



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년01월12일

(11) 등록번호 10-1584506

(24) 등록일자 2016년01월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61L 27/54 (2006.01) A61C 8/00 (2006.01)

A61F 2/28 (2006.01) A61L 27/06 (2006.01)

A61L 27/28 (2006.01) A61L 33/10 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0101181

(22) 출원일자 2014년08월06일

심사청구일자 2014년08월06일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020130040647 A

Yanjiao Jiang et al., Biomaterials 35 (2014) 4969-4985

eal K. Devaraj et al., QSAR Comb. Sci. 26 (2007) 1253-1260

Yan Li et al., Langmuir 27 (2011) 4848-4856

(73) 특허권자

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

이덕원

서울특별시 강동구 동남로 892 강동경희대학교병원 4층 치과병원 구강악안면외과

김은철

서울특별시 강남구 영동대로128길 15, 1-802호 (홍실아파트)

(74) 대리인

고영갑, 이성원, 권정기, 임상엽

전체 청구항 수 : 총 20 항

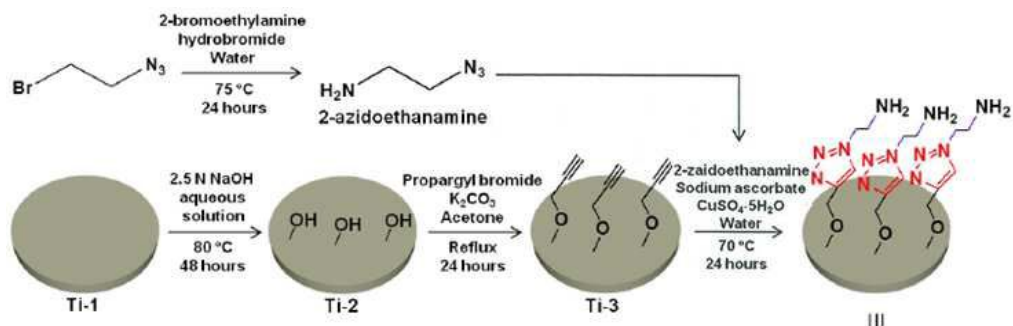
심사관 : 정재철

(54) 발명의 명칭 표면 개질된 임플란트, 골 형성 유도 또는 촉진용 임플란트 및 이들의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 표면에 수산기가 도입된 임플란트 기재 및 링커를 포함하는 표면 개질된 임플란트를 제공한다. 또한, 본 발명은 표면 개질된 임플란트의 링커에 고정된 골 유도 인자를 포함하는 골 형성 유도 또는 촉진용 임플란트를 제공한다. 본 발명에 따른 표면 개질된 임플란트는 공정이 간단하고 수율이 높으며 안전한 클릭 반응(Click reaction)을 통해 제조될 수 있다. 클릭 반응(Click reaction)을 통해 임플란트 기재에 형성된 링커는 헤파린, 골 유도 인자를 임플란트에 안정적이면서도 보다 용이하게 고정화시킬 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 골 형성 유도 또는 촉진용 임플란트는 골 유도 인자를 장시간 동안 서서히 방출하기 때문에 골 유도 인자의 조기 방출에 의한 문제를 해결할 수 있고, 조골세포의 분화 또는 증식을 유도 또는 촉진하여 골 형성 및 임플란트의 골 유착을 향상시킬 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012R1A5A2051384

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 선도연구센터지원사업

연구과제명 치아와 치주질환 병리기전 규명 및 제어기술 연구

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2012.09.01 ~ 2016.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

표면에 수산기가 도입된 임플란트 기재 및 링커를 포함하고,

상기 임플란트 기재는 전체 또는 표면이 금속 또는 금속산화물로 이루어지고,

상기 링커는 트리아졸기(triazole group)를 포함하고, 하나의 말단이 상기 임플란트 기재의 표면에 도입된 수산기와 결합한 상태로 존재하고, 수산기와 결합하지 않은 다른 말단은 아민기 또는 카르복실기로 이루어진 것을 특징으로 하는 표면 개질된 임플란트.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 임플란트 기재의 전체 또는 표면은 티타늄(Ti), 티타늄 합금 또는 이산화티타늄에서 선택되는 1종 이상으로 이루어진 것을 특징으로 하는 표면 개질된 임플란트.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 링커는 알킨(Alkyne) 화합물과 아자이드(Azide) 화합물의 클릭 반응(Click reaction)에 의해 형성되는 것을 특징으로 하는 표면 개질된 임플란트.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 알킨 화합물은 하나의 말단이 할로젠 원소, 수산기 또는 아민기로 이루어지고, 다른 말단은 삼중 결합을 갖는 것을 특징으로 하는 표면 개질된 임플란트.

청구항 5

제 3항에 있어서, 상기 아자이드 화합물은 하나의 말단이 아자이드기(azide group)로 이루어지고, 다른 말단은 아민기 또는 카르복실기로 이루어진 것을 특징으로 하는 표면 개질된 임플란트.

청구항 6

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 링커에 결합된 헤파린(Heparin)을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 표면 개질된 임플란트.

청구항 7

(S1) 전체 또는 표면이 금속 또는 금속산화물로 이루어진 임플란트 기재의 표면에 수산기를 도입하는 단계;

(S2) 상기 임플란트 기재의 표면에 도입된 수산기에 알킨 화합물을 결합시키는 단계; 및

(S3) 상기 알킨(Alkyne) 화합물과 아자이드(Azide) 화합물의 클릭 반응을 통해 링커를 형성하는 단계를 포함하고,

상기 (S3) 단계에서 링커는 트리아졸기(triazole group)를 포함하고, 하나의 말단이 상기 임플란트 기재의 표면에 도입된 수산기와 결합한 상태로 존재하고, 수산기와 결합하지 않은 다른 말단은 아민기 또는 카르복실기로

이루어진 것을 특징으로 하는 표면 개질된 임플란트의 제조방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 임플란트 기재의 전체 또는 표면은 티타늄(Ti), 티타늄 합금 또는 이산화티타늄에서 선택되는 1종 이상으로 이루어진 것을 특징으로 하는 표면 개질된 임플란트의 제조방법.

청구항 9

제 7항에 있어서, 상기 알킨 화합물은 클로로에틴(Chloroethyne), 브로로에틴(Bromoethyne), 아이오도에틴(Iodoethyne), 프로파길 클로라이드(Propargyl chloride), 프로파길 브로마이드(Propargyl bromide), 프로파길 아이오다이드(Propargyl iodide), 프로파길 알코올(Propargyl alcohol), Propargyl amine(프로파길 아민), 1-클로로-2-부틴(1-Chloro-2-butyne), 1-브로모-2-부틴(1-Bromo-2-butyne), 1-아이오도-2-부틴(1-Iodo-2-butyne), 3-클로로-1-부틴(3-Chloro-1-butyne), 3-브로모-1-부틴(3-Bromo-1-butyne), 3-아이오도-1-부틴(3-Iodo-1-butyne), 3-부틴-1-올(3-Butyn-1-ol), 4-펜틴-1-올(4-Pentyn-1-ol), 6-헥신-1-올(6-Hexyn-1-ol), 7-옥틴-1-올(7-Octyn-1-ol), 10-운데신-1-올(10-Undecyn-1-ol), 5-클로로-1-펜틴(5-Chloro-1-pentyne), 5-브로모-1-펜틴(5-Bromo-1-pentyne), 5-아이오도-1-펜틴(5-Iodo-1-pentyne), 1-에티닐시클로헥실아민(1-Ethynylcyclohexylamine), 3-클로로-3-메틸-1-부틴(3-Chloro-3-methyl-1-butyne), 3-브로모-3-메틸-1-부틴(3-Bromo-3-methyl-1-butyne), 3-아이오도-3-메틸-1-부틴(3-Iodo-3-methyl-1-butyne), 6-클로로-1-헥신(6-Chloro-1-hexyne), 6-브로모-1-헥신(6-Bromo-1-hexyne) 및 6-아이오도-1-헥신(6-Iodo-1-hexyne)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 표면 개질된 임플란트의 제조방법.

청구항 10

제 7항에 있어서, 상기 아자이드 화합물은 아지도메탄아민(azidomethanamine), 2-아지도에탄아민(2-Azidoethanamine), 3-아지도-1-프로판아민(3-Azido-1-propanamine), 4-아지도-1-부탄아민(4-Azido-1-butanamine), 5-아지도-1-펜탄아민(5-Azido-1-pentanamine), 6-아지도-1-헥산아민(6-Azido-1-hexanamine), 11-아지도-3,6,9-트라이옥사운데칸-1-아민(11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amine), 2-아지도아세트산(2-Azidoacetic acid), 3-아지도프로피온산(3-Azidopropionic acid), 4-아지도부티르산(4-azidobutyric acid), 5-아지도펜타노익산(5-Azidopentanoic acid), 3-(4-아지도페닐)프로피온산[3-(4-Azidophenyl)propionic acid] 및 2-아지도벤조익산(2-Azidobenzoic acid)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 표면 개질된 임플란트의 제조방법.

청구항 11

제 7항 내지 제 10항 중 어느 한 항에 있어서,

(S4) 상기 링커에 헤파린을 고정화시키는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 표면 개질된 임플란트의 제조방법.

청구항 12

제 11항에 있어서, 상기 헤파린은 링커와의 아마이드 결합에 의해 고정화되는 것을 특징으로 하는 표면 개질된 임플란트의 제조방법.

청구항 13

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항의 표면 개질된 임플란트 및 상기 임플란트에 형성되어 있는 링커에 고정된

골 유도 인자를 포함하는 골 형성 유도 또는 촉진용 임플란트.

청구항 14

제 13항에 있어서, 상기 골 유도 인자는 BMP(bone morphogenetic protein)인 것을 특징으로 하는 골 형성 유도 또는 촉진용 임플란트.

청구항 15

제 7항 내지 제 10항 중 어느 한 항의 표면 개질된 임플란트의 제조방법에 추가적으로, (S4') 상기 임플란트에 형성되어 있는 링커에 골 유도 인자를 고정화시키는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 골 형성 유도 또는 촉진용 임플란트의 제조방법.

청구항 16

제 15항에 있어서, 상기 골 유도 인자는 BMP(bone morphogenetic protein)인 것을 특징으로 하는 골 형성 유도 또는 촉진용 임플란트의 제조방법.

청구항 17

제 6항의 표면 개질된 임플란트 및 상기 임플란트에 형성되어 있는 헥사핀에 고정된 골 유도 인자를 포함하는 골 형성 유도 또는 촉진용 임플란트.

청구항 18

제 17항에 있어서, 상기 골 유도 인자는 BMP(bone morphogenetic protein)인 것을 특징으로 하는 골 형성 유도 또는 촉진용 임플란트.

청구항 19

제 11항의 표면 개질된 임플란트의 제조방법에 추가적으로, (S5) 상기 임플란트에 형성되어 있는 헥사핀에 골 유도 인자를 고정화시키는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 골 형성 유도 또는 촉진용 임플란트의 제조방법.

청구항 20

제 19항에 있어서, 상기 골 유도 인자는 BMP(bone morphogenetic protein)인 것을 특징으로 하는 골 형성 유도 또는 촉진용 임플란트의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명의 일 예는 표면 개질된 임플란트 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 더 상세하게는 링커에 의해 골 유도 인자의 결합을 보다 용이하게 할 수 있는 표면 개질된 임플란트 및 간단하고 수율이 높으며 안전한 클릭 반응(Click reaction)을 통해 이를 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0002] 본 발명의 다른 예는 골 형성 유도 또는 촉진용 임플란트 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 더 상세하게는 골

유도 인자의 조기 방출을 방지하고 조골세포의 분화를 촉진할 수 있는 골 형성 유도 또는 촉진용 임플란트 및 표면 개질된 임플란트로부터 이를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003]

최근에 골 결손부위의 임플란트 성공률을 높이기 위해 임플란트 표면에 생체분자들을 부착하는 생체모방적인 표면처리 기법에 관한 연구들이 활발히 진행되고 있다. 골 유착과 치유를 매개하는 생체분자로 Arg-Gly-Asp(RGD) 펩타이드, 세포외 기질 단백질(collagen), 성장인자 등이 이용되고 있으며, 그중에서도 중간엽 줄기세포로부터 조골세포로의 분화와 증식을 촉진하고 골 기질의 생합성을 도와 골 형성을 증진시키는 역할을 하는 골 형성 단백질(bone morphogenetic protein, BMP)과 같은 성장인자의 적용이 큰 관심을 받고 있다. BMP-2는 BMP 중 가장 높은 골 유도성을 지닌 것으로 보고되고 있으며, 상악동 거상술, 치조골 보존술, 골 증대술, 치주적 회복술 등을 포함하는 다양한 연구를 통해 골 재생에 관한 잠재성이 입증되었다. 최근에는 티타늄(Ti) 임플란트에 코팅된 recombinant human(rh) BMP-2가 임플란트 주변 골의 재생과 유착에 미치는 효과에 대해 연구가 활발히 진행되고 있다. Hue 등은 Escherichia coli-rhBMP-2가 코팅된 양극 산화 임플란트를 비글견에 이식한 후 방사선학적 분석과 Implant stability quotient(ISQ) values 측정을 시행해 본 결과 수직적인 골 증대와 임플란트의 안정성이 향상되었음을 보고하였다. 그러나, rhBMP-2의 적용이 골 형성에 별다른 기여를 하지 못했다는 보고도 있으며, 이는 rhBMP-2의 빠른 반감기로 인한 급격한 분해, 표준화되지 못한 최적 농도, 생체내 다른 성장인자와의 상호작용 없이 단독 사용된 것 등이 원인으로 추정되고 있다. 이 중 빠른 반감기를 극복하여 BMP-2의 지속적이고 국소적인 방출을 유도할 수 있는 콜라겐 겔, 히아루론산, 피브린 겔 등을 이용한 BMP-2 전달 시스템이 연구되어 왔다.

[0004]

또한, BMP-2 방출을 조절하기 위해 성장인자와 결합하는 친화성을 가진 헤파린을 사용하는 연구도 보고된 바 있다. 헤파린을 결합시킨 생체 물질 시스템이 성장 인자들의 방출을 조절할 수 있다는 이점이 많은 연구를 통해 보고되고 있으며, 헤파린을 이식한 골에 rhBMP-2를 고정시켜 서방출과 조골세포의 기능 향상을 보고한 바 있다. Kim 등은 헤파린과 BMP-2를 고정시킨 티타늄(Ti) 디스크의 세포실험을 통해 BMP-2의 서방출과 항염증 효과를 확인하였고, Ishibe 등은 apatite 코팅된 티타늄(Ti) 바에 헤파린과 BMP-2를 고정하여 토끼의 경골에 식립한 후 조직학적 분석을 통해 수직적, 수평적 골 형성을 확인하였다.

[0005]

티타늄(Ti)은 심혈관 장치 뿐만 아니라 경조직 재건에도 널리 쓰인다(Liu, Chu, & Ding, 2004). 골 형성 작용을 강화시키기 위한 표면 변형 방법에 대해 많은 연구가 있었다. machining, grinding, polishing, blasting 등의 기계적 방법과 (Buser et al., 1999; Sutherland, Forshaw, Allen, Brown, & Williams, 1993; Wennerberg, Albrektsson, Johansson, & Andersson, 1996), 산-에칭(acid-etching), H₂O₂-에칭, 알칼리-에칭, 졸-겔 코팅(sol-gel coating), 양극 산화(anodic oxidation), 화학 증기 증착(chemical vapor deposition), 생화학 개질(biochemical modification) 등의 화학적인 방법이 있다(Andreazza, De Barros, Andreazza-Vignolle, Rats, & Vandenbulcke, 1998). 아미노화된 티타늄(Ti)의 가능성을 검사하기 위해 헤파린을 티타늄 표면에 고정시키고 헤파린과의 특이 반응을 통해 rhBMP-2를 고정시킨 바 있으며(Ruppert, Hoffmann, & Sebal, 1996) 효과적인 성장인자인 rhBMP-2는 골과 연골의 형성에 중요한 역할을 한다고 알려졌다.

[0006]

예를 들어, 임플란트의 표면에 성장-촉진 특성을 부여하는 기술에 관한 특허로서, 대한민국 공개특허공보 제 2005-58452호(2005. 6. 15 공개)에는 골 조직 또는 골 대체체로 보충된, 골 조직 내에 이식하기 위한 임플란트가 알려져 있다. 상기 특허의 경우에는 골 조직과 접촉되거나 또는 골 조직 옆의 주위에서 성장하거나 또는 골 조직과 상호 성장하는 임플란트의 표면은 제 1 유형의 영역과 상기 제 1 유형의 표면 영역과 상이한 제 2 유형의 영역을 포함하고 있으며, 상기 제 1 유형의 표면 영역은 골-통합, 염증-억제, 감염-치료, 성장-촉진 효과들을 갖는 화합물들이 골 조직의 내성장에 적합한 구조를 가지도록 형성된 것으로, 상기 제 1 유형의 표면 영역은, 예를 들면, 생물학적으로 양립가능한 표면(예컨대, 티타늄(Ti)으로 제조됨)이며, 이것들은 골조직의 내성장에 적합한 구조를 가지도록 형성될 수 있다. 또한, 이러한 표면에는 칼슘 포스페이트를 포함하는 재료가 추가적으로 코팅될 수 있다. 성장 인자를 포함하는 겔 또는 폴리머를 포함할 수 있는 것으로 되어 있기 때문에 임플란트의 표면에 성장-촉진 인자를 도포하기 위해서는 전처리로서 임플란트의 표면에 상기 성장-촉진 인자를 고정시키기 위한 칼슘 포스페이트를 포함하는 재료나 또는 성장-촉진 인자를 포함하는 겔 또는 폴리머와 같은 고정체를 반드시 이용하여 코팅하여야만 하는 문제점들이 있었다.

[0007]

또한, 임플란트 표면에 골 형성 촉진 인자를 고정화시키는 기술로서, 티타늄(Ti) 임플란트 표면에 실란기를 도입하고, 실란기의 아민 말단기와 헤파린의 카르복실기 사이의 결합을 통해 헤파린을 고정하고, 다시 헤파린에 rhBMP-2를 고정화시켜 티타늄(Ti) 임플란트 표면을 기능화시키는 내용이 보고된 바 있다[경희대학교 박사학위

논문, Titanium with Heparin and Recombinant Human Bone Morphogenic Protein (rhBMP-2) for Inhibition of Inflammation and Enhancement of Osteoblast Function, w010]. 여기에는 기능화된 티타늄(Ti) 임플란트로 인한 염증 억제 반응과 조골세포 분화 향상 효과가 있음이 기술되어 있다.

[0008] 또한, 다른 선행문헌(대한치과보철학회지/v.51 no.4, 2013년, pp.307-314)에는 임플란트의 표면을 양극 산화 처리하여 개질한 후, 여기에 화학적 이식 방법으로 3,4-dihydroxyphenylalanine(DOPA)-C-heparin과 rhBMP-2을 고정화시켜 티타늄(Ti) 임플란트 표면을 기능화시키는 내용이 개시되어 있다.

[0009] 또한, 대한민국 등록특허공보 제10-0736826호에는 표면을 가공하여 재조합 골 형성 촉진 인자인 rhBMP-2(recombinant human bone morphogenic protein-2)를 도포하여 영하 $75 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 의 냉동실에서 3~4시간 동안 1차 냉동시키고, 그리고 1차 냉동시킨 치과용 임플란트를 다시 미리 영하 $75 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 로 예냉시켜 놓은 냉동건조기에 넣고, 0.05 ± 0.005 torr의 압력으로 8시간 동안 2차 냉동 건조시키는 것을 특징으로 하는 재조합 골 형성 촉진 인자를 도포한 치과용 임플란트가 개시되어 있다. 상기 선행문헌은 rhBMP-2가 임플란트 표면에 물리적으로 흡착되기 때문에 안정성 측면에서 문제가 있다.

[0010] 또한, 대한민국 등록특허공보 제10-0892866호에는 i) 생체 이식용 임플란트 표면에 양극 산화방법을 이용해 전기화학적 산화막을 형성시키는 단계; ii) 피라냐(piranha), O_3 및 H_2O -Plasma로 이루어진 군에서 선택된 하나를 이용하여 상기 임플란트 표면을 처리하여 양극 산화막을 활성화시키는 단계; iii) 상기 양극 산화막 표면에 실란기를 가지는 중간 반응기형성 물질로 중간 반응기층을 형성하는 단계; iv) 상기 중간 반응기층과 생리활성 물질을 이어주는, BMOE(비스-말레이미도에탄) 및 SMCC(석신이미딜 4-(N-말레이미도에틸)-사이클로헥산-1-카복실레이트)로 이루어진 그룹에서 선택된 링커 물질로 이루어진 링커층을 형성하는 단계; 및 v) 상기 링커층이 형성된 생체이식용 임플란트 표면에 생리활성 물질을 고정화하는 단계를 포함하는 임플란트 표면에 생리활성 물질의 고정화 방법이 개시된 바 있다.

[0011] 그러나, 이들 선행문헌들에 보고된 임플란트는 골 형성 촉진 인자가 그 표면에 고정되기 어렵거나 고정되더라도 쉽게 떨어지거나 빨리 방출되어 임플란트 이식 후 골 형성 활성이 저하되고 골 조직과의 유착이 어렵다는 문제를 완전히 해결하지 못하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명은 이러한 종래의 배경하에서 도출된 것으로서, 본 발명의 일 목적은 골 유도 인자가 용이하게 고정될 수 있도록 간단한 방법을 통해 표면이 개질된 임플란트 및 이의 제조방법을 제공하는데에 있다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 표면에 고정된 골 유도 인자를 서서히 방출시켜 조골세포의 분화 및 골 형성을 지속적으로 유도 또는 촉진할 수 있는 골 형성 유도 또는 촉진용 임플란트 및 이의 제조방법을 제공하는데에 있다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명의 발명자들은 금속 또는 금속산화물로 이루어진 임플란트 기재의 표면에 간단하고 안전한 클릭반응을 이용하여 링커를 형성하는 경우 헤파린, 골 유도 인자 등과 같은 생체 유래 물질을 효율적으로 고정화시킬 수 있다는 점 및 상기 링커 또는 헤파린에 고정화된 골 유도 인자는 생체 내 조건에서 서서히 방출되고 조골세포의 분화 유도를 향상시키고 조골세포의 증식을 촉진시켜 궁극적으로 골 형성을 유도하거나 촉진한다는 점을 발견하고 본 발명을 완성하였다.

[0015] 본 발명의 일 목적을 해결하기 위하여, 본 발명은 표면에 수산기가 도입된 임플란트 기재 및 링커를 포함하고, 상기 임플란트 기재는 전체 또는 적어도 표면이 금속 또는 금속산화물로 이루어지고, 상기 링커는 트리아졸기(triazole group)를 포함하고, 하나의 말단은 상기 임플란트 기재의 표면에 도입된 수산기와 결합한 상태로 존재하고, 수산기와 결합하지 않은 다른 말단은 아민기 또는 카르복실기로 이루어진 것을 특징으로 하는 표면 개질된 임플란트를 제공한다. 또한, 본 발명은 (S1) 전체 또는 적어도 표면이 금속 또는 금속산화물로 이루어진 임플란트 기재의 표면에 수산기를 도입하는 단계; (S2) 상기 임플란트 기재의 표면에 도입된 수산기에 알킨 화합물을 결합시키는 단계; 및 (S3) 상기 알킨(Alkyne) 화합물과 아자이드(Azide) 화합물의 클릭 반응을 통해 링커를 형성하는 단계를 포함하고, 상기 링커는 트리아졸기(triazole group)를 포함하고, 하나의 말단은 상기 임

플라트 기재의 표면에 도입된 수산기와 결합한 상태로 존재하고, 수산기와 결합하지 않은 다른 말단은 아민기 또는 카르복실기로 이루어진 것을 특징으로 하는 표면 개질된 임플란트의 제조방법을 제공한다.

[0016]

본 발명의 일 목적을 해결하기 위하여, 본 발명은 표면에 수산기가 도입된 임플란트 기재, 링커 및 상기 링커에 고정된 헤파린을 포함하고, 상기 임플란트 기재는 전체 또는 적어도 표면이 금속 또는 금속산화물로 이루어지고, 상기 링커는 트리아졸기(triazole group)를 포함하고, 하나의 말단은 상기 임플란트 기재의 표면에 도입된 수산기와 결합한 상태로 존재하고, 수산기와 결합하지 않은 다른 말단은 아민기 또는 카르복실기로 이루어진 것을 특징으로 하는 표면 개질된 임플란트를 제공한다. 또한, 본 발명은 (S1) 전체 또는 적어도 표면이 금속 또는 금속산화물로 이루어진 임플란트 기재의 표면에 수산기를 도입하는 단계; (S2) 상기 임플란트 기재의 표면에 도입된 수산기에 알킨 화합물을 결합시키는 단계; (S3) 상기 알킨(Alkyne) 화합물과 아자이드(Azide) 화합물의 클릭 반응을 통해 링커를 형성하는 단계; 및 (S4) 상기 링커에 헤파린을 고정화시키는 단계를 포함하고, 상기 (S3) 단계에서 링커는 트리아졸기(triazole group)를 포함하고, 수산기와 결합하지 않은 다른 말단은 아민기 또는 카르복실기로 이루어진 것을 특징으로 하는 표면 개질된 임플란트의 제조방법을 제공한다.

[0017]

본 발명의 다른 목적을 해결하기 위하여, 본 발명은 표면에 수산기가 도입된 임플란트 기재, 링커 및 상기 링커에 고정된 골 유도 인자를 포함하고, 상기 임플란트 기재는 전체 또는 적어도 표면이 금속 또는 금속산화물로 이루어지고, 상기 링커는 트리아졸기(triazole group)를 포함하고, 하나의 말단은 상기 임플란트 기재의 표면에 도입된 수산기와 결합한 상태로 존재하고, 수산기와 결합하지 않은 다른 말단은 아민기 또는 카르복실기로 이루어진 것을 특징으로 하는 골 형성 유도 또는 촉진용 임플란트를 제공한다. 또한, 본 발명은 (S1) 전체 또는 적어도 표면이 금속 또는 금속산화물로 이루어진 임플란트 기재의 표면에 수산기를 도입하는 단계; (S2) 상기 임플란트 기재의 표면에 도입된 수산기에 알킨 화합물을 결합시키는 단계; (S3) 상기 알킨(Alkyne) 화합물과 아자이드(Azide) 화합물의 클릭 반응을 통해 링커를 형성하는 단계; 및 (S4') 상기 링커에 골 유도 인자를 고정화시키는 단계를 포함하고, 상기 (S3) 단계에서 링커는 트리아졸기(triazole group)를 포함하고, 수산기와 결합하지 않은 다른 말단은 아민기 또는 카르복실기로 이루어진 것을 특징으로 하는 골 형성 유도 또는 촉진용 임플란트의 제조방법을 제공한다.

[0018]

본 발명의 다른 목적을 해결하기 위하여, 본 발명은 표면에 수산기가 도입된 임플란트 기재, 링커, 상기 링커에 고정된 헤파린 및 상기 링커 또는 헤파린에 고정된 골 유도 인자를 포함하고, 상기 임플란트 기재는 전체 또는 적어도 표면이 금속 또는 금속산화물로 이루어지고, 상기 링커는 트리아졸기(triazole group)를 포함하고, 하나의 말단은 상기 임플란트 기재의 표면에 도입된 수산기와 결합한 상태로 존재하고, 수산기와 결합하지 않은 다른 말단은 아민기 또는 카르복실기로 이루어진 것을 특징으로 하는 골 형성 유도 또는 촉진용 임플란트를 제공한다. 또한, 본 발명은 (S1) 전체 또는 적어도 표면이 금속 또는 금속산화물로 이루어진 임플란트 기재의 표면에 수산기를 도입하는 단계; 상기 (S2) 임플란트 기재의 표면에 도입된 수산기에 알킨 화합물을 결합시키는 단계; (S3) 상기 알킨(Alkyne) 화합물과 아자이드(Azide) 화합물의 클릭 반응을 통해 링커를 형성하는 단계 (S4) 상기 링커에 헤파린을 고정화시키는 단계; 및 (S5) 상기 링커 또는 헤파린에 골 유도 인자를 고정화시키는 단계를 포함하고, 상기 (S3) 단계에서 링커는 트리아졸기(triazole group)를 포함하고, 수산기와 결합하지 않은 다른 말단은 아민기 또는 카르복실기로 이루어진 것을 특징으로 하는 골 형성 유도 또는 촉진용 임플란트의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0019]

본 발명에 따른 표면 개질된 임플란트는 공정이 간단하고 수율이 높으며 안전한 클릭 반응(Click reaction)을 통해 제조될 수 있다. 클릭 반응(Click reaction)을 통해 임플란트 기재에 형성된 링커는 헤파린, 골 유도 인자를 임플란트에 안정적이면서도 보다 용이하게 고정화시킬 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 골 형성 유도 또는 촉진용 임플란트는 골 유도 인자를 장시간 동안 서서히 방출하기 때문에 골 유도 인자의 조기 방출에 의한 문제를 해결할 수 있고, 조골세포의 분화 또는 증식을 유도 또는 촉진하여 골 형성 및 임플란트의 골 유착을 향상시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020]

도 1은 이산화 티타늄 디스크 표면에 수산기를 도입한 후 클릭반응을 이용하여 링커를 형성하는 과정을 도시한 것이다.

도 2는 링커에 의해 표면 개질된 임플란트에 히파린 및 골 형성 촉진 인자인 rhBMP-2를 순차적으로 결합하는 과정을 도식화한 것이다.

도 3은 Ti-1 내지 Ti-6 표본의 표면을 주사전자현미경(SEM)으로 관찰한 결과를 나타낸다.

도 4는 Ti-6를 28일 동안 배양하였을 때 방출되는 rhBMP-2의 양을 누적 형태로 나타낸 것이다.

도 5는 배양 후 1일, 3일 및 7일이 되었을 때 Ti-1, Ti-2 및 Ti-5 및 Ti-6 상에서 배양된 MC3T3-E1 세포의 증식과 형태를 형광 현미경으로 관찰한 결과를 나타낸 사진이다.

도 6은 배양 후 1일, 3일 및 7일이 되었을 때 대조군, Ti-1, Ti-2 및 Ti-5 및 Ti-6 상에서 배양된 MC3T3-E1 세포의 증식률을 정량적으로 나타낸 그래프이다.

도 7은 대조군, Ti-1, Ti-2, Ti-5 및 Ti-6 상에서 7일, 14일 및 21일 동안 배양된 MC3T3-E1 세포의 ALP 활성 수준을 나타낸 그래프이다.

도 8은 14일 및 21일 동안 MC3T3-E1 세포를 대조군, Ti-1, Ti-2, Ti-5 및 Ti-6 상에서 배양하였을 때 침착된 칼슘량을 정량적으로 비교한 그래프이고, 도 9는 21일 동안 MC3T3-E1 세포를 대조군, Ti-1, Ti-2, Ti-5 및 Ti-6 상에서 배양하였을 때 침착된 칼슘 양을 공초점 주사 레이저 현미경으로 관찰한 이미지이다.

도 10은 대조군 및 Ti-1, Ti-2, Ti-5 및 Ti-6 상에서 MC3T3-E1 세포를 배양할 때 조골세포 분화 관련 유전자의 발현량을 정량적으로 나타낸 그래프이다(A : OSX; B : Runx2; C : COL1; D : OC; E : OP; F : BSP).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021]

이하, 본 발명을 구체적으로 설명한다.

[0022]

본 발명의 일 측면은 골 유도 인자와 같은 생체 유래 물질을 안정적이면서 쉽게 고정화할 수 있도록 표면 개질된 임플란트 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

[0023]

본 발명의 일 예에 따른 표면 개질된 임플란트는 표면에 수산기가 도입된 임플란트 기재 및 링커를 포함한다. 또한, 본 발명의 일 예에 따른 표면 개질된 임플란트는 바람직하게는 상기 링커에 결합된 히파린(Heparin)을 더 포함할 수 있다.

[0024]

상기 임플란트 기재는 전체가 금속 또는 금속산화물로 이루어지거나 적어도 표면이 금속 또는 금속산화물로 이루어진다. 상기 임플란트 기재를 형성하는 재료는 치과용 임플란트, 정형외과용 임플란트, 생체이식용 임플란트 등과 같은 의료용 임플란트에서 사용되는 금속계 재료라면 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 티타늄, 티타늄 합금, 이산화티타늄, 지르코늄, 지르코늄 합금, 산화지르코늄, 금, 백금, 탄탈륨, 탄탈륨 합금, 하프늄, 하프늄 합금, 니오븀, 니오븀 합금, 니켈, 니켈 합금, 철, 크롬, 코발트, 알루미늄, 알루미늄 합금 및 팔라듐, 크롬-바나듐 합금, 코발트-크롬 합금 및 스테인레스 스틸로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있으며, 티타늄(Ti), 티타늄 합금 또는 이산화티타늄에서 선택되는 1종 이상인 것이 바람직하다. 상기 티타늄 합금은 알루미늄, 탄탈륨, 니오븀, 바나듐, 지르코늄, 주석, 나트륨, 마그네슘, 인, 백금 및 폴리브텐으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상과 티타늄을 포함할 수 있다. 상기 티타늄 합금의 구체적인 예로는 중량기준으로 98~99% 순도의 티타늄 또는 티타늄에 Al, V, Na, Mg, P, Nb, Zr, Sn, Pt, Ta 중 하나 또는 그 이상이 0.1~15% 첨가된 것이 있다. 상기 지르코늄 합금은 하프늄, 니오븀, 주석, 폴리브텐, 철, 크롬, 니켈, 구리 및 티타늄으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상과 지르코늄을 포함할 수 있다. 지르코늄 합금의 구체적인 예로는 90~98.5% 순도의 지르코늄(Zr)에 0.005~10% Hf, 0~4% Nb, 0~3% Sn, 0~2% Mo, 0.1~1% Fe, 0~1% Cr, 0~0.1% Ni, 0~0.1% Cu 중 하나 또는 그 이상이 첨가된 것이 있다. 상기 코발트-크롬 합금의 구체적인 예로는 코발트-크롬에 Mo, W, Ni, Mn, C, Si 및 Fe 중 하나 또는 그 이상이 중량기준으로 0.1~45% 첨가된 것이 있다. 또한, 상기 스테인레스 스틸의 구체적인 예로는 314, 316, 316L, 22-13-5 스테인레스 스틸 등이 있다.

[0025]

또한, 상기 링커는 내부에 트리아졸기(triazole group)를 포함하고, 하나의 말단은 임플란트 기재의 표면에 도입된 수산기와 결합한 상태로 존재하고, 수산기와 결합하지 않은 다른 말단은 아민기 또는 카르복실기로 이루어진다. 상기 링커의 다른 말단에 존재하는 아민기 또는 카르복실기는 후술하는 히파린, 골 유도 인자와 수소 결합 또는 아마이드 결합을 형성하여 히파린, 골 유도 인자를 임플란트 표면에 고정시키는 역할을 한다. 상기 링커는 바람직하게는 알킨(Alkyne) 화합물과 아자이드(Azide) 화합물의 클릭 반응(Click reaction)에 의해 형성된다. 구체적으로 임플란트 기재의 표면에 도입된 수산기에 알킨 화합물을 결합시키고, 이후 통상적인 클릭 반응 시스템 하에서 알킨 화합물에 아자이드 화합물을 반응시켜 링커를 형성할 수 있다. 이때, 링커에 존재하는 트리

아졸기는 알킨 화합물에 존재하는 삼중 결합 부위와 아자이드 화합물에 존재하는 아자이드기와의 화학적 결합에 의해 형성된다. 본 발명에서 클릭 반응(Click reaction)은 1,3-쌍극성 모이어티(moiety), 특히 아자이드와 불포화 모이어티(특히 알킨)와 반응으로서 의도되며, 1,2,3-트리아졸 모이어티와 같이 5원 복소환식 모이어티를 생성하는 1,3-쌍극성 고리화첨가 반응인 아자이드-알킨 휘스겐 고리화 첨가반응(Azide-alkyne Huisgen cycloaddition)을 포함한다. 클릭 반응은 반응 조건이 온화하고 높은 효율성을 가진다. 본 발명에서 링커를 구성하는 알킨 화합물은 바람직하게는 하나의 말단이 할로젠 원소, 수산기 또는 아민기로 이루어지고, 다른 말단이 삼중 결합 부위를 갖는다. 알킨 화합물의 일 말단에 존재하는 할로젠 원소, 수산기 또는 아민기는 임플란트 기체의 표면에 도입된 수산기와 반응하여 화학적으로 결합하고, 알킨 화합물의 타 말단에 존재하는 삼중 결합은 아자이드(Azide) 화합물에 존재하는 아자이드기와 화학적으로 결합하여 트리아졸기(triazole group)를 형성한다. 본 발명에서 사용되는 알킨 화합물은 클로로에틴(Chloroethyne), 브로로에틴(Bromoethyne), 아이오도에틴(Iodoethyne), 프로파길 클로라이드(Propargyl chloride), 프로파길 브로마이드(Propargyl bromide), 프로파길 아이오다이드(Propargyl iodide), 프로파길 알코올(Propargyl alcohol), Propargyl amine(프로파길 아민), 1-클로로-2-부틴(1-Chloro-2-butyne), 1-브로모-2-부틴(1-Bromo-2-butyne), 1-아이오도-2-부틴(1-Iodo-2-butyne), 3-클로로-1-부틴(3-Chloro-1-butyne), 3-브로모-1-부틴(3-Bromo-1-butyne), 3-아이오도-1-부틴(3-Iodo-1-butyne), 3-부틴-1-올(3-Butyn-1-ol), 4-펜틴-1-올(4-Pentyn-1-ol), 6-헥신-1-올(6-Hexyn-1-ol), 7-옥틴-1-올(7-Octyn-1-ol), 10-운데신-1-올(10-Undecyn-1-ol), 5-클로로-1-펜틴(5-Chloro-1-pentyne), 5-브로모-1-펜틴(5-Bromo-1-pentyne), 5-아이오도-1-펜틴(5-Iodo-1-pentyne), 1-에티닐시클로헥실아민(1-Ethynylcyclohexylamine), 3-클로로-3-메틸-1-부틴(3-Chloro-3-methyl-1-butyne), 3-브로모-3-메틸-1-부틴(3-Bromo-3-methyl-1-butyne), 3-아이오도-3-메틸-1-부틴(3-Iodo-3-methyl-1-butyne), 6-클로로-1-헥신(6-Chloro-1-hexyne), 6-브로모-1-헥신(6-Bromo-1-hexyne) 및 6-아이오도-1-헥신(6-Iodo-1-hexyne)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있으나, 여기에 반드시 제한되는 것은 아니다. 또한, 본 발명에서 링커를 구성하는 아자이드 화합물은 바람직하게는 하나의 말단이 아자이드기(azide group)로 이루어지고, 다른 말단이 아민기 또는 카르복실기로 이루어진다. 아자이드 화합물의 일 말단에 존재하는 아자이드기(azide group)는 알킨 화합물의 말단에 존재하는 삼중 결합 부위와 화학적으로 결합하여 트리아졸기(triazole group)를 형성하고, 아자이드 화합물의 타 말단에 존재하는 아민기 또는 카르복실기는 후술하는 헤파린, 골 유도 인자 등에 존재하는 아민기 또는 카르복실기와 수소 결합을 형성하거나 아마이드 결합을 형성한다. 본 발명에서 사용되는 아자이드 화합물은 아지도메탄아민(azidomethanamine), 2-아지도에탄아민(2-Azidoethanamine), 3-아지도-1-프로판아민(3-Azido-1-propanamine), 4-아지도-1-부탄아민(4-Azido-1-butanamine), 5-아지도-1-펜탄아민(5-Azido-1-pentanamine), 6-아지도-1-헥산아민(6-Azido-1-hexanamine), 11-아지도-3,6,9-트리아옥사운데칸-1-아민(11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amine), 2-아지도아세트산(2-Azidoacetic acid), 3-아지도프로피온산(3-Azidopropionic acid), 4-아지도부티르산(4-azidobutyric acid), 5-아지도펜타노익산(5-Azidopentanoic acid), 3-(4-아지도페닐)프로피온산[3-(4-Azidophenyl)propionic acid] 및 2-아지도벤조익산(2-Azidobenzoic acid)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있으나, 여기에 반드시 한정되는 것은 아니다.

[0026]

또한, 본 발명의 일 예에 따른 표면 개질된 임플란트는 바람직하게는 표면에 수산기가 도입된 임플란트 기체, 링커 및 상기 링커에 고정된 헤파린을 포함한다. 헤파린은 BMP(특히, BMP-2), GDF(growth and differentiation factor) 등과 같은 생체 유래 물질과 강한 상호 작용을 통해 결합할 수 있으므로 본 발명에서 헤파린은 생체 유래 물질을 임플란트 기체에 고정화하기 위한 바인딩 시스템(binding system)으로 작용할 수 있다. 헤파린은 약 3~30kDa의 분자량을 가진 산성 다당류의 일종으로, 헤파린의 대표적인 형태는 D-글루코사민과 D-글루쿠론산이 α -1,4의 결합으로 교대로 사슬 모양을 이루고 황산이 글루코사민의 N과 6위치 및 1개 걸러 글루쿠론산의 2위치에 결합되어 있다. 본 발명에서 헤파린은 링커를 구성하는 아자이드 화합물의 말단에 존재하는 아민기 또는 카르복실기와 수소 결합 또는 아마이드 결합을 형성하여 임플란트 기체에 고정화될 수 있다.

[0027]

본 발명의 일 예에 따른 표면 개질된 임플란트의 제조방법은 (S1) 전체 또는 적어도 표면이 금속 또는 금속산화물로 이루어진 임플란트 기체의 표면에 수산기를 도입하는 단계; (S2) 상기 임플란트 기체의 표면에 도입된 수산기에 알킨 화합물을 결합시키는 단계; 및 (S3) 상기 알킨(Alkyne) 화합물과 아자이드(Azide) 화합물의 클릭 반응을 통해 링커를 형성하는 단계를 포함한다. 또한, 본 발명의 일 예에 따른 표면 개질된 임플란트의 제조방법은 (S4) 상기 링커에 헤파린을 고정화시키는 단계를 더 포함할 수 있다. 이때, 상기 (S3) 단계에서 링커는 트리아졸기(triazole group)를 포함하고, 수산기와 결합하지 않은 다른 말단은 아민기 또는 카르복실기로 이루어진다. 또한, 본 발명에서 전체 또는 적어도 표면이 금속 또는 금속산화물로 이루어진 임플란트 기체의 표면에 수산기를 도입하기 위해 임플란트 기체를 알칼리금속 하이드록사이드 용액, 알칼리토금속 하이드록사이드 용액 또는 과산화수소 용액 등으로 처리하여 표면을 산화하는 방법 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 되지 않고

양극 산화 처리 등 공지의 다양한 방법을 사용할 수 있다. 또한, 상기 임플란트 기재의 전체 또는 표면은 티타늄(Ti), 티타늄 합금 또는 이산화티타늄에서 선택되는 1종 이상인 것이 바람직하다. 또한, 상기 알킨 화합물은 바람직하게는 하나의 말단이 할로젠 원소, 수산기 또는 아민기로 이루어지고, 다른 말단은 삼중 결합을 갖는다. 본 발명에서 알킨 화합물은 더 바람직하게는 클로로에틴(Chloroethyne), 브로로에틴(Bromoethyne), 아이오도에틴(Iodoethyne), 프로파길 클로라이드(Propargyl chloride), 프로파길 브로마이드(Propargyl bromide), 프로파길 아이오다이드(Propargyl iodide), 프로파길 알코올(Propargyl alcohol), Propargyl amine(프로파길 아민), 1-클로로-2-부틴(1-Chloro-2-butyne), 1-브로모-2-부틴(1-Bromo-2-butyne), 1-아이오도-2-부틴(1-Iodo-2-butyne), 3-클로로-1-부틴(3-Chloro-1-butyne), 3-브로모-1-부틴(3-Bromo-1-butyne), 3-아이오도-1-부틴(3-Iodo-1-butyne), 3-부틴-1-올(3-Butyn-1-ol), 4-펜틴-1-올(4-Pentyn-1-ol), 6-헥신-1-올(6-Hexyn-1-ol), 7-옥틴-1-올(7-Octyn-1-ol), 10-운데신-1-올(10-Undecyn-1-ol), 5-클로로-1-펜틴(5-Chloro-1-pentyne), 5-브로모-1-펜틴(5-Bromo-1-pentyne), 5-아이오도-1-펜틴(5-Iodo-1-pentyne), 1-에티닐시클로헥실아민(1-Ethynylcyclohexylamine), 3-클로로-3-메틸-1-부틴(3-Chloro-3-methyl-1-butyne), 3-브로모-3-메틸-1-부틴(3-Bromo-3-methyl-1-butyne), 3-아이오도-3-메틸-1-부틴(3-Iodo-3-methyl-1-butyne), 6-클로로-1-헥신(6-Chloro-1-hexyne), 6-브로모-1-헥신(6-Bromo-1-hexyne) 및 6-아이오도-1-헥신(6-Iodo-1-hexyne)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다. 또한, 상기 아자이드 화합물은 바람직하게는 하나의 말단이 아자이드기(azide group)로 이루어지고, 다른 말단은 아민기 또는 카르복실기로 이루어진다. 본 발명에서 아자이드 화합물은 바람직하게는 아지도메탄아민(azidomethanamine), 2-아지도에탄아민(2-Azidoethanamine), 3-아지도-1-프로판아민(3-Azido-1-propanamine), 4-아지도-1-부탄아민(4-Azido-1-butanamine), 5-아지도-1-펜탄아민(5-Azido-1-pentanamine), 6-아지도-1-헥산아민(6-Azido-1-hexanamine), 11-아지도-3,6,9-트라이옥사운데칸-1-아민(11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amine), 2-아지도아세트산(2-Azidoacetic acid), 3-아지도프로피온산(3-Azidopropionic acid), 4-아지도부티르산(4-azidobutyric acid), 5-아지도펜타노익산(5-Azidopentanoic acid), 3-(4-아지도페닐)프로피온산[3-(4-Azidophenyl)propionic acid] 및 2-아지도벤조익산(2-Azidobenzoic acid)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다. 또한, 상기 헤파린은 링커의 말단에 존재하는 아민기 또는 카르복실기와 수소 결합 또는 아마이드 결합에 의해 고정화될 수 있고, 바람직하게는 링커와의 아마이드 결합에 의해 고정화된다.

[0028]

본 발명의 다른 측면은 골 유도 인자를 장시간 동안 서서히 방출할 수 있고, 조골세포의 분화 또는 증식을 유도 또는 촉진하여 궁극적으로 골 형성 내지 임플란트의 골 유착을 향상시킬 수 있는 골 형성 유도 또는 촉진용 임플란트에 관한 것이다. 본 발명의 골 형성 유도 또는 촉진용 임플란트는 치과용 임플란트, 정형외과용 임플란트 또는 생체이식용 임플란트 등과 같이 다양한 용도로 사용될 수 있다.

[0029]

본 발명의 일 예에 따른 골 형성 유도 또는 촉진용 임플란트는 표면에 수산기가 도입된 임플란트 기재, 링커 및 상기 링커에 고정된 골 유도 인자를 포함한다. 이때, 상기 임플란트 기재는 전체 또는 적어도 표면이 금속 또는 금속산화물로 이루어진다. 또한, 상기 링커는 트리아졸기(triazole group)를 포함하고, 하나의 말단은 상기 임플란트 기재의 표면에 도입된 수산기와 결합한 상태로 존재하고, 수산기와 결합하지 않은 다른 말단은 아민기 또는 카르복실기로 이루어진다. 상기 링커의 수산기와 결합하지 않은 다른 말단에 존재하는 아민기 또는 카르복실기는 골 유도 인자와 수소 결합, 아마이드 결합을 형성할 수도 있고, 바람직하게는 골 유도 인자와의 사이에 형성된 아마이드 결합 형태로 변형되어 존재한다. 본 발명에서 사용되는 용어 '골 유도 인자'는 골 형성 또는 골 성장을 유도 또는 촉진할 수 있는 생체 유래의 물질, 특히 단백질을 총칭하는 개념이다. 상기 골 유도 인자의 구체적인 예로는 골 형성 단백질(bone morphogenic protein, BMP), 성장분화 인자(Growth and differentiation factor, GDF), 형질전환 성장 인자- β (Transforming Growth Factor- β , TGF- β), 인슐린형 성장 인자(insulin like growth fador, IGF), 섬유아세포성장인자(fibroblast growth factor, FGF), 프로스타글란딘 E 수용체 4(Prostaglandin E receptor 4, EP 4), 혈소판 풍부 혈장(platelet-rich plasma, PRP), 혈소판 유래 성장 인자(platelet derived growth factor, PDGF) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서 사용되는 골 유도 인자는 골 형성 단백질(bone morphogenic protein, BMP) 또는 성장분화 인자(Growth and differentiation factor, GDF)인 것이 바람직하다. 상기 골 형성 단백질(bone morphogenic protein, BMP)은 BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8, BMP-9, BMP-10, BMP-11, BMP-12, BMP-13, BMP-14, BMP-15 및 BMP-16에서 선택될 수 있고, BMP(bone morphogenic protein)-2, BMP-4, BMP-6 및 BMP-7에서 선택되는 것이 바람직하고, BMP-2인 것이 더 바람직하고, 생체 적합성, 이식 적합성 등을 고려할 때, rhBMP-2인 것이 가장 바람직하다. 또한, 상기 성장분화 인자(Growth and differentiation factor, GDF)는 GDF-1, GDF-2, GDF-3, GDF-4, GDF-5, GDF-6, GDF-7, GDF-8, GDF-9, GDF-10 및 GDF-11에서 선택될 수 있고, GDF-5인 것이 바람직하

다.

[0030] 본 발명의 일 예에 따른 골 형성 유도 또는 촉진용 임플란트의 제조방법은 (S1) 전체 또는 적어도 표면이 금속 또는 금속산화물로 이루어진 임플란트 기재의 표면에 수산기를 도입하는 단계; (S2) 상기 임플란트 기재의 표면에 도입된 수산기에 알킨 화합물을 결합시키는 단계; (S3) 상기 알킨(Alkyne) 화합물과 아자이드(Azide) 화합물의 클릭 반응을 통해 링커를 형성하는 단계; 및 (S4') 상기 링커에 골 유도 인자를 고정화시키는 단계를 포함한다. 이때, 상기 (S3) 단계에서 링커는 트리아졸기(triazole group)를 포함하고, 수산기와 결합하지 않은 다른 말단은 아민기 또는 카르복실기로 이루어진다. 상기 링커의 수산기와 결합하지 않은 다른 말단에 존재하는 아민기 또는 카르복실기는 골 유도 인자와 수소 결합, 아미이드 결합 등을 형성할 수도 있고, 바람직하게는 골 유도 인자와의 사이에 형성된 아미이드 결합 형태로 변형되어 존재한다. 또한, 상기 골 유도 인자는 BMP(bone morphogenetic protein)인 것이 바람직하고, BMP-2(bone morphogenetic protein-2)인 것이 더 바람직하다.

[0031] 본 발명의 다른 예에 따른 골 형성 유도 또는 촉진용 임플란트는 표면에 수산기가 도입된 임플란트 기재, 링커, 상기 링커에 고정된 헤파린 및 상기 링커 또는 헤파린에 고정된 골 유도 인자를 포함한다. 이때, 상기 임플란트 기재는 전체 또는 적어도 표면이 금속 또는 금속산화물로 이루어진다. 또한, 상기 링커는 트리아졸기(triazole group)를 포함하고, 하나의 말단은 상기 임플란트 기재의 표면에 도입된 수산기와 결합한 상태로 존재하고, 수산기와 결합하지 않은 다른 말단은 아민기 또는 카르복실기로 이루어진다. 상기 링커의 말단 중 수산기와 결합하지 않은 다른 말단에 존재하는 아민기 또는 카르복실기는 헤파린 또는 골 유도 인자와 수소 결합, 아미이드 결합 등을 형성할 수도 있고, 바람직하게는 헤파린 또는 골 유도 인자와의 사이에 형성된 아미이드 결합 형태로 변형되어 존재한다. 또한, 상기 골 유도 인자는 헤파린과의 수소 결합, 아미이드 결합, 입체적 구조에 의한 강한 상호 작용 등에 의해 헤파린에 고정화된다. 또는 상기 골 유도 인자는 링커의 말단 중 수산기와 결합하지 않은 다른 말단에 존재하는 아민기 또는 카르복실기와 수소 결합, 아미이드 결합 등을 형성할 수도 있다. 또한, 상기 골 유도 인자는 BMP(bone morphogenetic protein)인 것이 바람직하고, BMP-2(bone morphogenetic protein-2)인 것이 더 바람직하다.

[0032] 본 발명의 다른 예에 따른 골 형성 유도 또는 촉진용 임플란트의 제조방법은 (S1) 전체 또는 적어도 표면이 금속 또는 금속산화물로 이루어진 임플란트 기재의 표면에 수산기를 도입하는 단계; (S2) 상기 임플란트 기재의 표면에 도입된 수산기에 알킨 화합물을 결합시키는 단계; (S3) 상기 알킨(Alkyne) 화합물과 아자이드(Azide) 화합물의 클릭 반응을 통해 링커를 형성하는 단계 (S4) 상기 링커에 헤파린을 고정화시키는 단계; 및 (S5) 상기 링커 또는 헤파린에 골 유도 인자를 고정화시키는 단계를 포함한다. 이때, 상기 (S3) 단계에서 링커는 트리아졸기(triazole group)를 포함하고, 수산기와 결합하지 않은 다른 말단은 아민기 또는 카르복실기로 이루어진다. 또한, 상기 골 유도 인자는 BMP(bone morphogenetic protein)인 것이 바람직하고, BMP-2(bone morphogenetic protein-2)인 것이 더 바람직하다.

[0033] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명의 기술적 특징을 명확하게 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 보호범위를 한정하는 것은 아니다.

[0034] 1. 골 형성 유도 또는 촉진용 임플란트의 제조

[0035] 단계 1 : 링커에 의해 표면 개질된 임플란트의 제조

[0036] 이산화티타늄 디스크(이하 'Ti-1'이라 칭함; 직경 : 10mm, 높이 : 3mm; 공급자 : DIO co., Busan, Republic of Korea)을 80℃에서 2.5N NaOH 수용액 500ml로 48시간 동안 처리하여 수산기를 도입하였다. 이후, 수산기가 도입된 표본들을 음파 처리하고, 증류수로 5분 동안 세 차례 세척하였다. 이후, 표본들을 질소 가스로 건조한 뒤 실온에서 유지하였다(이하 'Ti-2'라 칭함).

[0037] 이후, 상기 Ti-2와 K₂CO₃ 6.91g(0.05 mol에 해당함)을 무수 아세톤(anhydrous acetone) 500ml에 섞고, 여기에 프로파길 브로마이드(propargyl bromide) 4.31ml(0.05 mol에 해당함)를 상온에서 첨가한 후 24시간 동안 환류(reflux)하여 Ti-2의 표면에 도입된 수산기에 프로파길 브로마이드(propargyl bromide)를 결합시켰다. 이후, 표본들을 꺼내고 아세톤과 증류수로 3번 교대로 세척한 뒤 질소 가스로 건조시키고 실온에서 보관하였다(이하 'Ti-3'라 칭함).

[0038] 수득된 Ti-3와 2-아지도에탄아민(2-azidoethanamine) 1.41g(0.02 mol에 해당함)을 증류수 50ml에서 혼합하였다. 여기에 아스코브산 나트륨(Sodium ascorbate) 3.96g(0.02 mol에 해당함)과 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.89g(3.57 mmol에 해당함)을 실온에서 첨가하고 24시간 동안 70℃에서 클릭 반응(Click reaction) 시켰다. 도 1은 이산화 티타늄 디스크 표면에 수산기를 도입한 후 클릭반응을 이용하여 링커를 형성하는 과정을 도시한 것이다.

[0039] 단계 2 : 헤파린 및 골 형성 촉진 인자가 고정된 임플란트의 제조

[0040] 상기 단계 1에서 수득된 링커가 형성된 임플란트를 증류수로 3번 세척하고, 질소가스로 건조시킨 뒤 실온에서 보관하였다(이하 'Ti-4'라 칭함). Ti-4의 한쪽 면과 테두리 부분은 헤파린의 고정을 막기 위해 사포로 문질렀다. 헤파린(Heparin sodium; 분자량 : 12,000~15,000 g/mol; 공급자 : Acrose Organics, NJ, USA) 92mg과 DMT-MM[4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride] 1g(3.61 mmol에 해당함)을 증류수 40ml에 넣고 상온에서 한 시간 동안 지속적으로 저어서 혼합 용액을 제조하였다. 이후, 상기 혼합 용액에 Ti-4를 첨가하고 실온에서 48시간 동안 반응시켜 링커의 말단 아민기와 헤파린의 카르복실기 사이에 아마이드 결합을 유도하였다. 이후, 표본을 증류수로 3 번 세척하고 질소 가스로 건조시켰다(이하, 'Ti-5'라 칭함). 상기 Ti-5는 사용하기 전에는 -20℃에서 보관하였다.

[0041] 이어서, 수득된 Ti-5와 재조합 인간 BMP-2(recombinant human bone morphogenic protein-2; 이하, 'rhBMP-2'라 함; 공급자 : Peprotech, NJ, USA) 10ng을 PBS(Phosphate buffered saline; pH 7.4)에 넣고 혼합한 후 37℃ 및 80 rpm의 교반 조건에서 24시간 동안 배양하여 rhBMP-2를 주로 헤파린에 고정시켰다(이하, 'Ti-6'이라 함). 도 2는 링커에 의해 표면 개질된 임플란트에 헤파린 및 골 형성 촉진 인자인 rhBMP-2를 순차적으로 결합하는 과정을 도식화한 것이다.

[0042] 2. 골 형성 유도 또는 촉진용 임플란트의 특성 분석

[0043] (1) 주사전자현미경(SEM) 관찰

[0044] 상기에서 제조된 Ti-1 내지 Ti-6의 표면구조를 주사전자현미경(SEM)을 통해 확인하였다. 금속판에 Ti-1 내지 Ti-6 표본을 고정하고 15kV의 전압 하에서 sputter-coater(Eiko IB, Japan)로 금 코팅하였고, 1.5k의 배율로 관찰했다.

[0045] 도 3은 Ti-1 내지 Ti-6 표본의 표면을 주사전자현미경(SEM)으로 관찰한 결과를 나타낸다. 표면 형태의 주요한 차이는 Ti-1 및 Ti-2 사이에서 관찰되었다. Ti-1의 부드러운 표면은 2.5N의 NaOH 처리에 의해 금이 간 양상을 보였다. 프로파길 브로마이드로 처리된 Ti-3의 표면에도 균열이 남았지만, Ti-4 내지 Ti-6의 표면에는 각각 2-아지도에탄아민(2-azidoethanamine), 헤파린 및 rhBMP-2 처리로 인해 균열이 사라진 것을 관찰할 수 있었다.

[0046] (2) 정 접촉각(static contact angle) 측정 및 표면화학조성 분석

[0047] Ti-1 내지 Ti-6의 정 접촉각 측정은 Sessile drop method(60%의 상대습도와 20℃의 온도 조건에서 표면장력이 71.8mN/m로 미리 조정된 3μl의 증류수 물방울을 사용함)를 통해 수행하였고, 측정 장치로 telescopic goniometer(Pheonix 300, Seoul, Korea)를 사용하였다.

[0048] 또한, Ti-1 내지 Ti-6의 표면화학조성은 X선 광전자 분광법(X-ray Photoelectron Spectroscopy; 이하, 'XPS'라 함)에 의해 분석되었다. XPS는 90°의 입사 여각(grazing angle)과 3.1×10^{-9} Torr 이하의 고진공상태에서 Thermo Electron(U.K) unit을 사용하여 수행하였다. Monochromatic aluminum Kα X-ray radiation source(photoelectron energy = 1486.6eV)를 사용하였고, 광범위하게 스캔된 XPS는 187.7eV가 통과할 때 얻어졌으며 0-1400eV까지 측정했다.

[0049] 하기 표 1에 Ti-1 내지 Ti-6의 정 접촉각(static contact angle) 측정 결과 및 표면화학조성 분석 결과를 나타내었다.

표 1

	C1s (283.7 eV, %)	N1s (399.2 eV, %)	O1s (528.8 eV, %)	S2p (163.8 eV, %)	Static contact angle (°)
Ti-1	29.21	0.32	51.27	0.25	71.55 ± 2.95
Ti-2	14.11	0.14	62.24	0.31	37.91 ± 2.80
Ti-3	32.09	0.47	52.12	0.32	64.10 ± 2.53
Ti-4	28.50	3.12	46.15	0.21	42.45 ± 1.75
Ti-5	30.05	1.28	45.04	5.89	40.80 ± 1.08
Ti-6	29.06	0.66	54.82	3.26	29.19 ± 2.37

[0050]

[0051]

상기 표 1에서와 같이 Ti-1의 정 접촉각은 71.55° 인 반면, Ti-2의 정 접촉각은 37.91° 로 더 친수성을 나타내었다. 이는 Ti-2의 표면에 도입된 수산기(hydroxyl group) 때문이다. Ti-3 내지 Ti-6의 정 접촉각은 프로파길 그룹, 2-아지도에탄아민(2-azidoethanamine), 헤파린, rhBMP-2 등과 같은 다른 성분들의 표면 개질에 의해 각각 다르게 나타났다. 또한, 광범위하게 스캔된 XPS에 의할 때, Ti-2는 Ti-1 및 Ti-3보다 더 높은 O1s 퍼센트를 보였고, 이는 수산기의 형성에 기인한 것이다. Ti-4에서 높은 N1s 퍼센트는 링커 내에 존재하는 트리아졸기 및 링커 말단에 존재하는 아민기의 존재 때문인 것으로 판단된다. 또한, Ti-5에서의 낮은 N1s 퍼센트는 헤파린의 고정화 때문인 것으로 판단된다. 또한, Ti-6에서의 N1s 퍼센트는 Ti-5에 비해 감소한 값을 보였는데, 이는 rhBMP-2가 헤파린 또는 링커 말단에 존재하는 아민기에 고정화된 것에 기인한 것으로 보인다. 또한, Ti-5 및 Ti-6에서의 높은 S2p 퍼센트는 주로 헤파린의 고정화 때문인 것으로 판단된다. 한편, Ti-6에서의 S2p 퍼센트는 rhBMP-2의 고정화 때문에 감소하였다.

[0052]

(3) Ti-5에 고정된 헤파린의 정량분석

[0053]

Ti-5에 고정된 헤파린의 정량분석은 toluidine blue method를 사용하여 수행하였다. 0.2% NaCl 수용액 2ml 및 Ti-5의 혼합물에 0.005% toluidine blue 용액 500μl를 첨가하고 30분간 부드럽게 흔들어준 후 헥산을 첨가하였다. 이후, 혼합 용액으로부터 Ti-5를 제거하고, 620nm의 파장에서 수용액 층의 흡광도를 측정하였다. 헤파린의 정량분석은 미리 알려진 헤파린 농도로부터 작성된 검량선을 사용하여 계산하였다. 검량선은 NaCl 수용액 내의 7가지 헤파린 농도(0.1, 0.5, 2, 3, 4, 5 및 10μg/ml)를 이용하여 작성하였다.

[0054]

Ti-5에 고정된 헤파린의 양은 분석 샘플 당 $4.1 \pm 0.27 \mu\text{m}$ 로 나타났다. 이는 3-아미노프로필트라이에톡시실란(3-Aminopropyltriethoxysilane, APTES)을 이용하여 티타늄 표면에 헤파린을 고정화한 이전 연구[Kim et al., 2011 : The effect of immobilization of heparin and bone morphogenic protein-2(BMP-2) to titanium surfaces on inflammation and osteoblast function, Biomaterials, 32(2), 366-373] 결과에 비하여 68배 이상 증가한 양이다. 이로부터 헤파린과 같은 생체분자를 티타늄과 같은 금속 표면에 고정화할 때 알킨(Alkyne)과 아자이드(Azide) 간의 클릭 반응을 통해 형성된 링커가 효과적이라고 판단할 수 있다.

[0055]

(4) Ti-6에 고정된 rhBMP-2의 양 및 Ti-6에서 rhBMP-2의 방출역학 측정

[0056]

rhBMP-2를 Ti-5의 표면에 고정화한 후 고정화되지 않은 자유 rhBMP-2의 양을 측정하여 간접적으로 Ti-6에 고정된 rhBMP-2의 양을 계산하였다. rhBMP-2를 Ti-5의 표면에 고정화하고 남은 반응 용액 100μg을 microplate reader(Bio-Rad, Hercules, CA USA)를 사용하여 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 방법으로 분석하였다. Ti-6의 표면에 고정된 rhBMP-2의 실질적인 양은 rhBMP-2의 여러 가지 농도에서 얻은 표준화 곡선과 비교하여 계산하였다. 이때, 광학 밀도는 495nm에서 측정하였다. Ti-6의 표면에 고정된 rhBMP-2의 실질적인 양은 $9.55 \pm 0.01\text{ng}$ 으로서, 고정화 효율은 약 95.5%이었다.

[0057]

또한, Ti-6을 3ml의 PBS(pH 7.4)가 채워진 바이알(vial)에 넣고 37°C의 온도 및 100rpm의 조건에서 배양하였다. 배양 후 1hr, 2hr, 8hr, 1일, 3일, 5일, 7일, 14일, 21일 및 28일이 경과한 시점에서 상층액 1ml를 채취하고, 이와 같은 부피의 PBS(pH 7.4)를 바이알에 첨가하였다. 채취한 상층액은 -20°C에서 냉장 보관했다. rhBMP-2의 방출량은 ELISA kit를 사용하여 결정하였다. 샘플링된 상층액의 광학 밀도는 495nm에서 측정하였다. 도 4는 Ti-6를 28일 동안 배양하였을 때 방출되는 rhBMP-2의 양을 누적 형태로 나타낸 것이다. 도 4에서 보이는 바와 같이, Ti-6의 표면에 고정된 rhBMP-2는 배양 8시간 동안 약 10% 이하($0.78 \pm 0.1 \text{ ng}$)의 누적 방출량을 나타내었고, 배양 28일 동안 지속적으로 서서히 방출되었으며 약 29% 이하($2.71 \pm 0.3 \text{ ng}$)의 누적 방출량을 나타내었다. 이는, 이산화티타늄 표면에 클릭 반응에 의해 형성된 링커를 통해 고정화된 rhBMP-2가 28일

이상의 장시간 동안 지속적으로 방출될 가능성을 시사한다.

[0058] (5) 표면 개질된 이산화티타늄 또는 골 형성 촉진 인자가 고정된 이산화티타늄이 조골세포의 증식에 미치는 영향 분석

[0059] 48-웰 플레이트 안에 Ti-1, Ti-2, Ti-5 및 Ti-6를 넣고 여기에 각각 MC3T3-E1 세포(밀도: 5×10^3 cells/well)를 접종하였다. 또한, 48-웰 플레이트 안에 MC3T3-E1 세포(밀도: 5×10^3 cells/well)만을 접종한 것을 대조군으로 사용하였다. 이후, 10% FBS(Fetal bovine serum)와 1% PS(penicillin-streptomycin)를 포함하는 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM, Gibco) 1ml를 세포가 수용된 각각의 웰에 첨가하고 1일, 3일 및 7일 동안 세포를 배양하였다. 이때, 배지는 3일에 한번 씩 교체하였다. 배양된 세포의 세포핵과 세포골격을 4,6-다이아미디노-2-페닐인돌(4,6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)과 F-actin method을 사용하여 염색하였고 형광 현미경(OLYMPUS DP2-BSW, NY, USA)을 이용하여 200 배율로 관찰하였다. 사전에 정해진 시점에서, 배양된 세포 표본을 PBS(pH 7.4)로 수세하고, cell counting kit(CCK-8)을 사용하여 분석하였다. 2시간의 배양 후에 시약을 표본에 첨가하고 조심스럽게 96-웰 플레이트로 옮겼다. 이후, microplate reader를 사용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0060] 도 5는 배양 후 1일, 3일 및 7일이 되었을 때 Ti-1, Ti-2 및 Ti-5 및 Ti-6 상에서 배양된 MC3T3-E1 세포의 증식과 형태를 형광 현미경으로 관찰한 결과를 나타낸 사진이다. 도 5에서 보이는 바와 같이, 배양 시간이 경과함에 따라 모든 표본에서 세포 분화가 점진적으로 증가하였고, 배양된 세포들은 여러 방향으로 뻗어나갔다. 특히, Ti-6는 가장 높은 세포 증식을 및 가장 빠른 뻗어나감 속도를 보였다. 또한, 도 6은 배양 후 1일, 3일 및 7일이 되었을 때 대조군, Ti-1, Ti-2 및 Ti-5 및 Ti-6 상에서 배양된 MC3T3-E1 세포의 증식률을 정량적으로 나타낸 그래프이다. 도 6에서 보이는 바와 같이 Ti-2, Ti-5 및 Ti-6 상에서 배양된 MC3T3-E1 세포의 증식률은 배양 1일이 경과하였을 때 대조군 또는 Ti-1에서 배양된 세포의 증식률과 근소한 차이를 보였다. 한편, Ti-5 및 Ti-6에서 배양된 MC3T3-E1 세포의 증식률은 배양 3일 및 7일이 경과하였을 때 대조군 또는 Ti-1에서 배양된 세포의 증식률과 유사하였다. 한편, Ti-6은 가장 높은 세포 증식률을 보였고, Ti-1의 세포 증식률과 통계적으로 유의한 차이를 보였다. 이러한 결과는 Ti-6가 MC3T3-E1 세포의 증식률을 향상시킬 수 있는 우수한 임플란트로 사용될 수 있음을 의미한다.

[0061] (6) 표면 개질된 이산화티타늄 또는 골 형성 촉진 인자가 고정된 이산화티타늄이 조골세포의 알칼리 포스파타제(Alkaline phosphatase, ALP) 활성 수준에 미치는 영향 분석

[0062] 48-웰 플레이트 안에 Ti-1, Ti-2, Ti-5 및 Ti-6를 넣고 여기에 각각 MC3T3-E1 세포(밀도: 5×10^3 cells/well)를 접종하였다. 또한, 48-웰 플레이트 안에 MC3T3-E1 세포(밀도: 5×10^3 cells/well)만을 접종한 것을 대조군으로 사용하였다. 이후, Osteogenic media(10% FBS, 1% PS, 10mM β -glycero phosphate disodium salt hydrate, 300 μ M 아스코브산 및 0.1 μ M dexamethasone)를 포함하는 DMEM를 세포가 수용된 각각의 웰에 첨가하고 7일, 14일 및 21일 동안 세포를 배양하였다. 사전에 정해진 시점에서, 배양된 세포 표본을 PBS(pH 7.4)로 수세하고, RIPA buffer[50mM Tris-HCl(pH 7.4), 150mM NaCl, 0.25% 데옥시콜산(deoxycholic acid), 1% Nonidet P-40(NP-40) 및 1mM EDTA]로 1배 희석한 후, 여기에 Protease inhibitor cocktail tablet(Roche, Mannheim, Germany)을 첨가하였다. RIPA buffer 내의 세포들을 얼음 상에서 20분간 용해하고, 각 용해물을 4℃에서 10분 동안 원심분리하여 세포 잔사들을 제거하였다. 이후, 상층액을 p-니트로페닐 포스페이트(p-nitrophenyl phosphate, PNPP)와 함께 배양하고, 1N NaOH 수용액 50 μ l를 첨가하여 반응을 종결시켰다. ALP 활성은 PNPP가 p-니트로페놀(p-nitrophenol)로 전환되는 것을 측정하여 결정하였다. 광학 밀도는 microplate reader를 사용하여 405nm에서 측정되었다.

[0063] 도 7은 대조군, Ti-1, Ti-2, Ti-5 및 Ti-6 상에서 7일, 14일 및 21일 동안 배양된 MC3T3-E1 세포의 ALP 활성 수준을 나타낸 그래프이다. 일반적으로 ALP 활성은 골 형성의 초기 단계에 나타난다. 도 7에서 보이는 바와 같이 Ti-1, Ti-2, Ti-5 및 Ti-6에서 배양된 세포의 ALP 활성은 배양 7일째에 대조군과 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나, 배양 14일 및 21일째에 Ti-2, Ti-5 및 Ti-6에서 배양된 세포의 ALP 활성은 확연한 증가를 보였다. 특히, Ti-6은 가장 높은 ALP 활성을 보였으며, 이는 Ti-6이 MC3T3-E1 세포의 골 형성 분화를 촉진하는 우수한 임플란트로 사용될 수 있음을 의미한다.

- [0064] (7) 표면 개질된 이산화티타늄 또는 골 형성 촉진 인자가 고정된 이산화티타늄 상에서 조골세포의 배양시 칼슘 침착량 분석
- [0065] 48-웰 플레이트 안에 Ti-1, Ti-2, Ti-5 및 Ti-6를 넣고 여기에 각각 MC3T3-E1 세포(밀도: 5×10^3 cells/well)를 접종한 후 7일, 14일 및 21일 동안 세포를 배양하였다. 또한, 48-웰 플레이트 안에 MC3T3-E1 세포(밀도: 5×10^3 cells/well)만을 접종한 것을 대조군으로 사용하였다. 사전에 정해진 시점에서, 배양된 세포 표본을 PBS(pH 7.4)로 2번 수세하고, 3.7% 포름알데히드를 사용하여 20분 동안 고정하고, PBS(pH 7.4)로 다시 수세하였다. 모든 세포 표본을 40mM alizarin S-red staining solution(pH 4.2)을 사용하여 염색한 후, 37℃의 온도 및 5% CO₂ 조건하에서 1시간 동안 배양하였다. 1시간 배양 후 염색 용액을 제거하고, 세포를 증류수로 3번 세척한 후, 공초점 주사 레이저 현미경(confocal laser scanning microscopy, CLSM; EclipseE600W, Nikon, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다. 정량적인 분석을 위해, 염색된 세포를 10% 1-헥사데실피리디늄 클로라이드(1-hexadecylpyridinium chloride)로 처리하여 흡수 물질을 제거하고, microplate reader를 사용하여 540nm에서의 광학 밀도를 측정하였다.
- [0066] 도 8은 14일 및 21일 동안 MC3T3-E1 세포를 대조군, Ti-1, Ti-2, Ti-5 및 Ti-6 상에서 배양하였을 때 침착된 칼슘량을 정량적으로 비교한 그래프이고, 도 9는 21일 동안 MC3T3-E1 세포를 대조군, Ti-1, Ti-2, Ti-5 및 Ti-6 상에서 배양하였을 때 침착된 칼슘량을 공초점 주사 레이저 현미경으로 관찰한 이미지이다. 도 8 및 도 9에서 보이는 바와 같이, 배양 21일째에 Ti-2, Ti-5 및 Ti-6 상에 많은 칼슘이 침착되었다. 특히, Ti-6은 가장 많은 칼슘 침착량을 보였으며, 이는 Ti-6이 MC3T3-E1 세포의 골 형성 분화를 촉진하는 우수한 임플란트로 사용될 수 있음을 의미한다.
- [0067] (8) 표면 개질된 이산화티타늄 또는 골 형성 촉진 인자가 고정된 이산화티타늄 상에서 조골세포의 배양시 조골 세포 분화 관련 유전자의 발현량 분석
- [0068] Ti-1, Ti-2, Ti-5 및 Ti-6 상에서 MC3T3-E1 세포를 배양할 때 조골세포 분화 관련 유전자의 발현량을 실시간 중합효소 연쇄반응(Real-time PCR)을 이용하여 측정하였다. 대조군 및 Ti-1, Ti-2, Ti-5, Ti-6 상에서 7일, 14일 및 21일 동안 배양된 MC3T3-E1 세포(밀도: 5×10^3 cells/well)의 총 RNA를 RNeasy Plus Mini Kit(Qiagen, CA, USA)를 사용하여 분리하였다. 모든 세포 표본으로부터 1μg의 총 RNA를 추출하고, AccuPowerCycleScript RT Premix(Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 cDNA로 전사하였다. 모든 표본에 대해 AccuPowerCycleScript RT Premix(Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 실시간 중합효소 연쇄반응(Real-time PCR) 증폭을 수행하였다. 표 2는 측정된 mRNA 유전자의 프라이머(primer)를 나타낸 것이다.

표 2

Genes	Primers	
OSX	Sense	5'-TTG AGG AAG AAG CTC ACT ATG GCT CCA G-3'
	Antisense	5'-GCT GAA AGG TCA GCG TAT GGC T-3'
Runx2	Sense	5'-TCG TCA GCA TCC TAT CAG TTC CCA-3'
	Antisense	5'-CCA TCA GCG TCA ACA CCA TCA TTC TGG TTA G-3'
COL1	Sense	5'-CGT GGC GAC CAA GGT CCA GT-3'
	Antisense	5'-AGG GAG ACC CAG AAT ACC GGG AG-3'
OP	Sense	5'-TGT GTC CTC TGA AGA AAC CA-3'
	Antisense	5'-TGG CTT TCG TTG GAC TTA CT-3'
OC	Sense	5'-AGC AAA GGT GCA GCC TTT GT-3'
	Antisense	5'-GCG CCT GGG TCT CTT CAC T-3'
BSP	Sense	5'-CAG CGG CCC TGA GTC TGA CAA A-3'
	Antisense	5'-TCA CAA GCA GGG TTA AGC TCA CAC TG-3'

[0069]

[0070] * OSX : osterix; Runx2 : runt-related transcription factor 2

[0071] * COL1 : type 1 collagen; OP : osteopontin

[0072] * OC : osteocalcin; BSP : bone sialoprotein

[0073] Real-time PCR 산물을 iQ SYBR Green supermix(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 분석하였다. Threshold cycle value는 comparative CT method에 의해 계산되었다. Real-time PCR 증폭은 95℃ 및 10분 조건인 초기 변성 과정 후 95℃에서 10초, 57~62℃에서 30초 및 72℃에서 30초로 이루어진 사이클의 45회 반복에 의하여 수행되었다.

[0074] 도 10은 대조군 및 Ti-1, Ti-2, Ti-5 및 Ti-6 상에서 MC3T3-E1 세포를 배양할 때 조골세포 분화 관련 유전자의 발현량을 정량적으로 나타낸 그래프이다(A : OSX; B : Runx2; C : COL1; D : OC; E : OP; F : BSP). 도 10에서 보이는 바와 같이, 골 형성 전사 인자인 OXS mRNA 발현량은 모든 표본에서 배양일의 경과에 따라 점진적인 증가를 보였다. 반면, Runx2 mRNA 발현량은 배양 14일째에 증가하였고 그 이후 감소하였다. 또한, 여러 세포 표본들 중 Ti-6 상에서 배양된 세포 표본에서 OSX 및 Runx2 유전자의 mRNA 발현량이 가장 높았다. COL1은 일반적으로 조골세포의 증식 과정에서 초기 표지자로 여겨지고 있다. COL1 합성은 모든 세포 표본에서 배양일의 경과에 따라 점진적으로 감소하였다. 한편, OC mRNA의 발현량은 모든 세포 표본에서 배양일의 경과에 따라 점진적으로 증가하였고, OP mRNA의 발현량은 모든 세포 표본에서 배양일의 경과에 따라 점진적으로 감소하였다. 특정 mRNA 유전자의 경우 Ti-1, Ti-2, Ti-5 및 Ti-6의 순서대로 발현량 증가를 보였다. 특히, 배양 14일 및 21일째에 Ti-6 상의 세포에서 OC mRNA 및 OP mRNA의 발현량이 크게 증가하였다. BSP mRNA 발현은 OC mRNA 발현과 비슷한 모습을 보였다. BSP mRNA 발현량도 Ti-6 상의 세포에서 확연하게 증가하였다.

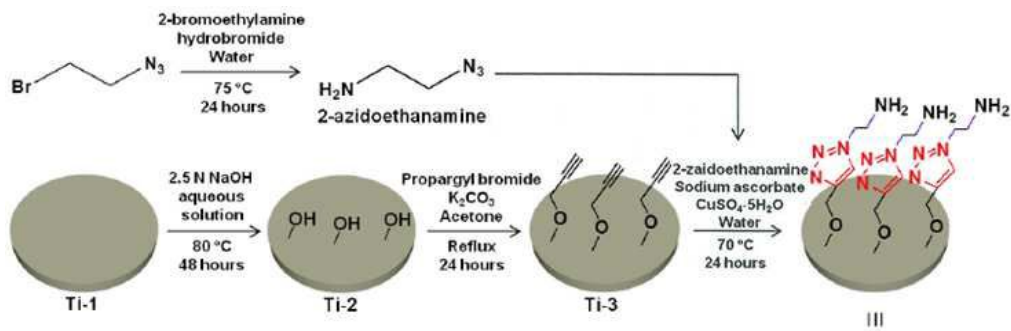
[0075] 3. 토의

[0076] rh-BMP2는 매우 강한 골 유도능을 가진 성장인자로 잘 알려져 있다. 그러나, rh-BMP2는 짧은 반감기 때문에 고용량이 필요하다는 문제가 있고, 골 재생을 촉진하는데에 사용하기 위해서는 rhBMP-2의 방출 제어를 위한 효과적인 시스템이 고려되어야 한다. 본 발명에서는 rhBMP-2의 지속적인 방출을 위해 수산기가 도입된 이산화티타늄 표면에 클릭 반응을 통해 링커를 형성하였다. 또한, rhBMP-2가 헤파린과 강하게 결합하는 점에 착안하여 rhBMP-2의 지속적인 방출을 위해 헤파린 바인딩 시스템을 이용하였다. 한편, MC3T3-E1 세포는 전구 조골세포로서, 성숙한 조골세포로의 분화를 통해 뼈의 생성과 재생에 관여하는 것으로 알려져 있다. 본 발명의 Ti-6 상에서 전구 조골세포인 MC3T3-E1 세포를 배양하는 경우 조골세포로의 분화 및 조골세포의 증식이 촉진되고, 이를 통해 골 형성이 향상된다. 따라서, 본 발명의 Ti-6은 골 형성의 향상을 위한 우수한 임플란트로 사용될 수 있다.

[0077] 이상에서와 같이 본 발명을 상기의 실시예를 통해 설명하였지만 본 발명이 반드시 여기에만 한정되는 것은 아니며 본 발명의 범주와 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 변형실시가 가능함은 물론이다. 따라서, 본 발명의 보호범위는 특정 실시 형태로 국한되는 것이 아니며, 본 발명에 첨부된 특허청구의 범위에 속하는 모든 실시 형태를 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

도면

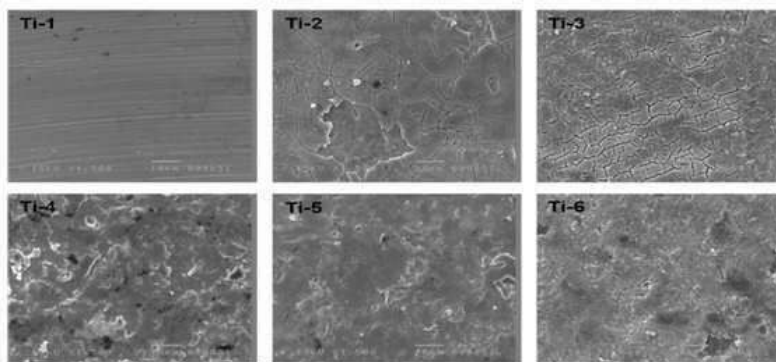
도면1



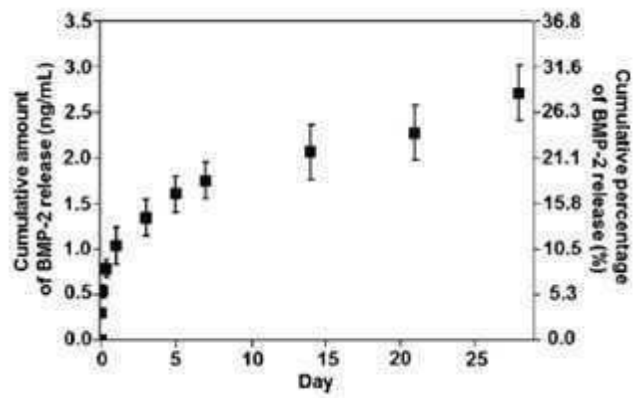
도면2



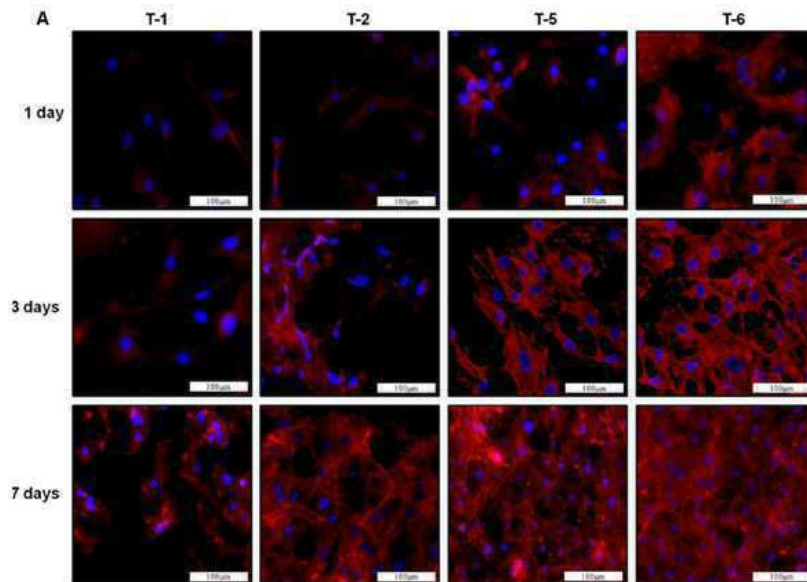
도면3



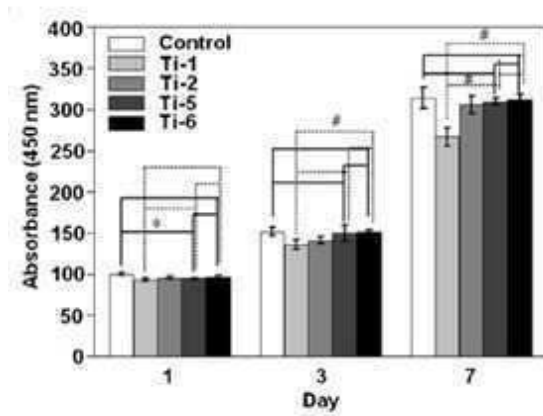
도면4



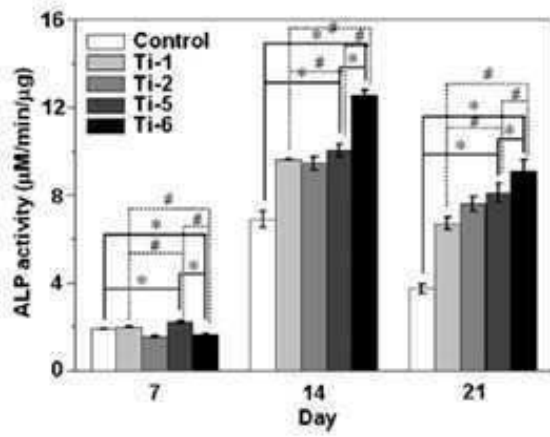
도면5



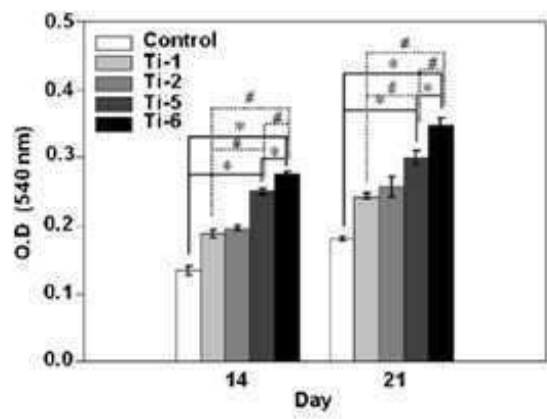
도면6



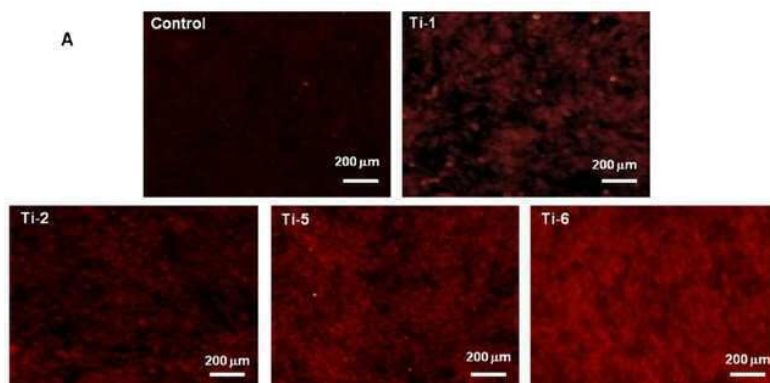
도면7



도면8



도면9



도면10

