



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0130289  
(43) 공개일자 2021년11월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61L 27/54 (2006.01) A61F 2/28 (2006.01)  
A61L 27/10 (2006.01) A61L 27/12 (2006.01)  
A61L 27/34 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61L 27/54 (2013.01)  
A61F 2/28 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0047890

(22) 출원일자 2020년04월21일

심사청구일자 2020년04월21일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

홍진기

서울특별시 서대문구 연세로 50 연세대학교

차재국

서울특별시 서대문구 연세로 50 치과대학병원 619호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 플러스

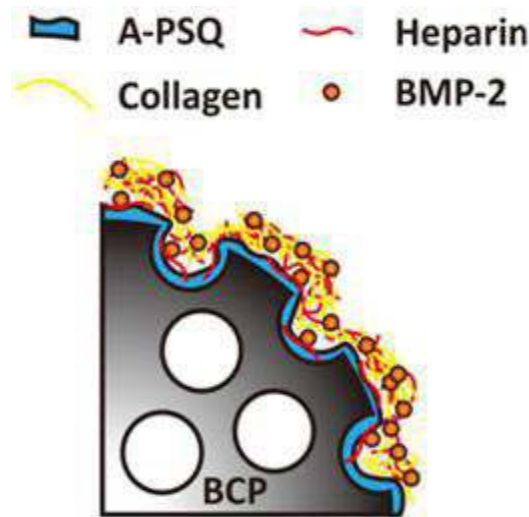
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 약물 방출용 골대체재 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 약물 방출용 골대체재 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명의 약물 방출용 골대체재는 골형성 유도 인자의 방출을 제어할 수 있고, 초기 방출을 억제하여 조직 상의 염증 발생을 억제할 수 있으며, 세포 분화 단계에서 골형성 유도 인자의 방출함으로써 방출 효율을 향상시킬 수 있는 약물 방출용 골대체재를 제공하는 것이다. 또한, 골형성 유도 인자를 담지하는 층을 형성한 이후에도, 골대체재의 다공성이 유지되어 골유도 특성이 우수하여, 치료 효과가 현저히 향상된 약물 방출용 골대체재를 제공하며, 이를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**A61L 27/10** (2013.01)

**A61L 27/12** (2013.01)

**A61L 27/34** (2013.01)

**A61F 2002/2817** (2013.01)

**A61F 2310/00976** (2013.01)

**A61L 2300/414** (2013.01)

**A61L 2300/602** (2013.01)

**A61L 2400/18** (2013.01)

**A61L 2430/02** (2013.01)

(72) 발명자

**정의원**

서울특별시 서대문구 연세로 50 치과대학병원 610호

**한서라**

서울특별시 서대문구 연세로 50 연세대학교

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2019-11-0125

과제번호 NRF-2017R1E1A1A01074343

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 전략공모

연구과제명 피부세포의 노화억제를 위한 산화질소 나노전달체 개발에 관한

연구(3/6)(2017.11.1~2022.10.31)

기 여 율 1/1

과제수행기관명 연세대학교

연구기간 2019.03.01 ~ 2020.02.29

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

아민화-폴리실세스퀴녹세인으로 표면 개질된 골대체재;

상기 골대체재의 표면에 화학 결합되며 카르복실기를 갖는 생체적합성 고분자를 포함하는 코팅층; 및

상기 코팅층 상에 형성되며 서로 다른 전하를 가진 2 이상의 수용성 고분자가 교번하여 적층된 복합체층; 을 포함하고,

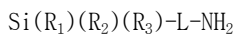
상기 코팅층은 골형성 유도 인자가 담지된 것을 특징으로 하는, 약물 방출용 골대체재.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 아민화-폴리실세스퀴녹세인은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물의 폴리머 형태인 것인 약물 방출용 골대체재.

[화학식 1]



(상기 화학식 1에서  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_2$  및  $\text{R}_3$ 는 각각 독립적으로 ( $\text{C}_1\text{-C}_6$ ) 알콕시기 또는 히드록시기이며, L은 치환 또는 비치환된 ( $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ ) 알킬렌기이다.)

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 골대체재는 하이드록시아파타이트, 이중상 칼슘포스페이트, 테트라칼슘 포스페이트, 칼슘파이로포스페이트, 칼슘폴리포스페이트, 디칼슘포스페이트 무수물, 모노칼슘포스페이트 모노하이드레이트, 지르코니아, 알루미늄 및 실리카로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상의 혼합물인 약물 방출용 골대체재.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 카르복실기를 갖는 생체적합성 고분자는 히알루론산, 헤파린, 콘드로이틴황산, 케라틴황산, 헤파린황산, 더마탄황산에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상인 약물 방출용 골대체재.

#### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 화학 결합은 아마이드 결합인 약물 방출용 골대체재.

#### 청구항 6

제1항에 있어서,

상기 골형성 유도 인자는 골형성 단백질2(Bone Morphogenetic Protein 2, BMP2)를 포함하는 것인 약물 방출용 골대체재.

#### 청구항 7

제1항에 있어서,

상기 복합체층은 서로 다른 전하를 가지는 제1수용성 고분자와 제2수용성 고분자가 1회 이상 교번하여 적층된 것인 약물 방출용 골대체재.

#### 청구항 8

제7항에 있어서,

상기 제1수용성 고분자와 제2수용성 고분자는 각각 헤파린과 콜라겐인 약물 방출용 골대체재.

#### 청구항 9

제1항에 있어서,

상기 복합체층은 골형성 유도 인자를 더 포함하는 것인 약물 방출용 골대체재.

#### 청구항 10

제1항에 있어서,

상기 골형성 유도 인자는 세포의 분화 단계에서 방출되는 것인 약물 방출용 골대체재.

#### 청구항 11

아민화-폴리실세스퀴녹세인을 제조하는 제1단계;

골대체재의 표면에 상기 아민화-폴리실세스퀴녹세인을 축합 반응시켜 표면 개질된 골대체재를 제조하는 제2단계;

상기 표면 개질된 골대체재의 표면에 카르복실기를 갖는 생체적합성 고분자를 화학 결합시켜 코팅층을 형성하는 제3단계;

상기 코팅층 상에 골형성 유도 인자를 담지하여 골형성 유도 인자가 담지된 코팅층을 제조하는 제4단계; 및

상기 골형성 유도 인자가 담지된 코팅층 상에 다층의 수용성 고분자가 적층된 복합체층을 형성하는 제5단계;

를 포함하는 약물 방출용 골대체재 제조방법.

#### 청구항 12

제11항에 있어서,

상기 제5단계의 복합체층은 층상 자기 조립법(Layer-by-layer self assembly)으로 형성하는 것인 약물 방출용 골대체재 제조방법.

#### 청구항 13

제11항에 있어서,

상기 제5단계에서 제조된 복합체층 상에 추가로 골형성 유도 인자를 더 담지하는 제6단계를 더 포함하는 것인 약물 방출용 골대체재 제조방법.

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 약물 방출용 골대체재 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 일반적으로 생체 내의 특정 부위에 골조직의 일부가 결손 되거나 보강을 필요로 하는 경우, 그 부위에 골(骨)을 이식하게 된다. 이와 같이 생체 내에 골이 이식되면, 이식된 골은 이식 부위에 새로운 골의 생성을 유도하고 이식된 골 그 자체는 부분 또는 전체적으로 서서히 분해되는 과정을 거치게 됨으로써, 골 이식 후 일정 기간이 경

과하면 이식 부위는 대부분 새로이 생성된 골에 의해 채워진 상태가 된다.

[0003] 여기서 생체 내에 이식되는 골은, 생체 내의 골조직의 일부를 추출한 것과, 세라믹스(ceramics) 등의 재료로 인공적으로 만들어진 인공 골이 혼합되어 사용되는 것이 일반적이다. 이 때, 인공 골을 흔히 골대체재 또는 합성 골이식재라고 한다.

[0004] 이러한 골대체재는 기본적으로 골전도(osteoconduction), 골유도(osteoinduction), 골생성(osteogenesis) 특성을 요구한다. 골전도는 결함 부위 주변의 골이 자라날 수 있는 물리적 구조를 제공하는 것을 의미하고, 골유도는 세포의 분화를 유도하여 골을 형성시키는 것을 의미하며, 골생성은 골과 함께 이식된 골 형성 세포를 제공하는 것을 의미한다.

[0005] 종래 사용되던 합성골이식재(Synthetic bone graft materials)의 경우, 흔히 세라믹스 재료인 인산칼슘계 화합물을 원료로 하여 제조되고, 독성 및 부작용이 없고, 생리적, 면역적 거부 반응을 일으키지 않고 새로운 골의 생성을 유도할 수 있는 장점이 있다. 이러한 합성골이식재는 보다 뛰어난 골유도 특성을 부여하기 위해 골성장인자 등과 같은 골생성을 촉진시키기 위한 유효성분을 함유하여 사용하고 있다. 그러나 많은 경우에 있어, 함유시킨 유효성분의 방출을 조절하기 어려워, 갑작스럽게 유효성분이 방출되어 염증 반응과 같은 부작용을 유발하거나, 유효성분이 합성골이식재와 결합되어 방출이 되지 않아 고가의 유효성분을 낭비하는 등의 문제점이 있다.

[0006] 따라서, 본 발명이 속하는 기술분야에서는 골대체재에서의 유효성분의 방출을 조절할 수 있으며, 방출 효율을 증가시킴으로써 치료 효과를 향상시킬 수 있는 골대체재의 개발에 대한 요구가 여전히 존재한다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제10-2017-0115451호(2017.10.17)

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 약물 방출용 골대체재를 제공하는 것으로, 구체적으로 골대체재에서의 골형성 유도 인자의 방출을 제어할 수 있고, 초기 방출을 억제하여 조직 상의 염증 발생을 억제할 수 있으며, 세포 분화 단계에서 골형성 유도 인자를 방출함으로써 치료 효과를 향상시킬 수 있는 약물 방출용 골대체재를 제공하는 것이다. 또한, 골형성 유도 인자를 담지하는 층을 형성한 이후에도, 골대체재의 다공성이 유지되어 골유도 특성이 우수하여, 치료 효과가 현저히 향상된 약물 방출용 골대체재를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상술한 바와 같은 약물 방출용 골대체재의 제조방법을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0010] 상기의 목적을 달성하기 위한 본 발명은 아민화-폴리실세스퀴녹세인으로 표면 개질된 골대체재; 상기 골대체재의 표면에 화학 결합되며 카르복실기를 갖는 생체적합성 고분자를 포함하는 코팅층; 및 상기 코팅층 상에 형성되며 서로 다른 전하를 가진 2 이상의 수용성 고분자가 교번하여 적층된 복합체층;을 포함하고, 상기 코팅층은 골형성 유도 인자가 담지된 것을 특징으로 하는, 약물 방출용 골대체재를 특징으로 한다.

[0011] 본 발명의 일 양태로서 상기 아민화-폴리실세스퀴녹세인은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물의 폴리머 형태인 것일 수 있다.

[0012] [화학식 1]

[0013]  $\text{Si}(\text{R}_1)(\text{R}_2)(\text{R}_3)-\text{L}-\text{NH}_2$

[0014] (상기 화학식 1에서  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_2$  및  $\text{R}_3$ 는 각각 독립적으로  $(\text{C}_1-\text{C}_6)$  알콕시기 또는 히드록시기이며, L은 치환 또는 비치환된  $(\text{C}_1-\text{C}_{10})$  알킬렌기이다.)

[0015] 본 발명의 일 양태로서 상기 골대체재는 하이드록시아파타이트, 이중상 칼슘포스페이트, 테트라칼슘

포스페이트, 칼슘파이로포스페이트, 칼슘폴리포스페이트, 디칼슘포스페이트 무수물, 모노칼슘포스페이트 모노하이드레이트, 지르코니아, 알루미늄 및 실리카 등으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상의 혼합물일 수 있다.

- [0016] 본 발명의 일 양태로서 상기 카르복실기를 갖는 생체적합성 고분자는 히알루론산(hyaluronic acid), 헤파린(heparin), 콘드로이틴황산(chondroitin sulfate), 케라틴황산(keratan sulfate), 헤파린황산(heparan sulfate), 더마탄황산(dermatan sulfate) 등에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상인 것일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 일 양태로서 상기 화학 결합은 아마이드 결합인 것일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 일 양태로서 상기 골형성 유도 인자는 골형성 단백질2(Bone Morphogenetic Protein 2, BMP2)를 포함하는 것일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 일 양태로서 상기 복합체층은 서로 다른 전하를 가지는 제1수용성 고분자와 제2수용성 고분자가 1회 이상 교번하여 적층된 것일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 일 양태로서 상기 제1수용성 고분자와 제2수용성 고분자는 각각 헤파린과 콜라겐인 것일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 일 양태로서 상기 복합체층은 골형성 유도 인자를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일 양태로서 상기 골형성 유도 인자는 세포의 분화 단계에서 방출되는 것일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 다른 일 양태는 아민화-폴리실세스퀴녹세인을 제조하는 제1단계; 골대체재의 표면에 상기 아민화-폴리실세스퀴녹세인을 축합 반응시켜 표면 개질된 골대체재를 제조하는 제2단계; 상기 표면 개질된 골대체재의 표면에 카르복실기를 갖는 생체적합성 고분자를 화학 결합시켜 코팅층을 형성하는 제3단계; 상기 코팅층 상에 골형성 유도 인자를 담지하여 골형성 유도 인자가 담지된 코팅층을 제조하는 제4단계; 및 상기 골형성 유도 인자가 담지된 코팅층 상에 다층의 수용성 고분자가 적층된 복합체층을 형성하는 제5단계;를 포함하는 약물 방출용 골대체재 제조방법인 것을 특징으로 한다.
- [0024] 본 발명의 일 양태로서 상기 제5단계의 복합체층은 층상 자기 조립법(Layer-by-layer self assembly)으로 형성하는 것일 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일 양태로서 상기 제5단계에서 제조된 복합체층 상에 추가로 골형성 유도 인자를 더 담지하는 제6단계를 더 포함하는 것일 수 있다.

### 발명의 효과

- [0026] 본 발명에 따른 약물 방출용 골대체재는, 골대체재 표면 상의 아민화-폴리실세스퀴녹세인과 카르복실기를 갖는 생체적합성 고분자가 화학 결합하여 형성된 코팅층 상에 골형성 유도 인자를 담지함으로써, 골대체재와 골형성 유도 인자의 결합을 억제시키고, 방출 효율을 증가시킬 수 있다. 또한, 상기 코팅층 상에 서로 다른 전하를 가진 2 이상의 수용성 고분자가 교번하여 적층된 복합체층을 포함함으로써, 초기에 골형성 유도 인자의 방출을 억제하고, 세포 분화 단계에서의 골형성 유도 인자의 방출을 통해 골유도(osteinduction) 특성을 향상시킬 수 있다.
- [0027] 또한, 본 발명에 따른 약물 방출용 골대체재 제조방법은, 골대체재 표면에 아민화-폴리실세스퀴녹세인을 사용하여 표면 개질하는 단계를 포함하여, 종래 골대체재 표면에 생체적합성 고분자를 물리적으로 코팅층을 형성하는 것에 비하여, 코팅층의 장기간 안정성을 더욱 향상시킬 수 있다. 또한, 층상 자기 조립법(Layer-by layer self assembly)으로 다층의 생체 고분자층을 형성하는 단계를 포함하여, 골형성 유도 인자의 초기 방출을 억제할 수 있는 약물 방출용 골대체재를 제조할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0028] 도 1은 본 발명의 실시예 2에서 제조한 약물 방출용 골대체재인 BCP-A-PSQ-HEP-BMP2-(Col/Hep)5-BMP2를 나타낸 모식도이다.
- 도 2는 본 발명의 실시예 2에서 제조한 약물 방출용 골대체재의 표면 SEM 이미지를 나타낸 것이다. 본 발명의 실시예 2에서 표면처리를 진행하지 않은 BCP의 표면 SEM 이미지와, 아민화-폴리실세스퀴녹세인으로 표면 처리된 BCP인 BCP-A-PSQ의 SEM 이미지 및 아민화-폴리실세스퀴녹세인으로 표면 처리된 BCP에 헤파린이 결합된 코팅층이 형성된 BCP-A-PSQ-HEP의 표면 SEM 이미지를 각각 도 2(a), 도 2(b) 및 도 2(c)에 나타내었다.

도 3은 본 발명의 실시예 2에서 제조한 약물 방출용 골대체재를 XPS를 이용하여 측정한 변화된 원소를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 실시예 2에서 제조된 약물 방출용 골대체재를 EDS를 이용하여 원소의 변화를 이미지로 나타낸 것이다. 코팅이 되지 않은 BCP와 헤파린이 코팅된 BCP-A-PSQ-HEP를 각각 도 4(a) 및 도 4(b)에 나타내었다.

도 5은 본 발명의 실시예 2에서 제조된 약물 방출용 골대체재를 porosimeter를 이용하여 porosity의 변화를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 복합체층의 적층 모델링 실험을 QCM을 이용하여 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 실시예 2에서 제조된 약물 방출용 골대체재의 골형성 유도 인자의 방출량을 ELISA를 이용하여 측정한 것을 나타낸 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 이하 첨부한 도면들을 참조하여 본 발명을 상세히 설명한다. 다음에 소개되는 도면들은 당업자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 예로서 제공되는 것이다. 따라서 본 발명은 이하 제시되는 도면들에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있으며, 이하 제시되는 도면들은 본 발명의 사상을 명확히 하기 위해 과장되어 도시될 수 있다.
- [0030] 또한 달리 정의되지 않는 한, 모든 기술적 용어 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 당업자 중 하나에 의해 일반적으로 이해되는 의미와 동일한 의미를 갖는다. 본 발명에서 설명에 사용되는 용어는 단지 특정 구체예를 효과적으로 기술하기 위함이고 본 발명을 제한하는 것으로 의도되지 않는다.
- [0031] 또한 명세서 및 첨부된 특허청구범위에서 사용되는 단수 형태는 문맥에서 특별한 지시가 없는 한 복수 형태도 포함하는 것으로 의도할 수 있다.
- [0032] 또한 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0033] 본 발명에서 사용되는 용어 '골대체재'는 '인공 골', '합성골이식재'와 동일한 의미로 사용된 것이다.
- [0034] 본 발명에서 사용되는 용어 '유효성분'은 '약물', '골형성 유도 인자'를 포함하는 개념이다.
- [0035] 본 발명에서 사용되는 용어 '아민화-폴리실세스퀴녹세인'은 'Amine-functionalized polysilsesquioxane', 'A-PSQ'와 동일한 의미로 사용된 것이다.
- [0036] 본 발명에서 사용되는 용어 'BCP-A-PSQ-HEP'와 'BAH'는 동일한 의미로 사용된 것이다.
- [0038] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명은 약물 방출용 골대체재 및 이의 제조방법을 제공한다.
- [0039] 본 발명자는 유효성분의 방출 제어가 가능하고, 유효성분의 초기 과다 방출을 억제하며, 세포 분화 단계에서 유효성분이 방출됨으로써, 세포 및 조직에서의 염증을 억제시키고, 방출 효율을 증가시킴으로써, 효과적으로 골이식 치료를 구현할 수 있는 골대체재에 대한 연구를 심화하였다. 이에 따라, 골대체재의 표면을 아민화-폴리실세스퀴녹세인으로 개질하고, 상기 아민화-폴리실세스퀴녹세인과 카르복실기를 갖는 생체적합성 고분자가 화학 결합하여 형성된 코팅층 상에 골형성 유도 인자를 담지하고, 수용성 고분자로 이루어진 복합체층을 상기 코팅층 상에 결합하여, 다층구조의 골대체재를 고안으로써 상기와 같은 효과를 구현할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [0041] 이하, 본 발명의 일 양태에 따른 약물 방출용 골대체재에 대해 상세히 설명한다.
- [0042] 본 발명의 일 양태에 따른 약물 방출용 골대체재는, 아민화-폴리실세스퀴녹세인으로 표면 개질된 골대체재; 상기 골대체재의 표면에 화학 결합되며 카르복실기를 갖는 생체적합성 고분자를 포함하는 코팅층; 및 상기 코팅층 상에 형성되며 서로 다른 전하를 가진 2 이상의 수용성 고분자가 교번하여 적층된 복합체층;을 포함하고, 상기 코팅층은 골형성 유도 인자가 담지 된 것일 수 있다.
- [0043] 본 발명의 일 양태에 따른 골대체재는, 아민화-폴리실세스퀴녹세인으로 표면이 개질 된 것일 수 있다.



- [0044] 상기 아민화-폴리실세스퀴녹세인(Amine-functionalized polysilsesquioxane)은 하기 화학식 1로 표시되는 아미노실란계 화합물이 축합되어 형성된 폴리머(polymer) 형태인 것일 수 있다. 상기 폴리머의 중량 평균 분자량의 범위는 5~100 kDa일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0045] [화학식 1]
- [0046]  $\text{Si}(\text{R}_1)(\text{R}_2)(\text{R}_3)-\text{L}-\text{NH}_2$
- [0047] 상기 화학식 1에서  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_2$  및  $\text{R}_3$ 는 각각 독립적으로 ( $\text{C}_1-\text{C}_6$ ) 알콕시기 또는 히드록시기이며, L은 치환 또는 비치환된 ( $\text{C}_1-\text{C}_{10}$ ) 알킬렌기이다.
- [0048] 상기 화학식 1에서 상기 L이 치환될 경우 ( $\text{C}_1-\text{C}_{10}$ ) 알킬렌기 중 적어도 하나의 메틸렌 단위가 카보닐( $\text{C}=\text{O}$ ), 에스테르( $\text{COO}$ ), 아미노( $\text{NH}$ ), 아마이드( $\text{CONH}$ ) 또는 에테르( $\text{O}$ )기로 치환될 수 있는 것을 의미한다.
- [0049] 구체적으로, 상기 화학식 1의 아미노실란계 화합물에 있어서, L은 치환 또는 비치환된 ( $\text{C}_1-\text{C}_{10}$ ) 알킬렌기일 수 있다.
- [0050] 상기 화학식 1로 표시되는 아미노실란계 화합물은 실리콘 원자에 결합된 ( $\text{C}_1-\text{C}_6$ ) 알콕시기 또는 히드록시기가 다른 아미노실란의 실리콘 원자에 결합된 ( $\text{C}_1-\text{C}_6$ ) 알콕시기 또는 히드록시기와 축합되어  $-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$ 결합을 형성함으로써 폴리머가 제조될 수 있다. 이에 따라 아민기가 폴리머의 겉가지에 다수 형성되며, 상기 폴리머는 복수개의 아민기를 포함하게 된다.
- [0051] 상기 화학식 1에서  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_2$  및  $\text{R}_3$  관능기가 알콕시기이며 L이 비치환된 ( $\text{C}_1-\text{C}_{10}$ ) 알킬렌기인 화합물의 일 예로는, 아미노메틸트리메톡시실란, 아미노에틸트리메톡시실란, 아미노프로필트리메톡시실란, 아미노부틸트리메톡시실란, 아미노펜틸트리메톡시실란, 아미노헥실트리메톡시실란, 아미노헵틸트리메톡시실란, 아미노옥틸트리메톡시실란, 아미노노닐트리메톡시실란, 아미노데실트리메톡시실란, 아미노메틸트리에톡시실란, 아미노에틸트리에톡시실란, 아미노프로필트리에톡시실란, 아미노부틸트리에톡시실란, 아미노펜틸트리에톡시실란, 아미노헥실트리에톡시실란, 아미노헵틸트리에톡시실란, 아미노옥틸트리에톡시실란, 아미노노닐트리에톡시실란 및 아미노데실트리에톡시실란 등일 수 있으며, 구체적으로 아미노에틸트리에톡시실란, 아미노프로필트리에톡시실란, 아미노부틸트리에톡시실란 일 수 있다.
- [0052] 상기 화학식 1에서  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_2$  및  $\text{R}_3$  관능기가 히드록시기이며 L이 비치환된 ( $\text{C}_1-\text{C}_{10}$ ) 알킬렌기인 화합물의 일 예로는, 아미노메틸실란트리올, 아미노에틸실란트리올, 아미노프로필실란트리올, 아미노부틸실란트리올, 아미노펜틸실란트리올, 아미노헥실실란트리올, 아미노헵틸실란트리올, 아미노옥틸실란트리올, 아미노노닐실란트리올 및 아미노데실실란트리올 등일 것일 수 있으며, 구체적으로 아미노메틸실란트리올, 아미노에틸실란트리올, 아미노프로필실란트리올인 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0053] 구체적으로, 상기 화학식 1로 표시되는 아미노실란계 화합물은 3-아미노프로필 트리에톡시실란(3-aminopropyltriethoxysilane, APTES)이 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0054] 상기 화학식 1로 표시되는 아미노실란계 화합물의 폴리머가 골대체재의 표면 개질에 사용될 경우, 상술한 바와 같이 폴리머는 겉가지에 복수개의 아민기를 포함하기 때문에 골대체재의 표면에 효과적으로 화학 결합될 수 있으며, 후술하는 바와 같이, 생체적합성 고분자와 매우 효과적으로 화학 결합이 형성될 수 있다. 또한, 골형성 유도 화합물이 상기 골대체재의 표면에 강하게 흡착하거나 결합하는 것을 억제할 수 있어, 고가의 골형성 유도 화합물이 방출되지 못하는 종래의 문제점을 해결할 수 있어 바람직하다.
- [0055] 상기 폴리머는 골대체재의 표면에 흡착 또는 결합되어 표면개질될 수 있으며, 골대체재의 표면 특성, 예를 들어, 표면 전위, 친수성 또는 소수성, 원자의 분포, 결정 특성과 같은 골대체재가 가지는 물리화학적 표면 특성이 실질적으로 관찰되지 않고, 표면 분석 시 폴리머의 물리화학적 특성이 관찰되는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 다공성 골대체재의 경우에도 골대체재의 기공율(porosity), 기공구조(tortuosity) 및 기공 표면적과 같은 기공 구조에는 실질적으로 미치지 않는 것이 바람직할 수 있다.
- [0056] 상기 골대체재는 결합 부위 주변의 골이 자라날 수 있는 물리적 구조를 제공하는 골전도(osteoconduction) 특성을 가지는 것이면, 제한 없이 사용될 수 있다. 이에 따라 골대체재는 다공성 골대체재가 바람직하게 사용될 수 있으며, 구체적으로 다공성을 가지는 인산칼슘계 물질, 다공성 지르코니아, 다공성 알루미늄 및 다공성 실리카



등으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상일 수 있고, 바람직하게는 상기 다공성 인산칼슘계 물질을 포함하는 것일 수 있다.

- [0057] 상기 인산칼슘계 물질은 인(P)과 칼슘(Ca)을 주 원소로 하여 구성되어 생체 내의 골의 성분과 유사하여, 생체 내에 이식되더라도 생리적, 면역적 거부 반응을 일으키지 않고 새로운 골의 생성을 유도할 수 있어 바람직하다. 구체적으로는 하이드록시아파타이트(hydroxyapatite, HAp), 이중상 칼슘포스페이트(biphasic calcium phosphate, BCP), 테트라칼슘 포스페이트(tetracalcium phosphate, TTCP), 칼슘파이로포스페이트(calcium pyrophosphate, CPC), 칼슘폴리포스페이트(calcium polyphosphate, CPP), 디칼슘포스페이트 무수물(dicalcium phosphate anhydrous, DCPA) 및 모노칼슘포스페이트 모노하이드레이트(monocalcium phosphate monohydrate, MCPM) 등에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상을 포함하는 것일 수 있다.
- [0058] 상기 골대체재는 입자의 평균 크기가 10 ~ 5000  $\mu\text{m}$ , 구체적으로 100 ~ 1500  $\mu\text{m}$ , 더욱 구체적으로는 500 ~ 1000  $\mu\text{m}$ 의 크기를 갖는 것일 수 있다.
- [0059] 본 발명의 일 양태에 따르면, 상기 코팅층은, 상기 표면 개질된 골대체재의 표면 상의 아민화-폴리실세스퀴녹세인의 아민기( $-\text{NH}_2$ )와 카르복실기를 갖는 생체적합성 고분자의 카르복실기( $-\text{COOH}$ )가 화학 결합되어 형성되는 것일 수 있고, 상기 화학 결합은 아마이드 결합( $-\text{CONH}-$ )일 수 있다.
- [0060] 상기 카르복실기를 갖는 생체 고분자는, 수용성 카르복실기 함유 생체 고분자일 수 있으며, 구체적으로 히알루론산(hyaluronic acid), 헤파린(heparin), 콘드로이틴황산(chondroitin sulfate), 케라틴황산(keratan sulfate), 헤파린황산(heparan sulfate), 더마탄황산(dermatan sulfate) 등에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0061] 상기 카르복실기를 갖는 생체적합성 고분자는 상기 아민화-폴리실세스퀴녹세인과 화학 결합하여 코팅층을 형성함으로써, 후술하는 골형성 유도 인자가 상기 골대체재와 직접적으로 결합하는 것을 억제하고, 상기 골형성 유도 인자가 안정적으로 담지 될 수 있도록 한다. 또한, 상기 코팅층은, 상기 골대체재의 표면 기공을 완전히 막지 않고, 기공을 유지시킴으로써, 골유도 특성이 저하되는 것을 방지할 수 있어 더욱 바람직하다.
- [0062] 상기 코팅층에 포함되는 카르복실기를 갖는 생체적합성 고분자의 카르복실기의 총 몰수는 아민화-폴리실세스퀴녹세인의 아미노기의 총 몰수와 동일하거나 더 많을 수 있다. 바람직하게, 상기 코팅층에 포함되는 카르복실기를 갖는 생체적합성 고분자의 카르복실기의 총 몰수는 골대체재의 표면에 존재하는 아미노기의 총 몰수보다 많을 수 있으며, 보다 많은 몰수의 카르복실기가 코팅층에 존재함에 따라, 후술하는 바와 같이, 서로 다른 전하를 가진 수용성 고분자가 카르복실기를 갖는 생체적합성 고분자의 카르복실기와 결합하여 복합체층이 안정되게 형성될 수 있다.
- [0063] 상기 본 발명의 일 양태에 따른 코팅층은, 골형성 유도 인자가 담지된 것일 수 있다. 상기 골형성 유도 인자는 골재생을 위한 성장 인자로, 구체적으로는 골형성 단백질(Bone Morphogenetic Protein, BMP)를 포함하는 것일 수 있고, 상기 골형성 단백질은 골형성 단백질1(Bone Morphogenetic Protein 1, BMP1), 골형성 단백질2(Bone Morphogenetic Protein 2, BMP2), 골형성 단백질4(Bone Morphogenetic Protein 4, BMP4), 골형성 단백질7(Bone Morphogenetic Protein 7, BMP7) 등에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상을 포함하는 것일 수 있고, 더욱 구체적으로는 골형성 단백질2(BMP2)를 포함하는 것일 수 있다. 상기 골형성 단백질2(BMP2)는 골유도 특성이 가장 우수하다고 보고되어 있어, 본 발명에서도 골형성 유도 인자로서 바람직하게 이용될 수 있다.
- [0064] 또한, 상기 골형성 유도 인자와 함께, 골형성을 더욱 촉진시키기 위하여 알렌드로네이트(alendronate), 리제드로네이트(risedronate), 졸레드로네이트(zoledronate), 에티드로네이트(etidronate), 코로드로네이트(clodronate), 티루드로네이트(tiludronate), 파미드로네이트(pamidronate), 올파드로네이트(olpadronate), 이바드로네이트(ibandronate), 혈관형성인자(VEGF), 혈소판 유래 성장인자(PDFG), 섬유모세포인자(FGF), 인슐린 유사 성장인자(IGF), 토브라마이신(tobramycin), 젠타마이신(gentamicin) 및 반코마이신(vancomycin) 등에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상을 더 포함할 수도 있다.
- [0065] 상기 본 발명의 일 양태에 따른 복합체층은, 상기 코팅층 상에 서로 다른 전하를 가진 2 이상의 수용성 고분자가 교번하여 적층된 것일 수 있다.
- [0066] 상세하게, 상기 수용성 고분자는 제1수용성 고분자와 제2수용성 고분자를 포함하며, 상기 제1수용성 고분자와 제2수용성 고분자는 주어진 pH에서 서로 다른 전하를 가질 수 있다. 예를 들어 양으로 하전된 수용성 고분자 및 음으로 하전된 수용성 고분자일 수 있다. 제1수용성 고분자와 제2수용성 고분자가 각각 서로 다른 전하를 가짐

에 따라 각각의 수용성 고분자를 함유하는 용액에 교번적으로 침지시킴으로써, 단계적으로 제1수용성 고분자와 제2수용성 고분자가 안정되게 순차적으로 결합되며 적층될 수 있다. 즉, 상기 제1수용성 고분자 및 제2수용성 고분자는 서로 다른 전하를 가짐으로써 후술하는 바와 같이, 약물 방출용 골대체재 제조방법에서 층상 자기 조립법(Layer-by-Layer self assembly)으로 교번하여 적층됨으로써, 다층의 적층구조를 가지는 복합체층을 형성할 수 있다.

[0067] 일 실시예에 따르면, 코팅층이 카르복실기를 갖는 생체적합성 고분자에 의해 음으로 하전되어 있을 경우, 코팅층 상에 적층되는 수용성 고분자는 양으로 하전된 수용성 고분자일 수 있으며, 양으로 하전된 수용성 고분자가 적층된 후, 이어서 음으로 하전된 수용성 고분자가 적층될 수 있다. 이러한 순차적인 적층 단계는 1회 이상, 바람직하게 2회 이상 반복될 수 있으며, 원하는 복합체층의 두께가 얻어질 때까지 복수회 반복될 수 있으며, 비한정적으로 1000회 이하일 수 있다.

[0068] 일 실시예에 따르면, 제1수용성 고분자와 제2수용성 고분자는 각각 헤파린(heparin)과 콜라겐(collagen)일 수 있으나, 수용성과 이온성을 가지면서 생체적합성을 가지는 고분자라면 제한받지 않고 사용될 수 있다.

[0069] 일 실시예에 따르면, 상기 복합체층은 상술한 바와 같은 골형성 유도 인자를 더 담지하여 포함할 수도 있다. 상기 복합체층은 층상 자기 조립법에 의해 다층의 적층구조를 가짐에 따라 고분자 사슬 내에 골형성 유도 인자가 안정적으로 담지될 수 있으며, 코팅층에 포함되어 있는 골형성 유도 인자의 방출이 이뤄지기 전, 복합체층에 포함되어 있는 골형성 유도 인자가 먼저 방출이 이뤄질 수 있다.

[0070] 본 발명에 따른 약물 방출용 골대체재는 상기 복합체층을 포함함으로써, 상기 코팅층 상에 담지된 골형성 유도 인자가 초기에 방출되는 것을 억제하여, 조직 및 세포에서의 염증을 유발하는 등의 부작용을 억제하고, 세포의 분화 단계에서 방출되게 함으로써, 골 손실 부위에서의 골형성 또는 골재생을 더욱 촉진시킴으로써, 치료 효과를 더욱 향상시킬 수 있어 바람직하다.

[0072] 이하, 본 발명의 일 양태에 따른 약물 방출용 골대체재의 제조방법에 대해 상세히 설명한다.

[0073] 본 발명에 따른 약물 방출용 골대체재 제조방법은, 아민화-폴리실세스퀴녹세인을 제조하는 제1단계; 골대체재의 표면에 상기 아민화-폴리실세스퀴녹세인을 축합 반응시켜 표면 개질된 골대체재를 제조하는 제2단계; 상기 표면 개질된 골대체재의 표면에 카르복실기를 갖는 생체적합성 고분자를 화학 결합시켜 코팅층을 형성하는 제3단계; 상기 코팅층 상에 골형성 유도 인자를 담지하여 상기 골형성 유도 인자가 담지된 코팅층을 제조하는 제4단계; 및 상기 골형성 유도 인자가 담지된 코팅층 상에 다층의 수용성 고분자가 적층된 복합체층을 형성하는 제5단계를 포함하는 것일 수 있다.

[0074] 상기 제1단계의 상기 아민화-폴리실세스퀴녹세인은 하기 화학식 1로 표시되는 아미노실란계 화합물을 사용하여 제조하는 것일 수 있고, 상기 아미노실란계 화합물은 상술한 아미노실란계 화합물과 동일하게 사용할 수 있다.

[0075] [화학식 1]

[0076]  $\text{Si}(\text{R}_1)(\text{R}_2)(\text{R}_3)-\text{L}-\text{NH}_2$

[0077] (상기 화학식 1에서 R1, R2 및 R3는 각각 독립적으로 (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) 알콕시기 또는 히드록시기이며, L은 치환 또는 비치환된 (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>) 알킬렌기이다.)

[0078] 상기 아미노실란계 화합물은 졸-겔(sol-gel) 방법을 이용하여 폴리머 형태의 아민화-폴리실세스퀴녹세인을 제조하고, 제조한 아민화-폴리실세스퀴녹세인을 상기 골대체재와 축합 반응시킴으로써, 골대체재의 표면을 아민화-폴리실세스퀴녹세인으로 개질하는 제2단계를 포함하는 것일 수 있다.

[0079] 상기 제1단계에서 졸-겔 방법에 의해 제조되는 아민화-폴리실세스퀴녹세인은 알코올-물 공용매 상에서 제조될 수 있다. 일 예로 상기 알코올은 (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) 알코올일 수 있으며, 구체적으로 에탄올일 수 있다. 알코올에 상기 아미노실란계 화합물의 단량체를 먼저 혼합하고, 물을 상기 아미노실란계 화합물의 단량체가 용해된 용액에 투입하여 공용매에 용해된 아미노실란계 화합물의 단량체 반응용액을 제조한다. 이어서 산을 상기 반응용액에 투입하고 축합반응을 통해 아민화-폴리실세스퀴녹세인이 제조될 수 있다.

[0080] 상기 산은 유기산 또는 무기산 등을 포함할 수 있고, 구체적으로 상기 유기산은 초산(Acetic acid), 글리콜산(Glycolic acid), 구연산(Citric acid), 글루콘산(Gluconic acid), 요산(Uric acid), 설펜산(Sulfonic acid),

붕산(Boric acid), 시트르산(Citric acid) 또는 젖산(Lactic acid) 등을 포함하는 것일 수 있고, 상기 무기산은 황산, 질산, 염산 또는 인산 등을 포함하는 것일 수 있고, 구체적으로는 염산일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0081] 상기 알코올-물 공용매에서 알코올 : 물의 부피비는 1 : 0.001 내지 1 : 0.1, 구체적으로 1 : 0.002 내지 1 : 0.05일 수 있고, 더욱 구체적으로는 1 : 0.005 내지 1 : 0.03일 수 있다. 상기 아미노실란계 화합물은 상기 알코올에 대하여 부피비로 10 : 0.1 내지 10 : 2의 범위로 포함되는 것일 수 있고, 구체적으로는 10 : 0.5 내지 10 : 1.5로 포함되는 것일 수 있다. 상기 산은 상기 알코올-물 공용매에 대하여 1 내지 1000  $\mu$ M의 농도로 포함되는 것일 수 있고, 구체적으로는 10 내지 800  $\mu$ M로 포함되는 것일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0082] 상기 축합반응은 80 ~ 120  $^{\circ}$ C에서 10 ~ 40 시간 동안 반응시켜 제조하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0083] 상기 제2단계에서는, 상기 제1단계에서 제조한 아민화-폴리실세스퀴녹세인을 용매와 혼합한 혼합 용액에 상기 골대체제를 넣고, 반응시킴으로써, 상기 골대체제의 표면 상에 아민화-폴리실세스퀴녹세인이 결합되도록하여, 표면 개질 반응이 수행된다.
- [0084] 상기 골대체제는 상술한 골대체제와 동일한 것을 사용할 수 있고, 상기 용매로는 제한되지 않으나, 에탄올 무수물을 사용할 수 있다. 상기 용매와 상기 아민화-폴리실세스퀴녹세인은 부피비로 0.5 : 1 내지 1 : 0.5로 혼합되는 것일 수 있다. 상기 반응은 80 ~ 120  $^{\circ}$ C에서 1 내지 6시간 반응하는 것일 수 있고, 상기 반응 단계 이후, 결합 안정화를 위하여 추가의 열처리를 수행할 수 있으며, 상기 열처리는 80 ~ 120  $^{\circ}$ C에서 6 내지 12시간 반응시키는 것일 수 있다.
- [0085] 상기 표면 개질된 골대체제의 표면에 카르복실기를 갖는 생체적합성 고분자를 화학 결합시켜 코팅층을 형성하는 제3단계는 상기 표면 개질된 골대체제의 표면에 존재하는 아민기( $-NH_2$ )와 카르복실기( $-COOH$ )를 갖는 생체적합성 고분자가 아미드( $-CONH-$ ) 결합을 통하여 결합됨으로써, 코팅층을 형성하는 것일 수 있고, 상기 생체적합성 고분자는 상술한 생체적합성 고분자와 동일한 것을 사용할 수 있다.
- [0086] 상기 아미드 결합은 아미드 결합을 유도하는 커플링제라면 제한받지 않고 사용될 수 있으며, 예시적으로, 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methyl-morpholinium chloride(DMT-MM)를 사용하는 것일 수 있다. 상기 DMT-MM을 사용하는 경우, 물리적인 방법으로 상기 골대체제에 상기 생체적합성 고분자를 코팅하는 것에 비하여 오랜 기간 안정적으로 코팅을 유지시킬 수 있고, 또한, 특별히 pH 나 온도 등의 조건을 설정하지 않고도, 효과적으로 아미드 결합을 형성할 수 있어 바람직하다.
- [0087] 상기 커플링제의 함량은 상기 생체적합성 고분자에 대하여 상기 커플링제는 중량비로 1 : 3으로 포함되는 것일 수 있고, 구체적으로는 1 : 2의 중량비로 포함되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0088] 상기와 같이 코팅층을 형성하는 경우, 상기 골대체제의 표면의 기공이 완전히 막히는 것을 방지하고, 기공이 유지되어, 골유도 특성이 유지되어 더욱 바람직하다.
- [0089] 상기 제4단계는 코팅층 상에 골형성 유도 인자를 담지하는 단계로 상기 담지는 물리적 흡착방법, 예를 들면 침지법 등의 통상적으로 사용되는 담지방법이면 제한되지 않고 사용될 수 있다.
- [0090] 일 실시예로 침지법을 이용하는 경우, 상기 제4단계는 골형성 유도 인자를 용매상에 용해시켜 골형성 유도 인자 용액을 제조하고, 상기 골형성 유도 인자 용액 상에 상기 제3단계에서 제조한 코팅층이 형성된 골대체제를 침지시켜 제조하는 것일 수 있다. 상기 제3단계에서 제조한 코팅층이 형성된 골대체제는 골형성 유도 인자 용액에 12 ~ 24시간 동안 침지하는 것일 수 있고, 구체적으로는 14 ~ 18 시간 침지하는 것일 수 있다.
- [0091] 상기 골형성 유도 인자 용액에서 상기 골형성 유도 인자는 상술한 골형성 유도 인자와 동일한 것을 사용할 수 있고, 상기 용매는 제한되지는 않으나 인산완충생리식염수(phosphate-buffered saline, PBS)를 바람직하게 사용할 수 있다.
- [0092] 상기 골형성 유도 인자는 0.001 ~ 100 mg/ml 농도의 버퍼 수용액에 포함되며, 상기 버퍼 수용액에 상기 코팅층이 형성된 골대체제가 침지시켜 물리적으로 담지될 수 있다. 상기 버퍼 수용액 내에서 골형성 유도 인자의 농도는 구체적으로는 0.001 ~ 1 mg/ml, 더욱 구체적으로는 0.005 ~ 0.1 mg/ml의 농도로 포함되는 것일 수 있다. 상기 범위에서 방출 효율이 우수하여, 골형성이 원활하게 촉진될 수 있다.
- [0093] 상기 담지하는 단계는 상기 코팅층에 의하여 골형성 유도 인자가 안정적으로 담지될 수 있고, 상기 골대체제와

골형성 유도 인자가 직접적으로 결합되어, 방출이 되지 않는 종래 문제점을 해결할 수 있어 바람직하다.

- [0094] 이후, 상기 골형성 유도 인자가 담지된 코팅층 상에 다층의 수용성 고분자가 교번하여 적층된 복합체층을 형성하는 제5단계를 포함할 수 있다. 상기 제5단계는 상기 서로 다른 전하를 가진 2 이상의 수용성 고분자를, 층상 자기 조립법(Layer-by layer self assembly)을 이용하여 교번하여 적층시킴으로써, 다층의 적층구조를 가지는 박막인 복합체층을 형성하는 것일 수 있다.
- [0095] 층상 자기 조립법이란, 기판에 상대 전하를 띠는 용액을 순차적으로 분사하는 과정을 원하는 만큼 반복함으로써 박막을 적층시키는 것을 의미하고, 상기 용액을 서로 혼합하는 것이 아니라 기질을 사용하는 방법이기 때문에 상분리가 일어나지 않는 박막 또는 고분자층을 제작할 수 있어 바람직하다.
- [0096] 상기 층상 자기 조립법은 pH 4 ~ pH 6의 용매에, 상기 제1수용성 고분자 및 제2수용성 고분자를 각각 용해시켜 서로 다른 전하를 가지는 제1수용성 고분자 용액과 제2수용성 고분자 용액을 제조하고, 상기 제1수용성 고분자 용액 및 제2수용성 고분자 용액에 교대로 침지 후 세척하는 과정을 2회 이상 반복함으로써, 다층의 박막층인 복합체층을 형성하는 것일 수 있다.
- [0097] 상기 제1수용성 고분자 용액과 제2수용성 고분자 용액은, 상기 제1수용성 고분자 및 제2수용성 고분자를 용매에 용해시켜 제조되는 것일 수 있고, 상기 제1수용성 고분자 용액과 제2수용성 고분자 용액은 공지된 방법을 이용하여 추가로 더 멸균하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 제1수용성 고분자와 제2수용성 고분자는 상술한 수용성 고분자와 동일한 것을 사용할 수 있고, 상기 용매는 아세트산 나트륨 완충액(sodium acetate buffer)를 바람직하게 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 제1수용성 고분자 용액과 제2수용성 고분자 용액의 농도는 각각 0.1 내지 10 mg/ml, 구체적으로는 0.5 내지 2 mg/ml일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0098] 상기 복합체층은 상기 골형성 유도 인자가 담지된 코팅층을 덮어, 상기 골형성 유도인자가 초기에 갑작스럽게 방출되는 것을 억제하고, 초기 방출에 의해 세포나 조직 등에서의 염증이 발생하는 등의 부작용을 방지할 수 있어 바람직하다. 또한, 세포 분화단계에서 골형성 유도 인자가 방출되게 함으로써, 골 이식 치료 효과를 향상시킬 수 있어 더욱 바람직하다.
- [0099] 비한정적으로, 상기 제6단계는 상기 제5단계에서 제조된 복합체층 상에 추가로 골형성 유도 인자를 더 담지하는 단계를 포함하는 것일 수 있다. 상기 추가로 담지하는 골형성 유도 인자는 상술한 골형성 유도 인자와 동일한 것을 사용할 수 있고, 상기 골형성 유도 인자 외에, 약물 등과 같은 유효성분을 추가로 더 포함할 수 있다.
- [0100] 상기 제6단계에 의해 추가로 골형성 유도 인자를 더 담지하는 경우, 다량의 유효성분을 골 결손 부위에 방출시킬 수 있고, 방출 효율을 더욱 향상시킬 수 있어 바람직하다.
- [0102] 이하 본 발명을 실시예에 의해 구체적으로 설명한다. 아래에서 설명하는 실시예는 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 발명이 실시예에 한정되지 않는다.
- [0103] 이하 실시예 및 비교예를 바탕으로 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 다만 하기 실시예 및 비교예는 본 발명을 더욱 상세히 설명하기 위한 하나의 예시일 뿐, 본 발명이 하기 실시예 및 비교예에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [0104] [실험방법]
- [0105] 1. 기공도(porosity) 측정
- [0106] 코팅되지 않은 BCP와 코팅된 BCP인 BCP-A-PSQ-HEP를 porosimeter(Quantachrome, PM33GT)를 이용하여 기공 내로 수은을 침투시켜 측정하였다.
- [0107] 2. 골대체재의 표면 특성 측정
- [0108] 1) XPS 측정
- [0109] 코팅이 되지 않은 BCP와 표면 처리된 BCP인 BCP-A-PSQ와 헤파린이 코팅된 BCP인 BCP-A-PSQ-HEP를 각각 시료로 사용하여, XPS (X-ray photoelectron spectroscopy) 분석을 실시하여, 각각의 시료에 포함된 원소를 분석하였다.
- [0110] 2) EDS 측정



- [0111] 코팅이 되지 않은 BCP와 헤파린이 코팅된 BCP인 BCP-A-PSQ-HEP를 카본 테이프에 접촉시킨 후 백금 코팅을 60초간 진행하고, 코팅되지 않은 BCP는 10kV의 조건으로, 코팅된 BCP는 15kV의 조건으로 SEM-EDS(JEOL, 7610f-plus)을 이용하여 측정하였다.
- [0112] 3) QCM 측정
- [0113] 산소 플라즈마를 이용하여 기관(Au 전극) 상에 하이드록시기를 유도하고, 하이드록시기가 유도된 기관을 콜라겐 용액에 약 5분간 담근 후, 위상을 2분, 1분 동안 2회 진행하였다. 이어서 헤파린 용액에 기관을 담겨 앞선 실험을 계속적으로 반복한다. 새로운 고분자 용액을 담구기 전에, 박막이 쌓여있는 기관을 QCM 전극에 로딩하여 주파수를 측정하였다. 위의 과정을 다층박막을 쌓는 중간중간 모두 진행하였다.
- [0114] 3. 방출량 측정
- [0115] 하기 실시예들에서 제조한 BMP2가 담지되어 있는 BCP를 인산완충생리식염수(phosphate-buffered saline, PBS)에 넣어 37 °C 인큐베이터에 보관하여 일정 시간마다 용액을 취한 후, 취해진 용액은 냉장 보관을 하였다. 일정 시간마다 모아진 용액을 ELISA kit에서 제공한 프로토콜에 따라 실험을 진행하였다. UV-vis 450 nm의 wavelength에서 흡광도를 측정하였다.
- [0117] [실시예 1] 약물 방출용 골대체재 제조(BCP-A-PSQ-HEP-BMP2-(Col/Hep)5)
- [0118] 제1단계: 아미노프로필 트리에톡시실란 폴리머(A-PSQ) 합성
- [0119] 에탄올 무수물(Anhydrous ethanol) 20 ml에 10%(v/v) 아미노프로필 트리에톡시실란을 2 ml을 넣고 혼합하고, H<sub>2</sub>O와 아미노프로필 트리에톡시실란의 물비가 1.5 : 1이 되도록 물을 첨가하고, 염산과 물의 물비가 0.00078 : 1이 되도록 1M의 염산 수용액을 첨가하여 혼합 용액을 제조하였다. 응축기(condenser)를 연결하여 고온에서도 용액이 증발되어 용량이 줄어들지 않도록 하면서, 오일 배스(oil bath)를 사용하여 100 °C로 온도를 맞춰주고, 상기 혼합 용액이 들어있는 둥근 플라스크를 오일 배스에 넣어 24시간 동안 반응하여 아미노프로필 트리에톡시실란 폴리머(A-PSQ)를 제조하였다.
- [0120] 제2단계: A-PSQ로 BCP 표면 개질[BCP- A-PSQ]
- [0121] 상기 단계1에서 제조한 아미노프로필 트리에톡시실란 폴리머를 에탄올 무수물과 부피비로 1 : 1로 혼합한 후, 상기 혼합용액 20 ml에 BCP(이중상 칼슘포스페이트, 다공성, 입자평균크기 1.0 mm) 300 mg와 함께 100 °C에서 4시간 동안 반응하여 결합을 유도하였다. 이어서, 에탄올 무수물로 세척하고, 100 °C에서 12시간 처리하여, BCP 표면에 아미노프로필 트리에톡시실란 폴리머(A-PSQ)가 형성된 BCP-A-PSQ를 제조하였다.
- [0122] 제3단계: 코팅층 형성[BCP-A-PSQ-HEP]
- [0123] 탈이온수(deionized water, DI)에 헤파린 10mg/ml를 용해시키고, DMT-MM(4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methyl-morpholinium chloride) 16 mg을 첨가하여 코팅용액을 제조한다. 상기 코팅용액에 제2단계에서 제조한 BCP-A-PSQ를 넣고, 24시간 동안 셰이커(shaker)를 이용하여 반응시킨 후, 헤파린 코팅층이 형성된 BCP-A-PSQ-HEP를 제조하였다.
- [0124] 제4단계: 골형성 유도 인자 담지
- [0125] 인산완충생리식염수(phosphate-buffered saline, PBS)에 BMP2(골형성 단백질2) 100 µg를 용해시켜 0.01 mg/ml 농도의 BMP2 용액을 제조한다. 상기 BMP2 용액에 제3단계에서 제조한 BCP-A-PSQ-HEP 100 mg을 4 °C에서 16시간 동안 침지하고, PBS를 이용하여 약하게 결합된 BMP2를 제거하여 BMP2가 담지된 BCP-A-PSQ-HEP-BMP2를 제조하였다.
- [0126] 제5단계: 복합체층 형성
- [0127] pH 5.4의 0.1M 아세트산 나트륨 완충액(sodium acetate buffer)에 헤파린과 콜라겐을 각각 용해하여 1mg/ml의 농도의 헤파린 용액과 1mg/ml의 농도의 콜라겐용액을 제조하고, 각 용액을 0.45 µm 필터(filter)를 이용하여 멸균하였다. 상기 제4단계에서 제조한 BCP-A-PSQ-HEP-BMP2에 콜라겐 용액을 주입해주고 5분 동안 침지하여, 콜라겐을 코팅층 표면에 흡착시켰다. 이 후, 탈이온수에 2분, 1분 동안 침지하여 위상(washing)을 2회 수행하였다. 이 과정은 2번 반복하여 콜라겐층을 형성하였다.

- [0128] 이후, hepatin 용액에 5분 동안 침지하여 hepatin을 콜라겐층 표면에 흡착시켰다. 이 후, 탈이온수에 2분, 1분 동안 침지하여 워싱(washing)을 2회 수행하였다. 이 과정은 2번 반복하였다. 상기 과정을 콜라겐 용액과 hepatin 용액을 번갈아가며 사용하여 콜라겐층과 hepatin층이 적층된 이중층이 5번 반복하여 형성된 다층 박막인 복합층을 형성하였다.
- [0129] 상기 제1단계 내지 제5단계에 의하여 본 발명의 일 양태에 따른 약물 방출용 골대체제인 BCP-A-PSQ-HEP-BMP2-(Col/Hep)5를 제조하였다.
- [0131] [실시예 2] 약물 방출용 골대체제 제조(BCP-A-PSQ-HEP-BMP2-(Col/Hep)5-BMP2)
- [0132] PBS에 BMP2를 용해시켜 제조한 농도 0.01 mg/ml의 BMP2 용액에, 상기 실시예 1에서 제조한 BCP-A-PSQ-HEP-BMP2-(Col/Hep)5를 4 °C에서 16 시간 동안 침지하고, PBS를 이용하여 약하게 결합된 BMP2를 제거하여 복합체층 상에 BMP2가 더 담지된 약물 방출용 골대체제인 BCP-A-PSQ-HEP-BMP2-(Col/Hep)5-BMP2를 제조하였다.
- [0134] [비교예 1]
- [0135] 인산완충생리식염수(phosphate-buffered saline, PBS)에 BMP2(골형성 단백질2)를 용해시켜 0.01 mg/ml 농도의 BMP2 용액을 제조하고, 상기 BMP2 용액에 BCP(이중상 칼슘포스페이트, 다공성, 입자평균크기 1.0 mm)를 4 °C에서 16 시간 동안 침지하고, PBS를 이용하여 약하게 결합된 BMP2를 제거한 후, BMP2가 담지된 BCP-BMP2를 제조하였다.
- [0137] 상기 실시예들에 대해 하기와 같이 특성을 평가하였다.
- [0138] [실험예 1] 표면 개질 및 코팅층 형성 확인
- [0139] 상기 실시예 2에서 표면처리를 진행하지 않은 BCP의 표면 SEM 이미지를 도 2(a)에 나타내었고, 아미노프로필 트리에톡시실란 폴리머(A-PSQ)로 표면 처리된 BCP인 BCP-A-PSQ의 SEM 이미지를 도 2(b)에 나타내었다. 아미노프로필 트리에톡시실란 폴리머(A-PSQ)로 표면 처리된 BCP에 hepatin이 결합된 코팅층이 형성된 BCP-A-PSQ-HEP의 표면 SEM 이미지를 도 2(c)에 나타내었다.
- [0140] 상기 도 2에서, 코팅층을 형성한 BCP-A-PSQ-HEP의 표면에서도 표면처리를 하지 않은 BCP와 같이 기공이 막히지 않고 유지되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0141] 상기 실시예 2에서 BCP의 표면개질 및 코팅층 형성에 따른 원소 변화를 XPS를 이용하여 측정한 것을 하기 표1 및 도 3에 나타내었고, EDS를 이용하여 측정한 것을 도 4에 나타내었다.

표 1

[0142]

	BCP	BCP-A-PSQ	BCP-A-PSQ-HEP
Name	Atomic %	Atomic %	Atomic %
C1s	28.13	51.96	33.65
N1s	0.59	5.31	2.26
O1s	51.65	30.86	50.14
P2p	16.56	5.85	10.98
S2p	1.96	-	1.42
Si2p	1.12	6.02	1.54
total	100.01	100	99.99

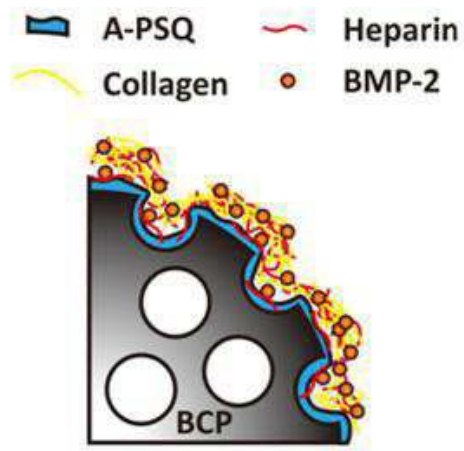
- [0143] 상기 표1 및 도 3에서와 같이, BCP에 아미노프로필 트리에톡시실란 폴리머(A-PSQ)로 개질됨으로써, 실리콘(Si) 및 질소(N)가 확인되고, hepatin을 코팅한 BCP-A-PSQ-HEP의 경우, 황(S)이 존재하며 또한, 표면 개질만 진행한 BCP-A-PSQ 대비하여, 산소(O)가 20% 증가한 것을 확인할 수 있었다. 또한, 도 4(b)에서와 같이 hepatin이 코팅된 BCP-A-PSQ-HEP의 경우, 붉은 색 점으로 표시되는 황(S)이 존재하는 것을 확인할 수 있다. 이는, hepatin이 안정적으로 코팅되었음을 시사한다.

- [0144] [실험예 2] 골대체제의 표면 기공도 확인
- [0145] 상기 실시예 2에서 제조한 BCP-A-PSQ-HEP와 표면 처리하지 않은 BCP의 기공도를 도 5에 나타내었다.
- [0146] 도 5에서와 같이, BCP 표면을 아미노프로필 트리에톡시실란 폴리머(A-PSQ)로 개질하고, 헤파린을 코팅한 BCP-A-PSQ-HEP(도 5에서 “BAH”로 약어 표기함)는 코팅 처리하지 않은 BCP에 대비하여, micropore가 증가한 것을 확인할 수 있다. 이는 BCP 상의 macropore들이 코팅에 의하여, 기공의 크기가 마이크로 수준으로 줄어들면서, macropore의 비율은 감소하고 micropore가 증가함에 따라 나타나는 것을 알 수 있다. 즉, 코팅 이후에도 macropore 및 micropore의 기공이 폐쇄되지 않고, micropore의 수준이 증가함에 따라, 약물 전달을 위한 골대체제로써의 역할이 유지되고 있음을 시사하는 것이다.
- [0147] [실험예 3] 복합체층 형성 확인
- [0148] 상기 실시예 1의 제5단계에서 다층의 박막이 쌓여서 형성되는 복합체층의 형성을 예측하기 위하여, QCM을 이용하여, 실리콘 웨이퍼 상에 다층의 박막이 쌓이는 양을 측정하는 것이다. 이를 도 6에 나타내었다.
- [0149] 도 6에서 확인할 수 있는 바와 같이, 서로 다른 전하를 가진 헤파린과 콜라겐을 교번하여 흡착함에 따라 각 흡착 단계마다 층상 자기 조립을 통해 복합체층의 두께가 증가함을 나타내고 있다.
- [0150] [실험예 4] 골형성 유도 인자 방출량 측정
- [0151] 상기 실시예 2에서 제조한 약물 방출용 골대체제의 ELISA를 이용하여 하루마다 방출된 BMP2의 양을 측정하는 것을 도 7에 나타내었다.
- [0152] 도 7에서와 같이, BCP 상에 BMP2를 담지한 BCP-BMP2의 경우, 초기 2일 까지 과다 방출되다가, 3일부터는 방출이 거의 되지 않는 것인데 반해, 실시예 2에서 제조한 BCP-A-PSQ-HEP-BMP2-(Col/Hep)5-BMP2의 경우 5일째까지는 BMP2가 거의 방출되지 않다가, 5일 이후에 BMP2를 방출하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 콜라겐과 헤파린이 교번 적층된 복합체층에 의하여 초기 5일 동안은 방출이 억제되다가 5일째에 다량의 BMP2가 방출되는 것을 의미하는 것으로, 특히 골형성 유도를 위한 약물의 치료적 효과에 매우 중요한 시사점을 가진다. 즉 골형성 유도 인자는 시술 또는 수술 후, 특정 시간에 방출되어야 약물의 치료효과가 현저할 수 있지만, 기존의 기술인 BCP-BMP2의 경우 약물 방출 특성을 조절하지 못하고 단지 초기 방출성이 높은 특성을 나타낸다. 이러한 특성으로 인해 원하는 시기(differentiation phase)에 약물이 방출되지 않고, 초기에 과량의 약물이 방출됨에 따라 염증을 유발하는 문제가 발생할 뿐만 아니라, 고가의 골형성 유도 인자가 초기 방출되어, 혈관을 타고 골손실 부위가 아닌 다른 부위로 전달되어, 골세포로 분화 등의 효과를 구현하지 못할 뿐만 아니라, BCP 상에 흡착 또는 반응을 통해 강하게 결합됨으로써 최소 약물로서 최대의 효과를 구현하지 못하는 비효율적인 문제가 있게 된다.
- [0153] 그러나 도 7의 결과에 따르면, BMP2를 특정 시간에 방출함으로써 약물의 치료효과를 극대화할 수 있음을 보여주고 있다. 이는 복합체층이 초기에 BMP2의 확산장벽 역할을 할 뿐만 아니라 생체내에서 점진적으로 복합체층이 해체됨으로써 BMP2를 빠르게 방출하는 것으로 추측된다. 이러한 특성은 본 발명에 따른 약물 방출용 골대체제가 코팅층 및 복합체층의 분리된 다층 구조로 이루어지며, 상기 다층 구조가 높은 분자량의 단백질계 약물인 BMP2와 결합됨으로써 유래된 것이다. 도면에 도시되지는 않았으나, 본 발명의 다른 유리한 점으로, BMP2의 방출 시간이 복합체층의 두께에 따라 자유롭게 조절가능하므로, 복합체층의 두께를 조절함으로써 약물 방출이 이루어지는 시간을 자유롭게 설계할 수 있는 장점을 가진다.
- [0154] 요약하면, 본 발명에 따른 약물 방출용 골대체제는 세포 분화 단계에 다량의 BMP2가 방출됨으로써, 약물의 치료적 효과를 극대화하여, 골 재생에 더욱 효율적이고 효과적임을 알 수 있다.
- [0155] 이상과 같이 본 발명에서는 특정된 사항들과 한정된 실시예에 의해 설명되었으나 이는 본 발명의 보다 전반적인 이해를 돕기 위해서 제공된 것일 뿐, 본 발명은 상기의 실시예에 한정되는 것은 아니며, 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이러한 기재로부터 다양한 수정 및 변형이 가능하다.
- [0156] 따라서, 본 발명의 사상은 설명된 실시예에 국한되어 정해져서는 아니되며, 후술하는 특허청구범위뿐 아니라 이 특허청구범위와 균등하거나 등가적 변형이 있는 모든 것들은 본 발명 사상의 범주에 속한다고 할 것이다.

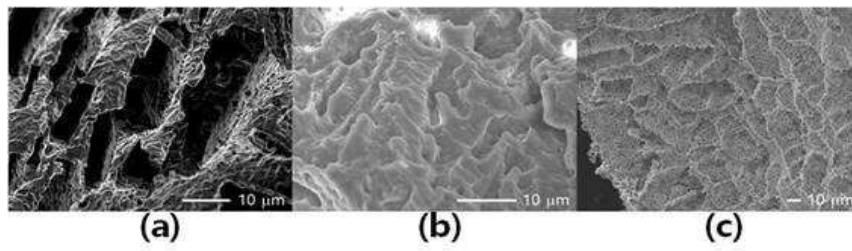


도면

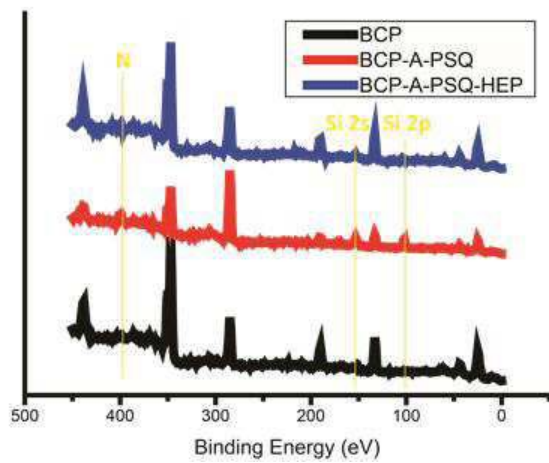
도면1



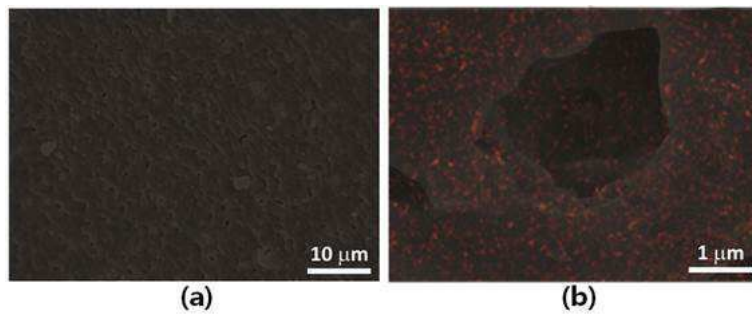
도면2



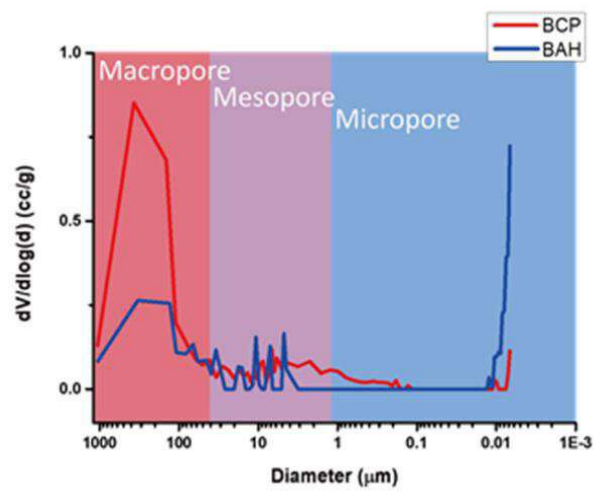
도면3



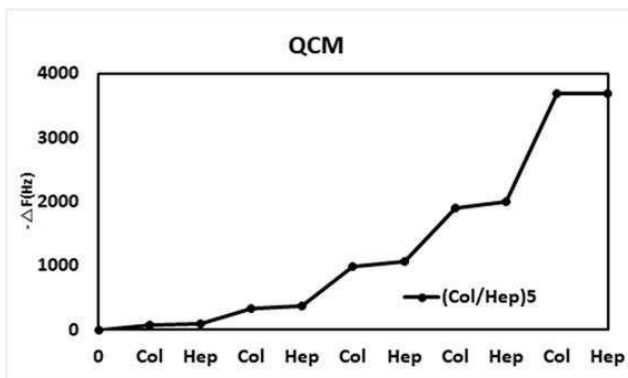
도면4



도면5



도면6



도면7

