

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2024-0023827
(43) 공개일자 2024년02월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/14 (2006.01) A61K 31/352 (2006.01)
A61K 33/242 (2019.01) A61K 9/51 (2006.01)
A61P 15/02 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/14 (2013.01)
A61K 31/352 (2023.05)

(21) 출원번호 10-2022-0102014

(22) 출원일자 2022년08월16일

심사청구일자 2022년08월16일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

정민형

서울특별시 동대문구 경희대로 26-6(회기동)

정남현

서울특별시 성북구 보국문로 116, 315동 501호(정릉동, 정릉힐스테이트3차)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인정진

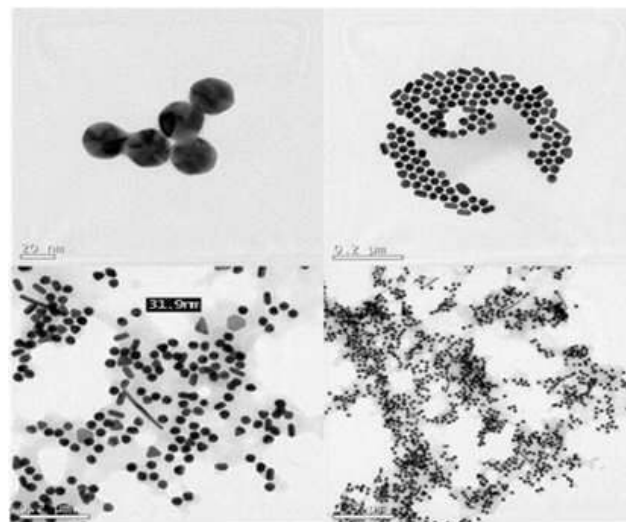
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 피세틴을 포함하는 금 나노 입자 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 금 나노 입자 및 피세틴을 포함함으로써, 평활근종 세포만을 선택적으로 타겟팅 하여 사멸시키는 사멸 효과가 우수하면서도, 세포 사멸과 함께 수반될 수 있는 염증 유발 등의 부작용을 감소시키는 효과가 우수한 나노 입자 복합체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 33/242 (2022.01)

A61K 9/51 (2013.01)

A61P 15/02 (2018.01)

(72) 발명자

이진우

서울특별시 성북구 오패산로 90, 118동 1801호(하월곡동, 래미안월곡아파트)

이동건

서울특별시 성북구 안암로9가길 72, 302호(안암동 5가)

김경숙

경기도 성남시 수정구 위례동로 61, 5619동 1605호(창곡동, 위례 자연엔 래미안이편한세상)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711163278
과제번호	2021R1F1A1050913
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	금나노-항산화제 (fisetin) 복합체 기반 자궁근종 표적치료 효과 및 작용기전 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희의료원
연구기간	2021.06.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

금 나노 입자 및 피세틴을 포함하는 것을 특징으로 하는 나노 입자 복합체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 복합체는 직경이 30 내지 60nm인 것을 특징으로 하는 나노 입자 복합체.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 금 나노 입자는 25 내지 50nm인 것을 특징으로 하는 나노 입자 복합체.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 복합체는 코어-셸 형태로서,

상기 코어는 상기 금 나노 입자를 포함하고, 상기 셸은 상기 피세틴을 포함하는 것을 특징으로 하는 나노 입자 복합체.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 복합체는 그 형태가 구형인 것을 특징으로 하는 나노 입자 복합체.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 나노 입자 복합체를 포함하는 평활근종의 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 평활근종은 자궁근종을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 8

(A) 금 나노 입자의 합성 단계; 및

(B) 상기 금 나노 입자와 피세틴(fisetin)을 결합하는 단계; 를 포함하는 것을 특징으로 하는 나노 입자 복합체의 제조방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 (B) 단계는 금 나노 입자 용액; 및 유기용매에 용해된 피세틴 용액을 혼합하는 단계를 포함하며,

상기 금 나노 입자 용액 및 피세틴 용액의 혼합비는 8:1 내지 25:1인 것을 특징으로 하는 나노 입자 복합체의 제조방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 (A) 단계는,

(a) 금 전구체 및 계면활성제를 포함하는 성장용액(growth solution)을 제조하는 단계; 및

(b) 금 전구체 및 유기산을 포함하는 시드용액(seed solution)을 제조하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 나노 입자 복합체의 제조방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 (A) 단계는 상기 (b) 단계 이후에,

(c) 상기 성장용액 및 시드용액을 혼합하여 제1혼합액을 제조하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 나노 입자 복합체의 제조방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 (A) 단계는 상기 (c) 단계 이후에,

(d) 상기 제1혼합액에 상기 (a) 단계에서 제조된 성장용액을 혼합하여 제2혼합액을 제조하는 단계; 및

(e) 상기 제2혼합액에 상기 (a) 단계에서 제조된 성장용액을 혼합하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 나노 입자 복합체의 제조방법.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 성장용액 및 시드용액의 혼합비는 6:1 내지 1:1인 것을 특징으로 하는 나노 입자 복합체의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 피세틴을 포함하는 금 나노 입자 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 평활근종(leiomyoma)은 평활근(smooth muscle)에 발생하는 양성 종양으로, 자궁, 소화관, 피부 신장 등에 주로 발생한다. 조직학적으로는 방추형의 평활근 세포의 다발이 여러가지 방향으로 들어오고 주위와의 경계가 명료하다. 소화관의 평활근종은 임상적으로는 점막하 근종으로 본다. 평활근종 중에서도 특히 많이 발생하는 근종은 자궁에 생기는 것을 자궁 근종이다.

[0003] 자궁 근종(uterine myoma)은 여성에게 발생하는 종양들 중 가장 흔한 종양으로, 가임기 여성의 약 25~35%에서 발견되며, 특히 35세 이상의 여성들 중 40~50%에서 발견되는 매우 흔한 양성 종양이며, 자궁암 등의 일반적인 악성종양과는 구별된다. 자궁근종의 원인은 아직까지 정확히 알려져 있지 않으나, 자궁의 평활근을 이루는 세포 중 하나가 비정상적으로 증식하여 하나의 자궁근종을 형성하는 것으로 여겨진다.

[0004] 자궁 근종이 빠르게 자라거나 이에 수반되는 증상이 있을 경우 치료가 필요한데, 일반적으로 치료는 크게 수술적 치료와 비수술적 치료로 나뉘며, 대부분의 경우 수술적 치료에 의존하고 있는 추세이나, 최근에는 비수술적 방법들이 개발 연구되고 있다.

[0005] 이와 관련하여, 대한민국 공개특허 제10-2015-0094364호에는 플라보피리돌을 유효성분으로 함유하는 자궁근종 예방 또는 치료용 조성물에 대하여 개시되어 있다.

[0006] 하지만, 여전히 평활근종 치료를 위한 약학적 조성물에 대해서는 그 연구 결과가 많지 않으며, 특히 다른 부작용

용을 유발하지 않으면서도 평활근종만을 선택적으로 타겟팅하는 약물에 대한 기술 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2015-0094364(2015.08.19)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기와 같은 문제를 해결하기 위한 것으로서, 근종 세포에 선택적 사멸 효과가 우수하면서도, 이에 따른 염증 유발 등에 대한 부작용을 저하시킬 수 있는 나노 입자 복합체를 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 나노 입자 복합체의 제조방법을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 나노 입자 복합체는 금 나노 입자 및 피세틴을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0011] 또한, 본 발명의 식품 조성물은 전술한 나노 입자 복합체를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0012] 또한, 본 발명의 나노 입자 복합체의 제조방법은 (A) 금 나노 입자의 합성 단계; 및 (B) 상기 금 나노 입자와 피세틴(fisetin)을 결합하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명의 나노 입자 복합체는 평활근종 세포만을 선택적으로 타겟팅 하는 사멸효과가 우수하여, 평활근종의 예방, 개선 또는 치료 효과가 우수하며, 이에 수반될 수 있는 염증 반응 등의 부작용이 감소되는 이점이 있다.

[0014] 또한, 본 발명의 식품 조성물은 상기 나노 입자 복합체를 포함함으로써, 평활근종의 예방 또는 개선 효과가 우수한 이점이 있다.

[0015] 또한, 본 발명의 나노 입자 복합체의 제조방법은 금 나노입자 및 피세틴을 포함하는 나노 입자를 제조할 수 있는 이점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 본 발명의 실시예에서 제조된 나노 입자 복합체를 전자 현미경으로 관찰한 결과(실험예 1)이다.

도 2는 본 발명의 제조예의 금 나노 입자(PVP+GNPs), 피세틴(PVP+FIS, fisetin) 및 실시예의 나노 입자 복합체(FIS@PVP-GNPs)의 흡광도를 측정한 결과(실험예 1)이다.

도 3은 본 발명의 실시예의 나노 입자 복합체의 pH에 따른 약물(fisetin) 방출능을 실험한 결과(실험예 1)이다.

도 4는 본 발명의 제조예의 금 나노 입자(GNPs)의 농도별 LDH 수준을 측정한 실험 결과(실험예 2)이다.

도 5는 본 발명의 제조예의 금 나노 입자(GNPs), 피세틴(FIS, fisetin), 실시예의 나노 입자 복합체(FIS@PVP-GNPs)의 LDH 수준(LDH leakage)을 측정한 실험 결과(실험예 2)이다.

도 6은 본 발명의 피세틴(FIS, fisetin) 및 실시예의 나노 입자 복합체(FIS@PVP-GNPs)의 TNF- α 사이토카인 수준을 측정한 실험 결과(실험예 3)이다.

도 7은 본 발명의 피세틴(FIS, fisetin) 및 실시예의 나노 입자 복합체(FIS@PVP-GNPs)의 IL-6 사이토카인 수준을 측정한 실험 결과(실험예 3)이다.

도 8은 본 발명의 피세틴(FIS, fisetin) 및 실시예의 나노 입자 복합체(FIS@PVP-GNPs)의 MCP-1 사이토카인 수준을 측정한 실험 결과(실험예 3)이다.

도 9는 본 발명의 제조예의 금 나노 입자(GNPs), 피세틴(Fisetin) 및 실시예의 나노 입자 복합체(GFs)를 자궁 근종 세포에 처리한 후 24시간 동안 배양한 결과(실험예 4)이다.

도 10은 본 발명의 제조예의 금 나노 입자(GNPs), 피세틴(Fisetin) 및 실시예의 나노 입자 복합체(GFs)를 자궁 근종 세포에 처리한 후 48시간 동안 배양한 결과(실험예 4)이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 본 발명에서 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0020] 이하, 본 발명에 대하여 더욱 상세히 설명한다.

[0022] 본 발명의 한 양태에 따른 나노 입자 복합체는 금 나노 입자 및 피세틴을 포함함으로써, 평활근종 세포만을 선택적으로 타겟팅 하여 사멸시키는 사멸 효과가 우수하면서도, 세포 사멸과 함께 수반될 수 있는 염증 유발 등의 부작용은 감소되는 이점이 있다.

[0024] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 상기 나노 입자 복합체는 그 직경이 30 내지 60nm일 수 있으며, 바람직하게는 35 내지 50nm일 수 있고, 보다 바람직하게는 38 내지 45nm 일 수 있다. 나노 입자 복합체의 직경이 상기 범위 내로 포함되는 경우, 타겟하는 근종 세포로의 약물 전달이 보다 용이하여 선택적 세포 사멸효과가 보다 우수할 수 있으며, 상기 범위 미만일 경우 세포 사멸 효과가 저하될 수 있고, 상기 범위를 초과하는 경우 체내 세포로의 침투가 어려워 타겟하는 근종 세포로의 약물 전달 효과가 저하될 수 있다.

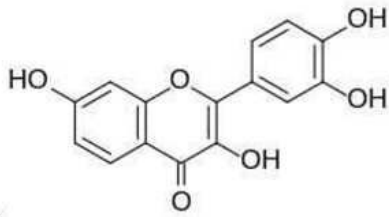
[0026] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 상기 나노 입자 복합체는 코어-셸 형태로서, 상기 코어는 금 나노 입자를 포함하고, 상기 셸은 피세틴을 포함하는 형태일 수 있다. 이와 같이, 본 발명의 나노 입자 복합체는 금 나노 입자를 포함하는 코어 및 피세틴을 포함하는 셸의 코어-셸 형태로서, 피세틴을 타겟하는 근종 세포로 용이하게 전달할 수 있으면서도, 코어에 포함되는 금 나노 입자를 통해 염증 반응 등의 부작용을 억제할 수 있는 이점이 있다.

[0028] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 상기 금 나노 입자는 그 직경이 25 내지 50nm, 바람직하게는 30 내지 45nm일 수 있고, 보다 바람직하게는 35 내지 40nm일 수 있다. 금 나노 입자의 직경이 상기 범위 내로 포함되는 경우, 이를 포함하는 나노 입자 복합체의 직경을 용이하게 조절할 수 있으며, 피세틴을 포함하는 셸의 형성이 용이할 수 있고, 상기 범위 미만인 경우 염증 반응 등의 부작용 등이 유발될 수 있으며, 상기 범위를 초과하는 경우 이를 포함하는 나노 입자 복합체의 전체적인 크기가 커짐으로 인해 타겟하는 근종 세포로의 침투가 어려울 수 있다.

[0030] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 상기 나노 입자 복합체는 그 형태가 구형일 수 있다. 이와 같이 나노 입자 복합체의 형태가 구형일 경우, 체내 타겟하는 근종 세포로의 침투가 보다 용이하여 평활근종 세포의 사멸 효과가 보다 향상될 수 있는 이점이 있다.

[0032] 상기 피세틴(fisetin)은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물일 수 있다.

[0033] [화학식 1]



[0034]

[0036] 또한, 이에 한정되는 것은 아니나, 상기 피세틴은 칠피 추출물에서 유래한 것일 수 있으며, 상기 칠피 추출물은 물, 탄소수 1 내지 6의 직쇄 또는 분지형 알코올 및 유기 용매로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 용매로 칠피를 추출하여 수득한 것일 수 있다. 일 예로서, 상기 칠피 추출물은 칠피의 용매 추출물의 농축물 또는 건조물일 수 있으며, 추출 시 피세틴의 추출량을 증가시키기 위해 발효, 숙성, 농축 및 정제로 이루어진 군으로부터 하나 이상의 공정을 거칠 수 있으며, 이 외에도 피세틴의 추출량을 증가시키기 위해 당 업계에 공지된 다양한 공정을 더 추가, 선택할 수 있다. 또한, 상기 칠피 추출물은 피세틴의 추출량을 보다 향상시키기 위해 첨가물을 더 포함할 수 있으며, 이 때 상기 첨가물은 약학적 또는 식품적으로 허용되고 본 발명의 목적을 저해하지 않는 범위 내에서 당 업계에 공지된 첨가물이 다양하게 적용될 수 있다.

[0037] 상기 칠피 추출물에서 추출된 피세틴은 평활근종 세포에 대한 증식 억제능 또는 세포 사멸능을 갖는 것일 수 있다. 이 때, 상기 증식 억제능 또는 세포 사멸능은, 평활근종 특히, 자궁근종 세포에 선택적으로 작용하는 것일 수 있다.

[0038] 상기 칠피(*Rhus verniciflua* Stokes, RVS)는 율나무과에 속하는 율나무의 수피로 율나무의 원산지는 중앙아시아 고원지대이며 세계적으로 약 600여종이 존재하고 중국, 일본 등 동북아시아에서 많이 자라는 낙엽교목이다.

[0039] 본 발명에서 "칠피 추출물"이라 함은 용매를 이용한 칠피의 추출처리에 의해 얻어지는 용매 추출액 뿐만 아니라, 상기 용매 추출액의 회석액이나 농축액, 상기 용매 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 상기 용매 추출액의 조정제물, 정제물, 분획물 또는 이들의 혼합물, 용매 추출액 자체 및 용매 추출액을 이용하여 제조 가능한 모든 제형의 추출물을 포함할 수 있으며, 이들은 용액 농축물 또는 분말상태일 수 있다.

[0040] 이에 한정되는 것은 아니나, 상기 칠피 추출물의 제조방법은 칠피를 가열하는 제1단계; 상기 칠피에 용매를 가하여 추출하는 제2단계; 상기 제2단계에서 얻어진 칠피 추출물을 농축하는 제3단계; 및 상기 칠피 추출물에서 피세틴을 분리하는 제4단계를 포함하는 것일 수 있다.

[0041] 상기 제1단계는, 칠피를 보다 효과적으로 추출하기 위해 칠피에 열을 가하여 추출하기 용이한 상태로 만드는 과정으로, 이를 통해 칠피에 함유된 여러 성분들 중 극성이 낮은 성분부터 극성이 높은 성분까지 모두 유효하게 추출될 수 있다. 예를 들어, 칠피를 160 내지 200℃의 온도에서, 30분 내지 3시간 동안 가열할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0042] 상기 제2단계는, 칠피에서 유효성분을 추출하기 위해 용매를 가하는 단계이다. 추출 용매의 종류는 본 발명에서 특별히 한정하지 않으며, 당 업계에 공지된 임의의 용매를 사용할 수 있다. 예를 들어, 물; 에탄올, 메탄올 등과 같은 탄소수 1(C1) 내지 6(C6)의 알코올, 및 다양한 유기용매로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상의 용매일 수 있다. 상기 다양한 유기용매의 예로는, 에틸렌, 아세톤, 헥산, 에테르, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부틸아세테이트, 디클로로메탄, N, N-디메틸포름아미드(DMF), 디메틸설폭사이드(DMSO), 1,3-부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 또는 이들의 혼합용매 등을 들 수 있으며, 상기 혼합 용매의 일예로서, 알코올과 물의 1:0.1 내지 1:10의 혼합비를 갖는 알코올 수용액 등을 포함할 수 있고, 바람직하게는 물 또는 증류수를 이용하여 용출하는 것일 수 있다.

[0043] 상기 제3단계는, 칠피 추출물을 농축하는 단계로, 농축기를 이용하여 용매를 제거하고, 농축시킨 후에 동결 건조하여 칠피 추출물을 얻을 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 제3단계는, 상기 제2단계에서 얻어진 칠피 추출물을 감압여과하고, 회전진공농축기를 사용하여 농축하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0044] 상기 제4단계는, 칠피 추출물에서 유효성분인 피세틴을 분리하는 단계로, 크로마토그래피, 액체크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피, 흡착 크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피 등을 사용할 수 있으며, 예를 들면

HPLC, UPLC 등을 사용하여 분리할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0045] 본 발명에서 상기 피세틴이라 함은 이의 약학적으로 허용 가능한 염뿐만 아니라, 이의 이성질체 또는 이로부터 제조될 수 있는 가능한 용매화물 또는 수화물의 의미를 모두 포함한다.

[0046] 상기 피세틴의 약학적으로 허용 가능한 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산에 의해 형성된 산 부가염일 수 있다. 상기 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설폰산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻을 수 있다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설페이트, 바이설페이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로겐 포스페이트, 디하이드로겐 포스페이트, 메타포스페?, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴-1,3-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, 베타-하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 산 부가염은 이에 한정되는 것은 아니나 통상의 방법, 예를 들면, 상기 피세틴을 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 또한 이 혼합물에서 용매나 과량의 산을 증발시킨 후 건조시키거나 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.

[0047] 상기 약학적으로 허용 가능한 염은 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한금속염으로 제조될 수도 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 이에 한정되는 것은 아니나 일 예를 들면, 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻을 수 있으며, 이 때 금속 염으로는 나트륨, 칼륨, 또는 칼슘염을 제조할 수 있다. 또한, 이에 대응하는 은 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 음염(예를 들어, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.

[0049] 본 발명의 다른 양태는 상기 나노 입자 복합체를 포함하는 평활근종의 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물이다.

[0050] 본 발명에서 평활근종이란 평활근에 형성되는 양성종양을 의미하며, 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 상기 평활근종은 자궁근종을 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 자궁근종은 자궁의 체부 또는 경부에 발생하는 양성 종양을 의미하는 것으로, 근육내 근종, 장막하 근종, 점막하 근종, 경부 근종, 기생 자궁 근종, 광인대 근종, 또는 다발성 근종일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0051] 상기 나노 입자 복합체를 포함하는 평활근종의 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물은 평활근종 세포의 선택적 증식 억제 또는 세포 사멸 효과가 우수한 이점이 있으며, 이에 동반될 수 있는 염증 발현 등의 부작용이 억제되는 이점이 있다.

[0052] 상기 약학적 조성물은 당 업계의 통상의 방법에 따라 경구 또는 비경구 투여될 수 있으며, 상기 투여 방법에 따라 다양하게 제형화될 수 있다.

[0053] 상기 경구투여를 위한 고형제제의 일 예로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 이들은 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상제제의 일 예로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 포함될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러가지 부형제, 예를 들면, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 사용될 수 있다.

[0054] 상기 비경구 투여를 위한 제제로는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 비수성용제와 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올

리브 오일 등과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

- [0055] 또한, 상기 약학적 조성물은 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 또는 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오즈, 메틸 셀룰로오즈, 하이드록시 프로필 메틸 셀룰로오즈, 미정질 셀룰로오즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 플로필히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 이산화규소 등의 광물유 등이 사용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0056] 상기 약학적 조성물의 투여 대상은 모든 포유동물일 수 있으며, 바람직하게는 설치류, 가축, 인간 등일 수 있고, 더욱 바람직하게는 인간일 수 있다. 투여 경로는 특별한 제한은 없고, 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관 내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0058] 본 발명의 다른 양태는 상기 나노 입자 복합체를 포함하는 평활근종의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 상기 평활근종은 자궁근종을 포함할 수 있다. 상기 평활근종의 예방 또는 개선용 식품 조성물은 염증 등의 부작용을 유발하지 않으면서도 선택적으로 평활근종 세포의 증식을 억제하고 상기 평활근종 세포를 사멸하는 효과가 있다.
- [0059] 상기 식품 조성물은 예를 들어, 각종 심품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등을 들 수 있고, 이들은 각각 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료의 형태일 수 있다.
- [0060] 상기 식품 조성물은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 식품보조 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 본 발명의 효과를 저해하지 않는 범위 내에서 상기 식품 보조 첨가제의 종류를 본 발명에서는 특별히 한정하지 않는다. 상기 식품보조 첨가제는 예를 들어, 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제, 충전제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등이 포함될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0061] 상기 건강기능식품이란, 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상 및 환 등의 형태로 제조 및 가공한 식품을 의미한다. 여기서 "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능식품은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조 가능하며, 상기 제조시에는 당 업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 건강기능식품의 제형 또한 건강기능식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 본 발명의 건강기능식품은 자궁근종을 예방 또는 개선시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.
- [0062] 본 발명의 건강기능식품이 취할 수 있는 형태에는 제한이 없으며, 통상적인 의미의 식품을 모두 포함할 수 있고, 기능성 식품 등 당업계에 알려진 용어와 혼용 가능하다. 아울러 본 발명의 건강기능식품은 당업자의 선택에 따라 식품에 포함될 수 있는 적절한 기타 보조성분과 공지의 첨가제를 혼합하여 제조할 수 있다. 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 본 발명에 따른 피세틴을 주성분으로 하여 제조한 즙, 차, 젤리 및 주스 등에 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 동물을 위한 사료로 이용되는 식품도 포함될 수 있다.
- [0064] 본 발명의 다른 양태는 상기 나노 입자 복합체의 제조 방법에 관한 것으로, 상기 제조 방법은 (A) 금 나노 입자의 합성 단계; 및 (B) 상기 금 나노 입자와 피세틴(fisetin)을 결합하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0066] 상기 (A) 단계는 금 나노 입자를 합성하는 단계로서, 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 상기 (A) 단계는 (a) 금 전구체 및 계면활성제를 포함하는 성장용액(growth solution)을 제조하는 단계; 및 (b) 금 전구체 및 안정화제

를 포함하는 시드용액(seed solution)을 제조하는 단계;를 포함할 수 있다.

[0067] 상기 금 전구체는 사염화금산(HAuCl_4 , Hydrogentetrachloroaurate(III)), 삼염화금(AuCl_3 , Gold trichloride), 사염화금칼륨(KAuCl_4 , PotassiumTetrachloroaurate), 수산화금($\text{Au}(\text{OH})_3$, Gold(III) hydroxide), 산화금(Au_2O_3 , Goldoxide) 및 황화금(Au_2S_3 , Gold sulfide)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 사염화금산(HAuCl_4 , Hydrogentetrachloroaurate(III))을 포함할 수 있다. 상기 (a) 단계 및 (b) 단계의 금 전구체는 동일하거나 또는 상이한 종류의 금 전구체일 수 있으며, 바람직하게는 동일한 종류의 금 전구체일 수 있다.

[0068] 상기 계면활성제는 양이온성 계면활성제일 수 있으며, 상기 금전구체와의 산화/환원 반응을 통해 금 나노 입자를 합성하거나 금 나노입자의 표면부분을 식각하는 원료물질이 되며, 세틸트리메틸암모늄 브로마이드(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB), 폴리(디메틸디알릴암모늄 클로라이드)(poly(dimethyldiallylammonium chloride)), 헥사데실트리메틸암모늄 브로마이드(hexadecyltrimethylammonium bromide) 및 헥사데실트리메틸암모늄 클로라이드(hexadecyltrimethylammonium chloride)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 포함할 수 있고, 바람직하게는 세트리모늄 브로마이드(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)을 포함할 수 있다.

[0069] 상기 안정화제는 이에 한정되는 것은 아니나, 일 예를 들면 인산이나트륨, 인산이칼륨, 시트르산이나트륨, 트리소듐시트레이트 디하이드레이트 및 소듐 보로하이드라이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 트리소듐시트레이트 디하이드레이트 또는 소듐 보로파이드라이드를 포함할 수 있다.

[0070] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 상기 (A) 단계는 상기 (b) 단계 이후에, (c) 상기 성장용액 및 시드용액을 혼합하여 제1혼합액을 제조하는 단계를 더 포함할 수 있으며, 이 과정에서 유기산을 더 포함할 수 있다. 상기 유기산은 이에 한정되는 것은 아니나, 일 예를 들면 아세트산, 프로피온산, 푸마르산, 말산, 숙신산, 그리콜산, 주석산, 구연산, 부티르산, 팔미트산, 포름산, 젖산, 옥살산, 옥살아세트산, 타타르산, 아스코르브산, 시트르산, 이소시트르산 및 알파케토 글루타르산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 아스코르브산을 포함할 수 있다. 이 때 유기산의 구체적인 종류는 전술한 바가 동일하게 적용될 수 있으나, 바람직하게는 아스코르브산을 포함할 수 있다.

[0071] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 상기 성장용액 및 시드용액의 혼합비는 중량을 기준으로 1:1 내지 6:1일 수 있으며, 바람직하게는 2:1 내지 5:1일 수 있고, 보다 바람직하게는 3:1 내지 4:1일 수 있다. 상기 성장용액 및 시드용액의 혼합비가 상기 범위를 만족하는 경우, 금 나노 입자의 직경을 균일하게 증가시킬 수 있는 이점이 있으며, 금 나노입자의 크기를 본원발명에서 목적하는 수준으로 제조할 수 있는 이점이 있다.

[0072] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 상기 (A) 단계는 상기 (c) 단계 이후에 (d) 상기 제1혼합액에 상기 (a) 단계에서 제조된 성장용액을 혼합하여 제2혼합액을 제조하는 단계; 및 (e) 상기 제2혼합액에 상기 (a) 단계에서 제조된 성장용액을 혼합하는 단계를 더 포함할 수 있다. 이와 같이, 성장용액을 지속적으로 혼합하는 단계를 더 포함함으로써, 금 나노 입자의 직경을 원하는 크기로 균일하게 증가시킬 수 있는 이점이 있다. 또한, 상기 (d) 및 (e) 단계 역시 상기 (c) 단계에서와 마찬가지로 혼합 과정 중 유기산을 더 포함할 수 있으며, 이 때 유기산의 구체적인 종류는 전술한 바가 동일하게 적용될 수 있으나, 바람직하게는 아스코르브산을 포함하는 것일 수 있다.

[0073] 이와 같이, 상기 (A) 단계를 통해 합성된 금 나노입자는 용액의 형태로 존재할 수 있다.

[0075] 상기 (B) 단계는 상기 (A) 단계에서 합성된 금 나노 입자에 피세틴을 결합하는 단계로서, 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 상기 (B) 단계는 금 나노 입자 용액; 및 유기용매에 용해된 피세틴 용액을 혼합하는 단계를 포함하며, 상기 금 나노 입자 용액 및 피세틴 용액의 혼합비는 8:1 내지 25:1, 바람직하게는 12:1 내지 20:1일 수 있고, 보다 바람직하게는 15:1 내지 18:1일 수 있다. 상기 금 나노 입자 용액 및 피세틴 용액의 혼합비가 상기 범위 내로 포함되는 경우, 금 나노 입자 및 피세틴이 적절한 비율로 결합됨으로써, 평활근종 세포에 대한 선택적 사멸효과와 이에 따라 발생될 수 있는 염증 유발 등의 부작용 억제 효과가 모두 우수한 나노 입자 복합체를 제조할 수 있는 이점이 있다. 상기 유기용매의 종류는 본 발명에서 특별히 한정하는 것은 아니나, 일 예를 들면 테트라하이드로퓨란(THF), 메탄올, 에탄올, 아세톤, 디클로로메탄 및 클로로포름으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 아세톤일 수 있다.

- [0076] 상기 (B) 단계는 가교제(cross-linker)를 더 포함할 수 있는데, 상기 가교제는 예를 들면, 에틸렌글리콜, 글리세롤, 폴리비닐피롤리돈, 폴리비닐알코올, 폴리글리시딜아크릴레이트, 폴리글리시딜메타크릴레이트, 폴리에틸렌글리콜 다이글리시딜에테르, 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌글리콜, 폴리(4-하이드록시부틸 아크릴레이트), 폴리(2-하이드록시에틸 아크릴레이트), 및 폴리(2-하이드록시프로필 아크릴레이트)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 포함할 수 있으며, 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 상기 (B) 단계는 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone, PVP)을 포함하는 가교제를 더 포함할 수 있다. 이와 같이 상기 (B) 단계에서 가교제를 더 포함함으로써, 금 나노 입자 및 피세틴의 결합을 보다 용이하게 할 수 있는 이점이 있다.
- [0077] 또한, 이 때 상기 가교제의 투입량은 본 발명에서 특별히 이를 한정하는 것은 아니고, 당 업계에 알려진 방법을 참고하여 정해질 수 있으며 일 예를 들면, 상기 가교제와 상기 (A) 단계에서 합성된 금 나노 입자 용액은 그 부피(volume)를 기준으로 1:5 내지 1:10, 바람직하게는 1:4 내지 1:9, 보다 바람직하게는 1:6 내지 1:9로 혼합될 수 있다.
- [0078] 상기 (B) 단계의 상기 혼합은 교반을 통해 이루어질 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니나, 예를 들면 20 내지 50℃의 온도에서 1 내지 3시간 동안 교반하는 것일 수 있다.
- [0080] 이와 같이, 본 발명의 제조방법은 전술한 바와 같이 평활근종에 대한 선택적 세포 증식 억제 및 세포 사멸효과가 우수하면서도 이에 따른 염증 유발 등의 부작용 억제 효과 또한 우수한 금 나노 복합체를 제조할 수 있는 이점이 있다.
- [0082] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시하나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범주 및 기술사상 범위 내에서 다양한 변경 및 수정이 가능함은 당 업자에게 있어서 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속하는 것도 당연한 것이다. 이하의 실시예 및 비교예에서 함량을 나타내는 "%" 및 "부"는 특별히 언급하지 않는 한 중량 기준이다.
- [0084] **제조예: 금 나노 입자의 제조**
- [0085] 성장용액(growth solution)의 제조
- [0086] 2.5×10^{-4} M의 사염화금산(HAuCl₄; cat#484385; sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA) 200 mL를 삼각 플라스크에 준비한 후, 5.831 g의 세틸트리암모늄 브로마이드(cetyltrimethylammonium bromide; CTAB; cat#H62629; sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA)와 45℃에서 교반시켰다. 교반 20분 후 혼합액이 선명한 오렌지색을 보이면 교반을 중단하고 상온에서 식혀 성장용액으로 활용하였다.
- [0087] 시드용액(seed solution)의 제조
- [0088] 2.5×10^{-4} M의 사염화금산(HAuCl₄; cat#484385; sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA) 20mL를 삼각플라스크에 넣은 후 2.5×10^{-4} M의 트리소듐 시트레이트 디하이드레이트(trisodium citrate dihydrate, C₆H₅Na₃O₇ · 2H₂O; cat#S1804; sigma-aldrich St. Louis, MO, USA)를 넣어주었다. 마그네틱바를 이용하여 교반하면서, 차가운(ice-cold) 0.1 M 소듐 보로하이드라이드(sodium borohydride, NaBH₄; cat#71321; fluka) 0.6 mL을 넣어주었다. 20분 후 용액이 선홍색으로 변하면 교반을 중단하고 시드용액으로 활용하였다.
- [0089] 금 나노입자의 합성
- [0090] 18mL의 성장용액에 0.1 M의 아스코르브산(ascorbic acid, C₆H₈O₆; cat#A5960; sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA) 0.1 mL을 넣고 25℃에서, 10분 동안 교반 시켰다. 혼합 용액이 투명해지는 것을 육안으로 확인한 뒤 5 mL의 시드용액을 넣어 교반하고, 교반 20분 후 용액이 선홍색을 보이면 교반을 중단하여 제1혼합액을 제조하였다.
- [0091] 27 mL의 성장용액에 0.1M의 아스코르브산(ascorbic acid, C₆H₈O₆; cat#A5960; sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA) 0.15 mL를 넣고 25℃에서, 10분 동안 교반 시켰다. 혼합 용액이 투명해지면 3 mL의 제1혼합액을 넣어 교반

하고, 교반 20분 후 용액이 진한 붉은색을 보이면 교반을 중단하여 제2혼합액을 제조하였다.

[0092] 225 mL의 성장용액에 0.1 M의 아스코르브산(ascorbic acid, $C_6H_8O_6$; cat#A5960; sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA) 1.25 mL을 넣고 25℃에서, 20분 동안 교반시켰다. 혼합 용액이 투명해지면 25 mL의 제2혼합액을 넣어 교반하고, 교반 20분 후 용액이 보라색을 보이면 교반을 중단하여 금 나노 입자 용액을 제조하였다.

[0093] 이와 같이 합성된 금 나노 입자 용액은 12,000 xg, 10분, 30℃의 조건으로 3회 원심분리(centrifugation)하여 금 나노 입자를 제외한 불순물을 제거하였다.

[0095] **실시예: 나노 입자 복합체의 제조**

[0096] 상기 제조예에서 제조된 금 나노 입자 용액 80mL를 삼각 플라스크에 넣고, 0.67 mg/ml 농도의 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone, PVP; MW = 40,000; cat#PVP40; sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA) 수용액 10mL를 혼합한 후 40℃에서 1시간 동안 교반하였다. 이후 아세톤에 녹인 10 mM 피세틴(fisetin, cat#15246; cayman chemical, Ann Arbor, MI, USA) 용액 5 mL을 넣고 40℃에서 2시간 동안 교반하여 나노 입자 복합체를 제조하였다.

[0097] 이와 같이 제조한 금 나노 - 피세틴 나노 입자 복합체를 1,500 xg, 30분, 30℃의 조건으로 3회 원심분리(centrifugation)하여 나노입자에 부착되지 않은 피세틴을 제거하였다.

[0099] **실험예 1: 나노 입자 복합체의 물리화학적 특성**

[0100] **1. 크기 및 모양 확인**

[0101] 상기 실시예에서 제조된 나노 입자 복합체의 크기 및 모양을 확인하기 위해, 그리드(grid, cat#FCF200-CU, electron microscopy sciences)에 상기 실시예에서 제조된 나노 입자 복합체 시료 10 μ L 분주한 후 O/N 건조시키는 전처리 과정을 진행하였고 이후 전자현미경 (FEI Tecnai 20; Hillsboro, OR, USA) 장비를 이용하여 관찰하여 그 결과를 도 1에 개시하였다.

[0103] **2. 크기, 다분산성 및 제타전위 확인**

[0104] 큐벳(cuvette)에 상기 실시예에서 제조된 나노 입자 복합체와 상기 제조예에서 제조된 금 나노 입자를 각각 1 mL씩 넣고 Nanobrook 90 plus (Brookhaven, GA, USA) 장비를 이용하여 측정하였으며, 그 결과는 하기 표 1과 같다.

표 1

	직경(nm)	다분산지수(PDI)	제타 전위(zeta potential, mV)
제조예 (금 나노 입자)	37.4 $\pm$ 0.3	0.319 $\pm$ 0.006	33.34 $\pm$ 1.41
실시예 (나노 입자 복합체)	41.5 $\pm$ 0.2	0.182 $\pm$ 0.007	23.02 $\pm$ 1.12

[0108] 상기 표 1에서, 다분산지수(PDI)는 입자의 안정성과 균일도를 나타내는 지표로, 그 값이 0에 가까울수록 단순 분산(monodisperse)되는 것으로 정의되는데, 본원발명의 제조예의 금 나노 입자 및 실시예의 나노 입자 복합체 모두 0.5 이하의 값을 나타내는 것을 확인하였다.

[0109] 상기 제타 전위는 분산액 내 입자들 간의 반발력의 정도를 나타내는 척도로서, 본원발명의 제조예의 금 나노 입자 및 실시예의 나노 입자 복합체 모두 30mV 내외의 값을 보이는 것을 확인하였고, 이를 통해 적당한 안정성을

보이는 것을 확인하였다.

3. 흡광도 측정

큐벳(cuvette)에 상기 제조예의 금 나노 입자, 실시예의 나노 입자 복합체, DMSO(dimethyl sulfoxide)에 녹인 피세틴(fisetin)을 넣고 UV/visible spectrophotometer (Ultrospec 2100 pro; Amersham BioSciences, Buckinghamshire, UK) 장비를 이용하여 250nm 내지 800nm 사이의 흡광도를 측정하였다. 이 때, 상기 DMSO에 녹인 피세틴의 경우, 0 내지 100 μ M 내 다양한 구간의 피세틴 표준 용액을 준비한 후 각각의 흡광도를 측정하여 표준 곡선(standard curve)로 사용하였다. 본 흡광도 측정 결과를 도 2에 개시하였다.

도 2를 참고하면, 본 발명의 실시예에서 제조된 나노 입자 복합체(FIS@PVP-GNPs)의 경우 피세틴(PVP+FIS)의 파장(320nm) 및 금 나노 입자(PVP+GNPs)의 파장(530nm) 모두에서 특징적인 피크를 보이는 것으로 확인되었다. 즉, 본 발명의 실시예에서 제조된 나노 입자 복합체는 금 나노 입자 및 피세틴을 모두 포함하는 복합체인 것을 확인하였다.

4. 약물 방출능 확인

상기 실시예에서 제조된 나노 입자 복합체의 체 내 약물방출능을 확인하기 위하여, pH 환경에 따른 흡광도를 측정하였다. 2 mL의 나노 입자 복합체 수용액을 Slide-A-Lyzer™ MINI dialysis device (10K MWCO; Thermo Fisher scientific, MA, USA)에 넣고 아래부분을 1 x PBS(phosphate buffer saline, pH 7.4) 혹은 아세트이트 버퍼(acetate buffer, pH 5.0)으로 채웠다. 이후 라커(rocker)를 이용하여 흔들어주면서 30분에서 96 시간까지 특정 구간마다 360 nm의 흡광도를 UV/visible spectrophotometer (Ultrospec 2100 pro; Amersham BioSciences, Buckinghamshire, UK) 장비로 측정하였다. 0분의 흡광도를 기준으로 각 시간마다의 감소한 흡광도를 방출된 피세틴(fisetin)의 정도로 규정하여 백분율로 나타내었으며, 그 결과는 도 3에 개시하였다. 이 때, 모든 실험은 적어도 독립적으로 3번 수행되었다.

도 3을 참고하면, 본 발명의 실시예에서 합성된 나노 입자 복합체는 96시간 후 1 x PBS 용액(pH 7.4)에서 38%의 피세틴 방출능, 1 x acetate buffer(pH 5.0)에서 80%의 피세틴 방출능을 보이는 것을 확인하였다. 본 발명의 나노 입자 복합체가 저산소증(hypoxia)으로 인해 낮은 pH를 보이는 암세포 주변에서 2배가량 더 뛰어난 방출능을 보인다고 해석된다.

실험예 2: 면역독성 확인

상기 제조예에서 제조된 금 나노 입자 및 실시예에서 제조된 나노 입자 복합체의 면역독성을 확인하였다.

먼저, Raw264.7 (KCLB40071; 한국세포주은행 분양)을 3×10^5 cells/well 로 6-well plate의 밀도로 분주하고, 배양기에서 24시간 배양하였다.

상기 배양된 Raw264.7 세포에 음성대조군을 제외하고 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS; cat#L6529; sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA)를 100 ng/mL를 처리하였으며 실험군에는 1, 2.5, 5 및 10 μ g/mL의 나노 입자 복합체 또는 금 나노 입자를 추가적으로 처리하였다.

48시간 이후 상등액을 모아 (1,500 xg, 10min, 25℃에서 1회 원심분리(centrifugation) 하였으며 LDH cytotoxicity detection kit (cat#MK401, TAKARA, Japan)으로 LDH (Lactate dehydrogenase)의 양을 측정하였다.

ELISA reader (EL800, Biotek) 장비를 이용하여 490 nm에서의 흡광도를 측정하였으며 각 실험군은 음성 대조군과 비교해 백분율로 나타내었으며, 그 결과를 도 4 및 도 5에 개시하였다. 이 때, 모든 실험은 적어도 독립적으로 3번 수행되었다.

[0128] 도 4를 참고하면, 본 발명의 제조예에서 제조된 금 나노 입자(GNPs)를 단독 처리했을 때, 금 나노 입자의 농도가 높아질수록 LDH 수준(LDH leakage)이 유의미하게 감소하는 것을 확인하였다. LDH(Lactate dehydrogenase)는 세포 독성이 발생하면 미토콘드리아가 손상을 받으면서 누출되는 효소로, LDH 수준이 감소했다는 것은 본원발명의 제조예에서 제조된 금 나노 입자가 Raw264.7 세포에서 발생하는 독성을 경감시켰다는 것을 의미한다.

[0130] 도 5를 참고하면, 피세틴 단독 처리군(FIS)의 경우 그 농도가 높아짐에 따라 LDH를 증가시키는 것을 확인할 수 있었으나, 본 발명의 실시예의 나노 입자 복합체(FIS@PVP-GNPs)의 경우, 상기 피세틴 단독 처리군에 비해 통계적으로 유의미한 수준으로 LDH 수준이 감소된 것을 확인하였다. 이는, 본 발명의 나노 입자 복합체가 피세틴이 유발하는 면역독성을 경감시켰음을 의미한다.

[0132] 실험예 3: 항염증 효과 확인

[0133] 상기 제조예의 금 나노 입자 및 실시예의 나노 입자 복합체의 항염증 효과를 확인하였다.

[0134] Raw264.7을 3×10^5 cells/well 로 6-well plate의 밀도로 분주하고, 배양기에서 24시간 배양하였다. 상기 배양된 Raw264.7 세포에 음성대조군을 제외하고 지질다당류(lipopolysaccharide) 100 ng/mL를 처리하였으며 실험군에는 1, 2.5 및 5 μ g/mL의 나노 입자 복합체 또는 금 나노 입자를 추가적으로 처리하였다.

[0135] 48시간 이후 상등액을 모아 (1,500 xg, 10min, 25℃)에서 1회 원심분리(centrifugation) 하였으며 ELISA를 이용하여 TNF- α , IL-6, MCP-1의 사이토카인 분비량을 측정하였다. ELISA reader (EL800, Biotek) 장비를 이용하여 450 nm에서의 흡광도를 측정하였으며, 그 결과를 도 6 내지 도 8에 개시하였다. 이 때, 모든 실험은 적어도 독립적으로 3번 수행되었다.

[0137] 도 6 내지 8을 참고하면, 피세틴을 단독 처리한 경우(FIS) 및 상기 실시예의 나노 입자 복합체를 처리한 경우(FIS@PVP-GNPs) 모두 TNF- α , IL-6, MCP-1 사이토카인 분비량이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 상기 TNF- α , IL-6 및 MCP-1의 사이토카인 모두가 염증 반응 시 그 분비량이 증가하는 사이토카인이라는 점을 고려할 때, 피세틴 단독 처리(FIS) 및 상기 실시예의 나노 입자 복합체 처리(FIS@PVP-GNPs) 모두 항염 효과가 있다는 것을 의미한다. 특히, 본원발명의 실시예에서 제조된 나노 입자 복합체(FIS@PVP-GNPs)의 경우 피세틴을 단독 처리한 경우(FIS)에 비해 TNF- α , IL-6 및 MCP-1 사이토카인 분비량이 현저히 감소된 것을 확인하였다. 이는, 본원발명의 실시예의 나노 입자 복합체(FIS@PVP-GNPs)가 피세틴을 단독 처리한 경우(FIS) 보다 항염 효과가 우수함을 의미한다.

[0139] 실험예 4: 자궁근종 세포 사멸효과 확인

[0140] 자궁근종 세포의 사멸효과를 확인하기 위하여, 양성 자궁질환으로 자궁절제술 및 자궁근종 절제술을 시행하는 환자들에게 인체유래물 연구 동의서 및 연구 동의서를 취득한 후 채취한 자궁근종 조직을 실험에 사용하였다. 본 발명과 관련하여 기관윤리위원회 (IRB)의 승인을 받았다.

[0141] 96-well plate에 자궁 근종 세포를 1×10^4 cells/well 의 밀도로 분주하고, 배양기에서 24시간 배양하였다.

[0142] 상기 배양된 자궁 세포에 상기 제조예의 금 나노 입자 수용액을 0.15 또는 0.3% (v/v), 피세틴 또는 상기 실시예의 나노 입자 복합체를 각각 1.25, 2.5, 5 및 10 μ M의 농도로 처리한 후에 배양시간 24, 48시간에서 WST-1 분석을 시행하였다.

[0143] 구체적으로, 각 자궁 세포에 수용성 테트라졸륨(water soluble tetrazolium, WST-1)시약을 처리 후, 37℃ 배양기에서 3시간동안 반응시키고 ELISA reader (EL800, Biotek) 장비를 이용하여 450 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 대조군은 자궁 세포에 그 어떤 물질도 처리하지 않은 비처리군이며 대조군을 100으로 산정하고 각 농도별로 대조군과 비교해 생존한 세포를 백분율로 나타내었으며, 그 결과를 도 9(24시간 배양) 및 도 10(48시간 배양)에 개시하였다. 이 때, 모든 실험은 적어도 독립적으로 3번 수행되었다.

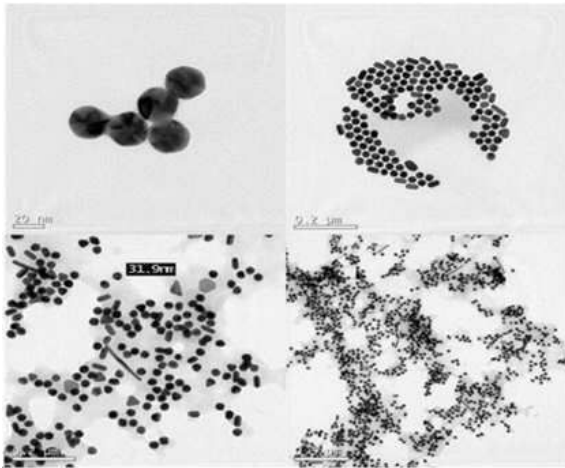
[0145] 도 9 및 도 10을 살펴보면, 상기 제조예에서 제조된 금 나노 입자(GNPs)의 경우 모든 농도 구간에서도 자궁 근종 세포에 독성을 나타내지 않는 것을 확인할 수 있었다.

[0146] 도 9를 참고하면, 상기 제조예의 금 나노 입자(GNPs), 피세틴(Fisetin), 상기 실시예의 나노 입자 복합체(GFs)를 처리한 후 24시간 동안 배양하였을 때, 피세틴을 단독으로 처리한 경우(Fisetin) 20 μ M의 농도까지는 자궁 근종 세포의 성장을 저해하지 못한 반면, 본원발명의 실시예의 나노 입자 복합체(GFs)를 처리한 경우, 10 μ M부터 자궁 근종 세포의 사멸을 유발한 것을 확인할 수 있었고, 10, 20, 40 μ M에서 모두 통계적으로 유의하게 피세틴 단독 처리군(Fisetin)보다 우수한 사멸효과를 보이는 것을 확인할 수 있었다.

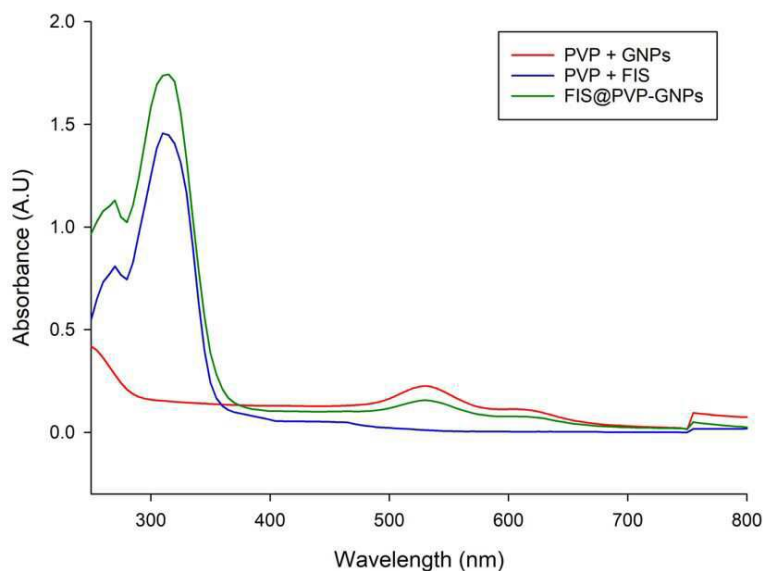
[0147] 도 10을 참고하면, 상기 상기 제조예의 금 나노 입자(GNPs), 피세틴(Fisetin), 상기 실시예의 나노 입자 복합체(GFs)를 처리한 후 48시간 동안 배양하였을 때, 피세틴을 단독으로 처리한 경우(Fisetin) 10 μ M의 농도에서부터 세포의 성장을 저해하는 것을 확인하였다. 본원발명의 실시예의 나노 입자 복합체(GFs)를 처리한 경우 저농도에서는 피세틴 단독 처리군(Fisetin)과 비슷한 경향을 보였으나 10 μ M부터는 피세틴 단독 처리군(Fisetin) 보다 우수한 세포사멸정도를 보이는 것을 확인하였고, 20, 40 μ M에서는 각각 통계적으로 유의하게 피세틴 단독 처리군(Fisetin)보다 우수한 사멸 효과를 보이는 것을 확인하였다.

도면

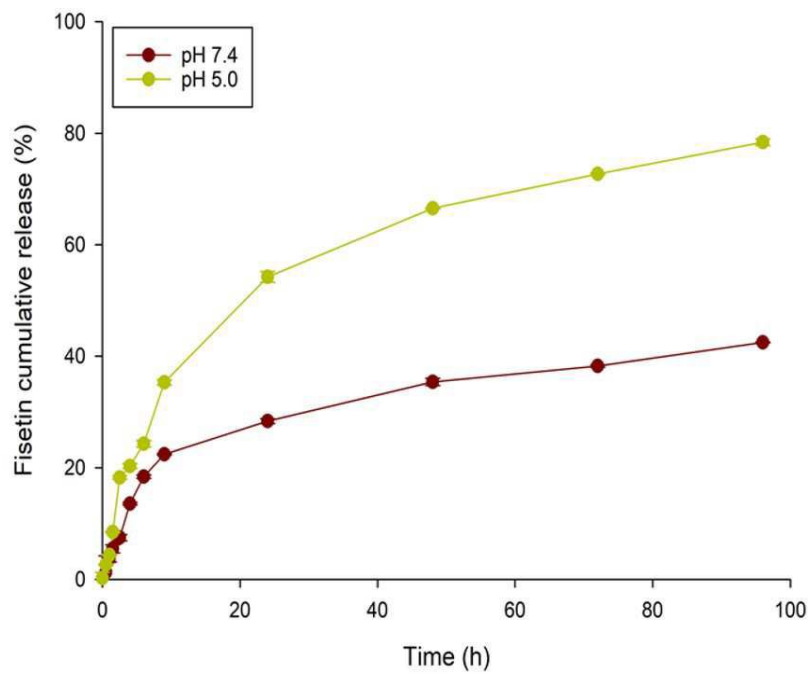
도면1



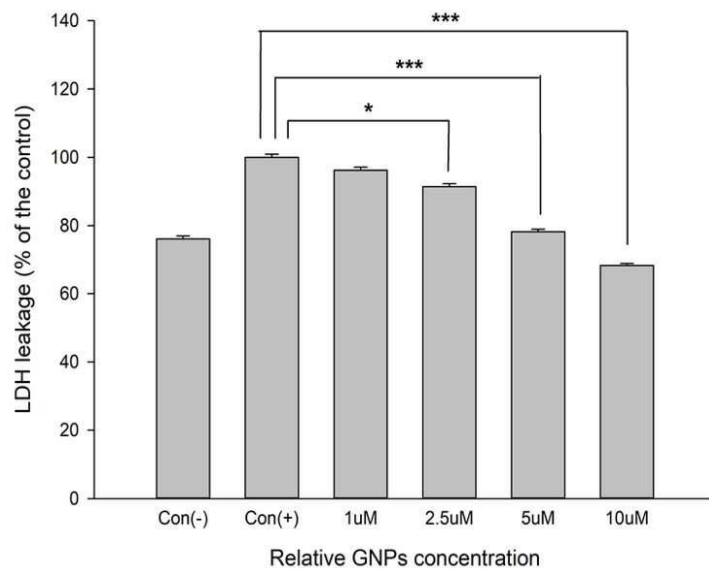
도면2



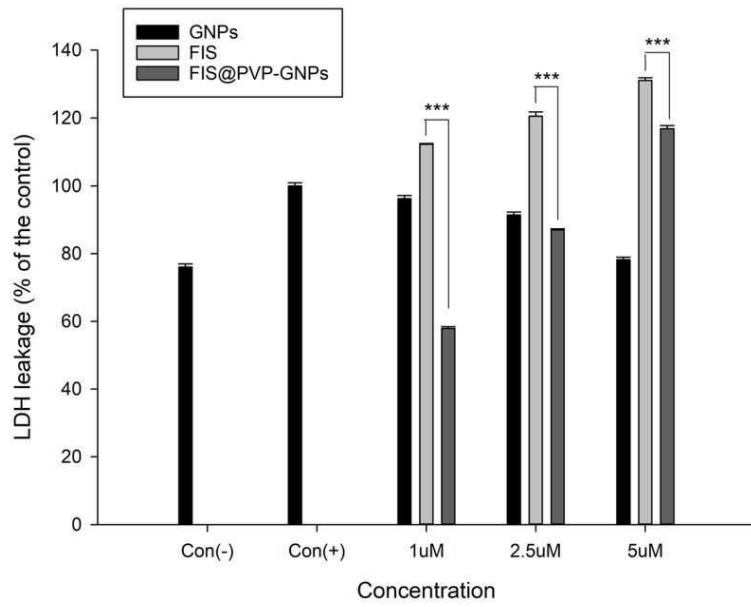
도면3



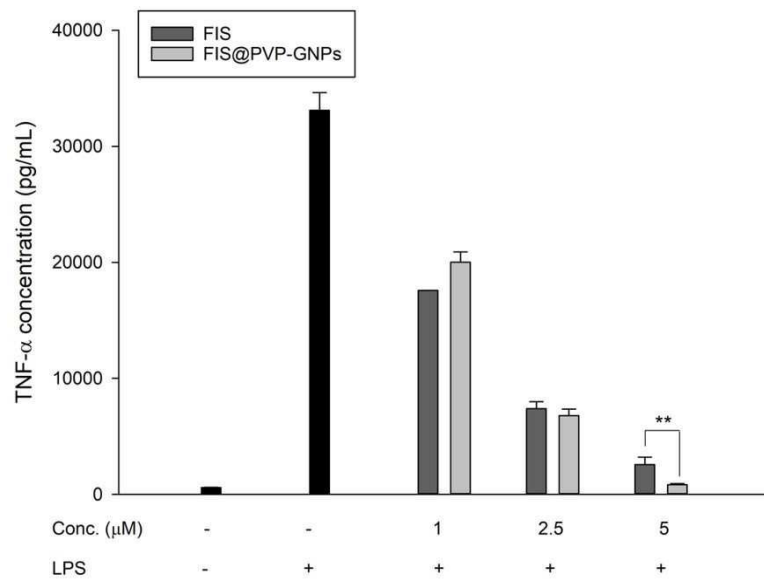
도면4



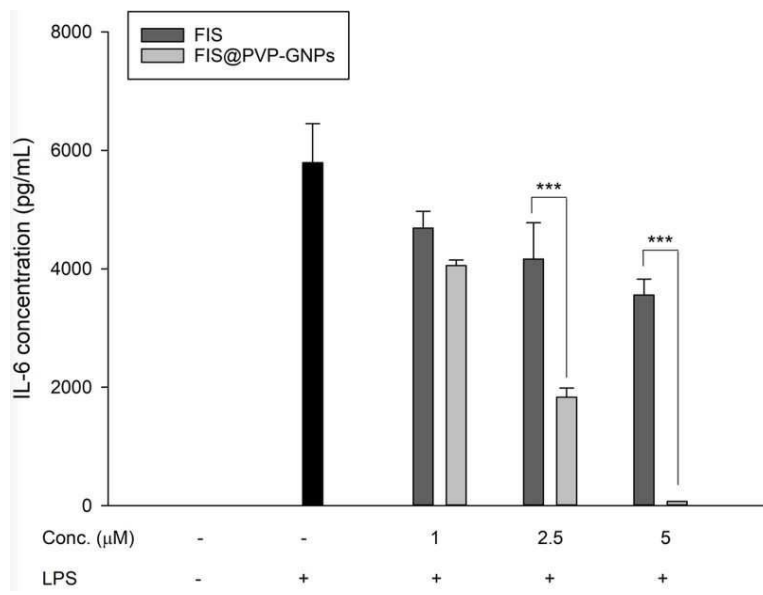
도면5



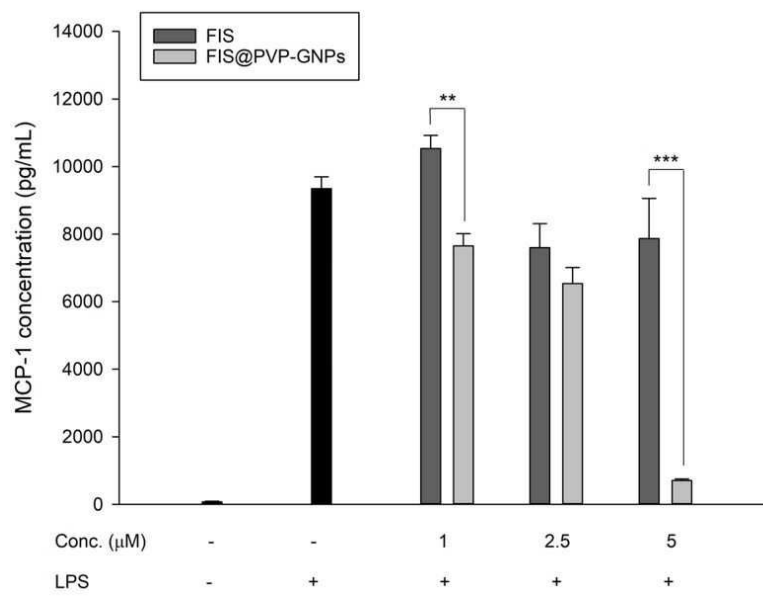
도면6



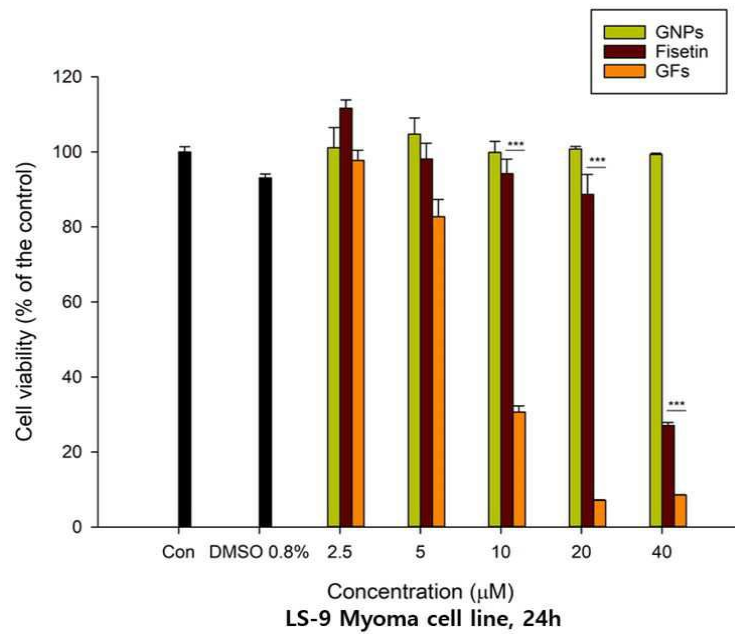
도면7



도면8



도면9



도면10

