



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0004008
(43) 공개일자 2024년01월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 8/02 (2006.01) A61K 8/19 (2006.01)
A61K 8/365 (2006.01) A61K 8/49 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 8/0245 (2013.01)
A61K 8/19 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0082022

(22) 출원일자 2022년07월04일
심사청구일자 2022년07월04일

(71) 출원인

인천대학교 산학협력단

인천광역시 연수구 갯벌로 27, 인천대학교 이노베이션센터(송도동)

주식회사 하이코스킨

인천광역시 서구 가좌로12번길 23 (가좌동)

(72) 발명자

황병희

인천광역시 연수구 컨벤시아대로274번길 15, 2304동 2701호(송도동, 송도 더샵 마스터뷰 23-1BL)

이재욱

인천광역시 연수구 먼우금로 123(동춘동, 동춘마을아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인이름리온

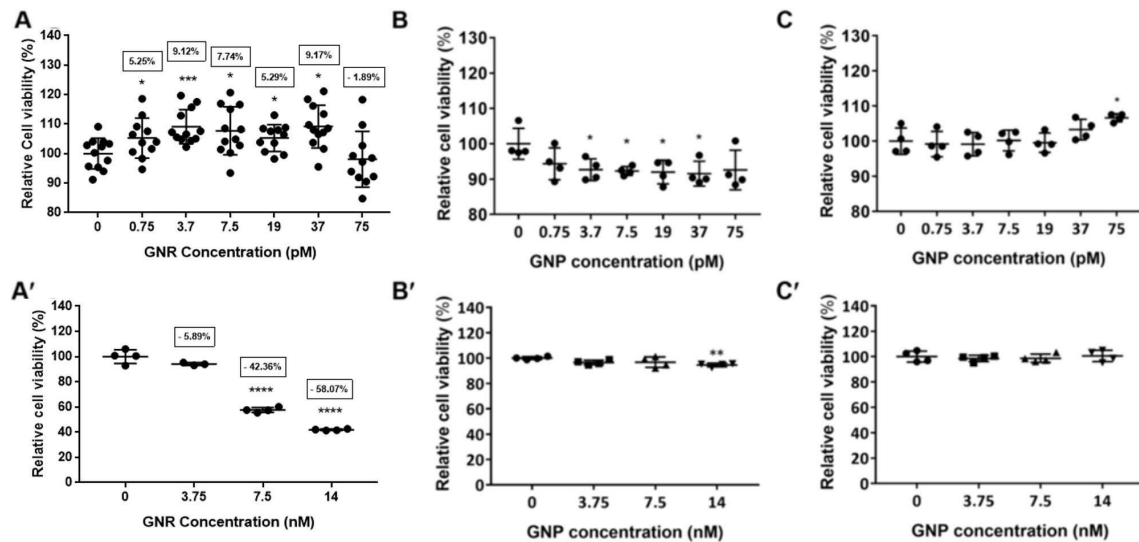
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 금나노로드 및 화장품 유효성분을 포함하는 화장료 조성물과 화장품 유효성분 전달체

(57) 요약

본 발명은 금나노로드 및 화장품 유효성분을 포함하는 화장료 조성물과 화장품 유효성분 전달체에 관한 것으로, 화장품 유효성분을 피부 섬유아세포에 적용하여 전달효율 향상 및 활성을 증가시킬 수 있다. 본 발명에 따른 화장료 조성물 및 화장품 유효성분 전달체를 이용하면 세포 증식력이 증가하며, 화장품 유효성분이 세포 내로 전달되는 효율이 높아지는 바, 다양한 화장품 유효성분으로 활용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61K 8/365 (2013.01)
A61K 8/4973 (2013.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
A61K 2800/413 (2013.01)
A61K 2800/56 (2013.01)
A61K 2800/622 (2013.01)

(72) 발명자

임두영

경기도 부천시 원종로 95, 가동 201호(원종동, 우성빌라)

윤성용

인천광역시 연수구 인천타워대로132번길 9, 롯데몰 송도캐슬파크 A동 1920호(송도동)

정의수

인천광역시 부평구 안남로 91, 201동 1505호(산곡동, 현대아파트)

류승보

인천광역시 남동구 문화서로28번길 19-13(구월동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1425154520
과제번호	S3119535 (G21S311953501)
부처명	중소벤처기업부
과제관리(전문)기관명	중소기업기술정보진흥원
연구사업명	맞춤형 기술파트너 지원사업
연구과제명	금 나노로드 매개 화장품 유효성분 피부전달 플랫폼 원천기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	인천대학교 산학협력단 공학컨설팅센터
연구기간	2021.07.01 ~ 2022.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

금나노로드 및 화장품 유효성분을 포함하는 화장료 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 금나노로드는 중형비가 3.3 내지 3.7 : 1 인 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 금나노로드는 시트르산으로 코팅된 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 금나노로드의 농도는 3.7 내지 75 pM 인 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 화장품 유효성분은 식물, 한방 혹은 해조류 추출물, 펩타이드, 푸에라린, 세라마이드, 엑소좀, 발효 복합 추출물, 펙틴, 이소프로스타노이드, 런시나트 사이드, 실크 세리신, 올리고뉴클레오티드, 히알루론산, 파라쿠마릭산, 이데베논, 레스베라트롤, 커큐민, 비스디메톡시 커큐민, 탁솔, 퀴서틴, 올레오놀산, 로베티올린, 이프리 플라본, 해조류 유래 다당류, 비타민A, B, C, D, E, F, K, 보툴리눔 독소 유래 펩타이드, 폴리페놀계, 에피갈로카테킨 갈레이트, 진세노사이드, 피루브산염, 오일, 트롬보포이에틴, 피페라진 유도체, 퀴놀린 유도체, 카지놀 A, 성장인자, 이소플라본, 콜라겐, 코노 톡신, 글리시르레틴산 유도체, 하이드록시프로필 테트라하이드로피란트리올 및 케라틴으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 1종인 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 화장품 유효성분이 하이드록시프로필 테트라하이드로피란트리올인 경우, 농도는 0.3 내지 3% (w/v) 인 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 조성물을 이용하는 경우 진피 섬유아세포의 세포 증식력이 40% 이상 증가하는 것을 특징으로 하는 화장료

조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 조성물을 처리하는 경우, 진피 섬유아세포에서의 화장품 유효성분의 전달 효율이 50% 이상 높아지는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 화장품 유효성분이 하이드록시프로필 테트라하이드로피란트리올인 경우, 보습 개선효과가 있는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 10

금나노로드 및 화장품 유효성분을 포함하는 화장품 유효성분 전달체.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 금나노로드는 종횡비가 3.3 내지 3.7 : 1 인 것을 특징으로 하는 화장품 유효성분 전달체.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 금나노로드는 시트르산으로 코팅된 것을 특징으로 하는 화장품 유효성분 전달체.

청구항 13

제10항에 있어서,

상기 금나노로드의 농도는 3.7 내지 75 pM 인 것을 특징으로 하는 화장품 유효성분 전달체.

청구항 14

제10항에 있어서,

상기 화장품 유효성분은 식물, 한방 혹은 해조류 추출물, 펩타이드, 푸에라린, 세라마이드, 엑소솜, 발효 복합 추출물, 펙틴, 이소프로스타노이드, 런시나트 사이드, 실크 세리신, 올리고뉴클레오티드, 히알루론산, 파라쿠마릭산, 이데베논, 레스베라트롤, 커큐민, 비스디메톡시 커큐민, 탁솔, 퀴서틴, 올레오놀산, 로베티올린, 이프리플라본, 해조류 유래 다당류, 비타민A, B, C, D, E, F, K, 보툴리눔 독소 유래 펩타이드, 폴리페놀계, 에피갈로카테킨 갈레이트, 진세노사이드, 피루브산염, 오일, 트롬보포이에틴, 피페라진 유도체, 퀴놀린 유도체, 카지놀 A, 성장인자, 이소플라본, 콜라겐, 코노 톡신, 글리시르레틴산 유도체, 하이드록시프로필 테트라하이드로피란트리올 및 케라틴으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 1종인 것을 특징으로 하는 화장품 유효성분 전달체.

청구항 15

제10항에 있어서,

상기 화장품 유효성분이 하이드록시프로필 테트라하이드로피란트리올인 경우, 농도는 0.3 내지 3% (w/v) 인 것을 특징으로 하는 화장품 유효성분 전달체.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 본 발명은 금나노로드 및 화장품 유효성분을 포함하는 화장료 조성물과 화장품 유효성분 전달체에 관한 것으로, 화장품 유효성분을 피부 섬유아세포에 전달효율 향상 및 활성 증가시킬 수 있는 기술에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 나노기술의 발달로 이전에는 불가능했던 나노크기의 물질을 합성, 분석, 활용하는 것이 가능해졌다. 그 결과 나노 크기의 재료는 매크로 크기의 재료에서 볼 수 없는 수많은 고유한 특성을 보여 인류를 새로운 가능성의 세계로 이끌었다. 현재 나노기술은 바이오센서, 바이오소재, 치료제, 약물전달과 같은 바이오 분야뿐만 아니라, 신재생에너지, 화장품, 식품, 환경분야에 널리 이용되고 있다. 그러나 신소재는 가능성과 위험성을 동시에 내포하고 있기 때문에 나노소재의 위험성을 정확히 분석하고 안전하게 사용하는 것이 중요하다. 대표적인 나노크기 물질인 나노입자는 100 nm 미만이며 다양한 구, 막대, 껍질, 케이지로 합성할 수 있다. 또한, 금 나노 입자(Gold Nano Particle, GNP)는 물리적 매개변수(모양, 크기, 중형비 등) 및 화학적 조성에 따라 세포에 다르게 영향을 미친다. 예를 들어, RAW264.7 세포에서 GNP는 gold nanotriangle, gold nanorod(GNR), gold star의 순서로 높은 세포 흡수를 보였다. 반면, HEK293T 세포에서는 gold nanoprism과 gold nanostar가 300 μ M 이하 농도에서 세포독성을 유도하지 않았다. 대조적으로 GNS(gold nanosphere)와 GNR은 농도가 증가함에 따라 세포독성을 유도하였다. 또한, 50 nm의 GNS는 HeLa 세포에 대한 가장 높은 세포 흡수를 나타냈다. 또한 중형비가 증가함에 따라 GNR의 세포 흡수가 억제되었다는 종래의 연구도 존재한다. 따라서 물리적 매개변수와 화학적 조성을 제어하는 GNP의 비교 연구는 매우 중요하다.

[0004] 또한 GNP는 생체영상, 약물전달, 광열치료 등의 형태로 응용되고 있다. GNR을 사용한 이전 연구에서는 광열 요법, 진단용 조영제, GNR 표면 고정, 생물 독성 및 항균 효과의 가능성을 확인하였다. 대부분의 GNR 연구는 세포 성장을 억제하는 데 사용되었다. 암 치료 연구에서는 세포 내 활성산소종(ROS)을 증가시켜 세포자멸사를 유도하는 것으로 나타났다. 드문 경우지만 GNR은 세포 성장을 촉진하는 것으로 밝혀졌으나, 세포 증식이 촉진되는 이유에 대해서는 설명되지 않았다.

[0005] 대한민국 등록특허공보 제10-2151740호에는 금나노로드 및 이산화티타늄을 함유하는 근적외선 및 열 차단용 화장료 조성물에 대하여 개시하고 있으나, 세포 증식력 및 화장품 유효성분 전달에 대해 개시된 바는 없다.

[0006] 따라서, 본 발명자들은 GNP의 모양 및 농도에 의한 세포 증식력을 측정하고, 최적의 농도와 적용 가능한 세포의 종류를 밝혀냄으로서, 화장료 조성물에 이용가능한 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용**해결하려는 과제**

[0008] 이에, 본 발명자들은 GNP 모양 및 농도에 따른 세포 증식력을 최적화하고, 세포 전달 효율을 평가하여, 이를 화장료 조성물로 이용하고자 하는 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 금나노로드 및 화장품 유효성분을 포함하는 화장료 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또다른 목적은 나노로드 및 화장품 유효성분을 포함하는 화장품 유효성분 전달체를 제공하는 것이다.

[0011] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또

다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 금나노로드 및 화장품 유효성분을 포함하는 화장료 조성물을 제공한다.
- [0014] 일실시예에 있어서, 상기 금나노로드는 중형비가 3.3 내지 3.7 : 1 일 수 있다.
- [0015] 일실시예에 있어서, 상기 금나노로드는 시트르산으로 코팅된 것일 수 있다.
- [0016] 일실시예에 있어서, 상기 금나노로드의 농도는 3.7 내지 75 pM 일 수 있다.
- [0017] 일실시예에 있어서, 상기 화장품 유효성분은 식물, 한방 혹은 해조류 추출물, 펩타이드, 푸에라린, 세라마이드, 엑소좀, 발효 복합추출물, 팩틴, 이소프로스타노이드, 런시나트 사이드, 실크 세리신, 올리고뉴클레오타이드, 히알루론산, 파라쿠마릭산, 이데베논, 레스베라트롤, 커큐민, 비스디메톡시 커큐민, 탁솔, 퀴서틴, 올레오놀산, 로베티올린, 이프리플라본, 해조류 유래 다당류, 비타민A, B, C, D, E, F, K, 보툴리눔 독소 유래 펩타이드, 폴리페놀계, 에피갈 로카테킨 갈레이트, 진세노사이드, 피루브산염, 오일, 트롬보포이에틴, 피페라진 유도체, 퀴놀린 유도체, 카지놀 A, 성장인자, 이소플라본, 콜라겐, 코노 독신, 글리시르레틴산 유도체, 하이드록시프로필 테트라하이드로피란트리올 및 케라틴으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 1종인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0018] 일실시예에 있어서, 상기 화장품 유효성분이 하이드록시프로필 테트라하이드로피란트리올인 경우, 농도는 0.3 내지 3% (w/v) 일 수 있다.
- [0019] 일실시예에 있어서, 상기 조성물을 이용하는 경우 진피 섬유아세포의 세포 증식력이 40% 이상 증가하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0020] 일실시예에 있어서, 상기 조성물을 처리하는 경우, 진피 섬유아세포에서의 화장품 유효성분의 전달 효율이 50% 이상 높아지는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0021] 일실시예에 있어서, 상기 화장품 유효성분이 하이드록시프로필 테트라하이드로피란트리올인 경우, 보습 개선효과가 있는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0022] 본 발명은 또한, 금나노로드 및 화장품 유효성분을 포함하는 화장품 유효성분 전달체를 제공한다.

발명의 효과

- [0024] 본 발명에 따른 화장료 조성물 및 화장품 유효성분 전달체를 이용하면 세포 증식력이 증가하며, 화장품 유효성분이 세포 내로 전달되는 효율이 높아지는 바, 다양한 화장품 유효성분으로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0026] 도 1은 금 나노 입자의 투과 전자 현미경(TEM) 이미지를 나타낸다. 금 나노로드(GNR)의 TEM 이미지는 (A) 94,000X 및 (B) 245,000X 배율에서 촬영되었다. GNR의 평균 길이는 34.5 ± 5.3 nm이고 평균 너비는 10.1 ± 1.6 nm이다. (C) 10 nm 금 나노구(GNS)의 TEM 이미지를 1,050,000배 배율로 촬영했다. (D) 60 nm GNS의 TEM 이미지는 94,000X 배율로 촬영되었다. 10 및 60 nm의 GNS는 각각 약 10 nm 및 60 nm 구체를 보였다.

도 2는 금 나노 입자에 노출된 후 인간 신생아 진피 섬유아세포에서 세포 내 활성 산소 종(ROS) 수준의 형광 세포 분석결과를 나타낸다. (A) 금 나노로드, (B) 10 nm 금 나노구(GNS) 및 (C) 60 nm GNS에 노출된 상태에서 계산되었다. 왼쪽, 중간 및 오른쪽 그래프는 각각 0, 19 pM 및 7.5 nM의 서로 다른 농도에서 실험을 나타낸다. (D) 형광 이미지는 100X 배율에서 형광 현미경을 사용하여 촬영되었다. 스케일 바는 100 μ m를 나타낸다.

도 3은 다양한 농도의 금 나노입자(GNP)에 노출된 후 인간 신생아 진피 섬유아세포(HDFn)의 상대적 세포 증식률을 나타낸다. 상대 세포 증식률 그래프는 (A 및 A') 금 나노로드(GNR), (B 및 B') 10 nm 금 나노구(GNS), (C 및 C') 60 nm 금 나노구(GNS)의 피코몰 및 나노몰 농도이며, 프라임 기호가 나노몰 농도에서 결과를 의미한다. 상대 세포 증식은 GNR이 없는 세포의 평균 $\pm$ 표준 편차로 나눈 값으로 표시되었다.

도 4는 HeLa 세포에서 (A) 24시간 동안 다양한 금 나노로드(GNR) 농도에 노출된 후 측정된 상대적인 세포 증식률이며(n = 3), (B) 다른 H₂O₂ 농도에 노출된 후 측정된 상대적인 세포 증식률이다(n = 4).

도 5는 (A) 다양한 H₂O₂ 농도에 24시간 동안 노출된 후 WST-1 분석을 사용하여 측정된 인간 신생아 진피 섬유아 세포의 상대적 세포 증식률이다. 상대 세포 증식률은 평균 ± 표준 편차를 세포만의 것으로 나눈 값으로 나타내었다. (B)는 금 나노로드에 의해 촉진되는 세포 증식의 제안된 생물학적 메커니즘을 나타낸다.

도 6은 프로자일렌 전달 후 세포 증식력 결과를 나타낸다 (n = 4, Independent repeats).

도 7은 (A) 금 나노로드 매개 프로자일렌 전달 후 세포 증식력 결과 (n = 11), (B)는 DNA 기능화 금 나노로드 매개 프로자일렌 전달 후 세포 증식력 결과 (n = 3)를 나타낸다.

도 8은 금 나노로드에 의한 세포 전달 효율 분석 결과(n = 5)를 나타낸다.

도 9는 GAG ELISA를 이용한 GAG 발현 정량 결과(n = 3)를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 전술한 바와 같이, 본 발명에서는 금나노입자를 매개로 한 화장품 유효성분의 고효율 전달을 위하여 모양과 농도 의존적 효과에 따라 세포 증식력을 최적화하고, 세포 전달 효율을 평가하였다. 구체적으로, 금나노로드의 크기와 종횡비를 확인하였으며(도 1), 세포내 ROS 수준과 세포 증식률은 피코몰 및 나노몰 농도의 GNR, 10-nm 및 60-nm GNS에서 측정하였다(도 2 및 도 3). H₂O₂ 노출 실험은 농도 의존적 ROS가 세포 증식력을 촉진하거나 감소시키는지를 증명하기 위해 수행하였다(도 4 및 도5). 이를 화장품 유효성분 전달에 이용하고자 프로자일렌(Hydroxypropyl tetrahydropyrantriol, 이하 '하이드록시프로필 테트라하이드로피란트리올')의 농도를 최적화하고, 세포 증식력 및 전달효율을 분석하여 본 발명을 완성하였다.

[0028] 따라서, 본 발명은 금나노로드 및 화장품 유효성분을 포함하는 화장료 조성물을 제공한다.

[0029] 본 발명의 화장료 조성물에는 금나노로드 및 화장품 유효성분 이외에도 통상적으로 사용되는 화장료를 추가로 함유할 수 있는데, 예를 들면 수용성 스킨제제화를 위하여 글리세롤, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸렌글리콜, 솔비톨, 폴리에틸렌글리콜, 카르복시비닐 폴리머, 잔탄검, 카르복시메틸셀룰로오스, 하이드록시에틸셀룰로오스, 하이드록시메틸셀룰로오스, 로커스트빈검, 알란토인, 카라기난 등을 첨가할 수 있으며; 점도와 경도조절제로 밀납, 파라핀 왁스, 스테아릴 알콜, 카르나우바 왁스, 칸테릴라 왁스 및 칼슘스테아레이트, 알루미늄스테아레이트, 아연스테아레이트, 위치하젤(witchhazel) 등을 사용할 수 있고; 자외선 흡수제로 부틸메톡시디벤조일메탄, 옥틸메톡시신나메이트 등을 사용할 수 있으며; 안료로는 이산화티탄, 미립자 이산화티탄, 카올린, 나이론파우더, 탈크, 세리사이트, 마이카, 폴리메틸메타크릴레이트 등의 체질 안료와 황색산화철, 흑색산화철, 적색산화철, 울트라마린, 산화크롬, 수산화 크롬 등의 착색안료를 사용할 수 있고; 보습제로 1,3-부틸렌글리콜, 농글리세린, 에틸렌글리콜 등과 키틴, 키토산, 히아론산, 하이알루론산, 젖산, 글리콜산 등의 천연보습 물질들을 이용할 수 있으며; 방부제로 파라옥시 안식향산 에스테르류, 이미다졸리디닐우레아 등을 사용할 수 있을 뿐만 아니라, 상기한 성분들을 제품특성에 따라 1종 또는 2종이상 혼용 배합할 수도 있다.

[0030] 본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클린싱, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.

[0031] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.

[0032] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.

[0033] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌

글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.

[0034] 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 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.

[0035] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아마이드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

[0036] 상기 조성물에 향료, 색소, 안정화제, 비타민, 담체, 살균제, 산화방지제, 방부제, 보습제, 점증제, 무기염류, 합성 고분자 물질, 유분, 물, 계면활성제, 알콜, 및 킬레이트제등의 첨가제가 제한없이 추가되어 이용될 수 있다.

[0038] 일실시예에 있어서, 상기 금나노로드는 중형비가 3.3 내지 3.7 : 1 일 수 있다.

[0039] 일실시예에 있어서, 상기 금나노로드는 시트르산으로 코팅된 것일 수 있다. 금나노로드를 코팅하는 물질은 PEG, BSA, 시트르산, 실리카, 폴리에틸렌글리콜 및 DNA로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 물질로 코팅된 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는 시트르산으로 코팅된 것일 수 있다.

[0040] 구체적인 일실시예에서 DNA를 금나노물질로 코팅하면 유효성분과의 수소결합을 통해 전달 효율이 향상될 예상하였으나, 도 7에 나타난 바와 같이 DNA 기능화된 금나노로드보다 시트르산으로 코팅된 금나노로드가 세포 증식률이 더 높았다.

[0042] 구체적인 일실시예에서 피코몰과 나노몰 농도로 농도조건을 설정하여 세포 증식력을 측정하였으며, 그 결과 도 3에 나타난 바와 같이 금나노로드의 농도가 3.7 내지 75 pM에서 증식률이 5 - 10% 증가하였다. 일실시예에 있어서, 상기 금나노로드의 농도는 3.7 내지 75 pM 일 수 있으며, 바람직하게는 7.5 내지 37 pM 일 수 있다.

[0044] 아울러, 본 발명에서 제공하는 상기 화장품 조성물은 피부 보습, 각질 개선, 피부자극 감소, 피부 탄력성 증가 또는 주름개선 효과를 나타내는 기능성化妆품을 제조하는데 사용될 수 있다.

[0045] 본 발명의 용어 "기능성 화장품(cosmedical, cosmeceutical)"이란 화장품에 의약품의 전문적인 치료기능이 도입되어, 일반 화장품과 달리 생리활성적인 효능, 효과가 강조된 전문적인 기능성을 갖는 제품으로서, 피부의 보습에 도움을 주는 제품, 피부 주름개선에 도움을 주는 제품, 피부를 곱게 태우거나 자외선으로부터 피부를 보호하는데 도움을 주는 제품 중에서 보건복지부령이 정하는化妆품을 의미한다.

[0046] 일실시예에 있어서, 상기 화장품 유효성분은 식물, 한방 혹은 해조류 추출물, 펩타이드, 푸에라린, 세라마이드, 엑소좀, 발효 복합추출물, 팩틴, 이소프로스타노이드, 런시나트 사이드, 실크 세리신, 올리고뉴클레오타이드, 히알루론산, 파라쿠마릭산, 이데베논, 레스베라트롤, 커큐민, 비스디메톡시 커큐민, 탁솔, 퀴서틴, 올레오놀산, 로베티올린, 이프리플라본, 해조류 유래 다당류, 비타민A, B, C, D, E, F, K, 보톨리눔 독소 유래 펩타이드, 폴리페놀계, 에피갈 로카테킨 갈레이트, 진세노사이드, 피루브산염, 오일, 트롬보포이에틴, 피페라진 유도체, 퀴놀린 유도체, 카지놀 A, 성장인자, 이소플라본, 콜라겐, 코노 톡신, 글리시르레틴산 유도체, 하이드록시프로필 테트라하이드로피란트리올 및 케라틴으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 1종인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0047] 한편, 프로자일렌 Pro-xylane(Hydroxypropyl tetrahydropyrantriol)은 서유럽에서 흔히 볼 수 있는 너도밤나무에 존재하는 자일로스에서 얻은 물질로, 진피와 표피에서 점액다당류 합성을 촉발하고 자극하여 피부의 탄력과 강장성에 대한 입증된 결과를 나타내는 물질이다. 본 명세서에 있어서 프로자일렌은 '하이드록시프로필 테트라하이드로피란트리올'과 동일한 의미로 상호교환적으로 사용된다.

[0048] 일실시예에 있어서, 상기 화장품 유효성분이 하이드록시프로필 테트라하이드로피란트리올인 경우, 농도는 0.3

내지 3% (w/v) 일 수 있으며, 바람직하게는 0.5 내지 5% (w/v) 일 수 있다.

- [0050] 일실시예에 있어서, 상기 조성물을 이용하는 경우 진피 섬유아세포의 세포 증식력이 40% 이상 증가하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0051] 일실시예에 있어서, 상기 조성물을 처리하는 경우, 진피 섬유아세포에서의 화장품 유효성분의 전달 효율이 50% 이상 높아지는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0052] 일실시예에 있어서, 상기 화장품 유효성분이 하이드록시프로필 테트라하이드로피란트리올인 경우, 보습 개선효과가 있는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0053] 본 발명의 용어 "피부 보습"이란, 피부의 수분손실(수분 증발) 등을 적절히 조절하여 피부조직의 항상성을 유지하는 모든 행위를 의미한다.

[0055] 본 발명은 또한, 금나노로드 및 화장품 유효성분을 포함하는 화장품 유효성분 전달체를 제공한다.

[0056] 용어 "화장품 유효성분 전달체"는 화장품의 개발에서 외부인자로부터 유효성분을 보호하여 안정성을 향상시키는 기술과 더불어 유효성분의 용해도나 분산효율을 향상시키는 기술, 유효성분을 원하는 부위에 효율적으로 전달할 수 있는 기술 및 유효성분의 피부흡수를 촉진하는 기술을 실현시키기 위해, 궁극적으로 유효성분이 원하는 부위에서 본래의 기능을 충분히 발휘할 수 있도록 하는 안정한 전달체를 의미한다. 화장품 유효성분 전달체와 관련하여 금나노로드 및 화장품 유효성분에 대한 설명은 전술한 화장료 조성물과 동일하게 적용되며, 중복되는 기재는 생략한다.

[0058] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0060] [준비예]

[0061] 세포 배양

[0062] 인간 신생아 진피 섬유아세포 (HDFn)를 10% 소태아혈청(Corning)과 1% 페니실린-스트렙토마이신(Gibco)이 포함된 DMEM(Dulbecco's modified eagle's medium, Corning)으로 37℃, 5% CO₂ 표준 조건으로 배양하였다.

실시예 1

[0064] GNR의 특성 파악

[0065] GNP(Gold Nano Particle)의 크기와 모양은 TEM 이미지를 사용하여 분석되었다. 먼저 GNR(Gold Nano Rod), 10nm 및 60nm GNS(Gold Nano Sphere)를 물로 각각 7.45 nM, 6.16 μM 및 703 μM으로 희석했다. 다음으로, 희석된 GNR 및 GNS의 20 μL 분취량을 탄소 그리드에 떨어뜨리고 밤새 공기 건조했다. TEM 이미지는 94,000x, 245,000x 및 1,050,000x 배율에서 TEM(TALOS F200X; FEI Inc., Hillsboro, OR, USA)을 사용하여 촬영되었다. 그런 다음 ImageJ 프로그램(National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)을 사용하여 크기와 중형비를 분석했다.

[0066] GNR의 크기 및 중형비는 TEM을 사용하여 분석되었다(도 1A 및 도 1B). 21개의 GNR은 평균 길이가 34.5 ± 5.3 nm이고 평균 너비가 10.1 ± 1.6 nm였다. 또한, GNR은 평균 중형비가 3.4인 막대 모양으로 관찰되었다. 10 및 60 nm의 GNS는 각각 약 10 nm 및 60 nm 구를 보여주었다(도 1C 및 1D).

실시예 2

[0068] GNR에 의한 세포내 ROS 증가 측정

[0069] HDFn 세포를 이용하여 정상 피부 세포에 미치는 영향을 확인하고, HeLa 세포를 이용하여 암세포에 미치는 영향을 조사했다. HDFn(인간 신생아 진피 섬유아세포, 계대 번호 = 8~12), HeLa(자궁경부 선암종) 세포를 10% vol/vol FBS, 100 unit/mL - 100 µg/mL 페니실린-스트렙토마이신이 보충된 DMEM에서 배양했다. 세포를 5% CO₂ 가습 배양기(ESCO, Changi, Singapore)에서 37℃에서 배양했다. Confluency가 80%에 도달하면 계대배양을 위해 DPBS로 세포를 세척한 후 트립신-EDTA로 세포를 분리하였다. 300 × g에서 3분간 원심분리한 후 상층액을 제거하였다. 세포 펠렛을 10% FBS가 포함된 DMEM에 재현탁하고 30 내지 40% 농도로 분배하였다.

[0070] 세포내 ROS 농도는 DCFDA/H2DCFDA - Cellular ROS Assay Kit를 사용하여 측정하였다. 2×10^3 세포의 HDFn을 96-웰 배양 플레이트의 웰에 접종하고 10% FBS를 함유하는 DMEM에서 37℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 세포를 6 시간 동안 분석 키트 완충액에서 0, 0.019 및 7.5 nM GNR의 다른 농도로 처리했다. 형광(Ex/Em = 485/535)은 마이크로플레이트 판독기(Spectramax M2; Molecular Devices, San Jose, CA, USA)를 사용하여 측정되었다. 형광 세포 계수기(Arthur Fluorescence Cell Counter; NanoEntek, Seoul, Korea)를 사용하여 형광 세포를 계수하였다. 간단히 말해서, 트립신 EDTA 용액을 사용하여 분리한 후, 세포를 10% FBS가 포함된 70 µL의 DMEM으로 세척하였다. 300 × g에서 3분 동안 원심분리한 후 상층액을 제거하고 펠렛을 10% FBS가 포함된 25 µL의 DMEM에 재현탁했다. 마지막으로 25 µL의 샘플 용액을 슬라이드(NanoEntek)에 첨가하고 세포 형광 계수기로 분석했다. 세포 내 ROS의 형광 이미지는 세포를 96웰 플레이트에서 100 µL의 DPBS로 두 번 세척한 후 형광 현미경(Nikon ECLIPSE Ti2; Nikon, Tokyo, Japan)을 사용하여 촬영했다. 녹색 형광 필터를 사용하여 샘플을 100배 배율로 관찰했다(스케일 바 = 100 µm).

[0071] 그 결과로, 도 2A는 GNR, 도 2B는 10-nm GNS, 도 2C는 60-nm GNS에 대한 HDFn 세포의 세포내 ROS 수준을 나타내며, 각각 농도는 0 nM(왼쪽), 19 pM(중간) 및 7.5 nM(오른쪽) 농도의 GNR 및 GNS에 노출된 상태에서 측정된 결과를 나타낸다(도 2A 내지 2C). 3614 상대 형광 단위(RFU)의 파란색 선은 실험 그룹에 대해 0 pM에서 상위 1% 형광 값의 임계값 평균을 나타낸다. 역치 이상의 ROS 양성 세포 집단은 GNR 농도가 0 nM, 19 pM 및 7.5 nM에서 증가함에 따라 15.2%p, 54.0%p 및 81.1%p 증가했다(도 2A). 반면에, 10 nm 및 60 nm GNS의 ROS 양성 세포 집단은 0, 19 pM 및 7.5 nM에서 각각 0%p, 0.55%p, 1.12%p(도 2B) 및 4.77%p, 0.49%p, 0.0%p(도 2C)로 감소된 결과를 나타냈다. 세포내 ROS의 형광을 100배 확대한 형광현미경으로 관찰한 결과, 형광강도는 GNR 농도에 비례하여 증가하였다(도 2D).

실시예 3

[0073] 인간 신생아 진피 섬유아세포에서 GNR의 영향을 받는 세포 증식률 측정

[0074] GNR과 GNS를 첨가한 후 세포 증식을 분석하기 위하여 WST-1 분석 키트를 사용하여 분석되었다.

[0075] 구체적으로, HDFn(2×10^3) 및 HeLa(5×10^3) 세포를 96웰 배양 플레이트의 각 웰에 분주하고 10% FBS를 함유하는 DMEM에서 37℃에서 밤새 배양하였다. 분주 24시간 후 금 나노로드(하이코스킨)를 농도 조건을 도 3a[0, 0.75, 3.7, 7.5, 19, 37, 75 pM]과 도 3b[0, 3.75, 7.5 14 nM]에 맞추어 각 웰에 10 µL씩 처리한 뒤에 표준조건에서 24시간동안 배양하였다. 처리 후, 프로토콜에 따라 WST-1 분석을 수행하였다. 간단히 말해서, 10 µL의 CCK 용액을 웰당 분배한 다음 37℃에서 2시간 동안 인큐베이션했다. 흡광도는 EPOCH2 마이크로플레이트 분광광도계(Agilent Technologies, Inc, Santa Clara, CA, USA)를 사용하여 450 nm에서 측정되었다.

[0076] 그 결과로, 도 3은 HDFn에서 GNR(도 3A, A'), 10-nm GNS(도 3B, B'), 60-nm GNS(도 3C, C')를 피코몰 단위(도 3A 내지 3C) 및 나노몰 단위(도 3A' 내지 3C')로 처리한 결과를 나타낸다.

[0077] 결과적으로, 피코몰 GNR은 HDFn 세포 증식률을 촉진했다(도 3A). 최종 GNR 농도가 0.75, 3.7, 7.5, 19 및 37 pM일 때 세포 증식률은 대조군과 비교하여 5.25, 9.12, 7.74, 5.29 및 9.17%p 유의하게 증가했으며 p-값은 0.049, 0.00013, 각각 0.017 및 0.0018였다. 한편, 75 pM GNR에서의 세포 증식은 통계적으로 유의한 변화를 나타내지 않았다(p-값 = 0.55)(도 3A).

[0078] 반면에, 나노몰 농도의 GNR은, 3.75, 7.5 및 14 nM에서 세포증식률은 대조군과 비교하여 5.89, 42.4 및 58.1%p 감소시켰으며, p-값이 각각 0.13, 6.10×10^{-6} 및 1.96×10^{-5} 이었다(도 3A').

[0079] 10-nm의 GNS는 3.7 pM, 7.5 pM, 19 pM, 37 pM 및 75 nM에서 세포증식률은 대조군과 비교하여 7.3%, 7.6%,

8.0%, 8.4% 및 5.6%p 감소시켰으며, p-값은 0.034, 0.015, 0.027, 0.024, 0.12였다(도 3B)

[0080] 반면, 10-nm GNS는 3.75 nM, 7.5 nM 및 14 nM에서 상대 세포 증식률을 3.5%, 3.2% 및 5.4%p 감소시켰으며, 이때의 p-값은 0.017, 0.18 및 0.0011이었다(도 3B').

[0081] 또한, 60-nm GNS는 3.7, 7.5 및 19 pM에서 0.74, 0.94 및 0.085의 p-값으로 0.86%, 0.18% 및 0.45% 감소했다(도 3C). 대조적으로, 60-nm GNS는 37 및 75 pM에서 0.21 및 0.015의 p-값으로 3.3% 및 6.7% 증가했다.

[0082] 60-nm의 GNS는 3.75 nM, 7.5 nM 및 14 nM에서 세포증식률은 대조군과 비교하여 0.57, 0.64 및 0.87의 p-값으로 1.5%, 1.3% 및 0.5% 감소했다(도 3C').

[0084] HeLa 세포에 대한 24시간 GNR 노출에서 세포 증식률은 GNR 0.75 nM에서 8.4% 증가하고 GNR 1.5 nM 및 GNR 3.7 nM에서 3.5% 및 32.3% 감소했으며 p-값은 0.20, 0.60, 0.0080였다(도 4A).

실시예 4

[0086] H₂O₂의 영향을 받는 세포 증식률

[0087] 2×10^3 세포의 HDFn을 상기한 방법으로 96-웰 플레이트의 웰에서 배양하였다. 먼저, 30% H₂O₂ 용액을 DMEM을 사용하여 0.11 μ M에서 2.2 mM까지 희석하였다. 그런 다음, 10 μ L의 희석된 H₂O₂ 용액을 각 웰에 첨가하여 최종 농도가 0.01-200 μ M이 되도록 하였다. WST-1 분석 후 EPOCH2 마이크로플레이트 분광광도계를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정했다.

[0088] H₂O₂ 농도가 증가하면 상대적인 세포 증식은 1 μ M까지 낮은 H₂O₂ 농도에서 증가하고 H₂O₂ 농도가 높을수록 감소한다(도 5). HDFn의 상대적인 세포 증식은 최종 H₂O₂ 농도 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 200 μ M에서 107.1, 108.6, 109.4, 102.9, 106.5, 100.2%였다. p-값은 각각 0.00969, 0.0129, 0.0694, 0.372, 0.932, 0.94로 같은 순서로 나타났다. 따라서 0.01 및 0.1 μ M H₂O₂에서의 상대 세포 증식률은 통계적으로 유의하게 증가했다.

[0089] 상대 HeLa 세포 증식은 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 200 μ M의 최종 H₂O₂ 농도에서 각각 105.8, 117.0, 109.6, 98.5, 84.0, 62.8%였고, p-값은 동일한 순서로 각각 0.333, 7.33×10^{-5} , 0.0252, 0.451, 7.76×10^{-5} 및 0.0141이었다(도 4B).

[0091] 결과적으로, 막대 모양의 피코몰 GNR은 미량의 세포 내 ROS를 증가시켰고(도 2A) HDFn 세포 증식력을 촉진했다(도 3A). 반면에, 나노몰 GNR은 세포 내 ROS를 증가시켰고(도 2A) HDFn과 HeLa 세포 증식력을 감소시켰다(도 3A' 및 도 4A). 대조적으로, 10 nm 및 60 nm GNS는 세포 내 ROS(도 2B 및 2C)와 세포 증식력(도 3B 및 3C)을 변경시키지 않았다. 이러한 결과를 바탕으로 GNR이 많을수록 세포 내 ROS 생성이 증가하여 세포 생존에 영향을 미쳤음을 확인하였다.

[0092] 0.75 pM에서 37 pM 사이의 GNR 기준은 HDFn 세포 생존을 촉진했다. 7.5 nM 이상의 GNR은 HDFn 세포 증식력을 감소시켰다. 반면에 0.745 nm 부근의 GNR은 HeLa 세포 증식력을 촉진시켰다. 3.75 nM 이상의 GNR은 HeLa 세포 증식을 억제시켰다.

[0093] GNR은 슈퍼옥사이드 디스뮤타제와 유사하게 슈퍼옥사이드에서 과산화수소로의 전환을 촉매하는 것으로 알려져 있다. 따라서 GNR은 세포 내로 흡수되어 세포 내 ROS를 생성하거나 외부 GNR에 의해 생성된 세포의 ROS는 세포에 스트레스를 유발하고 결과적으로 스트레스를 받는 세포는 ROS를 생성할 수 있다. ROS는 일반적으로 지질, 단백질, DNA를 손상시켜 세포 노화를 유발하는 독성 부산물로 알려져 있지만, ROS는 적절한 양의 세포에서 신호 분자로 작용한다는 연구도 있다. 더욱이, 과산화수소에 노출된 HDFn 세포 증식률은 농도에 따라 GNR에 노출된 것과 유사했다(도 5A).

[0094] 따라서 이러한 데이터에 따르면 적절한 농도의 GNR 생성 ROS는 세포 증식을 촉진함을 추론할 수 있다. 활성화된 EGFR은 Ras/Raf 신호 전달 경로를 통해 ERK1/2 활성화를 유도할 수 있다. ERK1/2는 세포 증식 마커로 알려진 단

백질로 DNA 합성, 단백질 합성, 세포 주기 진입 및 미토콘드리아를 조절한다. 이는 적절한 농도의 GNR 생성 ROS가 세포 증식을 촉진한다는 가설을 뒷받침할 수 있다(도 5B). 이는 저농도 과산화수소의 세포 증식률 결과와 일치했다. 예를 들어, 0.01 및 0.1 μM 과산화수소는 HDFn 세포 증식률을 7%p 및 9.9%p 증가시켰다(도 5A).

[0095] 따라서 GNR은 농도에 따라 세포 증식력을 촉진하거나 감소시키는 데 적용될 수 있음을 확인하였다. 피코몰 GNR은 화장품 및 상처 치유에서 피부세포를 포함한 세포 증식력을 향상시키는 데 사용될 수 있다. 다만, 상기에서 확인한 바와 같이, GNR을 화장품에 적용하기 위해서는 세포 증식과 생체 안전성에 가장 좋은 영향을 주는 GNR 농도를 미세하게 조절해야 한다.

[0096] 상기 실시예에서 확인한 바와 같이, 본 발명에서는 GNP 모양 효과와 세포 증식률에 대한 농도 기준 및 GNR이 세포 증식을 촉진하는 이유를 확인하였다. 10-nm 및 60-nm GNS와 달리 GNR은 세포 내 ROS를 생성하고 ROS는 농도에 따라 세포 생존에 영향을 미친다. 0.75 pM에서 37 pM 사이의 GNR은 HDFn 세포 생존을 촉진했다. 7.5 nM 이상의 GNR은 HDFn 세포 증식력을 감소시켰다.

[0097] 이러한 결과를 바탕으로 GNR을 화장품에 이용하기 위하여 하기 실험을 진행하였다.

실시예 5

[0099] 금 나노로드 전달 후 세포 증식력 확인

[0100] 금 나노로드 (GNR 또는 DNA-GNR)를 인간 신생아 진피 섬유아세포에 처리하여 세포 증식력을 확인하였다.

[0102] 금 나노로드의 특징

[0103] 실험에 쓰인 금 나노로드는 Nanopartz™에서 구입하였다. 해당 금 나노로드는 10 nm의 직경, 35 nm의 길이, 그리고 3.5의 종횡비를 가졌고, 금 나노로드 입자의 안정화를 위해 시트르산으로 코팅되었다.

[0105] 금 나노로드의 DNA 기능화 (DNA-GNR)

[0106] 금나노로드를 코팅하는 물질 중 세포 전달효율을 비교하기 위해 DNA를 이용하였다.

[0107] 금 나노로드의 DNA 기능화는 J. Liu et al.(Nature Protocol, 2006)의 프로토콜에 따라 salt aging method를 통해 5' 말단이 싸이클로 변형된 폴리(A20) 올리고뉴클레오타이드(5' -AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-3')로 기능화되었다. 간단히 말해서, 1 mM 폴리(A20) 올리고뉴클레오타이드 용액 3 μL 에 500 mM Acetate buffer 0.33 μL 와 10 mM TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphine) 0.5 μL 를 첨가하고 1시간동안 배양하여 올리고뉴클레오타이드를 활성화시켰다. 13 nM 금 나노로드 1 mL를 마그네틱 바를 이용하여 교반하면서 활성화된 올리고뉴클레오타이드 3.83 μL 를 첨가하였고, 상온에서 하룻밤동안 배양했다. 금 나노로드와 올리고뉴클레오타이드 혼합액을 마그네틱 바를 이용하여 교반하면서 500 mM Tris-acetate buffer 10 μL 를 첨가한 뒤, 3.43 M NaCl 용액 12.5 μL 를 1시간마다 첨가하여 총 87.5 μL 를 첨가하였고 상온에서 최소 하룻밤동안 배양했다. 이 후, 혼합액을 상온에서 20분동안 원심분리 (16,110 $\times$ g)하고 상층액을 제거하여 Free DNA를 제거했고, 100 mM NaCl이 포함된 25 mM Tris-acetate buffer (pH 8.2)를 첨가하여 현탁시켰다. 현탁액을 다시 상온에서 20분동안 원심분리 (16,110 $\times$ g)하여 상층액을 제거하였고, 300 mM NaCl이 포함된 25 mM Tris-acetate buffer (pH 8.2) 1 mL을 첨가하여 재현탁시켰다.

[0109] 금 나노로드 전달 후 세포 증식력 측정

[0110] 그 결과는, 전술한 도 3A, A'에 나타난 바와 같이, 인간 신생아 진피 섬유아세포는 금 나노로드가 처리되었을 때 세포 증식력이 높았으며, 37 pM을 기점으로 농도가 높아졌을 때 세포 증식력이 감소하였다.

[0111] 결론적으로, 75 pM 미만의 금 나노로드는 세포 증식력을 증가시키고 75 pM 이상의 금 나노로드는 세포 증식력을 감소시키는 반면, 금 나노로드에 DNA가 기능화되었을 때에는 고농도 (500 pM 이상)의 금 나노로드에 의해서만 세포 증식력이 증가함을 확인하였다.

실시예 6

[0113] 프로자일렌 농도 최적화

[0114] 최적의 프로자일렌 농도를 찾기 위해 인간 신생아 진피 섬유아세포에 프로자일렌을 농도별로 처리하여 세포 증식력을 확인하였다.

[0115] 인간 신생아 진피 섬유아세포를 96-웰 플레이트에 2.0×10^3 세포/웰이 되도록 100 μ L씩 분주한 후 표준조건에서 24시간동안 배양하였다. 프로자일렌(하이코스킨) 원액을 1:1 무게비로 3차 증류수를 이용해 희석하였다. 각 웰에 희석한 프로자일렌을 0.5%, 1.0%, 2.5%, 그리고 5.0% 농도로 처리를 한 뒤 48시간 동안 배양하였다. 배양 48시간 후, 인간 신생아 진피 섬유아세포의 증식력은 D-Plus™ CCK cell viability assay kit (동인LS)를 이용하여 해당 제품의 프로토콜에 따라 측정되었다. 간단히 말해, 세포가 배양되고 있는 각 웰에 D-Plus™ CCK 용액을 11 μ L (배양 부피의 1/10 첨가) 씩 첨가하고 표준조건에서 1시간동안 배양한 뒤, EPOCH2 microplate reader (BioTek)를 통해 각 웰에 담긴 용액의 흡광도(OD450)를 450 nm의 파장에서 측정하였다.

[0116] 측정된 OD450 값들로 Grubbs' test를 진행하였고, Grubbs' test가 진행된 OD450 값을 이용하여 0% 프로자일렌 실험군의 평균 세포 증식력이 100%가 되도록 표준화되었다.

[0117] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이 모든 조건이 0% 조건과 비교하여 통계적으로 유의미한 차이는 보이지 않았으나, 프로자일렌을 처리해주었을 때 2.5%p까지는 세포 증식력이 증가하는 경향이 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 그 중에서 1%를 처리했을 때가 가장 증식력이 증가하는 것을 확인하여 이후의 실험에서 프로자일렌의 농도는 1%로 진행하였다.

실시예 7

[0119] 금 나노로드 매개 프로자일렌 전달 후 세포 증식력 측정

[0120] 금 나노로드 (GNR 또는 DNA-GNR) 매개 프로자일렌 전달 후 세포 증식력은 인간 신생아 진피 섬유아세포를 이용하여 평가하였다.

[0121] 먼저, 인간 신생아 진피 섬유아세포를 96-웰 플레이트에 2.0×10^3 세포/웰이 되도록 100 μ L씩 분주한 후 표준조건에서 24시간동안 배양하였다. 분주 후 24시간이 되기 1시간 전에 프로자일렌과 금 나노로드(Nanopartz)를 3차 증류수로 희석한 후 상온에서 1시간동안 배양하였고, 농도 조건 [프로자일렌 1%(w/v) + 0 pM / 0.75 pM / 3.7 pM / 7.5 pM / 19 pM / 37 pM / 75 pM]에 맞도록 각 웰에 10 μ L씩 처리한 뒤에 표준조건에서 24시간동안 배양하였다. 배양 24시간 후, 인간 신생아 진피 섬유아세포의 증식력은 D-Plus™ CCK cell viability assay kit를 이용하여 각 웰에 D-Plus™ CCK 용액을 11 μ L씩 첨가하고 표준조건에서 1시간동안 배양한 뒤, EPOCH2 microplate reader를 통해 각 웰에 담긴 용액의 흡광도(OD450)를 450 nm의 파장에서 측정하였다.

[0122] 각 농도 별 금 나노로드 (GNR 또는 DNA-GNR)와 1% 프로자일렌을 인간 신생아 진피 섬유아세포에 처리하여 세포 증식력을 확인하였다. 측정된 OD450 값들로 Grubbs' test를 진행하였고, Grubbs' test가 진행된 OD450 값을 이용하여 0 pM 금 나노로드(+1% 프로자일렌) 실험군의 평균 세포 증식력이 100%가 되도록 표준화되었다.

[0123] 그 결과, 금 나노로드가 처리되었을 때의 세포 증식력이 그렇지 않았을 때의 세포 증식력보다 높았으며, 처리된 금 나노로드의 농도가 증가할수록 세포 증식력이 증가하다가 19 pM 농도의 금 나노로드를 처리했을 때를 기점으로 더 높은 농도의 금 나노로드가 처리되었을 때 세포 증식력이 점차 감소하였다(도 7A). 세포 증식력은 3.7 pM, 7.5 pM, 19 pM, 그리고 37 pM의 금 나노로드가 처리되었을 때 대조군에 비해 40%p 이상 증가하였으며 19 pM의 금 나노로드가 처리되었을 때에는 약 58%p로 가장 큰 세포 증식력 증가를 보였다.

[0124] 반면에, DNA가 기능화된 금 나노로드 (DNA-GNR)와 1% 프로자일렌을 함께 처리했을 때에는 기능화되지 않은 금 나노로드 (GNR)를 처리했을 때와 비교하여 모든 농도에서 큰 세포 증식력 증가를 보이지 않았다(도 7B). 따라서, 금 나노로드와 함께 프로자일렌을 전달했을 때 세포 증식력이 크게 증가하지만, 금 나노로드에 DNA가 기능화되었을 때에는 세포 증식력의 증가가 상대적으로 감소함을 확인하였다.

실시예 8

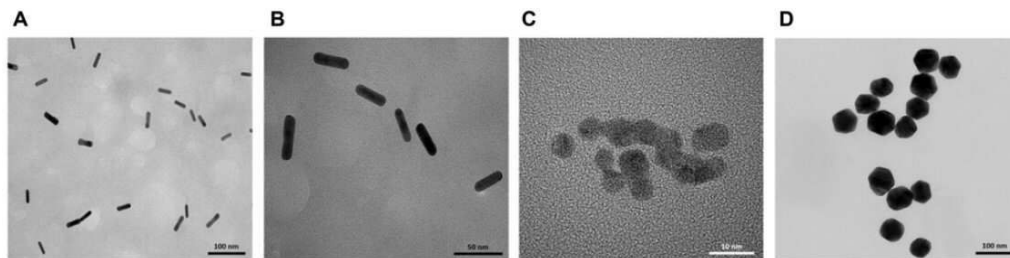
- [0126] 금 나노로드 매개 세포로다민 B 세포 전달 효율 분석
- [0127] 금 나노로드에 의한 세포 전달 효율은 금 나노로드와 세포로다민 B를 인간 신생아 진피 섬유아세포에 동시에 처리한 후 세포 용해물(Cell lysate)에서 측정된 세포로다민 B의 형광을 통해 평가하였다.
- [0128] 먼저, 인간 신생아 진피 섬유아세포를 24-웰 플레이트 (SPL)에 2.0×10^4 세포/웰이 되도록 500 μ L씩 분주한 후 표준조건에서 24시간동안 배양하였다. 3차 증류수, 세포로다민 B, 그리고 금 나노로드 및 세포로다민 B 혼합액은 3차 증류수를 이용하여 희석하고 상온에서 30분동안 빛을 차단하여 배양하였다. 배양된 3차 증류수, 세포로다민 B 희석액, 그리고 금 나노로드 및 세포로다민 B 희석액은 농도 조건 (3차 증류수 / 1 μ M 세포로다민 B / 1 nM 금 나노로드 + 1 μ M 세포로다민 B)에 맞도록 각 웰에 50 μ L씩 첨가되었고, 표준조건에서 4시간동안 빛을 차단하여 배양하였다. 이 후, 각 웰의 배양액을 모두 제거하고 DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline, Sigma-aldrich)로 5번 세척한 뒤에 KAlert™ lysis buffer (Invitrogen)를 150 μ L씩 첨가하고 상온에서 빛을 차단하여 30분동안 배양하였다. 웰에 있는 세포 용해물들은 피펫을 통해 섞어주었고, 검정색 384-웰 플레이트 (Corning)에 40 μ L씩 첨가한 뒤에 Varioskan™ LUX microplate reader (Thermo Fisher Scientific)를 통해 세포로다민 B의 Relative fluorescence unit (RFU, E_x :565 nm, E_m :586 nm)이 측정되었다. 측정된 RFU 값은 1 μ M 세포로다민 B 실험군의 RFU가 100%가 되도록 표준화되었다.
- [0129] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, 1 μ M의 세포로다민 B를 1 nM의 금 나노로드와 함께 전달했을 때의 RFU 값이 1 μ M의 세포로다민 B만 전달했을 때의 RFU 값보다 134%p 증가하는 결과를 보였다. 이를 통해 금 나노로드와 함께 물질을 전달하는 것이 세포 전달 효율을 향상시킬 수 있음을 확인하였다.

실시예 9

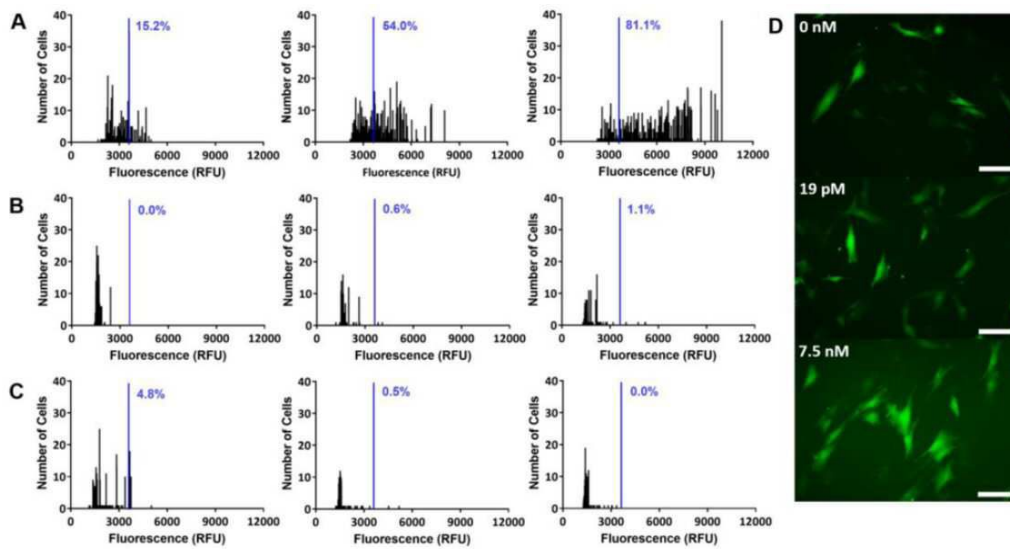
- [0131] GAG ELISA를 이용한 GAG 발현 정량
- [0132] 프로자일렌에 의한 인간 신생아 진피 섬유아세포의 글리코사미노글리칸 (GAG)의 발현은 Human glycosaminoglycan(GAGs) ELISA kit (Abbexa)를 이용하여 정량되었다.
- [0133] 먼저, 인간 신생아 진피 섬유아세포를 24-웰 플레이트 (SPL)에 1.0×10^4 세포/웰이 되도록 500 μ L씩 분주한 후 표준조건에서 24시간동안 배양하였다. 분주 후 24시간이 되기 1시간 전에 프로자일렌 용액과 금 나노로드 및 프로자일렌 혼합액을 3차 증류수로 희석한 후 상온에서 1시간동안 배양하고, 각 웰에 농도 조건 (1% 프로자일렌 / 1% 프로자일렌 + 19 pM 금 나노로드)에 맞게 50 μ L씩 처리한 뒤에 표준조건에서 48시간동안 배양하였다. 이 후, Human GAGs ELISA kit의 프로토콜에 따라 농도 별 Standard 용액 (100 ng/mL, 50 ng/mL, 25 ng/mL, 12.5 ng/mL, 6.25 ng/mL, 3.13 ng/mL, 1.56 ng/mL, 0 ng/mL), Detection reagent A 용액, 그리고 Detection reagent B 용액을 준비하였고, ELISA 실험을 진행하였다. 간단히 말해서, 인간 신생아 진피 섬유아세포 배양 상층액과 농도 별 Standard 용액들을 Pre-coated 96-well microplate에 50 μ L씩 첨가한 뒤, Detection reagent A 용액 50 μ L를 첨가하고 Plate sealer로 플레이트를 덮은 다음에 37°C에서 45분동안 배양하였다. 이 후, 상층액을 버린 뒤에 3차 증류수로 플레이트를 3회 세척하였고, Detection reagent B 용액 100 μ L를 첨가하고 Plate sealer로 플레이트를 덮은 다음에 37°C에서 30분동안 배양하였다. 상층액을 제거하고 3차 증류수로 5회 세척한 뒤에 TMB substrate 용액을 90 μ L를 첨가하고 Plate sealer로 플레이트를 덮은 다음에 37°C에서 20분동안 배양하였다. 마지막으로, Stop solution을 50 μ L 첨가하고 즉시 EPOCH2 microplate reader (BioTek)를 통해 각 웰에 담긴 용액의 흡광도(OD450)를 450 nm의 파장에서 측정하였다. GAG 표준곡선은 측정된 Standard 용액의 OD450 값을 이용하여 그렸다. 각 실험군 샘플의 OD450 값을 GAG 표준곡선의 식에 대입하여 GAG 양을 측정하였다.
- [0134] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, 프로자일렌에 의한 GAG 발현 정도를 비교하였을 때, 1% 프로자일렌 만을 전달했을 때에는 평균적으로 약 0.276 ng/mL의 GAG가 발현되었던 것에 비하여 19 pM의 금 나노로드와 1% 프로자일렌을 함께 전달했을 때에는 평균적으로 약 0.423 ng/mL의 GAG가 발현되는 결과를 보였다. 이는 금 나노로드를 매개로 프로자일렌을 전달했을 때 약 53%p의 GAG 발현 증가를 보인 것이며, 금 나노로드를 매개로 하여 프로자일렌을 전달하는 것이 프로자일렌만을 전달했을 때보다 GAG 발현을 증가시킬 수 있음을 확인하였다.

도면

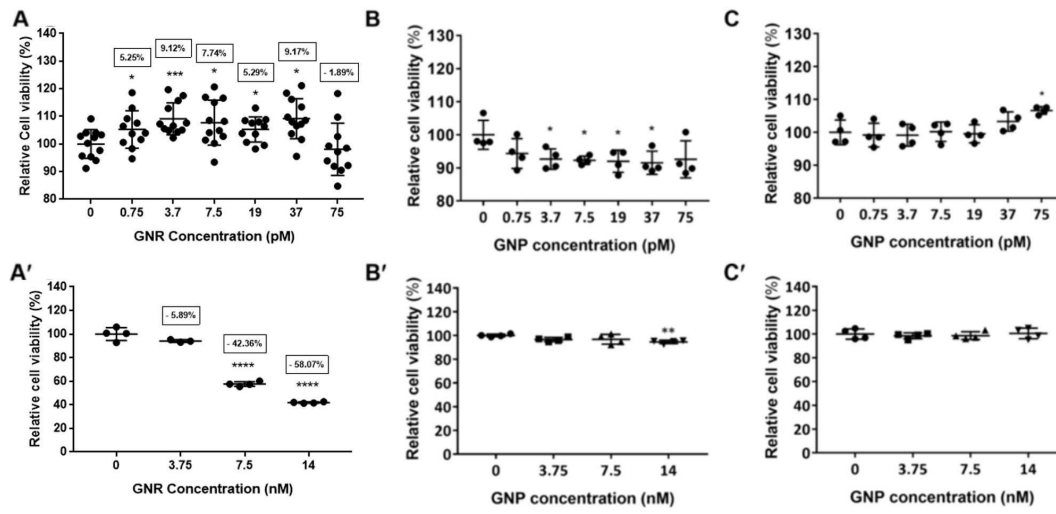
도면1



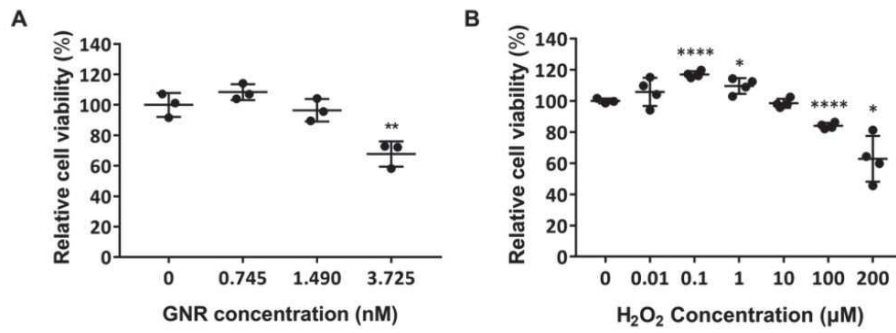
도면2



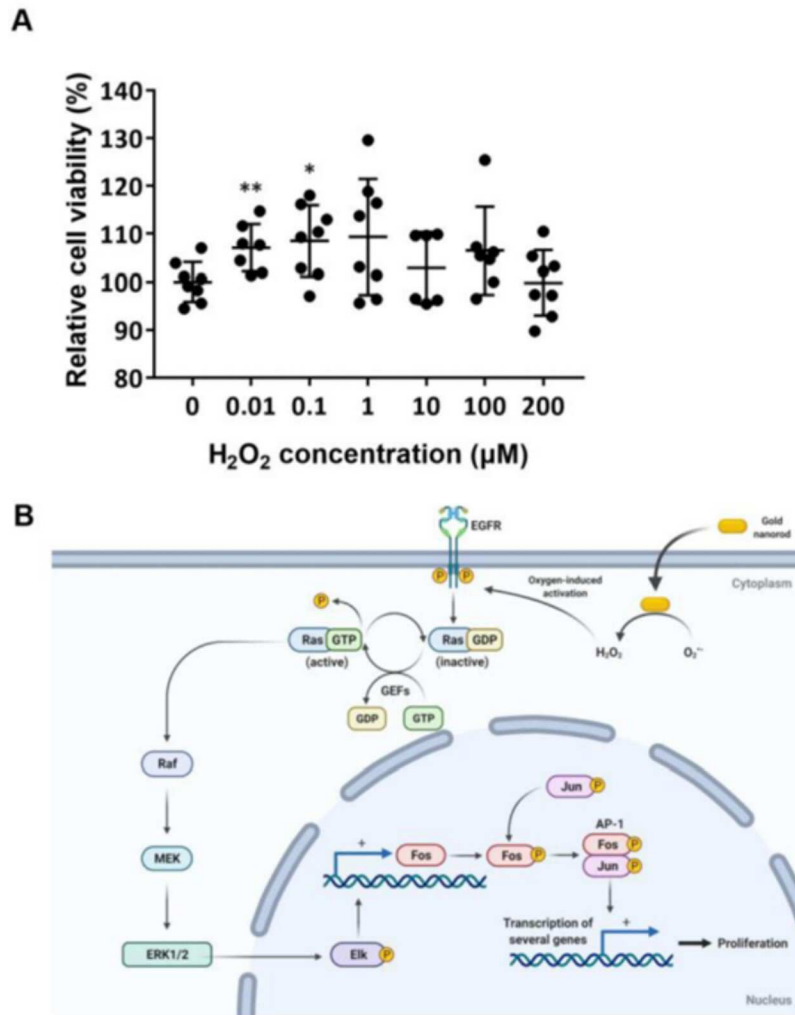
도면3



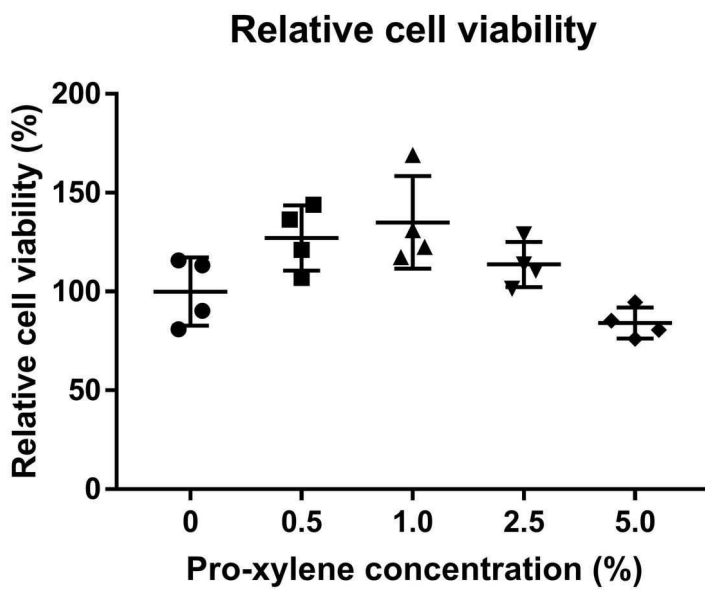
도면4



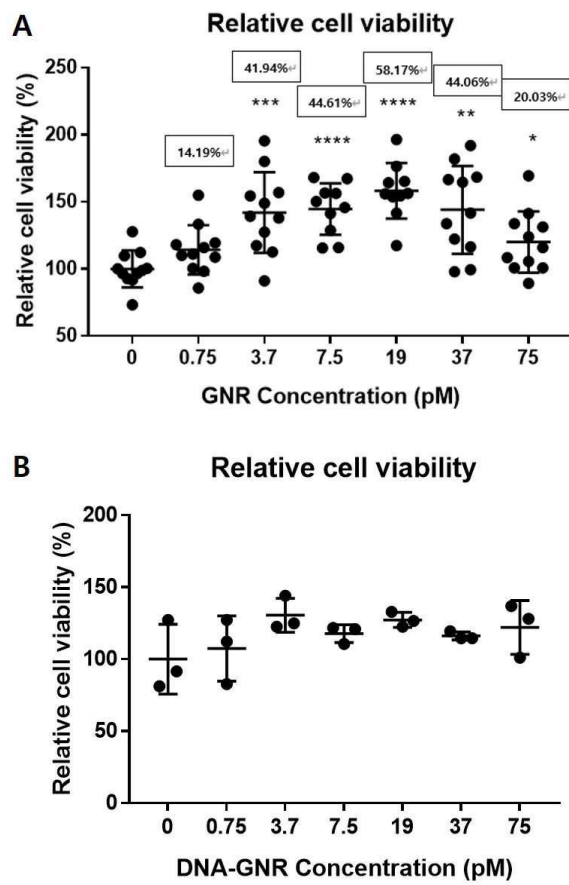
도면5



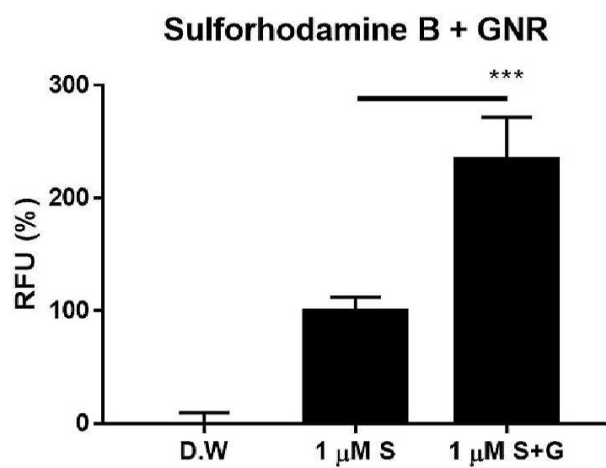
도면6



도면7



도면8



도면9

