

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0117761

(43) 공개일자 2022년08월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 33/242 (2019.01) A61K 33/34 (2006.01)

A61K 35/28 (2015.01) A61K 9/14 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 33/242 (2022.01)

A61K 33/34 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0021486

(22) 출원일자 2021년02월17일

심사청구일자 2021년03월08일

(71) 출원인

성균관대학교산학협력단

경기도 수원시 장안구 서부로 2066 (천천동, 성균관대학교내)

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

방석호

경기도 수원시 장안구 서부로 2066, 제2공학관 26433C호

유태경

서울특별시 마포구 독막로42길 2, 마포자이아파트 107동 1201호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이명진

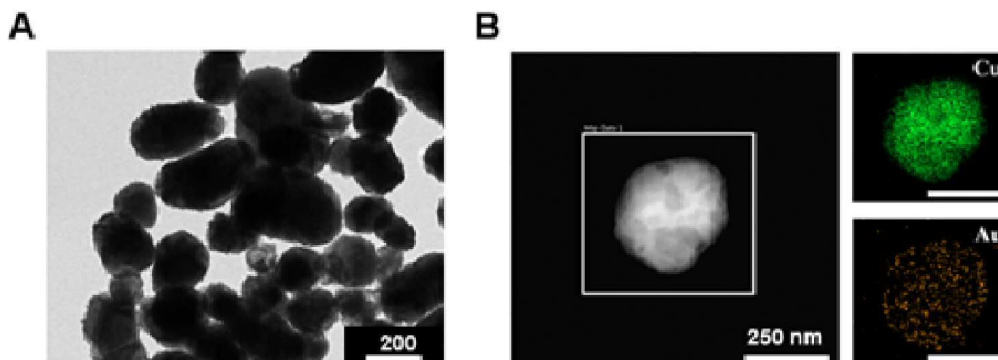
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 금-구리 나노입자를 유효성분으로 포함하는 허혈성 질환 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 금-구리 나노입자를 유효성분으로 포함하는 허혈성 질환 예방 또는 치료용 조성물 등에 관한 것으로, 본 발명에 따른 금-구리 나노입자는 세포 독성도가 낮음과 동시에 산화가 더디고, 낮은 pH 환경에서도 구리입자보다 분해 속도가 높아 생체 분해성도 뛰어나다. 또한, 금-구리 나노입자는 기존 줄기세포 치료제의 혈관 생성능을 크게 향상시킴을 확인하였는 바, 허혈성 질환 치료제 및 줄기세포 치료 보조제로서 유용하다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 35/28 (2013.01)

A61K 9/14 (2013.01)

A61P 9/10 (2018.01)

(72) 발명자

임광범

경기도 수원시 장안구 서부로 2066, 제2공학관
26405A호

이재영

충청남도 천안시 동남구 터미널9길 31, 101동 120
2호(신부동, 대림한내아파트)

송지우

경기도 수원시 권선구 동수원로145번길 74, 107
동1002호(권선동, 수원아이파크시티 1단지)

김유진

경기도 수원시 장안구 서부로 2066, 제2공학관
26405A호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711103671
 과제번호 2018M3A9E2023255
 부처명 과학기술정보통신부
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단
 연구사업명 차세대의료기기플랫폼기술
 연구과제명 심근경색 치료용 줄기세포 담지 생분해성 신개념 3D 패치 효능 및 전임상 연구
 기 여 율 1/8
 과제수행기관명 성균관대학교
 연구기간 2020.01.01 ~ 2020.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711106228
 과제번호 2019R1C1C1007384
 부처명 과학기술정보통신부
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단
 연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
 연구과제명 음향적으로 제어된 무중력 줄기세포 배양기를 이용한 다양한 줄기세포 배양법 및 허

혈성 질환 치료법 개발

기 여 율 1/8
 과제수행기관명 성균관대학교
 연구기간 2020.03.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711121318
 과제번호 2020M2D9A3094171
 부처명 과학기술정보통신부
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단
 연구사업명 첨단방사선융합치료기술개발(R&D)
 연구과제명 최소 외력 조건에서 암 세포 및 암 주변조직 세포 3D 공배양이 가능한 바이오 3D 펜
 텀 접목 가능 항암 치료용 음파제어 세포 배양기 개발

기 여 율 1/8
 과제수행기관명 가천대학교 산학협력단
 연구기간 2020.07.31 ~ 2020.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345322528
 과제번호 2020R1A6A3A13073307
 부처명 교육부
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단
 연구사업명 이공학학술연구기반구축(R&D)
 연구과제명 줄기세포와 나노입자를 통한 M2 대식세포의 분극유도 및 심근 경색 치료
 기 여 율 1/8
 과제수행기관명 성균관대학교 산학협력단
 연구기간 2020.06.01 ~ 2021.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711117277
 과제번호 2019M3E6A1103866

이 없는 친환경 연료전지 시스템 개발	부처명	과학기술정보통신부
	과제관리(전문)기관명	한국연구재단(KNRF)
	연구사업명	수소에너지혁신기술개발사(R&D)
	연구과제명	액상유기수소운반체(LOHC)의 전기화학적 수소 생산/저장을 이용한 이산화탄소 배출
	기여율	1/8
이 발명을 지원한 국가연구개발사업	과제수행기관명	경희대학교(국제캠퍼스)
	연구기간	2019.09.01 ~ 2023.12.31
	과제고유번호	1711106476
	과제번호	2020R1A2C1003885
	부처명	과학기술정보통신부
의 새로운 제조공정 개발	과제관리(전문)기관명	한국연구재단
	연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
	연구과제명	수용액상에서 산화아연과 금속 양이온의 반응을 이용한 아연기반 유무기 나노구조체
	기여율	1/8
	과제수행기관명	경희대학교(국제캠퍼스)
이 발명을 지원한 국가연구개발사업	연구기간	2020.03.01 ~ 2025.02.28
	과제고유번호	1711105013
	과제번호	2020M3A7B4002030
	부처명	과학기술정보통신부
	과제관리(전문)기관명	한국연구재단
이 발명을 지원한 국가연구개발사업	연구사업명	나노·소재기술개발(R&D)
	연구과제명	페로브스카이트용 전하 수송재료 및 박막공정 개발
	기여율	1/8
	과제수행기관명	경희대학교(국제캠퍼스)
	연구기간	2017.07.01 ~ 2022.06.30
및 반응 메커니즘 해석	과제고유번호	1711103986
	과제번호	2016M3D1A1021143
	부처명	과학기술정보통신부
	과제관리(전문)기관명	한국연구재단
	연구사업명	미래소재디스커버리지원(R&D)
	연구과제명	프랙탈 구조 알케미 촉매를 이용한 과산화수소 및 암모니아 합성 반응시스템 개발
	기여율	1/8
	과제수행기관명	고려대학교
	연구기간	2016.05.01 ~ 2022.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

금-구리 나노입자를 유효성분으로 포함하는 허혈성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물은 줄기세포를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 허혈성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 허혈성 질환은 허혈성 심장질환, 허혈성 심근경색, 허혈성 심부전, 허혈성 장염, 허혈성 혈관질환, 허혈성 안질환, 허혈성 망막증, 허혈성 녹내장, 허혈성 신부전, 허혈성 대머리, 허혈성 뇌졸중 및 허혈성 하지질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 허혈성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 금-구리 나노입자는 10 내지 500 nm의 직경을 갖는 것을 특징으로 하는, 허혈성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 금-구리 나노입자에 상기 금 및 구리는 1 : 10 내지 80의 원자 수 비율로 나노입자에 포함되는 것을 특징으로 하는, 허혈성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 금-구리 나노입자는 입자 코어 부분에 구리를 포함하며,

셸 부분에 금을 포함하는 것을 특징으로 하는, 허혈성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 금-구리 나노입자는 PHD2(prolyl hydroxylase2) 또는 FIH(factor inhibiting HIF) 발현 수준을 감소시키고 동시에, HIF-1 α (Hypoxia-inducible factor 1-alpha) 또는 VEGF(Vascular endothelial growth factor) 발

현 수준을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 허혈성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 금-구리 나노입자는 혈관 분화능을 가지는 것을 특징으로 하는, 허혈성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

금-구리 나노입자를 유효성분으로 포함하는, 줄기세포의 이식 보조제.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 줄기세포는 성체줄기세포, 배아줄기세포, 중간엽줄기세포, 지방줄기세포, 제대혈줄기세포 및 역분화줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 줄기세포의 이식 보조제.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 금-구리 나노입자는 줄기세포의 혈관 분화능을 증진시키는 것을 특징으로 하는, 줄기세포의 이식 보조제.

청구항 12

분리된 줄기세포에 금-구리 나노입자를 처리하는 단계를 포함하는, 줄기세포의 혈관 분화능 증진 방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 금-구리 나노입자는 줄기세포의 혈관내피세포 증식인자인 VEGF 또는 HIF-1 α 의 발현 수준을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 14

(a) 황산구리(CuSO_4), 폴리비닐피롤리돈(PVP), L-아스코르브산을 각각 독립적으로 에틸렌글리콜에 분산시키는 단계;

(b) 상기 분산된 에틸렌글리콜을 혼합하는 단계를 포함하는 구리 나노입자 분산액을 제조하는 단계; 및

(c) 상기 구리 나노입자 분산액에 염화금산(HAuCl_4)을 첨가하여 반응시키는 단계;를 포함하는 금-구리 나노입자의 제조방법으로서,

상기 금-구리 나노입자는 혈관 분화능을 갖는 것을 특징으로 하는, 제조방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 금-구리 나노입자를 유효성분으로 포함하는 허혈성 질환 예방 또는 치료용 조성물 등에 관한 것이다.

배경기술

[0003] 허혈은 심장 및 기타 조직에서 혈액공급의 차단으로 산소와 혈액 내에 포함되어 있는 여러 가지 영양분이 공급되지 못해 일어나는 현상이다. 신체 각 부분이 기능을 정상적으로 수행하려면 혈관을 통하여 적절한 산소와 영양이 공급되어야 한다. 허혈증으로 인해 손상 받는 대표적인 장기가 심장 및 뇌 조직이다. 심장은 관상동맥이라는 혈관을 통해 필요한 산소와 영양을 공급받는다. 그러나 필요한 양만큼의 혈류량을 공급받지 못하면 심장근육에 대사산물이 쌓이고 저산소증에 빠지게 되어 기능에 장애가 생기는데, 이러한 경우를 심근허혈이라고 한다. 그리고 심근허혈로 생기는 심장기능의 장애를 허혈성심질환이라고 한다. 질환은 크게 협심증과 심근경색증으로 나뉜다. 일반적으로 남성이 여성에 비해 발생빈도가 높고 연령이 높을수록, 위험요소를 갖춘 사람일수록 발생빈도가 높다.

[0004] 저산소유도인자(Hypoxia-inducible factor-1; HIF-1)는 저산소 상태에서 다량 유도 발현되는 핵 전사인자로서 세포 내에서의 산소 항상성을 유지하기 위해서, 적혈구 생성(erythropoiesis), 신혈관생성(angiogenesis) 및 해당과정(glycolysis)에 관련된 유전자를 발현시키는 기능을 한다. HIF-1은 α 와 β 두 가지의 군으로 나뉘어지며 HIF-1 α 는 전사인자로서 정상산소 분압에서는 분해되지만 저산소 상태에서는 단백질 자체가 안정화되는 것으로 알려져 있다. 안정화된 HIF-1 α 는 HIF-1 β 인 ARNT와 결합하여 핵으로 이동하여 혈관생성과 대사에 관여하는 유전자들을 발현시킨다. HIF-1의 활성화는 암 발생과 전이, 류마티스성 관절염, 허혈성 뇌졸중, 동맥경화증 등 다양한 만성 대사성 질환의 병리학적 기전과 밀접한 관계가 있기 때문에 최근 주요 신약 표적으로 부상하고 있다.

[0005] 근래에 들어, 줄기세포를 이용하여, G-CSF에 의해 분화유도된 조혈줄기세포를 이용하여 허혈성 질환을 치료하는데 적용한 예가 있으며, 또한 안지오프로이오티 유전자가 도입된 중간엽 줄기세포를 처리하는 방법 등이 있었다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 높은 산화성으로 인해 생체 적합성이 낮은 구리 입자 대신, 산화도가 낮으면서도 세포 독성도 또한 낮고, 낮은 pH 환경에서도 분해 속도가 높은 금-구리 나노입자를 허혈성 질환 치료제로 사용할 수 있음을 규명하였을 뿐만 아니라, 줄기세포의 치료 효과를 향상시키는 보조제로서 유용하다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) 한국 등록특허 제10-1555954호
(특허문헌 0002) 대한민국 특허공개 제2003-0034177호
(특허문헌 0003) 대한민국 특허공개 제2005-0111593호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 이에, 본 발명자들은 금-구리 나노입자가 생체 적합성이 우수할 뿐만 아니라, 허혈성 질환의 치료제 및 줄기세포 치료보조제로 이용될 수 있음을 최초로 확인하였다.

[0010] 따라서, 본 발명의 목적은 금-구리 나노입자를 유효성분으로 포함하는 허혈성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 금-구리 나노입자를 유효성분으로 포함하는, 줄기세포의 이식 보조제를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 분리된 줄기세포에 금-구리 나노입자를 처리하는 단계를 포함하는, 줄기세포의 혈관 분화능 증진 방법을 제공하는 것이다.

[0014] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 금-구리 나노입자를 유효성분으로 포함하는 허혈성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 금-구리 나노입자를 유효성분으로 포함하는, 줄기세포의 이식 보조제를 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 분리된 줄기세포에 금-구리 나노입자를 처리하는 단계를 포함하는, 줄기세포의 혈관 분화능 증진 방법을 제공한다.

[0019] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 조성물은 줄기세포를 추가로 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0020] 본 발명의 다른 실시예에서, 상기 허혈성 질환은 허혈성 심장질환, 허혈성 심근경색, 허혈성 심부전, 허혈성 장애, 허혈성 혈관질환, 허혈성 안질환, 허혈성 망막증, 허혈성 녹내장, 허혈성 신부전, 허혈성 대머리, 허혈성 뇌졸중 및 허혈성 하지질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0021] 본 발명의 다른 실시예에서, 상기 금-구리 나노입자는 10 내지 500 nm의 직경을 갖는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0022] 본 발명의 다른 실시예에서, 상기 금-구리 나노입자는 입자 코어 부분에 구리를 포함하며,

[0023] 셸 부분에 금을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0024] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 금-구리 나노입자에 상기 금 및 구리는 1 : 10 내지 80의 원자 수 비율로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0025] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 금-구리 나노입자는 PHD2(prolyl hydroxylase2) 또는 FIH(factor inhibiting HIF) 발현 수준을 감소시킴과 동시에, HIF-1 α (Hypoxia-inducible factor 1-alpha) 또는 VEGF(Vascular endothelial growth factor) 발현 수준을 증가시킬 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0026] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 금-구리 나노입자는 혈관 분화능을 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0027] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 줄기세포는 성체줄기세포, 배아줄기세포, 중간엽줄기세포, 지방줄기세포, 조혈모세포, 체내혈줄기세포 및 역분화줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0028] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 금-구리 나노입자는 줄기세포의 혈관 분화능을 증진시킬 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0029] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 금-구리 나노입자는 줄기세포의 혈관내피세포 증식인자인 VEGF 또는 HIF-1 α 의 발현 수준을 증가시킬 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0030] 또한, 본 발명은 금-구리 나노입자를 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하여 허혈성 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0031] 또한, 본 발명은 허혈성 질환의 예방 또는 치료를 위한 약제를 제조하기 위한 금-구리 나노입자 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 용도를 제공한다.

[0032] 또한, 본 발명은 금-구리 나노입자를 유효성분으로 포함하는 조성물의 허혈성 질환 치료 용도를 제공한다.

[0033] 또한, 본 발명은 (a)황산구리(CuSO_4), 폴리비닐피롤리돈(PVP), L-아스코르브산을 각각 독립적으로 에틸렌글리

콜에 분산시키는 단계;

[0034] (b)상기 분산된 에틸렌글리콜을 혼합하는 단계를 포함하는 구리 나노입자 분산액을 제조하는 단계; 및

[0035] (c)상기 구리 나노입자 분산액에 염화금산(HAuCl_4)을 첨가하여 반응시키는 단계;를 포함하는 금-구리 나노입자의 제조방법으로서,

[0036] 상기 금-구리 나노입자는 혈관 분화능을 갖는 것을 특징으로 하는, 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0038] 본 발명에 따른 금-구리 나노입자는 세포 독성도가 낮음과 동시에 산화가 더디고, 낮은 pH 환경에서도 구리입자보다 분해 속도가 높아 생체 분해성도 뛰어나다. 또한, 금-구리 나노입자는 기존 줄기세포 치료제의 혈관 생성능을 크게 향상시킴을 확인하였는 바, 허혈성 질환 치료제 및 줄기세포 치료 보조제로서 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0040] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 (A) 금-구리 나노입자의 TEM 사진, (B) 금-구리 나노입자 구성 원소의 EDS 매핑을 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 금-구리 나노입자 및 구리 나노입자의 XRD 패턴을 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 금-구리 나노입자 및 구리 나노입자의 (A) Cu 2p (피크 1, 2는 각각 산화된 Cu 및 금속 Cu에 해당) 및 (B) CuAu NP의 Au 4f의 XPS 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 pH 4.0 및 7.0 용액에서 구리 및 금-구리 나노입자의 Cu 이온에 대한 누적 방출 수치를 보여주는 그래프를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 금-구리 나노입자 및 구리 나노입자에 대한 지방 유래 줄기세포에서의 독성 평가 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 금-구리 나노입자를 주입하였을 때 세포의 유전자 발현 변화에 대한 모식도를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 미처리(NT), 구리 나노입자(Cu NP), 금-구리 나노입자(CuAu NP)를 각각 처리하였을 때 발생하는 ROS에 대한 변화량 및 ATP 변화를 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 금-구리 나노입자를 주입하였을 때 (A) FIIH, PHD2 유전자 발현의 변화, (B) VEGF의 유전자 발현 변화, (C) HIF-1 α 와 VEGF에 대한 단백질 변화, (D), (E) HIF-1 α 와 VEGF의 단백질 발현양에 대한 정량분석 결과, 금-구리 나노입자를 주입한 이후의 (F) VEGF 유전자와 (G) 단백질 발현량의 변화를 나타낸 것이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 미처리군(NT)과 금-구리 나노입자가 주입된 세포 배양액을 통한 (A) HUVEC 세포에서의 혈관 분화에 대한 분석, (B) tube 형성의 수에 대한 분석, (C) 가지화 되는 점의 수에 대한 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 줄기세포를 주입하였을 때 누드마우스의 하지허혈 모델에 대한 동물 실험 결과를 나타낸 것으로, (A) 다리 상태에 대한 중증도 분석, (B) 누드마우스의 하지허혈 다리 중증도에 대한 대표적인 사진, (C) Laser dopler를 통한 혈류량 확인 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 본 발명은 금-구리 나노입자를 유효성분으로 포함하는 허혈성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

- [0043] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [0045] 본 발명에서, “금-구리 나노입자”는 입자 코어 부분에 구리를 포함하며, 셸 부분에 금을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 금-구리 나노입자는 갈바닉 반응을 통해 제작된 것일 수 있으나, 당업계에 공지된 금-구리 나노입자의 제조 방법이라면 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0046] 본 발명에서, 상기 금-구리 나노입자는 10 내지 500 nm, 30 내지 400 nm, 50 내지 300 nm, 70 내지 300 nm, 80 내지 300 nm, 100 내지 300 nm, 150 내지 250 nm, 180 내지 220 nm, 190 내지 210 nm, 또는 약 200 nm의 직경을 갖는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0047] 본 발명에서, 상기 금-구리 나노입자에 상기 금 및 구리는 1 : 10 내지 80, 1 : 10 내지 70, 1 : 10 내지 60, 1 : 10 내지 50, 1 : 20 내지 80, 1 : 20 내지 70, 1 : 20 내지 60, 1 : 20 내지 50, 1 : 30 내지 80, 1 : 30 내지 70, 1 : 30 내지 60, 1 : 30 내지 50, 1 : 40 내지 80, 1 : 40 내지 70, 1 : 40 내지 60, 1 : 40 내지 50, 1 : 45 내지 80, 1 : 45 내지 70, 1 : 45 내지 60, 1 : 45 내지 55, 1 : 47 내지 52, 1 : 48 내지 50, 또는 약 1 : 49의 원자 수 비율로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0048] 본 발명에서, 상기 조성물은 줄기세포를 추가로 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 줄기세포란 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 서로 다른 종류의 세포로 분화하는 능력을 가지는 세포를 의미한다. 본 발명에 있어서, 상기 줄기세포는 성체줄기세포, 배아줄기세포, 중간엽줄기세포, 지방줄기세포, 조혈모세포, 체대혈줄기세포 및 역분화줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으며, 바람직하게는 성체 줄기세포일 수 있으며, 보다 바람직하게는 지방 유래 줄기세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0049] 본 발명에서, 상기 줄기세포는 줄기세포 자체 또는 줄기세포를 포함하는 배양액의 형태로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 줄기세포를 배양하는 배양액은 당해 분야에서 줄기세포 배양에 통상적으로 사용되는 배지 배양액을 모두 포함한다. 배양에 사용되는 배양액은 일반적으로 탄소원, 질소원 및 미량원소 성분을 포함한다.
- [0050] 본 발명에서, 상기 줄기세포는 동종 또는 자가 줄기세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0051] 본 발명에서, 상기 허혈성 질환은, 허혈성 심장질환, 허혈성 심근경색, 허혈성 심부전, 허혈성 장염, 허혈성 혈관질환, 허혈성 안질환, 허혈성 망막증, 허혈성 녹내장, 허혈성 신부전, 허혈성 대머리, 허혈성 뇌졸중 및 허혈성 하지질환으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0052] 본 발명에서, 상기 허혈성 심장질환은 협심증, 심근경색증 및 심부전증으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0053] 본 발명에서, 상기 금-구리 나노입자는 HIF-1 α 또는 VEGF(Vascular endothelial growth factor) 발현 수준을 증가시킬 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0054] 본 발명에서, 상기 금-구리 나노입자는 PHD2 또는 FIH 발현 수준을 감소시킬 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0055] 본 발명에서, 상기 발현 수준은 유전자 또는 단백질의 발현 수준일 수 있다.
- [0056] 본 발명에서, 상기 금-구리 나노입자는 혈관 분화능을 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0057] 본 발명에서, 상기 금-구리 나노입자는 혈관신생을 촉진하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서, “혈관신생”은 혈관이 새로 형성되는 과정, 즉, 새로운 혈관이 세포, 조직 또는 기관 내로 발생하는 것을 지칭하는 것이며, 새로운 혈관이 생성되는 경우(vasculogenesis) 및 기존에 존재하는 혈관에서 새로운 혈관이 뻗어나가는 경우(angiogenesis)를 모두 포함한다.
- [0058] 본 발명은 또한, 금-구리 나노입자의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함할 수 있다. 본 발명에서 용어, “약학적으로 허용 가능한 염”이란 약학적으로 허용되는 무기산, 유기산, 또는 염기로부터 유도된 염을 포함한다.
- [0059] 적합한 산의 예로는 염산, 브롬산, 황산, 질산, 과염소산, 푸마르산, 말레산, 인산, 글리콜산, 락트산, 살리실산, 숙신산, 톨루엔-p-설폰산, 타르타르산, 아세트산, 시트르산, 메탄설폰산, 포름산, 벤조산, 말론산, 글루콘

산, 나프탈렌-2-설폰산, 벤젠설폰산 등을 들 수 있다. 산부가염은 통상의 방법, 예를 들면 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴과 같은 수혼화성 유기 용매를 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 또한, 동물량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올을 가열하고 이어서 상기 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시켜 제조할 수 있다.

[0060] 적합한 염기로부터 유도된 염은 나트륨, 칼륨 등의 알칼리 금속, 마그네슘 등의 알칼리 토금속, 및 암모늄 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리토 금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻을 수 있다. 이 때, 금속염으로서 특히 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하며, 또한 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.

[0061] 본 발명의 조성물 내의 금-구리 나노입자의 함량은 질환의 증상, 증상의 진행 정도, 환자의 상태 등에 따라서 적절히 조절 가능하며, 예컨대, 전체 조성물 중량을 기준으로 0.0001 내지 99.9중량%, 또는 0.001 내지 50중량% 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 함량비는 용매를 제거한 건조량을 기준으로 한 값이다.

[0062] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 부형제는 예를 들어, 희석제, 결합제, 붕해제, 활택제, 흡착제, 보습제, 필름-코팅 물질, 및 제어방출첨가제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.

[0063] 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 서방형 과립제, 장용과립제, 액제, 점안제, 엘실릭제, 유제, 현탁액제, 주정제, 트로키제, 방향수제, 리모나아데제, 정제, 서방형정제, 장용정제, 실하정, 경질캡셀제, 연질캡셀제, 서방캡셀제, 장용캡셀제, 환제, 틱크제, 연조엑스제, 건조엑스제, 유동엑스제, 주사제, 캡슐제, 관류액, 경고제, 로션제, 파스타제, 분무제, 흡입제, 패취제, 멸균주사용액, 또는 에어로졸 등의 외용제 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 외용제는 크림, 젤, 패치, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 또는 카타폴라스마제 등의 제형을 가질 수 있다.

[0064] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0065] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

[0066] 본 발명에 따른 정제, 산제, 과립제, 캡슐제, 환제, 트로키제의 첨가제로 옥수수전분, 감자전분, 밀전분, 유당, 백당, 포도당, 과당, 디-만니톨, 침강탄산칼슘, 합성규산알루미늄, 인산일수소칼슘, 황산칼슘, 염화나트륨, 탄산수소나트륨, 정제 라놀린, 미결정셀룰로오스, 텍스트린, 알긴산나트륨, 메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 카올린, 요소, 콜로이드성실리카겔, 히드록시프로필스타치, 히드록시프로필메틸셀룰로오스(HPMC) 1928, HPMC 2208, HPMC 2906, HPMC 2910, 프로필렌글리콜, 카제인, 젖산칼슘, 프리모젤 등 부형제; 젤라틴, 아라비아고무, 에탄올, 한천가루, 초산프탈산셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스칼슘, 포도당, 정제수, 카제인나트륨, 글리세린, 스테아린산, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 메틸셀룰로오스나트륨, 메틸셀룰로오스, 미결정셀룰로오스, 텍스트린, 히드록시셀룰로오스, 히드록시프로필스타치, 히드록시메틸셀룰로오스, 정제 셀락, 전분호, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 폴리비닐알코올, 폴리비닐피롤리돈 등의 결합제가 사용될 수 있으며, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 옥수수전분, 한천가루, 메틸셀룰로오스, 벤토나이트, 히드록시프로필스타치, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 알긴산나트륨, 카르복시메틸셀룰로오스칼슘, 구연산칼슘, 라우릴황산나트륨, 무수규산, 1-히드록시프로필셀룰로오스, 텍스트린, 이온교환수지, 초산폴리비닐, 포름알데히드처리 카제인 및 젤라틴, 알긴산, 아밀로오스, 구아르고무(Guar gum), 중조, 폴리비닐피롤리돈, 인산칼슘, 젤라틴, 아라비아고무, 아밀로펙틴, 펙틴, 폴리인산나트륨, 에틸셀룰로오스, 백당, 규산 마그네슘알루미늄, 디-소르비톨액, 경질무수규산 등 붕해제; 스테아린산칼슘, 스테아린산마그네슘, 스테아린산, 수소화식물유(Hydrogenated vegetable oil), 탈크, 석송자, 카올린, 바셀린, 스테아린산나트륨, 카카오지, 살리실산나트륨, 살리실산마그네슘, 폴리에틸렌글리콜(PEG) 4000, PEG 6000, 유동파라핀, 수소첨가대두유(Lubri wax), 스테아린산알루미늄, 스테아린산아연, 라우릴황산나트륨, 산화마그네슘, 마크로골(Macrogol), 합성규산알루미늄, 무수규산, 고급지방산, 고급알코올, 실리코유, 파라핀유, 폴리에틸렌글리콜지방산에테르, 전분, 염화나트륨, 초산나트륨, 올레인산나트륨, dl-로이신, 경질무수규산 등의 활택제;가 사용될 수 있다.

- [0067] 본 발명에 따른 액제의 첨가제로는 물, 묽은 염산, 묽은 황산, 구연산나트륨, 모노스테아린산슈크로스를, 폴리옥시에틸렌소르비톨지방산에스테르류(트윈에스테르), 폴리옥시에틸렌모노알킬에테르류, 라놀린에테르류, 라놀린에스테르류, 초산, 염산, 암모니아수, 탄산암모늄, 수산화칼륨, 수산화나트륨, 프롤아민, 폴리비닐피롤리돈, 에틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨 등이 사용될 수 있다.
- [0068] 본 발명에 따른 시럽제에는 백당의 용액, 다른 당류 혹은 감미제 등이 사용될 수 있으며, 필요에 따라 방향제, 착색제, 보존제, 안정제, 현탁화제, 유화제, 점조제 등이 사용될 수 있다.
- [0069] 본 발명에 따른 유제에는 정제수가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 유화제, 보존제, 안정제, 방향제 등이 사용될 수 있다.
- [0070] 본 발명에 따른 현탁제에는 아카시아, 트라가칸타, 메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 미결정셀룰로오스, 알긴산나트륨, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, HPMC 1828, HPMC 2906, HPMC 2910 등 현탁화제가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 계면활성제, 보존제, 안정제, 착색제, 방향제가 사용될 수 있다.
- [0071] 본 발명에 따른 주사제에는 주사용 증류수, 0.9%염화나트륨주사액, 링겔주사액, 텍스트로스주사액, 텍스트로스+염화나트륨주사액, 피이지(PEG), 락테이트 링겔주사액, 에탄올, 프로필렌글리콜, 비휘발성유-참기름, 면실유, 낙화생유, 콩기름, 옥수수기름, 올레인산에틸, 미리스트산 이소프로필, 안식향산벤젠과 같은 용제; 안식향산나트륨, 살리실산나트륨, 초산나트륨, 요소, 우레탄, 모노에틸아세트아마이드, 부타졸리딘, 프로필렌글리콜, 트윈류, 니정틴산아미드, 헥사민, 디메틸아세트아마이드와 같은 용해보조제; 약산 및 그 염(초산과 초산나트륨), 약염기 및 그 염(암모니아 및 초산암모늄), 유기화합물, 단백질, 알부민, 펩톤, 검류와 같은 완충제; 염화나트륨과 같은 등장화제; 중아황산나트륨(NaHSO_3) 이산화탄소가스, 메타중아황산나트륨($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), 아황산나트륨(Na_2SO_3), 질소가스(N_2), 에틸렌디아민테트라초산과 같은 안정제; 소듐비셀파이드 0.1%, 소듐포름알데히드 설폭실레이트, 치오우레아, 에틸렌디아민테트라초산디나트륨, 아세톤소듐비셀파이드와 같은 황산화제; 벤질알코올, 클로로부탄올, 염산프로카인, 포도당, 글루콘산칼슘과 같은 무통화제; 시엠시나트륨, 알긴산나트륨, 트윈 80, 모노스테아린산알루미늄과 같은 현탁화제를 포함할 수 있다.
- [0072] 본 발명에 따른 좌제에는 카카오지, 라놀린, 위템솔, 폴리에틸렌글리콜, 글리세로젤라틴, 메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스, 스테아린산과 올레인산의 혼합물, 수바날(subanal), 면실유, 낙화생유, 야자유, 카카오버터+콜레스테롤, 레시틴, 라네트왁스, 모노스테아린산글리세롤, 트윈 또는 스펀, 임하우젠(Imhausen), 모놀렌(모노스테아린산프로필렌글리콜), 글리세린, 아덱스솔리두스(Adeps solidus), 부티룸 태고-G(Buytyrum Tego-G), 세베스파마 16 (Cebes Pharma 16), 헥사라이드베이스 95, 코토마(Cotomar), 히드록코테 SP, S-70-XXA, S-70-XX75(S-70-XX95), 히드록코테(Hydrokote) 25, 히드록코테 711, 이드로포스탈 (Idropostal), 마사에스트라리움(Massa estrarium, A, AS, B, C, D, E, I, T), 마사-MF, 마수폴, 마수폴-15, 네오수포스탈-엔, 파라마운드-B, 수포시로(OSI, OSIX, A, B, C, D, H, L), 좌제기제 IV 타입 (AB, B, A, BC, BBG, E, BGF, C, D, 299), 수포스탈 (N, Es), 웨코비 (W, R, S, M, Fs), 테제스터 트리글리세라이드 기제 (TG-95, MA, 57)와 같은 기제가 사용될 수 있다.
- [0073] 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 슈크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.
- [0074] 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [0075] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수해/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

- [0076] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 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 본 발명이 속하는 기술분야에 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0077] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구 복용, 피하 주사, 복강 투여, 정맥 주사, 근육 주사, 척수 주위 공간(경막내) 주사, 설하 투여, 불점막 투여, 직장 내 삽입, 질 내 삽입, 안구 투여, 귀 투여, 비강 투여, 흡입, 입 또는 코를 통한 분무, 피부 투여, 경피 투여 등에 따라 투여될 수 있다.
- [0078] 본 발명의 약학적 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 질환의 중등도 등의 여러 관련 인자와 함께 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다.
- [0079] 본 발명에서 “개체”란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐 (mouse), 쥐 (rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0080] 본 발명에서 “투여”란 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.
- [0081] 본 발명에서 “예방”이란 목적하는 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, “치료”란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 그에 따른 대사 이상 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미하며, “개선”이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0082] 또한, 본 발명은 금-구리 나노입자를 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하여 허혈성 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [0083] 또한, 본 발명은 허혈성 질환의 예방 또는 치료를 위한 약제를 제조하기 위한 금-구리 나노입자 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 용도를 제공한다.
- [0084] 또한, 본 발명은 금-구리 나노입자를 유효성분으로 포함하는 조성물의 허혈성 질환 치료 용도를 제공한다.
- [0085] 또한, 본 발명은 금-구리 나노입자를 유효성분으로 포함하는, 줄기세포의 이식 보조제 또는 치료 보조제를 제공한다.
- [0086] 본 발명의 금-구리 나노입자는 줄기세포의 세포치료제의 이식을 보조하기 위한 용도로 제공될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로, 본 발명의 금-구리 나노입자를 줄기세포와 병용 처리하는 경우, 줄기세포의 혈관 분화능 또는 혈관 신생능이 촉진 또는 유도됨을 확인하였는 바, 본 발명의 금-구리 나노입자를 줄기세포의 이식 보조제로서 사용할 수 있다.
- [0087] 본 발명에서, 상기 줄기세포 치료 보조제는 당업계에서 일반적으로 사용되는 줄기세포 치료제의 효과를 증진시키기 위하여 보조적으로 사용될 수 있는 제제를 말하며, 본 발명에 의한 보조제를 사용함으로써 줄기세포 치료제의 줄기세포의 분화 및 노화 억제를 촉진하여 치료제의 효과를 향상시킬 수 있다.
- [0088] 본 발명의 용어 “세포치료제 (cellular therapeutic agent)”란, 인간으로부터 분리, 배양 및 특수한 조작을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품 (미국 FDA 규정)으로서, 세포 혹은 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가, 동종, 또는 이종세포를 체외에서 증식 선별하거나 다른 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 이러한 세포가 질병의 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 의미한다.
- [0089] 본 발명의 세포치료제 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 비경구 투여, 예를 들어, 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 보다 구체적으로, 환자로의 세포이식은 질병부위로 이동을 유도할 수 있다면 어떠한 경로를 통해서든지 투여 가능하다. 예를 들어, 이식하는 세포를 인공뇌척수액과 생리식염수 등을 사용하여 부유시킨 상태에서 주사기에 모으고, 수술에 의하여 손상한 신경조직을 노출하여 이 손상부위에 주사바늘로 직접 주입하는 것에 의하여 행할 수 있으며, 줄기세포를 병변으로 향하게 하는 수단을 구비한 비히클에 로딩하는 방안을 고려할 수도 있다. 따라서 본 발명의 줄기세포는 국소(협측, 설하, 피부 및 안내 투여를 포함), 비경구(피하, 피내, 근육내, 점적, 정맥 내, 동맥 내, 관절 내 및 뇌척수액 내를 포함) 또는 경피성 투여를 포

함한 여러 경로를 통해 투여할 수 있으며, 바람직하게는 비경구, 가장 바람직하게는 발병부위에 직접 투여한다. 본 발명의 줄기세포는 손상된 부위, 특히 허혈 손상 부위로의 이동성이 높기 때문에, 효과적으로 치료가 필요한 부위로 이동이 가능하다. 또한, 뇌척수액 중으로의 주입도 효과를 기대할 수 있다. 이 경우, 통상의 요추천자(lumbar puncture)로 세포를 주입하는 것이 가능하기 때문에 수술이 불필요하고, 국소마취만으로 끝내기 때문에 병실에서 환자를 처치할 수 있는 점에서 좋다. 나아가, 동맥 내와 정맥 내로의 주입도 효과를 기대할 수 있다.

- [0090] 상기 조성물은 세포 치료에 일반적으로 사용되는 약제학적 담체와 함께 적합한 형태로 제형화될 수 있다. '약학적으로 허용되는'이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 약학적으로 허용되는 담체로는 예를 들면, 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코스 및 글리콜 등과 같은 비경구 투여용 담체 등이 있으며 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체로는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995).
- [0091] 또한, 상기 조성물은 세포치료제가 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수도 있다.
- [0092] 본 발명의 세포치료제 조성물은 질환의 치료를 위하여 치료학적으로 유효한 양의 세포치료제를 포함할 수 있다. '치료학적으로 유효한 양 (therapeutically effective amount)'은 연구자, 의사, 의사 또는 기타 임상에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다.
- [0093] 본 발명의 조성물에 포함되는 세포치료제는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로 최적의 세포치료제 함량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 포함하는 것이 중요하다. 예컨대, 본 발명의 줄기세포의 1일 투여량은 1.0×10^4 내지 1.0×10^{11} 세포/kg 체중, 바람직하게는 1.0×10^5 내지 1.0×10^9 세포/kg 체중을 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 유효성분의 실제 투여량은 치료하고자 하는 질환, 질환의 중증도, 투여경로, 환자의 체중, 연령 및 성별 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0094] 본 발명은 포유동물에게 치료학적으로 유효한 양의 본 발명의 상기 세포치료제 조성물을 투여하는 것을 포함하는 치료방법을 제공한다. 여기에서 사용된 용어 포유동물은 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 포유동물을 말하며, 바람직하게는 인간을 말한다.
- [0095] 또한, 본 발명은 분리된 줄기세포에 금-구리 나노입자를 처리하는 단계를 포함하는, 줄기세포의 혈관 분화능 증진 방법을 제공한다.
- [0096] 본 발명에서, 상기 금-구리 나노입자는 줄기세포의 혈관 분화능을 증진시킬 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0097] 본 발명에서, 상기 금-구리 나노입자는 줄기세포의 혈관내피세포 증식인자인 VEGF 또는 HIF-1 α 의 발현 수준을 증가시킬 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0099] 또한, 본 발명은 (a)황산구리(CuSO_4), 폴리비닐피롤리돈(PVP), L-아스코르브산을 각각 독립적으로 에틸렌글리콜에 분산시키는 단계;
- [0100] (b)상기 분산된 에틸렌글리콜을 혼합하는 단계를 포함하는 구리 나노입자 분산액을 제조하는 단계; 및
- [0101] (c)상기 구리 나노입자 분산액에 염화금산(HAuCl_4)을 첨가하여 반응시키는 단계;를 포함하는 금-구리 나노입자의 제조방법으로서,
- [0102] 상기 금-구리 나노입자는 혈관 분화능을 갖는 것을 특징으로 하는, 제조방법을 제공한다.

- [0103] 본 발명에서, 상기 단계 (b)는 (b-1) 상기 에틸렌글리콜이 혼합된 용액을 가열하는 단계;
- [0104] (b-2)상기 가열된 용액을 원심분리 후 세척하여 구리 나노입자를 수득하는 단계; 및
- [0105] (b-3)상기 세척된 구리 나노입자를 에탄올에 분산시키는 단계를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0106] 본 발명에서, 상기 염화금산은 구리 나노입자 분산액에 0.0001 내지 0.01, 0.0001 내지 0.009, 0.0001 내지 0.008, 0.0001 내지 0.007, 0.0001 내지 0.006, 0.0001 내지 0.005, 0.0001 내지 0.004, 0.0001 내지 0.003, 0.0001 내지 0.002, 0.001 내지 0.0015, 또는 약 0.0012 mmol로 첨가될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0108] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0110] **[실시예]**
- [0111] **실험 재료 및 방법**
- [0112] **실험물질**
- [0113] 황산구리(II) (CuSO_4 , $\geq 99.0\%$), 폴리 비닐 피롤리돈 (PVP, MW = 40,000), L-아스코르브산 ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$), 염화금(III) 수화물 (HAuCl_4 , 99.9 %), 무수 에틸렌글리콜 ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$, 99.8 %)는 Sigma Aldrich (미국, 미주리주, 세인트루이스)에서 구입했다. 모든 시약은 다른 정제 과정을 거치지 않았다.
- [0115] **구리 나노입자의 합성**
- [0116] 0.2mmol의 CuSO_4 (10mL), 0.3mmol의 PVP (10mL) 및 1.6mmol의 L-아스코르브산 (80mL)을 각각 에틸렌글리콜에 완전히 분산시켰다. 완전히 분산된 용액을 모두 합친 후 반응 용액을 1 시간 동안 190 °C로 가열하였다. 반응 후 최종 생성물을 원심 분리하고 아세톤과 에탄올의 혼합물로 2 회 (12,000 rpm, 15 분) 세척하였다. 마지막으로 합성된 구리 나노입자를 에탄올 10ml에 재분산시켰다.
- [0118] **금-구리 나노입자의 합성**
- [0119] 금-구리 나노입자의 합성을 위해 제조된 에탄올상 구리 나노입자 분산액 10mL에 HAuCl_4 0.0012mmol (0.4mg)을 넣고 상온에서 1 분간 반응시켰다. 반응 중에 용액의 색이 자홍색에서 검정색으로 변했다. 최종 생성물을 원심 분리 (11,000 rpm, 10 분)하고 아세톤과 에탄올의 혼합물로 2 회 세척하였다. 금-구리 나노입자는 10ml의 물에 재분산되었다.
- [0121] **나노입자의 특성 분석**
- [0122] 나노입자의 형태와 구성은 EDS (Energy Dispersive X-ray) 검출기가 장착된 200kV에서 작동하는 TEM JEM-2100F 현미경을 사용하여 수집되었다. 분말 X 선 회절 (XRD)은 6° / min의 스캔 속도로 Cu-K α 방사선 ($\lambda = 0.154$ nm)을 사용하는 Rigaku D/MAX-2200PC X 선 회절계에서 수행되었다. X 선 광전자 분광법 (XPS) 측정은 PHI 5000 VersaProbe (ULVAC PHI, 일본) 및 K α 분광법에서 수행하였다. 구리 및 금-구리 나노입자의 원소 분석은 Echelle 유도 결합 플라즈마 (ICP-AES) 분광계를 사용하여 결정하였다.
- [0124] **세포 배양**
- [0125] 인간 지방 유래 줄기세포 (hADSC)는 Lonza (Bazel, Switzerland)에서 구입하였다. hADSC는 10 % (v/v) 소태아 혈청 (Gibco BRL) 및 1 % (v/v) 페니실린/스트렙토마이신 (Gibco BRL)의 배지에서 5 % CO_2 포화도로 37 °C에서

배양하였다. 배지는 2 일마다 교체하였다. 7 계대 이내의 세포를 실험에 사용하였다.

[0127] 세포 독성도 측정

[0128] 세포 생존율은 cell counting kit-8 (CCK-8) 분석 (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Kumamoto, Japan)을 사용하여 평가하였다. CCK-8 분석을 위해, 세포 내 탈수소 효소 활성화에 의해 감소되는 포르마잔 염료의 양을 측정하였다. 살아있는 세포의 수는 포르마잔 염료의 양에 비례한다. hADSC (400 μ L 무혈청 배지에서 1×10^4 세포/웰)를 다양한 농도의 금-구리 및 구리 나노입자가 있는 24 웰 플레이트에서 24 시간 동안 배양하고 인산염 완충 식염수 (PBS, Gibco BRL)로 세 번 세척하였다. 웰에 신선한 배지를 보충한 후 CCK-8 용액을 각 웰에 첨가하고 세포를 2 시간 동안 배양하였다. 그런 다음 플레이트 리더 (Infinite F50, Tecan, Mannedorf, Switzerland)를 사용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0130] 활성산소(ROS) 분석

[0131] 활성산소는 형광 지시약 DCFDA (D339 Invitrogen)를 사용하여 측정하였다. 24 시간 동안 CuAu NP 또는 Cu NP 처리 후 세포를 PBS 용액에서 10 μ M DCFDA와 함께 37 $^{\circ}$ C에서 20 분 동안 배양하였다. 염색 후 샘플을 PBS 또는 FACS (fluorescence-activated cell sorting) 완충액으로 2 회 세척하고 유세포 분석기 (MACSQuant[®] VYB, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany)를 사용하여 형광 현미경 (IX71, Olympus) 및 FACS로 검사하였다. 평균 형광 신호는 FlowJo 소프트웨어 (Becton, Dickinson & Company, Bergen County, NJ, USA)에 의해 계산하였다

[0133] 정량적 실시간 중합 효소 연쇄 반응 (qRT-PCR)

[0134] qRT-PCR을 사용하여 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), VEGF (vascular endothelial growth factor), BCL-2, BAX, CASPASE-3, CD31 및 alpha smooth muscle actin (α -SMA)의 상대적 유전자 발현 수준을 정량화하였다. 총 리보핵산 (RNA)은 1mL Trizol 시약 (Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA, USA) 및 200 μ L 클로로포름을 사용하여 샘플에서 추출하였다. 용해된 샘플은 4 $^{\circ}$ C에서 10 분 동안 12,000 rpm에서 원심 분리되었다. RNA 펠렛을 물에 용해된 75 % (v/v) 에탄올로 세척하고 건조시켰다. 건조 후 샘플을 RNase가 없는 물에 용해시켰다. qRT-PCR의 경우 SsoAdvanced[™] Universal SYBR Green Supermix 키트 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 및 제조업체 지침에 따른 CFX Connect[™] 실시간 PCR 검출 시스템 (Bio-Rad)을 사용하였다. qRT-PCR에 사용된 프라이머는 표 1에 나타내었다.

표 1

[0135]

Primer	Sequence
Human <i>GAPDH</i>	F: 5' -GTC GGA GTC AAC GGA TTT GG-3' R: 5' -GGGTGGAATCATTGGAACAT-3'
Human <i>VEGF</i>	F: 5' -GAG GGC AGA ATC ATC ACG AAG T-3' R: 5' -CACCAGGGTCTCGATTGGAT-3'
Human <i>CASPASE-3</i>	F: 5' -CCT GGT TAT TAT TCT TGG CGA AA-3' R: 5' -GCA CAA AGC GAC TGG ATG AA-3'
Human <i>PHD2</i>	F: 5' -TTT TTC TGG TCT GAC CGT CGC A-3' R: 5' -CCC TCA CAC CTT TTT CAC CTT GT-3'
Human <i>FIH</i>	F: 5' -CAG GTG ACT GCT ATC CCG TC-3' R: 5' -GTG CAG CGT GCA ATA CTA GC-3'

[0137] 웨스턴 블롯 (Western blot)

[0138] hADSC를 수집하고 방사선 면역 침전 (RIPA) 용해 완충액 (Rockland Immunochemicals Inc., Limerick, PA, USA)에서 용해시켰다. 10,000g에서 10 분간 원심 분리 한 후 단백질을 추출물로 상청액을 제조하였다.

Bicinchoninic acid (BCA) 단백질 분석 (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)을 사용하여 단백질 농도를 측정하였다. 각 샘플의 동일한 단백질을 샘플 버퍼와 혼합하고 로딩한 다음 10 % (v/v) 분해 겔을 사용하여 소듐 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기 영동 (SDS-PAGE)을 수행하였다. SDS-PAGE로 분리된 단백질은 면역 블롯 PVDF 막 (Bio-Rad)으로 옮겨진 후 GAPDH, HIF-1 α , 및 VEGF에 대한 항체(R & D Systems, Minneapolis, MN, USA)로 4 °C에서 밤새 탐침하였다. 그런 다음 세척하고 양 고추냉이 과산화 효소 결합 2차 항체 (R & D Systems)와 함께 실온에서 1 시간 동안 배양하였다. 암실에서 형광 정도를 관찰하였다. 발광은 X- 레이 필름 블루 (Agfa HealthCare NV, Mortsel, Belgium)에 기록하였다. 밴드는 Photoshop CC 프로그램 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA)을 통해 이미지화하였다.

[0140] 아데노신 삼인산 (ATP) 분석

[0141] 1×10^6 개의 세포를 트립신으로 처리하고, PBS로 세척하고 ATP 분석 완충액 (Abcam, Cambridge, UK)에 재현탁한 후, 피펫팅으로 균질화하였다. 용액을 원심 분리한 후, 상청액을 수집하여 제조업체의 지침에 따라 ATP (ATP 분석 키트 #ab83355, Abcam) 수준을 결정하였다. 이온 그룹의 경우, hADSC를 CuSO_4 용액 ($2.5 \mu\text{g} / \text{mL}$)과 함께 $2.5 \mu\text{g}$ 구리로 처리하였다.

[0143] 마우스 뒷다리 허혈 모델링

[0144] 4 주령 암컷 무흉선 생쥐 (체중 20-25g, 동양, 대한민국, 서울)를 자일라진 (10mg/kg)과 케타민 (100mg/kg)으로 마취시켰다. 대퇴동맥과 그 가지는 외부 장골 동맥 및 모든 상류 동맥과 함께 6-10 실크 봉합사 (Ethicon, Somerville, NJ, USA)를 사용하여 피부 절개를 통해 절찰시켰다. 대퇴 동맥은 외부 장골 동맥의 분지로서 근위 기원에서 원위 지점까지 절제함으로써, 복재 동맥과 슬와 동맥으로 분기시켰다. 이 연구에서 모든 동물의 사용 및 관리는 성균관대학교 동물 관리 및 사용위원회 (SKKUIACUC2020-01-12-1)의 승인을 받았다.

[0146] 실시예 1. 금-구리 나노입자의 특성 확인

[0147] 먼저, 상기 금-구리 나노입자의 제법을 통해 제조된 본 발명의 금-구리 나노입자의 특성을 확인하였다.

[0148] 도 1A에 나타난 바와 같이, 금-구리 나노 입자의 투과 전자 현미경 (TEM) 이미지에서 직경이 200nm 수준인 구형 입자가 합성된 것을 확인 하였다. 또한, 도 1B에 나타난 바와 같이, EDS 매핑 분석 결과, 입자의 코어가 Cu이고 Au가 쉘 영역에 분포되어 있음을 확인하였다.

[0149] 또한, 도 2에 나타난 바와 같이, XRD 패턴에서 명확하게 보이는 43.4° , 50.5° 및 74.2° 피크는 각각 금속 Cu의 (111), (200), (220) 평면과 잘 일치하였다. Au의 XRD 피크는 CuAu NP에 상대적으로 적은 양이 포함되어 있어, 잘 나타나지 않았다.

[0150] 도 3에 나타난 바와 같이, 금-구리 나노입자는 각각 산화된 Cu 피크 (934.8 eV)와 금속성 Cu 피크 (932.6 eV)를 포함한 두 개의 피크를 결합하여 형성된 하나의 피크를 나타내었다. 또한, Au XPS 4f 스펙트럼은 Au0 (83.7 eV , 87.4 eV) 및 Au δ^+ (85.2 eV , 88.8 eV) 피크로 구성되었다.

[0152] 실시예 2. 금-구리 나노입자의 이온화 정도 확인

[0153] 구리 나노입자는 분해 속도가 느려 생체적합성 면에서 적절하지 않다는 단점이 있었다. 이에, 금-구리 나노입자의 이온화 정도를 확인함으로써 생체 분해성을 확인하였다.

[0154] 도 4에 나타난 바와 같이, 금-구리 나노입자의 경우, 세포 엔도솜 수준의 낮은 pH (4-5) 상태에서 구리 나노입자에 비해 이온화되는 정도가 빠르며, 구리 나노입자의 경우 외부 산화막에 의해 이온화가 느린 것으로 나타났다.

[0155] 이는 낮은 pH 환경에서의 금-구리 나노입자의 분해속도가 구리 나노입자보다 높아 생체 분해성이 뛰어난 것을 뒷받침하는 결과이다.

[0157] **실시예 3. 금-구리 나노입자의 세포 독성 확인**

[0158] 금-구리 나노입자의 생체 적합성을 확인하기 위하여, 인간 지방 유래 줄기세포에 대한 세포 독성을 확인하였다.

[0159] 도 5에 나타난 바와 같이, 금-구리 나노입자의 경우, 구리 나노입자에 비해 독성도가 낮았다. 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 이상에서 구리 나노입자는 독성을 나타내지만 금-구리 나노입자는 두 배 이상의 농도에서도 높은 세포 생존율을 나타내었는 바, 이는 금-구리 나노입자의 생체 적합성이 더 우수함을 뒷받침하는 결과이다.

[0161] **실시예 4. 금-구리 나노입자의 세포의 ROS 및 ATP 생성 변화에 미치는 영향 확인**

[0162] 구리 나노입자의 경우 세포 내 ROS 생성을 증가시키고, ATP 양을 크게 감소시켜 생체적합성이 낮다는 단점이 있었는데, 금-구리 나노입자의 경우에 구리 나노입자의 상기 단점이 보완되었는지 확인하였다.

[0163] 도 7A 내지 도 7E에 나타난 바와 같이, 아무 처리 하지 않은 (NT) 그룹에 비해 구리 나노입자 (Cu NP)와 금-구리 나노입자 (CuAu NP)를 처리한 경우, 활성산소 발생량이 올라가는 것을 확인할 수 있다. 또한, 구리 나노입자 (Cu NP)의 경우, 동일한 양을 처리하였을 때 금-구리 나노입자보다 더 많은 활성산소를 발생시키는 것으로 나타났다.

[0164] 또한, 도 7F에 나타난 바와 같이, 구리 나노입자를 처리하는 경우 지방 유래 줄기 세포 내에 존재하는 ATP의 양도 크게 떨어지는 반면, 금-구리 나노입자를 처리하는 경우 NT 그룹과 비슷한 정도의 ATP 양을 나타냄을 확인하였다.

[0166] **실시예 5. 금-구리 나노입자의 HIF-1 α 및 VEGF 단백질 발현량에 미치는 영향 확인**

[0167] HIF-1 α 는 쥐의 배아 줄기세포에서 혈관내피세포 증식인자인 VEGF 유전자가 저산소 상태에서 발현되는 데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있어, HIF-1 α 및 VEGF는 허혈성 질환의 치료의 타겟으로 여겨진다. 이에 본 발명자들은 본 발명의 금-구리 나노입자의 HIF-1 α 및 VEGF에 대한 영향을 확인하였다.

[0168] 도 8A를 통해 금-구리 나노입자를 처리할 경우, HIF-1 α 의 발현을 막는 FIH(factor inhibiting HIF)와 PHD2(prolyl hydroxylase2)의 유전자 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[0169] 또한, 도 8B 내지 8E에 나타난 바와 같이, 금-구리 나노입자를 처리할 경우, 유전자 뿐만 아니라 단백질 수준에서의 HIF-1 α (Hypoxia-inducible factor 1-alpha)와 VEGF(Vascular endothelial growth factor)의 발현이 크게 증가하는 것을 확인하였다.

[0170] 또한, 도 8F 및 8G에 나타난 바와 같이, 금-구리 나노입자를 독성이 보이지 않는 농도인 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 에서 24 시간동안 처리시 VEGF의 유전자와 단백질의 발현이 NT 군에 비해 유의미하게 증가하는 것을 확인했다.

[0172] **실시예 6. 금-구리 나노입자의 혈관 분화능에 미치는 영향 확인**

[0173] 인간 탯줄 정맥 내피 세포 (Human umbilical vascular endothelial cell, HUVEC)의 혈관 분화에 대한 분석을 나노입자 미처리(NT) 세포에서 추출한 배양액과 금-구리를 처리한 세포에서 추출한 배양액을 통해 확인하였다.

[0174] 도 9에 나타난 바와 같이, 금-구리 나노입자 (2.5 $\mu\text{g/mL}$, 24 시간)를 처리한 인간 지방 유래 줄기세포에서 추출한 배양액을 처리하는 경우, 인간 탯줄 정맥 내피 세포의 혈관 분화능이 NT 세포와 비교하여 유의하게 증가하는 것을 확인 할 수 있었다.

[0176] **실시예 7. 금-구리 나노입자의 하지허혈 동물 모델 치료 효과 확인**

[0177] 본 발명 금-구리 나노입자의 허혈성 질환 치료 효과를 확인하기 위하여, 누드 마우스의 하지허혈 모델링 이후, 금-구리 나노입자를 처리한 인간 지방 유래 줄기세포 치료제 (10^6 cells/200 μL)를 인슐린 주사기를 통해 환부에 주입하고, 3일차, 14일차, 28일차에 대한 다리 중증도를 확인하였다.

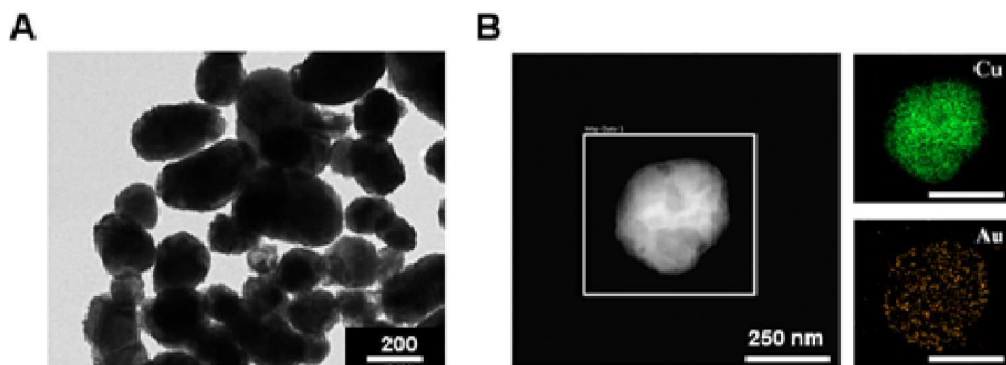
[0178] 도 10A에 나타난 바와 같이, 금-구리 나노입자를 처리한 인간 지방 유래 줄기세포 치료제를 인슐린 주사기를 통해 환부에 주입하는 경우, 28일까지 다른 군에 비해 월등히 다리의 회복상태가 뛰어난 것을 확인하였다.

[0179] 또한, 도 10B에 나타난 바와 같이, 외관상으로는 혈류량으로 보았을 때도 금-구리 나노입자를 처리한 그룹이 다른 그룹에 비해 회복이 잘되었음을 확인하였다.

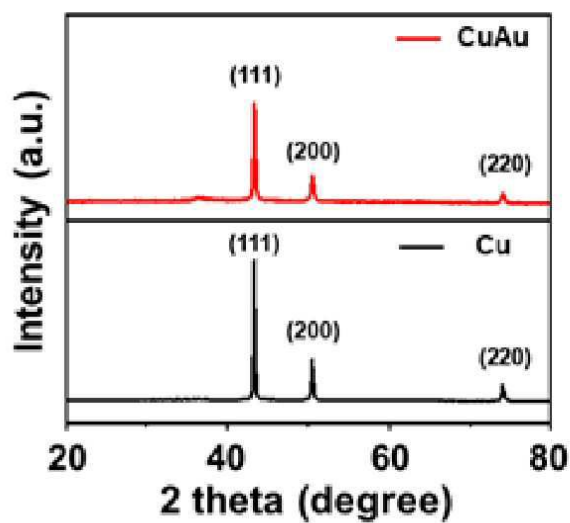
[0181] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가지는 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

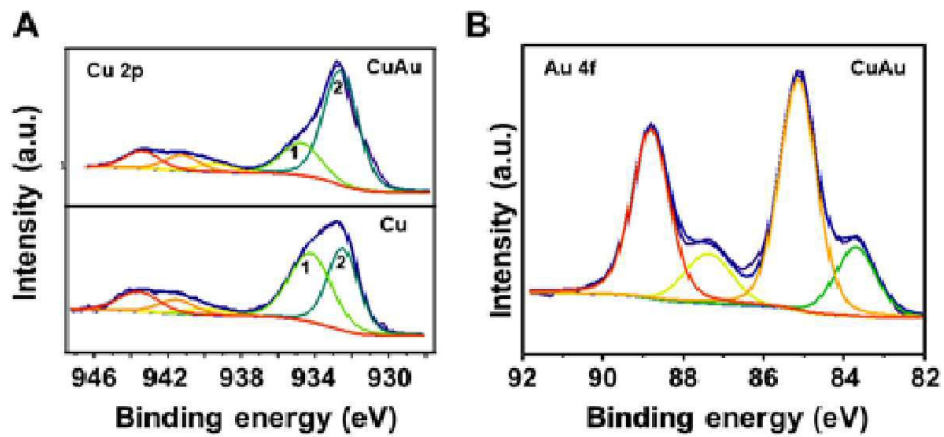
도면1



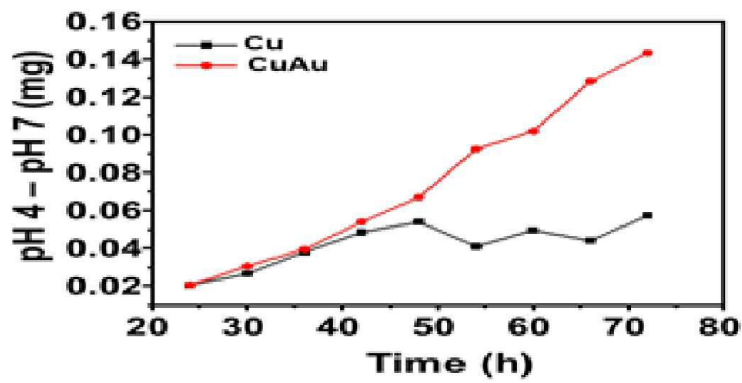
도면2



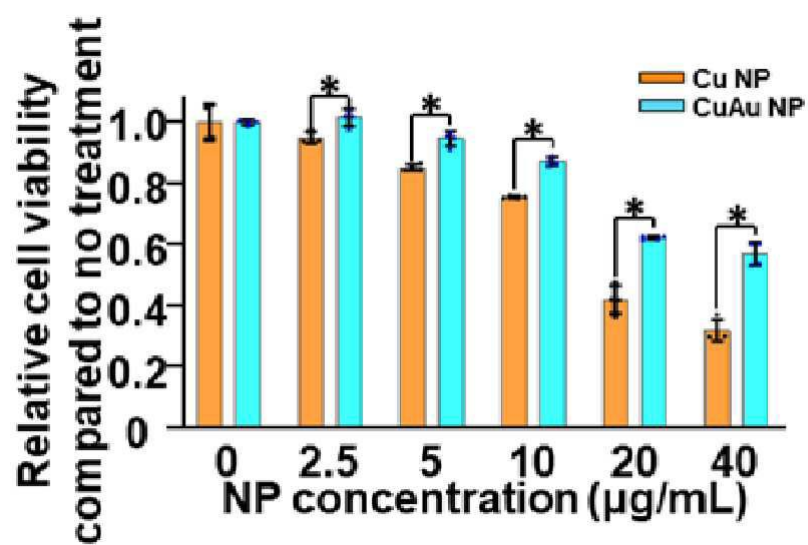
도면3



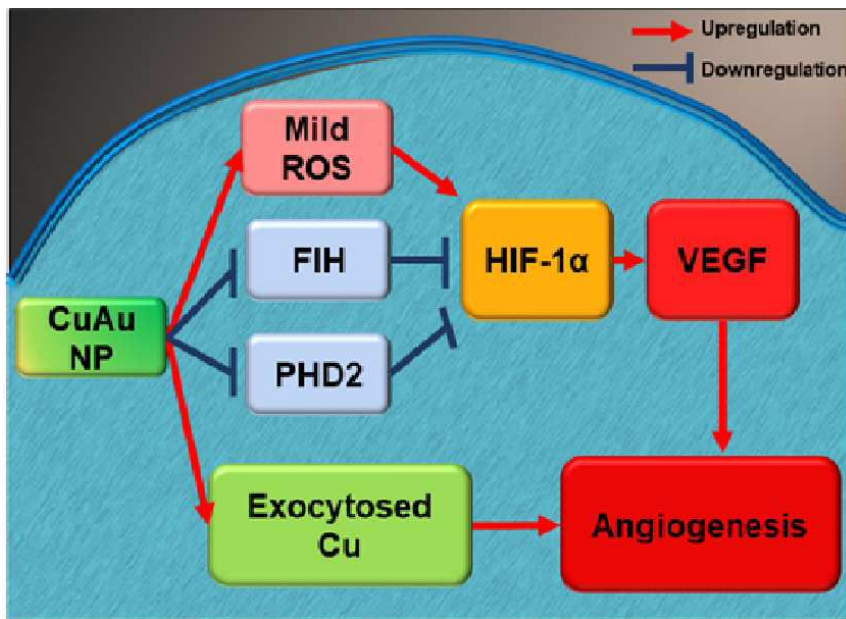
도면4



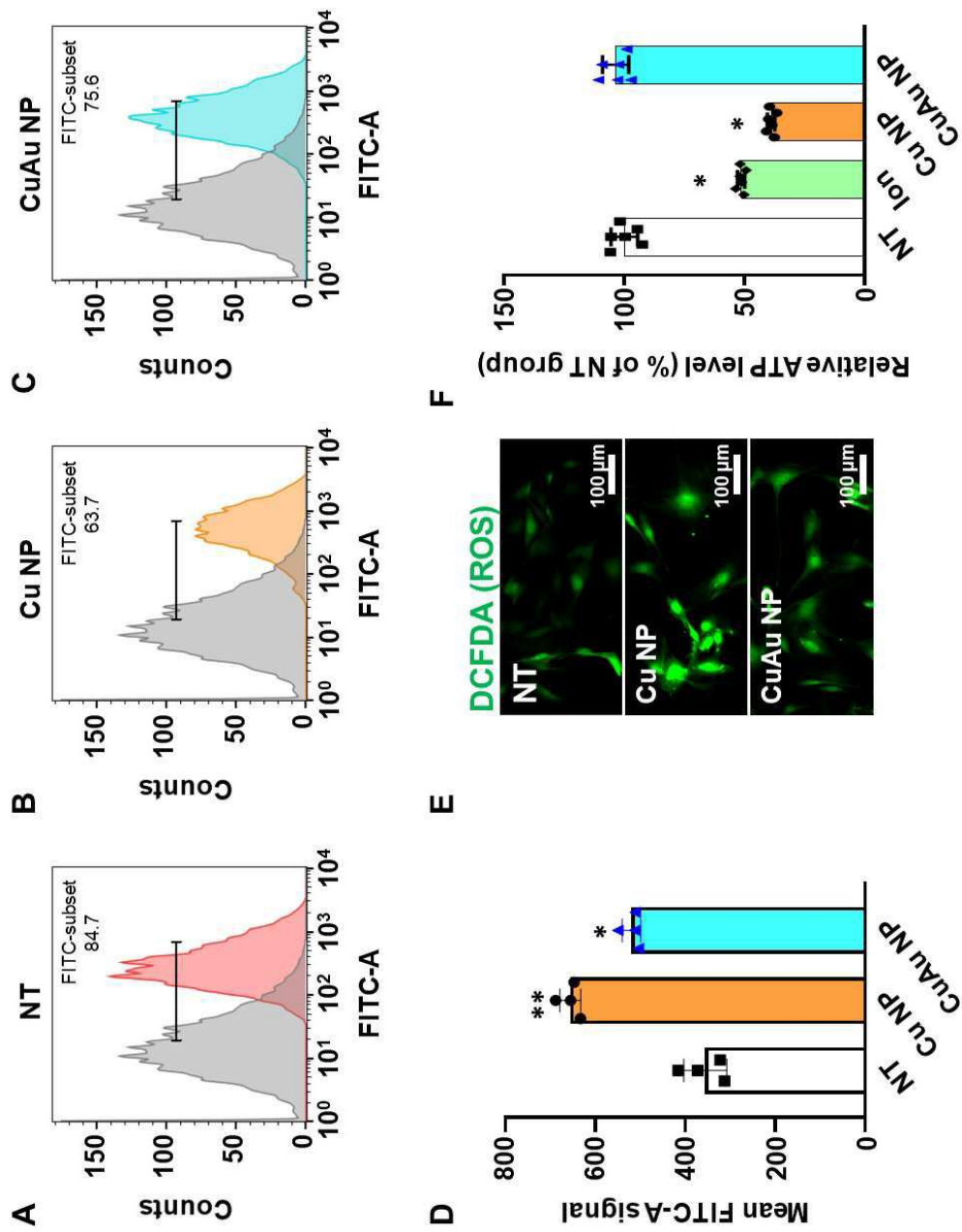
도면5



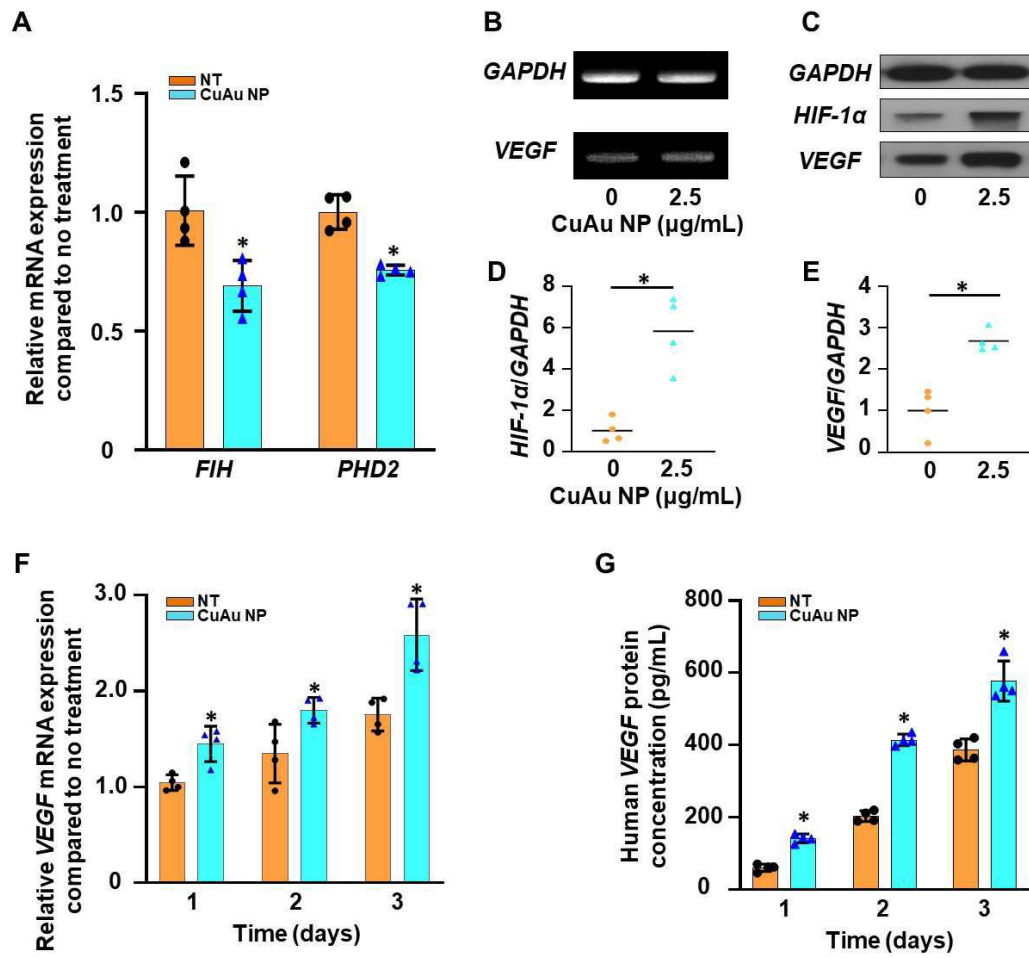
도면6



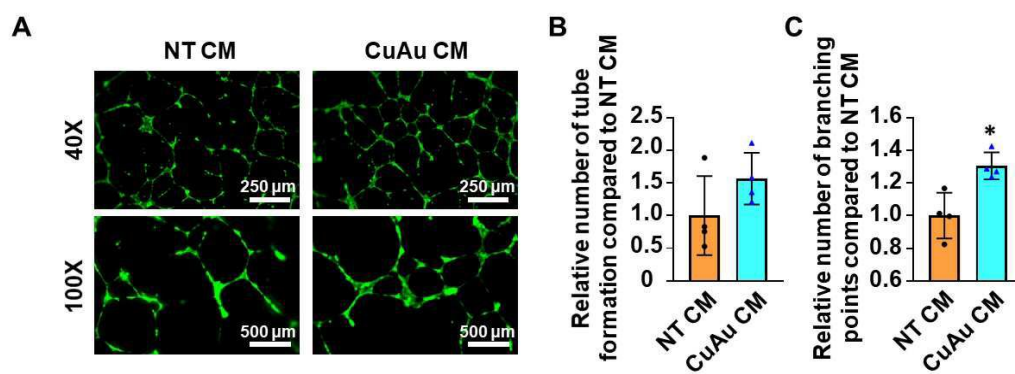
도면7



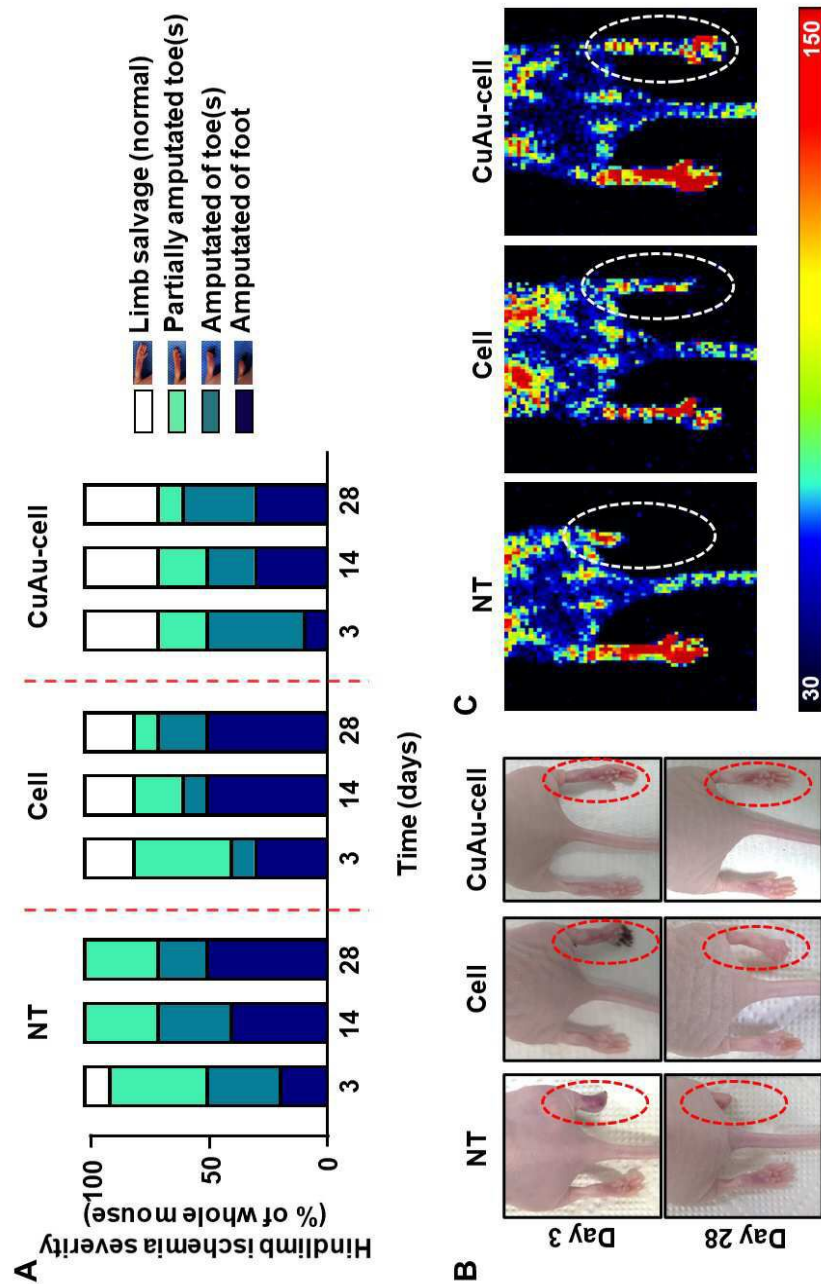
도면8



도면9



도면10



서열 목록

- <110> Research & Business Foundation SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY
University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> Composition for preventing or treating ischemic disease
comprising gold-copper nanoparticle as an active ingredient
- <130> MP20-248
- <160> 10
- <170> KoPatent In 3.0

<210> 1
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human GAPDH_F
 <400> 1
 gtcggagtca acggatttgg 20

<210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human GAPDH_R
 <400> 2
 ggggtggaatc attggaacat 20

<210> 3
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human VEGF_F
 <400> 3
 gagggcagaa tcatacagaa gt 22

<210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human VEGF_R
 <400> 4
 caccagggtc tcgattggat 20

<210> 5
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human CASPASE-3_F

<400>	5	
cctggttatt attcttggcg aaa		23
<210>	6	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Human CASPASE-3_R	
<400>	6	
gcacaaagcg actggatgaa		20
<210>	7	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Human PHD2_F	
<400>	7	
tttttctggt ctgaccgtcg ca		22
<210>	8	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Human PHD2_R	
<400>	8	
ccctcacacc ttttccacct tgt		23
<210>	9	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Human FIH_F	
<400>	9	
caggtgactg ctatccgtc		20
<210>	10	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>		

> Artificial Sequence

<220><223> Human FIH_R

<400> 10

gtgcagcgtg caatactagc

20