



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0126619
(43) 공개일자 2016년11월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/14 (2006.01) A61K 31/12 (2006.01)
A61K 47/40 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/143 (2013.01)
A61K 31/12 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0057919
(22) 출원일자 2015년04월24일
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)
허동녕
서울특별시 강북구 솔샘로 174, 120동 1902호(미아동, SK아파트)
(74) 대리인
안소영

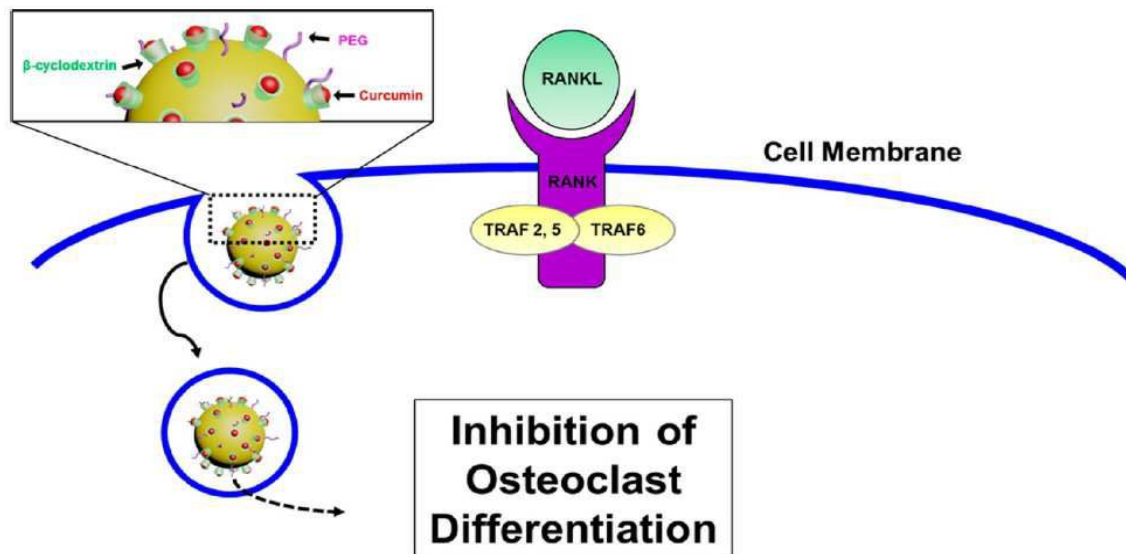
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 약물전달체

(57) 요약

본 발명은 금 나노입자 및 상기 금 나노입자 표면 상에 연결된 사이클로덱스트린을 포함하는 약물전달체, 및 상기 약물전달체를 포함하는 골다공증 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 47/40 (2013.01)

(72) 발명자

고완규

서울특별시 동대문구 회기로12길 48-9 (회기동)

이상진

경기도 안양시 동안구 동안로 102, 205동 1202호
(호계동, 목련선경아파트)

이동현

서울특별시 동대문구 경희대로1나길 35, 301호 (회기동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012-0008610

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 공공복지안전기술개발사업

연구과제명 이식형 신경전극의 단/장기적 생체적합성 향상

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2014.08.01 ~ 2015.07.31

명세서

청구범위

청구항 1

금 나노입자 및 상기 금 나노입자 표면 상에 연결된 사이클로텍스트린을 포함하는 약물전달체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 사이클로텍스트린에 골다공증 치료제가 포접되어 있는 약물전달체.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 골다공증 치료제는 커큐민인 약물전달체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 약물전달체를 포함하는 골다공증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 금 나노입자 및 상기 금 나노입자 표면 상에 연결된 사이클로텍스트린을 포함하는 약물전달체, 및 상기 약물전달체를 포함하는 골다공증 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인체의 골조직은 조골세포에 의한 골 재형성(Bone formation)과 파골세포에 의한 골 재흡수(Bone resorption) 과정과 같은 골의 리모델링(Bone remodeling)이 평생동안 끊임없이 반복되어 이루어진 역동적인 기관이다. 골 조직은 연골과 골격계를 구성하며 기계적 기능으로 지지와 근 부착의 역할을 하고, 생체기관 및 골수를 보호하는 기능을 하며, 칼슘과 인 이온의 항상성 유지를 위해 이들을 보존하는 기능을 담당한다. 이와 같은 기능을 하는 골 조직은 교원질, 당단백질과 같은 세포 기질과 조골세포, 파골세포 및 골세포 등 여러 종류의 세포들로 이루어진다. 이들 중 파골세포는 조혈모세포로부터 유래한 세포로서 노화된 골의 흡수를 담당하며, 조골세포는 골 수 내 간질세포(bone marrow stromal cell)로부터 유래한 세포로서 골 형성에 주된 역할을 담당한다.

[0003] 이 중 파골세포는 마우스의 RAW264.7 단핵구 세포가 RANKL(receptor activator of nuclear factor κ B (RANK) ligand)에 의해 다핵파골세포(multinucleated osteoclasts)로 분화된다. 이러한 분화 과정은 세포 외부의 RANKL이 RANK에 결합하여 미토겐 활성화 단백질 키나아제(mitogen-activated protein kinase, MAPK)의 활성을 촉진하고, 이는 NF- κ B라는 전사 인자가 핵 내로 들어가서 파골세포 분화와 관련된 TRAP(tartrate-resistant acid phosphatase), MMP-9(matrix metalloproteinase-9), c-Src 티로신 키나아제(tyrosine kinase) 등의 발현을 증가시킴으로써 가능한데, 이러한 과정으로 형성된 다핵 파골세포는 무기질 골(mineralized bone)을 흡수하는 역할을 한다. 또한, RANKL이 RANK에 결합하면 TRAF6(tumor necrosis factor receptor-associated factor 6)의 활성을 촉진시켜 MAPK, 또는 NF- κ B, AP-1, NFATc1과 같은 전사인자들의 활성을 촉진시킨다. 따라서 RANKL에 의해 활성화되는 신호전달 경로의 차단은 골다공증을 비롯한 골 질환의 치료를 위한 치료적 접근 방법 중의 하나로 인지되고 있다.

[0004] 골 질환의 대표적인 예인 골다공증은 골의 재흡수와 재형성 사이의 균형이 깨어져서 골 재흡수 속도가 빨라짐에 따라 골의 칼슘이 빠져 일어나게 되는 골소실로 인한 골절에 의해 급격히 초래되는 질병이다. 골다공증은 그 증세 자체보다는 골의 약화에 따라 용이하게 초래되는 각종 골절, 특히 대퇴골 골절은 장기간 활동을 제한하여 긴장한 생활을 영위할 수 없고, 결과적으로 노인층 사망의 15%에 대한 원인제공을 하는 것으로 알려져 있다.

[0005] 골다공증 치료제를 개발하기 위한 통상적인 실험방법은 일차적으로 파골세포의 활성을 억제시키거나, 조골세포의 활성을 증가시키는 물질을 선택한 후, 인간에서 나타나는 골다공증과 유사한 증상을 보이는 동물을 사용하여

골량이 얼마만큼 회복되고, 골강도가 얼마만큼 회복되었는지 정도로 약효를 평가한다.

[0006] 골다공증의 원인은 다양하게 생각할 수 있지만, 가장 많은 것이 나이가 드는 것(노화) 또는 여성의 폐경 후의 호르몬 불균형이기 때문에, 현재의 치료는 주로 에스트로겐, 비타민 D나 칼시토닌의 투여가 행해지고 있다. 그러나, 호르몬의 투여는 암(특히, 유방암, 자궁암 등)을 유발할 위험이 있어 안전한 치료 방법이라고는 할 수 없다. 또한, 제2 세대 치료제로서, 비스포스포네이트의 투여도 행해지고 있지만, 투여를 중단하면 리바운드가 발생하는 문제점을 가지고 있다. 또한, 어느 쪽의 방법도 골다공증의 진행을 지연시킬 수는 있어도 일단 감소한 골을 재생시키기는 어려운 단점을 가지고 있다.

[0007] 또한, 골 질환을 치료하기 위해서는 파골세포와 조골세포의 균형을 조절하는 것이 필요하기 때문에, 이에 대한 치료제로 크게 골흡수 억제제와 골형성 자극제가 있다. 이들 중 골 형성 자극제에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있으나 골 형성 자극제로 인한 골밀도 강화가 반드시 골절의 감소를 의미하지는 않으므로 임상적으로 널리 사용되기 위해서는 좀 더 많은 연구가 필요하다. 뿐만 아니라, 골 형성을 자극하기 위한 제제로서 조골세포를 활성화시키기 위한 촉진제 및 파골세포의 골 흡수를 억제하기 위한 억제제는 일반적으로 환자에게 장기 투여하여야 하기 때문에 독성이 적고 경구투여가 가능한 것이 바람직하므로 이에 대한 연구가 절실히 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 금 나노입자 및 상기 금 나노입자 표면 상에 연결된 사이클로덱스트린을 포함하는 약물전달체, 및 상기 약물전달체를 포함하는 골다공증 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 수행하기 위하여, 본 발명은 금 나노입자 및 상기 금 나노입자 표면 상에 연결된 사이클로덱스트린을 포함하는 약물전달체를 제공한다.

[0011] 본 발명의 약물전달체는 표면에 사이클로덱스트린이 연결, 결합되어 있는 금 나노입자이다. 바람직하게 본 발명의 사이클로덱스트린으로 표면 기능화된 약물전달체에서 상기 연결은 금 나노입자와 황, 예컨대 티올기 간의 상호작용에 의한 결합에 의한 것이며, 예를 들어 상기 결합은 디설파이드 결합일 수 있다.

[0013] 본 발명의 약물전달체는 공지된 방법(*Biomaterials* 2012, 33, 856-866)을 참고하여 통상의 기술자가 용이하게 제조할 수 있다. 구체적으로 사이클로덱스트린이 연결된 금나노입자(CGNPs)는 약물 포켓으로 티올화 사이클로덱스트린(CD) 및 금나노입자(GNPs)의 표면에 용매화 안티파울링 셀로서 메톡시 폴리(에틸렌 글리콜 티올)기를 Au-S 결합을 통하여 컨쥬게이팅시킴으로써 제조할 수 있다.

[0015] 본 발명의 약물전달체는 약물을 담지할 수 있는데, 구체적으로 사이클로덱스트린의 내부에 골다공증 치료제가 포접되어 복합체를 형성할 수 있다. 골다공증 치료제로는 골형성 촉진제, 골흡수 억제제, 복합제제 등이 있으며, 바람직하게 상기 골다공증 치료제는 커큐민일 수 있다.

[0017] 구체적인 일 양태에서, 커큐민(CUR)을 포접 복합체 형성으로 사이클로덱스트린이 연결된 금나노입자(CGNPs)의 표면에 로딩시켰다. 이러한 디자인은 세포내 흡수 후, 커큐민(CUR)의 효과적인 전달을 가능토록 한다.

[0019] 구체적인 다른 양태에서, BMMs 중 금나노입자(GNP)의 존재를 확인하기 위하여, 공지된 방법으로 rhodamine B labeled CD를 제조하였고, 이를 Au-S 결합을 통하여 GNP의 표면에 컨쥬게이트화하였다. rhodamine B의 형광은 GNP의 표면에서 사라졌으나, rhodamine B가 세포내 글루타티온(GSH)에 의해 분해되면서 소광물질로부터 자유로워짐에 따라 그 자체가 발광하는 것을 확인하여, 본 발명의 약물전달체가 BMM 세포 내로 효과적으로 전달되는

것을 확인하였다.

- [0021] 또한, 본 발명의 약물 전달체를 포함하는 약학적 조성물은 골다공증의 예방 또는 치료제로서 유용하게 사용될 수 있다.
- [0023] 본 발명에서, 골다공증은 뼈에 구조상 아무런 이상이 없으면서 뼈를 구성하는 무기질과 기질의 양이 과도하게 감소하여 뼈에 스펀지처럼 작은 구멍이 많이 나서 무르고 쉽게 부러지는 상태를 말하며, 다른 용어로 골조소증 또는 골소공증이라고도 한다. 상기 골다공증은 일반적으로 골량의 저하, 즉 골밀도의 저하나 골조직이 열화되는 증상을 수반한다.
- [0025] 상기 골다공증은 예컨대, 여성에서의 폐경에 따른 골다공증, 노인성 골다공증 및 난소 적출술에 따른 골다공증 등의 원발성 골다공증; 글루티코르티코이드 유발성 골다공증, 갑상선 기능 항진성 골다공증 고정 유발성 골다공증, 해파린 유발성 골다공증, 면역 억제 유발성 골다공증, 신부전에 따른 골다공증, 염증성 골다공증, 쿠싱 증후군에 따른 골다공증 및 류마티스성 골다공증 등의 이차성 골다공증; 등과 같은 골 질환 중 어느 하나 이상일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [0027] 바람직하게 본 발명의 약학적 조성물은 파골세포의 분화 표지 마커로 알려져 있는 c-Fos, NFATc1 및 TRAP의 발현을 효과적으로 억제하므로 골다공증의 예방 또는 치료제로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0029] 본 발명에서 예방은 본 발명의 조성물의 투여에 의해 골다공증을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미하며, 치료는 본 발명의 조성물의 투여에 의해 골다공증에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0031] 구체적인 일 양태에서, 난소를 절제한 마우스에서 본 발명의 약물전달체를 투여한 후 그 효과를 실험하였다. 그 결과, 모든 실험군의 골밀도가 개선되었고, 해면골의 부피, 두께, 밀도가 모두 증가하는 것이 관찰되었다.
- [0033] 상기와 같이 본 발명의 약물전달체를 포함하는 약학적 조성물은 파골세포의 형성 및 분화를 억제함으로써, 궁극적으로 파골세포에 의한 골 재흡수를 제어하고, 골다공증 질환을 효과적으로 치료할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.
- [0035] 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 약학적으로 유효한 양이란 의학적 치료에 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 증정도, 연령, 성별, 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 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0037] 본 발명의 조성물은 상기 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제 등을 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트,

탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[0039] 본 발명의 상기 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 상세하게는, 제형화할 경우 통상 사용하는 충전제, 중량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위캡슐, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0041] 본 발명의 상기 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간 등에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

발명의 효과

[0042] 본 발명에 따른 약물전달체는 금나노입자 및 커큐민을 효과적으로 세포내로 전달하여, 파골세포의 분화를 효과적으로 억제함으로써, 과도한 골 재흡수를 억제하여 궁극적으로 골다공증의 예방 및 치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0043] 도 1은 본 발명의 사이클로텍스트린/커큐민(CD/CUR) 포접 복합체로 커버된 기능화된 금나노입자(GNPs) 및 이의 골다공증 예방 및 치료 기전을 나타낸 도해이다.

도 2의 A는 사이클로텍스트린 결합(컨쥬게이트화된) 금나노입자(CGNP) 및 커큐민(CUR)의 혼합 용액의 표면 플라즈몬 공명 스펙트라이그, B는 CUR, CGNP, CUR-CGNPs의 FTIR이다.

도 3의 CGNP 및 CGNP-CUR의 구조 및 정성을 나타낸 것으로 A는 CGNP의 TEM 이미지이고, B는 CUR-CGNP의 TEM 이미지이며, C는 DLS로 측정된 CGNP 및 CUR-CGNP의 크기 분포이다(scale bar = 50 nm).

도 4의 A는 CUR 존재 하 BMM의 생존성 시험 결과, B는 CGNP 존재 하 BMM의 생존성 시험 결과를 나타낸 것이다(결과는 세 번 실험의 평균±SD 이고, *p<0.01).

도 5는 comet 검정으로 측정된 24시간 켈의 CUR 및 CGNP 존재 하 BMM의 유전자 독성을 나타낸 것으로 A는 CUR, B는 CGNPs의 존재하 DNA 단편화(comet tail 중 DNA %, 평균±SD).이고, C는 다양한 농도에서 CUR 및 CGNP 처리로부터 얻은 대표 comet 이미지이다(결과는 세 번 실험의 평균±SD 이고, *p<0.01, **p<0.05).

도 6은 CLSM으로 확인한 Rho-CGNP 및 cell tracker로 처리한 BMM의 세포내 흡수 이미지이다.

도 7은 CUR 및 CGNP 처리 후 TRAP 검정 결과를 나타낸 그래프이다(결과는 세 번 실험의 평균±SD 이고, *p<0.01, **p<0.05).

도 8은 CUR, CGNP, 및 CUR-CGNPs 처리 후 TRAP 검정 결과를 나타낸 것이다(결과는 세 번 실험의 평균±SD 이고, *p<0.01, **p<0.05).

도 9는 BMM에서 CUR, CGNP, 및 CUR-CGNP의 RANKL-유도성 액틴 고리 형성 효과를 나타낸 것이다(scale bar = 200 μm).

도 10은 CUR (1 μM), CGNP (10 μM), 및 CUR-CGNP (1/10 μM)의 존재 하, A는 c-Fos, B는 NFATc1, C는 TRAP 및 D는 OSCAR의 유전자 발현을 나타낸 것이다(결과는 세 번 실험의 평균±SD 이고, *p<0.01, **p<0.05).

도 11은 CGNP (10 μ M) 및 CUR-CGNPs (1/10 μ M)의 존재 하, 인산화된 p38, ERK, JNK, 1 κ Ba 및 Akt의 단백질 발현결과를 나타낸 것이고 불꽃은 세 번 실험의 대표적 이미지이다.

도 12는 마우스 골 조직 방사선 분석 결과를 나타낸 것으로 A는 좌측 대퇴골의 방사선 이미지이고, B는 모든 실험군의 상대적 골밀도값의 평균을 나타낸 것이다(군당 n=5, *p<0.01).

도 13은 실험군의 대퇴골의 조직학적 분석 결과를 기재한 것으로 A는 대퇴골을 H&E로 염색한 결과이고(scale bar = 200 μ m), B는 해면골 부피를 나타낸 그래프이다(p<0.05).

도 14는 마우스 골조직의 μ CT 결과를 나타낸 것으로 A는 μ CT에 의해 측정된 해면골의 3D 이미지이고, B는 퍼센트 골 부피비의 평균 값이고, C는 골 미네랄 밀도를 나타낸 것이다(군당 n=5, *p<0.01).

도 15는 UV-Vis 분광학에 의해 측정된 커큐민의 교정(calibration) 곡선을 나타낸 것이다.

도 16은 CGNP 중 커큐민의 로딩 효율을 나타낸 그래프이다.

도 17은 실험기간 중 측정된 마우스의 체중을 나타낸 그래프이다(모든 시점은 마우스의 평균 $\pm$ 표준편차 값을 의미한다).

도 18은 실험군의 상대적 대퇴골 중량을 나타낸 그래프이다.

도 19는 마우스 골 조직의 μ CT 분석 결과를 나타낸 것으로 A는 해면골 부피(BV), B는 해면골 수(Tb.N), C는 해면골 두께(Tb.Th), 및 D는 해면골 분리(Tb.Sp)를 나타낸 것이다(군당 n=5, *p<0.01).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 본 발명의 범위가 하기 내용에 의해 한정되는 것은 아니다.

1. 실험방법

1-1. 재료 및 방법

재료 및 장치: 사이클로렉스트린(CD) 표면-기능화된 금나노입자(GNPs) (CGNPs) 및 로다민 B 연결 사이클로렉스트린(CD) 표면-기능화된 금나노입자(GNPs) (Rho-CGNPs)는 *Biomaterials* 2012, 33, 856-866에 기재된 공지된 방법을 참고하여 제조하였다. 커큐민(CUR) 및 Leukocyte Acid Phosphatase Assay kit는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)에서 구입하였다. RANKL 및 M-CSF (macrophage-colony stimulating factor)는 Peprotech (Rocky Hill, NJ)에서 구입하였다. α -최소필수배지(α -MEM), 우태아혈청(FBS), DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline), 트립신-EDTA 및 페니실린-스트렙토마이신(PS)은 GIBCO BRL (Invitrogen Co., Carlsbad, CA)에서 구입하였다. cell tracker green은 Molecular Probes (Invitrogen Co., USA)에서 구입하였다. p38, phospho-38 (Thr180/Tyr182), ERK (extracellular signal-regulated kinase), phospho-ERK, JNK (c-Jun N-terminal kinase), phospho-JNK, B-세포 저해제의 nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer, alpha (1 κ Ba), phosphor-1 κ Ba, Akt, 및 phosphor-Akt에 대한 모든 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA)에서 구입하였다. 모든 시약은 추가 정제 없이 구입한 그대로 사용하였다. 투과 전자 현미경(TEM) 관찰은 H-7100 (Hitachi, Japan)을 사용하여 수행하였다. DLS (Dynamic light scattering) 측정은 90 PLUS (Brookhaven, Holtsville, NY)를 사용하여 수행하였다. 자외/가시(UV/Vis) 흡광도는 UV-1650PC 분광기(Shimadzu, Japan)를 사용하여 측정하였다. ATR-FTIR (Attenuated total reflectance-Fourier transform infrared) 측정은 TENSOR 37 (Bruker, Billerica, MA)를 사용하여 수행하였다.

1-2. 사이클로렉스트린/커큐민(CD/CUR) 포접 복합체로 덮힌 금나노입자(GNPs)의 제조

커큐민(CUR)을 금나노입자(GNPs)의 표면에 로드시키기 위하여 DMSO (dimethyl sufoxide)에 용해시킨 10 μ L의 2.5 mM CUR을 50 μ M의 CGNPs 용액(1 mL)에 가하고, 그 결과로 얻은 용액을 5분 동안 초음파처리하였다. 원심분리 후에, 침전물을 증류수로 세 번 세척하였다. CUR의 CGNPs로의 로딩 효율은 426 nm의 검출 파장에서 UV/vis 분광기를 사용하여 측정하였다.

[0053] **1-3. 세포 배양**

[0054] 일차 배양된 BMMs를 세포독성 및 파골세포(OC) 분화연구에 사용하였다. 골수-유래 파골세포의 생성을 위하여 공지된 방법으로 ICR 6주령 마우스의 경골에서 단핵구를 분리하였다. 세포를 100 mm 플레이트(1.5×10^6 /웰)에 분주하고 30 ng/mL M-CSF 존재하에 72시간 동안 배양하였다. 이 단계의 세포들은 M-CSF 의존성 BMMs인 것으로 간주하고 전구세포로 사용하였다. 세포를 습기 있는 5% CO₂ 대기 조건에서 10% FBS 및 1% PS를 함유한 α -MEM에서 배양하였다. 파골세포(OC)로의 분화 유도는 세포들을 다양한 농도의 시험 물질(CUR, CGNP, 및 CUR-CGNP)의 존재 및 부재하에 RANKL (100 ng/mL) 및 M-CSF (30 ng/mL)를 함유한 배지에서 배양시킴으로써 달성하였다. 다양한 시험 물질을 함유한 완성 배양 배지는 3일마다 교체하였다. 생물시험 및 분석을 위하여 세포를 수확하였고, 1000 rpm에서 5분 동안 원심분리하였고, 인 비트로 생물 검정 전에 웰 플레이트에 접종하였다.

[0056] **1-4. 세포 생존 검정**

[0057] 다양한 시험 물질의 세포 생존성은 셀 카운팅 키트(CCK-8, Dojindo Molecular Technologies Inc., Japan) 검정을 사용하여 평가하였다. 세포 접종 후, 부착하여 증식한 세포들을 24시간 및 48시간에 측정하였다. 정해진 시간 간격에서, 세포를 DPBS로 세척하였고, CCK-8를 함유한 신선 배지(0.1 mL/ml 중 300 μ l)를 첨가하였고, 그리고 나서 세포를 2시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후에, 450 nm의 파장에서 마이크로플레이트 리더(BioRad, USA)로 강도를 측정하였다.

[0059] **1-5. Comet 검정**

[0060] comet 검정은 Trevigen, Gaithersburg, MD에서 구매한 키트에 제공되는 시약을 사용하여 Javeri 등의 방법에 따라 수행하였다. 간단하게, 1×10^5 세포/ml의 세포 현탁액을 1:10 (v/v)의 비율로 낮은 녹는점 한천으로 희석하였고, 즉시 CometSlide 상에 펼쳤다. 슬라이드를 4°C에서 10분 동안 굳혔고, 4°C 용해 용액에서 1시간 동안 담가두었다. 용해 후, 슬라이드 상의 DNA를 전기영동으로 분리하였고, SYBR Green 1 염색용액으로 가시화시켰다. 이미지는 올림퍼스 형광 현미경(Tokyo, Japan)으로 캡처하였고, Comet Assay IV software (<http://www.scorecomets.com>)으로 분석하였다. DNA 손상은 DNA tail의 %로 정량하였다(% tail DNA).

[0062] **1-6. 공초점 주사 레이저 현미경(CLSM; confocal laser scanning microscopy) 분석으로 확인한 Rho-CGNPs의 세포내 흡수**

[0063] BMMs (2×10^4 세포/웰 당)은 48-웰 배양 플레이트에 접종하였고 CLSM 분석을 위해 밤새 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후에, 배지는 Rho-CGNPs 및 cell tracker를 함유한 신선 배지로 교환하였고, 2, 4, 12 및 24시간 동안 각각 인큐베이션하였다. 배지를 제거한 후, 세포를 신선 DPBS로 세척하였고 3.7% 포르말데하이드로 고정하였다. Rho-CGNPs의 세포내 흡수는 CLSM (Eclipse E600W, Nikon, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다. 얻어진 이미지는 Nikon EZ-C1 software로 평가하였다.

[0065] **1-7. TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase) 검정**

[0066] BMMs (2×10^4 세포/웰 당)을 48 웰-배양 플레이트에 접종하였고 다양한 시험 물질을 함유하는 완전 배양 배지와 함께 인큐베이션하였다. TRAP-양성 다핵 세포(TRAP⁺ MNCs)는 5일 후 관찰하였다. 세포를 3.7% 포르말데하이드에서 15분 동안 적심으로 고정하였고, 0.1% 트리톤 X-100 중에서 10분 동안 방치하였다. 세포를 DPBS로 세 번 세척하였고 37°C에서 Leukocyte Acid Phosphatase Assay kit를 사용하여 제조사의 지시에 따라 어둠 속에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 염색 후에, 셋 이상의 핵을 함유한 TRAP⁺ MNCs은 파골세포로 간주하였고 광학 현미경을 이용하여 점수를 매겼다.

[0068] 1-8. 액틴 고리 형성(Actin Ring Formation) 검정

[0069] BMMs (2×10^4 세포/웰 당)을 완전 배양 배지의 존재 하에 5일 동안 48 웰-배양 플레이트에 접종하였다. 이어서, 세포를 3.7% 포름알데하이드로 20분 동안 고정하였다. DPBS로 세 번 세척 후에, 세포를 로다민-컨쥬게이트드 팔로딘 및 4',6-디아미디노-2-페닐리돌(DAPI)로 30분 동안 염색하였고, 다시 DPBS로 세 번 세척하였다. 각 샘플의 액틴 고리 형성(actin ring formation)은 공초점 주사 레이저 현미경(CLSM, Eclipse E600W, Nikon, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

[0071] 1-9. 실시간 PCR (Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction)

[0072] 48 웰-배양 플레이트에서 배양한 BMMs (2×10^4 세포)의 총 RNA를 제조사의 지시에 따라 Rneasy Plus Mini Kit (Qiagen, CA)를 사용하여 분리하였다. 총 RNA 1 μ g을 AccuPower CycleScript RT Premix (Bioneer, Daejeon, Republic of Korea)로 cDNA로 전사시켰다. mRNA 유전자 프라이머는 다음과 같다:

[0073] TRAP, 5'-CTG GAG TGC ACG ATG CCA GCG ACA-3' (sense) 및 5'-TCC GTG CTC GGC GAT GGA CCA GA-3' (antisense);

[0074] osteoclast-associated receptor (OSCAR), 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);

[0075] c-Fos, 5'-CTG GTG CAG CCC ACT CTG GTC-3' (sense) 및 5'-CTT TCA GCA GAT TGG CAA TCT C-3' (antisense);

[0076] NFATc1, 5'-CTC GAA AGA CAG CAC TGG AGC AT-3' (sense) 및 5'-CGG CTG CCT TCC GTC TCA TAG-3' (antisense); 및

[0077] glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), 5'-CAT GGC CTT CCG TGT TCC TAC CC-3' (sense) 및 5'-CCT CAG TGT AGC CCA AGA TGC CCT-3' (antisense).

[0078] 실시간 PCR은 iQ SYBR Green supermix (Bio-Rad, Hercules, CA)를 사용하여 분석하였다. 역치 사이클 값은 비교 사이클 역치법을 사용하여 계산하였다. 배양 5일 제의 대조군(RANKL 및 M-CSF로 처리)의 배수 변화를 1배로 설정하였고, 정규화한 배수 변화를 계산하였다. 실시간 PCR 증폭은 95°C에서 10분간 초기 변성 단계 후 95°C에서 10초, 57-66°C에서 30초 및 72°C에서 30초를 45 사이클 수행하였다. 모든 결과는 GAPDH로 정규화하였다.

[0080] 1-10. 웨스턴 블롯

[0081] BMM은 0.5 M Tris-HCl, pH 7.4, 1.5 M NaCl, 2.5% 테옥시콜산, 10% NP-40, 및 10 mM EDTA를 함유한 차가운 RIPA 용해 버퍼를 프로테아제 및 포스포타제 저해제와 함께 가하여 용해시켰다. 세포 용해물은 아이스 박스에서 30분 동안 인큐베이션 하였고, 13000 rpm에서 10분 동안 원심분리하였다. 단백질 농도는 마이크로플레이트 분광광도계(Benchmark Plus, Bio-Rad, Japan)을 사용하여 595 nm의 파장에서 측정하였다. 단백질 동량(40 μ g)을 SDS-PAGE 대상으로 하였고 니트로셀룰로스 트랜스퍼 멤브레인(Protran, Whatman, Germany)로 이동시켰다. 5% 스킵 밀크로 차단한 후, 홀스-래디쉬 퍼옥시다제와 컨쥬게이트화된 적절한 이차 항체와 함께 인큐베이션 시키고 나서 멤브레인을 p38 (Thr180/Tyr182), ERK, JNK, 1 μ Ba, 및 Akt의 인산화 형태로 탐침하였다. 동일한 멤브레인을 스트립하고 p38, ERK, JNK, 1 μ Ba 및 Akt의 총 형태로 재탐침하였다. 신호는 ChemiDoc XRS System (Bio-Rad, Hercules, CA)를 사용하여 검출하였다.

[0083] 1-11. 동물시험

[0084] 평균 20 g의 무게가 나가는 10주령의 C57BI/6 암컷 마우스(n=30)는 Orient Bio (Seognam, Korea)에서 구입하였다. 모든 동물실험은 건국 대학(KU13118)의 Institutional Animal Care and Use Committee에서 승인받았다. OVX 또는 sham 수술이 12주차에 수행되었다. OVX 동물은 난소를 제거하였고, sham-수술받은 동물은 난소를 노출시켰으나 제거하지는 않았다. OVX 마우스를 랜덤으로 실험군(n=5)으로 다음과 같이 나누었다. 실험군은 OVX (미처리), CGNPs (용량: 500 μ M), CUR (용량: 50 μ M CUR), 및 CUR-CGNPs (용량: 50/500 μ M CUR-CGNPs)을 포함한다. 주사가능한 용액을 생리식염수 중 투여용량으로 매일 제조하였다. 실험군에 각 용액(매일 0.5 mL)을 위

내 주입하였다. 9주간의 투여 후, 해부 방사선 분석을 soft X-ray로 분석하였다. 구역의 상대적 방사선 밀도를 이미지 분석으로 평가하였다. 마이크로 CT (micro computed tomography, μ CT) 검사를 사용하여 해면골 (trabecular bone) 중 변화가 있는지를 확인하였다. 이는 Skyscan1173 (SKYSCAN, Belgium)을 사용하여 8 μ m 해상도로 수행하였다. μ CT상의 골밀도 정도는 mean gray value 및 standard deviation of region of interest (ROI)로 정량화하였다. 모든 형태학 파라미터는 On-demand software (CyberMed Inc., Korea)를 사용하여 얻었다. μ CT 분석 후, 각 동물의 대퇴골을 제거하고 조직학 분석을 위하여 헤마톡실린 및 에오신(H&E)으로 염색하였다.

1-12. 통계 분석

모든 값은 평균 $\pm$ 표준편차로 표시하였다. 통계 분석은 PASW 통계 21 소프트웨어(SPSS, Inc., Chicago, IL)을 사용하여 수행하였다. 다중 비교는 분산 편도 분석(ANOVA)를 사용하여 분석하였고 Dunnett's T3 post hoc paired comparison 시험을 수행하였다. p 값은 < 0.05인 것이 통계적으로 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

2. 실험결과

2-1. CUR-CGNP의 제조 및 정성

CGNPs는 약물 포켓으로 티올화 CD 및 GNPs의 표면에 용매화 안티파울링 셀로서 메톡시 폴리(에틸렌 글리콜 티올)기를 Au-S 결합을 통하여 컨쥬게이팅시킴으로써 제조하였다. CUR은 포접 복합체 형성으로 CGNPs의 표면에 로딩시켰다. 이러한 디자인은 세포내 흡수 후, CUR의 효과적인 전달을 가능토록 한다. CUR의 CGNPs로의 로딩 능력은 CGNPs와의 인큐베이션을 위한 CUR 용액 및 초원심분리로 정제 후 상청액 간의 CUR의 UV 흡수 비교로 측정하였다(도 15 및 16).

CUR의 대략적인 로딩 효율은 38.95%였고, CUR-CGNPs의 농도는 50 μ M CGNPs 중 10 μ M (CUR)로 조정하였다. CGNPs는 표면 플라즈마 공명 때문에 533 nm에서 강한 흡수를 나타내었다(도 2A). CUR은 426 nm에서 최대 흡수를 나타내었다. CGNPs는 426 nm 근처 지역에서 눈에 띄는 흡수가 관찰되지 않았다. 그러나, CUR 및 CGNPs의 혼합용액은 426 nm와 533 nm 파장 모두에서 흡수를 나타내었다. CUR 및 CGNPs의 초음파 파쇄 후, 426 nm에서 최대 흡수는 GNP 표면 상에서 CD/CUR 포접 복합체의 형성 때문에 감소하였다. 이러한 복합 패턴은 FTIR 분광학으로 추가 확인하였다(도 2B). CUR은 1605 cm^{-1} (벤젠 고리 스트레칭), 1502 cm^{-1} (C=O 및 C=C 결합), 1435 cm^{-1} (C-H 밴딩(bending)), 1285 cm^{-1} (C-O 스트레칭), 및 1026 cm^{-1} (C-O-C 스트레칭)에서 흡수 밴드를 나타내었다. CGNPs는 3430 cm^{-1} (O-H 스트레칭), 2920 cm^{-1} (C-H 스트레칭), 1632 cm^{-1} (O-H 밴딩) 및 1041 cm^{-1} (C-O-C 스트레칭)에서 흡수 밴드를 나타내었다. CUR-CGNPs의 경우에, CUR 피크 및 CGNPs에 속하는 모든 피크가 관찰되었다. 이러한 결과는 CD/CUR 포접 복합체가 GNP 표면 상에 성공적으로 형성되었다는 것을 가리킨다.

CGNPs 및 CUR-CGNPs의 형태학 및 크기 분배는 TEM 및 DLS로 관찰하였다. TEM 이미지는 CGNPs 및 CUR-CGNPs가 구형이고, 잘 분산되어 있고, 20-40 nm로 균일한 것을 보여주었다(도 3A, B). DLS 측정은 정량적으로 CGNPs 및 CUR-CGNPs의 크기 분포를 확인하였고, 그 결과 각각 28.7 nm 및 36.3 nm의 평균 크기를 갖는 것을 확인하였다(도 3C). TEM 및 DLS 측정 결과는 CUR의 캡슐화 후, CGNPs들 간에 어떠한 응집도 발생하지 않았음을 가리킨다.

2-2. BMMs의 생존성에 대한 CUR 및 CGNPs의 효과

BMMs에 대한 다양한 농도의 CUR 및 CGNPs에서의 세포 생존성은 다양한 인큐베이션 시간 간격에서 CCK 검정으로 확인하였다(도 4). CUR은 1, 2 및 5일 후 5 μ M의 농도까지 세포 독성을 나타내지 않았다. CGNPs는 다양한 농도(1, 5, 10 및 20 μ M)에서 세포독성을 나타내지 않았으나, CUR의 세포독성은 10 μ M에서 확인되었다. 이러한 결과는 CGNPs가 세포학적으로 양립가능한 전달 비히클로 유용하게 사용될 수 있음을 의미한다.

2-3. CUR 및 CGNPs의 BMM에 대한 유전자 독성

BMMs에 대한 다양한 농도의 CUR 및 CGNPs의 유전자 독성은 24시간째 comet 검정으로 확인하였다(도 5). 도 5A에

서 확인할 수 있듯이, CUR은 용량 의존적으로 BMM에 대한 약한 유전자 독성 효과를 나타내었다. 이는 comet tail 중 DNA의 함량으로 확인하였다. 한편, CGNPs는 다양한 농도에서 세포독성을 나타내지 않았다(도 5B). 도 5C는 다양한 농도의 CUR 및 CGNPs로 처리한 BMMs의 comet 이미지를 나타낸다. DNA 단편은 CUR의 농도가 증가함에 따라 증가하였고, 반면 CGNPs는 농도가 증가하여도 눈에 띄는 변화가 관찰되지 않았다.

[0101] 2-4. CLSM 분석에 의한 Rho-CGNPs의 세포내 흡수

[0102] BMMs 중 GNP의 존재를 확인하기 위하여, 공지된 방법으로 rhodamine B labeled CD를 제조하였고, 이를 Au-S 결합을 통하여 GNP의 표면에 컨쥬게이트화하였다. rhodamine B의 형광은 GNP의 표면에서 사라졌다. 그러나, rhodamine B가 세포내 글루타티온(GSH)에 의해 분해되면서 소광물질로부터 자유로워짐에 따라 그 자체가 발광하였다. 도 6은 Rho-CGNPs 및 cell tracker를 사용하여 세포내 흡수를 측정한 결과를 나타낸다. 이러한 측정은 CLSM으로 확인하였다. Rho-CGNPs와 함께 인큐베이션 한 후, rhodamine B의 형광이 시간이 지날수록 증가하는 것이 발견되었다. 광학 이미지에 나타나듯이 Rho-CGNPs가 BMM을 효과적으로 관통하는 것이 발견되었다.

[0104] 2-5. CUR, CGNPs, CUR-CGNPs의 RANKL-유도성 파골세포(OC) 형성 저해

[0105] 파골세포의 분화는 BMM을 파골세포의 분화를 유도하는 파골성 사이토카인 RANKL (100 ng/ml) 및 M-CSF (monocyte survival factor) (30 ng/ml)를 함유한 배지에서 인큐베이션하여 시험하였다. 이는 CUR, CGNPs 및 CUR-CGNPs의 존재/부재(대조군) 하에 수행하였다. 파골세포 분화에 대한 CUR 및 CGNPs의 효과를 시험하기 앞서, 이들 시험 물질의 BMMs에 대한 세포독성은 CCK-8 키트(도 4)에 의해 시험하였다. CUR은 BMM에 대하여 10 μ M의 농도에서 약간의 세포독성이 있는 것이 나타났다. 그러므로, CUR은 세포독성이 없는 조건에서 파골세포 형성 저해 효과를 비교하기 위하여 5 μ M 이하의 농도로 사용하였다. 파골세포 분화에 대한 시험 물질의 효과는 TRAP 염색으로 확인하였다(도 7). 세포는 파골세포 마커 TRAP (보라색 세포)로 염색하였고, 광학 현미경으로 촬영하였고, TRAP⁺ MNCs 수를 계산하였다. 도 7A, B에 나타나듯이, 5일차에 TRAP⁺ MNCs의 가장 많은 수는 파골세포 유도 배지 단독인 대조군에서 관찰되었다. 반면, CUR 및 CGNPs에 비하여 염색 TRAP⁺ MNCs는 용량의존적으로 감소하는 것이 가시적으로 관찰되었다. CUR은 0.5, 1 및 5 μ M의 농도에서 각각 TRAP⁺ MNCs의 형성을 197.6 $\pm$ 11.2 (대조군)에서 144.3 $\pm$ 10.7, 116.3 $\pm$ 11.8 및 44.3 $\pm$ 6.1 (73.0%, 58.8% 및 22.4%)까지 저해하였다. 또한, CGNPs는 1, 5, 10 및 20 μ M의 농도에서 각각 TRAP⁺ MNCs의 형성을 198.3 $\pm$ 6.5 (대조군)에서 163.6 $\pm$ 11.1, 71.6 $\pm$ 11.0, 26.0 $\pm$ 3.6 및 8.0 $\pm$ 2.6까지 저해하였다(도 7C). 고용량의 CUR 및 CGNPs는 BMM의 파골세포 분화에 대하여 높은 저해 효과를 나타내었다.

[0106] CUR 및 CGNPs와 비교하여 CUR-CGNPs의 효과를 검증하기 위하여, BMM을 CUR (1 및 5 μ M), CGNPs (5 및 10 μ M), 및 CUR-CGNPs (1/5 및 1/10 μ M)의 존재 또는 부재 하에 배양하였다. BMMs은 시험 물질 부재 하에 TRAP⁺ MNCs로 효과적으로 분화하였고(201 $\pm$ 12.0), 반면 TRAP⁺ MNCs의 형성은 CUR, CGNPs 및 CUR-CGNPs의 존재 하에 용량의존적으로 감소하였다(도 8A). 1 μ M의 CUR, 5 μ M의 CUR, 5 μ M의 CGNPs, 10 μ M의 CGNPs, 1/5 μ M의 CUR-CGNPs, 및 1/10 μ M CUR-CGNPs로 처리한 TRAP⁺ MNCs의 평균 계산값은 각각 111.3 $\pm$ 10.6 (55.2%), 41.0 $\pm$ 13.1 (20.3%), 78.6 $\pm$ 10.2 (39%), 30.0 $\pm$ 4.6 (14.8%), 42.3 $\pm$ 9.4 (20.9%) 및 9.6 $\pm$ 3.5 (4.8%)이었다(도 8B). 게다가, 1/10 μ M CUR-CGNPs는 TRAP⁺ MNCs의 가장 많은 감소를 나타내었다. 이는 CGNP가 효과적으로 CUR을 전달하고 BMM의 파골세포 분화를 저해한다는 것을 의미한다. 또한, 이러한 복합은 파골세포의 형성 저해에 시너지 효과를 나타낸다.

[0108] 2-6. CUR, CGNPs 및 CUR-CGNPs의 액틴 고리 형성 저해

[0109] RANKL은 파골세포를 성숙시키는 것이 주된 기능이기 때문에 골 재흡수를 가속화하는 것으로 알려져있다. 파골세포는 골로 재흡수되도록 하는 독특한 세포골격 구조인 액틴 고리로 작용한다. CUR, CGNPs, 및 CUR-CGNPs의 존재 혹은 부재 하에 파골세포 유도 배지 중 인큐베이션된 BMMs의 액틴 고리 형성을 면역형광 분석법으로 확인하였다. RANKL은 액틴 고리 형성을 자극하는 반면, 시험 물질(CUR, CGNPs, 및 CUR-CGNPs)은 액틴 고리 형성을 감소시키는 것이 확인되었다(도 9). 또한, CUR-CGNPs는 다른 군에 비하여 액틴 고리 형성이 거의 없는 것으

로 나타났다. 이러한 결과는, CUR-CGNPs가 골다공증 치료제로서 유용하게 사용될 수 있음을 의미한다.

[0111] 2-7. CUR, CGNPs, CUR-CGNPs의 파골성 유전자 및 전자 조절자의 하향 조절

[0112] RANKL 처리 BMMs 중 파골세포 특이성 유전자의 발현에 대한 시험 물질들의 효과를 조사하기 위하여, c-Fos, NFATc1, TRAP 및 OSCAR의 mRNA 발현을 실시간 PCR로 확인하였다(도 10). RANKL 존재 또는 부재 대조군을 양성 및 음성 대조군으로 각각 사용하였다. 결과는 GAPDH 발현으로 정규화하였다. c-Fos 및 NFATc1은 RANKL 자극 후 상향 조절되었고, 이는 파골세포 분화에 연관된 가장 중요한 파골세포 특이적 전사 인자이다. RANKL 존재 하 BMMs의 자극은 c-Fos 및 NFATc1 모두의 높은 mRNA 발현을 유도하였다. 시험 물질 처리 후, 이들 마커의 발현 수준은 CUR, CGNP, 및 CUR-CGNP의 순서로 현저히 감소하였다(도 10A 및 B). 이들 시험 물질 중에, CUR-CGNPs는 c-Fos 및 NFATc1의 가장 낮은 mRNA 발현 수준을 나타내었다. 모든 시험 물질들은 c-Fos 및 NFATc1에 의해 강화되는 TRAP 및 OSCAR 유전자의 유도를 현저하게 저해하였다(도 10C, D). TRAP 및 OSCAR의 mRNA 발현은 CUR-CGNPs의 존재 하에 현저하게 감소되었고, 이러한 결과는 TRAP⁺ MNCs 생성에 대한 이전의 연구와 연관관계가 있다. 전반적으로, 모든 시험 물질은 CUR, CGNP, 및 CUR-CGNPs의 순서로 파골성 유전자(TRAP 및 OSCAR)를 하향 조절시켰다. 특히, CUR-CGNPs는 모든 마커들에 대하여 가장 낮은 mRNA 발현을 보여주었다.

[0114] 2-8. RANKL 유도성 신호 경로에 대한 CGNPs 및 CUR의 효과

[0115] 파골세포 분화에 대한 CUR-GNPs의 저해효과를 조사하기 위하여 RANKL-유도성 신호경로의 생리적 메커니즘을 웨스턴 블롯으로 확인하였다(도 11). CGNPs 및 CUR-CGNPs의 존재 또는 부재하에 RANKL로 BMMs를 자극하였다. 파골세포 분화 과정을 조절하는 PKs (p38, ERK, 및 JNK)의 활성/불활성 수준은 정해진 시점에서 측정하였다. 전체 단백질 발현 수준은 각 분자의 활성형인 특이적 항량 항체로 확인하였다. 결과는 CGNPs가 30분 후 p38 인산화 수준 증가가 관찰되었고, 다만 CUR은 p38 활성화를 감소시켰다. 그러므로 CUR-CGNPs는 RANKL 단독과의 비교할 때 p38 활성화에 실질적인 향상을 전혀 나타내지 않았다. 이 결과는 p38 신호 경로가 CGNP로 상향 조절되고, CUR에 의해 하향 조절되는 것을 의미한다. CUR-CGNPs는 CUR 및 CGNP 단독보다, p-ERK, p-JNK, 및 p-I κ B α 의 발현 수준을 상당히 감소시켰다. 이는 CGNPs 및 CUR이 BMM과의 상호작용으로 상기 신호 경로를 저해하는 것을 의미한다.

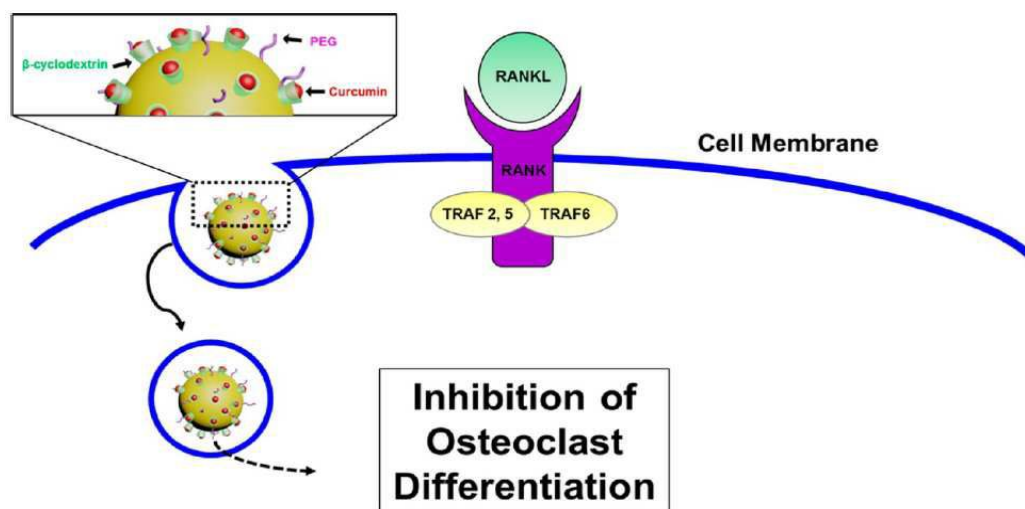
[0116] 또한, 세포 죽음의 저해에 중요한 단백질인, Akt, 즉 또다른 RANKL-유도성 단백질의 단백질 발현 수준을 확인하였다. p-Akt의 발현 수준은 CGNPs의 존재 하에 약간 증가하였고, CUR의 존재하에 감소하였다. 이는 Akt 신호 경로가 CGNP로 상향 조절되고, CUR로 하향 조절되는 것을 의미한다.

[0118] 2-9. CUR, CGNPs, CUR-CGNPs의 인 비보 골 손실 예방 효과

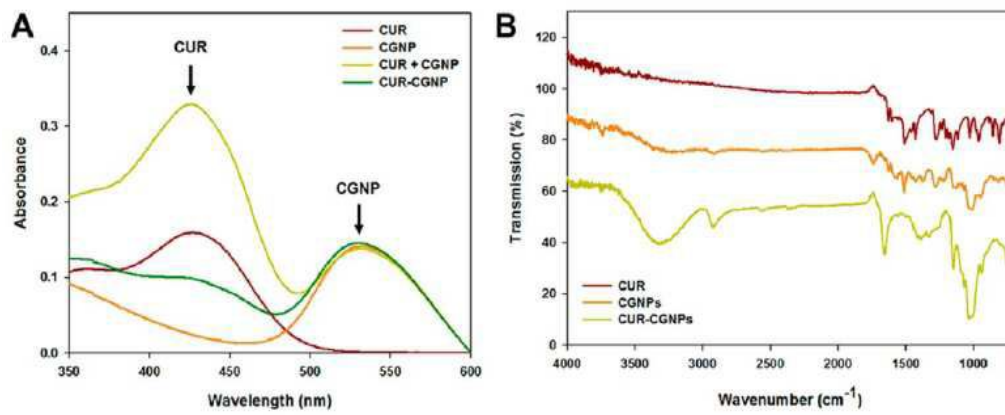
[0119] 모든 시험 물질이 인 비트로 상에서 파골세포의 분화를 저해하였기 때문에, CGNP (용량: 500 μ M), CUR (용량: 50 μ M) 및 CUR-CGNP (용량: 50/500 μ M)의 OVX-유도성 골손실 예방에 대한 효과를 조사하였다. 모든 실험 기간 동안, 모든 실험 군에서 유의한 체중 변화는 관찰되지 않았다(도 17). 모든 군은 soft X-ray (방사선 분석)으로 분석하였다. 모든 실험군의 골밀도는 9주 동안 OVX 군과 비교하여 개선된 것이 관찰되었다(도 12A). 또한, 시험 물질로 처리한 모든 실험군은 상대적인 골 밀도에서 통계적으로 상당한 증가를 보였다(도 12B). 도 13A는 대퇴부 골의 헤마톡실린(hematoxylin) 및 에오신(eosin) 염색 이미지를 보여준다. 모든 난소절제군은 sham 군에 비하여 높은 양의 지방조직이 있는 것이 관찰되었다. 이들 중에서, 해면골(trabecular bone)은 CGNPs 및 CUR-CGNPs 군에서 훨씬 우세하였다. 또한, 대퇴골 조직의 상대적 해면골 크기는 모든 실험군이 비처리 OVX 군에 비하여 높은 것을 확인하였다. CUR-CGNPs는 모든 실험군 중에서 가장 높은 해면골 크기를 가졌다(도 13B). 골밀도를 정량화하기 위하여 μ CT 분석을 수행하였다. 골 부피/조직 부피(BV/TV), 골 미네랄 밀도(BMD), BV, 해면골 수(Tb.N), 해면골 두께(Tb.Th) 및 해면골 분리(Tb.Sp)의 구조적 파라미터는 도 14 및 도 19에 도시되어 있다. 도 14A에 나타나있듯이, 해면골 두께는 OVX 후 상당히 감소하였다. 시험 물질의 처리로, 대퇴부 골밀도는 OVX 군과 비교하여 모든 군에서 상당히 증가하였다. 골 두께의 상당한 증가는 CGNPs 및 CUR-CGNPs로 처리한 골에서 확인되었다. OVX 군과 비교하여, CUR, CGNPs, 및 CUR-CGNP 군은 각각 OVX 보다 0.004%, 1.417% 및 1.609% 더 높았다(도 14B). 또한, CGNPs 및 CUR-CGNPs의 BMD 값은 OVX 군 보다 훨씬 높았다(도 14C). 또한, CUR-CGNPs는 다른 군과 비교하여 가장 향상된 골밀도를 나타내었고, sham과 유사한 값을 보여주었다(도 19).

도면

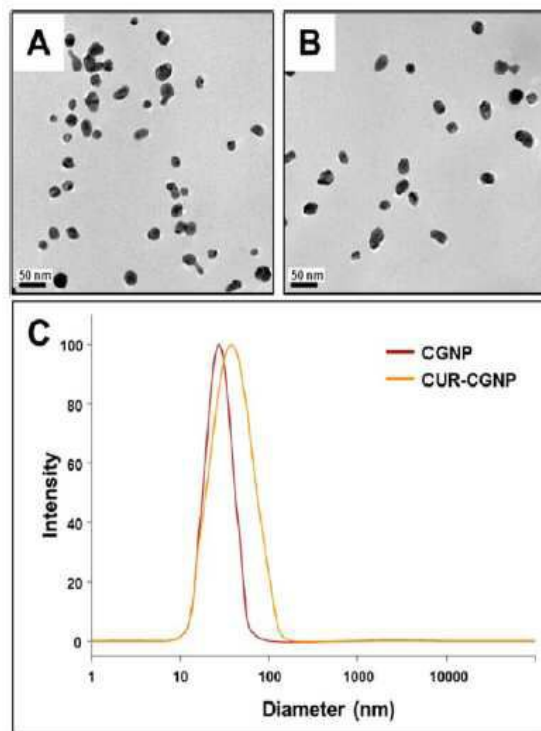
도면1



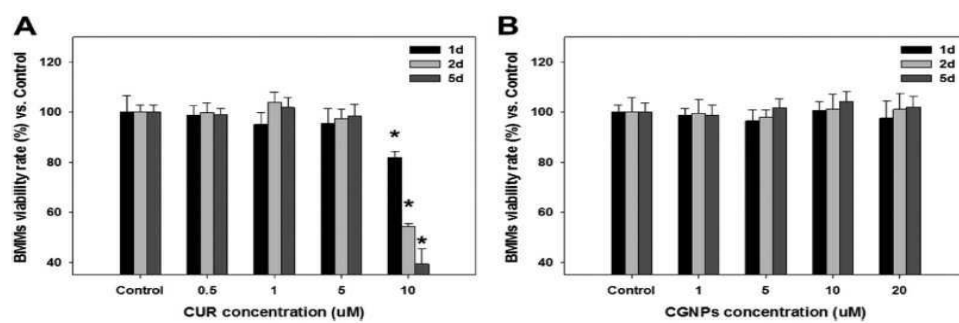
도면2



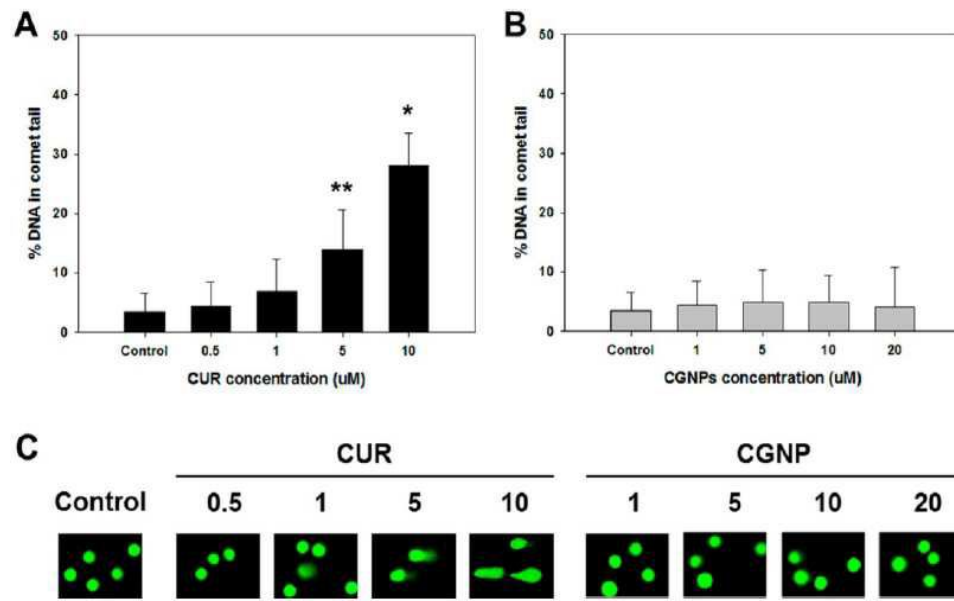
도면3



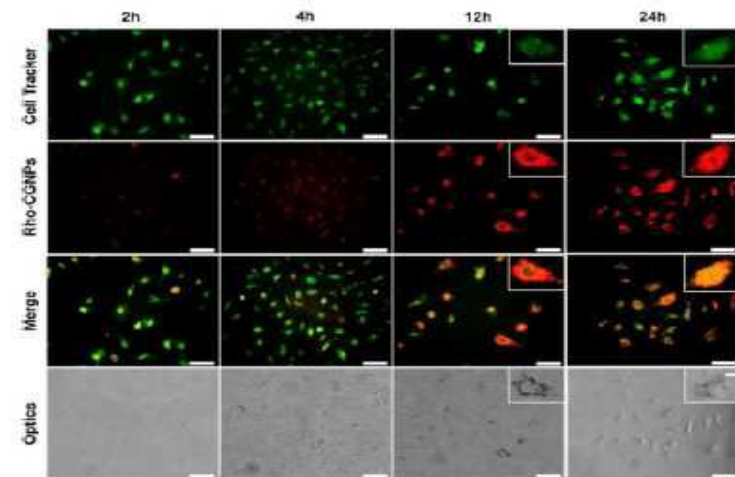
도면4



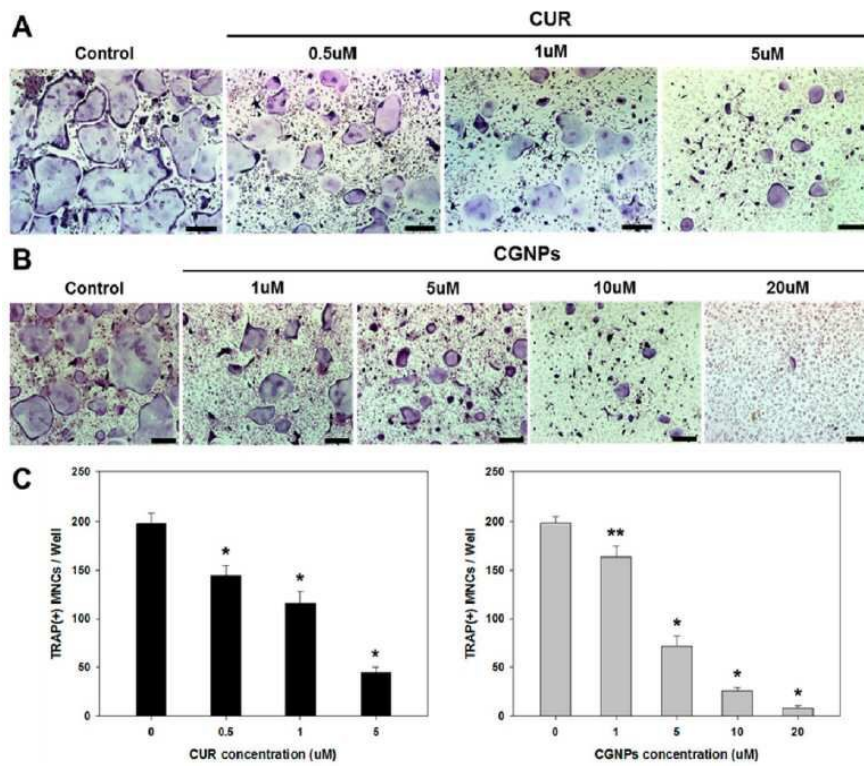
도면5



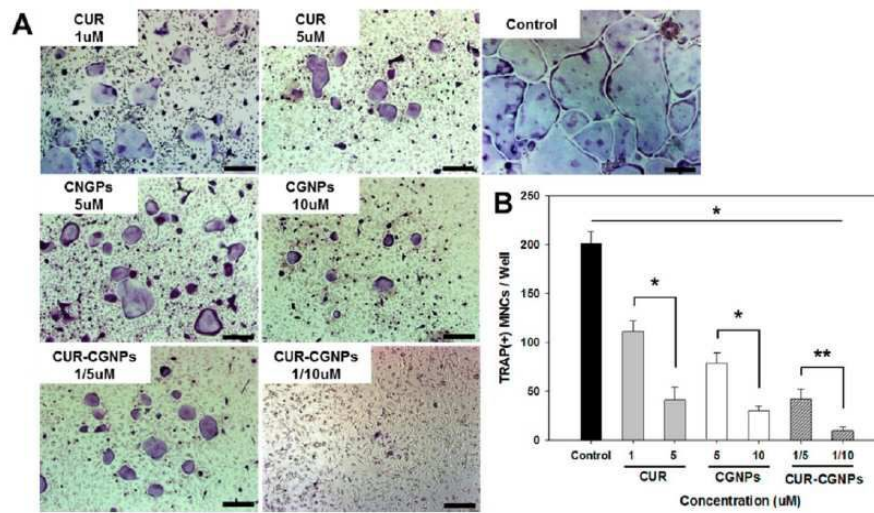
도면6



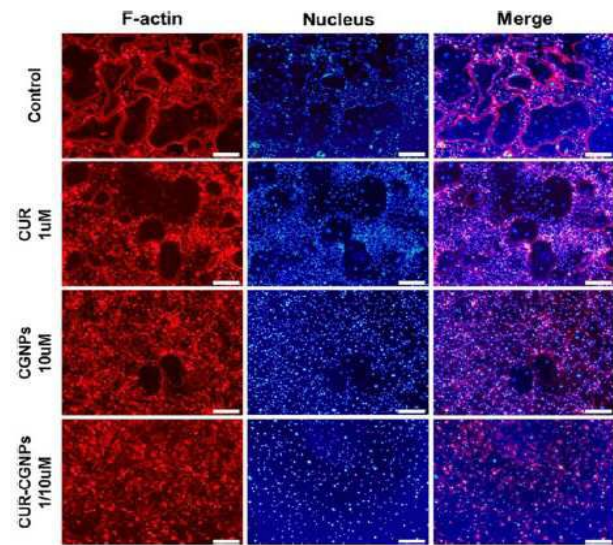
도면7



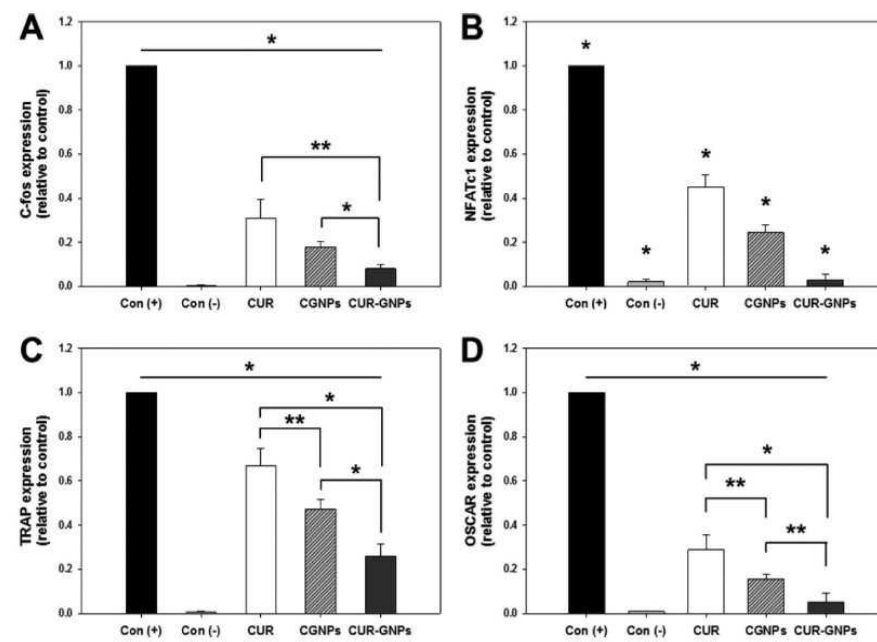
도면8



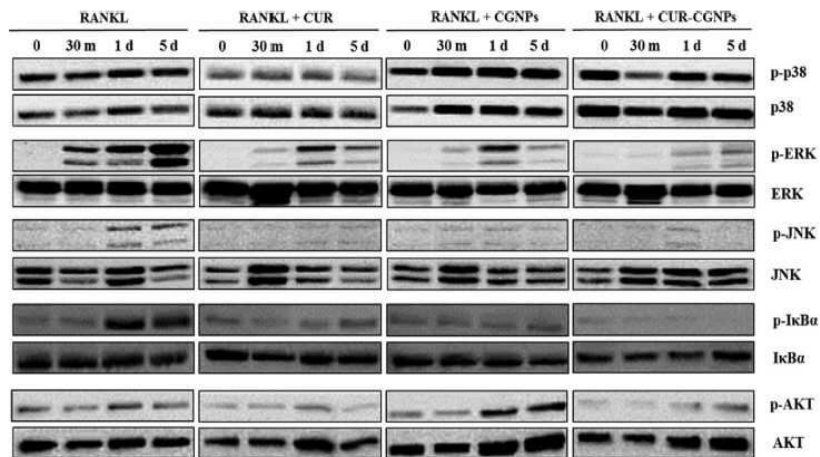
도면9



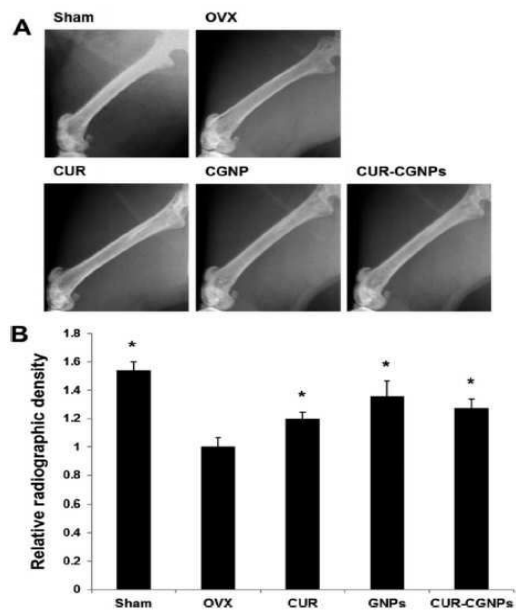
도면10



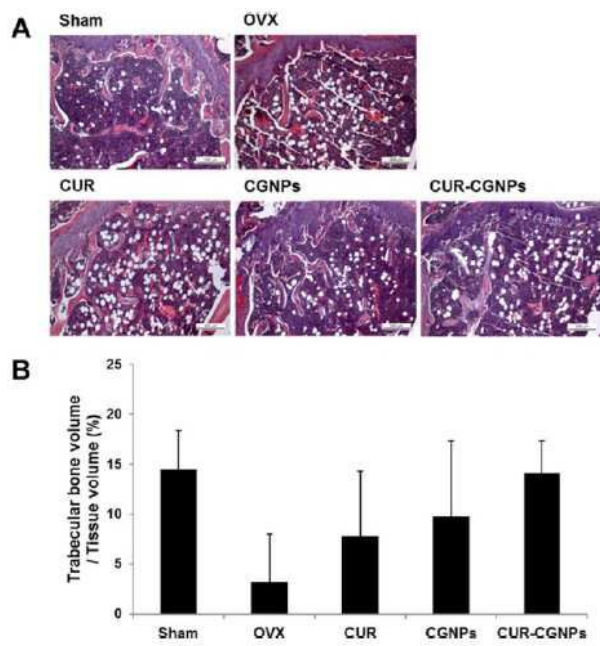
도면11



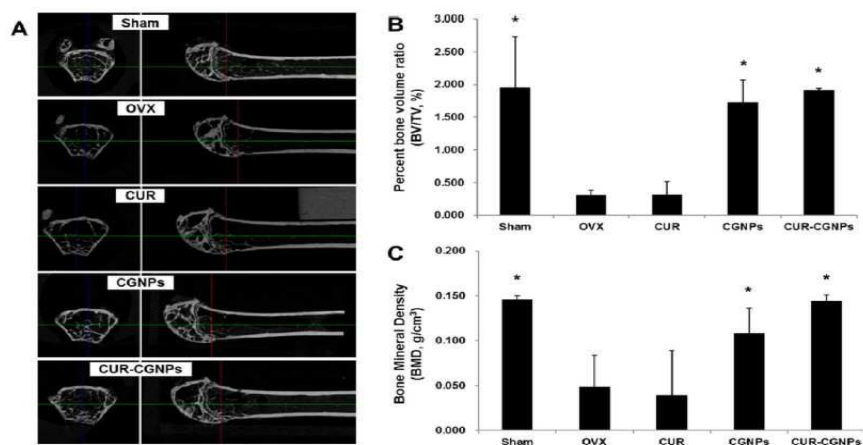
도면12



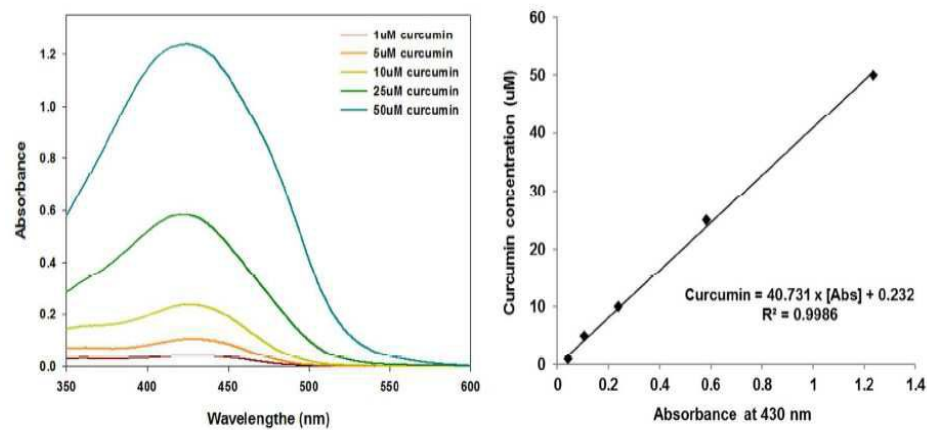
도면13



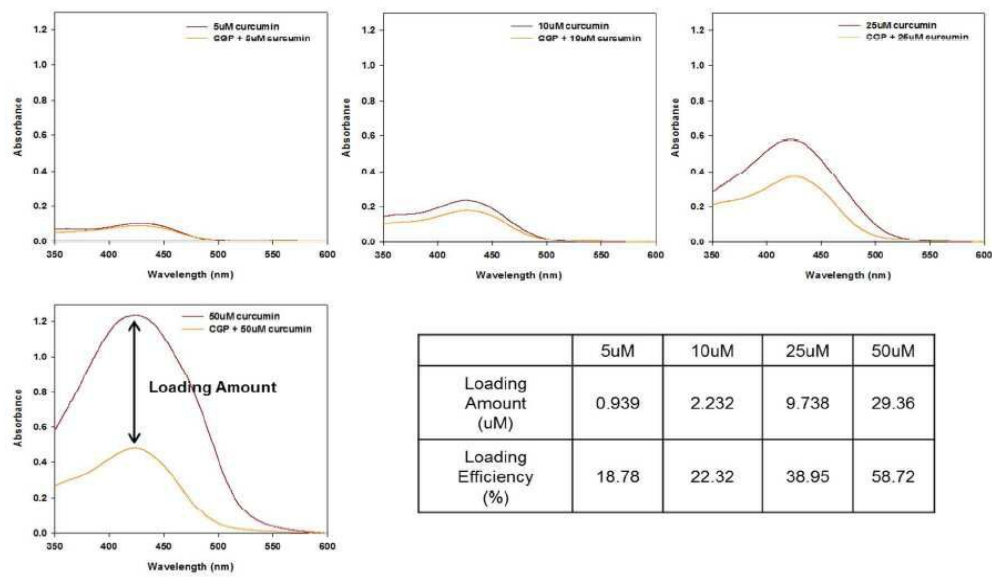
도면14



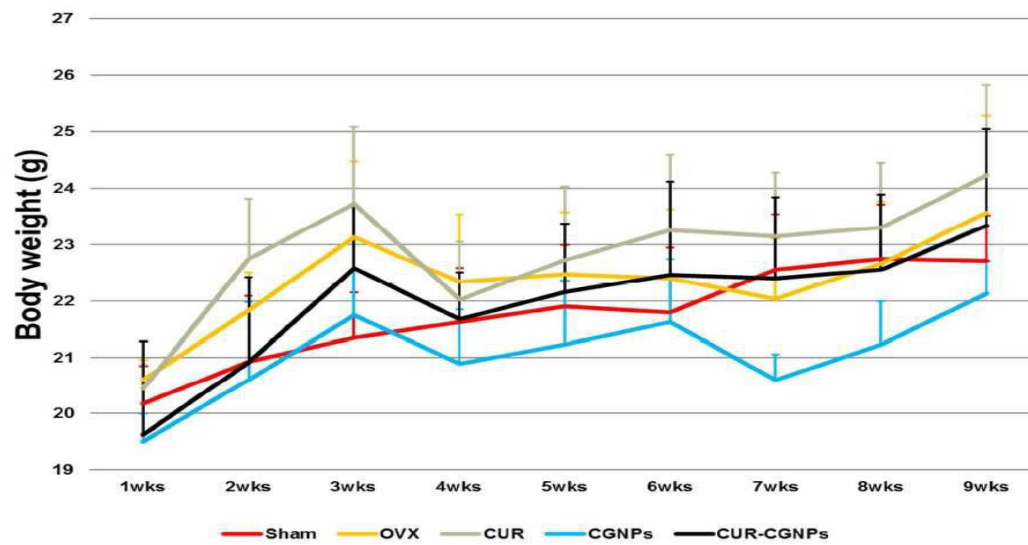
도면15



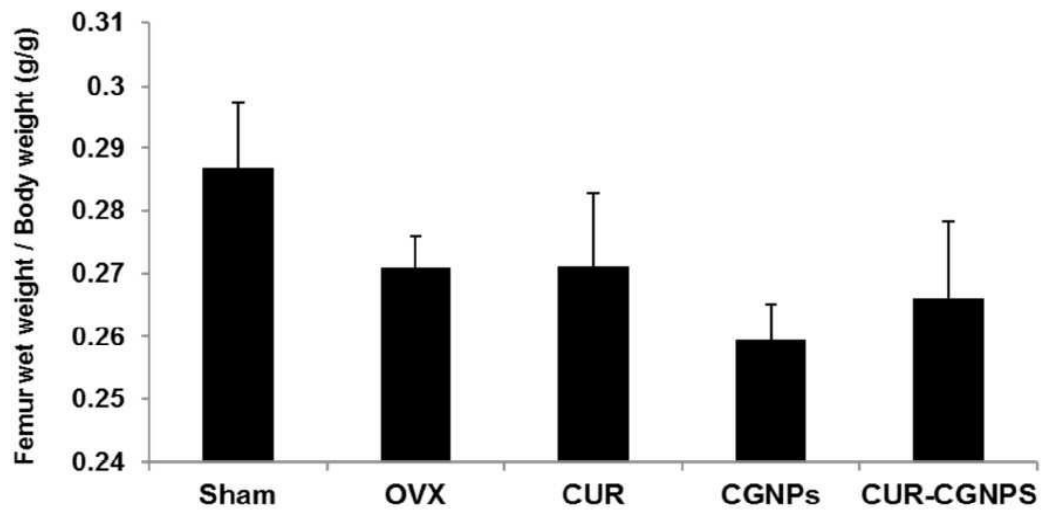
도면16



도면17



도면18



도면19

