



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0133186
(43) 공개일자 2016년11월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/48 (2006.01) A61K 33/24 (2006.01)
A61K 47/42 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/48292 (2013.01)
A61K 33/24 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0065899
(22) 출원일자 2015년05월12일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
권일근
서울특별시 노원구 중계로 195, 108동 1501호 (중계동, 동진, 신안아파트)
이상진
경기도 안양시 동안구 동안로 102, 205동 1202호 (호계동, 목련선경아파트)
(74) 대리인
안소영

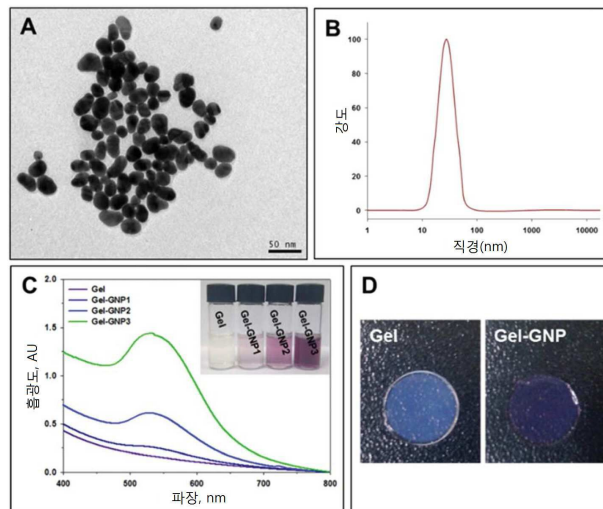
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 금나노입자를 포함하는 수화젤 및 그 제조방법

(57) 요약

본 발명은 금나노입자를 포함하는 골 재생용 수화젤 및 그 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 금나노입자를 포함하는 수화젤은 지방유래 줄기세포의 분화를 촉진하고, 조골세포 유전자의 mRNA 발현을 증가시키기 때문에 골 재생에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 47/42 (2013.01)

A61K 47/48784 (2013.01)

C01G 7/00 (2013.01)

C01P 2004/64 (2013.01)

(72) 발명자

허동녕

서울특별시 강북구 술샘로 174, 120동 1902호(미아동, SK아파트)

이동현

서울특별시 동대문구 경희대로1나길 35, 301호 (회기동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2010-0019346

부처명 한국연구재단

연구관리전문기관 미래창조과학부

연구사업명 미래유망 융합기술 파이오니아사업

연구과제명 신경조직의 기능적 복원을 위한 기능성 고분자 유도체 개발

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교

연구기간 2015.03.01 ~ 2016.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

금나노입자를 포함하는 골 재생용 수화젤.

청구항 2

제1항에 있어서, 수화젤은 젤라틴 수화젤인 수화젤.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 금나노입자의 직경은 24 nm 내지 30 nm인 수화젤.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 골 재생은 골 결손 또는 골절 부위의 충전 또는 수복을 위한 것인 금나노입자를 포함하는 수화젤.

청구항 5

i) 금나노입자 및 젤라틴을 광-개시제와 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계 및
ii) 단계 i)의 혼합물을 자외선에 노출시켜 광-가교하는 단계를 포함하는 제1항 또는 제2항의 수화젤의 제조 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 단계 i)의 금나노입자는 HAuCl_4 의 환원으로 제조되는 것인 제조 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 단계 ii)의 젤라틴은 메타크릴산 젤라틴인 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 골 재생을 위한 금나노입자를 포함하는 수화젤 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 지난 몇 년 동안 콜로이드성 나노입자가 포함된 생분해성 수화젤은 생명의학 및 생명공학 분야에 다양하게 적용되어 왔다. 최근에는, 수화젤에 무기물 기반 나노입자를 포함하는 복합적 생체재료 개발에 초점을 맞춰 많은 연구가 이루어지고 있다. 이러한 복합재료는 무기물 나노입자와 고분자 수화젤 모두의 특성을 갖는 이중적 장점을 제공하여 생물학적 시스템에서 나노입자의 기능성을 향상시키는 데 효과적으로 사용될 수 있다. 이들 복합재료에 사용되는 재료들은 기능성을 고려하여 다양한 재료들 중에서 선택적으로 사용하고 있다.

[0003] 한편, 무기물 나노입자들로는 다양한 재료들이 사용되고 있으며, 이 중에서 금나노입자가 가장 폭넓게 이용되고 있다. 금나노입자는 특별한 물리적, 화학적 성질 때문에 다양한 생물의학 분야 특히, 약물전달 시스템, 세포 표적화, 바이오센싱, 조직공학에 주로 사용되고 있다. 최근의 연구에서 금나노입자는 골조직 재생을 위한 새로운 골 형성 물질로 사용될 수 있다고 보고되고 있다. 보고된 연구에 따르면 금나노입자는 중간엽 줄기세포의 내부로 흡수되어 p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) 경로를 활성화하고, 조골세포로의 분화를 촉진한다고 증명하고 있다(C. Yi, D. Liu, C. C. Fong, J. Zhang 및 M. Yang, *ACS Nano*, 2010, 4, 6439-6448). 또 다른 연구에서는 금나노입자가 골수 유래 대식세포의 NF- κ B (nuclear factor- κ B) 리간드 경로의 수용체를 자극시켜 파

골세포 분화를 억제하는 것으로 나타났다(O. J. Sul, J. C. Kim, T. W. Kyung, H. J. Kim, Y. Y. Kim, S. H. Kim, J. S. Kim and H. S. Choi, *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, 2010, 74, 2209-2213).

- [0004] 골조직 재생을 향상시키기 위한 방법 중 가장 널리 사용되고 있는 방법은 골분화 유도성 인자를 이용하여 줄기 세포를 조골세포로 분화를 유도시키는 방법이다. 이 방법에 가장 많이 사용되고 있는 인자는 골 형성 단백질(bone morphogenic protein, BMP)이며 골 재생 및 보강에 가장 효과적이라고 알려져있다. 골 형성 단백질은 골 조직 재생에 있어 많은 장점을 가지고 있지만 임상에 적용할 경우 가격이 비싸며, 불필요한 곳에 뼈가 형성되거나 국부적 염증 반응이 나타난다는 단점을 가지고 있다. 따라서, 골 형성 단백질에 비해 저비용 고효율성이며 더 안정적이고 효과적인 대체 인자의 개발이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 본 발명의 목적은 골 재생을 위한 금나노입자를 포함하는 수화젤을 제공하는 것이다. 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 수화젤의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0006] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 골 재생을 위한 금나노입자를 포함하는 수화젤을 제공한다.
- [0008] 본 발명에서 '금나노입자'는 직경 100 nm 이하의 금(Au) 원자를 의미하며, 상기 직경은 바람직하게는 24 nm 내지 30 nm 이다. 금나노입자는 가격이 저렴하고, 무독성이며, 골 형성 및 골 분화를 유도하는 효과를 가진다.
- [0009] 본 발명의 금나노입자는 HAuCl_4 의 환원으로 제조할 수 있다. 바람직하게는 HAuCl_4 용액을 환류한 후, 시트르산 삼나트륨의 첨가로 환원하여 금나노입자를 제조할 수 있다.
- [0010] 구체적인 일 실시양태에서, 금나노입자의 형태 및 크기 분포를 투과 전자 현미경 및 동적 광 산란으로 관찰하였다. 투과 전자 현미경으로 관찰한 결과, 합성된 금나노입자는 거의 구형이었고(도 1A), 동적 광 산란으로 크기 분포를 평가한 결과 평균 직경은 27 ± 3 nm의 단-분산이었다(도 1B).
- [0012] 본 발명에서, '수화젤'은 물을 분산매로 하는 젤을 의미한다.
- [0013] 본 발명의 수화젤은 예를 들어, 콜라겐, 젤라틴, 피브린, 실크피브린 또는 엘라스틴을 포함하는 단백질 기반의 고분자로 제조할 수 있으나, 이제 제한되지 않는다. 단백질 기반 고분자 수화젤은 3차원 네트워크를 갖으며, 조직과 유사한 수분 함량을 갖고, 생분해성이 높아 골 조직 재생에 효과적으로 작용할 수 있다.
- [0014] 상기 수화젤은 바람직하게는 젤라틴으로 제조한다. 젤라틴은 피부, 뼈, 연골, 동물의 힘줄 등의 결합 조직에서 유래된 콜라겐을 가수분해시킴으로써 생성된 물질이다. 젤라틴은 콜라겐의 많은 생리 활성 기능을 유지하고 있으며 생분해성, 생체적합성, 무독성의 장점을 가지고 있다. 수화젤이 골 재생이 필요한 부위에 주입되었을 때 향후 수화젤이 체내에 축적되지 않고 분해되어야 하므로, 젤라틴의 생분해성은 골 재생용 수화젤에 있어서 유용한 효과이다.
- [0015] 구체적인 일 실시양태에서, 본 발명의 젤라틴 수화젤의 생분해성을 확인하기 위하여, 젤라틴 수화젤을 콜라게나아제 용액과 배양하였다. 그 결과, 젤라틴이 콜라게나아제에 의해 민감하게 분해됨을 확인하였다(도 3).
- [0016] 또한, 젤라틴은 광-경화(photo-curing)가 가능하다는 특징이 있다.
- [0017] 바람직하게, 젤라틴 수화젤은 메타크릴산 젤라틴에 광-개시제를 혼합한 후 자외선을 조사함으로써 제조한다. 도 1D는 광-가교된 젤라틴 수화젤의 사진을 나타낸다.
- [0019] 본 발명에서 '골 재생'은 골 형성, 골 분화 또는 골 증식을 의미한다. 상기 골 재생은 바람직하게는, 골 결손 또는 골절 부위의 충전 또는 수복일 수 있다.

- [0020] 상기 골 결손 또는 골절은 사고, 발치, 치과 교정, 골다공증, 골 용해, 골연화증, 골 성장 장애, 골 형성 부전, 골 종양, 유전적 골 성장의 결함에 의한 골 결손 또는 골절을 포함한다.
- [0022] 본 발명의 금나노입자를 포함하는 수화젤은 골 재생 효과가 우수하므로, 골결손 또는 골절의 치료에 유용하게 활용될 수 있다.
- [0023] 구체적인 일 실시양태에서, 본 발명의 금나노입자를 포함하는 수화젤이 지방유래 줄기세포(Adipose derived stem cells, ADSCs)의 증식 및 생존에 미치는 효과를 확인하였다. ADSCs를 수화젤에 접촉하고 일정시간 후 관찰한 결과, 세포의 증식속도는 수화젤 내부의 금나노입자 함량이 증가될수록 증가하였다(도 4A). 또한, 금나노입자 함량이 증가하면 살아있는 세포의 수가 약간 증가하였다(도 4B).
- [0024] 구체적인 일 실시양태에서, 본 발명의 금나노입자를 포함하는 수화젤이 ADSCs의 골 분화에 미치는 효과를 알칼리성 포스파타아제(Alkaline phosphatase, ALP)의 활성을 측정하여 확인하였다. 그 결과 금나노입자의 함량이 증가할수록 ALP 활성 수준이 증가하였다(도 5).
- [0025] 또한, 구체적인 다른 실시양태에서, 본 발명의 금나노입자를 포함하는 수화젤이 조골세포 유전자의 mRNA 발현에 미치는 효과를 확인하였다. 금나노입자를 포함하는 수화젤에서 분리한 ADSCs의 RNA를 분석한 결과, 조골세포 유전자인 골 시알로단백질(BSP) 오스테오칼신(OCN), 타입 I 콜라겐(COL1), 및 런트-관련 전사 인자 2(Runx2)에 대한 mRNA 발현이 증가하였다(도 6).
- [0026] 또한, 구체적인 다른 실시양태에서, 금나노입자를 포함하는 수화젤이 생체내 골 재생에 미치는 효과를 확인하기 위해, 토끼의 두개골 결손부위에서 금나노입자를 포함하는 수화젤을 삽입하였다. 그 결과, 금나노입자의 함량이 증가할수록 총 재생된 골 부피가 증가함을 발견하였다(도 7).
- [0028] 따라서, 본 발명의 금나노입자를 포함하는 수화젤은 ADSCs의 증식 및 생존을 향상시키고, ADSCs의 골 분화를 촉진하며, 골 분화 유전자의 mRNA 발현 증가시킴으로써 골 결손 및 골절 부위의 골 재생에 매우 효과적이다.
- [0030] 또한, 본 발명은
- [0031] i) 금나노입자 및 젤라틴을 광-개시제와 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계, 및
- [0032] ii) 단계 i)의 혼합물을 자외선에 노출시켜 광-가교하는 단계를 포함하는 금나노입자를 포함하는 젤라틴 수화젤의 제조방법을 제공한다.
- [0033] 상기 금나노입자 및 젤라틴 수화젤은 앞서 기술된 바와 같다.
- [0035] 상기 제 i) 단계는 수화젤 형성을 위한 원료물질을 첨가하는 단계이다. 상기 젤라틴은 메타크릴산 젤라틴을 사용하는 것이 바람직하며, 상기 광-개시제는 공지의 물질을 제한 없이 사용 가능하다.
- [0037] 바람직하게 상기 제 i) 단계의 금나노입자는 금 이온(예를 들어, HAuCl_4)를 환원하여 생성시킬 수 있다. 환원에 사용가능한 환원제는 통상의 기술자에게 공지된 환원제를 제한 없이 사용 가능하며, 바람직하게는 시트르산을 사용할 수 있다.
- [0039] 상기 제 ii) 단계는 광-가교된 젤라틴 수화젤을 형성하는 단계이다. 자외선을 조사하면 젤라틴이 광-가교되어 금나노입자를 포함하는 수화젤을 쉽게 형성시킬 수 있다.
- [0041] 구체적인 일 실시양태에서, HAuCl_4 용액을 환류한 후, 2% 시트르산삼나트륨을 빠르게 첨가하였다. 용액의 색이 짙은 적색으로 변화하였고, 이어서 금나노입자를 형성하였다. 이후, 금나노입자의 회색액을 10%(v/v) 메타크릴

산 젤라틴 및 0.1%(w/v) 광-개시제와 혼합하였다. 혼합 용액을 두 개의 글라스 슬라이드 사이로 피펫팅하고, 60 초 동안 자외선(320-500 nm, 7.0 mW/cm², EXFO Omnicure S2000)에 노출시켜 금나노입자를 포함하는 수화젤을 제조하였다.

[0043] 상기 방법에 의하면 직경 24 nm 내지 30 nm의 금나노입자를 포함하는 광-가교된 수화젤을 제조할 수 있다.

발명의 효과

[0044] 본 발명의 금나노입자를 포함하는 수화젤은 지방유래 줄기세포(ADSCs)의 증식 및 생존을 향상시키고, 지방유래 줄기세포의 골 분화를 촉진한다. 또한, BSP, OCN, COL1 및 Runx2와 같은 조골세포 유전자의 mRNA 발현을 증가시키는 효과가 있다. 특히, 젤라틴 수화젤의 경우, 생분해성이기 때문에 인체에 주입 후 쉽게 효소성분해되어 골 결손부위의 수복 및 촉진에 유용하다. 상기와 같은 효과로 인하여, 본 발명의 금나노입자를 포함하는 수화젤은 골재생에 유용하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0045] 도 1의 A는 금나노입자의 투과 전자 현미경(TEM) 이미지를 나타내고, B는 동적 광 산란(DLS)으로 측정된 금나노입자의 크기 분산을 나타내고, C는 금나노입자와 메타크릴산 젤라틴의 혼합물의 표면 플라즈몬 흡수도를 나타내며, D는 광경화된 젤라틴 및 금나노입자를 포함하는 젤라틴(Gel-GNP) 수화젤의 사진을 나타낸다.

도 2의 A는 젤라틴 및 Gel-GNP 수화젤에 대한 시차주사열량계(DSC)의 서모그램을 나타내고, B는 젤라틴 및 Gel-GNP 수화젤에 대한 열 중량 분석을 나타낸다.

도 3의 A는 콜라게나아제에 의한 효소성분해도를 나타내고, B는 공초점 레이저 현미경(CLSM)으로 확인한 Gel-GNP 수화젤의 형태학적 변화를 나타낸다.

도 4는 셀 카운팅 키트 및 생존/사망 검정으로 조사한 젤라틴, Gel-BMP 및 Gel-GNP 수화젤에서 배양한 지방유래 줄기세포(ADSCs)의 증식(A) 및 생존(B)을 나타낸다.

도 5는 금나노입자에서 배양한 ADSCs의 알칼리성포스파타아제(ALP)활성(A) 및 ALP 염색(B)을 나타낸다.

도 6은 젤라틴, Gel-BMP 및 Gel-GNP 수화젤에서 배양한 ADSCs의 ALP 활성(A) 및 ALP 염색(B)을 나타낸다.

도 7은 골 시알로단백질(A), 오스테오칼신(B), 타입 1 콜라겐(C), 및 런트-관련 전사인자 2(D)의 유전자 발현을 나타낸다.

도 8의 A는 대조군, 젤라틴, Gel-BMP 및 Gel-GNP 수화젤의 삽입 후 토끼 두개골의 3차원 스캔 이미지를 나타내며, B는 결손된 토끼 두개골 부위의 회복 면적을 나타낸다.

도 9는 금나노입자가 삽입된 광-경화된 젤라틴 수화젤 네트워크의 개략적인 도해 및 골 결손 치료를 위한 방법을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0048] 1. 실험 재료 및 기구

[0049] 1-1. 재료

[0050] 메타크릴산 젤라틴(Methacrylated gelatin, GelMA)의 합성에 사용되는 돼지피부로부터 유래된 젤라틴(유형 A)과 메타크릴산 무수물(MA)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)사로부터 구입하였다. 금나노입자(Gold nano particles, GNP)의 생산에 사용되는 염화 금산(HAuCl₄)과 시트르산삼나트륨은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)사로부터 구입하였다. 광중합(photopolymerization)에 사용되는 광개시제(photoinitiator)인 1-[4-(2-하이드록시에톡시)-페닐]-2-하이드록시-2-메틸-1-프로판은(Irgacure 2959)은 Ciba Specialty Chemicals사(basel, Switzerland)로 부터 구입하였다. 인간 지방유래 줄기세포(human Adipose-Derived Stem Cells, ADSCs),

MesenPRO RS™ 성장 보충제로 보충된 MesenPRO RS™ 배지, 알파-최소 필수배지(alpha-minimum essential medium, α -MEM), 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS), 돌베코 인산완충 식염수(Dulbecco's phosphate-buffered saline, DPBS), 트립신-EDTA 및 페니실린-스트렙토마이신(PS)은 GIBCO BRL사(Invitrogen Co., USA)로부터 구입하였다. 골 형성 단백질-2(Bone morphogenetic protein-2)는 R&D Systems사(Minneapolis, Mn, USA)로부터 구입하였다.

[0051] 모든 시약은 추가적 정제 없이 사용하였다.

[0052] 1-2. 기구

[0053] 투과 전자 현미경(Transmission electron microscopy, TEM) 관찰은 H-7100(Hitachi, Japan)을 사용하여 수행하였다. 동적 광 산란(Dynamic light scattering, DLS) 측정은 90PLUS (brookhaven, USA)를 사용하여 수행하였다. 자외-가시 흡광도(UV-Vis)는 UV-1650PC (Shimadzu, Japan) 분광광도계를 사용하여 측정하였다. 광 각 X-선 회절 측정은 D8 Advance (Bruker, USA) 회절분석기를 사용하여 수행하였다. 시차주사 열량측정법(Differential Scanning Calorimetry, DSC) 및 열중량 분석(thermogravimetric analysis, TGA)과 같은 열분석은 일정한 질소 유동(constant nitrogen flow)하에서 10 °C/min의 가열속도로 SDT Q 6000 (TA Instruments, USA)을 사용하여 수행하였다.

[0055] 2. 금나노입자를 포함하는 젤라틴 수화젤의 제조

[0056] 2-1. 메타크릴산 젤라틴의 합성

[0057] 젤라틴(Gel)을 50°C에서 돌베코 인산-완충 식염수(Dulbecco's phosphate-buffered saline, DPBS)에 용해시켜 10 중량% 균일 용액을 만들었다. 합성 과정에서 20 %(v/v)의 메타크릴산을 첨가하여 높은 등급으로 메타크릴산화 하였다. 메타크릴산은 교반 상태 하에서 0.5 ml/min의 속도로 젤라틴 용액에 첨가되었다. 혼합물을 50°C에서 3시간 동안 반응시켰다. 추가적 온난 DPBS로 5회 희석한 후, 메타크릴산 젤라틴 용액을 12-14 kDa 차단 투석 튜브를 사용하여 40°C에서 6일 동안 탈이온수로 투석하여 미반응 메타크릴산 및 다른 불순물을 제거하였다. 메타크릴산 젤라틴(GelMA) 용액을 -80°C에서 냉각하고, 사용할 때까지 -80°C에서 동결건조 및 저장하였다.

[0058] 2-2. 금나노입자 용액의 제조

[0059] 금나노입자(GNP) 수용액은 HAuCl₄의 시트르산 환원으로 합성한다. 0.5 mM의 HAuCl₄(800 mL) 용액을 환류한 후, 2% 시트르산삼나트륨(15 mL)을 빠르게 첨가하였다. 15분 후, 용액의 색이 짙은 적색으로 변화하였고, 이어서 금나노입자(GNP)를 형성하였다. 생성된 GNP를 투과 전자 현미경(TEM)과 동적 광 산란(DLS)으로 관찰하였다. GNP를 함유하는 용액은 모든 실험에서 추가적 정제 없이 사용하였다.

[0060] 2-3. 금나노입자-젤라틴 수화젤의 제조

[0061] 금나노입자-젤라틴 복합체 수화젤은 자외선-유도 화학적 가교에 의해 제조하였다. 금나노입자(GNP)의 일련의 다양한 희석액(70 μ g 중 1, 5 및 14 μ g의 최종 농도)을 10%(v/v) 메타크릴산 젤라틴(GelMA) 및 0.1%(w/v) 광-개시제와 혼합하였다. 분광광도계를 사용하여, 자외-가시 흡광도를 측정하여 GNP의 존재를 확인하였다. 그 후에, 이 혼합 용액 70 μ l를 50 μ m 스페이서로 분리된 두 개의 글라스 슬라이드 사이로 피펫팅하고, 60초 동안 자외선(320-500 nm, 7.0 mW/cm², EXFO Omnicure S2000)에 노출시켰다. 샘플(직경 12 mm 및 높이 500 μ m)을 슬라이드에 서 분리하고 37°C에서 24시간 동안 DPBS에 배양하여 추가적 실험에 사용하였다. 이들을 각각 GNP의 희석 수준에 따라 Gel-GNP 1(1 μ g), Gel-GNP 2(5 μ g) 및 Gel-GNP 3(14 μ g)으로 표시하였다. GNP의 기능성을 비교하기 위하여, 기능성 인자인 BMP-2(Bone morphogenetic protein 2)를 종래 연구에서 사용된 양인 10 ng으로 10%(w/v) GelMA 및 0.1%(w/v) 광-개시제 혼합 용액 70 μ l에 첨가하고, 자외선으로 광-중합하였다. 수화젤 내부에 GNP의 혼입을 시차주사 열량 측정법(DSC)과 열중량 분석(TGA)으로 확인하였다.

[0062] 2-4. 결과

[0063] GNP의 형태 및 크기 분포를 TEM 및 DLS로 관찰하였다. TEM 이미지에 나타나 있듯이(도 1A), 합성된 GNP는 거의 구형이고, 평균 직경 27 $\pm$ 3 nm의 단-분산이었다(도 1B). 메타크릴산 젤라틴은 GNP 용액에 용해되고, Gel-GNP 복합체를 쉽게 형성한다. Gel-GNP 복합체의 자외-가시 스펙트럼은 GNP의 표면 플라스몬 흡수로 인해 530 nm에서 강한 흡수율을 나타낸다(도 1C). 반면, 젤라틴 용액에서는 흡수가 관찰되지 않는다. 또한, 530 nm 표면 플라스

몬 밴드의 최대 흡수율은 GNP의 양이 증가하면 유의하게 증가하였다.

[0064] 메타크릴산 젤라틴 및 GNP의 혼합 용액을 자외선으로 광-경화하였다. 도 1D는 순수 젤라틴 수화젤 및 광-가교된 Gel-GNP 수화젤의 사진을 나타낸다.

[0065] 수화젤 네트워크 내부의 GNP의 존재는 열 분석으로 확인하였다. 도 2는 Gel 및 Gel-GNP 수화젤의 DSC와 TGA 곡선을 나타낸다. 도 2A에 나타나 있듯이, 젤라틴 수화젤은 202℃ 및 325℃에서 흡열성 피크를 나타내며, 이는 가교된 수화젤의 형성 때문이다. GNP가 젤라틴 수화젤에 혼입되었을 때, 흡열성 피크는 다른 온도로 이동되거나 얻어진 온도 범위에서 사라졌다. 따라서, Gel-GNP 수화젤은 125℃에서 새로운 피크를 나타냈고, 이는 수화젤 내 GNP의 존재 때문이다. TGA를 수행하여, Gel, Gel-GNP 1, Gel-GNP 2 및 Gel-GNP 3의 무게 손실 퍼센트를 결정하였다(도 2B). 열 중량 곡선은 250℃ 와 500℃ 사이에서 특징을 나타내었는데, 모든 샘플에서 큰 무게의 손실이 나타났다. 이러한 무게의 손실은 젤라틴의 특유의 열적 거동 때문이다. 780℃에서 TGA로 측정된 모든 샘플의 남은 양은 대략 19.46%(Gel), 19.94%(Gel-GNP 1), 20.27%(Gel-GNP 2) 및 20.41%(Gel-GNP 3)였다. 수화젤 내 GNP의 존재를 Gel 과 Gel-GNP 수화젤 사이의 이러한 분해의 차이로 확인하였다.

[0067] 3. 수화젤의 효소성 분해

[0068] 3-1. 시험관내 효소성 분해 실험

[0069] Gel-GNP 수화젤의 효소성 분해의 특성을 확인하기 위하여, 각각의 수화젤 샘플을 1.5 ml 원심분리 관에 위치시키고, 콜라게나아제 용액(2.5 U/ml, 콜라게나아제 타입 II) 1 ml와 37℃에서 배양하였다. 정해진 시점에서 수화젤을 제거하고, 냉각 및 동결건조하였다. 분해 퍼센트는 최초 무게에 대한 최종 무게의 비율로 계산하였다. 샘플의 크기는 그룹당 5젤이다.

[0070] 분해된 수화젤의 형태를 아민 반응 형광 염료(Alexa Fluor 488 카복실산, 석신이미딜 에테르, Molecular Probes®)에 의한 라벨링으로 결정하여 시각화를 용이하게 하였다. 염료를 0.5 mg/ml의 농도로 디메틸 설펝시드(DMSO)에 용해시켰다. 저장 용액(stock solution)을 탄산수소나트륨(50 mM, pH 8.5)으로 희석하여 50 µg/ml의 작업 농도(working concentration)를 얻었다. 그 후 샘플을 1시간 동안 실온에서 1 ml의 작업 용액에 담그고, DPBS에서 3회 세척하였다. 형광 라벨된 수화젤을 공초점 레이저 현미경(Confocal laser microscopy)(CLSM, Eclipse E600W, Nikon, Tokyo, Japan)으로 이미지화 하였다. 얻은 이미지를 Nikon EZ-C1 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0071] 3-2. 결과

[0072] 수화젤의 효소성분해를 시험하여 그들의 효소분해속도를 확인하였다. 젤라틴(Gel) 및 Gel-GNP 수화젤의 분해 거동을 무게 감소를 측정하여 결정하였다. 도 3A에 나타나 있듯이, 효소 없이 배양하였을 때, 72시간 동안 무게 감소가 관찰되지 않았다. 반면, 콜라게나아제와 함께 배양된 Gel, Gel-GNP 1, Gel-GNP 2 및 Gel-GNP 3 수화젤은 상기 시간 동안 유의한 질량의 감소를 나타내었다. 도 3B는 시험관내 분해에서 이러한 형광 라벨된 수화젤의 형태학적 변화를 보여준다. 콜라게나아제와 함께 배양하는 동안 질량 손실 실험의 결과와 대응되는 수화젤 형태의 확연한 변화가 있었다. 상기 결과는 젤라틴이 콜라겐으로부터 유래된 천연 중합체이며, 콜라게나아제에 의해 민감하게 분해됨을 나타낸다.

[0074] 4. 지방유래 줄기세포(Adipose-Derived Stem Cells, ADSCs)의 증식 및 생존

[0075] 4-1. 세포 배양

[0076] 지방유래 줄기세포(ADSCs)를 사용하여 세포 독성 및 골 분화(osteogenic differentiation)를 연구하였다. ADSCs를 37℃의 5% CO₂를 함유한 습한 공기하의 표준 세포 배양 인큐베이터에서 배양하였다. 세포를 MesenPRO RSTTM 성장 보충제, 2% FBS, 및 2 mM 글루타민으로 보충된 MesenPRO RSTTM 배지에서 유지시켰다. 배지를 3일마다 교체하였다. 모든 세포를 지수 증식기(exponential growth phase)일 때 사용하였다. 생물학적 실험 및 분석을 위해, 세포들을 수확하고, 1000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 회수한 후, 시험관내 생물학적 평가에 앞서, 웰 플레이트에 접종하였다. 시험관내 연구를 위하여, 수화젤(직경 12 mm 및 높이 500 µm)을 자외선-유도 화학적 가교로 3-(트리메톡시실릴)프로필 메타크릴레이트(TMSPMA)-코팅 글라스 슬라이드 위에서 제조하였다. 그 후 각각 Gel, Gel-BMP, Gel-GNP 1, Gel-GNP 2, 및 Gel-GNP 3으로 가교된 수화젤을 제조하고, 37℃에서 밤새 둘베코 수

정 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM) 중에 두었다.

4-2. 세포의 증식 및 생존

ADSCs를 트립신-EDTA 용액을 사용하여 배양 접시에서 분리하고, 5×10^4 세포 밀도로 여러 종류의 수화젤에 접종하였다. 수화젤의 세포 증식을 세포 카운팅 키트(CCK-8, Dojindo Molecular Technologies Inc., Japan)를 사용하여 평가하였다. 세포를 접종한 후에, 부착 및 증식된 세포를 24, 48, 및 72시간에 측정하였다. 각각의 결정된 시점에서, 수화젤을 DPBS로 세척하고, CCK-8(0.1 ml/ml 300 μ l)을 함유한 신선한 배지를 첨가하였다. 이를 2 시간 동안 배양하고, 마이크로플레이트 리더(microplate reader)(BioRad, USA)를 450 nm 파장에서 사용하여 강도를 측정하였다. 추가적으로, 세포 생존은 calcein-AM/ethidium homodimer-1(EthD-1) 생존/사망 키트(Invitrogen, USA)를 사용하여 평가하였다. 배양 24시간 후, 세포-접종 수화젤을 DPBS로 세척하고, 2 μ M calcein AM 및 4 μ M EthD-1 시험 용액을 각각의 수화젤에 직접 첨가하였다. 그 후에, 염색된 세포를 공초점 레이저현미경(CLSM)으로 관찰하였다.

4-3. 결과

여러 수화젤에서의 ADSCs의 세포증식을 상이한 시간 간격에서 CCK 검정으로 결정하였다(도 4A). Gel-BMP를 양성 대조로 사용하였고, 이 물질은 24, 48, 및 72시간에서 각각 19%, 27%, 및 31%의 ADSCs 증식 수준을 나타내었다. Gel-GNP 수화젤은 ADSCs의 증식에 있어서 유사한 효과를 보였다. 또한, 세포의 증식속도는 수화젤 내부의 GNP 함량이 증가될수록 증가하였다. Gel-GNP 3의 사례에서, 증식 속도가 Gel-BMP와 유사한 양상으로 증가하였으며, 72시간에 28%에 도달하였다. ADSCs의 생존/사망 염색 검정은 증식검정과 유사한 결과를 나타내었다. 이 검정은 GNP 함량이 증가되면 살아있는 세포의 수가 약간 증가함을 보여주었다(도 4B).

5. ADSCs의 골분화에 대한 금나노입자의 효과

5-1. 알칼리성 포스파타아제(Alkaline phosphatase, ALP) 활성 및 ALP 염색

알칼리성 포스파타아제(ALP) 활성 및 ALP 염색 검정을 사용하여 ADSCs의 골 분화를 평가하였다. ALP 검정을 위해, ADSCs를 24 웰 플레이트에 5×10^4 세포/웰의 밀도로 접종하고, 3일 동안 배양하였다. 세포가 배양 플레이트에 부착된 후, GNP를 골형성 배지[10% FBS, 1% PS, 10 mM β -인산글리세롤이 보충된 DMEM (Sigma-Aldrich), 0.1 μ M 텍사메타손 (Sigma-Aldrich), 및 300 μ M 아스코르브산 (Sigma-Aldrich)]에 최종 농도 1, 5, 및 14 μ g/ml로 첨가하고, 14일동안 배양하였다. 배양 후, ADSCs를 DPBS로 세척하고, 프로테아제 억제제 콕테일(Boehringer Mannheim GmbH, Germany)과 함께 1 $\times$ RIPA 버퍼(50 mM Tri-HCl, 150 mM NaCl, 0.25% 데옥시콜산, 1% NP-40 및 1 mM EDTA)로 30분 동안 얼음에서 용해시켰다. 용해물을 1.3×10^4 rpm으로 4°C에서 15분 동안 원심분리하여 세포 파편을 제거하였다. 원심분리 후에, 상청액을 회수하고, 그 후 *p*-니트로페놀 포스페이트 용액(pNPP, Sigma)과 37°C에서 30분 동안 5% CO₂의 습한 인큐베이터에서 반응시켰다. 그 후, 1 M NaOH 50 μ l를 첨가하여 pNPP와의 반응을 중단시켰다. 마이크로플레이트 리더를 사용하여 405 nm에서의 흡수도로 ALPase 존재하의 *p*-니트로페놀 생산 수준을 측정하였다. 골 분화 정도를 평가하기 위하여, 세포를 실온에서 10분 동안 3.7% 포름알데히드로 고정한 후, ALP 염색 키트(Sigma-Aldrich)를 제조자의 지시대로 사용하여 염색하였다. 염색 후에, 세포-접종 웰을 DPBS로 2회 세척하고, 광학 현미경으로 관찰하였다.

5-2. 결과

골 분화에 대한 GNP의 효과를 ALP 활성 및 ALP 염색의 측정으로 확인하였다(도 5A). GNP가 1, 5, 및 14 μ g/ml의 모든 시험 농도에서 ADSCs의 골 분화를 용량-의존 방식으로 촉진함을 발견하였다. 또한, GNP 처리 10일 후, 염색된 ALP 침착물의 양이 유의하게 증가하였다(도 5B).

6. ADSCs의 골분화에 대한 Gel-GNP 수화젤의 효과

6-1. 알칼리성 포스파타아제(Alkaline phosphatase, ALP) 활성 및 ALP 염색

Gel-GNP 수화젤의 효과를 확인하기 위하여, ADSCs를 4, 7, 10, 및 14일 동안 골형성 배지에서 5×10^4 세포 밀도로 여러 종류의 수화젤에 접종하였다. 배양 후에, 수화젤을 1시간 동안 0.1% 콜라게나아제 용액 1 ml로 처리

하여 완전히 온침(digest)하고, 각각의 수화젤에서 분리된 세포들을 1500 rpm으로 15분 동안 원심분리하였다. 그 후 세포 펠렛을 $1 \times$ RIPA 버퍼로 30분 동안 얼음에서 용해시켰다. 세포 용해 후에, ALP 활성 및 ALP 염색을 상기 5-1에 기재된 것과 동일하게 관찰하였다.

6-2. 결과

골 분화에 대한 Gel-GNP 수화젤의 효과를 ALP 활성의 측정으로 확인하였다(도 6A). 모든 표본에서 ADSCs에 대한 ALP 활성 수준은 배양 과정 동안 증가하였다. ALP 활성의 수준은 Gel, Gel-GNP 1, Gel-GNP 2, Gel-GNP 3 및 Gel-BMP의 순서로 유의하게 증가하였다. Gel-GNP 수화젤은 ALP 활성에 대하여 용량 및 시간 의존적 효과를 나타내었다. 가장 높은 용량인 Gel-GNP 3은 Gel-BMP와 유사한, 높은 ALP 활성을 나타내었으며, 이는 Gel-GNP 3이 ADSCs의 골 분화를 양성적으로 가속할 수 있음을 나타낸다. 도 6B에 나타나 있듯이, 배양 14일째에 염색된 ALP 침착물의 양이 Gel, Gel-GNP 1, Gel-GNP 2, Gel-GNP 3 및 Gel-BMP의 순서로 증가됨을 시각적으로 확인하였다. 또한, Gel-GNP 3 및 Gel-BMP에 침착된 ALP의 양은 다른 모든 표본들에 비하여 유의하게 높음을 발견하였다.

7. 조골세포 유전자의 mRNA 발현

7-1. 정량적 실시간 증폭효소 연쇄반응

각각의 결정된 시점에서, Gel, Gel-BMP, Gel-GNP 1, Gel-GNP 2, 및 Gel-GNP 3에서 배양된 ADSCs의 총 RNA(5×10^4 세포 밀도로 접종)를 RNeasy Plus Mini 키트(Qiagen, CA, USA)를 사용하여 분리하였다. 제조자의 지시대로, 총 RNA의 1 μ g을 모든 표본에서 추출하고, 그 후 AccuPower Cycle Script RT Premix (Bioneer, 대전, 대한민국)로 cDNA로 전사시켰다. 측정된 mRNA 유전자의 프라이머는 다음과 같다: 골 시알로단백질(Bone sialoprotein, BSP) - 5'-AAC GAA GAA AGC GAA GCA GAA-3' (센스) 및 5'-TCT GCC TCT GTG CTG TTG GT-3' (안티센스), 오스테오칼신 (Osteocalcin, OCN) - 5'-AGC AAA GGT GCA GCC TTT GT-3' (센스) 및 5'-GCG CCT GGG TCT CTT CAC -3' (안티센스), 타입 I 콜라겐 (Type I collagen, COL1) - 5'-ATG ACT ATG AGT ATG GGG AAG CA-3' (센스) 및 5'-TGG GTC CCT CTG TTA CAC TTT-3' (안티센스), 런트-관련 전사 인자 2 (Runx2) - 5'-AAC CCA CGA ATG CAC TAT CCA-3' (센스) 및 5'-CGG ACA TAC CGA CGA GGG ACA TG-3' (안티센스), 글리세르알데히드 3-포스페이트 탈수소효소(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) - 5'-ATG GGG AAG GTG AAG GTC G-3' (센스) 및 5'-GGG GTC ATT GAT GGC AAC AAT A-3' (안티센스). 실시간 PCR을 iQ SYBR Green supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 분석하였다. 상대적 주기 역치 법을 사용하여 역치 주기(threshold cycle) 값을 계산하였다. 배양 7일째 대조군(Gel)의 배수 변화를 1배로 설정하고, 표준화된 배수 변화의 비율을 계산하였다. 95°C에서 10분간의 최초 변성 단계 후에, 95°C에서 10초간, 53-56°C(BSP: 54°C, OCN: 55°C, COL1: 53°C, Runx2: 56°C)에서 30초간 및 72°C에서 30초간 45 주기의 실시간 PCR 증폭을 수행하였다. 모든 결과를 GAPDH로 표준화하였다.

7-2. 결과

BSP, OCN, COL1, 및 Runx2와 같은 다양한 조골세포 유전자의 mRNA 발현을 실시간 PCR로 결정하였다(도 7). 결과를 GAPDH 발현으로 표준화하였다. 도 7A와 7B에 나타나 있듯이, 골 분화 및 무기물화 과정의 후기 마커인, BSP 및 OCN에 대한 mRNA 발현은 모든 표본에서 배양 7일째에 가장 낮게 발현하였고, 그 후 14일째에 증가하였다. 이 마커들의 발현수준은 Gel, Gel-GNP 1, Gel-GNP 2, Gel-GNP 3 및 Gel-BMP 순서로 유의하게 증가하였다. 상기 표본들 사이에서, Gel-BMP가 가장 높은 mRNA 발현을 나타내었으며, Gel-GNP 3도 Gel-BMP와 유사한 효과를 나타냈다. 한편, 골 성숙의 초기 마커인, COL1에 대한 mRNA 발현은 모든 표본에서 7일째에 가장 높았고, 그 후 14일째에 감소하였다(도 7C). 각각의 시간 간격에서 가장 높은 수준의 COL1은 Gel-BMP 및 Gel-GNP 3에서 관찰되었다. 또다른 골 형성 전사 인자인 Runx2는 모든 표본에서 모든 과정의 시간동안 증가된 수준을 나타내었다. Runx2에 대한 mRNA 발현은 BSP 및 OCN의 결과와 유사하게, Gel, Gel-GNP 1, Gel-GNP 2, Gel-GNP 3 및 Gel-BMP의 순서로 유의하게 증가하였다(도 7D). 모든 마커들에서, mRNA 발현은 Gel, Gel-GNP 1, Gel-GNP 2, Gel-GNP 3 및 Gel-BMP의 순서로 증가하였다. 특히, Gel-GNP3는 모든 프라이머에서 Gel-BMP와 유사한 발현을 나타내었다.

8. 생체내 골 재생에 대한 Gel-GNP 수화젤의 효과

8-1. 생체내 동물 모델 실험

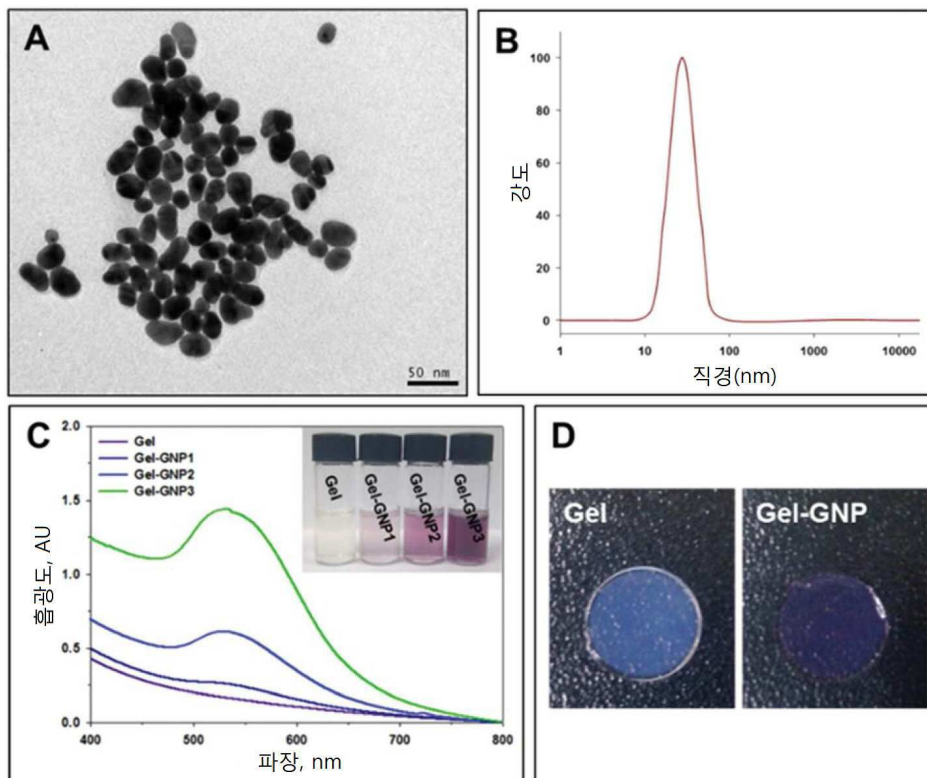
[0102] 6마리의 수컷 뉴질랜드 토끼(대략 2.5 kg)를 동등하게 6개의 그룹으로 배정하였다: (1) blank(대조군), (2) Gel, (3) Gel-BMP, (4) Gel-GNP 1, (5) Gel-GNP 2, 및 (6) Gel-GNP 3. 직경 10 mm가 결손된 두정골(parietal bone)을 두개골의 왼쪽과 오른쪽 양쪽에 생성하였다. 그 후 결손 부위를 앞서 제조한 5종류의 수화젤로 충전하였다. 이식 4주 및 8주 후에, 각각의 토끼를 마취시키고, 희생시켜, 두정골을 추출하였다. 마이크로-컴퓨터 단층촬영(micro-computed tomography, μ CT) 검사를 사용하여 골 결손에 대한 골 치유를 평가하였다. 이는 SkyScan1173 (SKYSCAN, Kartuizersweg 3B 2550 Kontich, Belgium)을 사용하여 하기의 설정으로 수행하였다: 130 kV 전압, 30 μ A 전류, 및 250 ms 노출 시간. 평균 회색값(gray value) 및 관심 영역(region of interest, ROI)의 표준 편차를 사용하여 μ CT에서의 골 치유 정도를 정량하였다. 온디맨드 소프트웨어(CyberMed Inc., 한국)를 사용하여 μ CT 이미지로부터 결함 부위의 총 부피를 갖는 3-차원 이미지를 얻었다.

[0103] 8-2. 결과

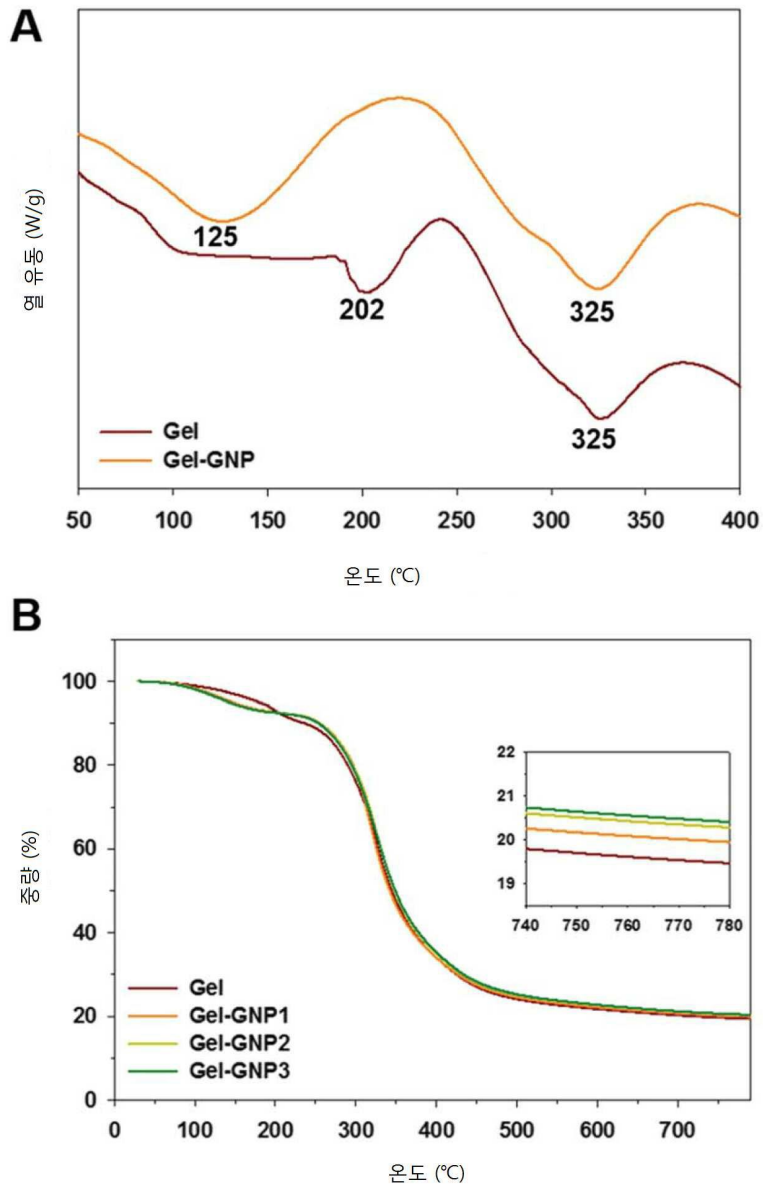
[0104] 두정골 결손(10 mm 직경)을 앞서 기재된 수술 절차를 사용하여 생성하였다. 결손 부위를 5개 종류의 수화젤 중 하나로 충전하였다(Gel, Gel-GNP 1, 하기의 설정으로 2, 및 하기의 설정으로 3). 수술 후에, 미리 결정된 시점에서 μ CT 분석을 수행하여 다양한 수화젤의 골 치유 효과를 확인하였다. 결손 및 재생된 부위의 3-차원 이미지를 분석하여, ROI의 평균 회색값을 얻었다. 도 8에 나타나 있듯이, 3-차원 이미지로 모든 그룹의 총 재생된 골 부피(regenerated bone volume, RBV)가 4주 에서 8주 사이에 증가함을 발견했다. 모든 실험군(Gel, Gel-BMP, Gel-GNP 1, Gel-GNP 2, 및 Gel-GNP 3)이 대조군과 비교하여 결손 부위에서 골 치유에 양성적 효과를 갖는 것을 발견했다. Gel-BMP로 충전된 부위에서 RBV의 유의한 증가를 발견하였다. 또한, Gel-GNP 1, Gel-GNP 2, 및 Gel-GNP 3의 순서로 RBV 수준이 유의하게 증가함을 발견하였다. Gel-GNP 수화젤은 시간 및 용량 의존 방식으로 골 재생의 향상을 나타내었다.

도면

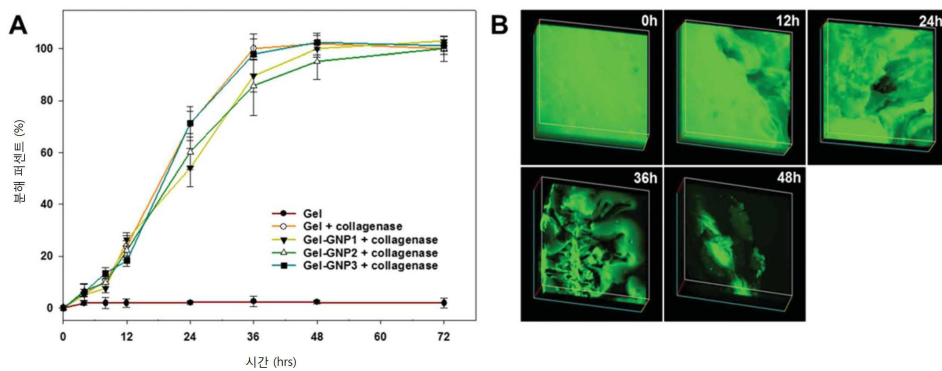
도면1



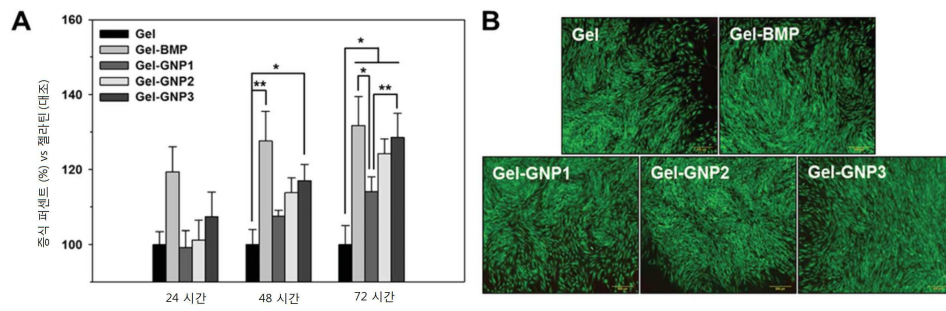
도면2



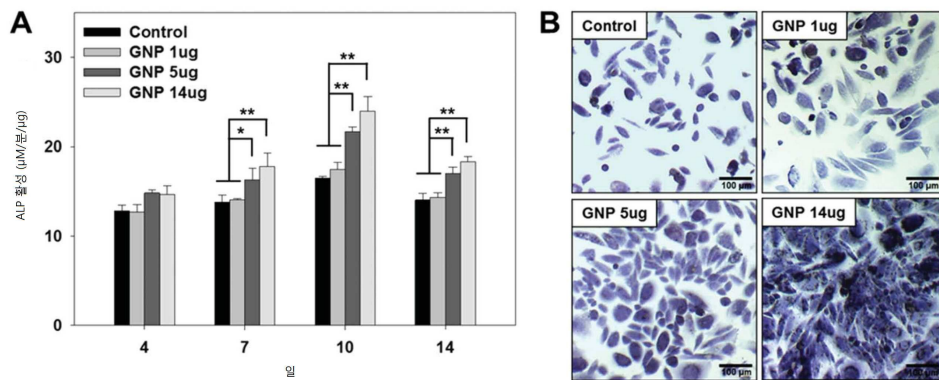
도면3



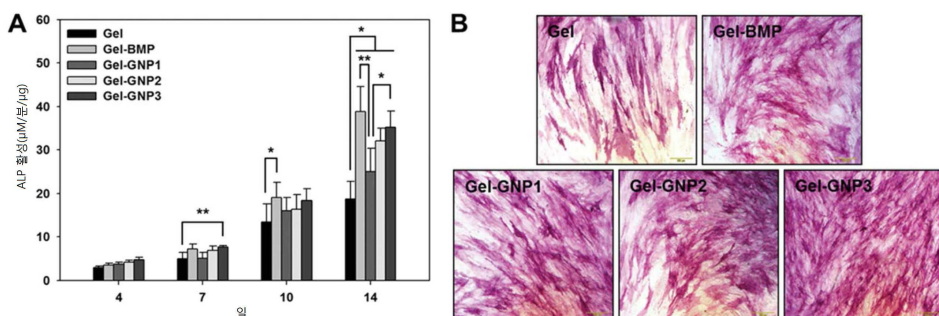
도면4



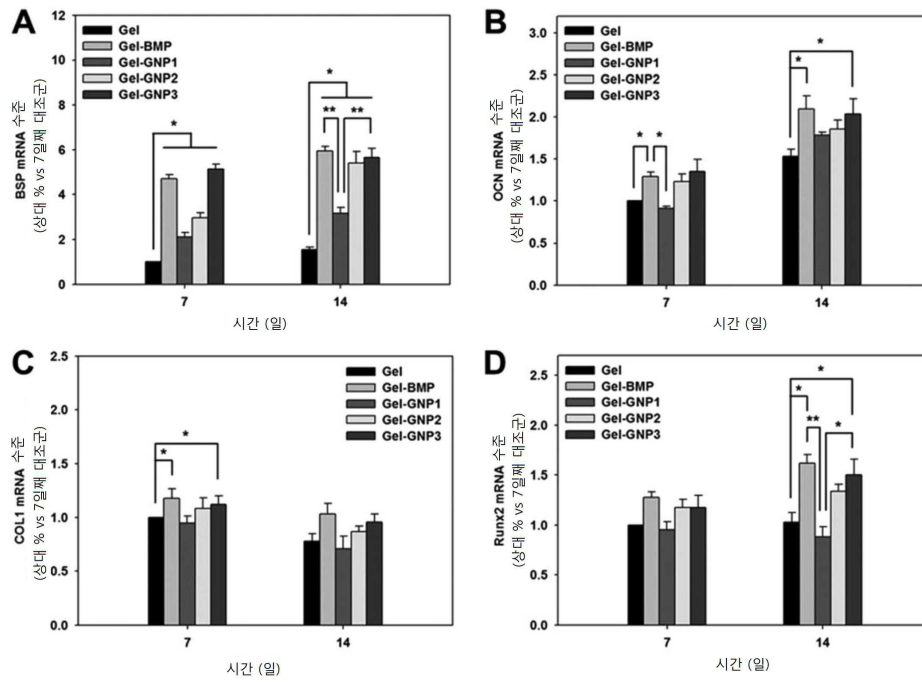
도면5



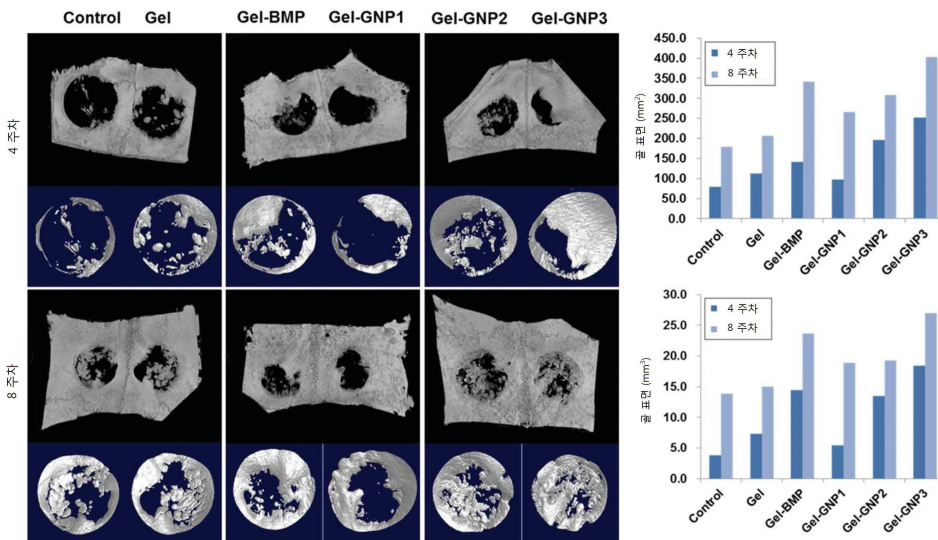
도면6



도면7



도면8



도면9

