



(51) 국제특허분류:

A61K 47/50 (2017.01) A61K 31/704 (2006.01)
A23L 33/10 (2016.01) A61K 8/60 (2006.01)
A23L 33/105 (2016.01) A61K 8/63 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2017/000489

(22) 국제출원일: 2017년 1월 13일 (13.01.2017)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:

10-2016-0004875 2016년 1월 14일 (14.01.2016) KR
10-2016-0043664 2016년 4월 8일 (08.04.2016) KR
10-2016-0043668 2016년 4월 8일 (08.04.2016) KR

(71) 출원인: 경희대학교 산학협력단 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) [KR/KR]; 17104 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: 양덕춘 (YANG, Deok Chun); 17080 경기도 용인시 기흥구 용구대로 1842, 111 동 301 호, Gyeonggi-do (KR). 김연주 (KIM, Yeon-Ju); 17104 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 애지원 인삼소재은행, Gyeonggi-do (KR). 프리양카싱 (PRIYANKA, Singh);

17104 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 애지원 한방바이오연구실, Gyeonggi-do (KR). 양동욱 (YANG, Dong Uk); 17080 경기도 용인시 기흥구 용구대로 1842, 111 동 301 호, Gyeonggi-do (KR). 안성은 (AHN, Sung Eun); 16709 경기도 수원시 영통구 청명북로 81, 409 동 1804 호, Gyeonggi-do (KR). 람야매티알라간 (RAMYA, Mathiyalagan); 17104 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 애지원 인삼소재은행, Gyeonggi-do (KR).

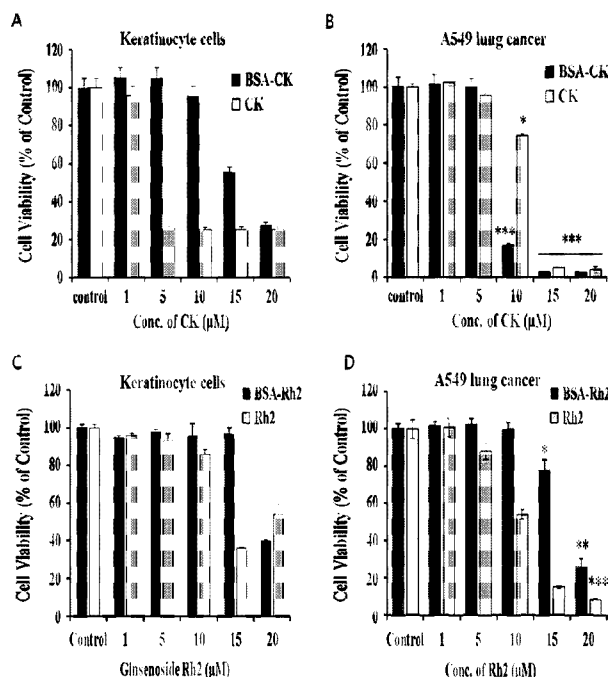
(74) 대리인: 손민 (SON, Min); 06302 서울시 강남구 양재천로 163 6층 한얼국제특허사무소, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[다음 쪽 계속]

(54) Title: NANOCOMPOSITE COMPRISING NANO DRUG DELIVERY SYSTEM AND GINSENG EXTRACT OR GINSENOSE SEPARATED THEREFROM

(54) 발명의 명칭: 나노 약물전달체; 및 인삼추출물 또는 이로부터 분리된 진세노사이드를 포함하는 나노 복합체



(57) Abstract: The present invention relates to a nanocomposite comprising: a nano drug delivery system; and a ginseng extract or ginsenoside separated therefrom, and a method for producing the same. The nanocomposite can be used for the prevention or treatment of cancer and inflammatory diseases. The production time of the nanocomposite of the present invention is significantly reduced compared to conventional metal nanoparticles, and metal nanocomposites having a uniform size can be produced without the addition of a separate reducing agent or stabilizer. Also, the nanocomposite of the present invention has a high solubility in water and a high ability to target cancer cells, and thus is advantageous to be developed as a drug. In addition, the nanocomposite of the present invention exhibits high anti-cancer activity, anti-inflammatory activity, etc., and thus can be usefully utilized in the prevention and treatment of cancer and inflammatory diseases. Furthermore, the nanocomposite of the present invention has antibacterial activity, biofilm decomposition activity and anticoagulant activity, and thus can be utilized in various business fields.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

규칙 4.17에 의한 선언서:

— 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

나노 약물전달체; 및 인삼추출물 또는 이로부터 분리된 진세노사이드를 포함하는 나노 복합체와 이의 제조방법에 관한 것으로, 상기 나노 복합체는 암 및 염증성 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다. 본 발명의 나노 복합체는 종래 금속 나노입자보다 제조시간이 현저히 단축되고, 별도의 환원제 또는 안정제의 부가 없이도 크기가 균일한 금속 나노 복합체를 제조할 수 있다. 또한, 물에 대한 용해도가 높고, 암세포에 대한 타겟 능력이 높아 약물로 개발되기에 유리하다. 또한, 높은 항암, 항염 활성 등을 나타내므로 암 및 염증 질환의 예방, 치료에 유용하게 활용될 수 있으며, 나아가 항균활성, 바이오필름 분해 활성, 항응고 활성을 가져 다양한 사업분야에서 활용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 나노 약물전달체; 및 인삼추출물 또는 이로부터 분리된 진세노사이드를 포함하는 나노 복합체

기술분야

- [1] 나노 약물전달체; 및 인삼추출물 또는 이로부터 분리된 진세노사이드를 포함하는 나노 복합체에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 인삼(*Panax ginseng*)은 두릅나무과(*Araliaceae*)에 속한 식물로, 다른 식물과 비교할 때, 성장이 매우 느리고, 다년생인 식물이며, 대부분은 한국, 중국의 북동쪽, 또는 시베리아 극동지역에서 발견된다. 인삼은 오랫동안 토닉, 강장제, 안티 에이징제 등의 전통적 약제로 재배되어 사용되어 왔는데, 주요 활성성분은 진세노사이드로 40개 이상 존재한다고 알려져 있으며, 대부분이 항암, 항당뇨, 산화방지제, 항염증, 면역기능의 변화 및 통제, 방사선 방호, 항건망증, 항아포프토시스 또는 항스트레스 등의 생물학적이고 약학적인 활성을 가진다고 알려져 있다. 또한, 다른 연구에서도 인삼의 일부 성분이 노화, 주요 신경 시스템의 장애나 신경변성질환에 효과가 있다고 보고되고 있다.
- [4] 인삼은 여러 부위 중에서도 주로 뿌리나 열매가 많이 사용되고 있다. 그 이유는, 인삼의 뿌리에 진세노사이드가 대량으로 함유되어 있다고 알려져 있기 때문이다. 반면, 인삼의 뿌리와 다르게 인삼의 잎은 뿌리보다 많은 부위를 차지하고 있음에도 불구하고, 그것을 활용한 약제의 제조 빈도는 뿌리나 열매에 비해 현저히 낮았다. 그러나 최근 인삼의 잎에 플라보노이드(flavonoids), 트리테르페노이드(triterpenoids), 폴리아세틸렌(polyacetylenic), 알코올, 진세노사이드, 아미노산, 펩타이드, 폴리사카라이드, 휘발성 기름 및 지방산과 같은 많은 활성 성분을 포함되어 있고, 이러한 활성 성분들이 심혈관, 생식 및 대사시스템 뿐 아니라, 주요 신경 시스템에 많은 중요한 약학적인 효과를 생산하고, 그 외에도 항-피로, 항-고혈당, 항당뇨, 항암, 산화방지제 및 항노화의 특성을 가진다고 보고되고 있어(*Biomaterials*, 2009, 30(10), 1857-69), 인삼의 잎을 이용한 연구가 점차 증대되고 있는 중이다. 다만, 아직까지 인삼의 잎 추출물을 이용하여 금속 나노입자를 제조한 바 없다.
- [5] 또한, 진세노사이드는 트리테르펜(triterpene) 사포닌으로, 한국, 중국 및 일본의 전통 의학에서 사용되는 약초인 인삼(*P. ginseng*)의 주된 활성 화합물이다. 진세노사이드는 항종양, 항염, 항비만 활성 및 알츠하이머병에 대한 보호 효과 등의 광대한 범위의 약리 효과를 나타낸다. 이에 따라, 진세노사이드 Rg5를 유효성분으로 함유하는 혈관형성 촉진용 조성물(한국 공개특허 제2016-0018974호), 진세노사이드 F2의 간 질환 예방 또는 치료 용도(한국

공개특허 제2016-0029894호) 등의 치료용 조성물을 비롯하여, 진세노사이드 Rd가 강화된 발효 인삼 또는 홍삼 추출물의 제조방법(한국 공개특허 제2016-0018147호), 녹강균을 이용한 진세노사이드 함량이 증가된 홍삼 제제 및 이의 제조방법(한국 공개특허 제2015-0125785호) 등 진세노사이드 관련 기술의 개발이 활발히 이루어지고 있다. 그러나, 이러한 다양한 약리학적 활성에도 불구하고, 타겟 세포로의 전달 효율이 현저히 떨어지며, 용해도가 낮아 약물로 개발하기에 많은 문제점이 있었다.

[6]

[7] 나노 테크놀로지는 전기공학 및 생물공학에서 잠재적인 효과를 가지는 현대과학에서 중요한 분야로 급격하게 성장하고 있다. 또한, 상기와 같은 문제점을 극복하기 위하여 나노운반체를 이용한 약물 전달 시스템의 개발이 활발히 이루어지고 있다.

[8]

[9] 그 중에서도 금속 나노 복합체는 이화화적이고 생물학적인 독특한 입자 크기와 그의 모양 때문에 중요하게 여겨지고 있으며(Colloids Surf B Biointerfaces, 2013, 107, 227-34), 특유의 전자성, 자기성, 촉매성 및 광학적인 특성으로 인하여 생의학, 광학 등의 분야에서 다양하게 응용되고 있어 그의 중요성은 점차 높아져 가고 있다.

[10]

여러 금속 중, 은은 오랫동안 그것의 항균 특성으로 많은 세균 감염을 치료하기 위한 의학적 질병의 치료를 위해 사용되어 왔고, 나노입자 형태로서의 은 나노 복합체는 그의 이온 형태보다 세포독성이 감소되고 항박테리아의 효과를 증대시킨다고 알려져 있어, 항균, 항염증 또는 감염 방지를 위해 많은 분야에 적용된다고 알려져 있다. 금 또한, 그것의 독특하고 조화스러운 표면 플라즈몬 진동으로 약 전달자, 조직 또는 암 이미징, 포토 광열 치료(photo thermal therap), 검체에서 병원균의 면역 색층 확인(immune chromatographic identification), 바이오 센서, DNA 라벨링 또는 베이포 센싱(vapor sensing) 등의 다양한 분야에서 사용되어져 왔다.

[11]

일반적으로 이러한 금속 나노 복합체를 제조하기 위하여 화학적, 물리적 또는 생물학적 합성방법 등이 이용되고 있는데, 화학적 합성방법은 비교적 공정이 간단하나 비용이 많이 들고 시약의 부작용 등이 문제시 되고 있다. 또한, 물리적 방법은 나노입자의 크기 제어가 어렵고 고가의 제조 설비가 요구되는 등의 문제가 있어 효과적인 금속 나노 복합체의 제조가 어렵다는 단점이 있다.

[12]

이러한 이유로, 최근 박테리아 또는 균주에 의한 제조방법이나, 천연 추출물을 유효성분으로 포함하는 친환경적인 금속 나노 복합체의 제조방법에 대한 연구가 많이 진행되고 있다. 그러나 종래 박테리아 또는 균주에 의해 금속 나노 복합체를 합성하는 방법은 짧게는 하루에서 길게는 며칠까지 합성을 위한 긴 시간이 필요하고, 합성된 나노입자의 안정화를 위해 부가적인 환원제 또는 안정화제와 같은 캡핑제(capping agent)가 필요하다는 단점이 존재하였다. 이에,

여전히 친환경적이면서 동시에 안정하고, 화학적 또는 물리적인 합성방법과 비교할 때 제조시간의 한계를 극복한 금속 나노 복합체에 대한 개발은 계속 요구되고 있는 실정이다.

[13]

[14] 또한, 최근에는 유기적 플랫폼(리포좀, 폴리머 및 덴드리머 등) 및 무기적 시스템(금, 반도체 나노크리스탈, 자성 NP 및 실리카 입자 등) 등을 기반으로 한 여러 나노운반체가 개발되었으며, 이 중에서도 무기물을 기반으로 한 나노운반체인 메조다공성 실리카 나노입자(Mesoporous silica nanoparticle; MSNP)는 약물 운반체로서의 주목할 만한 특징을 갖는다.

[15] 구체적으로, 상기 MSNP의 표면을 덮고 있는 많은 실라놀기(silanol groups, Si-OH)는 합성 후 변형을 용이하게 하여 약물 전달의 디자인을 단순화하며, MSNP는 가수분해 및 효소적 분해에 저항성을 보이므로, 약물을 높은 수준으로 적재할 수 있다. 또한, 대부분의 효소 단백질은 상기 MSNP의 나노기공(nanopore)보다 상당히 큰 직경을 가지고 있어, 나노기공의 좁은 경계는 효소의 침입을 저해하는 물리적 장벽을 제공한다. 따라서, MSNP의 내부 벽에 갇히거나 벽에 연결된 약물들은 생체 내 가수분해 및 조기 방출로부터 보호될 수 있다.

[16]

[17] 또한, 단백질에 결합한 약물은 암세포나 염증 조직에 우선적으로 흡수되는 고유한 특성을 나타내는 고분자 단백질은 상기 언급된 항암제의 문제점을 극복할 수 있는 유망한 약물 전달 시스템으로 주목받고 있다. 또한, 단백질의 전하기(charged group)는 단백질이 약물 분자를 물리적으로 포획하는 것을 돕는데, 이러한 단백질의 특성은 단백질을 이상적인 약물 전달의 후보자로 사용될 수 있게 한다.

[18] 최근, 알부민(albumin) 기반 나노입자를 임상에 적용하기 위하여 많은 연구가 수행되고 있다. 알부민은 혈장 단백질로서 다양한 생물학적 과정을 수행하는데, 혈장 알부민은 독특한 리간드-전달 특성을 가지고 있어 혈장 알부민에 결합된 소수성 약물에 대하여 향상된 용해도를 부여하고, 생물학적 환경에서 약물 분자가 향상된 약물 동력학적 특징을 나타낼 수 있도록 돕는다. 이에 따라, 알부민을 이용한 많은 약물이 개발된 상태이며, 구체적인 예로 비소세포성 폐암 및 유방암에 대한 치료제로서 nabTM사에서 개발한 아브락산(Abraxane, paclitaxel-albumin NPs)이 미국 FDA의 승인을 받았다. 또한, 약 7가지 알부민 기반 약물 또는 조영제(imaging agents)가 시장에 출시되었으며, 약 10가지의 상품이 암, 당뇨, C형 간염 및 류마티스성 관절염 등의 치료에 임상 적용되었다(Yu *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2015).

[19]

[20] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 인삼 추출물을 이용하여 금속 나노 복합체를 제조하는 데 있어, 종래보다 제조시간이 현저히 단축되고 크기가 균일하며,

별도의 환원제 또는 안정제의 부가 없이도 안정하게 제조할 수 있는 금속 나노 복합체의 제조방법을 개발하고, 상기 방법에 의해 제조된 금속 나노 복합체를 포함하는 조성물이 항균활성, 바이오필름 분해활성, 항응고, 항암 및 항염증 활성을 가짐을 확인하였다.

- [21] 또한, 본 발명자들은 암세포에 대한 타겟 능력 및 반감기가 향상된 진세노사이드 약물체를 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, 나노입자에 진세노사이드가 연결된 나노 복합체는 물에 대한 용해도가 높거나 pH에 따른 선택적인 약물 방출 패턴을 가지며, 높은 항암 및 항염 활성을 가짐을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[22]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [23] 본 발명의 하나의 목적은 나노 약물전달체; 및 인삼추출물 또는 이로부터 분리된 진세노사이드를 포함하는 나노 복합체를 제공하는 것이다.
- [24] 본 발명의 다른 목적은 상기 나노 복합체를 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [25] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 나노 복합체를 포함하는, 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [26] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 나노 복합체를 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 암을 치료하는 방법을 제공하는 것이다.
- [27] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 나노 복합체를 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 염증성 질환을 치료하는 방법을 제공하는 것이다.
- [28] 본 발명의 또 다른 목적은 나노 약물전달체; 및 인삼추출물 또는 이로부터 분리된 진세노사이드를 혼합하여 반응시키는 단계를 포함하는, 나노 복합체의 제조방법을 제공하는 것이다.

[29]

과제 해결 수단

- [30] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는 나노 약물전달체; 및 인삼추출물 또는 이로부터 분리된 진세노사이드를 포함하는 나노 복합체를 제공한다.
- [31] 본 발명에서 용어, "인삼"은 두릅나무과(Araliaceae)에 속한 식물로, 다른 식물과 비교할 때, 성장이 매우 느리고, 다년생인 식물이며, 대부분은 한국, 중국의 북동쪽, 또는 시베리아 극동지역에서 발견되는 식물을 의미한다. 구체적으로, 상기 인삼은 인삼(panax ginseng) 또는 홍삼(red ginseng)을 선택할 수 있으나, 이에 한정된 것은 아니다.
- [32] 본 발명에서 용어, "인삼 추출물"은 인삼을 용매를 이용하여 통상적인 방법으로 얻어낸 인삼에 속한 성분이나 물질을 의미한다.

- [33] 상기 인삼 추출물은 하기의 단계들을 포함하는 제조방법에 의해 제조될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다:
- [34] 1) 인삼에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;
- [35] 2) 단계 1)의 추출물을 식힌 후 여과하는 단계; 및
- [36] 3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압 농축한 후 건조하는 단계.
- [37] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 인삼은 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있으며, 구체적으로는, 인삼(*panax ginseng*) 또는 홍삼(*red ginseng*)을 이용할 수 있으나, 이에 한정된 것은 아니다. 또한, 인삼의 부위로는 천연, 잡종 또는 변종 수련의 모든 기관, 예를 들어, 뿌리, 가지, 줄기, 잎, 꽃, 열매와 같은 지상부를 모두 포함할 수 있고, 보다 구체적으로는 뿌리 또는 잎을 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [38] 본 발명의 일 실시예에서는, 채취한 인삼(*panax ginseng*)의 뿌리 또는 잎을 세척 및 건조한 후, 조각으로 잘라 멸균수에서 가열하여 인삼의 성분들을 물에 침출시킨 추출물이나, 홍삼(*red ginseng*) 뿌리 추출물을 제조하였다.
- [39] 상기 방법에 있어서, 상기 추출물은 물, C1 내지 C4의 알코올 또는 이들의 혼합물인 용매로 추출되는 것일 수 있으며, 구체적으로 상기 알코올은 에탄올 또는 메탄올일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 보다 구체적으로는, 증류수를 용매로 하여 추출되는 것일 수 있다.
- [40] 상기 추출 방법으로는 여과법, 열수추출, 침지추출, 환류냉각추출 및 초음파추출 등 당업계의 통상적인 방법을 이용할 수 있다. 상기 열수추출 방법으로는 1회 내지 5회 추출할 수 있고, 구체적으로는 3회 반복 추출할 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 상기 추출용매는 건조된 인삼에 0.1 내지 10배 첨가할 수 있으며, 구체적으로는 0.3 내지 5배 첨가할 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 또한, 추출온도는 구체적으로 20 °C 내지 40°C일 수 있으나 이에 한정하지 않으며, 추출시간은 구체적으로 12 내지 48시간일 수 있으나 이에 한정되지 않는다.
- [41] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 구체적으로 진공감압농축기 또는 진공회전증발기를 이용할 수 있으나 이에 한정되지 않으며, 상기 건조는 구체적으로 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조할 수 있으나 이에 한정하지 않는다.
- [42]
- [43] 한편, 본 발명의 용어, "진세노사이드(*ginsenosides*)"는 인삼에 있는 사포닌을 의미한다. 인삼 사포닌은 다른 식물에서 발견되는 사포닌과는 다른 특이한 화학구조를 가지고 있으며, 약리효능도 특이하여 인삼(*Ginseng*) 배당체(*Glycoside*)란 의미로 진세노사이드(*ginsenosides*)라 불린다.
- [44] 본 발명에서, 상기 진세노사이드는 상업적으로 판매되는 것을 구입하거나 또는 자연계에서 재배 또는 채취한 인삼으로부터 분리된 것을 사용할 수 있으며, 또는 합성방법에 의해 합성된 것을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

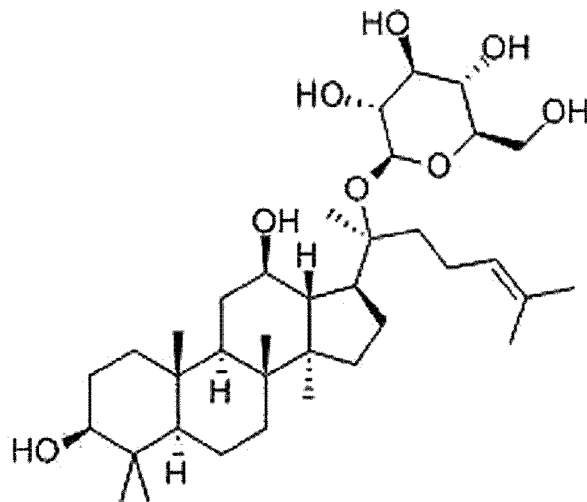
[45] 본 발명에서, 상기 진세노사이드는 진세노사이드 화합물 K(Compound K) 또는 진세노사이드 Rh2일 수 있다.

[46]

[47] 본 발명의 용어, "진세노사이드 화합물 K(Compound K)"는 인삼 자체에는 존재하지 않으나, 인삼 또는 홍삼에 존재하는 진세노사이드 Rb1, Rb2, Rc, Rd 등의 사포닌이 비피더스 균과 같은 장내 미생물 또는 토양미생물의 작용에 의하여 체내에서 흡수가 가능한 형태로 전환된 사포닌을 의미하며, 하기 화학식 1로 표시될 수 있다. 본 발명에서, 상기 진세노사이드 화합물 K(Compound K)는 '진세노사이드 CK' 또는 'CK'로 혼용되어 명명될 수 있다.

[48] [화학식 1]

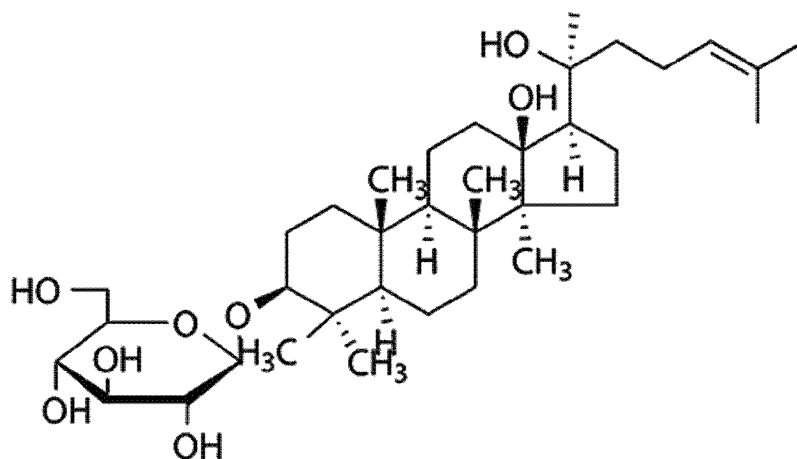
[49]



[50] 본 발명의 용어, "진세노사이드 Rh2"는 인삼으로부터 분리된 PPD(protopanaxadiol) 계열 사포닌을 의미한다. 20(S)-protopanaxadiol-3-O-β-D-glucopyranoside라고도 하고, $C_{36}H_{62}O_8$ 의 화학식으로 표시되며, 하기 화학식 2로 표시될 수 있다. 본 발명에서, 상기 진세노사이드 Rh2는 'Rh2'로 혼용되어 명명될 수 있다.

[51] [화학식 2]

[52]



[53] 지금까지 연구된 바에 의하면 상기 진세노사이드 CK는 비인두암 사멸

작용(Law CK, Chin Med., 2014, 2, 9(1):11.), 항알레르기 작용(Choo MK, et al., Planta Med., 69:518-522, 2003), 신경퇴행성질환 예방작용(Tohda C., et al., Neuropsychopharmacology, 29:860-868, 2004), 피부보호 작용(Shin YW, et al., J. Pharmacol. Sci., 99:83-88, 2005) 등의 효과를 나타내며, 상기 진세노사이드 Rh2는 간암(Xiao-Xi Guo, Int. J. Mol. Sci., 2012, 13, 15523-15535), 췌장암(Xi-Ping Tang, World J Gastroenterol., 2013, 19(10), 1582-1592), 골파괴 억제(He L., Bone., 2012, 50(6), 1207-13.) 등의 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.

- [54] 그러나 상기 진세노사이드 CK 또는 Rh2는 수용성이 떨어지고, 암세포뿐만 아니라 정상 세포에도 독성을 가져 항암제로 사용되는데 한계가 있었다. 따라서 본 발명에서는 진세노사이드의 수용성을 증가시키고, 암세포 특이적 활성을 가지도록 나노 복합체를 제조하여 본 발명을 완성하였다. 진세노사이드 CK 또는 Rh2는 수용성이 낮고, 암세포 특이성이 없으며, 약물 전달체는 항암 활성이 없으나, 상기 두 화합물의 결합에 의해 이와 같은 단점을 모두 극복한 것이다. 또한, 상기 나노 복합체는 우수한 항암 활성뿐만 아니라, 진세노사이드 CK 또는 Rh2 단독으로부터 유추할 수 없는 우수한 항염 활성을 나타냄을 확인하여 본 발명을 완성하였다
- [55] 본 발명의 용어 "나노 복합체"는 약물 전달체; 및 인삼추출물 또는 이로부터 분리된 진세노사이드를 화학적으로 연결한 형태를 의미한다.
- [56] 본 발명에서, 상기 나노 복합체는 금속 나노입자, BSA(Bovine serum albumin) 또는 메조다공성 실리카 나노입자(Mesoporous silica nanoparticle)와 인삼 추출물 또는 이로부터 분리된 진세노사이드 CK 및 Rh2의 나노 복합체일 수 있으며, 예컨대 '금 나노 복합체', '은 나노 복합체', 'BSA-CK', 'BSA-CK 나노 복합체', 'MSNP-CK', 'MSNP-CK 나노 복합체'등으로 혼용되어 명명될 수 있다.
- [57]
- [58] 상기 나노 약물 전달체가 금속 나노입자인 경우, 천연 추출물인 인삼의 뿌리 또는 잎 추출물, 또는 홍삼 뿌리 추출물을 유효성분으로 이용하여, 종래보다 제조시간이 현저히 단축되고, 별도의 환원제 또는 안정제의 부가 없이도 크기가 균일한 나노 복합체를 제조할 수 있다. 특히, 잎 추출물을 이용할 경우, 균일하며 작은입자의 나노 복합체를 제조할 수 있으며, 우수한 안정성을 가진다. 또한, 상기 방법에 의해 제조된 나노 복합체를 포함하는 조성물은 항균 활성, 바이오필름 분해 활성, 항응고 활성, 항암 활성 및 항염증 활성을 가져 다양한 산업분야에서 활용될 수 있다.
- [59] 본 발명에서 용어, "금속 나노입자"는 금속으로 이루어진, 크기가 최소한 1~100nm인 초미세 입자로, 작은 크기에 기인하는 특이하고도 다양한 성질을 보이는 입자를 의미한다. 특히, 본 발명의 인삼 뿌리 또는 잎 추출물이나 홍삼 뿌리 추출물을 이용하여 제조된 것은 생리활성 물질을 포함하고 있는 "금속 나노 복합체"이다. 따라서, 다른 방법으로 제조된 금속 나노입자보다 매우 우수한 항균 활성, 바이오필름 분해 활성, 항응고 활성, 항암 활성 및 항염증 활성을 가질

수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [60] 구체적으로, 상기 "금속"은 금(Au), 은(Ag), 구리(Cu), 팔라듐(Pd), 백금(Pt) 및 로듐(Rd)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으며, 보다 구체적으로는, 금(Au) 또는 은(Ag)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [61] 본 발명에서 금 나노입자, 금 나노 복합체 및 AuNP(s)는 혼용되고, 은 나노입자, 은 나노 복합체, AgP(s)는 혼용된다.
- [62] 본 발명의 일 실시예에서는, 인삼 뿌리 또는 잎 추출물이나 홍삼 뿌리 추출물과 상기 추출액을 테트라클로로금(III)산 또는 질산은 용액과 환원반응을 일으켜 나타나는 반응 혼합액의 색 변화를 육안으로 관찰하여 금 또는 은 나노 복합체의 합성을 확인하였다.
- [63] 따라서 인삼 추출물을 유효성분으로 이용하여 나노 복합체를 제조하기 위한 것으로, 특히, 인삼의 잎 또는 뿌리 추출물이나 홍삼 뿌리 추출물을 이용하여 금 또는 은 나노 복합체를 제조할 수 있다.
- [64] 이 경우, 상기 나노 복합체의 크기는 구체적으로 3 내지 80 nm, 더욱 구체적으로 5 내지 50 nm, 가장 구체적으로 10 내지 40nm일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 종래 금 나노 복합체의 경우 2 내지 40nm의 크기이고, 은 나노 복합체의 경우 100nm가 일반적인 크기라고 공지된 것과 비교할 때, 본 발명의 인삼 추출물을 이용하여 제조된 금 또는 은 나노 복합체의 크기는 종래 제조된 금속 나노입자에 비해 작으며, 그 분포가 균일하며, 특히, 본 발명의 은 나노 복합체의 경우는 종래의 크기보다 매우 작다.
- [65] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 인삼 추출물을 이용한 금속 나노 복합체가 10 내지 40 nm 범위의 균일한 크기의 나노 복합체가 형성된다는 것을 확인하였다. 구체적으로, 금 나노 복합체의 경우, 인삼 잎 추출물을 이용한 경우는 10 내지 30nm의 크기이고, 인삼의 뿌리 추출물을 이용한 경우에는 10 내지 40nm의 크기였으며, 홍삼의 뿌리 추출물을 이용한 경우에는 10 내지 30nm의 크기로 그 크기가 매우 균일하였다.
- [66] 또한, 은 나노 복합체의 경우, 인삼의 잎 추출물을 이용한 경우에는 10 내지 20nm의 크기이고, 인삼의 뿌리 추출물을 이용한 경우에는 10 내지 30nm의 크기였으며, 홍삼의 뿌리 추출물을 이용한 경우에는 10 내지 30nm의 크기로 은 나노입자의 크기 또한, 매우 균일한 범위임을 확인하였다.
- [67]
- [68] 상기 나노 약물 전달체가 BSA(Bovine serum albumin)인 경우, "BSA(Bovine serum albumin)"는 소혈청알부민을 의미하며, 혈장 내에 약 60% 정도로 다량 함유되어 있는 단백질의 일종이다. 세포 배양 시 세포의 영양분으로서 첨가되어 사용되며, 단백질의 정량에서 검정곡선을 얻기 위한 표준물, 또는 다양한 생화학적 실험(Western blot, Immunocytochemistry, ELISA 등)에서 비특이적 결합을 방지하는데 사용된다.
- [69] 이 경우, 나노 복합체 1 mg 당 0.05 내지 0.15 mg의 진세노사이드를 포함할 수

있다.

- [70] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, HPLC를 이용하여 BSA-CK 또는 BSA-Rh2 나노 복합체에 적재된 진세노사이드의 양을 계산한 결과, 1 mg의 BSA-CK에 적재된 CK의 양은 0.087 mg, 1 mg의 BSA-Rh2에 적재된 Rh2의 양은 0.096 mg임을 확인하였다.
- [71] 또한, FE-TEM을 이용하여 BSA-CK 또는 BSA-Rh2 나노 복합체의 형태를 확인한 결과, 상기 나노 복합체 모두 구의 모양을 나타냄을 확인하였고; 동적광산란(dynamic light scattering; DLS)을 통해 BSA-CK 또는 BSA-Rh2 나노 복합체의 크기를 확인한 결과, 각각 157.2 nm, 175.8 nm의 평균 유체역학적 크기를 갖는 것을 확인하였고; BSA-CK 또는 BSA-Rh2 나노 복합체의 제타 전위값을 측정한 결과, 각각 -70.80 mV, -80.2 mV임을 확인하였다.
- [72] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, BSA-CK의 폐암세포 사멸능력이 CK 단독의 폐암세포 사멸능력보다 현저히 증가됨을 확인하였다.
- [73]
- [74] 상기 나노 약물 전달체가 메조다공성 실리카 나노입자(Mesoporous silica nanoparticle)인 경우, "메조다공성 실리카 나노입자(Mesoporous silica nanoparticle)"는 실리카의 메조다공성 형태를 나타내면서 1 내지 100 nm의 크기를 갖는 입자를 의미하며, 상기 용어 '메조다공성'(mesoporous)은 지름 2 내지 50 nm의 다수의 기공을 의미한다. 본 발명에서, 상기 메조다공성 실리카 나노입자는 'MSNP'로 혼용되어 명명될 수 있다.
- [75] 이 경우, 상기 나노 복합체는 나노 복합체 1 mg 당 0.05 내지 0.15 mg의 진세노사이드를 포함할 수 있다.
- [76] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, HPLC를 이용하여 MSNP-CK 또는 MSNP-Rh2 나노 복합체에 적재된 진세노사이드의 양을 계산한 결과, 1 mg의 MSNP-CK에 적재된 CK의 양은 0.087 mg, 1 mg의 MSNP-Rh2에 적재된 Rh2의 양은 0.096 mg임을 확인하였다.
- [77] 본 발명의 다른 구체적인 일 실시예에서는, MSNP-CK 또는 MSNP-Rh2 나노 복합체의 특성을 확인하기 위하여 ¹H NMR과 FTIR를 이용하여 분석한 결과, 상기 나노 복합체는 진세노사이드 고유의 특징적인 피크를 나타냄을 확인하였고, FE-TEM을 이용하여 MSNP-CK 또는 MSNP-Rh2 나노 복합체의 형태를 확인한 결과, 상기 나노 복합체 모두 구의 모양을 나타냄을 확인하였다.
- [78] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, MSNP-CK의 폐암세포 사멸능력이 CK 단독의 폐암세포 사멸능력보다 현저히 증가됨을 확인하였다.
- [79]
- [80] 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 나노 복합체를 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 또한, 상기 나노 복합체를 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 암을 치료하는 방법을 제공한다.
- [81] 본 발명의 용어 "나노 복합체"는 상기에서 설명한 바와 같다.

- [82] 본 발명의 용어, "암"은 생체 조직 안에서 세포가 무제한으로 증식하여 악성 종양을 일으키는 질환을 의미하며, 본 발명의 약학적 조성물에 의하여 증상이 완화, 경감, 개선 또는 치료될 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 구체적인 예로, 폐암일 수 있다.
- [83] 상기 암은 폐암, 비소세포성 폐암, 결장암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부암, 피부 또는 안구내 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 위암, 항문부근암, 결장암, 유방암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장 또는 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS; central nervous system) 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종, 뇌하수체 선종 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [84] 본 발명의 용어, "예방"은 본 발명의 BSA와 진세노사이드의 나노 복합체를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물의 투여에 의해 질병의 발병을 억제시키거나 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 본 발명에서, 상기 '질병'은 암 또는 염증성 질환일 수 있다.
- [85] 본 발명의 용어, "치료"는 상기 약학적 조성물의 투여에 의해 질병의 의심 및 발병 개체의 증상이 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다. 본 발명에서, 상기 '질병'은 암 또는 염증성 질환일 수 있다.
- [86] 본 발명의 약학적 조성물은 총 조성물의 중량 대비 BSA와 진세노사이드의 나노 복합체를 0.0001 내지 50 중량%로 포함할 수 있으며, 구체적으로 0.01 중량% 내지 10 중량%로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [87] 상기 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있고, 상기 담체는 비자연적 담체(non-naturally occurring carrier)를 포함할 수 있다.
- [88] 구체적으로, 상기 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명에서, 상기 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose),

젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는 데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는

프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

- [89] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 은 및 금 나노 복합체가 인간 폐암 세포(A549)에 대해 각각 $100\mu\text{g/mL}$ 및 $2\mu\text{g/mL}$ 농도에서 세포독성을 나타냄을 확인하였다. 이를 통해 인삼의 잎 추출물에 의해 생합성된, 은 및 금 나노 복합체가 항암 활성을 가짐을 알 수 있었다.
- [90] 다른 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, BSA-CK 또는 BSA-Rh2 나노 복합체는 A549 폐암 세포주에 대하여 높은 세포독성을 나타냄을 확인하였고, 동일한 농도에서 정상 세포주인 각질세포주에는 세포독성을 나타내지 않음을 확인하였다. 이는, 본 발명의 BSA와 진세노사이드의 나노 복합체는 정상 세포에는 작용하지 않는 암세포 특이적인 세포독성을 나타내므로, 암의 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 시사하는 것이다.
- [91] 또 다른 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, MSNP-CK 또는 MSNP-Rh2 나노 복합체는 A549 폐암 세포주에 대하여 높은 세포독성을 나타냄을 확인하였고, 동일한 농도에서 정상 세포주인 각질세포주에는 세포독성을 나타내지 않음을 확인하였다(도 3). 이는, 본 발명의 MSNP와 진세노사이드의 나노 복합체는 정상 세포에는 작용하지 않는 암세포 특이적인 세포독성을 나타내므로, 암의 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 시사하는 것이다.
- [92] 본 발명의 용어, "투여"는 적절한 방법으로 개체에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미한다.
- [93] 본 발명의 용어, "개체"는 질병이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 쥐, 생쥐, 가축 등의 모든 동물을 의미한다. 구체적인 예로, 인간을 포함한 포유동물일 수 있다. 본 발명에서, 상기 '질병'은 암 또는 염증성 질환일 수 있다.
- [94] 본 발명의 암의 예방 또는 치료 방법은 구체적으로, 개체에 MSNP와 진세노사이드의 나노 복합체를 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 약학적으로 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함할 수 있다.
- [95] 상기 용어, '약학적으로 유효한 양'은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수해/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 성별, 연령, 체중, 건강상태, 질병의

종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로, 및 배출 비율, 치료 기간, 배합 또는 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[96] 구체적으로, 본 발명의 조성물은 고형분을 기준으로 1일 0.0001 내지 100 mg/체중 kg으로, 더욱 구체적으로 0.001 내지 100 mg/체중 kg으로 투여할 수 있다. 투여는 상기 권장 투여량을 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다.

[97] 본 발명의 암의 예방 또는 치료 방법에서, 상기 조성물을 투여하는 투여 경로 및 투여 방식은 특별히 제한되지 않으며, 목적하는 해당 부위에 상기 조성물을 포함하는 조성물이 도달할 수 있는 한 임의의 투여 경로 및 투여 방식에 따를 수 있다. 구체적으로, 상기 조성물은 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 그 투여 경로의 비제한적인 예로는, 구강, 직장, 국소, 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 경피, 비측내 또는 흡입 등을 통하여 투여되는 것을 들 수 있다.

[98]

[99] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 나노 복합체를 포함하는, 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 또한, 상기 나노 복합체를 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 염증성 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[100] 본 발명의 용어 "나노 복합체", "예방", "치료"는 상기에서 설명한 바와 같다.

[101] 본 발명의 용어, "염증성 질환"은 염증에 의해 야기되는 질환을 의미한다. 상기 염증성 질환은, 본 발명의 약학 조성물에 의하여 증상이 완화, 경감, 개선 또는 치료될 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 구체적인 예로, 크론씨병, 홍반병, 아토피, 류마티스 관절염, 하시모토 갑상선염, 악성빈혈, 에디슨씨 병, 제1형 당뇨병, 루프스, 만성피로증후군, 섬유근육통, 갑상선기능저하증과 항진증, 경피증, 베체트병, 염증성 장질환, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 메니에르 증후군(Meniere's syndrome), 길리안-바레 증후군(Guillian-Barre syndrome), 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 백반증, 자궁내막증, 건선, 백반증, 전신성 경피증 또는 궤양성 대장염일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[102] 본 발명의 약학적 조성물은 총 조성물의 중량 대비 상기 나노 복합체의 나노 복합체를 0.0001 내지 50 중량%로 포함할 수 있으며, 구체적으로 0.01 중량% 내지 10 중량%로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[103] 상기 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있고, 상기 담체는 비자연적 담체(non-naturally occurring carrier)를 포함할 수 있다.

[104] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 은 나노 복합체는 1000 μ M 농도까지 RAW264.7 세포에 대해 세포독성이 없으며, 농도의존적으로 NO 생산을 억제함을 확인하였다(도 26). 또한, 금 나노 복합체는 100 μ M 농도까지 RAW264.7 세포에 대해 세포독성이 없으며, 농도의존적으로 NO 생산을 억제함을

확인하였다. 이를 통해, 인삼의 잎 추출물에 의해 생합성된, 은 및 금 나노 복합체가 세포독성 없이 항염증 활성을 가짐을 확인하였다.

[105] 다른 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, BSA-CK 또는 BSA-Rh2 나노 복합체는 RAW 264.7 대식세포주에 대해서는 심각한 세포독성을 야기하지 않으면서, 낮은 농도에서도 RAW 264.7 대식세포주의 NO 생산은 억제할 수 있음을 확인하였다. 이는, 본 발명의 BSA와 진세노사이드의 나노 복합체는 정상 대식세포에 대하여 직접적으로 독성을 나타내지 않으면서 NO 생산만을 선택적으로 억제하므로, 염증성 질환의 치료에 부작용 없이 유용하게 사용될 수 있음을 시사하는 것이다.

[106] 또 다른 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, MSNP-CK 또는 MSNP-Rh2 나노 복합체는 RAW 264.7 대식세포주에 대해서는 심각한 세포독성을 야기하지 않으면서, 낮은 농도에서도 RAW 264.7 대식세포주의 NO 생산은 억제할 수 있음을 확인하였다. 이는, 본 발명의 MSNP와 진세노사이드의 나노 복합체는 정상 대식세포에 대하여 직접적으로 독성을 나타내지 않으면서 NO 생산만을 선택적으로 억제하므로, 염증성 질환의 치료에 부작용 없이 유용하게 사용될 수 있음을 시사하는 것이다.

[107] 본 발명의 염증성 질환의 예방 또는 치료 방법은 구체적으로, 개체에 상기 나노 복합체를 유효성분으로 포함하는, 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 약학적으로 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 조성물은 고형분을 기준으로 1일 0.0001 내지 100 mg/체중 kg으로, 더욱 구체적으로 0.001 내지 100 mg/체중 kg으로 투여할 수 있다. 투여는 상기 권장 투여량을 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다.

[108] 본 발명의 염증성 질환의 예방 또는 치료 방법에서, 상기 조성물을 투여하는 투여 경로 및 투여 방식은 특별히 제한되지 않으며, 목적하는 해당 부위에 상기 조성물을 포함하는 조성물이 도달할 수 있는 한 임의의 투여 경로 및 투여 방식에 따를 수 있다. 구체적으로, 상기 조성물은 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 그 투여 경로의 비제한적인 예로는, 구강, 직장, 국소, 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 경피, 비측내 또는 흡입 등을 통하여 투여되는 것을 들 수 있다.

[109]

[110] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 나노 복합체를 유효성분으로 포함하는 암의 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[111] 본 발명의 용어, "개선"은 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[112] 본 발명의 용어, "식품"은 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료, 비타민 복합제, 건강기능식품 및 건강식품

등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다.

- [113] 상기 건강기능(성)식품(functional food)이란, 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)와 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미한다. 여기서 "기능(성)"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 식품은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조시에는 당 업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 식품의 제형 또한 식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다. 본 발명의 식품용 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 본 발명의 식품은 질병의 예방 또는 개선의 효과를 증진시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.
- [114] 상기 건강식품(health food)은 일반식품에 비해 적극적인 건강유지나 증진 효과를 가지는 식품을 의미하고, 건강보조식품(health supplement food)는 건강보조 목적의 식품을 의미한다. 경우에 따라, 건강 기능 식품, 건강식품, 건강보조식품의 용어는 호용된다.
- [115] 구체적으로, 상기 건강기능식품은 상기 나노 복합체를 음료, 차류, 향신료, 껌, 과자류 등의 식품소재에 첨가하거나, 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조한 식품으로, 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오는 것을 의미하나, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용이 없는 장점이 있다.
- [116] 본 발명의 식품 조성물은 일상적으로 섭취하는 것이 가능하기 때문에 높은 암의 예방 또는 개선 효과를 기대할 수 있어 매우 유용하다.
- [117] 상기 조성물은 생리학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있는데, 담체의 종류는 특별히 제한되지 않으며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다.
- [118] 또한, 상기 조성물은 식품 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 추가 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 비타민 A, C, D, E, B1, B2, B6, B12, 니아신(niacin), 비오틴(biotin), 폴레이트(folate), 판토텐산(panthotenic acid) 등을 포함할 수 있다. 또한, 아연(Zn), 철(Fe), 칼슘(Ca), 크롬(Cr), 마그네슘(Mg), 망간(Mn), 구리(Cu), 크롬(Cr) 등의 미네랄을 포함할 수 있다. 또한, 라이신, 트립토판, 시스테인, 발린 등의 아미노산을 포함할 수 있다.
- [119] 또한, 상기 조성물은 방부제(소르빈산 칼륨, 벤조산나트륨, 살리실산, 데히드로초산나트륨 등), 살균제(표백분과 고도 표백분, 차아염소산나트륨 등), 산화방지제(부틸히드록시아니졸(BHA), 부틸히드록시톨루엔(BHT) 등), 착색제(타르색소 등), 발색제(아질산 나트륨, 아초산 나트륨 등),

표백제(아황산나트륨), 조미료(MSG 글루타민산나트륨 등), 감미료(둘신, 사이클레메이트, 사카린, 나트륨 등), 향료(바닐린, 락톤류 등), 팽창제(명반, D-주석산수소칼륨 등), 강화제, 유화제, 증점제(호료), 피막제, 검기초제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품 첨가물(food additives)을 포함할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별되고 적절한 양으로 사용될 수 있다.

[120] 상기 BSA와 진세노사이드의 나노 복합체는 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 식품 조성물은 식품 또는 음료에 대하여 50 중량부 이하, 구체적으로 20 중량부 이하의 양으로 첨가될 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 장기간 섭취할 경우에는 상기 범위 이하의 함량을 포함할 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[121] 본 발명의 식품 조성물의 일 예로 건강음료 조성물로 사용될 수 있으며, 이 경우 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드; 말토스, 슈크로스과 같은 디사카라이드; 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드; 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜일 수 있다. 감미제는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제; 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 mL 당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 구체적으로 약 0.02 ~ 0.03 g이 될 수 있다.

[122] 상기 외에 건강음료 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산, 펙트산의 염, 알긴산, 알긴산의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올 또는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일주스, 과일주스 음료, 또는 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[123] 본 발명의 식품 조성물은 암의 예방 또는 개선 효과를 나타낼 수 있다면 다양한 중량%로 포함할 수 있으나, 구체적으로 상기 나노 복합체를 식품 조성물의 총 중량 대비 0.00001 내지 100 중량% 또는 0.01 내지 80 중량%로 포함할 수 있다.

[124]

[125] 또 다른 하나의 양태는 상기 나노 복합체를 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[126] 본 발명의 식품 조성물은 일상적으로 섭취하는 것이 가능하기 때문에 높은 염증성 질환의 예방 또는 개선 효과를 기대할 수 있어 매우 유용하다.

[127] 상기 조성물은 생리학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있는데,

담체의 종류는 특별히 제한되지 않으며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다.

- [128] 상기 나노 복합체는 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 식품 조성물은 식품 또는 음료에 대하여 50 중량부 이하, 구체적으로 20 중량부 이하의 양으로 첨가될 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 장기간 섭취할 경우에는 상기 범위 이하의 함량을 포함할 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [129] 본 발명의 식품 조성물은 염증성 질환의 예방 또는 개선 효과를 나타낼 수 있다면 다양한 중량%로 포함할 수 있으나, 구체적으로 상기 나노 복합체를 식품 조성물의 총 중량 대비 0.00001 내지 100 중량% 또는 0.01 내지 80 중량%로 포함할 수 있다.
- [130] 또 다른 하나의 양태는 상기 나노 복합체를 유효성분으로 포함하는 암 또는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 의약품 조성물을 제공한다.
- [131] 본 발명에서, 상기 진세노사이드는 진세노사이드 화합물 K(Compound K) 또는 진세노사이드 Rh2일 수 있다.
- [132] 본 발명의 용어, "의약품"은 사람이나 동물의 질병을 치료, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용되는 섬유, 고무제품 또는 이와 유사한 것, 인체에 대한 작용이 약하거나 인체에 직접 작용하지 아니하며, 기구 또는 기계가 아닌 것과 이와 유사한 것, 감염 예방을 위하여 살균, 살충 및 이와 유사한 용도로 사용되는 제제 중 하나에 해당하는 물품으로서, 사람이나 동물의 질병을 진단, 치료, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용하는 물품 중 기구, 기계 또는 장치가 아닌 것 및 사람이나 동물의 구조와 기능에 약리학적 영향을 줄 목적으로 사용하는 물품 중 기구, 기계 또는 장치가 아닌 것을 제외한 물품을 의미하며, 구체적으로 피부 외용제일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [133] 상기 나노 복합체를 염증성 질환의 예방 또는 개선을 목적으로 의약품 조성물에 첨가할 경우, 상기 BSA와 진세노사이드의 나노 복합체를 그대로 첨가하거나 다른 의약품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적에 따라 적합하게 결정할 수 있다.
- [134] 상기 피부 외용제는 특별히 이에 제한되지 않으나, 예를 들어 연고제, 로션제, 스프레이제, 패취제, 크림제, 산제, 현탁제, 겔제 또는 젤의 형태로 제조되어 사용될 수 있다.
- [135] 본 발명의 의약품 조성물은 염증성 질환의 예방 또는 개선 효과를 나타낼 수 있다면 다양한 중량%로 포함할 수 있으나, 구체적으로 상기 나노 복합체를 의약품 조성물의 총중량 대비 0.01 내지 100 중량%, 더욱 구체적으로 1 내지 80

중량%로 포함할 수 있다.

- [136] 또 다른 하나의 양태는 상기 나노 복합체를 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 화장료 조성물을 제공한다.
- [137] 본 발명의 화장료 조성물은 총 조성물의 중량 대비 상기 나노 복합체를 0.0001 내지 50 중량%로 포함할 수 있으며, 구체적으로 0.01 중량% 내지 10 중량%로 포함할 수 있다. 상기 범위 내에서 우수한 염증성 질환의 예방 또는 개선 효과를 나타내는 이점이 있으며, 조성물의 제형이 안정화되는 이점이 있다.
- [138] 상기 화장료 조성물은 용액, 외용 연고, 크림, 폼, 영양 화장수, 유연 화장수, 팩, 유연수, 유액, 메이크업 베이스, 에센스, 비누, 액체 세정료, 입욕제, 선 스크린 크림, 선 오일, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 로션, 파우더, 비누, 계면 활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션, 패취 및 스프레이로 이루어진 군으로부터 선택되는 제형으로 제조할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [139] 상기 화장료 조성물은 일반 피부 화장료에 배합되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 추가로 포함할 수 있으며, 통상의 성분으로 예를 들면 유분, 물, 계면 활성제, 보습제, 저급 알코올, 증점제, 킬레이트제, 색소, 방부제, 향료 등을 적절히 배합할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [140] 상기 화장료 조성물에 포함되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체는 화장료 조성물의 제형에 따라 다양하다.
- [141] 본 발명의 제형이 연고, 페이스트, 크림 또는 젤인 경우에는, 담체 성분으로서 동물성 유, 식물성 유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 산화 아연 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.
- [142] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는, 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록사이드, 칼슘 실케이트, 폴리아미드 파우더 등이 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로폴루오로하드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진제를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.
- [143] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는, 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제 등이 이용될 수 있으며, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일 등이 이용될 수 있고, 특히, 목화씨 오일, 땅콩 오일, 옥수수 배종 오일, 올리브 오일, 피마자 오일 및 참깨 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.

- [144] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는, 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타하이드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.
- [145] 본 발명의 제형이 비누인 경우에는, 담체 성분으로서 지방산의 알칼리 금속 염, 지방산 헤미에스테르 염, 지방산 단백질 히드롤리제이트, 이세티오네이트, 라놀린 유도체, 지방족 알코올, 식물성 유, 글리세롤, 당 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.
- [146] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클렌징인 경우에는, 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시테이트, 지방산 아마이드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 오일, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.
- [147]
- [148] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 나노 복합체를 포함하는 향균용 조성물을 제공한다.
- [149] 본 발명의 나노 복합체는 인삼 뿌리 또는 잎 추출물이나 홍삼 뿌리 추출물을 이용하여 제조되어, 각 추출물의 생리활성 물질을 포함하고 있는 바, 다른 방법으로 제조된 금속 나노입자보다 매우 우수한 향균 활성을 가진다.
- [150] 본 발명의 향균용 조성물은 세균, 진균 또는 효모에 대해 향균활성을 가질 수 있으며, 구체적으로, 비브리오(*Vibrio*) 속 미생물, 살모넬라(*Salmonella*) 속 미생물, 스테피로코커스(*Staphylococcus*) 속 미생물, 에스케리치아(*Escherichia*) 속 미생물, 바실러스(*Bacillus*) 속 미생물, 및 칸디다(*Candida*)속 미생물로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상에 대해 향균 활성을 가질 수 있으며, 더욱 구체적으로는, 비브리오 파라헤몰리티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*), 살모넬라 엔테리카(*Salmonella enterica*), 스테피로코커스 오우러스(*Staphylococcus aureus*), 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*), 바실러스 안트라시스(*Bacillus anthracis*), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*) 및 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상에 대해 향균 활성을 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [151] 구체적으로, 본 발명의 은 나노 복합체 또는 상기 은 나노 복합체를 포함하는 조성물은 병원성 미생물에 대한 향균활성이 일반적인 은 나노 복합체보다 매우

우수한 바, 화장품, 의약외품, 의약품, 식품 등의 다양한 분야에서 널리 사용될 수 있다.

- [152] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 인삼 잎 추출물을 이용하는 금 나노 복합체는 비브리오 파라헤몰리티쿠스, 살모넬라 엔테리카, 에스케리치아 콜라이, 스테피로코커스 오우러스에 대해 항균활성을 가짐을 확인할 수 있었고, 인삼 뿌리 추출물을 이용하는 은 나노 복합체는 에스케리치아 콜라이, 바실러스 세레우스, 스테피로코커스 오우러스, 비브리오 파라헤몰리티쿠스 및 바실러스 안트라시스에 대하여 항균활성을 보여주었다. 또한, 홍삼 뿌리 추출물을 이용하는 은 나노 복합체는 비브리오 파라헤몰리티쿠스, 스테피로코커스 오우러스, 바실러스 세레우스 및 칸디다 알비칸스에 대한 항균 활성을 가짐이 확인되었는데, 칸디다 알비칸스에 대해 가장 크고, 그 다음으로 비브리오 파라헤몰리티쿠스, 스테피로코커스 오우러스, 바실러스 세레우스의 순서로 항균활성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 상기 결과를 통해 본 발명의 은 나노 복합체가 미생물에 대하여 항균활성을 가짐을 확인할 수 있다.
- [153] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 금속 나노 복합체를 포함하는 바이오필름 분해용 조성물을 제공하는 것이다.
- [154] 본 발명의 나노 복합체는 인삼 뿌리 또는 잎 추출물이나 홍삼 뿌리 추출물을 이용하여 제조되어, 각 추출물의 생리활성 물질을 포함하고 있는 바, 다른 방법으로 제조된 금속 나노입자보다 매우 우수한 바이오필름 분해 활성을 가진다.
- [155] 본 발명에서 용어, "바이오필름"은 세균의 집합체로서 세균이 얇게 필름처럼 둘러싸여 있는 것을 의미한다. 즉, 바이오필름은 세균으로 인해 생성되며 다시 그것은 세균에게 서식처를 제공하여 세균 증식을 가속화하는 원인이 된다.
- [156] 본 발명의 바이오필름 분해 조성물은 바이오필름 분해 활성을 가져 바이오필름-관련 감염을 저해함으로써, 비용적인 측면이나 환자의 고통을 경감시키는 역할을 하는바, 구체적으로, 플라스틱, 금속 등의 표면을 부식 등으로부터 보호하기 위한 산업이나, 치과기기 산업, 배관 산업 등의 다양한 분야에서 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [157] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 스테피로코커스 오우러스(*Staphylococcus aureus*) 및 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*)에 대한 비색법(colorimetric method)으로 본 발명의 바이오필름 분해 활성을 확인한 결과, 인삼 잎 추출물을 이용하여 제조된 은 나노 복합체는, 4 ?g/ml 농도의 은 나노 복합체에서 스테피로코커스 오우러스와 슈도모나스 에루지노사에 대한 바이오필름 분해 활성이 최고조였으며, 홍삼 뿌리 추출물을 이용하여 제조된 은 나노 복합체에서도 상기와 같은 농도에서 스테피로코커스 오우러스와 슈도모나스 에루지노사에 대한 바이오 분해 활성이 있음을 확인하였다.
- [158] 이를 통해, 인삼 추출물을 이용하여 제조된 나노 복합체가 균주에 대한 바이오필름 분해 활성을 가져 바이오필름-관련 감염을 저해함으로써 비용적인

- 측면이나 환자의 고통을 경감시키는 역할을 할 수 있다는 것을 확인할 수 있다.
- [159] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 나노 복합체를 포함하는 항응고용 조성물을 제공하는 것이다.
- [160] 본 발명의 금속 나노 복합체는 인삼 뿌리 또는 잎 추출물이나 홍삼 뿌리 추출물을 이용하여 제조되어, 각 추출물의 생리활성 물질을 포함하고 있는 바, 다른 방법으로 제조된 금속 나노입자보다 매우 우수한 항응고 활성을 가진다.
- [161] 본 발명에서 용어, "항응고"는 신체의 정상적인 혈액응고 성질을 저해하는 것을 의미하며, 항응혈이라고도 쓰인다. 구체적으로는, 혈액에 첨가함으로써 응고를 저지하는 항응혈제, 혈액에 존재하는 활성형 혈액응고인자에 대한 혈액의 생리적 항응혈소로 여러 혈액응고인자의 작용을 저지하는 항트롬빈Ⅲ나 헤파린 등이 있고, 경구 투여에 의해 응혈인자의 활성을 저해하는 항응혈약제, 및 병적 상태에서 후천적으로 출현하여 가역적, 비가역적으로 혈액응고인자의 활성을 억제하는 항응혈물질로 나뉜다.
- [162] 본 발명의 항응고용 조성물은 인삼 추출물, 구체적으로는 인삼의 잎 또는 뿌리 추출물이나 홍삼 뿌리 추출물을 이용하여 제조된 나노 복합체를 포함함으로써, 혈액의 응고를 저지하는바, 구체적으로는, 의학 분야나 생명공학 분야에서 사용될 수 있으며, 보다 구체적으로는, 혈액과 직접적으로 접촉하는 약 및 유전자의 전달자나 또는 바이오센서, 생체 내 나노캐리어로서 변형하여 사용될 수 있으나, 이에 제한된 것은 아니다. 또한, *in vitro* 상에서 실험을 위한 목적으로도 사용될 수 있다.
- [163] 본 발명에서 상기 항응고용 조성물을 약학, 의약품, 화장품, 식품 및 사료 조성물로 사용될 수 있다.
- [164] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 나이 25 내지 45세 범위의 건강한 남성 및 여성 자원자의 혈액을 채취하여 2 개의 진공 채혈기에 넣고 각각 A 및 B로 표시한 후 합성된 금 나노 복합체의 항응고 효과를 관찰하였다. 그 결과, 인삼 잎 추출물을 이용하여 제조된 금 나노 복합체는, 금 나노 복합체가 존재할 시 응혈 형성이 저해되었으며, 금 나노 복합체가 포함되지 않은 대조군은 혈액이 완전히 응고됨을 확인하였다. 이와 같은 결과를 통하여, 인삼의 잎 추출물에 의해 생합성된 금 나노 복합체가 항응고 활성을 가짐을 확인할 수 있다.
- [165]
- [166] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 나노 약물전달체; 및 인삼추출물 또는 이로부터 분리된 진세노사이드를 혼합하여 반응시키는 단계를 포함하는, 나노 복합체의 제조방법을 제공한다.
- [167]
- [168] 상기 나노 복합체의 제조방법에 있어서 약물 전달체가 금속 나노입자인 경우, 천연 추출물인 인삼 추출물을 이용하여 금속 나노 복합체를 제조하는바, 화학적 합성방법 및 물리적 합성방법에 비해 친환경적이고 제조시간을 현저히 단축시키며, 동시에 별도의 환원제 또는 안정제 없이 안정화를 유지할 수 있는

금속 나노 복합체를 제조할 수 있어, 다양한 산업 분야에서 매우 유용하게 사용될 수 있다.

- [169] 본 발명의 제조방법은 사용하는 금속 전구체에 따라 다양한 금속 나노입자를 제조할 수 있으며, 구체적으로, 금(Au), 은(Ag), 구리(Cu), 팔라듐(Pd), 백금(Pt) 및 로듐(Rd)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정된 것은 아니다. 보다 구체적으로는, 금(Au) 또는 은(Ag)을 선택할 수 있다.
- [170] 본 발명에서 용어, "금속 전구체"는 금속 나노입자를 제조하기 위하여 첨가하는 화합물을 의미한다. 구체적으로, 금속 전구체로는 제조하고자 하는 나노입자의 금속 종류에 따라 다양한 종류의 화합물을 선택하여 사용할 수 있다. 예를 들어, 금 나노입자의 제조에는 테트라클로로금(III)산 (HAuCl_4), NaAuCl_3 , 및 AuCl_3 로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상을 사용할 수 있으며, 보다 구체적으로는, 테트라클로로금(III)산 (HAuCl_4)을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [171] 또한, 은 나노입자의 제조에는 AgBF_4 , AgCF_3SO_3 , AgClO_4 , AgNO_3 , AgPF_6 및 $\text{Ag}(\text{CF}_3\text{COO})$ 로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상을 사용할 수 있으며, 보다 구체적으로는, 질산은(AgNO_3)을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [172] 또한, 구리 나노입자의 제조에는 CuCl_2 , CuF_2 , CuBr_2 , CuI_2 , $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Cu}$, $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 및 CuSO_4 로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [173] 본 발명의 제조방법에서, 반응에 사용되는 금속 전구체의 농도는 금속 나노입자 제조에 영향을 미칠 수 있다. 본 발명의 금속 전구체의 농도는 금속 나노입자 제조용 조성물로 금속 나노입자를 제조할 수 있는 한 제한되지 않으나, 구체적으로 금속 전구체의 농도는 0.01 내지 100 mM, 더욱 구체적으로는 0.01 내지 50mM, 가장 구체적으로는, 0.01 내지 10mM일 수 있다.
- [174] 본 발명의 제조방법에서, 반응 온도는 금속 나노입자 제조에 영향을 미칠 수 있다. 본 발명의 반응 온도는 금속 나노입자 제조용 조성물로 금속 나노입자를 제조할 수 있는 한 제한되지 않으나, 구체적으로 반응 온도는 10 내지 100°C, 더욱 구체적으로 50 내지 100°C일 수 있다.
- [175] 본 발명의 제조방법에서, 반응 시간은 금속 나노입자 제조에 영향을 미칠 수 있다. 본 발명의 반응 시간은 금속 나노입자 제조용 조성물로 금속 나노입자를 제조할 수 있는 한 제한되지 않으나, 구체적으로 금속이 금인 경우 반응 시간은 1분 내지 1시간, 더욱 구체적으로 1분 내지 50분일 수 있으며, 금속이 은인 경우, 반응 시간은 30분 내지 5시간, 더욱 구체적으로는 30분 내지 2시간일 수 있다.
- [176]
- [177] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 인삼(*panax ginseng*)의 잎 추출물을 이용하여 금 또는 은 나노입자를 제조하는 경우, 테트라클로로금(III)산을 넣은 반응 혼합액은 3분 내에 어두운 자주색으로 변하였고(도 1의 a), 질산은을 넣은 반응 혼합액은 45분 내에 완전히 갈색으로 변하였다(도 1의 b). 또한, 인삼(*panax*

ginseng)의 뿌리 추출물을 이용하는 경우는, 질산은을 넣은 반응 혼합액은 하얀색에서 갈색으로 변하는데 2시간이 소요되었고(도 1의 d), 테트라클로로금(III)산을 넣은 반응 혼합액은 5분이 소요되었다(도 1의 e). 또한, 홍삼 뿌리 추출액을 이용하여 제조한 경우에는, 반응 혼합액이 각각 은 나노입자의 제조시에는 1시간, 금 나노입자의 제조시에는 10분 이내에 각각 갈색과 루비색(ruby red)으로 변하는 것을 확인하였다(도 1의 f 및 g).

- [178] 상기의 결과를 통해, 인삼의 잎 또는 뿌리, 홍삼 뿌리 추출물을 이용하여 제조되는 금 또는 은 나노입자가 다른 천연 추출물이나 인삼의 다른 부위 추출물을 이용하여 제조되는 나노입자에 비해 매우 짧은 시간 안에 합성되는 것을 확인할 수 있었으며, 특히, 인삼의 잎 추출물을 이용할 경우, 현저히 빠른 시간 내에 경제적이고 친환경적인 방법으로 안정적인 금속 나노입자가 합성된다는 것을 알 수 있다.
- [179] 상기 약물 전달체가 금속 나노입자인 경우, 본 발명의 제조방법은 반응액을 원심분리하여 금속 나노입자를 회수하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [180] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 인삼 추출물을 함유하는 금속 나노입자 제조용 조성물을 1mM의 테트라클로로금(III)산과 질산은 용액에 각각 첨가한 후, 80°C로 유지하고, 16,000rpm에서 20분간 원심분리하여 금속 나노입자를 제조하였다(실시예 3).
- [181] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 제조방법에 의해 제조된 금속 나노입자를 제공하는 것이다.
- [182] 본 발명의 금속 나노입자는 인삼 뿌리 또는 잎 추출물이나 홍삼 뿌리 추출물을 이용하여 제조되어, 각 추출물의 생리활성 물질을 포함하고 있는 바, 다른 방법으로 제조된 금속 나노입자보다 매우 우수한 항균 활성, 바이오필름 분해 활성, 항응고 활성, 항암 활성 및 항염증 활성을 가져 다양한 산업에 유용하게 이용될 수 있다.
- [183] 본 발명의 금속 나노입자는 의료용, 생물학적 분석용, 연료용, 전자부품 재료의 용도로 사용될 수 있으며, 구체적으로, 금 나노입자는 고유의 빛 전도 특성으로 인해 유기태양전지, 센서프로브, 생물의학용 드러그 딜리버리, 전도재료 및 촉매제로 이용될 수 있고, 은 나노입자는 광학특성, 전도성 및 항균성으로 인해, 항균제, 정량검출을 위한 바이오센서, 광학분석법 등에 이용될 수 있다. 또한, 본 발명의 금속 나노입자는 크기나 형태, 표면의 화학적 특성 또는 응집상태를 변화시킴으로써, 입자의 광학적, 전자적 특성을 조절할 수 있다.
- [184] 본 발명의 제조방법에 의해 제조된 금속 나노입자의 모양은, 일반적으로 구형의 모양을 띌 수 있으나, 이에 한정된 것은 아니다.
- [185] 또한, 본 발명의 제조방법에 의해 제조된 금속 나노입자의 크기는 구체적으로 3 내지 80 nm, 더욱 구체적으로 5 내지 50 nm, 가장 구체적으로 10 내지 40nm일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 종래 금 나노입자의 경우 2 내지 40nm의 크기이고, 은 나노입자의 경우 100nm가 일반적인 크기라고 공지된 것과 비교할

때, 본 발명의 인삼 추출물을 이용하여 제조된 금 또는 은 나노입자의 크기는 종래 제조된 금속 나노입자에 비해 작으며, 그 분포가 균일하며, 특히, 본 발명의 은 나노입자의 경우는 종래의 크기보다 매우 작다.

[186] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 인삼 추출물을 이용하여 제조한 금속 나노입자가 10 내지 40 nm 범위의 균일한 크기의 나노입자를 제조한다는 것을 확인하였다(실시예 3). 구체적으로, 금 나노입자의 경우, 인삼) 잎 추출물을 이용한 경우는 10 내지 30nm의 크기이고, 인삼의 뿌리 추출물을 이용한 경우에는 10 내지 40nm의 크기였으며, 홍삼의 뿌리 추출물을 이용한 경우에는 10 내지 30nm의 크기로 그 크기가 매우 균일하였다.

[187] 또한, 은 나노입자의 경우, 인삼의 잎 추출물을 이용한 경우에는 10 내지 20nm의 크기이고, 인삼의 뿌리 추출물을 이용한 경우에는 10 내지 30nm의 크기였으며, 홍삼의 뿌리 추출물을 이용한 경우에는 10 내지 30nm의 크기로 은 나노입자의 크기 또한, 매우 균일한 범위임을 확인하였다.

[188]

[189] 상기 나노 복합체의 제조방법에 있어서 약물 전달체가 BSA(Bovine serum albumin)인 경우, 구체적으로 (a) BSA(Bovine serum albumin)를 물에 용해하여 혼합액을 제조하는 단계; (b) 상기 혼합액에 진세노사이드를 첨가하여 반응 혼합액을 제조하는 단계; 및 (c) 상기 반응 혼합액을 투석하는 단계를 포함하여 나노 복합체를 제조할 수 있다.

[190] 상기 (a) 단계는 BSA가 진세노사이드와 반응할 수 있도록 BSA 수용액을 제조하는 단계로서, BSA의 반응성을 향상시키기 위한 과정일 수 있다. 또한, 상기 BSA 수용액에 추가의 처리를 가할 수 있으며, 구체적인 예로 초음파 처리할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[191] 상기 (b) 단계는 BSA를 진세노사이드와 결합시키는 단계로서, 상기 (a) 단계에서 제조한 BSA 수용액에 진세노사이드를 첨가함으로써 수행될 수 있다. 구체적으로, 상기 진세노사이드는 용매에 용해된 상태일 수 있으며, 상기 용매의 종류는 구체적으로 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올이나, 에틸아세테이트 또는 아세톤 등의 극성용매, 헥산 또는 디크로로메탄의 비극성용매일 수 있고, 더욱 구체적으로 에탄올일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 진세노사이드는 BSA 수용액에 드롭 방식(drop wise)으로 첨가될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[192] 상기 (c) 단계는 제조된 BSA와 진세노사이드의 나노 복합체를 정제하는 단계로서, 반응하지 않고 남은 물질 또는 불순 물질을 제거하는 과정이다. 투석막을 이용하여 수행하거나, 또는 용매에 의하여 수행할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[193] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, BSA 수용액을 초음파 처리한 이후, 에탄올에 용해된 진세노사이드 CK 또는 Rh2를 드롭 방식(drop wise)으로 첨가하였고, 상기 반응 혼합액을 투석막에 옮긴 후, 메탄올/증류수 및 증류수를

이용한 추가의 투석 과정을 거쳐 BSA와 진세노사이드의 나노 복합체를 제조하였다.

[194]

[195] 상기 나노 복합체의 제조방법에 있어서 약물 전달체가 메조다공성 실리카 나노입자인 경우, 구체적으로 (a) 메조다공성 실리카 나노입자를 자유 아민기(amine group)로 기능화하는 단계; 및 (b) 상기 기능화된 메조다공성 실리카 나노입자에 진세노사이드를 결합시키는 단계를 포함하여 나노 복합체를 제조할 수 있다.

[196]

상기 (a) 단계는 MSNP가 진세노사이드와 효율적으로 결합하도록 하기 위해 MSNP에 변형을 가하는 단계로서, MSNP의 표면에 아민기를 결합시키는 과정일 수 있다. 특히, 상기 아민화는 수산화암모늄(NH_4OH)을 이용하여 유도된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[197]

상기 (b) 단계는 MSNP를 진세노사이드와 결합시키는 단계로서, MSNP의 아민기가 진세노사이드와 반응하여 공유결합을 형성하는 단계이다. 상기 진세노사이드는 용매에 용해된 상태일 수 있으며, 상기 용매의 종류는 구체적으로 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올이나, 에틸아세테이트 또는 아세톤 등의 극성용매, 헥산 또는 디크로로메탄의 비극성용매일 수 있고, 더욱 구체적으로 에탄올일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[198]

본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, MSNP를 NH_4OH 를 이용하여 자유 아민기로 기능화하였고, 상기 MSNP에 진세노사이드를 첨가하여 교반함으로써 MSNP와 진세노사이드의 나노 복합체를 제조하였다.

[199]

발명의 효과

[200]

본 발명의 나노 복합체는 종래 금속 나노입자보다 제조시간이 현저히 단축되고, 별도의 환원제 또는 안정제의 부가 없이도 크기가 균일한 금속 나노 복합체를 제조할 수 있다. 또한, 물에대한 용해도가 높고, 암세포에 대한 타겟 능력이 높아 약물로 개발되기에 유리하다. 또한, 높은 항암, 항염 활성 등을 나타내므로 암 및 염증 질환의 예방, 치료에 유용하게 활용될 수 있으며, 나아가 항균활성, 바이오필름 분해 활성, 항응고 활성을 가져 다양한 사업분야에서 활용될 수 있다.

[201]

도면의 간단한 설명

[202]

도 1은 인삼 잎 추출물(a 내지 c), 인삼 뿌리 추출물(d 및 e) 또는 홍삼(f 및 g) 추출물과 테트라클로로금(III)산($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 또는 질산은 용액을 반응시킨 후의 색 변화를 나타낸 도이다(control : 대조군, AgNPs: 은 나노 복합체, AuNPs: 금 나노 복합체).

[203]

도 2는 UV-vis를 통한 인삼 잎 추출물을 이용하여 제조된 금 또는 은 나노

복합체의 생성여부를 확인한 도면이다.

- [204] 도 3은 UV-vis를 통한 인삼 뿌리 추출물을 이용하여 제조된 금 또는 은 나노 복합체의 생성여부를 확인한 도면이다.
- [205] 도 4는 UV-vis를 통한 홍삼 뿌리 추출물을 이용하여 제조된 금 또는 은 나노 복합체의 생성여부를 확인한 도면이다.
- [206] 도 5는 FE-TEM을 통한 인삼 잎 추출물을 이용하여 제조된 금 또는 은 나노 복합체의 구조적 특징을 나타낸 도면이다.
- [207] 도 6은 FE-TEM을 통한 인삼 뿌리 추출물을 이용하여 제조된 금 또는 은 나노 복합체의 구조적 특징을 나타낸 도면이다.
- [208] 도 7은 FE-TEM을 통한 인삼 뿌리 추출물을 이용하여 제조된 금 또는 은 나노 복합체의 구조적 특징의 단순분산형, 나노 복합체 간섭무늬 간격(fringe spacing)을 나타낸 것이다.
- [209] 도 8은 FE-TEM을 통한 홍삼 뿌리 추출물을 이용하여 제조된 금 또는 은 나노 복합체의 구조적 특징을 나타낸 도면이다.
- [210] 도 9는 EDAX 분석을 통해, 인삼 잎 추출물을 이용하여 제조된 금 또는 은 나노 복합체의 순도를 나타낸 것이다.
- [211] 도 10은 EDAX 분석을 통해, 인삼 뿌리 추출물을 이용하여 제조된 금 또는 은 나노 복합체의 순도를 나타낸 것이다.
- [212] 도 11은 EDAX 분석을 통해, 홍삼 잎 추출물을 이용하여 제조된 금 또는 은 나노 복합체의 순도를 나타낸 것이다.
- [213] 도 12는 TEM을 통해, 인삼 잎 추출물을 이용하여 제조된 금 또는 은 나노 복합체의 원소 매핑 결과를 분석한 것이다.
- [214] 도 13은 TEM을 통해, 인삼 뿌리 추출물을 이용하여 제조된 금 또는 은 나노 복합체의 원소 매핑 결과를 분석한 것이다.
- [215] 도 14는 TEM을 통해, 홍삼 뿌리 추출물을 이용하여 제조된 금 또는 은 나노 복합체의 원소 매핑 결과를 분석한 것이다.
- [216] 도 15는 X선 회절을 통해, 인삼 잎 추출물을 이용하여 제조된 금 또는 은 나노 복합체의 회절패턴을 나타낸 것이다.
- [217] 도 16은 X선 회절을 통해, 인삼 뿌리 추출물을 이용하여 제조된 금 또는 은 나노 복합체의 회절패턴을 나타낸 것이다.
- [218] 도 17은 동적광산란법 분석을 통해, 인삼 잎 추출물을 이용하여 제조된 금 또는 은 나노 복합체의 용량(volume), 강도(intensity) 및 수(number)를 바탕으로 크기분포 프로파일 결과를 나타낸 도면이다.
- [219] 도 18은 동적광산란법 분석을 통해, 홍삼 뿌리 추출물을 이용하여 제조된 금 또는 은 나노 복합체의 용량(volume), 강도(intensity) 및 수(number)를 바탕으로 크기분포 프로파일 결과를 나타낸 도면이다.
- [220] 도 19는 인삼의 잎 추출물을 이용하여 제조된 금 또는 은 나노 복합체의 항균활성을 나타낸 것이다.

- [221] 도 20은 인삼의 뿌리 추출물을 이용하여 제조된 은 나노 복합체의 항균활성을 나타낸 것이다.
- [222] 도 21은 홍삼의 뿌리 추출물을 이용하여 제조된 은 나노 복합체의 항균활성을 나타낸 것이다.
- [223] 도 22은 인삼의 잎 추출물을 이용하여 제조된 은 나노 복합체의 바이오필름 분해 활성을 나타낸 것이다.
- [224] 도 23은 홍삼의 뿌리 추출물을 이용하여 제조된 은 나노 복합체의 바이오필름 분해 활성을 나타낸 것이다.
- [225] 도 24는 인삼의 잎 추출물을 이용하여 제조된 금 또는 은 나노 복합체의 항응고활성을 나타낸 것이다.
- [226] 도 25는 인삼의 잎 추출물을 이용하여 제조된 금 또는 은 나노 복합체의 모모세포(Keratinocyte cell) 및 폐암 세포(A549 cell)에 대한 세포 독성을 나타낸 것이다.
- [227] 도 26은 인삼의 잎 추출물을 이용하여 제조된 금 또는 은 나노 복합체의 항염 활성을 나타낸 것이다.
- [228] 도 27은 BSA-CK 및 BSA-Rh2의 제조 결과에 관한 것으로, A 내지 C는 BSA-CK, 및 D 내지 F는 BSA-Rh2에 관한 것이다. 구체적으로, A 및 D는 상기 두 나노 복합체의 HPLC 분석 결과, B 및 E는 ^1H NMR 스펙트럼, C 및 F는 FTIR 스펙트럼을 보여준다.
- [229] 도 28은 BSA-CK 및 BSA-Rh2의 물리화학적 특성에 관한 것으로, A 내지 C는 BSA-CK, 및 D 내지 F는 BSA-Rh2에 관한 것이다. 구체적으로, A 및 D는 FE-TEM 이미지, B 및 E는 입자 크기 분포 분석 결과, C 및 F는 제타 전위(zeta potential) 분석 결과를 보여준다.
- [230] 도 29는 BSA-CK 및 BSA-Rh2의 물에 대한 용해도에 관한 것으로, 각각 현미경 이미지 및 상층액의 HPLC 분석 결과를 보여준다. A는 CK 단독 또는 BSA-CK, B는 Rh2 단독 또는 BSA-Rh2의 용해도에 대한 결과를 나타낸다.
- [231] 도 30은 BSA-CK 및 BSA-Rh2의 A549 폐암 세포 또는 각질세포(keratinocyte)에 대한 세포 독성을 보여주는 그래프이다. A 및 B는 BSA-CK, C 및 D는 BSA-Rh2의 결과를 나타낸다. 통계적 유의성은 student's t-test를 이용하여 확인하였다. $P < 0.05$ 인 경우에 유의하다고 판단하였으며, 별표(*)로 표시하였다.
- [232] 도 31은 BSA-CK 및 BSA-Rh2의 항염 활성에 관한 것으로, 쥐 대식세포주 RAW 264.7에 대한 세포 독성 및 LPS-유도 NO 생산 저해 효과를 보여준다. NO 생산 저해 효과 분석에 있어서, 질산 합성효소의 저해제인 L-NMMA(NG-monomethyl L-arginine)이 양성 대조군으로 사용되었다. A 및 B는 BSA-CK, C 및 D는 BSA-Rh2의 결과를 나타낸다. 통계적 유의성은 student's t-test를 이용하여 확인하였다. $P < 0.05$ 인 경우에 유의하다고 판단하였으며, 별표(*)로 표시하였다.
- [233] 도 32는 MSNP-CK 및 MSNP-Rh2의 합성 결과에 관한 것으로, A 내지 C는 MSNP-CK, 및 D 내지 F는 MSNP-Rh2에 관한 것이다. 구체적으로, A 및 D는 상기

두 나노 복합체의 HPLC 분석 결과, B 및 E는 ^1H NMR 스펙트럼, C 및 F는 FTIR 스펙트럼을 보여준다.

[234] 도 33은 MSNP-CK 및 MSNP-Rh2의 FE-TEM 이미지이며, A는 MSNP-CK, B는 MSNP-Rh2에 관한 것이다.

[235] 도 34는 MSNP-CK 및 MSNP-Rh2의 A549 폐암 세포 또는 각질세포(keratinocyte)에 대한 세포 독성을 보여주는 그래프이다. A 및 B는 MSNP-CK, C 및 D는 MSNP-Rh2의 결과를 나타낸다. 통계적 유의성은 student's t-test를 이용하여 확인하였다. $P < 0.05$ 인 경우에 유의하다고 판단하였으며, 별표(*)로 표시하였다.

[236] 도 35는 MSNP-CK 및 MSNP-Rh2의 항염 활성화에 관한 것으로, 쥐 대식세포주 RAW 264.7에 대한 세포 독성 및 LPS-유도 NO 생산 저해 효과를 보여준다. NO 생산 저해 효과 분석에 있어서, 질산 합성효소의 저해제인 L-NMMA(NG-monomethyl L-arginine)이 양성 대조군으로 사용되었다. A 및 B는 MSNP-CK, C 및 D는 MSNP-Rh2의 결과를 나타낸다. 통계적 유의성은 student's t-test를 이용하여 확인하였다. $P < 0.05$ 인 경우에 유의하다고 판단하였으며, 별표(*)로 표시하였다.

[237]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[238] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[239]

[240] 제조예 1. 금속-인산추출물 나노 복합체의 제조

[241] 제조예 1-1. 재료

[242] 테트라클로로금(III)산($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 및 질산은(AgNO_3)을 시그마-알드리치 케미칼(Sigma-Aldrich Chemicals, USA)에서 구입하고, 배지들은 구입하고 Difco에서 구입하였다(MB cell, Seoul, Republic of Korea). 또한, 인삼의 뿌리와 잎은 한국 고창에서 4년 생 인삼으로부터 채취하였다.

[243] 표준 항생제 디스크(disks)로는 시판되는 반코마이신(vancomycin, VA30) 30 $\mu\text{g}/\text{disc}$, 리팜피신(rifampicin, RD5) 5 $\mu\text{g}/\text{disk}$, 올레안도마이신(oleandomycin, OL15) 15 $\mu\text{g}/\text{disk}$, 페니실린 G(P10) 10 $\mu\text{g}/\text{disk}$, 노보비오신(novobiocin, NV30) 30 $\mu\text{g}/\text{disk}$, 린코마이신(lincomycin, MY15) 15 $\mu\text{g}/\text{disk}$ 및 테트라사이클린(tetracycline, TE30) 30 $\mu\text{g}/\text{disc}$ 을 구입하였다(Oxoid Ltd., England).

[244] 병원 박테리아 균주로는 비브리오 파라헤몰리티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*) [ATCC 33844], 살모넬라 엔테리카(*Salmonella enteric*) [ATCC 13076], 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) [ATCC 10798], 스테피로코커스 오우러스(*Staphylococcus aureus*) [ATCC 6538], 바실러스 안트라시스(*Bacillus anthracis*)

[NCTC 10340], 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*) [ATCC 14579], 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*) [KACC 30062], 및 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*) [ATCC 27853]로 구성된 군에서 선택하여 사용하였다. 상기 박테리아 균주들은 37°C의 아가 영양배지에서 배양하였고, 글리세롤 스타크 바이알에서 -0°C로 보존하였다.

[245] 그 외 인간의 혈액은 건강한 남성 및 여성 자원자로부터 채혈하여 진공 채혈기 튜브에 저장하였다(Greiner Bio-One).

[246] 제조예 1-2. 인삼 추출물의 제조

[247] 제조예 1-2-1. 인삼의 잎 추출물의 제조

[248] 상기 제조예 1-1에서 채취한 인삼 잎 15g을 깨끗이 한 후, 증류수에서 여러 번 씻어 먼지나 현탁된 물질들을 제거하고, 6~8 시간동안 실온에서 그늘 건조하였다. 이후, 상기 잎들을 작은 조각으로 잘라 절구와 막자로 뺐었다. 그런 다음, 상기 조각들을 100 ml의 멸균수에서 20분간 가열하여 인삼의 성분들을 물에 침출시킨 추출액을 Whatman 필터 페이퍼로 여과한 후, 15분간 10,000rpm에서 원심분리하였다. 여과시킨 액체를 멸균수 100 ml에 두고 4°C에서 저장하였다.

[249] 제조예 1-2-2. 인삼의 뿌리 추출물 제조

[250] 상기 제조예 1-1에서 채취한 인삼 뿌리 25g을 깨끗이 한 후, 증류수에서 여러 번 씻어 먼지나 현탁된 물질들을 제거하였다. 이후, 상기 뿌리를 작은 조각으로 잘라 절구와 막자로 뺐었다. 그런 다음, 상기 조각들을 100ml의 멸균수에서 30분간 가열하여 인삼의 성분들을 물에 침출시킨 추출액을 Whatman 필터 페이퍼로 여과한 후, 10분간 10,000rpm에서 원심분리하였다. 여과시킨 액체를 멸균수 100ml에 두고 4°C에서 저장하였다.

[251] 제조예 1-2-3. 홍삼의 뿌리 추출물 제조

[252] 홍삼뿌리를 뺐아 홍삼뿌리 파우더를 획득한 후, 뿌리 파우더 10g을 멸균수 100ml와 혼합하고 30분간 가열하여 홍삼 성분을 물에 침출시킨 액체를 Whatman 여과 페이퍼로 여과하고 10분간 10,000rpm으로 원심분리하였다. 여과시킨 액체를 멸균수 100 ml에 두고 4°C에서 저장하였다.

[253] 제조예 1-3. 금 또는 은 나노 복합체의 합성

[254] 제조예 1-3-1. 인삼 잎 추출물을 이용한 금 또는 은 나노 복합체의 합성방법

[255] 상기 제조예 1-2-1에서 제조된 인삼 잎 여과액 100 ml에서 5 ml의 여과액을 25 ml의 멸균수와 혼합하고, 최종농도 1 mM의 테트라클로로금(III)산과 질산은 용액을 상기 반응 혼합액 각각 첨가하였다. 이후, Au^{3+} 가 Au^0 로, Ag^+ 가 Ag^0 원자로 환원될 수 있도록 반응 혼합액을 80°C로 유지한 후, 나노 복합체의 형성을 나타내는 색 변화를 지속적으로 관찰하였다. 상기 반응 혼합액을 2,000rpm에서 10분 동안 원심분리하여 원하지 않는 성분들을 제거하고, 16,000rpm에서 15분간 원심분리하여 펄렛으로 만들고 멸균수로 여러 번 수세한 후, 밤새도록 공기 중에서 건조하였다. 여기서, 반응 혼합액의 색 변화를 육안으로 관찰하여 금

또는 은 나노 복합체(AuNP, AgNP)의 합성을 확인하였다.

- [256] 도 1의 a 내지 c에서 확인할 수 있는 바와 같이, 테트라클로로금(III)산을 넣은 반응 혼합액은 3분 내에 어두운 자주색으로 변하였고(도 1의 a), 질산은을 넣은 반응 혼합액은 45분 내에 완전히 갈색으로 변하였다(도 1의 b). 반면, 인삼 잎 추출물과 멸균수가 같은 비율로 존재하고 상기의 반응 혼합액과 유사한 조건인 대조군에서는 색 변화가 관찰되지 않았다(도 1의 c). 상기의 색 변화는 표면 플라즈몬(surface plasmon) 진동에 의한 것으로, 반응 혼합액 중에서 금 또는 은 나노 복합체의 형성에 의해 발생하는 것이다.
- [257] 즉, 상기의 결과를 통해, 인삼의 잎 추출물을 이용하여 제조된 금 또는 은 나노 복합체가 다른 천연 추출물이나 인삼의 다른 부위 추출물을 이용하여 제조되는 나노 복합체에 비해 매우 짧은 시간 안에 합성되는 것을 확인할 수 있는바, 인삼의 잎 추출물을 이용하면, 매우 빠른 시간 내에 경제적이고 친환경적인 방법으로 안정적인 금속 나노 복합체를 합성할 수 있다는 것을 알 수 있으며, 이를 통해 인삼 잎에 존재하는 페놀산, 플라보노이드, 진세노사이드, 및 폴리사카라이드가 금속 나노 복합체 형성에 영향을 미친다는 것을 간접적으로 확인할 수 있다.
- [258] 제조예 1-3-2. 인삼 뿌리 추출물을 이용한 금 및 은 나노 복합체의 합성방법
- [259] 상기 제조예 1-2-2에서 제조된 인삼 뿌리 여과액 100ml에서 5ml의 여과액을 25 ml의 멸균수와 혼합하고, 최종농도 1mM의 테트라클로로금(III)산과 질산은 용액을 반응 혼합액에 각각 첨가한 후, 80°C로 유지하였다. 상기 반응 혼합액을 2,000rpm에서 10분 동안 원심분리하여 원하지 않는 성분들을 제거하고, 16,000rpm에서 20분간 원심분리하여 펠릿으로 만들고 멸균수로 여러 번 수세한 후, 밤새도록 공기 중에서 건조하였다. 여기서, 반응 혼합액의 색 변화를 육안으로 관찰하여 금 및 은 나노 복합체의 합성을 확인하였다.
- [260] 도 1의 d 및 e에서 확인할 수 있는 바와 같이, 질산은을 넣은 반응 혼합액은 하얀색에서 갈색으로 변하는데 2시간이 소요되었고, 테트라클로로금(III)산을 넣은 반응 혼합액은 5분 후에 핑크색으로 완전히 변하였다. 반면, 대조군에서는 색 변화가 관찰되지 않았다. 역시 상기의 색 변화는 표면 플라즈몬(surface plasmon) 진동에 의한 것으로, 반응 혼합액 중에서 금 또는 은 나노 복합체의 형성에 의해 발생하는 것으로, 이를 통해, 인삼 잎 추출물보다는 합성시간이 느리나, 다른 천연 추출물을 이용하여 제조되는 금 또는 은 나노 복합체의 합성시간에 비해서는 빠른 시간 내에 합성되는 것을 확인할 수 있었다.
- [261] 제조예 1-3-3. 홍삼 뿌리 추출물을 이용한 금 및 은 나노 복합체의 합성방법
- [262] 상기 제조예 1-2-3에서 제조된 홍삼 뿌리 여과액 100ml에서 5ml의 여과액을 25ml의 멸균수와 혼합하고 최종농도 1 mM의 테트라클로로금(III)산과 질산은 용액을 반응 혼합액에 각각 첨가한 후, 환원반응이 일어날 수 있도록 80°C로 유지하였다. 이후, 2,000rpm에서 10분 동안 원심분리하여 원하지 않는 성분들을 제거하고, 16,000rpm에서 15분간 원심분리하여 펠릿으로 만들고 멸균수로 여러

변 수세한 후, 밤새도록 공기 중에서 건조하였다. 여기서, 반응 혼합액의 색 변화를 육안으로 관찰하여 금 및 은 나노 복합체의 합성을 확인하였다.

- [263] 그 결과 도 1의 f 및 g에서 확인할 수 있는 바와 같이, 상기 반응 혼합액은 각각 1시간 및 10분 이내에 갈색과 루비색(ruby red)으로 변하였다. 이를 통해서도 역시 홍삼 뿌리 추출물을 이용하여 제조된 금 또는 은 나노 복합체는 인삼 잎 추출물을 이용하는 경우보다는 느리게 합성되나, 다른 천연 추출물을 이용하여 제조되는 금속 나노 복합체의 합성시간에 비해서는 현저히 빠른 시간 내에 합성되는 것을 확인할 수 있었다.

[264] 실시에 1. 인삼 추출물을 이용하여 제조된 금속 나노 복합체의 특성분석

[265] 실시에 1-1. 분석방법

- [266] 상기 인삼 추출물을 이용하여 제조되는 나노 복합체를 자외선/가시광선 분광법(Ultraviolet/Visible Spectroscopy, UV-vis), 전계 방출형 주사전자현미경(Field-emission transmission electron microscopy, FE-TEM), 에너지 분산형 X선 분석 (energydispersive X-ray spectrometer, EDX spectra), 원소 매핑 (elemental mapping), 동적광산란법 (Dynamic Light Scattering, DLS) 및 안정성 분석을 이용하여 나노 복합체의 크기, 모양, 구성 및 특성을 분석하였다.

- [267] 구체적으로, 각 용액을 UV-vis 분광광도계(Ultrospec 2100 Pro, Amersham, Biosciences)에서 300 내지 800 nm의 파장 범위내에 걸쳐 흡광도를 스캔함으로써, 금 및 은 이온의 환원을 확인하였다. 또한, 전계 방출형 주사전자현미경(field emission transmission electron microscopy, FE-TEM), 에너지 분산형 X선 분석(energy dispersive X-ray spectroscopy, EDAX), 및 200 kV에서 작동되는 JEM-2100F (JEOL) 장치로 원소매핑(elemental mapping)을 이용하여 상기 제조된 나노 복합체의 크기, 모양, 형태(morphology) 및 분포를 분석하였다.

- [268] 또한, FM-TEM, EDAX 및 원소 매핑 분석을 위해, 탄소 코팅된 구리 그리드(carbon coated copper grid) 상에 정제한 나노 복합체 소량을 적하하고, 60°C의 오븐에서 건조하여 시료를 제조하였다. 제조된 시료를 FE-TEM을 통해 나노 복합체의 구조적 특성을 분석하였고, EDX 및 원소 매핑을 통해 원소의 분포를 분석하였다.

- [269] 또한, 동적 광산란법((Dynamic light scattering, DLS), Particles size analyzer, Photal, Otsuka Electronics, Japan)을 이용하여 나노 복합체의 사이즈 분석 프로파일을 분석하였다. 구체적으로, 유체역학적 직경(hydrodynamic diameters)과 다분산지수(polydispersity index, PDI)를 25°C에서 분석하고, 참고 분산매질로서, 굴절률 1.3328, 점성 0.8878 및 유전율(dielectric constant) 78.3을 가지는 순수 물을 사용하였다.

- [270] 상기 제조된 나노 복합체의 X선 회절(X-ray diffraction, XRD) 분석은 X선 회절계(X-ray diffractometer, D8 Advance, Bruker, Germany) 상에서, 40 kv, 40 mA의 CuK α 방사(radiation)로 6°/분의 스캔률, 0.02의 스텝사이트, 20 내지 80°의 2 θ 범위에 걸쳐 수행하였다.

- [271] 또한, 나노 복합체의 안정성 분석을 수산화나트륨을 상기 나노 복합체에 첨가하기 전 및 후로 나누어 관찰하였다. 상기 나노 복합체의 안정성에서의 pH 변화에 따른 효과를 pH 3 내지 12 범위에서 관찰하였다.
- [272] 실시에 1-2. 인삼 추출물을 이용하여 제조된 금 또는 은 나노 복합체의 특성분석 결과
- [273] 실시에 1-2-1. 자외선/가시광선 분광법 (Ultraviolet/Visible Spectroscopy, UV-vis) 분석
- [274] 상기 제조예 1-3-1 내지 1-3-3에서 제조된 인삼 잎, 뿌리 추출물과 홍삼 뿌리 추출물을 이용하여 제조되는 금 또는 은 나노 복합체의 제조여부를 UV-vis 분석을 통해 확인한 결과, 인삼 잎 추출물을 이용한 경우에는 금 나노 복합체의 경우 578nm에서, 은 나노 복합체의 경우 420nm에서 주요 흡수 피크가 확인되어, 인삼 잎 추출물을 이용하여 금 및 은 나노 복합체가 제조되었음을 확인할 수 있었다(도 2의 a 및 b). 또한, 인삼 뿌리 추출물을 이용한 경우에는 은 나노 복합체는 412nm에서, 금 나노 복합체는 534 nm에서 주요 흡수 피크가 확인되어 역시 인삼 뿌리 추출물을 이용한 경우에도 금 및 은 나노 복합체가 제조되었음을 확인할 수 있었다(도 3의 a 및 b).
- [275] 마지막으로, 홍삼 뿌리 추출물을 이용한 경우는, 은 나노 복합체는 410nm에서, 금 나노 복합체는 560nm에서 주요 흡수 피크를 확인하였는바, 이를 통해 홍삼 뿌리 추출물을 이용한 금 및 은 나노 복합체가 제조되었음을 확인할 수 있었다(도 4의 a 및 b).
- [276] 이와 같은 주요 흡광 피크는 금 또는 은 나노 복합체의 특이적인 피크로, 나노 복합체의 표면 플라즈몬 공명(Surface Resonance Plasmon)에 대응하는 것이다. 상기 인삼의 잎, 뿌리 또는 홍삼의 뿌리 추출물을 이용하여 합성된 금 또는 은 나노 복합체는 20°C에 저장되어도 UV-vis 스펙트럼이 몇 달 동안 변하지 않았으며, 이것은 상기 금속 나노 복합체가 물에서 오랜 시간동안 안정하다는 것을 나타내는 것이다.
- [277] 실시에 1-2-2. 전계 방출형 주사전자현미경 (Field-emission transmission electron microscopy, FE-TEM) 분석
- [278] FE-TEM을 통해, 제조예 1-3-1 내지 1-3-3에서 제조된 인삼의 잎, 뿌리 또는 홍삼의 뿌리 추출물을 이용하여 제조한 금 또는 은 나노 복합체의 구조적 특징을 분석하였다.
- [279] 그 결과, 인삼의 잎 추출물로 제조한 경우의 금 나노 복합체는 10 내지 30nm의 크기이고 구형을 가지며(도 5의 a 및 b), 간섭무늬 간격(fringe spacing)이 0.23nm임을 확인할 수 있었다(도 5의 c). 또한, 도 5의 d에서는 [111], [200], [220], [311] 및 [222] 상에 대응되는 링을 가지는 정제된 구형모양의 금 나노 복합체가 가지는 선택된 전자 회절 패턴(selected electron diffraction pattern, SEAD)을 확인할 수 있었다(도 5의 d). 은 나노 복합체의 경우는 10 내지 20nm의 크기의 구형이고(도 5의 e 및 f), 간섭무늬 간격을 0.24nm이며(도 5의 g), [111], [200],

[220], [311], 및 [222] 상에 대응되는 링을 가지는 은 나노 복합체의 SEAD 이미지를 확인할 수 있었다(도 5의 h).

[280]

[281] 인삼의 뿌리 추출물로 제조된 은 나노 복합체는 10 내지 30nm의 크기이고 구형이며(도 6의 a 및 b), 금 나노 복합체는 10 내지 40nm의 크기이고, 구형임을 확인하였다(도 6의 c, d). 또한, 상기 은 및 금 나노 복합체는 균일하고 단순분산형이며(도 7의 a), 나노 복합체 간섭무늬 간격(fringe spacing)이 0.23nm임을 확인할 수 있었다(도 7의 b, c). 입자가 크리스탈임을 보여주는 링-유사(ring-like) 회절 패턴이 [111], [200], [220], 및 [311] 상에 대응되는 은 및 금 나노 복합체의 SEAD 이미지를 확인하였다(도 7의 d 내지 f).

[282] 홍삼 뿌리 추출물을 이용하여 제조된 금 및 은 나노 복합체는 모두 10 내지 30nm의 크기이고 구형을 가지며, 균일한 단순 분산형임을 확인하였다(도 8의 a 및 b).

[283] 이와 같은 결과를 통하여, 인삼의 잎, 뿌리 추출물 또는 홍삼의 뿌리 추출물을 이용하여 제조되는 금 및 은 나노 복합체가 제조되었음을 다시 확인할 수 있었다. 또한, 제조된 금 및 은 나노 복합체의 크기가 종래 제조된 금속 나노 복합체에 비해 그 분포가 균일하고 작은 크기로 존재한다는 것을 확인할 수 있었으며, 특히, 은 나노 복합체의 경우가 종래의 크기인 100nm보다 현저히 줄어들었음을 확인할 수 있었다.

[284] 실시예 1-2-3. 에너지 분산형 X선 (Energy Dispersive X-Ray Analysis, EDAX) 분석

[285] EDAX 분석을 통해, 제조예 1-3에서 제조된 금 및 은 나노 복합체의 순도를 각각 측정하였다.

[286] 그 결과, 인삼의 잎 추출물을 이용하여 제조한 금 또는 은 나노 복합체의 경우, 도 9의 a 및 b에서 확인할 수 있는 바와 같이, 금 나노 복합체는 2.15 keV에서, 은 나노 복합체는 3 keV에서 광학적인 흡광이 관찰되었으며(도 9의 a 및 b), 인삼의 뿌리 추출물을 이용한 경우에는, 은 나노 복합체가 3 keV에서, 금 나노 복합체는 2.2 keV에서 광학적인 흡광이 관찰되었다(도 10의 a 및 b). 또한, 홍삼의 뿌리 추출물을 이용하여 제조한 경우에는, 은 나노 복합체는 3 keV에서, 금 나노 복합체는 2.3 keV에서 광학적인 흡광이 관찰되었는바(도 11의 a 및 b), 상기의 결과는 금 및 은 나노결정의 특성으로, 이를 통해 금 및 은 나노 복합체가 제조되었음을 확인할 수 있다.

[287] 실시예 1-2-4. 투과전자현미경 (Transmission electron microscope, TEM) 분석

[288] TEM을 통해, 제조예 1-3에서 제조된 금 및 은 나노 복합체의 분포를 분석하였으며, 상기 원소 매핑 결과는 합성된 나노 복합체 펠렛 용액을 전자현미경을 통해 확인하였다.

[289] 그 결과, 인삼 잎 추출물을 이용하여 제조한 금 나노 복합체의 분포는 54.73%이고(도 12의 a 및 b), 은 나노 복합체는 47.70%임을 확인할 수

있었으며(도 12의 c 및 d), 인삼 뿌리 추출물을 이용하여 제조한 경우의 은 나노 복합체의 분포는 54.73%이고(도 13의 c 및 d), 금 나노 복합체는 52.16%임을 확인할 수 있었다(도 13의 c 및 d). 또한, 홍삼 뿌리 추출물을 이용하여 합성된 경우의 원소 매핑 결과는 도 14의 a 내지 d를 통해 확인하였다. 원소 매핑에서 얻은 상기 결과를 통해 본원발명의 금 및 은 나노 복합체가 각각의 물질에서 우수한 입자임을 확인할 수 있었다.

[290] 실시예 1-2-5. X선 회절 (X-ray diffraction, XRD) 분석

[291] XRD 분석을 통해, 제조예 1-3에서 제조된 금 및 은 나노 복합체의 회절패턴을 분석하였다.

[292] 그 결과, 인삼 잎 추출물을 이용하여 제조된 금 나노 복합체는 [111], [200], [220], [311] 및 [222]에 대응되는 20 내지 80 범위의 2 θ 값 전체 스펙트럼에서 강렬한 피크를 확인할 수 있었으며, 은 나노 복합체는 XRD 스펙트럼에서 [111], [200], [331], [241] 및 [311]에 대응되는 20 값에서 피크를 확인할 수 있었다(도 15의 a 및 b). 인삼 뿌리 추출물을 이용한 경우에는, [111], [200], [331], [241] 및 [311]에 대응되는 20 값 전체 스펙트럼에서 강렬한 피크를 확인할 수 있었다(도 16의 a 및 b). 이는 금 및 은 나노 크리스탈의 Bragg's reflection과 유사한 값을 나타내므로, 이러한 결과로부터 금 및 은 나노 복합체가 제조되었음을 확인할 수 있다.

[293] 실시예 1-2-6. 동적광산란법 (Dynamic Light Scattering, DLS) 분석

[294] 동적광산란법 분석을 통해, 제조예 1-3에서 제조된 금 및 은 나노 복합체의 용량(volume), 강도(intensity) 및 수(number)를 바탕으로 입자의 크기 분포를 프로파일을 확인하였다.

[295] 그 결과, 인삼 잎 추출물을 이용하여 제조한 경우의 금 나노 복합체는 다분산지수(polydispersity index, PDI)가 0.191인, 50 내지 150nm의 범위이고(도 17의 a 내지 c), 은 나노 복합체는 다분산지수(polydispersity index)가 0.13인, 70 내지 140 nm의 범위임을 확인하였으며(도 17의 d 내지 f), 금 및 은 나노 복합체의 평균 입자 크기, 즉 나노 복합체의 역학적 직경(hydrodynamic diameter)은 각각 97nm 및 80nm임을 확인하였다. 또한, 홍삼 뿌리 추출물을 이용한 경우의 은 나노 복합체는 다분산지수(polydispersity index, PDI)가 0.190이고, 평균지름이 83 nm이며(도 18의 a 내지 c), 금 나노 복합체는 다분산지수(polydispersity index)가 0.159이고, 평균지름이 183 nm 임을 확인하였다(도 18의 d 내지 f).

[296] 실시예 1-2-7. 안정성 분석

[297] 마지막으로, 제조예 1-3에서 제조된 금 및 은 나노 복합체의 안정성 분석을 위해, pH가 각각 5.6과 6인 나노 복합체 합성을 위한 반응 혼합액에 0.1M의 수산화나트륨을 첨가하였다.

[298] 그 결과, 인삼의 잎 또는 뿌리 추출물을 이용하여 제조한 금 또는 은 나노 복합체의 경우, 수산화나트륨이 첨가되었어도, 주요한 변화(shift)가 나타나지 않아 안정하다는 것을 확인할 수 있었으며, 특히, pH 3 내지 12의 범위의

흡수에서 주요한 변화가 나타나지 않았다. 또한, 합성 후 3주가 지난 뒤 반은 혼합액의 UV-vis 스펙트럼을 확인해본 결과, 아무런 변화가 관측되지 않았다. 또한, 홍삼 뿌리 추출물을 이용하여 합성한 경우에도, 상기 pH 범위에서 주요한 변화(shift)가 나타나지 않아 안정하다는 것을 확인할 수 있었으며, 합성 후 3주가 지난 뒤 반은 혼합액의 UV-vis 스펙트럼을 확인해본 결과에서도, 아무런 변화가 관측되지 않았다.

- [299] 이것은 인삼의 잎 또는 뿌리 추출물이나 홍삼 추출물을 이용하여 합성된 금 및 은 나노 복합체는 별도의 환원제나 안정제의 부가 없이도 안정성을 나타낸다는 것을 의미하는 것이다. 특히, 잎의 추출물의 경우, 상기의 결과는 인삼 잎에 존재하는 산화방지제 활성을 나타내는 페놀산 및 플라보노이드와, Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rg1, F1, F2, 및 F4와 같은 진세노사이드와 같은 성분들이 합성된 금 및 은 나노 복합체의 안정성에 중요한 역할을 한다는 것을 시사하는 것이며, 이에 따라, 인삼 잎 추출물은 다른 환원제나 안정제 없이 그 자체로 환원제 및 안정제의 역할을 하고, 본 발명의 인삼 잎 추출물을 이용하여 제조된, 금 및 은 나노 복합체는 넓은 범위의 pH에 걸쳐 약 전달자에 적용할 수 있는 가능성이 있음을 시사하는 것이다.

[300] 실시예 2. 나노 복합체의 항균활성 평가

[301] 실시예 2-1. 측정방법

- [302] 나노 복합체의 항균활성을 측정하기 위해, 디스크 확산법(disc diffusion method)을 이용하여 뮐러-힌톤 아가(Muller-Hinton agar, MHA) 플레이트에서 측정하였다. 항균활성 평가 시험에 사용된 병원성 미생물은 비브리오 파라헤몰리티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*), 살모넬라 엔테리카(*Salmonella enterica*), 스테피로코커스 오우러스(*Staphylococcus aureus*), 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*), 바실러스 안트라시스(*Bacillus anthracis*), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*) 및 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)로 구성된 군에서 선택하여 이용하였다.

- [303] 상기 각 균주를 MHA 배지 플레이트에 100 μ l를 균등하게 펴 바른 후 하룻동안 배양하고, 제조된 은 및 금 나노 복합체 반응 혼합액 30 μ l(100 mg/L) 또는 50 μ l(100 mg/L)를 도포하여 37°C에 24시간 배양하였다. 배양 후, 은 및 금 나노 복합체 주위의 저해영역(inhibition zone)을 측정하고 각 항생제 디스크의 저해영역과 비교하였다. 대조군으로는, 반코마이신(vancomycin), 노보비오신(novobiocin), 테트라사이클린, 리팜피신(rifampicin), 올렌도마이신(oleandomycin), 페니실린, 및 린코마이신(lincomycin)으로 이루어진 군에서 하나 이상의 표준 항생물질을 선택하여 이용하였다.

[304] 실시예 2-2. 항균활성 측정 결과

- [305] 제조예 1-3-1에서 제조된 인삼 잎 추출물을 이용하여 제조되는 금 나노 복합체는 도 19에서 확인할 수 있는 바와 같이, 비브리오 파라헤몰리티쿠스, 살모넬라 엔테리카, 에스케리치아 콜라이 및 스테피로코커스 오우러스에 대해

항균활성을 가짐을 확인하였으며, 은 나노 복합체는 비브리오 파라헤몰리티쿠스, 살모넬라 엔테리카, 및 에스케리치아 콜라이에 대해 항균 활성을 가짐을 확인할 수 있었다. 상기의 결과는 하기 표 1과 같다.

[306] [표1]

Strain name	Zone of inhibition				
	AgNPs	AuNPs	Tetracyclin	Vancomycin	Novobiocin
<i>E.coli</i>	14±0.7	-	20±0.1	-	-
<i>S.enterica</i>	15±0.5	-	30±0.3	-	-
<i>V. parahaemolyticus</i>	14±1	-	25±0.6	-	-
<i>S.aureus</i>	16±1.2	-	-	-	-

[307] 또한, 제조예 1-3-2에서 제조된 인삼 뿌리 추출물을 이용하여 제조되는 금 및 은 나노 복합체의 항균활성을 측정한 결과, 도 20에서 확인할 수 있는 바와 같이, 은 나노 복합체는 에스케리치아 콜라이, 바실러스 세레우스, 스테피로코커스 오우러스, 비브리오 파라헤몰리티쿠스 및 바실러스 안트라시스에 대하여는 항균활성을 보여주었으나, 금 나노 복합체는 같은 농도에서 어떤 활성도 관측되지 않았다.

[308] 마지막으로, 제조예 1-3-3에서 제조된 홍삼 뿌리 추출물을 이용하여 제조되는 은 나노 복합체는 도 21에서 확인할 수 있는 바와 같이, 비브리오 파라헤몰리티쿠스, 스테피로코커스 오우러스, 바실러스 세레우스 및 칸디다 알비칸스에 대한 항균 활성을 가짐을 확인하였다. 그 중에서도, 특히 칸디다 알비칸스에 대한 항균활성이 가장 컸고, 그 다음으로 비브리오 파라헤몰리티쿠스, 스테피로코커스 오우러스, 바실러스 세레우스의 순서였다. 이에 대한 결과는 하기 표 2에서 나타내었다. 상기 결과를 통해 본 발명의 금 또는 은 나노 복합체는 미생물에 대한 항균활성을 가짐을 확인할 수 있다.

[309] [표2]

Pathogenic microorganism	Zone of inhibition (mm) †
<i>Candida albicans</i> [KACC 30062]	27±0.9
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> [ATCC 33844]	25±0.6
<i>Staphylococcus aureus</i> [ATCC 6538]	23±1
<i>Bacillus cereus</i> [ATCC 14579]	16±0.3

[310] 실시예 3. 나노 복합체의 바이오필름 분해 활성 평가

[311] 실시예 3-1. 측정방법

[312] 은 나노 복합체의 바이오필름 분해 활성은 스테피로코커스 오우러스(

Staphylococcus aureus) 및 슈도모나스에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*)에 대한 비색법(colorimetric method)으로 확인하였다. 구체적으로, 96-웰 마이크로-티터 플레이트의 웰에 100 μ l의 스테피로코커스 오우러스와 슈도모나스에루지노사 균주로 채워 로그 기(log phase)로 24시간 배양하였다. 이후, 은 나노 복합체를 1 내지 4 μ g의 범위로 추가하고, 상기 세포배양 플레이트를 4시간 동안 37°C에서 배양한 후, 상기 배지를 제거하고, 상기 웰을 200 μ l의 멸균수로 3회 수세하였다. 그런 다음 마이크로-티터 플레이트를 45분 동안 공기 건조하고, 물에 0.1%의 크리스털 바이올렛(crystal violet)이 첨가된 용액 200 μ l을 각 웰에 첨가하여 4분 동안 둔 후 300 μ l의 멸균수로 3회 수세하여 과도한 균주를 제거하였다. 이를 통해 근접한 세포에 의해 통합된 염색은 95%의 에탄올 200 μ l에 함께 용해되었다. 각 웰의 흡수를 마이크로-티터 ELISA 리더를 사용하여 595 nm에서 측정 한 후, 하기의 식을 이용하여 바이오필름 활성 저해의 퍼센트를 계산하였다: $[1-(A_{595} \text{ of test } / A_{595} \text{ of control})] \times 100$ (Gurunathan et al., 2014). 상기 실험은 반복하여 수행되며 결과는 평균 $\pm$ SD 하에서 분석하였다.

[313] 실시예 3-2. 바이오필름분해활성 측정결과

[314] 인삼 잎 추출물을 이용하여 제조된, 제조예 1-3-1의 은 나노 복합체는, 도 22에서 확인할 수 있는 바와 같이, 은 나노 복합체 4 μ g/ml의 농도에서 스테피로코커스 오우러스와 슈도모나스에루지노사에 대한 바이오필름 분해 활성이 최고조임을 확인할 수 있었으며, 실시예 3-3에서 제조된 홍삼 뿌리 추출물을 이용하여 제조되는 은 나노 복합체에서도 도 23에서 확인할 수 있는 바와 같이, 은 나노 복합체의 4 μ g/ml 농도에서 스테피로코커스 오우러스와 슈도모나스에루지노사에 대한 바이오 분해 활성이 있음을 확인하였다.

[315] 이를 통해, 인삼 추출물을 이용하여 제조된 나노 복합체가 균주에 대한 바이오필름 분해 활성을 가져 바이오필름-관련 감염을 저해함으로써 비용적인 측면이나 환자의 고통을 경감시키는 역할을 할 수 있다는 것을 확인할 수 있다.

[316] 실시예 4. 나노 복합체의 항응고 활성 평가

[317] 실시예 4-1. 측정방법

[318] 건강한 남성 및 여성 자원자(나이 25 내지 45세의 나이범위)에게 인간 혈액을 채취하여 2 개의 진공 채혈기에 넣고 각각 A 및 B로 표시하였다. 시간이 경과된 후, 합성된 금 나노 복합체의 항응고 효과를 관찰하였다.

[319] 실시예 4-2. 항응고 활성의 측정결과

[320] 인삼 잎 추출물을 이용하여 제조된, 제조예 1-3-1의 금 나노 복합체는, 도 24에서 확인할 수 있는 바와 같이, 금 나노 복합체가 존재하면 응혈 형성이 저해되는 것을 확인할 수 있었다(도 24의 a). 이와 비교하여, 항응고제가 포함되지 않은 대조군은 혈액이 완전히 응고된다(도 24의 b). 또한, 24 시간 후에도, 금 나노 복합체의 안정성에 대한 특이적인 변화는 관찰되지 않았다.

[321] 이와 같은 결과를 통하여, 인삼의 잎 추출물에 의해 생합성된 금 나노 복합체의 항응고 활성을 알 수 있으며, 또한, 이러한 결과는 상기 금 나노 복합체를 혈액과

직접적으로 접촉하는 약 및 유전자의 전달자나 또는 바이오센서, 생체 내 나노캐리어로서 변형하여 사용할 수 있음을 시사하는 것이다.

[322] 실시에 5. 나노 복합체의 모모세포 및 암세포에 대한 세포 독성 평가

[323] 인삼 잎 추출물을 이용하여 제조된, 제조예 1-3-1의 나노 복합체의 항암 활성을 측정하기 위하여, 인간 폐암 세포(A549) 및 모모 세포(HaCaT Skin)에서 금 나노 복합체 및 은 나노 복합체의 세포독성을 MTT 분석법을 통해 측정하였다. 그 결과, 은 나노 복합체는 모모 세포에 대해 1000 μ g/mL 농도에서도 세포 독성이 없어, 생체적합성을 가짐을 알 수 있었다(도 25). 그러나, 은 나노 복합체는 A549 폐암 세포에 대해서는 100 μ g/mL 농도에서도 세포독성을 나타내었다. 또한, 금 나노입자의 경우, 모모 세포에 대해 20 μ g/mL 농도에서도 세포 독성이 없어, 생체적합성을 가짐을 알 수 있었다(도 25). 그러나, 금 나노 복합체는 A549 폐암 세포에 대해서는 2 μ g/mL 농도에서도 세포독성을 나타내었다. 따라서, 은 나노 복합체는 약 전달을 위한 생체적합성을 가지고, 금 나노 복합체는 항암제로서 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

[324] 실시에 6. 나노 복합체의 항염 활성 평가

[325] 인삼 잎 추출물을 이용하여 제조된, 제조예 1-3-1의 은 또는 금 나노 복합체를 처리한 후 RAW264.7 세포의 생존능을 측정하고, 은 또는 금 나노 복합체와 함께 LPS (1 μ g/ml)를 RAW264.7 세포에 처리한 후, NO의 생성량을 측정하였다. 이때, L-NMMA(monomethylarginine)를 양성 대조군으로 사용하였다. 그 결과, 은 나노 복합체는 1000 μ M 농도까지 RAW264.7 세포에 대해 세포독성이 없으며, 농도의존적으로 NO 생산을 억제함을 확인하였다(도 26). 또한, 금 나노 복합체는 100 μ M 농도까지 RAW264.7 세포에 대해 세포독성이 없으며, 농도의존적으로 NO 생산을 억제함을 확인하였다(도 26). 이를 통해, 인삼의 잎 추출물에 의해 생합성된, 은 및 금 나노 복합체가 세포독성 없이 항염증 활성을 가짐을 확인하였다.

[326]

[327] 제조예 2. BSA-CK 및 BSA-Rh2의 제조 방법

[328] 진세노사이드 CK 또는 Rh2의 용해도를 향상시키기 위하여, 상기 진세노사이드에 BSA를 결합시킨 BSA-CK 또는 BSA-Rh2 나노 복합체를 제조하였다.

[329] 구체적으로, 나노 복합체를 제조하기 위하여, 다음과 같은 시약을 사용하였다. 소 혈청 알부민(Bovine serum albumin; BSA, Mw = 66000)은 Sigma Aldrich(St. Louis, MO, USA) 사에서 구입하였고, 진세노사이드 CK 및 Rh2는 인삼소재은행(Kyung Hee University, Yongin, South Korea)에서 구입하였다. 다른 모든 화학물질은 분석 수준의 등급인 것을 사용하였다.

[330] BSA-CK의 합성은 탈용매 방법을 통해 수행하였다. 구체적으로, BSA를 물에 용해하였으며, 5 내지 10분 동안 초음파를 처리하였다. 이후, BSA-물 혼합액을 격렬하게 교반하였고, 에탄올에 용해된 진세노사이드 CK를 BSA-물 혼합액에

드롭 방식(drop wise)으로 첨가하였다. 상기 BSA-진세노사이드 반응 혼합액을 실온에서 24시간 동안 보관하였다. 이후, 상기 반응 혼합액을 투석 막(Mw. cut off: 3,000)에 옮겼고, 메탄올/증류수(75:25, v/v)에서 하루 동안 투석하였으며, 증류수로 2일 동안 추가로 투석한 후, 동결건조하였다.

- [331] BSA-Rh2 나노 복합체도 상기와 같은 방법으로, 진세노사이드 Rh2를 이용하여 합성하였다.
- [332] 실시예 7. BSA-CK 및 BSA-Rh2의 합성 결과 분석
- [333] 실시예 7-1. BSA-CK 및 BSA-Rh2의 진세노사이드 양 확인
- [334] BSA-CK 또는 BSA-Rh2 나노 복합체에 적재된 진세노사이드의 양은 HPLC를 이용하여 계산하였다.
- [335] 그 결과, 도 27의 A에서 볼 수 있듯이, BSA-CK는 CK 단독과 동일한 명확한 피크를 보였고, BSA-CK에 적재된 CK의 양은 나노 복합체 1 mg 당 0.087 mg임을 확인하였다. 아울러, 도 27의 D에서 볼 수 있듯이, BSA-Rh2는 단독과 동일한 명확한 피크를 보였고, BSA-Rh2에 적재된 Rh2의 양은 나노 복합체 1 mg 당 0.096 mg임을 확인하였다.
- [336] 실시예 7-2. BSA-CK 및 BSA-Rh2의 진세노사이드 고유 특성 확인
- [337] 본 발명의 BSA-CK 및 BSA-Rh2 나노 복합체가 잘 제조되었는지 확인하기 위하여, BSA-CK 및 BSA-Rh2, 및 이의 중간체의 구조를 ^1H NMR과 FT-IR을 이용하여 확인하였다.
- [338] 구체적으로, ^1H NMR 스펙트럼은 300 MHz(JEOL, Tokyo, Japan)에서 기록하였고, 샘플은 D_2O 또는 CD_3OD 에 용해하였다. FT-IR 스펙트럼은 KBr 펠렛을 이용한 Perkin-Elmer FT-IR 분광광도계를 이용하여 확인하였다.
- [339] 그 결과, 도 27의 B 및 C에서 볼 수 있듯이, BSA-CK의 ^1H NMR 결과와 FTIR의 결과는 CK의 특징적인 피크를 나타냄을 확인하였다. 아울러, 도 27의 E 및 F에서 볼 수 있듯이, BSA-Rh2의 ^1H NMR 결과와 FTIR의 결과는 Rh2의 특징적인 피크를 나타냄을 확인하였다.
- [340] 상기 결과를 통해, BSA-CK 및 BSA-Rh2 나노 복합체는 각각 CK 및 Rh2의 고유한 특성을 지니고 있음을 알 수 있었다.
- [341] 실시예 8. BSA-CK 및 BSA-Rh2의 물리화학적 특징 분석
- [342] 실시예 8-1. 형태 분석
- [343] 본 발명의 BSA-CK 및 BSA-Rh2 나노 복합체의 형태를 확인하기 위하여, 200 kV의 가속 전압으로 작동한 FE-TEM(JEM-2000F, JEOL)을 이용하였다.
- [344] 구체적으로, FE-TEM 샘플을 준비하기 위하여 샘플 용액의 한 방울을 탄소가 코팅된 200-메쉬(mesh) 구리 그리드(grid)에 두어 자연건조하였다. 상기 나노 복합체의 크기 분포 및 안정성은 입자 분석기 및 제타 전위를 통해 확인하였고, 샘플은 인산염-완충된 살린(PBS, pH 7.4) 또는 아세트이트 버퍼(pH 5.0)에 분산시켰다.
- [345] 그 결과, 도 28의 A 및 D에서 볼 수 있듯이, BSA-CK 및 BSA-Rh2는 균일한 크기

분포를 갖는 구의 형태를 가짐을 확인하였다.

[346] 실시예 8-2. 크기 분포 분석

[347] 본 발명의 BSA-CK 및 BSA-Rh2 나노 복합체의 크기 분포를 확인하기 위하여, 동적광산란(dynamic light scattering; DLS)을 수행하였다.

[348] 그 결과, 도 28의 B 및 E에서 볼 수 있듯이, BSA-CK 및 BSA-Rh2의 평균 유체역학적 크기는 각각 157.2 및 175.8 nm임을 확인하였다.

[349] 실시예 8-3. 안정성 분석

[350] 나노 복합체 표면의 음전하간의 높은 정전기적 반발력은 콜로이드 상태에서 응집을 방지하여 높은 안정성을 제공한다. 이에 따라, 본 발명의 BSA-CK 및 BSA-Rh2 나노 복합체의 용액 내 안정성을 확인하기 위하여, 제타 전위(zeta potential) 값을 측정하여 비교하였다.

[351] 그 결과, 도 28의 C 및 F에서 볼 수 있듯이, BSA-CK 및 BSA-Rh2의 제타 전위값은 각각 -70.80 mV 및 -80.2 mV임을 확인하였고, BSA 자체가 -17.9 mV임을 비교하였을 때, BSA-CK 및 BSA-Rh2는 상당히 높은 제타 전위에 속하며, 안정된 범위 안에 속함을 확인하였다.

[352] 이를 통해, 본 발명의 나노 복합체는 안정된 시스템을 형성함으로써 제조됨을 확인하였다.

[353] 실시예 9. BSA-CK 및 BSA-Rh2의 용해도 분석

[354] 높은 수용성 용해도는 생물이용성, 막투과성 및 치료학적 활성 등 약물동태학적 특성을 유리하게 향상시킨다. 약물 흡수에는 물에 대한 용해도가 가장 중요한 생리화학적 요인임에 따라, 본 발명의 BSA-CK 및 BSA-Rh2 나노 복합체의 용해도를 분석하였다.

[355] 그 결과, 도 29의 A 및 B에서 볼 수 있듯이, 진세노사이드 CK 또는 Rh2 단독은 낮은 농도에서도 불용성인 반면, BSA-CK 및 BSA-Rh2는 물에 쉽게 용해됨을 확인하였다. 상기 결과를 통해, 본 발명의 나노 복합체는 높은 용해도를 가지므로 약물로서 유용하게 이용될 수 있음을 알 수 있었다.

[356] 실시예 10. BSA-CK 및 BSA-Rh2의 항암 활성 분석

[357] 본 발명의 BSA-CK 및 BSA-Rh2 나노 복합체의 항암 활성을 분석하기 위하여, 폐암 세포에 대한 독성을 하기 실시예 10-1 및 10-2를 통해 확인하였다.

[358] 실시예 10-1. BSA-CK의 세포 독성 확인

[359] BSA-CK 나노 복합체의 항암 활성을 분석하기 위하여, 폐암세포에 대한 독성을 확인하였다.

[360] 먼저, 인간 폐암 세포(A549)를 10% 소 태아 혈청(FBS)과 100 IU/mL 페니실린 및 100 μ g/mL 스트렙토마이신(Gibco-Brl. Gaithersburg, MD, USA)이 보충된 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. 세포를 5% CO₂가 포함된 습윤 대기 조건의 37°C에서 배양하였다.

[361] 이후, 세포 생존율을 MTT(3, 4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 어세이를 이용하여 평가하였다. 구체적으로, 세포를 1×10^5 세포/mL의

밀도로 96-웰 플레이트에 분주하였고, 24시간 동안 배양 후, 다양한 농도의 BSA-Rh2, BSA-CK, 진세노사이드 CK 또는 Rh2를 세포에 24시간 동안 처리하였다. 지정된 배양시간이 끝난 후, MTT 스톱 용액(5 mg/ml) 10 μ l를 각 웰에 넣었고, 4시간 동안 배양하였다. 이후, 상층액을 제거하고, DMSO 100 μ l를 상기 웰에 넣었다. 생존한 세포에 의해 형성되는 포마잔(formazan)의 양을 multi-model 플레이트 리더기를 이용하여 570 nm의 파장에서 측정하였으며, 기준파장은 630 nm로 하였다. 추가로, 각질 세포주(keratinocyte)에 대한 세포독성을 상기와 같은 방법으로 측정하였다.

- [362] 그 결과, 도 30의 A 및 B에서 볼 수 있듯이, A549 폐암 세포주에 대하여, BSA-CK 나노 복합체는 5 μ g/mL에서 약 80% 정도의 세포 성장을 저해하는 상당히 높은 세포독성을 나타냄을 확인하였다. 또한, CK 단독에 비하여 월등히 우수한 세포 독성을 나타냄을 확인하였다. 반면, BSA-CK는 각질세포주에 대해서는 10 μ g/mL의 높은 농도에서도 세포독성을 나타내지 않음을 확인하였다.
- [363] 상기 결과를 통해, BSA-CK는 A549에 대하여 독성을 나타냄으로써 우수한 항암활성을 가짐을 알 수 있었고, 정상 세포에는 작용하지 않는 암세포 특이적인 세포독성을 나타냄을 알 수 있었다.
- [364] 실시예 10-2. BSA-Rh2의 세포 독성 확인
- [365] BSA-Rh2 나노 복합체의 항암 활성을 분석하기 위하여, 폐암세포에 대한 독성을 확인하였다.
- [366] 구체적으로, A549 폐암 세포주의 배양과 세포의 생존율은 상기 실시예 4-1에 따른 방법을 수행하여 확인하였다.
- [367] 그 결과, 도 30의 C 및 D에서 볼 수 있듯이, A549 폐암 세포주에 대하여, BSA-Rh2는 Rh2 단독보다는 약간 낮은 독성을 나타냄을 확인하였다. 아울러, BSA-Rh2는 각질세포주에 대해서는 최대 15 μ M의 농도에서도 독성을 나타내지 않았지만, Rh2 단독은 동일한 농도에서 독성을 나타냄을 확인하였다.
- [368] 상기 결과를 통해, BSA-Rh2는 암세포 특이적인 세포독성을 나타냄을 알 수 있었다.
- [369] 실시예 11. BSA-CK 및 BSA-Rh2의 항염 활성 분석
- [370] 본 발명의 BSA-CK 및 BSA-Rh2 나노 복합체의 항염 활성을 분석하기 위하여, 대식세포에 대한 독성을 하기 실시예 5-1 및 5-2를 통해 확인하였으며, LPS-유도된 대식세포의 NO 생성 저해 활성을 하기 실시예 5-3 및 5-4를 통해 확인하였다.
- [371] 실시예 11-1. BSA-CK의 항염 활성 분석
- [372] 실시예 11-1-1. BSA-CK의 세포 독성 확인
- [373] BSA-CK 나노 복합체의 항염 활성을 분석하기 위하여, 대식세포에 대한 독성을 확인하였다.
- [374] 먼저, 쥐 대식세포주(RAW 264.7)를 5×10^3 세포/웰의 밀도로 96-웰 마이크로플레이트에 분주하였다. 이때, 10% 소 태아 혈청(FBS)과 100 IU/mL

페니실린 및 100 $\mu\text{g/mL}$ 스트렙토마이신(Gibco-Brl. Gaithersburg, MD, USA)이 보충된 RPMI 1640 배지를 사용하였으며, 5% CO_2 가 포함된 습윤 대기 조건의 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 이후, 세포의 생존율을 상기 실시예 4-1에 따른 MTT 어세이 방법으로 측정하였다.

- [375] 그 결과, 도 31의 A에서 볼 수 있듯이, BSA-CK 나노 복합체는 5 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 대식세포의 성장을 저해하지 않으며, 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 고농도에서 성장을 저해함을 확인하였다.
- [376] 실시예 11-1-2. BSA-CK의 NO 생산 억제 활성 확인
- [377] BSA-CK 나노 복합체의 항염 활성을 분석하기 위하여, 대식세포의 NO 생산 억제 활성을 확인하였다.
- [378] 구체적으로, 생성된 질산(NO)의 양을 측정하기 위하여, RAW 264.7 세포를 BSA-Rh2, BSA-CK, 진세노사이드 CK 단독 또는 Rh2 단독으로 1시간 동안 선처리하였고, 이후 상기 샘플이 존재하는 조건에서 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 지질다당류(LPS)로 자극하였다. 세포를 24시간 동안 배양한 후, 세포 배양액의 상층액 100 μL 를 동등한 부피의 그리스 시약(Griess reagent)과 혼합하였고, 마이크로리더기(Bio-Tek Instruments, Inc.)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 질산나트륨 곡선을 각 실험에 포함시켰다.
- [379] 그 결과, 도 31의 B에서 볼 수 있듯이, BSA-CK 나노 복합체는 세포독성을 나타내지 않은 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 낮은 농도에서 대식세포의 NO 생산을 유의하게 저해함을 확인하였다. 또한, CK 단독에 비하여 근소하지만 더 우수한 정도로 대식세포의 NO 생산을 억제함을 확인하였고, 이러한 효과는 BSA-CK 나노 복합체의 농도가 높아질수록 향상됨을 확인하였다.
- [380] 상기 결과를 통해, BSA-CK는 정상 대식세포주 대하여 직접적으로 독성을 나타내지 않으면서 NO 생산만을 선택적으로 억제함으로써, 우수한 항염활성을 나타냄을 알 수 있었다.
- [381] 실시예 11-2. BSA-Rh2의 항염 활성 분석
- [382] 실시예 11-2-1. BSA-Rh2의 세포 독성 확인
- [383] BSA-Rh2 나노 복합체의 항염 활성을 분석하기 위하여, 대식세포에 대한 독성을 확인하였다.
- [384] 구체적으로, RAW 264.7의 배양과 세포의 생존율은 상기 실시예 5-1-1에 따른 방법을 수행하여 확인하였다.
- [385] 그 결과, 도 31의 C에서 볼 수 있듯이, BSA-Rh2 나노 복합체는 5 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 대식세포의 성장을 저해하지 않으며, 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 고농도에서 성장을 저해함을 확인하였다.
- [386] 실시예 11-2-2. BSA-Rh2의 NO 생산 억제 활성 확인
- [387] BSA-Rh2 나노 복합체의 항염 활성을 분석하기 위하여, 대식세포의 NO 생산 억제 활성을 확인하였다.
- [388] 구체적으로, BSA-Rh2의 처리에 따른 RAW 264.7의 NO 생산 정도는 상기

실시에 5-1-2에 따른 방법을 수행하여 확인하였다.

- [389] 그 결과, 도 31의 D에서 볼 수 있듯이, BSA-Rh2 나노 복합체는 세포독성을 나타내지 않은 $1 \mu\text{g/mL}$ 의 낮은 농도에서 대식세포의 NO 생산을 유의하게 저해함을 확인하였다. 또한, Rh2 단독에 비하여 근소하지만 더 우수한 정도로 대식세포의 NO 생산을 억제함을 확인하였고, 이러한 효과는 BSA-Rh2 나노 복합체의 농도가 높아질수록 향상됨을 확인하였다.
- [390] 상기 결과를 통해, BSA-Rh2는 정상 대식세포주에 대하여 직접적으로 독성을 나타내지 않으면서 NO 생산만을 선택적으로 억제함으로써, 우수한 항염활성을 나타냄을 알 수 있었다.
- [391]
- [392] 제조예 3. MSNP-CK 및 MSNP-Rh2의 합성 방법
- [393] 진세노사이드 CK 또는 Rh2의 타겟 능력 및 반감기를 향상시키기 위하여, 상기 진세노사이드에 메조다공성 실리카 나노입자(Mesoporous silica nanoparticle; MSNP)를 결합시킨 MSNP-CK 또는 MSNP-Rh2 나노 복합체를 합성하였다.
- [394] 구체적으로, 나노 복합체를 제조하기 위하여, 다음과 같은 시약을 사용하였다. 메조다공성 실리카 나노입자(Mesoporous silica nanoparticle; MSNP, 200 nm, 4 nm의 기공 크기)는 Sigma Aldrich(St. Louis, MO, USA).사에서 구입하였다. 실리카의 재료로서 테트라에틸 오소실리케이트(Tetraethyl orthosilicate; TEOS, 98%), 3-아미노프로필트리에톡시-살린(3-aminopropyltriethoxy-silane; APTEOS, 98%)을 커플링(coupling) 물질로 사용하였고, 염색시약인 플루오레세인이소티오시안산염(fluorescein isothiocyanate; FITC)를 Aldrich-Sigma Chemical 사(USA)에서 구입하였다. 진세노사이드 CK 및 Rh2는 인삼소재은행(Kyung Hee University, Yongin, South Korea)에서 구입하였다. 다른 모든 화학물질은 분석 수준의 등급인 것을 사용하였다.
- [395] MSNP-CK의 합성은 다음과 같은 세 단계를 통해 합성하였다. 1단계로서, 먼저 FITC 250 mg과 순수 에탄올 10 ml을 50 mL 부피의 세 개의 목이 긴 병에 첨가하였다. 이후, 물 2.5 ml과 NH_4OH 를 첨가하였고, 상온에서 30분 동안 교반하였다. TEOS 15 ml 및 APTMS 200 μL 을 상기 혼합 용액에 첨가하였고, 염색 시약의 표백을 방지하기 위하여 암조건에서 12시간 동안 교반하였다. 수득한 FITC/APTMS 복합체는 광표백을 피하기 위하여 빛을 차단한 암조건에서 보관하였다. 상기 제조한 나노 복합체 용액은 사용 전에 에탄올 용매를 제거하기 위하여 증류하였다.
- [396] 2단계로서, 진세노사이드를 효율적으로 결합시키기 위하여, MSNP를 자유 아민기(amine group)로 기능화하였고, 실리카를 FITC 코팅하였다. 구체적으로, MSNP 100 mg을 톨루엔(toluene) 15 ml에 용해하였고, 혼합액을 잘 분산시키고, 교반하였다. 이후, APTMS 10 μL 을 드롭 방식으로 첨가하였고, HCl(1M) 1방울을 첨가하였다. 반응 혼합액을 24시간 동안 교반하였고, 물로 여러 번 헹군 뒤, 건조하였다.

- [397] 마지막 3단계로서, 진세노사이드에 MSNP를 결합시키기 위하여, 활성화된 MSNP(100 mg)를 물 5 ml에 첨가하였고, 에탄올 10ml에 용해된 진세노사이드 CK(30 mg)를 드롭 방식으로 첨가하였다. FITC 염색 시약이 코팅된 실리카를 추가로 20 mg 첨가하였고, 이후 48시간 동안 교반하였으며, 수득한 나노입자를 10,000 rpm에서 20분 동안 원심분리하였다. 이후, 순수 에탄올로 세 번 행구고, 반응되지 않은 화학물질을 제거하기 위하여 물로 세 번 행구었고, 건조하였다. 이후, MSNP-CK 및 MSNP-Rh2를 수득하기 위하여, 투석된 용액을 동결건조하였다.
- [398] MSNP-Rh2 나노 복합체도 상기와 같은 방법으로, 진세노사이드 Rh2를 이용하여 합성하였다.
- [399] 실시에 12. MSNP-CK 및 MSNP-Rh2의 합성 결과 분석
- [400] 실시에 12-1. MSNP-CK 및 MSNP-Rh2의 진세노사이드 양 확인
- [401] MSNP-CK 또는 MSNP-Rh2 나노 복합체에 적재된 진세노사이드의 양은 HPLC를 이용하여 계산하였다.
- [402] 그 결과, 도 32의 A에서 볼 수 있듯이, MSNP-CK는 CK 단독과 동일한 명확한 피크를 보였고, MSNP-CK에 적재된 CK의 양은 나노 복합체 1 mg 당 0.066 mg임을 확인하였다. 아울러, 도 32의 D에서 볼 수 있듯이, MSNP-Rh2는 단독과 동일한 명확한 피크를 보였고, MSNP-Rh2에 적재된 Rh2의 양은 나노 복합체 1 mg 당 0.072 mg임을 확인하였다.
- [403] 실시에 12-2. MSNP-CK 및 MSNP-Rh2의 진세노사이드 고유 특성 확인
- [404] 본 발명의 MSNP-CK 및 MSNP-Rh2 나노 복합체가 잘 제조되었는지 확인하기 위하여, MSNP-CK 및 MSNP-Rh2, 및 이의 중간체의 구조를 ^1H NMR과 FT-IR을 이용하여 확인하였다.
- [405] 구체적으로, ^1H NMR 스펙트럼은 300 MHz(JEOL, Tokyo, Japan)에서 기록하였고, 샘플은 D_2O 또는 CD_3OD 에 용해하였다. FT-IR 스펙트럼은 KBr 펠렛을 이용한 Perkin-Elmer FT-IR 분광광도계를 이용하여 확인하였다.
- [406] 그 결과, 도 32의 B 및 C에서 볼 수 있듯이, MSNP-CK의 ^1H NMR 결과와 FTIR의 결과는 CK의 특징적인 피크를 나타냄을 확인하였다. 아울러, 도 32의 E 및 F에서 볼 수 있듯이, MSNP-Rh2의 ^1H NMR 결과와 FTIR의 결과는 Rh2의 특징적인 피크를 나타냄을 확인하였다.
- [407] 상기 결과를 통해, MSNP-CK 및 MSNP-Rh2 나노 복합체는 각각 CK 및 Rh2의 고유한 특성을 지니고 있음을 알 수 있었다.
- [408] 실시에 13. MSNP-CK 및 MSNP-Rh2의 형태 분석
- [409] 본 발명의 MSNP-CK 및 MSNP-Rh2 나노 복합체의 형태를 확인하기 위하여, 200 kV의 가속 전압으로 작동한 FE-TEM(JEM-2000F, JEOL)을 이용하였다.
- [410] 구체적으로, FE-TEM 샘플을 준비하기 위하여 샘플 용액의 한 방울을 탄소가 코팅된 200-메쉬(mesh) 구리 그리드(grid)에 두어 자연건조하였고, 상기 샘플은 인산염-완충된 살린(PBS, pH 7.4) 또는 아세트이트 버퍼(pH 5.0)에 분산시켰다.

- [411] 그 결과, 도 33의 A 및 B에서 볼 수 있듯이, MSNP-CK 및 MSNP-Rh2는 균일한 크기 분포를 갖는 구의 형태를 가짐을 확인하였다.
- [412] 실시예 14. MSNP-CK 및 MSNP-Rh2의 항암 활성 분석
- [413] 본 발명의 MSNP-CK 및 MSNP-Rh2 나노 복합체의 항암 활성을 분석하기 위하여, 폐암 세포에 대한 독성을 하기 실시예 3-1 및 3-2를 통해 확인하였다.
- [414] 실시예 14-1. MSNP-CK의 세포 독성 확인
- [415] MSNP-CK 나노 복합체의 항암 활성을 분석하기 위하여, 폐암세포에 대한 독성을 확인하였다.
- [416] 먼저, 인간 폐암 세포(A549)를 10% 소 태아 혈청(FBS)과 100 IU/mL 페니실린 및 100 μ g/mL 스트렙토마이신(Gibco-Brl. Gaithersburg, MD, USA)이 보충된 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. 세포를 5% CO₂가 포함된 습윤 대기 조건의 37°C에서 배양하였다.
- [417] 이후, 세포 생존율을 MTT(3, 4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 어세이를 이용하여 평가하였다. 구체적으로, 세포를 1×10^5 세포/mL의 밀도로 96-웰 플레이트에 분주하였고, 24시간 동안 배양 후, 다양한 농도의 MSNP-Rh2, MSNP-CK, 진세노사이드 CK 또는 Rh2를 세포에 24시간 동안 처리하였다. 지정된 배양시간이 끝난 후, MTT 스톱 용액(5 mg/ml) 10 μ l를 각 웰에 넣었고, 4시간 동안 배양하였다. 이후, 상층액을 제거하고, DMSO 100 μ l를 상기 웰에 넣었다. 생존한 세포에 의해 형성되는 포마잔(formazan)의 양을 multi-model 플레이트 리더기를 이용하여 570 nm의 파장에서 측정하였으며, 기준파장은 630 nm로 하였다. 추가로, 각질 세포주(keratinocyte)에 대한 세포독성을 상기와 같은 방법으로 측정하였다.
- [418] 그 결과, 도 34의 A 및 B에서 볼 수 있듯이, A549 폐암 세포주에 대하여, MSNP-CK 나노 복합체는 1 μ g/mL의 낮은 농도에서 약 50% 정도의 세포 성장을 저해하는 상당히 높은 세포독성을 나타냄을 확인하였고, 10 μ g/mL의 농도에서는 약 90% 이상의 세포독성을 나타냄을 확인하였다. 또한, CK 단독에 비하여 월등히 우수한 세포 독성을 나타냄을 확인하였다. 반면, 각질세포주에 대해서는 15 μ g/mL의 높은 농도에서도 세포독성을 나타내지 않음을 확인하였다.
- [419] 상기 결과를 통해, MSNP-CK는 A549에 대하여 독성을 나타냄으로써 우수한 항암활성을 가짐을 알 수 있었고, 정상 세포에는 작용하지 않는 암세포 특이적인 세포독성을 나타냄을 알 수 있었다.
- [420] 실시예 3-2. MSNP-Rh2의 세포 독성 확인
- [421] MSNP-Rh2 나노 복합체의 항암 활성을 분석하기 위하여, 폐암세포에 대한 독성을 확인하였다.
- [422] 구체적으로, A549 폐암 세포주의 배양과 세포의 생존율은 상기 실시예 3-1에 따른 방법을 수행하여 확인하였다.
- [423] 그 결과, 도 35의 C 및 D에서 볼 수 있듯이, A549 폐암 세포주에 대하여, MSNP-Rh2 나노 복합체는 1 μ g/mL의 낮은 농도에서 약 50% 정도의 세포 성장을

저해하는 상당히 높은 세포독성을 나타냄을 확인하였고, 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 약 90% 이상의 세포독성을 나타냄을 확인하였다. 또한, CK 단독에 비하여 월등히 우수한 세포 독성을 나타냄을 확인하였다. 반면, 각질세포주에 대해서는 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 높은 농도에서도 세포독성을 나타내지 않음을 확인하였다.

[424] 상기 결과를 통해, MSNP-Rh2는 A549에 대하여 독성을 나타냄으로써 우수한 항암활성을 가짐을 알 수 있었고, 정상 세포에는 작용하지 않는 암세포 특이적인 세포독성을 나타냄을 알 수 있었다.

[425] 실시예 15. MSNP-CK 및 MSNP-Rh2의 항염 활성 분석

[426] 본 발명의 MSNP-CK 및 MSNP-Rh2 나노 복합체의 항염 활성을 분석하기 위하여, 대식세포에 대한 독성을 하기 실시예 15-1-1 및 15-2-1를 통해 확인하였으며, LPS-유도된 대식세포의 NO 생성 저해 활성을 하기 실시예 15-1-2 및 15-2-2를 통해 확인하였다.

[427] 실시예 15-1. MSNP-CK의 항염 활성 분석

[428] 실시예 15-1-1. MSNP-CK의 세포 독성 확인

[429] MSNP-CK 나노 복합체의 항염 활성을 분석하기 위하여, 대식세포에 대한 독성을 확인하였다.

[430] 먼저, 쥐 대식세포주(RAW 264.7)를 5×10^3 세포/웰의 밀도로 96-웰 마이크로플레이트에 분주하였다. 이때, 10% 소 태아 혈청(FBS)과 100 IU/mL 페니실린 및 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 스트렙토마이신(Gibco-Brl. Gaithersburg, MD, USA)이 보충된 RPMI 1640 배지를 사용하였으며, 5% CO_2 가 포함된 습윤 대기 조건의 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 이후, 세포의 생존율을 상기 실시예 3-1에 따른 MTT 어세이 방법으로 측정하였다.

[431] 그 결과, 도 35의 A에서 볼 수 있듯이, MSNP-CK 나노 복합체는 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 대식세포의 성장을 저해하지 않으며, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 고농도에서 성장을 저해함을 확인하였다.

[432] 실시예 15-1-2. MSNP-CK의 NO 생산 억제 활성 확인

[433] MSNP-CK 나노 복합체의 항염 활성을 분석하기 위하여, 대식세포의 NO 생산 억제 활성을 확인하였다.

[434] 구체적으로, 생성된 질산(NO)의 양을 측정하기 위하여, RAW 264.7 세포를 MSNP-Rh2, MSNP-CK, 진세노사이드 CK 단독 또는 Rh2 단독으로 1시간 동안 선처리하였고, 이후 상기 샘플이 존재하는 조건에서 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 지질다당류(LPS)로 자극하였다. 세포를 24시간 동안 배양한 후, 세포 배양액의 상층액 100 μL 를 동등한 부피의 그리스 시약(Griess reagent)과 혼합하였고, 마이크로리더기(Bio-Tek Instruments, Inc.)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 질산나트륨 곡선을 각 실험에 포함시켰다.

[435] 그 결과, 도 35의 B에서 볼 수 있듯이, MSNP-CK 나노 복합체는 세포독성을 나타내지 않은 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 낮은 농도에서 대식세포의 NO 생산을 유의하게 저해함을 확인하였다. 또한, CK 단독에 비하여 근소하지만 더 우수한 정도로

대식세포의 NO 생산을 억제함을 확인하였고, 이러한 효과는 MSNP-CK 나노 복합체의 농도가 높아질수록 향상됨을 확인하였다.

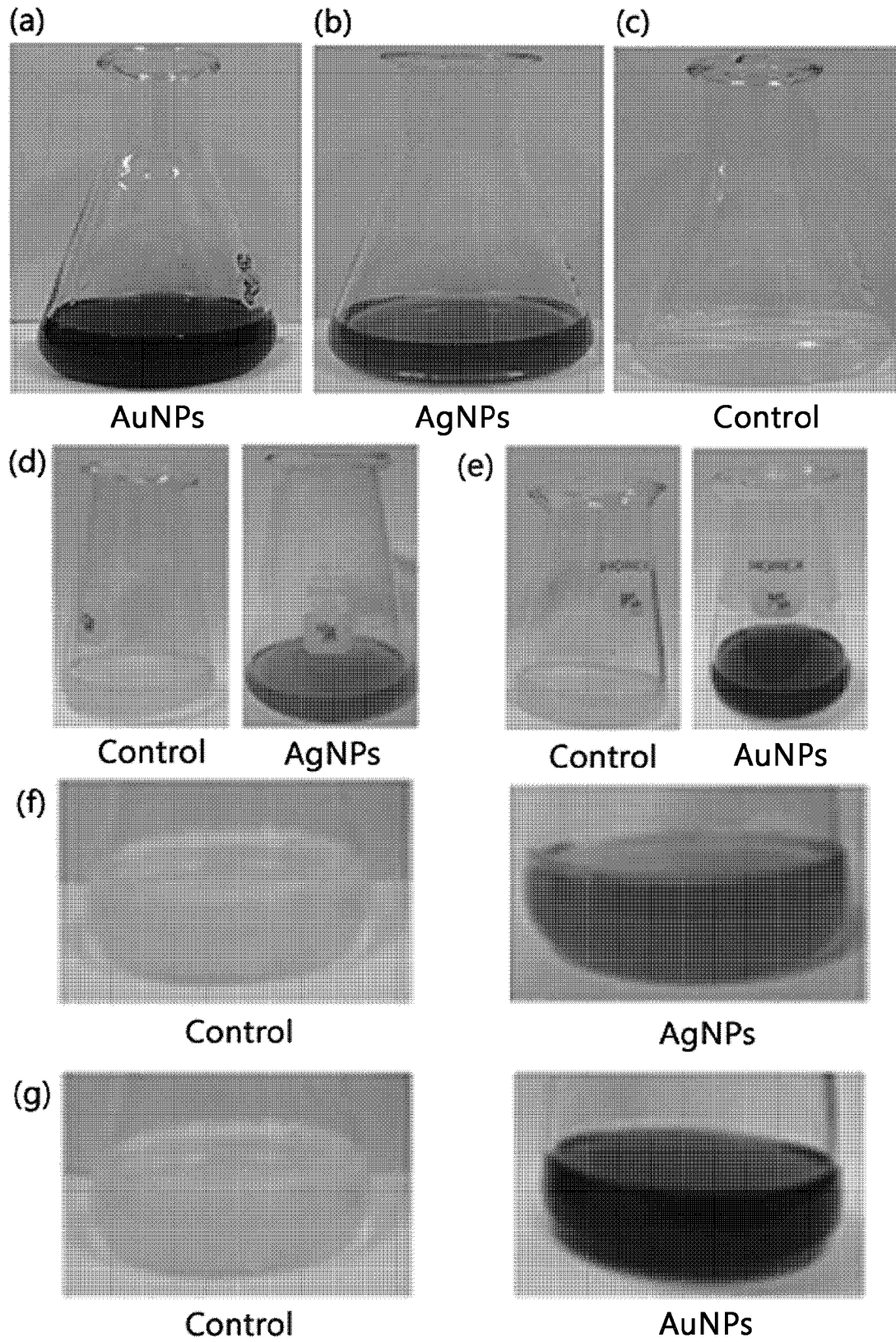
- [436] 상기 결과를 통해, MSNP-CK는 정상 대식세포주 대하여 직접적으로 독성을 나타내지 않으면서 NO 생산만을 선택적으로 억제함으로써, 우수한 항염활성을 나타냄을 알 수 있었다.
- [437] 실시예 15-2. MSNP-Rh2의 항염 활성 분석
- [438] 실시예 15-2-1. MSNP-Rh2의 세포 독성 확인
- [439] MSNP-Rh2 나노 복합체의 항염 활성을 분석하기 위하여, 대식세포에 대한 독성을 확인하였다.
- [440] 구체적으로, RAW 264.7의 배양과 세포의 생존율은 상기 실시예 4-1-1에 따른 방법을 수행하여 확인하였다.
- [441] 그 결과, 도 35의 C에서 볼 수 있듯이, MSNP-Rh2 나노 복합체는 5 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 대식세포의 성장을 저해하지 않으며, 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 고농도에서 성장을 저해함을 확인하였다.
- [442] 실시예 15-2-2. MSNP-Rh2의 NO 생산 억제 활성 확인
- [443] MSNP-Rh2 나노 복합체의 항염 활성을 분석하기 위하여, 대식세포의 NO 생산 억제 활성을 확인하였다.
- [444] 구체적으로, MSNP-Rh2의 처리에 따른 RAW 264.7의 NO 생산 정도는 상기 실시예 4-1-2에 따른 방법을 수행하여 확인하였다.
- [445] 그 결과, 도 35의 D에서 볼 수 있듯이, MSNP-Rh2는 세포독성을 나타내지 않은 1 $\mu\text{g/mL}$ 의 낮은 농도에서 대식세포의 NO 생산을 유의하게 저해함을 확인하였다. 또한, Rh2 단독에 비하여 근소하지만 더 우수한 정도로 대식세포의 NO 생산을 억제함을 확인하였고, 이러한 효과는 MSNP-Rh2 나노 복합체의 농도가 높아질수록 향상됨을 확인하였다.
- [446] 상기 결과를 통해, MSNP-Rh2는 정상 대식세포주에 대하여 직접적으로 독성을 나타내지 않으면서 NO 생산만을 선택적으로 억제함으로써, 우수한 항염활성을 나타냄을 알 수 있었다.
- [447]
- [448] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.
- [449]

청구범위

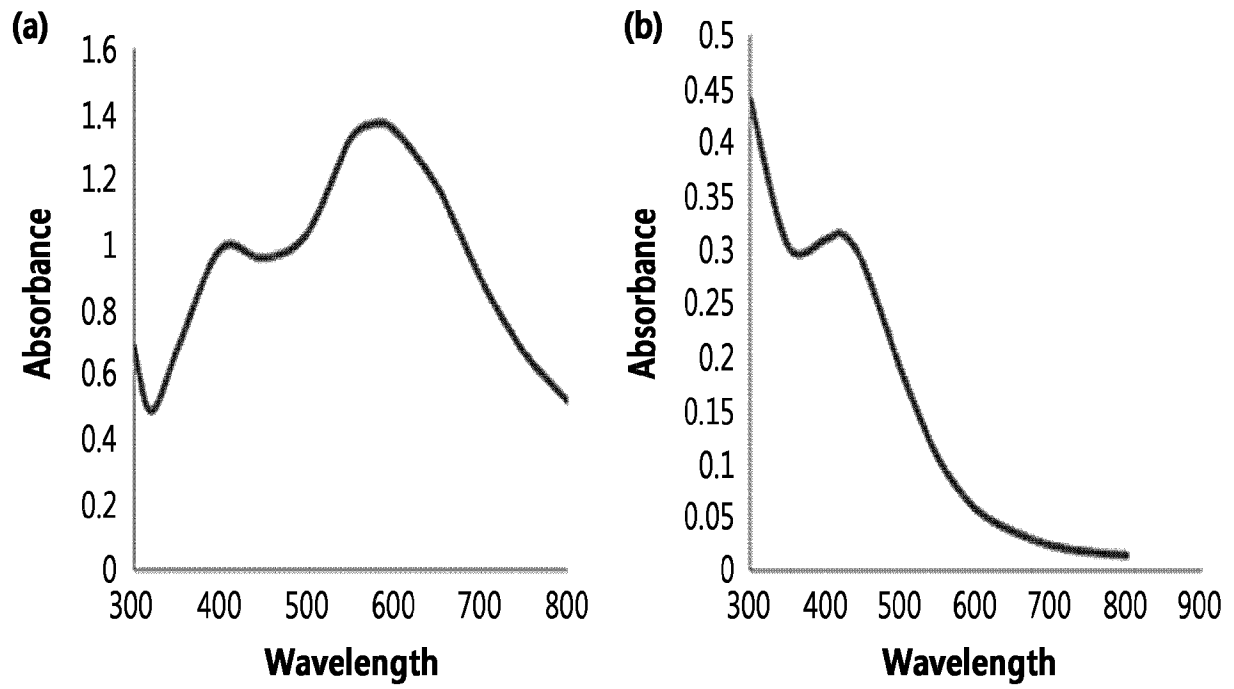
- [청구항 1] 나노 약물전달체; 및 인삼추출물 또는 이로부터 분리된 진세노사이드를 포함하는 나노 복합체.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 나노 약물전달체는 금속 나노입자, BSA(Bovine serum albumin) 또는 메조다공성 실리카 나노입자(Mesoporous silica nanoparticle)인 것인, 나노 복합체.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 금속은 금(Au), 은(Ag), 구리(Cu), 팔라듐(Pd), 백금(Pt) 및 로듐(Rd)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 나노 복합체.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 인삼추출물은 인삼(panax ginseng) 잎 추출물, 인삼(panax ginseng) 뿌리 추출물 및 홍삼(red ginseng) 뿌리 추출물로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 나노 복합체.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 인삼추출물은 물, C1 내지 C4의 알코올 및 이들의 혼합 용매로 구성되는 군으로부터 선택되는 용매로 추출된 것인, 나노 복합체.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 인삼추출물로부터 분리된 진세노사이드는 진세노사이드 화합물 K(Compound K) 또는 진세노사이드 Rh2인 것인, 나노 복합체.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 나노 복합체 1 mg 당 0.05 내지 0.15 mg의 진세노사이드를 포함하는 것인, 나노 복합체.
- [청구항 8] 제2항에 있어서, 크기가 5 내지 40 nm인 것인, 나노 복합체.
- [청구항 9] 제1항의 나노 복합체를 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 암은 폐암인 것인, 약학적 조성물.
- [청구항 11] 제1항의 나노 복합체를 포함하는, 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 염증성 질환은 크론씨병, 홍반병, 아토피, 류마티스 관절염, 하시모토 갑상선염, 악성빈혈, 에디슨씨 병, 제1형 당뇨병, 루프스, 만성피로증후군, 섬유근육통, 갑상선기능저하증과 항진증, 경피증, 베체트병, 염증성 장질환, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 메니에르 증후군(Meniere's syndrome), 길리안-바레 증후군(Guillian-Barre syndrome), 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 백반증, 자궁내막증, 건선, 백반증, 전신성 경피증 및 궤양성 대장염으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 13] 제1항의 나노 복합체를 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 암을 치료하는 방법.
- [청구항 14] 제1항의 나노 복합체를 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 염증성 질환을 치료하는 방법.

- [청구항 15] 나노 약물전달체; 및 인삼추출물 또는 이로부터 분리된 진세노사이드를 혼합하여 반응시키는 단계를 포함하는, 나노 복합체의 제조방법.
- [청구항 16] 제15항에 있어서, 상기 나노 약물 전달체는 금속 나노입자이며, 상기 반응은 10 내지 100°C에서 수행되며, 상기 반응에 사용되는 금속 전구체의 농도는 0.01 내지 100mM인 것인, 나노 복합체의 제조방법.
- [청구항 17] 제16항에 있어서, 반응액을 원심분리하여 나노 전달체를 회수하는 단계를 추가로 포함하는, 나노 복합체의 제조방법.
- [청구항 18] 제13항에 있어서, 상기 나노 약물 전달체는 BSA(Bovine serum albumin)이며, 상기 단계에서 혼합하여 얻은 반응액을 투석하는 단계를 포함하는, 나노 복합체의 제조방법.
- [청구항 19] 제13항에 있어서, 상기 나노 약물 전달체는 메조다공성 실리카 나노입자이고 APTEOS(3-aminopropyltriethoxy-silane)의 자유 아민기(amine group)로 기능화 된 것인, 나노 복합체의 제조 방법.

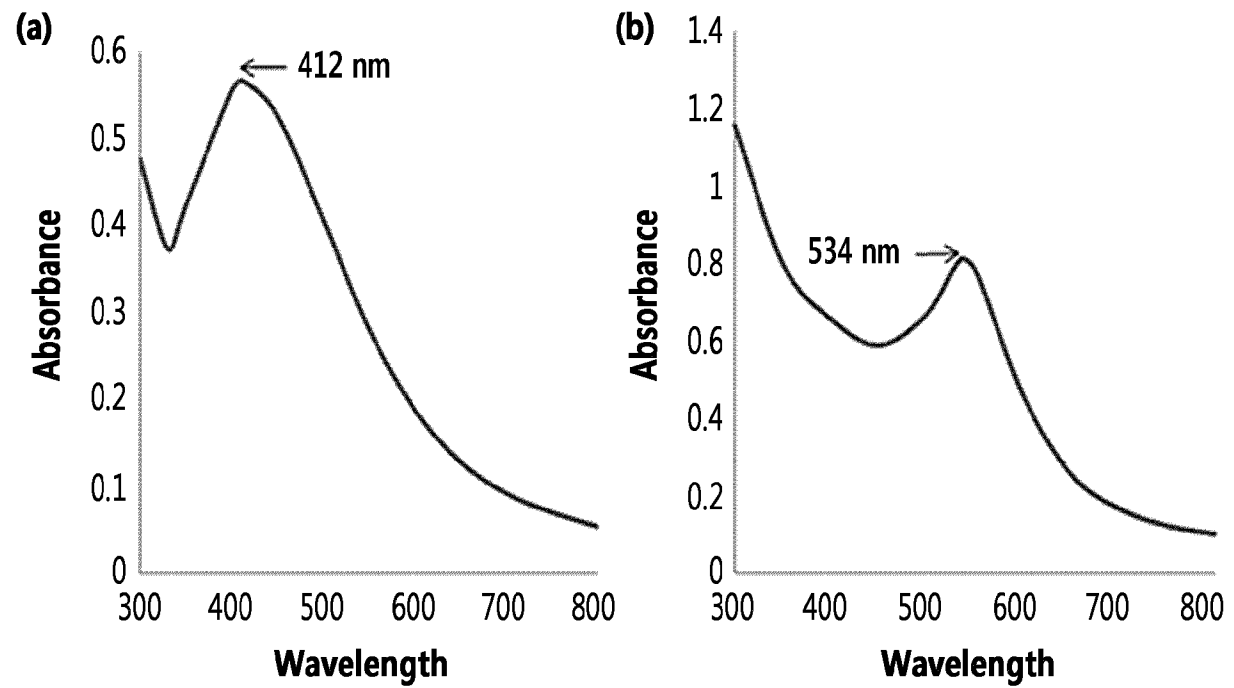
[도1]



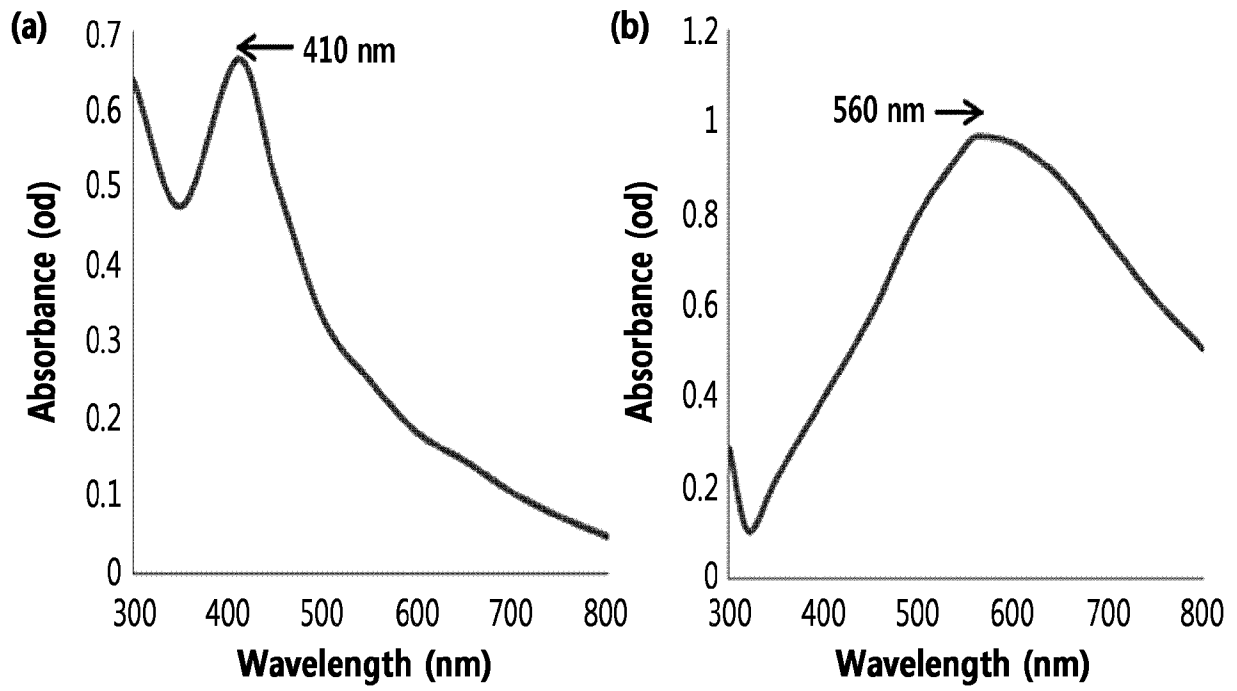
[도2]



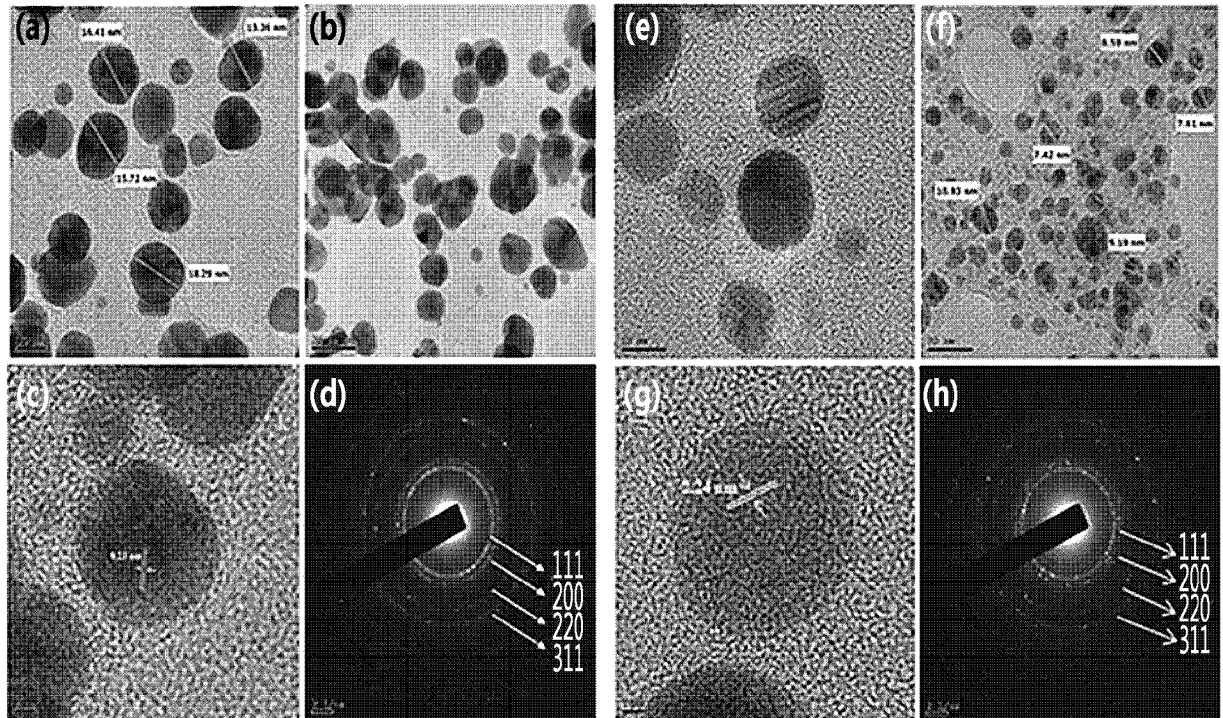
[도3]



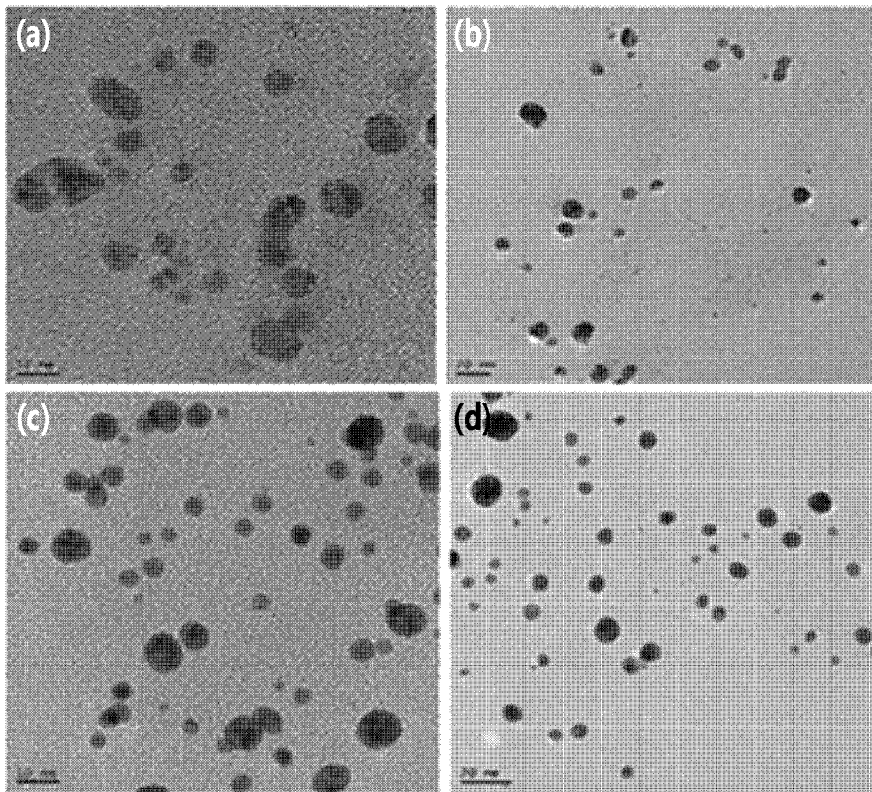
[도4]



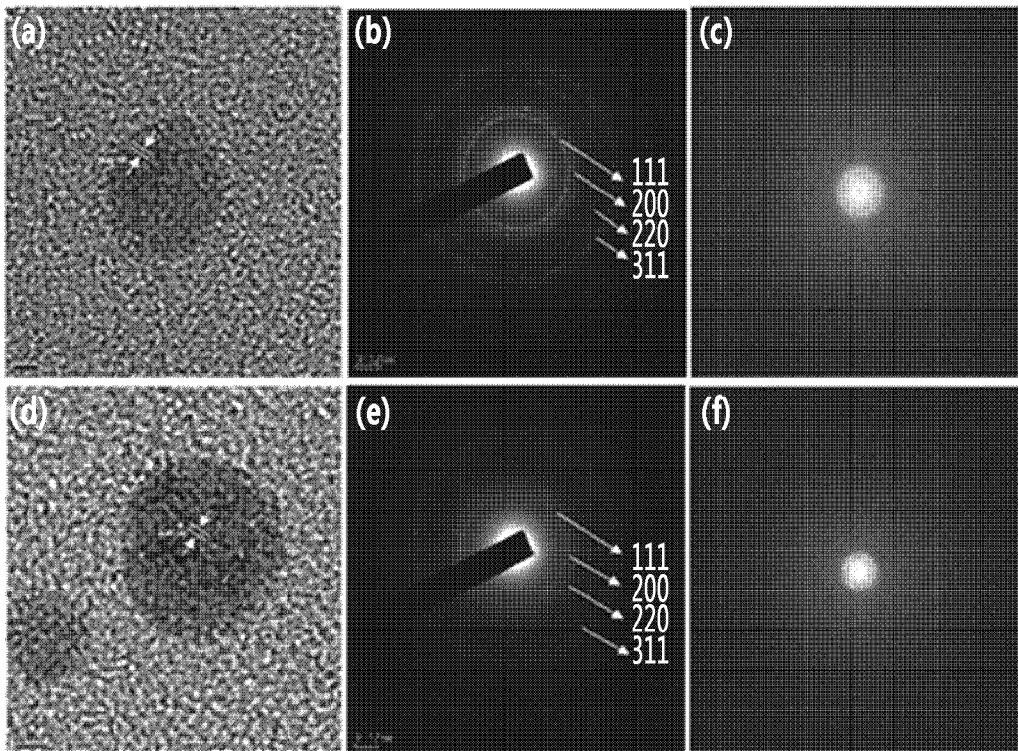
[도5]



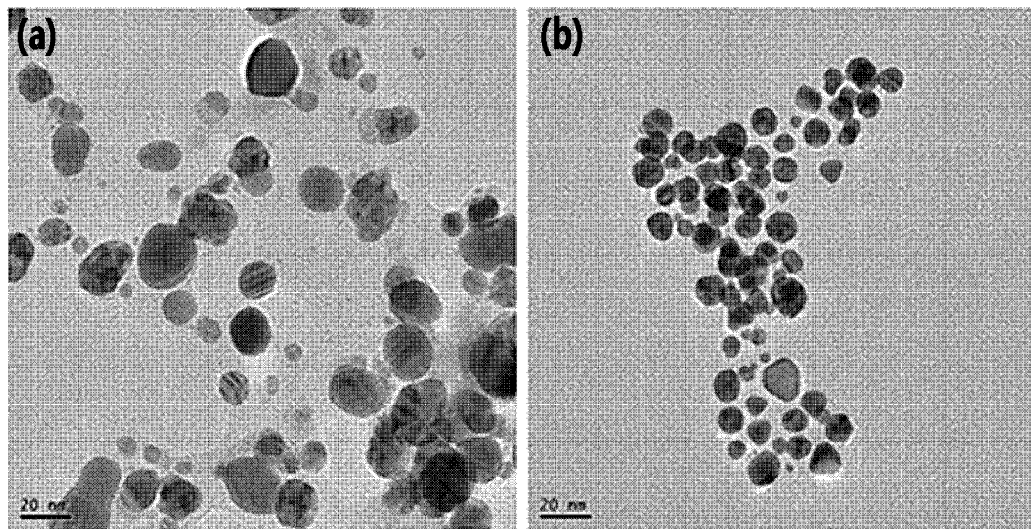
[도6]



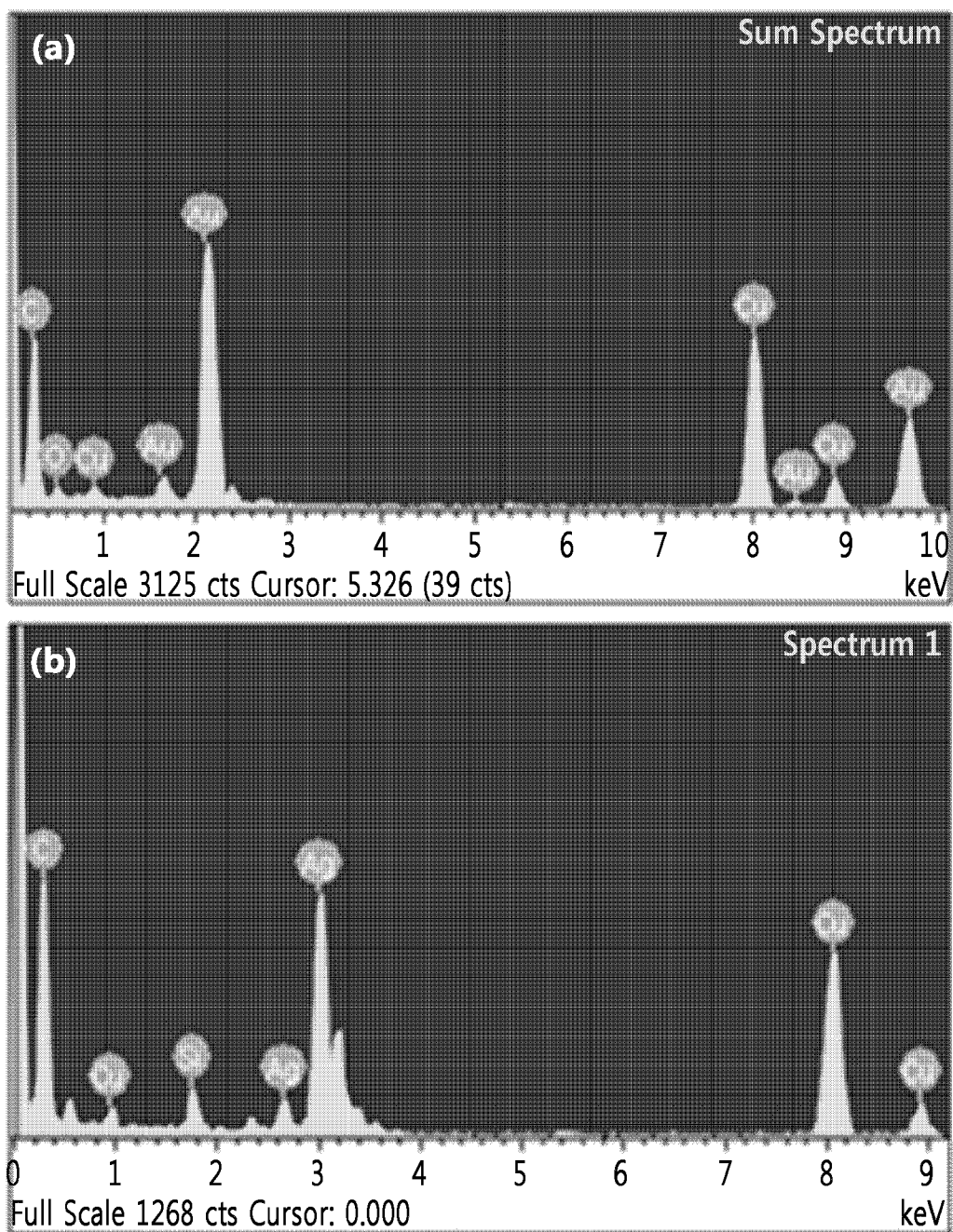
[도7]



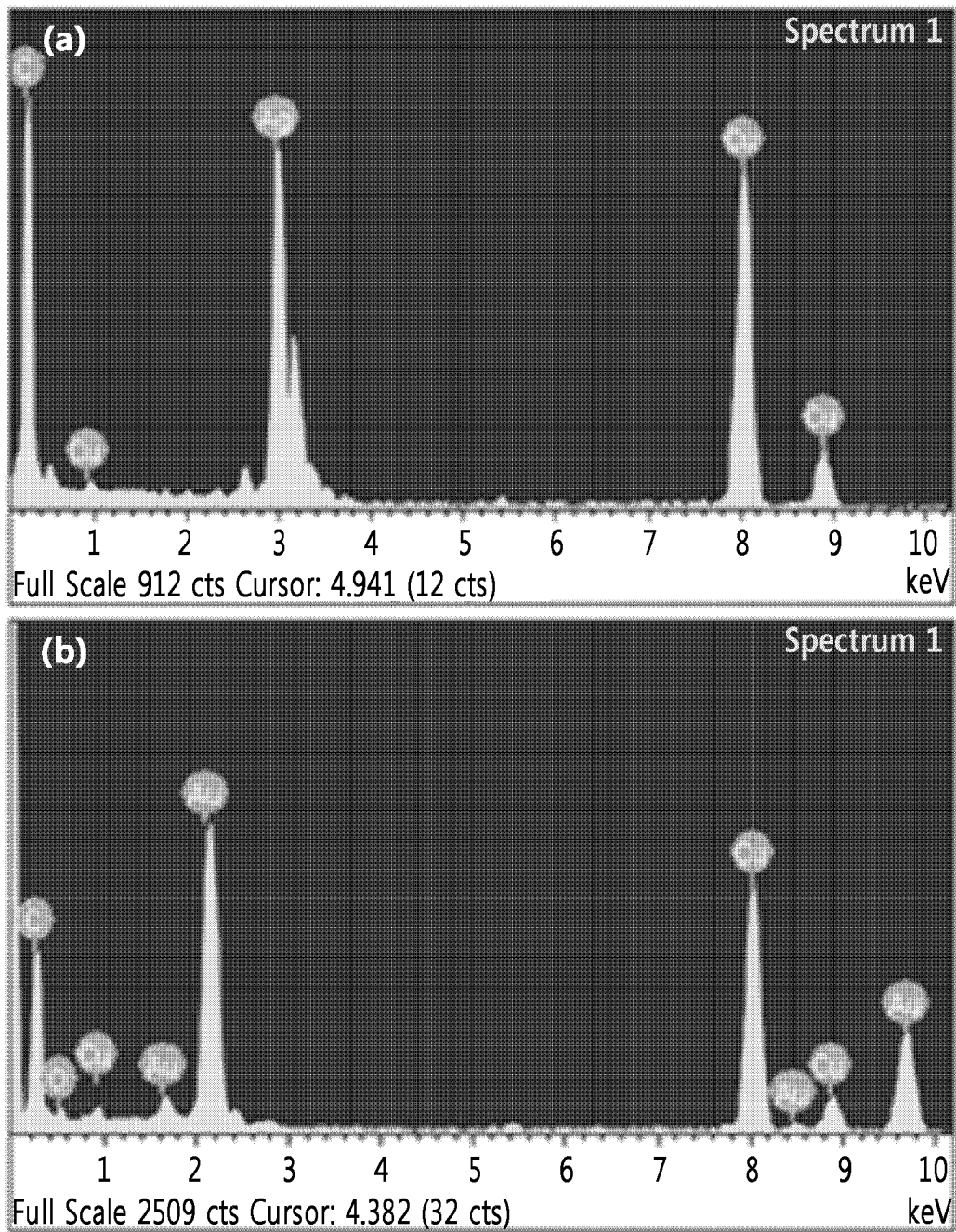
[도8]



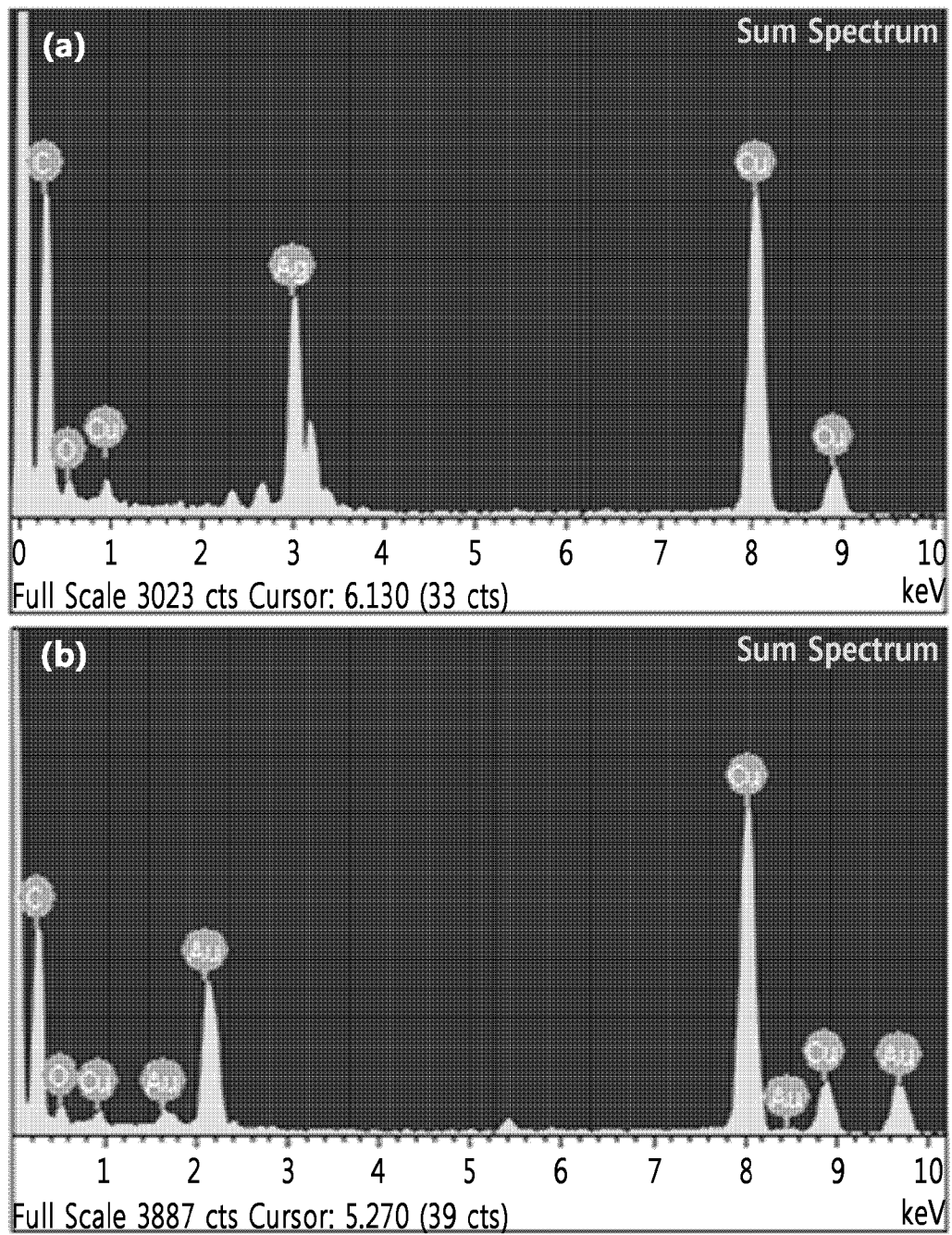
[도9]



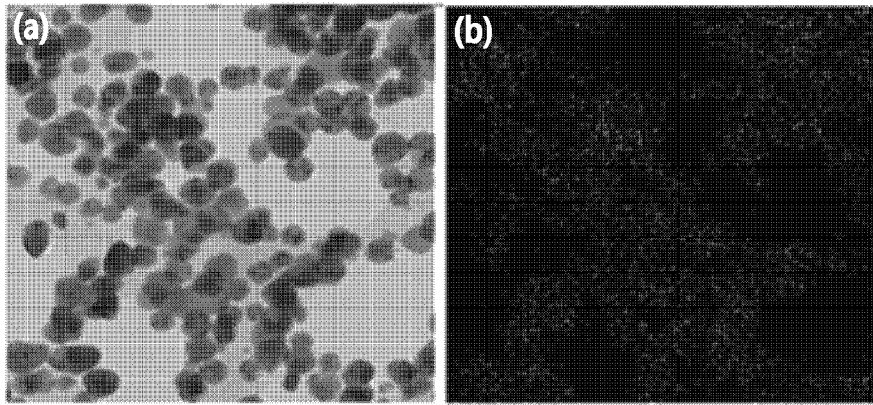
[도10]



[도11]

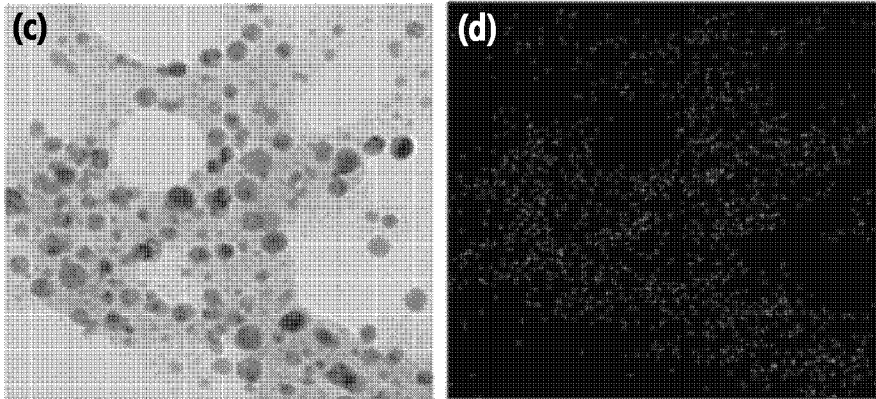


[도12]



Electron Image 1

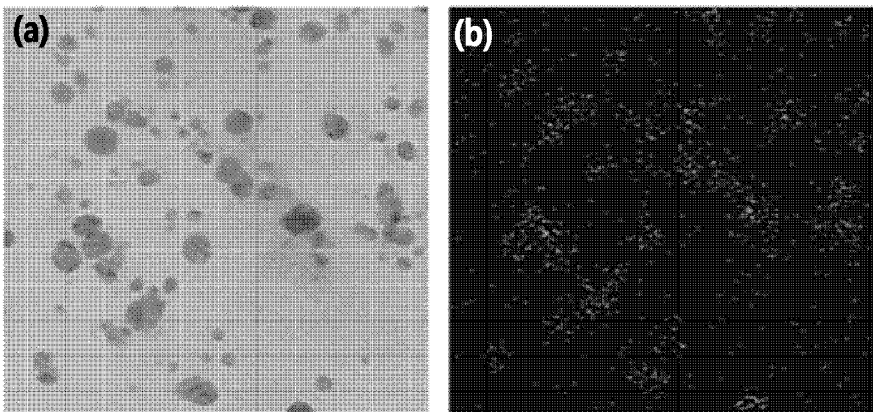
AuLa1



Electron Image 1

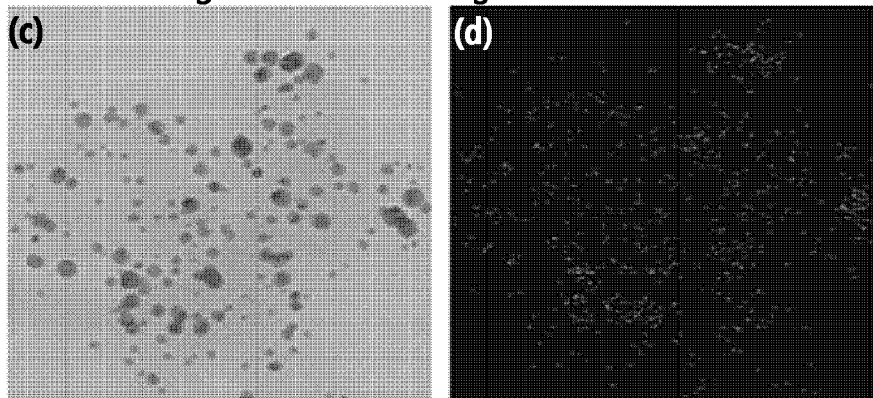
AgLa1

[도13]



Electron Image 1

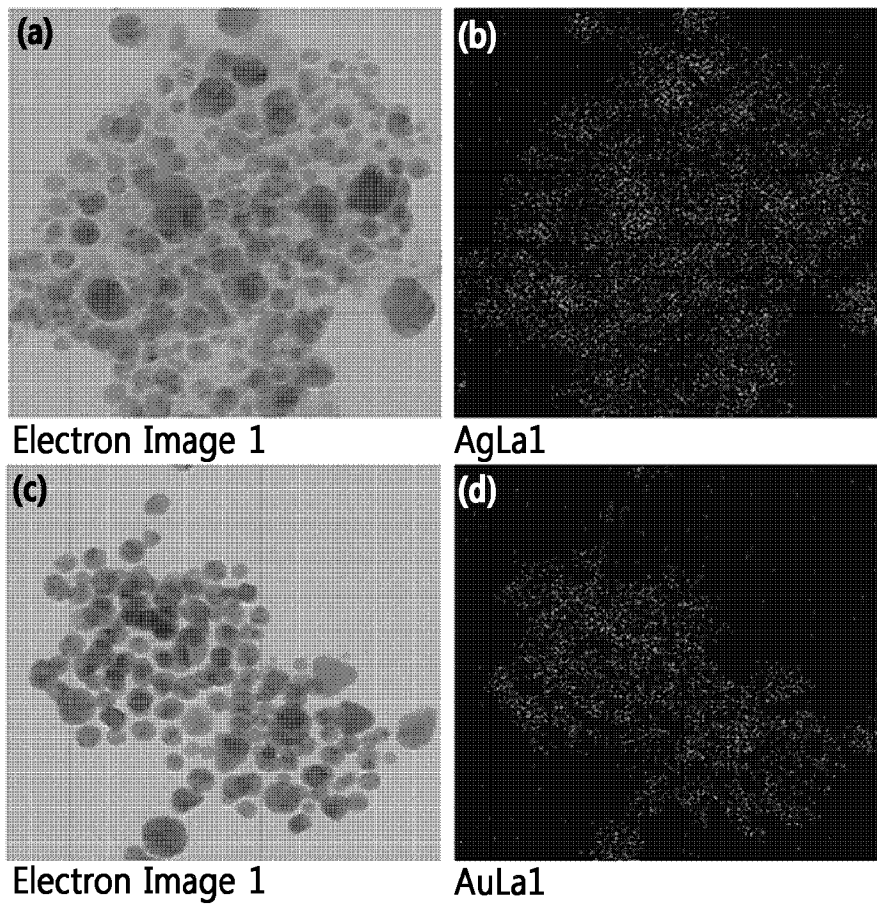
AgLa1



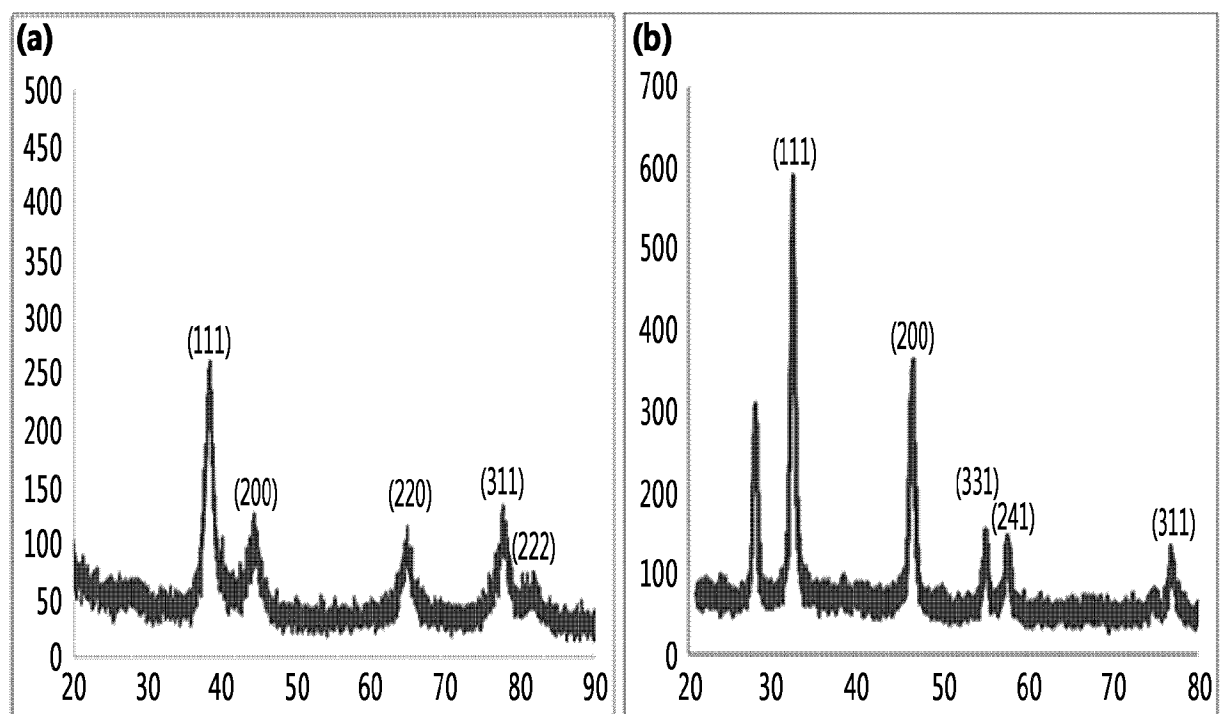
Electron Image 1

AgLa1

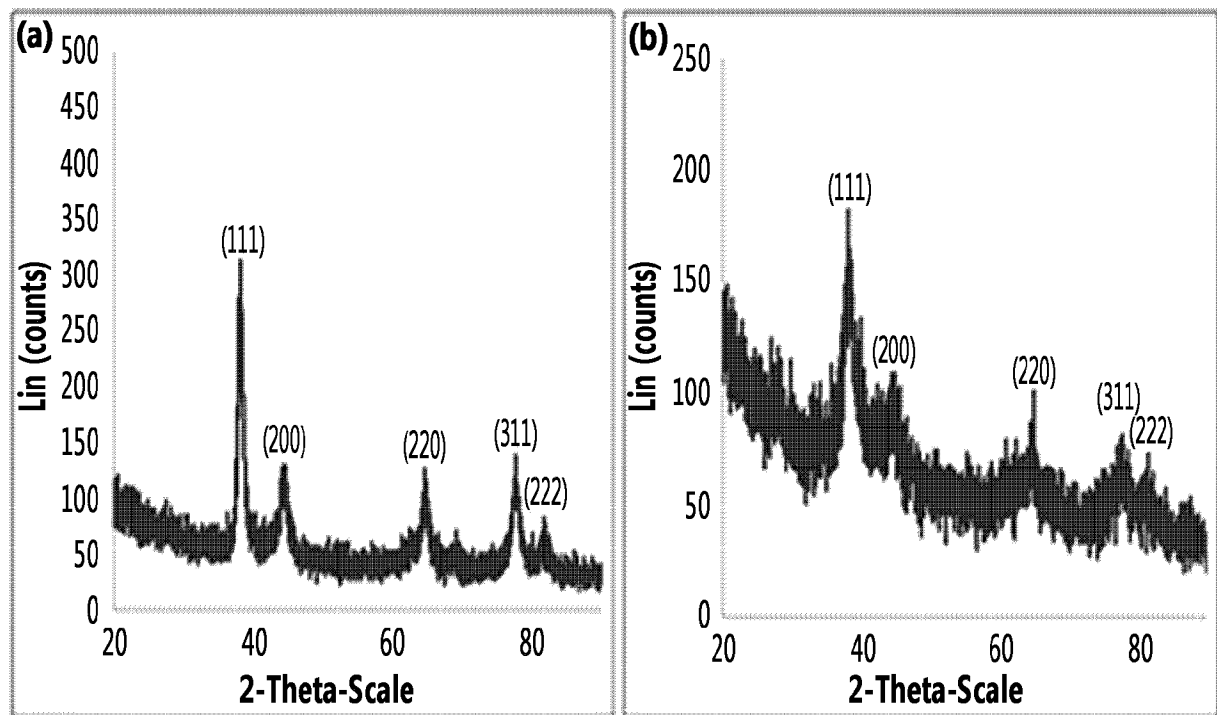
[도14]



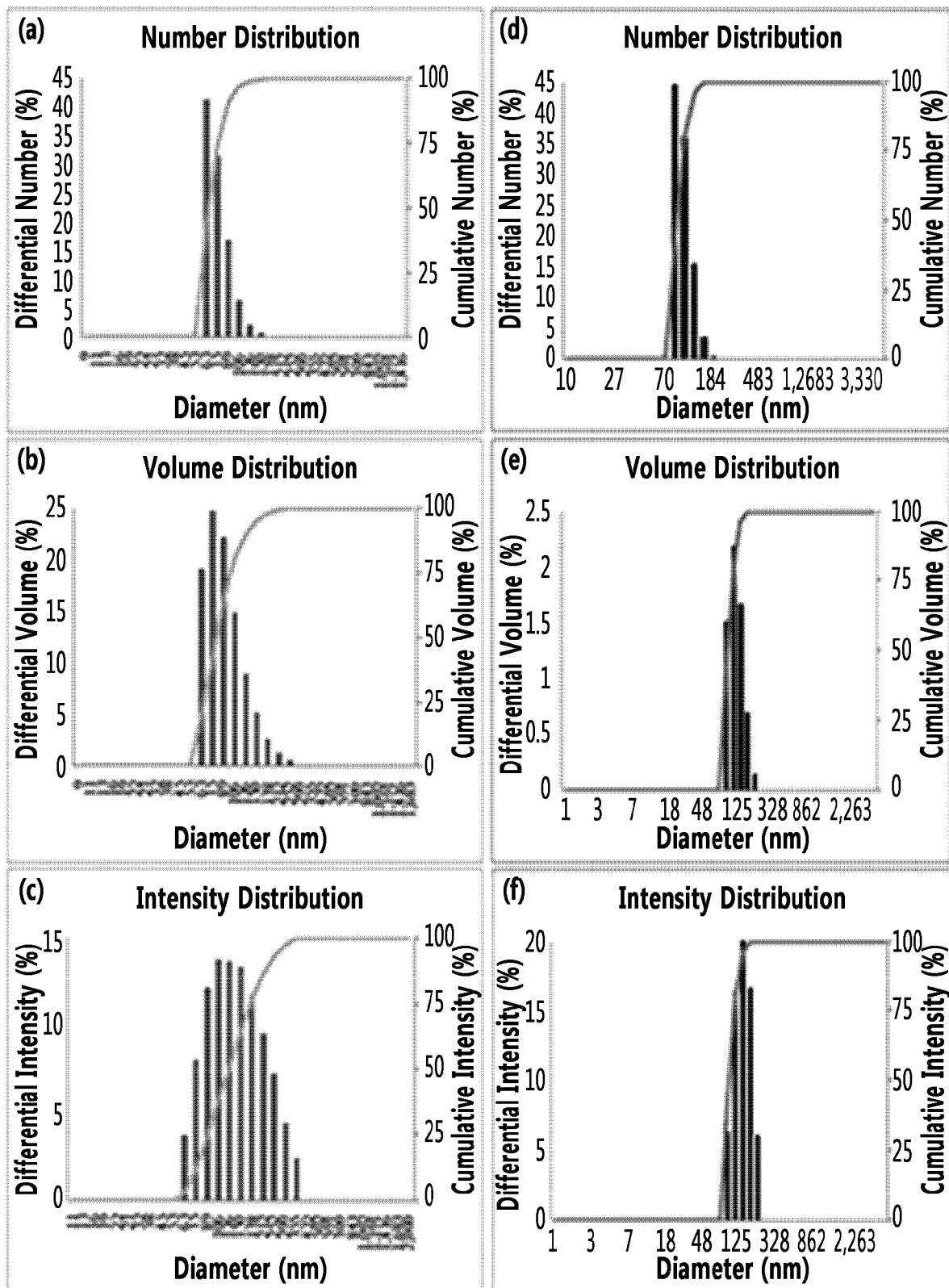
[도15]



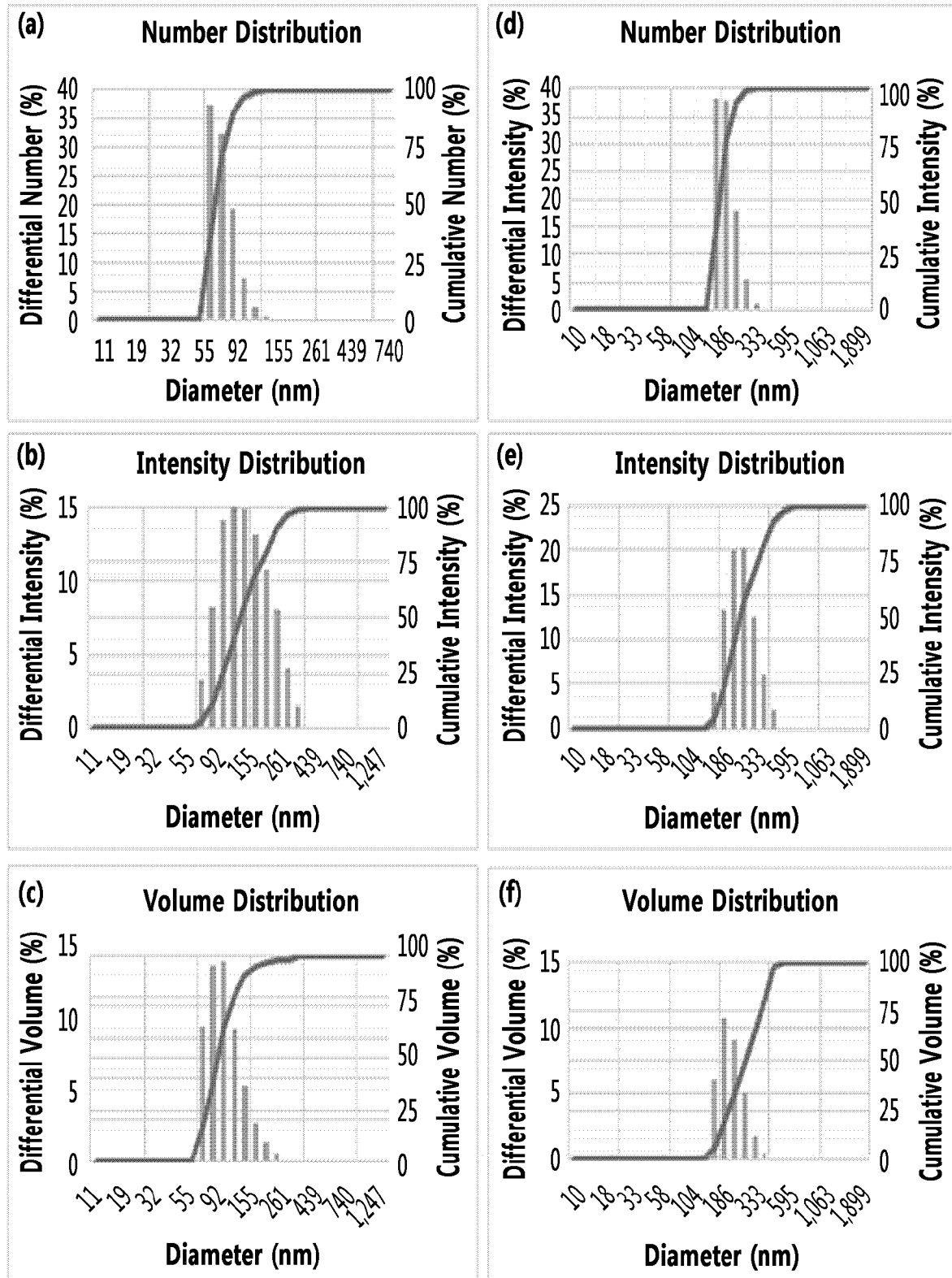
[도16]



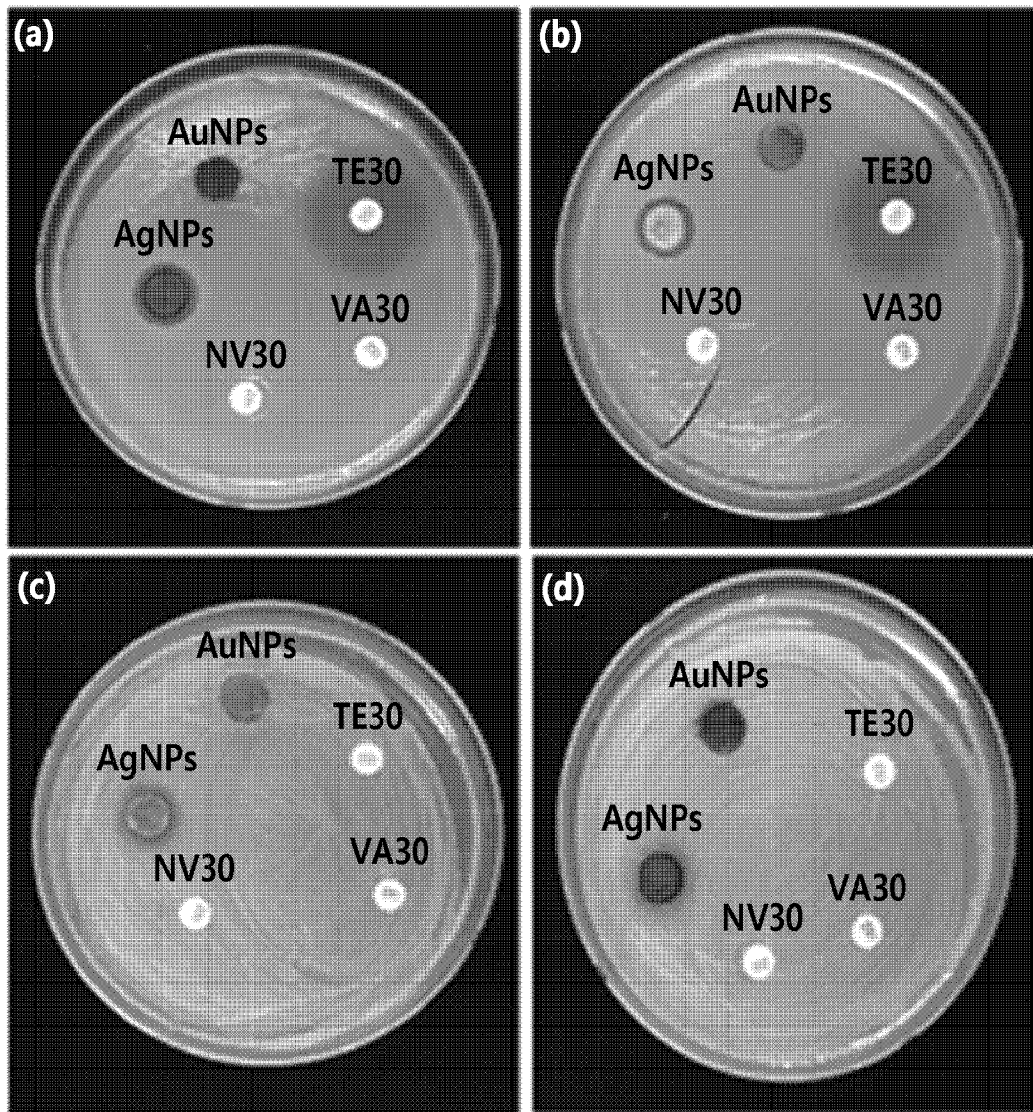
[도17]



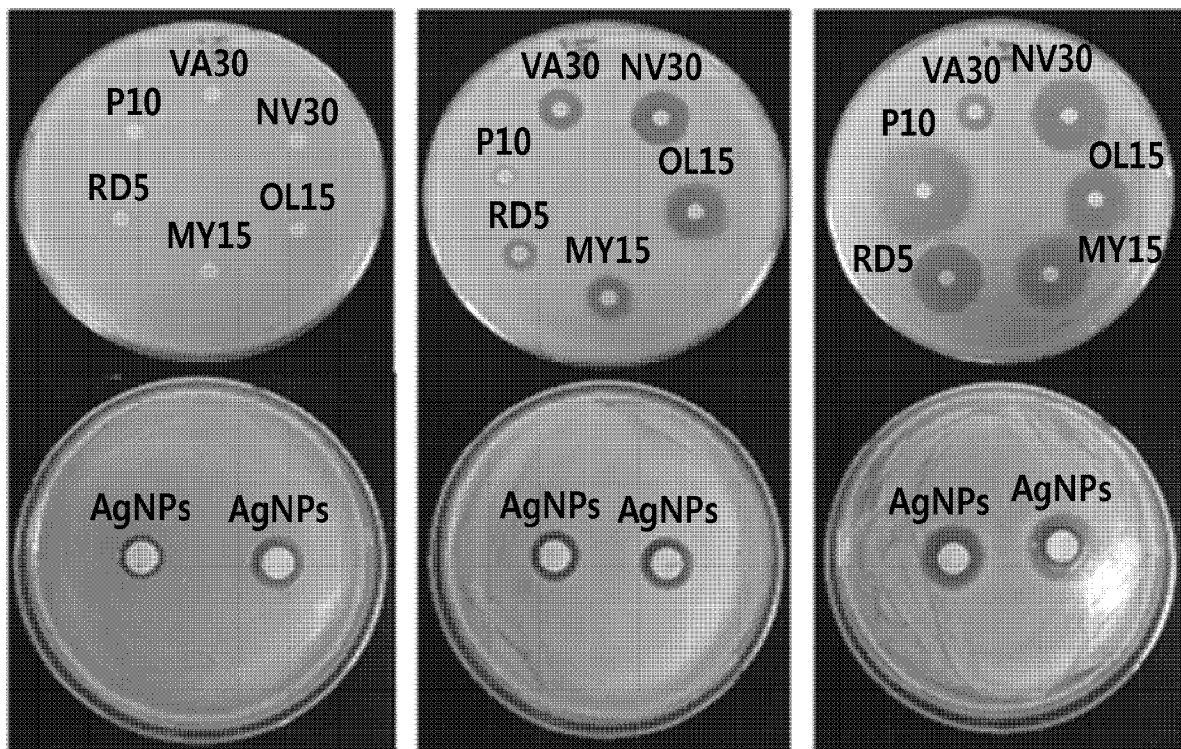
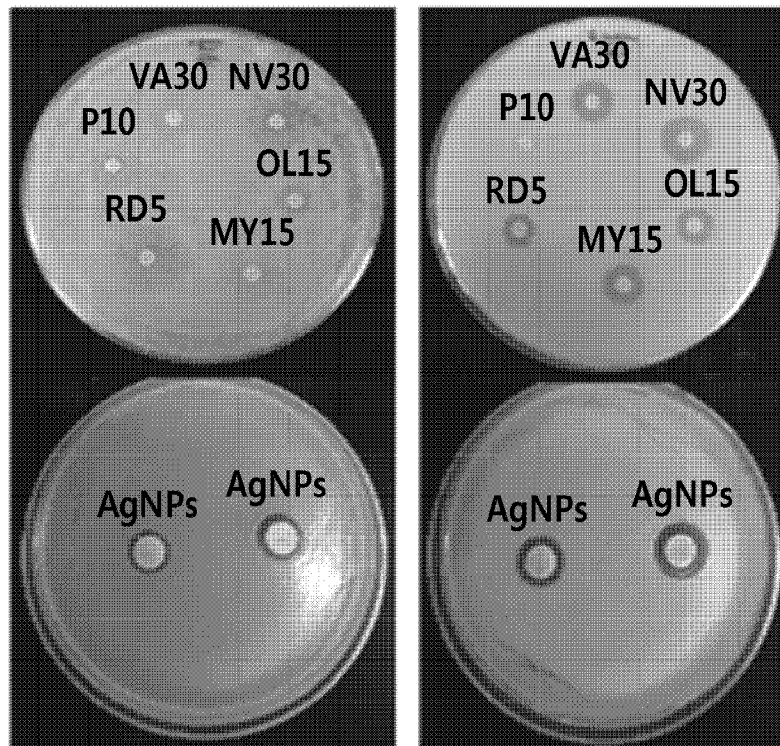
[도18]



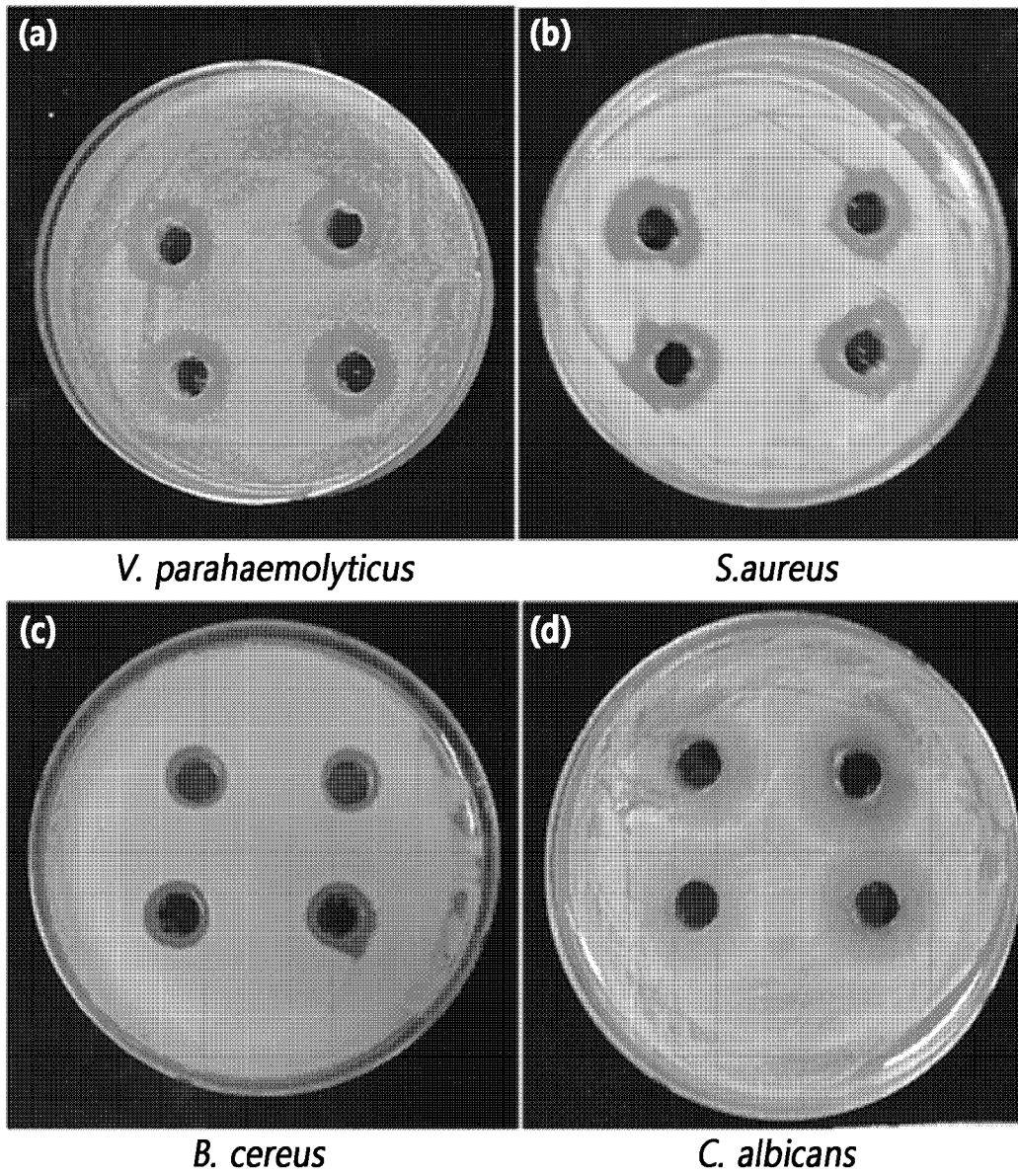
[도 19]



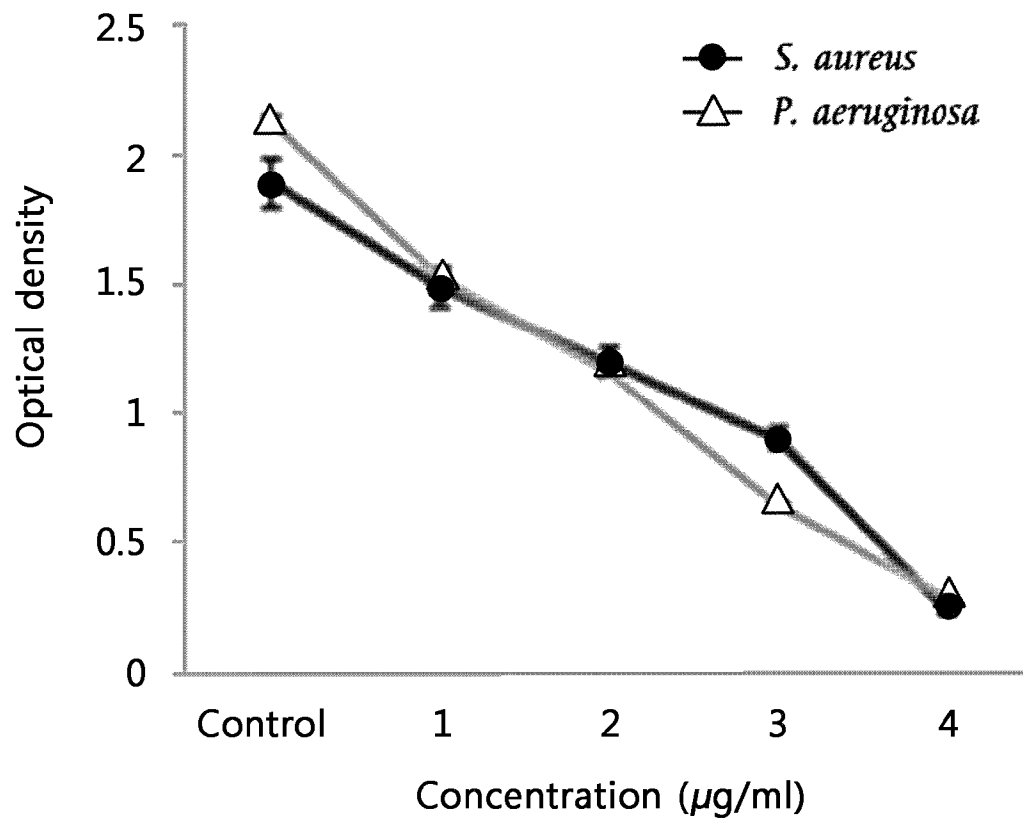
[도20]

*E. coli**B. cereus**S. aureus**V. parahaemolyticus**B. anthracis*

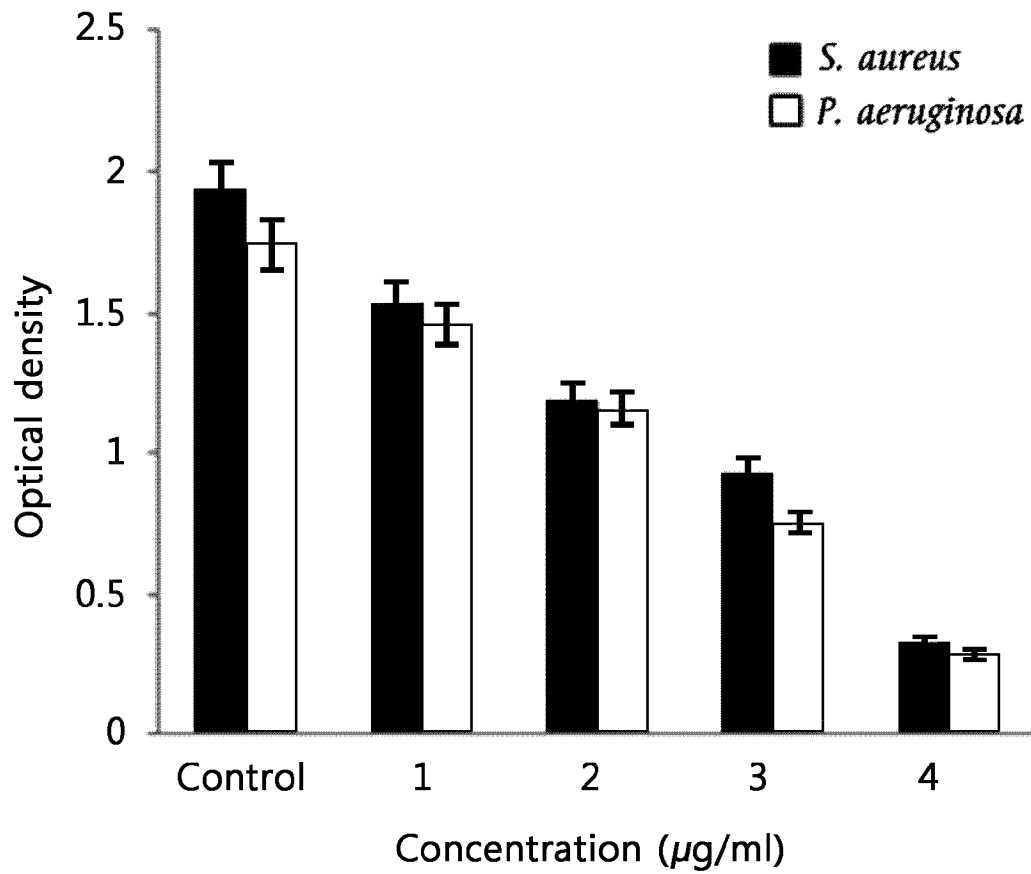
[도21]



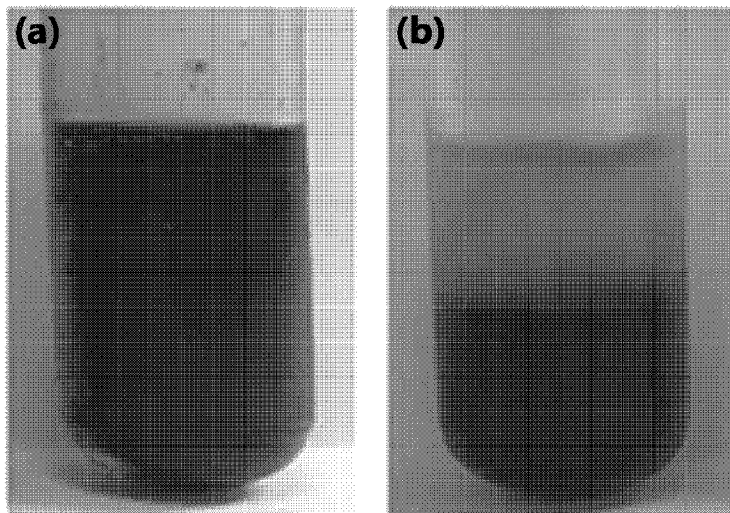
[도22]



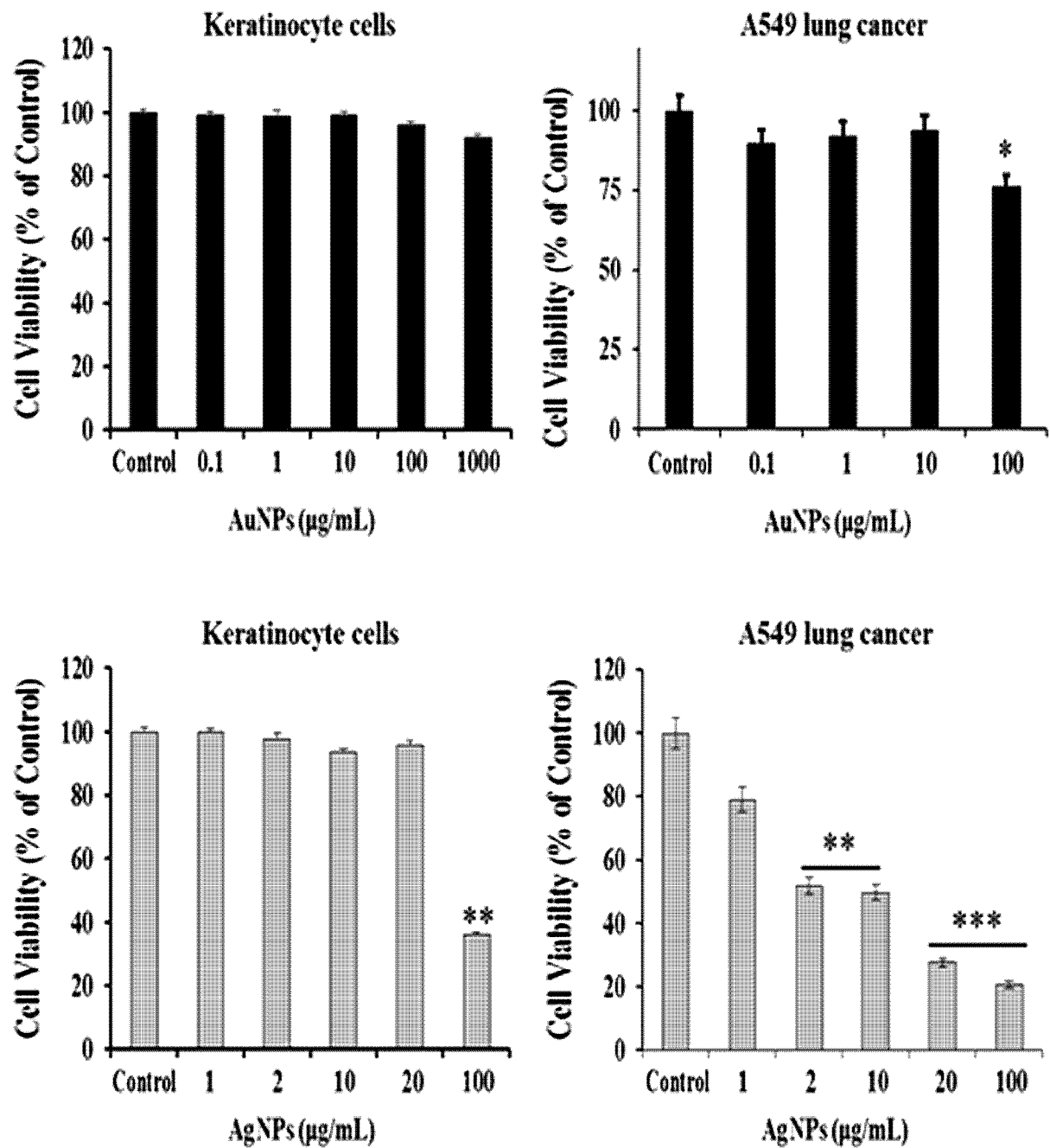
[도23]



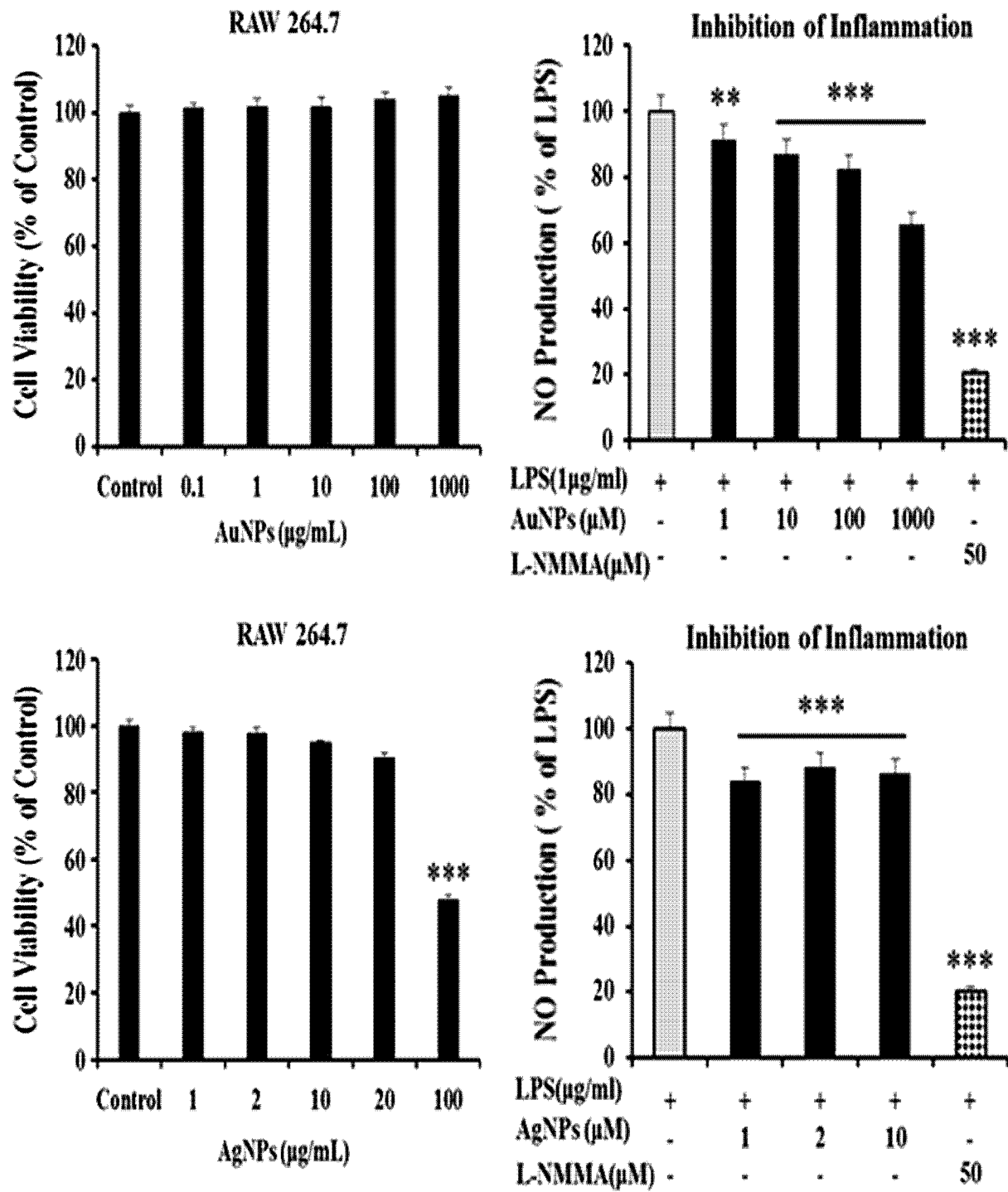
[도24]



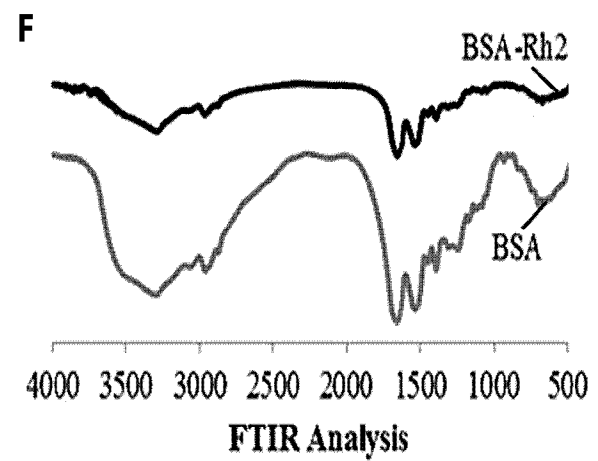
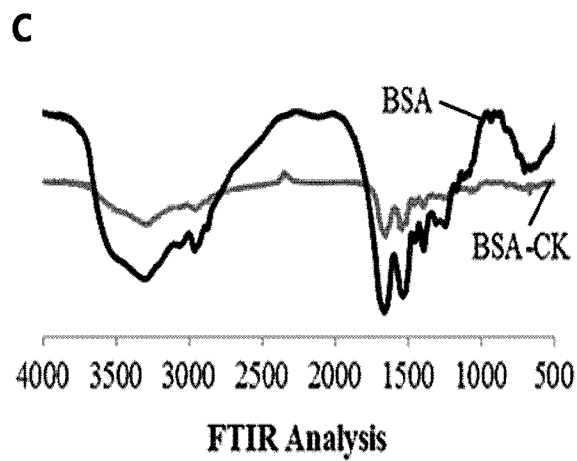
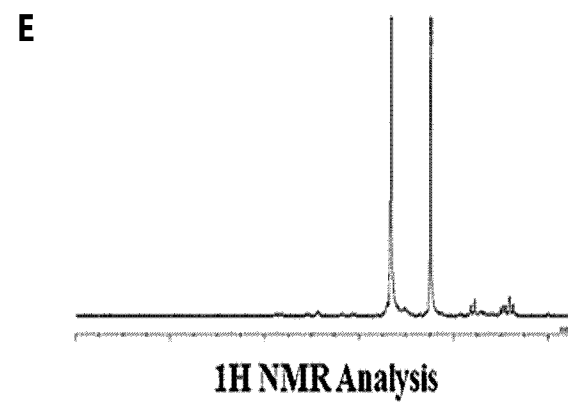
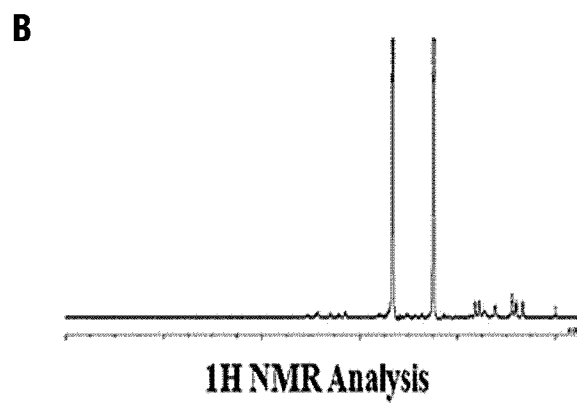
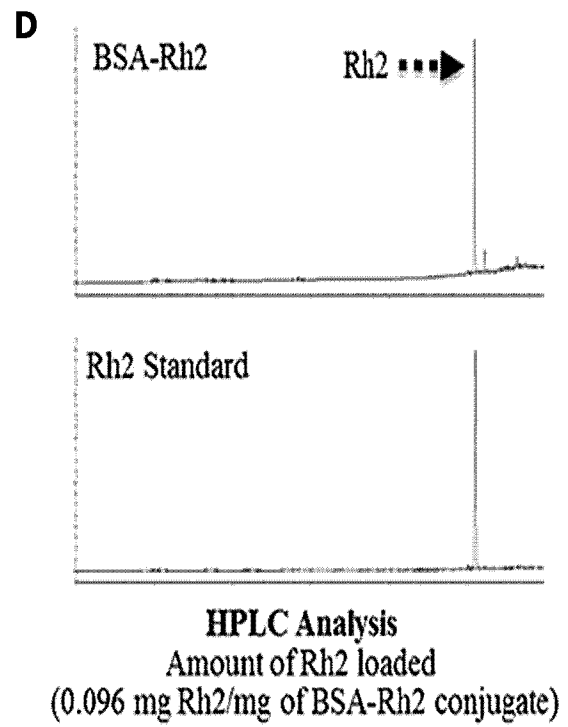
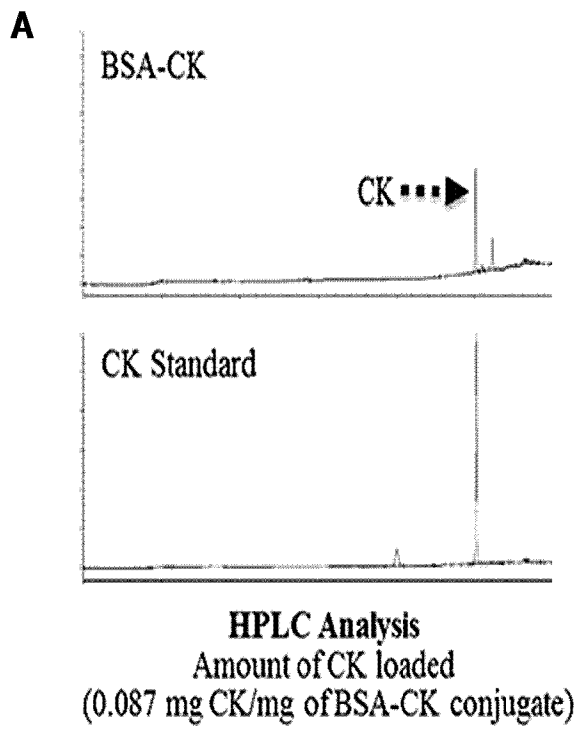
[도25]



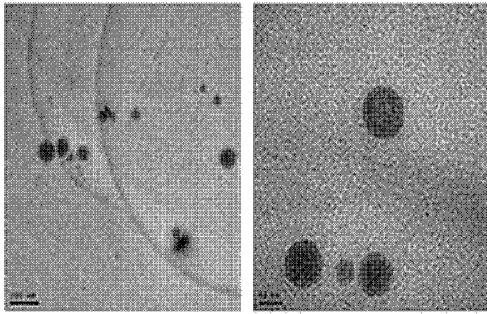
[도26]



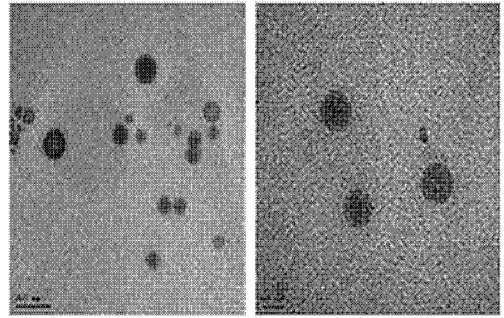
[도27]



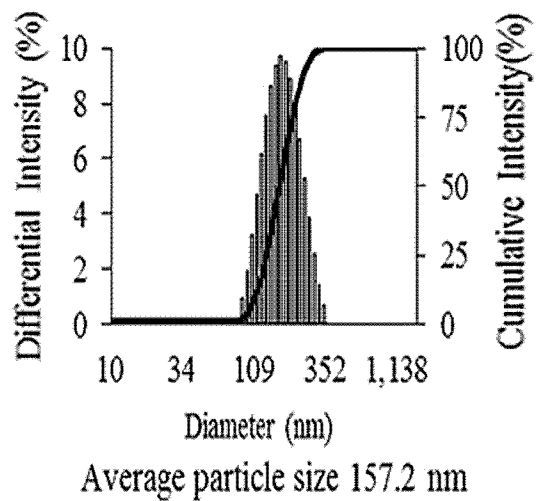
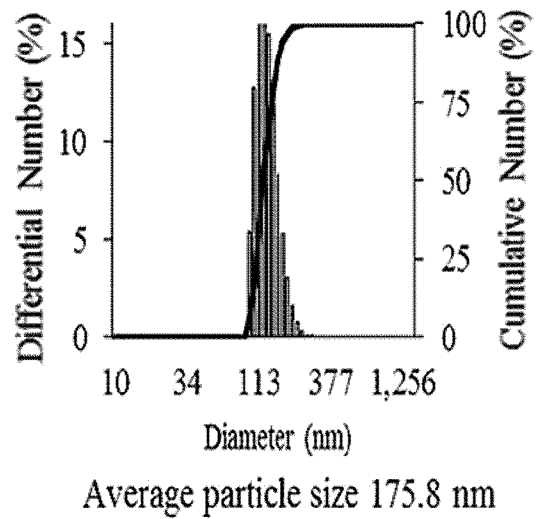
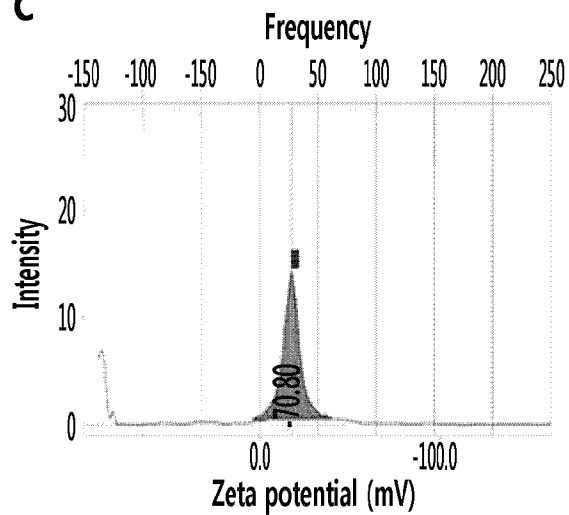
[도28]

A

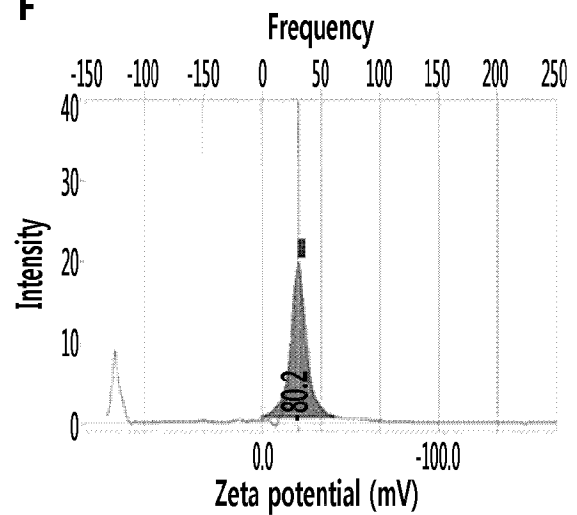
FE-TEM (Spherical particles)

D

FE-TEM (Spherical particles)

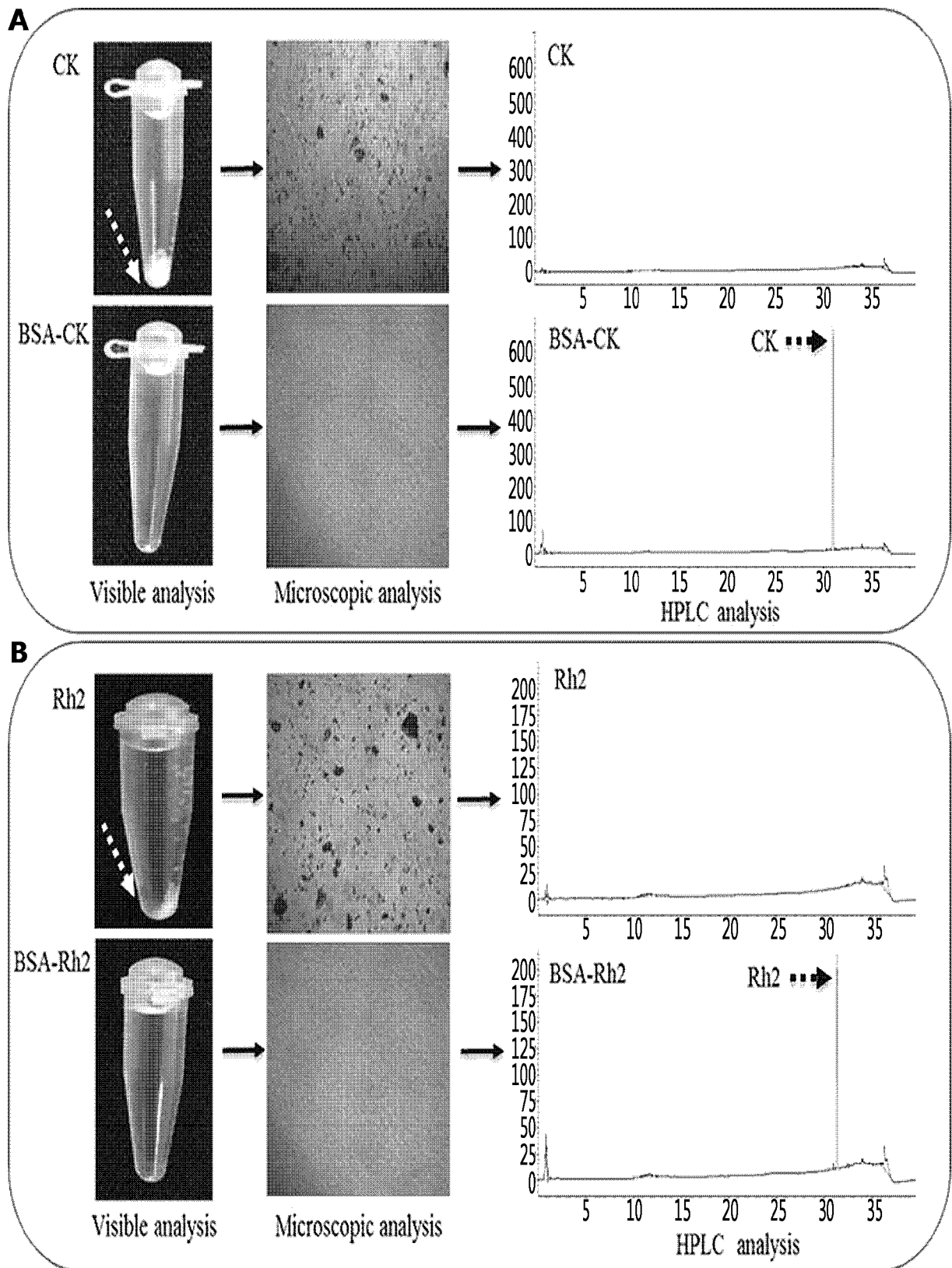
B**E****C**

Resist agglomeration (Stable particles)

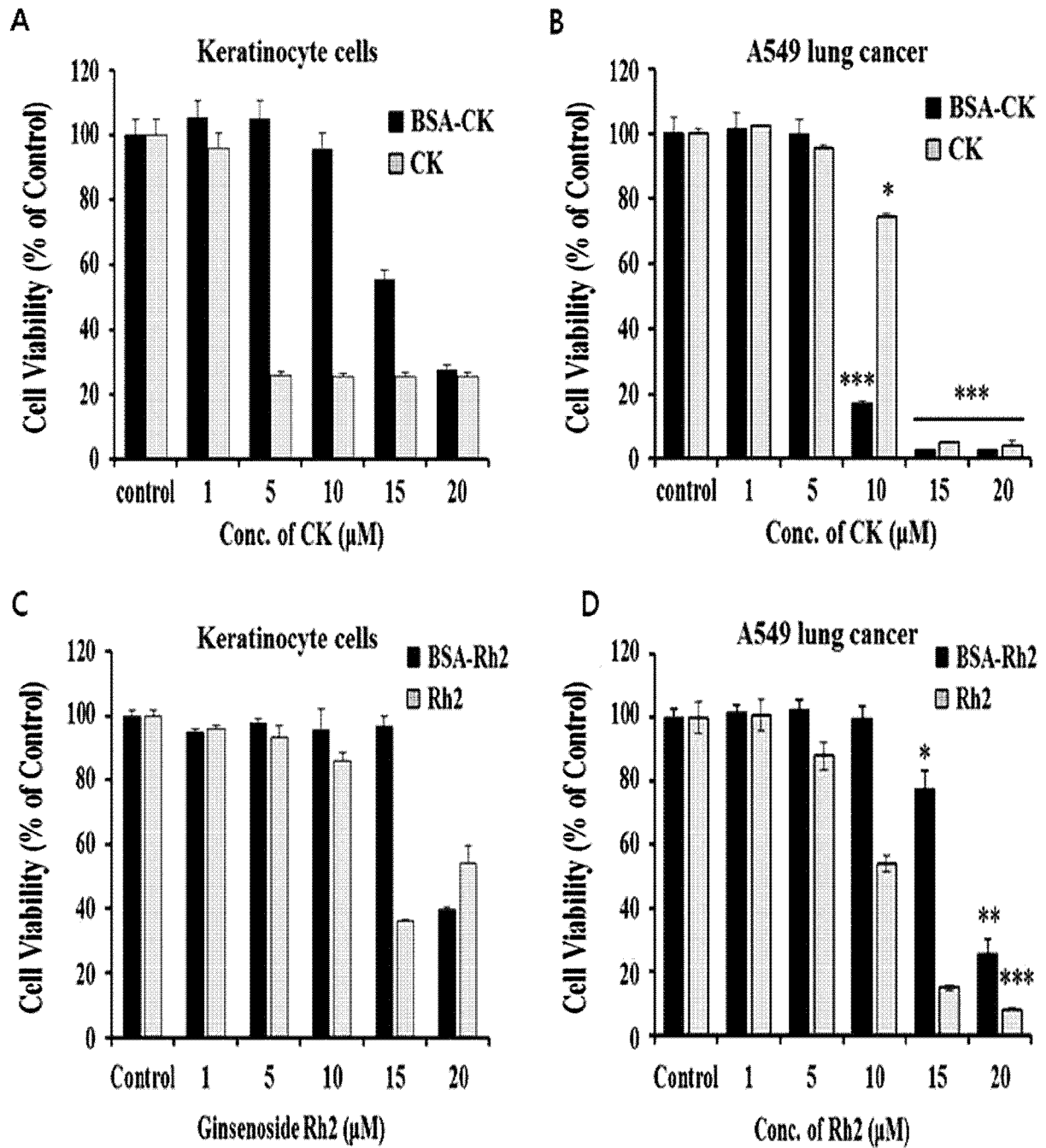
F

Resist agglomeration (Stable particles)

[도29]

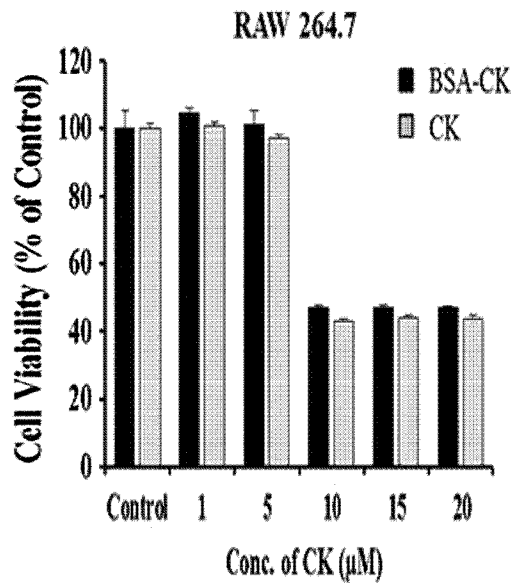


[도30]

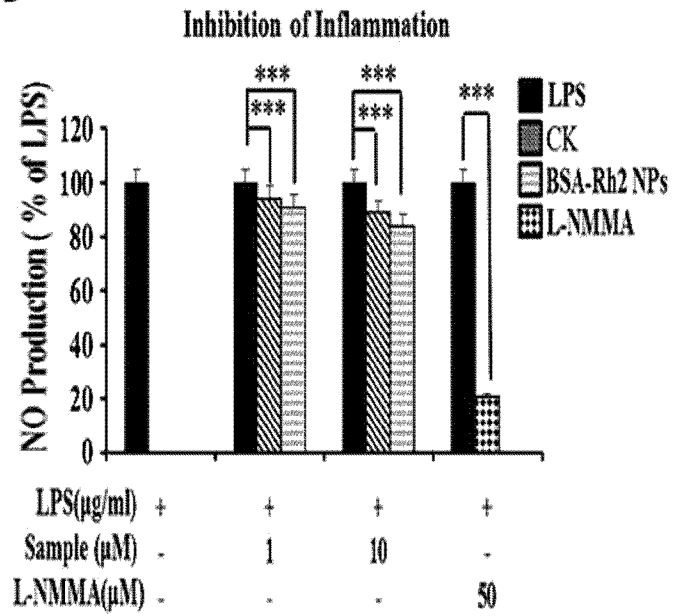


[도31]

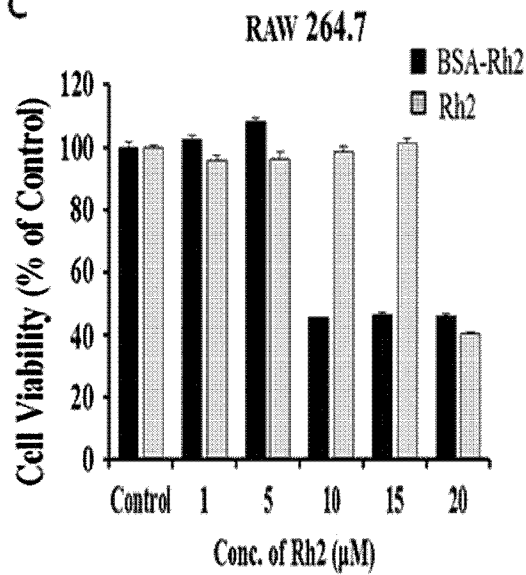
A



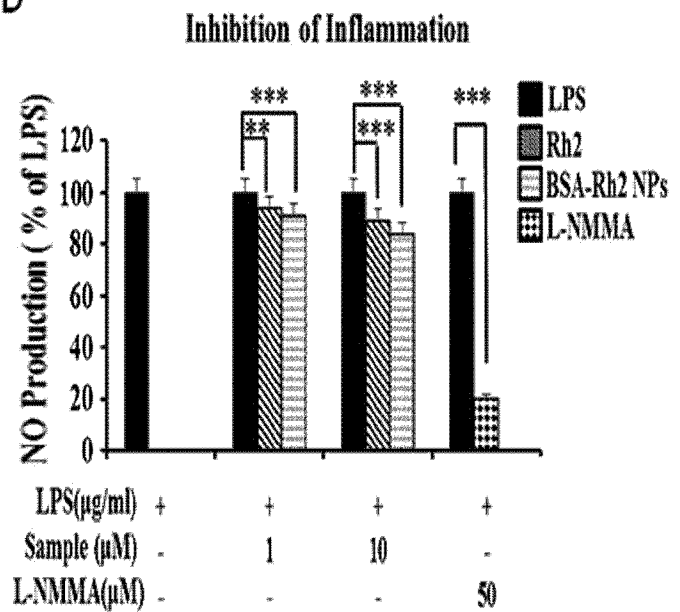
B



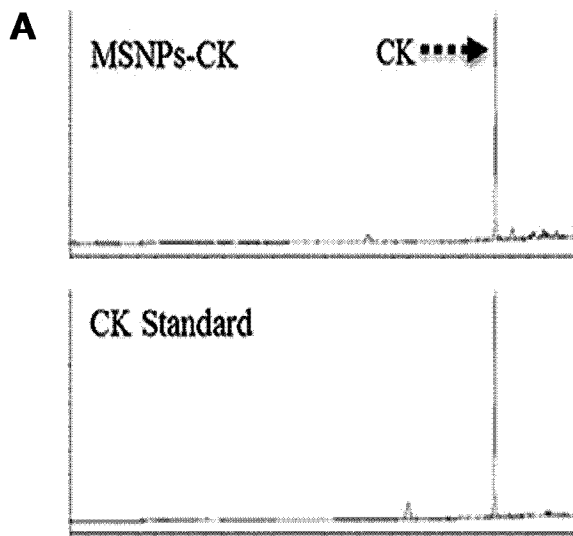
C



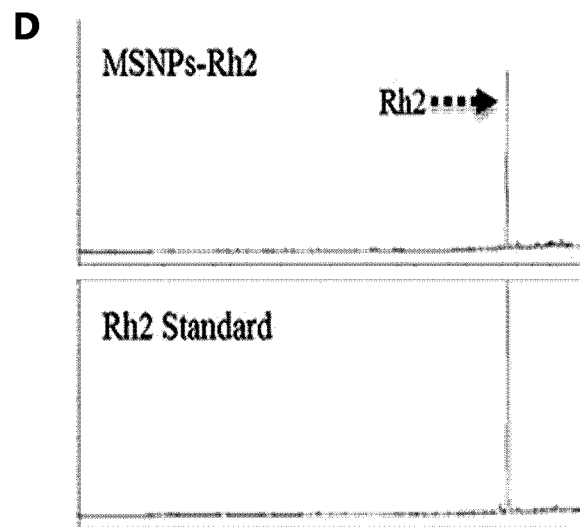
D



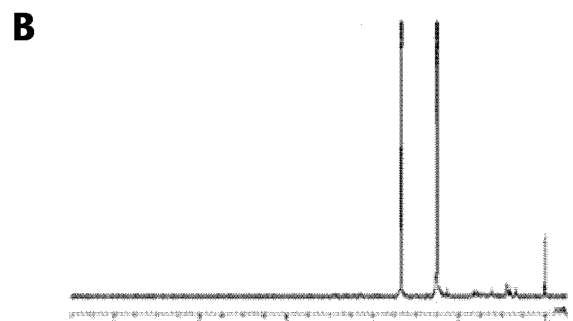
[도32]



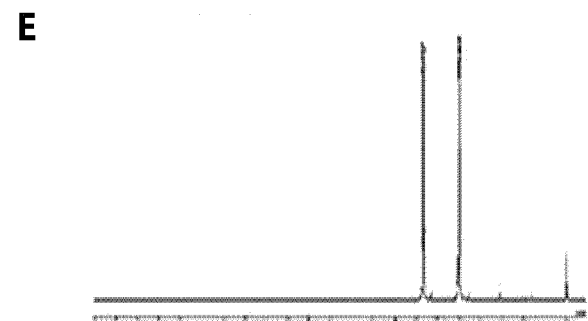
HPLC Analysis



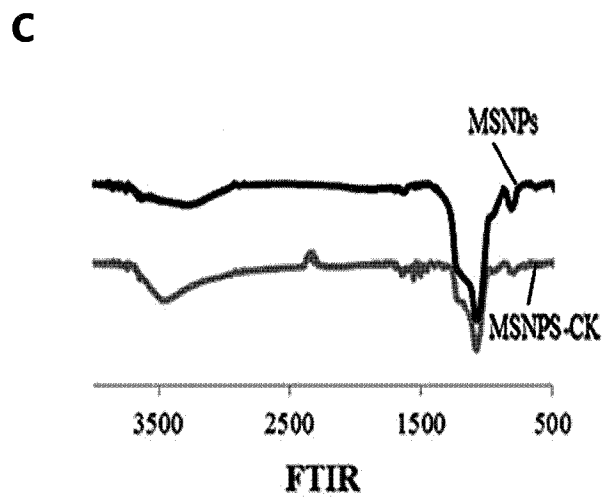
HPLC Analysis



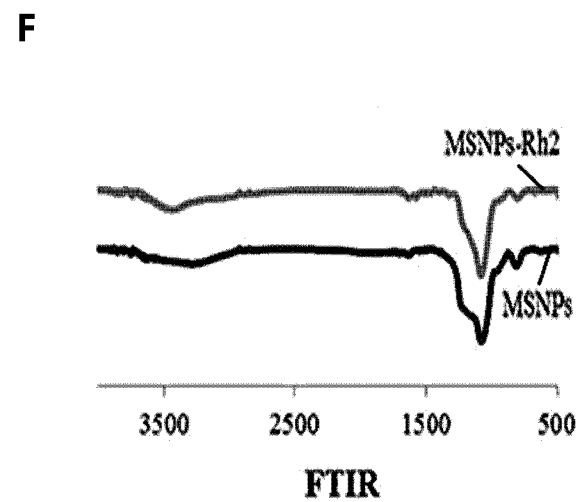
1H NMR Analysis



1H NMR Analysis

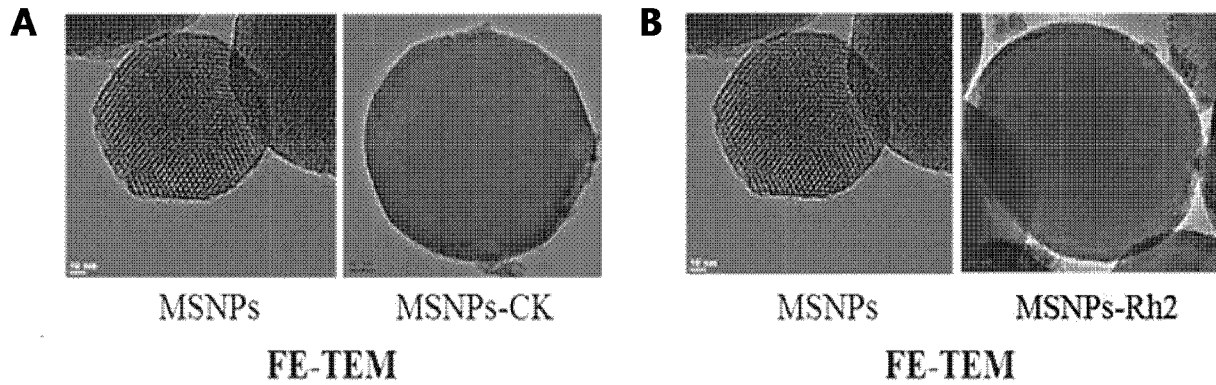


FTIR

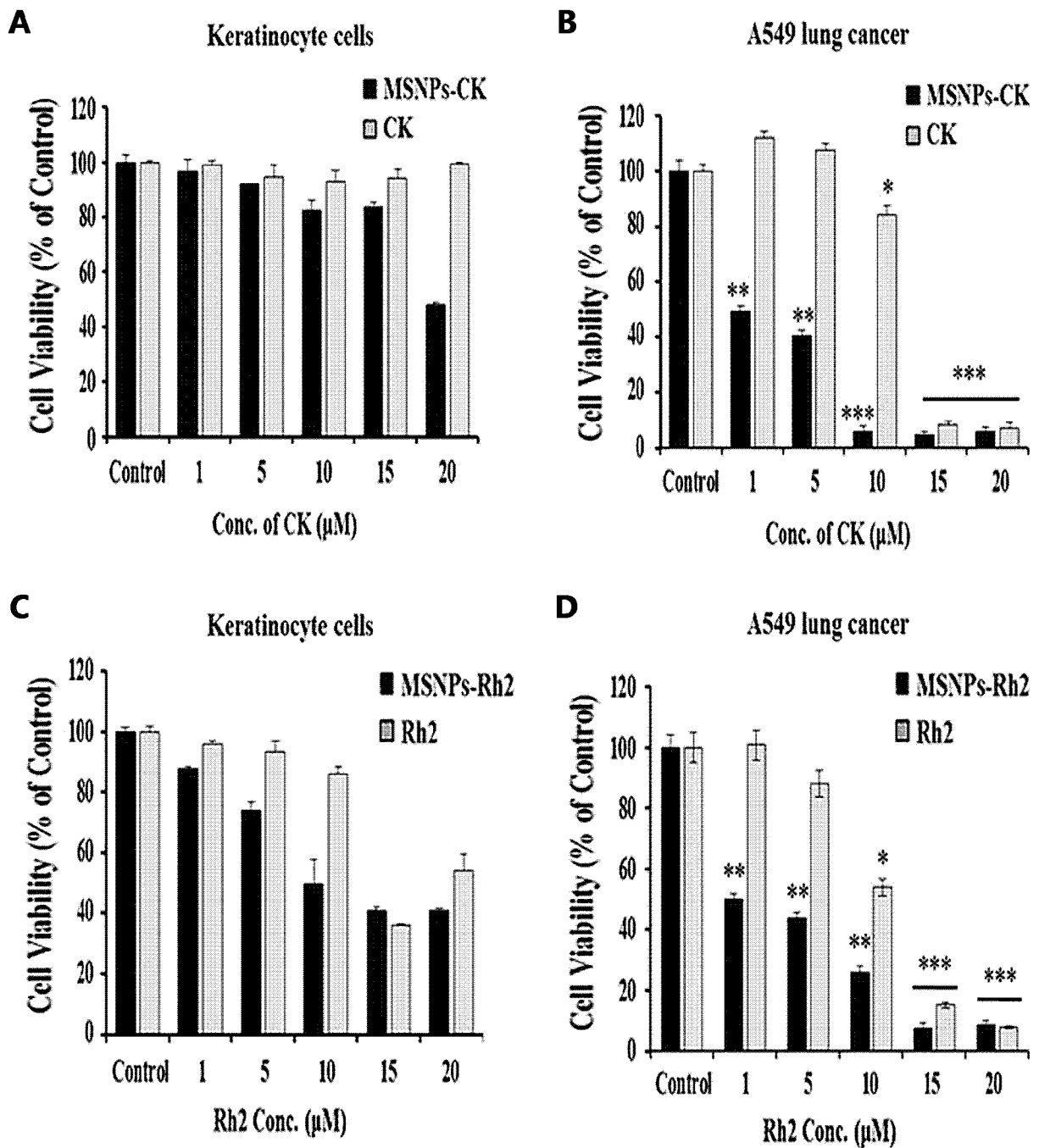


FTIR

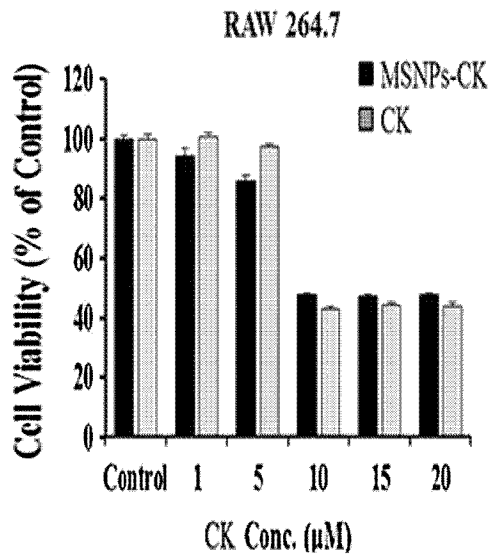
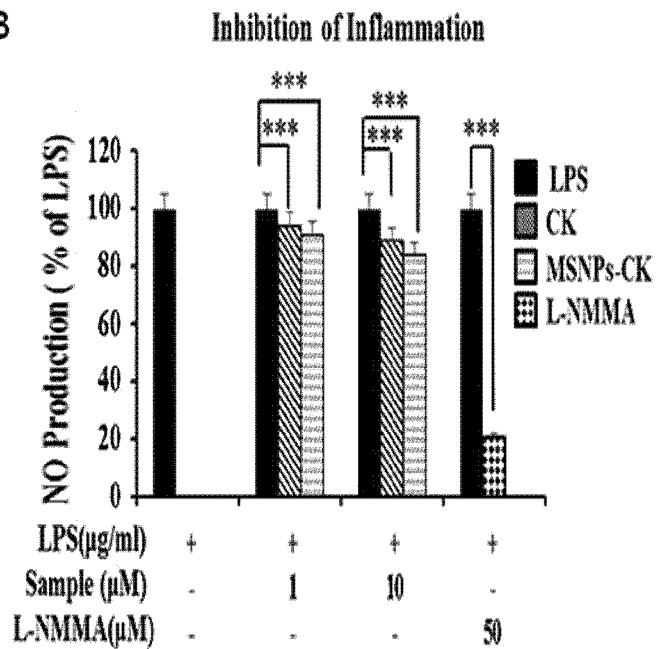
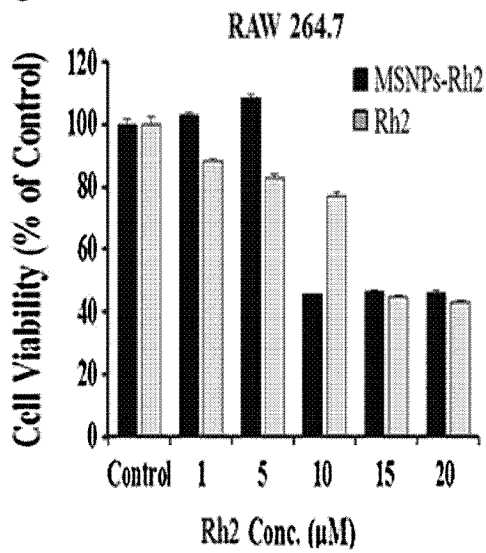
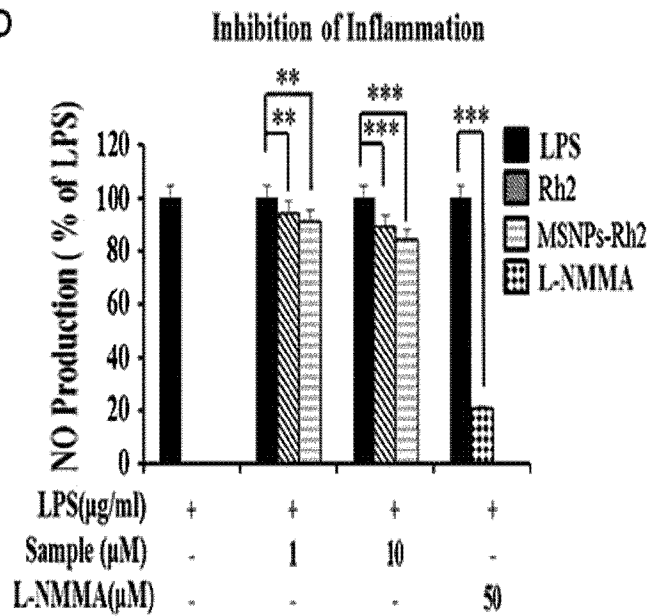
[도33]



[도34]



[도35]

A**B****C****D**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/000489

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 47/50(2017.01)i, A23L 33/10(2016.01)i, A23L 33/105(2016.01)i, A61K 31/704(2006.01)i, A61K 8/60(2006.01)i, A61K 8/63(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 47/50; A61K 9/14; A61K 31/704; A23L 33/10; A23L 33/105; A61K 8/60; A61K 8/63

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: nano composite, drug carrier, ginseng extract, ginsenoside, metal nanoparticle, BSA, mesoporous silica, cancer, inflammation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GANESAN, P. et al., "Recent Trends of Nano Bioactive Compounds from Ginseng for Its Possible Preventive Role in Chronic Disease Models", RSC Advances, 2015, vol. 5, no. 119, pages 98634-98642 See abstract; pages 98637-98638.	1-12,15-18
Y		19
Y	XU, Y. et al., "Effect of Amino Groups of Mesoporous Silica Nanoparticles on CpG Oligodeoxynucleotide Delivery", Science and Technology of Advanced Materials, 18 August 2015, vol. 16, Thesis no. 045006, pages 1-11 See abstract; paragraph [2.2].	19
X	CN 103768024 A (WUXI HEALTHCARE HOSPITAL FOR WOMEN CHILDREN) 07 May 2014 See claims 1 to 9.	1,2,4-12,15-18
A	ZHAO, Z. Z. et al., "Development of Mesoporous Silica Nanoparticle for Enhancing the Dissolution of Ginsenoside Rg3", Chinese Traditional Patent Medicine, September 2014 (Source: http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTotat-ZCYA201409010.htm) See abstract.	1-12,15-19



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 MAY 2017 (10.05.2017)

Date of mailing of the international search report

10 MAY 2017 (10.05.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/000489

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YANG, R. et al., "20 (s)-ginsenoside Rg3-loaded Magnetic Human Serum Albumin Nanospheres Applied to HeLa Cervical Cancer Cells in Vitro", Bio-medical Materials and Engineering, 2014, vol. 24, pages 1991-1998 See the entire document.	1-12,15-19
A	LEE, J. -Y. et al., "Nanocomplexes Based on Amphiphilic Hyaluronic Acid Derivative and Polyethylene Glycol-Lipid for Ginsenoside Rg3 Delivery", Journal of Pharmaceutical Sciences, 2014, vol. 103, pages 3254-3262 See the entire document.	1-12,15-19
X	SINGH, P. et al., "Biogenic Silver and Gold Nanoparticles Synthesized Using Red Ginseng Root Extract, and Their Applications", Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, 2016, vol. 44, no. 3, pages 811-816 [E-pub. 22 February 2015] See the entire document.	1-12,15-19
X	SINGH, P. et al., "The Development of a Green Approach for the Biosynthesis of Silver and Gold Nanoparticles by Using Panax Ginseng Root Extract, and Their Biological Applications", Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, 2016, vol. 44, no. 4, pages 1150-1157 [E-pub. 14 March 2015] See the entire document.	1-12,15-19
X	SINGH, P. et al., "A Strategic Approach for Rapid Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles by Panax Ginseng Leaves", Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, 2016, vol. 44, no. 8, pages 1949-1957 [E-pub. 24 December 2015] See the entire document. ※ The above documents such as SINGH, P. of the present international application pertain to a document concerning non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty.	1-12,15-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/000489

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **13, 14**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 13 and 14 pertain to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, and thus pertain to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Information on patent family members

PCT/KR2017/000489

24/02/2016

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 47/50(2017.01)i, A23L 33/10(2016.01)i, A23L 33/105(2016.01)i, A61K 31/704(2006.01)i, A61K 8/60(2006.01)i, A61K 8/63(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 47/50; A61K 9/14; A61K 31/704; A23L 33/10; A23L 33/105; A61K 8/60; A61K 8/63

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 나노 복합체, 약물 전달체, 인삼추출물, 진세노사이드, 금속 나노입자, BSA, 메조다공성 실리카, 암, 염증

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	GANESAN, P. 등, "Recent trends of nano bioactive compounds from ginseng for its possible preventive role in chronic disease models", RSC Advances, 2015, 제5권, 제119호, 페이지 98634-98642 초록; 페이지 98637-98638 참조.	1-12, 15-18
Y		19
Y	XU, Y. 등, "Effect of amino groups of mesoporous silica nanoparticles on CpG oligodeoxynucleotide delivery", Science and Technology of Advanced Materials, 2015.08.18, 제16권, 논문번호 045006, 페이지 1-11 초록; 단락 2.2 참조.	19
X	CN 103768024 A (WUXI HEALTHCARE HOSPITAL FOR WOMEN CHILDREN) 2014.05.07 청구항 1 내지 9 참조.	1, 2, 4-12, 15-18
A	ZHAO, Z. Z. 등, "Development of mesoporous silica nanoparticle for enhancing the dissolution of ginsenoside Rg3", Chinese Traditional Patent Medicine, 2014.09 (출처: http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTotat-ZCYA201409010.htm) 초록 참조.	1-12, 15-19

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2017년 05월 10일 (10.05.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 05월 10일 (10.05.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

박정민

전화번호 +82-42-481-3516



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	YANG, R. 등, "20 (s)-ginsenoside Rg3-loaded magnetic human serum albumin nanospheres applied to HeLa cervical cancer cells in vitro", Bio-medical materials and engineering, 2014, 제24권, 페이지 1991-1998 전체 문헌 참조.	1-12, 15-19
A	LEE, J.-Y. 등, "Nanocomplexes Based on Amphiphilic Hyaluronic Acid Derivative and Polyethylene Glycol-Lipid for Ginsenoside Rg3 Delivery", Journal of pharmaceutical sciences, 2014, 제103권, 페이지 3254-3262 전체 문헌 참조.	1-12, 15-19
X	SINGH, P. 등, "Biogenic silver and gold nanoparticles synthesized using red ginseng root extract, and their applications", Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology, 2016, 제44권, 제3호, 페이지 811-816 [전자공개 2015.02.23] 전체 문헌 참조.	1-12, 15-19
X	SINGH, P. 등, "The development of a green approach for the biosynthesis of silver and gold nanoparticles by using Panax ginseng root extract, and their biological applications", Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology, 2016, 제44권, 제4호, 페이지 1150-1157 [전자공개 2015.03.14] 전체 문헌 참조.	1-12, 15-19
X	SINGH, P. 등, "A strategic approach for rapid synthesis of gold and silver nanoparticles by Panax ginseng leaves", Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology, 2016, 제44권, 제8호, 페이지 1949-1957 [전자공개 2015.12.24] 전체 문헌 참조. ※상기 SINGH, P. 등의 인용문헌들은 본 국제출원의 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언서와 관련된 문헌입니다.	1-12, 15-19

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 13, 14
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 13 및 14는 수술 또는 치료에 의한 사람의 처치방법에 해당하는 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT
규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당합니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니
다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합
니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를
요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상
으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발
명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된
기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제출원번호
PCT/KR2017/000489

PCT/KR2017/000489

서식 PCT/ISA/210 (대응특허 추가용지) (2015년 1월)