

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0033900 (43) 공개일자 2013년04월04일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61L 27/14 (2006.01) A61F 2/10 (2006.01) D01D 5/00 (2006.01) (21) 출원번호 10-2011-0097860 (22) 출원일자 2011년09월27일 심사청구일자 2011년09월27일		(71) 출원인 인하대학교 산학협력단 인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동) (72) 발명자 신화성 인천광역시 연수구 동춘동 현대대림2차아파트 215동 102호 김성훈 서울특별시 강서구 강서로34길 47-5, 3층 (화곡동) 정상명 서울특별시 강남구 논현로51길 25, 304호 (도곡동, 현대그린아파트) (74) 대리인 김원식

전체 청구항 수 : 총 9 항

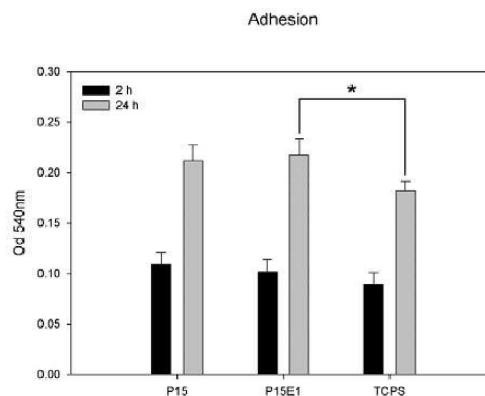
(54) 발명의 명칭 미역 유래 EPS를 포함하는 인공피부용 전기방사 나노 섬유 세포 지지체 및 그 제조방법

(57) 요약

본 발명은 미역 유래 EPS를 포함하는 전기방사 나노섬유 세포지지체 및 그 제조방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 미역 유래 EPS를 포함하여 기존의 나노섬유보다 생체 적합성이 큰 세포지지체 및 그 제조방법에 관한 것이다.

상기와 같이 구성되는 본 발명에 의한 전기방사 처리된 인공피부용 나노 섬유 세포 지지체는 기존의 나노 섬유 세포 지지체보다 생체적합성이 크고 미역 유래 EPS의 항산화 및 항바이러스 효과를 가지는 이점이 있다.

대표도 - 도3



특허청구의 범위

청구항 1

미역 유래 EPS 와 생체 적합성 고분자물질을 포함하고 전기방사 처리된 인공피부용 나노 섬유 세포 지지체.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 생체 적합성 고분자물질은 50g/L이상 150g/L이하인 것을 특징으로 하고, 상기 미역 유래 EPS는 5g/L이상 10g/L이하인 것을 특징으로 하는 전기방사 처리된 인공피부용 나노 섬유 세포 지지체.

청구항 3

제1항 내지 제2항에 있어서, 상기 생체 적합성 고분자 물질은 폴리락타이드, 폴리글리콜라이드, 폴리카프로락톤 중에서 선택된 어느 하나로 구성되는 것을 특징으로 하는 전기방사 처리된 인공피부용 나노 섬유 세포 지지체.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 생체 적합성 고분자 물질은 폴리카프로락톤인 것을 특징으로 하는 전기방사 처리된 인공피부용 나노 섬유 세포 지지체.

청구항 5

생체적합성 고분자 물질을 용매에 용해시켜 고분자 용액을 제조하는 제1단계와;

상기 고분자 용액에 미역 유래 EPS를 첨가하여 방사용액을 제조하는 제2단계와;

전기방사장치를 이용하여 상기 방사용액을 전기방사하여 나노섬유 구조체를 제조하는 제3단계로 구성된 것을 특징으로 하는 전기방사 처리된 인공피부용 나노 섬유 세포 지지체의 제조방법.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 생체 적합성 고분자물질은 50g/L이상 150g/L이하인 것을 특징으로 하고, 상기 미역 유래 EPS는 5g/L이상 10g/L이하인 것을 특징으로 하는 전기방사 처리된 인공피부용 나노 섬유 세포 지지체의 제조방법.

청구항 7

제1항 내지 제2항에 있어서, 상기 생체 적합성 고분자 물질은 폴리락타이드, 폴리글리콜라이드, 폴리카프로락톤 중에서 선택된 어느 하나로 구성되는 것을 특징으로 하는 전기방사 처리된 인공피부용 나노 섬유 세포 지지체의 제조방법.

청구항 8

제3항에 있어서, 상기 생체 적합성 고분자 물질은 폴리카프로락톤인 것을 특징으로 하는 전기방사 처리된 인공피부용 나노 섬유 세포 지지체의 제조방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항에 있어서, 상기 세포 지지체는 항산화 및 항바이러스 효과를 갖는 것을 특징으로 하는 전기방사 처리된 인공피부용 나노 섬유 세포 지지체.

명세서

기술분야

본 발명은 미역 유래 EPS를 포함하는 전기방사 나노섬유 세포지지체 및 그 제조방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 미역 유래 EPS를 포함하여 기존의 나노섬유보다 생체 적합성이 큰 세포지지체 및 그 제조방법에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 조직재생용 지지체를 개발하는데 많이 사용되는 생분해성 합성 고분자는 폴리알파하이드록시에스터 계열의 고분자로 폴리락타이드, 폴리글리콜라이드, 그리고 그들의 공중합체가 많이 사용되고 있다. 이들 고분자는 우수한 기계적 물성을 제공함과 동시에 생체 내에서 분해되기 때문에 지지체를 제거하는 2차 시술의 수요를 없앨 수 있는 장점을 갖고 있다.
- [0003] 상기 생분해성 합성고분자는 우수한 기계적 강도와 생분해성을 보여줌으로서 조직재생용 지지체를 개발하는데 사용되고 있다. 상기 생분해성 합성 고분자를 이용한 조직재생용 지지체는 딱딱한 성질을 통해 우수한 강도를 보임으로서 우수한 기계적 강도가 필요한 뼈 조직재생용 재료로써 이상적으로 고려되고 있다. 그러나 근육, 혈관, 피부 등의 조직은 탄성을 갖고 있는 조직으로서 지속적인 수축과 이완을 반복하며 조직이 구성되어 있어, 상기 생분해성 합성 고분자의 물성이 근육 등의 반복적인 수축/이완을 견뎌내기는 제한적인 것으로 알려져 있다.
- [0004] 또한 폴리락타이드, 폴리글리콜라이드, 그리고 그들의 공중합체들은 우수한 기계적 강도와 생분해성을 보여줌으로서 조직재생용 지지체를 개발하는데 사용되고 있지만, 이들 고분자는 친수성이 매우 낮아 세포가 지지체에 부착되어 생존하는데 어려움이 있고, 세포와 상호작용을 촉진시켜 줄 수 있는 생물학적 기능기의 부재로 인해 지지체 내에서 세포의 성장을 촉진시키지 못하는 단점이 있다.
- [0005] 한편, 생체적합성, 생분해성 고분자로 이루어진 인공 피부는 기존에 상품화 되어 있으며 이러한 인공 피부를 이용하여 피부재생의 치료에 사용되어지고 있다. 사고나 화상으로 피부 손상된 환자의 경우 피복체를 이용하여 피부가 재생하도록 유도를 할 수 있다.
- [0006] 최근에는 피부 조직과의 친화성을 증대시키기 위해 상기 지지체를 피부 조직과 형태학적으로 비슷한 나노섬유로 제작하는 방법이 제안되고 있다. 나노섬유 형태의 지지체는 기존에 사용되어 온 다공성 지지체보다 다소 높은 표면적을 갖고 있어 더 많은 세포가 부착될 수 있으며, 다소 높은 공극율로 인해 각 공극 간의 상호연결을 확보하여 영양물의 공급이 우수한 잇점이 있다. 그러나 아직까지 나노섬유사 사이사이에 형성된 공극의 크기가 너무나 작아서 체세포 조직이 착생하지 못하므로, 지지체로서의 역할을 수행하기 위한 적절한 기계적인 물성과, 피부 조직과의 친화성, 이 두 가지 면을 만족시키지는 못하고 있다. 이에 지지체의 재질이나 방법적인 면에서 다각적으로 연구가 수행되고 있으나 그 효과에 있어서는 크게 만족스럽지는 못하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 상기한 종래 기술의 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로서, 생체적합성이 높은 고분자재료에 미역 유래 EPS를 포함시켜 전기방사법으로 처리한 나노섬유 구조체를 제조하여 나노섬유 사이사이에 미세공극 뿐만 아니라 거대공극이 형성되도록 함으로써, 생체조직이 용이하게 생착되어 신체조직의 기능을 수행함과 동시에 적극적으로 신체조직을 재건할 수 있는 생체적합성 나노섬유 구조체 및 그 제조방법을 제공하는데 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 미역 유래 EPS 와 생체 적합성 고분자물질을 포함하고 전기방사 처리된 인공피부용 나노 섬유 세포 지지체를 제공한다. 상기 생체 적합성 고분자물질은 50g/L이상 150g/L이하인 것이 바람직 하고, 상기 미역 유래 EPS는 5g/L이상 10g/L이하인 것이 바람직하며, 생체 적합성 고분자물질은 150g/L 이고 미역 유래 EPS는 10g/L 인 것이 가장 바람직하다. 또한, 상기 생체 적합성 고분자 물질은 폴리락타이드, 폴리글리콜라이드, 폴리카프로락톤 중에서 선택되고 그 중 폴리카프로락톤인 것이 바람직하다.
- [0009] 또한, 본 발명은 생체적합성 고분자 물질을 용매에 용해시켜 고분자 용액을 제조하는 제1단계와; 상기 고분자 용액에 미역 유래 EPS를 첨가하여 방사용액을 제조하는 제2단계와; 전기방사장치를 이용하여 상기 방사용액을 전기방사하여 나노섬유 구조체를 제조하는 제3단계로 구성된 것을 특징으로 하는 전기방사 처리된 인공피부용 나노 섬유 세포 지지체의 제조방법을 제공한다. 상기 생체 적합성 고분자물질은 50g/L이상 150g/L이하인 것이 바람직 하고, 상기 미역 유래 EPS는 5g/L이상 10g/L이하인 것이 바람직 하며, 생체 적합성 고분자물질은 150g/L 이고 미역 유래 EPS는 10g/L 인 것이 가장 바람직하다. 또한, 상기 생체 적합성 고분자 물질은 폴리락타이드,

폴리글리콜라이드, 폴리카프로락톤 중에서 선택되며, 그 중 폴리카프로락톤인 것이 바람직하다.

발명의 효과

[0010] 상기와 같이 구성되는 본 발명에 의한 전기방사 처리된 인공피부용 나노 섬유 세포 지지체는 기존의 나노 섬유 세포 지지체보다 생체적합성이 크고 미역 유래 EPS의 항산화 및 항바이러스 효과를 가지는 이점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도1은 미역 유래 EPS 함유 PCL nanofiber(a)와 PCL nanofiber(b) 의 SEM images이다.
 도2는 PCL나노섬유(P15), 미역 유래 EPS가 포함된 PCL나노섬유(P15E1) 및 기본적인 세포배양 표면(TCPS)에서 SD Rat 의 진피세포를 배양하여 세포독성을 비교한 결과이다.
 도3은 PCL나노섬유(P15), 미역 유래 EPS가 포함된 PCL나노섬유(P15E1) 및 기본적인 세포배양 표면(TCPS)에서 SD Rat 의 진피세포를 배양하여 세포부착력을 평가한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0013] 본 발명은 미역 유래 EPS를 함유한 전기방사 나노섬유를 세포지지체로 이용하여 기존의 나노섬유보다 생체 적합성이 큰 세포지지체를 제작하는 것이다. 기존에 유기용매에 녹인 polycaprolactone(PCL)에 미역 유래 EPS를 첨가한 후 전기방사를 하여 얻은 나노섬유 세포지지체는 기존의 PCL나노섬유에 비해 생체 적합성이 향상되었다. 이는 rat skin 유래 fibroblast cell 배양 결과에서도 그 적합성을 확인 할 수 있었다.

[0014] 본 발명은 미역 유래 EPS 와 생체 적합성 고분자물질을 포함하고 전기방사 처리된 인공피부용 나노 섬유 세포 지지체를 제공한다.

[0015] 전기방사를 위해서는 일정이상 농도의 고분자 물질이 필요하다. PCL은 50g/L이상 150g/L이하 에서 전기방사가 일어나고, 50g/L 미만에서는 전기방사에 필요한 일정이상의 점도와 표면장력이 없으므로 방사가 일어나기 힘들고, 150g/L 초과시에는 점도가 너무 높아 주사기바늘 끝으로 토출되는데 어려움이 있다. 따라서, 상기 생체 적합성 고분자물질은 50g/L이상 150g/L이하인 것이 바람직 하다.

[0016] 미역유래 EPS 는 10g/L 초과시에는 잘 녹지 않아 균일한 상태의 용액을 만들기 어렵고, 5g/L 미만인 경우에는 생체적합성의 향상 효과가 미미하다. 따라서, 상기 미역 유래 EPS는 5g/L이상 10g/L이하인 것이 바람직하다.

[0017] 또한, 상기 생체 적합성 고분자물질은 150g/L 이고 미역 유래 EPS는 10g/L 인 것이 가장 바람직하다.

[0018] 상기 생체 적합성 고분자 물질은 폴리락타이드, 폴리글리콜라이드, 폴리카프로락톤 중에서 선택되고 그 중 폴리 카프로락톤인 것이 바람직하다.

[0019] 또한, 본 발명은 생체적합성 고분자 물질을 용매에 용해시켜 고분자 용액을 제조하는 제1단계와; 상기 고분자 용액에 미역 유래 EPS를 첨가하여 방사용액을 제조하는 제2단계와; 전기방사장치를 이용하여 상기 방사용액을 전기방사하여 나노섬유 구조체를 제조하는 제3단계로 구성된 것을 특징으로 하는 전기방사 처리된 인공피부용 나노 섬유 세포 지지체의 제조방법을 제공한다.

[0020] PCL은 생분해성이면서 분해시 독성물질을 내지 않는 널리 알려진 생체고분자로 알려져 있으며 이를 이용하여 전기방사 나노섬유의 연구는 많이 진행되어 있다. 미역유래의 EPS는 항산화 및 항바이러스등의 효과가 있는 물질로 알려져 있으나 아직 산업적으로 활용된 바는 적다. 이러한 효과를 이용하기 위해, 본 발명은 PCL nanofiber 에 EPS성분을 함유함으로써 기존의 PCL nanofiber 보다 생체적합성이 크고 항산화 및 항바이러스 효과를 기대할 수 있는 nanofiber의 소재의 가능성을 제시하였다.

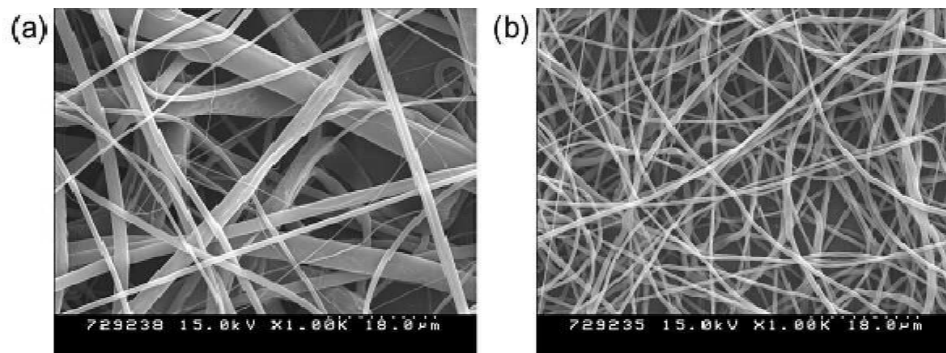
실시예 1

[0021] 나노 섬유 세포 지지체 제작
 [0022] (제조예1) EPS 추출

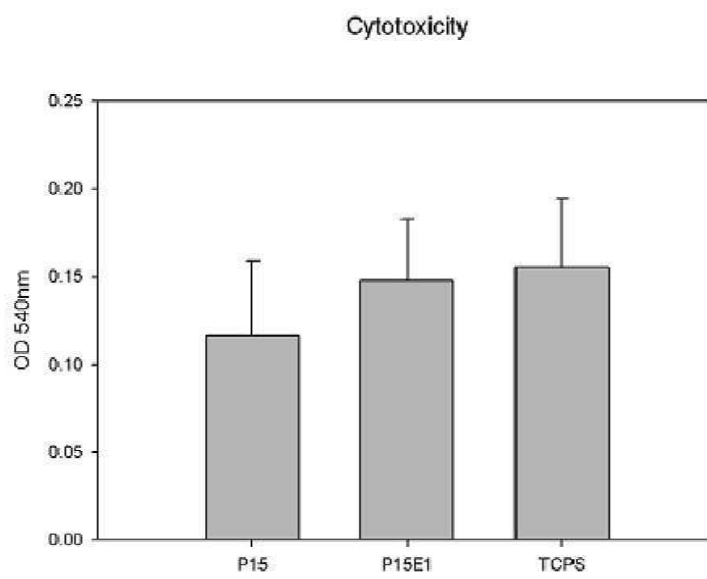
- [0023] 미역(*Undaria pinnatifida*)을 물로 세척 후 분쇄기를 이용하여 작은 조각으로 자른다. 미역조각을 160g/L 로 증류수와 혼합하여 멸균기를 이용하여 130 ℃ 에서 30분간 처리한다. 열처리한 용액에 고체부분을 제거하고 용액의 2배수의 에탄올을 첨가하여 다당류를 침전시키고 원심분리를 하여 pellet부분을 얻어낸다. 얻어진 pellet은 NaCl + EDTA용액에 녹인 후 um를 가진 dialysis membrane으로 1일 투석을 하여 EDTA를 제거한다. 투석된용액은 동결건조를 하여 고체상태의 EPS를 얻는다.
- [0024] (제조예2) 폴리머 용액제조 및 나노섬유 제작
- [0025] 전기방사를 위한 고분자 용액 제조는 tetrahydrofuran과 dimethylformamide을 7:3으로 혼합한 용액에 polycaprolactone(PCL)을 15g/100ml로 녹인다. 여기에 얻어낸 미역EPS를 1g/100ml로 첨가하여 녹인다. 충분히 섞어주어 혼합한 용액은 기포를 제거한다. 제조한 고분자 용액을 전기방사를 하기 위해서 용액을 주사기에 담고 시린지 펌프를 이용하여 바늘 끝에 일정하게 용액이 맺히게 한다. 그리고 용액이 토출되는 곳과 10~20cm 떨어진 collector에 10~15kV의 전압을 가하여 전기방사를 일으킨다.
- [0026] (실험예)나노 섬유 세포 지지체의 세포독성 및 세포부착력 평가
- [0027] <세포 추출>
- [0028] 1일령 SD rat의 피부를 채취하여 serum free media에 dispase를 1mg/ml로 녹인 용액에 12시간 처리한다. 처리된 피부조직은 표피조직과 진피조직으로 분리가 용이하게 된다. 분리한 진피와 표피조직은 잘게 조각내어 각각 1mg/ml 으로 녹인 collagenase 용액에 다시 12시간 처리한다. 처리된 조직은cell strainer를 이용하여 세포 이외의 물질을 걸러낸 후 1000rpm에서 5분간 원심분리를 하여 상등액을 제거하여 10% FBS가 포함된 DMEM 배지에 배양한다.
- [0029] <평가>
- [0030] 정량적인 세포독성 및 세포부착력을 평가하기 위하여 3-MTT (4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 이용하여 세포의 양을 평가하였다. 먼저, 소재의 독성 평가를 위해, PCL나노섬유와 실시예에서 제조된 EPS가 포함된 PCL나노섬유 그리고 기본적인 세포배양 표면(TCPS)에 각각의 배양액을 넣어 24시간 incubation 시키고 같은 시간동안 배양한 진피세포에 각각의 배양액을 넣어 다시 24시간 배양을 하였다. 여기에 MTT가 0.5mg/mL으로 녹아 있는 배지를 넣고 1시간 더 배양을 하여 불용성의 formazan이 형성되게 하였다. 배지를 제거하고 DMSO를 넣어 녹여낸 후 540nm의 파장으로 흡광도를 재어 세포독성을 평가했다. 세포부착력 평가는 PCL나노섬유와 실시예에서 제조한 EPS가 포함된 PCL나노섬유 그리고 기본적인 세포배양 표면(TCPS)에 진피세포를 분주한 후 2시간, 24시간 후에 각각 MTT 를 진행하여 각각의 흡광도를 얻어서 진행하였다.
- [0031] 그 결과, 세포독성 평가에서는 일반적인 세포배양 표면과 비교하여 PCL nanofiber 및 본 발명에 따른 EPS가 포함된 PCL 나노섬유의 세포독성은 통계적으로 차이가 없는 것으로 나타났다. 따라서, PCL nanofiber와 EPS가 포함된 PCL nanofiber 에서 독성물질이 나오지 않는 것으로 판단된다.(도2)
- [0032] 또, 세포부착력 평가 결과, 분주 후 24시간이 지났을 때 기본적인 세포배양 표면(TCPS)와 비교하여 통계적인 차이가 있는 것으로 나타났다. 즉, TCPS에 비해 본 발명에 따른 EPS가 포함된 PCL nanofiber에서 세포 부착력이 높은 것으로 나타났다.(도3)

도면

도면1



도면2



도면3

