(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0159893
(43) 공개일자 2022년12월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C01F 17/235 (2020.01) *A61K 33/244* (2019.01)
A61P 25/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C01F 17/235 (2022.01)
A61K 33/244 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2022-0060263
(22) 출원일자 2022년05월17일
심사청구일자 2022년05월17일
(30) 우선권주장
1020210067541 2021년05월26일 대한민국(KR)

(71) 출원인
한양대학교 에리카산학협력단
경기도 안산시 상록구 한양대학로 55
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
유효종
경기도 안산시 상록구 한양대학로 55, 제5공학관 414호
전진평
강원도 춘천시 삭주로 77 (교동, 춘천성심병원)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
유동환, 정병훈

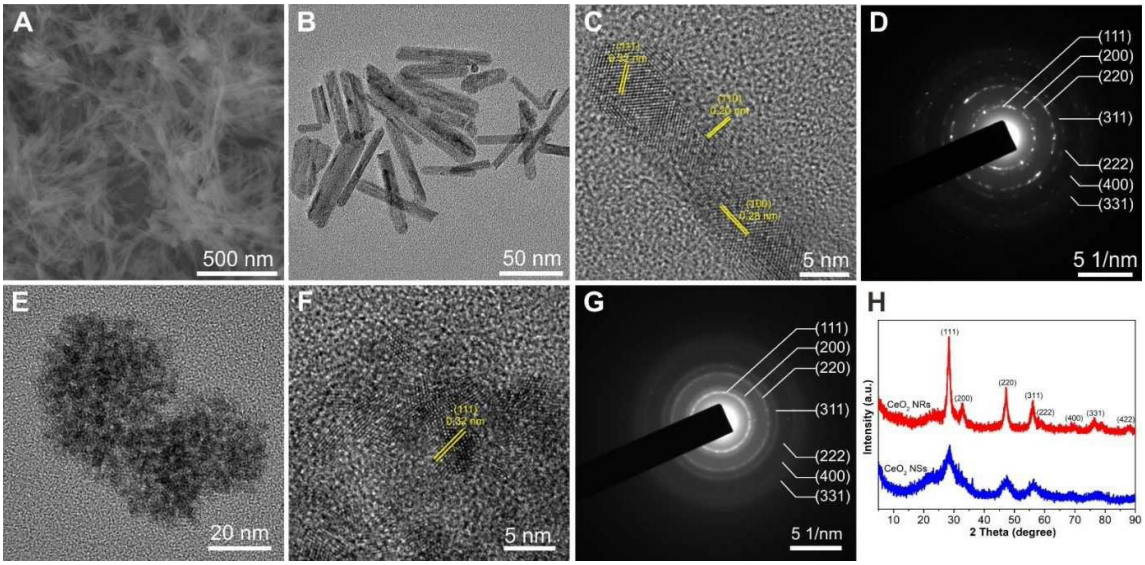
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **산화세륨 나노입자, 그 제조방법과 이를 포함하는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 산화세륨 나노입자, 그 제조방법과 이를 포함하는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본기술의 산화세륨 나노입자는 세륨(Ⅲ) 질산염 6수화물 및 수산화 나트륨을 이용하여 합성된 막대 모양을 갖는다. 본 기술의 산화세륨 나노입자는 외상성 뇌손상과 같은 질환에 치료효과를 나타낸다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61P 25/00 (2018.01)
C01P 2004/16 (2013.01)
C01P 2004/54 (2013.01)
C01P 2004/64 (2013.01)
C01P 2006/12 (2013.01)

(72) 발명자
트란민녹
경기도 안산시 상록구 한양대학로 55, 제5공학관 425-1호
김봉준
강원도 춘천시 교동길 50 (교동)
김영미
강원도 춘천시 국사봉길 7 (퇴계동, 우성아파트)
윤동혁
충청북도 단양군 어상천면 어상천로 1589-8

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711108166
과제번호	2020R1A2C1004006
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	배위고분자 골격체 기반 기능성 나노복합재료의 제조 및 촉매로의 활용
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한양대학교(ERICA캠퍼스)
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

세륨(Ⅲ) 질산염 6수화물 및 수산화 나트륨을 이용하여 합성된 막대 모양의 산화세륨 나노입자.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 막대 모양의 산화세륨 나노입자는 그 길이가 130.1±42.1 nm의 값을 갖고 그 직경은 9.4±2.1 nm의 값을 갖는 것을 특징으로 하는 막대 모양의 산화세륨 나노입자.

청구항 3

제2항에 있어서,

100° C 미만의 가열 조건에서 가열되어 수득된 상기 막대 모양의 산화세륨 나노입자는 그 길이가 84.3 ± 29.6 nm로서 90 nm 이하의 값을 갖고 그 직경은 5.5 ± 1.2 nm로서 10 nm 미만의 값을 갖는 것을 특징으로 하는 막대 모양의 산화세륨 나노입자.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 막대 모양의 산화세륨 나노입자의 길이와 직경에 따른 종횡비는 15.3의 값을 만족하는 것을 특징으로 하는 막대 모양의 산화세륨 나노입자.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 막대 모양의 산화세륨 나노입자 표면의 Ce^{3+}/Ce^{4+} 몰비는 0.40 이상의 값을 갖는 것을 특징으로 하는 막대 모양의 산화세륨 나노입자.

청구항 6

제5항에 있어서,

100° C 미만의 가열 조건에서 가열되어 수득된 상기 막대 모양의 산화세륨 나노입자 표면의 Ce^{3+}/Ce^{4+} 몰비는 0.99 이상의 값을 갖는 것을 특징으로 하는 막대 모양의 산화세륨 나노입자.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 막대 모양의 산회세륨 나노입자의 질소 흡착 측정에서 계산된 비표면적은 60 $m^2.g^{-1}$ 이상 129.0 $m^2.g^{-1}$ 이하의 값을 갖는 것을 특징으로 하는 막대 모양의 산화세륨 나노입자.

청구항 8

제7항에 있어서,

100° C 미만의 가열 조건에서 가열되어 수득된 상기 막대 모양의 산화세륨 나노입자의 질소 흡착 측정에서 계산된 비표면적은 129.0 $m^2.g^{-1}$인 것을 특징으로 하는 막대 모양의 산화세륨 나노입자.

청구항 9

세륨(Ⅲ) 질산염 6수화물을 수산화 나트륨 수용액에 첨가하여 혼합하는 단계;

상기 혼합한 반응 혼합물을 교반한 후 소정의 온도에서 일정 시간동안 가열/유지하는 단계;

상기 가열/유지한 반응 생성물을 실온에서 냉각 후 원심분리로 수집하는 단계; 및

상기 수집된 생성물을 용매로 세척한 다음 건조시키는 단계;를 포함하는, 막대 모양의 산화세륨 나노입자 제조방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 소정의 온도는 60° C 이상 180° C 이하인, 막대 모양의 산화세륨 나노입자 제조방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 혼합하는 단계는 $Ce(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$(0.868g, 2mmol)를 PTFE 비이커에 담긴 NaOH(10M, 40mL) 수용액에 첨가하는 단계를 포함하고,

상기 가열/유지하는 단계는 상기 첨가에 따른 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반한 후 100° C 미만에서 10시간 동안 유지하는 단계를 포함하는, 막대 모양의 산화세륨 나노입자 제조방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 가열/유지하는 단계에서 상기 소정의 온도는 60° C에 해당하는, 막대 모양의 산화세륨 나노입자 제조방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 막대 모양의 산화세륨 나노입자를 포함하는, 경증 외상성 뇌손상 치료용 약학적 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 약학적 조성물이 경증 외상성 뇌손상 후 뇌부종을 완화하는 효과를 갖는, 경증 외상성 뇌손상 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 산화세륨 나노입자, 그 제조방법과 이를 포함하는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는, 막대 모양을 갖는 산화세륨 나노입자, 그 제조방법과 이를 포함하는 외상성 뇌손상 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 외상성 뇌손상(Traumatic brain injury, TBI)은 사망이나 장애를 초래하는 주요 건강 문제로 남아 있다. TBI은 어린 나이에서도 비교적 빈번하게 발생하기 때문에 경제적 및 건강상 큰 부담을 준다. 매년 약 6,900 만 명의 사람들이 TBI를 겪고 있는 것으로 추정되며, 특히 동남아시아 및 서태평양 지역은 TBI의 부담이 가장 크다. TBI는 직접적인 1차 기계적 손상과 급성에서 만성 단계를 포함하는 2 차 생화학적 기능 장애를 포함한 두 가지 다른 기전을 통해 신경학적 후유증을 유발할 수 있다. TBI는 질병 중증도에 따라 경증, 중등도 및 중증 그룹으로 분류될 수 있다.

[0003] 일반적으로 경증 TBI(mild TBI, mTBI) 환자는 컴퓨터 단층 촬영(CT) 또는 자기 공명 영상(MRI)과 같은 초기 방사선 조사에 근거한 명확한 이상 없이 짧은 의식 상실을 포함하여 일시적이거나 국소 신경학적 결손을 경험하지

않는다. 그러나 mTBI 환자의 약 10~15 %는 주의력과 인식 감소로 인해 계속해서 기억 장애를 겪을 수 있으며 이는 임상적으로 주요 도전 과제이다. 이러한 경우 1차 뇌손상으로 인한 세포 사멸이 최소화되거나 전혀 발생하지 않지만, 증가된 산화 스트레스와 내인성 항산화제 및 라디칼 제거제 간의 불균형으로 인한 세포 기능 장애로 인한 2차 뇌손상은 결국 지속적인 세포 손상과 인지 기능 장애로 이어질 수 있다. 항산화 약물은 산화적 손상을 개선하기 위해 임상 연구에서 연구되고 있지만, 효과적인 약물 치료는 아직 보고되지는 않았다.

[0004] 본 발명의 발명자는 이러한 문제점들을 해결하기 위하여 오랫동안 연구하고 시행착오를 거친 끝에 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 외상성 뇌손상 치료에 적합한 산화세륨 나노입자, 그 제조방법 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0006] 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

[0007] 본 발명의 실시예에 따른 산화세륨 나노입자는 세륨(Ⅲ) 질산염 6수화물 및 수산화 나트륨을 이용하여 합성된 막대 모양을 가질 수 있다.

[0008] 상기 막대 모양의 산화세륨 나노입자는 그 길이가 130.1±42.1 nm의 값을 갖고 그 직경은 9.4±2.1 nm의 값을 가질 수 있다.

[0009] 100° C 미만의 가열 조건에서 가열되어 수득된 상기 막대 모양의 산화세륨 나노입자는 그 길이가 84.3 ± 29.6 nm로서 90 nm 이하의 값을 갖고 그 직경은 5.5 ± 1.2 nm로서 10 nm 미만의 값을 가질 수 있다.

[0010] 상기 막대 모양의 산화세륨 나노입자의 길이와 직경에 따른 종횡비는 15.3의 값을 만족할 수 있다.

[0011] 상기 막대 모양의 산화세륨 나노입자 표면의 Ce^{3+}/Ce^{4+} 몰비는 0.40 이상의 값을 가질 수 있다.

[0012] 100° C 미만의 가열 조건에서 가열되어 수득된 상기 막대 모양의 산화세륨 나노입자 표면의 Ce^{3+}/Ce^{4+} 몰비는 0.99 이상의 값을 가질 수 있다.

[0013] 상기 막대 모양의 산회세륨 나노입자의 질소 흡착 측정에서 계산된 비표면적은 60 $m^2.g^{-1}$ 이상 129.0 $m^2.g^{-1}$ 이하의 값을 가질 수 있다.

[0014] 100° C 미만의 가열 조건에서 가열되어 수득된 상기 막대 모양의 산화세륨 나노입자의 질소 흡착 측정에서 계산된 비표면적은 129.0 $m^2.g^{-1}$일 수 있다.

[0015] 또한 본 발명의 실시예에 따른 산화세륨 나노입자 제조방법은 세륨(Ⅲ) 질산염 6수화물을 수산화 나트륨 수용액에 첨가하여 혼합하는 단계; 상기 혼합한 반응 혼합물을 교반한 후 소정의 온도에서 일정 시간동안 가열/유지하는 단계; 상기 가열/유지한 반응 생성물을 실온에서 냉각 후 원심분리로 수집하는 단계; 및 상기 수집된 생성물을 용매로 세척한 다음 건조시키는 단계;를 포함할 수 있다.

[0016] 상기 소정의 온도는 60° C 이상 180° C 이하일 수 있다.

[0017] 상기 혼합하는 단계는 $Ce(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$(0.868g, 2mmol)를 PTFE 비이커에 담긴 NaOH(10M, 40mL) 수용액에 첨가하는 단계를 포함하고, 상기 가열/유지하는 단계는 상기 첨가에 따른 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반한 후 100° C 미만에서 10시간 동안 유지하는 단계를 포함할 수 있다.

[0018] 상기 가열/유지하는 단계에서 상기 소정의 온도는 60° C에 해당할 수 있다.

[0019] 또한 본 발명의 실시예에 따른 경증 외상성 뇌손상 치료용 약학적 조성물은 상술한 막대 모양의 산화세륨 나노입자를 포함할 수 있다.

[0020] 상기 약학적 조성물이 경증 외상성 뇌손상 후 뇌부종을 완화하는 효과를 가질 수 있다.

발명의 효과

[0021] 본 기술의 산화세륨 나노입자는 외상성 뇌손상과 같은 질환에 치료효과를 가질 수 있다.

[0022] 한편, 본 발명의 명시되지 않은 또 다른 목적들은 하기의 상세한 설명 및 그 효과로부터 용이하게 추론할 수 있는 범위 내에서 추가적으로 고려될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1에서 (A)는 Ceria NR의 SEM 이미지; (B 및 E)는 TEM 이미지, (C 및 F)는 고해상도 TEM 이미지, 및 (D 및 G)는 SAED 패턴에 관한 것으로서 각각 Ceria NR과 Ceria NS에 관한 것이며; (H)는 Ceria NR(빨간색) 및 Ceria NS(파란색)의 PXRD 패턴을 나타낸다.

도 2는 각각 Ceria NR 및 Ceria NS의 XPS 조사 스펙트럼 (A 및 D), Ce 3d (B 및 E) 및 O 1s(C 및 F)의 XPS 고해상도 결합 에너지 스펙트럼을 나타낸 것이다. (Ce^{4+} 및 Ce^{3+}는 Ceria NR 및 Ceria NS에서 공존한다)

도 3에서 (A)는 생체 내 실험의 개략도, (B 및 C)는 Fluoro-Jade B (FJB) 염색을 사용하여 뉴런 사멸을 검출한 결과를 나타낸 것이고(형광 이미지는 피질의 상대적인 신경 세포 사멸 정도를 나타냄. FJB 양성 세포의 수는 DBPS군보다 Ceria NR 및 Ceria NS에서 감소함), (D 및 E)는 생체 내 mTBI에서 TUNEL 분석결과로서, TUNEL-양성 녹색 세포의 대표 이미지 및 그 정량화를 나타낸 것이며(DAPI는 대조염색(파란색)에 사용됨), (F)는 qRT-PCR을 사용하여 SOD1 및 SOD2 mRNA 발현 수준을 분석한 결과를 나타낸 것이고, (G)는 COX-2 발현의 웨스턴 블롯 분석 결과이며, (H)는 상기 웨스턴 블롯을 정량화하여 나타낸 것으로서 COX-2 및 β-액틴 단백질의 상대적 광학 밀도를 기반으로 한다. (스케일 바 = 200 μm. Error bars, mean SEM, : * P <0.05, ** P <0.01 및 *** P <0.001)

도 4에서 (A)는 Novel Object Recognition (NOR) 실험 설계를 도식화하여 나타낸 것이며, (B)는 NOR 테스트에서 변경된 개체 탐색 비율. NOR 테스트에 따른 동물 추적의 히트맵 분석결과를, (C 및 D)에서 각 그룹은 mTBI 이전에 새로운 대상에 대한 유사한 우선 조사 결과를 나타낸 것이며, (E)는 DPBS와 Ceria NS 또는 Ceria NR 사이의 mTBI 후 손상된 차별 지수의 차이를 나타낸 것이다. (산화세륨 나노입자로 처리된 마우스는 DPBS보다 새로운 물체에 대한 선호도가 더 높았으며, 이는 부상 후 인지 개선을 나타냄)

도 5는 뇌부종의 정도에 대한 뇌 수분 함량 분석의 개략도(A)와 DPBS, Ceria NSs, 및 Ceria NRs의 세 그룹의 뇌 수분 함량 비교(B)를 나타낸 것이다. (Error bars, mean SEM, ** P <0.01 및 *** P <0.001)

도 6은 Ceria NR의 크기를 나타낸 것으로, (A)는 길이 분포(317 개 입자), (B)는 직경 분포(228 개 입자), (C)는 Ceria NS의 입자 크기 분포(218 개 입자)를 나타낸 것이다.

도 7은 (A) Ceria NR 및 (B) Ceria NS의 TEM 이미지 및 EDX 원소 매핑 데이터를 나타낸 것이다(세륨: 적색, 산소: 녹색).

도 8은 Ceria NR (A) 및 Ceria NS (B)에 대해 77K에서 측정한 질소 흡착 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 도 3G에서 나타낸 웨스턴 블롯의 전체 스캔으로서 빨간색이 잘린 부분을 나타낸다.

도 10은 세리아 나노막대(Ceria NRs)(A)와 세리아 나노스피어(Ceria NSs)(B)의 투과전자현미경 사진을, 그리고 세리아 나노입자로 처리된 SHSY5Y 세포의 MTT 세포 생존력 분석(C)을 나타낸다. (NS : 비특이성(non-specific), TBI : 외상성 뇌손상, DPBS : 둘베코 인산완충 생리식염수).

도 11은 세리아 나노로드(Ceria NRs)와 세리아 나노스피어(Ceria NSs)의 항산화제(A)와 항염증 효과(B) 비교를 나타낸다. (LPS로 유발된 염증에서 슈퍼옥사이드 음이온과 산화질소(NO) 수준의 측정을 위한 분석은 별도로 수행되었다. *p<0.05. †p<0.01. ‡p<0.001. LPS : lipopolysaccharides, PMA : phorbol-12-myristate-13-acetate, DPBS : 둘베코 인산완충 생리식염수, NS : 비특이성)

도 12는 SH-SY5Y 세포에서 정적 기계적 손상에 의해 유발된 외상성 뇌 손상(TBI)의 시험관 내 모델(A)과, DCFH-DA 염색법을 이용한 시험관내 TBI 모델의 항산화 및 항염증 효과 비교(B[x20] 및 C)와, SOD1 및 SOD2의 mRNA 발현 분석(D 및 E)과, IL-6(F), IL-1β(G) 및 TNF-α(H)이 정량적 실시간 중합효소 연쇄 반응을 사용하여 표시됨과, 세포 TBI 모델에서 COX2 발현의 웨스턴 블롯 분석(I)과, 그리고 COX2 및 β-액틴 단백질의 상대 광학 밀도를 사용한 블롯 정량화(J)를 나타낸다. (Error bars, mean SEM, *p<0.05. †p<0.01. ‡p<0.001. LPS :

lipopolysaccharides, PMA : phorbol-12-myristate-13-acetate, DPBS : 둘베코 인산완충 생리식염수, NS : 비특이성(non-specific), TNF-α : 종양괴사인자-α(tumor necrosis factor-α))

도 13에서 (a, c, e, g)는 SEM 이미지 및 (b, d, f, h)는 TEM 이미지로서, 각각 Ceria NRs_60(a 및 b), Ceria NRs_100(c 및 d), Ceria NPs_100(e 및 f), 및 Ceria NCs_180(g 및 h)이다.

도 14는 Ceria NRs_60(빨간색), Ceria NRs_100(파란색), Ceria NPs_100(분홍색) 및 Ceria NCs_180(녹색)의 XRD 패턴을 나타낸다. (모든 주요 피크는 순수한 형석 입방체 CeO_2(JCPDS 34-0394, space group Fm-3m)에 할당될 수 있음)

도 15는 Ceria NRs_60(빨간색), Ceria NRs_100(파란색), Ceria NPs_100(분홍색) 및 Ceria NCs_180(녹색)의 질소 흡착 측정을 나타낸다.

도 16은 XPS 조사 스펙트럼으로서 (a) Ceria NRs_60, (b) Ceria NRs_100, (c) Ceria NPs_100, (d) Ceria NCs_180에 관한다.

도 17은 Ce 3d의 XPS 고해상도 결합 에너지 스펙트럼으로서 Ce^{3+}(파란색) 및 Ce^{4+}(녹색)를 나타내는 (a) Ceria NRs_60, (b) Ceria NRs_100, (c) Ceria NPs_100, (d) Ceria NCs_180에 관한다.

도 18은 O 1s의 XPS 고해상도 결합 에너지 스펙트럼으로서 (a) Ceria NRs_60, (b) Ceria NRs_100, (c) Ceria NPs_100 및 (d) Ceria NCs_180에 관한다.

도 19는 경증 외상성 뇌 손상(TBI)의 시험관 내 실험 분석 결과를 나타낸다. (Error bars, mean SEM, *P<0.05, ** P<0.01 및 *** P<0.005)

도 20은 FJB 염색 분석 결과를 나타낸다.

첨부된 도면은 본 발명의 기술사상에 대한 이해를 위하여 참조로서 예시된 것임을 밝히며, 그것에 의해 본 발명의 권리범위가 제한되지는 아니한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 세륨 산화물(ceria, 세리아)은 환경 응용 및 촉매 작용 분야에서 상당한 관심을 받고 있다. 세리아 나노 입자는 만족스러운 항산화, 항균 및 항암 활성을 보였을뿐만 아니라 세포 독성 및 신경 독성에 대한 높은 내성을 보여주었다. 세리아 나노 입자의 광범위한 사용은 Ce^{3+}와 Ce^{4+}의 산화 상태의 빠른 변화로 인해 높은 촉매 활성(이른바 산소 저장 용량(oxygen storage capacity))에 기인한다. 또한, 세리아 나노 입자는 전자 또는 산소 원자의 손실로 인해 격자 구조에 산소 결핍(oxygen vacancies)을 나타내어 산화 환원 과정에서 CeO_2와 CeO_{2-x} 사이의 전환을 유도한다. 이에, 본 발명은 외상성 질환에 대한 산화세륨 나노입자의 개선효과를 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

[0025] 따라서, 본 발명은 산화세륨 나노입자와, 상기 나노입자를 포함하는 외상성 질환 치료 또는 예방용 조성물을 제공한다.

[0026] 또한, 본 발명은 상기 산화세륨 나노입자를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 외상성 질환의 치료 또는 예방 방법을 제공한다.

[0027] 또한, 본 발명은 상기 산화세륨 나노입자의 외상성 질환의 치료 또는 예방 용도를 제공한다.

[0028] 상기 산화세륨 나노입자는, 구형, 막대형, 다면체형 또는 이들이 혼합된 형태일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는 막대형일 수 있다.

[0029] 상기 외상성 질환은, 외상성 뇌손상에 의해 발생하는 질환일 수 있으며, 바람직하게는 뇌부종일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0030] 표면의 반응성 결정면(reactive crystal planes)의 선택적 노출은 촉매 부위(catalytic sites)를 풍부하게 할 수 있기 때문에, 형태(morphology)를 제어하는 것은 세리아 나노입자의 촉매 성능에 중요하다. 최근 연구에 따르면 구형(spherical shape)의 세리아 나노 입자는 mTBI 모델에서 항산화 시스템을 보존함으로써 신경 세포 사멸과 칼슘 조절 장애를 감소시키는 것이 알려져 있다. 그러나, 다른 나노 약물과의 비교는 이루어지지 않았고, 연구는 치료되지 않은 동물에 비해 부상당한 마우스에서 세리아 나노 입자의 더 나은 치료 효능을 입증했을 뿐

이다. 이에, 하기 실시예에서는 mTBI의 마우스 모델에서 세리아 나노 입자(나노스피어(nanospheres) vs 나노로드(nanorods))의 치료 효과의 가능한 차이를 비교하였다.

[0031] 본 기술에 따르면, 나노 입자의 촉매 성능과 치료 효과는 모양에 따라 다르다. 여기에서 우리는 가벼운 외상성 뇌 손상(mTBI)의 생체 내 연구에서 세리아 나노막대(Ceria NRs)와 세리아 나노스피어(Ceria NSs)의 치료 결과를 조사하고 비교했다. 세리아 나노입자는 FJB 양성 세포와 TUNEL 양성 세포를 유의하게 감소시켰고, SOD1 및 SOD2의 mRNA 수준을 회복시켰다. 그들은 또한 무처리 대조군에 비해 COX-2 발현을 감소시켰다. 두 나노 물질을 비교하면 Ceria NR은 덜 안정적이고 고에너지 (100) 및 (110) 평면을 보여 활성 사이트 수가 증가했다. Ceria NRs의 Ce^{3+}/Ce^{4+} 몰비는(0.40) Ceria NSs보다(0.27) 더 컸다. Ceria NR(70.1 ± 0.5%)은 Ceria NS(73.7 ± 0.4%; p=0.0015)에 비해 뇌 수분 함량을 유의하게 감소시켰으며, 이는 Ceria NR이 생체 내 mTBI 후 뇌부종을 완화하는 데 더 효과적임을 나타낸다.

[0033] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 이하 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0035] <실시예>

[0037] **재료 및 방법**

[0038] **세리아 나노입자의 합성(Synthesis of ceria nanoparticles)**

[0039] 두 가지 유형의 세리아 나노 입자를 합성하였다.

[0040] 세리아 나노 로드(Ceria NSs)를 준비하기 위해, 세륨(Ⅲ) 질산염 6수화물($Ce(NO_3)_3.6H_2O$, 99 %, Sigma-Aldrich) 및 수산화 나트륨(NaOH, 98 %, Sigma-Aldrich)을 사용했다. 일반적으로 $Ce(NO_3)_3.6H_2O$(0.434g, 1mmol)를 PTFE 비이커의 NaOH(10M, 20mL) 수용액에 첨가했다. 반응 혼합물을 실온에서 2 시간 동안 격렬하게 교반한 후 테플론 라이닝된 스테인리스스틸 오토 클레이브를 옮기고 100 ℃에서 10 시간 동안 온도 조절 오븐에서 인큐베이션(incubated)했다. 반응 완료 후 혼합물을 자연적으로 실온으로 냉각시켰다. 반응 생성물을 원심 분리로 수집하고 용매(탈 이온수 및 에탄올)로 여러 번 세척한 다음 추가 사용을 위해 24 시간 동안 진공 건조시켰다.

[0041] 세리아 나노 스피어(Ceria NSs)를 준비하기 위해, 세륨(Ⅲ) 질산염 6수화물($Ce(NO_3)_3.6H_2O$, 99 %, Sigma-Aldrich), 올레일아민($C_{18}H_{37}N$, 70 %, Sigma-Aldrich) 및 자일렌(C_8H_{10}, 98.5 %, Junsei)을 사용했다. 일반적으로 $Ce(NO_3)_3.6H_2O$(0.434g, 1mmol) 및 $C_{18}H_{37}N$(3.25g, 12mmol)은 C_8H_{10}(15mL)에 용해되었다. 생성된 용액을 25 ℃에서 2 시간 동안 격렬하게 교반한 다음 진공 하에서 2 ℃ min^{-1}의 속도로 90 ℃로 가열했다. 탈이온수(1mL)를 90 ℃에서 격렬하게 교반하면서 용액에 빠르게 주입하여 보라색에서 탁한 노란색으로의 색상 변화로 표시되는 졸-겔 반응을 시작했다. 반응 혼합물을 90 ℃에서 3 시간 동안 인큐베이션하여 밝은 노란색(담황색) 콜로이드 용액을 얻었다. 혼합물을 주위 온도로 냉각시키고 에탄올(75mL)을 첨가하여 Ceria NSs를 침전시켰다. 생성물을 원심 분리하고 에탄올로 여러 번 세척 한 다음 추가 사용을 위해 24 시간 동안 진공 하에서 건조시켰다.

[0042] **생체 내 경증 TBI(*In vivo* mild TBI)**

[0043] 7-8 주령의 C57BL/6J 수컷 마우스는 한림대학교 실험 동물 자원 센터에서 입수했다. 동물들에게 24 ℃, 55 ± 10 % 습도에서 12 시간 암흑/광주기 하에서 규칙적인 음식과 물을 자유롭게 제공했다. 실험군은 1) mTBI(n = 16), 2) Ceria NR로 처리한 mTBI(n = 16), 3) Ceria NS로 처리한 mTBI(n = 16), 모조 수술(n = 6)이었다.

[0044] 생체 내 TBI는 정위 임팩터(RWD Life Science, RWD-68099, 중국)를 사용하여 개방성 두부 손상을 통해 유도되었다. 간단히 말해서, 마우스는 산소 중 2.5 % 이소푸란을 사용하여 마취되었고 정위 프레임에 배치되었다. 두개골은 중간선 피부 절개를 통해 노출되었고, TBI는 다음과 같이 유도되었다: 브레그마에서, M/L = -2.5mm, A/P =

-2.0mm, 직경 2mm의 블런트 팁을 사용하여 1.5mm 깊이. 충격기의 속도는 경막 물질 아래 2mm 블런트 팁을 사용하여 1.5mm 깊이로 3.0m s^{-1}에 도달했다. 뇌에서의 체류 시간은 0.5m s^{-1}였다. 세리아 나노 입자는 종 모양(bell-shaped)의 용량 반응 곡선(dose-response curve)을 통해 뇌에 축적되므로, 본 발명에서는 11.6 nM 용량의 세리아 나노 입자를 한 번의 안와후주사(retro-orbital injection)로 투여했다. 결과 측정은 본 발명의 마우스의 치료 방법에 대해 모르는 연구자에 의해 수행되었다.

[0045] **통계 분석(Statistical analysis)**

[0046] 모든 데이터는 평균±표준 오차로 표시되었다. 가능한 모든 쌍별 비교(pair-wise comparisons)에 대해 post-hoc Bonferroni 보정을 사용하는 Student's t-test 또는 일원 분산 분석(one-way ANOVA)을 수행했다. <0.05, 0.01 및 0.001 미만의 P 값은 도면에서 각각 *, **, ***로 표시되고, 모든 통계 분석은 GraphPad Prism 소프트웨어(v.6.01; GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)로 수행되었다.

[0047] 본 발명의 실시예에서 실시한 분석 실험 방법은 하기에 설명하였다.

[0048] 보충적인 방법들

[0049] 특징 확인(Characterization)

[0050] 유리 제품은 사용하기 전에 오븐에서 건조되었다. 분말 X-선 회절 (PXRD) 분석은 Cu-Kα 방사선 (파장 1.5406 A)을 사용하는 RIGAKU Ultima IV 회절계를 사용하여, 실온 5° -90° 범위에서 2° min^{-1}의 연속 스캔 속도로 집중된 빔 구성에서 수행되었다. 나노 입자는 Hitachi S-4800 주사 전자 현미경(SEM)을 사용하여 이미지화되었다. 투과 전자 현미경(TEM), 선택 영역 전자 회절(SAED) 및 에너지 분산 X-선(EDX) 분석은 JEOL JEM-2100F 현미경으로 수행되었다. X 선 광전자 분광법(XPS)은 여기를 위한 X 선 소스로 단색 Al Kα X 선 방사선을 사용하는 K-ALPHA 분광계(Thermo VG, 영국)를 사용하여 수행되었다. N_2 흡착 등온선은 BELSORP-mini II(BEL Japan, Inc.) 기기를 사용하여 얻었다.

[0051] TUNEL 분석

[0052] 생체 내 세포 사멸은 DeadEndTM Fluorometric TUNEL 시스템(Promega, USA)을 사용하여 감지했다. 관류된 대조군(sham) 및 세리아 나노 입자의 유무에 관계없이 처리된 TBI-유도 마우스에서 뇌를 신속하게 절제하고, 최적의 절단 온도 화합물에 내장한 후, 급속 냉동시켰다. 두께가 30 μm 인 일련의 수평 동결절편(cryosections)을 슬라이드에 배치했다. 제조업체의 프로토콜에 따라 슬라이드를 TUNEL 반응 혼합물로 염색하고 형광 현미경을 통해 분석하여 녹색 형광을 검출했다. 슬라이드는 4,6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI)로 대조-염색되었다.

[0053] FJB 염색

[0054] 동결절편 슬라이드를 0.06 % 과망간산 칼륨에 15분 동안 담근 후 증류수로 1 분 동안 세척하였다. 슬라이드를 0.001 % Fluoro-Jade B(Histo-Chem Inc., Jefferson, AR, USA) 용액으로 30 분 동안 염색했다. 5분 동안 증류수로 3회 세척 한 후, 슬라이드를 암실에서 55 ℃에서 35분 이상 건조하고 D.P.X(Sigma-Aldrich Co., USA)로 커버슬립하였다(coverslipped). 염색된 뇌 조직은 형광 현미경(Carl Zeiss, Germany)을 사용하여 450-490 nm에서 관찰되었다.

[0055] qRT-PCR

[0056] easy-BLUE(Invitrogen)를 사용하여 뇌 조직에서 Total RNA를 분리했다. cDNA는 제조사의 지침에 따라 Maxime RT PreMix 키트(iNtRON Biotechnoloty, Korea)를 사용하여 합성되었다. PCR 반응은 Rotor-Gene Q(Qiagen 사, 미국) 에서 2X Rotor-Gene Q SYBR Green PCR Master Mix(Qiagen 사, 미국)로 수행되었다. 프라이머는 표 3에 나열되어 있다. PCR은 94° C에서 15초, 55° C에서 30초, 70° C에서 30초의 조건에서 45 주기 동안 수행되었다.

[0057] 뇌 수분 함량(Brain water content)

[0058] 뇌 조직의 습윤 중량을 측정한 후 100° C의 오븐에서 3시간 동안 건조하여 건조 중량을 구하였다. 뇌부종은 다음 공식을 사용하여 추정되었다: % 수분 함량 = 100*(습식 중량 - 건조 중량)/습식 중량. 그룹당 6개의 독립적인 실험을 수행했다(n=6). 실험 그룹은 각각 mTBI, Ceria NR이 있는 mTBI, Ceria NS가 있는 mTBI의 6마리 마우스 마우스(C57BL/6 J-수컷)의 세 그룹으로 나누었다.

[0059] 웨스턴 블롯(Western blot)

[0060] 뇌 조직 및 세포는 프로테이나제 억제제 K를 함유하는 RIPA 완충액에서 용해되었다. 단백질 농도는 PierceBCA 단백질 분석 키트(Thermo Scientific)를 사용하여 측정되었다. 웨스턴 블롯팅 분석을 위해 동일한 양의 세포 추출물을 로딩했다. 이 연구에 사용된 1차 항체는 항-COX2(sc-7877; Abcam) 및 항-β-액틴(ab8227; Abcam)이었다.

[0061] 새로운 물체 인식 테스트(Novel object recognition test)

[0062] 마우스를 매일 10분씩 2일 동안 야외 경기장(65 X 45 X 30cm)에서 적응시켰다. 그런 다음 마우스를 두 개의 동일한 개체(A1 및 A2)에 대해 매일 10분씩 3일 동안 경기장 내에서 개별적으로 적응시켰다. 24시간 후, 마우스를 친숙한 물체 A1과 B1으로 명명된 새로운 물체에 10분 동안 노출시켰다. mTBI 유도 3일 후, 동일한 물체 A1과 C1이라는 새로운 물체 사이의 10분 동안 열린 필드 테스트에서 이동한 거리를 사용하여 마우스 활동을 평가했다. 대상 탐색은 대상을 키우거나 2cm 미만의 거리에서 냄새를 맡거나 코로 만지는 것으로 정의되었다. 대상체 선호도는 마우스의 코와 대상체 사이의 거리가 2cm 이내일 때 1회 측정하였다. 모든 동물 행동 테스트는 비디오 추적 시스템을 통해 기록되었고 히트 맵 추적 이미지(Noldus Ethovision, Leesburg, VA)를 사용하여 표시되었다. 파란색은 방문자가 적은 지역을, 빨간색은 자주 방문하는 지역을 나타낸다.

[0063] **결과**

[0064] **세리아 나노 입자의 특징(Characterization of ceria nanoparticles)**

[0065] 제조된 세리나 나노입자의 SEM 및 TEM 이미지(도 1A 및 1B)는 Ceria NR가 길이 130.1±42.1 nm, 직경 9.4±2.1 nm(도 6A 및 6B)의 막대 모양의 형태(rod-like morphology)를 가졌고, Ceria NSs(도 1E)는 평균 입자 크기가 약 3.5 ± 0.5 nm 인 균일하고 구형의 형태를 가진다는 것을 보여준다(도 6C). 고해상도 TEM 이미지(도 1C 및 1F)는 Ceria NRs 및 Ceria NSs 표면에 노출된 결정면(the exposed crystal planes)을 보여 주었으며, 결과적으로 생성된 세리아 나노 입자의 높은 결정질 특성을 보여주었다. Ceria NR은 노출된 (100), (110) 및 (111) 평면을 포함하는 반면, Ceria NS의 표면에는 (111) 평면만 노출되었다. 두 세리아 나노 입자의 SAED(도 1D 및 1G)와 PXRD 패턴 (도 1H)은 유사했다. 우세한 피크는 (111), (200), (220), (311), (222), (400) 및 (311) 평면으로 색인화되어 두 세리아 나노 입자가 모두 CeO_2의 순수한 형석 입방체 구조(fluorite cubic structures)에 할당되었음이 확인되었다(JCPDS 34-0394, space group Fm-3m). 다른 이물질에 속하는 회절 피크는 검출되지 않았으며, 이는 수득된 생성물의 순도를 나타낸다.

[0066] 세리아 나노 입자의 구성은 EDX 원소 매핑 데이터를 사용하여 추가로 확립되었다(도 7). Ceria NRs 및 Ceria NSs의 비 표면적(SBET)은 각각 76 및 230 $m^2 g^{-1}$이었다(도 8). 세리아 나노 입자의 특성은 표 1에 요약되어있다.

표 1

[0067]

Particle characteristic	Ceria NRs	Ceria NSs
Morphology	Nanorod	Nanosphere
Size (nm)	Length: 130.1 ± 42.1 Diameter: 9.4 ± 2.1	Diameter: 3.5 ± 0.5
S_{BET} ($m^2 g^{-1}$)	76	230

[0068] 순수한 CeO_2의 흰색과는 대조적으로, 생성된 세리아 나노 입자는 황색을 띠는 색상을 나타내어 구조에서 Ce^{4+}뿐만 아니라 Ce^{3+}도 공존함을 보여주었다. XPS 분석은 Ce^{4+}와 Ce^{3+}의 혼합 원자가 상태(mixed valence state)를 나타냈다(도 2). 도 2A 및 2D는 Ceria NR 및 Ceria NS의 XPS 조사 스펙트럼을 나타낸 것이다. Ceria NRs는 882.9, 889.4, 897.6, 900.9, 907.5 및 916.3 eV의 결합 에너지로 Ce^{4+}의 특징적인 피크를 보였고, 880.7, 886.4, 898.6 및 904.2 eV의 결합 에너지에서의 피크는 Ce^{3+}에 해당한다(도 2B). Ceria NSs의 경우(도 2E), Ce^{4+}에서 882.3, 888.7, 898.2, 900.9, 907.1, 916.1 eV 및 Ce^{3+}에서 885.4, 903.7 eV의 결합 에너지에서 피크가 관찰되었다. Ce^{4+}와 Ce^{3+}의 피팅된 피크 면적 사이의 몰비는 세리아 나노 입자 표면에서의 농도를 추정하는 데 사용되었다. ESM의 하기 표 2에 나타난 바와 같이, Ceria NR과 Ceria NS의 Ce^{3+}/Ce^{4+} 몰비는 각각 0.40 및 0.27이었다. 이 데이터는 Ceria NR이 Ceria NS보다 표면에 더 많은 Ce^{3+}를 함유하고 있음을 나타낸다. 세리아 나노 입자

의 생의학적 활성은 표면에 더 높은 수준의 Ce^{3+}에 의해 강화된다는 것은 잘 알려져 있다. 도 2C 및 2F에 도시된 바와 같이, Ceria NR 및 Ceria NS의 O 1s의 XPS 고분해능 결합 에너지 스펙트럼에서 약 529 eV에서 첫 번째 피크는 격자 산소와 관련이 있었다. 약 532 eV에서 더 높은 결합 에너지 숄더(shoulder)는 산소 결핍(oxygen vacancies) 또는 표면 흡착 산소(mixture of surface-adsorbed oxygen), 하이드록실(hydroxyl) 및 탄산염 그룹(carbonate groups)의 혼합물(mixture)에 할당되었다.

표 2

[0069]

Sample	Surface percentage (%)			Ce^{3+} / Ce^{4+} ratio*
	Ce 3d (Total)	Ce 3d (Ce^{3+})	Ce 3d (Ce^{4+})	
Ceria NRs	100	28.40	71.60	0.40
Ceria NSs	100	21.28	78.72	0.27

[0070] 위 표 2는 세리아 나노 입자의 표면 조성을 나타낸다.Ce^{3+}/Ce^{4+} 비율은 다음 공식을 사용하여 계산된다.

[0071] Ceria NRs의 경우:

[0072] $$[Ce^{3+}] = \frac{A_{v_o} + A_{v'} + A_{u_o} + A_{u'}}{A_{v_o} + A_{v'} + A_{u_o} + A_{u'} + A_v + A_{v''} + A_{v'''} + A_u + A_{u''} + A_{u'''}}$$

[0073] $$[Ce^{4+}] = \frac{A_v + A_{v''} + A_{v'''} + A_u + A_{u''} + A_{u'''}}{A_{v_o} + A_{v'} + A_{u_o} + A_{u'} + A_v + A_{v''} + A_{v'''} + A_u + A_{u''} + A_{u'''}}$$

[0074] Ceria NSs의 경우:

[0075] $$[Ce^{3+}] = \frac{A_{v'} + A_{u'}}{A_{v'} + A_{u'} + A_v + A_{v''} + A_{v'''} + A_u + A_{u''} + A_{u'''}}$$

[0076] $$[Ce^{4+}] = \frac{A_v + A_{v''} + A_{v'''} + A_u + A_{u''} + A_{u'''}}{A_{v'} + A_{u'} + A_v + A_{v''} + A_{v'''} + A_u + A_{u''} + A_{u'''}}$$

[0077] 여기서 A_i 는 피크 "i"의 통합 면적(integrated area)임.

[0078] **생체 내 경증 TBI의 세포 보호 효과(Cytoprotective effect in *in vivo* mild TBI)**

[0079] FJB 염색 및 TUNEL 분석은 항염증 활성 및 생체 내 mTBI에서 신경 세포 사멸의 후속 예방에서 나노 입자 모양의 역할을 추가로 평가하기 위해 수행되었다. 개략도(도 3A)에 나타난 바와 같이, 마우스는 Ceria NRs 또는 Ceria NSs를 주사하거나 주사하지 않고 mTBI 후 3 일 후에 희생되었다. 대조군에서는 FJB 양성 세포가 검출되지 않았다. FJB 양성 신경 세포 손상은 mTBI 후 피질 영역에서 관찰되었다(도 3B). DPBS 처리된 mTBI 그룹(519.552 ± 76.185)과 비교했을 때, 세리아 나노 입자 주입 그룹(11.6mM/마우스)은 FJB 양성 세포수(Ceria NSs에서 188.981 ± 16.329 및 Ceria NRs에서 209.205 ± 12.785)에서 현저한 감소를 보였다(도 3B 및 3C).

[0080] FJB 염색과 일치하게, Ceria NRs 및 Ceria NSs는 mTBI 그룹에 비해 TUNEL 양성 세포의 수를 현저하게 감소시켰다(도 3D 및 3E). 상기 확인에 사용된 qRT-PCR 프라이머의 서열은 하기 표 3과 같다.

표 3

[0081]

Gene	Species	Sequences for primers	
Actin	mouse	Forward	5'-GGC ACC ACA CCT TCT ACA ATG-3'
		Reverse	5'-GGG GTG TTG AAG GTC TCA AAC-3'
	human	Forward	5'-GTG CTA TCC CTG TAC GCC TC-3'
		Reverse	5'-GGC CAT CTC TTG CTC GAA GT-3'
SOD1	mouse	Forward	5'-CAG AAG GCA AGC GGT GAA C -3'
		Reverse	5'-CAG CCT TGT GTA TTG TCC CCA TA-3'
	human	Forward	5'-TGA AGA GAG GCA TGT TGG AGA-3'
		Reverse	5'-TGC CCA AGT CAT CTG CTT TTT-3'

SOD2	mouse	Forward	5'-CCA AGA CCT GCC TTA CGA CTA-3'
		Reverse	5'-GGT GGC GTT GAG ATT GTT GA-3'
	human	Forward	5'-GGA AGC CAT CAA ACG TGA CTT-3'
		Reverse	5'-GCA GTG GAT CCT GAT TTG GAC-3'

[0082] 세리아 나노 입자 처리는 mTBI 이후 감소된 SOD1 및 SOD2의 mRNA 수준을 회복시켰다(도 3F). 또한, COX-2 발현도 대조군에 비해 세리아 나노 입자를 처리한 군에서 현저하게 감소하였다(도 3G 및 3H). 이러한 결과는 손상된 신경 세포에서 염증 및 산화 스트레스 억제를 통한 세리아 나노 입자의 세포 보호 효과를 시사하였으나, 항산화 활성은 나노형태에 따라 크게 다르지 않았다. Ceria NRs(0.059 ± 0.021)는 Ceria NSs(0.133 ± 0.024)보다 더 나은 항염증 효과를 보였지만, 그 효과는 통계적으로 미미했다(p = 0.190).**생체 내 경증 TBI의 인지 기능 (Cognitive function in *in vivo* mild TBI)**

[0083] NOR에 대한 생체 내 연구의 개략도 및 그 설명이 도 4에 제시되어 있다. 도 4B(오른쪽)의 각 그룹에 대한 평균 선호도 지수는 도 4C ~ 4E에 요약되어 있다. 각 그룹은 mTBI 이전에 온전한 NOR 기억력을 보였다(도 4C 및 4D). mTBI 이후, 마우스는 기억 장애를 보였고(도 4B, 오른쪽 상단) 해당 선호도 지수는 대략 3.0(도 4E, 회색 막대)이었다. 두 세리아 나노 입자는 mTBI-유도 마우스에서 NOR 기억력을 향상시켰다(도 4C; C1의 새로운 대상에 대한 선호도 지수, 파란색과 빨간색 막대로 표시됨). 따라서 세리아 나노 입자는 인지 기능을 향상시켰고, 그러나 세리아 NRs와 세리아 NSs의 모양에 따라 그 효과는 크게 다르지 않았다.

[0084] **생체 내 경증 TBI에서 뇌부종(Cerebral edema in *in vivo* mild TBI)**

[0085] 뇌부종은 앞서 설명한 바와 같이 뇌 조직의 전체 수분 함량 변화를 추정하여 추가로 비교되었다. 뇌부종 측정에 대한 모식도가 도 5에 나와있다. 세리아 나노 입자는 대조군(DPBS 처리된 mTBI 그룹)보다 뇌부종을 현저하게 감소시켰다. Ceria NSs(73.7 ± 0.4 %)와 비교하여, Ceria NRs(70.1 ± 0.5 %)는 뇌 수분 함량을 현저히 감소시켜 뇌 부종의 더 효과적인 감소를 보여주었다(p = 0.0015).

[0086] **결과분석**

[0087] 상기 실시예들을 통해 생체 내 mTBI 모델에서 모양을 기반으로 세리아 나노 입자의 능력을 확인하였다. 이론적으로, Ceria NR은 다음과 같은 이유로 Ceria NS보다 더 나은 항산화 활성(antioxidant activity)과 세포 독성(cytotoxicity)을 나타낸다.

[0088] 첫째, 반응성 결정면의 차이는 치료 효과의 차이에 기인하는 것을 확인하였다. 고분해능 TEM 분석 (도 1)에서 알 수 있듯이 덜 안정적이고 에너지가 높은 (100) 및 (110) 평면이 주로 Ceria NRs에 노출되었다. 그러나 표면의 (111) 평면은 주로 Ceria NSs에서 노출되었다. Ceria NRs의 개선된 생체 의학 활동은 Ceria NSs에 비해 (100) 및 (110) 말단 평면(terminated planes)이 풍부하기 때문에 발생하는 것으로 판단된다. 높은 표면 에너지를 가진 결정질 평면이 더 많은 활성 부위를 제공하기 때문이다. 세리아 나노 입자의 구조적 특징이 CO 산화와 같은 촉매 작용에 미치는 영향은 종합적으로 조사되었다. 예를 들어, Ceria NR은 나노 큐브, 나노 와이어 및 나노 입자보다 CO 산화에서 더 활동적인 것으로 밝혀졌다. 유사하게, 반응성 결정면의 노출이 더 높은 Co_3O_4 NR은 또한 저온에서 CO 산화에 대해 특히 높은 활성을 나타냈다.

[0089] 둘째, 세리아 나노 입자 표면의 Ce^{3+}/Ce^{4+} 몰비는 생의학 활동에도 영향을 미친다. 산화 상태를 Ce^{3+}에서 Ce^{4+}로 변경함으로써 세리아 나노 입자는 자유 라디칼 또는 활성 산소종을 제거(scavenge)할 수 있다. 한편, 세리아 나노 입자의 산화 상태를 Ce^{4+}에서 Ce^{3+}로 변경하면 자동 재생 반응 사이클(autoregenerative reaction cycle)이 완료된다. 도 2에서 볼 수 있듯이, Ceria NRs의 Ce^{3+}/Ce^{4+} 몰비(0.40)는 Ceria NSs(0.27)(XPS 데이터에서 계산)보다 크게 나타났다. 이는 Ceria NRs 표면의 Ce^{3+} 농도가 Ceria NSs보다 높다는 것을 나타낸다.

[0090] 셋째, 표면에서 가장 활성화된 세리아 나노 입자의 격자 구조에 있는 산소 결손도 생물 의학적 특성을 결정하는 데 필수적인 역할을 한다. 세리아 나노 입자의 산화 상태의 변화는 산소 결손을 생성하여 산소와 전자의 손실을 통해 정전기 균형을 유지한다. 세리아 나노 입자에서 증가된 Ce^{3+} 부위는 표면의 산소 결손의 수를 증가시킨다. 그럼에도 불구하고, 본 발명에서 SOD1, SOD2, COX-2의 mRNA 발현은 Ceria NSs보다 Ceria NRs에서 감소하는 경향이 있었지만 *in vitro* mTBI의 항산화 및 항염증 활성은 나노 형태에 따라 유의하게 다르지 않았다. 그러나 뇌부종은 mTBI 후 Ceria NS에 비해 Ceria NR에서 유의하게 감소하였다.

[0091] 상기 실시예에서 생체 내 mTBI에서 Ceria NRs 및 Ceria NSs를 포함하는 세리아 나노 입자의 치료 효과에 대해 확인하였으며, 그 결과 세리아 나노 입자는 신경 세포 손상을 줄이고 인지 장애를 개선했다. 세리아 나노 입자는 FJB-양성 세포와 TUNEL-양성 세포를 현저히 감소시켰고 SOD1과 SOD2의 mRNA 수준을 회복시켰다. 또한, COX-2 발현도 미처리 대조군에 비해 세리아 나노 입자 처리 군에서 감소하였다. 두 나노 물질을 비교했을 때, Ceria NRs는 덜 안정적이고 고에너지 (100) 및 (110) 평면을 나타내어 활성 사이트의 수가 증가했다. Ceria NRs (0.40)의 Ce^{3+}/Ce^{4+} 몰비는 Ceria NSs (0.27)보다 컸다. 중요한 것은, Ceria NR이 생체 내 mTBI 후 뇌부종을 완화하는 데 Ceria NS보다 더 효과적이라는 것이다. Ceria NRs (70.1 ± 0.5 %)는 Ceria NSs (73.7 ± 0.4 %; p = 0.0015)에 비해 뇌 수분 함량을 크게 감소시켰다.

[0093] <추가 실시예1>

[0095] 외상성 뇌 손상(TBI)의 *in vitro* 모델에서 세리아 나노막대(Ceria NRs) 및 세리아 나노구(Ceria NS)의 두 가지 다른 모양의 세리아 나노입자와 관련된 치료 효과의 비교 분석을 수행하였다.

[0096] 이를 위해, 6x6 정사각형 격자에서 멸균 피펫 팁을 갖고서 손으로 긁어 6-웰 컨플루언트 플레이트를 사용하여 *in vitro* TBI를 유도했다. 그런 다음 세포를 배양하고, 나노 입자가 없는 긁힘 손상이 있는 세포와 긁힘 손상이 있는 세포로 분류하고, 1.16mM의 Ceria NS와 Ceria NR을 별도로 처리했다. 항산화 활성과 항염 효과를 분석하였다.

[0097] 분석 결과를 요약하면 다음과 같다. Ceria NRs와 Ceria NSs는 둘베코 인산완충 생리식염수(Dulbecco's phosphate-buffered saline, DPBS)로 처리된 SH-SY5Y 세포의 대조군과 비교하여 활성산소의 수준을 유의하게 감소시켰다. 슈퍼옥사이드 디스뮤타제의 mRNA 발현은 나노입자 처리 SH-SY5Y 세포에서도 감소했지만, mRNA 발현 감소 정도는 나노입자 모양(shape)에 의존하지 않는 경향을 보였다. 세리아 나노입자에 대한 노출은 또한 시클로옥시게나아제-2(cyclooxygenase-2)(COX-2) 발현을 감소시켰는데, 특히 Ceria NS 처리군보다 Ceria NR 처리군에서 두드러졌다.

[0098] 이하 보다 상세히 살펴본다.

[0099] **재료 및 방법**

[0100] **세리아 나노입자의 합성(Synthesis of ceria nanoparticles)**

[0101] 위 <실시예>에서 논의된 방식과 동일하게 합성하였다. 다음과 같다.

[0102] Ceria NR(도 10A)을 준비하기 위해, 세륨 니트레이트 6수화물(0.434g, 1mmol)을 PTFE 비커에 담긴 수산화나트륨(10M, 20mL) 수용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 격렬하게 교반한 후 테플론 라이닝된 스테인리스강 오토클레이브에 옮긴 다음, 100° C의 온도 조절 오븐에서 10시간 동안 인큐베이션(incubation)하였다. 반응 종료 후 혼합물을 상온으로 자연 냉각시켰다. 생성된 생성물을 원심분리한 후, 용매로 반복적으로 세척한 후, 24시간 동안 진공 건조하였다.

[0103] Ceria NS(도 10B)를 준비하기 위해, 질산세륨 6수화물(0.434g, 1mmol) 및 올레일아민(3.25g, 12mmol)을 크실렌(15mL)에 용해시켰다. 생성된 용액을 25℃에서 2시간 동안 격렬하게 교반한 다음, 진공 하에 2℃.min^{-1}의 속도로 90℃로 가열하였다. 탈이온수(1mL)를 90° C에서 격렬하게 교반하면서 용액에 빠르게 주입하여 색상이 보라색에서 흐린 노란색으로 바뀔 때까지 졸-겔 반응을 시작했다. 반응 혼합물을 90℃에서 3시간 동안 인큐베이션하여 담황색 콜로이드 용액을 얻었다. 혼합물을 주위 온도로 자연적으로 냉각시키고, 에탄올(75mL)을 첨가하여 Ceria NS를 침전시켰다. 수득된 생성물을 원심분리에 의해 수집하고 에탄올로 반복적으로 세척한 다음 추가 사용을 위해 24시간 동안 진공 건조하였다.

[0104] **세포 배양 및 배양 조건(Cell culture and culture conditions)**

[0105] 인간 조직구 림프종(U-937), 인간 신경모세포종(SH-SY5Y) 및 마우스 정상 단핵구 대식세포(RAW 264.7)를 *in vitro* 실험에 사용했다. U-937 세포는 10% 열-불활성화 소태아혈청(FBS; Welgene Inc.) 및 1% 페니실린 스트렙토마이신(P/S; Gibco, 브루클린, 뉴욕, 미국)이 보충된 Roswell Park Memorial Institute 배지(Welgene Inc., 대구, 한국) 1640에서 유지되었다. SH-SY5Y 세포를 Ham's-F12/Minimum Essential 배지(1:1)에서 1% P/S로 배양

하였다. RAW 264.7 세포는 10% FBS 및 1% P/S를 포함하는 둘베코수정이글배지(Welgene Inc.)에서 배양되었다. 모든 세포주는 최적의 성장을 위해 5% CO_2의 가습 분위기에서 37℃로 유지되었다.

[0106] **세리아 나노입자의 비교(Comparison of ceria nanoparticles)**

[0107] Ceria NR과 Ceria NS의 항산화 및 항염 효과를 조사하고 비교하였다(도 11). 슈퍼옥사이드 음이온 소거 활성은 슈퍼옥사이드 음이온 분석 키트(CS1000-1KT; SigmaAldrich, Saint Louis, MO, USA)를 사용하여 시험관 내에서 평가되었다.

[0108] U-937 세포를 48시간 동안 배양하고 24시간 동안 1㎍/mL의 지질다당류(lipopolysaccharides)(LPS; L2630; Sigma, Saint Louis, MO, USA)로 처리하여 활성화시켰다. 5.0 x 105개 세포의 U-937 세포 현탁액을 각 웰에 첨가하였다. 키트 제조업체의 프로토콜에 따라 20μg/mL의 포르볼-12-미리스테이트-13-아세테이트(phorbol-12-myristate-13-acetate)(PMA; P8139; Sigma), 루미놀 용액, 인핸서 용액 및 분석 완충액을 첨가하여 반응을 시작했다. 1.16mM의 Ceria NS 및 Ceria NR을 함유하는 완충액을 분석시에 사용하였다. 4시간 동안 10분마다 과산화물 음이온 유도 발광 강도(superoxie anion-induced luminescenece intensity)를 측정하였다. 그리스시약(Promega, Madison, WI, USA)을 사용하여 세리아 나노입자의 산화질소(NO) 소거 활성 분석을 수행했다. 간단히 말해서, 96-웰 플레이트의 RAW264.7 세포(5.0 x 105개 세포/웰)는 24시간 및 48시간 동안 1.16mM의 세리아 나노입자가 있거나 없는 1㎍/mL의 LPS를 첨가하여 자극했다. 그리스시약을 배양 상등액과 함께 실온에서 10분 동안 인큐베이션한 후 550 nm에서 흡광도를 측정했다.

[0109] **MTT 분석(MTT assay)**

[0110] SH-SY5Y 세포(5 x 105 cells/well)를 96-웰 배양 플레이트에 완전한 배지에서 밤새 시딩한 다음, 1.16 mM의 Ceria NR 및 Ceria NS로 24시간 동안 처리하였다(도 10C). 각 시점에서 50 μL MTT 테트라졸륨(3-(4,5-디메틸티아졸릴-2-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드; Sigma-Aldrich-Merck, Saint Louis, MO, USA) 용액(5 mg/mL)을 첨가하고 세포를 2시간 동안 암실에서 CO_2 인큐베이터에서 인큐베이션하였다. 용액을 제거하고 100 μL의 DMSO를 사용하여 용해시켰다. 흡광도는 Glo-Max® Discover Microplate Reader(Promega™, Madison, WI, USA)에서 30분 이내에 570 nm에서 판독되었다. 모든 실험은 어둠 속에서 수행되었다.

[0111] **TBI의 시험관내 모델(*In vitro* model of TBI)**

[0112] TBI의 시험관 내 모델은 이전에 설명한 절차를 수정하여 개발되었다. 간단히 말해서, 6-웰 컨플루언트 플레이트는 6x6 정사각형 격자(선 사이의 간격 5mm)를 사용하여 멸균 피펫 팁으로 수동으로 긁었다. 보다 구체적으로, SH-SY5Y 세포는 1.16mM의 세리아 나노입자의 유무에 관계없이 긁힌 후 세포를 다음과 같이 배양하였다: 손상이 없는 세포(대조군), 긁힌 상처가 있는 세포, 1.16mM의 세리아 나노입자로 처리한 긁힌 상처가 있는 세포 세리아 나노 입자. 37℃에서 24시간 동안 인큐베이션한 후, 배지를 제거하고 3회 세척하였다. 세리아 나노입자의 세포 내 ROS 소거 활성은 디클로로-디하이드로-플루오레세인 디아세테이트(DCFH-DA)(Molecular Probes. Inc., Cambridge, MA, USA) 형광으로 측정되었다. 배양된 세포를 웨스턴 블롯 및 정량적 실시간 중합효소 연쇄 반응(qRT-PCR)에 적용한 후 단백질 추출 및 웨스턴 블롯 분석을 수행했다. ROS 생산은 DCFH-DA 염색을 통해 측정되었다. 실험은 관련 지침에 따라 수행되었다.

[0113] **RNA 추출 및 정량적 RT-PCR(RNA extraction and quantitative RT-PCR)**

[0114] 이지 블루를 사용하여 토탈 RNA를 추출하고 Maxime RT PreMix 키트(iNtRON Biotechology, Inc., Burlington, MA, USA)를 사용하여 cDNA로 역전사했다. 94℃에서 15초 변성, 55℃에서 30초 어닐링 및 70℃에서 30초 연장을 포함하는 3-단계 프로그램으로 40주기 동안 SYBR Green PCR Kit(applied Biosystems, Norwalk, CT, USA)를 사용하여 각 샘플에 대해 qRT-PCR을 3회 수행했다. 증폭 특이성은 용융 곡선 분석을 통해 평가되었다. Glyeraldehyde-3-phosphate dehydrogenase는 내인성 대조군으로 사용되었다. $2^{-\Delta\Delta ct}$ 방법을 사용하여 qRT-PCR을 통한 cDNA의 발현을 분석하였다. qRT-PCR에 대한 프라이머 서열은 다음과 같다: SOD1, 정방향 5'-TGAAGAGAGGCATGTTGGAGA-3' 및 역방향 5'-TGCCCAAGTCATCTGCTTTTT-3'; SOD2, 정방향 5'-GGAAGCCATCAAACGTGACTT-3' 및 역방향 5'-GCAGTGGATCCTGATTTGGAC-3'; 인터루킨(IL)-6, 정방향 5'-AATTCGGTACATCCTCGACGG-3' 및 역방향 5'-GGTTGTTTTCTGCCAGTGCC-3'; IL-1β, 정방향 5'-ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA-3' 및 역방향 5'-GTCGGAGATTCGTAGCTGGA-3'; 종양 괴사 인자-α(TNF-α), 정방향 5'-TGTAGCCCATGTTGTAGCAAACC-3' 및 역방향 5'-GAGGACCTGGGAGTAGATGAGGTA-3'; 액틴, 정방향 5'-GTGCTATCCCTGTACGCCTC-3' 및 역방향 5'-GGCCATCTCTTGCTCGAAGT-3'.

[0115] **단백질 추출 및 웨스턴 블로팅 분석(Protein extraction and western blotting analysis)**

[0116] 단백질 농도는 단백질분해효소 억제제 칵테일이 보충된 방사선 면역침전 분석 완충액에서 세포를 용해한 후 Pierce BCA 단백질 분석 키트(Thermo Fisher Scientif ic Inc., Waltham, MA, USA)를 사용하여 측정되었다. 단백질(15㎍)을 10% 나트륨 도데실 설페이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동으로 분리하고 폴리비닐리덴 플루오라이드 막으로 옮겼다. 막을 10% 소혈청 알부민으로 실온에서 1시간 동안 차단하고 1차 항체와 함께 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 이 실험에 사용된 1차 항체는 항-COX-2(sc-7877; 1:1000; Abcam, Cambridge, MA, USA) 및 항-β-액틴(ab8227; 1:1000; Abcam)이었다. 멤브레인의 블롯을 0.1% Tween 20이 포함된 트리스 완충 식염수로 15분 동안 3회 세척한 다음 서양고추냉이 퍼옥시다제-링크된 이차 항체와 함께 인큐베이션했다. 블롯을 X선 필름에 30초 동안 노출시키고 Image J 소프트웨어(Image J 1.49 v; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)로 분석했다.

[0117] **통계 분석(Statistical analysis)**

[0118] 데이터의 결과는 평균±평균의 표준오차로 표현된다. 가능한 모든 쌍별 비교에 대해 post-hoc Bonferroni 보정이 포함된 Student's t-test 또는 일원 분산 분석을 수행했다. p-값 <0.05, <0.01 및 <0.001은 각각 *, † 및 ‡로 표시된다. 모든 통계 분석은 GraphPad Prism 소프트웨어(v.6.01; GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)를 사용하여 수행되었다.

[0119] **결과**

[0120] MTT 분석 결과는 1.16nM의 용량에서 세리아 나노입자의 부작용(세포 생존력 손실)이 없음을 나타낸다(도 10C). 또한, 세리아 형태에 따른 세포생존율에는 유의한 차이가 없었다. 세리아 나노입자의 항산화 효과는 슈퍼옥사이드 음이온 분석을 사용하여 결정되었다. Ceria NR과 Ceria NS는 PMA로 LPS-프라이밍된 U937 세포를 자극한 후 둘베코 인산완충 생리식염수에 비해 슈퍼옥사이드 음이온의 생성을 감소시켰다(도 11A). 그리스시약을 사용하여 LPS 자극 하에 RAW264.7 세포의 배양 배지로 NO의 주요 대사산물인 아질산염의 방출을 검출하였다. 세포에 세리아 나노입자와 1 μg/mL의 LPS를 함께 처리한 경우 LPS만 처리한 그룹에 비해 24시간 및 48시간에 아질산염의 방출이 유의하게 감소했다(도 11B).

[0121] SH-SY5Y 세포에서 TBI로 유도된 변화에 이어, DCFH-DA 분석을 수행하여 다양한 치료군에서 공초점 레이저 스캐닝 현미경 하에서 총 세포내 ROS의 차이를 결정했다(도 12A-C). Ceria NR 및 Ceria NS는 대조군에 비해 세포 내부의 ROS 수준을 유의하게 감소시켰다. 감소된 총 ROS 수준은 슈퍼옥사이드 음이온 분석에서 유사한 변화를 보였다. 이러한 결과를 바탕으로 qRT-PCR을 사용하여 SOD의 mRNA 발현을 정량화했다. 세리아 나노입자는 대조군과 비교하여 SH-SY5Y 세포에서 SOD1 및 SOD2의 발현을 감소시켰다(도 12D 및 E). Ceria NR 및 Ceria NS는 SOD1 및 SOD2의 mRNA 발현 감소를 변화시키지 않았다. 또한, Ceria NR은 Ceria NS보다 낮은 수준의 IL-6, IL-1β 및 TNF-α를 가졌다(도 12F-H). 세리아 나노입자는 또한 세포 TBI 모델에서 염증을 유발하는 COX2 수준을 감소시켰다(도 12I 및 J). Ceria NRs(0.438±0.105)는 ceria NSs(1.321±0.139; p=0.025)보다 우수한 항염 활성을 보였다.

[0122] **결과분석**

[0123] 세리아 나노입자는 촉매 경로에서 빠른 Ce^{3+}/Ce^{4+} 순환을 통해 항산화 및 항염 효과를 나타낸다. 이러한 산화 환원 특성은 나노 입자의 모양과 크기에 따라 다르다. Ceria NS와 비교하여 Ceria NR은 덜 안정적이고 고에너지 반응성 결정면을 포함했다. Ceria NR은 더 높은 산소 저장 용량과 CO 산화에 대한 촉매 활성을 제공했다. 또한, Ceria NRs는 Ceria NS(0.27)보다 표면에서 더 높은 Ce^{3+}/Ce^{4+} 몰비(0.40)를 나타냈다. 따라서 Ceria NR이 Ceria NS보다 더 나은 치료 효과를 나타낼 수 있다. 본 발명에서는 세리아 나노입자 처리군에서 SOD1과 SOD2의 mRNA 발현과 COX2의 단백질 수준이 감소하였다. 그러나, Ceria NR과 Ceria NS는 유사하게 SOD1 및 SOD2의 mRNA 발현을 감소시켰지만, Ceria NR은 Ceria NS보다 우수한 항염 활성을 나타내었다. 이 실험에 사용된 나노 입자의 상대적으로 높은 복용량은 결과에 영향을 미칠 수 있다. 최적의 치료 효과는 1nM 및 100nM과 비교하여 10nM의 세리아 나노입자를 사용하는 경증 TBI의 시험관 내 모델에서 발견되었다.

[0124] **결론**

[0125] 세리아 나노입자는 TBI의 시험관내 모델에서 항산화 및 항염 효과를 나타냈다. Ceria NR이 뚜렷한 항염 효과를 나타내긴 했지만 Ceria NR과 Ceria NS의 항산화 활성 사이에는 유의한 차이가 감지되지 않았다.

[0127] <추가 실시예2>

[0129] 경증 외상성 뇌손상에 대한 산화세륨 나노입자의 형태 효과에 대해 실험하였다.

[0130] **재료 및 방법**

[0131] **세리아 나노로드 및 세리아 나노큐브의 합성(Synthesis of ceria nanorods and ceria nanocubes)**

[0132] 세리아 나노로드(Ceria NRs) 및 세리아 나노큐브(Ceria NCs)는 다음의 절차를 통해 합성되었다. 세륨(III) 질산염 6수화물($Ce(NO_3)_3.6H_2O$, 99%, Sigma-Aldrich) 및 나트륨 수산화물(NaOH, 98%, Sigma-Aldrich)을 사용하였다. $Ce(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$(0.868g, 2mmol)를 PTFE 비이커에 담긴 NaOH(10M, 40mL) 수용액에 첨가했다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 격렬하게 교반한 후 테플론 라이닝된 스테인리스강 오토클레이브에 옮기고 온도 조절 오븐에서 60° C, 100° C 및 180° C에서 10시간 동안 각각 가열했다(heated). 해당 제품은 본 발명에서 각각 Ceria NRs_60, Ceria NRs_100 및 Ceria NCs_180으로 참조된다. 상온으로 냉각한 후 원심분리하여 생성물을 회수하고 용매(탈이온수 및 에탄올)로 여러 번 세척한 다음 추가 사용을 위해 24시간 동안 진공 건조시켰다.

[0133] **세리아 나노다면체 합성(Synthesis of ceria nanopolyhedra)**

[0134] 세리아 나노다면체(Ceria nanopolyhedra)(Ceria NPs)는 다음의 절차를 통해 제조되었다. 세륨(III) 질산염 6수화물($Ce(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$, 99%, Sigma-Aldrich) 및 수산화나트륨(NaOH, 98%, Sigma-Aldrich)을 사용했다. $Ce(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$(0.868g, 2mmol)를 PTFE 비커에 담긴 NaOH(0.1M, 40mL) 수용액에 첨가했다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 격렬하게 교반한 후 테플론 라이닝된 스테인리스강 오토클레이브에 옮기고 100° C의 온도 조절 오븐에 10시간 동안 유지(kept)했다. 해당 제품은 본 발명에서 Ceria NPs_100으로 참조된다. 상온으로 식힌 후 원심분리하여 생성물을 회수하고 탈이온수와 에탄올로 여러 번 세척한 후 24시간 동안 진공 건조하였다.

[0135] **경증 TBI의 시험관 내 모델(*In vitro* model of mild TBI)**

[0136] 경증 TBI의 시험관내 모델은 다음과 같이 수행되었다. BioFlex 6-웰 배양 플레이트(Flexcell International Corporation, McKeesport, PA, USA)에서 세포가 합류할 때까지 성장했다. 약 80-90% 합류(confluence)에 도달한 후, 세포를 배양 배지로 인큐베이션하였다. 세포 손상은 50ms 펄스 지속 시간 및 조절기 압력 3.0으로 Cell Injury Controller ± 시스템(Flexcell International Corporation, McKeesport, PA, USA)을 사용하여 세포에 적용되었다. 손상 후 세포는 다음과 같이 배양되었다: 손상이 없는 세포(대조군), 욕창(pressure injuries)이 있는 세포, 0.058mM의 Ceria NS, Ceria NC 및 Ceria NR로 처리된 욕창이 있는 세포. 37℃에서 24시간 동안 배양한 후, 배지를 제거하고 3회 세척하였다.

[0137] 배양된 세포를 웨스턴 블롯 및 정량적 실시간 중합효소 연쇄 반응(qRT-PCR)에 적용했다. ROS 생산은 디클로로-디히드로-플루오레세인 디아세테이트(DCFH-DA) 염색을 통해 측정되었다. 모든 실험은 참여 대학의 기관 동물 관리 및 사용 위원회의 승인을 받았다(승인 번호 R2 2019-35). 연구는 관련 지침에 따라 수행되었다.

[0138] **생체 내 경증 TBI(*In vivo* mild TBI)**

[0139] 모든 동물 실험은 한림대학교 동물연구소(IACUC)의 승인을 받았다(승인번호 HallymR2 2019-35). C57BL/6J 수컷 마우스는 7-8주령의 한림대학교 동물실험실 동물자원센터에서 입수하였다. 동물에게 24℃, 55 ± 10% 습도에서 12시간 암/광 주기 하에서 규칙적인 음식과 물을 임의로 제공했다. 다른 실험군은 다음과 같다: 1) mTBI(n=16), 2) Ceria NR로 처리된 mTBI(n=16), 3) Ceria NS로 처리된 mTBI(n=16), 및 모조 수술(n=6).

[0140] 생체 내 TBI는 정위 임팩터(RWD Life Science, RWD-68099, 중국)를 사용하여 열린 머리 부상을 통해 유도되었다. 간단히 말해서, 마우스를 산소 중 2.5% 이소퓨란을 사용하여 마취하고 정위 프레임에 배치했다. 두개골은 정중선 피부 절개를 통해 노출되었고 TBI는 다음과 같이 유도되었다: 브레그마에서 직경 2mm의 뭉툭한 팁을 사용하여 깊이 1.5mm에서 M/L = -2.5mm, A/P = -2.0mm. 충격기의 속도는 경질막 아래 2mm 블런트 팁을 사용하여 1.5mm 깊이로 3.0m/s에 도달했다. 뇌에서의 체류 시간은 0.5m/s였다. 세리아 나노입자는 종 모양의 용량-반응 곡선을 통해 뇌에 축적되며, 따라서 본 발명에서는 11.6nM의 세리아 나노입자를 사용하여 단일 안와후주사(retro-orbital injection)를 시행했다. FJB, TUNEL, 웨스턴 블롯, 뇌부종 측정, 새로운 물체 인식 테스트(NOR 테스트)를 포함한 행동 테스트는 상술한 <실시예>에서 보충적인 방법들에 자세히 설명되어 있다. 결과 측

정은 마우스의 치료 방법에 대해 모르는 조사자들에 의해 수행되었다.

[0141] **통계 분석(Statistical analysis)**

[0142] 모든 데이터는 평균 ± 평균의 표준 오차(standard errors of the mean, SEM)로 설명된다. 모든 가능한 쌍별 비교에 대해 post-hoc Bonferroni 보정이 포함된 Student's t-test 및 일원 분산 분석을 수행했다. <0.05, 0.01 및 0.005보다 작은 P 값은 *, ** 및 ***로 표시된다. 모든 통계 분석은 GraphPad Prism 소프트웨어(v.6.01; GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)로 수행되었다.

[0143] **결과**

[0144] **세리아 나노입자의 특성화**

[0145] 얻어진 세리아 나노입자의 형태는 주사전자현미경(SEM) 및 투과전자현미경(TEM)에 의한 이미지였다. 도 13a-b와 같이 60° C에서 합성된 세리아 나노막대(Ceria NRs_60)는 길이 84.3 ± 29.6(nm), 직경 5.5 ± 1.2(nm)로 막대 모양의 형태를 보였다. 더 높은 온도, 즉 100° C에서 합성할 때 얻은 제품(Ceria NRs_100)도 막대 모양으로 비슷한 모양을 나타내었지만 해당하는 길이와 직경은 각각 127.2 ± 39.9(nm) 및 9.3 ± 1.9(nm)의 값으로(도 13c-d) Ceria NRs_60보다 길고 컸다. Ceria NRs_60의 종횡비는 15.3으로 13.8의 값을 갖는 Ceria NRs_100의 것보다 높다. 세리아 나노다면체(Ceria NPs_100)(도 13e-f)는 평균 입자 크기가 약 6.8 ± 1.1 nm인 다면체 및 균일한 나노구조인 반면, 세리아 나노큐브(Ceria NCs_180)는 입방체 모양과 대략 394.7 ± 108.5(nm)의 평균 값을 갖는 입자 크기의 넓은 분포를 나타냈다(도 13g-h). 세리아 나노입자의 결정질 특성은 X선 회절(XRD) 방법에 의해 입증되었다(도 14). 주요 피크는 (111), (200), (220), (311), (222), (400), (331), (420) 및 (422) 평면에 할당되어 모든 세리아 나노 입자가 인덱싱되었음을 나타냈다. CeO_2의 순수한 형석 입방 구조(JCPDS 34-0394, space group Fm-3m). 또한, 다른 외부 성분에 속하는 회절 피크가 없어 생성된 화합물의 순도를 나타냈다. 4개의 샘플 Ceria NRs_60, Ceria NRs_100, Ceria NPs_100 및 Ceria NCs_180의 질소 흡착 측정에서 계산된 비표면적(SBET)은 각각 129.0 $m^2.g^{-1}$, 60.0 $m^2.g^{-1}$, 89.0, $m^2.g^{-1}$ 및 5.2 $m^2.g^{-1}$이었다(도 15). 얻어진 세리아 나노입자의 전체 특성을 아래 표 4에 정리하였다.

표 4

[0147]

Particle characteristic	Morphology	Size (nm)		Surface Ce^{3+}/Ce^{4+} ratio	S_{BET} ($m^2.g^{-1}$)
		Length	Diameter		
Ceria NRs_60	Nanorods	84.3±29.6 (n = 148)	5.5±1.2 (n = 144)	0.99	129.0
Ceria NRs_100	Nanorods	127.2±39.9 (n = 212)	9.3±1.9 (n = 205)	0.43	60.0
Ceria NPs_100	Nanopolyhedra		6.8±1.1 (n = 239)	0.73	89.0
Ceria NCs_180	Nanocubes		394.7±108.5 (n = 205)	0.34	5.2

[0148] Ceria NCs_180의 백색과 대조적으로 Ceria NRs_60, Ceria NRs_100, Ceria NPs_100을 포함한 다른 세리아 나노입자는 황색을 띠며, 이는 Ce^{3+}와 Ce^{4+}의 공존뿐만 아니라 Ceria NCs_180에 비해 Ceria NRs_60, Ceria NRs_100, Ceria NPs_100의 구조에서 Ce^{3+}/Ce^{4+} 몰비가 더 높음을 증명하였다. X선 광전자 분광법(XPS) 분석을 통해 제품에 세륨과 산소 원소가 존재함을 확인했다(도 16). 또한, Ce 3d의 XPS 고해상도 결합 에너지 스펙트럼의 디콘볼루션(deconvolution)은 Ce^{3+}와 Ce^{4+}의 혼합-원자가 상태(mixed-valence state)를 보여주었다(도 17). Ceria NRs_60은 911.5, 901.9, 896.1, 891.8, 883.7 및 878.0 eV의 결합 에너지로 Ce^{4+}의 특징적인 피크를 나타낸 반면 898.0, 893.6, 880.1, 및 876.7 eV의 결합 에너지에서 피크는 Ce^{3+}에 해당한다(도 17a). Ceria NRs_100(도 17b)의 경우, Ce^{4+}에서 911.3, 902.4, 896.1, 891.9, 883.9 및 877.8 eV와 Ce^{3+}에서 898.6, 893.7, 880.5 및 876.4 eV의 결합 에너지에서 피크가 관찰되었고, Ceria NPs_100은 911.4, 902.0, 896.0, 892.0, 883.7, 877.8

eV의 결합 에너지로 Ce^{4+}의 특징적인 피크를 나타낸 반면 898.0, 893.7, 879.9 및 875.7 eV의 결합 에너지에서 피크는 Ce^{3+}에 해당한다(도 17c). Ceria NCs_180(도 17d)은, Ce^{4+}에서 914.3, 904.9, 898.9, 895.6, 887.3, 880.7 eV와 Ce^{3+}에서 901.6, 896.6, 883.9 및 878.6 eV의 결합 에너지에서 피크가 관찰되었다. Ce^{3+}와 Ce^{4+}의 피팅된 피크 면적 사이의 몰비는 모든 유형의 세리아 나노입자 표면의 농도를 평가하는 데 사용되었다. 표 4에서 보는 바와 같이 Ceria NRs_60, Ceria NRs_100, Ceria NPs_100, Ceria NCs_180의 Ce^{3+}/Ce^{4+} 몰비는 각각 0.99, 0.43, 0.73, 0.34였다. 이 데이터는 Ceria NRs_60이 Ceria NRs_100, Ceria NPs_100 및 Ceria NCs_180에 비해 표면에 가장 많은 양의 Ce^{3+}를 함유함을 나타낸다. 표면이 더 높은 수준의 Ce^{3+}를 가질 때 세리아 나노입자의 생체의학적 성능이 향상되는 것으로 추정된다. 도 18에 표시된 세리아 나노입자의 O 1s의 XPS 고해상도 결합 에너지 스펙트럼에서 약 529eV의 첫 번째 피크는 격자 산소와 관련이 있는 반면, 약 531eV의 더 높은 결합 에너지 숄더는 산소 결손(oxygen vacancies) 또는 표면에 흡착된 하이드록실, 산소 및 탄산염 기의 혼합물(mixture)에 대한 지표가 되었다. Ce 3d 및 O 1s에 대한 XPS 고해상도 결합 에너지 데이터는 아래 표 5에 요약되어 있다.

표 5

[0149]

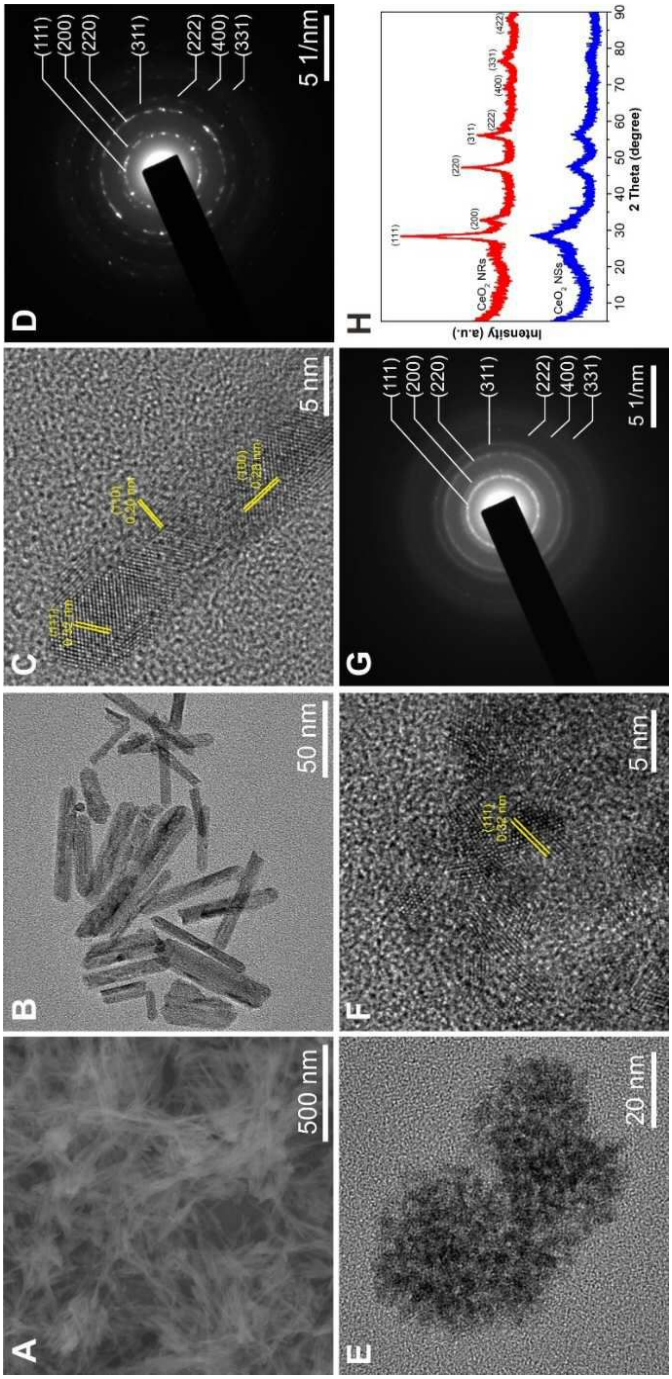
Sample	Ce 3d		O 1s (eV)
	Ce^{3+} (eV)	Ce^{4+} (eV)	
Ceria NRs_60	898.0, 893.6 880.1, 876.7	911.5, 901.9 896.1, 891.8 883.7, 878.0	530.9, 528.9 519.1
Ceria NRs_100	898.6, 893.7 880.5, 876.4	911.3, 902.4 896.1, 891.9 883.9, 877.8	530.5, 528.6 518.5
Ceria NPs_100	898.0, 893.7879.9, 875.7	911.4, 902.0 896.0, 892.0 883.7, 877.8	532.2, 530.0 519.8
Ceria NCs_180	901.6, 896.6 883.9, 878.6	914.3, 904.9 898.9, 895.6 887.3, 880.7	529.5, 527.0 516.6

[0150] Ceria NRs_60, Ceria NRs_100, Ceria NPs_100, Ceria NCs_180에 대한 시험관 내 모델 결과는 0.058mM의 용량에서 세리아 나노입자의 부작용(세포 생존력 손실)이 없음을 나타낸다(도 19A). 또한, 세리아 형태에 따른 세포생존율에는 유의한 차이는 없는 것으로 확인된다. 세리아 나노입자의 항산화 효과는 슈퍼옥사이드 음이온 분석을 사용하여 결정되었다. Ceria NRs_60, Ceria NRs_100, Ceria NPs_100, Ceria NCs_180는 LPS 자극 하에 대조군에 비해 슈퍼옥사이드 음이온의 생성을 감소시켰다(도 19B). 그리스시약을 사용하여 LPS 자극 하에 세포의 배양 배지로 NO의 주요 대사산물인 아질산염의 방출을 검추하였다. 그 결과 세포에 세리아 나노입자와 1 μg/mL의 LPS를 함께 처리한 경우 LPS만 처리한 그룹에 비해 24시간 및 48시간에 아질산염의 방출이 유의하게 감소했다(도 19C).세리아 나노입자는 대조군과 비교하여 SOD1 및 SOD2 mRNA의 발현을 감소시켰다(도 19D 및 E). Ceria NRs_60, Ceria NRs_100, Ceria NPs_100, Ceria NCs_180의 mRNA 발현 감소 정도는 대체로 나노입자 모양에 의존하는 경향을 보이며 Ceria NPs_100 및 Ceria NCs_180 보다 Ceria NRs_60 및 Ceria NRs_100이 SOD1 및 SOD2의 mRNA 수준을 잘 회복시켰다. 그 중에서도 Ceria NRs_60이 가장 우수한 성능을 보인다. 즉, Ceria NRs_60이 가장 우수한 항산화 효과를 가짐을 알 수 있다. 이때 SOD2의 mRNA 수준을 회복하는 것은 Ceria NRs_100이 다소 Ceria NRs_60에 비해 항산화 효과가 좋아 보이나(도 19D 참조) SOD1과 SOD2의 차이는 시토졸 또는 미토콘드리아 측정의 차이이며 통계적 유의성은 없는 것으로 확인된다. 또한, Ceria NRs_60 및 Ceria NRs_100는 Ceria NPs_100 및 Ceria NCs_180보다 낮은 수준의 TNF-α 및 IL-1β를 가졌다(도 19F 및 도 19G). 그 중에서도 Ceria NRs_60이 가장 낮은 수준을 보여 항염증 효과가 가장 우수함을 알 수 있다.

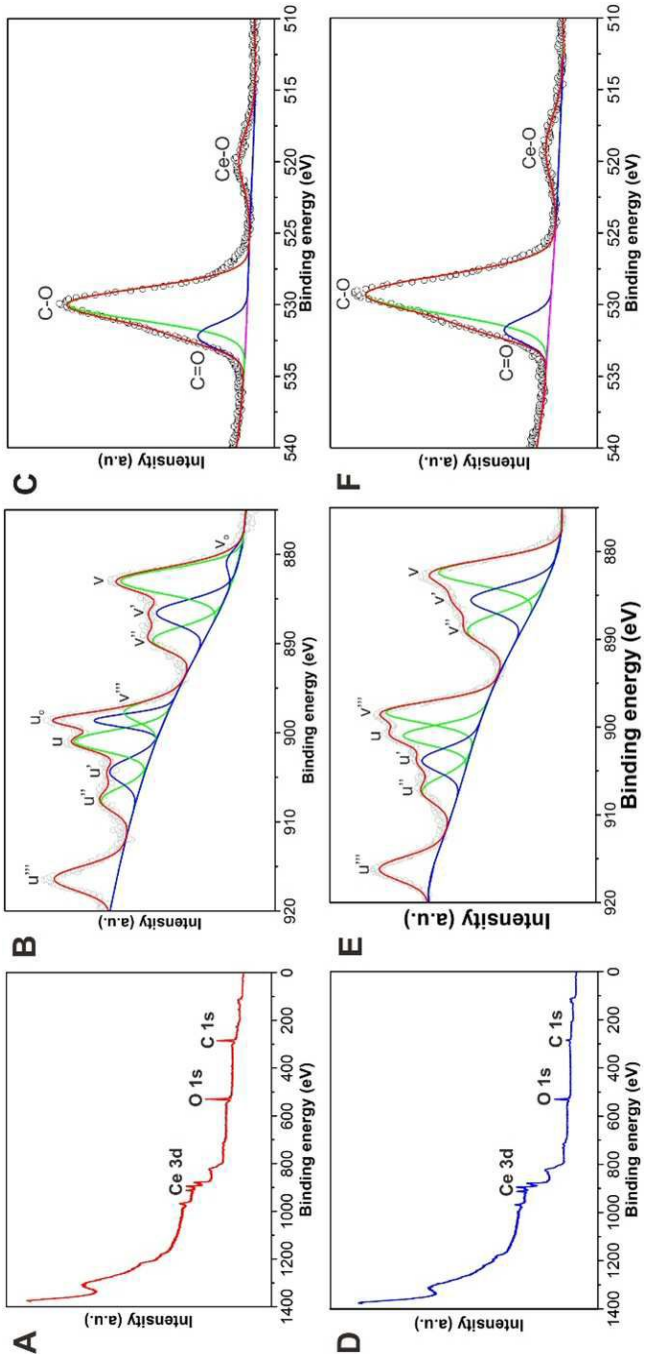
[0152] 이상에서 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본 발명의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본 발명의 권리범위에 속하는 것이다.

도면

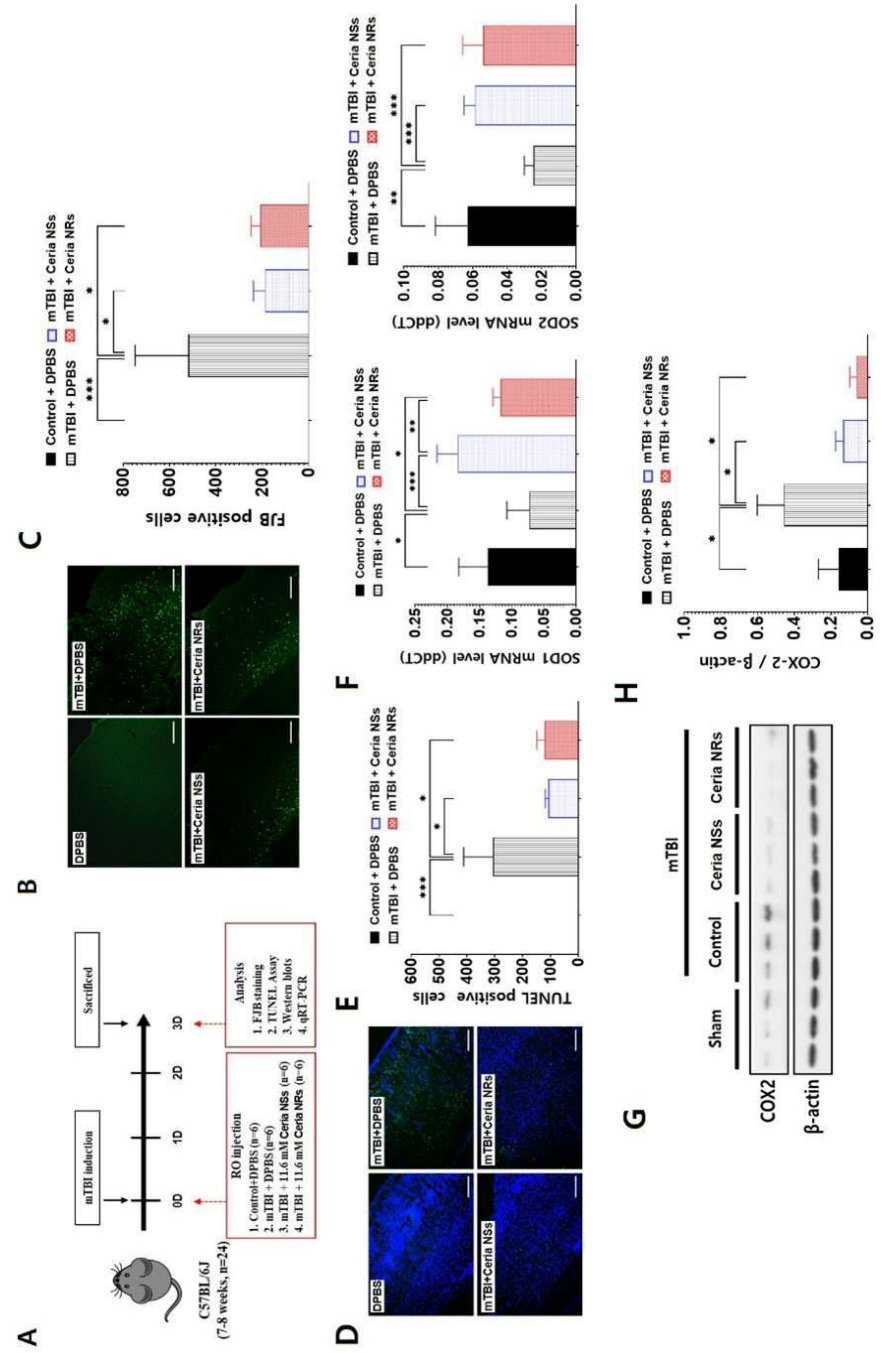
도면1


A
500 nm
B
50 nm
C
5 nm
D
5 1/nm
(111)
(200)
(220)
(311)
(222)
(400)
(331)
E
20 nm
F
5 nm
G
5 1/nm
H
Intensity (a.u.)
2 Theta (degree)
CeO2 NRs
CeO2 NSs

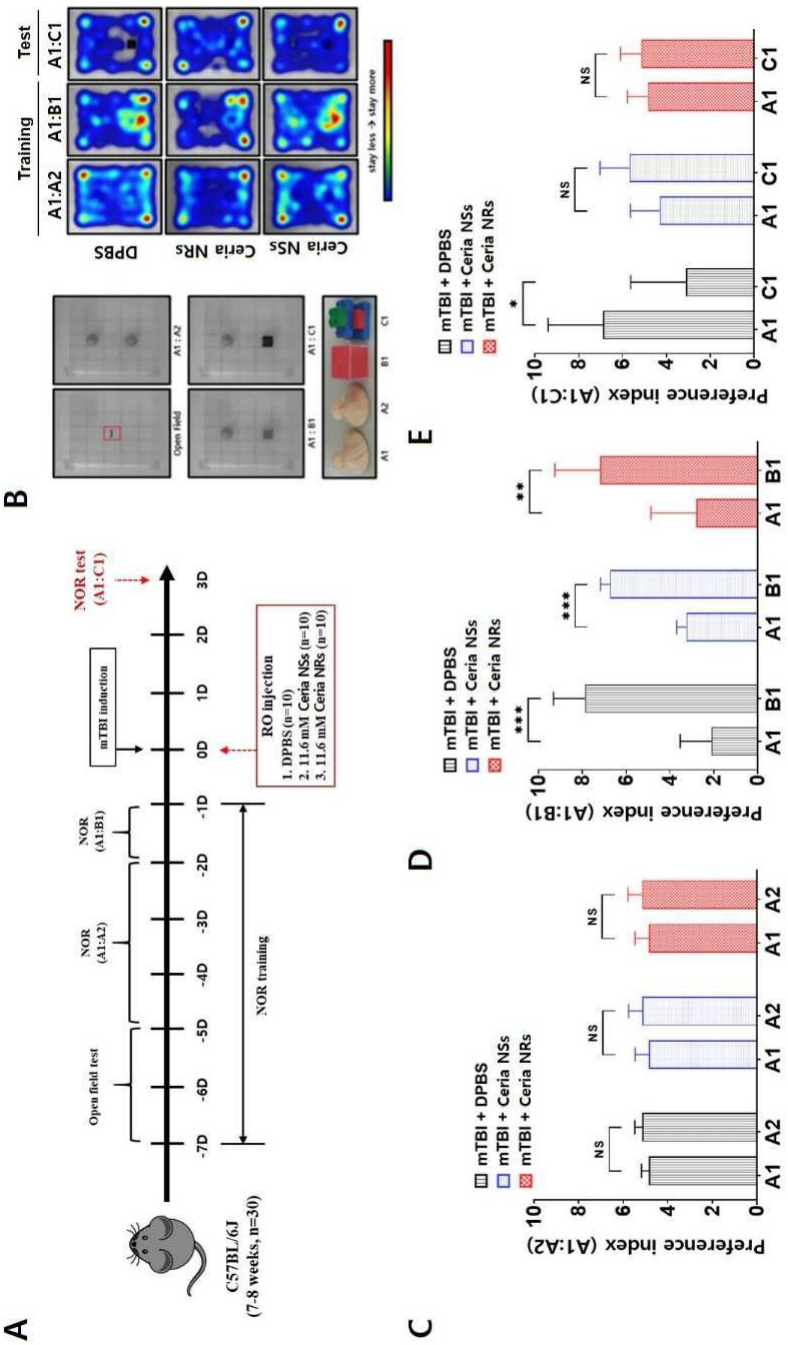
도면2


A
B
C
D
E
F
Intensity (a.u.)
Binding energy (eV)
Ce 3d
O 1s
C 1s
u'''
u''
u'
u
u°
v'''
v''
v'
v
v°
C=O
C-O
Ce-O

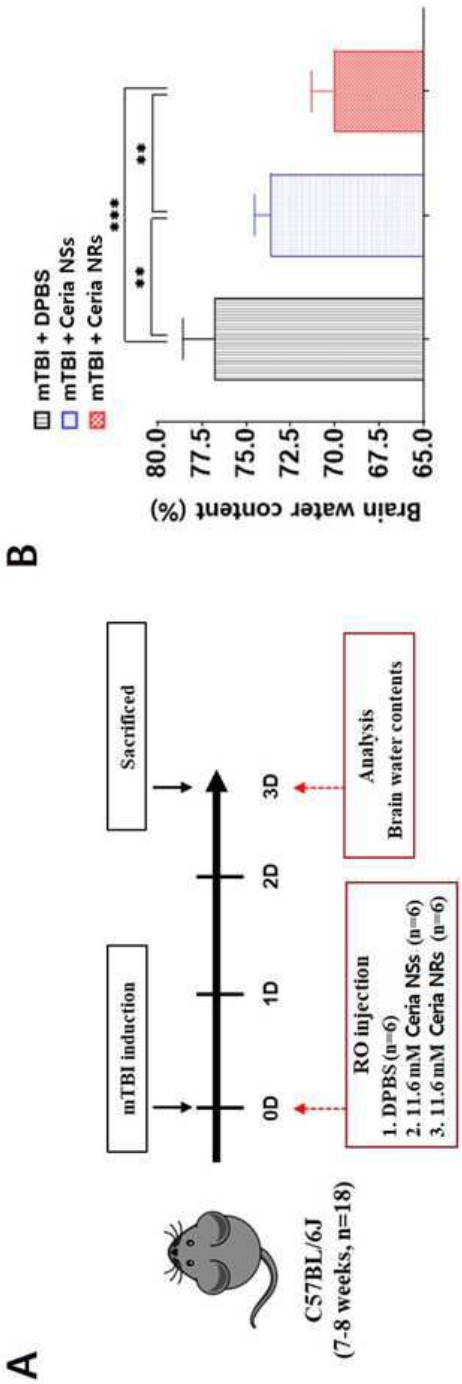
도면3


A
mTBI induction
Sacrificed
0D
1D
2D
3D
C57BL/6J
(7-8 weeks, n=24)
RO injection
1. Control+DPBS (n=6)
2. mTBI + DPBS (n=6)
3. mTBI + 11.6 mM Ceria NSs (n=6)
4. mTBI + 11.6 mM Ceria NRs (n=6)
Analysis
1. FJB staining
2. TUNEL Assay
3. Western blots
4. qRT-PCR
B
DPBS
mTBI+DPBS
mTBI+Ceria NSs
mTBI+Ceria NRs
C
Control + DPBS
mTBI + DPBS
mTBI + Ceria NSs
mTBI + Ceria NRs
FJB positive cells
D
E
TUNEL positive cells
F
SOD1 mRNA level (ddCT)
SOD2 mRNA level (ddCT)
G
mTBI
Sham
Control
Ceria NSs
Ceria NRs
COX2
β-actin
H
COX-2 / β-actin

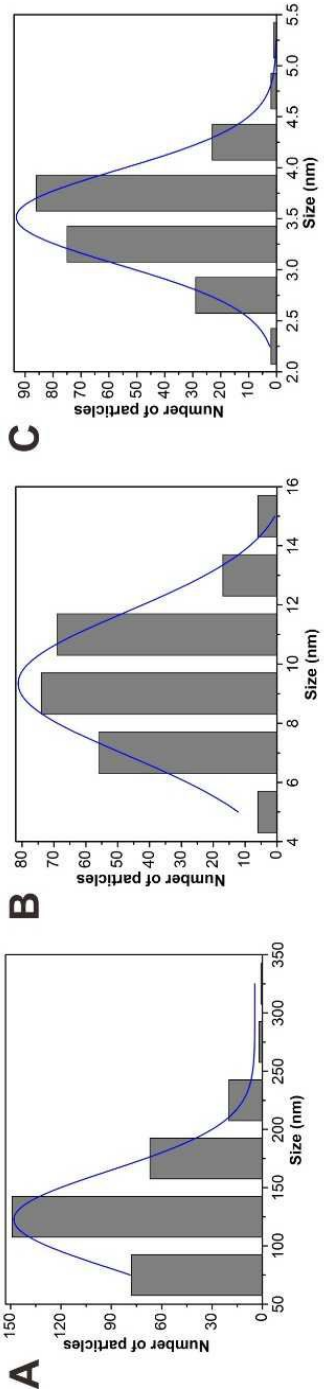
도면4


A
C57BL/6J
(7-8 weeks, n=30)
Open field test
NOR (A1:A2)
NOR (A1:B1)
mTBI induction
NOR test (A1:C1)
NOR training
RO injection
1. DPBS (n=10)
2. 11.6 mM Ceria NSs (n=10)
3. 11.6 mM Ceria NRs (n=10)
B
Training
Test
A1:A2
A1:B1
A1:C1
DPBS
Ceria NRs
Ceria NSs
stay less → stay more
Open field
C
mTBI + DPBS
mTBI + Ceria NSs
mTBI + Ceria NRs
Preference index (A1:A2)
NS
D
Preference index (A1:B1)
***
E
Preference index (A1:C1)
*
**

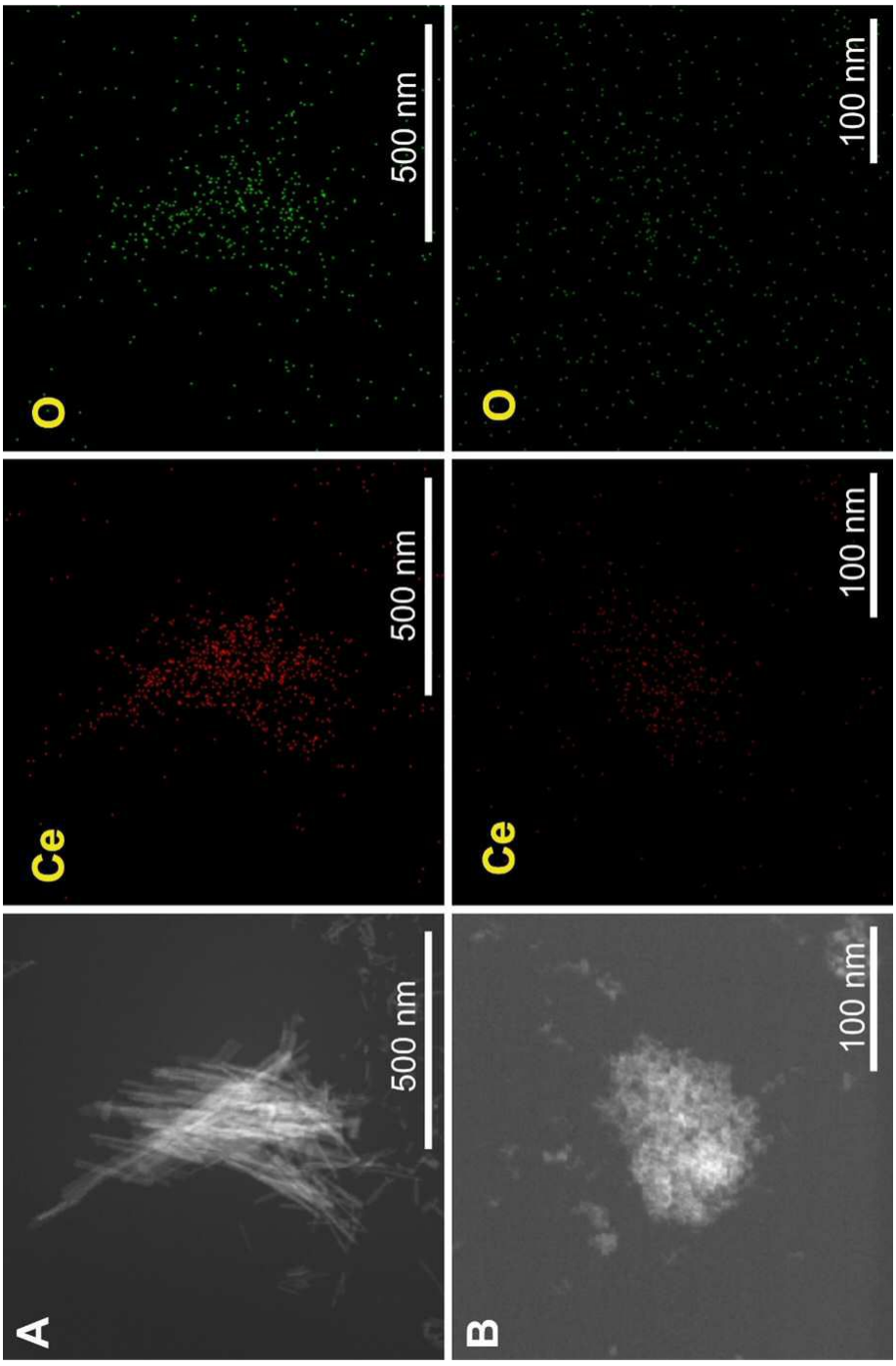
도면5


A
C57BL/6J
(7-8 weeks, n=18)
mTBI induction
Sacrificed
0D
1D
2D
3D
RO injection
1. DPBS (n=6)
2. 11.6 mM Ceria NSs (n=6)
3. 11.6 mM Ceria NRs (n=6)
Analysis
Brain water contents
B
mTBI + DPBS
mTBI + Ceria NSs
mTBI + Ceria NRs
Brain water content (%)
80.0
77.5
75.0
72.5
70.0
67.5
65.0
**
***
**

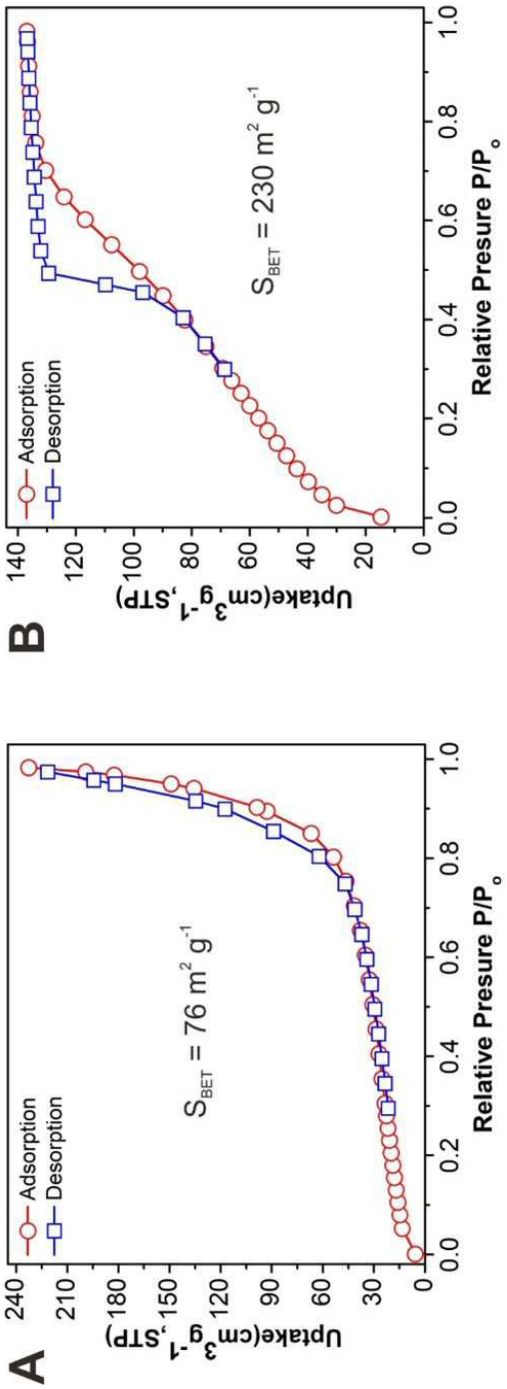
도면6


A
Number of particles
Size (nm)
B
Number of particles
Size (nm)
C
Number of particles
Size (nm)

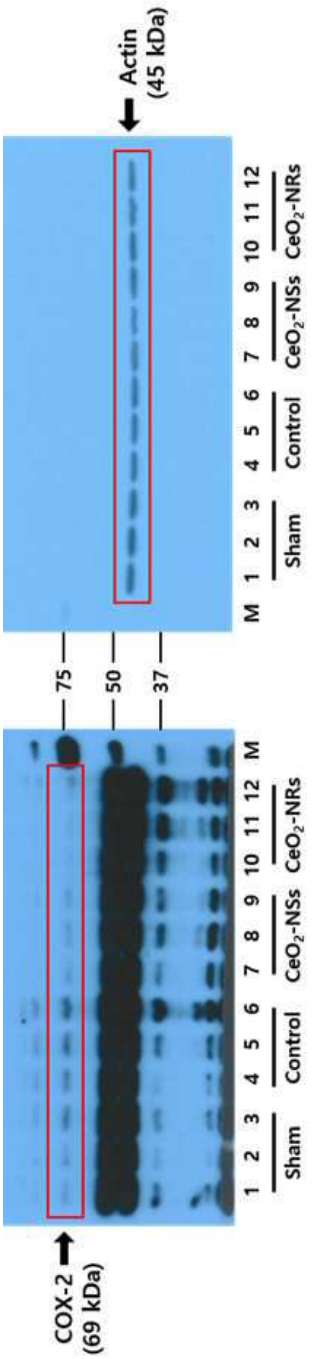
도면7



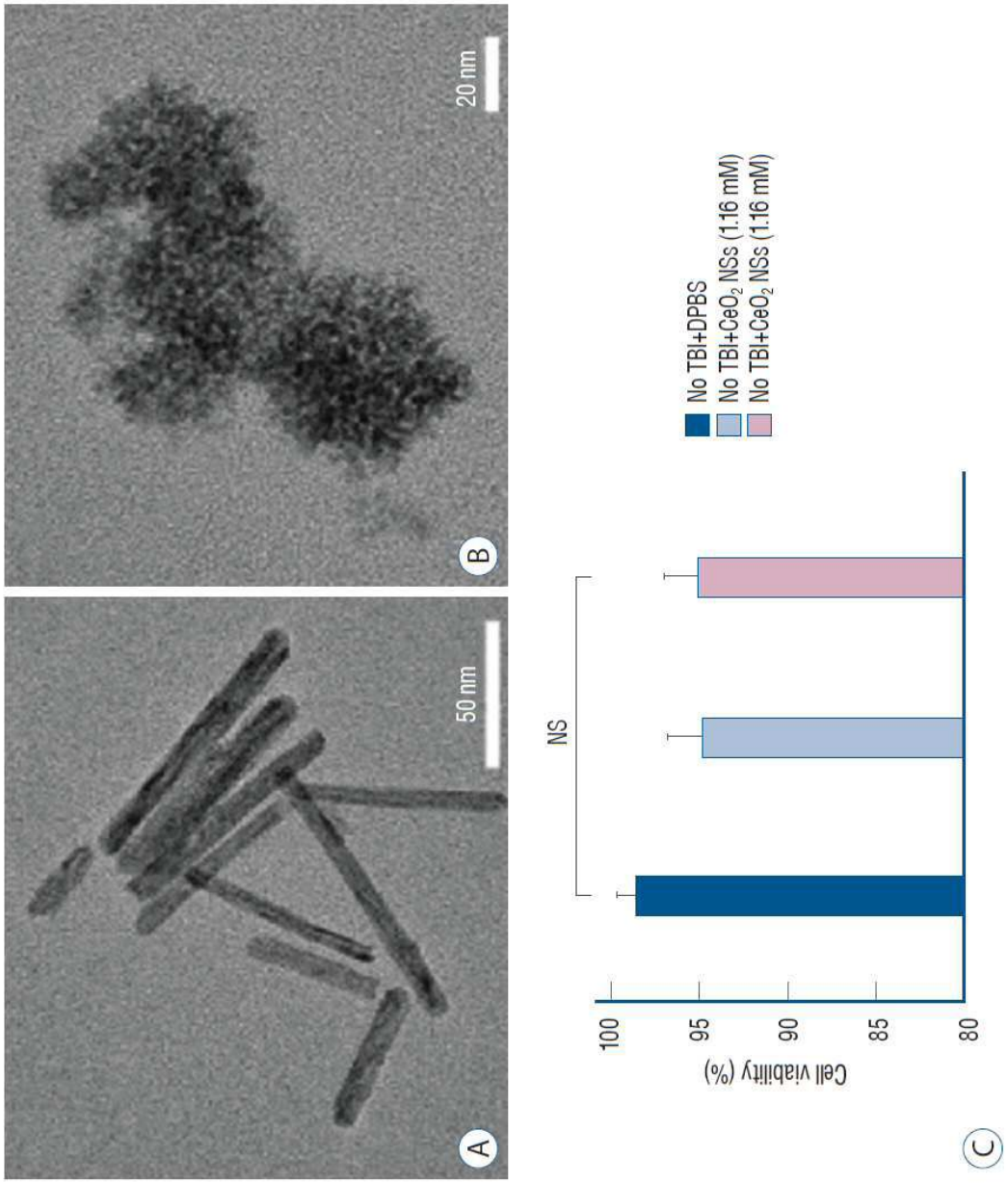
도면8


A
Uptake(cm3g-1,STP)
Relative Presure P/P0
Adsorption
Desorption
SBET = 76 m2 g-1
B
Uptake(cm3g-1,STP)
Relative Presure P/P0
Adsorption
Desorption
SBET = 230 m2 g-1

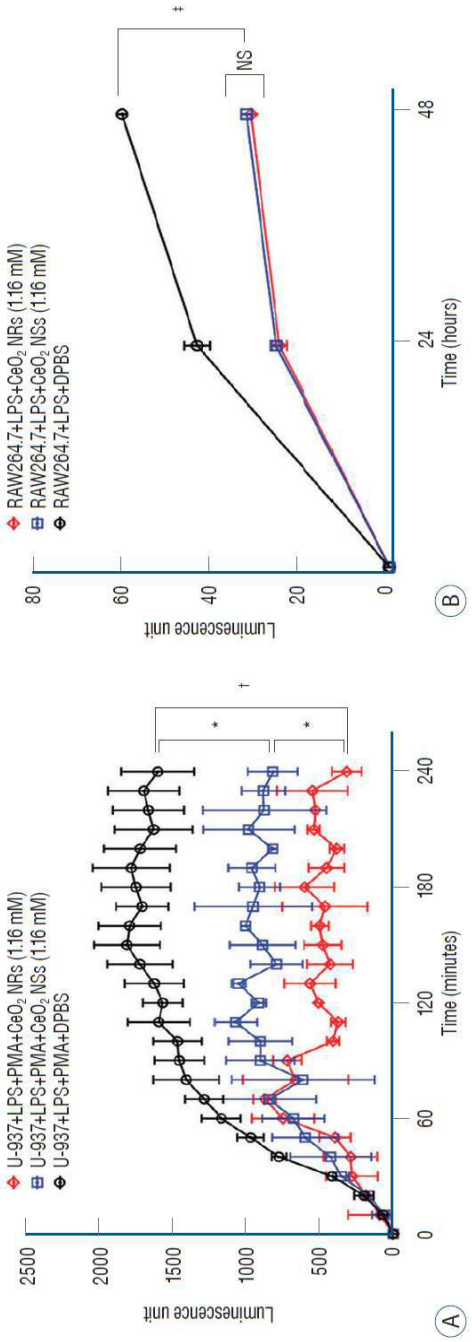
도면9


Actin
(45 kDa)
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
Sham
Control
CeO2-NSs
CeO2-NRs
75
50
37
COX-2
(69 kDa)
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 M
Sham
Control
CeO2-NSs
CeO2-NRs

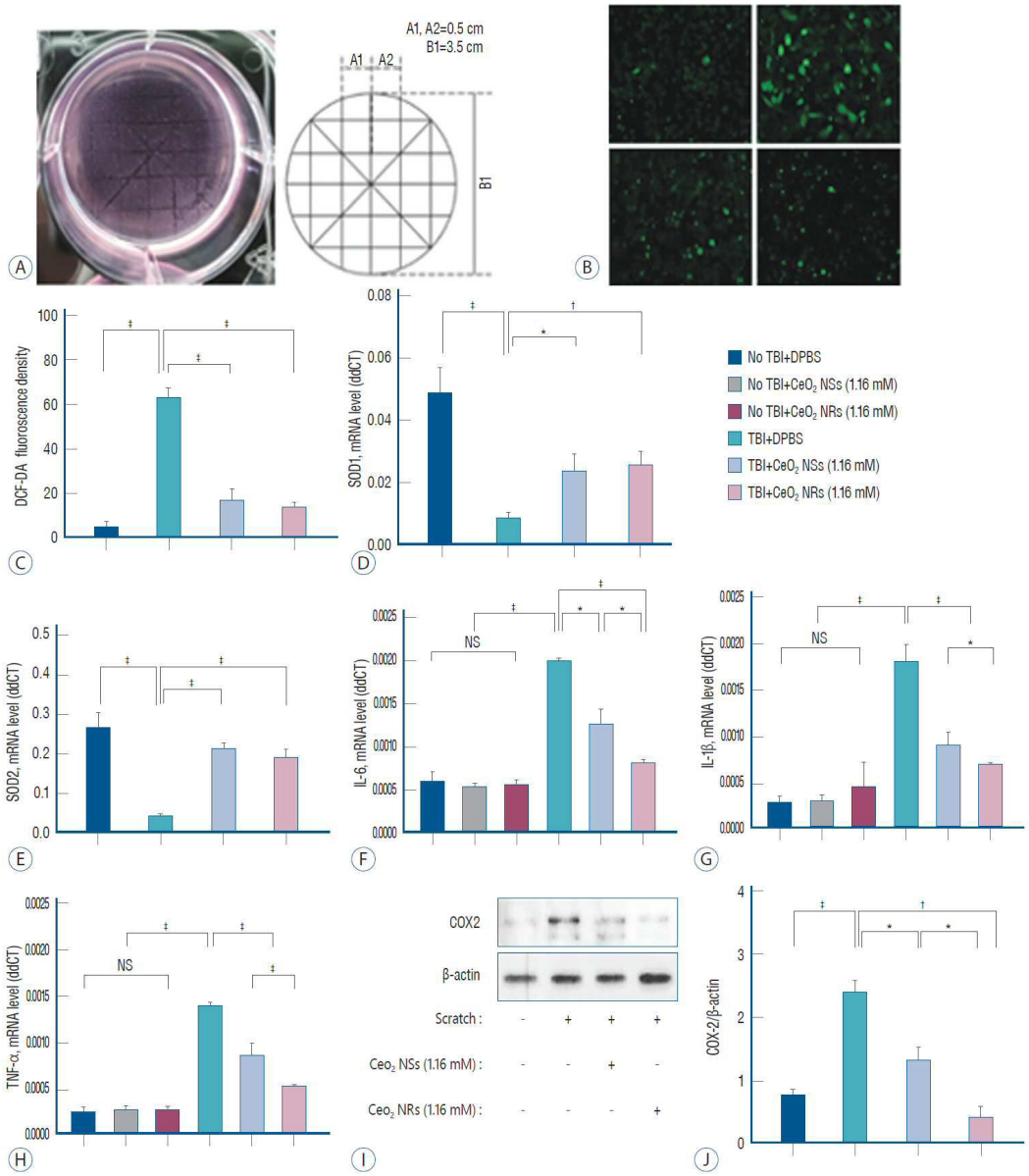
도면10


A
50 nm
B
20 nm
C
No TBI+DPBS
No TBI+CeO2 NSs (1.16 mM)
No TBI+CeO2 NSs (1.16 mM)
NS
Cell viability (%)
100
95
90
85
80

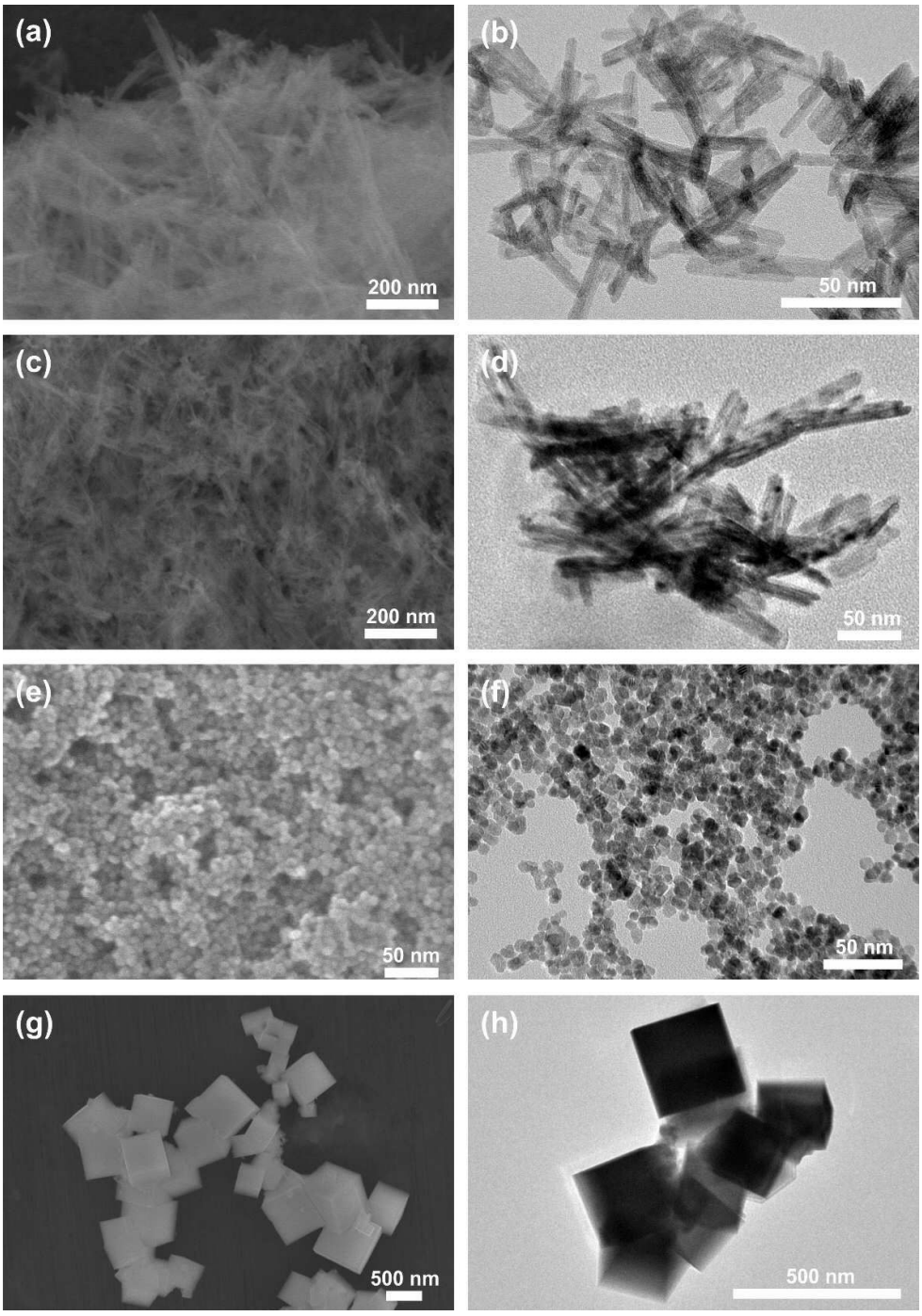
도면11


RAW264.7+LPS+CeO2 NRs (1.16 mM)
RAW264.7+LPS+CeO2 NSs (1.16 mM)
RAW264.7+LPS+DPBS
Luminescence unit
Time (hours)
NS
++
(B)
U-937+LPS+PMA+CeO2 NRs (1.16 mM)
U-937+LPS+PMA+CeO2 NSs (1.16 mM)
U-937+LPS+PMA+DPBS
Luminescence unit
Time (minutes)
*
*
+
(A)

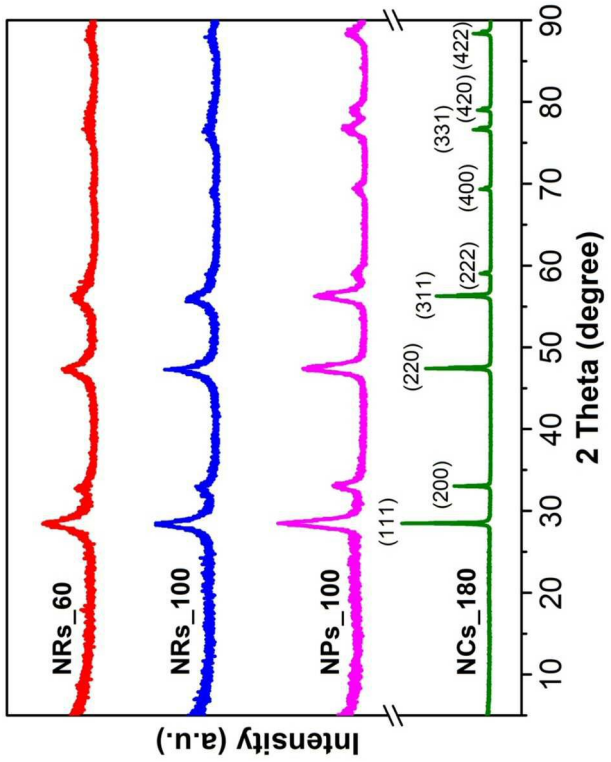
도면12


A1, A2=0.5 cm
B1=3.5 cm
A1
A2
B1
A
B
DCF-DA fluorescence density
C
SOD1, mRNA level (ddCT)
D
No TBI+DPBS
No TBI+CeO2 NSs (1.16 mM)
No TBI+CeO2 NRs (1.16 mM)
TBI+DPBS
TBI+CeO2 NSs (1.16 mM)
TBI+CeO2 NRs (1.16 mM)
SOD2, mRNA level (ddCT)
E
IL-6, mRNA level (ddCT)
NS
F
IL-1β, mRNA level (ddCT)
NS
G
TNF-α, mRNA level (ddCT)
NS
H
COX2
β-actin
Scratch :
Ceo2 NSs (1.16 mM) :
Ceo2 NRs (1.16 mM) :
I
COX-2/β-actin
J

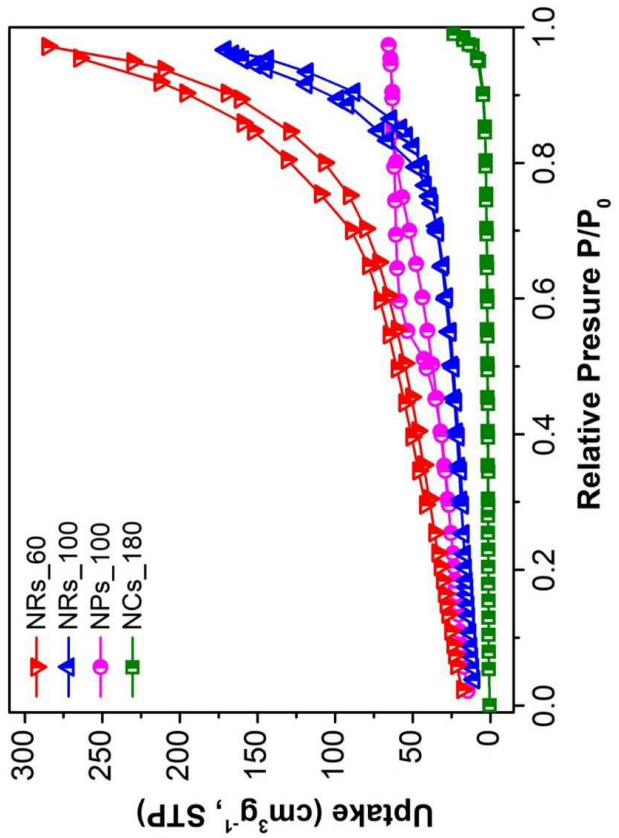
도면13



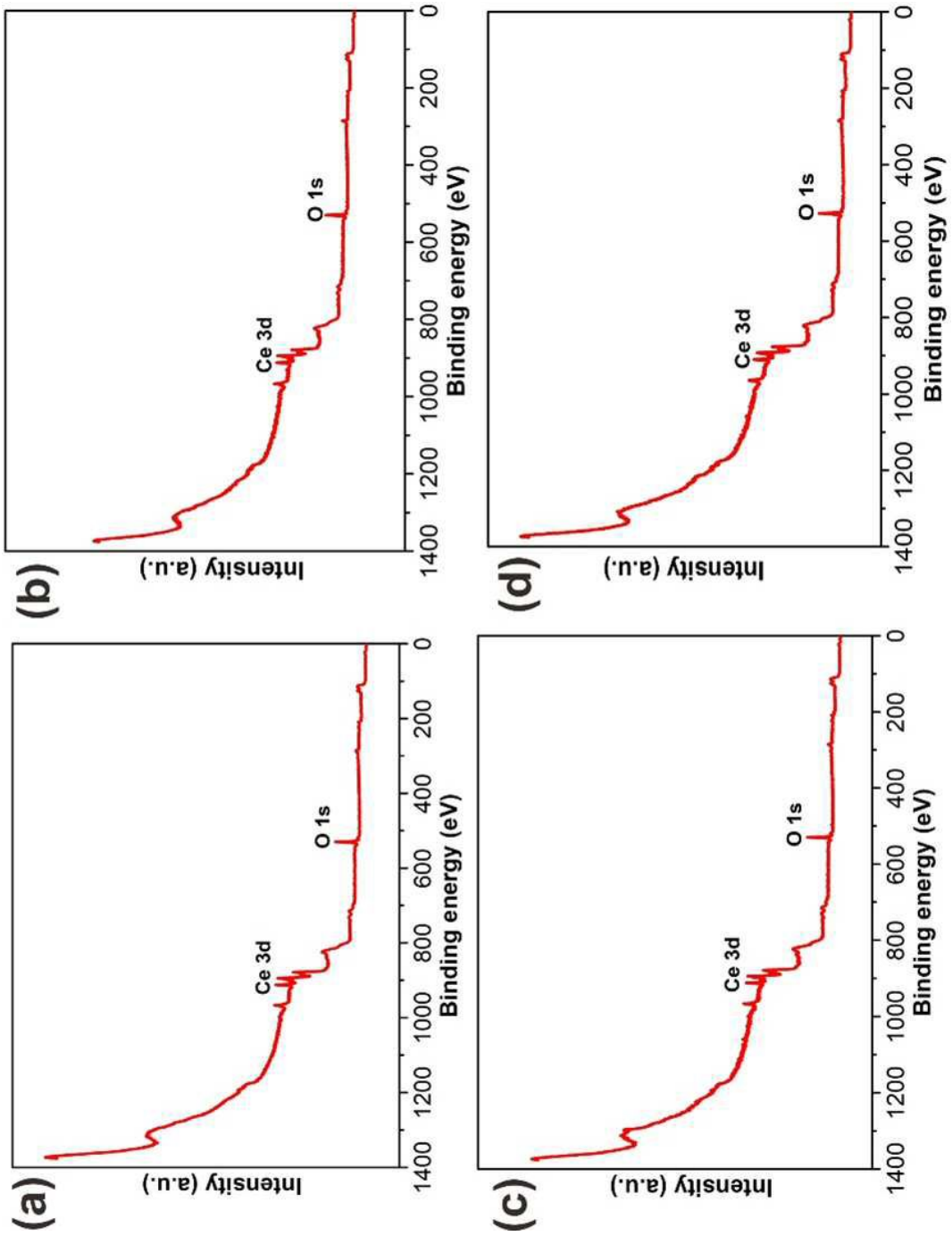
도면14


NRs_60
NRs_100
NPs_100
NCs_180
(111)
(200)
(220)
(311)
(222)
(400)
(331)
(420)
(422)
Intensity (a.u.)
2 Theta (degree)
10
20
30
40
50
60
70
80
90

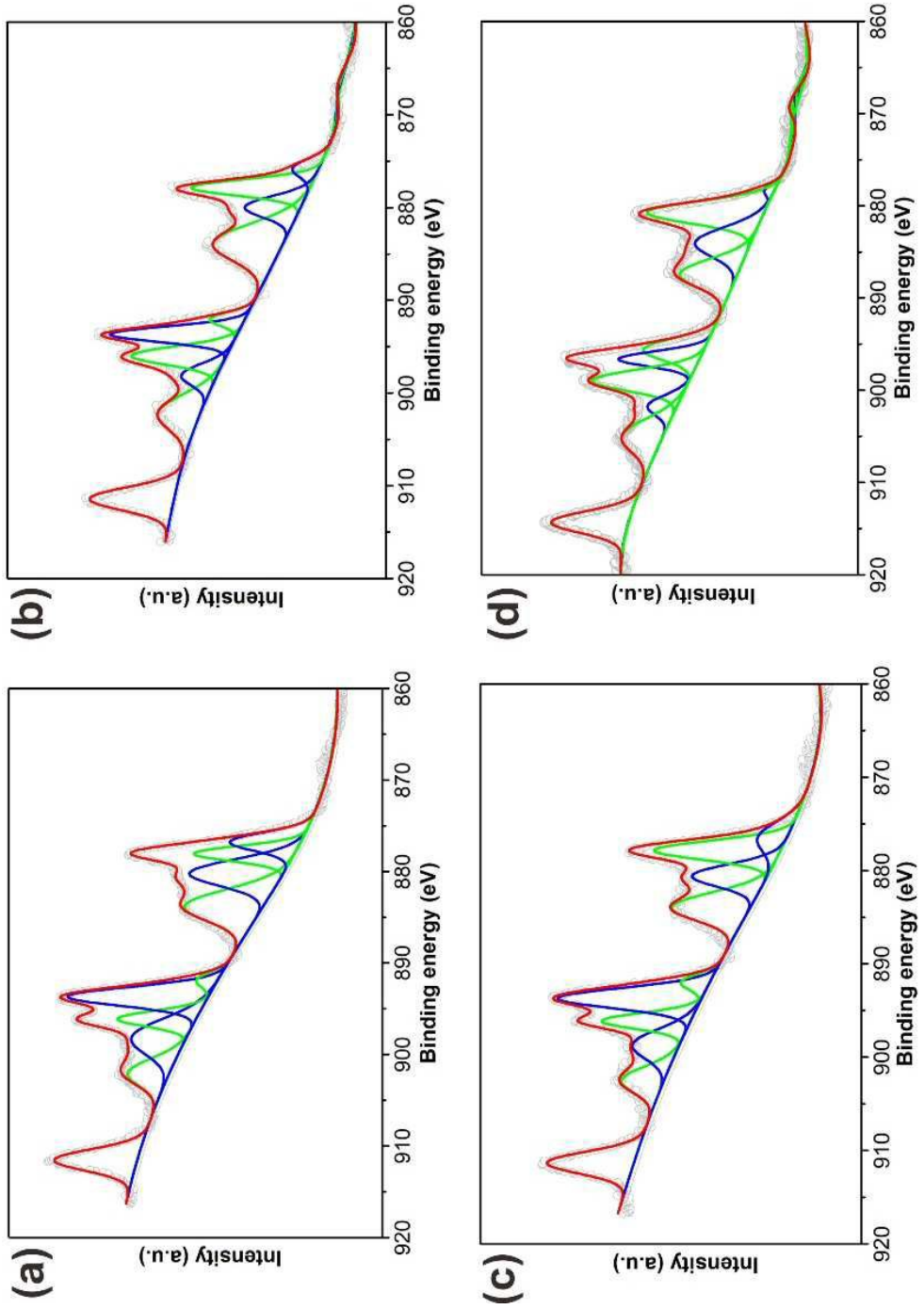
도면15


NRs_60
NRs_100
NPs_100
NCs_180
Uptake (cm³g⁻¹, STP)
Relative Presure P/P₀
0
50
100
150
200
250
300
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0

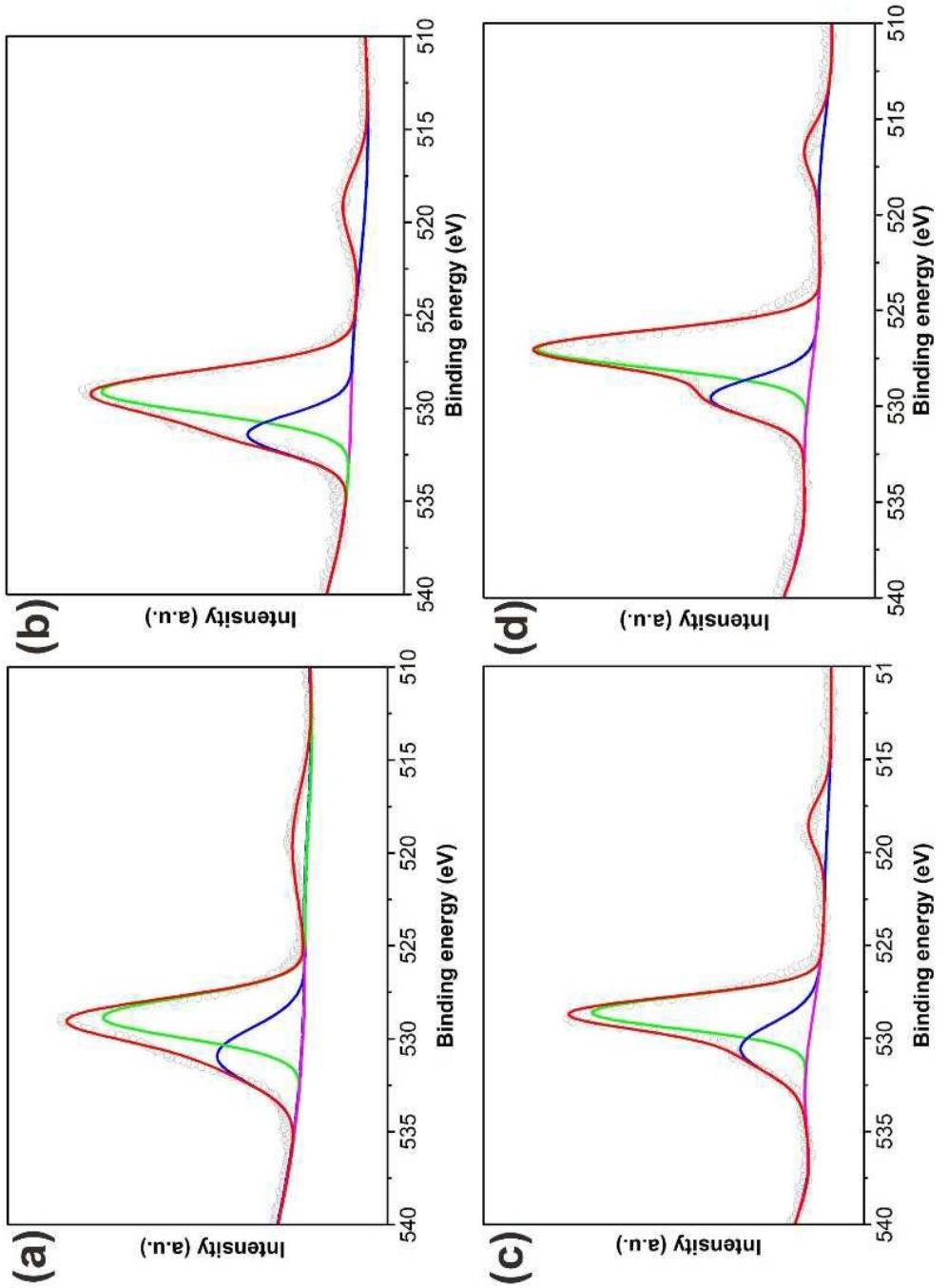
도면16


(a)
(b)
(c)
(d)
Intensity (a.u.)
Binding energy (eV)
Ce 3d
O 1s
0
200
400
600
800
1000
1200
1400

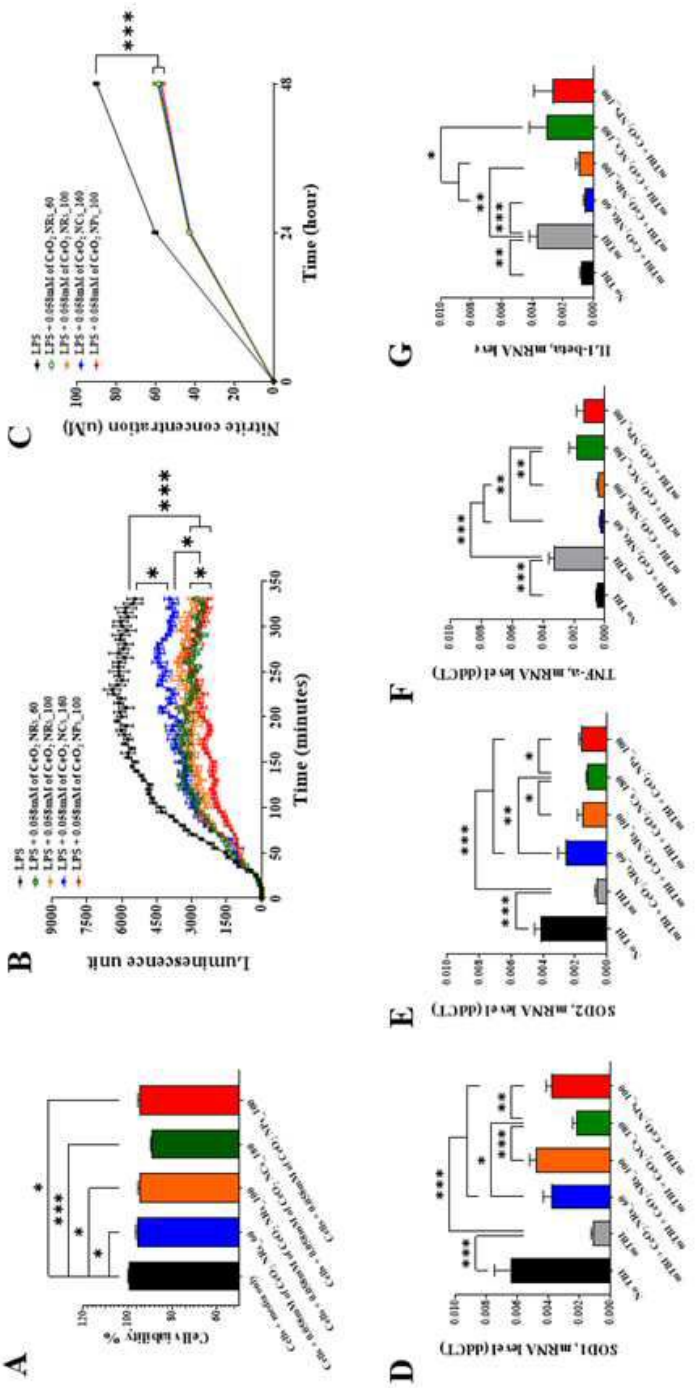
도면17


(a)
(b)
(c)
(d)
Intensity (a.u.)
Binding energy (eV)
860
870
880
890
900
910
920

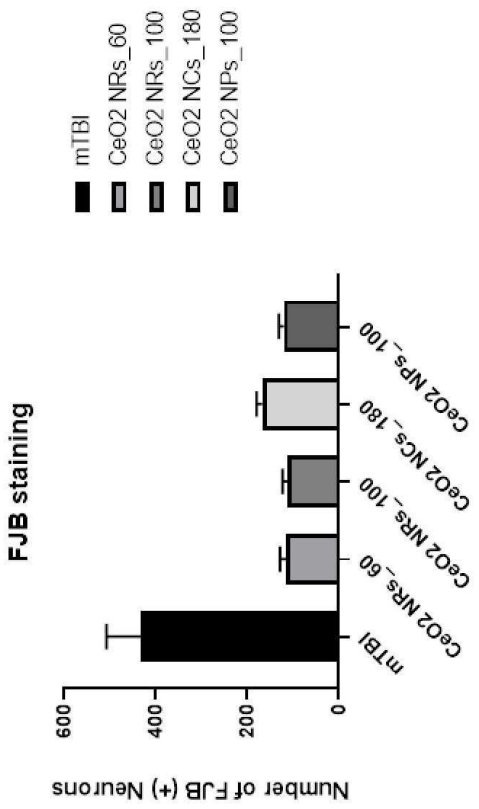
도면18


(a)
(b)
(c)
(d)
Intensity (a.u.)
Binding energy (eV)
510
515
520
525
530
535
540

도면19


A
Cell viability %
B
Luminescence unit
Time (minutes)
C
Nitrite concentration (uM)
Time (hour)
D
SOD1, mRNA level (ddCT)
E
SOD2, mRNA level (ddCT)
F
TNF-α, mRNA level (ddCT)
G
IL1-beta, mRNA lev

도면20


mTBI
CeO2 NRs_60
CeO2 NRs_100
CeO2 NCs_180
CeO2 NPs_100
FJB staining
Number of FJB (+) Neurons
0
200
400
600
mTBI
CeO2 NRs_60
CeO2 NRs_100
CeO2 NCs_180
CeO2 NPs_100