



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0003800
(43) 공개일자 2011년01월13일

<p>(51) Int. Cl. A61K 31/717 (2006.01) A61L 15/42 (2006.01) A61L 27/54 (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2009-0061248 (22) 출원일자 2009년07월06일 심사청구일자 2009년07월06일</p>	<p>(71) 출원인 강릉원주대학교산학협력단 강릉시 강릉대학로 120</p> <p>(72) 발명자 이석근 서울 동작구 노량진 1동 신동아 리버파크 아파트 702-1602 김연숙 서울 동작구 노량진 1동 신동아 리버파크 아파트 702-1602 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인 특허법인세신</p>
--	--

전체 청구항 수 : 총 10 항

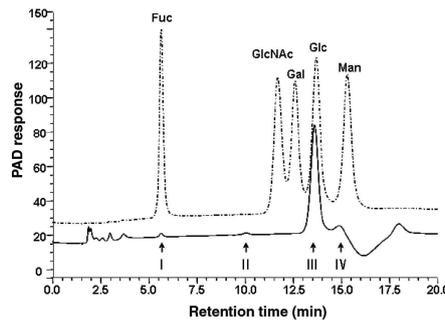
(54) 해양 멧게류 피부 각질로부터의 생활성 셀룰로오스 막의 제조 방법 및 이에 의하여 얻어지는 생활성 셀룰로오스 막

(57) 요약

본원에서는 종래의 멧게 및 미더덕 유래 셀룰로오스 막 제조 방법을 개량하여 보다 효과적으로 멧게류의 피부 각질 내에 존재하는, 미세 셀룰로오스 섬유에 부착된 단백질을 완전하게 제거하고, 미세 셀룰로오스 섬유의 간극을 넓힘으로써 물의 투과성을 증가시키며, 미세 셀룰로오스 섬유를 강하게 산화시켜서 순수한 생활성 셀룰로오스 막을 제조하는 방법을 제공한다. 또한, 본원에서는, 멧게류에서 분리한 순수 생활성 셀룰로오스 막으로서 인체에 다양하게 적용하는 생활성 셀룰로오스 막을 제공하는데, 주로 창상이나 화상 등에 의해 생긴 상처에 대한 항균, 상처 보호, 혈액 응고 또는 상처 치유 촉진, 골절이나 골 결손 부위의 치유를 촉진시키는 골 형성 유도 또는 골 이식, 그리고 외상이나 절단 등에 의한 신경 장애를 회복시켜 주는 신경 재생 유도, 손상 받은 장막 (serosa)의 재생을 촉진 장막 재생 유도, 골수 세포, 장막 세포, 배아 줄기 세포 또는 성체 줄기 세포의 배양 및/또는 이식 등에 효과적으로 사용할 수 있는 생활성 셀룰로오스 막을 포함한다.

대표도 - 도3

생활성 셀룰로오스 막에 대한 High Performance Anion-Exchange Chromatography 분석



High Performance Anion-Exchange Chromatography (HPAEC) 분석에서 Pulsed Amperometric Detector (PAD)의 반응을 측정된 결과 glucose (III)가 두껍게 관찰되었으나 다른 당류들은 무시할 정도로 빈약하였다.

(72) 발명자

이상신

강원 동해시 천곡동 삼성아파트 3동 404호

진덕희

강원도 강릉시 교동 357 이편한세상 103동 1003호

이중호

서울특별시 서초구 반포동 1197 반포주공아파트 7
0동 202호

김성민

서울 강남구 삼성동 한솔아파트 101-1107

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 없음

부처명 국토해양부

연구관리전문기관

연구사업명 수산특정연구개발사업

연구과제명 미더덕의 피부각질을 이용한 의료용 유도막의 개발

기여율

주관기관 강릉원주대학교

연구기간 2005년 9월 14일 ~ 2009년 9월 13일

특허청구의 범위

청구항 1

멍게류의 피부 각질에 강산과 강염기를 반복 처리하는 생활성 셀룰로오스 막의 제조 방법에 있어서,

(i) 셀룰로오스 막을 단백질 분해 효소로 처리하는 공정,

(ii) 상기 공정에서 얻은 셀룰로오스 막을 물리적으로 신장시켜 셀룰로오스 막 내부의 투과성을 증가시키고, 잔존 미세 단백질의 제거를 용이하게 하는 공정,

(iii) 상기 공정에서 얻은 셀룰로오스 막에 차아염소산나트륨 (NaClO), 과황산칼륨 (K₂S₂O₈), 과산화수소 (H₂O₂), 산소 (O₂), 일산화이염소 (Cl₂O), 오존 (O₃) 및 염소 (Cl₂)로 이루어진 군 중에서 선택되는 산화제로 처리하여 셀룰로오스 막을 산화시키는 공정 및

(iv) 상기 공정에서 얻은 셀룰로오스 막에 수산화칼슘을 처리하여 셀룰로오스 막 표면을 수산화칼슘 아파타이트 나노 파티클 미세 결정체로 피복하는 공정

을 더 포함하는 것인, 생활성 셀룰로오스 막의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 (iv) 공정 후에

(v) 상기 공정에서 얻은 셀룰로오스 막의 내면에 항균 물질; 아가로스 또는 실리콘; 휘브린 모노머 및 트롬빈 분말; 상처 치유 물질; 골 형성 촉진 물질; 신경 조직 형성 물질; 장막 재생 물질; 및 이의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 물질을 피복하여, 항균 기능; 상처 보호; 혈액 응고; 상처 치유 촉진; 골 형성 촉진; 신경 재생 유도; 및 장막 재생 유도로 이루어진 군 중에서 선택되는 기능을 1개 이상 가지는 층을 형성시키는 공정

을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 생활성 셀룰로오스 막의 제조 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 항균 물질은 베타-디펜신, 라이조자임, 락토펜린, LL-37, 히스타틴, 뮤코사이드, 암피실린, 가나마이신, 테트라사이클린, 겐타마이신, 테라마이신, 설파제 및 이의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 것이고,

상기 상처 치유 물질은 암피실린, 가나마이신, 테라마이신, 겐타마이신, 테트라사이클린, 설파제, 베타-디펜신, 히스타틴, 라이조자임, 락토펜린, LL-37, 뮤코사이드, 재조합 VEGF (vascular angiogenesis growth factor), 콜라겐, 엘라스틴, 라미닌 및 이의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 것이며,

상기 골 형성 촉진 물질은 재조합 BMPs (bone morphogenetic proteins), 콜라겐, 라미닌, 탈회 골 기질 단백질 (demineralized bone matrix proteins), 오스테오넥틴, 오스테오칼신, 오스테오펜틴, 삼칼슘인산, 수산화칼슘 및 이의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 것이고,

상기 신경 조직 형성 물질은 재조합 NGFs (nerve growth factors), 콜라겐, 라미닌, 신경 성장 인자 (neurotrophin) 및 이의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 것이며,

상기 장막 재생 물질은 재조합 VEGF, 콜라겐, 라미닌, 성장 호르몬, FGFs (fibroblast growth factors), TGFs (transforming growth factors), 에스트로젠, 인슐린 및 이의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는

것임을 특징으로 하는 생활성 셀룰로오스 막의 제조 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 멍게류는 비대된 포낭을 가지도록 폐쇄 공간에서 양식한 것이고, 상기 셀룰로오스 막은 두께가 50 내지 100 μ m이며, 크기가 30 mm \times 30 mm 내지 50 mm \times 50 mm인 것을 특징으로 하는, 생활성 셀룰로오스 막의 제조 방법.

청구항 5

제1항의 제조 방법에 의하여 제조된 생활성 셀룰로오스 막의 내면에 골수 세포, 장막 세포, 배아 줄기 세포, 성체 줄기 세포로 이루어진 군 중에서 선택되는 세포를 부착시켜 배양하는 것인, 생활성 셀룰로오스 막을 이용한 세포의 배양 방법.

청구항 6

제1항의 제조 방법에 의하여 제조된 생활성 셀룰로오스 막으로서, 상기 셀룰로오스 막의 아미노산 함량은 0 중량%이고, 글루코오스의 함량은 95 중량% 이상인 것인, 생활성 셀룰로오스 막.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 생활성 셀룰로오스 막은 차폐성 골 재생 유도, 신경 재생 유도 및 차폐성 장막 재생 유도로 이루어진 군 중에서 선택되는 기능의 막으로서 사용되는 것인, 생활성 셀룰로오스 막.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 생활성 셀룰로오스 막의 내면에 항균 물질; 아가로스 또는 실리콘; 휘브린 모노머 및 트롬빈 분말; 상처 치유 물질; 골 형성 촉진 물질; 신경 조직 형성 물질; 장막 재생 물질; 및 이의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 물질이 피복되어 형성된 항균 기능; 상처 보호; 혈액 응고; 상처 치유 촉진; 골 형성 촉진; 신경 재생 촉진; 및 장막 재생 촉진으로 이루어진 군 중에서 선택되는 기능을 1개 이상 가진 층이 더 있는 것을 특징으로 하는, 생활성 셀룰로오스 막.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 항균 물질은 베타-디펜신, 라이조자임, 락토펜린, LL-37, 히스타틴, 뮤코사이드인, 암피실린, 가나마이신, 테트라사이클린, 겐타마이신, 테라마이신, 설파제 및 이의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 것이고,

상기 상처 치유 물질은 암피실린, 가나마이신, 테라마이신, 겐타마이신, 테트라사이클린, 설파제, 베타-디펜신, 히스타틴, 라이조자임, 락토펜린, LL-37, 뮤코사이드인, 재조합 VEGF (vascular angiogenesis growth factor), 콜라겐, 엘라스틴, 라미닌 및 이의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 것이며,

상기 골 형성 촉진 물질은 재조합 BMPs (bone morphogenetic proteins), 콜라겐, 라미닌, 탈회 골 기질 단백질 (demineralized bone matrix proteins), 오스테오넥틴, 오스테오칼신, 오스테오폰틴, 삼칼슘인산, 수산화칼슘 및 이의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 것이고,

상기 신경 조직 형성 물질은 재조합 NGFs (nerve growth factors), 콜라겐, 라미닌, 신경 성장 인자 (neurotrophin) 및 이의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 것이며,

상기 장막 재생 물질은 재조합 VEGF, 콜라겐, 라미닌, 성장 호르몬, FGFs (fibroblast growth factors), TGFs (transforming growth factors), 에스트로젠, 인슐린 및 이의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는

것임을 특징으로 하는, 생활성 셀룰로오스 막.

청구항 10

제6항에 있어서, 상기 생활성 셀룰로오스 막은 골수 세포, 장막 세포, 골수 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 성체 줄기 세포로 이루어진 군 중에서 선택되는 세포의 배양, 이식과, 배양 및 이식 둘다에 사용되는 것을 특징으로 하는, 생활성 셀룰로오스 막.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

본 발명은 멍게류의 피부 각질로부터 생활성 셀룰로오스 막을 제조하는 방법 및 이에 의하여 얻어지는 생활성 셀룰로오스 막에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 멧게류는 전세계 해양에서 자생하는 척삭동물군 해초강 측성해초목에 속하는 생물체로서, 이중에서 멧게와 미더덕 등은 독성이 없고, 식용이 가능하며, 양식을 통하여 대량 생산이 이루어지고 있다. 그러나, 멧게와 미더덕에 있어 내부의 육질은 식용으로 사용되지만 그 껍질은 일반적으로 버리는 경우가 대부분이며, 이때 껍질이 견고해서 쉽게 분해되지 않기 때문에 함부로 버리는 경우에는 환경 오염의 원인이 되고 있다.
- [0003] 멧게류의 생체는 매우 특이해서 유생 시기에는 척추가 있고 헤엄쳐서 이동할 수 있으나, 성체는 바위에 붙거나 해저 바닥의 흙 속에 파묻혀 살면서 식물의 뿌리와 유사한 구조물을 만들어서 단단하게 부착하기 때문에 움직이지 못한다. 몸통에는 바닷물을 들이는 입수공과 출수공이 있는데, 이를 통해 각종 유기물, 플랑크톤을 걸러서 먹는다. 따라서, 멧게와 미더덕은 동물로 태어나서 식물과 유사한 생체를 갖기 때문에, 육질이 식물성 풍미를 띠며 특히 피부 각질은 육상 식물과 유사하게 베타-셀룰로오스로 되어 있다.
- [0004] 멧게와 미더덕의 피부 각질을 이루고 있는 이러한 셀룰로오스는 매우 섬세한 섬유 구조로 되어 있는데, 이는 일반적인 식물 유래의 셀룰로오스와 큰 차이가 있다. 멧게와 미더덕의 셀룰로오스 막은 약 10 내지 100 nm 두께의 미세 섬유들이 서로 치밀하게 짜집기 되어 있는 형태로 결합되어 있는데, 이들 미세 섬유들은 셀룰로오스 부착 단백질 (cellulose binding protein)들에 의하여 서로 단단히 연결되어 있다. 따라서, 멧게류의 피부 각질에서 기질 단백질을 대부분 제거한 셀룰로오스 막은 물 투과성을 가지고, 동물성 셀룰로오스 막으로서 질기고 유연한 특성을 가지고 있다.
- [0005] 대한민국 등록 특허 제10-0605382호에서 제시하는 멧게 또는 미더덕-유래 셀룰로오스 막을 포함하는 피부 상처 보호막 및 골형성 유도막은 단지 강산과 강알칼리를 반복 처리하고 간단한 단백질 분해 효소 처리를 통하여 얻은 셀룰로오스 막인데, 셀룰로오스 막 내부에 있는 미세 섬유를 연결시키는 셀룰로오스 부착 단백질의 일부가 제거되지 않아서 셀룰로오스 막의 물 투과성이 낮고, 그로 인하여 생체 내에서 생활성 막으로서의 그 기능이 약할 뿐 아니라 셀룰로오스 막을 장기간 생체 내에 삽입하는 경우에는 셀룰로오스 막 내부의 잔존 단백질이 유리되어 인체 내에서 염증 반응을 일으킬 수 있다. 그리고, 셀룰로오스 막이 생체 내에서 기질 단백질이나 무기질과의 친화성을 갖지 못하고, 또한 생체 내에서 세포들이나 기질의 활성화 기능을 갖지 못하여, 세포 부착성이 낮고 그에 따라 생체 조직 반응이 지연되어서 생활성 막으로서의 기능이 저조한 실정이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0006] 이에 본원에서는 종래의 멧게 및 미더덕 유래 셀룰로오스 막 제조 방법을 개량하여 보다 효과적으로 멧게류의 피부 각질 내에 존재하는, 미세 셀룰로오스 섬유에 부착된 단백질을 완전하게 제거하고, 미세 셀룰로오스 섬유의 간극을 넓힘으로써 물의 투과성을 증가시키며, 미세 셀룰로오스 섬유를 강하게 산화시켜서 부착된 불순물을 완전히 제거함과 동시에 기질 단백질이나 무기질과의 친화성 및 세포들이나 기질의 활성화 기능을 갖도록 하고, 미세 셀룰로오스 표면에 수산화칼슘을 피복하여 생체 내에 사용시 골 재생을 돕고 주위 조직 내에 있는 세포들과 기질의 신진대사를 활성화시킬 수 있는 기능성 셀룰로오스 막을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0007] 또한, 멧게류에서 분리한 순수 생활성 셀룰로오스 막으로서 인체에 다양하게 적용하는 생활성 셀룰로오스 막을 제공하고자 하는데, 주로 창상이나 화상 등에 의해 생긴 상처에 대한 항균, 상처 보호, 혈액 응고 또는 상처 치유 촉진, 골절이나 골 결손 부위의 치유를 촉진시키는 골 형성 유도 또는 골 이식, 그리고 외상이나 절단 등에 의한 신경 장애를 회복시켜 주는 신경 재생 유도, 손상 받은 장막 (serosa)의 재생을 촉진 장막 재생 유도, 골수 세포, 장막 세포, 배아 줄기 세포 또는 성체 줄기 세포의 배양 및/또는 이식 등에 효과적으로 사용할 수 있는 생활성 셀룰로오스 막을 포함한다.

과제 해결수단

- [0008] 1. 본 발명은, 멧게류의 피부 각질에 강산과 강염기를 반복 처리하는 생활성 셀룰로오스 막의 제조 방법에 있어서,
- [0009] (i) 셀룰로오스 막을 단백질 분해 효소로 처리하는 공정,
- [0010] (ii) 상기 공정에서 얻은 셀룰로오스 막을 물리적으로 신장시켜 셀룰로오스 막 내부의 투과성을 증가시키고, 잔존 미세 단백질의 제거를 용이하게 하는 공정,

- [0011] (iii) 상기 공정에서 얻은 셀룰로오스 막에 차아염소산나트륨 (NaClO), 과황산칼륨 ($K_2S_2O_8$), 과산화수소 (H_2O_2), 산소 (O_2), 일산화이염소 (Cl_2O), 오존 (O_3) 및 염소 (Cl_2)로 이루어진 군 중에서 선택되는 산화제로 처리하여 셀룰로오스 막을 산화시키는 공정 및
- [0012] (iv) 상기 공정에서 얻은 셀룰로오스 막에 수산화칼슘을 처리하여 셀룰로오스 막 표면을 수산화칼슘 아파타이트 나노 파티클 미세 결정체로 피복하는 공정
- [0013] 을 더 포함하는 것인, 생활성 셀룰로오스 막의 제조 방법을 제공한다.
- [0014] 2. 본 발명은, 상기 1에 있어서, 상기 (iv) 공정 후에
- [0015] (v) 상기 공정에서 얻은 셀룰로오스 막의 내면에 항균 물질; 아가로스 또는 실리콘; 휘브린 모노머 및 트롬빈 분말; 상처 치유 물질; 골 형성 촉진 물질; 신경 조직 형성 물질; 장막 재생 물질; 및 이의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 물질을 피복하여, 항균 기능; 상처 보호; 혈액 응고; 상처 치유 촉진; 골 형성 촉진; 신경 재생 유도; 및 장막 재생 유도로 이루어진 군 중에서 선택되는 기능을 1개 이상 가지는 층을 형성시키는 공정
- [0016] 을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 생활성 셀룰로오스 막의 제조 방법을 제공한다.
- [0017] 3. 본 발명은, 상기 2에 있어서,
- [0018] 상기 항균 물질은 베타-디펜신, 라이조자임, 락토펜린, LL-37, 히스타틴, 뮤코사이드인, 암피실린, 가나마이신, 테트라사이클린, 겐타마이신, 테라마이신, 설파제 및 이의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 것이고,
- [0019] 상기 상처 치유 물질은 암피실린, 가나마이신, 테라마이신, 겐타마이신, 테트라사이클린, 설파제, 베타-디펜신, 히스타틴, 라이조자임, 락토펜린, LL-37, 뮤코사이드인, 재조합 VEGF (vascular angiogenesis growth factor), 콜라겐, 엘라스틴, 라미닌 및 이의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 것이며,
- [0020] 상기 골 형성 촉진 물질은 재조합 BMPs (bone morphogenetic proteins), 콜라겐, 라미닌, 탈회 골 기질 단백질 (demineralized bone matrix proteins), 오스테오넥틴, 오스테오칼신, 오스테오폰틴, 삼갈슘인산, 수산화칼슘 및 이의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 것이고,
- [0021] 상기 신경 조직 형성 물질은 재조합 NGFs (nerve growth factors), 콜라겐, 라미닌, 신경 성장 인자 (neurotrophin) 및 이의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 것이며,
- [0022] 상기 장막 재생 물질은 재조합 VEGF, 콜라겐, 라미닌, 성장 호르몬, FGFs (fibroblast growth factors), TGFs (transforming growth factors), 에스트로젠, 인슐린 및 이의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는
- [0023] 것임을 특징으로 하는 생활성 셀룰로오스 막의 제조 방법을 제공한다.
- [0024] 4. 본 발명은, 상기 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, 상기 명계류는 비대된 포낭을 가지도록 폐쇄 공간에서 양식한 것이고, 상기 셀룰로오스 막은 두께가 50 내지 100 μm 이며, 크기가 30 mm \times 30 mm 내지 50 mm \times 50 mm인 것을 특징으로 하는, 생활성 셀룰로오스 막의 제조 방법을 제공한다.
- [0025] 5. 본 발명은, 상기 1의 제조 방법에 의하여 제조된 생활성 셀룰로오스 막의 내면에 골수 세포, 장막 세포, 배아 줄기 세포, 성체 줄기 세포로 이루어진 군 중에서 선택되는 세포를 부착시켜 배양하는 것인, 생활성 셀룰로오스 막을 이용한 세포의 배양 방법을 제공한다.
- [0026] 6. 본 발명은, 상기 1의 제조 방법에 의하여 제조된 생활성 셀룰로오스 막으로서, 상기 셀룰로오스 막의 아미노산 함량은 0 중량%이고, 글루코오스의 함량은 95 중량% 이상인 것인, 생활성 셀룰로오스 막을 제공한다.
- [0027] 7. 본 발명은, 상기 6에 있어서, 상기 생활성 셀룰로오스 막은 차폐성 골 재생 유도, 신경 재생 유도 및 차폐성 장막 재생 유도로 이루어진 군 중에서 선택되는 기능의 막으로서 사용되는 것인, 생활성 셀룰로오스 막을 제공한다.
- [0028] 8. 본 발명은, 상기 6에 있어서, 상기 생활성 셀룰로오스 막의 내면에 항균 물질; 아가로스 또는 실리콘; 휘브린 모노머 및 트롬빈 분말; 상처 치유 물질; 골 형성 촉진 물질; 신경 조직 형성 물질; 장막 재생 물질; 및 이의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 물질이 피복되어 형성된 항균 기능; 상처 보호; 혈액 응고; 상처 치유 촉진; 골 형성 촉진; 신경 재생 촉진; 및 장막 재생 촉진으로 이루어진 군 중에서 선택되는 기능을 1개 이상 가진 층이 더 있는 것을 특징으로 하는, 생활성 셀룰로오스 막을 제공한다.

- [0029] 9. 본 발명은, 상기 8에 있어서,
- [0030] 상기 항균 물질은 베타-디펜신, 라이조자임, 락토펜린, LL-37, 히스타틴, 뮤코사이딘, 암피실린, 가나마이신, 테트라사이클린, 겐타마이신, 테라마이신, 설과제 및 이의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 것이고,
- [0031] 상기 상처 치유 물질은 암피실린, 가나마이신, 테라마이신, 겐타마이신, 테트라사이클린, 설과제, 베타-디펜신, 히스타틴, 라이조자임, 락토펜린, LL-37, 뮤코사이딘, 재조합 VEGF (vascular angiogenesis growth factor), 콜라겐, 엘라스틴, 라미닌 및 이의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 것이며,
- [0032] 상기 골 형성 촉진 물질은 재조합 BMPs (bone morphogenetic proteins), 콜라겐, 라미닌, 탈회 골 기질 단백질 (demineralized bone matrix proteins), 오스테오백틴, 오스테오칼신, 오스테오펜틴, 삼칼슘인산, 수산화칼슘 및 이의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 것이고,
- [0033] 상기 신경 조직 형성 물질은 재조합 NGFs (nerve growth factors), 콜라겐, 라미닌, 신경 성장 인자 (neurotrophin) 및 이의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 것이며,
- [0034] 상기 장막 재생 물질은 재조합 VEGF, 콜라겐, 라미닌, 성장 호르몬, FGFs (fibroblast growth factors), TGFs (transforming growth factors), 에스트로젠, 인슐린 및 이의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는
- [0035] 것임을 특징으로 하는, 생활성 셀룰로오스 막을 제공한다.
- [0036] 10. 본 발명은, 상기 6에 있어서, 상기 생활성 셀룰로오스 막은 골수 세포, 장막 세포, 골수 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 성체 줄기 세포로 이루어진 군 중에서 선택되는 세포의 배양, 이식과, 배양 및 이식 둘다에 사용되는 것을 특징으로 하는, 생활성 셀룰로오스 막을 제공한다.

효 과

- [0037] 이러한 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막의 제조 방법에 의하면, 보다 효과적으로 멩게류의 피부 각질 내에 존재하는, 미세 셀룰로오스 섬유에 부착된 단백질을 완전하게 제거하고, 미세 셀룰로오스 섬유의 간극을 넓힘으로써 물 및 기질의 투과성을 증가시키며, 미세 셀룰로오스 섬유를 강하게 산화시켜서 부착된 불순물을 완전히 제거함과 동시에 기질 단백질이나 무기질과의 친화성 및 세포들이나 기질의 활성화 기능을 갖도록 하고 부착된 불순물을 완전히 제거함과 동시에 기질 단백질이나 무기질과의 친화성 및 세포들이나 기질의 활성화 기능을 갖는 생활성 셀룰로오스 막을 제조할 수 있다.
- [0038] 또한, 이러한 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막의 제조 방법에 의하면, 산화 처리 후 미세 셀룰로오스 표면을 수산화칼슘으로 처리하여 상기 표면에 수산화칼슘 아파타이트 나노 파티클 미세 결정체가 피복됨으로써 이러한 피복 물질이 생체 내에 사용시 골 재생을 돕고, 특히 유리된 칼슘 이온이 주위 조직 내에 있는 세포들과 기질의 신진대사를 활성화시키는 기능성 생활성 셀룰로오스 막을 제조할 수 있다.
- [0039] 또한, 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막의 제조 방법에 의하여 얻은 생활성 셀룰로오스 막은, 아미노산 함량은 0 중량%이고 글루코오스의 함량은 95 중량% 이상으로서 단백질은 완전하게 제거되고 글루코오스의 순도가 매우 높기 때문에 인체에 더욱 안전하고 다양하게 적용할 수 있다.
- [0040] 또한, 멩게류의 셀룰로오스는 대단히 치밀하여 물 투과성이 매우 낮고, 이러한 멩게류의 셀룰로오스를 이용하여 종래의 방법에 따라 제조한 셀룰로오스 막 역시 기질 내에서 기질액을 잘 투과시키지 못하고 (종래의 방법에 따라 제조한 셀룰로오스 막에 물을 0.3 ml 정도 떨어뜨린 경우에는 물의 대부분이 셀룰로오스 막을 빠져 나가지 못함) 그로 인하여 생활성 기능이 낮은 문제점이 있었는데 비하여, 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막은, 그 제조시 탄력적인 신장 장치를 이용해서 지속적으로 신장시킴으로써 물 투과성이 현저히 개선될 뿐만 아니라 (본 발명의 제조 방법에 따라 제조한 생활성 셀룰로오스 막에 0.3 ml 정도 떨어뜨렸을 때 대부분의 물이 약 1분 이내에 생활성 셀룰로오스 막을 빠져 나감) 기질 물질의 투과성 역시 현저하게 개선되므로 이러한 생활성 셀룰로오스 막을 생체 조직 내에 사용시 세포들과 세포들 사이를 폐쇄시키지 않고 잘 적용할 수 있으며 그로 인해 생활성이 높아져 인체에 더욱 안전하고 다양하게 적용될 수 있다.
- [0041] 특히, 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막은 이와 같이 현저히 개선된 물 및 기질 물질 투과성으로 인하여 영양 및 산소 공급을 원활하게 할 수 있어 세포 배양에도 사용될 수 있다.
- [0042] 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막은, 구체적으로, 창상이나 화상 등에 의해 생긴 상처에 대한 항균, 상처 보호, 혈액 응고 또는 상처 치유 촉진, 골절이나 골 결손 부위의 치유를 촉진시키는 골 형성 유도 또는 골 이식, 그리

고 외상이나 절단 등에 의한 신경 장애를 회복시켜 주는 신경 재생 유도, 손상 받은 장막의 재생을 촉진 장막 재생 유도, 골수 세포, 장막 세포, 배아 줄기 세포 또는 성체 줄기 세포의 배양 및/또는 이식 등에 효과적으로 사용할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

1. 멩게류에서 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막을 제조하는 방법

0) 멩게류에서 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막을 제조하는 방법

본 발명은 멩게류의 피부 각질에 강산과 강염기를 반복 처리하는 생활성 셀룰로오스 막의 제조 방법에 있어서,

(i) 셀룰로오스 막을 단백질 분해 효소로 처리하는 공정,

(ii) 상기 공정에서 얻은 셀룰로오스 막을 물리적으로 신장시켜 셀룰로오스 막 내부의 투과성을 증가시키고, 잔존 미세 단백질의 제거를 용이하게 하는 공정,

(iii) 상기 공정에서 얻은 셀룰로오스 막에 차아염소산나트륨 (NaClO), 과황산칼륨 (K₂S₂O₈), 과산화수소 (H₂O₂), 산소 (O₂), 일산화이염소 (Cl₂O), 오존 (O₃) 및 염소 (Cl₂)로 이루어진 군 중에서 선택되는 산화제로 처리하여 셀룰로오스 막을 산화시키는 공정 및

(iv) 상기 공정에서 얻은 셀룰로오스 막에 수산화칼슘을 처리하여 셀룰로오스 막 표면을 수산화칼슘 아파타이트 나노 파티클 미세 결정체로 피복하는 공정

을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 생활성 셀룰로오스 막의 제조 방법에 관한 것이다.

이러한 본 발명에 관하여 이하에서 자세히 설명한다.

1) 멩게류의 선택

다양한 종류의 멩게류들 중에서 의료용으로 사용하기 위한 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막을 제조하기 위해서는 독성이 없고 장기간 사람들이 식용으로 사용해 온 식용 멩게와 미더덕을 선택하는 것이 안전하다.

피부 보호막과 같이 비교적 두꺼운 셀룰로오스 막이 필요한 경우에는 주로 멩게를 선택하고, 골 재생 유도막, 신경 재생 유도막 및 장막 재생 유도막과 같이 얇은 셀룰로오스 막이 필요한 경우에는 주로 미더덕을 선택한다.

멩게에서는 피부 각질이 두껍고 거친 뿌리 부위는 피하고, 비교적 부드럽고 평탄한 멩게 피부의 측방 부위를 선택한다. 미더덕에서는 주로 얇은 포낭 부위를 선택하는데 포낭이 크고 충분히 팽윤되어 있는 것이 유리하였다. 각각의 멩게와 미더덕의 피부 각질은 색깔이 선명하고 윤택이 나는 것을 선택하여야 하는데 경우에 따라서는 피부 감염에 의해서 변색되거나 변형되어 있는 것은 제외시킨다. 멩게와 미더덕의 피부 각질은 수중에서 충분히 질기고 견고하기 때문에 다량을 축적해서 보관해도 변형이 생기지 않지만 다수의 부패 세균에 의하여 오염되어 있는 경우가 많으므로 다량을 장기간 보관하지 말고 신속하게 처리한다.

비교적 큰 생활성 셀룰로오스 막을 제조하기 위하여, 비대된 포낭을 가지도록 폐쇄된 공간에서 양식한 멩게류를 사용하는 것이 좋다.

한편, 식용 멩게와 미더덕 외에 다양한 종류의 멩게류를 사용해서 생활성 셀룰로오스 막을 제조하는 경우에도 각각 멩게류의 피부 각질이 부드럽고 평탄한 부위를 선택하여 분리 과정을 진행한다.

2) 멩게류의 피부 각질의 세척

멩게류의 피부 각질에는 폐수성 불순물과 각종 세균들이 존재할 수 있으므로 일차적으로 충분한 세척이 필요하다. 우선 흐르는 물에서 세척하여 표면에 부착된 용해성 불순물을 제거하고, 세척제 용액, 예컨대 5%의 옥시크린 세척제 용액 등에서 1 시간 이상 세척한다.

3) 멩게류의 피부 각질에 부착된 잔존 육질 제거

[0061] 멧게류의 피부 각질의 내면에는 근육이나 장막 등이 단단하게 부착되어 있으므로 약 1 일 동안 강염기, 예컨대 0.1M 수산화칼륨 용액에 넣어서 육질을 포함하는 내피 연조직을 대부분 제거한다.

[0062] **4) 멧게류의 피부 각질에 강한 염산 처리**

[0063] 멧게류 피부 각질에 포함되어 있는 색소, 단백질, 불순물 등을 완전히 제거하기 위해서는 여러 차례 강한 염산 용액의 처리가 필요하다.

[0064] 상기 3) 항에서 처리된 멧게류의 피부 각질을 40 - 50 °C의 강산, 예컨대 1M 염산 용액에서 교반하면서 약 6 시간 동안 처리하고, 염산 용액을 제거한 후에 다시 새로운 40 - 50 °C의 강산, 예컨대 1M 염산 용액에서 약 6 시간 동안 처리한다. 이와 같이 강한 염산 처리를 5 - 10 회 반복한다. 강한 염산 처리 과정에서 독성 가스가 발생되므로 반드시 화학 배기실 내에서 수행하고 강한 염산의 교환은 자동 흡입 및 배관 장치를 사용한다.

[0065] 멧게류에 여러 차례 강한 염산 처리 후에 하얀 셀룰로오스 막이 나타나고 셀룰로오스 막이 수용액 내에서 약하게 투명한 상태가 될 때까지 상기의 강한 염산 처리를 반복한다. 강한 염산 처리에 의해서 매우 얇아진 셀룰로오스 막은 교반에 의해서 손상받을 수 있으므로 교반시 셀룰로오스 막들이 엉기거나 서로 부딪히지 않게 교반 속도를 감소시킨다.

[0066] 멧게류에 강한 염산을 처리한 경우에는 멧게류의 피부 각질에 잔존되어 있는 단백질과 양이온성 불순물이 대부분 제거된다.

[0067] **5) 멧게류의 피부 각질에 강한 수산화나트륨 알카리 처리**

[0068] 멧게류의 피부 각질에 부착되어 있는 잔존 유기 물질 중에서 분해되기 어려운 소기성 단백질들과 양이온성 불순물들을 제거하기 위하여 상기 4) 항에서 처리된 셀룰로오스 막들을 약 6 시간 동안 40 - 50 °C의 강염기, 예컨대 1M 수산화나트륨 용액에 넣고 교반하고, 수산화나트륨 용액을 제거한 후에 다시 새로운 40 - 50 °C의 강염기, 예컨대 1M 수산화나트륨 용액에서 약 6시간 동안 처리한다. 이와 같이 강한 수산화나트륨 처리를 2 - 3 회 반복한다. 강한 수산화나트륨 처리 과정에서도 독성 가스가 발생되므로 반드시 화학 배기실 내에서 수행하고 강한 수산화나트륨의 교환은 자동 흡입 및 배관 장치를 사용한다.

[0069] 멧게류에 여러 차례 강한 수산화나트륨 처리 후에는 하얀 셀룰로오스 막이 더욱 하얗게 되면서 셀룰로오스 막의 투명성이 약간 감소되면서 셀룰로오스 막 표면에 빛의 반사가 증가된다. 강한 수산화나트륨 처리에 의해서 더욱 얇아진 셀룰로오스 막은 교반에 의해서 손상 받을 수 있으므로 교반시 셀룰로오스 막들이 엉기거나 서로 부딪히지 않게 교반 속도를 감소시킨다.

[0070] 멧게류에 강한 수산화나트륨을 처리한 경우에는 멧게류의 피부 각질에 잔존되어 있는 소수성 단백질과 음이온성 불순물이 대부분 제거된다.

[0071] **6) 멧게류의 피부 각질에 단백 분해 효소 처리**

[0072] 상기 5) 항에서 처리된 셀룰로오스 막의 내부에 잔존되어 있는 단백질과 불순물을 제거하기 위하여 단백질 분해 효소를 처리한다. 단백질 분해 효소로는, 예컨대, 트립신, 펩신 또는 이의 혼합물 등을 사용할 수 있으며, 여기에 엘라스타제, 콜라게나제 또는 이의 혼합물 등을 더 추가하여 사용할 수도 있다. 단백질 분해 효소 처리의 구체적인 일례는 다음과 같다.

[0073] 우선, 산성에 내성이 많은 단백질을 제거하기 위하여 50 °C의 0.1 M 초산나트륨 용액 (pH 2.0)에서 펩신 (100 units/mL)으로 12 시간 배양하고 증류수로 세척한 후에 중성 완충액 PBS 용액으로 중화시킨다. 그리고 다시 셀룰로오스 막 내부에 잔존하는 중성 단백질을 제거하기 위하여 50 °C의 PBS 용액에서 트립신 (100 BAEE [N-benzoyl-L-arginine ethyl ester] units/mL)으로 12 시간 배양한다.

[0074] 단백질 분해 효소 처리 후에는 셀룰로오스 막이 매우 유연해지고 적은 기계적 손상에 의해서도 변형이 생길 수 있으므로 주의하여야 한다.

[0075] 7) 멩계류의 피부 각질을 탄력적으로 신장시킵

[0076] 상기 6) 항에서 처리된 셀룰로오스 막은 미세 셀룰로오스 막을 서로 단단하게 연결시키는 부착 단백질이 제거됨에 따라 셀룰로오스 막이 쉽게 신장될 수 있는데, 잘못해서 무리하게 신장시키면 셀룰로오스 막이 파열될 수 있으므로 도 1에서와 같이 고정자 (4) 및 집게 (3)로 셀룰로오스 막 (1)을 고정시키는 고무줄 또는 용수철 (2)을 이용해서 균등하게 지속적으로 셀룰로오스 막 (1)을 신장시킬 수 있는 탄력적 신장 장치를 사용한다.

[0077]

[0078] 8) 멩계류의 피부 각질에 강한 염산 처리 및 중화시킵

[0079] 상기 7) 항에서 처리된 셀룰로오스 막은 신장에 의해서 셀룰로오스 내부가 쉽게 노출되는데, 셀룰로오스 내부의 잔존 부착 단백질을 완전히 제거하기 위하여 다시 강한 염산 처리를 한다. 즉, 6) 항에서 처리된 셀룰로오스 막을 40 - 50 °C의 1M 염산 용액에서 교반하면서 약 6 시간 동안 처리하고 염산 용액을 제거한 후에 다시 새로운 40 - 50 °C의 1M 염산 용액에서 약 6 시간 동안 처리한다. 이와 같이 강한 염산 처리를 2 - 3 회 반복한다. 강한 염산 처리 과정에서 독성 가스가 발생되므로 반드시 화학 배기실 내에서 수행하고 강한 염산의 교환은 자동 흡입 및 배관 장치를 사용한다.

[0080] 염산 처리가 끝난 셀룰로오스 막은 증류수로 2 - 3 회 세척하고 다시 중성 PBS 완충 용액으로 중화시킨다.

[0081] 9) 멩계류의 피부 각질을 산화제를 사용해서 표면을 산화시킵

[0082] 상기 8) 항에서 처리된 셀룰로오스 막을 차아염소산나트륨 (NaClO), 과황산칼륨 (K₂S₂O₈), 과산화수소 (H₂O₂), 산소 (O₂), 일산화이염소 (Cl₂O), 오존 (O₃) 및 염소 (Cl₂)로 이루어진 군 중에서 선택되는 산화제로 처리하여 산화시킨다. 구체적인 일례로서 상기 8) 항에서 처리된 셀룰로오스 막을 0.1M NaOCl 용액에 12 시간 동안 처리해서 셀룰로오스 막 표면을 산화시킨다.

[0083] 이와 같이 셀룰로오스 막을 산화제로 처리하면 막 표면은 음성 전하 상태가 되고, 또한 막의 반응 엔트로피가 증가되어 추후 행하는 수산화칼슘의 피복 및 항균물질 등의 피복을 용이하게 한다.

[0084] 즉, 셀룰로오스 막을 산화제로 처리하지 않은 채 수산화칼슘 및 항균 물질 등을 피복시키는 경우 수산화칼슘 및 항균 물질 등의 셀룰로오스 막으로의 부착성이 나빠 잘 피복되지 않고, 따라서 수산화칼슘 및 항균 물질 등을 셀룰로오스 막에 피복한 후 추가로 이를 건조시키거나 열로 압착하여야 어느 정도의 부착성이 나타나는 문제가 있다.

[0085] 그러나, 본 발명의 방법에 따라 셀룰로오스 막 표면을 산화제로 처리하면 표면의 반응 엔트로피가 증가되어 화학적으로 수산화칼슘 및 항균 물질 등을 셀룰로오스 표면에 부착시키기 때문에 이들의 피복을 용이하게 한다.

[0086] 10) 멩계류의 피부 각질을 수산화칼슘 (Ca(OH)₂)을 사용해서 수산화칼슘 아파타이트 나노 파티클 미세 결정체를 피복시킵

[0087] 상기 9) 항에서 처리된 셀룰로오스 막을 증류수로 2 - 3회 세척한 후에 바로 수산화칼슘 포화 용액에 24 시간 침전시켜서 셀룰로오스 미세 섬유 표면에 수산화칼슘 아파타이트 나노 파티클 미세 결정체를 피복시킨다. 여기서 나노 파티클 미세 결정체라 함은 그 직경이 1 내지 100 nm인 결정체를 말한다.

[0088] 이와 같은 공정으로 인하여 셀룰로오스 표면에 피복된 수산화칼슘 아파타이트 나노 파티클 미세 결정체는 골 재생을 돕고 특히 유리된 칼슘 이온이 주위 조직 내에 있는 세포들과 기질의 신진 대사를 활성화시킨다.

[0089] 또한, 상기한 9) 항의 공정을 거침으로 인하여 셀룰로오스 막의 표면은 강한 음성 전하 상태가 되고, 이러한 산화막의 강한 음성 전하 상태는 생체 조직 내에서 독성을 나타낼 수 있는 문제가 있지만, 이러한 산화 처리를 거친 셀룰로오스 막을 본 항의 공정에 의하여 수산화칼슘으로 처리하게 되면 상기한 강한 음성 전하 상태가 어느 정도 중화되어 약음성의 셀룰로오스 막이 되고 그로 인해 강한 음성 전하 상태로 인한 독성이 제거된다.

[0090] 이러한 산화막의 독성 제거는 추후 설명하는, 산화 처리를 거친 셀룰로오스 막에 항균 물질 등의 피복하는 것에

의하여도 달성된다.

[0091]

[0092]

11) 멩계류의 피부 각질의 중화 반응

[0093]

상기 10) 항에서 처리된 셀룰로오스 막을 증류수로 2 - 3회 세척한 후에 중성 PBS 완충 용액에서 중화시킨다. 이때 중성 PBS 완충 용액을 3 - 5 차례 교환하여 셀룰로오스 막이 충분히 중성 상태가 된 생활성 셀룰로오스 막을 제조한다.

[0094]

12) 생활성 셀룰로오스 막의 건조

[0095]

도 2에서 보는 바와 같이 11) 항에서 만들어진 생활성 셀룰로오스 막을 7) 항에서 사용한 도 1의 탄력적 신장 장치에 다시 장착하여 가볍게 신장시킨 후에 신장 장치에서 신장된 상태로 바로 건조기 내에서 3 - 6 시간 동안 건조시킨다. 건조된 생활성 셀룰로오스는 매우 얇고 쉽게 파절될 수 있으므로 주의하여야 한다.

[0096]

건조된 셀룰로오스 막 (상기한 모든 공정을 거쳐 얻은 셀룰로오스 막)은 순수한 셀룰로오스 당질이므로 정전기적으로 쉽게 양성 전하를 띠기 때문에 다른 불순물이 쉽게 부착될 수 있는 상태이므로 건조기 내부는 청결하여야 하며 건조기에서 셀룰로오스 막이 건조된 후에는 바로 밀폐된 용기에 보관하여야 한다. 이때 가능하면 진공 건조기 등에 보관하는 것이 바람직하다.

[0097]

13) 생활성 셀룰로오스 막의 소독

[0098]

생활성 셀룰로오스 막의 소독 방법에는 대체로 두 가지 방법 중 하나가 사용될 수 있다.

[0099]

첫 번째 소독 방법은 상기 1) 내지 12) 과정을 수행하여 얻은 생활성 셀룰로오스 막을 탄력적 신장 장치에 장착된 채로 밀폐된 용기에 넣어서 autoclave에서 멸균 소독하거나, 또는 건조된 생활성 셀룰로오스 막을 탄력적 신장 장치에서 제거하고 사용하고자 하는 용도에 맞게 절단한 후에 에틸렌옥사이드를 사용하는 가스 소독을 수행해서 완전히 멸균 및 포장하는 방법이다. 이러한 첫 번째 방법 중 전자의 방법에 의하는 경우에는 최대 크기의 생활성 셀룰로오스 막을 순수한 상태로 얻을 수 있으며, 후자의 방법에 의하는 경우에는 매우 다양한 종류의 생활성 셀룰로오스 막을 바로 제조할 수 있는 반면에 생활성 셀룰로오스 막에 소량의 에틸렌 옥사이드가 잔류될 수 있으므로 밀폐 용기의 개봉시에 에틸렌 옥사이드가 저절로 기화되도록 충분한 시간을 방지할 필요가 있다.

[0100]

두 번째 소독 방법은 소독 과정을 거치기 전에 생활성 셀룰로오스 막의 외면에 무독성 카본 잉크를 사용해서 인식 표시를 함으로써 셀룰로오스 막의 외면과 내면을 쉽게 판별할 수 있도록 구별하며, 각각의 용도에 따라 크기를 다르게 절단하고, 특히 피부 재생, 골 재생, 신경 재생, 및 장막 재생 등의 특성에 따라 생체 물질 등을 피복하는 과정을 포함한다. 그리고 소독 과정 중의 포장 재료는 한쪽 면이 투명한 비닐 등의 소재를 사용해서 내용물의 상태를 쉽게 판별할 수 있게 한다.

[0101]

2. 본 발명의 제조 방법에 의하여 얻은 생활성 셀룰로오스 막

[0102]

0) 본 발명의 제조 방법에 의하여 얻은 생활성 셀룰로오스 막

[0103]

본 발명의 생활성 셀룰로오스 막을 제조하기 위해서는 멩계류의 멩계 및 미더덕의 윗부분의 부드러운 피부 각질을 선택하여, 우선 흐르는 물에서 세척하고, 5 %의 옥시크린 세척제 용액에서 1시간 이상 세척한 후, 약 1 일 동안 0.1M 수산화 칼륨 용액에 넣어 두었다.

[0104]

상기 피부 각질을 40 - 50 °C의, 1M 염산 용액에서 교반하면서 약 6 시간 동안 처리하고 염산 용액을 제거하는 공정을 5 회 반복하고, 약 6 시간 동안 40 - 50 °C의, 1M 수산화나트륨 용액에 넣고 교반하고 수산화나트륨 용액을 제거하는 공정을 5 회 반복하여 셀룰로오스 막을 얻었다.

[0105]

상기 셀룰로오스 막을 50 °C의 0.1 M 초산나트륨 용액 (pH 2.0)에서 펩신 (100 units/mL)으로 12 시간 배양하고 증류수로 세척한 후에 중성 완충액 PBS 용액으로 중화시킨 후, 50 °C의 PBS 용액에서 트립신 (100 BAEE [N-benzoyl-L-arginine ethyl ester] units/mL)으로 12 시간 배양한 후, 도 1의 탄력적 신장 장치를 이용하여 셀룰로오스 막을 신장시켰다.

- [0106] 상기 셀룰로오스 막을 40 - 50 °C의 1M 염산 용액에서 교반하면서 약 6 시간 동안 처리하고 염산 용액을 제거하는 공정을 3 회 반복하고, 염산 처리가 끝난 셀룰로오스 막을 증류수로 3 회 세척한 후 다시 중성 PBS 완충 용액으로 중화시켰다.
- [0107] 상기 셀룰로오스 막을 0.1M NaOCl 용액에 12 시간 동안 처리해서 셀룰로오스 막 표면을 산화시키고, 증류수로 3 회 세척한 후에 바로 수산화칼슘 포화 용액에 24 시간 침전시켜서 셀룰로오스 미세섬유 표면에 수산화칼슘 피복을 시킨 다음, 증류수로 3 회 세척한 후에 중성 PBS 완충 용액을 3 차례 교환하면서 셀룰로오스 막을 충분히 중화시켰다.
- [0108] 마지막으로, 상기 셀룰로오스 막을 도 1의 탄력적 신장 장치에 다시 장착하여 가볍게 신장시킨 후에 신장 장치에서 신장된 상태로 바로 건조기 내에서 건조시켜 본 발명의 셀룰로오스 막을 얻었다.
- [0109] **1) 본 발명의 제조 방법에 의하여 얻은 생활성 셀룰로오스 막의 구성 성분**
- [0110] 상기한 본 발명의 제조 방법에 의하여 얻은 셀룰로오스 막은 생체 내에서 생물학적인 활성을 유도하는 특성이 크기 때문에 본 발명에서는 이 셀룰로오스 막을 생활성 셀룰로오스 막으로 명명한다.
- [0111] 이러한 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막은 두께가 30 내지 150 μm 이고, 크기가 10 mm \times 10 mm 내지 50 mm \times 50 mm이다. 바람직하게는, 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막은 두께가 50 내지 100 μm 이고, 크기가 30 mm \times 30 mm 내지 50 mm \times 50 mm이다.
- [0112] 이러한 본 발명의 산화 처리된 생활성 셀룰로오스 막의 순수도를 확인하기 위하여 Field Emission Scanning Electronmicroscope (FESEM)를 사용한 원소 분석을 실시하였으며, 그 결과 당류 분자에 해당하는 탄소와 산소 원소만 검출되었다.
- [0113] 또한, 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막을 1N HCl 용액 내에서 분해 및 용해시킨 후에 실시한 아미노산 분석 (Amino Acid Analyzer (Hitachi Co. *Amino Acid Analyzer*, Model L-8900)에서 실시한 liquid chromatography에서도 아미노산에 해당하는 피크는 발견되지 않았다.
- [0114] 또한, 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막의 당류 성분을 확인하기 위하여 High performance anion-exchange chromatography (HPAEC)를 수행하였는데, 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막 3.5 mg을 실온에서 1 mL 72% H₂SO₄로 45 분간 용해시켰으며, 2.5 시간 동안 끓여서 가수분해시키고 얻은 상청액 1 mL을 13,000 rpm (1.66 x 10⁴ g)에서 15 분 동안 원심분리시켜서 얻은 상청액을 미세 여과 (MFS-25, Advantec MFS, Inc., USA)한 후에 anionic exchange column (Carbopac PA-1, 4 X 250mm, Dionex Co., USA)을 사용해서 HPAEC를 수행하였다. 이때 mobile solution은 18 mM NaOH로 1.0 mL/min 유속을 유지하였으며 pulsed amperometric detector (Electrochemical Detector, ED50, Dionex Co., USA)를 사용하여 검색하였다. 결과적으로 대부분 (99% 이상)이 glucose 성분으로 검색되었으며 다른 종류의 당류들은 무시해도 될 정도의 소음 효과에 가까웠다 (도 3).
- [0115] 상기한 실험 결과를 모두 종합적으로 고려하면, 본 발명의 제조 방법으로 얻은 생활성 셀룰로오스 막은 멍게류의 기질 단백질 성분이 완전히 제거된 순수한 β -1,4-glucose 성분 (95 중량% 이상)으로 확인되었다.

[0116] **2) 본 발명의 제조 방법에 의하여 얻은 생활성 셀룰로오스 막의 생체 내 안전성**

- [0117] 상기 0) 항에서 설명한 바와 같이 중성 PBS 완충 용액으로 충분히 중화시켜 얻은 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막의 생체 내 안전성을 확인하기 위하여 세포 독성 검사를 수행하였다.
- [0118] 이는 ISO 10993-5 시험법을 따라서 시행하였는데 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막을 37 \pm 2 °C에서 72 시간 동안 용출한 수용액을 사용하여 실험군 1 내지 3의 배지를 만들었으며, 세포 독성이 있는 것으로 알려져 있는 polyurethan film을 도포해서 양성 대조군 1 내지 3을 만들었고, 세포 독성이 전혀 없는 것으로 알려져 있는 polyethylene film을 사용해서 음성 대조군 1 내지 3을 만들었다. 우선 NCTC clone 929 (ATCC CLC-1) 세포를 5% CO₂, 37 °C 배양기에서 24 시간 이상 배양한 후 80% 정도 monolayer 형성을 확인하였다. 그리고 배지를 제거한 뒤 한천 용액 (1.5%) 3 mL을 증충하고, 양성 대조군 1 내지 3, 음성 대조군 1 내지 3, 실험군 1 내지 3을 배양 용기에 올려 놓는다. 한천 평판을 5% CO₂, 37 °C 배양기에서 24 시간 배양한 뒤에 0.01% neutral red 염색

을 하여 광학 현미경으로 관찰하고 반응 지수를 측정하였다.

[0119] 결과적으로 음성 대조군 등급이 0, 양성 대조군 등급이 2, 실험군 등급이 0 이므로, 실험군에서는 전혀 세포 독성이 관찰되지 않았다 (표 1).

표 1

[0120]

세포 독성 반응				
	탈색도 (zone index)	용해도 (lysis index)	세포 반응 (cell reactivity)	등급 (grade)
음성대조군 1	0	0	0/0	0
음성대조군 2	0	0	0/0	0
음성대조군 3	0	0	0/0	0
양성대조군 1	3	5	3/5	3
양성대조군 2	2	5	2/5	2
양성대조군 3	2	5	2/5	2
실험군 1	0	0	0/0	0
실험군 2	0	0	0/0	0
실험군 3	0	0	0/0	0

[0121] **3) 본 발명의 제조 방법에 의하여 얻은 생활성 셀룰로오스 막의 세포에 대한 유전 독성**

[0122] 상기 0) 항에서 설명한 바와 같이 중성 PBS 완충 용액으로 충분히 중화시켜 얻은 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막의 세포에 대한 유전 독성을 확인하기 위하여 OECD guideline에 따라 Salmonella typhimurium를 사용해서 Reverse mutation assay를 수행하였다.

[0123] 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막을 37 ± 2 °C에서 72 시간 동안 용출한 수용액을 사용하여 실험군 배지를 만들었으며, 시험관에 각각 셀룰로오스 용출액을 포함하지 않는 음성 대조군, 셀룰로오스 용출액을 포함하는 양성 대조군 및 실험군에 0.5 mM histidine/biotin 용액을 첨가한 다음 항온수조에서 45 °C top agar를 모든 시험관에 넣는다. S9 혼합액 첨가군의 경우 신선하게 준비된 S9 혼합액 0.5 mL을 넣고 적정 배양된 균주를 0.1 mL 첨가하고, S9 혼합액 무첨가군의 경우에는 S9 혼합액을 제외한 균주만 0.1 mL 첨가하였다. 각각의 시험관들은 내용물들을 잘 섞어서 최소 포도당 한천 (평판) 배지에 부은 후 좌우로 잘 흔들어 균히고 37 °C에서 48 시간 배양한 다음 역변이에 의해 형성된 콜로니를 계수하였다.

[0124] 결과적으로 실험군의 S9 혼합액 첨가군 및 비첨가군 모두에서 콜로니수가 음성대조군과 차이가 없으므로 유전적 세포 독성이 없는 것으로 판단되었다 (표 2).

표 2

[0125]

S9 혼합액 첨가 유무 및 시험 균주별 역변이 콜로니 수 변화에 의한 유전 세포 독성 검사 결과

revertants/plate				
S9 처리유무	strain	음성대조군	실험군	양성대조군
S9 비첨가군 (S9-)	TA98	124	121	1216
	TA100	138	132	1116
	TA102	12	12	383
	TA15359	9	2	117
S9 첨가군 (S9+)	TA97	130	129	1860
	TA98	108	83	1200
	TA100	116	114	1436
	TA1505	10	7	208

[0126] **3. 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막의 용도 및 부가적인 기능성 생활성 셀룰로오스 막의 제조**

[0127] 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막은 창상 및 화상 등에 의해 생긴 상처를 항균 소독, 보호, 치유를 촉진시키기 위한 상처 보호막으로 사용할 수 있으며, 파손된 골 조직을 재생하기 위한 골 재생 유도, 골 형성 촉진, 골 이식 막, 손상된 신경 조직의 재생을 촉진하는 신경 재생 유도막, 내장의 손상된 장막의 결손을 보완하고 재생을 유도하는 장막 재생 유도막, 그리고 다양한 종류의 줄기세포들을 부착 배양시켜서 생체에 이식 전달하기 위한 줄기세포 배양막 등으로 사용할 수 있다.

[0128] **1) 멩계류에서 얻은 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막으로 상처 보호막의 제조 및 적용 방법**

[0129] 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막은 생체의 피부 상처에서 치유를 촉진시키는 효과를 갖고 있는데, 백서 (白鼠)의 등쪽 피부에서 1 × 1 cm 정도의 피부를 절제하여 궤양을 형성시킨 후에 궤양 부위를 통상적인 지혈 방법으로 처치한 경우와 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막 봉합술로 처치한 경우를 비교 관찰한 결과, 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막을 사용하여 피부 상처 부위를 봉합한 경우에서 매우 신속한 치유 효과를 관찰하였다 (도 4a 내지 도 4d).

[0130] 이를 자세히 보면 다음과 같다.

[0131] 도 4a에 있어서, 백서 등쪽 피부를 절제한 후에 변연부 봉합만 한 경우, 수술 후 7일 경에는 피부 상처에 깊은 궤양이 생겼으며, 피하 결체 조직에 염증 세포 침윤이 심하였고, 피부에 생긴 혈병은 쉽게 탈락되며, 궤양 표면에 농양성 염증 침출물이 관찰되었다.

[0132] 이에 비하여 백서 등쪽 피부 절제 후에 궤양 부위를 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막으로 덮고 봉합한 경우 (도 4b)에는, 수술 후 7일 경에 피부 상처 부위에 얇은 궤양이 관찰되고, 상처 부위가 대부분 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막으로 덮혀 있었다. 그리고 고배율 관찰에서 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막 인접부까지 섬유성 조직이 증식되어 상처 부위가 치유되고 있는 양상이 관찰되었다.

[0133] 도 4c에 있어서, 백서 등쪽 피부를 절제한 후에 변연부 봉합만 한 경우, 수술 후 14일 경에는 피부 상처 부위에 증식성 상흔이 생겼으며, 염증성 반응이 지속적으로 잔존하고, 상처 부위의 상피 재생이 불규칙적이며, 상피 각화가 불량하였다.

[0134] 반면에 백서 등쪽 피부 절제 후에 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막으로 덮고 봉합한 경우 (도 4d)에는, 수술 후

14일 경에는 피부 상처가 거의 회복되었으며, 염증반응도 거의 사라졌고, 상처 부위의 각화가 잘 이루어져 상피 조직으로 덮히고, 피하 결체 조직의 형성도 정상적이어서 잘 발달된 육아조직으로 채워져 있었다.

[0135] 따라서, 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막을 피부 상처의 보호막으로 사용하는 경우에 피부 상처 치유 촉진 및 상흔 발생 억제 효과 등을 얻을 수 있었다.

[0136] 이러한 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막을 인체의 바깥 면에서 상처 보호 및 치유 촉진 등의 목적으로 사용하는 경우에는 다음과 같이 항균 물질, 아가로스와 같은 상처 보호제, 휘브린 및 트롬빈와 같은 혈액 응고제, 상처 치유 촉진제 등의 다양한 생체 전달 물질 등을 셀룰로오스 막 내면에 피복하여 상기한 물질들을 함유하는 층을 형성할 수 있다.

[0137] **가) 본 발명의 항균 소독용 생활성 셀룰로오스 막 (생활성 셀룰로오스 막 내면에 항균 기능 층이 형성된 것임)의 제조**

[0138] 상처 치유에 필요한 항균 소독 물질에는 일반적인 화학적 살균제들이 포함되고, 이들의 대표적인 예로는 음이온성 (anion)이거나 자유 전자 라디칼을 만들어내는 것으로, 알코올, 클로르헥시딘, 요오드 용액 등이 있는데, 이들은 대부분 상처에도 독성을 주기 때문에 음성 이온제는 사용하지 않는 것이 유리하다.

[0139] 반면에 상기한 일반적인 화학적 살균제 대신 사용할 수 있는, 다양한 종류의 생체 항균 소독 물질은 음성 전하를 띠는 세균에 부착이 용이한 양성 전하를 띠는 화학 물질이나 짧은 단백질로 이루어져 있다. 따라서 이들 양성 물질을 생활성 셀룰로오스 막에 부착시키기 위해서는 특별한 과정이 필요하다.

[0140] 일반적으로 생활성 셀룰로오스 막은 양성 전하를 갖고 있기 때문에 양성 전하를 띠고 있는 생체 항균 물질이 부착되기 어려운 상태이다. 그러므로 생활성 셀룰로오스 막을 음성 전하 상태로 만들어야 하는데, 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막의 제조 방법에서는 셀룰로오스 막에 생체 항균 물질이 쉽게 부착될 수 있도록 셀룰로오스 막을 산화시키는 공정을 거치도록 한다.

[0141] 본 발명의 항균 소독용 생활성 셀룰로오스 막의 제조 방법을 자세히 보면, 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막의 제조 방법을 설명하는 1. 명세서에서 생활성 셀룰로오스 막을 제조하는 방법 중 12) 항의 건조 공정이 다음과 같이 변형된다.

[0142] 즉, 11) 항에서 만들어진 생활성 셀룰로오스 막을 그 내면이 위쪽을 향하도록 7) 항에서 사용한 도 1의 탄력적 신장 장치에 다시 장착하여 가볍게 신장시킨 후에 약 0.1 M의 항균 물질 함유 수용액을 마이크로 파이펫을 사용해서 3 - 5 씩 상기 생활성 셀룰로오스 막 내면에 고르게 떨어뜨려서 얇게 입히고, 신장기에 부착시킨 채로 건조기에 1 시간 이상 건조시킨 다음 다시 동일한 항균 물질을 같은 방법으로 생활성 셀룰로오스 막 내면에 얇게 입힌 후에 건조기에서 건조시키는 과정을 약 2 - 3 회 반복한다. 이러한 방법으로 다량의 항균 물질을 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막에 단단하게 피복시킬 수 있다.

[0143] 상기한 항균 물질로는 매우 다양한 의약품이 사용될 수 있는데, 주요 항균 물질에는 베타-디펜신, 라이조자임, 락토헤린, LL-37, 히스타틴, 뮤코사이딘 등의 인체 항균 단백질이나 암피실린, 가나마이신, 테트라사이클린, 겐타마이신, 테라마이신, 설파제 등의 항생제 등이 있다.

[0144] **나) 본 발명의 상처 보호용 생활성 셀룰로오스 막 (생활성 셀룰로오스 막 내면에 상처 보호 기능 층이 형성된 것임)의 제조**

[0145] 상처 부위 보호 기능을 부여하기 위하여 부드러운 침습성 소재인 아가로즈 층이나 실리콘 등을 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막 내면에 형성 및 건조시켜, 상처 보호 기능 층을 가지는 생활성 셀룰로오스 막을 제조한다.

[0146] 아가로즈는 무독성이고 유연하므로 상처 부위에 바로 적용할 수 있고, 건조시킨 후에도 물을 흡수하여 젤 상태의 아가로즈로 환원되는 성질을 가지므로 이를 이용하는 것으로서, 생활성 셀룰로오스 막에 젤 상태의 아가로즈를 피복시킨 다음 건조시켜서 장기간 보관할 수 있는, 본 발명의 상처 보호용 생활성 셀룰로오스 막을 제조한다.

[0147] 이를 자세히 보면, 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막의 제조 방법을 설명하는 1. 명세서에서 생활성 셀룰로오스

막을 제조하는 방법 중 12) 항의 건조 공정이 다음과 같이 변형된다.

- [0148] 즉, 11) 항에서 만들어진 생활성 셀룰로오스 막을 그 내면이 위쪽을 향하도록 7) 항에서 사용한 도 1의 탄력적 신장 장치에 다시 장착하여 가볍게 신장시킨 후에 액체 상태의 1 중량% 아가로즈 수용액을 약 50 °C로 식힌 후에 3 - 5 씩 상기 생활성 셀룰로오스 막 내면에 고르게 떨어뜨려서 얇게 피복시킨 후에 이를 식혀서 젤 상태로 만들며, 이때 상기 생활성 셀룰로오스 막에 아가로즈 젤의 두께가 약 2 mm를 초과하는 경우에는 건조시 생활성 셀룰로오스 막으로부터 아가로즈 젤이 탈락될 수 있으므로 그 두께가 약 2 mm를 넘지 않게 피복시키는 것이 바람직하다. 이 생활성 셀룰로오스 막을 탄력적 신장 장치에 장치시킨 채로 50 °C 건조기 내에서 건조시킨다.
- [0149] 아가로즈를 피복한 다음 건조시켜서 만든 셀룰로오스 막은 인위적으로 소독된 물이나 식염수를 적시거나 출혈에 의해 젖게 되며 이로 인하여 건조된 아가로즈가 수분을 흡수하면서 원래의 부드럽고 탄력이 있는 침습성 보호막이 만들어진다. 그리고 이러한 아가로즈는 일차적으로 상처 부위를 압박해서 지속적인 출혈을 방지하고, 접촉에 의한 통증을 감소시키며, 이차적으로 생활성 셀룰로오스 막이 상처 부위로부터 용이하게 제거되도록 하여 상처 부위로부터 상처 보호막 제거시 통상적으로 상처 부위에 추가 손상이 발생하는 것을 방지하고, 추후 상처 치료를 용이하게 한다.
- [0150] 실리콘을 고정제로 사용하는 경우에는 약 0.5 - 1 mm 정도의 얇은 실리콘 막에 생활성 셀룰로오스 막을 위치시켜서 사용하는데 실리콘은 공기와 물이 통과되지 못하기 때문에 피부 상처 부위에 부착해서 2 - 3 시간 후에 생활성 셀룰로오스 막이 상처 부위에 부착된 다음 외부의 실리콘 막을 제거해 주는 것이 바람직하다. 실리콘 막을 제거시킨 다음에는 생활성 셀룰로오스 막이 쉽게 건조되므로 생리 식염수로 젖힌 거즈 등으로 상처 부위를 덮어 주는 것이 좋다.
- [0151]
- [0152] **다) 본 발명의 혈액 응고용 생활성 셀룰로오스 막 (생활성 셀룰로오스 막 내면에 혈액 응고 기능 층이 형성된 것임)의 제조**
- [0153] 상처 등에 생긴 출혈 부위에 적용하여 혈액의 응고를 유도, 신속하게 지혈시키기 위하여 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막 내면에 혈액 응고 기능을 가진 층을 형성시켜, 혈액 응고 기능 층을 가지는 생활성 셀룰로오스 막을 제조한다.
- [0154] 일반적으로 생체 내에서의 혈액 응고 기전은 복잡한 연쇄 반응에 의해서 빠르게 진행되는데, 이를 요약하면 하계만 획타 (Hageman factor, Factor XII)가 음성 전하를 갖는 콜라겐이나 세포막에 의해서 활성화되어 혈액 응고 기전이 시작되고 그에 따라 만들어진 트롬빈 (Thrombin, Factor IIa)이 휘브리노겐 (fibrinogen)을 중합 반응시켜서 휘브린 (fibrin)이라는 교차 결합 물질을 만들어서 혈액 응고가 이루어진다.
- [0155] 따라서, 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막에 휘브린 모노머를 두껍게 피복 및 건조시킨 후에 트롬빈 가루 막을 그 위에 만들어 주고 이를 추후 출혈된 상처 부위에 적용하면, 생활성 셀룰로오스 막 내면에 피복된 휘브린 모노머 및 트롬빈 가루에 의하여 혈액 응고 중합 반응이 일어나고 그에 따라 혈액을 조기에 응고시켜 지혈시키는 효과를 얻을 수 있다.
- [0156] 이를 자세히 보면, 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막의 제조 방법을 설명하는 1. 명계류에서 생활성 셀룰로오스 막을 제조하는 방법 중 12) 항의 건조 공정이 다음과 같이 변형된다.
- [0157] 즉, 11) 항에서 만들어진 생활성 셀룰로오스 막을 그 내면이 위쪽을 향하도록 7) 항에서 사용한 도 1의 탄력적 신장 장치에 다시 장착하여 가볍게 신장시킨 후에 먼저 1 중량% 휘브린 모노머 수용액을 셀룰로오스 내면에 고르게 바른 후에 무균 건조기에서 완전히 건조시킨 다음 트롬빈 가루를 균등하게 뿌려 주는데 이때 트롬빈 가루 입자의 직경은 약 50 - 100 의 크기이고 입자와 입자의 간격이 약 200 - 300 정도로 분무식으로 분산시킨다. 건조된 휘브린 모노머 위에 트롬빈 가루를 고르게 입힌 셀룰로오스 막은 공기 중의 습기가 침투하지 않게 건조한 곳에서 바로 진공 포장한다.
- [0158] 이와 같이 휘브린 모노머와 트롬빈 가루 막이 차례로 피복된 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막은 출혈된 상처 부위에 광범위하게 사용할 수 있다.
- [0159] **라) 본 발명의 상처 치유 촉진용 생활성 셀룰로오스 막 (생활성 셀룰로오스 막 내면에 상처 치유 촉진 기능 층이 형성된 것임)의 제조**

- [0160] 상처의 이차 감염을 방지하고 치유를 촉진시키기 위하여 항생 물질, 항균 단백질, 혈관 또는 결체 조직 성장 인자 등의 생체 물질을 생활성 셀룰로오스 막에 적용시켜 상처 치유를 촉진하기 위한 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막 내면에 상처 치유 기능을 가진 층을 형성시켜, 상처 치유 촉진 기능 층을 가지는 생활성 셀룰로오스 막을 제조한다.
- [0161] 상기한 생체 물질로는 암피실린, 가나마이신, 테라마이신, 겐타마이신, 테트라사이클린, 설파제 등의 항생 물질, 베타-디펜신, 히스타틴, 라이조자임, 락토크린, LL-37, 뮤코사이딘 등의 항균 단백질, 그리고 재조합 VEGF (vascular angiogenesis growth factor), 콜라겐, 엘라스틴, 라미닌 등의 결체 조직 성장 인자가 포함된다.
- [0162] 이러한 생체 물질을 피복시킨, 상처 치유 촉진 기능을 가지는 생활성 셀룰로오스 막의 제조 방법은, 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막의 제조 방법을 설명하는 1. 명계류에서 생활성 셀룰로오스 막을 제조하는 방법 중 12) 항의 건조 공정을 다음과 같이 변형시키는 것으로 이루어진다.
- [0163] 즉, 11) 항에서 만들어진 생활성 셀룰로오스 막을 그 내면이 위쪽을 향하도록 7) 항에서 사용한 도 1의 탄력적 신장 장치에 다시 장착하여 가볍게 신장시킨 후에 암피실린, 가나마이신, 테라마이신, 겐타마이신, 테트라사이클린, 설파제 등의 항생 물질, 베타-디펜신, 히스타틴, 라이조자임, 락토크린, LL-37, 뮤코사이딘 등의 항균 단백질, 그리고 재조합 VEGF (vascular angiogenesis growth factor), 콜라겐, 엘라스틴, 라미닌 등의 결체 조직 성장 인자 중에서 선택되는 1종 이상의 생체 물질의 수용액 (약 1 중량%)을 상기 생활성 셀룰로오스 막 내면에 고르게 떨어뜨려서 얇게 피복시킨 후에 이를 탄력적 신장 장치에 장치시킨 채로 약 50-70 °C 건조기 내에서 건조시킨다.
- [0164] **2) 명계류에서 얻은 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막으로 골 재생 유도막의 제조 및 적용 방법**
- [0165] 본 발명의, 명계류에서 순수 분리한 생활성 셀룰로오스 막은 골 재생 촉진 효과를 갖고 있는데, 이를 확인하기 위하여 백서의 전두 두개골에 직경 8 mm의 투과성 원형 골 결손을 형성시킨 후에 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막의 골 재생 효과를 관찰하였다.
- [0166] 백서의 전두 두개골에서 8 mm 직경의 원형 투과성 골 결손의 경우 손상된 골 결손이 자연 치유에 의해 모두 채워지지 못하는 크기의 골 결손이므로 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막에 의한 신생골 재생 효과를 관찰하기에 적합하다.
- [0167] 실험 결과, Gore Tex 막을 사용한 대조군에 비하여 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막을 사용한 실험군에서 매우 신속한 신생골 재생이 관찰되었는데, 수술 후 10 주경에는 골 손상 부위가 대부분 두꺼운 신생골로 채워져 있었는데 비하여 대조군에서는 16 주경까지 신생골의 재생이 불량하였다 (도 5a 및 5b).
- [0168] 한편, 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막의 내면에서 매우 활발한 신생골 재생이 수술 후 16 주까지 지속적으로 관찰되었다. 이에 비하여 본 발명의 생활성 셀룰로오스의 외면에서는 신생골 재생이 빈약하고 불규칙적으로 관찰되었다 (도 6). 따라서, 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막의 골 재생 유도 시에 생활성 셀룰로오스 막의 내면이 외면보다 더 활발하게 신생골 재생을 유도하는 것으로 판단된다.
- [0169] 도 7에 있어서, 백서 전두 두개골에서 실험한 투과성 골 결손 부위에 이식한 본 발명의 생활성 셀룰로오스가 만든 골 형성 작용을 전자 현미경으로 관찰한 결과, 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막에 섬유모세포와 콜라겐 섬유들이 직접 단단하게 부착되었고, 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막에 연결해서 바로 골 조직이 침착되는 양상이 관찰되었다.
- [0170] 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막이 골 재생을 유도하는 기전을 확인하기 위하여 골 형성 인자인 BMP-2에 대한 항체를 사용하여 면역조직화학적 염색을 통하여 골 재생 현상을 관찰하였다. 마찬가지로 백서의 전두 두개골의 투과성 골 결손부에 생활성 셀룰로오스 막을 이식하여 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막에 의한 신생골 형성 과정에 BMP-2 면역 반응을 검색하였다.
- [0171] 실험 결과, Gore Tex 막을 사용한 대조군에 비하여 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막을 사용한 실험군에서 수술 후 4-8 주경에 매우 강한 BMP-2의 발현이 골 재생 부위에서 관찰되었는데 BMP-2 단백질이 조골 세포와 골 기질 뿐 아니라 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막에도 강하게 침착되는 현상이 발견되었다 (도 8).

[0172] 이는 양성을 띠는 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막이 골 기질 내에 분포되어 있는 BMP-2 단백질을 신속하게 흡수하여 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막 내부로 침착시키는 특성을 보이는 것으로 이렇게 BMP-2에 의해서 침착된 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막은 인접하는 섬유모세포를 분화시켜서 조골세포로 만들 수 있고 골 재생을 촉진하게 된다. 결과적으로 다른 골 이식제들과 다르게 골질이 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막에 직접 침착되는 이유는 아마도 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막이 BMP-2 등의 골 형성 인자들이나 골 기질 단백질을 우선적으로 침착하기 때문에 생기는 것으로 추측된다.

[0173] 따라서 본 발명에서 얻은 생활성 셀룰로오스 막은 β -1,4-glucose가 갖는 강한 양성에 기질 단백질을 흡수 침착하는 성질이 각종의 생체 반응에서 생활성 유도막의 특성을 보이는 원인으로 생각된다.

[0174] 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막을 이용한 골 재생 유도막에는 여러 가지 적용 방법들이 가능한데, 우선적으로 차폐성 골 재생 유도막으로 유용하다. 이는 순수하게 정제한 멧게류에서 얻은, 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막의 내면이 갖는 독특한 기능으로서, 이론적으로는 이러한 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막이 주변 조직으로부터 섬유모세포의 침윤 증식을 막고 골 결손 부위에 내재하는 골 증식력을 증가시키는 특성을 이용한 것이다.

[0175] 따라서 이러한 골 재생 유도막으로서의 기능을 갖는 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막을 제조하기 위하여는, 멧게류 셀룰로오스 막의 완전한 순수 분리가 필수적이고 또한 셀룰로오스 막의 조직 친화성 또는 생체 물질 전달 기능을 유지하는 것이 중요하다.

[0176] 한편, 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막은 그 내면에 골 형성 촉진 물질을 피복하여 골 형성 촉진 층이 형성된 생활성 셀룰로오스 막으로 제조될 수 있고, 또한 그 내면에 골수 세포 (자기 골수에서 얻은 자가 골수 세포) 또는 골수 줄기 세포를 부착시켜 세포의 배양, 이식과, 배양 및 이식 둘다에 사용될 수 있다.

[0177] **가) 본 발명의 차폐성 골 재생 유도용 생활성 셀룰로오스 막 제조**

[0178] 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막의 제조 방법을 설명하는 1. 멧게류에서 생활성 셀룰로오스 막을 제조하는 방법에 의하여 제조된, 생활성 셀룰로오스 막은 멧게류 (동물) 피부 각질 유래의 순수한 셀룰로오스이며, 산화막 처리 및 칼슘 피복이 되어 있으므로 바로 차폐성 골 재생 유도막으로 사용이 가능하다.

[0179] 따라서, 상기한 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막을 골 결손 부위에 적용하기 위한 적당한 크기로 절단한 후에 포장하여 폴리에틸렌옥사이드 가스 소독을 통하여 멸균시킨 후에 생체에 사용한다.

[0180] 예를 들면, 골 결손 부위가 10×10 mm 정도이면 대략 15×15 mm 크기로 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막을 절단하여 사용하고, 이때 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막이 매우 얇기 때문에 골막 부위에서 유동되거나 접히는 것을 방지하기 위하여 셀룰로오스 막의 주변부를 주변의 골막 부위에 봉합시켜 주는 것이 바람직하다. 이런 경우에는 봉합을 고려하여 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막을 더 충분히 크게 절단하여 사용하는 것이 좋다.

[0181] **나) 본 발명의 골 형성 촉진용 생활성 셀룰로오스 막 (생활성 셀룰로오스 막 내면에 골 형성 촉진 기능 층이 형성된 것임)의 제조**

[0182] 상기한 차폐성 골 재생 유도막의 특성과 함께 지속적인 골 형성을 유도 및 촉진하기 위하여 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막 내면에 여러 가지 종류의 골 형성 촉진 물질을 피복하여 사용할 수 있다.

[0183] 골 형성 촉진 물질로는, 예를 들어, 재조합 BMPs (bone morphogenetic proteins), 콜라겐, 라미닌, 탈회 골 기질 단백질 (demineralized bone matrix proteins), 오스테오넥틴, 오스테오칼신, 오스테오폰틴, 삼칼슘인산, 수산화 칼슘 등이 있다.

[0184] 이러한 골 형성 촉진 물질을 피복시켜 얻는, 골 형성 촉진 기능을 가지는 생활성 셀룰로오스 막의 제조 방법은, 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막의 제조 방법을 설명하는 1. 멧게류에서 생활성 셀룰로오스 막을 제조하는 방법 중 12) 항의 건조 공정을 다음과 같이 변형시키는 것으로 이루어진다.

[0185] 즉, 11) 항에서 만들어진 생활성 셀룰로오스 막을 그 내면이 위쪽을 향하도록 7) 항에서 사용한 도 1의 탄력적 신장 장치에 다시 장착하여 가볍게 신장시킨 후에 재조합 BMPs (bone morphogenetic proteins), 콜라겐, 라미닌, 탈회 골 기질 단백질 (demineralized bone matrix proteins), 삼칼슘인산 등으로부터 선택되는 1종 이상의 골 형성 촉진 물질의 수용액 (약 1 중량%)을 상기 생활성 셀룰로오스 막 내면에 스포이드로 고르게 떨어뜨리게

나 붓으로 고르게 발라 얇게 피복시킨 후에 이를 탄력적 신장 장치에 장치시킨 채로 50 - 70 °C 건조기 내에서 건조시킨다.

[0186] 두 가지 이상의 골 형성 촉진 물질을 피복시키기 위해서는 이들을 혼합하여 피복한다. 또한, 골 형성 촉진 물질을 충분히 두껍게 피복하기 위해서는, 예컨대 10 μm 내지 50 μm 정도, 바람직하게는 20 내지 30 정도의 두께로 피복하기 위하여는 2 - 3회 반복하여 골 형성 촉진 물질을 피복한다. 다만 골 형성 촉진 물질을 과다하게 두껍게 피복하는 경우, 예컨대, 피복 두께가 100 μm 이상 과다하게 피복하는 경우에는 셀룰로오스 막의 유연성이 떨어질 수 있으므로 주의를 요한다.

[0187] **다) 본 발명의 골 이식용 생활성 셀룰로오스 막 (생활성 셀룰로오스 막 내면에 골수 세포 또는 골수 줄기 세포를 부착 및 배양하여 골이식 기능 층이 형성된 것임)의 제조**

[0188] 골수 등에서 얻은 자가 골수 세포를 배양해서 생활성 셀룰로오스 막 내면에 부착시킨 후 이를 골 결손 부위의 골막에 부착시킴으로써 보다 효과적인 골형성 유도 효과를 얻을 수 있고, 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막은 배양 세포들의 부착이 용이하므로 자가 골수 세포를 생활성 셀룰로오스 막 내면에 부착시켜 배양시켜 상기 효과를 얻을 수도 있다.

[0189] 본 발명의 골 이식용 생활성 셀룰로오스 막의 제조에 관하여 자세히 설명하기에 앞서 생활성 셀룰로오스 막을 이용한 실린더형 셀룰로오스 막의 배양 장치에 관하여 먼저 설명한다.

[0190]

[0191] **본 발명의 생활성 셀룰로오스 막을 이용한 실린더형 셀룰로오스 막 세포 배양 장치**

[0192] 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막 내면에서 세포 배양을 하기 위해서는 도 9에서 설명하는 바와 같은 실린더형 (또는 원통형) 셀룰로오스 막 세포 배양 장치가 필요하다.

[0193] 이러한 세포 배양 장치는 셀룰로오스 막의 크기에 따라 지름이 약 10 - 50 mm 정도의 원형 (또는 각형)의 통, 보다 자세하게는 위쪽 원통과 아래쪽 원통의 2개의 원통으로 구성되는데, 이러한 세포 배양 장치의 높이는 세포 배양 페트리디쉬의 높이에 따라 약 5 - 15 mm 정도이고, 그 벽면과 바닥면에는 배양액의 유통이 원활하도록 미세한 구멍 (예컨대, 직경이 약 0.5 mm)들을 만들며, 배양 세포들이 용기 밖으로 빠져 나가지 않도록 충분한 배양 공간을 만든다.

[0194] 이러한 실린더형 셀룰로오스 막 배양 장치의 아래쪽 원통의 바닥면에 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막을 그 내면이 실린더형 세포 배양 장치의 내부를 향하도록 위치 및 부착시키고, 이때 셀룰로오스 막의 탈-부착이 용이하도록 압착형 플라스틱 잠금 매듭 장치를 사용한다.

[0195] 이러한 실린더형 셀룰로오스 막 세포 배양 장치는 고압 증기 멸균 시에 변형이 생기는 않는 단단한 무독성의 폴리스티렌 등의 플라스틱 재질을 사용한다. 경우에 따라서는 이전에 사용한 것을 재사용한다.

[0196] 도 10에서 보는 바와 같이, 실린더형 셀룰로오스 막 세포 배양 장치를 페트리디쉬 내부에 위치시키고, 배양하고자 하는 세포를 실린더형 세포 배양 장치 내에 부착시킨 셀룰로오스 막의 내면에 부착시키며, 이때 배양하고자 하는 세포를 배양하기에 충분한 양의 배양액을 실린더형 셀룰로오스 막 세포 배양 장치가 내부에 위치한 페트리디쉬에 채운다. 그리고 통상의 배양기를 사용하여 배양한다.

[0197] 지름이 약 10 - 50 mm 정도의 실린더형 셀룰로오스 막 세포 배양 장치에서는 약 $1 \times 10^6 - 1 \times 10^8$ 정도의 세포 배양이 가능하고, 세포 배양 모두 끝난 후 배양된 세포 중에서 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막 내면에 부착된 세포들을 선택적으로 사용한다.

[0198] 이러한 실린더형 셀룰로오스 막 세포 배양 장치를 사용하여 본 발명의 골 이식용 생활성 셀룰로오스 막을 제조하는 방법에 관하여 설명하면 다음과 같다.

[0199] 즉, 도 9에서 보는 바와 같은 실린더형 (또는 원통형) 셀룰로오스 막 세포 배양 장치에서 다량의 골수 세포를 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막에 부착시킬 수 있을 뿐 아니라 소량의 골수 줄기 세포 ($1 \times 10^3 - 1 \times 10^5$)를

생활성 셀룰로오스 막에 부착 및 배양시켜서 그 세포의 수를 증가시킬 수 있다.

[0200] 다량의 골수 세포를 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막에 부착시키기 위해서는 1 - 2 일 동안 37 °C, 5% CO₂ 배양기 내에서 배양시키면 충분한 세포 부착이 이루어지는데 현미경 관찰을 통하여 충분한 세포 부착을 확인한 후에 실린더형 셀룰로오스 막 세포 배양 장치에서 다량의 골수 세포가 충분히 부착된 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막을 제거하여 사용한다.

[0201] 골 결손 부위에 상기한 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막을 부착시킬 때에는 반드시 세포 배양면이 골면으로 향하도록 위치시켜야 한다.

[0202] 한편, 소량의 골수 줄기 세포를 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막에 부착시켜 증식시키는 경우에는 2주일 이상 비교적 장기간 배양하여야 하는데 배양하는 골수 줄기 세포의 분화 및 증식에 도움이 되는 BMPs, RANKL, 오스테오넥틴 (osteonectin), 오스테오칼신 (osteocalcin), 오스테오프로테제린 (osteoprotegerin), FGF, CTGF, 알칼라인 포스파타아제 (alkaline phosphatase) 등 성장 인자나 영양소가 함유된 배양액을 사용해서 37 °C, 5% CO₂ 배양기 내에서 배양하면서 현미경 관찰을 통해서 적당한 양의 골수 줄기 세포 증식을 확인한 후에 사용한다.

[0203] 내면에 충분하게 세포 배양이 이루어진 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막을 실린더형 셀룰로오스 막 세포 배양 장치에서 떼어낸 다음 세포들이 부착된 생활성 셀룰로오스 막의 내면이 골면을 향하게 하여 골 결손 부위 등에 그대로 이식한다.

[0204] **3) 명세서에서 얻은 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막으로 신경 재생 유도막의 제조 및 적용 방법**

[0205] 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막은 골막 조직 뿐 아니라 신경 다발 주변 조직에도 쉽게 작용하여 부착 증식 효과를 보이는데, 변성 및 절단된 신경 다발이 재생하는 과정에서 신경초의 증식을 일정한 방향으로 유도해 주는 기능을 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막이 수행할 수 있다.

[0206] 이러한 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막에 의한 신경 재생 촉진 효과를 확인하기 위하여 백서의 좌골 신경에 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막의 이식 실험을 수행하였다.

[0207] 백서의 좌골 신경을 충분히 박리한 다음 약 1 cm 정도의 좌골 신경을 절단하고 절단한 좌골 신경의 길이와 유사한 크기의 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막 띠를 만들어서 절단한 좌골 신경의 양단에 봉합하여 연결시켜 주는 실험을 시행하였다.

[0208] 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막 이식 후 8주경에 좌골 신경 전체를 적출해서 현미경 표본을 제조한 후 현미경 관찰하였는데, 절단된 좌골 신경의 근심에서 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막 내면으로 신경 조직이 부착되어 증식되는 현상이 관찰되었다. 이들 신경 조직에는 여러 다발의 신경초들이 포함되어 있었으며 Masson trichrome 염색과 aniline blue 염색에서 잘 배열된 신경초들이 분명하게 관찰되었다.

[0209] 그리고, 수술 후 12 주경에는 신경 조직들이 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막에 두껍게 부착되어 증식되었는데 마찬가지로 Masson trichrome 염색과 aniline blue 염색에서 신경조직들이 잘 분화되면서 증식되는 양상이 관찰되었다 (도 11).

[0210] 상기한 바와 같은 백서의 좌골 신경 결손 모델의 자연 치유 과정에서는 수술 후 6개월이 지나도록 신경 절단 부위를 연결하는 자연 치유는 이루어 지지 않았다.

[0211] 따라서, 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막이 절단된 신경 조직에 친화적으로 작용하여 재생되는 신경 조직들이 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막 내면에 빠르게 부착되면서 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막을 따라서 증식됨에 따라 손상된 신경조직의 재생의 방향을 유도하고 신경 다발의 성숙을 촉진시키는 것으로 판단된다.

[0212] 골 형성 유도막의 역할과는 다르게 신경 조직 재생 유도 과정에서는 신경 손상의 정도에 따라 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막의 형태가 띠 형태나 튜브 형태로 만드는데, 신경 손상이 경미하거나 커다란 신경 다발인 경우에는 튜브 형태로 만들고, 신경 손상이 커서 신경 재생이 지연되는 경우에는 가느다란 띠 형태로 만들어서 신경초의 증식을 유도한다. 각각의 크기와 길이는 손상된 신경의 종류와 위치에 따라 적당하게 조절한다.

[0213] **가) 본 발명의 신경 재생 유도용 생활성 셀룰로오스 막 제조**

- [0214] 화상이나 절단 등의 손상에 의하여 변성된 신경 조직을 재생시키는 것은 매우 중요하지만 실제로는 신경 재생 과정에서 여러 가지 부작용이 수반되므로 어려움이 많다. 현재까지 화학적 셀룰로오스 막, 실리콘, 화학 섬유 등의 다양한 소재를 사용해서 신경 재생을 유도하는 실험과 임상적 시도가 이루어져 왔으나 대체로 매우 미흡한 상태이다.
- [0215] 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막의 내면은 신경 막을 신속하게 부착시키고 신경초의 증식 방향을 안내하는 역할을 하면서 신경 다발이 안정적으로 성장할 수 있도록 도와주는 역할을 한다.
- [0216] 신경 조직의 재생을 유도하기 위해서는 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막의 제조 방법을 설명하는 1. 멩게류에서 생활성 셀룰로오스 막을 제조하는 방법에 의하여 제조된, 순수하게 정제된 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막을 사용하여야 하며, 이러한 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막은 신경 조직 재생 기전 뿐 아니라 해부학적인 구조에서도 적합한 형태를 갖추어야 한다.
- [0217] 실험적으로, 절단된 신경 다발 근처에 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막의 띠를 위치시키면 신경 조직이 셀룰로오스 막의 내면에 부착되어 원심 쪽으로 증식되는 현상이 관찰되었다.
- [0218] 띠 형태의 셀룰로오스 막은 손상된 신경 두께의 2배 정도이고 손상된 신경 길이보다 20-30% 긴 모양으로 만드는데, 이러한 띠 형태의 셀룰로오스 막은 주로 말단 부위의 신경 다발의 재생에 적합하다. 띠 형태의 셀룰로오스 막은 임의로 그 길이와 크기를 쉽게 조절할 수 있으며, 경우에 따라 분지된 신경인 경우에도 쉽게 그 형태에 따라 분지된 띠 형태의 셀룰로오스 막을 제조할 수 있으므로 사용이 간편하다. 그러나 시술 시에는 띠 형태의 셀룰로오스 막이 조직 내에서 형태 유지가 어렵기 때문에 띠 형태의 셀룰로오스 막을 신경 조직의 인접 조직에 단단히 융합해 주어야 한다.
- [0219] 이러한 띠 형태의 셀룰로오스 막은 충분히 질기고 육안적으로 생체 조직과 분명히 구분이 되므로 시술 시에 셀룰로오스 띠를 손상된 신경 부위에 정확하게 이식시킬 수 있으며 이식된 셀룰로오스 띠는 유연하기 때문에 물리적 장애 및 불편감이 생기지 않고, 신경 조직이 재생된 후에는 셀룰로오스 막을 제거하지 않아도 되기 때문에 유리하다.
- [0220] 튜브 형태의 셀룰로오스 막은 대체로 손상된 신경 다발 지름의 2배 정도 되고 손상된 신경 다발 길이의 20-30% 긴 원통형인데 생활성 셀룰로오스 막을 튜브 모양으로 접어서 외과용 실 (예를 들면 5-0 실크)로 봉합해서 만들 수 있다. 그리고 튜브 내부로 혈관 조직이 자라 들어갈 수 있도록 셀룰로오스 막 표면에 지름이 0.5 - 1 mm 정도의 구멍들이 다수 뚫은 셀룰로오스 막을 사용하여 부분적으로 개방된 튜브 모양을 만들어 준다. 튜브 형태의 셀룰로오스 막은 주로 커다란 신경 다발이 손상을 받은 경우에 사용되며 셀룰로오스 튜브의 양 끝은 신경 다발 인접 조직에 단단히 융합되어야 한다.
- [0221] **나) 본 발명의 신경 재생 유도용 생활성 셀룰로오스 막 (생활성 셀룰로오스 막 내면에 신경 형성 기능 층이 형성된 것임)의 제조**
- [0222] 상기한 신경 재생 유도막의 특성과 함께 신속한 신경 재생을 유도하기 위하여 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막 내면에 여러 가지 종류의 신경 조직 형성 촉진 물질을 피복하여 사용할 수 있다.
- [0223] 신경 조직 형성 촉진 물질로는, 예를 들어, 재조합 NGFs (nerve growth factors), 콜라겐, 라미닌, 신경 성장 인자 (neurotrophin) 등이 있다.
- [0224] 이러한 신경 조직 형성 촉진 물질을 피복시켜 얻는, 신경 재생 촉진 기능을 가지는 생활성 셀룰로오스 막의 제조 방법은, 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막의 제조 방법을 설명하는 1. 멩게류에서 생활성 셀룰로오스 막을 제조하는 방법 중 12) 항의 건조 공정을 다음과 같이 변형시키는 것으로 이루어진다.
- [0225] 즉, 11) 항에서 만들어진 생활성 셀룰로오스 막을 그 내면이 위쪽을 향하도록 7) 항에서 사용한 도 1의 탄력적 신장 장치에 다시 장착하여 가볍게 신장시킨 후에 재조합 NGFs (nerve growth factors), 콜라겐, 라미닌, 신경 성장 인자 등에서 선택되는 1종 이상의 신경 재생 촉진 물질의 수용액 (약 1 중량%)을 상기 생활성 셀룰로오스 막 내면에 스포이드로 고르게 떨어뜨리거나 붓으로 고르게 발라 얇게 피복시킨 후에 이를 탄력적 신장 장치에 장치시킨 채로 50 - 70 °C 건조기 내에서 완전히 건조시킨다.
- [0226] 두 가지 이상의 신경 재생 촉진 물질을 피복시키기 위해서는 이들을 혼합하여 피복한다. 또한, 신경 재생 촉진 물질을 충분히 두껍게, 예컨대, 10 μm 내지 50 μm 정도, 바람직하게는 20 내지 30 정도의 두께로 피복하기 위하

여는 2 - 3회 반복하여 신경 재생 촉진 물질을 피복한다. 다만 신경 재생 촉진 물질이 100 이상 과다하게 두껍게 피복하는 경우에는 셀룰로오스 막의 유연성이 떨어질 수 있으므로 주의를 요한다.

[0227] 4) 멩게류에서 얻은 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막으로 장막 (serosa) 재생 유도막의 제조 및 적용 방법

[0228] 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막이 생체 내의 장막 재생에 미치는 효과를 확인하기 위하여 백서의 간 일부를 절제한 후에 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막으로 덮어 주는 이식술을 수행하였다.

[0229] 백서 간의 전엽을 1/3 정도 절단한 다음 순수하게 정제된 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막을 적당한 크기로 절단하여 간 절제 부위를 충분히 덮고 간 절단 부위에서 혈액이 응고될 때까지 약 5 - 10 분간 압박 지혈하였다. 출혈이 멈춘 것을 확인한 다음 복강을 닫고 봉합하였으며, 쇼크와 감염 방지를 위한 약물 처치를 한 후에 안정적으로 사육하였다.

[0230] 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막의 이식 수술 후 1 주경에 백서의 간을 적출하였는데 육안적으로 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막이 간의 표면에 단단히 부착되어 있었으며 간의 실질이 정상적으로 비대되어 있었다. 적출된 백서의 간으로 현미경 절편을 제조하였고 현미경 관찰한 결과 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막이 간조직의 장막 부위에 부착되어 있었으며 간 절단 부위에서 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막과 간 조직 사이에 새로운 장막이 재생되어 있었다 (도 12).

[0231] 따라서, 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막은 손상된 간조직에 친화적으로 작용해서 간조직의 장막 재생을 촉진시키는 것으로 판단된다.

[0232] 백서 간 절제 실험은 통상적으로 압박 지혈 후에 바로 복막을 봉합하는 것으로 수술이 이루어지는데, 이 경우 복강 내 지속적인 출혈이 생기고, 간 절제 부위의 재생이 지연되는 것으로 알려져 있으며, 아직 적당한 조직 친화성 생활성막이 없기 때문에 인공 장막을 백서에 사용하지 못하고 있어 인체의 경우에는 휘브린 그루 (fibrin glue)와 같은 응고 결합제를 사용하여 출혈을 방지하고 근처의 장막에 부착하여 고정시키는 효과를 얻고 있는 정도인 것을 고려하면, 상기한 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막을 이용하여 간 조직의 장막 재생을 촉진할 수 있는 것은 매우 획기적인 것이다.

[0233] 가) 본 발명의 차폐성 장막 재생 유도용 생활성 셀룰로오스 막 제조

[0234] 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막의 제조 방법을 설명하는 1. 멩게류에서 생활성 셀룰로오스 막을 제조하는 방법에 의하여 제조된, 생활성 셀룰로오스 막은 멩게류 (동물) 피부 각질 유래의 순수한 셀룰로오스 막이므로, 장막의 손상 부위를 채워 주기 위한 장막 보호막으로, 일시적으로 장기를 안정시키고 새로운 장막이 재생될 때까지 장기의 형태를 유지시켜주는 역할을 할 수 있다.

[0235] 장기 손상의 크기에 따라 광폭의 생활성 셀룰로오스 막을 사용하는 경우에는 여러 개의 생활성 셀룰로오스 막들을 봉합하여 사용할 수 있다.

[0236] 장막 손상 시에는 주로 출혈 및 감염 등이 우려되기 때문에 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막에 혈액 응고제인 휘브린 및/또는 트롬빈 등을 피복하거나 항균제 및/또는 항생제를 피복하여 사용할 수 있다.

[0237] 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막은 생체 내에서 서서히 흡수되어 제거되는데 주로 미약한 염증 반응과 함께 거대 세포의 포식 작용에 의하여 소멸되기 때문에 이차 수술에 의하여 생활성 셀룰로오스 막을 제거해 줄 필요는 없다. 단, 지나친 이물감으로 동통이 생기거나 이차 감염 등으로 부작용이 우려되는 경우에는 생활성 셀룰로오스 막을 제거하는 것이 좋다.

[0238] 나) 본 발명의 장막 재생 촉진용 생활성 셀룰로오스 막 (생활성 셀룰로오스 막 내면에 장막 재생 촉진 기능층이 형성된 것임)의 제조

[0239] 재조합 VEGF, 콜라겐, 라미닌, 성장 호르몬, FGFs (fibroblast growth factors), TGFs (transforming growth factors), 에스트로젠, 인슐린 등의 장막 재생 촉진 기능을 가진 생체 물질들을 비교적 장기간 공급할 수 있는 생활성 셀룰로오스 막을 장막으로 이식하기 위하여는 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막에 상기 생체 물질의 피복을 복합적으로 수행하여야 한다.

- [0240] 즉, 일반적인 생활성 셀룰로오스 막은 단일 피복으로 충분하지만 상기한 장막 재생 촉진 기능을 가진 생체 물질을 비교적 장기간 공급할 목적으로 장막 재생 촉진 기능을 가진 생활성 셀룰로오스 막을 제조하는 경우에는 여러 겹의 피복을 수행하기 위하여 콜라겐이나 휘브린과 같은 부착성 물질을 먼저 피복하고 그 후에 생체 물질을 피복하는 과정을 반복하는 것이 좋다.
- [0241] 이를 자세히 보면 다음과 같다.
- [0242] 장막 재생 촉진 물질을 피복시켜 얻는, 장막 재생 촉진 기능을 가지는 생활성 셀룰로오스 막의 제조 방법은, 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막의 제조 방법을 설명하는 1. 명계류에서 생활성 셀룰로오스 막을 제조하는 방법 중 12) 항의 건조 공정을 다음과 같이 변형시키는 것으로 이루어진다.
- [0243] 즉, 11) 항에서 만들어진 생활성 셀룰로오스 막을 그 내면이 위쪽을 향하도록 7) 항에서 사용한 도 1의 탄력적 신장 장치에 다시 장착하여 가볍게 신장시킨 후에 콜라겐이나 휘브린 등의 부착성 물질을 먼저 피복하고 그 후에 재조합 VEGF, 콜라겐, 라미닌, 성장 호르몬, 에스트로젠, 인슐린 등에서 선택되는 1종 이상의 장막 재생 촉진 물질 수용액 (약 1 중량%)을 스포이드로 고르게 떨어뜨리거나 붓으로 고르게 발라 얇게 피복시키는 과정을 여러 차례 반복한 다음, 이를 탄력적 신장 장치에 장치시킨 채로 50 - 70 °C 건조기 내에서 건조시킴으로써, 장막 재생 촉진 물질을 피복시켜 얻는, 장막 재생 촉진 기능을 가지는 생활성 셀룰로오스 막을 제조한다.
- [0244] 경우에 따라서 다량의 생체 물질을 장기간 공급할 때에는 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막이 반투막의 성질이 있으므로 두 장의 생활성 셀룰로오스 막을 그 외면이 서로 마주 보도록 하고 단단히 밀봉해서 주머니로 만들고 상기 생체 물질을 이 주머니 내부에 넣은 후에 장막에 이식함으로써 가능하다.
- [0245] 이 경우 물리적 충격이나 신속한 흡수에 의하여 내부의 생체 물질이 빠르게 유출되는 것을 방지하기 위하여, 비교적 두꺼운 200 - 300 두께의 생활성 셀룰로오스 막을 사용하는 것이 유리하다.
- [0246] **다) 본 발명의 장막 이식용 생활성 셀룰로오스 막 (생활성 셀룰로오스 막 내면에 장막 세포를 부착 및 배양하여 장막 이식 기능 층이 형성된 것임)의 제조**
- [0247] 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막을 이용하여 장막 이식을 수행할 때 특히, 해당 장기에 대한 동종 이식 (allogenic graft)나 줄기 세포 이식을 수행하고자 할 때, 예를 들면 장막과 함께 간장에 간세포를 이식하거나 장막과 함께 뇌에 신경세포를 이식하는 경우에는 본 발명의 실린더형 셀룰로오스 막 세포 배양 장치에 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막을 위치시키고 그 내면에 이식하고자 하는 세포, 상기 예에서는 간 줄기 세포나 신경 줄기 세포를 37 °C 5 % 이산화탄소의 무균 배양기에서 3 일 내지 5 일 동안 배양해서 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막에 충분히 부착시킨 다음, 세포들이 부착된 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막을 떼어 내어 그대로 각각의 장기의 장막으로 이식한다.
- [0248] 이 경우 배양된 세포들이 각각의 장기에 접합성이 우수하고 세포들의 손실이 적어서 거의 대부분의 세포들이 장기 내로 이전되어 증식 및 분화되고, 이식에 따르는 염증 반응은 미만성으로 약한 정도로 관찰된다.
- [0249] 이때 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막은 세포 배양용 현미경 관찰에 적당하게 투명하기 때문에 세포 배양 시에 장기에 이식하고자 하는 충분한 세포의 양이 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막에 부착되어 있음을 현미경 관찰로 확인할 수 있으며, 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막은 실린더형 셀룰로오스 막 세포 배양 장치에서 쉽게 제거될 수 있으므로 배양 세포의 손실 없이 장막 이식을 수행할 수 있다.
- [0250] 경우에 따라서 세포들의 유실을 방지하고 이식 부위에 지나친 출혈을 억제하기 위하여 출혈 방지 및 응고 부착을 위한 휘브린 그루 (fibrin glue)와 같은 결합제를 사용할 수 있다.
- [0251] 한편, 보다 안전하게 그리고 보다 다량의 세포들을 이식하기 위하여 지속적인 세포 배양을 위한 바이오 리액타 (Bioreactor)와 같은 배양 장비의 배양액 내에 실린더형 셀룰로오스 막 세포 배양 장치를 삽입하여 사용하거나, 바이오 리액타의 세포 배양 용기 밀면을 생활성 셀룰로오스 막으로 대체한 후에 마찬가지로 방법으로 세포 배양한 후에 생활성 셀룰로오스 막을 제거하여 장막 이식을 수행할 수 있다.
- [0252] 5) 명계류에서 얻은 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막으로 여러 종류의 줄기 세포의 부착, 배양 및 전달 매체로 사용하는 줄기 세포 배양막의 제조 방법

- [0253] 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막은 대부분의 세포들과 친화성을 갖는데 특히 줄기 세포와 같은 미분화 세포에 대한 친화성을 확인하기 위하여 실린더형 셀룰로오스 막 세포 배양 장치를 사용해서 줄기 세포 부착성에 대한 실험을 수행하였다.
- [0254] 생쥐의 장골을 박리해서 골수 내 줄기 세포들을 적출하여 세포 배양하였는데 통상적인 세포 배양용 플라스틱 페트리디쉬를 사용해서 배양한 것 (대조군)과 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막을 이용한 실린더형 셀룰로오스 막 세포 배양 장치를 사용해서 배양한 것 (실험군)을 서로 비교하였다.
- [0255] 대조군과 실험군에 동일한 수의 (약 1×10^7 개) 줄기 세포를 동일한 배양 면적 (약 3.14 cm^2)에 넣은 후에 37 °C 5 % 이산화탄소의 무균 배양기에서 상기한 방법과 동일한 방법으로 배양한 후에 관찰하였다.
- [0256] 결과적으로 배양 후 24 시간 내에 통상적인 페트리디쉬의 플라스틱 면에 부착된 줄기 세포의 수는 $(1.25 \pm 0.187) \times 10^4 / \text{mm}^2$ 정도이었는데 비하여, 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막을 이용한 실린더형 셀룰로오스 막 세포 배양 장치의 생활성 셀룰로오스 막에 부착된 줄기 세포의 수는 $(3.16 \pm 0.432) \times 10^5 / \text{mm}^2$ 정도로 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막에 부착된 줄기세포의 수가 훨씬 많았다 (도 13).
- [0257] 따라서 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막이 미분화된 줄기 세포에 친화적으로 작용해서 줄기 세포의 부착성을 증가시킴으로써 줄기 세포의 증식이나 세포 분화를 촉진시키는 것으로 판단된다.

[0258] **가) 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막을 이용한 줄기 세포의 배양, 이식과, 배양 및 이식 방법**

- [0259] 골수에서 유래하는 조혈 세포 또는 골 형성 줄기 세포의 경우와 같이 성체에서 얻는 줄기 세포들은 비교적 분화가 잘 되어 있으며 생체 적합성이 좋기 때문에 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막을 쉽게 응용해서 사용할 수 있다. 이 경우 비교적 단시일 동안, 예컨대 1 - 2 일 세포 배양함으로써 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막에 줄기 세포의 부착 및 증식을 유도할 수 있으며 그 결과 다량의 줄기 세포들을 얻을 수 있으므로 효과적인 적용이 용이하다.
- [0260] 반면, 대체로 배아 및 제대혈 등에서 얻은 줄기 세포들은 미분화 상태이므로 세포간 신호 전달 체계가 성숙되어 있지 않기 때문에 세포간 부착성이 적으며, 세포질이 안정되어 있지 않기 때문에 부유되는 상태보다는 우선적으로 일정한 기질 구조에 부착되어야 제대로 신진 대사가 이루어져서 세포의 증식과 분화를 이룰 수 있다. 따라서, 이들 줄기 세포의 안정된 증식과 세포 분화 상태를 얻기 위해서는 줄기 세포를 세포외 기질에 부착시켜서 사용하는 것이 바람직하다.
- [0261] 이들 줄기 세포들을 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막에 신속하게 부착시키기 위해서는 콜라겐 등의 부착성 성분의 피복이 필요하다.
- [0262] 또한, 부착된 줄기 세포들을 목적하는 세포 형태로 분화시키기 위해서는 각각 시기별로 다른 종류의 성장인자들이 필요하며 배양액도 영양분의 농도가 일정하게 유지되어야 하므로 세포 배양 시에 이러한 조절이 가능한 배양기를 사용하여야 한다.
- [0263] 이를 위해서는 줄기 세포 배양용 바이오 리액터의 사용이 적절하다. 줄기 세포 배양용 바이오 리액터에서는 배양액의 농도, 온도, CO₂ 농도, pH 등이 자동 조절되어야 하고, 일정시간 동안 한 종류의 성장인자를 투여한 후에 새로운 배양액으로 신속하게 바꾸어 주어야 하며, 세포 분화 과정의 필요에 따라 다른 성장 인자를 투여할 수 있는 자동화 장치가 포함되어야 한다.
- [0264] 이런 바이오 리액터의 내부 세포 배양 장치에 본 발명의 실린더형 셀룰로오스 막 세포 배양 장치의 삽입이 가능하거나 또는 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막을 바이오 리액터의 세포 배양기 밑면에 부착하여 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

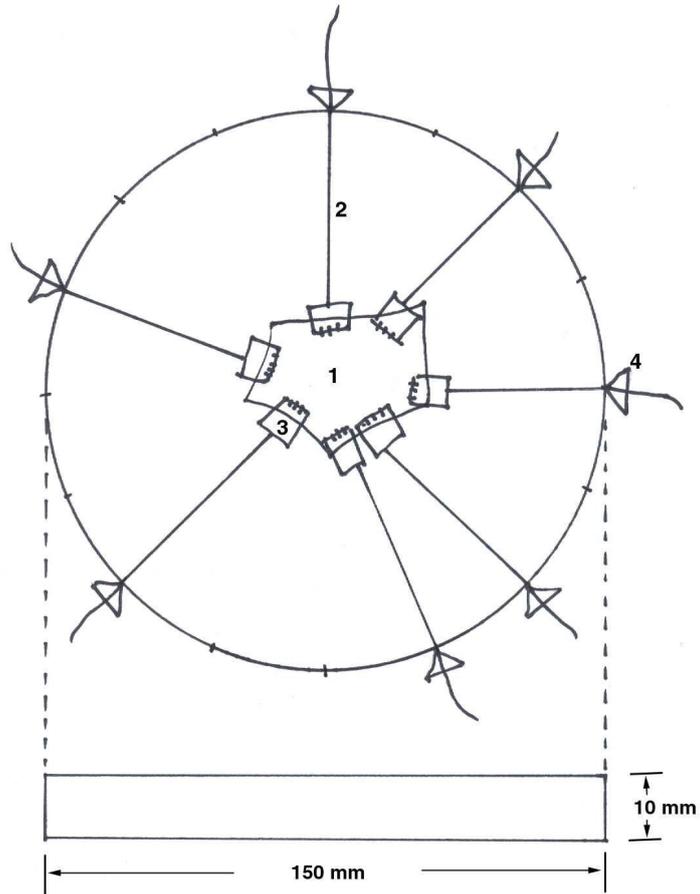
- [0265] 도 1은 본 발명의 탄력적 신장 장치의 구조를 보이는 도면.
- [0266] 도 2는 본 발명의 셀룰로오스 막을 위한 탄력적 신장 장치의 사용 방법 및 건조 과정을 보이는 도면.
- [0267] 도 3은 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막에 대한 High Performane Anion-Exchange Chromatography 분석 결과를 보이는 도면.

- [0268] 도 4a 내지 도 4d는 백서 등쪽 피부 절제후 변연부 봉합한 경우와 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막을 덮고 봉합한 경우의 치유 효과 관찰 결과를 보이는 도면.
- [0269] 도 5a 및 도 5b는 백서 두개골 투과 손상부에 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막을 이식한 경우와 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막 대신 GORETEX 막을 이식한 경우의 골 재생 정도를 보이는 도면.
- [0270] 도 6은 백서 두개골 투과 손상부에 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막의 내면 및 외면 각각을 골면으로 향하게 이식한 효과 관찰 결과를 보이는 도면.
- [0271] 도 7은 백서 전두 두개골 투과성 골 결손 부위에 이식한 본 발명의 생활성 셀룰로오스가 만든 골 형성 작용을 전자 현미경으로 관찰한 결과를 보이는 도면.
- [0272] 도 8은 백서 두개골 손상 부위에 본 발명의 셀룰로오스 막을 이식한 후에 보이는 BMP-2의 발현 양상을 보이는 도면.
- [0273] 도 9는 본 발명의 실린더형 (원통형) 셀룰로오스 막 세포 배양 장치의 구조를 보이는 도면.
- [0274] 도 10은 본 발명의 원통형 세포 배양 장치를 이용한 줄기 세포 배양 방법을 보이는 도면.
- [0275] 도 11은 백서의 좌골 신경 절단 후에 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막을 이식 연결 실험한 결과를 보이는 도면.
- [0276] 도 12는 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막을 간 장막에 이식한 결과를 보이는 도면.
- [0277] 도 13은 본 발명의 생활성 셀룰로오스 막의 세포 부착성에 대한 실험 결과를 보이는 도면.

도면

도면1

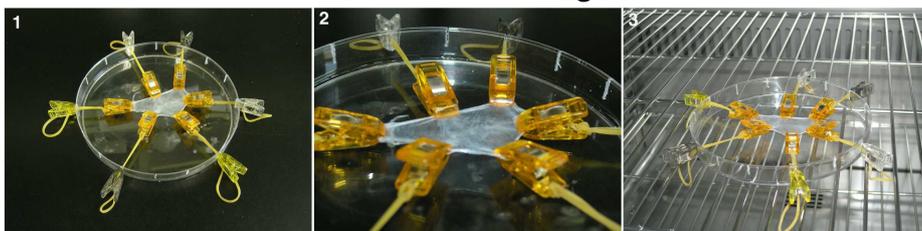
탄력적 신장장치의 구조도



1: 셀룰로오스 막, 2: 고무줄 또는 용수철, 3: 집게, 4: 고정자

도면2

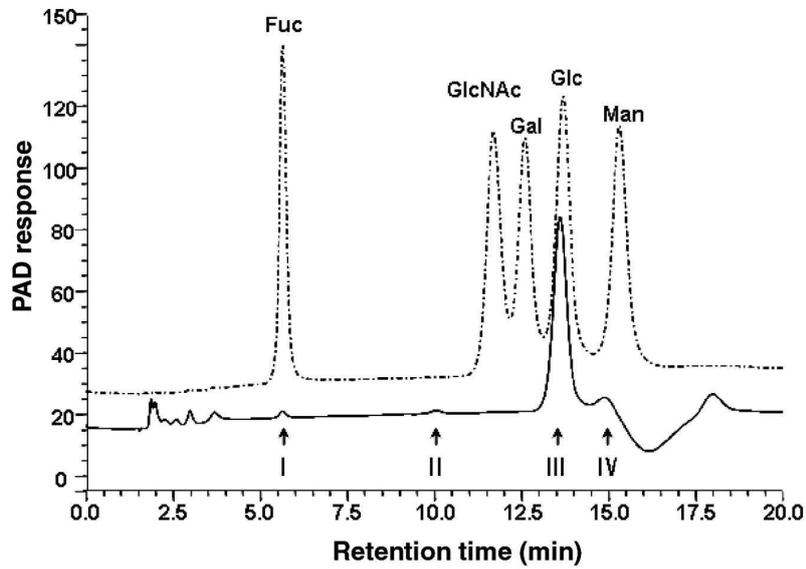
셀룰로오스 막을 위한 탄력적 신장 장치의 사용 방법 및 건조 과정



1, 2: 셀룰로오스 막을 탄력적 신장 장치에 고정시킨 모습, 3: 셀룰로오스 막을 탄력적 신장 장치에 고정 시킨 채로 건조기 내에서 완전히 건조시킴

도면3

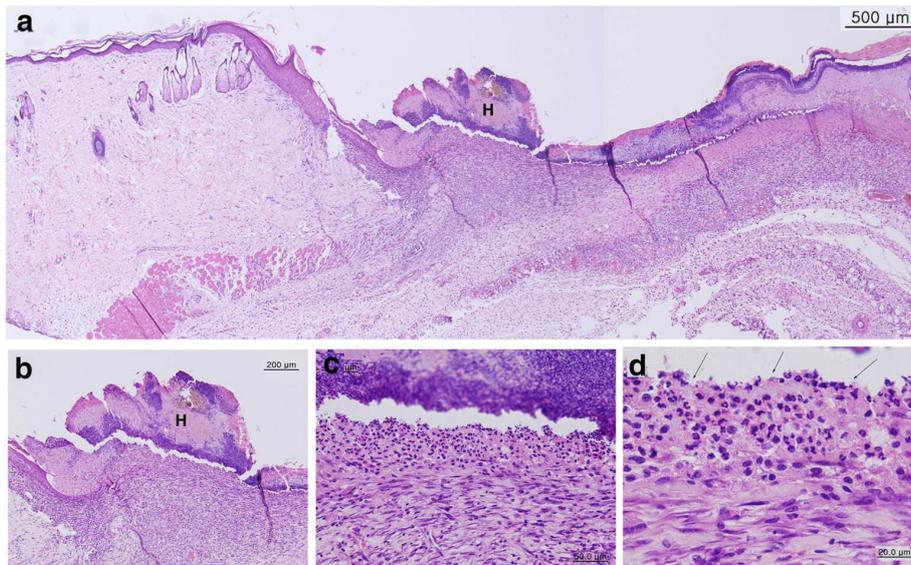
생활성 셀룰로오스 막에 대한 High Performance Anion-Exchange Chromatography 분석



High Performance Anion-Exchange Chromatography (HPAEC) 분석에서 Pulsed Amperometric Detector (PAD)의 반응을 측정된 결과 glucose (III)가 뚜렷하게 관찰되었으나 다른 당류들은 무시할 정도로 빈약하였다.

도면4a

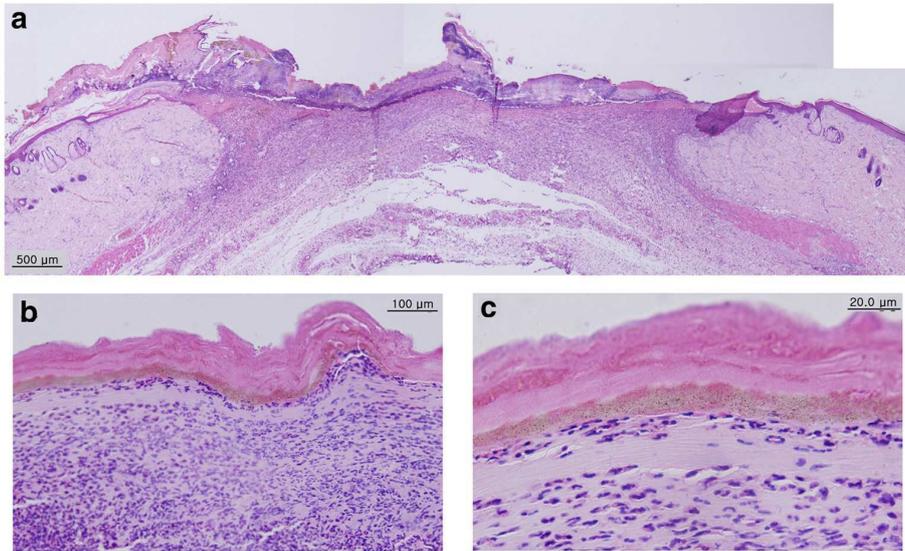
백서 등쪽 피부 절제한 후에 변연부 봉합만 함, 7일 후



a: 피부 상처에 깊은 궤양이 생겼으며심한 염증세포 침윤이 보임,
b, c: 혈병이 쉽게 탈락되며, d: 궤양 표면에 농양성 염증이 보임

도면4b

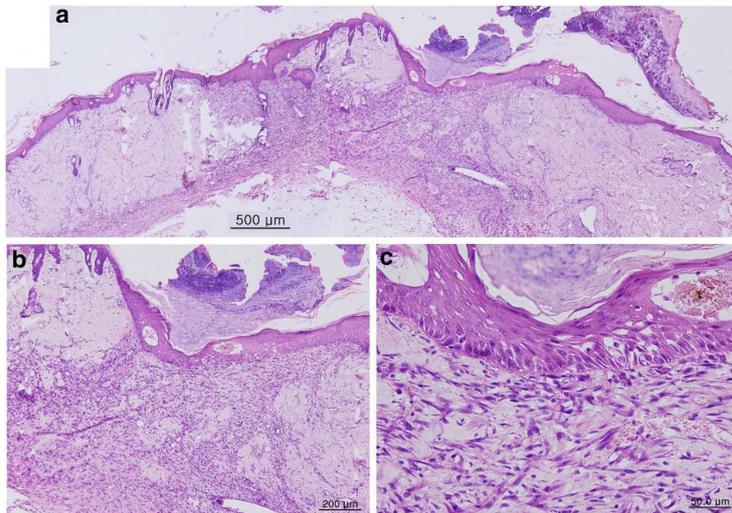
백서 등쪽 피부 절제 후에 생활성 셀룰로오스로 덮고 봉합함, 7일 후



a: 피부 상처의 얇은 궤양이 생겼는데 대부분 셀룰로오스 막으로 덮혀 있음,
b: 궤양면이 생활성 셀룰로오스 막에 의하여 잘 덮혀 있음, c: 고배율 관찰에서 생활성 셀룰로오스 막 인접부까지 섬유성 조직이 증식하였음

도면4c

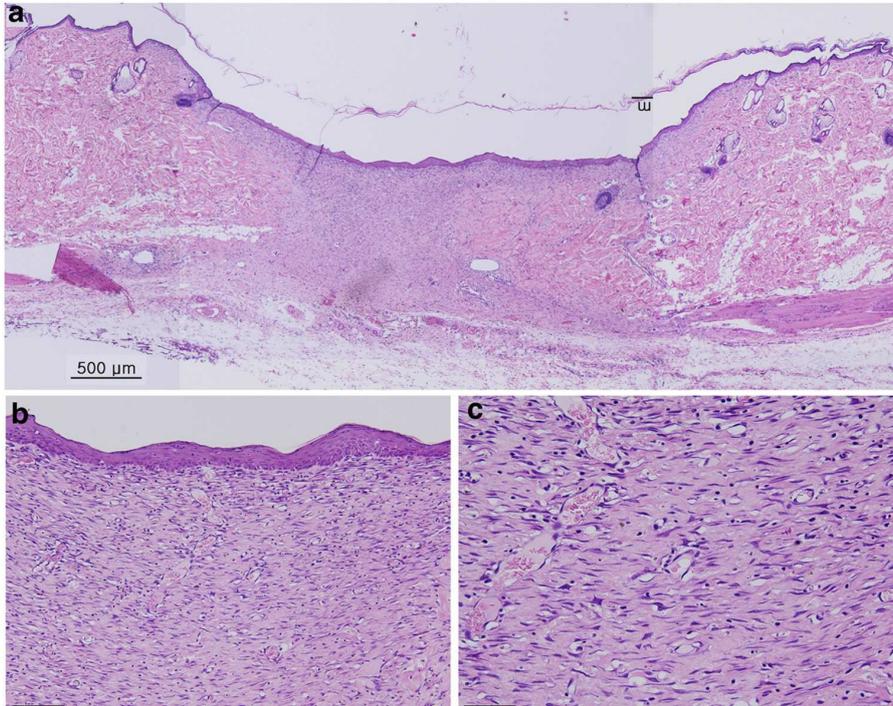
백서 등쪽 피부 절제한 후에 변연부 봉합만 함, 14일 후



a: 피부 상처 부위에 상흔이 생겼으며 염증 반응이 지속적으로 잔존함,
b, c: 상피 재생이 불규칙적이고 상피 각화가 불량하다.

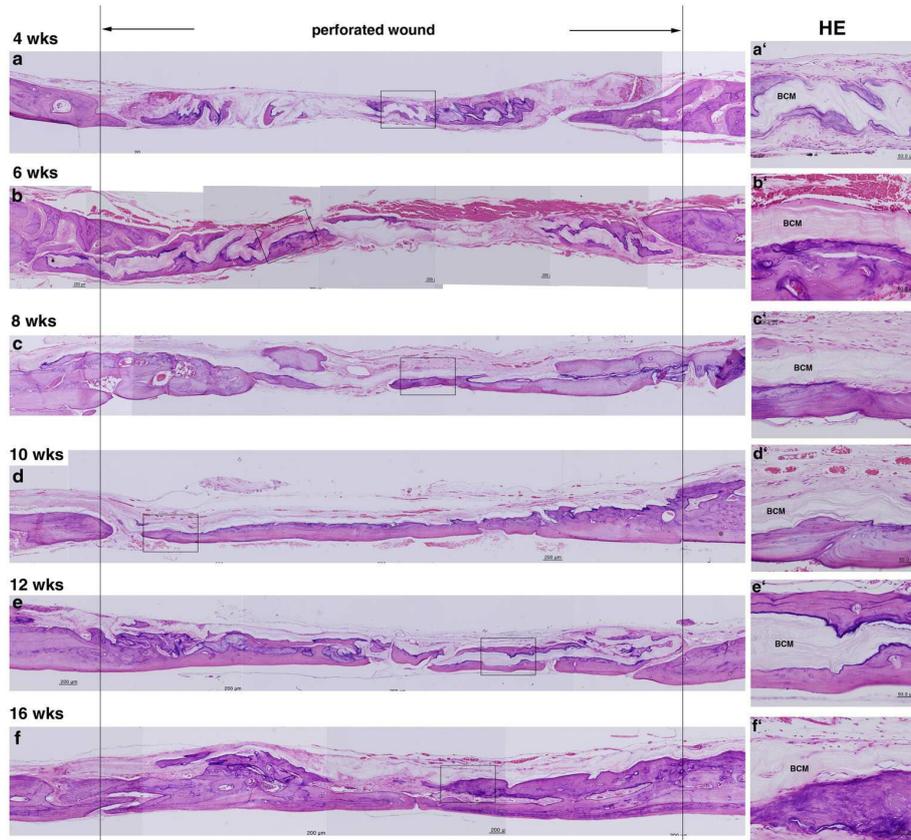
도면4d

백서 등쪽 피부 절제 후에 생활성 셀룰로오스로 덮고 봉합함,14일 후



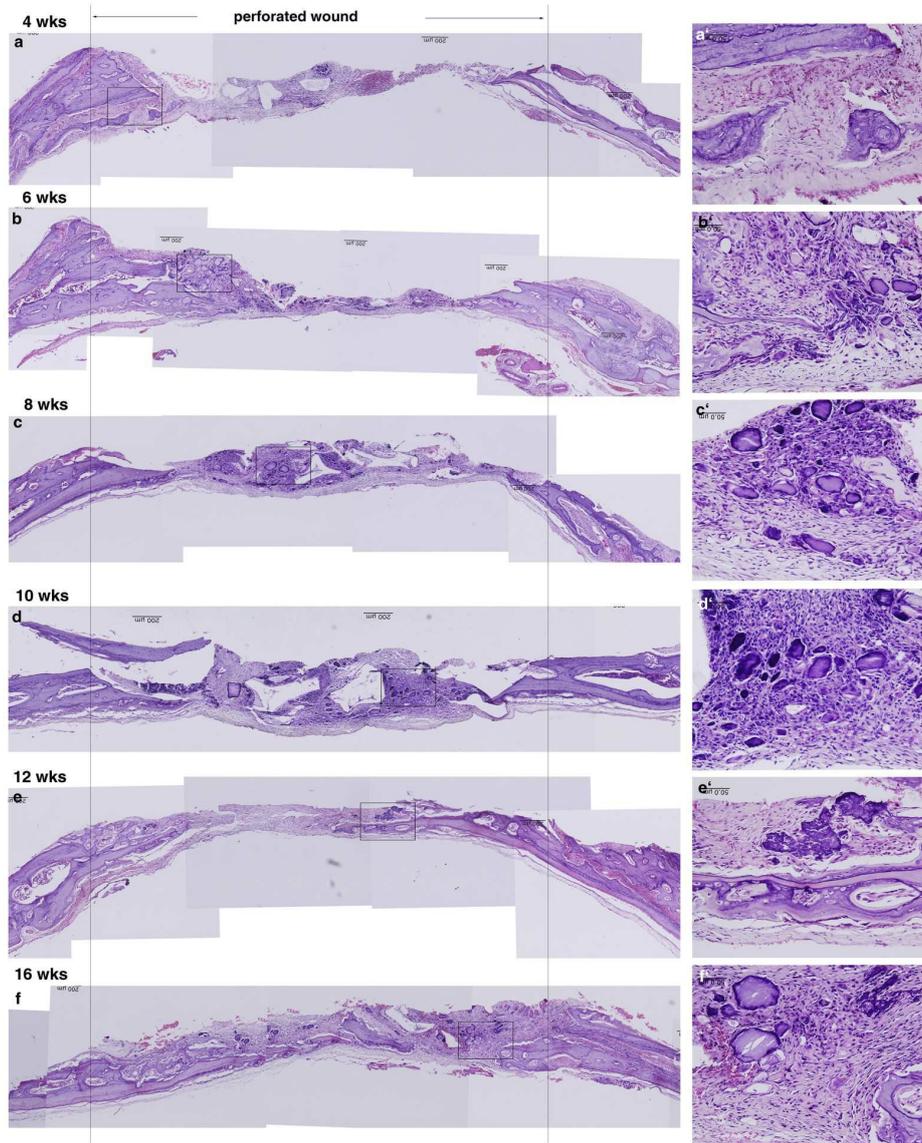
a: 피부 상처가 거의 회복되었으며 염증반응도 거의 사라졌다. b: 각화가 잘 이루어진 상피로 덮혀 지고 피하 결체조직의 발달도 양호하다. c: 정상적인 육아조직으로 치유됨

도면5a



백서 두개골 투과 손상부에 생활성 셀룰로오스 막을 이식한 경우 이식후 4주경 부터 골 재생이 나타나서 지속적으로 손상부위에 골재생이 이루어져서 10주경에는 손상부위가 거의 신생골로 채워지고 12주에는 거의 회복되며 이식후 16주에는 골 손상부위가 두꺼운 피질골로 채워진다.

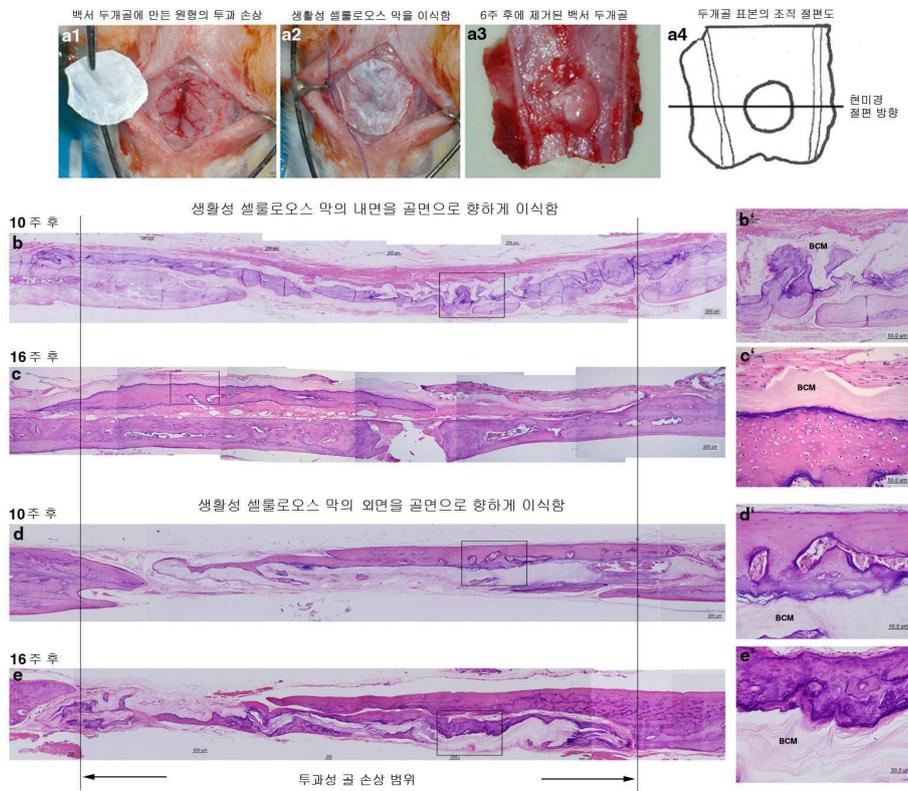
도면5b



생활성 셀룰로오스 막 대신에 Goretex 막을 백서의 두개골 투과성 손상부위에 이식한 경우에는 골재생이 매우 지연되어서 이식후 8주에서도 골재생이 불량하고 이식후 12주 경에 약간의 골재생이 나타나지만 이식후 16주까지도 골손상 부위가 회복되지는 못하였다.

도면6

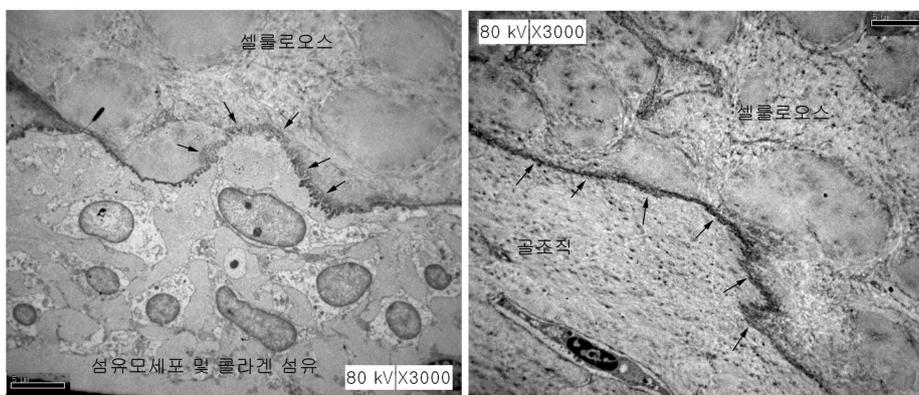
백서 두개골 투과 손상부에 생활성 셀룰로오스 막의 이식효과



BCM: bioactive cellulose membrane, 생활성 셀룰로오스 막. a1-a4: 백서의 전두 두개골에 직경 8 mm의 원형의 투과성 골 손상을 만든 후에 생활성 셀룰로오스 막을 이식해서 손상 부위를 도포한 후에 골 재생 효과를 관찰하였다. b, c: 생활성 셀룰로오스 막의 내면을 골 손상 부위를 향하게 이식한 경우에는 이식 후 10, 16 주경에 매우 두꺼운 신생골이 고르게 생긴 반면에, d, e: 생활성 셀룰로오스 막의 외면을 골 손상 부위를 향하게 이식한 경우에는 이식 후 10, 16 주경에 얇은 신생골이 불규칙하게 생겼다. 따라서 생활성 셀룰로오스 막의 내면이 외면보다 더 활발한 신생골 재생 효과를 보였다.

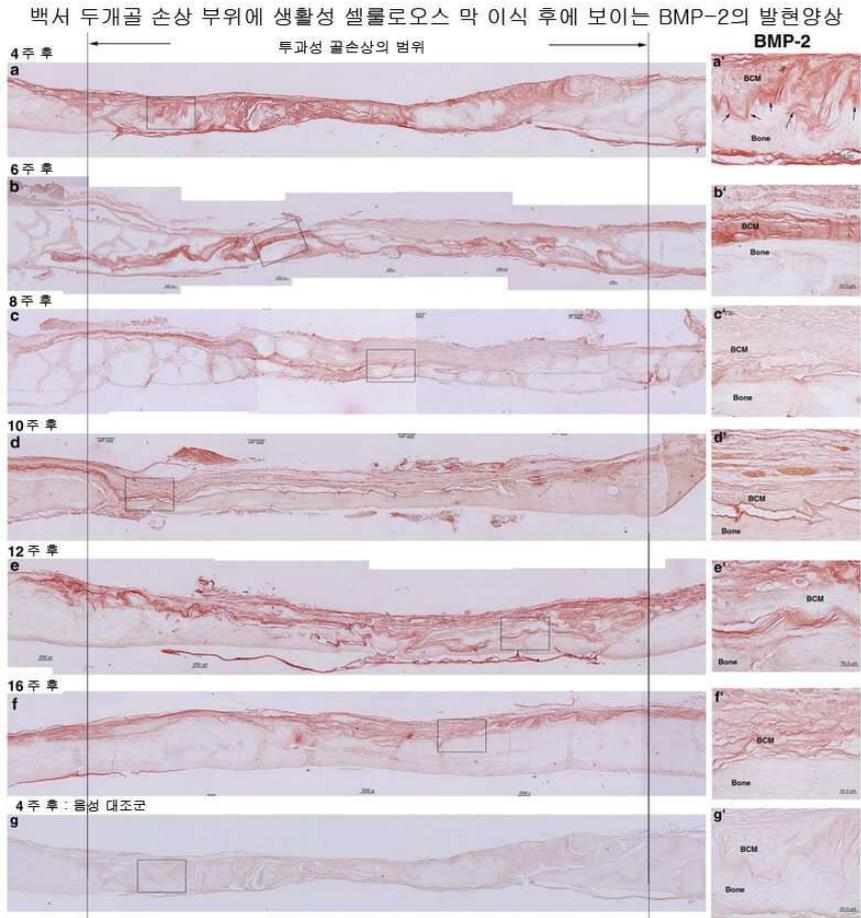
도면7

생활성 셀룰로오스에 의한 골 형성 작용의 전자현미경 소견



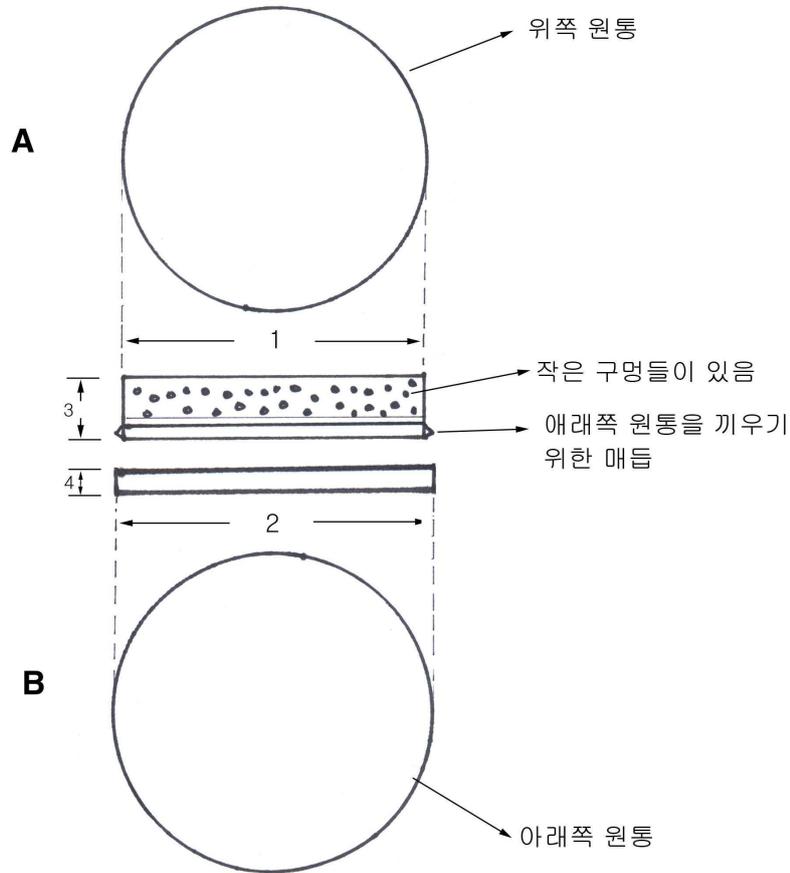
왼쪽 사진: 생활성 셀룰로오스 막에 섬유모세포와 콜라겐 섬유가 직접 단단하게 부착되었다 (화살표).
오른쪽 사진: 생활성 셀룰로오스 막에 연결해서 바로 골조직이 침착되었다 (화살표).

도면8



도면9

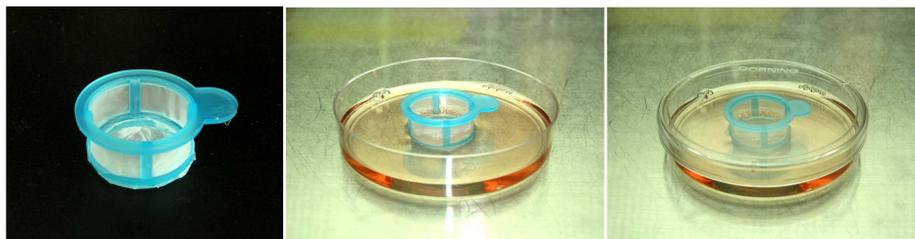
실린더형 (원통형) 셀룰로오스 막 세포 배양 장치



- 1: 위쪽 원통의 지름은 셀룰로오스 막의 크기에 따라 10-20 mm 정도
- 2: 아래쪽 원통의 지름은 위쪽 원통에 끼울 수 있는 크기로 함
- 3: 사용하는 페트리디쉬의 크기에 따라 대략 5-15 mm 정도
- 4: 3의 길이의 1/3 정도

도면10

원통형 세포 배양장치를 이용한 줄기 세포 배양 방법



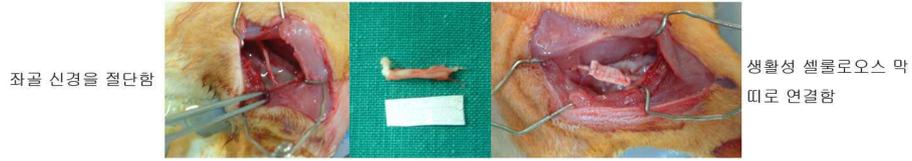
간편하게 그물형 원통의 밑면에 생활성 셀룰로오스를 부착시켰다.

통상적인 플라스틱 페트리디쉬에 원통형 세포 배양 장치를 놓고 줄기세포를 부어 넣는다.

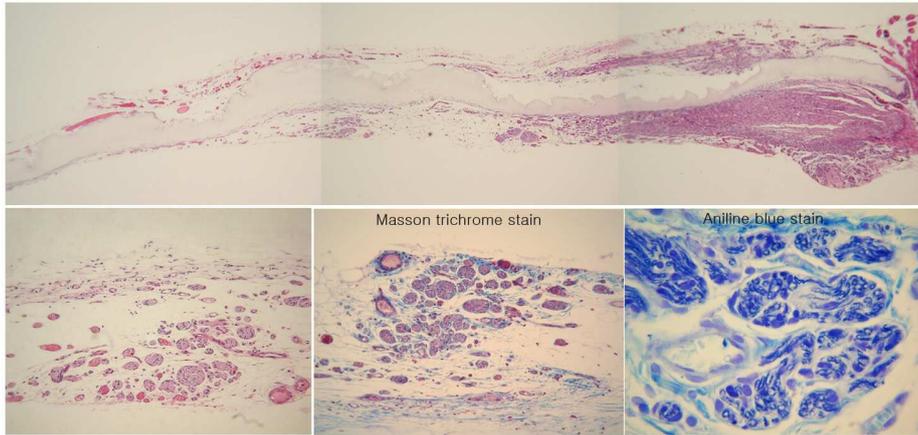
줄기세포를 채운 원통형 세포 배양 장치를 중앙에 위치시키고 뚜껑을 닫은 다음 통상적인 방법으로 세포 배양한다.

도면11

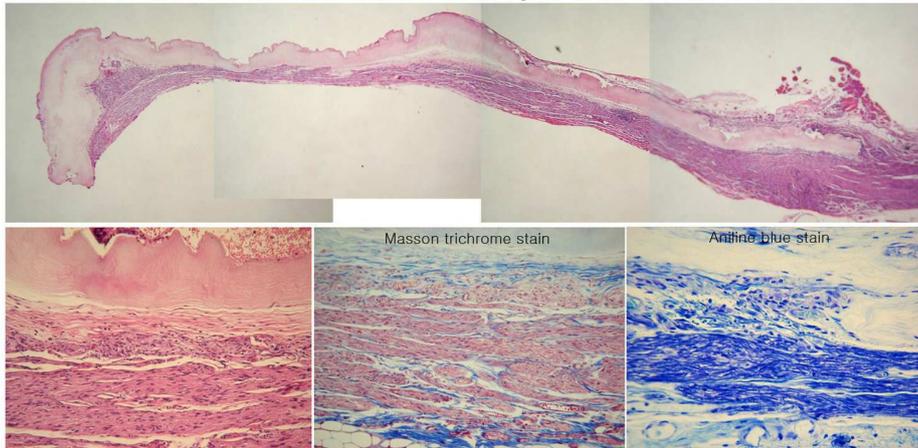
백서의 좌골신경 절단 후에 생활성 셀룰로오스 막을 이식 연결 실험



수술후 8 주경: 셀룰로오스 막의 내면으로 신경 다발이 부착되어 증식함

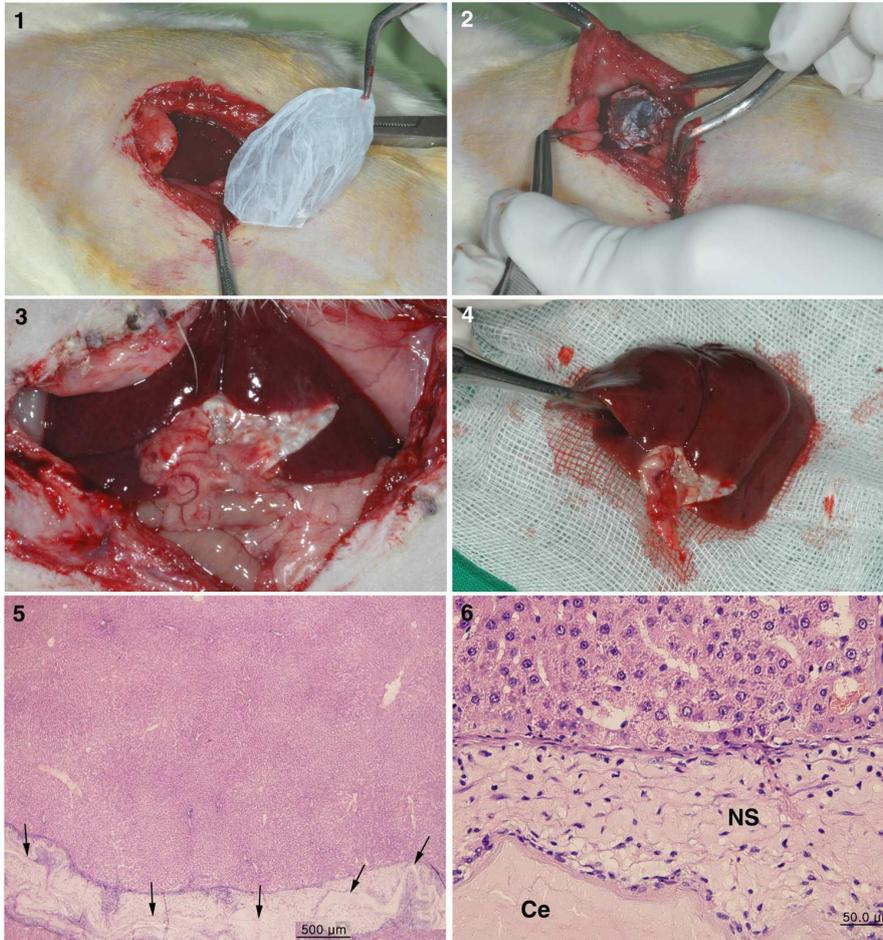


수술후 12 주경: 생활성 셀룰로오스 막을 따라 좌골 신경이 두껍게 재생되었다.



도면12

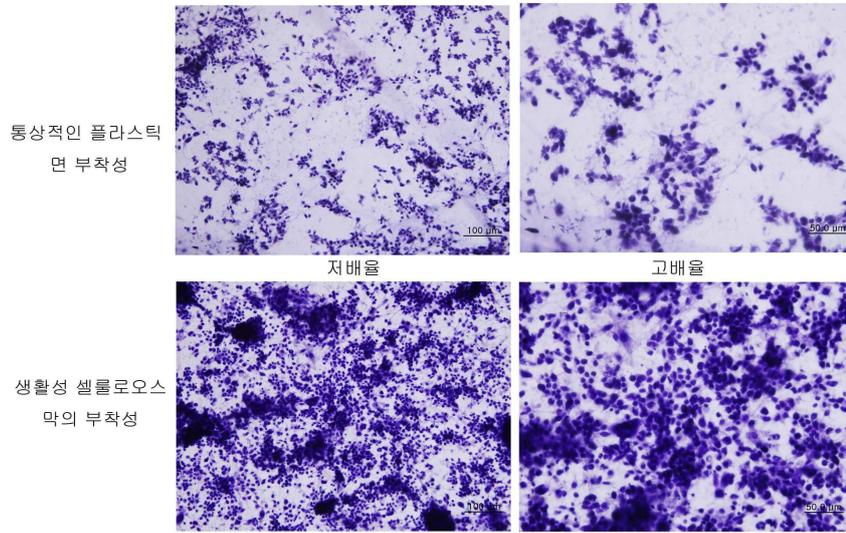
생활성 셀룰로오스 막의 간 장간막 이식



1: 백서의 간에 생활성 셀룰로오스 막의 이식전, 2: 백서의 간을 일부 절단한 후에 생긴 상처 부위에 생활성 셀룰로오스 막을 이식하였음, 3: 생활성 셀룰로오스 막을 이식한 다음 1주일 후에 복강을 절개하여 셀룰로오스 막이 간 표면에 잘 부착되어 있음을 확인함, 4: 백서의 간을 적출하여 관찰함, 5: 백서 간의 조직학적 관찰, 생활성 셀룰로오스 막 (화살표) 간의 표면에 잘 부착되어 있음, 6: 5 그림의 고배율 관찰, 생활성 셀룰로오스 막 (Ce)과 간 조직 사이에 새로운 장간막 (NS)이 생긴.

도면13

생활성 셀룰로오스 막의 세포 부착성, 배양 24 시간 후



생쥐의 골수 줄기세포 배양시에 통상적인 배양용 페트리디쉬 플라스틱 면에 부착하는 세포 수와 생활성 셀룰로오스 막에 부착하는 세포 수를 비교한 결과 배양 후 24 시간 후에 통상적인 플라스틱 면에 부착하는 골수 줄기세포의 수보다 생활성 셀룰로오스 막에 부착하는 줄기세포의 수가 훨씬 많았다.