(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0127324
(43) 공개일자 2011년11월25일

(51) Int. Cl.
A61F 2/02 (2006.01) *A61L 27/22* (2006.01)
C08J 3/205 (2006.01) *C08L 89/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0046741
(22) 출원일자 2010년05월19일
심사청구일자 2010년05월19일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원 춘천시 한림대학길 39 한림대학교
대한민국(농촌진흥청장)
경기 수원시 권선구 서둔동 250번지
인하대학교 산학협력단
인천 남구 용현동 253 인하대학교
(72) 발명자
최수영
강원 춘천시 후평3동 동아아파트 105-706
음원식
강원 춘천시 후평2동 904번지 포스코더샵아파트 112동 802호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
강성혜

전체 청구항 수 : 총 10 항

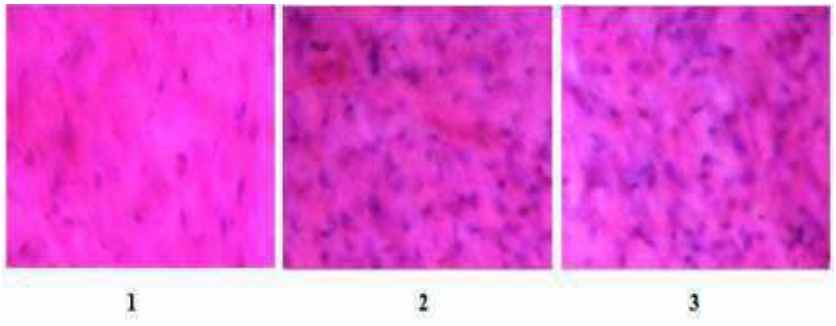
(54) 실크 피브로인으로부터 제조되는 인공 뇌경막 및 그 제조방법

(57) 요 약

목적: 본 발명은 뇌척수액이 누수되지 않고, 종래 인공경막과는 달리 생체적합성이 우수하여 세포독성이 없고 수술시 염증을 유발하지 않으면서 투명하여 수술시 안전성을 담보할 수 있는 실크피브로인을 주요 구성 요소로 하는 인공경막을 제공하는 것이다.

방법: 본 발명자들은 누에(*Bombyx mori*)로부터 얻은 실크 피브로인을 이용하여 투명한 인공 뇌경막을 제조하였고, 인비트로 및 인비보에서 세포독성 및 염증저해효과를 시험하였다. 실크 피브로인 인공 뇌경막을 가지고 뇌경막재생수술을 동물 모델에 실시하였다. 염증은 조직학적 시험 및 웨스턴 블랏팅으로 측정하였다. 본 발명의 실크 피브로인을 이용한 새로운 인공 뇌경막은 세포 내에서 세포 독성을 나타내지 않았고, 래트에서 일반적인 종래의 뇌경막 재료인 음성대조군과 비교하여 차이가 없었다. 또한, 실크 피브로인 뇌경막은 래트에서 COX-2와 iNOS 발현을 효과적으로 감소시켰다.

대 표 도 - 도5



(72) 발명자

박진서

강원 춘천시 후평3동 동아아파트 105동 1404호

장상호

강원도 춘천시 옥천동 1-1 한림창업보육센터(바이오셀트란)

김대원

서울특별시 강남구 대치동 316 은미아파트 19동 103호

조용준

강원도 춘천시 석사동 대우아파트 110-802

조성민

강원도 춘천시 석사동 현진아파트 111-901

신승훈

강원도 춘천시 칠전동 대우아파트 103-503

권해용

경기도 수원시 영통구 망포동 망포마을현대2차아이파크아파트 201-1601

이광길

경기도 수원시 권선구 탑동 42-1 우방APT 105동 203호

강석우

경기도 화성시 반송동 79 우남퍼스트빌 350동 1903호

진형준

서울특별시 양천구 신정6동 신시가지 APT 1305동 206호

조세연

인천광역시 남구 용현동 187-1 다가구주택 402호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ007170201004

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관

연구사업명 2010 바이오그린21사업

연구과제명 척추체 압박골절용 인공시멘트와 인공 뇌경막 개발

기여율

주관기관 한림대학교산학협력단

연구기간 2010년 01월 01일 ~ 2010년 12월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

실크 피브로인으로부터 제조된 인공 뇌경막

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 인공 뇌경막은 탄소나노튜브 및 섬유질로 이루어진 그룹 중 선택된 1종 이상을 0중량% 초과 ~ 20중량% 이하로 더 함유함을 특징으로 하는 인공 뇌경막

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 인공 뇌경막은 콜라겐, 젤라틴, 키틴, 키토산, 케라틴, 셀룰로오스, 피브로넥틴, 엘라스틴, 피브리노겐, 피브로모듈린, 라미닌, 테나신, 비트로넥틴, 알지네이트, 히알루론산, 실크 프로테인 및 그들의 유도체, 아가로스, 폴리락산(polylactic acid; PLA), 폴리글리콜산(polyglycolic acid; PGA), 폴리락산과 폴리글리콜산의 공중합체(PLGA), 폴리카프로락톤(polycaprolactone; PCL), 폴리{폴리(에틸렌옥사이드)테레프탈레이트-co-부틸렌테레프탈레이트}(PEOT/PBT), 폴리포스포에스터(polyphosphoester; PPE), 폴리포스파젠(PPA), 폴리안하이드라이드(Polyanhydride; PA), 폴리오르쏘에스터{poly(ortho ester; POE}, 폴리(프로필렌푸마레이트)-디아크릴레이트{poly(propylene fumarate)-diacrylate; PPF-DA} 및 폴리에틸렌글라이콜디아크릴레이트{poly(ethylene glycol) diacrylate; PEG-DA}로 이루어진 그룹 중에서 선택된 1종 이상을 0중량% 초과 ~ 30중량% 이하로 함유함을 특징으로 하는 인공 뇌경막

청구항 4

청구항 1에 있어서,

항생제, 항바이러스제, 항균제, 핵산, 펩타이드 및 단백질 중 선택된 1종 이상이 부가되는 것을 특징으로 하는 인공 뇌경막

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 인공 뇌경막은 인장강도가 20~80MPa임을 특징으로 하는 인공 뇌경막

청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 인공 뇌경막은 캐스팅법으로 제조된 것임을 특징으로 하는 인공 뇌경막

청구항 7

실크 피브로인 수용액을 매끄럽고 평평한 곳에 캐스팅하여 건조시키는 단계; 및

상기 건조된 실크 피브로인의 결정화를 유도하는 단계;를 포함하는 실크 피브로인으로부터 제조되는 인공 뇌경막 제조방법

청구항 8

청구항 7에 있어서,

상기 결정화 유도 단계는 상기 건조된 실크 피브로인을 상대습도 80% 이상인 폐쇄 용기에 넣어 수분으로 어닐링(annealing)하는 것임을 특징으로 하는 방법

청구항 9

청구항 7에 있어서,

상기 결정화 유도 단계는 상기 건조된 실크 피브로인을 탄소수 4 이하의 친수성 극성용매와 증류수를 70~90:10~30 중량비로 혼합한 용액에 담그는 것임을 특징으로 하는 방법

청구항 10

청구항 7에 있어서,

상기 실크 피브로인 수용액에는 콜라겐, 젤라틴, 키틴, 키토산, 케라틴, 셀룰로오스, 피브로넥틴, 엘라스틴, 피브리노겐, 피브로모듈린, 라미닌, 테나신, 비트로넥틴, 알지네이트, 히알루론산, 실크 프로테인 및 그들의 유도체, 아가로스, 폴리락산(polylactic acid; PLA), 폴리글리콜산(polyglycolic acid; PGA), 폴리락산과 폴리글리콜산의 공중합체(PLGA), 폴리카프로락톤(polycaprolactone; PCL), 폴리{폴리(에틸렌옥사이드)테레프탈레이트-co-부틸렌테레프탈레이트}(PEOT/PBT), 폴리포스포에스터(polyphosphoester; PPE), 폴리포스파젠(PPA), 폴리안하이드라이드(Polyanhydride; PA), 폴리오르쏘에스터{poly(ortho ester; POE}, 폴리(프로필렌푸마레이트)-디아크릴레이트{poly(propylene fumarate)-diacrylate; PPF-DA} 및 폴리에틸렌글라이콜디아크릴레이트{poly(ethylene glycol) diacrylate; PEG-DA}로 이루어진 그룹 중에서 선택된 1종 이상이 더 함유됨을 특징으로 하는 방법

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신경외과 분야에서 뇌경막 결손 보충에 사용하는 인공 뇌경막 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 뇌신경 외과 수술을 받아야하는 환자 중에서 일부 환자는 손실된 뇌경막을 인공 뇌경막으로 보충하고 뇌를 봉하여 대뇌에 한 층의 보호층을 형성시켜 뇌수술 후 대뇌 감염을 감소시켜야 한다. 두개골과 뇌 사이 또는 척수를 덮도록 개재되는 뇌경막(腦硬膜)은 주로 뇌, 척수의 보호와 뇌척수액의 누출을 방지하는 기능을 수행한다. 뇌신경외과 분야의 수술에서는 통상 뇌경막을 파손시켜 그 아래의 뇌신경 조직에 대해 수술을 수행해야 하므로 수술 후에는 파손된 뇌경막을 보충 또는 재생(repair)할 필요가 있고, 종래는 이러한 목적으로 인간 뇌경막의 감압동결건조물이 사용되어 왔다.

[0003] 그러나, 인간 뇌경막 감압동결건조물은 제품의 균일성이 확보되지 않으며, 공급이 어렵고, 또한 인간 뇌경막을 통한 크로이츠펠트-야콥병 감염 가능성이 보고되어 현재는 사용이 금지된 상태이다.

[0004] 대안으로서 여러 가지 합성 재료를 이용한 인공 뇌경막이 개발되고 있다. 예컨대, 실리콘 재질의 인공 뇌경막이 개발되었으나 비분해성이기 때문에 체내에 영구적으로 잔류하여 주변조직에의 만성적인 자극원이 되어 부작용을 일으킨다고 보고되었다.

[0005] 이후 생체 적합성 재료를 이용하여 제조한 인공 뇌경막이 있는데, 콜라겐(Journal of Biomedical Materials Research: Vol. 25 267-276, 1991) 또는 젤라틴(뇌와 신경; 21, 1089-1098, 1969) 소재 인공 뇌경막이 그것이다. 그러나, 이들 인공 뇌경막은 생체 뇌경막과 봉합시킬 때 충분한 봉합강도를 얻을 수 없다는 문제점이 제기되어 실용화되지 못하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 종래 인공 뇌경막과 달리 생체에 적합하고 투명하여 뇌신경외과 분야의 수술시 안전성을 담보할 수 있는 인공 뇌경막을 제공하려는 것이다.

[0007] 또한, 본 발명의 목적은 뇌신경외과적 수술시 염증을 유발하지 않고, 세포독성이 없는 인공 뇌경막을 제공하려는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명자들은 여러 가지 생체 적합성 천연 재료를 이용하여 인공 뇌경막을 제조하고 이에 대하여 염증 시험 및 세포 독성 시험 등을 수행한 결과, 실크 피브로인으로 제조한 투명 실크 피브로인 인공 뇌경막이 투명성을 갖추고 있을 뿐만 아니라, 염증을 억제하는 등 인공 뇌경막으로 적합하다고 판단되어 본 발명에 이르게 되었다.

[0009] 지금까지 자가 지방, 감압동결건조한 뇌경막 및 합성 재료와 같은 뇌경막 재료를 이용한 외과 기술이 뇌경막의 수명과 기능성을 개선시켜왔다. 대부분의 신경외과학적 처치에서는 중앙신경계에 접근하기 위하여 뇌경막을 열어야 한다. 부적절한 뇌경막 폐쇄는 생명을 위협하는 합병증을 일으킬 수 있다. 따라서, 신경외과 의사들은 개두수술 후 합병증을 막기 위해 뇌경막을 주의 깊게 치료하여야 한다고 주장해 왔으며, 적절한 뇌경막 재료 개발이 시급하게 요구되고 있다. 이상적인 뇌경막 재료는 다음과 같은 조건을 만족해야 한다: 1) 생체에 적합할 것, 2) 염증으로부터 보호할 것, 3) 뇌척수액 누수와 피질 유착(cortical adhesion)을 방지할 것, 4) 재료가 투명할 것, 5) 충분한 봉합강도. 대부분의 인공 재료들에 대하여 뇌경막 치료를 평가하였다. 그러나, 최근까지 어떠한 뇌경막 재료도 이러한 조건을 만족시키지 못했다.

[0010] 누에 유래 실크는 천연 단백질이고 생체재료로서 널리 연구되어 왔다. 실크 단백질은 다양한 의학 분야에 널리 이용되어 왔다(Altman GH, Horan R, Lu HH, Moreau J, Martin I, Richamind JC, Kaplan L: Silk matrix for tissue engineered anterior cruciate ligaments. **Biomateri. 23:**4131-4131,2002; Sofia S, Mccarthy MB, Gronowicz G, Kaplan DL: Functionalized silk-based biomaterials for bone formation. **J. Biomed. Mater. Res. 54:**139-148,2001; Lv Q, Cao C, Zhang Y, Man X, Zhu H: The preparation of insoluble fibroin films induced by degummed fibroin or fibroin microspheres. **J. Mater. Sci. Mater. Med. 15:**1193-1197,2004; Mori H, Tsukada M: New silk protein: modification of silk protein by gene engineering for production of biomaterials. **Rev. Mol. Biotechnol. 74:**95-103,2000; Chitrangada A, Ghosh SK, Kundu SC: Silk fibroin film non-mulberry tropical tasar silkworms: a novel substrate for invitro fibroblast culture. **Acta Biomateri 5:**429-437,2009). 좀더 적합한 뇌경막 재료를 찾기 위한 시도로서, 본 발명자들은 투명 실크 피브로인 뇌경막을 제조하였다. 도 1과 같이 제조된 투명 실크 피브로인 뇌경막은 수술 동안 시야를 확보해 주어 그 아래의 조직을 잘 볼 수 있도록 해준다.

[0011] Preul 등(Preul MC, Bichard WD, Spetzler RF: Toward optimal tissue sealants for neurosurgery: Use of a novel hydrogel sealant in a canine durotomy repair model. **Neurosurg 53:**1189-1199,2003)은 이상적인 뇌경막이 갖추어야 할 여러 가지 조건을 제안하였는데, 그 중 하나가 염증 반응을 저해하고, 독성이 없을 것이라는 조건이다. 그리하여 본 발명자들은 인비트로와 인비보에서 세포 생존률 및 염증에 대해 시험하였다. 성상세포를 본 발명의 투명 실크 피브로인 뇌경막에 24시간 노출시킨 후 세포 생존률은 100%였다. 이 결과는 투명 실크 피브로인 뇌경막이 세포 내에서 독성이 없음을 의미한다. 투명 실크 피브로인 뇌경막을 처리한 세포의 생존률은 음성대조군으로서 통상의 뇌경막 재료와 비교해 보면 유사하다. 또한, 투명 실크 피브로인 뇌경막을 48시간 처리했을 때도 생존률은 달라지지 않았다(데이터 나타내지 않음).

[0012] COX-2(cyclooxygenase-2)와 iNOS(inducible notric oxide) 발현이 염증 질환에서 중요한 역할을 수행한다는 것

은 잘 알려져 있다(Romanovsky AA, Ivanov AI, Petresen SR: Microsomal prostaglandin E synthase-1, ephrins, and ephrin kinases as suspected therapeutic targets in arthritis. **Ann NY Acad Sci 1069:**183-194,2006). COX-2 발현은 염증반응 동안 사이토카인을 포함하여 다양한 자극에 의하여 유도된다(Carey MA, Germolec DR, Langenbach R, Zeldin DC: Cyclooxygenase enzymes in allergic inflammation and asthma. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids** 69: 157-162, 2003). 비스테로이드 항염증제는 COX를 저해하여 프로스타글란딘 합성 및 염증을 현저히 감소시킨다(Simon LS: Actions and toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Curr Opin Rheumatol 8:**169-175,1996). 그리하여, COX-2와 iNOS 발현 억제는 염증 치료 및 염증 질환 억제에 효과적인 새로운 치료전략이 된다. 본 발명의 투명 실크 피브로인 뇌경막이 염증을 억제할 수 있는지를 알아보기 위하여 본 발명자들은 래트에서 COX-2와 iNOS 발현 수준에 미치는 투명 실크 피브로인 뇌경막의 효과를 시험하였다. 2주후 음성대조군과 비교에서 투명 실크 피브로인 뇌경막으로 치료한 래트는 웨스턴 블랏 분석에 따르면 COX-2 발현 수준이 감소하였다. 또한, iNOS 발현은 음성대조군과 유사한 수준이었다. 동일한 실험조건 하에서 본 발명자들은 조직학적 염색으로 염증을 확인하였다. 음성대조군 래트에서는 수술후 예상한 대로 염증반응이 있었다. 반면, 본 발명의 투명 실크 피브로인 뇌경막은 음성대조군 래트와 비교하여 염증을 약간 억제하였다. 이러한 결과는 투명 실크 피브로인 뇌경막이 뇌경막 치료 래트 모델에서 염증을 억제함을 가리킨다. 본 발명에서 신경외과학적 처치에 투명 실크 피브로인 뇌경막을 적용하는 것은 부작용 없이 염증을 안전하고 효과적으로 억제한다.

[0013] 본 발명은 실크 피브로인을 함유하여 제조되는 인공 뇌경막에 관한 것이다.

[0014] 또한, 본 발명은 탄소나노튜브 및 섬유질로 이루어진 그룹 중 선택된 1종 이상을 0중량% 초과 ~ 20중량% 이하로 더 함유함을 특징으로 하는 인공 뇌경막에 관한 것이다. 탄소나노튜브나 나노셀룰로스를 비롯한 섬유질은 실크 피브로인의 투명도를 유지하면서 물성을 증가시키기 위하여 본 발명의 인공 뇌경막에 20중량% 이하로 부가할 수 있다. 20중량%를 초과하는 경우 투명성 등이 저하될 수 있다.

[0015] 또한, 본 발명은 콜라겐, 젤라틴, 키틴, 키토산, 케라틴, 셀룰로오스, 피브로넥틴, 엘라스틴, 피브리노겐, 피브로모듈린, 라미닌, 테나신, 비트로넥틴, 알지네이트, 히알루론산, 실크 프로테인 및 그들의 유도체, 아가로스, 폴리락산(polylactic acid; PLA), 폴리글리콜산(polyglycolic acid; PGA), 폴리락산과 폴리글리콜산의 공중합체(PLGA), 폴리카프로락톤(polycaprolactone; PCL), 폴리{폴리(에틸렌옥사이드)테레프탈레이트-co-부틸렌테레프탈레이트}(PEOT/PBT), 폴리포스포에스터(polyphosphoester; PPE), 폴리포스파젠(PPA), 폴리안하이드라이드(Polyanhydride; PA), 폴리오르쏘에스터{poly(ortho ester; POE}, 폴리(프로필렌푸마레이트)-디아크릴레이트{poly(propylene fumarate)-diacrylate; PPF-DA} 및 폴리에틸렌글라이콜디아크릴레이트{poly(ethylene glycol) diacrylate; PEG-DA}로 이루어진 그룹 중에서 선택된 1종 이상을 0중량% 초과 ~ 30중량% 이하로 함유함을 특징으로 하는 인공 뇌경막에 관한 것이다. 본 발명의 인공 뇌경막은 실크 피브로인 100%만으로 제조할 수 있으며, 인공 뇌경막의 투명성과 물성을 해하지 않는 범위에서 생체 적합성 조직공학용 재료인 상기 재료들을 30중량% 이하로 함유시켜 복합재료로 인공 뇌경막을 제조할 수 있다. 30중량%를 초과하는 경우 투명성 등이 저하되는 문제가 발생할 수 있다. 본 발명에서 "투명", "투명성"이라는 용어는 완전한 투명 상태 외에도 막의 내부를 관찰할 수 있는 정도의 투명 상태를 포함하는 의미로 사용하였다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 인공 뇌경막에 다양한 생리활성물질을 부가할 수 있다. 생리활성물질은 특별한 제한은 없으며, 상기 인공 뇌경막의 구조 및 기능에 부정적인 영향을 미치지 않는 것이면 가능하다. 구체적인 예로는 항생제, 항바이러스제, 항균제, 핵산, 펩타이드 및 단백질 중 선택된 1종 이상을 부가한다. 항생제, 항바이러스제, 항균제 등은 인공 뇌경막의 감염을 막기 위한 것이고, 단백질로는 호르몬, 사이토카인, 효소, 항체, 성장인자, 전사조절인자, 백신, 구조단백질, 리간드 단백질, 수용체, 세포표면항원 및 수용체 길항물질로 이루어진 그룹 중 선택된 것임을 특징으로 한다.

[0017] 또한, 본 발명은 인장강도가 20~80MPa임을 특징으로 하는 인공 뇌경막에 관한 것이다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 인공 뇌경막이 캐스팅법으로 제조된 것임을 특징으로 하는 인공 뇌경막에 관한 것이다.

[0019] 또한, 본 발명은 실크 피브로인 수용액을 매끄럽고 평평한 용기에 캐스팅하여 건조시키는 단계; 및 상기 건조된 실크 피브로인의 결정화를 유도하는 단계;를 포함하는 실크 피브로인을 주재료로 하는 인공 뇌경막 제조방법에 관한 것이다.

[0020] 또한, 본 발명은 상기 결정화 유도 단계가 상기 건조된 실크 피브로인을 상대습도 80% 이상인 폐쇄 용기에 넣어

수분으로 어닐링(annealing)하는 것임을 특징으로 한다.

[0021] 또한, 본 발명은 상기 결정화 유도 단계가 상기 건조된 실크 피브로인을 탄소수 4 이하의 친수성 극성용매와 증류수를 70~90: 10~30 중량비로 혼합한 용액에 담그는 것임을 특징으로 한다. 상기 탄소수 4 이하의 친수성 극성용매로는 특별한 제한은 없으나, 대표적으로는 메탄올, 에탄올, 프로판올 등의 저급알콜이다.

[0022] 또한, 본 발명은 상기 방법에서 상기 실크 피브로인 수용액에 콜라겐, 젤라틴, 키틴, 키토산, 케라틴, 셀룰로오스, 피브로넥틴, 엘라스틴, 피브리노겐, 피브로모듈린, 라미닌, 테나신, 비트로넥틴, 알지네이트, 히알루론산, 실크 프로테인 및 그들의 유도체, 아가로스, 폴리락산(polylactic acid; PLA), 폴리글리콜산(polyglycolic acid; PGA), 폴리락산과 폴리글리콜산의 공중합체(PLGA), 폴리카프로락톤(polycaprolactone; PCL), 폴리{폴리(에틸렌옥사이드)테레프탈레이트-co-부틸렌테레프탈레이트}(PEOT/PBT), 폴리포스포에스터(polyphosphoester; PPE), 폴리포스파젠(PPA), 폴리안하이드라이드(Polyanhydride; PA), 폴리오르쏘에스터{poly(ortho ester; POE}, 폴리(프로필렌푸마레이트)-디아크릴레이트{poly(propylene fumarate)-diacrylate; PPF-DA} 및 폴리에틸렌글라이콜디아크릴레이트{poly(ethylene glycol) diacrylate; PEG-DA}로 이루어진 그룹 중에서 선택된 1종 이상이 더 함유됨을 특징으로 한다. 상기 물질들은 최종 생산되는 인공 뇌경막에서의 함량이 0중량% 초과 ~ 30중량% 이하가 되도록 함유될 수 있다.

발명의 효과

[0023] 본 발명에 의한 실크 피브로인 재료를 주재료로 하여 제조한 인공 뇌경막은 세포 내에서 독성이 없고 염증반응을 억제하였다.

[0024] 또한, 본 발명에 의한 실크 피브로인 재료를 주재료로 하여 제조한 인공 뇌경막은 투명하여 뇌신경외과 처치시 시야를 가리지 않아 안전한 처치가 가능하도록 하였다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 제조된 투명 실크 피브로인 뇌경막 사진이다.

도 2는 투명 실크 피브로인 뇌경막이 세포 생존률에 미치는 영향을 나타낸다. 성상세포를 PBS로 24시간 동안 처리하였다. 세포 생존률은 MTT를 이용한 발색시험으로 평가하였다. 레인 1: 양성 대조군, 레인 2: PBS 처리군; 레인 3: 투명 실크 피브로인 뇌경막 처리 세포, 레인 4: 음성 대조군. 각 막대는 다섯 번의 실험에서 얻은 평균±표준편차를 나타낸다. 통계학적 유의성은 $p<0.01$로 나타낸다.

도 3은 래트의 뇌경막 재생실험 단계 사진이다. 화살표는 투명 실크 피브로인 뇌경막을 가리킨다.

도 4는 투명 실크 피브로인 뇌경막이 COX-2 및 iNOS 발현 수준에 미치는 영향을 나타내는 사진이다. 래트는 투명 실크 피브로인 뇌경막으로 뇌경막이 재생되었다. 뇌경막 재생수술 2주 후 뇌경막을 제거하고 항 COX-2 및 항 iNOS 항체로 각각 웨스턴 블랏 분석하였다. 레인 1: 양성 대조군, 레인 2: 음성 대조군, 레인 3: 투명 실크 피브로인 뇌경막.

도 5는 투명 실크 피브로인 뇌경막의 염증에 대한 저해 효과를 나타내는 사진이다. 래트는 투명 실크 피브로인 뇌경막으로 뇌경막 재생되었고 재생수술 2주 후 헤마토자일린 및 에오신 염색으로 염증저해정도를 분석하였다. 레인 1: 양성 대조군, 레인 2: 음성 대조군, 레인 3: 투명 실크 피브로인 뇌경막.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 이하, 본 발명의 구성을 구체적인 실시예를 들어 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에만 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[0027] <재료와 방법>

[0028] **실시예 1: 실크 피브로인 뇌경막 제조**

[0029] 누에(*Bombyx mori*)를 0.02M Na_2CO_3 수용액에 넣고 30분 동안 끓여 세리신 단백질을 제거한 후 물로 세척하여 순수한 실크 피브로인을 얻었다. 추출된 실크 피브로인은 9.3M LiBr 용액에 60℃로 4시간 동안 용해시켰다. 용액을 48시간 동안 물에서 투석하여 실크 피브로인 수용액을 얻어내었다. 실크 피브로인 수용액의 최종 농도는 약 8중량%였다.

[0030] 실크 피브로인 뇌경막은 용매 캐스팅(solvent casting) 방식으로 제조하였다. 즉, 제조된 약 8중량%의 실크 피브로인 수용액을 매끄럽고 평평한 용기에 부은 후 이를 공기 중에서 건조시켜 뇌경막을 제조하였다. 이렇게 형성된 실크 피브로인 뇌경막은 실크제일구조(silk Ⅰ)와 랜덤코일구조로 이루어져 있으며 물에서의 용해가 가능하다. 이를 수분으로 어닐링(annealing)하거나 메탄올, 에탄올, 프로판올 등의 저급알콜로 처리함으로써 결정화를 유도하여 물에 용해되지 않는 실크피브로인 뇌경막을 제조하였다. 즉, 뇌경막을 상대습도가 90% 이상인 폐쇄된 용기 안에 24시간 동안 방치하면 수화되어 실크제일구조를 안정시키므로 뇌경막이 물에 녹지 않게 된다. 또한 수용성 실크 피브로인 뇌경막을 메탄올이나 에탄올, 프로판올 같은 친수성 극성용매와 증류수를 85:15의 중량비율로 혼합한 용액에 10분 동안 담가두면 뇌경막 표면에 실크제이구조(silk Ⅱ)로의 구조적 변화가 일어나면서 비수용성 뇌경막이 얻어진다.

[0031] **실시예 2: 세포배양 및 세포독성 시험**

[0032] 성상세포를 37℃의 습한 조건에서 95% 공기와 5% CO_2를 공급해주며 5% 우태혈청(fetal bovine serum; FBS), 항생제(100㎍/㎖ 스트렙토마이신, 100U/ml 페니실린), 20mM HEPES/NaOH(pH 7.4) 및 5mM $NaHCO_3$가 포함된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)에서 배양하였다.

[0033] 실크 피브로인 뇌경막의 세포독성은 실크 피브로인 뇌경막(1×1㎝)으로 12시간 처리한 세포의 생존률을 측정하여 평가하였다. 이후 세포는 35㎜ 디쉬에 시딩하여 70%가 될 때까지 배양한 다음 MTT[3-(4,5,-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 염색을 이용한 발색측정으로 세포생존률을 측정하였다.

[0034] **실시예 3: 실험동물 및 외과적 처치**

[0035] 본 발명에서는 한림대 실험동물센터에서 입수한 스프래그 돌리(SD) 래트를 이용하였다. 이 동물들은 일정 온도(23℃), 상대 습도 60%로 12시간의 빛/어둠 사이클로 고정하고 물과 사료에 자유롭게 접근할 수 있도록 하여 사육되었다. 실험동물들은 현재 국제 법률 및 정책(NIH의 실험동물 보호와 이용에 관한 가이드, NIH 공고 번호 85-23, 1985, 1996 개정) 준수 하에 사육 및 이용되었다.

[0036] 체중 200-250g의 SD 래트를 2.5% 아이소플루란(Abbott Laboratories, 일리노이주, 미국) 함유 33% 산소 및 67% 산화질소 혼합물로 일반 마취하고, 스테레오택식 프레임 개두술(stereotaxic frame craniotomy)을 실시하였다. 뇌경막은 절개하여 제거되었다. 실크 피브로인 뇌경막 작은 조각을 개두에 맞는 모양으로 만든 다음 열린 뇌경막의 끝부분(margins of the opened dura) 아래 위치한 뇌경막 가장자리의 노출된 대뇌 피질(exposed cortex with the edges of the dura) 위로 위치시켰다.

[0037] **실시예 4: 웨스턴 블랏 분석**

[0038] 2주후 래트를 희생시키고 래트의 뇌경막을 준비하였다. 폴리아크릴아마이드 젤 상의 뇌경막은 전기영동한 다음 나이트로셀룰로스막으로 전이시켰다. 막은 5% 탈지유와 0.05%의 트윈 20이 함유된 트리스 완충액 식염수(TBST; 20mM Tris, 0.2M NaCl, pH 7.5)로 두 시간 동안 블로킹한 후 항COX-2 및 항iNOS 항체(Santa Cruz, CA, 미국)로 상온에서 한 시간 동안 배양하였다. 세척후 막은 TBST에 1:10000으로 희석된 호스래디쉬 퍼옥시다제와 결합된 적절한 2차 항체와 함께 한 시간 동안 배양하였다. 막은 화학형광물질과 함께 배양한 후 Hyferfilm ECL에 노출시켰다.

[0039] 이때 양성 대조군으로서는 정상적인 쥐의 뇌경막을, 음성 대조군으로서는 현재 병원에서 뇌경막 수술시 사용하고 있는 라이오플란트(Lyoplant; Bbraun, 독일)를 이용하였다.

[0040] **실시예 5: 조직학적 시험**

[0041] 수술 2주 후 각 군마다 8마리의 래트에 대하여 조직학적 시험을 수행하였다. 복강에 소듐 펜토바비탈 마취를 유도한 후 래트를 희생시켰다. 래트는 0.1M PBS(pH 7.4)에 포함된 4% 파라포름알데하이드로 관류시켰다. 조직학적 분석을 위하여 시편은 4% 파라포름알데하이드로 고정시키고, 파라핀에 깊숙이 넣고, 5㎛ 두께로 절단한 후 헤마토자일린 및 에오신으로 염색하였다. 염색된 조직 절편은 표준 명시 광학(bright field optics)(Zeiss, AXIOMAGER M1, Gottingen, 독일)을 이용하여 염증세포의 침윤을 분석하였다.

[0042] **실시예 6: 인공 뇌경막 물성시험**

[0043] 상기 실시예 1에서 제조된 인공 뇌경막에 대하여 인장강도, 영률 및 절단신장률을 미국재료시험협회(American Society for Testing Materials, ASTM) 규격(D638 Typw(Ⅴ))의 방법에 의거하여 측정하였다.

[0044] **결과 1: 투명 실크 피브로인 뇌경막 제조**

[0045] 누에에서 얻은 실크 피브로인은 탁월한 생물학적 적합성을 나타내므로 이를 바이오재료로 이용하려는 연구가 광범위하게 진행되고 있다. 그러나, 실크 피브로인을 이용한 뇌경막에 대한 보고는 없었다. 그리하여, 본 발명자들은 누에의 실크 피브로인을 이용한 새로운 뇌경막을 제조하였고 이를 투명 실크 피브로인 뇌경막이라 명명하였다. 본 발명의 인공 뇌경막은 두께를 300㎛ 이하로 제조할 수 있으며, 통상 150~300㎛이다. 본 발명의 인공 뇌경막인 투명 실크 피브로인 뇌경막과 일반적으로 사용되는 뇌경막 재료의 결정적인 차이점은 투명성이다. 통상의 뇌경막 재료는 투명하지 않다. 그러나, 본 발명의 실크 피브로인 뇌경막은 투명하므로 신경외과학적 처치에 안전성을 부여한다.

[0046] **결과 2: 세포독성 시험**

[0047] 투명 실크 피브로인 뇌경막이 세포 내에서 독성을 유발하는가를 확인하기 위하여 본 발명자들은 세포 생존률에 대한 투명 실크 피브로인 뇌경막의 효과를 시험하였다. 모든 변수들을 음성대조군인 종래의 뇌경막 재료들과 비교하였다. 그 결과, 도 2와 같이 PBS에 24시간 처리한 세포는 100% 생존하였다. 본 발명의 투명 실크 피브로인 뇌경막으로 24시간 처리한 세포는 세포 생존률에 변화가 없었다. 이 결과는 투명 실크 피브로인 뇌경막이 세포 독성을 나타내지 않음을 가리킨다.

[0048] **결과 3: 염증에 대한 투명 실크 피브로인 뇌경막의 효과**

[0049] 염증 정도를 나타내는 표지로서 COX-2와 iNOS 수준이 있다. 본 발명자들은 COX-2와 iNOS 발현에 대한 투명 실크 피브로인 뇌경막의 효과를 시험하였다. 도 3과 같이, 개두수술을 실시하였다. 수술한 래트는 모두 합병증 없이 회복되었다. 대조군 및 수술한 래트는 두개(頭蓋) 내 감염, 국소 마비(focal paresis) 또는 발작 징후를 나타내지 않았다. 수술 2주 후 웨스턴 블랏팅과 조직학적 염색으로 뇌경막 내 염증을 시험하였다. 투명 실크 피브로인 뇌경막은 래트에서 COX-2와 iNOS 발현 수준을 억제하였다. 음성대조군과 본발명의 투명 실크 피브로인 뇌경막에서 iNOS 발현 수준은 유사한 결과를 나타내었다. 그러나, 본 발명의 투명 실크 피브로인 뇌경막은 좀더 효과적으로 COX-2 발현 수준을 억제하였다(도 4).

[0050] 동일한 실험 조건 하에서 염증에 대한 투명 실크 피브로인 뇌경막의 효과는 헤마토자일린 및 에오신 염색으로 확인되었다. 도 5는 래트에서 염증에 대한 조직학적 분석을 실시한 대표적인 결과를 보여준다. 음성대조군 래트와 비교할 때 외과수술을 겪은 래트에서 세포 침투(infiltration)가 현저하였다. 그렇지만, 투명 실크 피브로인 뇌경막은 래트에서 염증을 효과적으로 저해하였다.

[0051] **결과 4: 본 발명의 인공 뇌경막 물성**

[0052] 상기 실시예 1에 의해 제조된 인공 뇌경막에 대하여 물성 시험을 실시한 결과 아래 표 1과 같은 결과를 얻었다.

표 1

[0053]

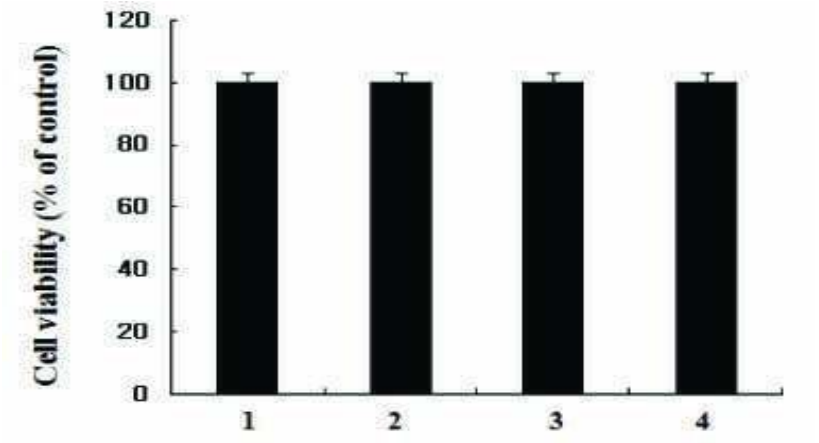
	인장강도(MPa)	영률(GPa)	절단신장률(%)
증기처리(건조 상태)	65.6±7.1	1.8±0.2	7.0±0.6
증기처리(건조 상태)	64.1±12.3	2.1±0.1	6.6±0.4
증기처리(습윤 상태)	27.33±8.78	0.28±0.08	96.61±11.58

도면

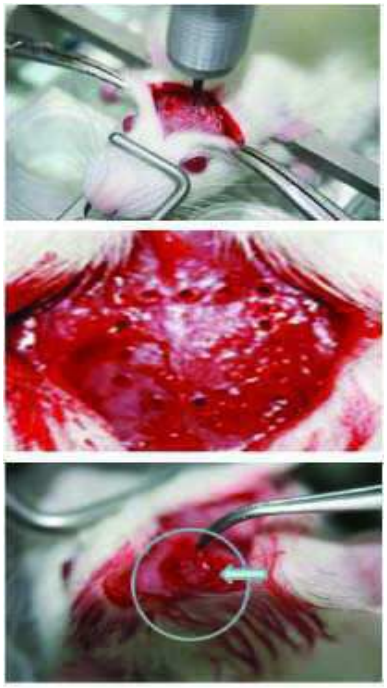
도면1



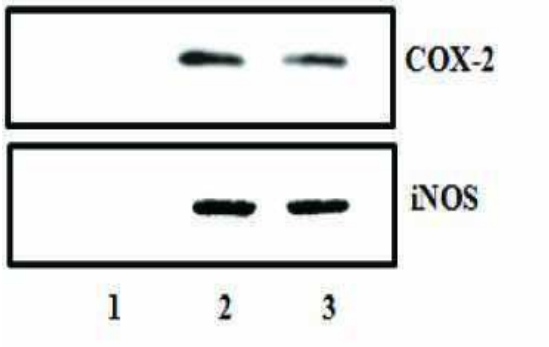
도면2



도면3



도면4



도면5

