

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0081198 (43) 공개일자 2016년07월08일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61F 2/00 (2006.01) A61L 27/14 (2006.01)		(71) 출원인 인하대학교 산학협력단 인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
(21) 출원번호 10-2014-0194649		(72) 발명자 심봉섭 인천광역시 연수구 컨벤시아대로42번길 61 (송도동, 송도더샵 그린애비뉴) 805동 1202호
(22) 출원일자 2014년12월31일 심사청구일자 2014년12월31일		김현 충청북도 청주시 흥덕구 사운로359번길 13 우림필유아파트 103동 102호 (뒷면에 계속)
		(74) 대리인 특허법인 공간

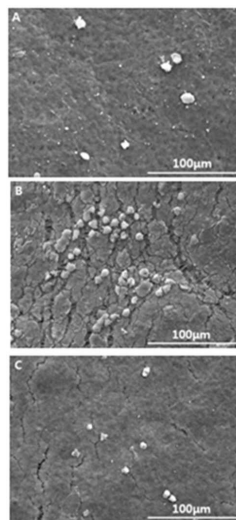
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 생체유래 천연 전도성 물질이 코팅된 전기전도성 신경재생유도관

(57) 요약

본 발명은 손상 혹은 절단된 말초신경을 재생시키는 신경재생유도관에 관한 것이다. 좀 더 상세하게는, 생분해성 고분자 혹은 콜라겐 등의 생체적합 재료로 제작된 유도관에 전기전도성 물질인 천연 전도성 소재를 코팅하여, 전기 전도성을 지니는 신경재생유도관에 관한 것이다. 전도성 신경재생유도관의 이식을 통해, 단절된 신경의 재생을 촉진시키고, 신경의 기능회복을 증진시킬 수 있다.

대 표 도 - 도2



(72) 발명자

엄태식

인천광역시 남구 한나루로502번길 88, 드림하이츠
2차 501호

장다슬

서울특별시 도봉구 덕릉로62길 13 신창아파트, 10
4동 1605호

임재열

인천광역시 연수구 해송로30번길 19 (송도동, 송도
웰카운티3단지아파트) 웰카운티3단지 305-2202

최정석

인천광역시 중구 인항로 27 인하대학병원 이비인후
과

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013R1A1A1076111

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 신진연구지원사업

연구과제명 생체이식형 3세대 유연전극 나노복합소재 개발

기 여 율 1/1

주관기관 인하대학교

연구기간 2014.12.01 ~ 2015.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

손상으로 단절된 신경 사이에 설치하여 신경재생을 유도하기 위한 신경재생유도관에 있어서, 신경재생유도관의 내표면 또는 외표면 또는 상기 내표면과 외표면 모두에 전기 전도성을 가지는, 생체로부터 유래된 전기전도성물질을 코팅하여 전기 전도성을 가지도록 함으로써, 전기 자극을 통하여 단절된 신경의 재생을 유도하도록 하는 생체 유래 천연 전도성 물질이 코팅된 신경재생유도관.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 신경재생유도관은 생분해성 고분자, 콜라겐, 세포외기질, 탈세포신경조직으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 성분으로 구성된 소재로 이루어진 것임을 특징으로 하는 생체유래 천연 전도성 물질이 코팅된 신경재생유도관.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 생체유래 천연 전기전도성 물질은, 생체유래 천연 물질 중 공액 백본(conjugate backbone)을 지니는 물질로 전기전도성을 갖는 것임을 특징으로 하는 생체유래 천연 전도성 물질이 코팅된 신경재생유도관.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 공액 백본(conjugate backbone)을 지니는 물질은 멜라닌(melanin), β -카로틴(β -carotene), 인디고(indigo), 티리안퍼플(Tyrian purple)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 물질인 것을 특징으로 하는 생체 유래 천연 전도성 물질이 코팅된 신경재생유도관.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 신경재생유도관은 튜브형, 다중관, 섬유다발 형태 중 어느 하나의 형태를 갖는 것을 특징으로 하는 생체 유래 천연 전도성 물질이 코팅된 신경재생유도관.

청구항 6

제 2항에 있어서, 상기 생분해성 고분자는 생체 내 또는 자연 환경하에서 스스로 분해되는 고분자로서 폴리글리콜라이드(Polyglycolide, PGA), 폴리-L-락티드(Poly-L-lactide, PLLA), 폴리-D,L-락티드(Poly-D,L-lactide, PDLLA), 폴리- ϵ -카프로락톤(Poly- ϵ -caprolactone, PCL), 폴리-1,4-디옥산-2-원(Poly-1,4-dioxane-2-one, PDO), 폴리트리메틸렌카보네이트(Polytrimethylenecarbonate, PTMC), 폴리- β -하이드록시부티레이트(Poly- ϵ -hydroxybutyrate, PHB)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 물질인 것을 특징으로 하는 생체유래 천연 전도성 물질이 코팅된 신경재생유도관.

청구항 7

제 2항에 있어서, 상기 콜라겐은 콜라겐 I, 또는 콜라겐 II, 또는 콜라겐 I과 콜라겐 II의 혼합물인 것임을 특징으로 하는 생체 유래 천연 전도성 물질이 코팅된 신경재생유도관.

발명의 설명

기술 분야

본 발명의 기술분야는 신경재생유도관에 대한 것이다. 손상된 신경 사이(gap)에 연결하여 신경재생을 극대화하고 이를 통해 손상된 기능 회복을 위한 신경재생유도관에 관한 것이다. 보다 자세하게는 생체적합 및 생분해성 고분자 혹은 콜라겐 등의 생체적합 재료로 제작된 튜브에 전기전도성 물질인 생체유래 천연 전도성소재를 코팅하여 전기전도성을 가지도록 함으로써, 단절된 신경단 사이의 신경신호 전도성을 증진시켜, 신경의 재생을 돕고

[0001]

신경의 기능회복을 증진시키는 신경재생유도관 및 이의 제조방법에 대한 것이다.

배경 기술

- [0002] 신경 손상(nerve injuries)은 감각기능과 운동기능에 장애를 일으키는 가장 큰 요인 중 하나이며, 신경 손상으로 인해서 사회생활에 어려움을 겪기도 한다. 현대사회에서는 교통사고, 산업재해 등의 이유로 신경절단과 같은 신경계 손상 사례가 매우 많다.
- [0003] 상대적으로 신경의 손상 부위(nerve gap)가 짧을 때(5mm이하)는 축색돌기(axon)의 자발적 재생이 가능하다. 하지만 신경 손상 부위가 크면 자발적으로 재생이나 기능 회복이 어렵기 때문에 인공적으로 신경을 재생시킬 수 있는 기술이 꼭 필요하다.
- [0004] 신경재생 방법으로는 자가신경이식 autograft)과 신경재생유도관(nerve guidance conduits, NGC), 줄기세포(stem cell), 신경성장인자를 이용한 신경재생법, 그리고 유전자치료가 있다. 그러나 신경재생이 일어난다고 해도 올바른 방향으로 적절한 목표점(target)에 항상 도달하는 것이 아니기 때문에 손상된 기능까지 회복 되지 않을 수 있다. 따라서 목표점까지 바른 방향으로 신경을 재생시키고 기능까지 회복시킬 수 있는 신경재생유도관이 관심을 받고 있다.
- [0005] 신경손상을 치료하는 방법은 초기에 절단된 신경을 직접 연결하는 방법과 상대적으로 중요성이 낮은 부위에서 정상적인 신경을 채취하여 그라프트(graft)로 사용하는 방법을 사용해 왔다. 그러나 신경을 직접 연결하는 방법의 경우 절단된 신경간의 거리가 5mm 이하로 매우 짧거나 손상이 미미한 경우에만 시술가능하며, 실제로 치료가 필요한 정도의 신경절단에는 이용하기에 어려움이 있다. 또한 다른 부위에서 신경 그라프트(graft)를 채취하여 사용하는 방법의 경우는 채취된 부위에 2차적인 신경 손상이 발생하며, 또한 채취하려는 신경과 시술이 필요한 손상된 신경끼리 굵기 및 형태가 일치되어야 한다는 단점이 존재한다.
- [0006] 이러한 자가신경이식 autograft)은 신경이 손상된 환자 자신의 신경을 사용해 치료하는 것으로, 장딴지신경(sural nerve)처럼 상대적으로 덜 중요한 신경을 사용하며, 성공률은 50% 정도 된다. 하지만 자가신경이식은 공여부위와 재생부위의 신경 다발구조가 다르고, 특히 운동신경(motor nerve)과 감각신경(sensory nerve)의 불일치로 인한 신경 재생 및 손상 부위 기능회복에 치명적 한계가 있다.
- [0007] 또한 신경을 채취하는 부위(donor site)에 수술로 인한 신경적 손상과 흉터가 생긴다. 그리고 신경절단거리가 약 5cm 이상일 경우 자가신경이식으로는 한계가 있기 때문에 동종신경이식(allograft)을 필요로 한다. 그러나 동종신경이식은 이식 후 면역 반응을 일으킬 수 있는 우려가 있기 때문에 여전히 신경 재생 방법으로 사용하기에 한계가 있다.
- [0008] 이를 해결하기 위한 방법으로 연구되고 있는 것이 손상된 신경의 끝과 끝을 연결하여 그 내부에 신경재생이 이루어 질 수 있도록 하는 신경재생유도관이다. 신경 재생 유도관을 이용한 손상 신경의 재생은 활발한 연구결과 및 임상사례가 보고되고 있으며, 오늘날, 신경재생유도관은 자가신경이식의 대안으로 받아들여지고 있다.
- [0009] 신경재생유도관은 인공적으로 만든 도관으로, 손상된 신경의 양 끝을 튜브형태로 연결하여 그 내부에서 신경의 재생이 이루어지도록 하는 것이다. 이러한 신경재생유도관은 신경의 재생에 다양한 효과를 보여준다. 첫째로 근육섬유아세포의 침투를 제한하며, 둘째로 신경종과 흉터의 생성을 억제한다. 셋째로 절단된 축삭의 끝가지 재생을 감소시키고, 넷째로 신경친화성 물질이 높은 농도로 축적되도록 한다. 결국 신경의 재생을 촉진하는 역할을 하게 된다.
- [0010] 이상적인 신경재생유도관이 가져야 하는 조건은 다음과 같다.
- [0011] 1) 생체적합성물질이어야 한다. 생체적합성물질이란 인체 내에서 적절한 응답을 이끌어 내면서, 독성이 없고 해로운 작용을 하지 않으며, 세포의 변화를 야기시키면 안 된다. 즉, 면역반응은 최소화하면서 생체 내에서 기능은 원활히 이루어져야 한다..
- [0012] 2) 신경종과 흉터 및 염증의 생성을 억제하기 위해 영양분의 공급은 원활해야 하며, 비세포성 및 체액성의 요소들을 최소화해야 한다. 즉, 외부로부터 섬유세포 등이 성장하여 신경이 재생되는 경로를 차단하는 것을 막을 수 있어야 한다.
- [0013] 3) 가능하면 재수술이 없도록 인체 내에서 분해되는 생분해성, 생흡수성을 가지는 재료로 구성되어야 한다.
- [0014] 4) 또한 신경이 자라는 기간 동안 그 형태를 유지할 수 있도록 지지체로서 형태 안정성 및 적절한 지지 강도를

지니고 있어야 한다.

- [0015] 5) 각 신경에 따라 그 굵기와 형태가 다르기 때문에 이에 맞추어 그 굵기와 형태를 조절하기 용이해야 한다.
- [0016] 앞서 설명한 바와 같은 조건을 가지고 있어야 하기 때문에 현재 콜라겐, 생분해성고분자, 실리콘(silicone)계열 등의 단일성분 및 단일관 신경재생유도관이 제품화 이용되고 있다. 현재까지 이러한 물질들로 이루어진 다양한 신경재생유도관이 사용되고 있지만, 신경재생속도, 재생 후 기능 회복, 긴 거리 및 난치성 신경 재생 등의 성능적 측면에서 아직 많은 개선점이 있다.
- [0017] 한편, 전도성 소재를 사용하여 신경세포의 재생을 촉진시키는 연구가 진행되어 왔다. 특히 전기화학적 활성을 지니는 탄소나노재료, 금속나노재료와 합성 전도성 고분자 등을 이용한 표면개질을 통해, 신경세포 및 근육세포의 성장, 분화를 조절할 수 있음이 보고되고 있다.
- [0018] 한국공개특허 2013-0081400은 안면신경의 재생튜브에 대한 것으로, 손상된 신경의 신경 근위부와 신경 원위부를 튜브로 연결하되, 상기 튜브의 바깥면을 금이나 백금과 같은 전도성 물질로 피복하며, 상기 튜브는 주변에 자기장을 형성하는 자성체, 양이온과 음이온으로 분리되어 주변에 전기장을 형성하는 강유전체, 음전하를 띠는 음이온을 방출하는 음이온 발생물질로 제작하여, 자기장이나 전기장 또는 음이온 및 전도성 물질에 의해 튜브에 의해 연결되는 손상된 신경이 똑바로 연결되어 손상된 신경의 재생속도를 높여 치료효율을 향상시키는 방법이 기재되어 있다.
- [0019] 미국공개특허 US2013-0331869에서는 신경재생유도관으로서 전기전도성을 갖는 폴리카프로락톤 푸마레이트(polycaprolacton fumarate)-폴리피롤(polypyrrole) 고분자 복합체를 제시하고 있다. 또한 US2012-0109167에서는 절연소재를 포함하는 도관으로서 내부 표면이 탄소나노튜브로 코팅된 신경재생유도관에 대하여 기술하고 있다.
- [0020] 그러나 위와 같은 탄소나노재료, 금속나노재료, 합성 전도성 고분자 등은, 생체 외부 물질이므로, 면역 및 염증 반응을 유발할 수 있다는 단점이 있다.
- [0021] 또한 이들의 제조과정에서 사용되는 금속 촉매, 유기용매 등 인체에 유해한 물질이 잔류될 가능성으로 인해, 생체 독성을 유발할 수 있다는 위험성도 지니고 있다. 더욱이 이들 물질은 생체 내에서 분해 및 흡수되지 않으므로, 이러한 나노재료들이 생체 내 잔류할 경우의 독성에 대해서는, 아직 충분히 검증되지 않았다는 점에서 역시 위험성을 지닌다. 이러한 점에서, 이들 전도성 재료의 생체 이식 시, 추후에 제거를 위한 2차 수술이 필요할 가능성 역시 가지고 있으며, 비용 또한 높다는 단점이 있었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0022] 신경의 성장속도, 정합성 및 기능회복 효율을 향상시키기 위하여, 본 발명에서는 신경재생유도관의 내표면 혹은 내외표면에 생체유래 천연 전도성 물질을 코팅함으로써 신경재생물질의 생성 및 신경의 형성을 촉진하고, 올바른 방향으로 재생하도록 방향성을 제시하는 것을 목적으로 하고 있다.
- [0023] 신경재생유도관이 전도성을 가지게 된다면 이 전도성물질을 통하여 신경의 전기적 자극이 전달되며, 이 전기적 자극 및 전기장의 발생에 의해 신경재생유도관 내에서 재생에 필요한 세포의 분화가 촉진된다. 또한, 표면에 축적된 전하는 축삭의 성장을 촉진시키는 역할을 한다. 결과적으로 신경의 재생이 촉진되어 절단된 신경을 빠르게 회복시킬 수 있게 된다.
- [0024] 그러나 전술한 바와 같은 기존기술들은 전도성물질의 생체적합성이 낮으며, 비용이 높다는 단점이 있으므로, 본 발명에서는 전기전도성을 가지면서도 생체적합성이 높고, 비용절감이 가능한 전도성 물질을 이용한 신경재생유도관을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0025] 상기 기술적 과제를 달성하기 위하여 본 발명은 신경재생유도관의 내표면 또는 외표면 또는 상기 내표면과 외표면 모두에 전기 전도성을 가지는, 생체로부터 유래된 천연 전도성물질을 코팅하여 전기 전도성을 가지도록 함으로써, 전기 자극을 통하여 단절된 신경의 재생을 유도하도록 하는 생체 유래 천연 전도성 물질이 코팅된 신경재생유도관을 제공한다.

- [0026] 또한, 본 발명은 상기 신경재생유도관이 생분해성 고분자, 콜라겐, 세포외기질, 탈세포신경조직으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 성분으로 구성된 소재로 이루어진 생체유래 천연 전기전도성 물질이 코팅된 신경재생 유도관을 제공한다.
- [0027] 이 때, 생체유래 천연 전도성 물질은 생체유래 물질 중 공액백본(conjugate backbone)을 지니는 물질로 전기전도성을 갖는 물질을 사용한다.
- [0028] 상기 공액백본(conjugate backbone)을 지니는 물질로서는 이에 제한되는 것은 아니나 멜라닌(melanin), β -카로텐(β -carotene), 인디고(indigo), 티리안퍼플(Tyrian purple)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 물질을 선택하여 사용할 수 있다.
- [0029] 또한 본 발명의 신경재생유도관은 튜브형, 다중관, 섬유다발 형태 중 어느 하나의 형태를 갖도록 성형하여 사용될 수 있다.
- [0030] 또한, 본 발명의 신경재생유도관에 사용되는 생분해성 고분자는 생체 내 또는 자연 환경하에서 스스로 분해되는 고분자로서 폴리글리콜라이드(Polyglycolide, PGA), 폴리-L-락티드(Poly-L-lactide, PLLA), 폴리-D,L-락티드(Poly-D,L-lactide, PDLA), 폴리- ϵ -카프로락톤(Poly- ϵ -caprolactone, PCL), 폴리-1,4-디옥산-2-원(Poly-1,4-dioxane-2-one, PDO), 폴리트리메틸렌카보네이트(Polytrimethylene carbonate, PTMC), 폴리- β -하이드록시부티레이트(Poly- β -hydroxybutyrate, PHB)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 물질을 사용할 수 있다.
- [0031] 상기 콜라겐은 정제된 혹은 정제되지 않은 상태의 콜라겐을 사용할 수도 있으며, 콜라겐 I, 또는 콜라겐 II, 또는 콜라겐 I과 콜라겐 II의 혼합물을 사용할 수도 있다.

발명의 효과

- [0032] 본 발명은, 신경재생유도관의 내표면, 외표면 혹은 내표면과 외표면의 양면에 생체유래 천연 전도성 물질을 코팅함으로써 신경재생유도관에 전도성을 부여하고, 이를 통하여 신경재생물질의 생성 및 신경의 재생을 촉진하고, 신경의 형성을 촉진하며, 신경이 올바른 방향으로 자라날 수 있도록 방향성을 제시해 줄 수 있다. 결과적으로 신경이 재생되는 시간을 단축하고, 올바른 방향으로 신경이 재생되어 시술 후에도 제 기능을 원활하게 수행할 수 있기 때문에 기존의 비 전도성 신경재생도관에 비하여 우수한 신경재생 효과를 기대할 수 있다.
- [0033] 본 발명은 멜라닌과 같은 생체 유래 천연 전도성물질을 사용함으로써, 기존의 전도성 소재에 비해 뛰어난 생체 적합성을 지닌다. 그러므로 면역 및 염증반응을 최소화할 수 있으며, 생체에 이미 존재하는 분자를 사용하였으므로, 제거를 위한 2차 시술이 필요하지 않다는 장점을 지닌다.

도면의 간단한 설명

- [0034] 도 1은 실시예 및 비교예에서 제조된 멤브레인의 표면의 SEM 사진이다.
- 도 2는 실시예 및 비교예에서 제조된 멤브레인 표면에서 PC12세포 배양 실험의 SEM 이미지 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0035] 이하에서 본 발명에 대하여 상세히 기술한다.
- [0036] 전도성 소재 표면에서의 신경재생 및 신경세포 분화 촉진에 관한 연구 사례는, 많은 선행연구를 통하여 입증되어 왔다. 특히 전기화학적 활성을 지니는 탄소나노재료, 금속나노재료와 합성 전도성 고분자 등을 이용한 표면 개질을 통해, 신경세포 및 근육세포의 성장, 분화를 조절할 수 있음이 보고되고 있다.
- [0037] 본 발명은, 신경재생유도관의 표면에 생체유래의 천연 전도성 물질을 코팅함으로써, 신경재생을 촉진하고 신경의 기능회복을 증진시키고자 하는 목적을 지니고 있다.
- [0038] 본 발명의 신경재생유도관등에 사용되는 전기전도성 물질로는, 멜라닌(melanin), β -카로텐(β -carotene), 인디고(indigo), 티리안 퍼플(Tyrian purple)등의 생체유래의 천연 전기 전도성 소재를 사용한다.
- [0039] 본 발명에 따른 신경재생유도관은 생분해성 물질로 이루어진 도관의 내부면, 또는 외부면, 또는 내외부면 전부 에 생체유래 천연 전도성 물질을 코팅함으로써 제조될 수 있다.
- [0040] 신경재생유도관의 구성 소재로는, 생분해성 고분자, 콜라겐, 세포외 기질, 탈세포신경조직으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 성분으로 구성된 복합소재로 이루어진 도관을 사용한다.

- [0041] 이러한 신경재생 도관에 전도성을 부여하기 위하여, 도관에 생체 유래 천연 전도성 물질을 코팅한다.
- [0042] 본 발명에서 생체유래 천연 전도성 물질이란, 생체에서 유래된 전도성 물질로서, 분자 구조에서 공액백본(conjugate backbone)을 지니므로써, 전기 전도성을 지니게 되는 물질을 의미한다.
- [0043] 이들 생체 유래 천연 전도성 물질로는 대표적으로 멜라닌(melanin), β -카로텐(β -carotene), 인디고(indigo), 티리안 퍼플(Tyrian purple) 등이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0044] 이들 생체 유래 천연 전도성 물질은 생체 적합성을 지니는 도관에 코팅되어 신경재생유도관을 형성할 수 있다.
- [0045] 상기 코팅을 위해서는 통상적으로 사용되는 코팅방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 용액담금코팅, 전기화학적 코팅, 스핀코팅, 자기조립코팅, 스프레이코팅, 층상분자조립코팅 등이 사용될 수 있다.
- [0046] 상기 용액담금코팅은, 코팅하고자 하는 전도성 물질이 용해되어 있거나 분산되어 있는 용액에 도관을 일정시간 담그었다가, 세척 후 건조 혹은 단순 건조하는방법이며, 전기화학적 코팅은 도관 표면에 전도성 물질을 증착시키는 방법으로, 도관에 표면에 모노머(monomer)를 전기화학적중합에 의하여 중합이 일어나고 동시에 고분자가 증착이 되도록 하여 코팅을 실시한다.
- [0047] 층상분자조립코팅 (Layer By Layer(LBL))은, 코팅하고자 하는 물질의 용액 또는 분산액에 도관을 담근 후, 세척 및 건조 공정을 통해 코팅하는 방법이다. 코팅 두께를 나노 수준의 단분자 두께로 제어할 수 있으며, 2가지 분자를 교대로 쌓아나감으로써, 표면에 나노박막 복합소재를 코팅하는 방법이다.
- [0048] 스핀코팅은, 코팅하고자 하는 물질의 용액이나 액체를 일정한 속도로 회전하는 기판 위에 올려놓아 원심력을 이용하여 일정한 두께가 되도록 조절하여 코팅하는 방법이다.
- [0049] 자기조립코팅은, 코팅하고자 하는 물질과 기질간의 친화력을 이용하여 스스로 기질과 결합하여 코팅되는 것이며, 스프레이코팅은 코팅하고자 하는 물질의 용액이나 액체상을 고압으로 분사하여 원하는 표면에 코팅하는 것이다.
- [0050] 이하, 본 발명에 따른 생체유래 천연 전도성 물질이 코팅된 신경재생유도관의 실시예를 포함하여 상세히 설명한다. 본 발명은 이하에 설명되는 실시예에 한정되는 것이 아니라 더 다양한 형태로 구현될 수 있으며, 본 실시예는 본 발명이 실질적으로 적용 가능함을 보이기 위한 수단으로 제공되는 것이다.
- [0051] <실시예>
- [0052] 본 발명에 따른 신경재생유도관의 효과를 간접적으로 측정하기 위하여 다음과 같이 실험을 구성하였다.
- [0053] (a) 멤브레인 기판의 준비
- [0054] 신경재생유도관의 재료로 사용될 수 있는 FDA 승인 의료용 생체적합 고분자인 폴리카프로락톤(Polycaprolactone,PCL)을 준비하였다. 이때, 도관의 형태로 형성하여 사용할 수도 있으나 실험의 편의를 위하여 멤브레인 형태로 사용하였다.
- [0055] (b) 생체유래 천연 전도성 물질의 준비
- [0056] 생체 유래 천연 전도성 물질로서는 멜라닌을 선택하였다.
- [0057] 천연 멜라닌 용액을 만들기 위해, 갑오징어 먹물(*Sepia officinalis* ink)을 증류수에 희석한 후 원심분리기에서 rpm 3500, 15분간 원심분리하여 상등액을 제거한 후 가라앉은 것을 다시 증류수에 희석하여 원심 분리하는 과정을 총 5회 반복하였다.
- [0058] 최종적으로 얻어진 물질을 60도의 오븐에서 완전히 건조한 후 이를 증류수에 0.5wt%가 되도록 넣은 후, 초음파 진동기 처리에서 6시간 이상 처리하여, 멜라닌이 분산된 용액을 얻었다.
- [0059] (c) PDDA 고분자 용액의 제조
- [0060] 다음으로 층상분자조립을 위한 PDDA(poly diallyldimethylammounium chloride) 고분자 용액을 준비하였다. 상기 PDDA는 증류수에 0.5wt%로 용해하여 사용하였다.
- [0061] (d) 층상분자조립에 의한 천연 전도성 물질의 코팅
- [0062] ① PCL 멤브레인을 PDDA용액에 5분간 담근 후 꺼내고, 증류수로 충분히 씻어준 후 상온에서 건조한 공기를 불어 주며 충분히 건조하였다.

- [0063] ② 상기 ①단계 후에 건조된 PCL 멤브레인을 다시 상기 준비된 0.5wt%의 멜라닌 용액에 15분간 담근 후 꺼내어, 증류수로 충분히 세척한 뒤, 상온에서 건조 공기를 이용하여 충분히 건조하였다.
- [0064] ③ 상기 ②단계 후의 PCL멤브레인을 다시 ①단계와 ②단계의 과정을 반복하여 멜라닌이 폴리카프로락톤 멤브레인의 표면에 3층으로 코팅되도록 하였다.
- [0065] <비교예1>
- [0066] 본 발명의 생체 유래 천연 전도성 물질이 코팅된 경우와 비교하기 위하여 합성 고분자의 일종인 PEDOTPSS(Poly-3,4-ethylenedioxythiophenepoly styrene sulfonate)가 코팅된 폴리카프로락톤 멤브레인을 다음과 같이 준비하였다.
- [0067] (a) 멤브레인 기관의 준비
- [0068] 폴리카프로락톤 멤브레인을 상기 실시예1의 (a)와 동일하게 준비하였다.
- [0069] (b) PEDOTPSS 용액의 준비
- [0070] PEDOTPSS를 0.5wt%가 되도록 녹인 용액을 준비하였다.
- [0071] (c) PDPA 고분자 용액의 제조
- [0072] 다음으로 층상분자조립을 위한 PDPA 고분자 용액을 상기 실시예의 (c)와 동일하게 준비하였다.
- [0073] (d) 층상분자조립에 의한 천연 전도성 물질의 코팅
- [0074] ① PCL 멤브레인을 PDPA용액에 5분간 담근 후 꺼내고, 증류수로 충분히 씻어준 후 상온에서 건조한 공기를 불어주며 충분히 건조하였다.
- [0075] ② 상기 ①단계 후에 건조된 PCL 멤브레인을 다시 상기 준비된 0.5wt%의 PEDOTPSS 용액에 15분간 담근 후 꺼내어, 증류수로 충분히 세척한 뒤, 상온에서 건조 공기를 이용하여 충분히 건조하였다.
- [0076] ③ 상기 ②단계 후의 PCL멤브레인을 다시 ①단계와 ②단계의 과정을 반복하여 PEDOTPSS가 폴리카프로락톤 멤브레인 표면에 3층으로 코팅되도록 하였다.
- [0077] <비교예2>
- [0078] 아무런 물질이 코팅되지 않은 경우의 신경재생유도 성능을 비교하기 위하여 코팅되지 않은 폴리카프로락톤 멤브레인을 상기 실시예의 (a)단계와 같이 준비하였다.
- [0079] <실험예>
- [0080] 상기 제조된 실시예와 비교예에서 제조된 멤브레인의 신경재생유도관으로서의 효능을 간접적으로 비교하기 위하여 다음과 같은 실험을 실시하였다.
- [0081] 먼저 PC12세포를 RPMI 500ml + FBS 56ml (10%) + Pen Strep 5.6ml (1%) 배지에서 배양한다. 배양한 PC12세포를 10,000,000 cell/ml 정도의 개체수가 되도록 배지에 희석한다. 앞서 준비한 실시예와 비교예에서 제조된 멤브레인을 48well 조직 배양 템플레이트(tissue culture template)에 지름 1cm의 크기로 원형으로 잘라서 넣어준다. 그 후 배지 1ml를 각각의 샘플에 넣어준 후, PC12세포가 희석되어 있는 배지를 1.56 μ l 넣어준다. 그 상태로 3일간 배양을 한 후 세포고정화를 통하여 SEM으로 관찰한다.
- [0082] 세포고정화는 글루타르알데히드(glutaraldehyde)를 2.5% 가 되도록 인산완충식염수(PBS)에 희석한 용액에 세포를 배양한 각 샘플을 37도에서 30분에서 2시간 정도 담가준다.
- [0083] 그 후 PBS용액으로 조심스럽게 씻어낸 후 25%, 50%, 75% 90%, 100%의 에탄올 용액에서 차례대로 20분정도 담가준다. 그 후 HMDS (1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazane)용액 0.2ml를 넣은 후 진공에서 건조시켜준다.
- [0084] 이러한 과정을 거친 멤브레인은 SEM촬영을 통하여 단일세포 부착 정도 및 표면 세포 개체수를 비교한다.
- [0085] 도 1은 상기 실시예 및 비교예에서 제조된 멤브레인의 표면의 SEM 사진이다. A는 비교예2의 아무것도 코팅되지 않은 상태의 폴리카프로락톤 멤브레인이며, B는 실시예의 멜라닌이 3 층으로 코팅된 폴리카프로락톤 멤브레인이며, C는 PEDOTPSS가 3층으로 코팅된 폴리카프로락톤 멤브레인이다.
- [0086] 상기 도 1에서는 멜라닌이 코팅된 경우 다른 비교예의 멤브레인 표면과는 달리 작은 구형 모양의 입자가 형성되

어 있는 것을 보여주어, 멜라닌 분자가 표면에 코팅되어 있음을 확인할 수 있었다.

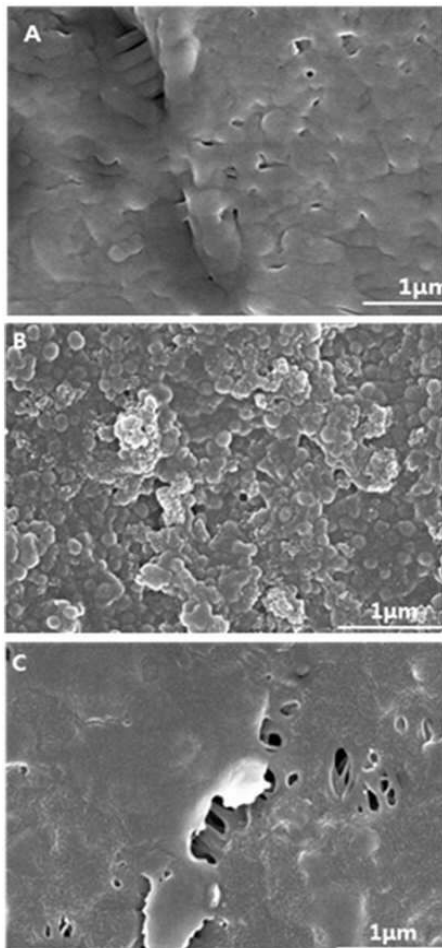
[0087] 도 2는 실시예와 비교예의 멤브레인 표면에서 PC12 세포의 배양 실험 후의 SEM 이미지이다. A는 비교예2의 아무것도 코팅되지 않은 상태의 폴리카프로락톤 멤브레인이며, B는 실시예의 멜라닌이 3 층으로 코팅된 폴리카프로락톤 멤브레인이며, C는 PEDOTPSS가 3층으로 코팅된 폴리카프로락톤 멤브레인이다.

[0088] SEM 사진 결과에서 보이듯이, 본 발명에 의한 생체 유래의 천연 전도성 물질인 멜라닌이 코팅된 경우인 B 표면의 세포 개수 및 부착정도가, 합성 전도성 물질 코팅 표면에 비해 더 우수함을 확인하였다. 따라서 생체 유래 천연 전도성 물질은 신경세포 생장에 유리한 전도성과 생체적합성을 동시에 제공함으로써, 신경재생유도관으로서의 우수성을 충분히 예측할 수 있다.

[0089] 이상으로 본 발명은 첨부된 도면에 도시된 실시예를 참조하여 설명되었으나, 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술에 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 타 실시예가 가능하다는 것을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 기술적 보호범위는 아래의 특허청구범위에 의해서 정하여져야 할 것이다.

도면

도면1



도면2

