(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년04월24일
(11) 등록번호 10-1387886
(24) 등록일자 2014년04월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
D01D 5/00 (2006.01) *D04H 1/728* (2012.01)
A61L 27/56 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0056586
(22) 출원일자 2013년05월20일
심사청구일자 2013년05월20일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020130051602 A
KR1020110040389 A
KR1020070053443 A
KR1020110016581 A

(73) 특허권자
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
박찬흠
강원도 춘천시 지석로 67, 204동 1302호
이정민
경기도 수원시 권선구 서호동로20번길 18, 6동 204호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
정태훈, 배성호, 오용수

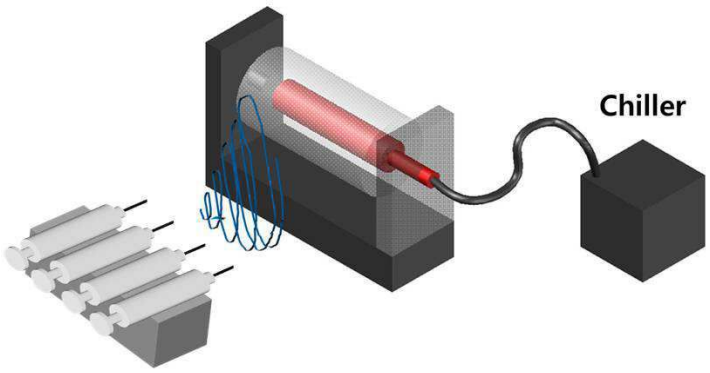
전체 청구항 수 : 총 17 항 심사관 : 최중환

(54) 발명의 명칭 **두께 조절 및 공극 크기 조절이 가능한 나노섬유 지지체의 제조방법, 이에 의하여 제조된 나노섬유 지지체 및 이에 사용되는 나노섬유 지지체의 제조장치**

(57) 요 약

본 발명은 두께 조절 및 공극 크기 조절이 가능한 나노섬유 지지체의 제조방법, 이에 의하여 제조된 나노섬유 지지체 및 이에 사용되는 나노섬유 지지체의 제조장치에 관한 것이다. 본 발명은 전기 방사법을 이용하여 공극의 크기 및 두께 조절이 가능한 나노 섬유 지지제를 제조하는 것을 특징으로 한다. 본 발명에 의하면 지지체의 공극 조절을 다양하게 할 수 있기 때문에 생체 내 다양한 용도에 적합한 지지체를 제조할 수 있다. 또한, 본 발명에 의하면 용이하고 간단한 방법으로 다양한 고분자를 이용하여 인체진피 대체물 및 인공혈관 지지체로 사용될 수 있는 3차원 나노섬유 지지체를 제조할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

주형우

경기 남양주시 도농로 34, 508동 2302호 (도농동, 부영그린타운)

이옥주

강원도 평창군 진부면 오대천로 703-2

문보미

서울 도봉구 마들로 735-8, 101동 808호 (도봉동, 현대성우아파트)

김정호

강원 춘천시 복골길 3, (후평동)

박현정

인천 중구 하늘달빛로 113, 우미린 753동 1501호 2단지 (중산동, 하늘도시우미린2단지)

셰이크 파힘 아르자먼드

강원도 춘천시 교동 93-70 102호, 200-060, 대한민국

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1111-03
부처명	농림축산식품부
연구사업명	생명기술개발사업
연구과제명	누에고치 단백질의 화상 치료효과에 대한 입증과 이를 이용한 화상 전용 실크 피브로인 나노섬유 폼/스펀지의 개발
기 여 율	1/1
주관기관	한림대학교 산학협력단
연구기간	2012.11.03 ~ 2013.11.02

특허청구의 범위

청구항 1

전기방사용 용액을 준비하는 제1 공정;

상기 전기방사용 용액을 전기방사하여 나노섬유를 형성함과 동시에 얼음 결정을 함께 형성하여 나노섬유와 얼음이 혼재하는 나노섬유-얼음 지지체를 형성하는 제2 공정; 및

상기 나노섬유-얼음 지지체로부터 얼음을 제거하여 공극을 가지는 나노섬유 지지체를 형성하는 제3 공정;

을 포함하는 나노섬유 지지체의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 공극은 평균 직경이 10㎛ ~ 150㎛ 이고, 상기 나노섬유 지지체의 두께는 1㎜ ~ 10㎜인 나노섬유 지지체의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 제2 공정은, 전기방사 챔버의 습도와 전기방사된 나노섬유를 수집하는 콜렉터의 온도를 조절하여 수행되는 나노섬유 지지체의 제조방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 제2 공정은, 전기방사 되는 나노섬유를 수집하는 콜렉터를 -25℃ ~ -50℃로 냉각시키고, 전기방사 장치 내부의 습도를 30% ~ 60% 로 증가시킨 상태에서 전기방사를 수행하는 나노섬유 지지체의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 제3 공정은, 동결 건조 방법에 의하여 수행되는 나노섬유 지지체의 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 제3 공정 이후에, 상기 나노섬유 지지체를 불용화 처리하는 공정을 더 포함하는 나노섬유 지지체의 제조방법.

청구항 7

실크 피브로인을 포함하는 전기방사용 용액을 준비하는 제1 공정;

상기 전기방사용 용액을 전기방사하되, 전기방사 되는 나노섬유를 수집하는 콜렉터를 -25℃ ~ -50℃로 냉각시키고, 전기방사 장치 내부의 습도를 30% ~ 60% 로 증가시킨 상태에서 전기방사를 수행하고, 상기 전기방사에 의하여 나노섬유의 형성과 동시에 얼음 결정이 함께 형성되어 나노섬유와 얼음이 혼재하는 나노섬유-얼음 지지체를 형성하는 제2 공정; 및

상기 나노섬유-얼음 지지체를 동결건조시킴로써 얼음을 제거하여 공극을 가지는 나노섬유 지지체를 형성하는 제3 공정;

을 포함하는 나노섬유 지지체의 제조방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 공극은 평균 직경이 10㎛ ~ 150㎛ 이고, 상기 나노섬유 지지체의 두께는 1㎜ ~ 10㎜인 나노섬유 지지체의 제조방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 제1 공정은, 누에고치에서 세리신 단백질을 제거하여 실크 피브로인을 얻는 공정, 상기 실크 피브로인을 염 용액에 용해시켜 실크 피브로인 용액을 얻는 공정, 상기 실크 피브로인 용액을 투석하여 이온 성분을 제거하는 공정, 상기 투석된 실크 피브로인 용액에 폴리머를 첨가하는 공정을 포함하는 나노섬유 지지체의 제조방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

폴리머와 실크 피브로인의 중량비는 1:3 내지 1:5인 나노섬유 지지체의 제조방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 폴리머는 폴리비닐알콜, 히알루론산, 폴리카프로락톤, 폴리에틸렌옥사이드, 폴리에틸렌글리콜 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함하는 나노섬유 지지체의 제조방법.

청구항 12

제7항에 있어서,

상기 전기방사는, 주사기와 콜렉터 간의 거리는 10cm ~ 15cm, 주사기에는 12KV ~ 20KV, 콜렉터에는 1KV ~ 5KV 전압을 인가하고, 유속은 1㎖/hr 의 조건에서 수행하는 나노섬유 지지체의 제조방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 방법에 따라 제조되고, 평균 직경이 10㎛ ~ 150㎛ 인 공극을 가지고, 두께가 1㎜ ~ 10㎜인 나노섬유 지지체.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 나노섬유 지지체는 심장혈관용 지지체인 나노섬유 지지체.

청구항 15

제13항에 있어서,

상기 나노섬유 지지체는 인체 진피 대체용 지지체인 나노섬유 지지체.

청구항 16

전기방사 용액을 함유하는 시린지;

전기방사되는 나노섬유를 수집하는 콜렉터;

상기 시린지와 상기 콜렉터를 포함하는 전기방사 챔버;

상기 콜렉터를 냉각시킬 수 있는 냉각장치; 및

상기 전기방사 챔버 내의 습도를 조절할 수 있는 습도 조절장치;를 포함하고,

상기 냉각장치 및 상기 습도조절장치를 이용하여 상기 콜렉터의 온도 및 상기 전기방사 챔버 내의 습도를 조절

함으로써 나노섬유와 얼음이 혼재하는 나노섬유-얼음 지지체를 형성할 수 있는 전기방사 장치.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 냉각장치에 의하여 콜렉터의 온도는 -25℃ ~ -50℃ 로 유지될 수 있고, 상기 습도 조절장치에 의하여 상기 전기방사 챔버 내의 습도는 30% ~ 60% 로 유지될 수 있는 전기방사장치.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 두께 조절 및 공극 크기 조절이 가능한 나노섬유 지지체의 제조방법, 이에 의하여 제조된 나노섬유 지지체 및 이에 사용되는 나노섬유 지지체의 제조장치에 관한 것이다. 보다 상세하게는 다양한 생체 적합한 고분자(폴리유산계열, 폴리우레탄, 폴리에스터, 폴리아미드, 불소계고분자, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리글리콜, 키틴, 키토산, 알지네이트, 하이알론산, 실크 피브로인, 콜라겐, 일라스틴 등)를 이용한 조직공학용 생체재료(ex: scaffold, membrane, sheet, matrix, mesh, web .etc) 및 인공진피 대체용 지지체, 인공 혈관 지지체 제조방법에 관한 것으로, 수용성 합성?천연고분자 및 수용성 고분자 혼합물을 온도가 조절되는 새로운 콜렉터(collector)에 전기 방사하여 공극의 크기 및 지지체의 생분해 속도를 조절한 다용도 나노섬유 생체재료 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근 전기방사한 나노섬유 지지체의 조직공학 실험 및 생체 의학적용사용에 관한 연구가 활발히 진행되고 있는데, 이는 세포의 기질과 구조적, 물리적으로 비슷한 특성 때문이며, 신체조직으로부터 다공성 표면의 내부로 세포부착과 성장을 촉진시키는 좋은 재료로 평가 받고 있다.

[0003] 그러나 일반적인 전기방사를 통한 나노섬유 지지체의 경우, 직경100~800 nm의 섬유가 불규칙하게 망상구조로 배열된 일종의 부직포로서, 나노섬유 지지체의 두께는 통상 50~200 um의 정도이며 또한 70~80%의 높은 공극도에 공극의 크기는 최대 1 um이다.

[0004] 위와 같은 나노 섬유 지지체의 구조상 나노섬유 간 공극이 작아 섬유아세포 및 혈관재생세포들의 침윤이 어렵다. 나노 섬유 지지체의공극을 세포의 침윤이 용이하게 하기 위해서는 적어도 10-80 um의 공극이 필요하다. 그러나 전기방사법의 의한 나노 섬유 지지체의 경우 전기장에 의한 무질서한 나노섬유 간의 배열로 인해 나노섬유 간의 공극을 늘리는 것이 어렵다. 또한 전기방사된 나노섬유 지지체의 두께가 최대 200um 정도로 얇아서 실제로 임상에 적용하기 힘들다.

[0005] 따라서 나노 섬유 지지체를 생체 대체물로 사용하기 위해서는 공극의 크기가 세포의 침윤이 자유로울 수 있도록 10um 이상 및 두께는 1mm 이상이 되어야 한다.

[0006] 위와 같은 문제를 해결하고자 공극의 크기를 늘리기 위해 다양한 연구가 진행되어 왔으며, 그 결과로 염 첨가 공법, 나노 섬유 배열 공법, 자석을 이용한 전기방사 공법 등이 많이 사용되고 있다.

[0007] 염 첨가 공법은 전기방사 원액을 방사하여 나노 섬유를 콜렉터에 증착시키는 과정에 일정한 크기의 염을 공급기를 이용해 첨가하는 것으로 나노 섬유와 염의 혼합 지지체를 제작하는 공법이다(L.D. Wright et al., Material science and engineering C 31(2011) 30-36). 염의 크기를 조절하여 공극의 크기를 조절할 수 있는 장점이 있지만, 이 공법은 추가로 물을 이용해 염을 제거 해주고 다시 건조해야 하는 과정의 필요성과 일정하지 못한 공극의 크기 및 공극의 배열이 단점이다. 최근 연구가 활발한 방법 중의 하나다.

[0008] 나노 섬유 배열 공법은 고속으로 회전하는 드럼 형태의 collector에 전기 방사한 나노 섬유를 수집하는 공정을 통해 나노 섬유를 일정하게 배열하는 공법이다(Han BingWang, et al., Jounal of Neural Engineering, 6(2009)). 나노 섬유 배열 공법은 드럼의 회전방향으로 섬유를 일직선으로 배열 할 수 밖에 없고, 배열을 통해 생기는 공극의 크기가 제한적이다.

[0009] 자석을 이용한 전기방사 공법은 알루미늄 호일과 같은 collector에 양쪽 끝에 자석을 N극과 S극으로 배열하여 설치한 뒤 자석의 N극과 S극에 형성되는 자기장 사이로 전기방사를 하여 방사된 나노 섬유가 자기장을 통과하는

과정에서 자기장을 따라 섬유를 배열시키는 공법이다(Dayong Yang, et al., Advanced materials, 2007. 19, 3702-3706). 이와 같이 형성되는 나노 섬유 또한, 하나의 방향성을 갖는 일자로 배열된 형태의 나노 섬유이며, 격자 모양의 그물망 구조를 형성하기 위해서는 자석의 배열을 바꾸어 가며 나노 섬유를 수집한 뒤 추가로 가교 과정을 거쳐 결합시키는 방법을 사용한다. 이 공법 또한, 공극의 크기가 제한적이며 조절하기가 어렵다는 단점이 있다.

[0010] 위와 같은 공법들은 모두 공극의 크기를 조절하기 위한 방법들로 공극 조절에 효과가 있으나, 그 효과가 생체에 적합한 세포외 기질 형태를 제작하기에는 공극의 크기나, 두께가 제한적이다.

[0011] 따라서, 공극의 크기가 세포성장에 적합하며, 일정하고 규칙적인 공극을 갖는 새로운 나노 섬유 지지체 제작 공법의 개발이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명은 두께 조절 및 공극 크기 조절이 가능한 나노섬유 지지체의 제조방법, 이에 의하여 제조된 나노섬유 지지체 및 이에 사용되는 나노섬유 지지체의 제조장치를 제공하고자 한다.

[0013] 본 발명은 공극의 크기 및 두께가 각 조직공학실험에 적합한 구조로서, 그 용도에 맞는 다양한 공극과 두께 그리고 생분해 속도가 조절된 3차원 나노섬유 지지체를 제공하고자 한다.

[0014] 또한, 본 발명은 용이하고 간단한 방법으로 인체 진피 대체물로 사용될 수 있는 3차원 나노섬유 지지체를 제조하는 방법을 제공하고자 한다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 인공 혈관용 지지체를 제조하는 방법을 제공하고자 한다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 방법을 구현할 수 있는 나노섬유 지지체 제조장치를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명의 제1 측면은 전기방사용 용액을 준비하는 제1 공정; 전기방사용 용액을 전기방사하여 나노섬유를 형성함과 동시에 얼음 결정을 함께 형성하여 나노섬유와 얼음이 혼재하는 나노섬유-얼음 지지체를 형성하는 제2 공정; 및 나노섬유-얼음 지지체로부터 얼음을 제거하여 공극을 가지는 나노섬유 지지체를 형성하는 제3 공정을 포함하는 나노섬유 지지체의 제조방법일 수 있다.

[0018] 보다 구체적으로, 실크 피브로인을 포함하는 전기방사용 용액을 준비하는 제1 공정; 전기방사용 용액을 전기방사하되, 전기방사 되는 나노섬유를 수집하는 콜렉터를 -30℃ 이하로 냉각시키고, 전기방사 장치 내부의 습도를 60% 이상으로 증가시킨 상태에서 전기방사를 수행하고, 전기방사에 의하여 나노섬유의 형성과 동시에 얼음 결정이 함께 형성되어 나노섬유와 얼음이 혼재하는 나노섬유-얼음 지지체를 형성하는 제2 공정; 및 나노섬유-얼음 지지체를 동결건조시킴로써 얼음을 제거하여 공극을 가지는 나노섬유 지지체를 형성하는 제3 공정을 포함하는 나노섬유 지지체의 제조방법일 수 있다.

[0019] 본 발명의 제2 측면은 제1 측면에 따라 제조되고, 평균 직경이 10㎛ ~ 150㎛ 인 공극을 가지고, 두께가 1㎜ ~ 10㎜인 나노섬유 지지체일 수 있다.

[0020] 본 발명의 제3 측면은 전기방사 용액을 함유하는 시린지; 전기방사되는 나노섬유를 수집하는 콜렉터; 시린지와 콜렉터를 포함하는 전기방사 챔버; 콜렉터를 냉각시킬 수 있는 냉각장치; 및 전기방사 챔버 내의 습도를 조절할 수 있는 습도 조절장치를 포함하고, 냉각장치 및 습도조절장치를 이용하여 콜렉터의 온도 및 전기방사 챔버 내의 습도를 조절함으로써 나노섬유와 얼음이 혼재하는 나노섬유-얼음 지지체를 형성할 수 있는 전기방사 장치일 수 있다.

발명의 효과

[0021] 본 발명에 의하면 3차원 나노섬유 지지체의 공극 및 두께를 조절할 수 있어 용도에 따라 바람직한 공극 및 두께를 가지는 조직공학용 3차원 나노섬유 지지체를 제공할 수 있다.

[0022] 또한, 본 발명에 의하면 용이하고 간단한 방법으로 조직공학용 나노섬유 지지체를 제조할 수 있어, 제조비용 및 공정 면에서도 유리한 장점이 있다.

[0023] 또한, 본 발명에 의하면 충분한 공극 및 섬유막 두께를 가지며, 또한 그 조절이 가능한 수용성 고분자 나노섬유 지지체를 제조할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 본 발명에 따른 전기방사 장치의 개략도이다.

도 2는 실시예, 비교예 1 및 2에 따른 나노섬유 지지체에 대한 주사전자현미경 사진이다.

도 3는 실시예, 비교예 1 및 2에 따른 나노섬유 지지체에 섬유 아세포를 4주간 배양한 후 주사전자현미경으로 관찰한 사진이다.

도 4는 실시예 및 비교예 1에 따른 나노섬유 지지체의 육안 사진이다.

도 5는 진피결손 동물 모델의 실험 순서를 나타내는 사진이다.

도 6은 진피결손 동물 모델 실험 결과를 헤마톡실린 & 에오신 염색하여 관찰한 조직 사진이다.

도 7은 진피결손 동물 모델 실험 결과를 Masson뭩 trichrome 염색을 통해 관찰한 콜라젠 침착 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 바람직한 측면들을 설명한다. 본 발명의 측면은 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 이하 설명하는 실시 형태로 한정되는 것은 아니다. 또한, 본 발명의 측면들은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 더욱 완전하게 설명하기 위해서 제공되는 것이다. 따라서, 도면에서의 요소들의 형상 및 크기 등은 보다 명확한 설명을 위해 과장될 수 있으며, 도면상의 동일한 부호로 표시되는 요소는 동일한 요소이다.

[0026] 본 발명의 제1 측면은 전기방사용 용액을 준비하는 제1 공정; 전기방사용 용액을 전기방사하여 나노섬유를 형성함과 동시에 얼음 결정을 함께 형성하여 나노섬유와 얼음이 혼재하는 나노섬유-얼음 지지체를 형성하는 제2 공정; 및 나노섬유-얼음 지지체로부터 얼음을 제거하여 공극을 가지는 나노섬유 지지체를 형성하는 제3 공정을 포함하는 나노섬유 지지체의 제조방법일 수 있다.

[0027] 이하에서는 공정에 대하여 순서대로 설명한다.

[0028] 먼저, 전기방사용 용액을 준비할 수 있다(제1 공정).

[0029] 전기방사 용액은 실크 피브로인을 포함할 수 있으며, 이 경우에는 실크 피브로인 나노섬유로 이루어진 지지체를 제조할 수 있다. 이 경우 누에고치에서 세리신 단백질을 제거하여 실크 피브로인을 얻고, 이를 염 용액에 용해시켜 실크 피브로인 용액을 제조하고, 실크 피브로인 용액을 투석하여 이온 성분을 제거하고, 투석된 실크 피브로인 용액에 폴리머를 첨가하여 전기방사 용액을 제조할 수 있다.

[0030] 폴리머와 실크 피브로인의 중량비는 1:3 내지 1:5일 수 있다. 실크 피브로인 수용액은 점성이 거의 없는 용액상태인데 이와 같은 조건으로는 전기방사를 하기가 어렵다. 그렇기 때문에 수용성 폴리머를 혼합하여 전기방사를 하게 된다. 상기 범위를 벗어나는 경우에는 폴리머가 너무 과하게 첨가되거나 너무 소량 첨가되면 전기방사에 맞는 적정 점도를 충족하지 않기 때문에 전기방사가 되지 않을 수 있다. 또한 첨가되는 폴리머의 종류에 따라 물성이 조금씩 변하게 되는데 실크피브로인 나노섬유를 만들기 위하여는 상기 범위가 바람직하며, 또한 폴리머의 혼합 비율에 따라 제조되는 섬유의 직경이 변할 수 있는데 나노 오더 정도의 섬유를 제작하기 위하여 상기 범위의 혼합비율이 적당하다.

[0031] 폴리머는 폴리머는 실크 피브로인의 전기방사 물성을 개선시킬 있는 것을 사용할 수 있다. 구체적으로는 폴리비닐알콜, 히알루론산, 폴리카프로락톤, 폴리에틸렌옥사이드, 폴리에틸렌글리콜 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다. 또한 폴리플루오린화비닐리덴 (PVdf:nylidenedifluoride), 폴리락틱글라콜릭에시드 (PLGA: polylactic-co-glycolic acid) 등의 고분자 물질을 사용할 수도 있다.

[0032] 다음으로, 전기방사용 용액을 전기방사하여 나노섬유를 형성함과 동시에 얼음결정을 함께 형성하여 나노섬유와 얼음이 혼재하는 나노섬유-얼음 지지체를 형성할 수 있다(제2 공정).

[0033] 전기방사에 의하여 형성되는 나노섬유가 콜렉터에 증착할 때 주위 수분과 함께 얼어붙어 얼음 결정이 형성될 수 있다. 냉매를 이용하여 콜렉터를 냉각 시킬 수 있다.

[0034] 전기방사 챔버 내의 습도 및 콜렉터의 온도를 조절함으로써 얼음 결정의 크기와 생성 속도를 조절할 수 있다. 결국 얼음 결정의 크기를 조절함으로써 나노섬유 지지체 내의 공극의 크기를 조절할 수 있다.

[0035] 제2 공정은, 전기방사 챔버의 습도와 전기방사된 나노섬유를 수집하는 콜렉터의 온도를 조절함으로써 수행할 수 있다.

[0036] 실크 피브로인을 포함하는 용액을 사용하여 실크 피브로인 나노섬유 지지체를 제조하는 경우에는 전기방사 되는 나노섬유를 수집하는 콜렉터를 -25℃ ~ -45℃ 로 냉각시키고, 전기방사 장치 내부의 습도를 30~60% 로 증가시킨 상태에서 전기방사를 수행할 수 있다.

[0037] 실크 피브로인을 포함하는 용액을 사용하여 실크 피브로인 나노섬유 지지체를 제조하는 경우의 전기방사 조건은 다음과 같다. 주사기와 콜렉터 간의 거리는 10cm ~ 15cm, 주사기에는 12KV ~ 20KV, 콜렉터에는 1KV ~ 5KV 전압을 인가하고, 유속은 1㎖/hr 의 조건 하에서 전기방사를 수행할 수 있다.

[0038] 주사기와 콜렉터 간의 거리가 너무 멀어지면 전기방사되어 만들어지는 섬유의 두께가 감소하게 되고, 거리가 너무 가까워지면 섬유의 두께가 증가하며 용매의 증발이 늦어지기 때문에 섬유가 뭉쳐 섬유상이 뭉개질 수 있고 비드가 생길 수 있다.

[0039] 12kv 이하의 전압을 걸어주면 방사용액에 미치는 전압의 힘이 부족하기에 용액의 표면에서 방출되는 섬유의 두께가 증가하고, 완전히 섬유상을 가지지 못하는 비드들이 생길수 있다. 20kv 이상으로 전압이 증가하면 전압이 너무 과하여 섬유의 두께가 감소하고, 방사용액의 표면장력이 빨리 깨지면서 섬유를 형성하기 전에 콜렉터로 이동하게 됨으로 일정한 두께의 섬유를 만들기 어렵다.

[0040] 콜렉터는 영하의 극저온을 유지하고 있기 때문에 성애가 생기게 되는데 이때 전압을 5kv 이상으로 올리게 되면 콜렉터에 전류가 흐르게 되면서 기계에 영향을 줄 수 있고, 전기방사 되어 만들어지 섬유의 콜렉터로의 흐름을 방해할 수 있다.

[0041] 전기방사 용액의 방출 유속과 섬유의 방출은 비례하지 않는다. 방사용액에서 제한적인 양이 섬유로 방사되기 때문에 유속을 증가시키면 용액의 loss만 생기게 된다. 유속이 너무 적게 되면 방사가 끊길수도 있다.

[0042] 본 발명의 나노섬유 지지체는, 지지체의 형성과 동시에 지지체 사이에 주변 습기에 의한 미세 얼음 결정이 이루어지므로, 본 발명에 의해 제조되는 지지체에는 충분한 크기와 비율의 공극이 형성될 수 있다. 또한, 이때 주변 습도 및 콜렉터의 온도를 다양하게 조절함으로써 다양한 크기와 비율의 공극을 갖는 3차원 나노섬유 지지체 제조할 수 있다. 일반적인 전기 방사의 경우 200-100 um 정도의 film 형태를 가지는데, 이와 달리 본 발명에 의하면 두께가 두꺼운 나노섬유 지지체(1㎜ ~ 10㎜)를 제조할 수 있기 때문에 이를 3차원 나노섬유 지지체라 할 수 있다.

[0043] 특히, 주변 습도를 높이고, 콜렉터의 온도를 낮추는 경우에는 나노섬유 지지체 사이의 공극이 커지고, 이에 따라 나노섬유 지지체의 두께도 증가할 수 있다.

[0044] 다음으로, 나노섬유-얼음 지지체로부터 얼음을 제거하여 공극을 가지는 나노섬유 지지체를 형성할 수 있다(제3 공정).

[0045] 제3 공정은, 동결 건조 방법에 의하여 수행될 수 있다. 나노섬유-얼음 지지체를 동결건조시킴으로써 얼음을 제거할 수 있고, 얼음이 제거된 부위는 공극으로서 잔존하게 된다. 따라서 전기방사시 형성된 얼음 결정의 크기에

따라 공극의 크기가 결정될 수 있다. 얼음 결정의 크기는 전기방사 챔버 내의 습도 및 콜렉터의 온도에 따라 좌우될 수 있으므로, 결국 전기방사 챔버 내의 습도 및 콜렉터의 온도를 조절하여 나노섬유 지지체 내의 공극의 크기를 조절할 수 있다.

[0046]

[0047] 추가적으로, 제3 공정 이후에, 나노섬유 지지체를 불용화 처리하는 공정을 더 포함할 수 있다. 나노섬유가 수용성인 경우 체내에 이식되는 경우 채액에 의하여 용해될 수 있어 나노섬유 지지체가 지지체로서 그 기능을 수행할 수 없다. 따라서 수용성 나노섬유를 불용화처리할 필요가 있다. 불용화 처리는 구체적으로는 메탄올, 에탄올, 프로판올 등의 알코올에 담지하거나 또는 수화처리를 하여 나노섬유를 결정화함으로써 수행할 수 있다.

[0048] 또한, 나노섬유 지지체는 결정화 과정에서 생분해 속도가 조절될 수 있다.

[0049] 본 발명의 제2 측면은 제1 측면에 따라 제조되고, 평균 직경이 10㎛ ~ 150㎛ 인 공극을 가지고, 두께가 1㎜ ~ 10㎜인 나노섬유 지지체일 수 있다. 실크 피브로인을 포함하는 전기방사 용액을 사용하는 경우에는 실크 피브로인 나노섬유 지지체일 수 있다. 이러한 나노섬유 지지체는 심장혈관용 지지체 또는 인체 진피 대체용 지지체로도 사용할 수 있다.

[0050] 본 측면은 공극의 크기가 10㎛ ~ 150㎛ 이고, 두께가 1㎜ ~ 10㎜ 인 것을 특징으로 하는 나노섬유 지지체을 제공할 수 있다. 상기 나노섬유 지지체는 인체 세포외 기질(Extracellular matrix)과 유사한 구조로서 조직공학 실험에 적합하며, 세포와 재료를 혼합할 수 있는 최상의 물리적 조건을 제공 할 수 있다.

[0051] 조직공학 실험 및 응용의 한 예를 들면, 본 측면의 나노섬유 지지체는 인체 진피를 대체하기에 충분한 공극의 크기 및 두께를 제공하므로, 연조직 결손 및 화상환자의 진피결손의 치유에 유용하게 사용될 수 있다.

[0052] 본 발명에 의하여 제조된 나노섬유 지지체는 공업적으로는 필터로 사용될 수도 있다.

[0053] 도 1은 본 발명에 따른 전기방사 장치의 개략도이다. 도 1을 참조하면, 본 발명의 제3 측면은 전기방사 용액을 함유하는 시린지; 전기방사되는 나노섬유를 수집하는 콜렉터; 시린지와 상기 콜렉터를 포함하는 전기방사 챔버; 콜렉터를 냉각시키는 냉각장치; 및 전기방사 챔버 내의 습도를 조절할 수 있는 습도 조절장치를 포함하고, 냉각장치 및 습도조절장치를 이용하여 콜렉터의 온도 및 전기방사 챔버 내의 습도를 조절함으로써 나노섬유와 얼음이 혼재하는 나노섬유-얼음 지지체를 형성할 수 있는 전기방사 장치일 수 있다.

[0054] 냉각장치에 의하여 콜렉터의 온도는 -25℃ ~ -50℃ 이하로 유지될 수 있고, 습도조절장치에 의하여 전기방사 챔버 내의 습도는 30% ~ 60% 이상으로 유지될 수 있다. 본 측면에 따른 전기방사 장치를 사용하여 본 발명의 제1 및 제2 측면을 구현할 수 있다.

[0055] 이하에서는 실시예 및 비교예를 이용하여 본 발명에 대하여 보다 상세하게 설명한다.

[0056] [실시예]

[0057] < 실크 피브로인 전기방사 원액의 준비 >

[0058] 누에고치(Bombyx mori)를 탄산나트륨 등의 염기성 수용액에 넣고 가열한 후 증류수로 세척하는 과정을 거침으로써, 누에고치로부터 세리신 단백질 및 불순물 등을 제거하였다.

[0059] 상기 과정을 거친 실크 피브로인을 칼슘클로라이드 등의 염 용액에 넣고 용해시켰다. 그런 다음, 상기 용액으로부터 이온 성분을 제거하기 위해 증류수로 투석을 50시간 동안 실시하였다.

[0060] 다음으로, 투석된 실크 피브로인 용액에 실크 피브로인의 전기방사 물성 개선을 위해 폴리머로서 폴리비닐알코올(Polyvinyl alcohol, PVA)을 첨가하여 실크 피브로인 혼합 수용액(전기방사 용액)을 제조하였다. 이때, 첨가되는 폴리머와 실크 피브로인의 중량비는 1:4로 하였다.

[0061] < 실크 피브로인 나노섬유 지지체 제조 >

[0062] 전기방사를 하기 전에 콜렉터를 약 -30℃ 로 미리 냉각 시켰다. 가습기를 이용하여 전기방사 챔버 내부의 습도를 70% 정도로 조절하였다. 그 뒤 제조된 실크 피브로인 전기방사 용액을 10㎖ 주사기에 나누어 담아 펌프에 장착하여 1㎖/hr의 속도로 전기방사를 실시하였다. 이때, 주사기와 콜렉터 간의 거리는 12cm 로 하였으며, DC 전원공급장치를 이용하여 주사기에 15kV, 콜렉터에 3kV 의 전압을 인가하였다. 전기방사가 종료 된 후 제작된 실크 피브로인 나노섬유-얼음 지지체를 동결건조하여 수분을 제거함으로써 실크 비프로인 나노섬유 지지체를 제조하였다.

[0063] < 실크 피브로인 나노섬유 지지체의 불용화 처리 >

[0064] 상기 제작된 실크 피브로인 나노섬유 지지체를 메탄올로 처리하여 불용화시켰다.

[0065] [비교예 1]

[0066] 콜렉터의 냉각하지 않고 챔버 내부의 습도를 높이지 않음으로써 얼음이 형성되지 않도록 한 점 및 이에 수반하는 공정을 거치지 않은 점을 제외하고는, 실시예와 동일한 방법에 따라 실크 피브로인 나노섬유 지지체를 제조하였다.

[0067] [비교예 2]

[0068] 실크 피브로인 혼합액을 주사기에 담고 송출펌프를 이용하여 1ml/hr의 속도로 토출했다. 이때 주사기 바늘에 전극을 연결하여 직류전원장치로 15kv의 정전압을 가하여 회전형 드럼 표면에 실크 나노 섬유를 수집했다.

[0069] 이때 회전형 드럼의 상부에 위치하는 염 공급기의 분배기에 분말 상의 염화나트륨(NaCl, 입자크기: 180-250 um)을 채운 뒤 35g/hr의 속도로, 전기 방사와 동시에 염 공급기로부터 드럼에 균일하게 염을 분사하여 실크 피브로인나노섬유막 (1 um x 80 cm x 20cm)에 염이 함유되도록 하였다. 물을 이용하여 염을 제거한 후 건조하여 나노섬유 지지체를 제조하였다.

[0070] [평가]

[0071] < 실크 피브로인 나노섬유 지지체의 구조 관찰 >

[0072] 도 2는 실시예, 비교예 1 및 2에 따른 나노섬유 지지체에 대한 주사전자현미경 사진이다(A: 비교예 1, B: 비교예 2, C: 실시예) (좌: 2500배, 우: 100배). 도 2를 참조하면, 실시예의 실크 피브로인 지지체는 약 40㎛ 정도의 일정한 크기의 공극을 가짐을 확인할 수 있다.

[0073] 도2의 주사 전자 현미경 소견상 본 발명의 C에서 A와 B에 비해 규칙적이고 나노 섬유간 공극 간격이 큰 것을 확인 할 수 있으며, 특히 나노 섬유간 구조에서 3차원 형태의 나노 섬유 구조를 확인할 수 있다.

[0074] 도2의 A는 일반적, B는 염첨가, C는 본발명에 의한 전기방사를 통해 얻어진 섬유지지체의 샘플이며 SEM을 통해 관찰한 비교사진이다. 좌측은 2500배의 표면사진이고, 우측은 200배의 단면사진이다. 각 사진을 비교해 보았을 때, A와 B의 표면사진의 차이점은 크게 없으나 단면사진을 관찰하게 되면 A에 비해 염을 첨가해준 B의 두께가 증가한 것을 볼 수 있다. C의 사진을 보면 A와 B에 비교해 보았을 때 확연히 공극의 크기와 두께가 증가한 것을 확인할 수 있다. 이를 통해 본 발명이 공극과 두께조절에 효과가 있다는 것을 확인할 수 있다.

[0075] < 세포 친화성 및 세포 독성, 세포 부착성 및 침윤 정도 >

[0076] 실시예 및 비교예에 따른 실크 피브로인 나노섬유 지지체를 의료용 펀치를 이용하여 6mm 크기로 시료를 각각 제

작하였다. 세포 친화성 및 세포 독성은 MTT assay를 이용하여 확인하였으며, 구체적으로 실크 나노섬유 지지체 시료를 96 well에 넣고 섬유 아세포를 분주한 뒤 분주 후 1-3일간 배양한 뒤 MTT 시약과 반응시켜 흡광도를 측정하여 확인하였다. 세포 부착성 및 침윤 정도는 상기와 동일하게 섬유 아세포를 분주하고 2주, 4주간 배양한 뒤 주사전지현미경을 통해 관찰하여 확인하였다.

[0077] 표 1에는 실시예, 비교예 1 및 2에 따른 나노섬유 지지체의 공극률 및 수분 함유율을 나타내는 표이다. 표 1을 참조하면, 실시예의 경우 97% 이상의 공극률(porosity)을 가짐을 확인할 수 있다.

[0078] 수분함유율은 샘플 전체가 수분을 함유할 수 있는 비율을 말한다. Swelling ratio의 경우는 샘플 자체 즉 섬유들이 수분을 흡수하는 비율을 말하며, porosity의 경우 샘플 자체를 제외한 즉 섬유들을 제외하고 섬유들 사이의 공극들이 수분을 함유함을 말한다.

표 1

[0079]

	Porosity(%)	Swelling ratio	Water uptake(%)
비교예 1	82.35	15.5	93.93
비교예 2	84.95	22	95.65
실시예	97.08	37.3	97.3

[0080] 표 2에는 실시예, 비교예 1 및 2에 따른 나노섬유 지지체의 두께 및 공극의 크기를 측정한 결과를 나타내었다(A: 비교예 1, B: 비교예 2, C: 실시예). 표 2를 참조하면, 실시예의 경우 지지체의 두께가 5㎜ 이상이고, 공극의 크기는 40 um 이상인 반면에, 비교예 1의 경우는 공극의 크기가 대략 0.9㎛, 지지체의 두께가 87㎛ 이고, 비교예 2의 경우는 공극의 크기가 18.5㎛ 정도, 지지체의 두께가 557㎛ 정도로서, 실시예의 경우가 공극의 크기도 크고 두께도 훨씬 두껍다는 점을 확인할 수 있다.

표 2

[0081]

	비교예 1	비교예 2	실시예
공극(pore) 크기(㎛)	0.885	18.50	41.96
지지체의 두께(㎛)	87	557.6	5357

[0082] 표 3에는 습도에 따른 나노섬유지지체의두께 및 공극의 크기를 측정한 결과를 나타내었다(A: 습도30% 1, B: 습도 50% 2, C: 습도 90%).

표 3

[0083]

Humidity	30%	50%	90%
swelling ratio	16.97	29.2	31.22
water uptake(%)	94.38	96.63	96.85
porosity(%)	72.69	75.14	95.46

[0084] 표 3를 참조하면, 주변 습도가 증가할수록 지지체의 swelling ratio, water uptake, porosity 가 증가하는 것을 볼 수 있다. Swelling ratio의 경우 지지체의 섬유가 수분을 흡수 하는 능력은 비슷하나, 습도가 증가 할수록 공극의 size가 커지기 때문에 지지체 내부의 공기와 물의 치환이 빠르게 진행 되어 지지체의 섬유가 물을 더 빨리 흡수 할 수 있게 해준다.

[0085] 도 5에는 실시예, 비교예 1 및 2에 따른 나노섬유 지지체에 섬유 아세포를 4주간 배양한 후 주사전자현미경으로 관찰한 사진이다(A: 비교예 1, B: 비교예 2, C: 실시예). 도 5를 참조하면, 실시예의 경우 4주 만에 지지체 표면 및 지지체 내부로 세포가 침투하였지만, 비교예 1 및 2의 경우는 지지체로 세포가 침투하지 못하였음을 알

수 있다.

[0086] < 진피결손 동물 모델 실험 >

[0087] 진피결손 동물 모델로 Rat을 선정하여 등 부위에 메스를 이용하여 1.5㎝x 1㎝ 의 진피결손 부위를 만들어준 뒤 각각 소독된 2D실크 나노섬유 지지체(비교예 1)와 3D실크 나노섬유 지지체(실시예)를 삽입한 뒤 환부 수분 증발 방지를 위하여 의료용 실리콘을 덧대어 주고 봉합사를 이용하여 봉합하였다. 이후 7일, 14일, 21일별로 조직을 적출하여 헤마톡실린& 에오신 염색을 통해 조직학적 관찰을 하였고, 메손트리컬럼 염색을 통해 콜라젠 침착 여부를 확인하였다.

[0088] 도 4은 실시예 및 비교예 1에 따른 나노섬유 지지체를 진피결손 부위에 삽입하는 시료의 육안 사진이다. 도 4를 참조하면, 실시예의 경우 5㎜ 이상의 적층된 스펀지 구조를 가짐을 확인할 수 있다.

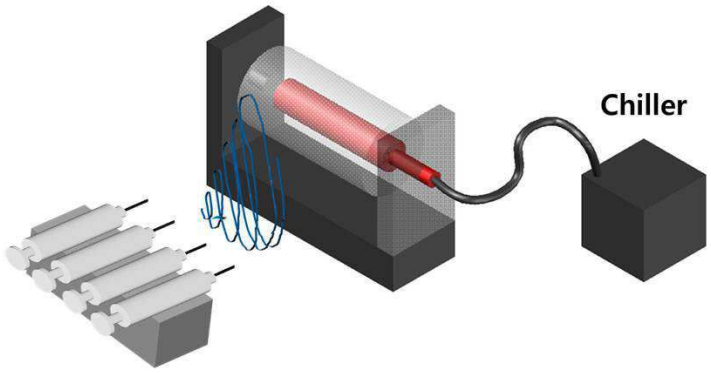
[0089] 도 5은 진피결손 동물 모델의 실험 순서를 나타내는 사진이다.

[0090] 도 6는 진피결손 동물 모델 실험 결과를 헤마톡실린& 에오신 염색하여 관찰한 조직 사진이다(A: 비교예 1, B: 실시예). 도 6A를 참조하면, 비교예 1에 따라 일반적인 전기방사를 이용하여 제조한 2차원 지지체를 사용한 경우에는 지지체의 공극이 적기 때문에 4주 경과 후에도 지지체 내로 세포가 침투가 되지 않아 주변 조직과의 융합이 떨어지고 지지체와 주변 조직 간의 분리가 발생함을 확인할 수 있다. 그러나 도 6B를 참조하면, 실시예에 따른 3차원 지지체를 사용하는 경우 지지체의 공극이 커서 때문에 주변 조직과의 융합이 뛰어나고 지지체 내에 세포 침투가 용이하기 때문에 4주 경과 후에는 지지체가 주변 조직과 완전히 융합되어 진피로 대체되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

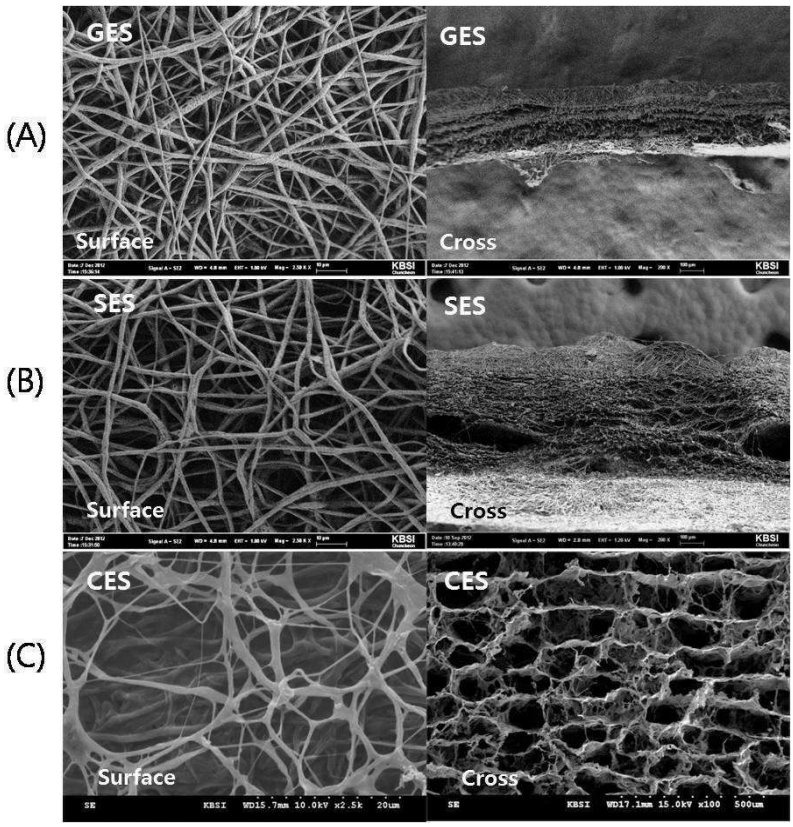
[0091] 도 7에는 3 주 경과된 진피결손 동물 모델 실험 결과를 Masson뭘 trichrome 염색을 통해 관찰한 콜라젠 침착 결과를 나타내었다(A: 비교예 1, B: 실시예). 도 7B를 참조하면, 실시예에 따른 3차원 지지체의 경우 3주째 섬유세포의 침윤 및 증식으로 인해 지지체 내부로 프르게 염색된 콜라겐 침착을 확인할 수 있었으나 비교예 1에 따른 2차원 지지체의 경우 콜라겐 침착을 확인할 수 없었다.

도면

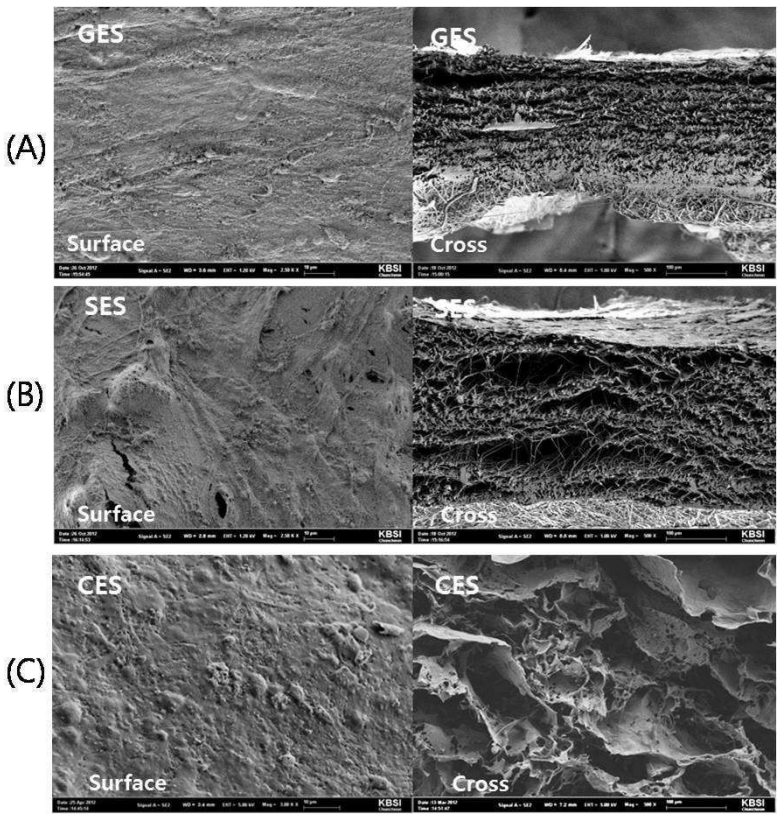
도면1



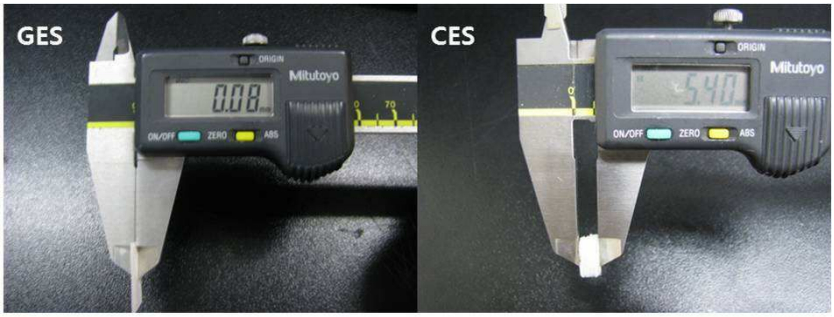
도면2


(A)
GES
Surface
GES
Cross
(B)
SES
Surface
SES
Cross
(C)
CES
Surface
CES
Cross

도면3

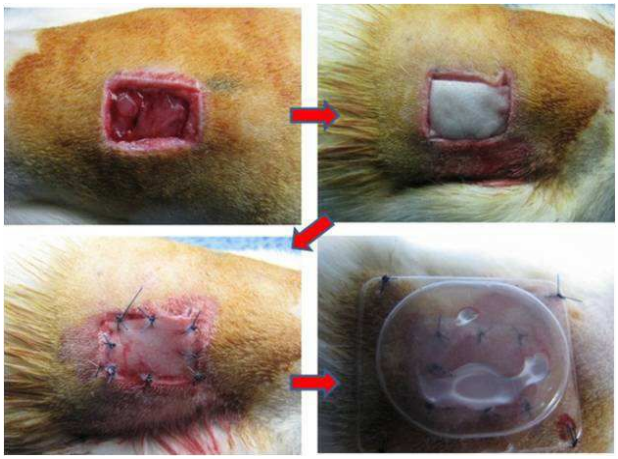

(A)
GES
Surface
GES
Cross
(B)
SES
Surface
SES
Cross
(C)
CES
Surface
CES
Cross

도면4

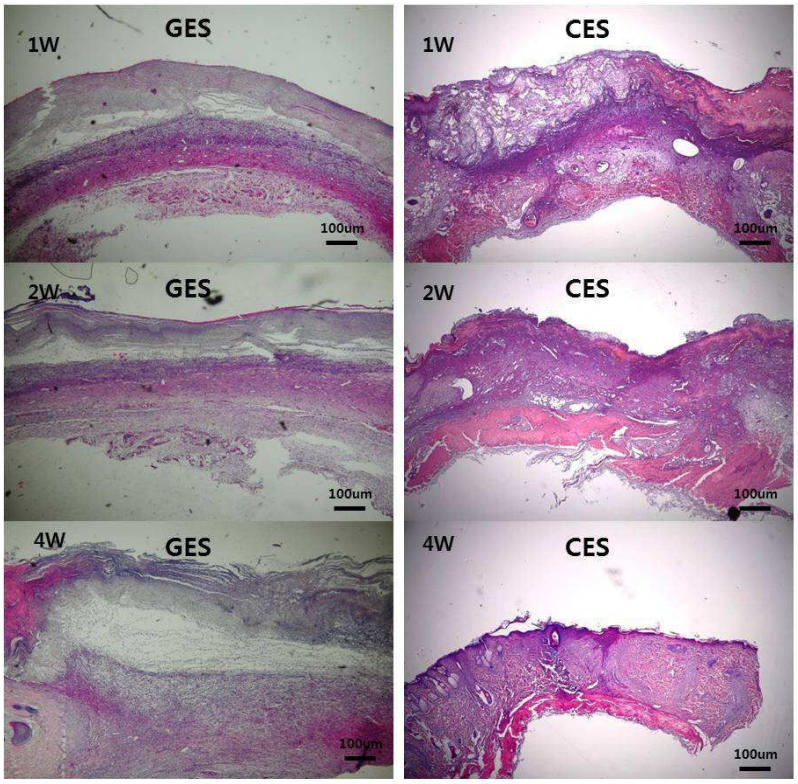


(A) (B)

도면5

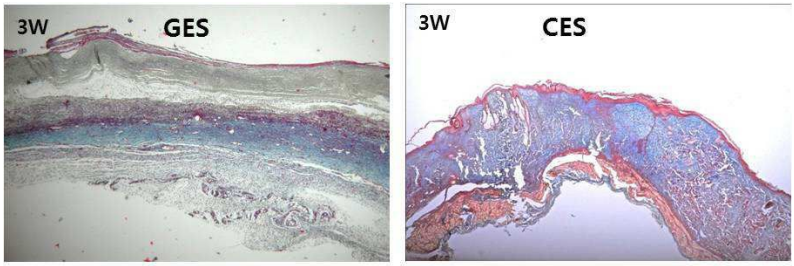


도면6


1W
GES
100um
2W
GES
100um
4W
GES
100um
1W
CES
100um
2W
CES
100um
4W
CES
100um

(A) (B)

도면7


3W
GES
3W
CES

(A) (B)