와 노즐의 거리는 13cm, 유량은 0.8 ml/h이었다. 이 때 각 용액의 점도를 측정하였으며, 이를 표 1에 나타내었다.

표 1

[0026]

PCL / PVP-*b*-PCL(w/w)	용액의 농도(%)	점도(cp)
100/0	11.0	161
90/10	11.5	148
85/15	12.3	141
80/20	13.0	140
70/30	15.0	142

[0027] **실험예 1. 제조된 세포지지체의 특성 분석**

[0028] 1-1. SEM 분석 및 평균섬유직경 측정

[0029] 상기 실시예 1에서 제조한 나노섬유의 모양을 관찰하기 위해, 주사전자현미경(SEM; scanning electron microscope)(Hitachi S-4300)을 이용하였으며, 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0030] 도 1에 나타낸 바와 같이, 나노섬유가 잘 형성되었음을 확인하였고, 섬유 20개의 직경을 측정하여 평균 섬유직경을 구하였으며, 이를 표 2에 나타내었다.

표 2

[0031]

PCL / PVP-*b*-PCL(w/w)	평균직경(nm)
100/0	476.74±31.70
90/10	407.78±20.36
85/15	422.33±26.81
80/20	421.34±28.99

70/30	438.25±24.56

[0032] 표 2에 나타낸 바와 같이, 나노섬유의 평균 섬유직경이 각각 476.74, 407.78, 422.33, 421.34, 438.25 nm 로 유사한 평균 직경을 갖는 것을 확인하였다.

[0033] 1-2. 접촉각 측정

[0034] 상기 실시예 1에서 제조한 나노섬유의 PVP-*b*-PCL의 함량에 따른 친수화도를 측정하기 위하여 접촉각을 관찰하였으며, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0035] 도 2에 나타낸 바와 같이, PVP-*b*-PCL의 함량이 증가할수록 접촉각이 감소하여 나노섬유 매트의 친수성이 증가함을 확인하였으며, 전기방사된 나노섬유 매트가 물에 대한 친화도가 증가함에 따라 물방울을 흡수하는 속도도 빨라지는 것을 확인하였다.

[0036] 1-3. 용출 실험

[0037] 세포의 배양 환경인 물에서 친수성 물질인 PVP가 용출되는지를 실험하였다. PCL/PVP-*b*-PCL (70/30 w/w) 나노섬유 세포지지체를 물에 담근 상태로 30℃의 오븐에 각각 1시간부터 10일까지 놓아두었다. 그 후 메탄올로 나노섬유 세포지지체를 세척한 후 진공건조하여 실험 전과 후의 무게를 비교하였으며, 이의 결과를 표 3에 나타내었다.

[0038] 또한 SEM 분석을 통하여 용출 실험 후 나노섬유 표면의 형상이 변화되는지 관찰하였으며, 이의 결과를 도 3에 나타내었다.

[0039] *표 3*

	무게(mg)	
	전	후
1시간	6.6	6.1
3시간	6.4	6.2
6시간	6.2	6.0
12시간	6.3	6.0
1일	6.7	6.7
3일	6.6	6.6
5일	6.8	6.2
7일	6.6	6.4
10일	6.7	6.4

[0040] 표 3 및 도 3에 나타낸 바와 같이, 친수성 물질의 용출로 의심되는 무게변화는 보이지 않았으며, 나노섬유 형상도 유지되었다. 따라서 PCL/PVP-*b*-PCL 나노섬유 세포지지체는 세포 배양시에도 초기의 친수성을 유지할 것임을 확인하였다.

[0041] **실험예 2. 세포지지체가 부착되어 있는 모양 관찰**

[0042] 상기 실시예 1에서 제조한 나노섬유 세포지지체가 세포에 부착되어 있는 모양을 관찰하기 위해, SEM을 이용하였다. 세포는 SD 랫트의 피부를 1차 배양 (primary culture)하여 이용하였다. 1차 배양은 1일령의 SD 랫트의 피부를 자른 후(1cm*1cm), 디스파아제(1 mg/ml)를 포함하는 HBSS 배지에 넣고, 4℃에서 24시간 동안 반응시킨 후, 피부의 진피층과 표피층을 분리하였다. 이를 다시 콜라게나아제 2 (1 mg/ml)를 포함하는 HBSS 배지에 넣고 4℃에서 24시간 동안 반응시켰다. 각각의 표피와 진피를 공극 크기가 70 μm인 세포 여과기에 거르고, 고농도 글루코오스-DMEM 배지(10% FBS, 1% 항생제)에서 배양하였다. 24 웰 플레이트에 상기 실시예 1에서 제조한 PCL/PVP-*b*-PCL 나노섬유 매트 또는 PCL 나노섬유 매트를 넣고, $1X10^4$ cells/well의 농도로 세포를 심고(seeding), 5일 동안 배양하였다. 5일 후, 각 나노섬유 매트 샘플을 PBS로 세척하고, 3% 글루타르알데하이드를 첨가한 후, 37℃

에서 30분 동안 배양하였다. 이 후, 에탄올의 농도를 25%, 50% 75%, 90%, 100%로 증가시키며 탈수하였다. 탈수된 각 나노섬유 매트 샘플에 헥사메틸디실라잔(HMDS; hexa methyl di silazane)을 3방울 떨어뜨리고, 3분간 반응시킨 후, 진공 상태에서 30분간 증발시킨 후 관찰하였으며, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0043] 도 4에 나타낸 바와 같이, PCL 나노섬유 매트에 비해서 본 발명의 나노섬유 매트에 세포가 더욱 안정적으로 부착되어 있는 것을 확인하였다.

[0044] 또한, 배양 4일째 각 샘플에서의 세포의 부착형태를 1~10 K의 배율로 관찰하였으며, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0045] 도 5에 나타낸 바와 같이, 모든 샘플에서 세포가 나노섬유를 지지체로 부착하여 자라는 것을 확인하였다.

[0046] **실험예 3. 세포지지체의 세포 독성 분석**

[0047] 상기 실시예 1에서 제조한 나노섬유 세포지지체의 세포 독성을 확인하기 위하여, MTT assay(3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)를 수행하였다. 보다 구체적으로는, 24 웰 플레이트에 상기 실시예 1에서 제조한 PCL/PVP-*b*-PCL 나노섬유 매트 또는 PCL 나노섬유 매트를 넣고, DMEM 배지 (1% 항생제)를 첨가하여 1일 동안 배양하였다. 또한, 96 웰 플레이트에 $3x10^3$ cells/well의 농도로 세포를 심은 후, 미리 준비해놓은 각 나노섬유 샘플을 처리한 배지를 첨가하고, 1일간 배양하였다. 이 후, 각 웰에 MTT 용액을 처리하고, DMSO로 녹인 후, O.D 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0048] 도 6에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 PCL/PVP-*b*-PCL 나노섬유 매트를 처리한 배지는 이미 독성이 없다고 알려진 PCL 나노섬유 매트를 처리한 배지와 유사한 값을 나타내므로, 독성이 없음을 확인하였다.

[0049] **실험예 4. 세포 활성 측정**

[0050] 상기 실시예 1에서 제조한 나노섬유 세포지지체가 세포에 주는 영향을 확인하기 위하여 MTT assay를 이용하여 세포 활성을 측정하였다. 96 웰 플레이트에 $3x10^3$ cells/well의 농도로 세포를 심은 후 1일간 배양하였다. 각 웰을 상기 실시예 1에서 제조한 PCL/PVP-*b*-PCL 나노섬유 세포지지체를 농도별(0~100 μg/mg)로 포함하는 DMEM 배지로 교환하고, 1, 3 및 5일 후, MTT assay로 세포의 활성을 측정하였으며, 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0051] 도 7에 나타낸 바와 같이, 세포지지체를 처리한 세포에서 세포 활성의 감소 억제를 확인하였으며, PCL과 PVP-*b*-PCL 블록공중합체의 비율이 9:1인 세포지지체가 세포배양에 가장 적절한 친수성을 나타내는 것을 확인하였다.

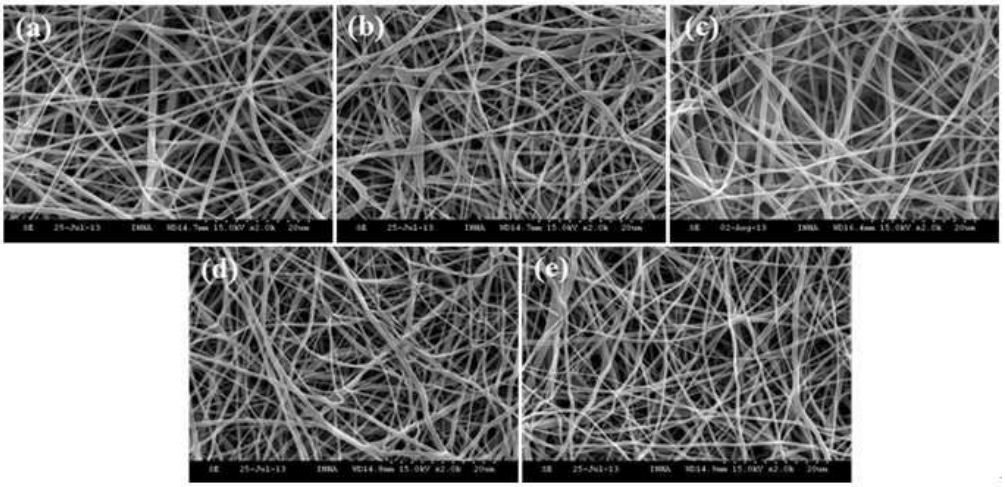
[0052] 또한, 가장 좋은 효과를 나타낸 9:1 샘플의 세포 분포를 형광 핵염색을 통해 1일, 4일 및 7일의 간격으로 확인하였으며, 이의 결과를 도 8에 나타내었다.

[0053] 도 8에 나타낸 바와 같이, 시간이 증가할 수록 세포의 밀도가 증가하는 것을 확인하였으며, 특히 7일째의 경우 세포끼리 뭉친 덩어리가 생성되어 있는 것이 관찰되었다.

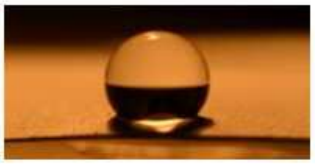
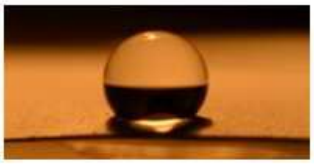
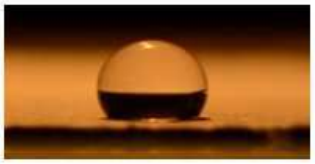
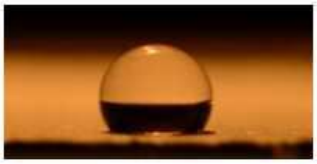
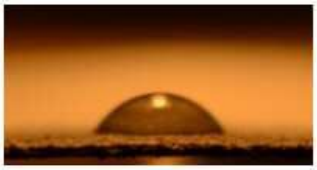
[0054] 상기 실험 결과를 통하여, 본 발명의 PCL/PVP-*b*-PCL 나노섬유 상에서 세포가 잘 부착되어 증식됨을 확인하였으며, 상기 PCL/PVP-*b*-PCL 나노섬유를 세포지지체로 이용하여 인공 조직의 형성이 가능하고, 세포 제거 시, 인체에 삽입물 등으로 이용할 수 있는 복합 ECM의 제작이 가능함을 확인하였다.

도면

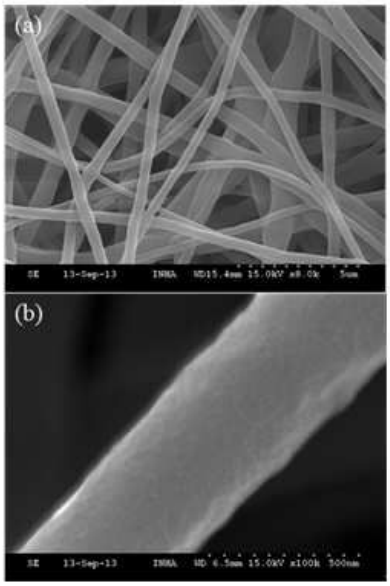
도면1



도면2

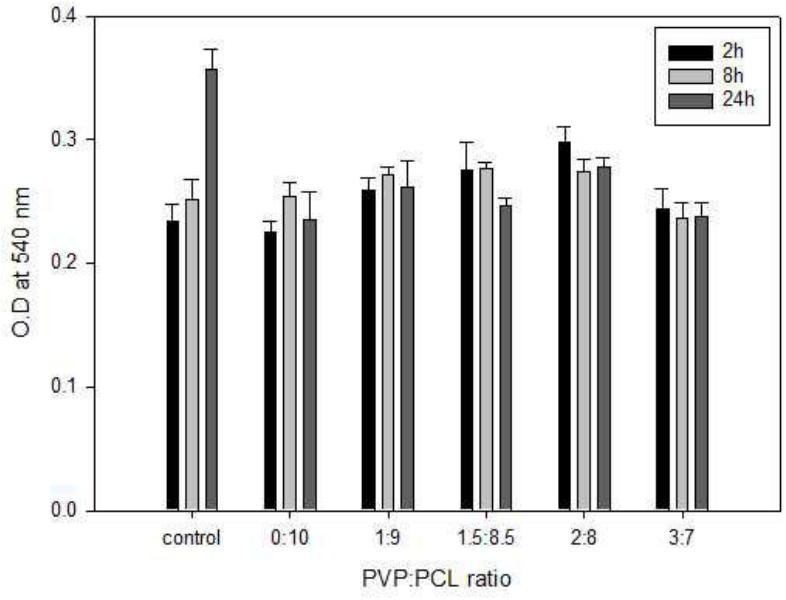
PCL / PVP-*b*-PCL	After 1 sec	After 2 sec
100/0		
90/10		
85/15		
80/20		
70/30		

도면3

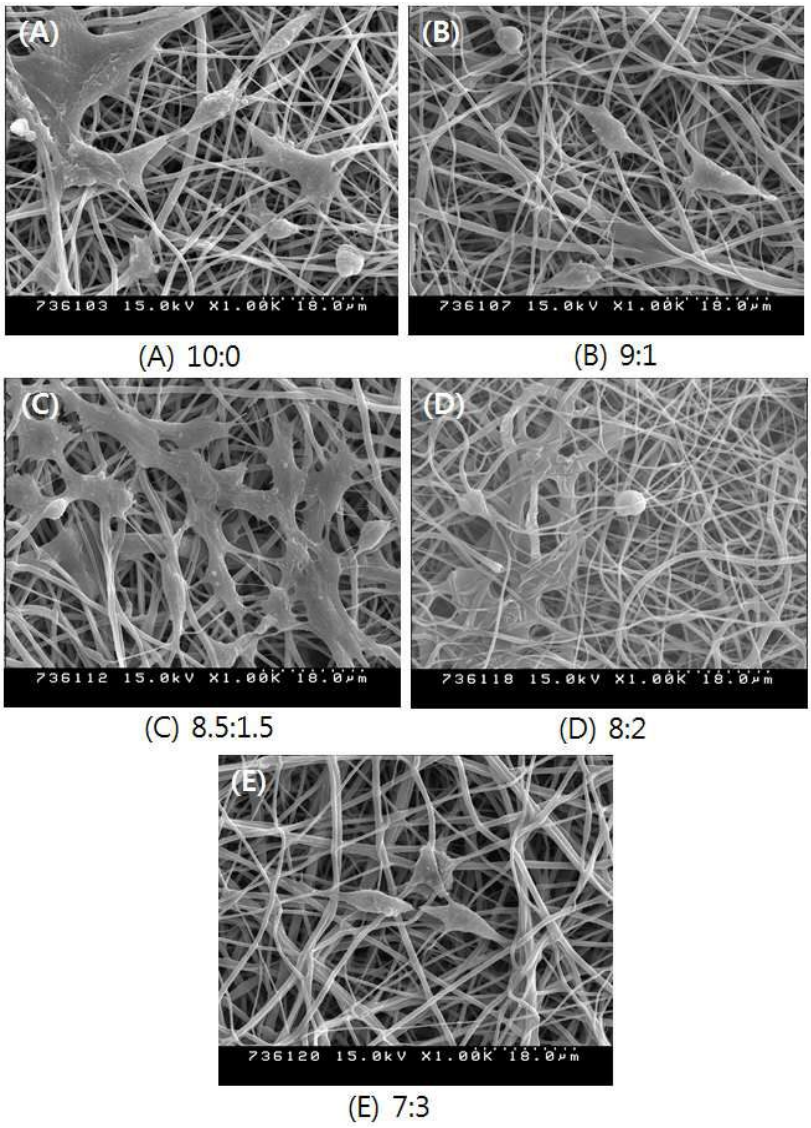


(a) 용출 실험 전
(b) 용출 실험 후

도면4



도면5

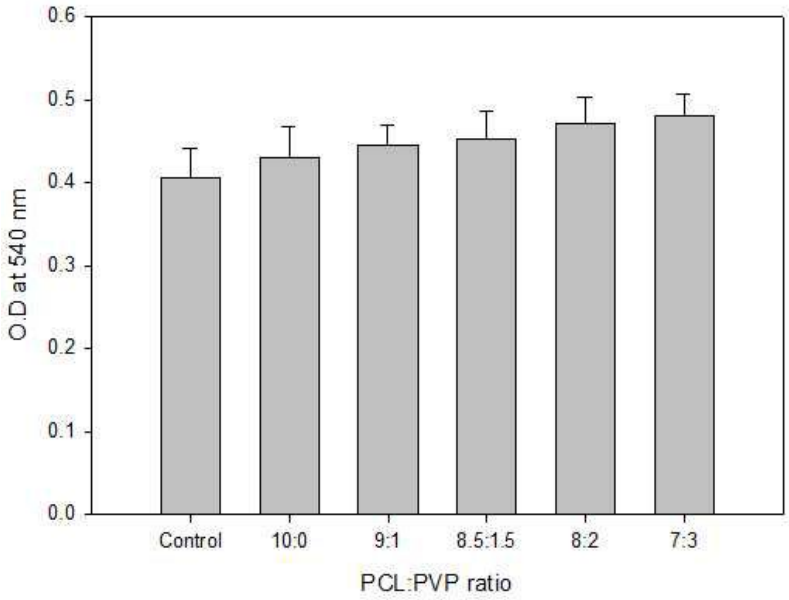


(A) 10:0 (B) 9:1

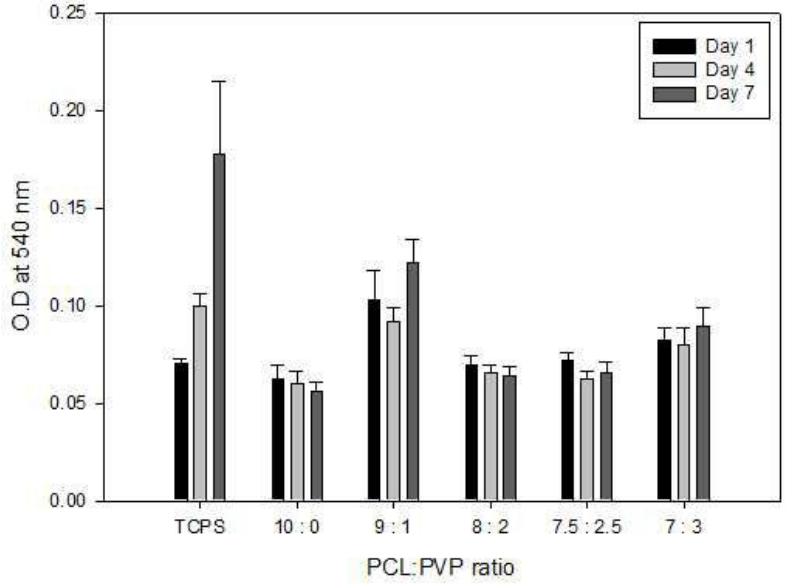
(C) 8.5:1.5 (D) 8:2

(E) 7:3

도면6


0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
O.D at 540 nm
Control
10:0
9:1
8.5:1.5
8:2
7:3
PCL:PVP ratio

도면7


0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
O.D at 540 nm
Day 1
Day 4
Day 7
TCPS
10 : 0
9 : 1
8 : 2
7.5 : 2.5
7 : 3
PCL:PVP ratio

도면8

