

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0124497

(43) 공개일자 2019년11월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61L 15/40 (2006.01) A61L 15/22 (2006.01)

A61L 15/26 (2006.01) A61L 15/28 (2006.01)

A61L 15/42 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61L 15/40 (2013.01)

A61L 15/225 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0048533

(22) 출원일자 2018년04월26일

심사청구일자 2018년04월26일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)

(72) 발명자

신화성

인천광역시 연수구 먼우금로 126, 210동 1201호(동춘동, 현대대림2차아파트)

최정일

경기도 시흥시 하중로133번길 19, 102동 1208호(하중동, 동아아파트)

김민식

부산광역시 동구 망양로 516-4, 2호동 102호(초량동, 초량화신아파트)

(74) 대리인

김순용

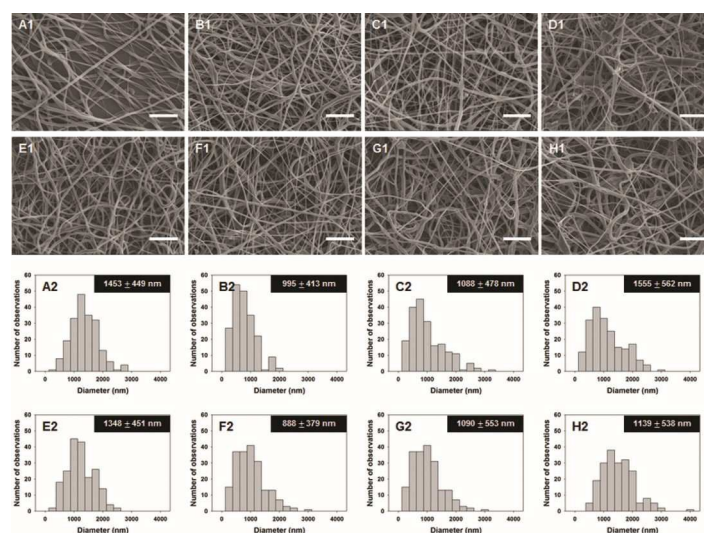
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 스피룰리나 추출물이 함침된 알지네이트-PCL 나노섬유 상처 드레싱

(57) 요약

본 발명은 스피룰리나 추출물, 알지네이트 및 폴리카프로락톤을 포함하는 상처 드레싱용 나노섬유에 관한 것이다. 본 발명에 따른 나노섬유는 다량의 물을 보유할 수 있는 친수성 구조를 가지며, 피부 접착력이 좋고, 세포 독성 없이 스피룰리나 추출물을 방출할 수 있어, 피부 창상 모델의 회복에 효과적이어서, 피부 전층 상처 치료에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61L 15/26 (2013.01)

A61L 15/28 (2013.01)

A61L 15/42 (2013.01)

A61L 2400/12 (2013.01)

A61L 2430/34 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1525006526

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 해양수산과학기술진흥원

연구사업명 해양수산생명공학기술개발

연구과제명 용암해수 기반 청정원료소재 융합 기술개발

기 여 율 1/1

주관기관 한국해양과학기술원

연구기간 2017.04.01 ~ 2017.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

스피루리나 추출물, 알지네이트 및 폴리카프로락톤을 포함하는 나노섬유.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 스피루리나 추출물 및 상기 알지네이트는 1.9 ~ 5.7 : 2 ~ 4의 중량비로 포함되는 것인, 나노섬유.

청구항 3

제1항의 나노섬유를 포함하는 상처 드레싱.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 스피루리나 추출물이 함침된 알지네이트-PCL 나노섬유 상처 드레싱에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 피부는 박테리아 및 바이러스성 유기체로부터 인체를 보호하는 가장 바깥쪽 장벽이다. 피부가 상처를 입게 되면, 얇은 상처 부위에서는 재생 메커니즘이 일어난다. 그러나, 깊은 피부 상처에서는 손상된 피부를 회복하는데 오랜 시간이 필요하고, 섬유증처럼 자가 조직 재생이 실패할 수도 있다. 피부 재생을 위한 기술을 개발하기 위해서는 피부-재생 세포의 올바른 기능을 위한 최적의 환경 유지 여부가 평가되어야 한다.

[0003] 상처 드레싱은 피부 재생 중에 상처를 입은 피부를 외부 위험 요소로부터 보호하는 생의학적 소재이다. 최근 몇 년 사이에, 생체 활성 성분을 드레싱 재료에 포함시켜 왔고, 이는 세포 증식 및 분화의 메커니즘을 촉진시키거나 조절함으로써 피부 조직 재생을 돕는 역할을 한다.

[0004] 스피루리나는 피부 재생 뿐만 아니라 항염증 및 항박테리아 기능과 관련된 생리 활성 성분을 포함하는 광합성 섬유상 시아노박테리아이다. 스피루리나 성분이 함유된 상처 드레싱은 피부 조직 재생 능력이 있음이 입증되었다. 특히, 나노섬유 상처 드레싱은 피부 재생에 중요한 향상된 산소 투과력, 배수 능력 및 수분 증발 조절력을 나타내었다. 또한 최근에는 스피루리나 추출물을 포함하는 폴리카프로락톤 (PCL) 나노섬유가 궤의 전층 (full-thickness) 피부 상처를 효과적으로 치료하는 것이 입증되었다. FDA 승인을 받은 생체 적합성 및 생분해성 고분자인 폴리카프로락톤은 조직 재생에 적합하다; 그러나, 스피루리나 추출물-폴리카프로락톤 (Spi-PCL) 나노섬유는 폴리카프로락톤의 소수성 때문에 상처 입은 피부를 습윤하게 하는 능력이 제한되는 한계가 있었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 종래 스피루리나 추출물-폴리카프로락톤 나노섬유의 소수성을 조절하는 수단을 제공함으로써, 피부에 접촉하여 피부를 습윤하게 유지할 수 있는 나노섬유를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명자들은 알지네이트가 높은 친수성, 수분 흡수 및 보유 능력을 가지는 점에 착안하여, 스피루리나 추출물-폴리카프로락톤 (Spi-PCL) 나노섬유의 소수성으로 인한 문제를 해결하기 위한 친수성 재료로 알지네이트를 선택하여 첨가하였다.

[0007] 따라서, 본 발명은 스피루리나 추출물, 알지네이트 및 폴리카프로락톤을 포함하는 나노섬유에 관한 것이다.

[0008] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 나노섬유를 포함하는 상처 드레싱에 관한 것이다.

발명의 효과

[0009] 본 발명에 따라 스피루리나 추출물, 알지네이트 및 폴리카프로락톤을 포함하는 나노섬유가 제공되며, 상기 나노섬유로 제조한 상처 드레싱의 경우 종래 스피루리나 추출물-폴리카프로락톤 나노섬유로 제조한 상처 드레싱에 비해 피부 상처 부위의 보습 효과가 뛰어나며, 치료 효능이 개선되어 상처 치유를 촉진하는 효과가 있다.

[0010] 본 발명에 따라 제공되는 나노섬유는 증가된 피부 접착력을 가지며, 세포 독성 없이 생체 안정적으로 상처를 치료할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1의 A1 내지 H1은 제조예에 따라 제조한 다양한 함량의 스피루리나 추출물을 포함하는 폴리카프로락톤 및 알지네이트/폴리카프로락톤 나노섬유의 SEM 이미지 (스케일 바는 20 μm 를 의미한다.)이고, A2 내지 H2는 상기 나노섬유의 지름 분포 및 평균값을 나타낸 그래프이다. A 내지 D는 스피루리나 함량이 각각 0%, 1.9%, 3.8% 및 5.7%인 폴리카프로락톤 나노섬유이고, E 내지 H는 스피루리나 함량이 각각 0%, 1.9%, 3.8% 및 5.7%인 알지네이트/폴리카프로락톤 나노섬유를 나타낸다.

도 2는 제조예에 따라 제조한 다양한 함량의 스피루리나 추출물을 포함하는 폴리카프로락톤 및 알지네이트/폴리카프로락톤 나노섬유에서의 물방울의 접촉각을 나타내는 사진이다. A 내지 D는 스피루리나 함량이 각각 0%, 1.9%, 3.8% 및 5.7%인 폴리카프로락톤 나노섬유이고, E 내지 H는 스피루리나 함량이 각각 0%, 1.9%, 3.8% 및 5.7%인 알지네이트/폴리카프로락톤 나노섬유이다. 우측 (I) 그래프는 폴리카프로락톤 및 알지네이트/폴리카프로락톤 나노섬유에서 스피루리나 함량에 따른 접촉각의 변화를 나타낸 것이다. 그래프 내 별표 (*)는 유의차를 나타낸다 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

도 3은 제조예에 따라 제조한 스피루리나 추출물-폴리카프로락톤 (Spi-PCL), 스피루리나 추출물-알지네이트/폴리카프로락톤 (Spi-Alg/PCL) 및 염화칼슘으로 가교된 스피루리나 추출물-알지네이트/폴리카프로락톤 (cSpi-Alg/PCL) 나노섬유에서 방출되는 스피루리나 추출물의 양을 나타내는 그래프이다. 그래프 내 별표 (*)는 유의차를 나타낸다 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

도 4는 제조예에 따라 제조한 스피루리나 추출물-폴리카프로락톤 (Spi-PCL) 및 스피루리나 추출물-알지네이트/폴리카프로락톤 (Spi-Alg/PCL) 나노섬유의 수분 흡수력을 보여주는 그래프이다. 그래프 내 별표 (*)는 유의차를 나타낸다 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

도 5는 제조예에 따라 제조한 스피루리나 추출물-폴리카프로락톤 (Spi-PCL) 및 스피루리나 추출물-알지네이트/폴리카프로락톤 (Spi-Alg/PCL) 나노섬유의 피부에의 접착력을 비교한 사진이다. 나노섬유 매트를 피부에 부착한 직후와 30분 후의 사진이다.

도 6은 TCPS (조직 배양 등급 폴리스티렌)에서 배양된 HaCaT의 생존력을 대조군으로하여, 제조예에 따라 제조한 스피루리나 추출물-폴리카프로락톤 (Spi-PCL) 및 스피루리나 추출물-알지네이트/폴리카프로락톤 (Spi-Alg/PCL) 나노섬유에서 배양된 HaCaT의 생존력을 비교한 그래프이다. 그래프 내 별표 (*)는 유의차를 나타낸다 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

도 7은 H&E (헤마톡실린 및 에오신)로 염색된 쥐의 깊은 상처 모델에서의 재생을 보여주는 단면도이다. 폴리카프로락톤 나노섬유를 대조군 (A, E, I)으로 하여, 알지네이트/폴리카프로락톤 나노섬유 (B, F, J), 스피루리나 추출물-PCL 나노섬유 (C, G, K), 및 스피루리나 추출물-알지네이트/PCL 나노섬유 (D, H, L)를 5, 7 및 9일 동안 적용한 것이다. 스피루리나 추출물을 포함하는 경우, 함량은 3.7%이고, 스케일 바는 200 μm 를 의미한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명은 스피루리나 추출물, 알지네이트 및 폴리카프로락톤을 포함하는 나노섬유에 관한 것이다.

[0013] 본 발명에 있어서, 스피루리나는 해양 유래 시아노박테리아로, 색소단백질인 피코시아닌을 포함하고 있는 것이 특징이며, 천연적으로 재배한 것을 사용하여도 되고, 인공적으로 가공하여 시판되는 것을 사용할 수도 있다. 상기 피코시아닌은 상처 부위나, 수술 부위 등에 적용시 세린 단백질 가수분해효소 (serine protease) 분비를 촉진시키고, 피브린 용해성 (fibrinolytic)을 증진시켜 진피층의 피부를 재생시키는 역할을 할 수 있다. 알지네이트는 알파-L-글루론산 및 베타-D-만누론산으로 구성되어, 많은 양의 물을 수용할 수 있는 친수성 구조로 되어

있어, 나노섬유에 포함시키는 경우 나노섬유 전체의 수분 보유력 및 피부 접착력을 향상시킬 수 있다. 폴리카프로락톤은 생체적합성, 생분해성 다공성 중합체로서 나노섬유 전체의 구조를 유지하면서도 수분 보유력을 가진다.

[0014] 본 발명에 있어서, 상기 스피루리나 추출물의 형태는 크게 제한되지 않으나, 추출물을 분말 형태로 제형화하여 사용하는 것이 바람직하다. 또한, 본 발명에서 사용되는 스피루리나 추출물은 물, 수용성 알코올, 또는 이들의 혼합용매로 추출한 것일 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 상기 수용성 알코올은 에탄올 또는 메탄올일 수 있다. 추출 방법으로는 여과법, 열수 추출, 침지 추출, 환류 냉각 추출, 초음파 추출 방법을 이용할 수 있으며, 열수 추출법으로 1 내지 5회 추출한 것일 수 있다. 상기 추출은 20 내지 40℃의 온도에서, 12 내지 48시간 동안 수행될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 이어서, 상기 추출물을 여과한 후 감압농축하고 건조하여 스피루리나 분말을 얻을 수 있다. 이때 상기 감압농축은 진공 감압 농축기 또는 진공 회전 증발기를 이용할 수 있으며, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조할 수 있다.

[0015] 본 발명에 있어서, 상기 나노섬유는 스피루리나 추출물, 알지네이트 및 폴리카프로락톤을 포함하는 유기 용매를 전기 방사하여 제조할 수 있다. 상기 유기 용매는 디메틸포름아미드, 테트라하이드로퓨란, 클로로포름, 아세톤, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트로 이루어진 군에서 1종 이상 선택된 것일 수 있고, 바람직하게는 디메틸포름아미드와 테트라하이드로퓨란의 혼합 용매일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0016] 본 발명에 있어서, 상기 스피루리나 추출물은 상기 용매 100중량부에 대해 1.9 내지 5.7 중량부로 포함될 수 있다. 스피루리나 추출물의 함량이 용매 100중량부에 대해 1.9 중량부보다 낮은 경우에는 스피루리나 추출물의 효과가 발현되지 않을 수 있고, 5.7 중량부보다 높은 경우에는 피부에 적용하기 충분한 물성의 나노섬유를 제조할 수 없다.

[0017] 본 발명에 있어서, 상기 알지네이트는 상기 용매 100중량부에 대해 2 내지 4 중량부로 포함될 수 있다. 알지네이트의 함량이 용매 100중량부에 대해 2 중량부 보다 낮은 경우, 상처 회복 효과가 거의 없으며, 4 중량부 보다 높은 경우 알지네이트를 포함하는 용액은 점성이 과도해져 전기 방사할 수 없게 된다.

[0018] 따라서, 본 발명에 따른 상기 나노섬유는 스피루리나 추출물 및 알지네이트를 1.9 ~ 5.7 : 2 ~ 4의 중량비로 포함할 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명은 스피루리나 추출물, 알지네이트 및 폴리카프로락톤을 포함하는 나노섬유를 포함하는 상처 드레싱에 관한 것이다.

[0020] 제조예 및 실험예

[0021] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 제조예 및 실험예를 제시한다. 그러나 하기의 예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 제조예 및 실험예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0022] 제조예. 스피루리나 추출물-폴리카프로락톤 및 스피루리나 추출물-알지네이트/폴리카프로락톤 나노섬유의 제조

[0023] 스피루리나 세포 덩어리 (Nature' s Care)를 분쇄하여 분말로 준비하고, -20℃에서 보관하였다. N,N-디메틸포름아미드 (Junsei Chemical) 및 테트라하이드로퓨란 (Junsei Chemical)을 3:7의 비율 (v/v)로 혼합하여 유기용매를 준비하였다. 이어서 15% (w/v) 폴리카프로락톤 (분자량 : 70,000 내지 90,000, Sigma-Aldrich)을 상기 용매에 용해시켰다. 스피루리나의 세포량이 상기 용액의 0, 1.9, 3.8 및 5.7% (w/v)가 되도록 하여, 스피루리나 추출물 및 폴리카프로락톤을 포함하는 방사액을 제조하였다. 스피루리나 추출물, 알지네이트 및 폴리카프로락톤을 포함하는 방사액은 상기 스피루리나 추출물 및 폴리카프로락톤을 포함하는 방사액에 4% (w/v)의 알지네이트 (Sigma)를 첨가하여 골고루 분산시킴으로써 제조하였다. 제조한 방사액을 이용하여, 18-게이지 스틸 니들을 사용하고, 15 kV의 전압 및 니들과 콜렉터 사이 거리가 15 cm인 조건에서 전기 방사하여 스피루리나 추출물-폴리카프로락톤 (Spi-PCL) 나노섬유 및 스피루리나 추출물-알지네이트/폴리카프로락톤 (Spi-Alg/PCL) 나노섬유를 제조하였다. 추가적으로, 스피루리나 추출물-알지네이트/폴리카프로락톤 나노섬유는 CaCl₂ (Sigma)으로 가교결합된 형태와 가교결합되지 않은 것 두 가지를 제조하였다.

[0024] 나노섬유의 형태적 특성 분석

[0025] 각 나노섬유의 형태는 Pt-코팅된 샘플을 이용하여 주사 전자 현미경 (SEM; 히타치 S-4300)을 사용하여 관찰하였다. 200개의 임의의 위치에서 나노섬유 이미지를 측정함으로써 나노섬유의 지름의 크기 분포를 분석하였다.

[0026] 도 1의 A1 내지 H1는 다양한 스피루리나 추출물 함량을 갖는 폴리카프로락톤 및 알지네이트/폴리카프로락톤 나

노섬유 매트 SEM 이미지이다. 상기 이미지는 나노섬유의 부드러운 형태를 보여준다. 각 섬유의 지름 분포를 도 1의 A2 내지 H2에 나타내었고, 각 나노섬유 매트의 평균 지름을 표시하였다. 알지네이트/폴리카프로락톤 나노섬유 ($1.35 \pm 0.45 \mu\text{m}$)는 폴리카프로락톤 나노섬유 ($1.45 \pm 0.45 \mu\text{m}$)에 비해 얇았다. 나노섬유의 평균 지름은 스피루리나 추출물 농도에 따라 증가하였다. 추가적으로, 스피루리나 추출물의 농도가 높을수록 나노섬유의 응집이 많고, 나노섬유가 형태적으로 불균일하였다.

[0027] 실험예

[0028] 모든 실험 결과는 적어도 3회 이상 수행한 것이다. 평균 및 표준편차는 SigmaPlot을 이용하여 계산하였다. 그룹 간의 차이는 Student's t-tests를 이용하여 식별하였으며, p-값은 유의차를 나타내었다 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

[0029] 실험예 1. 나노섬유의 친수성 확인

[0030] 나노섬유의 친수성은 샘플 상에 $3 \mu\text{L}$ 의 증류된 물방울을 떨어뜨리고, 접촉각 분석기 (S-E0 Phoenix Touch)로 평가하였다.

[0031] 도 2에 나타난 것과 같이, 폴리카프로락톤 나노섬유에서는 스피루리나 추출물의 농도가 0%에서부터 1.9%, 3.8% 및 5.7%로 높아짐에 따라 표면 접촉각이 각각 $124.28 \pm 4.25^\circ$ 에서부터 $115.92 \pm 2.90^\circ$, $97.65 \pm 2.74^\circ$ 및 $39.80 \pm 4.51^\circ$ 로 감소하였다. 알지네이트/폴리카프로락톤 나노섬유의 접촉각은 $115.18 \pm 4.51^\circ$ 로, 폴리카프로락톤 나노섬유의 접촉각에 비해 약간 낮았다. 나노섬유 내의 스피루리나 추출물의 흡수 능력으로 인해, 스피루리나 추출물 농도가 높아질수록 나노섬유 매트의 접촉각이 급격히 감소하였다. 알지네이트/폴리카프로락톤 나노섬유에서는 스피루리나 추출물의 농도가 0%에서부터 1.9% 및 3.8%로 높아짐에 따라 접촉각이 $115.18 \pm 4.51^\circ$ 에서부터 $57.53 \pm 4.76^\circ$ 및 $40.86 \pm 3.75^\circ$ 로 감소하였다. 5.7% 스피루리나 추출물-알지네이트/폴리카프로락톤 나노섬유는 물을 모두 흡수하여 버렸기 때문에 접촉각을 측정할 수 없었다.

[0032] 실험예 2. 스피루리나 추출물 방출

[0033] 스피루리나 추출물의 방출을 확인하기 위해, 나노섬유를 $1 \times 1 \text{ cm}^2$ 조각으로 자르고, 24-웰플레이트에 16 조각을 배치하였다. 30분 동안 증류수 1 mL에 적신 후에, $200 \mu\text{L}$ 의 상청액을 수득하고, 620 nm의 파장에서 상청액의 O.D. 값을 측정하였다.

[0034] 스피루리나 추출물-폴리카프로락톤 나노섬유를 물에 침지시킨 즉시, 스피루리나 추출물이 나노섬유로부터 방출되고, 물에 용해되었다. 도 3에서 볼 수 있듯이, 방출된 스피루리나 추출물의 양은 스피루리나 추출물의 함량에 비례하여 증가하였다. 알지네이트는 스피루리나 추출물 방출에 거의 영향을 미치지 않았고, 방출된 스피루리나 추출물의 양은 가교결합된 스피루리나 추출물-알지네이트/폴리카프로락톤 나노섬유에서 크게 감소하였다.

[0035] 실험예 3. 수분 흡수력

[0036] 수분 흡수력을 확인하기 위해, 나노섬유를 $2 \times 2 \text{ cm}^2$ 조각으로 자르고, 각 섬유당 3 세트의 샘플을 준비하였다. 상기 샘플을 증류수가 담긴 페트리 디쉬에 배치하고, 30분 동안 물을 흡수하도록 두었다. 나노섬유 표면에서 물을 제거한 후에, 나노섬유 샘플의 무게를 재어 건조 샘플의 무게와 비교하였다. 수분 흡수 수준은 나노섬유 샘플을 적시기 전후의 중량 차이로 계산하였다.

[0037] 도 4에 나타난 것과 같이, 스피루리나 추출물-알지네이트/폴리카프로락톤 나노섬유는 스피루리나 추출물-폴리카프로락톤 나노섬유에 비해 거의 2 배에 가까운 물을 흡수하였다. 알지네이트를 포함하는 나노섬유는 크게 향상된 수분 흡수력을 나타냈지만, 스피루리나 함량은 수분 흡수에는 거의 영향을 미치지 않았다.

[0038] 실험예 4. 피부 접착력

[0039] 피부에 대한 접착력을 평가하기 위해, $2 \times 2 \text{ cm}^2$ 나노섬유 메쉬를 증류수에 담그고, 피부 위에 올려두었다. 30분 후, 부착된 나노섬유 메쉬의 사진을 찍었다.

[0040] 도 5에 나타난 것과 같이, 모든 8개의 샘플들이 30분 동안 피부에서 접착되어 있었지만, 샘플 간의 수분 수준은 달랐다. 스피루리나 추출물의 농도가 증가함에 따라, 수분이 더 긴 시간동안 유지되었다. 알지네이트도 수분 수준을 더 향상시켰다.

[0041] 실험예 5. 나노섬유의 세포독성 확인을 위한 시험관 실험

- [0042] 케라틴 세포주인, HaCaT 세포를 10% (v/v) 소태아혈청 (Gibco) 및 1% (v/v) 항생제-항진균제 (Gibco)를 함유하는 돌베코 수정 이글 배지가 있는 24-웰 플레이트에서 3×10^4 세포/웰의 시딩 밀도로 나노섬유 상에 뿌렸다. 5% CO₂ 및 37°C 조건에서 세포를 24시간 동안 배양한 후에, 배양 배지를 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐 테트라졸리움브로미드 144 (MTT) 용액 (Sigma)으로 교체하고, 이어서 디메틸설폭사이드 (Sigma)를 첨가하여 보라색의 포르마잔 결정을 용해시켰다. 용해된 포르마잔은 540 nm에서 광학 밀도를 측정함으로써 정량화하였다.
- [0043] 나노섬유의 세포독성은 MTT 분석에 의해 평가되었다. 도 6은 폴리카프로락톤 나노섬유 또는 TCPS (조직 배양 등급 폴리스티렌)을 사용하는 경우에 비교할 때, 알지네이트를 포함하는 나노섬유의 사용과 관련된 세포의 생존력에 현저한 감소가 없다는 것을 보여주었다. 스피루리나 추출물을 포함하는 나노섬유의 세포 생존력은 약간 증가하였다. 이러한 결과는 샘플 중 어느 것도 HaCaT 세포에 대해 세포독성이 없음을 보여주었다. 스피루리나 추출물-폴리카프로락톤 나노섬유에서 배양된 세포는 폴리카프로락톤 나노섬유에서 배양된 세포에 비해 더 높은 생존력을 보여주었다. 스피루리나 추출물-알지네이트/폴리카프로락톤 나노섬유와 스피루리나 추출물-폴리카프로락톤 나노섬유에서 배양된 세포 사이에는 생존력의 차이가 없었다. 따라서, 알지네이트는 세포 생존력에 영향을 미치지 않았다.
- [0044] **실험예 6. 상처 치료에 대한 나노섬유의 생체 내 효능 실험**
- [0045] 전층 상처에 대한 재생을 관찰하기 위해, 4주령의 Sprague-Dawley 쥐를 사용하였다. 전층 상처 모델로 사용하기 위해 편치를 사용하여 쥐의 등 피부에 지름 3 cm인 2 개의 구멍을 만들었다. 각 상처 부위를 대조군인 폴리카프로락톤 나노섬유, 알지네이트/폴리카프로락톤 나노섬유, 스피루리나 추출물-폴리카프로락톤 나노섬유 또는 스피루리나 추출물-알지네이트/폴리카프로락톤 나노섬유로 덮어주었다. 상기 스피루리나 추출물-폴리카프로락톤 나노섬유 및 스피루리나 추출물-알지네이트/폴리카프로락톤 나노섬유는 3.7% (w/v)의 스피루리나 추출물을 함유하는 것이다. 나노섬유 샘플들을 상처 부위에 압박 붕대로 고정하였다. 샘플 처리 후 5, 7 또는 9일 경과 후에, 상처 부위의 조직을 수확하고 4% 파라포름알데히드 (Sigma)로 고정하였다. 상기 조직은 OCT 화합물 (Sakura TissueTek)을 이용하여 동결 차단 (cyro-block)하고, 동결 절편 (cyro-section)으로 만들었다. 절편을 헤마톡실린 및 에오신으로 염색하고 현미경으로 관찰하였다.
- [0046] 도 7에 나타난 것과 같이, 보다 효과적으로 재생된 상처는 정상 부위와 혼합된 표피층과 세포외 기질 (ECM)을 보여주었다. 스피루리나 추출물-폴리카프로락톤 나노섬유를 상처 입은 피부에 적용한 경우, 폴리카프로락톤 나노섬유의 적용시에 비해 상처 부위의 피부는 더 빠르게 재생되었고, ECM은 더 빠르게 재배열되었다. 5일 후에 스피루리나 추출물-알지네이트/폴리카프로락톤 나노섬유로 덮인 상처 부위의 피부는 폴리카프로락톤 나노섬유로 덮인 상처에 비해 더 재생되었으나, 7 또는 9일 후에는 유의미한 차이가 관찰되지 않았다. 스피루리나 추출물-폴리카프로락톤 나노섬유 및 스피루리나 추출물-알지네이트/폴리카프로락톤 나노섬유 사이에서는, 스피루리나 추출물-알지네이트/폴리카프로락톤 나노섬유가 5일 후에 재생 효과가 더 효과적이었다.
- [0047] **검토**
- [0048] 스피루리나 추출물을 포함하는 폴리카프로락톤 나노섬유는 전층 피부 상처 치료에 효과적이었다. 본 발명의 목적은 나노섬유의 수분 흡수 능력 및 피부에 대한 접착력을 향상시키는 데에 있다. 이러한 목적을 달성하기 위해, 폴리카프로락톤 및 스피루리나 추출물을 혼합한 후에 수분을 많이 흡수할 수 있는 알지네이트를 같이 전기방사하였다. 소듐알지네이트 용액의 전기방사는 매우 낮은 중합체 농도 (2중량%)에서 소듐알지네이트 용액의 겔화가 발생하기 때문에 어렵다. 일반적으로, PEO (폴리에틸렌옥사이드)와 같은 일부 첨가제를 알지네이트 용액과 혼합하여 점도를 낮춘다. 또한, 가교결합 공정은 알지네이트 나노섬유 구조의 파괴를 방지하기 위해 필요하다. 그러나, 알지네이트/폴리카프로락톤 나노섬유는 폴리카프로락톤이 나노섬유의 구조를 위한 중추로서 역할을 하였기 때문에 가교결합 없이도 물에 침지될 때 섬유 구조를 유지하였다. 이러한 성질은 세척 단계 동안 스피루리나 추출물-알지네이트/폴리카프로락톤 나노섬유에 함유된 스피루리나 추출물의 손실을 일으키는 가교결합 공정을 건너뛸 수 있게 해주었다.
- [0049] 4 중량%를 넘는 농도의 알지네이트 용액은 점성이 생겨 전기방사 할 수 없다. 알지네이트는 섬유의 직경에 영향을 주었다; 스피루리나 추출물-폴리카프로락톤 용액보다는 스피루리나 추출물-알지네이트/폴리카프로락톤 용액을 이용하여 더 얇고 더욱 친수성인 섬유를 제조하였다. 이는 알지네이트를 포함하는 전기방사 용액이 전하 반발력을 갖기 때문이다. 추가적으로, 높은 스피루리나 추출물 함량은 나노섬유 매트와 친수성을 높게 만들었다. 따라서, 스피루리나를 포함하는 나노섬유는 스피루리나 농도에 의존하여 증가하는 수분 흡수율을 나타내었다.
- [0050] 스피루리나 추출물-알지네이트/폴리카프로락톤 나노섬유 상처 드레싱의 스피루리나 추출물의 방출, 수분 흡수

및 피부 접촉 특성을 조사하였다. 스피루리나 추출물은 상처 치유를 돕는 항염증 및 항산화 기능으로 인해 약으로 사용되어 왔다. 스피루리나 추출물-알지네이트/폴리카프로락톤 나노섬유를 물에 담그고 30분 후에 거의 모든 스피루리나 추출물이 방출되었고, 알지네이트는 스피루리나 추출물의 방출에 거의 영향을 미치지 않았다 (도 3). 이는 스피루리나 추출물-알지네이트/폴리카프로락톤 나노섬유의 스피루리나 추출물이 피부로 옮겨져 상처를 치료할 수 있음을 시사한다. 스피루리나 추출물-알지네이트/폴리카프로락톤 나노섬유는 스피루리나 추출물-폴리카프로락톤 나노섬유에 비해 향상된 수분 흡수 능력, 수분 보유력 및 접착력을 보여주었다. 알지네이트는 알파-L-글루론산 및 베타-D-만누론산으로 구성되어, 3차원 네트워크 내부에 많은 양의 물을 저장할 수 있는 친수성 구조를 가진다. 스피루리나 추출물-알지네이트/폴리카프로락톤 나노섬유는 물을 빠르게 흡수하고, 스피루리나 추출물-폴리카프로락톤 나노섬유에 비해 많은 양의 물을 흡수한다. 많은 연구에서 습윤한 미세 환경이 육아 (granulation), 조직 형성 및 빠른 상피화를 촉진하기 때문에 수분이 피부 상처 치유를 촉진한다는 것을 보여주었다. 향상된 수분 보유력은 피부에 대해 더 긴 시간동안 접촉하게 한다 (도 5). 이러한 결과는 스피루리나 추출물-알지네이트/폴리카프로락톤 나노섬유 메쉬가 상처 치료 패치로 적절하다는 것을 시사한다.

[0051] 스피루리나 추출물-알지네이트/폴리카프로락톤 나노섬유의 안정성 및 효능을 테스트하였다. 스피루리나 추출물-알지네이트/폴리카프로락톤 나노섬유는 HaCaT 세포에 대해 독성이 없음을 보여주었다 (도 6). 스피루리나 추출물은 0% 스피루리나 추출물-폴리카프로락톤 나노섬유 및 TCPS에서 배양된 세포의 경우와 비교하여 세포 생존력을 약간 향상시켰다. 이는 스피루리나의 친수성으로 인해 시딩 이후에 스피루리나 추출물을 함유하는 나노섬유의 표면에 부착하기에 더 좋은 환경을 제공하기 때문이다. 스피루리나 추출물-폴리카프로락톤 나노섬유를 스피루리나 추출물-알지네이트/폴리카프로락톤 나노섬유와 비교하면, 알지네이트 그 자체는 세포 생존력에 영향을 미치지 않으며, 이는 알지네이트가 배지에 분산되었기 때문일 수 있다. 그러나, 나노섬유에 포함된 알지네이트를 전달받은 쥐는 초기 단계동안 다른 쥐들보다 빠른 회복을 보여주었다 (도 7). 이는 상처 치유에 근본적으로 중요한 조건인 알지네이트/폴리카프로락톤 나노섬유의 상처 배출 흡수 및 습도 유지 능력 때문일 수 있다.

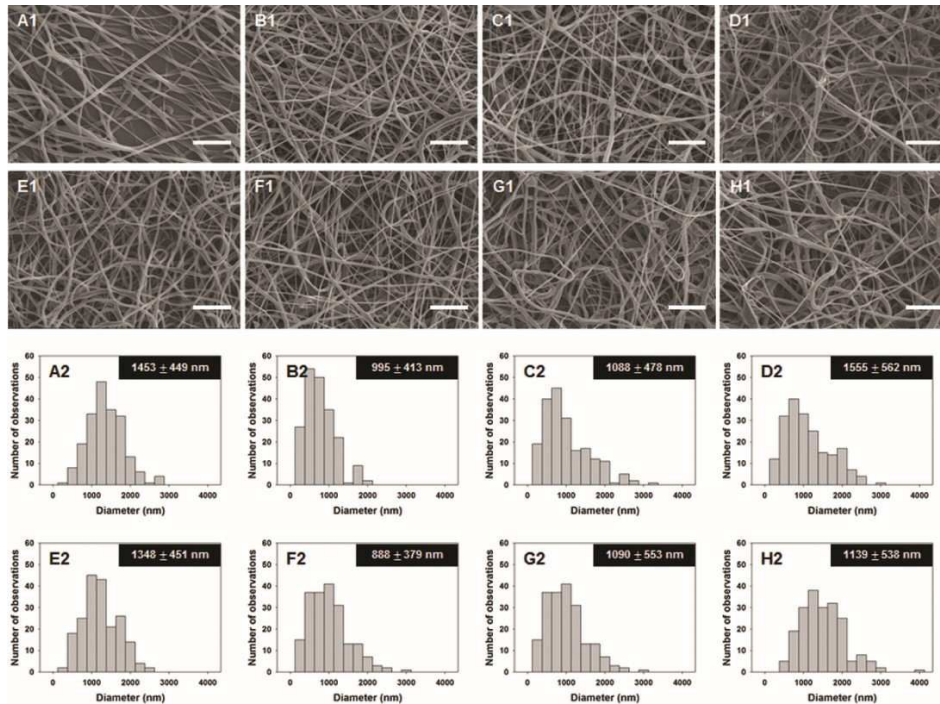
[0052] 결론

[0053] 스피루리나 추출물을 포함하는 알지네이트/폴리카프로락톤 복합 나노섬유를 제작하여 손상 후 전층 피부 재생 능력을 조사하였다. 나노섬유는 인간 상피 세포에 구조적으로 안정하고 세포독성이 없었다. 이전에 개발된 스피루리나 추출물-폴리카프로락톤 나노섬유와 비교하여 알지네이트는 스피루리나 추출물-알지네이트/폴리카프로락톤 나노섬유의 수분 유지 및 접착력을 향상 시켰을 뿐만 아니라, 쥐 모델에서 전층 손상된 피부의 재생을 촉진하였다. 이는 알지네이트가 피부에서 수분을 흡수하고 유지하기 때문인 것으로 보인다. 결론적으로, 스피루리나 추출물-알지네이트/폴리카프로락톤 나노섬유는 전층 피부 상처 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

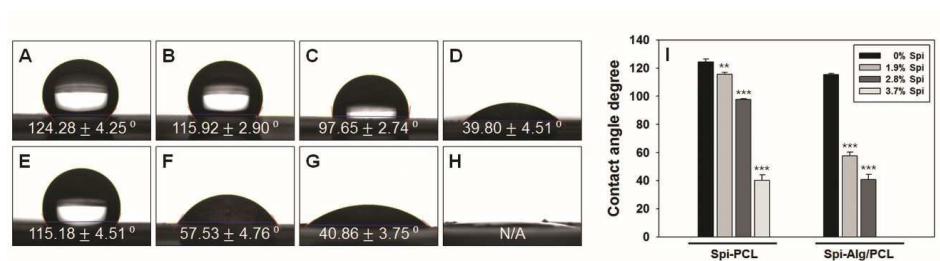
[0055] 이상과 같이 제조예와 실험예를 통하여 본 발명을 설명하였다. 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 상술한 실시예들은 모든 면에 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해되어야 한다. 본 발명의 범위는 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

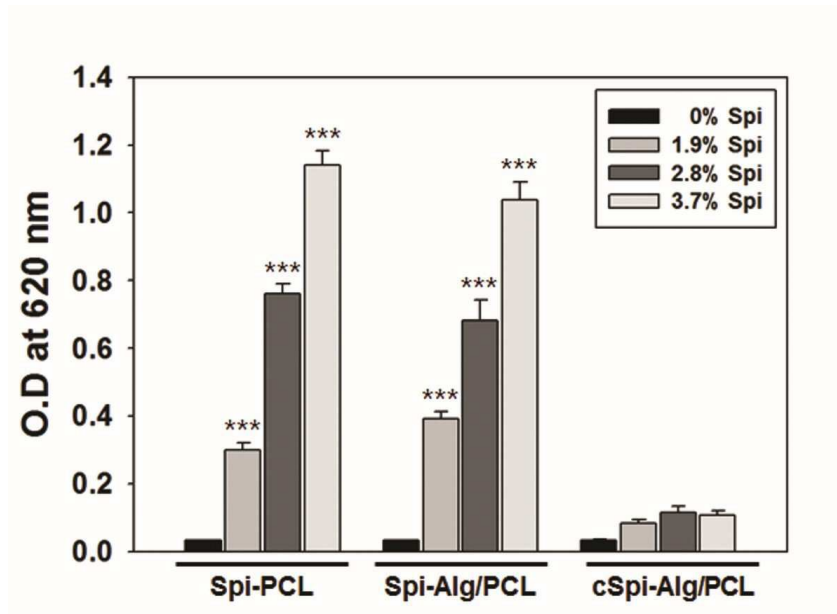
도면1



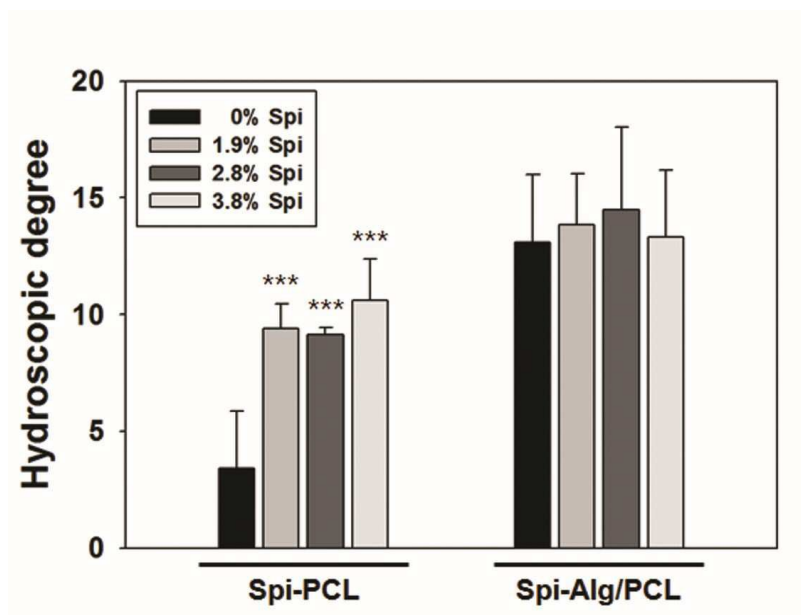
도면2



도면3



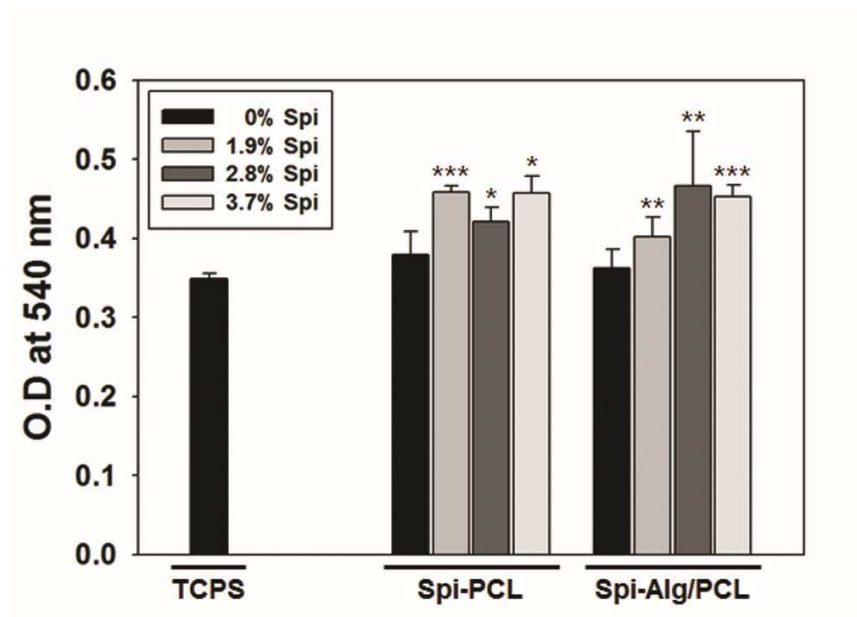
도면4



도면5

Spirulina extract content	[Spi-PCL nanofiber]				[Spi-Alg/PCL nanofiber]			
	0%	1.9%	3.8%	5.7%	0%	1.9%	3.8%	5.7%
Right after attachment								
30 min later								

도면6



도면7

