



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년11월08일

(11) 등록번호 10-2323939

(24) 등록일자 2021년11월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/14 (2006.01) A61K 31/352 (2006.01)

A61K 33/04 (2006.01) A61K 47/69 (2017.01)

A61K 9/51 (2006.01) A61P 19/10 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/14 (2013.01)

A61K 31/352 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0118125

(22) 출원일자 2020년09월15일

심사청구일자 2020년09월15일

(56) 선행기술조사문헌

Nasser Ahmad, et al., RSC Advances, 2016, 6, 97613-97628. (Available online: 2016.09.21.)*

Yujie Qi, et al., Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2020, 602, 125058. (Available online: 2020.05.23.)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

이상수

서울특별시 양천구 목동중앙로7길 32, 105동 901호(목동, 이편한세상)

아쉬시 란잔 샤르마

강원도 춘천시 성심로 67

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김남혁

전체 청구항 수 : 총 2 항

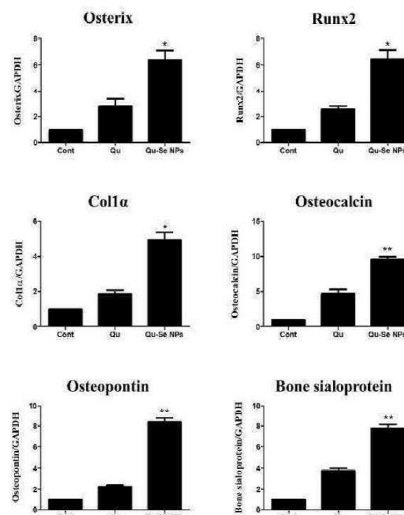
심사관 : 신영신

(54) 발명의 명칭 골다공증 치료용 조성물

(57) 요약

퀘세틴(Qu)의 유효 용량을 감소시키기 위해 퀘세틴(Qu)로 캡핑된 셀레늄(Se) 나노 입자를 포함하는 것을 특징으로 하는 골다공증 치료용 조성물이 제공된다.

대표도 - 도17



(52) CPC특허분류

A61K 33/04 (2013.01)

A61K 47/6923 (2017.08)

A61K 47/6929 (2017.08)

A61K 9/51 (2013.01)

A61P 19/10 (2018.01)

(72) 발명자

가리마 샤르마

강원도 춘천시 성심로 67

이연희

경기도 이천시 설성면 설성로 71번길 18

신대용

강원도 춘천시 남춘천새길 42, 507-301

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

조골세포에 퀘세틴(Qu)으로 캡핑된 셀레늄(Se) 나노 입자를 처리하는 단계를 포함하고,

상기 나노 입자는 평균 직경이 20 내지 50nm의 구형이고, UV-VIS 흡수 스펙트럼이 200 내지 350nm이며,

시험관 내(in vitro)에서 상기 조골세포의 ALP, Osterix, Colla, Runx2, Bone Sialoprotein, Osteopontin 및 Osteocalcin의 발현을 촉진하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 퀘세틴(Qu)으로 캡핑된 셀레늄(Se) 나노 입자는 파골세포 유도 물질의 mRNA 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 골다공증 치료용 조성물에 관한 것으로, 골형성을 촉진하고 파골세포 형성을 억제하는 골다공증 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 전 세계 인구의 고령화로 인해 골격 장애는 성별에 관계없이 중년 및 노인의 건강에 심각한 영향을 미치는 세계적인 건강 문제가 되고 있으며, 이는 정부의 재정 및 의료 시스템에 실질적인 부담을 주고 있다.

[0003] 골다공증은 남성과 여성 모두의 건강에 영향을 미치는 주요 골 장애 중 하나이지만 폐경 후 여성에서 더 흔하다. 골다공증은 골밀도가 낮고 미세 구조가 약하여 골절 위험을 증가시키는 전신 골격 질환이다. 골 형성과 골 흡수의 불균형은 골다공증을 정의하는 병태 생리학적 상태이며 골 흡수를 향상시켜 뼈의 취약성과 골절을 증가시킨다. 조골 세포 및 파골 세포는 각각 골 형성 및 골 흡수에 책임이 있기 때문에, 현재 골다공증 요법의 연구는 그들의 균형, 분화 및 조절에 초점을 두고 있다 [Sims SM, et al. 2013; Zhao H, et al. 2018].

[0004] 골다공증의 주요 치료법은 항 흡수제 (예: 선택적 에스트로겐 수용체 조절제, SERM, selective estrogen receptor modulators), 비스포스포네이트 (BPs, bisphosphonates) 및 항 -RANKL 항체, 단백동화제 (또는 부갑상선 호르몬 (PTH, parathyroid hormone)와 같은 뼈형성제) 및 이들의 조합이다.

[0005] 에스트로겐 결핍은 폐경기 여성의 골다공증 발병에 대한 잠재적 위험 요소이다. SERM은 조골 세포 전구체 세포에서 Wnt / β - 카테닌 신호 전달을 자극함으로써 조골 세포 증식 및 분화를 증가시킬 수 있다. 이전 연구에 따르면 혈전 색전증, 폐색전증 및 치명적인 뇌졸중과 같은 부작용이 SERM과 관련이 있다고 보고되었다.

[0006] BP는 가장 일반적인 약물이며, 파골 세포 기능을 억제하여 뼈 재 흡수를 억제한다. BP의 일반적인 부작용은 위

장관의 염증이다. 더욱이, BP의 장기간 사용은 골 흡수뿐만 아니라 석회화를 감소시킴으로써 골수 화증의 잠재적 위험이 있다.

- [0007] PTH는 부갑상선에 의해 분비되며 혈청 칼슘 및 인산염 수준을 조정한다. 또한 조골 세포에서 RANKL의 발현을 증가시킨다. 따라서 PTH는 파골 세포 분화를 간접적으로 증가시킬 수 있기 때문에 뼈 재 형성에 매우 중요하다. 그럼에도 불구하고, 고용량의 PTH는 골육종의 위험을 증가시키고 고칼슘 혈증, 근육 경련, 메스꺼움 및 두통과 같은 다른 일반적인 부작용을 유발한다. 수많은 임상 시험에 의해 입증된 바와 같이, 대부분의 골다공증 요법이 도움이 되지만, 장기 투여하는 동안 심각한 부작용이 있다. 따라서 많은 골다공증 환자에게 부작용이 적은 새로운 치료법이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 따라서, 본 발명은 상기한 실정을 고려하여 종래 기술들에서 야기되는 여러 가지 결점 및 문제점들을 해결하고자 하는 것으로서, 세포에 의한 약물 흡수를 촉진시켜 저용량에서도 약물의 생물학적 활성을 증가시키고 부작용을 감소시킬 수 있는 퀘세틴-셀레늄 나노입자 및 이를 포함하는 골다공증 치료용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0009] 또한, 퀘세틴(Qu)의 유효 용량을 감소시킬 수 있으면서도, 골 형성 촉진 및 파골세포형성을 억제할 수 있는 퀘세틴-셀레늄 나노입자 및 이를 포함하는 골다공증 치료용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0010] 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 과제들은 이상에서 언급된 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다

과제의 해결 수단

- [0011] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 퀘세틴(Qu)의 유효 용량을 감소시키기 위해 퀘세틴(Qu)로 캡핑된 셀레늄(Se) 나노 입자를 포함하는 것을 특징으로 하는 골다공증 치료용 조성물이 제공된다.
- [0012] 본 발명의 일 실시예에 따라, 상기 퀘세틴(Qu)로 캡핑된 셀레늄(Se) 나노 입자는 조골세포의 골 형성을 촉진하는 것일 수 있다.
- [0013] 본 발명의 일 실시예에 따라, 상기 퀘세틴(Qu)로 캡핑된 셀레늄(Se) 나노 입자는 파골세포 유도 물질의 mRNA 발현을 억제하는 것일 수 있다.
- [0014] 본 발명의 일 실시예에 따라, 상기 퀘세틴(Qu)로 캡핑된 셀레늄(Se) 나노 입자는 파골세포 유도 물질의 mRNA 발현을 억제하는 것일 수 있다.
- [0015] 본 발명의 일 실시예에 따라, 상기 퀘세틴(Qu)로 캡핑된 셀레늄(Se) 나노 입자는 퀘세틴(Qu)의 방출 속도를 감소시키는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0016] 본 발명은 퀘세틴(Qu)으로 표면이 캡핑된 셀레늄(Se) 나노입자를 포함함으로써, 낮은 유효 용량으로도 조골 세포에서 우수한 세포 생존력 및 무해한 세포독성을 가질 수 있는 이점이 있다.
- [0017] 또한, 본 발명의 퀘세틴-셀레늄 나노입자는 낮은 유효 용량으로도 조골 세포에서 골 형성을 촉진할 수 있으며, 파골세포의 형성을 억제할 수 있는 이점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 본 발명에 적용할 수 있는 퀘세틴(Qu)의 구조식이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 Qu 캡핑된 셀레늄 나노 입자 (Qu-Se NP)의 합성 개략도이다.
- 도 3은 Qu로 캡핑하지 않은 Se NP이다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따라 합성된 Qu-Se NP의 사진이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 Qu-Se NP의 UV-Vis 분광 광도계 분석이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 Qu-Se NP의 ICP 분석을 사용한 Se 이온 농도의 AAS (Atomic Absorption Spectroscopy) 그래프이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 Qu-Se NP의 DLS 측정에 의한 유체 역학적 유효 직경이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 Qu-Se NP의 200 nm의 스케일에서 TEM 이미지이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 Qu-Se NP의 DLS 분석을 이용한 제타 전위이다.

도 10은 Se, Qu 및 Qu-Se NP의 FTIR 스펙트럼 피크이다.

도 11은 72 시간까지 Qu-Se NP로부터 Qu 방출 농도를 나타내는 것이다.

도12 및 도13은 조골 세포에서의 Se, Qu 및 NP의 세포 생존력 및 세포 독성을 나타낸 것이다.

도 14 및 도 15는 조골 세포에서의 Se, Qu 및 NP의 ALP 활성을 나타낸 것이다.

도 16은 조골 세포에 의한 Qu 및 Qu-Se NP의 시간 의존적 세포 흡수를 나타낸 것이다.

도17 내지 도 19는 본 발명의 일 실시예에 따른 Qu-Se NP의 조골 세포에서 골 형성을 촉진하는 것을 나타낸 것이다.

도 20 및 도 21은 본 발명의 일 실시예에 따른 Qu-Se NP의 조골 세포에서 WNT 및 BMP 신호 전달 경로를 활성화하는 것을 나타낸 것이다.

도 22 및 도 23는 본 발명의 일 실시예에 따른 Qu-Se NP 항골 세포 형성 특성을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명하기로 한다. 이에 앞서, 본 명세서 및 특허청구범위에 사용된 용어 또는 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 아니되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다. 따라서, 본 명세서에 기재된 실시예에 기재된 구성은 본 발명의 가장 바람직한 일 실시예에 불과할 뿐이고 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원 시점에 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.
- [0020] 본 발명의 일 실시예에 따라, 퀘세틴(Qu)의 유효 용량을 감소시키기 위해 퀘세틴(Qu)로 캡핑된 셀레늄(Se) 나노입자를 포함하는 것을 특징으로 하는 골다공증 치료용 조성물이 제공된다.
- [0021] 한편, 이때, 본 발명의 명세서 전체에 걸쳐서 퀘세틴-셀레늄 나노입자는 퀘세틴(Qu)으로 캡핑된 셀레늄 나노입자, Qu-Se NPs으로 혼용하여 사용될 수 있다. 또한, 퀘세틴(Qu)은 케르세틴, Qu로 혼용되어 사용될 수 있고, 셀레늄은 셀레늄(Se), Se으로 나노입자는 NP, NPs, NPS, nanoparticles로 혼용되어 사용될 수 있다.
- [0022] 도 1은 본 발명에 적용할 수 있는 퀘세틴(Qu)의 구조식으로, 퀘세틴(Qu)은 3,3',4',5,7-펜타하이드록시플라본(3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone)으로, 양파, 오렌지, 블루 베리 및 사과에 주로 함유된 인기 있는 플라보노이드이다.
- [0023] 플라보노이드는 식물성 에스트로겐이며, 골다공증에 의한 골 손실에 대한 안전성 프로파일 및 호르몬 요법으로 종종 발생하는 부작용이 없기 때문에 골다공증에 대한 예방제로서 선호되고 있다. 또한, 플라보노이드는 자연적으로 발생하는 2 차 식물 대사 산물이며 허브, 과일 및 야채에서 발견되는 페놀 화합물 계열로, 인간의 건강을 유지하는데 중요한 역할을 하며 항산화제, 항종양제, 항염증제 및 골대사와 같은 기능을 한다.
- [0024] 한편, 퀘세틴(Qu)은 항암, 항 알레르기, 항염증제 활동, 항 당뇨병 및 뼈 건강을 포함하여 몇 가지 유익한 효과가 있으며, Qu는 종양의 성장을 감소시킴으로써 특정 악성 세포의 성장 및 뇌, 간, 결장 및 다른 조직에서의 악성 세포의 확산을 억제할 수 있다. 또한, Qu는 비만 세포의 분비를 억제하고 알레르기와 관련된 물질을 차단할 수 있고, 부분적으로 염증 신호 전달 경로 (핵 인자- κ B (NF- κ B) 신호 전달 경로)를 하향 조절하는 능력의 결과로서 항 염증 특성을 보유하고 염증성 효소를 억제함으로써 프로스타글란딘 및 류코트리엔과 같은 염증 매개체를 감소시킬 수 있다. 아울러, Qu는 RA에서 염증 반응을 조절한다. RA 활막 섬유 아세포에 의한 IL-1 β - 유도된 증식 및 매트릭스 메탈 로프 로테이나 제, 프로스타글란딘 E2 및 COX-2의 발현을 억제한다.

- [0025] 또한, Qu는 조골 세포 분화 과정 및 뼈 형성에 영향을 미치며, 환경 에스트로겐 및 식물성 에스트로겐은 MC3T3-E1 세포, 마우스 칼 바리 아(mouse calvaria osteoblast) 조골 세포 유사 세포주를 사용하여 조골 세포 분화에 영향을 미친다. 이들은 이들 세포에서 알칼리성 포스파타제 활성 (alkaline phosphatase activity, ALP)의 증가와 뼈의 광물화를 보여줄 수 있다. 또한, Qu는 파골 세포 생성을 억제할 수 있으며, Qu는 NF- κ B 및 AP-1의 억제에 의해 대퇴 장기 배양에서 파골 세포 형성 및 골 흡수를 길항한다. 이는 RAW 264.7 (마우스 단핵구/대식 세포 및 파골 세포 전구체 세포주) 세포에서 파골 세포 분화 마커 및 파골 세포 분화의 억제에 대한 Qu의 효과로 입증되면, Qu는 시험관 내에서 파골 세포 생성을 억제하고 생체 내에서 난소 절제된 마우스에서 골 손실을 방지하는 효과도 있다.
- [0026] 한편, 종래 기술들은 다양한 질병에 대한 치료제로서 Qu의 강력한 고유 효능 및 활성을 보고 하였으면, 전술한 장점에도 불구하고 치료에 대한 Qu의 적용은 낮은 생체 이용률 및 용해도로 인해 제한되었다. 또한 Qu는 글리코실화된 형태로 존재하며, 이 형태는 비-친유성으로 인해 물에 대한 용해도가 낮았으며, Qu의 생체 이용률이 낮기 때문에 체내로 쉽게 흡수되지 않는 문제가 있었다.
- [0027] 본 발명의 셀레늄 (Se)은 미량 영양소이며 뼈 건강에 필수적인 역할을 하며, 신체의 셀레노 단백질의 기능을 조절한다. 또한, 면역계의 기능을 최적의 수준으로 향상시키고 신체의 산화 균형을 유지하고 골 흡수를 감소시키는 필수 미량 영양소이다. 그러나 고용량에서 Se는 독성을 보일 수 있기 때문에, 셀레늄 (Se) 나노 입자를 사용하며, 셀레늄 나노입자는 유효량을 감소시킬 수 있고 생활 시스템에 대해 독성이 적고 안전하다. 셀레늄 나노입자는 또한, 항염증제 및 항산화 제에 대한 대안으로서 사용될 수 있으며, 글루타티온 퍼 옥시 다제 (glutathione peroxidase, GPx, selenoprotein enzyme)의 활성은 골다공증 환자에서 산화 스트레스에 의해 야기되는 손상으로부터 세포를 보호한다.
- [0028] 이에, 본 발명의 플라보노이드를 사용한 NP의 합성은 화학적 및 물리적 방법의 대안으로서 보다 경제적이고 안전하며 친환경적이다. 또한, 생물의 사용에 대해 독성이 적고 안전할 뿐만 아니라, Qu의 유효량을 줄이고 낮은 생체 이용률 및 생물학적 활성을 개선할 수 있는 Qu-Se NP를 제공할 수 있다.
- [0030] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상술하나 하기 실시예에 의해 본 발명이 제한되지 아니함은 자명하다.
- [0032] 시험예
- [0033] 1. 물질
- [0034] 나트륨 셀레나이트(Sodium selenite), 퀘세틴 (Quercetin, u), 아스코르브산, 3-(4,5-디메틸티아졸-2일)-2,5-디-페닐-테트라졸륨브로마이드(Ascorbic acid, 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide, T), 디메틸 술폭 시드 (Dimethyl sulfoxide, DMSO), 4 % 파라-포름 알데히드(Para-formaldehyde), 알리자린 레드 S 용액(Alizarin Red S solution), 세틸피리디늄클로라이드(Cetylpyridinium chloride), 시리우스 레드 염료(Sirius Red dye), Bouin's 유체(Bouin's fluid) 및 수산화 나트륨을 미국 시그마-알드리치 (Sigma-Aldrich)로부터 구입 하였다. 태아 소 혈청 (Fetal Bovine Serum, FBS), 페니실린-스트렙토 마이신 용액 (Penicillin-Streptomycin Solution, P / S) 및 DMEM은 미국 Gibco에서 구입했다. 인산 완충 식염수 (PBS), RIPA 완충액은 한국의 T & I에서 구입하였다. 단백질 분석 키트는 미국 Bio-Rad에서 구입하였다. 세포 독성 검출 키트 및 TRACP 및 ALP 이중 염색 키트는 일본 Takara Bio Inc.에서 구입하였다. CSPD 기판은 독일 로슈에서 구입하였다. 트리 졸 시약, 수퍼 스크립트 II 역전사 효소 및 Renilla luciferase thymidine kinase construct은 미국의 인비트로젠 (Invitrogen)에서 구입하였다. SYBR green qPCR MasterMix는 한국 Bioneer에서 구입하였다. β - 카테닌, p-smad 및 β - 액틴은 미국 산타 크루즈 바이오 테크놀로지에서 구입하였다. PVDF 막 및 화학 발광 시약은 미국 Millipore Corporation으로부터 구입하였다. Genefectine 시약은 한국 Genetrone에서 구입했다. Axin-2 및 BRE 리포터 구조물은 미국 Addgene에서 구입하였다. 이중-루시퍼 라제 분석 키트는 미국 프로 메가 (Promega)로부터 구입하였다.
- [0036] 2. Qu 캡핑된 Se NP (Qu-Se NP)의 제조
- [0037] Qu-Se NP의 합성을 위해, Qu를 사용한 Se 용액을 다음과 같이 제조하였다. 1 g의 나트륨 셀레나이트(sodium selenite)를 100 ml의 증류수에 몇 분 동안 교반하면서 용해시켰다. 그 후, 1 ml의 Qu 스톡(Qu stock, (80mg/ml in acetone)을 일정하게 교반하면서 첨가하였다. 이어서, 환원 반응에 아스코르브산(ascorbic acid)을 사용하였다. 400mM 아스코르브 산 3 ~ 5mL를 적가하고 어두운 조건에서 55 $^{\circ}$ C (200rpm)에서 24 시간 동안 배양하였다 (도 2 내지 도 4). 이로 인해 색이 노란색으로 변했다. 혼합물을 원심 분리하고 15 분 동안 15,000 rpm에서 침전시켰다. 펠렛을 증류수로 세척하고 밤새 동결 건조시켰다. 이어서 Qu-Se NP를 실온에서 저장하고 추가

분석에 사용하였다.

- [0039] 3. 자외선-가시 광선 (UV-Vis) 분광 분석
- [0040] Qu이 없는 100 mg의 나트륨 셀레나이트가 10 분 동안 증류수에 용해되어 몇 분 동안 교반되었다. 이어서, 용액이 진한 적색으로 변할 때 500 μ l의 400 mM 아스코르브산을 적가하고, 어두운 조건에서 55 $^{\circ}$ C (200 rpm)에서 24 시간 동안 인큐베이션 하였다. 이 용액은 UV-Vis 분광 분석에 사용되었다. 용액 내 Se 이온의 존재는 UV-Vis 분광법(SpectraMax M2, Molecular Devices, USA)을 사용해 검출되었으며 광학 흡광도 피크로 확인되었다. NPs의 크기가 줄어들수록 밴드갭은 증가한다. 따라서 광학 흡광도는 벌크 입자의 광학 흡광도에 비해 증가한다. 합성된 Se NP의 광학적 거동을 연구하기 위해 200nm에서 360nm 사이의 분해능 1nm에서 작동하는 상온에서 UV 가시 분광 측정(SoftMax Pro 5 소프트웨어, 미국 분자 소자)을 통해 2분마다 샘플의 지혈액을 주기적으로 분석하였다.
- [0042] 4. 유도 결합 플라즈마 광 방출 분광법(ICP-OES)
- [0043] Qu이 없는 100 mg의 나트륨 셀레나이트를 10 분 동안 증류수에 교반하면서 몇 분 동안 용해시켰다. 그 후, 500 μ l의 400 mM 아스코르브 산을 첨가하여 50 μ l를 용액으로 나누어 각 샘플을 얻었다. 용액을 모든 단계 동안 어두운 조건에서 55 $^{\circ}$ C (200 rpm)에서 24 시간 동안 배양하였다. 이어서, ICP-OES (ICAP 6300 duo, Thermo Fisher Scientific, USA)를 사용하여 Se 이온의 0가 Se NP 로의 전환을 확인하였다. 모든 샘플을 12,000 rpm에서 15 분 동안 원심 분리하여 펠릿으로서 비이 온성 Se NP를 분리하고 상청액 중의 Se 이온의 농도를 추가로 정량화 하였다. Se NP의 Se NP 로의 감소 백분율을 계산하였다.
- [0045] 5.투과 전자 현미경 (TEM)
- [0046] Qu-Se NP의 형태 및 크기는 200kV의 가속 전압에서 작동하는 TEM (Philips CM 200, USA)을 사용하여 분석되었다. TEM 분석을 위한 샘플을 준비하기 위해, Qu-Se NP를 증류수에 희석하고 기계적으로 200 메쉬 탄소 코팅 된 구리 TEM 그리드로 옮겼다. 이 샘플을 완전히 진공 건조시킨 후, 샘플의 전자 현미경 사진을 찍었다
- [0048] 6. 동적 광산란 (DLS) 및 Zeta 전위 분석
- [0049] DLS 및 제타 전위 분석기는 나노 입자, 거대 분자 및 콜로이드 특성을 검출할 수 있습니다. DLS 분석을 위한 샘플을 1X PBS (pH 7.4)를 사용하여 10 배로 희석하였다. Qu-Se NP의 유체 역학적 면적을 갖는 크기 분포 또는 평균 크기는 10 내지 100 nm의 범위에서 측정되었고, Qu-Se NP의 제타 전위도 분석되었다.
- [0051] 7. 푸리에 변환 적외선 (FTIR) 분광법
- [0052] FTIR은 고체, 액체 및 기체의 시료에서 광전도도, 흡수 및 방출의 적외선 스펙트럼을 분석합니다. FTIR 스펙트럼은 NP의 합성 및 안정화를 담당하는 가능한 생체 분자를 나타내었고 일반적으로 4000 내지 400 cm^{-1} 의 범위에서 기록된다. FTIR 스펙트럼을 결정하기 위해, 2 mg의 Se, Qu 및 Qu-Se NP를 KBr로 분쇄하여 펠릿을 형성 한 다음 Nicolet IR 200 (Thermo Fisher Scientific, USA)을 사용하여 분석하였다.
- [0054] 8. Qu 적재 효율
- [0055] 약물 로딩 (DL) 함량은 NP의 단위 중량 당 약물 로딩되는 양이다. Qu-Se NP에서 Qu의 DL을 결정하기 위해, 10 mg의 동결 건조된 Qu-Se NP를 100 ml의 아세트 니트릴에 용해시켰다. Qu-Se NP의 Qu 함량은 약간 수정된 잘 수용되는 UV-Vis 분광 광도계 (380nm)를 사용하여 정량화되었다. 정량화를 위해 알려진 양의 Qu에 의해 표준 곡선을 제조하였다. DL은 하기 식 1과 같이 Se NP의 Qu의 양 대 Se NP의 양의 백분율 비로서 계산되었다.
- [0056] [식 1]
- $$\text{약물로딩양} = \frac{\text{퀘세틴-셀레늄나노입자중퀘세틴의질량}}{\text{퀘세틴-셀레늄나노입자의총질량}} \times 100$$
- [0057]
- [0059] 9. Qu 방출 분석
- [0060] 1 mg의 Qu-Se NP를 1 ml의 0.1 % PEG (1X PBS에 용해)에 첨가하고 볼 텍싱에 의해 충분히 용해시켰다. 이어서, 혼합물을 교반하면서 37 $^{\circ}$ C에서 인큐베이션 하였다. 혼합물을 각 시점 (0, 0.5, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48 및 72 시간)에 수집하고 15 분 동안 12,000 rpm에서 원심 분리하였다. 상청액을 수득하고 추가 분석을 위해 4 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 72 시간 후, 모든 샘플을 UV-Vis 분광법을 사용하여 372 nm에서 분석하였다. Qu의 양은 표준 곡

선을 사용하여 계산되었다.

[0062] 10. 세포 배양

[0063] MC3T3-E1 세포 (마우스 조골 세포주, ATCC®CRL-2593™) 및 RAW 264.7 세포 (쥐 대식 세포주, ATCC®TIB-71™)를 1mM 피루브산 나트륨, 2mM L- 글루타민 및 0.1mM 비 필수 아미노산, 10 % FBS, 1 % P / S가 보충 된 DMEM에서 배양 하였다. 모든 세포를 95 % 공기 및 5 % CO₂의 가습 분위기에서 37 °C에서 인큐베이션 하였다. 이 실험에서 파골 세포 전구체로 RAW 264.7 세포가 사용되었다.

[0065] 11. MTT 분석

[0066] 불용성 자주색 MTT 포르 마잔 결정(formazan crystal)은 대사 활성 세포의 미토콘드리아에서 석시네이트 탈수소 효소를 생성한다. MC3T3-E1 세포를 96 웰 플레이트에서 2×10^4 세포 / 웰의 농도로 배양하고 다양한 용량(0, 12.5, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 nM 용량의 Se 및 Se NPs 또는 0, 0.03, 0.07, 0.15, 0.31, 0.62, 1.25, 2.5, 5, 10 μM 용량의 Se 및 Se NPs)으로 48시간 동안 Se, Qu, Se NP 및 Qu-Se NP를 처리 하였다. 10 μl의 MTT (PBS에 용해된 5mg / ml)를 세포가 있는 플레이트의 각 웰에 첨가했다. 37°C에서 2 시간 동안 배양 한 후, 상청액을 버리고 200 μl의 DMSO를 각 웰에 첨가하여 용해시켰다. 광학 밀도는 UV-Vis 분광 광도계를 사용하여 570 nm의 파장에서 측정되었다.

[0068] 12. 젖산 탈수소 효소 (LDH) 분석

[0069] Se, Qu, Se NP 및 Qu-Se NP의 세포 독성 효과는 세포 독성 검출 키트 프로토콜에 따라 결정되었다. MC3T3-E1 세포를 96 웰 플레이트에서 2×10^4 세포 / 웰의 농도로 배양하고 다양한 용량 (Se, Se NP의 0, 12.5, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 nM 또는 0, 0.03, 0.07, 0.15, 0.31, 0.62, 1.25, 2.5, 5, 10 μM의 용량에서 Qu 및 Qu-Se NP)으로 48시간 동안 Se, Qu, Se NP 및 Qu-Se NP를 처리 하였다. 세포와 함께 96- 웰 플레이트로부터 10 μl의 세포 배양 배지를 수집하고 새로운 96- 웰 플레이트로 옮겼다. 이어서, 40 μl의 PBS를 10 μl의 세포 배양 배지를 갖는 플레이트에서 각각의 웰에 첨가한 다음, 50 μl의 LDH 시약을 각각의 웰에 첨가하였다. 어두운 곳에서 25 °C에서 45 분 동안 배양한 후, 50 μl의 정지 용액을 첨가함으로써 효소 반응을 중단시켰다. UV-Vis 분광 광도계를 사용하여 490 nm에서 광학 밀도를 측정하였다. 총 세포 용 해물을 세포 사멸에 대한 양성 대조군으로 사용하였다.

[0071] 13. 알칼리성 포스파타제 (Alkaline Phosphatase, ALP) 활성

[0072] ALP 활성은 조골 세포 분화를 나타내는 것으로 간주된다. ALP 활성을 분석하기 위해, MC3T3-E1 세포를 시딩하고 3×10^5 세포/웰의 밀도로 48- 웰 플레이트에서 배양 하였다. 이어서, Se, Qu, Se NP 및 Qu-Se NP는 다양한 용량 (0, 12.5, 25, 50, 100, 250, 500 및 1000 nM의 용량에서 Se 및 Se NP 또는 0, 0.03, 0.07, 0.15, 0.31, 0.62, 1.25, 2.5, 5 및 10 μM의 용량에서 Qu 및 Qu-Se NPs)으로 처리되었다. 48 시간 동안 처리 한 후, 냉 PBS를 사용하여 세포를 2 회 세척하고, 100 μl의 냉 RIPA 완충제를 각 웰에 첨가 하였다. 전 세포 용해물을 4 °C에서 20 분 동안 14,000 rpm으로 원심 분리 하였다. 그 후, 20 μl의 상청액을 100 μl의 CSPD 기질에 첨가하고 30 분 동안 실온에서 인큐베이션 하였다. 발광 강도는 발광 계 (Glomax, Promega, USA)에 의해 평가되었다. 단백질 분석 키트를 사용하여 단백질 농도를 정규화하기 위해 총 세포 용해물을 측정하였다.

[0074] 14. 세포 흡수

[0075] MC3T3-E1 세포를 3×10^5 세포 / 웰의 농도로 48- 웰 플레이트에 시딩하고 배양 한 다음, 0.03 μM의 Qu-Se NP를 6, 12, 24, 48 및 72 시간 동안 처리 하였다. 그 후, 세포를 PBS를 사용하여 2 회 세척하고 20mM Tris-HCl, pH 7.5, 200mM NaCl, 1 % Triton X-100 및 1mM 디티 오 트레인을 함유하는 RIPA 완충액에 용해시켰다. 세포 용해물에서 Qu의 정량적 추정을 위해, 세포 용해물을 4 °C에서 15 분 동안 12,000 rpm으로 원심 분리 하였다. 상청액을 버린 후, 에탄올 분획에 Qu를 용해시키기 위해 볼텍싱하여 펠렛을 에탄올로 추출하고, UV-Vis 분광 광도계를 사용하여 380 nm에서 흡수 스펙트럼을 기록하였다. 표준 곡선을 사용하여 Qu의 양을 계산하고, 총 세포 용 해물의 단백질 농도를 단백질 분석 키트에 의해 표준화하였다.

[0077] 15. RNA 분리 및 실시간 RT-PCR

[0078] MC3T3-E1 세포를 5×10^4 세포/웰의 밀도로 24- 웰 플레이트에서 배양하고 48 시간 동안 10 μM의 Qu 및 0.07 μM의 Qu-Se NP로 처리하였다. 트리졸 시약을 사용하여 세포로부터 RNA를 수집하였다. 흡광도 비율 (260/280)을 평가하고 RNA를 아가 로스 겔에서 분리함으로써 품질 및 완전성을 결정 하였다. cDNA는 SuperScript II 역전사

효소 (Reverse Transcriptase)를 사용하여 2 μ g의 RNA로부터 합성되었다. SYBR green qPCR MasterMix를 포함하는 실시간 PCR에 1 μ l의 cDNA를 사용했다. 그 후, Rotor-Gene 3000 실시간 PCR (Corbett, Germany)을 수행하였다. qPCR 절차는 다음과 같았다 : 초기 단계로서 95 $^{\circ}$ C에서 10 분 동안 변성되고, 95 $^{\circ}$ C에서 20 초 동안, 60 $^{\circ}$ C에서 20 초 동안, 및 40 $^{\circ}$ C의 증폭이 40 초의 증폭으로 25 초 동안 연장되었다. 상대 발현은 GAPDH로 표준화되었다. mRNA 발현의 모든 결과는 이중 델타 CT ($\Delta\Delta$ CT) 방법에 의해 정량화되었다. 프라이머 서열은 표 1 (실시간 RT-PCR 용 마우스 프라이머)에 기록되어있다.

표 1

Gene	Primer sequence (5'-3')
<i>Osterix</i>	F: GGAAAGGAGGCACAAAGAAGCCAT R: AGTCCATTGGTGTGCTGAGAAGGGA
<i>Colla</i>	F: TTCTCCTGGCAAAGACGGAC R: AGGAAGCTGAAGTCATAACCGCCA
<i>Osteocalcin</i>	F: TGCTTGTGACGAGCTATCAG R: GAGGACAGGGAGGATCAAGT
<i>Osteopontin</i>	F: CCACAATGAACAAGTGGCTGTGCT R: TAGGTAGGTGCCAGGAGCACATT
<i>Runx2</i>	F: AAGTGGGTGCAAACCTTCT R: TCTCGGTGGCTGGTAGTGA
<i>Bone sialoprotein</i>	F: TCCCAGGTGTGTCATTGAAGA R: GGTATGTTGCGCAGTTAGCAA
<i>RANKL</i>	F: CGTGCAGAAGGAAGTCAACACAT R: TAGGTAGGTGAGGTGTGCAAA
<i>GAPDH</i>	F: TCGTGGATCTGACGTGCCGCCTG R: CACCACCCTGTTGCTGTAGCCGTAT

16. 단백질 추출 및 웨스턴 블롯팅 MC3T3-E1 세포를 5 x 10⁴ 세포 / 웰의 밀도로 24- 웰 플레이트에서 배양하고 48 시간 동안 10 μ M의 Qu 및 0.07 μ M의 Qu-Se NP로 처리 하였다. 프로테아제 억제제 및 포스파타제 억제제를 함유하는 RIPA 완충액으로 세포를 수확 하였다. 단백질 농도는 단백질 분석 키트에 의해 추정되었다. 수집된 단백질을 SDS- 폴리 아크릴 아마이드겔에 로딩 한 후 PVDF 막으로 옮겼다. 1 시간 동안 5 % 탈지유로 막을 차단한 후, 밤새 4 $^{\circ}$ C에서 β - 카테닌, p-smad 및 β - 액틴에 대한 항체와 함께 배양 하였다. 그 후, 막을 1X TBST (Tris- 완충 식염수, 0.1 % 트윈 20)로 세척하고 horseradish 퍼옥시다제-접합된 이차 항체와 함께 실온에서 45 분 동안 배양 하였다. 화학 발광 시약을 사용하여 표적 단백질 밴드를 시각화 하였다. 로딩 대조군으로서 β - 액틴을 사용 하였다. 밴드 강도는 Image J 소프트웨어 (NIH, USA)를 사용하여 정량화되었다.

17. 루시페라제(Luciferase) 리포터 분석

MC3T3-E1 세포는 제조사의 지시에 따라 48 웰 플레이트에서 유전자 원 시약을 사용하여 리포터 구조물을 형질 감염시킨 후 48 시간 동안 10 μ M의 Qu 및 0.07 μ M의 Qu-Se NP로 처리되었다. Axin-2, BRE의 1 μ g 구축물 및 동일한 양의 Renilla luciferase thymidine kinase 구축물을 사용하여 루시페라제 활성을 평가 하였다. 루시페라제 활성을 루미노 미터로 평가하였다. 각각의 샘플로부터 확인된 리포터 활성을 레 닐라 루시페 라제 활성 (Renilla luciferase activity)으로 표준화하였다.

18. 시리우스 레드 S(Sirius Red S)와 알리자린 레드 (Alizarin Red S) 염색

콜라겐 합성 및 미네랄 매트릭스 침착에 대한 Qu-Se NP의 효과는 각각 알리자린 레드 S 및 시리우스 레드 염색에 의해 분석되었다. MC3T3-E1 세포를 24- 웰 플레이트에서 배양하고 7 일 동안 Qu (10 μ M) 및 Qu-Se NP (0.07 μ M)로 처리하고 매 2 일마다 배지를 교체하였다. 알리자린 레드 S 염색의 경우, 세포를 4 %의 파라 폼 알데히드로 1 시간 동안 고정시키고, 실온에서 30 분 동안 40 mM 알리자린 레드 S 용액으로 염색하였다. 염색된 세포를 현미경 (Carl Zeiss, Germany)으로 관찰 하였다. 광물화를 정량화하기 위해, 염색된 세포를 10 % 세틸피리디늄 클로라이드(cetylpyridinium chloride)를 사용하여 1 시간 동안 용해시키고 분광 광도계로 570 nm에서 흡광도를 측정하기 위해 96- 웰 플레이트로 옮겼다. 콜라겐 염색의 경우, 세포를 Bouin's 의 유체로 1 시간 동안 고정시키고 포화 수성 피크 산에 1 시간 동안 용해 된 1 mg / ml 시리우스 레드 염료로 염색 하였다. 정량을 위해, 염색된 세포를 0.1 N 수산화 나트륨에 30 분 동안 용해시켰다. 용해된 용액의 광학 밀도는 블랭크로서 0.1 N 수산화 나트륨에 대해 550 nm에서 분광 광도계를 사용하여 측정되었다. 삼중 배양 물을 분석하였다.

19. 타르트레이트 내성 산 포스파타제 (Tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP) 염색

파골 세포-유사 세포의 형성을 결정하기 위해, 24- 웰 배양 플레이트 (5 x 10⁴ 세포/웰)에서 RAW 264.7 세포를

2 일 동안 RANKL 50 ug/ml로 배양 하였다. 이어서, 세포를 PBS로 2 회 세척하고 7 일 동안 Qu (10 μ M) 및 Qu-Se NP(0.07 μ M)로 처리 하였다. 제조사의 프로토콜에 따라 TRACP 및 ALP 이중 염색 키트를 사용하여 세포를 고정하고 염색 하였다. 3 개 초과와 핵을 갖는 TRAP- 양성 다핵 세포는 파골 세포-유사 세포로 간주되어 광학 현미경으로 계수되었다.

[0092] 20. 통계 분석

[0093] 데이터를 통계적으로 분석하기 위해 Graphpad Prism 5.0 (캘리포니아 샌디에고) 소프트웨어가 사용되었다. 데이터는 양측 스튜던트 t-검정, 단방향 또는 양방향 ANOVA에 의해 평가되었고, P < 0.05의 값은 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

[0095] 평가예

[0096] 1. Qu-Se NP의 특성

[0097] Se NP의 합성은 특징적인 벽돌 적색의 외관을 특징으로 한다. Qu가 없는 합성된 Se-NP는 합성 후 6 시간 이내에 안정하지 않고 응집 (검은 색으로 나타남) 한 반면, Qu는 안정화된 Se NP를 첨가함으로써 Qu의 캡핑제 역할을 암시하는 것으로 관찰되었다 (도 3 및 도 4). Qu-Se NP의 합성은 UV-VIS 분광 광도계 (도 5)에 의해 확인되었다. Qu-Se NP의 UV-VIS 흡수 스펙트럼은 200-350 nm의 범위에서 모니터링되었다. Se-NP의 합성에 특이적인 강한 피크가 260nm에서 얻어졌다. ICP 데이터에 따르면, 셀렌산에 350 μ l의 아스코르브 산을 첨가한 후 대략 98 %의 전환이 수득되었다. 셀레늄 이온의 0가 셀레늄 나노 입자로의 전환이 도 6에 도시되어있다. TEM 이미지 (도 7)는 모든 합성된 Qu-Se NP가 20 내지 50 nm 크기의 구형이며, 수성 매질에 잘 분산된 것으로 밝혀졌다. DLS 기술은 입자의 크기를 결정하는데 사용되었다. Qu-Se NP의 평균 크기는 67.12 nm였다. DLS의 크기는 나노 입자의 유체 역학적 영역으로 인해 TEM 이미지보다 약간 더 크다 (도 8). 콜로이드 현탁액에서 입자의 잠재적 안정성을 측정하기 위해 제타 전위가 사용되었다. Qu-Se NP의 제타 전위 그래프는 -23.50 mV (PDI = 0.18)의 전하를 나타냈다 (도 9). FT-IR 스펙트럼은 퀴논 그룹으로 인한 Qu의 특징적인 진동 결합 및 Qu-Se NP의 셀레늄 나노 입자와의 부착으로 인한 케르세틴의 진동 결합의 변화를 보여 주었다 (도 10). Qu-Se NP의 약물 로딩 백분율 (%)은 46.8 %로 기록되었다. Qu는 Qu-Se NP로부터 느린 방출을 나타내었고, Qu-Se NP로부터 방출된 최대 Qu의 농도는 72 시간에 관찰되었다 (도 11).

[0099] 2. 세포 생존력 및 세포 독성

[0100] 세포 생존을 및 세포 독성에 대한 Se, Qu 및 NP의 효과를 확인하기 위해, MC3T3-E1 세포를 다양한 농도로 처리하고 각각 MTT 및 LDH 분석으로 분석 하였다. 도 12는 48 시간 동안 다양한 농도로 Se 및 Se NP로 처리된 MC3T3-E1 세포주의 용량 의존적 MTT 및 LDH 분석한 것으로, 데이터는 3 개의 독립적 인 실험의 평균 $\pm$ SD로 표시된다. 이때, Se 및 Se NP의 다양한 농도 (0, 12.5, 25, 50, 100, 250, 500 및 1000 nM)는 MC3T3-E1 세포의 세포 생존력 및 세포 독성에 영향을 미치지 않았다 (도 12). 도 13은 Qu 및 Qu-Se NP로 48 시간 동안 다양한 농도로 처리된 MC3T3-E1 세포주의 용량 의존적 MTT 및 LDH 분석한 것으로, 데이터는 3 개의 독립적 인 실험의 평균 $\pm$ SD로 표시되며, 마찬가지로, Qu 및 Qu-Se NP의 다양한 농도 (0, 0.03, 0.07, 0.15, 0.31, 0.62, 1.25, 2.5, 5 및 10 μ M)도 세포 생존력 및 세포 독성에 영향을 미치지 않음을 보여 주었다 (도 13). 처리를 위한 Se 및 Se NP의 농도는 Qu-Se NP에 존재하는 유사한 농도와 관련하여 결정되었다.

[0102] 3. ALP 활동

[0103] ALP는 조골 세포 분화의 마커이다. Qu, Se 및 Se NP에 대한 효과와 비교하여 골 형성을 촉진하기 위한 Qu-Se NP의 자극 효과를 관찰하기 위해, 48 시간의 MC3T3-E1 세포 처리 후 ALP 활성이 검출되었다. Qu의 효과는 2.5, 5 및 10 μ M의 용량에서 증가하였고 대조군에 비해 10uM (~ 2 배)의 용량에서 최대 유도가 관찰되는 반면, Qu-Se NP는 0.03, 0.07의 용량에서 ALP를 증가시켰다 0.15 μ M 및 최대 유도는 대조군과 비교하여 0.75 μ M (~ 2.7 배)의 용량에서 관찰되었다. Qu-Se NPs 처리된 조골 세포의 ALP 활성은 Qu보다 상대적으로 낮은 용량으로 유의하게 증가 하였다. 그러나, MC3T3-E1 세포에서 Se 및 Se NP의 처리는 ALP 활성에 영향을 미치지 않았다(도 14 및 15).

[0105] 4. Qu-Se NP의 세포 흡수

[0106] Qu (10 μ M) 및 Qu-Se NP (0.07 μ M)의 세포 흡수를 확인하기 위해, 6, 12, 24, 48 및 72 시간 동안 MC3T3 세포로 처리 하였다. 유리 Qu 처리된 세포와 비교하여 Qu-Se NP 처리된 세포에서 상당히 높은 농도의 퀴세틴이 관찰되었다 (도 16). 이는 나노 입자 또는 Se NP의 표면 전하가 세포 내에서 Qu의 높은 흡수를 촉진했음을 시사한

다. 또한, 유리 Qu가 세포 지질 막을 가로 질러 천천히 확산되는 것이 제안될 수 있다.

[0108] 5. Qu-Se NP의 조골 세포에서 골 형성 촉진

[0109] Qu 및 Qu-Se NP의 골 형성 효과는 골 형성 (Osterix), 초기 조골 세포 분화 (Colla 및 Runx2 (콜라겐 1a 및 런트 관련 전사 인자 2))에 대한 마스터 조절제와 같은 골 형성 마커와 Qu (10 μ M) 및 Qu-Se NP (0.07 μ M)를 48 시간 동안 MC3T3-E1 세포로 처리 한 후 말단 분화 마커 (Bone Sialoprotein, Osteopontin 및 Osteocalcin)의 mRNA 발현 수준에 의해 확인되었다. Qu-Se NP는 osterix (~ 7 배), colla (~ 5 배), osteocalcin (~ 8 배), osteopontin (~ 8 배), Runx2 (~ 6 배) 및 bone sialoprotein (~ 8 배)의 발현을 유도했다. 대조군과 비교하여 Qu의 효과보다 훨씬 향상되었다 (그림 17). 또한, 콜라겐 합성 및 광물화와 같은 분화의 말기 단계에 대한 Qu 및 Qu-Se NP의 효과를 분석하고 비교하였다. 7 일 동안 10 μ M의 Qu 및 0.07 μ M의 Qu-Se NP로 처리된 MC3T3-E1 세포는 용량 의존적 방식으로 시리우스 레드 및 알리자린 레드 S 염색으로 나타낸 바와 같이 유도된 광물화를 나타냈다 (도 18 및 19). 종합하면, Qu-Se NP는 Qu보다 우수한 골 유도 특성을 나타냈다.

[0111] 6. Qu-Se NP의 조골 세포에서 WNT 및 BMP 신호 전달 경로 활성화

[0112] WNT 및 BMP 신호 경로 조골 차별화 및 뼈 형성 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있기 때문에 우리는 조골 세포에서 Qu-Se NPs에 의해 WNT 및 BMP 신호 통로의 활성화를 조사했다. MC3T3-E1 세포를 Genefectine을 사용하여 48 시간 동안 Axin-2 또는 BRE luciferase 리포터 구축물로 형질 감염시키고 Qu (10 μ M) 또는 Qu-Se NP (0.07 μ M)로 처리하고 48 시간 후 그 효과를 분석하였다. Axin-2 및 BRE 루시퍼 라제 활성은 대조군과 비교하여 Qu 및 Qu-Se NP 모두에 의해 증가되었다. 그러나 Qu와 비교하여 Qu-Se NP에서 훨씬 큰 증가가 관찰되었다 (도 20). WNT 신호 전달 경로의 활성화는 핵에서 β - 카테닌의 안정화를 초래하고, 이는 이어서 DNA- 결합 단백질의 TCF / LEF 패밀리에 결합하여 골 형성을 위한 WNT- 매개 표적 유전자를 조절한다. 또한, BMP 신호 전달 경로의 활성화는 smad 1 / 5 / 8 분자의 다운 스트림 포스포릴 화로 이어지고, 이는 골 형성 유전자의 전사 조절을 매개한다. 따라서, MC3T3-E1 세포를 10, 10 μ M의 Qu 및 0.07 μ M의 Qu-Se NP로 12, 24 및 48 시간 동안 처리 한 후, β - 카테닌 분자의 안정화 및 smad1 / 5 / 8 분자의 인산화는 웨스턴에 의해 검출되었다 블로팅. Qu 및 Qu-Se NP 모두 12 시간 후 48 시간까지 β - 카테닌 안정화를 증가시켰다. 그러나, β - 카테닌 안정화의 현저한 증가는 Qu와 비교하여 Qu-Se NP에 의해 증가되었다. 또한, 15, 30 및 60 분 동안 10 μ M의 Qu 및 0.07 μ M의 Qu-Se NP의 처리는 30 분에서 smad1 / 5 / 8 분자의 인산화 증가를 입증 하였다. Qu와 비교하여, Qu-Se NP는 smad1 / 5 / 8 분자의 더 많은 인산화를 유도했다 (도 21). 종합하면, Qu-Se NP는 WNT 및 BMP 신호 전달 경로의 활성화를 통해 조골 세포에서 골 형성 효과를 유도하고 Qu보다 더 큰 영향을 미친다.

[0114] 7. Qu-Se NP의 RANKL- 유도된 파골 세포 형성 예방

[0115] Qu는 RANKL에 의해 유도된 골질 분화를 감소시킬 수 있다. RANKL은 파골 세포 전구체를 파골 세포로의 분화를 유도하는 주요 요인으로 간주된다. 조골 세포는 또한 RANKL을 분비하여 파골 세포 생성을 유도한다. Qu (10 μ M) 및 Qu-Se NP (0.07 μ M)를 24 시간 동안 MC3T3-E1 세포로 처리하였다. Qu-Se-NP는 조골 세포에서 RANKL의 mRNA 발현을 억제하였다 (도 22). 파골 세포 생성에 대한 Qu 및 Qu-Se NP의 효과를 쥐 대식세포 세포주 RAW 264.7과 비교하였다. RANKL (50 ng / ml)을 RAW 264.7 세포에서 처리하여 파골 세포 생성을 유도 하였다. 3 일 후, Qu (10 μ M) 및 Qu-Se NP (0.07 μ M)는 7 일간 RANKL- 자극된 RAW 264.7 세포로 처리되었다. 파골 세포의 형성에 대한 Qu 및 Qu-Se NP의 영향을 설명하기 위해, TRAP- 양성 세포는 재료 및 방법에 기재된 TRAP 염색에 의해 검출되었다. RANKL- 처리된 샘플은 대조군과 비교하여 다핵 세포 형성을 유도함으로써 파골 세포 형성의 증가를 나타냈다. 그러나, Qu 및 Qu-Se NP 처리된 세포는 낮은 파골 세포 형성을 나타냈다. Qu-Se NP는 Qu와 비교하여 파골 세포 형성을 실질적으로 억제하였다 (도 23).

[0117] 골다공증은 뼈 재형성 동안 뼈 형성보다 뼈 재흡수가 증가하여 발생하는 질병으로, 골다공증 치료를 위한 이상적인 전략은 뼈 형성을 촉진하면서 뼈 흡수를 억제하는 것이며, Qu는 골 형성을 촉진하고 골 재 흡수를 억제할 수 있다.

[0118] 본 발명에서는 Qu의 생체 이용률 및 세포 내 흡수의 한계를 극복하기 위해, 셀레늄 나노 입자가 나노 담체로서 사용되었으며, 이는 퀘세틴의 생체 이용률을 증가 시키는 것을 확인하였다. 200 nm 미만의 고분자 나노 입자의 직경은 생체 내 약물 전달에 적합하기 때문에, Qu-Se NP의 더 작은 입자 크기 (20 ~ 50nm)가 합성되었고, TEM 및 DLS 분석에 의해 확인되었다(도 2 내지 도 11). 합성된 입자의 적은 PDI (<0.2)는 또한 나노 현탁액의 균질성을 반영한다.

[0119] 또한, 본 발명에서 생성된 제타 전위는 -23.50 mV였으며, 이는 세포에 쉽게 부착되는 것으로 간주될 수 있다. 또

한, Se NP는 지속 방출을 위한 소수성 약물의 방출을 억제하는데 도움을 줄 수 있다. 본 발명에서, Qu-Se NPs 나노 입자는 퀘세틴의 느리고 지속적인 방출을 보여주었으며, 이는 지속적이고 장기적인 치료 효과를 촉진하는 안정한 약물 용량을 안정적으로 제공 할 수 있다.

[0120] MC3T3-E1 조골 세포에 대한 Qu-Se NP의 시험 관내 용량-의존적 세포 독성 활성을 MTT 및 LDH 분석을 사용하여 측정하였다. Qu-Se NP의 세포 독성 효과는 24 시간 처리 후 유리 케르세틴의 효과와 유사하게 관찰되었다 (도 12 및 도 13). Qu-Se NP는 ALP 활성을 통해 조골 세포 분화를 자극한다. ALP는 조골 세포 활성 생성물에 의해 분비된다. Qu-Se NP는 0.03 μ M에서 최대 ALP 활성을 자극한 후 감소한 반면, Qu는 5 및 10 μ M에서 최대 ALP 활성을 증가시켰다. 고농도에서, NP는 응집되는 경향이 있으며, 이는 세포에서 그들의 흡수를 억제 또는 방지한다. 따라서, 세포 내로 NP의 최대 흡수를 위해 최적의 농도가 필요하다. ALP 활성 데이터에 기초하여, ALP 활성에 대한 최적 농도는 10 μ M의 Qu 및 0.03 μ M의 Qu-Se NP에서 결정되었다 (도 14 및 도 15). 게다가, 결과는 또한 유리 케르세틴에 비해 Qu-Se NPs 처리 MC3T3-E1 세포에서 케르세틴의 삼킴 농도가 ~ 2 배 증가한 것으로 나타났으며, 이는 Qu-Se NPs 처리 세포에서 Qu의 높은 흡수를 시사한다. 이것은 캐리어 Se NP의 크기가 작고 표면 전하 때문일 수 있습니다. 또한, 퀘세틴 수준의 증가는 세포막 내 Qu-Se NP의 높은 용해도에 기인하여 세포 내부로의 진입을 촉진할 수 있다. 따라서, 세포 내에서, 나노 입자는 약물 저장소로서 작용하여 유리 Qu와 비교하여 더 긴 시간 동안 그 효과를 발휘한다. Qu-Se NP의 향상된 흡수는 유리 퀘세틴 보다 더 나은 골 형성 효과 및 항골 세포 형성을 향상시킬 수 있다. 나노 입자로부터 퀘세틴의 제어된 후속 방출은 증가된 골 형성 활성에 기여할 것이다 (도 16).

[0121] Qu는 세포에 존재하는 에스트로겐 수용체 (ERa 및 ERb)와 상호 작용함으로써 뼈 결합 모델에서 뼈의 형성 및 대사 활성을 자극한다. 나노 담체로서의 Se NP는 뼈 건강에 영향을 미치는 기능을 가지며, 공동 효소로서 작용한다. Qu-Se NP의 ALP 및 골 형성 마커의 가장 높은 발현은 Qu-Se NP가 조골 세포의 분화를 자극하는데 매우 효율적임을 시사한다. 또한, Qu-Se NP로 처리한 후, 알리자린 레드 및 시리우스 레드 염색으로 묘사된 증가된 광물화는 조골 세포에서 Qu-Se NP의 자극적 역할을 나타냈다. 따라서, 이들 결과는 Qu-Se NP가 유리 Qu와 비교하여 조골 세포를 분화하고 광물 화를 자극하는 더 우수한 능력을 가짐을 보여 주었다 (도 20 및 도 21). 이전의 연구는 뼈 세포 분화 및 광물화에 대한 Qu뿐만 아니라 Se의 영향을 보고 하였다. 둘 다의 통합 또는 상승 효과는 조골 세포의 분화 및 광물 화 과정에 필요한 자극을 제공했을 수 있다.

[0122] 다음으로, 조골 세포에서 WNT 및 BMP 신호 전달 경로의 활성화에 대한 Qu-Se NP의 영향이 관찰되었다. 표준 WNT 및 BMP 신호 전달 경로는 골격 발달 동안 조골 세포 분화 및 광물 화를 촉진시킨다. Wnt / β - 카테닌 신호 전달 경로는 조골 세포 분화 마커의 발현 및 광화를 자극한다. Wnt 신호 전달 하류 분자, β - 카테닌은 조골 세포 분화를 증가시키고 OPG의 상향 조절 및 RANKL의 하향 조절을 억제함으로써 파골 세포 분화를 간접적으로 억제한다. BMP 리간드는 세포 표면 수용체에 결합한 후 Smads1 / 5 / 8를 인산화시킨다. Smad4는 인산화 된 Smads1/5/8과 복합체를 형성하고 핵으로 이동한다. 결과적으로, BMP 신호 전달 경로는 뼈-특이적 유전자의 전사를 조절함으로써 뼈 형성을 유도한다. BMP 신호 전달 경로 및 WNT / β - 카테닌 신호 전달은 상승 작용에 의해 조골 세포 분화 및 뼈 형성을 촉진한다. 조골 세포에서 마스터 골 형성 인자, BMP2의 발현은 Wnt / β - 카테닌 신호 전달 경로에 의해 활성화되며, 이는 Wnt / β - 카테닌과 BMP 신호 전달 경로 사이의 상호 작용에 의해 BMP 신호 전달 경로에 대한 제어를 제한한다.

[0123] Runx2 및 osterix는 조골 세포 분화 조절에 필수적인 전사 인자이며 WNT / β -catenin 및 BMP 신호 전달 경로를 자극하는 것으로 알려져 있다. Qu-Se NP는 Runx2 및 osterix와 같은 BMP 신호 전달 경로 성분의 mRNA 발현을 활성화시켰다. 이 두 전사 인자는 ALP 및 Col1a를 포함하여 조골 세포 관련 유전자의 발현을 조절한다. WNT 및 BMP 신호 전달 경로에 대한 Qu 또는 Qu-Se NP의 효과는 Axin 2 및 MC3T3-E1 세포에 형질 감염된 BRE 리포터 구성에 의해 분석되었다. 결과는 Qu와 비교하여 Qu-Se NPs 처리 된 MC3T3-E1 세포에서 Axin 2 및 BRE 리포터 활성의 증가 된 활성화를 입증 하였다. 또한, Qu와 비교 한 Qu-Se NP의 효과는 β - 카테닌의 안정화 및 smad 1/5/8 분자의 인산화에서 상당한 증가를 나타냈다 (도 20 및 도 21). 따라서, Qu-Se NP는 조골 세포 분화를 조절하기 위해 WNT 및 BMP 신호 전달 경로를 활성화시킬 수 있다.

[0124] 몇몇 플라보노이드 화합물은 이전에 뼈 재 흡수를 감소시키는 것으로 나타났다. Qu는 RAW264.7 세포에서 파골 세포 형성의 수를 감소시키고 MC3T3-E1 세포에서 트랩, Ctsk, MMP9, RANKL과 같은 파골 세포 관련 유전자의 발현 수준을 하향 조절할 수 있다. 조골 세포에 의해 합성된 RANKL은 그의 수용체 RANK에 결합함으로써 파골 세포 분화 및 형성을 자극한다. 또한, OPG / RANKL / RANK 시스템 조절은 파골 세포 생성에 관련한다. 따라서, OPG 및 RANKL의 발현은 골 재흡수 및 골 재형성을 평가 인자로 결정할 수 있다. MTT 및 LDH 분석을 사용하여 RAW264.7 세포에서 Qu-Se NP의 시험관내 용량-의존적 세포 독성 활성을 알 수 있다.. 본 데이터에서, Qu-Se NP

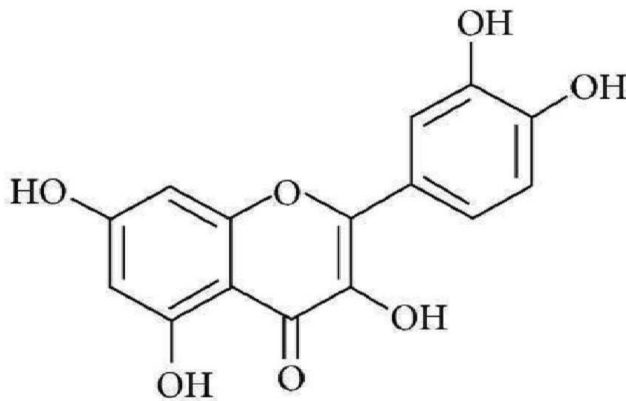
는 조골 세포에서 RANKL의 mRNA 발현 수준을 감소시키고 RANKL 보충된 RAW264.7 세포에서 파골 세포 형성을 감소시켰다. 이 결과는 RANKL을 억제함으로써 파골 세포에 대한 Qu-Se NP의 직접적인 효과를 나타냈다 (도 22 및 도 23).

[0125] 이에, 본 발명에서는 Qu-Se NP가 세포 내에서 Qu의 높은 흡수를 촉진함으로써 뼈 재흡수를 억제하고 새로운 뼈 형성을 자극함으로써 뼈 손실을 예방한다는 것을 입증한다. Qu-Se NP는 RANKL의 발현을 억제함으로써 파골 세포 형성을 감소시킬 수 있으며, 이는 조골 세포에서 WNT 및 BMP 신호 전달 경로를 활성화시킴으로써 골 형성을 촉진시킨다.

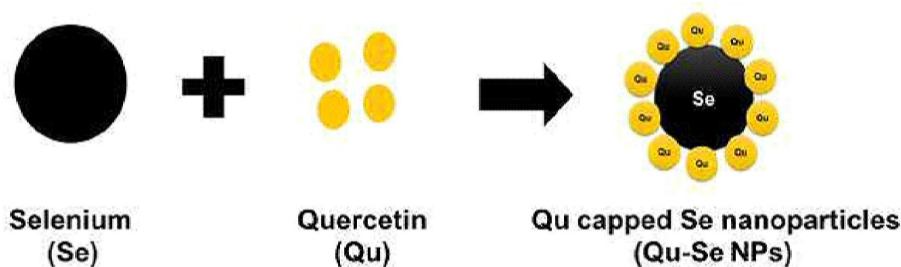
[0127] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로, 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

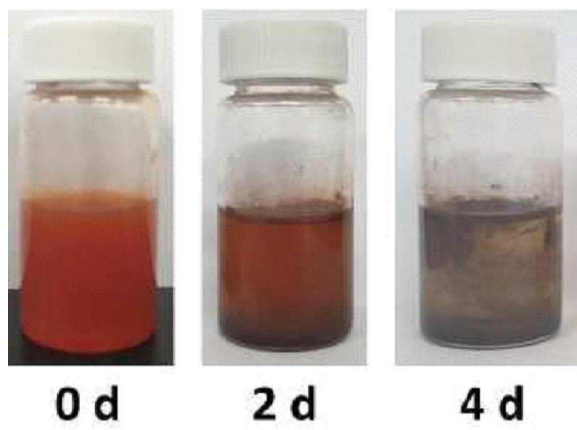
도면1



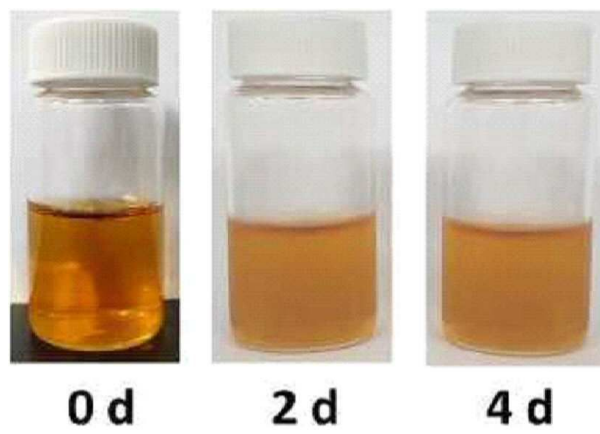
도면2



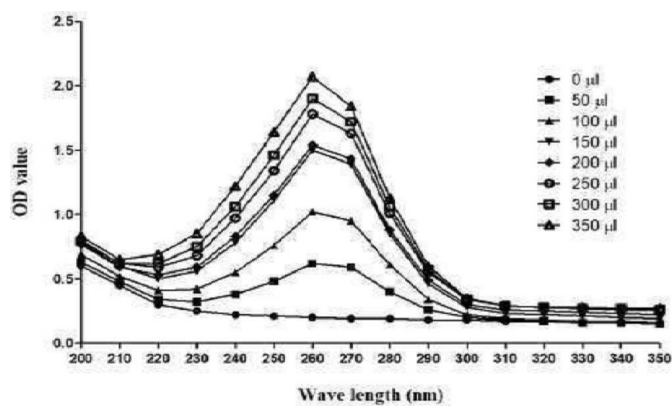
도면3



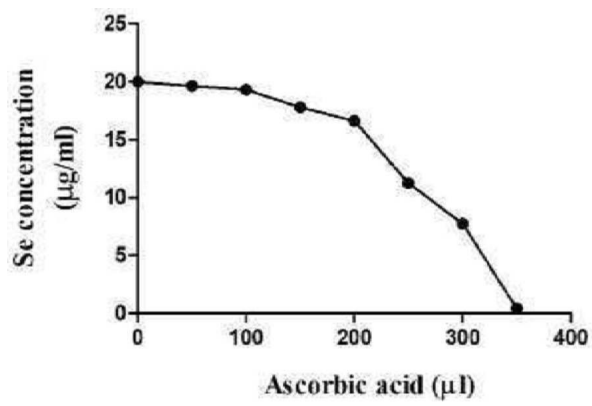
도면4



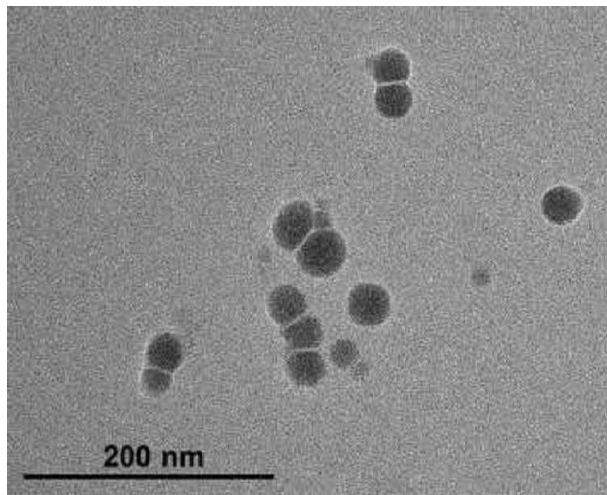
도면5



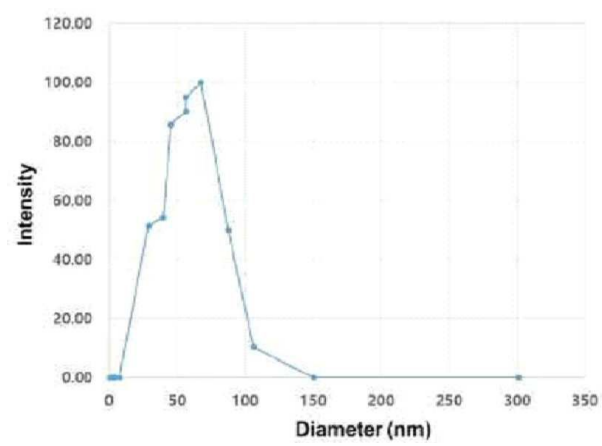
도면6



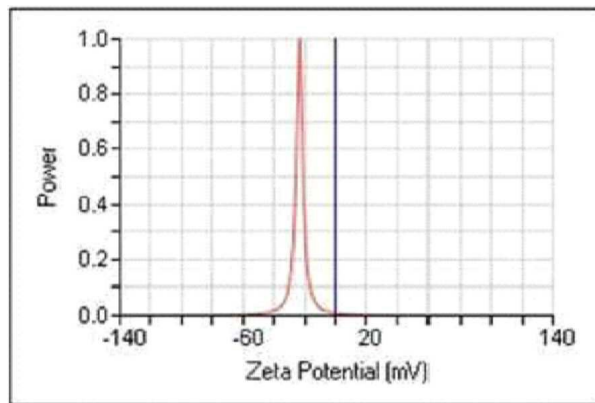
도면7



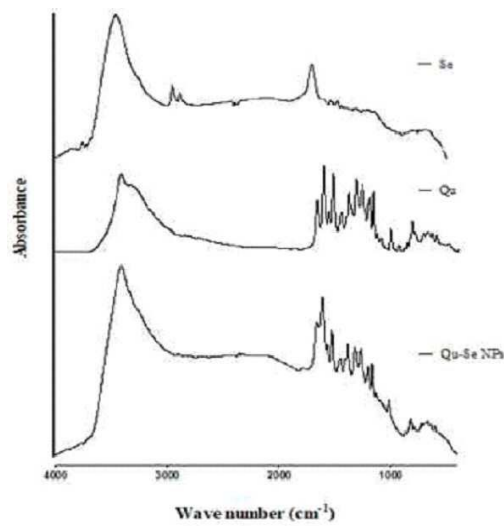
도면8



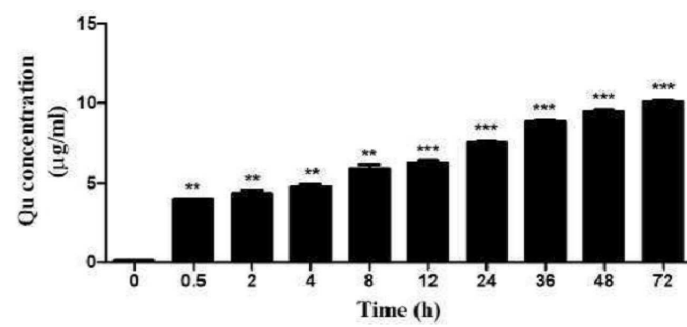
도면9



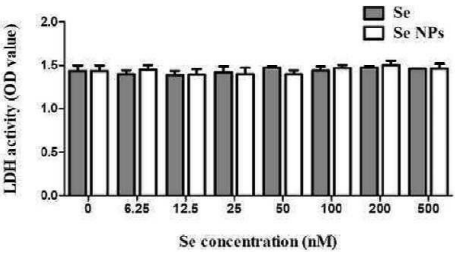
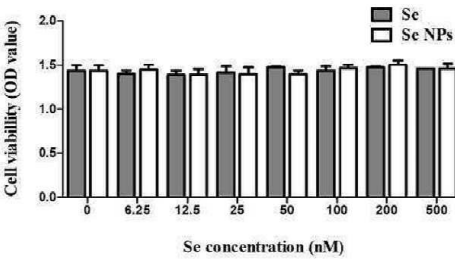
도면10



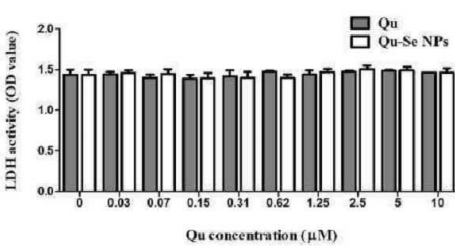
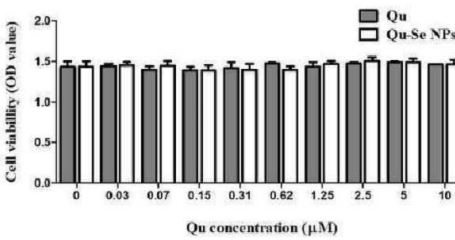
도면11



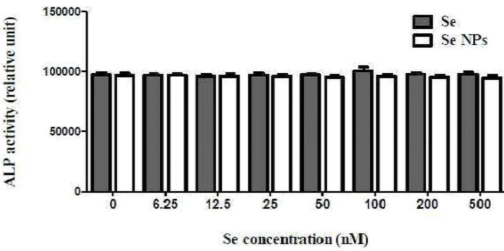
도면12



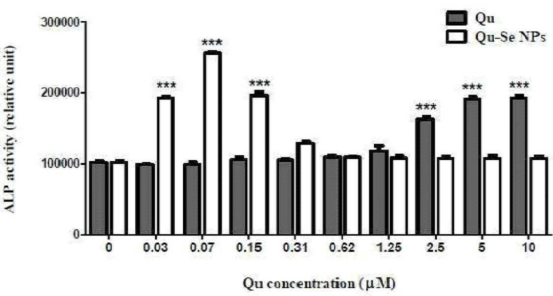
도면13



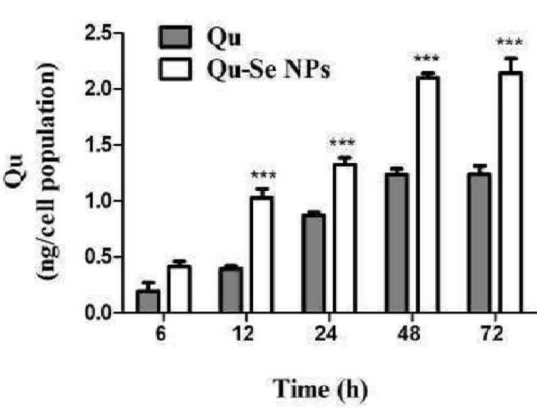
도면14



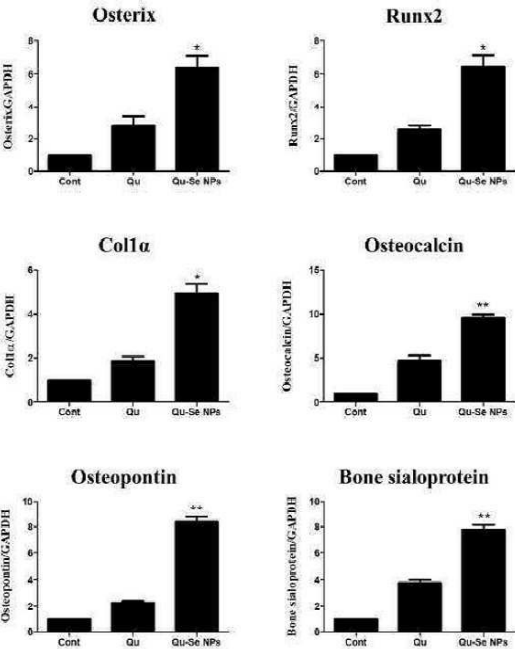
도면15



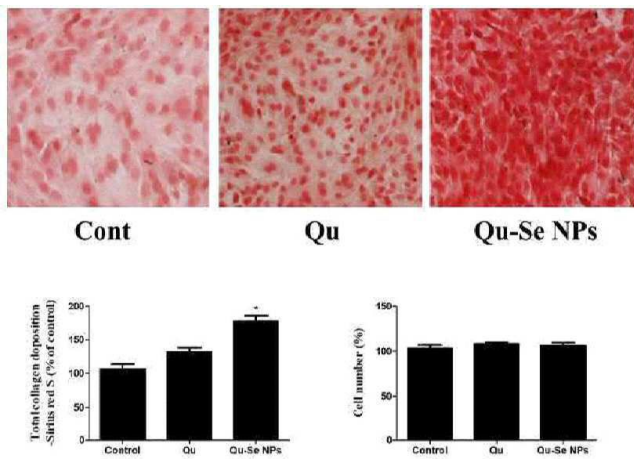
도면16



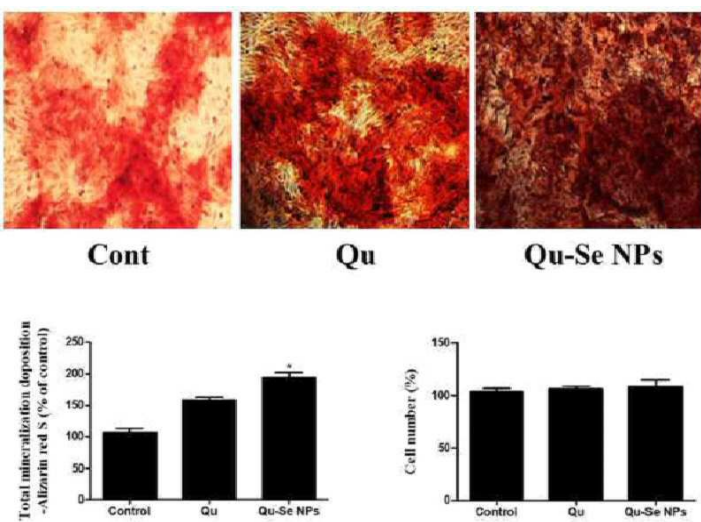
도면17



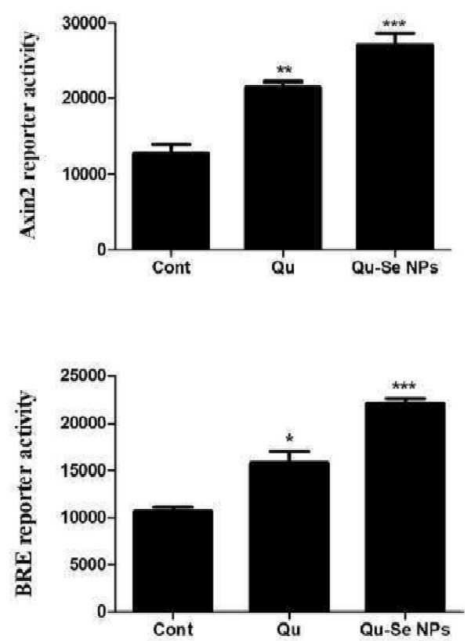
도면18



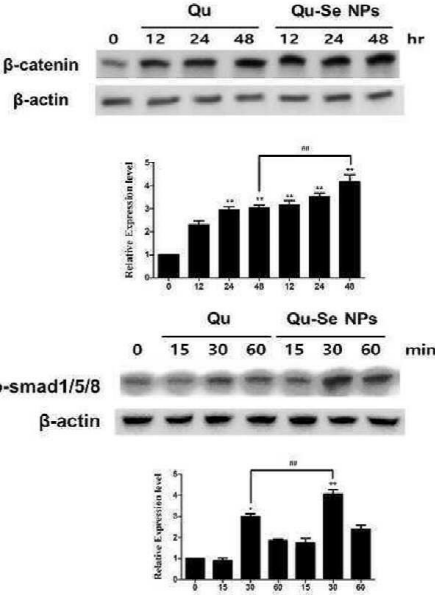
도면19



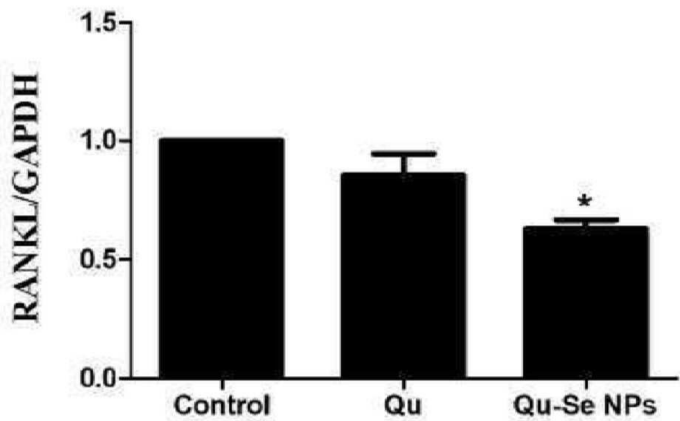
도면20



도면21



도면22



도면23

