(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0007273
(43) 공개일자 2015년01월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/56 (2006.01) *A61L 27/54* (2006.01)
A61L 27/34 (2006.01) *A61C 8/00* (2006.01)
A61F 2/28 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0184214(분할)
(22) 출원일자 2014년12월19일
심사청구일자 2014년12월19일
(62) 원출원 특허 10-2013-0014862
원출원일자 2013년02월12일
심사청구일자 2013년02월12일
(30) 우선권주장
1020120013262 2012년02월09일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
윤영필
서울특별시 양천구 신월로10길 23, 301호 (신월동, 삼동1차아파트)
송해룡
서울특별시 구로구 신도림로 87, 105동 102호 (신도림동, 동아1차아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인충현

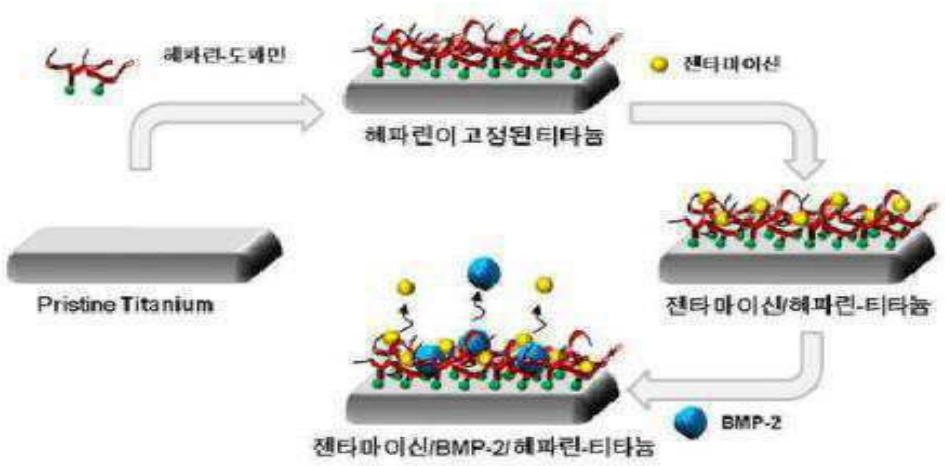
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **골 융합 향상 및 항균 효능을 갖는 항생제와 골형성 촉진 물질 방출형 임플란트 또는 스캐폴드 및 그 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 정형외과 또는 치과용 임플란트 또는 스캐폴드의 이식 후에 발생될 수 있는 박테리아 감염을 방지하고, 골융합 및 골형성 효능을 동시에 갖는 항생제와 골형성 촉진 물질 방출형 임플란트 또는 스캐폴드 및 그 제조방법을 제공한다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

김성은

서울특별시 양천구 신월로20길 7, 105동 1302호 (신월동, 신정뉴타운두산위브아파트)

박경순

강원도 춘천시 후석로 325, 104동 1602호 (후평동, 춘천더샵아파트)

김학준

서울특별시 강남구 선릉로 221, 302-1702 (도곡동, 도곡렉슬아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A11041611110000100
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
연구사업명 보건의료연구개발사업
연구과제명 [산학]골절/골수염 부위 형태에 따른 환자 맞춤형 인공 지지체 개발
기 여 율 1/2
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2011.05.01 ~ 2012.03.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 HI13C1501
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
연구사업명 질환극복기술개발
연구과제명 근골격계 연부조직 재생을 위한 지지체의 전임상 및 임상시험 연구
기 여 율 1/2
주관기관 고려대학교 구로병원
연구기간 2013.11.01 ~ 2014.10.31

특허청구의 범위

청구항 1

헤파린-도파민의 화학결합체를 이용하여 표면을 개질한 스캐폴드로서,

상기 스캐폴드는 BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8a, BMP-8b, BMP-10, BMP-15와 혈소판유래증식인자(Platelet derived growth factor; PDGF), 형질전환성장인자베타(Transforming growth factor beta; TGF-beta), 염기성 섬유모세포생장인자(basic fibroblast growth factor; bFGF), 인슐린유사성장인자-1(Insulin like growth factor 1; IGF-1) 및 락토페린(lactoferin)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 또는 2종 이상의 골형성 촉진 물질을 포함하고,

상기 스캐폴드의 표면은 PCL/PLGA로 이루어진 것을 특징으로 하는 스캐폴드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 골형성 촉진 물질은 1 pg/ml 내지 3 mg/ml 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는 스캐폴드.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 스캐폴드는 치과용 또는 정형외과용인 것을 특징으로 하는 스캐폴드.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 치과용 스캐폴드는 고정(Fixture)형 또는 멤브레인형인 것을 특징으로 하는 스캐폴드.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 정형외과용 스캐폴드는 고관절, 슬관절, 족관절, 견관절 또는 주관절을 포함하는 인공관절이나, 척추영역 인공디스크를 포함하는 인공삽입물; 및

골절치료에 사용되는 금속나사, 금속판 또는 금속정을 포함하는 고정물로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 스캐폴드.

청구항 6

I) 헤파린-도파민의 화학결합체를 형성하는 단계;

II) PCL/PLGA 스캐폴드를 세척 및 건조하여 전처리하는 단계;

III) 상기 II) 단계에서 전처리한 PCL/PLGA 스캐폴드의 표면을 상기 I) 단계에서 형성된 헤파린-도파민의 화학결합체로 개질하는 단계; 및

IV) 상기 III) 단계에서 표면개질된 PCL/PLGA 스캐폴드에, BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8a, BMP-8b, BMP-10, BMP-15와 혈소판유래증식인자(Platelet derived growth factor; PDGF), 형질전환성장인자베타(Transforming growth factor beta; TGF-beta), 염기성 섬유모세포생장인자(basic fibroblast growth factor; bFGF), 인슐린유사성장인자-1(Insulin like growth factor 1; IGF-1) 및 락토페린(lactoferin)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 또는 2종 이상의 골형성 촉진 물질을 고정화시키는 단계;를 포함하는 기능화 PCL/PLGA 스캐폴드의 제조방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 II) 단계에서 세척 및 건조는 에탄올 용액에서 1시간 동안 초음파 세척한 후, 24시간 동안 50℃에서 건조하는 것을 특징으로 하는 기능화 PCL/PLGA 스캐폴드의 제조방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 III) 단계에서 표면개질은 전처리한 PCL/PLGA 스캐폴드를 헤파린-도파민의 화학결합체가

5 mg/ml의 농도로 용해되어 있는 10 mM Tris 버퍼 용액(pH 8.0)에 첨가하여 빛이 차단된 분위기에서 교반한 후, 증류수로 세척 및 건조함으로써 수행되는 것을 특징으로 하는 기능화 PCL/PLGA 스캐폴드의 제조방법.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 IV) 단계에서 골형성 촉진 물질의 고정화는 상기 III) 단계에서 표면개질된 PCL/PLGA 스캐폴드를 50 ng/ml 농도의 골형성 촉진 물질이 포함된 0.1M MES 버퍼 용액(pH 5.6)에 첨가하여 교반한 후, 증류수로 세척 및 건조함으로써 수행되는 것을 특징으로 하는 기능화 PCL/PLGA 스캐폴드의 제조방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 정형외과용 또는 치과용 임플란트 또는 스캐폴드 이식 후 발생하는 박테리아 감염을 방지하고 동시에 골융합 및 골형성을 유도 촉진할 수 있는 기능성 임플란트 또는 스캐폴드 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 임플란트(implant) 또는 스캐폴드(scaffold)는 생체 내에 매식되어 소기의 기능을 발휘하는 생체 매식용 의료기구이다. 따라서 임플란트 또는 스캐폴드는 반복되는 하중 및 순간적인 압력에도 견딜 수 있는 기계적 강도를 지니고 있어야 함은 물론, 생체 친화성(biocompatibility), 화학적 적합성(chemical compatibility) 등의 조건을 만족해야 한다.

[0003] 따라서 임플란트 또는 스캐폴드 재료 중 현재 가장 많이 사용되고 있는 재료는 생체적합성이 뛰어난 티타늄과 일부의 티타늄 합금 등이다. 티타늄은 비중이 낮아서 다른 금속재료에 비해 상대적으로 가볍지만 다른 금속과의 합금으로 제조되거나 적절한 처리과정을 거치면 강도가 향상될 수 있고 또한 공기 중이나 수중에서 매우 치밀하고 재형성 능력이 뛰어난 부동태 산화 피막을 형성하여 매우 큰 부식저항성을 갖는다. 또한, 골 내에 매식되었을 때 골과의 유착(osteointegration)이 일어나는 장점이 있으므로 현재 임플란트 또는 스캐폴드의 소재로서 가장 널리 사용되고 있다.

[0004] 이러한 뛰어난 기계적 특성, 화학적 안정성, 생체적합성 등의 특성을 갖는 티타늄 및 그의 합금은 정형외과 및 치과영역에서 사용되는 임플란트 또는 스캐폴드로 널리 사용이 되고 있다. 하지만, 임플란트 또는 스캐폴드와 골 조직 간의 불충분한 결합이 임플란트 또는 스캐폴드를 느슨하게 하고 결국에는 임플란트 또는 스캐폴드의 이식 실패에 이르게 된다. 티타늄 표면과 골 조직사이의 골 융합을 향상시키기 위해, 칼슘 포스페이트 또는 히드록시아파타이트 코팅, 생체분자, 단백질, 표면 지형의 제어를 통한 표면 개질과 기능화에 대한 다양한 방법들이 개발이 되어져 왔다. 최근에, 조골세포의 기능을 향상시키기 위해, 콜라젠 젤, 스폰지, 피브노젠, 키토산 등을 이용한 골형성 성장인자 BMP-2 (Bone morphogenic protein-2) 전달시스템이 개발되어 왔다. 하지만, 이러한 약물전달체 중에 몇몇은 BMP-2가 단기간에 빠른 약물 방출과 초기에 갑작스런 방출되는 문제점을 나타내었다.

[0005] 정형외과 또는 치과 영역의 임플란트 또는 스캐폴드의 이식 실패에 대한 또 다른 주요 원인은 금속표면에 대한 박테리아의 감염과 관련이 되어 있다. 일반적인 티타늄 임플란트는 삽입하는 동안 환자 자신의 피부 또는 점막으로부터 유래하는 박테리아에 감염이 되기 쉽다. 임플란트 표면에 박테리아가 부착되어 성장을 하면, 박테리아 세포는 두꺼운 생체필름을 형성하게 되고, 이는 숙주방어 메커니즘과 투여된 항생제의 확산/침투를 막는 주요 장애물 역할을 한다. 이러한 박테리아 감염은 임플란트의 실패의 원인이 되며, 임플란트 제거에 따른 추가 비용과 함께 환자의 질병을 악화시킬 수 있다.

[0006] 이러한 문제점 중, 단기간 내에 빠른 약물방출과 초기 갑작스런 방출의 문제점을 해결하기 위해, 음전하를 띄는 선형 다당류인 헤파린을 화학적으로 티타늄 표면에 결합함으로써, BMP-2가 천천히 방출될 수 있도록 약물방출속도를 제어할 수 있었다(Sung Eun Kim et al., *Biomaterials*, 2011, 32(2), 366-373). 그러나, 이는 박테리아 세포의 부착 및 감염 억제 효과는 낮을 것으로 사료된다.

[0007] 또한 골융합 효능을 향상시키기 위하여 대한민국 공개특허 제2007-0068240호에는 재조합 골형성 촉진 단백질을 도포하여 턱뼈에 매식하면 시술부위 주변의 성체 미분화세포가 빠르게 골세포로 분화되어 골유도성 치유가 일어나도록 하여 치유기간을 단축시킬 수 있는 치과용 임플란트가 개시되어 있으나, 상기 기술은 임플란트 표면에 박테리아의 부착 및 감염될 수 있는 문제점이 있다. 이러한 문제점을 해결하고자 실제 임상에서는 박테리아 부착 및 감염 방지를 위하여 환자에게 항생제를 추가적으로 복용해야한다.

[0008] 또한, 박테리아 감염을 방지하고 골융합 효능을 향상시키기 위해, Wilson Wang 그룹(Biomacromolecules, 2009, 10(6) 1603-1611; Tissue Eng Part A, 2009, 15(2), 417-426; Biomaterials, 1008, 29(10), 1412-1421; J Biomed Mater Res A, 2008, 86(4), 85-872)에서는 키토산 및 그의 유도체, 덱스트란, 히알루론산, 펩타이드 등이 표면에 결합된 티타늄 임플란트가 개발이 되어 왔다. 이러한 티타늄 임플란트는 조골세포의 부착, 증식 및 알칼리성 포스파타제 활성도를 현저히 증가시켰으며, 동시에 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*)과 표피포도알균(*Staphylococcus epidermidis*)과 같은 박테리아의 부착을 감소시켰다. 그러나, 이러한 고분자 또는 펩타이드만으로 결합된 티타늄 임플란트의 경우, 임플란트 표면에 박테이라의 부착 및 감염을 최소화 또는 방지하기 위해서 의사의 처방을 받은 항생제를 추가적으로 복용을 해야만 하는 번거로움이 있다.

[0009] 이에 본 발명자들은 정형외과 또는 치과에서 사용되는 임플란트 또는 스캐폴드의 이식 후에 발생될 수 있는 박테리아 부착 및 감염을 방지하고, 추가적으로 항생제 복용이 필요가 없으며, 동시에 골 조직과의 융합 및 골형성 효능을 갖고 있는, 항생제와 골형성 촉진 물질이 동시에 지속적으로 서방형 방출이 가능한 기능성 임플란트 또는 스캐폴드를 발명하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) KR2007-0068240 A

비특허문헌

[0011] (비특허문헌 0001) Biomaterials, 2011, 32(2), 366-373, Sung Eun Kim et al.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 정형외과 또는 치과용 임플란트 또는 스캐폴드의 이식 후에 발생될 수 있는 박테리아 감염을 방지하고, 골융합 및 골형성 효능을 동시에 갖는 임플란트 또는 스캐폴드를 제공하는 것으로, 보다 상세하게는 임플란트 또는 스캐폴드의표면을 고분자로 개질하여 임플란트 또는 스캐폴드의 표면을 기능화(활성화)하고, 물리적 결합을 통하여 고분자로 활성화된 임플란트 또는 스캐폴드의 표면에 항생제와 골형성 촉진 물질을 고정화하여, 항생제와 골형성 촉진 물질을 동시에 지속적으로 서방형으로 방출할 수 있는, 항생제와 골형성 촉진 물질 방출형 임플란트 또는 스캐폴드 및 그 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명은 고분자 - 카테콜 작용기를 함유하는 화합물의 복합체를 이용하여 표면을 개질한 임플란트 또는 스캐폴드로서, 상기 임플란트 또는 스캐폴드는 항생제 및 골형성 촉진물질 중에서 선택되는 1종 또는 2종 이상을 포함하는 임플란트 또는 스캐폴드를 제공한다.

[0014] 또한 본 발명은 (a) 고분자 - 카테콜 작용기를 함유하는 화합물의 복합체를 제조하는 단계;

[0015] (b) 상기 (a)단계에서 제조된 고분자 - 카테콜 작용기를 함유하는 화합물의 복합체를 이용하여 임플란트 또는 스캐폴드 표면을 개질시켜, 표면을 활성화시키는 단계;

[0016] (c) 상기 (b)단계에서 제조된 표면 활성화된 임플란트 또는 스캐폴드를 항생제가 포함된 용액에 침지한 후, 20 ~ 25℃에서 4 내지 24시간 동안 교반하여, 항생제를 임플란트 또는 스캐폴드 표면에 고정화시키는 단계; 및

[0017] (d) 상기 (c) 단계에서 제조된 항생제가 표면에 고정화된 임플란트 또는 스캐폴드를 골 형성 촉진 물질이 포함된 용액에 침지한 후, 20 ~ 25℃에서 4 내지 24시간 동안 교반하여, 항생제/골 형성 촉진 물질을 임플란트 또는 스캐폴드 표면에 고정화시키는 단계를 포함하는 임플란트 또는 스캐폴드의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명의 임플란트 또는 스캐폴드는 항생제 및 골형성 촉진 물질을 포함할 경우, 임플란트 또는 스캐폴드로부터 장기간 지속적으로 항생제가 방출이 되기 때문에 임플란트 또는 스캐폴드를 이식하는 과정 또는 이식 후에 발생할 수 있는 박테리아 부착, 성장 및 감염을 방지하여, 박테리아에 의한 임플란트 또는 스캐폴드 이식 실패율을 현저히 감소시킬 수 있다. 또한, 임플란트 또는 스캐폴드 이식 후에도 추가적으로 항생제를 복용해야하는 번거로움이 없다. 게다가, 골융합 및 골형성을 촉진하는 물질(골 형성 촉진 물질)이 장기간 지속적으로 방출이 되기 때문에 임플란트 또는 스캐폴드와 골조직 사이의 부착, 조골세포의 분화를 촉진하여 골형성을 향상시킬 수 있기 때문에 임플란트 또는 스캐폴드 이식 후 치료기간이 단축이 될 수가 있으며, 임플란트 또는 스캐폴드 이식 성공률을 높일 수 있기 때문에 경제적 부담감을 줄일 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 헤파린 처리하여 개질된 임플란트의 티타늄 금속표면에 항생제인 젠타마이신과 골형성 촉진 성장인자 BMP-2를 순차적으로 고정화시키는 방법을 도시하고 있다.

도 2는 비교예 1 내지 4 및 실시예 1의 임플란트 티타늄 표면의 주사전자현미경 사진으로, 각각 (a) 티타늄(비교예 1), (b) 헤파린-티타늄(비교예 2), (c) 젠타마이신이 고정된 헤파린-티타늄(비교예 3), (d) BMP-2가 고정된 헤파린-티타늄(비교예 4), (e) 젠타마이신/BMP-2가 고정된 헤파린 티타늄(실시예 1)의 표면에 대한 주사전자현미경 사진을 도시하고 있다.

도 3은 임플란트의 티타늄(비교예 1) 및 활성화된 티타늄(헤파린-티타늄(비교예 2), 젠타마이신이 고정된 헤파린-티타늄(비교예 3), BMP-2가 고정된 헤파린-티타늄(비교예 4), 젠타마이신/BMP-2가 고정된 헤파린 티타늄(실시예 1))들의 X-선 광전자 분광기를 이용한 표면의 화학적 원소분석 결과를 도시하고 있다.

도 4는 본 발명의 실험예 2에 따른 비교예 2 내지 4 및 실시예 1의 활성화된 티타늄으로부터 젠타마이신 또는 BMP-2의 약물 방출을 보여주는 결과를 나타낸 그래프로, 도 4a는 젠타마이신이 고정된 헤파린-티타늄(비교예 3, GSHep-Ti) 및 젠타마이신/BMP-2가 고정된 헤파린 티타늄(실시예 1, GS/BMP-2 Hep-Ti)으로부터 젠타마이신의 약물 방출 거동을 도시하고 있으며, 도 4b는 BMP-2가 고정된 헤파린-티타늄(비교예 4, BMP-2/Hep-Ti) 및 젠타마이신/BMP-2가 고정된 헤파린 티타늄(실시예 1, GS/BMP-2 Hep-Ti)으로부터 BMP-2의 약물 방출 거동 결과를 도시하고 있다.

도 5는 본 발명의 실험예 3에 따른 비교예 1(Pristine Ti) 및 기능화된 티타늄 (젠타마이신이 고정된 헤파린-티타늄(비교예 3, GSHep-Ti), BMP-2가 고정된 헤파린-티타늄(비교예 4, BMP-2/Hep-Ti) 및 젠타마이신/BMP-2가 고정된 헤파린 티타늄(실시예 1, GS/BMP-2 Hep-Ti))들의 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*) 박테리아 세포에 대한 항균 효과에 대한 결과를 도시하고 있다.

도 6은 본 발명의 실험예 4에 따른 비교예 1(Pristine Ti) 및 기능화된 티타늄 (헤파린-티타늄(비교예 2, Heparinized Ti), 젠타마이신이 고정된 헤파린-티타늄(비교예 3, GSHep-Ti), BMP-2가 고정된 헤파린-티타늄(비교예 4, BMP-2/Hep-Ti) 및 젠타마이신/BMP-2가 고정된 헤파린 티타늄(실시예 1, GS/BMP-2 Hep-Ti))들의 조골세포에 대한 세포독성 결과를 도시하고 있다.

도 7은 본 발명의 실험예 5에 따른 비교예 1(Pristine Ti) 및 기능화된 티타늄(헤파린-티타늄(비교예 2, Heparnized Ti), 젠타마이신이 고정된 헤파린-티타늄(비교예 3, GSHep-Ti), BMP-2가 고정된 헤파린-티타늄(비교예 4, BMP-2/Hep-Ti) 및 젠타마이신/BMP-2가 고정된 헤파린 티타늄(실시예 1, GS/BMP-2 Hep-Ti))들의 조골세포에 대한 Live/Dead 분석 결과를 도시하고 있다.

도 8은 본 발명의 실험예 6에 따른 비교예 1(Pristine Ti) 및 기능화된 티타늄(헤파린-티타늄(비교예 2, Heparnized Ti), 젠타마이신이 고정된 헤파린-티타늄(비교예 3, GSHep-Ti), BMP-2가 고정된 헤파린-티타늄(비교예 4, BMP-2/Hep-Ti) 및 젠타마이신/BMP-2가 고정된 헤파린 티타늄(실시예 1, GS/BMP-2 Hep-Ti))에 조골세포를 1일, 3일, 7일 배양 후의 세포증식에 대한 결과를 도시하고 있다.

도 9는 본 발명의 실험예 7에 따른 비교예 1(Pristine Ti) 및 기능화된 티타늄(헤파린-티타늄(비교예 2, Heparnized Ti), 젠타마이신이 고정된 헤파린-티타늄(비교예 3, GSHep-Ti), BMP-2가 고정된 헤파린-티타늄(비교예 4, BMP-2/Hep-Ti) 및 젠타마이신/BMP-2가 고정된 헤파린 티타늄(실시예 1, GS/BMP-2 Hep-Ti))에 조골세포를 7일, 14일, 21일 배양 후의 알칼리성 포스파타제 활성도에 대한 결과를 도시하고 있으며,

도 10은 본 발명의 실험예 7에 따른 비교예 1(Pristine Ti) 및 기능화된 티타늄(헤파린-티타늄(비교예 2, Heparnized Ti), 젠타마이신이 고정된 헤파린-티타늄(비교예 3, GSHep-Ti), BMP-2가 고정된 헤파린-티타늄(비교

예 4, BMP-2/Hep-Ti) 및 젠타마이신/BMP-2가 고정된 헤파린 티타늄(실시예 1, GS/BMP-2 Hep-Ti))에 조골세포를 21일 동안 배양 후의 칼슘 침착에 대한 결과를 도시하고 있다.

도 11은 실시예 2의 (a) PCL/PLGA 스캐폴드 표면, (b) BMP-2 탑재 헤파린 PCL/PLGA 스캐폴드 표면, (c) BMP-2 탑재 헤파린-도파민 PCL/PLGA 스캐폴드 표면을 주사전자현미경으로 관찰한 결과이다.

도 12는 PCL/PLGA 스캐폴드, BMP-2 탑재 헤파린-PCL/PLGA 스캐폴드, BMP-2 탑재 헤파린-도파민- PCL/PLGA 스캐폴드의 조골세포에 대한 세포독성을 평가하기 위해, 각각의 스캐폴드를 세포배양액에 넣고 배양한 후 450 nm에서 흡광도를 측정한 결과이다.

도 13은 PCL/PLGA 스캐폴드, BMP-2 탑재 헤파린-PCL/PLGA 스캐폴드, BMP-2 탑재 헤파린-도파민-PCL/PLGA 스캐폴드의 조골세포에 대한 세포증식을 평가하기 위해, 1×10^5 개의 조골세포를 각각의 스캐폴드에 넣고 1일, 3일, 7일을 배양한 후, 450 nm에서 흡광도를 측정한 결과이다.

도 14는 PCL/PLGA 스캐폴드, BMP-2 탑재 헤파린-PCL/PLGA 스캐폴드, BMP-2 탑재 헤파린-도파민- PCL/PLGA 스캐폴드의 조골세포의 초기분화 마커인 알칼리성 포스파타제 활성도를 측정한 결과이다.

도 15는 PCL/PLGA 스캐폴드, BMP-2 탑재 헤파린-PCL/PLGA 스캐폴드, BMP-2 탑재 헤파린-도파민- PCL/PLGA 스캐폴드를 조골세포의 후기분화 마커인 칼슘침착을 측정한 결과이다.

도 16은 PCL/PLGA 스캐폴드, BMP-2 탑재 헤파린-PCL/PLGA 스캐폴드, BMP-2 탑재 헤파린-도파민- PCL/PLGA 스캐폴드에 대한 골형성능을 알아보기 위해, 쥐 경골(tibia)에 8 mm 골결손(bone defect) 부분에 이식된 각각의 스캐폴드를각각 hematoxylin and eosin (H&E) 과 Masson's trichrome (MT) 염색을 한 후, 조직학적 분석을 한 결과이다.

도 17은 PCL/PLGA 스캐폴드, BMP-2 탑재 헤파린-PCL/PLGA 스캐폴드, BMP-2 탑재 헤파린-도파민- PCL/PLGA 스캐폴드에 대한 골형성능을 알아보기 위해, 쥐 경골(tibia)에 8 mm 골결손(bone defect) 부분에 이식된 각각의 스캐폴드에 대하여 X-ray 분석, CT 분석 및 조직형태학적 분석을 한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 이하, 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다.

[0021] 본 발명은 고분자 - 카테콜 작용기를 함유하는 화합물의 복합체를 이용하여 표면을 개질한 임플란트 또는 스캐폴드로서, 상기 임플란트 또는 스캐폴드는 항생제 및 골형성 촉진물질 중에서 선택되는 1종 또는 2종 이상을 포함하는 임플란트 또는 스캐폴드를 제공한다.

[0022] 보다 상세하게, 본 발명은 생체적합성이 뛰어난 고분자를 강력한 공유결합 또는 비공유결합을 통하여 임플란트 또는 스캐폴드의 표면을 개질하고, 박테리아 부착 및 감염을 억제할 수 있는 항생제 및/또는 골 융합 및 골 형성을 증가시킬 수 있는 골형성 촉진 물질을 고분자로 표면이 개질된 임플란트 또는 스캐폴드 표면에 고정화를 함으로써, 항생제 및/또는 골형성 촉진 물질이 서방형으로 동시에 방출이 가능한 기능성 임플란트 또는 스캐폴드를 제공한다.

[0023] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 임플란트 또는 스캐폴드의 표면은 생체적합성이 뛰어난 티타늄과 일부의 티타늄 합금으로 이루어질 수 있다.

[0024] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 임플란트 또는 스캐폴드의 표면은 폴리카프로락톤(PCL); 폴리유산(polylactic acids, PLA), 폴리글리콜산(polyglycolic acid) 또는 이들의 공중합체인 PLGA; 폴리리드록시부티레이트-코-발레레이트(PHBV), 폴리비닐알콜(PVA), 폴리부틸렌 숙시네이트(PBS) 및 폴리필렌 글리콜산(PG)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 또는 2종 이상의 생분해성 플라스틱 조성물로 이루어질 수 있다.

[0025] 상기 임플란트 또는 스캐폴드의 표면 개질에 사용될 수 있는 고분자는 생체적합성 고분자로, 헤파린 (Heparin), 헤파란설페이트 (Heparan sulfate), 히알루론산(Hyaluronic acid), 알지네이트(Alginate), 폴리아스파틱산 [Poly(aspartic acid)], 폴리아크릴산 [Poly(acrylic acid)], 폴리글루타믹산 [Poly(glutamic acid)], 카르복시메틸셀룰로오스(Carboxymethyl cellulose), 젤라틴(Gelatin), 콜라젠(Collagen), 키토산(Chitosan) 및 그의 유도체, 글라이콜키토산(Glycol chitosan), 폴리-L-라이신 (Poly-L-lysine), 폴리에틸렌이민 (Polyethyleneimine), 및 말단에 아민 그룹의 작용기를 갖는 덴드리머(Dendrimer)로 이루어진 군으로부터 선택

된 1종 또는 2종 이상인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0026] 상기 말단에 아민 그룹의 작용기를 갖는 덴드리머(Dendrimer)는 중심에서부터 방사상으로 결합된 반복단위(세대)로 구성되는 것으로, 상기 덴드리머의 세대(generation) 수는 1 내지 5인 것이 바람직하다.

[0027] 상기 고분자가 임플란트 또는 스캐폴드의 표면에 강력한 공유결합 또는 비공유결합을 형성할 수 있도록 하기 위하여, 본 발명에서는 실질적으로 모든 종류의 무기 및 유기 기판에 접착할 수 있는 부착유기물을 갖는 홍합(Mussel)의 접착 특성을 이용하였다. 홍합의 강력한 접착 특성은 플라크-기판 접면 근처에서 발견되는 3,4-다이하이드록시-L-페닐알라닌(3,4-dihydroxy-L-phenylalanine, DOPA) 및 라이신 아미노산이 풍부한 단백질의 아미노산에서 기인하는 것으로 보여진다. 상기 DOPA는 접착물질의 고화를 초래하는 반응에 관여할 뿐만 아니라, 기판과 강력한 공유결합 또는 비공유결합을 형성한다. 특히, DOPA 구조식 중에 카테콜(catechol)이라 불리는 오르소-다이하이드록시페닐(ortho-dihydroxyphenyl)의 작용기가 기판과 강력한 공유결합 또는 비공유결합을 형성하는데 중요한 역할을 한다. 따라서 본 발명에서는 상기 생체적합성 고분자를 임플란트 또는 스캐폴드 표면에 결합을 하기 위해서, 카테콜 작용기를 함유하는 화합물을 이용하였다. 상기 카테콜 작용기를 함유하는 화합물은 3,4-다이하이드록시페닐알라닌(L-3,4-dihydroxyphenylalanine), 도파민(Dopamine), 3,4-다이하이드록시벨질아민(3,4-dihydroxybenzylamine), 노르에피네피린(norepinephirine);, 3,4-다이하이드록시벤즈알데히드(3,4,-dihydroxybenzaldehyde), 3,4-다이하이드록시벤조익산(3,4-dihydroxybenzoic acid), 카페익산(Caffeic acid) 및 3,4-다이하이드록시-페닐아세트산(3,4-Dihydroxyphenylacetic acid)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 화합물인 것이 바람직하나, 이에 한정하는 것은 아니다.

[0028] 상기 고분자를 카테콜 작용기를 포함하는 화합물을 이용하여 임플란트 또는 스캐폴드의 표면에 결합시켜, 임플란트 또는 스캐폴드의 표면을 활성화 또는 기능화시키는 고분자-카테콜을 함유한 화합물의 복합체는, 고분자와 카테콜을 함유하는 화합물에 가교제(crosslinker)를 사용함으로써 제조할 수 있다.

[0029] 상기 고분자-카테콜 작용기를 함유한 화합물의 복합체는 상기 고분자의 아민그룹 또는 카르복시그룹의 작용기; 및

[0030] 카테콜 작용기를 포함하는 화합물의 아민그룹, 카르복시그룹 또는 알데히드 작용기로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 작용기와의 화학적으로 결합할 수 있는 조합에 의하여 형성되는 것이 바람직하며, 이에 따라 제조된 고분자-카테콜 작용기를 함유한 화합물의 복합체를 이용하여 임플란트 또는 스캐폴드의 표면을 개질할 수 있다.

[0031] 상기 고분자-카테콜을 함유한 화합물의 복합체는 다음과 같은 조합에 의하여 제조되는 것이 보다 바람직하다. 예를 들면, 카르복시 그룹의 작용기를 가지고 있는 고분자인 헤파린 (Heparin), 헤파란설페이트 (Heparan sulfate), 히알루론산(Hyaluronic acid), 알지네이트(Alginate), 폴리아스파틱산 [Poly(aspartic acid)], 폴리아크릴산 [Poly(acrylic acid)], 폴리글루타믹산 [Poly(glutamic acid)], 카르복시메틸셀룰로오스(Carboxymethyl cellulose), 젤라틴(Gelatin), 콜라젠(Collagen)은 아민그룹의 작용기를 갖는 카테콜을 함유하는 화합물인 3,4-다이하이드록시페닐알라닌(L-3,4-dihydroxyphenylalanine), 도파민(Dopamine), 3,4-다이하이드록시벤질아민(3,4-dihydroxybenzylamine), 노르에피네피린(norepinephirine)과 다양한 조합을 통하여 고분자-카테콜을 함유하는 화합물 복합체를 제조할 수 있다. 또한, 아민 그룹의 작용기를 갖는 고분자인 젤라틴(Gelatin), 콜라젠(Collagen), 키토산(Chitosan) 및 그의 유도체, 글라이콜키토산(Glycol chitosan), 폴리-L-라이신 (Poly-L-lysine), 폴리에틸렌이민(Polyethyleneimine), 덴드리머(Dendrimer)는 카르복시 작용기 또는 알데히드 작용기를 갖는 카테콜 함유 화합물인 3,4-다이하이드록시벤즈알데히드(3,4,-dihydroxybenzaldehyde), 3,4-다이하이드록시벤조익산(3,4-dihydroxybenzoic acid), 카페익산(Caffeic acid), 3,4-다이하이드록시-페닐아세트산(3,4-Dihydroxyphenylacetic acid)와 다양한 조합을 통하여 고분자-카테콜을 함유하는 화합물 복합체를 제조할 수 있다. 하기 표 1은, 고분자와 카테콜 함유하는 화합물의 다양한 조합을 통하여 얻어질 수 있는 고분자-카테콜을 함유하는 복합체의 예를 제공하고 있다.

표 1

[0032] 고분자-카테콜 함유한 화합물 복합체

고분자 종류	결합 가능한 카테콜 함유 화합물	제조 가능한 고분자-카테콜 함유 화합물 복합체
Heparin (Hep)	- 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) - Dopamine (DOPAm) - 3,4-dihydroxybenzylamine (DHBA) - norepinephirine (NENP)	- Hep-DOPA - Hep-DOPAm - Hep-DHBA - Hep-NENP
Heparin sulfate (HS)	- 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) - Dopamine (DOPAm) - 3,4-dihydroxybenzylamine (DHBA) - norepinephirine (NENP)	- HS-DOPA - HS-DOPAm - HS-DHBA - HS-NENP
Hyaluronic acid (HA)	- 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) - Dopamine (DOPAm) - 3,4-dihydroxybenzylamine (DHBA) - norepinephirine (NENP)	- HA-DOPA - HA-DOPAm - HA-DHBA - HA-NENP
Alginate (AG)	- 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) - Dopamine (DOPAm) - 3,4-dihydroxybenzylamine (DHBA) - norepinephirine (NENP)	- AG-DOPA - AG-DOPAm - AG-DHBA - AG-NENP
Polyaspartic acid (PAA)	- 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) - Dopamine (DOPAm) - 3,4-dihydroxybenzylamine (DHBA) - norepinephirine (NENP)	- PAA-DOPA - PAA-DOPAm - PAA-DHBA - PAA-NENP
Polyacrylic acid (PAcA)	- 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) - Dopamine (DOPAm) - 3,4-dihydroxybenzylamine (DHBA) - norepinephirine (NENP)	- PAcA-DOPA - PAcA-DOPAm - PAcA-DHBA - PAcA-NENP
Polyglutamic acid (PGA)	- 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) - Dopamine (DOPAm) - 3,4-dihydroxybenzylamine (DHBA) - norepinephirine (NENP)	- PGA-DOPA - PGA-DOPAm - PGA-DHBA - PGA-NENP
Carboxymethyl cellulose (CMC)	- 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) - Dopamine (DOPAm) - 3,4-dihydroxybenzylamine (DHBA) - norepinephirine (NENP)	- CMC-DOPA - CMC-DOPAm - CMC-DHBA - CMC-NENP
Gelatin (Gel)	- 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) - Dopamine (DOPAm) - 3,4-dihydroxybenzylamine (DHBA) - norepinephirine (NENP) - 3,4,-dihydroxybenzaldehyde (DHBAl) - 3,4-dihydroxybenzoic acid (DHBAc) - Caffeic acid (CFA) - 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (DHPA)	- Gel-DOPA - Gel-DOPAm - Gel-DHBA - Gel-NENP - Gel-DHBAl - Gel-DHBAc - Gel-CFA - Gel-DHPA
Collagen (Col)	- 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) - Dopamine (DOPAm) - 3,4-dihydroxybenzylamine (DHBA) - norepinephirine (NENP) - 3,4,-dihydroxybenzaldehyde (DHBAl) - 3,4-dihydroxybenzoic acid (DHBAc) - Caffeic acid (CFA) - 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (DHPA)	- Col-DOPA - Col-DOPAm - Col-DHBA - Col-NENP - Col-DHBAl - Col-DHBAc - Col-CFA - Col-DHPA

Chitosan (Chi)	- 3,4,-dihydroxybenzaldehyde (DHBAl) - 3,4-dihydroxybenzoic acid (DHBAc) - Caffeic acid (CFA) - 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (DHPA)	- Chi-DHBAl - Chi-DHBAc - Chi-CFA - Chi-DHPA
Glycol chitosan (GC)	- 3,4,-dihydroxybenzaldehyde (DHBAl) - 3,4-dihydroxybenzoic acid (DHBAc) - Caffeic acid (CFA) - 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (DHPA)	- GC-DHBAl - GC-DHBAc - GC-CFA - GC-DHPA
Poly-L-Lysine (PLL)	- 3,4,-dihydroxybenzaldehyde (DHBAl) - 3,4-dihydroxybenzoic acid (DHBAc) - Caffeic acid (CFA) - 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (DHPA)	- PLL-DHBAl - PLL-DHBAc - PLL-CFA - PLL-DHPA
Polyethyleneimine (PEI)	- 3,4,-dihydroxybenzaldehyde (DHBAl) - 3,4-dihydroxybenzoic acid (DHBAc) - Caffeic acid (CFA) - 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (DHPA)	- PEI-DHBAl - PEI-DHBAc - PEI-CFA - PEI-DHPA
Dendrimer (Den)	- 3,4,-dihydroxybenzaldehyde (DHBAl) - 3,4-dihydroxybenzoic acid (DHBAc) - Caffeic acid (CFA) - 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (DHPA)	- Den-DHBAl - Den-DHBAc - Den-CFA - Den-DHPA

[0033] 상기 고분자의 중량평균분자량은 1,800 내지 300,000인 것이 바람직하다. 또한 상기고분자 - 카테콜 작용기를 함유하는 화합물의 복합체는 상기 고분자 1몰에 대하여 상기 카테콜 작용기를 함유하는 화합물 3 내지 25몰로 결합되는 것이 바람하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0034] 상기 고분자-카테콜 작용기를 함유한 화합물 복합체를 임플란트 또는 스캐폴드의 표면에 결합시켜 임플란트 또는 스캐폴드 표면의 활성화 및 기능화를 하기 위해선, 카테콜 작용기가 산화중합반응이 용이하게 일어날 수 있는 염기조건이 바람직하며, 용액의 pH는 7 내지 12인 것이 바람직하다. 용액의 pH를 상기와 같은 조건으로 유지하기 위하여 트리스버퍼(Tris), 인산버퍼(PBS)와 같은 pH 버퍼를 사용하는 것이 가능하다.

[0035] 상기 고분자-카테콜 작용기를 함유한 화합물 복합체를 사용하여 표면활성화 또는 기능화된 임플란트 또는 스캐폴드의 표면에 고정화 또는 탑재될 수 있는 항생제는 시소마이신(Sisomicin), 리보스타마이신(Ribostamycin), 반코마이신(Vancomycin), 토브라마이신(Tobramycin), 아즈트레오남(Aztreonam), 젠타마이신(Gentamicin), 세포티암(Cefotiam), 세프트리악손(Ceftriaxone), 네틸마이신(Netilmicin), 시프로플록사신(Ciprofloxacin), 신다마이신(Cindamycin) 및 세포졸린 (Cefazolin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 또는 2종이상인 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 카르복실산(carboxylic acid), 아민(amine), 인산염(phosphates) 및 황산염(sulfate)의 작용기 중 어느 하나 이상의 작용기를 가지고 있는 것을 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0036] 상기 고분자로 활성화된 임플란트 또는 스캐폴드의 표면에 탑재 또는 고정화될 수 있는 항생제의 농도는 1ng/ml 내지 200 mg/ml의 농도 범위인 것이 바람직하며, 상기의 항생제 농도 범위에서 고분자로 활성화된 임플란트 또는 스캐폴드의 표면에 항생제를 탑재 또는 고정화할 수 있으나, 임플란트 또는 스캐폴드의 크기에 따라 탑재 및 고정화될 수 있는 용량이 결정될 수 있다. 상기 항생제의 농도가 1ng/ml 미만의 농도로 처리할 경우에는 향균효과가 나타나지 않을 것이며, 200mg/ml 농도를 초과하여 처리할 경우에는 정상세포에 영향을 미칠 수 있다.

[0037] 상기 고분자-카테콜 작용기를 함유한 화합물 복합체를 사용하여 표면 활성화 또는 기능화된 임플란트 또는 스캐폴드의 표면에 고정화 또는 탑재될 수 있는 골 형성 촉진 물질로는 단백질인 골형성 성장인자 또는 저분자량의 골형성 화합물을 사용할 수 있으며, 골 형성 성장인자인 것이 보다 바람직하나, 이에 한정하는 것은 아니다.

[0038] 상기 골 형성 촉진 물질 중 골 형성 성장인자로는, 골형성 단백질(bone morphogenic protein)인 BMP-1, BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8a, BMP-8b, BMP-10, BMP-15와 혈소판유래증식인자(Platelet derived growth factor; PDGF), 형질전환성장인자베타(Transforming growth factor beta; TGF-beta), 염기성 섬유모세포생장인자(basic fibroblast growth factor; bFGF), 인슐린유사성장인자-1(Insulin like growth factor 1; IGF-1) 및 락토페린(lactoferin)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 또는 2종 이상인 것이 바람직

하다.

[0039] 또한, 본 발명의 표면활성화 또는 기능화된 임플란트 또는 스캐폴드의 표면에 골융합 및 골형성 효능을 향상시키기 위하여 사용되는 골형성 성장인자 대신에 대체가 가능한 저분자량의 골형성 화합물인 비스포스포네이트 약물계열인 알렌드로네이드(alendronate), 리제드로네이트(risedronate), 졸레드로네이트(zoledronate), 에티드로네이트(Etidronate), 클로드로네이트(Clodronate), 틸루드로네이트(Tiludronate), 파미드로네이트(Pamidronate), 올파드로네이트(Olpadronate), 이바드로네이트(Ibadronate); 스태틴 약물 계열인 아트로바스타틴(Atrovastatin), 플루바스타틴(Fluvastatin), 로바스타틴(Lovastatin), 피타바스타틴(pitavastatin), 프라바스타틴(pravastatin), 로수바스타틴(rosuvastatin), 심바스타틴(simastatin); 프로스타글란틴 E2(Prostaglandin E2, PGE2), 신바로메틴(shinbarometin), 파이로포스페이트(pyrophosphate), 메드로네이트(medronate), 옥시드로네이트(oxidronate) 및 옥시스테롤(Oxysterol)로 이루어진 군으로 선택되는 1종 또는 2종이상의 약물이 탑재 또는 고정화될 수 있다.

[0040] 상기 골형성 성장인자가 고분자로 활성화된 임플란트 또는 스캐폴드의 표면에 탑재 또는 고정화될 수 있는 용량은 1pg/ml 내지 3 mg/ml의 농도범위인 것이 바람직하며, 상기 골형성 성장인자의 농도가 1pg/ml 미만일 경우에는 골형성 효능이 나타나지 않으며, 3mg/ml를 초과할 경우에는 뼈를 녹이게 하는 부작용 발생이 가능하다.

[0041] 골융합 및 골형성을 촉진할 수 있는 상기 저분자량의 골형성 화합물이 고분자로 활성화된 임플란트 또는 스캐폴드의 표면에 탑재 또는 고정화될 수 있는 용량은 1 ng/ml 내지 500 mg/ml의 농도 범위인 것이 바람직하다. 상기 골형성 성장인자의 농도가 1ng/ml 미만일 경우에는 골형성 효능이 나타나지 않으며, 500 mg/ml를 초과할 경우에는 뼈를 녹이게 하는 부작용 발생할 수 있다.

[0042] 상기 고분자로 표면이 활성화 또는 기능화된 임플란트 또는 스캐폴드에 항생제, 골 형성 촉진 물질을 탑재 또는 고정화하기 위해선, 고분자와 항생제, 고분자와 골형성 촉진 물질간의 정전기적 상호작용이 용이하게 일어날 수 있는 약산성 조건인 pH 5 내지 6.5 범위가 바람직하며, 용액으로는 상기의 pH 범위를 갖는 물, MES 버퍼[2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid], 트리스버퍼(Tris), 인산버퍼(PBS)와 같은 용액을 사용하는 것이 가능하다.

[0043] 본 발명의 임플란트 또는 스캐폴드는 치과용 또는 정형외과용인 임플란트 또는 스캐폴드인 것이 바람직하며, 예를 들어, 상기 정형외과용 임플란트 또는 스캐폴드는 고관절, 슬관절, 족관절, 견관절, 주관절의 인공관절이나, 척추영역 인공디스크 등의 인공삽입물이 사용되며, 골절치료에 사용되는 금속나사, 금속판, 금속정 등의 고정물을 포함한다. 또한 상기 치과용 임플란트 또는 스캐폴드는 고정(Fixture)형 임플란트 또는 스캐폴드, 멤브레인(Membrane) 형 임플란트 또는 스캐폴드 등을 포함한다.

[0044] 따라서, 본 발명의 상기 항생제와 골형성 촉진 물질이 서방형으로 방출 가능한 기능성 임플란트 또는 스캐폴드를 이용할 경우, 임플란트 또는 스캐폴드로부터 장기간 지속적으로 항생제가 방출이 되기 때문에 임플란트 또는 스캐폴드를 이식하는 동안 발생할 수 있는 박테리아 부착 및 감염을 방지할 수 있으며, 임플란트 또는 스캐폴드 이식 후에도 추가적으로 항생제를 복용해야하는 번거로움이 없다. 또한, 골융합 및 골형성을 촉진하는 물질이 장기간 지속적으로 방출이 되기 때문에 임플란트 또는 스캐폴드와 골조직 사이의 부착 및 골형성이 촉진되어 임플란트 또는 스캐폴드의 치료기간이 단축될 수가 있으며, 임플란트 또는 스캐폴드의 이식 성공에 크게 기여를 할 수 있다.

[0045] 또한 본 발명은 임플란트 또는 스캐폴드의 제조방법에 관한 것으로,

[0046] (a) 고분자 - 카테콜 작용기를 함유하는 화합물의 복합체를 제조하는 단계;

[0047] (b) 상기 (a)단계에서 제조된 고분자 - 카테콜 작용기를 함유하는 화합물의 복합체를 이용하여 임플란트 또는 스캐폴드의 표면을 개질시켜, 표면을 활성화시키는 단계;

[0048] (c) 상기 (b)단계에서 제조된 표면 활성화된 임플란트 또는 스캐폴드를 항생제가 포함된 용액에 침지한 후, 20 ~ 25℃에서 4 내지 24시간 동안 교반하여, 항생제를 임플란트 또는 스캐폴드 표면에 고정화시키는 단계; 및

[0049] (d) 상기 (c) 단계에서 제조된 항생제가 표면에 고정화된 임플란트 또는 스캐폴드를 골 형성 촉진 물질이 포함된 용액에 침지한 후, 20 ~ 25℃에서 4 내지 24시간 동안 교반하여, 항생제/골 형성 촉진 물질을 임플란트 또는 스캐폴드 표면에 고정화시키는 단계를 포함하는 것이 바람직하다.

[0050] 상기 (a)단계의 상기 고분자 - 카테콜 작용기를 함유하는 화합물의 복합체는 생체적합성 고분자의 아민그룹 또

는 카르복시그룹의 작용기; 및

[0051] 카테콜 작용기를 포함하는 화합물의 아민그룹, 카르복시그룹 또는 알데히드 작용기로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 작용기와의 결합에 의하여 형성되는 것이 바람직하다.

[0052] 상기 고분자 물질- 카테콜 작용기를 함유하는 화합물의 복합체의 제조 방법은 상기에 기재한 내용을 원용한다.

[0053] 상기 임플란트 또는 스캐폴드의 제조 방법의 (C)단계 및 (d)단계의 고분자와 항생제, 고분자와 골형성 촉진 물질간의 정전기적 상호작용이 용이하게 일어날 수 있는 반응 조건은 약산성 조건인 pH 5 내지 6.5의 범위의 조건인 것이 바람직하며, 이때 이용할 수 있는 용액으로는 상기의 pH 범위를 갖는 물, MES 버퍼[2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid], 트리스버퍼(Tris), 인산버퍼(PBS)와 같은 용액을 사용하는 것이 가능하다.

[0054] 또한, 상기 (b), (c) 및 (d)단계 이후, 각각 증류수로 3-4회 세척한 후, 50도에서 건조시키는 단계를 포함하는 것이 바람직하다.

[0055] 상기 항생제는 상기 기재한 내용을 원용한다.

[0056] 상기 고분자로 활성화된 임플란트 또는 스캐폴드 표면에 탑재 또는 고정화될 수 있는 항생제 용액의 농도는 1ng/ml 내지 200 mg/ml의 농도 범위인 것이 바람직하며, 상기의 항생제 농도 범위에서 고분자로 활성화된 임플란트 또는 스캐폴드 표면에 항생제를 탑재 또는 고정화할 수 있으나, 임플란트 또는 스캐폴드의 크기에 따라 탑재 및 고정화될 수 있는 용량이 결정될 수 있다. 상기 항생제의 농도가 1ng/ml 미만의 농도로 처리할 경우에는 향균효과가 나타나지 않을 것이며, 200mg/ml 농도를 초과하여 처리할 경우에는 정상세포에 영향을 미칠 수 있다.

[0057] 상기 골형성 촉진 물질은 상기 기재한 내용을 원용한다.

[0058] 상기 골형성 성장인자가 고분자로 활성화된 임플란트 또는 스캐폴드 표면에 탑재 또는 고정화될 수 있는 용량은 1pg/ml 내지 3 mg/ml의 농도 범위인 것이 바람직하며,

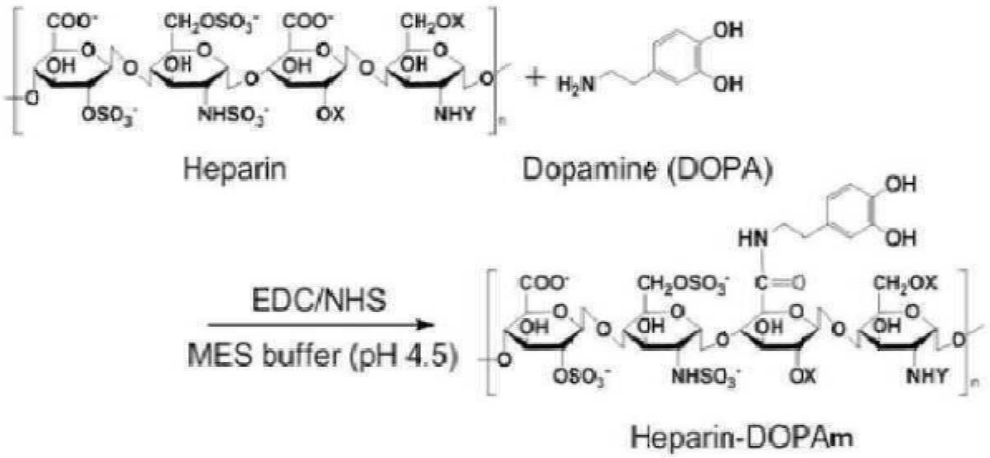
[0059] 골융합 및 골형성을 촉진할 수 있는 상기 저분자량의 골형성 화합물이 고분자로 활성화된 임플란트 또는 스캐폴드 표면에 탑재 또는 고정화될 수 있는 용량은 1 ng/ml 내지 500 mg/ml의 농도 범위인 것이 바람직하다.

[0060] 이하, 본 발명을 하기의 실시예 및 실험예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 다만, 하기의 실시예 및 실험예는 본 발명의 예시로서, 본 발명의 권리범위가 이에 의하여 한정되지 않는다.

[0061] **제조예 1. 헤파린-도파민 복합체 제조**

[0062] 헤파린(heparin) 400 mg, 1-에틸-3-(3-디메틸-아미노프로필)카보디이미드 (1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl) carbodiimide; EDC) 190.6 mg, N-하이드로숙시니미드(N-hydrosuccinimide; NHS) 115 mg을 10 ml의 MES buffer(pH 4.5)에 녹여 10분간 반응시킨 후, 102.2 mg의 도파민을 넣어 25℃에서 약 24시간 동안 반응시킨다. 반응 후, 증류수에서 투석하여 미반응 물질을 제거한 후, 동결건조하여 헤파린-도파민 복합체(Hep-DOPAm)를 제조하였다. 상기의 반응은 하기 반응식 1에 나타난 바와 같다.

[0063] [반응식 1]



[0064]

[0065] 상기 제조된 헤파린-도파민 복합체를 자외선 및 가시광선 분광분석법을 통하여 280 nm 파장에서 분석한 결과, 헤파린 한 개의 분자 당 약 4.6 ± 0.8 개의 도파민 분자가 결합되어 있음을 확인하였다.

[0066] **실시예 1. 티타늄 임플란트 표면에 헤파린, 젠타마이신 설페이트** (gentamicin sulfate)와 BMP-2의 고정화

[0067] 임플란트의 티타늄 표면을 개질하기 전에, 티타늄 임플란트를 에탄올 용액에 넣어 1시간 정도 초음파 세척을 한 후, 약 24시간 동안 50도에서 건조시켰다. 그 후, 티타늄 임플란트를 상기 제조예 1에서 제조한 헤파린-도파민 복합체가 5 mg/ml의 농도로 용해되어 있는 10 mM Tris 버퍼 (pH 8.0)에 넣고, 빛을 차단한 후 밤새도록 교반한 뒤에, 헤파린-도파민 복합체로 표면이 개질된 티타늄 임플란트(헤파린-티타늄 임플란트)를 증류수로 3-4회 세척한 후 질소가스를 흘려주면서 건조시켜 헤파린-도파민 복합체로 표면이 개질된 티타늄 임플란트를 제조하였다. 항생제인 젠타마이신을 상기 헤파린-도파민 복합체로 표면이 개질된 티타늄 임플란트에 탑재시키기 위해, 헤파린-도파민 복합체로 표면이 개질된 티타늄 임플란트를 50 mg/ml 농도로 젠타마이신이 녹여져 있는 0.1 M MES 버퍼 (pH 5.6)에 넣고 25도에서 80 rpm으로 15-24시간 정도 교반한 후, 증류수로 3-4회 세척한 후, 50도에서 건조시켜 젠타마이신이 고정된 헤파린-티타늄 임플란트(젠타마이신-헤파린-티타늄 임플란트)를 제조하였다. 골형성 성장인자인 BMP-2를 추가적으로 탑재하기위해, 50 ng/ml 농도의 BMP-2가 포함된 0.1 M MES 버퍼 (pH 5.6)에 젠타마이신이 고정된 헤파린-티타늄 임플란트를 넣고, 밤새도록 교반한 후, 3-4회 증류수로 세척한 후, 건조하여, 젠타마이신/BMP-2가 고정된 헤파린-티타늄 임플란트를 얻었다.

[0068] **비교예 1. 티타늄 임플란트**

[0069] 표면처리 되지 않은 티타늄 임플란트.

[0070] **비교예 2. 헤파린-티타늄 임플란트 제조**

[0071] 임플란트의 티타늄 표면을 개질하기 전에, 티타늄 임플란트를 에탄올 용액에 넣어 1시간 정도 초음파 세척을 한 후, 약 24시간 동안 50도에서 건조시켰다. 그 후, 티타늄 임플란트를 상기 제조예 1에서 제조한 헤파린-도파민 복합체가 5 mg/ml의 농도로 용해되어 있는 10 mM Tris 버퍼 (pH 8.0)에 넣고, 빛을 차단한 후 밤새도록 교반한 뒤에, 헤파린-도파민 복합체로 표면이 개질된 티타늄 임플란트(헤파린-티타늄 임플란트)를 증류수로 3-4회 세척한 후 질소가스를 흘려주면서 건조시켜 헤파린-도파민 복합체로 표면이 개질된 티타늄 임플란트를 제조하였다.

[0072] **비교예 3. 젠타마이신이 고정화된 헤파린-티타늄 임플란트 제조**

[0073] 헤파린-도파민 복합체로 표면이 개질된 티타늄 임플란트에 BMP-2를 고정화시키는 단계를 제외한 것 이외에는 실시예 1과 동일한 방법으로 젠타마이신이 고정된 헤파린-티타늄 임플란트(젠타마이신-헤파린-티타늄 임플란트)를 제조하였다.

[0074] **비교예 4. BMP-2가 고정화된 헤파린-티타늄 임플란트 제조**

[0075] 헤파린-도파민 복합체로 표면이 개질된 티타늄 임플란트에 젠타마이신만을 고정화시킨 것을 제외한 것 이외에는 실시예 1과 동일한 방법으로 BMP-2가 고정된 헤파린-티타늄 임플란트(젠타마이신-헤파린-티타늄 임플란트)를 제

조하였다.

[0076] **실험예 1.**

[0077] 상기 제조된 실시예 1의 임플란트의 활성화된 티타늄 표면에 헤파린, 젠타마이신 및 BMP-2를 탑재한 기능화된 티타늄 임플란트와 비교예 1 내지 4의 티타늄 임플란트들의 표면을 주사전자현미경으로 관찰한 결과, 도 2에서 보여주듯이 모두 비슷한 표면 형상이 나타났다. 비교예 1의 티타늄 임플란트와 기능화된 티타늄 임플란트(실시예 1 및 비교예 2 내지 3)를 x-선 광전자 분광기를 이용해 표면 원소 분석을 한 결과, 도 3에 나타내었다. 도 3에서 보여주듯이, 개질되지 않은 티타늄 임플란트(비교예 1)와 비교하여 헤파린-티타늄 임플란트에서 3.63%의 질소 성분의 증가와 20.49%의 산소 성분의 감소를 확인함으로써 헤파린이 티타늄 임플란트 표면에 성공적으로 개질이 되었음을 확인하였다. 또한, 헤파린-티타늄 임플란트(비교예 2)와 비교하여, 젠타마이신이 고정된 헤파린-티타늄 임플란트(비교예 3), BMP-2가 고정된 헤파린-티타늄 임플란트(비교예 4), 젠타마이신/BMP-2가 고정된 헤파린 티타늄 임플란트(실시예 1)는 탄소 성분 감소와 질소 성분이 증가된 것으로 젠타마이신과 BMP-2가 성공적으로 탑재가 되었음을 확인하였다. 하기의 표 2는 티타늄과 기능화된 티타늄의 표면 원소 분석 결과를 보여주고 있다.

표 2

[0078] **티타늄과 기능화된 티타늄의 표면 원소 분석 결과**

	Substrate	C%	N%	O%	Ti%
비교예 1	Pristine Ti	52.02	1.12	36.11	10.75
비교예 2	Hep-Ti	76.44	4.75	15.62	3.19
비교예 3	GS/Hep-Ti	75.05	5.76	16.81	2.38
비교예 4	BMP-2/Hep-Ti	75.19	5.17	17.19	2.45
실시예 1	GS/BMP-2/Hep-Ti	75.94	7.23	14.23	2.60

[0079] GS: Gentamicin sulfate

[0080] Hep: heparin

[0081] **실험예 2. 기능화된 티타늄에서 젠타마이신 또는 BMP-2의 약물 방출 거동**

[0082] 기능화된 티타늄 임플란트인, 젠타마이신이 고정된 헤파린-티타늄 임플란트(비교예 3), BMP-2가 고정된 헤파린-티타늄 임플란트(비교예 4), 젠타마이신/BMP-2가 고정된 헤파린-티타늄 임플란트(실시예 1)로부터 젠타마이신 또는 BMP-2의 방출 거동을 분석하기 위해, 각 기능화된 티타늄 임플란트를 1 ml의 PBS 버퍼(pH 7.4)에 넣고 37도에서 100 rpm으로 교반을 하였다. 각 정해진 시간인 1, 3, 5, 10 시간과 1, 3, 5, 7, 14, 21, 28일 간격으로 측정하였다. 새로운 버퍼로 교환을 해 주었다. 방출된 젠타마이신은 적외선 및 가시광선 분광분석기(DU-530, Beckman Coulter™, 미국)를 이용하여 257 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였으며, 방출된 BMP-2는 ELISA 키트(Human BMP-2 Mini ELISA Development Kit(900-M255), Peprotech, 미국) 를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였으며, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0083] 도 4에서 보여주듯이, 젠타마이신이 고정된 헤파린-티타늄(비교예 3), BMP-2가 고정된 헤파린-티타늄(비교예 4), 젠타마이신/BMP-2가 고정된 헤파린-티타늄(실시예 1)으로부터 젠타마이신 또는 BMP-2는 초반 1일 동안에 약간 빠르게 방출되기는 하였으나, 그 이후로 4주 동안 지속적으로 방출이 되는 것으로 나타났다.

[0084] **실험예 3. 기능화된 티타늄의 항균효능**

[0085] 티타늄(비교예 1)과 기능화된 티타늄인 젠타마이신이 고정된 헤파린-티타늄(비교예 3), BMP-2가 고정된 헤파린-티타늄(비교예 4), 젠타마이신/BMP-2가 고정된 헤파린-티타늄(실시예 1)의 항균효과를 검증하기위해, 각각의 티타늄을 박테리아 배양액인 TSB (Tryptic Soy Broth)에 넣은 후, 1 × 10^6개의 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*) 박테리아 세포를 넣고 37도에서 지속적으로 교반하였다. 배양 후 6시간, 12시간, 24시간 후에 각각 배양액의 흡광도를 600 nm에서 측정하여 각 티타늄의 항균효능을 분석하였으며, 그 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5에서 보여주듯이, 티타늄(비교예 1)과 BMP-2가 고정된 헤파린-티타늄(비교예 4)은 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*)의 성장을 억제하지 못하였으나, 젠타마이신이 고정된 헤파린-티타늄(비교예 3)과 젠타마이신/BMP-2가 고정된 헤파린-티타늄(실시예1)은 박테리아의 성장을 매우 효과적으로 억제하였다.

[0086] **실험예 4. 티타늄과 기능화된 티타늄의 세포독성 평가**

[0087] 티타늄(비교예 1)과 기능화된 티타늄인 헤파린-티타늄(비교예 2), 젠타마이신이 고정된 헤파린-티타늄(비교예 3), BMP-2가 고정된 헤파린-티타늄(비교예 4), 젠타마이신/BMP-2가 고정된 헤파린-티타늄(실시예 1)의 조골세포에 대한 세포독성을 평가하기위해, 각각의 티타늄을 세포배양액에 넣고 37도에서 24시간 배양하여 추출배양액을 얻었다. 한편, 조골세포인 MG63세포 1 × 10^4개를 96-well 플레이트에 넣고 37도에서 24시간 배양하였다. 배양된 조골세포의 배양액을 제거하고 PBS 버퍼로 세척한 후, 추출배양액을 첨가한 후 조골세포를 24시간, 48시간 배양한 후, 추출배양액을 제거하였다. 세포독성은 CCK-8 증식 키트 시약을 첨가하여 37도에서 1시간을 더 배양한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다. 도 6에 나타난 바와 같이, 티타늄 및 기능화된 티타늄들은 모두 48시간 배양후에도 95%이상의 세포생존율을 보여주었으며, 이 결과는 티타늄 및 기능화된 티타늄 모두 조골세포에 대한 세포독성이 없음을 의미한다.

[0088] **실험예 5. 티타늄과 기능화된 티타늄의 Live/Dead 분석**

[0089] 티타늄과 기능화된 티타늄인 헤파린-티타늄, 젠타마이신이 고정된 헤파린-티타늄, BMP-2가 고정된 헤파린-티타늄, 젠타마이신/BMP-2가 고정된 헤파린-티타늄의 조골세포에 대한 Live/dead 분석 평가를 위해, 각 티타늄을 48 well-플레이트에 넣고 5 × 10^4개의 조골세포를 조심스럽게 각각 티타늄 표면에 넣은 후 48시간을 배양하였다. 48시간 배양 후, PBS 버퍼로 3-4회 세척한 후 live/dead 염색약(Calcein, Ethidium homodimer-1 시약, L3224(Live/DEAD Viability/ Cytotoxicity Kit for mammalian cells), Molecular ProbesTM, 미국)을 넣고 30분간 배양한 후, 공초점 레이져 주사 현미경으로 분석하였다. 티타늄 및 기능화된 티타늄의 모든 그룹에서 조골세포가 매우 건강하게 티타늄 표면에 부착되어서 잘 자라고 있음을 확인하였다 (도 7).

[0090] **실험예 6. 티타늄과 기능화된 티타늄의 세포증식**

[0091] 티타늄과 기능화된 티타늄인 헤파린-티타늄, 젠타마이신이 고정된 헤파린-티타늄, BMP-2가 고정된 헤파린-티타늄, 젠타마이신/BMP-2가 고정된 헤파린-티타늄의 조골세포에 대한 세포증식을 평가하기위해, 1 × 10^5개의 조골세포를 각각의 티타늄에 조심스럽게 넣고 1일, 3일, 7일을 배양한 후, 세포를 PBS 버퍼로 세척하였다. 세척 후, CCK-8 증식 키트 시약(Tetrazolium salt 시약, Cell Counting kit-8, Dojindo, 미국)을 넣고 1시간 배양한 후에, 배양액을 96 well 플레이트에 조심스럽게 옮긴 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 티타늄 및 기능화된 티타늄 표면 위에서 배양된 조골세포는 1일, 3일, 7일 후에 점차적으로 세포가 활발하게 증식이 되었으며 (도 8), 각 그룹간의 세포증식에 대한 차이는 없는 것으로 확인되었다.

[0092] **실험예 7. 티타늄과 기능화된 티타늄의 알칼리성 포스파타제 활성도**

[0093] 조골세포의 초기분화 마커인 알칼리성 포스파타제 활성도를 측정 분석함으로서 티타늄과 기능화된 티타늄들의 골융합 효능을 평가하였다. 1 × 10^5개의 조골세포를 각각의 티타늄 위에 조심스럽게 넣고 7일, 14일, 21일을 배양한다. 배양 후, 세포를 PBS 버퍼로 세척한 뒤, 1×RIPA 버퍼를 세포에 넣어 0℃에서 110와트로 1분동안 초음파를 가한다. 용해된 세포를 4도에서 3분 동안 13,500 rpm으로 원심분리하였다. 원심분리 후, 상층액을 p-니트로페닐포스파테이트 용액과 37도에서 30분 동안 배양한 후, 500 ㎕의 1 N NaOH로 반응을 종결시킨 후, 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며 그 결과를 도 9에 나타내었다. 도 9에서 보듯이, 티타늄, 헤파린-티타늄, 젠타마이신이 고정된 헤파린-티타늄은 조골세포에 대한 알칼리성 포스파타제 활성도가 비슷하였으며, 전혀 차이를 보이지 않았다. 또한, BMP-2가 고정된 헤파린-티타늄과 젠타마이신/BMP-2가 고정된 헤파린-티타늄도 서로 알칼리성 포스파타제 활성도가 비슷하였다. 그러나 BMP-2가 고정된 헤파린-티타늄(비교예 4)과 젠타마이신/BMP-2가 고정된 헤파린-티타늄(실시예 1)은 티타늄(비교예 1), 헤파린-티타늄(비교예 2) 및 젠타마이신이 고정된 헤파린-티타늄(비교예 3)과 비교하여 현저하게 높은 알칼리성 포스파타제 활성도를 나타내었다.

[0094] **실험예 8. 티타늄과 기능화된 티타늄의 칼슘 침착**

[0095] 조골세포의 후기 분화 마커인 칼슘침착을 측정 분석함으로서 실시예 1 및 비교예 1 내지 4 티타늄의 골융합 효능을 평가하였다. 1 × 10^5개의 조골세포를 각각의 티타늄 위에 조심스럽게 넣고 21일 동안 배양한다. 배양 후, 세포를 PBS 버퍼로 세척한 뒤 각각의 티타늄 표면으로부터 세포를 조심스럽게 긁어낸다. 긁어낸 세포를 1분간 13,500 rpm으로 원심분리 한 뒤, 0.1% 트리톤 X-100 용액을 세포에 넣었다. 세포의 막을 분쇄시키기 위해 0도에서 약 1분 동안 초음파를 가한 후, 원심분리를 한다. 상층액을 분리하여 QuantiChrom™ Calcium Assay 키트를 이용하여 612 nm에서 흡광도를 측정 비교하여 칼슘 침착 정도를 분석하였다. 도 10에서 보여주듯이, 티타늄(비

교예 1), 헤파린-티타늄(비교예 2), 젠타마이신이 고정된 헤파린-티타늄(비교예 3)의 칼슘침착 정도가 비슷하였으며 통계학적으로도 큰 차이를 보이지 않았다. 또한, BMP-2가 고정된 헤파린-티타늄(비교예 4)과 젠타마이신/BMP-2가 고정된 헤파린-티타늄(실시예 1)도 서로 칼슘침착 정도가 비슷하였다. 그러나, BMP-2가 고정된 헤파린-티타늄과 젠타마이신/BMP-2가 고정된 헤파린-티타늄은 티타늄, 헤파린-티타늄, 젠타마이신이 고정된 헤파린-티타늄들과 비교하여 현저하게 높은 칼슘 침착 정도를 나타내었다.

[0096] 따라서 상기 실험예에 나타난 바와 같이 임플란트의 티타늄 표면을 개질하여 항생제 및 골형성 촉진물질을 고정화시킨 기능성 임플란트인, 실시예 1의 젠타마이신/BMP-2가 고정된 헤파린-티타늄 임플란트가 비교예에 비하여 박테리아 감염을 방지할 뿐만 아니라 골융합 및 골형성 효능에도 우수한 효과를 가지는 것으로 나타났다.

[0097] **실시예 2. PCL/PLGA 스캐폴드 표면에 BMP-2의 고정화**

[0098] PCL/PLGA 스캐폴드의 표면을 개질하기 전에, 스캐폴드를 에탄올 용액에 넣어 1시간 정도 초음파 세척을 한 후, 약 24시간 동안 50도에서 건조시켰다. 그 후, PCL/PLGA 스캐폴드를 상기 제조예 1에서 제조한 헤파린-도파민 복합체가 5 mg/ml의 농도로 용해되어 있는 10 mM Tris 버퍼 (pH 8.0)에 넣고, 빛을 차단한 후 밤새도록 교반한 뒤에, 헤파린-도파민 복합체로 표면이 개질된 PCL/PLGA 스캐폴드(헤파린-도파민-PCL/PLGA 스캐폴드)를 증류수로 3-4회 세척한 후 질소가스를 흘려주면서 건조시켜 헤파린-도파민 복합체로 표면이 개질된 PCL/PLGA 스캐폴드를 제조하였다. 골형성 성장인자인 BMP-2를 탑재하기 위해, 50 ng/ml 농도의 BMP-2가 포함된 0.1 M MES 버퍼 (pH 5.6)에 헤파린-도파민 복합체로 표면이 개질된 PCL/PLGA 스캐폴드를 넣고, 밤새도록 교반한 후, 3-4회 증류수로 세척한 후, 건조하여, BMP-2가 고정된 헤파린-도파민-PCL/PLGA 스캐폴드를 얻었다.

[0099] **실험예 9. PCL/PLGA와 기능화된 PCL/PLGA 스캐폴드의 표면 관찰**

[0100] 상기 제조된 실시예 2의 스캐폴드의 활성화된 PCL/PLGA 스캐폴드 표면에 헤파린 및 헤파린-도파민 스캐폴드에 BMP-2를 탑재한 기능화된 PCL/PLGA 스캐폴드를 주사전자현미경으로 관찰한 결과, 도 11에서 보여주듯이 헤파린처리 BMP-2 탑재 PCL/PLGA 스캐폴드는 표면이 거칠고 헤파린-도파민 BMP-2 탑재 PCL/PLGA 스캐폴드는 표면이 매끄러운 형상이 나타났다. 이는 헤파린-도파민 복합체 스캐폴드가 BMP-2 탑재에 적합함을 나타낸다.

[0101] **실험예 10. PCL/PLGA와 기능화된 PCL/PLGA 스캐폴드의 세포독성 평가**

[0102] PCL/PLGA와 BMP-2 고정된 헤파린-PCL/PLGA, BMP-2 고정된 헤파린-도파민-PCL/PLGA 스캐폴드의 조골세포에 대한 세포독성을 평가하기 위해, 각각의 스캐폴드를 세포배양액에 넣고 37도에서 24시간 배양하여 추출배양액을 얻었다. 한편, 조골세포인 MG63세포 1×10^4 개를 96-well 플레이트에 넣고 37도에서 24시간 배양하였다. 배양된 조골세포의 배양액을 제거하고 PBS 버퍼로 세척한 후, 추출배양액을 첨가한 후 조골세포를 24시간, 48시간 배양한 후, 추출배양액을 제거하였다. 세포독성은 CCK-8 증식 키트 시약을 첨가하여 37도에서 1시간을 더 배양한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다. 도 12에 나타난 바와 같이, PCL/PLGA 및 기능화된 PCL/PLGA 스캐폴드들은 모두 48시간 배양 후에도 90%이상의 세포생존율을 보여주었으며, 이 결과는 PCL/PLGA 및 기능화된 PCL/PLGA 스캐폴드 모두 조골세포에 대한 세포독성이 없음을 의미한다.

[0103] **실험예 11. PCL/PLGA와 기능화된 PCL/PLGA 스캐폴드의 세포증식**

[0104] PCL/PLGA와 BMP-2 담지 PCL/PLGA인 헤파린-PCL/PLGA, BMP-2가 고정된 헤파린-도파민-PCL/PLGA 스캐폴드의 조골세포에 대한 세포증식을 평가하기 위해, 1×10^5 개의 조골세포를 각각의 스캐폴드에 조심스럽게 넣고 1일, 3일, 7일을 배양한 후, 세포를 PBS 버퍼로 세척하였다. 세척 후, CCK-8 증식 키트 시약(Tetrazolium salt 시약, Cell Counting kit-8, Dojindo, 미국)을 넣고 1시간 배양한 후에, 배양액을 96 well 플레이트에 조심스럽게 옮긴 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. PCL/PLGA 및 기능화된 PCL/PLGA 위에서 배양된 조골세포는 1일, 3일, 7일 후에 점차적으로 세포가 활발하게 증식이 되었으며 (도 13), 각 그룹간의 세포증식에 대한 차이는 7일에 BMP-2가 고정된 헤파린-도파민-PCL/PLGA 스캐폴드가 유효성 있게 증가하는 것을 확인하였다.

[0105] **실험예 12. PCL/PLGA과 기능화된 PCL/PLGA 스캐폴드의 알칼리성 포스파타제** 활성도

[0106] 조골세포의 초기분화 마커인 알칼리성 포스파타제 활성도를 측정 분석함으로서 PCL/PLGA와 기능화된 PCL/PLGA 스캐폴드들의 골융합 효능을 평가하였다. 1×10^5 개의 조골세포를 각각의 PCL/PLGA 위에 조심스럽게 넣고 3일, 10일, 14일을 배양한다. 배양 후, 세포를 PBS 버퍼로 세척한 뒤, 1×RIPA 버퍼를 세포에 넣어 0℃에서 110 와트로 1분 동안 초음파를 가하였다. 용해된 세포를 4도에서 3분 동안 13,500 rpm으로 원심분리하였다. 원심분

리 후, 상층액을 p-니트로페닐포스파테이트 용액과 37도에서 30분 동안 배양한 후, 500 ㎕의 1 N NaOH로 반응을 종결시킨 후, 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며 그 결과를 도 14에 나타내었다. 도 14에서 보듯이, PCL/PLGA, BMP-2 담지 헤파린-PCL/PLGA 스캐폴드는 조골세포에 대한 알칼리성 포스파타제 활성도가 비슷하였으며, 전혀 차이를 보이지 않았다. 그러나 BMP-2가 고정된 헤파린-도파민-PCL/PLGA 스캐폴드는 PCL/PLGA 스캐폴드와 비교하여 현저하게 높은 알칼리성 포스파타제 활성도를 나타내었다.

[0107] **실험예 13. PCL/PLGA과 기능화된 PCL/PLGA 스캐폴드의 칼슘 침착**

[0108] 조골세포의 후기 분화 마커인 칼슘침착을 측정 분석함으로서 PCL/PLGA 및 BMP-2가 고정된 헤파린-도파민-PCL/PLGA 스캐폴드의 골융합 효능을 평가하였다. 1 × 10^5 개의 조골세포를 각각의 스캐폴드 위에 조심스럽게 넣고 21일 동안 배양하였다. 배양 후, 세포를 PBS 버퍼로 세척한 뒤 Tris-EDTA 용액으로 각각의 스캐폴드로부터 세포를 조심스럽게 떼어내었다. 떼어낸 세포를 1분간 13,500 rpm으로 원심분리 한 뒤, 0.1% 트리톤 X-100 용액을 세포에 넣었다. 세포의 막을 분쇄시키기 위해 0도에서 약 1분 동안 초음파를 가한 후, 원심분리를 하였다. 상층액을 분리하여 QuantiChrom TM Calcium Assay 키트를 이용하여 612nm에서 흡광도를 측정 비교하여 칼슘 침착 정도를 분석하였다. 도 15에서 보여주듯이, PCL/PLGA, BMP-2 담지 헤파린-PCL/PLGA 스캐폴드의 칼슘침착 정도가 비슷하였으며 통계학적으로도 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나, BMP-2가 고정된 헤파린-도파민-PCL/PLGA 스캐폴드는 PCL/PLGA 스캐폴드와 비교하여 현저하게 높은 칼슘 침착 정도를 나타내었다.

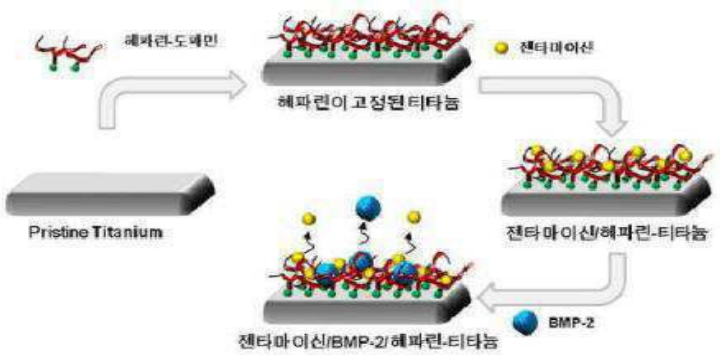
[0109] **실험예 14. 조직학 및 조직형태학적 분석**

[0110] 쥐 경골(tibia)에 8 mm 골결손(bone defect) 부분에 이식된 각각의 스캐폴드를 X-ray 촬영 후, 각 시료의 절반을 조직학 및 조직형태학적 분석을 위해 처리하였다. 각 조직은 10% buffered formaldehyde에 고정하였으며, 10% formic acid로 탈회하였다. 시상봉합에 직각으로 골결손부의 적도를 포함하여 양부위를 trimming 한 후 파라핀에 포매하였다. 블록을 6 μm 두께로 절단한 후 hematoxylin and eosin (H&E) 과 Masson's trichrome (MT) 염색을 하였다. 조직학적 소견상 기능화된 PCL/PLGA 스캐폴드 군의 경우, 이물반응과 염증이 적으며 8주로 갈수록 골형성이 빨리 진행되었고, 수술후 회복과 골재생이 잘되는 양상이 관찰되었다. PCL/PLGA 스캐폴드의 경우, 초기에 이물반응과 염증반응이 심하며, 8주로 갈수록 줄어드는 양상을 보였고, 아직 스캐폴드가 잔존함이 관찰되었다 (도 16). 조직형태학적 분석에서 8주차에는 기능화된 PCL/PLGA 스캐폴드이 PCL/PLGA 스캐폴드에 비해 유의하게 높았다(P<0.001). 골형성양이 8주차에서 BMP-2가 탑재된 헤파린-도파민 PCL-PLGA 스캐폴드 군이 다른 군보다 80% 이상의 높은 수치를 보였다 (도 17).

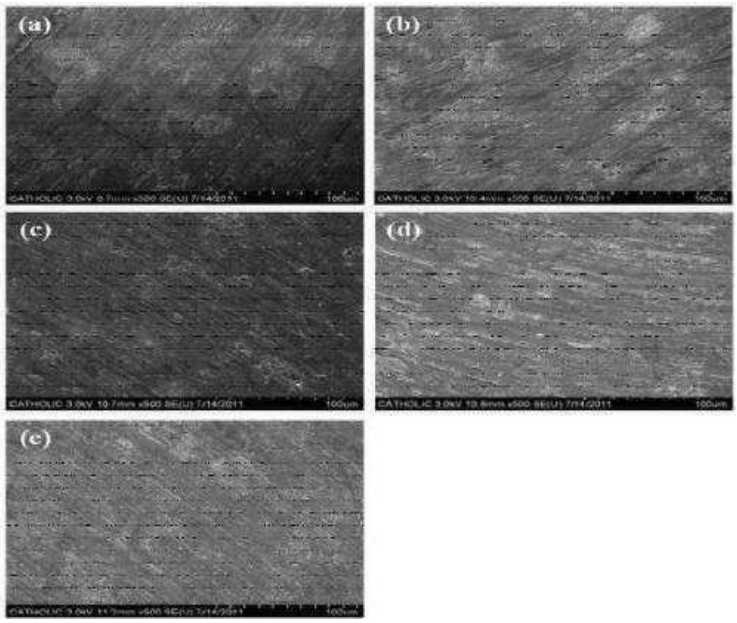
[0111] 따라서 상기 실험예에 나타난 바와 같이 PCL/PLGA 스캐폴드 표면을 개질하여 골형성 촉진물질을 고정화시킨 기능성 스캐폴드인, 실시예 2의 BMP-2가 고정된 헤파린-도파민 PCL/PLGA 스캐폴드가 골융합 및 골형성 효능에도 우수한 효과를 가지는 것으로 나타났다.

도면

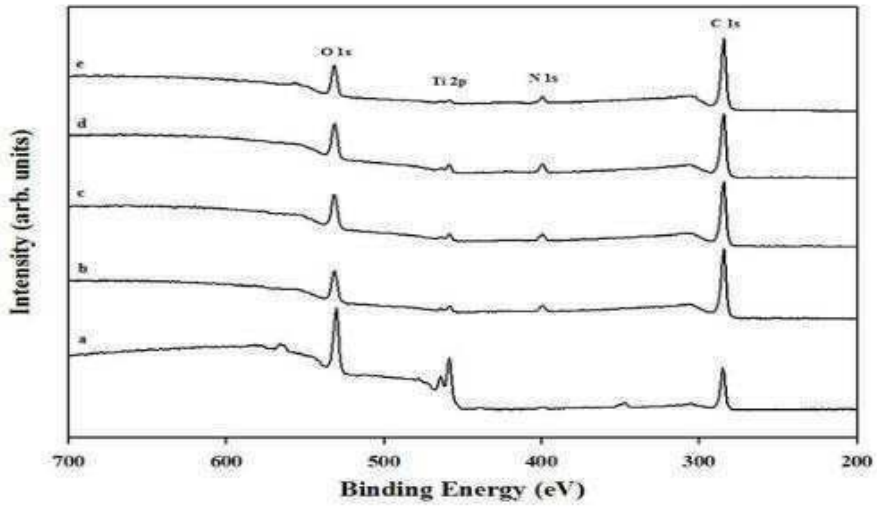
도면1



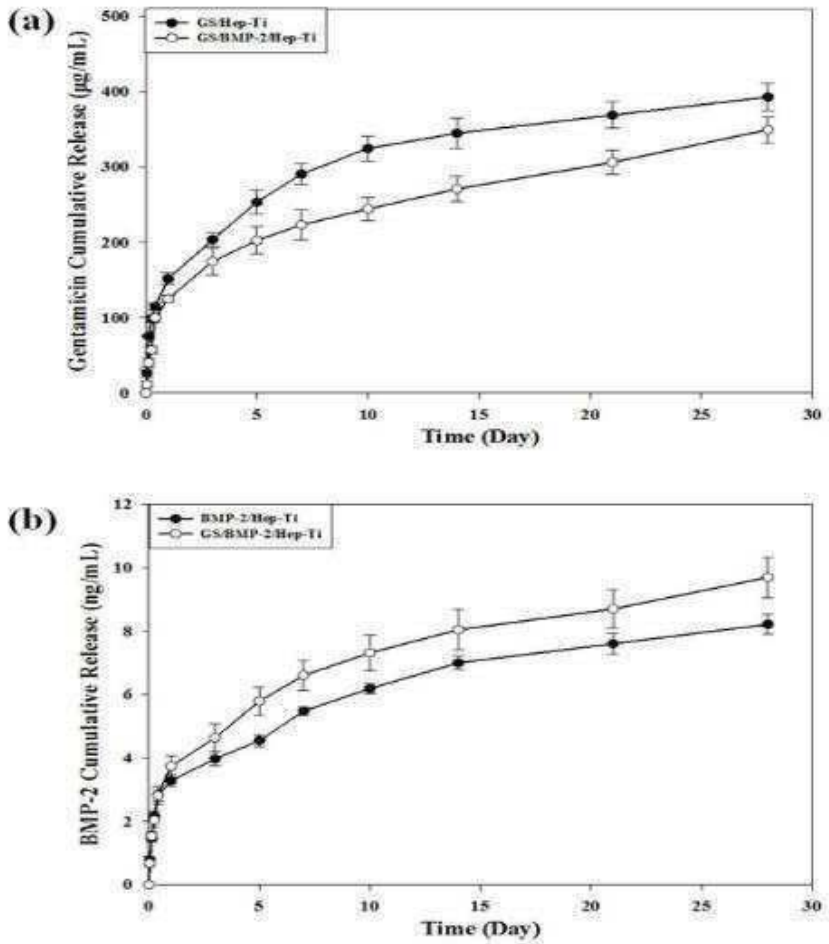
도면2


(a)
(b)
(c)
(d)
(e)

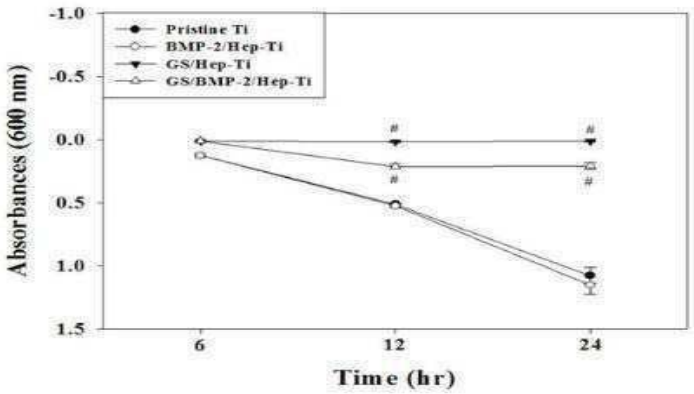
도면3


O 1s
Ti 2p
N 1s
C 1s
e
d
c
b
a
Intensity (arb. units)
700
600
500
400
300
200
Binding Energy (eV)

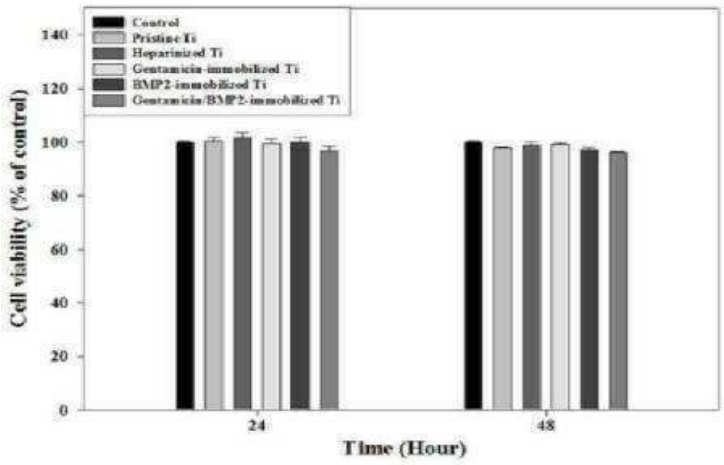
도면4


(a)
GS/Hep-Ti
GS/BMP-2/Hep-Ti
Gentamicin Cumulative Release (μg/mL)
Time (Day)
(b)
BMP-2/Hep-Ti
GS/BMP-2/Hep-Ti
BMP-2 Cumulative Release (ng/mL)
Time (Day)

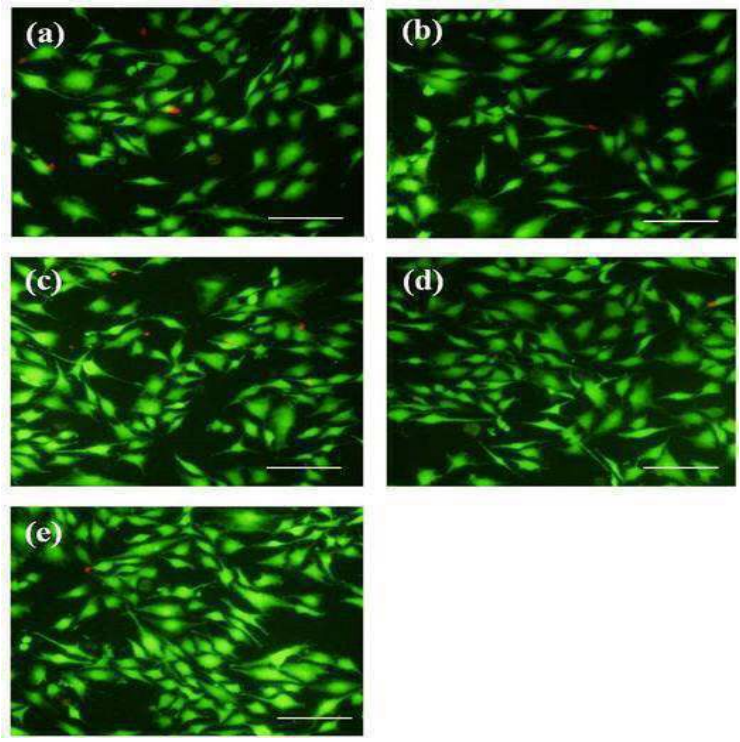
도면5


Pristine Ti
BMP-2/Hep-Ti
GS/Hep-Ti
GS/BMP-2/Hep-Ti
Absorbances (600 nm)
Time (hr)

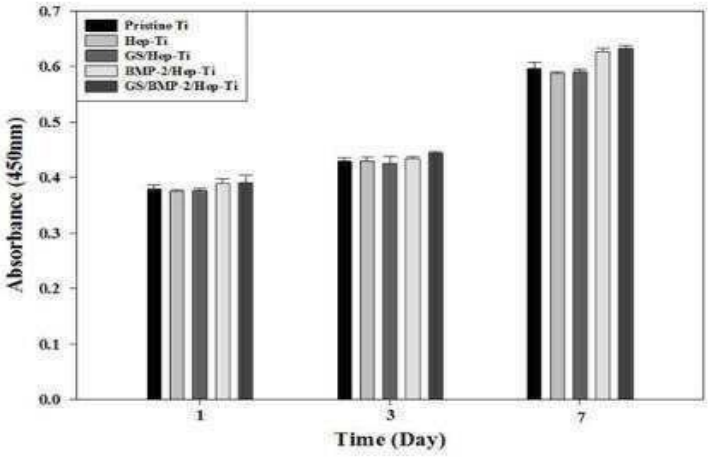
도면6


Control
Pristine Ti
Heparinized Ti
Gentamicin-immobilized Ti
BMP2-immobilized Ti
Gentamicin/BMP2-immobilized Ti
Cell viability (% of control)
140
120
100
80
60
40
20
0
24
48
Time (Hour)

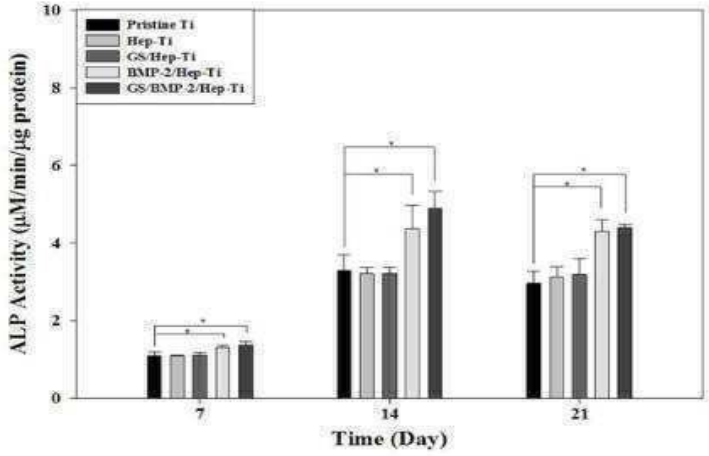
도면7


(a)
(b)
(c)
(d)
(e)

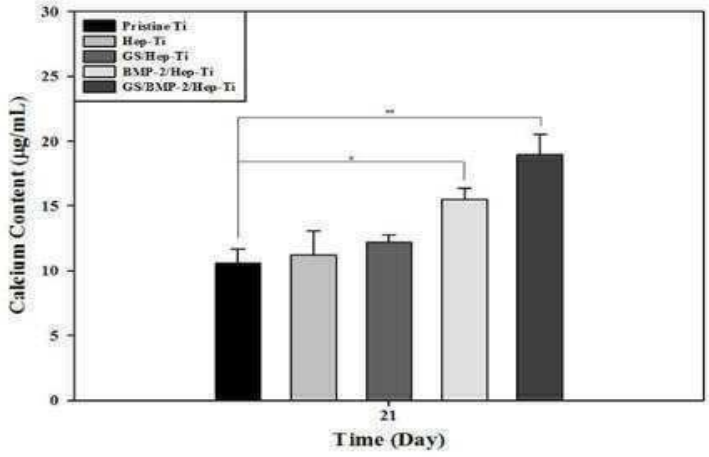
도면8


Pristine Ti
Hep-Ti
GS/Hep-Ti
BMP-2/Hep-Ti
GS/BMP-2/Hep-Ti
Absorbance (450nm)
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
1
3
7
Time (Day)

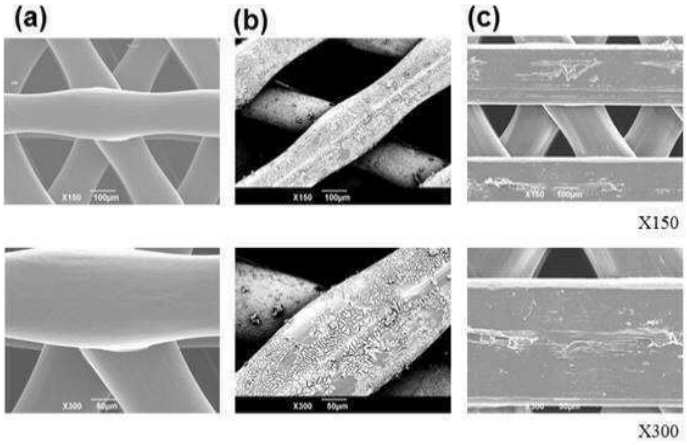
도면9


Pristine Ti
Hep-Ti
GS/Hep-Ti
BMP-2/Hep-Ti
GS/BMP-2/Hep-Ti
ALP Activity (μM/min/μg protein)
0
2
4
6
8
10
7
14
21
Time (Day)

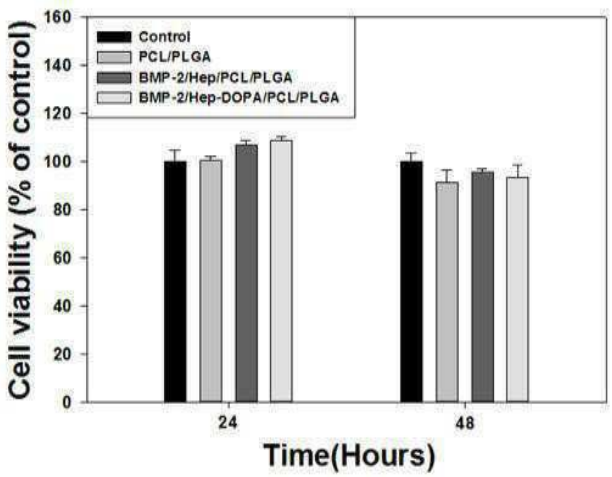
도면10


Pristine Ti
Hep-Ti
GS/Hep-Ti
BMP-2/Hep-Ti
GS/BMP-2/Hep-Ti
Calcium Content (μg/mL)
0
5
10
15
20
25
30
21
Time (Day)

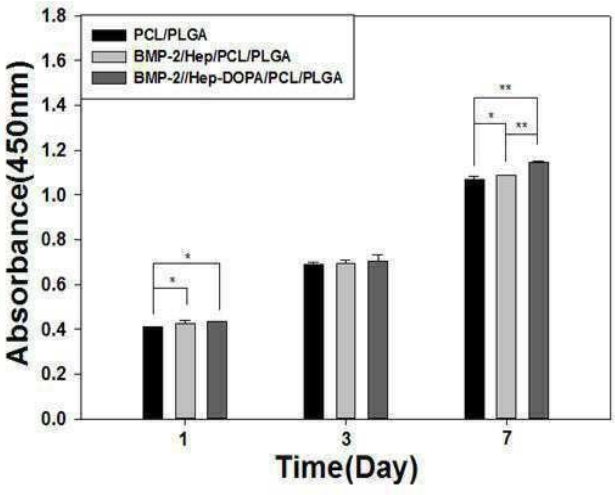
도면11



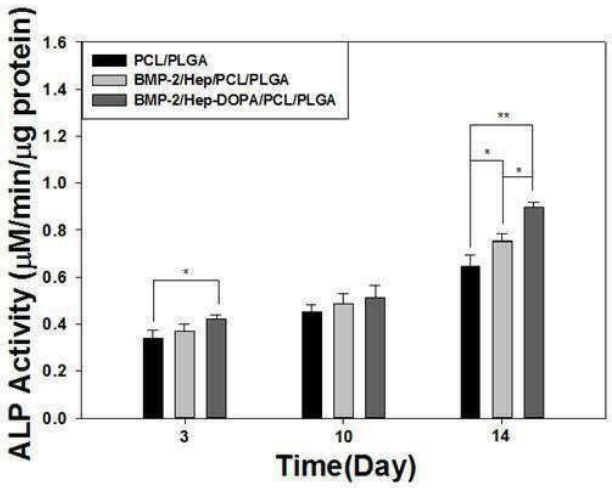
도면12



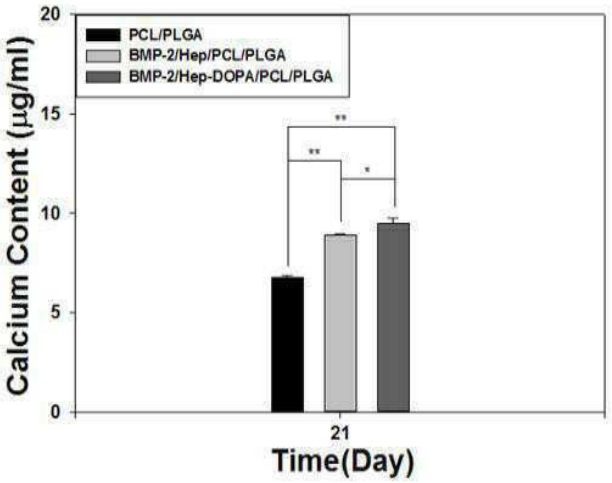
도면13



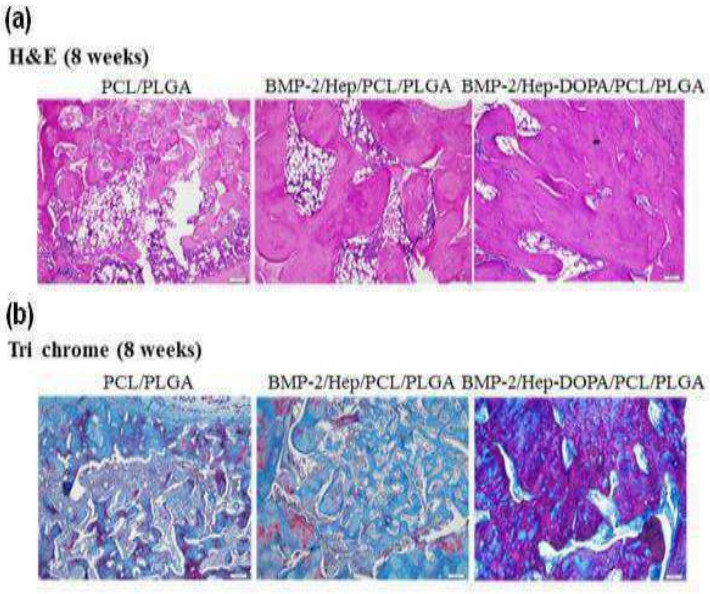
도면14


PCL/PLGA
BMP-2/Hep/PCL/PLGA
BMP-2/Hep-DOPA/PCL/PLGA
ALP Activity (μM/min/μg protein)
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
3
10
14
Time(Day)

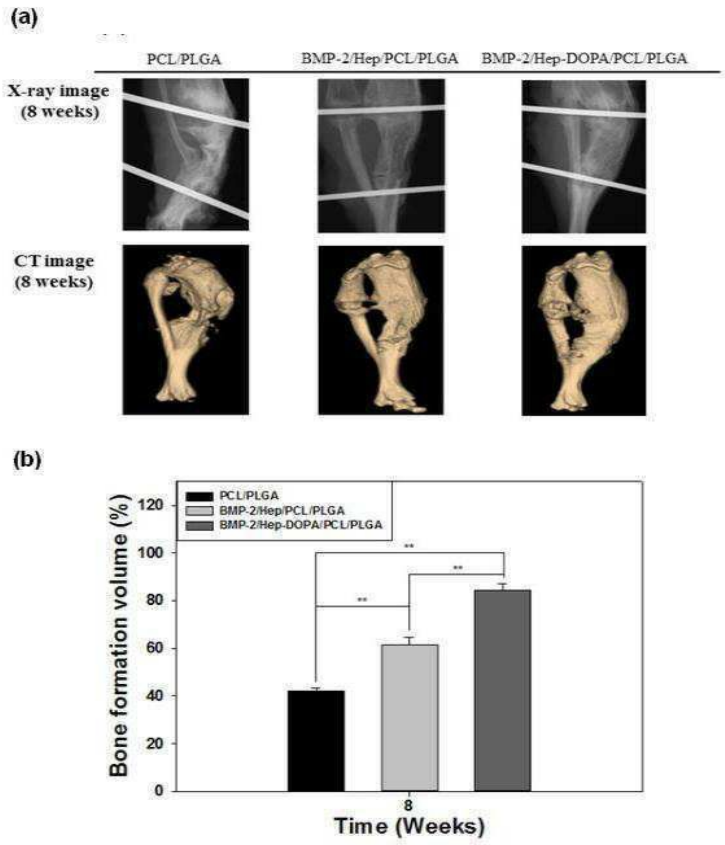
도면15


PCL/PLGA
BMP-2/Hep/PCL/PLGA
BMP-2/Hep-DOPA/PCL/PLGA
Calcium Content (μg/ml)
20
15
10
5
0
21
Time(Day)

도면16


(a)
H&E (8 weeks)
PCL/PLGA
BMP-2/Hep/PCL/PLGA
BMP-2/Hep-DOPA/PCL/PLGA
(b)
Tri chrome (8 weeks)
PCL/PLGA
BMP-2/Hep/PCL/PLGA
BMP-2/Hep-DOPA/PCL/PLGA

도면17


(a)
PCL/PLGA
BMP-2/Hep/PCL/PLGA
BMP-2/Hep-DOPA/PCL/PLGA
X-ray image (8 weeks)
CT image (8 weeks)
(b)
PCL/PLGA
BMP-2/Hep/PCL/PLGA
BMP-2/Hep-DOPA/PCL/PLGA
Bone formation volume (%)
120
100
80
60
40
20
0
**
**
**
8
Time (Weeks)