



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0032707
(43) 공개일자 2023년03월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/14 (2006.01) A23L 33/16 (2016.01)
A61K 33/242 (2019.01) A61K 47/18 (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/14 (2013.01)
A23L 33/16 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2021-0115807

(22) 출원일자 2021년08월31일

심사청구일자 2021년08월31일

(71) 출원인

울산과학기술원

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

한국과학기술연구원

서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)

(72) 발명자

정영도

서울특별시 성북구 화랑로14길 5(하월곡동)

유자형

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

리엔목특허법인

전체 청구항 수 : 총 15 항

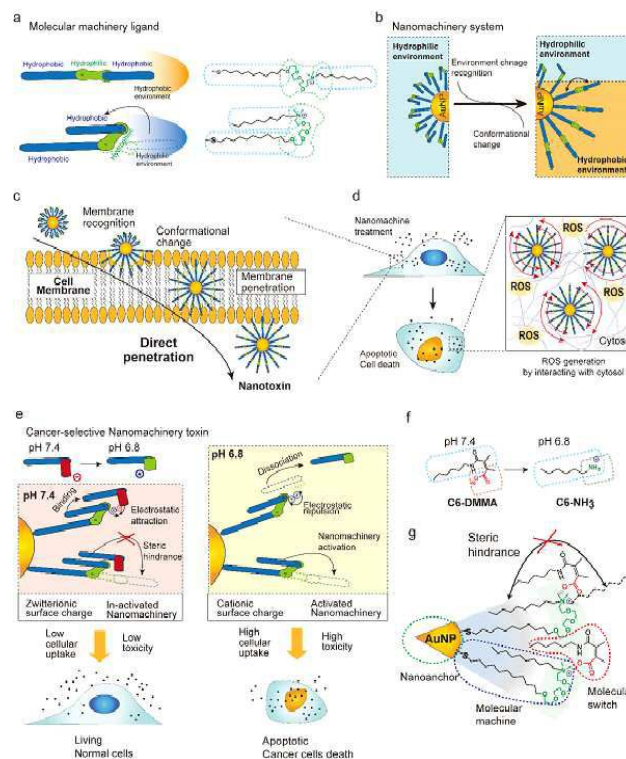
(54) 발명의 명칭 암의 예방 또는 치료용 나노 머신

(57) 요약

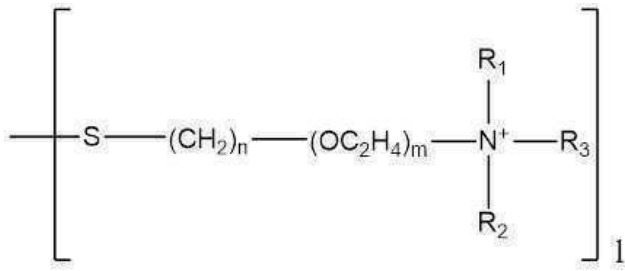
일 양상은 하기 화학식 1의 화합물 또는 이의 염이 결합된 금(Au) 나노 입자를 제공한다. 상기 금 나노 입자는 나노 머신으로 작용하여, 세포 사멸을 유발할 수 있고, 특히, 4-(hexylamino)-2,3-dimethyl-4-oxobut-2-enoic acid와 함께 제공됨으로써 산성 조건인 암 세포를 선택적으로 세포 사멸시킬 수 있다. 이에 따라, 상기 금 나노

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



입자를 포함하는 약학적 조성물 및 건강기능식품은 암중에 관계없이, 암 세포의 예방, 개선 또는 치료 효과를 나타낼 수 있다:



(52) CPC특허분류

A61K 33/242 (2022.01)

A61K 47/186 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/25 (2013.01)

A23V 2200/308 (2013.01)

A23V 2250/1568 (2013.01)

(72) 발명자

최후연

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

곽상규

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

김채규

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711119204
과제번호	2020M3A9D8038192
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오·의료기술개발(R&D)
연구과제명	노화세포 운명조절을 위한 노화세포 선택적 치료 실용화 방법 개발
기 여 율	1/4
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2020.06.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711118832
과제번호	2020R1A2C3005939
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	세포 안에서 고분자 중합반응과 세포 운명 조절
기 여 율	1/4
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2020.06.01 ~ 2023.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711133956
과제번호	2016R1A5A1009405
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원(R&D)
연구과제명	다공성 플랫폼 기반 생체모방 촉매
기 여 율	1/4
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711121096
과제번호	2020R1A2C1101377
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	노화제어기술 기반 치료용 나노머신 개발
기 여 율	1/4
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2020.09.01 ~ 2021.08.31

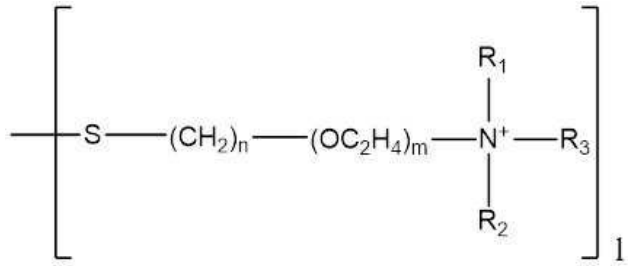
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1의 화합물 또는 이의 염이 결합된 금(Au) 나노 입자:

[화학식 1]



상기 S는 황(S)이며,

상기 n은 5 내지 20 중 선택되는 하나의 정수이며,

상기 m은 2 내지 6 중 선택되는 하나의 정수이며,

상기 l은 1 내지 10^5 중 선택되는 하나의 정수이며,

상기 R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 1 내지 5 중 선택되는 하나의 정수의 탄소수를 가진 알킬이며,

상기 R₃는 5 내지 20 중 선택되는 하나의 정수의 탄소수를 가진 알킬이다.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 n은 8 내지 15 중 선택되는 하나의 정수이며,

상기 m은 3 내지 5 중 선택되는 하나의 정수이며,

상기 l은 10 내지 10^2 중 선택되는 하나의 정수이며,

상기 R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 1 내지 2 중 선택되는 하나의 정수의 탄소수를 가진 알킬이며,

상기 R₃는 8 내지 15 중 선택되는 하나의 정수의 탄소수를 가진 알킬인, 금 나노 입자.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 금 나노 입자의 직경은 0.5 내지 3.5 nm인 것인, 금 나노 입자.

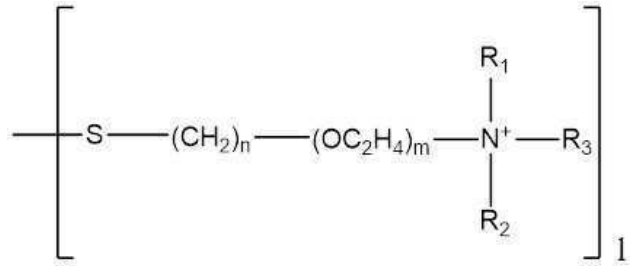
청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 금 나노 입자의 제타 전위는 13 내지 15.5 mV인 것인, 금 나노 입자.

청구항 5

상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 염이 결합된 금(Au) 나노 입자를 포함하는 세포 사멸 유발용 조성물:

[화학식 1]



상기 S는 황(S)이며,

상기 n은 5 내지 20 중 선택되는 하나의 정수이며,

상기 m은 2 내지 6 중 선택되는 하나의 정수이며,

상기 1은 1 내지 10^5 중 선택되는 하나의 정수이며,

상기 R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 1 내지 5 중 선택되는 하나의 정수의 탄소수를 가진 알킬이며,

상기 R₃는 5 내지 20 중 선택되는 하나의 정수의 탄소수를 가진 알킬이다.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 4-(hexylamino)-2,3-dimethyl-4-oxobut-2-enoic acid를 더 포함하는 조성물.

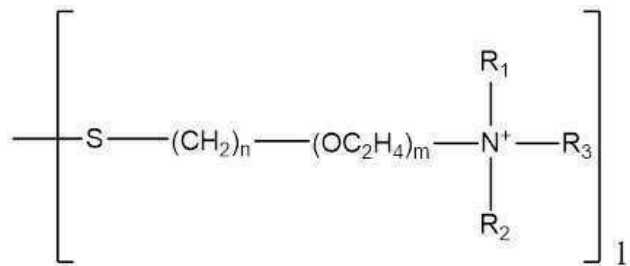
청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 조성물은 암 세포를 선택적으로 세포 사멸시키는 것인, 조성물.

청구항 8

상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이 결합된 금(Au) 나노 입자를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



상기 S는 황(S)이며,

상기 n은 5 내지 20 중 선택되는 하나의 정수이며,

상기 m은 2 내지 6 중 선택되는 하나의 정수이며,

상기 1은 1 내지 10^5 중 선택되는 하나의 정수이며,

상기 R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 1 내지 5 중 선택되는 하나의 정수의 탄소수를 가진 알킬이며,

상기 R_3 는 5 내지 20 중 선택되는 하나의 정수의 탄소수를 가진 알킬이다.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 암은 폐암, 피부암, 식도암, 전립선암, 자궁경부암 및 방광암으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인, 약학적 조성물.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 피부암은 편평세포암종, 각질극세포종, 흑색종, 기저세포암종인, 약학적 조성물.

청구항 11

청구항 8에 있어서, 4-(hexylamino)-2,3-dimethyl-4-oxobut-2-enoic acid를 더 포함하는 약학적 조성물.

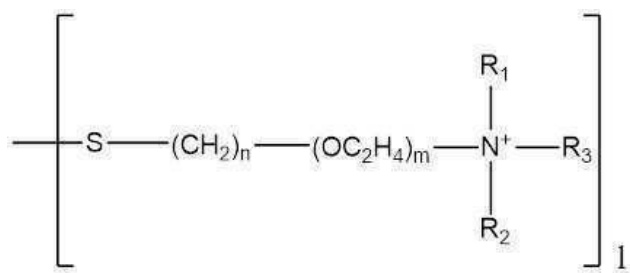
청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 조성물은 pH 6.5 내지 7.1의 범위에서 암 세포를 선택적으로 사멸시키는 것인, 약학적 조성물.

청구항 13

하기 화학식 1의 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염이 결합된 금(Au) 나노 입자를 포함하는 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품:

[화학식 1]



상기 S는 황(S)이며,

상기 n은 5 내지 20 중 선택되는 하나의 정수이며,

상기 m은 2 내지 6 중 선택되는 하나의 정수이며,

상기 1은 1 내지 10^5 중 선택되는 하나의 정수이며,

상기 R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 1 내지 5 중 선택되는 하나의 정수의 탄소수를 가진 알킬이며,

상기 R₃는 5 내지 20 중 선택되는 하나의 정수의 탄소수를 가진 알킬이다.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 4-(hexylamino)-2,3-dimethyl-4-oxobut-2-enoic acid를 더 포함하는 건강기능식품.

청구항 15

청구항 8 또는 11의 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 암의 예방 또는 치료용 나노 머신에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 단백질 및 핵산과 같은 생물학적 분자 머신은 다양하고 복잡한 생물학적 기능들을 수행함으로써 모든 생물학적 과정을 통제한다. 예를 들어, 단백질의 형태적 변화, 채널 단백질의 개방/폐쇄 과정 및 클라트린 또는 미세소관의 조립/분해는 증식, 세포 내 이입 및 세포 이동의 세포 과정을 지시한다. 생물학적 분자 머신은 관련 생물학적 반응에 반응하여, 3차원 형태의 정밀하고 프로그래밍된 기계적 운동을 통해 그 역할을 수행한다. 이렇나 자극-반응 작용은 정전기적, 소수성, 수소 결합 및 반데르 발스 상호작용과 같은 조화된 초분자 작용 세트를 이용하여 수행된다. 자연에서 영감받아, 분자 모터, 펌프, 근육 및 클램프를 포함하는 다양한 인공 분자 머신들이 개발되어 왔다. 하지만, 계층적 구조가 이동 단위와 정교한 생물학적 기능을 수행하기 위한 지지체로서 잔류물로 구성된 단백질과 달리, 개발된 나노 머신 시스템은 그들의 분자 조직의 낮은 수준에 의해 여전히 제한적이며, 각 구성요소의 선형 또는 회전 운동은 특정 방향 없이 개별적으로 제한된다. 따라서, 분자 구성 요소가 높은 차원의 구조로 통합되는 생물학적 기능 계층적 구조의 개발이 매우 요구된다.

[0004] 인공 나노 머신의 구성에 대한 주요 과제 중 하나는 그들의 움직임의 궤적을 방해하지 않으면서 작동 가능한 분자의 기계적 움직임을 특정 방향으로 발생되도록 허용하는 지지체에 분자 구성 요소를 효율적으로 고정시키는 것이다. 이러한 점에서, 무기 나노 입자는 전체적인 크기와 코어 내부에서 외부로 기능 단위의 배향 측면에서, 단백질과의 구조적 유사성으로 인해 지지체로 적합하다. 나노 입자에서, 그들의 표면에 유기 작용기의 존재는 생분자들과의 상호작용을 가능케 하며, 금속 코어는 천연 단백질에서 일반적으로 관찰되는 비가역적 형태 변화를 방지하기 위한 작용기에 대해 단단한 기질을 제공한다. 일부 분자-스위치-통합(molecular-switch-incorporated) 나노 입자들이 개발되었고, 감지, 촉매 및 게이트키퍼 시스템의 구축에 적용되었다. 하지만, 생물학적 대응물로서 적용 가능한 인공적인 나노 머신의 개발은 여전히 과제로 남아있었다.

[0005] 이에, 본원에서 독소 모방체로서 자극-반응성 나노 머신을 개발하기에 이르렀으며, 초분자 인식에 의해 유도된 기계적 움직임을 가진 나노 머신의 개발은 잠재적 치료 응용 프로그램을 가진 시스템의 개발을 위한 새로운 플랫폼을 제공할 수 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) Jana B et al. Drug resistance-free cytotoxic nanodrugs in composites for cancer therapy. J. Mater. Chem. B, 9(14): 3143-3152 (2021).

(비특허문헌 0002) Huang, T. J. & Juluri, B. K. Biological and biomimetic molecular machines.

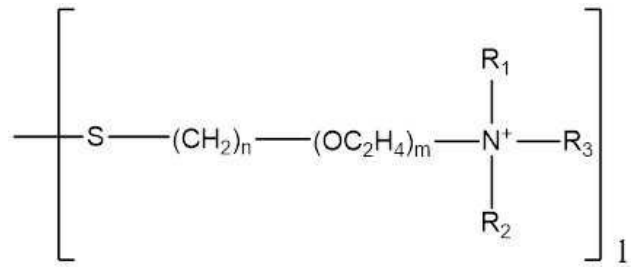
Nanomedicine 3, 107-124 (2008).

발명의 내용

해결하려는 과제

일 양상은 하기 화학식 1의 화합물이 결합된 금(Au) 나노 입자를 제공하는 것이다:

[화학식 1]



상기 S는 황(S)이며,

상기 n은 5 내지 20 중 선택되는 하나의 정수이며,

상기 m은 2 내지 6 중 선택되는 하나의 정수이며,

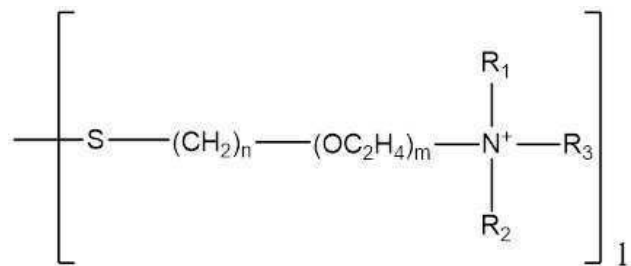
상기 l은 1 내지 10^5 중 선택되는 하나의 정수이며,

상기 R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 1 내지 5 중 선택되는 하나의 정수의 탄소수를 가진 알킬이며,

상기 R₃는 5 내지 20 중 선택되는 하나의 정수의 탄소수를 가진 알킬이다.

다른 양상은 하기 화학식 1의 화합물 또는 이의 염이 결합된 금(Au) 나노 입자를 포함하는 세포 사멸 유발용 조성물을 제공하는 것이다:

[화학식 1]



상기 S는 황(S)이며,

상기 n은 5 내지 20 중 선택되는 하나의 정수이며,

상기 m은 2 내지 6 중 선택되는 하나의 정수이며,

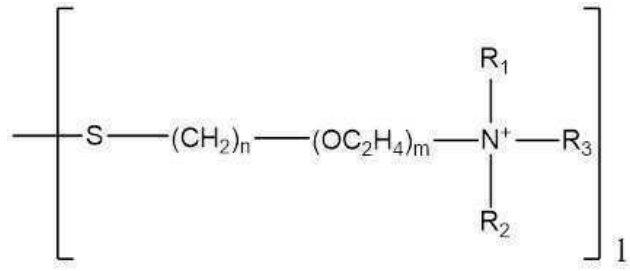
상기 l은 1 내지 10^5 중 선택되는 하나의 정수이며,

상기 R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 1 내지 5 중 선택되는 하나의 정수의 탄소수를 가진 알킬이며,

상기 R₃는 5 내지 20 중 선택되는 하나의 정수의 탄소수를 가진 알킬이다.

또 다른 양상은 하기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이 결합된 금(Au) 나노 입자를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다:

[0027] [화학식 1]



[0028]

[0029] 상기 S는 황(S)이며,

[0030] 상기 n은 5 내지 20 중 선택되는 하나의 정수이며,

[0031] 상기 m은 2 내지 6 중 선택되는 하나의 정수이며,

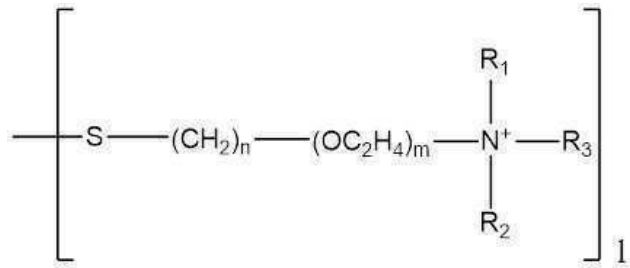
[0032] 상기 l은 1 내지 10^5 중 선택되는 하나의 정수이며,

[0033] 상기 R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 1 내지 5 중 선택되는 하나의 정수의 탄소수를 가진 알킬이며,

[0034] 상기 R₃는 5 내지 20 중 선택되는 하나의 정수의 탄소수를 가진 알킬이다.

[0035] 또 다른 양상은 하기 화학식 1의 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염이 결합된 금(Au) 나노 입자를 포함하는 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다:

[0036] [화학식 1]



[0037]

[0038] 상기 S는 황(S)이며,

[0039] 상기 n은 5 내지 20 중 선택되는 하나의 정수이며,

[0040] 상기 m은 2 내지 6 중 선택되는 하나의 정수이며,

[0041] 상기 l은 1 내지 10^5 중 선택되는 하나의 정수이며,

[0042] 상기 R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 1 내지 5 중 선택되는 하나의 정수의 탄소수를 가진 알킬이며,

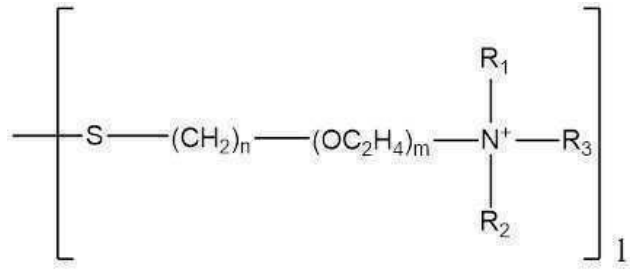
[0043] 상기 R₃는 5 내지 20 중 선택되는 하나의 정수의 탄소수를 가진 알킬이다.

[0044] 또 다른 양상은 상기 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0046] 일 양상은 하기 화학식 1의 화합물 또는 이의 염이 결합된 금(Au) 나노 입자를 제공한다:

[0047] [화학식 1]



[0048]

[0049] 상기 S는 황(S)이며,

[0050] 상기 n은 5 내지 20 중 선택되는 하나의 정수이며,

[0051] 상기 m은 2 내지 6 중 선택되는 하나의 정수이며,

[0052] 상기 l은 1 내지 10^5 중 선택되는 하나의 정수이며,

[0053] 상기 R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 1 내지 5 중 선택되는 하나의 정수의 탄소수를 가진 알킬이며,

[0054] 상기 R_3 는 5 내지 20 중 선택되는 하나의 정수의 탄소수를 가진 알킬이다.

[0055] 상기 금 나노 입자는 나노 독소 모방체로서 기계적 움직임을 통한 나노 머신으로서 작용할 수 있다. 구체적으로, 상기 금 나노 입자는 상기 $-\text{S}-(\text{CH}_2)_n-$ 모이어티가 소수성이고, $-(\text{OC}_2\text{H}_4)_m-\text{N}^+(\text{R}_1)(\text{R}_2)-$ 모이어티는 친수성이고, $-\text{R}_3$ 모이어티는 소수성인 바, 친수성 모이어티 부위를 중심으로 리간드 접힘/풀림(기계적 운동)이 가능하다. 상기 금 나노 입자는 상기 리간드 접힘/풀림을 통해 유기상 또는 수상 양쪽에서 존재가 가능하며, 계면 활성제 또는 랫칭 분자를 통해 상전이가 조절될 수 있다. 또한, 상기 금 나노 입자는 상기 리간드 접힘/풀림을 통해 세포막을 투과 및 파괴하여, 나노 독소 모방체로서 세포 사멸을 유발할 수 있다.

[0056] 용어 "염"은 일 양상에 따른 특정 화합물과 비교적 무독성인 산 또는 염기를 이용해서 조제되는 염을 의미한다.

[0057] 또한, 일 양상에 있어서, 상기 n은 5 내지 20 중 선택되는 하나의 정수일 수 있고, 구체적으로, 8 내지 15 중 선택되는 하나의 정수일 수 있고, 보다 구체적으로, 9 내지 13 중 선택되는 하나의 정수일 수 있다.

[0058] 또한, 일 양상에 있어서, 상기 m은 2 내지 6 중 선택되는 하나의 정수일 수 있고, 구체적으로, 3 내지 5 중 선택되는 하나의 정수일 수 있고, 보다 구체적으로 4일 수 있다.

[0059] 또한, 일 양상에 있어서, 상기 l은 1 내지 10^5 중 선택되는 하나의 정수일 수 있고, 구체적으로 10 내지 10^4 중 선택되는 하나의 정수, 10 내지 10^3 중 선택되는 하나의 정수, 보다 구체적으로, 10 내지 10^2 중 선택되는 하나의 정수일 수 있다.

[0060] 또한, 일 양상에 있어서, 상기 R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 1 내지 5 중 선택되는 하나의 정수의 탄소수를 가진 알킬일 수 있고, 구체적으로 각각 독립적으로 1 내지 2 중 선택되는 하나의 정수의 탄소수를 가진 알킬일 수 있고, 보다 구체적으로, 메틸일 수 있다.

[0061] 또한, 일 양상에 있어서, 상기 R_3 는 5 내지 20 중 선택되는 하나의 정수의 탄소수를 가진 알킬일 수 있고, 구체적으로 8 내지 15 중 선택되는 하나의 정수의 탄소수를 가진 알킬일 수 있고, 보다 구체적으로, 9 내지 12 중 선택되는 하나의 정수의 탄소수를 가진 알킬일 수 있다.

[0062] 상기 n, m, l, R_1 , R_2 및 R_3 가 상기 기재된 사항 범위 내일 경우, 리간드 접힘/풀림이 적합하게 이루어질 수 있으나, 상기 기재된 사항 범위를 초과하는 경우, 리간드 접힘/풀림이 적절하게 이루어지지 않을 수 있고, 이에 따라 세포막을 투과하지 못하거나, 세포 사멸을 유발하지 못 할 수 있다.

[0063] 또한, 일 양상에 있어서, 상기 금 나노 입자의 직경은 0.5 내지 3.5 nm일 수 있고, 구체적으로는 1 내지 3 nm일 수 있고, 보다 구체적으로는 1.2 내지 2.8 nm일 수 있다.

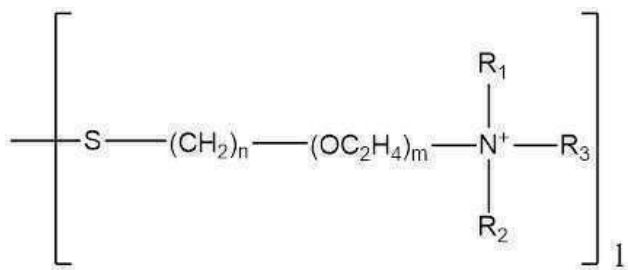
[0064] 상기 금 나노 입자의 직경이 0.5 nm 미만인 경우, 충분한 수의 리간드가 결합되지 못하여, 리간드 접힘/풀림이 적절하게 이루어지지 않을 수 있고, 3.5 nm 초과인 경우 리간드끼리의 반발력으로 인하여 리간드 접힘/풀림이 적절하게 이루어지지 않을 수 있고, 이에 따라 세포막을 투과하지 못하거나, 세포 사멸을 유발하지 못 할 수 있다.

[0065] 또한, 일 양상에 있어서, 상기 금 나노 입자의 제타 전위는 13 내지 15.5 mV일 수 있고, 구체적으로, 13.5 내지 15 mV일 수 있고, 보다 구체적으로 14 내지 14.5 mV일 수 있다.

[0066] 상기 금 나노 입자의 제타 전위가 13 mV 미만이거나 15.5 mV 초과인 경우, 리간드 접힘/풀림이 적절하게 이루어지지 않을 수 있고, 이에 따라 세포막을 투과하지 못하거나, 세포 사멸을 유발하지 못 할 수 있다.

[0068] 다른 양상은 하기 화학식 1의 화합물 또는 이의 염이 결합된 금(Au) 나노 입자를 포함하는 세포 사멸 유발용 조성물을 제공한다:

[0069] [화학식 1]



[0070]

[0071] 상기 S는 황(S)이며,

[0072] 상기 n은 5 내지 20 중 선택되는 하나의 정수이며,

[0073] 상기 m은 2 내지 6 중 선택되는 하나의 정수이며,

[0074] 상기 l은 1 내지 10^5 중 선택되는 하나의 정수이며,

[0075] 상기 R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 1 내지 5 중 선택되는 하나의 정수의 탄소수를 가진 알킬이며,

[0076] 상기 R₃는 5 내지 20 중 선택되는 하나의 정수의 탄소수를 가진 알킬이다.

[0077] 상기 화학식 1의 화합물 및 금 나노 입자는 전술한 범위 내일 수 있다.

[0078] 상기 조성물 내 금 나노 입자는 상기 리간드 접힘/풀림을 통해 세포막을 투과 및 파괴하여, 나노 독소 모방체로서 세포 사멸을 유발할 수 있다.

[0079] 일 양상에 있어서, 상기 조성물은 4-(hexylamino)-2,3-dimethyl-4-oxobut-2-enoic acid를 더 포함할 수 있다.

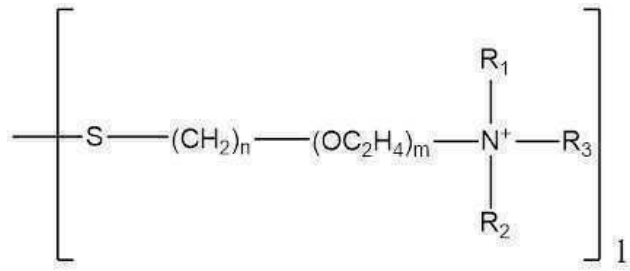
[0080] 상기 4-(hexylamino)-2,3-dimethyl-4-oxobut-2-enoic acid는 C6-DMMA로도 지칭될 수 있고, 상기 금 나노 입자의 랫칭(latching) 분자로서 작용할 수 있다. 구체적으로, 4-(hexylamino)-2,3-dimethyl-4-oxobut-2-enoic acid는 상기 화학식 1의 화합물이 결합된 금 나노 입자의 양이온 표면 전하를 중화시키고, 접혀있는 상기 화학식 1의 -R₃(소수성 모이어티)를 입체적으로 방해하여 풀리지 않게 고정시킬 수 있다. 이에 따라 상기 조성물 내 금 나노 입자의 독성을 감소시킬 수 있고, 종양 미세 환경과 같은 산성 조건에서는 아마이드 결합이 절단되어 핵 실 아민 생성됨과 동시에 상기 화학식 1의 -R₃(소수성 모이어티)가 풀릴 수 있어, 세포 독성 능력이 다시 활성화될 수 있다.

[0081] 상기와 같이 종양 미세 환경(약산성, 예를 들어, pH 6.5 내지 7.1)에서 상기 조성물은 세포 독성 능력이 다시 활성화되는 바, 암 세포를 선택적으로 세포 사멸시킬 수 있다.

[0083] 또 다른 양상은 하기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이 결합된 금(Au) 나노 입자를 포

합하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다:

[화학식 1]



상기 S는 황(S)이며,

상기 n은 5 내지 20 중 선택되는 하나의 정수이며,

상기 m은 2 내지 6 중 선택되는 하나의 정수이며,

상기 l은 1 내지 10^5 중 선택되는 하나의 정수이며,

상기 R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 1 내지 5 중 선택되는 하나의 정수의 탄소수를 가진 알킬이며,

상기 R₃는 5 내지 20 중 선택되는 하나의 정수의 탄소수를 가진 알킬이다.

상기 화학식 1의 화합물, 금 나노 입자 등은 전술한 범위 내일 수 있다.

용어 "약학적으로 허용 가능한"이란 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 특성을 나타내는 것을 의미한다.

용어 "약학적으로 허용 가능한 염"이란, 일 양상에 따른 특정 화합물과 비교적 무독성인 산 또는 염기를 이용해서 조제되는 염을 의미한다. 상기 화합물이 상대적으로 산성 관능기를 포함할 때, 순수 용액 또는 적합한 불활성 용매 중에서 충분한 양의 염기를 이러한 화합물의 중성 형태와 접촉시킴으로써 염기 부가염을 얻을 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 염기 부가염은 나트륨, 칼륨, 칼슘, 암모늄, 유기 아민, 혹은 마그네슘의 염 또는 유사한 염이 포함된다. 상기 화합물이 상대적으로 염기성 관능기를 포함할 때, 순수 용액 또는 적합한 불활성 용매 중에서 충분한 양의 산을 이러한 화합물의 중성 형태와 접촉시킴으로써 산 부가염을 얻을 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 산 부가염은 염산, 브롬화 수소산, 질산, 탄산, 탄산 수소 이온, 인산, 인산 1수소 이온, 인산 2수소 이온, 황산, 황산 수소 이온, 요오드화 수소산 또는 아인산 등의 무기산의 염, 그리고 아세트산, 프로피온산, 이소부티르산, 말레산, 말론산, 안식향산, 숙신산, 수베르산, 푸마르산, 락트산, 만델산, 프탈산, 벤젠술폰산, p-톨릴술폰산, 구연산, 주석산, 메탄술폰산 등의 유기산의 염을 들 수 있고, 나아가 아미노산(예를 들면 아르기닌 등)의 염 및 글루쿠론산 등의 유기산의 염도 포함된다.

상기 약학적으로 허용 가능한 염은 산성 또는 염기성 부분을 포함하는 모체 화합물로부터 통상적인 화학적 방법으로 합성할 수 있다. 일반적으로 이러한 염은 수중 또는 유기 용매 중 또는 이 2종의 혼합물 중에서, 이들 화합물의 유리산 또는 염기의 형태를 화학량론적으로 적량인 염기 또는 산과 반응시켜서 조제된다. 일반적으로 에테르, 아세트산에틸, 에탄올, 이소프로판올 또는 아세토니트릴 등의 비수성 매질이 바람직하다.

용어 "예방"은 일 양상에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 개체의 암을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미할 수 있다.

용어 "치료"는 일 양상에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 개체의 암에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미할 수 있다.

일 양상에 따르면, 상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이 결합된 금 나노 입자는 리간드 접합/폴림을 통해 세포막을 투과 및 파괴하여, 나노 독소 모방체로서 세포 사멸을 유발하여 암의 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있다.

상기 약학적 조성물은 유효성분을 단독으로 포함하거나, 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하여 약학적 조성물로 제공될 수 있다.

- [0100] 구체적으로, 상기 담체는 예를 들어, 콜로이드 현탁액, 분말, 식염수, 지질, 리포좀, 미소구체(microspheres) 또는 나노 구형 입자일 수 있다. 이들은 운반 수단과 복합체를 형성하거나 관련될 수 있고, 지질, 리포좀, 미세 입자, 금, 나노입자, 폴리머, 축합 반응제, 다당류, 폴리아미노산, 덴드리머, 사포닌, 흡착 증진 물질 또는 지방산과 같은 당업계에 공지된 운반 시스템을 사용하여 생체 내 운반될 수 있다.
- [0101] 상기 약학적 조성물이 제제화될 경우에는 통상적으로 사용하는 윤활제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제, 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함될 수 있고, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calciumcarbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며, 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 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propyleneglycol), 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로 젤라틴 등이 사용될 수 있고, 점안제 형태로 제조 시 공지의 희석제 또는 부형제 등이 사용될 수 있다.
- [0102] 또한, 일 양상에 있어서, 상기 약학적 조성물은 다른 항암제를 더 포함할 수 있다.
- [0103] 상기 약학적 조성물은 종래에 알려져 있는 암의 예방 또는 치료용 조성물, 기존의 항암제 또는 새롭게 개발되는 항암제를 더 포함할 수 있고, 이들과 혼합되어 제공될 수도 있다.
- [0104] 상기 약학적 조성물이 암의 예방 또는 치료 효과를 가지는 다른 항암제를 포함하는 경우, 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양이 혼합되는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0105] 상기 약학적 조성물이 다른 항암제를 더 포함하는 경우, 상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이 결합된 금(Au) 나노 입자를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물만을 유효성분으로 포함하는 경우보다 항암 효과, 즉 종양 성장 억제, 면역활성 등의 효과가 보다 현저해지는 시너지 효과가 나타날 수 있다.
- [0106] 또한, 일 양상에 있어서, 상기 약학적 조성물은 단독 투여 또는 다른 항암제와 병용 투여되는 것일 수 있다.
- [0107] 상기 다른 항암제는 종래에 알려져 있는 암의 예방 또는 치료용 조성물, 기존의 항암제 또는 새롭게 개발되는 항암제일 수 있다.
- [0108] 상기 약학적 조성물은 암의 예방 또는 치료 효과를 가지는 공지의 조성물 또는 다른 항암제와 병행하여 투여될 수 있고, 동시에, 별도로, 또는 순차적으로 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0109] 상기 약학적 조성물이 다른 항암제와 병용투여되는 경우, 상기 약학적 조성물을 단독 투여하는 경우보다 항암 효과, 즉 종양 성장 억제, 면역활성 등의 효과가 보다 현저해지는 시너지 효과가 나타날 수 있다.
- [0110] 용어 "투여"란 적절한 방법으로 개체에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, "개체"란 암을 보유할 수 있는 인간을 포함한 쥐, 생쥐, 가축 등의 모든 생물을 의미한다. 구체적인 예로, 인간을 포함한 포유동물일 수 있다.
- [0111] 상기 약학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사, 동맥내 주사, 골수내 주사, 심장내 주사, 경막내 주사, 경피주사, 비강내 주사, 장관내 주사, 국소주사, 설하 주사, 직장내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식을 선택할 수 있다.
- [0112] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 구체적으로, 상기 약학적 조성물은 0.001 내지 1000 mg/kg/day로, 보다 구체적으로 0.1 내지 100 mg/kg/day로 투여될 수 있다. 상기

투여는 하루에 한 번 투여되는 것일 수도 있고, 수 회 나누어 투여되는 것일 수도 있다.

[0113] 용어 "암(cancer)"는 제어 불가능하게 증식하며 정상적인 신체 조직을 침투하고 파괴하는 능력을 갖는 비정상적인 세포의 발생을 특징으로 하는 질병의 부류를 지칭한다.

[0114] 상기 암은 청각 신경종(acoustic neuroma); 선암종(adenocarcinoma); 부신암(adrenal gland cancer); 항문암(anal cancer); 혈관육종(angiosarcoma)(예를 들어, 림프관육종(lymphangiosarcoma), 림프혈관내피육종(lymphangioendotheliosarcoma), 혈관육종(hemangiosarcoma)); 충수암(appendix cancer); 양성 단세포군 감마글로블린병증(monoclonal gammopathy); 담도암(biliary cancer)(예를 들어, 담관 암종(cholangiocarcinoma)); 방광암(bladder cancer); 유방암(breast cancer)(예를 들어, 유방의 선암종, 유방의 유두상 암종(papillary carcinoma), 유선암(mammary cancer), 유방의 수질 암종(medullary carcinoma)); 뇌암(brain cancer)(예를 들어, 수막종(meningioma), 교모세포종(glioblastoma), 신경교종(glioblastoma)(예를 들어, 성상 세포종(astrocytoma), 핍지교종(oligodendroglioma)), 수모세포종(medulloblastoma)); 기관지암(bronchus cancer); 유암 종양(carcinoid tumor); 자궁경부암(cervical cancer)(예를 들어, 자궁경부선암종(cervical adenocarcinoma)); 융모암종(choriocarcinoma); 척색종(chordoma); 머리인두종(craniopharyngioma); 결장암(colorectal cancer)(예를 들어, 대장암(colon cancer), 직장암(rectal cancer), 직결장 선암종(colorectal adenocarcinoma)); 연결 조직 암(connective tissue cancer); 상피 암종(epithelial carcinoma); 상의 세포종(ependymoma); 내피세포육종(endotheliosarcoma)(예를 들어, 카포시 육종(Kaposi's sarcoma), 다발성 특발성 출혈 육종(multiple idiopathic hemorrhagic sarcoma)); 자궁 내막암(endometrial cancer)(예를 들어, 자궁암(uterine cancer), 자궁 육종(uterine sarcoma)); 식도암(esophageal cancer)(예를 들어, 식도의 선암종, 바렛 선암종(Barrett's adenocarcinoma)); 윙 육종(Ewing's sarcoma); 안암(ocular cancer)(예를 들어, 안내 흑색종(intraocular melanoma), 망막아종(retinoblastoma)); 가족성 과호산구증가증(familial hypereosinophilia); 담낭암(gall bladder cancer); 위암(gastric cancer)(예를 들어, 위 선암(stomach adenocarcinoma)); 위장관 기질적 종양(gastrointestinal stromal tumor; GIST); 생식세포 암(germ cell cancer); 두경부암(head and neck cancer)(예를 들어, 두경부 편평세포암종(head and neck squamous cell carcinoma), 구강암(oral cancer)(예를 들어, 구강 편평세포암종(oral squamous cell carcinoma)); 인후암(throat cancer)(예를 들어, 후두암(laryngeal cancer), 인두암(pharyngeal cancer), 비인두암(nasopharyngeal cancer), 구인두암(oropharyngeal cancer)); 중쇄병(heavy chain disease)(예를 들어, 알파쇄병(alpha chain disease), 감마쇄병(gamma chain disease), 뮤쇄병(mu chain disease)); 혈관모세포종(hemangioblastoma); 하인두암(hypopharynx cancer); 염증성 근섬유모세포 종양(inflammatory myofibroblastic tumors); 면역성 아밀로이드 병증(immunocytic amyloidosis); 신장암(kidney cancer)(예를 들어, 신아세포종(nephroblastoma), 윌름 종양(Wilms' tumor)으로도 알려져 있음, 신세포 암종(renal cell carcinoma)); 간암(liver cancer)(예를 들어, 간 세포암(hepatocellular cancer, HCC), 악성 간암종(malignant hepatoma)); 폐암(lung cancer)(예를 들어, 기관지원성 암종(bronchogenic carcinoma), 소세포 폐암(small cell lung cancer, SCLC), 비소세포 폐암(non-small cell lung cancer, NSCLC), 폐의 선암); 평활근육종(leiomyosarcoma; LMS); 비만세포증(mastocytosis)(예를 들어, 전신성 비만세포증(systemic mastocytosis)); 근육암(muscle cancer); 골수이형성 증후군(myelodysplastic syndrome; MDS); 중피종(mesothelioma); 골수증식성 질환(mesothelioma; myeloproliferative disorder, MPD)(예를 들어, 진성다혈구증(polycythemia Vera; PV), 본태성 혈소판 증가증(essential thrombocytosis; ET), 골수 섬유증(myelofibrosis; MF)으로도 알려진 원인불명 골수화생(agnogenic myeloid metaplasia; AMM), 만성 특발성 골수섬유증(chronic idiopathic myelofibrosis), 만성 골수성 백혈병(chronic myelocytic leukemia, CML), 만성 호중구성 백혈병(chronic neutrophilic leukemia, CNL), 과호산구 증후군(hypereosinophilic syndrome, HES)); 신경아세포종(neuroblastoma); 신경 섬유종(neurofibroma)(예를 들어, 신경 섬유종증(neurofibromatosis, NF) 타입 1 또는 타입 2, 신경초종증(schwannomatosis)); 신경내분비암(neuroendocrine cancer)(예를 들어, 위장관 췌장 신경내분비 종양(gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor; GEP-NET), 카르시노이드 종양(carcinoid tumor)); 골육종(osteosarcoma)(예를 들어, 골암(bone cancer)); 난소암(ovarian cancer)(예를 들어, 낭포선암(cystadenocarcinoma), 난소 배아 암종(ovarian embryonal carcinoma), 난소 선암(ovarian adenocarcinoma)); 유두상 선암(papillary adenocarcinoma); 췌장암(pancreatic cancer)(예를 들어, 췌장 선암(pancreatic adenocarcinoma), 유두상 점액성 종양 유관(intraductal papillary mucinous neoplasm; IPMN), 도세포 종양(Islet cell tumors)); 음경암(penile cancer)(예를 들어, 음경 및 음낭의 파제트병(Paget's disease)); 송과체종(pinealoma); 원시 신경외배엽성 종양(primitive neuroectodermal tumor; PNT); 혈장세포 종양형성(plasma cell neoplasia); 부신생물 증후군(paraneoplastic syndrome); 상피내 신생물(intraepithelial neoplasm); 전립선암(prostate cancer)(예를 들어, 전립선 선암(prostate adenocarcinoma));

직장암(rectal cancer); 횡문근육종(rhabdomyosarcoma); 침샘암(salivary gland cancer); 피부암(skin cancer)(예를 들어, 편평세포암종(squamous cell carcinoma, SCC), 각질극세포종(keratoacanthoma, KA), 흑색 종(melanoma), 기저세포암종(basal cell carcinoma, BCC)); 소장암(small bowel cancer)(예를 들어, 충수암(appendix cancer)); 연조직 육종(soft tissue sarcoma)(예를 들어, 악성 섬유성조직구종(malignant fibrous histiocytoma, MFH), 지방 육종(liposarcoma), 악성 말초신경초종(malignant peripheral nerve sheath tumor, MPNST), 연골육종(chondrosarcoma), 섬유육종(fibrosarcoma), 점액육종(myxosarcoma)); 피지선 암종(sebaceous gland carcinoma); 소장암(small intestine cancer); 땀샘 암종(sweat gland carcinoma), 활막종(synovioma), 고환암(testicular cancer)(예를 들어, 정상피종(seminoma), 고환 배아 암종(testicular embryonal carcinoma)); 갑상선암(thyroid cancer)(예를 들어, 갑상선의 유두상 암종(papillary carcinoma of the thyroid), 유두상 갑상선 암종(papillary thyroid carcinoma, PTC), 갑상선 수질암(medullary thyroid cancer)); 요도암(urethral cancer); 질암(vaginal cancer); 및 외음부암(vulvar cancer)(예를 들어, 외음부의 파제트병(Paget's disease))로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 암일 수 있고, 구체적으로, 편평세포암 종일 수 있다.

[0115] 일 양상에 있어서, 상기 약학적 조성물은 4-(hexylamino)-2,3-dimethyl-4-oxobut-2-enoic acid를 더 포함할 수 있다.

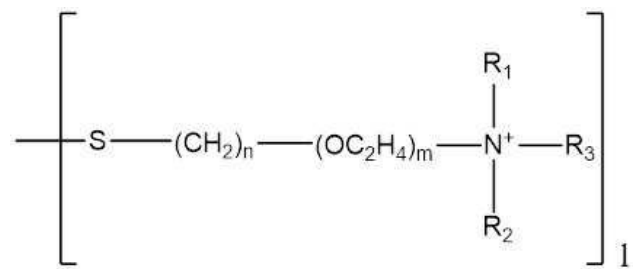
[0116] 상기 4-(hexylamino)-2,3-dimethyl-4-oxobut-2-enoic acid는 상기 화학식 1의 화합물이 결합된 금 나노 입자의 양이온 표면 전하를 중화시키고, 접혀있는 상기 화학식 1의 $-R_3$ (소수성 모이어티)를 입체적으로 방해하여 풀리지 않게 고정시킬 수 있다. 이에 따라 상기 조성물 내 금 나노 입자의 독성을 감소시킬 수 있고, 종양 미세 환경과 같은 산성 조건에서는 아마이드 결합이 절단되어 핵심 아민 생성됨과 동시에 상기 화학식 1의 $-R_3$ (소수성 모이어티)가 풀릴 수 있어, 세포 독성 능력이 다시 활성화될 수 있다.

[0117] 상기와 같이 종양 미세 환경(약산성, 예를 들어, pH 6.5 내지 7.1)에서 상기 조성물은 세포 독성 능력이 다시 활성화되는 바, 암 세포를 선택적으로 세포 사멸시킬 수 있다.

[0118] 일 양상에 있어서, 상기 조성물은 pH 6.5 내지 7.1의 범위에서 암 세포를 선택적으로 사멸시킬 수 있고, 구체적으로 pH 6.6 내지 7.0, 보다 구체적으로는 pH 6.7 내지 6.9의 범위에서 암 세포를 선택적으로 사멸시킬 수 있다.

[0120] 또 다른 양상은 하기 화학식 1의 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염이 결합된 금(Au) 나노 입자를 포함하는 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다:

[0121] [화학식 1]



[0122]

[0123] 상기 S는 황(S)이며,

[0124] 상기 n은 5 내지 20 중 선택되는 하나의 정수이며,

[0125] 상기 m은 2 내지 6 중 선택되는 하나의 정수이며,

[0126] 상기 l은 1 내지 10^5 중 선택되는 하나의 정수이며,

[0127] 상기 R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 1 내지 5 중 선택되는 하나의 정수의 탄소수를 가진 알킬이며,

[0128] 상기 R_3 는 5 내지 20 중 선택되는 하나의 정수의 탄소수를 가진 알킬이다.

- [0129] 상기 "화학식 1의 화합물", "금 나노 입자", "암", "예방" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.
- [0130] 상기 용어 "식품학적으로 허용 가능한"이란 상기 화합물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 특성을 나타내는 것을 의미한다.
- [0131] 상기 용어 "식품학적으로 허용 가능한 염"이란, 일 양상에 따른 특정 화합물과 비교적 무독성인 산 또는 염기를 이용해서 조제되는 염을 의미하며, "염"에 관한 전술한 범위 내일 수 있다.
- [0132] 상기 용어 "개선"이란 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들어, 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미할 수 있다. 이때, 상기 건강기능식품은 암의 예방 또는 개선을 위하여 해당 질의 발병 단계 이전 또는 발병 후, 치료를 위한 약제와 동시에 또는 별개로 사용될 수 있다.
- [0133] 상기 건강기능식품에서, 유효성분은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 상기 건강기능식품은 원료에 대하여 구체적으로 약 15 중량% 이하, 보다 구체적으로 약 10 중량% 이하의 양으로 첨가될 수 있다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있다.
- [0134] 상기 건강기능식품은 담체, 희석제, 부형제 및 첨가제 중 하나 이상을 더 포함하여 정제, 환제, 산제, 과립제, 분말제, 캡슐제 및 액제 제형으로 이루어진 군에서 선택된 하나로 제형될 수 있다. 일 양상에 따른 화합물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 각종 식품류, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽제, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강 기능성 식품류 등이 있다.
- [0135] 상기 담체, 부형제, 희석제 및 첨가제의 구체적인 예로는 락토즈, 텍스트로즈, 슈크로즈, 솔비톨, 만니톨, 에리스리톨, 전분, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 미세결정성 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 메틸셀룰로즈, 물, 설탕시럽, 메틸셀룰로즈, 메틸하이드록시 벤조에이트, 프로필하이드록시 벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다.
- [0136] 상기 건강기능식품은 상기 유효성분을 함유하는 것 외에 특별한 제한없이 다른 성분들을 필수 성분으로서 함유할 수 있다. 예를 들어, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당 알코올일 수 있다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제 (타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어, 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르트람 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 당업자의 선택에 의해 적절하게 결정될 수 있다.
- [0137] 상기 외에도, 일 양상에 따른 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있으며, 이러한 첨가제의 비율 또한 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다.
- [0138] 상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염이 결합된 금(Au) 나노 입자는 상기 리간드 접힘/폴딩을 통해 세포막을 투과 및 파괴하여, 나노 독소 모방체로서 세포 사멸을 유발할 수 있다.
- [0139] 일 양상에 있어서, 상기 건강기능식품은 4-(hexylamino)-2,3-dimethyl-4-oxobut-2-enoic acid를 더 포함할 수 있다.
- [0140] 상기 4-(hexylamino)-2,3-dimethyl-4-oxobut-2-enoic acid는 상기 화학식 1의 화합물이 결합된 금 나노 입자의 양이온 표면 전하를 중화시키고, 접혀있는 상기 화학식 1의 $-R_3$ (소수성 모이어티)를 입체적으로 방해하여 폴리지 않게 고정시킬 수 있다. 이에 따라 상기 건강기능식품 내 금 나노 입자의 독성을 감소시킬 수 있고, 종양 미세 환경과 같은 산성 조건에서는 아마이드 결합이 절단되어 핵심 아민 생성됨과 동시에 상기 화학식 1의 $-R_3$ (소수성 모이어티)가 풀릴 수 있어, 세포 독성 능력이 다시 활성화될 수 있다.

[0141] 상기와 같이 중양 미세 환경(약산성, 예를 들어, pH 6.5 내지 7.1)에서 상기 건강기능식품은 세포 독성 능력이 다시 활성화되는 바, 암 세포를 선택적으로 세포 사멸시킬 수 있다.

[0143] 또 다른 양상은 상기 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0144] 상기 용어 “약학적 조성물”, “개체”, “투여”, “예방”, “치료”, “암” 등은 전술한 범위 내일 수 있다.

발명의 효과

[0146] 일 양상에 따라 제공되는 금 나노 입자는 나노 머신으로 작용하여, 세포 사멸을 유발할 수 있고, 특히, 4-(hexylamino)-2,3-dimethyl-4-oxobut-2-enoic acid와 함께 제공됨으로써 산성 조건인 암 세포를 선택적으로 세포 사멸시킬 수 있다. 이에 따라, 상기 금 나노 입자를 포함하는 약학적 조성물 및 건강기능식품은 암중에 관계 없이, 암 세포의 예방, 개선 또는 치료 효과를 나타낼 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0148] 도 1은 개발된 나노 머신의 개략도를 나타낸 도이다.

도 2는 시뮬레이션을 위한 CG(Coarse-grained) 모델을 나타낸 도이다.

도 3은 분자의 구조적 조정 가능성, NMR 및 상전이 연구 결과를 나타낸 도이다.

도 4의 a는 AuNP-C10 및 AuNP-TTMA의 TEM 이미지를 나타내며, b는 AuNP-C10 및 AuNP-TTMA의 유체역학적 반경을 나타내며, c는 AuNP-C10 및 AuNP-TTMA의 제타 전위를 나타낸 도이다.

도 5는 금 나노 입자로서 AuNP-C10의 양친매성 특성을 나타낸 도이다.

도 6은 말단 극성을 가진 2개의 용매로부터 동결 건조된 AuNP-C10 분말의 SAXS 곡선 피팅 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 AuNP-C10의 알킬 단위의 구조적 조정 가능성을 나타낸 도이다.

도 8은 기름-물 계면에서 AuNP-C10의 상전이를 나타낸 도이다.

도 9는 물/DCM 2상 시스템에 OA 및 TOAB를 첨가하는 동안의 CGMD 결과의 구성을 나타낸 도이다.

도 10은 OA의 알킬 그룹과 AuNP-C10 리간드의 구성 요소의 RDF를 나타낸 도이다.

도 11의 a는 DCM에서 물로 AuNP-C10의 전이에 대한 스냅샷을 나타내며, b는 DCM 및 수상에서 AuNP-C10의 시스템의 자유에너지를 나타낸 도이다.

도 12는 기름-물 계면에서 AuNP-C10의 상전이를 나타낸 도이다.

도 13은 랫치 분자의 스레딩을 통한 리간드 폴립 및 표면 정전기 특성이 제어를 나타낸 도이다.

도 14의 a는 350 ns 후 DMMA와 AuNP-C10의 스냅샷을 나타내고, b는 C10 리간드의 구성요소 및 DMMA의 친수성 그룹의 RDF를 나타내며, c는 DMMA-C10 리간드 및 OA-C10 리간드의 RDF를 나타내고, d는 시뮬레이션 시간에 따라 C10 리간드의 종단 간 거리를 나타낸 도이다.

도 15는 접힘-폴립 형태 변화를 통한 나노 독소의 직접 침투 및 그의 세포 독성을 나타낸 도이다.

도 16은 AuNP-C10이 처리된 SCC7 세포의 세포-TEM 이미지를 나타낸 도이다.

도 17은 AuNP-TTMA이 처리된 SCC7 세포의 세포-TEM 이미지를 나타낸 도이다.

도 18의 a는 AuNP-C10의 암세포막에의 침투 및 침투 전후의 AuNP-C10의 확대된 상태를 나타내며, b는 암세포막 상의 AuNP-TTMA의 흡수 및 막의 압출을 나타낸 도이다.

도 19의 a는 AuNP-C10이 세포막에 침투할 때, C10 리간드의 TEG 그룹의 용매가 접근 가능한 표면적(SASA: Solvent accessible surface area)을 나타내고, b는 세포막의 지질과 C10 리간드 간의 상호작용 에너지를 나타낸 도이다.

도 20은 세포막을 가로지르는 AuNP-C10 및 AuNP-TTMA의 전위 메커니즘을 CGMD 시뮬레이션을 통해 조사한 결과를 나타낸 도이다.

도 21은 지질의 머리와 꼬리 그룹 및 TTMA 리간드의 구성요소 간의 RDF를 나타낸 도이다.

도 22는 AuNP-C10(a) 및 AuNP-TTMA(b)의 암세포막을 통한 전위 동안 상대 위치 에너지를 나타낸 도이다.

도 23은 세포 내 나노 독소의 세포 독성 및 표적 활성화를 나타낸 도이다.

도 24는 pH 7.4 및 pH 6.8에서 AuNP-C10 및 AuNP-SucA의 세포독성 분석을 나타낸 도이다.

도 25의 a는 pH 7.4에서 AuNP-DMMA를 처리한 SCC7 세포의 세포-TEM 이미지를 나타내고, b는 pH 6.8에서 AuNP-DMMA를 처리한 SCC7 세포의 세포-TEM 이미지를 나타낸 도이다.

도 26은 약물 내성이 있는 암세포에서 AuNP-C10의 세포 독성을 나타낸 도이다(a: MCF7/ADR and b: SNU-620-ADR).

도 27은 나노 독소로서의 나노 머신을 나타낸 도이다.

도 28의 a는 AuNP-DMMA 및 AuNP-SucA를 처리하고, pH 7.4 및 pH 6.8에서 배양한 SCC7 세포의 아넥신 V-FITC/PI 염색에 따른 세포사멸/괴사에 대한 유세포 분석을 나타내며, b는 pH 7.4 및 pH 6.8에서 PI 및 아넥신 V의 염색 후 AuNP-DMMA 및 AuNP-SucA를 처리한 SCC7 세포의 공초점 이미지를 나타낸 도이다.

도 29는 pH 7.4 및 pH 6.8에서 AuNP-DMMA 및 AuNP-SucA를 처리한 SCC7 세포의 웨스턴 블롯 분석을 나타낸 도이다.

도 30은 pH 7.4 및 pH 6.8에서 AuNP-DMMA 및 AuNP-SucA를 처리한 SCC7 세포의 공초점 이미지를 나타낸 도이다.

도 31은 금 나노 입자의 기능화를 위한 C10 리간드의 합성 계획을 나타낸 도이다.

도 32는 CDCl_3 내 compound 2의 ^1H NMR 스펙트럼(400 MHz)을 나타낸 도이다(D, 99.8%).

도 33은 CDCl_3 내 compound 3의 ^1H NMR 스펙트럼(400 MHz)을 나타낸 도이다(D, 99.8%).

도 34는 CDCl_3 내 compound 4의 ^1H NMR 스펙트럼(400 MHz)을 나타낸 도이다(D, 99.8%).

도 35는 C10-리간드-보호된 금 나노 입자(AuNP-C10)의 합성을 나타낸 도이다.

도 36은 D_2O 내 AuNPs-C10의 ^1H NMR 스펙트럼(400 MHz)을 나타낸 도이다(D, 99.8%).

도 37은 DMMA의 합성 계획을 나타낸 도이다.

도 38은 CDCl_3 내 DMMA의 ^1H NMR 스펙트럼(400 MHz)을 나타낸 도이다(D, 99.8%).

도 39는 SucA의 합성 계획을 나타낸 도이다.

도 40은 CDCl_3 내 SucA의 ^1H NMR 스펙트럼(400 MHz)을 나타낸 도이다(D, 99.8%).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0149]

이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0151]

본원 나노 머신의 개요

[0152] 일 양상은 이동 가능한 분자 구성 요소가 2.0 ± 0.7 nm의 평균 직경을 가진 금 나노 입자 상에 단층으로 통합된 합성 나노 머신 시스템을 제공한다. 분자 시스템은 3개의 기능 도메인으로 구성되었다: 소수성 알칸티올 내부, 4차 암모늄 양이온이 존재하는 테트라 에틸렌 글리콜(TEG: tetra-ethylene glycol)으로 구성된 친수성 중간 구조 및 친수성 알킬 말단 그룹(도 1a). 수성 배지에서, 말단 그룹은 소수성 내부에 묻혀 있어, 친수성 표면 부분이 외부로 노출된 상태(접힌 형태)를 유지함으로써 나노입자들을 가용성으로 유지한다. 세포 지질 이중층과 같은 소수성 도메인과의 접촉하면, 알킬 말단 그룹은 외부 표면에 불리하게 노출되어(접히지 않은 형태)(도 1b), 나노 머신이 막을 파괴하고 세포질로 침투할 수 있다(도 1c). 이것은 결국 막 펀칭과 생물학적 독소의 침투 과정을 모방하여 세포 사멸을 유발할 수 있다(도 1d).

[0153] 또한, 나노 머신은 초분자 상호 작용을 통해 분자 부가물로 추가적으로 변형될 수 있다(도 1e). 나노 머신에 랫칭 분자로 4-(hexylamino)-2,3-dimethyl-4-oxobut-2-enoic acid (C6-DMMA, 도 1f)를 연결함으로써, 양이온 표면 전하가 중화되고, 알킬 말단 그룹의 노출이 입체적으로 방해받는다(도 1e 및 1g), 흡수 및 세포의 상호 작용을 감소시킨다. 이러한 나노 머신의 기계적 움직임의 시스템적 억제제는 그의 세포 독성을 감소시킨다. 종양 미세 환경과 같은 산성 조건(약 pH 6.8) 하에서, 랫칭 분자의 아마이드 결합은 절단되어 핵심 아민이 생성되고(도 1f), 단층으로부터 랫칭 분자가 방출된다(도 1e). 차례로, 나노 머신의 알킬 말단 그룹은 펼쳐지고, 세포막과 상호 작용하여, 세포 독성 능력을 활성화한다(도 1e 및 1g). 세포 독성은 다중-구성요소-통합(multiple-component-integrated) 나노 입자에 대한 초분자 전략을 이용하여 유도할 수 있고, 독소 모방체로서 자극-반응성 나노 머신을 제공한다.

[0155] **참조예**

[0156] **1. 나노 머신(AuNP-C10)의 제작**

[0157] 30 mg의 AuNP-C10을 5 mL의 다이클로로메탄에 용해시키고, 100 mg의 C10 리간드를 1 mL의 다이클로로메탄에 용해시켰다. 두 용액을 함께 혼합하고, 2일간 실온에서 교반하였다. 그 후, 다이클로로메탄을 증발시키고, 잔류물을 헥산에 여러 번 세척하고, 물에 용해시켰다. 그 후, 용액을 2일 간 투석하고, 여과하였다. 그 후, 용액을 동결 건조하고, CDCl_3 및 D_2O 에 별도로 용해시키고, ^1H NMR & 2D NMR을 기록하였다.

[0159] **2. AuNP-C10의 특징화**

[0160] ^1H NMR 및 2D ^1H - ^1H NOESY (nuclear overhauser effect spectroscopy) NMR 스펙트럼은 용매로서 CDCl_3 및 D_2O 를 사용하여, 400 MHz의 Bruker AVANCE III HD 분광계로 기록하였다. D_2O 실험을 위해, D1 지연 시간은 0.529 s로 설정하였고, D8 혼합 시간은 0.28 s로 설정하였다. CDCl_3 실험을 위해, D1 지연 시간은 2.117 s로 설정하였고, D8 혼합 시간은 1.12 s로 설정하였다. MestReNova 10.02 소프트웨어를 후 처리에 사용하였다.

[0162] **3. 싱크로트론 소각 X-ray 산란(Synchrotron Small Angle X-ray Scattering)**

[0163] X-ray 샘플을 봉규산 모세관(Hilgenberg, Germany)에 준비하고, 불로 밀봉하였다. 다양한 용매로부터 동결 건조된 C10 샘플들의 싱크로트론 SAXS 스캔은 포항 가속기 연구소 빔라인 4C SAXS II에서 수행하였다. 싱크로트론 소스의 평균 광자 에너지는 16.9 keV이고, 빔 크기는 $100 \mu\text{m} \times 300 \mu\text{m}$ 였다. 샘플 대 검출기 거리(SDD: sample to detector distances)는 1 m 및 4 m였다. 2D 산란 데이터는 Rayonix 2D SX 165 CCD 검출기(Rayonix, USA)에서 수집하여 방사형 평균을 내고, 빔라인에서 맞춤형-설립 배경 제거 소프트웨어 및 유럽 싱크로트론 방사선 시설의 FIT2D 소프트웨어(<http://www.esrf.eu/computing/scientific/FIT2D>)를 사용하여 통합하였다. 얻어진 1D 산란 곡선의 곡선 피팅은 SASfit 소프트웨어를 사용하여 수행하였다.

[0165] **4. AuNP-C10에 대한 랫칭(latching) 분자의 스레딩(threading)**

[0166] AuNP-DMMA 또는 AuNP-SucA를 제조하기 위해, 물과 아세톤을 이용하여 용매 치환법을 수행하였다. C6-DMMA 또는 C6-SucA 화합물(약 10 mg)의 아세톤 용액 및 AuNP-C10 ($100 \mu\text{M}$)의 수용액을 혼합하였다. 그 후, 아세톤은 회전

증발기에 의해 실온에서 천천히 증발되었다. 다음으로, AuNP-DMMA 또는 AuNP-SucA 복합체 용액을 증류수로 세척하였고, Amicon Ultra-4 튜브(10,000 MWCO)와 함께 여러 번 원심 분리하였다(2 mL X 3 회).

[0168] 5. ICP-AES에 의한 세포 흡수 및 경로 분석

[0169] SCC-7 세포들은 6-세포 배양 접시(Thermo Fisher) 내 2000 μ L 완전 배지에서 2×10^5 세포/웰의 밀도로 시딩되었다. 24시간 배양 후, 흡수 경로를 확인하기 위해, 세포들을 하기 약물들과 함께 37°C에서 30분 간 사전 배양하였다; 5 mM 메틸- β -사이클로텍스트린; 400 μ M 수크로오스; 또는 5 μ M 아밀로이드. 이어서, 0.25 μ M의 AuNP-C10 및 AuNP-TTMA를 첨가하였다. 그 후, 37°C에서 억제제의 존재 또는 부재 하 또는 4°C에서 1시간 동안 세포들을 유지하였다. 그 후, 세포들을 얼음처럼 차가운 PBS로 세척하고, 트립신 처리에 의해 수확하고, 원심 분리하고, ICP-AES 분석을 위해 인산염 완충액에서 재현탁함으로써, 흡수 경로를 결정하였다.

[0171] 6. 상세 시뮬레이션

[0172] AuNP 리간드의 분자 거동을 조사하기 위해, Martini force fields를 이용 하여 CGMD를 수행하였다. AuNP 모델의 직경은 2 nm였고, 249개의 Au CG 비드들을 이용하였다. 리간드들(즉, C10 또는 TTMA)은 황을 나타내는 AuNP의 표면 상에서 100개의 비드에 부착되었다(도 2a). OA, TOAB 및 DMMA는 각각 6, 9 및 4개의 비드의 거친 입자로 구성되었다(도 2b). 물과 DCM의 비드 유형은 각각 P4 및 C3이었다. 상전이를 위한 시스템은 물 환경에서 4개의 AuNP-C10를 포함하였고, DCM 상은 수상 아래에 위치하였다. OA 계면활성제를 첨가하기 전에, NPT(즉, 등온-등압) 시뮬레이션을 $30 \times 30 \times 40 \text{ nm}^3$ 의 상자에서 45 ns동안 수행하였다. 그 후, OA를 순차적으로 첨가하였고, NPT 시뮬레이션을 순차적으로 300 ns, 150 ns 및 150 ns 동안 수행하였다. 각 단계에서 첨가된 OA의 수는 각각 400, 200 및 200이었다. DCM 상으로부터 수상으로 AuNP-C10의 전이를 조사하기 위해, TOAB를 AuNP-C10 및 OA를 포함하는 DCM 상에 첨가하였다. TOAB는 순차적으로 400, 200 및 200씩 순차적으로 첨가되었고, 각 시뮬레이션은 300 ns, 600 ns 및 600 ns 동안 수행되었다. 또한, 수상 및 DCM 상에서 AuNP-C10의 안정성을 추정하기 위해, AuNP-C10의 자유에너지 상태를 PMF(potential of mean force) 계산으로 비교하였다. PMF 시뮬레이션은 100 kJ/mol/nm²의 힘과 함께 0.001 nm/ps의 속도로 수행되었다. 풀링(pulling) 방향은 DCM으로부터 물이었고, AuNP-C10만이 이동되었다. 마지막으로, AuNP-C10의 기계 리간드에 대한 DMMA의 효과를 확인하기 위해, 1개의 AuNP-C10 및 100개의 DMMA를 물로 채워진 $15 \times 15 \times 15 \text{ nm}^3$ 의 상자에 이용하였다. OA를 첨가하기 전에, NPT 시뮬레이션은 400 ns 동안 수행되었다. 그 후, OA는 시스템에 첨가되었고, 첨가된 OA의 수는 400이었다. NPT 시뮬레이션은 350 ns 동안 수행되었다. RDF 분석은 최종 5 ns의 궤적을 이용하여 수행되었다. 시스템의 중화를 위해, 카운터이온(즉, Na⁺ 및 Cl⁻)을 적절히 첨가하였다.

[0173] 암세포 막을 통한 전위에 대한 리간드(즉, C10 및 TTMA)의 효과를 비교하기 위해, 2개의 AuNP-C10 또는 AuNP-TTMA를 각각 $40 \times 40 \times 50 \text{ nm}^3$ 및 $50 \times 50 \times 45 \text{ nm}^3$ 의 물로 채워진 상자 내 암세포 막에 위치시켰다. 암세포 막은 2.3:1의 DPPC 및 DPPG로 구성되었다. NPT 시뮬레이션은 AuNP-C10 및 AuNP-TTMA 시스템에 대해 각각 1.6 μ s 및 1.1 μ s 동안 수행되었다. 각도 확률 분석은 최종 10 ns의 궤적을 사용하여 수행되었다. 막 및 AuNP-C10의 수밀도는 각각 초기 및 최종 5 ns의 궤적으로 분석되었다. 상호 작용 에너지는 최종 5 ns의 궤적으로 분석되었다. AuNP-TTMA 및 지질의 방사형 분포 함수(RDF: Radial distribution function)는 최종 5 ns의 궤적으로 분석되었다. AuNP-C10 및 AuNP-TTMA의 세포 막을 통한 전위를 관찰하기 위해, 0.0005 nm/ps의 속도 및 1000 kJ/mol/nm²의 힘으로 풀링(pulling) 시뮬레이션을 수행하였다. 풀링 시뮬레이션을 위해, 1개의 AuNP-C10 또는 AuNP-TTMA는 각각 물로 채워진 $30 \times 30 \times 40 \text{ nm}^3$ 및 $40 \times 40 \times 50 \text{ nm}^3$ 의 상자 내 암세포 막에 위치시켰다. 구성은 각 단계 사이의 AuNP의 간격이 0.2 nm인 시뮬레이션 궤적으로부터 추출되었다. 각 구성은 1 ns 동안 평형화되었다. 가중 히스토그램 방법은 PMF를 계산하기 위해 사용되었다.

[0174] 모든 CGMD 시뮬레이션들은 10 fs의 시간 단계로 수행되었다. 상전이 시스템을 위한 온도는 298K이었고, 암세포 막 시스템을 위한 온도는 310K이었다. 온도 및 압력은 각각 속도 재조정 온도 조절 장치 및 Parrinello-Rahman 압력 조절 장치에 의해 제어되었다. 반데르발스 상호 작용의 컷오프 반경은 1.2 nm였고, PME(particle mesh Ewald) 합산 방법은 쿨롱 상호 작용에 사용되었다. CGMD 시뮬레이션을 위해, GROMACS 2019.1 패키지가 사용되었

다.

[0176] 7. TEM 및 세포-TEM

[0177] 투과전자현미경(TEM: Transmission electron microscopy) 이미지는 JEOL에 의한 JEM-1400로 획득하였다. 이미지들은 120 kV의 가속 전압에서 획득하였다. 모든 샘플들은 포름바/탄소 코팅된 300 메쉬 구리 그리드에 분산되었다. 데이터는 가탄 디지털 마이크로그래프 프로그램으로 분석하였다. 세포 TEM 샘플을 제조하기 위해, SCC7 세포들을 시딩하고, 24-웰 플레이트(1 mL 내 50,000 세포수, 혈청 포함 배지)에 위치한 15-mm 직경의 테라마낙스 커버슬립(Nalge Nunc International) 상에서 실험 전 24시간 동안 배양하였다. 혈청을 포함하는 배지 내 모든 샘플들로 배지를 교환하고, 72시간 동안 배양하였다. 모든 샘플들을 포함하는 배지를 버리고, 세포들을 0.1 M 인산 나트륨 완충액(pH 7.0)으로 3회 완전히 세척하였다. 이 후, 세포들을 0.05M 인산 나트륨 완충액(pH 7.0)에서 5% 수크로스와 함께 2% glutaldehyde에 30분 간 고정하였고, 5% 수크로스를 포함하는 0.05M 인산 나트륨 완충액(pH 7.0)로 30분에 걸쳐 3회 세척하였다. 세포들을 0.05M 인산 나트륨 완충액(pH 7.0)에서 5% 수크로스와 함께 1% 오스뮴 테트라옥사이드에 1시간 동안 후고정시킨 후, 3차 증류수로 3회 행구었다. 그들을 등급이 매겨진 일련의 아세톤에서 탈수시키고(20% 단계), 에폭시 레진에 파묻었다. 레진은 12시간 동안 80℃에서 중합시켰다. CR-X 울트라마이크로톰으로 울트라썬 섹션(100 nm)을 얻은 후, 120 kV에서 작동하는 JEM-1400로 이미징하였다.

[0179] 8. 접촉각(Contact Angle)

[0180] 접촉각 측정은 대기 조건(22℃)에서 KRÜSS의 Drop Shape Analyzer (DSA100S)로 수행하였다. PDMS 코팅된 유리판을 이용하여 접촉각 측정하였다. 5 μ L의 물방울, AuNP-TTMA 및 AuNP-C10 수용액을 기판에 위치시키고, 접촉각을 5초 간 측정하였다.

[0182] 9. 세포 배양 및 생존력

[0183] 마우스 편평세포 암종 SCC-7은 UNIST 강세부양 교수의 연구실로부터 받았고, 5×10^3 세포/웰(> 95 % confluence)의 시딩 밀도로 96-웰 Nunc (Thermo Fisher Scientific Inc.) 극소량 판 내 10% 우태아혈청(FBS), 100 μ g mL⁻¹ 스트렙토마이신 및 100 U mL⁻¹ 페니실린이 보충된 RPMI 1640 배지를 이용하여 37℃ 및 5% CO₂에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 다른 농도의 AuNP-TTMA, AuNP-DMMA, AuNP-SucA 및 AuNP-C10 (0, 0.01, 0.01, 0.25, 0.5 및 1.0 μ M)를 포함하는 pH 6.8 및 pH 7.4의 신선한 배지로 배지를 교체하고, 제조사(DAL 1025, Invitrogen)의 지시에 따라 565 nm로 excitation 파장을 설정하고, 590 nm에서 96-웰 플레이트로부터 방출을 모니터링함으로써 plate reader (Tecan Infinite Series, Germany) 및 Alamar Blue 염색 분석법을 이용하여 24 시간 후 세포 생존력을 분석하였으며, 각 데이터는 3회 반복 측정하였다.

[0185] 10. 미토콘드리아 막 전위 분석

[0186] SCC-7 세포를 10% FBS 및 1% 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 RPMI 1640 (Invitrogen)에서 95% confluence로 Lab Tek II 슬라이드 챔버 상에 시딩하였고, 5% CO₂ 및 37℃에서 배양하였다. 미토콘드리아 막 전위를 측정하기 위해, 세포들을 20분 동안 200 nM TMRM (Invitrogen)로 라벨링하였다. 신선한 배지로 세척한 후, 세포들을 0.25 μ M의 AuNP-C10 및 AuNP-TTMA와 함께 다른 시간 간격(0.5, 6.0 및 12.0 h)으로 배양하고, 올림푸스 FV1000 레이저 공초점 스캐닝 현미경을 이용하여 촬영하였다. 유사하게, 유세포 분석을 위해 처리된 세포들을 인산염 완충 식염수로 세척하고, 수확하고, 즉시 FACS Caliber System (BD Biosciences)로 분석하였다. 수집된 데이터는 FlowJo 소프트웨어(TreeStar)를 이용하여 분석하고, 상대적인 형광 강도로 표현하였다.

[0188] 11. DHE 분석에 의한 ROS 분석

[0189] 활성산소종 생성을 측정하기 위해, dihydroethidium (DHE, Santa Cruz, SC-204724A) 분석을 수행하였다. SCC-7

세포를 10% FBS 및 1% 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 RPMI 1640 (Invitrogen)에서 90% 이상의 confluence로 Lab Tek II 슬라이드 챔버 상에 시딩하였고, 5% CO₂ 및 37℃에서 배양하였다. 24시간 후, 세포들을 0.25 μM의 AuNP-C10 및 AuNP-TTMA로 6시간 동안 처리하였고, 레이저 공초점 스캐닝 현미경(Olympus FV 100)을 이용하여 촬영하였다.

12. 세포 사멸 분석

SCC-7 세포에 0.25 μM의 AuNP-C10 및 AuNP-TTMA를 24시간 동안 처리하였다. pH 의존적 세포 사멸을 조사하기 위해, 0.25 μM의 AuNP-DMMA 및 AuNP-SucA를 6 내지 12시간 동안 2개의 서로 다른 pH인 pH 7.4 및 pH 6.8에서 처리하고, 신선한 배지로 교체하고, 24시간 동안 배양하였다. 이어서, 세포들을 얼음처럼 차가운 PBS로 세척하고, 트립신 처리에 의해 수확하고, 원심 분리하고, 1X 아넥신-결합 완충액(10mM HEPES, 140mM NaCl, 2.5mM CaCl₂, pH 7.4)에서 약 1×10^6 mL 당 세포의 밀도로 재현탁하였다. 그 후, 세포들을 실온에서 15분 동안 100 μL의 세포 현탁액 당 5 μL의 Alexa 488-컨쥬게이트된 아넥신 V 및 0.1 μg의 PI로 염색하고, 400 μL의 1 X 아넥신-결합 완충액(Invitrogen, V13242)을 첨가하였다. 즉시, 형광을 유세포분석을 이용하여 측정하고, 데이터는 FlowJo 소프트웨어(TreeStar)를 이용하여 분석하고, PI(Propidium iodide) vs 아넥신-V으로 표현하였다.

13. 각 화합물의 제조예

금 나노 입자로 기능화하기 위한 C10 리간드의 합성 개요는 도 31과 같았다.

(1) Compound 2의 제조

Compound 1 (7 g, 11.24 mmol)을 4℃에서 건조 dichloromethane (DCM)에 용해하고, triethylamine (3.41 g, 33.72 mmol)을 첨가하였다. 5℃ 이하의 온도를 유지하며, Methylsulfonyl chloride (2.44 g, 16.86 mmol)를 점적으로 반응 용액에 주입하였다. 30분 후, 반응 용액을 실온으로 가열하고, 30분 간 교반하였다. 최종적으로, 반응이 완료되었을 때(TLC에 따라), DCM 용매를 증발시켰다. 점성 화합물을 다시 DCM으로 희석하고, 0.1 M의 HCl 용액에 붓고, 2회 세척하였다. 유기층을 NaHCO₃ 포화 용액에 붓고, 3회 처리하였다. 유기층을 분리하고, NaCl이 포화된 다른 용액에 첨가하고, 3회 처리하였다. 이 후, 유기층을 분리하고, 건조시키고(Na₂SO₄), 감압으로 농축시켰다. 조생성물을 용리액으로서 헥산/에틸 아세트산염(1:1, 1:4 및 0:1 v/v)를 이용하여 실리카겔(flash running) 상에서 컬럼 크로마토그래피로 정제하였다. 진공으로 용매를 제거함으로써 compound 2를 무색 오일로 얻었다(수율 7.31 g, >92.5 %). NMR 결과는 1,1,1-triphenyl-14,17,20,23-tetraoxa-2-thiapentacosan-25-yl methanesulphonate의 합성을 확인하는 약 2.75 ppm의 compound 1의 스펙트럼 상에 추가적인 피크를 나타냈다(도 32).

Compound 2의 ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, TMS): δ 7.44-7.37 (m, 6H, HAr-), 7.31-7.23 (m, 6H, HAr-), 7.22-7.16 (m, 3H, HAr-), 4.40 (t, 2H, -CH₂OSO₃CH₃), 3.78-3.54 (m, 14H, CH₂-(OCH₂CH₂)₃-CH₂CH₂OSO₃CH₃), 3.44 (t, J = 6.8Hz, 2H, CH₂-CH₂-(OCH₂CH₂)₃-), 3.07 (s, 3H, -OSO₃CH₃), 2.12 (t, J = 7.2Hz, 2H, -SCH₂-), 1.56 (p, J = 7.2Hz, 2H, -CH₂CH₂TEG-N(CH₃)₂), 1.38 (p, J=7.6Hz, 2H, -SCH₂CH₂-), 1.32-1.11 (m, 14H, -(CH₂)₇CH₂CH₂TEGOSO₃CH₃).

(2) Compound 3의 제조

Compound 2 (1 g, 1.43 mmol)을 5%의 에탄올을 포함하는 dimethyldecylamine 용액(28.53 mmol)의 이용 가능한 라이브리리에 첨가하였다. 반응 용액을 약 35℃에서 48시간 동안 교반하였다. 조생성물은 TLC에 의해 확인되었고, 에탄올은 감압으로 제거되었다. 밝은 노란색 잔여물은 열과 초음파 처리와 함께 헥산에 의해 정제되었고, 고진공 시스템에서 추가적으로 건조되었다. 생성물 형성(3)은 정량적이었고, 그들의 구조는 NMR에 의해 확인되었다. 수율은 94.6% 이상이었다(도 33).

[0203] Compound 3의 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3 , TMS): ^1H NMR (400MHz, CDCl_3 , TMS): δ 7.43-7.38 (m, 4H, HAr), 7.31-7.24 (m, 9H, HAr), 7.23-7.17 (m, 2H, HAr), 3.98 (br, 2H, $-\text{OCH}_2-(\text{CH}_2\text{N})-$), 3.67-3.58 (m, 14H, $-\text{CH}_2\text{O}-$ + $-\text{CH}_2\text{N}-$), 3.55 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 3.50-3.41 (m, 2H, $-\text{NCH}_2-$), 3.27 (s, 6H, $-(\text{CH}_3)_2\text{N}-$), 2.75 (s, 3H, CH_3SO_3-), 2.21 (t, 2H, $-\text{SCH}_2-$), 1.74-1.50 (m, 6H, $-(\text{NCH}_2)\text{CH}_2-$) + $(\text{SCH}_2)\text{CH}_2$ + $-\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{O})-$, 1.42-1.11 (m, 28H, $-(\text{NCH}_2\text{CH}_2-)\text{CH}_2-$) + $-\text{CH}_2-$), 0.89 (t, 3H, $-\text{CH}_3-$).

[0205] (3) Compound 4의 제조

[0206] Compound 3은 건조된 DCM(dichloromethane)에 용해되었고, 과량의 trifluoroacetic acid (TFA, 약 20 당량)를 첨가하였다. 용액의 색깔은 즉시 노란색으로 변하였다. 연속적으로, triisopropylsilane (TIPS, 약 1.2 당량)을 반응 용액에 첨가하였다. 반응 용액을 실온에서 Ar_2 하 약 5시간동안 교반하였다. 용매 및 대부분의 TFA 및 TIPS를 감압 하에서 증류 제거하였다. 열은 노란 잔여물을 열과 초음파 모두를 결합하여 헥산에 의해 정제하였고, 고진공 시스템에서 추가적으로 건조하였다. 생성물 형성은 정량적이었고, 그들의 구조는 스펙트럼 상에서 카운터 이온 피크의 시프트가 약 2.98 ppm 더 다운 필드로 이동함을 나타내는 NMR에 의해 확인되었다. 수율은 95.4% 이상이었다(도 34).

[0207] Compound 4의 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3 , TMS): d 3.95 (br, 2H, $-\text{OCH}_2-(\text{CH}_2\text{N})-$), 3.68-3.56 (m, 14H, $-\text{CH}_2\text{O}-$ + $-\text{CH}_2\text{N}-$), 3.46 (t, 2H, $-\text{CH}_2\text{O}-$), 3.40-3.33 (m, 2H, $-\text{NCH}_2-$), 3.19 (s, 6H, $-(\text{CH}_3)_2\text{N}-$), 2.87 (s, 3H, CH_3SO_3-), 2.52 (q, 2H, $-\text{CH}_2\text{S}-$), 1.76-1.53 (m, 6H, $-(\text{NCH}_2)\text{CH}_2-$) + $(\text{SCH}_2)\text{CH}_2$ + $-\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{O})-$, 1.41-1.22 (m, 29H, $-\text{SH}$ + $-(\text{NCH}_2\text{CH}_2-)\text{CH}_2-$) + $-\text{CH}_2-$), 0.89 (t, 3H, $-\text{CH}_3-$).

[0209] (4) AuNP-C10의 제조

[0210] 1-Pentanethiol 코팅된 금 나노 입자 (d = 약 2 nm)를 제조하였다. pentanethiol-코팅된 금 나노 입자 (d = 약 2 nm)와 함께 DCM 내 용해된 Compound 4의 장소-교환 반응을 실온에서 3일 간 수행하였다. 그 후, DCM을 37°C 감압 하에서 증발시켰다 잔여물을 소량의 증류에서 용해시키고, 투석하여 (막 MWCO = 10,000) 나노 입자 용액과 함께 존재하는 초과 리간드, 아세트산 및 기타 염들을 제거하였다. 투석 후, 입자들을 동결 건조하여, 갈색의 고체 생성물을 얻었다. 입자들(AuNPs-C10)을 물 및/또는 탈이온화된 물(18 M Ω -cm)에서 재분산시켰다. D_2O 내 ^1H NMR 스펙트럼은 양성자 신호의 상당한 확장을 나타냈으며, 자유 리간드는 관찰되지 않았다(도 35 및 36)

[0212] (5) DMMA의 제조

[0213] 2,3-dimethylmaleic anhydride (1g, 7.9 mmol)를 에틸 아세테이트에 용해하고, 헥실 아민 (800 mg, 7.9 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물은 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 그 후, 반응을 80°C까지 가열하고, 6시간 동안 유지하였다. 조 생성물은 TLC로 확인하였고, 용매는 감압으로 제거하였다. 화합물을 다시 DCM으로 희석하고, 염수에 붓고, 2회 세척하였다. 이후, 유기층을 분리하고, Na_2SO_4 로 건조하고, 감압으로 농축하였다. 조 생성물은 실리카겔을 통한 컬럼 크로마토그래피(플래시 러닝)로 정제하였다(도 37 및 38).

[0214] DMMA의 ^1H NMR (400MHz, CDCl_3 , TMS): d 5.75 (s, 1H, NH), 3.22 (t, 2H, $-(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2-(\text{NH})-$), 2.75 (t, 3H, $-\text{CH}_3-\text{C}=\text{C}-\text{COOH}$ in *trans*), 1.9-1.8 (d, 3H, $-\text{CH}_3-\text{C}=\text{C}-\text{CONH}$ in *cis* and *trans*), 2.75 (t, 3H, $-\text{CH}_3-\text{C}=\text{C}-\text{COOH}$ in *trans*), 1.62 (t, 3H, $-\text{CH}_3-\text{C}=\text{C}-\text{COOH}$ in *cis*), 1.5 (q, 2H, $(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2-(\text{CH}_2\text{NH})-$), 1.25-1.32(m, 6H, $(\text{CH}_3)-(\text{CH}_2)_3-(\text{CH}_2\text{NH})$), 0.89 (t, 3H, $-\text{CH}_3-$).

[0216] (6) SucA의 제조

[0217] Succinic anhydride (1g, 10 mmol)를 에틸 아세테이트에 용해하고, 헥실아민(1.01 g, 10 mmol)을 첨가하였다.

반응 혼합물은 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 이후, 반응을 80℃까지 가열하고, 6시간 동안 유지하였다. 조 생성물은 TLC로 확인하고 용매는 감압으로 제거하였다. 화합물을 다시 DCM으로 희석하고, 염수에 붓고, 2회 세척하였다. 이후, 유기층을 분리하고, Na₂SO₄로 건조하고, 감압으로 농축하였다. 조 생성물은 실리카겔을 통한 컬럼 크로마토그래피(플래시 러닝)로 정제하였다(도 39 및 40).

[0218] SucA의 ¹H NMR (400MHz, CDCl₃, TMS): d 5.75 (s, 1H, -NH-(CH₂)), 3.25 (t, 2H, -(CH₂)₄-CH₂-(NH)-), 2.60 (t, 2H, -(CO-CH₂)-CH₂-(COOH), 2.49 (t, 2H, -(CO)-CH₂-(CH₂-COOH), 1.5 (q, 2H, (CH₂)₃-CH₂-(CH₂-NH)-), 1.25-1.32(m, 6H, (CH₃)₃-(CH₂)₃-(CH₂NH)), 0.89 (t, 3H, -CH₃-).

[0220] 14. 통계 분석

[0221] 모든 데이터는 평균 ± SE (n = 3 내지 6)로 표현되었다. 두 그룹 간의 통계적 유의성은 짝없는 t-test으로 평가되었고, 3개 이상의 그룹 간의 경우는 양방향 분산 분석(ANOVA)에 이어, Tukey's post hoc test로 평가되었다. P<0.05는 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

[0223] 실시예

[0224] 1. 나노 머신의 디자인 및 합성

[0225] 자극-반응성 형태 변화를 갖는 단백질을 모방한 나노 머신 시스템을 개발하기 위해, AuNP-C10라 불리는 금 나노 입자(AuNP)를 알칸티올(alkanethiol), 4차 아민을 갖는 테트라에틸렌 글리콜(TEG) 단위 및 알킬 사슬(C₁₀H₂₁, C10)을 포함하는 분자 시스템의 Murray place-exchange 반응을 통해 제조하였다(도 3a). 기계적 운동을 할 수 없는 대조군 나노 입자로서, 알칸티올 및 4차 아민(TMA: trimethyl ammonium)을 갖는 TEG 단위로 구성된 리간드 층을 갖는 AuNP-TTMA도 합성되었다(도 3e). AuNP의 두 유형 모두 2.1 ± 0.5 nm의 코어 사이즈 및 10.7 ± 0.4 nm의 유체역학 직경을 나타냈고, AuNP-C10은 +14.2 mV의 제타 전위를 가졌다(도 4). 리간드의 접힘/풀림 움직임에 따라 표면 특성이 변화하는 AuNP-C10은 수성 및 유기 용매에 모두 용해되는 반면, AuNP-TTMA는 유기 용매에 용해되지 않았다(도 5).

[0226] 입자 상의 리간드의 용매-의존적 형태 변화가 ¹H NMR(nuclear magnetic resonance) 및 ¹H-¹H NOESY(nuclear Overhauser effect spectroscopy) NMR을 통해 확인되었다. D₂O 내 AuNP-C10의 NOESY NMR 스펙트럼에서 TEG 및 소수성 알킬 말단 그룹 간의 NOE 피크의 존재는 AuNP 상의 리간드 접힘의 발생을 입증하였다(도 3a). 대조적으로, CDCl₃ 내 기록된 NOESY 스펙트럼에서 그러한 NOE 피크의 부재는 덜 극성 용매 내 리간드의 풀림을 나타낸다(도 3b). 또한, CDCl₃ 내 ¹H NMR 스펙트럼에서 관찰된 알킬 헤드 및 4차 아민에서 메틸 그룹들의 신호는 CDCl₃/CD₃OD (v/v = 50/50) 및 D₂O에서 각각 넓고, 상향 필드로 시프팅되었고(도 3c), 이는 AuNP-C10의 말단 알킬 단위가 극성 용매에 노출되었을 때, 소수성 단층 방향으로 구부러져 있음을 나타낸다. 다른 용액 내 AuNP-C10의 형태적 차이를 확인하기 위해, 탈이온화된 H₂O 및 CH₂Cl₂ (DCM)로부터 동결 건조된 AuNP-C10 분말을 싱크로트론 소각 X-ray 산란(SAXS: synchrotron small-angle X-ray scattering)으로 분석하였다(도 3d). DCM 및 H₂O로부터 동결 건조된 샘플들에 대해 각각 q = 0.11 및 0.25 nm⁻¹; 0.12 및 0.25 nm⁻¹에서 2개의 넓은 피크가 관찰되었다. 두 샘플에서 2개의 피크의 존재는 각각 거칠고 단단한 구형 모델 및 AuNP-C10의 형태 요인에 의해 설명되는 구조 요인에 해당할 수 있다(도 6). DCM에서 동결 건조된 AuNP-C10 샘플에 대한 첫 번째 피크의 낮은 q 값은 이러한 용매에서 입자 간의 거리가 평균적으로 5 Å보다 컸다는 것을 나타낸다. 이 것은 DCM에서 동결 건조된 AuNP-C10은 H₂O에서 동결 건조된 샘플에 비해 확장된 리간드 형태를 가지고 있음을 의미한다.

[0227] 알킬 단위의 형태적 조화 가능성은 4차 알킬 아민에 결합할 수 있는 cucurbit[7]uril (CB[7]) (K_a ~ 1 X 10⁵ M⁻¹)를 첨가함으로써 조사되었다. AuNP-C10 수용액 내 CB[7]의 첨가는 입자 침전을 발생시키며, 이는 말단 알킬 단위가 외부 표면에 노출되어, 나노 입자의 용해성을 감소시켰음을 나타낸다(도 7). CB[7]에 대한 친화력이 높

은 1-아다만틸아민(1-adamantylamine) ($K_a \sim 1 \times 10^{-13} \text{ M}^{-1}$)을 첨가함으로써, 경쟁적 실험을 수행하였다. 결과적으로, 입자들은 수용액에서 다시 용해되었고(도 7), 이는 입자 상의 리간드의 형태적 변화가 외부 환경에 의해 제어될 수 있음을 나타낸다.

2. 나노 머신의 기계적 운동

일상 생활에서 사용되는 거시적 기계와 마찬가지로, 나노 머신은 하기 단계를 통해 작동된다: 에너지 소비, 기계적 운동 생성 및 작업 수행. 현재 나노 머신에서 이러한 과정을 확인하기 위해, 리간드의 분자 운동 특성을 그들의 상 전이 거동을 연구하여 조사하였다. DCM에 용해된 나노 머신은 양이온성 나노 머신에 대한 에너지 장벽을 낮추어 수상에서 유기상으로 경계면을 가로지르기 위해 유기상에 첨가된 음이온성 계면활성제인 OA(oleic acid)의 존재 하에 유기 상으로 빠르게 전이되었다(도 3e 및 8). 한편, 유기 상에서 나노 머신과 OA 간의 상호작용을 상쇄하는 테트라옥틸암모늄 브로마이드(TOAB: tetraoctylammonium bromide) 및 수상에서 나노 머신과 SDS 간의 상호작용을 증진시키는 SDS(sodium dodecyl sulfate)의 후속적인 첨가는 유기상에서 수상으로 나노 머신의 전이를 야기시켰다(도 3e 및 8). 이러한 상전이 거동은 주변 환경의 변화에 의해 유발된 정전기적 및 소수성 힘이 나노 머신에 대한 작동 에너지를 제공하고(즉, 에너지 소비), 이는 알킬 말단 그룹이 소수성 내부로 굽어지게 하거나, 외부 표면으로 노출되게 하며(즉, 기계적 움직임 생성), 그리고 차례로 나노 머신이 수용성-유기 계면을 가로지르도록 한다(즉, 작업 수행)(도 3f).

나노 머신의 상전이 동안 AuNP-C10 및 계면활성제(즉, OA 및 TOAB) 간의 분자 상호작용은 CGMD(coarse-grained molecular dynamics) 시뮬레이션을 이용해 추가적으로 조사하였고(참조예 6 및 도 2 참조), 이를 통해 AuNP-C10은 OA를 첨가함으로써 물로부터 DCM으로 전이되었고, TOAB를 첨가함으로써 DCM으로부터 물로 전이된다는 실험 결과를 확인하였다(도 3d 및 9). 따라서, RDF(radial distribution function) 및 분자 배열에 따르면, OA가 물/DCM 2상 시스템에 첨가되면, OA는 카르복실산염 그룹을 통해 C10의 TMA 그룹에 부착되어, C10 리간드에 파묻힌다(도 3f). 또한, C10의 알킬 그룹 및 OA는 서로 상호작용하여(도 10), C10 리간드의 친수성 부분을 숨김으로써, AuNP-C10의 상 전이를 초래한다. 이 후, DCM 상에 TOAB를 첨가하면, OA의 카르복실산염 그룹과 TOAB의 TMA 그룹과의 상호작용 때문에, AuNP-C10으로부터 OA가 분리된다(도 3g). OA의 방출은 물과 DCM 사이의 계면으로 AuNP-C10의 전이를 촉진하는 반면, C10 리간드는 그의 친수성 부분을 노출하도록 굽어진다. 91.7 kcal/mol의 에너지가 물과 DCM 사이의 계면을 통과하기 위해 필요하며, 이는 DCM 또는 ANF 안에 AuNP-C10이 존재할 때의 자유 에너지 차이와 일치한다(도 11). 결과적으로, 상전이 동안 CGMD 내 리간드의 폴립 및 접힘은 나노 머신의 구조적 변화를 확인시켜준다(도 3h).

나노 머신의 운동 양식에 대한 알킬 헤드 그룹의 영향은 말단에 친수성 표면만을 포함하는 대조군 나노 입자인 AuNP-TTMA와의 비교를 통해 추가적으로 조사되었다. 용해된 AuNP-TTMA 나노 입자는 OA(도 3e) 및 다른 계면활성제(도 8)의 존재 하에서도 상전이를 겪지 않았다. 또한, 정적 접촉각 및 펜던트 드롭 장력계 측정은 AuNP-C10의 수용액이 AuNP-TTMA 용액보다 낮은 접촉각(각각 $107.4 \pm 2.4^\circ$, $96.5 \pm 2.9^\circ$) 및 표면 장력(각각 $72 \pm 3.5 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$, $65.2 \pm 4.5 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$)을 나타냄을 확인하였다. 이는 아마도 공기 상에 알킬 헤드 그룹의 노출 및 단백질 용액에서 일반적으로 관찰되는 물과 물 간의 수소 결합의 간섭의 형성 때문일 수 있다(도 12). 종합해보면, 이러한 결과는 알킬 말단 그룹과 정전기적 상호작용이 환경-반응적 분자 운동 양식을 통해 작동 에너지와 수성-유기 계면의 교차에 기여했음을 나타낸다.

3. 나노 머신을 위한 "랫치(latch)" 분자의 디자인 및 합성

리간드의 기계적 움직임을 통해 AuNP-C10의 상전이가 발생되었음을 확인한 후, 접힘-폴립 변환을 제한하고, pH 변화에 따른 움직임을 유발하기 위해 랫치 분자를 디자인하였다. pH-반응적 랫치 분자 및 pH 안정성을 가진 대조군 랫치 분자로서 2개의 첨가물들이 각각 합성되었다: 1) 아마이드 결합을 통해 DMMA(dimethylmaleic anhydride) 및 헥실 아민을 접합한 C6-DMMA (4-(hexylamino)-2,3-dimethyl-4-oxobut-2-enoic acid) 및 2) 아마이드 결합을 통해 SucA(succinyl acid) 및 헥실 아민을 접합한 C6-SucA (4-(hexylamino)-4-oxobutanoic acid)(도 13a 및 13b). 두 화합물의 헥실 아민 단편은 소수성 상호작용을 통해 AuNP-C10의 리간드 사이에 연결되어, 리간드의 기계적 움직임을 제한할 수 있다. 한편 산 그룹은 AuNP-C10의 리간드 내 양성 아민을 끌어당겨, 스레딩을 촉진하고, 양이온에서 양쪽성 이온으로 AuNP-C10의 정전기적 특성을 변화시킨다(도 13c 및 13d). C6-DMMA 내

핵심 아민과 DMMA 간의 아마이드 결합은 pH 6.8과 같은 산성 조건에서 절단될 수 있는 반면, C6-SucA는 낮은 pH 조건에서 그의 구조를 유지할 수 있다. C6-DMMA 분자의 의도된 디자인은 산성 pH에 의한 AuNP-C10의 활성화를 내포한다.

[0236] 랫치 분자 C6-DMMA 및 C6-SucA는 용매 증발법을 이용하여 AuNP-C10의 리간드 층과 엮이며, 각각 AuNP-DMMA 및 AuNP-SucA가 제공된다(도 13e 및 13f). 랫치 분자는 음전하를 갖기 때문에, 엮인 부가물들의 형성은 AuNP-C10의 + 39.7 mV에서 AuNP-DMMA 및 AuNP-SucA의 낮은 값(각각 - 0.1 및 + 6.11 mV)으로의 제타 전위 시프팅에 의해 확인된다(도 13g). 약산성 조건(약 pH 6.8)은 음으로 하전된 C6-DMMA를 양으로 하전된 핵심 아민으로 변환시킬 수 있기 때문에, 엮인 C6-DMMA는 핵심 아민 분자와 양으로 하전된 리간드 층 간의 전하 간 반발을 통해 AuNP-C10으로부터 분해될 수 있다. 우리의 pH-작동 나노 머신의 디자인을 검증하기 위해, AuNP-C10, AuNP-DMMA 및 AuNP-SucA의 제타 전위를 pH 8부터 pH 4의 범위에서 측정하였다(도 13h). AuNP-SucA의 양쪽 이온성 표면과 AuNP-C10의 양이온성 표면은 각각 약 0 mV 및 약 + 40 mV의 값을 나타내며, 모든 pH 범위에 걸쳐 변화 없이 유지되었다. 놀랍게도, AuNP-DMMA의 제타 전위는 pH 8에서 4로 변화됨에 따라 0 mV 에서 약 + 40 mV로 시프팅되었고, 이는 나노 입자로부터 C6-DMMA 분자가 해리되었음을 나타낸다.

[0237] pH의 함수로서 나노 머신과 랫치 분자의 가역적 복합화를 확인한 후, 나노 머신에서 리간드의 기계적 움직임의 억제체로서 랫치 분자의 역할을 조사하였다. 수성 용매에서, 분자 기계적 리간드의 알킬 말단 그룹은 접힌 형태로 소수성 내부 리간드 층에 위치하였다. 수성 환경에서도, 파묻힌 리간드는 CB[7]과 같은 거대 고리 호스트 분자와 결합함으로써 풀릴 수 있었다. CB[7]와 결합 후, AuNP-C10 나노 입자는 그들의 표면의 습윤성이 친수성으로부터 소수성으로 변화하였기 때문에 수성 용매에서 침전되었다. AuNP-DMMA 및 AuNP-SucA의 랫치 분자들이 접힘-풀림 변형을 억제할 수 있다고 가정하고, CB[7] 분자의 존재 하에서 나노 입자들의 침전을 모니터링 하였다(도 13i). 예상대로, CB[7]의 첨가에 따라 pH 7.4 및 pH 6.8 모두에서 AuNP-C10의 침전이 관찰되었다. 대조적으로, AuNP-DMMA 및 AuNP-SucA는 잘 분산된 상태를 유지하여, 변형이 억제되었음을 보였다. pH 6.8에서, AuNP-DMMA는 침전된 반면, AuNP-SucA는 분산된 상태를 유지하였다. 이러한 결과는 랫치 분자에 의한 형태적 변화가 억제될 뿐만 아니라, pH-반응성 활성화의 발생됨을 나타낸다. CB[7] 분자에 의한 나노 머신의 침전은 동적 광산란(dynamic light scattering)에 의해 확인되었고, 이는 관찰과 일치하였다(도 13j).

[0238] 또한, AuNP-DMMA의 랫치 분자에 의한 상전이 억제를 CGMD를 이용하여 조사하였다(도 14a). AuNP-C10와 달리, 물에서 DCM으로 AuNP-DMMA의 상전이는 일어나지 않았다. DMMA의 카르복실산염 그룹은 RDF에 나타난 바와 같이, C10의 TMA 및 TEG 그룹과 얽혀있었다(도 14b). 따라서, C10의 TMA 그룹을 통해 발생하는 C10과 OA의 상호 작용은 감소되었다(도 14b). 결과적으로, AuNP-C10은 물과 DCM 사이의 계면에 머무르며, C10 리간드의 곁어진 상태를 유지하였다(도 14d).

[0240] 4. 나노 머신의 직접적인 세포 침투 및 그의 독성

[0241] 우리의 나노 머신의 작동 가능한 움직임은 세포막을 통한 움직임 변화와 세포 내 구성 요소간의 상호 작용을 통한 직접적인 침투에 의해 질병 세포들을 죽이는 생물학적 독소 모방체를 예상하였다. 우리의 가정을 입증하기 위해, 암세포(SCC7, 쥐 편평 세포 암종)에 AuNP-C10을 투여하고, 단일 AuNP를 식별할 수 있는 세포 투과 전자 현미경(cell-TEM)으로 추적하였다. 수성 매체에서 구조와 전하 관점에서 접힌 형태가 AuNP-C10과 유사하지만, 기계적 움직임은 상이한 AuNP-TTMA 나노 입자가 대조군으로서 사용되었다. 세포-TEM 이미지에서 볼 수 있듯이, AuNP-C10 입자는 SCC7 세포의 세포질에 광범위하게 분산되어 있는 반면, AuNP-TTMA 입자는 엔도솜에 붙잡혀 있었다(도 15a, 16 및 17). 1) 소수성 나노 입자는 인지질 이중층을 통해 침투할 수 있는 점, 2) AuNP-C10은 형태적 변화로 유발된 그의 표면 습윤성의 변화에 의해 계면활성제-안정화된 계면을 통해 이동할 수 있는 점, 및 3) 세포-TEM 결과를 보았을 때, AuNP-C10 나노 입자는 그들의 리간드의 접힘 및 풀림 움직임을 통해 세포막을 직접 투과한다는 것을 유추할 수 있었다(도 13b 및 13e).

[0242] AuNP-C10이 세포 내 이입 없이 세포막을 직접적으로 투과할 수 있다는 것을 입증하기 위해, 유도적으로 결합된 혈장 질량 분석(ICP-MS: inductively coupled plasma mass spectrometry)를 이용하여 다양한 식균 억제제의 존재 하에서 AuNP-C10 및 AuNP-TTMA의 흡수를 모니터링하였다(도 13g). 세포 내 이입-억제 조건(4°C: ATP-매개성 세포 내 이입의 억제, 수크로오스: 클라트린-의존성 세포 내 이입의 억제, MbCD(methyl-β-cyclodextrin): 카베올라/지질 뗏목(raft) 의존성 세포 내 이입의 억제, 아밀로린: 미소세포흡수 의존성 세포 내 이입의 억제) 하에서, 모든 조건에서 AuNP-TTMA의 흡수량은 약 50% 이하로 극적으로 감소한 반면, AuNP-C10은 클라트린-의존성 세포 내 이입을 제외하고는, 주위 조건과 비교하였을 때, 유사한 양이 흡수되었다. 클라트린-의존성 세포 내 이입

억제 조건에서도, AuNP-C10 나노 입자는 약 70% 이상이 흡수되었고, 이는 나노 머신의 접힘-풀림 움직임에 의해 유도된 직접적인 확산을 통해 주로 흡수됨을 나타냈다.

[0243] 세포막을 가로지르는 AuNP-C10 및 AuNP-TTMA의 전좌 메커니즘은 cgmd 시뮬레이션에 의해 조사되었다(도 18). 도 15a에 표시된 세포-TEM 이미지는 AuNP-C10 입자가 별도로 세포막을 투과하는 것을 나타낸다. 침투가 알킬 체인의 신장과 함께 발생되었기 때문에, 기계 리간드의 친수성 부분은 가려지며, 이는 C10 리간드의 TEG 그룹의 용매-접근 가능 표면의 감소로 나타난다(도 19a). C10의 친수성 및 소수성 부분은 세포막에서 각각 지질의 머리 그룹(즉, 하전된 그룹) 및 꼬리 그룹(즉, 소수성 그룹)과 상호 작용한다(도 11b). 정렬된 영역과 비교하여 지질의 더 큰 각도 분포에서 볼 수 있듯이, 지질들은 무질서한 영역에서 오직 AuNP-C10과 상호 작용한다는 점에서 유의해야 한다(도 20a). AuNP-C10이 침투된 영역에서 지질은 막의 수직 방향에 대해 25° 기울어진 반면, 변형되지 않은 지질의 각도는 약 10° 이다. 또한, 상부 및 하부 층에 위치한 지질은 침투 영역에서 혼합되어, 상부와 하부 지질 꼬리들의 중첩이 증가하는 것으로 확인되었다(도 20b). 따라서, 직접적인 침투는 지질의 부분적 붕괴와 AuNP-C10의 침투로부터 예측될 수 있다.

[0244] 한편, AuNP-TTMA 입자는 세포막 표면에 응집되고, 막이 압출되었다(도 18b). TTMA의 TMA 그룹만이 지질의 머리 그룹과 상호 작용하였고(도 21), AuNP-TTMA는 세포막에 둘러싸여 있었다. 세포막의 모든 지질들은 AuNP-TTMA의 흡수에 관계없이 무질서했다(도 20c). 특히, AuNP-TTMA가 흡착되지 않은 영역에서도 지질은 30° 기울어져 있었다. AuNP-TTMA가 직접적인 침투 없이, 세포막의 표면과 상호 작용하기 때문에, 세포막은 신장되었고, 이는 AuNP-TTMA가 세포 내 이입에 의해 세포막을 침투한다는 것을 간접적으로 나타낸다. 결과적으로, AuNP의 계면활성제가 침투 메커니즘에 영향을 미친다는 결론을 내릴 수 있다.

[0245] AuNP-C10 및 AuNP-TTMA의 흡수 과정을 비교하기 위해, 세포막을 가로질러 25 nm에 걸쳐 폴링 시뮬레이션을 수행하였다(도 20d 및 20e). AuNP-C10은 막을 뚫기 시작할 때까지 막에 안정적으로 묻혀 있었다. AuNP의 막을 통과하기 위한 에너지 장벽은 3455.7 kcal/mol로 추정되었다(도 22a). 한편, AuNP-TTMA는 세포막의 표면에 흡착되었고, 흡수 과정에서 투과하지 못했다. 그 후, AuNP-TTMA는 엔도솜을 형성하면서 막을 투과하였고, AuNP-TTMA의 세포 내 이입에 대한 에너지 장벽은 5114.7 kcal/mol로 계산되었다(도 22b). AuNP-TTMA 입자는 응집된 상태에서 세포막을 이동한다. 따라서, 응집된 AuNP-TTMA의 에너지 장벽은 더 높을 수 있다. 이 결과에 따르면, AuNP의 계면활성제는 흡수 과정 및 세포막 이동에 대한 에너지 장벽에 영향을 미친다. AuNP-C10은 에너지 장벽이 낮기 때문에, 더 큰 독성을 예측할 수 있으며, 지질에 둘러싸이지 않고 세포막을 투과하기 때문에, 세포 구성 요소와의 상호작용을 촉진한다.

[0247] 5. 세포 내 나노 독소의 세포 독성 및 표적 활성화

[0248] AuNP-C10의 직접 침투를 확인한 후, 세포 내 구성 요소와의 상호작용을 통해 질병 세포를 죽이는 새로운 나노 독소로서 본 나노 머신의 타당성을 조사하였다. 우리의 이전 보고에 따르면, 소수성 AuNP는 그들의 세포 내 물질과의 다가 소수성 상호작용으로 인해 세포 독성이 높은 거대 분자 의약으로서 사용되었다. 따라서, 본 나노 머신에서도 유사한 치료학적 효과가 예상되었다. 따라서, AuNP-C10 및 대조군으로서 AuNP-TTMA의 세포 독성을 조사하였다. 동일 농도의 AuNP-TTMA는 세포수의 약 10% 정도의 세포 사멸을 유발한 반면, AuNP-C10 (0.5 μ M)은 약 50% 정도 세포 생존력을 감소시키는 것으로 밝혀졌으며, 이는 후자가 전자에 비해 더 독성이 강하다는 것을 의미한다(도 23a). 펼쳐진 형태의 AuNP-C10은 소수성 세포 내 부분과 상호작용하는 소수성 나노 입자로 작용할 수 있기 때문에, AuNP-C10의 접힌 형태와 유사한 구조의 AuNP-TTMA보다 AuNP-C10에 대해 높은 독성이 예상될 수 있었다(도 23b). 또한, 세포에서 AuNP-C10의 높은 분산은 응집된 AuNP-TTMA에 비해 세포질 생물체와의 상호 작용을 촉진할 수 있다(도 15a, 15c, 15d, 15f, 16 및 17).

[0249] 나노 독소로서 나노 머신의 관찰된 기능, 스레딩 랫칭 분자에 의한 기계적 제어 및 산성 조건에서의 활성화는 표적 암 치료법으로서 AuNP-DMMA의 적용을 조사하도록 유도하였다. 종양 환경은 일반적으로 건강한 조건 (pH 약 7.4)에 비해 낮은 pH (약 6.8)를 가지기 때문에, 산성 조건에서 나노 독소의 활성화는 그의 암-표적화 능력을 암시하였다. 첫째로, AuNP-C10, AuNP-SucA 및 AuNP-DMMA의 세포 독성은 SCC7 세포들을 이용하여 서로 다른 pH 값 하에서 추적되었다(도 23c 및 24). 랫칭 분자-스레드 나노 독소(AuNP-DMMA 및 AuNP-SucA)는 pH 7.4에서 AuNP-C10에 비해 훨씬 적은 독성을 나타냈다. 비록 AuNP-DMMA는 pH 7.4에서 어떠한 세포 독성도 나타내지 않았지만, pH 6.8에서 그의 세포 독성 경향은 AuNP-C10과 유사하였고, 이는 독성이 pH-선택적임을 나타낸다. 나노 독소의 초기 디자인과 그 결과를 바탕으로, 리간드의 기계적 움직임의 억제는 세포 막의 직접적인 침투를 방지하고, 나노 독소의 양쪽 이온성 표면 특성이 흡수를 감소시킴으로써 세포 독성이 감소된다고 추정할 수 있었다

(도 23c). 세포-TEM 분석은 AuNP-C10와 유사하게, AuNP-DMMA 나노 입자는 pH 6.8에서 세포질로 잘 분산되는 반면, pH 7.4에서는 소량의 흡수된 AuNP-DMMA만이 관찰되었다는 것을 보여주었다. 세포 외부의 세포막 근처에서 가장 많은 양의 AuNP가 pH 7.4에서 관찰되었다(도 25). 랫치 분자를 스레딩할 때, 양쪽 이온성 표면 특성은 그들의 세포 독성을 감소시켜, AuNP의 흡수를 억제하였다. AuNP 흡수의 감소는 금 원소 정량화를 이용한 ICP-MS 분석법으로 입증되었다(표 1).

표 1

[0250]

Samples	pH 7.4 ($\mu\text{g}/\text{cell}$)	pH 6.8 ($\mu\text{g}/\text{cell}$)
AuNP-C10	16.71 $\pm$ 1.29	21.56 $\pm$ 4.74
AuNP-DMMA	1.305 $\pm$ 0.0953	20.9 $\pm$ 1.06
AuNP-SucA	0.884 $\pm$ 0.194	0.851 $\pm$ 0.068

[0251]

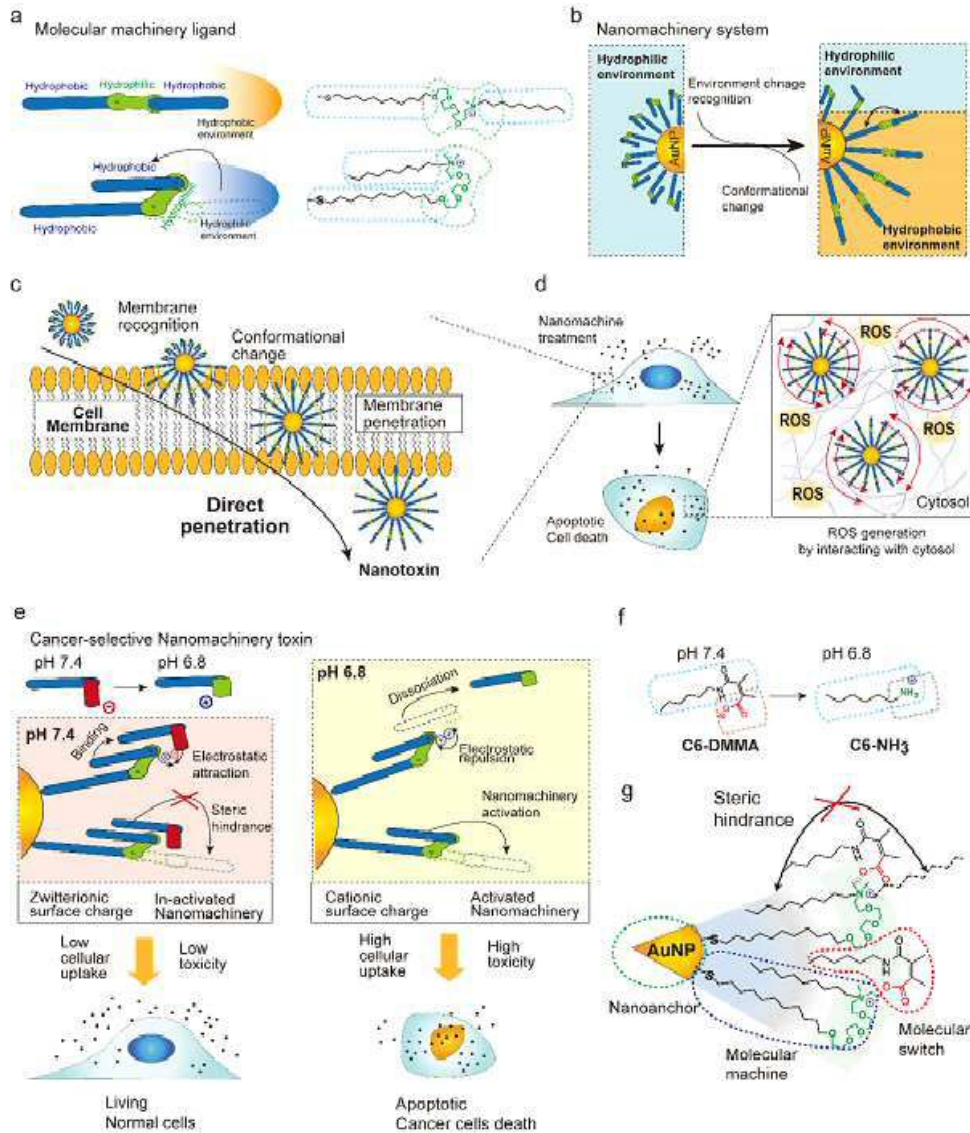
약물 내성을 가진 다른 유형의 암에서, 나노 독소의 pH-반응성 세포 독성을 조사하였고, 그의 효율적인 치료 및 표적화 효과를 나타냈다(도 26). 따라서, AuNP-DMMA는 그들의 리간드의 기계적 움직임 및 산성 조건 하 활성화를 통한 표적화 능력에 의해 유발된 세포 독성을 보유한다.

[0252]

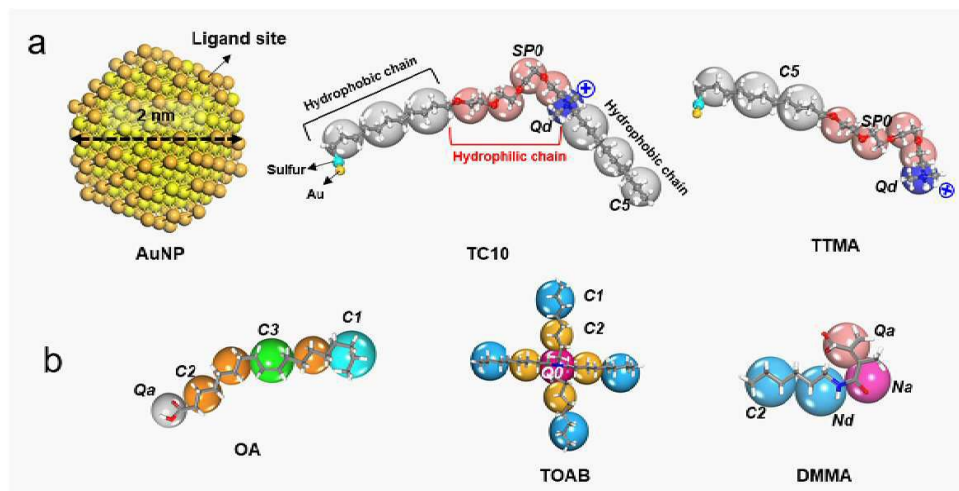
나노 독소로 치료된 세포들을 분석하기 위해, pH 6.8에서 AuNP-C10 및 AuNP-DMMA에 의해 유발된 세포 사멸을 유세포 분석을 통해 추가적으로 조사하였다(도 27a 및 28). 대조군의 세포(pH 7.4에서 AuNP-TTMA, AuNP-SucA 및 AuNP-DMMA)와 달리, pH 6.8에서 AuNP-DMMA가 처리된 세포는 세포 사멸을 겪었다. AuNP-C10의 동일한 카스파제-의존성 세포사멸 메커니즘에 의해 pH 6.8에서 AuNP-DMMA의 세포 사멸이 발생되는 것인지 명확히 하기 위해, 활성 산소종의 세포 내 생성 및 세포 내 세포 사멸-관련 단백질(절단된 카스파제-3, 사이토크롬 C, b-액틴, 절단된 PARP 및 LAMP-1)의 발현을 각각 염색 및 웨스턴 블롯 분석을 이용해 조사하였다. 공초점 이미지와 면역블롯 겔의 밴드는 pH 6.8에서 활성화된 AuNP-C10 및 AuNP-DMMA의 세포 사멸이 동일한 메커니즘을 통해 발생되었다는 것을 나타낸다(도 27c 내지 27f, 29 및 30).

도면

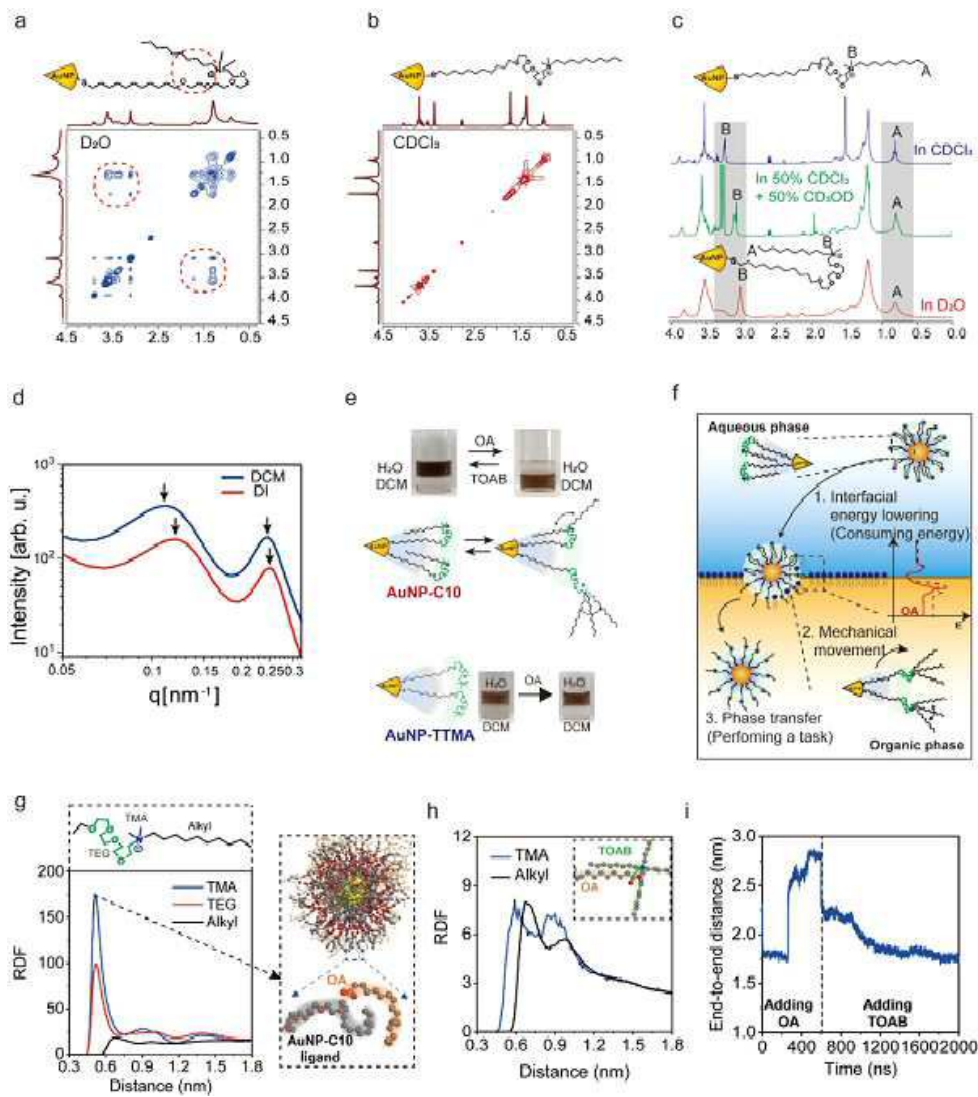
도면1



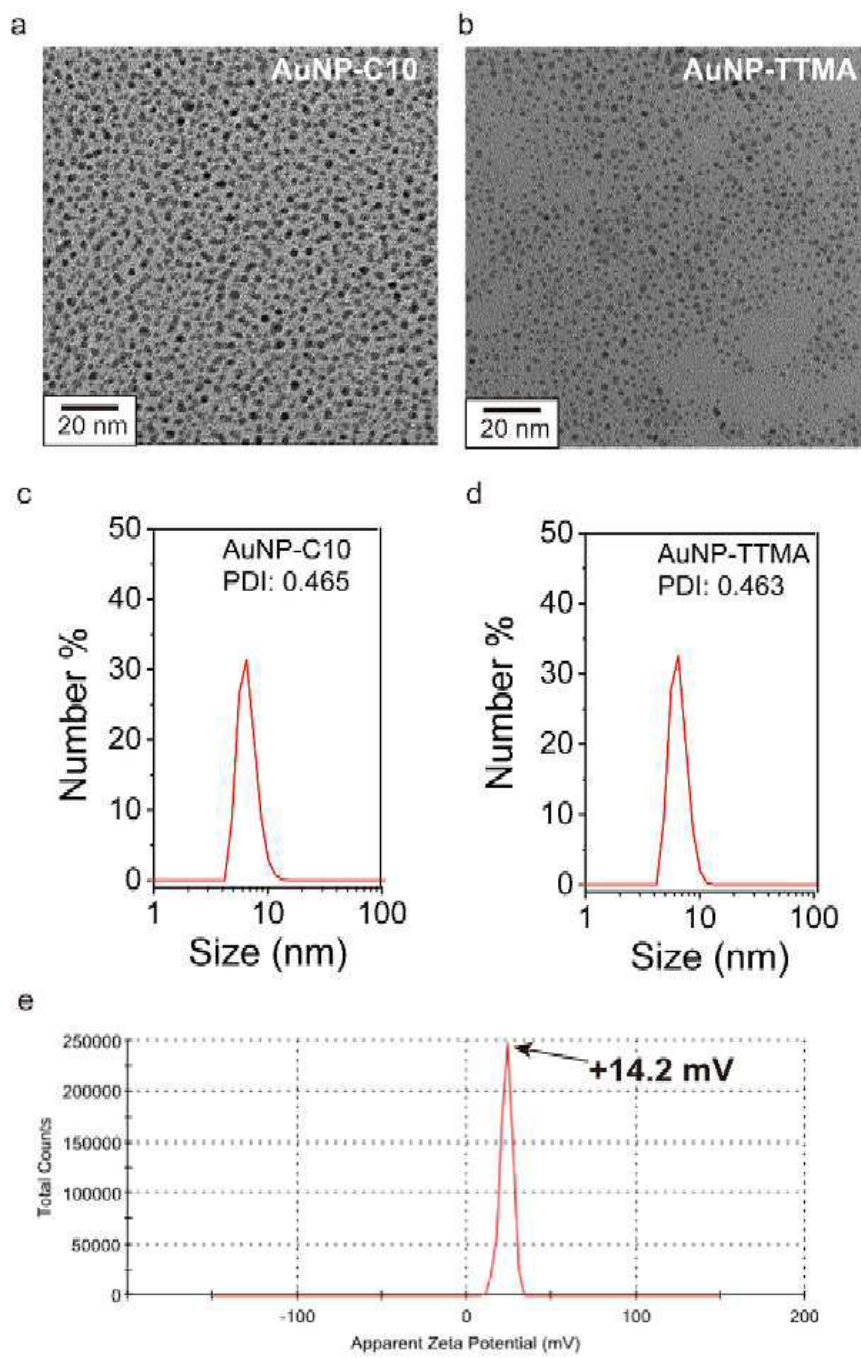
도면2



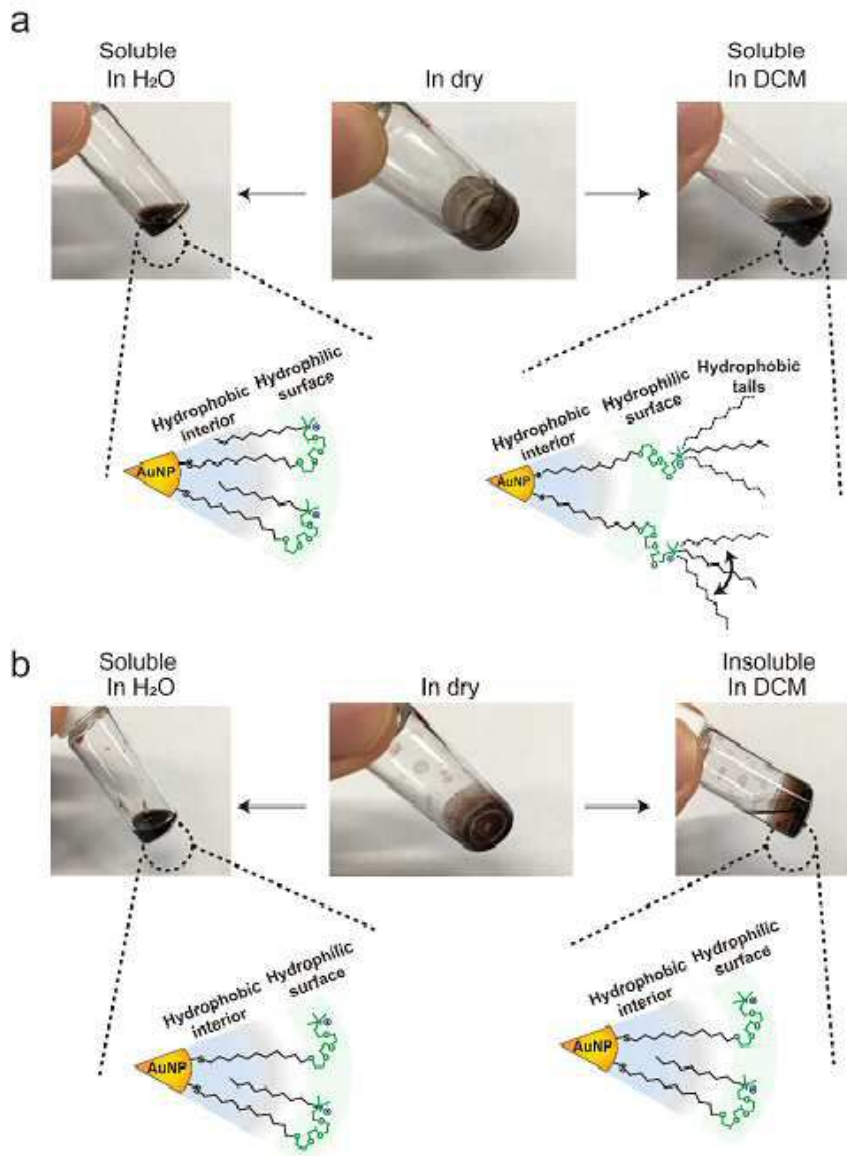
도면3



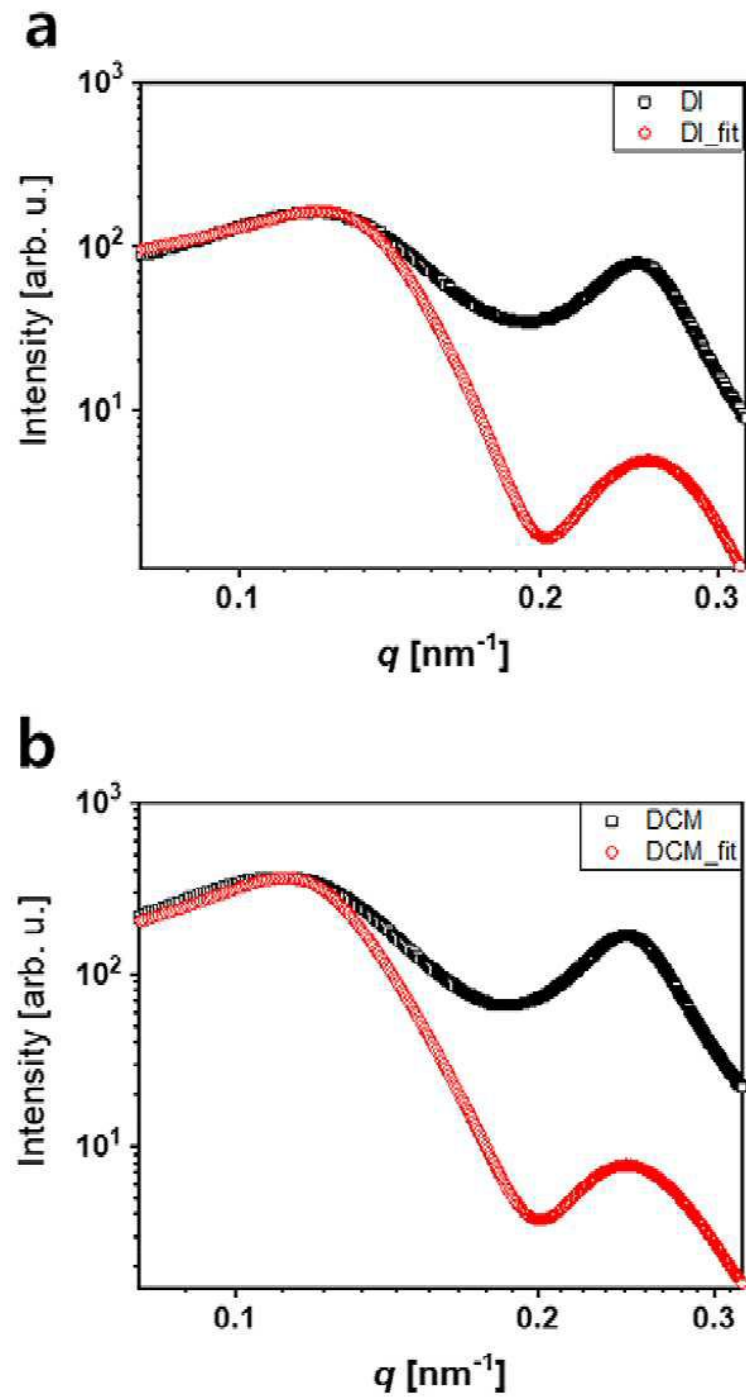
도면4



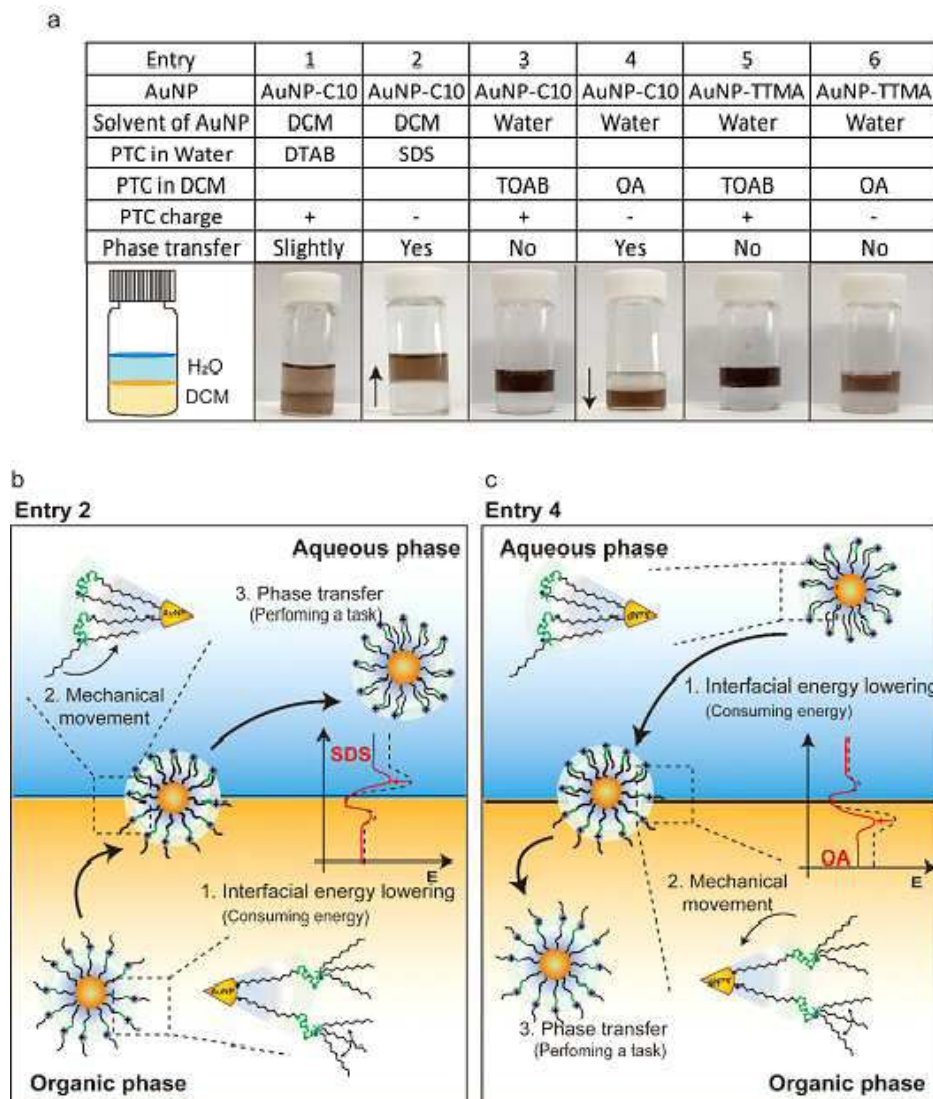
도면5



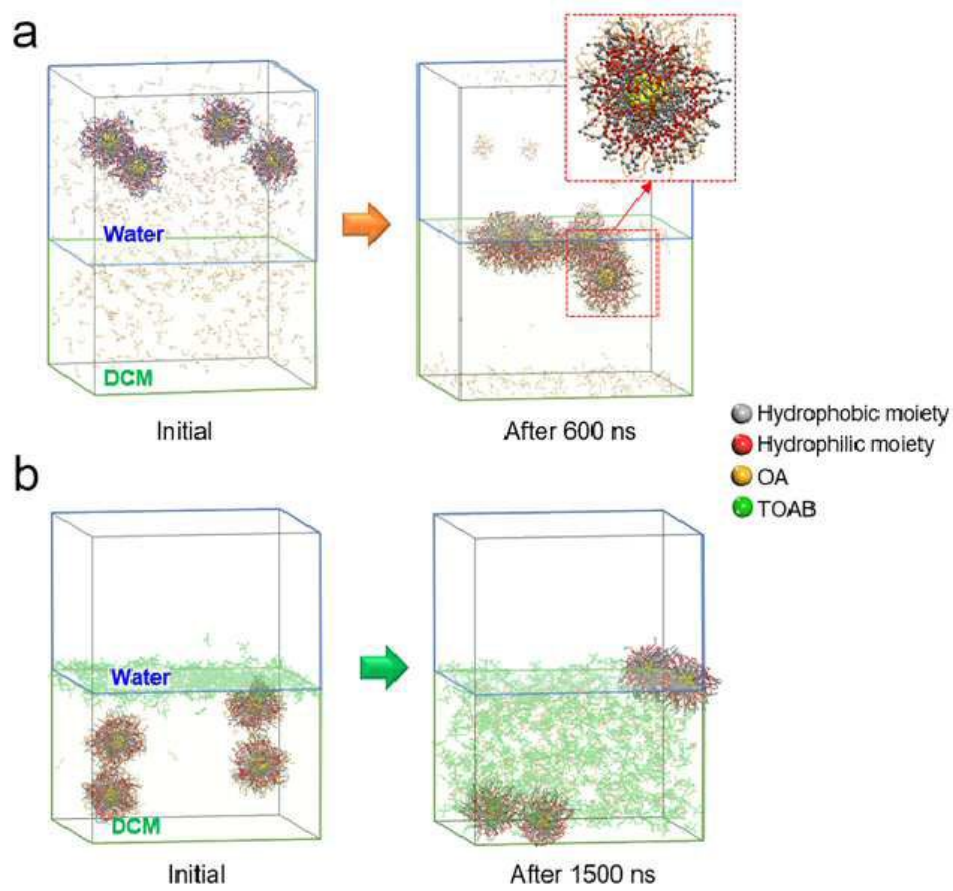
도면6



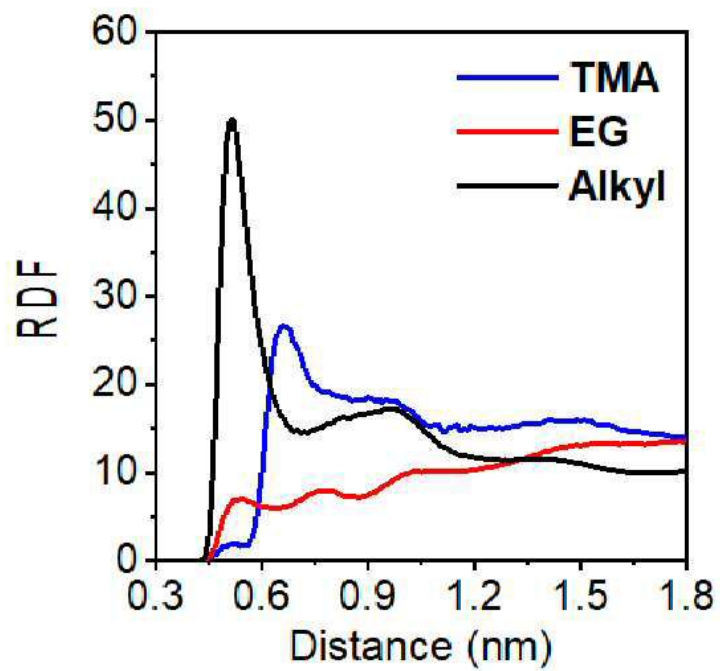
도면8



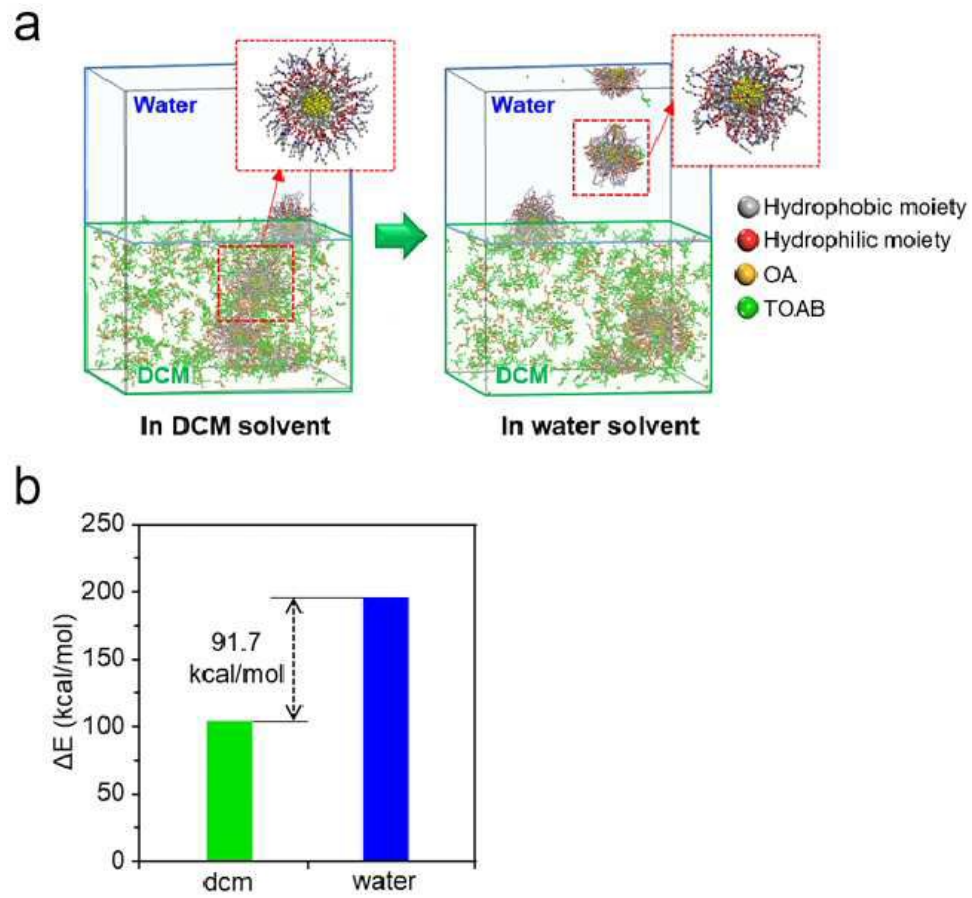
도면9



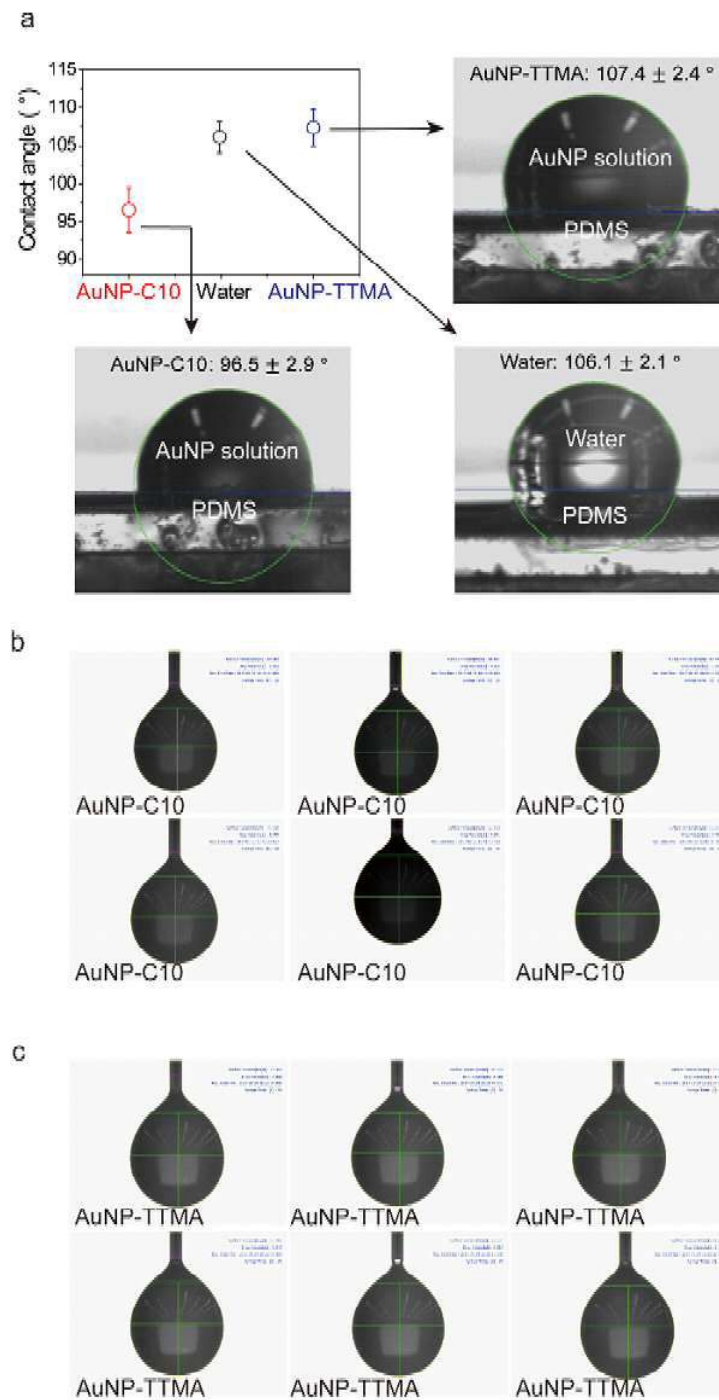
도면10



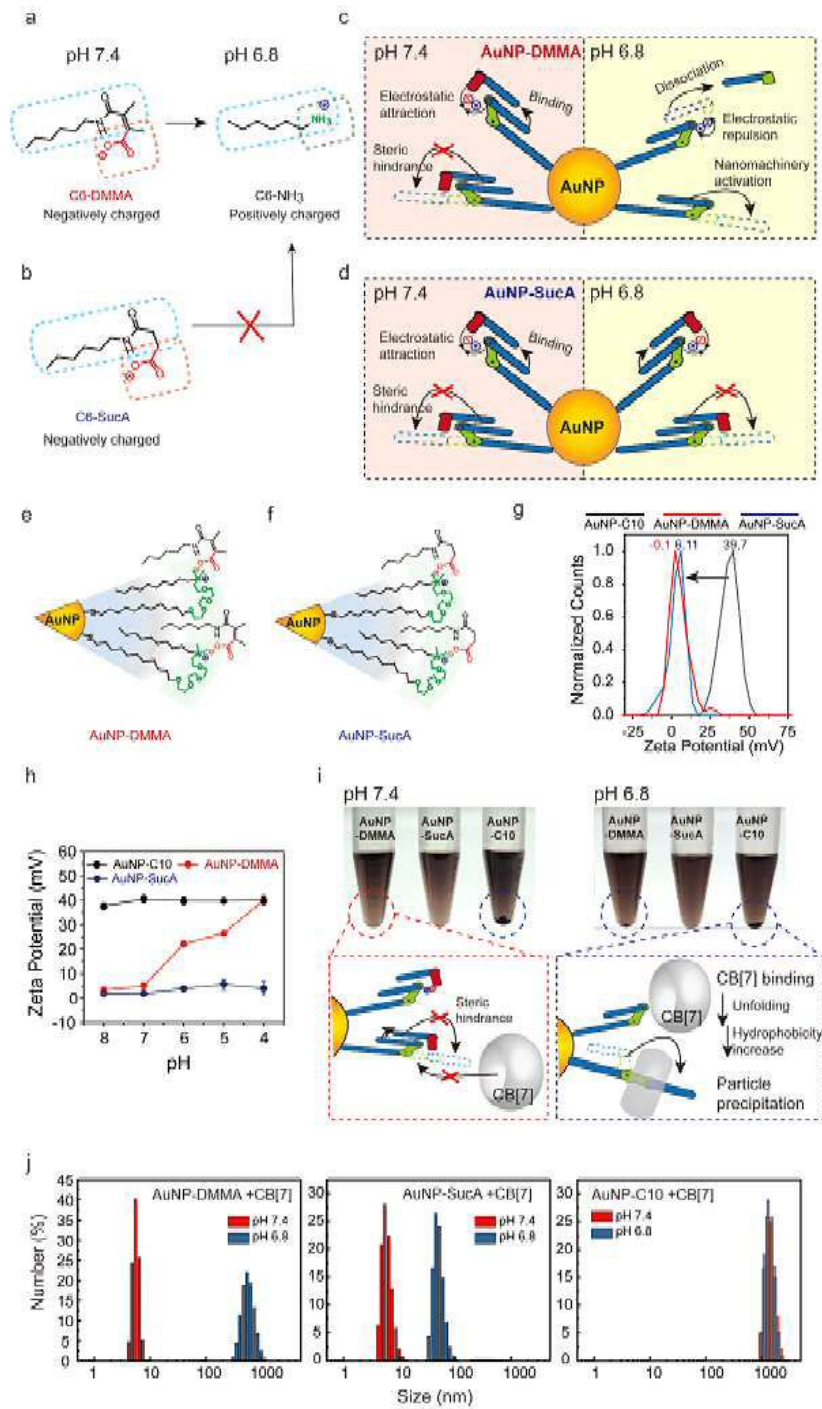
도면11



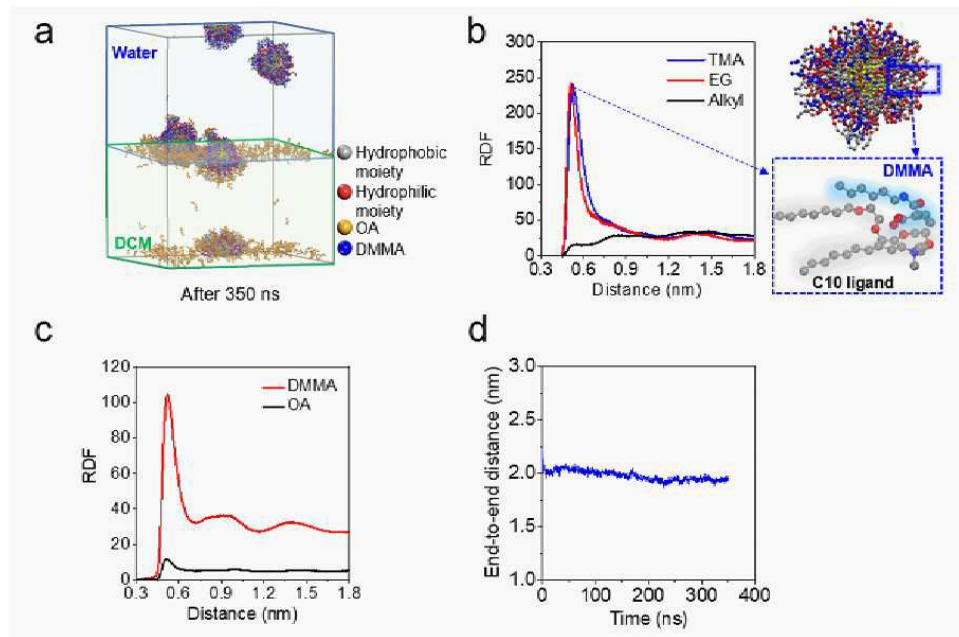
도면12



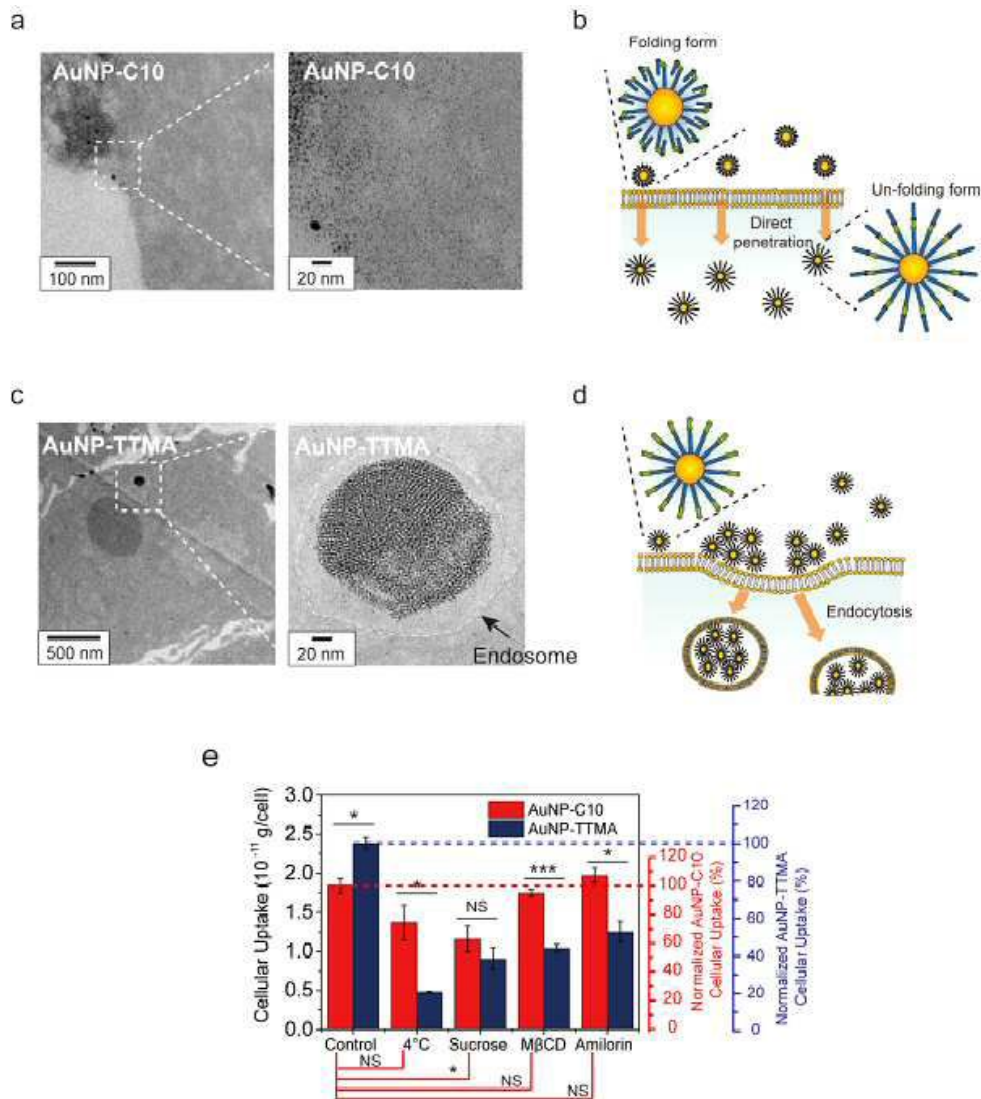
도면13



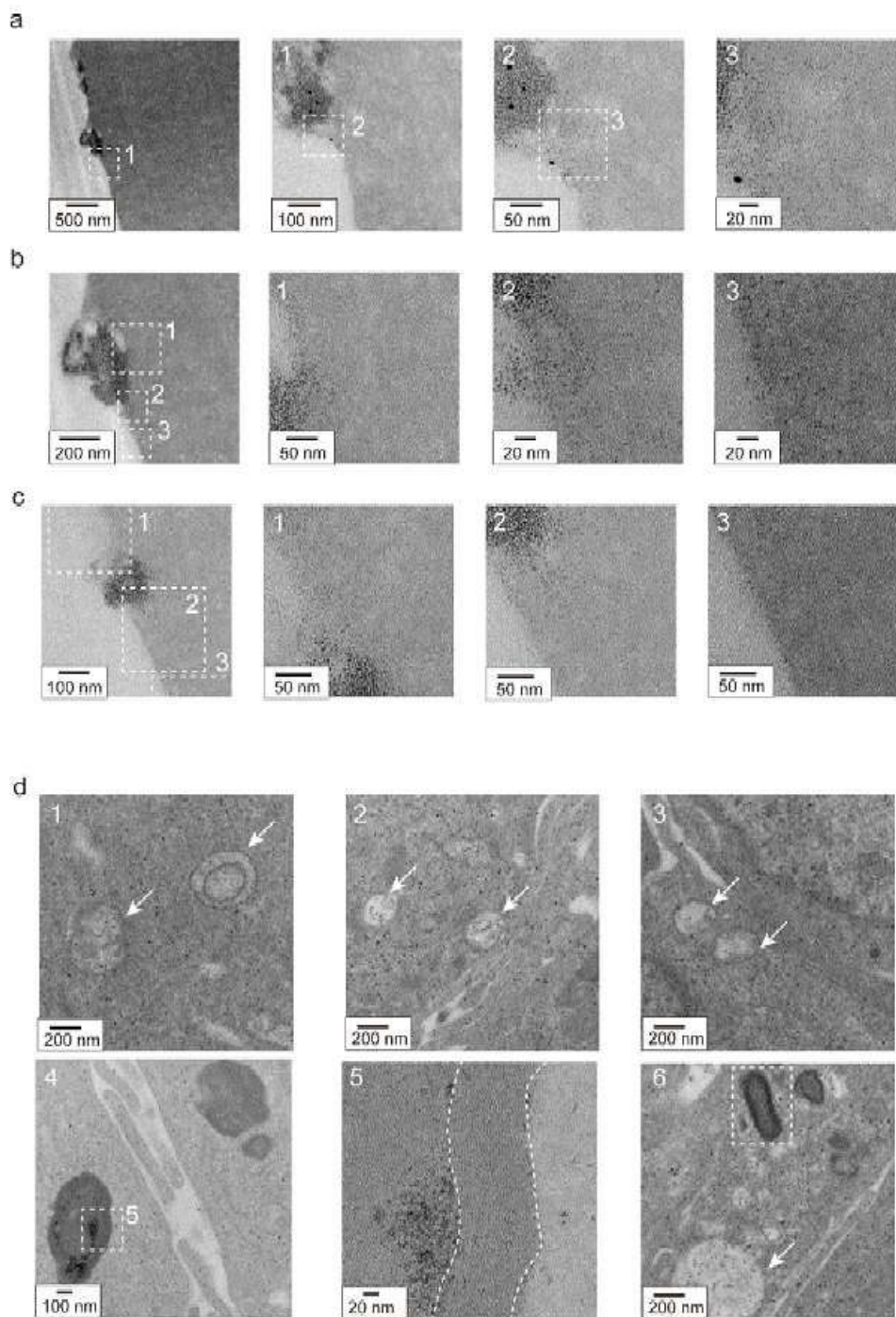
도면14



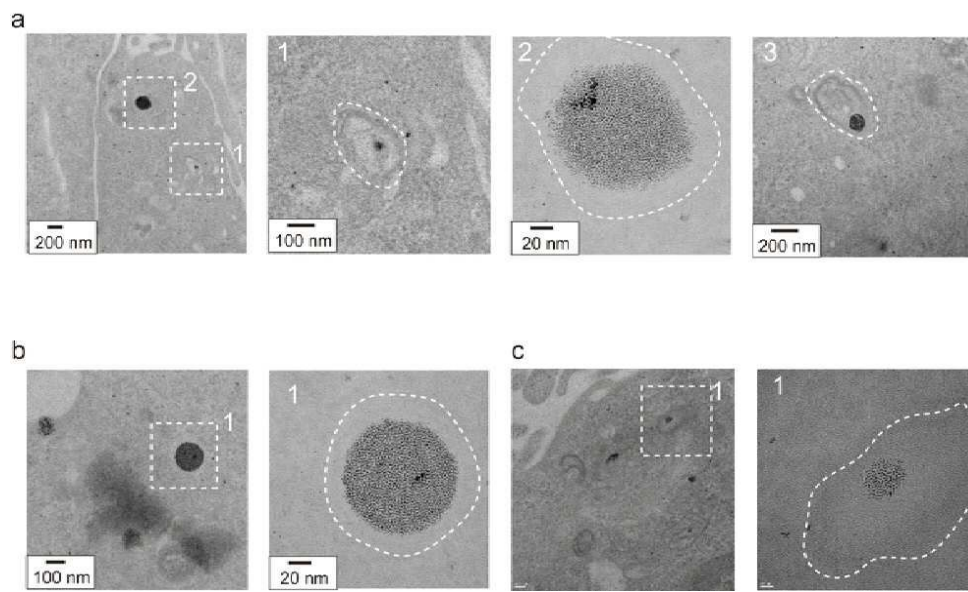
도면15



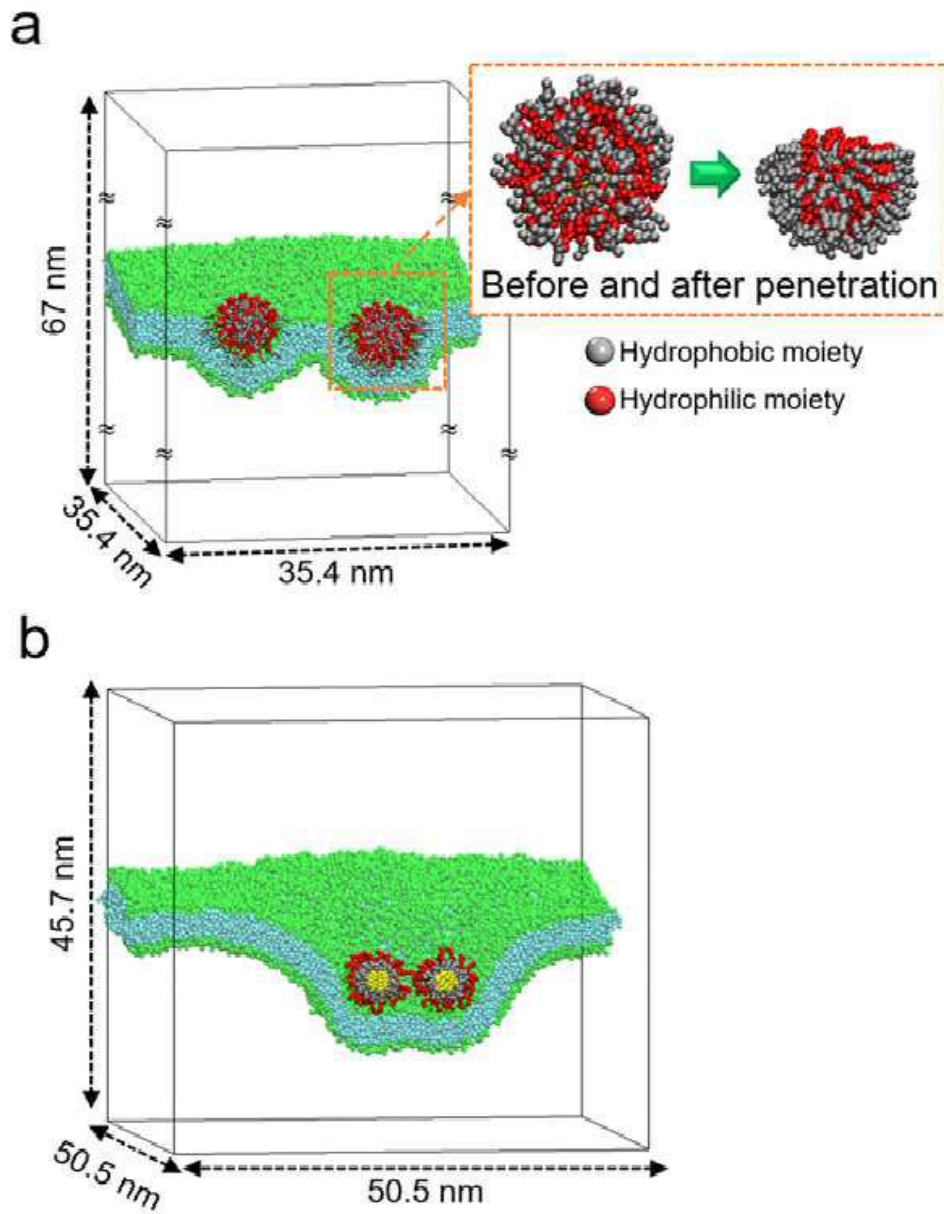
도면16



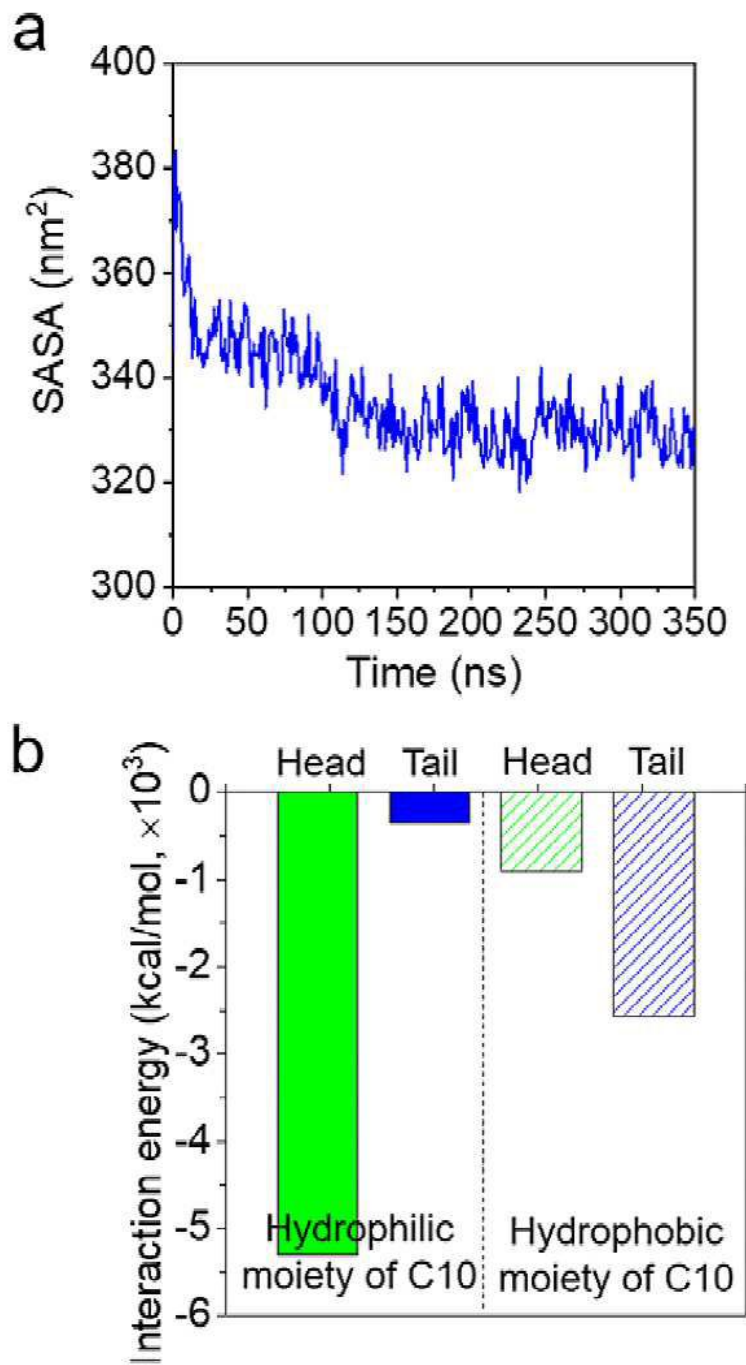
도면17



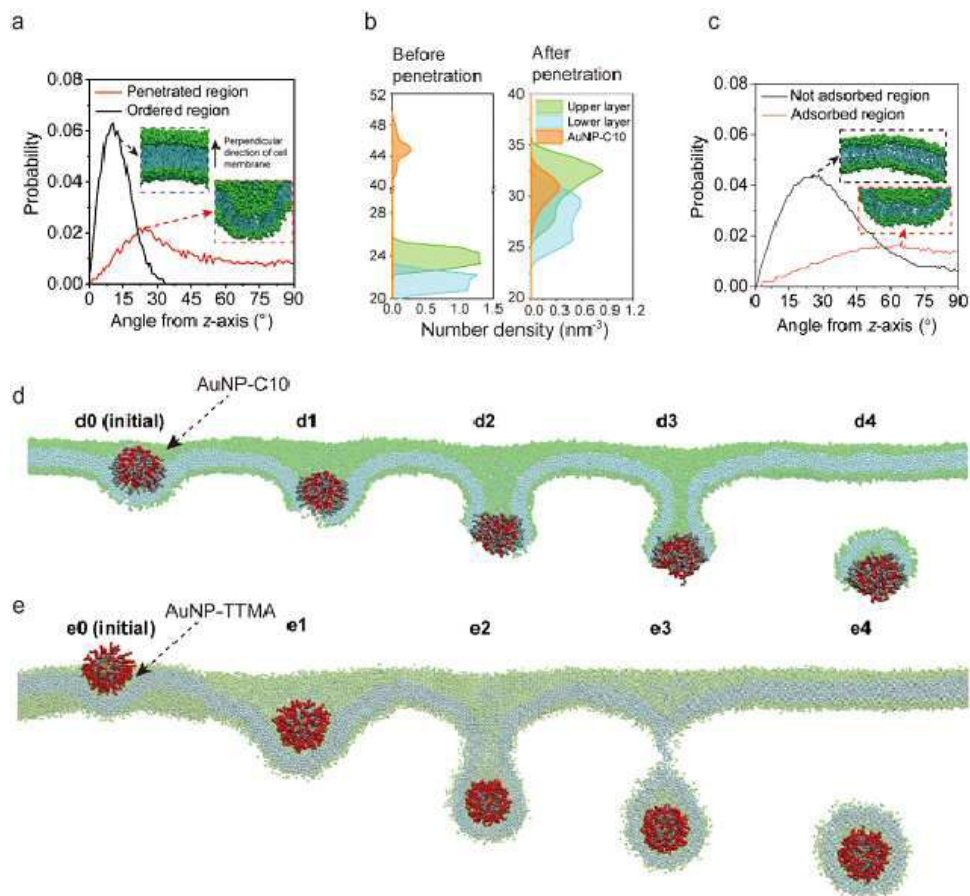
도면18



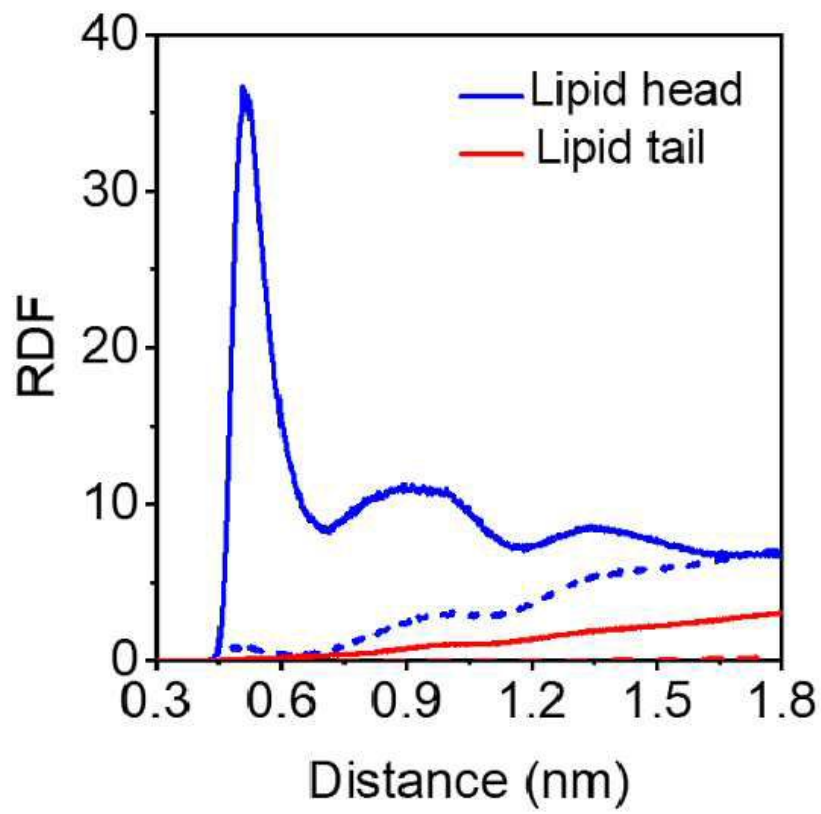
도면19



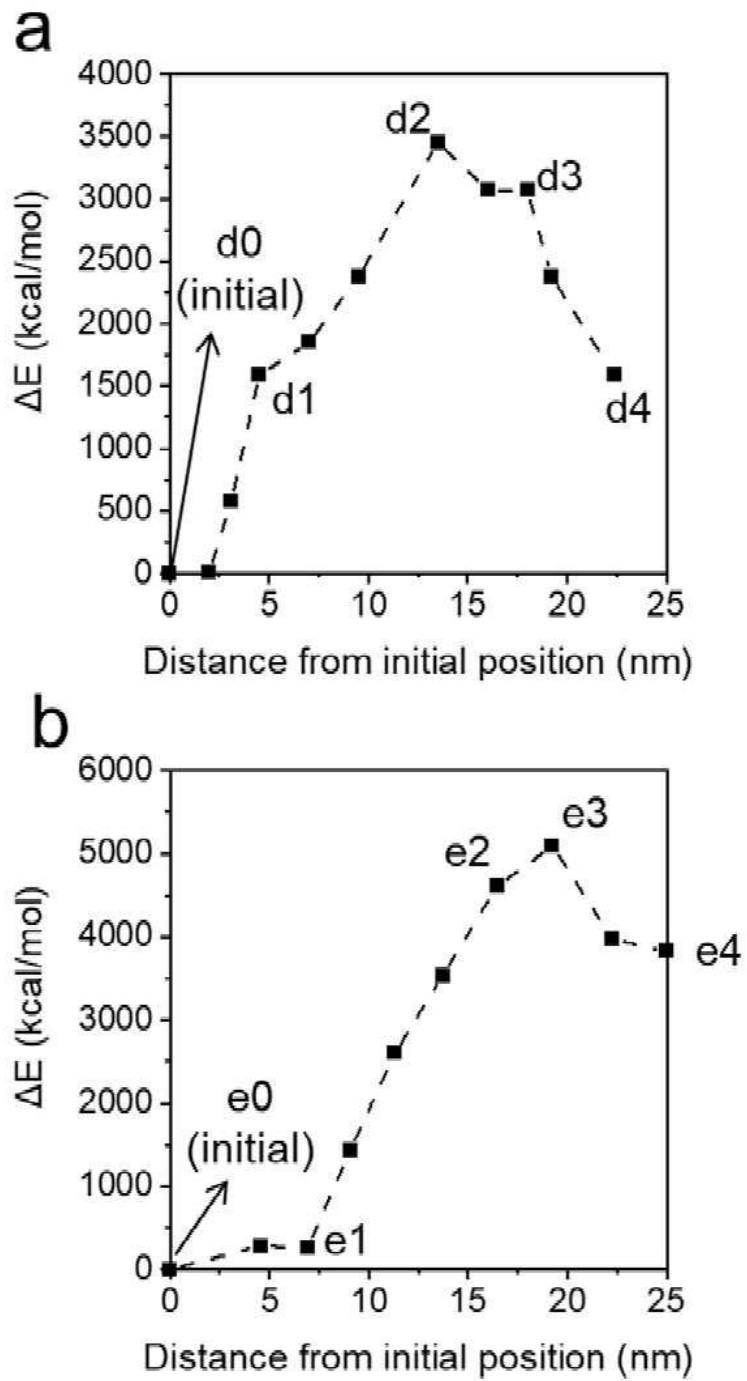
도면20



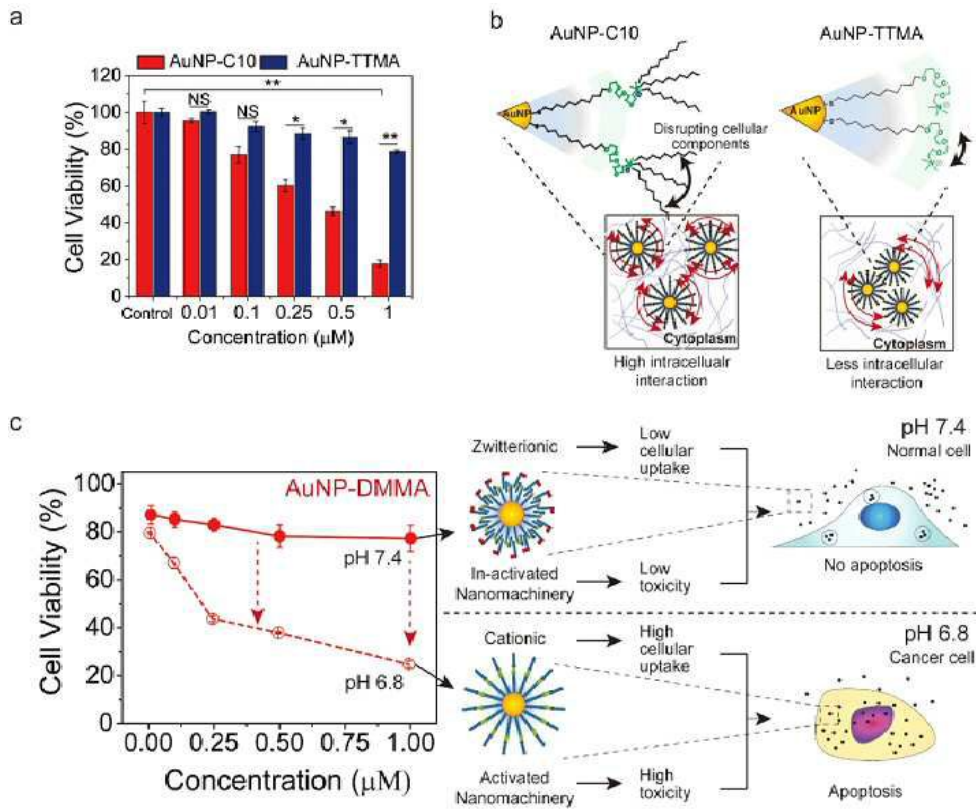
도면21



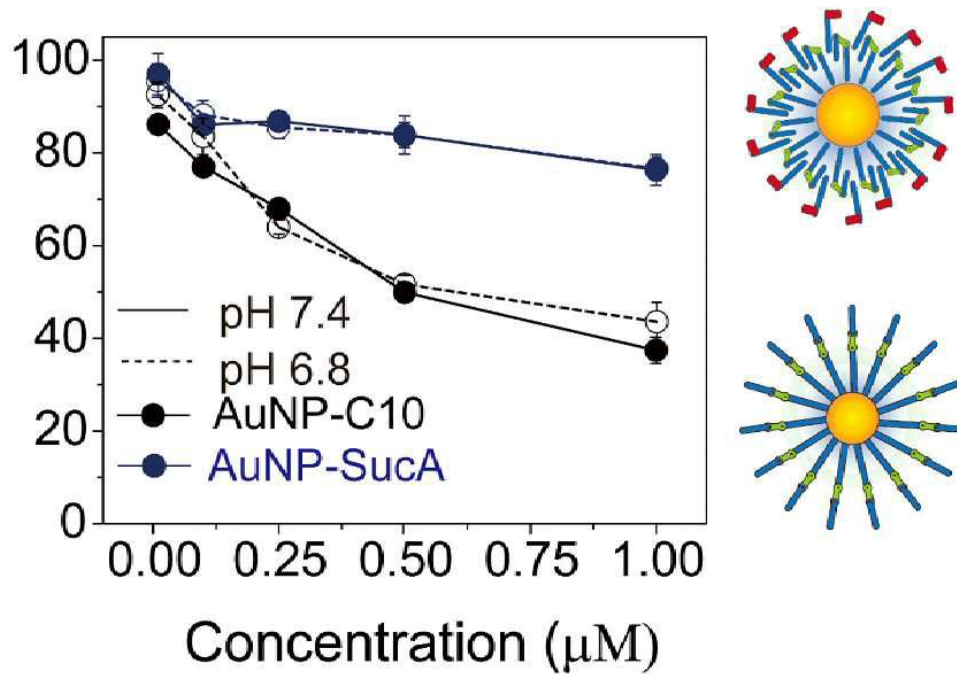
도면22



도면23

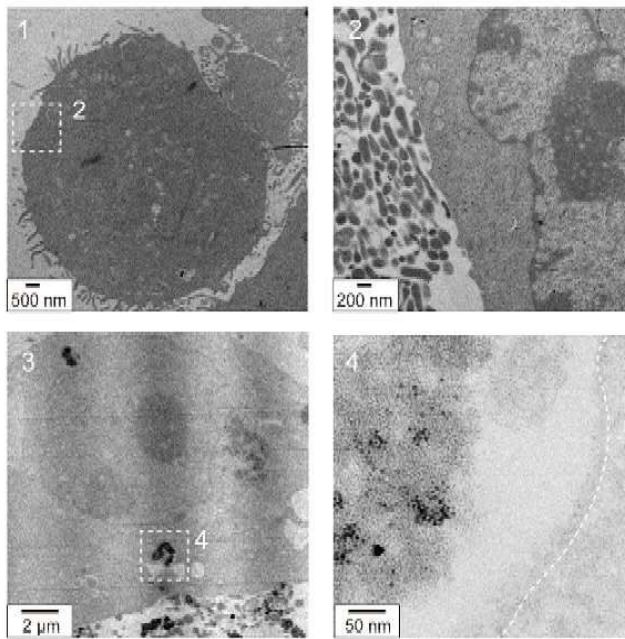


도면24

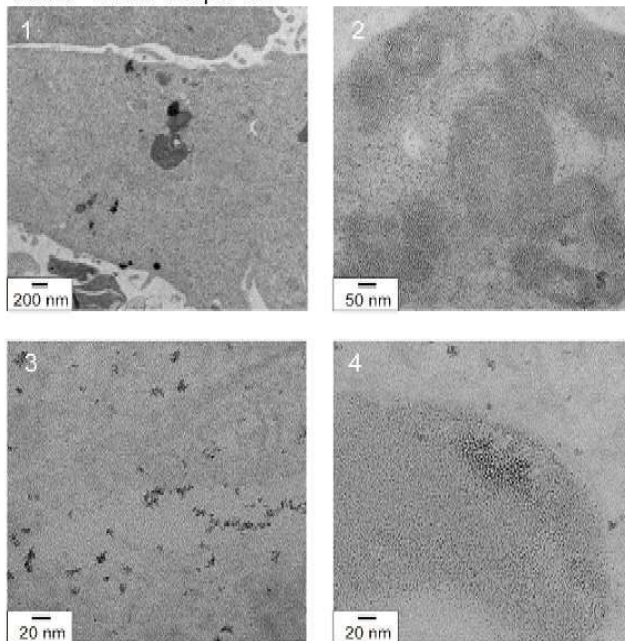


도면25

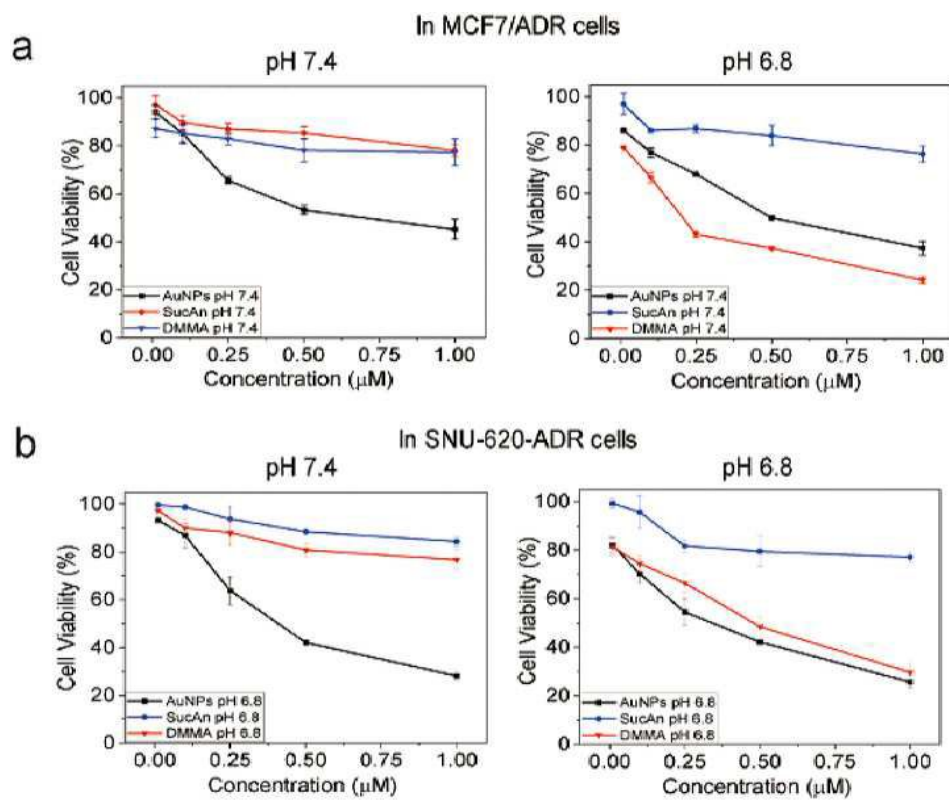
a AuNP- DMMA at pH 7.4



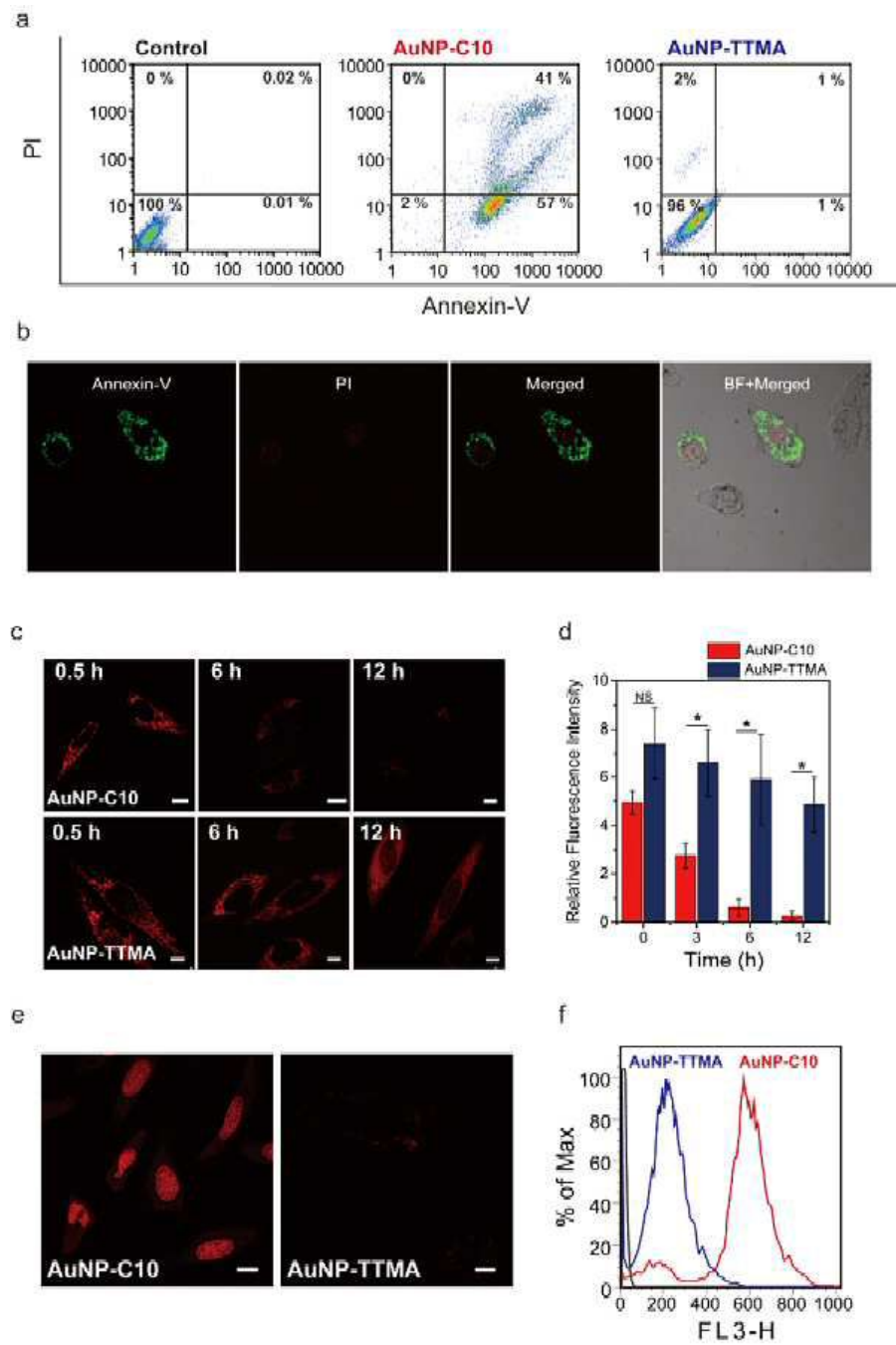
b AuNP-DMMA at pH 6.8



도면26

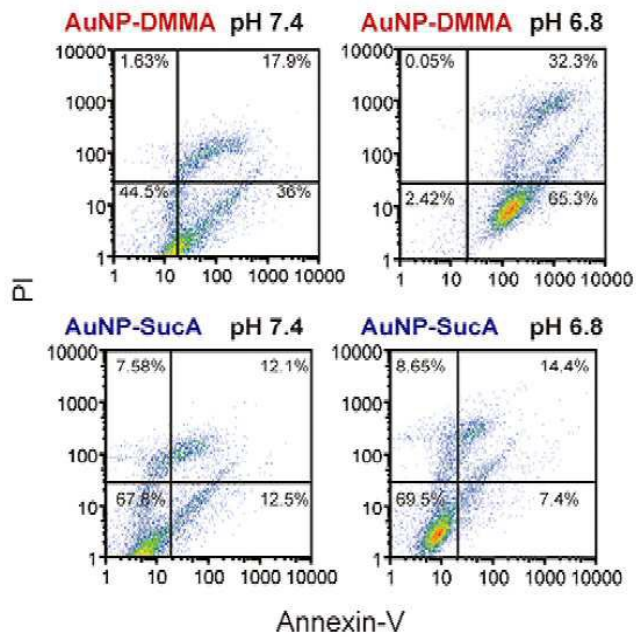


도면27

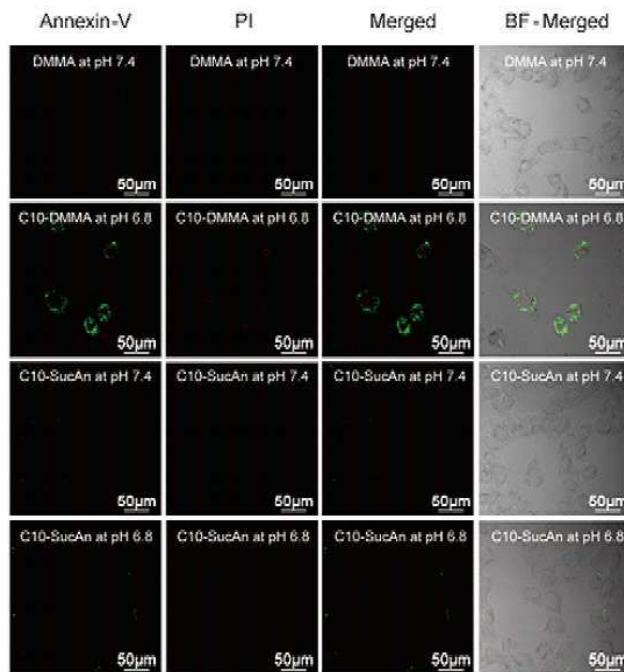


도면28

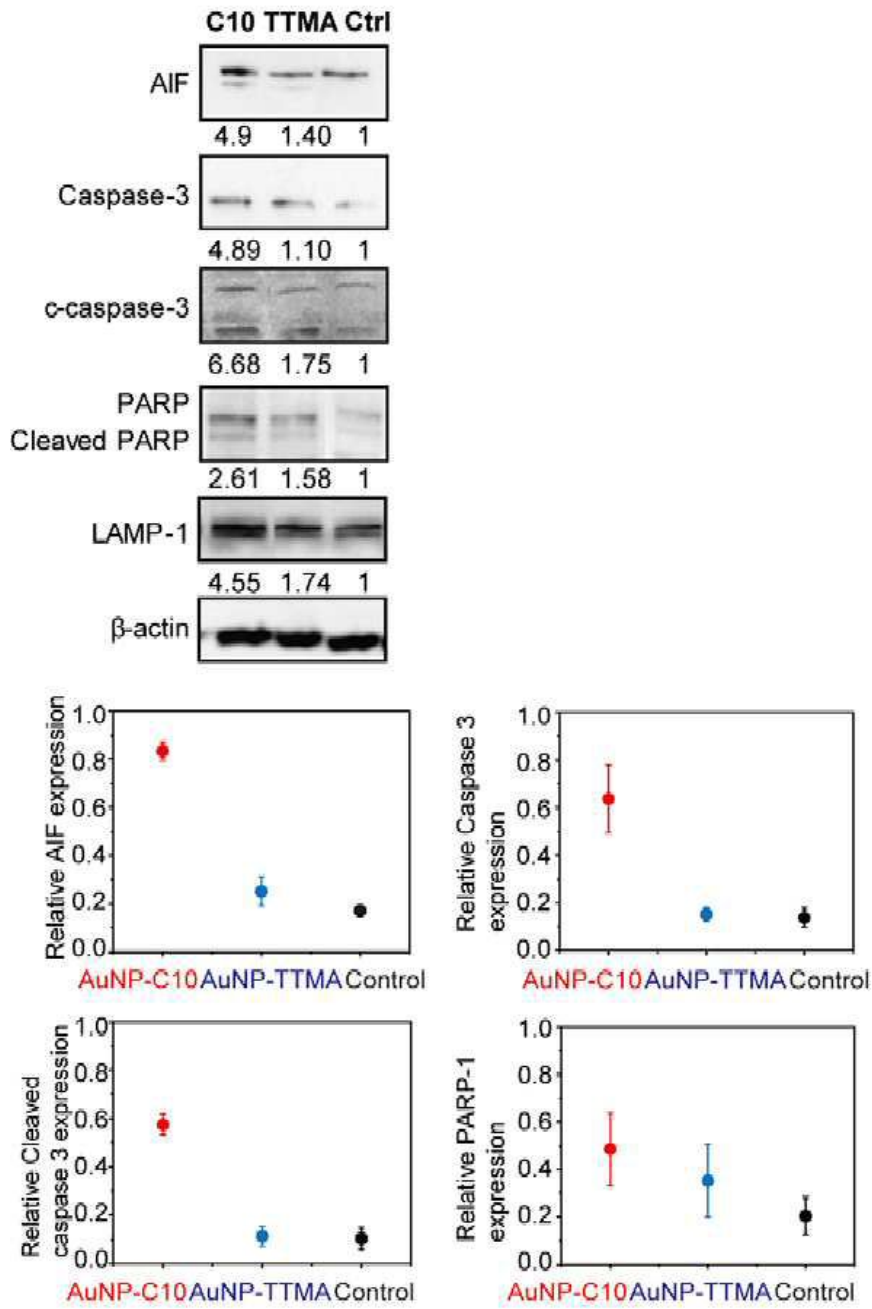
a



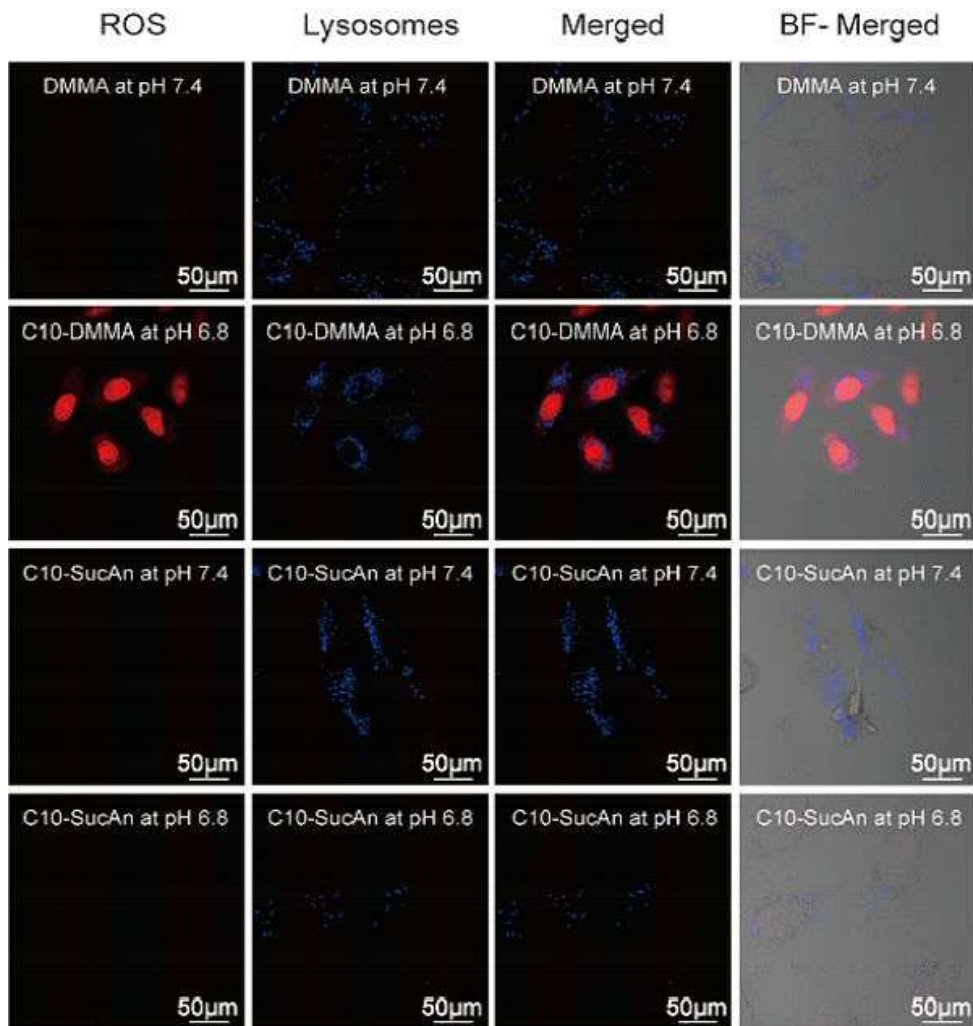
b



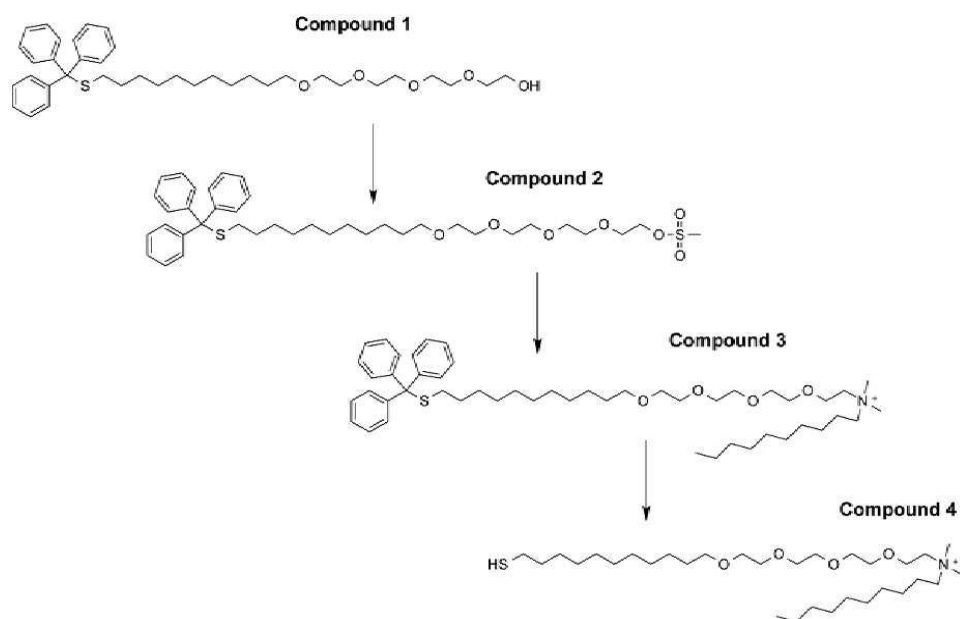
도면29



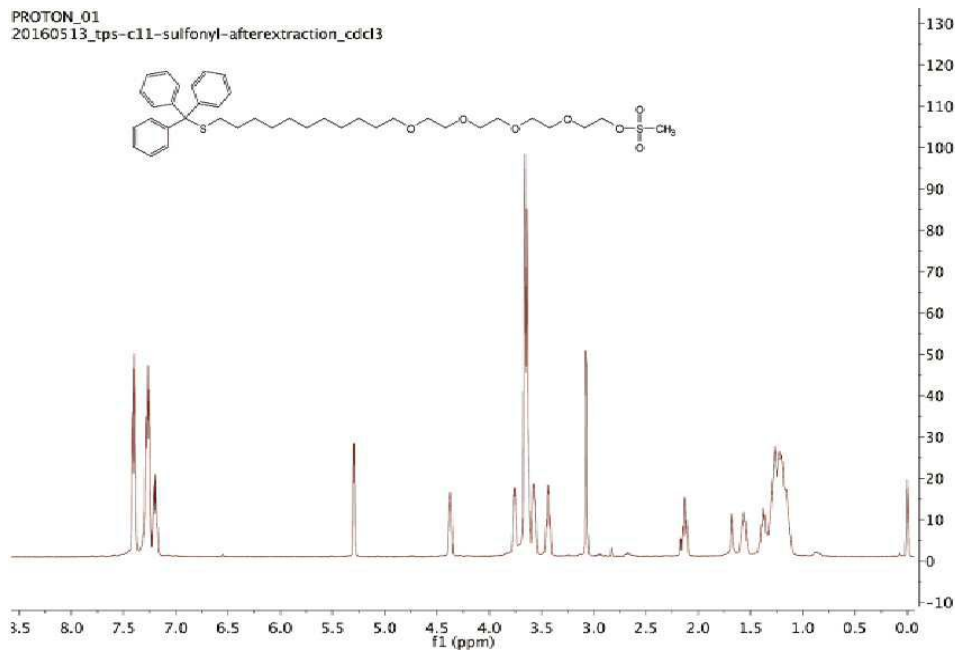
도면30



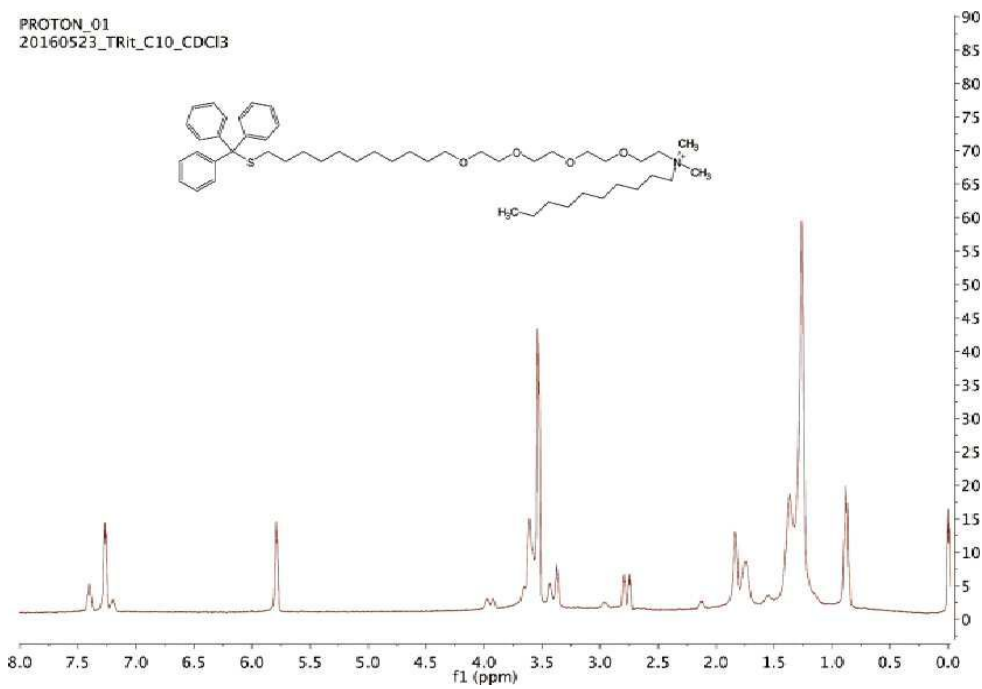
도면31



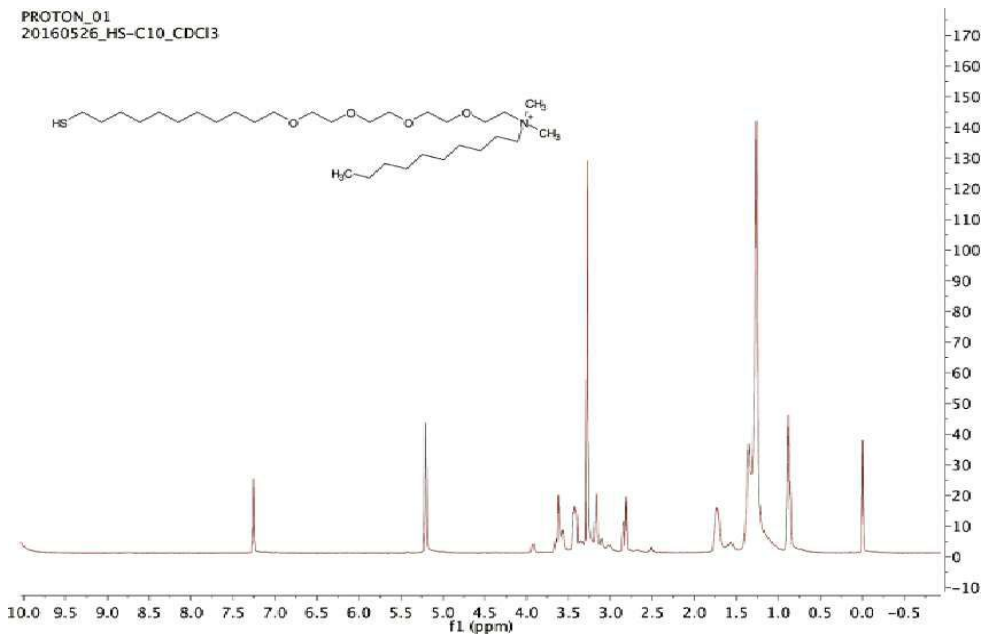
도면32



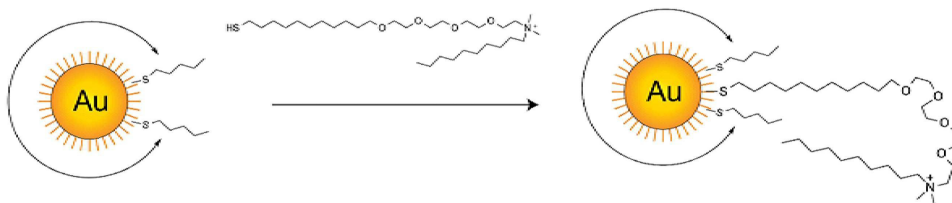
도면33



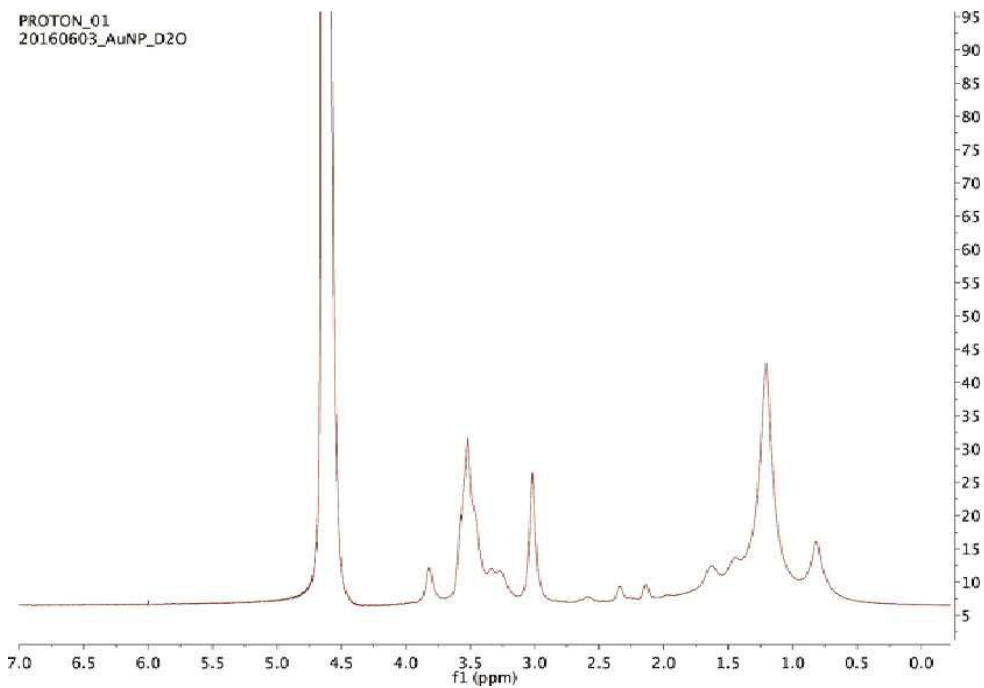
도면34



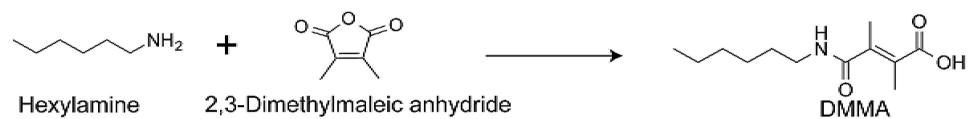
도면35



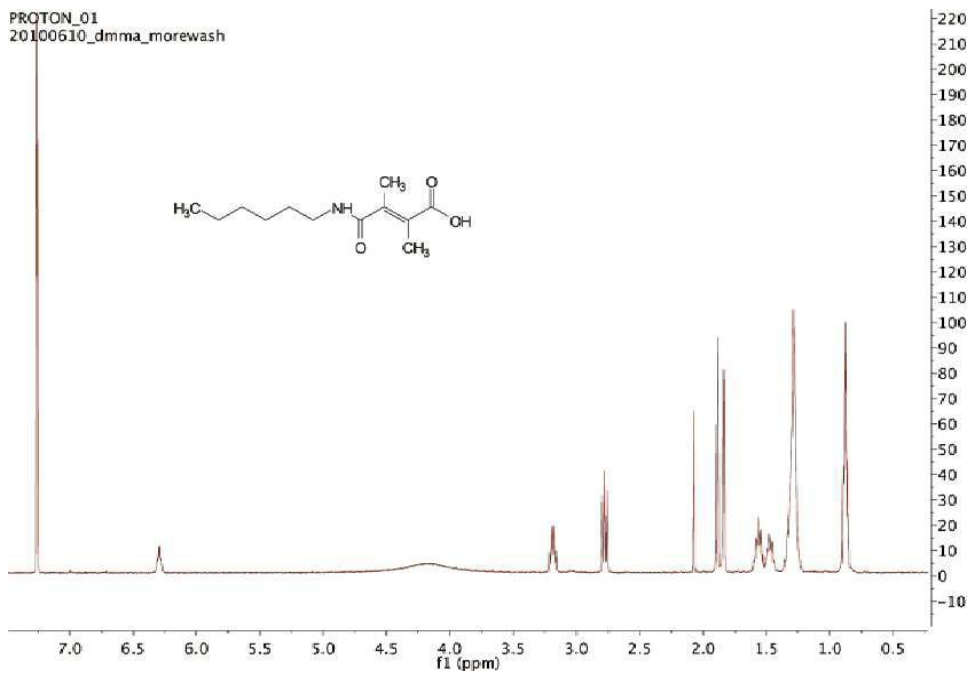
도면36



도면37



도면38



도면39



도면40

PROTON_01
20160601_product_succinyl_cdcl3

