(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0115571
(43) 공개일자 2016년10월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/48 (2006.01) *A61K 31/66* (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/48015 (2013.01)
A61K 31/66 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0043508
(22) 출원일자 2015년03월27일
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)
이동현
서울특별시 동대문구 경희대로1나길 35, 301호 (회기동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
안소영

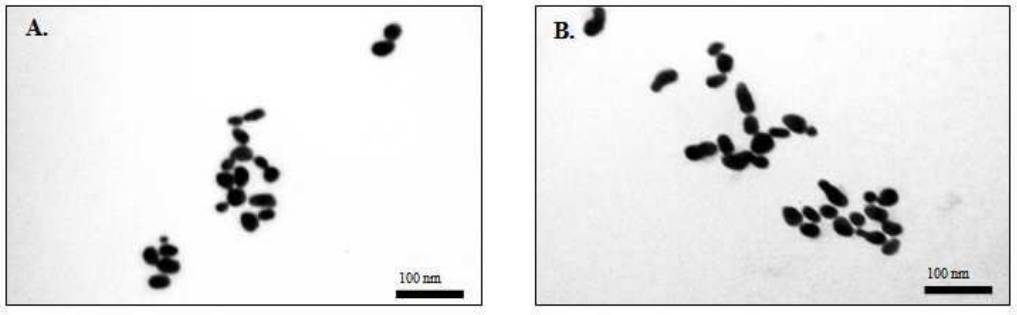
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **알렌드로네이트 결합 금나노입자**

(57) 요 약

본 발명은 알렌드로네이트가 표면에 고정된 금나노입자 및 상기 금나노입자를 포함하는 골다공증의 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 알렌드로네이트가 표면에 고정된 금나노입자는 파골세포의 분화를 효과적으로 저해하기 때문에, 골다공증 관련 질환의 예방 및 치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 47/02 (2013.01)
(72) 발명자
허동녕
서울특별시 강북구 솔샘로 174, 120동 1902호(미아동, SK아파트)
고완규
서울특별시 동대문구 회기로12길 48-9 (회기동)
이상진
경기도 안양시 동안구 동안로 102, 205동 1202호 (호계동, 목련선경아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2012R1A5A2051388
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 이공분야기초연구사업〉선도연구센터지원사업〉기초의과학분야(MRC)
연구과제명 나노융합 생체소재 기반 치아와 치주조직 재생연구
기 여 율 1/1
주관기관 경희대학교
연구기간 2012.09.01 ~ 2016.08.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

알렌드로네이트가 표면에 고정된 금나노입자.

청구항 2

제1항에 있어서, 알렌드로네이트가 금나노입자의 표면에 결합된 것인 금나노입자.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 금나노입자는 직경이 30㎚ 이하인 금나노입자.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 금나노입자는 파골세포의 골 흡수 억제작용을 하는 것인 금나노입자.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 금나노입자를 포함하는 골다공증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 알렌드로네이트가 표면에 고정된 금나노입자 및 상기 금나노입자를 포함하는 골다공증의 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 금나노입자는 특별한 물리적, 화학적 성질을 가지고 있으며 생체 내에 주사되어도 무독성이라는 장점이 있다. 이러한 특징 때문에 금나노입자는 나노이미징, 생체재료, 약물전달 등 다양한 분야에 사용되고 있다. 최근에 보고된 연구결과에서는 금나노입자가 세포내 흡수(intracellular uptake)를 통해 줄기세포의 골 분화 촉진 및 파골세포로의 분화를 억제한다는 연구결과가 발표되었다. 하지만 보고된 연구내용은 인 비트로상의 효과로서 실제로 인 비보상에 적용되기 위하여 골 조직와의 상호작용(interaction)을 향상시키는 방법이 적용되어야 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

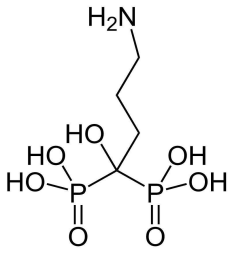
[0003] 따라서, 본 발명에서는 금나노입자에 알렌드로네이트를 결합시켜 파골세포가 이 물질을 흡수하게 되면서 알렌드로네이트가 파골세포의 골 흡수 작용을 억제하도록 유도하였다.

[0004] 본 발명의 목적은 알렌드로네이트가 표면에 고정된 금나노입자를 제공하는 것이다. 또한, 본 발명의 목적은 상기 금나노입자를 포함하는 골다공증의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0005] 본 발명은 알렌드로네이트가 표면에 고정된 금나노입자를 제공한다.

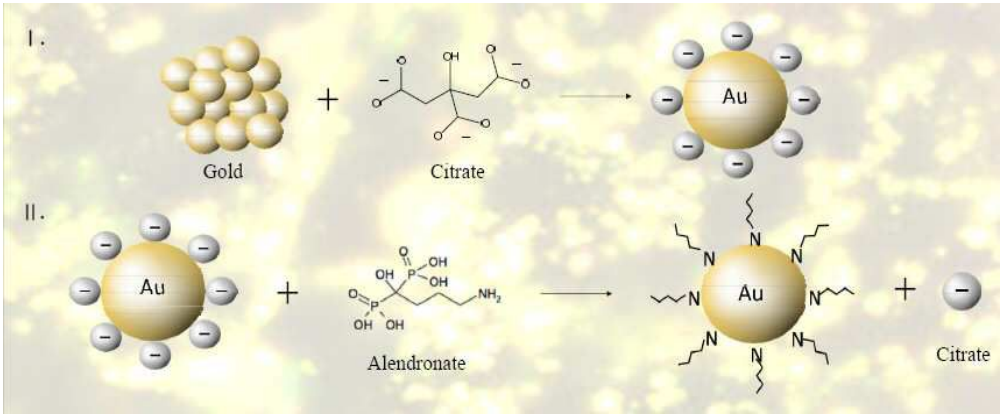
[0006] 본 발명에 있어서, 상기 알렌드로네이트는 하기 구조식으로 표시되는 화합물을 의미한다:

[0007] 

[0008] 상기 알렌드로네이트는 상업적으로 구매하여 사용하거나, 혹은 공지된 방법으로 합성하여 사용할 수 있다.

[0009] 본 발명의 상기 알렌드로네이트는 금나노입자의 표면에 결합된 것을 특징으로 한다.

[0010] 본 발명에서, 알렌드로네이트는 $HAuCl_4$의 시트레이트 환원법을 이용하여 금나노입자의 표면에 결합시킬 수 있다. 구체적으로, $HAuCl_4$ 용액에 소듐 시트레이트 용액을 혼합하고, 일정 시간 유지 후 냉각시킨다. 그 후, 알렌드로네이트 소듐 트리하이드레이트 용액을 가하여 알렌드로네이트가 결합된 금나노입자를 수득할 수 있다. 본 발명의 알렌드로네이트-금나노입자의 개략적인 합성과정을 도식화하면 다음과 같다:

[0011] 

[0012] 바람직하게, 본 발명의 금나노입자는 그 직경이 약 30nm 이하인 것을 특징으로 한다. 금나노입자의 직경 크기를 약 30nm 이하로 하는 것은 금나노입자가 체내 축적시 특별한 피해를 주지 않는 비장으로 유도하기 위함이다.

[0013] 구체적인 일 양태에서, 알렌드로네이트가 결합된 금나노입자의 정성분석을 수행하였다. 먼저 투과 전자현미경을 통하여 금나노입자-알렌드로네이트 입자를 확인하였고, 입자의 직경이 약 20-40nm임을 확인하였다(도 1). 금나노입자-알렌드로네이트의 흡광도는 UV-분광광도계를 이용하여 측정하였고, 금나노입자, 알렌드로네이트 각각의 흡광도 피크과 비교하여, 알렌드로네이트가 금나노입자에 결합한 것을 확인할 수 있었다(도 3).

[0014] 본 발명의 약물전달체는 알렌드로네이트 및 금나노입자를 골 조직으로 효과적으로 전달하는 효과를 가진다.

[0015] 구체적인 일 양태에서, 본 발명의 금나노입자-알렌드로네이트가 골에 잘 결합하는지, 즉 잘 고정화되는지 확인하기 위하여 마우스 경골을 대상으로 FE-SEM 및 EDX 분석을 수행하였다. 그 결과, 골 표면에서 고정된 금나노입자-알렌드로네이트가 관찰되었다(도 5).

[0016] 또한, 본 발명의 알렌드로네이트가 표면에 고정된 금나노입자는 파골세포의 골 흡수 억제작용이 우수한 것을 특

징으로 한다.

[0017] 구체적인 일 양태에서, 본 발명의 금나노입자-알렌드로네이트가 BMM의 파골세포로의 분화를 억제하는지 확인하기 위하여 TRAP 활성을 평가하였다. 그 결과, 알렌드로네이트와 결합된 금나노입자는 TRAP 활성을 효과적으로 저해하는 것을 확인하였다(도 8).

[0018] 또한, 구체적인 일 양태에서, 본 발명의 금나노입자-알렌드로네이트가 파골성 유전자의 발현을 저해하는지 평가하였고, TRAP, OSCAR, c-Fos 및 NFATc1의 발현을 모두 효과적으로 저해하는 것을 확인하였다(도 9).

[0019] 상기와 같이, 본 발명의 알렌드로네이트 결합 금나노입자는 파골세포의 골 흡수 억제 작용이 우수하므로, 골다공증의 예방 또는 치료제로서 유용하게 활용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 알렌드로네이트가 표면에 고정 또는 결합된 금나노입자를 포함하는 골다공증의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0020] 본 발명에서 "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 골다공증 관련 질환의 발생, 확산 또는 재발을 억제시키거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"는 본 발명의 조성물의 투여로 상기 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0021] 본 발명의 조성물은 각각의 사용 목적에 맞게 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁제, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구 제형, 멸균 주사용액의 주사제 등 다양한 형태로 제형화하여 사용할 수 있으며, 경구 투여하거나 정맥내, 복강내, 피하, 직장, 국소 투여 등을 포함한 다양한 경로를 통해 투여될 수 있다.

[0022] 이러한 조성물에 포함될 수 있는 적합한 담체, 부형제 또는 희석제의 예로는 락토오스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리쓰리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 비정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 들 수 있다. 본 발명의 조성물은 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0023] 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 탄산칼슘, 수크로스, 락토오스, 젤라틴 등을 혼합하여 제형화한다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크와 같은 윤활제가 사용될 수 있다.

[0024] 경구용 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 예시될 수 있으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0025] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액제, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등을 예시할 수 있다. 비수성용제, 현탁제에는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 포함될 수 있다. 주사제에는 용해제, 등장화제, 현탁화제, 유화제, 안정화제, 방부제 등과 같은 종래의 첨가제가 포함될 수 있다.

[0026] 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에

투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0027] 구체적으로, 본 발명의 조성물에서 알렌드로네이트-금나노입자의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 kg 당 1 내지 10 mg, 바람직하게는 1 내지 5 mg을 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 투여 경로, 질병의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

발명의 효과

[0028] 본 발명의 알렌드로네이트가 표면에 고정된 금나노입자는 파골세포의 분화를 효과적으로 저해하기 때문에, 골다공증 관련 질환의 예방 및 치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 금나노입자(A) 및 금나노입자-알렌드로네이트(B)의 투과 전자현미경 이미지이다.

도 2는 금나노입자(GNPs) 및 금나노입자-알렌드로네이트(GNPs-ALD)의 UV-Visible 스펙트럼을 나타낸 그래프이다.

도 3은 금나노입자(GNPs), 금나노입자-알렌드로네이트(GNPs-ALD) 및 알렌드로네이트(ALD)의 ATR-FTIR 스펙트럼 그래프이다.

도 4는 금나노입자(GNPs), 알렌드로네이트(ALD) 및 컨쥬게이트화된 금나노입자-알렌드로네이트(GNPs-ALD)의 열분석(thermogravimetric analysis)를 나타낸 결과 그래프이다.

도 5는 EDS (energy dispersive x-ray spectroscopy)로 시험한 면적을 가리키는 박스와 함께 FE-SEM 이미지 및 EDS의 결과를 나타낸 것으로, 경골에서 미-처리(A, D), 금나노입자(GNP) 용액 처리(B,E) 및 금나노입자-알렌드로네이트(GNP-ALD) 용액 처리(C, F) 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 다양한 농도의 금나노입자(GNP) A, 알렌드로네이트(ALD) B로 처리한 후 BMM 세포의 세포독성을 평가한 그래프이다.

도 7은 5일째의 금나노입자(GNPs), 알렌드로네이트(ALD) 및 금나노입자-알렌드로네이트(GNP-ALD)의 TRAP 활성을 나타낸 그래프이다.

도 8은 파골성 분화 BMM 상에서 다양한 농도를 사용하여 금나노입자(GNPs) A-D, 알렌드로네이트(ALD) E-H, 및 금나노입자-알렌드로네이트(GNPs-ALD) I-L를 처리한 TRAP 염색 이미지를 나타낸 것이다.

도 9는 대조군에서 파골세포 형성 후 금나노입자(GNP), 알렌드로네이트(ALD) 및 금나노입자-알렌드로네이트(GNP-ALD)에 대한 TRAP (A), OSCAR (B), c-Fos (C) 및 NFATc1 (D)의 유전자 발현을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 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.

[0031] **[재료 및 실험방법]**

[0032] **마우스 및 재료**

[0033] 금(Ⅲ) 클로라이드 하이드레이트(99.999%, trace metals basis), 소듐 시트레이트, 적혈구 용해 완충액, TRAP 키트는 시그마-알드리치에서 구입하였다. TRACP&ALP 검정 키트는 Takara에서 구입하였다. 알렌드로네이트 소듐 트리하이드레이트는 TCI (Tokyo Chemical Industry Co., LTD, Japan)에서 구입하였다. 마크로파지 콜로니 자극 인자(M-CSF)와 재조합 뮤린 sRANK 리간드는 Peprotech Korea에서 구입하였다. RIPA 라이시스 완충액과 PBS 10X는 Millipore에서 구입하였다. 프로테아제 저해제 칵테일 정제는 Roche Diagnostics Indianapolis (USA)에서 구입하였다. 골수-유래 마크로파지의 추출용 ICR 육주령 수컷 마우스는 Young bio에서 구입하였다. 최소필수배

지(MEM) Alpha Medium, 소태아혈청(FBS), 항생제(페니실린/스트렙토마이신, PS) 및 DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)는 GIBCO BRL (Invitrogen Co., USA)에서 구입하였다. 48-웰 세포 배양 플레이트 및 세포 배양 접시(100mm×20mm)는 Corning Incorporated (뉴욕, USA)에서 구입하였다. FE-SEM (Field emission scanning electron microscopy) 및 EDX (Energy dispersive X-ray spectroscopy) 관찰은 Field Emission S-4700 (Hitachi High Technologies Corp., Tokyo, Japan)을 사용하여 수행하였다. 자외선-가시 흡광도(UV-Vis)는 UV-1650PC (Shimadzu, Japan) 분광광도계를 사용하여 분석하였다. DSC (differential scanning calorimetry) 및 TGA (thermo gravimetric analysis)와 같은 온도 분석은 SDT Q600 (TA instrument)를 사용하여 수행하였다. AT-FTIR (attenuated total reflectance-Fourier transform infrared) 측정은 IFS66V/S 및 HYPERION 3000 (Bruker Optiks, Germany)를 사용하여 수행하였다.

[0034] **금나노입자 및 알렌드로네이트 결합 금나노입자의 제조**

[0035] 금나노입자(GNPs)는 $HAuCl_4$의 시트레이트 환원법을 사용하여 제조하였다. 구체적으로 0.02% $HAuCl_4$ 용액을 100℃에서 환류하였고, 2%의 소듐 시트레이트 용액으로 재빨리 혼합하였다. 용액의 색이 어두운 붉은색으로 변한 뒤, 용액 상태를 15분 동안 유지시켰고, 이어서 반응 혼합물을 상온으로 천천히 냉각시켰다.

[0036] 금나노입자는 상온에서 48시간 동안 교반하면서 0.204mM 알렌드로네이트 소듐 트리하이드레이트 용액을 가함으로써 알렌드로네이트와 컨쥬케이트시켰다. 이후, 금나노입자에 결합하지 않은 알렌드로네이트를 제거하기 위하여 나흘 동안 혼합물을 투석(MWCO:3500Da)하였다. 금나노입자 및 금나노입자-알렌드로네이트 용액을 냉장(4℃)하였고, 금나노입자 및 금나노입자-알렌드로네이트 펠렛을 형성하기 위하여 10분동안 13000rpm으로 원심분리하였다. 상기 펠렛은 물성 확인과 추가 실험을 위한 것이다. 또한, 이 펠렛은 성분 분석을 위하여 TFD 시리즈(Ilshinbiobase, Korea)를 이용하여 동결건조 하였다.

[0037] UV 스펙트럼 분석을 위하여, 금나노입자 용액의 농도를 금나노입자-알렌드로네이트의 농도와 동일하게 조정하였다. 이는 금나노입자-알렌드로네이트의 생산과정 중 두 물질의 합성 후 투석과정에서 금나노입자-알렌드로네이트의 농도가 감소하기 때문에 필수적이었다. 상기 용액은 UV-1650PC로 측정하였다. 용액은 TGA 및 ATR-FT-IR로 측정하기 전에 동결건조하였다. TGA 분석은 100ml/min의 고순도 유동 질소 중에 수행하였다. 용광로의 온도는 10℃/min으로 증가하여 최대 800℃에 도달하도록 설정하였다.

[0038] **골 상에서 금나노입자 및 금나노입자-알렌드로네이트의 고정화 비교**

[0039] 추출된 경골 및 대퇴골을 본 실험에 사용하였다. 상기 골들을 37℃, 쉐이커에서 DPBS, 금나노입자 및 금나노입자-알렌드로네이트 용액 각각에 적셨다. 24시간 후에, 경골 및 대퇴골을 초음파분쇄기로 10분동안 DPBS 중에서 세척하였고, 24시간 동안 동결건조로 탈수시켰다. FE-SEM 및 EDX 측정을 위하여, 상기 샘플들을 진공 챔버에서 백금으로 코팅하였고, Field Emission S-4700으로 관찰하였다.

[0040] **금나노입자, 알렌드로네이트, 및 금나노입자-알렌드로네이트의 BMM의 생물 활성**

[0041] **-BMM의 추출 및 배양**

[0042] BMM은 6주령의 ICR 마우스의 경골 및 대퇴골 골수에서 분리하였다. 마우스는 경추탈골로 희생시켰고, 마우스 뒷다리를 잘라내었다. 골수를 1ml 주사기 및 25-거즈 바늘을 사용하여 MEM 알파 배지와 함께 골수강을 세척함으로써 다리에서 분리하였다. BMM을 골수 및 MEM 알파 배지의 혼합물에서 분리하였다. BMM을 습한 5% CO_2 인큐베이터 중의 성장인자(1% PS, 10% FBS 및 30ng/ml M-CSF)를 함유한 MEM 알파 배지로 채워진 페트리 접시 중에서 37℃에서 배양하였다. BMM을 나흘 동안 배양한 후, 세포를 세포 스크레퍼(scrapper)를 사용하여 페트리 접시에서 긁어모았고, 웰 배양 플레이트 중에 접종하였다. 파골세포로 분화시키기 위하여 100ng/ml RANKL을 성장 배지(ODM)에 가하였다. BMM 접종 후, 배지는 삼일 마다 교체하였다.

[0043] - BMM 생존성 검정

[0044] BMM은 4일 동안 성장 배지에서 배양하였고, 웰 당 1×10^4개의 세포 밀도로 48 웰 배양 플레이트에 분주하였다. 분주 24시간 후, 성장 배지를 다양한 농도의 금나노입자 및 알렌드로네이트를 함유하는 새로운 배지로 교체하였다. 금나노입자 및 알렌드로네이트로 처리한 BMM의 생존성은 EZ-Cytox를 사용하여 평가하였고, 24시간 및 48시간에 체크하였다. 24 및 48시간 후에, 각 군은 10%의 EZ-Cytox를 함유한 MEM 알파 배지로 처리하였고, 450nm 파장에서 ELISA 리더를 사용하여 그 결과를 측정하였다.

[0045] - TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase) 활성 및 염색

[0046] BMM에 대한 금나노입자, 알렌드로네이트 및 금나노입자-알렌드로네이트의 항-파골세포 분화 효과는 TRAP 활성 및 염색 키트를 사용하여 정성 및 정량적으로 평가하였다. BMM은 웰 당 2×10^4개의 세포 밀도로 48 웰 배양 플레이트에 분주하였다. 세포는 파골세포를 현미경으로 관찰할 때까지 ODM을 사용하여 배양하였다. 분화를 측정하기 위하여, 세포를 4% 포르말린으로 고정하고 생리식염수로 세척하였다. 이어서, 세포를 TRAP 활성 키트 및 염색 키트로 각각 처리하였다. TRAP 활성은 405nm 파장에서 ELISA 리더기로 평가하였고 염색은 현미경으로 관찰하였다.

[0047] - 실시간 폴리머라제 사슬 반응(RT-PCR)

[0048] BMM은 웰 당 2×10^4개의 세포 밀도로 배양하였고, 5일 동안 20㎛M의 금나노입자, 금나노입자-알렌드로네이트 및 7.32㎍/ml의 알렌드로네이트로 처리하였다. 세포의 RNA는 RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, CA, USA)로 분리하였다. cDNA는 AccuPower CycloeScript RT Premix (Bioneer, 대전, 한국)을 사용하여 합성하였다. 측정된 mRNA 유전자의 프라이머는 다음과 같다:

[0049] TRAP: 5'-CTG GAG TGC ACG ATG CCA GCG ACA-3' (sense) 및 5'-TCC GTG CTC GGC GAT GGA CCA GA-3' (antisense),

[0050] OSCAR (osteoclast-associated receptor): 5'- CTG CTG GTA ACG GAT CAG CTC CCC AGA - 3' (sense) 및 5'-CCA AGG AGC CAG AAC CTT CGA AAC T - 3' (antisense),

[0051] c-Fos: 5'-CTG GTG CAG CCC ACT CTG GTC -3' (sense) 및 5'- CTT TCA GCA GAT TGG CAA TCT C -3' (antisense),

[0052] NFATc1: 5'-CTC GAA AGA CAG CAC TGG AGC AT-3' (sense) 및 5'-CGG CTG CCT TCC GTC TCA TAG-3' (antisense), 및

[0053] GADPH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase): 5'- CAT GGC CTT CCG TGT TCC TAC CC -3' (sense) 및 5'- CCT CAG TGT AGC CCA AGA TGC CCT-3' (antisense).

[0054] RANKL 및 M-CSF를 포함하는 배지로 처리한 대조군은 1로 설정하고 실험군을 대조군과 비교하였다. RT-PCR 증폭은 95℃에서 10분간 초기 변성단계 후에 40 사이클 동안 95℃에서 20초, 60℃에서 30초 및 72℃에서 20초로 수행하였다. 모든 측정 결과는 GAPDH로 정규화하였다.

[0055] [결과]

[0056] 금나노입자, 알렌드로네이트, 금나노입자-알렌드로네이트의 정성분석(characterization)

[0057] 생성된 금나노입자는 직경 약 30mm , 농도 540㎛M 였다. 금나노입자는 알렌드로네이트 용액을 가함으로써 알렌드로네이트와 컨쥬게이트화되었다. 합성된 입자의 모양은 투과 전자현미경(transmission electron microscope)를 사용하여 약 20~40mm의 크기임을 확인하였다. 금나노입자와 금나노입자-알렌드로네이트 간의 시각적 차이는 없었다(도 1의 A 및 B). 입자의 UV-Vis spectrum 은 UV-분광광도계를 사용하여 측정하였다(도 2). 금나노입자와 금나노입자-알렌드로네이트에서 최대 흡광도에 상응하는 파장은 각각 525nm 및 531nm에서 발견되었다. 본 그래

프에서, 곡선의 모양은 유사한 것으로 보였지만, 최대값의 변경으로 약간 차이가 있었다. 알렌드로네이트 및 금나노입자-알렌드로네이트의 FT-IR 스펙트럼 중에서 피크는 926cm^{-1}, 1020cm^{-1}, 1050cm^{-1} 및 1650cm^{-1}에 관찰되었다(도 3). 그러나, 이들 알렌드로네이트 피크는 금나노입자에서 관찰되지 않았다.

[0058] TGA 분석은 물질의 열분해에 의한 질량 감소를 나타내었다(도 4). 800℃까지 가열한 후, 금나노입자, 금나노입자-알렌드로네이트, 및 알렌드로네이트의 남은 질량 비율은 97.9, 94.24 및 49.99%였다. 두 번의 현저한 감소가 TGA 그래프의 알렌드로네이트에서 관찰되었다.

[0059] **골 상에서 금나노입자 및 금나노입자-알렌드로네이트의 고정화**

[0060] 마우스의 경골 상에서 합성된 입자의 고정화는 FE-SEM 및 EDX 분석으로 평가하였다(도 5). 도 5는 골 표면상의 고정된 입자와 세척 후의 성분 비율을 보여준다. 대조군 A 및 금나노입자 B의 이미지에서 차이는 없었고, 표면에 붙은 나노입자도 거의 없었다. 그러나, 많은 양의 입자가 금나노입자-알렌드로네이트 C 중 표면상에 결합된 것이 관찰되었다. 또한, 금 피크는 금나노입자-알렌드로네이트를 사용한 골상에 고정된 입자를 함유하는 샘플중에서만 나타났다.

[0061] **금나노입자 및 알렌드로네이트의 세포독성 시험**

[0062] BMM을 금나노입자 및 알렌드로네이트에 노출시켰고, WST 검정을 사용하여 평가하였다(도 6). 금나노입자 및 알렌드로네이트 없이 24시간 동안 배지에서 배양된 BMM을 양성 대조군으로 사용하였다. 100㎍/ml의 금나노입자와 함께 24시간 및 48시간 동안 배양한 BMM의 생존율은 대조군에 비하여 각각 23.5% 및 37.9% 증가하였다. 한편, 다양한 농도의 알렌드로네이트로 처리한 군에서는 100㎍/ml 이상의 농도에서 24시간 및 48시간에 세포 생존율에서 현저한 감소를 보여주었다.

[0063] **파골세포 저해 효과의 평가**

[0064] 5일동안 100ng/ml RANKL의 자극 후, BMM의 파골세포로의 분화를 억제하는 약물 시스템의 효과를 확인하였다(도 7). 이는 TRAP 검정으로 확인하였다. 입자 및/또는 약물로 처리된 모든 군의 TRAP 활성은 용량의존적으로 감소하였다. 알렌드로네이트 군에서 알렌드로네이트의 농도는 30μM 이하로 제한하였고 20μM에서 파골세포의 분화를 완벽하게 억제하는 것을 발견하였다. 1μM의 알렌드로네이트로 처리한 군과 대조군(약물 없음)간에는 유의한 차이가 없었다.

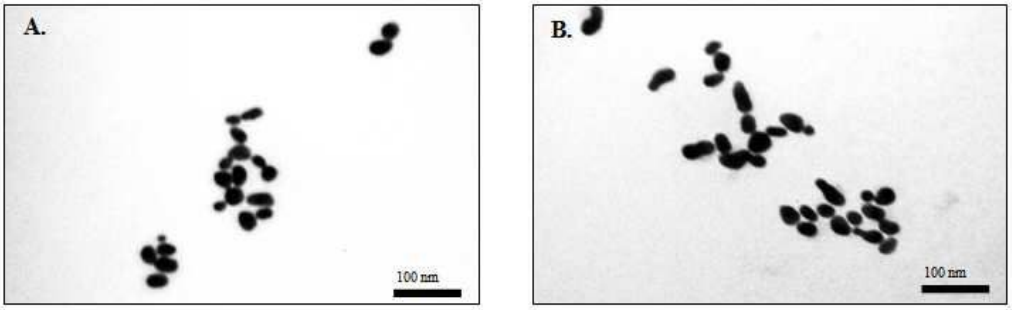
[0065] BMM의 RANKL-자극성 파골세포 분화에 대한 금나노입자, 금나노입자-알렌드로네이트 및 금나노입자-알렌드로네이트의 저해 효과는 TRAP-양성 다핵화 세포의 염색으로 정량적으로 확인하였다(도 8). 양성 대조군(약물 없음)은 TRAP-양성 다핵화 세포에서 상당한 양을 표시하였다. 그러나, 1-20μM의 입자 및 알렌드로네이트는 TRAP-양성 다핵화 세포의 형성을 저해하였다.

[0066] **파골성(osteogenic) 유전자 발현의 저해효과**

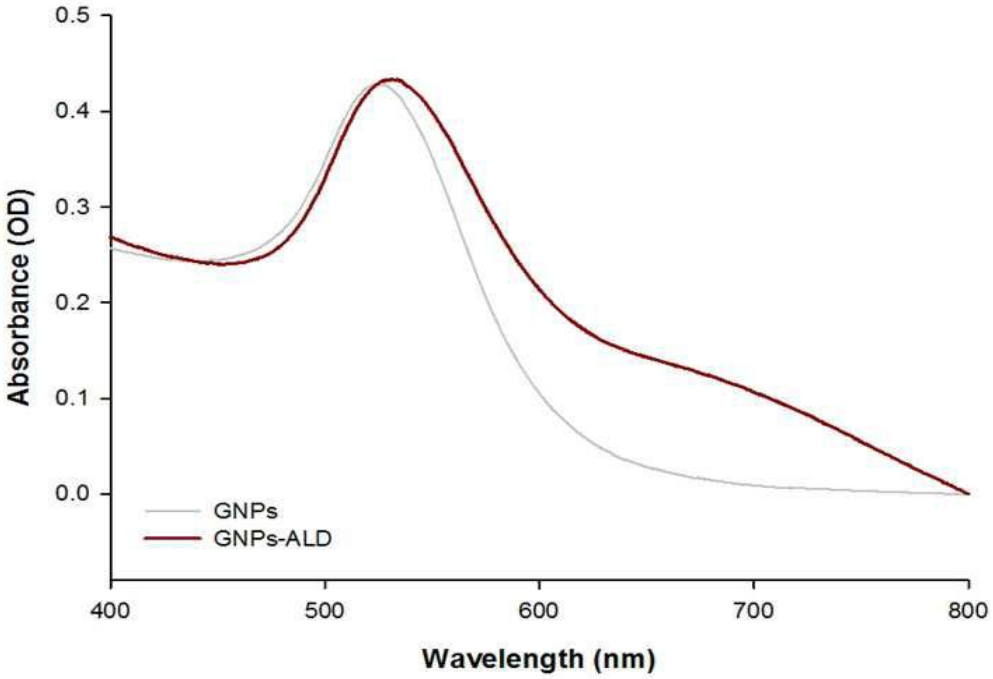
[0067] TRAP, OSCAR, c-Fos 및 NFATc1은 모두 파골세포에서 세포 분화를 유도하는 것으로 알려져있다. 금나노입자, 알렌드로네이트 및 금나노입자-알렌드로네이트의 저해 효과는 파골세포 유전자 마커를 측정하는 RT-PCR에 의해 확인하였다. 데이타에 첨부되지는 않았지만, RANKL이 첨가되지 않은 음성 대조군에서 0에 가까운 값이 나타났다. 본 연구에서 측정된 모든 마커들의 발현은 금나노입자, 알렌드로네이트, 금나노입자-알렌드로네이트에 의하여 감소하였다. 금나노입자-알렌드로네이트는 다른 군에 비교하여 우수한 저해 활성을 나타내었다. TRAP의 mRNA 발현은 모든 실험군에서 현저하게 감소하였다.

도면

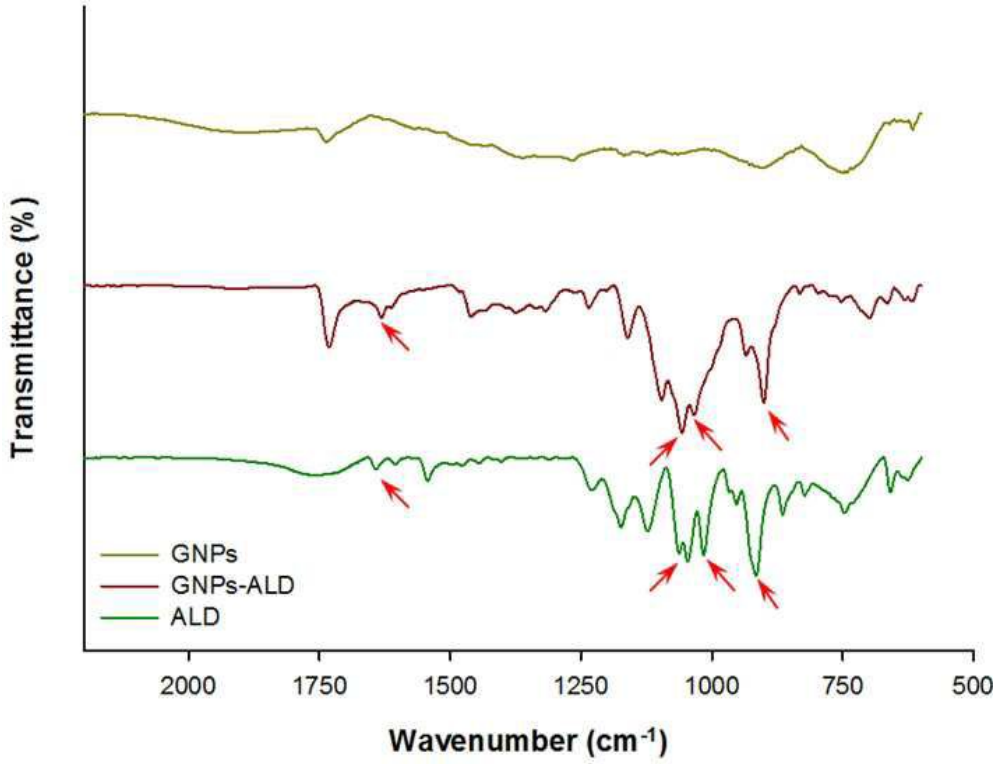
도면1


A.
100 nm
B.
100 nm

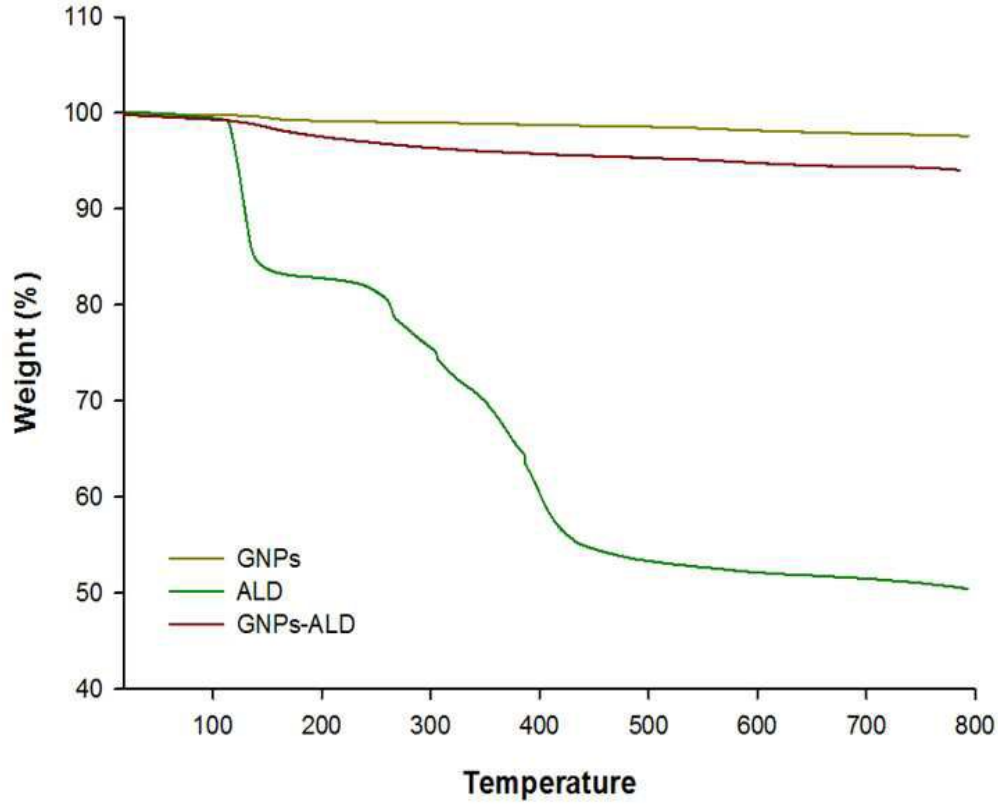
도면2


0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
Absorbance (OD)
GNPs
GNPs-ALD
400
500
600
700
800
Wavelength (nm)

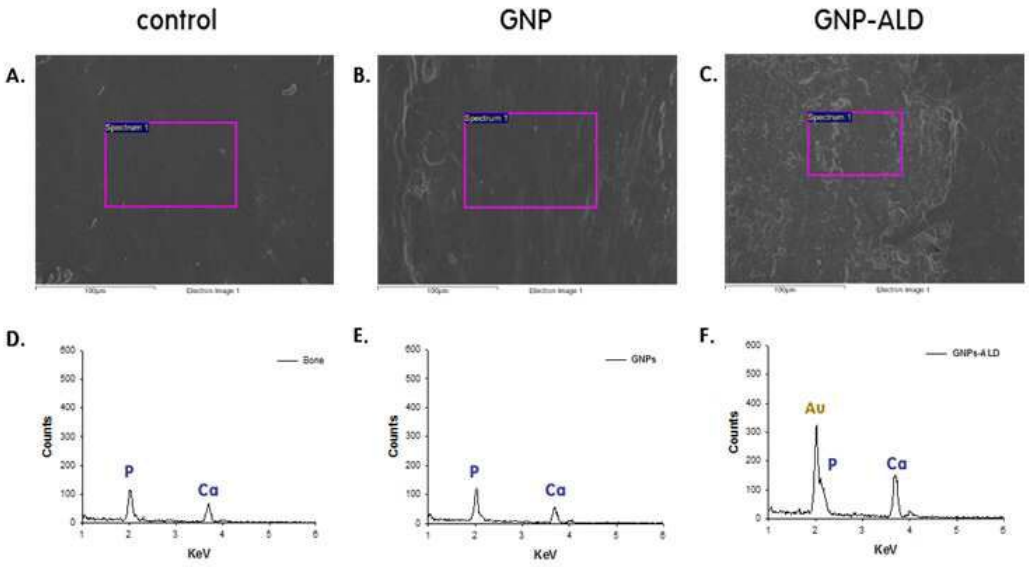
도면3


Transmittance (%)
GNPs
GNPs-ALD
ALD
2000
1750
1500
1250
1000
750
500
Wavenumber (cm-1)

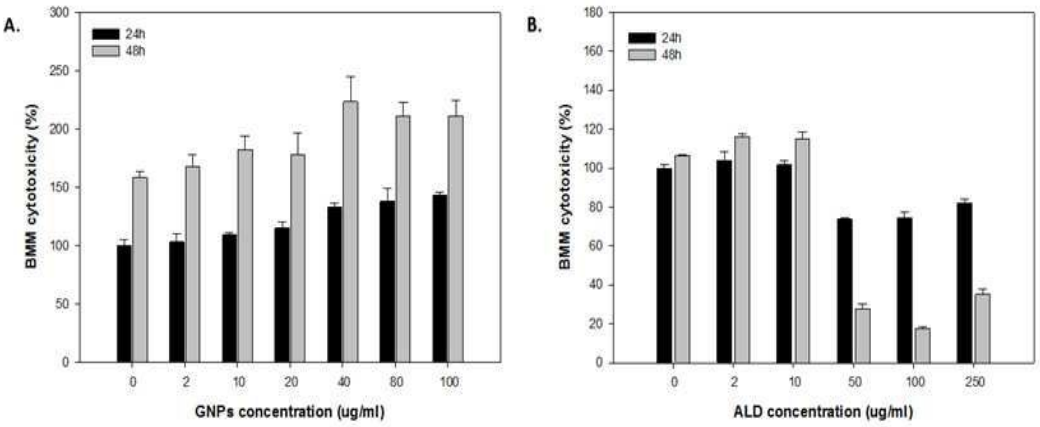
도면4


Weight (%)
110
100
90
80
70
60
50
40
GNPs
ALD
GNPs-ALD
100
200
300
400
500
600
700
800
Temperature

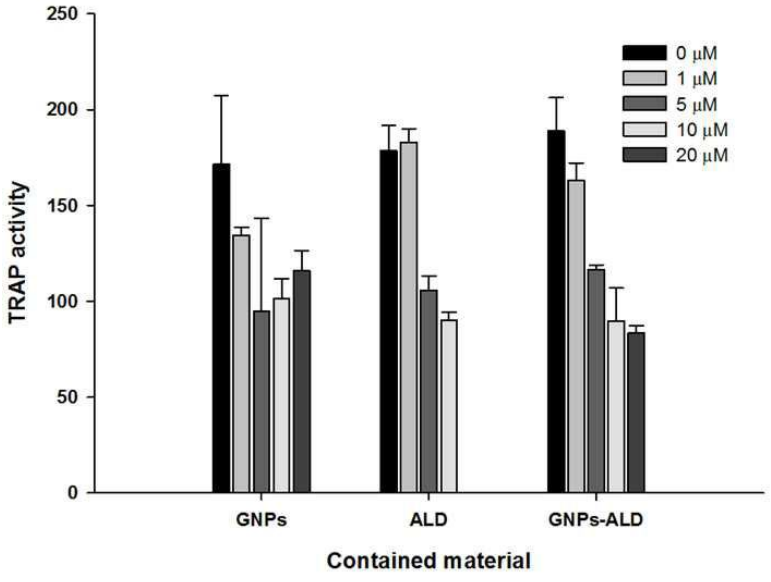
도면5


control
GNP
GNP-ALD
A.
B.
C.
D.
E.
F.
Bone
GNPs
GNPs-ALD
Counts
KeV
P
Ca
Au

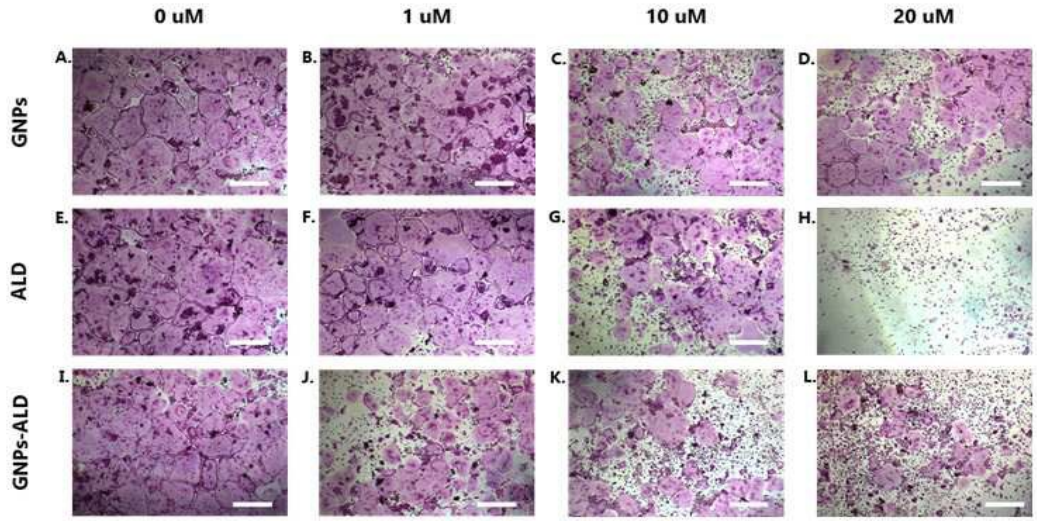
도면6


A.
B.
24h
48h
BMM cytotoxicity (%)
GNPs concentration (ug/ml)
ALD concentration (ug/ml)

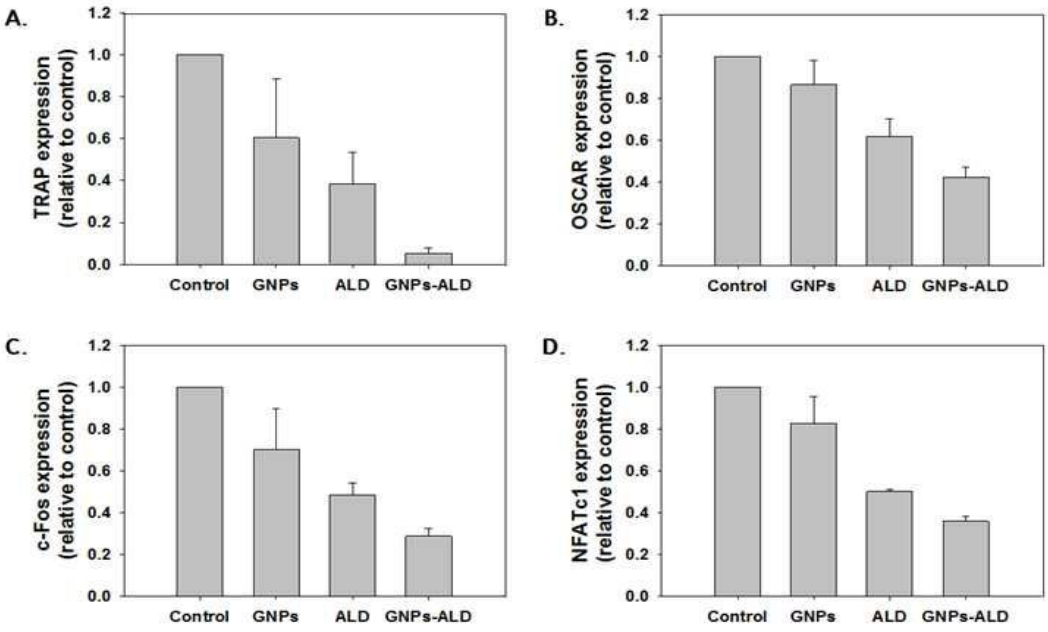
도면7


0 μM
1 μM
5 μM
10 μM
20 μM
TRAP activity
GNPs
ALD
GNPs-ALD
Contained material

도면8


0 uM
1 uM
10 uM
20 uM
GNPs
ALD
GNPs-ALD
A.
B.
C.
D.
E.
F.
G.
H.
I.
J.
K.
L.

도면9


A.
TRAP expression (relative to control)
B.
OSCAR expression (relative to control)
C.
c-Fos expression (relative to control)
D.
NFATc1 expression (relative to control)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
Control
GNPs
ALD
GNPs-ALD