(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0053506
(43) 공개일자 2022년04월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/51 (2006.01) *A61K 31/357* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/5115 (2013.01)
A61K 31/357 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0141811
(22) 출원일자 2021년10월22일
심사청구일자 2021년10월22일
(30) 우선권주장
1020200137876 2020년10월22일 대한민국(KR)

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
김연주
경기도 성남시 분당구 동판교로 275, 107동 801호 (삼평동, 봇들마을1단지)
미 샤오지예
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 경희대학교 국제캠퍼스 연구동 B, 113호 (서천동)
최한솔
인천광역시 남동구 논고개로68번길 49, 103동 704호 (논현동, 힐스테이트아파트)
(74) 대리인
특허법인(유한)아이시스

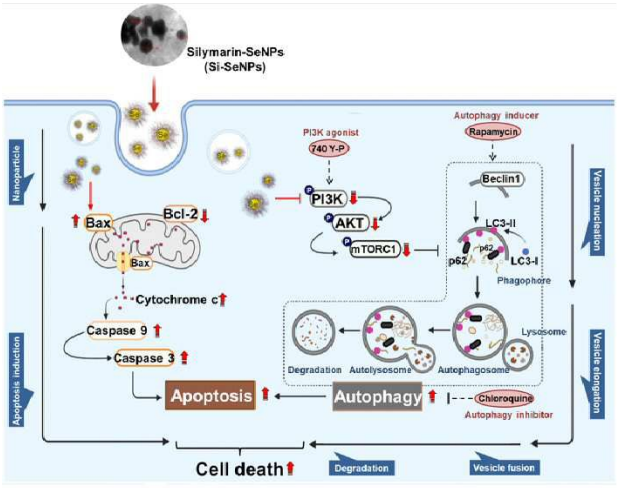
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **실리마린 매개된 셀레늄 나노입자 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 실리마린 매개된 셀레늄 나노입자에 관한 것으로, 일 예에 따른 실리마린 매개된 셀레늄 나노입자는 실리마린의 한계(예를 들면, 물과 지질에서의 낮은 용해도와 장 흡수율, 생체 이용률 등)을 개선하여 보다 효과적이고 안전한 항암제로 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도8



Human gastric cancer cell

(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711110161
과제번호 2019R1A2C1010428
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공분야기초연구사업/중견연구
연구과제명 신장 및 간세포에서 uric acid 축적을 억제하는 신규 희귀사포닌 금나노 곤충 펩타이드 결합체 대량생산 및 작용메카니즘 규명
기 여 율 1/2
과제수행기관명 경희대학교
연구기간 2019.03.01 ~ 2022.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 0131732020
과제번호 PJ0131732020
부처명 농림축산식품부
과제관리(전문)기관명 농촌진흥청
연구사업명 차세대 바이오그린 21/시스템합성 농생명공학사업
연구과제명 시스템생물학 기반 유용신소재 생산을 위한 식물세포기능 향상 연구
기 여 율 1/2
과제수행기관명 경상대학교 산학협력단
연구기간 2018.01.01 ~ 2020.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

실리마린 매개된 셀레늄 나노입자.

청구항 2

제1항에 있어서, 셀레늄 나노입자 표면에 실리마린 유래 플라보노리그난(flavonolignan)을 포함하는 것인, 나노입자.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 실리마린은 실리크리스틴(silychristin), 실리빈 A(silybin A), 실리빈 B(silybin B), 이소실리빈 A(isosilybin A), 이소실리빈 B(isosilybin B), 및 실리디아닌(silydianin)으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것인, 나노입자.

청구항 4

제1항에 있어서, 평균 크기가 10 내지 100nm인, 나노입자.

청구항 5

제1항에 있어서, 단면이 원 또는 n각형(n은 3 내지 10에서 선택되는 정수)인 입자이거나 이들의 조합을 포함하는, 나노입자.

청구항 6

제1항에 있어서, 적혈구에 처리시 적혈구를 5% 미만으로 용혈시키는 것인, 나노입자.

청구항 7

제1항에 있어서, 실리마린 보다 정상세포에 대한 세포 독성이 감소된 것인, 나노입자.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 나노입자를 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 암은 위암, 간암, 결장암, 유방암, 폐암, 비소세포성폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부암, 두경부암, 흑색종, 자궁암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암, 자궁경부암, 질암, 음문암, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 전립선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 신장암, 수뇨관암, 신장골반암, 혈액암, 뇌암, 중추신경계(CNS; central nervous system) 종양, 척수 종양, 뇌간 신경교종, 및 뇌하수체 선종으로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상인, 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서, (1) BAX의 활성이 약화 또는 불활성화, (2) BCL-2의 활성이 강화, 및 (3) PI3K/Akt/mTOR 경로가 활성화로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 특징을 갖는 환자에 적용하기 위한 것인, 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 나노입자를 포함하는, 암세포 사멸 유도용 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 암세포는 간암 세포, 자궁경부암 세포, 폐암 세포, 및 위암 세포로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상인, 조성물

청구항 13

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 나노입자를 포함하는, 약물 전달용 조성물.

청구항 14

생물학적 시료에서 (1) BAX의 활성이 약화 또는 불활성화, (2) BCL-2의 활성이 강화, 및 (3) PI3K/Akt/mTOR 경로가 활성화로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 확인하는 단계를 포함하는, 실리마린 매개된 셀레늄 나노입자의 투여에 의한 암 치료에 적절한 환자 선별에 정보를 제공하는 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 암은 위암, 간암, 결장암, 유방암, 폐암, 비소세포성폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부암, 두경부암, 흑색종, 자궁암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암, 자궁경부암, 질암, 음문암, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 전립선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 신장암, 수뇨관암, 신장골반암, 혈액암, 뇌암, 중추신경계(CNS; central nervous system) 종양, 척수 종양, 뇌간 신경교종, 및 뇌하수체 선종으로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상인, 방법

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 실리마린 매개된 셀레늄 나노입자 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근 몇 년 동안 실리마린의 암세포에 대한 세포 사멸 유도, 성장 억제, 전이 및 항염증 활성이 보고되고 있다. 실리마린은 물과 지질 용해도가 낮고 장 흡수율이 20~40%로 낮기 때문에 생체 이용률이 낮아 암을 표적으로 하는 임상 적용을 제한한다. 낮은 생체 이용률 및 용해도를 가진 항암제의 결함을 개선하기 위해 금, 은 및 이산화 티타늄 등의 나노 입자가 등장했지만 금속 나노 물질은 금속 이온을 누출하고 조직에 과도하게 축적되어 인체 건강에 좋지 않은 영향을 미칠 수 있다.

[0003] 한편, 유기체에서 생물학적 효소의 필수 미량 원소이자 핵심 성분인 셀레늄은 금속에 비해 이상적인 안전성, 생체 적합성 및 분해성을 보여준다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 실리마린 매개된 셀레늄 나노입자를 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 상기 실리마린 매개된 셀레늄 나노입자를 포함하는 암 예방 및/또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 실리마린 매개된 셀레늄 나노입자를 포함하는 암세포 사멸 유도용 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 실리마린 매개된 셀레늄 나노입자를 포함하는 약물 전달용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 실리마린 매개된 셀레늄 나노입자의 투여에 의한 암 치료에 적절한 환자 선별에 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 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.

[0013] 상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양상은, 실리마린 매개된 셀레늄 나노입자를 제공하는 것이다.

[0014] 본 명세서에서, "나노입자"는 나노 단위의 직경을 가지는 입자를 의미한다.

[0015] 상기 실리마린 매개된 셀레늄 나노입자는 실리마린 및 셀레늄 전구체(예를 들면, 아셀렌나트륨(sodium selenite; Na_2SeO_3) 용액 또는 selenious acid solution (aqueous solution of SeO_2))을 혼합하여 생물학적 환원(biological reduction) 반응에 의해 수득한 것일 수 있고, 예를 들면, 실리마린(또는 실리마린 유래 생물학적 물질(biological substances), 예를 들면 플라보노리그난)에 의해 셀레늄(또는 셀레늄 나노입자)이 캡핑되고(둘러싸이고) 안정화(stabilized)되어 실리마린 매개된 셀레늄 나노입자가 제조될 수 있다. 일 예에서, 실리마린은 Se 원소의 환원 및/또는 상기 셀레늄 나노입자의 안정화제로서의 역할을 할 수 있다. 일 예에서 실리마린 매개된 셀레늄 나노입자가 성공적으로 제조되면, 상기 실리마린 매개된 셀레늄 나노입자를 포함하는 용액은 적색을 나타낼 수 있다.

[0016] 일 예에 따르면, 상기 실리마린 매개된 셀레늄 나노입자는 상기 셀레늄 나노입자 표면에 실리마린 유래 생물학적 물질(예를 들면 플라보노리그난(flavonolignan))을 포함하는 것일 수 있다. 일 예에 따르면, 상기 실리마린 매개된 셀레늄 나노입자는 셀레늄 나노입자 주변에 실리마린으로부터 유래한 생물학적 물질이 캡핑되어 형성된 실리마린(또는 실리마린 유래 생물학적 물질)-셀레늄 나노입자의 복합체일 수 있다.

[0017] 상기 실리마린(Silymarin)은, 해바라기와 데이지가 속해있는 국화과 식물인 엉겅퀴(*Silybum marianum*; 학명은 Silybum marianum (L.) Gaertn이고, 이명은 Carduus silybum, 또는 밀크씨슬(Milk Thistle))에 포함된 기능 성분을 의미하며, silybin A, silybin B, isosilybin A, isosilybin B, silychristin, 및/또는 silydianin 등의 플라보노리그난(flavonolignan) 화합물을 포함할 수 있다. 상기 실리마린은 천연물(예를 들면, 밀크씨슬)에서 추출 및/또는 분리하여 얻거나 통상적인 유기합성 방법으로 제조할 수 있으나 이에 한정하지 않는다.

[0018] 상기 실리마린(또는 상기 실리마린 유래 플라보노리그난)은 실리크리스틴(silychristin), 실리빈 A(silybin A), 실리빈 B(silybin B), 이소실리빈 A(isosilybin A), 이소실리빈 B(isosilybin B), 및 실리디아닌(silydianin)으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있다.

[0019] 상기 실리마린 매개된 셀레늄 나노입자는 평균 크기(또는 직경, 입경)가 10 내지 100nm, 20 내지 100nm, 30 내지 100nm, 10 내지 90nm, 10 내지 80nm, 20 내지 90nm, 또는 20 내지 80nm, 30 내지 90nm, 또는 30 내지 80nm 일 수 있다.

[0020] 상기 실리마린 매개된 셀레늄 나노입자는, 단면이 원 또는 n각형(n은 3 내지10에서 선택되는 정수)인 입자이거나 이들의 조합(예를 들면, 단면이 원인 입자 및 단면이 다각형(n이 n 내지 10 중 선택되는 정수인 n각형)인 입자에서 선택된 1종 이상의 조합)을 포함할 수 있다. 상기 n 각형은 예를 들면 삼각형, 사각형, 오각형, 및/또는 육각형일 수 있다.

[0021] 상기 실리마린 매개된 셀레늄 나노입자는 정상세포(예를 들면, 정상 포유동물 세포(예를 들면, RAW264.7, NHDF, 및/또는 HEK293 세포))에 대해 세포 독성을 나타내지 않는 것일 수 있고, 예를 들면 5㎍/mL 이상, 6.4㎍/mL 이상, 7.5㎍/mL 이상, 10㎍/mL 이상, 15㎍/mL 이상, 20㎍/mL 이상, 25㎍/mL 이상, 25.4㎍/mL 이상, 30㎍/mL 이상, 40㎍/mL 이상, 또는 50㎍/mL이상의 농도로 일 예에 따른 실리마린 매개된 셀레늄 나노입자를 처리하여도 정상세포에 대한 세포 독성이 나타나지 않음(예를 들면, 정상세포가 5% 이상, 10% 이상, 또는 20% 이상 사멸하지 않는 것) 수 있다. 일 예에 따른 실리마린 매개된 셀레늄 나노입자는 정상세포에 대해 실리마린 보다 세포 독성이 감소된 것(또는 세포 독성을 나타내지 않는; 예를 들면, 정상세포의 세포 사멸 및/또는 형태 변화 정도가 적은 것) 일 수 있다.

[0022] 상기 실리마린 매개 셀레늄 나노입자는 적혈구에 처리시 적혈구를 10% 미만, 7.5% 미만, 5% 미만, 3% 미만, 2.5% 미만, 또는 2% 미만으로 용혈시키는 것일 수 있다. 상기 범위로 적혈구를 용혈시킴으로서 일 예에 따른 실리마린 매개 셀레늄 나노입자는 생체 적합하고, 생체 내에 투입되어도 안전할 수 있다.

[0024] 다른 양상은 상기 실리마린 매개된 셀레늄 나노입자를 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0025] 일 예에서, 상기 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 염을 추가로 포함할 수 있다. 본 명세서에서, "약학적으로 허용 가능한 염"이란 양이온과 음이온이 정전기적 인력에 의해 결합하고 있는 물질인 염 중에서도 약제학적으로 사용될 수 있는 형태의 염을 의미하는데, 통상적으로 금속염, 유기 염기와의 염, 무기산과의 염, 유기산과의 염, 염기성 또는 산성 아미노산과의 염 등이 될 수 있다. 예를 들어, 금속염으로는 알칼리 금속염(나트륨염, 칼륨염 등), 알칼리 토금속염(칼슘염, 마그네슘염, 바륨염 등), 알루미늄염 등이 될 수 있고; 유기 염기와의 염으로는 트리에틸아민, 피리딘, 피콜린, 2,6-루티딘, 에탄올아민, 디에탄올아민, 트리에탄올아민, 시클로헥실아민, 디시클로헥실아민, N,N-디벤질에틸렌디아민 등과의 염이 될 수 있으며; 무기산과의 염으로는 염산, 브롬화수소산, 질산, 황산, 인산 등과의 염이 될 수 있고; 유기산과의 염으로는 포름산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 프탈산, 푸마르산, 옥살산, 타르타르산, 말레인산, 시트르산, 숙신산, 메탄술폰산, 벤젠술폰산, p-톨루엔술폰산 등과의 염이 될 수 있으며; 염기성 아미노산과의 염으로는 아르기닌, 라이신, 오르니틴 등과의 염이 될 수 있고; 산성 아미노산과의 염으로는 아스파르트산, 글루탐산 등과의 염이 될 수 있다.

[0026] 상기 암 예방 또는 치료용 약학 조성물은 (1) BAX의 활성이 약화 또는 불활성화, (2) BCL-2의 활성이 강화, 및 (3) PI3K/Akt/mTOR 경로가 활성화로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 특징을 갖는 환자에 적용하기 위한 것일 수 있다. 상기 환자는 인간 등의 영장류, 마우스 등의 설치류 등을 포함하는 포유류 또는 인간을 제외한 포유류일 수 있다. 일 예에 따른 실리마린 매개된 셀레늄 나노입자는 Bax 활성화, Bcl-2 활성 억제 및 PI3K/Akt/mTOR 경로 활성 억제를 유도하여, 세포의 아폽토시스, 및/또는 자가포식을 억제하여 암세포의 사멸을 유도할 수 있어, 상기 특징을 갖는 환자에 일 예에 따른 약학 조성물을 적용시, 우수한 항암 효과를 나타낼 수 있다.

[0027] 본 명세서에서, BAX의 활성이 "약화" 또는 "불활성화"되었다는 것은 BAX를 암호화하는 유전자의 핵산 서열 및/또는 단백질의 아미노산 서열의 변이(치환, 결실, 부가 등) 및/또는 2차 또는 3차 구조의 변형 등의 변이에 의하여 BAX의 활성 정도가 야생형(wildtype)에 비하여 감소되었거나 BAX의 활성이 없는 경우를 의미하고, BAX를 암호화하는 유전자의 전사(transcription) 저해 또는 번역(translation) 저해 등으로 상기 BAX 단백질의 발현 수준이 저하되거나 전혀 발현되지 않아 세포 내에서 전체적인 활성 정도가 야생형에 비하여 낮거나 전혀 없는 경우, 또는 이들의 조합 역시 포함하는 개념이다.

[0028] 본 명세서에서 BCL-2의 활성이 "강화"되었다는 것은 BCL-2를 암호화하는 유전자의 핵산 서열 및/또는 단백질의 아미노산 서열의 변이(치환, 결실, 부가 등) 및/또는 2차 또는 3차 구조의 변형 등의 변이에 의하여 BCL-2의 활성 정도가 야생형(wildtype)에 비하여 증가된 의미하고, BCL-2를 암호화하는 유전자의 전사(transcription) 증가 또는 유도나 번역(translation) 증가 또는 유도 등으로 상기 BCL-2 단백질의 발현 수준이 증가하여 세포 내에서 전체적인 활성 정도가 야생형에 비하여 증가된 경우, 또는 이들의 조합 역시 포함하는 개념이다.

[0029] 본 명세서에서 PI3K/Akt/mTOR 경로가 활성화되었다는 것은 PI3K, Akt, 및 mTOR 로 이어지는 메커니즘이 활성화된 것을 의미할 수 있고, 상기 메커니즘의 활성화는 PI3K, Akt, 및/또는 mTOR의 활성이 강화된 것일 수 있으며, 활성 강화에 대해서는 BCL-2의 활성이 강화되었다는 것에 대해 전술한 바와 유사하다.

[0030] 본 명세서에서, "암"이란, 신체 조직의 자율적인 과잉 성장에 의해 비정상적으로 자라난 종양, 또는 종양을 형성하는 병을 의미하며, 특히 정상적인 세포사멸 활성의 상실, 부족 등에 의해 발병되는 것일 수 있다. 따라서, 세포사멸의 조절을 통해 암을 치료 할 수 있다.

[0031] 일 예에 따르면, 암은 상기 약학 조성물에 의해 증상이 완화, 경감, 개선 또는 치료될 수 있는 한 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면, 상기 암은 위암, 간암, 결장암, 유방암, 폐암, 비소세포성폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부암, 두경부암, 흑색종, 자궁암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암, 자궁경부암, 질암, 음문암, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 전립선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 신장암, 수뇨관암, 신장골반암, 혈액암, 뇌암, 중추신경계(CNS; central nervous system) 종양, 척수 종양, 뇌간 신경교종, 및 뇌하수체 선종으로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상인 것일 수 있다. 일 예에 따르면 상기 암은 Bcl-2, PI3K, Akt, 및/또는 mTOR 가 존재하거나 Bcl-2, PI3K, Akt, 및/또는 mTOR의 활성이 강화된 것일 수 있다.

[0032] 상기 약학 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘,

락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 덱스트로스, 소르비톨 및/또는 탈크 등이 사용될 수 있다.

[0033] 상기 약학 조성물은 경구 투여, 비경구 투여 등의 다양한 경로로 투여될 수 있으며, 각 투여 경로에 적합한 제형으로 제제화될 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 상기 약학 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calciumcarbonate), 수크로스(Sucrose), 락토오스(Lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다.

[0034] 상기 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여할 수 있다. 비경구 투여는 복강내 투여, 직장내 투여, 피하 투여, 정맥 투여, 근육내 투여 또는 흉부내 투여 등에 의하여 수행될 수 있고, 상기 투여는 주사 등 다양한 방법으로 수행될 수 있다. 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.

[0035] 상기 약학 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있다. 본 명세서에서 "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 상기 약학 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0036] 구체적으로, 상기 약학 조성물의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1kg 당 0.01mg 내지 1,000mg, 또는 1mg 내지 500mg, 또는 1 내지 100mg을 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 상기 투여량 및 투여 간격은 투여 경로, 질환의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있다.

[0038] 다른 양상은, 상기 실리마린 매개된 셀레늄 나노입자를 암의 예방 또는 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0039] 일 예에 따르면, 상기 환자는 (1) BAX의 활성이 약화 또는 불활성화, (2) BCL-2의 활성이 강화, 및 (3) PI3K/Akt/mTOR 경로가 활성화로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 특징을 갖는 환자일 수 있다.

[0040] 일 예에 따르면, 상기 암의 예방 또는 치료 방법은 투여하는 단계 이전에, 적절한 환자를 선별하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있고, 상기 적절한 환자에 대한 것은 전술한 바와 같다. 상기 적절한 환자를 선별하는 단계는 환자로부터 분리된 생물학적 시료에서 (1) BAX의 활성이 약화 또는 불활성화, (2) BCL-2의 활성이 강화, 및/또는 (3) PI3K/Akt/mTOR 경로가 활성화되었는지 여부를 (예를 들면, 정상군으로부터 분리된 생물학적 시료와 비교하여) 확인하여 수행할 수 있다.

[0041] 상기 단백질의 활성의 강화, 약화 또는 불활성화 여부를 확인하는 단계는 공지된 방법이면 제한없이 수행될 수 있고, 예를 들면 효소역가 반응값으로 효소 활성을 분석하거나, 효소와 결합하는 항체를 반응시켜 결합을 유도하고, 그 결합 정도를 항체에 결합된 효소와 기질 복합 반응에 의한 발색 또는 형광 신호를 통하여 측정(정량)하는 효소면역분석방법 등을 사용하여 효소와 기질 간 반응 정도를 측정할 수 있다. 다른 예에서, 상기 단백질 활성의 약화 또는 불활성화 여부를 확인하는 단계는 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자의 핵산 서열의 분석을 통하여 돌연변이 여부를 검출하는 단계에 의하여 수행될 수 있다. 이 때, 단백질의 아미노산 서열 또는 유전자의 핵산 서열에 돌연변이(예를 들면, 점 돌연변이, 삽입, 결실)가 검출되는 경우(즉, 돌연변이가 존재하는 경우), 상기 생물학적 시료에서 활성이 약화 또는 불활성화된 것으로 확인할 수 있다. 또 다른 예에서 단백질 활성의 강화, 약화 및/또는 불활성화 여부를 확인하는 단계는 단백질 수준 및/또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자 수준을 측정하여 수행될 수 있다. 예를 들면 실시간 PCR, RT-PCR, 웨스턴 블롯팅(western blotting), 방사선면역분석법(radioimmunoassay; RIA), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 효소면역분석법(ELISA), 면역침전법(immunoprecipitation), 유세포분석법(flow cytometry), 면역형광염색법(immunofluorescence), 오우

크테로니(ouchterlony), 보체 고정 분석법(complement fixation assay), 및 단백질 칩(protein chip)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법에 의해서 단백질 및/또는 유전자(예를 들면, mRNA) 수준이 측정될 수 있다.

[0042] 상기 치료방법이 적용되는 대상 개체는 암이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 쥐, 가축 등을 포함하는 포유 동물(또는 인간을 제외한 포유 동물)을 의미하나 이에 한정되지 않는다.

[0043] 본 명세서에서, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 대상 개체에게 상기 약학 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구(예를 들면 정맥 내, 피하, 복강내 또는 국소 적용)의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.

[0044] 상기 예방 또는 치료 방법은 일 예에 따른 실리마린 매개된 셀레늄 나노입자를 포함하는 약학 조성물을 약학적 유효량으로 투여하는 것을 포함할 수 있다. 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치에 의해 결정될 수 있으며, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용할 수 있다.

[0046] 또 다른 양상은 상기 실리마린 매개된 셀레늄 나노입자를 포함하는, 암세포 사멸 유도용 조성물을 제공한다.

[0047] 상기 암세포는 위암, 간암, 결장암, 유방암, 폐암, 비소세포성폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부암, 두경부암, 흑색종, 자궁암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암, 자궁경부암, 질암, 음문암, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 전립선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 신장암, 수뇨관암, 신장골반암, 혈액암, 뇌암, 중추신경계(CNS; central nervous system) 종양, 척수 종양, 뇌간 신경교종, 및 뇌하수체 선종으로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이의 암에 대한 세포일 수 있으며, 예를 들면, 간암 세포, 자궁경부암 세포, 폐암 세포, 및/또는 간암 세포일 수 있다. 예를 들면, HepG2 세포(인간 간 암종 세포주; human liver carcinoma cell line), Hela 세포(자궁경부암 세포주; Cervical cancer cell line), A549 세포(인간 폐 선암종 세포주; human lung adenocarcinoma cell line), 및/또는 AGS 세포(인간 위 선암종 세포주; human stomach adenocarcinoma cell line)일 수 있으며, 일 예에 따른 실리마린 매개된 셀레늄 나노입자는 암세포 중에서도 특히 위암 세포(예를 들면, AGS 세포)에 대한 세포 사멸 유도 효과가 우수하다(높다).

[0048] 또 다른 양상은 인비트로에서 일 예에 따른 실리마린 매개된 셀레늄 나노입자를 포함하는 조성물을 분리된 암세포에 처리하는 단계를 포함하는, 암세포 사멸 방법을 제공한다. 암세포에 대해서는 전술한 바와 같다.

[0050] 또 다른 양상은 상기 실리마린 매개된 셀레늄 나노입자를 포함하는, 약물 전달용 조성물을 제공한다. 상기 약물 전달용 조성물은 상기 실리마린 매개된 셀레늄 나노입자 및 약물을 포함할 수 있으며, 상기 약물은 소분자 화합물, 핵산, 각종 펩타이드, 단백질 약물, 단백질-핵산 구조체 또는 히알루로닉산-펩타이드 접합체, 히알루로닉산-단백질 접합체 등의 생체고분자-약물 접합체 등일 수 있다. 상기 핵산은 소간섭리보핵산(siRNA), 리보좀 리보핵산(rRNA), 리보핵산(RNA), 디옥시리보핵산(DNA), 상보성 디옥시리보핵산(cDNA), 앱타머(aptamer), 전령 리보핵산(mRNA), 운반 리보핵산(tRNA), 안티센스 올리고뉴클레오티드, shRNA, miRNA, 리보자임(ribozyme), PNA, DNAzyme, 및 유전자교정을 위한 sgRNA 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0051] 일 예에 따른 실리마린 매개된 셀레늄 나노 입자는 우수한 혈액 적합성(낮은 적혈구 용해 정도)를 나타내어 생체에 적용 가능하고, 안전하게 약물 전달체로 활용할 수 있다.

[0053] 또 다른 양상은 생물학적 시료에서 (1) BAX의 활성이 약화 또는 불활성화, (2) BCL-2의 활성이 강화, 및 (3) PI3K/Akt/mTOR 경로가 활성화로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 특징을 확인하는 단계를 포함하는, 실리마린 매개된 셀레늄 나노입자의 투여에 의한 암 치료에 적절한 환자 선별에 정보를 제공하는 방법을 제공한다. 암에 대해서는 전술한 바와 같다. 상기 암에 대해서는 전술한 바와 같다. BAX, BCL-2, PI3K/Akt/mTOR 경로가 활

성화되었는지 여부를 확인하는 단계는 전술한 바와 같다.

[0054] 상기 정보를 제공하는 방법은 생물학적 시료에서 상기 (1) 내지 (3)으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 특징이 확인된 경우, 상기 생물학적 시료가 유래된 환자를 일 예에 따른 실리마린 매개된 셀레늄 나노입자의 투여에 의한 암 치료에 적절한 환자로 선별하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0055] 일 예에 따른 실리마린 매개된 셀레늄 나노입자는 Bax 활성화, Bcl-2 활성 억제 및 PI3K/Akt/mTOR 경로 활성 억제를 유도하여, 세포의 아폽토시스, 및/또는 자가포식을 억제하여 암세포의 사멸을 유도할 수 있어, 상기 (1) 내지 (3)으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상의 특징을 갖는 생물학적 시료가 유래한 환자는 일 예에 따른 실리마린 매개된 셀레늄 나노입자의 투여에 의해 우수한 암 치료 효과가 나타날 수 있다.

발명의 효과

[0057] 일 예에 따른 실리마린 매개된 셀레늄 나노입자는 실리마린의 한계(예를 들면, 물과 지질에서의 낮은 용해도와 장 흡수율, 생체 이용률 등)을 개선하여 보다 효과적이고 안전한 항암제로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0059] 도 1a 내지 도 1g는 Si-SeNP의 생합성(Biosynthesis) 및 특징을 나타낸다. 구체적으로, 도 1a는 Si-SeNP의 생합성 과정을 나타낸 모식도이다. 도 1b는 합성된 Si-SeNP 및 실리마린의 UV-Vis 흡수 분광법 분석결과를 나타내며, 도 1c는 Si-SeNP에 대한 형태학적 분석을 위한 TEM 이미지 및 EDX 분석결과를 나타낸다. 도 1d는 Si-SeNP와 실리마린에 대한 FT-IR 분석을 나타낸다. 도 1e는 SeNP의 합성에 관여하는 생리활성 화합물(bioactive compounds)을 나타내며, 도 1f는 Si-SeNP 및 실리마린의 TGA 커브를 나타내고, 도 1g는 Si-SeNP 및 실리마린의 용혈 수준을 나타낸다. 도 1a 내지 도 1g에서 모든 값은 평균 ± S.D으로 표시되었고 *는 대조군(control group)과 대비시 $p < 0.05$를 의미하고, **는 $p < 0.01$를 의미한다.

도 2a 내지 도2c는 정상세포와 암세포에 대한 Si-SeNP의 세포독성 효과(Cytotoxic effect)에 대한 결과를 나타낸다. 구체적으로, 도 2a는 RAW264.7, NHDF, 및 HEK293 세포에서 Si-SeNP 및 실리마린의 세포독성 정도를 나타내고, 도 2b는모든 HepG2, A549, Hela, 및 AGS 세포에서의 Si-SeNP 의 IC50 값을 나타내며, 도 2c는 AGS 세포에 대한 콜로니 형성 및 현미경 이미지를 나타낸다. 도 2a 내지 도 2c에서 모든 값은 평균 ± S.D으로 표시되었고 *는 대조군과 대비시 $p < 0.05$를 의미하고, **는 $p < 0.01$를 의미한다.

도 3a 내지 도 3c는 Si-SeNP가 AGS 세포에서 미토콘드리아-관련 아폽토시스를 유도한 결과를 나타낸다. 구체적으로, 도 3a는 AGS 세포에서의 Hoechst 및 PI(propidium iodide) 염색 결과를 나타내고, 도 3b는 AGS 세포에서 세포사멸 마커(apoptosis markers)의 mRNA 발현에 대한 Si-SeNP 또는 실리마린의 효과를 나타내며, 도 3c는 AGS 세포에서 세포사멸-관련 단백질(apoptosis-related protein)의 단백질 발현에 대한 Si-SeNP 또는 실리마린의 효과를 나타낸다. 도 3a 내지 도 3c에서 모든 값은 평균 ± S.D으로 표시되었고 *는 대조군과 대비시 $p < 0.05$를 의미하고, **는 $p < 0.01$를 의미한다.

도 4a 내지 도 4e는 Si-SeNP가 AGS 세포에서 자가포식(autophagy)을 악화시킴으로써 세포사멸을 유발하는 것을 나타내는 결과이다. 구체적으로, 도 4a 및 도 4b는 AGS 세포에서 자가포식 마커(LC3, p62, 및 Beclin1)의 mRNA 발현(도 4a) 및 및 단백질 발현(도 4b)에 대한 Si-SeNP 또는 실리마린의 효과를 나타낸다. 도 4c는 LC3 단백질 발현의 면역형광 분석결과를 나타내며, 도 4d는 AGS 세포에서 p62 단백질 발현에 대한 면역형광의 분석결과를 나타낸다. 도 4e는 각 단백질의 발현을 나타내는 웨스턴 블롯팅 결과이다. 도 3a 내지 도 3c에서 모든 값은 평균 ± S.D으로 표시되었고 *는 대조군과 대비시 $p < 0.05$를 의미하고, **는 대조군과 대비시 $p < 0.01$를 의미하고, #은 Si-SeNP 그룹과 대비시 $p < 0.05$를 의미하고, ##는 Si-SeNP 그룹과 대비시 $p < 0.01$를 의미한다.

도 5a 및 도 5b는 Si-SeNPs-유도된 세포 사멸이 자가포식 유도제(autophagy inducer; Rapa)에 의해 악화되었고 자가포식으로 억제제(autophagy inhibitor; CQ)에 의해서 역전된 결과를 나타낸다. 구체적으로, 도 5a는 생/사 분석 키트(live/dead assay kit)로 염색된 AGS 세포의 형광 현미경 이미지를 나타낸다. 녹색 형광 및 적색 형광은 각각 살아있는 세포 및 죽은 세포의 마커이다. 도 5b는 세포 생존능(cell viability) 분석 결과를 나타내는 MTT 분석 결과이다. 도 5a 및 도 5b에서 모든 값은 평균 ± S.D으로 표시되었고, **는 대조군과 대비시 $p < 0.01$를 의미하고, ##는 Si-SeNP 그룹과 대비시 $p < 0.01$를 의미한다.

도 6a 및 도 6b는 Si-SeNP가 AGS 세포에서 PI3K/AKT/mTORC1 신호전달 경로를 억제한 결과를 나타낸다. 구체적으로, 도 6a는 AGS 세포에서 PI3K, AKT 및 P70S6K의 mRNA 발현양를 나타내고, 도 6b는 AGS 세포에서 PI3K/AKT/mTORC1 신호전달 경로의 단백질 발현양을 나타낸다. 도 6a 및 도 6b에서 모든 값은 평균 ± S.D으로 표시되었고 *는 대조군(control group)과 대비시 $p < 0.05$를 의미하고, **는 $p < 0.01$를 의미한다.

도 7a 내지 도 7e는 Si-SeNP-유도된 자가포식성 플럭스(autophagy flux) 및 세포사멸이 AGS 세포에서 PI3K/AKT/mTORC1 경로의 활성화를 통해 부분적으로 역전된 것을 나타낸다. 구체적으로, 도 7a는 AGS 세포에서 PI3K, AKT, P70S6K, LC3, 및 p62 단백질의 면역블롯팅(Immunoblotting) 결과를 나타내고, 도 7b는 AGS 세포에서 LC3 단백질 발현의 면역형광 분석 결과를 나타내며, 도 7c는 세포사멸 마커의 단백질 발현을 나타내는 웨스턴 블롯팅 결과를 나타낸다. 도 7d는 Hoechst 및 PI로 염색된 AGS 세포의 형광 현미경 이미지를 나타낸다. 도 7e는 세포 생존능 분석 결과를 나타내는 MTT 분석 결과이다. 도 7a 내지 도 7e에서 모든 값은 평균 ± S.D으로 표시되었고, **는 대조군과 대비시 $p < 0.01$를 의미하고, ##는 Si-SeNP 그룹과 대비시 $p < 0.01$를 의미한다.

도 8은 AGS 세포에서 Si-SeNP-유도된 세포사멸의 주요 기본 메카니즘 및 개략도를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0060] 본 발명은 하기 실시예를 들어 더욱 자세히 설명할 것이나, 하기 실시예로 권리범위가 한정되는 의도는 아니다.

[0062] **재료 및 방법**

[0064] **참고예 1. 시약 및 항체**

[0065] RPMI 1640 배양 배지, 둘베코(Dulbecco) 변형 이글 배지(DMEM), 페니실린-스트렙토마이신, 및 태아 소 혈청(FBS)을 GenDEPOT(Katy, TX, USA)로부터 구입하였다. 실리마린, 디메틸 설폭사이드(DMSO), 가용성 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드(MTT), 및 Hoechst 33258은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 나트륨 셀레나이트는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)로부터 입수하였다. 프로피듐 요오다이드 용액(PI)은 인비트로겐 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)으로부터 구입하였다. 740Y-P는 MedChemExpress(MCE, 미국)로부터 구입하였다. 라파마이신(Rapa) 및 클로로퀸(CQ)을 Sigma-Aldrich로부터 수득하였다. 모든 프라이머는 Macrogen (Seoul, Republic of Korea)에 의해 설계되었다. Abcam(Cambridge, UK)으로부터 PI3K, p-PI3 K, AKT, P-AKT, Bax, Bcl-2, Cytochrome c(Cyt c), cleaved caspase 9, caspase 9, cleaved caspase 3, 및 caspase 3에 대한 1차 항체를 얻었고, Cell Signaling Technology(MA, USA)로부터 anti-p70S6K, p-p70S6K, LC3A/B, Beclin1, p62, 및 â-actin를 얻었다.

[0067] **참고예 2. Si-SeNP의 생합성(Biosynthesis)**

[0068] Si-SeNP를 약간 수정된 프라사드 KS 등 (Prasad and Selvaraj, 2014, Biol Trace Elem Res 157, 275-283.)에 따라 합성하였다. 간략히, 실리마린을 10 mg/mL 용액으로 20mL로 제조한 다음, 자기 교반(magnetic agitation) 하에 새로운 아셀렌산나트륨(Na_2SeO_3) 용액(80mL, 20mM)을 첨가하였다. 이 혼합물을 자기 교반(30℃) 작동 하에 24시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 반응에 관여하지 않은 실리마린 및 Na_2SeO_3을 초순수(ultrapure water)에 대한 투석으로 제거하였다(도 1a). 나노입자의 물리화학적 특성은 다양한 분광(spectrometric) 및 현미경 분석을 사용하여 특성화되었다.

[0070] **참고예 3. Si-SeNP의 물리화학적 특성화**

[0071] Si-SeNP의 흡수 스펙트럼은 200-600nm 범위에서 Cary 60 UV-Vis 분광 광도계(Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA)를 사용하여 얻었다. JEM-2100F 전계 방출-투과 전자 현미경(field emission-transmission electron microscope; FE-TEM; JEOL, Ltd., Tokyo, Japan)을 사용하여 Si-SeNP의 크기 및 형태를 평가하였다. SeNP의 형태학적 관찰 및 에너지-분산 X-선 분광계(energy-dispersive X-ray spectrometer; EDX) 스펙트럼을 수행하였다.

[0073] **참고예 4. 합성된 Si-SeNPs의 화합물 로딩 및 캡슐화**

[0074] 활성화된 화합물 로딩 및 캡슐화의 평가를 위해, 1mg의 동결-건조된 Si-SeNP를 아세토니트릴에 용해시키고, 20분 동안 초음파로 진탕시켰다. 이어서, 필터 멤브레인(0.45㎛)을 사용하여 여과하였다. 여액에서 방출된 화합물을 Ultimate3000 시스템(Thermo Scientific, USA)을 이용한 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC) 분석을 사용하여 측정하였다. 워터스 코텍스(Waters Cortex) C18 (2.1mm X 150mm, 1.6㎛)을 45℃에서 50㎕의 샘플 주입 부피로 분리하는데 사용하였다. 이동상은 메탄올:물(50:50v/v)로 이루어졌고, 용리는 1mL/분의 유속에서 석유 에테르(petroleum ether):클로로포름의 다양한 비율 및 클로로포름과 메탄올의 비율(99:1 v/v)로 연속적으로 수행되었다. 합성 나노입자에서 실리마린 화합물을 확인하기 위해, 실리마린의 표준 화합물을 나노입자와 함께 측정하였다. 또한, 샘플을 30 내지 600℃의 온도에서 열중량 분석(thermo-gravimetric analysis; TGA)을 사용하여 평가하였다.

[0076] **참고예 5. 혈액적합성 분석(Hemocompatibility assay)**

[0077] 탈피브린화 양 혈액(Defibrinated Sheep Blood)을 Kisan Bio Co. Ltd. (Seoul, Korea)로부터 구입하였다. 혈액적합성 분석은 용혈 분석의 표준 절차에 따라 수행되었다(Rezaei et al., 2017). 혈액적합성을 측정하기 위해, 샘플을 PBS에 용해시키고, 각각 1mg/mL의 농도를 갖는 용액으로 제조하였다. 샘플 용액을 상이한 시간(10분, 1시간, 6시간 및 24시간) 동안 적혈구(RBC) 현탁액(1:100 v/v)과 함께 인큐베이션하였다. 혼합 용액을 13,000rpm에서 10분 동안 원심분리한 후, UV-Vis 분광광도계(SpectraMax ABS plus)를 사용하여 545nm에서 상청액(supernatant)의 흡광도를 측정하였다. 증류수 및 PBS를 각각 양성 대조군(100%) 및 음성 대조군(0%)으로 사용하였다.

[0079] **참고예 6. 다양한 암 세포 및 정상 세포의 생존 생존능 평가**

[0080] 본 연구에서 사용된 모든 세포주는 한국 세포주 은행(KCLB, Seoul, Republic of Korea)으로부터 구입하였다. HepG2 세포(인간 간 암종 세포주; human liver carcinoma cell line), Hela 세포(자궁경부암 세포주; Cervical cancer cell line), A549 세포(인간 폐 선암종 세포주; human lung adenocarcinoma cell line), 및 AGS 세포(인간 위 선암종 세포주; human stomach adenocarcinoma cell line)를, 각각 10% FBS(v/v) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신(vicillin-streptomycin)(v/v)이 보충된 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. NHDF 세포 (인간 섬유아세포; human fibroblasts), HEK293 세포(인간 배아 신장 293 세포; human Embryonic Kidney 293 cell) 및 RAW264.7 세포(대식세포 세포주; macrophage cell line)를 완전 DMEM 배지(고 글루코스)에서 배양하였다. 세포를 37℃에서 5% CO_2 atmosphere에서 인큐베이션했다.

[0081] 샘플의 세포독성 효과를 검출하기 위해, 각각의 세포 현탁액(1×10^4 세포/웰)을 96-웰 플레이트에 접종하였다. 24시간 동안 안정화시킨 후, 배양 상청액을 흡입에 의해 제거하고, 다양한 농도의 실리마린 또는 Si-SeNP를 함유하는 새로운 배지를 24시간 동안 세포에 첨가하였다. 샘플의 세포 독성은 이전에 보고된 방법(Mi et al., 2018, Sci Rep 8, 15922.)에 따라 MTT 분석을 사용하여 측정되었다.

[0083] **참고예 7. 콜로니 형성 검정**

[0084] AGS 세포를 6-웰 플레이트에 플레이팅하였다. 24시간 동안 안정화시킨 후 세포를 36시간 동안 샘플로 처리하였다. 콜로니-형성 세포를 시각화하기 위해, AGS 세포를 PBS로 세척한 다음, 트립판 블루 용액(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)으로 5분 동안 염색하였다. 세포 콜로니를 광학 현미경으로 관찰하였다.

[0086] **참고예 8. 아폽토시스(apoptosis)을 위한 Hoechst 33258 및 PI(propidium iodide) 염색**

[0087] 상기 기재된 바와 같이 샘플을 처리 후, AGS 세포를 암실, 37℃에서 30분 동안 Hoechst 33258(5㎍/mL) 및 PI(5㎍/mL)로 염색하였다. 세포사멸된 세포의 양을 관찰하기 위해, 염색된 세포를 형광 주사 현미경(fluorescence

scanning microscope;Leica, Wetzlar, Germany)을 사용하여 조사하였다.

[0089] **참고예 9. 생/사 형광 분석(Live/dead fluorescent assay)**

[0090] AGS 세포에 대한 샘플의 세포독성을 생/사(Live/Dead) 염색에 의해 조사하였다. 간단히, 상기 기재된 바와 같이 샘플을 처리 후, AGS 세포를 생/사 분석 키트로 염색하였다. 암실에서 37℃, 30분의 인큐베이션 후에, 염색된 세포를 형광 주사 현미경을 사용하여 조사하였다.

[0092] **참고예 10. 정량적 실시간 PCR(qRT-PCR)**

[0093] mRNA 발현은 qRT-PCR에 의해 정량화되었다. 간단히 말해서, 총 세포 RNA를 트리졸 시약 키트(Trizol reagent kit; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 추출하였다. 먼저, 500ng의 RNA를 Superscript First-Strand Synthesis Kit(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 단일-가닥 cDNA로 역-전사시켰다. qRT-PCR은 SYBR ®Premix Ex TaqII RT-PCR Kit(TaKaRa, Japan)와 함께 CFX96TM 실시간 RT-PCR 시스템을 사용하여 수행하였다. ampfiSure qGreen Q-PCR Master Mix (GenDEOT, TX, USA)를 사용하여 20㎕ 반응 부피에서 50ng cDNA를 사용하여 수행하였다. qRT-PCR에 사용된 프라이머 서열(정방향(Forward) 및 역방향(Reverse))을 하기 표 1에 기재하였다. 각각의 샘플을 3회 분석하였다. 유전자 발현은 내인성 대조군(ndogenous control; GAPDH)의 발현으로 정규화되었다.

표 1

[0094]

Primer		Sequence (5'-3')	서열번호
Bax	Forward	5'-AGCAAACTGGTGCTCAAGGC-3'	서열번호 1
	Reverse	5'-CCACAAAGATGGTCACTGTC-3'	서열번호 2
Bcl-2	Forward	5'-GTGGTGGAGGAACTCTTCAG-3';	서열번호 3
	Reverse	5'-GTTCCACAAAGGCATCCCAG-3'	서열번호 4
Cyt c	Forward	5'-GAGGCAAGCATAAGACTGG-3'	서열번호 5
	Reverse	5'-TACTCCATCAGGGTATCCTC-3'	서열번호 6
Caspase 9	Forward	5'-AGTTCCCGGGTGCTGTCTA-3'	서열번호 7
	Reverse	5'-GCCATGGTCTTTCTGCTCA-3'	서열번호 8
Caspase 3	Forward	5'-CCTCAGAGAGAGACATTCATG-3'	서열번호 9
	Reverse	5'-GCAGTAGTCGCCTCTGAAG-3'	서열번호 10
PI3K	Forward	5'-AGCTGTGGATCTTAGGGACCTCA-3'	서열번호 11
	Reverse	5'-ACCATGACTGTGTACCAGAACAA-3'	서열번호 12
AKT	Forward	5'-TACTACGCCATGAAGATCCTCAA-3'	서열번호 13
	Reverse	5'-TCTGGAAAGAGTACTTCAGGGCT-3'	서열번호 14
p70S6K	Forward	5'-CTCCCTACCTCACACAAGAAGCTC-3'	서열번호 15
	Reverse	5'-GAAGTTCTTCCCAGTTAATGTGTC-3'	서열번호 16
LC3 I	Forward	5'- ACATGAGCGAGTTGGTCAAGATCA-3	서열번호 17
	Reverse	5'- GATGGATTCTGGCCCAGTCATATT-3'	서열번호 18
LC3 II	Forward	5'- ATAATTAGAAGGCGCTTACAGCTC-3'	서열번호 19
	Reverse	5'- TGGCAGGTTCTCTTCTCTAGATCT-3'	서열번호 20
p62	Forward	5'-ACCTGTCTGAGGGCTTCTCGCACA-3'	서열번호 21
	Reverse	5'-CTCTTCTCCTCTGTGCTGGAACTC-3'	서열번호 22
Beclin1	Forward	5'-GCCAGGATGGTGTCTCTCGAAGAT-3'	서열번호 23
	Reverse	5'-GTGGAAGGTGGCATTGAAGACATT-3'	서열번호 24
GAPDH	Forward	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'	서열번호 25
	Reverse	5'-CCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'	서열번호 26

[0095] **참고예 11. 면역형광 염색(Immunofluorescence staining)**

[0096] AGS 세포를 상기 언급된 바와 같은 샘플로 처리한 후 30분 동안 차가운 4% 파라포름알데히드에 고정시키고, 이어서 1% 트리톤 X-100을 투과화를 위해 사용하였다. 세포를 5% BSA를 사용하여 1시간 동안 추가로 차단하고 4℃에서 1차 항체에서 밤새 인큐베이션하였다. 이어서, AGS 세포를 PBS로 3회 세척한 후, 암실에서 Alexa Fluor® 488-conjugated goat anti-rabbit IgG 또는 Alexa Fluor® 594-conjugated goat anti-rabbit IgG H&L (Abcam,

UK)로 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세포의 핵을 DAPI를 사용하여 염색하였다. 형광 현미경(Leica, Wetzlar, Germany)을 사용하여 형광을 관찰하였다.

[0098] **참고예 12. 웨스턴 블롯팅**

[0099] AGS 세포 펠릿을 상기 언급된 바와 같은 샘플로 처리한 후에 수집하였다. Pierce™ RIPA Buffer(Thermo Scientific, USA)을 사용하여 세포 펠렛을 용해시키고, 이어서 12,000rpm 및 4℃에서 20분 동안 원심분리하고, 이어서 상층액에서 총 단백질을 수집하였다. 각각의 총 단백질 50㎍을 10% SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide) 겔에 로딩하고 PVDF 멤브레인(Thermo Fisher Scientific, USA)으로 트랜스퍼하였다. PBS-T(phosphate-buffered saline-Tween 20) 완충제로 3회 세척한 후, PVDF 멤브레인을 4℃에서 밤새 1차 항체(희석, 1: 1000)에서 인큐베이션한 다음, 희석된 2차 항체(1:5000)와 함께 1시간 동안 인큐베이션하였다. West-Q Pico ECL 용액(GenDEPOT, Katy, TX, USA)은 Alliance MINI HD9 AUTO Immunoblot Imaging System (UVItec Limited, England, UK)에 의한 면역 반응성 밴드(immunoreactive bands)의 시각화에 사용되었다.

[0101] **참고예 13. 통계학적 분석**

[0102] 실험을 3회 반복하고, 데이터를 평균 ± SD로서 표현하고, 일원배치 분산분석(One-way ANOVA) 에 이어 사후검정(post hoc test) 또는 2-표본 등분산과 결합하여 통계적 차이를 평가한 Student's t-검정으로 표시되었고, 차이는 적어도 $p < 0.05$에서 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[0104] **결과**

[0106] **실시예 1. Si-SeNP의 합성 및 특성화**

[0107] 본 연구에서 사용된 Si-SeNP는 상기 참고예 및 도 1a에 예시된 바와 같이, 1-단계 화학 반응에 따라 합성되었다. 이 방법에서, 실리마린의 생물학적 분자는 환원 및 안정화를 위한 단독 작용제로서 이용되었다. UV-vis 분광법을 사용하여 나노입자의 가시 흡수 스펙트럼을 모니터링하였다. 이러한 흡수 스펙트럼은 나노입자 형상, 크기, 표면 및 응집 상태에 크게 의존한다(Haiss et al., 2007, Anal Chem 79, 4215-4221.). 도 1b에 나타낸 바와 같이, 합성된 Si-SeNP의 색 변화는 황색에서 갈색으로 시각적으로 관찰되었다. 실리마린에 대해서는 모두 플라즈몬 흡광도가 관찰되지 않았지만, 260nm의 파장에서 Si-SeNP의 $\ddot{e}_{max}$가 관찰되었고, 이는 Si-SeNP의 성공적인 합성을 입증한다. $\ddot{e}_{max}$의 유사한 성질이 다른 연구(예를 들어 Cui D et al.,2019, Int J Biol Macromol 137, 829-835.)에서 보고되었고, 흡수 피크의 이러한 이동은 Si-SeNP의 형성을 나타낸다(Cui et al, 2018, Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 90, 104-112.).

[0108] 또한, Si-SeNP의 TEM 이미지는 크기가 30 ~ 80nm 범위인 다분산된 나노입자(polydispersed nanoparticles)의 형성과 구형, 삼각형, 및 육각형과 같은 혼합된 모양의 나노하이브리드의 존재를 나타내었다. 도 1c에 나타난 바와 같이, EDX 분석은 2.2 keV에서 Se 원소의 가장 높은 특성 피크를 보여주었다. 도 1d에 나타난 바와 같이, FT-R 스펙트럼은 내장 FT-IR 스펙트럼 라이브러리(in-house FT-IR spectral library)를 사용하여 Si-SeNP의 표면 상의 가능한 작용기를 확인하였다. Si-SeNP는 실리마린과 유사한 흡수 패턴 또는 적은 이동을 나타냈다. 3212.16 cm^{-1}(실리마린) 및 3038.35 cm^{-1}(Si-SeNP)에서 나타나는 연신(stretching)은 페놀 및 플라보노이드의 존재를 의미하는 O-H 연신으로 특징지어진다. 여기서 약간의 이동이 발생하였고, 이는 실리마린 중의 카르보닐기가 캡핑되고 안정화되었음을 시사한다. 실리마린 및 Si-SeNP는 C=O 및 C=C 이중 결합 작용기를 나타내는 1586.43 내지 1634.95 cm^{-1}에서 밴드를 나타내었다. Si-SeNP의 1095.70 cm^{-1}에서의 밴드는, SeNP로 캡핑한 후 실리마린의 1124.19 cm-1에서 피크로부터 이동이 일어나는 지방족 에테르(C-O)의 존재를 확인하였다. 784.82 내지 785.91 cm-1의 범위는 =CH 작용 결합(functional bonds)의 변각 진동(deformation vibration)을 나타냈다. 그 결과, 실리마린에 의한 Se 원소의 환원 및 Si-SeNP의 표면 상의 유기 중합체 코팅이 형성된 것을 확인하였다.

[0110] **실시예 2. 플라보노리그난의 Si-SeNP의 합성 관여**

[0111] Si-SeNP의 합성에 관여하는 생리활성 화합물(bioactive compounds)은 플라보노리그난의 군이다. 도 1e에 나타난 바와 같이, Si-SeNP에서 실리크리스틴(silychristin), 실라이빈 A/B(silybin A/B) 및 이소실리빈 A(isosilybin A)의 지문 피크는 확인되었으며 이는 적어도 이들 주요 유형의 플라보노리그난(실라이빈, 이소실린빈, 실리크리스틴)이 SeNP의 합성에 관여함을 의미한다. 또한, 상기 참고예의 방법으로, Si-SeNP의 TGA 곡선을 얻어 표면 상에 그라프팅된 그의 중합체를 확인하였다. 도 1f에 나타난 바와 같이, 실리마린 (21.25%)은 이에 상응하는 Si-SeNP(6.61%)보다 더 큰 정도로 분해되어, 2개의 별개의 분해 영역을 나타났다. 따라서, Si-SeNP의 표면 상의 유기 중합체 코팅의 형성을 입증할 수 있었다.

[0113] **실시예 3. Si-SeNP의 혈액적합성(Hemocompatibility)**

[0114] 본 실시예에서, Si-SeNP의 안정성을 평가하고자 상기 참고예의 방법과 같이, 양 적혈구(sheep red blood cell(RBC))를 이용하여 Si-SeNP의 혈액접학성을 확인하였다. 도 1g에 나타난 바와 같이, Si-SeNP는 심지어 1mg/mL의 고농도에서도 RBC에 대해 약간의 용혈(2% 미만)을 나타내었으며, 이는 생체 적합 재료의 허용 한계(5%) 이내였다. 이로부터, Si-SeNP가 혈액적합성이었고, 따라서 약물 전달에 대한 잠재적인 후보일 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[0116] **실시예 4. Si-SeNPs의 세포독성 효과**

[0117] Si-SeNP의 항암 효과를 평가하기 위해, 통상적인 악성 암 세포(HepG2, A549, Hela, 및 AGS 세포) 및 정상 포유동물 세포(RAW264.7, NHDF, 및 HEK293 세포)를 포함한 7개의 세포주에 대해 예비 스크리닝을 수행하였다. 도 2a에 나타난 바와 같이, NHDF 및 HEK293 세포는 대조군(미처리 세포)과 처리군(0.4-25.6㎍/mL의 농도로 실리마린, 또는 Si-SeNP이 처리된 세포) 사이의 세포독성의 측면에서 유의한 차이를 보이지 않았으며, 이는 시험 농도에서 실리마린 및 Si-SeNP가 정상 세포에 비독성(non-toxic)임을 나타낸다. 그러나, RAW264.7 세포에서 실리마린 처리 후 농도가 점차 증가하면 상대적으로 독성 효과가 관찰되었고, Si-SeNP에 대해서는 >25.6㎍/mL의 높은 내성 수준을 기록하였다. 이들 결과는 정상적인 포유동물 세포에 대한 Si-SeNP의 비독성 효과를 나타내었다.

[0118] 도 2b에 나타난 바와 같이, Si-SeNP 처리된 HepG2, A549, Hela, 및 AGS 세포의 IC50 값은 각각 2.24, 4.17, 0.66, 및 0.21㎍/mL였다. 암세포에 대한 Si-SeNP의 억제 활성이 실리마린에 비해 증가된 것으로 관찰되었고, 이는 암을 치료하는데 Si-SeNP가 중요하다는 것을 시사한다.

[0119] 상기 참고예의 방법과 같이, 현미경 관찰을 통해 AGS 세포의 세포 형태학 및 콜로니 형성을 관찰하여 그 결과를 도 2c에 나타내었다. 도 2c에 나타난 바와 같이, 대조군 및 실리마린 처리군과 비교하여, AGS 세포의 증식은 Si-SeNP의 처리에 대한 반응으로 유의하게 억제되었으며, 이는 세포 형태의 변경 및 콜로니 수 감소로 입증되었다. 더욱이, 0.4㎍/mL의 Si-SeNP 처리는 시스플라틴(50μM, 양성 약물) 보다 콜로니 형성을 더 크게 억제하였고, 이는 암 치료에서 Si-SeNP의 잠재적 적용을 시사한다. 이들 결과는 Si-SeNP의 항암 활성이 정상 포유동물 세포에 대한 유의한 독성 효과를 유도하지 않으면서 세포 형태의 변화 및 콜로니 형성의 억제를 수반함을 시사한다. 따라서, AGS 세포는 추후 실시예에서 기본 메커니즘을 탐색하기 위해 선택되었다.

[0121] Si-SeNP는 AGS 세포에서 미토콘드리아-관련 아폽토시스를 크게 유도하였다. 세포사멸(Cell death)은 아폽토시스(apoptosis), 괴사증(necroptosis) 및 자가포식(autophagy)을 포함한 다양한 형태로 암 치료에서 중요한 역할을 한다. 미토콘드리아 기능장애는 Bcl-2 패밀리의 관여를 통해 아폽토시스 세포사멸을 유도하여 미토콘드리아 외막 전위(potential)의 고갈을 촉진하는 것으로 나타났다. 이어서, Caspase 9 및 Caspase 3 발현을 활성화시킴으로써 시토크롬을 방출한다 (Zuo et al., 2014). Si-SeNP가 아폽토시스 매개된 세포사멸을 유발하는지 여부를 조사하기 위해, 세포를 Hoechst 33258 및 PI 염색으로 각각 표지함으로써 아폽토시스 속도를 측정하였다. 도 3a에 도시된 바와 같이, 대조군에서는 형광 변화는 검출되지 않았지만, 시스플라틴(cisplatin(positive duge)) 및 Si-SeNP는 아폽토시스 세포의 수를 유의하게 증가시켰다. 아폽토시스 속도는 0.8㎍/mL의 Si-SeNP 처리에서 대략 80%로 증가한 반면, 0.8㎍/mL의 실리마린이 사용될 때, 아폽토시스 속도는 약 30%였다. 이러한 결과는 Si-SeNP가 실리마린과 비교하여 위암 세포자멸사를 유도하는데 더 효과적이었다는 것을 나타낸다.

[0122] Bcl-2 패밀리는 미토콘드리아 기능장애에 의해 촉발되는 내재적 아폽토시스 경로를 촉진하거나 억제하는데 중요

한 역할을 한다(Peng et al., 2009, Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi 26, 829-835.). Bcl2는 미토콘드리아 막 투과성을 조절하고 미토콘드리아 경로에서 Bax(프로아폽토시스 유전자)를 불활성화시킴으로써 아폽토시스를 억제한다(Tan et al., 2006, J Biol Chem 281, 14764-14775.). Bcl2의 하향-조절은 미토콘드리아 막 투과성 및 미토콘드리아에서 사이토크롬 c의 방출을 향상시키는 Bax 발현을 활성화시킬 수 있다(Elmore, 2007, Toxicol Pathol 35, 495-516.). 시토크롬 c의 방출은 후속적으로 Caspase 9 및 Caspase 3을 포함하는 아폽토시스 활성화제의 발현을 용이하게 하여, 프로그래밍된 세포 사멸을 초래한다(Garrido et al., 2006, Cell Death Differ 13, 1423-1433.).

[0123] AGS 세포에서 미토콘드리아 아폽토시스에 대한 Si-SeNP의 효과를 조사하기 위해, 본 실시예에서 각각 Bax, Bcl2, Cyt C, Caspase 9 및 Caspase 3을 포함하는 아폽토시스 신호전달 경로에 관여하는 중요한 단백질의 발현 수준을 각각 측정하였다. 도 3b에 나타난 바와 같이, BAX(5.87배 및 7.48배), Cyt C(13.23배 및 25.87배), Caspase 3(23.64배 및 60.98배) 및 Caspase 9(17.03배 및 52.3배)의 mRNA 발현이 실리마린 및 Si-SeNP 처리된 AGS 세포에서 관찰되었고, BCL-2 mRNA 발현은 각각 0.5배 및 0.31배까지 감소되었다. 도 3c에 나타난 바와 같이, 단백질 수준과 관련하여 유사한 경향이 관찰되었다. 이러한 결과는 Si-SeNPs가 AGS 세포에서 미토콘드리아 경로를 통해 아폽토시스를 유도하였다는 것을 명확하게 보여주었다.

[0125] **실시예 5. AGS 세포에서의 Si-SeNP의 자가포식 플럭스(autophagy flux) 악화를 통한 아폽토시스 유발**

[0126] 자가포식은 고도로 보존된 이화 과정이고, 또한 암 세포에 대한 자가-파괴 과정일 수 있다(Sophia et al., 2018, Cell Death Dis 9, 1087.). 본 실시예에서 AGS 세포에 대한 세포독성에 대한 Si-SeNP의 효과가 자가포식 경로에 의해 매개되었는지 여부를 조사하기 위해, Beclin1, LC3-II/I 및 p62를 포함하는 자가포식 플럭스의 바이오마커를 Si-SNP 처리된 세포에서 qRT-PCR 및 웨스턴 블롯팅 분석을 이용하여 검출하였다.

[0127] 도 4a에 나타난 바와 같이, Si-SeNP의 처리 후, Beclin1(4.07배) 및 LC3-II(2.74배)의 발현은 유의하게 증가되었고, 도 4b에 나타난 바와 같이 단백질 발현 수준은 또한 각각 2.92 및 3.73배로 상승되었다. 반면, 도 4b에 나타난 바와 같이 p62는 비처리된 대조군 세포와 비교하여 유의하게 분해되었다. 또한, 도 4c에 나타난 바와 같이, Si-SeNP 처리된 AGS 세포에서는 실리마린-처리된 세포에 비해 유의하게 더 높은 내인성 LC3 puncta가 있었다. 이러한 데이터는 Si-SeNP가 AGS 세포에서 자가포식 플럭스를 유발하는 것을 확인시켜 주었다.

[0128] 이러한 결과는 몇몇 자가포식 유도제가 암세포에서 LC3-II 발현 및 p62 분해를 유도함으로써 향상된 항종양 효과를 나타낸다는 것(예컨대 Rapa (악성 신경교종을 억제함) 및 에를로티닙 (비-소세포 폐암을 억제시킴))을 보여주는 이전의 연구 결과와 일치한다(Carayol 등, 2010, Proc Natl Acad Sci U S A 107, 12469-12474; Gorzalczany 등, 2011, Cancer Lett 310, 207-215.).

[0129] 상기 결과에 기초하여, Si-SeNP는 AGS 세포에서 아폽토시스 신호전달 및 과도한 자가포식을 유발시킴으로써 세포 사멸을 유도하는 것으로 보였다. 아폽토시스와 자가포식 사이의 생물학적 상관관계를 밝히기 위해, AGS 세포를 자가포식 유도제(Rapa, 100nM) 또는 자가포식으로 억제제(CQ, 30μM)로 전처리한 후, Si-SeNP로 처리하였다. 처리되지 않은 세포를 대조군으로서 사용하였다. 먼저, 상기 참고예의 방법과 같이, 면역조직화학적 염색에 의해 p62의 발현 수준을 조사하였다. 도 4d에 나타난 바와 같이, Rapa가 p62 분해를 촉진시켰고, 반면에 CQ는 Si-SeNP로 처리된 AGS 세포에서 p62 분해를 역전시켰으며, 이는 Si-SeNP로 처리된 AGS 세포에서 각각 Rapa 및 CQ에 대한 반응으로 자가포식의 촉진 및 억제를 확인시켜 주었다. 또한, 자가포식 관련 바이오마커, 예컨대 LC3-II/I, p62 및 아폽토시스 마커의 단백질 발현 수준을 조사하였다(도 4e). 도 4e에 나타난 바와 같이, Rapa는 Si-SeNP-처리된 AGS 세포에서 LC3-II의 단백질 발현을 악화시켰고, CQ는 이 과정을 억제하였다. 그러나, p62의 발현 수준은 반대의 경향을 나타내어, Si-SeNP 및 Rapa로 공동-처리된 세포에서 Si-SeNP 단독으로 처리한 세포에 비해 p62가 하향-조절되는 것이 관찰되었고, 한편 CQ는 Si-SeNP로 처리된 AGS 세포에서 p62의 발현 수준을 회복시켰다. 또한, 아폽토시스 마커 (Bax, Bcl-2 및 Caspase 3)의 단백질 발현을 검출하였다. 도 4e에 나타낸 바와 같이, Bcl2를 제외한 모든 바이오마커의 단백질 발현 수준은 Si-SeNP 단독 처리된 세포와 비교하여 Rapa로 공동 처리된 세포에서 유의하게 상향조절되는 반면, CQ는 Bax/Bcl-2 및 Caspase 3 발현의 감소에 의해 입증되는 바와 같이 Si-SeNP 처리된 세포에서 아폽토시스 수준을 감소시켰다.

[0130] 유사한 효과가 생/사 염색에서 관찰되었다. 도 5a에 나타낸 바와 같이, Si-SeNP는 대조군과 비교하여 유의한 세포 사멸을 유도하였다. Rapa는 Si-SeNP 처리된 AGS 세포에서 죽은 세포의 수를 유의하게 증가시켰고, CQ는 부분적으로 Si-SeNP에 의해 유도된 세포 사멸을 부분적으로 역전시켰다. 도 5b에 나타난 바와 같이, MTT 분석은 또

한 CQ가 Si-SeNP 처리군에 비해 세포 생존력을 상당히 회복시켰다는 것을 보여주었다. 이들 증거는 Si-SeNP가 AGS 세포에서 자가포식 플럭스를 악화시킴으로써 아폽토시스를 촉발시키는 것을 제안하였으며, 이는 아폽토시스 매개 세포 사멸에서 자가포식으로의 역할을 입증하였다.

[0132] **실시예 6. AGS 세포에서 Si-SeNP의 PI3K/AKT/mTORC1 경로의 억제를 통한 자가포식을 유도**

[0133] mTOR(mammalian target of rapamycin)은 자가포식의 주요 음성 조절자 및 PI3K/AKT 경로의 하류 표적이다 (Dobbin and Landen, 2013, Int J Mol Sci 14, 8213-8227.). mTOR은 세포 성장 및 분화를 자극하는 성장 인자의 수용체, 뿐만 세포 사멸 신호에 대한 세포 저항을 강화하는 성장 인자 수용체에 의해 활성화된다 (Amaral et al., 2018, J Steroid Biochem Mol Biol 183, 51-61.).

[0134] 본 실시예에서 PI3K/AKT/mTOR 경로가 Si-SeNP에 의해 유발된 자가포식에 관여하는지 여부를 확인하기 위해, Si-SeNP 처리된 AGS 세포에서 PI3k/AkT/ mTOR 경로의 핵심 신호의 발현 수준을 검출하였다. 도 6a에 나타낸 바와 같이, Si-SeNP는 AGS 세포에서 PI3K/AKT/p70S6K1 전사체의 mRNA 발현을 억제하였다. 한편, 도 6b에 나타난 바와 같이, PI3K, AKT, 및 p70S6K 단백질의 인산화 수준도 Si-SeNP로의 처리 후 AGS 세포에서 유의하게 감소되었다. 이들 결과로부터 PI3K/AKT/mTOR 경로에 대한 Si-SeNP의 억제 효과를 확인하였다.

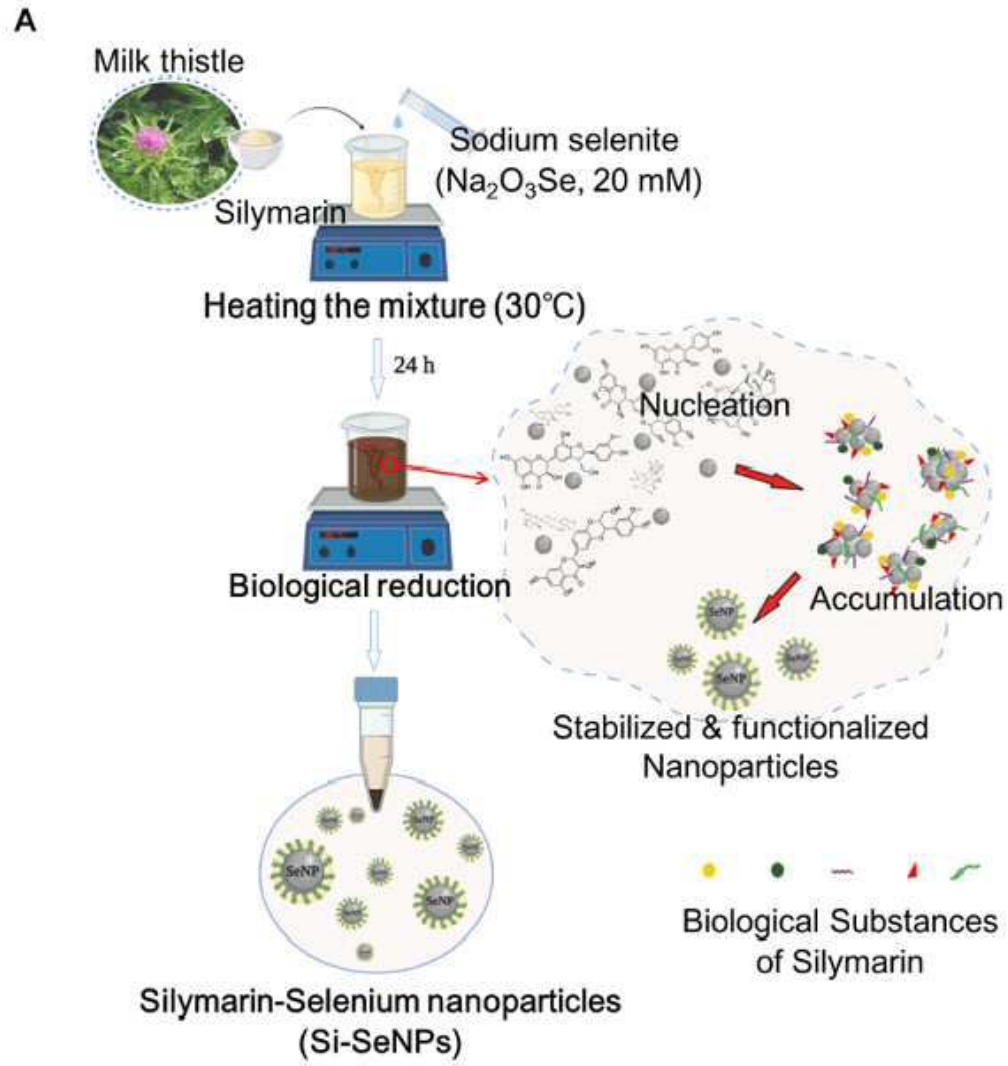
[0135] AGS 세포에서, PI3K/Akt/mTOR 신호전달이 Si-SeNP로 유발된 자가포식성 플럭스에 의해 매개되는지 확인하기 위해, 본 실시예에서 AGS 세포를 PI3K/AKT 경로의 활성화제인 PI3K 작용제(agonist)(740 Y-P, 30μM)로 처리하고 경로에서 주요 단백질의 발현 수준을 관찰하였다. 도 7a에 나타난 바와 같이, 740 Y-P 활성화된 PI3K/AKT/mTOR 경로는 LC3 II 및 Beclin1의 과발현을 역전시켰고, Si-SeNP로 처리된 AGS 세포에서 p62 발현을 증가시켰다. 또한, 도 7b에 나타난 바와 같이, 740 Y-P는 Si-SeNP로 처리된 AGS 세포에서 내인성 LC3 puncta를 감소시켰다. 도 7c에 나타난 바와 같이, 이는 각각 mTOR 발현과 LC3 I($p = 0.037$)/LC3 II($p= 0.00011$) 발현 사이에 나타난 강한 상관관계가 관찰된 이전의 결과와 일치하였다. 이러한 증거로부터 AGS 세포에서 Si-SeNP에 의해 유발된 자가포식 플럭스가 PI3K/AKT/mTOR 신호전달 경로와 고도로 연관되었음을 확인할 수 있었다.

[0136] 또한, 감소된 Bax/Bcl-2, caspase 9 및 caspase 3 발현에 의해 입증되는 바와 같이 740 Y-P는 AGS 세포에서 Si-SeNP에 의해 유도된 아폽토시스 수준을 부분적으로 억제하였다(도 7d). 도 7e 및 도 7f에 나타난 바와 같이, 740 Y-P로 처리된 세포는 Si-SeNP 처리군에 비해 상당히 감소된 아폽토시스 속도를 나타내었고, 세포 생존능(cell viability)을 회복시켰다. 종합적으로, 이러한 데이터는 Si-SeNP가 AGS 세포에서 PI3K/AKT/mTOR 경로의 하향 조절을 통해 자가포식-매개 아폽토시스를 유도한다는 것을 나타내었다. 따라서, 본 연구에서 Si-SeNP에 의해 유발된 암세포 사멸은 각각 PI3K/AKT 신호전달 경로, 자가포식 플럭스 및 아폽토시스 사이의 크로스토크를 포함하였다.

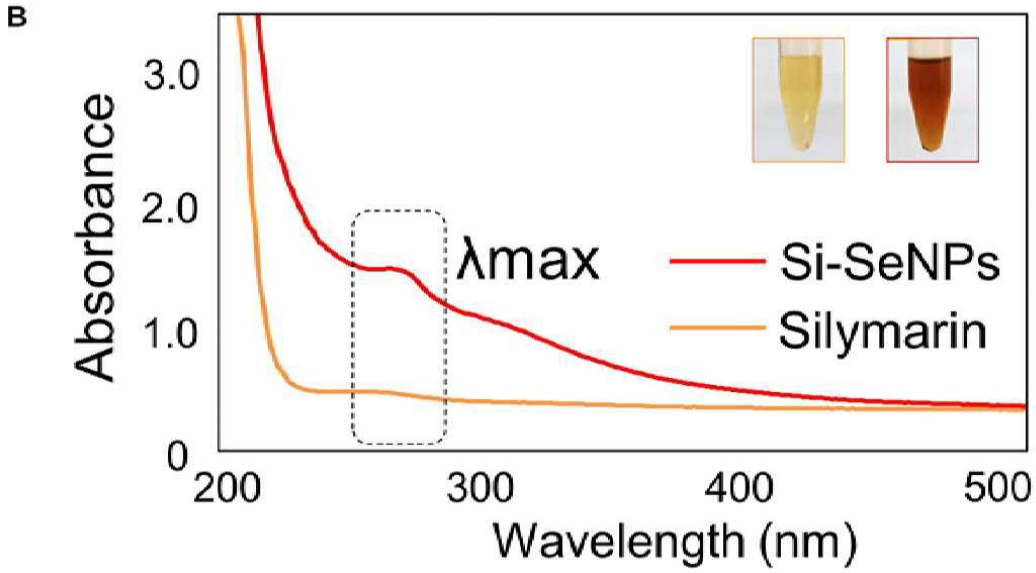
[0138] 실리마린 매개된 SeNP(Si-SeNP)는 생물학적 응용에 매우 적합하도록 환경친화적이고 효율적이며 경제적으로 성공적으로 합성되었다. 생리활성 플라보노리그난(bioactive flavonolignans)은 Si-SeNP의 생합성에 관여하였다. Si-SeNP는 다른 시험된 암 세포에 비해 AGS 세포에 대한 가장 높은 세포독성을 기록하였다. 본 발명자들은 Si-SeNP가 PI3K/Akt/mTOR 경로를 부분적으로 억제함으로써 자가포식 매개 세포자멸사를 유도함을 보여주었다. 이러한 결과는 실리마린 매개된 SeNP가 위암(GC)를 치료하기 위한 신규한 치료제로서 작용할 수 있음을 보여주는 것이다.

도면

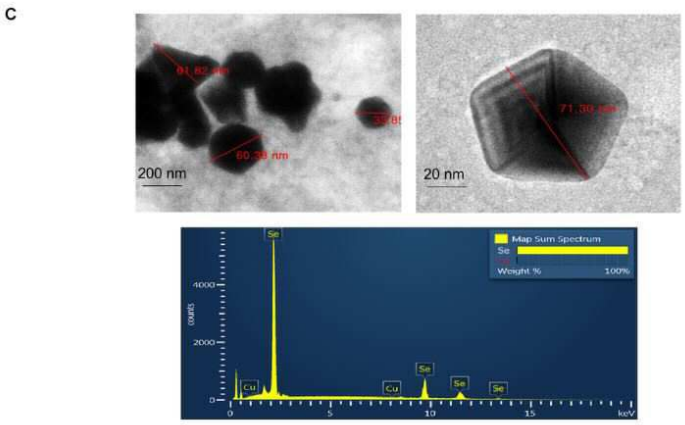
도면1a


A
Milk thistle
Silymarin
Sodium selenite
(Na_2O_3Se, 20 mM)
Heating the mixture (30°C)
24 h
Nucleation
Biological reduction
Accumulation
Stabilized & functionalized
Nanoparticles
Biological Substances
of Silymarin
Silymarin-Selenium nanoparticles
(Si-SeNPs)

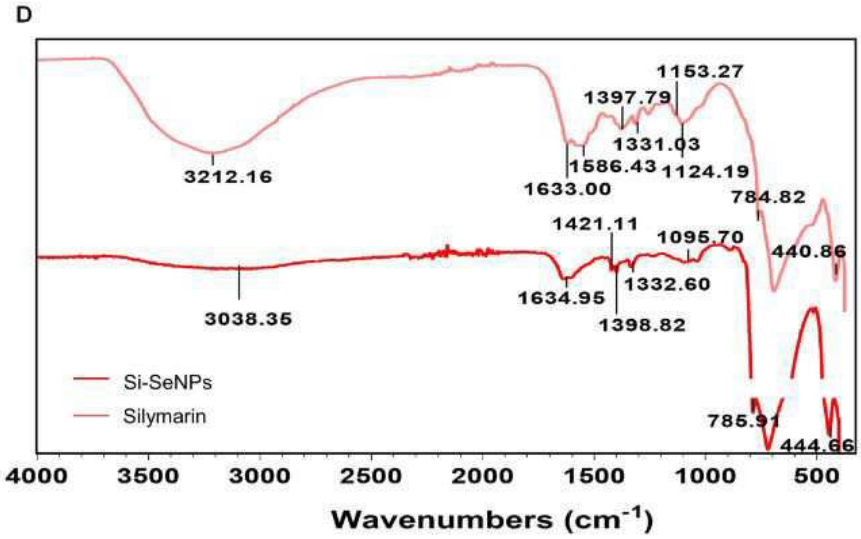
도면1b


B
Absorbance
3.0
2.0
1.0
0
200
300
400
500
Wavelength (nm)
λmax
Si-SeNPs
Silymarin

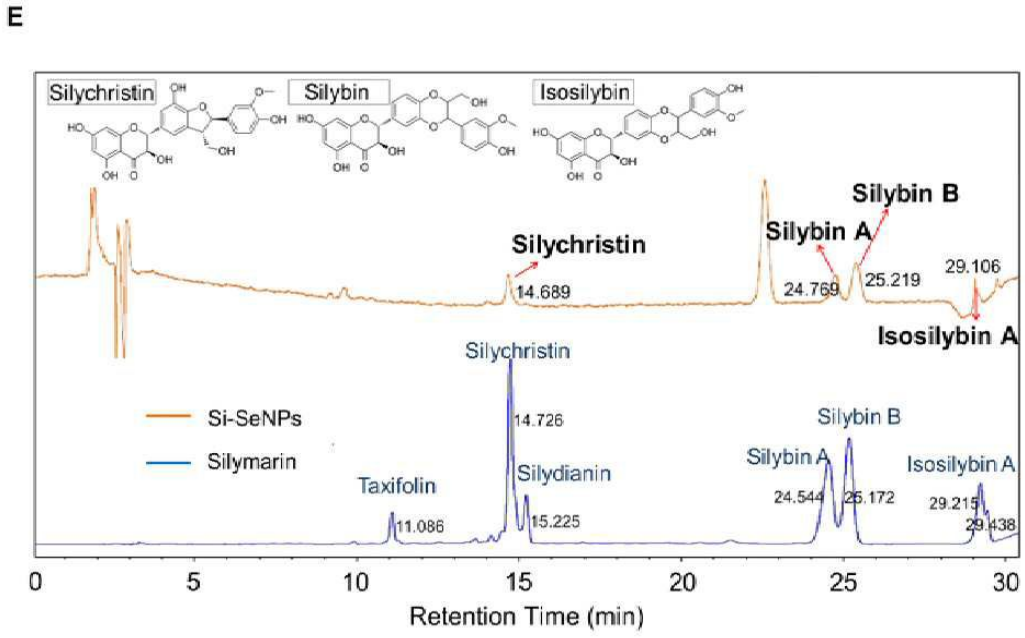
도면1c


c
200 nm
20 nm
Map Sum Spectrum
Se
Weight %
100%
Cu
Cu
Se
Se
Se
keV

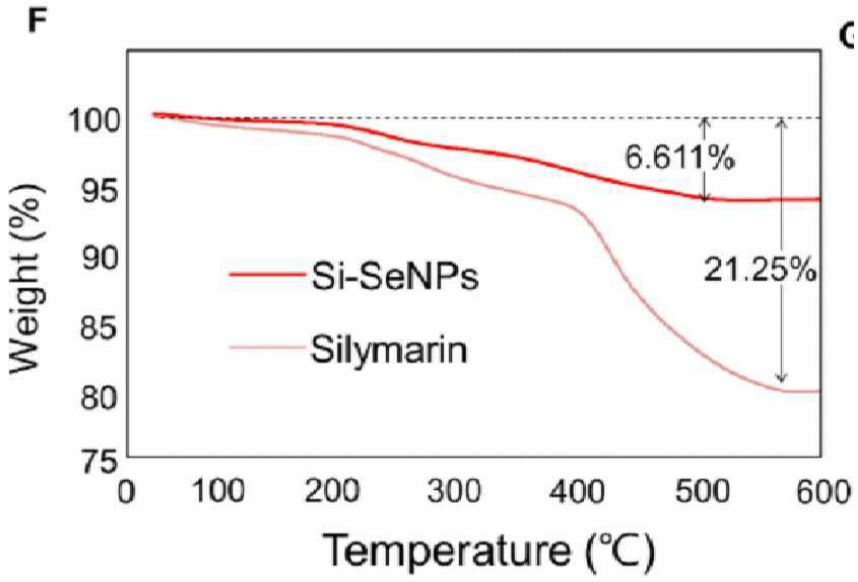
도면1d


D
3212.16
1633.00
1586.43
1397.79
1331.03
1153.27
1124.19
784.82
3038.35
1634.95
1421.11
1398.82
1095.70
1332.60
440.86
785.91
444.66
Si-SeNPs
Silymarin
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
Wavenumbers (cm-1)

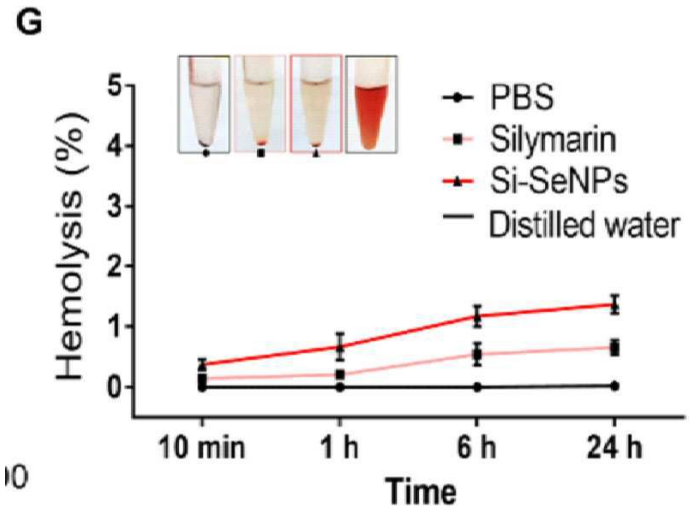
도면1e


E
Silychristin
Silybin
Isosilybin
Silychristin
14.689
Silybin A
24.769
Silybin B
25.219
29.106
Isosilybin A
Silychristin
14.726
Si-SeNPs
Silymarin
Taxifolin
11.086
Silydianin
15.225
Silybin A
24.544
Silybin B
25.172
Isosilybin A
29.215
29.438
0
5
10
15
20
25
30
Retention Time (min)

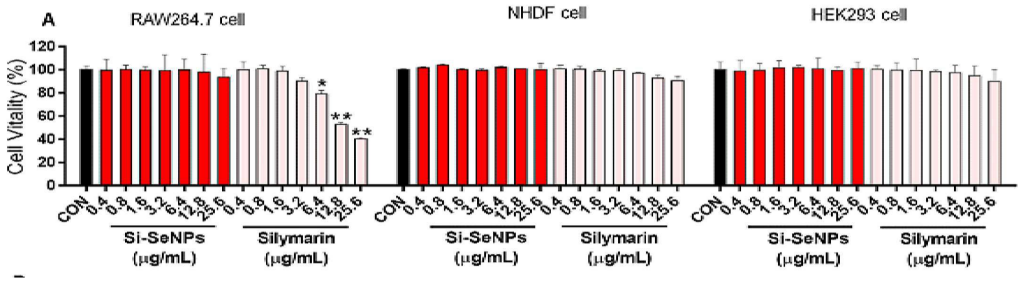
도면1f



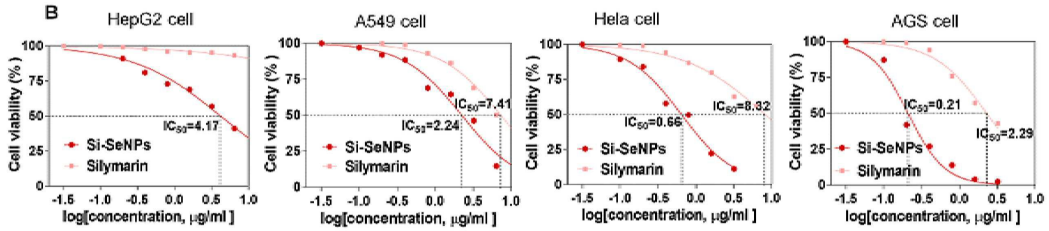
도면1g



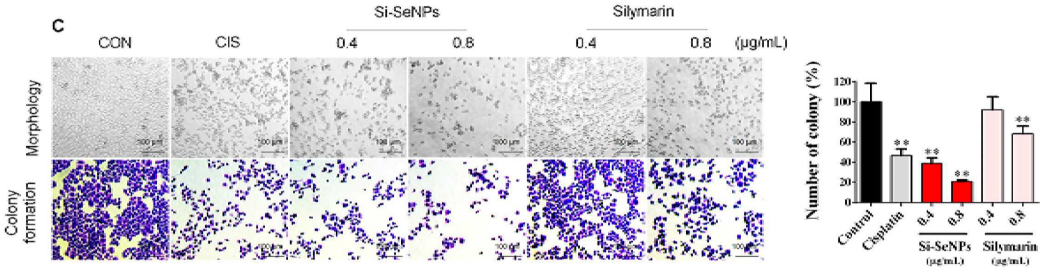
도면2a



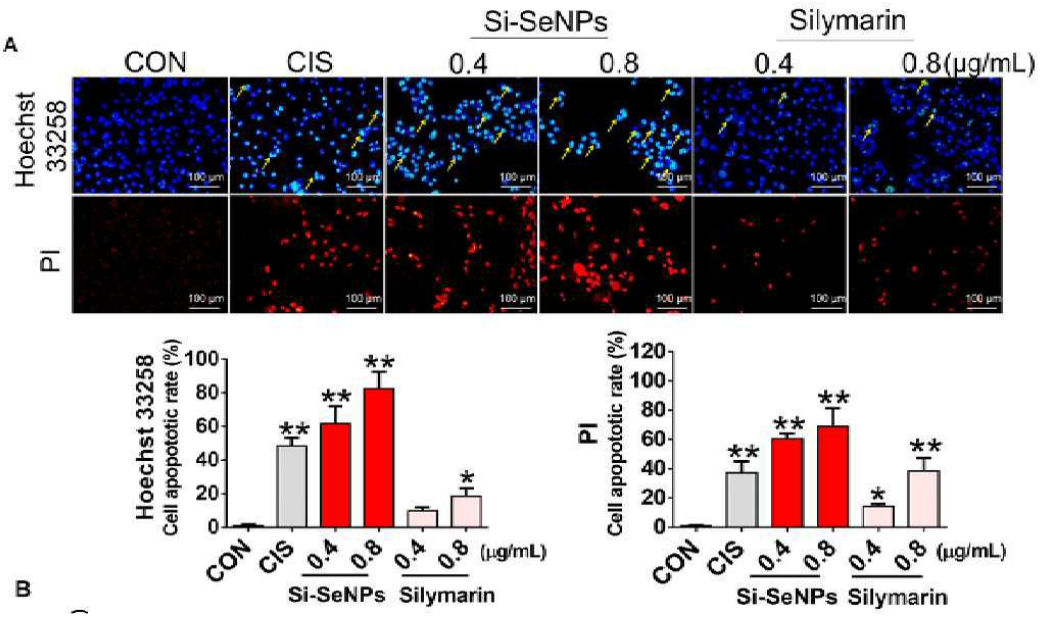
도면2b



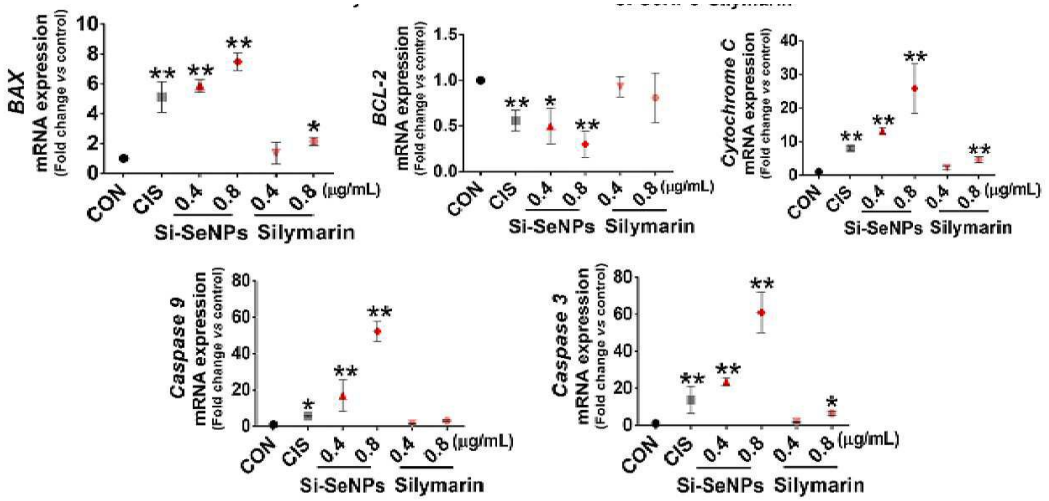
도면2c



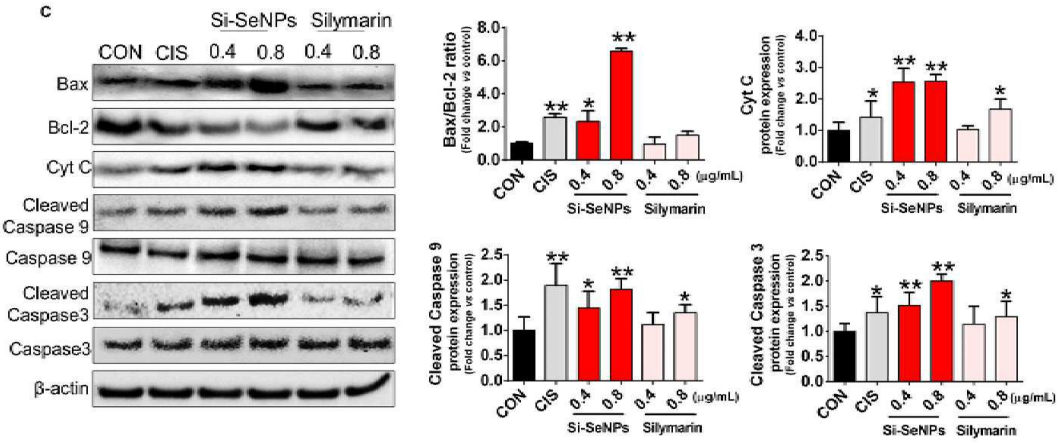
도면3a



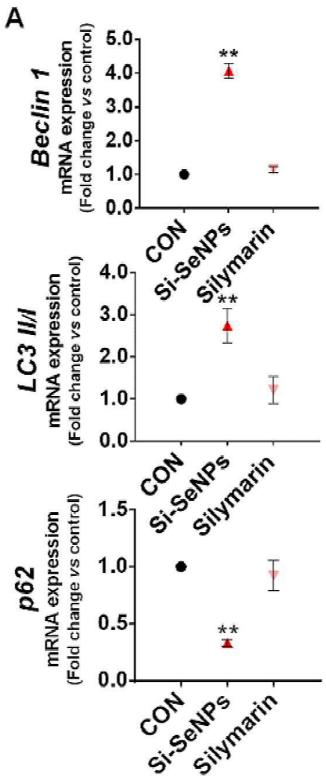
도면3b


BAX
mRNA expression
(Fold change vs control)
BCL-2
mRNA expression
(Fold change vs control)
Cytochrome C
mRNA expression
(Fold change vs control)
Caspase 9
mRNA expression
(Fold change vs control)
Caspase 3
mRNA expression
(Fold change vs control)
CON
CIS
0.4
0.8
0.4
0.8 (μg/mL)
Si-SeNPs
Silymarin

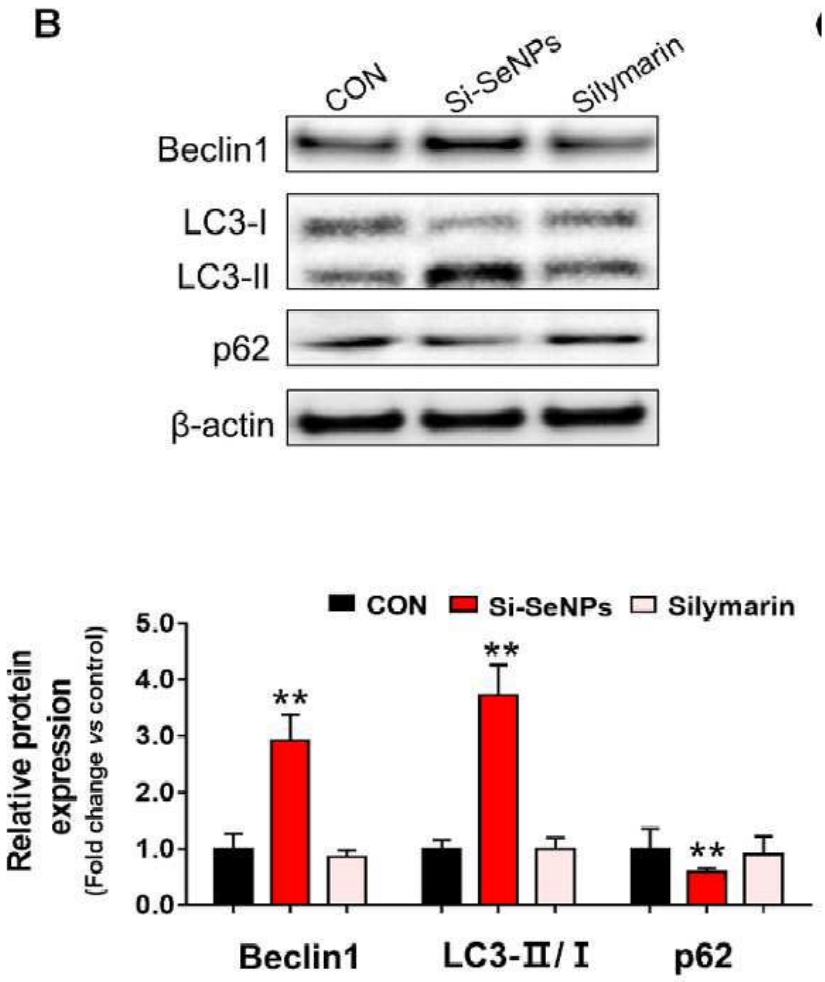
도면3c


c
Si-SeNPs
Silymarin
CON
CIS
0.4
0.8
0.4
0.8
Bax
Bcl-2
Cyt C
Cleaved Caspase 9
Caspase 9
Cleaved Caspase3
Caspase3
β-actin
Bax/Bcl-2 ratio
(Fold change vs control)
Cyt C
protein expression
(Fold change vs control)
Cleaved Caspase 9
protein expression
(Fold change vs control)
Cleaved Caspase 3
protein expression
(Fold change vs control)
(μg/mL)

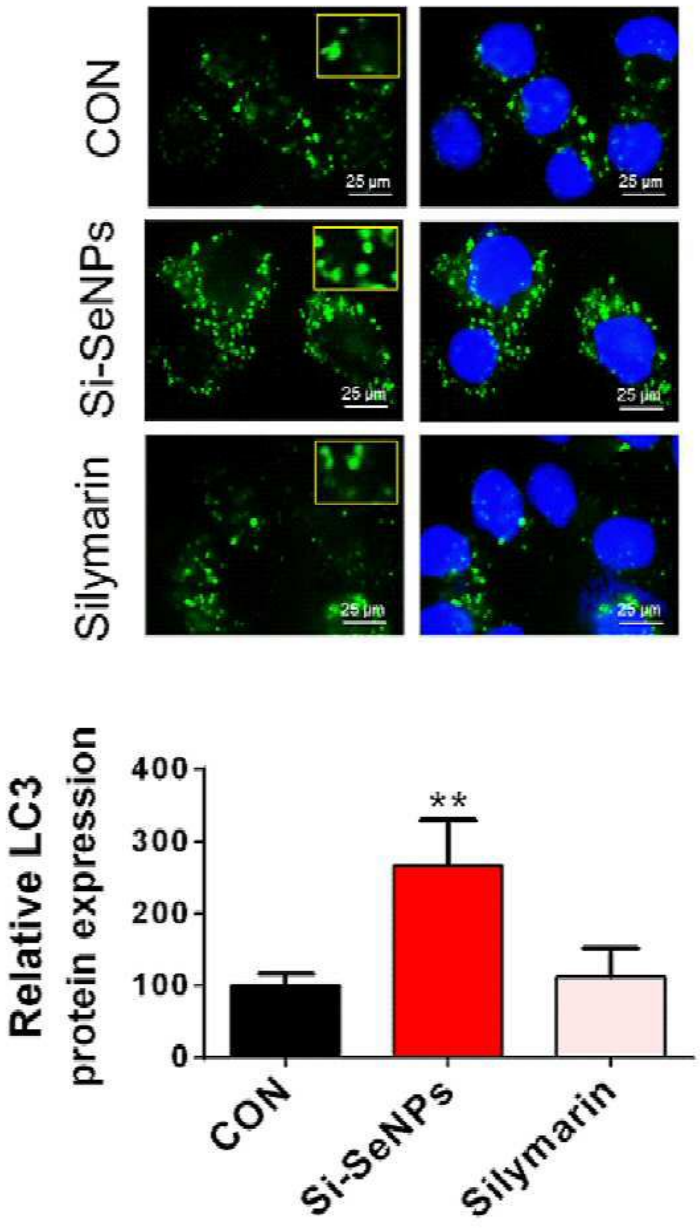
도면4a


A
Beclin 1
mRNA expression
(Fold change vs control)
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
**
CON
Si-SeNPs
Silymarin
LC3 II/I
mRNA expression
(Fold change vs control)
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
**
CON
Si-SeNPs
Silymarin
p62
mRNA expression
(Fold change vs control)
1.5
1.0
0.5
0.0
**
CON
Si-SeNPs
Silymarin

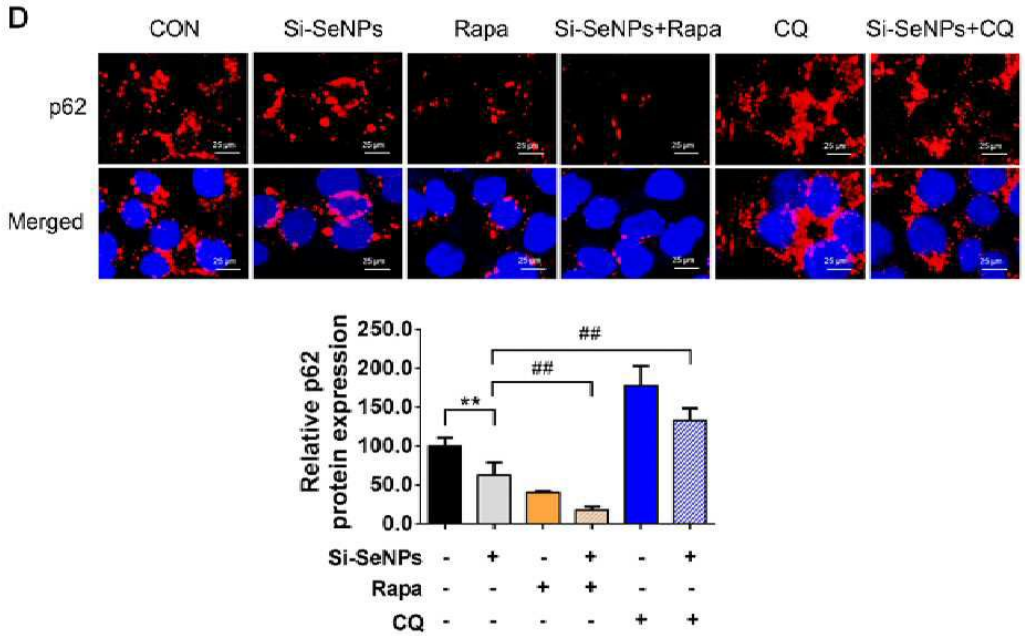
도면4b


B
CON
Si-SeNPs
Silymarin
Beclin1
LC3-I
LC3-II
p62
β-actin
CON
Si-SeNPs
Silymarin
Relative protein expression
(Fold change vs control)
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
**
**
**
Beclin1
LC3-Ⅱ/Ⅰ
p62

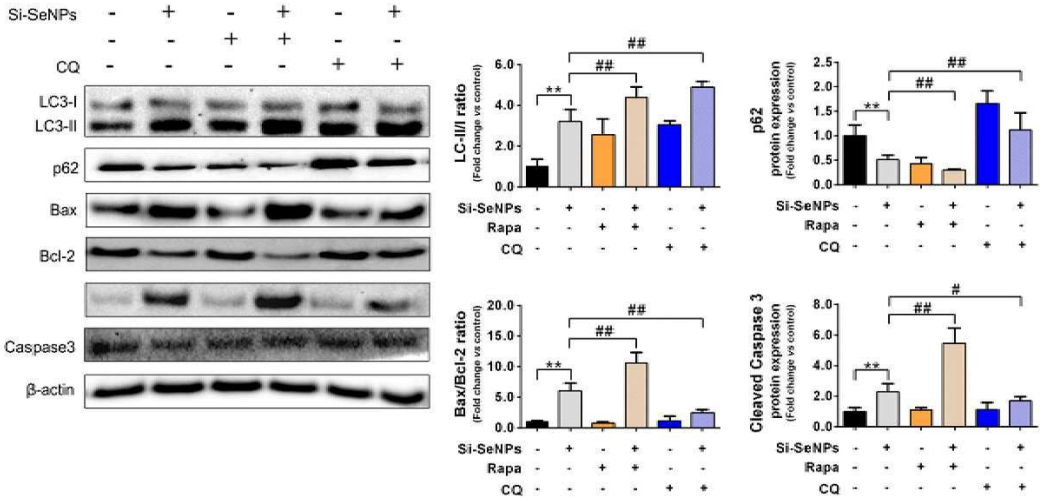
도면4c


CON
Si-SeNPs
Silymarin
25 μm
Relative LC3
protein expression
400
300
200
100
0
**
CON
Si-SeNPs
Silymarin

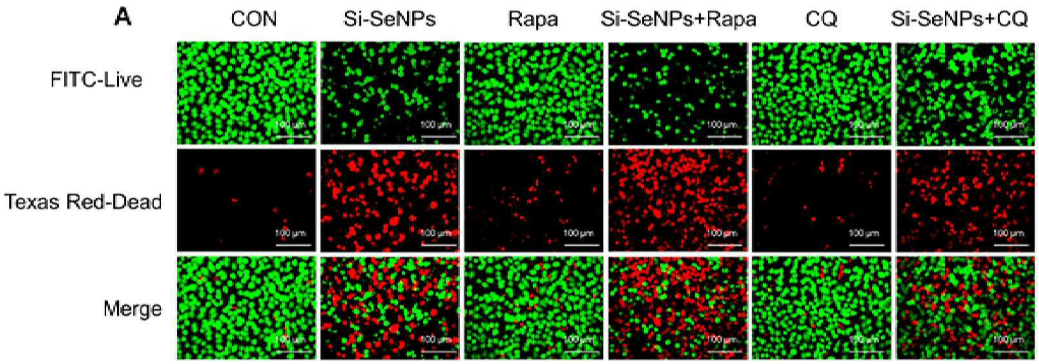
도면4d



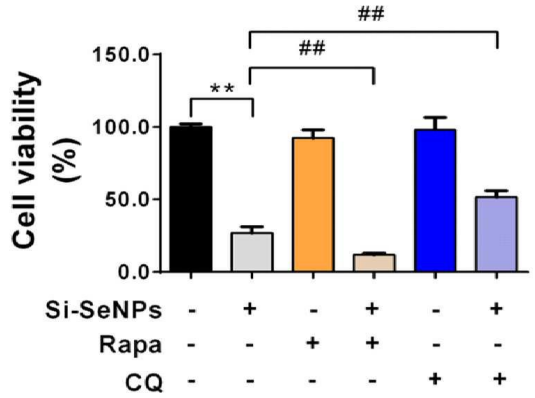
도면4e



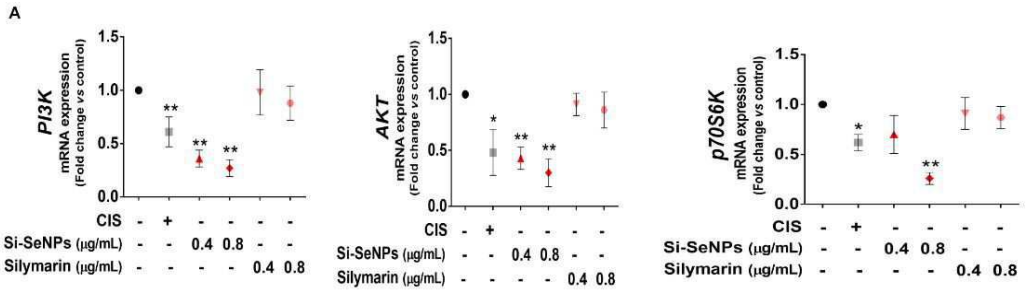
도면5a



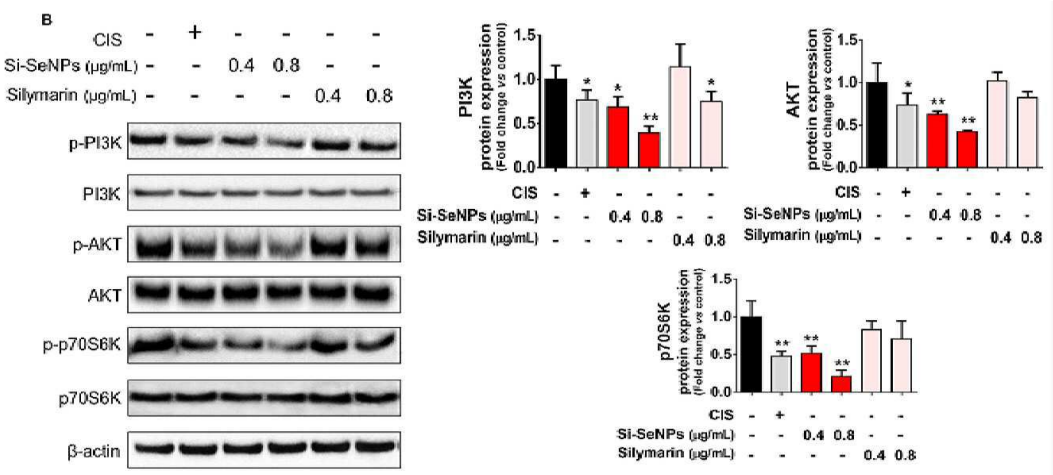
도면5b



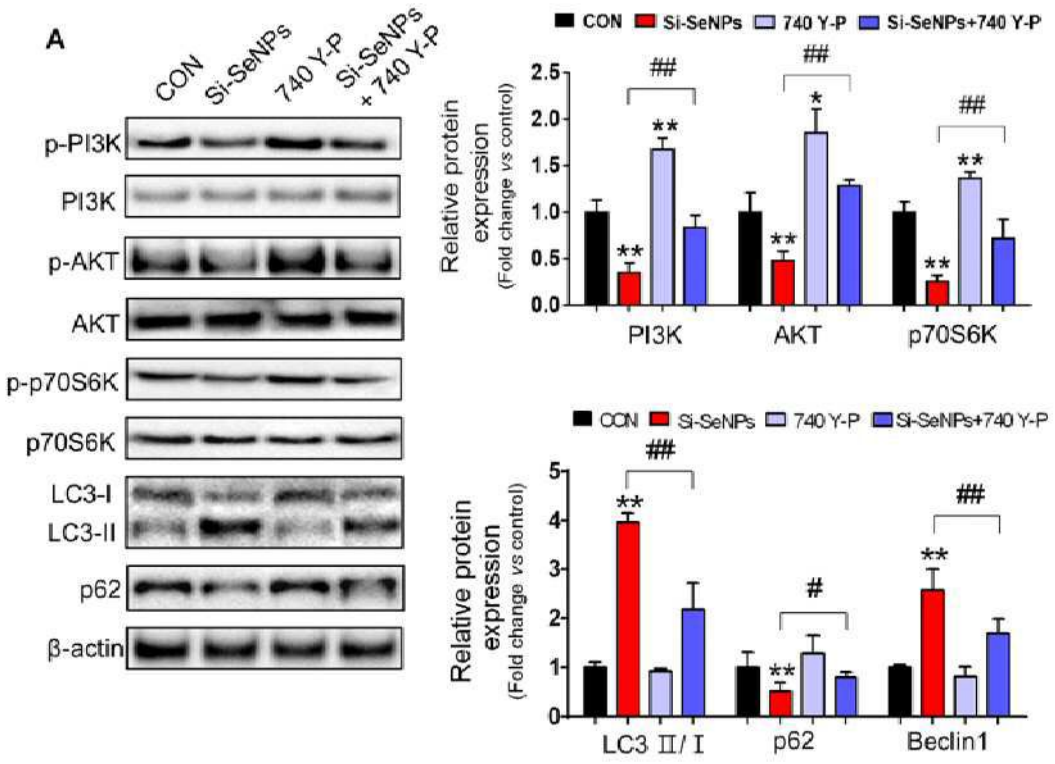
도면6a



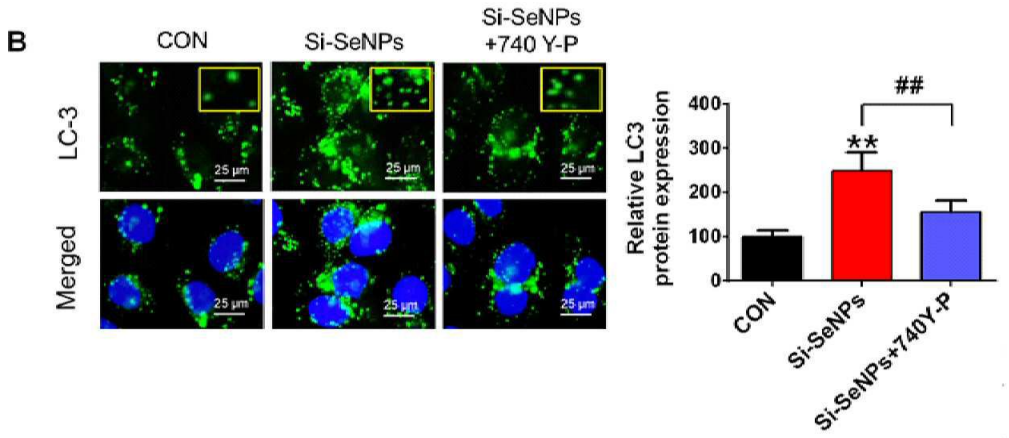
도면6b



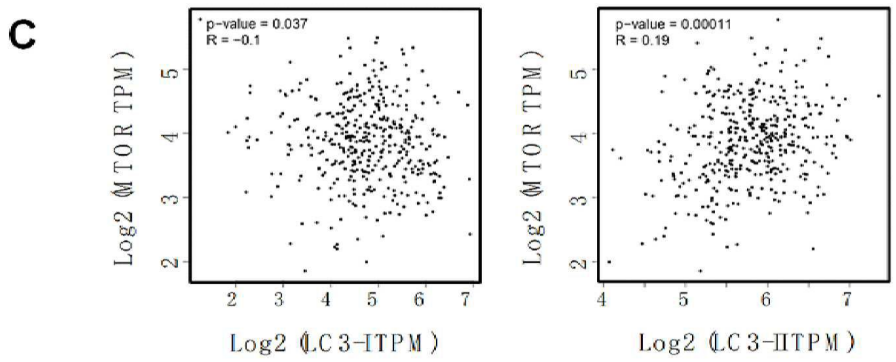
도면7a


A
CON
Si-SeNPs
740 Y-P
Si-SeNPs +740 Y-P
p-PI3K
PI3K
p-AKT
AKT
p-p70S6K
p70S6K
LC3-I
LC3-II
p62
β-actin
CON Si-SeNPs 740 Y-P Si-SeNPs+740 Y-P
Relative protein expression (Fold change vs control)
PI3K
AKT
p70S6K
LC3 Ⅱ/ Ⅰ
p62
Beclin1

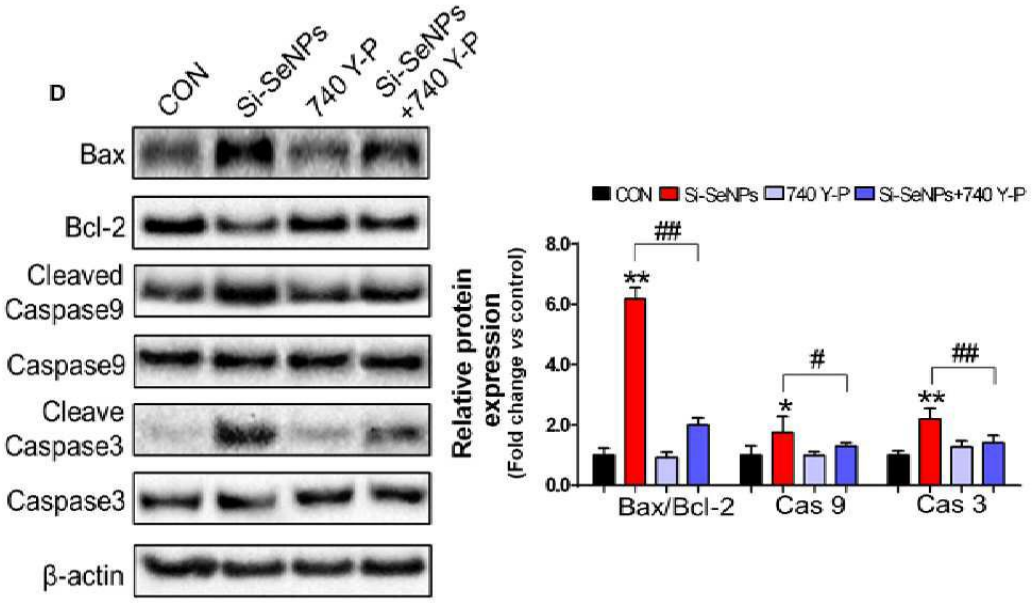
도면7b


B
CON
Si-SeNPs
Si-SeNPs +740 Y-P
LC-3
Merged
25 μm
Relative LC3 protein expression
CON
Si-SeNPs
Si-SeNPs+740Y-P

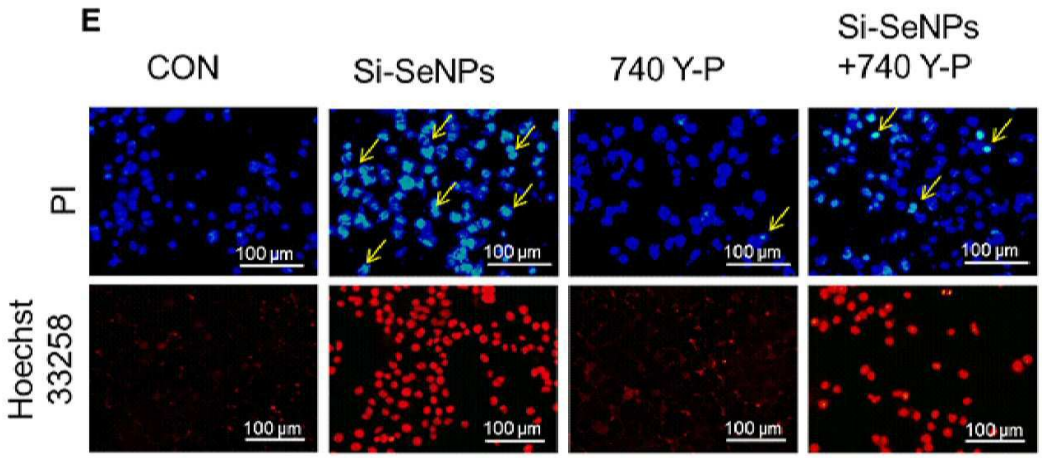
도면7c



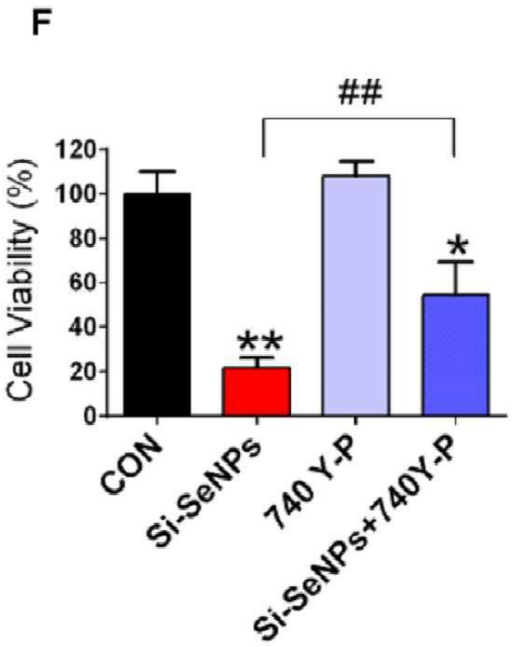
도면7d



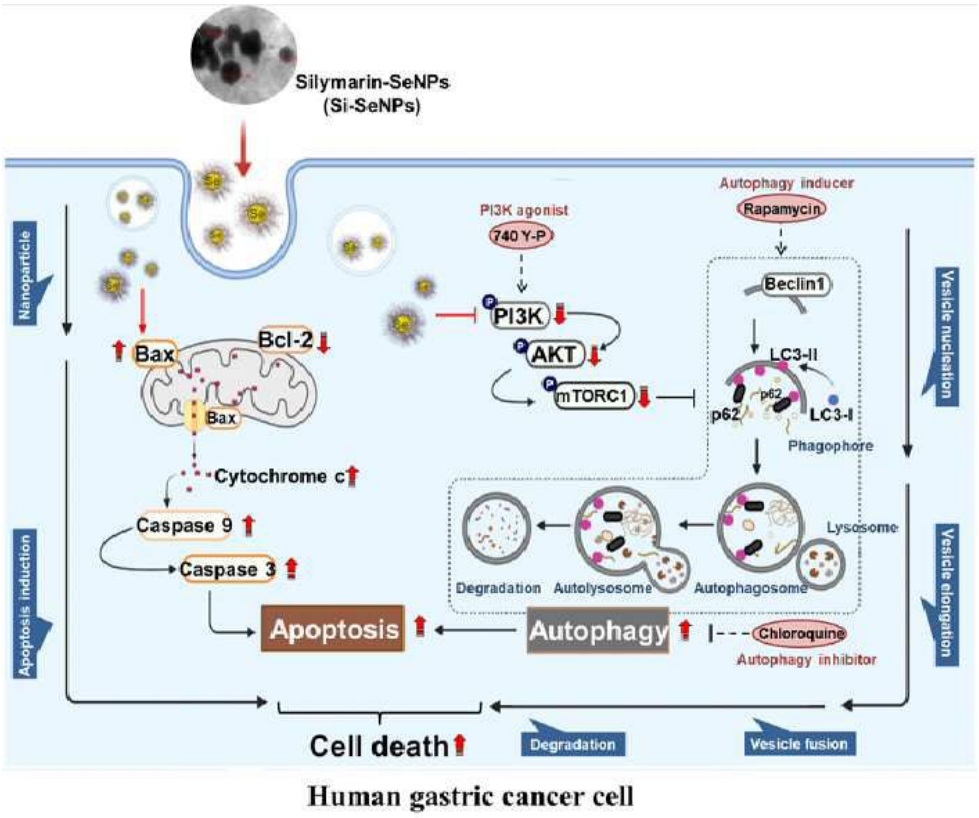
도면7e



도면7f



도면8



서 열 목 록

<110> UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY

<120> Silymarin-mediated selenium nanoparticles and uses thereof

<130> GKH20P-0194-KR-PRI

<150> KR 10-2020-0137876

<151> 2020-10-22

<160> 26

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bax_Forward

<400> 1

agcaaactgg tgctcaaggc 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bax_Reverse

<400> 2

ccacaaagat ggtcactgtc 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bcl-2_Forward

<400> 3

gtggtggagg aactcttcag 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bcl-2_Reverse

<400> 4

gttccacaaa ggcatcccag 20

<210
> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cyt c_Forward

<400> 5

gaggcaagca taagactgg 19

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cyt c_Reverse

<400> 6

tactccatca gggtatcctc 20

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Caspase 9_Forward

<400> 7

agttcccggg tgctgtcta 19

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Caspase 9_Reverse

<400> 8

gccatggtct ttctgctca 19

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Caspase 3_Forward

<400> 9

cctcagagag agacattcat g 21

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Caspase 3_Reverse

<400> 10

gcagtagtcg cctctgaag 19

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PI3K_Forward

<400> 11

agctgtggat cttagggacc tca 23

<210> 12

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PI3K_Reverse

<400> 12

accatgactg tgtaccagaa caa 23

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AKT_Forward

<400> 13

tactacgcca tgaagatcct caa 23

<210> 14

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AKT_Reverse

<400> 14

tctggaaaga gtacttcagg gct 23

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> p70S6K_Forward

<400> 15

ctccctacct cacacaagaa gctc 24

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> p70S6K_Reverse

<400> 16

gaagttcttc ccagttaatg tgtc 24

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LC3 I_Forward

<400> 17

acatgagcga gttggtcaag atca 24

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LC3 I_Reverse

<400> 18

gatggattct ggcccagtca tatt 24

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LC3 II_Forward

<400> 19

ataattagaa ggcgcttaca gctc 24

<210> 20

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LC3 II_Reverse

<400> 20

tggcaggttc tcttctctag atct 24

<210> 21

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> p62_Forward

<400> 21

acctgtctga gggcttctcg caca 24

<210> 22

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> p62_Reverse

<400> 22

ctcttctcct ctgtgctgga actc 24

<210> 23

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Beclin1_Forward

<400> 23

gccaggatgg tgtctctcga agat 24

<210> 24

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Beclin1_Reverse

<400> 24

gtggaaggtg gcattgaaga catt 24

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH_Forward

<400> 25

accacagtcc atgccatcac 20

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH_Reverse

<400> 26

ccaccaccct gttgctgtag 20