



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0121182
(43) 공개일자 2024년08월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23L 33/105 (2016.01) A23L 33/16 (2016.01)
A61K 36/539 (2006.01) A61K 36/718 (2006.01)
A61K 36/744 (2006.01) A61K 36/756 (2006.01)
A61K 8/02 (2006.01) A61K 8/19 (2006.01)
A61K 8/9789 (2017.01) A61K 9/51 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A23L 33/105 (2016.08)
A23L 33/16 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2024-0014177

(22) 출원일자 2024년01월30일

심사청구일자 2024년01월30일

(30) 우선권주장

1020230011545 2023년01월30일 대한민국(KR)

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

케이디바이오 주식회사

서울특별시 동대문구 경희대로 26, 비114-에이1호(회기동, 경희대학교 네오르네상스관)

(72) 발명자

조익현

서울특별시 서초구 신반포로 32 19동 509호(반포동, 반포아파트)

김연주

경기도 성남시 분당구 동판교로 275, 107동 801호(삼평동, 봇들마을1단지)

(74) 대리인

특허법인한얼

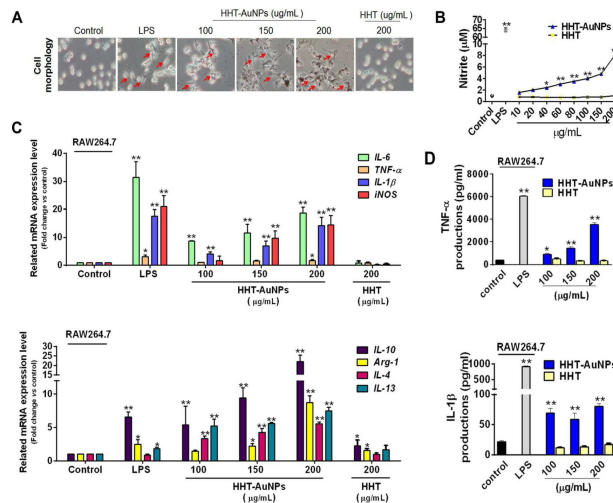
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 황련해독탕이 결합된 금 나노입자를 포함하는 면역증강용 조성물

(57) 요약

본 발명은 황련해독탕이 결합된 금 (Au) 나노입자를 유효성분으로 포함하는, 면역증강용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 금 나노입자는 빠른 시간 내에 별도의 환원제 또는 안정제의 부가 없이도 크기가 균일하고, 면역 증강 효과를 가지므로, 이를 포함하는 조성물은 산업에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A61K 36/539 (2013.01)
A61K 36/718 (2013.01)
A61K 36/744 (2013.01)
A61K 36/756 (2013.01)
A61K 8/0245 (2013.01)
A61K 8/19 (2013.01)
A61K 8/9789 (2017.08)
A61K 9/5115 (2013.01)
A61P 37/02 (2018.01)

명세서

청구범위

청구항 1

황련해독탕이 결합된 금(Au) 나노입자를 유효성분으로 포함하는, 면역증강용 식품 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 황련해독탕은 황련, 황금, 황백 및 치자 혼합 추출물인 것인, 식품 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물은 면역세포의 NO 생성 촉진, 면역 관련 사이토카인(pro-inflammatory cytokine) 분비 증가, 면역세포 생육 증진, NF- κ B 및 MAPK 신호 전달 경로를 활성화 또는 IgG 및 IgA의 발현과 생성을 촉진하는 것인, 식품 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 면역 관련 사이토카인은 IL-1 β , TNF- α , IL-4, IL-6, IL-12, IFN- γ , 및 IL-2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함하는, 식품 조성물.

청구항 5

황련해독탕이 결합된 금(Au) 나노입자를 유효성분으로 포함하는, 면역장애 또는 면역질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 면역장애 또는 면역질환은 면역저하 또는 면역결핍으로 발생하는 장애 또는 질환인 것인, 약학 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 면역장애 또는 면역질환은 알레르기 반응, 염증성 질환, 자가면역질환, 바이러스 감염질환, 이식거부 질환 및 염증 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 것인, 약학 조성물.

청구항 8

황련해독탕이 결합된 금(Au) 나노입자를 유효성분으로 포함하는, 면역증강용 약학 조성물.

청구항 9

제5항 내지 제7항 중 어느 한 항의 약학 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 면역장애

치료방법.

청구항 10

황련해독탕이 결합된 금(Au) 나노입자를 유효성분으로 포함하는, 면역증강용 화장품 조성물.

청구항 11

황련해독탕이 결합된 금(Au) 나노입자를 유효성분으로 포함하는, 면역증강용 의약품 조성물.

청구항 12

황련해독탕이 결합된 금(Au) 나노입자를 유효성분으로 포함하는, 면역증진용 사료 조성물.

청구항 13

황련해독탕을 제조하는 단계; 및

상기 황련해독탕을 증류수에 용해시킨 후, 이를 금염에 혼합하여 반응시키는 단계;를 포함하는 황련해독탕이 결합된 금 나노입자 제조방법.

청구항 14

제14항에 있어서,

상기 황련해독탕 농도는 2 내지 4 mg/mL인 것인, 제조방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 금염은 1 내지 2mM인 것인, 제조방법.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 반응 시간은 25분 내지 35분인 것인, 제조방법.

청구항 17

제14항에 있어서, 상기 반응 pH는 2.5 내지 3.5인 것인, 제조방법.

청구항 18

제14항에 있어서, 상기 반응 온도는 30 내지 50℃인 것인, 제조방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 황련해독탕이 결합된 금 (Au) 나노입자를 유효성분으로 포함하는, 면역증강용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0003] 면역 반응은 다양한 침입 병원체, 세포 내 위험 신호 및 종양 형성으로부터 신체를 보호하는 필수적인 생물학적 과정이다. 이상적인 면역 자극제는 면역 세포의 활성화를 조절하여 병원균에 대한 숙주의 방어력을 향상시키는 것이며, 여기에서 면역 활성화는 면역 억제성 질환을 치료하고 감염병을 예방하기 위한 장기적인 목표라 할 수 있다. 기존 면역 자극제는 항종양 면역 반응을 강화하고 종양 퇴행을 유도하지만, 이는 종종 부작용인 염증 반응을 초래한다. 예컨대, 재조합 인간 인터페론 알파(IFN- α)와 사이토카인 인터루킨-2(IL-2)는 각각 1992년과 1998년에 절제된 고위험 흑색종 환자의 보조 면역 요법으로 승인되었으나, 이러한 면역 자극제는 환자의 80% 이상에서 발열, 부기, 피로, 두통, 근육통을 포함한 체질적 증상이 보고되는 등 빈번하고 심각한 부작용이 있어 사용에 제한된다. 이러한 부작용은 항염증제를 사용하여 조절해야 하겠지만, 증상이 심할 경우 치료를 중단해야 하는 경우가 많다. 특히 이러한 문제는 기존의 보조제로는 적절히 해결되지 않는다.

[0005] 한편, 현재 나노 기술은 면역 요법의 필요성을 충족시키며, 나노 기술 기반 면역 자극제가 우선적인 선택이 될 수 있는 증거가 점점 더 많아지고 있다. 지난 10년 동안 생체재료 기반 나노 입자는 바이오 의약품 개발을 위한 혁신적인 연구의 진전을 가능하게 했다. 이러한 나노 운반체의 면역 자극성은 면역 반응을 시작하고 조절하는 새로운 예방 및 치료 접근법으로 집중적으로 연구되었다. 이처럼 나노 입자가 널리 개발되었지만, 정상 세포에 대한 독성은 치료적 적용을 제한하는 주요 과제 중 하나로 남아 있다.

[0006] 그 중, 금 나노입자(AuNP)는 불활성 및 무독성 코어로 인해 상대적으로 낮은 독성을 나타내므로 가장 많은 관심을 받고 있다. 그러나 기존의 나노 입자 화학 합성에는 독성 화학물질이 사용되며 생산에 높은 에너지가 필요하다는 문제가 있다. 이를 해결하기 위해 생물학적 경로, 특히 식물을 기반으로 하는 AuNP 합성은 독성 물질의 사용을 피할 수 있기 때문에 선호되는 생산 전략이다. 상기 전략은 식물 공급원의 다양한 폴리페놀과 수산기는 환원 반응을 통해 금염으로부터 AuNP를 합성할 수 있다는 것이다. 또한, 식물을 매개로 한 AuNP는 식물 추출물보다 안정성이 향상되고 생리활성이 더 강하다고 보고된다. 일 예로, 켈라자 사포나리아, 아스파라거스 라세모수스, 타마린두스 인디카 추출물에서 추출한 것과 같은 식물 보조제는 AuNP와 함께 면역 자극제로 사용할 수 있다. 따라서 면역 자극 활성을 강화하기 위해 식물 공급원을 사용하여 AuNP를 생합성하는 방법도 연구되고 있다.

[0007] 최근 하이폭시아 헤메로칼리데아(hypoxis hemerocallidea) 추출물에서 합성된 AuNP의 시험관 내 면역 조절 효과를 보고되었다. 그러나 AuNP와 지질다당류(LPS)를 병용 투여한 연구에서 식물 추출물을 매개로 한 면역 세포 자극의 근본적인 메커니즘을 밝히지 못하였다. 또한, 단일 식물 추출물의 생리활성 및 독성의 한계는 식물 추출물로 개발된 AuNP에 대한 최근 연구에서 간과된 것으로 보인다. 나아가 아직 한약재를 이용한 혼합 추출물로 다양한 시너지 치료 효과를 발휘할 수 있는 나노입자 제조를 위한 활용은 아직 광범위하게 연구되지 않았다.

[0009] 유명한 한약 처방 중 황제내경에 기술된 유명한 중국 고전 처방인 황련해독탕(HHT)은 중국 약전에 공식적으로 등재되어 있으며, 임상에서 면역 관련 질환 치료에 널리 사용되고 있다. HHT는 면역 관련 사이토카인의 발현을 조절하는 대식세포와 NK 세포를 포함한 다양한 면역 세포 유형을 활성화하여 동물 모델과 면역 기능 장애 환자의 면역 기능을 개선하는 데 탁월한 효과를 발휘한다.

[0011] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 천연 추출물, 그 중에서도 다양한 한약재를 포함하는 복합 혼합 추출물인 황련해독탕을 이용하여 금속 나노입자를 제조하는 데 있어, 종래보다 제조시간이 현저히 단축되고 크기가 균일하며, 별도의 환원제 또는 안정제의 부가 없이도 안정하게 제조할 수 있는 금속 나노입자의 제조방법을 개발하고, 상기 방법에 의해 제조된 금속 나노입자를 포함하는 조성물이 우수한 면역증강 효과를 가짐을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 본 발명의 하나의 목적은 황련해독탕이 결합된 금 (Au) 나노입자를 유효성분으로 포함하는, 면역증강용 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 다른 하나의 목적은 황련해독탕이 결합된 금 (Au) 나노입자를 유효성분으로 포함하는, 면역장애 예방 또는 개선용 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 다른 하나의 목적은 황련해독탕이 결합된 금 (Au) 나노입자를 유효성분으로 포함하는, 면역증강용 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 면역 증강 방법을 제공하는 것이다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 황련해독탕이 결합된 금 (Au) 나노입자를 유효성분으로 포함하는, 면역증강용 화장료 조성물을 제공하는 것이다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 황련해독탕이 결합된 금 (Au) 나노입자를 유효성분으로 포함하는, 면역증강용 의약품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 황련해독탕이 결합된 금 (Au) 나노입자를 유효성분으로 포함하는, 면역증강용 사료 조성물을 제공하는 것이다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 황련해독탕이 결합된 금 나노입자의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 황련해독탕이 결합된 금 (Au) 나노입자를 유효성분으로 포함하는 조성물의 면역증강 용도를 제공하는 것이다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 황련해독탕이 결합된 금 (Au) 나노입자를 유효성분으로 포함하는 조성물의 면역장애 예방, 개선 또는 치료 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0024] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.
- [0025] 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 발명에 기재된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.
- [0027] 본 발명의 하나의 양태는 황련해독탕이 결합된 금 (Au) 나노입자를 유효성분으로 포함하는, 면역증강용 식품 조성물을 제공한다.
- [0028] 상기 황련해독탕이 결합된 금 (Au) 나노입자는 세포 독성을 나타내지 않으면서, 대식세포에 의해 빠르게 흡수되고, NF- κ 및 MAPK 신호 전달 경로를 활성화하고, 면역관련 사이토카인의 생산을 증진시킬 수 있을 뿐만 아니라, 비장 세포 증식 및 NO 생성 유도를 하고, 나아가 비장 세포에서 면역 관련 사이토카인(예: IL-1 β , TNF- α , IL-4, IL-6, IL-12, IFN- γ , IL-2) 및 바이오마커(IgG 및 IgA)의 발현과 생성을 유도함으로써 HHT-AuNP의 생체 외 면역 증강 효과를 얻을 수 있음을 확인하였다.
- [0029] 본 발명의 용어, “황련해독탕”은 황련, 황금, 황백 및 치자로 구성된 탕으로, 황련, 황금, 황백 및 치자 혼합 추출물과 혼용되어 사용될 수 있다. 상기 황련해독탕은 이를 구성하는 약재가 모두 맛이 쓰고 몸을 차게 하는 성질이 있어 열독이 있는 증상에만 사용할 수 있고, 위장이 약하거나 체력이 부족한 사람은 장기간 사용할 수

없다. 황련해독탕은 청열, 진정 작용이 있는 한약으로서, 고열, 출혈, 염증, 심화왕, 간담화왕, 위열 등에 효과가 있다고 보고된다. 황련해독탕은 탕약이나 엑기스제로 제조되고, 부작용으로는 위장기능을 손상시키거나 설사, 식욕부진, 구토, 복통 등의 증상을 유발할 수 있고, 드물지만 발진, 두드러기, 장간만 동맥 경화증의 부작용이 보고된 경우가 있다.

[0030] 일 예로, 본 발명의 “황련해독탕”은 황련, 황금, 황백 및 치자 혼합물을 이용하여 통상적인 방법으로 얻어낸 황련해독탕에 속한 성분이나 물질을 의미한다.

[0031] 상기 황련은 학명은 *Coptis chinensis*이고 생약명은 *Rhizoma coptidis*으로 생약용은 한국, 일본, 중국 등에서 재배하는 여러해살이풀이다. 한방에서는 11월경에, 재식 5~6년된 황련이나 왜황련의 뿌리를 채취하여 햇볕에 말린 것을 황련이라 하며, 건위, 진정, 소염, 항균 등의 효능이 있어, 소화불량, 위염, 장염, 복통, 구토, 이질, 심계, 변역, 정신불안, 인후종통, 토혈, 코피, 하혈, 화상 등의 치료에 처방한다.

[0032] 상기 황금은 학명이 *Scutellaria baicalensis*이고 생약명은 *Radix scutellariae*로 한국, 중국, 몽골 등에서 재배하는 높이 20~60cm의 식물이다. 열매는 9월에 결실하며, 둥근 모양으로 꽃받침 안에 들어 있다. 원뿌리는 원뿔형이고 살이 황색이다. 한방에서는 뿌리를 해열, 이노, 지사, 이담 및 소염제로 이용하고 약용식물로 재배한다.

[0033] 상기 황백은 자백(子藥) · 소백(小藥) · 단환(檀桓)이라고도 불리며, 산초과 식물인 황경피나무(황벽나무) *Phellodendron amurense* Rupr.의 껍질을 말린 것이다. 이의 생약명은 *Cortex phellodendri*이다. 황경피나무는 봄부터 여름 사이에 껍질을 벗겨 겹껍질을 벗겨 버리고 햇볕에 말린다. 맛은 쓰고 성질은 차며, 신경(腎經) · 방광경(膀胱經) · 대장경(大腸經) · 심포경(心包經)에 작용한다. 열을 내리고 습사(濕邪)를 없애며 독을 제거한다. 황백 탕약과 베르베린 성분이 혈압강화 작용, 혈액응고 촉진 작용, 이담(利膽) 작용, 자궁수축 작용, 결핵균을 비롯한 일련의 병원성 미생물에 대한 항균 작용, 소염 작용을 나타낸다고 보고된다. 또한, 베르베린은 고미건위(苦味健胃) 작용, 해열 작용, 소장(小腸)에 대한 진정 작용, 백혈구의 탐식 기능을 높이는 작용을 나타낸다고 보고된다. 습열설사(濕熱泄瀉), 이질, 황달, 오로(惡露), 임증(淋證), 폐결핵, 유정(遺精), 음부 가려움증, 헌데, 습진 등에 쓴다. 세균성 적리(赤痢), 장결핵, 방광 및 요도의 염증, 골관절 결핵 등에도 쓰고 고혈압증과 입맛이 없는데도 쓴다. 하루 6~9g을 탕제 · 산제 · 환제 형태로 만들어 먹는다. 외용약으로 쓸 때는 가루 내서 기초(藥)제에 개어 바른다. 베르베린을 뽑아 염산염이나 유산염을 만들어 담낭염, 담석증, 만성 간염에 쓴다.

[0034] 상기 치자는 치자나무(*Gardenia jasminoides*, cape jasmine)의 열매로, 생약명은 *Fructus gardenia*이다. 치자는 긴 난형~난형으로 길이 1~3.5cm, 너비 1~1.5cm이다. 바깥 면은 황갈색~적갈색이고, 보통 5~7개의 날개 모양인 세로 능선이 뚜렷하다. 맨 위에는 꽃받침 또는 그 자국이 있으며, 아래쪽은 조금 뾰족하고 열매꼭지가 남아 있기도 한다. 열매껍질은 얇고 부스러지기 쉽다. 잘린 면의 안쪽이 색깔이 비교적 진하지 않으나 광택이 있으며, 2~3줄의 튀어나온 격막이 있고 그 안에는 씨가 들어있다. 씨는 납작하고 난원형이며 여러 개가 모여 덩어리를 이루고 있다. 진한 적색~황적색이고, 바깥 면에는 가늘고 작은 혹 모양의 돌기가 뾰뾰하게 나 있다. 약간 특유한 냄새가 있고 맛은 쓰다.

[0035] 본 발명에서 황련, 황금, 황백 및 치자는 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있다. 또한, 부위로는 천연, 잡종 또는 변종 수련의 모든 기관, 예를 들어, 뿌리, 가지, 줄기, 잎, 꽃, 열매와 같은 지상부를 모두 포함할 수 있고, 일 예로 황련과 황금은 뿌리 부위를, 황백은 껍질 부위를, 치자는 열매 부위를 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0036] 상기 방법에 있어서, 상기 추출용매는 황련해독탕을 제조할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 물, C1 내지 C4의 알코올 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있으며, 구체적으로는 물일 수 있다.

[0037] 상기 방법에 있어서, 추출 방법으로는 여과법, 열수추출, 침지추출, 환류냉각추출 및 초음파추출 등 당업계의 통상적인 방법을 이용할 수 있다. 상기 추출용매는 건조된 감에 5 내지 20배 첨가할 수 있으며, 구체적으로는 10 내지 15배 첨가할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 추출온도는 구체적으로 90 내지 120℃, 보다 구체적으로 100℃ 내지 110℃일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 추출시간은 구체적으로 1시간 내지 7시간, 보다 구체적으로 3시간 내지 5시간일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0038] 본 발명의 황련해독탕이 결합된 금 나노입자는 천연 추출물인 황련해독탕을 유효성분으로 포함하여 제조한 것으로서, 종래의 화학적 합성방법 및 물리적 합성방법에 비해 친환경적이고, 제조시간이 현저히 단축되며, 동시에 별도의 환원제 또는 안정제의 부가 없이도 크기가 균일하고 안정한 황련해독탕이 결합된 금 나노입자를 제조할

수 있으므로, 다양한 산업 분야에서 매우 유용하게 사용될 수 있다.

- [0040] 본 발명의 용어, "금 나노입자"는 금으로 이루어진, 크기가 1~100nm인 초미세 입자로, 작은 크기에 기인하는 특이하고도 다양한 성질을 보이는 입자를 의미한다. 본 발명에서 금 나노입자는 제조방법에 따라 서로 다른 생리활성을 가질 수 있으며, 구체적으로 황련해독탕을 이용하여 제조된 본 발명의 금 나노입자는 상기 추출물의 생리활성 물질을 포함하고 있어, 다른 방법으로 제조된 금속 나노입자보다 매우 우수한 생물학적 활성을 가질 수 있다.
- [0041] 본 발명에서, 황련해독탕을 이용하여 제조된 금 나노입자는 '황련해독탕-금 나노입자', '금 나노입자' 또는 'HHT-AuNPs'으로 혼용되어 사용될 수 있다.
- [0042] 황련해독탕이 결합된 금 나노입자는 황련해독탕이 금 나노입자를 코팅, 캐핑(capping)되어 있는 것일 수 있으며, 구체적으로 금 나노입자의 표면에는 황련해독탕이 코팅되어 있는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0043] 본 발명의 금 나노입자는 의료용, 생물학적 분석용, 연료용, 전자부품 재료의 용도로 사용될 수 있다. 이에 제한되지 않지만, 구체적으로, 금 나노입자는 고유의 빛 전도 특성으로 인해 유기태양전지, 센서프로브, 생물의학용 약물 전달체, 전도재료, 촉매제 또는 치료제로 이용될 수 있다.
- [0044] 본 발명의 일 실시예에서는 황련해독탕을 이용하여 황련해독탕이 결합된 금 (Au) 나노입자를 제조하였다. 특히, 황련해독탕을 금 나노입자 제조 시 최적의 조건을 확인함으로써, 효과적으로 금 나노입자를 제조할 수 있는 프로세스를 최적화하였다.
- [0046] 본 발명에서 금 전구체는 금속 나노입자를 제조하기 위하여 첨가하는 화합물을 의미한다. 금 전구체는 금 나노입자를 제조할 수 있는 한 특별히 제한되지 않으며, $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, NaAuCl_3 , 및 AuCl_3 로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상을 사용할 수 있으며, 보다 구체적으로는, $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 를 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0047] 본 발명의 황련해독탕의 농도는 금 나노입자를 제조할 수 있는 한 이에 제한되지 않으나, 1 내지 10 mg/mL, 구체적으로 1.5 내지 8 mg/mL, 보다 구체적으로 2 내지 6 mg/mL, 보다 더 구체적으로는 2 내지 4 mg/mL 일 수 있다.
- [0048] 본 발명의 금 전구체의 농도는 금 나노입자를 제조할 수 있는 한 이에 제한되지 않으나, 0.05 내지 10Mm, 구체적으로 0.1 내지 7Mm, 보다 구체적으로 1 내지 5Mm, 보다 더 구체적으로는 1 내지 2Mm 일 수 있다.
- [0049] 또한, 본 발명의 금 나노입자의 제조 온도 (반응 온도)는 금 나노입자를 제조할 수 있는 한 이에 제한되지 않으나, 10 내지 80℃, 구체적으로 20 내지 60℃, 보다 구체적으로 30 내지 50℃일 수 있다.
- [0050] 또한, 본 발명의 금 나노입자의 제조시간(반응 시간)는 금 나노입자를 제조할 수 있는 한 이에 제한되지 않으나, 1분 내지 50분, 구체적으로 10분 내지 45분, 보다 구체적으로 20분 내지 40분, 보다 더 구체적으로는 25분 내지 35분일 수 있다.
- [0051] 또한, 본 발명의 금 나노입자의 제조pH(반응 pH)는 금 나노입자를 제조할 수 있는 한 이에 제한되지 않으나, pH 1 내지 7, 구체적으로 pH 2 내지 5, 보다 구체적으로 pH 2.5 내지 3.5일 수 있다.
- [0053] 본 발명의 황련해독탕이 결합된 금 (Au) 나노입자를 유효성분으로 포함하는 식품 조성물은 면역증강용일 수 있다.
- [0054] 본 발명에서 용어, “면역 증강”은 면역을 강화시키는 것을 의미하는 것으로서, 면역 증진과 혼용되어 사용될 수 있다.
- [0055] 상기 면역 증강은 내재면역(Innate immune) 및/또는 적응면역(adaptive immune) 증강용일 수 있다.
- [0056] 내재면역은 미생물들과 독소들이 체내로 진입하는 데 성공하였을 때 곧바로 작용하는 면역 기능으로 패턴 인식 수용체가 미생물들 사이에 널리 보존되어 있는 부분을 인지하여 외부의 미생물을 감지하는 방식으로

작용하거나, 손상된 세포들이 방출하는 경고성 신호를 같은 종류의 수용체가 이를 인지하여 미생물의 존재 사실을 감지하는 방식으로 작용한다. 적응면역은 항원의 표식을 기억하는 기능을 의미하는 면역기억(immunological memory)을 비롯한 보다 강력한 면역 반응을 말하며 항원에 특이적이며 항원제시(antigen presentation) 과정을 통한 비자기항원의 인지를 필요로 한다.

[0057] 본 발명의 황련해독탕이 결합된 금 나노입자는 대식세포 활성화, 산화 질소 생성 증가 또는 $\text{TNF-}\alpha$, IL-2, IL-4, IFN- γ IL-10 및 IL-13 로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 사이토카인의 발현 증가를 유도하고/하거나 혈청 내 IgG 및 IgA를 증가시키고, 비장 세포의 증식을 촉진하고, IFN- γ 유도 활성을 나타내는 등의 효과를 나타내므로, 효과적인 내재 면역 또는 면역 증강 효과를 나타낸다.

[0058] 상기 면역 증강은 면역세포의 NO 생성 촉진, 면역 관련 사이토카인(pro-inflammatory cytokine) 분비 증가, 면역세포 생육 증진, NF- κ B 및 MAPK 신호 전달 경로를 활성화 또는 IgG 및 IgA의 발현과 생성을 촉진하는 것일 수 있고, 상기 면역 관련 사이토카인은 IL-1 β , TNF- α , IL-4, IL-6, IL-12, IFN- γ , 및 IL-2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0059] 또한, 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 본 발명의 금 나노입자를 처리한 경우 면역세포의 NO 생성 촉진, 면역 관련 사이토카인이나 전염증 사이토카인(pro-inflammatory cytokine) 분비 증가 또는 면역세포 생육을 증진시키는 것을 확인하였다.

[0060] 또한, 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 상기 황련해독탕이 결합된 금 (Au) 나노입자는 세포 독성을 나타내지 않으면서, 대식세포에 의해 빠르게 흡수되고, NF- κ 및 MAPK 신호 전달 경로를 활성화하고, 면역관련 사이토카인의 생산을 증진시킬 수 있을 뿐만 아니라, 비장 세포 증식 및 NO 생성 유도를 하고, 나아가 비장 세포에서 면역 관련 사이토카인(예: IL-1 β , TNF- α , IL-4, IL-6, IL-12, IFN- γ , IL-2) 및 바이오마커(IgG 및 IgA)의 발현과 생성을 유도함으로써 HHT-AuNP의 생체 외 면역 증강 효과를 얻을 수 있음을 확인하였다.

[0062] 본 발명의 용어, "식품"은 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료, 비타민 복합제, 건강기능식품 및 건강식품 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다.

[0063] 상기 건강기능(성)식품(functional food)이란, 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)와 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미한다. 여기서 "기능(성)"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 식품은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조시에는 당 업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 식품의 제형 또한 식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다. 본 발명의 식품용 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나므로, 본 발명의 식품은 질병의 예방 또는 개선의 효과를 증진시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.

[0064] 상기 건강식품(health food)은 일반식품에 비해 적극적인 건강유지나 증진 효과를 가지는 식품을 의미하고, 건강보조식품(health supplement food)는 건강보조 목적의 식품을 의미한다. 경우에 따라, 건강 기능 식품, 건강식품, 건강보조식품의 용어는 혼용된다.

[0065] 구체적으로, 상기 건강기능식품은 금 나노입자를 음료, 차류, 향신료, 껌, 과자류 등의 식품소재에 첨가하거나, 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조한 식품으로, 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오는 것을 의미하나, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용이 없는 장점이 있다.

[0066] 본 발명의 식품 조성물은 일상적으로 섭취하는 것이 가능하기 때문에 암의 예방 또는 개선에 우수한 효과를 기대할 수 있어 매우 유용하다.

[0067] 상기 조성물은 생리학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있는데, 담체의 종류는 특별히 제한되지 않으며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다.

[0068] 또한, 상기 조성물은 식품 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 추가 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 비타민 A, C, D, E, B1, B2, B6, B12, 니아신(niacin), 비오틴(biotin), 폴레이트

(folate), 판토텐산(panthotenic acid) 등을 포함할 수 있다. 또한, 아연(Zn), 철(Fe), 칼슘(Ca), 크롬(Cr), 마그네슘(Mg), 망간(Mn), 구리(Cu), 크롬(Cr) 등의 미네랄을 포함할 수 있다. 또한, 라이신, 트립토판, 시스테인, 발린 등의 아미노산을 포함할 수 있다.

- [0069] 또한, 상기 조성물은 방부제(소르빈산 칼륨, 벤조산나트륨, 살리실산, 데히드로초산나트륨 등), 살균제(표백분과 고도 표백분, 차아염소산나트륨 등), 산화방지제(부틸히드록시아니솔(BHA), 부틸히드록시톨루엔(BHT) 등), 착색제(타르색소 등), 발색제(아질산 나트륨, 아초산 나트륨 등), 표백제(아황산나트륨), 조미료(MSG 글루타민산나트륨 등), 감미료(둘신, 사이클레메이트, 사카린, 나트륨 등), 향료(바닐린, 락톤류 등), 팽창제(명반, D-주석산수소칼륨 등), 강화제, 유화제, 증점제(호료), 피막제, 검기초제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품첨가물(food additives)을 포함할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별되고 적절한 양으로 사용될 수 있다.
- [0070] 상기 금 나노입자는 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 식품 조성물은 식품 또는 음료에 대하여 50 중량부 이하, 구체적으로 20 중량부 이하의 양으로 첨가될 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 장기간 섭취할 경우에는 상기 범위 이하의 함량을 포함할 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0071] 본 발명의 식품 조성물의 일 예로 건강음료 조성물로서 사용될 수 있으며, 이 경우 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드; 말토스, 슈크로스과 같은 디사카라이드; 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드; 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜일 수 있다. 감미제는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제; 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 mL 당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 구체적으로 약 0.02 ~ 0.03 g이 될 수 있다.
- [0072] 상기 외에 건강음료 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산, 펙트산의 염, 알긴산, 알긴산의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올 또는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일주스, 과일주스 음료, 또는 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0073] 본 발명의 식품 조성물은 암의 예방 또는 개선 효과를 나타낼 수 있다면 다양한 중량%로 포함할 수 있으나, 구체적으로 상기 금 나노입자를 식품 조성물의 총 중량 대비 0.00001 내지 100 중량% 또는 0.01 내지 80 중량%로 포함할 수 있다.
- [0075] 본 발명의 다른 하나의 양태는 황련해독탕이 결합된 금 (Au) 나노입자를 유효성분으로 포함하는, 면역증강용 약학 조성물을 제공한다.
- [0076] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 황련해독탕이 결합된 금 (Au) 나노입자를 유효성분으로 포함하는, 면역장애 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0077] 상기 황련해독탕, 금 나노입자 및 면역 증강은 전술한 바와 같다.
- [0079] 상기 면역장애는 면역반응에 일어나는 장애로 정상적인 면역 반응이 이뤄지지 않는 상태로서 면역 결핍이 일어나 발생하는 장애 또는 질환을 의미한다.
- [0080] 일 예로, 상기 면역장애는 면역질환으로서, 상기 면역질환은 알레르기 반응, 염증성 질환, 자가면역질환, 바이러스 감염질환, 이식거부 질환 및 염증 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0081] 본 발명의 조성물은 내재 면역 또는 적응 면역 증강효과가 있으므로, 면역기능 저하로 기인되는 질환의 예방 및 개선에 효과가 있으며, 상기 면역기능 저하로 기인되는 질환은 감기 등의 감염성 질환 및 염증성 질환, 아토피 등의 알레르기 질환, 만성피로, 및 암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한

정되는 것은 아니며, 당업자에 알려진 번역 기능 저하로 기인되는 질환은 모두 본 발명에 포함될 수 있다.

- [0082] 본 발명의 용어, "예방"은 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여에 의해 번역장애 또는 번역질환의 발병을 억제시키거나 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0083] 본 발명의 용어, "개선"은 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0084] 본 발명의 용어, "치료"는 상기 약학 조성물의 투여에 의해 번역장애 또는 번역질환의 의심 및 발병 개체의 증상이 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0085] 본 발명의 약학 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 추출물을 0.001 내지 80, 구체적으로 0.001 내지 70, 더욱 구체적으로 0.001 내지 60 중량%로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0086] 또한, 상기 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있고, 상기 담체는 비자연적 담체(non-naturally occurring carrier)를 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 있다.
- [0087] 또한, 상기 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 경피흡수제, 껌제, 로션제, 연고제, 크림제, 첩부제, 카타플라스마제, 페이스트제, 스프레이, 피부 유화액, 피부 현탁액, 경피 전달성 패치, 약물 함유 붕대 또는 좌제의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 구체적으로, 제형화할 경우 통상 사용하는 충전제, 중량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 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 윤활제 등도 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 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0088] 본 발명의 다른 하나의 양태는, 상기 약학 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 번역장애 또는 번역질환 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0089] 상기 약학 조성물, 번역장애 또는 번역질환, 예방 및 치료는 상기 설명한 바와 같다.
- [0090] 본 발명에서 용어, "개체"는 본 발명의 번역장애 또는 번역질환을 보유하거나 또는 발병한, 인간을 포함한 모든 동물을 의미할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물을 개체에 투여함으로써 번역장애 또는 번역질환의 예방 및 치료 효과를 얻을 수 있다.
- [0091] 상기 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다.
- [0092] 본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 대상에게 본 발명의 약학 조성물을 도입하는 것을 말하며, 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.
- [0093] 상기 약학 조성물은 목적 또는 필요에 따라 당업계에서 사용되는 통상적인 방법, 투여 경로, 투여량에 따라 적절하게 개체에 투여될 수 있다. 투여 경로의 예로는 경구, 비경구, 피하, 복강 내, 폐 내, 및 비강 내로 투여될 수 있으며, 비경구 주입에는 근육 내, 정맥 내, 동맥 내, 복강 내 또는 피하투여가 포함된다. 또한 당업계에 공지된 방법에 따라 적절한 투여량 및 투여 횟수가 선택될 수 있으며, 실제로 투여되는 본 발명의 약학 조성물의 양 및 투여 횟수는 치료하고자 하는 증상의 종류, 투여 경로, 성별, 건강 상태, 식이, 개체의 연령 및 체중, 및 질환의 중증도와 같은 다양한 인자에 의해 적절하게 결정될 수 있다.
- [0094] 본 발명에서의 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 용도에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 혈관 투과성 증가를 억제 또는 완화하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별,

약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약 물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 예를 들면, 상기 금 나노입자는 1일 0.01 내지 500 mg/kg으로, 구체적으로 10 내지 100 mg/kg의 용량으로 투여할 수 있으며, 상기 투여는 하루에 한 번 또는 수회 나누어 투여할 수도 있다

[0095] 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.

[0096] 본 발명의 조성물은 면역장애 또는 면역질환 예방 또는 치료를 위하여 단독으로 사용할 수 있고, 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0097] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 금 나노입자는 독성이 나타나지 않음을 확인하여, 금 나노입자는 새로운 치료제로 유용하게 활용될 수 있음을 시사하는 것이다.

[0098] 또한, 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 본 발명의 금 나노입자를 처리한 경우 세포 독성이 없어, 유용한 치료제로 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0100] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 황련해독탕이 결합된 금 (Au) 나노입자를 유효성분으로 포함하는, 면역증강용 화장품 조성물을 제공한다.

[0101] 상기 황련해독탕, 금 나노입자 및 면역 증강은 전술한 바와 같다.

[0102] 상기 화장품 조성물은 본 명세서에서, '화장료 조성물'은 피부, 모발 등에 적용되어 유리한 효과를 발생시키는 모든 외용 조성물을 포괄하는 것으로, 본 명세서에서 제공하는 화장품 조성물은 생체리듬 방해 등을 유발하는 피로 및/또는 운동수행능력 저하에 의한 피부에서의 악영향을 억제 내지 제거하여 피부 및/또는 모발에 생리적 및/또는 심미적 측면에서 유리한 효과를 발생시키는 것을 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0103] 상기 화장품 조성물은, 유효성분으로서의 백출 및 배초향 혼합 추출물에 더하여, 화장품 조성물에 통상적으로 사용되는 향산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료, 향료 등과 같은 통상적인 보조제 및/또는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 화장품 조성물은 글리세린, 부틸렌 글라이콜, 폴리옥시에틸렌 경화피마자유, 토크페틸 아세테이트, 시트릭산, 판테놀, 스쿠알란, 소듐 시트레이트, 알란토인 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 보조성분이 추가로 더 포함될 수 있다.

[0104] 상기 화장품 조성물은 기본적으로 피부 및/또는 모발에 도포되는 것이므로, 당업계의 화장품 조성물을 참조하여 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있다. 구체적으로, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클린징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연 화장수, 영양 화장수, 영양크림, 마사지크림, 에센스, 아이크림, 클렌징크림, 클렌징폼, 클렌징워터, 마스크팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.

[0105] 화장품 조성물의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는, 담체 성분으로 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 산화아연 등이 포함될 수 있다.

[0106] 화장품 조성물의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는, 담체 성분으로 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트, 폴리아미드 파우더 등이 포함될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄, 디메틸 에테르 등의 추진체를 포함할 수 있다.

[0107] 화장품 조성물의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는, 담체 성분으로 용매, 용해화제, 유탁화제 등이 포함될 수 있고, 구체적으로 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜, 소르비탄의 지방산 에스테르 등이 포함될 수 있다.

[0108] 화장품 조성물의 현탁액인 경우에는, 담체 성분으로 물, 에탄올, 프로필렌글리콜 등의 액상 희석제; 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르 등의 현탁제; 미

소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가, 트라칸트 등이 포함될 수 있다.

- [0109] 화장료 조성물의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는, 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아마이드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성유, 라놀린유도체, 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 포함될 수 있다.
- [0111] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 황련해독탕이 결합된 금 (Au) 나노입자를 유효성분으로 포함하는, 면역증강용 의약품 조성물을 제공한다.
- [0112] 상기 황련해독탕, 금 나노입자 및 면역 증강은 전술한 바와 같다.
- [0113] 본 발명에서 의약품 조성물은 질병에 대한 치료, 경감, 처치 또는 예방의 효과를 나타내나 의약품보다 인체에 미치는 작용이 경미한 물품을 의미한다. 약사법에 따른 의약품의 용도로 사용되는 물품을 제외하며, 보건복지부가 따로 정한 분류 기준에 의한 물품을 포함한다. 구체적으로 피부 외용제 또는 개인위생용품일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0114] 본 발명의 조성물을 의약품 조성물에 첨가할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 의약품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적에 따라 적합하게 결정할 수 있다.
- [0116] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 황련해독탕이 결합된 금 (Au) 나노입자를 유효성분으로 포함하는, 면역증강용 사료 조성물을 제공한다.
- [0117] 상기 황련해독탕, 금 나노입자 및 면역 증강은 전술한 바와 같다.
- [0118] 본 발명의 용어 "사료"란, 동물이 먹고, 섭취하며, 소화시키기 위한 또는 이에 적당한 임의의 천연 또는 인공 규정식, 한끼식 등 또는 상기 한끼식의 성분을 의미한다.
- [0119] 상기 사료의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 사료를 사용할 수 있다. 상기 사료의 비제한적인 예로는, 곡물류, 근과류, 식품 가공 부산물류, 조류, 섬유질류, 제약 부산물류, 유지류, 전분류, 박 류 또는 곡물 부산물류 등과 같은 식물성 사료; 단백질류, 무기물류, 유지류, 광물 성류, 유지류, 단세포 단백질류, 동물성 플랑크톤류 또는 음식물 등과 같은 동물성 사료를 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.
- [0120] 본 발명의 사료 조성물에 포함되는 본 발명의 금 나노입자는 사료의 사용목적 및 사용조건에 따라 달라질 수 있으며, 일 예로 가축 사료 조성물의 총 중량에 대하여 0.01 내지 100 중량%, 보다 구체적으로는 1 내지 80 중량%로 포함될 수 있다.
- [0122] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 황련해독탕이 결합된 금 나노입자의 제조방법을 제공한다.
- [0123] 상기 제조방법은 황련해독탕을 제조하는 단계; 및 상기 황련해독탕을 용해시킨 후, 이를 금염에 혼합하여 반응시키는 단계;를 포함할 수 있다.
- [0124] 상기 용어, “황련해독탕”, “황련해독탕 제조”, 및 “금 나노입자”는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0126] 상기 황련해독탕을 용해시킨 후, 이를 금염에 혼합하여 반응시키는 단계는, 황련해독탕을 용매에 용해시킨 후 용해된 황련해독탕을 금염에 혼합하여 반응시키는 단계를 의미한다.
- [0127] 황련해독탕을 용해시키는 용매는 종류수일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0128] 상기 금염($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)은 금 나노입자를 제조하기 위한 금의 이온상태를 의미하는 것으로서, 금염 원액이거나 또는 금염이 용매에 용해된 상태일 수 있다.
- [0129] 이후 상기 혼합된 황련해독탕과 금염이 반응하여 황련해독탕이 결합된 금 나노입자가 제조될 수 있는데, 이 때

상기 반응에서 황련해독탕 농도는 2 내지 4 mg/mL, 금염은 1 내지 2mM, 반응 시간은 25분 내지 35분, 반응 pH는 2.5 내지 3.5 또는 반응 온도는 30 내지 50℃일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0130] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, pH 3.0의 용액에서 2.5mg/mL HHT와 1.5mM HAuCl₄·3H₂O를 40℃에서 30분 동안 반응시켰을 때 HHT-AuNP가 가장 잘 생산되는 것을 확인하였다.

발명의 효과

[0132] 본 발명의 황련해독탕이 결합된 금 나노입자는 빠른 시간 내에 별도의 환원제 또는 안정제의 부가 없이도 크기가 균일하고, 면역 증강 효과를 가지므로, 이를 포함하는 조성물은 산업에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0134] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 황련해독탕이 결합된 금 나노입자(HHT-AuNP)의 합성 및 최적화에 대한 도이다. 구체적으로, (A) HHT를 이용한 AuNP 합성의 개략도, (B) HAuCl₄·3H₂O의 대규모 생물 환원을 위한 HHT 농도(a), 온도(b), 반응 시간(c), 금염 농도(d), pH(e) 등 반응 조건의 최적화를 나타낸다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 HHT-AuNP의 특성을 분석한 도이다. 구체적으로, (A) 합성된 HHT-AuNP와 HHT의 UV-Vis 흡수 분광 분석; (B) 눈금 막대가 200nm, 50nm 및 5nm를 나타내는 HHT-AuNP의 TEM 현미경 사진(a); 금 분포(원소 매핑, b) 및 에너지 분산형 X-선 분광 분석(EDX, c); (C) HHT-AuNP의 FESEM 패턴(a) 및 금 분포(b); (D) 선택된 영역 회절 패턴(왼쪽) 및 X-선 회절(XRD) 패턴(오른쪽); (E) 강도, 수 및 부피에 대한 동적 광산란(DLS)을 사용한 나노 입자의 크기 분포를 나타낸다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 HHT-식물성 화학 물질을 HHT-AuNP 표면에 착화하는 것을 나타낸 도이다. 구체적으로, (A) HHT 및 HHT-AuNP의 FTIR 스펙트럼; (B) 작용기 프로필의 표 형식 보기; (C) HHT 및 HHT-AuNP의 열 중량 분석 (TGA) 곡선을 나타낸다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 대식세포에서 HHT-AuNP의 흡수 및 세포 독성을 나타낸 도이다. 구체적으로, (A) 바이오-TEM 이미지, 선 사각형에서 확대된 이미지(아래)는 HHT-AuNPs 세포 흡수에 대한 대표적인 TEM 이미지이며, 노란색 화살표는 HHT-AuNPs의 축적을 가리키고, "C"와 "N"은 각각 핵질(N)과 세포질(C)을 나타낸다. (B) RAW264 세포에서 생존력에 대한 HHT 및 HHT-AuNP의 영향; (C) 살아있는/죽은 RAW264.7 세포의 형광 이미지와 Hoechst 33258 염색 후의 형광 이미지를 나타낸다. 여기에서 모든 값은 평균 $\pm$ SD *p < 0.05 대 대조군으로 표시하였다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 대식세포에 대한 HHT-AuNP의 면역 자극 활성을 나타낸다. 구체적으로, (A) HHT-AuNP 및 HHT 처리 후 RAW264.7 세포의 형태학적 특성, 빨간색 화살표는 분화된 RAW264.7 세포를 가리킴; (B) NO 생성; (C) RAW264.7 세포에서 각 표적 사이토카인의 mRNA 발현 수준; (D) RAW264.7 세포의 배양액에서 TNF- α 및 IL-1 β 수준을 나타낸다. 여기에서, 모든 값은 평균 $\pm$ SD로 표시되며, *p < 0.05, **p < 0.01 대비 대조군을 의미한다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 NF- κ B 및 MAPK 신호 전달 경로의 활성화에 의한 RAW264.7 세포의 HHT-AuNP 매개 면역 자극을 나타낸 도이다. 구체적으로, (A) RAW264.7 세포에서 ERK, JNK 및 p38 단백질의 면역 반응; (B) RAW264.7 세포에서 I κ B α 및 NF- κ B 단백질의 면역 반응을 나타낸다. 여기에서 모든 값은 평균 $\pm$ SD로 표시되며 *p < 0.05, **p < 0.01 대비 대조군을 의미한다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 HHT-AuNP로 촉발된 비장 세포 증식을 나타낸 도이다. 구체적으로, (A) 비장 세포의 생존력에 대한 HHT-AuNP 농도 증가의 영향; (B) 다른 시간대의 세포 생존력에 대한 HHT-AuNP의 영향; (C) 다른 시점의 비장 세포에서 NO 생성을 나타낸다. 여기에서, 모든 값은 평균 $\pm$ SD로 표시되며 **p < 0.01 대 대조군을 의미한다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 마우스 비장 세포에 대한 HHT-AuNP의 면역 자극 효과를 나타낸 도이다. 구체적으로, (A) 비장세포에 HHTAuNP 또는 HHT를 각기 다른 시간에 처리한 후 mRNA 발현 수준(TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10 및 IL-12) 분석; (B) 비장세포 배양액에서 TNF- α , IL-1 β , IFN- γ 및 IL-2 수준. (C) 비장 세포의 면역글로불린(IgG 및 IgA) 수치에 대한 HHT-AuNP의 영향을 나타낸다. 여기에서 모든 값은 평균 $\pm$ SD로

표시되며 *p < 0.05, **p < 0.01 대 대조군을 의미한다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 대식세포와 비장 세포에서 HHT-AuNP의 면역 증강 작용 메커니즘을 나타낸다. 여기에서 약어는 다음과 같다: M, 대식세포; T, T 림프구; B, B 림프구; NK, 자연살해세포.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 HHT-AuNP가 면역과 관련된 장내 미생물총에 미치는 효과를 나타낸다.

도 11은 마커 화합물인 제니포사이드, 바이칼린 또는 베르베린의 Calibration 커브를 나타낸 도이다.

도 12는 마커 화합물인 제니포사이드, 바이칼린 또는 베르베린의 HPLC 크로마토그램 결과를 나타낸 도이다.

도 13은 마커 화합물인 HHT와 HHT-AuNP의 HPLC에서의 크로마토그램이 차이가 있는 것을 설명하고 있는 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0135] 이하, 하기 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0137] 실험예 1: 재료

[0138] GenDEPOT(미국 텍사스주 케이티)에서 RPMI 1640 배양 배지, 둘베코의 수정 이글 배지(DMEM), 태아 소 혈청(FBS)을 구입하였다. Invitrogen(미국 캘리포니아주 칼스배드)에서 항생제(페니실린 및 스트렙토마이신)를 조달하였다. 시그마-알드리히(미국 미주리주 세인트루이스)에서 LPS, 디메틸 설폭사이드(DMSO), 가용성 3-(4, 5-디메틸티아졸-2-일)-2, 5-디페닐테트라졸륨 브로마이드(MTT), Hoechst 33258 및 그리이스 시약을 구입하였다. Life Technologies(미국 캘리포니아주 칼스배드)에서 LIVE/DEAD™ 생존력/세포독성 키트를 제공받았다. Biomed Co. (서울, 대한민국)에서 Quanti-Max™ WST-8 세포 생존력 분석 키트를 구입하였다. 스트렙 케미칼(미국 뉴베리포트, 매사추세츠주)에서 사업화수소 수화물(HAuCl₄ 3H₂O, 금염)을 공급받았다. R&D Systems(미국 미네아폴리스)에서 종양괴사인자-알파(TNF-α), IL-1β, IL-6), 인터루킨-2(IL-2), 인터페론-감마(IFN-γ) 검출을 위한 효소 결합면역흡착분석(ELISA) 키트를 구입하였다. Cell Signaling Technology(미국 매사추세츠주 댄버스)에서 IκBα, p-IκBα, NF-κB, p-NF-κB, β-액틴에 대한 1차 항체를 구입하였다. Proteintech(미국 일리노이주)에서 세포 외 신호 관련 키나아제(ERK), p-ERK, c-Jun N-말단 키나아제(JNK), p-JNK, p-p38 및 p38에 대한 1차 항체를 구입하였다. 본 출원의 분석에 사용된 다른 모든 화학물질과 시약은 시약 등급의 품질이며 시중에서 판매되는 제품이다.

[0140] 실험예 2: 황련해독탕(HHT) 추출물 준비

[0141] HHT를 구성하는 4가지 건조 약재(황련, 황금, 황백, 치자)를 (주)윌니허브(대구광역시 소재)에서 구입하였다. 상기 각각의 건조된 약재를 작은 조각으로 세절한 후 1:1:1:1의 비율로 총 100g의 중량으로 혼합하였다. 이후, 상기 혼합물을 환류추출 시스템으로 1.0 L 증류수에서 90분 동안 배양한 다음, 90분 동안 끓였다. 이를 통해 수득한 추출물을 20-25 μm 기공 크기의 Whatman No. 4 여과지로 여과하고, 60° C에서 EYELA N-1200A(EYELA, 일본 도쿄, 리카카이 주식회사)로 진공 증발로 농축시켰다. 이후 동결 건조하여 사용할 때까지 -80° C에서 보관하였다. 상기 방법으로 제조된 추출물의 최종 수율은 17.6%였다.

[0142] 다음으로, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) PerkinElmer PDA LC 검출기(미국 코네티컷주 셸튼)가 장착된 PerkinElmer Flexar QUATERNARY 펌프(미국 코네티컷주 셸튼)를 사용하여 HHT의 마커 화합물을 HPLC 분석으로 확인하였다. 이 때, 크로마토그래피 분리는 30° C의 컬럼 온도에서 INNO C18 컬럼(25cm x 4.6mm, 5 μm)에서 수행하였다. 이 때 이동상은 (A) 물에 0.5% 아세트산과 (B) 아세토니트릴의 두 부분으로 구성하였다. 그라데이션은 다음과 같은 조건에서 수행하였다: 0-25분, 5% B; 25-30분, 25-40% B; 30-40분, 40-100% B; 40-55분, 100-5% B. 또한 유속은 1mL/min으로 설정하고 주입량은 10 μL로 설정하였다.

[0143] HHT의 마커 화합물은 제니포사이드, 베르베린, 바이칼린이므로 HHT 및 HHT-AuNP에서 제니포사이드, 베르베린, 및 바이칼린을 정량화하고 HHT 내 함량을 정량적으로 분석하였다. 먼저, HHT 분말 추출물(2.4 mg) 및 HHT-AuNP(1.5 mg)를 각각 0.8 mL 및 0.5 mL의 MeOH에 용해시켰다. 이후 HHT 및 HHT-AuNP(3 mg/mL)를 20분 동안 초음파 수조에 넣었다. 그런 다음, 현탁액을 1,000배 희석하고 0.45 μm PVDF 멤브레인 필터로 여과하였다. 그런 후 상등액을 HPLC 분석에 사용하였다. 표준 화합물(제니포사이드, 바이칼린 또는 베르베린 1mg)을 1mL MeOH에

용해하고 동일한 조건에서 처리하였다.

[0144] 그 결과, 도 11 내지 도 13에서 확인할 수 있듯이, HHT에서 마커 화합물의 상관 계수(R2)는 양호한 선형성을 보이는 것을 확인할 수 있었다(≥ 0.9995).

[0146] 실험예 3: HHT-AuNP의 준비 및 최적화

[0147] 다음으로, 황련해독탕이 결합된 HHT-AuNP를 합성하기 위한 최적화된 조건을 확인하였다.

[0148] 구체적으로, HHT 추출물을 증류수에 10 mg/mL 농도로 용해하고 사용하기 전에 0.22 μ m 필터를 통과시켰다. 금염(HAuCl₄ 3H₂O)은 증류수에 용해하여 100mM(스톡 용액)으로 사용하였다. 금염 원액을 다양한 농도로 HHT 용액에 첨가하였다. 반응된 혼합물을 진동 배양기(MSH-20A, 대한민국)에서 배양하였다. HHT 및 HAuCl₄ 3H₂O 농도, 배양 시간 및 반응 pH 측면에서 HHT-AuNP의 합성 조건을 최적화하였다. 먼저 반응 혼합물에 대하여 시각적 색상 변화로 모니터링한 다음 스펙트럼 분석으로 확인하였다. 금염(1.5mM)이 나노 입자로 완전히 환원된 후, 생성된 나노 입자를 12,000rpm에서 20분간 원심분리하여 수득하였다(Smart R17 Plus, 한일과학(주), 대한민국). 상기 수득한 나노 입자를 증류수로 철저히 세척하여 변환되지 않은 금속 이온이나 기타 성분을 제거하였다. 마지막으로 상기 나노 입자를 공기 건조하여 수집하고 분석 특성 분석 및 응용에 사용하였다.

[0150] 실험예 4: HHT-AuNP의 특성 분석

[0151] UV-Vis 분광광도계(Cary 60, 미국 캘리포니아주 산타클라라 소재 애질런트)로 정제된 나노입자 현탁액의 흡광도 스펙트럼을 300-800nm 범위에서 확인하였다. AuNP의 형태학적 관찰, 원소 매핑, SAED 및 EDX를 확인하였다.

[0152] 구체적으로, 샘플은 물에 분산된 정제된 나노입자 방울을 탄소 코팅된 구리 격자 위에 올려놓고 37° C에서 건조시킨 후 현미경으로 옮겼다. 전계 방출 주사 전자 현미경(FE-SEM)으로 HHT-AuNP의 형태, 순도, 구조 및 원소 분포를 확인하였다. 또한 동적 광 산란(DLS, 일본 시가현 오츠카 일렉트로닉스)을 사용하여 물속에서 입자 크기를 측정하였다. 합성된 나노 입자의 결정 구조를 특성화하기 위해 분말 XRD 패턴을 기록하였다. 건조된 HHT-AuNP의 FTIR 스펙트럼을 Spectrum™ One FTIR 분광기(미국 매사추세츠주 월섬, PerkinElmer)를 사용하여 AuNP 표면에 캡핑된 식물 추출물의 가능한 작용기를 식별하였다.

[0154] 실험예 5: in vivo 실험

[0155] 체중 28~30g의 4주령 수컷 ICR 마우스를 오리엔트바이오(대한민국 성남)에서 구입하였다. 마우스는 23 $\pm$ 2° C의 온도에서 12시간/12시간의 명암 주기로 습도가 조절된 방에서 사육하였으며, 사료와 물은 자유로이 제공하였다. 동물 실험을 위한 모든 실험 절차는 경희대학교 기관 동물 관리 및 사용 위원회(KHUASP(SE)-14-040)의 검토 및 승인을 받았으며, 실험동물 관리 원칙(NIH 간행물 #85-23, 1985년 개정)에 따라 수행하였다. 세포 배양체의 실험을 위해 한국세포주은행(서울대학교, 서울)에서 RAW264.7 세포를 구입하여 5% CO₂가 공급되는 가습 인큐베이터에서 37° C에서 10% FBS가 첨가된 DMEM(고포도당)으로 유지하였다. 세포 독성 분석에는 MTT 분석법을 사용하였다. 구체적으로, 96웰 플레이트에 RAW264.7 세포(1 $\times$ 10⁴ 세포/웰)를 시딩하고 24시간 동안 배양한 후 세포를 다양한 농도의 샘플로 24시간 동안 처리한 후 세포 독성을 분석하였으며, 양성 대조군으로 LPS(1 μ g/mL)를 사용하였다. MTT 용액(0.5mg/mL, 100 μ L)을 세포에 첨가하고 37° C에서 약 3시간 동안 추가 배양하였다. 생성된 포마잔 결정을 DMSO(100 μ L)에 용해하고 마이크로플레이트 판독기(Molecular Devices Filter Max F5, 미국 샌프란시스코, 캘리포니아)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0156] 다음으로, 생체 외 실험을 위해 비장 조직을 무균적으로 제거하여 비장 세포를 수득하기 위해 비장을 수술용 가위로 부드럽게 작은 조각으로 자른 후 70 μ m 세포 여과기(SPL Life Sciences, 경기도 포천시, 대한민국)로 여과하였다. 이후 상기 세포를 적혈구 용해 완충액(미국 미주리주 세인트루이스 소재 시그마-알드리히)에 용해하여 적혈구를 제거하였다. 분리된 비장 세포를 5% CO₂가 공급되는 가습 인큐베이터에서 37° C에서 10% FBS와 1% 페니실린-스트렙토마이신이 첨가된 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. 부유 세포를 3시간 동안 배양한 후 수집하여 비장 세포를 얻었다. 비장 세포(2 $\times$ 10⁵ 세포/웰)를 96웰 플레이트에 시딩하고 다양한 농도의 샘플로 처리한 후 5% CO₂가 공급되는 가습 인큐베이터에서 37° C에서 12, 24, 36 또는 48시간 동안 배양하였다. 제조업체의 프로토콜에 따라 WST-8 분석 키트와 마이크로플레이트 판독기(Molecular Devices Filter Max F5, 미국 샌프란시스코,

캘리포니아주)로 세포 생존율을 측정하였다.

[0158] **실험예 6: HHT-AuNP의 흡수 및 세포 내 국소화**

[0159] 다음으로, RAW264.7 세포를 PBS로 세 번 세척하여 결합되지 않은 나노 입자를 제거하였다. 세포의 경우 수집된 세포 펠렛을 4℃에서 8시간 동안 2.5% 글루타르알데히드를 사용하여 고정하고, 1% 사산화오늄으로 2시간 동안 후고정하고, 50%, 70%, 90%, 100% 에탄올로 각각 15분 동안 서서히 탈수시켜 사용하였다. 그런 다음 상기 샘플을 Epon(시그마-알드리치)에 내장하고 초미세 현미경(라이카 EM UC7, Wetzlar, 독일)을 사용하여 초박형 단면(70nm)을 얻었다. 이후 상기 샘플은 Bio-TEM 이미징을 위한 표준 프로토콜에 따라 후처리하였다. 마지막으로, 80kV에서 작동하는 JEM-1010 TEM(일본 도쿄, JEOL)을 사용하여 섹션을 이미지화하였다.

[0161] **실험예 7: 생체/사체 형광 분석 및 Hoechst 33258 염색**

[0162] 시료의 세포 독성 효과를 평가하기 위해 RAW264.7 세포를 6웰 배양 플레이트에 2.0×10^5 세포/웰의 밀도로 배치하고 70~80% 합류할 때까지 약 하루 동안 안정화시켰다. 배양 배지를 PBS로 두 번 행구어 제거한 후, 다양한 농도의 샘플이 포함된 신선한 배지를 세포에 추가하였다. 24시간 동안 더 배양한 후, 제조업체의 프로토콜에 따라 생세포/사세포 염색 키트와 Hoechst 33258 염료 용액으로 세포를 염색하였다. 37℃의 어두운 곳에서 30분간 배양한 후, 형광 주사 현미경(독일 라이카, Wetzlar)을 사용하여 490/525nm의 Ex/Em으로 염색된 세포를 시각화하였다.

[0164] **실험예 8: 산화질소 측정**

[0165] 산화질소 측정을 위해, RAW264.7 세포(1×10^4 세포/웰)를 96 웰 플레이트에 시딩하고 24시간 동안 시료로 처리하였다. 산화질소(NO) 산화의 안정적인 최종 생성물인 아질산염(NaNO_2)의 생성은 제조업체의 프로토콜에 따라 Griess 시약을 사용하여 측정하였다. 배양 상층액(100 μL)을 100 μL Griess 시약과 반응시켰다. 30분 배양 후, 분광광도계 마이크로플레이트 판독기(Molecular Devices Filter Max F5, 미국 샌프란시스코, 캘리포니아주)로 575nm에서 흡광도를 측정하였다. 아질산나트륨의 표준 곡선을 사용하여 NaNO_2 의 농도를 추정하였다.

[0167] **실험예 9: 정량적 실시간 중합효소 연쇄 반응(qRT-PCR)**

[0168] 이후, qRT-PCR을 사용하여 mRNA 발현을 정량화하였다. 구체적으로, TRIzol 시약(Invitrogen, 미국 캘리포니아주 칼스배드)을 사용하여 총 세포 RNA를 추출하였다. 그런 다음, 500ng의 RNA를 슈퍼스크립트 퍼스트 스트랜드 합성 키트(Invitrogen, 캘리포니아주 칼스배드, 미국)를 사용하여 단일 가닥 cDNA로 역전사하였다. 제조업체의 지침에 따라 SYBR®Premix Ex TaqII RT-PCR 키트(TaKaRa, 일본)로 CFX96™ 실시간 RT-PCR 시스템에서 qRT-PCR을 수행하였다. 분석은 20 μL 반응량에서 50ng cDNA를 사용하여 amfiSure qGreen Q-PCR 마스터 믹스(미국 텍사스주 GenDEOT)와 함께 수행하였다. qRT-PCR에 사용된 프라이머 서열(순방향 및 역방향)은 하기 표 1과 같다. 각 샘플은 삼중으로 분석하였다. 유전자 발현은 내인성 대조군(GAPDH)의 발현으로 정규화하였다.

표 1

Primer		Sequence (5'-3')
IL-6	Forward; Reverse	5'-GTTCTCTGGGAAATCGTGGA-3'; 5'-TGTACTCCAGGTAGCTATGG-3'
TNF- α	Forward; Reverse	5'-AGCCACGTCGTAGCAAACCAC-3'; 5'-AACACCCATTCCCTTCACAG-3'
IL-1 β	Forward; Reverse	5'-TGCAGAGTTCCTCAACTGGTAC-3'; 5'-GTGCTGCCTAATGTCCCTT-3'
iNOS	Forward; Reverse	5'-AATGGCAACATCAGGTCGGCCA-3'; 5'-GCTGTGTGTACAGAAAGTCT-3'
IL-10	Forward; Reverse	5'-TAGAGCTGCGGACTGCCTTCA-3'; 5'-GGTCTTCAGCTTCTCACCAG-3'
Arg-1	Forward; Reverse	5'-ACTGAGGAATGCTGGTCTGGT-3'; 5'-GCTTCCAAGTCCATAGTGTGG-3'
IL-4	Forward; Reverse	5'-TGATCACAACATTGCATTCA-3'; 5'-ACACCAGATTGTCAGTCACTTG-3'
IL-13	Forward; Reverse	5'-CCAGAAGGTGAGTGTCTGGCTA-3'; 5'-CTAACGAATCCTCCTGTAAGG-3'
IFN- γ	Forward; Reverse	5'-TATGCTTTTCTACCTCAGAC-3'; 5'-GCAATCACAGTCTTGGCTAATTAG-3'
IL-2	Forward; Reverse	5'-CCTGAGCAGGATGGAGAATTA-3'; 5'-TCCAGAATCATGCCGAGAG-3'
GAPDH	Forward; Reverse	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'; 5'-CCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'

[0169]

[0171] **실험예 10: 효소 결합 면역 흡착 분석법(ELISA)**

[0172] 세포를 샘플로 처리한 후, 제조업체의 지침에 따라 RAW264.7 세포 배양 상층액(100 μ L)을 수집하고 ELISA 키트(R&D Systems, 미국 미네소타주)로 TNF- α 및 IL-1 β 의 수치를 측정하였다. 또한, 비장세포 배양 상층액을 사용하여 각각의 ELISA 키트(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)로 TNF- α , IL-1 β , IL-2, IFN- γ 의 분비를 확인하고, 마우스 IgG 및 IgA ELISA 키트(Elabscience, Texas, USA)로 각각 면역글로불린 G(IgG)와 면역글로불린 A(IgA)의 수치를 측정하였다.

[0174] **실험예 11: 웨스턴 블로팅**

[0175] 웨스턴 블로팅은 다음과 같은 과정으로 진행하였다. 구체적으로, RAW264.7 세포 펠릿을 수집하여 Pierce™ RIPA 버퍼(Thermo Scientific, 미국)에서 1시간 동안 용해시켰다. 세포 용해물을 4℃에서 12,000rpm으로 20분간 원심 분리하고 상층액에서 총 단백질을 수집하였다. 단백질 농도를 측정하기 위해 Bio-Rad 단백질 분석 키트(미국 캘리포니아주 헤라클레스 소재 BioRad Laboratories Inc.)를 사용하였다. 구체적으로, 총 단백질의 동일한 양(50 μ g)을 소듐도데실설페이트폴리아크릴아미드(SDS-PAGE; 10% 겔)에 처리한 후, 여기에서 분리된 단백질을 단백질 겔 전기영동 챔버 시스템(Thermo Fisher Scientific, 미국)을 사용하여 PVDF 멤브레인(Thermo Fisher Scientific, 미국)으로 옮겼다. 멤브레인을 5% 무지방 우유로 실온에서 1시간 동안 차단한 다음 1차 항체(1:1000)와 함께 4℃에서 하룻밤 동안 배양하였다. 인산 완충 식염수Tween 20(PBS-T)으로 세 번 세척한 후, 멤브레인을 적절한 HRP 결합 2차 항체(1:5000)와 함께 암실에서 1시간 동안 배양하였다. 면역 반응 밴드는 West-Q Pico ECL 솔루션(미국 텍사스주 케이티의 GenDEPOT)을 사용하여 확인하고, Alliance MINI HD9 AUTO 면역 블롯 이미징 시스템(영국 잉글랜드의 UVItec Limited)을 사용하여 시각화하며, ImageJ 소프트웨어를 사용하여 정량화하였다.

[0177] **실험예 12: 높은 처리량 시퀀싱 및 생물정보학 분석**

[0178] 각 그룹에서 무작위로 선택된 5마리의 생쥐의 신선한 배설물 샘플을 액체 질소에서 급속 냉동하였다. 장기간 보존을 위해 분변 샘플을 -80℃에 보관하였다. 토양용 FastDNA Spin Kit(MP Biomedicals, CA, USA)를 사용하여 분변 샘플에서 게놈 DNA를 추출했다. 16S rDNA의 V3 및 V4 영역은 범용 프라이머를 사용한 PCR을 사용하여 게놈 DNA로부터 증폭하였으며 제조사의 지침에 따라 Illumina MiSeq Sequencing system(Illumina, USA)을 사용하여 ChunLab, Inc.(Seoul, Korea)에서 시퀀싱하였다. 생성된 고품질 서열은 추가 생물정보학 분석을 위해 EzBioCloud 16S 기반 MTP(ChunLab의 생물정보학 클라우드 플랫폼)를 사용하여 운영 분류 단위(OTU)로 분류하고, 마지막으로 종 수준은 OTU 상대성에 따라 분류하였다.

[0180] **실험예 13: 통계 분석**

[0181] 이 연구에 표시된 정성적 데이터는 최소 3개의 개별 실험을 대표한다. 정량적 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차(SD)로 표시하였다. 그룹 간의 통계적 유의성을 확인하기 위해 일원 분산 분석과 학생 t-검정을 수행하였다. 통계 분석에는 GraphPad Prism 6을 사용하였다. $p < 0.05$ 및 $p < 0.01$ 의 결과는 통계적으로 유의미한 것으로 간주된다.

[0183] **실시예 1: HHT-AuNP의 합성 및 최적화 조건 확인**

[0184] HHT-AuNP를 제조하는 절차는 도 1A와 같다.

[0185] HHT-AuNP의 합성에 있어 최적의 합성 조건을 확인하였다. 구체적으로, 나노 입자의 가시광 흡수 스펙트럼을 모니터링하기 위해 UV-Vis 분광법을 사용하여 확인하였다.

[0186] 그 결과, 도 1B에서 확인할 수 있듯이, UV-Vis 스펙트럼 분석과 다양한 조건에서의 색상 변화를 통해 AuNP가 형성되는 것을 확인할 수 있었다. 먼저 도 1B(a)는 HHT 농도가 HHT-AuNP 형성에 미치는 영향으로, pH 4.0에서 다

양한 농도(0.08, 0.16, 0.31, 0.63, 1.25, 2.5, 5, 10 mg/mL)의 HHT와 1mM HAuCl₄·3H₂O를 상온(25℃)에서 반응시켰을 때, 감소 속도가 느리지만 551nm에서 AuNP의 표면 플라즈몬 파장이 확인되었으며, 총 반응 시간은 40분인 것을 확인하였다. 이 때 합성된 AuNP는 2.5 ~ 10 mg/mL 농도의 HHT 추출물에서 유사한 흡광도를 보였다. 다만, 더 낮은 농도(2.5mg/mL)가 생물학적 응용에 더 적합하고 비용적으로도 효율적이었다. 따라서 반응 온도를 더욱 최적화하기 위해 2.5mg/mL HHT를 선택하였다.

[0187] 다음으로, 최적의 온도와 최적의 반응 시간을 확인해 보았다. 도 1B(b)에서 볼 수 있듯이, 2.5mg/mL HHT와 1mM HAuCl₄·3H₂O(pH 4.0)를 다양한 온도(20℃, 30℃, 40℃, 50℃, 60℃)에서 40분 동안 반응시킨 결과, 40℃에서 HHT-AuNP의 최적 생산이 확인되었다. 또한, 도 1B(c)에서 확인할 수 있듯이, pH 4.0에서 2.5mg/mL HHT와 1mM HAuCl₄·3H₂O를 40℃에서 다양한 반응 시간(10, 20, 30, 40, 50, 60분)으로 반응시켰을 때, 합성된 HHT-AuNP는 유사한 흡수 스펙트럼을 보였으나, 그 중에서도 HAuCl₄·3H₂O 농도를 더욱 최적화하기 위해 30분의 반응 시간이 최적의 시간임을 확인하였다.

[0188] 다음으로, 상기 최적화된 조건으로 금 나노입자를 합성한 결과, 도 1B(d)에서 확인할 수 있듯이, 2.5mg/mL HHT와 다양한 농도의 HAuCl₄·3H₂O(0.25, 0.5, 1, 1.5, 2 및 2.5mM)를 pH 4.0에서 40℃에서 30분 동안 반응시켰고, HAuCl₄·3H₂O 농도가 1.5mM일 때 551nm에서 주요 흡수 피크가 더 크게 나타나는 것을 확인하였다.

[0189] 마지막으로, 40℃에서 30분 동안 다양한 pH(2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0)에서 HHT(2.5mg/mL)와 HAuCl₄·3H₂O(1.5mM)를 사용하여 HHT-AuNP를 합성해 본 결과, 도 1B(e)에서 볼 수 있듯이, 반응 pH가 3.0일 때 551nm에서 주요 흡수 피크가 더 크게 나타나는 것을 확인하였다.

[0190] 종합하여, 본 발명의 HHT가 결합된 금 나노입자는 pH 3.0의 용액에서 2.5mg/mL HHT와 1.5mM HAuCl₄·3H₂O를 40℃에서 30분 동안 반응시켰을 때 HHT-AuNP가 가장 잘 생산되는 것을 확인할 수 있다.

[0192] 실시예 2: HHT-AuNP의 특성 분석 결과 확인

[0193] 상기 실시예 1의 최적의 합성 조건에서, UV-Vis 분광광도계로 HHT-AuNP를 합성하고 특성을 분석하였다(도 2A 참조). HHT-AuNP는 λ_{max} 가 551nm에서 확인할 수 있었으며, 이는 형성된 AuNP의 전도대에서 자유 전자의 진동으로 인한 표면 플라즈몬 공명의 반응을 나타낸다. 또한 색상은 연한 노란색에서 진한 보라색으로 바뀌었으며, 이러한 결과로부터 HHT-AuNP가 성공적으로 합성되었음을 확인할 수 있다.

[0194] 이후, 3개의 독립적인 분석(FE-TEM, FE-SEM, DLS)으로 상기 합성된 HHT-AuNP의 구조적 특성(크기 및 형태)을 측정하였다.

[0195] 먼저, 도 2B에서 볼 수 있듯이, FE-TEM에서는 본 발명의 금 나노입자 크기가 6~74nm로 다양하고 구형 및 다각형 형태임을 보여준다(a). 또한, 원소 매핑을 통해 정제된 입자에서 금(녹색)의 뚜렷한 분포를 감지할 수 있었다(b). EDX 분석 결과에서는 2.2keV에서 금속 금의 가장 높은 특징적인 피크를 보여주는 것을 확인할 수 있었다(c). 또한, FE-SEM으로 AuNP의 높은 표면 에너지로 인해 조밀한 구형 형태와 응집을 나타남을 확인하였다(도 2C(a)). 나아가 원소 매핑(도 2C(b), 녹색) 결과로도 금 분포가 확인되었으며, 이는 앞서 설명한 TEM 결과와 일치함을 알 수 있다. SAED 및 XRD 패턴 결과는 38.12°, 44.53°, 64.68°, 77.93°의 2 θ 값에서 4개의 주요 회절 피크를 보였으며, 이는 각각 브래그 반사의 (111), (200), (220), (311) 격자 평면에서 금의 네 가지 특징적인 피크에 해당함을 알 수 있다(도 2D).

[0196] 다음으로, 강도, 개수 및 부피에 대한 HHT-AuNP의 크기 분포 프로파일을 확인하기 위하여, 11°, 45.15°, 64.65°, 77.93°.29 입자 크기 분석기를 사용하여 DLS 방법으로 확인하였다. 그 결과, 도 2E에서 볼 수 있듯이, 평균 강도, 수, 부피 값은 각각 106, 19.2, 10.3nm인 것을 확인하였다. 또한, HHT-AuNP의 유체역학적 직경은 91.3nm, 중간 정도이고, 다분산 지수(PDI)는 0.25(AuNP의 좁은 크기 분포를 나타냄)이며, HHT-AuNP의 제타 전위는 -30.06mV인 것으로 확인하였다.

[0197] DLS는 콜로이드 내 컨주게이트의 전체 크기 또는 평균 유체역학적 크기를 결정할 때 유기 겹질을 고려한다. 콜로이드의 각 NP를 덮고 있는 생체 분자의 수가 많기 때문에 DLS를 사용하여 측정한 유체 역학적 크기가 TEM을 사용하여 측정한 크기보다 컸다. 금속 나노입자는 입자 크기에 따라 종양 표적화 능력이 다르게 나타납니다. 20nm보다 작은 나노입자는 종양 특이적으로 축적되는 양이 적은 반면, 300nm보다 큰 나노입자는 식세포 작용에 의해 쉽게 제거된다. 반면, 50~200nm 크기의 나노입자는 종양 축적 가능성이 높은 것으로 나타난다. 따라서, 상

기의 결과는 본 발명의 HHTAuNP가 암 면역치료에 유리할 수 있음을 시사하는 것이다.

[0198] 다음으로, FTIR 스펙트럼으로 HHT-AuNP의 표면에서 가능한 작용기를 확인하였다(도 3A). 흡수 피크는 도 3B와 같다.

[0199] 그 결과, HHT-AuNP와 HHT는 각각 3423.55 및 3256.49 cm^{-1} 에서 밴드를 보였으며, 1508.14-1635.81 cm^{-1} 범위에서 C-H 스트레칭에 해당하는 2850.05-2920.84 cm^{-1} 에서 O-H 스트레칭으로 특성화되는 것을 확인하였다. 이 스트레칭은 518.29-768.16 cm^{-1} 범위에서 C-C 및 C-O 밴드에 해당하는 1018.61-1362.10 cm^{-1} 에서 C=O 및 C=C 이중 결합 작용기로 나타났는데, 이는 =CH 작용 결합의 변형 진동으로 나타났다. 이러한 결과는 HHT-AuNP가 개별 $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 와 HHT로 구성된 혼합 구조로 구성되었음을 시사한다. 또한, 폴리머가 표면에 접목되었는지 여부를 확인하기 위해 HHT-AuNP와 HHT의 열무게 분석(TGA) 곡선을 얻었다. HHT(63.74%)는 해당 HHT-AuNP(15.62%)보다 더 크게 분해되어 두 개의 뚜렷한 분해 영역이 나타났다(도 3C). 이러한 결과를 통해 본 발명의 HHT-AuNP 표면에 유기 폴리머 코팅($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)이 형성됨을 확인할 수 있었다.

[0201] 실시예 3: HHT 및 HHT-AuNP에서 제니포사이드, 바이칼린, 베르베린의 정량화 분석 결과 확인

[0202] HPLC를 사용하여 HHT의 마커 화합물을 분석하였다.

[0203] 그 결과, 도 11 내지 도 13에서 확인할 수 있는 것과 같이, HHT에서는 제니포사이드, 바이칼린 및 베르베린의 특징적인 피크가 확인된 것과 달리, 본 발명의 HHT-AuNP에서는 바이칼린과 베르베린 피크만 확인되었다. HHT 추출물의 지표 화합물 함량은 이리도이드(제니포사이드 60.92 $\pm$ 0.23 mg/g), 플라보노이드(바이칼린 17.29 $\pm$ 0.85 mg/g), 알칼로이드(베르베린 21.53 $\pm$ 0.17 mg/g)인 반면, 본 발명의 HHT-AuNP의 주요 화합물 함량은 바이칼린(4.41 $\pm$ 0.06 mg/g)과 베르베린(2.97 $\pm$ 0.06 mg/g)으로 나타났다(표 2).

표 2

Components	Geniposide	Baicalin	Berberine
HHT (mg/g)	60.92 $\pm$ 0.23	17.29 $\pm$ 0.85	21.53 $\pm$ 0.17
HHT-AuNPs (mg/g)	0	4.41 $\pm$ 0.06	2.97 $\pm$ 0.06

[0204]

[0206] 식물 플라보노이드와 알칼로이드는 금속 이온을 나노 입자로 환원시킬 수 있는 다양한 작용기를 가지고 있다. 이를 토대로 보건대, 상기 결과는 HHT-AuNP 표면에 플라보노이드와 알칼로이드가 존재하며, 이는 $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 를 AuNP로 환원시키고 더 안정화시키는데 유리함을 알 수 있다.

[0207] 또한, 본 발명의 금 나노입자에 결합된 주요 활성 화합물은 10% 미만이었지만 실제 활성은 같은 양에서 100배 더 높은 것을 확인하였다. 따라서 이러한 결과는 천연물질의 세포 내 활성 증가는 최소한의 천연물질로 최대의 활성을 이끌어낼 수 있으며, 활성은 높지만 독성이 있는 화합물은 나노입자의 원뿔 합성을 통해 독성을 줄이고 세포 내 활성을 높일 수 있음을 시사한다.

[0209] 실시예 4: 대식세포에서 HHT-AuNP의 흡수 및 세포 독성 확인

[0210] 면역 세포는 나노 입자가 세포로 침투하는 것을 막는 첫 번째 장벽이다. 따라서, 식세포와 HHT-AuNP 간의 상호 작용을 확인하기 위하여, 대식세포를 사용하여 AuNP의 체외 흡수 및 면역 자극 활성(및 기본 메커니즘)을 확인하였다.

[0211] 먼저, Bio-TEM 이미징으로 HHT-AuNP의 세포 내 국소화를 확인하였다. 도 4A에서 볼 수 있듯이, 3시간 배양 후 세포가 흡수한 NP는 주로 엔도솜에 나타나 비교적 크고 밀집된 응집체를 형성하는 것을 확인하였다. 일부 NP는 엔도솜 외부의 세포질에 나타났는데, 이는 입자의 엔도솜 탈출을 반영하며 추가적인 세포 내 생물학적 효과를

유발할 수 있다. 이러한 결과는 대식세포가 엔도사이토시스를 통해 HHT-AuNP를 내재화했음을 시사한다.

[0212] 종래 연구에서 유체역학적 크기가 100nm 미만인 AuNP는 포식 작용을 통해 세포와 클라트린을 통해 내재화될 수 있음이 확인된 바, 본 발명의 HHT-AuNP의 높은 생체적합성을 확인하기 위해 유체역학적 크기가 100nm 미만인지 여부를 확인하였다.

[0213] 다음으로, 생물학적으로 안전한 HHT-AuNP 농도를 선별하기 위해, MTT 분석법으로 RAW264.7 세포에 대한 HHT-AuNP의 세포 독성을 확인하였다. 그 결과, 10~200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 대조군(무처리 세포)과 HHT-AuNP 또는 HHT 처리 그룹 간에 세포 생존율에 유의미한 차이가 없는 것으로 나타났다(도 4B). 생물의학 물질의 허용 가능한 세포 독성은 포유류 세포에 대해 75%이므로, 상기 결과는 HHT-AuNP가 표시된 농도에서 정상 세포에 무독성임을 시사한다. 생체/사체 및 Hoechst 33258 염색에서도 비슷한 결과가 확인되었다. 도 4C에서 볼 수 있듯이, 대조군에 비해 LPS에 의해 상당한 수준의 세포 사멸이 유도된 반면, RAW264.7 세포에서는 HHT-AuNP의 내약성이 더 우수하였다. 따라서 이러한 결과를 토대로, 후속 실험에서는 100 및 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도를 사용하여 RAW264.7 세포에서 HHT-AuNP의 면역 자극 활성을 확인하였다.

[0215] 실시예 5: 대식세포에 대한 HHT-AuNP의 시험관 내 면역 자극 활동 확인

[0216] 대식세포는 생리를 빠르게 변화시키고 사이토카인을 방출하여 활성화됨으로써 외부 자극에 반응할 수 있다. RAW264.7 세포로 대식세포와 유사한 특성을 바탕으로 분석하는 동안 대조군에서 형태학적 변화가 관찰되지 않았다. LPS에 의한 세포 활성화와 유사하게, 본 발명의 HHT-AuNP는 세포 분화(빨간색 화살표)를 유도하여 편평하고 길쭉한 세포가 슈도포디아 형성을 보이는 것을 확인하였다(도 5A). 활성화된 대식세포는 복잡한 일련의 생물학적 과정을 거쳐 침입 병원체를 인식하고 죽임으로써 인체를 보호하는 면역 관련 사이토카인 및 NO를 포함한 염증 매개체 발현을 유도한다. 면역 체계가 자기 보호를 달성하기 위해서는 적절한 NO 생성이 중요하다. 따라서 RAW264.7 세포에서 NO 생성에 대한 AuNP의 영향을 확인하였다. 그 결과, 도 5B에서 볼 수 있듯이, HHT-AuNP는 대조군에 비해 용량 의존적인 방식으로 NO 생성을 상당히 촉진하였다. 그러나 HHT-AuNP에 의한 NO 생성은 LPS로 처리한 대조군에 비해 상당히 낮았으며, 이는 HHT-AuNP가 염증보다는 NO 생성을 유도한다는 것을 나타낸다. 사이토카인은 대식세포의 분화와 활성화를 조절하여 면역 반응에 큰 영향을 미친다. 대식세포의 사이토카인 수준은 종종 면역 조절 능력을 평가하는 데 사용된다. 구체적으로, IL-6, TNF- α , IL-1 β 는 대식세포에 독제적인 방식으로 작용하여 다양한 기능적 반응을 강화하는 가장 중요한 전 염증성 사이토카인으로 간주되며, iNOS와 같은 다른 면역 조절 매개체의 발현을 유도한다고 보고된다. 이를 토대로 본 발명에서는 HHT-AuNP 처리 후 대식세포에서 다양한 면역 관련 유전자의 발현이 용량 의존적으로 상향 조절되는 것을 확인하였다(도 5C). 그러나 M1과 M2 대식세포 표현형의 활성화에는 미묘한 차이가 있었다. 대식세포는 표현형에 따라 다양한 자극에 노출되었을 때 전염증성(M1 세포) 또는 항염증성(M2 세포)을 담당할 수 있지만, M1 및 M2 대식세포는 모두 면역 반응과 밀접한 관련이 있다. HHT-AuNP(200 $\mu\text{g/mL}$)는 대식세포에서 각각 18.6배, 1.7배, 14.2배, 14.4배의 IL-6, TNF- α , IL-1 β 및 iNOS mRNA 발현을 유도하였다(도 5C). iNOS는 대식세포에서 대부분의 NO 합성에 중요한 조절 인자이다. 따라서 iNOS의 mRNA 발현 증가는 NO의 생산 증가를 나타낸다(도 5B). M2 세포 반응과 관련된 사이토카인의 경우, HHT-AuNP는 IL-10 mRNA는 22.8배, Arg-1 mRNA는 8.7배, IL-4 mRNA는 5.5배, IL-13 mRNA는 7.5배의 발현 증가를 유도했다(도 5C).

[0217] 반면, HHT(200 $\mu\text{g/mL}$)는 IL-10과 Arg-1의 발현을 약간만 증가시켰다. 또한 HHT-AuNP는 RAW 264.7 세포에서 TNF- α 및 IL-1 β 생성을 유도한 반면, HHT는 대조군에 비해 아무런 영향을 미치지 않았다(도 5D). 이러한 결과는 본 발명의 HHT-AuNP의 면역 자극 활동이 대식세포를 M1 및 M2 유형으로 분화시킬 수 있음을 시사한다.

[0219] 실시예 6: HHT-AuNP의 대식세포에서 MAPK 및 NF- κ B 신호 전달 경로 활성화 확인

[0220] 최근 면역 자극 활성의 기전에 대한 연구 결과를 보면, 대식세포의 활성화를 위해서는 세포 내 신호 전달 경로를 조절하는 것이 필요하다는 사실을 확인할 수 있다. 이를 토대로 본 발명의 HHT-AuNP에 의한 대식세포 활성화의 기전을 밝히기 위해 웨스턴 블랏팅을 통해 핵전사인자- κ B(NF- κ B)와 미토겐 활성화 단백질 키나제(MAPK) 신호 전달 경로에 미치는 영향을 확인하였다.

[0221] 세린/트레오닌 단백질 키나아제인 MAPK는 염증 매개체를 조절하고 면역 반응을 조절한다. 대표적인 MAPK 신호는 세 가지가 확인된다: ERK, JNK, p38.

- [0222] 이를 토대로 본 발명의 금 나노입자가 미치는 영향을 확인하면, 도 6A에서 볼 수 있듯이, HHT-AuNP는 처리되지 않은 세포에서 확인된 것과 비교하여, ERK, JNK 및 p38의 인산화를 유의하게 증가시키는 것을 확인할 수 있다. 이러한 결과는 본 발명의 HHT-AuNP로 촉발된 MAPK 신호 경로가 면역 반응을 매개하고 대식세포에서 AuNP의 식균 작용에 참여할 수 있음을 시사하는 것이다.
- [0223] 유비쿼터스 전사인자인 NF- κ B는 숙주 방어와 관련된 여러 사이토카인의 발현을 조절한다. 도 6B에 표시된 바와 같이, 테스트한 농도 중 HHT-AuNP는 인산화 I κ B α 와 NF- κ B의 발현을 유의하게 상향 조절하였으며, 이는 도 5C 및 D에 표시된 사이토카인의 mRNA 발현 및 분비에 미치는 영향과 일치한다. 이러한 결과는 HHT-AuNP가 MAPK 및 NF- κ B 신호 경로를 모두 활성화하여 대식세포를 자극한다는 것을 강력하게 시사한다.
- [0225] **실시예 7: 마우스 비장 세포에 대한 HHT-AuNP의 생체 외 면역 자극 효과 확인**
- [0226] 다음으로 생체 외 비장 세포를 사용하여 HHTAuNP의 면역 자극 활성을 확인하였다. 그 결과, 도 7A와 B에서 볼 수 있듯이, 테스트한 농도에서는 세포 독성이 관찰되지 않았으며, 오히려 용량 및 시간 의존적으로 세포 생존력이 크게 증가하는 것을 확인하였다. 또한, HHT-AuNP는 비장세포에서 시간 의존적으로 NO 생성을 유의하게 증가시켰으며(도 7C), 이는 HHT-AuNP가 비장세포에서 대식세포를 자극한다는 것을 나타낸다.
- [0227] 비장 세포는 다양한 면역 기능을 가진 다양한 세포(예: T/B 세포, 대식세포, 수지상 세포)와 이러한 면역 세포에 특이적인 사이토카인으로 구성되어 있다. Th1 세포에서 분비되는 TNF- α 와 IFN- γ 는 세포 매개 면역 반응에 관여하는 반면, IL-4, IL-6 및 IL-10은 체액성 면역 반응에 관여하는 Th-2 특이적 사이토카인이다. TNF- α 는 T 세포, B세포, 대식세포, NK세포에서 분비되며 박테리아 감염과 급성 스트레스를 억제하여 염증과 숙주 방어를 조절한다. IL-12는 수지상세포, 대식세포, B세포에서 생성되며, 각각 T세포와 NK세포에서 TNF- α 와 IFN- γ 의 생성을 촉진한다. T세포 증식을 자극하는 널리 사용되는 미토겐인 콘카나발린 A(ConA)를 양성 대조군으로 사용하여 비장세포의 T세포 활성화 및 면역 관련 사이토카인 생성에 대한 HHT-AuNP 치료의 효과를 조사할 수 있다. 이를 토대로 도 8A에서는 면역 세포에 대한 HHT-AuNP의 효과는 이러한 면역 세포에 특이적인 사이토카인의 mRNA 발현 및 분비 수준을 감지하여 확인하였다. 그 결과, 본 발명의 HHT-AuNP는 24~36시간 동안 비장 세포에서 TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12의 발현을 유의하게 유도하였다(도 8A). 또한 IL-2는 T세포 성장을 촉진하고 NK세포 용해 활성을 향상시키며 Treg 세포의 분화를 유도하는 다발성 사이토카인이다. HHT-AuNPs 처리에 반응하여 비장 세포에서 IL-2의 발현이 현저하게 증가하는 것이 확인되었다. IFN- γ 는 주요 면역 관련 사이토카인으로서 T 세포의 생성을 유도하고 대식세포와 NK 세포의 증식을 활성화하며 Th1과 Th2 세포를 교차 조절한다. 도 8A에서 볼 수 있듯이 HHT-AuNP는 비장 세포에서 IFN- γ 의 발현을 유도했으며, 이는 HHT-AuNP가 비장 세포 증식을 유도하는 것임을 설명할 수 있다.
- [0228] 이에 따라 ELISA 결과에서도 HHT-AuNP가 비장 세포에서 TNF- α , IL-1 β , IFN- γ 및 IL-2의 생성을 크게 증가시키는 것으로 나타났다(도 8B). 따라서 비장 세포에 대한 HHT-AuNP의 효과는 면역 자극으로 볼 수 있는 반면, HHT는 이러한 사이토카인의 생산을 상향 조절하지 않았다. 체니포사이드, 베르베린, 바이칼린은 HAuCl₄-3 H₂O로 산화될 때 화학적 변형을 일으켜 보다 활성적인 형태로 전환되었을 수 있다고 가정할 수 있다. 또한 FTIR 결과(도 3A)는 AuNP 합성 후 유기 고분자 화학에 큰 변화가 있었음을 시사한다. 종래 하이포시아 헤메로칼리데아 추출물에서 녹색으로 합성된 AuNP가 NK 세포에 미치는 면역 조절 효과를 확인한 바 있으나, 이 물질은 IFN- γ 생성을 억제하는 것으로 확인된 바 있다. 이를 통해 다른 식물 공급원 매개 AuNP는 면역 반응에 대조적인 영향을 미칠 수 있으며, 이는 다른 유기 폴리머를 사용한 AuNP 합성 후의 화학적 변형에 따라 달라질 수 있음을 알 수 있다. AuNP 합성 후 유기 폴리머의 화학적 변형은 활성 화합물과 HHT-AuNP에 대한 보다 정교한 분광 분석을 수행해야만 확인할 수 있다. 반면, 자극을 받은 B세포는 기억 B세포로 전환된 후 면역글로불린(Ig, 대표적인 면역 기능 분자)으로 분화되어 독소, 박테리아 또는 바이러스를 중화시키고 면역 반응을 조절하는 형질 세포를 분비할 수 있다. IgG와 IgA는 보체 활성화에 관여하는 주요 면역 글로불린이며, 여러 연구에서 천연물이 IgA와 IgG의 생성을 촉진하여 체액성 면역 반응을 향상시킬 수 있다고 보고된 바 있다. 이를 토대로 HHT-AuNP의 면역 강화 활성의 기본 메커니즘을 이해하기 위해 비장 세포의 IgG 및 IgA 수준을 ELISA를 사용하여 측정하였다. 그 결과, 도 8C에서 볼 수 있듯이, HHT 치료는 치료하지 않은 세포에 비해 IgG 또는 IgA 생산에 큰 영향을 미치지 않았다. 그러나 HHT-AuNP 처리 후 IgG 및 IgA 수치가 유의미하게 증가하는 것을 확인하였다. 이를 통해 본 발명의 HHT-AuNP가 B 세포를 활성화하여 면역 반응을 개선할 수 있음을 알 수 있다.
- [0229] 이러한 결과를 종합해 볼 때, HHT-AuNP는 T세포를 프라이밍하고 대식세포, NK세포, B세포를 활성화함으로써 마

우스 비장세포에 면역 자극 효과를 나타낸다는 것을 확인할 수 있다.

[0231] **실시예 8: 장내 미생물총에 대한 HHT-AuNP의 효과 확인**

[0232] 본 발명의 HHT-AuNP의 면역장애 또는 면역질환에 미치는 효과를 확인하기 위하여, 면역과 밀접한 관련이 있다고 보고된 장내 미생물총에 미치는 효과를 확인해 보았다.

[0233] 여기에서 장내 미생물군은 전신 면역체계의 성숙과 기능에 중요한 신호를 제공하며, 이는 결국 숙주의 장내 미생물군 구성을 형성한다(Kamada, Seo, Chen, & Nunez, 2013). 최근 장내 미생물군은 면역체계에 상당한 기여를 하기 때문에 상당한 주목을 받아왔다(Ding et al., 2019). 많은 연구에서 CTX에 의해 유도된 Th1/Th2 변화가 장내 미생물총의 구성을 변화시키고 미생물총 불균형을 유발할 수 있음을 보여주었다(Zhao et al., 2021). 이에 이러한 사실을 기반으로 장내 미생물총이 미치는 본 발명의 HHT-금 나노입자의 효과를 확인해 보았다.

[0234] 구체적으로, 본 발명에서는 CTX 유발 이상균에 대한 HHT-AuNP의 효과를 확인하였다. V3 및 V4 초가변 영역에서의 16S rDNA에 따르면 시퀀싱 리드의 낮은 품질은 필터링한 후 수득한 배설물 샘플에서 깨끗한 리드를 얻었는데, 이는 프로바이오틱스가 CTX로 유발된 장내 미생물 불균형을 조절하여 면역 반응을 향상시킬 수 있음을 시사하는 이전 연구와 일치한다(Zhao et al., 2021). 이와 달리, HHT-AuNP를 사용하였을 때 CTX에 의해 유도된 페르미쿠테스/박테로이데테스의 비율 증가에는 영향을 미치지 않는 것으로 보였지만, 악티노박테리아의 상대적인 풍부함은 명확히 증가시키는 것을 확인할 수 있었다(도 10a). 이러한 결과는 HHT-AuNP가 다양한 작용 패턴으로 CTX로 유발된 장내 미생물 불균형을 회복 또는 조절할 수 있음을 시사한다. 또한 HHT-AuNP가 락토바실러스의 성장을 촉진할 수 있음을 시사하는 결과이다. 수많은 연구에 따르면 프로바이오틱스 및 장 점막 면역 강화제인 락토바실러스(Lactobacillus)는 장 면역 체계를 매개하여 면역 반응을 자극할 수 있다고 보고되는 바, 이를 통해 HHT-AuNP가 장내 미생물군을 개선하고 숙주 면역을 보호함을 알 수 있다.

[0235] 또한, 도 10b 내지 도 10c를 보면, CTX에 의해 유발된 장내 미생물총의 불균형은 HHT-AuNP 투여 후 불균형이 되지 않는 쪽으로 역전되고 회복되는 경향을 가짐을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 HHT-AuNP가 CTX로 유도된 면역 결핍 쥐에서 일부 유익한 박테리아의 성장을 효과적으로 촉진하고 여러 유해 박테리아의 성장을 억제했음을 시사한다. 따라서 CTX로 유발된 장내 미생물총 불균형에 대한 HHT-AuNP의 보호는 면역 관련 사이토카인과 면역글로불린을 매개하여 전신 면역 반응을 추가로 조절할 수 있음을 시사하며, 특히 HHT-AuNP 처리 후 CTX 처리된 쥐 배설물 샘플에서 Verrucomicrobium Akkermensia의 풍부함이 증가하는 것으로 나타나 CTX 처리된 생쥐에서 본 발명의 HHT-AuNP가 면역 강화에 있어 잠재력이 있음을 시사한다.

[0236] 이러한 결과를 통해, 본 발명의 HHT-금 나노입자가 면역장애 또는 면역질환, 그 중에서도 장과 관련된 면역장애 또는 면역질환에 대하여, 예방, 개선 또는 치료 효과를 가짐을 유추할 수 있다.

[0238] 종합하면,

[0239] 본 발명에서는 환원 및 안정화를 위해 HHT를 단독으로 사용하여 친환경적이고 효율적인 AuNP의 생합성 방법을 개발하고, HHT-AuNP의 면역 자극 활성을 시험관 내 및 생체 외에서 모두 확인하였다. 그 결과, 본 발명의 HHT-AuNP는 대식세포에 의해 빠르게 흡수되고, NO 생성을 유도하며, 세포 독성을 유발하지 않고 NF- κ B 및 MAPK 신호 전달 경로를 활성화하여 면역 관련 사이토카인의 발현을 상향 조절하는 것으로 확인되었다. 또한, 생체 외에서도 확인한 결과, HHT-AuNP는 비장 세포 증식을 유의하게 자극하고 NO 생성을 유도하는 것으로 확인되었다. 나아가 비장 세포에서 면역 관련 사이토카인(예: IL-1 β , TNF- α , IL-4, IL-6, IL-12, IFN- γ , IL-2) 및 바이오마커(IgG 및 IgA)의 발현과 생성을 유도함으로써 HHT-AuNP의 생체 외 면역 증강 효과를 얻을 수 있었다.

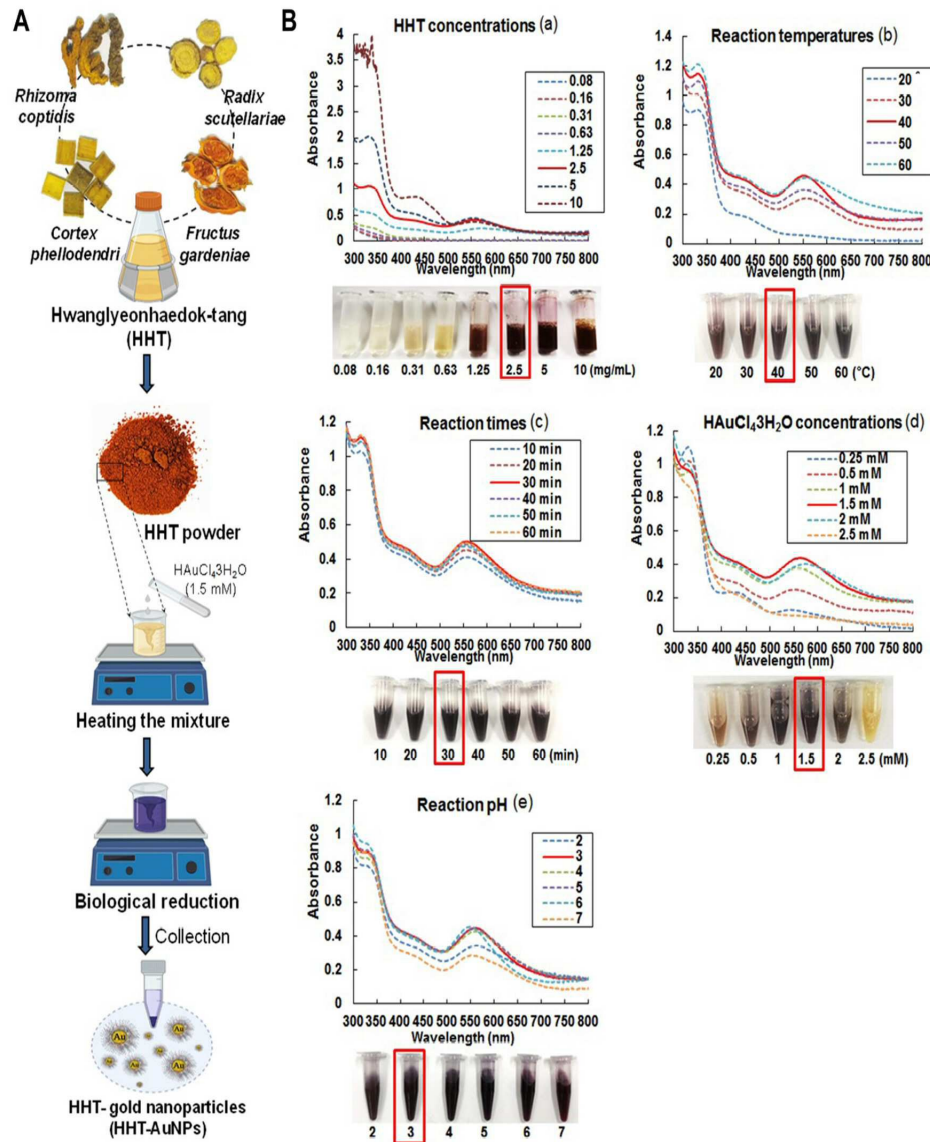
[0240] 이러한 결과를 종합해 볼 때, 본 발명의 HHT-AuNP는 효과적인 면역 증강 효과를 가지며, 이를 토대로 면역과 관련된 장애나 질환을 예방, 개선 또는 치료할 수 있음을 시사한다.

[0242] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모

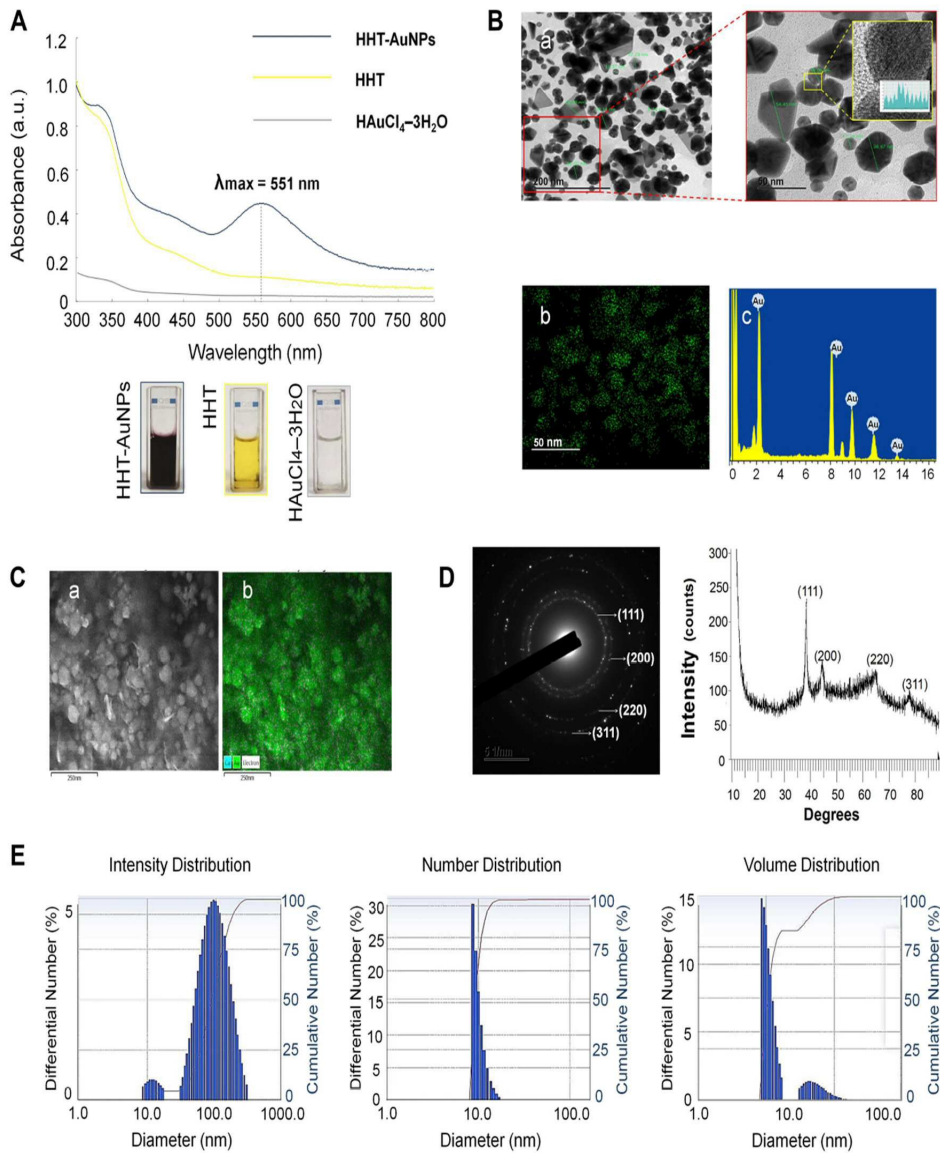
든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

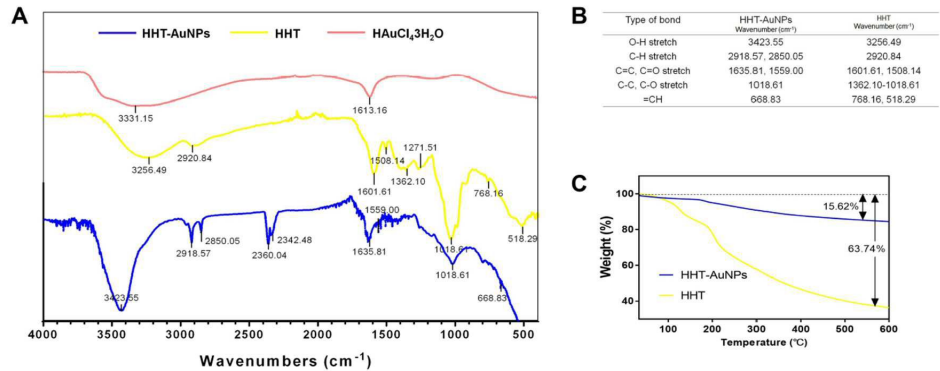
도면1



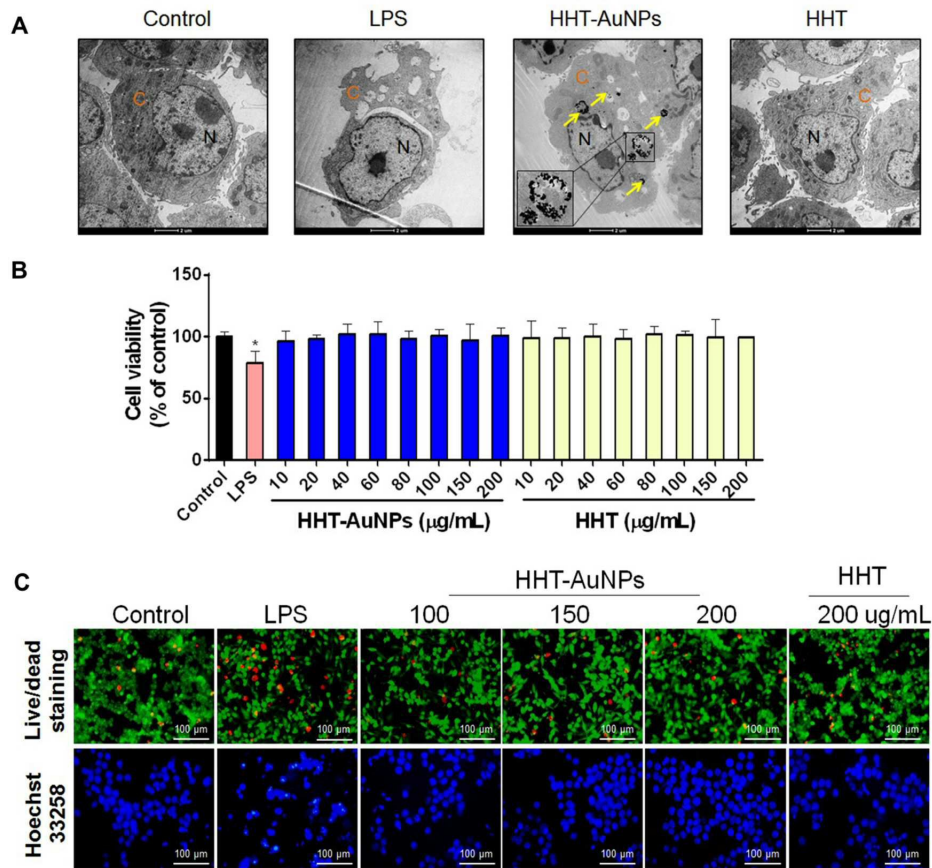
도면2



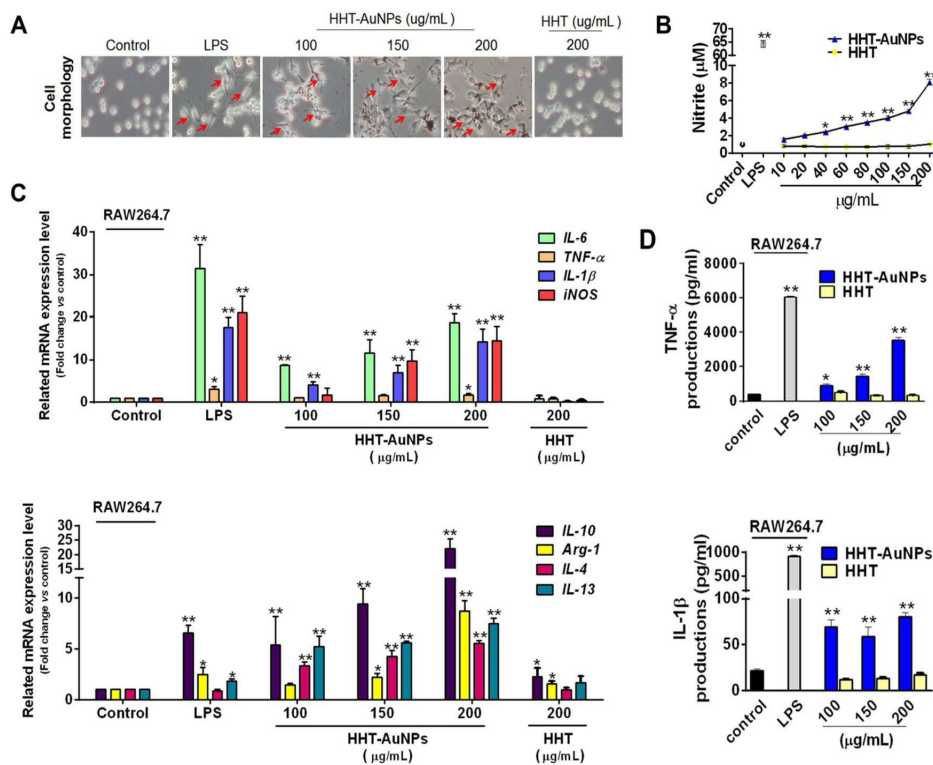
도면3



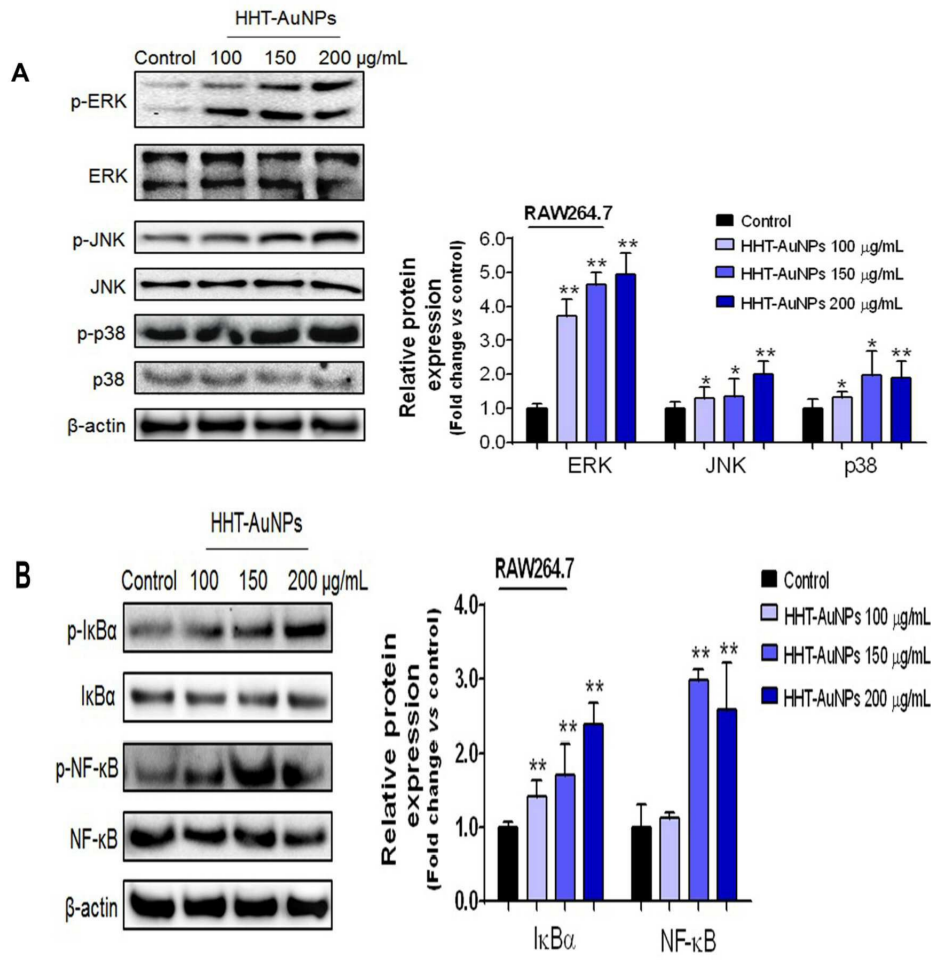
도면4



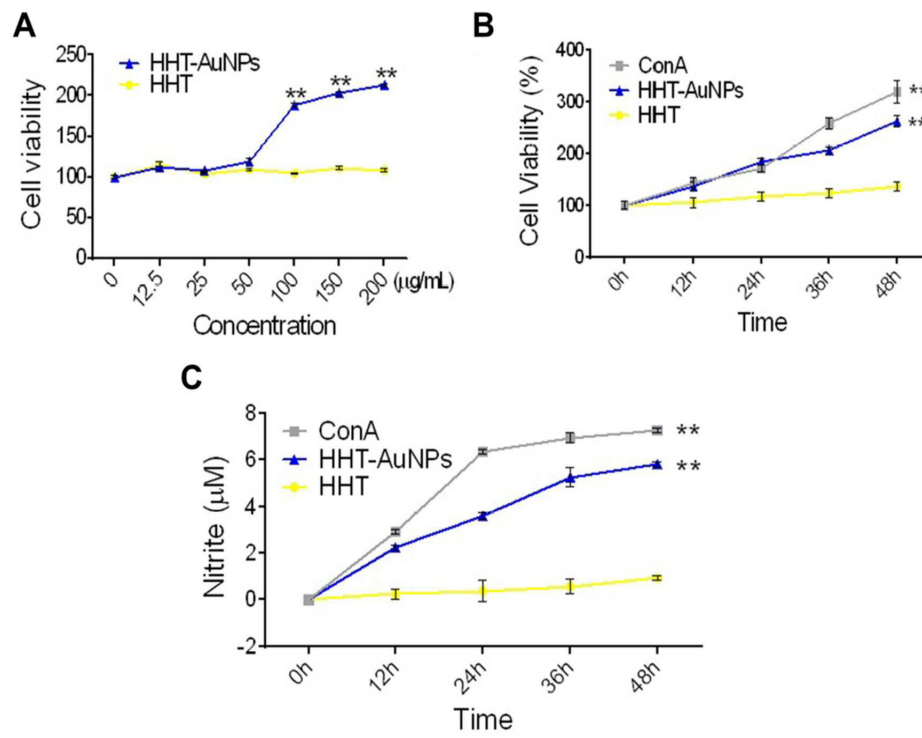
도면5



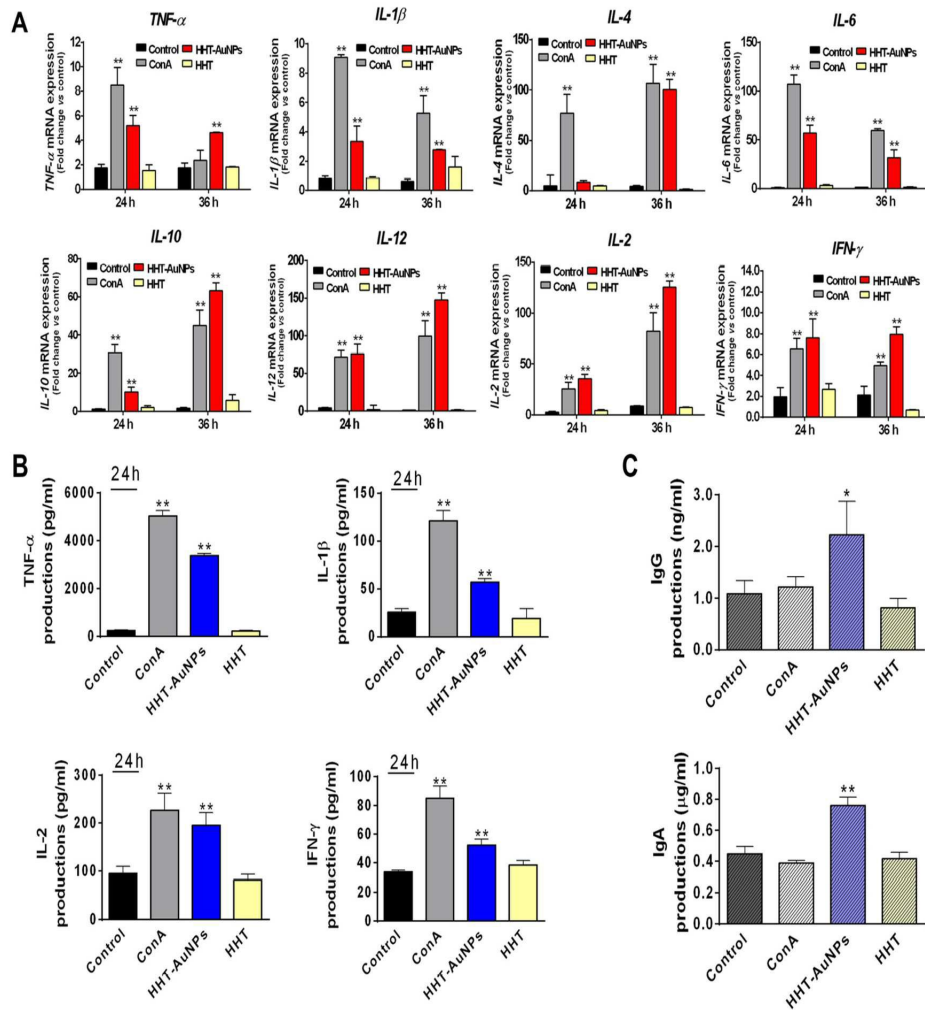
도면6



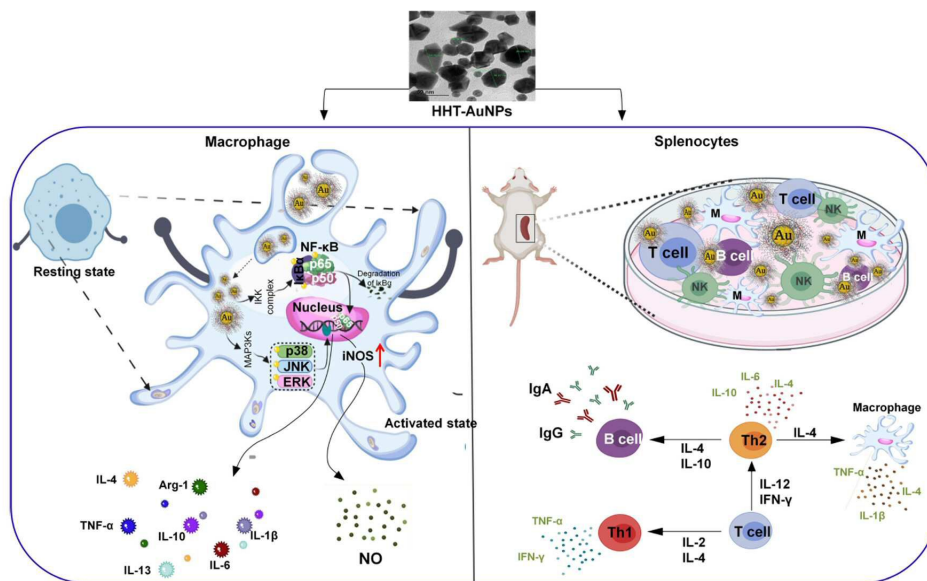
도면7



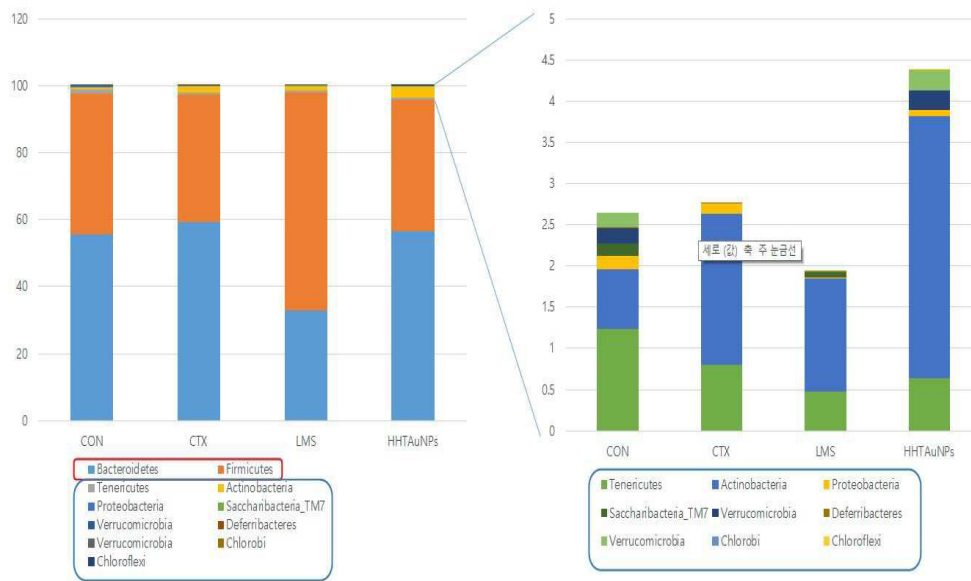
도면8



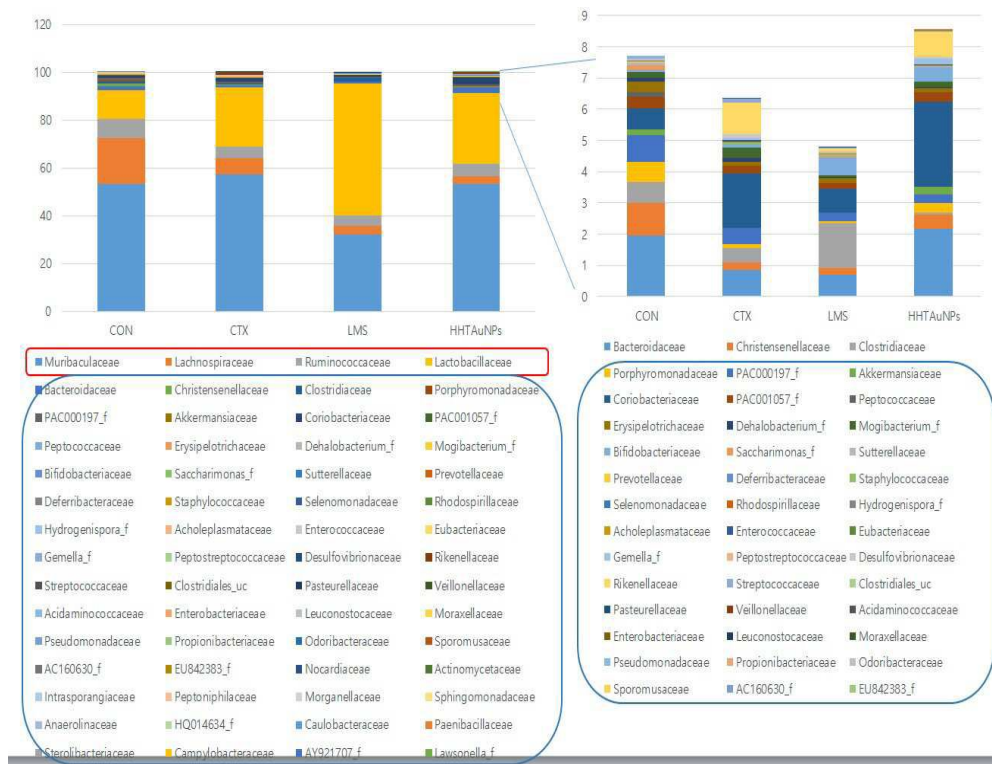
도면9



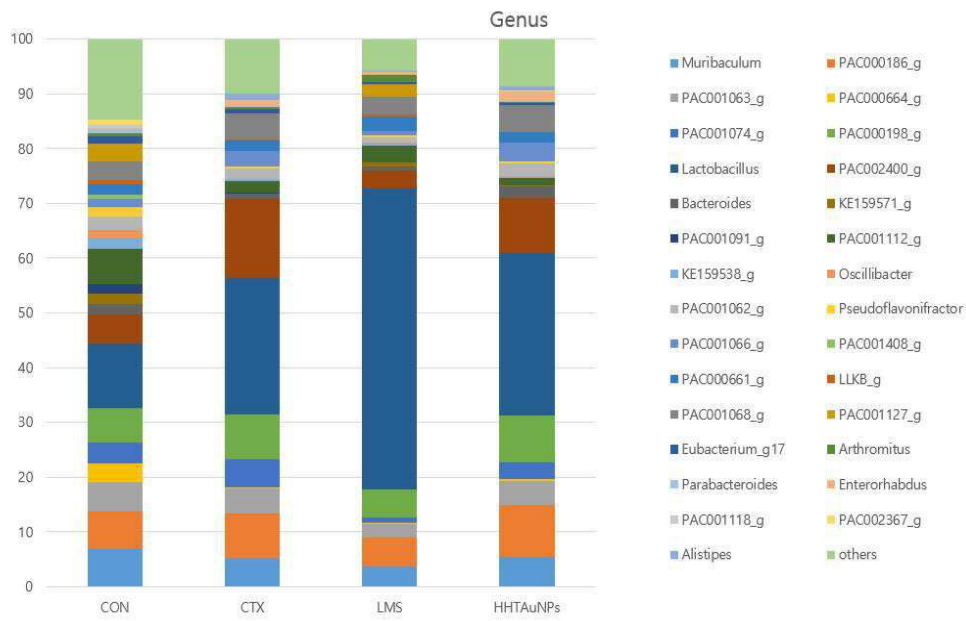
도면10a



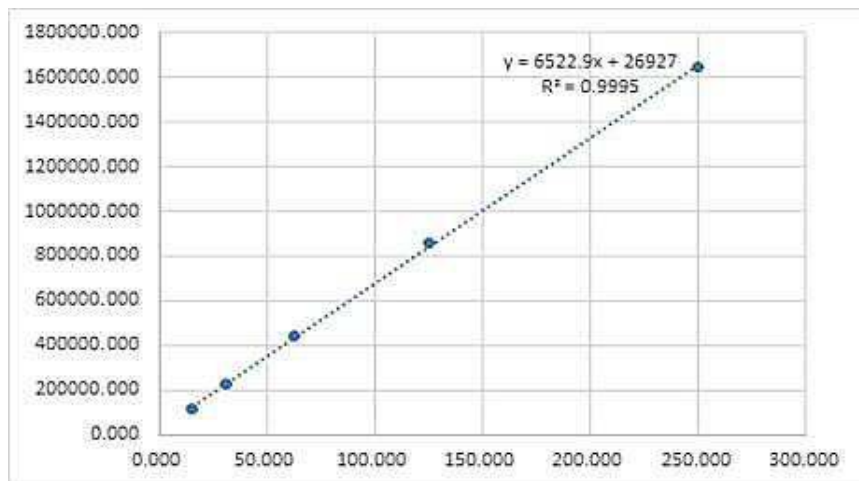
도면10b



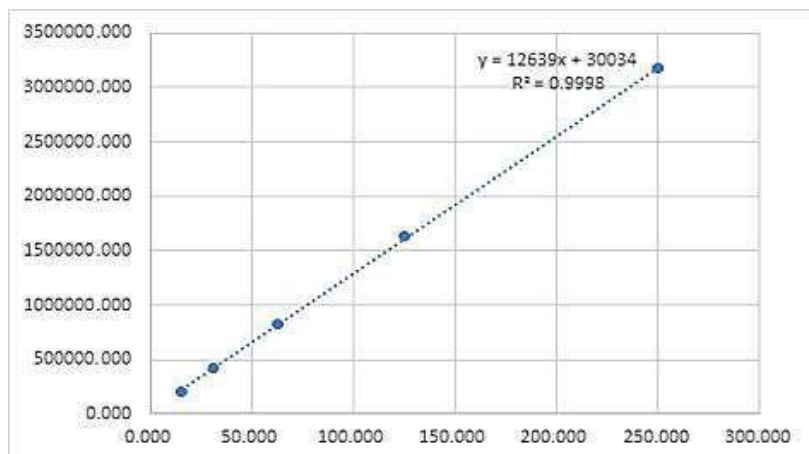
도면10c



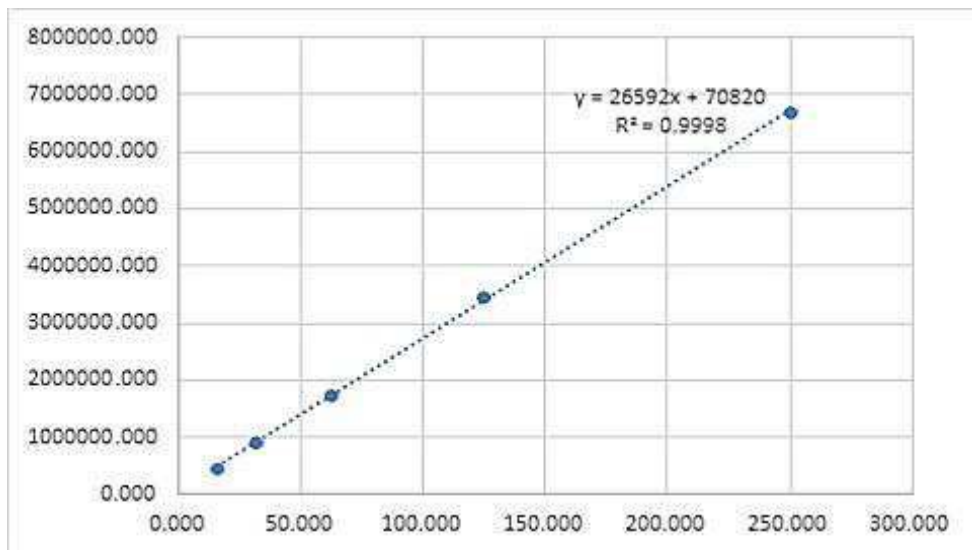
도면11a



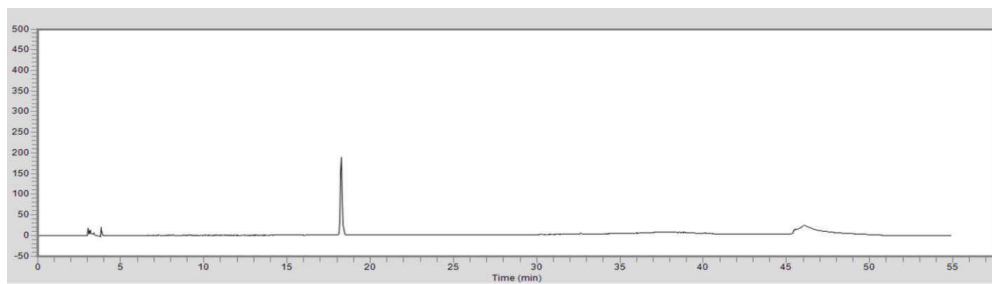
도면11b



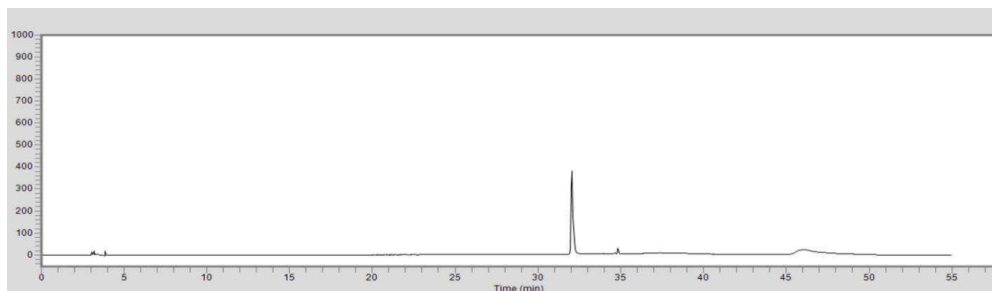
도면11c



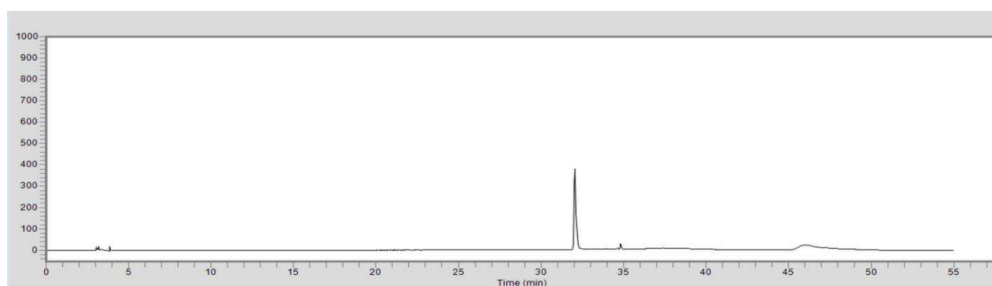
도면12a



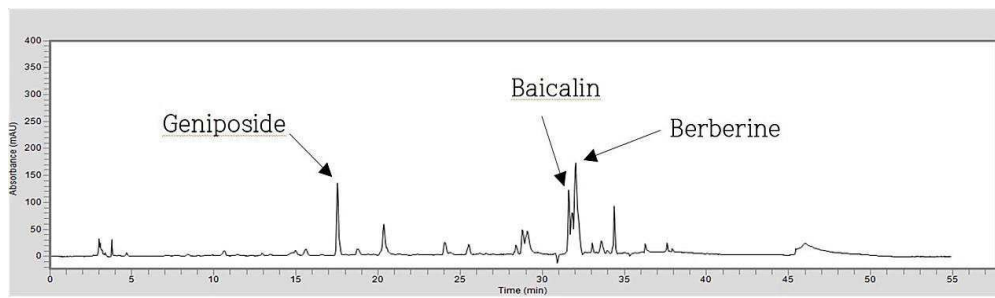
도면12b



도면12c



도면13a



도면13b

