(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0133738
(43) 공개일자 2014년11월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
B82B 3/00 (2006.01) *A61L 27/34* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0053334
(22) 출원일자 2013년05월10일
심사청구일자 2013년05월10일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)
(72) 발명자
이상천
경기 성남시 분당구 양현로 220, 1003동 204호 (이매동, 이매촌아파트)
이석원
경기도 성남시 분당구 내정로 186 (수내동 51) 파크타운 대림아파트 102동 806호
최기현
서울 동대문구 이문로6길 39, 304호 (휘경동)
(74) 대리인
손민

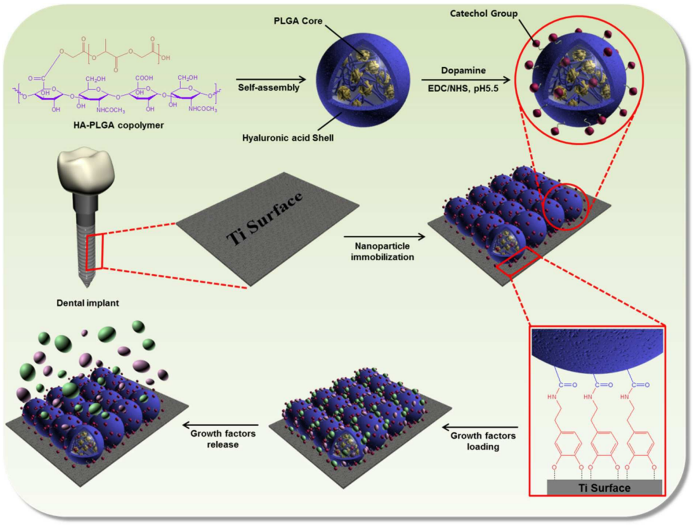
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 **카테콜기가 표면에 결합되어 있는 접착성 나노입자 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 카테콜기를 포함하는 접착성 나노입자; 이의 제조방법; 상기 접착성 나노입자가 기재 상에 접착되어 있는 복합체; 및 지속적으로 약물의 제어 방출이 가능한 복합체의 제조방법을 제공한다.

대 표 도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2012R1A5A2051388
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 선도연구센터지원사업
연구과제명 나노융합 생체소재 기반 치아와 치주조직 재생연구
기 여 율 1/2
주관기관 경희대학교
연구기간 2012.09.01 ~ 2013.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 10043624
부처명 지식경제부
연구관리전문기관 한국산업기술평가관리원
연구사업명 투자자연계형기술개발사업
연구과제명 CAD/CAM 기술을 이용한 비침습적 맞춤형 골증대술 소재 개발
기 여 율 1/2
주관기관 (주)네오바이오텍
연구기간 2012.12.01 ~ 2013.11.30

특허청구의 범위

청구항 1

약물이 결합가능한 제1고분자 하나 이상 및 제1고분자보다 소수성인 제2고분자 하나 이상을 포함하는 제3고분자를 준비하는 제1단계;

제3고분자의 자가조립을 통해 제2고분자는 내부에 제1고분자는 외부에 위치하는 나노입자를 형성시키는 제2단계; 및

상기 나노입자의 표면에, 카테콜기를 결합시키는 제3단계를 포함하는,

접착성 나노입자의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 제2단계에서 제2고분자는 나노입자 내부에서 단일 코어 또는 다중 코어를 형성하며, 제1고분자는 상기 단일 코어 또는 다중 코어를 둘러싸며 외부에 위치하는 것인 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 카테콜기는 나노입자 외부 표면에 위치한 제1고분자에 결합된 것인 제조방법.

청구항 4

약물이 결합가능한 제1고분자 하나 이상 및 제1고분자 보다 소수성인 제2고분자 하나 이상을 포함하는 제3고분자의 자가조립을 통해 형성된 나노입자로서, 제2고분자는 내부에 제1고분자는 외부에 위치하여 형성된 나노입자; 및 상기 자가조립된 나노입자의 표면에 도입된 카테콜기를 포함하는 것인 접착성 나노입자.

청구항 5

제4항에 있어서, 제2고분자는 나노입자 내부에서 단일 코어 또는 다중 코어를 형성하며, 제1고분자는 상기 단일 코어 또는 다중 코어를 둘러싸며 외부에 위치하는 것인 접착성 나노입자.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 카테콜기는 나노입자 외부 표면에 위치한 제1고분자에 결합되어 도입된 것인 접착성 나노입자.

청구항 7

제4항에 있어서, 제1고분자는 약물과 이온결합가능하도록 전하를 띠는 이온성 고분자인 것인 접착성 나노입자.

청구항 8

제4항에 있어서, 상기 제1고분자는 히알루론산, 알지네이트, 헤파린, 카라지난, 덱스트란 설페이트, 카르복시메틸 셀룰로오스 및 키토산으로 이루어진 군에서 선택된 다당류계 고분자인 것인 접착성 나노입자.

청구항 9

제4항에 있어서, 상기 제2고분자는 폴리(락티드-코-글리콜리드)(PLGA), 폴리글리콜산(PGA), 폴리락트산(PLA), 폴리-ε-카프로락톤(PCL), 락트산-카프로락톤 공중합체(PLCL), 생분해성 폴리우레탄(biodegradable polyurethane) 및 생분해성 폴리카보네이트(biodegradable polycarbonate)로 이루어진 군에서 선택된 생분해성 고분자인 것인 접착성 나노입자.

청구항 10

제4항에 있어서, 제3고분자는 제1고분자 주쇄에 제2고분자가 측쇄로 연결된 그래프트 공중합체인 것인 접착성 나노입자.

청구항 11

제4항에 있어서, 제1고분자는 히알루론산이고 제2고분자는 PLGA인 것인 접착성 나노입자.

청구항 12

제4항에 있어서, 상기 접착성 나노입자는 약물을 탑재하고 있는 것인 접착성 나노입자.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 약물은 골형성 성장인자, 섬유아세포 성장인자, 혈소판 유도 성장인자, 전환 성장인자-β, 인슐린 유사 성장인자, 파라티로이드 호르몬 및 이의 조합 중 어느 하나인 접착성 나노입자.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 약물은 성장인자인 BMP-2 및 IGF-1의 조합인 접착성 나노입자.

청구항 15

제12항에 있어서, 상기 약물은 에티드로네이트, 클로드로네이트, 팔미드로네이트, 알렌드로네이트, 이반드로네이트, 리세드로네이트, 졸레드로네이트, 틸루드로네이트, [1-히드록시-2-(이미다조[1,2-a]피리딘-3-일)에틸리덴]-비스포스폰산 모노하이드레이트, 이카드로네이트, 올파드로네이트, 네리드로네이트, 디소듐-1-히드록시-3-(1-피롤리디닐)-프로필리덴-1,1-비스포스포네이트, 파클리탁셀, 도세탁셀, 시롤리머스, 덱사메타손 및 이의 조합 중 어느 하나인 접착성 나노입자.

청구항 16

기재; 및 상기 기재 상에 카테콜기를 통해 접착되어 있는 제4항 내지 제15항 중 어느 한 항의 접착성 나노입자 하나 이상을 포함하는 복합체.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 기재는 플라스틱, 유리, 세라믹, 금속 및 고분자로 이루어진 군으로부터 선택된 재료로

제조된 것인 복합체.

청구항 18

제16항에 있어서, 상기 기재는 생체 이식용 임플란트, 멤브레인 또는 스텐트인 복합체.

청구항 19

지속적으로 약물의 제어 방출이 가능한 복합체의 제조방법에 있어서,

제4항 내지 제11항 중 어느 한 항의 접착성 나노입자 하나 이상을 카테콜기를 통해 기재에 접착시키는 제a단계; 및

상기 접착성 나노 입자에 약물을 결합시키는 제b단계를 포함하는 것인 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 카테콜기를 포함하는 접착성 나노입자; 이의 제조방법; 상기 접착성 나노입자가 기재 상에 접착되어 있는 복합체; 및 지속적으로 약물의 제어 방출이 가능한 복합체의 제조방법을 제공한다.

배 경 기 술

[0002] 골생성 능력을 갖는 치과용 또는 정형외과용 임플란트에서, 지속적인 성장인자 방출을 유도하기 위하여 다양한 표면 처리 접근법들이 사용되어 왔다. 성장인자를 탑재 및 방출하기 위해 생분해성 고분자인 PLGA (Poly(D,L-lactide-co-glycolide)), PDLLA (poly(D,L-lactide))의 코팅기술이 이용되고 있다. BMP-2, TGF-β 및 IGF-1을 포함하는 다양한 성장인자를 고분자 코팅 내에 탑재시킬 경우 하기와 같은 문제들이 존재한다. 첫째, 코팅 공정은 침지코팅(dip coating)으로 단백질 안정성에 해로운 영향을 줄 수 있는 유기 용매를 필요로 한다. 둘째, 코팅 용액을 임플란트 표면상에 떨어뜨리고 건조시키는 용매 코팅은 일정한 두께를 갖는 균일한 코팅층을 생성시킬 수 없다. 이에 따라, 성장인자의 계획된 제어 방출을 얻기 어렵다. 셋째, 고분자 코팅과 임플란트 표면 사이의 낮은 계면 접착으로 인해 코팅이 임플란트 표면으로부터 벗겨질 수 있다. 따라서, 안정적이고 균일하게 성장인자를 보유하면서 제어된 방식으로 상기 성장인자를 방출할 수 있는 새로운 코팅 기술을 개발할 필요성이 있다.

[0003] 다양한 전달 시스템 중, 나노입자 타입 전달체는 명확하고 균일한 나노구조로 인해 계획된 방식으로 약물 또는 성장인자를 탑재 및 방출할 수 있기 때문에, 의료 기구에 있어 이상적이다. 몇몇 나노입자 시스템들이 의료 장비 상 표면 고정화를 위해 보고된 바 있다. 저 분자량 약물의 방출이 제어된 PLGA 나노입자들을 이온성 상호작용을 통해 금속 표면에 접착시킨 경우 성장인자 전달을 위해 사용될 수 없다. 이온성 상호작용이 의료 장비의 표면에 대한 나노입자의 안정적인 고정화를 보장해줄 수 없기 때문이다. 따라서, 고 분자량인 성장인자를 안전하게 담지할 수 있고 의료 장비의 표면에 안정적으로 고정화될 수 있는 나노입자 타입의 접착형 전달체의 개발이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명자들은 고분자 공중합체가 자가조립되어 형성된 나노입자의 표면에 카테콜기를 결합시킴으로써, 각종 의료 기재 표면접착력이 우수한 나노입자들을 자가조립가능한 다양한 고분자들을 사용하여 제조할 수 있고, 기재

에 카테콜기를 통해 결합된 나노 입자에 이온성 성장인자와 같은 약물을 탑재한 결과, 성장인자와 같은 약물을 지속적으로 제어 방출할 수 있다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다. 본 발명은 이에 기초한 것이다.

과제의 해결 수단

[0005] 본 발명의 제1양태는, 약물이 결합가능한 제1고분자 하나 이상 및 제1고분자보다 소수성인 제2고분자 하나 이상을 포함하는 제3고분자를 준비하는 제1단계; 제3고분자의 자가조립을 통해 제2고분자는 내부에 제1고분자는 외부에 위치하는 나노입자를 형성시키는 제2단계; 및 상기 나노입자의 표면에, 카테콜기를 결합시키는 제3단계를 포함하는, 접착성 나노입자의 제조방법을 제공한다.

[0006] 본 발명의 제2양태는, 약물이 결합가능한 제1고분자 하나 이상 및 제1고분자 보다 소수성인 제2고분자 하나 이상을 포함하는 제3고분자의 자가조립을 통해 형성된 나노입자로서, 제2고분자는 내부에 제1고분자는 외부에 위치하여 형성된 나노입자; 및 상기 자가조립된 나노입자의 표면에 도입된 카테콜기를 포함하는 것인 접착성 나노입자를 제공한다.

[0007] 본 발명의 제3양태는, 기재; 및 상기 기재 상에 카테콜기를 통해 접착되어 있는 제2양태의 접착성 나노입자 하나 이상을 포함하는 복합체를 제공한다.

[0008] 본 발명의 제4양태는, 지속적으로 약물의 제어 방출이 가능한 복합체의 제조방법에 있어서, 제2양태의 접착성 나노입자 하나 이상을 카테콜기를 통해 기재에 접착시키는 제a단계; 및 상기 접착성 나노 입자에 약물을 결합시키는 제b단계를 포함하는 것인 방법을 제공한다.

[0009] 이하, 본 발명을 자세히 설명한다.

[0010] 본 발명은 약물이 결합가능한 제1고분자 하나 이상과, 제1고분자보다 소수성인 제2고분자 하나 이상을 포함하는 제3고분자를 자가조립하여 먼저 나노입자을 형성한 후, 나노입자의 표면에 카테콜기를 결합하는 것이 특징이다.

[0011] 이때, 나노 입자 중 소수성인 제2고분자는 수용액 중 자가조립시 내부에 위치하면서, 약물이 결합가능한 제1고분자를 외부에 위치시켜 줄 수 있는 지지체 역할을 할 수 있다. 그리고, 자가조립에 의해 약물이 결합가능한 제1고분자를 외부에 노출시킨 후, 나노입자의 표면에 카테콜기를 결합시킴으로써, 카테콜기를 통해 임의의 형상 및/또는 재료의 기재 표면에 나노입자를 용이 및/또는 강력하게 결합시킬 수 있을 뿐만 아니라, 나노입자를 기재에 결합시킨 후, 나노입자의 표면에 위치한, 약물이 결합가능한 제1고분자에 용이하게 약물을 탑재시킬 수 있다.

[0012] 따라서, 나노입자를 형성하는 제1고분자는 약물이 결합가능한 임의의 고분자가 될 수 있고, 나노입자를 형성하는 제2고분자는 제1고분자보다 소수성이기만 하면 임의의 고분자가 될 수 있다.

[0013] 본 발명의 나노입자에서, 제2고분자는 소수성으로 인하여 나노입자 내부에 위치하면서 이들이 뭉쳐 일종의 하나 이상의 코어를 형성할 수 있으며, 제2고분자와 연결된 제1고분자는 친수성으로 인하여 이들 코어를 둘러싸며 나노입자의 나머지 영역(외부)을 형성할 수 있다. 이러한 방식으로 상기 나노입자는 제2고분자로 이루어진 하나 이상의 코어를 포함하면서 이를 제외한 나머지 영역과 표면이 제1고분자로 이루어진, 일종의 코어-쉘 구조일 수 있다.

[0014] 나노입자의 내부가 다중 코어를 형성하는 경우, 나노입자의 표면은 주로, 바람직하게는 제1고분자로만 이루어져 있을 수 있다. 이때, 나노입자의 내부에는 응집되어 있는 제2고분자와 함께 제1고분자의 일부가 위치할 수 있다. 도 2에는 제1고분자로 히알루론산, 제2고분자로 PLGA가 그래프트 중합된 제3고분자가 자가조립되어, PLGA가 나노입자 내부의 다중 코어를 형성하는 나노입자의 구조 모식도를 도시하였다.

[0015] 한편, 제3고분자에서, 하나 이상의 제1고분자와 하나 이상의 제2고분자는 직접 또는 링커를 통해 통상의 방법에 따라 연결될 수 있다.

[0016] 제3 고분자는 제1고분자 및 제2고분자가 중합된 그래프트 공중합체 또는 블록 공중합체일 수 있다. 제3고분자는 제1고분자 주쇄에 제2고분자가 측쇄로 연결된 그래프트 공중합체일 수 있다. 나아가 제3고분자는 약물이 결합가능한 제1고분자를 외부에 위치시켜 줄 수 있는 자가조립을 수행할 수 있는 한, 다른 단량체 또는 고분자를 더

포함할 수 있다.

[0017] 제2고분자는 나노입자 내부에서 단일 코어 또는 다중 코어를 형성할 수 있으며, 제1고분자는 상기 단일 코어 또는 다중 코어를 둘러싸며 외부에 위치할 수 있다. 다중 코어를 갖는 나노입자의 경우, 둘 이상의 제3고분자에 의해 형성될 수도 있고, 둘 이상의 제2고분자를 갖고 있는 하나의 제3고분자에 의해 형성될 수도 있다.

[0018] 제1고분자는 정전기적 상호작용을 통해 이온성 약물(예, 성장인자)을 쉽게 탑재할 수 있도록, 자유 카르복실기(free carboxylate group) 또는 아민기 (amine group)를 갖는 것이 바람직하다. 특히, 자유 카르복실기를 갖음으로써 낮은 제타 전위(zeta potential)을 형성할 수 있는 다당류계 고분자가 바람직하다. 제1고분자의 비제한적인 예로는 히알루론산, 알지네이트, 헤파린, 카라지난, 덱스트란 설페이트, 카르복시메틸 셀룰로오스, 키토산 등이 있다. 히알루론산(hyaluronic acid, HA)이 대표적일 수 있다.

[0019] 상기 본 발명의 제1고분자의 비제한적인 예인 히알루론산, 알지네이트, 헤파린, 카라지난, 덱스트란 설페이트 및 카르복시메틸 셀룰로오스의 경우, 음이온성 다당류로써, 생리학상 pH에서 양전하를 띠는 양이온성 약물(예를 들어, BMP-2 또는 IGF-1)과 정전기적 상호작용을 통해 결합될 수 있다.

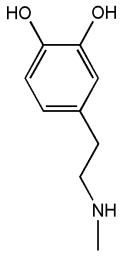
[0020] 다만, 본 발명의 제1고분자의 비제한적인 예 중, 키토산의 경우는 양이온성 다당류로써, 생리학상 pH에서 음전하를 띠는 음이온성 약물과 정전기적 상호작용을 통해 결합될 수 있다.

[0021] 제2고분자는 생체 내에서 분해되어 물, 이산화탄소 및 메탄 등으로 분해될 수 있는 생분해성 고분자인 것이 바람직하고, 이의 비제한적인 예로는 폴리(락티드-코-글리콜리드)(PLGA), 폴리글리콜산(PGA), 폴리락트산(PLA), 폴리-ε-카프로락톤(PCL), 락트산-카프로락톤 공중합체(PLCL), 생분해성 폴리우레탄(biodegradable polyurethane), 생분해성 폴리카보네이트(biodegradable polycarbonate) 등이 있다. 생분해성 고분자는 천연 또는 합성 고분자일 수 있다.

[0022] 본 발명의 접착성 나노입자는 다양한 생체 이식용 의료 기재에 적용될 수 있기 때문에 생분해성 고분자를 사용하는 것이 바람직하며, 특히 폴리(락티드-코-글리콜리드)(PLGA)인 것이 바람직하다.

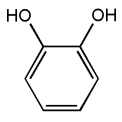
[0023] 나노입자에 카테콜기(하기 화학식 2) 도입시, 카테콜기를 갖는 홍합 접착 단백질 유래 도파민(dopamine)(하기 화학식 1)을 사용할 수 있다.

[0024] [화학식 1]



[0025]

[0026] [화학식 2]



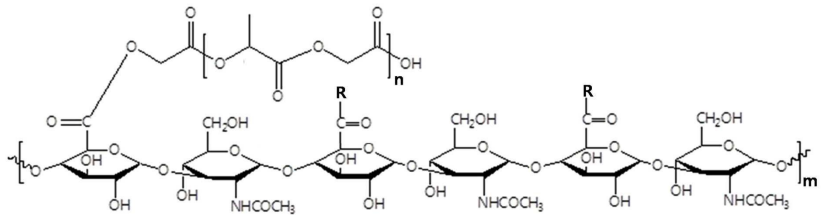
[0027]

[0028] 본 발명의 바람직한 구현예로써, 나노입자 외부 표면에 위치하는 제1고분자 부분의 카르복실기를 활성화시킨 후, 카테콜기를 갖는 도파민과 반응시켜 연결함으로써, 나노입자 표면에 있는 제1고분자에 카테콜기를 도입시킬 수 있다.

[0029] 상기 카르복실기 활성화는 EDC·HCl(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride), NHS(N-hydroxysuccinimide) 또는 이의 조합을 제2단계에서 형성된 나노입자에 첨가하여 달성할 수 있다.

[0030] 본 발명의 바람직한 구현예에 있어서, 상기 제1고분자는 히알루론산이고, 상기 제2고분자는 폴리(락티드-코-글리콜리드)(PLGA)이며, 상기 접착성 나노입자는 카테콜기, 히알루론산 및 PLGA로 이루어진 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물을 기본 구조로 취하는 접착성 나노입자일 수 있다.

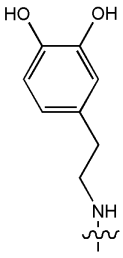
[0031] [화학식 3]

[0032] 

[0033] 상기 식에서,

[0034] n은 10 내지 100의 정수이고,

[0035] m은 10 내지 100의 정수이고,

[0036] R은 히드록시기 또는  이다.

[0037] 본 발명에서 기재는 플라스틱, 유리, 세라믹, 금속 및 고분자로 이루어진 군으로부터 선택된 재료로 제조된 것일 수 있다. 바람직하게는 생체 이식용 임플란트, 멤브레인 또는 스텐트와 같은 의료 기재일 수 있다. 생체에 적용가능한 치과용 임플란트, 정형외과용 임플란트, 혈관 스텐트 및 비혈관계 스텐트 등의 다양한 기재일 수 있다.

[0038] 본 발명에 있어서, 상기 접착성 나노입자는 입자 표면에 위치하는 카테콜기가 다양한 소재로 구성되는 의료 기재에 용이하게 접착될 수 있으므로, 접착성 나노입자 조성물의 간단한 도포 또는 침지 등의 방법으로 의료 기재의 표면처리가 용이하게 가능할 수 있다.

[0039] 상기 나노입자들은 표면 상에 수백 개의 카테콜기를 가질 수 있으므로, Ti과 같은 금속 표면에 대한 상기 나노입자의 결합세기는 말단 카테콜기의 협력적인 접착을 통해 극히 강화될 수 있다.

[0040] 본 발명의 나노입자들은 상기 기재 상에 코팅시킬 수 있으며, 나노입자를 기재 상에 코팅시킨 후 나노입자에 약물을 탑재할 수도 있지만, 약물이 탑재된 나노입자를 기재에 코팅시킬 수도 있다.

[0041] 이와 같이 본 발명의 나노입자는 기재에 약물을 도입시키는 전달체로서의 역할을 수행할 있으며, 생체내 삽입후 약물을 생체내에 지속적으로 방출시키는 전달체의 역할도 수행할 수 있다.

[0042] 상기 접착성 나노입자는 외부에 위치한 제1고분자를 통해, 성장인자과 같은 약물을 하나 이상 탑재시킬 수 있다. 하나의 나노입자에 복수개의 약물을 탑재할 수 있고, 이때, 약물은 동일 또는 상이할 수 있다. 또한, 서로다른 약물이 각 나노입자에 결합된 2종이상의 나노입자를 병용할 수 있다.

[0043] 약물의 비제한적인 예로는, 비스포스포네이트계의 에티드로네이트 (etidronate), 클로드로네이트(clodronate), 팔미드로네이트(palmidronate), 알렌드로네이트(alendronate), 이반드로네이트(ibandronate), 리세드로네이트(risedronate), 졸레드로네이트(zoledronate), 틸루드로네이트(tiludronate), [1-히드록시-2-(이미다조[1,2-a]피리딘-3-일)에틸리덴]-비스포스폰산 모노하이드레이트([1-hydroxy-2-(imidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)ethylidene]-bisphosphonic acid monohydrate, YH529), 이카드로네이트(icadronate), 올파드로네이트(olpadronate), 네리드로네이트(neridronate) 및 디소듐-1-히드록시-3-(1-피롤리디닐)-프로필리덴-1,1-비스포스포네이트(disodium-1-hydroxy-3-(1-pyrrolidinyl)-propylidene-1,1-bisphosphonate, EB-1053) 등이 있다.

또한, 상기 비스포스포네이트계의 약물 이외에 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 시롤리머스(Sirolimus), 덱사메타손(dexamethasone) 등이 있다. 상기 약물은 1종 단독 또는 2종 이상의 조합으로 사용할 수 있다.

[0044] 본 발명에서 약물로 성장인자를 사용할 수 있으며, 성장인자의 비제한적인 예로, 골형성 성장인자(bone morphogenetic proteins, BMPs), 섬유아세포 성장인자(fibroblast growth factors, FGFs), 혈소판 유도 성장인자(platelet-derived growth factor, PDGF), 전환 성장인자-β(transforming growth factor-β, TGF-β), 인슐린 유사 성장인자(insulin-like growth factors, IGFs), 파라티로이드 호르몬(parathyroid hormone, PTH) 및 이의 조합 등이 있다.

[0045] 의료 기재인 임플란트, 멤브레인 또는 스텐트 상에 약물 함유 나노입자가 제역할을 수행하기 위해서는 하기 2가지 선행 조건을 만족하는 것이 바람직하다.

[0046] 첫째, 임플란트 또는 스텐트와 같은 의료 기재는 주로 Ti를 사용하는데, Ti 표면에 단단히 접착되거나 유실될 위험성이 없는 것이 바람직하다. 둘째, 상기 나노입자들은 각각 등전점이 8.5 및 8.6이고 생리학상 pH에서 양전하를 띠는 BMP-2 및 IGF-1을 동시에 결합하도록 설계되는 것이 바람직하다.

[0047] 강한 접착을 위한 첫 번째 요건을 위하여, 본 발명에서는 홍합 접착 단백질 유래 도파민 하이드로클로라이드의 카테콜기를 이용한다. 이러한 카테콜 화합물들은 이들이 금속 또는 금속 산화물 기판과 강한 공유적 및 비공유적 상호작용을 형성하기 때문에 코팅 금속 및 무기 표면에 대한 강한 결합제로서 작용할 수 있다.

[0048] 두 번째 요건을 위하여, 본 발명에서는 히알루론산과 같은 음이온성 다당류계 고분자(제1고분자)를 이용한다. 이러한 설계를 위하여, 본 발명자들은 카테콜-, 음이온성 히알루론산- 및 생분해성 고분자인 PLGA-기반의 화합물(화학식 3)을 기본 구조로 취하는 Ti-접착 나노입자 시스템을 이용하였다. 상기 나노입자 시스템에 양이온성 성장인자인 BMP-2 및 IGF-1을 도입시킨 결과, 이러한 이중 성장인자가 잘 탑재되어 있음을 확인할 수 있었다(실험예 4).

[0049] 나아가 상기 시스템은 제어된 방식으로 수일동안 지속적으로 BMP-2 및 IGF-1을 방출함을 확인할 수 있었다(실험예 5). 따라서 본 발명의 나노입자 시스템은 미세한 홈의 Ti 표면상에 이들의 전달체 본래의 모습을 유지함으로써 급속한 골유착을 유도하며, 생물체 내에서 골형성 및 생체활성을 촉진시킬 수 있다.

발명의 효과

[0050] 본 발명의 접착성 나노입자는 표면에 카테콜기를 함유함으로써 기재 표면접착력이 우수하며, 음이온성 제1고분자를 통하여 이온성 성장인자와 같은 약물의 탑재가 가능하고 약물의 지속적인 제어방출을 유도할 수 있으며, 복합적인 성장인자 탑재를 통하여, 생물체 내에서 골형성 및 생체활성을 촉진시킬 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0051] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 카테콜 함유 나노입자의 구조 확인을 위한 ^{1}H NMR 스펙트럼이다.

도 2는 BMP-2 및 IGF-1 탑재/방출을 위한 카테콜-히알루론산-PLGA 구조의 접착성 나노입자의 모습을 도식적으로 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 접착성 나노입자의 평균 직경, 제타 전위 및 형태를 나타낸 것이다.

도 4는 Ti 기재 상에 표면-고정화된 나노입자의 모습을 보여주는 Fe-SEM 이미지이다.

도 5는 개질되지 않은 Ti 및 나노입자-고정화된 Ti 표면의 XPS survey 스펙트럼이다.

도 6은 개질되지 않은 Ti 및 나노입자-고정화된 Ti 기재 상에서의 물 접촉각을 나타낸 것이다.

도 7은 FITC-표지된 BMP-2와 TRITC-표지된 IGF-1을 개질되지 않은 Ti 기재와 나노입자-고정화된 Ti 기재 상에 적용하여, 이들에 대한 FITC 형광, TRITC 형광의 IX71 형광현미경 이미지 및 이의 조합 이미지를 나타낸

것이다.

도 8은 FITC-표지된 BMP-2와 TRITC-표지된 IGF-1을 나노입자-고정화된 Ti 기재 상에 적용하여, 성장인자 BMP-2 및 IGF-1의 in vitro 제어 방출 프로파일을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0052] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0053] **실시예 1: PLGA(Poly(D,L-lactide-co-glycolide))와 히알루론산과의 복합 고분자의 합성**

[0054] 탈염된(desalted) 히알루론산 0.2g과 dmPEG(dimethyl ether of poly(ethyleneglycol)) 1.0g을 혼합하고, 이러한 혼합물을 동결건조시켰다. 흰색을 띄는 히알루론산/dmPEG 복합체 혼합물을, 무수 DMSO(dimethyl sulfoxide) 12㎖ 용액에 첨가하여 80℃에서 2시간 동안 용해시키고, 상온에서 냉각시켰다. 히알루론산의 카르복실기를 활성화 시키기 위하여, DCC(dicyclohexylcarbodiimide) 206mg(1 mmol)과 DMAP(4-dimethylaminopyridine) 122mg(1 mmol)을 상기 혼합용액에 첨가하였다. 2시간 동안 교반한 후, PLGA 0.26g이 용해되어 있는 DMSO 6㎖ 용액을 천천히 상기 혼합용액에 첨가하여 반응 혼합물을 제조하였다. 반응 혼합물을 상온에서 2일 동안 교반하였다. 그다음 상기 반응 혼합물을 멤브레인(분획분자량(DMSO): 10,000 Da)을 이용하여, 무수 DMSO에 대해 1일 동안 분리(dialyzed)하고, 증류수에 대해 3일 동안 분리하여, 동결건조시켜 최종적으로 PLGA와 히알루론산과의 복합 고분자 공중합체(HA-PLGA copolymer)를 수득하였다(수율: 90%).

[0055] **실시예 2: 카테콜기가 결합된 HA-PLGA 나노입자의 제조**

[0056] HA-PLGA 공중합체의 자유 카르복실기(free carboxylate group)와 도파민(dopamine)의 1급 아민기(primary amine group)간의 결합을 통하여, 카테콜-히알루론산-PLGA 중합체 및 나노입자를 합성하였다.

[0057] 실시예 1에서 제조된 HA-PLGA 공중합체 60mg 수용액(pH 5.5)을 상온에서 12시간 동안 교반하여, HA-PLGA 공중합체가 자가조립된 나노입자를 준비하였다. 나노입자 표면의 자유 카르복실기를 활성화시키기 위하여, EDC·HCl(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride) 9.6mg(0.05 mmol)과 NHS(N-hydroxysuccinimide) 5.8 mg(0.05 mmol)을 상기 나노입자가 형성된 용액에 첨가하였다. 2시간 뒤, 도파민 하이드로클로라이드(dopamine hydrochloride) 6.2 mg(0.033 mmol)을 상기 용액과 혼합시키고 상온에서 12시간 동안 교반하였다. 그 다음 상기 용액을 멤브레인(MWCO: 10,000 Da)을 이용하여 2일 동안 분리하고, 동결건조시켜 최종적으로 카테콜기가 결합된 HA-PLGA 나노입자를 수득하였다(수율: 95%).

[0058] **실험예 1: 나노입자의 구조 확인**

[0059] 상기 실시예 2에서 제조된 나노입자의 화학구조를 ^{1}H NMR 스펙트럼(400 MHz, Varian, USA)을 통해 분석하였다. 나노입자를 중수(D_2O) 1㎖와 DMSO-d_6 1㎖에 용해시켜, ^{1}H NMR측정을 위한 각 샘플 10mg을 준비하였다. 카테콜기가 결합된 비율은 자외선 가시광선 분광법(UV-Visible spectrometry, Shimadzu, Japan)에 의해 계산되었다. 나노입자(Catechol-HA-PLGA)는 DMSO에 5g/ℓ의 농도로 용해되었고, 260-360 nm 영역에서 스펙트럼을 측정하였다.

[0060] 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0061] 도 1을 통해, 카테콜-히알루론산-PLGA의 구조를 갖는 나노입자가 합성되었음을 확인할 수 있었다. 또한, 히알루론산에 결합된 PLGA는 4.69%이며, 카테콜기가 결합된 비율은 5.51%인 나노입자를 형성한다.

[0062] 나아가 도 2와 같이, 나노입자는 기재-접착성 카테콜 부분, 히알루론산 쉘 및 PLGA 다중 코어로 이루어지는 3개의 명확하고, 구별되는 도메인을 가진 다중 코어-쉘 형태의 고분자 나노입자를 형성한다.

[0063] **실험예 2: 나노입자의 물리적 특성 확인**

[0064] 상기 실시예 2에서 제조된 나노입자의 평균 입자 크기 및 입도분포(size distribution)를 동적 광산란(BrookHAVEN Instruments Cooperation, New York, USA)을 통해 계산하였다.

[0065] 수직편광된 He-Ne 레이저(632.8 nm) 광선을 산란시키고, 그 결과 산란된 광선을 90° 각도로 분석하였다. 나노입자의 평균 입자 크기(mean diameter, d)는 스톡스-아인슈타인(Stokes-Einstein)식으로 계산되었으며, 다분산성 인자(polydispersity factor)는 큐물란트법(cumulant method)에 의해 계산되었다. 나노입자의 제타포텐셜(ζ)은 입도분석기(90 PLUS particle size analyzer)에 의해 측정되었다.

[0066] 그 결과, 상기 접착성 나노입자의 평균 입자 크기는 137.1nm인 것으로 확인되었다. 나아가, 제타포텐셜(zeta potential, ζ)은 히알루론산의 음이온성 자유 카르복실기로 인하여 상당한 음의 값이었고(-23.71), 다분산 지수는 0.180임을 확인하였다(도 3). 특히 이러한 음이온성 히알루론산 도메인은 생리학적인 pH에서 양으로 하전되는 BMP-2 및 IGF-1(BMP-2 및 IGF-1의 등전점은 각각 8.5 및 8.6임)을 위한 결합 영역으로서 이용될 수 있을 것으로 기대되었다.

[0067] 한편, 상기 실시예 2에서 제조된 나노입자를 투과 전자 현미경(TEM. CM30, Philips, CA)을 통해 관찰하였다. 1 g/ℓ의 나노입자 수용액을 준비하였고, 이의 액적을 탄소가 코팅된 200-메쉬 cooper grid상에 놓았다. 5분 뒤, 상기 수용액의 과잉양을 필터 페이퍼를 이용하여 제거하였다. 200 kV의 전압 인가 하에서 TEM 이미지(negatively stained with 2% uranyl acetate)를 얻었다.

[0068] 조사한 결과, 구형의 균일한 나노입자가 형성되었음을 확인할 수 있었다(도 3).

[0069] **실시예 3: 나노입자의 Ti 기재 상 고정화**

[0070] 2% 플루오린화수소산으로 5분간 식각되고, 아세톤, 이소프로필 알코올 및 증류수로 세척된 2 cm^2의 표면적을 갖는 구형의 Ti 기재를 준비하였다. 그 후, 상기 구형 Ti 기재는 12시간 동안 진공 하에서 건조되었다. 상기 실시예 2에서 제조된 나노입자 수용액 1 g/ℓ, 2 g/ℓ 및 5 g/ℓ를 각각 준비하고, 상기 Ti 기재를 나노입자 수용액에 침지시켰다. 상기 각각의 Ti 기재 샘플들을 24시간 동안 가벼운 교반을 통해, 나노입자를 Ti 기재 표면에 고정화시켰다. 고정화 단계 이후에, 상기 각각의 샘플들을 증류수로 세번 세척하고, 동결건조 시킴으로써 완료하였다.

[0071] **실험예 3: 나노입자의 Ti 기재 상 고정화 조사**

[0072] 주사전자현미경(FE-SEM, S-4200, Hitachi, Tokyo, Japan)을 통해 상기 실시예 3의 Ti 기재 표면상에 고정된 나노입자의 고정화밀도와 Ti 기재 표면 형태를 분석하였다.

[0073] 도 4에서 보여주듯이, 전계방사형 주사전자현미경(Fe-SEM)을 통해 접착성 나노입자들이 Ti 표면상에 안정적으로 고정되었음을 확인할 수 있었다. 그리고 나노입자의 농도를 조절함으로써 고정화 밀도를 제어할 수 있었다. 구체적으로 나노입자의 농도가 2 g/ℓ일 때, 밀도는 $1.13\times10^8/cm^2$이며, 5 g/ℓ일 때, 밀도는 $1.36\times10^8/cm^2$로 증가하였다.

[0074] 또한, Ti 표면 상의 나노입자의 고정화는 X-선 광전자 분광기(XPS, ESCALAB MK II, V.G. Scientific Co., UK) 및 접촉각 측정(Surface Electro Optics, PHOENIX 150)을 통해 조사하였다.

[0075] 도 5는 개질되지 않은 Ti 기재(Bare Ti)와 나노입자-고정화된 Ti 기재의 XPS survey 스펙트럼을 나타낸다. 본래 Ti 표면은 본래 표면의 산화물로부터 기인한 Ti과 O로 주로 구성되며, 탄화수소 오염물 유래의 소량의 C를 포함한다. 카테콜-히알루론산-PLGA 나노입자의 정착은 C 몰비의 유의적인 증가를 통해 확인하였다. 고정화를 위해 사용된 나노입자의 농도가 증가할수록, Ti 원자비는 감소하는 반면, 표면 C 원자비는 37.72%로부터 48.82%까지 증가하였다. 또한, 개질되지 않은 Ti 기재 상에서는 거의 검출되지 않은 N의 존재가 관찰되었으며, C 시그널의 증가 경향과 유사하게 나노입자 농도에 비례하여 N 원자비도 증가하였다. 또한, 고해상도 XPS 스펙트럼 분석 결과 고정화된 나노입자의 화학적 구조와 잘 일치하는 것으로 나타났다.

[0076] 도 6에서 보여주듯이, 접촉각 변화를 통해 또한 Ti 기재 상의 나노입자 고정화를 확인하였다. 나노입자 고정화 전에, Ti 기재의 정적 물 접촉각은

[0077] 68.47±4.87° 였다. 나노입자의 고정화 이후 (1 g/ℓ), 접촉각은 57.61±0.93° 감소하였으며 나노입자의 농도가 증가함에 따라 22.87±1.56° 까지 추가로 감소하였다. 이는 고정화된 나노입자로 인하여 Ti 기재의 표면 친수성이 증가함을 나타낸다. 음이온성 히알루론산 쉘이 상기 접촉각의 감소에 대한 주요 요인으로 판단된다.

[0078] **실시예 4: 이중(dual) 성장인자의 탑재**

[0079] BMP-2 및 IGF-1의 조합인 성장인자(기재 단위면적(cm^2)당 BMP-2 50 ng + IGF-1 50 ng 또는 BMP-2 200 ng + IGF-1 200 ng)가 용해된 인산완충식염수(PBS, pH 7.4) 용액에 실시예 3의 나노입자가 고정화된 Ti 기재를 24시간 동안 가벼운 교반과 함께 침지시켰다. 그 후 이를 증류수로 세번 세척하고, 동결건조 시킴으로써 완료하였다.

[0080] **실험예 4: 탑재된 이중 성장인자(BMP-2 및 IGF-1)의 시각적 확인**

[0081] 본 실험예에서는 BMP-2 및 IGF-1가 고정화된 나노입자상으로 이중으로 탑재(또는 결합)되었는지 여부를 녹색형광단백질 FITC (BMP-2 표지)와 적색형광단백질 TRITC(BMP-2 표지)를 통하여 확인하였다.

[0082] 나노입자는 음이온성의 히알루론산(HA) 쉘을 가지며, 이에 따라 정전기적 상호작용을 통해 양으로 하전된 BMP-2 및 IGF-1를 결합할 수 있었다. 나노입자상으로의 BMP-2 결합을 시각화하기 위하여 녹색형광단백질(FITC-표지된 BMP-2)을 사용하였고, IGF-1 결합을 시각화하기 위하여 적색형광단백질(TRITC-표지된 IGF-1)을 사용하였다. FITC 수용액(300 ㎕ 탄산나트륨 용액에 0.3 ㎍ FITC가 용해됨, pH 9.0)을 BMP-2 용액(700 ㎕ 탄산나트륨 용액에 20 ㎍ BMP-2가 용해됨)과 상온에서 2시간동안 혼합하였다. FITC-표지된 BMP-2는 멤브레인(MWCO: 3,500)을 사용하여 24시간 동안 여과(분리)하고, 동결건조 하였다. TRITC-표지된 IGF-1은 상기와 동일한 방법으로, 동일한 양을 합성하여 준비하였다. 상기 모든 과정은, FITC 와 TRITC의 형광활성을 잃지 않기 위하여, 암실에서 진행되었다.

[0083] 실시예 3의 나노입자가 고정화된 Ti 기재와 그렇지 않은(개질되지 않은) Ti 기재를 FITC-표지된 BMP-2와 TRITC-표지된 IGF-1의 수용액(FITC-표지된 BMP-2 100 ng 및 TRITC-표지된 IGF-1 100 ng이 인산완충식염수(PBS) 1 ㎖에 용해됨)에 가벼운 교반상태로 4℃의 온도에서 24시간동안 침지시켜 평형시켰다. 그 후, 증류수로 3번 세척하고 동결건조하였다. 형광현미경 이미지는 IX71 형광현미경(Olympus Optical Co., Tokyo, Japan)의 녹색 및 적색 필터를 이용하여 관찰하였다.

[0084] 도 7은 BMP-2 및 IGF-1이 개질되지 않은 Ti 표면상에 효과적으로 결합되지 않음을 보여준다. 그러나 나노입자-고정화된 표면에서는 나노입자상의 BMP-2의 효과적인 탑재를 나타내는 강한 FITC 형광과, IGF-1의 효과적인 탑재를 나타내는 강한 TRITC 형광이 관찰되었고, 나아가 이들의 조합 이미지를 통해 BMP-2 및 IGF-1가 이중으로 잘 탑재되어 있음을 관찰할 수 있었다.

[0085] **실험예 5: 이중 성장인자의 Ti 표면으로부터의 제어 방출 조사**

[0086] 형광단백질이 표지된 성장인자들을 포함하는 나노입자-Ti 기재(표면적 2 cm^2 및 2 g/ℓ의 나노입자 농도)에 있어서, 성장인자 BMP-2 및 IGF-1의 in vitro 방출 프로파일을 pH 7.4의 인산완충식염수 내에서 확인하였다.

[0087] BMP-2 및 IGF-1가 탑재된 상기 실시예 4에서 제조된 나노입자-고정화된 Ti 기재를 인산완충식염수 3 ㎖에 침지시키고, 150 rpm으로 37℃에서 교반하여 평형시켰다. 방출매질은 기-결정된 시간구간에서 완전히 교체되었으며, 모든 샘플들은 실험동안 -20℃에서 보관되었다. 방출된 BMP-2 및 IGF-1에 대한 매질 상층액을 ELISA 진단 키트를 사용하여, 통상의 방법에 따라 분석하였다.

[0088] 도 8은 BMP-2 및 IGF-1이 눈에 띄는 버스트 방출 없이 28일에 걸쳐 방출됨을 보여준다. 이로써 BMP-2 및 IGF-1의 방출되는 양이 제어되면서 지속적으로 방출됨을 알 수 있었다.

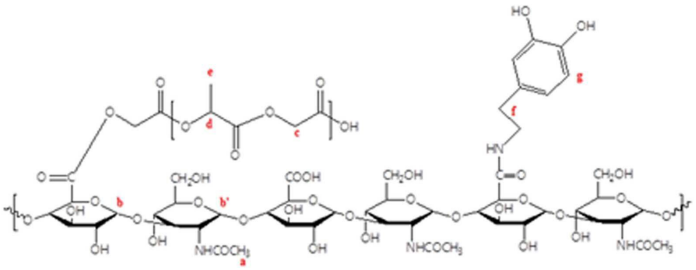
[0089] 나아가 조합된 약물이 아닌 단독 약물, 예를 들어 BMP-2가 단독 탑재된 나노입자-고정화된 Ti 기재의 경우에도,

상기와 같은 방출 프로파일을 나타낼 것이라 예측되었다.

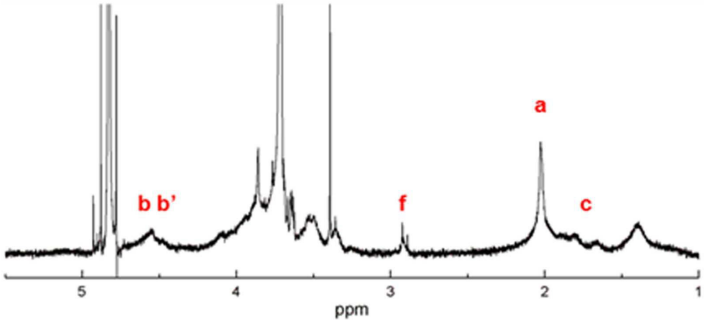
[0090] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

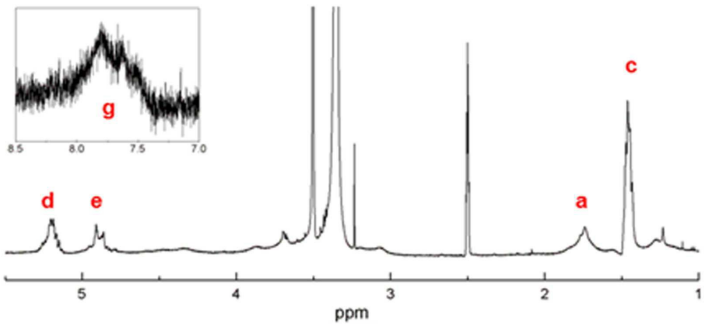
도면1



(a) ^{1}H-NMR in D_2O

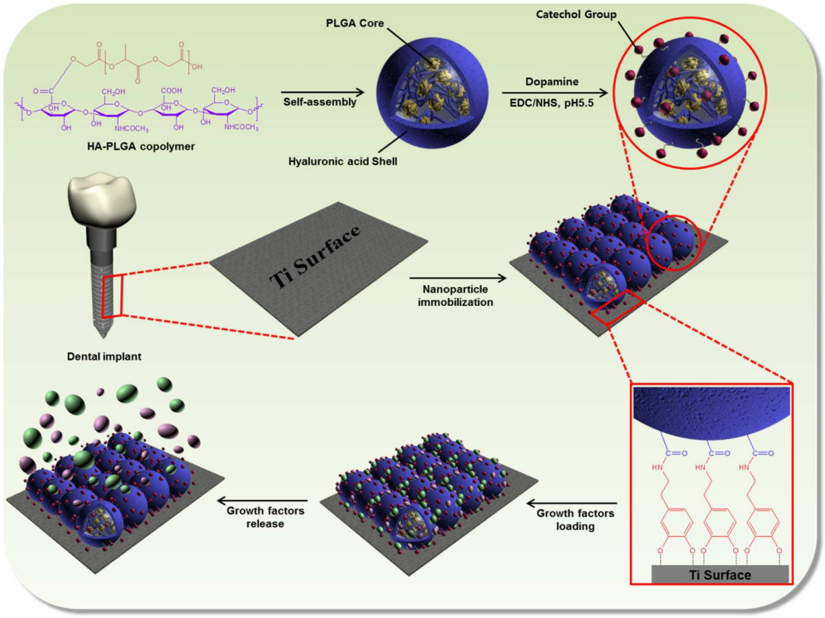


(b) ^{1}H-NMR in DMSO-d_6

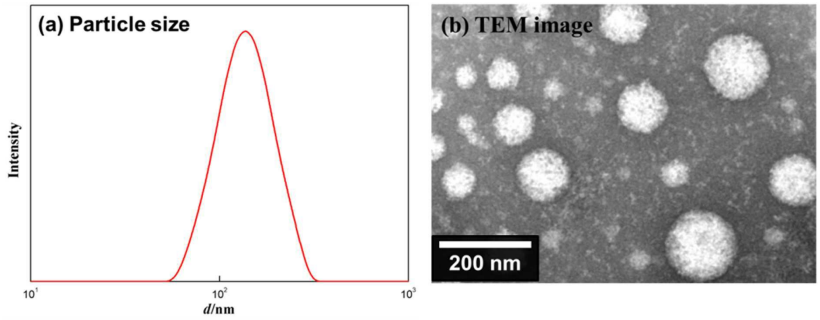


Polymer	Percentage of grafted PLGA to HA (%)	Percentage of conjugated catechol groups (%)
Catechol-HA-PLGA	4.69	5.51

도면2

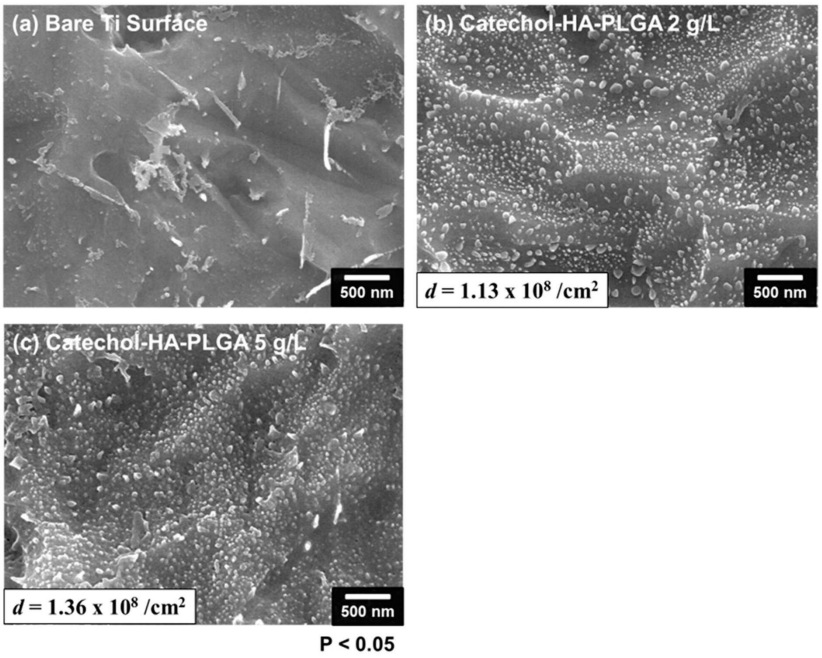


도면3

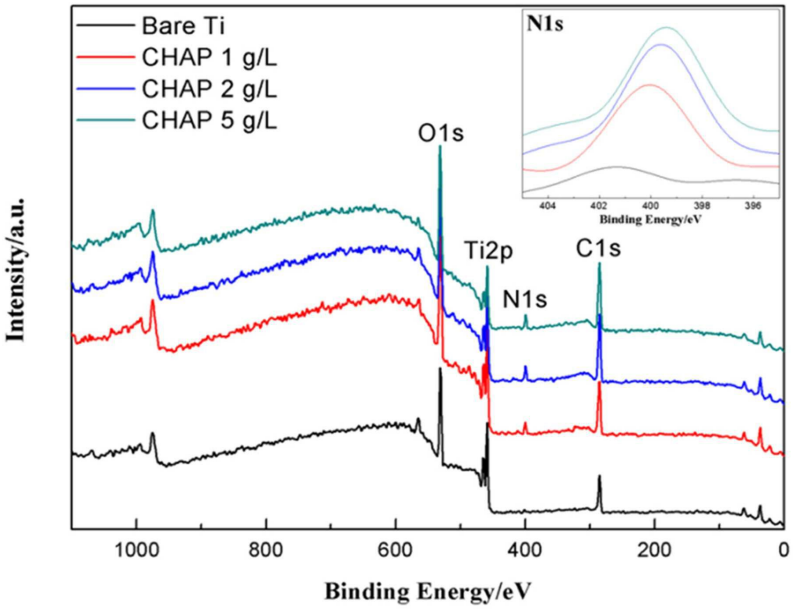


Nanoparticle	*d*/nm	ζ/mV	μ_2/Γ^{2c}
Catechol-HA-PLGA	137.1	- 23.71	0.180

도면4

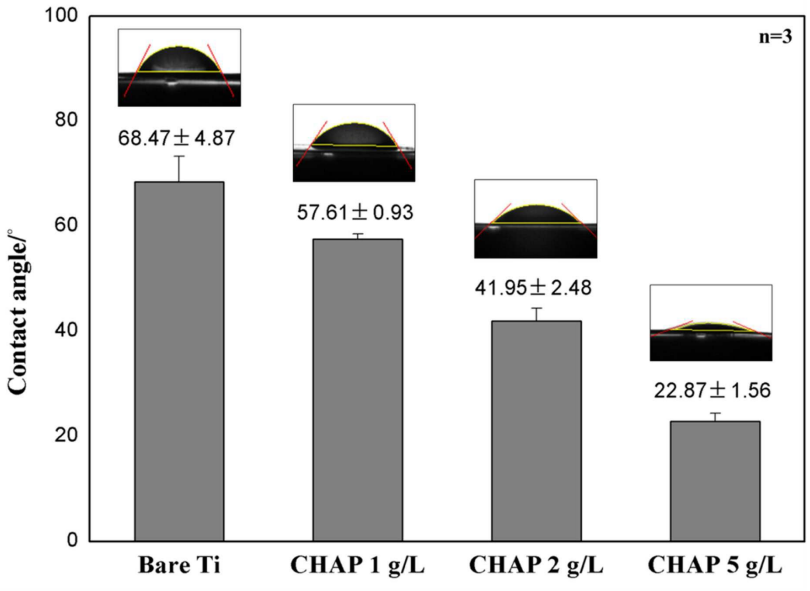

(a) Bare Ti Surface
500 nm
(b) Catechol-HA-PLGA 2 g/L
d = 1.13 x 10^8 /cm^2
500 nm
(c) Catechol-HA-PLGA 5 g/L
d = 1.36 x 10^8 /cm^2
500 nm
P < 0.05

도면5

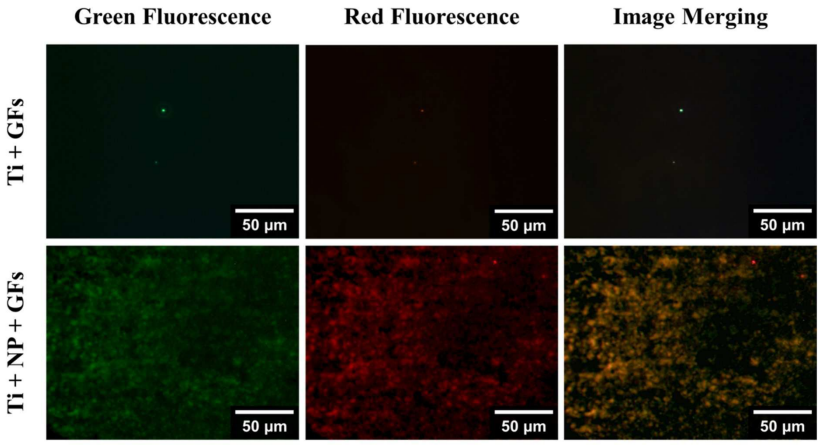


Sample	Surface Atomic Concentration (%)			
	[Ti]	[C]	[O]	[N]
Bare Ti	19.89	23.82	55.45	0.85
CHAP 1 g/L	13.72	37.72	44.93	3.64
CHAP 2 g/L	10.92	43.63	41.02	4.44
CHAP 5 g/L	7.99	48.82	37.75	5.45

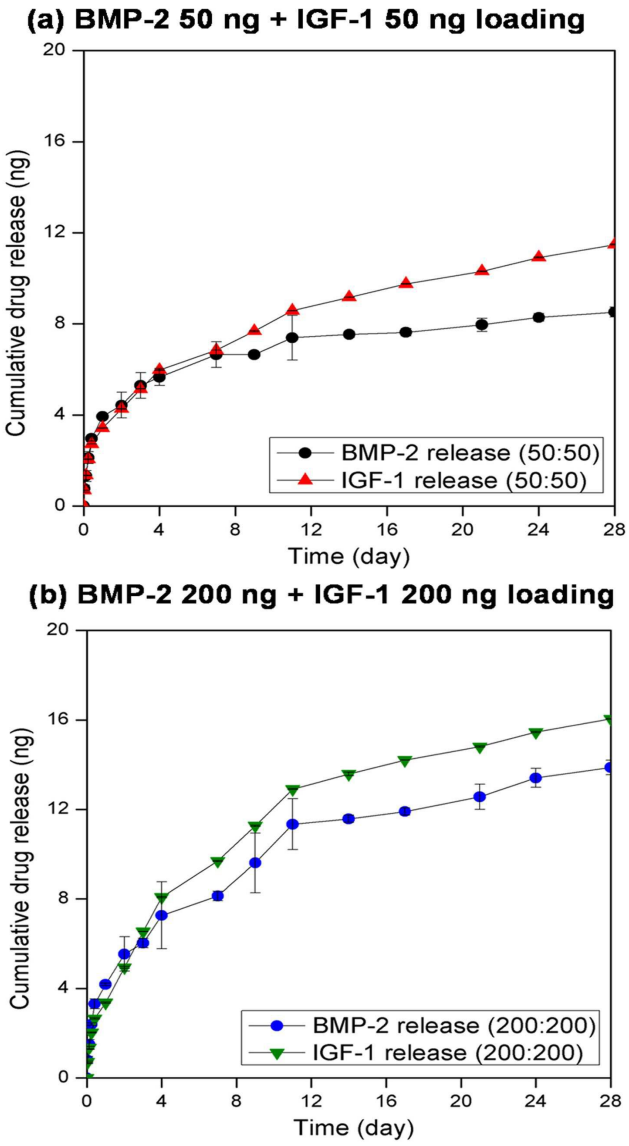
도면6


n=3
Contact angle/°
100
80
60
40
20
0
68.47±4.87
57.61±0.93
41.95±2.48
22.87±1.56
Bare Ti
CHAP 1 g/L
CHAP 2 g/L
CHAP 5 g/L

도면7


Green Fluorescence
Red Fluorescence
Image Merging
Ti + GFs
Ti + NP + GFs
50 μm

도면8


(a) BMP-2 50 ng + IGF-1 50 ng loading
Cumulative drug release (ng)
Time (day)
BMP-2 release (50:50)
IGF-1 release (50:50)
(b) BMP-2 200 ng + IGF-1 200 ng loading
Cumulative drug release (ng)
Time (day)
BMP-2 release (200:200)
IGF-1 release (200:200)