



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년09월23일

(11) 등록번호 10-1659697

(24) 등록일자 2016년09월19일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61C 8/00 (2006.01) *A61C 13/00* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61C 8/0012 (2013.01)
A61C 13/0006 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-0139295
- (22) 출원일자 2015년10월02일
 심사청구일자 2015년10월02일
- (56) 선행기술조사문헌
 US20020156151 A1
 WO2009026380 A1
 WO2007095393 A2
- 논문 "Trends in Polymer Science" , Macromol.
 Chem.Phys. 2013, 214, 302-312

- (73) 특허권자
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
- (72) 발명자
권일근
서울특별시 노원구 중계로 195, 108동 1501호 (중계동, 동진, 신안아파트)
- 이상진**
경기도 안양시 동안구 동안로 102, 205동 1202호 (호계동, 목련선경아파트)
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
안소영

전체 청구항 수 : 총 7 항

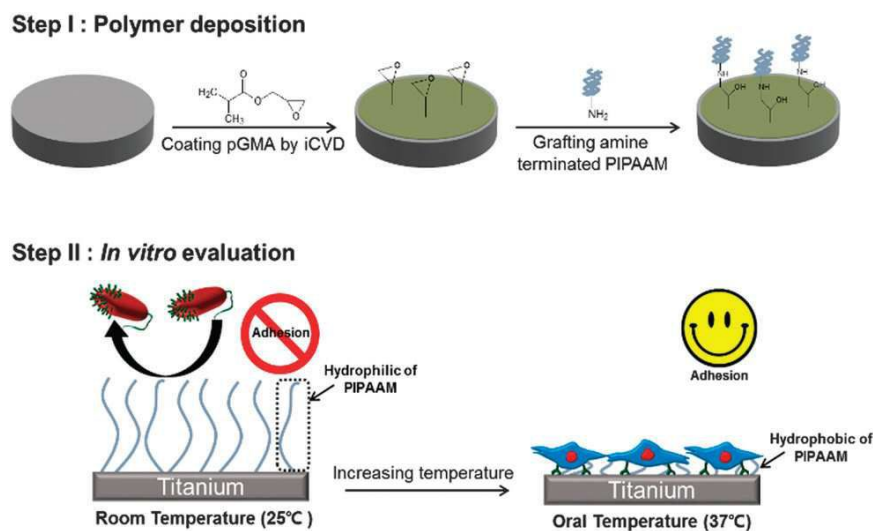
심사관 : 문선흡

(54) 발명의 명칭 **의료용 임플란트 및 그의 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 온도감응성 중합체인 NIPAAm 코팅층을 표면에 포함하여 미생물의 부착이 억제되는 의료용 임플란트에 관한 것으로, 상기 의료용 임플란트는 체내 온도에서 세포 부착능을 유지하면서도, 실온에서 세척하면 쉽게 임플란트에 부착된 미생물이 떨어진다. 또한 본 발명은 상기 의료용 임플란트의 제조방법을 제공하며, 본 발명에 따르면 용매 없이 저온에서 효율적으로 NIPAAm이 코팅된 의료용 임플란트를 제조할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

허동녕

서울특별시 강북구 서울로 174, 120동 1902호(미아동, SK아파트)

이동현

서울특별시 동대문구 경희대로1나길 35, 301호 (회기동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI14C2241

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 급속교정용 환자맞춤형 약물전달 생체재료의 개발

연구과제명 질환극복기술개발

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교

연구기간 2014.11.01 ~ 2018.10.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

표면에 폴리 글리시딜 메타크릴레이트(poly glycidyl methacrylate) 층 및 폴리(*N*-이소프로필아크릴아미드)(poly(*N*-isopropylacrylamide))층을 포함하는 항균성 의료용 임플란트.

청구항 2

제1항에 있어서, 임플란트 표면에 폴리 글리시딜 메타크릴레이트(poly glycidyl methacrylate)층을 포함하고, 상기 폴리 글리시딜 메타크릴레이트층 위에 폴리(*N*-이소프로필아크릴아미드)(poly(*N*-isopropylacrylamide))층을 포함하는 항균성 의료용 임플란트.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 폴리 글리시딜 메타크릴레이트(poly glycidyl methacrylate, pGMA)층의 두께가 55 nm 내지 65 nm인 항균성 의료용 임플란트.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 임플란트는 티타늄, 티타늄 합금, 코발트-크롬 합금, 스테인레스 스틸, 칼슘 포스페이트 세라믹, 생체유리, 유리 세라믹, 칼슘 카보네이트, 칼슘 설페이트, 유기 중합체 또는 이들의 복합물로 구성된 항균성 의료용 임플란트.

청구항 5

제1항에 있어서, 포르피노모나스 긴기발리스(*Porphyromonas gingivalis*) 또는 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)의 부착이 억제되는 항균성 의료용 임플란트.

청구항 6

i) 개시 화학 기상 증착(initiated Chemical Vapor Deposition, iCVD)법을 이용하며, 개시제로 t-부틸 퍼옥사이드(tert-butyl peroxide)를 사용하여 임플란트에 폴리 글리시딜 메타크릴레이트(poly glycidyl methacrylate)를 증착시키는 단계; 및 ii) 폴리 글리시딜 메타크릴레이트(poly glycidyl methacrylate)가 증착된 임플란트에 폴리(*N*-이소프로필아크릴아미드)(poly(*N*-isopropylacrylamide))를 코팅하는 단계를 포함하는 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 항균성 의료용 임플란트의 제조방법.

청구항 7

제6항에 있어서, ii) 단계의 폴리(*N*-이소프로필아크릴아미드)(poly(*N*-isopropylacrylamide))의 코팅은 딥-코팅(dip-coating)법으로 수행되는 항균성 의료용 임플란트의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항균성 코팅층을 포함하여 미생물의 부착이 억제되는 의료용 임플란트 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 치과 분야에서 티타늄은 생체적합성, 뛰어난 물리적 특성 및 우수한 부식 내성 덕분에 임플란트용 물질로 유용함이 증명되어 있다. 지난 십년 동안, 티타늄은 치조골의 피개의치 및 인공 치아의 지지체로 사용되어 부식된 치조골을 대체하는 임플란트로 사용되어 왔다.

[0003] 미생물, 박테리아 등의 병원균들은 치주염과 같은 심각한 감염에 이르게 하여, 티타늄 임플란트의 임상적 실패

율을 높인다. 따라서 치과에서는 티타늄 임플란트를 식립하기 전에 미생물 및 박테리아 모두를 박멸하기 위하여 자외선, 플라즈마 및 에틸렌옥사이드 가스 노출을 포함하는 다양한 방법으로 멸균과정을 거친다.

[0004] 그런데 멸균된 티타늄 임플란트는 주변 환경에 의해 쉽게 재-감염되는 문제가 있다. 예를 들어, 티타늄 임플란트는 우연히 입 주위의 피부, 기구, 장갑 또는 다른 표면에 닿을 수 있다. 또한, 멸균된 티타늄 임플란트가 공기 중에 노출되는 순간, 쉽게 균에 노출될 수 있다. 이러한 문제를 극복하기 위해, 구강 외과의들은 일반적으로 수술 바로 직전에 티타늄 임플란트를 멸균 식염수로 세척한다. 그럼에도 불구하고, 박테리아는 계속 티타늄 임플란트 표면에 부착되어 있을 수 있다. 그러므로 티타늄 임플란트 표면으로의 박테리아 부착을 방지하는 신규한 항-부착 처리 시스템이 필요하다.

[0005] 한편, 개시 화학 기상 증착(iCVD)은 표면에 나노미터 두께의 박막을 생성하는 기술이다. 지금까지 iCVD 기술은 일반적으로 세포의 분화를 향상시키거나, 바이오 의학 분야에서 살아있는 세포 시트의 제조와 관련되어 적용되어 왔다.

[0006] 폴리(*N*-이소프로필아크릴아미드)(poly(*N*-isopropylacrylamide), NIPAAM)는 온도감응성 성질이 큰 중합체이다. 이러한 독특한 성질에 의하여, NIPAAM은 바이오의학 공학, 특히 살아있는 세포 시트 및 생물학적 세포 박리의 적용에 대해 폭넓게 연구되고 있다. 종래 연구에서, Kohji Nishida 등은 NIPAAM이 코팅된 물질을 이용하여 제작된 세포 시트를 개시한 바 있다. 그러나, NIPAAM이 항균용 코팅 물질로 사용된 바는 없다.

[0007] 이러한 배경 하, 본 발명자들은 티타늄 임플란트 표면에 코팅된 온도감응성 중합체가 실온에서 임플란트로부터 박테리아를 분리시키고, 체내 온도에서는 세포에 잘 부착하는 것을 발견하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) S. G. Im, K. W. Bong, C. H. Lee, P. S. Doyle and K. K. Gleason, Lab Chip, 2009, 9, 411-416.

(비특허문헌 0002) K. Nishida, M. Yamato, Y. Hayashida, K. Watanabe, K. Yamamoto, E. Adachi, S. Nagai, A. Kikuchi, N. Maeda and H. Watanabe, N. Engl. J. Med., 2004, 351, 1187-1196.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 폴리(*N*-이소프로필아크릴아미드)(poly(*N*-isopropylacrylamide))가 코팅된 항균성 의료용 임플란트 및 그 제조방법을 제공하는 것이다.

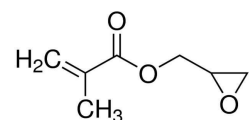
과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 수행하기 위하여, 본 발명은 표면에 폴리 글리시딜 메타크릴레이트(poly glycidyl methacrylate, 이하 pGMA) 층 및 폴리(*N*-이소프로필아크릴아미드)(poly(*N*-isopropylacrylamide), 이하 NIPAAM)층을 포함하는 항균성 의료용 임플란트를 제공한다.

[0011] 본 발명의 의료용 임플란트에 있어서, 표면에 pGMA층이 먼저 증착되어 있고, pGMA층 위에 NIPAAM 층이 코팅되는 것이 바람직하다.

[0012] 본 발명에서, 상기 pGMA는 하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물의 중합체이다.

[0013] [화학식 1]



[0014]

[0015] 본 발명에서 pGMA 층의 두께는 45 내지 75 nm 일 수 있으며, 바람직하게는 55 내지 65 nm일 수 있다.

- [0016] 본 발명의 NIPAAm은 특정 임계 온도를 기준으로 가역적으로 친수성-소수성 성질변화가 나타나는 온도감응성 중합체이다.
- [0017] 상기 온도감응성 중합체는 하한 임계 용액 온도(Lower Critical Solution Temperature, 이하 LCST) 이하에서는 친수성 구조가 되어 수화된 표면을 제공하기 때문에, 물 분자를 흡수하여 고분자 중합체 사슬이 팽창한다. 따라서 LCST 이하에서는 세포의 부착이 저해된다. 또한, LCST 이상에서는 소수성 구조가 되기 때문에 세포의 부착이 촉진된다. 본 발명의 온도감응성 중합체인 NIPAAm은 32 ℃에서 LCST를 갖는다.
- [0018] 본 발명의 의료용 임플란트는 생체에 식립가능한 통상의 물질로 이루어질 수 있으나, 바람직하게는 티타늄, 티타늄 합금, 코발트-크롬 합금, 스테인레스 스틸, 칼슘 포스페이트 세라믹, 생체유리, 유리 세라믹, 칼슘 카보네이트, 칼슘 셀레이트, 유기 중합체 또는 이들의 복합물질 중 어느 하나 일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 의료용 임플란트는 온도감응성 중합인 NIPAAm이 코팅되어있기 때문에 실온에서는 친수성이며, 체내 온도에서는 소수성이다. 따라서 실온에서는 미생물의 부착이 저해되나, 체내 온도에서는 세포의 부착이 저해되지 않는다.
- [0020] 상기 미생물은 병원성 박테리아를 모두 포함하나, 바람직하게는 구강 병원균일 수 있다. 상기 구강내 병원균에는 예를 들어, 포르피노모나스 긴기발리스(*Porphyromonas gingivalis*) 및 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*, 황색포도상구균) 등이 있다.
- [0021] 구체적인 일 실험예에서, NIPAAm이 코팅된 티타늄 디스크와 코팅되지 않은 디스크에 *P. gingivalis* 또는 *S. aureus*를 첨가하고 37 ℃에서 배양하였다. 그 후, 실온의 KCl 완충 용액과 37 ℃의 KCl 완충 용액으로 샘플을 각각 세척하였다. 그 결과, NIPAAm이 코팅된 티타늄 디스크에 부착된 박테리아의 양이 코팅되지 않은 티타늄 디스크 보다 적었다. 또한, NIPAAm이 코팅된 티타늄 디스크의 경우, 37 ℃의 용액으로 세척한 경우보다 25 ℃의 용액으로 세척한 경우에 남아있는 박테리아의 양이 더 적었다(도 5, 도 6 참조).
- [0022] 구체적인 또 다른 실험예에서, NIPAAm이 코팅된 티타늄과 코팅되지 않은 티타늄에 인간 지방유래 줄기세포(human adipose-derived stem cell, 이하 hADSC)를 접종시키고, 37 ℃에서 배양하였다. 상기 hADSC는 골 조직 재생에 있어서 다양한 용도로 사용되는 세포이다. 그 결과, 코팅되지 않은 티타늄과 비교하여 세포 부착에 있어서 실질적인 차이가 없음을 확인하였다(도 7 참조).
- [0023] 따라서 본 발명의 의료용 임플란트는 체내 온도에서는 임플란트에 대한 세포 부착능을 유지하면서, 실온에서의 세척으로 박테리아의 부착을 저해시킬 수 있다.
- [0024] 또한, 본 발명은 i) 개시 화학 기상 증착(initiated Chemical Vapor Deposition, 이하 iCVD)법을 이용하며, 개시제로 t-부틸 퍼옥사이드(*tert*-butyl peroxide, TBPO)를 사용하여 임플란트에 폴리 글리시딜 메타크릴레이트(poly glycidyl methacrylate, pGMA)를 증착시키는 단계; 및 ii) 폴리 글리시딜 메타크릴레이트(poly glycidyl methacrylate, pGMA)가 증착된 임플란트에 폴리(*N*-이소프로필아크릴아미드)(poly(*N*-isopropylacrylamide), NIPAAm)를 코팅하는 단계를 포함하는 항균성 의료용 임플란트의 제조방법을 제공한다.
- [0025] 상기 pGMA, NIPAAm 및 의료용 임플란트는 앞서 기술된 바와 같다.
- [0026] 본 발명의 제조방법은 도 1에 간단히 도식화 하였다.
- [0027] 본 발명에 있어서, i) 단계는 임플란트 표면에 pGMA를 증착시키는 단계이다. 상기 [화학식 1]의 글리시딜 메타크릴레이트(glycidyl methacrylate, GMA)는 비닐기(vinyl)를 가지고 있어, iCVD법에서의 자유라디칼 연쇄중합 반응이 가능하다. 또한 화학식 1의 화합물은 에폭시고리(epoxy)를 가지고 있으며, 에폭시 고리는 고리열림 반응에 의한 아민기와 반응성이 크기 때문에 아민기를 갖는 중합체의 그래프팅에 이용될 수 있다.
- [0028] iCVD법은 개시제와 단량체를 기화하여 기상에서 고분자 반응이 이루어지게 함으로써, 고분자 박막을 기판의 표면에 증착시키는 기술을 의미한다. iCVD법은 유기용매를 사용하지 않는 완전한 건조 공정으로, 순도가 높은 박막을 생성할 수 있다. 또한, iCVD법은 기판의 온도가 상온인 상태에서 진행 가능하며, 고압 환경을 요구하지 않아 저전력 만으로도 공정을 진행할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 iCVD법의 개시제로는 과산화물(peroxide)을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 t-부틸퍼옥사이드(*tert*-butylperoxide, TBPO)를 사용할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 iCVD법에서 필라멘트의 온도는 150 ℃ 내지 250 ℃일 수 있으며, 바람직하게는 180 ℃ 내지 220 ℃일

수 있다.

- [0031] 본 발명의 iCVD법에서 기관의 온도는 15 ℃ 내지 40 ℃일 수 있으며, 바람직하게는 20 ℃ 내지 30 ℃ 일 수 있다.
- [0032] 본 발명의 iCVD법에서 개시제의 유량은 0.5 sccm 내지 1.5 sccm일 수 있으며, 바람직하게는 0.8 sccm 내지 1.2 sccm일 수 있다. GMA 단량체의 유량은 1.5 sccm 내지 2.5 sccm일 수 있으며, 바람직하게는 1.8 sccm 내지 2.2 sccm일 수 있다.
- [0033] 구체적인 일 실시양태에서, iCVD 챔버의 필라멘트 온도와 기관 온도를 각각 200 ℃와 25 ℃로 하고, GMA 단량체와 개시제인 TBPO를 각각 2.0 sccm과 1.0 sccm의 유량으로 주입하여, 티타늄 기관으로의 pGMA의 증착반응을 진행하였다. 그 결과, pGMA가 티타늄 기관을 완벽히 뒤덮어 증착된 것을 확인하였다(도 2e, 도 3a-c, 도 4 참조).
- [0034] 본 발명에 있어서, ii) 단계는 pGMA와 NIPAAM이 결합하여 임플란트를 NIPAAM으로 코팅 하는 단계이다.
- [0035] 본 발명의 ii) 단계에서 pGMA와 NIPAAM은 pGMA의 에폭시기와 NIPAAM의 아민기 사이의 고리-열림 반응으로 결합한다. 상기 고리-열림 반응은 낮은 온도에서도 단시간에 진행이 일어난다는 장점을 가지고 있다.
- [0036] 상기 고리-열림 반응은 당업계에서 사용되는 통상의 방법으로 수행가능하며, 바람직하게는 딥-코팅(dip-coating)법을 사용한다. 상기 딥-코팅법은 코팅 대상을 코팅용액에 일정시간 담가 코팅하는 방법을 의미한다.
- [0037] 구체적인 일 실시양태에서, pGMA가 증착된 티타늄 기관을 NIPAAM 용액에 24시간 동안 담가두고 교반하였다. 그 결과 티타늄 기관에 NIPAAM이 완벽히 코팅된 것을 확인할 수 있었다(도 2f, 도 3d, 도 4 참조).
- [0038] 따라서 본 발명의 제조방법에 의하면, 용매 없이 저온에서 효율적으로 NIPAAM이 코팅된 의료용 임플란트를 제조할 수 있다.

발명의 효과

- [0039] 본 발명의 의료용 임플란트는 온도감응성 중합체인 NIPAAM으로 코팅되어 있어, 실온에서의 세척에 의해 미생물을 임플란트에서 쉽게 제거할 수 있다. 따라서 병원에서 발생하는 원내 감염을 예방할 수 있으며, 임플란트 주위염 등 의료용 임플란트의 식립을 저해하는 질환을 예방할 수 있다.
- [0040] 또한, 본 발명은 용매 없이 저온에서 효율적으로 NIPAAM이 코팅된 의료용 임플란트를 제조할 수 있는 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0041] 도 1은 pGMA 층과, NIPAAM 층을 포함하는 의료용 임플란트의 제조 과정 및 그 항균활성에 대하여 도식화한 그림이다.
- 도 2의 (a), (b) 및 (c)는 각각 티타늄, pGMA가 증착된 티타늄 및 NIPAAM이 코팅된 티타늄을 FE-SEM으로 관찰한 것을 나타낸 것이고, (d), (e) 및 (f)는 티타늄, pGMA가 증착된 티타늄 및 NIPAAM이 코팅된 티타늄을 AFM으로 관찰한 것을 나타낸 것이다.
- 도 3의 (a)는 pGMA가 증착된 티타늄의 횡단면을 XPS로 관찰한 것을 나타낸 것이고, (b)는 티타늄의 EDX 분석(위쪽)과 pGMA가 증착된 티타늄의 EDX 분석(아래쪽)을 나타내며, (c)는 티타늄, pGMA가 증착된 티타늄 및 NIPAAM이 코팅된 티타늄의 XPS 분석을 나타내고, (d)는 티타늄과 NIPAAM이 코팅된 티타늄의 수분 접촉각을 나타낸 것이다.
- 도 4는 티타늄, pGMA가 증착된 티타늄 및 NIPAAM이 코팅된 티타늄 표면의 원소 조성의 상대적 비율을 나타낸 것이다.
- 도 5는 티타늄, pGMA가 증착된 티타늄 및 NIPAAM이 코팅된 티타늄에 *P. gingivalis*와 *S. aureus*를 접종한 후, 구강 온도의 KCl 완충 용액으로 세척한 경우와, 실온의 KCl 완충 용액으로 세척한 경우의 표면을 FE-SEM으로 관찰한 것을 나타낸 것이다.
- 도 6은 티타늄, pGMA가 증착된 티타늄 및 NIPAAM이 코팅된 티타늄에 *P. gingivalis*와 *S. aureus*를 접종한 후, 구강 온도의 KCl 완충 용액으로 세척한 경우와(a), 실온의 KCl 완충 용액으로 세척한 경우(b)의 박테리아의 수

를 BacTiter-Glo™ 미생물 세포 생존 검정 키트로 측정된 것을 나타낸 그래프이다.

도 7은 티타늄, pGMA가 증착된 티타늄 및 NIPAAM이 코팅된 티타늄에 hADSC를 접종하여 배양한 것을 CLSM으로 관찰하여 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0042] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 본 발명의 범위가 하기 내용에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0043] <참고예 1> 실험 재료
- [0044] 티타늄 디스크(직경: 12 mm, 두께: 1 mm) (Biotem Co., Ltd., 한국), 글리시딜 메타크릴레이트(Glycidyl methacrylate, GMA) 단량체(97%), t-부틸 퍼옥사이드(tert-butyl peroxide, TBPO) 개시제(98%), 아민 말단화된 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)(poly(N-isopropylacrylamide), NIPAAM)(Mn = 2500)(Sigma Aldrich, 세인트 루이스, 미주리, 미국);
- [0045] 포르피노모나스 긴기발리스(*Porphyromonas gingivalis*) ATCC 33277 및 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*, 황색포도상구균) ATCC 25923 (American Type Culture Collection, 머내서스, 버지니아);
- [0046] MesenPRO RS™ 배지(MPRO 배지) 및 StemPro® 인간 지방유래줄기세포(Adipose derived stem cells) (인비트로젠, Invitrogen, 칼스배드, 캘리포니아, 미국);
- [0047] 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS), 스트렙토마이신 및 페니실린 (GIBCO®, 그랜드 아일랜드, 뉴욕).
- [0048] 다른 모든 시약 및 용매들은 분석용 등급을 추가적 정제 없이 사용하였다.
- [0049] <참고예 2> 분석 장비 및 조건
- [0050] 표면 관찰은 전계방사형 주사전자현미경(Field emission-scanning electron microscope, FE-SEM)(LEO supra 55, Genesis 20000, Carl Zeiss, 독일)을 사용하여 10 kV의 가속 전압에서 측정하였다.
- [0051] 원자력 현미경(Atomic Force Microscopy, AFM)(Park-system XE-100, 한국)을 사용하여 실온에서 $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ 의 스캔 영역 측정으로 표면을 관찰하였다.
- [0052] K-알파(Thermo Electron, 영국)를 사용해서 X-선 광전자 분광법(X-ray photoelectron spectroscopy, XPS)을 수행하여, 표면의 화학적 성질을 확인하였다.
- [0053] 집속 이온 빔 밀링(Focused ion beam milling, FIB)을 Helios NanoLab 600(FEI Company, 네덜란드)을 사용하여 수행하였으며, 에너지 분산형 X-선 분석장치(Energy dispersive X-ray analyzer, EDX)(EMAX-7000, Horiba Co., Ltd., 일본)를 함께 사용하였다.
- [0054] 접촉각 측정기(Phoenix 150, SEO, 한국)로 물 접촉각을 측정하였다.
- [0055] 티타늄 표면의 세포 부착을 공초점 레이저 주사 현미경(confocal laser scanning microscopy, CLSM, Eclipse E600W, Nikon, 일본)으로 관찰하였다.
- [0056] 모든 분석은 3회 반복 수행하였다.
- [0057] <실시예 1> NIPAAM이 코팅된 티타늄의 제조
- [0058] 1-1. pGMA가 증착된 티타늄의 제조
- [0059] iCVD 챔버(대기 하이텍, 한국)로 pGMA 중합체 필름을 티타늄 기판에 증착시켰다.
- [0060] 먼저, GMA 단량체를 증발시켜 35 ℃로 가열된 챔버에 공급하였다. 개시제(TBPO)를 가열 없이 챔버 내부에 공급하고, 챔버 안에서 GMA 단량체와 혼합하였다. 개시제와 GMA 단량체의 유량은 각각 1.0 sccm과 2.0 sccm으로 유지시켰다. 필라멘트 온도를 200 ℃로 하고, 기판의 온도를 25 ℃로 한 상태에서, 증착 과정을 진행하였다. 필라멘트의 온도는 열전대(thermocouple)를 필라멘트 중 하나에 직접 부착하여 지속적으로 조절하였다. 미리 결정한 두께인 대략 60 nm를 얻기 위해서, 증착 과정 동안 pGMA 필름의 인 시츄 성장 속도를 He-Ne 레이저(JDS

Uniphase, 밀피타스, 캘리포니아, 미국)를 사용하여 모니터하였다.

[0061] **1-2. NIPAAM이 코팅된 티타늄의 제조**

[0062] 티타늄 기판에 pGMA 박막을 증착시킨 후에, 딥-코팅(dip-coating) 법을 사용하여 아민 말단화된 NIPAAM을 티타늄 표면에 그래프팅하였다.

[0063] 먼저, 아민 말단화된 NIPAAM을 50 °C에서 1g/30ml의 농도로 증류수에 용해시켰다. 그 후, 티타늄 기판을 NIPAAM 용액에 24시간 동안 담가두고 교반하였다. 딥-코팅을 완료하고, NIPAAM이 코팅된 티타늄 기판을 증류수로 세척하고, *in vitro* 시험 전에 자외선으로 멸균시켰다.

[0064] **<실험예 1> 전계방사형 주사전자현미경(FE-SEM) 및 원자력 현미경(AFM) 분석**

[0065] 기본 티타늄과, 표면에 pGMA와 NIPAAM이 처리된 티타늄의 형태를 FE-SEM과 AFM으로 분석하였다. 기본 티타늄, pGMA 증착 티타늄, 및 NIPAAM이 코팅된 티타늄 각각에 대한 FE-SEM 이미지를 도 2a-c에 나타내었으며, AFM 이미지는 도 2d-f에 나타내었다.

[0066] FE-SEM 이미지는 티타늄 표면에 줄무늬를 제외하고는 큰 차이를 나타내지 않았다. 그러나 AFM 이미지는 표면 형태 및 코팅 거칠기의 차이를 명확히 보여주었다. 계곡평균계곡근(Rq)을 계산하여 도면 아래에 표시하였다. 기본 티타늄의 표면은 단단하고 뭉툭한 표면을 나타내었으나, pGMA가 증착된 티타늄 표면은 덜 균일하였다. 이러한 현상은 티타늄을 덮은 pGMA 때문이다. 그 결과, pGMA가 증착된 티타늄이 기본 티타늄보다 더 거친 표면을 나타내며, 이것은 도 3a의 FIB 실험의 결과와도 일치한다. 또한, NIPAAM이 그래프팅된 티타늄 표면은 pGMA가 증착된 티타늄 표면보다 더 매끄러우며, 이는 pGMA가 증착된 티타늄 표면 위에 NIPAAM이 결합하였기 때문이다.

[0067] AFM 연구를 통해서, 표면이 조작된 티타늄이 서로 상이한 형태를 가지고 있음을 확인하였으며, 이는 pGMA 및 NIPAAM이 티타늄 표면에 잘 증착되어 있음을 입증한다.

[0068] **<실험예 2> 집속 이온 빔 밀링(FIB) 및 에너지 분산형 X-선 분석장치(EDX) 분석**

[0069] 티타늄 표면에 코팅된 pGMA 층의 두께를 직접적으로 확인하기 위하여, FIB로 분석하였다. 도 3a의 횡단면의 SEM 이미지는 플래티늄 스트랩, pGMA, 및 티타늄 기판에 상응하는 세 개의 선형 층을 보여준다(플래티늄 스트랩을 표본에 부착한 것은 밀링(milling)을 도와주고, 정확한 관찰을 하기 위함이다). 도 3b에서, 티타늄 기판 부분 및 pGMA 부분의 횡단면층을 EDX 분석으로 계산하여, pGMA의 존재를 확인하였다. 도 3b의 위쪽 EDX 결과에서 나타나 있듯이, 티타늄 부분은 티타늄 성분으로만 구성되어 있다. 그러나, 아래쪽 EDX 결과는 pGMA 층이 부착된 티타늄 기판이 각각 96.69 wt% 및 3.31 wt%의 상대 함량의 티타늄과 탄소 성분으로 구성되어 있음을 보여주었다. 두 개의 상이한 성분인 티타늄과 탄소의 존재는 pGMA가 탄소를 가지고 있기 때문이다. FIB/SEM/EDX 실험의 결과는 티타늄 표면이 iCVD 기술에 의해 어떠한 독성 용매 없이도 pGMA로 완전히 덮혀짐을 입증한다. 또한, 60 nm 두께의 pGMA 층이 어떠한 틈도 없이 티타늄 표면을 코팅하였음을 확인할 수 있었다.

[0070] **<실험예 3> X-선 광전자 분광법(XPS) 분석**

[0071] 각 표본의 표면의 성분 조성을 XPS 실험으로 분석하였다. 도 3c 에 나타나 있듯이, 코팅되지 않은 티타늄은 산소(O1s), 티타늄(Ti2p) 및 탄소(C1s)을 포함하는 세 개의 주요 피크를 가지고 있었다. pGMA가 증착된 티타늄은 산소(O1s)와 탄소(C1s)의 두 개의 주 피크를 나타내었다. NIPAAM이 코팅된 티타늄은 산소(O1s), 아민(N1s) 및 탄소(C1s)의 세개의 피크를 가졌다. 원소 조성의 상대적 비율을 도 4에 나타내었다. 코팅되지 않은 티타늄의 스펙트럼은 Ti(Ti2p) 피크를 가지고 있으나, pGMA가 코팅된 티타늄의 스펙트럼은 Ti(Ti2p) 피크를 가지고 있지 않았다. 이것은 티타늄이 pGMA로 완벽히 코팅되었기 때문이다. 온도감응성 중합체의 그래프팅 반응 후에, NIPAAM 이 코팅된 티타늄의 스펙트럼은 아민(N1s) 피크를 보여주는데, 이는 아민 말단화된 NIPAAM이 NIPAAM 사슬의 끝가지에 붙은 아민을 유지하면서 그래프팅되기 때문이다.

[0072] XPS 연구는 티타늄 표면에 pGMA가 완벽히 코팅되며, NIPAAM이 pGMA가 증착된 티타늄 표면에 고리-열림 반응으로 그래프팅됨을 보여주었다.

[0073] **<실험예 4> 접촉각 측정**

[0074] NIPAAM이 코팅된 티타늄 표면의 온도감응성 특성을 입증하기 위해서, 온도를 조절한 접촉각 측정을 수행하였다.

[0075] 25 °C 및 37 °C 각각에서, 증류수 물방울(8 μ l)을 티타늄 표면에 떨어트렸다. 도 3d는 상이한 온도에서 NIPAAM이 그래프팅된 티타늄 표면의 물방울을 보여준다.

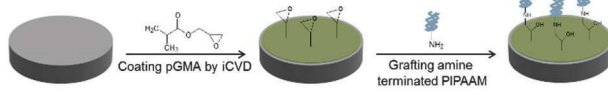
- [0076] 25 ℃에서는 물의 접촉각이 20^도로 측정되며, 37 ℃에서는 물의 접촉각이 55^도로 측정되었다. 즉, 코팅된 티타늄 표면이 실온에서는 친수성이며, 체온에서는 소수성임을 보여준다. 이는 코팅된 티타늄표면에 NIPAAm이 확실하게 그래프팅되었으며, 온도감응성 기능을 유지함을 입증한다.
- [0077] <실험예 5> 티타늄에 부착된 박테리아 수 측정
- [0078] 박테리아에 대한 표면의 항-부착 효과를 확인하기 위해서, *P. gingivalis* 및 *S. aureus*를 사용하여 *in vitro* 미생물 부착 시험을 수행하였다. *P. gingivalis*는 임플란트 주위염 뿐만 아니라 치주염의 원인이 되는 주치의 구강 병원균이며, *S. aureus*는 병원 감염과 관련된 가장 흔한 병원균 중 하나이기 때문에, 본 항-부착 실험에 선택되었다.
- [0079] 실험 전, *P. gingivalis*를 37 ℃, 85 % N₂, 10% H₂, 및 5% CO₂ 대기 하에서 5 µg/ml의 헤민 및 1 µg/ml의 비타민 K₁으로 보충된 1/2 뇌-심장 침출 액체 배지(brain heart infusion broth)(Difco Laboratories, 디트로이트, 미시간)에서 성장시켰다. *S. aureus*는 37 ℃의 유산소 상태에서 트립틱 소이(tryptic soy) 액체 배지에서 성장시켰다. 티타늄 디스크를 실리콘 실란트(실리콘 II; GE Sealants and Adhesives, 헌터스빌, 노스캐롤라이나)로 웰 바닥에 고정시킨 두 개의 동일한 24-웰 플레이트를 제조하였다.
- [0080] 박테리아 세포를 중간 로그 기(mid-log phase)(OD₆₀₀ = 0.5)까지 성장시키고, 원심분리로 수확하였다. 그 후, 1 mM KH₂PO₄, 1 mM CaCl₂ 및 0.1 mM MgCl₂이 보충된 pH 6의 50 mM KCl 완충 용액으로 세척한 후, 미리 가온된(37 ℃) KCl 완충액으로 재현탁 시켰다. 새 완충액의 부피는 원래 배양액의 부피와 동일하다. 박테리아 세포 현탁액의 표본(1 ml)을 24-웰 플레이트의 각 웰에 첨가한 후, 검정 플레이트를 37 ℃에서 1시간 동안 인큐베이트하였다. 하나의 검정 플레이트를 15분 동안 실온에 놓아둔 후에, 티타늄 디스크를 실온의 KCl 완충 용액으로 세척하여 비-부착 박테리아 세포를 제거하였다. 다른 검정 플레이트들은 티타늄 디스크를 미리 가온된 KCl 완충액으로 세척하는 동안 엄격하게 37 ℃로 유지시켰다. 티타늄 디스크에 부착된 박테리아 세포의 수를 BacTiter-Glo™ 미생물 세포 생존 검정 키트(Promega, 매디슨, 위스콘신)를 제조자의 프로토콜에 따라 이용하여 ATP-생물발광(ATP-bioluminescence) 정량화로 세었다. 티타늄 표면에 대한 박테리아의 부착을 FE-SEM을 사용하여 관찰하기 위하여, 티타늄에 부착된 박테리아 세포를 0.1 M 인산 완충액 중의 2.5 % 글루타르알데히드로 1시간 동안 고정시켰다. 이어서, 0.1 M 인산 완충액 중의 1 % OsO₄로 1시간 동안 4 ℃에서 추가 고정시켰다. 그 후, 단계적 에탄올 시리즈로 탈수시켰다. 임계점 건조로 샘플들을 최종적으로 건조시켰다.
- [0081] 도 5에 나타나 있듯이, 박테리아가 각각의 티타늄 표면에 부착되었다. 코팅되지 않은 티타늄과 비교한 상대적 정량분석을 도 6에 나타내었다. 코팅되지 않은 티타늄과 pGMA가 증착된 티타늄 모두에서, 실온 또는 37 ℃에서 세척한 것에 의한 박테리아 부착에 대한 유의한 차이는 발견되지 않았다. 그러나, NIPAAm이 코팅된 티타늄 그룹은 완충액로 세척한 후에 박테리아 양의 유의한 감소가 나타났다. 무엇보다도, NIPAAm이 코팅된 티타늄 표면을 실온에서 세척하였을 때, 체내 온도에서 세척하였을 때와 비교하여 더 큰 박테리아의 감소가 나타났다.
- [0082] <실험예 6> 티타늄 표면으로의 hADSC 세포의 부착 관찰
- [0083] 박테리아 부착 저해 능력뿐만 아니라 생물학적 기능도 유지하는지 확인하기 위해서, 체내 온도에서의 hADSC의 부착을 실험하였다. hADSC는 CLSM로 시각화하였다. hADSC는 골 조직 재생에 있어서 그 다양한 용도 때문에 선택되었다.
- [0084] hADSC를 MesenPRO RS™ 배지(MPRO 배지, Invitrogen)를 사용하여 배양하였고, 3회 계대배양한 ADSC(Invitrogen)을 사용하였다. 37 ℃, 5% CO₂의 습한 환경 하인 인큐베이터 내부에서 세포를 배양하였다. MesenPRO RS™ 성장 MPRO 배지를 MesenPRO RS™ 성장 보충제(2% FBS, 2 mM 글루타민)로 보충시켰다. hADSC를 티타늄 표면에 떨어뜨려 접종시켰다.
- [0085] 각각의 티타늄 표본을 48 웰 배양 플레이트에 넣은 후, 60 µl의 hADSC를 5 × 10³ 세포/mL 밀도로 티타늄 표면에 떨어뜨려 접종하였다. 2시간 후, 940 µl의 배양액을 각 웰에 첨가하였다. 인큐베이션 1일 후 세포를 37 ℃ PBS로 세척하고, 3.8 % 포름알데히드로 12시간 동안 고정하였다. 그 이후, 세포를 37 ℃에서 PBS로 다시 세척하였다. 샘플들을 0.5 wt%의 오레곤 그린 514 팔로이딘(Oregon green 514 phalloidin) 및 0.1 wt%의 DAPI로 염색하여 세포를 형광라벨 하였다.
- [0086] 도 7의 CLSM 이미지는 hADSC가 체내 온도에서 온도감응성 중합체가 코팅된 티타늄 표면에 잘 부착됨을

보여주며, 세포 부착에 있어서는 코팅되지 않은 티타늄과 실질적 차이가 없음을 보여주었다.

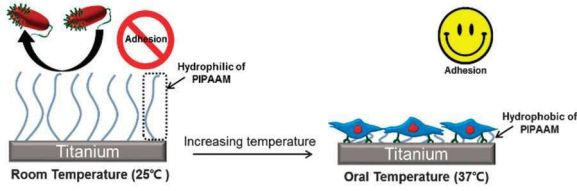
도면

도면1

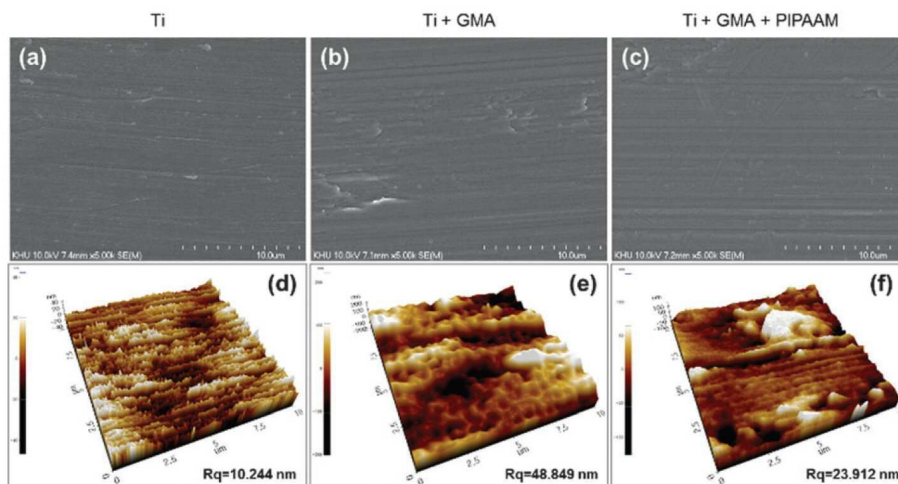
Step I : Polymer deposition



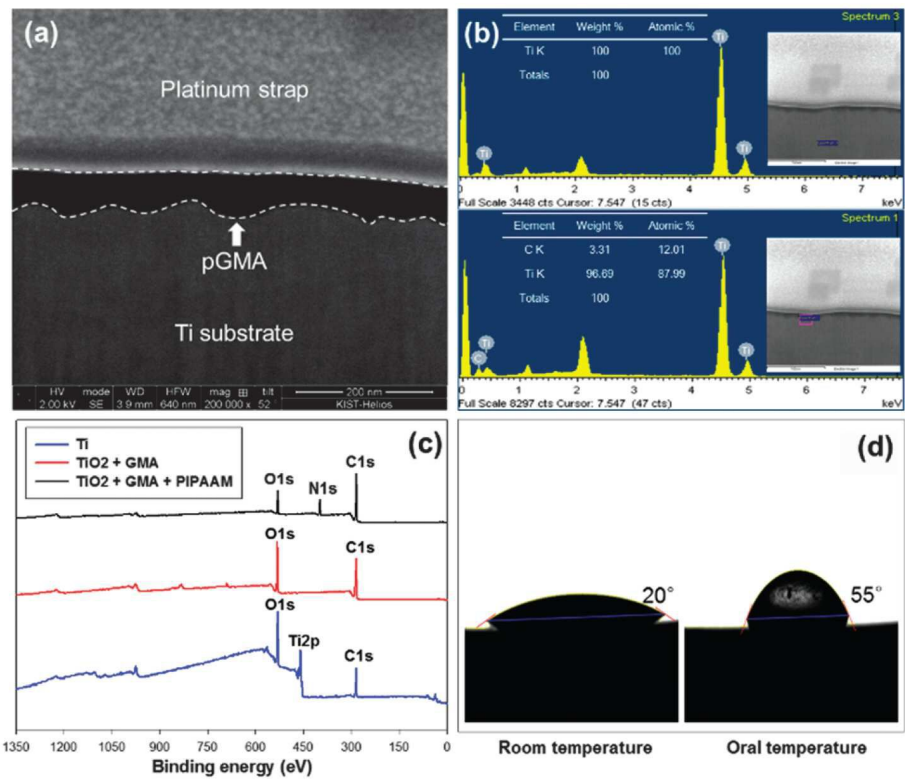
Step II : *In vitro* evaluation



도면2



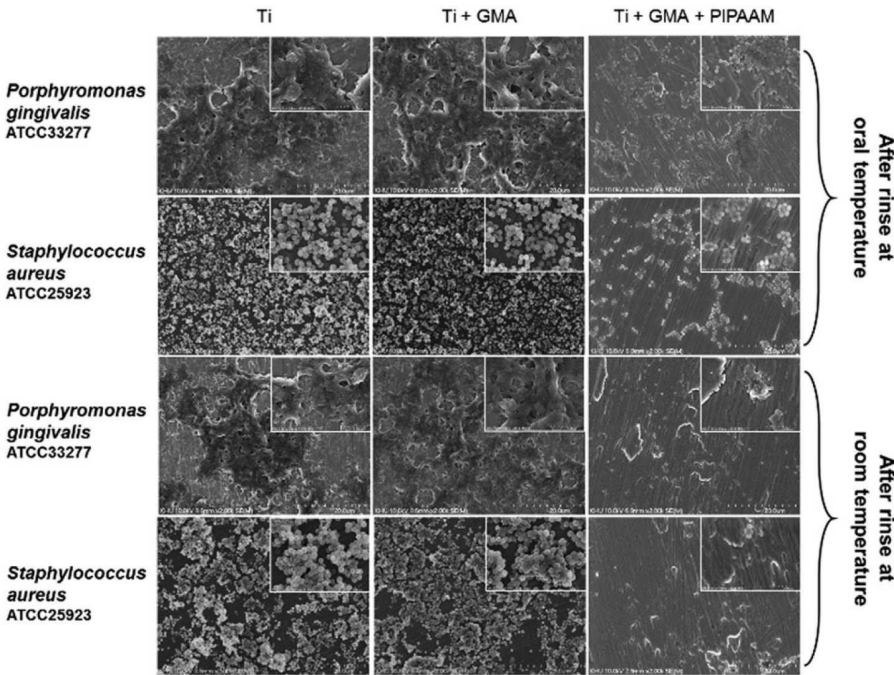
도면3



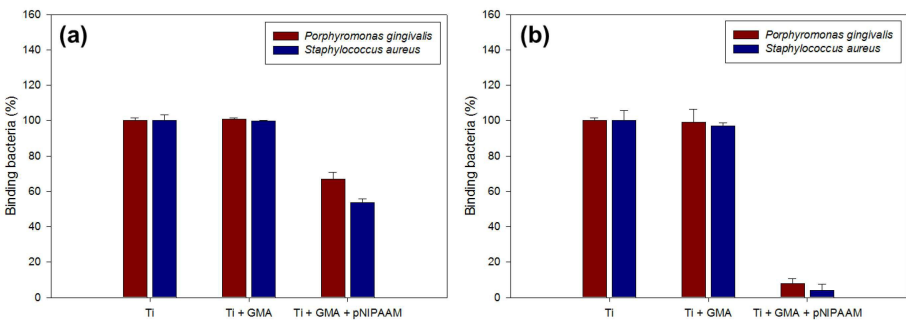
도면4

	C1s (%)	O1s (%)	N1s (%)	Ti2p (%)
Ti	44.57	42.14	0	13.29
Ti + GMA	71.26	28.74	0	0
Ti + GMA + PIPAAm	76.84	11.9	11.26	0

도면5



도면6



도면7

