

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0097778 (43) 공개일자 2016년08월18일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A01K 67/027 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01) (52) CPC특허분류 A01K 67/027 (2013.01) G01N 33/5008 (2013.01) (21) 출원번호 10-2015-0020041 (22) 출원일자 2015년02월10일 심사청구일자 2015년02월10일		(71) 출원인 이화여자대학교 산학협력단 서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교) (72) 발명자 김선중 서울특별시 양천구 목동서로 37, 503호 (목동) 김진우 서울특별시 양천구 안양천로 1071 (목동) (74) 대리인 안소영

전체 청구항 수 : 총 14 항

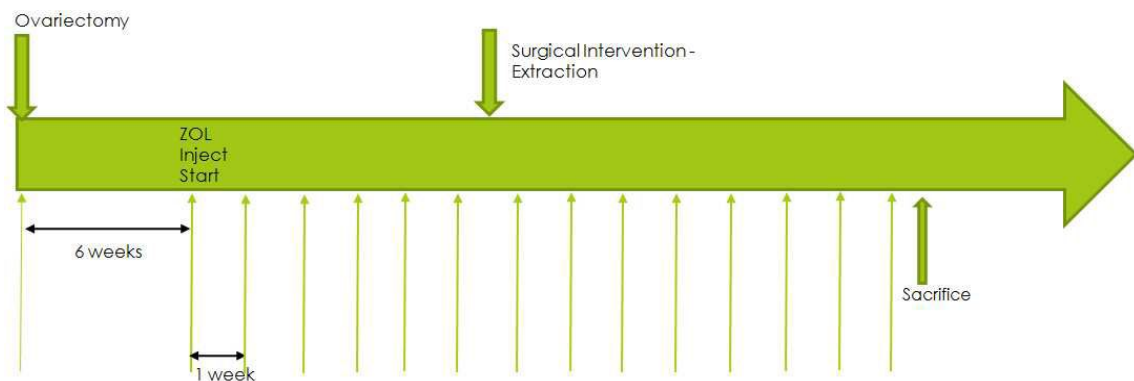
(54) 발명의 명칭 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 동물 모델 및 이의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 동물 모델 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명의 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 설치류 동물 모델은 인간에서 비스포스포네이트 연관 악골 괴사증과 유사한 질환 조건을 제공함으로써, 비스포스포네이트 연관 악골 괴사증의 연구에 적합한 연구 모델을 제공하여 해당 질환의 연구 개발에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 설치류 동물에서 골 질환을 유발하고 배양하는 단계;
- (b) 비스포스포네이트 약물을 상기 (a) 단계의 설치류 동물에 투여하고 배양하는 단계;
- (c) 상기 (b) 단계의 설치류 동물에 외과 수술로 발치를 수행하여 치아를 적출하는 단계; 및
- (d) 비스포스포네이트 약물을 상기 (c) 단계의 설치류 동물에 투여하고 배양하는 단계를 포함하는 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 동물 모델의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 골질환은 골다공증, 골전이 악성 종양 또는 다발성 골수종으로부터 선택되는 어느 하나에 의해 유발되는 것인 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 동물 모델의 제조 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 배양은 4 내지 10주 동안 수행되는 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 동물 모델의 제조 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계의 비스포스포네이트 약물은 졸레드로네이트, 리제드로네이트, 알렌드로네이트, 에티드로네이트, 이반드로네이트 또는 파미드로네이트로부터 선택되는 어느 하나인 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 동물 모델의 제조 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계의 비스포스포네이트 약물의 투여는 매주 1 또는 2회, 50 내지 300 ug/kg의 투여량으로, 피하 또는 정맥 투여되는 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 동물 모델의 제조 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 (c) 단계의 외과 수술로 발치는 하악골의 대구치 발치인 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 동물 모델의 제조 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 (d) 단계의 비스포스포네이트 약물은 졸레드로네이트, 리제드로네이트, 알렌드로네이트, 에티드로네이트, 이반드로네이트 또는 파미드로네이트로부터 선택되는 어느 하나인 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 동물 모델의 제조 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 (d) 단계의 비스포스포네이트 약물의 투여는 매주 1 또는 2회, 50 내지 300 ug/kg의 투여량으로, 피하 또는 정맥 투여되는 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 동물 모델의 제조 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 (d) 단계의 배양은 4 내지 10주 동안 수행되는 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 동물 모델의 제조 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 설치류 동물은 랫트(rat)인 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 동물 모델의 제조 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따라 제조된 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 설치류 동물 모델.

청구항 12

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따라 제조된 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 설치류 동물 모델을 이용하는 비스포스포네이트 연관 악골 괴사증 치료 물질의 스크리닝 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 비스포스포네이트 연관 악골 괴사증 치료 물질의 스크리닝 방법은 설치류 동물 모델에 치료 후보 물질을 투여하는 단계를 포함하는 것인 비스포스포네이트 연관 악골 괴사증 치료 물질의 스크리닝 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 비스포스포네이트 연관 악골 괴사증 치료 물질의 스크리닝 방법은 임상적 외관 평가, 바이오마커 확인, H&E 염색, Micro-CT 형태 분석법 또는 TRAP 염색 중 선택된 어느 하나의 분석방법을 통해 분석되는 것인 비스포스포네이트 연관 악골 괴사증 치료 물질의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 동물 모델 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 비스포스포네이트는 골다공증의 치료 및 암환자의 골전이 예방 등 다수의 골질환에 널리 이용되고 있는 약물이다. 전세계적으로 늘어나는 비스포스포네이트의 사용 및 고령화 사회의 본격적 진입에 따라 비스포스포네이트 연관 악골 괴사증의 발생 빈도 또한 폭발적으로 증가할 것으로 예상되어 이와 관련된 연구가 매우 시급한 실정이다.

[0003] 비스포스포네이트 복용과 관련하여 악골의 괴사증이 2003년 처음 발표된 이래, 본 질병의 발생 원인과 병리 생태에 대해 규명하려는 많은 노력들이 있어왔다. 그러나 아직도 발생 기전은 명확히 이해되지 않고 있으며, 현재 이 질병은 비스포스포네이트의 주 작용인 파골세포 작용의 억제에 의한 골 재형성의 과억제에 따른 치유 능력 부전에 의한 질병으로 이해되고 있다.

[0004] 이와 같이 비스포스포네이트 연관 악골 괴사증 (Bisphosphonate-related Osteonecrosis of Jaw; BRONJ)이 골대사 질환이라는 점에 근거하여 BRONJ의 진단을 목적으로 일부 위험도 예측 방안 등이 제안된 바가 있었으나, 비스포스포네이트 연관 악골 괴사증 질환에 대한 바이오마커로서 이용 가능성이 명확히 밝혀진 것은 없다.

[0005] 상기 질환의 예측 방안 등을 마련하기 위해서는 새로운 바이오마커의 전임상적 탐지 및 개발을 위해 동물 모델을 통한 규명이 필요하나 현재까지는 확립된 비스포스포네이트 연관 악골 괴사증 동물 모델이 없으며, 기존 선행문헌들은 다양한 문제점을 내포하고 있어 비스포스포네이트 연관 악골 괴사증에 적합한 동물모델을 제공한다고 볼 수 없다. 예를 들어, 악성 종양 환자의 권장되는 zoledronate 투여량은 정맥투여 4mg/4주 (약 67ug/kg)인데, Rat과 mice 등의 동물 모델에서는 인간에서와 같이 정맥 투여가 기술적으로 어렵기 때문에 대개 복강 투여하게 됨으로써 이에 대한 투여량 증감이 고려되어야 하는데, 이러한 투여량 측면의 검토가 제대로 이루어지지 않았다. 또한, 설치류의 대사는 인간에 비해 빠르기 때문에 투여 기간의 감소가 고려되어야 하나, 대부분의 동물 모델 실험적 연구에서는 이를 간과하여 실험이 수행되어 인간에서의 BRONJ를 모델링하는 동물 모델을 제공한다고 보기 어렵다. 또한, 각 연구들의 실험 방법과 결과가 너무 상반되어 신뢰성에 문제가 있으며, BRONJ 유발을 위해 가장 중요한 포인트인 발치의 방법이 매우 다양하여 이에 대한 고려가 필요하다. 특히, 비스포스포네이트가 투여되는 환자에 있어서는 선행하는 골 대사 질환이 있기 마련인데, 앞선 연구들은 선행하는 골 대사 질환에 대한 어떠한 고려도 이루어지지 않았다.

[0006] 이러한 배경 하에, 인간에서의 환경과 유사한 비스포스포네이트 연관 악골 괴사증 동물 모델에 대한 연구 개발이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) KR 10-1475833, 2014.12.17

(특허문헌 0002) KR 10-1279356, 2013.06.21

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 동물 모델의 제조 방법으로, (a) 설치류 동물에서 골 질환을 유발하고 배양하는 단계; (b) 비스포스포네이트 약물을 상기 (a) 단계의 설치류 동물에 투여하고 배양하는 단계; (c) 상기 (b) 단계의 설치류 동물에 외과 수술로 발치를 수행하여 치아를 적출하는 단계; 및 (d) 비스포스포네이트 약물을 상기 (c) 단계의 설치류 동물에 투여하고 배양하는 단계를 포함하는 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 동물 모델의 제조 방법을 제공한다.

[0009] 본 발명은 또한 상기 방법에 따라 제조된 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 설치류 동물 모델을 제공한다.

[0010] 본 발명은 상기 방법에 따라 제조된 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 설치류 동물 모델을 이용하는 비스포스포네이트 연관 악골 괴사증 치료 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명자들은 인간에서의 질환과 유사한 질환 조건을 이룰 수 있는 비스포스포네이트 연관 악골 괴사증 동물 모델을 제조하기 위한 연구를 진행하여, 선행하는 골질환을 유발하고, 인간에서의 대사와 유사한 수준이 적용될 수 있도록 비스포스포네이트의 투여량을 설정하고, 적합한 발치를 제공함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0012] 본 발명은 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 동물 모델의 제조 방법으로, (a) 설치류 동물에서 골 질환을 유발하고 배양하는 단계; (b) 비스포스포네이트 약물을 상기 (a) 단계의 설치류 동물에 투여하고 배양하는 단계; (c) 상기 (b) 단계의 설치류 동물에 외과 수술로 발치를 수행하여 치아를 적출하는 단계; 및 (d) 비스포스포네이트 약물을 상기 (c) 단계의 설치류 동물에 투여하고 배양하는 단계를 포함하는 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 동물 모델의 제조 방법을 제공한다.

[0013] 본 발명에 있어서 사용된 용어 "비스포스포네이트 연관 악골괴사증"이란 비스포스포네이트 화합물 (예컨대 졸레드로네이트, 리제드로네이트, 알렌드로네이트, 에티드로네이트, 이반드로네이트 또는 파미드로네이트 등)의 처리에 의해 악골에 발생하는 모든 비정상적인 골수염 증상, 세포괴사 현상 등을 의미하며, 비스포스포네이트 처리에 따른 이환부의 동통, 치아 동요, 점막 부종, 궤양, 이환부 감각 변화 등의 비정상적인 임상적 증상들을 포함한다.

[0014] 본 발명에서 정상 대조군 (비질환 개체)이란 선행하는 골질환이 유발되었으나 비스포스포네이트 투여를 받지 않은 정상 개체를 의미한다.

[0015] 본 발명에서 비스포스포네이트 연관 악골 괴사증 개체란 비스포스포네이트 투여 및 수술적 개입 후 정상 치유되지 않고 악골 괴사증이 발생한 개체로써, 노출되어 괴사된 뼈에서 궤양성 병소 및/또는 골 용해가 존재하며 염증성 세포 침윤이 동반된 상피조직에서의 가성상피종 유사 증식(pseudoepitheliomatous-like hyperplasia)이 존재하고, 부골 및 세균 콜로니가 존재하는 증상을 가지는 그룹을 의미한다.

[0016] 본 발명에서 비-비스포스포네이트 연관 악골 괴사증 개체란 비스포스포네이트 투여 및 수술적 개입 후에도 악골 괴사증이 발생하지 않고 정상적으로 치유가 일어난 개체를 의미한다.

[0017] 본 발명에 따른 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 동물 모델의 제조 방법은 (a) 설치류 동물에서 골 질환을 유발하고 배양하는 단계를 포함한다. 본 발명에 있어서 설치류 동물은 랫트(rat)인 것이 바람직하며, 6 주령 ~10

주령, 170~350g의 개체를 사용하는 것이 바람직하다. (a) 단계의 골질환은 정상 골상태를 벗어나는 골에 영향을 미치는 의학적 상태로써, 골다공증, 골전이 악성 종양, 다발성 골수종 등을 유발시키는 것이 바람직하나 이에 제한되는 것은 아니다. 예컨대, 대표적인 골질환으로써 대사성 골질환인 골다공증은 난소 적출술을 통해 유도가능하며, 골전이 악성 종양은 배양된 종양 세포를 주입함으로써 실험적인 유도가 가능하다. 바람직하게, 설치류에 골다공증을 유발하고 배양하는 단계는 4 내지 10주 동안, 보다 바람직하게 6주 동안 수행될 수 있다.

[0018] 본 발명에 따른 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 동물 모델의 제조 방법은 (b) 비스포스포네이트 약물을 상기 (a) 단계의 설치류 동물에 투여하고 배양하는 단계를 포함한다. 상기 (b) 단계의 비스포스포네이트 약물은 졸레드로네이트, 리제드로네이트, 알렌드로네이트, 에티드로네이트, 이반드로네이트 또는 파미드로네이트로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다. 또한, 유사 적응증에서 사용되는 Anti-RANKL 제제인 Denosumab 및 항-혈관 신생 제제들을 이용하여 악골 괴사증을 발현시킬 수 있다.

[0019] 비스포스포네이트 약물의 투여는 매주 1 또는 2회, 50 내지 300 ug/kg으로 피하 혹은 정맥 투여될 수 있으며, 특히 졸레드로네이트의 경우에 상기 투여 범위가 가장 바람직하다.

[0020] 보다 바람직하게 졸레드로네이트는 매주 1회 180 내지 220 ug/kg으로 피하 투여되는 것이 바람직하다. 이는 매 3 내지 4주에 졸레드로네이트의 단일 정맥 투여를 받는 암 환자의 cumulative treatment에 맞추어 디자인된 것으로, 설치류의 빠른 회복을 고려하여 인간의 1/3 수준으로 투여 주기를 가져 주 1회의 투여 주기가 결정될 수 있는 것이며, 피하 주입의 낮은 C_{max} 와 AUC를 고려하여 인간의 정맥 투여와 대비하여 3배의 졸레드로네이트 투여량으로 180 내지 220 ug/kg 피하 투여되는 것이 결정될 수 있는 것이다.

[0021] 본 발명에 따른 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 동물 모델의 제조 방법은 (c) 상기 (b) 단계의 설치류 동물에 외과 수술로 발치를 수행하여 치아를 적출하는 단계를 포함한다. 상기 (c) 단계의 외과 수술로 발치는 하악골의 대구치 발치일 수 있다. 악골 괴사증 발현의 가장 큰 위험 인자는 비스포스포네이트계 약물 등의 투여 및/또는 발치와 같은 외과적 개입이다. 그 중 발치의 incidence가 높으며, 특히 상악골에 비교하여 하악골의 incidence가 높기 때문에 하악골의 발치가 바람직하다.

[0022] 설치류는 당업계의 통상의 방법으로 마취될 수 있으며, 바람직하게 케타민(ketamine), 자일라진(xylazine) 및 멜록시캄(meloxicam)의 근육 내 주사로 마취되고, 치과용 탐침을 사용하여 인대절개술 후, 치아의 유동성이 충분히 얻어질 때까지 적절한 탈구가 수행될 수 있으며, 치아 발치 후 거즈 압박을 하여 출혈을 조절하고, 상처는 아무 봉합 없이 열어 둬으로써 치아가 적출될 수 있다.

[0023] 본 발명에 따른 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 동물 모델의 제조 방법은 (d) 비스포스포네이트 약물을 상기 (c) 단계의 설치류 동물에 투여하고 배양하는 단계를 포함한다. 상기 (d) 단계의 비스포스포네이트 약물은 졸레드로네이트, 리제드로네이트, 알렌드로네이트, 에티드로네이트, 이반드로네이트 또는 파미드로네이트로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으며, 비스포스포네이트 약물의 투여는 매주 1 또는 2회 50 내지 300 ug/kg으로 피하 혹은 정맥 투여될 수 있으며, 특히 졸레드로네이트가 상기 투여에 바람직하다. 바람직하게 매주 1회 180 내지 220 ug/kg으로 졸레드로네이트를 피하 투여할 수 있다. 상기 (d) 단계의 배양은 4 내지 10주동안, 바람직하게 8주동안 수행될 수 있다.

[0024] 상기와 같은 본 발명의 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 동물 모델의 제조 방법에 따르면, 선행하는 골질환을 통해 병인의 다른 위험 인자들도 함께 평가하면서 약물 투여와 관련된 인간 개체의 해당 질환 조건과 가장 유사하게 비스포스포네이트 연관 악골 괴사증 동물 모델을 제조할 수 있기 때문에, 관련 연구 개발을 위한 동물 모델 제공에 가장 적합하다.

[0025] 본 발명은 상기 제조 방법에 따라 제조된 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 설치류 동물 모델을 제공한다. 본 발명의 제조 방법에 따라 제조된 설치류 동물 모델은 인간에서의 비스포스포네이트 연관 악골 괴사증의 증상과 유사하게 노출되어 괴사된 뼈에서 궤양성 병소 및/또는 골 용해가 존재하며 염증성 세포 침윤이 동반된 상피조직에서의 가성상피종 유사 증식(pseudoepitheliomatous-like hyperplasia)이 존재하고, 부골 및 세균 콜로니가 존재하는 증상을 가질 수 있다.

[0026] 본 발명은 상기 방법에 따라 제조된 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 설치류 동물 모델을 이용하는 비스포스포네이트 연관 악골 괴사증 치료 물질의 스크리닝 방법을 제공한다. 본 발명의 치료 물질의 스크리닝 방법은 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 설치류 동물 모델에 치료 후보 물질을 투여하는 단계를 포함할 수 있으며, 당업계에 알려진 방법에 따라 비스포스포네이트 연관 악골 괴사증의 예방 및 치료 결과를 확인할 수 있다. 바람직하게, 임상적 외관 평가, 바이오마커의 변화 확인, H&E 염색, Micro-CT 형태 분석법, TRAP 염색을 통하여 이의

분석이 가능하며, 이에 따라 해당 치료 후보 물질 투여에 따른 효과를 확인함으로써 치료 물질을 스크리닝하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0027] 본 발명의 비스포스포네이트 연관 악골괴사증 설치류 동물 모델은 인간에서 비스포스포네이트 연관 악골 괴사증과 유사한 질환 조건을 제공함으로써, 비스포스포네이트 연관 악골 괴사증의 연구에 적합한 연구 모델을 제공하여 해당 질환의 연구 개발에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 본 발명의 비스포스포네이트 연관 악골 괴사증 동물 모델 제조를 위한 실험 방법을 나타내는 모식도이다.

도 2는 본 발명 비스포스포네이트 연관 악골 괴사증 동물 모델 제조 단계에 있어서 치아 발치 과정을 나타내는 도이다.

도 3은 난소 적출 후 진행되는 실험 set의 모식도를 나타낸 것이다.

도 4는 난소 적출 후 비스포스포네이트 투여 그룹과 대조군 그룹의 악골의 임상적 외관을 나타내는 도이다.

도 5는 비스포스포네이트 투여 그룹과 대조군 그룹의 골 면적, 골 표면, 골표면 밀도 및 특이 골 표면을 비교한 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 비스포스포네이트 연관 악골 괴사증 개체와 비-비스포스포네이트 연관 악골 괴사증 개체에서 골 면적, 골 표면, 골표면 밀도, 연결성, 연결성 밀도를 비교한 결과를 나타내는 도이다.

도 7은 비스포스포네이트 투여 그룹과 대조군 그룹의 세균 콜로니, 골괴사 및 염증성 세포 침윤을 비교한 결과를 나타내는 도이다.

도 8은 비스포스포네이트 연관 악골 괴사증 개체와 비-비스포스포네이트 연관 악골 괴사증 개체에서 골괴사 및 세균 콜로니 형성을 비교한 결과를 나타내는 도이다.

도 9는 비스포스포네이트 투여 그룹과 대조군 그룹의 골괴사, 파골 세포 변화를 비교한 결과를 나타내는 도이다.

도 10은 비스포스포네이트 연관 악골 괴사증 개체와 비-비스포스포네이트 연관 악골 괴사증 개체에서 골괴사 및 파골세포 변화를 비교한 결과를 나타내는 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0030] <실시예 1> 동물 모델 및 실험 디자인

[0031] 이화여자대학교 의과학연구소(Ewah Medical Research, 대한민국 서울)에서 구입된 8주령의 평균 무게 220g (범위 190~247g) 암컷 랫트(rat)(Sprague Dawley, SD)(n=48)가 본 실험에 사용되었다. 동물들은 케이지(cage)당 3마리씩 수용되었으며, 이어 편치(ear punch)를 사용하여 각각 번호가 매겨졌다. 케이지는 정화된 공기의, 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $50\% \pm 10\%$ 의 방에 위치시켰다. 12시간 명/암 주기가 유지되었다. 동물들은 평균적인 설치류의 식사 및 물을 자유식으로 먹었다. 동물들은 실험 시작 1주일 전부터 순응시켰다. 본 실험은 동물 연구 윤리 위원회 규정(Institutional animal research ethics committee)에 승인되었고, 그 지침에 따라 수행되었다.

[0032] 랫트는 임의로 두 집단으로 나뉘어졌다. 랫트는 모두 졸레드로네이트(Zo1) 투여 6주전에 난소 적출술(Ovariectomy)이 수행되었다. 난소 적출술은 전신 마취 하에 양측 난소를 적출하고 봉합하는 방식으로 수행되었으며, 적출 6주 후 bone mineral density를 측정함으로써 비스포스포네이트 투여 적응증인 대사성 골질환(골다공증)이 유발됨을 확인하였다.

- [0033] 난소 적출술 수행 6주 후, 비스포스포네이트(bisphosphonate) 집단(n=36)은 졸레드로네이트 200 μ g/kg을, 대조군(n=12)은 생리 식염수를 주1회 피하로 투여하였다. 비스포스포네이트의 약력학이 설치류에서 밝혀지지 않았음을 고려하여, 다음 요인에 따라 투여량을 결정하였다 : (1) 종양학에서 사람의 적절한 졸레드로네이트(zoledronate) 투여량(67 μ g/kg/4주); (2) 설치류의 상대적으로 빠른 골 대사; (3) 비스포스포네이트의 투여 경로(정맥 투여와 대비하여 피하 투여를 사용하였을 때 낮은 더 혈장 농도); 및 (4) 상대적으로 짧은 실험 기간 동안 최대의 약물 노출.
- [0034] 6주간의 주사 후, 외과 수술로 발치가 수행되어 악골괴사증을 유도하였다. 동물들은 케타민(ketamine)(100mg/kg, 대한민국 서울, Yuhan pharmacy), 자일라진(xylazine)(10mg/kg Rompun, 독일 Leverkusen, Bayer AG) 및 멜록시캄(meloxicam)(1.5mg/mL Metacam, 독일, Boehringer Ingelheim) 근육 내 주사로 마취되었다. 빠른 치과용 탐침을 사용하여 인대절개술을 한 후, 치아의 유동성이 충분히 얻어질 때까지 적절한 탈구가 수행되었다. 이런 방식으로, 치과용 탐침을 사용해 하악 좌측 제1, 2, 3 대구치가 순차적으로 적출되었다. 거즈 압박을 하여 출혈을 조절하고, 상처는 아무 봉합 없이 열어 두었다. 주 1회의 주사가 8주간 동일 농도로 더 지속되며, 비스포스포네이트 연관 악골괴사증의 발병 진행에 따라 그 기간이 선택되었다. 그 후, 동물들은 추가적인 평가를 위해 희생되었다.
- [0035] 상기 실험 디자인 내용은 도 1에 도시하였으며, Surgical Intervention 과정은 도 2에 나타내었으며, 도 3은 난소 적출 후 진행되는 실험 set의 모식도를 나타낸 것이다.
- [0036] <실시예 2> 임상 평가 결과
- [0037] 다음 기준에 따른 조직학적 분석을 기초로 악골괴사의 존재를 결정했다 : (1) 노출되어 괴사된 뼈에서 케양성 병소 및/또는 골 용해의 존재, (2) 염증성 세포 침윤이 동반된 상피조직에서의 가성상피종 유사 증식(pseudoepitheliomatous-like hyperplasia)의 존재, 및 (3) 부골 및 세균 콜로니의 존재
- [0038] 희생된 랫트의 악골 사진을 도 4에 나타내었다. 도 4은 난소 적출술이 수행되고 비스포스포네이트를 투여받지 않은 Control 그룹이 외과 수술 8주 후 정상 점막을 가지는 악골을 가지는 것을 보여주며, 도 4의 BPs 그룹은 비스포스포네이트 투여에 따라 악골 괴사증이 발병된 그룹의 악골을 보여준다. 도 4에서 확인되는 바와 같이, 악골 괴사증 발병 그룹에서 점막 치유가 일어나지 않은 연조직의 케양성 병소와 골 괴사/골 용해가 존재하며 조직학적으로 염증성 세포 침윤이 동반된 상피조직에서의 가성상피종 유사 증식과 괴사골이 확인되었다.
- [0039] <실시예 3> Micro-CT 형태 분석법 (Micro-CT Morphometry)
- [0040] Micro-CT 형태 분석법 (Micro-CT Morphometry)에 Micro-computed tomography로 악골괴사 병변의 이미지를 획득하여, 골의 미세구조를 계측학적으로 분석하였다. 각 Criteria가 의미하는 바는 아래와 같다:
- [0041] **Total volume (TV)**- Volume of the entire region of interest (mm^3)
- [0042] **Bone volume (BV)** - Volume of the region segmented as bone(mm^3)
- [0043] **Bone surface (BS)** - Surface of the region segmented as bone (mm^2)
- [0044] **Bone volume fraction (BV/TV)** - Ratio of the segmented bone volume to the total volume of the region of interest (%)
- [0045] **Bone surface density (BS/TV)** - Ratio of the segmented bone surface to the total volume of the region of interest (mm^2/mm^3)
- [0046] **Specific bone surface (BS/BV)** - Ratio of the segmented bone surface to the segmented bone volume (mm^2/mm^3)
- [0047] **Connectivity (Conn)** - A measure of the degree of connectivity of trabeculae
- [0048] **Connectivity density (Conn.D)** - A measure of the degree of connectivity of trabeculae normalized by TV, ($1/\text{mm}^3$)
- [0049] **Structure model index (SMI)** - An indicator of the structure of trabeculae; SMI will be 0 for parallel

plates and 3 for cylindrical rods

- [0050] 상기 Criteria들에 대하여 분석된 결과를 도 5 및 도 6에 나타내었다.
- [0051] 도 5는 대조군 그룹(Control)과 비스포스포네이트 투여 그룹 간의 Bone Volume, Bone surface, Bone surface density 및 Specific bone surface를 대비한 결과를 나타낸다.
- [0052] Micro-CT 분석결과 새로 형성된 Bone Volume이 대조군 그룹에서 비스포스포네이트 투여 그룹과 대비하여 증가되는 것이 확인되었다. 반면, Bone surface, Bone surface density 및 Specific bone surface의 경우, 비스포스포네이트 투여그룹보다 대조군 그룹에서 감소되는 것이 확인되었다. 이를 통해서, 비스포스포네이트 투여 그룹(Bisphosphonate)은 노출되어 과사된 뼈에서 궤양성 병소 및/또는 골 용해 등을 통한 악골 과사의 증상을 가지는 것을 확인할 수 있었다.
- [0053] 도 6은 비스포스포네이트 투여 그룹에 있어서, 비스포스포네이트 연관 악골 과사증 개체(ONJ)와 비-비스포스포네이트 연관 악골 과사증 개체(Non-ONJ)를 대비한 결과를 보여준다.
- [0054] 비스포스포네이트 연관 악골 과사증 개체는 Bone Volume, Bone surface, Bone surface density, Connectivity density 및 Connectivity 모두 비-비스포스포네이트 연관 악골 과사증 개체와 대비하여 감소되는 것이 확인되었다. Bone volume이 비-비스포스포네이트 연관 악골 과사증 개체에서 높게 나타나는 것은 비스포스포네이트 연관 악골 과사증 개체보다 compressive strength를 높게 받기 때문인 것으로 분석된다. 또한 비-비스포스포네이트 연관 악골 과사증 개체에서 높은 Connectivity density 및 Connectivity는 해면골의 섬유주들이 compressive strength를 높게 받아 많은 무게를 받기 때문인 것으로 보인다.
- [0055] 상기 결과들을 통해서, 본 동물 모델이 인간에서의 질환과 유사한 임상적 실험 결과들을 나타냄을 확인하였다.
- [0056] **<실시예 4> H&E 염색을 통한 조직학적 분석**
- [0057] H&E 염색을 통한 조직학적 분석을 위하여, 샘플들은 4% 인산완충식염수(phosphate-buffer saline) 포르말린으로 2주간 고정되고, 10% EDTA(pH 7.2)로 4℃에서 28일간 탈석회화되었다. 샘플은 여러 단계에 걸쳐 에탄올로 탈수되고, 자일렌(xylene)으로 세척되어 파라핀에 담구었다. 그 후, 샘플들은 파라핀에 포매되고 4-μm-thick 절편으로 잘렸다. 절편들에서 파라핀이 제거되고, 다시 수화하여 헤마톡실린(hematoxylin) 및 에오신(eosin) (H-E)으로 염색되었다. 분석은 정상 그룹을 0점 악골과사증 병변 발생을 4점으로 하여, 분석되었으며, 3 내지 4점의 경우 노출되어 과사된 뼈에서 궤양성 병소 및/또는 골 용해가 존재하고, 염증성 세포 침윤이 동반된 상피조직에서의 가성상피종 유사 증식(pseudoepitheliomatous-like hyperplasia)이 존재하고, 부골 및 세균 콜로니가 존재하는 것으로 분석되었다.
- [0058] 그 결과를 도 7 및 도 8에 나타내었다.
- [0059] 도 7은 대조군(Control)과 비스포스포네이트 투여 그룹(Bisphosphonate) 간의 세균 콜로니 증식, 골 과사 및 염증성 세포 침윤을 확인한 결과를 나타낸다. 도 7에 나타난 바와 같이, 비스포스포네이트 투여 그룹에서 세균 콜로니 증식, 골 과사 및 염증성 세포 침윤이 현저히 증가한 것이 확인되었다.
- [0060] 도 8은 비스포스포네이트 연관 악골 과사증 개체(ONJ)와 비-비스포스포네이트 연관 악골 과사증 개체(NON-ONJ) 간의 골과사 및 세균 콜로니 증식 여부를 확인한 결과를 나타낸다. 도 8에 나타난 바와 같이, 비-비스포스포네이트 연관 악골 과사증 개체와 대비하여 비스포스포네이트 연관 악골 과사증 개체에서 세균 콜로니 및 골과사가 현저히 증가하는 것이 확인되었다.
- [0061] 상기 결과들을 통해서, 본 동물 모델이 인간에서의 질환과 유사한 임상적 실험 결과들을 나타냄을 확인하였다.
- [0062] **<실시예 5> TRAP 염색을 통한 조직학적 분석**
- [0063] 조직학적 분석을 위하여, acid phosphatase leukocyte kit (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 염색을 제조사의 지침에 따라 수행하였다. 조직은 TRAP-염색 용액에 10분간 37 ℃로 처리되어서, 조직이 분석되었다.
- [0064] 그 결과를 도 9 및 도 10에 나타내었다.
- [0065] 도 9는 대조군 그룹(control)과 비스포스포네이트 투여 그룹(Bisphosphonate) 간의 TRAP 염색 결과를 나타낸다. 도 9의 (A)는 활성 파골세포의 골 재형성을 보여준다. 도 9의 (B)에 나타난 바와 같이, 골 과사 정도가 비스포

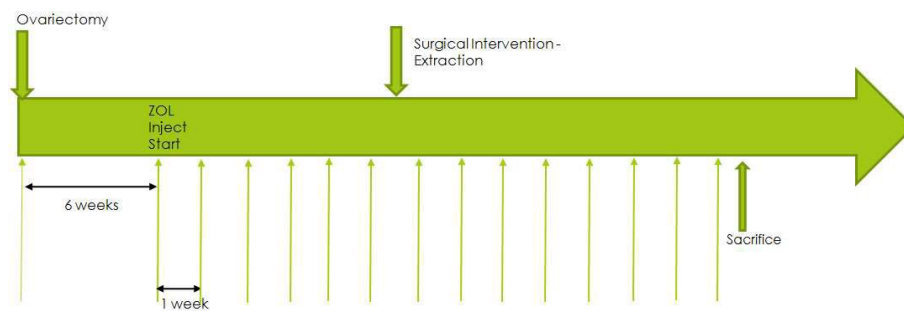
스포네이트 투여 그룹에서 현저히 증가하는 것이 확인되었다. 반면, 골 표면당 파골세포, 골 면적당 파골세포 및 골 주변 당 파골 세포 주변이 대조군에서 크게 높게 나타나는 것이 확인되었다. 즉, 파골 세포의 감소로부터 비스포스포네이트 투여 그룹의 질환 비율이 높음을 확인하였다.

[0066] 도 10은 비스포스포네이트 연관 악골 괴사증 개체(ONJ)와 비-비스포스포네이트 연관 악골 괴사증 개체(Non-ONJ) 간의 TRAP 염색 결과 분석을 보여준다. 도 10의 (A)에서 확인되는 바와 같이, 골 괴사는 비스포스포네이트 연관 악골 괴사증 개체에서 현저히 증가되는 것이 확인되었다. 반면, 골 주변 당 파골 세포 및 골 면적 당 파골 세포는 비-비스포스포네이트 연관 악골 괴사증 개체에서 높게 나타나는 것이 확인되었다. 이를 통해서, 비스포스포네이트 연관 악골 괴사증 개체에서 질환이 더욱 심각하게 나타나는 것이 확인되었다.

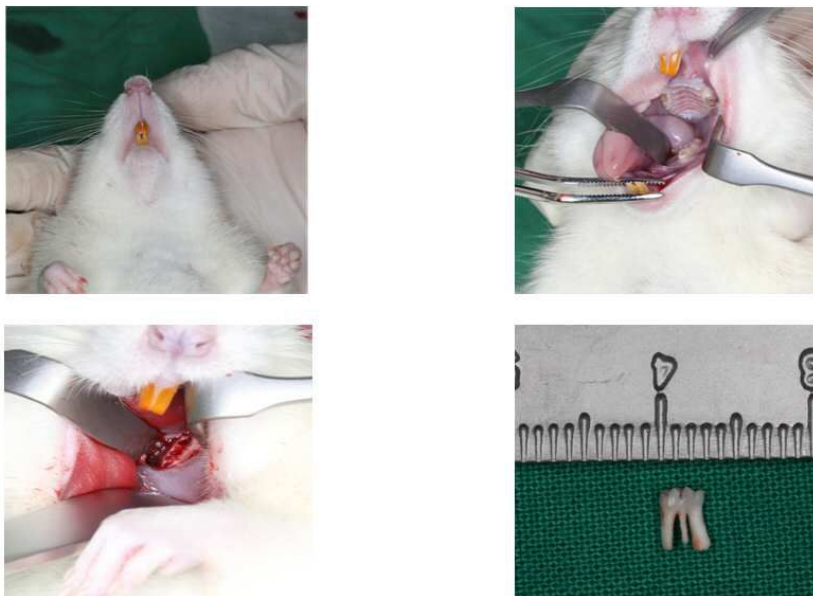
[0067] 상기 결과들을 통해서, 본 동물 모델이 인간에서의 질환과 유사한 임상적 실험 결과들을 나타냄을 확인하였다.

도면

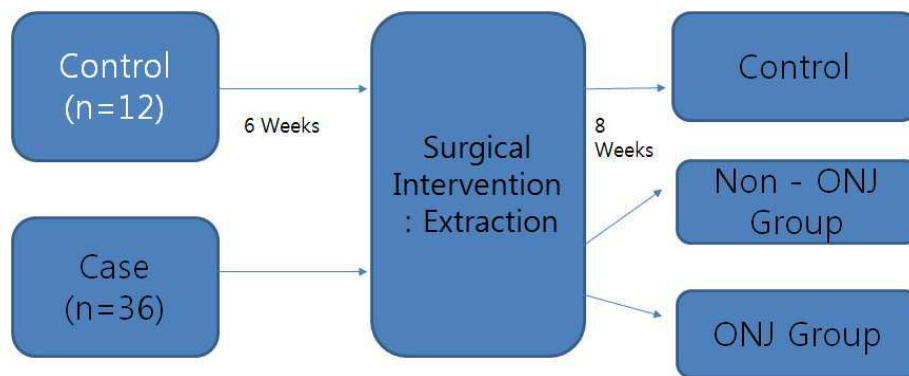
도면1



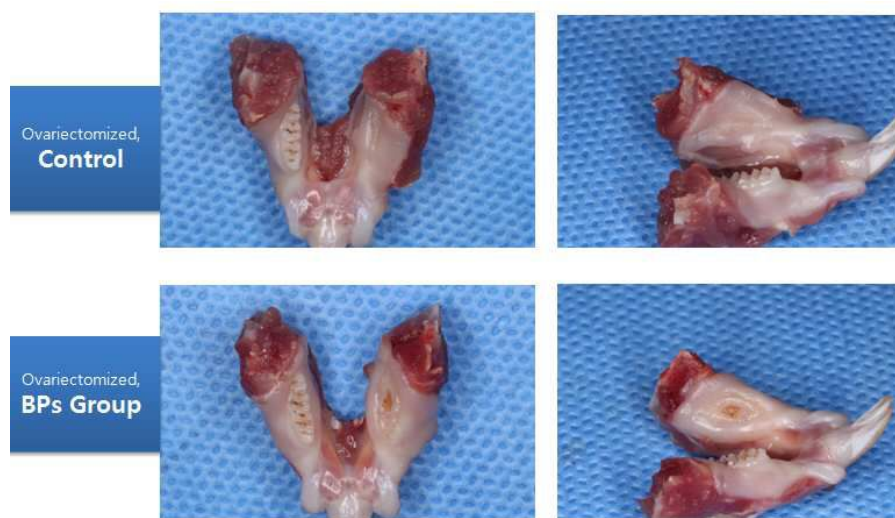
도면2



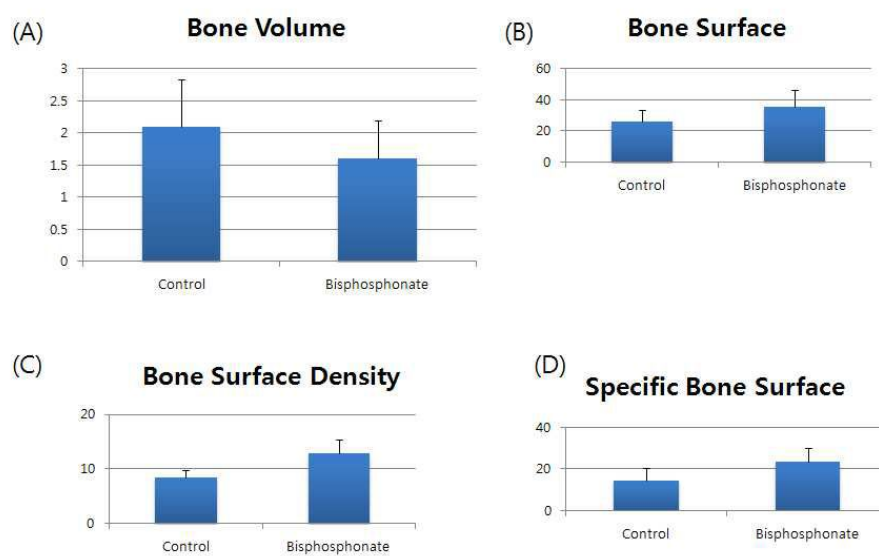
도면3



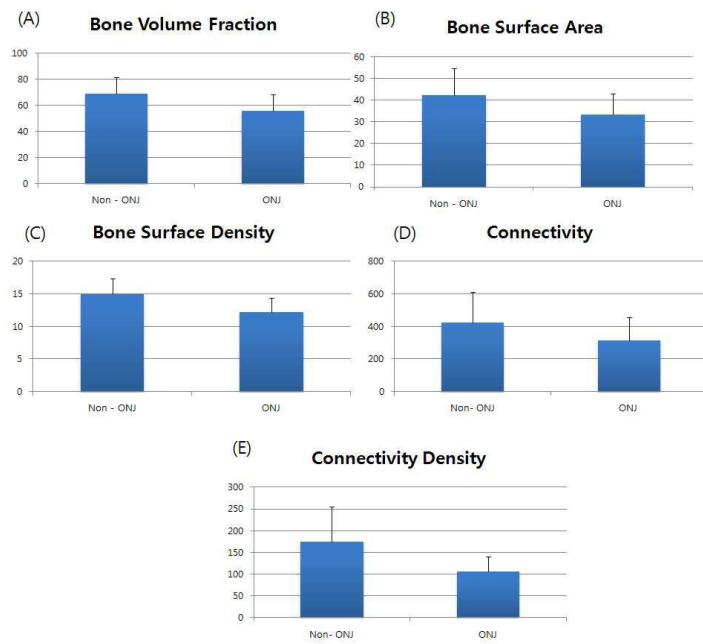
도면4



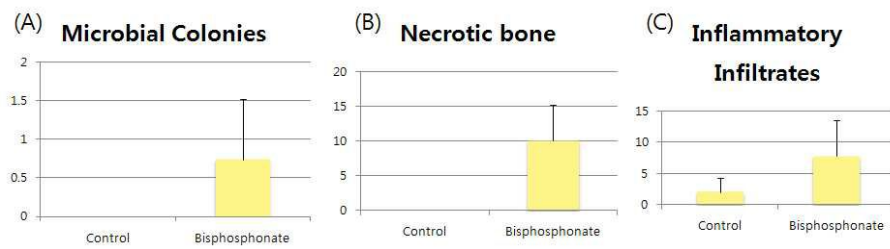
도면5



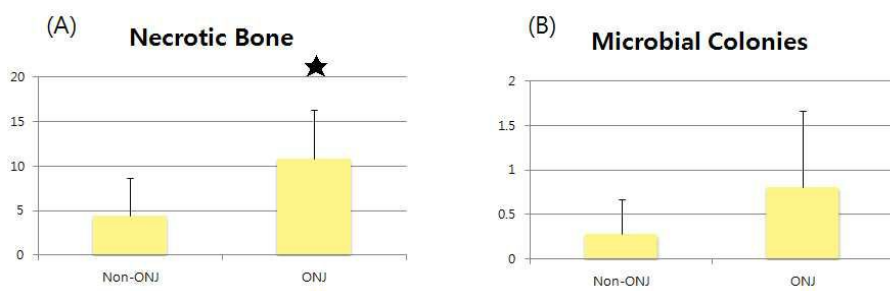
도면6



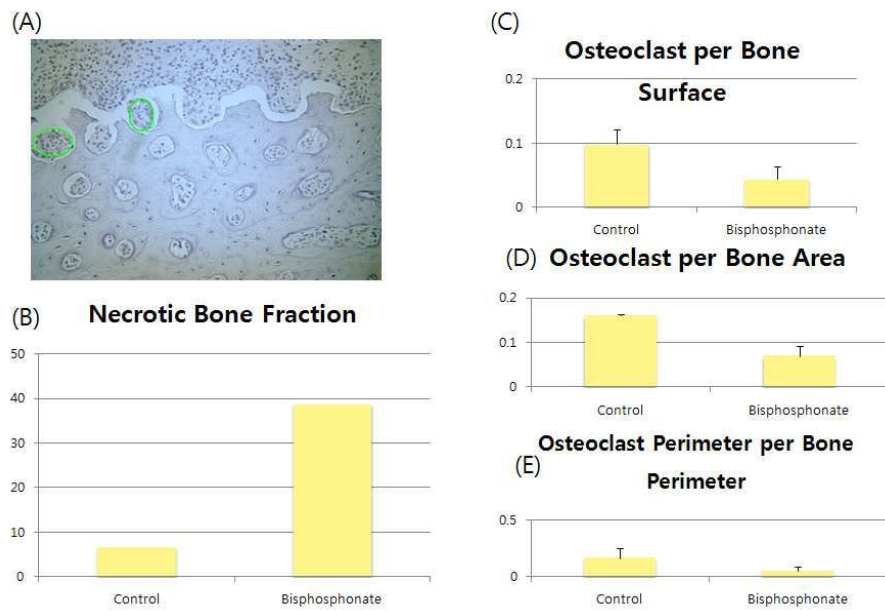
도면7



도면8



도면9



도면10

