



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0032642
(43) 공개일자 2025년03월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61L 27/18 (2006.01) A61L 27/54 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61L 27/18 (2013.01)
A61L 27/54 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0115735
(22) 출원일자 2023년08월31일
심사청구일자 2023년08월31일

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 조선대길 126(서석동, 산학협력단)
(72) 발명자
조승환
광주광역시 남구 제석로80번안길 11 (봉선동, 한국아텔리움1단지아파트)
(74) 대리인
특허법인(유)남아이피그룹, 특허법인 남앤남

전체 청구항 수 : 총 20 항

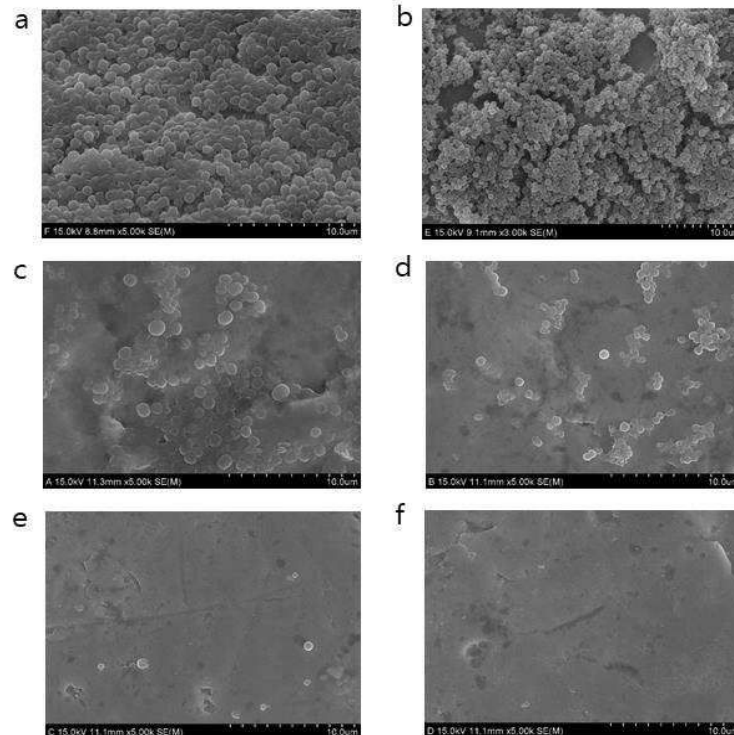
(54) 발명의 명칭 감염 방지 활성을 갖는 생체 인공 삽입물 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 감염 방지 활성을 갖는 생체 인공 삽입물 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명은, 생체 삽입용 기재; 및 상기 기재의 상부에 형성되는 다층의 폴리머층;을 포함하고, 상기 다층의 폴리머층은 각각 하한 임계 용액 온도(LCST)를 가지는 온도 감응성 폴리머층이며, 상기 폴리머층에는 약물을 포함하는 것을 특징

(뒷면에 계속)

대표도 - 도10



으로 하는 감염 방지 활성을 갖는 생체 인공 삽입물에 관한 것이고, 또한 본 발명은, (1) 생체 삽입용 기재의 표면에 하한 임계 용액 온도(LCST)를 가지는 복수의 서로 다른 폴리머층을 적층하는 단계; 및 (2) 상기 복수의 서로 다른 폴리머층에 약물을 로딩하는 단계를 포함하는 감염 방지 활성을 갖는 생체 인공 삽입물의 제조방법 및 (1) 생체 삽입용 기재의 표면에 하한 임계 용액 온도(LCST)를 가지는 온도 감응성 폴리머층을 중합하는 단계; (2) 상기 중합된 온도 감응성 폴리머층에 약물을 로딩하는 단계; 및 (3) 상기 약물이 로딩된 폴리머층에 약물이 로딩된 하한 임계 용액 온도(LCST)를 가지며 상기 폴리머층과는 다른 종류의 고분자로 중합된 공중합체를 함유한 폴리머층을 적층하는 단계를 포함하는 감염 방지 활성을 갖는 생체 인공 삽입물의 제조방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61L 2300/404 (2013.01)

A61L 2420/08 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711090555
과제번호	2017R1C1B2008511
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	온도 감응 고분자-브러시를 이용한 정형외과적 항생제 방출 시스템의 개발 및 응용
기 여 율	1/1
과제수행기관명	조선대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

생체 삽입용 기재; 및

상기 기재의 상부에 형성되는 다층의 폴리머층;을 포함하고,

상기 다층의 폴리머층은 각각 하한 임계 용액 온도(LCST)를 가지는 온도 감응성 폴리머층이며,

상기 폴리머층에는 약물을 포함하는 것을 특징으로 하는, 감염 방지 활성을 갖는 생체 인공 삽입물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 다층의 폴리머층은 2개 이상의 폴리머층인 것을 특징으로 하는, 감염 방지 활성을 갖는 생체 인공 삽입물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 다층의 폴리머층은 서로 다른 종류의 고분자로 중합된 공중합체를 함유한 폴리머층이 교번하면서 복수 개의 층으로 형성된 것을 특징으로 하는, 감염 방지 활성을 갖는 생체 인공 삽입물.

청구항 4

제3항에 있어서,

서로 다른 종류의 고분자로 중합된 공중합체는 DEGMA/OEGMA 공중합체 또는 HEMA/OEGMA 공중합체인 것을 특징으로 하는, 감염 방지 활성을 갖는 생체 인공 삽입물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 하한 임계 용액 온도(LCST)는 37℃~40℃인 것을 특징으로 하는, 감염 방지 활성을 갖는 생체 인공 삽입물.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 DEGMA/OEGMA 공중합체를 포함하는 폴리머층에는 소수성 약물이 함유되어 있고, 상기 HEMA/OEGMA 공중합체를 포함하는 폴리머층에는 친수성 약물이 함유되어 있는 것을 특징으로 하는, 감염 방지 활성을 갖는 생체 인공 삽입물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 약물은 Gentamycin, Levofloxacin, Vancomycin, Linexolid, Erythromycin 및 Rifampin 으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 항생제인 것을 특징으로 하는, 감염 방지 활성을 갖는 생체 인공 삽입물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 다층의 폴리머층 각각에 대한 하한 임계 용액 온도(LCST)는 생체 삽입용 기재로부터 외각으로 갈수록 상대적으로 낮은 것을 특징으로 하는, 감염 방지 활성을 갖는 생체 인공 삽입물.

청구항 9

- (1) 생체 삽입용 기재의 표면에 하한 임계 용액 온도(LCST)를 가지는 복수의 서로 다른 폴리머층을 적층하는 단계; 및
- (2) 상기 복수의 서로 다른 폴리머층에 약물을 로딩하는 단계를 포함하는, 감염 방지 활성을 갖는 생체 인공 삽입물의 제조방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 복수의 서로 다른 폴리머층은 서로 다른 종류의 고분자로 중합된 공중합체를 함유한 폴리머층을 교번하면서 2개 이상의 층으로 적층하는 것을 특징으로 하는, 감염 방지 활성을 갖는 생체 인공 삽입물의 제조방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 서로 다른 종류의 고분자로 중합된 공중합체는 DEGMA/OEGMA 공중합체 또는 HEMA/OEGMA 공중합체인 것을 특징으로 하는, 감염 방지 활성을 갖는 생체 인공 삽입물의 제조방법.

청구항 12

제9항에 있어서,

상기 (2) 단계의 약물을 로딩하는 것은 상기 약물을 포함하는 용액에 상기 복수의 서로 다른 폴리머층을 함침하는 방법으로 수행하는 것을 특징으로 하는, 감염 방지 활성을 갖는 생체 인공 삽입물의 제조방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 함침은 상기 약물을 포함하는 용액의 온도를 상기 복수의 서로 다른 폴리머층의 하한 임계 용액 온도(LCST) 이상으로 상승시킨 후, 상기 하한 임계 용액 온도(LCST) 이하로 냉각시켜 수행하는 것을 특징으로 하는, 감염 방지 활성을 갖는 생체 인공 삽입물의 제조방법.

청구항 14

제9항에 있어서,

상기 하한 임계 용액 온도(LCST)는 37℃~40℃인 것을 특징으로 하는, 감염 방지 활성을 갖는 생체 인공 삽입물의 제조방법.

청구항 15

제11항에 있어서,

상기 DEGMA/OEGMA 공중합체를 포함하는 폴리머층에는 소수성 약물을 로딩하고, 상기 HEMA/OEGMA 공중합체를 포함하는 폴리머층에는 친수성 약물을 로딩하는 것을 특징으로 하는, 감염 방지 활성을 갖는 생체 인공 삽입물의 제조방법.

청구항 16

제9항에 있어서,

상기 약물은 Gentamycin, Levofloxacin, Vancomycin, Linexolid, Erythromycin 및 Rifampin 으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 항생제인 것을 특징으로 하는, 감염 방지 활성을 갖는 생체 인공 삽입물의 제조방법.

청구항 17

- (1) 생체 삽입용 기재의 표면에 하한 임계 용액 온도(LCST)를 가지는 온도 감응성 폴리머층을 중합하는 단계;
- (2) 상기 중합된 온도 감응성 폴리머층에 약물을 로딩하는 단계; 및
- (3) 상기 약물이 로딩된 폴리머층에 약물이 로딩된 하한 임계 용액 온도(LCST)를 가지며 상기 폴리머층과는 다른 종류의 고분자로 중합된 공중합체를 함유한 폴리머층을 적층하는 단계;를 포함하는, 감염 방지 활성을 갖는 생체 인공 삽입물의 제조방법.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 (1) 내지 (3)단계를 반복 수행하여 생체 삽입용 기재의 표면에 서로 다른 종류의 고분자로 중합된 공중합체를 함유한 폴리머층이 2개 이상의 복수의 층으로 형성하는 것을 특징으로 하는, 감염 방지 활성을 갖는 생체 인공 삽입물의 제조방법.

청구항 19

제17항에 있어서,

약물을 로딩하는 단계는, 상기 약물을 포함하는 용액에 상기 폴리머층을 함침하여 수행하거나, 또는 약물을 포함하는 용액을 상기 폴리머층에 도포하는 방법으로 수행하는 것을 특징으로 하는, 감염 방지 활성을 갖는 생체 인공 삽입물의 제조방법.

청구항 20

제17항에 있어서,

상기 약물은 Gentamycin, Levofloxacin, Vancomycin, Linexolid, Erythromycin 및 Rifampin으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 항생제인 것을 특징으로 하는, 감염 방지 활성을 갖는 생체 인공 삽입물의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 감염 방지 활성을 갖는 생체 인공 삽입물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 인구의 고령화로 인하여 사고 및 노화로 인한 골절에 따른 금속판 수술, 인공 관절 임플란트 기술뿐만 아니라 건강을 위한 치아 임플란트 기술이 증가하고 있다. 또한, 페이스메이커와 같은 생체 삽입형 기기의 착용을 위한 기술도 증가하고 있다.

[0003] 이러한 기술에 뒤따르는 주요한 위험 요인으로 생체 인공 삽입물의 표면에 미생물(박테리아)이 부착되어 생성되는 바이오 필름을 들 수 있다. 이러한 바이오 필름이 형성되고 나면 필름 내부 미생물(박테리아) 등에 약물의 적용이 제한적이어서 치료가 어렵고, 재수술의 원인이 된다.

[0004] 종래에는 이러한 생체 인공 삽입물의 표면에 코팅 등을 통해 항균 성능을 부여하려는 시도가 있었으나, 코팅 두께의 제한 등으로 인한 항생제의 로딩량 등에 한계가 있어 크게 효과를 기대하기가 어려웠다.

[0005] 따라서 기술 부위에서 감염이 발생하는 경우 항생제 등의 약물이 방출되면서 바이오 필름을 억제할 수 있는 기술 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 10-2020-0060037

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 이에 본 발명자들은 생체 삽입용 기재의 표면에 다층 구조의 온도 감응성(온도 반응형) 폴리머에 항생제 등의 약물을 로딩하여 코팅할 경우, 일정 온도 이상에서 상기 약물이 방출됨으로써 수술 후 체내에서 발생할 수 있는 염증 또는 감염에 의한 증상을 효과적으로 예방, 개선 및 치료할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0008] 그러므로 본 발명의 목적은, 생체 삽입용 기재; 및 상기 기재의 상부에 형성되는 다층의 폴리머층;을 포함하고, 상기 다층의 폴리머층은 각각 하한 임계 용액 온도(LCST)를 가지는 온도 감응성 폴리머층이며, 상기 폴리머층에는 약물을 포함하는 것을 특징으로 하는, 감염 방지 활성을 갖는 생체 인공 삽입물을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은, (1) 생체 삽입용 기재의 표면에 하한 임계 용액 온도(LCST)를 가지는 복수의 서로 다른 폴리머층을 적층하는 단계; 및 (2) 상기 복수의 서로 다른 폴리머층에 약물을 로딩하는 단계를 포함하는, 감염 방지 활성을 갖는 생체 인공 삽입물의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은, (1) 생체 삽입용 기재의 표면에 하한 임계 용액 온도(LCST)를 가지는 온도 감응성 폴리머층을 중합하는 단계; (2) 상기 중합된 온도 감응성 폴리머층에 약물을 로딩하는 단계; 및 (3) 상기 약물이 로딩된 폴리머층에 약물이 로딩된 하한 임계 용액 온도(LCST)를 가지며 상기 폴리머층과는 다른 종류의 고분자로 중합된 공중합체를 함유한 폴리머층을 적층하는 단계;를 포함하는, 감염 방지 활성을 갖는 생체 인공 삽입물의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해 본 발명은, 생체 삽입용 기재; 및 상기 기재의 상부에 형성되는 다층의 폴리머층;을 포함하고, 상기 다층의 폴리머층은 각각 하한 임계 용액 온도(LCST)를 가지는 온도 감응성 폴리머층이며, 상기 폴리머층에는 약물을 포함하는 것을 특징으로 하는, 감염 방지 활성을 갖는 생체 인공 삽입물을 제공한다.
- [0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 다층의 폴리머층은 2개 이상의 폴리머층일 수 있다.
- [0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 다층의 폴리머층은 서로 다른 종류의 고분자로 중합된 공중합체를 함유한 폴리머층이 교번하면서 복수 개의 층으로 형성된 것일 수 있다.
- [0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 서로 다른 종류의 고분자로 중합된 공중합체는 DEGM/OEGMA 공중합체 또는 HEMA/OEGMA 공중합체일 수 있다.
- [0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 하한 임계 용액 온도(LCST)는 37℃~40℃일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 DEGM/OEGMA 공중합체를 포함하는 폴리머층에는 소수성 약물이 함유되어 있고, 상기 HEMA/OEGMA 공중합체를 포함하는 폴리머층에는 친수성 약물이 함유되어 있는 것일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 약물은 Gentamycin, Levofloxacin, Vancomycin, Linexolid, Erythromycin 및 Rifampin 으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 항생제일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 다층의 폴리머층 각각에 대한 하한 임계 용액 온도(LCST)는 생체 삽입용 기재로부터 외각으로 갈수록 상대적으로 낮은 것일 수 있다.
- [0019] 또한 본 발명은, (1) 생체 삽입용 기재의 표면에 하한 임계 용액 온도(LCST)를 가지는 복수의 서로 다른 폴리머층을 적층하는 단계; 및 (2) 상기 복수의 서로 다른 폴리머층에 약물을 로딩하는 단계를 포함하는, 감염 방지 활성을 갖는 생체 인공 삽입물의 제조방법을 제공한다.
- [0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 복수의 서로 다른 폴리머층은 서로 다른 종류의 고분자로 중합된 공중합체를 함유한 폴리머층을 교번하면서 2개 이상의 층으로 적층하는 것일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 서로 다른 종류의 고분자로 중합된 공중합체는 DEGM/OEGMA 공중합체 또는 HEMA/OEGMA 공중합체일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 (2) 단계의 약물을 로딩하는 것은 상기 약물을 포함하는 용액에 상기 복수

의 서로 다른 폴리머층을 함침하는 방법으로 수행하는 것일 수 있다.

- [0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 함침은 상기 약물을 포함하는 용액의 온도를 상기 복수의 서로 다른 폴리머층의 하한 임계 용액 온도(LCST) 이상으로 상승시킨 후, 상기 하한 임계 용액 온도(LCST) 이하로 냉각시켜 수행하는 것일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 하한 임계 용액 온도(LCST)는 37℃~40℃인 것일 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 DEGM/OEGMA 공중합체를 포함하는 폴리머층에는 소수성 약물을 로딩하고, 상기 HEMA/OEGMA 공중합체를 포함하는 폴리머층에는 친수성 약물을 로딩하는 것일 수 있다.
- [0026] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 약물은 Gentamycin, Levofloxacin, Vancomycin, Linexolid, Erythromycin 및 Rifampin 으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 항생제일 수 있다.
- [0027] 또한 본 발명은, (1) 생체 삽입용 기재의 표면에 하한 임계 용액 온도(LCST)를 가지는 온도 감응성 폴리머층을 중합하는 단계; (2) 상기 중합된 온도 감응성 폴리머층에 약물을 로딩하는 단계; 및 (3) 상기 약물이 로딩된 폴리머층에 약물이 로딩된 하한 임계 용액 온도(LCST)를 가지며 상기 폴리머층과는 다른 종류의 고분자로 중합된 공중합체를 함유한 폴리머층을 적층하는 단계;를 포함하는, 감염 방지 활성을 갖는 생체 인공 삽입물의 제조방법을 제공한다.
- [0028] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 (1) 내지 (3)단계를 반복 수행하여 생체 삽입용 기재의 표면에 서로 다른 종류의 고분자로 중합된 공중합체를 함유한 폴리머층이 2개 이상의 복수의 층으로 형성하는 것일 수 있다.
- [0029] 본 발명의 일실시예에 있어서, 약물을 로딩하는 단계는, 상기 약물을 포함하는 용액에 상기 폴리머층을 함침하여 수행하거나, 또는 약물을 포함하는 용액을 상기 폴리머층에 도포하는 방법으로 수행하는 것일 수 있다.
- [0030] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 약물은 Gentamycin, Levofloxacin, Vancomycin, Linexolid, Erythromycin 및 Rifampin으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 항생제일 수 있다.

발명의 효과

- [0031] 본 발명의 생체 인공 삽입물은 온도 감응성 폴리머를 포함하고 있어, 유해 세균 감염 등에 의해 체내에서 염증 반응이 발생하여 정상 체온 이상으로 온도가 올라가는 경우, 폴리머층에 포함된 약물이 방출되어 바이오 필름의 형성을 저해하는 등 염증 및 감염의 증상을 예방, 개선 및 치료할 수 있는 효과를 갖는다.

도면의 간단한 설명

- [0032] 도 1은 본 발명의 일실시예에서 티타늄 임플란트 기재의 표면에 다층 온도 반응형 폴리머 브러시(MLTRPB)의 중합 반응 원리를 나타낸 것으로, (A)는 DEGM₉₀-co-OEGMA₁₀ 및 HEMA₂₀-co-OEGMA₈₀의 화학식을 나타낸 것이고, (B)는 항생제를 사용한 3층 구조의 MLTRPB-Ti 코팅 형태를 나타낸 것이며, (C) 본 발명의 일실시예에서 사용한 항생제에 대한 화학식을 나타낸 것이다.
- 도 2는 MLTRPB 코팅에 대한 항균 효능 분석용 넷트 모델에 관한 것으로, (A) 무균관절 접근에 노출된 대퇴골을 나타낸 것이고, (B) 18g 바늘을 이용하여 골수를 확인한 것이고, (C) 코팅된 나사의 삽입형태를 나타낸 것이며, (D) 임플란트 삽입 수술 후의 x-레이 사진을 나타낸 것이다.
- 도 3은 XPS 측량 스펙트럼을 나타낸 것으로, (A) 티타늄 임플란트 표면에 단층 코팅된 1-MLTRPB에 대한 다층 XPS 데이터이고, (B) 티타늄 임플란트 표면에 2층 코팅된 MLTRPB를 나타낸 것이며(1층: DEGM 풍부, 2층: HEMA 함유), (C) LVF 항생제가 로딩된 3층의 MLTRPB를 나타낸 것이고(LVF 로딩된 3층-MLTRPB: DEGM 풍부) 및 (D) GM 항생제가 로딩된 4층의 MLTRPB를 나타낸 것이다(GM 로드된 4층-MLTRPB: HEMA 함유).
- 도 4는 티타늄 임플란트의 표면에 형성된 MLTRPB에 대한 FT-IR 스펙트럼을 나타낸 것으로, 빨간색 화살표는 OH 벤딩 진동을 나타낸 것이다.
- 도 5는 FE-SEM 분석으로 티타늄 표면 상에 코팅된 MLTRPB의 두께를 관찰한 것으로, (A) 2층-MLTRPB-Ti 임플란트 및 (B) 3-MLTRPB-Ti 임플란트를 나타낸 것이다.
- 도 6은 본 발명의 다층 구조를 갖는 MLTRPB에 대한 SEM 이미지 분석 결과를 나타낸 것으로, (a) 1층 폴리머층(DEGM₉₀/OEGMA₁₀), (b) 2층 폴리머층(HEMA₂₀/OEGMA₈₀)의 단면도를 나타낸 것이고, (c) 다층 구조의 폴리머층이

부착된 임플란트의 단면도이며, (d) 다층 폴리머층이 부착된 임플란트를 액체 질소에 처리하여 깨트린 후, 충격으로 갈라진 부분을 통해 다층의 구조를 확인한 것이며, (e) 6개 층의 구조를 갖는 폴리머층의 두께를 확인한 것이고, (f) (e)를 액체질소 처리하여 깨트린 후, 다층 구조를 확인한 것이며, (g) 고분자 폴리머층을 벗겨낸 후 측정된 폴리머층의 두께를 나타낸 것이다.

도 7은 약물의 방출거동을 분석한 것으로, (A) 40℃에서 티타늄 임플란트 표면의 MLTRPB에서 Milli-Q 물로 방출된 LVF의 양을 분석한 것이고, (B) 서로 다른 온도에서 3층-및 4층-MLTRPB에서 방출된 LVF의 양을 분석한 것이며, (C) 40℃에서 PBS 버퍼-D₂(pH 7.0)로 방출된 GM의 양을 분석한 것이고, (D) 서로 다른 온도에서 4층-MLTRPB로부터 방출된 GM의 양을 분석한 것을 나타낸 것이다.

도 8은 FE-SEM 관찰 사진으로, (A) 티타늄 임플란트 표면 상의 생물막 형성을 관찰한 것이고, (B) LVF 약물이 처리된 4층 구조의 MLTRPB이 코팅된 티타늄 임플란트를 *S. aureus*(10⁷ CFU mL⁻¹) 박테리아와 37℃에서 12시간 동안 함께 배양 후, 임플란트 표면에서의 생물막 형성여부를 관찰한 사진을 나타낸 것이다.

도 9는 항균 활성 분석 결과를 나타낸 것으로, (A) 25℃, 36.5℃ 및 40℃에서 Ti 나사 표면에 코팅된 4층 MLTRPB로부터 방출되는 LVF 또는 GM 항생제에 의한 항균 활성을 분석한 것이고, (B)는 40℃에서 다층 구조(1층, 2층 3층, 4층)의 MLTRPB로부터 방출되는 LVF에 의한 항균 활성을 분석한 것이며, (C) 40℃에서 다층 구조(1층, 2층 3층, 4층)의 MLTRPB로부터 방출되는 GM에 대한 항균 활성을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 10 및 도 11은 MLTRPB가 부착되지 않은 임플란트, 1층의 고분자 폴리머층이 부착된 임플란트 및 항생제가 로딩된 1층, 2층 및 3층 구조를 갖는 MLTRPB가 부착된 임플란트에 대한 항균 활성을 분석한 것으로, 도 10은 각 실험군의 임플란트 표면을 SEM으로 관찰한 사진을 나타낸 것이고, 도 11은 배양 플레이트 상에서 유해 세균의 콜로니 형성정도를 관찰한 사진을 나타낸 것이다.

도 12는 MLTRPB에 대한 세포독성 여부를 세포생존을 분석을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 13은 생체 내에서 본 발명의 MLTRPB에 대한 감염 억제 효과를 확인한 것으로, (A,D)는 MLTRPB를 처리하지 않은 군, (B,E)는 단층의 MLTRPB가 처리된 군, (C,F)는 4층의 MLTRPB가 처리된 군에 대해 피낭주위 조직에서 감염된 무릎부위의 사진과 해당 조직을 현미경으로 관찰한 것으로, 화살촉은 코팅층과 관계없이 염증세포가 두드러지는 고름 형성부위를 나타낸 것이다.

도 14는 본 발명에 따른 다층 구조의 MLTRPB에 대한 유해 박테리아의 항균 활성을 CFUs 측정 결과로 확인한 것이다.

도 15는 항생제(GM 또는 LVF)가 로딩된 HEMA rich 고분자 브러시 및 DEGMA rich 고분자 브러시에 대한 항균 활성을 시간별로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0033] 본 발명은 생체 삽입용 기재를 이용한 시술 후에 종종 발생하는 염증 및 감염에 의한 부작용을 억제할 수 있는 기술에 관한 것으로, 생체 삽입용 기재의 표면에 하한 임계 용액 온도(Low Critical Solution Temperature; LCST)를 가지는 온도 감응성 폴리머층을 다층의 구조로 부착시키고, 상기 폴리머층에 약물을 주입하여 체내에서 온도 변화에 따른 약물 방출을 유도함으로써, 유해 세균 등으로 오염된 생체 삽입용 기재로 야기되는 염증 및 감염을 방지할 수 있는 생체 인공 삽입물을 제공한다는 점에 특징이 있다.
- [0034] 구체적으로 본 발명은, 생체 삽입용 기재; 및 상기 기재의 상부에 형성되는 다층의 폴리머층;을 포함하고, 상기 다층의 폴리머층은 각각 하한 임계 용액 온도(LCST)를 가지는 온도 감응성 폴리머층이며, 상기 폴리머층에는 약물을 포함하는 것을 특징으로 하는, 감염 방지 활성을 갖는 생체 인공 삽입물을 제공할 수 있다.
- [0035] 본 발명에서 상기 ‘하한 임계 용액 온도(LCST; lower critical solution temperature)’는 온도 감응성 폴리머(즉, 온도 감응성 고분자)의 구조 변화가 나타나는 온도를 말하는데, 상기 온도 감응성 폴리머는 외부 온도에 따라서 그 성질이 바뀌는 고분자로서 특정 온도에서 가역적인 졸-겔 상전이(sol-gel phase transition) 또는 부피 상전이(volume phase transition)가 일어난다. 이러한 상전이가 나타나는 온도를 임계 용액 온도(critical solution temperature)라 하고, 상전이에 대한 농도-온도 다이어그램에서 가장 낮은 상전이 온도를 하한 임계 용액 온도(lower critical solution temperature; LCST)라 한다.
- [0036] 또한 본 발명의 일실시예에서는, 본 발명에 따른 다층의 온도 반응형 폴리머층을 MLTRB(multilayered

temperature-responsive polymer brush)라고도 표기하였다.

- [0037] 본 발명에 따른 감염 방지 활성을 갖는 생체 인공 삽입물은 생체 삽입용 기재의 상부, 즉 표면에 다층의 폴리머층이 부착되어 있는데, 각각의 폴리머층은 상기 폴리머층을 구성하는 고분자의 종류 및 함량에 따라 각각 다른 하한 임계 용액 온도를 가질 수 있으며, 상기 폴리머층에는 염증 또는 감염의 증상을 억제, 개선 또는 치료할 수 있는 약물을 포함하고 있다.
- [0038] 이러한 약물은 각각의 폴리머층이 갖는 하한 임계 용액 온도 이상에서 폴리머의 상전이가 일어나면서 약물이 외부로 방출되어진다.
- [0039] 또한, 상기 다층의 폴리머층은 2개 이상의 폴리머층으로, 서로 다른 종류의 고분자 단량체가 중합된 공중합체를 함유한 폴리머층이 교번하면서 복수 개의 층으로 형성된 것일 수 있다.
- [0040] 또한, 서로 다른 종류의 고분자 단량체를 사용하는 경우, 친수성 및 소수성(친유성) 특성을 갖는 단량체를 선택하여 사용함으로써 약물과의 친화도를 조절할 수 있고, 각 폴리머층에 로딩되는 주요 약물을 다르게 구성할 수도 있으며, 약물의 로딩(loading) 양도 조절할 수 있다.
- [0041] 바람직하게, 상기 폴리머층이 친수성의 특성을 갖는 공중합체로 구성된 폴리머층인 경우 친수성의 약물을 주입할 수 있고, 상기 폴리머층이 소수성의 특성을 갖는 공중합체로 구성된 폴리머층인 경우에는 소수성의 약물을 주입할 수 있다.
- [0042] 본 발명의 일실시예에서는, 서로 다른 종류의 DEGM/OEGMA 공중합체 및 HEMA/OEGMA 공중합체를 교번하면서 생체 삽입용 기재의 표면에 순차적으로 적층하여 다층의 폴리머층이 형성되도록 하였으며, 2층 내지 6층의 폴리머층이 형성되도록 제조하였다.
- [0043] 일례로, 다층의 폴리머층으로, 제1 폴리머층은 DEGM/OEGMA 공중합체일 수 있고, 상기 제2 폴리머층은 HEMA/OEGMA 공중합체일 수 있다. 또는, 상기 제1 폴리머층은 HEMA/OEGMA 공중합체일 수 있고, 상기 제2 폴리머층은 DEGM/OEGMA 공중합체일 수 있다. 이처럼 제1 폴리머층과 제2 폴리머층을 다른 종류의 공중합체가 되도록 하면서 복수로 적층하여 다층의 폴리머층을 형성하였다.
- [0044] 여기서 상기 DEGM(di(ethyleneglycol) methyl ether methacrylate)는 무독성, 생체 적합성 및 단백질 저항성 고분자 단량체로, OEGMA(oligo(ethyleneglycol) methyl ether methacrylate)와의 공중합을 통해 LCST를 조절할 수 있다. 또한, HEMA(2-hydroxyethyl methacrylate)는 미국 FDA 의료용 인증 물질로, 치과, 안과 및 조직공학에서 혈액투석막, 임플란트 생산용 및 세포 또는 약물의 고정을 위해 다양한 형태로 사용되고 있다.
- [0045] 또한, 본 발명에서 DEGM/OEGMA 공중합체를 포함하는 폴리머층에는 소수성 약물이 함유되어 있고, 상기 HEMA/OEGMA 공중합체를 포함하는 폴리머층에는 친수성 약물이 함유되도록 하였다.
- [0046] 본 발명에서 상기 약물은 염증 또는 감염질환의 원인이 되는 유해 세균을 사멸시키거나 세균의 성장을 억제할 수 있는 항생제일 수 있고, 상기 항생제로는 이에 제한되지는 않으나, Gentamycin, Levofloxacin, Vancomycin, Linexolid, Erythromycin 및 Rifampin 으로 이루어진 군 중에서 선택될 수 있다.
- [0047] 본 발명의 일실시예에서는, 공중합체를 구성하는 고분자의 종류와 약물 종류의 선택이 유해 세균에 대한 항균 활성에 어떠한 영향을 주는지 분석하였는데, 친수성 약물인 Gentamycin을 수용성기가 큰 고분자인 HEMA/OEGMA 폴리머층에 주입한 경우가 소수성기가 큰 고분자인 DEGM/OEGMA 폴리머층에 주입한 경우에 비해 항균 활성이 더 우수한 것으로 확인되었고, 반면 소수성 약물인 Levofloxacin는 소수성기가 큰 고분자인 DEGM/OEGMA 폴리머층에 주입한 경우가 수용성기가 큰 고분자인 HEMA/OEGMA 폴리머층에 주입한 경우에 비해 더 우수한 항균 활성을 보이는 것으로 확인되었다.
- [0048] 따라서 우수한 항균 활성의 유도하기 위해서는 친수성이 큰 폴리머층에는 친수성 약물을, 소수성이 큰 폴리머층에는 소수성 약물이 포함되도록 하는 것이 바람직하다.
- [0049] 상기 하한 임계 용액 온도(LCST)는 각 폴리머층의 고분자 단량체의 비율을 조절함으로써 설정이 가능하고, 필요로 하는 온도에 맞춰 설계할 수 있다. 본 발명에서는 유해 세균 등에 의해 체내 염증 반응이 시작될 경우, 인체의 정상 체온인 36.5℃ 보다 높은 온도로 열이 발생하므로 37℃ 내지 40℃ 범위에서 하한 임계 용액 온도를 설계할 수 있지만, 이것만으로 한정되지는 않는다. 만약 37℃ 미만의 온도에서 폴리머의 상전이가 일어나면 정상 체온에서도 항생제 등의 약물이 방출될 수 있고, 40℃ 초과 온도에서 폴리머의 상전이가 일어나면 이미 염증 반응이 지속되어 바이오 필름이 형성되어 효용을 나타내기 어려울 수 있다.

- [0050] 이러한 하한 임계 용액 온도는 DEGMa, OEGMA 또는 HEMA의 사용 함량에 따라, 상기 고분자들로 중합되는 공중합체의 하한 임계 용액 온도를 조정할 수 있다.
- [0051] DEGMa-OEGMA 공중합체는 DEGMa 85 mol% 내지 99.9 mol% 범위, OEGMA 15 mol% 내지 0.1 mol% 범위로 공중합체를 형성할 수 있다. 또한, HEMA-OEGMA 공중합체는 HEMA 5 mol% 내지 40 mol% 범위, OEGMA 95 mol% 내지 60 mol% 범위로 공중합체를 형성할 수 있다. 본 발명의 일실시예에서는 DEGMa-OEGMA 공중합체는 DEGMa 90 mol% 및 OEGMA 10 mol%로 공중합체를 형성하였고, HEMA-OEGMA 공중합체는 HEMA 20 mol% 및 OEGMA 80 mol%로 공중합체를 형성하였다.
- [0052] 또한 본 발명에 따른 상기 다층의 폴리머층 각각에 대한 하한 임계 용액 온도(LCST)는 생체 삽입용 기재로부터 외각으로 갈수록 상대적으로 낮은 특징을 갖는다.
- [0053] 예를 들면, 생체 삽입용 기재의 표면 바로 위에 형성된 제1 폴리머층은 상기 제1 폴리머층의 위에 형성된 제2 폴리머층 대비 LCST가 상대적으로 더 높을 수 있다. 이 경우, 최외각에 위치하는 제2 폴리머층이 먼저 상전이를 진행하면서 상기 제2 폴리머층 내부의 약물이 방출되고, 이후 온도가 더 높아지는 경우 내부의 제1 폴리머층이 상전이를 진행하여 제1 폴리머층 내부의 약물이 방출되도록 함으로써, 약물의 서방성 효과를 극대화시킬 수 있다.
- [0054] 즉, 생체 삽입용 기재의 표면에서부터 최외각에 위치한 폴리머층이 가장 낮은 LCST를 가지며, 반면 상기 기재의 표면에 가까운 곳에 위치한 폴리머층 일수록 상대적으로 높은 LCST를 가지게 함으로써, 약물의 서방성 효과를 극대화하고 항생제 내성 등의 부작용을 억제할 수 있다.
- [0055] 나아가 본 발명은, (1) 생체 삽입용 기재의 표면에 하한 임계 용액 온도(LCST)를 가지는 복수의 서로 다른 폴리머층을 적층하는 단계; 및 (2) 상기 복수의 서로 다른 폴리머층에 약물을 로딩하는 단계를 포함하는, 감염 방지 활성을 갖는 생체 인공 삽입물의 제조방법을 제공할 수 있다.
- [0056] 상기 복수의 서로 다른 폴리머층은 서로 다른 종류의 고분자로 중합된 공중합체를 함유한 폴리머층을 교번하면서 2개 이상의 층으로 적층될 수 있다.
- [0057] 상기 고분자로 중합된 공중합체를 함유한 폴리머층은 고분자를 이용한 원자 전이 라디칼 중합(Atomic Transfer Radical Polymerization; ATRP) 방법으로 제조할 수 있으며, 원자 전이 라디칼 중합을 이용할 경우, 각 폴리머 체인의 길이가 일정하여 PDI(polymer distribution index)가 1에 가까워 상기 생체 삽입용 기재의 표면에서 성장시킬 경우, 매끈한 표면을 얻을 수 있다.
- [0058] 본 발명의 일실시예에서는 서로 다른 종류의 고분자로 중합된 공중합체인 DEGMa/OEGMA 및 HEMA/OEGMA을 이용하여 2층, 3층, 4층, 5층 및 6층의 다층 폴리머층을 제조하였다.
- [0059] 본 발명에서 상기 폴리머층의 중합에 따른 복수의 서로 다른 폴리머층의 적층은, 각각의 공중합체 용액중합 반응기를 준비하고 상기 생체 삽입용 기재를 순차적으로 담구어 진행할 수 있다. 3개 이상의 층을 형성하는 경우에는 상기 각각의 공중합체 용액중합 반응기에 상기 생체 삽입용 기재를 교대로 담구어 진행할 수 있다. 하나의 예에서, 동일한 단량체를 사용하더라도 함량을 다르게 한 공중합체 용액중합 반응기를 준비하고, 순차적으로 담구어 복수 개의 폴리머층을 형성하는 경우에는 각 층의 LCST를 다르게 설정할 수도 있다.
- [0060] 또한, 상기 폴리머층에 약물을 로딩하는 단계는, 상기 약물을 포함하는 용액에 상기 복수의 폴리머층을 함침하여 이루어질 수 있다.
- [0061] 상기 함침하는 과정에서, 상기 약물을 포함하는 용액의 온도를 상기 복수의 서로 다른 폴리머층의 하한 임계 용액 온도(LCST) 이상으로 상승시킨 후, 상기 하한 임계 용액 온도(LCST) 이하로 냉각할 수 있다. 이 경우 하한 임계 용액 온도 이상에서는 상기 폴리머층이 상전이를 거쳐 부피가 팽창되어 내부로 약물이 잘 로딩될 수 있고, 냉각 시 각 폴리머층 내부에 상기 약물이 위치한 상태로 역 상전이를 통해 부피가 축소되어 상기 약물의 로딩량이 증가할 수 있다.
- [0062] 상기 약물은 항생제일 수 있고, 상기 항생제로는 이에 제한되지는 않으나, Gentamycin, Levofloxacin, Vancomycin, Linezolid, Erythromycin 및 Rifampin 등이 사용될 수 있으며, 온도 감응성 폴리머의 종류에 따라 선택하여 사용할 수 있다. 또한 본 발명은 또 다른 방법의 감염 방지 활성을 갖는 생체 인공 삽입물 제조방법을 제공할 수 있는데, 상기 방법은, (1) 생체 삽입용 기재의 표면에 하한 임계 용액 온도(LCST)를 가지는 온도 감응성 폴리머층을 중합하는 단계; (2) 상기 중합된 온도 감응성 폴리머층에 약물을 로딩하는 단계; 및 (3) 상기 약물이 로딩된 폴리머층에 약물이 로딩된 하한 임계 용액 온도(LCST)를 가지며 상기 폴리머층과는 다른 중

류의 고분자로 중합된 공중합체를 함유한 폴리머층을 적층하는 단계를 포함한다.

- [0063] 여기서 상기 (1) 내지 (3) 단계를 반복 수행하여 생체 삽입용 기재의 표면에 서로 다른 종류의 고분자로 중합된 공중합체를 함유한 폴리머층이 2개 이상의 복수의 층으로 형성할 수 있다.
- [0064] 또한 상기 중합은 앞서 기술한 바와 같이, 원자 전이 라디칼 중합(Atomic Transfer Radical Polymerization; ATRP) 방법으로 수행할 수 있다.
- [0065] 상기 약물을 로딩(loading)하는 단계는, 상기 약물을 포함하는 용액에 상기 폴리머층을 함침하여 수행하거나 또는 약물을 포함하는 용액을 상기 폴리머층에 도포하는 방법으로 수행할 수 있다.
- [0066] 또한 상기 함침하는 과정에서, 상기 약물을 포함하는 용액의 온도를 상기 폴리머층의 하한 임계 용액 온도(LCST) 이상으로 상승시킨 후 상기 폴리머층의 하한 임계 용액 온도(LCST) 이하로 냉각할 수 있다. 이 경우 하한 임계 용액 온도 이상에서 상기 폴리머층이 상전이를 거쳐 부피가 팽창되어 내부로 약물이 잘 로딩될 수 있고, 냉각 시 상기 폴리머층 내부에 상기 약물이 위치한 상태로 역 상전이를 통해 부피가 축소되어 상기 약물의 로딩 양이 증가할 수 있다.
- [0067] 또한 상기 약물은 앞서 기술한 바와 같이, 항생제일 수 있고, 상기 항생제로는 이에 제한되지는 않으나, Gentamycin, Levofloxacin, Vancomycin, Linexolid, Erythromycin 및 Rifampin 등이 사용될 수 있으며, 온도 감응성 폴리머의 종류에 따라 선택하여 사용할 수 있다.
- [0068] 본 발명에서 상기 생체 인공 삽입용 기재는 인공 관절, 치아 임플란트 등 체내로 주입할 수 있는 기재를 모두 포함할 수 있고, 각기 다양한 형태의 기재를 모두 포함할 수 있으며, 기재의 형태는 플레이트, 나사 및 위셔 등 일 수 있다.
- [0069] 본 발명의 일실시예에서는 티타늄 플레이트를 사용하였다.
- [0071] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0073] <준비에 및 실험방법>

- [0074] 티타늄(Ti) 임플란트의 다층 온도 반응형 폴리머 브러시(MLTRPB; multi-layered temperature-responsive polymer brush)는 폴리(에틸렌 글리콜)을 사용하여 제조하였다. 메틸 에테르 메타크릴레이트(OEGMA, Aldrich, Mn; 300g/mol), 디(에틸렌 글리콜) 메틸 에테르 메타크릴레이트(DEGMA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, Mw; 188.22g/mol) 및 2-하이드록시에틸 메타크릴레이트(HEMA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)은 원자 이동 라디칼 중합(ATRP)에 사용되었다. Levofloxacin(LVF, USP, Israel) 및 gentamycin(GM, 40 mg/mL, Shinpoong Pharmaceutical Co., Ltd., Seoul, Korea)은 MLTRPB의 효과 테스트에 사용하였다. 두 약제 모두 다양한 유형의 그람 양성 및 그람 음성 박테리아, 특히 정형외과 분야에서 이식 후 가장 흔한 병원균인 S aureus 균주에 대해 항균 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

[0076] (1) 티타늄 기재 표면 상에 MLTRPB의 형성

- [0077] 티타늄 합금(Ti-6Al-4V) 임플란트 상에 MLTRPB의 제조를 위해, Ti 임플란트의 표면을 전자 전달 기술(SI-ARGET ATRP)로 재생된 활성화제로 표면 개시 원자 전달 라디칼 중합 처리하였다. MLTRPB는 서로 다른 2종류의 Ti 임플란트 상에 제조되었는데, (1) 디스크 타입 티타늄 플레이트(10mm 직경 및 1mm 두께, 1,57314 cm³ 면적)를 이용하여 코팅된 MLTRPB의 양과 두께를 측정하였고 특성 분석에 사용되었으며, (2) 유관 나사 타입(10mm 길이, 25mm의 헤드 폭, 평균 중량 908.5 μg)은 MLTRPB에 대한 항균 효과를 분석하는데 사용하였다.
- [0078] MLTRPB는 폴리(DEGMA₉₀-co-OEGMA₁₀) 및 폴리(HEMA₂₀-co-OEGMA₈₀) 층(도 1)을 기반으로 선형 폴리머 "브러시" 층을 포함하는 다층 필름으로 제조하였다. 첫 번째 층은 Me-OH/Milli-Q 물 40 mL에 용해된 DEGMA₉₀-co-OEGMA₁₀을 이용하여 제조하였고, 이후 두 번째 층은 동일한 방법으로 HEMA₂₀-co-OEGMA₈₀을 이용하여 첫 번째 층 상에 위치되도록 중합하여 제조하였다. 이러한 과정의 반복으로 4번째 층까지 제조하였다. 3번째와 4번째 층의 중합은 30 mL

의 Me-OH/Milli-Q 물을 이용하여 수행하였다.

[0079] MLTRPB의 LCST를 38℃~40℃의 온도 범위에서 제어하기 위해, 중합 시 단량체의 몰비는 DEGM/OEGMA의 경우 0.9/0.1이 되도록 하였고, HEMA/OEGMA의 경우에는 0.2/0.8이 되도록 하였으며, 따라서 첫 번째와 3번째 층은 DEGM가 풍부한 층이 되고, 2번째와 4번째 층은 HEMA가 풍부한 층이 되었다. Ti 임플란트(MLTRPB-Ti) 상에 MLTRPB의 중합이 완료된 후, 기판을 물과 에탄올로 세척하였고, 24시간 동안 진공에서 완전히 건조시켰다. MLTRPB의 두께는 타원편광법(Ellipsometry)를 이용하여 분석하였고, 두께가 1μm를 초과하는 경우 전계방출주사 전자현미경(FE-SEM, S-4800, Hitachi)을 이용하였다. Ti 임플란트 상의 MLTRPB의 양은 서로 다른 층의 그룹당 20개 시편의 평균 무게를 측정하였고, 10⁻⁴ g까지 상세하게 측정할 수 있는 전자저울을 사용하여 그룹 간 차이를 계산하여 분석하였다.

[0080] 또한, 제조된 MLTRPB는 HP-XPS(High-Performance Xray Photoelectron Spectroscopy, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA, K-ALPHA+) 및 FT-IR(FT-infrared spectroscopy, ATR 모드, ThermoFisher Scientific, iS10)를 이용하여 특성을 분석하였고, MLTRPB의 친수성은 corona가 처리된 폴리머 필름(ASTM D5946)을 이용한 표준 테스트 방법을 사용하여 실온에서 측정된 자동 접촉각 분석기(Phoenix 300 Touch, SEO, Kromtek, Shah Alam, Malaysia)으로 분석하였다.

[0082] 2) 시험관내 항생제 용출 동역학 분석

[0083] MLTRPB-Ti 임플란트 상에 항균제를 로딩하기 위해, 제작된 임플란트를 먼저 완전히 건조시키고, 상기 건조시킨 임플란트를 10mg/mL의 LVF가 용해된 Milli-Q 물 4mL 또는 20mg/mL의 GM이 희석된 D₂O 4mL에 침지시켰다. 이러한 항균제의 로딩과정은 진공 하에서 1시간 동안 수행하였고, 질소 기류 하에서 건조시킨 다음, 진공 하에서 12시간 이상 유지하였다. 항생제와 폴리머 브러시 사이의 수소 결합이 항생제 로딩 용량에 영향을 미칠 수 있으므로, 상기 과정은 각 샘플에 대해 균일한 로딩 조건이 되도록 MLTRPB를 완전히 탈수시켰다. 또한, LCST는 다양한 온도(25℃, 40℃)에서 MLTRPB-Ti 임플란트로부터의 항생제 방출 분석으로 확인하였다. LVF 항생제가 포함된 MLTRPB-Ti를 5mL의 pH 7.0 PBS 버퍼에 로딩하여 염증 분위기를 모사하도록 하였고, 0.5mL의 현탁액을 0.5, 1, 2, 4, 6시간에 각각 회수한 후, LVF 항생제의 방출농도(μg mL⁻¹)를 형광 분광법(Cary Eclipse spectrometer, Agilent, Santa Clara, CA, USA)으로 292nm 및 540nm의 여기 및 방출파장에서 분석하였고, 확립된 보정 곡선을 사용하여 계산하였다. pH 7.0의 PBS buffer-d₂(PBS를 D₂O에 용해시킴)에서 MLTRPB-Ti로부터 방출된 GM의 농도는 FT-NMR(JEOL 300 MHz, Tokyo, Japan)을 사용하여 0.5, 1, 2, 4, 6시간에서 GM에 해당되는 피크의 면적(1.84ppm)을 각 시간별로 측정하였다.

[0085] 3) 시험관내 항균활성 분석

[0086] *S. aureus*(ATCC 29213, Xen29)는 상기 본 발명에서 제조한 MLTRPB-Ti-LVF 및 MLTRPB-Ti-GM의 항균활성을 분석하기 위해 사용하였다. 또한 항생제가 처리되지 않은 MLTRPB-Ti를 대조군으로 사용하였다. 모든 기판은 70% 에탄올로 세척하였고, 층류 하에서 건조하여 멸균하였다. *S. aureus*는 200rpm의 속도로 37℃ 온도의 진탕 배양기에서 TSB(tryptic soy broth) 배지를 이용하여 배양하여 준비하였다. 박테리아의 양은 광학 밀도(OD)로 확인하였고, TSB에서 박테리아 현탁액을 연속 희석한 후(10²-10⁷배 희석), CFU를 측정하여 확인하였다.

[0087] *S. aureus*에 대한 LVF 및 GM의 MBC(minimum bactericidal concentration;최소 살균 농도) 분석을 위해, LVF(1, 2, 4, 10 μg) 또는 GM(1, 2, 4, 10 μg)을 1 mL의 *S. aureus*(2.0 × 10⁶ CFU/mL-1)가 함유된 TSB 배양액에 처리하고 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 또한, 온도에 따른 항균 활성을 확인하기 위해, 조정된 *S. aureus* 현탁액(2.0 × 10⁶ CFU mL⁻¹) 1 mL를 6웰 플레이트에서 MLTRPB-Ti와 공동 배양하였고, 이때 LVF 및 GM을 처리한 군과 처리하지 않은 군에 대해 분석하였으며, 각 온도 조건(25℃, 36.5℃, 40℃)에서 0.5, 1, 2, 4, 12시간 처리 후, 현탁액 50 μL를 TSB 한천에 접종하고 24시간 동안 배양한 다음 항균활성을 분석하였다. 항균 활성은 CFU 카운팅 분석으로 수행하였고, 또한 IVIS 스펙트럼(In Vivo Imaging System, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)을 사용하여 박테리아 발광(*S. aureus* Xen29)의 발광 강도를 측정하여 분석하였다. 항생제를 코팅한 군과 코팅하지 않은 군의 티타늄 표면에서의 생물막 형성은 FE-SEM으로 확인하였다.

[0089] 4) 세포독성 분석

[0090] MLTRPB에 대한 세포독성 여부는 세포 생존능 분석을 통해 확인하였다. 구체적으로, 마우스 조골세포(MC3T3-E1)를 알파-MEM 배지에서 배양하고, 세포에 대한 삼투압을 최소화하기 위해 25mM D-만니톨을 첨가하였다. 분석은 생존 세포에서 미토콘드리아 탈수소효소에 의한 MTT(3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드)의 감소를 기반으로 하여 보라색 포르마잔 생성물을 생성하는데, 이는 세포 호흡의 수준을 나타낸다. 96-웰 플레이트를 사용하여 세포 배양액 200 μ L을 웰당 5×10^4 개 세포로 분주하고, DMSO로 희석한 다양한 농도의 MLTRPB를 DMSO로 희석하고 다양한 농도의 MLTRPB 현탁액 10 μ L를 세포에 첨가한 후, 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배지를 제거한 후, 세포를 30 μ L의 MTT를 포함하는 인산염 완충 식염수에서 3시간 동안 반응시킨 후, 포르마잔 생성물을 50 μ L의 디메틸 설펝사이드(Calbiochem, San Diego, CA, USA)에 용해시키고 비색 마이크로플레이트 판독기(BioTek, Winooski, VT, USA)를 사용하여 570 nm에서 OD를 측정하여 세포 생존율을 분석하였다.

[0092] 5) MLTRPB 코팅의 생체 내 평가

[0093] 모든 동물연구는 IACUC(Institutional Animal Care and Use Committee)의 실험 프로토콜 승인 하에 수행하였다. 생후 6주된 Sprague Dawley(SD) 랫트를 생체 내 효능 실험에 사용하였다. 수술 당시 쥐의 평균 체중은 221 ± 19 g이었고, 랫트를 1L의 O_2 /min의 속도로 3% 이소플루란을 이용하여 마취시켰다. 무균 기술을 사용하여 무릎 위의 3cm 피부를 절개하여 무릎 관절을 노출시켰고, 수술용 1 mm 드릴 팁을 사용하여 대퇴 연골을 부분적으로 제거한 후, 구멍을 통해 18 게이지 바늘을 삽입하여 골수관을 확인하였다. 삽입용 임플란트로 직경 1.2mm의 유관나사(Trident medical, 직경 1.2mm, 길이 10mm)를 이용하였으며, 유관나사는 작은 직경과 캐논러 모양 때문에 선택하였으나 골 유착을 촉진하기 위해 드릴 팁을 사용하여 나사 표면에 추가 거칠기를 수행하였다. 또한 스크류 상의 MLTRPB 코팅은 앞서 기술된 방법으로 수행하였고, 이때 GM 항생제를 MLTRPB에 함유되도록 하였다. 나사 머리가 원위 대퇴골의 관절면과 수평이 될 때까지 나사를 삽입하였다(도 2 참조). 나사 삽입 후, 10^6 S. aureus를 나사 캐논라의 30 μ L 용액에 주입하였다. 신근기전(extensor mechanism)과 피부를 층별로 봉합하고 피부 봉합 후 열광을 30분 동안 적용하여 쥐의 무릎 국소 피부 온도가 40-45 °C에 도달하도록 하였다. 이후 실험에 사용한 동물은 수술 후 14일째에 안락사 시켰다. 40마리의 동물이 수술을 받았고, 10마리씩 4개의 그룹인 비조립 나사 삽입 대조군, MLTRPB를 1층으로 코팅한 군, MLTRPB를 3층으로 코팅한 군 II, MLTRPB를 4층으로 코팅한 군 IV으로 분류하였다.

[0095] 6) 박테리아의 바이오버든(Bioburden) 분석

[0096] 스크류에 부착된 박테리아의 수는 초음파 처리 후 콜로니 형성 단위의 수를 세어 분석하였다. 대퇴의 나사를 무균적으로 회수하고 플랑크톤 박테리아를 제거하기 위해 PBS로 세척하였다. 이후 4mL의 PBS 용액이 함유된 15mL 원심분리 튜브에 넣고 30초 동안 볼텍싱을 수행한 후, 24 °C(52kHz, 137와트, BioSonic UC125, Coltene, Altstätten, Switzerland)에서 15분 동안 초음파 처리하였다. 이후 초음파 처리된 용액을 연속 희석하고 TSB 한천에 플레이트팅하여 밤새도록 배양하였다. 이후 24시간 지난 다음 CFU의 수를 두 명의 조사자에 의해 정량분석하였다.

[0097] 또한 임플란트 주변의 연조직을 채취하여 4% 포르말데히드에 48시간 동안 고정시킨 후, 조직 절편을 헤마톡실린과 에오신(H&E)으로 염색하였다. 이를 통해 연조직의 다형핵 백혈구(PMNL)의 수를 측정하여 용출된 항생제가 인접한 피막주위 연조직에서 박테리아의 생균수를 감소시켰는지를 확인할 수 있다. PMNL의 수는 Olympus BX 51 현미경을 사용하여 고배율 시야에서 계수하였다.

[0099] <실시예 1>

[0100] 단층 또는 다층의 온도 반응형 폴리머 브러시가 부착된 생체 삽입용 기재의 제조

[0101] 티타늄 금속판을 도파민 수용액(10 ml 당 염산 도파민 2 mg)에 담궈 상온에서 2시간 동안 교반한 후, 꺼내서 15

분 동안 초음파 처리한 다음 초순수로 행구고 질소 흐름으로 건조시켜 도파민이 도포된 티타늄 금속판을 제조하였다. 이후, DCM 30 ml가 담긴 반응기에 넣고 아르곤 대기 상태에서 얼음 중탕(ice bath)으로 차갑게 식힌 후에 TEA를 반응 혼합물에 천천히 첨가한 다음, ATRP 개시제인 BiBB 용액을 방울별로 첨가하여 1시간 동안 반응시켰다. 이렇게 개시제가 부착된 티타늄판은 DCM, 에틸아세테이트, 에탄올로 세척한 후 질소 흐름에서 건조시켰다.

[0102] 이후, 상기 과정에서 준비된 티타늄 금속판은 하기 기재된 중합 방법 중 하나를 선택하여 고분자 브러시를 상기 금속판 표면에 부착시켜 단층 고분자 브러시가 부착된 티타늄 금속판을 제조하였다. 이때 단층 고분자 브러시가 부착된 티타늄 금속판은 하기 실시예에서 비교예로 사용하였다.

[0103] 또한, 상기 과정에서 준비된 티타늄 금속판은 하기 기재된 중합 방법을 2회 이상 수행하여 중합체의 종류가 서로 다른 다층의 고분자 브러시가 부착된 티타늄 금속판을 제조하였는데, 2층, 3층, 4층, 5층 및 6층의 고분자 브러시가 부착된 티타늄 금속판을 제조하였다.

[0104] 또한 본 발명자들은 생체 삽입용 기재의 종류로서 티타늄 금속판 외에도 나사 및 워셔의 기재를 사용하여 상기와 동일한 방법으로 기재의 표면을 다층의 고분자 브러시로 부착시켰다.

[0105] 다층의 고분자 브러시, 즉 다층의 온도 반응형 폴리머층의 중합방법은 다음과 같다.

[0107] ① 1st polymerization

[0108] Poly(DEGMA90/OEGMA10)는 단량체인 DEGMA/OEGMA를 9/1의 몰비로 혼합하고, 이를 메탄올/물(1/1(v/v))의 혼합용매 40ml을 이용하여 ATRP 개시제가 부착된 티타늄 플레이트, 나사 및 워셔 각각의 표면에서 원자 전이 라디칼 중합법으로 고분자 브러시를 부착하였다.

[0109]

[0110] ② 2nd polymerization

[0111] Poly(HEMA20/OEGMA80)은 단량체인 HEMA/OEGMA를 2/8의 몰비로 혼합하고 이를 메탄올/물(1/1(v/v))의 혼합용매 40ml을 이용하여 ATRP 개시제가 부착된 티타늄 플레이트, 나사 및 워셔 각각의 표면에서 원자 전이 라디칼 중합법으로 고분자 브러시를 부착하였다.

[0113] ③ 3rd Polymerization

[0114] Poly(DEGMA90/OEGMA10)는 단량체인 DEGMA/OEGMA를 9/1의 몰비로 혼합하고, 이를 메탄올/물(1/1(v/v))의 혼합용매 30ml을 이용하여 ATRP 개시제가 부착된 티타늄 플레이트, 나사 및 워셔 각각의 표면에서 원자 전이 라디칼 중합법으로 고분자 브러시를 부착하였다.

[0116] ④ 4th Polymerization

[0117] Poly(HEMA20/OEGMA80)은 단량체인 HEMA/OEGMA를 2/8의 몰비로 혼합하고, 이를 메탄올/물(1/1(v/v))의 혼합용매 30ml을 이용하여 ATRP 개시제가 부착된 티타늄 플레이트, 나사 및 워셔 각각의 표면에서 원자 전이 라디칼 중합법으로 고분자 브러시를 부착하였다.

[0119] ⑤ 5th Polymerization

[0120] Poly(DEGMA90/OEGMA10)는 단량체인 DEGMA/OEGMA를 9/1의 몰비로 혼합하고, 이를 메탄올/물(1/1(v/v))의 혼합용매 20ml을 이용하여 ATRP 개시제가 부착된 티타늄 플레이트, 나사 및 워셔 각각의 표면에서 원자 전이 라디칼 중합법으로 고분자 브러시를 부착하였다.

[0122] ⑥ 6th Polymerization

[0123] Poly(HEMA20/OEGMA80)은 단량체인 HEMA/OEGMA를 2/8의 몰비로 혼합하고 메탄올/물(1/1(v/v))의 혼합용매 20ml에서 ATRP 개시제가 부착된 티타늄 플레이트, 나사 및 워셔 각각의 표면에서 원자 전이 라디칼 중합법으로 고분

자 브러시를 부착하였다. 각 단계에서 메탄올/물(1/1(v/v)) 공용매의 양은 단량체의 양이 총 40mmol일 때, 20~40ml를 조절하여 고분자 브러시의 두께를 조절하였다.

[0125] 다음으로, 상기 방법으로 제조된 단층 또는 다층의 온도 반응형 폴리머 브러시가 부착된 생체 삽입용 임플란트 상에 항균제를 로딩하는 과정을 수행하였다.

[0126] 이를 위해 상기 단층 또는 다층의 온도 반응형 폴리머 브러시가 부착된 생체 삽입용 임플란트를 완전히 건조시킨 후, 이를 10mg/mL의 Levofloxacin(LVF)가 용해된 Milli-Q 물 4mL 또는 20mg/mL의 Gentamycin(GM)이 희석된 D₂O 4mL에 침지시켰다. 이러한 항균제의 로딩과정은 진공 하에서 1시간 동안 수행하여, 항생제가 로딩된 단층 또는 다층의 온도 반응형 폴리머 브러시(MLTRPB)가 부착된 생체 삽입용 임플란트를 각각 제조하였다.

[0128] <실시예 2>

[0129] 티타늄(Ti) 임플란트 상에 형성된 다층 온도 반응형 폴리머 브러시(MLTRPB; multi-layered temperature-responsive polymer brush)의 특성분석

[0130] 본 발명의 방법에 의해 제조된 생체 인공 삽입물인 티타늄 임플란트의 표면에 형성된 MLTRPB에 대한 특성 분석을 위해 XPS와 FT-IR 분석으로 MLTRPB의 화학 구조를 분석하였다.

[0132] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, DEGMA가 풍부한 1,3-MLTRPB과 HEMA가 풍부한 2,4-MLTRPB는 서로 다른 특성을 나타내는 피크가 확인되었다. 도 3A의 경우, DEGMA가 풍부한 제3층의 MLTRPB는 고해상도의 XPS 스캔의 C1s 영역에서 285.5eV에서 C-C, 286.5eV에서 C-O, 288.7eV에서 OC=O의 3개의 피크를 나타냈다. HEMA를 포함하는 제4층의 MLTRPB(4-MLTRPB)는 제3층의 MLTRPB(3-MLTRPB)의 C-C 강도와 비교하여 285.5eV에서 더 강한 C-C를 갖는 것으로 나타났다. LVF 약물이 로딩된 제3층의 MLTRPB는 686eV에서 C-F 피크를 나타내었고(도 3C), GM 약물이 로딩된 제4층의 MLTRPB는 401.5eV에서 N-H 피크를 갖는 것으로 나타났다(도 3D).

[0133] 또한, FT-IR 스펙트럼 분석결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 1170 cm⁻¹에서의 OH 밴딩 진동은 HEMA 함유 MLTRPB 이 적층된 티타늄 임플란트 표면의 하이드록시기를 나타내며, 이는 XPS 데이터와 일치하는 것으로 나타났고, 예상한 바와 같이 폴리머 브러시가 각 층에 중합되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 본 발명의 방법에 따라 생체 삽입용 기재 표면에 서로 다른 성분으로 구성된 폴리머가 각각 다른 층으로 적층되어 다층 구조를 형성하고 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[0134] 또한, 폴리(DEGMA₉₀-co-OEGMA₁₀)와 폴리(HEMA₂₀-co-OEGMA₈₀)의 정적 물 접촉각은 각각 43.2 ± 1.5° 와 76.1 ± 2.4° 로 측정되었다. 또한, 친수성 HEMA를 포함하는 폴리(HEMA₂₀-co-OEGMA₈₀) 층은 폴리(DEGMA₉₀-co-OEGMA₁₀)보다 습윤성이 더 큰 것으로 나타났다.

[0135] 또한, 임플란트 상에 적층되는 폴리머층 수에 따른 MLTRPB-Ti의 무게는 하기 표 1에 나타난 바와 같이, 20개의 베어-티타늄 임플란트의 평균 무게는 14.8293g(각각 평균 무게; 0.7415g)이었고, 4층 구조의 MLTRPB(4-MLTRPB)의 무게는 2052.0(±66.7) μg/cm³인 것으로 나타났으며, Ti 임플란트의 폴리머 층 수가 증가함에 따라 폴리머 브러시의 두께가 3.075(±0.134) μm로 증가한 것으로 나타났다. 이로 인해 항생제의 로딩 양이 증가하여 4-MLTRPB에서는 최대 37.3 μg/cm³ GM 및 17.9 μg/cm³ LVF가 되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 HEMA가 풍부한 폴리머 브러시를 사용했기 때문에 GM은 친수성으로 인해 LVF보다 MLTRPB에 더 많은 양이 로딩될 수 있는 것을 알 수 있었다. 층 수가 다른 MLTRPB-Ti 임플란트의 FE-SEM 이미지는 도 5에 나타내었다.

표 1

티타늄 임플란트 상의 MLTRPB에 대한 물리적 특성

	Avg. Thickness (nm)	STD	Avg. Weight of Polymer Brush ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	STD	Avg. LVF Amount Loaded ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Avg. GM Amount Loaded ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
1-MLTRPB	398	1.4	278.4	4.7	3.4	4.0
2-MLTRPB	1030	2.1	659.8	5.7	6.2	12.3
3-MLTRPB	1865	49.5	1057.6	12.8	10.2	21.9
4-MLTRPB	3075	134.4	2052.0	66.7	17.9	37.3

[0136]

[0137]

나아가 본 발명자들은 6개 층의 구조를 갖는 MLTRPB에 대한 SEM 이미지 분석을 수행하였는데, 그 결과 도 6에 나타난 바와 같이, 다층 구조를 갖는 MLTRPB는 여러 층의 고분자가 중합되어 임플란트에 부착되어 있는 것을 확인할 수 있었고, 6개 층의 고분자 폴리머층의 두께는 대략 6 μm 이상인 것으로 확인되었다.

[0138]

[0139]

<실시예 3>

[0140]

약물방출 특성분석 결과

[0141]

본 발명자들은 MLTRPB-Ti의 두께 변화에 따른 항생제 약물의 방출 거동 변화를 분석하였다. 그 결과, MLTRPB-Ti의 두께가 증가함에 따라 항생제의 증가된 방출거동이 관찰되었다. 25℃와 40℃에서 MLTRPB-Ti의 서로 다른 층에서 방출되는 LVF 및 GM의 방출량을 도 7에 나타내었다.

[0142]

구체적으로 처음 6시간 동안 LVF는 LCST(25℃) 이하에서는 56%(9.13 $\mu\text{g cm}^{-2}$)로 나타났고, GM의 최대 방출량은 40℃에서 33.63 $\mu\text{g cm}^{-2}$ (90.1%)이었으며, LCST 이하(25℃)에서는 23.2%로 감소하였다. 이러한 결과는 약물의 방출 거동은 온도-반응성 고분자의 형태 변화로 인한 것임을 의미한다.

[0144]

<실시예 4>

[0145]

시험관 내에서 항균 활성 분석

[0146]

S. aureus에 대한 LVF 및 GM 항생제의 최소 살균 농도(MBC) 분석 결과, 각각 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 및 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 로 나타났다. 한편, 37℃에서 S. aureus와 함께 배양된 MLTRPB가 코팅되지 않은 임플란트는 24시간 후 임플란트 표면에 생물막이 형성된 것을 확인할 수 있었다(도 7).

[0147]

또한, 본 발명자들은 MLTRPB-Ti-LVF의 단층(1층), 2층 및 3층으로 중첩되어 코팅된 임플란트에 대한 항균 활성을 분석한 결과, 단층(1층), 2층 및 3층으로 구성된 MLTRPB-Ti-LVF에는 LVF의 양이 충분하지 못해 항균 활성이 다소 낮게 나타난 반면, 4개 층으로 구성된 MLTRPB-Ti-LVF는 LCST 이상의 온도인 40℃에서 상당한 항균 활성이 있는 것으로 나타났다(도 9).

[0148]

또한, MLTRPB-Ti-LVF에 비해 MLTRPB-Ti-GM 나사는 폴리머 브러시에 더 많은 양의 항생제가 포함되어 있는 것으로 확인되었다(도 7C). GM의 MBC는 LVF의 MBC보다 낮으므로 함침된 GM의 양이 많을수록 MLTRPB-Ti-GM의 항균 효과가 더 증가하였다. 반면, LCST(25℃) 미만의 온도에서는 LVF 및 GM 장착 MLTRPB 나사 모두에서 항균 활성이 나타나지 않았다.

[0150]

즉, 상기 결과에서 LVF는 4-MLTRPB-Ti에서 상당한 항균 효과가 있는 것으로 나타났고, 3-MLTRPB-Ti와 4-MLTRPB-Ti는 모두 GM 처리 시, 효과가 있는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 MLTRPB를 이용하여 충분한 항균 효과를 나타내기 위해서는 최소 3층 이상의 MLTRPB가 필요하다는 것을 알 수 있었고, 또한 소수성 항생제와 병용할 경우에는 적은 수의 층만으로도(2개층 이상) 항균 활성을 나타낼 수 있음을 알 수

있었다.

[0152] 나아가 본 발명자들은 본 발명의 MLTRPB이 부착된 임플란트의 항균성 활성을 재확인하기 위해, 임플란트를 에탄올로 세척하고 질소로 건조하여 멸균한 후, 70% 에탄올에 30분 동안 담근 다음 PBS로 두 번 세척하였고, 사용할 때까지 PBS에 저장되었다. 또한 유해 세균인 *S. aureus* Xen 29의 콜로니는 TB 박테리아 배양 튜브로 옮겨져 37° C에서 배양한 후 MAXQ 6000 스택 가능한 흔들림 인큐베이터(Thermo Scienti)에서 200 rpm으로 18시간 동안 교반하면서 배양하였다. 이후 세균 현탁액을 TS 배양액에서 OD 600nm 0.5까지 희석하여 분광광도계 Helios Epsilon을 통해 3.0×10^9 CFU (colony forming unit)/mL에 대응하여 측정하였다. 세균의 양은 2.0×10^8 CFU (colony forming unit)/mL로 측정되었다.

[0153] 이후 세균양이 조절된 *S. aureus* Xen29 배양액 3 mL를 각각 항생제가 무처리된 임플란트에 넣고 6-웰 플레이트에서 37° C 온도로 24시간 동안 공동 배양하였다. 또한 각각 고분자 폴리머층의 부착 두께가 다른 임플란트에 무항생제, levofloxacin 및 gentamycin을 각각 로딩하고 6-웰 플레이트에서 37° C 온도로 24시간 동안 공동 배양하였다. 그 후 상등액을 6-웰 플레이트로부터 희석 없이 채취한 후 CFU 카운트를 위해서 TS 한천배지에서 세균의 농도를 분석하였는데, 즉 TS 한천판에 100 μ L씩 접종하여 37 ° C에서 24시간 배양 후, CFU/mL을 결정하기 위해 눈에 보이는 콜로니를 측정하였고 그 결과를 하기 표에 나타내었다.

표 2

[0154] 항균활성 분석결과

	임플란트 실험군	CFU/ml
a	MLTRPB이 부착되지 않은 임플란트(bare implant)	매우 많은 콜로니 형성
b	단층의 고분자 폴리머층이 부착된 임플란트	매우 많은 콜로니 형성
c	Levofloxacin 항생제가 로딩된 1층 폴리머층이 부착된 임플란트	약 2000개 콜로니 형성
d	Gentamycin 항생제가 로딩된 1층 폴리머층이 부착된 임플란트	매우 많은 콜로니 형성
e	Gentamycin 항생제가 로딩된 2층 폴리머층이 부착된 임플란트	형성된 콜로니 없음
f	Gentamycin 항생제가 로딩된 3층 폴리머층이 부착된 임플란트	형성된 콜로니 없음

[0155] 또한 각 실험군에 대한 SEM 분석을 수행하였는데, 이를 통해 각 임플란트에서 유해 세균인 *S. aureus*의 생체막(biofilm) 형성 여부를 확인하였다. 배양된 임플란트는 포름알데히드 4%를 사용하여 10분간 고정하고 공기 건조시켰고, 샘플은 에탄올 농도(65%, 75%, 85%, 95%, 100%)가 증가하는 에탄올 혼합물에서 탈수시킨 후, 최종적으로 밤새 공기 건조시켰다. 탈수된 임플란트는 금과 팔라듐으로 코팅하여 SEM 이미지를 얻었다.

[0156] 그 결과, 도 10 및 도 11에 나타난 바와 같이, 본 발명의 MLTRPB이 부착되지 않은 임플란트의 경우, 티타늄 플레이트 임플란트 상에 바이오필름이 형성되어 부착된 것을 확인할 수 있었고(a), 단층(1층)의 폴리머층이 부착된 임플란트에서도 바이오필름이 형성되어 있는 것으로 나타났다(b). 또한, Levofloxacin 또는 Gentamycin 항생제가 로딩된 단층(1층)의 폴리머층이 부착된 임플란트의 경우, 떠다니는 유해 세균이 관찰되었고, 폴리머층에 박혀있는 세균도 관찰이 되었다(c, d). 한편, Levofloxacin 또는 Gentamycin 항생제가 로딩된 2층 구조를 갖는 폴리머층이 부착된 임플란트의 경우, 세균(박테리아)가 현저하게 감소되었거나 거의 관찰되지 않았다(e, f).

[0158] 이러한 결과를 통해, 항생제가 로딩된 본 발명의 MLTRPB가 부착된 임플란트를 사용할 경우, 최소 2층 이상의 고분자 폴리머층을 임플란트에 코팅하여 부착시킬 경우, 유해 세균에 대한 항균 활성을 유도할 수 있음을 알 수 있었고, 특히 3층 이상의 고분자 폴리머층을 부착시킬 경우, 매우 우수한 항균 활성을 나타낼 수 있음을 알 수 있었다.

[0160] <실시예 5>

[0161] MLTRPB의 세포독성 여부 분석

[0162] 본 발명자들은 본 발명에 따른 MLTRPB에 대해 세포독성 여부를 평가하였다.

[0163] 그 결과, 도 12에 나타난 바와 같이, 고농도의 폴리(DEGMA₉₀-co-OEGMA₁₀)에서도 세포성장이 억제되지 않는 것으로 나타났고, 폴리(HEMA₂₀-co-OEGMA₈₀)의 경우에도 고농도(500ng/μL)에서 91.4%의 세포생존율을 보였다.

[0164] 따라서 본 발명자들은 인체 생체 삽입용 임플란트에 코팅되는 MLTRPB가 세포성장에 유해한 영향을 주지 않으며 세포 독성을 유발하지 않는다는 것을 확인함에 따라 MLTRPB가 생체 적합성 고분자라는 것을 알 수 있었다.

[0166] <실시예 6>

[0167] In vivo에서 본 발명의 MLTRPB 코팅 생체 삽입용 임플란트 사용에 따른 감염 방지 효과분석

[0168] 나아가 본 발명자들은 본 발명의 MLTRPB 코팅에 대한 생체 내 평가를 실험용 랫트를 대상으로 분석하였다.

[0169] 수술 14일 후 안락사시킨 모든 랫트로부터 피부 주름을 제거했을 때, 명백한 감염 조직이 관찰되었다(도 13A~13C). 또한 피막 주위 연조직 샘플의 조직학을 분석한 결과, 모든 샘플에서 염증세포가 다량 관찰되었는데, 이는 피막 주위 조직의 MLTRPB 코팅에서 용출된 항생제로부터 제한된 항균 효과가 있음을 나타낸다(도 13D~13F).

[0170] MLTRPB-Ti의 CFU는 적용된 MLTRPB의 층 수와 관련하여 박테리아의 생균수가 크게 감소되는 것으로 나타났다. 구체적으로 코팅하지 않은 임플란트에 비해 단층으로 코팅된 MLTRPB의 CFU는 77.2% 감소한 것으로 나타났고, 3개 층으로 코팅된 MLTRPB는 99.8%, 4개 층으로 코팅된 MLTRPB는 99.9% 이상으로 CFU가 감소된 것으로 나타났다(도 14). 특히 3층 코팅 MLTRPB 및 4층 코팅 MLTRPB는 모두 임상적으로 중요하게 여겨지는 세균 생물막에 대해 3-로 그 감소 효과가 있는 것으로 나타났다.

[0172] 이러한 결과들을 통해 본 발명자들은 본 발명에서 개발한 생체 삽입용 의료기기에 코팅할 수 있는 MLTRBP는 온도에 반응하고 LCST 이상에서는 구조적인 붕괴가 유도될 수 있는 특징이 있어 체내 임플란트가 삽입된 국소 부위에서 감염 등에 의해 온도가 증가하게 되면 함침되어 있던 항생제를 방출하여 감염의 증상을 예방, 개선 및 치료할 수 있다.

[0173] 또한, 본 발명에서 MLTRPB의 제조에 사용된 2종류의 폴리머 브러시인 폴리(DEGMA₉₀-co-OEGMA₁₀)와 폴리(HEMA₂₀-co-OEGMA₈₀)는 서로 다른 극성을 가지므로 항생제가 갖는 친수성 또는 소수성의 특성에 따라 항균 효과가 달라질 수 있음을 확인하였다. 구체적으로 소수성 고분자로 구성된 폴리머 브러시의 경우에는 소수성 약물을 함침하고, 친수성 고분자로 구성된 폴리머 브러시의 경우에는 친수성 약물을 함침할 경우, 보다 효과적으로 약물에 의한 감염 억제 효과를 도출할 수 있다.

[0175] <실시예 7>

[0176] 고분자 성분과 항생제 종류의 상관관계 분석

[0177] 본 발명에 따른 MLTRPB를 임플란트에 적용 시, 우수한 항균활성을 도출할 수 있는 방법에 있어서, 임플란트에 부착되는 고분자 폴리머층의 성분과 항생제의 종류가 상관관계가 있는지를 확인하기 위한 실험을 수행하였다.

[0178] 이를 위해, 1층 구조의 HMEA rich 고분자 브러시와 1층 구조의 DEGMA rich 고분자 브러시를 티타늄 임플란트 표면에 각각 합성하여 부착하였다. 1회의 반응으로 중합을 수행하였고, 용액중합의 농도는 메탄올/물(1/1 v/v) 공용매 20ml이며, 상기 기술된 방법과 동일하게 중합 반응을 수행하였다. 이때 고분자 브러시 층의 두께는 4층 구조의 고분자 브러시의 두께와 유사하도록 하였고, 1층의 고분자 브러시에 함침되는 항생제인 GM(gentamycin) 및 LVF(levofloxacin)의 항생제 로딩량은 4층 구조의 DEGMA₉₀/OEGMA₁₀ 및 4층 구조의 HEMA₂₀/OEGMA₈₀ 고분자 브러시 층에 로딩한 항생제 양과 유사하게 사용하였다.

[0179] 이후 S. aureus균을 고분자 브러시 층이 부착된 임플란트와 공동배양 후, 배양액을 이용하여 앞서 기술된 동일 방법으로 항균 활성을 분석하였다.

[0181] 그 결과, 도 15에 나타난 바와 같이, 수용성 항생제인 GM의 경우, 친수성기가 큰 고분자인 HEMA rich 고분자 브

러쉬에 로딩한 경우가 소수성기가 큰 고분자인 DEGMA rich 고분자 브러시에 로딩한 경우보다 항균 활성이 더 우수한 것으로 나타났고, 소수성 특성을 갖는 항생제인 LVF의 경우, 소수성기가 큰 고분자인 DEGMA rich 고분자 브러시에 로딩한 경우가 친수성기가 큰 고분자인 HEMA rich 고분자 브러쉬에 로딩한 경우에 비해 항균 활성이 더 우수한 것으로 나타났는데, 특히 초기 항균 활성이 우수한 것으로 나타났다.

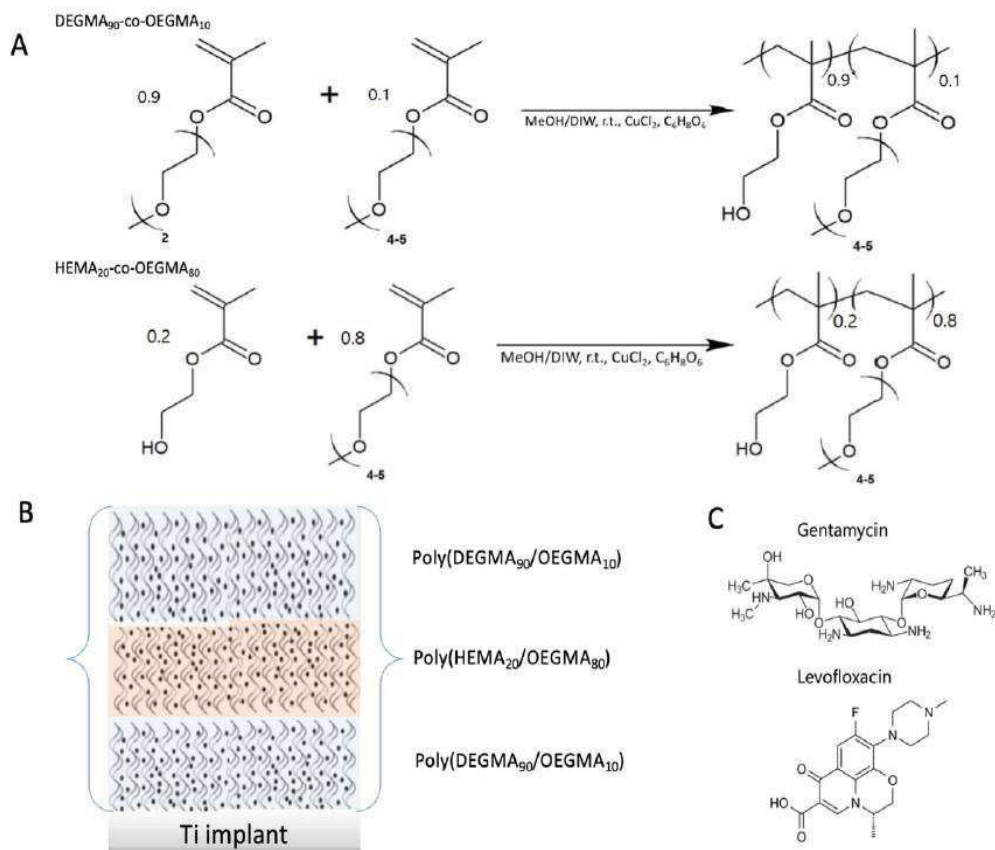
[0182] 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 고분자 브러쉬의 특성에 따라 항생제의 종류를 선택하여 사용하는 것이 항균 활성의 수준을 결정하는데 중요하게 작용할 수 있다는 것을 알 수 있었고, 특히 소수성기의 고분자 브러시에는 소수성 특성을 갖는 항생제를 로딩하여 사용하고, 친수성기의 고분자 브러시에는 수용성 항생제를 로딩하여 사용하는 것이 바람직하다는 것을 알 수 있었다.

[0183] 뿐만 아니라 상기와 같이 항생제를 로딩한 MLTRPB의 경우, 25℃에서도 뛰어난 항균 특성을 나타내었고, 이러한 항균 활성은 LCST 40℃에서의 항생제가 작용하는 온도감응 특성과 유사한 항균특성임을 알 수 있었다.

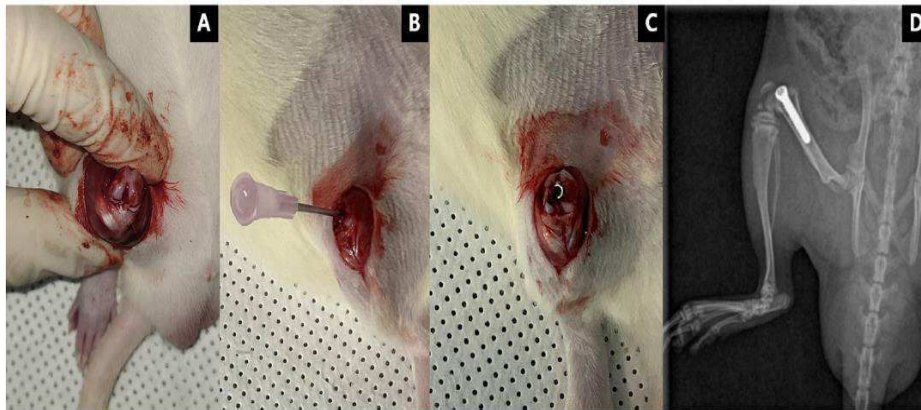
[0185] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

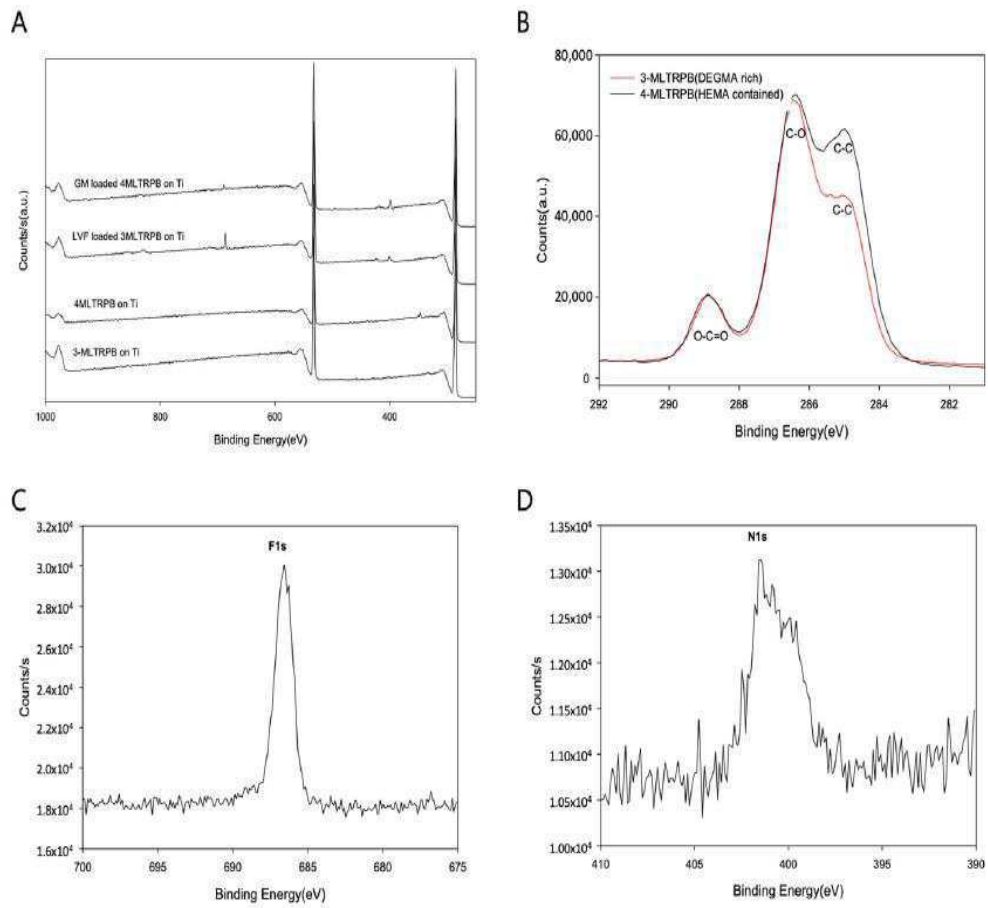
도면1



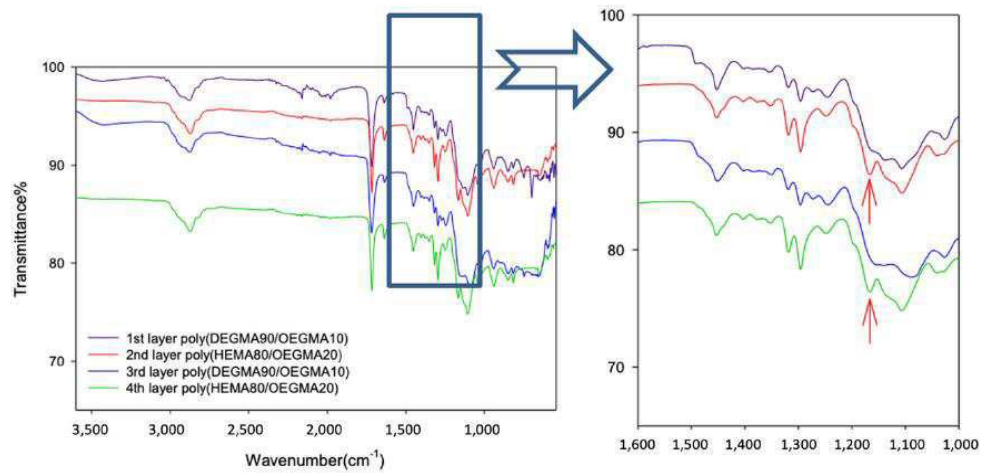
도면2



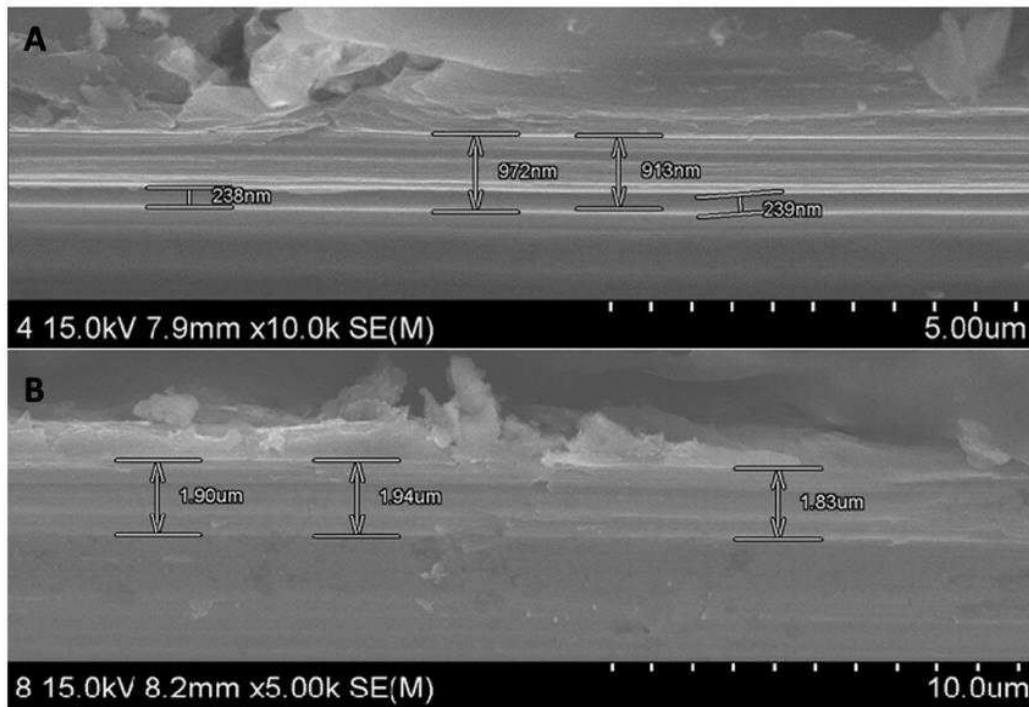
도면3



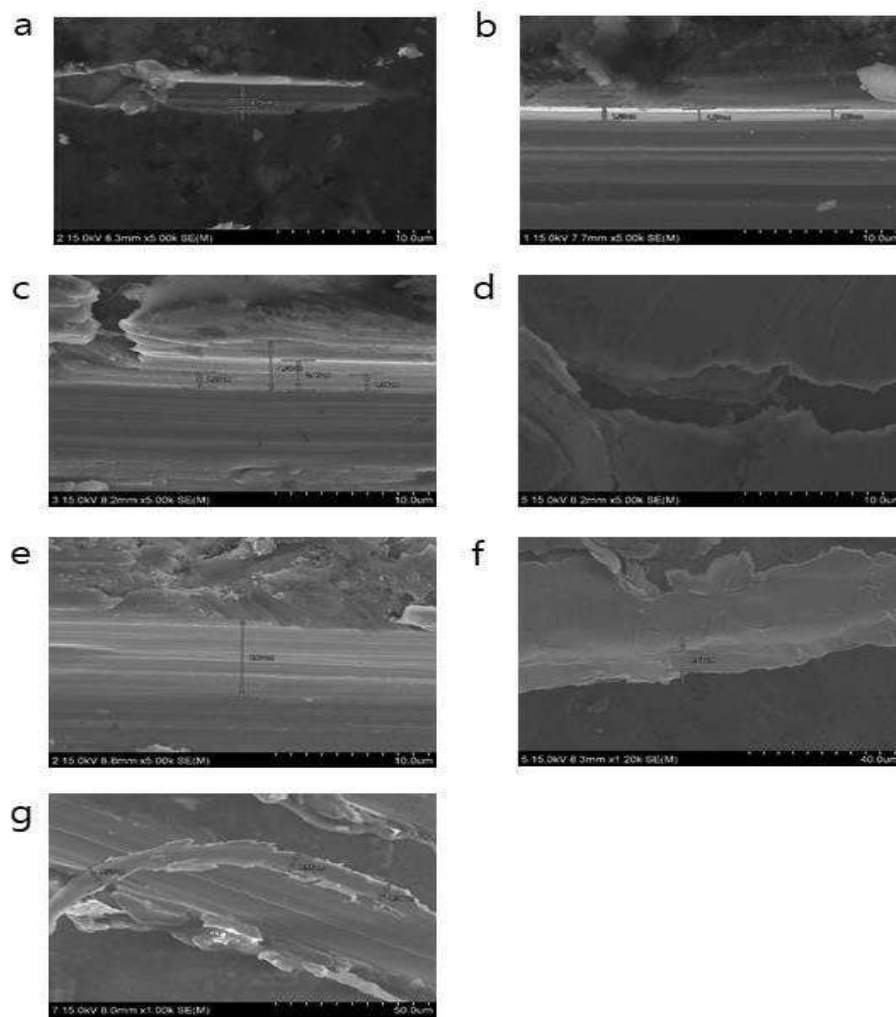
도면4



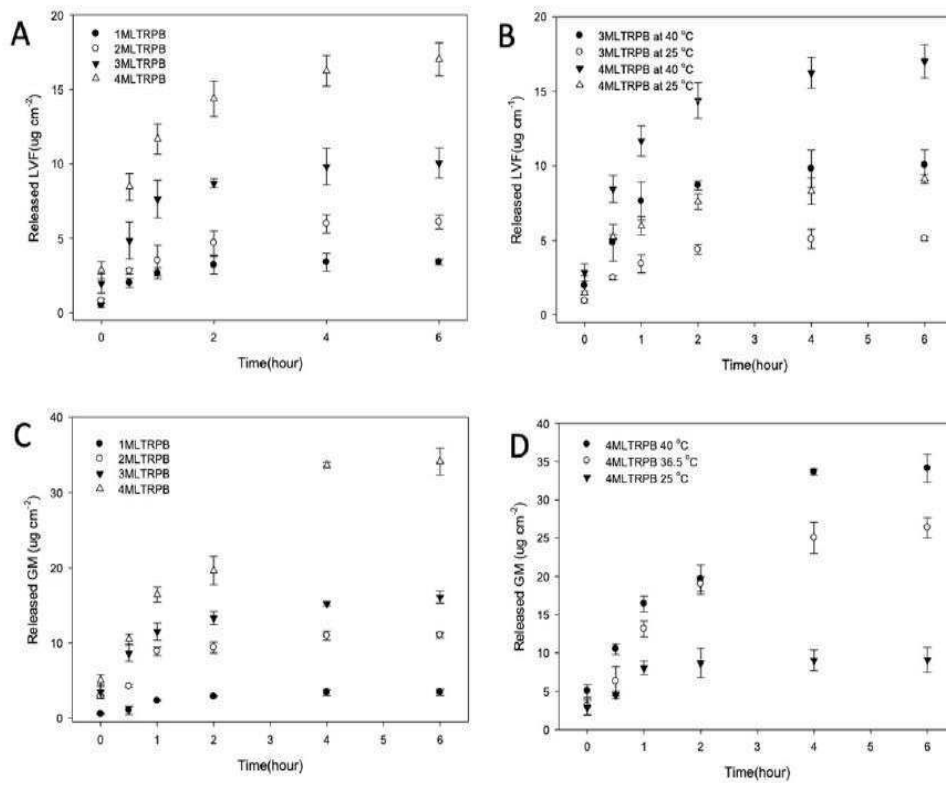
도면5



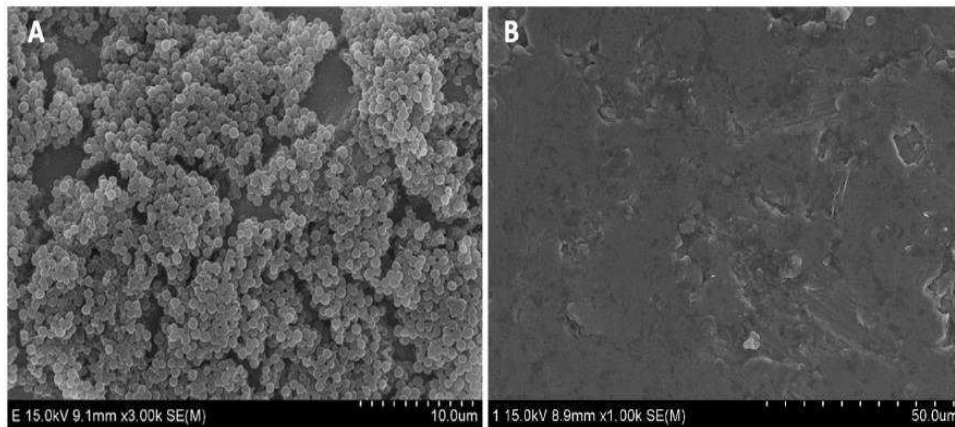
도면6



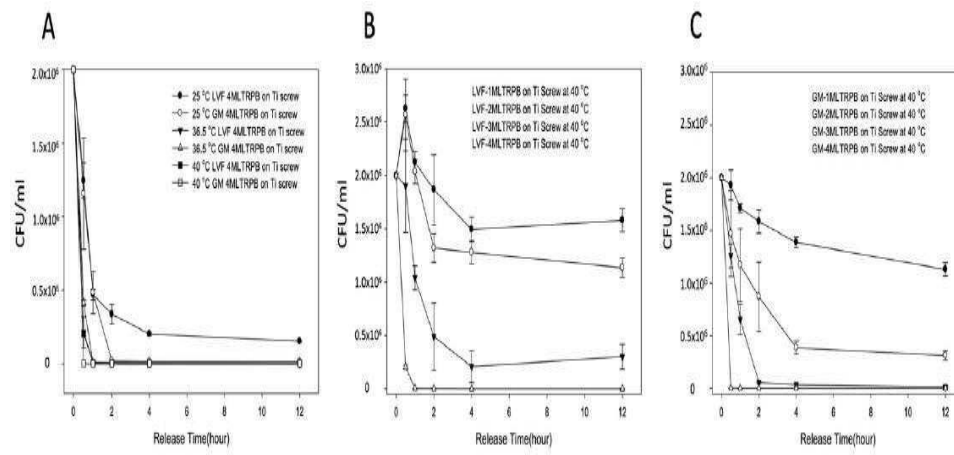
도면7



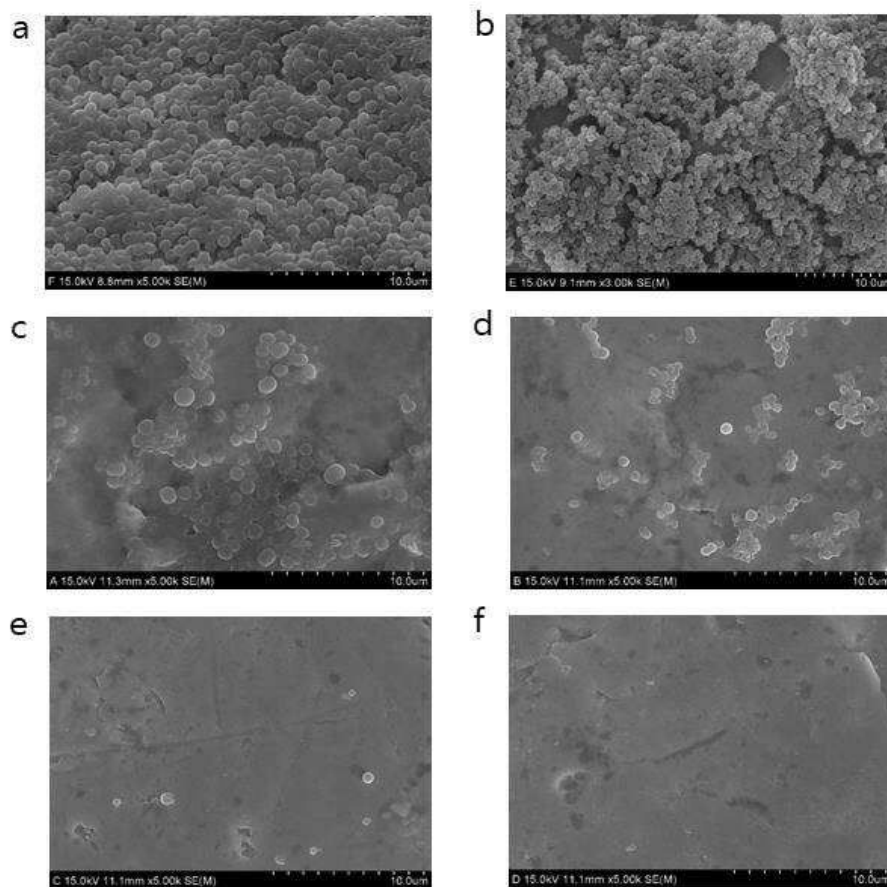
도면8



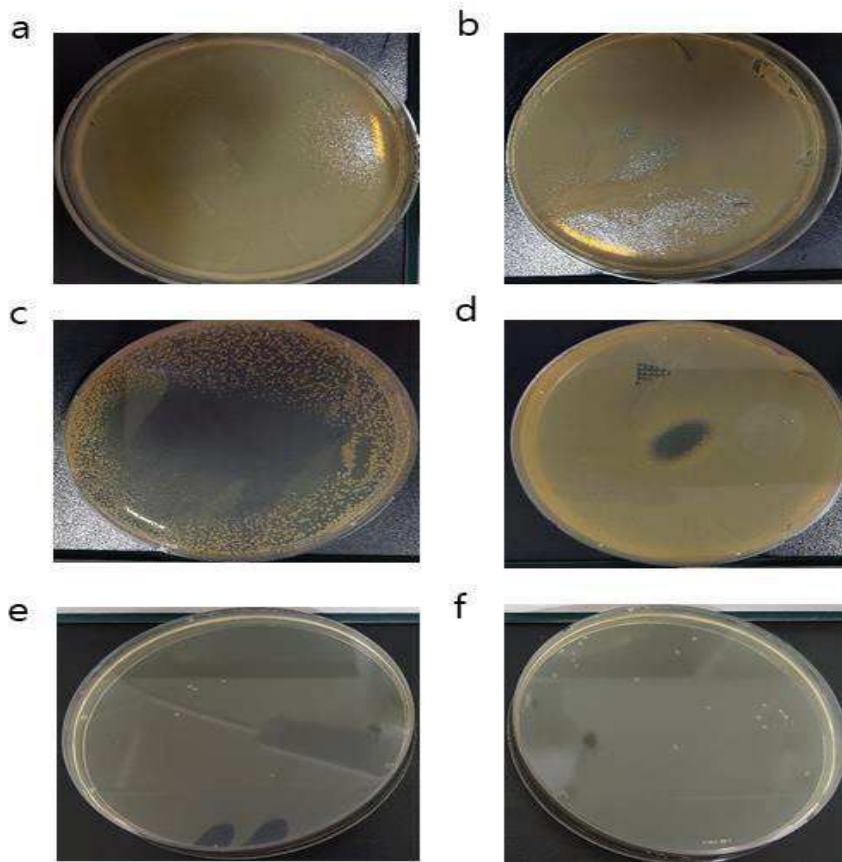
도면9



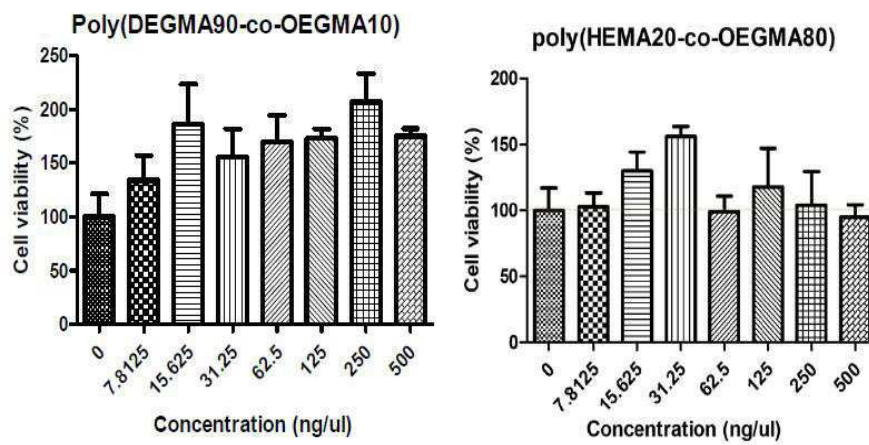
도면10



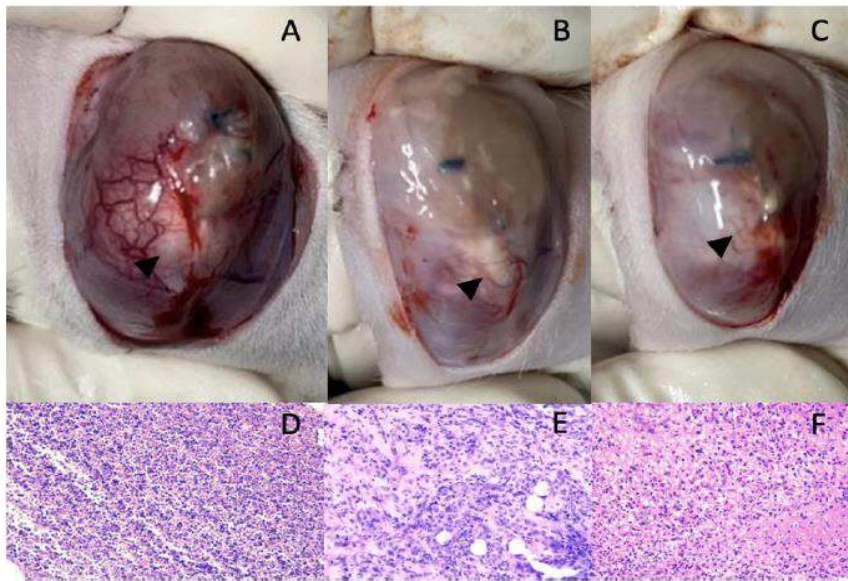
도면11



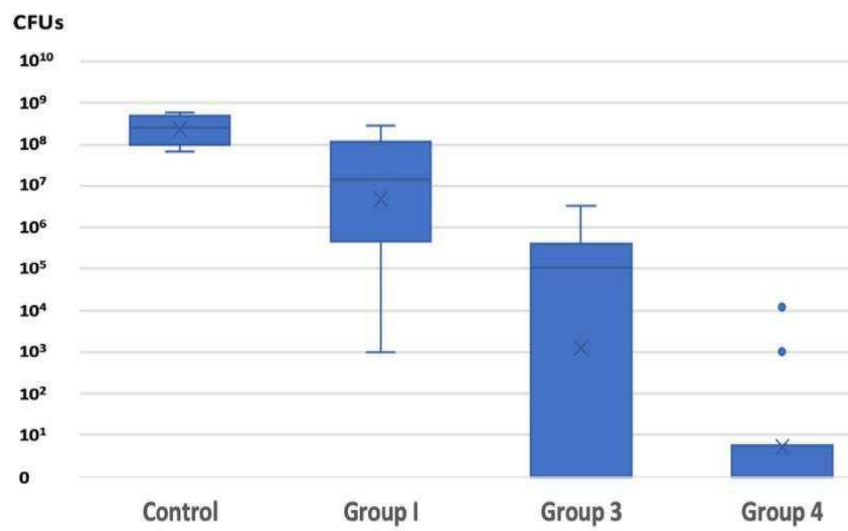
도면12



도면13

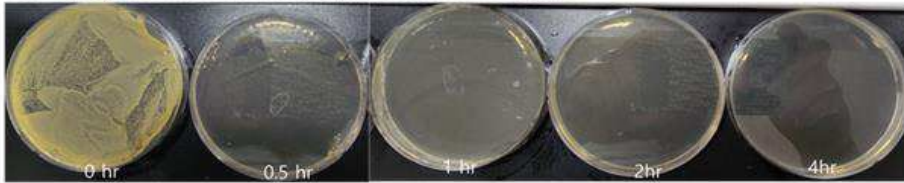


도면14



도면15

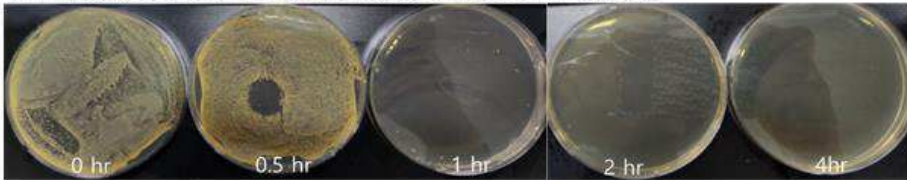
GM impregnated into HEMA rich polymer brushes on Ti- implant



GM impregnated into DEGMA rich polymer brushes on Ti- implant



LVF impregnated into HEMA rich polymer brushes on Ti- implant



LVF impregnated into DEGMA rich polymer brushes on Ti- implant

