

제 3 차 년 도
최 종 보 고 서

생체 의료용 고분자 개발

Development of Biomedical Polymer

생체적합성이 개선된 인공심장용 재료의 개발

Development of Biocompatible Material for Artificial Heart

연구 기관

서울대학교 의학연구원

의 공 학 연 구 소

과 학 기 술 처

제 출 문

과학기술처 장관 귀하

본 보고서를 "생체의료용 고분자 개발" 과제의 (세부과제 "생체적합성이 개선된
인공심장용 재료의 개발" 과제의) 최종 보고서로 제출합니다.

1995 년 7 월 27 일

연구기관명 : 서울대학교 의학연구원
의공학연구소

연구책임자 : 민 병 구

연구원 : 유 규 하

김 종 원

이 규 백

장 준 근

김 진 희

박 용 두

김 정 훈

심 재 희

전 성 민

장 현 아

협동연구기관명 : (주) 메디슨

협동연구책임자 : 이 민 화

요 약 문

본 연구는 생체적합성이 우수한 생체재료를 개발하여 완전이식형 인공심장의 재료로서 실용화하여 기타 다른 심혈관계 인공장기에도 응용하는 것을 최종 목표로 하며, 연구의 1단계중 3차년도에서는 지난 1,2차년도에 개발된 혈액적합성 소재를 이용한 인공심장용 혈액주머니의 개발 및 평가와 세균센서를 이용한 항감염성 소재를 개발하는 것을 목표로 하였다.

본 연구에서는 룬부로키나제 원재료의 대량 순수분리를 위하여 3단계 크로마토그래피법과 HPLC 기법의 조건을 확립하였다. 또한 룬부로키나제가 고정화된 폴리우레탄에 대한 토끼를 이용한 체내 독성 실험을 수행하여 개발된 재료가 체내 독성이 없음을 입증하였다.

룬부로키나제의 혈전용해기전을 입증하기위하여 룬부로키나제 유전자에 대한 클로닝을 수행한 결과 룬부로키나제의 아미노 말단서열 및 유전자 library를 작성하였다.

항감염 처리 방법을 개선하여 처리 방법이 단순화되고, 좀 더 다양한 균주에 대하여 항균성을 나타내도록 하였다. 항생제에 대한 연결체의 최적화를 위한 세균효소의 역학 실험에서는 여러가지 연결체중에서 PDI와 HMDI가 가장 적합한 연결체임을 확인하였다. 또한 혈액과 접촉한 상태에서의 연결체의 안정성과 고정화된 항생제의 약효 검색 결과 혈액내에서 안정하게 항생제가 세균과 반응하여 유리됨을 확인하였다.

Summary

The final goal of this project is to commercialize the biocompatible totally implantable artificial heart by developing biocompatible materials which can be applied to other blood-contacting artificial organs. The objectives of the 3rd year was to develop the blood compatible artificial heart and anti-infective material using a bacteria sensor system.

The three step chromatography and HPLC were established for the mass production of highly purified lumbrokinase. Lumbrokinase-immobilized polyurethane showed no toxicity in the in vivo implantation experiment using a rabbit.

The cloning of lumbrokinase gene was performed to prove the thrombolytic mechanism of lumbrokinase. The amino terminal sequence and genetic library of lumbrokinase were found.

Anti-infective treatment method was improved to simplify the method and show better anti-infective action to various bacteria. In the kinetic experiment of bacterial enzyme for optimizing the linker of antibiotics, PDI and HMDI were proved to be effective linkers of antibiotics. And the immobilized antibiotics were effectively released to blood when bacteria contacted to the surface, which was confirmed from the the experiments of the stability of linkers and the effect of antibiotics in blood.

목 차

제 1 장 서 론	1
제 1 절 연구개발의 필요성	1
제 2 절 현재까지의 연구개발 현황	4
제 3 절 연구개발의 목적과 범위	8
제 2 장 연구추진 방법 (실험 방법)	9
제 1 절 롬부로키나제의 순수분리법 개발	9
1. 롬부로키나제의 대량 순수 분리법	9
2. HPLC를 이용한 롬부로키나제의 분리	10
제 2 절 롬부로키나제가 고정화된 재료의 체내 독성 테스트	12
1. 단기 근육내 이식 실험	12
제 3 절 롬부로키나제의 클로닝	14
1. 롬부로키나제의 전기 영동	14
2. Electroblothing	14
3. Membrane의 염색	15
4. N 말단 sequencing	15
5. Internal peptide sequencing	15
6. Oligonucleotide의 합성	15
7. Total RNA의 추출	16
8. RNA의 정량	16
9. PCR	16
10. 염기서열 결정	17
11. DNA 데이터 베이스의 검색	17

제 4 절	항감염체 기술의 확립 및 그 산물의 생체내 활성 평가.....	17
1.	항 감염 처리방법의 개선	17
2.	항균 기전의 확인을 위한 연구	19
3.	연결체의 체내 안정성 연구	23
제 5 절	인공심장의 동물 실험	23
제 6 절	인공심장 혈액주머니에서의 혈장단백질 흡착과 3차구조의 변화 관찰	24
1.	폴리우레탄 시료의 준비	24
2.	단일 항체의 준비	24
3.	피브리노겐의 방사능 표지	24
4.	항체의 방사능 표지	25
5.	혈소판의 방사능 표지	25
6.	폴리우레탄 표면에 흡착된 피브리노겐의 정량	26
7.	본 구조를 유지하고 있는 피브리노겐의 정량	27
8.	혈소판과의 반응성 측정	27
9.	폴리우레탄 표면에 흡착된 피브리노겐과 혈소판의 반응 저해에 대한 실험	28
제 3 장	연구 결과 및 고찰	29
제 1 절	룸부로키나제의 분리 및 정제	29
1.	<i>Lumbricus rubellus</i> 의 전처리 과정	29
2.	컬럼 크로마토그래피	29
3.	룸부로키나제의 생화학적 특성	31
4.	룸부로키나제에 의한 fibrinogen의 용해	31
제 2 절	룸부로키나제가 고정화된 재료의 체내 독성 테스트	32
제 3 절	룸부로키나제의 클로닝	32
1.	룸부로키나제의 아미노 말단 서열 결정	32
2.	아미노 말단으로부터 유래한 DNA 합성	35
3.	구인으로부터 유전자 library의 작성	36
4.	유전자의 screening	40

제 4 절	항 감염체 기술의 확립 및 그 산물의 생체내 활성 평가	40
1.	항 감염 처리방법의 개선	40
2.	항균 기전의 확인을 위한 연구	41
3.	연결체의 체내 안정성 연구	44
제 5 절	인공심장의 동물 실험	44
제 6 절	인공심장 혈액주머니에서의 혈장단백질 흡착과 3차구조의 변화 관찰	45
1.	서 설	45
2.	폴리우레탄 표면에 흡착된 피브리노겐의 정량	47
3.	흡착된 피브리노겐의 감마체인에 있어서의 구조적 변화	47
4.	흡착된 피브리노겐의 알파체인에 있어서의 구조적 변화	48
5.	폴리우레탄 표면에 흡착된 피브리노겐과 혈소판의 반응성 및 단일항체를 이용한 반응 저해성의 평가	48
제 4 장	결 론	50
제 5 장	참고 문헌	52
부 록	(표와 그림)	55

제 1 장 서 론

제 1 절 연구 개발의 필요성

의료용 특히 인공심장과 같은 체내 이식용 재료의 기본적인 요건은 생체 또는 그 구성 요소에 대하여 적합한 기능을 갖는 것이다. 즉 재료 구입의 용이성, 우수한 물리적 및 기계적 물성, 재료의 체내안정성, 소독가능성과 생체적합성(biocompatibility)이 있어야 한다. 따라서 우수한 생체적합성을 비롯한 위의 요건들에 부합되는 고분자 재료의 개발을 위하여 많은 연구가 진행되고 있으며, 특히 혈액적합성(hemo-compatibility)이 좋고 체내이식시에 나타날 수 있는 각종 염증(inflammation)과 감염(infection)을 방지할 수 있는 물질의 개발은 인공 심장의 성공적인 이식을 위하여 반드시 해결되어야 할 문제 중의 하나이다.

인공생체재료가 생체조직을 대신하여 인체에 삽입되면 인체의 혈액응고와 응고억제 및 혈전용해의 균형이 깨져 혈전의 형성이 지속적으로 진행된다. 그 원인은 수동적 응고억제 기전과 능동적 응고억제기전이 인공생체재료의 표면에서는 작게 작용하기 때문이며, 또한 혈장 단백질의 흡착에 따른 혈소판의 점착 및 활성화에 의하여 혈액의 응고가 급속히 진행되기 때문이다. 항상 약물을 복용하는 경우를 제외하면 인위적으로 응고억제기전을 만들어내기 어렵기 때문에 생체재료표면에서의 혈액응고 초기과정은 매우 중요한 의미를 가진다. 초기의 혈액응고과정에 혈장 단백질의 흡착이 관여하고 있다고 알려져 있으며, 혈장단백질과 생체재료와의 반응에 관하여 많은 연구가 진행되고 있다. 또한 생체재료표면의 혈액적합성을 향상시키고자 다양한 종류의 생리활성물질 및 화합물을 고정화하여 혈액의 응고억제기전을 유발시키고자 하는 연구도 시도되었으나 대부분의 연구결과 인공생체재료표면에서의 혈전형성을 완벽히 피할수는 없으리라 생각되고 있으며, 따라서 생체재료표면에서 능동적으로 형성된 혈전을 용해하는 방법은 가장 효율적인 방법중의 하나라 생각될 수 있다.

재료의 혈액적합성은 주로 수동적 응고억제기전에 영향을 주는 표면의 물리적 및 화학적 구조에 따라 결정되며, 특히 재료의 극성, 표면에너지, 표면전하, 친수성 및 소수성, 표면의 평활도와 다공도 등에 의해서 크게 영향을 받는다. 현재까지 많은 연구 집단에서 혈액과 생체재료사이의 반응현상에 관하여 연구를 진행하고 있으나 생체재료 표면에서의 혈전의 형성은 매우 복잡한 기전에 의해 일어나고, 분자 수준으로 반응이 진행되어 혈액과 생체재료와의 반응의 실체를 해석하기에는 아직도 많은 문제점이 남아 있으며, 진행되고 있는 연구의 대부분은 재료자체의 특성에 관한 것일뿐, 재료표면에서의 혈장단백질 흡착에 있어서 혈액의 유동특성에 따른 영향은 고려되지 않고 있다. 그러나, 인공심장을 비롯한 인공장치에서의 혈전의 생성은 재료의 특성뿐만 아니라 혈액의 유동특성에 의해서도 영향을 받는다. 특히 인공심장내에서는 복잡한 혈액의 유동현상이 진행되며 혈류의 모양에 따라 혈전의 형성도 영향을 받는다고 알려져 있으므로 인공심장내의 혈액유동현상에 대한 고찰은 대단히 중요한 의미를 갖는다고 할 수 있다.

감염은 혈전과 더불어 인공장기를 장기간 생체내에 장치할 때 발생하는 중요한 합병증이다. 생체재료는 사용되는 재료의 종류와 목적에 따라 감염률에 차이를 보이고 있는데 인공혈관의 경우에는 6%이상이 감염되고, 감염된 환자의 30%에서 사망이나 수족절단을 초래한다[1-4]. 인공고관절의 경우는 0.1-1% [5], 인공슬관절의 경우는 1-4% [6], 인공완관절의 경우는 4-7% [7,8]에서 감염이 일어난다. 중심정맥catheter에서는 4-12%[9]에서 감염이 일어나며 인공심장을 이식받은 환자에 있어서는 감염문제가 더욱 심각하다. 장기간 이식된 인공심장의 90%에서 감염이 일어나고 균혈증이나 기타의 합병증으로 사망에 이르게 된다 [10-12].

인공 구조물이 세균에 의하여 감염되는 것을 막기 위해서는 인공장기의 표면이 세균의 부착을 억제하거나 항균작용을 할 수 있어야 한다. 세균의 부착에 관여하는 요인으로는 생체재료(biomaterial)의 표면에너지(surface energy)[13,14], 소수성 정도(hydrophobicity)[15], 생체 재료의 표면특성에 따라, 부착되는 종류가 달라지는 생체 고분자 물질들 그리고 생체재

료 위에 살아있는 세포가 이미 붙어있는지의 유무[16] 등이다. 인공구조물이 생체에 장치 되면 가장 먼저 체액내에 있는 여러가지 고분자물질들(macromolecules)이 인공장기의 표면에 부착되고 그 위에 세균이 정착하여 증식을 한다[13]. 일단 세균이 증식을 하면 세균으로부터 나오는 분비물의 일종인 슬라임(slime)이 식균작용이나 항체 및 항균제의 공격으로부터 병원체를 감싸는 역할을 함으로써[17-20] 인공구조물이 병원체의 성역이 되기 때문에, 인공구조물에 생긴 감염은 치료에 잘 반응하지 않으며, 결국 감염된 인공구조물을 제거해야 감염 문제가 해결된다[13]. 그러므로 감염의 예방이나 억제는 인공구조물을 장시간 인체내에 장치하는데 필수적인 과제이다.

국내의 경우 좌심실보조장치의 혜택을 받을 가능성이 있는 환자가 상당히 많다는 것이 흉부외과의들의 공통된 의견이며, 최후의 처치 수단으로서 인공심장의 도움을 받아야만 될 환자의 수도 상당수 있는 것으로 사료된다. 서울대학교 병원의 경우 연간 약 600 여명의 환자가 개심수술을 받았으며, 전국적으로는 약 1500 여명의 환자가 이 수술을 받은 것으로 보고되고 있으나 실제로 이러한 심장질환 환자는 연간 약 10,000 여명에 달하고 있으며, 이중 약 10% 이상이 인공심장이 완성될 경우 혜택을 받을 것으로 기대된다. 최근 국내의료계에서 장기이식이 합법화되어 가는 추세이므로 몇 년내에 장기이식이 국내에서도 활성화될 가능성이 높고 장기이식이 활성화될 경우 심장이식도 많아지게 된다. 일반적으로 장기이식을 받으려는 환자의 수에 비하여 장기의 제공자는 매우 적고 특히 심장의 경우에는 심장이식을 받으려는 환자나 비슷한 면역성을 가진 사람이 심장의 손상을 당하지 않고 사망하였을 경우에만 심장이 제공되어 이식이 가능하다. 따라서 자신의 심장으로 당장의 생명 유지가 어려운 환자에게 인공심장을 이식함으로써 적합한 심장이 제공될 때까지 생명을 유지할 필요성이 커지므로 가까운 미래에 국내에서의 인공심장 사용은 급증하리라 예상할 수 있다. 특히 우리나라의 경우 서구에 비해 심장질환에 대한 관심이 적어 조기 진단이 거의 이루어지지 않고 있으며, 질병이 발견되는 환자들 중 많은 사람들에서 이미 심장상태가 많이 악화되어 있기 때문에 인공심장의 필요성이나 그 수요는 외국보다 더욱 절실하다고 할 수 있다.

국내에서 한국인의 체형에 맞는 인공심장과 그 제어방식이 개발된다면 이것을 이식하여 그 생명을 연장시킬 수 있으며, 적절한 심장이식을 위한 제공자가 나올 때까지 유지 수단으로 쓰일 수 있을 것이다. 서구인과는 판이한 체형과 생리변수를 갖고있는 우리의 경우에 있어서 자체적인 개발의 의학적인 필요성이 크게 대두되고 있는 것이다.

미국의 국립 보건성(NIH)의 1994년 발표에 따르면 앞으로 6년 안에 인간 신체내에서 고장이 없이 작동할 수 있는 인공 심장을 개발할 것이라고 한다. 이렇게 인공심장등의 인공장기의 개발과 함께 보다 좋은 기능을 가지고 있는 생체재료에 대한 요구가 커가고 있다. 그러나 지금까지 어디에서 개발된 생체재료도 인공장치 재료의 가장 큰 요건인 항혈전성의 보장이나 장기적 감염에 대한 예방이 가능한 제품은 없다. 인공 심장 분야와 생체재료 분야에서 최고 수준에 있는 미국에서조차 이식후에 나타나는 혈전이나 감염등의 제반 부작용을 근원적으로 해결할 수 없는 만큼 항혈전성이 우수하고 항균처리가 된 생체재료는 큰 수요를 창출할 것이며 기술이전으로 인한 수익도 상당하리라 기대된다.

제 2 절 현재까지의 연구개발 현황

의료용 재료의 혈액 적합성이나 항균성을 향상시키는 방법은 혈액적합성이 우수한 새로운 물질을 개발하는 방법과 기존 재료의 표면을 개질함으로써 혈액 적합성이나 항균성을 향상시키는 방법으로 크게 나눌 수 있다. 최근 세계적 연구 추세를 살펴보면, 새로운 폴리우레탄의 합성이나 표면 개질에 초점이 모아지고 있는데, 이는 폴리우레탄이 상대적으로 혈액 적합성이 우수할 뿐 아니라, 의료용 재료로서 적합한 기계적 성질을 지니고 있음을 암시한다. 그러나 일반적으로 새로운 물질의 합성을 통하여 충분한 기계적 특성과 혈액적합성을 얻기 위하여서는 많은 어려움이 따른다. 따라서 새로운 물질을 개발하는 것보다 표면의 개질을 통하여 혈액적합성을 향상시키려는 시도가 많이 연구되고 있다.

혈액적합성 고분자 재료의 개발은 현재 미국을 중심으로 활발하게 진행되고 있다. 미국 유타 대학의 김성완 박사팀의 경우 오랜 기간에 걸쳐 헤파린의 고정화에 관한 연구를 하여 인공 심장에 응용한 바 있다. 일본의 경우 동경여자 의과대학의 Okano 박사팀은 새로운 고분자 물질의 합성을 시도함으로써 재료의 혈액적합성을 향상시키고자 노력하고 있다. 또한 오사카 순환기병 센터의 Matsuda 박사팀은 인공 심장에 대한 혈액 및 조직적합성을 향상시키기 위하여 인공 심장에 대한 표면 개질을 시도하여 현재 인공 심장에의 응용을 서두르고 있다. 이밖에도 혈관 내피세포의 배양을 통한 생체적합성의 향상에 관한 연구도 미국, 일본, 유럽 등을 중심으로 현재 활발하게 진행중에 있다. 또한 인공 장기의 주요 사인의 하나로 심각하게 대두되고 있는 감염의 원인을 해결하고자 전세계의 많은 연구 집단에서 연구를 진행 중이다.

서울대학교 의과대학 의공학교실에서는 지난 수년간에 걸쳐 인공심장 및 관련장치의 혈전(thrombus) 및 감염(infection)을 억제하는 재료를 개발중에 있으며, 폴리우레탄에 알부민을 공유결합시켜, *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo* 실험을 거친 결과 항혈전성이 향상되었음을 보고 한 바 있다. 또한 인공심장내에서의 혈류양상을 분석함으로써 혈전 형성에 관련된 요소들을 가능한 제거하여 혈전형성의 초기단계에서 혈전형성을 효과적으로 억제할 수 있는 물질을 설계하는데 기본자료로 이용하고 있다. 아울러 폴리우레탄을 기질로하여 혈관내피세포를 배양함으로써 궁극적으로 가장 안정한 생체적합성재료를 개발하고자 현재 연구를 진행중에 있다.

본 연구개발과제 1단계 연구에서 강력한 혈전분해효소이며, 높은 역가와 안정성을 지니는 롬부로키나제를 폴리우레탄(PU)의 표면에 도입하는 방법이 개발되었다 [21-23]. 롬부로키나제를 폴리우레탄의 표면에 도입하기 위하여 가교제로 maleic anhydride methylvinyl ether copolymer (MAMEC)를 사용하고 효소의 아민기와 가교제 (MAMEC)의 무수기 사이의 개환반응을 통하여 효소의 고정화를 이루었다. ATR-FTIR을 이용하여 효소의 도입을 확인하였으며, ESCA분석과 접촉각 측정을 시행하여 효소의 성공적 도입을 재확인하고 표면

이 친수화됨을 관찰하였다. 특이염색제 (Coomasie Brilliant Blue G)를 이용하여 고정화된 효소의 농도를정량함으로써 약 24 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 임을 관찰하였고, 효소의 섬유소분해 활성도와 단백질분해 활성도를 측정하여 폴리우레탄에 고정된 효소가 피브리노겐을 분해하며 용액상의 롬부로키나제에 비하여 34%의 활성이 있는 것을 관찰할 수 있었다. pH와 온도의 변화에 따른 활성의 변화를 측정한 결과 용액상의 롬부로키나제보다 더욱 안정된 활성도를 보였으며, 혈장내 기질에 대한 특이성을 측정한 결과 피브리노겐/피브린에 특이적으로 작용하였고, 단백질분해효소 억제인자에 의한 영향을 관찰하여 용액상의 롬부로키나제는 활성이 소실되는 반면 고정화된 롬부로키나제는 활성이 거의 억제되지 않고 60-93%까지 활성이 유지됨을 알 수 있었다. 37 °C 전혈(Whole blood)내의 피브리노겐이 흡착하는 양을 방사선 동위원소를 이용하여 측정한 결과 콘트롤 폴리우레탄에 비하여 효소가 고정된 폴리우레탄에 피브리노겐이 훨씬 적게 흡착하는 것을 확인할 수 있었으며, 혈소판 점착 실험에서도 롬부로키나제가 고정된 폴리우레탄에서 반응시간이 지남에 따라 점착된 혈소판의 수가 점차 감소하는 양상을 보였다. 또한 *ex vivo*상에서 토끼의 경동맥에 롬부로키나제를 고정화한 폴리우레탄 튜브를 이식하여 혈액응고시간을 측정한 결과 폴리우레탄 콘트롤에 비하여 약 5배의 혈액응고시간이 연장됨을 확인하였다. 또한 *in vitro* 및 *in vivo* 독성실험 결과 어떠한 독성도 관찰되지 않았다.

생체재료표면에 혈관내피세포를 배양하는 방법을 확립하였으며, 생체재료표면에 대한 세포의 부착능을 평가하였다. 일반적으로 생체적합성이 우수하다고 알려진 생체재료 위에서는 혈관내피세포가 잘 자라지 않으며, 폴리우레탄위에서도 혈관내피세포가 잘 자라지 않기 때문에 혈관내피세포의 부착및 생장을 향상시키기 위하여 표면에 피브로넥틴을 도포하는 방법과 섬유아세포의 세포외기질(Extracellular matrix)을 도포하는 방법을 사용하였으며, 두가지를 비교관찰한 결과 섬유아세포의 세포외기질위에서 혈관내피세포가 더 잘 자라는 것을 확인할 수 있었다. 세포외기질을 도포하기 위하여 폴리우레탄 위에 배양된 섬유아세

포를 세포외기질로부터 떼어내는 방법에 따른 혈관내피세포의 성장속도를 관찰한 결과 감마선 조사법보다 Hypotonic shock법이 더욱 효과적이며 생리적인 방법임을 확인하였다.

표면에 부착된 혈관내피세포의 부착능을 측정하기 위하여 층류발생실험기(flow chamber)를 제작하고 균일방향의 전단응력(uniform laminar shear stress)를 가하여 세포가 떨어지는 양상을 관찰하였다. 세포배양 시작후 2일에서 4일사이에 세포부착능력이 극대화됨을 알 수 있었으며 부착능의 면에서 보았을 때 섬유아세포의 세포외기질보다는 피브로넥틴위에 배양된 세포가 부착능이 큼을 알 수 있었다.

생체재료의 감염을 방지하기 위하여 표면에 항생제를 고정화하였다. 생체재료와 항생제를 carbamate 공유결합으로 직접 항생제를 고정화하거나 또는 생체재료와 항생제사이에 oligonucleotide를 삽입하여 carbamate 공유결합으로 고정화하였다 두가지 경우 모두 인공생체재료의 주 감염균인 *S. aureus*, *S. epidermidis* 에 항균성을 나타내었다.

인공심장의 일종인 좌심실보조장치의 혈류분석을 모의 순환장치내에서 시행하여 디지털 영상처리기법으로 영상의 유체속도벡터를 구하여 부위별 전단응력수준을 결정하고 그 결과를 바탕으로 피브리노젠에 대한 단일클론 항체를 이용하여 단백질의 흡착특성을 분석하였다. 전단응력이 커질수록 흡착된 총 피브리노젠의 양과 3차구조가 변하지 않은 피브리노젠의 양이 함께 감소하는 양상을 관찰하였다 [24, 25].

지난 1단계의 연구성과로는 국내 학술지 게재 6건, 국외 학술지 게재 9건, 국내 학술대회 발표 19건, 국제학술대회 발표 35건 등이며, 3건의 인공심장 관련 특허 (룸부로키나제를 고정한 생체재료 및 그 제조방법, 수채형고분자 밸브, 인공심장 판막)를 출원하였다.

지난 1단계의 연구 결과를 바탕으로하여 본 연구의 참여업체인 (주)메디슨에서 2억원의 자본금을 출자하여 인공심장의 상품화를 목적으로하는 (주) 바이오메드랩을 설립하였으며, 아울러 7개의 회사로 구성된 인공장기연구조합이 창설되었다.

제 3 절 연구개발의 목적과 범위

3차년도에 수행된 실험 방법은 우선 롬부로키나제로 처리한 폴리우레탄의 생체내 독성 실험이다. 동물에 롬부로키나제를 처리한 폴리우레탄을 이식하고 그 독성정도를 보고 그 추출물의 독성을 테스트하는 실험을 수행하였다. 또한 롬부로키나제의 사업화가 추진 중에 있는 만큼 롬부로키나제를 처리하기 위해서는 대량의 롬부로키나제가 필요하게 된다. 현재 롬부로키나제를 분리하는 방법은 지렁이의 일종인 *Lumbricus rubellus* 를 분말로 만들어서 이것을 생리 식염수로 녹이고 여기서 나온 상층액을 3단계의 크로마토그래피를 거쳐서 분리를 해내는 것이다. 본 연구에서는 기존의 방법을 개선함과 아울러 High performance liquid chromatography(HPLC)를 이용하여 짧은 시간에 많은 양의 순수분리된 효소를 얻을 수 있도록 하였다.

본 실험에서 사용하는 롬부로키나제는 *in vivo* 또는 *ex vivo* 에서 사용시 혈전을 줄인다는 결과를 낸 바 있으나 어떠한 기작에 의해 분해하는지 알려지지 않고 있다. 본 연구에서 롬부로키나제를 사용하는 궁극적 목적은 인공 장치의 표면에 처리함이 목적이고, 인공 장치는 영구적이건 일시적이건 간에 인체 내에 들어가 혈액 또는 세포와 접촉하기 마련이다. 그러므로 신체 내 특히 혈액 내에서 롬부로키나제가 작용하는 기전을 밝히는 것은 장치의 안정성 내지 독성을 예측하는데 필수적인 과정이라 할 수 있을 것이다. 생체 내에서 롬부로키나제가 어떤 역할을 하며 어떤 기작에 의해 혈전 방지 내지는 용해 효과를 나타내는지 알아보기 위해 롬부로키나제를 클로닝하는 작업이 필요하였으며, 유전자를 클로닝하여 그 유전자의 nucleotide sequence를 일부 분석하여 롬부로키나제의 생체 내에서 기능과 작용 기전을 간접적으로 알 수 있게 되었다.

제 2 장 연구 추진 방법 (실험 방법)

제 1 절 롬부로키나제의 순수 분리법 개발

1. 롬부로키나제의 대량 순수 분리법

롬부로키나제의 안정적 공급을 위한 HPLC 도입 기술 확립을 위해서 우리는 먼저 분석용 컬럼을 사용하여 최적화된 조건(flow rate, gradient time, concentration gradient, temperature, pH etc.)을 확립하고, 그후에 preparative 수준의 컬럼을 사용하여 분리를 수행하였다.

(1) 소수성 크로마토 그래피(Hydrophobic Interaction Chromatography)

기존의 분리 방법에서는 ammonium sulfate 에 의해서 단백질을 침전시키고 이것을 이용한 교환 크로마토그래피에 적용하였는데, 이를 위해선 ammonium sulfate 를 제거하기 위해서 dialysis를 해야 한다. 이 과정은 시간(1-2일)이 걸리고 또 샘플에 단백질 분해 효소나 여러가지 다른 물질들이 있어서 활성 효소 획득률이 떨어지게 하는 원인이 된다. 이것을 피하기 위해서 dialysis가 필요 없게끔 같은 ammonium sulfate으로 염농도 경사를 건 소수성 크로마토그래피를 수행하였다. 소수성 크로마토그래피는 다른 종류의 컬럼보다 많은 양의 시료를 적용할 수 있기 때문에 HPLC 의 첫 단계에 사용하기엔 매우 유용한 특징을 가지고 있다. 소수성 컬럼을 사용하는 데 있어서는 ammonium sulfate 로 gradient 를 건다. 기존의 크로마토그래피에서 사용하였던 30-10 % gradient를 기준으로 gradient time을 90분으로 조건의 최적화를 이룬다. pH도 단백질의 소수성 결합력에 영향을 주기 때문에 분석용 컬럼에서 최적화 한다 [26]. 롬부로키나제가 컬럼입자에 잘 접근할 수 있도록 컬럼의 입자는 20-40 μ m 되는 것을 사용하였다. Pore diameter는 300 Å 정도의 것을 선택하였다. 분석용 컬럼은

45x4 mm 정도 되는 것을 사용하고, prepative 컬럼은 250x25 mm 정도 되는 것을 사용하였다.

(2) 이온 교환 크로마토그래피의 이용

분리하려고 하는 물질의 전하를 이용하여 시료의 성분을 분리하는 이온 교환 크로마토그래피를 HPLC 에서 이용하려면 우선 조건의 최적화가 이루어져야 한다. 완충 용액의 ionic strength를 증가시켜서 컬럼의 표면에 붙어 있는 단백질을 떨어 뜨리는 방법과 pH 를 이용하여 단백질을 분리하는 방법이 있는데 본 실험에서는 pH 를 8.0 으로 고정시키고 ionic strength를 점점 증가시키는 방법을 사용하였다. 분석용 컬럼으로는 5x50 mm의 크기가 되는 것을 prepative 컬럼으로는 250x22 mm 정도 되는 것을 사용하였다.

2. HPLC 를 이용한 롬부로키나제의 분리

(1) 전처리

*Lumbricus rubellus*의 건조 분말을 10배(W/V)의 생리 식염수에서 저어 주면서 4 oC 에서 녹인 후 이것을 2,500 g 에서 30 분간 원심 분리하여 상층액을 여과지(Whatman #1)로 몇 번 여과하였다. 그리고 이것을 다시 nylon66 pre-cut membrane(0.4 μ m) 으로 여과하고, 시료의 불순물을 완전히 제거하기 위하여 용액을 다시 0.2 μ m ANIDISC 47 filter membrane 으로 여과하였다. 여기에서 나온 용액을 다음 과정에서 사용되는 시작 완충 용액과 같은 농도의 ammonium sulfate 용액으로 만들어 주었다.

(2) 소수성 HPLC (Hydrophobic Interaction HPLC)

컬럼을 시작완충 용액(30 % Ammonium sulfate, Tris-HCl pH 8.0)으로 충분히 흘려주고, 분석용 컬럼에서 최적화 된 온도, pH, flow rate(<1.5 ml/min)를 유지한 후 시료를 컬럼

에 적용하고, 최적화 ammonium sulfate 농도 경사를 걸어 주었다. 여기에서 나온 각 분획들의 전체 단백질 농도를 정량하고, simple fibrin plate method 로 효소 활성을 측정하여 활성 분획들을 얻어 내었다. 항혈전 효소 활성을 보이는 분획들을 모아서 60 % ammonium sulfate 로 단백질을 침전 시키고, 이것을 다시 3,000 g 에서 4 °C 에서 30 분간 원심 분리하여 침전물만을 완충 용액에 녹이고(pH 8.0), 1-2일 동안 dialysis를 수행하였다.

(3) 이온 교환 HPLC

이온 교환 HPLC도 최적화된 조건으로 시작 완충용액을 컬럼 부피의 2-3배 정도 흘려 주고, 컬럼의 온도는 4 °C를 유지 하였다 [27]. 시료를 적용한 후에 원하지 않는 비특이적으로 결합한 물질들을 제거하기 위해서 다시 시작 완충 용액으로 컬럼 부피의 5배 정도 흘려주어서 세척을 실시하였다. 0.01M-0.5M NaCl 의 농도 경사를 이루게 해서 gradient time은 1시간이 되게 해서 분리한 후 이 분획들의 단백질 농도를 측정하고, 다시 simple fibrin plate method를 사용하여 효소 활성을 보이는 peak를 구하였다.

(4) 단백질 정량과 효소 활성 측정

분획을 peak별로 모아서 PEG(polyethylene glycol)를 이용하여 부피를 조정하고[28], 얻어진 sample 의 정확한 정량을 실시하였다. 분리 되어진 sample들의 효소 활성을 측정하기 위해서 simple fibrin plate method를 이용하였는데, sample과 함께 standard 로 유로키나제를 사용하여 두가지 효소(urokinase & sample)의 효소 활성 정도를 비교하여서 림부로 키나제의 전체 활성과 특이 활성을 구하였다.

제 2 절 룬부로키나제가 고정화된 재료의 체내 독성 테스트 [29]

1. 단기 근육내 이식 실험 (Short-Term Intramuscular Implantation Assay)

본 실험은 동물(토끼)의 조직내로 이식되는 생체재료의 살아있는 조직에 대한 반응을 측정하기위해 실시하였다.

(1) 실험동물 및 이식부위

: 동물은 New Zealand White rabbit (>2.5 kg) 을 사용하며, 토끼의 paravertebral muscle 에 이식하였다. 콘트롤재료로는 폴리우레탄(Polyurethane,PU) 과 폴리테트라플루오르에틸렌 (Polytetrafluoro-ethylene,PTFE) 을 사용하였다.

(2) 실험 재료

- 1) 이식 재료의 크기 : 1 x 10 mm ~ 3.2 x 12 mm
- 2) 이식 재료의 모양 : 원형 혹은 모서리가 둥근 사각 모양
- 3) 이식 기간 : 7, 30, 90, 180 일간 이식하며, 각 시기당 최소 3마리의 토끼에 이식하였다.

(3) 실험 방법

1) 이식 방법

가. 이식재료를 strip 형태로 준비하고, troca needle, stylet 을 준비후 각각 소독하였다.

나. 토끼를 케타민(ketamine)으로 마취하였다.

다. 포비돈(povidone)으로 이식부위를 소독하였다.

라. 토끼의 한쪽등의 paravertebral muscle에 4개의 strip을 이식하고, 토끼등의 중심선으로부터 2 ~ 5 cm 가량 간격을 두고, strip 사이의 간격은 2.5 cm 가 되게 하였다.

마. 토끼의 다른쪽 등에 같은 방법으로 4개의 콘트롤 strip 을 이식하였다 .

(2 PU strips + 2 PTFE strips)

바. troca 를 stylet 과 함께 근육속에 넣고, stylet 을 꺼내어 strip 을 이식하였다.

사. troca 를 제거하고, 이식부위를 봉합하였다.

2) 수술후 처치

가. 실험기간동안 각 동물을 세심히 관찰하여 비정상적인 동물의 상태를 기록하였다

나. 동물의 사망시 사인을 판명하고, 특히 이식재료와의 상관성 여부를 조사하였다.

3) 이식재료의 회수

: 이식부위 주변조직의 색깔 변화를 포함하는 전반적인 비정상적 소견을 기록하였다.

4) 총체적 관찰, Acute Test (7 days)

: 이식된 각각의 재료의 중심부위 조직을 관찰하여 4가지 샘플재료중 3개부위의 염증반응이 음성 콘트롤 (PTFE) 보다 크지 않아야 한다.

5) 조직학적 관찰, Acute Test (7 days) and Subchronic Test (30 and 90 days)

가. 이식재료주위의 조직을 4 mm 두께로 떼어낸다.

나. 조직샘플을 적절한 시편으로 자른다.

다. 이식주위의 조직을 총체적으로 관찰하였다 (육안 혹은 stereomicroscope).

라. 시편을 고정후 자르고 embedding 후 염색하였다.

마. 콘트롤 재료와 조직반응의 정도를 다음의 항목별로 비교관찰하였다.

: scar 의 두께, 정상조직에는 없는 염증이나 세포의 존재유무, particle 의 유무, 기타 조직과 재료의 반응

제 3 절 룬부로키나제의 클로닝

본 실험은 생체내 사용되는 룬부로키나제의 생체내 활성 및 기능을 보기위한 기초 지식의 축적을 목표로 하였다.

1. 룬부로키나제의 전기영동

Bio-Rad의 Mini-Gel Kit를 이용하고, resolving gel은 12 %, stacking gel은 5 %로 사용하였으며, 200 V로 40 분간 전기영동 시켜 단백질을 분석하였다.

2. Electroblotting

PVDF membrane(milipore)을 사용하는데, 우선 membrane을 전기 영동한 젤의 크기로 자르고, Membrane을 100 % 메탄올에 2-3초간 담근 후, 증류수로 2-3 분간 씻은 후, CAPS buffer(10 mM CAPS, 10 % methanol, pH 11)에 최소한 15분간 담그어 평형을 유지시켰다. 젤은 이 buffer에 5분간 담가놓아 씻어주고, Blotting cassette에 Whatman paper를 양쪽으로 겹쳐 놓고 그 사이에 gel과 membrane을 전극에 맞추어 놓는다. Blotting은 4 ℃에서 150 mA로 1시간동안 수행하며, buffer를 순환시키기 위해 magnetic stirrer로 지속적으로 저어주었다. Transfer가 완전히 수행된 후, 증류수로 membrane을 5분간 3회 이상 씻어주어 남아있는 염기들을 제거하였다.

3. Membrane의 염색

Coomassie blue R-250 (0.1 % in 50 % methanol)용액에 2분 정다 담가두어 염색한 후, 탈염색 용액(50 % methanol, 10 % acetic acid)로 완전히 배경염색을 제거하였다. 단백질 밴드의 염색 정도로 어느 정도 양의 단백질이 membrane에 흡착되었는지 판단하였다.

4. N말단 sequencing

Edman degradation방법을 사용하여 단백질 펩티드의 서열을 결정하였다.

5. Internal peptide sequencing

(1) CNBr을 이용한 단백질의 절단

순수 분리된 단백질 10 μg 을 진공 흡착기를 사용하여 용액을 완전히 날리고, 이 단백질에 formic acid를 10 μl 첨가하고, 단백질 양과 동일한 양의 CNBr을 넣었다. 반응 용기를 foil로 싸 후 상온에서 12시간 이상 반응시킨 후 증류수 200 μl 를 넣고 진공 흡착기로 말리는 과정을 3 - 4회 반복하고, 증류수 10 μl 에 녹였다.

(2) 펩티드 조각의 전기 영동

위에서 사용한 방법과 동일 하지만 펩티드 분리가 잘되도록 하기 위하여 buffer에 glycine을 사용하지 않고 tricine 을 사용하였다.

6. Oligonucleotide의 합성

PCR에 사용하기 위한 primer를 합성하였다. 특히 중요한 것은 지렁이에서 단백질 코돈 사용법이며, 또한, primer끼리 2차 구조를 형성하는지 고려하여 디자인하고 합성하였다.

7. Total RNA의 추출

RNAzol B의 방법을 사용하여 RNA를 얻어내었다. 우선, 지렁이에서 얻어낸 부위를 RNase가 없는 막자 사발에 넣고 액체 질소를 부어 가며 조직을 갈아 -70 ℃에 보관하였다. 1-2 g의 조직을 갈아 0.2 ml의 RNAzol B 용액을 첨가하여 세포를 lysis시켰다. 십분의 일 볼륨의 chloroform을 첨가 한후, 15초 동안 shaking을 하고 얼음에 5분동안 방치하였다. 샘플을 12,000 g 에서 15분간 원심 분리하여 RNA층과 단백질 그리고 DNA층을 분리해 내었다. 상층의 수층 즉, RNA가 들어 있는 부위를 새로운 용기에 옮긴 후 동량의 isopropanol을 첨가하였다. 샘플을 얼음에 15분간 놓아둔 후, 다시 12 K에서 15분간 원심 분리하였다. 원심 분리 후 가라앉은 pellet이 RNA 이므로 이것을 두고 윗층을 제거한 후, 75 % ethanol용액으로 씻고난 후, 진공 흡착기를 사용하여 RNA 샘플을 완전히 말렸다.

8. RNA의 정량

1/500으로 희석하여 spectrophotometer를 사용하여 O.D 260/280에서 측정한 후, O.D 값에 40을 곱하고 다시 희석율을 곱하여 RNA의 양을 얻어내었다.

9. PCR

(1) RT (reverse-transcriptase) 반응

얻어낸 RNA 10 µg을 RNase 없는 T.E(Tris 10 mM, EDTA 10 mM)에 녹이고, 여기에 reverse transcriptase buffer와 reverse transcriptase를 첨가한 후 45 ℃에서 30분간 반응하여 mRNA에 상보적인 DNA를 합성하였다.

(2) TD(touch-down) PCR

PCR의 특이성을 더욱 높이기 위해 TD-PCR을 수행하였다. 즉 denaturing 온도와 extension 온도는 정상과 같이 94 ℃, 72 ℃에서 수행하고 annealing 하는 온도를 세 사이클마다 1도씩 낮추어 주면서 수행하였다. 50 ℃에서부터 40 ℃ 까지 수행한 후 마지막 10 사이클은 40 ℃에서 수행하였다. 반응의 산물을 DNA agarose gel을 걸어 증폭된 DNA의 크기가 원하는 유전자인 롬부로키나제인지 확인하였다.

10. 염기 서열 결정

Dideoxyribonucleic acid를 사용하여 염기 서열을 결정하였다.

11. DNA 데이터 베이스의 검색

Gene bank에 시퀀싱한 염기 서열을 보내 유사성 있는 시퀀스가 존재하는지 알아보고 유사성 있는 단백질이 어떤 기능을 하는 단백질인지 비교 분석하였다.

제 4 절 항 감염체 기술의 확립 및 그 산물의 생체내 활성 평가

1. 항 감염처리방법의 개선

2차년도에 개발된 항감염처리 방법에서는 methanol로 세척된 PU의 표면에 hexamethylene diisocyanate(HMDI)를 이용하여 PU표면에 -N=C=O기를 도입하고 5'-말단에 amine 기가 도입된 oligoDNA를 반응시켜 oligoDNA가 부착된 PU(PU-DNA)를 만들었으며, PU-DNA와 succinic anhydride를 dichloromethane/ether(1/2) 용액에 넣고 triethylamine과 4-pyrrolidinopyridine을 촉매로 사용하여 40 ℃에서 반응시켜 succinic acid가 부착된 PU(PU-DNA-SA)를 만들었다. 마지막으로 PU-DNA-SA와 rifampicin 을 동일한 용액에 넣고 2-chloro-1-methyl pyridium iodide와 TEA를 촉매로 사용하여 40 ℃에서

반응시켜 rifampicin 이 고정화된 PU(PU-DNA-SA-Rif)를 만들었다. 개발된 PU-DNA-SA-Rif은 목표가 되는 *S.aureus*균의 성장과 증식 억제에 매우 효과적이었다.

(1) 대상균에 대한 특이성의 확인실험

PU-DNA-SA-Rif의 항균 대상인 *S.aureus*균 즉 nuclease를 생산하며 동시에 항생제인 Rifampicin에 대해 민감한 반응을 보이는 특정균만을 억제하는지를 확인하기 위해 *S.aureus*와는 생리적 특성이 다른 균주들을 negative control로 선정하여 실험하였다. 또한 oligodT와 Rifampicin간을 연결하는 ester bond가 *S.pneumoniae*의 esterase와 같은 효소 작용에 의해 가수분해 됨으로서 항균polymer로부터 Rifampicin이 유리되어 항균 작용을 나타낼 가능성이 높으리라 생각하여 oligodT와 항생제간을 HMDI(1,6-diisocyanate)를 이용하여 carbamate 결합으로 바꾸어 동시에 실험하였다.

항균작용의 평가는 2차년도에 시행한 것과 동일한 disc diffusion method를 사용하였으며 시험균주는 *S. aureus*, *E. coli*, *S. pneumoniae*를 사용하였고 *S. aureus*와 *E. coli*의 배지는 nutrient agar plate를 사용하였고 *S. pneumoniae*의 배지는 5% sheep blood가 함유된 blood agar plate를 사용하였다. oligodT는 succinic anhydride를 linker로 사용한 경우는 oligodT 5 mer를, HMDI를 linker로 사용한 경우는 oligodT 5mer와 10mer를 사용하였다. 시료는 PU sheet를 10mm 내경의 펀치로 잘라내어 원반형 disc 형태로 반응에 사용하였다. 모든 시료는 methylene chloride에서 2일간 세척하고 ethanol에서 1일간 세척한 다음 상온에서 24시간 이상 진공 건조하였다. EO(ethylene oxide) gas로 멸균하고 1일간 vacuum으로 EO gas를 제거한 후 실험에 사용하였다.

또한 oligodT를 사용하지 않고 PU에 HMDI를 사용하여 rifampicin 을 직접 고정화하고 항균성의 유무를 관찰하였다. 실험균주는 *E. coli*와 *S. aureus*를 사용하였고 3ml의 nutrient broth에 지름 12mm의 소독된 PU disc와 PU-HMDI-Rif disc를 3장씩 넣은 다음 *S. aureus*는 7.2×10^6 /ml의 균액을, *E. coli*는 7.6×10^6 /ml의 균액을 100 μ l씩 첨가하고 22시간동

안 배양하였다. 시료의 세척방법 및 멸균방법은 위의 실험과 동일하게 하였다. 세균의 억제 정도는 595nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 관찰하였다.

(2) 항감염처리 방법의 개선

항생제와 carbamate 결합을 형성하는 linker의 결합 안정성을 알아보기 위해 oligoDNA를 배제한 조건 즉, PU-linker-rifampicin 의 형태로 항생제를 폴리우레탄에 결합시켰다. linker는 1,6diisocyanatohexane(HMDI), 1,12diisocyanatododecane(DDI), 1,3-phenylenediisocyanate(PDI), 4-methyl-1,3-phenylenediisocyanate(TDI) 를 사용하였다.

PU-linker-rifampicin 의 합성을 위해 polyurethane bead를 각각의 linker와 수분이 제거된 톨루엔에 넣은 후 질소기류하에서 반응시켰다. 반응 조건은 40°C에서 폴리우레탄과 반응하고 남은 과량의 linker가 dimer 또는 trimer를 형성하여 각각 침전으로 용출될때까지 반응완료의 지표로 사용하여 실험하였고 촉매로는 stannous octoate를 사용하였다. 얻어진 PU-linker를 다시 rifampicin 과 수분이 제거된 톨루엔에서 반응시켰으며, 이 때 반응 조건은 상온에서 12시간 이상 반응하여 합성하였다.

반응 과정에서 폴리우레탄에 공유결합으로 결합되어 있지 않고 단순히 포함된 rifampicin 성분을 제거하기 위해 methylene chloride에서 7일, ethanol에서 3일간 washing 하거나 증류수에서 8일간 세척한 후 상온에서 24시간 이상 진공 건조하였다.

각각의 linker를 사용하여 얻어진 4종류의 PU-linker-rifampicin 중 rifampicin 이 고 정화된 정도와 양상을 colorimetry로 비교 분석하였다.

2. 항균 기전의 확인을 위한 연구

(1) PU와 rifampicin 간의 linker변경에 따른 항균 정도 관찰

4종류의 linker로 합성된 각각의 PU-linker-rifampicin bead들은 methylene chloride

에서 5일, ethanol에서 3일간 washing하거나 증류수에서 8일간 세척한 후 상온에서 24시간 이상 진공 건조하여 빛을 차단한 상태로 진공에서 보관하였다. 실험하기전에 EO gas로 멸균하고 진공에서 1일간 보관한 다음 실험에 사용하였다. 각각의 PU-linker-rifampicin bead 들을 2g씩 취해 2×10^6 /ml의 *S. aureus*, *E. coli*, *S. epidermidis* RP12 균액이 들어있는 시험관에 넣고 22시간동안 37°C에서 진탕배양하여 세균이 억제된 정도를 관찰하였다. *S. epidermidis* 는 *S. pneumoniae*와 동일한 생리적 조건 즉, nuclease를 생산하지 않으면서 rifampicin 에 민감한 특성을 가지는 균주로써 사용되었다.

세균의 억제된 정도는 595nm 파장에서의 균액의 흡광도를 spectrophotometer로 측정 하였으며 반응을 하지 않은 PU bead가 들어있는 균액을 negative control로 사용하여 비교 하였다.

(2) 소독 방법에 따른 PU-HMDI-Rifampicin의 항균성 비교

PU-HMDI-rifampicin 이 *S. aureus* 등의 성장을 억제하는 요인 중의 하나는 합성된 polymer 가 Ethylene oxide 가스 소독 과정 중 polymer에 남아있는 잔여 소독 성분이 항균 작용에 영향을 줄 수 있으므로 이의 확인을 위해 세 가지 소독 방법을 적용했다.

첫째, PU와 PU-HMDI-rifampicin disc(직경 10mm)를 Ethylene oxide(E.O.)gas에 소독한 후 vacuum oven에 1일동안 보관하였다.

두번째, PU와 PU-HMDI-rifampicin discs를 75%Ethanol에 1분동안 담근 후 꺼내어 상온에서 5분간 말렸다.

세번째, UV lamp하에서 PU와 PU-HMDI-rifampicin disc의 양면을 조사하였다. 각 샘플 disc를 *S. aureus*와 *S. pneumoniae*가 접종된 평판배지 위에 올려 놓고 24시간 배양하여 세균억제대의 지름을 측정하였다.

(3) PU-HMDI-Rifampicin의 항생제 유리기전의 확인 실험

PU-HMDI-Rifampicin의 항균작용이 단순히 bond의 불안정성 즉, chemical hydrolysis에 의해 유도된 rifampicin에 의해 일어나는지 혹은 세균으로부터 분비되는 특정 효소에 의해 enzymatic hydrolysis가 일어남으로서 방출된 rifampicin이 활성을 나타내는지 를 알아보기 위해 PU-HMDI-Rifampicin beads 2g씩을 *S.aureus*와 *E.coli*.에 각각 22시간동안 노출시켰다. 여기서 얻은 1차 배양액을 원심분리하여 상층액 1ml을 취한 다음 log phase의 *S. aureus* 균 배양액 2ml에 첨가하고 21시간 배양시켰다.

또한 상층액에 의하여 억제되는 것이 PU matrix에 포함되었다가 유리된 항생제에 의한 것이 아님을 간접적으로 확인하기 위하여 1차배양시 rifampicin을 0.3 µg씩 첨가하고 각각의 균을 배양한 다음, 그 상층액 1ml씩을 취하여 log phase의 *S. aureus* 균 배양액 2ml에 첨가하고 21시간 배양시켰다.

(4) PU-HMDI-rifampicin matrix내에 단순포합된 항생제의 양 측정

rifampicin을 공유결합시키기 위하여 반응시킨 PU-HMDI-Rifampicin disc와 rifampicin을 toluene에 녹인 용액에 반응시간과 동일한 시간(16시간)동안 담갔다 꺼낸 PU disc(PU+Rif)를 일정시간 동안 세척하고 matrix에 남아있는 항생제의 양을 측정하였다. 세척은 두가지 시료 모두 methylene chloride에서 5시간, ethanol에서 30분간 2회하였고 각각의 disc(total surface area: 6.782cm²)를 tetrahydrofuran(THF) 7ml 에 4시간동안 상온에서 완전히 녹인 후 PU의 비용매인 methanol을 20ml 넣어 상분리를 일으켜 PU를 가라앉혔다. 용액에 5ml의 methanol을 더 첨가 한 다음 glass filter로 걸러내고 freeze dryer로 휘발시켰다. 남아있는 물질을 DMSO 500µl에 녹여 334nm에서 UV/visible spectrophotometer로 측정하였다. 아무 처리를 하지 않은 PU disc를 negative control로 사용하여 같은 방법으로 흡광도를 측정하고 그 값을 시료의 측정된 흡광도에서 빼주었으며 rifampicin을 DMSO에 녹여 검량곡선을 작성하고 정량을 하였다.

(5) 세척기간에 따른 rifampicin의 유리속도 비교

항생제를 polymer에 고정화시키는 합성 과정 중 단순포합된 항생제가 세척 과정에서 유리되는 속도를 세척기간에 따라서 알아보기 위해 methylene chloride에 시료를 넣고 동량의 세척액을 일정기간마다 갈아주면서 세척액에 유리되는 항생제의 양을 334nm에서 UV/visible spectrophotometer로 측정하여 비교하였다.

시료의량은 표면적 5.653 cm^2 으로 통일하여 사용하였고 측정에 사용된 시료의 종류는 PU-HMDI-rifampicin disc와 PU-HMDI-rifampicin 합성시 사용된 동일한 반응 조건에서 HMDI만을 빼 disc(PU+Rif+SO) 그리고 HMDI와 stannous octoate를 빼 disc(PU+Rif)였으며 세척액에 남아있는 미량의 rifampicin를 측정하기 위하여 각 시료의 세척액을 농축하여 측정하였다.

(6) PU-HMDI-Rifampicin의 지속적인 항균성 확인

PU-HMDI-Rifampicin discs의 지속적인 항균성을 확인하기 위하여 methylene chloride용액에서 5시간, ethanol에서 30분간 2회 세척한 다음 충분히 건조시킨 disc를 0.01M PBS(pH7.4)용액에 노출시키고 세척 용액은 매일 교체하면서 2, 4, 8, 24, 48시간동안의 세척액을 각각 회수하여 방출되는 rifampicin의 양을 334nm에서 UV/visible spectrophotometer로 측정하고 *S. aureus*에 대한 세균 성장 억제 정도를 측정하여 보았다. PU-HMDI-Rifampicin beads에 존재하는 rifampicin의 양과 toluene에 rifampicin을 녹인 용액에 16시간동안 담가 단순 포합시킨 PU disc(PU+Rif)의 rifampicin양을 측정 비교하기 위하여 각 sample을 THF(tetrahydrofuran)에 녹인 후 nonsolvent인 ethanol을 첨가하여 생긴 침전물을 제거하였다. 그런 다음 상등액을 취해 rifampicin의 양을 결정하였다.

3. 연결체의 체내 안정성 연구

(1) MIC(minimum inhibitory concentration)와 MBC(minimum bactericidal concentration)의 결정

In vivo에서의 감염 방지 효과를 최대한 얻기 위해서는 적절한 항생제의 투여가 무엇보다 중요하며 이에 대한 기준은 주로 MIC와 MBC에 의해 결정된다. 따라서 본 연구에 사용하는 *S.aureus* 균주에 대한 rifampicin 의 MIC를 결정하기 위해, 소량의 methanol에 rifampicin 을 용해시킨 후 0-0.03ug/ml의 농도 범위를 갖도록 nutrient broth 를 사용하여 희석한 다음 4.91×10^3 /ml균농도를 갖는 *S.aureus* 균액에 1ml씩 첨가하였다.

(2) In Vitro 실험

PU-HMDI-rifampicin 의 체내 안정성 연구를 위한 선행 조건으로 in vitro에서의 blood protein성분 중의 하나인 혈청에 노출시 유리되는 rifampicin 의 항균 작용이 안정화되는지를 실험하였다. PU-HMDI-Rifampicin과 rifampicin용액에 넣었다 꺼낸 PU discs를 bovine calf serum(BCS)에 2, 4, 8, 24, 48시간동안 노출시킨 후 얻은 혈청액을 각각 *S. aureus*에 첨가하여 방출된 rifampicin이 serum protein과 접촉시에도 제기능을 유지하고 있는지를 PBS의 경우에서와 같은 방법으로 비교 평가하였다.

제 5 절 인공심장의 동물 실험

현재 개발이 진행중인 전기식 진자운동형 완전인공심장 (TAH) 및 전기유압식 심실보조장치 (LVAD) 를 40 - 50 kg 의 양을 대상으로 하여 LVAD 의 경우 10회, TAH 는 8회의 이식실험을 시행하였다.

제 6 절 인공심장 혈액주머니에서의 혈장단백질 흡착과 3차구조의 변화 관찰

1. 폴리우레탄 시료의 준비

폴리우레탄 재료로는 Dow chemical 사의 Pellethane 2363-80AE 으로 만들어진 bead 을 사용하였다. bead 형태의 폴리우레탄을 사용한 것은 표면적을 크게 해서 결과의 신빙성을 높이기 위한 것이었다. 실험에서 사용된 량의 표면적은 한번에 12 cm² 정도이다. 폴리우레탄 비드를 재서 5ml 주사기에 넣어서 Syringe column을 만든다.

2. 단일 항체의 준비

피브리노겐을 인지하는 단일 항체 세가지(155B, 134B, Z69)는 미국 Scripps 연구소 Ruggeri 박사로부터 받은 것으로서 생쥐의 복막액 상태로 전달되었다. 이 단일 항체는 복막액 상태로 되어 있어서 다른 단백질이나 이 물질이 상당히 많이 포함되어 있는 상태라서 다른 단백질이 피브리노겐이나 혈소판 과의 반응성에 영향을 줄 가능성이 있어서 DEAE Anion Exchanger Chromatography 와 Protein-A Column 을 이용하여 항체를 정제하였다. 정제된 항체는 3 mg/ml BSA 가 포함된 PBS 버퍼로 희석하여 사용될 때까지 -70°C에서 보관 되었다.

3. 피브리노겐의 방사능 표지

피브리노겐(Calbiochem company, U. S. A) 을 PBS 버퍼에 10 mg/ml 의 농도로 녹인다. 피브리노겐 용액에 NaI¹²⁵(NEN, U.S.A.)을 2 mCi, chloramine T(1 mg/ml) 용액을 10 ug 를 첨가하고 잘 섞은 후 10 분 동안 반응시킨다. 여기에서 생기는 산화 반응의 진행을 sodium metabisulfate 10 ug 을 넣어서 중단시킨다. 여기에서 나온 시료를 KI(1%) 가 든 PBS 버퍼로 희석시킨다. 피브리노겐에 붙지않은 ¹²⁵I 을 제거하기 위해서 0.3 M NaCl 버퍼

를 바꾸어 가면서 투석을 실시한다.

4. 항체의 방사능 표지

항체를 100 ug 정도되게 분주하고 같은 부피의 0.25 몰 sodium phosphate buffer(pH 7.5) 를 첨가한다. 1 mCi의 NaI^{125} (NEN, U. S. A.)와 chloramine-T용액을 50 ul을 넣은 후 잘 섞고 상온에서 10 분 정도 반응시킨다. Sodium metabisulfate 용액(2.5 mg/ml, 0.05 M sodium phosphate buffer)을 50 ul 정도 넣고 잘 섞고난 다음에 Potassium iodide(1mg/ml) 와 Bovine serum albumin(0.1%)이 든 PBS 을 2500 ul 넣어서 희석시킨후 dialysis membrane(Spectrum Co. U. S. A.) 에서 0.3 M NaCl 용액으로 투석을 over night 한다. 방사선의 specific activity 가 1000 cpm/ng Antibody 정도 되도록 3 mg/ml BSA 가 첨가된 PBS 버퍼로 조절한다.

5. 혈소판의 방사능 표지

헌혈자로 부터 뽑은 320 ml의 혈액을 이용해서 만든 혈소판 농축액(PC) 을 150 g 에서 10 분 정도만 원심 분리하여 적혈구를 떨어 뜨린다. 여기에서 나온 상층액을 다른 튜브에 옮기고 Acidic Citrate Dextrose Solution(ACD) 을 넣어서 PC의 PH 를 6.3-6.5 로 낮춘다. PC 를 1,100 g 에서 15 분 정도 원심 분리하여 혈소판으로 이루어진 층을 얻는다. 여기에 다시 Platelet Poor Plasma(PPP) 를 넣어서 Resuspension 을 만든다. 여기에 방사능 물질인 NaCr^{51} 350 uCi 처리하고 상온에서 천천히 섞어주면서 약 30 분간 반응시킨다. 반응을 시킨 후 다시 1,100 g 에서 15 분간 원심 분리하여 혈소판을 가라앉힌후 30 분 정도 가만히 놓아둔다. 원심 분리로 나온 혈소판 층위의 상층액을 제거한 후, 다시 PPP 를 첨가하고 잘 섞어 주고 원심 분리해서 상층액을 버린다. 이런 Washing 단계를 두번 반복해서 혈소판과 반응을 하지 않은 Cr^{51} 을 제거한다. 여기에서 나온 혈소판 층을 PGE_1 (300 ng/ml) Ca^{2+} -free Tyrode Buffer 에 잘 섞어준다. 시료를 Dose Calibrator 를 사용하여 방사선량을 측정하여 혈

소판에 표지된 방사선량을 계산한다.

6. 폴리우레탄 표면에 흡착된 피브리노겐의 정량

(1) 방사선 표지된 피브리노겐 이용

3번과 같이 방사선 표지된 피브리노겐 용액을 PBS 버퍼에서 연속 희석하여 폴리우레탄 bead 가 들어 있는 Syringe column 에 처리한다(0 ug/ml, 10 ug/ml, 50 ug/ml, 100 ug/ml, 200 ug/ml, 500 ug/ml). 37°C에서 2 시간 동안 반응시켜서 피브리노겐이 폴리우레탄 표면에 흡착되게 한다. 반응시간 후에 충분한 량의 PBS 로 폴리우레탄 비드를 씻어 주어서 흡착되지 않은 피브리노겐 분자를 제거해준다. 이런 washing 단계 후에도 남아 있는 방사선 량을 흡착된 피브리노겐의 량으로 생각하고 감마카운터(Cobra counter, Perkin-Elmer, U. S. A.)로 정량한다.

(2) 방사선 표지된 항체 이용

피브리노겐 용액을 PBS 버퍼에서 연속 희석하여 폴리우레탄 bead 가 들어 있는 Syringe column 에 처리한다(0 ug/ml, 10 ug/ml, 50 ug/ml, 100 ug/ml, 200 ug/ml, 500 ug/ml). 37°C에서 2 시간 동안 반응시켜서 피브리노겐이 폴리우레탄 표면에 흡착되게 한다. PBS 버퍼로 2번씩 폴리우레탄 비드를 씻어준다. 3% BSA 가 들어있는 Blocking solution 을 넣고 2 시간 동안 처리한다. 반응 후 다시 PBS 버퍼로 2회 비드를 씻어준다. 폴리우레탄 표면 위에 붙어 있는 피브리노겐을 인지할 수 있는 Polyclonal antibody(Goat anti-human fibrinogen antibody, Sigma Chemical Co. U. S. A.) 를 Syringe column 에 넣고 37°C에서 2 시간 동안 반응시킨다. PBS 버퍼로 2회 씻어주고 다시 위 4.와 같은 방법으로 방사선 표지된 polyclonal antibody(mouse anti-goat IgG antibody, Fc-specific, Sigma chemical Co., U. S.

A.)을 넣고 37°C에서 2 시간 동안 반응시킨다. 마지막으로 PBS 으로 2회 씻어준 후에 남아 있는 방사선 량을 정량한다.

7. 본 구조를 유지하고 있는 피브리노겐의 정량

자연 혈관의 혈전 형성 과정에서 가장 결정적인 역할을 한다고 알려진 피브리노겐 분자의 영역 두곳(알파체인의 87번에서 부터 100번 까지의 아미노산 잔기부분과 감마체인의 400번에서 411번까지의 잔기부분)의 구조적 변화를 폴리우레탄 표면에서 알아보기 위해서 이들을 인지하는 두가지 단일 항체(155B, Z69)를 primary antibody로 사용하고 이들 항체를 인지하는 방사선 표지된 secondary antibody 로 해서 원래의 conformational 구조를 유지하고 있는 피브리노겐의 양을 정량하였다. 실험과정을 간단히 서술하면, 피브리노겐이 흡착된 폴리우레탄 비드가 들어 있는 syringe column을 두가지 단일 항체(155B, Z69) 으로 처리한후 37°C에서 2 시간 동안 반응시킨다. PBS 버퍼로 비드를 2 회 씻어내고 다시 primary antibody 를 인지하는 goat anti-mouse IgG antibody(Fc specific, Sigma Chemical Co. U.S.A.)를 4.의 방법과 같이 방사선 표지하여 비드에 적용한후 다시 PBS 로 씻어낸 후 폴리우레탄 표면위에 남아 있는 방사선 량을 감마 카운터로 정량하는 방법으로 원래의 상태를 유지하고 있는 피브리노겐의 량을 측정하였다.

8. 혈소판과의 반응성 측정

6번의 실험으로 부터 폴리우레탄 표면에 흡착되는 피브리노겐의 량이 포화되는 것으로 나타난 농도인 200 ug/ml 의 피브리노겐 용액을 폴리우레탄 비드가 들어있는 Syringe column 에 적용하고 37°C에서 2 시간 동안 반응시킨다. PBS 버퍼로 비드를 씻어내고 실험 5.번에서와 같이 방사선 표지된 혈소판을 Ca²⁺-free Tyrode buffer(pH. 7.4) 로 희석해서 10⁸ 혈소판/ml 정도 되게 조정하여서 Syringe column에 적용한 후 37°C에서 2 시간 동안 반응

시킨다. 다시 PBS 버퍼로 washing 을 하고 비드 위에 남아 있는 방사선량을 감마 카운터로 정량하였다. 여기에서 나온 결과를 폴리우레탄 단위 면적당 흡착되는 혈소판의 수로 환산해서 혈소판과 폴리우레탄 표면 그리고 혈소판과 피브리노겐이 흡착된 폴리우레탄 표면의 반응성을 알아보았다.

9. 폴리우레탄 표면에 흡착된 피브리노겐과 혈소판의 반응 저해에 대한 실험

혈전 형성에 있어서 중요한 것으로 알려진 피브리노겐의 영역인 알파체인의 87번에서부터 100번까지의 아미노산 잔기, 566번에서 580번까지의 아미노산 잔기, 그리고 감마체인의 400번에서 411번까지의 부분이 폴리우레탄 표면에서도 비슷한 효과를 나타내는 지 또 어느 부분이 혈전 형성에 가장 중요한 혈소판과의 반응성에 가장 큰 영향을 미치는 가를 알아보았다. 이것은 알파체인의 87번에서부터 100번까지의 아미노산 잔기를 인지하는 155B 단일 항체, 알파체인의 566번에서 580번까지의 아미노산 잔기부분을 인지하는 134B 단일 항체, 감마체인의 400번에서 411번까지의 잔기 부분을 인지하는 Z69 단일 항체를 사용함으로써 가능하다.

500 ug/ml 의 피브리노겐 용액을 폴리우레탄 비드가 들어있는 Syringe column 에 적용하고 37°C에서 2 시간 동안 반응시키고 PBS 버퍼로 비드를 씻어낸다. washing 이 끝난후 세가지 단일 항체를 1 ug/ml, 5 ug/ml, 10 ug/ml, 15 ug/ml, 20 ug/ml 으로 연속 희석시켜서 한가지씩 Syringe column 에 넣은 후 37°C에서 2 시간 동안 반응시키고 PBS 버퍼로 씻어낸다. 여기에 방사선 표지된 혈소판을 적용하고 37°C에서 2 시간 동안 반응시키고 PBS 버퍼로 씻어낸다. 여기에서 남은 방사선 량을 정량하여 붙어있는 혈소판의 수를 결정하여 각 항체가 흡착된 피브리노겐과 혈소판의 반응을 저해하는 정도를 알아보았다.

제 3 장 연구 결과 및 고찰

제 1 절 룬부로키나제의 분리 및 정제

1. *Lumbricus rubellus* 의 전처리 과정

동결건조된 *Lumbricus rubellus* 건조분말 500g을 25℃에서 4일 동안 0.1% sodium azide를 포함시킨 4배의 saline에 녹여 단백질 용액을 제조하였다. 이를 Whatman filter paper (No.2)로 상층액을 걸러낸 후 0-30%의 ammonium sulfate를 처리하여 8,300rpm 30분간 centrifuge하여 침전물을 제거하고 남은 용액을 다시 30-60%의 ammonium sulfate를 처리하여 10,000rpm 50분간 centrifuge하여 침전물을 수거하였다. 이 수거된 침전물을 10,000 cut용 투석막 (dialysis membrane)을 사용하여 pH8.0 Tris-HCl 완충용액으로 ammonium sulfate를 제거하였다.

2. 컬럼 크로마토그래피

(1) Diethylaminoethyl (DEAE)-Cellulose anion exchange 컬럼 크로마토그래피

Cellulose에 Diethylaminoethyl기가 붙어있는 컬럼의 충전제가 양이온을 띠게하기 위하여 pH8.0 Tris-HCl 완충용액으로 컬럼을 충분히 씻어 평형화시킨 후 대부분의 단백질이 pH8.0 상태에서 음이온을 띠고있다는 성질을 이용하여 전처리 과정에서 염석한 단백질 용액을 컬럼에 통과시켰다. pH8.0 Tris-HCl 완충용액으로 uv-spectrophotometer의 280nm 파장에서 흡광도가 0에 가깝도록 씻어주어 이온결합으로 결합되지 않은 물질을 제거하였다. pH8.0 Tris-HCl 완충용액에 0-500mM NaCl을 녹인 용액을 각각 만들어 농도 경사법으로 단백질을 서서히 용출시켜 단백질 분획 4개를 얻어내었다. 이를 각각 FI, FII, FIII, FIV라 명명하고 fibrin plate를 만들어 fibrinolytic 활성으로써 활성도를 측정하여 가장 활성도가 높은

FIII 분획을 수거하였다 (그림 1). fibrin plate는 fibrinogen (plasminogen이 포함되어 있지 않은 bovine plasma fibrinogen : sigma)을 0.8% 되도록 달아서 37℃에서 0.05M NaCl이 들어 있는 0.2M borate 완충용액 (pH7.8)에 완전히 녹여 filter paper로 filter하여 수평대에 petri dish를 놓고 10ml씩 담은 후 10u/ml(saline)의 thrombin을 살며시 넣은 후 좌우로 섞어 실온에서 2시간 굳혀 만들었다.

(2) p-amino benzamidine sepharose 6B affinity 컬럼 크로마토그래피

Trypsin의 inhibitor가 붙어있는 이 컬럼은 trypsin 및 trypsin과 유사한 성질을 갖고 있는 단백질을 분리할 수 있다. 우선 이 컬럼을 충분히 pH8.0 Tris-HCl 완충용액으로 씻어 평형화시킨 후 DEAE 컬럼에 의해 분리한 FIII 분획을 ultrafiltration (amicon사 제품)으로 농축하여 이 컬럼에 통과시켰다. 0.5M NaCl이 녹아있는 pH8.0 Tris-HCl 완충용액으로 280nm 파장에서 흡광도가 0에 가깝도록 씻어낸 후 0.5M arginine을 acetate 완충용액 (pH5.0)에 녹여 benzamidine 컬럼에 붙어있는 단백질을 용출시켰다 (그림 2).

(3) 정제된 단백질 (롬부로키나제)의 순수성 확인

이 용출된 단백질은 SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE)로 50 volt에서 시행하여 표준단백질과의 비율로써 MW 34,000 Da인 단일밴드의 정제된 단백질임을 확인하였다 (그림 3). 그리고 정제된 롬부로키나제가 단일밴드를 확인한 polyacrylamide gel의 같은 위치에서 fibrinolytic 활성이 있음을 확인하기 위해서 fibrin autography를 시행한 결과 34,000 Da과 같은 위치에서 fibrinolytic 활성을 확인할 수 있었다 (그림 4). fibrin autography는 SDS PAGE한 gel을 staining하지 않고 Triton X 100으로 45분간 2번씩 씻어 주고 물기를 제거한 후 fibrin plate 위에 올려놓아 37℃ humidity chamber에서 30분마다 관찰하였다. 또 SDS PAGE의 결과로써 정제되었다고 예상되는 롬부로키나제를 분석용 HPLC를 시행하여 단일 피크를 얻을 수 있었으며, 이때 사용한 컬럼은 분석용 Mono-Q 컬

럼 (Pharmacia제품)으로 롬부로키나제의 순도를 확인하였다 (그림 5).

3. 롬부로키나제의 생화학적 특성

정제된 롬부로키나제가 trypsin과 다르다는 것을 알아보기 위하여 β -mercaptoethanol 10.9%, 1%를 각각 처리하여 잔존 활성을 측정하였다 (그림 6). trypsin이 β -mercaptoethanol에 의해 불활성화되기 쉬운 반면에 롬부로키나제는 상대적으로 적은 불활성화를 나타내었으므로 롬부로키나제는 trypsin과 다른 구조를 가진 것으로 예상된다.

정제된 롬부로키나제에 Aprotinin, Trypsin inhibitor, ϵ -aminocaproic acid, EDTA의 여러가지 protease의 inhibitor를 처리하여 잔존 활성도를 측정하여 보았다 (그림 7). 이와같은 결과로써 분리된 롬부로키나제는 trypsin과 유사한 단백질이며 금속이온에 비의존적인 효소 단백질임을 알아내었다.

4. 롬부로키나제에 의한 fibrinogen의 용해

fibrinogen 2 mg을 TBS 용액 1 ml에 녹여 최종 농도가 2 mg/ml이 되도록 만든 후, 순수 분리한 롬부로키나제 40 ug을 첨가한다. 37도에서 각각 반응시킨 후 SDS-PAGE를 수행하여 fibrinogen의 분해 패턴을 살펴 보았다. 반응을 0, 20, 40, 80, 120, 200, 300, 400 분동안 각각 시켰으며, 이 반응 혼합물을 각각 10 ul 즉 fibrinogen 20 ug을 얻어낸 즉시 SDS-PAGE sample buffer를 넣고 100도에서 5분간 끓여 반응을 중단시켰다(그림 8). 0분에서 보면 alpha와 beta 그리고 gamma의 분해되는 양상이 다른 것을 알 수 있다. 우선 alpha와 beta는 상당히 롬부로키나제에 대해 민감하여 반응 즉시 분해되는 것을 볼 수 있으나, gamma chain은 다른 두 chain에 비해 안정한 것을 알 수 있다. 또한, 처음에 롬부로키나제에 의해 분해된 fibrinogen조각들은 시간이 지나도 처음과 같이 롬부로키나제에 대해 민감하지 않음을 알 수 있다. Lane 3, 4의 band 패턴이 크게 차이가 나지 않는 것으로 보아 gamma chain까지 완전히 분해된 조각들은 어느정도 저항성을 가지고 있는 것으로 여겨진다. 물론 반응시간을 오

래하면 할 수록 저항성을 보이는 band들도 사라지지만 gamma의 분해 산물로 여겨지는 peptide 조각들은 300분이 지난 후에도 여전히 남아 있는 것을 알 수 있다. 그러므로 fibrinogen은 롬부로키나제에 대해 선택적으로 민감하게 분해된다는 것을 알 수 있다. 즉, alpha와 beta chain은 롬부로키나제에 대해 민감성이 높지만 gamma chain은 어느정도 다른 chain 들에 비해 안정함을 알 수 있다.

제 2 절 롬부로키나제가 고정화된 재료의 체내 독성 테스트

롬부로키나제가 고정화된 폴리우레탄 (PU-MAMEC-LK, 12 cases)의 체내 독성 여부를 평가하기 위하여 negative control인 PTFE (8 cases), positive control인 폴리우레탄 (8 cases) 과 가교제인 MAMEC만을 처리한 폴리우레탄 슈트 (12 cases)를 토끼의 근육에 각각 7일, 1달, 3달, 6달 동안 이식하여 조직의 괴사나 암조직의 발생 여부를 관찰하여 보았다. 실험 결과 어떠한 기간내에서도 가교제 혹은 롬부로키나제가 고정화된 폴리우레탄에서 조직에 대한 독성 반응은 관찰되지 않아 본 재료가 체내에서도 안정함이 확인되었다 (표 1).

제 3 절 롬부로키나제의 클로닝

1. 롬부로키나제의 아미노 말단 서열 결정

순수 정제 분리된 롬부로키나제의 아미노 말단에 대한 정보는 유전자의 클로닝에 필수적이므로 이에 대한 실험을 수행하였다. 우선 아미노 말단의 서열을 알기 위한 전제 조건으로는 그 아미노 말단이 다른 인자들, 즉 단당이나 이당류, 에 의해 막혀져 있지 않아야 한다는 것이다. 아미노 말단의 서열을 수행한 결과 아미노 말단은 다른 인자들에 의해 변형되어 있지 않음을 확인 할 수 있었다.

아미노 말단의 서열을 알기 위해 우선 순수 분리한 단백질을 SDS를 넣은 폴리아크릴 아마이드 겔 상에서 영동 시켰다. 전기 영동된 단백질을 polyvinylidene fluoride (PVDF) 필터에 전기적으로 이전시킨 후, 단백질이 정상적으로 이전되었는가 확인하기 위해 coomassie brilliant blue의 염색약을 사용해 염색해 보았다. 그 결과 단백질이 성공적으로 이전되었음을 확인할 수 있었다. 이 필터를 기초과학 지원 연구센터에 의뢰하여 단백질의 아미노 말단 서열을 알아낼 수 있었다. 그 서열은 다음과 같다.

Fraction I-0

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

Val-Val-Gly-XXX-Ser-Ala-Thr-Thr-Ile-Gly-Gln-Tyr-Pro

Fraction I-1

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

Ile-Ile-Gly-Gly-Asn-Asn-Ala-Ser-Pro-XXX-Glu-Phe-XXX-XXX-Gln-Leu-Ser

Fraction II

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

Val-Ile-Gly-Gly-Thr-Asn-Ala-Ser-Pro-Gly-Glu-Phe-Pro-XXX-Gln

Fraction III-1

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

XXX-Val-Gly-Gly-Ile-Glu-Ala-XXX-Pro-Tyr-Glu-Phe-Pro-XXX-Gln-Val-Ser

Fraction III-2

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

XXX-Val-Gly-Gly-Ile-Glu-Ala-XXX-XXX-Tyr-Glu-Phe-XXX-Thr-Gln-Val-Ser

Mihara 등의 결과에 의하면 Fraction III의 경우 서로 다른 단백질이라고 생각을 하였으나 단백질 아미노 말단 서열 분석결과에 의하면 Fraction III-1과 Fraction III-2의 서열은 똑같이 나왔음을 알 수 있었다. 그리고 각 분획간의 단백질 서열의 유사성을 비교하면 다음과 같다.

Fraction I-C	VVG-SATTIGQYF
Fraction I-1	IIGGSNASP-EF--QLS
Fraction II	VIGGTNASPGEFP-Ç
Fraction III-1	EVGGIEA-PYEF-PQVS G
Fraction III-2	EVGGIEA--YEF-TQVS

특히 fraction I-1과 fraction II는 단백질 크기가 다름에도 불구하고 상당히 높은 유사성을 관찰할 수 있다. 또한 fraction II와 fraction III사이에도 유사한 서열이 많이 존재하는 것으로 보아 이 단백질들은 하나의 근원으로부터 유래했음을 추정해 볼 수 있다.

2. 아미노 말단으로 부터 유래한 DNA 합성

유전자를 클로닝하기 위하여 롬부로키나제의 아미노 말단 서열에 의하여 다음과 같이 oligonucleotide를 합성하였다. 합성시 고려한 점은 우선 구인에서 유전자의 사용 경향이다. 그러나, *Lumbricus rubellus* 에서 클로닝된 유전자를 찾아본 결과 찾을 수 없었으므로 그와 유사한 종인 *Lumbricus terrestris* 의 유전자 사용 경향을 참조하여 oligonucleotide를 합성하였다 (표 2). 합성한 시퀀스는 다음과 같다.

GGICKR GCYTCR ATI CCI CCG ACR AT

I : Inosine

K : G, T

R : A, G

Y : C, T

3. 구인으로 부터 유전자 library의 작성

(1) 지렁이로 부터 total RNA의 추출

살아 있는 지렁이를 50 g정도를 하룻밤새 상온에서 두어 몸속의 물질들을 제거한 후, 증류수로 씻어낸다. 또한, 증류수에 한시간 정도 담가 완전히 불순물들을 제거 시킨 후, 물기를 제거한다. 액체 질소에 담가 완전히 얼린 후, 막자 사발위에 놓고 완전히 가루가 될 때까지 간다. 이 지렁이 가루를 homogenizing buffer (5 M guanidinium thiocyanate, 20 mM sodium acetate, 2 % 2-mercaptoethanol)에 넣은 후, 바로 omni mixer에 넣고 3 분간 갈아 완전히 세포를 변성시키고 파괴한다. 이렇게 갈아낸 수용액을 원심분리하여 파괴되지 않은 세포 추출물이나 다른 불순물들을 분리한다. 상층액을 CsCl 용액위에 놓고 고속 원심분리를 수행하여 농도 구배에 따라 RNA가 분리되도록 한다. 고속원심분리는 26000 rpm에서 18시간동안 수행한다. RNA가 pellet으로 가라앉아 있으므로 이것을 얻어 T.E (20 mM Tris, 10 mM EDTA pH 8.0)에 넣고 녹인 후, 정량한다. 이런 방법으로 10 mg정도의 RNA를 얻어내었다. 그림에서 알 수 있듯이 28 S RNA와 18 S RNA의 비율이 2 : 1이 되지 않는 것으로 미루어 볼 때 mRNA가 추출하는 과정에서 많이 분해되었음을 알 수 있다. 그러나 분해된 정도와 양상으로 보아 심각하게 분해되지는 않았다고 보여진다. 또한 RNase가 nonspecific하게 RNA를 분해시키므로 크기가 큰 RNA에 비해 상대적으로 크기가 작은 RNA가 덜 분해되었을 것이라고 생각되어 그 다음 단계인 mRNA의 분리로 넘어가기로 결정하였다 (그림 9).

(2) mRNA의 분리

0.5 g의 oligo d(T) cellulose 를 0.1 N NaOH에서 부풀린 후, 파스퇴르 파이펫에 컬럼 resin을 붓는다. packing을 한 후 distilled water를 5 volume 흘려주어 컬럼을 씻어준다. 또한 column loading buffer로 씻어주어 나오는 용액의 pH가 8.0이하가 될 때 까지 흘려준다. 위에서 준비한 total RNA를 column에 로딩하고 바로 흘러 나오는 용액을 받기 시작한다. 5-

10 volume으로 씻어준 후, 나오는 용액의 흡광도가 260 nm에서 0이 되는지 확인하고 elution buffer로 elution한다. 모은 용액을 ethanol precipitation 하여 -80 도에 보관한다.

(3) Library의 제작

1) First strand의 합성

37도의 water bath를 미리 준비한 후 키트에 있는 first strand 합성에 필요한 시약들을 모두 녹인다. 위에서 분리한 mRNA 10 ug을 eppendorf tube에 넣고 위에서 녹인 시약들을 다음과 같은 순서대로 넣는다. 10 x first strand buffer 5 ul, 10 mM first strand methyl nucleotide mixture 3 ul, linker-primer 2 ul, RNase block I(40 U/ul)을 순서대로 넣고, 시약들에 들어있는 RNase를 제거하기 위해 상온에서 1시간정도 반응시킨다. 이 반응 혼합물에 MMuLV reverse transcriptase 50 U를 첨가한 후, 37도에서 1시간동안 반응시킨다.

2) Second strand의 합성

위에서 합성한 reaction mixture에 10x second strand buffer 40 ul, 10 mM second strand nucleotide mixture 6 ul, distilled water 288 ul, dATP 2 ul등을 넣는다. 이 혼합물을 16 도에서 2.5 시간동안 반응시킨다. 이때 좋은 질의 cDNA를 합성하기 위해서는 반응조건이 16도 이상을 넘지 않도록한다. 여기에 같은 양의 phenol;chloroform을 넣고 원심분리하여 위 혼합물에서 들어간 단백질을 분리한다. 원심분리시킨 용액의 상층액을 따서 ethanol을 넣고 침전 시켜 cDNA를 얻어낸다. 합성된 cDNA의 양이 어느정도인지 확인하기 위해 alkaline agarose gel을 걸어보았다. 0.4 g의 agarose를 36 ml의 물에 녹여 온도를 높에 끓인 후, agarose 용액을 방치하여 55도가 되도록 한다. 여기에 10 X alkaline agarose buffer 4 ml을 첨가하여 상온까지 온도를 떨어뜨려 agarose를 완전히 굳힌다. 같은 양의 sample loading buffer(glycerol 200 ul, water 750 ul, saturated bromophenol blue 46 ul, 5 M NaOH

5 ul) 를 합성된 샘플과 섞어준 후, 굳은 gel에 loading 한다. 50 volt로 gel을 영동시킨 후, agarose gel을 진공을 사용하여 완전히 말린다. X-ray 필름을 덮어 expose시킨 후, develop 하여 합성한 정도를 관찰하면 그림 10과 같다.

3) cDNA terminal의 blunting과 EcoRI adaptor와의 ligation

위의 혼합액에 10 x buffer 5 ul, blunting dNTPmixture 2.5 ul, klenow fragment 1 ul을 첨가한 후, 37도에서 30분간 반응시킨다. 이 용액에 phenol;chloroform을 동량 첨가한 후, 원심분리하고 상층액을 따서 다른 튜브에 옮기고 ethanol을 첨가하여 cDNA를 침전시킨다. 이 pellet을 EcoRI adaptor 7 ul에 녹이고, 10 x buffer 1 ul, 10 mM ATP 1 ul, T4 DNA ligase 4 Unit를 첨가한다. 이 반응혼합물을 8 도에서 18시간 이상 반응시킨다. 반응 후, ligase의 활성을 제거하기 위하여 70도에서 30분간 반응시킨다.

4) EcoRI 말단의 kinasing 및 Xho I 처리

위의 반응물에 10 x buffer 1ul, 10 mM rATP 2 ul, distilled water 6 ul, T4 kinase 100 Unit를 첨가한 후, 37도에서 30분간 반응시킨 후, 70도에서 30분간 방치하여 kinase 활성을 없앤다. 여기에 Xho I buffer 28 ul과 Xho I 40 unit를 첨가한 후, 37도에서 두시간 동안 반응시켜 합성된 cDNA의 말단을 Xho I이 인지하여 절단하도록 만든다. 이 반응혼합물을 phenol;chloroform extraction을 하고 상층액을 모아 다시 Ethanol precipitation 을 수행한다. 이 침전물을 다시 distilled water에 녹인 후 합성된 최종 DNA 양을 정량한다 (그림 11). 위의 결과로 미루어 보아 총 1500 ng의 cDNA가 합성되었음을 알 수 있다.

5) 합성된 cDNA와 ZAP expression vector 와의 ligation

100 ng정도의 cDNA를 첨가한 후, 10 x buffer 0.5 ul, 10 mM ATP 0.5 ul, ZAP express vector 1 ug, distilled water 1.7 ul를 첨가하여 반응 총량이 4.5 ul 이 되도록 한다. 여기에 T4

DNA ligase를 0.5 ul 첨가한 후, 4도에서 2일동안 반응하여 합성된 cDNA와 vector를 ligation시킨다.

6) Packaging (Stratagene Giga Pack glod II)

위에서 합성한 DNA를 준비한 후, kit에 있는 노란 튜브(sonic extract) 와 빨간 튜브 (freeze-thaw extract)를 녹인다. freeze thaw extract를 녹인 후, 재빨리 합성된 DNA 1 ul을 첨가하고 얼음에 놓는다. Sonic extract 15 ul을 위의 튜브에 첨가한 후 잘 섞어준다. 이 혼합물을 상온에서 2시간동안 반응시켜 합성된 cDNA가 bacteriophage 의 coat protein 속으로 packaging되도록 만든다. 여기에 SM buffer 500 ul을 첨가한 후, chloroform 20 ul을 넣고 잘 섞어준다. 이 혼합물을 사용전까지 4도에서 보관시킨다.

7) Host bacteria 의 준비

LB 배지에 0.2 % maltose, 10 mM MgSO₄를 넣고 멸균한 후, host bacteria를 접종한 후, 37에서 4시간정도 배양한다. 이 bacteria를 원심분리하여 모은 후, 멸균된 10 mM MgSO₄에 다시 resuspend시킨다. O.D. 600에서 0.5가 되도록 희석시켜 phage infection을 준비한다.

8) Plating and titering

packaged reaction 1 ul 과 위에서 준비한 host strain인 XL-1 Blue MRF cell을 200 ul 첨가하여 잘 섞어준다. 이 phage와 bacteria를 37도에서 15분간 반응시켜 phage가 bacteria에 흡착하도록 만든다. 여기에 NZY top agar 3 ml을 첨가한 후 재빨리 NZY top agar plate에 plating out 한 후, 37도에서 8시간 이상 배양해 생성된 plaque 수를 센다.

4. 유전자의 screening

위에서 작성한 oligonucleotide를 방사능 물질로 표지하여 library에서 롬부로키나제 유전자를 찾고 있는 중이다.

제 4 절 항 감염체 기술의 확립 및 그 산물의 생체내 활성 평가

1. 항 감염처리방법의 개선

(1) 대상균에 대한 특이성의 확인실험

Rifampin에 insensitive한 *E. coli*는 실험한 모든 종류의 시료에 의하여 억제되지 않았으며 *S. aureus*와 *S. pneumoniae*는 oligodT의 길이와 linker의 종류가 다른 모든 종류의 시료에 의하여 시료주위로 2-5mm의 clear zone을 형성하며 세균이 억제됨을 보여주었다(그림 12).

또한 HMDI를 사용하여 PU에 직접 Rifampicin을 고정화한 시료(PU-HMDI-Rif)도 *S. aureus*의 경우 PU를 넣은 균액의 흡광도가 평균 0.4324 ± 0.0243 인데 비하여 PU-HMDI-Rif을 넣은 균액의 흡광도가 평균 0.0100 ± 0.0029 로 강하게 억제함을 관찰할 수 있었으며(그림 13) *S. pneumoniae*는 PU를 넣은 균액이 평균 0.3398 ± 0.0371 , PU-HMDI-Rif을 넣은 균액이 평균 0.0037 ± 0.0010 의 흡광도를 가지며, *S. epidermidis*는 PU를 넣은 균액이 평균 9.7485 ± 0.2838 , PU-HMDI-Rif을 넣은 균액이 평균 0.3824 ± 0.0082 의 흡광도를 가짐으로써 *S. pneumoniae*와 *S. epidermidis*의 경우에는 그 억제정도가 더욱 더 강함을 관찰할 수 있었다.

이러한 결과의 원인으로 다음과 같은 두가지를 생각할 수 있다. 그 첫째는 항생제를 고정화하기 위하여 사용한 carbamate결합이 일반적인 예상과는 달리 실험조건에서 화학적인 가수분해 또는 효소에 의한 가수분해를 일으켜서 Rifampicin을 소량씩 유리할 가능성이며 둘째는 반응과정에서 공유결합에 참여하지 못한 항생제가 PU matrix에 포함되었다가 서서히 방출될 가능성등이다. 각각의 가능성에 대하여 확인실험을 겸하고 항생제의 공유결합

수율을 향상시키기 위하여 여러가지 linker를 사용하여 항생제가 공유결합된 PU(PU-linker-Rifampicin)를 제조하였다.

(2) 항 감염처리방법의 개선

Rifampicin과 carbamate결합을 형성하는 linker의 결합 안정성을 알아보기 위해 oligoDNA를 배제한 조건 즉, PU-linker-Rifampicin의 형태로 항생제를 폴리우레탄에 공유 결합시켰다. linker는 1,6-diisocyanatohexane(HMDI), 1,12-diisocyanatododecane (DDI), 1,3-phenylenediisocyanate(PDI), 4-methyl-1,3-phenylenediisocyanate(TDI)를 사용하였다 (그림 14).

PU에 공유결합된 항생제의 정량이 불가능하여 rifampicin자체의 색을 이용한 비색법으로 정성적인 비교를 한 결과 폴리우레탄에 rifampin을 가장 잘 결합시키는 linker는 HMDI와 PDI였으며, TDI와 DDI순으로 rifampin이 결합되는 양이 감소함을 알 수 있었다 (그림 15).

2. 항균 기전의 확인을 위한 연구

(1) PU와 Rifampin간의 linker변경에 따른 항균 정도 관찰

반응 과정에서 폴리우레탄에 공유결합으로 결합되어 있지 않고 단순히 포함된 rifampicin 성분을 제거하기 위해 methylene chloride에서 7일, ethanol에서 3일간 washing 하거나 증류수에서 8일간 세척한 후 실험을 하였음에도 불구하고 *E.coli*.를 제외한 *S.aureus* 와 *S.epidermidis*가 네가지의 시료에 의하여 모두 억제되었으며, HMDI와 PDI를 linker로 사용했을 경우가 나머지 두 linker에 비해 항균력이 특히 높았다. *S. aureus*는 HMDI linker의 경우에서 세균 억제 효과가 두드러졌으며, *S. epidermidis*의 경우에는 PDI linker를 사용하여 rifampin을 결합시킨 beads에서 세균 억제효과가 매우 높았으며 HMDI에서의 항균력도

우수한 편이었다(그림 16).

세척시 methylene chloride와 ethanol을 사용한 이유는 methylene chloride가 PU를 많이 swelling시키는 nonsolvent이며 ethanol은 rifampicin의 good solvent이기 때문이었으나 4가지의 시료에서 공통적으로 항균효과가 나타나므로 포함된 항생제의 유리에 의한 항균효과를 배제할 수 없으며 또한 멸균과정에서 PU matrix에 포함된 EO gas에 의한 효과일 가능성도 배제할 수 없다. 그러나 HMDI와 PDI를 사용한 경우에 특히 항균효과가 강하게 나타나며 오히려 반응시간이 긴 TDI나 DDI를 사용한 경우에는 항균효과가 약하게 나타나는 것을 포함한 항생제나 EO gas의 유리만으로는 해석할 수 없다.

(2) 소독 방법이 다른 PU-HMDI-Rifampicin의 항균성 비교

E.O., UV, 75% ethanol으로 처리된 PU-HMDI-Rif은 *S.aureus*와 *S.pneumoniae*균에 대해 각각 18.2, 18.5, 18.8 mm와 25.7, 26.7, 25.7mm의 세균 억제대를 보임으로서 실험에 사용했던 E.O. gas에 의한 소독 방법은 세균의 성장 억제 효과에 영향을 주는 요인이 아님을 확인할 수 있었다 (표 3).

(3) PU-HMDI-Rifampicin의 유리기전의 확인 실험

PU-HMDI-Rifampicin beads를 넣고 실험한 경우(그림 17)와 rifampicin을 넣고 실험한 경우 모두에서 *S. aureus*의 상등액을 첨가했던 곳의 *S. aureus* 균은 성장이 억제되었고 *E. coli*의 상등액을 첨가했던 곳의 *S. aureus*균은 성장 억제 효과가 없었다. 따라서 이 실험의 결과로는 세균 억제효과의 원인이 PU matrix에 포함되었다가 유리된 항생제에 의한 것인지 항생제를 고정화시키는 결합의 불안정성 때문인지를 구분할 수 없었다.

(4) PU-HMDI-Rifampicin matrix 내에 단순포합된 항생제의 양 측정

HMDI반응을 시키지 않은 PU+Rif disc는 THF에 완전히 녹는 반면 PU-HMDI-Rifampin disc는 THF에서 완전히 녹지 않고 gel 형태의 덩어리를 형성하였으며 상분리된 polymer의 색이 붉은 갈색을 띄고 있었다. 표면적이 6.782 cm²인 disc에서 PU+Rif disc는 PU와 차이가 없었으며 PU-HMDI-Rifampicin disc는 PU+Rif disc에 비하여 단순 포합된 rifampicin을 4.188 µg 정도 더 포함하고 있음을 확인할 수 있었다.

(5) 세척기간에 따른 rifampicin의 유리속도 비교

HMDI를 사용하여 항생제를 고정화한 시료와 HMDI를 사용하지 않은 시료를 비교해 본 결과 항생제 유리속도의 현저한 차이를 나타냈다. PU+Rif나 PU+Rif+SO의 경우에는 세척기간이 12일이 지나면 거의 유리가 되지 않았으나 PU-HMDI-Rifampin의 경우에는 24일 후에도 MIC농도보다 훨씬 높은 양의 항생제를 유리하였다 (그림 18).

(6) PU-HMDI-Rifampicin의 지속적인 항균성 확인

Rifampin 정량 결과 PU-HMDI-Rifampin으로 부터 유리된 rifampicin의 양이 초기에도 rifampicin을 단순포합시킨 PU discs에서 보다 더 많이 방출되며, *S. aureus*에 대한 항균 활성도 더 높았다. 또한 rifampicin을 단순 포합시킨 disc의 24시간째 세척액을 회수하여 균에 노출시켰을 경우 항균성이 최대로 나타났으며 그 이후로는 항균 활성이 급격히 감소되는 경향을 보였다. 그에 비해 공유 결합으로 이루어진 polymer로부터 유리되어 나오는 rifampin의 항균력은 48시간 이후에도 지속적으로 유지되고 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 HMDI linker가 항생제를 PU matrix내에 더 많이 포함시키게 할 뿐만 아니라 항생제의 유리 또한 느리게 해 줌을 알 수 있다. 정확한 항균 작용의 기전은 아직 밝히지 못하였으나, 예상되는 기전으로는 PU의 표면을 가교시켜 PU matrix내에 포함된 항생제의 유리를 느리게 만들거나 표면 또는 표면에 가까운 matrix에 공유결합된 항생제가 hydrolysis에 의

하여 천천히 유리되는 것 또는 전자와 후자의 복합적인 작용등을 생각할 수 있다 (그림 19).

3. 연결체의 체내 안정성 연구

(1) MIC(minimum inhibitory concentration)와 MBC(minimum bactericidal concentration)의 결정

본 실험에 사용되었던 *S. aureus* 균은 rifampicin에 대한 MIC가 0.003ug/ml로 문헌에 나와있는 농도와 동일하였고 MBC는 0.03ug/ml로 99.84%의 균을 사멸시킬 수 있는 농도임을 확인 할 수 있었다.

(2) In Vitro 실험

Bovine serum하에서도 PBS와 유사한 항균성을 유지하는 것으로 보아 PU-HMDI-Rifampin으로 부터 유리되는 rifampin이 serum protein과 접촉시에도 제기능을 유지하며 화학적 구조가 변화되지 않은 상태에서 제기능을 수행할 수 있다는 것을 알수 있었다 (그림 20).

제 5 절 인공심장의 동물 실험

1. 현재 개발이 진행중인 전기식 진자운동형 완전인공심장 (TAH) 및 전기유압식 심실보조 장치 (LVAD) 를 40 - 50 kg 의 양을 대상으로 하여 LVAD 의 경우 10회, TAH 는 8회의 이식 실험을 시행하였다.

2. 동물실험 결과 (LVAD)

(1) LVAD 의 경우 심실보조장치로서의 응용가능성을 확인하였다.

(2) 장시간 이식후의 안정성을 평가하였다.

(3) Hyperthermia 로 인공심장 이식시의 Heart-lung machine 을 대체할 수 있는 가능성을 확인하였다.

3. 동물실험 결과 (TAH)

(1) 본 연구팀이 개발한 TAH를 60 kg의 양에 이식하여 전기유압식 TAH로는 세계에서 최초로 3일간을 생존케함으로써 본 연구팀의 TAH가 인체의 흉곽에 적절함을 확인하였다.

(2) 동물용 완전 인공심장의 경우 실험동물의 해부학적 구조에 적합함을 확인하였다.

제 6 절 인공심장 혈액주머니에서의 혈장단백질 흡착과 3차구조의 변화 관찰

(폴리우레탄과 피브리노겐 및 혈소판의 반응성에 관한 연구)

1. 서설

폴리우레탄은 혈액과 접촉하는 vascular graft, ventricular assist device, catheter, 인공 심장 등의 인공장기에 사용되어 왔다. 폴리우레탄의 광범위한 사용은 폴리우레탄이 높은 혈액적합성 및 조직적합성을 나타내기 때문이다. 그러나 폴리우레탄을 임상적으로 장기간으로 사용하는 데는 폴리우레탄 표면의 혈전성이 여전히 큰 문제로 남아있다.

폴리우레탄 표면이 혈액과 접촉하게 되면 수초안에 혈장 단백질들이 표면에 얇은 단백질 막을 형성하게 되는 데 인공표면이 혈전을 만드는 성질을 나타내는 것은 여기서 생성된 단백질막이 다른 혈장 단백질이나 혈소판과 반응하기 때문이라고 생각된다. 폴리우레탄 표면위에 형성된 단백질막은 여러가지의 혈장 단백질로 이루어져 있지만 그 중에서도 Von Willibrand Factor(VWF) 라든가 피브리노겐이 혈전 형성에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 특히 피브리노겐은 혈전의 주요 구성물이며, 혈소판과 작용해서 혈전의 성장을 일으키는 것으로써 인공 표면의 혈전성에 가장 중요하다.

지금까지는 폴리우레탄 표면에 흡착되는 피브리노겐의 양이 많고 적음에 따라서만 혈전성이 결정된다고 생각했었지만 여러 연구 결과로부터 폴리우레탄 표면에 흡착된 피브리노겐의 량에 의해서라기 보다는 표면에 흡착된 피브리노겐의 분자적 그리고 구조적 구조의 상태에 의해서 폴리우레탄 표면의 혈전성이 결정된다는 것이 알려져 있다. 분자 구조적 상태로는 피브리노겐 분자가 표면에 흡착된 분포나 피브리노겐이 표면에 붙은 방향성이라든지 피브리노겐 분자 자체의 구조적인 변화 양상등을 들 수 있다. 피브리노겐의 분자 구조로 인한 혈전성의 변화로는 피브리노겐 고유의 상태를 유지하고 있는 피브리노겐 분자만이 혈전성을 나타내어서 혈소판과 반응할 수 있다고 보고되고 있다.

다른 연구자들의 보고에 따르면 혈전 형성에 중요한 피브리노겐의 영역으로는 알파체인의 87번에서 부터 100번 까지의 아미노산 잔기, 566번에서 580번 까지의 아미노산 잔기, 그리고 감마체인의 400번에서 411번까지의 부분이 가장 핵심적인 역할을 한다고 한다. 그러나 혈전 형성이 더욱 큰 문제로 대두되고 있는 인공장기의 표면 위에서의 혈전 형성에 대해서는 피브리노겐이 중요하는 것만 알려져 있을 뿐 자연 혈관에서와 같은 기작으로 혈전이 형성되는지 만약 그렇다면 피브리노겐의 어느 영역이 더욱 중요한지에 대한 연구가 이루어 지지 않고 있다. 다만 인공 표면의 특성이 혈장 단백질의 흡착에 영향을 주어 흡착량 뿐만 아니라 흡착되는 단백질 분자의 구조 변화의 유형을 결정한다는 것만 알려졌을 뿐 이런 인공 표면의 특성이 혈전 형성, 그 중에서도 혈전과 밀접한 관계가 있는 혈소판과 흡착되어진 혈장 단백질의 반응성에 어떤 변화를 주는 지에 대해서는 잘 알려져 있지 않았다.

우리는 인공 장기의 재료로써 많이 쓰이고 있는 폴리우레탄 표면위에서의 흡착된 피브리노겐의 양을 항체를 이용한 방법과 직접적으로 방사능 물질로 피브리노겐을 표지하는 방법으로 정량하였다. 이 두가지 방법으로부터 흡착된 피브리노겐의 양을 비교적 정확히 결정할 수 있었다. 이 결과는 이 후 계속된 실험의 기초 데이터로써 사용되어 다른 실험들의 신빙성을 높여 주었다. 흡착된 피브리노겐 중에서도 흡착과정에서 구조적 변화를 일으키지 않고 그 상태를 유지하고 있는 피브리노겐 만이 혈전을 일으킬 수 있다는 보고를 토대로 해서 특

정한 구조를 인지하는 단일 항체를 사용하여 혈전 형성에 중요한 것으로 알려진 부위에 원형을 유지하고 있는 피브리노겐의 양을 정량하였다. 이 들 결과로 부터 우리는 피브리노겐이 폴리우레탄에 흡착될때 피브리노겐의 어느 부위에서 많이 구조적 변화가 일어나는 지, 그리고 어느 부위에 원형을 유지하는 지를 유추할 수 있었다. 혈전 형성에 있어서 결정적 역할을 하는 혈소판과의 반응성을 알아보기 위해서 사람의 혈액으로 부터 혈소판을 분리하여 방사능으로 표지시킨후 피브리노겐이 흡착된 폴리우레탄 표면과의 반응을 알아보는 실험을 시행하였다. 그리고 이와함께 세가지 단일 항체를 피브리노겐이 흡착된 표면에 처리하여 혈소판과의 반응성을 실험 함으로써 어느 항체가 혈소판과 흡착된 피브리노겐의 반응을 효과적으로 저해하는 가를 알아보았다. 이 결과로 부터 우리는 피브리노겐의 어느 영역이 폴리우레탄 표면위에서 피브리노겐과 혈소판의 반응에 가장 중요한지를 유추할 수 있었다.

2. 폴리우레탄 표면에 흡착된 피브리노겐의 정량

폴리우레탄 표면에 흡착되는 피브리노겐의 정량하는 데 있어서 항체와 직접 방사선 표지된 피브리노겐을 이용하는 두가지 방법을 사용하였다. 이 것으로부터 나온 결과는 그림 21 과 그림 22 에서와 같은데 두가지 방법이 공히 비슷한 유형의 결과를 나타내었다. 피브리노겐의 농도 150 ug/ml 정도에 피브리노겐이 표면에 붙는 것이 포화되는 것으로 나타났다. 그래서 그 이상의 농도의 피브리노겐에서는 더이상 흡착이 증가하지 않는 것으로 나타났다. 그래서 두시간의 반응으로 나타나는 피브리노겐은 단위면적당 0.4 ug 정도에서 포화가 나타난다. 이런 결과로부터 항체를 이용한 정량 방법이 다른 결과와 같은 결과를 냄으로써, 이후 항체를 이용한 정량 방법의 유효성을 보장한다고 할 수 있겠다.

3. 흡착된 피브리노겐의 감마체인에 있어서의 구조적 변화

피브리노겐 감마체인의 400번 에서 411번 까지의 잔기 영역은 자연 혈관에서의 혈전 형성에 있어서 결정적인 역할을 한다고 알려져 있기때문에 폴리우레탄표면에 흡착되어 질

때 그 구조적 변화가 일어나는 지를 단일항체(Z-69)를 이용하여 측정하였다. 그림 23 에 나타난 바와 같이 피브리노겐 자체의 흡착 유형과 비슷한 모양의 결과를 나타내고 있으며 또한 200 ug/ml 의 피브리노겐 농도에서 포화되는 것을 볼 수 있다. 이것은 피브리노겐이 폴리우레탄 표면에 흡착되어는 과정에서 있어서 감마체인 부분에서는 거의 구조가 유지되는 것을 알 수 있다. 이것은 소수성인 폴리우레탄 표면과 친수성인 감마 체인이 서로 작용하기가 어렵기 때문에 피브리노겐이 표면에 흡착되어 질 때에도 감마체인 표면에서 멀리 위치하게 되어 표면 외부로 이 부분이 노출하게 될 것이다. 이런 이유로해서 피브리노겐의 감마 체인이 구조적으로 원래 상태를 유지하는 것이라고 생각된다.

4. 흡착된 피브리노겐의 알파체인에 있어서의 구조적 변화

피브리노겐의 알파체인의 87번에서 100번 까지의 아미노산 잔기 부분에서의 구조를 원 상태로 유지하고 있는 피브리노겐을 정량한 결과 피브리노겐 농도가 낮을 때는 (< 50 ug/ml)항체에 의해서 인지 되어지는 피브리노겐의 양이 증가하다가 그 이상의 농도에서는 인지되어 지는 피브리노겐의 양이 큰 변동이 일어나서 신빙성 있는 결과가 나타나지 않았다 (그림 24). 이것은 알파체인의 이 부분이 소수성이 크기 때문에 소수성인 폴리우레탄 표면과 반응을 많이 하기 때문에 피브리노겐의 농도가 증가한다고 해서 항체에 인지 되는 정도가 선형으로 증가하기 보다는 소수성인 폴리우레탄 표면과의 반응에 의한 구조적 변화가 훨씬 우세하기 때문에 흡착되는 피브리노겐의 양이 증가되는 것 때문에 일어나는 효과가 보이지 않는다고 사료된다.

5. 폴리우레탄 표면에 흡착된 피브리노겐과 혈소판의 반응성 및 단일 항체를 이용한 반응저해성의 평가

폴리우레탄에 피브리노겐이 흡착되어 구조 변화를 일으킬때 혈소판의 표면에 대한 반응성이 변화하는데 이것을 방사선 표지된 혈소판을 이용하여 정량하였다. 그림 25과 같이 단

위 면적당 $1.7 * 10^3$ 개의 혈소판이 반응하는 것을 알 수 있었다. 항체를 이용한 Blocking 효과를 보는 실험에서는 134 B 항체에 대해서는 거의 효과가 나타나지 않았지만 Z 69 항체에 대해서는 항체의 양이 증가함에 따라 혈소판의 반응이 현저히 저해됨을 볼 수 있었다. 이것으로부터 폴리우레탄 표면에서의 혈전 형성에 의해서는 피브리노겐 감마체인의 400번에서 411번에 이르는 아미노산 잔기가 가장 큰 역할을 할 것이라는 것을 유추할 수 있는데 이것은 자연 혈관에서도 비슷한 현상을 나타내는 바 시사하는 점이 크다고 하겠다.

제 4 장 결 론

생체 적합성이 좋은 폴리우레탄에 혈전용해효소(Lumbrokinase)를 처리한 생체재료가 1차년도에 실시한 *in vitro* 평가 그리고 2, 3차 년도의 *ex vivo* 와 *in vivo* 평가에서 우수한 혈전 분해능을 보였다. 롬부로키나제를 카테타나 인공심장의 인공장치 표면에 처리한다는 것은 인공장기가 영구적이건 일시적이건 간에 인체의 혈액이나 체내 세포와 접촉한다는 것을 전제로 하는 것이다. 롬부로키나제가 부착된 인공장기를 사용하기 위해서는 이것이 체내에 들어가서 혈전 분해능력을 나타냄은 물론이고 안정하고 독성을 나타내서는 안된다. 이를 확인하기 위해서 3차 년도에는 롬부로키나제로 코팅된 폴리우레탄 재료를 동물에 이식해서 생체재료가 동물의 살아 있는 조직에 대해서 어떤 작용을 하는지 *in vivo* 독성 평가를 수행 하였다. 그 결과로 롬부로키나제로 코팅된 폴리우레탄 재료는 독성을 보이지 않았다.

롬부로키나제를 생체재료로 사용하는데 있어서 이 혈전용해효소가 어떤 기전으로 혈전을 방해하거나 용해하는가 하는 기전에 대한 연구는 생체재료의 안정내지는 독성을 예측하는 필수적인 과정이다. 이런 과정을 거쳐서 기전과 생물학적 특성을 알게되면 요즈음 각광받고 있는 분자 생물학적 기술로서 롬부로키나제를 대량 생산할 수도 있을 것이며, 롬부로키나제 자체를 변형시켜서 혈전 분해능은 높이고 부작용은 없게 만드는 것도 가능할 것이다.

롬부로키나제를 코팅하여 카테타나 인공 심장등의 인공 장치의 항혈전성을 보장하는 기술이 사업화되는 단계에서 순수한 롬부로키나제를 안정적이고 반복적으로 공급하는 방법의 확립은 필수적이다. 이를 위해서 HPLC 를 사용하는 방법으로 롬부로키나제의 분리를 자동화하고, 롬부로키나제의 수득률을 올리는 기술을 확보할 수 있으리라 생각된다. 아울러 인공장치 이식후 주요 사인 중의 하나로 대두되는 감염문제를 해결하기 위해 개발하고 있는 세균 인지형 항감염 처리연구는 표면에 고정화된 항생제의 양을 늘리고 여러가지 균주에 대해서 작용할 수 있어서 예방 가능한 질병의 범위를 넓히는 방향으로 연구를 진행하고 있다.

본 연구를 통해서 얻어지는 여러가지 기술들은 인공장기에 사용되는 생체재료의 공통적 최대난제인 혈전 현상과 감염을 해결하는 것으로 비단 인공심장이나 카테타에 국한 되는 것이 아니라 다른 여러 인공장기 및 의료 제품의 표면처리에 있어서도 반드시 필요한 근간 기술이 될 것이다. 따라서 인공 심장용 재료의 개발로 인한 기술 축적은 관련 인공장기의 기술개발에 직접적인 도움을 주게 되어 이 분야의 기술 발전에도 상당한 파급 효과를 미칠 것이라고 사료된다.

2단계의 연구에서는 지난 1단계의 연구성과를 바탕으로하여 말기 심장질환 환자를 위해 심장이식까지의 가교로서 혹은 연구이식 목적으로 사용될 생체적합성이 우수한 완전이식형 인공심장을 개발하여 동물실험을 통한 성능 평가에서 최소 100일 이상의 생존기간을 달성하여 향후 임상에 응용하고, 참여기업을 통하여 상품화하도록 한다. 이를 위하여 1단계의 기반기술을 이용하여 인공심장에 대한 생체적합성 향상에 관한 처리기법을 확립하고, 심박출량 대 크기비가 개선된 혈액펌프를 개발하며, 이식형 제어장치, 생리적 자동제어 방식, 무선에너지 및 정보 전송장치의 개발을 포함하는 완전이식형 인공심장을 실현하고, 또한 중 단기 동물실험을 위한 의학적 수술기법 및 술후 관리법을 확립하도록 한다.

제 5 장 참 고 문 헌

1. Lorentzen JE, Nielsen OM, Arendrup H, Kimose KK, Bille S, Andersen J, Jensen CH, Jacobsen F and Rodor OC, *Surgery*, 98:81, 1985
2. Hepp W and Schultze T, *Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 34:265, 1986
3. Jensen LJ and Kimose KK, *Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 33:389, 1985
4. Sheth NK, Franson TR, Rose HD, Buckmire FLA, Cooper JA and Sohnle PG, *J. Clin. Microbiol.*, 18:1061, 1983
5. Eftekhar NS, *Clin. Orthop.*, 225:207, 1987
6. Jacobs MA, Hungerford DS, Krakow KA and Lennow DW, *Clin. Orthop.*, 238:159, 1989
7. Ross AC, Sneath RS and Scales JT, *J. Bone Joint Surg.*, 69B:652, 1987
8. Morrey BF and Bryan RS, *J. Bone Joint Surg.*, 69A:523, 1987
9. Dankert JA, Hogt AH and Feijen J, *Crit. Rev. Biocompat.*, 2:219, 1986
10. Gristina AG, Dobbins JJ, Giamara B, Lewis JC and DeVries WC, *J.A.M.A.*, 259:870, 1988
11. DeVries W, *J.A.M.A.*, 259:849, 1988
12. Didisheim P., Olsen D.B., Farrar D.J., Portner P.M., Griffith B.P., Pennington D.G., Joist J.H., Schoen F.J., Gristina A.G. and Anderson J.H., *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs.*, 35:54, 1989
13. Gristina AG, Naylor PT, Myrvik QN, Wagner WD, In high performance biomaterials : Microbial adhesion to biomaterials, Michael Szycher ed. Technomic Publishing Co., p144, 1991
14. Pashley RM, McGuiggan PM, Ninham BW, and Evans DF, *Science*, 229:1088, 1985
15. Jones GW, Isaacson RE, *CRC Crit Rev Microbiol*, 10 : 229, 1984

16. Gristina A.G., Barth E., and Webb L.X., 1987, In Biomaterials and Clinical Application; Microbial Adhesion and Molecular Mechanisms in Biomaterial and Compromised Tissue Centered Infection, Pizzoferrato et al ed., Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 661
17. Peters G, J. Antimicrob. Chemother., 21C suppl. c:139, 1988
18. Chstensen, GD, Simpson WA, Bisno AL and Beachey EH, Infect. Immun., 37:318, 1982
19. Johnson GM, Lee DA, Regelmann WE, Gray ED, Peters G and Quie PG, Infect. Immun., 54:13, 1986
20. Naylor PT, Jennings R, Webb LX, Gristina AG, Orthop Trans, 12 : 524, 1988
21. G.H. Ryu, S. Park, M. Kim, D.K. Han, Y.H. Kim, and B.G. Min, Antithrombotic Activity of a Lumbrokinase Immobilized Polyurethane Surface, Am. Soc. Artif. Intern. Organs J., Vol. 39(3), pp M314 - 318,1993
22. G.H. Ryu, S. Park, M. Kim, D.K. Han, Y.H. Kim, and B.G. Min, Antithrombogenicity of Lumbrokinase Immobilized Polyurethane, J. Biomed. Mater. Res., Vol. 28, pp 1069-1077,1994
23. G.H. Ryu, S. Park, M. Kim, D.K. Han, Y.H. Kim, and B.G. Min, Surface Characteristics and Properties of Lumbrokinase Immobilized Polyurethane, J. Biomed. Mater. Res., Vol. 29, pp 403-409,1995
24. G.H. Ryu, J. Kim, J.K. Chang, K.B. Lee, D.K. Han, Y.H. Kim, and B.G. Min, The Fluid Dynamic Effect on Protein Adsorption in Left Ventricular Assist Devices, Am. Soc. Artif. Intern. Organs J., Vol. 39(3), pp M332 - 336,1993
25. G.H. Ryu, J. Kim, K.B. Lee, J.K. Chang, Z.M. Ruggeri, and B.G. Min, Effect of Shear Stress on Fibrinogen Adsorption and Its Conformational Change, Am. Soc. Artif. Intern. Organs J., 1995 (in press)

26. Alltech product catalogue- Chromatography, 1993
27. G. Osthoff, A.I. Louw and L. Visser, *Anal. Biochem.* 164:315-319, 1987
28. Parmacia product brochure, 1992
29. Fazio, P.C. et al. *Annual Book of ASTM standards*, Vol 13.01 Medical Devices, 1992

㉟ 1. Intramuscular Rabbit Implantation Assay

Materials	Implantation period	7 days	1 month	3 month	6 month
	PTFE	No foreign body reaction & necrosis			
PU	"				
PU-MAMEC	"				
PU-MAMEC-LK	"				

* Sample No.

1) PTFE & PU : 8

2) PU-MAMEC & PU-MAMEC-LK : 12

表 2. Codon usage of *Lumbricus rubellus*

UUU UUC UUA UUG	Phe 0 4 0 3	UCU UCC UCA UCG	Ser 1 0 1 2	UAU UAC UAA UAG	Tyr 0 1	UGU UGC UGA UGG	Cys 0 3 Trp 3	
CUU CUC CUA CUG	Leu 3 10 1 5	CCU CCC CCA CCG	Pro 5 0 2 2	CAU CAC CAA CAG	His 2 8 2 5	Gln 2 5	CGU CGC CGA CGG	Arg 1 3 5 1
AUU AUC AUA AUG	Ile 3 7 1 Met 0	ACU ACC ACA ACG	Thr 0 1 0 1	AAU AAC AAA AAG	Asn 1 3 0 9	Lys 0 9	AGU AGC AGA AGG	Ser 1 0 2 Arg 0
GUU GUC GUA GUG	Val 0 5 1 1	GCU GCC GCA ACG	Ala 4 6 1 2	GAU GAC GAA GAG	Asp 5 9 5 7	Glu 5 7	GGU GGC GGA GGG	Gly 2 2 3 1

표 3. 소독 방법에 따른 세균의 항균성 측정

		Diameter of clear zone in <i>S. aureus</i>	Diameter of clear zone in <i>S. pneumoniae</i>
PU	EO gas	No clear zone	No clear zone
	UV	No clear zone	No clear zone
	75% ethanol	No clear zone	No clear zone
PHR	EO gas	18.2 mm*	25.7 mm*
	UV	18.5 mm*	26.7 mm*
	75% ethanol	18.8 mm*	25.7 mm*

*The diameter of clear zone includes the size of disc (12 mm)

DEAE anion chromatography

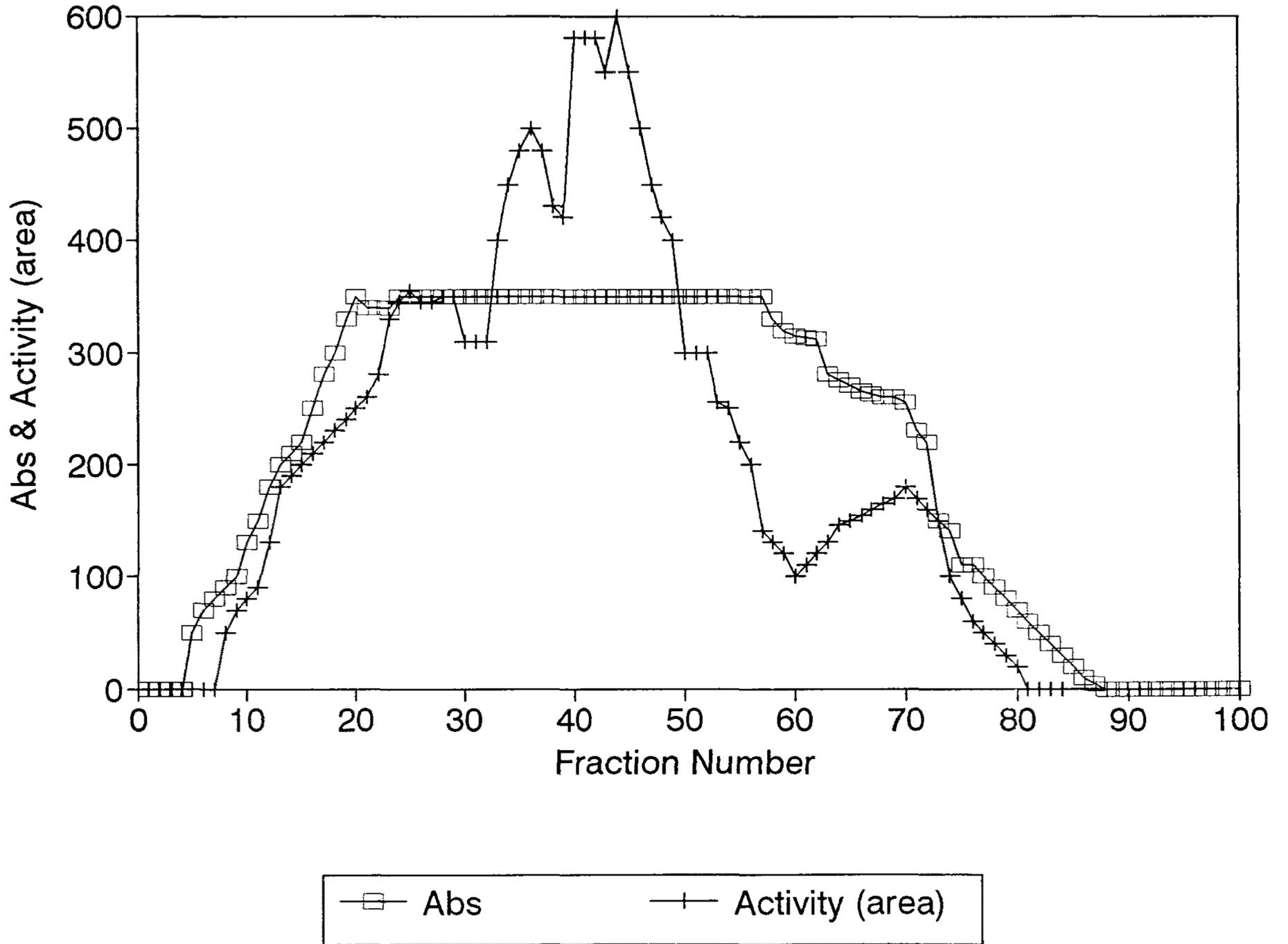


그림 1. DEAE-음이온 교환 크로마토그래피수행시 단백질의 양상과 fibrinolytic activity

Benzamidine affinity chromatography

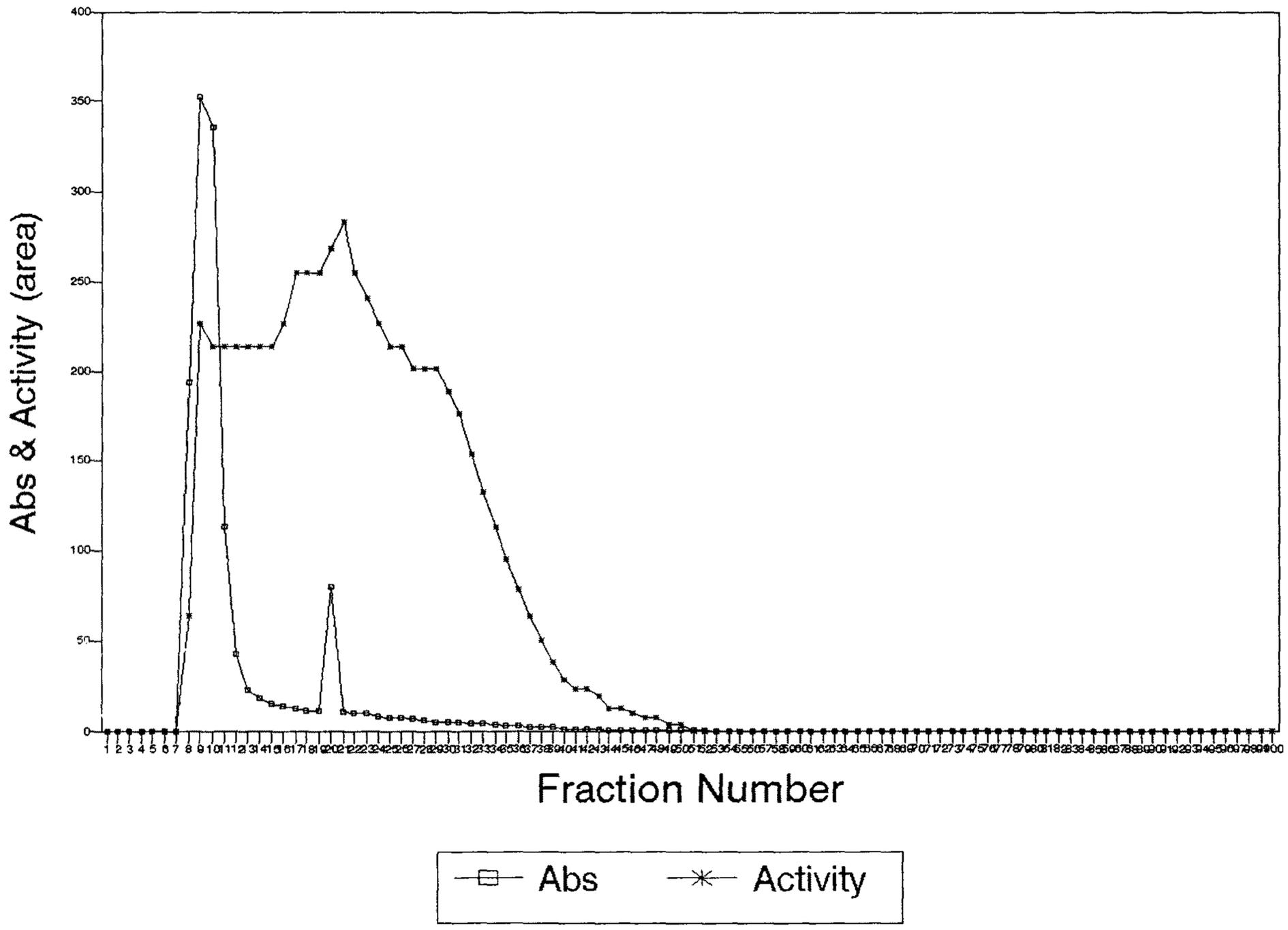
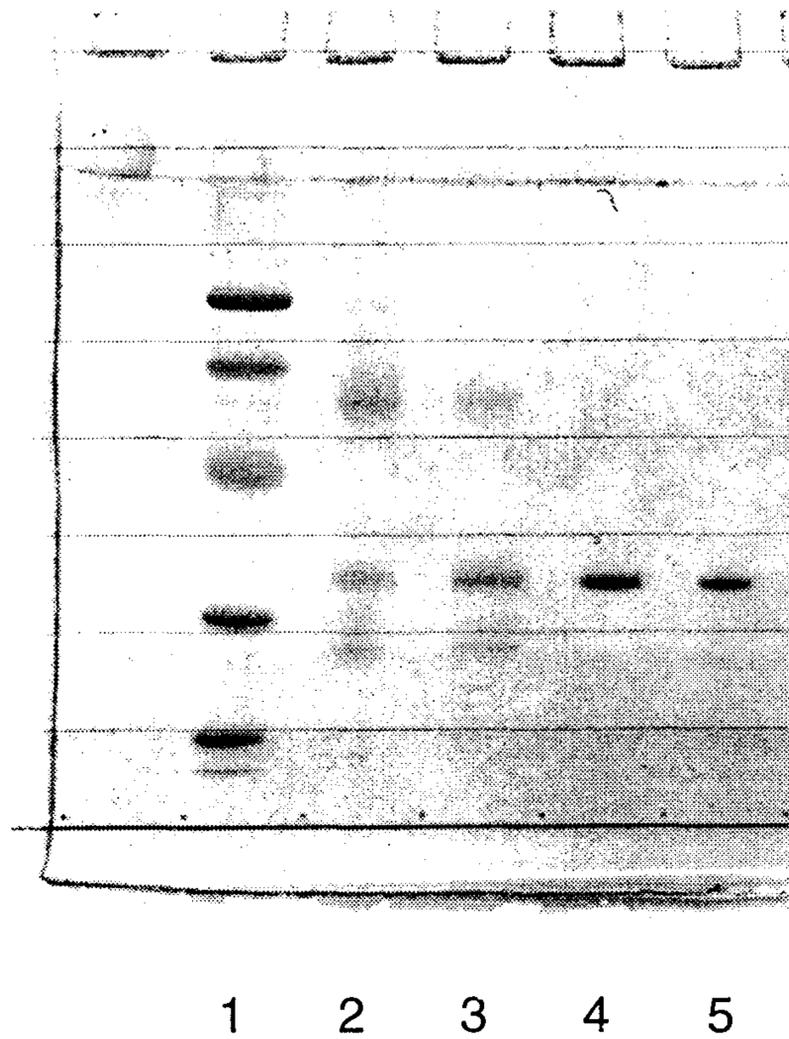


그림 2. p-aminobenzamidine affinity 크로마토그래피 수행시 단백질 양상과 fibrinolytic activity.



1: low molecular size marker, 2: crude extract, 3: before loading benzamidine column, 4, 5: purified lumbricinase

그림 3. SDS-PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis)수행시 단백질 밴드 양상

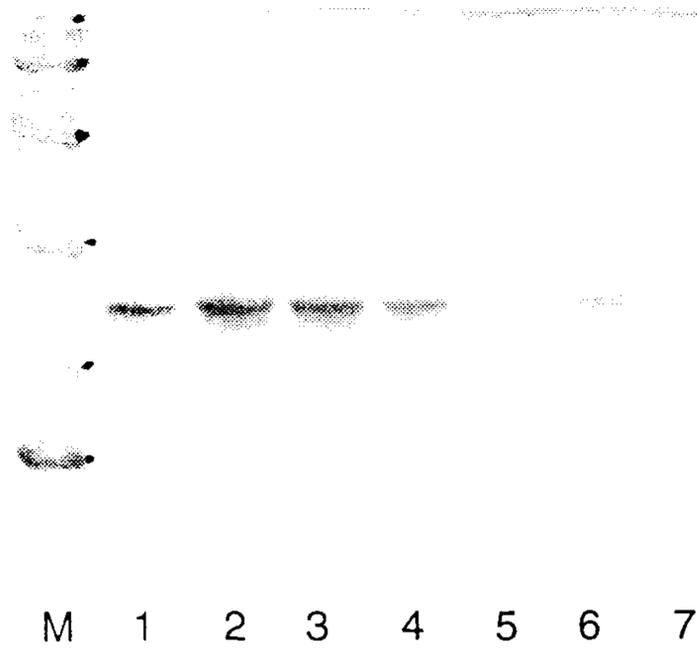
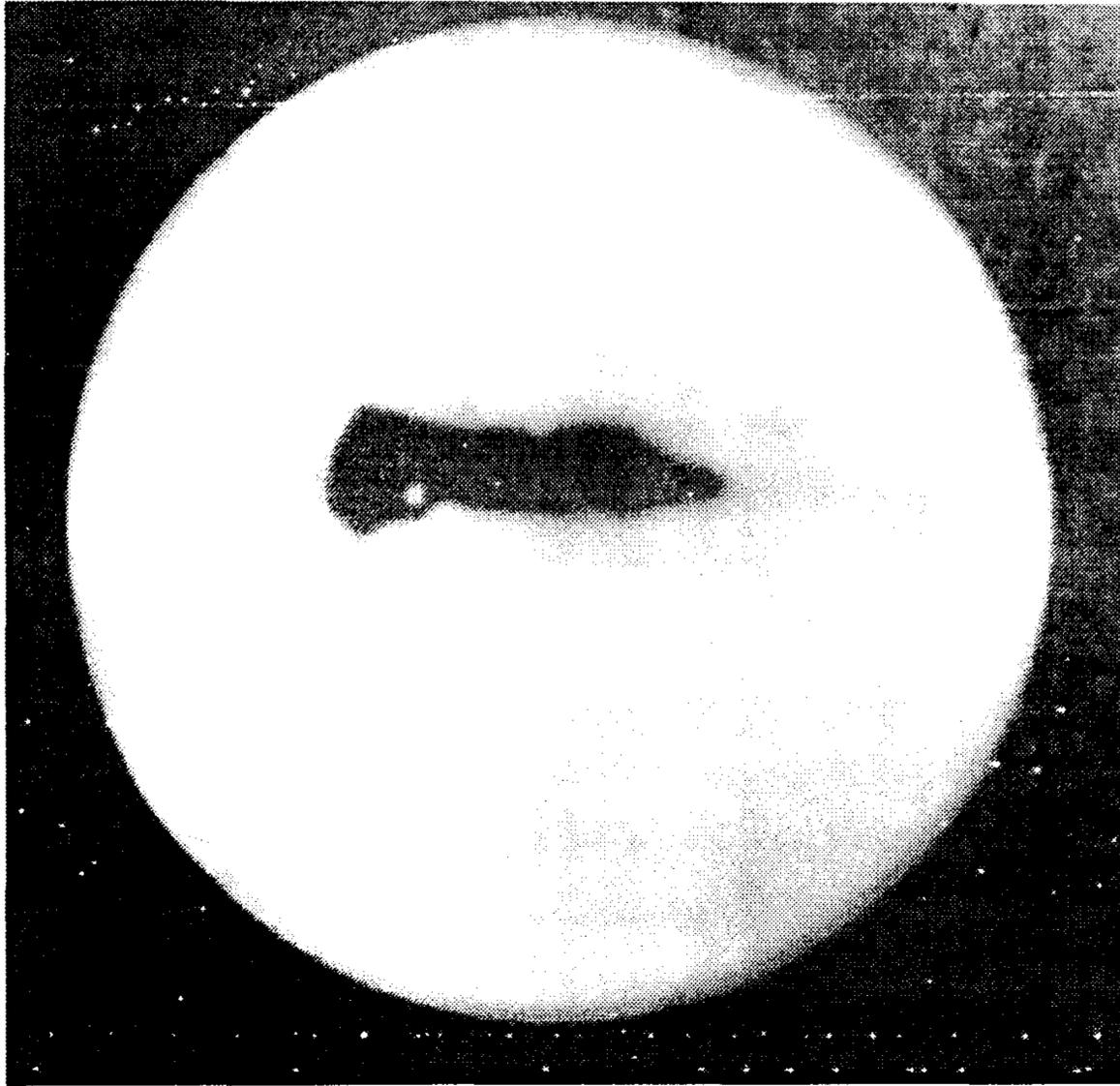


그림 4. 순수 분리된 롬부로키나 제의 fibrin autography

M:low molecular size marker, 1: fraction 16, 2: fraction 17, 3: fraction 19, 4: fraction 21, 5: fraction 22, 6: fraction 23, 7: fraction 25

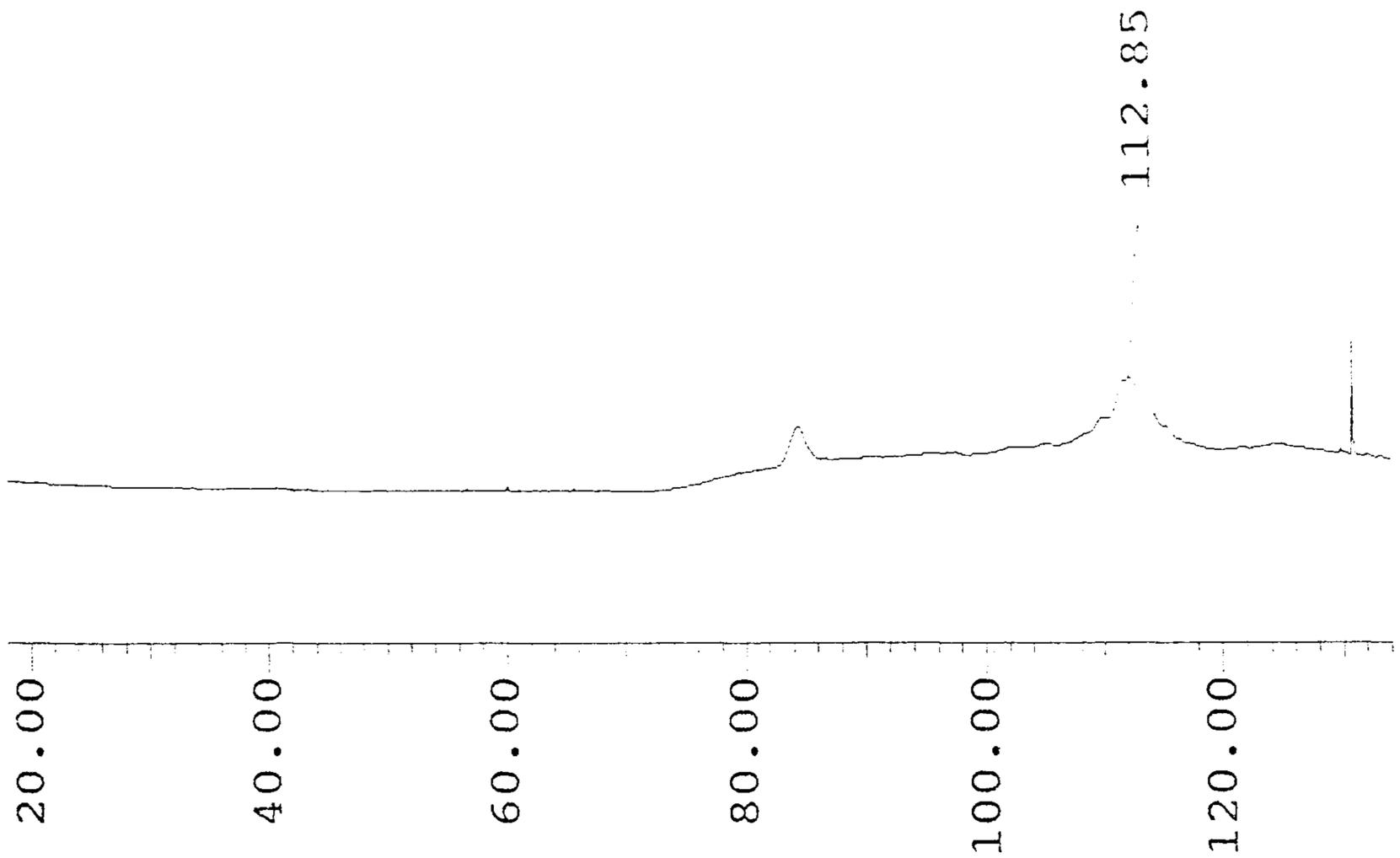
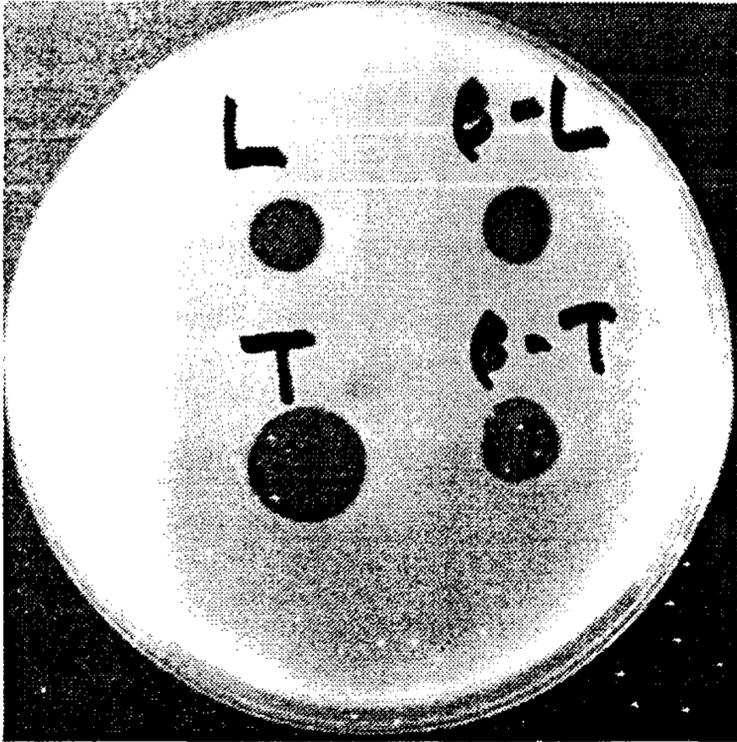
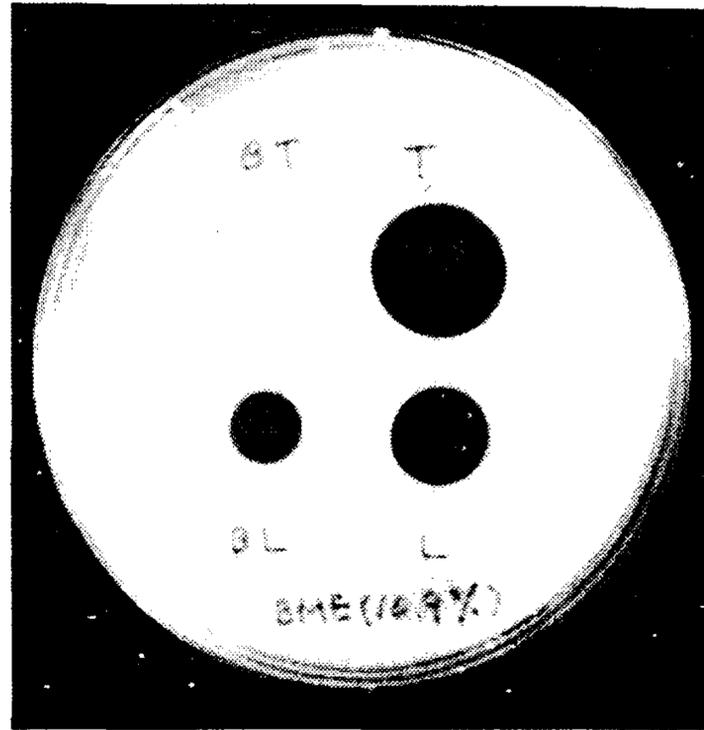


그림 5. HPLC(high performance liquid chromatography)를 이용한 순수 분리된 롬부로 키나 제의 분석

1



2

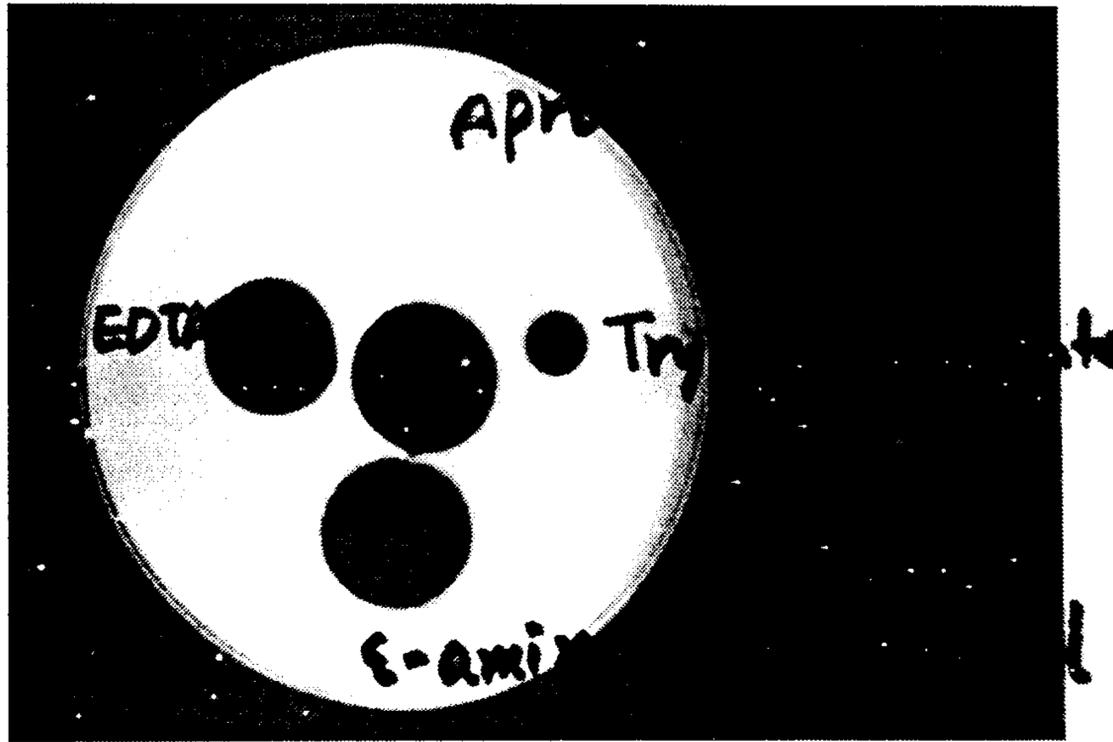


residual activity	(%)	residual activity	(%)
L	100	L	100
β -L	88	β -L	54
T	100	T	100
β -T	63	β -T	0

L: native lumbricinase,
 β -L: inactivated lumbricinase by
 1 % of β -mercaptoethanol
 T: native trypsin,
 β - T: inactivated trypsin by 1 %
 of β -mercaptoethanol

L: native lumbricinase,
 β -L: inactivated lumbricinase by
 10.9 % of β -mercaptoethanol
 T: native trypsin,
 β - T: inactivated trypsin by 10.9 %
 of β -mercaptoethanol

그림 6. 룬부로키나 제와 trypsin의 β -mercaptoethanol에 대한 내성 비교



Inhibitors	residual activity (%)
aprotinin	0
trypsin inhibitor	23
e-aminocaproic acid	100
EDTA	83

그림 7. 단백질 활성 저해 물질에 대한 롬브로키나 제의 활성 감소

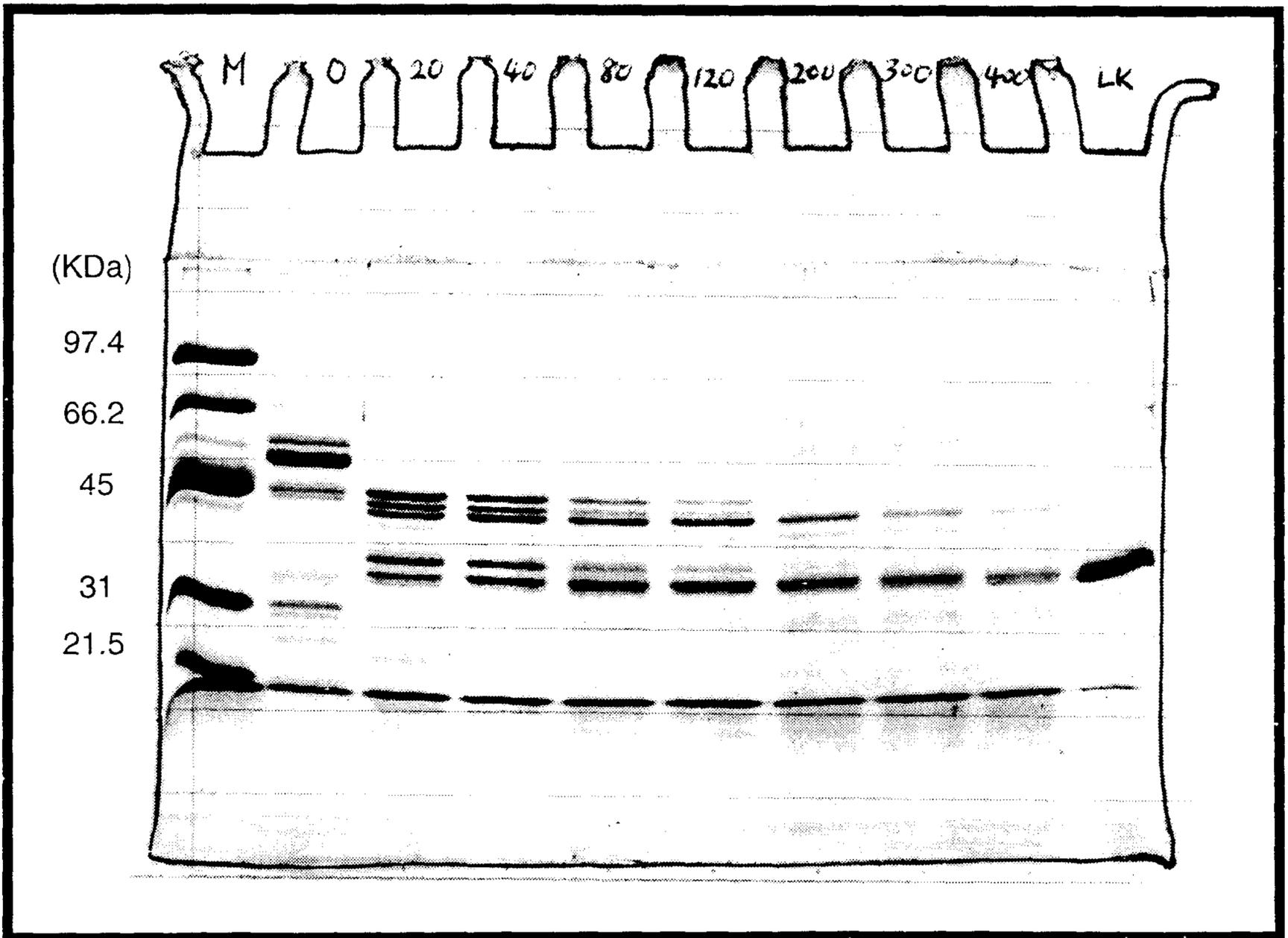


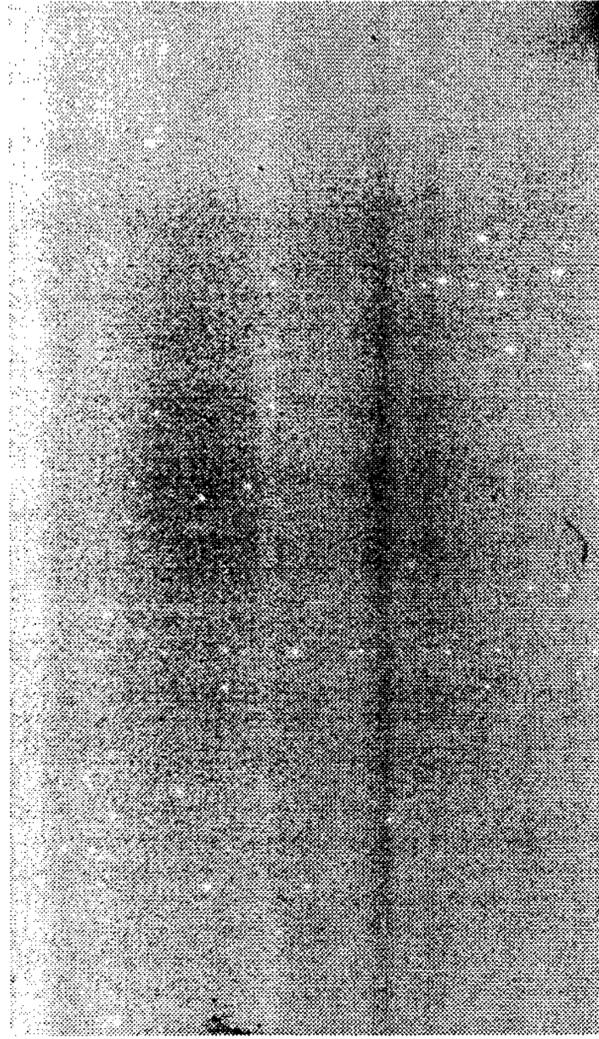
그림 8. 롬부로키나 제에 의한 bovine fibrinogen의 분해 양상



1 2 3

그림 9. CsCl을 이용한 지렁이 total RNA 와 oligo-d(T)컬럼 크로마토그래피를 이용한 mRNA의 분리

Lane 1: size marker, Lane 2: total RNA, Lane 3: mRNA



1 2

그림 10. reverse transcriptase와 Klenow fragment를 이용한 first strand 와 second strand cDNA의 합성

1: first strand DNA, 2: second strand DNA

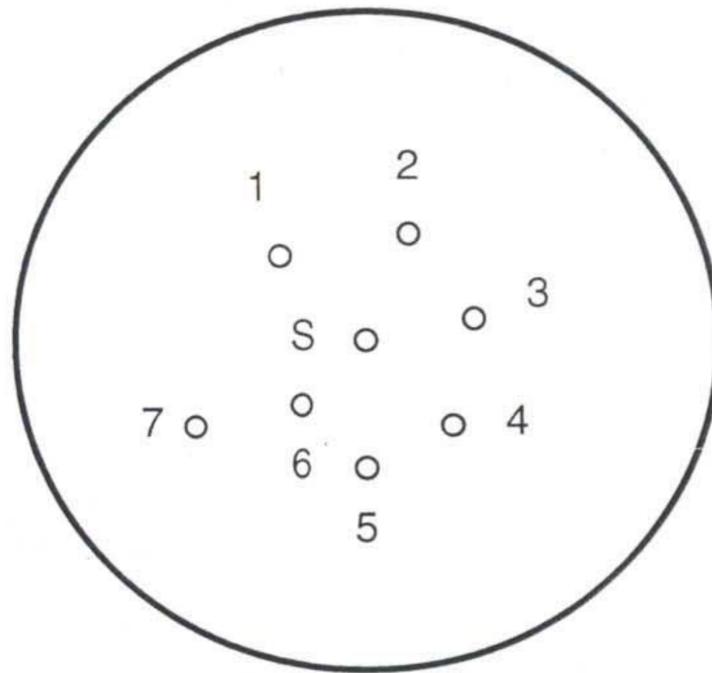
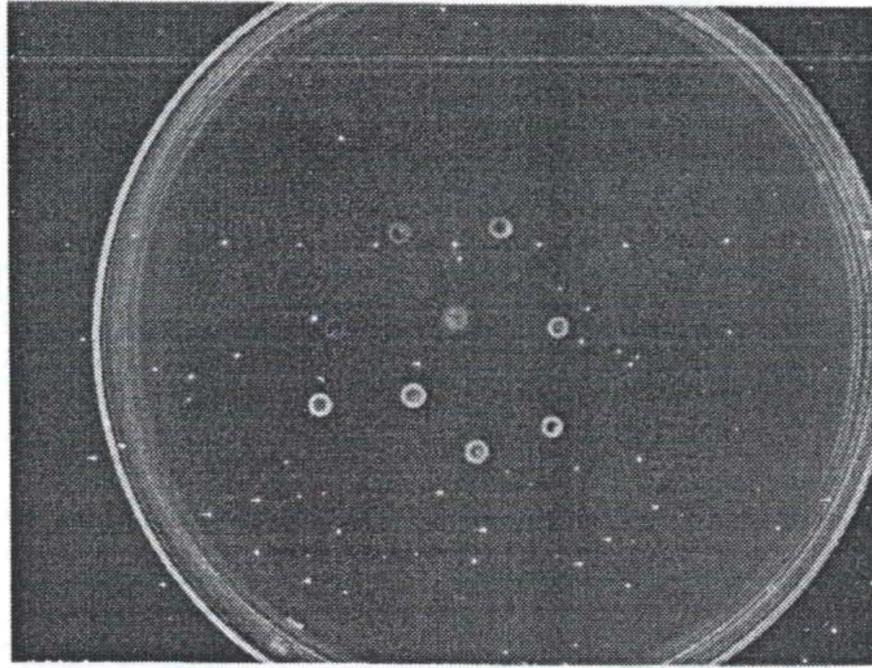
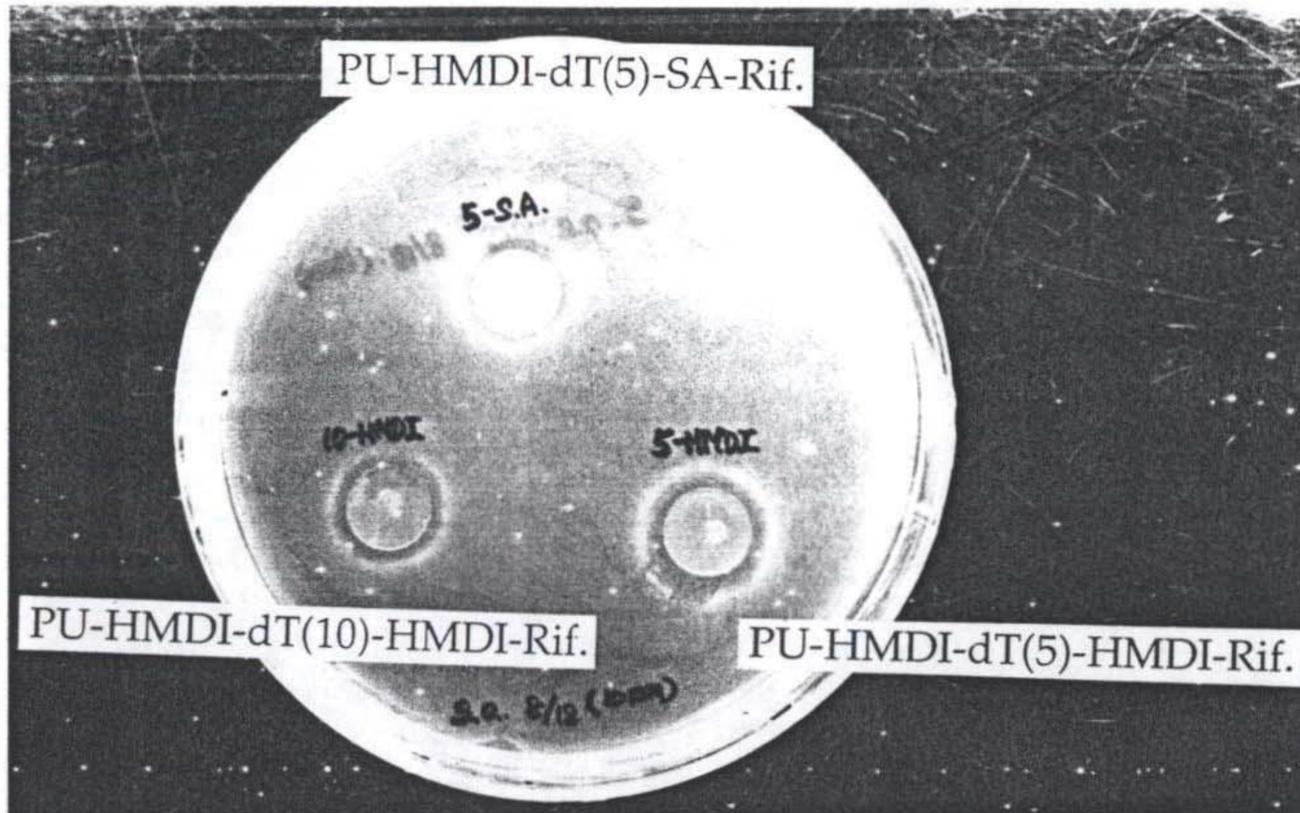


그림 11. 합성된 cDNA의 정량

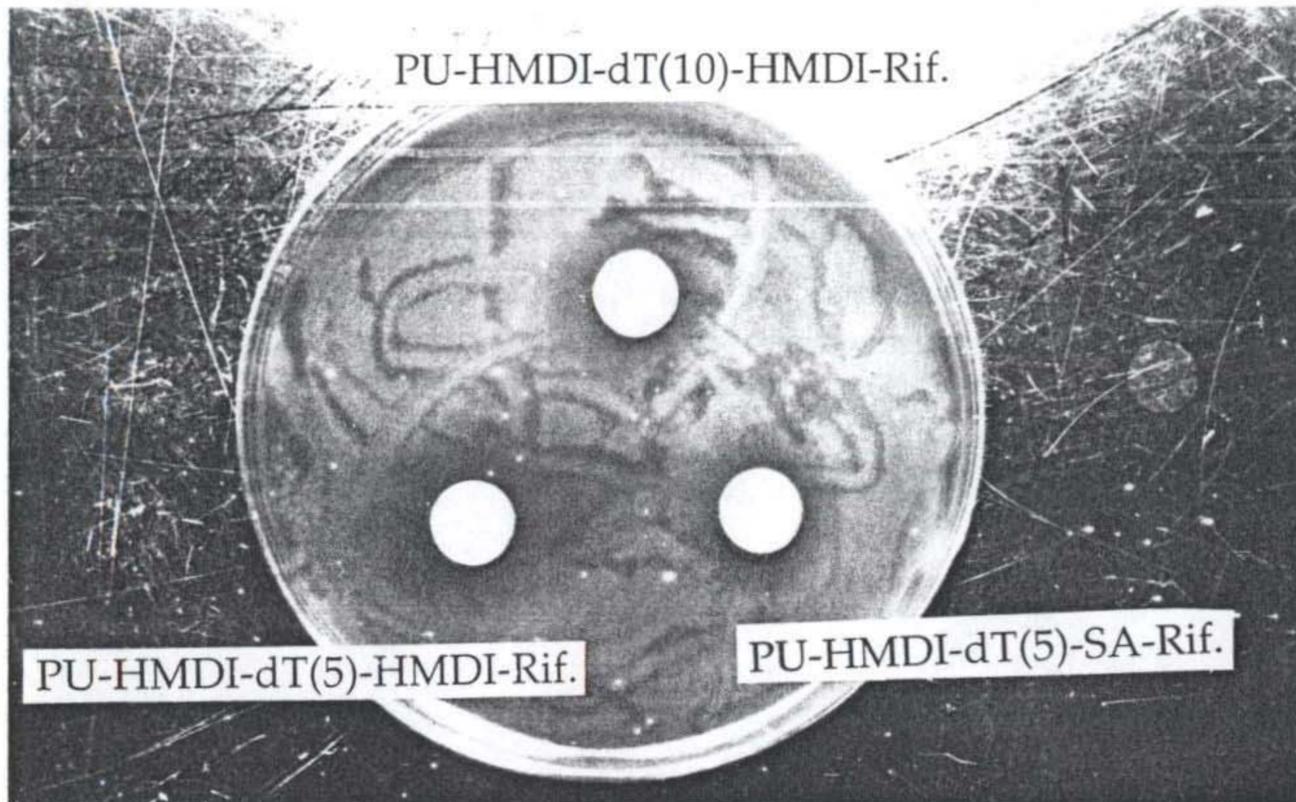
1:10 ng/ μ l, 2:25 ng/ μ l, 3:50 ng/ μ l, 4:75 ng/ μ l,
5:100 ng/ μ l, 6:150 ng/ μ l, 7: 200 ng/ μ l, S:sample DNA



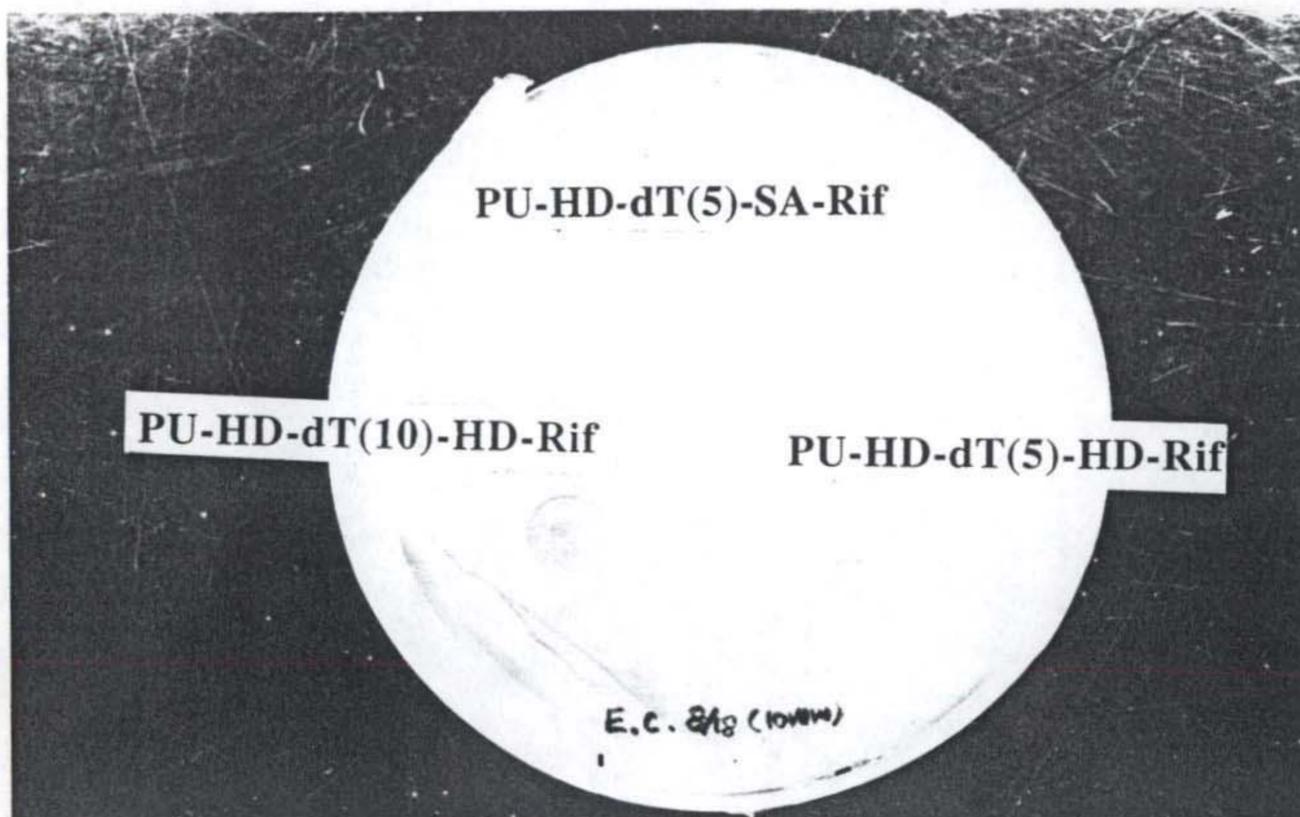
A. Antibiotic Effect of Modified PU. on *S. aureus*

그림 12. Antibiotic Effect of Modified PU on *S. aureus*,
S. pneumoniae, *E. coli*

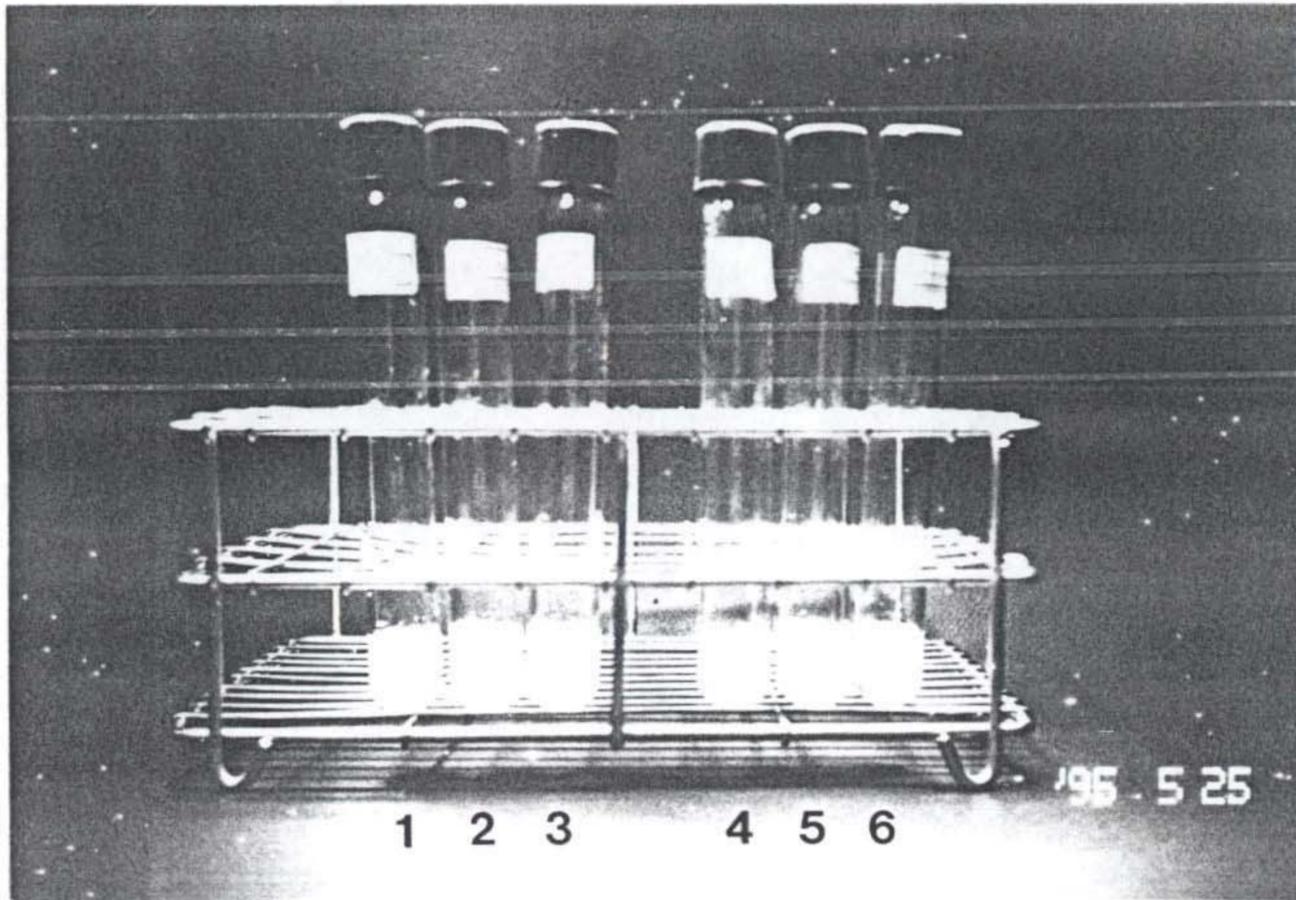
- A. PU-HMDI-dT(5)-SA-Rif; Rifampin immobilized PU with oligodT 5mer using HMDI and succinic anhydride,
- B. PU-HMDI-dT(10)-HMDI-Rif; Rifampin immobilized PU with oligodT 10mer using HMDI,
- C. PU-HMDI-dT(5)-HMDI-Rif, Rifampin immobilized PU with oligodT 10mer using HMDI,



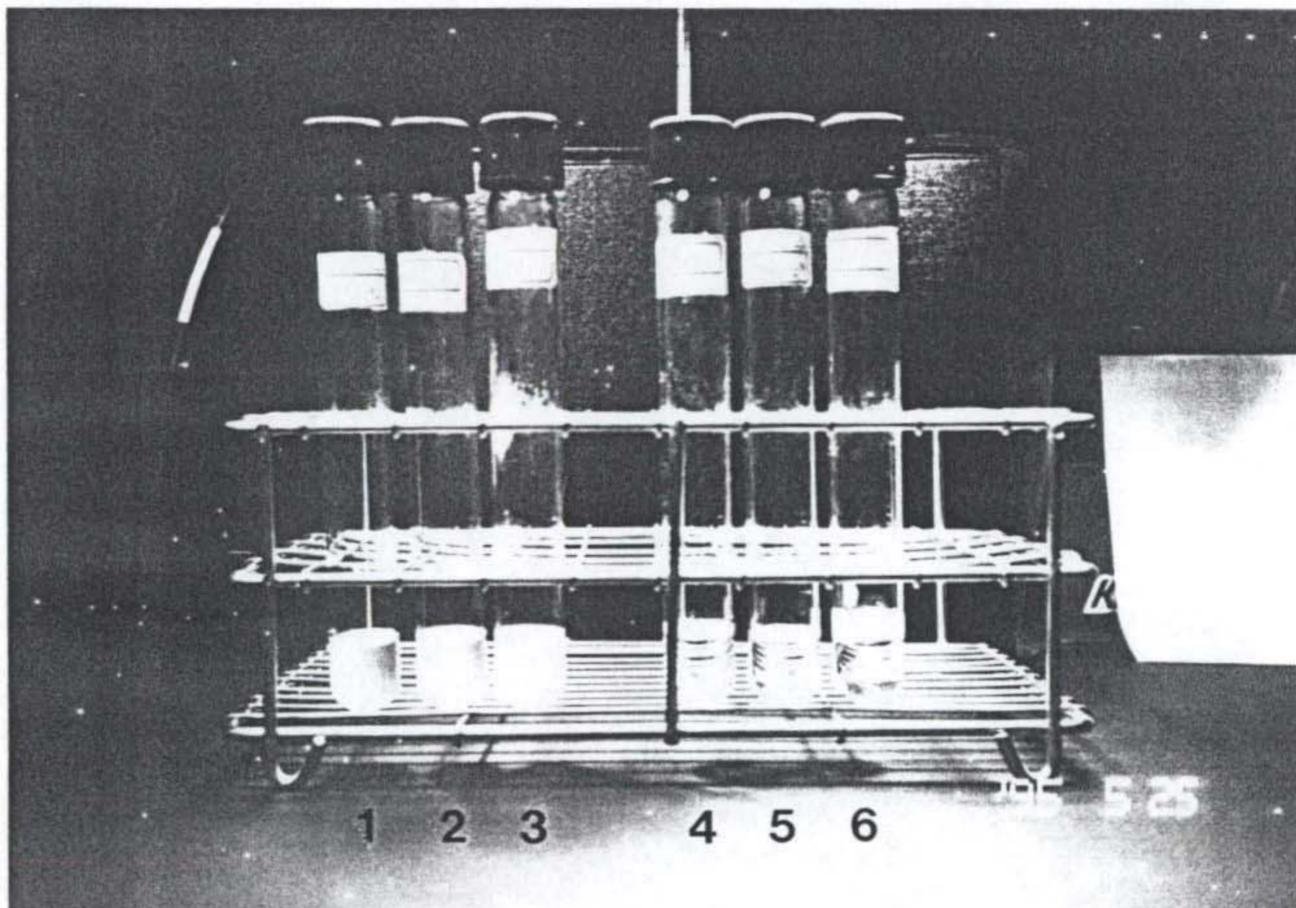
B. Antibiotic Effect of Modified PU on *S. pneumoniae*



C. Inactiveness of Modified PU on *E. coli*



A. Inactiveness of *E. coli* inhibition by PHR



B. Inhibition of *S. aureus* by PHR

그림 13. Bacterial Inhibition by PU-HMDI-Rifampicin(PHR)

A. Inactiveness of *E. coli* inhibition by PHR:

1, 2, 3; *E. coli*+PU, 4, 5, 6; *E. coli*+PHR

B. Inhibition of *S. aureus* by PHR:

1, 2, 3; *S. aureus*+PU, 4, 5, 6; *S. aureus*+PHR

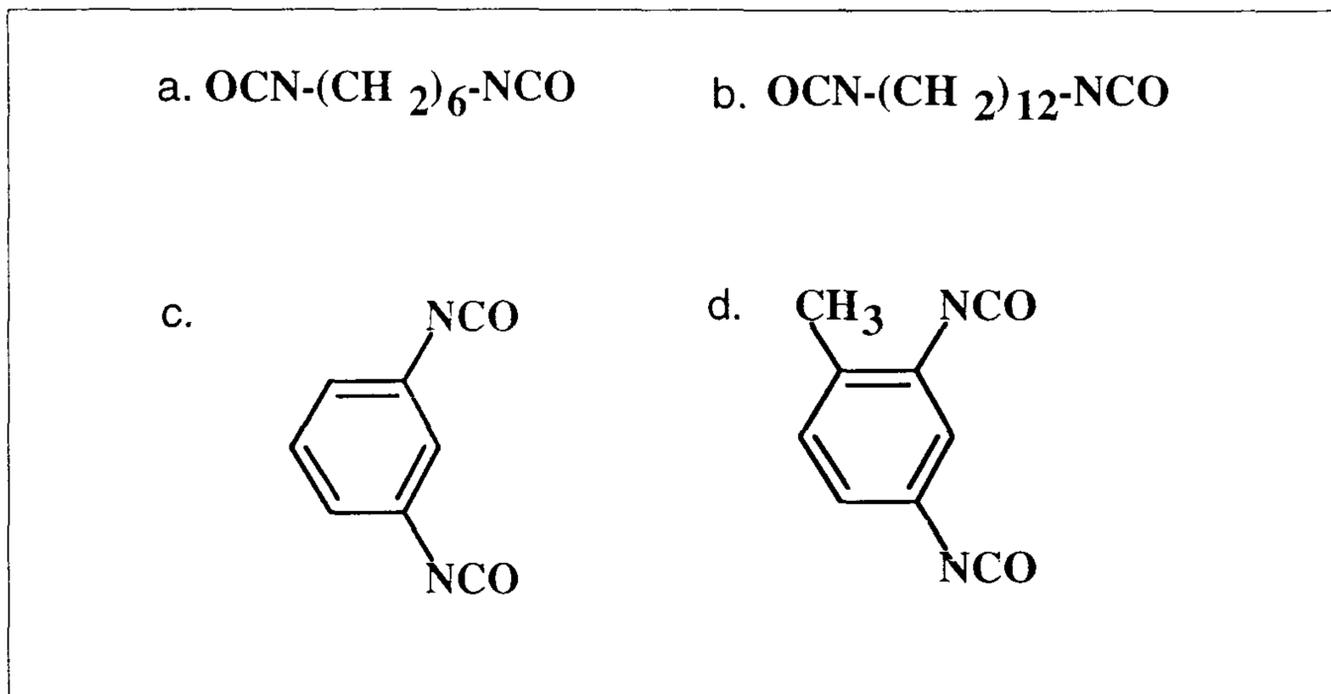


그림 14. Chemical structures of drug-linkers

- a. 1,6-diisocyanatohexane(HMDI)
- b. 1,12-diisocyanatododecane(DDI)
- c. 1,3-phenylenediisocyanate(PDI)
- d. 4-methyl-1,3-phenylenediisocyanate(TDI)

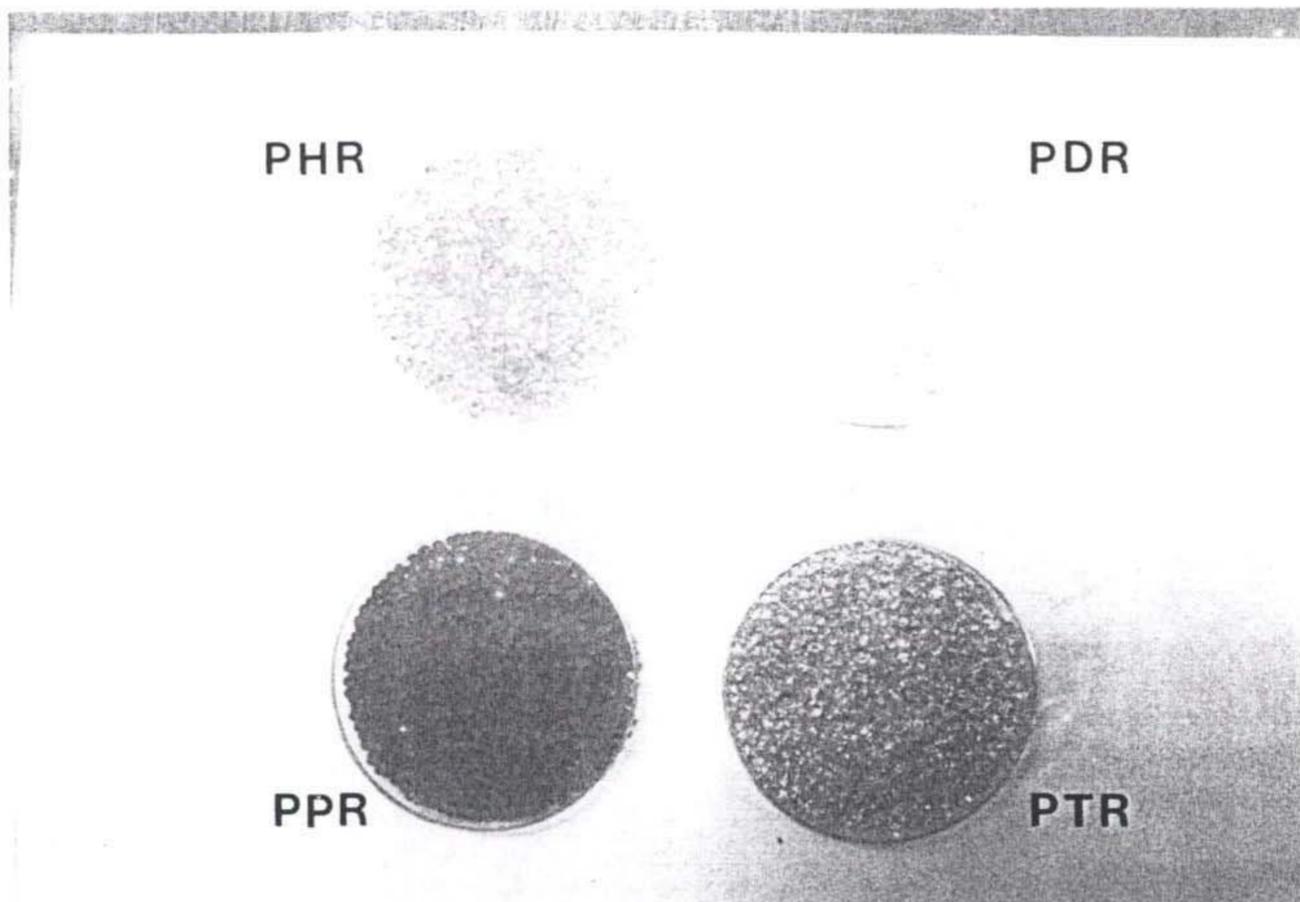


그림 15. Rifampicin immobilized PU beads
with various linkers

PHR : PU-HMDI-Rif. PDR : PU-DDI-Rif.

PPR : PU-PDI-Rif. PTR : PU-TDI-Rif

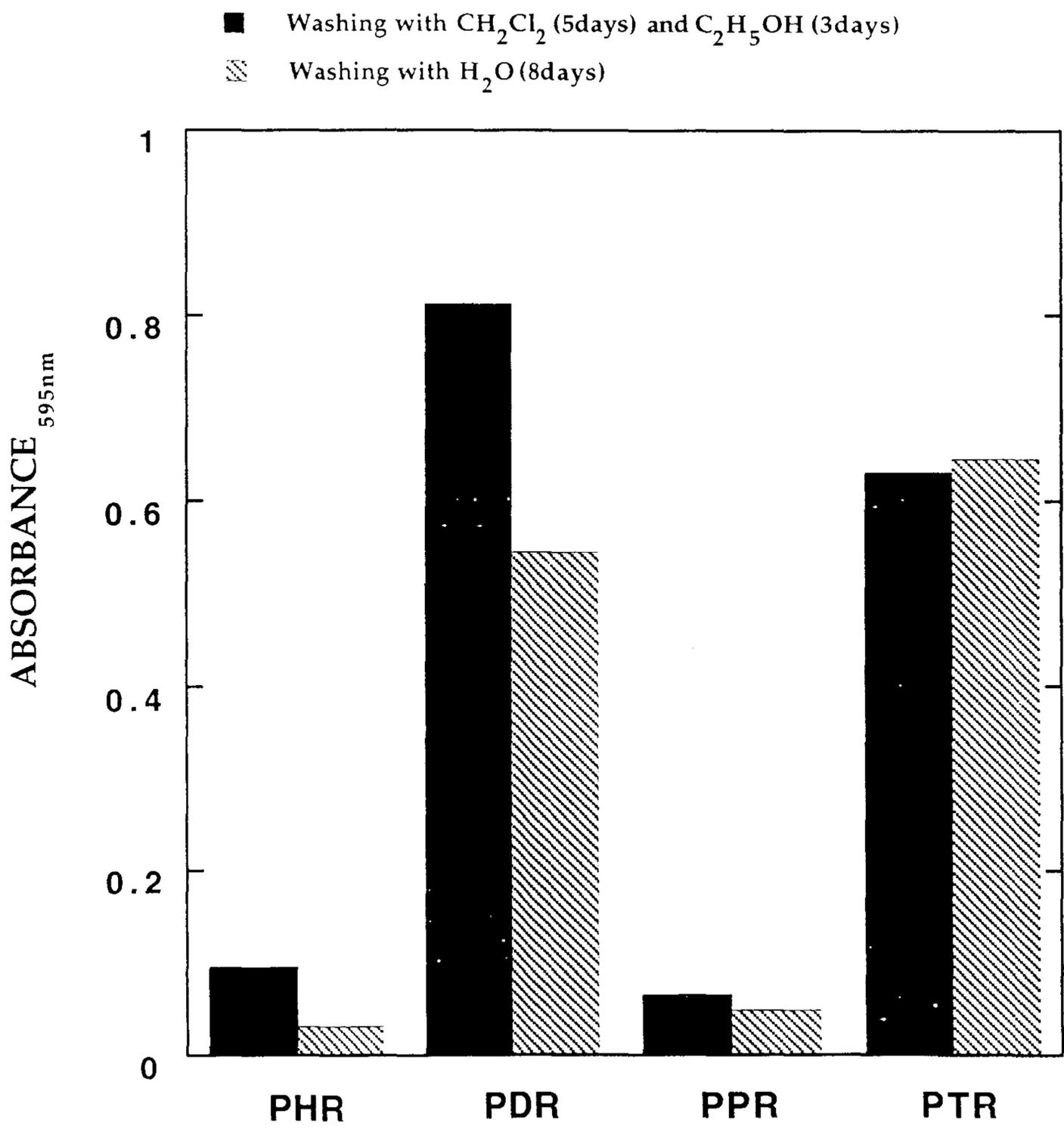


그림 16. Washing Effects on Antibacterial Function

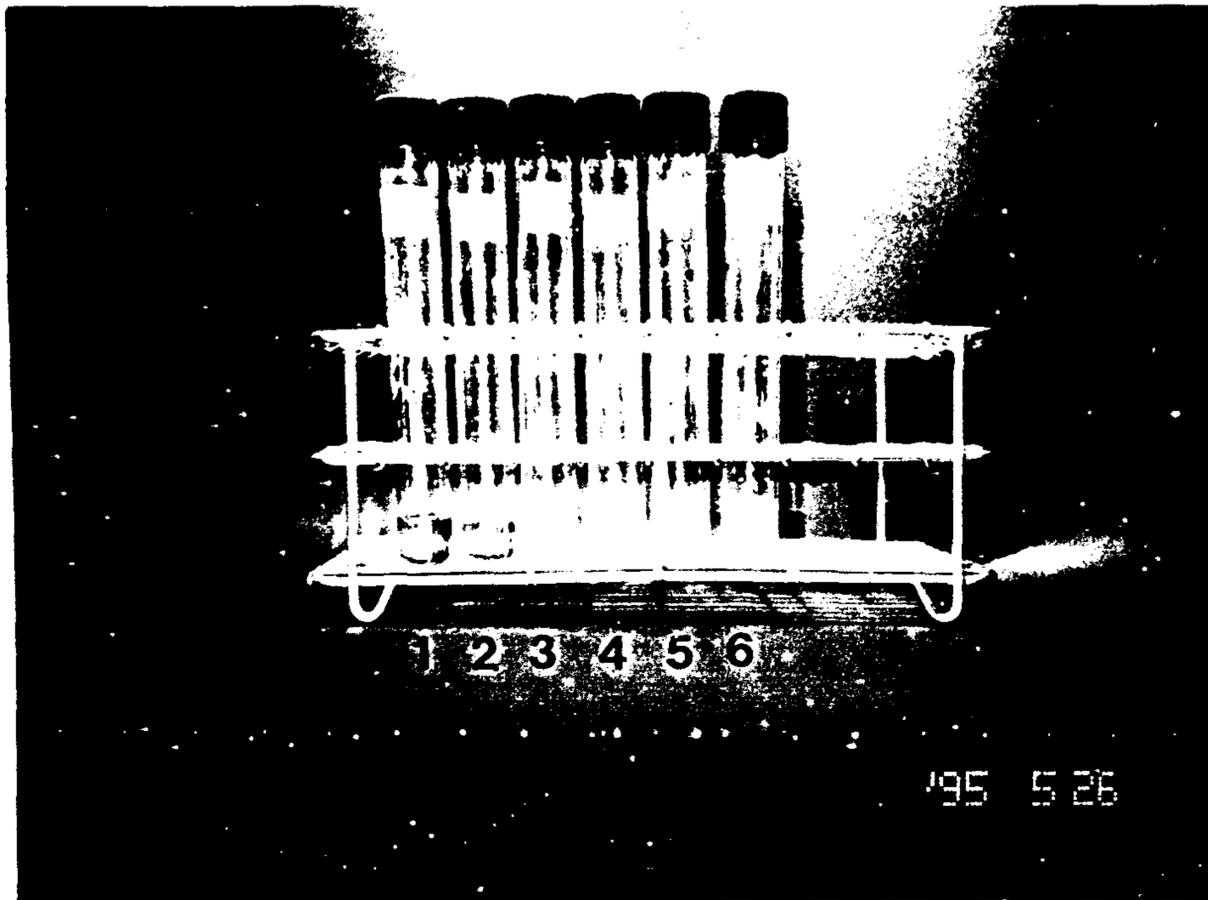


그림 17. Antibacterial Effects of Supernant

Supernant of bacterial culture medium incubated with PHR and *S. aureus* or *E. coli* for 22 hours were added into new culture medium and the inhibition of *S. aureus* was observed

1, 2 ; *S. aureus* culture with supernant of (*S. aureus*+PHR)

3, 4 ; *S. aureus* culture with supernant of (*E. coli*+PHR)

5, 6 ; *S. aureus* culture without supernant

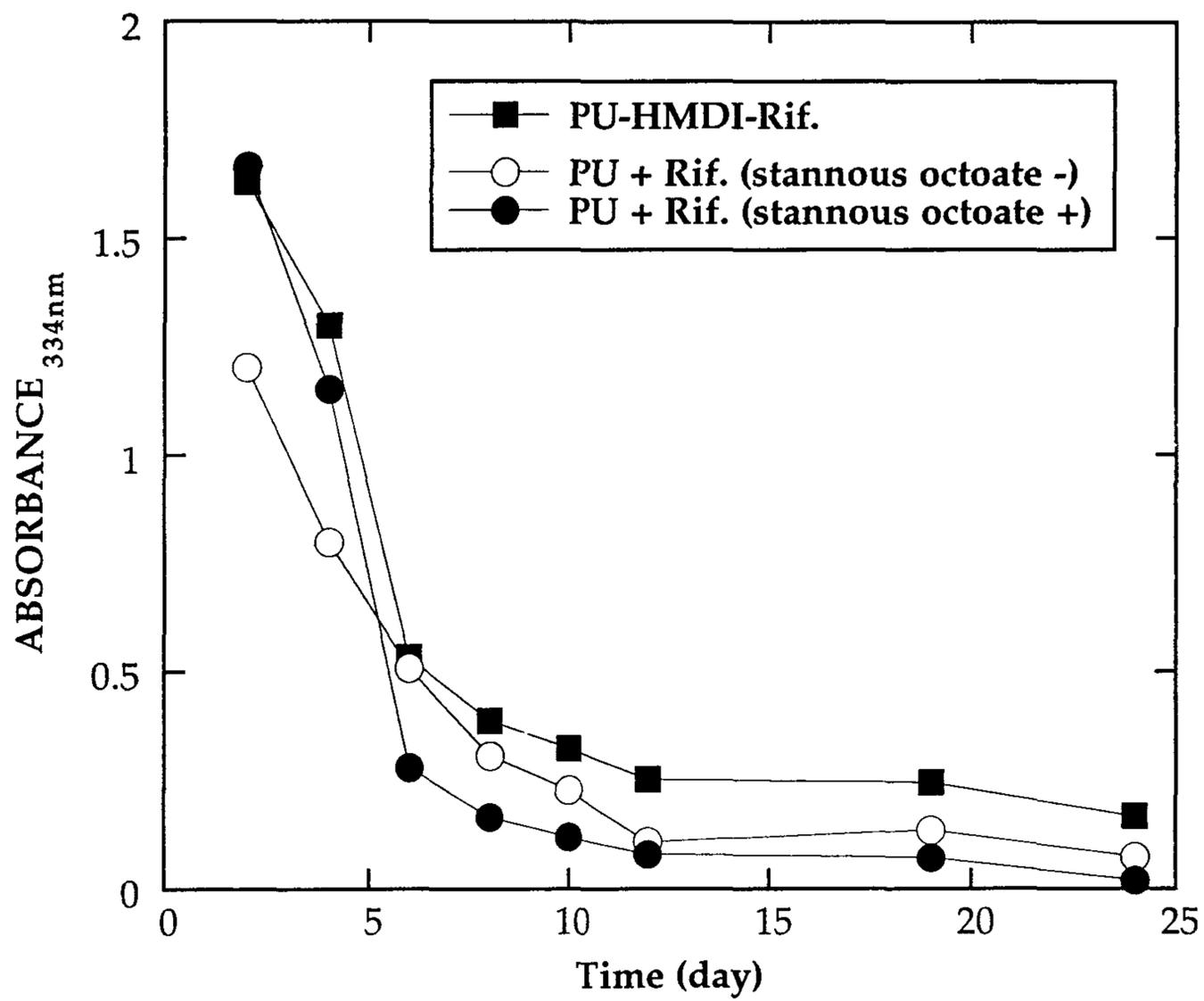


그림 18. Release of Rifampicin from modified polyurethane in CH_2Cl_2

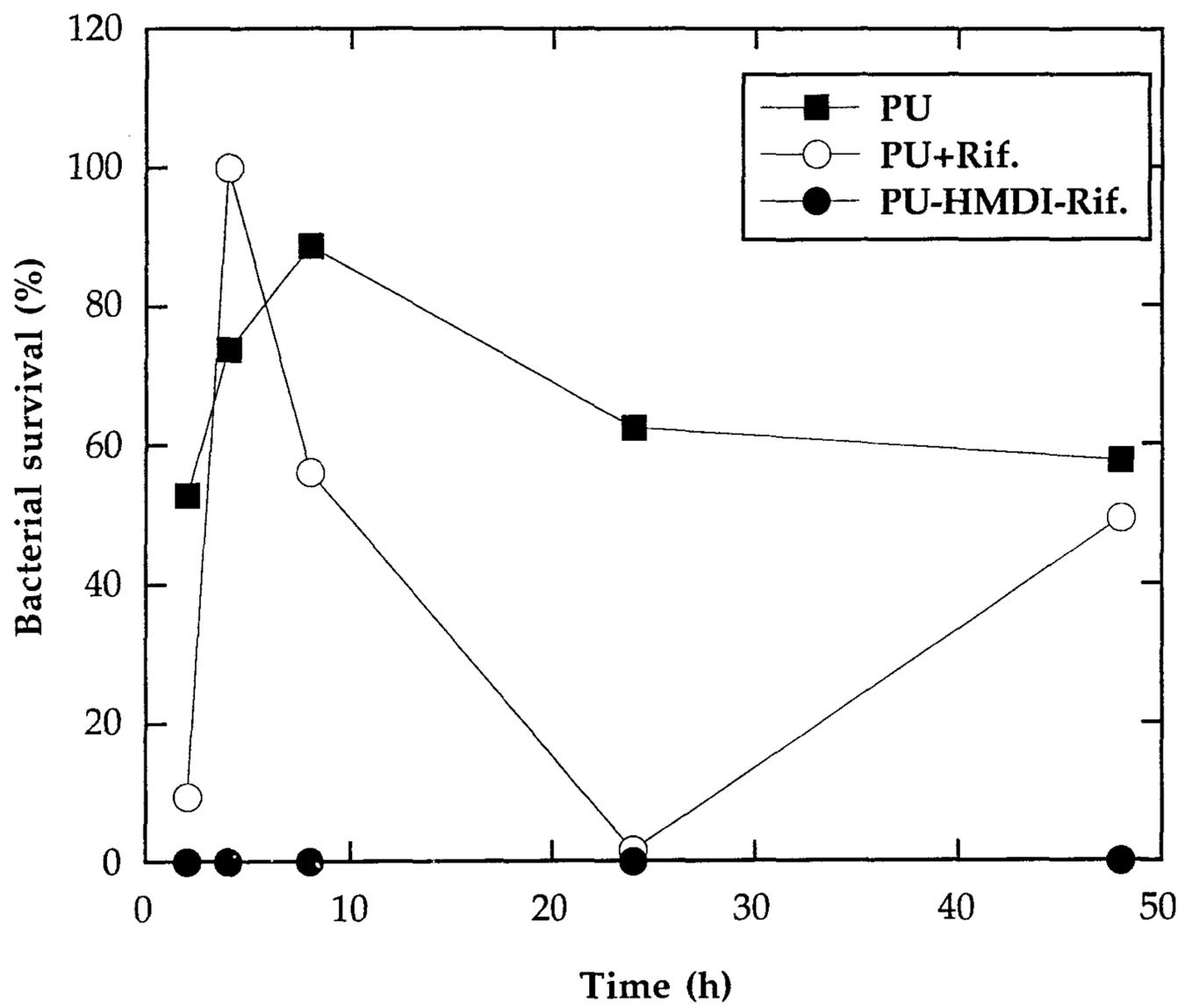


그림 19. PBS washing effects on antimicrobial activity of PHR

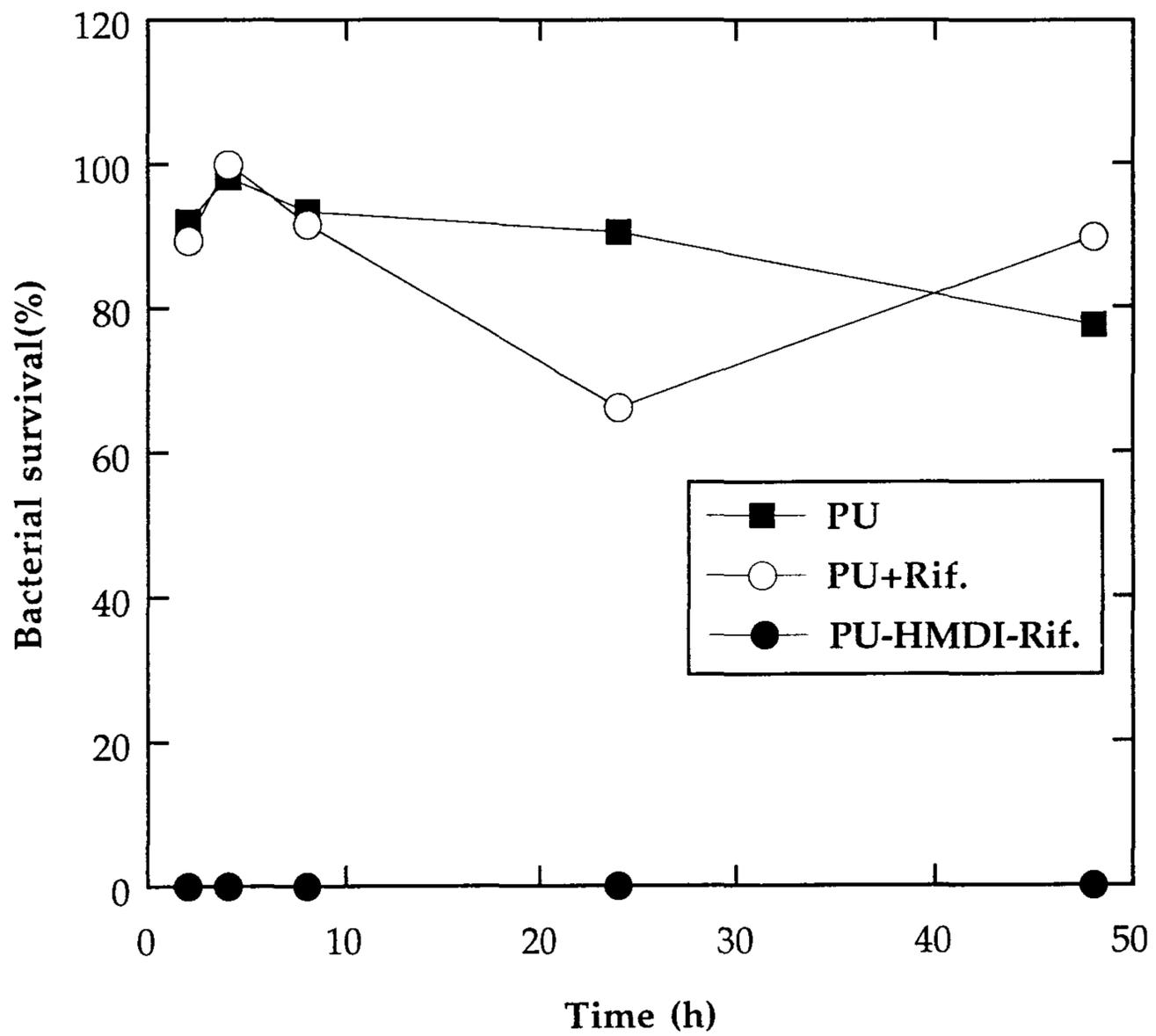


그림 20. Washing effect and inactivation effect of Bovine calf serum on antimicrobial activity of PHR

Adsorbed Fibrinogen
($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

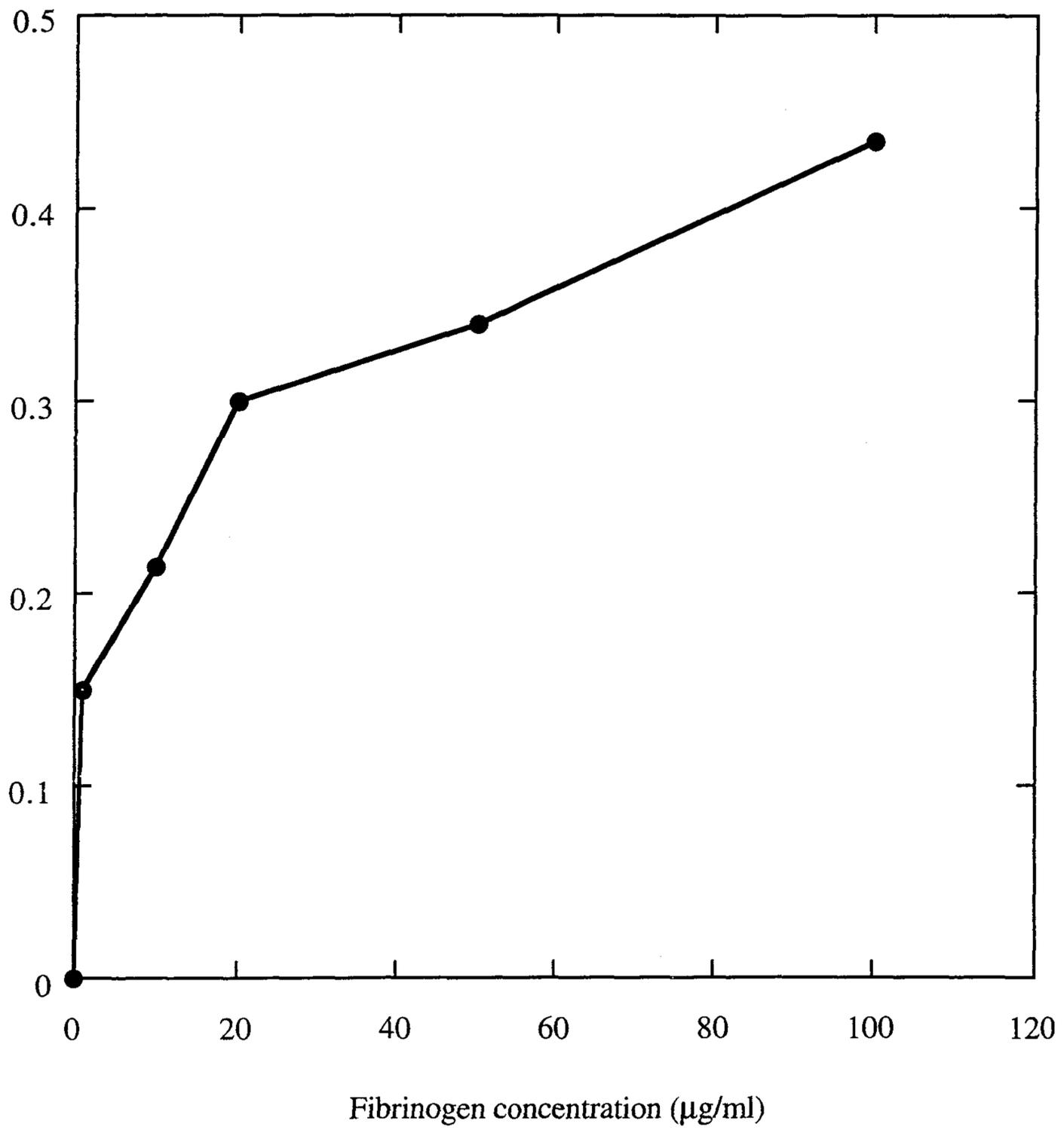


그림 21. Labeled Fibrinogen Adsorption

CPM
(by the use of antibody)

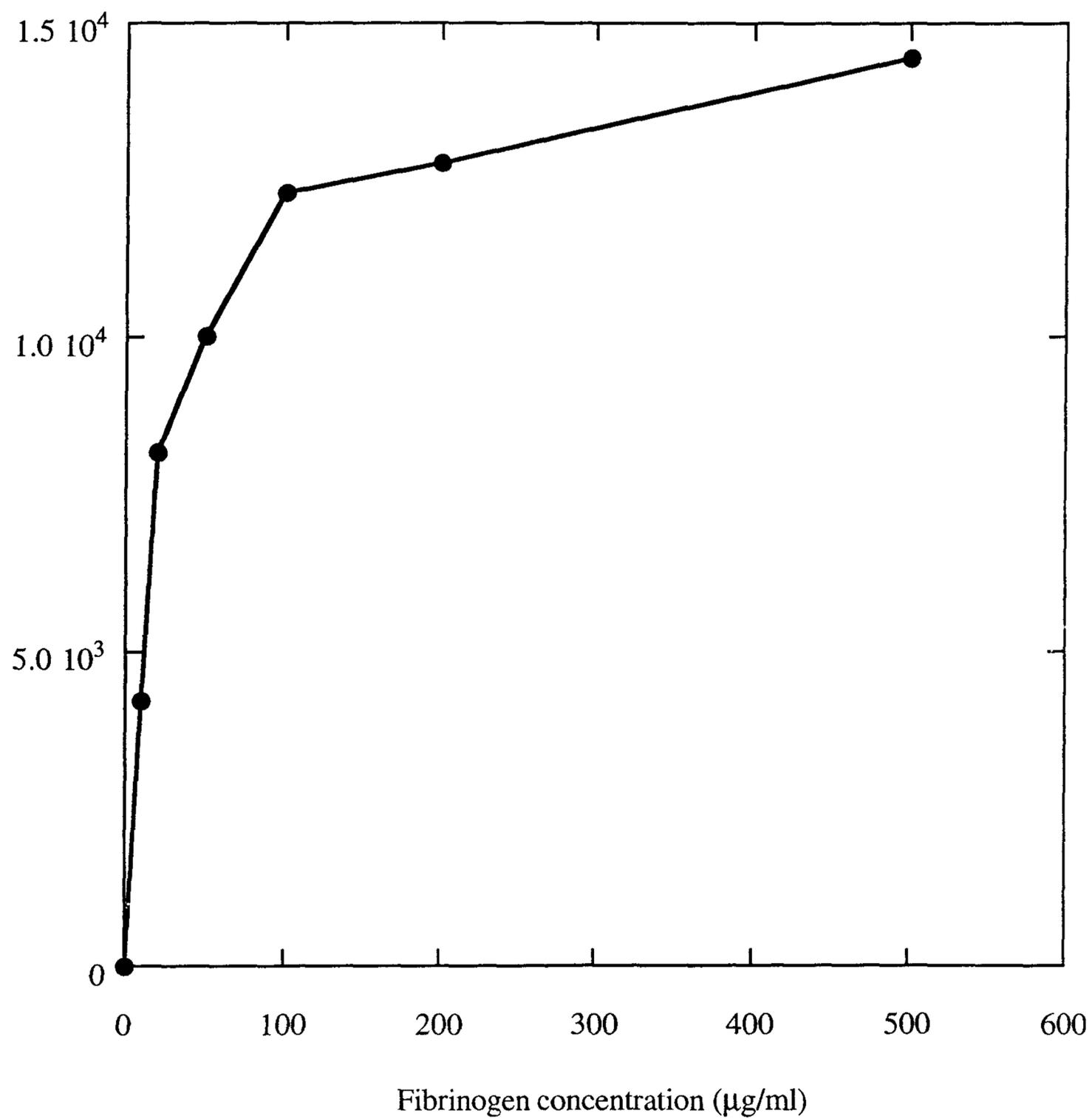


그림 22. Fibrinogen Adsorption by the Isotope-Labeled Antibody

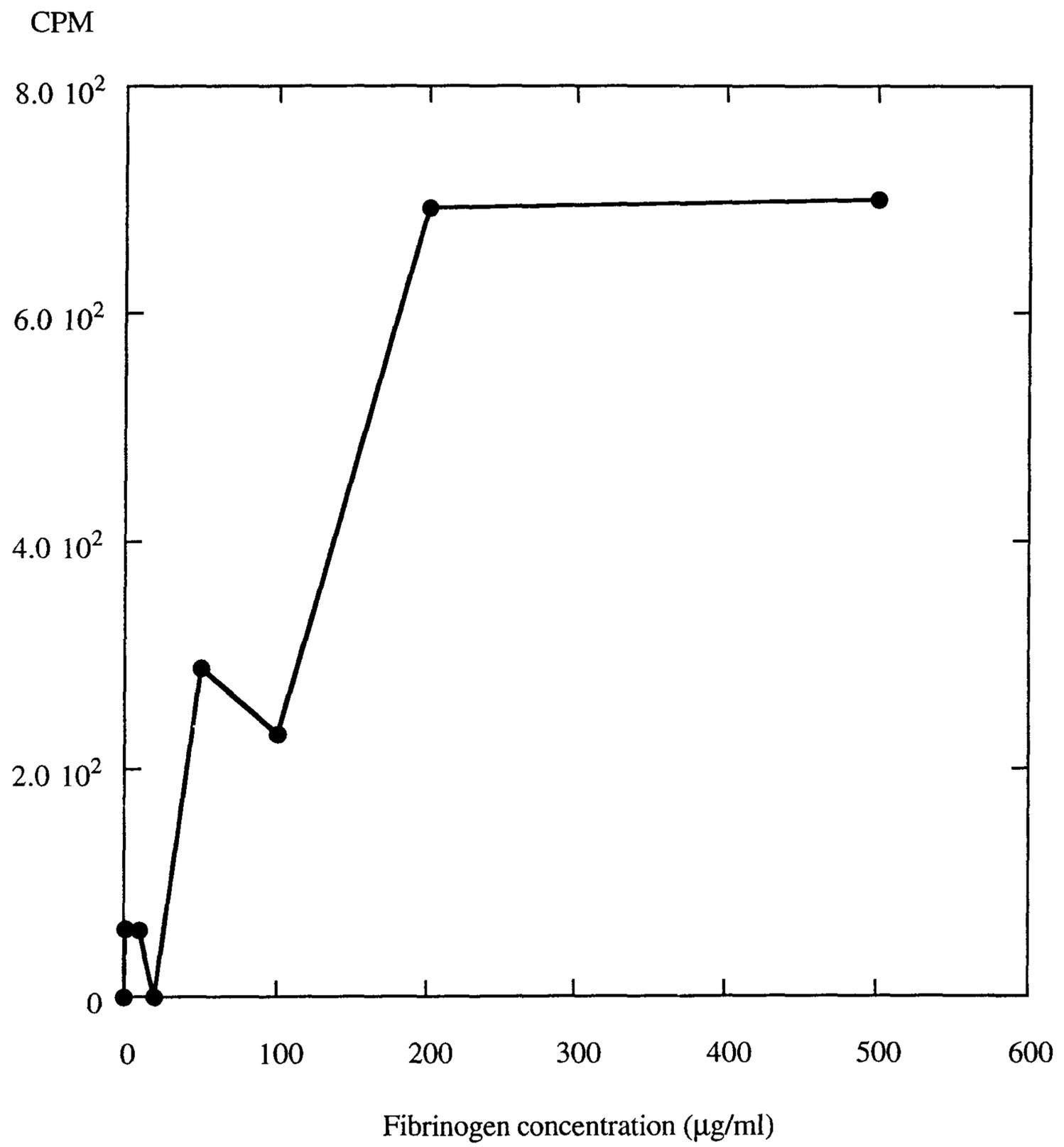


그림 23. 감마체인(400-411)의 원형을 유지하고있는 피브리노겐 분자의 정량

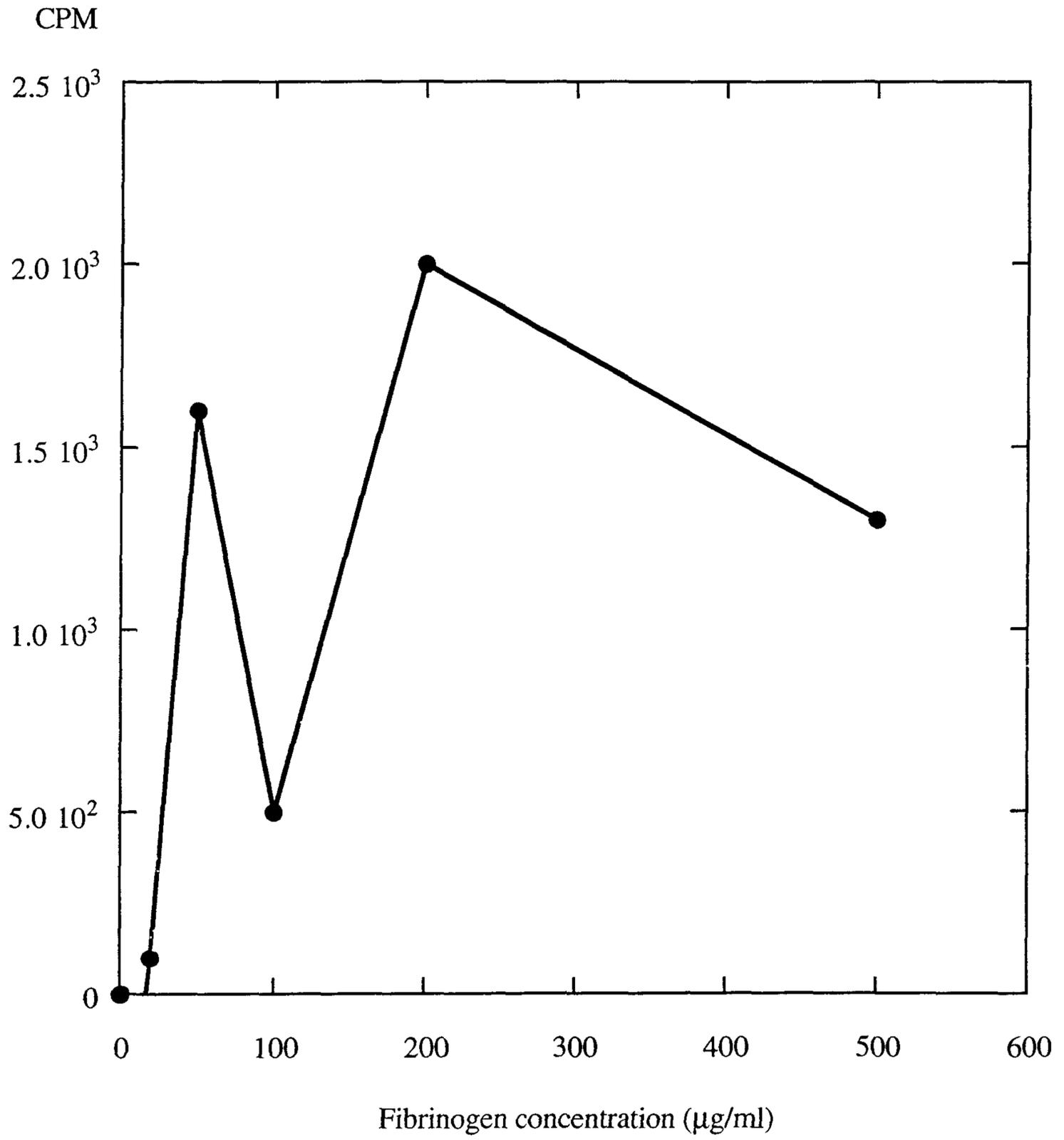


그림 24. 알파체인(87-100)의 원형을 유지하는 피브리노겐의 정량

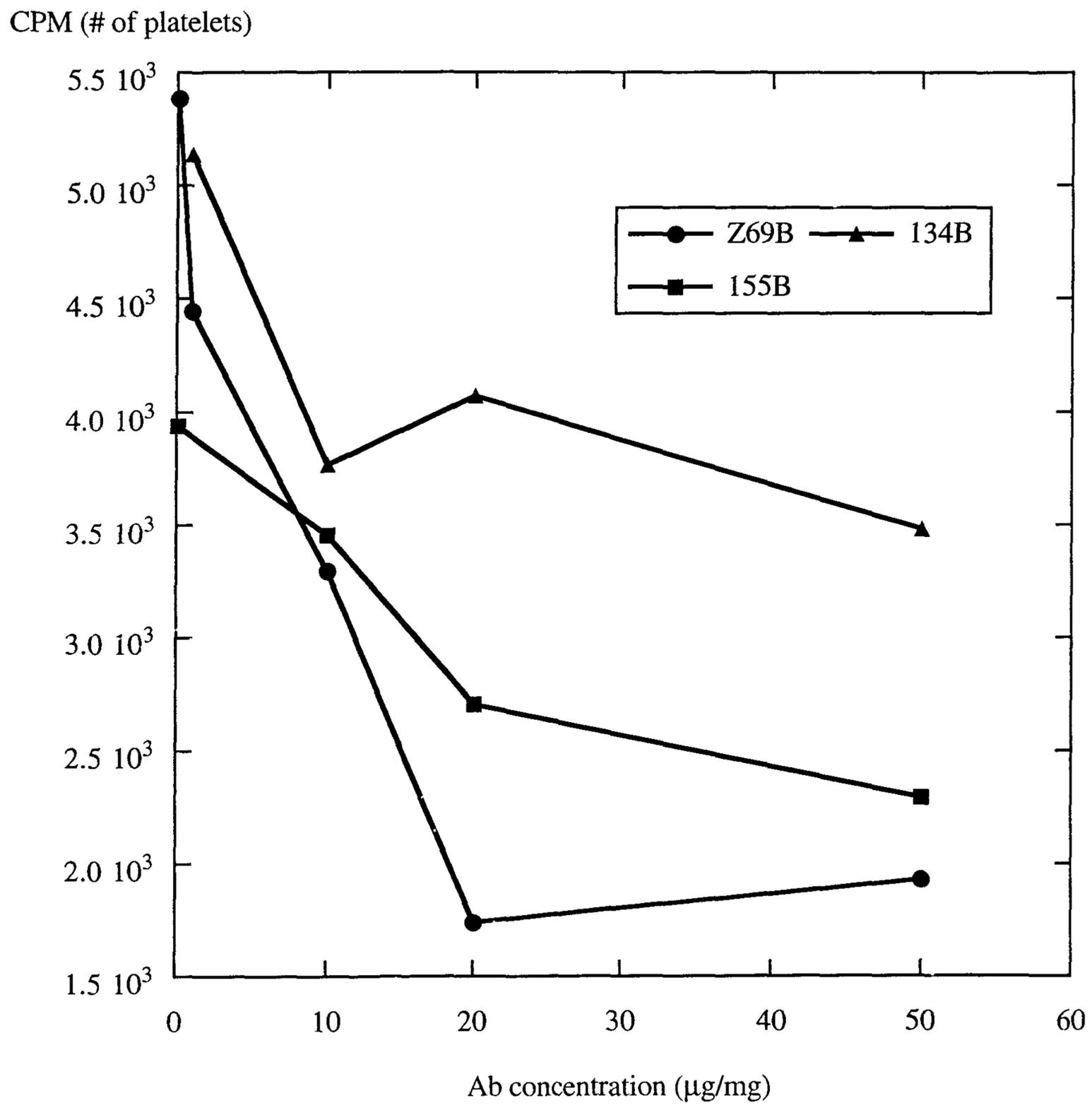


그림 25. 혈소판과 피브리노겐의 반응성 및 항체의 반응 저해성