

## 전기방사된 나노파이버 매트를 이용한 약물전달시스템에 관한 연구

윤 현 · 박윤경\* · 김근형†

바이오/나노유체실험실, 조선대학교 기계공학과, \*조선대학교 생명공학과  
(2008년 12월 5일 접수, 2009년 1월 14일 수정, 2009년 1월 28일 채택)

### Drug Delivery System Using Electrospun Nanofiber Mats

Hyeon Yoon, YoonKyung Park\*, and GeunHyung Kim†

Bio/Nanofluidics Lab., Dept. of Mechanical Engineering,  
Chosun University, Gwangju 501–759, Korea

\*Department of Biotechnology and BK21 Research Team for Protein Activity  
Control, Chosun University, Gwangju 501–759, Korea

(Received December 5, 2008; Revised January 14, 2009; Accepted January 28, 2009)

**초록:** 전기방사 공정을 이용하여 제조된 나노파이버는 나노 소자, 필터, 방호복, 향균성 드레싱 및 약물전달 등 다양한 분야에서 이용되고 있다. 약물전달시스템(drug delivery system, DDS)은 기존 의약품의 부작용을 최소화하며 그 효능 및 효과를 극대화할 수 있어야 하고 필요한 양의 약물을 원하는 환부에 효율적으로 전달할 수 있어야 한다. 본 연구에서는 전기유체역학공정의 하나인 전기방사공정을 이용하여, poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL), poly(ethylene oxide) (PEO)를 나노파이버 매트로 만들었으며, 고분자와 동시 방사된 Rhodamine B의 방출량을 측정하였다. PCL/Rhodamine B/PEO/PCL 나노파이버 매트는 전기방사 시간을 통한 두께 조절을 통하여 약물전달 거동이 조절될 수 있음을 확인하였으며, 실제 peptide를 PEO와 동시 전기방사시켜 얻어진 나노파이버 peptide가 방출되는 거동을 확인하였다. PCL/peptide/PEO/PCL시스템에서 방출된 peptide는 약물방출 시험 후에도 약물로서의 활성도를 잃지 않았으며, 이러한 나노파이버를 이용한 peptide 방출메커니즘은 새로운 약물전달시스템으로 적용 및 응용될 수 있을 것으로 예상된다.

**Abstract:** The nanofibers fabricated by using an electrohydrodynamic process has been used as various applications, such as nano-device, filtering system, protective clothes, wound dressing, and drug delivery system (DDS). Of these applications, the DDS should be needed to minimize side effects of drugs, maximize the properties of medicine, and efficiently deliver the required amount of drugs to the diseased area. In this paper, by using the electrospinning process, which is one of electrohydrodynamic processes, two different types, polycaprolactone and poly(ethylene oxide)/Rhodamine B, of electrospun mats were fabricated layer by layer and the release behavior of Rhodamine B was characterized with time. In addition, to show the feasibility of DDS of this type, we tested release behavior of a peptide of the nanofiber system, a PCL/(Peptide+PEO)/PCL nanofiber mat. The released peptide did not loss biological activities. From these results, we believe that the layered nanofiber mat as a DDS has enough function of a new drug delivery system.

**Keywords:** drug delivery system, nanofiber, electrospinning, PCL, PEO.

## 서 론

최근 신약들의 특허가 대부분이 만료되고 이에 따라 특허를 연장하기 위해 새로운 약물전달시스템(drug delivery system)을 개발하여 약물을 인체에 투여하는 기술 개발이 이슈가 되고 있다. 또한, 새로운 약물전달시스템은 기존의 약물투여 방식에 비해 약물 방출의 농도 및 시간 등을 조절할 수 있는 기능을 제공한다.

현재 사용되는 기존 전통적인 약물전달은 경구 또는 정맥(intra-

venous) 주사 등을 통해서 이루어 졌으며 이에 따라 혈액내의 약물 농도가 필요 이상으로 높아지거나 필요 이하로 낮아지게 되는 등 부작용을 일으킬 수 있는 조건이 형성됨에 따라 지속적인 약물의 투여가 필요하게 되는 등 많은 문제점이 발생하고 있다. 약물전달시스템의 초기 기술은 반복투여 횟수를 줄이기 위한 방법으로 고안된 지속방출 시스템(sustained release)이 그 모델이었다. 그러나, 이러한 약물의 방출속도 제어만으로는 다양한 제형 및 적합한 약물 농도를 유지하는 데는 많은 어려움이 있었다.<sup>1,2</sup>

현재는 이러한 부작용의 단점을 보완하기 위한 많은 방법들이 새로운 약물전달시스템이 개발되고 있으며 미국과 일본을 중심으로 신

†To whom correspondence should be addressed.  
E-mail: gkim@chosun.ac.kr

약개발의 위험성을 줄이면서도 신약과 동일한 파급효과를 일으킬 수 있는 새로운 개념의 약물전달시스템 개발에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 또한, 마이크로 및 나노 입자를 이용한 약물전달시스템이 활발히 연구되고 있다.

미세가공기술은 다양한 형태의 이식용, 구강용 약물전달장치의 제작을 가능하게 하였지만 이러한 대부분의 약물전달 장치들은 실리콘을 기반으로 하고 있으며, 이러한 재료는 자연 분해되지 않기 때문에 또 한번의 외과적인 수술을 통하여 제거해야 하는 단점이 있다. 그러나, 현재는 생분해성, 생체적합성 고분자를 이용하여 적정 시간 및 농도를 유지하며 약물을 방출하는 약물전달시스템의 연구가 활발히 진행되고 있으며 이러한 생분해성 고분자를 기반으로 하는 제작 기술에는 복제 기술(replication technique), 쾌속 조형 기술(rapid prototyping technique), 레이저 미세 가공(laser micromachining) 등이 있다.<sup>1</sup> 이러한 생분해성, 생체적합성 고분자를 사용하게 되면 고분자 matrix를 제거해야 하는 번거로운 과정을 줄일 수 있으며 고분자가 분해되는 시간 동안 그 약물의 방출 속도 및 농도 등을 조절할 수 있게 된다.

현재의 DDS는 과거 몇 년 동안 기존의 DDS에 비하여 약물의 전달효과, 부작용의 감소 등의 비약적인 발전을 하였다. 그 중 최근에는 전기방사공정을 이용하여 얻어진 나노파이버를 이용한 DDS가 연구되었다.

일반적으로, 전기방사공정은 고전압의 정전기력(electrostatic force)에 의해 낮은 점도 상태의 고분자를 고분자내의 표면장력보다 큰 정전기력을 가함으로써 순간적으로 파이버형태로 방사(spinning)하는 공정을 말한다. 이러한 공정을 통하여 얻어진 나노파이버는 기존의 용융공정에 의해서 얻어진 파이버에 비해 큰 표면적을 가지는 것이 특징이며, 이러한 특징으로 인해 필터, 방호복, 항균성 드레싱, 약물전달 물질 등에 이용되고 있다. 특히 나노파이버를 이용한 DDS는 특정 부위에 약물을 전달할 수 있으며 나노파이버의 넓은 표면적과 다공성 구조 등으로 의약품, 바이오센서, 조직 공학, 항미생물 물질 혹은 막, 태양 전지 등에도 응용되고 있다.<sup>3</sup> 약물을 함유하고 있는 나노파이버 매트트는 미래의 바이오 응용분야에 이용될 것으로 예상되며, 특히 local chemotherapy에 이용될 것으로 예상되고 있다. 기존의 DDS의 경우는 나노/마이크로 크기의 리포솜(liposome), 수화젤(hydrogel) 등을 사용하였으며 이것은 잘 터지는 문제점을 이용하여 마이크로 크기의 균일한 pore들을 이용하여 DDS로의 기능을 잘 수행할 수 있게 하였다.<sup>4-7</sup>

현재는 poly(lactic acid) 등을 이용한 생분해성의 고분자 물질을 이용한 DDS가 활발히 연구되고 있으며 최근에는 항암 물질을 약물전달시스템과 결합하여 사용을 시도하고 있으며 특히 수술 후 수술 부위에서 약물전달 매개체로 전기방사된 나노파이버를 이용하고 있다.<sup>8</sup> 이러한 약물전달 나노섬유는 크게 두 가지의 형태(matrix-type과 reservoir-type)를 사용하며 이 중에서 reservoir-type은 또한 두 가지로 나뉘며 core part에 형상에 따라 pure drug를 이용하는 방법과 drug solution을 이용하는 방법이 있다.<sup>8</sup>

본 연구에서는 제조 방법이 어려운 기존의 나노파이버의 core/shell 구조를<sup>8</sup> 이용한 약물전달시스템을 사용하지 않고, 매트형태의 나노파이버를 친수성의 고분자 물질과 함께 방사하여 제작하였고, 이들에 대한 약물의 방출을 소수성의 고분자 나노파이버 매트를 이용하여 조정

하는 시스템을 사용하였다. 사용된 고분자 물질은 생체적합성 및 생분해성 고분자인 PCL과 PEO를 전기방사 공정을 통하여 Rhodamine B와 같이 전기방사하여 *in vitro*로 상태에서 시간이 경과함에 따라 Rhodamine B의 방출되는 양을 측정함으로써 약물전달시스템으로서의 효용성을 확인하였다.<sup>9</sup> PCL/Rhodamine B/PEO/PCL의 전기방사의 시간을 통한 두께 조절을 통하여 약물전달 거동을 확인하였다. 또한, 실제 peptide를 PEO와 동시 전기방사를 함으로써 peptide가 방출되는 거동을 확인할 수 있었다.

## 실 험

**재료.** 본 연구에서는 PCL( $M_w=80000$ , Aldrich)과 PEO( $M_w=900000$ , Aldrich), Rhodamine B( $M_w=479.02$ , Fluka)를 사용하였으며 DMF(*N,N*-dimethyl formamide, Junsei Chemical co.), MC(methylene chloride, Junsei Chemical co.) 및 3<sup>rd</sup> distilled water를 용매로 사용하였다. DDS의 약물로 사용된 peptide는 Helicobacter pylori를 origin으로 하며 amino sequence를 일부 치환하거나 N, C-terminal에서부터 일부를 제거하여 항생제의 효과를 증가시키며 *in vitro*에서 그 독성을 최소화할 수 있도록 조절한 합성 peptide, HPA3NT3(amino acid sequence: FKRLKFLFKKIWNWK) 항생펩타이드(antibacterial peptide)이며, 전기방사에서 고분자 물질과 함께 방사한 후 이용하였고 방사된 peptide의 활성도를 측정함으로써 나노파이버를 전기방사할 때 전기장이 약물의 활성도에 미치는 영향을 실험하였다.<sup>10</sup>

**실험 조건 및 장비.** 전기방사를 위한 고분자 용액은 8 wt% PCL, 73.55 wt% MC, 18.45 wt% DMF를 사용하였고 2 wt% PEO와 0.01 wt% Rhodamine B, 98 wt% 3rd DW를 혼합하여 사용하였다. Peptide의 경우는 10 mg을 PEO solution과 혼합하여 사용하였다. 기본적인 전기방사장치의 구성 요소로는 고전압공급장치(high voltage power supply, HVPS, SHV200 40 kV/5 mA, Converttech), 시린지 펌프(syringe pump, model 781100, KDSscience), 노즐(nozzle), 콜렉터(collector)를 사용하였으며 노즐의 위치는 콜렉터로부터 150 mm 떨어진 곳에서 지면과 수직으로 방사하였고 각각의 고분자를 일정 시간 동안 방사하여 적층하는 방식을 사용하였다(Figure 1).

**분석.** 나노파이버의 직경을 측정하기 위하여 sputter(E-1030, Hitachi)를 사용하여 15 mA로 60초 동안 7 nm의 백금(pt)코팅을 하였으며 주사전자현미경(SEM, S-4800, Hitachi)을 이용하여 1000 배에서 나노파이버를 관찰하였다. 방출된 Rhodamine B의 양을 측정하기 위해 pH 7.4의 phosphate buffer(PBS)에 넣어 상온에서 방출되는 양을 시간별로 회수하여 spectrophotometer를 사용하여 543 nm의 파장에서 주기적으로 측정하였다.<sup>11</sup>

**Released Rhodamine B.** 나노 섬유로 만들어진 Rhodamine B를 20 mL의 pH 7.4 PBS(phosphate buffered saline)에 넣어 상온에서 방출 시간에 따라 일정량(1 mL)을 회수하여 spectrophotometer를 이용하여 543 nm의 파장에서 측정하였고 측정 후 다시 넣어 항상 20 mL의 volume을 유지할 수 있도록 하였다.

**Bichinonic Acid(BCA) Assay.** 방출되는 peptide의 농도를 측정하기 위하여 BCA working solution을 만든 후 시간에 따라 방출된 peptide 20  $\mu$ L를 working solution 1 mL첨가하여 30분간 60  $^{\circ}$ C

에 반응시킨다. 그 후 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후 562 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**Antibacterial Activity Assay.** DDS로 사용하기 위해 방사된 peptide (HPA3NT3)의 활성을 측정하였다. 측정 방법에 사용된 박테리아는 *E.coli*를 각각  $1 \times 10^6$  cfu/mL 이용하였으며 37 °C에서 Luria-Bertani (LB) agar 배지에 24시간 동안 배양하여 colony의 형성을 관찰하였다. Normal peptide와 released peptide를 1%의 bactopeptone에 동일 농도로 희석 후 *E.coli*를 혼합하였으며 이를 배지에 도말하여 세포의 성장을 관찰하였다.

### 결과 및 토론

나노파이버가 방사되는 초기젯(initial jet) 및 whipping motion을 비교하였을 때 PCL과 PEO/RM 모두 initial jet의 길이는 약 81 mm로 큰 차이가 없는 것을 실험상으로 확인하였으며 그와 대조적으로 각각의 whipping motion의 경우는 그 영역에 있어 많은 차이를 보였다. PCL solution의 경우는 약 52 mm로 측정되었으며 PEO의 경우는 160~200 mm로 약 3배에서 4배 이상의 차이를 보였다. 그 이유는 PEO/RM solution의 전기전도도가 PCL보다 훨씬 높기 때문일 것으로 예상되었다. 이러한 whipping 영역에 따른 제작된 나노파이버의 불균일성을 극복하기 위하여 plate collector를 0.3783 m/sec의 속도로 회전을 시켜 유니폼한 형태의 매트를 제작하였다.

나노파이버의 방사 각각의 적층 조건에 따른 적층 시간 및 순서는 Table 1과 같으며 PCL의 적층 시간을 달리함으로써 방출되는 양을 조절할 수 있었다.

제작된 PCL 나노파이버는 직경이 마이크로/나노 크기로 만들어

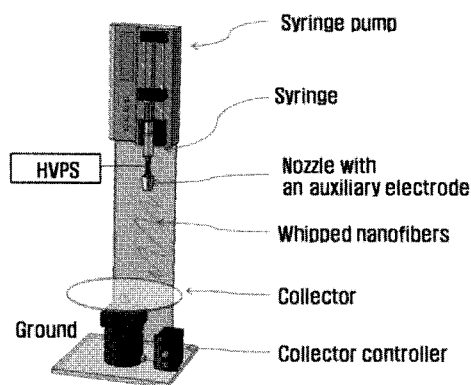
졌으며 각 조건에서 나노파이버의 평균직경은 약 0.75~1 μm 정도의 범위를 가졌으며 전자현미경을 이용하여 얻어진 전기방사 나노파이버 이미지를 통하여 나노파이버의 직경을 측정하였다. 제작된 PEO/Rhodamine B의 파이버 평균 직경은 500 nm임을 알 수 있었다. 매트의 두께는 적층 시간이 증가함에 따라서 두꺼워지는 것을 확인하였으며 적층 시간에 2차 함수 형태로 증가되었다. 이러한 이유는 시간이 증가함에 따른 제작된 나노파이버의 전하량이 계속 쌓이면서 발생된 원인으로 예상된다.

Figure 2는 나노파이버 매트의 SEM 이미지며 만들어진 나노파이버의 직경 및 전체 매트에 걸친 두께 균일성은 안정하에 형성됨을 알 수 있었다.

Figure 3은 각각 3가지 조건으로 제작된 나노파이버 매트에 있는 Rhodamine B의 방출량을 측정된 결과이다. 시간이 경과함에 따라서 Rhodamine B의 방출량이 증가하는 것을 확인하였으며, PCL층의 적층 시간을 통하여 제작된 다양한 두께에 따라 그 방출량 및 방출거동이 얻어짐을 알 수 있었다. 방출되는 Rhodamine B의 양을 시간에 따라 spectrophotometer를 이용하여 측정하였으며 방출량은 시간이 증가함에 따라 그 양이 축적되어 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

PCL/Rhodamine B/PEO/PCL 시스템에서 PCL층의 두께를 다르게 함으로써 약물의 방출량을 조절할 수 있음을 확인하였고, 이에 따라 항생 단백질을 이용하여 방출량 및 활성을 측정하기 위하여 다음과 같은 조건으로 실험을 하였다(Table 2).

Peptide의 방출 시간을 조절하기 위하여 PCL층의 적층 시간을 줄임으로써 빠른 시간 내에 peptide가 방출되도록 하였다. Figure 4는 peptide의 방출거동을 도시한 그래프이다. 약 2시간 경과 후 대부분의 peptide가 방출되었음을 알 수 있었다.

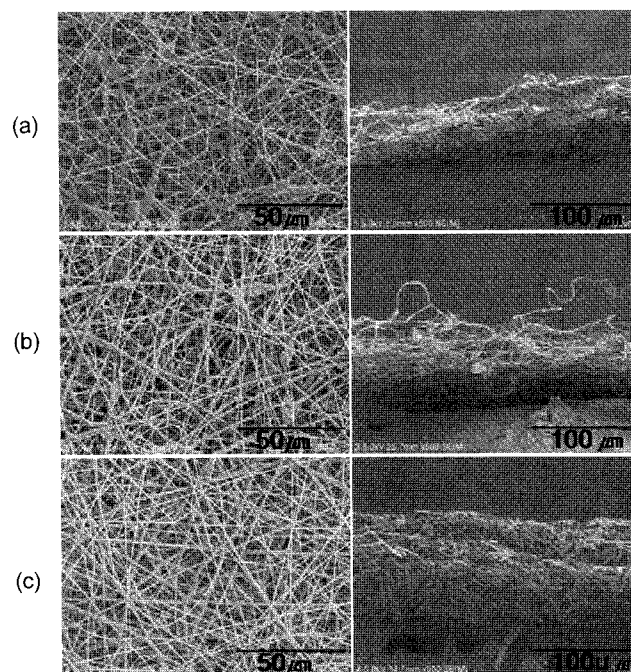


**Figure 1.** A schematic of electrospinning process to fabricate nanofiber mats layer by layer.

**Table 1. Deposition Time of PCL, PEO/Rhomamine B, and PCL and Average Diameter of the Electrospun Nanofibers and Thickness of the Fabricated Mats**

	Deposition time (min)			Average diameter (μm)	Thickness of mat (μm)
	PCL	PEO/RM	PCL		
A	10	5	10	0.95 ± 0.46	36.67
B	30	5	30	0.78 ± 0.35	68.46
C	60	5	60	0.85 ± 0.34	176

RM : Rhodamine B.



**Figure 2.** SEM images of electrospun fibers and thickness of fabricated mats: (a), (b), and (c) numbers are the fabricating conditions of the electrospun mats, which were described in Table 1.

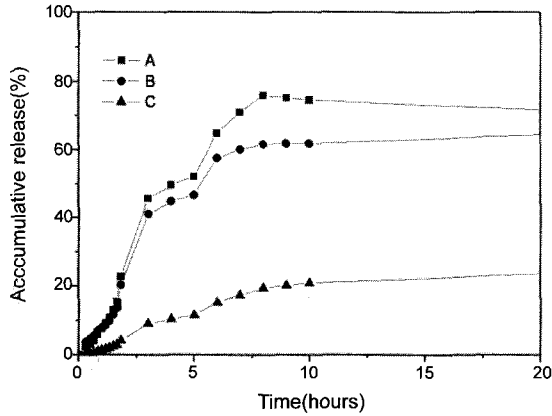


Figure 3. Accumulative release percent of Rhodamine B of the fabricated nanofiber mats.

Table 2. Deposition Time of PCL, PEO/Peptide, and PCL

Electrospun fiber	PCL	PEO/Peptide	PCL
Deposit time (min)	1	10	1

Peptide : HPA3NT3.

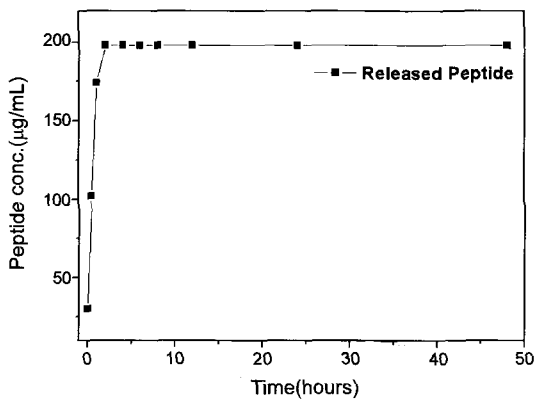


Figure 4. Release behavior of peptide of the fabricated nanofiber mats.

Figure 5는 방출된 peptide의 활성을 측정하기 위하여 *E. coli*를 이용하여 Luria-Bertani (LB) agar 배지에 24시간 배양을 하였으며 peptide의 항생제 활성도를 측정된 결과이다. Peptide의 투여량은 Table 3과 같으며 A는 peptide를 처리하지 않은 배지에 세포를 배양 것이며 B와 C는 normal peptide를 처리하여 세포를 배양한 것이며 D와 E는 released peptide를 처리하여 세포를 배양한 것이다.

Figure 5에서 알수 있듯이, *E. coli*를 이용한 활성도 실험에서 방사 전의 peptide(B와 C)와 방사후의 방출된 peptide(D와 E)의 활성도를 비교하였을 때 방사후의 방출된 peptide도 전기방사 과정에 의해 활성도가 낮아지거나 문제가 되지 않는 것으로 확인되었다.

결 론

본 연구에서는 전기방사공정을 이용하여 PCL, PEO/Rhodamine B를 나노파이버 매트로 만들었으며, 상온의 PBS에서 Rhodamine B

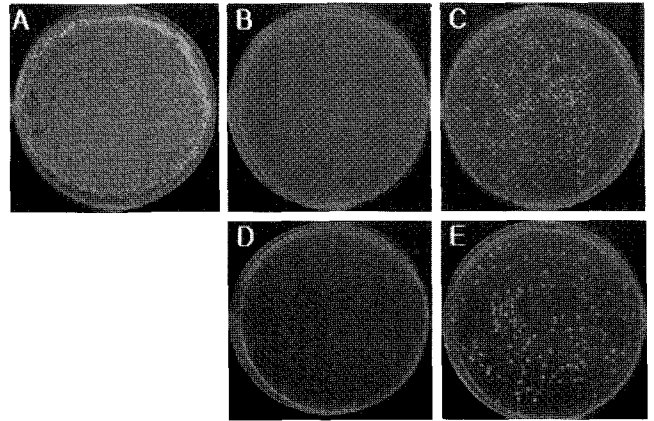


Figure 5. Biological activity test of a peptide using *E. coli*.

Table 3. The Concentration of a Peptide for Testing Biological Activities (peptide µg/mL)

Conc.	Control	Peptide		Released peptide	
	A	B	C	D	E
	0	12.5	6.25	12.5	6.25

의 방출량을 시간에 따라 측정, DDS로써 사용 가능성이 있는 나노파이버 매트를 제작하였다. 나노파이버 매트에서 Rhodamine B의 방출량을 PCL 나노파이버의 방사 적층 두께에 따라 시간별로 측정하였으며 적층 두께의 증가 등에 따라 Rhodamine B의 방출량 및 거동이 서로 다르게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 또한, peptide를 PEO와 동시 전기방사시켜 peptide가 방출되는 거동을 확인하였고, PCL/peptide/PEO/PCL 시스템에서 방출된 peptide를 약물로써 사용할 수 있는지 확인하기 위하여 그 활성을 antibacterial activity assay를 이용하여 측정하였다. 실험 결과 방출된 후 peptide의 활성도가 전혀 감소되지 않았으며 PCL의 적층 두께에 따라 Rhodamine B의 방출 거동과 유사하게 peptide가 방출되는 양을 조절할 수 있을 것으로 예상된다. 이를 이용하여 원하는 농도, 시간에 따라 약물을 방출시킬 수 있는 새로운 약물전달시스템의 매개체로 사용할 수 있을 것으로 예상된다. 또한, 환자의 환부에 약물이 함유된 나노파이버 패치를 사용할 때 나노파이버의 자체의 보호 및 필터 기능으로 인하여 세균 감염을 막을 수 있으며<sup>12</sup> 한번의 시술로 효과적, 지속적으로 약물전달을 할 수 있을 것으로 예상된다.

감사의 글: 이 논문은 2009학년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음.

참 고 문 헌

1. W. S. Cho, S. G. Kim, S. H. Ahn, W. S. Ha, and S. C. Ji, *Korean Society for Precision Engineering*, **23**, 21 (2006).
2. G. M. Hur, *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **5**, 145 (2008).
3. E. R. Kenawy, F. I. Adbel-Hay, M. H. El-newehy, and G. E. Wnek, *Mater. Chem. Phys.*, doi:10.1016/j.matchemphys.

- 2005.07.081 (2008).
4. J. Zeng, X. Xu, X. Chen, Q. Liang, X. Bian, L. Yang, and X. Jing, *J. Control. Release*, **92**, 227 (2003).
  5. E. R. Kenawy, G. L. Bowlin, K. Mansfield, J. Layman, D. G. Simpson, E. H. Sanders, and G. E. Wnek, *J. Control. Release*, **81**, 57 (2002).
  6. J. Zeng, L. Yang, Q. Liang, X. Zhang, H. Guan, X. Xu, X. Chen, and X. Jing, *J. Control. Release*, **105**, 43 (2005).
  7. Y. K. Luu, K. Kim, B. S. Hsiao, B. Chu, and M. Hadjiargyrou, *J. Control. Release*, **89**, 341 (2003).
  8. X. Xu, X. Chen, P. Ma, X. Wang, and X. Jing, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **70**, 165 (2008).
  9. K. Lin, K. N. Chua, G. T. Christopherson, S. Lim, and H. Q. Mao, *Polymer*, **48**, 6384 (2007).
  10. S. C. Park, M. H. Kim, M. A. Hossain, S. Y. Shin, Y. M. Kim, L. Stella, J. D. Wade, Y. K. Park, and K. S. Hahn, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1778**, 229 (2008).
  11. E. R. Kenawy, F. I. Abdel-Hay, M. H. E. Newehy, and G. E. Wnek, *Mater. Sci. Eng. A*, **459**, 390 (2007).
  12. G. H. Kim and H. Yoon, *Appl. Phys. A*, **90**, 389 (2008).