



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0040764  
(43) 공개일자 2017년04월13일

- |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/> <i>A61L 27/04</i> (2006.01) <i>A61K 6/02</i> (2006.01)<br/> <i>A61K 6/04</i> (2006.01) <i>A61L 27/06</i> (2006.01)<br/> <i>C25D 11/00</i> (2006.01) <i>C25D 3/46</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류<br/> <i>A61L 27/04</i> (2013.01)<br/> <i>A61K 6/0215</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2016-0128187<br/> (22) 출원일자 2016년10월05일<br/> 심사청구일자 2016년10월05일</p> <p>(30) 우선권주장<br/> 1020150139988 2015년10월05일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인<br/> <b>한국과학기술연구원</b><br/> 서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)</p> <p>(72) 발명자<br/> <b>옥명렬</b><br/> 서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)<br/> <b>박지민</b><br/> 서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)<br/> (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인<br/> <b>리앤목특허법인</b></p> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

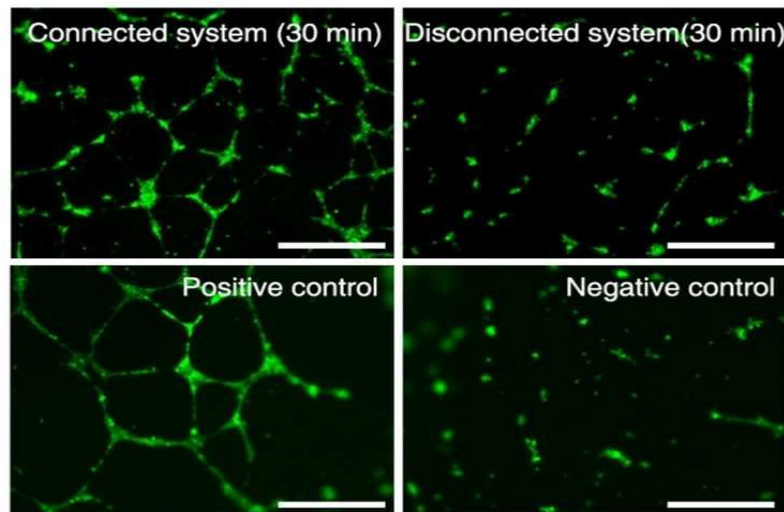
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 **활성 산소 종의 생성에 의해 혈관 신생을 촉진시키는 정형외과 및 치과용 금속 복합체**

**(57) 요약**

활성 산소 종의 생성에 의해 혈관 신생을 촉진시키는 정형외과 및 치과용 금속 복합체, 및 이를 이용한 방법에 관한 것으로, 일 양상에 따른 혈관 신생을 촉진하는 정형외과 및 치과용 금속 복합체 및 이를 이용한 방법에 의하면 활성 산소 종에 의한 혈관 신생을 촉진하여 정형외과 및 치과용 금속 복합체가 사용된 주변 조직의 골막 및 뼈를 효과적으로 재생시키고 치료기간을 단축시킬 수 있다. 상기 금속 복합체는 기존의 의료용 임플란트에 적용시켜 바로 이용 가능하다.

**대 표 도** - 도5b



(52) CPC특허분류

*A61K 6/0235* (2013.01)

*A61K 6/046* (2013.01)

*A61L 27/047* (2013.01)

*A61L 27/06* (2013.01)

*C25D 11/00* (2013.01)

*C25D 3/46* (2013.01)

(72) 발명자

**김유찬**

서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)

**전호정**

서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)

**석현광**

서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)

**한형섭**

서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)

**전진경**

서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)

**박종웅**

서울특별시 강남구 개포로109길 69, 104동 1901호  
(개포동, LG자이아파트)

**이지옥**

서울특별시 도봉구 노해로70길 19, 1904동 610호  
(창동, 주공19단지아파트)

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

제1 금속을 포함하는 양극(anode); 및

제2 금속 층을 포함하는 상기 양극과 전기적으로 연결되는 음극(cathode)을 포함하고,

상기 제2 금속 층의 금속은 제1 금속보다 이온화 경향이 작은 금속 복합체.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 음극은 산소 환원 반응을 발생시켜, 활성 산소 종(reactive oxygen species: ROS)을 생성시키는 음극 전위를 갖는 금속 복합체.

#### 청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 생성되는 활성 산소 종의 발생 속도는  $5 \text{ pmol/h/mm}^2$  내지  $1000 \text{ pmol/h/mm}^2$ 인 금속 복합체.

#### 청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 음극은 산화 제2 금속 층을 추가로 포함하는 금속 복합체.

#### 청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 산화 제2 금속 층의 두께는 20 nm 내지 10  $\mu\text{m}$ 인 금속 복합체.

#### 청구항 6

청구항 4에 있어서, 상기 음극은 서로 다른 부위에 위치한 두께가 서로 다른 산화 제2 금속 층을 포함하는 금속 복합체.

#### 청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 음극은 Au 층을 더 포함하고, 상기 Au 층의 두께는 1.5 nm 내지 25 nm인 금속 복합체.

#### 청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 제1 금속은 Mg 또는 그의 합금, 또는 Zn 또는 그의 합금인 금속 복합체.

#### 청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 제2 금속은 Ti 또는 그의 합금, 스테인리스강 또는 그의 합금, 코발트-크롬 합금을 포함하는 코발트 합금, 니켈-티타늄 합금 또는 Au, Ag, Pt, Pd 또는 이들의 합금 또는 그에 준하는 금속인 것인 금속 복합체.

#### 청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 양극은 음극 내부에 통합된 형태로서 연결된 금속 복합체.

#### 청구항 11

제1 금속을 포함하는 양극; 및

제1 금속보다 이온화 경향이 작은 제2 금속 층을 포함하는 음극을 전기적으로 연결하여 음극에서 활성 산소 종의 생성을 촉진시키는 방법.

## 청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 음극은 산화 제2 금속 층을 더 포함하는 것인 방법.

## 청구항 13

청구항 12에 있어서, 상기 산화 제2 금속 층의 두께는 20 nm 내지 10  $\mu$ m인 것인 방법.

## 청구항 14

청구항 12에 있어서, 상기 음극은 서로 다른 부위에 두께가 서로 다른 산화 제2 금속 층을 포함하는 것인 방법.

## 청구항 15

청구항 11에 있어서, 상기 음극에 Au 층을 형성시키는 단계를 더 포함하는 것인 방법.

## 청구항 16

청구항 15에 있어서, 상기 Au 층의 두께는 1.5 nm 내지 25 nm인 것인 방법.

## 청구항 17

청구항 11에 있어서, 상기 음극은 질화물 또는 다른 코팅 층을 더 포함하는 방법.

## 청구항 18

제1 금속을 포함하는 양극을 제조하는 단계;

제2 금속을 포함하는 음극을 제조하는 단계; 및

상기 양극 및 음극을 전기적으로 연결하는 단계를 포함하고, 상기 연결하는 단계는 상기 음극 내부에 상기 양극이 통합된 형태로 연결시키는, 금속 복합체를 제조하는 방법.

## 청구항 19

청구항 18에 있어서, 상기 제2 금속을 산화시켜 산화 제2 금속 층을 형성시키는 단계를 추가로 포함하고, 상기 산화 제2 금속 층은 두께가 20 nm 내지 10  $\mu$ m인 방법.

## 청구항 20

청구항 19에 있어서, 상기 산화 제2 금속 층에 Au 층을 형성시키는 단계를 더 포함하고, 상기 Au 층은 두께가 1.5 nm 내지 25 nm인 방법.

## 청구항 21

청구항 20에 있어서, 상기 산화 제2 금속 층을 형성시키는 단계는, 두께가 서로 다른 별개의 산화 제2 금속 층을 서로 다른 부위에 형성시키는 단계인 것인 방법.

## 발명의 설명

## 기술 분야

[0001]

활성 산소 종의 생성에 의해 혈관 신생을 촉진시키는 정형외과 및 치과용 금속 복합체, 및 이를 이용한 방법에 관한 것이다.

## 배경 기술

[0002]

골절 등의 치료를 위해 정형외과적으로 금속판 등이 사용되는 경우 필연적으로 골막 손상 및 소실이 발생하게 된다. 이러한 골막 손상 등은 골절부 불유합, 금속 파괴 및 골수염의 원인이 된다. 따라서 골 유합 과정에서의 골막의 재생 및 보존은 골절 치료의 핵심요소 중 하나이다. 골막을 최대한 보존하기 위한 다양한 수술 기법이 개발되었지만, 제한적인 골절 형태 및 부위에만 적용이 가능하였다.

[0003] 한편, 활성 산소 종(reactive oxygen species: ROS)의 다양한 생리학적 기전에 대한 연구가 진행되어, ROS의 혈관 신생을 촉진하는 효과가 밝혀졌다. 그러나, 기존의 ROS를 생성시키기 위한 기술들은 ROS 생산을 위해 빛 또는 전기 에너지와 같은 외부의 에너지 공급이 필요하였고, 과도한 ROS의 생산은 오히려 세포의 사멸을 초래하여, ROS 생산 시스템을 생체 내에 적용하는데에 어려움이 있었다.

[0004] 이에 본 발명자들은, 외부의 에너지 공급 없이 자연적으로 ROS를 발생시키는 금속 복합체를 발명하였고, 상기 금속 복합체가 주변 조직의 혈관 신생을 촉진하여 골막 및 골 재생에 효과적임을 입증하여, 본 발명의 금속 복합체가 정형외과용 금속 복합체로서 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다. 또한, 치과에서 손실된 치아를 수복하는 치과용 임플란트에도 본 발명의 금속복합체가 동일한 기전으로 사용될 수 있다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0005] 일 양상은 혈관 신생을 촉진하는 정형외과 및 치과용 금속 복합체를 제공한다.

[0006] 다른 양상은 금속 복합체를 이용하여 활성 산소 종을 발생시키는 방법을 제공한다.

[0007] 다른 양상은 혈관 신생을 촉진하는 정형외과 및 치과용 금속 복합체를 제조하는 방법을 제공한다.

### 과제의 해결 수단

[0008] 일 양상은 혈관 신생을 촉진하는 금속 복합체를 제공한다.

[0009] 상기 금속 복합체는,

[0010] 제1 금속을 포함하는 양극(anode); 및

[0011] 제2 금속 층을 포함하는 상기 양극과 전기적으로 연결되는 음극(cathode)을 포함할 수 있다.

[0012] 상기 금속 복합체는 정형외과 및 치과용으로 신체에 삽입되는 것일 수 있다.

[0013] 상기 금속 복합체는 신체에 삽입되어 체액, 혈액, 림프액, 조직액, 체액, 세포 내액, 또는 세포 외액과 접촉하는 것일 수 있다.

[0014] 용어 "혈관 신생(angiogenesis)"은 세포에 산소 및 영양분을 공급하기 위해 기존 혈관으로부터 새로운 혈관을 생성하는 기작을 의미할 수 있다.

[0015] 용어 "양극(anode)"은 음극에 비하여 높은 전위를 가지고 산화 반응으로 전자를 생성하여 음극에 전자를 빼앗기는 전극을 의미할 수 있다.

[0016] 용어 "음극(cathode)"은 양극에 비하여 낮은 전위를 가지고 양극의 전자를 흡수하여 환원 반응이 일어나는 전극을 의미할 수 있다. 상기 음극은  $-0.2 \text{ V vs. Ag/AgCl}$  이하의 전압,  $1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  이상의 전류 밀도 조건하에 산소환원반응(Oxygen reduction reaction, ORR)을 통하여, ROS를 생성시키거나, 또는 생성을 촉진시키는 것일 수 있다. 상기 ROS가 생성되는 장소는 체액, 혈액, 림프액, 조직액, 체액, 세포 내액, 또는 세포 외액, 또는 전해질 용액일 수 있다.

[0017] 상기 "전기적으로 연결"된 것은 각 전극 사이에 전자가 이동할 수 있도록 연결된 것을 의미하여, 직접적인 전극 간의 접촉 및 전도체 등을 통한 간접적인 연결을 모두 포함한다.

[0018] 상기 제1 금속은 Mg, Al, Co, K, Na, Ca, Fe, Si, Ti, V, Sn, Zn, Li, Sr, Ba, Nb, Ta, W, Co, Ni, Cu, Ag, Bi, Se, Ge, Ga, B, Be, As, Zr 또는 이들의 합금, 또는 이들에 준하는 금속을 포함할 수 있다.

[0019] 상기 제2 금속은 티타늄 및 티타늄 합금, 스테인리스강을 비롯한 철강 합금, 코발트 및 코발트-크롬 합금을 포함하는 코발트 합금, 니켈-티타늄 합금, 귀금속 (Au, Ag, Pt, Pd) 또는 이들의 합금, 또는 이들에 준하는 금속을 포함할 수 있다.

[0020] 상기 제2 금속은 제1 금속보다 이온화 경향이 작은 것일 수 있다.

[0021] 상기 음극은 산화 제2 금속 층을 더 포함하는 것일 수 있다. 상기 음극은 산화 제2 금속 층 이외에도 질화물 또는 다른 촉매 코팅 층을 더 포함하는 것일 수 있다.

- [0022] 상기 산화 금속 층의 형성 방법은 양극 처리(anodizing), 열처리 (Thermal processing), 산소 플라즈마 처리 (oxygen-plasma treatment), 그리고 아크 산화(micro arc oxidation)/플라즈마 전해산화(plasma electrolytic oxidation) 를 포함할 수 있다.
- [0023] 상기 "양극 처리"는 금속을 전해질 용액 중에서 양극에 놓고 전기를 통하게 하면, 금속의 양극에 전기적 인력으로 산소 음이온을 이동시키고 이들이 금속 표면을 산화시켜 표면에 산화 금속 층을 생성시키는 것을 의미할 수 있다. 이로서, 상기 금속은 내식, 내마모, 발색, 염색, 및 전기 절연 등의 효과를 가질 수 있다. 양극 처리로 인해 생성된 산화 금속 층은 ORR의 촉매이지만 필요 이상으로 두꺼워질 경우 전자의 이동을 방해하므로, 이의 두께에 따라 상기 금속 복합체의 음극에서의 ORR 반응이 조절될 수 있다.
- [0024] 상기 제1 금속 및 제2 금속은 표면에 코팅층을 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 코팅층은 코팅 원소의 옥사이드, 하이드록사이드, 코팅 원소의 옥시하이드록사이드, 코팅 원소의 옥시카보네이트, 또는 코팅 원소의 하이드록시카보네이트의 코팅 원소 화합물을 포함할 수 있다. 상기 코팅층을 이루는 화합물은 비정질 또는 결정질일 수 있다. 상기 코팅층에 포함되는 코팅 원소로는 Mg, Al, Co, K, Na, Ca, Fe, Si, Ti, V, Sn, Zn, Li, Sr, Ba, Nb, Ta, W, Co, Ni, Cu, Ag, Bi, Se, Ge, Ga, B, Be, As, Zr 또는 이들의 합금을 사용할 수 있다. 또한, 상기 제1 금속 및 제2 금속은 상기 화학식들로 표시되며 코팅층이 없는 상기 제1 금속 및 제2 금속과 상기 화학식들로 표시되며 코팅층을 추가적으로 포함하는 제1 금속 및 제2 금속의 합금을 포함할 수 있다.
- [0025] 상기 금속 복합체는 외부의 에너지 공급 없이 활성 산소 종을 생성시키는 것인 금속 복합체일 수 있다.
- [0026] 상기 "외부의 에너지 공급"은 외부로부터 빛, 전압, 및 전류와 같이 전자의 방출을 유도할 수 있는 에너지의 공급을 의미할 수 있다.
- [0027] "활성 산소 종(reactive oxygen species: ROS)"은 산소 원자를 포함하는 화학적으로 활성화 상태에 있는 분자를 의미하며,  $\cdot O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $O\cdot$ ,  $\cdot OH$ , 및  $\cdot O_2H$ 를 포함할 수 있다.
- [0028] 상기 금속 복합체의 음극으로부터 생성되는 활성 산소 종의 단위 시간당(1시간) 발생 속도는 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15  $\mu M/h$  이상일 수 있고, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 45, 40, 35, 30, 25, 24, 23, 22, 21, 20  $\mu M/h$  이하일 수 있다.
- [0029] 상기 금속 복합체의 음극으로부터 생성되는 활성 산소 종의 단위 시간당(1시간) 발생 분자 수는 2, 5, 10, 20, 30 nmol 이상일 수 있고, 200, 180, 160, 140, 120, 100, 80, 60, 40, 30 nmol 이하일 수 있다.
- [0030] 상기 금속 복합체의 음극으로부터 생성되는 활성 산소 종의 단위 시간당(1시간) 발생 분자 수는 단위 면적(1 mm<sup>2</sup>)당 5, 10, 20, 30, 40, 50 pmol 이상일 수 있고, 1000, 800, 600, 400, 200, 100, 80, 60 pmol 이하일 수 있다.
- [0031] 상기 금속 복합체의 음극으로부터 생성되는 활성 산소 종은 그 주변의 활성 산소 종의 농도를 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15  $\mu M$  이상으로 유지시킬 수 있는 속도, 또는 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 45, 40, 35, 30, 25, 24, 23, 22, 21, 20  $\mu M/h$  이하로 유지시킬 수 있는 속도로 생성되는 것일 수 있다.
- [0032] 일 구체예에서, 일정한 농도의 활성 산소 종은 주변 세포의 혈관 신생을 촉진하여 골막 및 골 주변 조직의 재생에 효과적임을 확인하였다. 이러한 활성 산소 종의 농도는 활성 산소 종의 발생 속도와 금속 복합체 주변의 세포의 상태, 질병의 종류, 질병의 진행 정도, 환자의 성별, 연령, 체중, 인종 등에 따라 달라질 수 있다.
- [0033] 상기 산화 제2 금속 층의 두께는 1, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 nm 이상일 수 있고, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 180, 160, 140, 120, 100, 90, 80, 70, 60, 50 nm 이하, 또는 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1  $\mu m$  이하 일 수 있다.
- [0034] 상기 산화 제2 금속 층은 음극의 서로 다른 부위에 2개 이상 형성될 수 있다. 상기 서로 다른 부위에 형성된 산화 제2 금속 층은 서로 다른 두께를 갖는 것일 수 있다. 서로 다른 두께를 갖는 산화 제2 금속 층은 서로 다른 농도의 활성 산소 종을 생성시키므로, 음극의 부위에 따라 생성되는 활성 산소 종의 양을 조절할 수 있다.
- [0035] 상기 음극은 산화 제2 금속 층상에 형성된 촉매 금속 층을 더 포함할 수 있다.
- [0036] 상기 촉매 금속은 Au, Mg, Al, Co, K, Na, Ca, Fe, Si, Ti, V, Sn, Zn, Li, Sr, Ba, Nb, Ta, W, Co, Ni, Cu, Ag, Bi, Se, Ge, Ga, B, Be, As, Zr 또는 이들의 합금을 포함할 수 있다.

- [0037] 상기 촉매 금속층의 형성 방법은 스퍼터링에 의한 증착, 이온 환원을 통한 흡착, 나노입자의 스핀 코팅(spin coating) 및 드랍 캐스팅(drop-casting)을 포함할 수 있다.
- [0038] 상기 "스퍼터링"은 진공 증착법의 일종으로, 낮은 진공도에서 플라스마를 발생시켜 이온화된 아르곤 등의 기체가 Au등의 금속과 충돌하여 그 금속 입자를 튕겨나오게 하고, 튕겨나온 금속 입자는 코팅될 기판 등에 다시 충돌하여 클러스터, 입자, 또는 막을 만드는 것을 의미할 수 있다. 상기와 같이 생성된 막을 박막이라고 한다. 상기와 같이 형성된 클러스터, 입자 또는 막은 양극으로부터 방출되는 전자를 흡수하여 음극에서의 환원 반응을 저해할 수 있으므로, 상기 박막 층의 두께 조절을 통해 음극에서의 ORR 반응이 조절될 수 있다.
- [0039] 상기 촉매 금속 층의 두께는 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0 nm 이상일 수 있고, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 24, 23, 22, 21, 20 nm 이하일 수 있다.
- [0040] 상기 촉매 금속 층은 음극의 서로 다른 부위에 2개 이상 형성될 수 있다. 상기 서로 다른 부위에 형성된 Au 층은 서로 다른 두께를 갖는 것일 수 있다. 서로 다른 두께를 갖는 촉매 금속 층은 서로 다른 농도의 활성 산소종을 생성시키므로, 음극의 부위에 따라 생성되는 활성 산소 종의 양을 조절할 수 있다.
- [0041] 다른 양상은 금속 복합체를 이용하여 활성 산소 종을 발생시키는 방법을 제공한다.
- [0042] 상기 방법은,
- [0043] 제1 금속을 포함하는 양극 및 제1 금속보다 이온화 경향이 작은 제2 금속을 포함하는 음극을 전기적으로 연결하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0044] 이온화 경향이 서로 다른 금속을 연결하는 경우, 이온화 경향이 높은 금속에서 산화 반응으로 인해 발생한 전자가 이온화 경향이 낮은 금속으로 이동하여 환원 반응에 이용될 수 있다. 따라서 상기 환원 반응에 의해 산소가 환원되어 활성 산소 종이 생성될 수 있다.
- [0045] 상기 방법에서, 최초 Mg의 부피 및 부식속도를 고려하면 활성 산소 종은 금속의 연결 직후부터 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30분 이상, 또는 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 7시간, 9시간, 12시간, 24시간, 36시간, 48시간, 60시간, 72시간, 100시간, 200시간, 300시간, 400시간, 500시간, 600시간, 700시간, 800시간, 900시간, 1000시간 이상, 또는 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 14일 이상, 또는 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주, 11주, 12주 이상, 또는 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월 이상의 시간 동안 생성될 수 있다. 이는 손상부의 초기 재생 단계에 작용하는 본 발명의 특성을 고려할 때 혈관 형성 및 이를 통한 조직 재생 유도에 충분한 시간이다.
- [0046] 활성 산소 종의 생성 시간의 조절에 따라 음극 주변의 활성 산소의 농도를 조절할 수 있다.
- [0047] 상기 촉진하는 방법에서 언급된 용어 또는 요소 중 상기 금속 복합체에 대한 설명에서 이미 언급된 것은 그와 같은 것으로 이해된다.
- [0048] 다른 양상은 혈관 신생을 촉진하는 정형외과 및 치과용 금속 복합체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0049] 상기 방법은,
- [0050] 제1 금속을 포함하는 양극을 제조하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0051] 제2 금속을 포함하는 음극을 제조하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0052] 상기 제2 금속을 산화시켜 산화 제2 금속 층을 형성시키는 단계를 포함할 수 있다.
- [0053] 상기 산화 제2 금속 층에 촉매 금속 층을 형성시키는 단계를 포함할 수 있다.
- [0054] 상기 양극 및 음극을 전기적으로 연결하는 단계를 포함할 수 있다
- [0055] 상기 제조하는 방법에서 언급된 용어 또는 요소 중 상기 금속 복합체 또는 촉진하는 방법에 대한 설명에서 이미 언급된 것은 그와 같은 것으로 이해된다.

### 발명의 효과

- [0056] 일 양상에 따른 혈관 신생을 촉진하는 정형외과 및 치과용 금속 복합체 및 이를 이용한 방법에 의하면 활성 산



소 중에 의한 혈관 신생을 촉진하여 정형외과 및 치과용 금속 복합체가 사용된 주변 조직의 골막 및 뼈를 효과적으로 재생시키고, 치료시간을 단축시킬 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0057]

도 1a는 집속 이온 빔(focused ion beam)으로 제작된 Ti/TiO<sub>2</sub>/Au 플레이트의 TEM 이미지이다.

도 1b는 Ti/TiO<sub>2</sub>/Au 플레이트의 각 층의 HR-TEM 이미지 및 고속 푸리에 변환이미지이다.

도 1c는 Au, TiO<sub>2</sub>, 및 Ti 영역의 구면 수차 보정 STEM 모드에서의 점 EDX 스펙트럼을 나타낸다.

도 1d는 Ti/TiO<sub>2</sub>/Au층의 단면의 구면 수차 보정 STEM 이미지와 그 일부분을 확대한 점 EDX 분석 결과를 나타낸다.

도 1e는 XPS, 및 도 1f는 원자력 현미경 (atomic force microscopy)으로 측정한 결과를 나타낸다.

도 1f는 Ti/TiO<sub>2</sub>/Au 플레이트 표면의 AFM 이미지를 나타낸다.

도 1g는 Ti/TiO<sub>2</sub>/Au 플레이트의 산소(O), 티타늄(Ti), 및 금(Au) 원자 비율의 XPS 깊이 분석 결과를 나타내는 그래프이다.

도 2a는 각각 O<sub>2</sub>-포화 PBS 버퍼에서 Mg vs. Ag/AgCl, 및 Ti/TiO<sub>2</sub>/Au vs. Ag/AgCl의 전압을 방전 전류 밀도에 대한 함수로서 나타낸 그래프이다.

도 2b는 N<sub>2</sub>-포화 PBS 버퍼에서 Mg vs. Ag/AgCl, 및 Ti/TiO<sub>2</sub>/Au vs. Ag/AgCl의 전압을 방전 전류 밀도에 대한 함수로서 나타낸 그래프이다.

도 2c는 O<sub>2</sub>-포화 PBS 버퍼에서 Ti/TiO<sub>2</sub>/Au vs. Mg 전압을 다양한 방전 전류 밀도에 대한 함수로서 나타낸 그래프이다.

도 3a는 O<sub>2</sub> 및 N<sub>2</sub> 포화 PBS 용액에서 Ti/TiO<sub>2</sub>/Au 플레이트의 CV를 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 3b는 -0.4 V vs. Ag/AgCl 전압을 거는 벌크-전기분해 과정 동안 Ti/TiO<sub>2</sub>/Au 플레이트로부터 생성되는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도 및 패러데이 효과를 나타내는 그래프이다.

도 3c는 O<sub>2</sub>-포화 PBS 버퍼에서, 순환 속도 400, 625, 900, 1225, 및 1600 rpm에서의 Ti/TiO<sub>2</sub>/Au 플레이트의 선형 스윕 전압 전류 곡선을 나타내는 그래프이다.

도 3d는 Ti/TiO<sub>2</sub>/Au 플레이트에 적용된 전압에 대한 함수로서 Koutecky-Levich 그래프를 나타낸다.

도 4a는 EBM-2 배지내에서 Mg와 Ti/TiO<sub>2</sub>/Au가 금속 도관에 의해 연결된 경우(검은색) 및 대조군으로서 연결되지 않은 경우(빨간색)에 생성되는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도를 나타내는 그래프이다.

도 4b는 PBS 버퍼내에서 Mg와 Ti/TiO<sub>2</sub>/Au가 금속 도관에 의해 연결된 경우(검은색) 및 대조군으로서 연결되지 않은 경우(빨간색)에 생성되는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도를 나타내는 그래프이다.

도 5a는 Mg-Ti/TiO<sub>2</sub>/Au 시스템의 혈관 신생에 대한 효과를 측정하는 실험을 나타내는 모식도이다.

도 5b는 Mg 및 Ti/TiO<sub>2</sub>/Au가 금속 도관으로 연결된 또는 분리된 금속 복합체에서 배양된 HUVEC, 및 양성 대조군 및 음성 대조군 세포의 혈관 형성을 나타내는 형광이미지이다.

도 5c는 Mg 및 Ti/TiO<sub>2</sub>/Au가 금속 도관으로 연결된 또는 분리된 금속 복합체에서 배양된 HUVEC, 및 양성 대조군 및 음성 대조군 세포의 단위 면적당 생성된 혈관 가지의 수를 측정한 데이터를 나타내는 그래프이다.

도 5d는 Mg 및 Ti/TiO<sub>2</sub>/Au가 금속 도관으로 연결된 또는 분리된 금속 복합체에서 배양된 HUVEC, 및 양성 대조군 및 음성 대조군의 8시간 및 24시간 배양 후 HUVEC의 DNA 함량을 PicoGreen 분석 방법으로 정량적 분석한 결과를 나타낸다.



도 6은 양성 대조군, 음성 대조군, 및 상대적으로 높은 농도의  $H_2O_2$  100  $\mu M$ 에 30분간 노출된 HUVEC의 배양 후 관형성 정도를 나타내는 이미지이다(스케일 바 = 500  $\mu m$ ).

도 7a는 양극 처리 전위에 따라 다양하게 생성되는 여러  $TiO_2$ 층의 두께에서의 방전 시간에 따른  $H_2O_2$ 의 농도를 DPD/POD로 정량측정한 결과를 나타내고, 도 7b는 방전 시간이 60분일 때, 양극 처리 전위에 따른  $H_2O_2$ 의 농도를 나타낸다.

도 8a는 Au 스퍼터링 시간에 따라 다양하게 형성되는 여러 Au층의 두께에서의 방전 시간에 따른  $H_2O_2$ 의 농도를 DPD/POD로 정량측정한 결과를 나타내고, 도 8b는 스퍼터링 시간이 20초, 및 방전 시간이 60분일 때 금 플라즈마 전류에 따른  $H_2O_2$ 의 농도를 나타낸다.

도 9a는 각각 다른 두께의  $TiO_2$ 층을 갖는 Mg-Ti/ $TiO_2$ /Au 금속 복합체의 모식도이다.

도 9b는 부위별로 다른 두께의  $TiO_2$ 층을 갖는 Mg-Ti/ $TiO_2$ /Au 금속 복합 임플란트의 응용예이다.

도 10a는 Mg-Ti/ $TiO_2$ /Au 금속 복합체를 이용한 임플란트 제조의 모식도를 나타낸다.

도 10b는 Mg-Ti/ $TiO_2$ /Au 금속 복합체를 이용하여 제조된 임플란트의 이미지이다.

도 10c는 Mg-Ti/ $TiO_2$ /Au 금속 복합체를 이용하여 제조된 임플란트를 HUVEC 세포가 포함된 EBM-2 배지에서 함께 배양하는 것을 나타내는 이미지이다.

도 10d는 HUVEC 세포가 Mg-Ti/ $TiO_2$ /Au 금속 복합체를 이용하여 제조된 임플란트 시제품에 접촉한 시간에 따른 단위 면적당 혈관 가지 형성 수를 나타내는 그래프이다.

도 10e는 Mg-Ti/ $TiO_2$ /Au 금속 복합체를 이용하여 제조된 임플란트 시제품에 접촉한 시간에 따른 HUVEC 세포의 혈관 형성을 형광 현미경으로 관찰한 이미지이다.

도 11은 Ti-6Al-4V 코인에 순수 아연 바를 삽입 후 Hanks 용액에 넣어 5일(120시간)간 액침 시험(immersion test)을 실시한 결과를 나타낸다.

도 12는 Ti-6Al-4V 나사에 순수 아연 바를 삽입 후 PBS 버퍼에서 ROS 발생량을 평가한 결과를 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0058] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

#### [0059] 제조예 1. Ti/ $TiO_2$ /Au 음극의 제조

[0060] 마그네슘을 양극(anode), 및 산화 Ti 합금을 음극(cathode)으로 사용하는 산소 환원 반응(Oxygen reduction reaction: ORR)의 촉매능이 향상된 Ti/ $TiO_2$ /Au 금속 복합체를 제조하였다.

[0061] 구체적으로, 1.7 M의 아세트산 내에서 Ti 판(2.0 mm 두께, 99.7% 순도, Sigma Aldrich)에 10V 전압을 30초간 적용하여 양극산화 처리하였다. 이후 마그네트론 스퍼터링 증착 기계를 이용하여 챔버 압력  $2 \times 10^{-6}$  Torr에서 20초간 2 mA의 전류를 흐르게 하고 상기 양극 처리된 Ti에 Au 스퍼터링을 수행하였다. 상업적으로 구매한 Mg(99.9%, Yinguang)을 추가적인 정제 없이 양극 물질로 이용하였다.

#### [0062] 실시예 1. Ti/ $TiO_2$ /Au 금속 복합체의 3층 구조 확인

[0063] 상기 제조예 1에서 제조된 형성된 Ti/ $TiO_2$ /Au 금속장치의 음극의 국부 구조(local structure)를 투과 전자 현미경(TEM)을 이용하여 관찰하였다.

[0064] 구체적으로, 고-해상도 투과 전자 현미경(High-resolution transmission electron microscopy: HR-TEM) 및 구면 수차 보정 주사 투과 전자 현미경(Cs-corrected scanning transmission electron microscopy: STEM)분석이 FEI Titan 80-300 현미경을 300 keV에서 작동시켜 수행되었다. TEM 분석을 위한 Ti/ $TiO_2$ /Au의 단면은 집속-이온

-빔(focused ion beam)(Helios NanoLab 600, FEI)을 사용하여 만들었다. 점 에너지 분산형 X-선(energy dispersive X-ray: EDX) 분석이 구면 수차 보정 STEM 모드(Cs-corrected STEM mode)에서 수행되었고, 3개의 다른 층 영역으로부터의 스펙트럼이 얻어졌다. 방전 후 부식된 Mg의 SEM 이미지는 Quantata 3D FEG(FEI, Netherland)로 얻었다. Ti/TiO<sub>2</sub>/Au 플레이트 표면의 AFM 이미지는 XE-100(Park systems, Korea)의 비-접촉 모드에서 얻었다. 0.4 Hz 스캔 속도의 동작 환경으로 세팅되었다. X-레이 광전자 분광법(X-ray photoelectron spectroscopy: XPS) 스펙트럼을 플레이트 표면에 대하여 통과 에너지(pass energy) 30 eV 및 각 단계 당 0.1 eV씩 조절하여 얻었다. 모든 결합 에너지는 C 1s(284.5 eV)를 기준으로 계산되었다. 플레이트 표면으로부터 80 nm의 깊이의 XPS 깊이 분석은 1 nm 단위의 단계적인 표면 에칭(etching)을 통해 수행되었다.

[0065] 도 1a는 집속 이온 빔으로 제작된 Ti/TiO<sub>2</sub>/Au 플레이트의 TEM 이미지를 나타낸다. Au, TiO<sub>2</sub>, 및 Ti의 3개의 구별되는 영역이 명확하게 관찰되었다. 상기 음극의 가장 상층 표면에 약 3 nm의 Au 클러스터가 무정형의 20 nm 두께 TiO<sub>2</sub> 층에 잘 증착되어 있는 것이 나타났다.

[0066] 도 1b는 상기 3개의 영역의 HR-TEM 이미지 및 이의 고속 푸리에 변환(fast Fourier transforms: FFT)을 나타낸다. Ti 및 Au 부위의 격자 무늬가 하얀색 및 노란색 화살표로 표시되어 있다. Au 클러스터의 격자 간격은 각각 0.230 nm 및 0.205 nm이다.

[0067] 도 1c는 구면 수차 보정 STEM 모드에서의 Au, TiO<sub>2</sub>, 및 Ti 영역의 점 EDX 스펙트럼을 나타낸다. 약 3 nm의 Au 클러스터 부근에서는 Au의 해당 EDX 피크가 발견되었으며, 무정형의 20 nm 두께 TiO<sub>2</sub> 층에는 Ti와 O의 EDX 피크가, 정형 Ti 플레이트에서는 Ti의 EDX 피크가 각각 나타났다. EDX 스펙트럼 상에서 나오는 작은 Cu 피크는 Cu TEM-그리드로 인한 것이다.

[0068] 도 1d는 Ti/TiO<sub>2</sub>/Au층의 단면의 구면 수차 보정 STEM 이미지와 그 일부분을 확대한 점 EDX 분석 결과를 나타낸다. 잘 정렬된 세 층의 구조를 확인할 수 있다.

[0069] 도 1e는 XPS, 및 도 1f는 원자력 현미경(atomic force microscopy)으로 측정한 결과를 나타낸다. 표면 XPS 결과 Au 클러스터의 Au 4d 및 4f 피크가 나타나는 것을 확인하였으며 (도 1e), 원자 현미경 결과에서 나타나는 약 3 nm 높이를 갖는 클러스터는 증착한 Au 클러스터로 기인한다 (도 1f). 또한, 깊이 방향으로 에칭(etching)을 하며 측정한 XPS 결과, 표면에 약 3 nm 크기의 Au 클러스터가 존재하며, 깊이 방향으로 순차적으로 비정형 TiO<sub>2</sub>, 정형 Ti가 있는 것을 확인할 수 있다 (도 1g). 뚜렷한 Au 4d 및 4f 피크와 함께 Ti 상에 잘 증착된 약 3 nm 높이의 Au 클러스터를 확인할 수 있다.

## [0070] 실시예 2. Mg-Ti/TiO<sub>2</sub>/Au 금속 복합체의 전기 화학적 특성 확인

[0071] Mg와 상기 제조예 1에서 제조된 Ti/TiO<sub>2</sub>/Au 금속 복합체 시스템의 전기 화학적 특성이 pH 7.4인 PBS에서 O<sub>2</sub>의 존재 또는 부존재하에서 평가되었다.

[0072] 구체적으로, 3-전극 전기 화학적 전지 시스템을 이용하여 Mg-Ti/TiO<sub>2</sub>/Au 금속 장치 시스템의 전기 화학적 특성을 분석하였다. Ag/AgCl 기준 전극(BASi Ag/AgCl/3M NaCl)이 이용되었다. 전기 화학적 특성은 O<sub>2</sub> 및 N<sub>2</sub> 포화 PBS 버퍼(1X, pH=7.4, Gibco, Life technology)내에서 37°C에서 전위 가변기를 이용하여 분석되었다. 각 버퍼는 고순도의 O<sub>2</sub>(99.999 %) 또는 N<sub>2</sub>(99.999 %)를 적어도 각각의 측정이 시작되기 전 2시간 동안 버블링시켜 각각의 기체로 포화시켰다. 측정이 진행되는 도중에도 O<sub>2</sub> 공급 흐름을 유지시켜 O<sub>2</sub> 포화 상태를 유지하였다. 전극 전위는 하기의 방정식을 이용하여 RHE 스케일로 변환되었다:  $E(\text{NHE}) = E(\text{Ag}/\text{AgCl}) + 0.059 \times \text{pH} + 0.197 \text{ V}$ . O<sub>2</sub> 및 N<sub>2</sub> 포화 PBS 버퍼 내의 Mg vs. Ag/AgCl, Ti/TiO<sub>2</sub>/Au vs. Ag/AgCl, 및 Mg vs. Ti/TiO<sub>2</sub>/Au 전압은 방전 전류 밀도의 함수로서 스캔 속도 0.005 mA/cm<sup>2</sup>s에서 기록되었다. 또한, Mg vs. Ti/TiO<sub>2</sub>/Au의 방전 성능은 2-전극 구성을 이용하여 일정한 방전 전류 밀도(0.05 mA/cm<sup>2</sup>, 0.10 mA/cm<sup>2</sup>, and 0.20 mA/cm<sup>2</sup>)하에서 최대 0.5 mAh 방전 용량까지 측정되었다.

[0073] 도 2a는 각각 O<sub>2</sub>-포화 PBS 버퍼에서 Mg vs. Ag/AgCl, 및 Ti/TiO<sub>2</sub>/Au vs. Ag/AgCl의 전압을 측정하여 방전되는 전류밀도에 대한 함수로서 나타낸 것이다. Mg vs. Ag/AgCl의 전압은 약 -1.5V 로 유지되며 약 1.0 mA/cm<sup>2</sup> 전류가 방전되었다. 상기와 같은 일정한 전압은 지배적인 양극 반응이 Mg가 Mg<sup>2+</sup> 이온으로 산화되는 것임을

나타낸다. 상기 Mg 양극의 전압과는 대조적으로, Ti/TiO<sub>2</sub>/Au vs. Ag/AgCl의 전압은 방전되는 전류 밀도가 0에서 1.0 mA/cm<sup>2</sup>로 증가하는 동안 점차적으로 -0.2V에서 -1.2V까지 떨어지는 것이 관찰되었고, 특히 약 0.6 mA/cm<sup>2</sup>의 전류 밀도에서는 급격한 전압 감소가 나타났다. 상기와 같은 방전 전류 밀도에 따른 전압의 변화는 음극 반응이 전류 밀도의 변화에 따라 변화하였음을 나타낸다. 이와 같은 결과로부터, pH 7.4인 PBS 버퍼 내의 -0.2 V부터 -1.2V(vs. Ag/AgCl)까지의 환원 반응으로 고려될 수 있는 것은 하기와 같다: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 또는 H<sub>2</sub>O로의 산소 환원 반응(0.59V 및 0.065V(vs. Ag/AgCl)), 또는 수소 발생(-0.64 V vs. Ag/AgCl). 상기 3개의 반응의 이론적인 환원 전위에 기초하면, ORR이 낮은 방전 전류에서 주요한 반응이고, 수소 발생 반응은 높은 방전 전류에서 주요한 반응이다. 방전 전류에 따라 감소되는 Ti/TiO<sub>2</sub>/Au vs. Ag/AgCl 전압 때문에, 전체적인 Ti/TiO<sub>2</sub>/Au vs. Mg 전압은 Ti/TiO<sub>2</sub>/Au vs. Ag/AgCl 전압과 유사하게 방전 전류의 증가에 따라 감소한다.

[0074] 도 2b는 N<sub>2</sub>-포화 PBS 버퍼에서 Mg vs. Ag/AgCl, 및 Ti/TiO<sub>2</sub>/Au vs. Ag/AgCl의 전압을 측정하여 방전되는 전류 밀도에 대한 함수로서 나타낸 것이다. O<sub>2</sub> 포화 조건 하에서의 Ti/TiO<sub>2</sub>/Au vs. Ag/AgCl 전압이 전류 밀도 약 0.6mA/cm<sup>2</sup>에서 -1.0 V까지 급격하게 떨어지는 것과는 대조적으로, N<sub>2</sub>-포화 PBS 용액에서의 전압은 상대적으로 낮은 전류밀도인 0.1mA/cm<sup>2</sup>에서 -1.0V까지 떨어지는 것이 관찰되었다. 버퍼 내의 O<sub>2</sub>의 존재 여부에 따라 낮은 전류 밀도 영역에서 전압 값이 달라지는 결과는, 전류가 방전되는 동안 음극에서 ORR이 발생한다는 것을 확실하게 나타낸다. 그러나 방전 전류가 0.6 mA/cm<sup>2</sup> 초과일 때는, 버퍼 내의 O<sub>2</sub>의 존재 여부와는 상관없이 상기 Ti/TiO<sub>2</sub>/Au vs. Ag/AgCl의 전압이 유사한 값을 나타내었다. 결론적으로 높은 방전 전류에서는 수소 발생 반응이 주요 반응을 확인하였다.

[0075] 도 2c는 O<sub>2</sub>-포화 PBS 버퍼 내의 Ti/TiO<sub>2</sub>/Au vs. Mg 전압을 다양한 전류 밀도에 대한 함수로서 나타낸 것이다. 일정하게 방전되는 전류 밀도에서의 전압 프로파일은 O<sub>2</sub>-포화 PBS 버퍼 내에서 전체적인 출력 전압(output voltage)이 0.05 mAh 용량(capacity)까지 유지될 수 있음을 나타낸다. 0.05 mA/cm<sup>2</sup>에서 0.20 mA/cm<sup>2</sup>까지 전류 밀도가 증가하면, 전체적인 출력 전압이 1.35 V에서 0.8 V까지 감소하였다.

[0076] 이러한 결과는 Mg-Ti/TiO<sub>2</sub>/Au 금속 복합체가, 방전 전류 밀도의 조절에 따라서, 즉 시간에 따라 음극에서 자연스럽게 ORR이 발생하도록 조절하는 것이 가능함을 나타낸다.

### [0077] 실시예 3. Ti/TiO<sub>2</sub>/Au에서 ORR이 발생하는 음극 환원 반응의 확인

[0078] Ti/TiO<sub>2</sub>/Au에서의 반응이 어떤 종류의 환원 반응인지 구체적으로 확인하기 위해, 하기와 같은 실험을 진행하였다.

[0079] Ti/TiO<sub>2</sub>/Au 플레이트의 순환 전압 전류(cyclic voltammetry: CV) 곡선을 얻기 위해, Ti/TiO<sub>2</sub>/Au 플레이트, Mg 플레이트 및 Ag/AgCl 전극을 각각 작용 전극, 상대 전극 및 기준 전극으로서 사용하였다. CV 곡선은 O<sub>2</sub> 및 N<sub>2</sub>-포화 PBS 내에서 스캔 속도 5 mV/초로, 0.5 V에서 -0.5 V (vs. Ag/AgCl)까지 기록되었다. 모든 전기 화학적 테스트 전에, 용액 저항(solution resistance)이 측정되었고, 그에 따라 모든 데이터를 iR-보상(iR-compensated)하였다.

[0080] 도 3a는 O<sub>2</sub> 및 N<sub>2</sub> 포화 PBS 용액에서 Ti/TiO<sub>2</sub>/Au 플레이트의 CV 측정 결과를 나타낸다. O<sub>2</sub>-포화 조건하에서, Ti/TiO<sub>2</sub>/Au의 명백한 환원 및 산화 피크가 약 -0.3 V 및 0.1 V (vs. Ag/AgCl)에서 각각 나타났다. 반면 미약한 전류가 N<sub>2</sub>-포화 조건하의 비슷한 전압에서 관찰되었다. 상기와 같은 전기 화학적 양상의 차이는 버퍼 내의 O<sub>2</sub>의 존재에 의존적인 것이며, Ti/TiO<sub>2</sub>/Au에서 ORR이 발생한다는 것을 더욱 명백히 확인할 수 있었다.

### [0081] 실시예 4. Mg-Ti/TiO<sub>2</sub>/Au 금속 복합체에서 외부 전압의 공급 없이도 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 발생되는지 여부의 확인

[0082] Mg-Ti/TiO<sub>2</sub>/Au 금속 복합체에 어떠한 외부의 전압 또는 전류의 공급 없이도 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 생성되는지 여부를 확인하였다. 구체적으로 약 230 mm<sup>2</sup>의 표면적을 갖는 상기 Mg-Ti/TiO<sub>2</sub>/Au 금속 복합체를 2 ml 부피의 EBM-2 배지 또는

PBS 버퍼에 넣고 생성되는  $H_2O_2$ 의 양을 측정하였다.

[0083] 도 4a 및 4b는 Mg와 Ti/TiO<sub>2</sub>/Au가 금속 도관에 의해 연결된 경우(검은색) 및 대조군으로서 연결되지 않은 경우(빨간색)에 생성되는  $H_2O_2$ 의 농도를 나타내는 것으로, 도 4a는 EBM-2 배지(endothelial growth basal medium), 및 도 4b는 PBS 버퍼내에서 실험한 결과를 나타낸다. 상기 실험은 외부의 전압원 없이 실시되었으며, 양극 및 음극이 금속 도관으로 연결된 후, DPD-POD 방법으로  $H_2O_2$  생성량을 결정하였다.

[0084] 도 4a에서 볼 수 있듯이, 시간이 지날수록 금속 도관에 의해 연결된 금속 복합체로부터의  $H_2O_2$  생성량이 증가하였으며, 30분 후 17  $\mu$ M에 도달하였다. 반면 30분 후 대조군에서의  $H_2O_2$ 의 생성량은 거의 무시할만한 수준(<5  $\mu$ M)이었다. 대조군에서의  $H_2O_2$ 의 생성은 자연적인 Mg의 부식 때문에 생긴 Mg 표면에서의  $H_2O_2$ 의 생성 때문인 것으로 추측된다.

[0085] 도 4b와 같이, PBS 버퍼 내에서는 비록 EBM-2의 경우와 비교하여 상대적으로 높은 수준의  $H_2O_2$ 의 생성이 관찰되었지만, EBM-2에서의 실험 결과와 전체적으로 유사한 결과가 관찰되었다. 이러한  $H_2O_2$ 의 농도 차이는  $H_2O_2$ 의 형성에 영향을 미치는 PBS와 EBM-2의 다른 화학적 조성 때문인 것으로 추측된다.

#### [0086] 실시예 5. Mg-Ti/TiO<sub>2</sub>/Au 금속 복합체의 혈관 신생 촉진 효과의 확인

[0087] Mg-Ti/TiO<sub>2</sub>/Au 금속 복합체의  $H_2O_2$  생성 효과에 기초하여, 이의 혈관 신생 효과를 확인하였다.

[0088] 먼저 HUVEC(C2517; Lonza) 세포가 내피 세포 성장 배지-2(endothelial growth medium-2: EGM-2)(CC-3162; Lonza)내에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 습윤 대기하에서 배양되었다. 4 내지 6 계대의 HUVEC가 실험에 사용되었다. HUVEC 혈관 형성 분석을 위해, 적절한 수의 HUVEC가 포함된 EBM-2 배지가 Mg 및 Ti/TiO<sub>2</sub>/Au 금속 복합체가 전기적으로 연결 또는 분리된 시스템으로 사전 도입되었다. 상기 Mg-Ti/TiO<sub>2</sub>/Au 시스템에 HUVEC가 노출된 상태의 배양 시간에 따라  $H_2O_2$  생성량이 조절될 수 있다. Mg-Ti/TiO<sub>2</sub>/Au 시스템의 제거 후, HUVEC는 EBM-배지 상층액을 제거하기 위해 원심분리 되었고 이후 다시 새로운 배지로 재현탁 되었다. 이후,  $H_2O_2$ -자극된 HUVEC가 성장 인자-감소화된(growth factor-reduced) Matrigel<sup>®</sup> (354230, Corning)이 코팅된 96-웰 플레이트(CC-3156, Lonza)에 성장 인자의 첨가 없이 분주되었다. 상기 Matrigel<sup>®</sup> 코팅된 웰은 하기의 프로토콜에 따라 제조되었다. Matrigel<sup>®</sup>은 4°C에서 얼음 위에서 하룻밤 동안 해동되었고 세럼 없는 배지(serum free-media)에 1:1 비율로 희석되었다. 75  $\mu$ l의 희석된 Matrigel<sup>®</sup>이 96-웰 플레이트 각각에 첨가되었고 세포 분주 전에 37°C에서 30분간 배양되었다.  $H_2O_2$  자극된 HUVEC는 코팅된 96-웰 플레이트 상에 100  $\mu$ l EBM-2 배지 내 1.5x10<sup>4</sup> 세포/웰의 밀도로 분주되었다.  $H_2O_2$ 에 의한 자극 없이 성장 인자가 첨가된 EBM-2 배지상에서 배양된 HUVEC는 양성 대조군으로서, 성장 인자 없이 EBM-2 배지상에서 배양된 HUVEC는 음성대조군으로서 사용되었다. HUVEC의 증식 형태는 여러 시간(3, 8 및 24시간)에서 위상차 현미경으로 관찰되었다. 다양한 세포 형태가 8시간에서 관찰되었고, 이후 그 시료를 칼세인-AM 염색(C3 100MP, Invitrogen)하였다. 칼세인-AM 염색을 위해, 2  $\mu$ M 칼세인-AM이 PBS 내에서 제조되었고, HUVEC는 염색 시약과 함께 30분간 배양되었다. 살아있는 세포는 형광 현미경(Zeiss Axio Vert.A1)에서 초록색으로 시각화되어 나타난다. CLS 형성 동안의 정량적 데이터를 추출하기 위해, 시료(n=5, 각 그룹)의 5개의 비-중첩 영역(50x)을 얻었다. 영역당 혈관의 수는 수동적으로 계수하였다.

[0089] 서로 다른 배양 시간에 따른 HUVEC 세포의 증식 및 생존 비율에 대한  $H_2O_2$ 의 영향을 결정하기 위해 2 x 10<sup>4</sup> 세포/웰 HUVEC 세포가 24웰 플레이트에 분주되었다. 상기 분주된 세포 그룹은 5, 15, 30, 및 60분간 EBM-2 배지에서 배양되었다. 동시에,  $H_2O_2$ 의 자극 없이 EGM-2 또는 EBM-2 배지에서 배양된 군은 양성 또는 음성 대조군으로 사용되었다. 상기한 분주 8시간 및 24시간 후 HUVEC는 세포 용해 버퍼를 이용하여 용해되었다. 각 그룹의 DNA 함량은 Quant-iT<sup>™</sup> PicoGreen<sup>®</sup> 분석 키트(P11496; Invitrogen)를 이용하여 정량적으로 분석되었다. 상기 시료들은 형광 파장(여기 파장: 485nm, 방출 파장: 525nm)에서 형광 마이크로 플레이트 리더(Infinite 200pro, Tecan, Switzerland)를 사용하여 형광 측정되었다. 전류 데이터의 통계적 분석은 Graph prism 5 프로그램을 이용한 편도 분산 분석(ANOVA)과 Tukey's 사후 비교를 통하여 수행되었다. 통계적 유의성은 \*(p<0.05), \*\*(p<0.01), 및

\*\*\*( $p < 0.001$ )로 각각 결정되었다.

[0090] 도 5a는 상기 실험을 수행하는 방식을 나타내는 모식도이다. 도 5b는 Mg 및 Ti/TiO<sub>2</sub>/Au가 금속 도관으로 연결된 또는 분리된 금속 복합체에서 배양된 HUVEC, 및 양성 대조군 및 음성 대조군 세포의 관 형성을 나타내는 형광 이미지이다. 도 5b에서와 같이, 30분간 금속 도관으로 연결된 금속 복합체에 노출되어, 약 16  $\mu\text{M}$  농도의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 자극된 HUVEC 세포는 이후 Matrigel<sup>®</sup> 플레이트에서의 8시간 동안의 배양 후 성장 인자가 첨가된 양성 대조군에 비해서도 가장 뚜렷한 혈관 형성을 나타냈다. 반면 금속 도관으로 연결되지 않은 Mg 및 Ti/TiO<sub>2</sub>/Au 금속 복합체하에서 배양되었던 HUVEC는 음성 대조군과 유사한 정도의 관 형성을 나타냈다. 이를 통해 금속 도관으로 연결된 Mg-Ti/TiO<sub>2</sub>/Au 금속 복합체가 성장 인자 없이도 혈관 신생을 촉진할 수 있음을 확인하였다.

[0091] 도 5c는 상기 실험의 다섯 번의 독립적인 반복 시행으로부터 얻은 단위 면적당 생성된 혈관 가지의 수를 측정된 데이터를 나타낸다. T1 및 T2는 각각 Mg 및 Ti/TiO<sub>2</sub>/Au가 연결된 금속 복합체 및 연결되지 않은 금속 복합체에서 HUVEC가 30분간 배양된 경우를 나타낸다. T1에서는 평균적으로 23개의 혈관 가지가 생성되었으며, T2 및 음성 대조군에서는 5개 미만의 혈관 가지 형성이 관찰되어, 현저한 차이가 있었다.

[0092] 도 5d는 T1, T2, 양성 대조군 및 음성 대조군의 8시간 및 24시간 배양 후 HUVEC의 DNA 함량을 PicoGreen 분석법으로 정량적 분석한 결과를 나타낸다. T1의 경우에서 HUVEC 세포의 양이 T2 및 음성 대조군에 비하여 유의미하게 증가한 것을 확인할 수 있다.

[0093] **실시예 6. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도에 따른 세포에 미치는 영향 확인**

[0094] H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 일반적으로 높은 농도에서는 세포 독성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 따라서 상기 실시예 5와 같은 방법으로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도만 변화시킨 경우 이것이 세포에 어떤 영향을 미치는지를 확인하였다.

[0095] 도 6은 성장 인자가 첨가된 양성 대조군, 음성 대조군, 및 상대적으로 높은 농도의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100  $\mu\text{M}$ 에 30분간 노출된 HUVEC의 Matrigel<sup>®</sup>상에서의 배양 후 혈관 형성을 나타내는 이미지이다. 도 6에서 확인할 수 있듯이, 100  $\mu\text{M}$ 의 높은 농도의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 노출된 HUVEC는 혈관 신생이 촉진되지 못하고, 오히려 세포 수가 감소되는 결과를 나타냈다. 이는 상기 실시예 5에서 확인한 바와 같이 약 16  $\mu\text{M}$ 의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 농도에서 혈관 신생이 촉진된 것과는 매우 상반되는 결과였다.

[0096] **실시예 7. Mg-Ti/TiO<sub>2</sub>/Au 금속 복합체의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성량 조절**

[0097] **(1) TiO<sub>2</sub>층의 두께에 따른 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 발생량 조절**

[0098] Mg-Ti/TiO<sub>2</sub>/Au 금속 복합체에서 발생하는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도를 조절하기 위하여 TiO<sub>2</sub>의 두께에 따른 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 발생량을 측정하였다.

[0099] 도 7a는 양극 처리 전위에 따라 다양하게 생성되는 여러 TiO<sub>2</sub>층의 두께에서의 방전 시간에 따른 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도를 DPD/POD로 정량측정한 결과를 나타내고, 도 7b는 방전 시간이 60분일 때, 양극 처리 전위에 따른 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도를 나타낸다. 즉, 양극 처리 전위에 따라 다르게 형성된 TiO<sub>2</sub>층의 두께에 따라 동일한 방전 시간에서도 다른 농도의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 생성됨을 확인하였다.

[0100] 따라서, TiO<sub>2</sub>층의 두께 조절에 따라 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성 농도를 조절할 수 있음을 확인하였다. 50 V 전위에서 30초간 양극 산화처리를 하여 약 90 nm 정도의 무정형 TiO<sub>2</sub> 층을 형성한 경우, Mg 양극과 결합하고 5분 이후에 16  $\mu\text{M}$ 의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>을 자발적으로 발생시키는 것을 확인하였다.

[0101] **(2) Au층의 두께에 따른 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 발생량 조절**

[0102] Mg-Ti/TiO<sub>2</sub>/Au 금속 복합체에서 발생하는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도를 조절하기 위하여 Au 층의 두께에 따른 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 발생량을 측정하였다.

[0103] 도 8a는 Au 스퍼터링 시간에 따라 다양하게 형성되는 여러 Au층의 두께에서의 방전 시간에 따른 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도를



DPD/POD로 정량측정한 결과를 나타내고, 도 8b는 스퍼터링 시간이 20초, 및 방전 시간이 60분일 때 금 플라즈마 전류에 따른  $H_2O_2$ 의 농도를 나타낸다. 도 8에서와 같이, 즉, 스퍼터링의 조건에 따라 다르게 형성된 Au층의 두께에 따라 동일한 방전 시간에서도 다른 농도의  $H_2O_2$ 가 생성됨을 확인하였다. 20 nm 두께의  $TiO_2$  층 위에 10 mA의 전류 밀도에서 20초 동안 Au를 증착한 경우, Mg 양극과 결합한 지 5분 이후에 약  $16 \mu M$  누적 농도의  $H_2O_2$ 를 발생시키는 것을 확인하였다.

[0104] (3) 서로 다른 두께를 갖는 별개의  $TiO_2$ 층 형성에 따른  $H_2O_2$  발생양 조절

[0105] Mg-Ti/ $TiO_2$ /Au 금속 복합체의 위치에 따른  $H_2O_2$  발생양 조절을 위해 도 9a와 같은 금속 복합체를 고안하였다.

[0106] 상기 실시예 6에서 확인한 바와 같이, 90 nm  $TiO_2$ 층에서 발생하는  $H_2O_2$ 가 200 nm  $TiO_2$ 층에서 발생하는  $H_2O_2$ 보다 높은 것을 이용하여, 각각 도 9a와 같이 각각 90 nm 및 200 nm 두께의 별개의  $TiO_2$ 층을 갖는 Mg-Ti/ $TiO_2$ /Au 금속 복합체를 제조하였다.

[0107] 그 결과,  $H_2O_2$ 는 90 nm  $TiO_2$ 층 부위에서 200 nm의 부위에 비해서 1.5 배 이상의  $H_2O_2$ 가 선택적으로 발생하는 것을 확인하였다. 이는 도 9b와 같이 손상된 특정 조직을 목표로 각기 다른 농도의  $H_2O_2$ 를 발생시키는 선별적 조직 재생 유도형 임플란트의 개발로 응용 가능하다.

[0108] 실시예 8. Mg-Ti/ $TiO_2$ /Au 금속 복합체를 이용한 임플란트 제조 및 이의 혈관 신생 효과

[0109] Mg-Ti/ $TiO_2$ /Au 금속 복합체의 혈관 신생 효과를 바탕으로, 도 10a 및 10b와 같이 신규한 Ti-기반 임플란트 시제품을 제조하였다. 10 V의 전압에서 30 초간 양극산화를 진행하여, 약 20 nm 두께의  $TiO_2$  층을 형성하고, 그 이후 약 3nm 크기의 Au cluster를 증착하였다. EBM-2 배지에서 이 임플란트 시제품은 15분 후에 약  $15 \mu M$ 의  $H_2O_2$ 를 발생시키는 것을 확인하였다. 특히, Mg 실린더는 물리적으로 스크류-형태의 Ti-6-4 합금 내부에 통합되었다. 상기 Ti-6-4 합금은 정형외과 및 치과용 임플란트에 사용되는 일반적인 재료이다. 상기 Ti 합금의 표면은 제조에 1에서와 같은 방법으로 산화되었고, Au로 증착되었다. 별도의 금속 도판 등에 의한 Mg 및 Ti의 연결 없이도, Mg에서 발생한 전자는 Ti의 표면으로 쉽게 이동 가능하다. 상기 제조된 임플란트 시제품은 HUVEC를 포함하는 EMB-2 배지에서 그 혈관 형성 효과가 테스트되었다.

[0110] 도 10c는 상기 임플란트 시제품이 들어있는 채로 배양되는 EBM-2 배지를 나타낸다. 도 10d는 HUVEC 세포가 상기 임플란트 시제품에 접촉한 시간에 따른 단위 면적당 혈관 가지 형성 수를 나타내는 그래프이다. 도 10e는 상기 임플란트 시제품에 접촉한 시간에 따른 HUVEC 세포의 혈관 형성을 형광 현미경으로 관찰한 이미지이다(스케일바 =  $500 \mu m$ ). 음성 대조군에 비하여 상기 임플란트 시제품에 의하여 자극된 HUVEC의 높은 수준의 혈관 형성이 관찰되었고, 특히 15분간 상기 임플란트 시제품과 접촉하여 배양된 경우에서 혈관 형성이 가장 많이 관찰되었다.

[0111] 제조예 2. 아연을 이용한 금속 복합체의 제조

[0112] 상기 제조예 1에 기재된 것과 같은 방법으로, 마그네슘을 대신하여 양극으로서 아연을 이용하여 금속 복합체를 제조하였다.

[0113] 실시예 9. 아연을 이용한 액침 시험 결과

[0114] 아연이 신체에 삽입된 후 2주 이상 유지될 수 있는지 여부를 확인하기 위해, Ti-6Al-4V 코인에 순수 아연 바를 삽입 후 Hanks 용액에 넣어 5일(120시간)간 액침 시험(immersion test)을 실시하였다.

[0115] 그 결과 도 11과 같이, 5일간의 액침 시험에도 불구하고 80% 이상의 아연이 잔류하는 것으로 나타났다. 도 11의 가운데 부분의 금속이 아연, 이를 둘러싸고 있는 부분이 Ti-6Al-4V 합금이며, 상단의 점선은 아연의 초기 표면을 나타낸다.

[0116] 실시예 10. 아연을 포함하는 금속 복합체를 이용한 활성 산소 발생량 측정

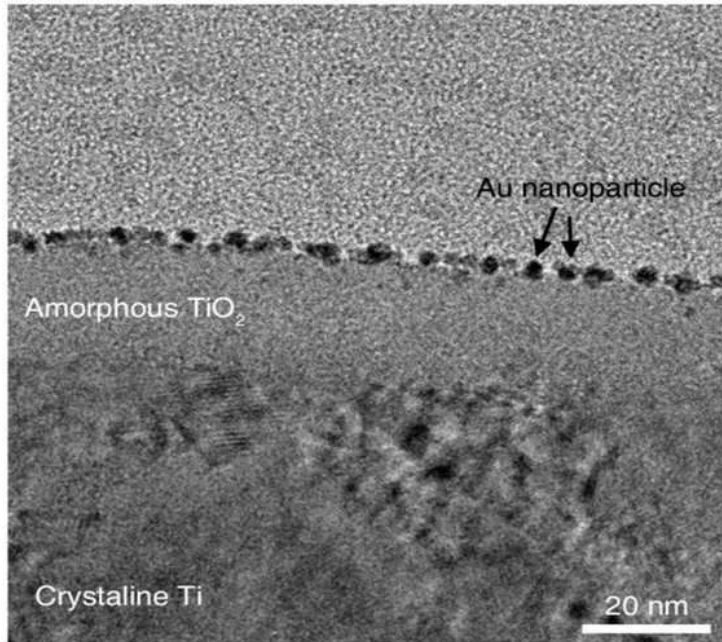
[0117] 상기 실시예 4에 기재된 방법과 유사하게, Ti-6Al-4V 디스크( $\Phi 10 \times 2T$ )에 아연 바를 삽입하여 PBS 버퍼 용액 (2 ml)에서의 활성산소 발생량을 3회 반복 측정하였다.

[0118] 그 결과, 도 12와 같이 3회의 시험 모두 PBS 버퍼 중에서  $H_2O_2$ 의 생성량이 증가하는 것을 관찰하였다. 특히 30분

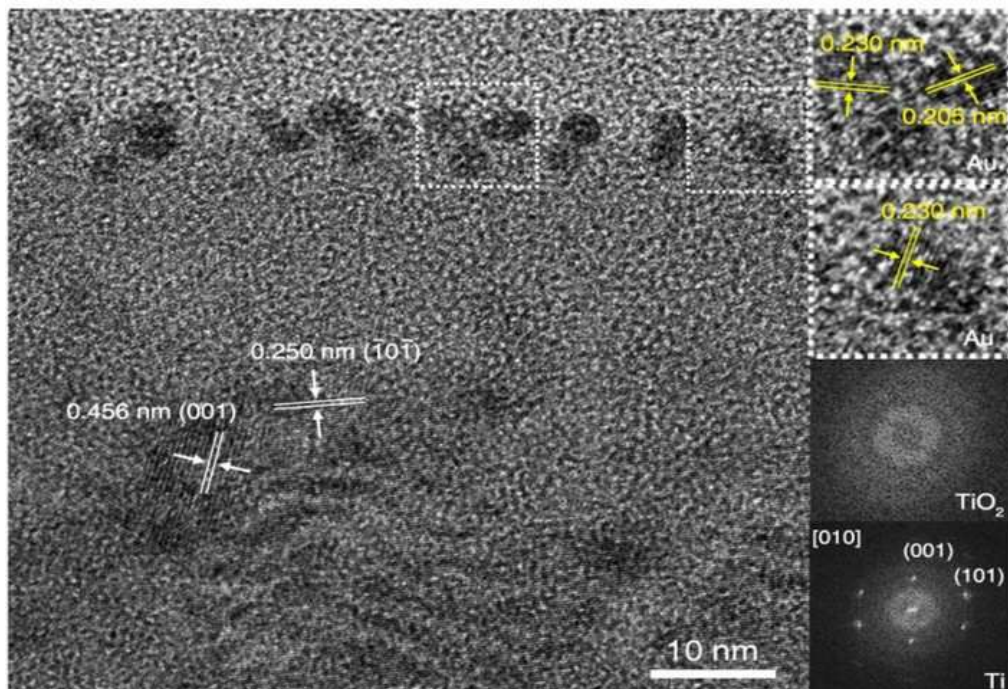
후의  $\text{H}_2\text{O}_2$ 의 농도가 평균 약 33  $\mu\text{M}$  정도로 측정되어, Mg에 비교하여 더 우수한 효과를 나타내었다.

## 도면

### 도면1a

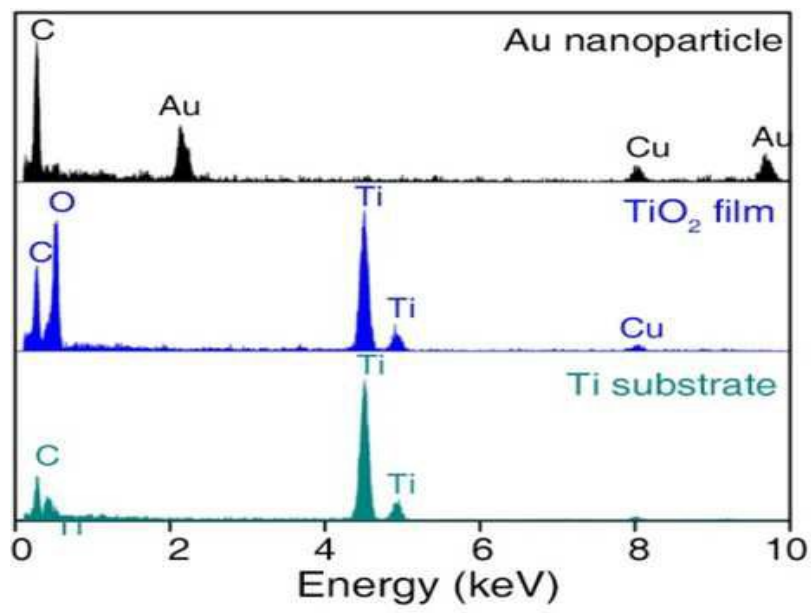


### 도면1b

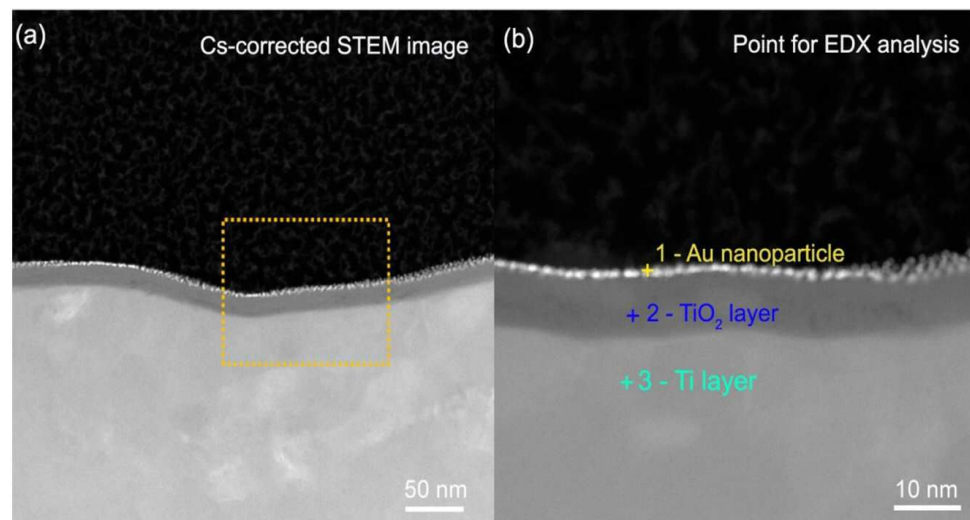




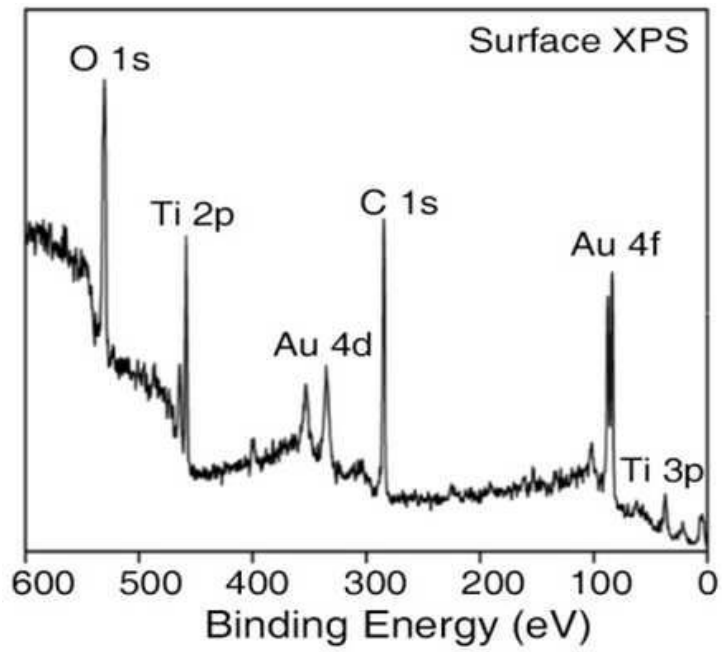
도면1c



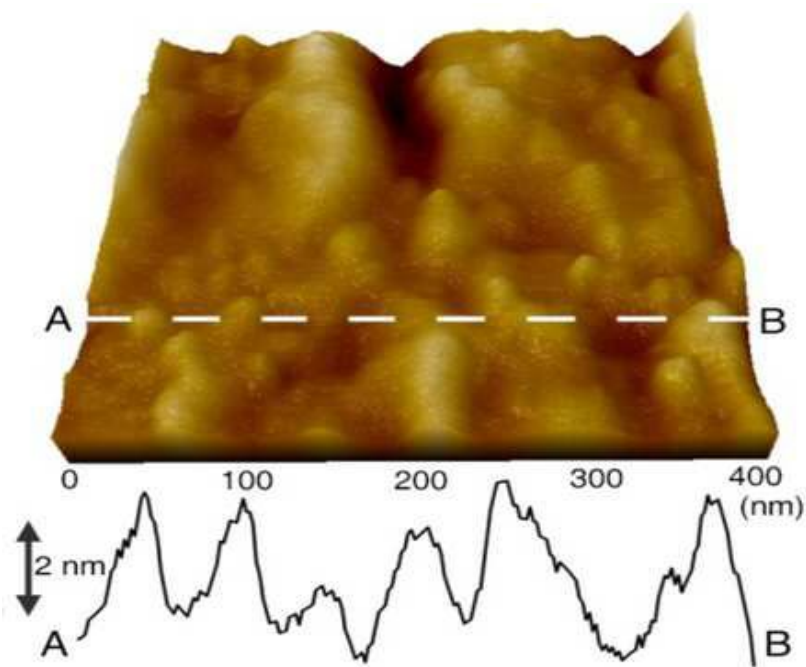
도면1d



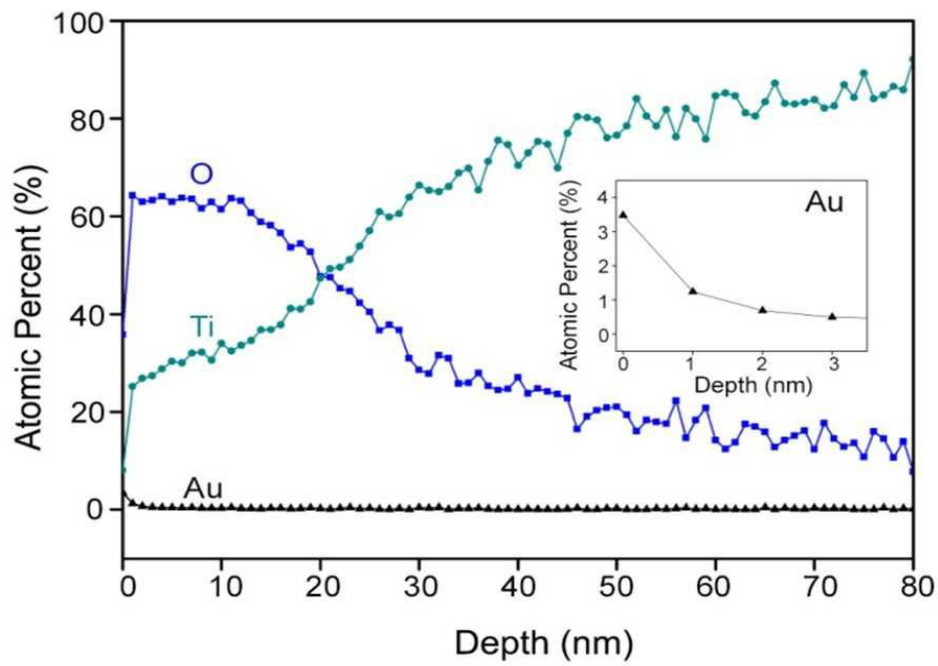
도면1e



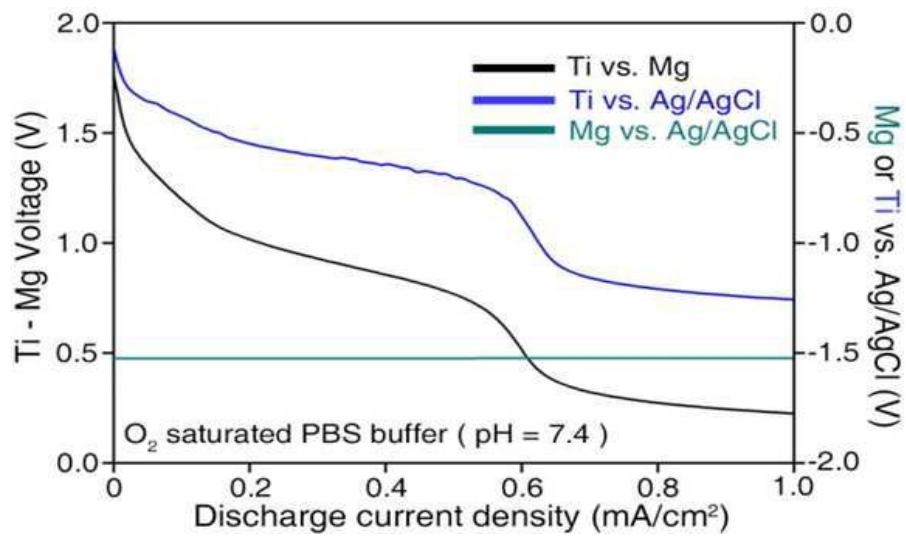
도면1f



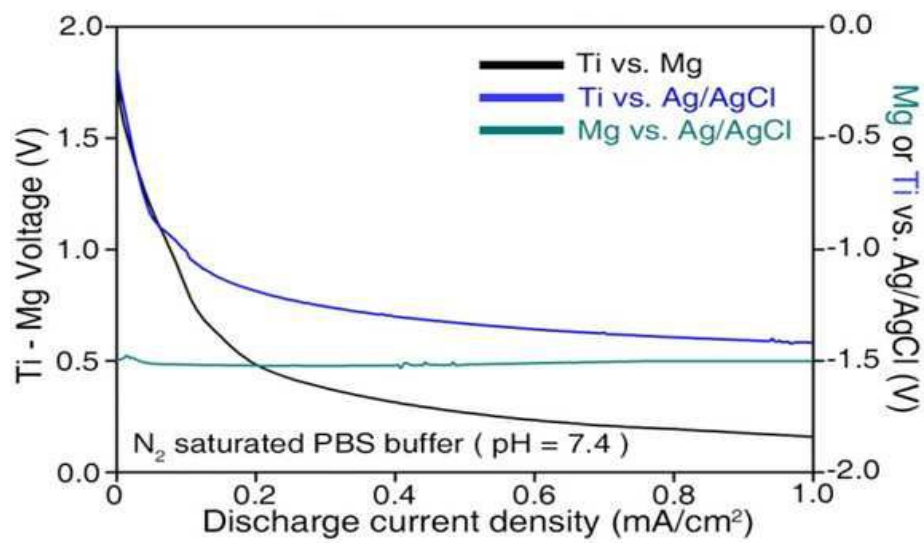
도면1g



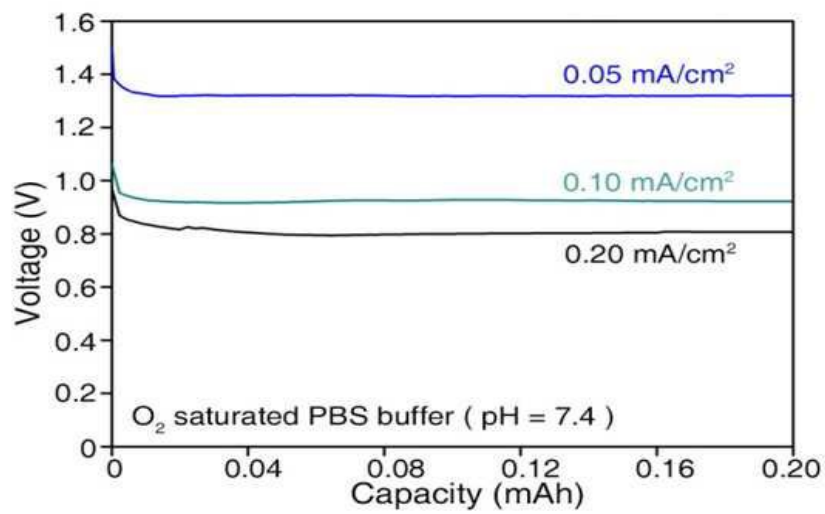
도면2a



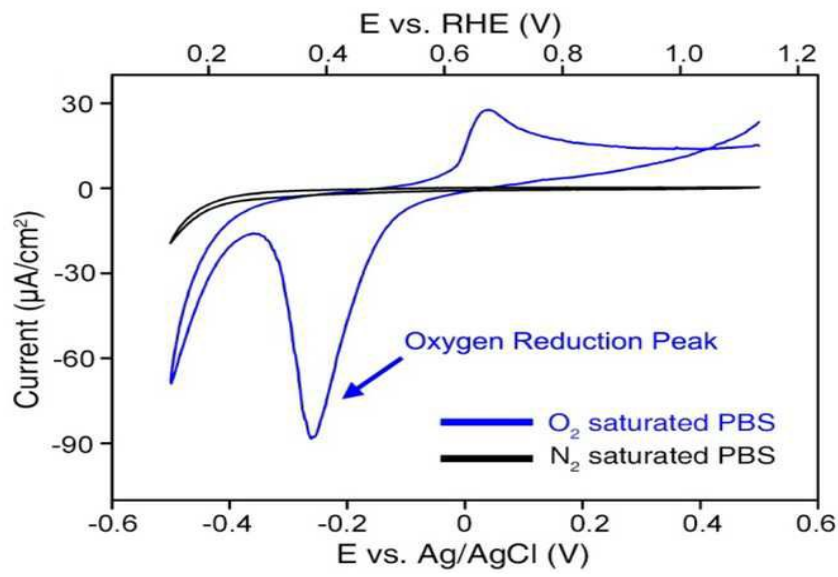
도면2b



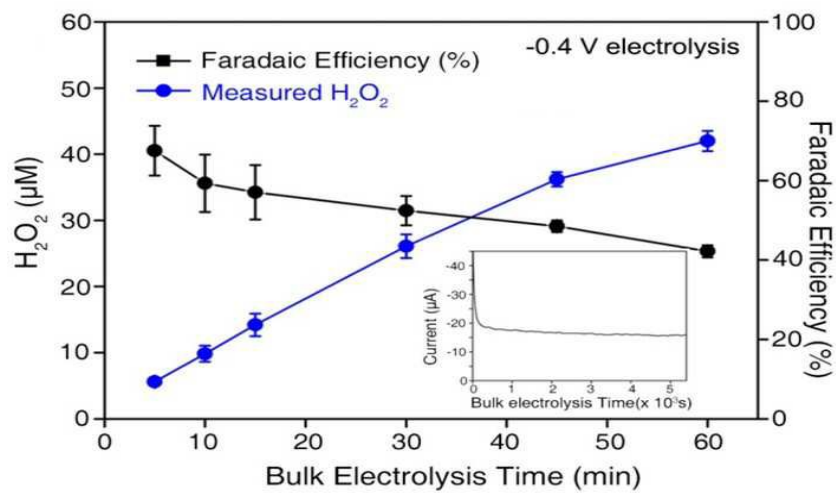
도면2c



도면3a

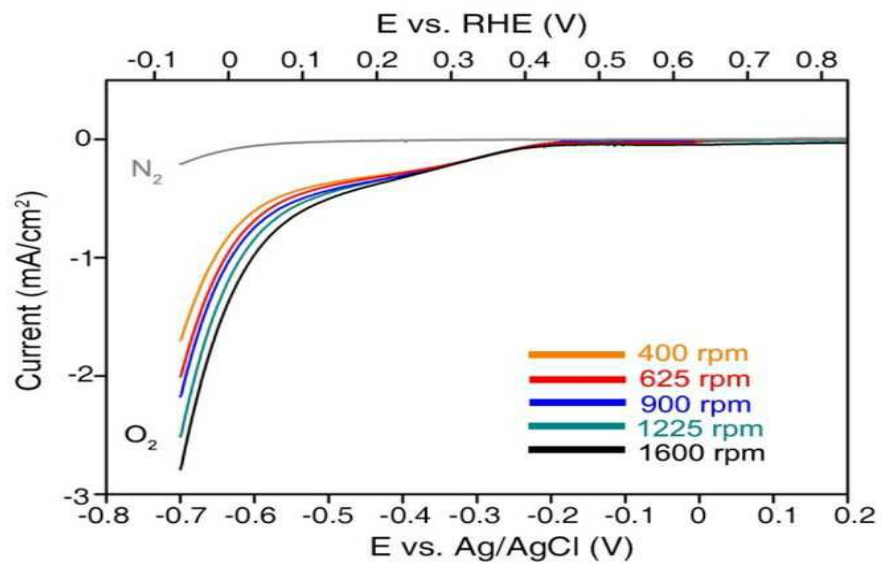


도면3b

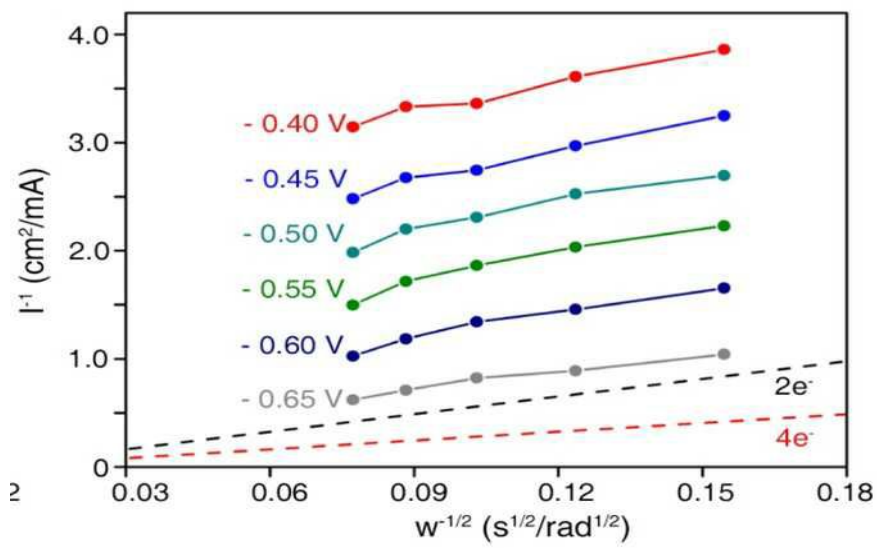




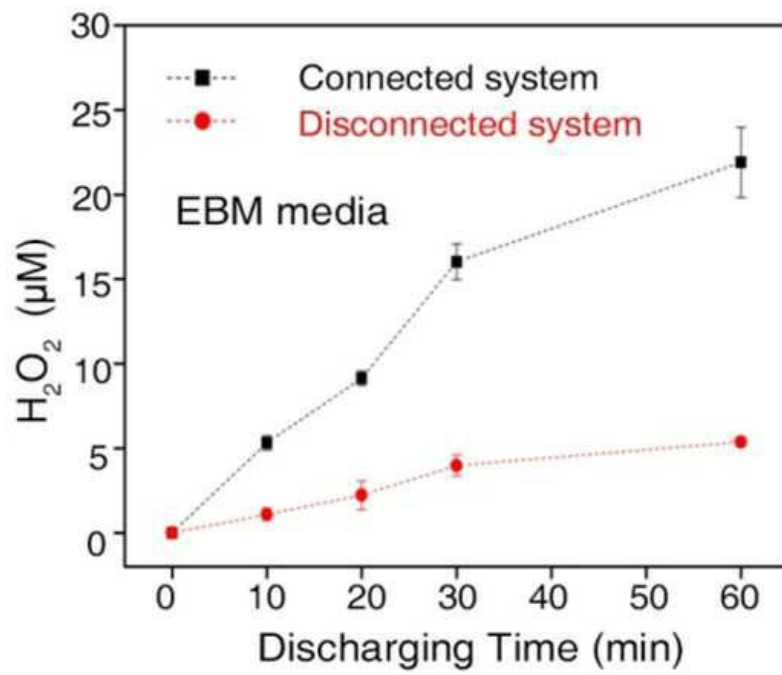
도면3c



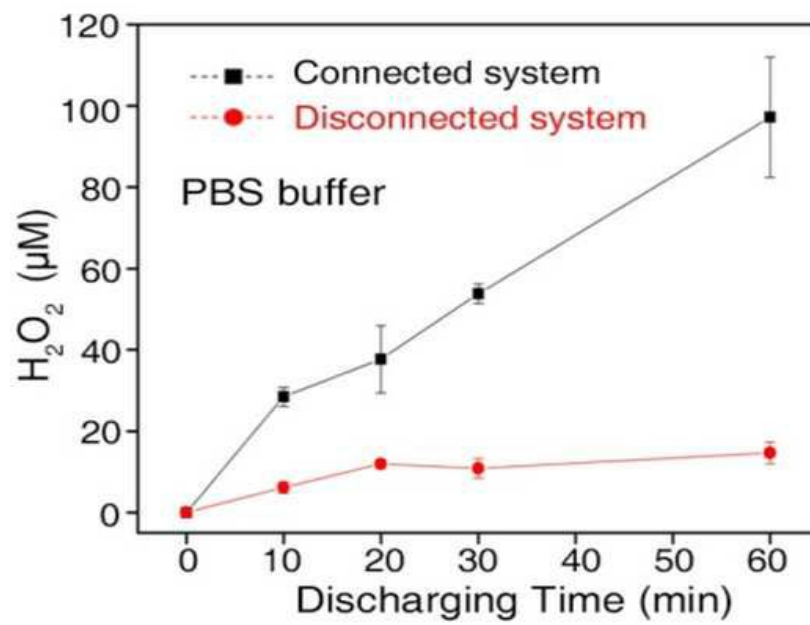
도면3d



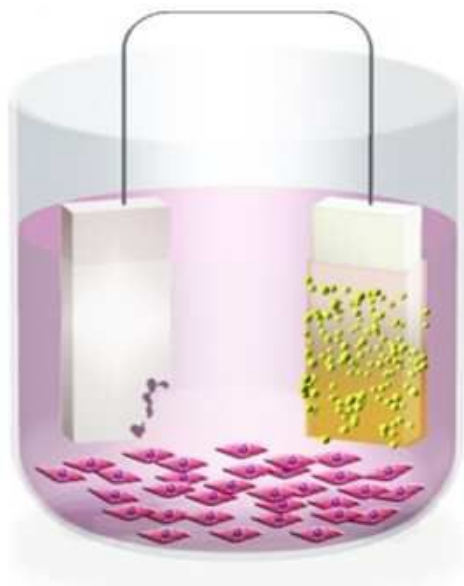
도면4a



도면4b

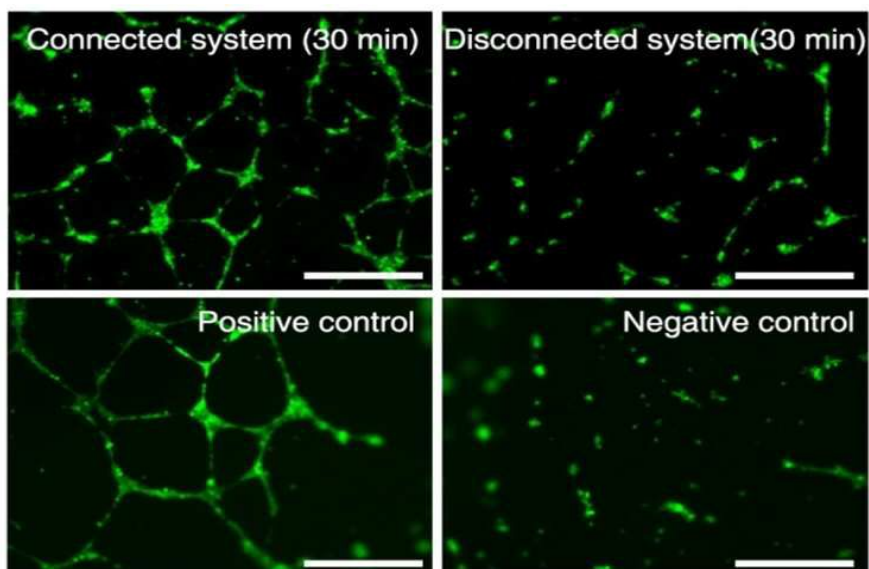


도면5a

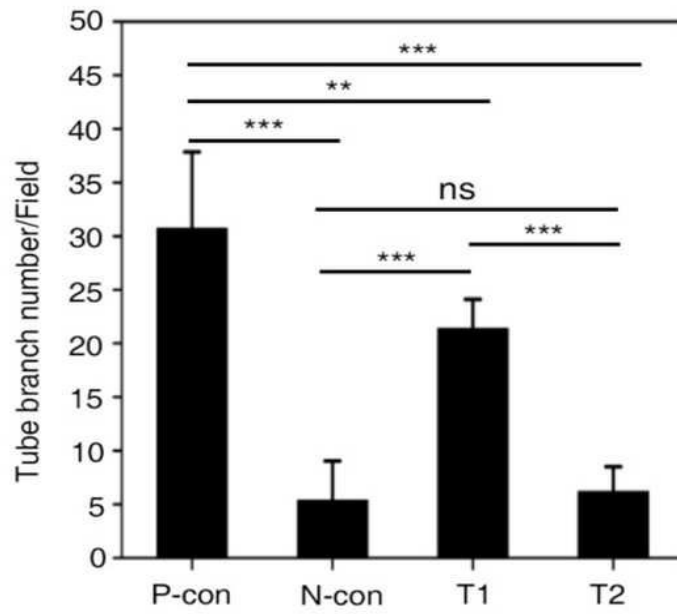


EBM - HUVEC  
Angiogenesis effect

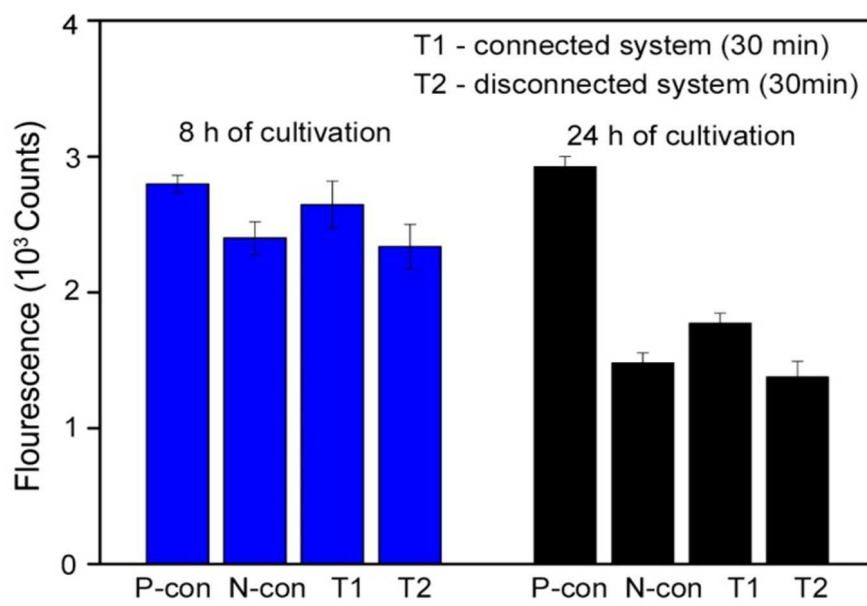
도면5b



도면5c



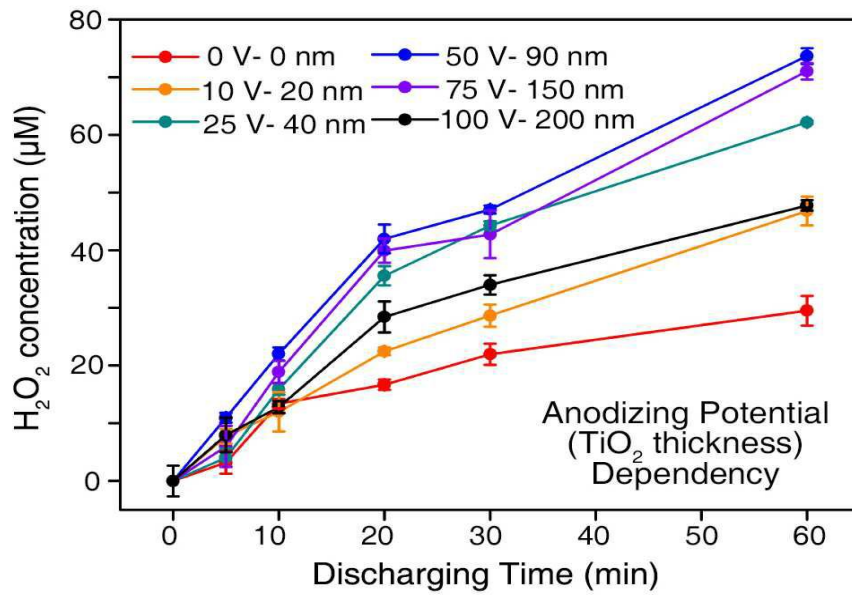
도면5d



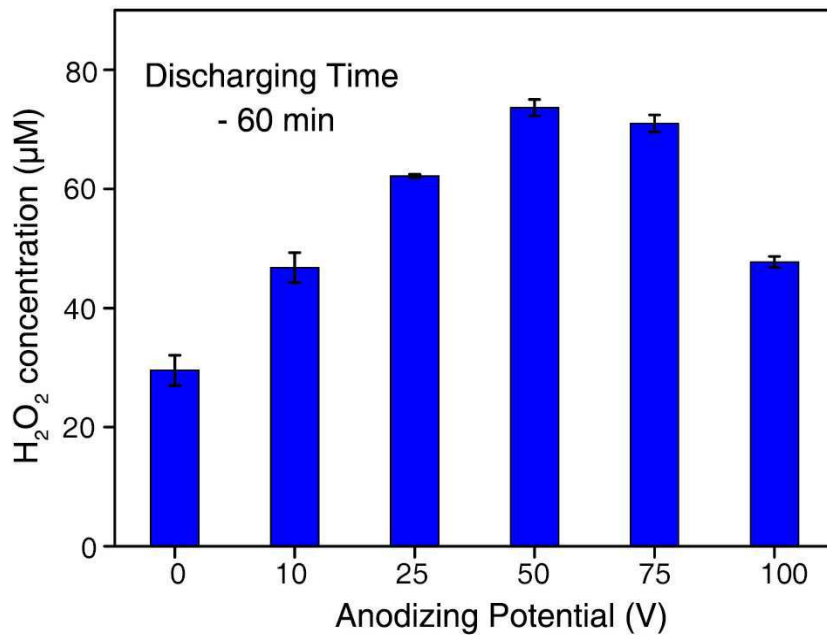
도면6



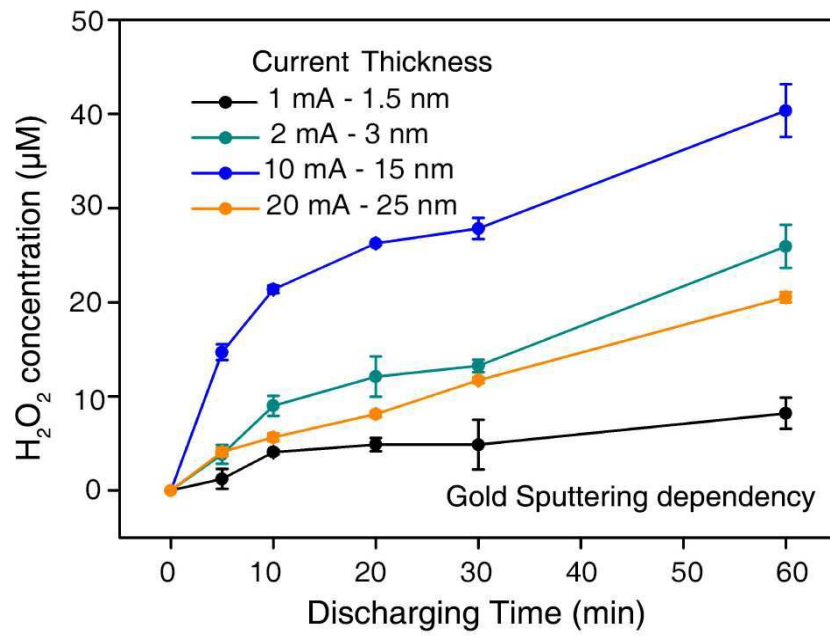
도면7a



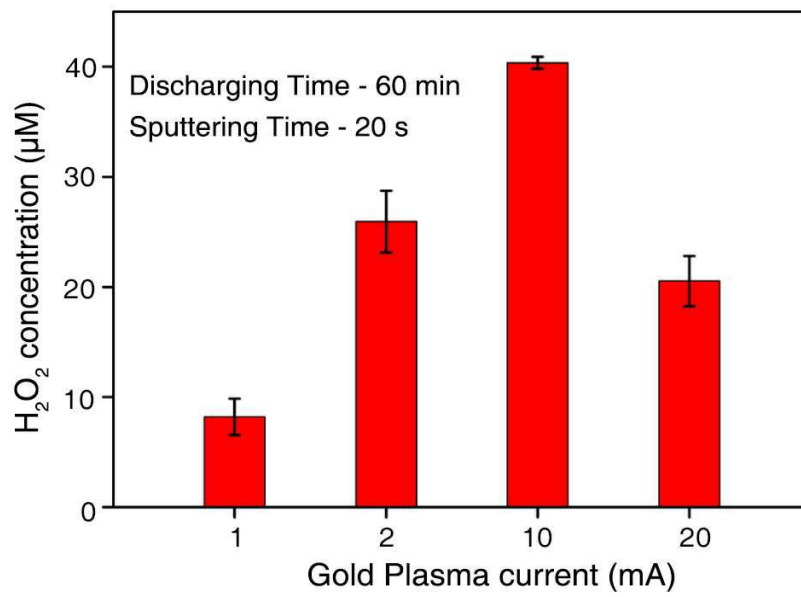
도면7b



도면8a

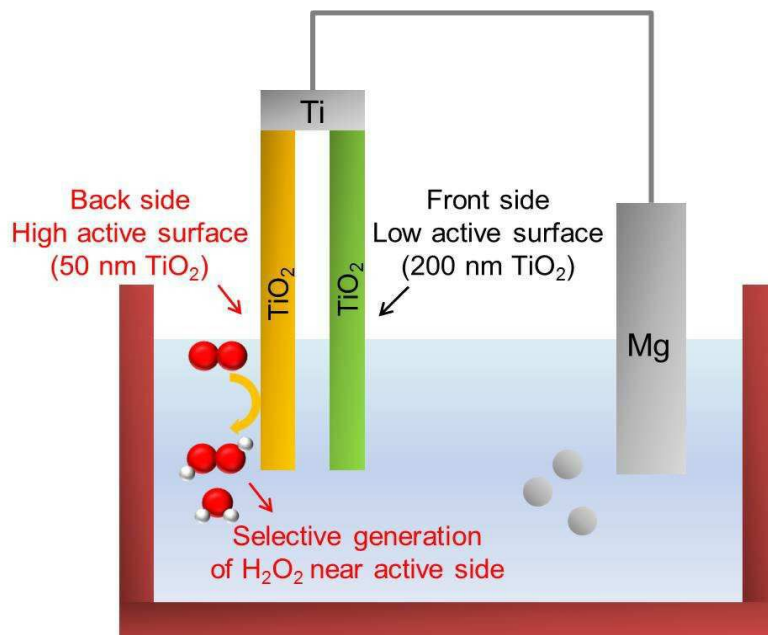


도면8b

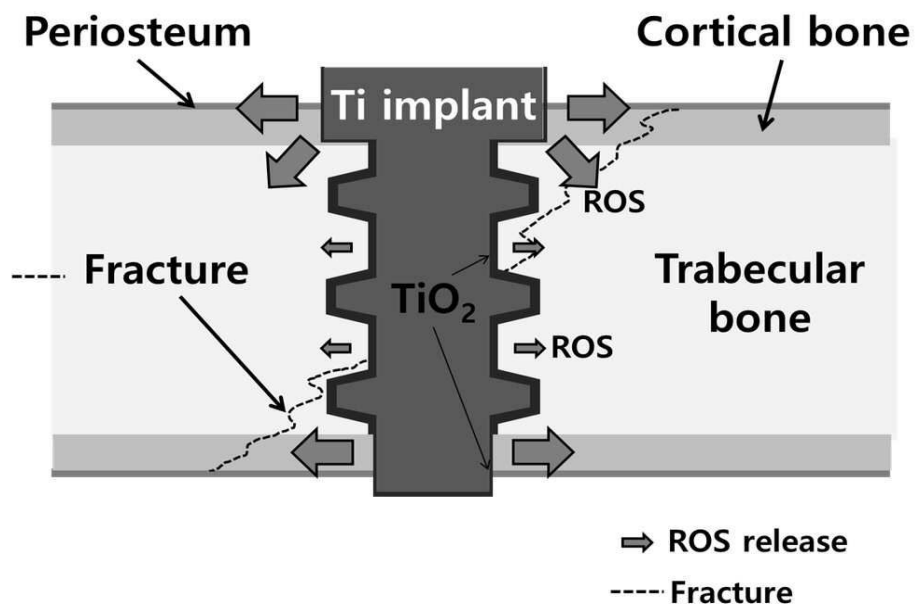




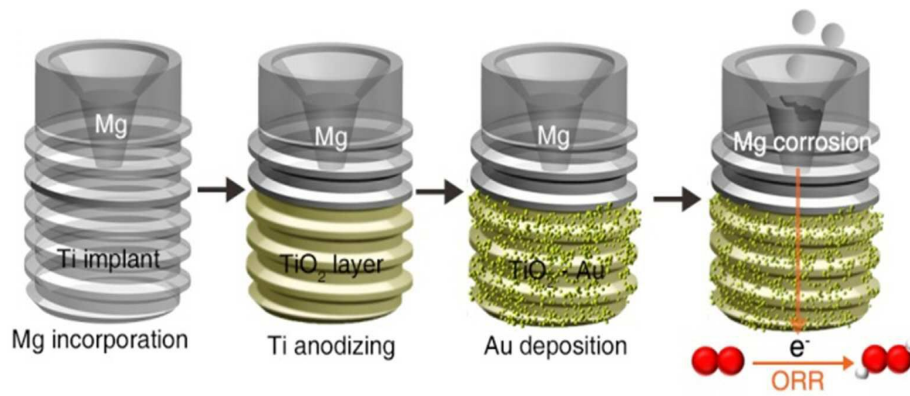
도면9a



도면9b



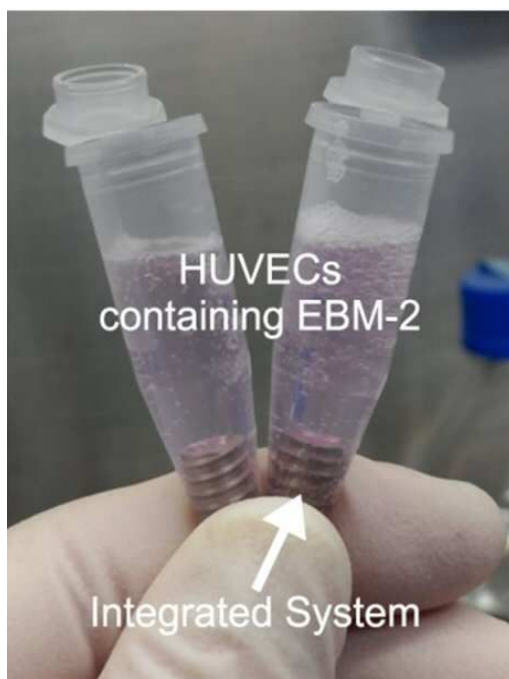
도면10a



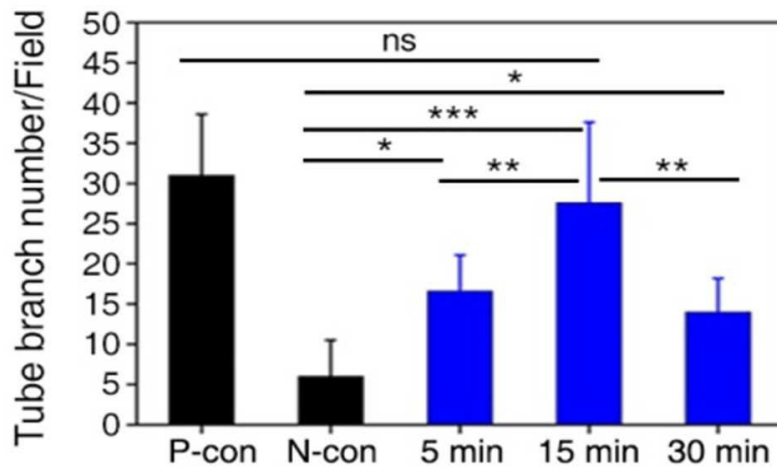
도면10b



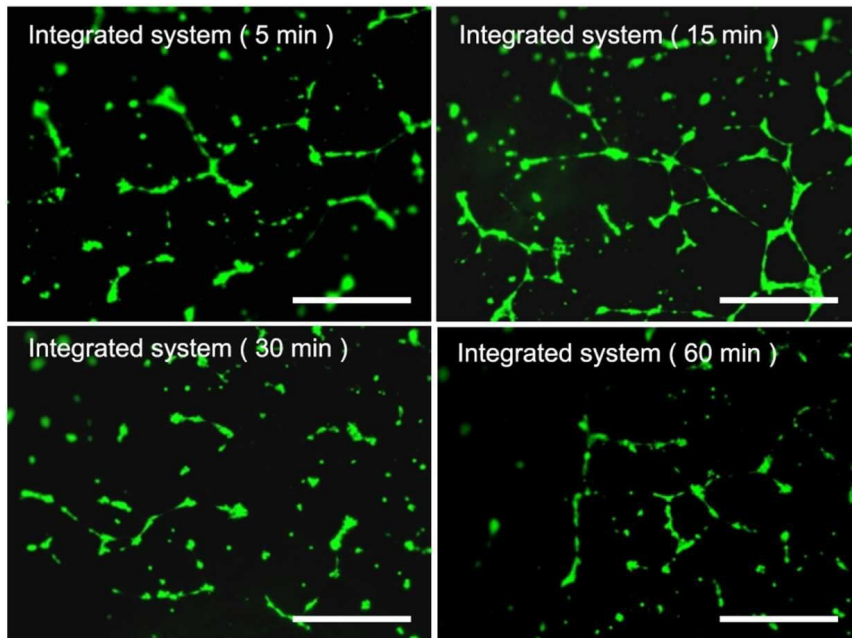
도면10c



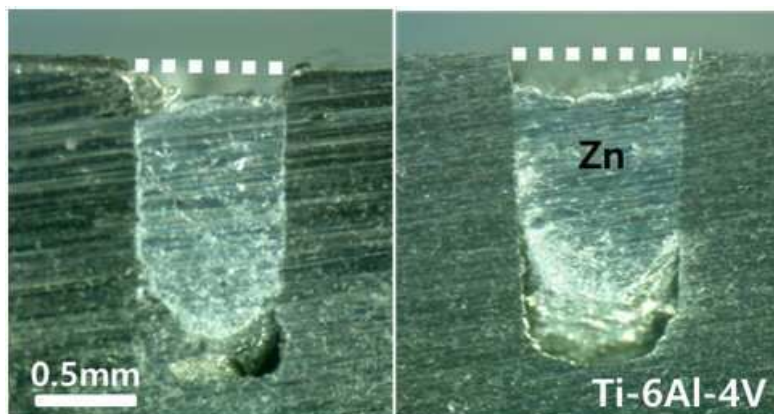
도면10d



도면10e



도면11



도면12

