

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2021-0069278
(43) 공개일자 2021년06월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61L 31/16 (2006.01) A61F 2/82 (2006.01)

A61L 31/04 (2006.01) A61L 31/14 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61L 31/16 (2013.01)

A61F 2/0077 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0158865

(22) 출원일자 2019년12월03일

심사청구일자 2019년12월03일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

고원건

서울특별시 서초구 효령로 164, 6동 502호 (방배동, 신동아아파트)

강성민

충청남도 부여군 부여읍 성왕로352번길 11, 311동 305호 (왕궁아파트)

조강희

서울특별시 서대문구 가재울로2길 15-5, 210호 (남가좌동)

(74) 대리인

특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 고분자 스텐트 표면처리 방법

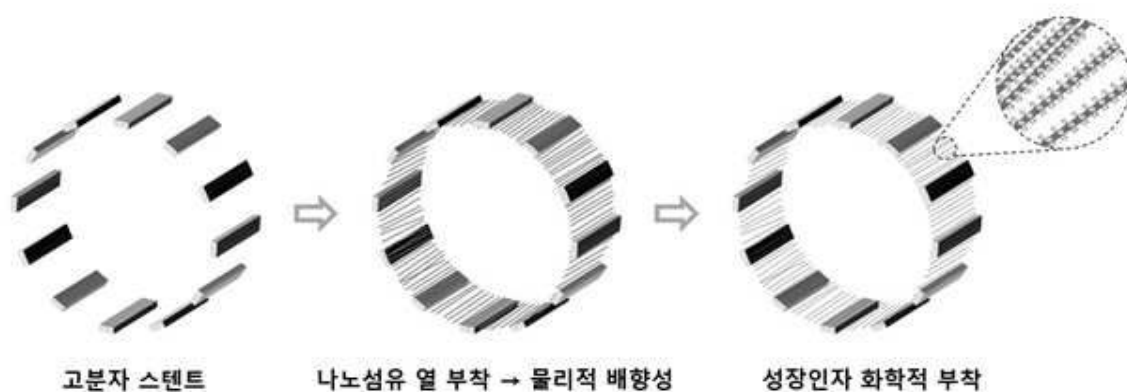
(57) 요약

본 발명은 나노 섬유가 열 부착된 스텐트에 클릭 화학 반응을 통해 혈관내피성장인자를 부착하여 효율적인 성장인자 작용을 가능하게 하는 생분해성 조직공학 스캐폴드에 관한 것으로, 상기 생분해성 고분자로 구성된 배향성을 갖는 나노 섬유 표면에 혈관내피성장인자를 화학적으로 결합하는 방식을 통해 재내피화 속도 향상을 위한 적절한 환경을 제공한다.

또한, 상기 나노 섬유를 스텐트 내벽에 열 부착함으로써 물리적인 배향성을 제공하여 혈관내피세포의 증식 및 이동을 촉진할 수 있다.

이러한 스텐트의 표면 처리 방식은 생분해성 고분자 스텐트 분야에 두루 이용 가능하며, 재협착에 대한 효과적인 대응 방법을 제시할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61F 2/82 (2013.01)
A61L 31/04 (2013.01)
A61L 31/148 (2013.01)
A61F 2002/0081 (2013.01)
A61F 2002/0086 (2013.01)
A61F 2240/002 (2013.01)
A61L 2300/414 (2013.01)
A61L 2400/12 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2019001952
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오의료기술개발사업
연구과제명	[Ezbaro] (2세부)심혈관 중재용 융해성 고분자 융합지지체의 고기능성 표면처리 기

술 개발 (1단계)(2/5)

기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711058054
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	나노, 소재원천기술개발사업
연구과제명	방수(aqueous humor) 액체생검을 이용한 뇌질환 바이오마커 탐색과 생체감응형 패턴

화 하이드로젤 모듈 개발을 통한 마커 센싱 시스템 구축

기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2017.07.01 ~ 2022.06.30

명세서

청구범위

청구항 1

스텐트(stent) 내부에 열 부착된 배상성을 갖는 나노 섬유를 포함하며,

상기 나노 섬유에 클릭 화학 반응(click chemistry reaction)에 의해 생체물질이 결합되어 있는 생분해성 고분자 스텐트.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 클릭 화학 반응은 구리-촉매 알킨-아자이드 첨가 환화(copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition, CuAAC), 스트레인-촉진 아자이드-알킨 첨가 환화(strain-promoted azide-alkyne cycloaddition, SPAAC) 및 스트레인-촉진 알킨-니트론 첨가 환화(strain-promoted alkyne-nitrone cycloaddition, SPANC)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 생분해성 고분자 스텐트.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 생체물질은 혈관내피성장인자(VEGF)인 것인 생분해성 고분자 스텐트.

청구항 4

생체적합성 고분자 용액을 전기방사법에 의해 배향성을 갖는 나노섬유로 제조하는 단계;

상기 나노 섬유를 스텐트 내벽에 열 부착하는 단계; 및

상기 나노 섬유에 클릭 화학 반응으로 생체물질을 결합하는 단계를 포함하는 생분해성 고분자 스텐트의 제조방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 클릭 화학 반응은 구리-촉매 알킨-아자이드 첨가 환화(copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition, CuAAC), 스트레인-촉진 아자이드-알킨 첨가 환화(strain-promoted azide-alkyne cycloaddition, SPAAC) 및 스트레인-촉진 알킨-니트론 첨가 환화(strain-promoted alkyne-nitrone cycloaddition, SPANC)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 생분해성 고분자 스텐트의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 나노 섬유가 열 부착된 스텐트에 클릭 화학 반응을 통해 혈관내피성장인자를 부착하여 효율적인 성장인자 작용을 가능하게 하는 생분해성 고분자 스텐트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 스텐트 또는 인공혈관의 삽입 수술 이후 가장 큰 문제점은 해당 기기 내부에서 혈관이 다시 협착되는 현상이 발생하는 것이다. 이러한 재협착은 주로 평활근 세포의 급격한 증식이나 혈전증 등에 의해 발생한다. 삽입된 기기 내벽에 내피화를 잘 진행할 경우 이러한 문제에 효과적으로 대응할 수 있다고 알려져 있으며, 이와 관련된 많은 연구들이 진행되고 있다.

[0003] 한편 성장인자는 생체 내에서 세포에 특별한 자극을 제공하는 물질로 생체 환경에서 발생하는 단백질이다. 특히 혈관내피성장인자는 혈관내피세포 증식에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 혈관 내피세포의 화학적 결합을 위해서 다양한 방식의 시도가 있었다. 이 중 클릭 화학(Click chemistry) 반응은 생체적합성이 매우 높고 선택성이 높은 반응으로 알려져 있다(특허문헌 1). 하지만 현재까지 클릭 화학 반응을 이용하여 혈관내피성장인자를

화학적으로 결합한 사례는 전무한 상황이다.

[0004] 화학적 측면의 세포 자극과는 다르게 물리적인 방식도 기기 내벽의 내피화에 많은 영향을 주는 것으로 알려져 있다(비특허문헌 1). 배향성을 가지는 표면에서 내피세포는 부착 및 증식, 이동이 가속되는 것으로 알려져 있다(비특허문헌 2 내지 4).

[0005] 따라서, 이러한 배향성을 가진 나노 섬유 위에 생체적합성이 높은 화학반응을 통해 혈관내피성장인자가 부착된 스텐트 표면 처리는 조직공학적으로 우수한 결과물로 예상되기에 Click 반응을 통해 혈관내피성장인자를 화학적으로 결합한 나노 섬유가 열 부착된 생분해성 고분자 스텐트의 개발이 절실히 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) KR 10-1743220

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) Biofunctionalization of Biomaterials for Accelerated in Situ Endothelialization: A Review, Achala de Mel et al., Bio MACROMOLECULES, 2008, 06, 24.

(비특허문헌 0002) Directing Vascular Cell Selectivity and Hemocompatibility on Patterned Platforms Featuring Variable Topographic Geometry and Size, Yonghui Ding et al., American Chemical Society, Appl. Mater. Interfaces 2014, 6, 1206212070.

(비특허문헌 0003) Influence of Surface Topography on Endothelialization of Intravascular Metallicaterial', Julio C. Palmaz et al., Influence of Surface Topography, JVIR 1999; 10:439-444.

(비특허문헌 0004) Control of initial endothelial spreading by topographic activation of focal adhesion kinase, Davide Franco et al., Soft Matter, 2011, 7, 7313.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 스텐트(stent) 내부에 열 부착된 배향성을 갖는 나노 섬유를 포함하며, 상기 나노 섬유에 클릭 화학 반응(click chemistry reaction)에 의해 생체물질이 결합되어 있는 생분해성 고분자 스텐트를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 생체적합성 고분자 용액을 전기방사법에 의해 배향성을 갖는 나노섬유로 제조하는 단계; 상기 나노 섬유를 스텐트 내벽에 열 부착하는 단계; 및 상기 나노 섬유에 클릭 화학 반응으로 생체물질을 결합하는 단계를 포함하는 생분해성 고분자 스텐트의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 과제를 해결하기 위해 본 발명은 스텐트(stent) 내부에 열 부착된 배향성을 갖는 나노 섬유를 포함하며, 상기 나노 섬유에 클릭 화학 반응(click chemistry reaction)에 의해 생체물질이 결합되어 있는 생분해성 고분자 스텐트를 제공한다.

[0013] 생체물질 중 하나인 혈관내피성장인자를 폴리(L-락티드)(PLLA) 나노 섬유 위에 화학적으로 부착하기 위해 아미노분해(Aminolysis), NSH 에스테르 반응 및 클릭 화학 반응을 이용하였다. 상기 세 반응 모두 생체적합성에 문제가 없는 반응이다.

- [0014] 일 실시예에 따르면, 혈관내피성장인자를 폴리(L-락티드)(PLLA) 고분자에 결합하기 위하여, 폴리(L-락티드)(PLLA)는 상기 혈관내피성장인자를 부착할 적절한 작용기가 없으므로 아미노분해 반응을 이용하여 아민기를 부착시켰다. 이후 NHS 에스테르 반응을 이용하여 아민기를 알킬기로 치환하였다. 상기 치환한 알킬기에 클릭 화학 반응을 이용하여 혈관내피성장인자를 부착하기 위해서는 혈관내피성장인자에 아자이드 작용기가 부착되어 있어야 한다. 따라서, 혈관내피성장인자를 구성하는 아미노산 중 라이신(Lysine)의 아민기에 NHS 에스테르 반응을 이용하여 아민기를 아자이드 작용기로 치환하였다.
- [0015] 따라서, 본 발명의 클릭 화학 반응은 생체 적합성이 높고 부반응이 없어 생체 내 혈관내피성장인자와 같은 생체 물질 이외의 다른 단백질이 결합할 가능성을 최소화 시키는 역할을 한다.
- [0016] 본 발명은 생체적합성 고분자 용액을 전기방사법에 의해 배향성을 갖는 나노섬유로 제조하는 단계; 상기 나노섬유를 스텐트 내벽에 열 부착하는 단계; 및 상기 나노 섬유에 클릭 화학 반응으로 생체물질을 결합하는 단계를 포함하는 생분해성 고분자 스텐트의 제조방법을 제공한다.
- [0017] 상기 스텐트의 재료는 생체적합성 고분자라면 그 종류가 제한되지 않으나, 폴리(L-락티드)(PLLA), 폴리글리톨산(PGA), 폴리락트산(PLA), 폴리[(락틱-co-글리콜산)](PLGA), 폴리카프로락톤(PCL) 및 폴리[(3-하이드록시부티레이트)-co-(3-하이드록시발러레이트)](PHBV)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 생체적합성 고분자 또는 이들의 공중합체 또는 이들의 혼합물로 형성되는 것일 수 있다.
- [0018] 일 실시예에 따르면, 상기 나노 섬유는 생체적합성 고분자를 유기용매에 녹인 용액으로 전기방사를 통해 배향성을 갖는 나노 섬유이다. 상기 나노 섬유는 폴리(L-락티드)(PLLA), 폴리글리톨산(PGA), 폴리락트산(PLA), 폴리[(락틱-co-글리콜산)](PLGA), 폴리카프로락톤(PCL) 및 폴리[(3-하이드록시부티레이트)-co-(3-하이드록시발러레이트)](PHBV)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 생체적합성 고분자 또는 이들의 공중합체 또는 이들의 혼합물로 형성되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0019] 상기 클릭 화학 반응은 구리-촉매 알킨-아자이드 첨가 환화(copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition, CuAAC), 스트레인-촉진 아자이드-알킨 첨가 환화(strain-promoted azide-alkyne cycloaddition, SPAAC) 및 스트레인-촉진 알킨-니트론 첨가 환화(strain-promoted alkyne-nitrone cycloaddition, SPANC)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것 일 수 있다.
- [0020] 상기 생체물질은 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF) 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0021] 일 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 스텐트는 스텐트 내 혈관의 재협착에 대하여 스텐트 내벽에서의 재내피화를 촉진할 수 있다.
- [0022] 또한, 상기 혈관내피성장인자는 상기 클릭 화학 반응을 이용하여 화학적으로 부착되므로, 화학적 자극을 통해 재내피화를 촉진시킬 수 있다.
- [0023] 본 발명에서, "포함한다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0024] 본 발명에서 사용된 용어 "스캐폴드"는 조직의 구축, 세포 기능 제어를 위해 인공적으로 만든 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)을 의미하며, 본 발명의 스텐트와 병용되어 사용될 수 있다.
- [0025] 본 출원에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다.
- [0027] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

발명의 효과

[0029] 본 발명에 따른 스텐트(stent) 내부에 열 부착된 배향성을 갖는 나노 섬유를 포함하며, 상기 나노 섬유에 클릭 화학 반응(click chemistry reaction)에 의해 생체물질이 결합되어 있는 생분해성 고분자 스텐트는 동일한 양의 성장인자를 용액으로 공급해 주는 방식보다 더 뛰어난 내피세포 증식 효과를 기대할 수 있으며, 이를 통해 내피화의 가속이 가능할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 고분자 스텐트에 나노 섬유가 열 부착되어 물리적 배향성을 가지며, 상기 스텐트에 성장인자가 화학적으로 부착되는 과정을 간략한 모식도로 보여준다.

도 2는 배향된 나노 섬유를 얻기 위해 회전식 집전판에 전기방사를 하는 모식도(도 2A)와 이를 통하여 형성된 배향된 PLLA 고분자 나노섬유의 SEM 이미지를 보여준다(도 2B).

도 3은 PLLA 고분자 나노섬유를 스텐트 내벽을 나타내는 PLLA 필름(film)에 부착한 이미지이다(도 3A). SEM 이미지는 각각 단면과 윗면의 이미지를 보여준다(도 3B).

도 4는 아미노분해 반응의 간략한 모식도(도 4A)와 XPS 그래프 분석을 통해 반응의 진행을 확인한 결과로서 탄소와 질소의 결합에 의한 결합 에너지 값이 증가되어 아미노분해 반응이 진행되고 있음을 알 수 있는 결과(도 4B) 및 질소 원자의 비율이 점차 증가하는 결과(도 4C)를 보여준다.

도 5는 NHS 에스테르(ester) 반응과 클릭 화학 반응(CuAAC)을 통해 혈관내피성장인자를 화학적으로 표면에 고정 한 모식도(도 5A)와 이를 XPS로 확인한 결과로서 클릭 화학 반응으로 인해 증가된 탄소와 질소의 결합 에너지 값이 증가되어 혈관내피성장인자의 부착을 알 수 있는 결과(도 5B) 및 질소 원자의 비율이 점차 증가하는 결과(도 5C)를 보여준다.

도 6은 최종적으로 형성된 스케폴드를 MTT assay(도 6A)와 L/D를 통해 hCAECs의 세포증식 및 세포독성을 확인한 결과를 보여준다(도 6B).

도 7은 hCAECs의 세포염색을 통해 세포 핵과 발현 단백질 등을 나타낸 결과를 보여주며, 세포 간의 집합 구조를 유지시켜주는 역할을 하는 CD31을 보여준다.

도 8은 hCAECs의 세포 이동속도를 비교한 실험 결과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[실시예]

[0035] 실시예 1: 배향성을 가진 나노섬유체 제작

[0036] Poly(L-lactide) (PLLA, Sigma-Aldrich) 1 g을 Chloroform (Samchun) 7.257 mL에 용해한 후 상온에서 12시간 교반하여 PLLA를 완전히 녹였다. 이후 N,N-Dimethylformamide (DMF, Sigma-Aldrich) 1.814 mL를 용액에 추가로 투여하여 PLLA 8 % solution in Chloroform : DMF = 4 : 1 용액을 제조한다. 제조된 혼합 용액을 10 mL 주사기에 넣고 0.4 mL/hr의 일정한 속력으로 관을 지나 금속으로 이루어진 원통형 바늘로 흘려주었다. 전압 차이로 인해 접지된 스테인리스스틸 드럼으로 용액이 잡아당겨지면서 나노섬유를 형성하였다. 나노섬유는 드럼의 회전을 따라 집적되면서 배향성을 가지게 되며 반복적인 집적으로 인해 다량의 나노섬유가 정렬되어 형성되었다(도 2).

[0038] 실시예 2: 나노섬유 시트의 고분자 표면 부착

[0039] 나노섬유 시트를 부착할 고분자 스텐트 표면을 모사하기 위해 고분자 필름을 제작하여 사용하였다. Poly(L-

lactide) (PLLA, Sigma-Aldrich) 0.1 g을 1.9 g 클로로포름(Chloroform)에 녹여 PLLA 5 % 용액을 제조한 뒤 실리콘 웨이퍼(silicon wafer) 1 cm² 당 100 μ L씩 도포한 후 24시간 동안 용매를 증발시켜 PLLA 필름을 제조하였다.

[0040] 제작된 PLLA 필름을 오븐에 넣고 130 °C에서 4분 30초 동안 가열하면 표면이 접착력을 가진 상태가 된다. 필름 표면에 나노섬유 시트를 눌러서 접합한 뒤 상온에 두면 고분자 표면에 나노섬유 시트의 부착이 가능하다(도 3).

[0042] **실시예 3: 고분자 표면에 Aminolysis 반응을 사용하여 아민기 부착**

[0043] 나노섬유 시트가 부착된 스텐트를 1,6-헥세디아민(1,6-hexanediamine) (Sigma-Aldrich) 600 mg을 아이소프로판올(isopropanol) 10 mL에 용해시킨 용액에 넣고 50 °C의 온도로 40분 간 반응시켜주었다. PLLA의 에스테르 결합이 해체되면서 하이드록시기와 아민기가 부착된다. 이후 아이소프로필 알코올(isopropyl alcohol) (IPA, Duksan)와 증류수로 표면을 세척하여 미반응물을 제거했다(도 4).

[0045] **실시예 4: NHS 반응, Click 반응을 통해 아민기로 개질된 고분자 표면에 혈관내피성장인자 부착**

[0046] 혈관내피 성장인자를 아민기로 개질된 고분자 표면에 부착하기 위해서는 고분자 표면에 앞서 부착하였던 아민기에 클릭 화학 반응에 필요한 작용기 중 한 가지를 만들어 주어야 하며, 이와는 다르게 혈관내피성장인자에는 또 다른 작용기를 만들어 주어야 한다. 해당 작용기로는 알킬기 및 아자이드 결합기로써, 본 실시예에서는 고분자 표면에 알킬기를, 성장인자에는 아자이드 작용기를 결합시켜 주었다. 특히 혈관내피성장인자는 단백질로 구성되어 있으며, 이를 이루는 아미노산 중 라이신에는 아민기가 존재한다. 따라서 고분자 표면과 혈관내피성장인자 두 물질 모두에서 NHS 에스테르 반응을 이용한 작용기의 부착이 가능하다.

[0047] 혈관내피성장인자의 아민기에 아자이드 작용기를 달아주기 위해서 우선 Azido-PEG5-NHS ester 6.76 mg을 PBS 5 μ L에 용해시켜 준 다음 혈관내피성장인자 6.4 μ g을 위 용액과 혼합하고 4 °C에서 2시간 동안 NHS 에스테르 반응을 진행하였다. 미반응물의 제거를 위하여 반응 물질을 압축기(Concentrator) (10K MWCO, 0.5 mL, Thermo scientific)에 넣고 PBS 95 μ L와 함께 원심분리기 (14000rpm, 3분30초)를 돌려주었으며, 이후 PBS를 이용하여 6.4 μ g/100 μ L(0.0016 mM)로 농도를 맞춰주었다.

[0048] 다음으로 아민기를 가진 PLLA표면에 알킬기를 달아주기 위해서도 마찬가지로 아민기와와 NHS 에스테르 반응을 이용한다. 2.140 mg의 프로파르길-N-하이드록시석시니미딜(Propargyl-N-hydroxysuccinimidyl)을 50 mL의 DMSO에 녹인 용액을 이용하여 앞서 아민기를 부착했던 PLLA표면과 상온에서 30분간 반응하여 주었다. 이후 미반응물의 제거를 위하여 PBS로 여러 번 표면을 세척하여 주었다.

[0049] 마지막으로 클릭 화학 반응을 통해 혈관내피성장인자를 부착하여 주었다. 혈관내피성장인자의 아자이드 결합기와 고분자 표면의 알킬기를 이용하여 클릭 화학 반응(CuAAC, copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition)을 진행하였다.

[0050] 반응은 고분자 표면 1 cm² 당 49 μ L의 아자이드가 부착된 혈관내피성장인자 용액과 1 μ L의 구리촉매용액을 사용하여 진행하였으며, 상온에서 1시간 동안 반응하였다. 구리촉매용액은 CuSO₄ 4 mg, Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amine 54.25 mg, Sodium ascorbate 198 mg을 PBS용매 5 mL에 용해하여 제조하였다. 반응 이후 증류수를 사용하여 표면을 세척하여 주었다.

[0051] 혈관내피성장인자의 부착 검증은 XPS를 통해 진행되었다(도 5).

[0053] **실시예 5: L/D 이미지화 및 시간에 따른 MTT 정량분석**

[0054] 상기 실시예 4에서 완성된 스캐폴드를 UV에 2시간 쬔어주어 소독과정을 진행하였다. 소독 후 인간 관상동맥 내피세포(Human coronary artery endothelial cell, HCAECs)를 8,00 cells/cm² 비율로 도포하였다. 약 3시간 후 세포 배양액을 스캐폴드가 잠길 수 있을 만큼 충분히 주입시켰으며, 이후 1일, 7일에 MTT assay를 통해 세포의 증식을 확인함으로써 세포독성을 확인하였다. 스캐폴드가 잠겨있는 배양액에 10 %의 MTT ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)) 용액을 첨가 한 후 1시간 후에 DMSO (Dimethyl

sulfoxide)에 formazan salt를 녹여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0055] 동일한 방식으로 진행 후 동일한 세포를 $10,000 \text{ cells/cm}^2$ 비율로 도포한 다음 동일하게 배양액을 주입하였다. 이후 3일차에 Live/Dead assay를 진행하였다. Live/Dead 용액은 Calcein-AM용액과 Ethd-1을 PBS에 용해한 용액으로 세포생존 및 사멸을 확인하기 위한 염색용액이다(도 6).

[0057] 실시예 6: 면역염색법(Immunostaining)을 통한 세포의 물리적 배향성 및 세포결합 정도 분석

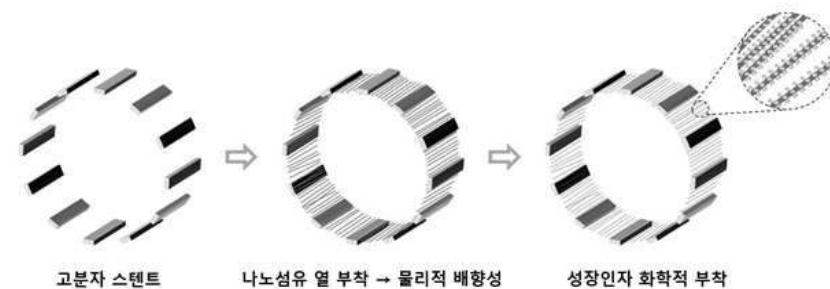
[0058] 상기 실시예 5에서와 동일하게 $10,000 \text{ cells/cm}^2$ 의 세포를 도포 후 동일한 양의 배양액을 주입하였다. 이후 3일차에 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 고정 후 PECAM-1 antibody Alexa fluor 488, rhodamine phalloidin, DAPI로 염색하였다. PECAM (CD31)은 내피세포 간의 접합부에서 다량으로 발현되며, 세포간의 접합 구조를 유지시켜주는 역할을 한다(도 7).

[0060] 실시예 7: 세포 이동 방법(Cell migration method)을 통한 세포이동 속도 변화 분석

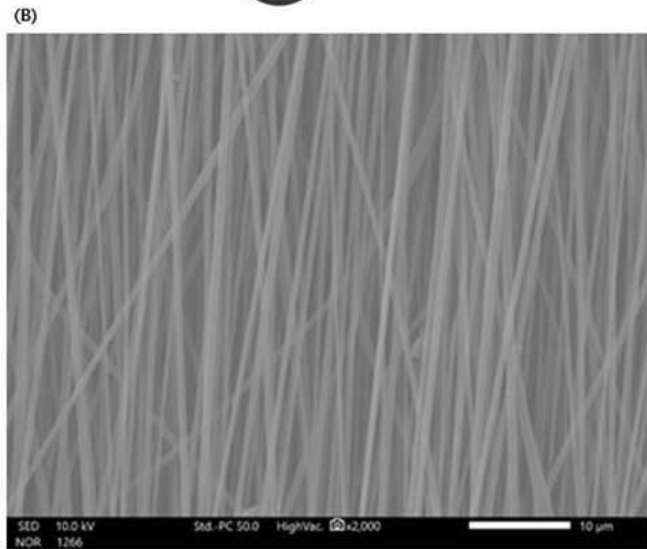
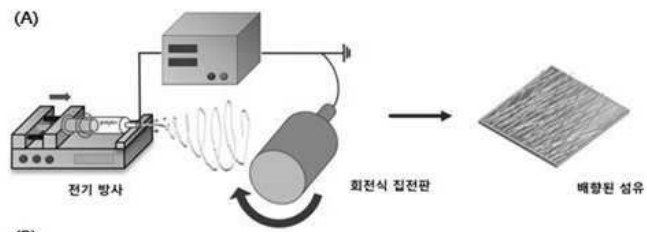
[0061] 표면처리에 의한 세포 이동 속도 변화를 분석하기 위해서 세포 이동 방법을 진행하였다. 실험은 제작된 Sample ($1 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$) 위에 PDMS로 제작한 스탬프(Stamp) (1 mm 폭)를 fiber 배향에 수직 방향으로 올려놓은 뒤 스탬프 양 옆에 인간 관상동맥 내피세포를 각 30,000 세포씩 살포(Seeding)하였다. 살포 후 24시간에 스탬프를 제거하였으며, 제거 후 24시간 이후에 상기 실시예 5에서와 동일하게 Calcein-AM용액을 이용하여 염색 후 관찰하였다(도 8).

도면

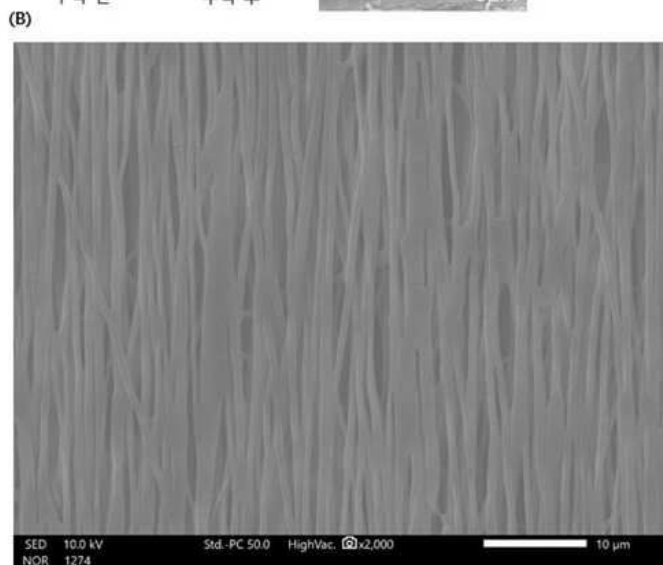
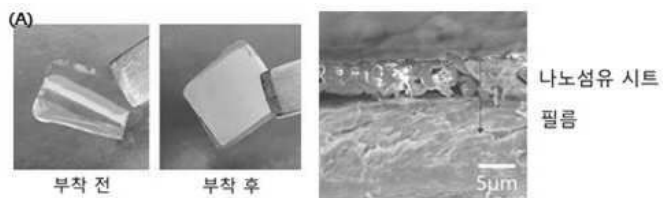
도면1



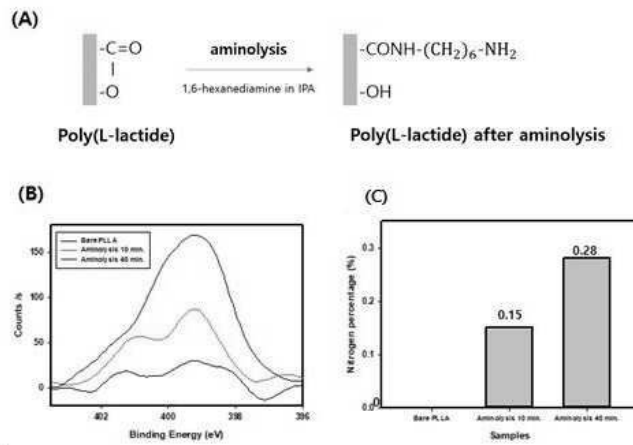
도면2



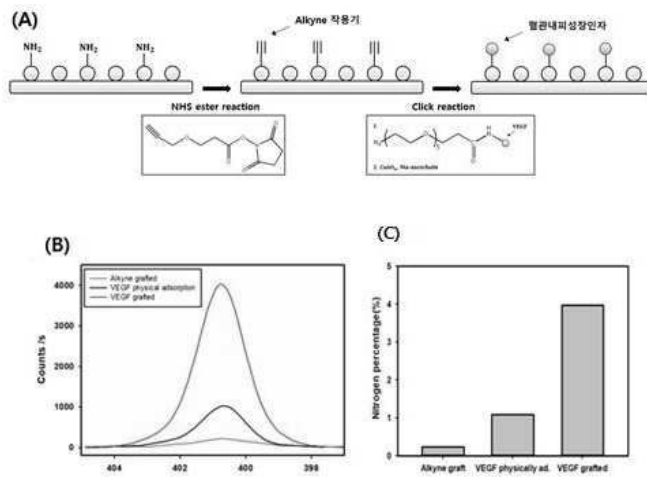
도면3



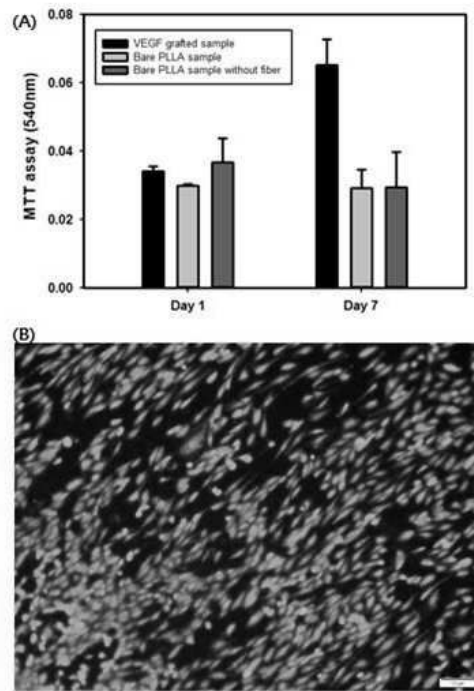
도면4



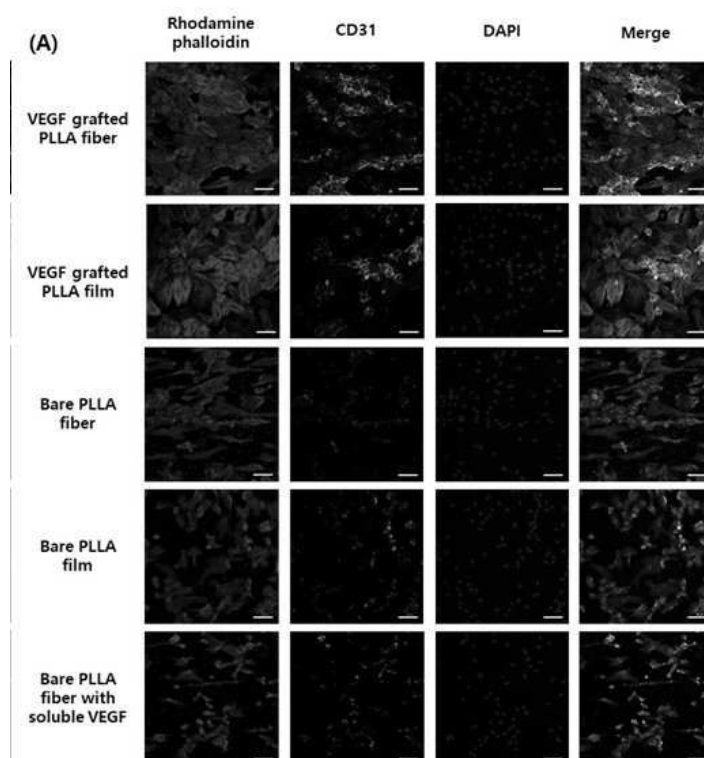
도면5



도면6



도면7



도면8

