



- (51) 국제특허분류:
A61F 2/82 (2006.01) A61L 27/28 (2006.01)
A61L 27/40 (2006.01) A61L 27/54 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/001526
- (22) 국제출원일: 2012년 2월 29일 (29.02.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2011-0021403 2011년 3월 10일 (10.03.2011) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **서울대학교 산학협력단 (SNU R&DB FOUNDATION)** [KR/KR]; 서울특별시 관악구 신림동 산 56-1, 151-015 Seoul (KR).
- (72) 발명자; 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **이윤식 (LEE, Yoon-Sik)** [KR/KR]; 경기도 안양시 동안구 관양동 현대아파트 10동 104호, 431-060 Gyeonggi-do (KR). **강찬구 (KANG, Chan-Koo)** [KR/KR]; 경기도 성남시 분당구 서현동 풍림아이원플러스 D동 413호, 463-862 Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: **서근복 (SEO, Keun Bok)**; 서울특별시 강남구 역삼동 642-6 성지하이츠 3차 빌딩 18층 9호, 135-080 Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

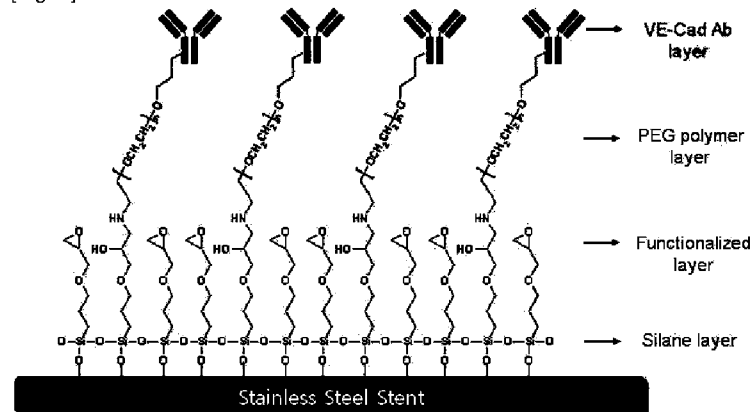
공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

(54) Title: STENT ABLE TO SELECTIVELY CAPTURE VASCULAR ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS AND A PRODUCTION METHOD THEREFOR

(54) 발명의 명칭 : 혈관내피 전구세포를 선택적으로 포획할 수 있는 스텐트 및 이의 제조 방법

[Fig. 1]



(57) Abstract: The present invention relates to a stent able to selectively capture vascular endothelial progenitor cells and to a production method therefor. More specifically the present invention relates to a stent wherein, joined in sequence on the stent skeleton, there are a silane compound layer, a functional layer, a hydrophilic polymer layer and a bioligand layer, and the present invention also relates to a production method therefor.

(57) 요약서: 본 발명은 혈관내피 전구세포를 선택적으로 포획할 수 있는 스텐트 및 이의 제조 방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은, 스텐트 골격 상에 실란 화합물층, 기능기층, 친수성 고분자층 및 바이오 리간드층이 차례로 결합되어 있는 스텐트 및 이의 제조 방법에 대한 것이다.

명세서

발명의 명칭: 혈관내피 전구세포를 선택적으로 포획할 수 있는 스텐트 및 이의 제조 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 혈관내피 전구세포를 선택적으로 포획할 수 있는 스텐트 및 이의 제조 방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은, 스텐트 골격 상에 실란 화합물층, 기능기층, 친수성 고분자층 및 바이오 리간드층이 차례로 결합되어 있는 스텐트 및 이의 제조 방법에 대한 것이다.

배경기술

- [2] 최근 협심증, 심근경색 등 관상동맥질환이 크게 늘어나 성인 사망의 주요 원인이 되고 있다. 관상동맥질환은 심장 주변을 둘러싸고 있는 혈관에 발생하는 질환으로서 심장 근육에 대한 혈액 공급 장애를 일으킨다. 이러한 관상동맥질환의 가장 흔한 원인은 동맥경화증이다. 관상 동맥 내에 콜레스테롤과 지방질, 그리고 혈액 내의 다른 여러 성분이 조합되어 만들어지는 플라크(plaque)가 증가하게 되면 관상동맥의 협착을 일으키게 되고 이에 따라 심장 근육에 혈액 공급이 감소하여 영양분과 산소가 부족하게 된다. 이렇게 되면 흉통(협심증) 또는 심근경색을 일으키게 되고 심한 경우 사망까지 초래한다.
- [3] 이러한 관상동맥질환의 치료법으로는, 새로운 혈관을 이식하는 수술치료법(bygraft surgery)과 경피적 풍선확장술(balloon angioplasty), 스텐트 삽입술(stenting) 등이 있는데, 최근에는 치료 효과와 환자만족도 측면에서 스텐트 삽입술이 대세를 이루고 있다.
- [4] 스텐트는 혈관이 혈전으로 인해 막히거나 악성, 혹은 양성질환이 발생하여 그 흐름에 장애가 발생하였을 때, 좁아지거나 막힌 결관 부위에 삽입하여 혈액의 흐름을 정상화시키는데 사용되는 원통형 튜브 모양의 정밀의료기구이다. 카테터(catheter) 말단의 풍선 위에 놓여진 채 병변까지 이동하고 병변에서 풍선을 부풀림으로써 스텐트를 원래의 직경으로 팽창시키면서 병변의 좁아진 혈관을 넓혀 준다. 기존의 수술치료법보다는 훨씬 수술이 간편하면서도 풍선확장술에 비해 재협착 발생율이 낮아 현재 관상동맥 중재술의 중심축이 되고 있다.
- [5] 그러나 스텐트 시술 이후에도 약 20% 정도에서 혈관이 다시 좁아지는 재협착(restenosis)이 발생하고, 더욱이 스텐트 내 재협착에 대한 시술할 경우 그 재협착률은 더 높아졌다. 2000년대 초기에 도입된 약물방출 스텐트(drug-eluting stent)는 국소적으로 재협착에 효과적인 약물을 지속적으로 전달하여 스텐트 내 재협착률을 획기적으로 낮췄다. 현재 Cypher, Taxus, Endeavor 등이 FDA 승인을 받아 시술되고 있고, 대부분의 병변에서 재협착으로 인한 재시술은 거의 사라진 실정이다. 이와 같이 약물방출 스텐트는 관상동맥 중재술의 오랜 숙원이었던

재협착을 극적으로 감소시켰으나, 지나친 신생내막증식(neointimal hyperplasia)의 억제는 오랜기간 금속망을 혈액에 노출시킴으로써 스텐트 혈전증(stent thrombosis)의 위험을 증가시키고 있다. Iakovou에 의하면 스텐트 혈전증은 약물방출 스텐트를 삽입한 전체 환자의 1.3%에서 발생하였고, 스텐트 혈전증 발생 환자의 45%가 사망하였다고 보고하였다(Iakovou I, et al. Incidence, predictors, and outcome of thrombosis after successful implantation of drug-eluting stents, JAMA 2005;293:2126~2130).

- [6] 이에 따라 약물방출 스텐트의 혈전증, 특히 1년 이후에 발생하는 후기 스텐트 혈전증(very late stent thrombosis)은 현재 관상동맥 중재술 분야의 가장 큰 화두로 떠오르고 있다. 이 문제를 해결하기 위해서 최근 혈관내피 전구세포 EPC(Endothelial Progenitor Cell)를 포획하여 시술부위 내 혈관내피세포의 생성(endothelialization)을 빠르게 유도하는 스텐트가 개발되었으나, 재협착률이 다시 올라가는 문제가 있어 완전한 해결을 보지 못하고 있다(Aoki J, et al. Endothelial progenitor cell capture by stents coated with antibody against CD34, JACC 2005;45:1574-1579). 약물이 코팅된 스텐트의 경우, 약물의 비선택적 효과로 인해 표면의 생체적합성이 크게 중요하지 않을 수 있으나, 약물이 아닌 바이올리간드를 코팅하는 경우 표면의 생체적합성에 따른 단백질의 비특이적 흡착여부는 스텐트의 성능을 좌우하는 가장 중요한 인자가 된다. 이는 혈관내피 전구세포를 포획하는 항체의 세포선택성이 떨어지고, 스텐트 표면 자체의 생체적합성이 떨어져 단백질의 비특이적 흡착(non-specific adsorption)이 발생하기 때문인 것으로 판단되고 있다.
- [7] 결국 관상동맥 중재술 역사에서 가장 큰 문제점이었던 재협착의 문제를 해결한 약물방출 스텐트는 다양한 기술 적용에도 불구하고 스텐트 혈전증이라는 새로운 문제를 야기시켰다. 혈관내피세포를 포획함으로써 문제를 해결하고자 한 스텐트 역시 표면의 성질과 바이올리간드의 세포선택성이 우수하지 못해 재협착문제가 다시 발생하고 있다. 여러 가지 스텐트 플랫폼이 연구되고 있지만, 재협착과 혈전증을 동시에 해결하고 생체적합성이 우수한 스텐트는 아직 개발되지 못한 상태이다.
- [8] 생체의 환경은 매우 복잡하면서도 고도의 질서를 유지하고 있기 때문에, 생체 재료가 삽입되어 생체조직과 접하게 되면 그 부위에서 생체 질서도가 깨져 여러 가지 생화학적 반응과 변형이 일어날 수밖에 없다. 따라서 생체 재료에서 가장 중요한 것 중의 하나가 바로 생체적합성(biocompatibility)인데, 생체 재료의 조직내 융합(integration)을 거부 반응 없이 진행시키기 위해서는 단백질의 비특이적 흡착(non-specific adsorption), 조직 치료/재생(tissue healing/regeneration)과 같은 생체 재료 표면에서의 반응을 표면 개질 기술을 통해 효과적으로 조절할 수 있어야 한다. 스텐트도 예외는 아니어서, 스텐트에 대한 생체 거부반응을 억제하고 설계된 기능을 제대로 구현하기 위해서는 고도의 표면 처리 기술이 필수적이다. 표면처리기술에 따라 스텐트의 생체적합성이

결정되고, 약물, 항체 등 활성성분의 로딩(loading)양, 확산속도, 생체내 효능 등이 조절될 수 있기 때문이다.

- [9] 현재 시판 중인 표면처리된 스텐트들의 경우, 약물 로딩을 위해 유기 고분자를 스텐트 금속 표면 위에 단순히 물리적으로 흡착시키는 방법을 사용하고 있다. 그러나 심장은 매우 역동적으로 움직이는 기관이고, 심혈관의 혈류는 상당히 빠르므로 물리적으로 흡착된 유기 고분자가 탈착되어 혈관 속으로 들어가게 되면 염증반응과 혈전생성반응이 일어날 수 있다. 이에 따라, 종래의 스텐트의 문제점들을 해결하기 위해 보다 안정하게 원하는 물질을 코팅하면서도 생체거부반응이 적은 표면처리기술의 개발이 매우 절실히 요구되고 있는 상황이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 본 발명의 기본적인 목적은 스텐트 골격 상에 실란 화합물층, 기능기층, 친수성 고분자층 및 바이오 리간드층이 차례로 결합되어 있는 스텐트를 제공하는 것이다.
- [11] 본 발명의 또 다른 목적은 (i) 실란화 반응을 통하여, 하이드록시기가 도입된 스텐트 골격 표면 상에 기능기를 도입하는 단계; (ii) 상기 기능기에 친수성 고분자를 커플링하여 친수성 고분자 박막을 그래프팅하는 단계; (iii) 상기 그래프팅된 친수성 고분자의 말단을 활성화하는 단계; 및 (iv) 상기 친수성 고분자의 활성화된 말단에 혈관내피세포 전구세포를 포획할 수 있는 바이오 리간드를 고정하는 단계를 포함하는, 스텐트 표면 처리 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [12] 전술한 본 발명의 기본적인 목적은 스텐트 골격 상에 실란 화합물층, 기능기층, 친수성 고분자층 및 바이오 리간드층이 차례로 결합되어 있는 스텐트를 제공함으로써 달성될 수 있다.
- [13] 본 발명의 스텐트에서, 상기 스텐트 골격은 스테인레스 스틸, 니켈-크롬 합금, 니켈-티타늄 합금, 코발트-크롬 합금, 탄탈륨, 티타늄, 알루미늄, 지르코늄, 크롬 또는 니켈로부터 선택될 수 있다.
- [14] 본 발명의 스텐트에서, 상기 기능기는 아민기, 에폭사이드기 또는 카르복실기로부터 선택될 수 있다.
- [15] 본 발명의 스텐트에서, 상기 친수성 고분자는 사슬 내에 하이드록시기 또는 에틸렌옥사이드기를 포함하는 고분자로서, 예를 들면, 폴리비닐알코올, 폴리아민, 폴리아크릴릭산, 폴리아크릴아미드, 폴리우레탄, 폴리(아크릴로니트릴-co-아크릴릭산), 폴리에틸렌글리콜 또는 폴리에틸렌이민과 같은 합성고분자와, 키토산, 텍스트란 또는 셀룰로오스와 같은 천연고분자로부터 선택될 수 있다.
- [16] 본 발명의 스텐트에서, 상기 바이오 리간드는 혈관내피 카드헤린(vascular

endothelial cadherin)과 결합하는 항체, 압타머(aptamer) 또는 펩타이드로부터 선택될 수 있다.

- [17] 전술한 본 발명의 또 다른 목적은 (i) 실란화 반응을 통하여, 하이드록시기가 도입된 스텐트 골격 표면 상에 기능기를 도입하는 단계; (ii) 상기 기능기에 친수성 고분자를 커플링하여 친수성 고분자 박막을 그래프팅하는 단계; (iii) 상기 그래프팅된 친수성 고분자의 말단을 활성화하는 단계; 및 (iv) 상기 친수성 고분자의 활성화된 말단에 혈관내피세포 전구세포를 포획할 수 있는 바이올리간드를 고정하는 단계를 포함하는, 스텐트 표면 처리 방법을 제공함으로써 달성될 수 있다.
- [18] 본 발명의 방법에서, 상기 스텐트 골격은 스테인레스 스틸, 니켈-크롬 합금, 니켈-티타늄 합금, 코발트-크롬 합금, 탄탈륨, 티타늄, 알루미늄, 지르코늄, 크롬 또는 니켈로부터 선택될 수 있다.
- [19] 본 발명의 방법에서, 상기 실란화 반응은 아래 화학식 (I)의 화합물을 사용하는 것으로서,
- [20] $X-(CH_2)_n-Si-Y_m$ 화학식 (I)
- [21] 상기 화학식 (I)에서 X는 고분자나 유기화합물과의 커플링을 가능하게 하는 기능기로서, 아민기, 할라이드기, 에폭시기, 알데히드기 또는 아세탈기일 수 있고; Y는 고체 표면과의 커플링 반응으로 유리될 수 있는 작용기로서, 할라이드기, 메톡시기 또는 에톡시기이며; n은 1 내지 25의 정수이고; m은 1 내지 3의 정수이다.
- [22] 이와 같이 새로운 기능기로 수식된 스텐트 표면은 상기 기능기를 이용하여 기성 고분자(preformed polymer)와 직접 커플링시킴으로써 고분자 박막이 형성될 수 있다. 생체적합성이 있다고 알려진 생체 고분자나 다양한 합성 고분자들은 대부분 화학반응을 수행할 수 있는 친핵체를 가지고 있다. 따라서 친핵체와 반응성이 강한 기능기를 실란화 반응을 통해 도입하는 과정이 중요하고, 에폭시기, 카르복실기와 같은 기능기들이 이러한 반응에 적합한 기능기이다.
- [23] 본 발명의 방법에서, 상기 친수성 고분자는 사슬 내에 하이드록시기 또는 에틸렌옥사이드기를 포함하는 고분자로서, 예를 들면, 상기 친수성 고분자는 폴리비닐알코올, 폴리라이신, 폴리아크릴릭산, 폴리아크릴아미드, 폴리우레탄, 폴리(아크릴로니트릴-co-아크릴릭산), 폴리에틸렌글리콜 또는 폴리에틸렌이민과 같은 합성고분자와, 키토산, 덱스트란 또는 셀룰로오스와 같은 천연고분자로부터 선택될 수 있다.
- [24] 전술한 고분자의 친수성과 유동성이 그 표면에서 단백질의 비특이적 흡착을 억제시킨다고 보고되고 있다. 또한, 이 고분자들은 히드록시기, 아민기 등의 기능기를 가지고 있어 그래프팅 이후에 항체 등의 또 다른 바이올리간드들을 고정화할 수 있다.
- [25] 혈관내피 전구세포만 선택적으로 포획하기 위해서는 생체적합하도록 수식된 스텐트 표면 위에 바이올리간드를 안정적으로 고정화시켜야 한다. 고분자

박막으로 인해 다량 도입된 기능기들은 여러 유기화학적 합성방법을 통해 바이오 리간드의 기능기와 커플링시킬 수 있다. 예를 들어, 스텐트 표면 위에 카르복실기가 다량 도입되어 있다면, 펩타이드반응(amide bond formation)을 통해 항체의 아민기와 안정적인 아마이드(amide) 결합을 형성시킬 수 있다.

[26] 본 발명의 방법에서, 상기 바이오 리간드는 혈관내피 카드헤린(vascular endothelial cadherin)과 결합하는 항체, 압타머(aptamer) 또는 펩타이드(peptide)로부터 선택될 수 있다. 상기 바이오 리간드들은 세포들과 선택적으로 결합할 수 있는 능력이 있는 것으로 알려져 있다.

[27] 본 발명의 방법은 실란화 반응, 고분자 그래프팅, 바이오 리간드 고정화의 조합으로서, 생체친화적 고분자와 혈관내피 전구세포를 포획할 수 있는 바이오 리간드를 함께 사용할 경우 스텐트의 재협착과 혈전증을 매우 효과적으로 억제할 수 있다.

[28] 본 발명은 스텐트 생체 재료에 사용될 수 있으며, 그 용도에 있어서는 특별히 한정되는 바가 없고, 예를 들면, 심혈관 치료, 뇌졸중 치료, 요도 치료 등이 될 수 있다.

[29] 또한, 본 발명의 방법은, 필요에 따라, 통상적으로 생체 재료에 적용되는 다른 기술들, 예를 들어, 재료 클리닝, 전해 연마(electropolishing), 살균(sterilization) 등을 포함할 수 있다.

발명의 효과

[30] 본 발명에 따른 스텐트를 사용하면, 시술 후 재협착 정도는 현저히 감소하면서도 혈관내피화는 빠르게 촉진된다. 또한, 본 발명에 따라 일반 금속 스텐트 표면 위에 친수성의 고분자를 그래프팅하고 그 위에 바이오 리간드를 순차적으로 고정화함으로써, 염증세포 또는 단백질과 같은 성분의 흡착은 최대한 억제하고 혈관내피 전구세포만 선택적으로 포획할 수 있는 생체적합성이 우수한 스텐트 표면을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[31] 도 1은 본 발명의 스텐트에 대한 하나의 실시 태양이다.

[32] 도 2는 EPC와 THP-1이 종래의 금속 스텐트와 본 발명에 따라 표면처리된 스텐트 표면에서 어떻게 흡착 거동이 달라지는지를 보여주는 형광현미경 사진이다. 녹색 형광이 EPC를 나타내고, 붉은색 형광은 THP-1을 나타낸다.

[33] 도 3은 본 발명에 따라 표면처리된 스텐트 표면에 EPC가 어떻게 포획되었는지를 보여주는 고해상도 전자현미경 사진이다.

[34] 도 4는 본 발명의 스텐트를 토끼에 적용한 동물임상시험결과로서, a와 b는 종래의 금속 스텐트와 본 발명에 따라 표면처리된 스텐트를 적용한 지 3일 후, 스텐트 시술부위에서의 혈관내피화가 어떻게 차이가 나는지를 보여주는 사진이다.

[35] 도 5는 종래의 금속 스텐트와 본 발명에 따라 표면처리된 스텐트를 토끼에

시술한 지 4주 후, 스텐트 시술부위에서 재협착이 어떻게 진행되고 있는지를 보여주는 사진이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [36] 이하, 다음의 실시예 및 도면을 들어 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 그러나 다음의 실시예 및 도면에 대한 설명은 본 발명의 구체적인 실시태양을 특정하여 설명하고자 하는 것일 뿐이며, 본 발명의 권리범위를 이들에 기재된 내용으로 한정하거나 제한해석하고자 의도하는 것은 아니다.
- [37]
- [38] 실시예 1. 스텐트 표면의 실란화 반응: 에폭시기가 수식된 스텐트 표면 제조
- [39] 스텐트(BMS; 316L stainless steel stent, 3mm diameter, 15m length, Humed, Korea)를 피라나(piranha) 용액($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ (4/1))에 약 1시간 동안 정지한 후, 5분간 3회 증류수로 초음파 세척을 하고 5분간 2회 아세톤으로 세척하였다. 그리고 30°C 진공에서 1시간 동안 건조하여 하이드록시기(hydroxy group)가 표면에 형성된 스텐트 표면을 준비한 후, 10%(v/v) 3-글리시독시프로필트리메톡시실란(3-glycidoxypentyltrimethoxysilane, GPTS)/톨루엔 용액 내에서 30°C 내지 60°C에서 48시간 동안 반응시키고, 5분간 3회 톨루엔으로 세척한 후, 이어서 5분간 2회 디클로로메탄으로 초음파 세척을 하였다. 30°C 진공 상태의 오븐에서 1시간 동안 건조하고 아르곤 기체 분위기 70°C에서 3시간 동안 가열을 하여 탈수반응을 통한 실란화합물의 안정적인 가교결합을 유도하였다.
- [40]
- [41] 실시예 2. 고분자 그래프팅: 폴리에틸렌글리콜로 개질된 스텐트 표면 제조
- [42] 10mM O,O'-비스(2-아미노프로필)폴리에틸렌글리콜(PEG, MW=1,500)/NMP용액에 DIEA(3당량)를 첨가하여 고분자용액을 만든 후, 실시예 1에서 제조된 스텐트를 상기 고분자 용액에 담그고 50°C에서 24시간 동안 표면처리하였다. 표면처리 후 5분간 NMP를 사용하여 3회, 이어서 5분간 디클로로메탄을 사용하여 2회 초음파 세척을 하였다. 마지막으로 30°C의 진공오븐에서 1시간 동안 건조하여 PEG가 그래프팅된 스텐트(PEG/GPTS/스텐트 표면)를 제조하였다.
- [43]
- [44] 실시예 3. 바이오리간드 고정화: 항체가 고정화된 스텐트 표면 제조
- [45] 먼저 스텐트 표면에 그래프팅된 PEG 말단의 아민기(amine group)를 석신산 무수물(succinic anhydride)을 사용하여 석시닐화(succinylation)하여 카르복시기(carboxyl group)로 치환시켰다. 그리고 20mM DIC(diisopropylcarbodiimide), HOBt(1-hydroxybenzotriazole)/NMP 용액에 상기 스텐트를 넣고 30°C에서 1시간 동안 반응시켜 상기 스텐트의 표면을 화학적으로 활성화시켰다. 상기 활성화 반응 후, 5분간 NMP를 사용하여 3회 및 5분간

디클로로메탄을 사용하여 2회 초음파 세척을 하였다. 이렇게 활성화된 표면은 아민기를 갖고 있는 항체 등의 단백질과 빠르게 펩타이드 결합을 형성하여 표면에 고정화시킬 수 있다. 여기에, EPC를 선택적으로 포획할 수 있는 항체를 포함한 인산염 버퍼(phosphate buffer, pH=7.4) 용액에 상기 스텐트를 넣고 37°C에서 24시간 동안 반응을 시켜 상기 항체가 고유의 성질을 잃지 않고 안정적으로 스텐트 표면 위에 고정화되었다(도 2 및 도 3 참조)

[46] 이렇게 제조된 스텐트 표면의 특성을 표 1 및 표 2에 나타내었다. 물 정접촉각 및 광전자 스펙트럼 분석을 통해 스텐트 표면이 의도한 대로 개질되었음을 확인할 수 있다.

[47]

[48] 표 1

[Table 1]

표면처리된 스텐트 표면의 물 정접촉각 측정

	스텐트 표면	각도(°)
	처리되지 않은 스텐트 표면	75
실시예 1	GTPS/스텐트 표면	60
실시예 2	PEG/스텐트 표면	45
실시예 3	항체/스텐트 표면	48

[49]

[50] 표 2

[Table 2]

표면처리된 스텐트 표면의 오제 전자(Auger-electron) 광전자 스펙트럼(APS) 측정

	스텐트 표면	C(1s)/Cr(2p)	N(1s)/C(1s)	C(1s)/O(1s)
	처리되지 않은 스텐트 표면	7.3	Trace	0.057
실시예 1	GTPS/스텐트 표면	92.8	Trace	0.6
실시예 2	PEG/스텐트 표면	128.8	0.03	1.37
실시예 3	항체/스텐트 표면	123.8	0.05	1.26

[51]

[52] 표면처리된 스텐트가 생체적합할 뿐만 아니라 혈관내피 전구세포만을 선택적으로 포획하여 혈관내피화를 빠르게 촉진시키는지 여부를 확인하기 위하여, 상기 표면처리된 스텐트를 혈관내피 전구세포(EPC) 용액과 THP-1 세포용액에 각각 인큐베이션한 후, 세포들의 흡착정도를 형광현미경과 FE-SEM(Field Emission-Scanning Electron Microscope)으로 확인 및 분석하였다.

혈관내피 전구세포의 비교예로서 THP-1 세포를 선택한 이유는 THP-1이 인간 혈액 내에 풍부하게 존재하는 대표적 세포이기 때문이다.

- [53] 상업적으로 구입할 수 있는 스테인리스 스틸 스텐트와 실시예 3에서 제조한 스텐트를 각 세포의 인산 완충 용액(phosphate buffer, pH=7.4)에 넣고 37°C에서 24시간 동안 인큐베이션한 후, 인산 완충 용액과 증류수로 각각 10분간 세척하였다. 그리고 30°C 진공 오븐에서 1시간 동안 건조한 후 형광현미경을 통해 세포가 흡착된 표면을 관찰하였다. 표면처리되지 않은 일반 금속 스텐트의 경우, EPC와 THP-1이 세포선택성 없이 일정량 흡착되었고, 실시예 3의 표면처리된 스텐트의 경우 THP-1의 흡착 없이 EPC만 선택적으로 다량 포획되었음을 확인할 수 있다. 또한 EPC가 포획된 스텐트의 경우 전자현미경으로 고해상도 분석을 수행한 결과 전형적인 세포증식 모습을 보여주었다. EPC만 선택적으로 스텐트 표면 위에 포획함으로써 비특이적인 생체거부반응 없이 스텐트 표면 위에 혈관내피세포증식을 빠르게 유도할 수 있다. 형광현미경으로 측정한 사진들을 도 2에 나타내었으며, 고해상도 전자현미경으로 측정한 사진들을 도 3에 나타내었다.
- [54] 또한, 토끼를 사용하여 종래의 금속 스텐트와 실시예 3의 표면처리된 스텐트의 생체반응을 비교분석하기 위한 동물임상실험을 수행한 결과, 스텐트 시술부위에 3일 만에 혈관내피세포가 빠르게 증식하였음을 관찰할 수 있었는데, 이 결과는 도 4를 통해 확인할 수 있다. 이렇게 빠른 혈관내피세포화는 생체거부반응을 억제하고 혈전 생성을 근본적으로 억제시킬 수 있다. 또한 4주 후에 토끼의 혈관 단면을 잘라 비교분석해 본 결과, 종래의 금속 스텐트는 4주 만에 신생내막증식(neointimal hyperplasia)이 상당부분 진행되어 혈관이 다시 좁아지는 재협착(restenosis) 문제가 발생하였으나, 실시예 3의 표면처리된 스텐트의 경우에는 뛰어난 생체적합성으로 인해 신생내막증식이 억제됨으로써 넓혀진 혈관이 유지되고 있음을 관찰할 수 있다(도 5). 즉, 본 발명의 목적인 고질적인 스텐트 재협착과 혈전생성 문제를 본 발명의 스텐트 표면 처리기술을 통해 동시에 효과적으로 해결할 수 있음을 확인하였다.

청구범위

- [청구항 1] 스텐트 골격 상에 실란 화합물층, 기능기층, 친수성 고분자층 및 바이오 리간드층이 차례로 결합되어 있는 스텐트.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 스텐트 골격이 스테인레스 스틸, 니켈-크롬 합금, 니켈-티타늄 합금, 코발트-크롬 합금, 탄탈륨, 티타늄, 알루미늄, 지르코늄, 크롬 및 니켈로 이루어진 군으로부터 선택되는 금속인 것임을 특징으로 하는 스텐트.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 기능기가 아민기, 에폭사이드기 및 카르복실기로 이루어진 군으로부터 선택되는 것임을 특징으로 하는 스텐트.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 친수성 고분자가 폴리비닐알코올, 폴리아민, 폴리아크릴릭산, 폴리아크릴아미드, 폴리우레탄, 폴리(아크릴로니트릴-co-아크릴릭산), 폴리에틸렌글리콜, 폴리에틸렌이민, 키토산, 텍스트란 및 셀룰로오스로 이루어진 군으로부터 선택되는 것임을 특징으로 하는 스텐트.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 바이오 리간드가 혈관내피 카드헤린(vascular endothelial cadherin)과 결합하는 항체, 압타머(aptamer) 및 펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 스텐트.
- [청구항 6] (i) 실란화 반응을 통하여, 하이드록시기가 도입된 스텐트 골격 표면 상에 기능기를 도입하는 단계;
(ii) 상기 기능기에 친수성 고분자를 커플링하여 친수성 고분자 막막을 그래프팅하는 단계;
(iii) 상기 그래프팅된 친수성 고분자의 말단을 활성화하는 단계; 및
(iv) 상기 친수성 고분자의 활성화된 말단에 혈관내피세포 전구세포를 포획할 수 있는 바이오 리간드를 고정하는 단계를 포함하는, 스텐트 표면 처리 방법.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 스텐트 골격이 스테인레스 스틸, 니켈-크롬 합금, 니켈-티타늄 합금, 코발트-크롬 합금, 탄탈륨, 티타늄, 알루미늄, 지르코늄, 크롬 및 니켈로 이루어진 군으로부터 선택되는 것임을 특징으로 하는 스텐트 표면 처리 방법.
- [청구항 8] 제6항에 있어서, 상기 실란화 반응이 아래 화학식 (I)의 화합물을 사용하는 것임을 특징으로 하는 스텐트 표면 처리 방법:

$$X-(CH_2)_n-Si-Y_m \dots\dots \text{화학식 (I)}$$
 상기 화학식 (I)에서 X는 아민기, 할라이드기, 에폭시기, 알데히드기 또는 아세탈기이고; Y는 할라이드기, 메톡시기 또는 에톡시기이며; n은 1 내지 25의 정수이고; m은 1 내지 3의

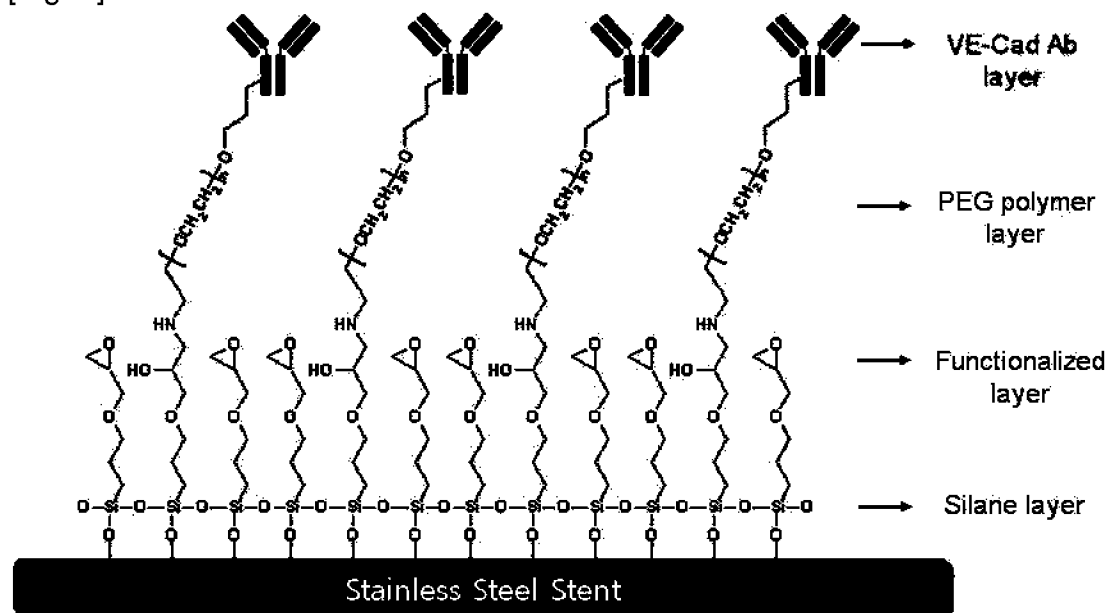
정수이다.

[청구항 9] 제6항에 있어서, 상기 친수성 고분자가 사슬 내에 하이드록시기 또는 에틸렌옥사이드기를 포함하는 고분자인 것임을 특징으로 하는 스텐트 표면 처리 방법.

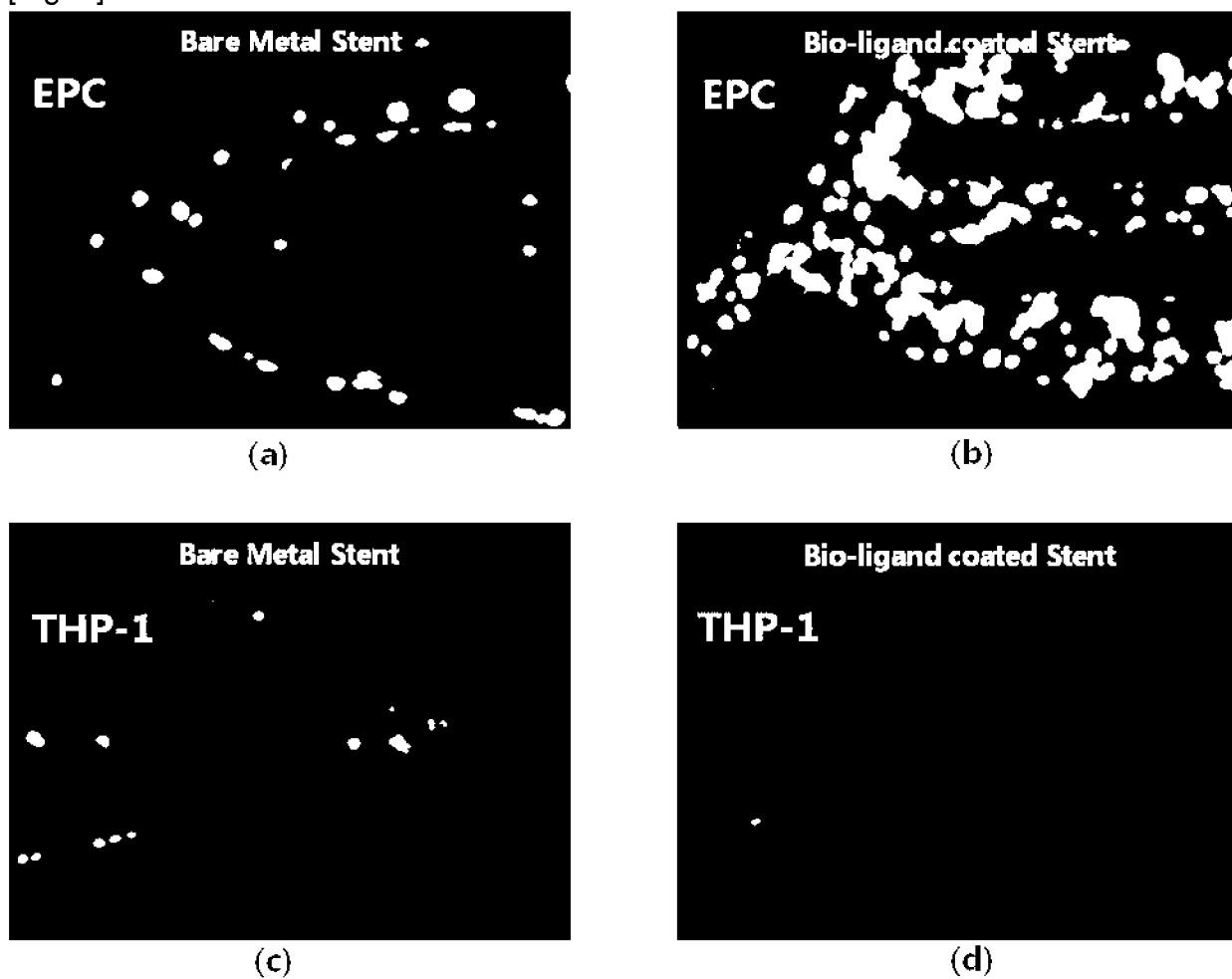
[청구항 10] 제6항에 있어서, 상기 친수성 고분자가 폴리비닐알코올, 폴리아민, 폴리아크릴릭산, 폴리아크릴아미드, 폴리우레탄, 폴리(아크릴로니트릴-co-아크릴릭산), 폴리에틸렌글리콜, 폴리에틸렌이민, 키토산, 덱스트란 및 셀룰로오스로 이루어진 군으로부터 선택되는 것임을 특징으로 하는 스텐트 표면 처리 방법.

[청구항 11] 제6항에 있어서, 상기 바이오 리간드가 혈관내피 카드헤린(vascular endothelial cadherin)과 결합하는 항체, 압타머(aptamer) 및 펩타이드(peptide)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것임을 특징으로 하는 스텐트 표면 처리 방법.

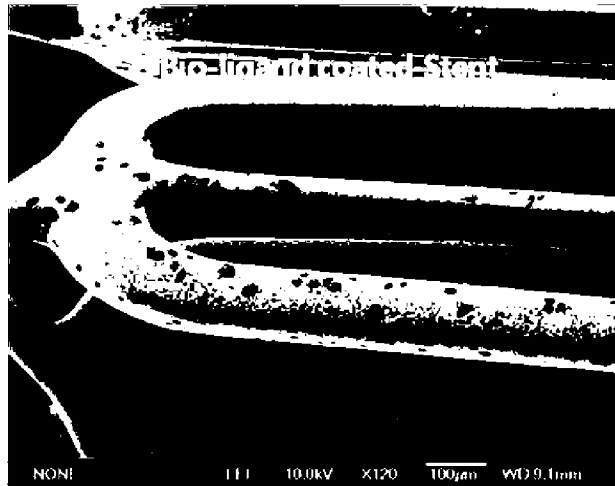
[Fig. 1]



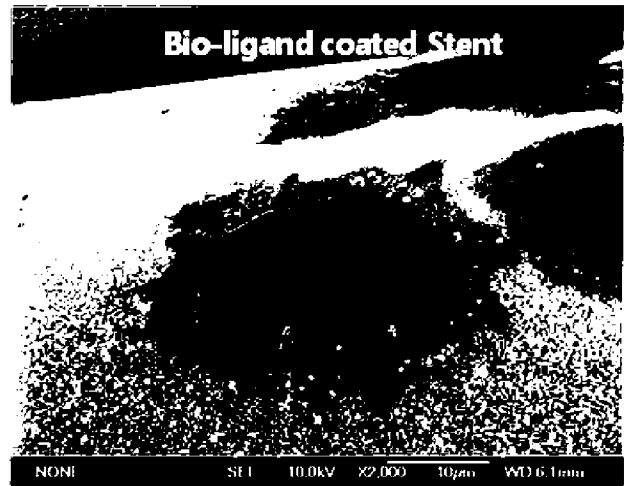
[Fig. 2]



[Fig. 3]

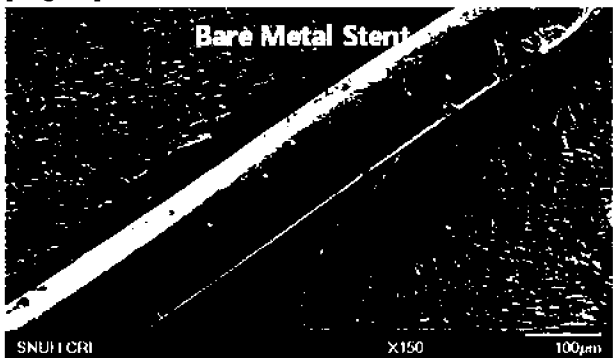


(a)

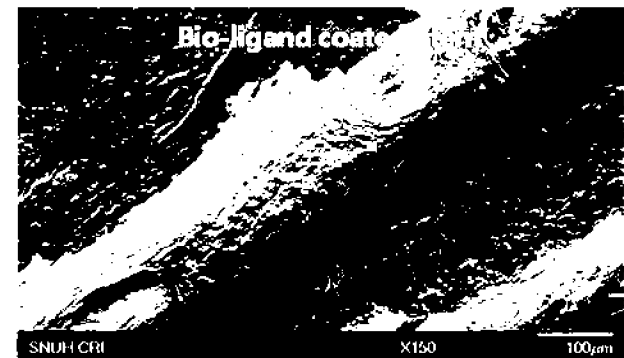


(b)

[Fig. 4]

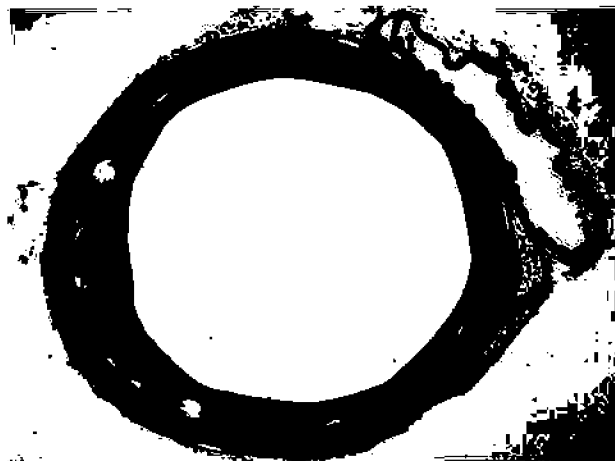


(a)

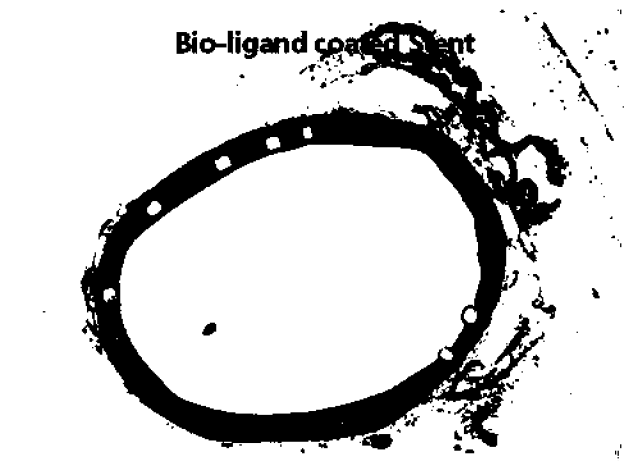


(b)

[Fig. 5]



(a)



(b)