

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0055740 (43) 공개일자 2016년05월18일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61L 27/04 (2006.01) A61C 8/00 (2006.01) A61F 2/28 (2006.01) A61L 27/10 (2006.01) A61L 27/36 (2006.01) A61L 27/54 (2006.01)	(71) 출원인 경희대학교 산학협력단 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)	
(52) CPC특허분류 A61L 27/04 (2013.01) A61C 8/0013 (2013.01)	(72) 발명자 이덕원 서울특별시 강동구 동남로 892 강동경희대학교병원 4층 치과병원 구강악안면외과	
(21) 출원번호 10-2016-0052631(분할)	김은철 서울특별시 강남구 영동대로128길 15, 1-802호 (홍실아파트)	
(22) 출원일자 2016년04월29일 심사청구일자 없음	(74) 대리인 고영갑, 이성원, 권정기, 임상엽	
(62) 원출원 특허 10-2014-0101185 원출원일자 2014년08월06일 심사청구일자 2014년08월06일		

전체 청구항 수 : 총 20 항

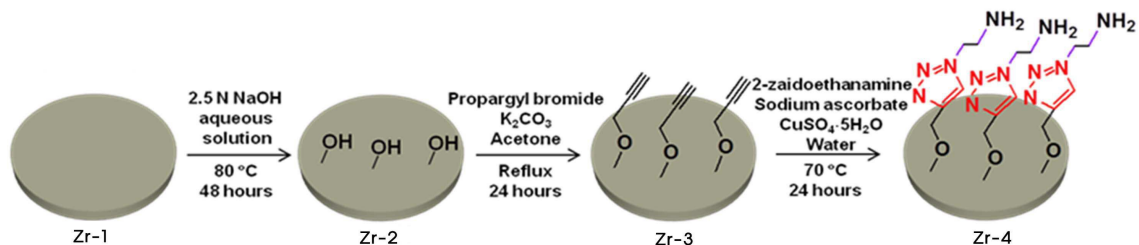
(54) 발명의 명칭 표면 개질된 지르코늄계 임플란트, 골 형성 유도 또는 촉진용 지르코늄계 임플란트 및 이들의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 표면에 수산기가 도입된 임플란트 기재 및 링커를 포함하는 표면 개질된 지르코늄계 임플란트를 제공한다. 또한, 본 발명은 표면 개질된 임플란트의 링커에 고정된 GDF(Growth and differentiation factor)를 포함하는 골 형성 유도 또는 촉진용 지르코늄계 임플란트를 제공한다. 본 발명에 따른 표면 개질된 지르코늄계 임플

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



란트는 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 또는 GDF(Growth and differentiation factor)를 임플란트에 안정적이면서도 보다 용이하게 고정화시킬 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 골 형성 유도 또는 촉진용 지르코늄계 임플란트는 GDF(Growth and differentiation factor)를 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.

(52) CPC특허분류

A61F 2/28 (2013.01)
A61L 27/10 (2013.01)
A61L 27/365 (2013.01)
A61L 27/3687 (2013.01)
A61L 27/54 (2013.01)
A61L 2300/236 (2013.01)
A61L 2300/414 (2013.01)
A61L 2400/18 (2013.01)
A61L 2430/02 (2013.01)

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 지르코늄(Zr), 지르코늄 합금 또는 산화지르코늄으로 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 지르코늄계 임플란트.

청구항 2

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

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 알킨 화합물은 하나의 말단이 할로젠 원소, 수산기 또는 아민기로 이루어지고, 다른 말단이 삼중 결합을 갖는 것을 특징으로 하는 표면 개질된 지르코늄계 임플란트.

청구항 4

제 3항에 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 지르코늄계 임플란트.

청구항 5

제 2항에 있어서, 상기 아자이드 화합물은 하나의 말단이 아자이드기(azide group)로 이루어지고, 다른 말단이 아민기 또는 카르복실기로 이루어진 것을 특징으로 하는 표면 개질된 지르코늄계 임플란트.

청구항 6

제 5항에 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 지르코늄계 임플란트.

청구항 7

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 링커에 결합된 헤파린(Heparin)을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 표면 개질된 지르코늄계 임플란트.

청구항 8

(S1) 전체 또는 표면이 지르코늄(Zr), 지르코늄 합금 또는 산화지르코늄으로 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 말단은 상기 임플란트 기재의 표면에 도입된 수산기와 결합한 상태로 존재하고, 수산기와 결합하지 않은 다른 말단은 아민기 또는 카르복실기로 이루어진 것을 특징으로 하는 표면 개질된 지르코늄계 임플란트의 제조방법.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 알킨 화합물은 하나의 말단이 할로젠 원소, 수산기 또는 아민기로 이루어지고, 다른 말단이 삼중 결합을 갖는 것을 특징으로 하는 표면 개질된 지르코늄계 임플란트의 제조방법.

청구항 10

제 9항에 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 지르코늄계 임플란트의 제조방법.

청구항 11

제 8항에 있어서, 상기 아자이드 화합물은 하나의 말단이 아자이드기(azide group)로 이루어지고, 다른 말단이 아민기 또는 카르복실기로 이루어진 것을 특징으로 하는 표면 개질된 지르코늄계 임플란트의 제조방법.

청구항 12

제 11항에 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 지르코늄계 임플란트의 제조방법.

청구항 13

제 8항 내지 제 12항 중 어느 한 항에 있어서,

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

청구항 14

제 13항에 있어서, 상기 헤파린은 링커와의 아마이드 결합에 의해 고정화되는 것을 특징으로 하는 표면 개질된 지르코늄계 임플란트의 제조방법.

청구항 15

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항의 표면 개질된 지르코늄계 임플란트 및 상기 임플란트에 형성되어 있는 링커에 고정된 GDF(Growth and differentiation factor)를 포함하는 골 형성 유도 또는 촉진용 지르코늄계 임플란트.

청구항 16

제 8항 내지 제 12항 중 어느 한 항의 표면 개질된 지르코늄계 임플란트의 제조방법에 추가적으로,

(S4') 상기 임플란트에 형성되어 있는 링커에 GDF(Growth and differentiation factor)를 고정화시키는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 골 형성 유도 또는 촉진용 지르코늄계 임플란트의 제조방법.

청구항 17

제 16항에 있어서, 상기 GDF(Growth and differentiation factor)는 링커와의 아마이드 결합에 의해 고정화되는 것을 특징으로 하는 골 형성 유도 또는 촉진용 지르코늄계 임플란트의 제조방법.

청구항 18

제 7항의 표면 개질된 지르코늄계 임플란트 및 상기 임플란트에 형성되어 있는 헤파린에 고정된 GDF(Growth and differentiation factor)를 포함하는 골 형성 유도 또는 촉진용 지르코늄계 임플란트.

청구항 19

제 18항에 있어서, 상기 골 형성 유도 또는 촉진용 지르코늄계 임플란트는 치과용 임플란트, 정형외과용 임플란트 또는 생체이식용 임플란트인 것을 특징으로 하는 골 형성 유도 또는 촉진용 지르코늄계 임플란트.

청구항 20

제 13항의 표면 개질된 지르코늄계 임플란트의 제조방법에 추가적으로,

(S5) 상기 임플란트에 형성되어 있는 헤파린에 GDF(Growth and differentiation factor)를 고정화시키는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 골 형성 유도 또는 촉진용 지르코늄계 임플란트의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명의 일 예는 표면 개질된 지르코늄계 임플란트 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 더 상세하게는 링커에 의해 성장분화 인자(Growth and differentiation factor, GDF)의 결합을 보다 용이하게 할 수 있는 표면 개질된 지르코늄계 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 지르코늄계 임플란트 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 더 상세하게는 성장분화 인자(Growth and differentiation factor, GDF)의 조기 방출을 방지하고 조골세포의 분화를 촉진할 수 있는 골 형성 유도 또는 촉진용 지르코늄계 임플란트 및 표면 개질된 지르코늄계 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), 성장분화 인자(Growth and differentiation factor, GDF)와 같은 성장인자의 적용이 큰 관심을 받고 있다.

[0004] 한편, 임상학적 임플란트 재료 중에서도 지르코니아와 같은 세라믹 재료는 굽힘 강도, 경도, 와이블 계수(Weibull modulus) 등과 같은 기계적 특성에서 선호할만한 물성을 가지기 때문에 각광받아 왔다. 또한, 지르코니아는 치태 부착이 낮은 생체 적합성 재료로 알려져 있다. 종래 지르코니아는 임상 수준에서 치과용 임플란트 재료로 적용되어 왔지만, 골 유착의 유도를 위한 재료로서의 연구는 보고된 바가 거의 없다. 지르코니아의 골 유착 특성을 향상시키기 위해 지르코니아의 표면은 개질될 필요가 있으나, 지르코니아는 미세구조적 측면에서 실리카나 실질적인 유리 상(glassy phase)을 포함하고 있지 않기 때문에 생물학적 물질을 적용하기 위해 미세가공 내지 화학적 결합을 통해 표면을 개질하는 데에는 한계가 있다.

[0005] 지르코니아를 임플란트 재료로 이용하는 기술과 관련하여, 대한민국 등록특허공보 제10-1161140호에는 100 중량부의 지르코니아, 3 내지 11 중량부의 인산칼슘 및 0.05 내지 0.25 중량부의 마그네슘 화합물을 포함하고, 투광도가 2.6×10^{-3} 내지 3.9×10^{-3} lux인 지르코니아 소결체가 개시되어 있다. 또한, 대한민국 등록특허공보 제10-1304989호에는 지르코니아 입자를 전해액 내에 분산시킨 뒤, 플라즈마 전해 처리를 하되, 상기 전해액에 피로인산칼륨($K_4P_2O_7$)과 수산화칼륨(KOH)이 포함되는 것을 특징으로 하는 티타늄 임플란트 제조 방법이 개시되어 있다. 또한, 대한민국 등록특허공보 제10-0690350호에는 직경이 10 내지 50 nm인 지르코니아 1차 입자 및 직경이 10 내지 100 nm 인 알루미늄 1차 입자가 나노 스케일에서 소결되어 2차 입자 상태에서 복합체를 이루는 지르코니아-알루미늄 나노-복합체 분말; 및 아파타이트계 화합물을 포함하는 임플란트용 생체활성 세라믹 소결 복합체가 개시되어 있다.

[0006] 그러나, 이들 선행문헌들에 보고된 기술들은 임플란트 자체의 생체 적합성을 향상시키기 위한 것이 대부분이고,

지르코니아를 포함하는 지르코늄계 임플란트에 표면에 골 형성 단백질(bone morphogenetic protein, BMP), 성장분화 인자(Growth and differentiation factor, GDF)와 같은 생체 물질을 고정화하고, 고정화된 생체 물질을 안정적으로 방출하여 골 형성을 유도하거나 촉진하는 기술과는 거리가 멀다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 이러한 종래의 배경하에서 도출된 것으로서, 본 발명의 일 목적은 성장분화 인자(Growth and differentiation factor, GDF)가 용이하게 고정될 수 있도록 간단한 방법을 통해 표면이 개질된 지르코늄계 임플란트 및 이의 제조방법을 제공하는데에 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 표면에 고정된 성장분화 인자(Growth and differentiation factor, GDF)를 서서히 방출시켜 조골세포의 분화 및 골 형성을 지속적으로 유도 또는 촉진할 수 있는 골 형성 유도 또는 촉진용 지르코늄계 임플란트 및 이의 제조방법을 제공하는데에 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 발명자들은 지르코늄계 임플란트 기재의 표면에 간단하고 안전한 클릭반응을 이용하여 링커를 형성하는 경우 헤파린 또는 성장분화 인자(Growth and differentiation factor, GDF) 등과 같은 생체 유래 물질을 효율적으로 고정화시킬 수 있다는 점 및 상기 링커 또는 헤파린에 고정화된 성장분화 인자(Growth and differentiation factor, GDF)는 생체 내 조건에서 서서히 방출되고 조골세포의 분화 유도를 향상시키고 조골세포의 증식을 촉진시켜 궁극적으로 골 형성을 유도하거나 촉진한다는 점을 발견하고 본 발명을 완성하였다.

[0010] 본 발명의 일 목적을 해결하기 위하여, 본 발명은 표면에 수산기가 도입된 임플란트 기재 및 링커를 포함하고, 상기 임플란트 기재는 전체 또는 적어도 표면이 지르코늄(Zr), 지르코늄 합금 또는 산화지르코늄으로 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 지르코늄계 임플란트를 제공한다. 또한, 본 발명은 (S1) 전체 또는 적어도 표면이 지르코늄(Zr), 지르코늄 합금 또는 산화지르코늄으로 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 말단은 상기 임플란트 기재의 표면에 도입된 수산기와 결합한 상태로 존재하고, 수산기와 결합하지 않은 다른 말단은 아민기 또는 카르복실기로 이루어진 것을 특징으로 하는 표면 개질된 지르코늄계 임플란트의 제조방법을 제공한다.

[0011] 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 지르코늄(Zr), 지르코늄 합금 또는 산화지르코늄으로 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 지르코늄계 임플란트를 제공한다. 또한, 본 발명은 (S1) 전체 또는 적어도 표면이 지르코늄(Zr), 지르코늄 합금 또는 산화지르코늄으로 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, 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 지르코늄계 임플란트의 제조방법을 제공한다.

[0012] 본 발명의 다른 목적을 해결하기 위하여, 본 발명은 표면에 수산기가 도입된 임플란트 기재, 링커 및 상기 링커에 고정된 성장분화 인자(Growth and differentiation factor, GDF)를 포함하고, 상기 임플란트 기재는 전체 또는 적어도 표면이 지르코늄(Zr), 지르코늄 합금 또는 산화지르코늄으로 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 지르코늄계 임플란트를 제공한다. 또한, 본 발명은 (S1) 전체 또는 적어도 표면이 지르코늄

(Zr), 지르코늄 합금 또는 산화지르코늄으로 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 성장분화 인자(Growth and differentiation factor, GDF)를 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 지르코늄계 임플란트의 제조방법을 제공한다.

[0013] 본 발명의 다른 목적을 해결하기 위하여, 본 발명은 표면에 수산기가 도입된 임플란트 기재, 링커, 상기 링커에 고정된 헤파린 및 상기 링커 또는 헤파린에 고정된 성장분화 인자(Growth and differentiation factor, GDF)를 포함하고, 상기 임플란트 기재는 전체 또는 적어도 표면이 지르코늄(Zr), 지르코늄 합금 또는 산화지르코늄으로 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 지르코늄계 임플란트를 제공한다. 또한, 본 발명은 (S1) 전체 또는 적어도 표면이 지르코늄(Zr), 지르코늄 합금 또는 산화지르코늄으로 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 상기 링커 또는 헤파린에 성장분화 인자(Growth and differentiation factor, GDF)를 고정화시키는 단계를 포함하고, 상기 (S3) 단계에서 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 지르코늄계 임플란트의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따른 표면 개질된 지르코늄계 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 또는 GDF(Growth and differentiation factor)를 임플란트에 안정적이면서도 보다 용이하게 고정화시킬 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 골 형성 유도 또는 촉진용 지르코늄계 임플란트는 GDF(Growth and differentiation factor)를 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

[0015] 도 1은 지르코니아 디스크 표면에 수산기를 도입한 후 클릭반응을 이용하여 링커를 형성하는 과정을 도시한 것이다.

도 2는 링커에 의해 표면 개질된 지르코늄계 임플란트에 헤파린 및 골 형성 촉진 인자인 GDF-5를 순차적으로 결합하는 과정을 도식화한 것이다.

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

도 4는 Zr-6를 28일 동안 배양하였을 때 방출되는 GDF-5의 양을 누적 형태로 나타낸 것이다.

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

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

도 7은 14일 및 21일 동안 MC3T3-E1 세포를 Zr-1, Zr-2, Zr-5 및 Zr-6 상에서 배양하였을 때 침착된 칼슘량을 정량적으로 비교한 그래프이다.

도 8은 Zr-1, Zr-2, Zr-5 및 Zr-6 상에서 MC3T3-E1 세포를 배양할 때 조골세포 분화 관련 유전자의 발현량을 정량적으로 나타낸 그래프이다.

도 3 내지 도 8에 표시된 용어 Pristine Zr, Zr-OH, Zr/Propargyl, Zr/2-azidoethanamine, Zr/Heparin 및 Zr/GDF-5는 각각 순서대로 지르코니아 표본인 Zr-1, Zr-2, Zr-3, Zr-4, Zr-5 및 Zr-6을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명한다.
- [0017] 본 발명의 일 측면은 GDF(Growth and differentiation factor)와 같은 생체 유래 물질을 안정적이면서 쉽게 고정화할 수 있도록 표면 개질된 지르코늄계 임플란트 및 이의 제조방법에 관한 것이다.
- [0018] 본 발명의 일 예에 따른 표면 개질된 지르코늄계 임플란트는 표면에 수산기가 도입된 임플란트 기재 및 링커를 포함한다. 또한, 본 발명의 일 예에 따른 표면 개질된 지르코늄계 임플란트는 바람직하게는 상기 링커에 결합된 헤파린(Heparin)을 더 포함할 수 있다.
- [0019] 상기 임플란트 기재는 전체가 지르코늄, 지르코늄 합금 또는 산화지르코늄으로 이루어지거나 적어도 표면이 지르코늄, 지르코늄 합금 또는 산화지르코늄으로 이루어진다. 상기 지르코늄 합금은 하프늄, 니오븀, 주석, 몰리브덴, 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.
- [0020] 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 헤파린 또는 GDF(Growth and differentiation factor)와 수소 결합 또는 아마이드 결합을 형성하여 헤파린 또는 GDF(Growth and differentiation factor)를 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 트리아졸기는 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 휘스젠 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 기재의 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 또는 GDF(Growth and differentiation factor) 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-헥산

아민(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 있으나, 여기에 반드시 한정되는 것은 아니다.

[0021] 또한, 본 발명의 일 예에 따른 표면 개질된 지르코늄계 임플란트는 바람직하게는 표면에 수산기가 도입된 지르코늄계 임플란트 기재, 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 GDF(growth and differentiation factor)를 임플란트 기재에 고정화하기 위한 바인딩 시스템(binding system)으로 작용할 수 있다[Gandhi NS1, Mancera RL. : Prediction of heparin binding sites in bone morphogenetic proteins (BMPs)., Biochim Biophys Acta. 2012 Dec;1824(12):1374-81]. 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 기재에 고정화될 수 있다.

[0022] 본 발명의 일 예에 따른 표면 개질된 지르코늄계 임플란트의 제조방법은 (S1) 전체 또는 적어도 표면이 지르코늄, 지르코늄 합금 또는 산화지르코늄으로 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 포함한다. 또한, 본 발명의 일 예에 따른 표면 개질된 지르코늄계 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 지르코늄, 지르코늄 합금 또는 산화지르코늄으로 이루어진 임플란트 기재의 표면에 수산기를 도입하기 위해 임플란트 기재를 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 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.

[0023] 본 발명의 다른 측면은 GDF(growth and differentiation factor)를 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 지르코늄계 임플란트에 관한 것이다. 본 발명의 골 형성 유도 또는 촉진용 지르코늄계 임플란트는 치과용 임플란트, 정형외과용 임플란트 또는 생체이식용 임플란트 등과 같이 다양한 용도로 사용될 수 있다.

[0024] 본 발명의 일 예에 따른 골 형성 유도 또는 촉진용 지르코늄계 임플란트는 표면에 수산기가 도입된 임플란트 기재, 링커 및 상기 링커에 고정된 GDF(growth and differentiation factor)를 포함한다. 이때, 상기 임플란트 기재는 전체 또는 적어도 표면이 지르코늄, 지르코늄 합금 또는 산화지르코늄으로 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 GDF(growth and differentiation factor)와 수소 결합, 아마이드 결합 등을 형성할 수도 있고, 바람직하게는 GDF(growth and differentiation factor)와의 사이에 형성된 아마이드 결합 형태로 변형되어 존재한다. 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, 생체 적합성 등을 고려할 때 GDF-5인 것이 바람직하다. GDF-5는 다수의 골 수선 관련 세포 과정에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 최근 골 재생 및 수선을 위한 유망한 후보 물질로 제안되고 있다.

[0025] 본 발명의 일 예에 따른 골 형성 유도 또는 촉진용 지르코늄계 임플란트의 제조방법은 (S1) 전체 또는 적어도 표면이 지르코늄, 지르코늄 합금 또는 산화지르코늄으로 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 GDF(growth and differentiation factor)를 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 GDF(growth and differentiation factor)와 수소 결합, 아마이드 결합을 형성할 수도 있고, 바람직하게는 GDF(growth and differentiation factor)와의 사이에 형성된 아마이드 결합 형태로 변형되어 존재한다. 또한, 상기 GDF(growth and differentiation factor)는 GDF-5(Growth and differentiation factor-5)인 것이 바람직하다.

[0026] 본 발명의 다른 예에 따른 골 형성 유도 또는 촉진용 지르코늄계 임플란트는 표면에 수산기가 도입된 임플란트 기재, 링커, 상기 링커에 고정된 헤파린 및 상기 링커 또는 헤파린에 고정된 GDF(growth and differentiation factor)를 포함한다. 이때, 상기 임플란트 기재는 전체 또는 적어도 표면이 지르코늄, 지르코늄 합금 또는 산화지르코늄으로 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 GDF(growth and differentiation factor)와 수소 결합, 아마이드 결합 등을 형성할 수도 있고, 바람직하게는 헤파린 또는 GDF(growth and differentiation factor)와의 사이에 형성된 아마이드 결합 형태로 변형되어 존재한다. 또한, 상기 GDF(growth and differentiation factor)는 헤파린과의 수소 결합, 아마이드 결합, 입체적 구조에 의한 강한 상호 작용 등에 의해 헤파린에 고정화된다. 또한, 상기 GDF(growth and differentiation factor)는 링커의 말단 중 수산기와 결합하지 않은 다른 말단에 존재하는 아민기 또는 카르복실기와 수소 결합, 아마이드 결합 등을 형성할 수도 있다. 또한, 상기 GDF(growth and differentiation factor)는 GDF-5(Growth and differentiation factor-5)인 것이 바람직하다.

[0027] 본 발명의 다른 예에 따른 골 형성 유도 또는 촉진용 지르코늄계 임플란트의 제조방법은 (S1) 전체 또는 적어도 표면이 지르코늄, 지르코늄 합금 또는 산화지르코늄으로 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 GDF(growth and differentiation factor)를 고정화시키는 단계를 포함한다. 이때, 상기 (S3) 단계에서 링커는 트리아졸기(triazole group)를 포함하고, 수산기와 결합하지 않은 다른 말단은 아민기 또는 카르복실기로 이루어진다. 또한, 상기 GDF(growth and differentiation factor)는 GDF-5(Growth and differentiation factor-5)인 것이 바람직하다.

[0028] 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.

[0029] **1. 골 형성 유도 또는 촉진용 지르코늄계 임플란트의 제조**

[0030] 단계 1 : 링커에 의해 표면 개질된 지르코늄계 임플란트의 제조

[0031] 지르코니아 디스크(이하 'Zr-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 증류수 내에서 5분 동안 초음파 처리하고, 증류수로 3회 세척하였다. 이후, 표본들을 질소 가스로 건조한 뒤 실온에서 유지하였다(이하 'Zr-2'라 칭함).

[0032] 이후, 상기 Zr-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 Zr-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 'Zr-3'라 칭함).

[0033] 이후, 2-아지도에탄아민(2-azidoethanamine) 1.41g(0.02 mol에 해당함), 아스코브산 나트륨(Sodium ascorbate) 3.96g(0.02 mol에 해당함) 및 CuSO₄ · 5H₂O 0.89g(3.57 mmol에 해당함)을 Zr-3와 증류수 50ml의 혼합물에 실온에서 70℃에서 24시간 동안 70℃에서 클릭 반응(Click reaction) 시켰다. 도 1은 지르코니아 디스크 표면에 수산기를 도입한 후 클릭반응을 이용하여 링커를 형성하는 과정을 도시한 것이다.

[0034] 단계 2 : 헤파린 및 GDF-5가 고정된 지르코늄계 임플란트의 제조

[0035] 상기 단계 1에서 수득된 링커가 형성된 지르코늄계 임플란트를 증류수로 3번 세척하고, 질소가스로 건조시킨 뒤 실온에서 보관하였다(이하 'Zr-4'라 칭함). Zr-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 Zr-4와 증류수 40ml의 혼합물에 첨가하고 실온에서 48시간 동안 반응시켜 링커의 말단 아민기와 헤파린의 카르복실기 사이에 아마이드 결합을 유도하였다. 이후, 표본을 증류수로 3 번 세척하고 질소 가스로 건조시켰다(이하, 'Zr-5'라 칭함). 상기 Zr-5는 사용하기 전에는 -20℃에서 보관하였다.

[0036] 이어서, 수득된 Zr-5와 GDF-5(Growth and differentiation factor-5; 공급자 : Peprotech, NJ, USA) 10ng을 PBS(Phosphate buffered saline; pH 7.4) 40ml에 넣고 혼합한 후 37℃ 및 80 rpm의 교반 조건에서 24시간 동안 배양하여 GDF-5를 주로 헤파린에 고정시켰다(이하, 'Zr-6'라 함). 도 2는 링커에 의해 표면 개질된 지르코늄계 임플란트에 헤파린 및 골 형성 촉진 인자인 GDF-5를 순차적으로 결합하는 과정을 도식화한 것이다.

[0037] **2. 골 형성 유도 또는 촉진용 지르코늄계 임플란트의 특성 분석**

[0038] (1) 주사전자현미경(SEM) 관찰

[0039] 상기에서 제조된 Zr-1 내지 Zr-6의 표면구조를 주사전자현미경(SEM)을 통해 확인하였다. 금속판에 Zr-1 내지 Zr-6 표본을 고정하고 15kV의 전압 하에서 sputter-coater(Eiko IB, Japan)로 금 코팅하였고, 주사전자현미경(S-2300; Hitachi, Tokyo, Japan)을 사용하여 2000 배율로 관찰했다.

[0040] 도 3은 Zr-1 내지 Zr-6 표본의 표면을 주사전자현미경(SEM)으로 관찰한 결과를 나타낸다. Zr-1 내지 Zr-4 표본 간에는 표면 형태에 큰 차이를 보이지 않았다. 한편, Zr-5 표본 및 Zr-6 표본은 각각 표면이 부분적으로 코팅된 형태를 보였다.

[0041] (2) 표면화학조성 분석

[0042] Zr-1 내지 Zr-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 Instrument(VG, UK)를 사용하여 수행하였다. Monochromatic aluminum K α X-ray radiation source(photoelectron energy = 1486.6eV)을 사용하였고, 광범위하게 스캔된 XPS는 187.7eV가 통과할 때 얻어졌으며 0~1400eV까지 측정했다.

[0043] 하기 표 1에 Zr-1 내지 Zr-6의 표면화학조성 분석 결과를 나타내었다.

표 1

(n = 3)	C1s (283.7 eV, %)	N1s (399.2 eV, %)	O1s (528.8 eV, %)	S2p (163.8 eV, %)
Pristine Zr	47.31±1.35	0.35±0.03	52.21±2.87	0.13±0.01
Zr-OH	34.26±2.12	0.21±0.02	65.32±4.43	0.21±0.02
Zr/Propargyl	50.00±3.12	0.31±0.01	49.27±3.21	0.42±0.01
Zr/2-azidoethanamine	50.15±1.87	4.27±0.12	45.26±5.34	0.32±0.04
Zr/Heparin	43.34±4.35	2.12±0.05	48.28±2.76	6.26±0.02
Zr/GDF-5	38.83±3.87	0.62±0.02	56.27±3.43	4.28±0.01

[0044]

[0045] 상기 표 1에서 Pristine Zr, Zr-OH, Zr/Propargyl, Zr/2-azidoethanamine, Zr/Heparin 및 Zr/GDF-5는 각각 순서대로 지르코니아 표본인 Zr-1, Zr-2, Zr-3, Zr-4, Zr-5 및 Zr-6을 나타낸다.

[0046] 광범위하게 스캔된 XPS에 의할 때, Zr-2는 Zr-1보다 더 높은 O1s 퍼센트를 보였고, 이는 수산기의 형성에 기인한 것이다. Zr-4에서의 높은 N1s 퍼센트는 링커 내에 존재하는 트리아졸기 및 링커 말단에 존재하는 아민기의 존재 때문인 것으로 판단된다. 또한, Zr-5에서의 N1s 퍼센트 감소 및 Zr-5 및 Zr-6에서의 S2P 퍼센트 증가는 헤파린과 GDF-5의 고정화 때문인 것으로 판단된다.

[0047] (3) Zr-6에 고정된 GDF-5의 양 및 Zr-6에서 GDF-5의 방출역학 측정

[0048] GDF-5를 Zr-5의 표면에 고정화한 후 고정화되지 않은 자유 GDF-5의 양을 측정하여 간접적으로 Zr-6에 고정된 GDF-5의 양을 계산하였다. GDF-5를 Zr-5의 표면에 고정화하고 남은 반응 용액 100 μ g을 microplate reader(Bio-Rad, Hercules, CA USA)를 사용하여 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 방법으로 분석하였다. Zr-6의 표면에 고정된 GDF-5의 실질적인 양은 GDF-5의 여러 가지 농도에서 얻은 표준화 곡선과 비교하여 계산하였다. 이때, 광학 밀도는 495nm에서 측정하였다. Zr-6의 표면에 고정된 GDF-5의 실질적인 양은 약 9.5ng으로서, 고정화 효율은 약 95%이었다.

[0049] 또한, Zr-6을 3mL의 PBS(pH 7.4)가 채워진 바이알(vial)에 넣고 37 $^{\circ}$ C의 온도 및 100rpm의 조건에서 배양하였다. 배양 후 1hr, 2hr, 8hr, 1일, 3일, 5일, 7일, 14일, 21일 및 28일이 경과한 시점에서 상층액 3mL를 채취하고, 이와 같은 부피의 PBS(pH 7.4)를 바이알에 첨가하였다. 채취한 상층액은 -20 $^{\circ}$ C에서 냉장 보관했다. GDF-5의 방출 거동은 ELISA kit(GDF-5 Kit; USCN Life Science Inc., Wuhan, China)를 사용하여 결정하였다. 샘플링된 상층액의 광학 밀도는 microplate reader(Bio-Rad, Hercules, CA USA)를 사용하여 495nm에서 측정하였다. 도 4는 Zr-6를 28일 동안 배양하였을 때 방출되는 GDF-5의 양을 누적 형태로 나타낸 것이다. 도 4에서 보이는 바와 같이, Ti-6의 표면에 고정된 GDF-5는 배양 8시간 이내에 약 8.7%(0.8 ng) 미만의 수준으로 방출되었고, 배양 28일 동안 지속적으로 서서히 방출되었다. Zr-6를 28일 동안 배양하였을 때 누적 방출 퍼센트는 약 28.4%(2.7 ng)를 보였다. 이는, 지르코니아 표면에 클릭 반응에 의해 형성된 링커를 통해 고정화된 GDF-5가 28일 이상의 장시간 동안 지속적으로 방출될 가능성을 시사한다.

[0050] (4) 표면 개질된 지르코니아 또는 GDF-5가 고정된 지르코니아가 조골세포의 증식에 미치는 영향 분석

[0051] 48-웰 플레이트 안에 Zr-1, Zr-2, Zr-5 및 Zr-6를 넣고 여기에 각각 MC3T3-E1 세포(밀도: 5×10^3 cells/well)를 접종하였다. 이후, 10% FBS(Fetal bovine serum)와 1% PS(penicillin-streptomycin)를 포함하는 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM, Gibco) 200 μ L를 세포가 수용된 각각의 웰에 첨가하고 3일 동안 세포를 배양하였다. 세포의 배양은 37 $^{\circ}$ C의 온도 및 5% CO₂ 조건하에서 이루어졌다. 사전에 정해진 시점에서, 배양된 세포를 채취하고 cell counting kit(CCK-8)을 사용하여 세포의 증식을 분석하였다. 시약을 세포 표본에 첨가하고 microplate reader(Bio-Rad, Hercules, CA USA)를 사용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

- [0052] 도 5는 배양 후 1일 및 3일이 되었을 때 Zr-1, Zr-2, Zr-5 및 Zr-6 상에서 배양된 MC3T3-E1 세포의 증식률을 정량적으로 나타낸 그래프이다. 도 5에서 보이는 바와 같이 Zr-1, Zr-2, Zr-5 및 Zr-6 상에서 배양된 MC3T3-E1 세포의 증식률은 배양 1일이 경과하였을 때 큰 차이를 보이지 않았다. 세포를 접종한 후 3일 동안 배양하였을 때에도 각 표본들의 세포 증식률은 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과로부터 지르코니아의 표면 개질이 세포 증식비(cell proliferation ratio)에 영향을 주지 않는다는 것을 알 수 있다. 줄기 세포의 경우 골 형성 분화를 거치는 경우 세포 증식비가 감소하기 때문에, 표면 개질된 지르코니아에서 관찰되는 정상적인 세포 증식비는 Zr-6가 전구 조골세포인 MC3T3-E1의 골 형성 분화를 유도하는데에 적합한 재료임을 의미한다.
- [0053] (5) 표면 개질된 지르코니아 또는 GDF-5가 고정된 지르코니아가 조골세포의 알칼리 포스파타제(Alkaline phosphatase, ALP) 활성 수준에 미치는 영향 분석
- [0054] 48-웰 플레이트 안에 Zr-1, Zr-2, Zr-5 및 Zr-6를 넣고 여기에 각각 MC3T3-E1 세포(밀도: 5×10^3 cells/well)를 접종하였다. 이후, Osteogenic media(10% FBS, 1% PS, 10mM β -glycero phosphate disodium salt hydrate, 300 μ M 아스코브산 및 0.1 μ M dexamethasone을 포함하는 DMEM)를 세포가 수용된 각각의 웰에 첨가하고 14일 동안 세포를 배양하였다. 세포의 배양은 37°C의 온도 및 5% CO₂ 조건하에서 이루어졌고, 3일에 한번 씩 배지를 교체하였다. 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°C에서 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 410nm에서 측정되었다.
- [0055] 도 6은 Zr-1, Zr-2, Zr-5 및 Zr-6 상에서 7일 및 14일 동안 배양된 MC3T3-E1 세포의 ALP 활성 수준을 나타낸 그래프이다. 일반적으로 ALP 활성은 골 형성의 초기 단계에 나타난다. 도 6에서 보이는 바와 같이 Ti-1, Ti-2, Ti-5 및 Ti-6에서 배양된 세포의 ALP 활성은 배양 7일째에 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나, 배양 14일 후에는 Zr-2, Zr-5 및 Zr-6 에서 배양된 세포의 ALP 활성은 확연한 증가를 보였다. 특히, Zr-6은 가장 높은 ALP 활성을 보였으며, 이는 Zr-6이 MC3T3-E1 세포의 골 형성 분화를 촉진하는 우수한 임플란트로 사용될 수 있음을 의미한다.
- [0056] (6) 표면 개질된 지르코니아 또는 GDF-5가 고정된 지르코니아 상에서 조골세포의 배양시 칼슘 침착량 분석
- [0057] 48-웰 플레이트 안에 Zr-1, Zr-2, Zr-5 및 Zr-6를 넣고 여기에 각각 MC3T3-E1 세포(밀도: 5×10^3 cells/well)를 접종한 후 21일 동안 세포를 배양하였다. 사전에 정해진 시점에서, 배양된 세포 표본을 PBS(pH 7.4)로 3번 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°C의 온도 및 5% CO₂ 조건하에서 1시간 동안 배양하였다. 1시간 배양 후 염색 용액을 제거하고, 세포 표본을 증류수로 3번 세척하였다. 칼슘 침착량을 정량적으로 분석하기 위해, 염색된 세포를 10% 1-헥사데실피리디늄 클로라이드(1-hexadecylpyridinium chloride)로 처리하여 흡수 물질을 제거하고, microplate reader를 사용하여 540nm에서의 흡광도를 측정하였다.
- [0058] 도 7은 14일 및 21일 동안 MC3T3-E1 세포를 Zr-1, Zr-2, Zr-5 및 Zr-6 상에서 배양하였을 때 침착된 칼슘량을 정량적으로 비교한 그래프이다. 도 7에서 보이는 바와 같이 칼슘 침착량은 Zr-1 < Zr-2 < Zr-5 < Zr-6의 순서로 증가하였다. 특히, Zr-6은 가장 많은 칼슘 침착량을 보였으며, 이는 Zr-6이 MC3T3-E1 세포의 골 형성 분화를 위한 우수한 임플란트 소재로 사용될 수 있음을 의미한다.
- [0059] (7) 표면 개질된 지르코니아 또는 GDF-5가 고정된 지르코니아 상에서 조골세포의 배양시 조골세포 분화 관련 유전자의 발현량 분석
- [0060] Zr-1, Zr-2, Zr-5 및 Zr-6 상에서 MC3T3-E1 세포를 배양할 때 조골세포 분화 관련 유전자의 발현량을 실시간 중합효소 연쇄반응(Real-time PCR)을 이용하여 측정하였다. Zr-1, Zr-2, Zr-5 및 Zr-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 1 μ g의 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'
OC	Sense 5'-AGC AAA GGT GCA GCC TTT GT-3'
	Antisense 5'-GCG CCT GGG TCT CTT CAC T-3'

[0061]

[0062] * OSX : osterix; Runx2 : runt-related transcription factor 2

[0063] * COL1 : type 1 collagen; * OC : osteocalcin

[0064] 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.

[0065] 도 8은 Zr-1, Zr-2, Zr-5 및 Zr-6 상에서 MC3T3-E1 세포를 배양할 때 조골세포 분화 관련 유전자의 발현량을 정량적으로 나타낸 그래프이다. 도 8에서 보이는 바와 같이, 골 형성 전사 인자인 OXS 및 Runx2 유전자 발현량은 배양 후 14일까지 Zr-6 표본에서 다른 표본에 비해 가장 높게 나타났다. COL1 및 OC는 일반적으로 골 형성 분화를 위한 표지자로 여겨지고 있다. COL1 및 OC 유전자의 발현량도 배양 21일째에 Zr-6 표본에서 다른 표본에 비해 가장 높게 나타났다.

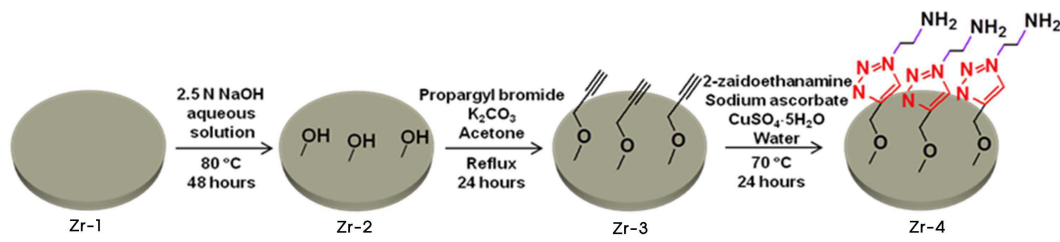
[0066] 3. 토의

[0067] 본 연구에서는 지르코니아 표면을 클릭 반응을 통해 개질하였고, 주사전자현미경 및 X선 광전자 분광법에 의해 성공적인 표면 개질을 확인하였다. 또한, 클릭 반응을 통해 표면 개질된 지르코니아 표면에 골 재생 및 수선을 위한 유망한 후보 물질인 GDF-5를 고정화시켰고(Zr-6), 이의 골 형성 유도 내지 촉진 효과를 평가하였다. 그 결과, GDF-5는 Zr-6의 표면상에서 지속적으로 장시간 동안 방출되었고, 전구 조골세포인 MC3T3-E1 세포의 조골세포로의 분화 및 조골세포의 증식을 촉진하였다. 따라서, 본 발명의 Zr-6은 골 형성의 향상을 위한 우수한 임플란트로 사용될 수 있다.

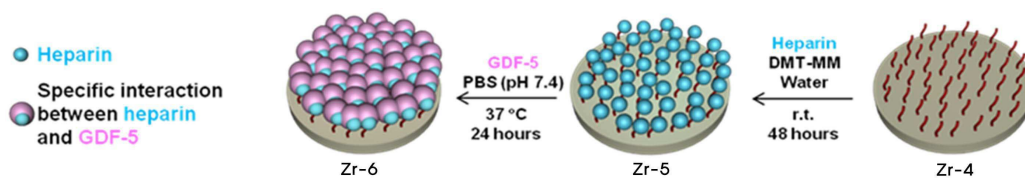
[0068] 이상에서와 같이 본 발명을 상기의 실시예를 통해 설명하였지만 본 발명이 반드시 여기에만 한정되는 것은 아니며 본 발명의 범주와 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 변형실시가 가능함은 물론이다. 따라서, 본 발명의 보호범위는 특정 실시 형태로 국한되는 것이 아니며, 본 발명에 첨부된 특허청구의 범위에 속하는 모든 실시 형태를 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

도면

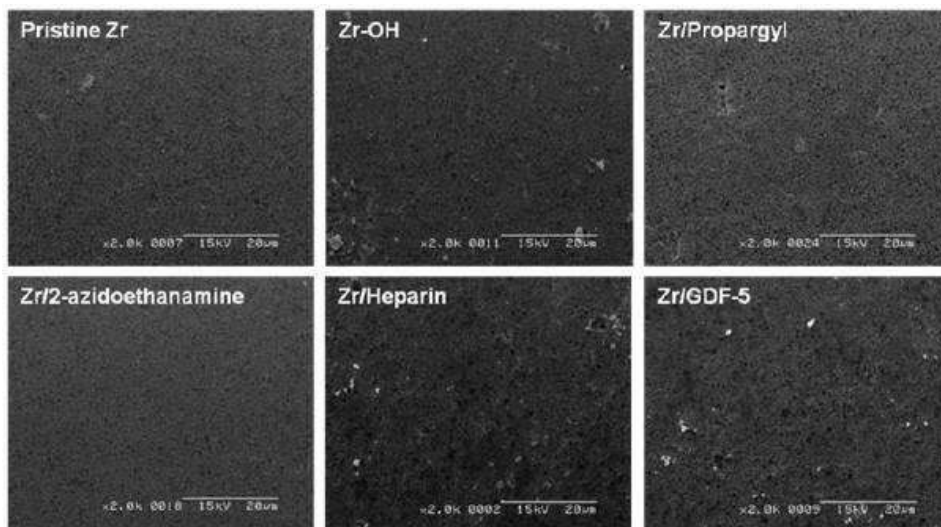
도면1



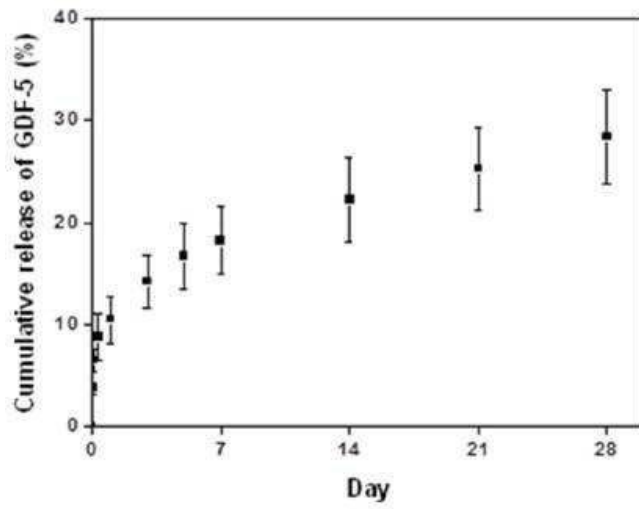
도면2



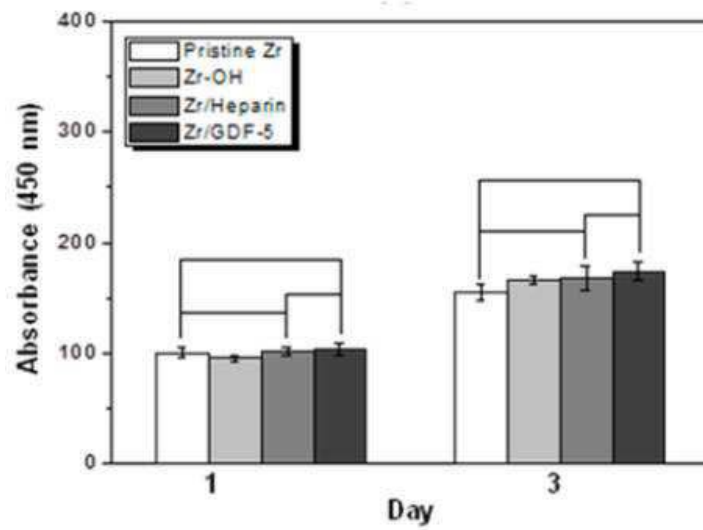
도면3



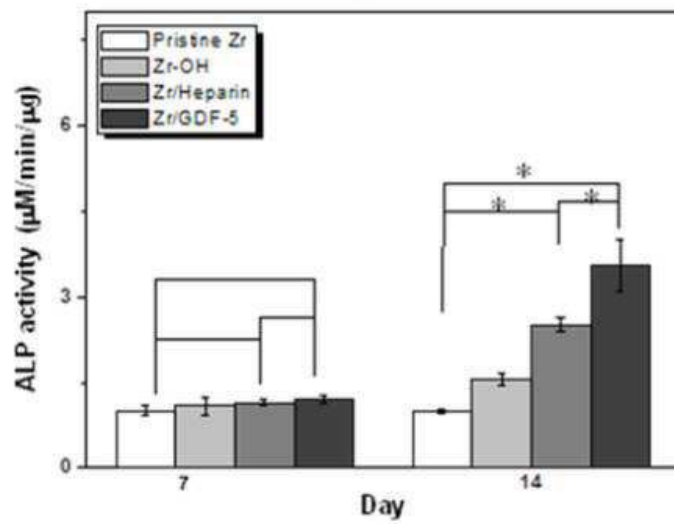
도면4



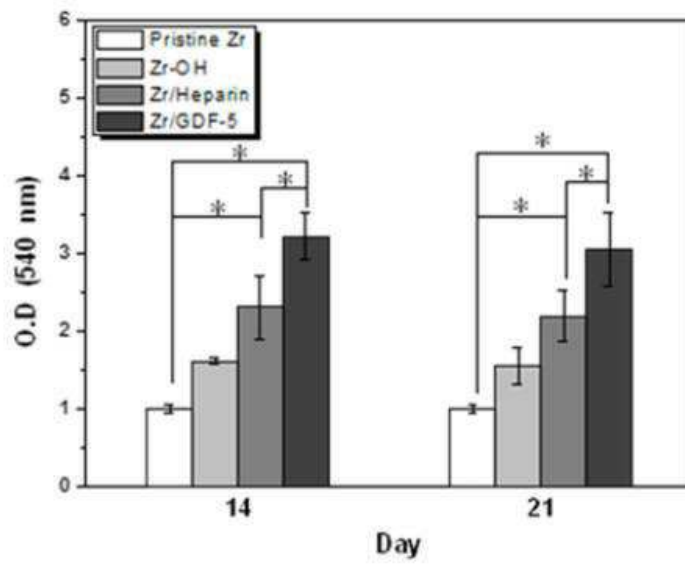
도면5



도면6



도면7



도면8

