

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0094110 (43) 공개일자 2016년08월09일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61L 27/34 (2006.01) A61L 27/06 (2006.01)	(71) 출원인 경희대학교 산학협력단 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)	
(52) CPC특허분류 A61L 27/34 (2013.01) A61L 27/06 (2013.01)	(72) 발명자 권일근 서울특별시 노원구 중계로 195 신안동진아파트 108동 1501호 (중계동, 신안동진아파트)	
(21) 출원번호 10-2015-0015267	임성갑 대전광역시 유성구 문지로 14 KAIST 교원아파트 1-501 (도룡동, 과학기술원관리아파트)	
(22) 출원일자 2015년01월30일 심사청구일자 2015년01월30일	박세웅 서울특별시 구로구 가마산로2길 14-6 (구로동)	
	(74) 대리인 김성호, 김병필, 박형달	

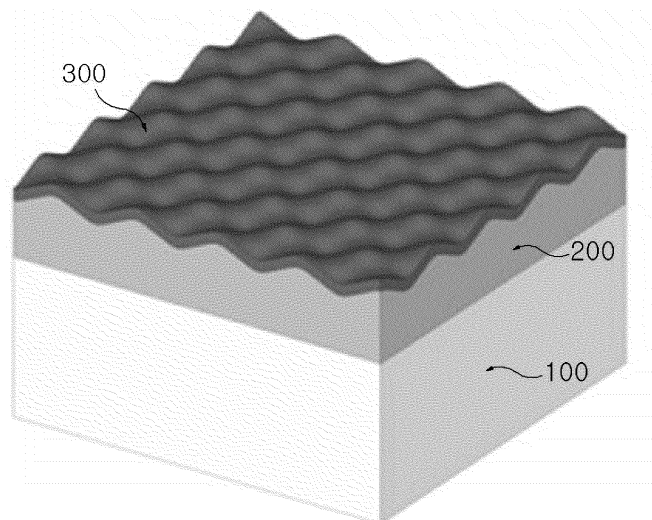
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **고분자 나노층을 포함하는 생체재료 및 이의 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 고분자 나노층을 포함하는 생체재료 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 임플란트 시술시 골분화능을 증대시키기 위해 표면에 고분자 나노층이 형성된 생체재료 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 폴리글리시딜 메타크릴레이트층을 적용하면, 임플란트 시술시 세포, 단백질 부착량 및 골분화능을 향상시킬 수 있을 뿐만 아니라 빠른 골분화능 또한 기대할 수 있다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345190656

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 선도연구센터지원

연구과제명 나노융합 생체소재 기반 치아와 치주조직 재생 연구

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교

연구기간 2012.09.01 ~ 2016.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

임플란트 모재가 되는 베이스층;
상기 베이스층의 적어도 일면에 형성된 산화막층; 및
상기 산화막층의 적어도 일면에 증착된 고분자 나노층;
을 포함하는 고분자 나노층이 형성된 생체재료.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 임플란트 모재가 되는 베이스층은 티타늄, 산화티타늄 및 티타늄 합금으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 고분자 나노층이 형성된 생체재료.

청구항 3

제1항에 있어서,
상기 고분자 나노층은 개시화학기상증착법(Initiated Chemical Vapor Deposition: iCVD)에 의해 증착된 것임을 특징으로 하는 고분자 나노층이 형성된 생체재료.

청구항 4

제1항에 있어서,
상기 고분자 나노층은 폴리글리시딜 메타크릴레이트(Polyglycidyl methacrylate: pGMA)층인 것을 특징으로 하는 고분자 나노층이 형성된 생체재료.

청구항 5

제1항에 있어서,
상기 고분자 나노층의 두께는 50 ~ 500nm인 것을 특징으로 하는 고분자 나노층이 형성된 생체재료.

청구항 6

제1항에 있어서,
상기 고분자 나노층은 양각부와 음각부를 포함하는 소정의 형상으로 패터닝된 것임을 특징으로 하는 고분자 나노층이 형성된 생체재료.

청구항 7

고분자 나노층이 형성된 생체재료의 제조방법에 있어서,

i) 임플란트 모재를 양극산화(Anodizing)하여 산화막층을 형성하는 단계;

및

ii) 상기 산화막층의 적어도 일면에 고분자 나노층을 증착하는 단계;

를 포함하며,

상기 고분자 나노층은 고분자 단량체(Monomer)를 개시화학기상증착법(Initiated Chemical Vapor Deposition: iCVD)으로 증착시켜 형성되는 것을 특징으로 하는 고분자 나노층이 형성된 생체재료의 제조방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 i) 단계 수행시,

상기 산화막층은 양극산화에 의해 상기 임플란트 모재 표면에 산화막이 피복되어 요철이 형성되는 것을 특징으로 하는 고분자 나노층이 형성된 생체재료의 제조방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 ii) 단계 수행시,

상기 개시화학기상증착법(iCVD)으로 증착되는 고분자 나노층을 중합하기 위한 고분자 단량체(Monomer)는 글리시딜 메타크릴레이트(Glycidyl methacrylate: GMA)인 것을 특징으로 하는 고분자 나노층이 형성된 생체재료의 제조방법.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 ii) 단계 수행시,

상기 개시화학기상증착법(iCVD)을 실시하기 위한 개시제(Initiator)는 tert-부틸 퍼옥사이드(tert-Butyl Peroxide: TBPO)인 것을 특징으로 하는 고분자 나노층이 형성된 생체재료의 제조방법.

청구항 11

제7항에 있어서,

상기 ii) 단계 수행시,

상기 개시화학기상증착법(iCVD)으로 증착되는 고분자 나노층의 두께는 50 ~ 500nm인 것을 특징으로 하는 고분자 나노층이 형성된 생체재료의 제조방법.

청구항 12

제7항에 있어서,

상기 ii) 단계 수행시,

상기 고분자 나노층은 양각부와 음각부를 포함하는 소정의 형상으로 패터닝되어 증착되는 것을 특징으로 하는 고분자 나노층이 형성된 생체재료의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 고분자 나노층을 포함하는 생체재료 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 임플란트 시술시 골분화능을 증대시키기 위해 표면에 고분자 나노층이 증착된 생체재료 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 고분자 물질의 액상 유기 합성 반응을 기상 반응 공정에 적용한 화학기상증착(Chemical vapor deposition, CVD)은 기화된 단량체(Monomer)가 챔버(Chamber) 내에서 활성화되어 고분자 중합반응이 이루어져, 기판 위로 고분자 박막이 형성되는 공정으로서, 고분자 중합반응과 박막 증착이 하나의 공정에서 동시에 이루어지는 것이 특징이다. 따라서 다양한 종류의 고분자 박막이 기판 표면의 마이크로, 혹은 나노 크기의 여러 형태를 그대로 유지한 채, 균일한 박막을 형성할 수 있다는 장점이 있다.

- [0003] 한편 고분자 물질은 분자량이 크고 비휘발성이기 때문에, 일반적으로 기상증착 공정을 적용할 수 없지만, 휘발성을 가진 단량체를 기화시켜 고분자 중합 반응과 성막 공정을 동시에 진행하는 기상중합증착 공정을 통해 고분자 박막을 얻을 수 있다. 개시제(Initiator)를 이용하는 개시화학기상증착(Initiated Chemical Vapor Deposition: iCVD) 공정은 이미 액상 공정으로는 대단히 잘 알려져 있는, 자유 라디칼(Free radical)을 이용한 연쇄중합 반응을 이용한다. 개시화학기상증착(iCVD) 공정에서는 개시제와 단량체(Monomer)를 기화하여 기상에서 고분자 연쇄중합 반응이 이루어지게 함으로써, 고분자 박막을 기판의 표면에 증착하는 공정이다.

- [0004] 개시제와 단량체를 단순히 혼합을 했을 경우에는 중합 반응이 일어나지 않으나, 기상 반응기 내에 위치한 고온의 필라멘트에 의해 개시제가 분해되어 라디칼이 생성되면, 이에 의해 단량체가 활성화되어 연쇄 중합 반응이 이루어진다. 개시제는 tert-부틸 퍼옥사이드(tert-Butyl Peroxide: TBPO)와 같은 과산화물(Peroxide)이 주로 사용되며, tert-부틸 퍼옥사이드(TBPO)는 110℃ 정도의 끓는점을 갖는 휘발성 물질로서, 약 150℃ 전후에서 열분해를 하게 된다. 따라서 개시화학기상증착(iCVD)에서 사용되는 고온 필라멘트의 온도는 200 ~ 250℃ 전후로 유지하면 손쉽게 기상 반응을 유도할 수 있다. 이 필라멘트의 온도는 tert-부틸 퍼옥사이드(TBPO)를 열분해하기에는 충분히 높은 온도이지만, 그와 동시에, 개시화학기상증착(iCVD)에 사용되는 단량체를 포함한 대부분의 유기물들은 이와 같은 온도에서는 열분해 되지 않는다. 개시제의 분해를 통해 형성된 자유 라디칼은 단량체에 있는 비닐($\text{CH}_2=\text{CH}-$) 그룹에 라디칼을 전달하여, 연쇄반응을 일으켜 고분자를 형성하게 되고, 이렇게 형성된 고분자 물질은 15 ~ 40℃ 사이의 저온으로 유지된 기판 위에 증착되게 된다. 고분자 중합 반응에 사용된 구동력은 오직 필라멘트의 고온뿐이며, 이 필라멘트의 온도에서는 다양한 종류의 단량체 물질들이 화학적 손상이 없기 때문에, 고분자 박막 역시 단량체가 가지고 있는 다양한 기능성 그룹을 그대로 유지한 채, 고분자 박막으로 전환될 수 있다.

- [0005] 일반적인 화학기상증착(CVD) 공정은 목적하는 화학반응을 유도하기 위하여 낮게는 500℃ 높게는 1000℃를 상회하는 고온을 요구함에 반해, 개시화학기상증착(iCVD) 공정은 유기물의 반응은 상온에서도 가능하므로 200℃ 내지 300℃ 정도의 저온 조건에서도 목적하는 고분자 박막을 용이하게 제조할 수 있는 방법이다. 또한 개시화학기상증착(iCVD) 공정은 완전한 건조 공정이므로, 다양한 종류의 기판에 적용이 가능하며, 특히 외부의 기계적, 화학적 충격에 약한 기판들 역시 손쉽게 적용할 수 있다. 예컨대, 액상 공정에 의해 손상을 받을 가능성이 매우 높은 종이나 옷감 등과 같은 기판들에도 적용할 수 있고, 또한 콘택트 렌즈와 같이 용매에 의해 변형이 쉽게 이루어지는 기판에도 적용 가능하며, 다양한 하이드로젤 물질의 표면에도 유용하게 사용될 수 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0006] (특허문헌 0001) 국제공개특허 제2014-127304호 "GRAFTED POLYMER SURFACES FOR DROPWISE CONDENSATION, AND ASSOCIATED METHODS OF USE AND MANUFACTURE"

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 1952년 Branemark 박사에 의하여 임플란트가 개발된 후, 임플란트는 의학/치의학계에서 매우 널리 사용되고 있다. 현재까지 다양한 표면처리 방법이 개발되었으나, 즉시 식립 및 부하가 가능한 임플란트를 만들기 위해서는 보다 빠른 골유착의 유도가 필요한 실정이다. 현재 임플란트는 높은 성공률을 보이고 있지만, 통상적으로 새로운 뼈가 생성된 이후에 보철물을 올리게 된다. 따라서 골분화능이 증대된다면, 기존골의 안정성이 감소되기 전에 새로운 골의 안정성이 증가되어 즉시 식립 및 부하가 가능해진다. 따라서 본 발명의 목적은 종래의 표면처리 방법 대비 보다 빠른 골유착의 유도를 위한 것이다.

과제의 해결 수단

- [0008] 본 발명은 상기의 과제를 해결하기 위해 안출된 것으로, 임플란트 모재가 되는 베이스층, 상기 베이스층의 적어도 일면에 형성된 산화막층 및 상기 산화막층의 적어도 일면에 증착된 고분자 나노층을 포함하는 생체재료를 제공한다.

- [0009] 또한 본 발명은 상기의 생체재료를 제조하기 위한 방법으로, 생체재료의 일 실시 태양인 임플란트 모재를 준비하고 양극산화로 표면처리된 산화막층을 형성한 후, 상기 산화막층에 폴리글리시딜 메타크릴레이트(Polyglycidyl methacrylate: pGMA) 고분자 나노층을 개시화학기상증착법(Initiated Chemical Vapor Deposition: iCVD)으로 형성시키는 생체재료의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0010] 첫째, 본 발명의 고분자 나노층을 포함하는 생체재료를 치과용, 정형외과용 또는 성형외과용 임플란트에 적용하면, 빠른 골유도성과 증대된 골분화능으로 즉시 식립 및 부하가 가능한 임플란트 기술이 가능하다. 또한 고분자 나노층의 종류에 따라 항생 효과, 친수성 및 생체 적합성의 효과를 기대할 수 있다.

- [0011] 둘째, 임플란트 뿐만 아니라 금속 및 세라믹 기반의 생체재료에 적용하면, 높은 생활성(Bioactivity) 및 항균성(Antimicrobial activity)을 가지면서 빠르고 강력한 골유착(Osseointegration) 및 골유도성(Osseoinductive surface properties)을 유도하여 치과, 정형외과 또는 성형외과 등의 영역에서 환자에게 시술되는 인체 삽입형 의료기재에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0012] 도 1은 본 발명의 일 구현예로서, 임플란트 모재인 티타늄 디스크에 양극산화막이 형성된 것을 나타낸다.
- 도 2는 본 발명의 일 구현예로서, 임플란트 모재인 티타늄 디스크의 양극산화막이 형성된 면에 폴리글리시딜 메타크릴레이트(pGMA)층이 증착된 것을 나타낸다.
- 도 3은 본 발명의 일 구현예로서, 임플란트 모재인 티타늄 디스크의 양극산화막이 형성된 면에 폴리글리시딜 메타크릴레이트(pGMA)층 패터닝되어 증착된 것을 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 일 구현예로서, 표면에 요철이 부여된 티타늄 디스크의 양극산화층의 FE-SEM 이미지이다.

도 5는 본 발명의 일 구현예로서, 고분자 나노층인 폴리글리시딜 메타크릴레이트(pGMA)층의 FE-SEM 이미지이다.

도 6은 본 발명의 일 구현예로서, 도트(Dot) 패턴의 고분자 나노층을 형성하기 위한 마스크(Mask)를 나타낸다.

도 7은 본 발명의 일 구현예로서, 도트(Dot) 패턴 마스크(Mask)를 이용하여 고분자 나노층을 증착하는 방법을 개략적으로 설명한다.

도 8은 본 발명의 일 구현예로서, 도트(Dot) 패턴의 고분자 나노층을 형성하기 위한 마스크(Mask)의 이미지이다.

도 9는 본 발명의 일 구현예로서, 도트(Dot) 패턴의 폴리글리시딜 메타크릴레이트(pGMA)층의 이미지이다.

도 10은 티타늄 디스크(Pristine Ti), 양극산화된 티타늄 디스크(ANOD), 폴리글리시딜 메타크릴레이트(pGMA)가 증착된 티타늄 디스크(GMA-full) 및 도트(Dot) 패턴의 폴리글리시딜 메타크릴레이트(pGMA)가 증착된 티타늄 디스크(GMA-dot)의 단백질 부착량을 비교 도시한 데이터이다.

도 11은 티타늄 디스크(Pristine Ti), 양극산화된 티타늄 디스크(ANOD), 폴리글리시딜 메타크릴레이트층(GMA-full) 및 도트(Dot) 패턴의 폴리글리시딜 메타크릴레이트층(GMA-dot)의 세포 독성을 비교 도시한 데이터이다.

도 12는 티타늄 디스크(Pristine Ti), 양극산화된 티타늄 디스크(ANOD), 폴리글리시딜 메타크릴레이트층(GMA-full) 및 도트(Dot) 패턴의 폴리글리시딜 메타크릴레이트층(GMA-dot)의 알칼라인 포스페이트(ALP) 활성을 비교 도시한 데이터이다.

도 13은 티타늄 디스크(Pristine Ti), 양극산화된 티타늄 디스크(ANOD), 폴리글리시딜 메타크릴레이트층(GMA-full) 및 도트(Dot) 패턴의 폴리글리시딜 메타크릴레이트층(GMA-dot)의 칼슘 침착량을 비교 도시한 데이터이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명은 고분자 나노층을 포함하는 생체재료 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 명세서에서 사용되는 기술 용어 및 과학 용어에 있어서 다른 정의가 없다면, 해당 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 이해하고 있는 의미를 가진다. 또한, 종래와 동일한 기술적 구성 및 작용에 대한 반복되는 설명은 생략하기로 한다.

[0014] 본 발명의 실시 태양으로서 '생체재료(生體材料, Biomaterial)'란 조직의 기능을 대체하기 위하여 체내에서 간헐적 또는 지속적으로 주위 조직과 직접 접촉하며 노출되는 인공적인 물질로서, 생체의 기능을 치환, 대체하기 위하여 사용되는 물질 또는 골격계 손상을 회복시키기 위하여 사용되는 물질을 의미한다.

[0015] 본 발명의 실시 태양으로서 '임플란트(Implant)'란 소실된 생물학적 조직을 대체하거나 생체 내 조직으로서 기능하도록 제조된 이식물 또는 삽입물을 지칭하는 것으로, 인공치근, 의치, 치관수복재료 및 의치수복재료 등을 포함하며, 또한 치과용만이 아닌 생체 내에 매입되는 인공뼈 및 인공관절 등의 골세포와 친화성을 필요로 하는 기재를 포함한다.

[0016] 본 발명의 실시 태양으로서 '임플란트 모재(母材)'란 임플란트 주된 골격체의 재료 또는 주된 골격체 자체를 지칭하는 것으로, 표면이 양극산화막에 의해 피복된 후 고분자 나노층이 개시화학기상증착법(Initiated chemical vapor deposition, iCVD)에 의해 형성되므로 골조직과의 친화성이 우수하다. 따라서, 본 발명에 있어서 임플란트 모재는 물리 화학적 물성 등의 특성을 충족하고 있으면 그 종류에 제한은 없으나, 본 발명의 일 구현예에 의하면 티타늄, 산화티타늄 및 티타늄 합금으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 바람직하며, 나아가 금속, 세라믹스 등을 이용할 수 있다. 또 인공치근을 비롯해, 의치, 인공뼈 및 인공관절 등 골세포와 친화성을 필요로 하는 다양한 임플란트에 적용 가능하다.

[0017] 본 발명의 실시 태양으로서 '개시화학기상증착법(Initiated chemical vapor deposition, iCVD)'은 개시제(Initiator)를 이용하여 고분자 중합반응을 유도하는 화학기상증착법으로, 통상의 액상 코팅 또는 증착 공정과

는 달리 용매가 사용되지 않으므로, 어닐링(Annealing) 단계도 불필요하다. 개시화학기상증착(iCVD) 공정은 통상의 기상증착 공정과는 달리 저온 공정으로 진행되며, 고진공 펌프의 사용을 필요로 하지 않는다. 개시화학기상증착(iCVD) 공정은 비닐 중합 반응을 이용하여 폴리머(Polymer)를 증착하는 공정이기 때문에 기본적으로 비닐기($\text{CH}_2=\text{CH}-$)를 가진 단량체는 모두 중합이 가능하다.

[0018] 본 발명의 실시 태양으로서 '개시제(Initiator)'는 본 발명의 공정에서 단량체들이 고분자를 형성할 수 있도록 첫 반응의 활성화를 유도하는 물질이다. 개시제는 단량체가 열분해되는 온도보다 낮은 온도에서 열분해되어 자유 라디칼(Free radical)을 형성할 수 있는 물질이 바람직하다. 본 발명의 개시제는 열의 공급에 의해 반응기가 분해되어 자유 라디칼을 형성하는 물질로서 단량체를 활성화시킬 수 있는 물질이면 특별히 한정되지 않는다. 본 발명의 실시예에서 사용할 수 있는 개시제는 열 개시제(Thermal initiator) 또는 UV 개시제 등이 적용될 수 있으며, 특히, 퍼옥사이드(Peroxide radical)기의 열 개시제가 바람직하다.

[0019] 이하에서는 본 발명은 도면과 실시예를 참조하여 상세히 설명한다. 본 발명은 임플란트 시술시 골분화능을 증대시키기 위하여, 도 1 내지 도 3에 도시된 바와 같이, 임플란트 모재가 되는 베이스층(100), 상기 베이스층(100)의 적어도 일면에 형성된 산화막층(200) 및 상기 산화막층(200)의 적어도 일면에 증착된 고분자 나노층(300)을 포함하는 생체재료를 제공한다.

[0020] 나아가 본 발명은 전술한 고분자 나노층이 형성된 생체재료의 제조방법으로서, 생체재료의 일 실시 태양인 임플란트 모재(100)를 준비하고, 상기 준비된 임플란트 모재(100)를 양극산화로 표면처리하여 요철이 부여된 산화막층(200)을 형성한 후, 상기 산화막층(200)의 적어도 일면에 고분자 나노층(300)을 개시화학기상증착법(iCVD)으로 증착시키는 고분자 나노층이 형성된 생체재료의 제조방법을 제공한다.

[0021] 상기 임플란트 모재(100)를 표면처리하는 방법으로는 표면에 요철을 부여하여 표면적을 증가시키는 방법 중에서 공지 또는 주지의 방법이 적용 가능하며, 예컨대 리소그래피(Lithography), 포토레지스트(Photoresist), 에칭(Etching), 레이저 스크라이빙(Laser scribing) 및 전자빔(E-beam)과 같은 패터닝 기술로부터 선택되는 어느 하나 이상의 방법일 수 있으나, 본 발명의 표면처리 방법은 상기 임플란트 모재(100)의 표면을 양극산화(Anodizing)하여 요철을 형성하는 것이며, 양극산화 표면처리를 통해 중합 반응의 면적을 증가시킬 수 있으며, 증착되는 고분자 나노층(300)과의 계면 접착력을 증대시킬 수 있다. 표면에 요철이 부여된 티타늄 디스크의 양극산화층(200)의 FE-SEM 이미지가 도 4에 도시되어 있다.

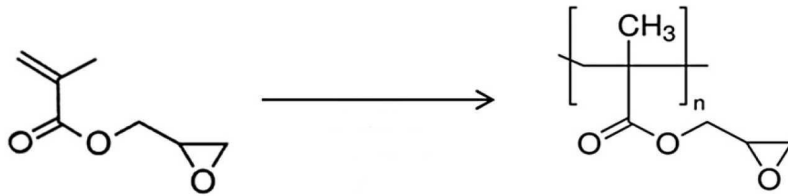
[0022] 본 발명의 일 구현예로서 고분자 나노층(300)은 적어도 일면이 양극산화 표면처리된 임플란트 모재(100)에 형성된 산화막층(200)에 글리시딜 메타크릴레이트(Glycidyl methacrylate: GMA)의 단량체(Monomer)를 개시제로서 tert-부틸 퍼옥사이드(tert-Butyl Peroxide: TBPO)와 함께 개시화학기상증착법(Initiated Chemical Vapor Deposition: iCVD)으로 증착시켜 형성된 것일 수 있다. 본 발명의 고분자 나노층(300)의 일 구현예인 폴리글리시딜 메타크릴레이트(pGMA)층의 FE-SEM 이미지가 도 5에 도시되어 있다.

[0023] 본 발명의 고분자 나노층(300)의 두께는 50 ~ 500nm인 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 200nm이다. 상기 고분자 나노층(300)의 두께가 50nm 미만이면 세포와 단백질 부착능 및 골분화능의 효과를 나타내기에 충분치 않으며, 상기 고분자 나노층(300)의 두께가 500nm를 초과한다 하더라도 상기 고분자 나노층(300)의 표면상의 반응면적이 일정하므로, 두께의 증가량에 비해 세포와 단백질 부착능 및 골분화능의 효과 등에 실질적인 이득이 없으며, 따라서 경제적 이유로 바람직하지 않다.

[0024] 글리시딜 메타크릴레이트(GMA)는 에폭시 고리(Epoxy ring)를 포함하고 있어서 반응결합 사이트(Binding site)를 제공하며, 고리열림반응(Ring opening reaction)을 통해서 다양한 기능을 수행할 수 있다. 예컨대 본 발명의 폴리글리시딜 메타크릴레이트(pGMA)층은 세포 및 단백질의 부착능을 향상시키고, 또한 골분화능을 증대시킬 수 있

다. 하기 [반응식 1]은 글리시딜 메타크릴레이트(GMA)의 연쇄 중합반응에 관한 것이다.

[반응식 1]



본 발명의 고분자 나노층(300)은 글리시딜 메타크릴레이트(GMA)의 연쇄 중합반응으로 생성된 폴리글리시딜 메타크릴레이트(pGMA)층을 구현하였으나, 임플란트 시술시 항생 효과, 친수성 및 생체 적합성 등의 다양한 기능을 수행하는 고분자라면 적용 가능성은 물론이다.

본 발명에서 고분자 나노층(300)은 도 3에 도시된 바와 같이, 양각부와 음각부를 포함하는 소정의 패턴을 가지는 형상일 수 있으며 그 형상에는 제한이 없으나, 상기 패턴은 고분자 나노층(300)이 증착되지 않아서 산화막층(200)이 노출된 부분을 포함할 수 있다. 후술되는 실시예의 결과로서, 상기의 패턴된 고분자 나노층(300)은 초기 골분화능을 향상시킬 수 있다. 일 구현예로서, 상기 패턴은 도트(Dot) 패턴일 수 있으며, 도 6에 도시된 금속 마스크(310)를 산화막층(200)에 올려 놓고, 도 7에 도시된 방법으로 고분자 나노층(300)을 증착함으로써 패턴을 형성할 수 있다. 도 8은 본 발명의 일 구현예로서 적용된 도트(Dot) 무늬의 스테인레스 스틸 마스크의 이미지이며, 도 9는 상기 마스크를 적용하여 증착된 폴리글리시딜 메타크릴레이트(Poly Glycidyl methacrylate: pGMA)층의 이미지이다.

이하의 본 발명의 고분자 나노층을 포함하는 생체재료를 구현하기 위한 실시예이나, 본 발명이 이에 한정되지 않음은 물론이고, 본 발명의 또 다른 적용 및 변형 등도 당업자에게 자명하다 할 것이다.

[실시예 1] 티타늄 디스크의 양극산화

직경이 12mm이고 두께가 1mm인 원판형의 티타늄 디스크(제조사: Biotem)를 준비한 뒤, 초음파 처리를 병행하여 헥산, 아세톤, 에탄올, 증류수의 순서로 15분 동안 세척했다. 세척된 티타늄 디스크를 유리챔버 내에서 2.0M의 황산(H₂SO₄) 수용액에 침지하고, 티타늄을 양극과 음극의 전극으로 사용하여 150V 전압의 직류전류를 2분 동안 인가함으로써 양극산화 했다(EX750H, Takasago Ltd., Japan). 양극산화된 티타늄 디스크를 증류수로 3회 헹군 후, 60℃에서 건조하면서 20분 동안 초음파처리 했다. 상기 수행 결과 도 4에 도시된 바와 같은 두께가 최대 2 μm인 티타늄 산화막(ANOD)이 형성되었다.

[실시예 2] 개시화학기상증착법(iCVD)으로 고분자 나노층 형성

글리시딜 메타크릴레이트(GMA) 모노머(Monomer)를 35℃로 가열하고, 상기 개시화학기상증착(iCVD) 반응기(Daeki Hi-Tech Co., Ltd)에 1.9sccm의 유량(Flow rate)으로 투입하였다. tert-부틸 퍼옥사이드(tert-Butyl Peroxide: TBPO) 증기를 실온에서 상기 개시화학기상증착(iCVD) 반응기에 0.8sccm의 유량(Flow rate)으로 투입하였다. 이후에, 글리시딜 메타크릴레이트(Glycidyl methacrylate: GMA) 모노머(monomer)와 tert-부틸 퍼옥사이드(tert-Butyl Peroxide: TBPO)를 200mTorr 기압에서 동시에 투입했다. 상기 수행 결과 도 5에 도시된 바와 같은 폴리글리시딜 메타크릴레이트층(GMA-full)이 형성되었으며, 표면은 상기 [실시예 1]에서 제조된 티타늄 디스크의 양극산화된 표면(도 4)과 유사한 형상인 것으로 나타났다.

[실시예 3] 패턴 증착

- [0035] 도 6에 도시된 도트(Dot) 패턴이 형성된 스테인레스 스틸 마스크(직경 1mm, 패턴원 간 중심거리 1.5mm)를 준비하여 상기 [실시예 1]에서 양극산화된 티타늄 디스크에 올려놓고 개시화학기상증착법(iCVD)을 수행한 결과 도 7에 도시된 바와 같이 양극산화된 전체 표면적 중에서 40%가 도트 패턴(나머지 60%는 양극산화면이 노출)된 폴리글리시딜 메타크릴레이트층(GMA-dot)이 형성되었다.
- [0036] 평가방법 및 결과
- [0037] 상기 [실시예 1]에서 준비된 티타늄 디스크(Pristine Ti), 상기 [실시예 1]에서 제조된 양극산화된 티타늄(ANOD), 상기 [실시예 2]에서 제조된 폴리글리시딜 메타크릴레이트층(GMA-full) 및 상기 [실시예 3]에서 제조된 도트(Dot) 패턴의 폴리글리시딜 메타크릴레이트층(GMA-dot)를 대상으로 단백질 흡착량, 세포독성, 알칼라인 포스페이트(ALP) 활성 및 칼슘 침착량에 대하여 평가실험을 실시하였다.
- [0038] 단백질 흡착량을 분석하기 위하여 소혈청알부민(Bovine Serum Albumin: BSA)을 준비하였으며, 세포독성, 알칼라인 포스페이트(ALP) 활성 및 칼슘 침착량을 분석하기 위하여 인간의 지방 유래 줄기세포(Adipose derived stem cells: ADSCs)를 MesenPRO RSTTM 배지(MPRO medium, Invitrogen)에서 배양하였다. 세포 배양액은 15%의 소 태아 혈청(Fetal bovine serum: FBS, GIBCO), 100U/ml의 페니실린(Penicillin, GIBCO), 100 μ g/ml의 스트렙토마이신(Streptomycin, GIBCO), 10mM의 글리세롤포스페이트나트륨 염수화물(b-Glycerol phosphate disodium salt hydrate, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 300 μ M의 아스코르브산(Ascorbic acid, Sigma-Aldrich) 및 0.1 μ M의 덤사메타손(Dexamethasone, Sigma-Aldrich)을 포함한다.
- [0039] (1) 단백질 흡착량 분석(BSA Assay)
- [0040] 각각의 Pristine Ti, ANOD, GMA-full 및 GMA-dot 표면에 500 μ l의 인산완충식염수(Phosphate-buffered Saline, PBS)를 도포한 후, 500 μ l의 소혈청알부민(Bovine Serum Albumin: BSA), (3mg/ml PBS)을 추가로 도포하였다. 표면의 잔여 소혈청알부민(BSA)의 양을 분석하기 위해 브래드포드 분석용 용액(Bradford assay solution, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 희석하여 브래드포드 분석을 실시한 후, 마이크로 플레이트 판독기(Microplate reader)를 이용하여 595nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 도 10은 각각의 시료에 대한 소혈청알부민(BSA)의 부착량을 나타내며, 그 결과 패턴이 되지 않은 [실시예 2]의 GMA-full에서 가장 많은 단백질 흡착량을 나타내었다.
- [0041] (2) 세포독성 분석(Cytotoxicity Assay)
- [0042] 지방 유래 줄기세포(Adipose derived stem cells: ADSCs)를 2×10^4 cells/ml의 밀도로 각각의 Pristine Ti, ANOD, GMA-full 및 GMA-dot 표면에 시딩(Seeding)하여 48시간 동안 배양하였다. 24시간, 48시간의 간격으로 인산완충식염수(PBS)로 헹구고 CCK-8 분화키트 시약(Dojindo, Kumamoto, Japan)을 첨가하였다. 2시간 후 96-well plate에 옮기고 마이크로 플레이트 판독기를 사용하여 450nm 파장에서 광학 밀도(Optical density)를 측정한 결과를 도 11에 도시하였으며, 상기 Pristine Ti, ANOD, GMA-full 및 GMA-dot의 차이가 나타나지 않았다. 이로부터 표면처리되지 않은 티타늄 디스크(Pristine Ti)과 더불어 양극산화된 티타늄(ANOD), 폴리글리시딜 메타크릴레이트층(GMA-full) 및 도트(Dot) 패턴의 폴리글리시딜 메타크릴레이트층(GMA-dot) 모두 세포독성을 나타내지 않음을 확인하였다.
- [0043] (3) 알칼라인 포스페이트 활성 분석(ALP Assay)
- [0044] 조골세포의 활성(골분화능)을 평가하기 위해서 알칼라인 포스페이트(Alkaline Phosphate, ALP) 활성의 정도를 측정하였다. 지방 유래 줄기세포(ADSCs)를 각각의 Pristine Ti, ANOD, GMA-full 및 GMA-dot 표면에 시딩하여(2×10^4 cells/ml, 24-well plate) 37 $^{\circ}$ C, 5%의 CO₂ 조건의 인큐베이터에서 1주와 2주 동안 배양하였다. 세포를 인산완충식염수(PBS)로 2회 수세한 후, 1 x RIPA 버퍼(50mM Tri-HCl(pH 7.4), 150mM NaCl, 0.25% Deoxycholic acid, 1% NP-40 and 1mM EDTA)에 Protease inhibitor cocktail(Boehringer Mannheim GmbH, Germany)을 추가하

여 얼음 위에서 30분 동안 용해시켰다. 1.3×10^4 RPM으로 원심분리하여 세포 파편을 제거하고 상등액을 수집하여 p-니트로페놀 포스페이트 용액(p-Nitrophenol phosphate solution, pNPP, Sigma)과 37°C, 5%의 CO₂ 조건의 인큐베이터에서 30분 동안 반응시킨 후, 1M, 50 μ l의 수산화나트륨(NaOH)을 첨가하여 반응을 종결시켰다. 마이크로 플레이트 판독기를 사용하여 405nm에서 흡광도를 측정함으로써 p-니트로페놀(p-Nitrophenol) 검출량을 산출하였다. 배양된 세포로부터 생산된 p-니트로페놀(p-Nitrophenol)의 농도는 표준 농도와 흡광도의 검량선과 대비하여 산출되었으며, 그 결과인 알칼라인 포스페이트(ALP) 활성은 분당 μ M/ μ g 단위로 도 12에 도시하였다. 상기 [실시예 3]에서 제조된 도트(Dot) 패턴의 폴리글리시딜 메타크릴레이트층(GMA-dot)의 알칼라인 포스페이트(ALP) 활성이 1주 및 2주 후에 유의하게 가장 높은 것으로 나타났다.

[0045] (4) 칼슘 침착량 분석(Calcium Deposition Assay)

[0046] 골분화능을 평가하기 위해서 지방 유래 줄기세포(ADSCs)를 각각의 Pristine Ti, ANOD, GMA-full 및 GMA-dot 표면에 시딩하여(2×10^4 cells/well) 골원성 배지에서 3주와 4주 동안 배양하였다. 인산완충식염수(PBS)로 2회 수세하고, 3.7%의 포름알데히드를 이용하여 20분 동안 고정한 후, 인산완충식염수(PBS)로 다시 수세하였다. 세포를 37°C, 5%의 CO₂ 조건의 인큐베이터에서 1시간 동안 40mM의 알리자린 레드(Alizarin red, pH 4.2)로 염색하고 1시간 후에 제거하여 증류수로 3회 수세하였다. 정량분석을 위해 염색된 세포를 10%의 1-헥사데실피리디늄 클로라이드(1-Hexadecylpyridinium chloride)를 통하여 얻어내고, 마이크로 플레이트 판독기를 이용하여 540nm에서의 흡광도를 측정함으로써 칼슘 침착량을 조사하였다. 도 13에 도시된 바와 같이, 패턴이 되지 않은 [실시예 2]의 폴리글리시딜 메타크릴레이트층(GMA-full)과 상기 [실시예 3]에서 제조된 도트(Dot) 패턴의 폴리글리시딜 메타크릴레이트층(GMA-dot)에서 양극산화된 티타늄(ANOD)에 비해 3주 및 4주 후에도 칼슘 침착량이 유의하게 증가하였다.

[0047] 결론

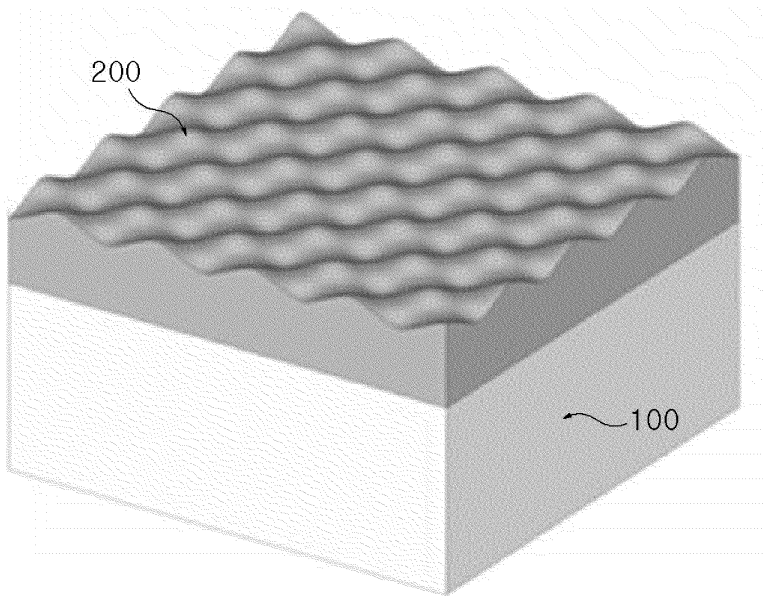
[0048] 임플란트 소재인 티타늄에 양극산화를 실시하여 표면에 요철을 부여한 뒤, 상기 요철이 부여된 양극산화면에 글리시딜 메타크릴레이트(GMA)를 개시화학증착공정(iCVD)을 이용해서 고분자 나노층을 형성한 결과, 단백질 흡착량이 증가하였으며, 또한 세포독성 없이 알칼라인 포스페이트(ALP) 활성 및 칼슘 침착량 또한 증가하는 것으로 나타났다. 특히 도트 패턴의 폴리글리시딜 메타크릴레이트층(GMA-dot)은 초기 골분화능의 지표인 알칼라인 포스페이트(ALP) 활성에서 현저한 증가를 보였다. 따라서, 본 발명의 폴리글리시딜 메타크릴레이트층을 적용하면, 임플란트 시술시 세포, 단백질 부착량 및 골분화능을 향상시킬 수 있을 뿐만 아니라 빠른 골분화능 또한 기대할 수 있다.

부호의 설명

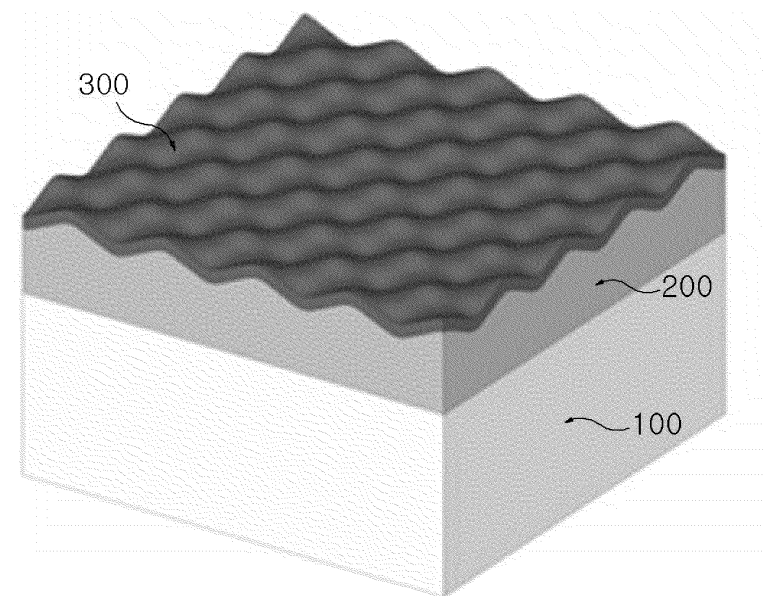
- [0049] 100. 임플란트 소재, 베이스층
200. 산화막층
300. 고분자 나노층
310. 도트 패턴의 마스크

도면

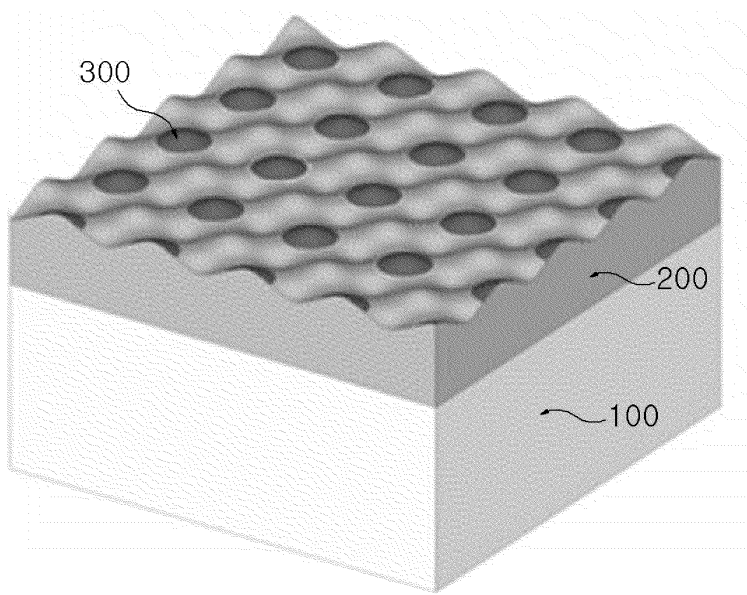
도면1



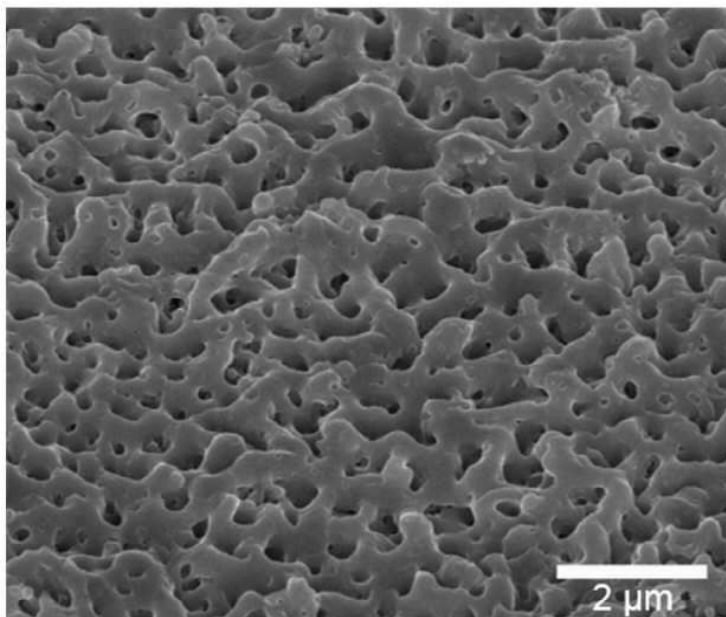
도면2



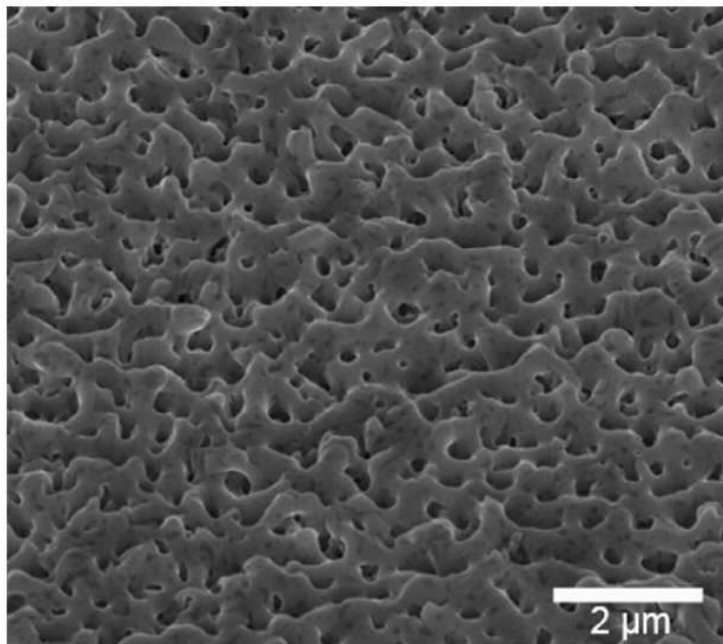
도면3



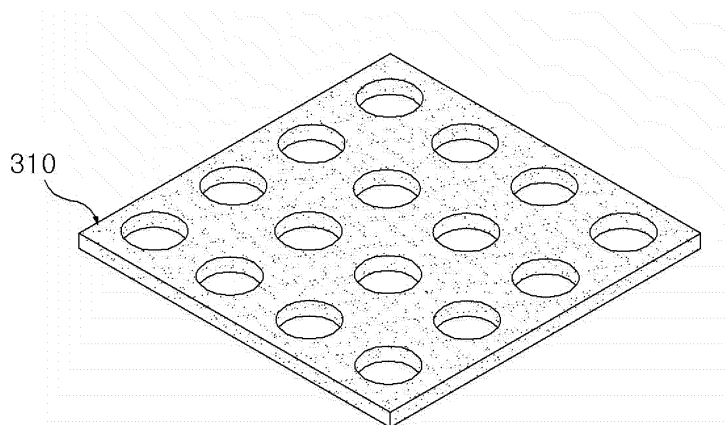
도면4



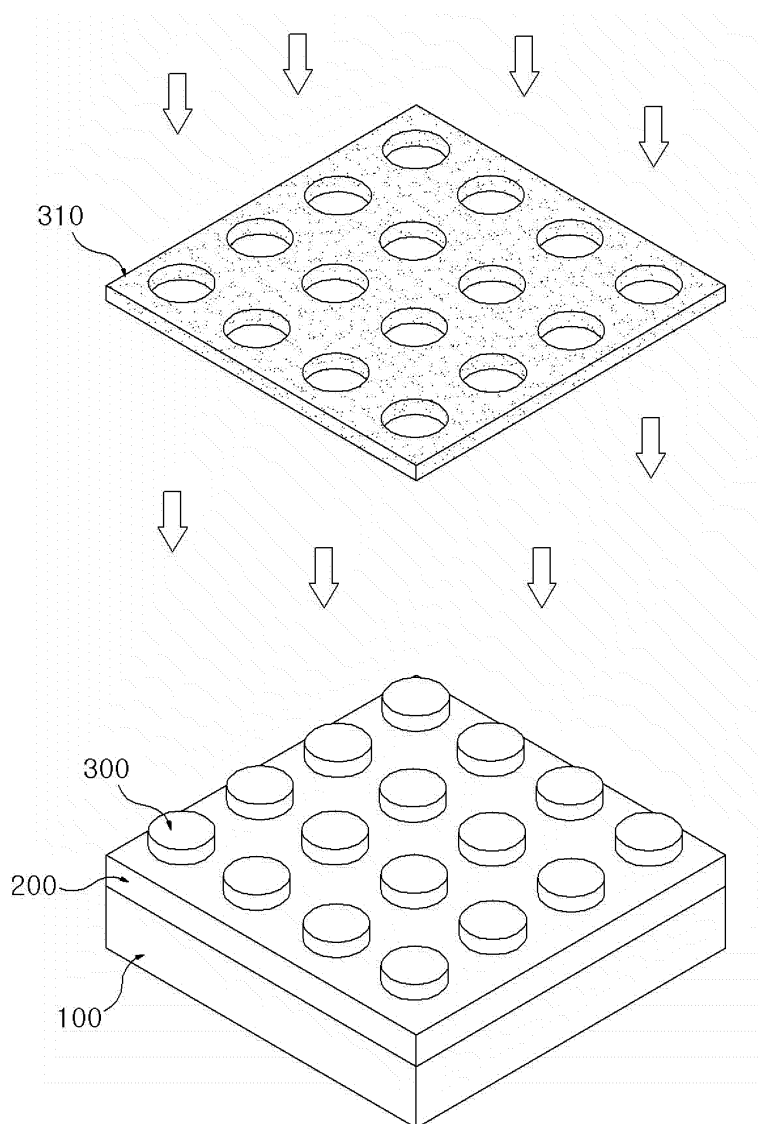
도면5



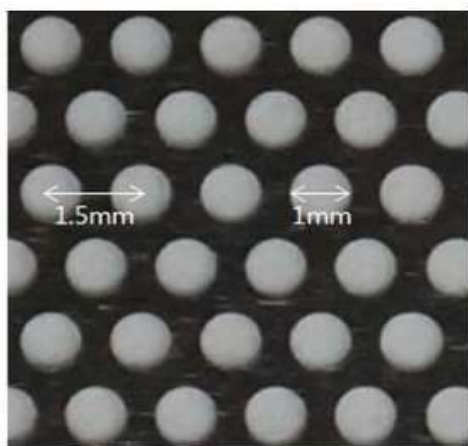
도면6



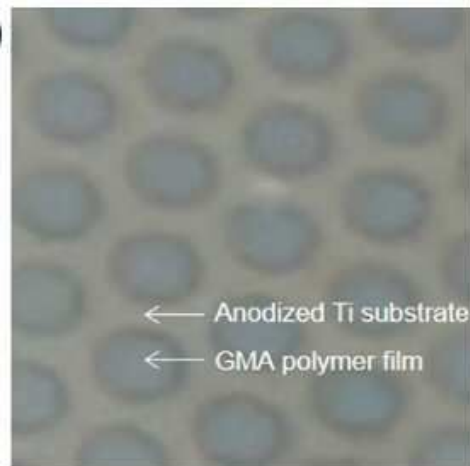
도면7



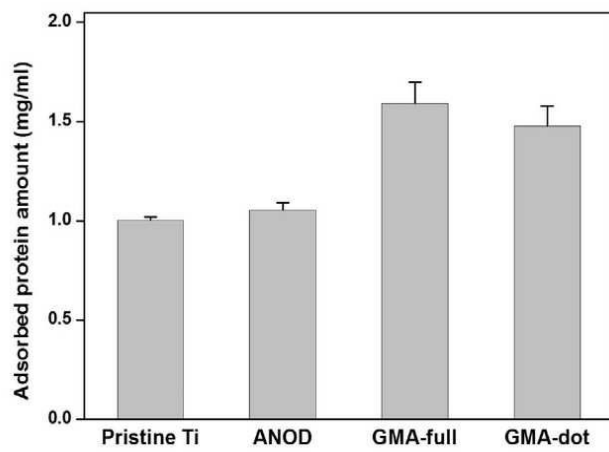
도면8



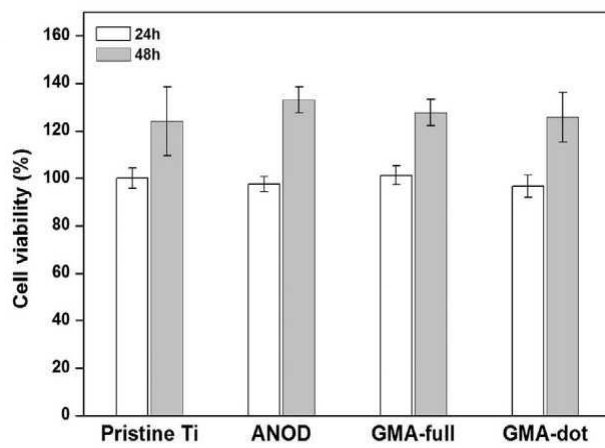
도면9



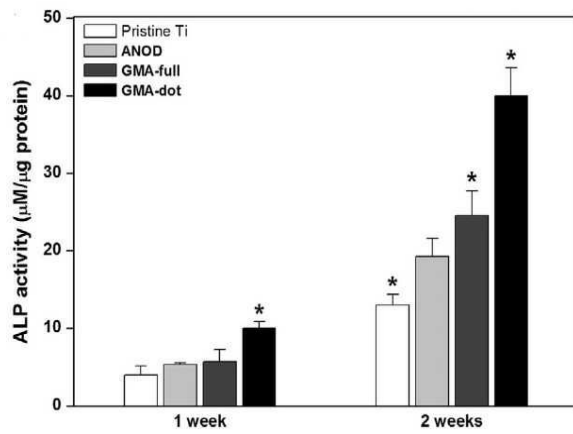
도면10



도면11



도면12



도면13

