

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2021-0104708
(43) 공개일자 2021년08월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23L 33/105 (2016.01) A23L 33/00 (2016.01)
A23L 33/10 (2016.01) A23P 10/40 (2016.01)
A61K 31/337 (2006.01) A61K 33/04 (2006.01)
A61K 33/06 (2006.01) A61K 33/26 (2006.01)
A61K 33/30 (2006.01) A61K 47/69 (2017.01)
C08L 5/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A23L 33/105 (2016.08)
A23L 33/10 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2021-7018227

(22) 출원일자(국제) 2019년11월15일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2021년06월14일

(86) 국제출원번호 PCT/CA2019/051634

(87) 국제공개번호 WO 2020/097739

국제공개일자 2020년05월22일

(30) 우선권주장

62/767,915 2018년11월15일 미국(US)

(71) 출원인

씨그리프 인코퍼레이티드

캐나다, 엔2케이 3와이4 온타리오, 워털루, 이스
트브리지 블루바드 450

(72) 발명자

펠리아스, 고퍼나단

캐나다, 엔2케이 3와이4 온타리오, 워털루, 이스
트브리지 블루바드 450

티와리, 크리슈나라즈

캐나다, 에이치3피 1에이5 퀘벡, 몽 로얄, 에이피
티 # 310, 브리터니 애버뉴 85

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인세신

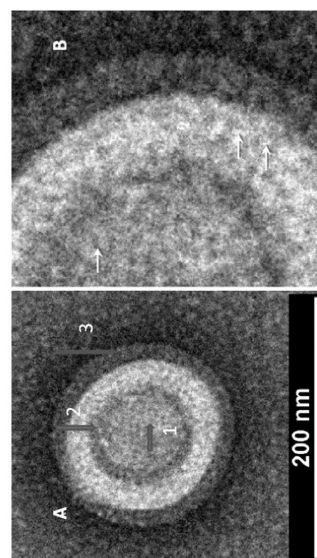
전체 청구항 수 : 총 176 항

(54) 발명의 명칭 식물 조직 유래 나노 입자 및 식품 분말

(57) 요약

본원에서는 균질화된 식물 조직으로부터 유래된 자가 조립 세포 성분을 포함하는 나노 입자가 제공된다. 또한 식품 분말 및 기타 관련 조성물이 제공된다. 이러한 나노 입자 및 식품 분말을 제조하는 방법뿐만 아니라 피험자 및/또는 전달 비히클에서 질병 또는 질환의 치료 또는 예방에 이의 용도가 또한 설명된다.

대표도 - 도17



(52) CPC특허분류

A23L 33/30 (2016.08)

A23P 10/40 (2016.08)

A61K 31/337 (2013.01)

A61K 33/04 (2013.01)

A61K 33/06 (2013.01)

A61K 33/26 (2013.01)

A61K 33/30 (2013.01)

A61K 47/6939 (2017.08)

C08L 5/00 (2013.01)

(72) 발명자

코레아-베탄조, 줄리에타

캐나다, 엠6에이치 2엑스7 온타리오, 토론토, 도버
코트 로드, 1051

파드매너벤, 프리야

캐나다, 엔2케이 3제트3 온타리오, 워털루, 패스틴
트레일 293

노스라티, 나기사

캐나다, 엔1이 5제이5 온타리오, 켈프, 빅토리아
로드 엔 323

마코빅, 모리카

캐나다, 엔1지 3오9 온타리오, 켈프, 크리즈 씨알
75

명세서

청구범위

청구항 1

균질화된 식물 조직 유래 자가 조립 세포 성분을 포함하는 나노 입자로서,

상기 세포 성분은 하나 이상의 구조적 탄수화물 또는 이의 절단 생성물을 포함하고, 여기서 지질은 나노 입자의 구조 성분이 아닌, 나노 입자.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 나노 입자는 실질적으로 지질이 없는, 나노 입자.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 나노 입자는 펙틴, 헤미셀룰로오스, 펩티드 및/또는 단백질, 유기산, 적어도 하나의 폴리 페놀, 이들의 절단 생성물, 또는 이들의 임의 조합을 포함하는, 나노 입자.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 나노 입자는,

펙틴계 내부 코어;

내부 코어를 둘러싸는 중간층으로서, 상기 중간층은 펙틴 및 헤미셀룰로오스의 거대 분자 및/또는 이들의 절단 생성물, 폴리 페놀 및 유기산을 포함하는 중간층; 및

식물 조직의 숙성 동안 및/또는 균질화 동안 이화 작용으로부터 선택적으로 형성된, 거대 분자 탄수화물 및 단백질을 포함하는 피브릴화된 외부 층을 포함하는, 나노 입자.

청구항 5

제3항 또는 제4항에 있어서, 상기 유기산은 말산, 아스코르브 산 또는 둘 다를 포함하는, 나노 입자.

청구항 6

제3항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리 페놀은 안토시아닌을 포함하는, 나노 입자.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 성분은 숙성 동안 또는 숙성된 과일의 균질화 동안 식물 조직으로부터 유리되고 나노 입자로 자가 조립될 수 있는 것들을 포함하는, 나노 입자.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 구조적 탄수화물은 펙틴, 펙틴산, 펙틴의 메틸 에스테르, 펙틴 유도체, 폴리 갈락투론산, 람노갈락투로난(rhamnogalacturonans), 자일로구칸(xylogucans), 헤미셀룰로오스, 글루코스, 만노스 또는 자일로스의 β -(1→4)-연결된 백본들을 포함하는 자일로글루칸, 및/또는 아라비노갈락탄 및/또는 이의 절단 생성물 중 하나 이상을 포함하는, 나노 입자.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 나노 입자는 직경이 약 50 내지 250nm인 실질적으로 구형 구조를 갖는, 나노 입자.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 나노 입자,

펙틴계 내부 코어;

내부 코어를 둘러싸는 중간층으로서, 상기 중간층은 펙틴 또는 이의 유도체를 포함하는 하나 이상의 나선형 피브릴(fibril) 구조, 및 하나 이상의 헤미셀룰로오스-유래 분자 또는 이의 유도체를 포함하는, 중간층; 및 헤미셀룰로오스 또는 이의 절단 생성물, 및 세포 단백질로부터 유래된 하나 이상의 펩티드를 포함하는 피브릴화된 외층을 포함하는, 나노 입자.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 나노 입자는 약 pH3 내지 약 pH7 범위에서 존재하는 수소-결합 상호 작용에 의해 안정화되고, 식물 조직의 세포 성분의 이화 작용으로부터 유래된 거대 분자들 사이에서 형성되고 히드록실기 및/또는 아미노기 및/또는 유기산 기를 갖는, 나노 입자.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 나노 입자는 비결정질인, 나노 입자.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 나노 입자는 생물학적 활성제를 추가로 포함하는, 나노 입자.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 생물학적 활성제는 약제학적 활성 약물, 단백질, 효소, 기능성 식품 또는 영양소인, 나노 입자.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 나노 입자는 수용액 중에 있는, 나노 입자.

청구항 16

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 나노 입자는 분말 형태인, 나노 입자.

청구항 17

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 나노 입자는 탈수, 냉동 건조(lyophilized), 동결-건조(freeze-drying), 분무-건조 또는 나노 분무 건조 형태인, 나노 입자.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 식물 조직은 과일 또는 채소 식물 조직을 포함하는, 나노 입자.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 식물 조직은 과일, 숙성 채소, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하고, 바람직하게는, 상기 식물 조직은 체리, 블루 베리, 포도, 복숭아, 천도 복숭아, 자두, 살구, 파파야, 토마토 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는, 나노 입자.

청구항 20

제18항 또는 제19항에 있어서, 상기 식물 조직은 신 체리 과일 조직을 포함하는, 나노 입자.

청구항 21

균질화된 식물 조직으로부터 나노 입자를 제조하는 방법으로서,

상기 방법은,

식물 조직으로부터 유리된 세포 성분을 포함하는, 용액 중 균질화된 식물 조직을 제조하는 단계;

존재하는 경우, 균질화된 식물 조직에서 파편(debris)을 제거하는 단계; 및

선택적으로, 균질화된 식물 조직을 투석하여 비-복합 화합물을 제거하거나, 크기 배제에 의해 비-복합 화합물을 제거하는 단계를 포함하고,

이에 의해 세포 성분의 자가 조립에 의해 형성된 나노 입자를 포함하는 용액을 제공하는, 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 방법은 나노 입자를 포함하는 용액을 탈수, 냉동 건조, 동결 건조, 분무 건조 또는 나노 분무 건조하는 단계를 추가로 포함하는, 방법

청구항 23

제21항 또는 제22항에 있어서, 상기 나노 입자는 실질적으로 수성 매질에서 자가 조립에 의해 형성되는, 방법

청구항 24

제21항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 용액에서 균질화된 식물 조직을 제조하는 단계는 수성, 유기성 또는 혼합된 수성-유기성 매질에서 식물 조직을 균질화하는 것을 포함하는, 방법

청구항 25

제21항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 용액에서 균질화된 식물 조직을 제조하는 단계는 식물 조직을 수성, 유기성 또는 물, 에탄올, 메탄올 또는 아세톤 중 어느 하나 이상을 포함하는 혼합된 수성-유기성 매질에서 고 전단 균질화 및/또는 초음파 처리하는 것을 포함하는, 방법

청구항 26

제21항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 파편 제거 단계는 투석, 균질화된 식물 조직을 여과하는 것, 균질화된 식물 조직을 원심 분리하는 것, 또는 균질화된 식물 조직에 대해 접선 유동 여과 또는 연속 유동 여과하는 것 또는 이들의 조합을 수행하는 단계를 포함하는, 방법

청구항 27

제21항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 정의된 나노 입자를 제조하기 위한 것인, 방법

청구항 28

균질화된 식물 조직으로부터 나노 입자를 제조하는 방법으로서, 상기 방법은,

상기 식물 조직으로부터 유리된 세포 성분을 포함하는 용액 중 균질화된 식물 조직을 제조하는 단계;

상기 세포 성분의 자가 조립에 의해 나노 입자가 형성되도록 하는 단계;

존재하는 경우, 균질화된 식물 조직에서 파편을 제거하는 단계; 및

동결 건조, 분무 건조 또는 나노 분무 건조를 통해 나노 입자를 포함하는 분말을 형성하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 자가 조립은 실질적으로 수성 매질에서 발생하는, 방법.

청구항 30

제28항 또는 제29항에 있어서, 상기 용액 중 균질화된 식물 조직을 제조하는 단계는 수성, 유기성 또는 혼합된 수성-유기성 매질에서 식물 조직을 고 전단 균질화시키는 것을 포함하는, 방법.

청구항 31

제28항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 파편을 제거하는 단계는 균질화된 식물 조직을 여과하거나,

균질화된 식물 조직을 원심 분리하거나, 또는 둘 모두를 포함하는, 방법.

청구항 32

제28항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 정의된 나노 입자를 제조하기 위한 것인, 방법.

청구항 33

제21항 내지 제32항 중 어느 한 항에서 정의된 방법으로 제조된 나노 입자.

청구항 34

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항 또는 제33항에 정의된 나노 입자로부터 제조된 식품 분말로서, 선택적으로 상기 식품 분말은 마이크로-크기 미세 분말 형태로 제공되는, 식품 분말.

청구항 35

생물학적 활성제를 필요로 하는 대상, 세포 또는 유기체에 전달하는 방법으로서, 상기 방법은,

화학적 또는 물리적 과정을 사용하여 생물학적 활성제와 복합체화 되거나 접합된, 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항 또는 제33항에 정의된 나노 입자를, 대상, 세포 또는 유기체에 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 36

제36항에 있어서, 상기 생물학적 활성제는 셀레늄, 아연, 철 또는 마그네슘과 같은 원소인, 방법.

청구항 37

제35항에 있어서, 상기 생물학적 활성제는 항암 약물이고, 상기 대상은 암에 걸린 대상인, 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 항암 약물은 파클리탁셀, 빈크리스틴, 또는 암 치료에 사용되는 임의의 천연 또는 합성 화합물인, 방법.

청구항 39

제35항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생물학적 활성제는 나노 입자 형성 동안 나노 입자에 도입되거나, 상기 생물학적 활성제는 임의로 알코올 또는 기타 유기 성분을 포함하는 수성 기반 매질에서 이미 형성된 나노 입자와 복합체화되거나 접합되는, 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 상기 수성 기반 매질은 DMSO, 또는 완충제 또는 둘 다를 포함하는, 방법.

청구항 41

필요로 하는 대상에서 염증을 유발하는 활성 산소 종의 증가된 수준과 관련된 질환 또는 질병을 치료하는 방법으로서,

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항 또는 제33항에 정의된 나노 입자를 상기 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 42

필요로 하는 대상에서 염증을 치료 또는 감소시키는 방법으로서,

상기 방법은,

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항 또는 제33항에 정의된 나노 입자를 상기 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 상기 나노 입자는 항염증제를 포함하거나 이와 병용-투여되는, 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 상기 항염증제는 커큐민을 포함하는, 방법

청구항 45

필요로 하는 대상에서 비만을 치료 또는 감소시키는 방법으로서,

상기 방법은,

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항 또는 제33항에 정의된 나노 입자를 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 나노 입자는 전통적으로 식품 또는 의료 목적으로 사용되는 견과류, 콩과 식물, 허브, 향신료, 채소 또는 진균 식물 조직으로부터 적어도 부분적으로 유래된 성분을 포함하는, 방법.

청구항 47

필요로 하는 대상에서 암을 치료 또는 예방하는 방법으로서,

상기 방법은,

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항 또는 제33항에 정의된 나노 입자를 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 48

제47항에 있어서, 상기 나노 입자는 항암 약물과 동시에 또는 순차적으로 병용 투여되는, 방법.

청구항 49

제47항 또는 제48항에 있어서, 상기 나노 입자는 항암 약물과 복합체화되거나 접합되는, 방법.

청구항 50

제48항 또는 제49항에 있어서, 상기 항암 약물은 파클리탁셀 또는 빈크리스틴인, 방법.

청구항 51

대상에게 가용성 식이 섬유를 제공하는 방법으로서,

상기 방법은,

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항 또는 제33항에 정의된 나노 입자를 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 52

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항 또는 제33항에 정의된 나노 입자를 포함하는 점도 증진 식품 첨가제.

청구항 53

필요로 하는 대상의 식후 혈당 수준을 감소시키는 방법으로서,

상기 방법은,

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항 또는 제33항에 정의된 나노 입자를 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 54

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항 또는 제33항에 정의된 나노 입자를 포함하는 화장품.

청구항 55

필요로 하는 대상에게 국소 투여하기 위한 조성물로서,

상기 조성물은 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항 또는 제33항에 정의된 나노 입자 및 선택적으로 생물학적 활성제 포함하는, 조성물.

청구항 56

필요로 하는 대상에서 태양 화상을 예방하는 방법으로서,

상기 방법은,

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항 또는 제33항에 정의된 나노 입자를 대상의 피부에 적용하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 57

제56항에 있어서, 상기 나노 입자는 추가 안토시아닌 또는 또 다른 UV-보호제를 포함하거나 이와 함께 적용되는, 방법.

청구항 58

세포 증식을 감소시키는 방법으로서, 상기 방법은,

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항 또는 제33항에 정의된 나노 입자를 세포 또는 조직 또는 기관에 처리하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 59

제58항에 있어서, 상기 나노 입자는 항암 약물과 동시에 또는 순차적으로 사용되는, 방법.

청구항 60

제58항 또는 제59항에 있어서, 상기 나노 입자는 항암 약물과 복합체화되거나 접합되는 것인, 방법.

청구항 61

제59항 또는 제60항에 있어서, 상기 항암 약물은 파클리탁셀 또는 빈크리스틴인, 방법.

청구항 62

필요로 하는 대상의 간에서 트리글리세라이드 축적을 감소시키는 방법으로서, 상기 방법은,

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항 또는 제33항에 정의된 나노 입자를 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 63

필요로 하는 대상 또는 세포에 생물학적 활성제를 전달하기 위한 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항 또는 제33항에 정의된 나노 입자의 용도.

청구항 64

제63항에 있어서, 상기 생물학적 활성제는 셀레늄, 아연, 마그네슘 또는 철과 같은 원소인, 용도.

청구항 65

제63항에 있어서, 상기 생물학적 활성제는 항암 약물이고, 상기 대상은 암에 걸린 대상인, 용도.

청구항 66

제65항에 있어서, 상기 항암 약물은 파클리탁셀 또는 빈크리스틴인, 용도.

청구항 67

제63항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생물학적 활성제는 나노 입자의 형성 동안 나노 입자에 도입되거나, 상기 생물학적 활성제는 수성 기반 매질에서 이미 형성된 나노 입자와 복합체화되거나 접합되는 것인, 용도.

청구항 68

제67항에 있어서, 상기 수성 기반 배지는 DMSO, 또는 완충액, 또는 둘 다를 포함하는, 용도.

청구항 69

필요로 하는 대상에서 활성 산소 종과 관련된 질환 또는 질병을 치료하기 위한 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항 또는 제33항에 정의된 나노 입자의 용도.

청구항 70

필요로 하는 대상에서 염증을 치료 또는 감소시키기 위한 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항 또는 제33항에 정의된 나노 입자의 용도.

청구항 71

제70항에 있어서, 상기 나노 입자는 항염증제를 포함하거나 그와 함께 투여하기 위한 것인, 용도

청구항 72

제71항에 있어서, 상기 항염증제는 커큐민을 포함하는, 용도.

청구항 73

필요로 하는 대상에서 비만을 치료 또는 감소시키기 위한 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항 또는 제33항에 정의된 나노 입자의 용도.

청구항 74

제73항에 있어서, 상기 나노 입자는 견과류, 콩과 식물, 허브, 향신료, 채소 또는 진균 식물 조직으로부터 적어도 부분적으로 유래된 것인, 용도.

청구항 75

필요로 하는 대상에서 암을 치료하거나 예방하기 위한 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항 또는 제33항에 정의된 나노 입자의 용도.

청구항 76

제75항에 있어서, 상기 나노 입자는 항암 약물과 동시에 또는 순차적 병용 투여를 위한 것인, 용도.

청구항 77

제75항 또는 제76항에 있어서, 상기 나노 입자는 항암 약물과 복합체화되거나 접합된 것인, 용도.

청구항 78

제76항 또는 제77항에 있어서, 상기 항암 약물은 파클리탁셀 또는 빈크리스틴인, 용도.

청구항 79

가용성 식이 섬유를 대상에게 제공하기 위한 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항 또는 제33항에 정의된 나노 입자의 용도.

청구항 80

점도 증진 식품 첨가제 또는 섬유질 대체물로서 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항 또는 제33항에 정의된 나노 입자의 용도.

청구항 81

필요로 하는 대상의 식후 혈당 수준을 감소시키기 위한 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항 또는 제33항에 정의된 나노 입자의 용도.

청구항 82

화장품에서 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항 또는 제33항에 정의된 나노 입자의 용도.

청구항 83

필요로 하는 대상에게 국소 투여하기 위한 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항 또는 제33항에 정의된 나노 입자의 용도.

청구항 84

국소 투여를 위한 약물 전달 비히클로서 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항 또는 제33항에 정의된 나노 입자의 용도.

청구항 85

필요로 하는 대상에서 태양 화상을 예방하기 위한 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항 또는 제33항에 정의된 나노 입자의 용도로서, 상기 나노 입자는 대상의 피부에 적용하기 위한 것인, 용도.

청구항 86

제85항에 있어서, 상기 나노 입자는 추가 안토시아닌 또는 또 다른 UV-보호제를 포함하거나 이와 함께 적용되는 것인, 용도.

청구항 87

세포 증식을 감소시키기 위한 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항 또는 제33항에 정의된 나노 입자의 용도.

청구항 88

제87항에 있어서, 상기 나노 입자는 항암 약물과 동시에 또는 순차적으로 사용되는 것인, 용도.

청구항 89

제87항 또는 제89항에 있어서, 상기 나노 입자는 항암 약물과 복합체화되거나 접합된 것인, 용도.

청구항 90

제88항 또는 제89항에 있어서, 상기 나노 입자는 파클리탁셀 또는 빈크리스틴인, 용도.

청구항 91

필요로 하는 대상의 간에서 트리글리 세라이드 축적을 감소시키기 위한 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항 또는 제33항에 정의된 나노 입자의 용도.

청구항 92

암 마커에 특이적인 표적화 항체와 접합된, 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항 또는 제33항에 정의된 나노 입자를 포함하는 표적화된 나노 입자.

청구항 93

제92항에 있어서, 상기 표적화 항체는 표적화된 나노 입자를 암세포로 표적화하기 위한 PD-L1 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 표적화된 나노 입자.

청구항 94

제92항 또는 제93항에 있어서, 상기 표적화된 나노 입자는 적어도 하나의 세포 독성 또는 항암 약물과 복합되거나 접합된 것인, 표적화된 나노 입자.

청구항 95

제94항에 있어서, 상기 표적화된 나노 입자는 파클리탁셀, 독소루비신, 또는 둘 모두와 복합체화 되거나 접합된 것인, 표적화된 나노 입자.

청구항 96

항균제와 복합체화 되거나 접합된 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항 또는 제33항에 정의된 나노 입자를 포함하는, 항균 나노 입자.

청구항 97

제96항에 있어서, 상기 항균제는 리소자임, 테트라사이클린, 또는 니신(Nisin), 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는, 항균 나노 입자.

청구항 98

제97항에 있어서, 상기 항균 나노 입자는 MDR 세균 감염의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 것인, 항균 나노 입자.

청구항 99

균질화된 식물 조직으로부터 유래된 자가 조립된 세포 성분을 포함하는 식품 분말로서, 상기 세포 성분은 하나 이상의 구조적 탄수화물 또는 그의 절단 생성물을 포함하고, 추가로 하나 이상의 영양제를 포함하며, 여기서 지질은 식품 분말의 구조적 구성 요소가 아닌, 식품 분말.

청구항 100

제99항에 있어서, 상기 식품 분말은, 나노 구 유사 구조를 형성하기 위해 스스로를 또는 그 주위를 감는 섬유 구조를 포함하는, 식품 분말.

청구항 101

제99항 또는 제100항에 있어서, 상기 식품 분말은 소수성 성분을 추가로 포함하는, 식품 분말.

청구항 102

제101항에 있어서, 상기 소수성 성분은 아몬드 우유, 코코넛 우유 및/또는 식용 견과류 유래 우유로 제공되는, 식품 분말.

청구항 103

제99항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 영양제는 건강상의 이점을 갖는 자연 발생 활성 성분을 포함하는, 식품 분말.

청구항 104

제99항 내지 제103항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 영양제는 하나 이상의 카로티노이드, 아노나신, 보스웰리아(Boswellia), 아슈와간다(Ashwagandha), 생강과 성분(Ginger family members), 칸나비노디올(cannabinodiols), 프럭토-올리고당, 갈락토-올리고당, 이눌린, 예루살렘 아티초크, 후추과 성분(Piperaceae family members), 검은후추 열매(Piper nigrum) 또는 피페린(piperine) 및/또는 이의 유도체를 함유하는 야생의 친척, 또는 건강상의 이점이 있는 임의의 활성 성분, 또는 이로부터 분리된 임의의 추출물, 유도체 또는 제품, 또는 이들의 조합을 포함하는, 식품 분말.

청구항 105

제99항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 식품 분말은,
 신 체리 또는 이의 수성 추출물;
 아몬드 우유 또는 아몬드의 다른 균질물;
 두유 또는 대두의 다른 균질물;
 브로콜리 또는 이의 수성 추출물; 및
 강황(turmeric) 또는 그 분말을 포함하는, 식품 분말.

청구항 106

제105항에 있어서, 상기 식품 분말은,
 약 25~30 v/v% 신 체리 추출물(적어도 약 0.1 mg/ml의 폴리페놀 당량);
 약 25~30 v/v% 아몬드 우유 또는 아몬드의 다른 균질물;
 약 10~18 v/v% 두유 또는 대두의 다른 균질물;
 약 25~30 v/v% 브로콜리 추출물; 및
 약 0.5~2.5 w/v% 강황 또는 그 분말을 포함하는, 식품 분말.

청구항 107

제105항 또는 제106항에 있어서, 상기 신 체리 추출물은 약 1~2 mg/ml 폴리페놀 당량인, 식품 분말.

청구항 108

균질화된 식물 조직으로부터 식품 분말을 제조하는 방법으로서, 상기 방법은,
 식물 조직으로부터 유리된 세포 성분을 포함하는, 용액 중 균질화된 식물 조직을 제조하는 단계로서, 상기 세포 성분은 하나 이상의 구조적 탄수화물 또는 이의 절단 생성물을 포함하고, 상기 용액 중 균질화된 식물 조직은 적어도 하나의 영양제를 추가로 포함하는, 단계;
 선택적으로, 존재하는 경우, 상기 용액 중 균질화된 식물 조직으로부터 과편을 제거하는 단계; 및
 용액 중 균질화된 식물 조직을 동결 건조, 냉동 건조, 분무 건조 또는 나노 분무 건조하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 109

제108항에 있어서, 상기 식물 조직은 과일, 채소 또는 다른 식물 조직을 포함하는, 방법.

청구항 110

제108항 또는 제109항에 있어서, 상기 식물 조직은 노화 과일(senescing fruit), 숙성 채소, 또는 이들의 임의 조합을 포함하고, 바람직하게는, 상기 식물 조직은 체리, 블루베리, 포도, 복숭아, 천도 복숭아, 자두, 살구, 파파야, 토마토, 과일 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는, 방법.

청구항 111

제108항 내지 제110항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 용액 중 균질화된 식물 조직은 소수성 성분을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 112

제111항에 있어서, 상기 소수성 성분은 아몬드 밀크, 코코넛 우유 및/또는 식용 견과류 유래 우유를 포함하거나 제공되는, 방법.

청구항 113

제108항 내지 제112항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 영양제는 건강상의 이점을 갖는 자연 발생 활성 성분을 포함하는, 방법.

청구항 114

제108항 내지 제113항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 영양제는 하나 이상의 카로티노이드, 아노나신, 보스웰리아, 아슈와간다, 생강과 성분, 칸나비노디올, 프럭토-올리고당, 갈락토-올리고당, 이눌린, 예루살렘 아티초크, 후추과 성분, 검은후추 열매 또는 피페린 및/또는 이의 유도체를 함유하는 야생의 친척, 또는 건강상의 이점이 있는 임의의 활성 성분, 또는 이로부터 분리된 임의의 추출물, 유도체 또는 제품, 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.

청구항 115

제108항 내지 제114항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 용액 중 균질화된 식물 조직은,
신 체리 또는 이의 수성 추출물;
아몬드 우유 또는 아몬드의 다른 균질물;
두유 또는 대두의 다른 균질물;
브로콜리 또는 이의 수성 추출물; 및
강황 또는 그 분말을 포함하는, 방법.

청구항 116

제115항에 있어서, 상기 용액 중 균질화된 식물 조직은,
약 25~30 v/v% 신 체리 추출물(적어도 약 0.1 mg/ml의 폴리페놀 당량);
약 25~30 v/v% 아몬드 우유 또는 아몬드의 다른 균질물;
약 10~18 v/v% 두유 또는 대두의 다른 균질물;
약 25~30 v/v% 브로콜리 추출물; 및
약 0.5~2.5 w/v% 강황 또는 그 분말을 포함하는, 방법.

청구항 117

제115항 또는 제116항에 있어서, 상기 신 체리 추출물은 약 1~2 mg/ml 폴리페놀 당량인, 방법.

청구항 118

제108항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 균질화된 식물 조직을 제조하는 단계는 수성 매질, 유기성 매질 또는 혼합 수성-유기성 매질에 상기 식물 조직을 균질화하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 119

제108항 내지 제118항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 식물 조직은 하나 이상의 영양소 함유 물질을 포함하고, 이는 원물이거나, 전처리되거나, 농축된 물질, 또는 이들의 임의의 조합인, 방법.

청구항 120

제108항 내지 제119항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 균질화된 식물 조직을 제조하는 단계는 블렌더로 상기 식물 조직을 균질화하는 단계를 포함하고, 바람직하게는 높은 rpm에서 작동하고 고 전단력, 초음파기 또는 또 다른 고성능 혼합 장치를 이용하여 식물 조직을 균질화하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 121

제108항 내지 제120항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 파편을 제거하는 단계는 원심 분리 장치, 여과 장치, 막 여과, 접선 유동 여과, 또는 이들의 임의의 조합에 의해 파편을 제거하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 122

제108항에 있어서, 상기 식물 조직은 신 체리, 아몬드 또는 아몬드 우유, 대두 또는 두유, 브로콜리, 강황 또는 이들의 임의의 조합을 포함하거나 이로부터 수득된 식물 조직을 포함하는, 방법.

청구항 123

제108항에 있어서, 상기 균질화된 식물 조직은 신 체리 추출물, 아몬드 우유, 두유, 브로콜리 추출물 및 강황 분말을 포함하는, 방법.

청구항 124

제108항 내지 제123항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 식품 분말.

청구항 125

필요로 하는 대상, 세포 또는 유기체에 생물학적 활성제를 전달하는 방법으로서, 상기 방법은,

화학적 또는 물리적 과정을 사용하여 생물학적 활성제와 복합되거나 접합된 제99항 내지 107항 중 어느 한 항 또는 제124항에 정의된 식품 분말을 대상, 세포 또는 유기체에 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 126

제125항에 있어서, 상기 생물학적 활성제는 셀레늄, 아연, 철 또는 마그네슘과 같은 원소인, 방법.

청구항 127

제125항에 있어서, 상기 생물학적 활성제는 항암 약물이고, 상기 대상은 암에 걸린 대상인, 방법.

청구항 128

제127항에 있어서, 상기 항암 약물은 파클리탁셀, 빈크리스틴, 또는 암 치료에 사용되는 임의의 천연 또는 합성 화합물인, 방법.

청구항 129

제125항 내지 제128항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생물학적 활성제는 식품 분말의 형성 동안 식품 분말에 도입될 수 있거나, 상기 생물학적 활성제는 알코올 또는 기타 유기 성분을 선택적으로 포함하는 수성 매질에서 이미 형성된 식품 분말과 복합체화되거나 접합된 것인, 방법.

청구항 130

제129항에 있어서, 상기 수성 매질은 DMSO, 또는 완충제, 또는 둘 다를 포함하는, 방법.

청구항 131

필요로 하는 대상의 염증을 유발하는 활성 산소 종의 증가된 수준과 관련된 질환 또는 장애를 치료하는 방법으로서, 상기 방법은,

제99항 내지 107항 중 어느 한 항 또는 제124항에 정의된 식품 분말을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 132

필요로 하는 대상의 염증을 치료 또는 감소시키는 방법으로서, 상기 방법은,

제99항 내지 107항 중 어느 한 항 또는 제124항에 정의된 식품 분말을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 133

제132항에 있어서, 상기 식품 분말은 항염증제를 포함할 수 있거나, 항염증제와 함께 투여되는, 방법.

청구항 134

제133항에 있어서, 상기 항염증제는 커큐민을 포함하는, 방법.

청구항 135

필요로 하는 대상의 비만을 치료 또는 감소시키는 방법으로서, 상기 방법은,

제99항 내지 107항 중 어느 한 항 또는 제124항에 정의된 식품 분말을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 136

제135항에 있어서, 상기 식품 분말은 식품 또는 의료 목적으로 사용되는 견과류, 콩과 식물, 허브, 향신료, 채소 또는 진균 식물 조직으로부터 적어도 부분적으로 유래된 성분을 함유하는, 방법.

청구항 137

필요로 하는 대상에서 암을 치료 또는 예방하는 방법으로서, 상기 방법은,

제99항 내지 107항 중 어느 한 항 또는 제124항에 정의된 식품 분말을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 138

제137항에 있어서, 상기 식품 분말은 항암 약물과 동시에 또는 순차적으로 병용 투여되는, 방법.

청구항 139

제137항 또는 제138항에 있어서, 상기 식품 분말은 항암 약물과 복합체화되거나 이와 접합되는, 방법.

청구항 140

제138항 또는 제139항에 있어서, 상기 항암 약물은 파클리탁셀 또는 빈크리스틴인, 방법.

청구항 141

대상에게 가용성 식이 섬유를 제공하는 방법이 제공되며, 상기 방법은,

제99항 내지 107항 중 어느 한 항 또는 제124항에 정의된 식품 분말을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 142

제99항 내지 107항 중 어느 한 항 또는 제124항에 정의된 식품 분말을 포함하는 점도 증진 식품 첨가제,

청구항 143

필요로 하는 대상의 식후 혈당 수준을 감소시키는 방법으로서, 상기 방법은,

제99항 내지 107항 중 어느 한 항 또는 제124항에 정의된 식품 분말을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 144

세포 증식을 감소시키는 방법으로서, 상기 방법은,

제99항 내지 107항 중 어느 한 항 또는 제124항에 정의된 식품 분말을 세포 또는 조직 또는 기관에 처리하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 145

제144항에 있어서, 상기 식품 분말은 항암 약물과 동시에 또는 순차적으로 사용되는, 방법.

청구항 146

제144항 또는 제145항에 있어서, 상기 식품 분말은 항암 약물과 복합체화 되거나 접합되는, 방법.

청구항 147

제145항 또는 제165항에 있어서, 상기 항암 약물은 파클리탁셀 또는 빈크리스틴인, 방법.

청구항 148

필요로 하는 대상의 간에 트리글리세라이드 축적을 감소시키는 방법으로서, 상기 방법은,

제99항 내지 107항 중 어느 한 항 또는 제124항에 정의된 식품 분말을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 149

필요로 하는 대상 또는 세포에 생물학적 활성제를 전달하기 위한 제99항 내지 107항 중 어느 한 항 또는 제124항에 정의된 식품 분말의 용도.

청구항 150

제149항에 있어서, 상기 생물학적 활성제는 셀레늄, 아연, 마그네슘 또는 철과 같은 원소인, 용도.

청구항 151

제149항에 있어서, 상기 생물학적 활성제는 항암 약물이고, 상기 대상은 암에 걸린 대상인, 용도.

청구항 152

제151항에 있어서, 상기 항암 약물은 파클리탁셀 또는 빈크리스틴인, 용도.

청구항 153

제149항 내지 제152항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생물학적 활성제는 식품 분말의 형성 동안 식품 분말에 도입되거나, 상기 생물학적 활성제는 알코올 또는 기타 유기 성분을 선택적으로 포함하는 수성 매질에서 이미 형성된 식품 분말과 복합체화 되거나 접합된 것인, 용도.

청구항 154

제153항에 있어서, 상기 수성 매질은 DMSO, 또는 완충제, 또는 둘 다를 포함하는, 용도.

청구항 155

필요로 하는 대상에서 활성 산소 종과 관련된 질환 또는 질병을 치료하기 위한 제99항 내지 107항 중 어느 한 항 또는 제124항에 정의된 식품 분말의 용도.

청구항 156

대상에서 염증을 치료 또는 감소시키기 위한 제99항 내지 107항 중 어느 한 항 또는 제124항에 정의된 식품 분말의 용도.

청구항 157

제156항에 있어서, 상기 식품 분말은 항염증제를 포함하거나 그와 함께 투여하기 위한 것인, 용도.

청구항 158

제157항에 있어서, 상기 항염증제는 커큐민을 포함하는, 용도.

청구항 159

필요로 하는 대상에서 비만을 치료 또는 감소시키기 위한 제99항 내지 107항 중 어느 한 항 또는 제124항에 정

의된 식품 분말의 용도.

청구항 160

제159항에 있어서, 상기 식품 분말은 견과류, 콩과 식물, 허브, 향신료, 채소 또는 진균 식물 조직으로부터 적어도 부분적으로 유래된 것인, 용도.

청구항 161

필요로 하는 대상에서 암을 치료 또는 예방하기 위한 제99항 내지 107항 중 어느 한 항 또는 제124항에 정의된 식품 분말의 용도.

청구항 162

제161항에 있어서, 상기 식품 분말은 항암 약물과 동시에 또는 순차적으로 병용 투여되기 위한 것인, 용도.

청구항 163

제161항 또는 제162항에 있어서, 상기 식품 분말은 항암 약물과 복합체화 되거나 접합된 것인, 용도.

청구항 164

제161항 또는 제162항에 있어서, 상기 항암 약물은 파클리탁셀 또는 빈크리스틴인, 용도.

청구항 165

가용성 식이 섬유를 대상에게 제공하기 위한 제99항 내지 107항 중 어느 한 항 또는 제124항에 정의된 식품 분말의 용도.

청구항 166

점도 증진 식품 첨가제 또는 섬유질 대체물로서 제99항 내지 107항 중 어느 한 항 또는 제124항에 정의된 식품 분말의 용도.

청구항 167

필요로 하는 대상의 식후 혈당 수준을 감소시키기 위한 제99항 내지 107항 중 어느 한 항 또는 제124항에 정의된 식품 분말의 용도.

청구항 168

세포 증식을 감소시키기 위한 제99항 내지 107항 중 어느 한 항 또는 제124항에 정의된 식품 분말의 용도.

청구항 169

제168항에 있어서, 상기 식품 분말은 항암 약물과 동시에 또는 순차적으로 사용되기 위한 것인, 용도.

청구항 170

제168항 또는 제169항에 있어서, 상기 식품 분말은 항암 약물과 복합체화되거나 접합된 것인, 용도.

청구항 171

제169항 또는 제170항에 있어서, 상기 항암 약물은 파클리탁셀 또는 빈크리스틴인, 용도.

청구항 172

필요로 하는 대상의 간에서 트리글리세라이드 축적을 감소시키기 위한 제99항 내지 107항 중 어느 한 항 또는 제124항에 정의된 식품 분말의 용도.

청구항 173

항균제와 복합체화 되거나 접합된 임의의 제99항 내지 107항 중 어느 한 항 또는 제124항에 정의된 식품 분말을

포함하는, 항균 식품 분말.

청구항 174

제173항에 있어서, 상기 항균제는 리소자임, 테트라사이클린, 또는 니신, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는, 항균 식품 분말.

청구항 175

제173항 또는 174항에 있어서, 상기 항균 식품 분말은 MDR 세균 감염의 치료 또는 예방의 용도인, 항균 식품 분말.

청구항 176

생물학적 활성제 또는 적재물로 제1항 내지 제20항 중 어느 한 항 또는 제30항에 정의된 나노 입자들을 적재하는 방법으로서, 상기 방법은,

탈수, 냉동 건조 또는 동결 건조된 나노 입자들의 샘플을 제공하는 단계;

상기 생물학적 활성제 또는 적재물을 상기 나노 입자들의 샘플과 혼합하여 혼합물을 제공하는 단계; 및

상기 나노 입자들을 수축시키기 위해 상기 혼합물에 물 또는 수용액을 첨가하여 상기 생물학적 활성제 또는 적재물을 그 안에 가두는 단계를 포함하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 일반적으로 나노 입자 및 식품 분말 및 그 용도에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 식물 조직 유래 나노 입자 및 식품 분말 및 그 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 과일은 에너지를 제공하는 설탕과 같은 단순한 분자에서부터, 다양한 질병 예방 및 건강 조절 기능을 가진 식이 섬유, 비타민, 미네랄 및 영양제 역할을 하는 셀룰로오스 및 펙틴과 같은 복합 거대 분자에 이르는, 식이 성분의 풍부한 공급원이다(Paliyath et al., 2011). 폴리 페놀, 특히 플라보노이드 및 유도체는 최근 자유 라디칼 소거, 효소 활성 조절, 세포 증식 억제와 같은 수많은 생물학적 효과뿐만 아니라 항생제, 항알레르기제 및 항염증제와 같은 잠재적 유용성으로 인해 점점 더 많은 관심을 받고 있다(Clifford and Brown, 2006). 폴리 페놀은 심혈관 질환, 암 및 기타 퇴행성 질환의 예방에 잠재적인 역할을 하는 것으로 나타났다(Scalbert et al., 2005, Paliyath et al., 2011). 식물 기원의 식품 및 음료(주스, 차, 커피 및 와인 포함)에 광범위하게 분포하기 때문에, 폴리 페놀은 인간 식단에서 일반적인 미량 영양소로 간주될 수 있다. 폴리 페놀이 풍부한 식품의 소비는 만성 질환의 발병을 예방하고 만성 질환으로 인한 사망률을 줄이기 위한 수단으로 장려되고 있다.

[0003] 생체 내에서 폴리 페놀의 생물학적 활성은, 흡수와 신진 대사뿐만 아니라, 섭취 후 체내 분포에 따라 달라진다(Clifford and Brown, 2006). 위장관(GIT)의 경우, 상피 세포는 이들 성분 또는 그 대사 산물과 접촉한다. 식품의 폴리 페놀 수준은 100~5,000 mg/kg이지만(Manach et al., 2004), 장에서 식이성 폴리 페놀의 흡수 정도는 상대적으로 적다(Spencer and Rice Evans, 2003). 일반적으로 유리 페놀 성분의 혈장 및 조직 수준은 낮은 마이크로 몰 범위이다. 또한, 식품 매트릭스 상호 작용으로 인해 소비된 모든 페놀 성분이 생물학적으로 이용 가능한 것은 아니라고 제안되었다(Saura-Calixto 및 Diaz-Rubio, 2007; Saura-Calixto et al., 2007; Del Rio et al., 2010). 식이 유래 구조체의 본질과 역할을 이해하는 것이 중요한데, 그 연구가 식품 유래 나노 물질이 인체 건강에 미치는 영향에 대한 이해에 영향을 미치기 때문이다.

[0004] 가공된 나노 물질의 사용이 전 세계적으로 증가함에 따라 인체 건강에 대한 나노 물질의 영향은 점점 더 면밀히 조사되고 있다(Maynard, 2006). 가공된 나노 물질은 공기 중(airborne) 나노 구조 응집체(예 :은 나노 입자, TiO₂) 또는 SWNT(단일벽 탄소 나노 튜브)로서 환경으로 빠져 나가, 흡입, 섭취 및 피부를 통한 침투를 통해 체내로 들어간 다음, 다른 기관으로 이동할 수 있다. 티타늄과 아연의 나노 입자는 화장품 산업에서 점점 더 많이 사용되고 있다. 생물학적 성분 유래 나노 물질도 약물 전달, 화장품, 식품 성분, 코팅, 식품 포장 등에서 연구되고 있다(Azeredo et al., 2009; Ramasamy et al., 2009; Zhao et al., 2011; Sessa et al., 2011;

Zhang et al., 2012). 나노 물질은 또한 먹이 사슬을 통해, 특히 토양, 물 및 공기로부터 이러한 물질을 축적한 식물 유래 식품의 소비를 통해 체내로 들어갈 수 있다(Rico et al., 2011). 나노 구조체로 자가 조립될 가능성이 있는 식품에서의 거대 분자의 존재는 특히 중요하다(IOM, 2009). 비정질 탄소 나노 입자의 잠재적인 형성은 예를 들어 캐러멜화 식품에 존재하는 것으로 관찰되었다(Palashuddin et al., 2012).

[0005] 대안적, 추가적 및/또는 개선된 나노 물질 및/또는 이의 제조 방법이 바람직하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 특정 질환 또는 질병의 치료 및/또는 예방에서, 및/또는 필요로 하는 대상에게 생물 활성제의 전달에서의 식품 보충제로서의 사용을 위한, 천연 원료 유래 나노 입자 및 식품 분말을 제공하는 것이다. 그것의 생산 방법도 제공된다.

과제의 해결 수단

[0007] 일 실시형태에서, 본원에서 균질화된 식물 조직 유래 자가 조립 세포 성분을 포함하는 나노 입자가 제공되며, 세포 성분은 하나 이상의 구조적 탄수화물 또는 이의 절단 생성물을 포함하며, 여기서 지질은 나노 입자의 구조 성분이 아니다.

[0008] 상기 나노 입자의 또 다른 실시형태에서, 나노 입자는 실질적으로 지질이 없을 수 있다.

[0009] 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들의 또 다른 실시형태에서, 나노 입자는 펙틴, 헤미셀룰로스, 펩티드 및/또는 단백질, 유기산, 적어도 하나의 폴리 페놀, 이들의 절단 생성물, 또는 이들의 임의 조합을 포함할 수 있다.

[0010] 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들의 또 다른 실시형태에서, 나노 입자는 다음을 포함할 수 있다:

[0011] 펙틴계 내부 코어;

[0012] 내부 코어를 둘러싸는 중간층으로서, 상기 중간층은 펙틴 및 헤미셀룰로오스의 거대 분자 및/또는 이들의 절단 생성물, 폴리 페놀 및 유기산을 포함하는 중간층; 및

[0013] 식물 조직의 숙성 동안 및/또는 균질화 동안 이화 작용으로부터 선택적으로 형성되는 거대 분자 탄수화물 및 단백질을 포함하는 피브릴화된 외부 층.

[0014] 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들의 또 다른 실시형태에서, 유기산은 말산, 아스코르브 산 또는 둘 다를 포함할 수 있다.

[0015] 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들의 또 다른 실시형태에서, 폴리 페놀은 안토시아닌을 포함할 수 있다.

[0016] 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들의 또 다른 실시형태에서, 세포 성분은 숙성 동안 또는 숙성된 과일의 균질화 동안 식물 조직으로부터 유리된 것들을 포함할 수 있으며, 이는 나노 입자로 자가 조립될 수 있다.

[0017] 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들의 또 다른 실시형태에서, 하나 이상의 구조적 탄수화물은 펙틴, 펙틴 산, 펙틴의 메틸 에스테르, 펙틴 유도체, 폴리 갈락투론산, 람노갈락투로난(rhamnogalacturonans), 자일로구칸(xylogucans), 헤미셀룰로오스, 글루코스, 만노스 또는 자일로스의 β -(1→4)-연결된 백본들을 포함하는 자일로글루칸, 및/또는 아라비노갈락탄 및/또는 이의 절단 생성물 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0018] 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들의 또 다른 실시형태에서, 나노 입자는 직경이 약 50~250nm인 실질적으로 구형 구조를 가질 수 있다.

[0019] 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들의 또 다른 실시형태에서, 나노 입자는 다음을 포함할 수 있다 :

[0020] 펙틴계 내부 코어;

[0021] 내부 코어를 둘러싸는 중간층으로서, 상기 중간층은 펙틴 또는 이의 유도체를 포함하는 하나 이상의 나선형 피브릴(fibril) 구조, 및 하나 이상의 헤미셀룰로오스-유래 분자 또는 이의 유도체를 포함하는, 중간층; 및

[0022] 헤미셀룰로오스 또는 이의 절단 생성물, 및 세포 단백질로부터 유래된 하나 이상의 펩티드를 포함하는 피브릴화된 외층.

- [0023] 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들의 또 다른 실시형태에서, 나노 입자는 약 pH3 내지 약 pH7 범위에서 존재하는 수소-결합 상호 작용에 의해 안정화 될 수 있고 식물 조직의 세포 성분의 이화 작용으로부터 유래된 거대 분자들 사이에서 형성되고 히드록실기 및/또는 아미노기 및/또는 유기산 기를 갖는다.
- [0024] 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들의 또 다른 실시형태에서, 나노 입자는 비결정질 수 있다.
- [0025] 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들의 또 다른 실시형태에서, 나노 입자는 생물학적 활성제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0026] 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들의 또 다른 실시형태에서, 생물학적 활성제는 약제학적 활성 약물, 단백질, 효소, 기능성 식품 또는 영양소일 수 있다.
- [0027] 상기 나노 입자 또는 나노 입자들 중 어느 하나의 또 다른 실시형태에서, 나노 입자는 수용액에 있을 수 있다.
- [0028] 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들의 또 다른 실시형태에서, 나노 입자는 분말 형태일 수 있다.
- [0029] 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들의 또 다른 실시형태에서, 나노 입자는 탈수, 냉동 건조(lyophilized), 동결-건조(freeze-drying), 분무-건조 또는 나노 분무 건조 형태일 수 있다.
- [0030] 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들의 또 다른 실시형태에서, 식물 조직은 과일 또는 채소 식물 조직을 포함할 수 있다.
- [0031] 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들의 또 다른 실시형태에서, 식물 조직은 과일, 숙성 채소, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다; 바람직하게는, 식물 조직은 체리, 블루 베리, 포도, 복숭아, 천도 복숭아, 자두, 살구, 파파야, 토마토 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다.
- [0032] 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들의 또 다른 실시형태에서, 식물 조직은 신 체리 과일 조직을 포함할 수 있다.
- [0033] 또 다른 실시형태에서, 균질화된 식물 조직으로부터 나노 입자를 제조하는 방법이 본원에 제공되며, 상기 방법은
- [0034] 식물 조직으로부터 유리된 세포 성분을 포함하는 용액 중 균질화된 식물 조직을 제조하는 단계;
- [0035] 균질화된 식물 조직(존재하는 경우)에서 파편(debris)을 제거하는 단계; 및
- [0036] 선택적으로, 균질화된 식물 조직을 투석하여 비-복합 화합물을 제거하거나 크기 배제에 의해 비-복합 화합물을 제거하는 단계,를 포함하고,
- [0037] 이에 의해 세포 성분의 자가 조립에 의해 형성된 나노 입자를 포함하는 용액을 제공한다.
- [0038] 상기 방법의 다른 실시형태에서, 상기 방법은 나노 입자를 포함하는 용액을 탈수, 동결건조, 동결 건조, 분무 건조 또는 나노 분무 건조하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0039] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 나노 입자는 실질적으로 수성 매질에서 자가 조립에 의해 형성될 수 있다.
- [0040] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 용액에서 균질화된 식물 조직을 제조하는 단계는 수성 매질, 유기성 매질 또는 혼합된 수성-유기성 매질에서 식물 조직을 균질화하는 것을 포함할 수 있다.
- [0041] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 용액에서 균질화된 식물 조직을 제조하는 단계는 식물 조직을 수성, 유기성 또는 물, 에탄올, 메탄올 또는 아세톤 중 어느 하나 이상을 포함하는 혼합된 수성-유기성 매질에서 고 전단(high shear) 균질화 및/또는 초음파 처리하는 것을 포함할 수 있다.
- [0042] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 파편 제거 단계는 투석, 균질화된 식물 조직을 여과, 균질화된 식물 조직을 원심 분리하거나, 균질화된 식물 조직에 대해 접선(tangential) 유동 여과 또는 연속 유동 여과 또는 이들의 조합을 수행하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0043] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 방법은 본원에 기재된 바와 같은 나노 입자를 제조하기 위한 것일 수 있다.
- [0044] 다른 실시형태에서, 균질화된 식물 조직으로부터 나노 입자를 제조하는 방법이 제공되며, 상기 방법은

- [0045] 식물 조직으로부터 유리된 세포 성분을 포함하는 용액 중 균질화된 식물 조직을 제조하는 단계;
- [0046] 세포 성분의 자가 조립에 의해 나노 입자가 형성되도록 하는 단계;
- [0047] 존재하는 경우, 균질화된 식물 조직에서 파편을 제거하는 단계; 및
- [0048] 동결 건조, 분무 건조 또는 나노 분무 건조를 통해 나노 입자를 포함하는 분말을 형성하는 단계를 포함한다.
- [0049] 상기 방법의 또 다른 실시형태에서, 자가 조립은 실질적으로 수성 매질에서 일어날 수 있다.
- [0050] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 용액에서 균질화된 식물 조직을 제조하는 단계는 수성 매질, 유기성 매질 또는 혼합된 수성-유기성 매질에서 식물 조직을 고 전단 균질화시키는 것을 포함할 수 있다.
- [0051] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 파편을 제거하는 단계는 균질화된 식물 조직을 여과하거나 균질화된 식물 조직을 원심 분리하거나, 또는 둘 모두를 포함할 수 있다.
- [0052] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 방법은 본원에 기재된 바와 같은 나노 입자를 제조하기 위한 것일 수 있다.
- [0053] 또 다른 실시형태에서, 상기 방법 또는 방법들 중 임의의 것에 의해 제조된 나노 입자가 본원에 제공된다.
- [0054] 또 다른 실시형태에서, 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들로부터 제조된 식품 분말이 본원에서 제공되며, 임의로 상기 식품 분말은 마이크로-크기 미세 분말 형태로 제공된다.
- [0055] 또 다른 실시형태에서, 생물학적 활성제를 필요로하는 대상, 세포 또는 유기체에 전달하는 방법이 제공되며, 상기 방법은,
- [0056] 화학적 또는 물리적 과정을 사용하여 생물학적 활성제와 복합체화되거나 접합된(conjugated) 상기 나노 입자 또는 나노 입자들을 대상, 세포 또는 유기체에 투여하는 단계를 포함한다.
- [0057] 상기 방법의 또 다른 실시형태에서, 상기 생물학적 활성제는 셀레늄, 아연, 철 또는 마그네슘과 같은 원소일 수 있다.
- [0058] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 생물학적 활성제는 항암 약물일 수 있고, 대상은 암에 걸린 대상일 수 있다.
- [0059] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 항암 약물은 파클리탁셀, 빈크리스틴, 또는 암 치료에 사용되는 임의의 천연 또는 합성 화합물일 수 있다.
- [0060] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 생물학적 활성제는 나노 입자 형성 동안 나노 입자에 도입될 수 있거나, 상기 생물학적 활성제는 임의로 알코올 또는 기타 유기 성분을 포함하는 수성 기반 매질에서 이미 형성된 나노 입자와 복합체화되거나 접합될 수 있다.
- [0061] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 수성 기반 매질은 DMSO, 또는 완충제 또는 둘 다를 포함할 수 있다.
- [0062] 또 다른 실시형태에서, 필요로 하는 대상에서 염증을 유발하는 활성 산소 종의 증가된 수준과 관련된 질환 또는 질병을 치료하는 방법이 본원에서 제공되며;
- [0063] 상기 나노 입자 또는 나노 입자들 중 임의의 것을 대상에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0064] 또 다른 실시형태에서, 본원에서는 필요로 하는 대상에서 염증을 치료 또는 감소시키는 방법이 제공되며, 상기 방법은,
- [0065] 상기 나노 입자 또는 나노 입자들 중 임의의 것을 대상에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0066] 상기 방법의 또 다른 실시형태에서, 상기 나노 입자는 항염증제를 포함하거나 이와 병용-투여될 수 있다.
- [0067] 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 항염증제는 커큐민을 포함할 수 있다.
- [0068] 또 다른 실시형태에서, 필요로 하는 대상에서 비만을 치료 또는 감소시키는 방법이 제공되며, 상기 방법은,
- [0069] 상기 나노 입자 또는 나노 입자들 중 임의의 것을 대상에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0070] 상기 방법의 또 다른 실시형태에서, 상기 나노 입자는 전통적으로 식품 또는 의료 목적으로 사용되는 견과류,

콩과 식물, 허브, 향신료, 채소 또는 진균 식물 조직으로부터 적어도 부분적으로 유래된 성분을 포함할 수 있다.

- [0071] 또 다른 실시형태에서, 필요로 하는 대상에서 암을 치료 또는 예방하는 방법이 본원에서 제공되며, 상기 방법은,
- [0072] 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들을 대상에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0073] 상기 방법의 다른 실시형태에서, 상기 나노 입자는 항암 약물과 동시에 또는 순차적으로 병용 투여될 수 있다.
- [0074] 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 나노 입자는 항암 약물과 복합체화되거나 접합될 수 있다.
- [0075] 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 항암 약물은 파클리탁셀 또는 빈크리스틴일 수 있다.
- [0076] 또 다른 실시형태에서, 본원에서 대상에게 가용성 식이 섬유를 제공하는 방법이 제공되며, 상기 방법은,
- [0077] 상기 나노 입자 또는 나노 입자들 중 임의의 것을 대상에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0078] 또 다른 실시형태에서, 상기 나노 입자 또는 나노 입자들 중 임의의 것을 포함하는 점도 증진 식품 첨가제가 본원에서 제공된다.
- [0079] 또 다른 실시형태에서, 필요로 하는 대상의 식후 혈당 수준을 감소시키는 방법이 제공되며, 상기 방법은,
- [0080] 상기 나노 입자 또는 나노 입자들 중 임의의 것을 대상에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0081] 또 다른 실시형태에서, 본원에서 상기 나노 입자 또는 나노 입자들 중 임의의 것을 포함하는 화장품이 제공된다.
- [0082] 또 다른 실시형태에서, 본원에서 필요로 하는 대상에게 국소 투여하기 위한 조성물이 제공되며, 상기 조성물은 상기 나노 입자 또는 나노 입자들 중 임의의 것, 또는 임의로 생물학적 활성제를 포함한다.
- [0083] 또 다른 실시형태에서, 본원에서 필요로 하는 대상에서 태양 화상을 예방하는 방법이 제공되며, 상기 방법은,
- [0084] 상기 나노 입자 또는 나노 입자들 중 임의의 것을 대상의 피부에 적용하는 단계를 포함한다.
- [0085] 상기 방법의 또 다른 실시형태에서, 상기 나노 입자는 추가 안토시아닌 또는 또 다른 UV- 보호제를 포함하거나 이와 함께 적용될 수 있다.
- [0086] 또 다른 실시형태에서, 본원에서 세포 증식을 감소시키는 방법이 제공되며, 상기 방법은,
- [0087] 상기 나노 입자 또는 나노 입자들 중 임의의 것을 세포 또는 조직 또는 기관에 처리하는 것을 포함한다.
- [0088] 상기 방법의 다른 실시형태에서, 상기 나노 입자는 항암 약물과 동시에 또는 순차적으로 사용될 수 있다.
- [0089] 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 나노 입자는 항암 약물과 복합체화되거나 접합될 수 있다.
- [0090] 상기 방법 또는 방법의 또 다른 실시형태에서, 항암 약물은 파클리탁셀 또는 빈크리스틴일 수 있다.
- [0091] 또 다른 실시형태에서, 필요로 하는 대상의 간에 트리글리세라이드 축적을 감소시키는 방법이 제공되며, 상기 방법은,
- [0092] 상기 나노 입자 또는 나노 입자들 중 임의의 것을 대상에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0093] 또 다른 실시형태에서, 상기 생물학적 활성제를 필요로 하는 대상 또는 세포에 전달하기 위한 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들의 용도가 본원에서 제공된다.
- [0094] 상기 용도의 또 다른 실시형태에서, 상기 생물학적 활성제는 셀레늄, 아연, 마그네슘 또는 철과 같은 원소일 수 있다.
- [0095] 상기 용도 또는 용도들의 또 다른 실시형태에서, 상기 생물학적 활성제는 항암 약물일 수 있고, 상기 대상은 암에 걸린 대상일 수 있다.
- [0096] 상기 용도 또는 용도들의 또 다른 실시형태에서, 상기 항암 약물은 파클리탁셀 또는 빈크리스틴일 수 있다.

- [0097] 임의의 상기 용도 또는 용도들의 또 다른 실시형태에서, 상기 생물학적 활성제는 나노 입자의 형성 동안 나노 입자에 도입될 수 있거나, 상기 생물학적 활성제는 수성 기반 매질에서 이미 형성된 나노 입자와 복합체화되거나 접합될 수 있다 .
- [0098] 상기 용도 또는 용도들의 또 다른 실시형태에서, 수성 기반 배지는 DMSO, 또는 완충액, 또는 둘 다를 포함할 수 있다.
- [0099] 또 다른 실시형태에서, 본원에서 필요로 하는 대상에서 활성 산소 종과 관련된 질환 또는 장애를 치료하기 위한 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들의 용도가 제공된다.
- [0100] 또 다른 실시형태에서, 본원에서 필요로 하는 대상에서 염증을 치료 또는 감소시키기 위한 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들의 용도가 제공된다.
- [0101] 상기 용도 또는 용도들의 또 다른 실시형태에서, 상기 나노 입자는 항염증제를 포함하거나 그와 함께 투여하기 위한 것일 수 있다.
- [0102] 상기 용도 또는 용도들의 또 다른 실시형태에서, 상기 항염증제는 커큐민을 포함 할 수 있다.
- [0103] 또 다른 실시형태에서, 본원에서 필요로 하는 대상에서 비만을 치료 또는 감소시키기 위한 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들의 용도가 제공된다.
- [0104] 상기 용도 또는 용도들의 또 다른 실시형태에서, 상기 나노 입자는 견과류, 콩과 식물, 허브, 향신료, 채소 또는 진균 식물 조직으로부터 적어도 부분적으로 유래될 수 있다.
- [0105] 또 다른 실시형태에서, 본원에서 필요로 하는 대상에서 암을 치료하거나 예방하기 위한 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들의 용도가 제공된다.
- [0106] 상기 용도 또는 용도들의 또 다른 실시형태에서, 상기 나노 입자는 항암 약물과 동시에 또는 순차적 병용 투여를 위한 것일 수 있다.
- [0107] 상기 용도 또는 용도들의 또 다른 실시형태에서, 상기 나노 입자는 항암 약물과 복합체화되거나 접합될 수 있다.
- [0108] 상기 용도 또는 용도들의 또 다른 실시형태에서, 상기 항암 약물은 파클리탁셀 또는 빈크리스틴일 수 있다.
- [0109] 또 다른 실시형태에서, 가용성 식이 섬유를 대상에게 제공하기 위한 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들의 용도가 본원에서 제공된다.
- [0110] 또 다른 실시형태에서, 점도 증진 식품 첨가제 또는 섬유질 대체물로서 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들의 용도가 본원에서 제공된다.
- [0111] 또 다른 실시형태에서, 필요로 하는 대상의 식후 혈중 당 수준을 감소시키기 위한 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들의 용도가 본원에서 제공된다.
- [0112] 또 다른 실시형태에서, 본원에서 화장품에서 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들의 용도가 제공된다.
- [0113] 또 다른 실시형태에서, 본원에서 필요로 하는 대상에게 국소 투여하기위한 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들의 용도가 제공된다.
- [0114] 또 다른 실시형태에서, 본원에서 국소 투여를 위한 약물 전달 비히클로서 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들의 용도가 제공된다.
- [0115] 또 다른 실시형태에서, 본원에서 필요로 하는 대상에서 태양 화상을 예방하기 위한 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들의 용도가 제공되며, 여기서 나노 입자는 대상의 피부에 적용하기 위한 것이다.
- [0116] 상기 용도의 또 다른 실시형태에서, 상기 나노 입자는 추가 안토시아닌 또는 또 다른 UV-보호제를 포함하거나 이와 함께 적용될 수 있다.
- [0117] 또 다른 실시형태에서, 본원에서 세포 증식을 감소시키기 위한 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들의 용도가 제공된다.
- [0118] 상기 용도의 또 다른 실시형태에서, 상기 나노 입자는 항암 약물과 동시에 또는 순차적으로 사용될 수 있다.

- [0119] 상기 용도 또는 용도들의 또 다른 실시형태에서, 상기 나노 입자는 항암 약물과 복합체화되거나 접합될 수 있다.
- [0120] 상기 용도 또는 용도들의 또 다른 실시형태에서, 상기 항암 약물은 파클리탁셀 또는 빈크리스틴일 수 있다.
- [0121] 또 다른 실시형태에서, 본원에서 필요로 하는 대상의 간에서 트리글리 세라이드 축적을 감소시키기 위한 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들의 용도가 제공된다.
- [0122] 또 다른 실시형태에서, 본원에서 암 마커에 특이적인 표적화 항체와 접합된 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들을 포함하는 표적화된 나노 입자가 본원에서 제공된다.
- [0123] 상기 표적화된 나노 입자의 또 다른 실시형태에서, 상기 표적화 항체는 표적화된 나노 입자를 암세포로 표적화 하기 위한 PD-L1 항체 또는 이의 항원 접합 단편을 포함할 수 있다.
- [0124] 상기 표적화된 나노 입자 또는 표적화된 나노 입자들의 또 다른 실시형태에서, 상기 표적화된 나노 입자는 적어도 하나의 세포 독성 또는 항암 약물과 복합되거나 접합될 수 있다.
- [0125] 상기 표적화된 나노 입자 또는 표적화된 나노 입자들의 또 다른 실시형태에서, 상기 표적화된 나노 입자는 파클리탁셀, 독소루비신, 또는 둘 모두와 복합체 화되거나 접합될 수 있다.
- [0126] 또 다른 실시형태에서, 본원에서 항균제와 복합되거나 접합된 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들을 포함하는 항균 나노 입자가 제공된다.
- [0127] 상기 항균 나노 입자의 또 다른 실시형태에서, 상기 항균제는 리소자임, 테트라사이클린, 또는 니신(Nisin), 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다.
- [0128] 상기 항균 나노 입자 또는 항균성 나노 입자의 또 다른 실시형태에서, 항균성 나노 입자는 MDR 세균 감염의 치료 또는 예방에 사용될 수 있다.
- [0129] 또 다른 실시형태에서, 본원에서 균질화된 식물 조직으로부터 유래된 자가 조립된 세포 성분을 포함하는 식품 분말이 제공되며, 상기 세포 성분은 하나 이상의 구조적 탄수화물 또는 그의 절단 생성물을 포함하고, 추가로 하나 이상의 영양제를 포함하며, 여기서 지질은 식품 분말의 구조적 구성 요소가 아니다.
- [0130] 상기 식품 분말의 다른 실시형태에서, 식품 분말은,
- [0131] 나노 구 유사 구조를 형성하기 위해 스스로를 또는 그 주위를 감는 섬유 구조를 포함한다.
- [0132] 임의의 상기 식품 분말 또는 식품 분말들의 또 다른 실시형태에서, 상기 식품 분말은 소수성 성분을 추가로 포함할 수 있다.
- [0133] 임의의 상기 식품 분말 또는 식품 분말들의 또 다른 실시형태에서, 상기 소수성 성분은 아몬드 우유, 코코넛 우유 및/또는 식용 견과류 유래 우유를 포함하거나 제공될 수 있다.
- [0134] 임의의 상기 식품 분말 또는 식품 분말들의 또 다른 실시형태에서, 상기 영양제는 건강상의 이점을 갖는 자연 발생 활성 성분을 포함할 수 있다.
- [0135] 임의의 상기 식품 분말 또는 식품 분말들의 또 다른 실시형태에서, 상기 영양제는 하나 이상의 카로티노이드, 아노나신, 보스웰리아(Boswelvia), 아슈와간다(Ashwagandha), 생강과 성분(Ginger family members), 칸나비노디올(cannabinodiols), 프럭토-올리고당, 갈락토-올리고당, 이눌린, 예루살렘 아티초크, 후추과 성분(Piperaceae family members), 검은후추 열매(Piper nigrum) 또는 피페린(piperine) 및/또는 이의 유도체를 함유하는 야생의 친척, 또는 건강상의 이점이 있는 임의의 활성 성분, 또는 이로부터 분리된 임의의 추출물, 유도체 또는 제 품, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.
- [0136] 상기 식품 분말 또는 식품 분말들의 또 다른 실시형태에서, 상기 식품 분말은 다음을 포함할 수 있다:
- [0137] 신 체리(sour cherry) 또는 이의 수성 추출물;
- [0138] 아몬드 우유 또는 아몬드의 다른 균질물;
- [0139] 두유 또는 대두의 다른 균질물;
- [0140] 브로콜리 또는 이의 수성 추출물; 및

- [0141] 강황(turmeric) 또는 그 분말.
- [0142] 상기 식품 분말 또는 식품 분말들의 또 다른 실시형태에서, 상기 식품 분말은,
- [0143] 약 25~30 v/v% 신 체리 추출물(적어도 약 0.1 mg/ml의 폴리페놀 당량);
- [0144] 약 25~30 v/v% 아몬드 우유 또는 아몬드의 다른 균질물;
- [0145] 약 10~18 v/v% 두유 또는 대두의 다른 균질물;
- [0146] 약 25~30 v/v% 브로콜리 추출물; 및
- [0147] 약 0.5~2.5 w/v% 강황 또는 그 분말을 포함할 수 있다.
- [0148] 임의의 상기 식품 분말 또는 식품 분말들의 또 다른 실시형태에서, 상기 신 체리 추출물은 약 1~2 mg/ml 폴리페놀 당량일 수 있다.
- [0149] 또 다른 실시형태에서, 본원에서 균질화된 식물 조직으로부터 식품 분말을 제조하는 방법이 제공되며, 상기 방법은,
- [0150] 식물 조직으로부터 유리된 세포 성분을 포함하는, 용액 중 균질화된 식물 조직을 제조하는 단계로서, 상기 세포 성분은 하나 이상의 구조 탄수화물 또는 이의 절단 생성물을 포함하고, 상기 용액 중 균질화된 식물 조직은 적어도 하나의 영양제를 추가로 포함하는, 단계;
- [0151] 선택적으로, 존재하는 경우, 상기 용액 중 균질화된 식물 조직으로부터 과편을 제거하는 단계; 및
- [0152] 용액 중 균질화된 식물 조직을 동결 건조, 냉동 건조(Lyophilizing), 분무 건조 또는 나노 분무 건조하는 단계를 포함한다.
- [0153] 상기 방법의 또 다른 실시형태에서, 상기 식물 조직은 과일, 채소 또는 다른 식물 조직을 포함할 수 있다.
- [0154] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 식물 조직은 노화 과일(senescing fruit), 숙성 채소, 또는 이들의 임의 조합을 포함할 수 있고; 바람직하게는, 상기 식물 조직은 체리, 블루베리, 포도, 복숭아, 천도 복숭아, 자두, 살구, 파파야, 토마토, 과일 및/또는 야생 유래 베리들, 또는 이들의 임의 조합을 포함한다.
- [0155] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 용액 중 균질화된 식물 조직은 소수성 성분을 추가로 포함할 수 있다.
- [0156] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 소수성 성분은 아몬드 우유, 코코넛 우유 및/또는 식용 견과류 유래 우유를 포함하거나 제공될 수 있다.
- [0157] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 영양제는 건강상의 이점을 갖는 자연 발생 활성 성분을 포함할 수 있다.
- [0158] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 영양제는 하나 이상의 카로티노이드, 아노나신, 보스웰리아(Boswelvia), 아슈와간다(Ashwagandha), 생강과 성분(Ginger family members), 칸나비노디올(cannabinodiols), 프럭토-올리고당, 갈락토-올리고당, 이눌린, 예루살렘 아티초크, 후추과 성분(Piperaceae family members), 검은후추 열매(Piper nigrum) 또는 피페린(piperine) 및/또는 이의 유도체를 함유하는 야생의 친척, 또는 건강상의 이점이 있는 임의의 활성 성분, 또는 이로부터 분리된 임의의 추출물, 유도체 또는 제품, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.
- [0159] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 용액 중 균질화된 식물 조직은 다음을 포함할 수 있다:
- [0160] 신 체리(sour cherry) 또는 이의 수성 추출물;
- [0161] 아몬드 우유 또는 아몬드의 다른 균질물;
- [0162] 두유 또는 대두의 다른 균질물;
- [0163] 브로콜리 또는 이의 수성 추출물; 및
- [0164] 강황 또는 그 분말.

- [0165] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 용액 중 균질화된 식물 조직은,
- [0166] 약 25~30 v/v% 신 체리 추출물(적어도 약 0.1 mg/ml의 폴리페놀 당량);
- [0167] 약 25~30 v/v% 아몬드 우유 또는 아몬드의 다른 균질물;
- [0168] 약 10~18 v/v% 두유 또는 대두의 다른 균질물;
- [0169] 약 25~30 v/v% 브로콜리 추출물; 및
- [0170] 약 0.5~2.5 w/v% 강황 또는 그 분말을 포함할 수 있다.
- [0171] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 신 체리 추출물은 약 1~2 mg/ml 폴리페놀 당량일 수 있다.
- [0172] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 균질화된 식물 조직을 제조하는 단계는 수성 매질, 유기성 매질 또는 혼합 수성-유기성 매질에 상기 식물 조직을 균질화하는 것을 포함할 수 있다.
- [0173] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 식물 조직은 하나 이상의 영양소 함유 물질을 포함할 수 있으며, 이는 원물(fresh)이거나, 전처리되거나, 농축된 물질, 또는 이들의 임의의 조합 일 수 있다.
- [0174] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 균질화된 식물 조직을 제조하는 단계는 블렌더로 상기 식물 조직을 균질화하는 단계를 포함할 수 있으며, 바람직하게는 높은 rpm에서 작동하고 고 전단력, 초음파기 또는 또 다른 고성능 혼합 장치를 이용하여 식물 조직을 균질화하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0175] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 파편을 제거하는 단계는 원심 분리 장치, 여과 장치, 막 여과, 접선 유동 여과, 또는 이들의 임의의 조합에 의해 파편을 제거하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0176] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 식물 조직은 신 체리, 아몬드 또는 아몬드 우유, 대두 또는 두유, 브로콜리, 강황 또는 이들의 임의의 조합으로부터 수득되거나 이를 포함하는 식물 조직을 포함할 수 있다.
- [0177] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 균질화된 식물 조직은 신 체리 추출물, 아몬드 우유, 두유, 브로콜리 추출물 및 강황 분말을 포함할 수 있다.
- [0178] 또 다른 실시형태에서, 임의의 상기 방법 또는 방법들에 의해 제조된 식품 분말이 본원에서 제공된다.
- [0179] 또 다른 실시형태에서, 본원에서 생물학적 활성제를 필요로 하는 대상, 세포 또는 유기체에 전달하는 방법이 제공되며, 상기 방법은,
- [0180] 화학적 또는 물리적 과정을 사용하여 생물학적 활성제와 복합되거나 접합된 임의의 상기 식품 분말 또는 식품 분말들을 대상 또는 세포 또는 유기체에 투여하는 단계를 포함한다.
- [0181] 상기 방법의 또 다른 실시형태에서, 상기 생물학적 활성제는 셀레늄, 아연, 철 또는 마그네슘과 같은 원소일 수 있다.
- [0182] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 생물학적 활성제는 항암 약물일 수 있고, 상기 대상은 암에 걸린 대상일 수 있다.
- [0183] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 항암 약물은 파클리탁셀, 빈크리스틴, 또는 암 치료에 사용되는 임의의 천연 또는 합성 화합물일 수 있다.
- [0184] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 생물학적 활성제는 식품 분말의 형성 동안 식품 분말에 도입될 수 있거나, 상기 생물학적 활성제는 알코올 또는 기타 유기 성분을 선택적으로 포함하는 수성 매질에서 이미 형성된 식품 분말과 복합체화되거나 접합될 수 있다.
- [0185] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 수성 매질은 DMSO, 또는 완충제, 또는 둘 다를 포함할 수 있다.
- [0186] 또 다른 실시형태에서, 본원에서 필요로 하는 대상의 염증을 유발하는 활성 산소 종의 증가된 수준과 관련된 질환 또는 장애를 치료하는 방법이 제공되며, 상기 방법은,
- [0187] 임의의 상기 식품 분말 또는 식품 분말들을 대상에게 투여하는 단계를 포함한다.

- [0188] 또 다른 실시형태에서, 본원에서 필요로 하는 대상의 염증을 치료 또는 감소시키는 방법이 제공되며, 상기 방법은,
- [0189] 임의의 상기 식품 분말 또는 식품 분말들을 대상에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0190] 상기 방법의 또 다른 실시형태에서, 상기 식품 분말은 항염증제를 포함할 수 있거나, 항염증제와 함께 투여될 수 있다.
- [0191] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 항염증제는 커큐민을 포함할 수 있다.
- [0192] 또 다른 실시형태에서, 본원에서 필요로 하는 대상의 비만을 치료 또는 감소시키는 방법이 제공되며, 상기 방법은,
- [0193] 임의의 상기 식품 분말 또는 식품 분말들을 대상에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0194] 상기 방법의 또 다른 실시형태에서, 상기 식품 분말은 식품 또는 의료 목적으로 사용되는 견과류, 콩과 식물, 허브, 향신료, 채소 또는 진균 식물 조직으로부터 적어도 부분적으로 유래된 성분을 함유하거나 포함할 수 있다.
- [0195] 또 다른 실시형태에서, 본원에서 제공되는 방법은 필요로 하는 대상에서 암을 치료 또는 예방하는 방법을 제공하고, 상기 방법은,
- [0196] 임의의 상기 식품 분말 또는 식품 분말들을 대상에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0197] 상기 방법의 또 다른 실시형태에서, 상기 식품 분말은 항암 약물과 동시에 또는 순차적으로 병용 투여될 수 있다.
- [0198] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 식품 분말은 항암 약물과 복합체화 되거나 이와 접합될 수 있다.
- [0199] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 항암 약물은 파클리탁셀 또는 빈크리스틴일 수 있다.
- [0200] 또 다른 실시형태에서, 본원에서 대상에게 가용성 식이 섬유를 제공하는 방법이 제공되며, 상기 방법은,
- [0201] 임의의 상기 식품 분말 또는 식품 분말들을 대상에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0202] 또 다른 실시형태에서, 본원에서 임의의 상기 식품 분말 또는 식품 분말들을 포함하는 점도 증진 식품 첨가제가 제공된다.
- [0203] 또 다른 실시형태에서, 필요로 하는 대상의 식후 혈당 수준을 감소시키는 방법이 제공되며, 상기 방법은,
- [0204] 임의의 상기 식품 분말 또는 식품 분말들을 대상에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0205] 또 다른 실시형태에서, 본원에서 세포 증식을 감소시키는 방법이 제공되며, 상기 방법은,
- [0206] 임의의 상기 식품 분말 또는 식품 분말들로 세포 또는 조직 또는 기관에 처리하는 단계를 포함한다.
- [0207] 상기 방법의 다른 실시형태에서, 상기 식품 분말은 항암 약물과 동시에 또는 순차적으로 사용될 수 있다.
- [0208] 상기 방법의 또 다른 실시형태에서, 상기 식품 분말은 항암 약물과 복합체화 되거나 접합될 수 있다.
- [0209] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 항암 약물은 파클리탁셀 또는 빈크리스틴일 수 있다.
- [0210] 또 다른 실시형태에서, 본원에서 필요로 하는 대상의 간에 트리글리세라이드 축적을 감소시키는 방법이 제공되며, 상기 방법은,
- [0211] 임의의 상기 식품 분말 또는 식품 분말들을 대상에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0212] 또 다른 실시형태에서, 생물학적 활성제를 필요로 하는 대상 또는 세포에 전달하기 위한 임의의 상기 식품 분말 또는 식품 분말들의 용도가 본원에서 제공된다.
- [0213] 상기 용도의 또 다른 실시형태에서, 상기 생물학적 활성제는 셀레늄, 아연, 마그네슘 또는 철과 같은 원소일 수 있다.

- [0214] 상기 용도 또는 용도의 또 다른 실시형태에서, 상기 생물학적 활성제는 항암 약물일 수 있고, 상기 대상은 암에 걸린 대상이다.
- [0215] 상기 용도 또는 용도들의 또 다른 실시형태에서, 상기 항암 약물은 파클리탁셀 또는 빈크리스틴일 수 있다.
- [0216] 임의의 상기 용도 또는 용도들의 또 다른 실시형태에서, 상기 생물학적 활성제는 식품 분말의 형성 동안 식품 분말에 도입될 수 있거나, 상기 생물학적 활성제는 알코올 또는 기타 유기 성분을 선택적으로 포함하는 수성 매질에서 이미 형성된 식품 분말과 복합체화 되거나 접합될 수 있다.
- [0217] 임의의 상기 용도 또는 용도들의 또 다른 실시형태에서, 상기 수성 매질은 DMSO, 또는 완충제, 또는 둘 다를 포함할 수 있다.
- [0218] 또 다른 실시형태에서, 필요로 하는 대상에서 활성 산소 종과 관련된 질환 또는 장애를 치료하기 위한 임의의 상기 식품 분말 또는 식품 분말들의 용도가 본원에 제공된다.
- [0219] 또 다른 실시형태에서, 필요로 하는 대상에서 염증을 치료 또는 감소시키기 위한 임의의 상기 식품 분말 또는 식품 분말들의 용도가 본원에서 제공된다.
- [0220] 상기 용도의 또 다른 실시형태에서, 상기 식품 분말은 항염증제를 포함하거나 그와 함께 투여하기 위한 것일 수 있다.
- [0221] 임의의 상기 용도 또는 용도들의 또 다른 실시형태에서, 상기 항염증제는 커큐민을 포함할 수 있다.
- [0222] 또 다른 실시형태에서, 필요로 하는 대상에서 비만을 치료 또는 감소시키기 위한 임의의 상기 식품 분말 또는 분말들의 용도가 본원에서 제공된다.
- [0223] 임의의 상기 용도 또는 용도들의 또 다른 실시형태에서, 상기 식품 분말은 견과류, 콩과 식물, 허브, 향신료, 채소 또는 진균 식물 조직으로부터 적어도 부분적으로 유래된 것일 수 있다.
- [0224] 또 다른 실시형태에서, 필요로 하는 대상에서 암을 치료 또는 예방하기 위한 임의의 상기 식품 분말 또는 분말들의 용도가 본원에서 제공된다.
- [0225] 임의의 상기 용도 또는 용도들의 또 다른 실시형태에서, 상기 식품 분말은 항암 약물과 동시에 또는 순차적으로 병용 투여되기 위한 것일 수 있다.
- [0226] 임의의 상기 용도 또는 용도들의 또 다른 실시형태에서, 상기 식품 분말은 항암 약물과 복합체화 되거나 접합될 수 있다.
- [0227] 임의의 상기 용도 또는 용도들의 또 다른 실시형태에서, 상기 항암 약물은 파클리탁셀 또는 빈크리스틴일 수 있다.
- [0228] 또 다른 실시형태에서, 가용성 식이 섬유를 대상에게 제공하기 위한 임의의 상기 식품 분말 또는 식품 분말들의 용도가 본원에서 제공된다.
- [0229] 또 다른 실시형태에서, 점도 증진 식품 첨가제 또는 섬유질 대체물로서 임의의 상기 식품 분말 또는 식품 분말들의 용도가 본원에서 제공된다.
- [0230] 또 다른 실시형태에서, 필요로 하는 대상의 식후 혈당 수준을 감소시키기 위한 임의의 상기 식품 분말 또는 식품 분말들의 용도가 본원에서 제공된다.
- [0231] 또 다른 실시형태에서, 세포 증식을 감소시키기 위한 임의의 상기 식품 분말 또는 식품 분말들의 용도가 본원에서 제공된다.
- [0232] 상기 용도의 또 다른 실시형태에서, 상기 식품 분말은 항암 약물과 동시에 또는 순차적으로 사용될 수 있다.
- [0233] 상기 용도 또는 용도들의 또 다른 실시형태에서, 상기 식품 분말은 항암 약물과 복합체화되거나 접합될 수 있다.
- [0234] 상기 용도 또는 용도들의 또 다른 실시형태에서, 상기 항암 약물은 파클리탁셀 또는 빈크리스틴일 수 있다.
- [0235] 또 다른 실시형태에서, 필요로 하는 대상의 간에서 트리글리세라이드 축적을 감소시키기 위한 임의의 상기 식품 분말 또는 식품 분말들의 용도가 본원에서 제공된다.

- [0236] 또 다른 실시형태에서, 항균제와 복합체화 되거나 접합된 임의의 상기 식품 분말 또는 식품 분말들을 포함하는, 항균 식품 분말이 본원에서 제공된다.
- [0237] 상기 항균 식품 분말의 또 다른 실시형태에서, 상기 항균제는 리소자임, 테트라사이클린, 또는 니신(Nisin), 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다.
- [0238] 상기 항균 식품 분말 또는 항균 식품 분말들의 또 다른 실시형태에서, 상기 항균 식품 분말은 MDR 세균 감염의 치료 또는 예방의 용도일 수 있다.
- [0239] 또 다른 실시형태에서, 생물학적 활성제 또는 적재물(cargo)로 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들을 로딩하는 방법이 본원에서 제공되며, 상기 방법은,
- [0240] 탈수, 냉동 건조 또는 동결 건조된 나노 입자들의 샘플을 제공하는 단계;
- [0241] 상기 생물학적 활성제 또는 적재물을 상기 나노 입자들의 샘플과 혼합하여 혼합물을 제공하는 단계; 및
- [0242] 상기 나노 입자들을 수축시키기 위해 혼합물에 물 또는 수용액을 첨가하여 상기 생물학적 활성제 또는 적재물을 그 안에 가두는 단계를 포함한다.
- [0243] 또 다른 실시형태에서, 균질화된 식물 조직으로부터 유래된 자가 조립 세포 성분을 포함하는 나노 섬유가 본원에서 제공되며, 상기 세포 성분은 하나 이상의 구조적 탄수화물 또는 이의 절단 생성물을 포함하며, 여기에서 지질 및 폴리페놀은 상기 나노 섬유의 구조적 성분이 아니다.
- [0244] 상기 나노 섬유의 다른 실시형태에서, 상기 나노 섬유는 실질적으로 지질이 없거나, 실질적으로 폴리 페놀이 없거나, 또는 둘 다일 수 있다.
- [0245] 임의의 상기 나노 섬유 또는 나노 섬유들의 또 다른 실시형태에서, 상기 나노 섬유는,
- [0246] 적어도 하나의 구조적 탄수화물을 포함하거나 그로부터 제조된 하나 이상의 가닥을 포함하는 긴 섬유를 포함할 수 있다.
- [0247] 임의의 상기 나노 섬유 또는 나노 섬유들의 또 다른 실시형태에서, 상기 나노 섬유는 펙틴, 헤미셀룰로스, 펩티드 및/또는 단백질, 유기산, 이들의 절단 생성물, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다.
- [0248] 임의의 상기 나노 섬유 또는 나노 섬유들의 또 다른 실시형태에서, 상기 유기산은 말산, 아스코르브산 또는 둘 다를 포함할 수 있다.
- [0249] 임의의 상기 나노 섬유 또는 나노 섬유들의 또 다른 실시형태에서, 상기 세포 성분은 숙성 동안 또는 숙성된 과일의 균질화 동안 식물 조직으로부터 유리된 것들을 포함할 수 있으며, 이는 나노 섬유로 자기 조립될 수 있다.
- [0250] 임의의 상기 나노 섬유 또는 나노 섬유들의 또 다른 실시형태에서, 하나 이상의 구조적 탄수화물은 펙틴, 펙틴산, 펙틴의 메틸에스테르, 펙틴 유도체, 폴리갈락투론산, 람노갈락투로난, 자일로구칸, 헤미셀룰로오스, 글루코스, 만노스 또는 자일로스의 β -(1→4)-연결된 백본들을 갖는 자일로글루칸, 및/또는 아라비노갈락탄, 및/또는 이의 절단 생성물의 중 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0251] 임의의 상기 나노 섬유 또는 나노 섬유들의 또 다른 실시형태에서, 상기 나노 섬유는 약 5~10nm의 직경을 갖는 섬유 형태를 가질 수 있다.
- [0252] 임의의 상기 나노 섬유 또는 나노 섬유들의 또 다른 실시형태에서, 상기 나노 섬유는 수소 결합 상호 작용에 의해 안정화될 수 있고 식물 조직의 세포 성분의 이화 작용으로부터 유도된 거대 분자들 사이에서 형성될 수 있고 하이드록실 그룹 및/또는 아미노 그룹 및/또는 유기산 그룹을 가질 수 있다.
- [0253] 임의의 상기 나노 섬유 또는 나노 섬유들의 또 다른 실시형태에서, 상기 나노 섬유는 비결정질일 수 있다.
- [0254] 임의의 상기 나노 섬유 또는 나노 섬유들의 또 다른 실시형태에서, 상기 나노 섬유는 생물학적 활성제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0255] 임의의 상기 나노 섬유 또는 나노 섬유들의 또 다른 실시형태에서, 상기 생물학적 활성제는 약제학적 활성 약물, 단백질, 효소, 기능성 식품 또는 영양소일 수 있다.
- [0256] 임의의 상기 나노 섬유 또는 나노 섬유들의 또 다른 실시형태에서, 상기 나노 섬유는 수용액 중에 있을 수 있다.

- [0257] 임의의 상기 나노 섬유 또는 나노 섬유들의 또 다른 실시형태에서, 상기 나노 섬유는 분말 형태일 수 있다.
- [0258] 임의의 상기 나노 섬유 또는 나노 섬유들의 또 다른 실시형태에서, 상기 나노 섬유는 탈수, 냉동 건조, 동결 건조, 분무 건조 또는 나노 분무 건조 형태일 수 있다.
- [0259] 임의의 상기 나노 섬유 또는 나노 섬유들의 또 다른 실시형태에서, 상기 식물 조직은 과일 또는 채소 식물 조직을 포함할 수 있고/있거나 균질화 전에 식물 조직으로부터 폴리페놀이 제거되었을 수 있다.
- [0260] 임의의 상기 나노 섬유 또는 나노 섬유들의 또 다른 실시형태에서, 상기 식물 조직은 노화 과일, 숙성 채소, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있고; 바람직하게는, 상기 식물 조직은 체리, 블루 베리, 포도, 복숭아, 천도 복숭아, 자두, 살구, 파파야, 토마토 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다.
- [0261] 임의의 상기 나노 섬유 또는 나노 섬유들의 또 다른 실시형태에서, 상기 식물 조직은 신 체리 과일 조직을 포함할 수 있다.
- [0262] 또 다른 실시형태에서, 균질화된 식물 조직으로부터 나노 섬유를 제조하는 방법이 제공되며, 상기 방법은,
- [0263] 식물 조직으로부터 유리된 세포 성분을 포함하는, 낮은 폴리페놀 함량을 갖는 용액에서 균질화된 식물 조직을 제조하는 단계;
- [0264] 존재하는 경우, 균질화된 식물 조직에서 과편을 제거하는 단계; 및
- [0265] 선택적으로, 균질화된 식물 조직을 투석하여 비복합 화합물을 제거하거나 크기 배제에 의해 비복합 화합물을 제거하는 단계를 포함하고,
- [0266] 이에 의해 세포 성분의 자가 조립에 의해 형성된 나노 섬유를 포함하는 용액을 제공하는 단계를 포함한다.
- [0267] 상기 방법의 또 다른 실시형태에서, 상기 방법은 나노 섬유를 포함하는 용액을 탈수, 냉동 건조, 동결 건조, 분무 건조 또는 나노 분무 건조하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0268] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 나노 섬유는 실질적인 수성 매질에서 자가 조립에 의해 형성될 수 있다.
- [0269] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 용액에서 균질화된 식물 조직을 제조하는 단계는 수성 매질, 유기성 매질 또는 혼합 수성-유기성 매질에서 식물 조직을 균질화하는 것을 포함할 수 있다.
- [0270] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 용액에서 균질화된 식물 조직을 제조하는 단계는 식물 조직을 수성, 유기성 또는 물, 에탄올, 메탄올 또는 아세톤 중 어느 하나 이상을 포함하는 혼합된 수성-유기성 매질에서 고 전단(high shear) 균질화 및/또는 초음파 처리하는 것을 포함할 수 있다.
- [0271] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 용액에서 균질화된 식물 조직을 제조하는 단계는 식물 조직의 균질화 이전에 식물 조직으로부터 폴리페놀이 제거하기 위하여 식물 조직을 표백하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0272] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 표백은 추출 용매를 이용하여 식물 조직으로부터 폴리페놀의 추출을 수행하는 것을 포함할 수 있다.
- [0273] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 추출 용매는 에탄올을 포함할 수 있다.
- [0274] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 과편을 제거하는 단계는 투석, 균질화된 식물 조직을 여과하는 것, 균질화된 식물 조직을 원심 분리하는 것, 또는 균질화된 식물 조직에 대해 접선 유동 여과 또는 연속 유동 여과를 수행하는 것, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다.
- [0275] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 방법은 임의의 상기 나노 섬유 또는 나노 섬유들을 제조하기 위한 것일 수 있다.
- [0276] 또 다른 실시형태에서, 균질화된 식물 조직으로부터 나노 섬유를 제조하는 방법이 본원에서 제공되고, 상기 방법은,
- [0277] 식물 조직으로부터 유리된 세포 성분을 포함하는, 낮은 폴리페놀 함량을 갖는 용액에서 균질화된 식물 조직을 제조하는 단계;
- [0278] 균질화된 식물 조직에서 (존재하는 경우) 과편을 제거하는 단계;

- [0279] 상기 세포 성분의 자가 조립에 의해 나노 섬유를 형성하는 단계; 및
- [0280] 동결-건조, 분무-건조, 또는 나노분무 건조를 실시하여 상기 나노 섬유를 포함하는 분말을 형성하는 단계를 포함한다.
- [0281] 상기 방법의 또 다른 실시형태에서, 상기 자가 조립은 실질적으로 수성 매질에서 발생할 수 있다.
- [0282] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 용액에서 균질화된 식물 조직을 제조하는 단계는 수성 매질, 유기성 매질 또는 혼합 수성-유기성 매질에서 식물 조직을 균질화하는 것을 포함할 수 있다.
- [0283] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 용액에서 균질화된 식물 조직을 제조하는 단계는 식물 조직을 수성, 유기성 또는 물, 에탄올, 메탄올 또는 아세톤 중 어느 하나 이상을 포함하는 혼합된 수성-유기성 매질에서 고 전단 균질화 및/또는 초음파 처리하는 것을 포함할 수 있다.
- [0284] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 용액에서 균질화된 식물 조직을 제조하는 단계는 식물 조직의 균질화 이전에 식물 조직으로부터 폴리페놀이 제거하기 위하여 식물 조직을 표백하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0285] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 표백은 추출 용매를 이용하여 식물 조직으로부터 폴리페놀의 추출을 수행하는 것을 포함할 수 있다.
- [0286] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 추출 용매는 에탄올을 포함할 수 있다.
- [0287] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 파편을 제거하는 단계는 투석, 균질화된 식물 조직을 여과하는 것, 균질화된 식물 조직을 원심 분리하는 것, 또는 균질화된 식물 조직에 대해 접선 유동 여과 또는 연속 유동 여과를 수행하는 것, 또는 이들의 임의 조합을 포함할 수 있다.
- [0288] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 식물 조직은 식물 조직으로부터 폴리페놀을 제거하기 위하여 추출 용매를 이용하여 추출된 식물 조직을 포함할 수 있다.
- [0289] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 추출 용매는 에탄올을 포함할 수 있다.
- [0290] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 방법은 임의의 상기 나노 섬유 또는 나노 섬유들을 제조하기 위한 것일 수 있다.
- [0291] 또 다른 실시형태에서, 임의의 상기 방법 또는 방법들에 의해 제조된 나노 섬유가 본원에서 제공된다.
- [0292] 또 다른 실시형태에서, 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들로부터 제조된 식품 분말이 본원에서 제공되며, 임의로 상기 식품 분말은 마이크로-크기 미세 분말 형태로 제공된다.
- [0293] 또 다른 실시형태에서, 생물학적 활성제를 필요로 하는 대상 또는 세포에 전달하는 방법이 본원에서 제공되며, 상기 방법은,
- [0294] 생물학적 활성제와 복합되거나 접합된, 임의의 상기 나노 섬유 또는 나노 섬유들을 대상에 투여하는 단계를 포함한다.
- [0295] 상기 방법의 또 다른 실시형태에서, 상기 생물학적 활성제는 셀레늄, 아연, 철 또는 마그네슘과 같은 원소일 수 있다.
- [0296] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 생물학적 활성제는 항암 약물일 수 있고, 상기 대상은 암에 걸린 대상일 수 있다.
- [0297] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 항암 약물은 파클리탁셀, 빈크리스틴, 또는 암 치료에 사용되는 임의의 천연 또는 합성 화합물일 수 있다.
- [0298] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 생물학적 활성제는 나노 섬유의 형성 동안 나노 섬유에 도입될 수 있거나, 상기 생물학적 활성제는 알코올 또는 기타 유기 성분을 선택적으로 포함하는 수성 매질에서 이미 형성된 나노 섬유와 복합되거나 접합될 수 있다.
- [0299] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 수성 매질은 DMSO, 또는 완충제, 또는 둘 다를 포함할 수 있다.
- [0300] 또 다른 실시형태에서, 필요로 하는 대상에서 암을 치료 또는 예방하는 방법이 본원에서 제공되며, 상기

방법은,

- [0301] 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들을 대상에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0302] 상기 방법의 다른 실시형태에서, 상기 나노 입자는 항암 약물과 동시에 또는 순차적으로 병용 투여될 수 있다.
- [0303] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 나노 입자는 항암 약물과 복합되거나 접합될 수 있다.
- [0304] 임의의 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 항암 약물은 파클리탁셀 또는 빈크리스틴일 수 있다.
- [0305] 또 다른 실시형태에서, 대상에게 가용성 식이 섬유를 제공하는 방법이 본원에서 제공되며, 상기 방법은,
- [0306] 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들을 대상에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0307] 또 다른 실시형태에서, 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들을 포함하는 점도 증진 식품 첨가제가 본원에서 제공된다.
- [0308] 또 다른 실시형태에서, 필요로 하는 대상의 식후 혈당 수준을 감소시키는 방법이 제공되며, 상기 방법은,
- [0309] 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들을 대상에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0310] 또 다른 실시형태에서, 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들을 포함하는 화장품이 본원에서 제공된다.
- [0311] 또 다른 실시형태에서, 필요로 하는 대상에게 국소 투여하기 위한 조성물이 본원에서 제공되며, 상기 조성물은 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들, 또는 임의로 생물학적 활성제를 포함한다.
- [0312] 또 다른 실시형태에서, 필요로 하는 대상에서 태양 화상을 예방하는 방법이 본원에서 제공되며, 상기 방법은,
- [0313] 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들을 대상의 피부에 적용하는 단계를 포함한다.
- [0314] 상기 방법의 또 다른 실시형태에서, 상기 나노 입자는 안토시아닌 또는 또 다른 UV-보호제를 포함하거나 이와 함께 적용될 수 있다.
- [0315] 또 다른 실시형태에서, 세포 증식을 감소시키는 방법이 본원에서 제공되며, 상기 방법은,
- [0316] 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들을 세포 또는 조직 또는 기관의 처리하는 것을 포함한다.
- [0317] 상기 방법의 또 다른 실시형태에서, 상기 나노 입자는 항암 약물과 동시에 또는 순차적으로 사용될 수 있다.
- [0318] 상기 방법 또는 방법들의 또 다른 실시형태에서, 상기 나노 입자는 항암 약물과 복합체화 되거나 접합될 수 있다.
- [0319] 상기 방법 또는 방법의 또 다른 실시형태에서, 항암 약물은 파클리탁셀 또는 빈크리스틴일 수 있다.
- [0320] 또 다른 실시형태에서, 필요로 하는 대상의 간에서 트리글리세라이드 축적을 감소시키는 방법이 제공되며, 상기 방법은,
- [0321] 임의의 상기 나노 섬유 또는 나노 섬유들을 대상에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0322] 또 다른 실시형태에서, 상기 생물학적 활성제를 필요로 하는 대상 또는 세포에 전달하기 위한 임의의 상기 나노 섬유 또는 나노 섬유들의 용도가 본원에서 제공된다.
- [0323] 상기 용도의 또 다른 실시형태에서, 상기 생물학적 활성제는 셀레늄, 아연, 마그네슘 또는 철과 같은 원소일 수 있다.
- [0324] 상기 용도 또는 용도들의 또 다른 실시형태에서, 상기 생물학적 활성제는 항암 약물일 수 있고, 상기 대상은 암에 걸린 대상일 수 있다.
- [0325] 상기 용도 또는 용도들의 또 다른 실시형태에서, 상기 항암 약물은 파클리탁셀 또는 빈크리스틴일 수 있다.
- [0326] 임의의 상기 용도 또는 용도들의 또 다른 실시형태에서, 상기 생물학적 활성제는 나노 섬유의 형성 동안 나노 섬유에 도입될 수 있거나, 상기 생물학적 활성제는 수성 매질에서 이미 형성된 나노 섬유와 복합체화 되거나 접합될 수 있다.

- [0327] 상기 용도 또는 용도들의 또 다른 실시형태에서, 상기 수성 기반 배지는 DMSO, 또는 완충액, 또는 둘 다를 포함할 수 있다.
- [0328] 또 다른 실시형태에서, 필요로 하는 대상에서 암을 치료 또는 예방하는 방법이 본원에서 제공되며, 상기 방법은,
- [0329] 임의의 상기 나노 섬유 또는 나노 섬유들을 대상에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0330] 상기 방법의 다른 실시형태에서, 상기 나노 섬유는 항암 약물과 동시에 또는 순차적으로 병용 투여될 수 있다.
- [0331] 임의의 상기 용도 또는 용도들의 또 다른 실시형태에서, 상기 나노 섬유는 항암 약물과 복합되거나 접합될 수 있다.
- [0332] 임의의 상기 용도 또는 용도들의 또 다른 실시형태에서, 상기 항암 약물은 파클리탁셀 또는 빈크리스틴일 수 있다.
- [0333] 또 다른 실시형태에서, 대상에게 가용성 식이 섬유를 제공하기 위한 임의의 상기 나노 섬유 또는 나노 섬유들의 용도가 본원에서 제공된다.
- [0334] 또 다른 실시형태에서, 점도 증진 식품 첨가제 또는 섬유질 대체제로서 임의의 상기 나노 섬유 또는 나노 섬유들의 용도가 본원에서 제공된다.
- [0335] 또 다른 실시형태에서, 필요로 하는 대상의 식후 혈당 수준을 감소시키기 위한 임의의 상기 나노 섬유 또는 나노 섬유들의 용도가 제공된다.
- [0336] 또 다른 실시형태에서, 화장품에서 임의의 상기 나노 섬유 또는 나노 섬유들의 용도가 본원에서 제공된다.
- [0337] 또 다른 실시형태에서, 필요로 하는 대상에게 국소 투여하기 위한 임의의 상기 나노 섬유 또는 나노 섬유들의 용도가 본원에서 제공되며, 상기 나노 섬유는 임의로 생물학적 활성제와 복합체화 되거나 접합된다.
- [0338] 또 다른 실시형태에서, 국소 투여를 위한 약물 전달체로서의 임의의 상기 나노 섬유 또는 나노 섬유들의 용도가 본원에서 제공된다.
- [0339] 또 다른 실시형태에서, 필요로 하는 대상에서 태양 화상을 예방하기 위한 임의의 상기 나노 섬유 또는 나노 섬유들의 용도가 본원에서 제공되며, 상기 나노 섬유는 대상의 피부에 적용하기 위한 것이다.
- [0340] 상기 용도의 또 다른 실시형태에서, 상기 나노 섬유는 안토시아닌 또는 또 다른 UV-보호제를 포함하거나 이와 함께 적용될 수 있다.
- [0341] 또 다른 실시형태에서, 세포 증식을 감소시키기 위한 임의의 상기 나노 섬유 또는 나노 섬유들의 용도가 본원에서 제공된다.
- [0342] 상기 용도의 또 다른 실시형태에서, 상기 나노 섬유는 항암 약물과 동시에 또는 순차적으로 사용될 수 있다.
- [0343] 상기 용도 또는 용도들의 또 다른 실시형태에서, 상기 나노 섬유는 항암 약물과 복합체화 되거나 접합될 수 있다.
- [0344] 상기 용도 또는 용도들의 또 다른 실시형태에서, 상기 항암 약물은 파클리탁셀 또는 빈크리스틴일 수 있다.
- [0345] 또 다른 실시형태에서, 필요로 하는 대상의 간에서 트리글리 세라이드 축적을 감소시키기 위한 임의의 상기 나노 섬유 또는 나노 섬유들의 용도가 본원에서 제공된다.
- [0346] 또 다른 실시형태에서, 암 마커에 특이적인 표적화 항체와 접합된, 임의의 상기 나노 섬유 또는 나노 섬유들을 포함하는 표적화된 나노 섬유가 본원에서 제공된다.
- [0347] 상기 표적화된 나노 섬유의 또 다른 실시형태에서, 상기 표적화 항체는 표적화된 나노 섬유를 암세포로 표적화하기 위한 PD-L1 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함할 수 있다.
- [0348] 상기 표적화된 나노 섬유 또는 표적화된 나노 섬유들의 또 다른 실시형태에서, 상기 표적화된 나노 섬유는 적어도 하나의 세포 독성 또는 항암 약물과 복합되거나 접합될 수 있다.
- [0349] 상기 표적화된 나노 섬유 또는 표적화된 나노 섬유들의 또 다른 실시형태에서, 상기 표적화된 나노 섬유는 파클리탁셀, 독소루비신, 또는 둘 모두와 복합되거나 접합될 수 있다.

- [0350] 또 다른 실시형태에서, 항균제와 복합되거나 접합된 임의의 상기 나노 섬유 또는 나노 섬유들을 포함하는 항균 나노 섬유가 본원에서 제공된다.
- [0351] 상기 항균 나노 섬유의 또 다른 실시형태에서, 상기 항균제는 리소자임, 테트라사이클린, 또는 니신, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다.
- [0352] 상기 항균성 나노 섬유 또는 항균성 나노 섬유들의 또 다른 실시형태에서, 항균성 나노 섬유는 MDR 세균 감염의 치료 또는 예방에 사용될 수 있다.
- [0353] 특정 실시형태에서, 임의의 상기 나노 입자 또는 나노 입자들, 임의의 상기 식품 분말 또는 식품 분말들, 임의의 상기 나노 섬유 또는 나노 섬유들, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 조성물이 본원에 제공된다. 특정 실시형태에서, 상기 조성물은 제약학상 허용되는 부형제, 담체 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 바와 같은 임의의 2개 또는 임의의 3개의 나노 입자들, 나노 섬유들 및/또는 식품 분말들의 혼합물이 본원에 기재된 용도 및/또는 방법에 사용될 수 있다는 것이 고려된다. 특정 실시형태에서, 예를 들어, 나노 입자들과 나노 섬유들의 혼합물이 사용될 수 있고; 나노 입자들과 식품 분말들의 혼합물이 사용될 수 있고; 나노 섬유들과 식품 분말들의 혼합물이 사용될 수 있고; 또는 나노 입자들, 나노 섬유들 및 식품 분말들의 혼합물이 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0354] 도 1은 신 체리(A)에서 제조된 나노 입자들의 투과 전자 현미경 이미지를 도시한다. 나노 입자들은 추출물 50 μ l 방울 상에 탄소 코팅된 니켈 그리드를 띄워서 1분 동안 그리드에 흡착되도록 했다. 그리드를 제거하고, 가장자리에서 닦아내어 건조시킨 후 1% 우라닐 아세테이트 방울 상에 띄웠다. 30초 후, 그리드를 제거하고 가장자리에서 닦아내어 건조시킨 후 Leo Electron 현미경을 사용하여 직접 검사했다. 액체 매질에서, 나노 입자들은 직경이 50~100nm 사이로 크기가 다양하다. 패널 B는 나노 입자의 확대도를 도시한다. 화살표는 나노 입자에서 나오는 섬유형 구조를 나타낸다.
- 도 2는 EM 하에서 관찰된 나노 입자들의 확대도를 도시한다. 패널 A - 훨씬 더 매끄러운 내부 껍질(화살표 1)을 노출하는 외부 구조(화살표 2)를 벗겨낸 두 개의 나노 입자. 패널 B, C - 피브릴로 구성된 외부 코팅의 상세한 형태를 보여주는 패널. 화살표 1은 나선형 필라멘트 구조를 갖는 원섬유(fibrils) 영역을 나타낸다. 나선형 필라멘트 구조는 원섬유로 코팅되어 있다(화살표 2). 패널 C는 나선형 필라멘트에서 벗겨진 단순한 원섬유 구조를 가진 영역을 나타낸다. 패널 D는 용액으로 저장될 때 복합체의 잠재적인 자연 해리 동안 형성된 원섬유의 매트(화살표)를 보여준다.
- 도 3은 나노 입자들의 안정성에 대한 펙티나제(폴리갈락투로나제(polygalacturonase)) 처리의 효과를 보여준다. 나노 입자들을 포함하는 투석된 추출물 1 ml(0.8~1 mg 폴리페놀 당량/ml)를 펙티나제(1 unit/ml 추출물)로 15분 동안 처리하였다. 나노 입자들은 탄소 코팅된 니켈 그리드에 흡착되도록 허용되었고 상기 기술된 우라닐 아세테이트로 염색한 후 시각화되었다. 패널 A- 추출물을 폴리 갈락투로나제 처리에 적용한 후, 구형 복합체가 더 작은 소포(vesicular) 및 필라멘트 구조로 용해되는 것을 볼 수 있으며(박스형 영역), 이는 폴리갈락투론산의 -1,4-글리코시드 결합을 포함하는 거대 분자 구조의 존재를 가리킨다. 패널 B는 박스 영역의 확대도를 도시한다. 패널 C와 D는 나노 입자들을 셀룰라아제(β -1,4-글루카나아제)로 처리한 효과를 도시하며, 이것은 필라멘트에서의 β -1,4-글루칸 타입의 성분의 존재를 가리키는 내부 코어를 남기고 실모양 코팅의 복합체를 벗겨낸다. _
- 도 4는 신 체리로 제조된 나노 입자들의 구조에 대한 트립신 처리의 효과를 보여준다. 투석된 추출물(1ml)을 트립신 1 유닛으로 15분 동안 처리하고 나노 입자들을 상기 기술된 바와 같이 조사하였다. 트립신 처리는 나노 입자들의 구형 내부 펙틴 껍질 주위에 어두운 얼룩진 영역으로 보이는 외부 필라멘트 구조(루테늄 레드로 염색된 패널 A)의 용해를 초래한다. 셀룰라아제 처리 후 관찰된 것처럼 껍질 유사 구조는 함께 융합되는 경향이 있다(도 3 참조). 트립신에 의한 외부 껍질의 용해는 외부 필라멘트 코팅도 단백질(즉, 세포벽에서 발견되는 확장형의 당단백질)과 숙성 및 노화(senescence) 동안 발생하는 분해에서 유래된 잠재적 펩티드로 구성되어 있음을 시사한다. 패널 B는 껍질 유사 구조의 확대도를 나타낸다. 패널 C는 부분적으로 분해된 나노 입자를 보여주며, 이는 원섬유(fibril)/원섬유 구조로 분산되는 섬유질 코팅을 보여준다. 패널 D는 원섬유 구조에서 벗겨진 나노 입자들을 보여준다. 화살표는 원섬유 구조가 용해된 후 남은 구형 껍질을 보여준다. 패널 E는 원섬유/원섬유 구조를 잠재적으로 형성하는 얇은 어셈블리를 보여주는 원섬유/원섬유 구조의 확대도를 나타낸다. 원섬유/원섬유 구조는 필라멘트가 아니고 양측 대칭이 부족한 것처럼 보이며 나선형으로 배열된 분자가 자체 축을 중심으로 1

차, 2차 및 3차 로프 유사 형상을 가진 원섬유 구조를 형성하는 것처럼 보인다.

도 5는 나노 입자들을 보여주는 동결 건조 투석된 신 체리 추출물의 주사 전자 현미경 사진을 보여준다. 물의 제거는 잠재적으로 붕괴된 외부 원섬유 모이어 티와 함께 나노 입자들의 크기를 증가시키는 것으로 보인다. 이론에 얽매이지 않고, 수성 환경에서, 나노 입자들의 외부 부분은 자유롭고 확장된 것처럼 보이며, 구조는 수소 결합을 통해 적어도 부분적으로 함께 유지될 수 있다. 물이 제거되면 원섬유 구조는 나노 입자들의 펙틴 코어와 융합하는 경향이 있으며, 또한 수소 결합을 촉진하는 물 분자가 없기 때문에 팽창하는 경향이 있다. 용액 상태에서 나노 입자들은 일반적으로 직경이 25~50nm 범위인 크기 분포를 보여 주며, 동결 건조한 후 크기는 200~800nm이며, 일부는 직경이 마이크로미터 이상에 이른다.

도 6은 시트(화살표 1), 관형 영역(화살표 2) 및 원섬유(fibril)(화살표 3)를 포함하는 다중 구조의 형성을 보여주는, 신 체리에서 투석된 추출물의 주사 전자 현미경 사진을 도시한다. 일부 영역에서는 나노 입자들의 출아(budding)를 볼 수 있다(화살표 4). 이들 구조는 나노 입자들 형성의 중간 단계를 나타낸다.

도 7은 에탄올 표백된 신 체리에서 분리된 나노 섬유들의 주사 전자 현미경 사진(패널 A) 및 투과 전자 현미경 사진을 도시한다. 신 체리 열매를 50% 에탄올에서 배양하여 폴리페놀(안토시아닌)(3x)을 제거하고, 세척하고 물에서 균질화했다. 균질액은 파편을 제거한 후 물에 투석하고 투석된 추출물은 SEM을 위해 동결 건조하고 TEM에 직접 사용하였다. 패널 A는 나노 섬유들의 나노 섬유 및 나노 필름 구조를 보여준다(화살표 1, 2). 우라닐 아세테이트로 염색한 후, 나노 섬유들은 직경이 5~10nm(패널 B)인 긴(마이크로미터 이상) 구조(화살표 1)처럼 보인다. 이들 섬유는 여전히 용액에서 나선형 구조(화살표 2)를 형성하는 능력을 유지한다. 비교해 보면, 나노 섬유들과 나노 입자들은 서로 다른 구조를 가지고 있다.

도 8은 나노 입자의 안정성에 대한 세제의 효과를 보여준다. 신 체리에서 투석된 추출물을 Triton-X 100 및 나트륨 테옥시콜레이트와 같은 지질 불안정성 세제의 농도가 증가하는 상태에서 6-8 kDa 절단된 투석 백에서 배양하고 pH 4로 조정된 물에 대해 12 시간 동안 투석했다. 투석 백 내부의 폴리페놀의 흡광도는 520nm(벤조 피란) 및 260nm(페놀 고리)에서 측정되었다. 광범위한 투석 후에도 폴리페놀 함량의 손실이 관찰되지 않았기 때문에 세제 처리는 복합체의 파괴를 초래하지 않았다. 나노 입자들에 지질이 구조적 요소/성분으로 포함된 경우 세제 처리로 인해 투석 백에서 투석액으로 폴리페놀이 누출되어 투석 백 내 추출물의 흡광도가 상응하게 감소한다. 260nm에서 Triton-X 100의 흡광도 증가는 용액에서 농도가 증가함에 따라 260nm에서 Triton-X 100의 페닐 모이어티의 흡수로 인해 발생할 수 있다.

도 9는 크기 배제 컬럼(PD 10)을 통과시켜 균질액을 여과한 후 얻은 나노 입자들의 유기 조성을 보여준다. 나노 입자들과 나노 섬유들 모두를 분리하고 동결 건조하여 분말로 만들었다. 분말(400 ug)을 100 ul 피리딘에 용해시키고 100 ul의 BSTFA : TMCS 혼합물(99:1)을 첨가하였다. 용액을 80℃에서 1 시간 동안 배양하였다. GC-MS 분석을 위해 1ul를 직접 주입했다. 유기산 표준 물질(A), 나노 입자(B) 및 나노 섬유들(C)의 비-가수분해 트리메틸실릴화(TMS) 및 말산의 존재를 보여주는 GC-MS를 사용한 이들의 분리를 나타낸다. 비교해 보면, 나노 섬유들과 나노 입자들은 서로 다른 조성을 가진 서로 다른 유형의 구조이며 말산은 공통 성분이다. 하단 패널은 기준 말산 트리메틸 실릴 유도체의 질량 스펙트럼을 보여준다.

도 10은 나노 입자들(도면에서 나노 복합체라고 함) 및 나노 섬유(도면에서 나노 필라멘트라고 함)(상단 패널) 및 당 표준물(하단 패널)에 있는 당의 트리메틸 실릴 유도체를 보여준다. 나노 입자들과 나노 섬유들은 BSTFA로 유도체화되기 전에 트리플루오로 아세트산(TFA)을 사용하여 분해되었다. 나노 입자들의 주요 당은 만노스, 갈락토스/갈락투론산 및 포도당이다. 나노 섬유들은 아라비노스가 풍부하고 소량의 포도당, 갈락토스/갈락투론산이 있다. TFA 소화가 가혹하고 일부 성분을 분해시킬 수 있으므로 양은 상대적이다. 갈락토스와 갈락투론산은 유사한 피크 분포를 제공하므로 피크는 두 화합물을 모두 나타낼 수 있다. 결과는 주로 나노 입자들에서 6 탄당(hexose)이 우세하고 나노 섬유들에서 5 탄당(pentoses)이 우세함을 나타낸다.

도 11은 신 체리 분획물에서 분리하고 쿠마시 블루로 염색한 단백질의 SDS-PAGE 분석을 보여준다. 전체 과일 유래 단백질은 트리폴 추출에 의해 분리되었다. 프로테아제 활성이 억제되는 조건(페놀, 구아니디늄 이소티오시아네이트의 존재에서와 같이)에서는 단백질 분해가 최소화되고 물 첨가 및 상 분리 후 유기상(페놀 : 클로로포름)에 단백질이 존재한다. 1 라인 - 분자 질량 마커; 2 라인 - 전체 과일에서 분리된 단백질; 3 라인 - 물에 있는 과일 균질물로부터의 단백질; 4 라인 - 15000xg에서 원심 분리 후 얻은 세포 파편 주스에서 얻은 단백질; 5 라인 - 15000xg에서 원심 분리 후 얻은 맑은 주스의 단백질; 6 라인 - 시료 완충액에 용해 및 적재된 투석 추출물의 동결 건조 분말; 7 라인 - 유기 상인 트리폴(trizol) 시약을 사용하여 동결 건조된 분말에서 추출한 단백질. 과일에서 물을 추출한 후 주스에는 주로 유기 상에 있는 저분자량 펩티드(25kD)가 포함되어 있다. 투석된

추출물의 동결 건조된 분말(6 라인)은 단백질의 이산(descrete) 밴드를 나타내지 않지만 SDS-PAGE 및 쿠마시-블루 염색 후 시각화 할 때 펩티드의 번짐(6 라인)을 나타낸다. 트리졸 추출 및 물을 이용한 추출물의 상 분리는 이론적으로 단백질이 유기 풍부 상(페놀 : 클로로포름 상)으로 이동해야 한다. 쿠마시브릴리언트블루(coomassie brilliant blue)(7 라인)에서는 염색이 관찰되지 않았으며, 이는 향상된 친수성(탄수화물, 폴리 페놀과의 결합)(7 라인)으로 인해 펩티드가 수상으로 이동했을 수 있음을 시사한다. 동등한 양의 샘플(15 µg 단백질)을 생중량(fresh weight)을 기준으로 각 라인에 적재했다.

도 12는 나노 입자들에서 펩티드의 SDS-PAGE 분석을 보여준다. 추출 및 투석은 폴리 페놀(안토시아닌)의 안정성을 높이기 위해 완충액(구연산 칼륨, 300mM, pH, 6, 균질화 후 최종 pH는 pH 5)과 함께 물에서 수행되었다. 패널 A는 젤이 물에서 10 %(v/v) 아세트산에서 배양될 때 폴리 페놀(안토시아닌)으로 인한 분홍색을 나타내기 위해 염색 전 젤을 보여준다. 패널 B는 펩티드를 나타내기 위해 쿠마시 브릴리언트 블루(coomassie brilliant blue)로 염색한 동일한 젤을 보여준다. 라인 1 - 분자 마커; 라인 2는 시료 완충액에 적재된 투석된 물 추출물의 동결 건조 분말에서 나온 나노 입자들의 폴리 페놀(안토시아닌) 및 폴리펩티드의 연관성을 보여준다. 트리졸(Trizol) 추출 후, 상층 액(수성 상, 라인 3)은 펩티드의 존재와 폴리 페놀(안토시아닌)과의 연관성을 보여준다. 라인 4 - 완충 투석 추출물 분말을 시료 완충액에 적재한다 라인 5, 6 및 7은 트리졸 추출 후 얻은 투석된 추출물 분말의 상등액, 중간상(interphase) 및 유기 상에 해당한다. 대부분의 펩티드와 폴리 페놀(안토시아닌)은 트리졸 추출물의 수성 상(친수성)(라인 5)에 있다는 것에 주목한다. 유기상에 해당하는 라인 7은 안토시아닌 또는 펩티드 염색을 나타내지 않는다. 라인 8, 9 및 10은 대부분의 폴리 페놀(안토시아닌)이 제거된 에탄올 표백된 체리에서 투석된 추출물 분말의 트리졸 추출 후 얻은 상층액, 중간상 및 유기상에 해당한다. 라인 8, 패널 B는 쿠마시 블루로 염색한 것을 보여준다. 표백된 체리 투석 추출물의 중간상 및 유기상은 펩티드에 대해 최소한의 염색을 나타냈다(라인 9, 10; 패널 B). 투석된 추출물 분말의 SDS-PAGE 후 프로피디움 요오드화물 및 쿠마시 브릴리언트 블루 염색의 유사성에 의해 밝혀진, 나노 입자들에서 펩틴과 폴리펩티드의 연관성(패널 C 및 D). 패널 C는 프로피디움 요오드화물(물에 10 µg, 물에 0.2%)을 사용한 염색 패턴을 보여준다. 라인 1은 시판되는 펩틴의 표준 샘플에 해당한다. 라인 2는 투석된 추출물의 투석된 분말을 나타내고; 라인 3은 투석물에 해당하며, 이 분석은 폴리펩티드에 대해 상대적으로 더 강한 염색을 나타낸다. 라인 4는 폴리갈락투론산의 표준물에 해당하며, 폴리갈락투론산은 폴리펩티드가 아닌 요오드화 프로피디움으로 염색되는 것을 보여준다. 신 체리 균질물의 젤리 유사 펠렛은 또한 펩틴과 폴리펩티드의 존재를 보여준다(라인 5).

도 13은 나노 섬유들 및 나노 입자들을 포함하는 에탄올 표백 체리 및 표백되지 않은 체리에서 각각 SDS-PAGE 및 구조 특이적 단일 클론 항체(rat IgM, www.Plant Probes.net)로 면역 국소화(immunolocalization) 투석 추출물을 보여준다. 결합된 항체는 알칼리성 포스포타제 접합된 염소-항 랫트 IgG로 검출되었다. 패널 A는 쿠마시 브릴리언트 블루(coomassie brilliant blue)에 의한 나노 섬유들(라인 2) 및 나노 입자들(라인 3)의 폴리펩티드 염색을 보여준다. 표백된 체리의 나노 섬유들은 흡습성이 매우 뛰어나 젤(gel)로 쉽게 되지 않는 젤리가 된다. 패널 B는 호모갈락투로난(올리고 1,4-연결된 갈락투론산 메틸 에스테르; LM 20)에 대한 항체의 반응성을 보여준다. 표백된 체리 투석 추출물은 나노 섬유들에서 노출된 호모 갈락투로난 단위를 나타내는 이 항체에 대한 반응성을 보여준다. 그러나 표백되지 않은 체리(구형 나노 입자 포함)에서 투석된 추출물에 대한 반응성은 훨씬 낮다(패널 B, 라인 3). 이것은 패널 B 아래에 표시된 도트 블롯의 강도에 다시 반영된다. 구형 나노 입자들에서 펩틴 모이어티는 껍질을 형성하고 잠재적으로 펩티드, 헤미 셀룰로스 및 폴리 페놀(안토시아닌)에 의해 가려진다. 이들은 항-호모갈락투로난 항체의 내부 접근을 방해할 수 있다. 나노 섬유에서 펩틴 모이어티는 잠재적으로 노출되어 항-호모갈락투로난 항체와 강력한 상호 작용을 가능하게 한다. 나노 섬유들과 나노 입자들 모두 항-익스텐신(HRGP [Hydroxyproline rich Glycoproteins]의 범위에 의해 운반되는 LM1 에피토프를 인식함)에 대해 약간의 반응성을 보였는데, 이는 과일의 주요 세포벽 단백질인 엑텐신(extensin)(패널 C)이, 온전하지 않을 수 있지만, 엑텐신에서 파생된 펩티드를 포함할 수 있다는 것을 시사한다. 복합체와 섬유 모두에서 항-아라비노갈락탄-단백질(당단백질; LM14 에피토프)(헤미셀룰로오스-단백질)에 대해 매우 강한 반응이 관찰되어, 이것이 나노 입자들 또는 나노 섬유들(패널 D)의 기본 구조의 주요 구성요소일 수 있음을 시사한다. 패널 A 아래의 하단 패널은 항-자일로글루칸에 대한 나노 입자들 및 나노 섬유들의 교차 반응성을 보여준다(LM 15; 자일로글루칸의 XXXG 모티프 인식). 블롯 동안 젤에서 전달된 항체와 분자 사이에는 반응이 없었다. 도트 블롯은 나노 섬유가 항-자일로글루칸에 대해 강한 반응을 보였지만 나노 입자에는 그렇지 않았다.

도 14는 나노 입자(라인 2) 및 나노 섬유(라인 3)의 SDS-PAGE 감소를 보여준다. 각각 100 µg을 10% 젤에 용해시켰다(resolve). (A) 젤 A를 10% 아세트산에서 배양한 후 나중에 쿠마시 브릴리언트 블루(젤 B)로 염색했다. 번호로 강조 표시된 젤 밴드는 LC/MS/MS에 의해 다음과 같이 확인되었다. 밴드 1: PR 단백질 단편; 체리로부터의 글루칸 엔도-1,3-베타-글루코시다제(수탁 번호 P50694); 밴드 2: PR 단백질 단편; 주요 체리 알레르겐

Prua1(수탁 번호 024248); 밴드 3: 밴드 1의 단편 일 가능성이 가장 높다. 패널 B와 C는 각각 베타-글루코시다아제(수탁 번호 P50694) 및 Prua1(수탁 번호 024248)의 아미노산 서열을 보여준다.

도 15는 구조적 유사성을 갖는 여러 성분(하단 패널)과 비교하여 에탄올 표백 및 표백되지 않은 체리(상단 패널)에서 투석된 추출물의 동결 건조된 분말의 FT-IR 스펙트럼을 보여준다. 추출물에 포함된 성분의 복잡한 특성으로 인해, 구조 및 기능성 작용기의 정확한 할당을 얻기가 어렵다. 표준 스펙트럼과의 비교는 OH 스트레칭(탄수화물, 폴리 페놀, 3000-3500 cm^{-1})의 존재와 CH-, COO, CN 등으로 인해 500-2000 cm^{-1} 까지 확장되는 여러 피크의 존재를 시사한다. 진짜(authentic) 펙틴, 단백질, 펩티드 백본(C-N-C-N)과 유사점이 분명하다. BSA와 PGA는 비교를 위해 도면에 표준물로 포함되어 있다.

도 16은 신 체리의 물 추출 후 얻은 투석된 추출물(나노 입자) 및 투석액(펙틴)의 동결 건조 분말의 광각 X-선 회절을 보여준다. 날카로운 피크는 시료 홀더의 편향으로 인해 발생한다. 투석된 추출물과 투석액 분말은 모두 2θ 10° 에서 30° 까지 확장되는 매우 확산된 밴드를 보여 투석된 추출물(DE) 및 투석액(DZ)에 결정 구조가 없음을 나타낸다. 셀룰로스(β -1,4-글루칸)는 세포벽에 결정 구조로 존재하는 유일한 탄수화물이다. 이 결과는 나노 입자들에 주성분인 셀룰로오스 생성물(β -1,4-글루칸 모이어티)이 없음을 시사한다. 펙틴은 시트, 소포 및 필라멘트를 형성할 수 있는 무정형 구조를 가지고 있으며 뚜렷한 날카로운 회절 패턴을 나타내지 않는다.

도 17은 제안된 나노 입자에 대한 구조 모델을 제안하는 결과를 보여준다. 신 체리 균질액에서 TEM으로 관찰된 나노 입자들의 확대도는 패널 A에 제공되고 확대된 영역은 B에 표시된다. 신 체리의 수성 균질액을 4°C에서 15 분 동안 원심 분리(15000xg)하여 과편과 겔 유사 펙틴성 물질을 침전시킨다. 균질물을 세파덱스 G 25(Sephadex G 25, 제의 한계 5kD, 7.5ml 베드 부피, Amersham Biosciences)로 포장된 PD 10 크기 배제 컬럼을 통과시키고 공극 부피 분획물을 수집했다. 나노 입자들을 포함하는 분획물은 투과 전자 현미경으로 검사했다. 도면은 고리 모양의 구조(패널 A, 화살표 1)를 보여주는 내부 코어 주변의 붕괴된 영역을 보여 주며, 펙틴과 단백질을 포함할 가능성이 있는 나선형 필라멘트 구조(패널 A, 화살표 2)로 구성된 전자 밀도가 낮은 영역으로, 때때로 앞에서 본 나선형 조직(화살표 2)에서, 둘러싸여 있다. 이 층 주변에는 필라멘트를 포함하는 아라 비노갈락탄-단백질을 잠재적으로 포함하는 나노 입자들의 외부 부분을 형성하는 약간 더 전자 밀도가 높은 섬유 유사 영역(패널 A, 화살표 3)이 있고, 폴리 페놀(즉, 안토시아닌)을 포함할 수 있다. 패널 B에는 나노 입자들의 확대된 확대도가 표시되어 있다. 나선형 요소는 화살표로 표시된다.

도 18은 나노 입자 용액(NP)을 마우스에 공급한 야생형 및 ETKO 마우스의 체중 변화에 대한 효과를 보여준다. 마우스(6~7 개월령)는 각각 5~6 마리씩 4개의 그룹(야생형 미처리(WT U), 야생형 처리(WT T), 녹아웃 미처리(KO U) 및 녹아웃 처리(KO T))로 나누었다. 처리된 마우스는 133 μg 당량의 용량을 투여받았다. NP 용액/40g 체중/일(100mg 추출물/kg 체중) 주 5 회 위관 영양으로 투여됨. 미처리 마우스는 물을 투여받았다. 실험은 4 주 동안 지속되었다. NP 처리 첫주는 실험군에서 마우스 체중에 영향이 없었지만, 2 주, 3 주 및 4 주 후, NP 처리를 계속하면 ETKO 마우스의 체중 증가가 방지되었다. 미처리 WT와 이러한 특정 용량/조건에서 처리된 WT 사이에 체중 감소에 유의한 변화가 없었지만, 미처리 KO와 처리된 KO 사이의 체중 증가의 감소는 통계적으로 유의했다($P < 0.05$).

도 19는 간에서 트리글리세라이드 수준의 변화에 대한 나노 입자(NP) 처리의 효과를 보여준다. 조직은 실시예 2에 기술된 시험으로부터 유래되었다. 간 조직의 트리글리세라이드 수준은 Wako L- 타입 TG M 분석 키트(Wako Life Sciences, CA, USA)를 사용하여 기술된 절차에 의해 평가되었다. NP 처리를 받은 ETKO 마우스에서 트리글리세라이드 수치가 현저하게 감소했다. 상단 패널은 수컷 및 암컷 마우스 모두에서 얻은 데이터를 보여준다. 하단 패널은 수컷 마우스에서 얻은 데이터를 보여준다. NP 치료에 의한 간에서의 트리글리세라이드 감소는 알라닌 아미노트랜스퍼라제(Alanine aminotransferase) 및 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제(aspartate aminotransferase)와 같은 마커 효소 활성화에 의해 정의된 간 지질 침착 및 관련 병리학적 증상의 예방을 위한 NP 사용을 지지하며, 예를 들어 야생형 마우스 간 구조와 가까운 구조로의 회복(reversion)을 위한 NP 사용을 지지한다. 유사한 비정상성(abnormalities)이 비-알코올성 지방증(steatosis) 및/또는 NASH에서 인간에서도 관찰되며, 이는 본원에 기술된 나노 입자 및/또는 식품 분말이 이러한 질환을 치료 및/또는 개선하기 위한 선택을 제공할 수 있음을 시사한다.

도 20은 실시예 2에 기술된 바와 같이 처리된 마우스로부터의 간 절편의 조직 병리를 보여준다. 냉동 절편을 Oil-red-O 염색(Sigma-Aldrich)으로 염색하여 트리글리세라이드를 포함하는 지질 방울이 적색 방울로 보이도록 만들었다. 상단 2 개 패널/행은 야생형(미처리-상단, 나노 입자 처리됨, 하단) 마우스에서 염색된 간 색선의 이미지를 나타낸다. 적색으로 염색된 영역의 정량화는 대조군 및 처리된 마우스 세트에서 거의 변화를 보이지 않

는다. 각 패널/행은 3 개의 독립적인 마우스의 절편을 나타낸다. 아래 2개 패널/행은 ETKO 미처리(위) 및 NP 처리(아래) 마우스의 간 절편의 모양을 보여준다. 일반적으로 ETKO 마우스의 간 절편은 여러 빈 영역을 보여준다. 이러한 영역은 처리된 ETKO 마우스에서 감소된다. 또한 간 구조는 WT와 유사한 경향이 있다(대조군보다 상대적으로 더 많은 보라색 영역). 오일 레드 염색 영역의 면적은 처리 후 현저하게 감소한다(도면의 하단 패널). 약어: 야생형 미처리(WT-U), 야생형 처리(WT-T), 녹아웃 미처리(KO-U) 및 녹아웃 처리(KO-T). 도면 라벨에 표시된 "SC"는 "신 체리(Sour Cherry)"를 나타낸다.

도 21은 나노 입자(NP) 처리된 마우스와 처리되지 않은 마우스의 혈청 매개 변수를 보여준다. 알부민, 글로불린 및 그 비율에는 큰 변화가 없었다. 혈청의 총 단백질 수준이 약간 감소한 것으로 보인다. 값은 3 개의 독립적인 처리에서 얻은 평균 $\pm$ SEM이다. 약어: 야생형 미처리(WT/U), 야생형 처리(WT/T), 녹아웃 미처리(KO/U) 및 녹아웃 처리(KO/T).

도 22는 대조군 및 NP 처리 마우스의 혈청 생리 기능 마커(ALT, AST, 콜레스테롤 및 CK) 수준의 변화를 보여준다. 분석은 Guelph 대학 실험실 서비스 부서의 병리학 실험실에서 테스트 키트를 사용하여 표준 절차에 따라 수행되었다. 알라닌 아미노트랜스퍼라제(Alanine aminotransferase) 및 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제(aspartate aminotransferase)는 간의 기능 상태를 나타내는 효소이다. 간 기능이 좋지 않거나 간에 염증이 생기면, 이들 효소가 더 많이 혈액으로 분비된다. 비만 마우스에서 NP 처리에 대한 반응으로 ALT와 AST의 수준이 유의하고 실질적으로 감소했다. 이들 효소 수준이 낮은 야생형 마우스에서도 NP 처리는 감소를 산출했다. NP 처리는 비만 마우스의 간 기능을 정상화시키는 것으로 보인다. 혈청 내 콜레스테롤 수치는 야생형 마우스와 비만 마우스 모두에서 NP 처리에 반응하여 감소했다. 높은 크레아틴 키나아제 수치는 근육 손상의 지표이며, NP 처리된 비만 마우스에서 큰 감소를 보였다. 이러한 결과는 NP의 항 염증 기능을 지지한다. 약어: 야생형 미처리(WT/U), 야생형 처리(WT/T), 녹아웃 미처리(KO/U) 및 녹아웃 처리(KO/T).

도 23은 처리되지 않은 마우스와 나노 입자 처리된 마우스의 혈액에서 포도당과 인의 수준을 보여준다. 미처리 야생형과 ETKO 마우스의 혈액에서 인의 수준에는 큰 변화가 없었다. 포도당 수준은 야생형에서 유사했으며 NP 용액 처리 후 비만 마우스에서 감소하는 경향을 보였다.

도 24는 실시예 2에 기술된 나노 입자 용액 처리에 대한 STAT4 유전자 발현의 변화를 평가한 것이다. PCR 산물을 아가로스 겔 상에서 분리하고 밴드를 시각화하기 위해 브롬화 에티디움 염색을 하여 정량화하였다. 미처리 마우스와 처리된 야생형 마우스 사이에 STAT4 수준의 유의미한 변화는 없다. NP 용액을 먹인 ETKO 마우스에서 STAT4 발현이 감소하는 경향이 있다. 이 실험에서 값은 미처리 ETKO 마우스의 수준과 크게 다르지 않았지만 감소 추세가 관찰되었다. 값은 각 그룹의 4~5 마리 마우스에서 평균 $\pm$ SEM이다. STAT4(Signal Transducer and Activator of transcription 4)는 단백질의 STAT 계열의 전사 인자이다. STAT4는 야누스 키나아제에 의해 인산화되어 이합체화를 가능하게 하고 사이토카인 신호 전달 중에 핵으로 전이되고 유전자 발현을 증가시킨다. Stat 4 관련 유전자 발현의 증가는 활성화된 염증 경로의 표시이다.

도 25는 실시예 2에 기술된 나노 입자 용액 처리에 대한 NF- κ B 유전자 발현의 변화 평가를 보여준다. NF- κ B 밴드 강도는 웨스턴 블롯 및 화학 발광 검출에 의해 정량화되었다. NF- κ B의 발현은 비만 마우스에서 상향 조절되어 염증 경로 기능이 증가했음을 시사한다. 나노 입자 용액 처리는 야생형 마우스나 비만 마우스에서 NF- κ B 수준의 유의미한 변화를 가져 오지 않았다. 값은 각 그룹의 4~5 마리 마우스에서 평균 $\pm$ SEM이다. Nuclear Factor- κ B(NF- κ B)는 인터루킨 및 중앙 피사 인자- α 와 같은 사이토카인을 통한 염증 신호 전달의 시작에 관여하는 핵심 단백질이다. 경로는 복잡하며 조건에 따라 전(pro)-염증 및 항(anti)-염증 역할을 모두 가질 수 있다. 감소된 NF- κ B 신호 전달은 감소된 정도의 염증의 표시로 간주된다.

도 26은 실시예 2에 기술된 나노 입자 용액으로 마우스 처리에 대한 반응으로 TNF α 유전자 발현의 변화를 평가한 것이다. PCR 산물을 아가로스 겔 상에서 분리하고 밴드를 시각화하기 위해 브롬화 에티디움 염색을 하여 정량화하였다. 처리되지 않은 마우스와 처리된 야생형 마우스 사이의 TNF α 유전자 발현 수준에는 유의미한 변화가 없다. NP 용액을 먹인 ETKO 마우스에서 TNF α 발현의 현저한 감소가 있다. 값은 각 그룹의 4~5 마리 마우스에서 평균 $\pm$ SEM이다. TNF α 는 자가 면역 활성화뿐만 아니라 감염으로 인한 염증과 관련된 신호 전달 경로에 관여하는 핵심 단백질이다. TNF α 의 하향 조절은 예를 들어 만성 자가 면역 질환을 제어하는 데 일반적으로 바람직하다. TNF α 의 감소는 비만 감소에 바람직하며 이는 신체의 염증 상태와도 관련이 있다.

도 27은 실시예 2에 기술된 바와 같은 나노 입자 용액으로 마우스 처리에 대한 반응으로 IL6 유전자 발현의 변화를 평가한 것이다. 미처리 마우스와 처리된 야생형 마우스 사이에 IL6 수준의 유의미한 변화는 없다. NP 용액을 먹인 ETKO 마우스에서 IL6 발현이 현저히 감소한다. 값은 각 그룹의 4~5 마리 마우스에서 평균 $\pm$ SEM이다.

IL6은 전-염증 및 항-염증 경로를 매개하는 사이토카인이다. IL6의 활성화는 여러 가지 질환을 유발하는 만성 염증 상태의 발달로 이어지는 것으로 알려져 있다. IL6의 하향 조절은 염증과 비만과 같은 만성 질환을 줄이는데 도움이 될 수 있다.

도 28은 실시예 2에 기재된 나노 입자 용액 처리에 대한 FASN 유전자 발현의 변화를 평가한 것이다. PCR 산물을 아가로스 겔 상에서 분리하고 밴드를 시각화하기 위해 브롬화 에티디움 염색을 하여 정량화하였다. NP-처리된 야생형 마우스에서 FAS 수준의 현저한 감소가 있었다. NP 용액을 먹인 ETKO 마우스에서 FAS 발현이 감소하는 경향이 있었다. 값은 이 실험에서 미처리 ETKO 마우스의 수치와 크게 다르지 않았다. 값은 각 그룹의 4~5 마리 마우스에서 평균 $\pm$ SEM이다. FAS(Fatty Acid Synthase)는 지방산의 생합성에 관여하는 효소이다. 지방산은 트리글리세라이드로 전환되며, 지방산 수치가 증가하면 지방 축적이 일어나 비만으로 이어질 수 있다. 따라서, 이 효소 수준의 감소는 감소된 트리글리세라이드 생합성 및 침착(deposition)에 유리할 수 있다;

도 29는 실시예 2에 기재된 나노 입자 용액 처리에 대한 ATGL 유전자 발현의 변화를 평가한 것이다. PCR 산물을 아가로스 겔 상에서 분리하고 밴드를 시각화하기 위해 브롬화 에티디움 염색을 하여 정량화하였다. 대조군과 NP-처리된 야생형 마우스 사이의 ATGL 수준에는 유의미한 차이가 없었다. 유사하게 ATGL 발현 수준은 미처리 마우스와 NP-처리 ETKO 마우스에서 동일했다. 값은 각 그룹에서 4~5 마리 마우스의 평균 $\pm$ SEM이다. ATGL(Adipose Triglyceride Lipase)은 지방산으로의 트리글리 세라이드 이화 작용을 시작하는 데 관여하는 효소이다. ATGL 기능은 잠재적으로 대사 증후군의 발생에 관여한다.

도 30은 실시예 2에 기재된 나노 입자 용액 처리에 대한 HSL 유전자 발현의 변화를 평가한 것이다. PCR 산물을 아가로스 겔 상에서 분리하고 밴드를 시각화하기 위해 브롬화 에티디움 염색을 하여 정량화하였다. 대조군과 NP-처리된 야생형 마우스 사이에 HSL 전사체 수준이 유의하게 증가했다. HSL 발현 수준은 미처리 마우스와 NP-처리된 ETKO 마우스에서 동일했다. 값은 각 그룹의 4~5 마리 마우스에서 평균 $\pm$ SEM이다. HSL(Hormone Sensitive Lipase)은 지방 조직에서 트리글리세라이드의 가수 분해에 관여하는 주요 효소이며 에너지 생성에 관여하는 주요 효소이다. HSL은 ATGL과 함께 작용하여 트리글리세라이드에서 유리 지방산을 방출한다. 효소는 일반적으로 단식 중에 에너지가 필요할 때 카테콜아민에 대한 반응으로 활성화되므로, 저장된 지질을 동원하는 기능을 한다. 또한 스테로이드 생합성에서 콜레스테롤 에스테르로부터 지방산을 방출한다.

도 31은 실시예 2에 기재된 나노 입자 용액 처리에 대한 반응으로 LPL 유전자 발현의 변화를 평가한 것이다. PCR 산물을 아가로스 겔 상에서 분리하고 밴드를 시각화하기 위해 브롬화 에티디움 염색을 하여 정량화하였다. 야생형 마우스에서 NP 처리에 대한 LPL 전사체 수준의 변화는 없었다. 대조적으로, NP-처리된 ETKO 마우스에서 LPL 발현 수준이 현저히 감소하였다. 값은 각 그룹의 4~5 마리 마우스에서의 평균 $\pm$ SEM이다. LPL(Lipoprotein lipase)은 지질 단백질에 결합된 트리글리세라이드를 가수 분해하여 유리 지방산과 모노아실글리세롤을 방출하는 효소이다. LPL은 체장 및 간 리파아제와 같은 다른 리파아제와 유사하다. LPL은 심장, 근육 및 지방 조직과 같은 여러 조직에 존재하며 모세 혈관의 내강(lumen)에 가까운 세포층에 존재한다. LPL은 모세 혈관의 지질 단백질 대사에 영향을 미칠 수 있다. LPL 활성화는 인슐린과 아드레날린과 같은 호르몬에 의해 별도로(differentially) 조절된다. LPL 수준은 고지방 식이 요법이나 고탄수화물 식이 후에 증가하는 것으로 알려져 있으며 비만의 발달에 작용할 수 있다.

도 32는 실시예 2에 기재된 나노 입자 용액 처리에 대한 PGC1- α 유전자 발현의 변화를 평가한 것이다. PCR 산물을 아가로스 겔 상에서 분리하고 밴드를 시각화하기 위해 브롬화 에티디움 염색을 하여 정량화하였다. 야생형 마우스에서 NP 처리에 대한 반응으로 PGC1-Alpha 전사체의 수준에는 변화가 없다. 대조적으로, NP-처리된 ETKO 마우스에서 PGC1-Alpha 발현 수준이 현저하게 감소하였다. 값은 각 그룹의 4~5 마리 마우스에서 평균 $\pm$ SEM이다. PGC1- α (Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator)는 탄수화물 및 지질과 관련된 에너지 대사 조절에 관여하는 전사 공동 활성화제(co-activator) 계열에 속한다. PGC1-A는 스트레스 조건에서 활성화된다. 이 단백질은 또한 염증 경로를 향상시키는 데 관여하는 NF- κ B를 활성화시키는 것으로 알려져 있다. 따라서 PGC1-A 수준의 감소는 염증을 감소시킬 수 있다.

도 33은 실시예 2에 기재된 나노 입자 용액 처리에 따른 PPAR- α 유전자 발현의 변화를 평가한 것이다. PCR 산물을 아가로스 겔 상에서 분리하고 밴드를 시각화하기 위해 브롬화 에티디움 염색을 하여 정량화하였다. 야생형 마우스 및 ETKO 비만 마우스에서 NP 처리에 대한 반응으로 PPAR- α 전사체의 수준에는 변화가 없었다. 값은 각 그룹의 4~5 마리 마우스의 평균 $\pm$ SEM이다. PPAR- α (Peroxisome Proliferator Activated Receptor-Alpha)는 핵 국소 전사 인자 그룹에 속한다. PPAR-Alpha는 지방산 흡수, 수송 및 이화 작용에 관여하는 유전자의 자극을 포함하여 간에서 지질 대사에 중요한 조절 기능을 가지고 있다.

도 34는 실시예 2에 기재된 나노 입자 용액 처리에 대한 PPAR- γ 유전자 발현의 변화를 평가한 것이다. PCR 산물을 아가로스 겔 상에서 분리하고 밴드를 시각화하기 위해 브롬화 에티디움 염색을 하여 정량화하였다. NP 처리 야생형 마우스에서 PPAR-감마 전사체의 유의한 감소가 있다. NP 처리 후 비만 마우스에서 PPAR 감마 수준에 큰 변화가 없었다. 값은 각 그룹의 4~5 마우스에서 평균 $\pm$ SEM이다. PPAR- 감마(Peroxisome Proliferator Activated Receptor-gamma)는 핵에 위치한 또 다른 전사 인자이다. 이 단백질은 지방 세포의 증식에 관여하여 비만 발달을 촉진한다. PPAR 감마는 지방 조직과 근육에서 더 낮은 수준으로 표현된다. PPAR 감마는 비만과 제2형 당뇨병 발병에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.

도 35는 실시예 2에 기술된 나노 입자 용액 처리에 대한 CTL1 유전자 발현의 변화를 평가한 것이다. PCR 산물을 아가로스 겔 상에서 분리하고 밴드를 시각화하기 위해 브롬화 에티디움 염색을 하여 정량화하였다. 야생형 마우스에서 NP 처리에 대한 CTL-1 전 사체 수준의 변화는 없다. 대조적으로, NP-처리된 ETKO 마우스에서 CTL1 발현 수준이 현저하게 감소했다. 값은 각 그룹의 4~5 마리 마우스에서 평균 $\pm$ SEM이다. CTL-1(Choline Transporter Like Protein 1)은 막 결합 효소로, 뇌 세포의 원형질막과 미토콘드리아에서 발견된다. 그것은 포스파티딜콜린 생합성 및 막 생합성에 사용되는 미토콘드리아에서 콜린의 수송에 관여한다. 염증에 의한 대식세포의 증가된 생산은 CTL-1의 과발현을 초래했으며 염증 증가와 관련이 있는 것으로 보인다. 높은 수준의 막 생합성 감소는 세포의 확대 및 비만 관련 변화를 줄이는 데 도움이 될 수 있다.

도 36은 실시예 2에 기술된 나노 입자 용액 처리에 대한 PSS 2 유전자 발현의 변화를 평가한 것이다. PCR 산물을 아가로스 겔 상에서 분리하고 밴드를 시각화하기 위해 브롬화 에티디움 염색을 하여 정량화하였다. 야생형 마우스에서 NP 처리에 대한 반응으로 PSS 2 전사체의 수준에는 변화가 없었다; 그러나 ETKO 마우스에서 낮지만 상당한 감소를 보였다. 값은 각 그룹의 4~5 마리 마우스에서 평균 $\pm$ SEM이다. PSS 2(CDP-diacylglycerol-serine O-phosphatidyltransferase 2; phosphatidylserine synthase 2)는 포스파티딜세린 생합성에 관여하는 효소이다. 이 단백질은 미토콘드리아에 국소적으로 있다. PSS 2 녹아웃 마우스는 정상적인 수명을 나타냈다. 결과는 나노 입자 용액 처리의 효과가 지질 생합성에 관여하는 경로에 관련된 모든 유전자가 아닌 특정 유전자를 표적으로 할 수 있음을 시사한다.

도 37은 2개의 독립적인 나노 섬유 제조에서 얻은 나노 섬유의 투과 전자 현미경 사진(TEM)을 도시한다. 왼쪽 패널은 동결 건조(냉동 건조)를 사용하여 에탄올 표백 신 체리에서 분리된 나노 섬유를 보여준다. 오른쪽 패널은 나노-분무 건조로 분리된 나노 섬유를 보여준다.

도 38은 철과 나노 섬유 복합체를 보여준다. 나노 섬유 제조물(2mg)을 물 2ml에 용해시키고 1mM 염화철과 혼합하였다. 상기 용액을 2 시간 동안 배양하고 물(2X)에 대해 밤새 투석하여 결합되지 않은 철을 제거하였다. 투석된 용액은 중금속 염색 없이(즉, 일반적으로 대비를 높이기 위해 사용되는 우라닐 아세테이트로 염색하지 않고) 전자 현미경으로 검사되었다. 나노 섬유 복합체는 (우라닐 아세테이트 대신) 철로 염색되어 나노 섬유가 철의 운반체로 사용될 가능성을 보여주었다.

도 39는 칼세인-적재 나노 섬유(calcein-loaded nanofibres)가 포유류 세포로 흡수되는 것을 보여준다(칼세인-나노 섬유 부가물). 칼세인(Ex 494 nm/Em 517 nm) 자체는 막에 대해 불투과성이며, 세포내 이입(endocytosis)에 의해 낮은 수준으로 흡수될 수 있다(A, C). 에탄올 표백 체리는 1mg/g 신선(fresh) 당량의 칼세인을 포함하는 물에서 균질화되었고, 상청액은 물에 대해 투석되었다. 나노 섬유와 복합된 칼세인은 투석 백 내에 유지되며 공-초점 현미경을 이용한 흡수 측정에 사용된다. 칼세인 단독 섭취는 HT 29 세포(왼쪽 상단 패널)와 정상 장 세포(왼쪽 하단 패널) 모두에서 비교적 매우 낮았다(패널 A 및 C). 칼세인-적재 나노 섬유는 대장 암 세포주 HT 29(오른쪽 상단, B) 및 정상 인간 장 CRL 1790(오른쪽 하단, D) 세포에서 분리된 구획으로 들어간다. (크기 막대-10 μ m). 패널 B와 D는 두 가지 유형의 세포에 나노 섬유-칼세인 복합체의 향상된 흡수를 보여준다.

도 40은 표백되지 않은 신 체리에서 분리된 나노 입자(A, C, E)와 에탄올 표백된 신 체리에서 분리된 나노 섬유(B, D, F)가 인간 세포(HT-29, CRL 2158, CRL1790)로 흡수되는 것을 보여준다. 나노 입자와 나노 섬유를 Dylight 650과 화학적으로 접합하고(conjugate), 물에 대해 강하게 투석하여(3x) 결합되지 않은 염료를 제거했다. Dylight는 일반적으로 항체의 아미노 그룹을 표지하는 데 사용되며 제공된 SOP 시트(Thermofisher)에 자세히 설명된 것과 유사한 방법을 사용하여 나노 입자 및 나노 섬유에 접합되었다. 요컨대, Dylight는 안정적인 공유 아미드 결합을 형성하는, 1 차 아민과 반응하는, N-히드록시숙시이미드(N-hydroxysuccinimide) 에스테르로 활성화되었다. 크기 배제 컬럼을 이용하여 Dylight와 결합된 나노 입자 및 나노 섬유를 제거하였다. 접합된 생성물은 빛으로부터 보호되는, -20°C의 어두운 곳에 보관되었다. 세포를 심고 48 시간 동안 성장시켰다. 접합된 나노 입자 및 나노 섬유(3ml 배양 배지에서 약 5 μ M Dylight 등가물)를 배지에 첨가하고 세포를 추가로 24 시간

동안 배양하였다. 세포를 페트리 플레이트(직경 3.5cm)에 유지하고 공초점 현미경(Leica)으로 633 nm에서의 여기와 680 nm에서 모니터링된 방출을 관찰했다. 패널 A 및 B는 각각 HT 29 세포(결장 직장암 세포주)에 의한 Dylight 접합 나노 입자 및 나노 섬유 흡수를 보여주고; 패널 C 및 D는 각각 CRL 2158 세포(MDR 결장 직장 세포주)에 의한 Dylight 접합 나노 입자 및 나노 섬유의 흡수를 보여주고; 그리고 패널 E 및 F는 각각 CRL 1790 세포(정상 인간 장 세포)에 의한 접합된 나노 입자의 흡수를 각각 보여준다. 패널의 삽입도는 세포의 확대된 복합 이미지이다. (크기 막대-10 μm).

도 41은 인간 대장 암 세포(HT 29)에 대한 나노 섬유-파클리탁셀(Nanofibre-Paclitaxel)의 세포 독성을 보여준다. 공초점 현미경으로 시각화된 HT 29 결장 직장암 세포의 생-사(Live-Dead) 세포 분석이 도시된다. 분석 키트(Invitrogen)에는 두 가지 형광 염료인, 칼세인 AM 에스테르(Ex 494 nm, Em 517 nm)가 포함되어 있으며, 이 염료는 살아있는 세포에 특이적으로 들어가, 탈-에스테르화되고 살아있는 세포를 녹색으로 염색한다. 죽어가는 세포와 죽은 세포는 막이 손상되어(누출된 원형질막) 에티디움 동종이량체(Ex 517 nm / Em 617)의 진입을 허용하여, 핵을 적색으로 염색한다. 세포는 살아있는 세포를 분화시킨 517 nm(녹색 채널)에서 관찰되었고 죽은 세포를 시각화할 수 있는 617 nm에서 관찰되었다. 두 파장의 합성 이미지는 세포 생존력(A, D, G; 노란색)의 상실로 전환되는 세포를 보여준다. 패널 B, C는 각각 617 nm(적색, 죽은 세포) 및 517 nm(녹색, 살아있는 세포)에서 시각화된 대조군 세포를 나타낸다. 패널 A는 처리되지 않은 세포의 합성 이미지이다. 패널 E, F는 각각 두 파장 617 및 517 nm에서 기록된 파클리탁셀(32 nM)로 처리된 세포의 이미지를 나타낸다. 패널 D는 합성 이미지이다. 패널 H와 I는 파클리탁셀 + 나노 섬유(32 nM + 4 $\mu\text{g/ml}$ 나노 섬유)로 처리된 세포를 보여준다. 패널 G는 빨간색과 녹색 이미지의 합성물이다.

도 42는 인간 대장 MDR 암 세포(CRL 2158)에 대한 나노 섬유-파클리탁셀의 세포 독성을 보여준다. 공초점 현미경으로 시각화한 CRL 2158 다중 약물 내성 결장암 세포의 생-사 세포 분석이 표시된다. 분석 키트(Invitrogen)에는 두 가지 형광 염료인, 칼세인 AM 에스테르 (Ex 494 nm, Em 517 nm)가 포함되어 있고, 이 염료는 살아있는 세포에 특이적으로 들어가 탈-에스테르화되고 살아있는 세포를 녹색으로 염색한다. 죽어가는 세포와 죽은 세포는 막이 손상되어(누출된 원형질막) 에티디움 동종이량체(Ex 517 nm / Em 617)의 진입을 허용하여 핵을 적색으로 염색한다. 세포는 살아있는 세포를 분화시킨 517 nm(녹색 채널)에서 관찰되었고 죽은 세포를 시각화할 수 있는 617 nm에서 관찰되었다. 두 파장의 합성 이미지는 세포 생존력(A, D, G; 노란색)의 상실로 전환되는 세포를 보여준다. 패널 B, C는 각각 617 nm(적색, 죽은 세포) 및 517 nm(녹색, 살아있는 세포)에서 시각화된 대조군 세포를 나타낸다. 패널 A는 처리되지 않은 세포의 합성 이미지이다. 패널 E, F는 각각 두 파장 617 및 517 nm에서 기록된 파클리탁셀(32 nM)로 처리된 세포의 이미지를 나타낸다. 패널 D는 합성 이미지이다. 패널 H와 I는 파클리탁셀 + 나노 섬유(32 nM + 4 $\mu\text{g/ml}$ 나노 섬유)로 처리된 세포를 보여준다. 패널 G는 빨간색과 녹색 이미지의 합성물이다.

도 43은 정상 인간 장 세포(CRL 1790)에 대한 나노 섬유-파클리탁셀의 세포 독성을 보여준다. 공초점 현미경으로 시각화된 CRL 1790 인간 장 정상 상피 세포의 생-사 세포 분석이 표시된다. 분석 키트(Invitrogen)에는 두 가지 형광 염료인, 칼세인 AM 에스테르(Ex 494 nm, Em 517 nm)가 포함되어 있고, 이 염료는 살아있는 세포에 특이적으로 들어가 탈 에스테르화되고 살아있는 세포를 녹색으로 염색한다. 죽어가는 세포와 죽은 세포는 막이 손상되어(누출된 원형질막) 에티디움 동종이량체(Ex 517 nm / Em 617)의 진입을 허용하여 핵을 적색으로 염색한다. 세포는 살아있는 세포를 분화시킨 517 nm(녹색 채널)에서 관찰되었고 죽은 세포를 시각화할 수 있는 617 nm에서 관찰되었다. 두 파장의 합성 이미지는 세포 생존력(A, D, G; 노란색)의 상실로 전환되는 세포를 보여준다. 패널 B, C는 각각 617 nm(적색, 죽은 세포) 및 517 nm(녹색, 살아있는 세포)에서 시각화된 대조군 세포를 나타낸다. 패널 A는 처리되지 않은 세포의 합성 이미지이다. 패널 E, F는 각각 두 파장 617 및 517 nm에서 기록된 파클리탁셀(32 nM)로 처리된 세포의 이미지를 나타낸다. 패널 D는 합성 이미지이다. 패널 H와 I는 파클리탁셀 + 나노 섬유(32 nM + 4 $\mu\text{g/ml}$ 나노 섬유)로 처리된 세포를 보여준다. 패널 G는 빨간색과 녹색 이미지의 합성물이다.

도 44는 신 체리, 브로콜리 및 기타 식품 성분으로 제조된 식품 분말의 주사 전자 현미경 사진을 보여준다. 식품 분말은 실시예 4에 기술된 바와 같이 개별 성분의 균질화된 용액의 혼합물을 혼합하고 혼합된 혼합물의 나노 분무 건조를 통해 제조되었다.

도 45는 초 구조적 특성을 나타내는 식품 분말 수용액의 투과 전자 현미경 사진을 보여준다. 식품 분말은 단단히 감긴 섬유 구조의 구형 덩어리에 직사각형 모양으로 나타난다(A로 표시된 화살표 참조). 상기 구조는 신 체리 나노 입자에서 관찰되는 구조적 조직이 없는 나노 입자와 유사하다(도 17 참조). 그러나 구형(spherical) 코어(화살표 B로 표시)와 유사한 구상(globular) 구조는 그로부터 나오는 섬유 구조와 함께 관찰될 수 있다. 나선

형으로 조직된 구조(화살표 C)는 나노 입자에서 관찰되는 나선형 섬유와 유사하다. 50 마이크로리터 분취량의 식품 분말 현탁액을 유리 슬라이드 위에 놓고, 탄소 코팅된 그리드를 코팅된 면이 아래로 향하게 하여 30초 동안 용액 위에 부유시켰다. 그리드를 가장자리에서 건조하고 0.1 % 우라닐 아세테이트 용액으로 염색했다. 사진은 훨씬 더 작은 나노 입자로 용해되는 식품 분말 입자의 거대 응집체를 보여준다(화살표 A로 표시). B로 표시된 화살표는 풀린 섬유가 있는 나노 입자의 코어를 보여준다. 와인딩 섬유의 나선형 특성은 화살표 C로 표시되는 것처럼 볼 수 있다.

도 46은 식품 분말의 항산화력 평가를 보여준다. 분말을 물에 용해시키고 용액의 DPPH 라디칼 소거능을 폴리 페놀 당량(폴린-시오칼도 시약으로 평가)으로 마이크로 그램 단위로 평가하여 용액의 항산화력을 측정했다. 0.1mM Folin-Ciocalteu 시약을 메탄올에 준비하고, 식품 분말 용액을 특정 양으로 첨가했다. 항산화제를 DPPH 시약 1ml와 반응시키고 흡광도(보라색, 517nm 흡수)를 모니터링했다. 517 nm 흡광도의 감소는 폴리 페놀이 없는 대조군과 비교하여 % 소강(quenching)으로 표시되었다. 트로록스(Trolox)는 폴리 페놀과 동일한 농도에서 양성 대조군으로 사용되었으며 TEAC 값 1을 나타냈다. 농도의 각 점은 준비된 식품 분말의 개별 샘플을 나타낸다.

도 47은 식품 분말 및 물로 처리된 야생형(WT) 및 에탄올 아민 녹아웃 마우스(KO)의 체질량 변화 평가를 보여준다. 실험은 24 주령 Pcyt2 녹아웃 마우스(KO) 및 한배 대조군(littermate controls)으로 수행되었다. 처리되지 않은(U) 그룹의 KO 및 야생형 마우스(각각 n = 4-6)는 처리 시점에 위관 영양법으로 100uL의 물을 제공 받았다. 처리된(T) 그룹의 KO 및 야생형(WT) 마우스(각각 n = 4-6)에 100 ug의 식품 분말(100uL 물에서)을 주 5 회 투여하였다. 모든 그룹의 구강 위관 영양은 8 주 동안 지속되었다. 처리 기간이 끝날 때 마우스를 희생시키고 분석을 위해 혈액 및 조직 샘플을 수집했다. 별은 상당히 다른 값을 나타낸다(*-P <0.05; **-P <0.01).

도 48은 간에서 트리글리세라이드 수치의 변화에 대한 식품 분말 처리의 효과를 보여준다. 조직은 실시예 4에 기술된 시험으로부터 유래되었다. 간 조직의 트리글리세라이드 수준은 Wako L- 타입 TG M 분석 키트(Wako Life Sciences, CA, USA)를 사용하여 기술된 절차에 의해 평가되었다. 식품 분말 처리를 받은 야생형 마우스와 ETKO 마우스 모두에서 트리글리세라이드 수준의 현저한 감소는 없다. 값은 세 개의 개별 샘플에서 얻은 평균 $\pm$ SEM이다. 식품 분말 처리된 비만 마우스에서 트리글리세라이드 감소 경향이 있는 것으로 보인다. 식품 분말 처리에 의한 간 트리글리세라이드 감소는 대사 증후군을 나타내는 개인에게 유익할 수 있다. 약어: 야생형 미처리 (WT/U), 야생형 처리 (WT/T), 녹아웃 미처리 (KO/U) 및 녹아웃 처리 (KO/T).

도 49는 식품 분말 처리, 및 미처리 야생형 및 ETKO 마우스의 혈청 매개 변수를 나타낸다. 알부민, 글로불린 및 그 비율에는 큰 변화가 없었다. 총 단백질은 대조군과 치료군간에 유의한 차이가 없었다. 값은 3개의 독립적인 처리에서 얻은 평균 $\pm$ SEM이다. 약어: 야생형 미처리 (WT/U), 야생형 처리 (WT/T), 녹아웃 미처리 (KO/U) 및 녹아웃 처리 (KO/T).

도 50은 식품 분말 처리, 및 미처리 야생형 및 ETKO 마우스의 혈청 매개 변수를 나타낸다. 포도당, 인 및 요소 수준에는 큰 변화가 없다. 식품 분말로 처리 한 비만 마우스의 트리글리세라이드 수치가 약간 감소한 것으로 보인다. 값은 3 개의 개별 샘플의 평균 $\pm$ SEM이다. 약어: 야생형 미처리 (WT/U), 야생형 처리 (WT/T), 녹아웃 미처리 (KO/U) 및 녹아웃 처리 (KO/T).

도 51은 식품 분말로 처리된 야생형 및 ETKO 마우스에서 케모카인(chemotactic cytokines)의 전사체 수준의 변화를 보여준다. CCL 유형 케모카인은 활성화된 T 세포에 의해 분비되는 작은 당 단백질로서, 단핵구(monocytes)를 염증 부위로 끌어 당긴다. CCL1(C-C 모티프 케모카인 리간드 1)과 그 패밀리 멤버(CCL2, CCL3, CCL5...)은 염증 과정에 관여한다. 식품 분말 처리에 대한 반응으로 야생형 마우스에서 CCL2 및 CCL 5의 현저한 감소가 관찰되었다. ETKO 마우스에서 식품 분말 처리 후 이러한 케모카인의 감소를 보여주는 경향이 있지만 이 테스트에서는 크게 다르지 않다. 데이터는 세 개의 개별 마우스의 샘플에서 전사체 수준의 평균 $\pm$ SEM이다. CCL1은 CCR8에 결합하여 작용한다. CCL2(Monocyte Chemoattractant Protein 1; MCP1)는 또한 단핵구를 염증 부위로 끌어 당기는 데 관여하며 수용체 CCR2 및 CCR4에 결합한다. CCL3(Macrophage inflammatory protein -Alpha; MIP1- α)는 급성 염증과 백혈구의 유인에 관여한다. 그것은 수용체 CCR1, CCR4 및 CCR 5에 결합한다. CCL5는 CCR5 표면 수용체에 결합하고 염증 및 암 진행에 관여한다. 약어: 야생형 미처리 (WT/U), 야생형 처리 (WT/T), 녹아웃 미처리 (KO/U) 및 녹아웃 처리 (KO/T).

도 52는 식품 분말로 처리된 야생형 및 ETKO 마우스에서 케모카인(chemotactic cytokines)의 전사체 수준의 변화를 보여준다. CCL 유형 케모카인은 활성화된 T 세포에 의해 분비되는 작은 당 단백질로 단핵구를 염증 부위로 끌어 당긴다. 도면은 CCL6, CCL7, CCL17 및 CCL19의 전사체 수준 변화를 보여준다. CCL6은 설치류에게 고유하며 작용하는 동안 CCR 1에 결합할 수 있다. CCL6은 골수 세포 분화 동안 대식세포에서 발현된다. 식품 분말 처리에

대한 반응으로 야생형 마우스에서 CCL6, CCL 7 및 CCL17의 현저한 감소가 관찰되었다. ETKO 마우스에서 CCL7의 현저한 감소가 관찰되었다. CCL 19는 야생형 및 ETKO 마우스 모두에서 전사체의 변화를 나타내지 않았다. 데이터는 세 개의 개별 마우스의 샘플에서 전사 수준의 평균 $\pm$ SEM이다. CCL6은 CCR1에 결합하여 작용한다. CCL7은 또한 단핵구를 염증 부위로 끌어 당기는 데 관여하고 CCR2 수용체에 결합한다. CCL7 발현의 비정상적인 수준은 종양 형성 및 MMP-2 활성화 및 전이와 관련이 있다. 따라서 CCL7의 하향 조절은 암 예방에 매우 유익할 가능성이 높다. CCL17은 림프구의 화학 유인에 관여하며 죽상 경화증(atherosclerosis) 및 염증성 장 질환과 같은 염증성 질환의 유도에 관여한다. CCL19는 림프구 재순환에 관여한다. 약어: 야생형 미처리 (WT/U), 야생형 처리 (WT/T), 녹아웃 미처리 (KO/U) 및 녹아웃 처리 (KO/T).

도 53은 식품 분말로 처리된 야생형 및 ETKO 마우스에서 CCL22 케모카인(chemotactic cytokines)의 전사체 수준의 변화를 보여준다. CCL22는 종양과 종양이 T 세포에 침투하여 생성되어, 종양에 의한 면역 억제 및 면역 세포 회피를 유발하여, 종양 진행을 돕는다. 면역 세포에서 CCL22 과-발현은 인터루킨-알파(Interleukin- α)에 의해 발생한다. 식품 분말 처리에 대한 반응으로 야생형 및 ETKO 마우스 모두에서 CCL22 수준의 변화는 없었다. 데이터는 세 개의 개별 마우스의 샘플에서 전사 수준의 평균 $\pm$ SEM이다. 약어: 야생형 미처리 (WT/U), 야생형 처리 (WT/T), 녹아웃 미처리 (KO/U) 및 녹아웃 처리 (KO/T).

도 54는 식품 분말로 처리된 야생형 및 ETKO 마우스에서 CCR 유형 수용체의 전사체 수준의 변화의 평가를 보여준다. CCR 패밀리의 케모카인 수용체는 호산구(eosinophils), 호염기구(basophils), 림프구, 대식세포 및 수지상 세포와 같은 혈액 세포에서 발현되며, 발현/활성의 향상은 염증 증가와 관련이 있다. CCR이 리간드 케모카인(CCL 패밀리에) 결합할 때 많은 신호 전달 경로가 활성화된다. 식품 분말 처리는 야생형 및 ETKO 마우스 모두에서 CCR1 및 CCR6의 발현 수준을 변경하지 않았다. 야생형 마우스의 CCR2 및 CCR 8은 식품 분말 처리에 대한 반응으로 상당한 하향 조절을 보였으며, 이는 식품 분말이 CCR을 유발하는 염증 수준을 하향 조절할 수 있음을 시사한다. 또한 식품 분말을 먹인 ETKO 마우스에서 CCR8의 유의 한 하향 조절이 있었다. 따라서 식품 분말 처리에 대한 반응으로 케모카인 수치와 수용체 모두의 감소가 발생하는 것으로 보인다. 데이터는 세 개의 개별 마우스의 샘플에서 전사 수준의 평균 $\pm$ SEM이다. 약어: 야생형 미처리 (WT/U), 야생형 처리 (WT/T), 녹아웃 미처리 (KO/U) 및 녹아웃 처리 (KO/T).

도 55는 식품 분말로 처리된 야생형 및 ETKO 마우스에서 CSF(Colony stimulating factor)의 전사체 수준의 변화 평가를 보여준다. CSF는 과립구(granulocytes)/대식세포(GM-CSF), 대식세포(M-CSF) 및 과립구(G-CSF)에 의해 생성되는 사이토카인이다. 발현/활성의 향상은 염증 증가와 관련이 있으며, 하향 조절은 염증 및 자가 면역 질환을 줄이는 데 도움이 된다. CSF 수준은 야생형 마우스와 식품 분말 처리된 마우스에서 유사했다. CSF3는 ETKO 마우스에서 상향 조절되었으며, 이는 비만의 발전과 잠재적인 연관성이 있다. 식품 분말로 처리하면 CSF 수준이 야생형 마우스에서 관찰된 수준에 가까워졌다. 케모카인 수치와 수용체 모두의 감소는 식품 분말 처리에 대한 반응으로 발생하는 것으로 보인다. CD40LG는 면역 세포 표면에 국한된 CD40 단백질의 리간드이며, 이 단백질의 발현 증가는 여러 암 발병과 관련하여 염증 증가와 관련이 있다. 혈관 내피에서 혈소판에 의한 CD40 리간드 분비의 증가는 플라크 세포의 형성과 동맥의 막힘을 유도하는 ROS의 생성을 증가시키는 것으로 보인다. 식품 분말로 처리된 마우스에서 CD40 리간드의 발현이 현저하게 감소하여 그 수준이 야생형에 가깝게 되었다. 데이터는 세 개의 개별 마우스의 샘플에서 전사 수준의 평균 $\pm$ SEM이다. 약어: 야생형 미처리 (WT/U), 야생형 처리 (WT/T), 녹아웃 미처리 (KO/U) 및 녹아웃 처리 (KO/T).

도 56은 야생형 및 ETKO 마우스에서 식품 분말 처리에 대한 CXCL 모티프 케모카인의 변화 평가를 보여준다. CXCL1 유형 케모카인: CXCL 케모카인은 면역원성 세포 표면의 CXCR 유형 수용체에 결합하여 그 작용을 유도한다. CXCL1(CXCL 모티프 리간드 1) 및 그 수용체 CXCR-2를 통한 작용은 염증에 중요한 역할을 한다. CXCL 1은 야생형 마우스에서 현저하게 하향 조절된 반면, ETKO 마우스는 식품 분말 처리에 대한 반응에서 유의한 변화를 나타내지 않았다. CXCL 10 및 그 수용체 CXCR3는 기관 특정 질환(organ specific diseases)(제1형 당뇨병), 및 류마티스 관절염과 같은 전신 자가 면역 질환을 포함하여 자가 면역 질환 발생 중에 발생하는 병리와 관련이 있다. 인터페론과 TNF는 CXCL10의 생성을 활성화시켜 TH1 림프구를 활성화시킨다. CXCL 10은 야생형 마우스에서 현저하게 하향 조절된 반면, ETKO 마우스는 음식 처리에 대한 반응에서 어떠한 변화도 보이지 않았다. CXCL-12(CXCL-motif ligand -12, stromal cell-derived factor 1 또는 SDF 1)는 수용체 CXCR-R 4에 결합하는 케모카인이다. CXCL-12는 다양한 조직에서 발현되며 발달에 중요하다. CXCL-12의 과발현은 염증을 유발하고 백혈구에 대해 높은 화학 주성(chemotactic)(신경염증)이다. CXCL 12는 체장암, 다발성 경화증, 알츠하이머 병 등에 대한 임상 마커이다. CXCL-12는 식품 분말 처리에 대한 반응으로 야생형 마우스에서 하향 조절되었다. 데이터는 3개의 개별 마우스의 샘플에서 전사 수준의 평균 $\pm$ SEM이다.

도 57은 CXC-리간드 전사 수준에 대한 식품 처리 효과의 평가를 보여준다. CXCL-5는 인터루킨과 TNF 알파에 의해 자극된 염증 동안 생성된다. CXC 수용체 2에 결합한다. 세포 증식에 중요한 역할을 하여, 운동성과 혈관 신생을 향상시키는 것으로 여겨진다. 미처리 및 식품 분말 처리 야생형 마우스와 ETKO 마우스 사이에 CXCL 5에는 변화가 없다. CXCL 15는 폐 표피 세포, 장 세포 등에서 발현되는 케모카인이며, 염증과 관련이 있다. 미처리 및 식품 분말 처리 야생형 마우스와 ETKO 마우스 사이에 CXCL15의 전사체 수준에는 변화가 없었다. 데이터는 세 개의 개별 마우스의 샘플에서 전사 수준의 평균 $\pm$ SEM이다. 이 유전자는 식품 분말 처리에 반응하지 않았으며, 이는 그 작용의 특정 특성을 나타낸다. 약어: 야생형 미처리 (WT/U), 야생형 처리 (WT/T), 녹아웃 미처리 (KO/U) 및 녹아웃 처리 (KO/T).

도 58은 CXCR(CXC motif chemokine receptors, 면역 활성화 혈액 세포를 유인하고 염증을 유도함으로써 케모카인 패밀리의 CXC 리간드 및 인터루킨에 결합함) 결과를 보여준다. CXCR-2의 수준은 야생형 마우스에서 식품 분말 처리에 의해 현저하게 감소했다. ETKO 마우스에서는 변화가 관찰되지 않았다. 야생형 및 ETKO 마우스 모두에서 CXCR-5 및 3 및 CXCR5에 차이가 없었다. 결과는 리간드(C-C; C-X-C- 모티프)를 제외하고, 수용체들이 식품 분말 처리에 의해 조절될 수 있으며, 이는 염증의 더 나은 하향 조절을 제공할 수 있음을 시사한다. 종양 괴사 인자 계열의 수용체는 염증과 관련된 또 다른 수용체 그룹이며, 여러 천연 생성물이 TNF 알파 연결 신호 전달 경로를 하향 조절하는 것으로 알려져 있다. FAS 리간드(FAS L)는 TNF 수퍼 패밀리에 속하며 수용체에 결합하면 세포 사멸(apoptosis)을 시작한다. 야생형 마우스와 ETKO 마우스 모두에서 식품 분말 처리 후 FAS L 수준에 유의한 차이는 없다. 데이터는 세 개의 개별 마우스의 샘플에서 전사 수준의 평균 $\pm$ SEM이다. 약어: 야생형 미처리 (WT/U), 야생형 처리 (WT/T), 녹아웃 미처리 (KO/U) 및 녹아웃 처리 (KO/T).

도 59는 야생형 및 ETKO 마우스에서 식품 분말 처리에 대한 반응으로서 인터루킨의 변화를 평가한 것이다. 인터루킨은 면역 기능에 관여하는 사이토카인이고, 일부 인터루킨은 전 염증성(IL17)이고, 다른 것들은 항 염증 기능(IL10)을 가지고 있다. 그것들은 정상 조건에서 그리고 질병을 일으키는 유기체에 직면할 때 면역 기능을 매개한다. 식품 분말로 처리한 야생형 마우스의 IL 1A, IL 1B 및 IL 7의 발현 수준에서 현저한 감소가 관찰되었다. 이러한 인터루킨의 수준은 식품 분말 처리에 대한 반응으로 유사하게 유지되었다. IL4의 발현 수준은 미처리 및 식품 분말 처리 야생형 및 ETKO 마우스에서 유사하게 유지되었다. 데이터는 세 개의 개별 마우스의 샘플에서 전사 수준의 평균 $\pm$ SEM이다. 약어: 야생형 미처리(WT/U), 야생형 처리(WT/T), 녹아웃 미처리 (KO/U) 및 녹아웃 처리(KO/T).

도 60은 야생형 및 ETKO 마우스에서 식품 분말 처리에 대한 반응으로서 인터루킨의 변화를 평가한 것이다. 인터루킨은 정상적인 조건에서 그리고 질병을 일으키는 유기체에 직면할 때 면역 기능을 매개한다. 야생형 및 ETKO 마우스 모두에서 식품 분말 처리에 대한 반응으로 IL11, IL13, IL2rb 및 IL17f의 발현 수준에는 변화가 없었다. 데이터는 세 개의 개별 마우스의 샘플에서 전사 수준의 평균 $\pm$ SEM이다. 약어: 야생형 미처리(WT / U), 야생형 처리(WT / T), 녹아웃 미처리(KO / U) 및 녹아웃 처리(KO / T).

도 61은 야생형 및 ETKO 마우스에서 식품 분말 처리에 대한 반응으로서 인터루킨의 변화 평가를 보여준다. 야생형 마우스와 ETKO 마우스 모두 식품 분말 처리 후 IL21의 발현 수준에는 변화가 없었다. 인터페론 감마(IFNG)는 바이러스 제제에 대한 반응에 관여하는 또 다른 사이토카인이다. 야생형 및 ETKO 마우스 모두에서 식품 분말 처리에 대한 IFNG 수준의 변화는 없었다. 데이터는 세 개의 개별 마우스의 샘플에서 전사 수준의 평균 $\pm$ SEM이다. 약어: 야생형 미처리(WT/U), 야생형 처리(WT/T), 녹아웃 미처리(KO/U) 및 녹아웃 처리(KO/T).

도 62는 야생형 및 ETKO 마우스에서 식품 분말로 처리하는 동안 반응과 관련하여 종양 괴사 인자 수퍼 패밀리의 구성원의 전사체 수준의 변화 평가를 보여준다. LTB(Lymphotoxin B: Lymphotoxin Beta(TNF Superfamily, Member 3))는 막 단백질이며 염증 반응을 유도한다. LTB 전사체의 수준은 식품 분말 처리에 대한 반응으로 야생형 마우스에서 하향 조절되었다. 식품 분말로 처리한 ETKO 마우스에서 LTB 전사체 수준의 변화는 없었다. TNFSF11, TNFSF11b 및 TNFSF11b와 같은 다른 TNF 수퍼 패밀리의 구성원의 전사체 수준은 야생형 및 ETKO 마우스 모두에서 식품 분말 처리 후 변하지 않았다. 데이터는 세 개의 개별 마우스의 샘플에서 전사 수준의 평균 $\pm$ SEM이다.

도 63은 식품 분말 처리가 있거나 없는 마우스의 간 절편의 조직 병리학 결과를 보여준다. 패널 (A)는 헤마톡실린 및 에오신으로 염색된 미처리 야생형(WT) 마우스 간 절편을 보여주며; 지질체가 거의 보이지 않는다. 패널 (B)는 식품 분말로 처리하고 헤마톡실린 및 에오신으로 염색한 야생형(WT) 마우스 간 절편을 보여주며; 지질체가 거의 보이지 않는다. 패널 (C)는 헤마톡실린 및 에오신으로 염색된 미처리 비만(KO) 마우스 간 절편을 보여주며; 선명한 원형 영역은 간에 널리 분포된 지질체이다. 패널 (D)는 식품 분말로 처리되고 헤마톡실린 및 에오

신으로 염색된 (KO) 마우스 간 절편을 보여주며; 선명한 원형 영역은 지질체이다. 조직 재생의 잠재적 영역은 화살표로 표시된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0355] 본원에는 식물 조직 유래 나노 입자 및 식품 분말, 이의 생산 방법 및 이의 용도가 설명된다. 비교를 위해 나노 섬유 및 그 제조 방법도 설명한다. 실시형태 및 실시예는 당업자를 위해 의도된 예시적인 목적으로 제공되며 어떠한 방식 으로든 제한하려는 의도가 아님을 이해할 것이다.
- [0356] 이하에 상세히 설명되는 바와 같이, 몇몇 중대한 특징을 가진 나노 입자, 식품 분말 및 나노 섬유가 현재 개발되었다. 나노 입자와 나노 섬유는 모두 식물 조직에서 제조될 수 있지만, 이들 두 나노 구조는 본원에서 현저하게 다른 방법을 사용하여 제조되었으며, 이들 두 나노 구조는 본원에서 현저하게 다른 구조를 채택하고 조성 측면에서 상당한 차이를 가지며, 기능 및/또는 생물학적 효과의 기능 측면에서 중대한 차이점(및 유사점)을 갖는 것으로 밝혀졌다.
- [0357] 예를 들어, 균질화된 식물 조직으로부터 유래된 자가 조립(self-assembled) 세포 성분을 포함하는 나노 입자, 하나 이상의 세포벽 및/또는 다른 세포 성분을 포함하는 세포 성분이 본원에 설명된다. 또한, 비교하여, 폴리페놀이 추출된 균질화된 식물 조직으로부터 유래된 자가 조립 세포 성분을 포함하는 나노 섬유가 설명되며, 상기 세포 성분은 하나 이상의 세포벽 및/또는 다른 세포 성분을 포함한다. 이러한 나노 입자 및 나노 섬유(이들 사이의 차이를 나타냄)를 제조하기 위한 방법 및 프로토콜, 및 예를 들어 대상의 질병 또는 장애의 치료 또는 예방에서의, 및/또는 전달 수단(delivery vehicles)으로서의 이러한 나노 입자 및 나노 섬유의 용도가 또한 설명된다. 본원에서 기술된 나노 입자 및 나노 섬유, 및 특히 본 나노 입자와 관련된 (그러나 이와는 다른) 식품 분말이 또한 본원에 상세히 기술된다.
- [0358] 나노 입자 및 그 제조 방법
- [0359] 나노 입자
- [0360] 일 실시형태에서, 균질화된 식물 조직으로부터 유래된 자가 조립 세포 성분을 포함하는 나노 입자가 본원에 제공되며, 상기 세포 성분은 하나 이상의 세포벽 및/또는 다른 세포 성분을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 세포 성분은 예를 들어 나노 입자로 자가 조립되는, 균질화에 의해 식물 조직으로부터 유리된 성분을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 하나 이상의 세포벽 성분은 펙틴 및/또는 이의 유도체를 포함할 수 있다.
- [0361] 특정 실시형태에서, 균질화된 식물 조직으로부터 유래된 자가 조립 세포 성분을 포함하는 나노 입자가 본원에 제공되며, 상기 세포 성분은 하나 이상의 구조적 탄수화물 또는 이의 절단 생성물을 포함하며, 여기서 지질(lipids)은 나노 입자의 구조적 성분이 아니다.
- [0362] 특정 실시형태에서, 나노 입자는 실질적으로 또는 완전히 지질이 없을 수 있거나, 최소, 잔류 또는 미량의 지질만을 함유할 수 있다. 특정 실시형태에서, 인지질, 디아실글리세롤, 트리아실글리세롤, 유리 지방산 또는 알데히드 및 알칸과 같은 지질은 나노 입자의 구조적 성분이 아니다(즉, 지질, 및 나노 입자 전체는 막 특성의 단일 또는 다중 층상 소포를 형성하지 않는다). 특정 실시형태에서, 약간의 지질이 존재하는 경우, 지질 양은 임계 미셀 농도(CMC) 수준 미만이고 미셀 또는 소포(vesicles)를 형성하지 않는다. 특정 실시형태에서, 지질은 나노 입자 3 차 또는 4 차 구조에 실질적으로 기여하지 않으며, 및/또는 나노 입자 자가 조립에 기여하지 않는다. 특정 실시형태에서, 식물 조직은 지질을 거의 또는 전혀 제공하지 않도록 선택될 수 있고/있거나 지질은 나노 입자 자가 조립 전에 제거될 수 있다.
- [0363] 특정 실시형태에서, 세포 성분은 숙성 동안 또는 숙성 된 과일의 균질화 동안 식물 조직으로부터 유리된 것들을 포함할 수 있으며, 이것들은 나노 입자로 자가 조립될 수 있다.
- [0364] 특정 실시형태에서, 식물 조직은 예를 들어 과일, 채소, 잎, 꽃, 종자(일반적으로 임의의 발달 단계에서) 또는 이들의 임의 조합의 식물 조직 또는 식물 재료를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 둘 이상의 조직의 혼합물이 사용될 수 있다. 특정 실시형태에서, 혼합물의 균질화가 나노 입자를 형성하기 위한 자가 조립을 위한 성분을 제공하도록 복수의 조직이 사용될 수 있고, 각 조직은 나노 입자의 하나 이상의 성분이 풍부하다. 특정 실시형태에서, 식물 조직 또는 식물 재료는 예를 들어 신 체리, 블루 베리, 이들의 일부 또는 이들의 혼합물을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 식물 재료 또는 식물 조직은 익은 과일을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 발육 과일(숙성 전)은 충분한 나노 입자 성분을 포함하지 않을 수 있지만, 다른 식물 재료 또는 조직 및/또는 특정 나노 입자 성분과 혼합하여 보상되고 /되거나, 미성숙 과일이, 균질화 후 나노 입자 조립이 가능할 정도의

나노 입자 성분을 생성하도록 효소로 처리되는 경우, 여전히 사용될 수 있다. 특정 실시형태에서, 식물 조직의 균질화는 숙성 효소가 활성화될 조건 하에서 숙성 효소에 대한 세포 성분의 노출을 증가시킴으로써 숙성을 증가시키는 방식으로 수행될 수 있다. 특정 실시형태에서, 식물 조직은 펙틴, 하나 이상의 헤미셀룰로스, 단백질/펩티드, 하나 이상의 탄수화물, 말산(또는 수소 결합을 형성할 수 있는 또 다른 유기산), 적어도 하나의 안토시아닌 및/또는 아스코르브 산, 또는 이들의 임의의 조합을 제공할 수 있다. 특정 실시형태에서, 식물 조직은 적어도 펙틴, 하나 이상의 헤미셀룰로스, 단백질/펩티드, 하나 이상의 탄수화물, 말산(또는 수소 결합을 형성할 수 있는 또 하나의 유기산), 적어도 하나의 안토시아닌 및 아스코르브 산을 제공할 수 있다. 특정 실시형태에서, 나노 입자는 펙틴, 헤미셀룰로스, 펩티드 및/또는 단백질, 유기산, 적어도 하나의 폴리 페놀, 이들의 절단 생성물, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 유기산은 말산, 아스코르브 산 또는 둘 다를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 폴리 페놀은 안토시아닌을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 세포 성분은 숙성 동안 및/또는 숙성된 과일의 균질화 동안 식물 조직으로부터 유리된 것들을 포함하며, 이것들은 나노 입자로 자가 조립될 수 있다. 특정 실시형태에서, 균질화는 나노 입자에 기여할 수 있는 절단 생성물을 형성하는 숙성 효소(들)에 대한 세포 성분의 노출을 증가시킬 수 있다.

[0365] 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 나노 입자는 전분(예 : 알파-아밀로스 및 베타-아밀로스)이 없거나 실질적으로 없을 수 있다. 전분은 덴드로머형 구조를 형성하는 경향이 있으므로 나노 입자를 생성하는 데 사용되는 식물 조직에 더 높은 수준의 전분이 존재하면 나노 입자 생성을 방해할 수 있다. 특정 실시형태에서, 전분을 함유하는 식물 조직이 사용되는 경우, 식물 조직은 전분 함량을 낮게 유지하기 위해 드물게 사용될 수 있다. 예를 들어, 바나나가 식물 조직의 일부로 사용되는 경우, 바나나로 대표되는 식물 조직의 비율은 사용되는 식물 조직의 다른 성분에 비해 상대적으로 낮을 수 있다. 특정 실시형태에서, 유사한 고려 사항이 또한 본원에 상세히 설명된 바와 같이 식품 분말 및/또는 나노 섬유에 적용될 수 있다.

[0366] 특정 실시형태에서, 식물 조직은 부분적으로 분해된 세포벽과 함께 부분적으로 분해된 상태(예를 들어 숙성된 상태)에 있을 수 있거나, 세포 벽 성분을 분해하는 균질화 동안 조직에 탄수화물 및/또는 단백질 분해 효소를 첨가하여 식물 조직에 첨가함으로써 생성될 수 있다. 특정 실시형태에서, 초기 식물 조직은 예를 들어 알코올 또는 아세트산(식초)과 같은 보존제에 고정함으로써 부분적으로 가공될 수 있고, 균질화되기 전에 재수화될 수 있다. 특정 실시형태에서, 식물 조직은 예를 들어 나노 입자의 구조적 완전성 및/또는 수율을 촉진하기 위해 아스코르브 산 및 말산과 혼합될 수 있다.

[0367] 특정 실시형태에서, 식물 조직은 과일 또는 채소 식물 조직을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 식물 조직은 노화(senescing) 과일, 숙성 채소, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 특정한 바람직한 실시형태에서, 식물 조직은 체리(예를 들어 신 체리와 같은), 블루 베리, 포도, 복숭아, 천도 복숭아, 자두, 살구, 파파야, 토마토, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 예를 들어, 특정 바람직한 실시형태에서, 식물 조직은 신 체리 과일 조직을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 식물 조직은 예를 들어 코코아에서와 같이 과일 껍질 및/또는 과일의 외부 조직을 포함할 수 있다.

[0368] 특정 실시형태에서, 나노 입자는 펙틴, 헤미셀룰로스, 펩티드 및/또는 단백질, 유기산, 적어도 하나의 폴리 페놀, 이들의 절단 생성물, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 유기산은 말산, 아스코르브 산 또는 둘 다를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 폴리 페놀은 안토시아닌을 포함할 수 있다.

[0369] 특정 실시형태에서, 나노 입자의 하나 이상의 구조적 탄수화물은 펙틴, 펙틴 산, 펙틴의 메틸 에스테르, 펙틴 유도체, 폴리갈락투론산, 람노갈락투로난, 헤미셀룰로스, 에켄대 글루코스, 만노스 또는 자일로스의 β -(1→4)-연결된 백본들을 갖는 자일로글루칸(특정 실시형태에서 셀룰로오스도 펙틴도 아닐 수 있음), 및/또는 아라비노갈락탄 및/또는 이들의 절단 생성물 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0370] 특정 실시형태에서, 나노 입자는 예를 들어 직경이 약 50 내지 약 250 nm 인 실질적으로 구형 구조를 가질 수 있다. 특정 실시형태에서, 나노 입자는 비결정질 일 수 있다. 특정 실시형태에서, 나노 입자는 수용액, 건조 분말 형태 또는 탈수, 냉동 건조, 동결 건조, 분무 건조 또는 나노 분무 건조 형태로 제공될 수 있다.

[0371] 특정 실시형태에서, 나노 입자는 펙틴계 내부 코어; 상기 내부 코어를 둘러싸는 중간층-상기 중간층은 펙틴 및 헤미셀룰로오스의 거대 분자 및/또는 이들의 절단 생성물, 폴리 페놀 및 유기산을 포함함-; 및 식물 조직의 숙성 동안 및/또는 균질화 동안 형성된 이화 작용 생성물로부터 임의로 형성된, 거대 분자 구조 탄수화물 및 단백질(펩티드)을 포함하는 피브릴화된 외부 층을 포함한다. 이하에서 더 상세히 설명되는 도 17은 그러한 구조적 조직의 예를 도시한다. 특정 실시형태에서, 펙틴계 내부 코어는 일반적으로 속이 비어 있거나 고체인, 구형 구조일 수 있으며, 나노 입자를 폴리갈락투로나제/펙티나제와 같은 펙틴 분해 효소로 처리하면 내부 코어가 더 작

은 소구로 분해될 수 있다(내핵이 펙틴계일 수 있음을 나타냄). 특정 실시형태에서, 중간층은 예를 들어, 펙틴 및 헤미셀룰로스 기원의 거대 분자, 안토시아닌, 아스코르브 산 및 말산을 통해 결합된 수소, 및 다양한 세포 단백질로부터 유래된 펩티드에 의해 형성된 층을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 피브릴화된 외부층은 예를 들어, 식물 조직의 숙성 동안 발생하는 이화 작용으로부터 유래된 거대 분자 구조 탄수화물 및/또는 단백질을 포함할 수 있다.

[0372] 특정 실시형태에서, 나노 입자는 숙성 동안 및/또는 균질화 동안 식물 조직에서 발생하는 단백질 분해로부터 유래하는 하나 이상의 펩티드를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 나노 입자는 숙성 동안 및/또는 균질화 동안 식물 조직에서 발생하는 구조적 탄수화물의 하나 이상의 이화 물질을 포함할 수 있다.

[0373] 특정 실시형태에서, 나노 입자는 펙틴계 내부 코어; 내부 코어를 둘러싸는 중간층-중간층은 펙틴 또는 이의 유도체를 포함하는 하나 이상의 나선형 원섬유 구조, 및 하나 이상의 헤미셀룰로오스-유래 분자 또는 이의 유도체를 포함함-; 및 헤미셀룰로스 또는 그의 절단 생성물, 및 세포 단백질로부터 유래된 하나 이상의 펩티드를 포함하는 피브릴화된 외부층을 포함한다.

[0374] 특정 실시형태에서, 나노 입자는 약 3 내지 약 7 범위의 pH에서 존재하고 식물 조직의 세포 성분의 이화 작용으로부터 유래된 거대 분자 사이에서 형성되며, 히드록실기(예컨대, 당에서 발견되는 것과 같이) 및/또는 아미노기(예컨대, 펩티드에서 발견되는 것과 같이) 및/또는 유기산 기(예컨대, 아스코르브 산 및/또는 말산에서 발견되는 것과 같이)를 갖는 수소-결합 상호 작용에 의해 안정화될 수 있다. 특정 실시형태에서, 수소-결합 상호 작용은 또한 폴리 페놀과 같은 소분자의 하이드록실기(예: 안토시아닌, 예를 들어 시아니딘-3-글루코사이드 및/또는 시아니딘-3-루티노사이드)을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 나노 입자는 다소 중성-산성 조건(예: 약 3 내지 약 7의 pH) 및 완충액이 아닌 용액 또는 수소 결합을 방해할 수 있는 높은 이온 강도를 갖는 다른 용액에서 형성/자가 조립 될 수 있다. 특정 실시형태에서, 칼슘 이온은 나노 입자의 안정화를 가능하게 하는 폴리갈락투론산 사슬 사이의 가교 역할을 할 수 있다. 이해되는 바와 같이, 예를 들어 식물 조직으로부터 유래된 칼륨, 나트륨 및/또는 칼슘과 같은 염이 상기 용액에 존재할 수 있다.

[0375] 이해되는 바와 같이, 균질화에 의해 식물 조직으로부터 유리된 세포 성분이 나노 입자로 자가 조립될 수 있는 조건은 사용되는 특정 용도 및 재료에 따라 달라질 수 있다. 특정 실시형태에서, 상기 조건은 약 4 °C 내지 약 40 °C, 바람직하게는 약 15 °C 내지 약 35 °C 범위의 온도일 수 있다. 특정 실시형태에서 상기 조건은 물, 또는 물과 혼합될 수 있는 메탄올 또는 에탄올과 같은 (이에 제한되지는 않음) 유기 용매와 물의 혼합물일 수 있다. 특정 실시형태에서, 균질화에 의해 식물 조직으로부터 유리된 세포 성분이 나노 입자로 자가 조립될 수 있는 조건은 약 15 내지 100 %v/v 물, 보다 바람직하게는 약 30 내지 약 100 %v/v 물, 가장 바람직하게는 약 100 %v/v 물이다. 자가 조립이 수성 또는 실질적으로 수용액에서 발생하는 경우, 특정 실시형태에서 폴리갈락토로나제와 같은 숙성 환경에 일반적으로 존재하는 효소가 혼합물에 첨가될 수 있으며, 특히 식물 조직으로서 또는 식물 조직의 일부로서 미숙 과일을 사용할 때 자가 조립을 돕기 위해 첨가될 수 있다. 특정 실시형태에서, 자가-조립이 발생할 수 있는 조건은 예를 들어 실질적으로 수성 매질일 수 있다. 특정 실시형태에서, 나노 입자의 생성은 적합한 매질을 사용하여 본원에 기재된 절차에 의해 달성될 수 있다. 전형적으로, 매질은 물 또는 수성 매질일 수 있지만, 특정 실시형태에서 물 및 혼화성 유기 용매, 예를 들어, 에탄올 및/또는 메탄올을 포함할 수 있는 하나 이상의 알코올, 아세톤과 같은 하나 이상의 케톤, 디메틸 설폭사이드를 개별적으로 또는 임의의 적합한 조합으로 포함할 수 있는 하나 이상의 용매를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 특정 실시형태에서, 나노 입자의 자가-조립은 상기서 설명된 매질 중 하나에서 발생할 수 있다. 자가 조립 조건은 열역학적으로 가능한 조건을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 자가 조립을 위한 조건은 예를 들어 약 4°C 내지 약 30°C의 온도, 일반적으로 생리학적으로 발견되는 것과 일치하는 이온 농도(즉, 마이크로몰 내지 밀리몰 수준), 약 5~10 %w/v, 범위의 당 농도, 및 밀리몰 범위로 존재하는 천연 유기산을 포함할 수 있다.

[0376] 특정 실시형태에서, 바람직한 방법은 블렌더, 폴리트론(polytron) 또는 세포 조직을 파괴할 수 있는 임의의 다른 장치를 사용하여 약 4°C에서 수성 또는 알코올성 매질(또는 둘 모두의 조합)에서 과일 조직을 균질화하는 방법을 포함할 수 있다. 출발 물질을 부드러운 균질물로 만든 후, 균질물을 여과하여 파편을 제거하고 약 10000 x g를 원심 분리하여 미세한 잔해물을 침전시킬 수 있다. 생성된 균질물은 약 4°C에서 약 15 시간 동안 약 100kD 컷오프 투석 백을 사용하여 투석될 수 있다. 투석 백으로부터의 용액을 수집하고 물 제거 및/또는 동결 건조/분무 건조, 나노 분무 건조 등의 형태로 처리하여 나노 입자를 제공할 수 있다. 나노 입자는 예를 들어 장기 보관이 필요한 어두운 곳에서 약 -20°C에서 건조 상태로 보관할 수 있다.

[0377] 특정 실시형태에서, 균질화는 식물 조직의 분쇄, 블렌딩, 고 전단 균질화 또는 폴리트론(polytron)과 같은 장치

를 사용한 균질화와 같은 식물 조직의 임의의 적절한 침연(maceration) 방법을 포함할 수 있다.

- [0378] 특정 실시형태에서, 식물 조직은 하나 이상의 과일 및/또는 채소를 포함할 수 있으며, 이는 다른 식물 조직과 조합되거나 조합되지 않을 수 있다. 기능성 식품이 요구되는 예에서, 담체(예: 과일) 및 기능성 식품 함유 식물(예: 강황 뿌리 줄기)이 식물 조직으로 사용될 수 있다. 특정 실시형태에서, 정제되거나 부분적으로 정제된 제품(예를 들어, 강황 분말 또는 커큐민)과 함께 식물 조직(예: 과일)이 사용될 수 있다.
- [0379] 기능성 식품 화합물 및 식물 군의 몇 가지 예는 다음과 같다:
- [0380] a. 카로티노이드(베타 카로틴, 리코펜, 루테인 및/또는 기타 크산토필, 아스타잔틴 등);
- [0381] b. 안노나신(Annonacins)(항암 특성을 가진 안노나(Annona) 과일에서 유래된 폴리케타이드);
- [0382] c. 보스웰리아(예를 들어, 추가된 항염증 기능을 제공하는 커큐민과 함께 작용할 수 있음);
- [0383] d. 주로 스테로이드 구조를 가진 아슈와간다(Ashwagandha)(항 스트레스 및 암 예방 특성이 있는 아놀라이드(anoliides)를 포함하는 허브 성분);
- [0384] e. 식용 생강(Zingiber officinalis), 망고 생강(Curcuma amada) 및 진저롤(gingerols) 및 쇼가올(shogaols)을 포함한 여러 생리 활성 성분을 포함하는 기타를 포함하는 생강과(Ginger family members);
- [0385] f. 커큐마 롱가(Curcuma longa)(강황, 커큐민 함유);
- [0386] g. 환각 활성이 없는 칸나비스 중(*Cannabis* sp.)의 약용 활성 성분인 칸나비오디올(Cannabinodiols);
- [0387] h. 프리바이오틱 함량을 높이기 위한 예루살렘 아티초크의 이눌린 뿐만 아니라 프럭토 올리고당 및 갈락토 올리고당;
- [0388] i. 파이프 니그룸(*Piper nigrum*) 및 여러 파생물을 포함하는 파이프 니그룸의 야생 친척(wild relatives)과 같은 후추과(Piperaceae member); 및/또는
- [0389] j. 위에 나열되지 않은 식물의 기타 적합한 성분.
- [0390] 추가 실시형태에서, 나노 입자는 적어도 하나의 폴리 페놀을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 폴리 페놀은 안토시아닌 또는 몇몇 안토시아닌이거나 이를 포함할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 나노 입자는 말산, 아스코르브 산 또는 둘 모두와 같은 유기산을 추가로 포함 할 수 있다. 특정 실시형태에서, 나노 입자는 하나 이상의 폴리 페놀을 포함할 수 있다. 이해되는 바와 같이, 나노 입자의 폴리 페놀 조성은 사용되는 식물 조직(예를 들어, 과일)의 폴리 페놀 조성 및 공급되는 임의의 추가 폴리 페놀(외부 폴리 페놀이 첨가되는 경우)을 반영할 수 있다. 예를 들어 신 체리가 사용되는 경우, 폴리 페놀은 시아니딘 3 루티노사이드(Cyanidin 3 rutinoside) 또는 글루코사이드(glucoside)를 포함할 수 있다. 블루 베리를 사용하는 경우 폴리 페놀에는 블루 베리에서 발견되는 여러 페놀성 물질과 안토시아닌이 포함될 수 있다. 폴리 페놀(안토시아닌 및 페놀성 물질 모두)의 예는 다음 표에 나와 있다.

[0391] [표]

안토시아닌 성분	페놀 성분
델피니딘 3-갈락토사이드(Delphinidin 3-galactoside)	카페인산(Caffeic acid)
델피니딘 3-글루코사이드(Delphinidin 3-glucoside)	페룰산(Ferulic acid)
델피니딘 3-아라비노사이드(Delphinidin 3-arabinoside)	갈릭산(Gallic acid)
시아니딘 3-글루코사이드(Cyanidin 3-glucoside)	계피산(Cinnamic acid)
페투니딘 3-갈락토사이드(Petunidin 3-galactoside)	페닐 아세트산(Phenyl acetic acid)
페오니딘 3-갈락토사이드(Peonidin 3-galactoside)	카테킨/에피카테킨(Catechins/Epicatechins)
페투니딘 3-아라비노사이드(Petunidin 3-arabinoside)	이소르함네티(Isorhamnetin)
말비니딘 3-갈락토사이드(Malvinidin 3-galactoside)	미리세틴(Myricetin)
페오니딘 3-아라비노사이드(Peonidin 3-arabinoside)	클로로겐산(Chlorogenic acid)
말비딘 3-글루코사이드(Malvidin 3-glucoside)	4-O-페룰로일 퀴산(4-O-feruloyl quinic acid)
말비딘 3-아라비노사이드(Malvidin 3-arabinoside)	퀘르세틴 3-아라비노사이드 (Quercetin 3- arabinoside)
델피니딘 6-아세틸-3- 글루코사이드 (Delphinidin 6-acetyl-3- glucoside)	시린게틴 3-O-갈락토사이드 (Syringetin 3-O-galactoside)
말비딘 6-아세틸 3-글루코사이드 (Malvidin 6-acetyl 3-glucoside)	

[0392]

[0393]

특정 실시형태에서, 나노 입자는 직경이 약 50~250nm인 실질적으로 구형 구조를 가질 수 있다. 특정 실시형태에서, 나노 입자는 펙틴 성분(예를 들어, 람노갈 락투로산), 하나 이상의 헤미 셀룰로스 유래 분자(예를 들어, 자일로 글루칸) 및 하나 이상의 하이드록시 프롤린이 풍부한 당 단백질(HRGPs)과 같은 세포벽 단백질에서 파생된 펩티드를 포함하는 하나 이상의 원섬유 구조에 의해 둘러싸인 펙틴계 코어를 포함할 수 있다.

[0394]

특정 실시형태에서, 나노 입자는 하나 이상의 생물학적 활성제를 추가로 포함 할 수 있다. 생물학적 활성제는 특정 실시형태에서 나노 입자와 복합체화, 접합 또는 혼합될 수 있다. 예를 들어, 생물학적 활성제는 약학적 활성 약물, 기능성 식품 또는 영양소일 수 있다. 본원의 교시와 관련된 당업자는 특정 적용에 따라 사용될 수 있는 다양한 적합한 제약 약물, 기능성 식품 및/또는 영양소를 알고 있을 것이다. 특정 실시형태에서, 약학적 활성 약물은 암 치료에 사용되는 것과 같은 만성 질환을 제어하기 위해 개발된 임의의 적합한 약물(예를 들어, 빈 크리스트틴, 빈블라스틴, 파클리탁셀, 독소루비신, 폴리카타이드, 칸나비노이드 등)을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 기능성 식품은 카로티노이드(예를 들어, 점안액에 사용 가능성이 있을 수 있는 라이코펜, 제아잔틴, 아스타잔틴), 항염증제(예: 강황/커큐민, 보스웰리아, 아슈와간다 및/또는 기타 생리 활성 물질), 영양소(예: Fe²⁺, Zn, Se, 코발라민(Cobalamins)(Vit B12)) 및/또는 과산화물 디스무타제, 표적 부위에 대한 카탈라제, 허혈/재관류 등과 같은 항산화 효소를 포함할 수 있다.

[0395]

특정 실시형태에서, 나노 입자는 예를 들어 수용액, 분말 형태, 또는 탈수, 냉동 건조, 동결 건조, 분무 건조 또는 나노 분무 건조 형태로 제공될 수 있다. 특정 실시형태에서, 나노 입자는 경구 투여용으로 제형화될 수 있다. 특정 실시형태에서, 나노 입자는 음식과 함께 섭취하기에 적합한 형태로 제공될 수 있다. 특정 실시형태에서, 나노 입자는 캡슐, 주사 가능한 형태, 점막 영역을 위한 스프레이 형태 및/또는 피부 적용을 위한 국소 투여를 위한 형태(연고와 같은)로 제공될 수 있다.

[0396]

특정 실시형태에서, 본원에 기재된 바와 같은 나노 입자를 포함하는 조성물이 본원에 제공된다. 특정 실시형태에서, 나노 입자 또는 조성물은 나노 입자의 제조 동안 또는 제조 후에 첨가되는 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 조성물은 약물, 생체 분자, 단백질, 효소, 항체 또는 임의의 다른 제약학적 작용제와 같은 생물학적 활성제를 추가로 포함할 수 있다.

[0397]

추가 실시형태에서, 나노 입자가 제조되는 식물 조직은 과일 또는 채소 식물 조직을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 식물 조직은 체리, 블루 베리, 포도와 같은 과일을 독립적으로 또는 조합하여 포함할 수 있고, 특정 실시형태에서 추가로 조직으로서 또는 가공된 제품으로서 브로콜리, 아몬드, 대두 또는 강황과 같은 영양학적으로 중요한 다른 제품을 포함하거나, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 예를 들어, 식물 조직은 신 체리 열매를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 식물 조직은 식물 기원의 영양소 또는 기능성 식품 담체를 추가로 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 식물 조직은 예를 들어 식물성 조직(예를 들어, 브로콜리, 버섯, 견과류 또는 견과류 제품(즉, 아몬드, 헤이즐넛), 뿌리 (즉, 아슈와간다, 인삼, 사이 페러스, 등)을 포함할 수 있다.

- [0398] 본원에서 설명된 나노 입자의 조직 구조가 복잡함을 보여주는 광범위한 연구가 수행되었다. 수득된 실험적 증거(아래 제시된 실시예 부분 참조)에 기초하고, 어떤 방식으로든 이론에 얽매이지 않고, 본원에서 설명된 나노 입자의 특정 실시형태에 대한 다음 구조적 모델이 제안된다:
- [0399] EM 데이터로부터, 나노 입자는 별개(distinct)의 중간층으로 둘러싸인 별개의 내부 코어로 구성될 수 있으며, 중간층 위에는 돌출된 섬유 유사 구조(fibre like structures)를 갖는 보다 섬유화된(fibrillated) 외부 층이 제공될 수 있다. 세 개의 다른 영역(내부 코어, 중간층 및 외부 층)은 중금속(예: 우라늄 아세테이트)에 결합하는 능력에 기초하여 구별할 수 있다. 우라늄 이온은 그 영역 전자 밀도(region electron dense)를 만드는 고분자 사슬의 당산들(sugar acids)(글루쿠론산, 갈락투론산)의 모이어티(moieties)와 같은 음전하를 띤 모이어티에 결합할 수 있다. 따라서, 3개의 층들 사이의 차이는 이들 층의 폴리머들의 조성의 차이를 반영할 수 있다.
- [0400] 나노 입자의 효소 처리는 구조의 단편화를 초래하여 중간 구조를 드러내 보인다. 펙티나제(폴리갈락투로나제) 처리는 전체 나노 입자가 소포 구조(vesicular structures)로 파괴되어, 폴리갈락투론산 모이어티가 나노 입자 전체에 분산될 수 있음을 시사한다.
- [0401] 베타-1,4-글루카나아제로 처리하면 나노 입자의 외부 구조가 용해되어 내부 코어가 남는다. 상기 구조에 존재하는 긴 사슬 셀룰로오스 분자의 레벨(level) 주목할 만한 것이 아니었기 때문에(x-선 회절), 이 활성은 베타-1,4-글루칸 구조를 가진 헤미셀룰로오스 모이어티로 향할 수 있는 것으로 보인다. 따라서, 헤미셀룰로오스는 나노 입자의 중간층/매개층(middle/intermediate) 및 외부층에 배열된 성분들의 주요 부분을 형성할 것으로 생각된다.
- [0402] 코어 구조는 트립신 처리 후 관찰되었다. 트립신 처리는 또한 외부층 및 중간층이 용해되어 구형의 펙틴계 내부 코어를 남겼다. 따라서 외부층 및 중간층 모두 단백질/펩티드를 포함할 수 있다.
- [0403] 호모갈락투로난에 대해 생성된 항체는 SDS-PAGE 동안 나노 섬유에 강한 반응을 보였다. SDS-PAGE는, 나노 입자에 안토시아닌, 펩티드 및 펙틴의 존재를 보여주는 반면에, 나노 섬유에 안토시아닌이 없음을 보여준다. 항체가 나노 입자 내부에 도달하지 못해 약한 반응이 보였을 수 있을 것으로 추정된다. 이것은 또한 호모갈락투로난이 나노 섬유에 노출될 수 있고 항체와 강력한 교차 반응을 일으킬 수 있음을 보여준다(점 열록, 도 12).
- [0404] 익스텐신에 대해 생성된 항체와의 교차 반응성은 나노 입자와 나노 섬유 모두에서 매우 낮았으며(점 열록, 도 12), 이는 익스텐신 유래 펩티드가 나노 입자와 나노 섬유 모두에서 상당한 수준으로 존재하지 않음을 시사한다.
- [0405] 대조적으로, 헤미셀룰로오스 단백질(아라비노갈락탄-단백질)에 대해 생성된 항체에 대해 강한 반응성이 관찰되었으며, 이는 나노 입자 외층의 주요 성분이자 나노 섬유의 구성 요소일 수 있음을 시사한다.
- [0406] 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 바와 같은 나노 입자는 약물, 영양소, 생체 분자(즉, 단백질, 효소, 핵산), 기능성 식품 또는 기타 제약학적 작용제와 같은 하나 이상의 생물학적 활성제를 추가로 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 생물학적 활성제는 나노 입자와 복합체화되거나 화학적으로 접합될 수 있다. 특정 실시형태에서, 생물학적 활성제는 나노 입자 형성 중에 또는 나노 입자 형성 후에 나노 입자에 도입(및 그와 복합체화 또는 접합)될 수 있다.
- [0407] 또 다른 실시형태에서, 암 마커(cancer marker)에 특이적인 표적화 항체(targeting antibody)와 접합되는, 본원에 기재된 나노 입자를 포함하는 표적화된 나노 입자가 본원에서 제공된다. 특정 실시형태에서, 표적화 항체는 표적화된 나노 입자를 암 세포로 표적화하기 위한 PD-L1 항체를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 표적화된 나노 입자는 적어도 하나의 세포 독성 또는 항암 약물과 복합체화되거나 접합될 수 있다. 특정 실시형태에서, 표적화된 나노 입자는 파클리탁셀, 독소루비신, 또는 둘 모두와 복합체화되거나 접합될 수 있다.
- [0408] 또 다른 실시형태에서, 본원에 기재된 바와 같은 나노 입자를 포함하고, 항균제와 복합체화되거나 접합된 항균 나노 입자가 본원에 제공된다. 특정 실시형태에서, 항균제는 리소자임, 테트라사이클린, 또는 니신, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 항균 나노 입자는 MDR 박테리아 감염을 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한 것일 수 있다.
- [0409] 나노 입자를 제조하는 방법:
- [0410] 일 실시형태에서, 균질화된 식물 조직으로부터 나노 입자(예를 들어, 본원에 기재된 것들)를 제조하는 방법이 제공되며, 상기 방법은,

- [0411] 식물 조직으로부터 유리된 세포 성분을 포함하는 용액 중 균질화된 식물 조직을 제조하는 단계;
- [0412] 존재하는 경우, 균질화된 식물 조직에서 파편(debris)을 제거하는 단계; 및
- [0413] 선택적으로, 균질화된 식물 조직을 투석하여 비-복합 화합물을 제거하거나 크기 배제에 의해 비-복합 화합물을 제거하는 단계;를 포함하고,
- [0414] 이에 의해 세포 성분의 자가 조립에 의해 형성된 나노 입자를 포함하는 용액을 제공한다.
- [0415] 특정 실시형태에서, 용액은 임의의 적합한 매질을 포함 할 수 있다. 전형적으로, 용액은 물 또는 수성 매질을 포함할 수 있지만, 특정 실시형태에서 물과, 혼화성 유기 용매, 예를 들어 에탄올 및/또는 메탄올을 포함할 수 있는 하나 이상의 알코올, 아세톤과 같은 하나 이상의 케톤, 디메틸 설펍사이드를 개별적으로 또는 임의의 적합한 조합으로 포함할 수 있는 하나 이상의 용매이거나 이를 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0416] 특정 실시형태에서, 파편은 투석, 균질화된 식물 조직을 여과하거나, 균질화 된 식물 조직을 원심 분리하거나, 균질화된 식물 조직에 대해 접선 유동 여과 또는 연속 유동 여과를 수행하거나, 또는 이들의 임의의 조합에 의해 제거될 수 있다. 특정 실시형태에서, 파편을 제거하는 단계는 균질화된 식물 조직을 여과하거나 균질화된 식물 조직을 원심 분리하거나, 또는 둘 모두를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 파편은 기술들 중 하나 또는 조합에 의해 제거될 수 있는데, 상기 기술은 원심 분리(예를 들어, 단순 또는 연속 유동 원심 분리) 및/또는 막 여과(예를 들어, 투석, 적절한 차단 막을 사용한 원심 분리, 예를 들어 1~100 μm), 접선 흐름 여과, 크기 배제를 위한 컬럼 분리 등을 개별적으로 또는 이러한 기술의 조합을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 약 9,000g~12,000g에서 원심 분리는 대부분의 파편을 침전시킬 수 있고, 또는 100 마이크로 필터를 통한 여과는 파편의 적절한 제거를 제공할 수 있다.
- [0417] 특정 실시형태에서, 투석 단계(수행되는 경우)는 물(또는 물이 바람직하지만 다른 수용액)에 대한 간단한 투석을 사용하여 수행될 수 있지만, 이는 상업적인 대규모 제품보다 실험실 규모에 더 쉽게 사용될 수 있다. 따라서, 특정 실시형태에서, 투석/분리는 연속 원심 분리, 접선 유동 여과를 사용하여 수행될 수 있거나, 투석 분리가 생략될 수 있도록 입자를 충분히 미세하게 만들어 생략할 수 있다(예를 들어, 고 전단 균질기(예를 들어 Sonolator) 또는 마이크로 유동화 장치).
- [0418] 특정 실시형태에서, 파편이 제거된 정화된 균질물은 나노 입자에 혼입되지 않은 더 작은 분자가 제거될 수 있는 막 여과 기술을 사용하여 추가로 정제될 수 있다. 예를 들어, 물에 대해 (예를 들어) 100,000 MW 컷-오프 투석 백(cut-off dialysis bag)을 사용하는 간단한 투석, 또는 유사한 컷-오프 크기의 적절한 막을 통해 균질물을 접선 여과(교차 흐름 여과)에 적용하는 것, 또는 나노 입자가 농축될 수 있는 교반된 셀(stirred cell)(예: Amicon, 또는 유사한 설정)를 사용하는 막을 가로 질러 여과하는 것을 포함할 수 있다. 대안으로, 유사한 배제 한계(100,000 MW)의 크기 배제 컬럼이 사용될 수 있으며, 여기서 나노 입자는 용매(약 4-5의 pH에서 낮은 몰(molarity)의 물 또는 완충액(예: 1mM))를 사용하여 공극 부피에서 용리된다. 이러한 작업은 바람직하게는 약 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 수행될 수 있다.
- [0419] 특정 실시형태에서, 상기 방법은 나노 입자를 포함하는 용액을 탈수, 냉동 건조, 동결-건조, 분무-건조 또는 나노 분무-건조시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0420] 특정 실시형태에서, 상기 방법은 적절한 조건 하에서 자가 조립에 의해 나노 입자를 형성하는 것을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 예를 들어, 상기 조건은 약 4 $^{\circ}\text{C}$ 내지 약 40 $^{\circ}\text{C}$, 바람직하게는 약 15 $^{\circ}\text{C}$ 내지 약 35 $^{\circ}\text{C}$ 범위의 온도 일 수 있다. 특정 실시형태에서 조건은 물에서, 또는 물 및 물 혼화성 유기 용매, 예를 들어 (이에 제한되지 않지만) 메탄올 또는 에탄올에서 이루어질 수 있다. 특정 실시형태에서, 균질화에 의해 식물 조직으로부터 유리된 세포 성분이 나노 입자로 자가 조립될 수 있는 조건은 약 15 내지 100 %v/v 물, 더 바람직하게는 약 30 내지 약 100 %v/v 물, 가장 바람직하게는 약 100 %v/v 물인 용액에서 이루어질 수 있다. 자가 조립이 수성 또는 실질적으로 수용액에서 발생하는 경우, 특정 실시형태에서 폴리갈락투로나제와 같은 숙성 환경에 일반적으로 존재하는 효소가, 특히 미숙 과일을 식물 조직으로 또는 식물 조직의 일부로 사용할 때 자가 조립을 돕기 위해, 혼합물에 첨가될 수 있다. 특정 실시형태에서, 자가-조립이 발생할 수 있는 조건은 예를 들어 실질적으로 수성 매질일 수 있다. 특정 실시형태에서, 나노 입자의 생산은 적합한 매질을 사용하여 본원에 기재된 절차에 의해 달성될 수 있다. 전형적으로, 매질은 물 또는 수성 매질일 수 있지만, 특정 실시형태에서 물과 혼화성 유기 용매, 예를 들어, 이에 제한되지 않지만, 에탄올 및/또는 메탄올을 포함할 수 있는 하나 이상의 알코올, 아세톤과 같은 하나 이상의 케톤, 디메틸설펍사이드를 개별적으로 또는 임의의 적합한 조합으로 포함할 수 있는 하나 이상의 용매이거나 이를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 나노 입자의 자가 조립은 위에서 설명된 매질 중

하나에서 발생할 수 있다. 자가 조립 조건은 열역학적으로 가능한 조건을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 자가 조립을 위한 조건은 예를 들어 약 4℃ 내지 약 30℃의 온도, 일반적으로 생리학적으로 발견되는 이온 농도(즉, 마이크로몰 내지 밀리몰 수준) 및, 예를 들어 약 5~10 %(w/v) 범위의 당 농도 및 예를 들어 밀리몰 범위로 존재하는 천연 유기산을 포함할 수 있다.

[0421] 특정 실시형태에서, 상기 방법은 실질적으로 수성 매질에서 자가 조립에 의해 나노 입자를 형성하는 것을 포함할 수 있다. 전형적으로, 상기 기재된 방법에서, 투석은 나노 입자 조립을 용이하게 하기 위해 밤새 약 4℃에서 수행될 수 있다. 상온에서 투석을 하면 대기 오염 물질로 인한 오염 위험이 높아질 수 있다. 특정 실시형태에서, 나노 입자는 특히 약제학적 약물(들)이 나노 입자에 첨가되는 분야와 같은 약제학적 분야에서 순수한 나노 입자를 제공하기 위해 GMP 조건 하에서 제조될 수 있다. 특정 실시형태에서, 균질화된 식물 조직(즉, 균질물)은 조직 약 1g 대 물 1ml 또는 2ml의 비율로 제조될 수 있다. 조직은 전형적으로 이미 물이 80~90%이다. 이러한 조건은 출발 물질의 특성에 따라 달라질 수 있다. 특정 실시형태에서, 나노 입자는 균질화 과정 동안 형성되거나 형성되기 시작할 수 있고, 또한 이후, 예를 들어 (만일 수행된다면) 투석 중에 형성되거나 형성되기 시작할 수 있다. 특정 실시형태에서, 약 80% 이상의 나노 입자를 함유하는 나노 입자 용액이 수득될 수 있다. 특정 실시형태에서, 온도는 일반적으로 바람직하지 않은 분해를 방지하기 위해, 예를 들어 약 4℃로 낮게 유지될 수 있다.

[0422] 상기 방법의 또 다른 실시형태에서, 용액에 균질화된 식물 조직을 제공하는 단계는 수성 매질 또는 유기성 매질(예를 들어, 이에 제한되지는 않지만, 물, 에탄올, 메탄올, 아세톤 또는 예를 들어 이들의 혼합물을 포함하는 수성 또는 유기성 매질(또는 이들의 혼합물)을 포함할 수 있다)에서 식물 조직을 균질화하는 단계를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 균질화된 식물 조직은 폴리트론 또는 예를 들어 초음파 처리기를 사용하는 초음파 처리에 의해 제조될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 용액에 균질화된 식물 조직을 제공하는 단계는, 예를 들어 물, 에탄올, 메탄올 또는 아세톤 중 임의의 하나 이상을 포함하는 수성 매질 또는 유기성 매질에서 식물 조직을 고 전단 균질화 및/또는 초음파 처리하는 것을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 고 전단 균질화는 예를 들어 약 80kN에서 약 20cm의 직경을 갖는 블레이드를 사용하여 약 3000~5000 rpm에서 균질화 하는 것을 포함할 수 있다(본원의 교시 내용과 관련된 당업자는 특정 용도에 적합한 고 전단 균질화 조건을 알 것이다). 예를 들어, 초음파 처리 및/또는 캐비테이션(cavitation)이 사용될 수 있는 경우, 사용된 조건에 의해 나노 입자가 분리되지 않도록 전단력이 선택될 수 있다. 특정 실시형태에서, 용액 내 균질화된 식물 조직에 대해 달성되는 크기 범위는 예를 들어 약 50 내지 약 250 nm일 수 있다. 특정 실시형태에서, 예를 들어 약 3 사이클 동안 30초 펄스를 사용하여 약 6~7의 속도로 설정된 폴리트론이 사용될 수 있다.

[0423] 예로서, 균질화된 식물 조직은 특정한 예시적인 실시형태에서 약 5 분 동안 약 4,500rpm에서 블렌더로 균질화한 다음, 약 5 분 동안 폴리트론으로 추가로 미세하게 균질화 시킨 체리 열매와 같은 식물 조직을 포함할 수 있다. 그 후 생성된 슬러리를 약 4 층의 무명천을 통과시켜 여과하고 약 10,000 x g에서 원심 분리하여 파편을 제거하고 상청액을 수집할 수 있다. 상청액은 저 분자량 성분을 제거하기 위해 물에 대해(against water) 약 10,000D 컷 오프 투석 백에서 투석될 수 있다. 투석 후, 용액을 동결 건조하거나 분무 건조하여 분말 형태의 나노 입자를 얻을 수 있다.

[0424] 특정 실시형태에서, 분산물을 만들기 위해 가속된 유체 흐름, 초음파 캐비테이션 및 난류(turbulence)를 사용하는 소놀레이터(Sonolator)가 사용될 수 있다. 나노 입자의 경우, 비교적 저압 시스템이 선호될 수 있으므로 그에 따라 펌프 선택이 수행될 수 있다. 소놀레이터(Sonolator)는 Sonic Corporation(Stratford, Connecticut (www.sonicmixing.com))의 제품이다.

[0425] 또 다른 실시형태에서, 균질화된 식물 조직으로부터 본원에서 기술된 나노 입자를 제조하는 방법이 본원에서 제공되며, 상기 방법은

[0426] 식물 조직으로부터 유리된 세포 성분을 포함하는 용액 중 균질화된 식물 조직을 제조하는 단계;

[0427] 세포 성분의 자가 조립에 의해 나노 입자가 형성되도록 하는 단계;

[0428] 존재하는 경우, 균질화된 식물 조직에서 파편을 제거하는 단계; 및

[0429] 동결 건조, 분무 건조 또는 나노 분무 건조를 통해 나노 입자를 포함하는 분말을 형성하는 단계를 포함한다.

[0430] 예를 들어, 특정 실시형태에서 분무 건조 단계는 예를 들어, 상이한 용량으로 물을 증발시킬 수 있는 Fujisaki 4 노즐 분무 건조 시스템을 사용할 수 있다 (DAIICHI JITSUGYO (AMERICA), Inc. (DJA) 939 AEC Drive, Wood Dale, IL 60191, USA). 이러한 파일럿 스케일 모델(MDL 150) 중 하나는, 예를 들어 하루에 약 40kg의 NP 또는 식품

분말의 회수하여 하루에 약 200 리터의 균질물의 분무 건조시키는 예상 용량으로 시간 당 약 10kg의 물을 증발시킬 수 있다.

[0431] 특정 실시형태에서, 상기 방법은 식물 조직이, 예를 들어 신 체리를 포함하는 경우에 사용될 수 있다. 신 체리는 나노 입자를 포함하는 분말을 형성하기 전에 투석 단계를 수행할 필요가 없는 전술한 방법으로 특히 잘 작동한다는 것이 발견되었다.

[0432] 상기 방법의 특정 실시형태에서, 자가-조립은 실질적으로 수성 매질에서 발생할 수 있다. 특정 실시형태에서, 용액에서 균질화된 식물 조직을 제조하는 단계는 수성 또는 유기성 매질에서 식물 조직을 고 전단 균질화시키는 것을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 파편을 제거하는 단계는 균질화된 식물 조직을 여과하거나 균질화된 식물 조직을 원심 분리하거나 둘 다를 포함할 수 있다.

[0433] 특정 실시형태에서, 본원에 기술된 나노 입자는 생물 활성제 또는 다른 관심 제제와 같은 적재물을 전달하는 데 사용될 수 있는 것으로 고려된다. 본원에 기술된 나노 입자는 예를 들어 동결 또는 분무 건조될 때 크기가 팽창할 수 있고, 수용액 또는 물에 위치될 때 크기가 줄어들 수 있음이 관찰되었다. 따라서, 특정 실시형태에서, 건조 또는 실질적으로 건조된 분말 또는 나노 입자의 다른 제제는 특정적재물과 혼합된 다음, 물 또는 수용액을 첨가하여 나노 입자를 수축시키고, 이에 의해 적재물을 나노 입자에 가두어 운반할 수 있는 것으로 고려된다. 실험적 연구에서 나노 입자 용액은 50~250 nm 직경의 구조가 주어졌으며, SEM(진공 건조 효과)에서 관찰했을 때, 이 구조들은 TEM 및 SEM의 데이터에 따르면 직경이 약 4~5 배 더 큰 껍질 모양(shell-shaped)의 구조를 가지며, 건조시 이러한 크기 확장의 예가 제공되는 것으로 관찰되었다.

[0434] 특정 실시형태에서, 나노 입자가 생물학적 활성제와 같은 또 다른 모이어티와 복합체화되거나 접합되는 것이 바람직한 경우, 본원에 기재된 임의의 방법은 모이어티(즉, 생물학적 활성제)를 용액 내 균질화된 식물 조직에, 또는 모이어티가 나노 입자와 복합체를 형성하거나 화학적으로 결합 또는 접합되기에 적합한 조건 하에서 이미 형성된 나노 입자에 도입하는 추가 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0435] 특정 실시형태에서, 예를 들어, 화학적 접합(conjugation)은 나노 입자(즉, $-NH_2$, $-COOH$, $-OH$) 및 접합 작용제에 존재하는 작용기에 적합한 절차를 사용하여 달성될 수 있다. 예를 들어, 아래 실시예 3에서 Dylight를 사용하는 동안, 단백질의 $-NH_2$ 모이어티를 표지하는 데 사용되는 반응성 그룹인, N-하이드록시숙신이미드(NHS) 에스테르를 사용하여 염료를 활성화했다. 화합물의 NHS 에스테르는 수용체 (즉, 나노 입자, 나노 섬유 함유 펩티드)의 1차 아민과 반응하여 안정적인 공유 아마이드 결합을 형성하고 NHS기를 방출한다. 이해되는 바와 같이, 동일하거나 상이한 작용기에서 결합하기 위한 다른 커플링제 또는 가교제도 이용 가능하다(예를 들어, Thermofisher Scientific로부터).

[0436] 바람직한 실시형태에서, 나노 입자 및/또는 나노 섬유는 인산염 완충 식염수에 용해되고 2 mg/ml의 농도 수준을 제공하기 위해 권장되는 대로 붕산염 완충액 0.67 M(Thermofisher Scientific)과 혼합될 수 있다. 활성화된 표지제(NHS 에스테르)와 완전히 혼합한 후 혼합물을 25°C에서 1 시간 동안 배양할 수 있다. 접합된 생성물이 함유된 혼합물(NP/NF)은 크기 배제 컬럼(size exclusion column) 또는 제조사에서 제공하는 스핀 컬럼(spin column)을 사용하여 분리될 수 있다. 접합된 NP/NF는 공극 부피(void volume)에서 용출될 수 있다. 접합된 생성물은 예를 들어 동결 건조되고 -20°C에서 건조 분말로 보관될 수 있다(예를 들어, Nour Karra 및 Simon Benita * (2012) The Ligand Nanoparticle Conjugation Approach for Targeted Cancer Therapy; Current Drug Metabolism, 2012, 13, 22-41, 참조, 본원에 참고로 포함됨).

[0437] 나노 섬유 및 그 제조 방법

[0438] 나노 섬유

[0439] 나노 섬유도 개발되었으며 본원에서 설명된다. 나노 입자와 나노 섬유는 모두 식물 조직에서 제조될 수 있지만, 이들 두 나노 구조는 본원에서 현저하게 다른 방법을 사용하여 제조되었으며, 이들 두 나노 구조는 본원에서 현저하게 다른 구조를 채택하고 조성 측면에서 상당한 차이를 특징으로 하고, 기능 및/또는 생물학적 효과 측면에서 중대한 차이점 (및 유사점)을 갖는 것으로 확인되었다.

[0440] 따라서, 균질화된 식물 조직으로부터 유래된 자가 조립된 세포 성분을 포함하는 나노 섬유가 본원에 또한 기술된다. 위에서 설명한 나노 입자와 비교하여, 나노 섬유는 여러 가지 측면에서 다르며, 특히 나노 섬유가 폴리페놀이 추출되거나 폴리 페놀 함량이 이미 자연적으로 낮은 균질화된 식물 조직에서 유래된다는 점에서 그러하다. 특정 실시예에서, 세포 성분은 나노 섬유로 자가 조립되는 균질화에 의해 식물 조직으로부터 유리된 성분을

포함할 수 있다. 특정 실시예에서, 하나 이상의 세포 성분은 펙틴을 포함할 수 있다. 특정 실시예에서, 나노 섬유는 하나 이상의 헤미셀룰로스 유래 분자, 세포벽 단백질로부터 유래된 하나 이상의 펩티드, 또는 둘 다를 포함할 수 있다.

- [0441] 일 실시형태에서, 균질화된 식물 조직으로부터 유래된 자가 조립된 세포 성분을 포함하는 나노 섬유가 제공되며, 상기 세포 성분은 하나 이상의 구조적 탄수화물 또는 이의 절단 생성물을 포함하며, 여기서 지질 및 폴리 페놀은 나노 섬유의 구조적 성분이 아니다.
- [0442] 본원에 기술된 바와 같이, 현재 기재된 나노 섬유는 일반적으로, 폴리 페놀이 먼저 추출되었거나 그렇지 않으면 식물 조직에서 낮거나 감소된 수준에서 발견된다, 본원에서 상세하게 기술된(예를 들어, 상기 참조) 나노 입자를 제조하기 위해 사용될 수 있는 것과 같은 임의의 적절한 식물 조직으로 제조될 수 있다. 특정 실시형태에서, 나노 섬유의 자가 조립, 세포 성분, 구조적 탄수화물 또는 이의 절단 산물 및 지질 함량은, 폴리 페놀이 나노 섬유에서 구조적 역할을 하지 않는 것을 제외하고는 여기에 자세히 설명된 나노 입자의 자가 조립, 세포 성분, 구조적 탄수화물 또는 이의 절단 산물 및 지질 함량과 실질적으로 유사할 수 있고, 이는 나노 섬유가 나노 입자와 상당히 다른 구조와 조직을 채택하도록 한다.
- [0443] 특정 실시형태에서, 나노 섬유는 실질적으로 지질이 없을 수 있고, 또는 실질적으로 폴리 페놀이 없을 수 있고, 또는 둘 다를 포함할 수 있다.
- [0444] 특정 실시형태에서, 나노 섬유는 적어도 하나의 구조적 탄수화물을 포함하거나 그로 이루어진 하나 이상의 가닥(strand)을 포함하는 긴 섬유를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 기본 나노 섬유는 길이가 마이크로 미터이고 직경이 약 5 내지 약 10nm인 긴 섬유로 구성될 수 있다(도 37, 좌측 및 우측 패널 참조). 이러한 섬유는 트립신 처리 후 나노 입자에서 방출되는 섬유와 동종인 것으로 보인다(도 4, 패널 D, E 참조). 이러한 섬유 유사 구조는 건조 나노 섬유를 주사 전자 현미경으로 검사할 때도 관찰된다(도 7, 패널 A 참조). 특정 실시형태에서, 나노 섬유는 나노 입자의 에탄올 표백 생성물로 간주될 수 있다. 나노 섬유는 나노 입자의 펙틴 코어를 둘러싸고 있는 거대 분자로부터의 잠재적 기원(potential origin)을 나타내는, 나선형으로 감긴 구조로도 관찰된다(도 2, 패널 C 참조).
- [0445] 특정 실시형태에서, 나노 섬유는 펙틴, 헤미셀룰로스, 펩티드 및/또는 단백질, 유기산, 이들의 절단 생성물, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 유기산은 말산, 아스코르브산 또는 둘 다를 포함할 수 있다.
- [0446] 특정 실시형태에서, 세포 성분은 숙성된 과일의 숙성 동안 또는 균질화 동안 식물 조직으로부터 유리된 것들을 포함할 수 있으며, 이것들은 나노 섬유로 자가 조립될 수 있다.
- [0447] 특정 실시형태에서, 하나 이상의 구조적 탄수화물은 펙틴, 펙틴 산, 펙틴의 메틸 에스테르, 펙틴 유도체, 폴리 갈락투론산, 람노갈락투로난, 자일로구칸, 헤미 셀룰로스, 글루코스, 만노스 또는 자일로스의 β -(1→4) 결합 백분들을 보유하는 자일로글루칸, 및/또는 아라비노갈락탄 및/또는 이들의 절단 생성물 중 하나 이상을 포함한다.
- [0448] 특정 실시형태에서, 나노 섬유는 예를 들어 약 5 내지 약 10nm의 직경을 갖는 섬유 형태를 가질 수 있다. 특정 실시형태에서, 나노 섬유는 비결정질일 수 있다.
- [0449] 특정 실시형태에서, 나노 섬유는 수소-결합 상호 작용에 의해 안정화될 수 있고 식물 조직의 세포 성분의 이화 작용으로부터 유래되고 하이드록실 그룹 및/또는 아미노 그룹 및/또는 유기산 그룹을 보유하는 거대 분자 사이에서 형성될 수 있다.
- [0450] 특정 실시형태에서, 나노 섬유는 생물학적 활성제를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 바와 같은 나노 섬유는 약물, 영양소, 생체 분자(즉, 단백질, 효소, 핵산), 기능성 식품 또는 기타 제약학적 작용제와 같은 하나 이상의 생물학적 활성제를 추가로 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 생물학적 활성제는 나노 섬유와 복합체화되거나 화학적으로 접합될 수 있다. 특정 실시형태에서, 생물학적 활성제는 나노 섬유 형성 동안 또는 후에 나노 섬유에 도입(및 복합체화 또는 접합)될 수 있다. 특정 실시형태에서, 생물학적 활성제는 제약학적 활성 약물, 단백질, 효소, 기능성 식품 또는 영양소이거나 이를 포함할 수 있다.
- [0451] 특정 실시형태에서, 나노 섬유는 일반적으로 상기 나노 입자와 관련하여 기술된 것과 같은 임의의 적절한 형태로 제공될 수 있다. 특정 실시형태에서, 나노 섬유는 예를 들어 수용액, 분말 형태, 또는 탈수, 냉동 건조, 동결 건조, 분무 건조 또는 나노 분무 건조 형태로 제공될 수 있다.

- [0452] 특정 실시형태에서, 나노 섬유를 제조하기 위해 사용되는 식물 조직은 폴리 페놀이 적거나 폴리 페놀이 추출 또는 제거된 과일 또는 채소 식물 조직을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 식물 조직은 노화 과일, 숙성 채소, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있고; 바람직하게는, 식물 조직은 체리(예: 신 체리), 블루 베리, 포도, 복숭아, 천도 복숭아, 자두, 살구, 파파야, 토마토 또는 이들의 임의의 조합을 포함하며, 폴리 페놀 함량이 낮고/낮거나 폴리 페놀이 제거되거나 감소되어 있다. 특정 실시형태에서, 식물 조직은 예를 들어, 폴리 페놀 함량이 낮고/낮거나 폴리 페놀이 제거되거나 감소된 코코아에서와 같이 과일의 껍질 및/또는 과일의 외부 조직을 포함할 수 있다.
- [0453] 특정 실시예에서, 나노 섬유는 약 5 내지 약 10nm의 직경 및 마이크로미터 범위의 길이를 갖는 필라멘트 또는 섬유 구조를 가질 수 있다. 특정 실시예에서, 나노 섬유는 하나 이상의 생물학적 활성제를 추가로 포함할 수 있다. 생물학적 활성제는 특정 실시예에서 나노 섬유와 복합체화, 접합 또는 혼합될 수 있다. 예시적인 실시예로서, 생물학적 활성제는 제약학적 활성 약물, 기능성 식품 또는 영양소일 수 있다. 특정 실시형태에서, 생물학적 활성제는 파클리탁셀, 도세탁셀, 독소루비신, 빈크리스틴 및/또는 빈블라스틴과 같은 하나 이상의 항암 약물; 철, 마그네슘, 셀레늄 및/또는 아연과 같은 하나 이상의 금속; 보스웰리아, 위타놀라이드(Withanolides), 안노나신(Annonacins), 바노마이신(vancomycin)과 같은 테트라사이클린, 및 니신(nisin), 라이소자임(lysozyme)과 같은 기타 항균제 및 질병 및 박테리아 식품 오염을 제어하는 데 사용되는 유사 특성을 가진 기타 분자와 같은 하나 이상의 기능성 식품을 포함할 수 있다.
- [0454] 특정 실시예에서, 나노 섬유는 예를 들어 수용액, 분말 형태, 또는 탈수, 냉동 건조, 동결 건조, 분무 건조 또는 나노 분무 건조 형태로 제공될 수 있다.
- [0455] 특정 실시형태에서, 나노 섬유는 예를 들어 음식과 함께 섭취할 캡슐 또는 나노 섬유-기능성 식품 복합체(예: 보스웰리아, 커큐민, 아슈와간다 등, 추가 실시예는 나노 입자 및/또는 식품 분말과 관련하여 본원에 제공된 실시예를 참조)로 제공될 수 있다.
- [0456] 실시예로서, 균질화된 식물 조직은, 특정 예시적인 실시형태에서 체리 열매와 같은 식물 조직을 포함할 수 있으며, 이는 약 95% 에탄올(1 : 1 w/v)에 약 24-48 시간 동안 침지하고, 그 후 용액을 따라 내고 열매를 에탄올에서 추가 48 시간 동안 추가로 배양하여 색 성분(즉, 안토시아닌)의 대부분 또는 실질적으로 모두를 제거함으로써, 저 분자량 덩어리 성분(폴리 페놀 포함)의 실질적인 제거 또는 고갈을 거친 것이다. 과일 조직은 약 24 시간 동안 물로 완전히 씻을 수 있다(동등한 양의 물에 2x~3x). 그 다음 과일 조직은 약 4,500 rpm에서 약 5분 동안 블렌더로 균질화될 수 있고, 이어서 약 5분 동안 폴리 트론으로 미세 균질화될 수 있다. 생성된 슬러리를 약 4 층의 무명천을 통해 여과하고 약 10,000 x g에서 원심 분리하여 파편을 제거하고 상청액을 수집할 수 있다. 상청액은 저 분자량 성분을 제거하기 위해 물에 대해(against water) 약 10,000D 컷-오프 투석 백에서 투석될 수 있다. 투석 후 용액을 동결 건조하거나 분무 건조하여 분말 형태의 나노 섬유를 얻을 수 있다.
- [0457] 대안으로, 특정 실시형태에서, 과일 조직은 주스를 분리하기 위해 냉간 압착 될 수 있다. 이렇게 얻은 찌꺼기는 색 성분을 제거한 다음 에탄올에서 배양하여 색 성분(예: 안토시아닌, 및 나노 입자의 탄수화물 및 펩티드와 수소 결합할 수 있는 기타 폴리 페놀)을 제거할 수 있다. 수화(hydrating) 후, 조직은 전술한 바와 같이 균질화되고 처리될 수 있다.
- [0458] 또 다른 실시예에서, 나노 섬유가 제조되는 식물 조직은 과일 또는 채소 식물 조직을 포함할 수 있다. 특정 예에서, 식물 조직은 체리, 블루 베리, 포도, 또는 이들의 임의의 과일 조합을 포함할 수 있다. 바람직한 예로서, 식물 조직은 신 체리 과일 조직을 포함할 수 있다.
- [0459] *나노 섬유의 제조 방법*
- [0460] 또 다른 실시형태에서, 균질화된 식물 조직으로부터 (본원에서 기술된 바와 같은) 나노 섬유를 제조하는 방법이 제공되며, 상기 방법은,
- [0461] 식물 조직으로부터 유리된 세포 성분을 포함하는, 낮은 폴리페놀 함량을 갖는 용액에서 균질화된 식물 조직을 제조하는 단계;
- [0462] 존재하는 경우, 균질화된 식물 조직에서 파편을 제거하는 단계; 및
- [0463] 선택적으로, 균질화된 식물 조직을 투석하여 비복합 화합물을 제거하거나 크기 배제에 의해 비복합 화합물을 제거하는 단계를 포함하고,

- [0464] 이에 의해 세포 성분의 자가 조립에 의해 형성된 나노 섬유를 포함하는 용액을 제공하는 단계를 포함한다.
- [0465] 특정 실시형태에서, 표백된 식물 조직은 일반적으로 물과 고도로 혼화되는 유기 용매를 사용하여 조직으로부터 이들을 추출함으로써 단순하고, 유리되고, 가용성인 분자가 제거된 조직으로 간주될 수 있다. 여기에는 에탄올, 메탄올, 아세톤 등과 같은 용매가 포함될 수 있다. 이들 용매는 세포 구획화를 깨뜨리고 안토시아닌, 당, 유기 산 등과 같은 대부분 유리 분자를 탈수화 매질로 침출시킬 수 있다. 대조적으로 자당(sucrose) 용액을 사용하는 삼투압 탈수는 대부분의 물을 빼내어 과일에 성분을 남긴다. 본원에 언급된 표백은 조직의 색상 손실을 말하며 산화 과정이 아니다.
- [0466] 또 다른 실시형태에서, 균질화된 식물 조직으로부터 나노 섬유를 제조하는 방법이 본원에서 제공되며, 상기 방법은,
- [0467] 식물 조직으로부터 유리된 세포 성분을 포함하는, 낮은 폴리페놀 함량을 갖는 용액에서 균질화된 식물 조직을 제조하는 단계;
- [0468] 존재하는 경우, 균질화된 식물 조직에서 과편을 제거하는 단계;
- [0469] 상기 세포 성분의 자가 조립에 의해 나노 섬유를 형성하는 단계; 및
- [0470] 동결 건조, 분무 건조, 또는 나노 분무 건조시켜 나노 섬유를 포함하는 분말을 형성하는 단계를 포함한다.
- [0471] 특정 실시형태에서, 본원에 기술된 나노 섬유를 제조하는 방법 및 이의 단계는 나노 입자를 제조하기 위해 본원에 기술된 방법과 실질적으로 유사할 수 있으며, 식물 조직은 폴리 페놀 함량이 낮을 수 있고, 또는 식물 조직은 나노 섬유 형성을 촉진하기 위해 폴리 페놀이 추출된 식물 조직일 수 있다.
- [0472] 상기 방법의 특정 실시예에서, 나노 섬유는 실질적으로 수성 매질에서 자가 조립에 의해 형성될 수 있다. 특정 실시형태에서, 균질화 동안 저온(즉, 약 4℃)이 사용될 수 있고, 나노 섬유를 분리하기 위해 광범위한 수 혼화성 용매가 사용될 수 있다는 것이 고려된다.
- [0473] 상기 방법의 특정 실시예에서, 방법은 나노 섬유를 포함하는 용액을 탈수, 냉동 건조, 동결-건조, 분무-건조 또는 나노 분무-건조하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0474] 특정 실시형태에서, 용액에서 균질화된 식물 조직을 제조하는 단계는 수성 매질 또는 유기성 매질 또는 혼합된 수성/유기성 매질에서 식물 조직을 균질화하는 것을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 용액에서 균질화된 식물 조직을 제조하는 단계는 물, 에탄올, 메탄올 또는 아세톤 중 임의의 하나 이상을 포함하는 수성 또는 유기성 매질에서 식물 조직을 고 전단 균질화 및/또는 초음파 처리하는 것을 포함할 수 있다.
- [0475] 추가 실시예에서, 용액에서 균질화된 식물 조직을 제조하는 단계는 식물 조직의 균질화 전에 식물 조직을 표백하여 폴리 페놀을 제거하는 단계를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 식물 조직의 표백은 추출 용액으로 식물 조직으로부터 폴리 페놀의 추출을 실시하는 것을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 추출 용액은 에탄올을 포함할 수 있다.
- [0476] 다른 실시예에서, 용액 중 균질화된 표백 식물 조직을 제공하는 단계는 식물 조직을 수성 매질 또는 유기성 매질에서 고 전단 균질화하는 것을 포함할 수 있다. 다른 실시예에서, 용액 중 균질화된 표백 식물 조직을 용액에 제공하는 단계는 표백된 식물 조직을 수성 매질 또는 유기성 매질에서 균질화하는 것을 포함할 수 있다.
- [0477] 특정 실시형태에서, 과편을 제거하는 단계는 투석, 균질화된 식물 조직을 여과, 균질화된 식물 조직을 원심 분리, 또는 균질화된 식물 조직에 대해 접선 유동 여과 또는 연속 유동 여과를 수행하거나, 또는 이들의 임의 조합을 포함할 수 있다.
- [0478] 식품 분말 및 첨가제 및 그 제조 방법
- [0479] 식품 분말 및 첨가제
- [0480] 또 다른 실시형태에서, 본원에 기재된 나노 입자 및/또는 나노 섬유, 또는 그의 일부 또는 성분, 또는 이와 관련된 구조를 포함하는 식품 분말 또는 식품 첨가제가 본원에 제공된다. 특정 실시형태에서, 식품 분말은 예를 들어 마이크론(micron) 크기의 미세 분말 형태를 형성하는 나노 입자 및/또는 나노 섬유의 기본 구조 성분을 포함할 수 있다.
- [0481] 또 다른 실시형태에서, 균질화된 식물 조직으로부터 유래된 자가 조립된 세포 성분을 포함하는 식품 분말이 제

공되며, 상기 세포 성분은 하나 이상의 구조적 탄수화물 또는 이의 절단 산물을 포함하고 적어도 하나의 영양제를 추가로 포함한다.

- [0482] 특정 실시형태에서, 식품 분말은 나노 구형 구조를 형성하기 위해 자체 주위를 감는 섬유 구조를 포함할 수 있다.
- [0483] 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 바와 같은 식품 분말은 제조 조건 하에서 약 1 μm 내지 약 10 μm 범위의 크기로 실질적으로 구형 또는 장방형 구조를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 이러한 큰 구조는 물에 용해될 때 약 50 내지 100nm 범위의 더 작은 구형 구조로서 소실될 수 있다. 특정 실시형태에서, 식품 분말 구조는 나노 입자 및 나노 섬유에서 관찰되는 것과 상응하는(homologous) 무작위로 감겨지고 조립된 섬유 또는 섬유들로 구성될 수 있다. 특정 실시형태에서, 식품 분말의 전체 구조는 섬유의 정확한 조직이 없는 나노 구(nanosphere)의 구조와 비슷하거나 유사할 수 있으며, 섬유는 예를 들어, 조직 추출물의 균질물에 존재하는 여러 성분을 흡착할 수 있다.
- [0484] 특정 실시형태에서, 식품 분말의 하나 이상의 영양제는 상기한 식품 분말의 섬유상 나노 구 구조와 복합체를 형성할 수 있고, 식품 분말 형성 및/또는 그 결과적인 구조에 기여할 수 있다.
- [0485] 특정 실시형태에서, 식품 분말은 소수성(hydrophobic) 성분을 추가로 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 소수성 성분은 아몬드 우유, 코코넛 우유 및/또는 식용 너트로부터 유래된 우유를 포함하거나 제공될 수 있다.
- [0486] 특정 실시형태에서, 영양제는 건강상의 이점을 갖는 자연 발생 활성 성분을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 영양제는 카로티노이드, 안노나신, 보스웰리아, 아슈와간다의 위다놀라이드, 진저롤 및 생강과의 샤오가올, 칸나비노디올, 프럭토-올리고당, 갈락토-올리고당, 이눌린, 피페린 및 피페라세아과의 유도체, 파이프 니그룸(Piper nigrum) 및 파이프 롱검(Piper longum) 또는 이러한 성분 및/또는 이의 유도체를 포함하는 기타 야생 친척 또는 건강상의 이점이 있는 이의 임의의 활성 성분, 또는 이로부터 분리된 임의의 추출물, 유도체 또는 제품, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다.
- [0487] 바람직한 실시형태에서, 식품 분말은,
- [0488] 신 체리(sour cherry) 또는 이의 수성 추출물;
- [0489] 아몬드 우유 또는 아몬드의 다른 균질물;
- [0490] 두유 또는 대두의 다른 균질물;
- [0491] 브로콜리 또는 이의 수성 추출물; 및
- [0492] 강황 또는 그 분말을 포함할 수 있다.
- [0493] 특정한 추가의 바람직한 실시형태에서, 상기 식품 분말은,
- [0494] 약 25~30 v/v% 신 체리 추출물(적어도 약 0.1 mg/ml의 폴리페놀 당량);
- [0495] 약 25~30 v/v% 아몬드 우유 또는 아몬드의 다른 균질물;
- [0496] 약 10~18 v/v% 두유 또는 대두의 다른 균질물;
- [0497] 약 25~30 v/v% 브로콜리 추출물; 및
- [0498] 약 0.5~2.5 w/v% 강황 또는 그 분말을 포함할 수 있다.
- [0499] 상기 식품 분말 실시예는 브로콜리나 콩 냄새가 나지 않는 좋은 미용 제품을 제공하기 위해 고안되었다. 다양한 다른 구성 요소, 구성 요소의 조합, 및 구성 요소의 상대적 백분율도 본원에서 고려된다는 것이 이해될 것이다.
- [0500] 특정한 추가 실시형태에서, 신 체리 추출물은 약 1~2 mg/ml 폴리페놀 당량일 수 있다.
- [0501] 특정 실시형태에서, 신 체리 추출물은 건조된 통과일로부터 상업적으로 생산된 하나 이상의 과일 분말, 과일 찌꺼기, 또는 분무 건조에 의해 과일 주스로부터 생산된 분말, 또는 다른 상업적으로 이용가능한 관심있는 과일 분말과 조합되거나 대체될 수 있다. 특정 실시형태에서, 과일은, 예를 들어 신선한 과일보다는 건조되고 미크론 크기로 분말화된 과일을 사용하여 재수화(rehydrate) 및 균질화할 수 있다.
- [0502] 본원에 기재된 바와 같이, 현재 기재된 식품 분말은 본원에서 상세히 기재된 바 나노 입자 및/또는 나노 섬유를 제조하는데 사용될 수 있는 임의의 적합한 식물 조직으로 일반적으로 제조될 수 있다. 특정 실시형태에서, 식품

분말은 본원에 기재된 바와 같이 탄수화물계 나노 입자 또는 나노 섬유를 형성할 수 있는 과일, 채소 또는 다른 식물 조직 또는 제품으로부터 제조될 수 있지만, 이해되는 바와 같이 식품 분말은 좀 더 나노 구와 유사한 구조와 같은 상이한 조직을 가질 수 있다. 식품 분말은 수성, 유기성 또는 이들의 조합을 포함하는 임의의 적합한 매질에서 제조될 수 있다. 특정 실시형태에서, 식품 분말은 식품 분말 제품에 포함되기에 바람직한 영양제 또는 영양소 함유 물질(또는 영양소)을 추가로 포함할 수 있고(일반적으로 식품 분말의 의도된 용도에 맞게 조정될 것이다), 신선하거나 가공된 또는 농축된 분말을 단독으로 또는 중량 또는 부피 기준으로 원하는 조합으로 포함할 수 있다.

- [0503] 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 식품 분말은 영양제 또는 영양제 함유 물질과 조합하여 본원에 이미 상세히 기재된 바와 같이 나노 입자 및/또는 나노 섬유를 제조하기에 적합한 식물 조직으로부터 제조될 수 있다. 이해되는 바와 같이, 영양제 또는 영양소 함유 물질은 전형적으로 식품 분말의 의도된 용도에 맞게 조정될 것이며, 신선하거나 가공된 또는 농축된 분말을 단독으로 또는 임의의 원하는 조합의 중량 또는 부피로 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 식품 분말은 영양제 또는 영양소 함유 성분으로 또는 특정 생리적 상태(예: 만성 질환)를 해결하기 위해 표적화된 성분으로 개발될 수 있으며, 이러한 영양제 또는 영양소 함유 물질은 예를 들어 예방 및/또는 치료 특성을 가질 수 있다. 이해되는 바와 같이, 본원에서 사용되는 용어 영양제 또는 영양소는 특정 적응증에 적합한 임의의 적절한 활성제 또는 화합물(또는 상기 활성제 또는 화합물을 포함하는 물질)을 포함할 수 있으며, 일반적으로 식품에서 발견되는 것과 같은 영양소로 간주되는 것 전체로 제한되지 않는다. 실시예로서, 특정 실시형태에서, 영양소는 건강상의 이점을 갖는 임의의 적합한 천연(또는 비천연) 성분을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 식물 조직은 예를 들어 코코아에서와 같이 과일 껍질 및/또는 과일의 외부 조직을 포함할 수 있다.
- [0504] 특정 실시형태에서, 식품 분말은,
- [0505] 1. 신 체리(또는 신 체리 추출물), 또는 본원에 기술된 바와 같이 탄수화물계 나노 입자 또는 나노 섬유를 형성할 수 있는 또 다른 과일 또는 채소(또는 이의 추출물);
- [0506] 2. 첨가된 물질로부터 소수성 분자를 포함할 수 있는 소수성 성분(예: 아몬드 우유, 이에 제한되지 않음)(예를 들어, 코코넛 우유 또는 식용 건과류에서 추출한 우유); 및
- [0507] 3. 예를 들어, 식품 분말의 원하는 용도를 위해 맞춤화된 하나 이상의 생리 활성 성분/성분들을 함유하는 영양소 함유 물질(예를 들어, 기능성 식품 추출물)을 포함할 수 있다.
- [0508] 영양소 함유 물질의 일부 비 제한적인 예시는 다음 활성 화합물 및/또는 식물군 중 하나 이상을 포함할 수 있다:
- [0509] 카로티노이드(즉, 베타-카로틴, 라이코펜, 루테인 및 기타 크산토폴, 아스 타잔틴 등);
- [0510] 안노나신(Annonacins)(즉, 향암 특성을 가진 안노나(Annona) 과일에서 유래된 폴리케타이드);
- [0511] 보스웰리아(Boswellia)(추가된 항염증 기능을 제공하는 커큐민과 함께 작용할 수 있음);
- [0512] 아슈와간다(Ashwagandha)(주로 스테로이드 구조를 가진 항스트레스 및 암 예방 특성이 있는 위타놀리이드(withanolides)를 포함하는 허브 성분);
- [0513] 예를 들어, 식용 생강(Zingiber officinalis), 망고 생강(Curcuma amada) 또는 진저롤 및 쇼가올을 포함한 임의의 여러 생리 활성 성분을 함유하는 기타를 포함할 수 있는 생강과; 커큐마 롱가(즉, 커큐민 함유 강황);
- [0514] 칸나비노디올(Cannabinodiols)(환각 활성이 없는 칸나비스 종(Cannabis sp.)의 약용 활성 성분);
- [0515] 프럭토-올리고당(Fructo-oligosaccharides) 및 갈락토-올리고당(galacto-oligosaccharides) 및 프리바이오틱 함량을 향상시키는 예루살렘 아키초크(Jerusalem artichoke)의 이눌린;
- [0516] 피페 니그룸(Piper nigrum)과 같은 피페라세아(Piperaceae) 구성원 및 피페린 및 여러 과생물을 포함하는 야생 친척; 및/또는
- [0517] 상기 열거되지 않은 다른 적합한 성분(예를 들어, 식물로부터 유래된 것(이에 제한되지 않음)); 및/또는
- [0518] 그로부터 분리된 임의의 추출물, 유도체, 생성물, 또는 그러한 성분을 함유하는 재료 또는 식물 조직.
- [0519] 식품 분말 및 첨가제의 제조 방법

- [0520] 또 다른 실시형태에서, 본원에서 균질화된 식물 조직으로부터 식품 분말을 제조하는 방법이 제공되며, 상기 방법은,
- [0521] 식물 조직으로부터 유리된 세포 성분을 포함하는, 용액 중 균질화된 식물 조직을 제조하는 단계로서, 상기 세포 성분은 하나 이상의 구조 탄수화물 또는 이의 절단 생성물을 포함하고, 상기 용액 중 균질화된 식물 조직은 적어도 하나의 영양제를 추가로 포함하는, 단계;
- [0522] 선택적으로, 존재하는 경우, 상기 용액 중 균질화된 식물 조직으로부터 과편을 제거하는 단계; 및
- [0523] 식품 분말을 형성하기 위해 용액 중 균질화된 식물 조직을 동결 건조, 냉동 건조(Lyophilizing), 분무 건조 또는 나노 분무 건조하는 단계를 포함한다.
- [0524] 적합한 식물 조직 및 영양제의 예시는 위에서 이미 상세히 설명되었다.
- [0525] 상기 방법의 또 다른 실시형태에서, 균질화된 식물 조직을 준비하는 단계는 수성 매질, 유기성 매질 또는 혼합된 수성-유기성 매질에서 식물 조직을 균질화하는 것을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 식품 분말은 용액에서 식품 분말 출발 물질의 균질화에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 균질화는 바람직하게는 높은 rpm에서 작동하고 고 전단력을 생성할 수 있는 블렌더, 또는 초음파기와 같은 고성능 혼합이 가능한 다른 적합한 기계를 사용하여 달성될 수 있다.
- [0526] 특정 실시형태에서, 용액 중 균질화된 식물 조직은 여과되어 과편을 제거할 수 있거나, 또는 과편이 균질화된 혼합물로부터 달리 제거될 수 있다. 예를 들어, 과편(즉, 균질물로 들어 가지 않고 중력에 의해 침전되는 입자상 물질)을 여과할 수 있는 원심 분리 장치 또는 여과 장치(예: 막 여과 장치 또는 접선 유동 여과 장치)를 사용하여 과편을 제거할 수 있다.
- [0527] 특정 실시형태에서, 식품 분말은 탈수, 동결 건조, 분무 건조, 나노 분무 건조 또는 달리 탈수 또는 건조될 수 있다. 예를 들어, 물(또는 사용되는 다른 용매)을 제거할 수 있는 장비를 사용할 수 있으며, 여기에는 나노 분무 건조기 또는 수성 시료용 동결 건조기, 또는 더 바람직하게는 예를 들어 대규모 분무 건조가 가능한 고효율 분무 건조기가 사용될 수 있다. 특정 실시형태에서, 건조기는 감압 하에서 작동할 수 있다.
- [0528] 다른 실시형태에서, 식물 조직은 과일, 채소 또는 식물 조직을 포함 할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 식물 조직은 노화 과일, 숙성 채소, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있으며; 바람직하게는, 식물 조직은 체리, 블루 베리, 포도, 복숭아, 천도 복숭아, 자두, 살구, 파파야, 토마토 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 특정 실시형태에서, 식물 조직은 신 체리, 아몬드 또는 아몬드 우유, 대두 또는 두유, 브로콜리, 강황 또는 이들의 임의의 조합으로부터 수득되거나 이를 포함하는 식물 조직을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 균질화된 식물 조직은 신 체리 추출물, 아몬드 우유, 두유, 브로콜리 추출물 및 강황 분말을 포함할 수 있다. 적절한 식물 조직은 이미 위에서 상세히 설명하였다.
- [0529] 특정 실시형태에서, 용액 중 균질화된 식물 조직은 상기에 이미 기재된 바와 같은 소수성 성분을 추가로 포함할 수 있다.
- [0530] 또 다른 실시형태에서, 식물 조직은 하나 이상의 영양소 함유 물질을 포함 할 수 있으며, 이는 신선하거나, 전처리되거나, 농축된 물질, 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다.
- [0531] 상기 방법의 특정 실시형태에서, 균질화된 식물 조직을 제조하는 단계는 바람직하게는 높은 rpm에서 작동하고 고 전단력, 초음파기 또는 다른 고성능 혼합 장치를 생성하는 블렌더로 식물 조직을 균질화하는 것을 포함할 수 있다.
- [0532] 상기 방법의 특정 실시형태에서, 과편을 제거하는 단계는 원심 분리 장치, 여과 장치, 막 여과, 접선 유동 여과 또는 이들의 임의의 조합으로 과편을 제거하는 것을 포함할 수 있다.
- [0533] 특정 실시형태에서, 식물 조직은 신 체리, 아몬드 또는 아몬드 우유, 대두 또는 두유, 브로콜리, 강황 또는 이들의 임의의 조합으로부터 수득되거나 이를 포함하는 식물 조직을 포함할 수 있다.
- [0534] 바람직한 실시형태에서, 상기 방법의 출발 재료는,
- [0535] 신 체리 또는 이의 수성 추출물;
- [0536] 아몬드 우유 또는 아몬드의 다른 균질물;

- [0537] 두유 또는 대두의 다른 균질물;
- [0538] 브로콜리 또는 이의 수성 추출물; 및
- [0539] 강황 또는 그 분말을 포함할 수 있다:
- [0540] 특정한 추가의 바람직한 실시형태에서, 상기 방법의 출발 재료는,
- [0541] 약 25~30 v/v% 신 체리 추출물(적어도 약 0.1 mg/ml의 폴리페놀 당량);
- [0542] 약 25~30 v/v% 아몬드 우유 또는 아몬드의 다른 균질물;
- [0543] 약 10~18 v/v% 두유 또는 대두의 다른 균질물;
- [0544] 약 25~30 v/v% 브로콜리 추출물; 및
- [0545] 약 0.5~2.5 w/v% 강황 또는 그 분말을 포함할 수 있다.
- [0546] 특정 실시형태에서, 상기 신 체리 추출물은 약 1~2 mg/ml 폴리페놀 당량일 수 있다.
- [0547] 상기 식품 분말 예시는 브로콜리나 콩 냄새가 나지 않는 좋은 미용 제품을 제공하기 위해 고안되었다. 다양한 다른 구성 요소, 구성 요소의 조합, 및 구성 요소의 상대적 백분율도 본원에서 고려된다는 것이 이해될 것이다.
- [0548] 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 바와 같은 식품 분말을 제조하는 방법 및 이의 단계는 나노 입자 및/또는 나노 섬유를 생산하기 위해 본원에 기재된 것과 실질적으로 유사할 수 있으며, 적어도 하나의 영양제의 존재가 나노 입자 및/또는 나노 섬유 구조보다는, 식품 분말 나노 구조의 생산에 유리하다는 차이점이 있다.
- [0549] 나노 입자, 나노 섬유 및 식품 분말의 용도
- [0550] 본원에 기술된 나노 입자, 나노 섬유 및 식품 분말의 고려되는 용도의 예시가 아래에 설명된다. 이들 예시는 제한하려는 것이 아니라, 당업자를 위한 예시적인 예를 제공한다. 아래의 실시예 부분에 제시된 실험 연구는 예시적인 방법 및 용도에 관한 추가 세부 사항을 제공한다.
- [0551] 특정 실시형태에서, 본원에서 대상 또는 세포에 대한 언급은 동물 대상 또는 동물 세포를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 동물은 포유류일 수 있다. 특정 실시형태에서, 동물은 인간일 수 있다.
- [0552] 나노 입자:
- [0553] 일 실시형태에서, 생물학적 활성제를 필요로 하는 대상에게 전달하는 방법이 제공되며, 상기 방법은,
- [0554] 생물학적 활성제와 복합되거나 접합된 본원에 기재된 나노 입자를 대상에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0555] 예를 들어, 특정 실시형태에서, 생물학적 활성제는 셀레늄, 아연, 마그네슘 및/또는 철일 수 있다. 특정 실시형태에서, 생물학적 활성제는 항암 약물을 포함 할 수 있고, 대상은 암에 걸린 대상일 수 있다. 특정 실시형태에서, 항암 약물은 파클리탁셀 또는 빈크리스틴 또는 암 치료에 사용되는 다른 천연 또는 합성 화합물일 수 있다. 특정 실시형태에서, 생물학적 활성제는 나노 입자의 형성 동안 나노 입자에 도입될 수 있거나, 생물학적 활성제는 임의로 알코올 또는 다른 유기 화합물을 포함하는 수성 기반 매질에서 이미 형성된 나노 입자와 복합체화 될 수 있다. 특정 실시형태에서, 수성 기반 배지는 DMSO, 또는 완충제 또는 둘 다를 포함할 수 있다.
- [0556] 또 다른 실시형태에서, 필요로 하는 대상에서 활성 산소 종과 관련된 질환 또는 질병을 치료하는 방법이 본원에서 제공되며, 상기 방법은,
- [0557] 본원에 기재된 바와 같은 나노 입자를 대상에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0558] 특정 실시형태에서, 나노 입자는 항산화제로 작용할 수 있다.
- [0559] 또 다른 실시형태에서, 본원에서는 필요로 하는 대상에서 염증을 치료 또는 감소시키는 방법이 제공되며, 상기 방법은,
- [0560] 본원에 기재된 바와 같은 나노 입자를 대상에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0561] 특정 실시형태에서, 나노 입자는 항염증제를 포함하거나, 항염증제와 순차적으로, 동시에 또는 공동-투여될 수 있다. 특정 실시형태에서, 항염증제는 커큐민을 포함할 수 있다.
- [0562] 또 다른 실시형태에서, 필요로 하는 대상에서 비만을 치료 또는 감소시키는 방법이 본원에서 제공되며, 상기 방

법은,

- [0563] 본원에 기재된 바와 같은 나노 입자를 대상에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0564] 특정 실시형태에서, 나노 입자는 전통적으로 식품 또는 의학적 목적으로 사용되는 견과류, 콩과 식물, 허브, 향신료, 채소 또는 진균 식물 조직으로부터 적어도 부분적으로 유래된 성분을 포함할 수 있다.
- [0565] 또 다른 실시형태에서, 필요로 하는 대상에서 암을 치료 또는 예방하는 방법이 본원에서 제공되며, 상기 방법은,
- [0566] 본원에 기재된 바와 같은 나노 입자를 대상에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0567] 특정 실시형태에서, 나노 입자는 항암 약물과 동시에 또는 순차적으로 또는 공동 투여될 수 있다. 특정 실시형태에서, 나노 입자는 항암 약물과 복합체화되거나 이와 접합될 수 있다. 추가 실시형태에서, 항암 약물은 파클리탁셀 또는 빈크리스틴일 수 있다.
- [0568] 또 다른 실시형태에서, 대상에게 가용성 식이 섬유를 제공하는 방법이 본원에서 제공되며, 상기 방법은,
- [0569] 본원에 기재된 바와 같은 나노 입자를 대상에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0570] 또 다른 실시형태에서, 본원에 기재된 바와 같은 나노 입자를 포함하는 점도 증진(viscosity enhancing) 식품 첨가제가 본원에 제공된다.
- [0571] 또 다른 실시형태에서, 필요로 하는 대상의 식후 혈당 수준을 감소시키는 방법이 본원에서 제공되며, 상기 방법은,
- [0572] 본원에 기재된 바와 같은 나노 입자를 대상에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0573] 또 다른 실시형태에서, 본원에 기재된 바와 같은 나노 입자를 포함하는 화장품이 본원에 제공된다.
- [0574] 또 다른 실시형태에서, 필요로 하는 대상에게 국소 투여하기 위한, 본원에 기재된 바와 같은 나노 입자 및 선택적으로 생물학적 활성제를 포함하는 조성물이 본원에서 제공된다.
- [0575] 또 다른 실시형태에서, 필요로 하는 대상에서 태양 화상을 예방하는 방법이 본원에서 제공되며, 상기 방법은,
- [0576] 본원에 기재된 나노 입자를 대상의 피부에 적용하는 단계를 포함한다.
- [0577] 특정 실시형태에서, 나노 입자는 추가 안토시아닌 또는 다른 UV-보호제를 포함하거나 이와 함께 적용될 수 있다.
- [0578] 다른 실시형태에서, 세포 증식을 감소시키는 방법이 본원에서 제공되며, 상기 방법은,
- [0579] 세포 또는 조직 또는 기관을 본원에 기재된 나노 입자와 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0580] 특정 실시형태에서, 나노 입자는 항암 약물과 동시에 또는 순차적으로 사용될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 나노 입자는 항암 약물과 복합되거나 접합될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 항암 약물은 파클리탁셀 또는 빈크리스틴일 수 있다.
- [0581] 또 다른 실시형태에서, 필요로 하는 대상의 간에서 트리글리세라이드 축적을 감소시키는 방법이 본원에서 제공되며, 상기 방법은,
- [0582] 본원에 기재된 바와 같은 나노 입자를 대상에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0583] 또 다른 실시형태에서, 필요로 하는 대상에서 콜레스테롤 수치를 감소시키는 방법이 본원에서 제공되며, 상기 방법은,
- [0584] 본원에 기술된 바와 같은 나노 입자 투여하는 단계를 포함한다.
- [0585] 또 다른 실시형태에서, 필요로 하는 대상에서 지질 대사를 개선하는 방법이 본원에서 제공되며, 상기 방법은,
- [0586] 본원에 기술된 바와 같은 나노 입자를 투여하는 단계를 포함한다.
- [0587] 또 다른 실시형태에서, 암 마커에 특이적인 표적화 항체와 접합된, 본원에 기재된 나노 입자를 포함하는 표적화된 나노 입자가 본원에서 제공된다. 특정 실시형태에서, 표적화 항체는 나노 입자를 암 세포로 표적화하기 위한 PD-L1 항체를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 표적화된 나노 입자는 적어도 하나의 세포 독성 또는 항암

약물과 복합체화되거나 접합될 수 있다. 특정 실시형태에서, 표적화된 나노 입자는 파클리탁셀, 독소루비신, 또는 둘 다 및/또는 예를 들어 하나 이상의 경로 지향 항체(즉, PI3K (Phosphatidylinositol-3- 키나아제)와 같은 또 다른 항암 약제와 복합체화되거나 접합될 수 있다.

- [0588] 또 다른 실시형태에서, 본원에 기재된 바와 같은 나노 입자를 포함하고, 항균제와 복합되거나 접합된 항균 나노 입자가 본원에 제공된다. 특정 실시형태에서, 항균제는 리소자임, 테트라사이클린, 또는 니신, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 항균 나노 입자는 MDR 박테리아 감염의 치료 또는 예방 및/또는 예를 들어 식품 산업 및/또는 병원체와 같은 표면의 살균에 사용하기 위한 것일 수 있다.
- [0589] 나노 섬유:
- [0590] 일 실시형태에서, 생물학적 활성제를 필요로 하는 대상에게 전달하는 방법이 제공되며, 상기 방법은,
- [0591] 생물학적 활성제와 복합체화되거나 접합된 본원에 기술된 바와 같은 나노 섬유를 대상에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0592] 특정 실시형태에서, 생물학적 활성제는 아연 또는 철 또는 셀레늄 또는 마그네슘, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 생물학적 활성제는 항암 약물을 포함할 수 있고, 대상은 암에 걸린 대상일 수 있다. 특정 실시형태에서, 항암 약물은 파클리탁셀 또는 빈크리스틴일 수 있다.
- [0593] 특정 실시형태에서, 생물학적 활성제는 나노 섬유의 형성 동안 나노 섬유에 도입될 수 있거나, 생물학적 활성제는 임의로 알코올 또는 다른 유기 화합물을 포함하는 수성 기반 매질에서 이미 형성된 나노 섬유와 복합체화될 수 있다. 특정 실시형태에서, 수성 기반 배지는 DMSO, 또는 완충제 또는 둘 다를 포함할 수 있다.
- [0594] 또 다른 실시형태에서, 필요로 하는 대상에서 암을 치료 또는 예방하는 방법이 본원에서 제공되며, 상기 방법은,
- [0595] 본원에 기술된 바와 같은 나노 섬유를 대상에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0596] 특정 실시형태에서, 나노 섬유는 항암 약물과 동시에 또는 순차적으로 또는 공동 투여될 수 있다. 특정 실시형태에서, 나노 섬유는 항암 약물과 복합체화되거나 접합될 수 있다. 특정 실시형태에서, 항암 약물은 파클리탁셀 또는 빈크리스틴일 수 있다.
- [0597] 또 다른 실시형태에서, 본원에서 대상에게 가용성 식이 섬유를 제공하는 방법이 제공되며, 상기 방법은,
- [0598] 본원에 기술된 바와 같은 나노 섬유를 대상에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0599] 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 바와 같은 나노 섬유를 포함하는 점도 증진 식품 첨가제가 본원에 제공된다.
- [0600] 또 다른 실시형태에서, 필요로 하는 대상의 식후 혈당 수준을 감소시키는 방법이 본원에서 제공되며, 상기 방법은,
- [0601] 본원에 기술된 바와 같은 나노 섬유를 대상에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0602] 또 다른 실시형태에서, 본원에 기재된 바와 같은 나노 섬유를 포함하는 화장품이 본원에서 제공된다.
- [0603] 또 다른 실시형태에서, 본원에 기재된 바와 같은 나노 섬유 및 임의로 생물학적 활성제를 포함하는 조성물을, 필요로 하는 대상에게 국소 투여하기 위한 조성물이 본원에서 제공된다.
- [0604] 또 다른 실시형태에서, 필요로 하는 대상에서 태양 화상을 예방하는 방법이 본원에서 제공되며, 상기 방법은,
- [0605] 본원에 기술된 바와 같은 나노 섬유를 대상의 피부에 적용하는 단계를 포함한다.
- [0606] 특정 실시형태에서, 나노 섬유는 안토시아닌 또는 다른 UV-보호제를 포함하거나 이와 함께 적용될 수 있다.
- [0607] 또 다른 실시형태에서, 세포 증식을 감소시키는 방법이 본원에 제공되며, 상기 방법은,
- [0608] 세포 또는 조직 또는 기관에, 임의로 세포 독성제와 복합체화되거나 접합된 나노 섬유를 도입하는 단계를 포함한다.
- [0609] 특정 실시형태에서, 나노섬유는 세포 또는 조직 또는 기관에 대해 특이적인 표적화 항체와 복합체화되거나 접합될 수 있다.
- [0610] 특정 실시형태에서, 나노 섬유는 항암 약물과 동시에, 또는 순차적으로 또는 공동-투여되거나 함께 사용될 수

있다. 특정 실시형태에서, 나노 섬유는 항암 약물과 복합체화 되거나 접합될 수 있다. 특정 실시형태에서, 항암 약물은 파클리탁셀 또는 빈크리스틴일 수 있다.

[0611] 또 다른 실시형태에서, 필요로 하는 대상체의 간에서 트리글리세라이드 축적을 감소시키는 방법이 본원에서 제공되며, 상기 방법은,

[0612] 본원에 기술된 바와 같은 나노 섬유를 대상에게 투여하는 것을 포함한다.

[0613] 또 다른 실시형태에서, 암 마커에 특이적인 표적화 항체와 접합된, 본원에 기재된 나노 섬유를 포함하는 표적화된 나노 섬유가 본원에서 제공된다. 특정 실시 형태에서, 표적화 항체는 표적화된 나노 섬유를 암 세포로 표적화하기 위한 PD-L1 항체를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 표적화된 나노 섬유는 적어도 하나의 세포 독성 또는 항암 약물과 복합체화 되거나 접합될 수 있다. 특정 실시형태에서, 표적화된 나노 섬유는 파클리탁셀, 독소루비신, 또는 둘 모두와 복합체를 형성하거나 접합될 수 있다.

[0614] 또 다른 실시형태에서, 항균제와 복합체화 되거나 접합된 본원에 기술된 바와 같은 나노 섬유를 포함하는, 항균 나노 섬유가 본원에 제공된다. 특정 실시형태에서, 항균제는 리소자임, 테트라사이클린, 또는 니신, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 항균 나노 섬유는 MDR 박테리아 감염을 치료하거나 예방하는데 사용하기 위한 것일 수 있다.

[0615] 식품 분말:

[0616] 일 실시형태에서, 생물학적 활성제를 필요로 하는 대상 또는 유기체에 전달하는 방법이 제공되며, 상기 방법은

[0617] 화학적 또는 물리적 과정을 사용하여 생물학적 활성제와 복합체화 되거나 접합된, 본원에 기술된 식품 분말을 대상에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0618] 다른 실시형태에서, 생물학적 활성제는 셀레늄, 아연, 철 또는 마그네슘과 같은 원소일 수 있다. 다른 실시형태에서, 생물학적 활성제는 항암 약물일 수 있고, 대상은 암에 걸린 대상일 수 있다. 특정 실시형태에서, 항암 약물은 파클리탁셀, 빈크리스틴, 또는 암 치료에 사용되는 임의의 천연 또는 합성 화합물일 수 있다.

[0619] 또 다른 실시형태에서, 생물학적 활성제는 식품 분말의 형성 동안 식품 분말에 도입될 수 있거나, 생물학적 활성제는 임의로 알코올 또는 다른 유기 화합물을 포함하는 수성 기반 매질에서 이미 형성된 식품 분말과 복합체화될 수 있다. 특정 실시형태에서, 수성 기반 배지는 DMSO, 또는 완충액, 또는 둘 다를 포함할 수 있다.

[0620] 또 다른 실시형태에서, 필요로 하는 대상에서 염증을 유발하는 활성 산소 종 수준의 증가와 관련된 질환 또는 질병을 치료하는 방법이 본원에서 제공되고, 상기 방법은,

[0621] 본원에 기재된 바와 같은 식품 분말을 대상에게 투여하는 것을 포함한다.

[0622] 또 다른 실시형태에서, 본원에서는 필요로 하는 대상에서 염증을 치료 또는 감소시키는 방법이 제공되며, 상기 방법은,

[0623] 본원에 기재된 바와 같은 식품 분말을 대상에게 투여하는 것을 포함한다.

[0624] 특정 실시형태에서, 식품 분말은 항염증제를 포함하거나 이와 함께 공동 투여될 수 있다. 특정 실시형태에서, 항염증제는 커큐민을 포함할 수 있다.

[0625] 또 다른 실시형태에서, 필요로 하는 대상에서 비만을 치료 또는 감소시키는 방법이 제공되며, 상기 방법은,

[0626] 본원에 기재된 바와 같은 식품 분말을 대상에게 투여하는 것을 포함한다.

[0627] 또 다른 실시형태에서, 식품 분말은 전통적으로 식품 또는 의료 목적으로 사용되는 견과류, 콩과 식물, 허브, 향신료, 채소 또는 진균 식물 조직으로부터 적어도 부분적으로 유래된 성분을 포함할 수 있다.

[0628] 또 다른 실시형태에서, 필요로 하는 대상에서 암을 치료 또는 예방하는 방법이 본원에서 제공되며, 상기 방법은,

[0629] 본원에 기재된 바와 같은 식품 분말을 대상에게 투여하는 것을 포함할 수 있다

[0630] 다른 실시형태에서, 식품 분말은 항암 약물과 동시에 또는 순차적으로 공동 투여될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 식품 분말은 항암 약물과 복합체화 되거나 이와 접합될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 항암 약물은 파클리탁셀 또는 빈크리스틴일 수 있다.

- [0631] 또 다른 실시형태에서, 대상에게 가용성 식이 섬유를 제공하는 방법이 본원에서 제공되며, 상기 방법은,
- [0632] 본원에 기재된 바와 같은 식품 분말을 대상에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0633] 또 다른 실시형태에서, 본원에 기재된 바와 같은 식품 분말을 포함하는 점도 증진 식품 첨가제가 본원에서 제공된다.
- [0634] 또 다른 실시형태에서, 필요로 하는 대상의 식후 혈당 수준을 감소시키는 방법이 제공되며, 상기 방법은,
- [0635] 본원에 기재된 바와 같은 식품 분말을 대상에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0636] 또 다른 실시형태에서, 세포 증식을 감소시키는 방법이 본원에서 제공되며, 상기 방법은
- [0637] 본원에 기술된 바와 같은 식품 분말로 세포 또는 조직 또는 기관을 치료하는 것을 포함한다.
- [0638] 다른 실시형태에서, 식품 분말은 항암 약물과 동시에 또는 순차적으로 사용될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 식품 분말은 항암 약물과 복합체화 되거나 이와 접합될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 항암 약물은 파클리탁셀 또는 빈크리스틴일 수 있다.
- [0639] 또 다른 실시형태에서, 필요로 하는 대상의 간에서 트리글리세라이드 축적을 감소시키는 방법이 본원에서 제공되며, 상기 방법은,
- [0640] 본원에 기재된 바와 같은 식품 분말을 대상에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0641] 또 다른 실시형태에서, 항균제와 복합체화되거나 접합된, 본원에 기술된 바와 같은 식품 분말을 포함하는, 항균 식품 분말이 본원에 제공된다. 특정 실시형태에서, 항균제는 리소자임, 테트라사이클린, 또는 니신, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 항균 식품 분말은 MDR 박테리아 감염을 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한 것일 수 있다.
- [0642] 또 다른 실시형태에서, 항균제와 복합체화되거나 접합된, 본원에 기술된 바와 같은 식품 분말을 포함하는, 항균 식품 분말이 본원에 제공된다. 다른 실시형태에서, 항균제는 리소자임, 테트라사이클린 또는 니신, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 항균 식품 분말은 MDR 박테리아 감염을 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한 것일 수 있다.
- [0643] **실시예 1 - 나노 입자 및 나노 섬유의 제조 및 특성화**
- [0644] *세포 파괴 조건에서 신 체리(*Prunus cerasus* L.) 열매의 거대 분자의 나노 입자와 나노 섬유로의 자연적 조립 및 그것들 사이의 비교*
- [0645] 본 발명자들은 나노 구조가 세포 파괴가 발생하는 특정 과일 처리 방법에 의해 생성될 수 있고, 분자 상호 작용이 발생할 수 있는 환경을 제공하고, 잠재적으로 잘 정의된 나노 구조의 형성을 초래할 수 있다는 가설을 세웠다. 본 실시예는 예를 들어, 식품 기능, 만성 질환 예방 및/또는 세포로의 약물 및/또는 생체 활성 전달에서 유익한 역할을 할 수 있는, 상이한 방법을 사용하여 생물학적 공급원(이 실시예에서는 신 체리 열매)에서 유래된 나노 입자 및 나노 섬유의 제조, 분리, 물리 화학적 특성 및 구조적 특성을 설명한다.
- [0646] 이 실시예에서, 수성 매질(또는 알코올과 물을 모두 포함하는 알코올 매질)에서 신 체리 열매의 균질화, 및 나노 입자(그리고 균질화되는 과일에서 폴리 페놀을 추출한 나노 섬유)를 형성하기 위한 세포 성분(예: 펙틴, 글루칸, 단백질에 연결된 올리고당 및/또는 이의 분해 산물), 폴리 페놀 및 유기산(예: 말산)의 자가 조립을 수행하고 연구했다. 이들 연구에서 형성된 나노 입자는 세제에 안정하고 용액에서 약 25 내지 약 50nm의 크기 범위의 균일한 구형 구조였으며, 동결 건조 후 분말로 탈수했을 때 크기가 훨씬 더 컸다. 본원에서 나노 섬유로 지칭되는 형태학적으로 상이한 유형의 나노 구조가 또한 제조되었으며, 이는 구형 구조와 구별되며 약 5 내지 약 10 nm의 폭, 및 마이크로미터 길이의 나노 섬유 형태로서, 균질화에 사용되는 식물 조직으로서 폴리 페놀이 없는 에탄올 표백된 체리에서 생성된 것이다. 복합체는 펙티나제로 처리함으로써 완전히 파괴될 수 있고, 구성 성분 구조의 펙틴 성질을 나타낸다. 또한, 셀룰라아제와 트립신으로 처리하면 나노 입자의 외부 원 섬유 구조가 제거되어, 내부 코어가 노출되었다. 나노 입자의 SDS-PAGE는 펙틴 및 폴리 페놀과 함께 도말(smear)로 공동-이동하는 다양한 질량의 폴리펩티드를 보여 주었고, 나노 섬유는 주로 폴리펩티드를 나타냈다. 나노 입자와 나노 섬유는 모두 아라비노갈락탄-단백질 복합체에 대해 생성된 항체에 대해 강한 친화성을 보였고, 항-익스텐신에 대해 훨씬 더 낮은 친화도를 보였다. 나노 입자는 항-호모갈락투로난, 항-자일로글루칸과 반응하지 않았고 나노 섬유는 매우 강한 반응을 보였다. 나노 입자는 포도당, 갈락토오스/갈락투론산, 만노스와 같은 6 탄당이 풍부하

지만, 나노 섬유는 아라비노스와 같은 5 탄당이 풍부했다. 나노 입자와 나노 섬유의 FT-IR 스펙트럼은 단백질과 펙틴의 스펙트럼과 유사성을 보였다. SDS-PAGE 이후 뚜렷한 밴드로 보이는 38kD 폴리펩티드는 글루칸 엔도-1,3-베타-글루코시다아제와 서열 유사성을 보인 반면, 20kD 폴리펩티드는 타우마틴-유사 단백질(thaumatin-like protein)과 유사성을 보였다. 본 실시예는 신 체리 열매로부터 자기 조립된 나노 입자의 구조적 특성을, 또한 신 체리 열매로부터 유래된 나노 섬유와 비교하여, 다른 방식으로 설명한다.

[0647] **재료 및 방법:**

[0648] 신 체리: 이 실시예에서 사용된 신 체리 열매는 온타리오 주 바인랜드에 있는 바인랜드 리서치 스테이션(Vineland Research Station)에서 왔으며, 여기에서 이들은 생식질(germplasm)로 유지된다. 모든 품종은 폴리페놀 함량이 300~500 mg/100g 신선 중량 범위인, 고 폴리 페놀 함유 품종이다. 현재 연구에 사용된 주요 품종은 V 70151이었고, V 71261, Hymann Conserva 및 Hymann Rubisn과 같은 다른 것들도 높은 수준의 나노 입자 형성을 보여주었다. 이 실시예에서 사용된 신 체리는 *Prunus cerasus L*이다.

[0649] 화학 물질은 미국 세인트루이스에 있는 Sigma Chemical Co.에서 입수했다; Fisher Chemicals; In Vitrogen; 분자 프로브(Molecular Probes); 기타 중에서.

[0650] **나노 입자의 제조 및 분리, 나노 섬유의 제조 및 분리:**

[0651] 나노 입자의 경우, 추출 방법은 PTA 10 프로브가 있는 폴리트론 균질기를 사용하여 매질(이 실시예에서 사용된 물이 바람직하지만, 대안으로는 예를 들어 절대 또는 희석된 메탄올 또는 에탄올을 사용할 수 있음)에서, 1 : 1 w/w 비율(조직 1g 대 물 또는 알코올 1ml)로, 과일 조직이 완전히 균질화될 때까지 중간(4~5) 설정에서 체리 열매를 균질화하는 것을 포함한다. 균질물을 4 층의 무명천으로 여과하여 파편을 제거했다. 생성된 균질물을 Sorvall RC 6 Plus 원심 분리기에서 20 분 동안 원심 분리(18,000xg)했다. 상청액을 따라 내었다. 5ml의 상청액을 4℃에서 12 시간 동안 물(1 리터)에 대해 투석(spectra-Por, 6-8kD 컷 오프)하였다. 투석 백 내의 투석된 추출물은 상청액(조 추출물이라고 함)과 마찬가지로 -20℃에서 냉동 보관되었다. 추출물은 수용액 상태인 경우 나노 입자를 분해할 수 있는 효소를 포함할 수 있기 때문에, 투석된 추출물은 저온 유지되었다. 알코올성 또는 실질적인 알코올성 매질이 사용되는 실시형태에서, 이러한 효소는 변성될 가능성이 높고/높거나 감소된 활성을 가질 수 있지만, 저온이 여전히 일반적으로 바람직하다. 본원에 기술된 바와 같이, 일단 동결 건조되거나 분무 건조되면(예를 들어), 나노 입자는 안정하다.

[0652] 물에 침출된 폴리 페놀은 상당히 희석되어, 실험 목적으로, sep-pak C18 카트리지를 통과함으로써 소수성 상호작용 크로마토그래피로 농축되었고, 메탄올로 용출한다.

[0653] 동결 건조를 위해, 투석된 균질물을 1 리터 부피(약 250ml)의 플라스크에 넣고 액체 N₂에서 냉각시켜 껍질(shell)로 만들었다. 플라스크를 동결 건조기(-60℃에서 3-4 Toricelli의 진공 상태에서 작동하고, 이 목적으로 사용됨)에 부착하였다. 동결 건조를 수행하기 전에 알코올 용액을 물에 투석하여 알코올을 제거했다. 나노 입자의 경우, 물이 나노 입자에 결합되어 있기 때문에, 이 방법으로 물을 완전히 제거하지 못했지만, 이것은 농축된 용액을 제공할 수 있다. 나노 섬유 용액은 이러한 방법을 사용하여 미세한 분말로 투석될 수 있다.

[0654] 나노 섬유의 경우 씨를 뺀(pitted) 신 체리 열매를 50% 에탄올에 48 시간 동안 3번 용매를 변경하면서 담가 놓았으며, 그 결과 폴리 페놀이 제거되어 체리 열매가 회백색을 띠게 되었다(여기서는 표백이라고 함). 신 체리 열의 씨 제거(pitting)는 용매와의 접촉 표면을 생성하고, 특정 실시형태에서 과일은 심지어 폴리 페놀의 제거를 더욱 증가시키기 위해 더 작은 크기의 조각으로 슬라이스될 수 있다는 것이 고려된다. 표백된 과일/조각을 물에 담그고 에탄올을 제거하기 위해 물에 3회 철저히 세척하였다(총 3 시간). 이들 과일은 위에서 설명한 표백되지 않은 체리 추출에 사용된 폴리트론을 사용하여 물 또는 메탄올(1:1 w/w)에서 균질화되었다. 15 분 동안 원심 분리(18000xg)로 파편을 제거한 후, 균질물을 물에 대해 투석하였다. 나노 섬유를 포함하는 투석된 추출물은 폴리 페놀이 실질적으로 없고 폭신한 흰색 분말로 동결 건조될 수 있다.

[0655] 나노 분무 건조를 위해, 미세 스프레이를 형성하도록, 나노 입자/나노 섬유 용액을 물과의 농도로 희석하였다(진한 용액은 사용되는 스프레이의 노즐을 막는 경향이 있음). 나노 분무 건조는 Buchi 미니 분무 건조기(B290)를 사용하여 수행되었다(펌프 속도 - 35~50%, 10~15ml 유량 제공, 입구 온도 180℃, 출구 온도 100℃, 공기 흐름 400 리터/시간 유지). 생성된 분말은 -20℃에서 밀봉된 튜브에 저장되었다.

[0656] **전자 현미경:** 처리된 나노 크기의 체리 분말 나노 입자 또는 나노 섬유 분말 약 500 ~ 1000 μg을 양면 접착 탄소 전도성 테이프의 일면에 균일하게 뿌렸다. 테이프는 12mm 직경의 알루미늄 스템(stub)에 장착되었다. 샘플

표면은 상이한 배열로 관찰되었으며 이미지는 주사 전자 현미경(모델 QUANTA 250, FEI, The Netherlands)을 사용하여 기록되었다.

- [0657] 나노 입자의 투과 전자 현미경은 앞서 설명한 바와 같이 투석된 추출물 또는 물(ml 당 약 100~200 μ g)에 용해된 분말을 사용하여 수행되었다(Jacob and Paliyath, 2008). 탄소 코팅된 니켈 그리드는 용액의 50 μ l 방울에 떠있고 나노 입자는 30 초 동안 그리드에 흡착되도록 두었다. 그리드를 건조하고 1 % 우라닐 아세테이트 한 방울에 30초 동안 부유시켰다. 그리드를 건조하고 Leo 912 B 투과 전자 현미경으로 검사했다.
- [0658] **단백질 분석:** 가공 중 단백질 분해를 평가하기 위해 제조사(Invitrogen)에서 제안한 대로 TRIzol®을 사용하여 각 단계에서 단백질을 추출했다. 간단히 말해, 100 μ g 단백질 당량 샘플(Bradford 시약으로 측정)을 TRIzol 시약(1ml)에서 균질화하거나 잘 혼합하고 실온에서 5 분 동안 배양했다. 균질물은 4℃에서 15 분 동안 12000xg에서 원심 분리되었다. 상 분리를 위해 200 μ l의 클로로포름을 첨가하고 잘 혼합하고 12000xg에서 15 분 동안 4℃에서 원심 분리하였다. 수상 및 유기상을 분리하였다. 수상을 동결 건조에 의해 건조시켰다. 건조된 잔류물을 SDS-PAGE용 샘플 로딩 완충액에서 가열(90℃)하여 재용해시켰다. 유기 분획에서 단백질을 침전시키기 위해 1.5ml의 이소프로판올을 첨가하고 실온에서 10분 동안 배양한 다음 4℃에서 12000xg에서 10 분 동안 원심 분리하였다. 원심 분리 후 얻은 펠렛을 95% 에탄올 중 0.3M 구아니딘 하이드로클로라이드를 사용하여 3회 세척한 다음 2ml의 100% 에탄올을 사용하여 최종 세척하였다. 샘플 로딩 완충액에서 가열하여 펠렛을 재용해시켰다. 단백질 샘플은 변성 및 환원 조건 하에서 10% 폴리아크릴아미드 겔에서 분리되었다. 겔을 10% 아세트산에 고정하고 쿠마시 브릴리언트 블루로 염색했다.
- [0659] **나노 입자에서 폴리 페놀과 펩티드의 연관성(association):** 물에서 신 체리를 균질화하는 동안 나노 입자 형성은 자발적인 과정이었다. 생성된 균질물은 일반적으로 약 3.0의 pH로 매우 산성이었다. 거의 중성 pH에서의 균질화가 나노 입자 형성 및 단백질과 폴리 페놀의 연관성에 영향을 미치는지 여부를 시험하기 위해, 신 체리를 pH 6.0의 300mM 구연산 나트륨 완충액에서 균질화했다. TRIzol™ 단백질 추출 방법에서, 유리 단백질은 유기상으로 이동하는 반면, 탄수화물과 같은 친수성 분자와 밀접하게 결합된 단백질은 수상으로 분할될 수 있다. 나노 입자에서 폴리 페놀과 단백질의 연관성을 평가하기 위해, TRIzol™ 추출 후 얻은 수상 및 유기상의 단백질을 SDS-PAGE를 사용하여 분석했다. 회석된 수상은 동결 건조에 의해 농축된 반면, 유기상의 단백질은 앞서 설명한 바와 같이 이소프로판올을 사용하여 침전되었다. 침전된 중간상은 단백질 샘플 로딩 완충액에 직접 가용화되었다. 단백질은 변성 및 환원 조건 하에서 10% 폴리아크릴아미드 겔에서 분리되었다. 전기 영동 후, 겔을 10% 아세트산에서 5 분 동안 배양하고 착색된 폴리 페놀의 분포를 강조하는 사진을 찍었다. 그 후, 단백질 검출을 위해 겔을 쿠마시 브릴리언트 블루로 염색하였다.
- [0660] 이 시험에서 나노 입자 형성은 3 ~ 6 범위의 낮은 pH에서 선호되었다. 폴리 페놀과 펩티드의 연관성은 염색되지 않은 겔(도 12A)과 쿠마시 브릴리언트 블루로 염색된 동일한 겔(도 12B)에서 관찰되는 펩티드와 안토시아닌의 공동 이동(co migration)에 의해 이해될 수 있다.
- [0661] **나노 입자에서 펙틴 산의 연관성:** 사과 펙틴과 폴리갈락투론산을 0.1N NaOH에 용해시켜 표준 물질로 사용했다. 이들 펙틴 샘플과 함께 나노 입자 및 유리 폴리 페놀은 변성/환원 조건 하에서 10% 폴리아크릴아미드 겔에서 용해되었다. 전기 영동 후 겔을 프로피듐 요오드화물(물에 10 μ g/ml)으로 1 시간 동안 염색하고 사진을 찍었다. 동일한 겔을 쿠마시 브릴리언트 블루로 다시 염색했다.
- [0662] **나노 입자의 구조 성분의 웨스턴 및 스팟 블롯 분석:** 나노 입자의 주요 탄수화물 구조 성분의 특성을 확인하기 위해 호모갈락투로난(LM20), 익스텐신(LM1) 및 아라비노갈락탄 단백질(LM14)에 대해 생성된 3개의 단일 클론 항체 (www.Plantprobes.net)를 사용하여 스팟 블롯 및 웨스턴 블롯을 수행했다. 미표백 및 표백된 신 체리에서 얻은 나노 입자의 동결 건조된 분말과 나노 섬유를 각각 샘플 로딩 완충액에서 5분 동안 끓는 물에서 가열하고 환원 조건 하에서 10% SDS-PAGE를 사용하여 분리했다. 겔로부터 분리된 폴리펩티드를 밤새 니트로셀룰로스 막으로 전기 이동시켰다. 도트 블롯 분석을 위해, 2 μ l의 끓인 샘플을 니트로셀룰로오스 멤브레인에 직접 적용했다. 이들 니트로셀룰로스 막은 PBS(phosphate buffered saline) 완충액 중 5% 무지방 우유 분말 용액으로 실온에서 1 시간 동안 차단되었다. PBS-T(0.1% Tween-20이 포함된 PBS)로 3회 세척하고 PBS로 최종 세척한 후, 막을 PBS 중 1 차 항체 용액(20x 희석)에서 실온에서 2 시간 동안 배양했다. 배양 후, 막을 PBS-T로 3회 세척하고 PBS에서 최종 세척한 후 실온에서 1 시간 동안 항-펩티드-AP 접합된 2 차 항체에서 배양하였다. 2 차 항체에서 배양한 후, 막을 PBS-T에서 3 회 세척하고 PBS에서 최종 세척하였다. 제조사가 권장하는 Bio-Rad Alkaline phosphatase conjugate substrate kit를 사용하여 발색이 이루어졌다.
- [0663] 이온 트랩이 장착된 Varian Saturn 2000 시스템에서 분석이 수행되었다. GC는 Sil-CB8(0.25mm x 30m) 컬럼에서

1 ml min의 일정한 유속으로 프로그래밍되었다. 주입기 온도는 분할 모드(20:1)에서 250℃로 일정하게 유지되었다. 주입하는 동안 오븐 온도를 100℃에서 4 분 동안 일정하게 유지한 다음, 8 ℃/분의 속도로 250℃로 상승시키고 추가 3 분 동안 250℃에서 유지했다. 이온 트랩은 3 분의 초기 지연 세그먼트로 40~650 m/z 사이의 질량을 분석하도록 프로그래밍되었다.

[0664] **당의 유도체화:** 주어진 GC-MS 매개 변수에서 각각의 유지 시간을 측정하기 위해 다양한 5 탄당 및 6 탄당의 트리메틸실릴(TMS) 유도체를 제조했다. 다양한 설탕 표준 물질(2mg)을 100 μl의 무수 피리딘에 용해시키고 100 μl의 BSTFA:TMCS(N, O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide:trimethylchlorosilane; 99:1)를 유리 바이알의 용액에 첨가했다. 공급사(Sigma)가 설명하는 절차를 사용하여 유도체화를 수행했다. 반응 혼합물을 80℃에서 2 시간 동안 배양하였다. 분석을 위해 1 μl의 유도체화된 당을 GC-MS에 주입했다.

[0665] **나노 입자의 유도체화:** 나노 입자는 일반적으로 위에서 설명한대로 10ml 증류수에서 10gm 신 체리 열매를 균질화하여 신선하게 제조되었다. 균질물을 15000g에서 20분 동안 원심 분리하였다. 상층액으로부터 정제된 주스를 10ml PD-10 탈염 컬럼에 통과시키고 6~8 kDa 컷-오프 막을 사용하여 증류수에 대해 추가로 투석하였다. 100 μl의 정제된 나노 입자를 200 μl의 농축된 TFA와 혼합하여 최종 농도가 8.6M이 되도록 혼합하고 90℃에서 2 시간 동안 배양하였다. 가수 분해된 샘플을 질소 기류 하에서 건조시켰다. 건조된 샘플을 100 μl의 피리딘에 재현탁하고 100 μl의 BSTFA:TMCS(99:1)를 용액에 첨가했다. 유도체화는 80℃에서 1 시간 동안 배양하여 수행되었다. GC-MS 분석을 위해 1 μl의 샘플이 주입되었다.

[0666] **나노 섬유유의 유도체화:** 동결 건조된 나노 섬유 4mg을 물 1ml에 용해시켜 나노 섬유 용액을 제조하였다. 100 μl의 나노 섬유를 8.6M TFA에서 90℃에서 2 시간 동안 가수 분해했다. 가수 분해된 샘플을 유리 섬유 필터를 통해 여과하고 질소 기류 하에서 건조시켰다. 건조된 샘플을 100 μl의 피리딘에 재현탁하고 100 μl의 BSTFA:TMCS(99:1)를 용액에 첨가했다. 유도체화는 80℃에서 1 시간 동안 배양하여 수행되었다. GC-MS 분석을 위해 1 μl의 샘플이 주입되었다.

[0667] **나노 입자의 FT-IR 분석:** Bruker Tensor 27 InfraRed 분광기를 사용하여 나노 입자 및 나노 섬유의 FT-IR 분석을 수행했다. 동일한 양의 분말(1%)을 KBr과 혼합하고 스펙트럼을 획득하기 위해 스캔한 투명한 디스크로 만들었다.

[0668] **나노 입자의 X-선 회절:** Bruker Nanostar SAXS 회절계를 사용하여 나노 입자의 작은 각도 X-선 회절을 수행했다. 표백되지 않은 체리의 투석 추출물에서 나온 나노 입자의 동결 건조된 분말과 투석액을 회절 분석에 사용했다.

[0669] **통계 분석:** 통계 분석은 GraphPad Prism 버전 4를 사용하여 수행되었다. 두 가지 평균을 가진 결과는 Student's t 테스트를 사용하여 비교되었다. 다중 평균을 사용한 결과는 유의 수준을 평가하기 위해 단방향 ANOVA와 "Tukey's test"를 사용하여 비교되었다. 상당히 다른 평균(p < 0.05)은 상이한 위첨자로 표시된다.

[0670] **결과 및 논의:**

[0671] **나노 입자의 특성화:** 이 연구에서, 수성 매질에서 과일의 균질화는 세포 거대 분자와 단순 분자의 자연적인 조직화를 방해하여, 무작위이지만 구조화된 조립으로 인해 뚜렷한 물리 화학적 및 구조적 특성을 가진 구조가 생성된다. 폴리 페놀과, 폴리 페놀과 복합된 나노 구조 사이의 크기 차이는 저 분자량 컷오프 막 또는 크기 배제 분리를 가능하게 하는 PD-10 컬럼을 사용하여, 투석을 통해 이러한 구조를 분리하는 데 사용되었다. 신 체리 추출물, 나노 입자를 포함하는 투석된 추출물 및 투석물(분자량이 약 6kD 이하인 막에서 제외된 분자 포함)의 폴리 페놀 함량이 표 1에 도시된다. 추출물 중 폴리 페놀의 거의 80%가 투석막 내에서 유지되었고, 이는 폴리 페놀이 복합체화 상태로 존재함을 시사한다. 포도와 블루 베리와 같은 다른 과일에 비해, 복합체화 형성은 신 체리에서 훨씬 더 높았다(포도 및 블루 베리에서도 나노 입자가 형성됨). 폴리 페놀 성분의 HPLC-MS 분리는 덜 풍부하게 페오니딘 3-루티노사이드(peonidin 3-rutinoside)와 함께 주요 안토시아닌으로서 시아디닝-3-루티노사이드(cyaniding-3 rutinoside)의 존재를 보여 주었다. 클로로겐산 및 파라-쿠마로일 퀴산(para-coumaroyl quinic acid)과 같은 페놀 산은 훨씬 더 적은 수준으로 존재했다(표 2 참조). 조 추출물, 투석된 추출물(나노 입자; NP) 및 수성 및 메탄올 추출물의 투석액의 항산화 활성은 표 3에 나타난다. 모든 추출물은 높은 수준의 과산화-, 하이드록실- 및 DPPH 라디칼 소거 활성을 나타냈다. 조 추출물은 두 추출 조건에서 가장 높은 항산화 능력을 나타냈다. 투석물(dialyzate)은 가장 낮은 항산화 활성을 가졌다. 항산화 능력의 상당 부분이 나노 입자(즉, 투석된 추출물)와 관련이 있다.

[0672] 메탄올에서의 추출(약 50 %v/v 최종)도 나노 입자를 형성했다.

[0673] 투석된 추출물은 단백질(10~12%), 폴리 페놀(12~14%), 펙틴(10%~15%) 및 기타 탄수화물(예: 자일로 글루칸과 같은 헤미셀룰로스 성분, 아라비노갈락탄과 같은 펙틴 성분)을 포함하는 폭신한 분말로 동결 건조될 수 있다. 일단 형성되면, 나노 입자의 폴리 페놀은 에탄올(50~100%)로 추출할 수 없다. 복합체는 일반적으로 산에 안정했다(pH <3). 10% 트리클로로아세트산을 첨가하면 복합체는 붉은 잔류물로 침전되지만 알칼리성 조건(> pH 7)은 폴리 페놀의 고리 절단을 일으켜 잠재적으로 거대 분자 조직화를 불안정하게 한다. 이에 비해 에탄올 표백 체리의 나노 섬유는 검출 가능한 양의 폴리 페놀을 함유하지 않았지만, 단백질(약 15%), 펙틴(15~20%) 및 기타 탄수화물(자일로글루칸과 같은 헤미셀룰로스, 아라비노실란과 같은 펙틴 성분 및 복합체화된 펙틴(60~70%))을 함유하고 있다. 복합체화 형성은 무작위 이벤트이기 때문에, 구성 성분 유형 간의 엄격한 비례의 원칙을 달성하기 어려우므로 다양한 구성 성분의 일반적인 비율이 제공된다.

[0674] 표 1: 신 체리 추출물의 총 폴리 페놀 함량

표 1

총 폴리페놀 함량 (mg 갈릭산/g 신선 중량 당량)		
시료	물 추출물	메탄올 추출물
조 추출물	0.88 ± 0.1 ^{b,c} - 0.94 ± 0.1 ^{b,c}	1.04 ± 0.1 ^{b,c} - 1.13 ± 0.1 ^{b,c}
투석된 추출물(나노입자)	0.65 ± 0.1 ^{a,c} - 0.63 ± 0.1 ^{a,c}	0.70 ± 0.1 ^{a,c} - 0.80 ± 0.1 ^{a,c}
투석물	0.03 ± 0.1 ^{a,b} - 0.06 ± 0.1 ^{a,b}	0.03 ± 0.1 ^{a,b} - 0.05 ± 0.1 ^{a,b}

[0676] 위첨자 "a"는 CE(물 및 메탄올)로부터 p < 0.05에서 통계적 유의성을 나타내고; "b"는 DE(물 및 메탄올)로부터 p < 0.05에서 통계적 유의성을 나타내고; "c"는 각각 DZ(물 및 메탄올)로부터 p < 0.05에서 통계적 유의성을 나타낸다. 각 세트의 값은 세 가지 개별 추정치의 평균 ± 표준 오차이다.

[0677] 표 2: 신 체리의 투석된 추출물의 폴리 페놀 조성(mg 갈릭산 당량/g 신선 중량)

표 2

폴리 페놀	투석된 물 추출물	투석된 메탄올 추출물
시아니딘-3-소포로사이드(Cyanidin-3-Sophoroside)	0.07 ± 0.1	0.07 ± 0.0
시아니딘-3-루티노사이드(Cyanidin-3-Rutinoside)	0.71 ± 0.1 ^b	0.55 ± 0.1 ^a
페오니딘-3-루티노사이드(Peonidin-3-Rutinoside)	0.17 ± 0.1	0.16 ± 0.0
페라고니딘-3-루티노사이드(Pelargonidin-3-Rutinoside)	0.06 ± 0.1 ^b	0.1 ± 0.1 ^a
p-쿠마로일 퀸산(p-Coumaroyl quinic Acid)	0.02 ± 0.0	0.01 ± 0.0
클로로겐산(Chlorogenic Acid)	0.04 ± 0.1	0.04 ± 0.1

[0679] 위첨자 "a" 및 "b"는 각 페놀 성분에 대해 각각 투석된 물 추출물 및 투석된 메탄올 추출물의 성분 간의 p < 0.05에서 통계적 유의성을 나타낸다. ND: 감지되지 않음. 정량화는 HPLC-MS 분석 및 피크 면적 비교에 의해 수행되었다.

[0680] 표 3: 신 체리에서 추출한 조 추출물, 투석된 추출물 및 투석액의 항산화능

표 3

항산화능(% 소강율(Quench rate)/μg 폴리 페놀)	
물 추출물	메탄올 추출물

항산화 분석	조 추출물	투석된 추출물 (나노입자)	투석물	조 추출물	투석된 추출물	투석물
과산화물 소거능	$2.6 \pm 0.2^{b,c}$	1.8 ± 0.1^a	1.4 ± 0.1^a	$3.6 \pm 0.1^{b,c}$	$2.5 \pm 0.1^{a,c}$	$1.6 \pm 0.2^{a,b}$
하이드록실 라디 칼 소거능	$4.9 \pm 0.2^{b,c}$	$2.1 \pm 0.2^{a,c}$	$1.5 \pm 0.1^{a,b}$	$6.5 \pm 0.3^{b,c}$	$3.9 \pm 0.3^{a,c}$	$1.8 \pm 0.1^{a,b}$
DPPH 라디칼 소 거능	$8.2 \pm 0.3^{b,c}$	4.4 ± 0.5^a	4.7 ± 0.1^a	$8.8 \pm 0.2^{b,c}$	$6.2 \pm 0.2^{a,c}$	$3.3 \pm 0.4^{a,b}$

[0682] 신 체리 추출물의 DPPH, 하이드록실 및 과산화물 라디칼 소거능(RSC). 위첨자 "a"는 조 추출물(CE)(물 및 메탄올)의 $p < 0.05$ 에서 통계적 유의성을 나타내고; "b"는 투석된 추출물(DE)(물 및 메탄올)로부터 $p < 0.05$ 에서 통계적 유의성을 나타내고; "c"는 각각 투석물(DL)(물 및 메탄올)로부터 $p < 0.05$ 에서 통계적 유의성을 나타낸다.

[0683] **나노 입자의 형태(morphology):** 투석된 추출물의 투과 전자 현미경(TEM)에서 직경이 약 25 ~ 약 50nm 범위인 나노 입자가 나타났다(도 1A, 화살표). 크기가 상당히 다양하여, 복합체가 구조적 성분의 손실을 통해 잠재적으로 변형될 수 있음을 시사한다. 나노 입자는 중앙 구조를 감싸고 있는 선형 필라멘트 성분을 가지고 있다. 이러한 구조는 복합체의 확대도에서 두 개의 나노 입자 사이에서 늘어나는 것을 볼 수 있다(도 1B, 화살표). 나노 입자 크기의 다양성은 중심 코어 주변을 여러 번 감는 복수의 섬유에서 발생할 수 있다. 섬유는 여러 나노 입자에서 풀린 것처럼 보이며(도 1B, 화살표), 이는 이들이 비공유 결합에 의해 함께 고정될 수 있으며, 외부 환경의 변화로 인해 나노 입자가 건물 단위로 분리될 수 있음을 시사한다. 나노 입자의 구조 성분의 TEM은 도 2에 도시된다. 도 2A는 나노 입자의 코어 구조는 구형 구조로 감긴 필라멘트가 벗겨져 있다(화살표). 섬유 유사 구조는 중앙 구형 구조에서 나오는 배경에서 관찰할 수 있다. 나선형 원섬유 구조를 나타내는 필라멘트의 하부 구조는 도 2B 및 C(화살표 1, 2)에서 볼 수 있다. 도 2D는 원섬유로 구성된 확장된 섬유 구조(화살표)를 보여준다. 따라서 나노 입자는 고유한 특성을 가진 하부 구조, 중심 코어, 코어를 둘러싼 섬유, 나선형으로 조립된 섬유 구조-비공유 결합을 통해 함께 고정될 수 있는 원섬유로 확장될 수 있음-를 형성하기 위해 여러 수준의 조직을 갖는 것으로 나타났다.

[0684] **나노 입자의 구조 성분:** 본 실시예에서는 나노 입자 및 나노 섬유를 제조하기 위한 식물 조직으로 숙성 신 체리를 사용하였다. 숙성 과일에 존재하는 거대 분자는 주로 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 펙틴 및 세포벽과 관련된 당 단백질과 같은 탄수화물이다(Negi and Handa, 2008). 숙성 과일에는 가용성 단백질이 거의 없다. 체리와 같은 과일에서 유기산은 숙성 과정에서 당으로 전환되는 주요 저장 분자이다. 주요 저장 성분인 전분은 고 분자량 구조로 존재하며, 숙성 과일에는 없다. 폴리 페놀 생합성은 열매에 붉은 색을 부여하는 액포에 폴리 페놀이 축적되면서 숙성 과정에서 증가한다.

[0685] 따라서 신 체리의 나노 입자는 주요 구조 성분으로서 세포벽 탄수화물(구조 탄수화물)과 단백질로 구성될 수 있다. 그렇다면 나노 입자는 펙티나제와 셀룰로라제 효소와 프로테아제를 사용하여 효소 소화를 할 수 있다는 가설을 세웠으며, 구조적 조직화에 대해 더 알아보기 위해 구조 검사를 통해 안정성을 평가했다. 나노 입자의 안정성에 대한 펙티나제(폴리갈락투로나제, α -1-4-글리코시다제) 처리의 효과는 도 3A에 표시되고, 확대된 영역은 3B에 표시된다. 펙티나제 소화(1 unit/ml)를 거친 후 나노 입자는 우라늄 이온이 펙틴에서 음전하를 띤 갈락투론산 분자에 결합함으로써 잠재적으로 형성된 전자 밀도 매트릭스 내에 산재된 작은 관형/소포 구조로 완전히 분해되었다(Negi and Handa, 2008). 이러한 소화된 구조가 상업용 콩코드 포도 주스에서 관찰된 나노 소포와 닮았다는 점은 흥미롭다(Jacob and Paliyath, 2008). 과일 균질물은 일반적으로 펙티나제로 처리되어 산업 공정 중에 더 높은 주스 수율을 얻는다. 이 관찰은 나노 입자가 펙틴에서 유래된 높은 수준의 탄수화물 올리고머를 포함하고 있음을 시사한다. 나노 입자는 또한 셀룰라아제(β -1,4-글루카나아제, 1 unit/ml)로 처리되었고 그에 따른 구조적 변형이 연구되었다. 펙티나제 소화와 달리, 셀룰라아제 처리는 훨씬 더 큰 소포와 소포 응집체를 형성했다(도 3C 및 3D, 화살표). 셀룰라아제는 펙틴을 소화할 수 없기 때문에 소화 후 남은 구조는 잠재적으로 나노 입자의 코어인 펙틴으로 만들어 질 수 있다. 따라서, 셀룰로스 모이어티는 나노 입자의 펙틴 코어를 둘러싸는 필라멘트 구조의 일부를 형성할 수 있다. 나노 입자는 또한 트립신(1 unit/ml)의 존재 하에서 배양되었으며, 이는 다시 나노 입자의 외부 필라멘트 구조를 분해하여 펙틴으로 만들어진 코어를 남겼다(도 4A). 이러한 구조는 또한 셀룰라아제 처리 후 관찰된 빈 껍질 구조와 유사하여, 나노 입자의 외부 필라멘트 구조가 셀룰로스 모이어티와 폴리펩티드(즉, 단백질성 물질)를 모두 포함함을 나타낸다. 트립신 처리에 의해 외부 섬유 구조를 벗겨낸 후 셀 구조의 확대보기는 도 4B에 표시된다. 트립신 소화 중에 형성된 중간 구조는 도 4C, 4D 및 4E에

표시된다. 도 4C는 트립신 처리의 결과로 방출되는 섬유 유사 구조(즉, 펙틴 코어 주변의 섬유 조직)의 동심원 고리로 둘러싸인 나노 입자를 보여준다. 도 4D는 복합체에서 벗겨진 섬유와 함께 나노 입자의 껍질을 보여준다. 도 4E는 로프를 닮은 구조로 섞이고 짜여진 긴 원섬유 구조로 구성된 섬유 재료의 하부 구조를 보여 주며, 섬유가 큰 직조 전체(entities)를 형성 할 가능성을 보여준다. 이러한 섬유 모양의 구조는 길고, 길이는 마이크로 미터에 이르지만 직경은 약 2 내지 약 3nm이다. 화학적 처리에 대한 나노 입자의 탄력성은 다양한 유형의 거대 분자에 의한 상호 작용을 통해 구조를 안정화시키는 이러한 구조적 복잡성에서 비롯될 수 있다.

[0686] **건조 나노 입자 분말의 주사 전자 현미경(SEM):** 나노 입자를 동결 건조하고 물을 제거하여 무정형 분말을 얻었다. SEM에 의한 이 분말의 조사는 나노 입자의 형성을 초래하는 일시적인 단계를 잠재적으로 나타내는 구조적 측면을 밝혀냈다. 나노 입자의 크기 분포는 도 5에 나와 있다. 건조한 형태에서, 이러한 복합체의 직경은 직경이 200nm 미만에서 1 마이크로 미터 이상이다. 이것은 크기 변화가 약 25nm에서 약 50nm까지인 현탁액의 수화된 나노 입자에서 관찰된 것보다 거의 10 배 더 크다(도 1A). 이는 느린 탈수 과정에서 나노 입자에 결합된 물이 제거되어 복합체가 팽창함을 의미한다. 물에 현탁하여 분말을 재수화하면 작은 나노 입자로 반전되었다(테이터는 도시되지 않음). 구형 구조 외에도, 동결 건조 분말에서 관형 구조가 관찰되었다(도 5, 화살표). 동결 건조된 분말의 구조적 변화는 시트(화살표 1), 필라멘트(화살표 2), 튜브(화살표 3) 및 소포의 형태-이들 모두는 혼합된 상태로 나타남-로, 일시적인 구조의 이질성을 보여주는 도 6에서 더 볼 수 있다. 관형 구조에서 소포의 싸이 트는 영역은 화살표 4로 표시된다. 따라서, 그 기원의 측면에서, 시트는 관형 구조를 형성하는 경향을 보이며, 이는 나노 입자 형성 동안 펙틴/셀룰로스 올리고머-폴리펩티드, 폴리 페놀 및 말산과 같은 기타 소분자로 코팅된 소포 구조에서 튀어 나올 수 있다.

[0687] **표백된 체리의 나노 섬유:** 폴리 페놀이 나노 입자에 단단히 결합되어 있고 용매 추출(알코올, DMSO, 산)로 제거하기 어려웠기 때문에 나노 입자를 생성하기 전에 에탄올로 과일에서 폴리 페놀을 제거하려고 시도했다. 과일을 3 번의 용매 변경으로 48 시간 동안 50% 에탄올에 담그면 폴리 페놀이 제거되어, 체리 과일이 회백색을 띤다. 일반적으로 나노 입자를 제조하기 위한 동일한 절차가 수행되었다. 폴리 페놀의 제거는 나노 입자에서 관찰된 것에서 전체 구조 변화를 가져 왔다. 동결 건조된 분말을 조사한 결과, 길이가 마이크로미터로 확장된 직경이 나노 미터(2~3 nm)인 필름이 산재해 있는 연장된 가닥 또는 필라멘트 구조(나노섬유)가 나타났다(도 7A). 수성 상태에서 나노 섬유는 길이가 마이크로 미터이고 직경이 약 5 내지 약 10nm인 형태를 유지했다(도 7B, 화살표 1). 이 필라멘트는 또한 나선형 구조(도 7B, 화살표 2)가 있는 영역을 보이고, 이는 이들을 트립신으로 처리한 후 늘어난 섬유로 나타나는(도 4E), 나노 입자를 코팅하는 나선형 섬유 유사 구조에서 비롯된 것일 수 있다. 따라서 폴리 페놀이 나노 입자의 구조적 구성을 결정하는 데 중요한 역할을 하는 것으로 보이고, 이러한 상호 작용은 또한 폴리펩티드와의 결합을 포함할 수 있다.

[0688] 폴리 페놀은 단백질과 상호 작용하는 것으로 알려져 있다(Dangles and Dufour, 2006). 기능적으로 사과 펙틴은 폴리 페놀과 상호 작용하고 대장 발효 및 체내 지질 제거에 유익한 효과를 향상시키는 것으로 알려져 있다(Aprikan et al., 2003). 구조적으로 폴리 페놀은 이온 결합 및 수소 결합을 통해 펙틴 및 셀룰로오스와 상호 작용하는 것으로 알려져 있다(Padayachee et al., 2012). 폴리 페놀은 18%까지 결합하는 2 상 과정에서 셀룰로오스 및 펙틴 성분과 상호 작용했다. 셀룰로오스 펙틴 복합물은 가장 높은 결합을 나타냈다. 따라서, 폴리펩티드, 펙틴/셀룰로스 올리고머의 조합은 폴리 페놀 결합에 매우 유리한 환경을 제공할 수 있으며, 심지어 폴리 페놀을 제거한 후에도 나노 섬유로 조립되는 폴리펩티드-펙틴-셀룰로스 백본을 여전히 유지한다.

[0689] **세제에 대한 나노 입자의 안정성:** 나노 입자의 안정성은 거대 분자 구조를 파괴할 수 있는 Triton X-100 및 나트륨 테옥시콜레이트와 같은 세제로 투석된 추출물을 처리하여 추가로 조사했다. 나노 입자를 포함하는 투석된 추출물을 이러한 세제의 농도를 증가시키면서 배양했을 때, 나노 입자와 관련된 폴리 페놀 수준은 520nm에서 측정했을 때 거의 일정하게 유지되었으며, 이는 안토시아닌의 벤조 피란 부분에 대한 흡수 최대 특성이다(도 8). 나트륨 테옥시콜레이트에서도 유사한 결과가 얻어졌다. 260 nm에서 측정했을 때 증가를 나타내며, 이는 잠재적으로 내부에 폴리 페놀을 포획하는 Triton X-100의 임계 미셀 농도보다 높은 미셀 형성을 나타낸다. 이러한 결과는 또한 나노 입자의 구조 성분 중 지질이 없음을 시사한다.

[0690] **나노 입자의 화학적 조성 및 나노 섬유와의 비교:**

[0691] **나노 입자의 산성 특성:** 나노 입자는 수용액과 건조 분말 모두에서 매우 안정적이었다. 나노 입자의 크기 배제 크로마토그래피 동안, 나노 입자에 결합된 폴리 페놀은 공극 부피에서 용출되어, 폴리 페놀의 특성인 520nm에서 최대 흡수를 나타내며 pH3을 나타낸다. 용액에 존재하는 유리 폴리 페놀의 용출이 지연되고, 용출액은 청회색으로 보였고 pH는 7에 가까웠으며, 이때 안토시아닌의 벤조피란 고리 절단은 관련 붉은 색 손실과 함께 발생했다.

주스 분자에서 유리 유기산을 제거했을 수 있는 신 체리 추출물을 광범위하게 투석한 후에도, 투석된 추출물은 여전히 3에 가까운 pH를 보였으며, 이는 호모갈락투로난(homogalacturonans)(pH 3)의 올리고갈락투로닉(oligogalacturonic) 모이어티와는 별도로, 구조 성분으로 나노 입자에 결합된 산성 성분(유기산)이 있을 수 있음을 시사했다. 이러한 성분을 확인하기 위해, 나노 입자 및 나노 섬유를 건조하고 트리메틸실릴 유도체를 제조하고 유도체를 GC-MS 분석을 실시하였다. 결과는 도 9에 도시한다. (A)의 상단 패널은 표준 유기산의 용출 패턴을 보여준다. (B)와 (C)는 각각 나노 입자와 나노 섬유에서 화합물의 용출 프로파일을 보여준다. 나노 입자와 나노 섬유는 모두 13.7 분에 용출된 말산(질량 스펙트럼, 트리메틸실릴 유도체)의 명확한 존재를 보여주었다. 말산은 신 체리 열매에 존재하는 주요 유기산이다. 하이드록실산이기 때문에, 말산은 수소 결합을 형성하여 나노 입자와 나노 섬유의 성분들 간의 분자 결합을 안정화할 수 있다. 20~25분 사이에 용출되는 피크는 유도체화된 당이나 올리고당에서 나온다. 도 9의 하단 패널은 기준 말산 트리메틸실릴 유도체의 질량 스펙트럼을 보여준다.

[0692] **신 체리 폴리펩티드의 SDS-PAGE 분석:** 일반적으로 과일의 단백질 양은 상대적으로 적으며 프로테아제의 활성화에 의해 숙성 동안 단백질 분해가 발생한다. 나노 입자에 단백질의 존재는 트립신에 대한 감수성으로 확인되었다. 과일의 단백질과 균질물은 과일의 핵산 및 단백질 추출에 이상적인 범용 시약인 TRIzol™을 사용하여 분리되었다(Tiwari and Paliyath, 2011). 프로테아제 활성이 억제되는 이러한 조건 하에서(페놀, 구아니듐 이소티오시아네이트의 존재에서와 같이) 단백질 분해가 최소화되고 물을 첨가한 후 유기상에 단백질이 존재하여 TRIzol 추출물의 상 분리를 초래했다. 원래 과일의 단백질, 균질물 및 원심 분리된 균질물로부터의 펠렛을 트리졸 추출을 실시하고, 단백질을 정상적으로 포함하는 유기상(클로로포름:페놀)을 SDS-PAGE로 분석했다. 결과는 도 11에 도시된다. 겔에서 단백질 밴드(도 11, 레인 2, 3, 4 참조)의 명확한 분리를 볼 수 있으며, 이는 과일(레인 2)의 단백질, 총 물 균질물(레인 3)의 단백질, 균질물을 원심 분리한 후 얻은 펠렛(레인 4)을 나타낸다. 그러나 원심 분리 후 얻은 과일 균질물의 상청액을 트리졸로 추출한 후, 유기상에는 단백질이 거의 없고 주로 저 분자량 펩티드(25kD)가 포함되어있다(레인 5). 투석된 추출물의 동결 건조된 분말은 TRIzol 추출없이 직접 분석했을 때 과일이나 그 균질물에서와 같이 별개의 단백질 밴드를 나타내지 않았지만, SDS-PAGE 및 쿠마시 블루 염색 후 시각화했을 때 폴리펩티드의 번짐(smear)(레인 6)을 보였다. 그러나 투석된 추출물 분말의 TRIzol 추출 후, 유기상은 쿠마시 브릴리언트 블루로 염색되지 않았으며, 이는 단백질/펩티드가 탄수화물 및 폴리 페놀과의 결합으로 인해 향상된 친수성 때문에 수상으로 이동했을 수 있음을 시사한다(레인 7).

[0693] **나노 입자에서 폴리펩티드의 SDS-PAGE 분석:** 나노 입자는 다양한 분자량의 폴리펩티드로 구성되었으므로(도 11, 레인 6), 탄수화물 및 폴리 페놀 성분과 같은 다른 성분과의 연관 특성을 설명하기 위해 추가 분석을 수행했다. 이러한 구조 성분이 나노 입자에서 밀접하게 관련되어 있다면, SDS-PAGE 동안 공동-이동해야 한다는 가설이 세워졌다. 신 체리를 물 또는 완충액(구연산 칼륨, 300mM, pH, 6, 균질화 후 최종 pH는 pH 5였다)에서 추출하고 물 또는 완충액에 대해 투석했다. 투석된 추출물을 동결 건조하고 분말을 로딩 완충액에 재현탁시켰다. 동등한 양(15 μ g)의 단백질 (물 중의 15% 글리세롤에 재현탁됨)을 겔에 로딩하고 SDS-PAGE에 적용하였다. 전기 영동 후, 겔을 제거하고 물 중 10 %(v/v) 아세트산에서 배양하였다. 패널 A(도 12)는 펩티드 분리 후 쿠마시 브릴리언트 블루로 염색하기 전의 겔을 보여 주어 폴리 페놀의 존재로 인해 레인에서 분홍색 후행(trailing) 색상을 나타낸다. 패널 B는 폴리펩티드를 나타내기 위해 쿠마시 브릴리언트 블루로 염색한 동일한 겔을 보여준다. 레인 2는 투석된 추출물 분말의 염색 패턴을 보여준다. 패널 A와 B의 레인 2를 비교하면 펩티드(레인 2, 패널 B)와 폴리 페놀(레인 2, 패널 A)의 이동이 유사하다는 것을 알 수 있는데, 이는 폴리 페놀이 나노 입자의 폴리펩티드에 단단히 결합되어 있음을 시사한다. 폴리 페놀은 펩티드에 비해 작고 하전되지 않은 분자이며, 복합체화되지 않은 경우 겔에서 용출된다. 나노 입자를 포함하는 투석된 추출물 분말(물 추출물에서 얻음)은 트리졸 추출 및 상 분리를 거쳤으며, 수상층 상청액 분획에 해당하는 레인 3(패널 A, B)은 그것들의 단단한 결합을 나타내는 폴리펩티드와 폴리 페놀 모두의 존재를 보여준다. 이 특성은 또한 펩티드-탄수화물-폴리 페놀 복합체의 친수성 특성을 드러내는데, 왜냐하면 복합체 형성이 없을 경우, 폴리펩티드 자체가 TRIzol 추출물(페놀:클로로포름)의 유기상에서 분리되었을 것이기 때문이다. 그러나 앞서 살펴본 바와 같이(도 11, 레인 7), 나노 입자의 트리졸 추출물에서 나온 유기상에는 폴리펩티드가 없었다. 펩티드와 폴리 페놀의 연관성은 투석된 완충액 추출물 분말에서도 분명하다(도 12, 레인 4). 레인 5, 6 및 7은 TRIzol 추출 후 얻은 투석된 완충액 추출물 분말의 수상 상청액, 중간상 및 유기상에 해당한다. 일반적으로 클로로포름:페놀 상에 유지되는 폴리펩티드는 수상 상(레인 5)으로 이동하여 많은 폴리펩티드와 폴리 페놀을 시각화할 수 있다. 중간층은 폴리펩티드의 존재를 보여 주지만 폴리 페놀은 거의 존재하지 않는다(레인 6, 패널 B, A). 유기상에 해당하는 레인 7은 안토시아닌이나 펩티드의 존재를 보여주지 않는다. 레인 8, 9 및 10은 대부분의 폴리 페놀이 제거된 에탄올 표백 체리 유래 투석된 추출물 분말을 TRIzol 추출한 후 얻은 상청액, 중간상 및 유기상에 해당한다. 폴리 페놀의 제거로 인해 나노 입자가 구형

에서 필라멘트 구조 나노 섬유로 구조적으로 전환되지만, 폴리펩티드는 여전히 나노 섬유의 필수 부분이다(레인 8, 패널 B). 표백된 체리 투석 추출물의 중간상 및 유기상은 펩티드에 대해 최소한의 염색을 나타냈다(레인 9, 10; 패널 B).

[0694]

나노 입자 및 나노 필라멘트의 탄수화물 조성: 탄수화물의 펙틴 특성 및 나노 입자에서 폴리펩티드와의 연관성은 SDS-PAGE 후 프로피듐 요오드화물 및 쿠마시 브릴리언트 블루 염색의 유사성에 의해 밝혀졌다. 프로피듐 요오드화물(Propidium iodide)는 펙틴 산에 대한 얼룩으로 보고되었다(Rounds et al., 2011). 패널 C(도 12)는 프로피듐 요오드화물(물에서 10 마이크로 몰)을 사용한 나노 입자의 염색 패턴을 보여준다. 하단 패널(D)은 쿠마시 브릴리언트 블루로 염색된 해당 겔을 보여준다. 레인 1은 시판되는 펙틴의 표준 샘플에 해당하며, 프로피듐 요오드화물로 최소한의 염색을 보여준다. 프로피듐 요오드화물로 펙틴의 염색은 음으로 하전된 유리 카르복실산 기의 존재 때문이다. 일부 펙틴 샘플에서 자연적으로 발생하는 것처럼 카르복시산 기가 메틸화에 의해 차단되면, 염색이 감소된다. 레인 2는 15% 글리세롤에 용해된 투석된 추출물의 동결 건조 분말 성분의 이동 패턴을 보여 주며, 이는 나노 입자(패널 A) 및 폴리펩티드(패널 B)에서 펙틴의 분포를 보여준다. 레인 3은 투석물 분획을 동결 건조한 후 얻은 펩틴/폴리 펩티드 분획에 해당하며, 이 분획은 폴리펩티드에 대해 상대적으로 더 강한 염색을 나타낸다. 레인 4는 폴리갈락투론산의 표준품에 해당하며, 이는 폴리펩티드가 아닌 프로피듐 요오드화물로 염색된 것을 보여준다. 신 체리 균질물의 겔리와 같은 펄렛은 또한 펙틴과 폴리펩티드의 존재를 보여준다(레인 5).

[0695]

나노 입자의 화학적 성질에 대한 추가 분석은 웨스턴 블롯 분석에 의해 수행되었다(도 13). 신 체리 열매는 에탄올에서의 표백 전후에(폴리 페놀 제거) 물에서 추출되었고 물에 대한 투석으로 나노 섬유와 나노 섬유를 분리하였다. 투석된 추출물을 동결 건조하고, 복합체를 글리세롤:물에 용해시키고 SDS-PAGE를 실시하고, 호모갈락투로난(펙틴의 주요 골격 구조를 형성하는 중간 메틸화 단위를 갖는 α -1,4-갈락투론산펙틴의 20량체(twentymer)), 익스텐신(주요 세포벽 당 단백질) 및 아라비노갈락탄 단백질(단백질에 연결된 주요 펩틴)에 대해 생성된 구조 특이적 단일 클론 항체(쥐 IgM)로 면역 국소화를 실시한다. 결합된 항체는 알칼리성 포스파타제 접합된 염소-항 랫트 IgG로 검출되었다. 패널 A는 쿠마시 브릴리언트 블루에 의해 표백된 체리(레인 2; 나노 섬유) 및 표백되지 않은 체리(레인 3; 나노 입자)의 나노 섬유/나노 입자의 염색을 각각 보여준다. 쿠마시 브릴리언트 블루 염색은 폴리 페놀의 에탄올 추출 후 상당히 낮아져 폴리 페놀과 함께 폴리펩티드의 잠재적 손실을 시사한다(레인 2). 이것은 또한 표백된 체리의 나노 섬유에 의한 겔 침투 감소 때문일 수 있다. 패널 B는 표백 체리(패널 B, 레인 2) 및 표백되지 않은 체리(레인 3)의 나노 섬유/나노 입자에 대해 호모갈락투로난에 대해 생성된 항체의 반응성을 보여준다. 흥미롭게도, 호모갈락투로난에 대한 반응성은 표백되지 않은 체리의 나노 입자에 비해 표백된 체리의 나노 섬유에서 더 강했다(패널 B, 레인 3). 이것은 패널 B 아래 표시된 도트 블롯의 강도에 다시 반영된다. 이것은 잠재적으로 나노 입자/나노섬유에서 항체에 의한 호모갈락투로난 모이어티의 접근성 차이를 반영할 수 있다. 표백되지 않은 체리의 나노 입자와 표백된 체리의 나노 섬유 사이의 주요 차이점은 폴리 페놀의 존재이다. 표백을 통해 폴리 페놀을 제거하면 호모갈락투로난 모이어티가 더 많이 노출되어 항체에 대한 반응성이 증가할 수 있다. 또한, 이러한 결과는 폴리 페놀이 표백되지 않은 체리의 나노 입자의 필수 부분이며, 그 제거는 구조적 변형으로 이어질 수 있음을 보여준다. 필라멘트 나노 섬유를 체리 폴리 페놀과 배양해도 필라멘트에서 구 형태로의 변형이 반전되지는 않았지만(데이터는 표시되지 않음) 두 형태 모두 구조적으로 안정적이다. 나노 입자와 나노 섬유는 모두 과일의 주요 세포벽 단백질에 대해 생성된 항체인 항-익스텐신에 대해 약간의 반응성을 나타냈다(패널 C). 항-익스텐신에 대한 도트 블롯은 또한 최소한의 반응성을 나타냈다. 그러나, 나노 입자/나노 섬유 형태 모두에서 항-아라비노갈락탄 단백질(펙틴-단백질)에 대해 매우 강한 반응이 관찰되어, 이것이 나노 입자/나노 섬유의 기본 구조의 주요 성분일 수 있음을 시사한다(패널 D, 레인 2, 3; 도트 블롯). 항-자일로글루칸에 대한 웨스턴 블롯은 겔에서 교차 반응성을 나타내지 않았지만, 나노 섬유(하단 패널, 패널 A)에 대해 강한 반응을 보였고, 필라멘트 응집체를 형성했다. SDS에 의해 용해되는 동안 폴리펩티드가 나노 입자 및 나노 섬유에서 벗겨진 것으로 보이지만, 탄수화물은 응집체로 남아 있어, 큰 크기와 전하 부족 때문에 겔에 효과적으로 들어 가지 못한다.

[0696]

BSTFA:TMCS(Sigma, 99:1)를 사용하여 트리플루오로아세트산(8.6M) 및 유리 된 당의 트리메틸실릴화로 분해한 후 나노 입자 및 나노 섬유의 탄수화물 조성에 대한 정성 분석을 수행했다. GC-MS에 의해 분리되고 확인된 당의 정성적 프로파일은 도 10(상단 패널)에 표준품으로 사용되는 일반 당의 프로파일(하단 패널)과 함께 표시된다. 나노 입자(파란색, 나노 복합체로 표시됨)와 나노 섬유(빨간색, 나노 필라멘트로 표시됨)의 당 조성에는 유사점과 차이점이 있다. 포도당, 갈락토스/갈락투론산, 만노스는 나노 입자의 주요 성분이었으며 상대적으로 적은 양의 아라비 노스를 함유하고 있다. 나노 섬유의 당은 아라비노스가 풍부하고 갈락토스/갈락투론산 및 글루코스가 더 적다. 나노 입자와 나노 섬유에는 확인되지 않은 다른 당이 존재할 수 있으며 일부 피크는 TFA 소화 중에 변형

된 당에서 유래할 수도 있다. 결과는 나노 섬유 형성 동안 글루코스, 갈락토스/갈락투론산 및 만노스가 풍부한 여러 올리고머가 제거되어 여전히 펙틴의 아라비노갈락탄에서 파생된 주로 아라비노스 올리고머가 풍부한 나노 섬유를 남길 수 있음을 시사한다.

[0697] **나노 섬유의 병인 발생 관련 단백질에서 유래된 펩티드 식별(identification):** SDS-PAGE 분석 중에 다양한 분자량의 펩티드가 나노 입자와 나노 섬유 모두에서 검출될 수 있으며, 이는 체리의 균질화 과정에서 천연 프로테아제 활성의 작용에 기인한다(도 14, 패널 A; 레인 2, 3; 젤 A, B). 이들 중 적어도 2개의 밴드는 40kD 및 20kD의 상대 분자량을 갖는 나노 섬유(레인 3; B)에서 구별되었다(라벨 1, 3, 도 14; 패널 A). 강도가 약간 더 강하고 분자량이 약 40kD인 폴리펩티드 밴드(라벨 2, 젤 B)도 관찰되었다. 염색되지 않은 겔에서 이 3개의 폴리펩티드는 폴리 페놀(보라색)과 관련이 있는 것으로 밝혀졌다(젤 A, 레인 2). 이들 밴드를 해부하고 트립신 분해 및 LC-MS/MS 후 펩티드 지문 채취를 수행했다. 확인된 주요 펩티드의 서열은 도 14(패널 B 및 C)에 나와 있다. 레인 3(Nanofibre)에서 약 40kD 분자 질량을 갖는 밴드 1은 체리(패널 B)의 PR 단백질 글루칸엔도-1,3-베타-글루코시다아제(수탁 번호 P50694)와 서열 유사성을 나타냈다. 서열은 LC-MS-MS에 의해 확인되었다(강조 표시된 단편으로 표시되고 genbank에서 추론된 서열은 단백질의 246 개 아미노산 길이의 펩티드에 해당한다). 레인 3에서 약 20kD의 두 번째 밴드(나노 섬유)는 다른 PR 단백질과 서열 유사성을 나타냈다(폴리펩티드에 총 161개 아미노산이 포함된 주요 체리 알레르겐 Pru a1(수탁 번호 O24248)(패널 B). 나노 섬유의 밴드 1에 해당하는 나노 입자의 40kD 밴드는 잠재적으로 결합된 폴리 페놀로부터의 간섭으로 인해 가수 분해 생성물을 산출하지 못했다. 이러한 동정된 펩티드 단편은 겔에서 분리된 모든 폴리펩티드의 소 분획물이다. 이것은 잠재적으로 나노 입자와 나노 섬유의 필수 성분을 형성할 수 있는 펩티드 생성을 초래하는 프로테아제의 높은 활성을 암시한다.

[0698] **나노 입자의 FT-IR 분석:** 표백되지 않은 체리 열매 및 표백된 체리 열매에서 나온 나노 입자/나노 섬유 분말의 FT-IR 스펙트럼은 서로 높은 수준의 유사성 및 단백질 및 세포 벽 다당류와 같은 거대 분자 구조와 유사한 복잡한 스펙트럼을 나타냈다(도 15; 나노 복합체 = 나노 입자, 나노 필라멘트 = 나노 섬유). 이 도면은 또한 폴리갈락투론산(PGA)(호모갈락투로난, 펙틴) 및 알부민(BSA)의 스펙트럼을 보여준다. 나노 입자의 주요 흡수 대역은 3000nm에서 3600nm 사이, 2600nm에서 3000nm 사이의 넓은 대역과 1750nm에서 800nm 사이의 지문 영역에서 여러 피크로 관찰되었다. 나노 입자의 거대 분자 특성으로 인해 개별 작용기 또는 구조적 특징에 특징적인 흡수 피크가 병합된다. 폴리펩티드, 펙틴 및 폴리 페놀의 스펙트럼 특성과 비교하여 나노 입자의 여러 구조적 특성을 설명할 수 있다. 단백질(> 10 %), 탄수화물(약 70%) 및 나노 입자에서의 폴리 페놀(약 10~15%)의 존재와 같은 성분의 비율도 피크와 피크 모양에 영향을 미쳐, 탄수화물의 특징 피크의 전반적인 우위를 나타낼 수 있다. 세포벽 탄수화물 성분의 FT-IR 분석은 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스 및 펙틴의 특징을 보여준다(Kacurakova et al., 2000; Urias-Orona, 2010). 과일 숙성에서, 셀룰로오스 분해 효소 및 펙틴 분해 효소의 활성이 증가하면 세포벽 성분의 이화 작용이 발생하여 특징적인 결합을 가진 저 분자량 올리고머를 산출한다. 이들 중 펙틴은 람노갈락투로난, 갈락탄, 아라비난 및 아라비노갈락탄으로 구성된 간헐적인 털이(hairy) 영역(즉, 강모 모양)을 갖는 α-1,4- 연결된 갈락투론산을 갖는 복합 분자이다(Negi and Handa, 2008). 자일로글루칸(Xyloglucans), 자일란(xylans), 글루코만난(glucomannans) 및 갈락토만난(galactomannans)은 세포벽의 반세포 성분이다. 따라서 과일을 균질화하는 동안, 이들 성분 중 하나가 나노 입자에 통합될 수 있다. 웨스턴 블롯 연구는 나노 입자에서 호모갈락투로난과 아라비노갈락탄의 존재를 보여 주었는데, 이는 펙틴이 그 형성에 우세하게 관여한다는 것을 암시한다. 체리 유래 두 가지 유형의 나노 입자/나노 섬유의 FT-IR 스펙트럼은 900cm⁻¹ 및 1200cm⁻¹에 이르는 탄수화물 영역에서 강력한 흡수를 보여준다. 표백된 체리 유래 나노 섬유는 약 1017 cm⁻¹에서 날카로운 피크를 보이며, 이는 높은 비율의 호모갈락투로난을 가진 펙틴의 특징이다(Kacurakova et al., 2000). 1045 cm⁻¹에서 1074 cm⁻¹ 사이의 어깨는 β-연결 아라비노갈락탄에서 유래할 수 있다. 람노갈락투로난과 헤미셀룰로오스에서의 흡수는 이 넓은 영역에서 발생한다.

[0699] 탄수화물 영역의 흡수는 주로 글리코시드 연결(C-O-C)에서 비롯되지만, 아노머 영역(anomeric region)은 당 모이어티 간의 연결 유형에 대한 정보를 제공한다. α-연결은 834 cm⁻¹에서 흡수 밴드를, β-연결은 898 cm⁻¹에서 밴드를 특징으로 한다. 두 가지 유형의 나노 입자 모두 약 834nm에서 넓은 흡수 최대 값을 보여, 복합체의 탄수화물이 펙틴에서 흔히 볼 수 있는 α 유형 연결을 우세하게 보유하고 있음을 시사하며, 이는 다시 나노 입자의 탄수화물이 주로 펙틴 기원임을 시사한다(도 15).

[0700] 약 1550 cm⁻¹에서 약 1800 cm⁻¹ 사이에서 관찰된 넓은 밴드는 다른 식물 조직에서 관찰된 것처럼 펙틴의 특징이다(McCann et al., 1994). 일반적으로 지문 영역을 포함하여 900 cm⁻¹에서 1800 cm⁻¹ 사이의 담배 세포에서 분리

된 펙틴의 FT-IR 스펙트럼 패턴은 나노 입자에서 관찰된 것과 거의 동일하다. 펙틴의 두 가지 주요 구조 요소는 에스테르 결합(1740 cm^{-1})과 카르복실산 그룹(1600 및 1414 cm^{-1})이다. 1740 cm^{-1} 에서 넓은 피크는 두 유형의 나노 입자에서 뚜렷이 구분되어 에스테르화된 펙틴의 존재를 나타내며 표백된 체리의 나노 입자에서 약간 더 낮은 강도를 나타낸다(도 15).

[0701] 나노 입자에서 단백질의 흡수 밴드는 아마도 펙틴에서 발생하는 것들에 의해 대부분 가려질 것이다(Gorinstein et al., 2009). 그러나 이러한 스펙트럼에서 2 차 구조의 특정 특징을 관찰할 수 있다. 단백질의 FT-IR 스펙트럼은 아마이드 A, B 밴드 및 아마이드 I ~ VII라고 하는 특정 아마이드 흡수를 특징으로 한다. -NH 스트레칭에서 발생하는 아마이드 A(약 3500 cm^{-1}) 및 아마이드 B 밴드(약 3100 cm^{-1})는 잠재적으로 탄수화물 하이드록실의 -OH 스트레칭(3400 cm^{-1})과 겹치며 나노 입자 스펙트럼에서 3600 cm^{-1} 과 3000 cm^{-1} 사이의 넓은 피크를 형성한다. 아마이드 I 및 II 흡수는 펙틴의 에스테르 흡수와 겹치는 $\text{-C}=\text{O}$ 및 -C-N 그룹의 스트레칭 진동($1600\sim 1700\text{ cm}^{-1}$)과 NH 스트레칭($1510\sim 1580\text{ cm}^{-1}$)에서 각각 발생한다. 아마이드 I 흡수는 베타 시트의 특징이다. 익스텐션과 같은 세포벽 당 단백질은 β 시트의 더 큰 성분을 가지고 있지만, 익스텐신 항체를 사용한 웨스턴 분석은 나노 입자에서 익스텐신의 우세(prevalence)를 나타내지 않았다(도 13). 그러나 아라비노갈락탄 단백질에 대해 발생한 항체에 대해 매우 긍정적인 반응이 나노 입자와 나노 섬유 모두에서 관찰되었다. 이것은 자연적으로 양친매성인 아라비노갈락탄 결합 단백질(Seifert and Roberts, 2007)이 나노 입자에 탄수화물-폴리펩티드 성분을 제공할 수 있음을 시사한다(도 15).

[0702] 폴리 페놀은 나노 입자의 필수적인 부분이다. 폴리 페놀의 상대적인 양은 나노 입자에서 12~15% 범위이다. 폴리 페놀을 포함하는 나노 입자와 폴리 페놀이 없는 표백 체리에서 분리된 나노 섬유의 FT-IR 스펙트럼은 큰 차이를 보이지 않았다. 폴리 페놀은 탄수화물 영역에서 주요 흡수인, $\text{-C}=\text{H}$ 스트레칭 (약 $2850\sim 3000\text{ cm}^{-1}$), 폴리 페놀 하이드록실 및 당(sugar) 하이드록실 그룹(자유 $3200\sim 3600\text{ cm}^{-1}$) (David et al., 2009)를 갖는 순수 형태의 특징 스펙트럼을 나타낸다. 폴리 페놀의 상대적인 양이 적기 때문에, 폴리 페놀 작용기의 흡수는 탄수화물과 단백질의 흡수에서 해독하기 어렵다(도 15).

[0703] **나노 입자의 X-선 회절:** 과일에서 펙틴의 우세(prevalence)는 이 실시예에 나타난 바와 같이 구조적 전이를 통해 잠재적으로 나노 입자를 생성할 수 있다. 나노 입자는 펙티나제 처리에 매우 민감하고 완전한 조직 용해를 거치기 때문에, 펙틴이 나노 입자의 주성분인 것으로 보인다. 펙틴은 메톡시화 정도와 당의 존재와 낮은 pH, 칼슘과 같은 2가 이온의 존재에 따라 겔을 형성할 수 있다(Fu and Rao, 2001; Strom et al., 2007). 셀룰로오스와 같은 베타-1,4-글루칸은 결정체로 발생하지만, 무정형 상태로 존재할 수도 있다. 셀룰로오스 처리에 대한 나노 입자의 민감성은 β -1,4-글리코시드 결합을 갖는 성분도 나노 입자 구조의 일부이며 이들은 셀룰로오스 마이크로피브릴을 연결하는 무정형 셀룰로오스 및/또는 헤미 셀룰로스 성분(자일로 글루칸)을 포함할 수 있음을 시사한다. 타마린드 종자 자일로글루칸에 대한 이전 연구는 자일로글루칸이 펙틴에 의해 가려질 수 있고(mask) 펙틴의 용해가 자일로글루칸을 노출한다는 것을 보여주었다(Marcus et al., 2008). 따라서 나노 입자에 펙틴과 셀룰로오스가 동시에 존재하는 것이 가능성이 높다. 결정질 셀룰로오스의 X-ray 회절은 22.5° 에서 회절 각(2θ)을 중심으로 한 날카로운 피크를 보여 주며, 비정질 셀룰로오스의 경우 20.7° 에서 특징적인 넓은 피크를 보여 준다 (Park et al., 2010). 나노 입자 분말의 X-선 회절(도 16)은 나노 입자에 무정형 셀룰로오스가 존재함을 시사하는 약 20° 중심의 피크를 보여준다. 투석액 분말의 회절도는 여러 유형의 탄수화물 성분을 포함할 수 있기 때문에 20° 를 중심으로 한 훨씬 더 넓은 피크를 보여준다. 나노 입자와 투석액의 X-선 회절 패턴은 젤라틴-펙틴 복합체와 유사하다(Sharma et al., 2011). 과일이 익으면 셀룰라아제와 펙티나제 활성이 증가하여 세포벽 성분이 용해되고, 나노 입자에 통합될 수 있는 여러 유형의 세포벽 중합체를 방출할 수 있다. 따라서 나노 입자는 유리 및 에스테르화된 카르복시 그룹, 아라비노갈락탄, 자일로글루칸, 무정형 셀룰로오스 등을 모두 포함하는 폴리갈락투론산과 같은 펙틴 성분에서 유래한 것으로 보인다. 추출 과정에서 펩티드 및 폴리 페놀과의 추가 조립은 나노 입자를 형성하기 위해 이들 성분의 자가 조립을 초래할 수 있다.

[0704] **구형 나노 입자의 구조적 구성을 위한 제안된 모델:** 나노 입자를 형성하기 위한 거대 분자와 폴리 페놀의 조직은 여러 결과에서 설명될 수 있다. 표백되지 않은 체리의 투석된 분획에서 나온 단일 나노 입자의 전자 현미경 사진은 도 17A에 도시된다. 대부분의 나노 입자는 직경이 약 $25\sim 50\text{nm}$ 의 크기 범위에 있고 매우 안정적인 구형 구조이며, 때로는 큰 복합체는 직경이 100nm 를 초과하여 형성된다. 더 큰 크기는 더 작은 나노 입자에 비해 구조적으로 덜 안정한 이러한 복합체를 만들 수 있다. 정상 조건에서 구형으로 보이는 큰 나노 입자는 때때로 붕괴되어 구조적 세부 사항을 드러낸다. 현미경 사진에서 붕괴된 영역은 중앙에 표시된다(화살표 1, 패널 A,

도 17). 이 관찰은, 나노 입자가 외부 구조를 제거하여 구형의 유연한 펙틴 코어를 나타내는, 효소(트립신, 셀룰라아제) 처리 후 얻은 결과와 일치한다. 나노 입자가 호모갈락투로난에 대해 생성된 항체에 대한 교차 반응성을 나타내지 않기 때문에, 코어는 호모갈락투로난 모이어티에 의해 형성되고 노출되지 않은 것 같다. 붕괴된 구조는 코어 내부가 비어있을 수 있음을 나타낸다. 코어는 펙티나제 및 트립신에 대한 민감성에 의해 추론된 바와 같이 호모갈락투로난 및 단백질로 구성된 나선형 조직(도 17, 패널 A, 화살표 2)에서 조립된 필라멘트로 둘러싸여 있다. 폴리 페놀을 에탄올로 제거하면 완전히 다른 조직이 되어 나선형 구조가 긴 필라멘트로 폴리프로, 폴리 페놀은 필라멘트의 나선형 조직을 안정화하는 데 중요한 역할을 할 수 있다. 이들 필라멘트는 폴리 페놀이 제거될 때 호모갈락투로난 항체에 대한 강한 반응성을 보이며, 이는 폴리 페놀이 나선형 구조를 가릴 수 있음을 시사한다. 펙틴 코어를 덮고 있는 나선형 필라멘트의 외부에,는 내부 피브릴 층과 다른 것처럼 보이는 또 다른 별개의 피브릴 층이 있는 것으로 보인다(도 17, 패널 A, 화살표 3). 이층은 주로 폴리펩티드와 결합된 아라비노갈 락탄으로 구성될 수 있고, 표백되지 않은 체리의 나노 입자가 아라비노갈락탄-단백질 항체에 대해 강한 반응성을 보여주기 때문에 - 이는 그것의 외부 위치 및 항체로의 향상된 접근성을 나타냄-, 이 층의 구성은 내부 층의 구성과 다를 가능성이 있다(화살표 2). 아라비노갈락탄-단백질은 표백된 체리에서 분리된 필라멘트 구조의 일부이기도 하다. 따라서 표백되지 않은 체리에서 분리된 나노 입자와 표백된 체리에서 분리된 나노 섬유는 유사한 성분을 가질 수 있지만, 물리적으로 구별되는 구조로 구성된다. 나노 입자의 확대도(도 17, 패널 B)는 나노 입자의 내부 층에 있는 나선형 구조(화살표)를 보여준다.

[0705] 여전히 완전하게 평가되지 않은, 산화철 나노 입자, 덴드리머, 금- 및 은 나노 입자, 탄소 나노 튜브 등과 같은 가공된 나노 물질의 사용으로 인해 잠재적인 세포 독성 효과가 나타나기 때문에, 천연물을 기반으로 한 나노 물질의 개발이 점점 더 연구되고 있다(Maynard, 2006). 가공된 나노 물질의 문제는 인체가 시스템에서 이를 제거할 수 있는 메커니즘이 없을 수 있다는 것이다. 세포 배양 연구에서, 구조의 수산화가 증가함에 따라 폴리렌 유형 나노 물질의 독성이 감소하는 것으로 관찰되었다(Lewinski et al., 2008). 가공된 나노 물질의 주요 응용 분야는 진단 및 생물 의학에 있다(Kunzmann et al., 2011). 70nm의 실리카 나노 입자는 태반 장벽을 뚫고 태아로 들어갈 수 있었지만, 300nm와 900nm 크기는 태아 조직에 축적되지 않았다(Yamashita et al., 2011). 유사하게, 직경 30nm의 약물 로딩된 고분자 미셀은 50nm, 70nm 또는 100nm 미셀보다 낮은 투과성으로 종양에 침투하는 데 더 효율적이었다(Cabral et al., 2011). 가공된 나노 물질의 흡수, 분포 및 제거 메커니즘을 이해하는 것도 생물학적 기원의 나노 물질에서 이러한 메커니즘을 이해하는 데 도움이 될 수 있다.

[0706] 약물 전달 및 유지에 이점을 제공하기 위해 다양한 모양과 크기의 생물학적 나노 물질이 제안되었다. 나노리포좀(Nanoliposomes), 나노킬레이트(nanocochleates), 미셀(micelles), 필라솜(filasomes) 등은 생물 의학에 잠재적인 응용이 가능한 생물학적 나노 구조의 잠재적인 형태 변형들(morpho variants)이다(Nishiyama, 2007). 이들 중, 직경 22~60nm, 길이 2~8μm의 필로미셀(filomicelles)로 불리는 필라멘트형 고분자 미셀이 구형 나노 미셀보다 혈액에 오래 남아있는 것으로 관찰되었다(Discher and Eisenberg, 2002). 피브리노젠과 같은 단백질은 폴리악릴산으로 코팅된 금 나노 입자를 둘러싸고 있으며, 이는 염증 유발의 일부인 구조적 변화를 나타낸다(Deng et al., 2011). 다이드제인(Daidzein) 로드 고체 지질 나노 입자는 생체 이용률을 향상시키고 순환 시간을 증가시켜 동물 모델의 심뇌혈관 보호에서 다이드제인 단독보다 더 효율적이었다(Gao et al., 2008).

[0707] 나노 입자는 세포 내 이입 메커니즘에 의해 흡수되기 쉬우므로 세포 표면에 결합, 내재화, 수송 및 세포에서 방출되는 동안 여러 유형의 변형을 겪을 수 있다. 엔도사이토시스 동안, 나노 입자는 세포 표면에 결합하고 엔도솜, 포식솜(phagosomes) 및 마크로피노솜(macropinosomes)을 통과하여 원형질막의 소포화에 의해 내재화될 수 있다. 이러한 프로세스에는 여러 유형의 메커니즘이 포함될 수 있다. 원형질막 기원의 소포 구조(Vesicular structures)는 복수 소포체(multivesicular bodies)가 되어 리소솜과 융합될 수 있다. 리소솜 pH는 산성이며 내용물을 방출하는 프로테아제 및 가수 분해 효소에 의한 나노 입자 분해에 이상적인 조건을 제공한다. 세포에 의한 나노 입자의 흡수는 세포의 표면 특성에 따라 달라진다(Iverson et al., 2011). 직경이 20~50nm인 나노 입자는 더 크거나 작은 나노 입자보다 훨씬 더 많이 흡수되는 것으로 보인다. 흡수는 또한 수용 세포의 표면 전하에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로 양전하를 띤 나노 입자가 더 효율적으로 흡수된다. 신 체리 유래 나노 구조는 두 가지 특성들인, 구형 나노 입자 형태일 때 폴리갈락투론산의 주변에 있는 펩티드 아미노기와 숨겨진 카르복실산의 잠재적인 노출로 인해 양전하를 띠는 특성과, 다른 한편으로는 그것들이 현탁되는 중성에 가까운 수성 매질에 노출된 폴리갈락투론산(산성 그룹)이 더 풍부한 나노 섬유로서 음전하를 띠는 특성을 모두 나타낼 수 있다. 숨겨진 폴리갈락투로네이트 모이어티를 가진 나노 입자는 항-호모갈락투로난 항체와 잘 반응하지 않는다. 이에 비해, 고도로 노출된 폴리갈락투로네이트 모이어티를 가진 나노 섬유는 도 13에서 볼 수 있듯이 항-호모갈락투로난 항체에 대해 매우 강하게 반응한다.

- [0708] 식물에서 편재하는 생물학적 거대 분자로서, 특히 과일과 채소에 풍부한 펙틴의 물리 화학적 특성이 잘 연구되어 왔으며, 약물 캡슐화, 표적 전달, 피부 보호제로서의 적용을 위한 하이드로 겔 개발을 위한 의학에서의 잠재적 유용성을 단독으로, 또는 단백질 또는 폴리비닐피롤리돈, 폴리락트산 등과 같은 합성 분자와 결합하여 점점 더 연구되고 있다(Mishra et al., 2012). 펙틴계 물질의 장점은 진화 과정 전반에 걸쳐 인간에 의해 소비되어 왔으며 캡슐화된 물질을 콜론 - 여기서 프로바이오틱 박테리아에 의해 다당류가 소화되어 내용물을 방출함 - 으로 운반하기 위한 식품 매트릭스로서 생물학적 특성을 확인했다. 펙틴은 또한 위장 시스템에서 콜레스테롤을 결합하고 제거하는 데 도움을 줄 수 있다. 펙틴계 전달 시스템은 여러 뿌리를 통한 약물 전달을 위해 탐색되었다(Yadav, 2009; Sriamornsak, 2011). 펙틴 매트릭스의 3 차원 구조는 유리 카르복실산기(호모갈락투로난 및 람노갈락투로난)에 의해 영향을 받을 수 있고, 내재된 용액의 pH에 근거하여, 펙틴 사슬은 다양한 형태를 채택하는 칼슘과 같은 2가 이온에 의해 안정화될 수 있는 음이온 사슬로 존재할 수 있다. 다시 말하지만, 메틸화된 카르복실기 대 유리 카르복실기의 비율은 3D 구조를 형성하는 펙틴의 능력에 영향을 미칠 수 있다. 따라서 필름, 하이드로겔, 나노 구조 등과 같은 펙틴 제형은 여러 의료 응용 분야에서 탐색되었다. 그러나 독점적으로 펙틴계 매트릭스는 낮은 기계적 강도, 낮은 전단 안정성, 낮은 약물 적재능, 및 조기 약물 방출과 같은 몇 가지 단점을 가질 수 있다. 이러한 이유로, 키토산, 폴리락트산, 전분, 젤라틴, 대두 단백질, β -락토글로불린, 인간 혈청 알부민 등과 같은 생분해성 고분자와 혼합 또는 공중합하여 펙틴을 화학적 및 물리적으로 변경하면 더 높은 전하 밀도를 제공할 수 있다(양성 1 차 아민 및 음성 카르복실기). 직경이 70~200 nm 사이인 크기 범위의 ZnO-펙틴 나노 입자의 생산은 Zn-겔립 집단 세그먼트에서 Zn 흡수를 향상시킬 가능성을 탐구하기 위해 달성되었다(Shi and Gunasekaran, 2008). 이러한 분자는 조직 깊숙이 침투하여 더 나은 약물 전달을 제공할 수 있는 것으로 관찰되었다. 펙틴의 티올화(Thiolated) 나노 입자는 더 나은 안구 약물 전달을 위해 제조되었다. SPION(수퍼파라마그네틱 철계 나노 입자)과 옥살리플라틴을 Pectin-Ca²⁺에 캡슐화하여 자기 기능(magnetic function)을 가진 직경 100~200 nm의 펙틴계 구형 나노 구조를 형성했다. 항암 약물 파클리탁셀은 펙틴 나노 구조와 결합되었으며, 이 과정은 펙틴(-OH 및 -COOH 그룹)의 친수성뿐만 아니라 양전하를 띤 아스파라긴의 아미드기의 영향을 받는 것으로 제안되었다(Verma et al., 2011). 또한 용해도가 낮은 티아졸, 항암 약물, 신경 및 기분 활성 약물, 펙틴계 나노 구조를 통해 인슐린과 같은 여러 종류의 약물을 전달하려는 시도가 있었다(Sharma et al., 2012).
- [0709] 펙틴계 나노 입자를 생산하는 합성 방법과 달리, 본 실시예에는 고유한 특성을 갖는 나노 입자 및 나노 섬유를 제조하기 위해 생체 내 과일계 시스템을 사용할 가능성을 나타낸다. 과일은 나노 입자와 나노 섬유를 형성하기 위한 자급 자족 공장 역할을 한다. 과일이 익으면 이화 작용 과정이 활성화되어 과일이 연화되고, 세포벽 당 단백질에서 유래된 셀룰로오스, 펙틴 및 폴리 펩티드를 포함하여 양성, 음성 및 양친매성 특성을 가지고 균질화 중에 방출되는 칼슘 이온 및 낮은 pH를 갖는 저 분자량의 세포벽 성분이 생성된다. 조직이 균질화되고 다양한 구성 요소가 방출되면, 다양한 성분들의 자가 조립이 발생하는 것으로 관찰된다. 외부 영향 없이, 이 실시예에서 형성된 나노 입자는 크기, 모양 및 물리 화학적 특성이 실질적으로 균일하다는 점에 유의해야 한다. 신 체리, 블루 베리 및 포도와 같은 상이한 특성을 가진 과일은 모두 기본 세포 성분의 자가 조립에 대해 잠재력을 나타내어 실질적으로 동일한 유형의 나노 입자를 형성한다.
- [0710] 이 실시예에서 명백해진 흥미로운 특징은 나노 입자를 형성하기 위한 성분의 자가 조립을 결정하는데 있어서 아마도 안토시아닌 및 말산의 역할이다. 안토시아닌이 있는 상태에서, 나노 입자는 갈락투로난-자일로글루칸-아라비노갈락탄-폴리펩티드 필라멘트로 엮인 중앙 펙틴 코어가 있는 구형이다. 이들 필라멘트는 안토시아닌의 존재 하에서 본질적으로 나선형이며 원섬유 구조로 구성된다. 안토시아닌은 양친매성 분자이며 다양한 성분들 사이의 가교 구조 역할을 할 수 있다. 그러나 일단 안토시아닌이 제거되면, 나노 입자는 대신에 필름형(펙틴의 평면 구조, 도 7)과 나노 섬유라고 하는 섬유 유사 구조(필로미셀 형)를 형성한다. 모양에 관계없이, 구형 나노 입자와 나노 섬유는 모두 매우 안정적이었으며 다양한 약물(파클리탁셀, 빈크리스틴) 및/또는 고효율 및 흡수 능력을 가진 미네랄과 결합할 수 있다. 기능 측면에서, 구형 나노 입자는 또한 안토시아닌을 결장(colon)으로 표적전달하기 위한 안토시아닌의 운반체 역할을 할 수 있고, 예를 들어, 안토시아닌은 유리 안토시아닌에 비해 구형 복합 구조 내에서 훨씬 더 보호되어, 위와 장 사이의 전환 동안 pH 변화로부터 이들을 보호 할 수 있기 때문이다.
- [0711] 본 실시예에서는 과일로부터 나노 입자와 나노 섬유를 제조하였으며, 나노 입자와 나노 섬유의 물리 화학적 특성 및 기능을 조사하고 기술하였다. 이들 나노 입자와 나노 섬유는, 폴리 페놀의 유무에 관계없이, 펙틴, 셀룰로오스 및 단백질로부터 3 차 구조 형성을 통해 생성되는 엄청난 표면적 측면에서 독특하다. 생물학적 기원의 이들 나노 입자 및 나노 섬유는 여러 응용 분야에서 가공된 나노 물질에 대한 대안을 제공할 수 있다. 구조 성분(building components)이 음식(주스, 스무디)을 통해 소비되고 부작용이 관찰되지 않기 때문에, 모든 음식 거

대 분자와 마찬가지로, 구조 성분의 생물학적 제거가 발생할 수 있음을 시사할 수 있다. 나노 입자 및 나노 섬유는 포유 동물 세포에 의해 내재화 되어, 예를 들어, 소분자, 영양소, 약물, 미네랄 또는 기타 이러한 제제/적재물의 전달 시스템으로 사용될 가능성을 나타낸다. 유사한 물질에서 파생되었음에도 불구하고, 나노 입자와 나노 섬유는 본원에서 자세히 설명된 바와 같이 상당한 차이가 있다.

[0712] 실시예 2 - 나노 입자의 기능 및 응용

[0713] 나노 입자 처리가 야생형(Wild-Type) 및 ETKO 마우스의 체중에 미치는 영향

[0714] 방법 및 재료:

[0715] **생체 내 분석 - 동물 및 유전형** - Pcyt2+/- 마우스(본원에서 ETKO 마우스라고도 함)를 생성하고 상기 설명한 대로 유전자형을 분석했다(Fullerton MD, et al. 2007). Pcyt2는 세포막과 세포 기관의 중요한 성분인 인지질, 포스파티딜에탄올아민(PE)의 생산을 조절하는 유전자이다. Pcyt2 유전자(null 동물)를 완전히 녹아웃 시키면 초기 배아 치사 사망(강아지는 출생 전에 사망)이 발생하는 반면, 이형 접합 동물(유전자 카피(copy)가 하나만 있음)은 출생시와 이후에 정상이다. 그러나 이형 접합 마우스는 인지질 대사의 변화로 인해 만성적인 체중 증가를 겪는다. 인지질을 구성하는 성분의 방향이 바뀌고 세포 기계가 PE를 만드는 것에서 트리글리 세라이드(지방)로 바뀐다. 즉, 마우스의 체중이 증가하고, 간과 혈장에 지방이 많으며 궁극적으로 인슐린에 대한 민감도가 감소한다(인슐린 저항성).

[0716] Pcyt2+/- 마우스는 교배되었고, 이형 접합 콜로니는 대학 동물 관리위원회(University Animal Care Committee)가 승인한 절차에 따라 겔프(Guelph) 대학에서 유지되었다. 마우스는 12 시간의 빛/12 시간의 어둠 주기로 수용되었고, 물에 자유롭게 접근할 수 있었고, 표준화된 사료(카탈로그 번호 S-2335; Harlan Teklad)를 먹였다. 마우스를 4 개의 실험 그룹(n=3~6/그룹)으로 나누었다: (i) 야생형 (C57BL/6)-미처리 (WT-U), (ii) 야생형 (C57BL/6)-처리된 (WT-T), (iii) Pcyt2 녹아웃-미처리 (KO-U) 및 (iv) Pcyt2 녹아웃-처리 (KO-T). 생화학적 분석을 위해 채취한 샘플(혈청 및 조직(간))을 액체 질소에서 급속 냉동하고 나중에 사용하기 위해 -80℃에 보관했다.

[0717] **혈액 분석.** 임상 사망 후 심장에서 말기 혈액을 채취했다. 혈청은 즉시 분리되어 알부민, 글로불린, A:G, 총 단백질, ALT, AST, 콜레스테롤, CK, 포도당, 인, 트리글리세라이드 및 요소와 같은 생화학적 분석을 위해 동물 보건 연구소(Animal Health Laboratory, 겔프 대학, 분석을 위한 공인 시설)로 보내졌다.

[0718] **화학 물질 및 시약.** L-형 트리글리세라이드 M 키트는 Wako Diagnostics(일본 오사카 및 독일 Neuss)에서 구입했다. p65 NF-kB 및 B-Tubulin에 대한 항체는 각각 Santa Cruz Biotechnology 및 Cell Signaling Technology에서 제공했다. RNA 분리를 위한 RNeasy Plus 키트는 Qiagen(Valencia, CA, USA)에서 구입했다. cDNA 제조를 위한 고품질 cDNA 역전사 키트는 Applied Biosystems(Foster city, CA, USA)에서 제공했다. 사용된 프라이머는 다음과 같다.

[0719] **표 4:** 나노 입자로 처리한 후 특정 유전자의 발현 수준을 측정하기 위해 PCT에 사용되는 프라이머 시퀀스. F = Forward, R = Reverse.

표 4

프라이머	서열	서열번호	TM (°C)	Amplicon Size (bp)
STAT4	F- 5' AGGTTAAGCTGGCTGTCCTG 3'	1	62	150
	R- 5' AGATCTCTTGCTTCTGGTTTGTG3'	2		
TNF- α	F- 5' CCGATGGGTTGTACCTTGTC 3'R- 5'	3	60	300
	GGGCTGGGTAGAGAATGGAT 3'	4		
IL-6	F- 5' CAAGGGTGTACACTGG 3'	5	62	200
	R- 5' CTGGTCTCATCCGAACCCCTG 3'	6		
FAS	F-5' CTTCGAGATGTGCTCCAGCTGC 3'	11	59	268
	R-5' CTTAGTGATAAGGTCCACGGAGGC 3'	12		
ATGL	F-5' CAACGCCACTCACATCTACGG 3'R-5'	13	57	106
	GGACACCTCAATAATGTTGGCAC 3'	14		
HSL	F-5' ACGCTACACAAAGGCTGCTT 3'R-5'	15	59	125
	TCGTTGCGTTTGTAGTGCTC 3'	16		
LPL	F-5' GCTCGCACGAGCGCTCCATT 3'R-5'	17	59	350
	CCTCGGCAGGGTGAAGGGAA 3'	18		

PGC1- α	F- 5' TTGACTGGCGTCATTTCGGG 3'R- 5' GAAGGACTGGCCTCGTTGTC 3'	19 20	59.5	396
PPAR- α	F-5' CGCATGTGAAGGCTGAAGGGC 3'R-5' GTCATCCAGTTCTAAGGCATTG 3'	21 22	57	289
PPAR- γ	F-5' CAGAAGTGCCTTGCTGTGGGG 3'R-5' CTTGGCTTTGGTCAGCGGG 3'	23 24	57	157
CTL1	F-5' GAACGCTCTGCGAGTGGCTGC 3'R-5' TTCTTATGTTCTTGACTGCC 3'	25 26	49	376
PCYT1	F-5' ATGCACAGAGAGTTCAGCTAAAG 3'R-5' GGGCTTACTAAAGTCAACTCAA 3'	27 28	50	170
PSS2	F-5' GAGTGGCTGTCCCTGAAGAC 3'R-5' TCGTAGATCTCACGCATGGC 3'	31 32	59	305

- [0721] **나노 입자 처리.** 실험은 24~30 주령 Pcyt2 녹아웃 마우스 및 한배 대조군으로 수행되었다. KO와 대조군 마우스의 미처리군(각각 n = 3~6)에 100uL 물을 주당 3회(위관 관에 의해) 제공하였다. KO와 대조군 마우스의 처리 군(각각 n = 3~6; 약 40g 평균 체중)은 100uL 물에 100mg/kg/4주 폴리 페놀 당량의 나노 입자 용액을 주 3 회(투여 당 133 μ g 폴리 페놀 당량) 투여하였다. 모든 그룹에 대한 구강 위관 영양은 4 주 동안 지속되었다. 실험은 두 번 반복되었고 실험이 끝날 때 마우스를 희생하여 혈액 및 조직 분석에 사용했다.
- [0722] **면역블롯팅(Immunoblotting).** NF-kB는 10% SDS-PAGE를 사용한 면역블롯팅, 웨스턴 블롯팅 및 화학 발광에 의한 밴드 검출에 의해 측정되었다. 막을 1X PBST에서 5% 우유로 차단하고 항-NF-kB(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA) 항체와 함께 4°C에서 밤새 배양했다. 그런 다음, 막을 항-토끼 IgG와 함께 배양하고 화학 발광(Sigma-Aldrich)으로 시각화했다. 로딩 정확도를 확인하기 위해 β -Tubulin을 사용한 막 재혼성화를 수행했다. 특정 밴드의 밀도는 이미지 농도계(이미지 J)로 정량화되었다.
- [0723] **간 트리글리세라이드 측정.** 간의 TG 함량은 키트(Wako) 절차에 따라 L-Type TG M 시약을 사용하여 측정되었다.
- [0724] **총 RNA 분리 및 유전자 발현.** 총 RNA는 RNeasy Plus 키트(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 분리되었고 cDNA는 High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)를 사용하여 준비되었다. 관심 유전자는 최적의 cDNA 양과 반응 사이클 수를 사용하여, PCR 증폭의 지수 단계에서 분석되었다. 각 유전자 수준은 내부 GAPDH 대조군과 관련하여 발현된다. 테스트된 유전자에는 전(pro)-염증 유전자(STAT4, TNF- α 및 IL-6)와 지방분 해 유전자(FAS, ATGL, HSL, LPL, PGC1- α , PPAR- α , PPAR- γ , CTL1, PCYT1 및 PSS2)가 포함된다. 실험은 Pcyt2+/- 및 Pcyt2+/+, 수컷 및 암컷 마우스에서 수집 한 간 샘플을 사용하여 수행되었다. 반응 생성물을 전기 영동하고 에티듐 브로마이드 염색으로 가시화된 밴드를 적용하였다. ImageJ 1.46 소프트웨어는 밴드 밀도를 정량화하는 데 사용되었으며 유전자 수준은 대조군에 비해 배수(fold) 변화로 표현된다. 사용된 프라이머는 상기 표에 나열되어 있다.
- [0725] NF-kB는 SDS-PAGE에 의한 면역블롯팅, 웨스턴 블롯팅 및 화학 발광에 의한 밴드 검출에 의해 결정되었다. 막을 1X PBST에서 5% 우유로 차단하고 항-NF-kB (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA) 항체와 함께 4°C에서 밤새 배양했다. 그런 다음 막을 항-토끼 IgG와 함께 배양하고 화학 발광(Sigma-Aldrich)으로 시각화했다. 로딩 정확도를 확인하기 위해 β -Tubulin을 사용한 막 재혼성화를 수행했다. 특정 밴드의 밀도는 이미지 농도계(이미지 J)로 정량화되었다.
- [0726] **통계 분석.** Prism GraphPad를 사용하여 통계 분석을 완료했다. 데이터는 평균 $\pm$ S.E로 표현된다. 통계적 유의성은 Student's t 검정(P 값 <0.05는 유의한 것으로 간주됨) 또는 다요인 ANOVA를 사용하여 계산되었다. 유의한 효과가 발견되면 Tukey의 정직한 유의차 테스트(Tukey's honestly significant difference test)를 사용하여 사후 비교를 수행했다. 차이는 P <0.05에서 중요한 것으로 간주되었다.
- [0727] **결과 및 논의:** 야생형 마우스와 ETKO 마우스에서 나노 입자 처리가 체중에 미치는 영향을 연구하기 위한 실험이 수행되었다. 도 18은 나노 입자 용액(NP)을 마우스에 공급한 야생형 및 ETKO 마우스의 체중 변화에 대한 효과를 보여준다. 마우스(6~7 개월령)는 각각 5~6 마리씩 4개의 그룹(야생형 미처리(WT U), 야생형 처리(WT T), 녹아웃 미처리(KO U) 및 녹아웃 처리(KO T))으로 나누었다. 나노 입자 처리된 마우스는 133 μ g 당량의 용량을 투여받았다. NP 용액/40g 체중/일(100mg 추출물/kg 체중) 주 5 회 위관 영양으로 투여됨. 미처리 마우스는 물을 투여받았다. 실험은 4 주 동안 지속되었다. NP 처리 첫 주는 실험군에서 마우스 체중에 영향이 없었지만, 2 주, 3 주 및 4 주 후, NP 처리를 계속하면 ETKO 마우스의 체중 증가가 방지되었다. 미처리 WT와 이러한 특정 용량/조건에

서 처리된 WT 사이에 체중 감소에 유의한 변화가 없었지만, 미처리 KO와 처리된 KO 사이의 체중 증가의 감소는 통계적으로 유의했다($P < 0.05$). 이러한 결과는 비만 및/또는 체중 감소의 치료 및/또는 관리에 나노 입자의 사용을 지지한다.

[0728] 나노 입자 처리가 간의 트리글리세라이드 수준, 간 조직 병리학, 혈청 생화학적 매개 변수 및 유전자 발현에 미치는 영향

[0729] 재료 및 방법:

[0730] 조직학적 분석. 간 조직학을 조사하기 위해, 조직을 10% 중성 완충 포르말린 + 인산염 완충 식염수에 고정하고 파라핀에 포매했다. 10 μ m 간 절편을 헤마톡실린 및 에오신(H & E)으로 염색하고 광학 현미경으로 시각화했다. 조직 지질은 이전에 설명한 대로 이미징 밀도계(이미지 J)로 분석되었다(Fullerton et al. 2007).

[0731] 간 트리글리세라이드 측정. 간의 TG 함량은 키트 Wako) 절차에 따라 L-Type TG M 시약을 사용하여 측정되었다.

[0732] 혈액 분석. 임상 사망 후 심장에서 말기 혈액을 채취했다. 혈청은 즉시 분리되어 알부민, 글로불린, A:G, 총 단백질, ALT, AST, 콜레스테롤, CK, 포도당, 인, 트리글리세라이드 및 요소와 같은 생화학적 분석을 위해 보내졌다.

[0733] 결과 및 논의:

[0734] 야생형 간 및 ETKO 마우스의 트리글리세라이드 수준에 대한 나노 입자 처리의 효과를 조사하기 위한 연구가 수행되었다. 정상적인 생리적 조건에서, 간은 지방 저장에 관여하지 않기 때문에 간 트리글리세라이드 수치가 상대적으로 낮다. 비 알코올성 지방간의 트리글리세라이드는 혈장에서 세포로의 지방산 흡수율과 간세포 용량에 따라 달라진다(Bradbury MW. 2006, Kawano Y 2013). 비만 마우스 간 조직에서 트리글리세라이드의 축적으로 인해, 나노 입자(NP) 처리 유무에 관계없이 WT 및 ETKO 마우스에서 트리글리세라이드의 수준을 조사했다. 도 19는 마우스 간에서 트리글리세라이드 수준의 변화에 대한 나노 입자(NP) 처리의 효과를 보여준다. 간 조직의 트리글리세라이드 수준은 Wako L- 타입 TG M 분석 키트(Wako Life Sciences, CA, USA)를 사용하여 기술된 절차에 의해 평가되었다. NP 처리를 받은 ETKO 마우스에서 트리글리세라이드 수치가 현저하게 감소했다. 상단 패널은 수컷 및 암컷 마우스 모두에서 얻은 데이터를 보여준다. 하단 패널은 수컷 마우스에서 얻은 데이터를 보여준다. NP 치료에 의한 간에서의 트리글리세라이드 감소는 비만 마우스 간 또는 필요로 하는 다른 동물 또는 대상의 간에서 트리글리세라이드 수준을 감소시키기 위한 NP의 사용을 지지한다.

[0735] 나노 입자 처리가 간 조직 병리학에 미치는 영향을 조사하기 위한 연구도 수행되었다. 지질 액적은 간세포 지질 저장 소기관으로 간주된다(Mashek DG, 2015). 간에서 비정상적인 지질 축적으로 인해 특정 대사 증후군 질환이 발생하는 것으로 여겨진다(Gluchewski 2017). 따라서, 나노 입자 처리가 간 조직 병리학 및 야생형 및 녹아웃(ETKO) 마우스의 간 지질 병리학에 미치는 영향을 조사하기 위한 연구가 수행되었다. 도 20은 나노 입자 처리된 마우스(WT 및 KO)의 간 절편의 조직 병리를 보여준다. 냉동 절편을 Oil-red-O 염색(Sigma-Aldrich)으로 염색하여 트리글리세라이드를 포함하는 지질 액적이 적색 액적으로 보이도록 만들었다. 상단 2 개 패널/행은 야생형(미처리-상단; 나노 입자 처리됨, 하단) 마우스에서 염색된 간 절편의 이미지를 나타낸다. 적색으로 염색된 영역의 정량화는 대조군 및 처리된 마우스 세트에서 거의 변화를 보이지 않는다. 각 패널/행은 3 개의 독립적인 마우스의 절편을 나타낸다. 아래 2개 패널/행은 ETKO 미처리(위) 및 NP 처리(아래) 마우스의 간 절편의 모양을 보여준다. 일반적으로 ETKO 마우스의 간 절편은 여러 빈 영역을 보여준다. 이러한 영역은 처리된 ETKO 마우스에서 감소된다. 또한 간 구조는 WT와 유사한 경향이 있다(대조군보다 상대적으로 더 많은 보라색 영역). 오일 레드 염색 영역의 면적은 처리 후 현저하게 감소한다(도면의 하단 패널). 처리 후, WT-T/WT-U 그룹에서는 유의한 변화가 관찰되지 않았지만, KO-U(처리되지 않은) 마우스와 비교하여 KO-T(처리된) 마우스에서 지질 액적의 양이 현저하게 감소했다. 이러한 데이터는 NP 처리가 비만 마우스 간에서 지질 액적의 비율을 감소시켰음을 보여준다.

[0736] 나노 입자 처리 후 비만 마우스의 간 트리글리세라이드 감소와 간 조직 병리학적 검사 결과를 고려할 때, 나노 입자 처리는 간에서 지질 침착을 조절하는 효과적인 수단이 될 수 있는 것으로 보인다. 비 알코올성 지방증(즉, NASH)에서 관찰되는 이러한 상태는 비만 마우스에서 관찰되는 것과 유사하다. 따라서, 본원에 기술된 나노 입자와 같은 항염증 식물 제품의 섭취는 예를 들어 동물, 포유류 또는 인간 대상에서 NASH를 조절 및/또는 관리하는 방법일 수 있다.

[0737] 마우스의 혈청 생화학적 매개 변수(야생형, WT 및 녹아웃, KO)에 대한 나노 입자 처리의 효과를 조사하기 위한 연구도 수행되었다. 혈청 매개 변수는 개인의 영양 상태를 나타내는 중요한 지표이다. 순환하는 지방산의 수준

이 증가하면 알부민과의 결합이 형태 변화를 일으킬 수 있다(Yamato M 2007). 글로불린 수치는 비만과 간 질환으로 인해 변경될 수 있다. 총 단백질 양의 변동은 간 및 신장 장애, 심부전 및 영양 실조를 나타낼 수 있다. 상승된 간 효소, 알라닌 아미노전이효소 (ALT) 및 아스파테이트 아미노전이효소(AST)는 비 알코올성 지방간 질환 및 비만의 경우에 관찰되는 비정상적인 간 기능의 핵심 지표이다(Marchesini G 2008). 높은 혈중 콜레스테롤 수치와 트리글리세라이드 수치는 지질 대사 장애, 고지혈증 또는 고 콜레스테롤 혈증의 결과이다. 혈청 내 크레아틴 키나제(CK)의 증가는 근육 손상, 심장병, 만성 신장 질환 및 급성 신부전(신장)의 지표이다. 혈청의 인 수치는 일반적으로 영양 실조, 흡수 장애 및 신장 기능 장애(인)와 관련이 있다. 높은 포도당 수치는 일반적으로 당뇨병을 나타내지만, 다른 많은 질병과 관련이 있을 수 있다.

[0738] 4 개의 실험군(야생형 나노 입자 처리 WT-T 및 미처리 WT-U 및 녹아웃 나노 입자 처리 KO-T 및 미처리 KO-U)에서 NP 처리가 알부민, 글로불린, A:G, 총 단백질, ALT, AST, 콜레스테롤, CK, 포도당, 인 및 트리글리세라이드의 혈청 농도에 미치는 영향을 조사하기 위해, 마우스를 4 주 동안 체중 kg 당 NP 용액 100mg으로 처리 하였다. 도 21은 나노 입자(NP) 처리된 마우스와 미처리 마우스의 혈청 매개 변수를 보여준다. 알부민, 글로불린 및 그 비율에는 큰 변화가 없었다. 혈청의 총 단백질 수준이 약간 감소한 것으로 보인다. 값은 3 개의 독립적인 처리에서 얻은 평균 $\pm$ SEM이다. 도 22는 대조군 및 NP 처리 마우스의 혈청 생리 기능 마커(ALT, AST, 콜레스테롤 및 CK) 수준의 변화를 보여준다. 분석은 겔프(Guelph) 대학 실험실 서비스 부서의 병리학 실험실에서 테스트 키트를 사용하여 표준 절차에 따라 수행되었다. 알라닌 아미노트랜스퍼라제(Alanine aminotransferase) 및 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제(aspartate aminotransferase)는 간의 기능 상태를 나타내는 효소이다. 간 기능이 좋지 않거나 간에 염증이 생기면, 이들 효소가 더 많이 혈액으로 분비된다. 비만 마우스에서 NP 처리에 대한 반응으로 ALT와 AST의 수준이 유의하고 실질적으로 감소했다. 이들 효소 수준이 낮은 야생형 마우스에서도 NP 처리는 감소를 산출했다. NP 처리는 비만 마우스의 간 기능을 정상화시키는 것으로 보인다. 혈청 내 콜레스테롤 수치는 야생형 마우스와 비만 마우스 모두에서 NP 처리에 반응하여 감소했다. 높은 크레아틴 키나아제 수치는 근육 손상의 지표이며, NP 처리된 비만 마우스에서 큰 감소를 보였다. 이러한 결과는 NP의 항 염증 기능을 지지한다. 도 23은 처리되지 않은 마우스와 나노 입자 처리된 마우스의 혈액에서 포도당과 인의 수준을 보여준다. 미처리 야생형과 ETKO 마우스의 혈액에서 인의 수준에는 큰 변화가 없었다. 포도당 수준은 야생형에서 유사했으며 NP 용액 처리 후 비만 마우스에서 감소하는 경향을 보였다.

[0739] 나노 입자 처리가 유전자 발현에 미치는 영향

[0740] **결과 및 논의:**

[0741] 다양한 관련 생물학적 경로 및/또는 조건에 관련된 다양한 주요 유전자의 발현 수준에 대한 나노 입자 처리의 효과를 조사하기 위한 연구가 수행되었다. 마우스(야생형, WT 및 ETKO 녹아웃, KO)를 나노 입자로 처리하고 유전자 발현 수준의 변화를 분석했다.

[0742] STAT4(Signal Transducer and Activator of transcription 4)는 단백질의 STAT 계열의 전사 인자이다. STAT4는 야누스 키나아제에 의해 인산화되어 이합체 화가 가능하게 되고 사이토카인 신호를 보내는 동안 핵으로 전이되고, 유전자 발현을 증가시킨다. Stat 4 관련 유전자 발현의 증가는 활성화된 염증 경로의 표시이다. 도 24는 나노 입자 용액 처리에 대한 STAT4 유전자 발현의 변화를 평가한 것이다. PCR 산물을 아가로스 겔 상에서 분리하고 밴드를 시각화하기 위해 브롬화 에티디움 염색을 하여 정량화하였다. 미처리 야생형 마우스와 처리된 야생형 마우스 사이에 STAT4 수준의 유의미한 변화는 없다. NP 용액을 먹인 ETKO 마우스에서 STAT4 발현이 감소하는 경향이 있다. 이 실험에서 값은 미처리 ETKO 마우스의 수준과 크게 다르지 않았지만 감소 추세가 관찰되었다. 값은 각 그룹의 4~5 마리 마우스에서 평균 $\pm$ SEM이다. 이는 나노 입자 용액이 신체의 염증 상태를 감소시키는 잠재력을 보여줄 수 있음을 시사한다.

[0743] 핵 인자-kB(NF-kB)는 인터루킨 및 종양 괴사 인자 - α 와 같은 사이토카인을 통한 염증 신호 전달 개시에 관여하는 핵심 단백질이다. 경로는 복잡하며 조건에 따라 전-염증 및 항-염증 역할을 모두 가질 수 있다. NF-kB 신호 전달의 감소는 염증과 관련된 만성 질환의 하향 조절에 유리한 것으로 간주된다. 도 25는 나노 입자 용액 처리에 대한 NF-kB 유전자 발현의 변화 평가를 보여준다. NF-kB 밴드 강도는 웨스턴 블롯 및 화학 발광 검출에 의해 정량화되었다. 처리되지 않은 야생형 마우스와 처리된 야생형 마우스 사이에 NF-kB 수준의 유의한 변화는 없었다. 비만 마우스의 경우에도 유사한 관찰이 이루어졌다. 그러나 야생형 마우스와 비교할 때 비만 마우스에서 NF-kB 발현 수준이 증가했다. 이러한 결과는 야생형과 비교하여 비만 마우스의 염증 상태가 증가했음을 시사한다. 값은 각 그룹의 4~5 마리 마우스에서 평균 $\pm$ SEM이다.

[0744] TNF α 는 자가 면역 활성화뿐만 아니라 감염으로 인한 염증과 관련된 신호 전달 경로에 관여하는 핵심 단백질이

다. TNF α 의 하향 조절은 관절염과 같은 만성자가 면역 질환을 제어하는 데 이상적인 것으로 간주된다. TNF α 의 감소는 신체의 염증 상태와 관련이 있는 비만 감소에 바람직하다. 도 26은 나노 입자 용액으로 마우스를 처리했을 때 TNF α 유전자의 발현 변화를 평가한 것이다. 정량화는 RT-PCR 및 아가로스겔 전기 영동 및 브로마이드 에티딘 염색에 의한 생성물 분리에 의해 이루어졌다. 처리되지 않은 야생형 마우스와 처리된 야생형 마우스 사이의 TNF α 유전자 발현 수준에는 유의한 변화가 없다. NP 용액을 먹인 ETKO 마우스에서 TNF α 발현의 현저한 감소가 있다. 값은 각 그룹의 4~5 마우스에서 평균 $\pm$ SEM이다.

[0745] IL6는 전-염증 및 항-염증 경로를 매개하는 사이토카인이다. IL6의 활성화는 여러 가지 장애를 일으키는 만성 염증 상태의 발달로 이어지는 것으로 알려져 있다. IL6에는 여러 역할이 있다. IL6-수용체(Tocilizumab)에 대한 단일 클론 항체는 염증성 질환인 류마티스 관절염을 표적으로 한다. IL6의 하향 조절은 비만과 같은 만성 질환을 줄이는 데 도움이 될 수 있다. 도 27은 나노 입자 용액으로 마우스를 처리했을 때 IL6 유전자의 발현 변화를 평가한 것이다. 처리되지 않은 야생형 마우스와 처리된 야생형 마우스 사이에 IL6 수준의 유의한 변화는 없다. NP 용액을 먹인 ETKO 마우스에서 IL6 발현의 현저한 감소가 있다. 값은 각 그룹의 4~5 마우스에서 평균 $\pm$ SEM이다.

[0746] FAS(Fatty Acid Synthase)는 지방산의 생합성에 관여하는 효소이다. 지방산은 트리글리세라이드로 전환되며 지방산 수치가 증가하면 지방 축적이 일어나 비만으로 이어질 수 있다. 따라서, 이 효소 수준의 감소는 감소된 트리글리 세라이드 생합성 및 침착에 유리할 수 있다. 도 28은 나노 입자 용액 처리에 대한 FASN 유전자 발현의 변화 평가를 보여준다. PCR 산물을 아가로스겔에서 분리하고, 밴드를 시각화하기 위해 에티딘 브로마이드 염색을 통해 정량화했다. NP-처리된 야생형 마우스에서 FAS 수준의 현저한 감소가 있었다. NP 용액을 먹인 ETKO 마우스에서 FAS 발현이 감소하는 경향이 있었다. 값은 이 테스트에서 처리되지 않은 ETKO 마우스의 수준과 크게 다르지 않았다. 값은 각 그룹의 4~5 마우스에서 평균 $\pm$ SEM이다.

[0747] ATGL(Adipose Triglyceride Lipase)은 지방산으로의 트리글리세라이드 이화 작용을 시작하는 데 관여하는 효소이다. ATGL 기능은 잠재적으로 대사 증후군의 발생에 관여한다. 도 29는 나노 입자 용액 처리에 대한 ATGL 유전자 발현의 변화를 평가한 것이다. PCR 산물을 아가로스 겔에서 분리하고, 밴드를 시각화하기 위해 에 티딘 브로 마이드 염색을 통해 정량화했다. 대조군과 NP 처리 야생형 마우스 사이의 ATGL 수준에는 유의한 차이가 없었다. 유사하게 ATGL 발현 수준은 미처리 마우스와 NP 처리 ETKO 마우스에서 동일했다. 값은 각 그룹의 4~5 마우스에서 평균 $\pm$ SEM이다.

[0748] HSL(호르몬 민감성 리파제)은 지방 조직에서 트리글리세라이드의 가수 분해에 관여하는 주요 효소이며 에너지 생성에 관여하는 주요 효소이다. HSL은 ATGL과 함께 작용하여 트리글리세라이드에서 유리 지방산을 방출한다. 이 효소는 단식 중에 에너지가 필요할 때 카테콜아민에 반응하여 활성화되어, 저장된 지질을 동원하는 기능을 한다. 또한 스테로이드 생합성에서 콜레스테롤 에스테르에서 지방산을 방출한다. HSL은 거품 세포(foam cell)에서 콜레스테롤 에스테르를 분해하여 죽상 경화증을 감소시키는 기능을 가질 수 있다. 도 30은 나노 입자 용액 처리에 대한 반응으로 HSL 유전자 발현의 변화를 평가한 것이다. PCR 생성물을 아가로스 겔에서 분리하고, 밴드를 시각화하기 위해 에티딘 브로마이드 염색을 통해 정량화했다. 대조군과 NP-처리 야생형 마우스 사이에 HSL 전사체 수준이 유의하게 증가했다. HSL 발현 수준은 미처리 마우스와 NP 처리 ETKO 마우스에서 동일했다. 값은 각 그룹의 4~5 마리 마우스에서 평균 $\pm$ SEM이다.

[0749] LPL(지질단백질 리파아제)은 지질단백질에 결합된 트리글리세라이드를 가수 분해하여, 유리 지방산과 모노아실 글리세롤을 방출하는 효소이다. LPL은 채장 및 간 리파아제와 같은 다른 리파아제와 유사하다. LPL은 심장, 근육 및 지방 조직과 같은 여러 조직에 존재하며, 모세 혈관의 내강에 가까운 세포층에 존재한다. LPL은 모세 혈관의 지질단백질 대사에 영향을 미칠 수 있다. LPL 활성화는 인슐린과 아드레날린과 같은 호르몬에 의해 차별적으로 조절된다. LPL 수준은 고지방 식이(diet)나 고 탄수화물 식이 후에 증가하는 것으로 알려져 있으며 비만의 발달에 기능이 있을 수 있다. 도 31은 나노 입자 용액 처리에 대한 반응으로 LPL 유전자 발현의 변화를 평가한 것이다. 정량화는 아가로스 겔 상에 PCR 생성물을 분리하고, 밴드를 시각화하기 위해 에티딘 브로마이드 염색하여 이루어졌다. 야생형 마우스에서 NP 처리에 대한 LPL 전사체 수준에는 변화가 없었다. 대조적으로, NP-처리 ETKO 마우스에서 LPL 발현 수준이 현저히 감소하였다. 값은 각 그룹의 4~5 마리 마우스에서 평균 $\pm$ SEM이다.

[0750] PGC1- α (Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator)는 탄수화물 및 지질과 관련된 에너지 대사 조절에 관여하는 전사 보조활성제(co-activator) 계열에 속한다. PGC1-A는 스트레스 조건에서 활성화된다. 이 단백질은 또한 염증 경로를 향상시키는 데 관여하는 NF- κ B를 활성화시키는 것으로 알려져 있다. 따라서 PGC1-A 수준의 감소는 염증을 감소시킬 수 있다. 도 32는 나노 입자 용액 처리에 대한 반응으로 PGC1- α 유전자

발현의 변화를 평가한 것이다. 정량화는 아가로스 겔 상에서 PCR 생성물을 분리하고, 밴드를 시각화하기 위해 에티디움 브로마이드 염색을 하여 이루어졌다. 야생형 마우스에서 NP 처리에 대한 반응으로 PGC1- 알파 전사체의 수준에는 변화가 없다. 대조적으로, NP 처리 ETKO 마우스에서 PGC1- 알파 발현 수준이 현저하게 감소하였다. 값은 각 그룹의 4~5 마리 마우스에서 평균 $\pm$ SEM이다.

[0751] PPAR- α (Peroxisome Proliferator Activated Receptor-Alpha)는 핵 국소 전사 인자 그룹에 속한다. PPAR-알파는 지방산 흡수, 수송 및 이화 작용에 관여하는 유전자의 자극을 포함하여, 간의 지질 대사에 중요한 조절 기능을 가지고 있다. PPR-알파 녹아웃 마우스는 비정상적인 지질 대사를 가지고 있어 지방간 질환을 유발한다. 도 33은 나노 입자 용액 처리에 따른 PPAR- α 유전자 발현의 변화를 평가 한 것이다. 정량화는 아가로스 겔 상에서 PCR 생성물을 분리하고, 밴드를 시각화하기 위해 에티디움 브로마이드 염색을 하여 이루어졌다. 야생형 마우스 및 ETKO 비만 마우스에서 NP 처리에 대한 반응으로 PPAR- α 전 사체의 수준에는 변화가 없었다. 값은 각 그룹의 4~5 마리 마우스에서 평균 $\pm$ SEM이다.

[0752] PPAR- 감마(Peroxisome Proliferator Activated Receptor-gamma)는 핵에 위치한 또 다른 전사 인자이다. 이 단백질은 지방 세포의 증식에 관여하여 비만 생성을 촉진한다. PPAR 감마는 지방 조직과 근육에서 더 낮은 수준으로 발현된다. PPAR 감마는 비만 및 제2 형 당뇨병 발병에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 도 34는 나노 입자 용액 처리에 대한 PPAR- γ 유전자 발현의 변화 평가를 보여준다. 정량화는 아가로스 겔 상에서 PCR 생성물을 분리하고, 밴드를 시각화하기 위해 에티디움 브로마이드 염색을 하여 이루어졌다. NP 처리 야생형 마우스에서 PPAR- 감마 전사체의 상당한 감소가 있다. NP 처리 후 비만 마우스에서 PPAR 감마 수준에 큰 변화가 없었다. 값은 각 그룹의 4~5 마리 마우스에서 평균 $\pm$ SEM이다.

[0753] CTL-1(Choline Transporter Like Protein 1)은 막 결합 효소이며 뇌 세포의 원형질막과 미토콘드리아에서 발견된다. 그것은 포스파티딜콜린 생합성 및 막 생합성에 사용되는 미토콘드리아에서 콜린의 수송에 관여한다. 염증에 의한 대식세포의 증가된 생산은 CTL-1의 과발현을 초래했으며 염증 증가와 관련이 있는 것으로 보인다. 높은 수준의 막 생물 발생의 감소는 세포의 확대 및 비만 관련 변화를 줄이는 데 도움이 될 수 있다. 도 35는 나노 입자 용액 처리에 대한 CTL1 유전자 발현의 변화 평가를 보여준다. 정량화는 아가로스 겔 상에서 PCR 생성물을 분리하고, 밴드를 시각화하기 위해 에티디움 브로마이드 염색을 하여 이루어졌다. 야생형 마우스에서 NP 처리에 대한 CTL-1 전사체 수준의 변화는 없다. 대조적으로, NP 처리 ETKO 마우스에서 CTL1 발현 수준이 현저하게 감소했다. 값은 각 그룹의 4~5 마리 마우스에서 평균 $\pm$ SEM이다.

[0754] PSS 2(CDP-diacylglycerol--serine O-phosphatidyltransferase 2; phosphatidylserine synthase 2)는 포스파티딜세린 생합성에 관여하는 효소이다. 이 단백질은 미토콘드리아에 위치한다. PSS 2 녹아웃 마우스는 정상 수명을 나타 냈다. 도 36은 나노 입자 용액 처리에 대한 PSS 2 유전자 발현의 변화를 평가 한 것이다. 정량화는 아가로스 겔 상에서 PCR 생성물을 분리하고, 밴드를 시각화하기 위해 에티디움 브로마이드 염색을 하여 이루어졌다. 야생형 마우스에서 NP 처리에 대한 반응으로 PSS 2 전사체의 수준에는 변화가 없었다. 그러나 ETKO 마우스에서는 낮지만 상당한 감소가 관찰되었다. 값은 각 그룹의 4~5 마리 마우스에서 평균 $\pm$ SEM이다.

[0755] 과일, 과일 주스 및 과일 분말의 기능성(항산화, 항염증) 및 질병 예방 특성은 이들 과일에 존재하는 안토시아닌, 페놀 성분, 비타민 C 등과 같은 다양한 성분의 존재에 기인한다. 그러나 그 성질 상 안토시아닌은 체내에 효율적으로 흡수되지 않는다. 또한, 안토시아닌은 위장 계를 통과하는 동안 구조적 재배열을 거친다. 장의 알칼리성 상태는 안토시아닌의 고리 파손을 유발한다. 나노 입자와 복합된 안토시아닌은 장 표피를 통해 더 쉽게 운반될 수 있으며 잠재적으로 체내에서 안토시아닌을 방출할 수 있다. 내재화된 안토시아닌은 항산화제로서의 염증 감소(ROS 소거를 통해)에 유리한 유전자 발현을 변화시킬 수 있을 뿐만 아니라, 단백질(TNF 알파, STAT, 인터루킨 및 그 수용체)뿐만 아니라 대사 경로를 조절하고 이에 참여하는 효과기 효소와 관련된 염증 경로를 하향 조절함으로써 유전자 발현을 변경시킬 수 있다

[0756] 이러한 결과는 나노 입자 처리의 직접적인 효과와 비만 감소를 보여준다. 지지하는 효과에는 간 트리글리세라이드 감소, 간 병리 감소(지질 액적 감소), ALT 및 AST와 같은 간 기능 마커 효소 감소, 체질량의 현저한 감소(4 주 이내에 > 10%), 염증 촉진 유전자 발현의 하향 조절 등을 포함한다. 만성 퇴행성 질환의 감소는 과일과 채소의 소비 증가와 관련이 있다. 기능성 성분의 가용성은 과일, 채소, 견과류, 향신료 등을 포함한 다양한 제품의 소비에 달려 있기 때문에, 이러한 연구는 적어도 부분적으로는 단일 농축된 고효능 용량을 통해 이러한 성분 조합을 제공하는 것을 목표로 하고, 염증 마커 감소 및 체중 증가 예방 측면에서의 효과는 약 2.5 mg/kg 체중(마우스 시험)의 일일 용량에서 관찰되었다. 예를 들어, 이 데이터를 사람에게 적용하면, 체중이 70kg인 사람의 일일 용량은 약 175mg이다.

[0757] **실시예 3 - 나노 섬유유의 기능과 응용**

[0758] 전담 매개체로서의 나노 섬유(및 나노 입자) 및 대장 암 세포에 대한 신 체리 (*Prunus cerasus* L.) 과일의 나노 입자 및 나노 섬유유의 세포 독성

[0759] **재료 및 방법 :**

[0760] **신 체리:** 이 실시예에서 사용된 신 체리 열매는 온타리오 주 바인랜드에 있는 바인랜드 리서치 스테이션 (Vineland Research Station)에서 왔으며, 여기에서 이들은 생식질(germplasm)로 유지된다. 모든 품종은 폴리 페놀 함량이 300~500 mg/100g 신선 중량 범위인, 고 폴리 페놀 함유 품종이다. 본 연구에 사용된 주요 품종은 V 70151이었고, V 71261, Hymann Conserva 및 Hymann Rubisn과 같은 다른 것들도 높은 수준의 나노 입자 형성을 보여주었다.

[0761] **나노 입자 및 나노 섬유유의 분리:** 추출 방법은 PTA 10 프로브가 있는 폴리트론 균질기를 사용하여 매질(바람직하게는 물이, 절대 또는 희석된 메탄올 또는 에탄올이 사용될 수 있음)에서, 1 : 1 w/w 비율(조직 1g 대 물 또는 알코올 1ml)로, 과일 조직이 완전히 균질화될 때까지 중간(4~5) 설정에서 열매를 균질화하는 것을 포함한다. 균질물을 4 층의 무명천으로 여과하여 파편을 제거했다. 생성된 균질물을 Sorvall RC 6 Plus 원심 분리기에서 20 분 동안 원심 분리(18,000xg)했다. 상청액을 따라 내었다. 5ml의 상청액을 4℃에서 12 시간 동안 물(1 리터)에 대해 투석(spectra-Por, 6-8kD 컷 오프)하였다. 투석 백 내의 투석된 추출물은 상청액(조 추출물이라고 함)과 마찬가지로 -20℃에서 냉동 보관되었다. 물에 침출되는 폴리 페놀은 상당히 희석되므로, 실험 목적으로, 이것은 sep-pak C18 카트리지를 통과하고 메탄올로 용출하는 소수성 상호 작용 크로마토 그래피로 농축되었다.

[0762] **폴리 페놀 평가 및 분석:** 폴리 페놀은 우리 실험실에서 일상적으로 수행되는 Folin-Ciocalteu 방법으로 평가되었다(Jacob and Paliyath, 2008). 추출물의 적절한 분취량을 물 중 50 %(v/v) 에탄올로 최종 부피 100 μ l로 희석했다. 혼합 용액에 증류수(0.5ml)와 50 μ l의 Folin Ciocalteu 시약(2N)을 첨가하였다. 탄산나트륨 (100 μ l의 5 %(w/v))을 각 샘플에 첨가하고, 볼텍싱으로 혼합한 다음, 암실에서 1 시간 동안 배양했다. 샘플을 완전히 혼합한 후 Beckman Coulter DU 800 분광광도계(Beckman Coulter Inc, USA)를 사용하여 λ_{max} = 725nm에서 흡광도를 측정했다. 0에서 200 μ g/ml 범위의 농도로 갈산을 사용하여 표준 곡선을 생성했다. 폴리 페놀 농도는 신선한 과일 중량 그램 당 갈산 당량으로 표시된다.

[0763] Sep-Pak C18 크로마토그래피를 사용하여 필요할 때 폴리 페놀을 정제하고 농축했다. 일반적으로 1~2 mg의 폴리 페놀 당량의 추출물을 1 ml 카트리지에 로드하고 1~2 ml의 물로 세척하고, 폴리 페놀을 100% 메탄올로 용출했다. 메탄올은 45℃의 질소 흐름에서 제거되었다. 생성된 건조 폴리 페놀을 메탄올(HPLC-MS의 경우) 분석 또는 항산화 분석 및 세포 배양 연구를 위해 물에 용해시킨 후 메탄올을 제거하고 물에 재용해했다.

[0764] 조 추출물, 투석된 추출물 및 투석물 분획물에서 분리된 안토시아닌의 HPLC-MS 분석은 Agilent 1100 시리즈 HPLC-MS를 사용하여 수행되었다. X-Terra® MS C-18 컬럼(5 μ m, 150 x 3.0 mm, Waters Corporation, MA, USA)을 사용하여 분리를 수행했다. 안토시아닌은 0.8 ml/분의 유속에서 메탄올(용매 A) 및 2.0 %(v/v) 포름산(용매 B)의 구배로 용출되었다. 사용된 구배는 다음과 같다 : 0-2 분, 93% B; 2-30 분, 80% B; 30-45 분, 70% B; 45-50 분; 65% B, 50-60 분, 50% B; 60-65 분, 20% B; 65-70 분, 93% B. 검출은 안토시아닌의 경우 520 nm에서, 페놀 산의 경우 260 nm에서 수행되었다. API-ES 질량 분석기로 ESI(Electrospray ionization)를 수행했다. 질소는 350℃에서 12 l/min의 유속으로 분무 및 건조 가스로 사용되었다; 4000V의 이온 스프레이 전압 및 80V의 프래그먼트 전압. 생성된 이온은 m/z 150에서 700까지 스캔된다. 스펙트럼은 양이온 및 음이온 모드에서 수집되었다. 20 μ l(20 μ g)의 시료 주입량은 모든 시료에 사용되었다. 화합물의 구조 식별은 LC-ESI-MS에서 얻은 분자 이온(m/z)을 문헌 데이터(www.metabolomics.jp)와 일치시켜 달성되었다. 3 개의 독립적인 샘플을 분석하고 성분의 양을 조직 당량의 신선 무게 g 당 평균 $\pm$ SEM으로 표시했다.

[0765] **항산화 능력 평가:**

[0766] 항산화 특성(활성 산소 중 또는 활성 라디칼 소거 능력)은 시험관 내 분석 조건에서 수퍼옥사이드 음이온 라디칼, 하이드록실 음이온 라디칼 및 DPPH 라디칼 소거능을 평가하여 수행되었다(Jacob 및 Paliyath, 2008). 이러한 라디칼 소거능은 특정 소강(quenching) 속도로 표시된다.

[0767] **세포 배양:** 대장(colon)에서 유래된 3 개의 세포주, CRL 1790, 정상 세포주, HT 29, 대장 암 세포주 및 CRL 2158 다중 약물 내성 대장 암 세포주(ATCC)를 사용하여 나노 복합체의 세포 독성을 평가했다. 세포들은 각 세포주에 대해 특별히 권장되는 배지에서 배양되었다. HT 29의 경우 사용된 배지는 DMEM(Dulbecco의 수정된 Eagle's

배지, Sigma), CRL 2158의 경우 사용된 배지는 RPMI, CRL 1790의 경우 사용된 배지는 EMEM(Eagle의 최소 필수 배지; Cedarlane Labs, Burlington, ON, 캐나다)이다. 모든 배지에는 FBS, 페니실린/스트렙토마이신 및 L-글루타민이 보충되었다. 포화밀도점(약 80%)에서 세포를 1X PBS로 두 번 세척했다. 세포를 트립신-EDTA로 5분 동안 인큐베이션 한 다음, 트립판 블루(세포 50 u1 및 트리 판 블루 450 u1)로 염색하기 전에 10% FBS가 보충된 각 배지에서 희석하고, 생존 세포를 계수하여 세포 독성을 평가했다. 세포 독성은 살아있는 세포에 의한 트립판 블루 배제 및 죽은 세포의 블루 염색에 의해 결정되었다. 단위 면적의 죽은 세포의 수를 세고 면적의 총 세포의 백분율로 표시했다.

[0768] **공초점 연구:** 2×10^5 세포를 세포 배양 접시(35mm X 10mm)에 플레이팅하고 플레이트가 포화밀도(confluency)에 도달할 때까지 2 일마다 배지를 교체했다. 적절한 시약으로 염색한 후 공초점 현미경으로 세포를 검사하였다. Dylight 650(여기 650 nm. 방출 700 nm, Thermo Scientific Pierce Biology Products)은 흡수 확장 중에 우수한 성능과 안정성을 제공하는 것으로 밝혀졌다. 나노 복합체(4mg)를 포함하는 투석된 추출물의 동결 건조된 분말을 디메틸포름아미드에 용해된 Dylight 650 에스테르의 10 μ M 용액과 혼합하고 접합을 위해 25°C에서 1 시간 동안 배양했다. 반응 후, 혼합물은 유리 시약이 완전히 제거될 때까지 6-8 kD 투석 멤브레인을 사용하여 물(3 x)에 대해 투석되었다. Dylight와 나노 복합체의 결합은 투석된 나노 복합체의 형광을 모니터링하여 평가되었다.

[0769] **HT 29, CRL 1790 세포로의 칼세인 흡수:** 포유류 세포로의 칼세인 로딩 나노 입자 흡수. 칼세인 자체는 막을 통해 불투과성(impermeable)이며, 세포 내 이입에 의해 낮은 수준으로 흡수될 수 있다. 에탄올 표백 처리는 1mg/g의 칼세인의 신선 당량을 포함하는 물에서 균질화되었고, 상청액은 물에 대해 투석되었다. 나노 필라멘트에 복합된 칼세인은 투석 백 내에 유지되며, 공초점 현미경으로 흡수 측정에 사용된다. 칼세인 로딩 나노 입자는 HT 29 및 CRL 1790 세포 모두에서 분리된 구획으로 흡수된다.

[0770] **나노 복합체 및 나노 필라멘트와 Dylight의 접합 및 HT 29, CRL 1790 및 CRL 2158 세포로의 흡수:** 표백되지 않은 신 체리 및 에탄올 표백된 신 체리에서 분리된 나노 필라멘트에서 분리된 나노 복합체가 포유류 세포(HT-29, CRL 2158, CRL1790)로의 흡수 증명. 나노 복합체와 나노 필라멘트를 Dylight 650과 결합하고 물에 대해 광범위하게(3x) 투석하여 결합되지 않은 염료를 제거했다. 세포를 심고 48 시간 동안 성장시켰다. 접합된 나노 복합체 및 필라멘트(3ml 배양 배지에서 약 5 μ M Dylight 당량)를 배지에 첨가하고 세포를 추가로 24 시간 동안 배양하였다. 세포를 페트리 플레이트(직경 3.5cm)에 유지하고, 공초점 현미경(Leica)으로 633 nm에서 여기하고 680 nm에서 방출을 모니터링하여 관찰했다. 패널 A 및 B는 각각 HT 29 세포에 의한 Dylight 접합 나노 복합체 및 나노 필라멘트의 흡수를 보여주고; 패널 C 및 D는 각각 CRL 2158 세포에 의한 Dylight 접합 나노 복합체 및 나노 필라멘트의 흡수를 보여주고; 그리고 패널 E 및 F는 각각 CRL 1790 세포에 의한 접합된 나노 복합체의 흡수를 각각 보여준다. 패널의 삽입물은 세포의 확대된 합성 이미지이다. (크기 막대)

[0771] **생-사(Live-Dead) 세포 분석:** 세포가 이전에 설명한 대로 24 시간 동안 포화밀도(confluent) 및 하위포화밀도(subconfluent) 단일 층으로 성장했다(Hakimuddin et al., 2004). 세포를 12 시간 동안 파클리탁셀, 또는 나노 섬유와 함께 파클리탁셀로 처리하였다(적절한 양의 파클리탁셀 및 나노 섬유를 물에서 5% DMSO에 혼합하고 세포에 첨가하였다). 세포를 인산염 완충액으로 세척하고, 제조사에 의해 기술 된 바와 같이 생/사멸 세포 생존 키트(Invitrogen, Mississauga, Ontario)를 사용하여 CRL 1790, CRL 2158 및 HT 29 세포에서 세포 생존력 테스트를 수행했다. 생-사 세포는 공초점 현미경으로 시각화되었다. 분석 키트에는 두 가지 형광 염료, 칼세인 AM 에스테르(Ex 494 nm, Em 517 nm)가 포함되어 있는데, 이는 특히 생세포에 들어가서 탈에스테르화되고 생세포를 녹색으로 염색한다. 죽어가는 세포와 죽은 세포는 막이 손상되어(누출된 원형질막) 에티디움 동종이량체(Ex 517 nm/ Em 617)의 진입을 허용하여 핵을 적색으로 염색한다. 세포는 살아있는 세포를 분화시킨 517 nm(녹색 채널)에서 관찰되었고, 죽은 세포를 시각화할 수 있는 617 nm에서 관찰되었다. 두 파장의 합성 이미지는 세포 생존 능력의 상실로 전환되는 세포를 보여준다.

[0772] 이 실시예에서, 나노 섬유는 마이알에서 적절한 양의 나노 섬유와 파클리탁셀의 10x 용액(50% DMSO)을 혼합함으로써 파클리탁셀과 결합되었다. 멸균 조건 하에서 배양 플레이트에 적절한 양을 분배했다.

[0773] 자발적인 조립에 의해 형성된 구형 또는 섬유질 특성을 가진 나노 입자 또는 나노 섬유는 신 체리 열매에서 분리되었다. 주로 탄수화물, 단백질 및 폴리 페놀 (나노 입자)로 구성된 이러한 나노 입자/나노 섬유의 기능적 특성을 평가하고 차이점을 조사했다. 신 체리 추출물의 나노 입자가 풍부한 분획물은 강력한 항산화 활성을 보였을 뿐만 아니라 HT 29 대장 암 세포에 대한 세포 독성을 증가시켰으며, 폴리 페놀이 없는 에탄올 표백 체리의 나노 섬유는 테스트 조건에서 이와 관련하여 비활성이었다. 나노 입자와 나노 섬유는 모두 정상 인간 결장 세포

와 암 세포에 의해 내재화되었다. 세포 독성 분석은, 나노 섬유유의 존재 또는 부재 하에, 파클리탁셀로 처리된 HT-29 세포가 높은 수준의 세포 독성을 초래한다는 것을 밝혀냈다. 다 약제 내성 대장암 세포는 파클리탁셀 치료에 내성이 있는 반면, 나노 섬유유 유의 존재 하에서, 치료는 거의 완전한 세포 독성을 초래했다. 유사한 치료 조건 하에서, 정상 결장 세포는 나노 섬유유와 혼합된 파클리탁셀 또는 파클리탁셀 유의 존재 하에서 매우 적은 세포 독성을 나타냈다. 이러한 결과는 나노 섬유유가 약물의 내재화를 위한 효율적인 도구가 될 수 있으며, 예를 들어 암세포 및 다약제 내성 암세포에서 세포 독성을 유도할 수 있음을 시사한다.

[0774] Dylight 650과 접합된 나노 입자 및 나노 섬유유는 포유류 세포가 이러한 접합된 입자로 처리될 때 분리되지만 유사한 세포 기관에 국한되어 나노 입자 또는 나노 섬유유에 접합된 구성 요소가 유사한 방식으로 흡수 및 축적될 수 있음을 시사한다. Dylight를 사용한 이러한 결과는 나노 입자 또는 나노 섬유유가 다른 약제, 기능성 식품 또는 기타 생물학적 활성제(Dylight가 아닌)와 접합될 때 적용으로 추론될 수 있다고 생각된다.

[0775] **항산화력 평가:** 항산화 특성(활성 산소 또는 활성 라디칼 소거능)은 시험관 내 분석 조건에서 수퍼 옥사이드 음이온 라디칼, 하이드 록실 음이온 라디칼 및 DPPH 라디칼 소거능을 평가하여 수행되었다(Jacob 및 Paliyath, 2008). 이러한 라디칼 소거 효율은 특정 소강(quenching) 속도로 표시된다.

[0776] **결과 및 논의:**

[0777] **나노 입자 및 나노 섬유유의 형태:** 원형의(original) 신 체리 과일과 에탄올 표백 신 체리 과일에서 분리된 나노 입자 및 나노 섬유유는 뚜렷한 특성을 나타냈다(실시예 1 및 3, 도 1 및 17(나노 입자) 및 도 37(나노 섬유유)의 논의 참조). 형태가 구형인 원래의 체리 추출물 유래 나노 입자. 상세한 분석은 구형 복합체가 특정 실시형태에서 펙틴 성분, 헤미셀룰로스 유래 분자, 세포벽 단백질로부터 유래된 펩티드, 안토시아닌 및 말산을 포함하는 섬유유 유사 구조로 둘러싸인 펙틴 코어에 의해 형성될 수 있음을 보여준다. 이 복합체는 용액에서 직경이 50~250 nm였다. 안토시아닌 및 기타 작은 분자(즉, 특정 실시형태에서 말산)가 제거될 때 신 체리 열매의 에탄올 표백 후, 최종 과일은 균질화 동안 길이가 수 마이크로 미터이고 직경이 5~10 nm인 섬유유 유사 구조를 형성했다(도 37 참조). 나노 입자와 나노 섬유유는 모두 기능적 특성을 평가하는 데 사용되었다.

[0778] **나노 입자의 폴리 페놀 함량:** 체리 균질물은 높은 수준의 폴리 페놀을 함유하는 신 체리의 엘리트 라인에서 얻었다. 상이한 체리 품종을 사용하여 추출하는 동안, 균질물은 수성 추출물에 0.88~0.94 mg/g의 신선 중량의 폴리 페놀을 함유한 반면, 메탄올 추출물에서 폴리 페놀 함량은 1.04~1.13 mg/g의 신선한 중량 범위였다(실시예 1, 표 1 참조). 물 또는 알코올(메탄올, 약 50 %v/v 최종)에서 제조된 신 체리 균질물을 물에 대한 투석에 적용하면, 복합 상태로 투석 백 내에 거의 80%의 폴리 페놀이 유지된다(실시예 1, 표 1 참조). 메탄올로 과일을 추출하면 조 추출물의 폴리 페놀 함량이 거의 20% 증가했지만, 투석된 추출물에 남아있는 양은 물 추출물을 투석한 후 얻은 양과 비슷했다. 투석 백(M, 컷오프 6000~8000)에서 투석액으로 이동하는 유리 폴리 페놀의 양은 매우 적었다(3% 미만). 일반적으로 다중 추출에서, 투석된 추출물의 폴리 페놀 함량은 수성 추출물에서 0.63~0.65 mg/g 신선 중량 범위였고, 메탄올 추출물의 투석된 추출물에서는 0.70~0.80 mg/g 신선 중량 범위였다. 투석액의 폴리 페놀 함량은 수성 및 메탄올 추출물에서 각각 0.03~0.06 mg/g 신선 중량으로 매우 낮았다.

[0779] 투석된 추출물과 투석물의 폴리 페놀 조성을 HPLC-MS(실시예 1, 표 2 참조) 및 성분으로 분석하였다. 폴리 페놀은 페놀 성분의 주요 비율(> 90 %)을 구성했으며 페놀 산은 적은 비율(<10 %)로 구성되었다. 시아니딘-3-루티노사이드가 주요 안토시아닌(약 70%)이었고 그 다음이 페오니딘-3-루티노사이드였다. 페랄고니딘-3-루티노사이드(Plelargonidin-3-rutinoside) 및 시나이딘-3-소포로사이드(cyanidin-3-sophoroside)는 약 10~12 %로 존재했다. 클로로겐산과 p-쿠마로일린 산이 주요 페놀 산이었다. 투석물의 정성적 조성은 투석된 추출물과 매우 유사했다. 정량적(quantity) 측면에서, 투석된 추출물은 시아니딘-3-루티노사이드 함량이 높고(약 25~30% 더 높음) 나노 입자를 형성하여 특정 농축을 나타냈다.

[0780] **유리 및 복합 폴리 페놀의 항산화력:** 조 추출물, 투석 추출물 및 투석물의 항산화 활성을 물과 메탄올 추출물 모두에서 측정했다. 슈퍼옥사이드, 하이드록실 라디칼 및 DPPH 라디칼의 특정 소강(quenching)이 실시예 1, 표 3에 제시되어 있다. 미정제 수성 또는 메탄올성 체리 추출물은 매우 강한 슈퍼옥사이드, 하이드록실 라디칼 및 DPPH 소거 능력을 나타냈다. 나노 입자의 일부임에도 불구하고, 폴리 페놀은 투석물의 유리 폴리 페놀보다 훨씬 높은 높은 항산화 활성을 보여, 복합체 형성이 폴리 페놀의 항산화 활성을 방해하지 않았음을 시사한다. 따라서 폴리 페놀을 포함하는 나노 입자가 GIT 막을 가로질러 신체 조직으로 들어가는 것은 이러한 결과를 바탕으로 항산화 기능을 저하시키지 않을 것이다.

[0781] 이 실시예에서는 나노 섬유유(및 나노 입자)의 세포 흡수를 연구하고 다양한 적재물의 운송 수단으로 나노 섬유유

(및 나노 입자)의 응용을 연구하기 위한 실험이 수행되었다. 도 37은 이러한 실험에 사용된 대표적인 나노 섬유
의 예를 보여준다. 도 37은 2개의 독립적인 나노 섬유 제조에서 얻은 나노 섬유의 투과 전자 현미경 사진(TEM)
을 도시한다. 왼쪽 패널은 동결 건조(냉동 건조)를 사용하여 에탄올 표백 신 체리에서 분리된 나노 섬유를 보여
준다. 오른쪽 패널은 나노-분무 건조로 분리된 나노 섬유를 보여준다. 이러한 나노 섬유는 아래에서 자세히 설
명하는 바와 같이 세포 흡수 및 전달 수단으로서의 응용을 연구하는 데 사용되었다.

[0782] 철과 같은 광물 적재물을 운반하기 위한 나노 섬유의 응용을 조사하기 위한 연구가 수행되었다. 도 38은 철과
나노 섬유 복합체를 보여준다. 나노 섬유 제조물(2mg)을 물 2ml에 용해시키고 1mM 염화철과 혼합하였다. 상기
용액을 2 시간 동안 배양하고 물(2X)에 대해 밤새 투석하여 결합되지 않은 철을 제거하였다. 투석된 용액은 우
라닐 아세테이트로 염색하지 않고 전자 현미경으로 검사되었다. 나노 섬유 복합체는 (우라닐 아세테이트 대신)
철로 염색되어, 나노 섬유가 철의 운반체로 사용될 가능성을 보여주었다.

[0783] 연구는 또한, 적재물이 나노 섬유와 비공유적으로 복합된, 관심 적재물의 운송 수단으로 나노 섬유의 사용을 조
사하기 위해 수행되었다. 이 연구에서 나노 섬유는 칼세인의 세포 전달에 사용되었다. 도 39는 칼세인-적재 나
노 섬유(calcein-loaded nanofibres)가 포유류 세포 로 흡수되는 것을 보여준다(칼세인-나노 섬유 부가물). 칼
세인(Ex 494 nm/Em 517 nm) 자체는 막에 대해 불투과성이며, 세포내 이입(endocytosis)에 의해 낮은 수준으로
흡수될 수 있다(도 39, A, C). 에탄올 표백 체리는 1mg/g 신선(fresh) 당량의 칼세인을 포함하는 물에서 균질화
되었고, 상청액은 물에 대해 투석되었다. 나노 섬유와 복합된 칼세인은 투석 백 내에 유지되며 공-초점 현미경
을 이용한 흡수 측정에 사용된다. 칼세인 단독 흡수는 HT 29 세포(패널 A)와 정상 장 세포(패널 B)에서 비교적
매우 낮았다. 칼세인-적재 나노 섬유는 대장 암 세포주 HT 29(B) 및 정상 인간 장 CRL 1790 세포(D) 모두에서
분리된 구획으로 들어간다. (크기 막대-10 μ m).

[0784] 암세포에 대한 나노 입자 및 나노 섬유의 세포 독성: 이 연구는 정상 인간 대장 상피 세포(CRL 1790), 인간 대
장암 세포(HT 29) 및 다약제 내성 인간 대장 직장 암세포 CRL 2158)를 사용하여 신 체리에서 분리된 정제된 나
노 입자 및 나노 섬유의 세포 독성 효과를 파클리탁셀의 존재 또는 부재 하에 평가한다. 나노 입자는 폴리 페놀
등가 분취량으로 첨가되었고, 나노 섬유는 중량 기준으로 첨가되었다. 세포를 48 시간 동안 증식시키고 페트리
플레이트 당 파클리탁셀(32nM) 및 4 μ g/ml의 나노 섬유로 처리하고, 트립판 블루 배제에 의해 세포 독성을 평
가하였다. 처리의 효과는 다음 표에 다양한 기간 동안 처리 후 생존 세포%로 제공된다.

[0785] 표 5: 나노 입자 및 나노 섬유의 세포 독성. 값은 3 회 반복의 평균이다. 일반적으로 복제 대(to) 복제 변이는
1~2% 사이였다. 처리 B의 데이터는 칼세인AM/에피디움 동종이량체(Ethidium homodimer)로 염색한 후, 4~6개의
무작위 프레임에서 살아있는/죽은 세포를 계수하여 얻었다.

표 5

A-처리	생존 세포% 정상 세포주 CRL 1790	생존 세포% 대장암 세포주 HT 29	생존 세포% 대장 MDR 세포주 CRL 2158
나노입자(μ g/ml)			
0	100	100	100
5	87.58	75.64	89.65
20	81.50	66.02	83.44
80	72.54	58.33	74.48
나노섬유 4 μ g/ml	99-100	98-100	100
파클리탁셀 (nM)			
0	100	100	100
2	86.66	70.93	90.86
8	74.28	59.11	86.17
32	66.79	48.27	83.76
B-생/사(live/dead) 세포 분 석			
-파클리탁셀-섬유	100	100	100
파클리탁셀32 nM, 24 h	97.6	10.78	46.00

파클리탁셀+ 나노섬유 (4 $\mu\text{g/ml}$)	117.3	10.57	4.2
--------------------------------------	-------	-------	-----

[0787] 나노 입자 자체는 세포에 가벼운 독성을 보였다(상기 표). HT 29는 나노 입자에 가장 민감한 반면, 정상 CRL 1790 세포는 가장 적은 영향을 받았다. 다중 약물 내성 세포주 CRL 2158은 80 $\mu\text{g/ml}$ 의 폴리 페놀 농도에서 생존 세포에서 거의 25% 감소를 나타냈다. 비슷한 정도의 감수성이 정상 세포에서도 관찰되었다. 80 $\mu\text{g/ml}$ 폴리 페놀로 처리된 HT 29 세포는 생존 세포에서 거의 42% 감소를 나타냈다. 나노 섬유는 사용된 농도(4 $\mu\text{g/ml}$)에서 어떤 세포주에도 세포 독성이 없었다. 나노 입자와 나노 섬유를 혼합했을 때, 80 $\mu\text{g/ml}$ 폴리 페놀 농도에서 HT 29 및 MDR 세포주에서 세포 독성이 약간 증가했다. 파클리탁셀 자체는 HT 29 세포에 대해 세포 독성이 있는 반면(32 nM에서 50% 생존), 정상 세포와 MDR 세포는 낮은 수준의 세포 독성을 나타냈다(상기 표). 나노 입자가 파클리탁셀과 함께 포함되었을 때, 세포 독성은 테스트된 조건에서 크게 변하지 않았다. 파클리탁셀과 나노 섬유가 함께 첨가되었을 때, MDR 세포의 세포 독성은 32 nM 파클리탁셀에서 거의 50%까지 증가했다. HT 29 세포는 파클리탁셀 단독에 대해 높은 수준의 세포 독성을 보였지만, 파클리탁셀과 나노 섬유의 조합은 시험된 조건 하에서 세포의 생존율을 변화시키지 않았다.

[0788] **나노 섬유에 의한 복합 분자의 흡수:** 나노 섬유는 매우 길며(길이는 마이크로미터, 직경은 약 5nm, 예를 들어 도 37 참조), 원형질막을 가로 지르는 능력을 조사했다. 이 실험에서 나노 섬유가 막 불 투과성 형광 염료인 칼세인과 천연 복합체를 형성하는 능력을 조사했다. 본원에서 위에 설명된 절차에 의해 에탄올 표백 처리로부터 제조된 나노 섬유. 균질화하면서 1 mg/g의 칼세인의 신선 당량을 처리와 혼합했다. 균질화 및 파편 제거 후, 투석액이 형광을 나타내지 않을 때까지 균질물을 물에 대해 투석(3x)했다. 동시에 투석 백 안의 추출물은 높은 수준의 형광을 보였다. HT-29 및 CRL-1790 세포는 칼세인 단독 및 칼세인 복합 나노 섬유(동일한 형광 강도)의 존재 하에 배양되었다. 나노 섬유와 복합된 칼세인 및 칼세인의 흡수는 공초점 현미경으로 모니터링되었다. 결과는 도 39에 나타난다. 패널 A 및 B는 각각 비복합 칼세인 및 나노 섬유 복합 칼세인이 HT 29 세포로 흡수되는 것을 보여준다. 도면에서 볼 수 있듯이, 나노 섬유와 복합된 칼세인은 우선적으로 세포 (패널 B)에 흡수되어 소포 구조에 국한된 것으로 보인다. 칼세인은 상대적으로 막 불투과성 분자이기 때문에, 칼세인의 흡수가 훨씬 감소하는 것이 관찰되었다. 대부분의 형광은 HT 29 세포의 원형질막에 가까운 영역에 국한되었지만, 흡수는 칼세인-나노 섬유 복합체(패널 D)와 함께 배양된 CRL 1790 세포에서 더 강렬했다. 또한, 칼세인 형광의 분포는 세포의 내부 영역에서 관찰되었다. 칼세인 단독 흡수는 CRL 1790 세포에 의해 매우 낮았다. 유사한 실험이 나노 입자에 대해서도 수행되었지만, 폴리 페놀에 의한 형광 소강(quenching)으로 인해 이미지를 성공적으로 획득하지 못했다. 본원에 기술된 나노 입자는 아래에서 추가로 조사되는 바와 같이 칼세인(또는 약물/보충 성질의 임의의 다른 분자)을 흡수하는 데 효율적일 수 있다고 생각된다.

[0789] **세포에 의한 나노 섬유 및 나노 입자에 의한 접합 Dylight 650의 흡수:** 적재물이 나노 섬유(또는 나노 입자)와 공유 복합체를 형성하는 경우, 관심 적재물의 운송 비히클로서 나노 섬유(및 나노 입자)의 사용을 조사하기 위해 추가 연구가 수행되었다. 이 연구에서 나노 섬유(및 나노 입자)는 Dylight 650의 세포 전달에 사용되었다. 나노 입자와 나노 섬유가 세포에 들어가는 능력을 추가로 평가하기 위해, 이들은 각각 표백되지 않은 처리와 에탄올 표백 처리에서 분리되고 형광 염료 Dylight 650(여기 650nm, 방출 670nm)와 화학적으로 접합되었다. HT 29, CRL 2158 및 CRL 1790 세포를 성장시키고 염료 용액과 함께 배양하고 공초점 현미경으로 검사했다(도 40).

[0790] 염료와 접합된 나노 입자와 나노 섬유 모두는 배양 중에 세포에 흡수되었으며, 세포질과 핵을 둘러싼 소포 구조에서 명확하게 구획화되었다. 도 40, 패널 A 및 B는 각각 HT 29 세포에 의한 나노 입자 및 나노 섬유의 흡수를 보여준다. 두 접합체는 삽입도(세포 확대보기)에 표시된 대로 세포에 의해 흡수된다. 접합된 나노 입자(C) 및 나노 섬유(D)와 함께 배양된 다중 약물 내성 CRL 2158 세포는 HT-29 세포에 의해 나타난 것과 동일하게 유사한 흡수를 보였으며, 상대적 강도는 나노 입자와 함께 배양된 세포(패널 C)에서 더 높을 수 있다. 삽입도는 세포의 복합 이미지를 확대하여 보여 주며, 핵을 둘러싼 세포 기관에 나노 입자가 축적된 것을 다시 보여준다. CRL 1790 세포는 시각적 강도로 판단했을 때 나노 섬유(F)보다 나노 입자(E)의 흡수율이 훨씬 높았다. 이러한 결과는 표백되지 않은 처리와 표백된 처리에서 분리된 나노 입자와 나노 섬유가 세포막을 가로 질러 특정 세포 기관에 축적 될 수 있음을 나타낸다.

[0791] 도 40은 표백되지 않은 신 처리에서 분리된 나노 입자(A, C, E)와 에탄올 표백된 신 처리에서 분리된 나노 섬유(B, D, F)가 인간 세포(HT-29, CRL 2158, CRL1790)로 흡수되는 것을 보여준다. 나노 입자와 나노 섬유를 Dylight 650과 화학적으로 접합시키고(conjugate), 물에 대해 강하게 투석하여(3x) 접합되지 않은 염료를 제거했다. 세포를 심고 48 시간 동안 성장시켰다. 접합된 나노 입자 및 나노 섬유(3ml 배양 배지에서 약 5 μM

Dylight 당량)를 배지에 첨가하고 세포를 추가로 24 시간 동안 배양하였다. 세포를 페트리 플레이트(직경 3.5cm)에 유지하고 공초점 현미경(Leica)으로 633 nm에서의 여기와 680 nm에서 모니터링된 방출을 관찰했다. 패널 A 및 B는 각각 HT 29 세포(결장 직장암 세포주)에 의한 Dylight 접합 나노 입자 및 나노 섬유의 흡수를 보여주고; 패널 C 및 D는 각각 CRL 2158 세포(MDR 결장 직장 세포주)에 의한 Dylight 접합 나노 입자 및 나노 섬유의 흡수를 보여주고; 그리고 패널 E 및 F는 각각 CRL 1790 세포(정상 인간 장 세포)에 의한 접합된 나노 입자의 흡수를 각각 보여준다. 패널의 삽입도는 세포의 확대된 합성 이미지이다. (크기 막대-10 μm).

[0792]

생-사 세포 분석에 의한 세포 독성 분화: 나노 섬유를 사용하여 다양한 세포주로의 파클리탁셀의 전달을 조사하기 위해 추가 연구가 수행되었다. 파클리탁셀의 세포 독성 향상에 있어 나노 섬유의 효율성을 더 평가하기 위해 생-사 세포 분석을 수행했다. 정상 세포(CRL 1790), 암 세포(HT-29) 및 MDR 세포(CRL 2158)를 배양하여 파클리탁셀 단독 및 나노 섬유와 함께 파클리탁셀에 노출시켰다. 세포는 24 시간 동안 배양되었고, 그 시점에서 파클리탁셀 및 나노 섬유가 배양에 첨가되었다. 생-사 세포 분석은 약물에 노출된 후 24 시간 동안 수행되었다. 결과는 도 41 내지 도 43에 나타난다. 도 41은 인간 대장 암 세포(HT 29)에 대한 나노 섬유-파클리탁셀(Nanofibre-Paclitaxel)의 세포 독성을 보여준다. 공초점 현미경으로 시각화된 HT 29 결장 직장암 세포의 생-사(Live-Dead) 세포 분석이 도시된다. 분석 키트(Invitrogen)에는 두 가지 형광 염료인, 칼세인 AM 에스테르(Ex 494 nm, Em 517 nm)가 포함되어 있으며, 이 염료는 살아있는 세포에 특이적으로 들어가, 탈-에스테르화되고 살아있는 세포를 녹색으로 염색한다. 죽어가는 세포와 죽은 세포는 막이 손상되어(누출된 원형질막) 에티디움 동종이량체(Ex 517 nm / Em 617)의 진입을 허용하여, 핵을 적색으로 염색한다. 세포는 살아있는 세포를 분화시킨 517 nm(녹색 채널)에서 관찰되었고 죽은 세포를 시각화할 수 있는 617 nm에서 관찰되었다. 두 파장의 복합(composite) 이미지는 세포 생존력(A, D, G; 노란색)의 상실로 전환되는 세포를 보여준다. 패널 B, C는 각각 617 nm(적색, 죽은 세포) 및 517 nm(녹색, 살아있는 세포)에서 시각화된 대조군 세포를 나타낸다. 패널 A는 처리되지 않은 세포의 복합 이미지이다. 패널 E, F는 각각 두 파장 617 및 517 nm에서 기록된 파클리탁셀(32 nM)로 처리된 세포의 이미지를 나타낸다. 패널 D는 복합 이미지이다. 패널 H와 I는 파클리탁셀 + 나노 섬유(32 nM + 4 $\mu\text{g/ml}$ 나노 섬유)로 처리된 세포를 보여준다. 패널 G는 빨간색과 녹색 이미지의 합성물이다. 이러한 결과는 나노 섬유를 사용하여 파클리탁셀(접합되지 않은, 나노 섬유와 복합됨)을 세포에 전달하고, 이는 예를 들어, MDR 세포에서 특히 세포 독성을 초래했다. 파클리탁셀 단독으로 효과를 얻었지만, MDR이 아닌, HT29 암 세포주에서만 효과를 얻었다. 나노 섬유는 MDR에서 더 나은 효과를 제공했다. 나노 입자는, 칼세인 및 dylight를 사용하는 이전의 실시예에서 지지되는 바와 같이, 하나 이상의 약물(또는 약물/보충 성질의 임의의 다른 분자)을 섭취하는 데 유사하게 효율적일 수 있다고 생각된다.

[0793]

도 42는 인간 대장 MDR 암 세포(CRL 2158)에 대한 나노 섬유-파클리탁셀의 세포 독성을 보여준다. 공초점 현미경으로 시각화된 CRL 2158 다중 약물 내성 결장암 세포의 생-사 세포 분석이 표시된다. 분석 키트(Invitrogen)에는 두 가지 형광 염료인, 칼세인 AM 에스테르(Ex 494 nm, Em 517 nm)가 포함되어 있고, 이 염료는 살아있는 세포에 특이적으로 들어가 탈-에스테르화되고 살아있는 세포를 녹색으로 염색한다. 죽어가는 세포와 죽은 세포는 막이 손상되어(누출된 원형질막) 에티디움 동종이량체(Ex 517 nm / Em 617)의 진입을 허용하여 핵을 적색으로 염색한다. 세포는 살아있는 세포를 분화시킨 517 nm(녹색 채널)에서 관찰되었고 죽은 세포를 시각화할 수 있는 617 nm에서 관찰되었다. 두 파장의 복합 이미지는 세포 생존력(A, D, G; 노란색)의 상실로 전환되는 세포를 보여준다. 패널 B, C는 각각 617 nm(적색, 죽은 세포) 및 517 nm(녹색, 살아있는 세포)에서 시각화된 대조군 세포를 나타낸다. 패널 A는 처리되지 않은 세포의 복합 이미지이다. 패널 E, F는 각각 두 파장 617 및 517 nm에서 기록된 파클리탁셀(32 nM)로 처리된 세포의 이미지를 나타낸다. 패널 D는 복합 이미지이다. 패널 H와 I는 파클리탁셀 + 나노 섬유(32 nM + 4 $\mu\text{g/ml}$ 나노 섬유)로 처리된 세포를 보여준다. 패널 G는 빨간색과 녹색 이미지의 합성물이다.

[0794]

도 43은 정상 인간 장 세포(CRL 1790)에 대한 나노 섬유-파클리탁셀의 세포 독성을 보여준다. 공초점 현미경으로 시각화된 CRL 1790 인간 결장 정상 상피 세포의 생-사 세포 분석이 표시된다. 분석 키트(Invitrogen)에는 두 가지 형광 염료인, 칼세인 AM 에스테르(Ex 494 nm, Em 517 nm)가 포함되어 있고, 이 염료는 살아있는 세포에 특이적으로 들어가 탈 에스테르화되고 살아있는 세포를 녹색으로 염색한다. 죽어가는 세포와 죽은 세포는 막이 손상되어(누출된 원형질막) 에티디움 동종이량체(Ex 517 nm / Em 617)의 진입을 허용하여 핵을 적색으로 염색한다. 세포는 살아있는 세포를 분화시킨 517 nm(녹색 채널)에서 관찰되었고 죽은 세포를 시각화할 수 있는 617 nm에서 관찰되었다. 두 파장의 복합 이미지는 세포 생존력(A, D, G; 노란색)의 상실로 전환되는 세포를 보여준다. 패널 B, C는 각각 617 nm(적색, 죽은 세포) 및 517 nm(녹색, 살아있는 세포)에서 시각화된 대조군 세포를 나타낸다. 패널 A는 처리되지 않은 세포의 복합 이미지이다. 패널 E, F는 각각 두 파장 617 및 517 nm에서 기록된 파클리탁셀(32 nM)로 처리된 세포의 이미지를 나타낸다. 패널 D는 복합 이미지이다. 패널 H와 I는 파클리

리타셀 + 나노 섬유(32 nM + 4 µg/ml 나노 섬유)로 처리된 세포를 보여준다. 패널 G는 빨간색과 녹색 이미지의 합성물이다.

[0795] 이러한 결과는 약품을 세포로 전달하기 위한 나노 섬유(및 잠재적인 나노 입자)의 용도에 대한 정보를 제공한다. 본 실시예에서는 대장암 세포주인 암세포 모델 HT 29와 다중 약물 내성 대장암 세포주 CRL 2158을 사용하여 나노 섬유 복합 파클리타셀의 효능을 연구하였다. 파클리타셀 단독, 및 나노 섬유와 복합된 파클리타셀의 세포 독성 효과는 HT 29 세포에서 거의 동일했다. 이 세포주는 비 다중 약물 내성이며, 파클리타셀 단독으로 세포 독성에 민감하다. 이 세포들은 또한 나노 섬유 복합 파클리타셀에 반응하며, 이는 약물이 세포 내부에서 복합체에서 방출되고 나노 섬유에 의해 유지되지 않음을 시사한다. 다중 약물 내성 발달은 세포가 약물을 적극적으로 펌핑하여 세포 독성을 제거하는 암 화학 요법의 주요 문제이다. CRL 2158의 경우, 파클리타셀 치료에 대한 내성에 의해 다중 약물 내성 능력이 드러났다. 그러나 MDR 세포의 거의 100%가 세포 독성을 보이는, 나노 섬유와의 복합체를 통해 다중 약물 내성을 극복했다. 따라서 나노 섬유와의 복합체는 다중 약물 내성 세포와 싸우는 길을 제공할 수 있다. 흥미롭게도, 정상 결장 세포(CRL 1790)는 사용된 파클리타셀 농도에서 파클리타셀 단독 또는 파클리타셀-나노 섬유 복합체에 대해 세포 독성을 나타내지 않았으며, 이는 세포에 대한 이러한 치료의 안전성을 나타낸다.

[0796] 흥미롭게도, 나노 섬유로 처리하더라도, 파클리타셀의 부재 또는 존재 하에서, 정상 결장 세포(CRL 1790)에서 세포 독성을 발견하기가 어려웠다(도 43, 패널 A-I). 이들 세포는 파클리타셀(패널 D, E, F) 또는 파클리타셀 및 나노 섬유(패널 G, H, I)의 존재 하에서 형태를 유지했으며 막 무결성 손실이 관찰되지 않았다.

[0797] 파클리타셀, 및 파클리타셀과 나노 섬유의 존재 또는 부재 하에 세포 배양 동안, CRL 1790, HT 29 및 CRL 2158에서 살아있는 세포의 정량적 평가가 본 실시예의 상기 표에 제공된다. 정상 세포주는 단독으로 또는 나노 섬유의 존재 하에 제공된 32 nM 파클리타셀에 대해 어떠한 세포 독성도 나타내지 않았다. HT 29 세포는 함께 공급되는 파클리타셀, 및 파클리타셀과 나노 섬유에 대해 높은 수준의 세포 독성을 나타냈다. CRL 2158 세포는 단독 공급시 파클리타셀에 어느 정도 내성을 보인 반면(약 50% 생존), 나노 섬유의 존재 하에서는, 생존 정도가 4%로 감소했다. 세포의 생-사 분석은 다양한 성분으로 처리하는 동안 세포의 생존을 결정하는 더 정확한 방법이다.

[0798] 위에서 언급한 결과는 약품을 세포로 전달하기 위한 나노 섬유(및 잠재적으로 확장에 의한 나노 입자)의 사용에 대한 통찰력을 제공한다. 본 실시예에서는 나노 섬유 복합 파클리타셀의 효능을 연구하기 위해, 대장암 세포주인 암세포 모델 HT 29와 다중 약물 내성 대장암 세포주 CRL 2158을 사용하였다. 파클리타셀 단독 및 나노 섬유와 복합된 파클리타셀의 세포 독성 효과는 HT 29 세포에서 거의 동일했다. 이 세포주는 비 다중 약물 내성이며, 파클리타셀 단독으로 세포 독성에 민감하다. 이 세포들은 또한 나노 섬유 복합된 파클리타셀에 반응하며, 이는 약물이 세포 내부에서 복합체로부터 방출되고 나노 섬유에 의해 유지되지 않음을 시사한다. 다중 약물 내성 발달은 세포가 약물을 적극적으로 펌핑하여 세포 독성을 제거하는 암 화학 요법의 주요 문제이다. CRL 2158의 경우, 파클리타셀 치료에 대한 내성에 의해 다중 약물 내성 능력이 드러났다. 그러나 MDR 세포의 거의 100%가 세포 독성을 보이는 나노 섬유와의 복합체를 통해 다중 약물 내성을 극복했다. 따라서, 나노 섬유와의 복합체화는 다중 약물 내성 세포와 싸우는 길을 제공한다. 흥미롭게도, 정상 결장 세포(CRL 1790)는 사용된 파클리타셀 농도에서 파클리타셀 단독 또는 파클리타셀-나노 섬유 복합체에 대해 세포 독성을 나타내지 않았으며, 이는 세포에 대한 이러한 치료의 안전성을 나타낸다.

[0799] 논의:

[0800] 세포벽(셀룰로오스, 펙틴, 단백질) 및 안토시아닌 및 말산과 같은 액포 성분에서 유래된 것들을 포함한 세포 성분의 자가 조립을 통해 신 체리 과일 균질화 과정에서 형성된 나노 입자 및 나노 섬유의 구성 및 구조적 특징을 평가한다. 나노 입자는 나선형 섬유 모양의 구조에 의해 감겨진 펙틴 코어를 포함하는 직경이 약 50 내지 약 250 nm인 구형 복합체였다. 대조적으로, 에탄올 표백 체리 열매로 형성된 나노 섬유는 섬유질(폭이 약 5 ~ 10nm)이고 길이는 마이크로미터였다. 이 연구에서 나노 섬유 형성을 촉진하기 위해 과일에서 안토시아닌과 말산을 제거했다. 따라서 안토시아닌이 적은 과일은 본원에서 설명된 방법에 따라 나노 섬유를 형성하는 우선적인 경향을 가질 수 있다. 나노 입자에 안토시아닌이 존재하기 때문에, 이들은 높은 항산화 활성을 나타내므로, 영양적으로 관련된 구조적 복합체가 될 수 있다. 세포 독성 테스트에서, 나노 섬유는 항암 약물과 복합되었을 때 훨씬 더 높은 활성을 나타냈다. 본 실시예는 포유 동물 세포에서 나노 입자 및 나노 섬유의 잠재적인 기능적 효과를 설명한다.

[0801] 식품에서의 폴리 페놀 및 약물/약물과의 상호 작용: 영양 및 식이 중재는 최근 다양한 염증성 질환을 하향 조절하기 위한 잠재적인 보완 전략이 되었다(Willcox et al., 2004). 폴리 페놀이 풍부한 과일의 식이 섭취는 동물

모델과 인간의 여러 염증 표지자의 하향 조절을 초래했다(Gonzalez-Galego et al., 2010). 과일 주스와 포도 및 식료 유래 제품을 중간 수준으로 섭취하면 항산화 기능이 증가하고 혈장 내 지질 과산화가 감소했다(Garcia-Alonso et al., 2006; Jensen et al., 2008). 여러 연구의 결과는 과일과 채소 섭취와 CRP(C- 반응성 단백질) 및 IL6(인터루킨 6)과 같은 혈액 내 염증 마커 및 CRP, IL-6 및 TNF α 와 같은 여러 다른 염증 마커 사이의 역 상관 관계를 보여준다(Holt et al., 2009). 40~74세 사이의 120명의 남녀 그룹에서, 폴리 페놀이 풍부한 블루베리 추출물(3 주 동안 300 mg/일)을 섭취하면 전-염증성 사이토카인과 NF- κ B 경로의 케모카인(IL-4, IL-13, IL-8 및 IFN- α)의 혈장 수치가 현저히 감소했다(Karlsen et al., 2007). 유사하게, 달콤한 Bing(bing) 체리의 증가된 소비(280 g/일)는 CRP 및 NO 수준을 낮추었다(Kelley et al., 2006). 신 체리 폴리 페놀은 염증 경로에 관여하는 핵심 효소인 사이클로옥시게나제(cyclooxygenase) 효소의 강력한 억제제이다(Chandra et al., 2002). 70세 노인을 대상으로 한 연구에서, 항산화 물질이 풍부한 음식 섭취량을 늘리면 사이클로옥시게나제, 사이토카인 매개 염증 및 산화 스트레스가 감소했다(Helmersson et al., 2009). 따라서 폴리 페놀 함유 식품은 염증 경로를 하향 조절하여, 암, 심혈관 질환 및 신경 퇴행성 질환과 같은 만성 퇴행성 질환을 예방하는 특성을 가지고 있다.

[0802] 폴리 페놀의 생물학적 효과와 관련하여 제기된 주요 문제는 이들이 위장 시스템을 통해 거의 흡수되지 않는 것으로(0.5%~1.5%) 믿어진다는 것이다. 또한, 채장 및 담즙과 혼합하여 위에서 장으로 이동하는 동안 음식이 알칼리화되면 안토시아닌 구조가 불안정해져 고리가 열리고 부분적으로 분해된다.

[0803] 본 실시예에서, 인간 세포에 의한 나노 입자(및 나노 섬유)의 효과적인 내재화가 입증되었다. 안토시아닌은 나노 입자에서 안정화되고, pH 변화에 저항할 수 있기 때문에, 나노 입자의 내재화는 GIT에서 폴리 페놀 전달의 대체 형태가 될 수 있다. 따라서, 폴리 페놀을 포함하는 나노 입자의 형성은 폴리 페놀의 생체 이용률을 향상시킬 수 있고, 이는 그것들이 공장(jejunem)에서 전형적인 담체 매개 흡수를 우회하여 장의 전 부위(pre-intestinal sites)에서 흡수를 가능하게 할 수 있기 때문이다. 복합체 형성은 또한 유익한 효과를 발휘할 수 있는 소장 및 결장의 원위 부분과 같은 장의 하류 영역으로 폴리페놀을 운반하는 데 도움이 될 수 있다. 특정 실시형태에서, 이들은 결장 미생물 군에 의해 생성된 활성 산소 종으로부터 장 조직을 보호하고, 세포 증식을 조절하고, 및/또는 추가 건강상의 이점을 제공할 수 있는 대사 산물의 형성을 가능하게 하는 항산화 기능을 포함할 수 있는 것으로 고려된다.

[0804] **약물 전달, 바이오 나노 입자의 중요성:** 자연적으로 존재하는 생체 분자에서 제조된 나노 물질과 가공된 나노 물질을 모두 활용하여, 의학 및 건강 분야에서 나노 기술 기반 전략을 개발하는 데 엄청난 발전이 있었다. 나노 구조 및 나노 구조 집합체의 생체 내 표적화에 의한 암 부위의 검출은 큰 관심 분야이지만, 흡수 및 생체 분포 메커니즘에 대한 더 많은 정보가 필요하다. 나노 구조와 그 집합체는 세포 내 이입(endocytosis), 비특이적 진입, 수포(vesiculation) 등을 포함한 여러 메커니즘을 통해 축적되는 것으로 여겨진다(Iversina et al., 2011). 그러나, 최근 연구는 또한 특정 흡수 메커니즘에 대한 증거를 제공한다. SWNT는 면역 세포 그룹인 Ly6c 단핵구로 특이적으로 격리된 것으로 밝혀졌다(Smith et al., 2014). 표적 펩티드 RGD와 SWNT의 집합은 나노 구조물의 단핵구의 진입을 더욱 향상시켰다. 따라서 단핵구는 트로이 목마 메커니즘을 통해 SWNT를 종양 부위로 전달하여 표적 부위에 거의 25%의 SWNT를 축적할 수 있게 한다. 따라서, 면역 세포를 이용하여 종양 세포를 표적으로 하는 것은 암 약물 전달을 위한 효과적인 전략을 제공할 수 있다.

[0805] 미토콘드리아는 암세포의 생존 또는 세포 사멸을 결정하는 데 관여하는 중요한 세포 기관이다. 미토콘드리아 에너지 생성을 방해하는 것은 암세포를 세포 사멸 경로(apoptotic pathways)로 유도하는 핵심 단계이다. 미토콘드리아에 펩티드를 유도하는 세포 사멸을 표적으로 하는 것은 암 세포를 죽이는 데 큰 관심이 있지만, 한계는 전달의 비특이성과 용해도의 부족을 포함한다. 자기(magnetic) 코어-셸 나노 입자와 집합함으로써 악성 뇌 및 전이성 암 세포에 양친매성 꼬리 고정 펩티드 (amphipathic tail-anchoring peptides, ATAP)를 표적으로 하는 미토콘드리아를 유도하는 세포 사멸의 전달을 증가시키는 것이, 화학 요법 효능을 향상시키는 효율적인 방법인 것으로 밝혀졌다(Shah et al., 2014). 암 세포에서 상향 조절되는 여러 유전자의 동시 침묵을 위한 siRNA를 전달하는 것은 마우스 모델의 혈관 내피 세포에서 저 분자량 폴리아민 및 지질(Dahlman et al., 2014)에서 합성된 고분자 나노 구조를 통해 달성될 수 있다(Dahlman et al., 2014).

[0806] 조성, 크기, 표면 전하 분포 등과 같은 물리 화학적 특성은 나노 구조의 세포 흡수에 영향을 미칠 수 있다. 최근 연구(Agarwala et al., 2013)에서 이러한 특성과는 별도로, 나노 구조의 형태가 흡수에 영향을 미칠 수 있다고 보고했다. 이 연구에서, 포유류 상피 세포, 내피 세포 및 면역 세포는 음으로 하전된 친수성 디스크 모양의 나노 구조를 우선적으로 내재화하는 것으로 관찰되었다. 종횡비가 높은 나노 디스크가 종횡비가 낮은 나노 디스크 및 막대 모양의 나노 구조보다 선호되었다. 구형 나노 구조체는 크기가 작아도 효율이 낮아 내재화된다. 문

현[Cabral 등 (2011)]은 또한 종양에서 나노 구조의 축적이 크기에 따라 달라진다고 보고했다. 나노 구조 내재화 과정은 나노 구조와 막 사이의 상호 작용, 세포 접착 및 막 변형을 위한 에너지, 세포막 표면의 나노 구조 농도를 포함하여 복잡될 수 있다.

[0807] 체리로부터 분리된 본원에 기술된 나노 입자 및 나노 섬유는 구조적으로 복잡하다. 나노 입자의 동결 건조된 분말은 산(4M HCl), 알칼리(1M NaOH) 및 동결에 대한 내성이 있었다. 나노 입자와 나노 섬유는 모두 해리되지 않는 작은 분자(염료, 약물)와 복합체를 형성했다. 파클리탁셀과 같은 약물도 이러한 구조와 결합될 수 있다. 파클리탁셀은 암 치료에 효과적인 약물이다. 이러한 연구는 나노 섬유와 함께 포유류 세포에 제공될 때 파클리탁셀의 효과가 향상될 수 있음을 나타낸다. 더욱이, 다중 약물 내성 암세포(CRL 2158)는 파클리탁셀에 대한 내성을 보였다. 나노 섬유와 함께 제공되었을 때, 파클리탁셀은 정상 HT 29 암세포와 마찬가지로 MDR 세포와 유사한 세포 독성을 나타냈다. 따라서 나노 섬유와 함께 약물을 사용하면 파클리탁셀 배제를 우회하여 효능을 높일 수 있다. 흥미로운 측면은 효율성의 증가가 나노 섬유와 파클리탁셀 사이의 순수한 연관성에 기인할 수 있다는 것이다. 유기 분자와의 복합체 형성 외에도, 나노 섬유 및 나노 입자는 철, 아연, Mg, Se 및/또는 기타와 같은 금속에 결합할 수 있다. 특정 실시형태에서, 나노 입자 및 나노 섬유의 더 높은 내재화 효율로, 금속 이온 섭취 효율이 향상되어 투여량이 감소될 수 있다는 것이 고려된다.

[0808] 본 실시예 결과는 나노 입자 및 나노 섬유 구조가 기능적 응용을 가지고 있음을 시사한다. 나노 입자는 그 자체로 고효율 항산화제일 수 있으며, 국소적인 항산화 기능이 바람직한 치료 용도에 적합할 수 있다. 나노 섬유는 접합 또는 복합 약물의 내재화에 매우 강력했다. 파클리탁셀-나노 섬유 복합체의 내재화는 다중 약물 내성 암의 약물 제거 능력을 우회하여, 단순한 약물에 의해 죽는 암세포처럼 암 약물에 취약하게 만들 수 있다. 따라서, 결과는 나노 입자와 나노 섬유가 모두 암 치료의 효율성을 향상시킬 수 있는 주목할 만한 잠재력을 가지고 있음을 나타낸다.

[0809] 본원에서 상세히 기술된 결과는 특정 나노 입자, 나노 섬유 및 식품 분말의 제조가 (예를 들어) 균질화를 포함하는 익은 과일의 가공에 의해 달성될 수 있음을 나타내며, 그 동안 부분적으로 분해된 상태에 있는, 셀룰로오스, 펙틴 및 단백질과 같은 세포벽 매트릭스는, 예를 들어 폴리 페놀(항산화제, 세포 대사 및 유전자 발현 조절제), 말산과 같은 유기산, 및 단백질 분해로 인한 펩티드를 포함하는 잘 구조화된 나노 입자로 자발적으로 조립될 수 있다. 유사한 구조를 가진 나노 입자는 다른 과일의 유사한 가공 과정 동안 형성된다. 예를 들어 블루 베리에서, 형성된 나노 입자는 신 체리에서 형성된 것과 구조적으로 유사하다. 본 실시예에서는 신 체리 유래 나노 입자 및 나노 섬유의 영양 및 증식 억제 활성을 조사하였다.

[0810] 나노 기술은 의학 분야에서 특히 표적 약물 전달 분야에서 큰 진전을 이루었다. 독성 및 나노 물질을 효율적으로 제거할 수 있는 시스템의 무능 때문에, 가공된 나노 물질의 사용이 복잡했지만(Maynard, 2006; Lewinski et al., 2008; Kunzman et al., 2011; Yamashita et al., 2011), 생물학적 시스템에서 쉽게 분해될 수 있는 생물학적 물질에서 유래된 나노 입자는 표적 약물 전달의 새로운 길을 제공할 수 있다.

[0811] 본 실시예에서, 신 체리 열매에서 분리된 나노 입자(및 나노 섬유)가 정상 세포와 암 세포로 내재화되는 능력과 안토시아닌 또는 항암 약물 파클리탁셀을 함유할 때 세포 독성을 유발하는 능력에 대해 설명한다. 나노 섬유는 안토시아닌이 없는 신 체리 과일에서 유래되었다. 나노 섬유의 구조 성분은 식품에서 유래된 성분이기 때문에, 식품 성분의 제약학적 적용은 예를 들어 합성 성분과 접합된 약물을 섭취할 때 정상 세포에 대한 손상이 보다 적은 것으로 간주될 수 있다. 또한 이론에 얽매이지 않고 세포에 의한 이러한 구조의 내재화는 성분들(펙틴, 펩티드, 안토시아닌, 유기산 등)이 GIT로부터 다른 형태의 진입을 가질 수 있음을 시사한다. 이러한 나노 입자는 단순한 분자로서 매우 잘 흡수되지 않는 안토시아닌의 흡수 촉진제 역할을 할 수 있지만 시험관 내 조건에서 큰 항산화 활성과 세포 독성 잠재력을 보여줄 수 있다.

[0812] 실시예 4 - 식품 분말 제조, 구조 및 응용 연구

[0813] 식품 분말 제조 및 구조 조사

[0814] 이 실시예에서, 브로콜리, 신 체리, 아몬드, 대두 및/또는 강황의 추출물 또는 이들의 임의의 조합(특히, 이들 성분 모두)으로부터 고 전단 블렌딩 및 나노 분무 건조를 통해 제조된 기능성 식품 분말이 설명된다. 분말의 각 입자는 원료(설포라판, 인돌-3-카비놀, 폴리 페놀, 피토스테롤, 이소플라본, 커큐민 등)에서 유래 한 기능성 식품의 실질적인 균일한 혼합물을 포함한다; 각 원료 성분에서 유래된 개별 건조 분말의 혼합물과 비교된다.

[0815] 높은 항산화 활성을 나타내는 형태의 식품 분말은, 재료의 높은 생체 이용률을 제공했으며, 일반적으로 광범위한 항염 활성을 나타냈다. 따라서 식품 분말의 섭취는, 특히 적절한 건강한 생활 방식과 함께 사용될 때, 만성

질환 발병을 예방할 수 있다.

- [0816] 건강한 생활 방식과 함께 권장 수준의 과일과 채소를 섭취하는 것은, 비만, 제2 형 당뇨병, 암, 관절 염증 등과 같은 만성 질환의 발병을 줄이는 것으로 잘 알려져 있다. 그러나 일반 대중은 적절한 양의 과일과 채소의 섭취가 부족하다. 현재의 생활 방식으로 인해, 비만, 특히 소아 비만 발생률이 증가했다. 과일과 채소에서 흔히 볼 수 있는 활성 성분의 식이 섭취를 늘리기 위해, 현재의 식품 분말이 생체 이용 가능한 형태의 성분으로 개발되었다. 기능성 식품 성분의 생체 이용률은 일반적으로 여러 가지 이유로 과일과 채소에서 낮다. 본원에서 기술된 식품 분말을 사용하면 생체 이용률을 증가시킬 수 있으며, 이에 따라 이러한 성분의 효능을 향상시킬 수 있다.
- [0817] 이 실시예에서 사용된 주요 식품 성분(및 일부 영양제)은 다음을 포함한다:
- [0818] *브로콜리*-설포라판 및 인돌-3-카비놀의 전구체와 같은 기능성 식품 성분(즉, 영양제)을 포함한다. 두 성분 모두 천연 항산화 시스템(KEAP-1/NRF2/ARE 경로)과 이중 생물학 제거에 관여하는 2 상 효소를 향상시킨다.
- [0819] *신 체리*-신 체리는 주요 폴리 페놀로 시아니딘-3 글루코사이드/루티노사이드가 포함되어 있다. 신 체리 추출물은 관절 염증에 대해 강력한 항 염증을 일으키는 것으로 나타났다.
- [0820] *아몬드*-아몬드는 필수 불포화 지방산과 식물 스테롤을 함유하고 있으며 콜레스테롤 생합성을 감소시킬 수 있다. 또한 비타민 E의 높은 공급원이다.
- [0821] *두유*-대두는 이소 플라본과 단백질의 공급원이다.
- [0822] *강황*-강황은 향신료이며 항염 작용으로 인정받았다. 강황에는 강력한 시클로 옥시게나제 억제제인 커큐민이 포함되어 있다. 최근 연구는 또한 실험적인 생체 내 모델에서 비만을 줄이는 능력을 확인했다.
- [0823] **재료 및 방법:** 식품 분말은 신 체리 추출물(제조 주성분)과 함께 여러 성분을 혼합하여 제조되었다. 신 체리와 브로콜리 꽃의 추출물은 레이체(Reicht) 고속 블렌더를 사용하여 4000rpm에서 5분 동안 물(1g 대 2ml 비율)에 혼합하여 독립적으로 제조했다. 균질물을 4 층의 무명천을 통해 여과하고 파편을 제거했다. 균질물은 사용할 때까지 차갑게 보관했다.
- [0824] 100ml의 신 체리 추출물, 100ml의 브로콜리 추출물, 100ml의 아몬드 우유(약 8 %w/v; SilkTM Brand; 미국 콜로라도 주 Whitewave Foods에서 공급됨); 50ml 두유 (약 10 %) 및 5g 강황 분말을 5 분 동안 5000rpm으로 레이체 고속 블렌더에서 함께 블렌딩했다. 혼합물을 2 시간 동안 냉장 보관하고 따라 내었다. 용액을 물과 희석된 농도로 조정하고 유사한 설정을 사용하여 실시예 1에서 앞서 기술한 바와 같이 나노 분무 건조시켰다. 건조된 분말을 모아 갈색 병에 -20℃의 질소 분위기에서 차갑게 보관했다.
- [0825] **결과 및 논의:** 식품 분말을 제조하고 구조적으로 특성화하기 위해 실험을 수행했다.
- [0826] 본원에 기재된 바와 같이, 본원에 기재된 식품 분말은 본원에 기재된 나노 입자 및/또는 나노 섬유를 제조하는데 사용될 수 있는 일반적으로 임의의 적합한 식물 조직으로 제조될 수 있다. 특정 실시형태에서, 식품 분말은 본원에 기재된 탄수화물 기반 나노 입자 또는 나노 섬유를 형성할 수 있는 과일, 채소 또는 다른 식물 조직 또는 제품 형태로 제조될 수 있다. 식품 분말은 수성, 유기성 또는 이들의 조합을 포함하는 임의의 적합한 매질에서 제조될 수 있다. 식품 분말은 특정 실시형태에서 식품 분말 제품에 포함되기에 바람직한 영양소 함유 물질(또는 영양소)을 추가로 포함할 수 있으며(일반적으로 식품 분말의 의도된 용도에 맞게 조정될 것임), 신선, 가공 또는 농축된 분말을 단독으로 또는 중량 또는 부피로 원하는 조합으로 포함한다.
- [0827] 특정 실시형태에서, 식품 분말은 식품 분말 출발 물질의 균질화에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 균질화는 바람직하게는 높은 rpm에서 작동하고 고 전단력을 생성할 수 있는 블렌더 또는 초음파기와 같은 고성능 혼합이 가능한 다른 적합한 기계를 사용하여 달성될 수 있다.
- [0828] 특정 실시형태에서, 식품 분말은 여과되어 파편을 제거할 수 있고, 또는 파편은 그렇지 않으면 균질화된 혼합물로부터 제거될 수 있다. 예를 들어, 파편(즉, 균질물에 들어 가지 않고 중력에 의해 침전되는 입자상 물질)을 여과할 수 있는 원심 분리 장치 또는 여과 장치(예: 막 여과 장치 또는 접선 유동 여과 장치)를 사용하여 파편을 제거할 수 있다.
- [0829] 특정 실시형태에서, 식품 분말은 탈수, 동결 건조, 분무 건조, 나노 분무 건조 또는 달리 탈수 또는 건조될 수 있다. 예를 들어, 물(또는 사용되는 다른 용매)을 제거할 수 있는 장비를 사용할 수 있으며, 여기에는 나노 분무 건조기 또는 수성 시료용 동결 건조기, 또는 예를 들어 더 바람직하게는 대규모 분무 건조가 가능한 고효율 분무 건조기가 포함될 수 있다. 특정 실시형태에서, 건조기는 감압 하에서 작동할 수 있다.

- [0830] 특정 실시형태에서, 본원에 기재된 식품 분말은 영양소 함유 물질과 함께 본원에 이미 상세히 기재된 나노 입자 및/또는 나노 섬유를 제조하기에 적합한 식물 조직으로부터 제조될 수 있다. 이해되는 바와 같이, 영양소 함유 물질은 일반적으로 식품 분말의 의도된 용도에 맞게 조정될 것이며, 신선하거나 가공된 또는 농축 된 분말을 단독으로 또는 임의의 원하는 조합의 중량 또는 부피로 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 식품 분말은 영양소 함유 성분 또는 특정 생리학적 상태(예: 만성 질환)를 해결하기 위한 성분으로 개발될 수 있으며, 이러한 영양소 함유 물질은 예를 들어, 예방 및/또는 치료 특성을 가질 수 있다. 이해되는 바와 같이, 본원에 사용된 영양소(nutrient)라는 용어는 특정 적응증에 적합한 임의의 적합한 활성제 또는 화합물(또는 상기 활성제 또는 화합물을 포함하는 물질)을 포함할 수 있으며, 식품에서 발견된 것과 같은 영양소로 일반적으로 고려되는 전체로는 제한되지 않는다. 예로서, 특정 실시형태에서, 영양소는 건강상의 이점을 갖는 임의의 적합한 천연(또는 비천연) 성분을 포함할 수 있다.
- [0831] 특정 실시형태에서, 식품 분말은 다음을 포함할 수 있다:
- [0832] 1. 신 체리(또는 신 체리 추출물), 또는 본원에 기술된 바와 같이 탄수화물 기반 나노 입자 또는 나노 섬유를 형성할 수 있는 또 다른 과일 또는 채소(또는 이의 추출물);
- [0833] 2. 첨가된 물질로부터 소수성 분자를 포함할 수 있는 소수성 성분(예: 아몬드 우유)(예를 들어, 코코넛 우유 또는 식용 견과류에서 추출한 우유); 및
- [0834] 3. 예를 들어, 식품 분말의 원하는 용도를 위해 맞춤화된 하나 이상의 생리 활성 성분/성분들을 함유하는 영양소 함유 물질(예를 들어, 기능성 식품 추출물).
- [0835] 영양소 함유 물질의 일부 비제한적인 예는 다음 활성 화합물 및/또는 식물 군 중 하나 이상을 포함할 수 있다:
- [0836] 카로티노이드(즉, 베타 카로틴, 리코펜, 루테인 및/또는 기타 크산토폴, 아스타잔틴 등);
- [0837] 안노나신(Annonacins)(즉, 항암 특성을 가진 안노나(Annona) 과일에서 유래된 폴리케타이드);
- [0838] 보스웰리아(추가된 항염증 기능을 제공하는 커큐민과 함께 작용할 수 있음);
- [0839] 아슈와간다(Ashwagandha)(항 스트레스 및 암 예방 특성이 있는 아놀라이드(anolides)를 포함하는 허브 성분, 주로 스테로이드 구조를 가짐);
- [0840] 예를 들어, 식용 생강(*Zingiber officinalis*), 망고 생강(*Curcuma amada*) 및 진저를 및 쇼가올을 포함한 여러 생리 활성 성분 중 임의의 것을 포함하는 생강과; 커큐마 롱가(*Curcuma longa*)(강황, 커큐민 함유);
- [0841] 칸나비노디올(Cannabinodiols)(환각 활성이 없는 칸나비스 중(*Cannabis* sp.)의 약용 활성 성분임);
- [0842] 프리바이오틱 함량을 높이기 위한 프럭토 올리고당 및 갈락토 올리고당 및 예루살렘 아티초크의 이눌린 ;
- [0843] 파이프 니그룸(*Piper nigrum*)과 같은 후추(Piperaceae member) 및 피페린 및 여러 과생물을 포함하는 야생 친척; 및/또는
- [0844] 위에 나열되지 않은 임의의 기타 적합한 성분(들)(예, 제한되지 않지만 식물 에서 유래된 것);
- [0845] 및/또는 추출물, 유도체, 그로부터 분리된 제품, 또는 그러한 성분을 포함하는 재료 또는 식물 조직.
- [0846] 이 실시예에서, 식품 분말은 다음과 같은 출발 물질에서 제조되었다:
- [0847] 1. 신 체리의 수성 추출물;
- [0848] 2. 아몬드 우유로 시판되는 아몬드의 균질물;
- [0849] 3. 두유로 시판되는 대두의 균질물;
- [0850] 4. 브로콜리의 수성 추출물; 및
- [0851] 5. 강황 가루.
- [0852] 이들 출발 물질은 4500rpm의 고속 블렌더(Recht, ATS science, Burlington)에서 블렌딩되었다; 권장 설정 하에서 Buchi Nanospray 건조기에서 나노 분무되었다. 사용된 부피/무게는 다음과 같다:
- [0853] 100 ml의 신 체리 추출물(1~2 mg/ml 폴리 페놀 당량이 사용되었으나, 약 0.1 mg/ml에서 물 또는 다른 용매에 완전히 포화된 폴리 페놀 용액에 이르는 농도 범위가 사용될 수 있음)

- [0854] 약 8~10 %, w/v에서 아몬드 우유 100ml;
- [0855] 약 8~10 %w/v에서 두유 50ml;
- [0856] 브로콜리 추출물 100ml; 및
- [0857] 강황 가루 5g.
- [0858] 이해되는 바와 같이, 신 체리 추출물의 부피는 이 실시예에서 100 ml로 유지되었지만, 다른 실시형태에서 신 체리 및/또는 다른 성분의 부피/중량은 원하는 대로 변할 수 있고, 추가 성분은 임의의 적절한 비율로 포함될 수 있다.
- [0859] 도 44는 신 체리, 브로콜리 및 기타 식품 성분으로 제조된 식품 분말의 주사 전자 현미경 사진을 보여준다. 식품 분말은 개별 성분의 균질화된 용액의 혼합물을 혼합하고, 혼합된 혼합물의 나노 분무 건조를 통해 제조되었다. 식품 분말은 바로 위에서 설명한 특정 혼합물을 사용하여 준비되었다.
- [0860] 도 45는 초 구조 특성을 나타내는 식품 분말 수용액의 투과 전자 현미경 사진을 보여준다. 도 45는 위에서 설명한 도 44에 도신된 것과 동일한 식품 분말을 도시한다. 50 마이크로미터 분취량의 식품 분말 현탁액을 유리 슬라이드 위에 놓고, 탄소 코팅된 그리드를 코팅된 면이 아래로 향하게 하여 30초 동안 용액 위에 부유시켰다. 그리드를 가장자리에서 건조하고 0.1% 우라닐 아세테이트 용액으로 염색했다. 식품 분말은 단단하게 감긴 섬유 구조의 구형 덩어리에 직사각형을 나타낸다(화살표 A로 표시). 구조는 나노 입자와 비슷하지만, 신 체리 나노 입자에서 관찰되는 구조적 조직이 없다(도 17 참조). 실제로, 구조는 나노 구(nanosphere)로 간주될 수 있으며, 나노 구 유사 구조를 형성하기 위해 스스로를 감고있는 섬유질 구조에 의해 정의된다(공 유사 구조로 얹힌 하나 이상의 섬유를 갖는, 끈의 얹힌 공과 다르지 않음). 자기 주변을 감고 있는 나노 섬유의 구상 구조(화살표 B)는 섬유 구조에서 발산하는 형태로 관찰될 수 있다. 이 구조는 섬유들이 함께 감겨 있고 여러 유형의 기능성 성분을 흡착할 수 있는 나노 구의 구조와 유사하다. 나선형으로 조직된 구조(화살표 C)는 나노 입자에서 관찰되는 나선형 섬유와 유사하다. 이 식품 분말의 예에서, 식품 분말에는 브로콜리 추출물과 강황 분말 성분이 제공하는 영양 성분이 포함되어 있다. 이들 영양제는 상기한 섬유질 구조와 복합되어 식품 분말 형성 및/또는 최종 구조에 기여할 수 있다.
- [0861] *생체 내 비만 마우스 모델을 사용한 식품 분말 응용*
- [0862] **재료 및 방법:**
- [0863] **발현 분석-화학 물질 및 시약.** L-형 트리글리세라이드 M 키트는 와코 디아그노틱스(Wako Diagnostics, 일본 오사카 및 독일 Neuss)에서 구입했다. RNA 분리를 위한 RNeasy Plus 키트는 퀴아젠(Qiagen, Valencia, CA, USA)에서 구입했다. cDNA 제조를 위한 고�용량 cDNA 역전사 키트는 어플라이드 바이오시스템(Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)에서 제공했다. RT² ProfilerTM PCR 어레이 마우스 염증성 사이토 카인 및 수용체 키트는 퀴아젠(Qiagen, Valencia, CA, USA)에서 구입했다. iQ SYBR Green Supermix는 Bio-rad (미국 캘리포니아)의 제품이다.
- [0864] **식품 분말 처리.** 실험은 36 내지 48 주령 Pcyt2 녹아웃 마우스 및 한배 대조군으로 수행되었다. 미처리 KO 그룹과 대조군 마우스(각각 n = 3-6)는 매일 100uL의 물을 섭취하고(위관(gavage)을 통해), KO 및 대조군 마우스의 처리 군(각각 n = 3-6)에는 주 5 회 식품 분말 100 ug(100 uL 물 중)를 투여했다. 모든 그룹의 구강 위관 영양은 8 주 동안 지속되었다. 실험은 두 번 반복되었고, 실험이 끝날 때 마우스를 희생하여 혈액 및 조직 분석에 사용했다.
- [0865] **총 RNA 분리 및 유전자 발현.** 총 RNA는 RNeasy Plus 키트(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 분리되었고 cDNA는 High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)를 사용하여 준비되었다. RT-qPCR은 Bio-rad CFX96 RT-qPCR 기계에 적합한 RT² ProfilerTM PCR Array Mouse Inflammatory Cytokines & Receptors 키트를 사용하여 수행되었다. 96 웰-플레이트의 RT² ProfilerTM PCR 어레이에는 84 개 경로 또는 질병 중심 유전자에 대한 프라이머 분석이 포함되어 있다. 관심 유전자는 최적의 cDNA 양과 반응 사이클 수를 사용하여 PCR 증폭의 지수 단계에서 분석되었다. 각 유전자 수준은 내부 B2m (베타-2-마이크로글로불린) 대조군과 관련하여 표현된다. 실험은 Pcyt2 +/- 및 Pcyt2 +/+ 암컷 마우스에서 수집한 간 샘플을 사용하여 수행되었습니다. 유전자 수준은 대조군과 관련된 배수 변화(fold changes)로 표현된다. RT-qPCR 결과는 비교 $\Delta\Delta Ct$ 방법을 사용하여 분석되었다.
- [0866] **통계 분석.** Prism GraphPad를 사용하여 통계 분석을 완료했다. 데이터는 평균 $\pm$ S.E로 표현된다. 통계적 유의

성은 스튜던트 t 검정(P 값 <0.05는 유의 한 것으로 간주됨) 또는 다요인 ANOVA를 사용하여 계산되었다. 유의한 효과가 발견되면 Tukey의 정직한 유의차 테스트를 사용하여 사후 비교를 수행했다. 차이는 P <0.05에서 중요한 것으로 간주되었다. *

- [0867] **결과 및 논의:** 여기에 설명된 식품 분말의 응용을 조사하기 위해 실험이 수행되었다. 이러한 연구를 위해 바로 위에서 설명한 연구에서 준비된 식품 분말을 사용했다.
- [0868] 도 46은 식품 분말의 항산화력 평가를 보여준다. 분말을 물에 용해시키고 용액의 DPPH 라디칼 소거능을 폴리 페놀 당량(폴린-시오칼토 시약으로 평가)으로 마이크로 그램 단위로 평가하여 용액의 항산화력을 측정했다. 0.1mM Folin-Ciocateau 시약을 메탄올에 준비하고, 식품 분말 용액을 특정 양으로 첨가했다. 항산화제를 DPPH 시약 1ml와 반응시키고, 흡광도(보라색, 517nm 흡수)를 모니터링했다. 517 nm 흡광도의 감소는 폴리 페놀이 없는 대조군과 비교하여 % 소강(quenching)으로 표시되었다. 트로록스(Trolox)는 폴리 페놀과 동일한 농도에서 양성 대조군으로 사용되었으며 TEAC 값 1을 나타냈다. 농도의 각 점은 준비된 식품 분말의 개별 샘플을 나타낸다. 결과는 식품 분말의 강력한 항산화 능력을 보여준다. 항산화 성분(나노 섬유 골격에 결합된)의 생체 이용률이 더 높을 가능성이 높기 때문에, 이러한 결과는, 식품 분말이 용액에 없는 성분에 비해, 유리 라디칼 소거 및 염증 감소 측면에서 더 큰 영향을 미칠 수 있음을 시사한다.
- [0869] 도 47은 식품 분말 및 물로 처리된 야생형(WT) 및 에탄올 아민 녹아웃 마우스(KO)의 체질량 변화 평가를 보여준다. 실험은 24 주령 Pcyt2 녹아웃 마우스(KO) 및 한배 대조군(littermate controls)으로 수행되었다. 처리되지 않은(U) 그룹의 KO 및 야생형 마우스(각각 n = 4-6)는 처리 시점에 위관 영양법으로 100uL의 물을 제공받았다. 처리된(T) 그룹의 KO 및 야생형(WT) 마우스(각각 n = 4-6)에 100 ug의 식품 분말(100uL 물에서)을 주 5 회 투여하였다. 모든 그룹의 구강 위관 영양은 8 주 동안 지속되었다. 처리 기간이 끝날 때 마우스를 희생시키고 분석을 위해 혈액 및 조직 샘플을 수집했다. 별은 상당히 다른 값을 나타낸다(*-P <0.05; **P <0.01). 이러한 결과는 식품 분말 처리가 체중 증가를 예방하는 데 상당한 효과가있을 수 있음을 시사한다. 유전적으로 손상되어 비만을 초래할 수 있는 시스템에서, 식품 분말 소비는 체중을 유지하는 옵션이 될 수 있다. 식품 분말 처리는 건강에 해로운 식습관으로 인해 비만이 발생하는 사람들에게 중재 역할을 할 수도 있다.
- [0870] 도 48은 간에서 트리글리세라이드 수치의 변화에 대한 식품 분말 처리의 효과를 보여준다. 간 조직의 트리글리세라이드 수준은 Wako L- 타입 TG M 분석 키트(Wako Life Sciences, CA, USA)를 사용하여 기술된 절차에 의해 평가되었다. 식품 분말 처리를 받은 야생형 마우스와 ETKO 마우스 모두에서 트리글리세라이드 수준의 현저한 감소는 없다. 값은 세 개의 개별 샘플에서 얻은 평균 $\pm$ SEM이다. 식품 분말 처리된 비만 마우스에서 트리글리세라이드 감소 경향이 있는 것으로 보인다. 식품 분말 처리에 의한 간 트리글리세라이드 감소는 대사 증후군을 나타내는 개인에게 유익할 수 있다. 간에서 지질 축적은 지방간 질환과 관련된 증상이다. 식품 분말 성분은 그러한 증상 및 관련 건강 문제를 적어도 부분적으로 역전시킬 수 있다.
- [0871] 도 49는 식품 분말 처리, 및 미처리 야생형 및 ETKO 마우스의 혈청 매개 변수를 나타낸다. 알부민, 글로불린 및 그 비율에는 큰 변화가 없었다. 총 단백질은 대조군과 치료군간에 유의한 차이가 없었다. 값은 3개의 독립적인 처리에서 얻은 평균 $\pm$ SEM이다. 이 데이터는 식품 분말 처리가 여러 생리적 매개 변수에 큰 변화를 일으키지 않음을 시사하며, 이는 그 작용이 특정 조건에 상대적으로 더 구체적 일 수 있음을 시사한다.
- [0872] 도 50은 식품 분말 처리, 및 미처리 야생형 및 ETKO 마우스의 혈청 매개 변수를 나타낸다. 포도당, 인 및 요소 수준에는 큰 변화가 없다. 식품 분말로 처리 한 비만 마우스의 트리글리세라이드 수치가 약간 감소한 것으로 보인다. 값은 3 개의 개별 샘플의 평균 $\pm$ SEM이다. 이 데이터는 식품 분말 처리가 여러 생리적 매개 변수에 큰 변화를 일으키지 않음을 시사하며, 이는 그 작용이 특정 조건에 상대적으로 더 구체적일 수 있음을 시사합니다.
- [0873] 도 51은 식품 분말로 처리된 야생형 및 ETKO 마우스에서 케모카인(chemotactic cytokines)의 전사체 수준의 변화를 보여준다. CCL 유형 케모카인은 활성화된 T 세포에 의해 분비되는 작은 당 단백질로서, 단핵구(monocytes)를 염증 부위로 끌어 당긴다. CCL1(C-C motif chemokine ligand 1)과 그 패밀리 멤버(CCL2, CCL3, CCL5...)는 염증 과정에 관여한다. 식품 분말 처리에 대한 반응으로 야생형 마우스에서 CCL2 및 CCL 5의 현저한 감소가 관찰되었다. ETKO 마우스에서 식품 분말 처리 후 이러한 케모카인의 감소를 보여주는 경향이 있지만, 이 테스트에서는 크게 다르지 않다. 데이터는 세 개의 개별 마우스의 샘플에서 전사체 수준의 평균 $\pm$ SEM이다. CCL1은 CCR8에 결합하여 작용한다. CCL2(Monocyte Chemoattractant Protein 1; MCP1)는 또한 단핵구를 염증 부위로 끌어 당기는 데 관여하며 수용체 CCR2 및 CCR4에 결합한다. CCL3(Macrophage inflammatory protein -Alpha; MIP1- α)는 급성 염증과 백혈구의 유인에 관여한다. 그것은 수용체 CCR1, CCR4 및 CCR 5에 결합한다. CCL5는 CCR5 표면 수용체에 결합하고 염증 및 압 진행에 관여한다. 이 데이터는 식품 분말 처리가 이러한 염증 성분의

하향 조절을 초래할 수 있음을 시사한다.

[0874] 도 52는 식품 분말로 처리된 야생형 및 ETKO 마우스에서 케모카인(chemotactic cytokines)의 전사체 수준의 변화를 보여준다. CCL 유형 케모카인은 활성화된 T 세포에 의해 분비되는 작은 당 단백질로 단핵구를 염증 부위로 끌어 당긴다. 도면은 CCL6, CCL7, CCL17 및 CCL19의 전사체 수준 변화를 보여준다. CCL6은 설치류에게 고유하며, 작용하는 동안 CCR 1에 결합할 수 있다. CCL6은 골수 세포 분화 동안 대식세포에서 발현된다. 식품 분말 처리에 대한 반응으로 야생형 마우스에서 CCL6, CCL 7 및 CCL17의 현저한 감소가 관찰되었다. ETKO 마우스에서 CCL7의 현저한 감소가 관찰되었다. CCL 19는 야생형 및 ETKO 마우스 모두에서 전사체의 변화를 나타내지 않았다. 데이터는 세 개의 개별 마우스의 샘플에서 전사 수준의 평균 $\pm$ SEM이다. CCL6은 CCR1에 결합하여 작용한다. CCL7은 또한 단핵구를 염증 부위로 끌어 당기는 데 관여하고 CCR2 수용체에 결합한다. CCL7 발현의 비정상적인 수준은 종양 형성 및 MMP-2 활성화 및 전이와 관련이 있다. 따라서, CCL7의 하향 조절은 암 예방에 매우 유익할 가능성이 높다. CCL17은 림프구의 화학 유인에 관여하며 죽상 경화증(atherosclerosis) 및 염증성 장 질환과 같은 염증성 질환의 유도에 관여한다. CCL19는 림프구 재순환에 관여한다. 전반적으로 이러한 결과는 염증 증가와 관련된 성분의 수준을 줄이는 것을 지지한다.

[0875] 도 53은 식품 분말로 처리된 야생형 및 ETKO 마우스에서 CCL22 케모카인(chemotactic cytokines)의 전사체 수준의 변화를 보여준다. CCL22는 종양과 종양이 T 세포에 침투하여 생성되어, 종양에 의한 면역 억제 및 면역 세포 회피를 유발하여, 종양 진행을 돕는다. 면역 세포에서 CCL22 과-발현은 인터루킨-알파(Interleukin- α)에 의해 발생한다. 식품 분말 처리에 대한 반응으로 야생형 및 ETKO 마우스 모두에서 CCL22 수준의 변화는 없었다. 데이터는 세 개의 개별 마우스의 샘플에서 전사 수준의 평균 $\pm$ SEM이다. 이 결과는 식품 분말 처리에 의한 CCL22 발현에 큰 영향이 없음을 시사한다.

[0876] 도 54는 식품 분말로 처리된 야생형 및 ETKO 마우스에서 CCR 유형 수용체의 전사체 수준의 변화의 평가를 보여준다. CCR 패밀리의 케모카인 수용체는 호산구(eosinophils), 호염기구(basophils), 림프구, 대식세포 및 수지상 세포와 같은 혈액 세포에서 발현되며, 발현/활성의 향상은 염증 증가와 관련이 있다. CCR이 리간드 케모카인(CCL 패밀리)에 결합할 때 많은 신호 전달 경로가 활성화된다. 식품 분말 처리는 야생형 및 ETKO 마우스 모두에서 CCR1 및 CCR6의 발현 수준을 변경하지 않았다. 야생형 마우스의 CCR2 및 CCR 8은 식품 분말 처리에 대한 반응으로 상당한 하향 조절을 보였으며, 이는 식품 분말이 CCR을 유발하는 염증 수준을 하향 조절할 수 있음을 시사한다. 또한, 식품 분말을 먹인 ETKO 마우스에서 CCR8의 유의 한 하향 조절이 있었다. 따라서, 식품 분말 처리에 대한 반응으로 케모카인 수치와 수용체 모두의 감소가 발생하는 것으로 보인다. 데이터는 세 개의 개별 마우스의 샘플에서 전사 수준의 평균 $\pm$ SEM이다. 도 55는 식품 분말로 처리된 야생형 및 ETKO 마우스에서 CSF(Colony stimulating factor)의 전사체 수준의 변화 평가를 보여준다. CSF는 과립구(granulocytes)/대식세포(GM-CSF), 대식세포(M-CSF) 및 과립구(G-CSF)에 의해 생성되는 사이토카인이다. 발현/활성의 향상은 염증 증가와 관련이 있으며, 하향 조절은 염증 및 자가 면역 질환을 줄이는 데 도움이 된다. CSF 수준은 야생형 마우스와 식품 분말 처리된 마우스에서 유사했다. CSF3는 ETKO 마우스에서 상향 조절되었으며, 이는 비만의 발생과 잠재적인 연관성이 있다. 식품 분말로 처리하면 CSF 수준이 야생형 마우스에서 관찰된 수준에 가까워졌다. 케모카인 수치와 수용체 모두의 감소는 식품 분말 처리에 대한 반응으로 발생하는 것으로 보인다. CD40LG는 면역 세포 표면에 국한된 CD40 단백질의 리간드이며, 이 단백질의 발현 증가는 여러 암 발병과 관련하여 염증 증가와 관련이 있다. 혈관 내피에서 혈소판에 의한 CD40 리간드 분비의 증가는 플라크 세포의 형성과 동맥의 막힘을 유도하는 ROS의 생성을 증가시키는 것으로 보인다. 식품 분말로 처리된 마우스에서 CD40 리간드의 발현이 현저하게 감소하여 그 수준이 야생형에 가깝게 되었다. 데이터는 세 개의 개별 마우스의 샘플에서 전사 수준의 평균 $\pm$ SEM이다.

[0877] 도 56은 야생형 및 ETKO 마우스에서 식품 분말 처리에 대한 CXCL 모티프 케모카인의 변화 평가를 보여준다. CXCL 유형 케모카인: CXCL 케모카인은 면역원성 세포 표면의 CXCR 유형 수용체에 결합하여 그 작용을 유도한다. CXCL1(CXCL 모티프 리간드 1) 및 그 수용체 CXCR-2를 통한 작용은 염증에 중요한 역할을 한다. CXCL 1은 야생형 마우스에서 현저하게 하향 조절된 반면, ETKO 마우스는 식품 분말 처리에 대한 반응에서 유의한 변화를 나타내지 않았다. CXCL 10 및 그 수용체 CXCR3는 기관 특정 질환(organ specific diseases)(제1형 당뇨병), 및 류마티스 관절염과 같은 전신 자가 면역 질환을 포함하여 자가 면역 질환 발생 중에 발생하는 병리와 관련이 있다. 인터페론과 TNF는 CXCL10의 생성을 활성화시켜 TH1 림프구를 활성화시킨다. CXCL 10은 야생형 마우스에서 현저하게 하향 조절된 반면, ETKO 마우스는 음식 처리에 대한 반응에서 어떠한 변화도 보이지 않았다. CXCL-12(CXCL-motif ligand -12, stromal cell-derived factor 1 또는 SDF 1)는 수용체 CXCR-R 4에 결합하는 케모카인이다. CXCL-12는 다양한 조직에서 발현되며 발달에 중요하다. CXCL-12의 과발현은 염증을 유발하고 백혈구에 대해 높

은 화학 주성(chemotactic)(신경염증)이다. CXCL 12는 체장암, 다발성 경화증, 알츠하이머 병 등에 대한 임상 마커이다. CXCL-12는 식품 분말 처리에 대한 반응으로 야생형 마우스에서 하향 조절되었다. 데이터는 3개의 개별 마우스의 샘플에서 전사 수준의 평균 $\pm$ SEM이다. 이 결과는 동일한 처리에 대한 야생형 마우스와 ETKO 마우스의 상이한 반응을 보여준다. 이론에 얽매이지 않고 비만은 항염증제에 대한 반응 패턴을 바꿀 수 있다.

[0878] 도 57은 CXC- 리간드 전사 수준에 대한 식품 처리 효과의 평가를 보여준다. CXCL-5는 인터루킨과 TNF 알파에 의해 자극된 염증 동안 생성된다. CXC 수용체 2에 결합한다. 세포 증식에 중요한 역할을 하여 운동성과 혈관 신생을 향상시키는 것으로 여겨진다. 미처리 및 식품 분말 처리 야생형 마우스와 ETKO 마우스 사이에 CXCL 5에는 변화가 없다. CXCL 15는 폐 표피 세포, 장 세포 등에서 발현되는 케모카인이며 염증과 관련이 있다. 미처리 및 식품 분말 처리 야생형 마우스와 ETKO 마우스 사이에 CXCL15의 전사체 수준에는 변화가 없었다. 데이터는 세 개의 개별 마우스의 샘플에서 전사 수준의 평균 $\pm$ SEM이다. 이 유전자는 식품 분말 처리에 반응하지 않았으며, 이는 그 작용의 특정 특성을 나타낸다.

[0879] 도 58은 CXCR(CXC 모티프 케모카인 수용체, 면역 활성화 혈액 세포를 유인하고 염증을 유도함으로써 케모카인 패밀리 CXCL 리간드 및 인터루킨에 결합함)을 보여준다. CXCR-2의 수준은 야생형 마우스에서 식품 분말 처리에 의해 현저하게 감소했다. ETKO 마우스에서는 변화가 관찰되지 않았다. 야생형 및 ETKO 마우스 모두에서 CXCR-5 및 3 및 CXCR5에 차이가 없었다. 결과는 리간드(C-C; C-X-C- 모티프)를 제외하고 수용체들이 식품 분말 처리에 의해 조절될 수 있으며, 이는 염증의 더 나은 하향 조절을 제공할 수 있음을 시사한다. 종양 괴사 인자 계열의 수용체는 염증과 관련된 또 다른 수용체 그룹이며, 여러 천연 생성물이 TNF 알파 연결 신호 전달 경로를 하향 조절하는 것으로 알려져 있다. FAS 리간드(FAS L)는 TNF 슈퍼 패밀리에 속하며 수용체에 결합하면 세포 사멸(apoptosis)을 시작한다. 야생형 마우스와 ETKO 마우스 모두에서 식품 분말 처리 후 FAS L 수준에 유의한 차이는 없다. 데이터는 세 개의 개별 마우스의 샘플에서 전사 수준의 평균 $\pm$ SEM이다. 식품 분말 처리는 테스트된 조건에서 이러한 유전자의 발현에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

[0880] 도 59는 야생형 및 ETKO 마우스에서 식품 분말 처리에 대한 반응으로서 인터루킨의 변화를 평가한 것이다. 인터루킨은 면역 기능에 관여하는 사이토카인이고, 일부 인터루킨은 전 염증성(IL17)이고, 다른 것들은 항 염증 기능(IL10)을 가지고 있다. 그것들은 정상 조건에서 그리고 질병을 일으키는 유기체에 직면할 때 면역 기능을 매개한다. 식품 분말로 처리한 야생형 마우스의 IL 1A, IL 1B 및 IL 7의 발현 수준에서 현저한 감소가 관찰되었다. 이러한 인터루킨의 수준은 식품 분말 처리에 대한 반응으로 유사하게 유지되었다. IL4의 발현 수준은 미처리 및 식품 분말 처리 야생형 및 ETKO 마우스에서 유사하게 유지되었다. 데이터는 세 개의 개별 마우스의 샘플에서 전사 수준의 평균 $\pm$ SEM이다. 이 결과는 야생형 마우스와 ETKO 마우스의 발현 패턴의 차이를 시사한다.

[0881] 도 60은 야생형 및 ETKO 마우스에서 식품 분말 처리에 대한 반응으로서 인터루킨의 변화를 평가한 것이다. 인터루킨은 정상적인 조건에서 그리고 질병을 일으키는 유기체에 직면할 때 면역 기능을 매개한다. IL11, IL13, IL2rb 및 IL17f의 발현 수준에는 변화가 없었으며 야생형 및 ETKO 마우스 모두에서 식품 분말 처리 후 변화하지 않았다. 데이터는 세 개의 개별 마우스의 샘플에서 전사 수준의 평균 $\pm$ SEM이다. 이 결과는 식품 분말 처리가 모든 유전자 발현에 변화를 일으키지는 않지만, 야생형 마우스와 ETKO 마우스 모두에서 상대적으로 더 많이 표적화 됨을 시사한다.

[0882] 도 61은 야생형 및 ETKO 마우스에서 식품 분말 처리에 대한 반응으로서 인터루킨의 변화 평가를 보여준다. 야생형 마우스와 ETKO 마우스 모두 식품 분말 처리 후 IL21의 발현 수준에는 변화가 없었다. 인터페론 감마(IFNG)는 바이러스 제제에 대한 반응에 관여하는 또 다른 사이토카인이다. 야생형 및 ETKO 마우스 모두에서 식품 분말 처리에 대한 IFNG 수준의 변화는 없었다. 데이터는 세 개의 개별 마우스의 샘플에서 전사 수준의 평균 $\pm$ SEM이다. 이러한 결과는 유전자 발현을 변화시키는 식품 분말의 표적화된 작용을 시사한다.

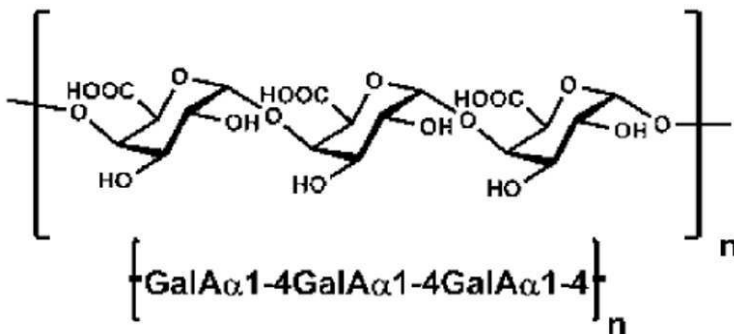
[0883] 도 62는 야생형 및 ETKO 마우스에서 식품 분말로 처리하는 동안 반응과 관련하여 종양 괴사 인자 슈퍼 패밀리를 구성원의 전사체 수준의 변화 평가를 보여준다. LTB(Lymphotoxin B: Lymphotoxin Beta(TNF Superfamily, Member 3))는 막 단백질이며 염증 반응을 유도한다. LTB 전사체의 수준은 식품 분말 처리에 대한 반응으로 야생형 마우스에서 하향 조절되었다. 식품 분말로 처리한 ETKO 마우스에서 LTB 전사체 수준의 변화는 없었다. TNFSF11, TNFSF11b 및 TNFSF113b와 같은 다른 TNF 슈퍼 패밀리를 구성원의 전사체 수준은 야생형 및 ETKO 마우스 모두에서 식품 분말 처리 후 변하지 않았다. 데이터는 세 개의 개별 마우스의 샘플에서 전사 수준의 평균 $\pm$ SEM이다.

[0884] 야생형 마우스가 염증성 사이토카인과 그 수용체를 하향 조절함으로써 식품 분말 처리에 반응했고, 어떤 경우에

는 비만 마우스보다 훨씬 더 많았다는 점은 흥미롭다. 이것은 식품 분말이 정상 마우스에서도 염증을 하향 조절하는 데 특히 효과적일 수 있음을 시사한다. 염증의 하향 조절은 여러 만성 질환의 예방과 매우 관련이 있기 때문에, 유사한 식품 분말 처리(즉, 섭취)가 인간 및/또는 다른 동물의 여러 만성 질환에 유익할 수 있다.

[0885] 실시예 5 - 나노 입자 및 나노 섬유에 대한 유기 분자 결합의 pH 의존성

[0886] 수성 조건 하에서 나노 섬유 및 나노 입자에 대한 유기 분자의 결합 능력을 평가하기 위한 실험이 수행되었다. 나노 섬유와 나노 입자 모두의 주요 성분은 폴리갈락투론산(PG) 중합체(아래 참조)와, 자일란 및 아라비난과 같은 기타 소량의 탄수화물 중합체이다. PG의 카르복실산 모이어티는 pKa가 4에 가까운, 수용액 중 PG에 높은 산성 특성을 제공한다. 이 pH에서 대부분의 카르복실산은 해리된 형태 (COO^-)가 될 것이다. 이것은 다중 가닥 구조에서 개별 가닥을 반발(repel)하는 경향이 있을 수 있으며, 아마도 리간드 분자의 결합 증가를 촉진할 수 있다.



[0887] 이 가능성을 테스트하기 위해, 나노 섬유와 나노 입자를 염료와 함께 배양하고 결합력을 모니터링했다. 나노 섬유의 경우, 칼세인(Ex 490; Em-515)이 사용되었으며, 나노 입자의 경우 dylight(Ex 650; Em 680)가 사용되었다. 나노 입자에는 폴리 페놀이 포함되어 있기 때문에, 스펙트럼의 녹색-오렌지 영역에서 방출을 억제하는 경향이 있다. 따라서, 600nm 이상의 흡수/방출 특성을 가진 dylight가 사용되었다. 이 두 염료는 나노 입자와 나노 섬유에 의해 통합된다.

[0889] 나노 섬유(10mg)를 물 10ml에 용해시켰다. 나노 입자는 또한 10ml의 물에 10mg의 분말을 함유했다. (이 두 제제 사이에 조성, 작용기 등의 측면에서 동등성이 없을 가능성이 높다). 나노 섬유는 5mg의 칼세인(10ml)과 혼합되었다. 나노 입자 용액은 10ml에 200 µg 당량의 dylight와 혼합되었다.

[0890] 용액을 3 시간 동안 부드럽게 혼합하고 pH 4 내지 pH 7 범위의 서로 다른 pH의 완충액에 대해 밤새 투석된 100 µl의 분획물로 분리했다. 투석된 나노 섬유 및 나노 입자 용액을 2ml로 희석하고 흡광도를 염료(490 nm에서 칼세인; 652 nm에서 dylight)에 대해 λ_{max} 에서 측정했다. 대조군을 제공하기 위해 나노 섬유 및 나노 입자 용액에서와 같이 칼세인 및 dylight 용액은 비례적으로 희석되었다. 결과는 다음 표 6 및 7에 나타낸다.

[0891] 표 6: 나노 섬유(NF) 샘플 - 염료로서 칼세인.

표 6

샘플 ID	λ_{Max}	OD	블랭크 흡수에 대한 변화%
칼세인 + water	491.5	1.121	대조군
칼세인 + 완충액 pH 4.0	472.5	0.444	대조군
투석된 NF (pH 4.0 + 칼세인)	472.5	1.090	145.5
칼세인 + 완충액 pH 6.0	491.5	0.927	대조군
투석된 NF (pH 6.0 + 칼세인)	491	2.010	116.83
칼세인 + 완충액 pH 6.5	492	1.250	대조군
투석된 NF (pH 6.5 + 칼세인)	492	2.230	78.4
칼세인+ 완충액 pH 7.0	492	1.390	대조군
투석된 NF (pH 7.0 + 칼세인)	491.5	2.474	78

[0893] pH 4 내지 pH 7에서 칼세인 흡수가 pH 의존적으로 증가했다. 칼세인 흡수는 pH 4-6 영역에서 가장 높았으며 그

이상에서는 접합이 감소했을 것이다. 결합은 pH 4-6 범위에서 최대였으며, 나노 섬유가 없는 대조군에 비해 145% 및 116% 증가했다. 모든 카르복실산기가 완전히 해리되면 pH가 증가함에 따라 효과적인 결합이 감소하는 경향이 있다. 이론에 제한되지 않고, 이것은 또한 더 높은 pH에서 나노 섬유 구조에서 구조적 유기산(예: 말산, 아스코르브 산 등)의 해리 때문일 수 있다.

[0894] 표 7: 나노 입자 샘플 - 염료로서 Dylight 650.

표 7

[0895]

샘플 ID	λ Max	OD	블랭크 흡수에 대한 변화%
Dylight + 완충액 pH 4.0	652.5	0.3154	대조군
투석된 NP (pH 4.0 + Dylight)	652.5	0.2545	80.95
Dylight + 완충액 pH 6.0	652.5	0.3620	대조군
투석된 NP (pH 6.0 + Dylight)	652.5	0.2760	76.24
Dylight + 완충액 pH 6.5	652.5	0.4309	대조군
투석된 NP (pH 6.5 + Dylight)	652.5	0.2504	58.00
Dylight + 완충액 pH 7.0	652.5	0.3788	대조군
투석된 NP (pH 7.0 + Dylight)	652.5	0.3053	80.47

[0896]

나노 입자와 dylight의 수용액을 3 시간 동안 부드럽게 혼합하고, pH 4 내지 pH 7 범위의 서로 다른 pH의 완충액에 대해 밤새 투석된 100 μ l의 분획물을 분리하였다. 투석된 나노 입자 용액을 2ml로 희석하고 λ max(652.5nm)에서 흡광도를 측정했다. Dylight 용액은 또한 각 pH 세트에 대한 제어를 제공하기 위해 투석된 나노 입자 용액에서와 같이 비례적으로 희석되었다. 나노 입자의 존재 하에서, 테스트 된 조건 하에서, dylight로부터의 흡광도는 pH와 관계없이 감소하는 경향이 있으며 pH와의 명확한 관계는 눈에 띄지 않았다. 이론에 제한되지 않고, 이는 나노 입자가 밀접하게 연관된 구조이고, 자가 조립 후, 내부의 일부가 특정 성분에 효율적으로 결합하지 못할 수 있기 때문일 것입니다. 그러나 두 경우 모두, 광범위한 투석에도 불구하고 염료가 유지되었으며, 이는 나노 입자와 나노 섬유에 의한 적체물 전달에 화학적 접합체가 필요하지 않을 수 있음을 시사한다. 그러나 특정 실시형태에서, 단클론 항체 및/또는 다른 거대 분자와 같은 항체의 경우와 같이 적체물이 큰 경우 접합이 바람직할 수 있다.

[0897] 실시예 6 - 식품 분말로 처리된 간 절편의 마우스 연구

[0898]

비만 마우스 모델에서 식품 분말 처리의 효과를 평가하기 위해 마우스를 대상으로 한 연구가 수행되었다. 실험 조건은 위에서 설명한 것과 같다. 절편은 에오신/헤마톡실린으로 염색되었다.

[0899]

도 63은 식품 분말 처리가 있거나 없는 마우스의 간 절편을 보여준다. 패널 (A)는 미처리 야생형(WT) 마우스 간 절편을 보여준다. 나타난 바와 같이, 지질체가 거의 보이지 않는다. 패널 (B)는 식품 분말로 처리된 야생형(WT) 마우스 간 절편을 보여준다. 다시 말하지만, 지질체가 거의 보이지 않는다. 패널 (C)는 미처리 비만(KO) 마우스 간 절편을 보여준다. 이 패널에서, 선명한 원형 영역은 간에 널리 분포된 지질체이다. 패널 (D)는 식품 분말로 처리된 (KO) 마우스 간 절편을 보여준다. 선명한 원형 영역은 지질체이다. 조직 재생의 잠재적 영역은 화살표로 표시된다. 이러한 결과는 본원에 기술된 바와 같이 식품 분말로 처리된 비만 마우스에서 지질체의 명백한 감소를 보여준다.

[0900]

하나 이상의 예시적인 실시예가 예로서 설명되었다. 청구 범위에 정의된 바와 같은 본 발명의 범위를 벗어나지 않고 다수의 변형 및 수정이 이루어질 수 있다는 것은 당업자에게 이해될 것이다.

[0901]

참고문헌

[0902]

Aprikian, O., Duclos, V., Guyot, S., Besson, C., Manach, C., Bernalier, A., Rémy, C. and Demigné, C. (2003) Apple pectin and a polyphenol-rich apple concentrate are more effective together than separately on cecal fermentations and plasma lipids in rats. J. Nutr., 133, 1860-1865.

[0903]

Azeredo, H.M.C., Mattoso, L.H.C., Wood, D., Williams, T.G., Avena-Bustillos, R.J. and McHugh, T.H. (2009) Nanocomposite edible films from mango puree reinforced with cellulose nanofibers. J. Food. Sci., 74, Nr 5, N31-N35.

- [0904] Cabral, H., Matsumoto, Y., Mizuno, K., Chen, Q., Murakami, M., Kimura, M., Terada, Y., Kano, M.R., Miyazono, K., Uesaka, M., Nishiyama, N. and Kataoka, K. (2011) Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size., *Nature Nanotechnol.*, 6., 815-823.
- [0905] Clifford, M. and Brown, J.E. (2006) Dietary flavonoids and health- Broadening the perspective In *Flavonoids Chemistry biochemistry and applications*, Andersen OM, Markham KR (Eds.); Taylor and Francis, New York, NY: 320-370.
- [0906] Dangles, O. and Dufour, C. (2006). *Flavonoid-protein interactions*. In *Flavonoids: Chemistry, biochemistry & applications*, ed. Andersen O, Markham K. 443-69. Boca Raton, FL: CRC Press.
- [0907] David, I., Stefanut, M.N., Cata, A., Ienascu, I., Pop, R., Tȃnasie, C., and Balcu, I. (2009) Study of polyphenols from *Vaccinium Myrtillus* L. frozen fruits. *J. Agroalimentary Processes and Technol.* 15 (3), 348-352.
- [0908] Del Rio, D., Borges, G. and Crozier, A. (2010) Berry Flavonoids and phenolics: bioavailability and evidence of protective effects. *Brit. J. Nutr.*, 104: S 67-S90.
- [0909] Deng, Z. J., Liang, M., Monteiro, M., Toth, I. and Minchin, R. F. (2011) Nanoparticle-induced unfolding of fibrinogen promotes Mac-1 receptor activation and inflammation. *Nature Nanotech.* 6, 39-44.
- [0910] Discher, D. E. and Eisenberg, A. (2002) Polymer vesicles. *Science* 297, 967-973.
- [0911] Fu, J.T.; Rao, M.A. (2001) Rheology and structure development during gelation of low-methoxyl pectin gels: The effect of sucrose. *Food Hydrocolloid.*, 15, 93-100.
- [0912] Gao, Y., Gu, W., Chen, L., Xu, Z., Li, Y. (2008). The role of daidzein-loaded sterically stabilized solid lipid nanoparticles in therapy for cardio-cerebrovascular diseases. *Biomaterials.*, 29, 4129-4136.
- [0913] Gorinstein, S., Haruenkit, R., Poovarodom, S., Park, Y-S., Vearasilp, S., Suhaj, M., Ham, K-S., Heo, B-G., Cho, J.Y., and Jang, H.G. 2009. The comparative characteristics of snake and kiwi fruits. *Food and Chem. Toxicol.*, 47, 1884-1891.
- [0914] IOM (Institute of Medicine) (2009) *Nanotechnology in food products: Workshop Summary*. Washington, DC: The National Academies Press.
- [0915] Iversen, T.G., Skotland, T. and Sandvig, K. (2011). Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies. *Nano Today*, 6, 176-185.
- [0916] Jacob, J.K. and Paliyath, G. (2008) Physico-chemical characteristics of nanovesicle-carbohydrate complexes in grape juice, *J. Agr. Food Chem.*, 56, 1305-1315.
- [0917] Kacurakova, M., Capek, P., Sasinkova, N., Wellner, A., and Ebrigerova, A. (2000) FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides. *Carbohydrate Polym.*, 43, 195-203.
- [0918] Kunzmann, A., Andersson, B., Thurnherr, T., Krug, H., Scheynius, A. and Fadeel, B. (2011) Toxicology of engineered nanomaterials: Focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1810, 361-373.
- [0919] Lewinski, N., Colvin, V. and Drezek, R. (2008) cytotoxicity of nanoparticles. *Small*, 4, 26-49.
- [0920] Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. and Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Amer. J. Clin. Nutr.*, 79:727-747.
- [0921] Marcus, S.E., Verhertbruggen, Y., Hervé, C., Ordaz-Ortiz, J.J., Farkas, V., Pedersen, H.L., Willats, W.G.T. and Knox, J.P. (2008). Pectic homogalacturonan masks abundant sets of xyloglucan epitopes in plant cell walls. *BMC Plant Biol.*, 8, 60-72.

- [0922] Maynard, A. D. (2006) Nanotechnology: Assessing the risks. *Nanotoday*, 1, 22-33.
- [0923] McCann, M.C., Shi, J., Roberts, K. And Carpita, N.C. (1994) Changes in pectin structure and localization during the growth of unadapted and NaCl-adapted tobacco cells. *Plant J.*, 5, 773-785.
- [0924] Mishra, R.K., Banthia, A.K. and Majeed, A.B.A. (2012) Pectin based formulations for biomedical applications: A Review. *Aian J. Pharm. Clin. Res.*, 5, 1-7.
- [0925] Mishra, R.K., Banthia, A.K. and Majeed, A.B.A. (2011). Development and characterization of pectin/gelatin hydrogel membranes for wound dressing. *Int. J. Plast. Technol.*, 15, 82-95.
- [0926] Negi, P.S. and Handa, A.K. (2008) Structural deterioration of the produce: The breakdown of cell wall components. In, *Post Harvest Biology and Technology of Fruits, Vegetables and Flowers* (Eds)
- [0927] Paliyath, G., D.P. Murr, A.K. Handa and S. Lurie, Blackwell Publications, Iowa, pp 162-194.
- [0928] Nishiyama N (2007) Nanocarriers shape up for long life. *Nature Nanotechnol.*, 2, 203-205.
- [0929] Padayachee, A., Netzel, G., Netzel, M., Day, L., Zabaras, D., Mikkelsen, D. and Gidley, M. (2012) Binding of polyphenols to plant cell wall analogues - Part 1: Anthocyanins. *Food Chemistry*, 134, 155-161.
- [0930] Palashuddin, Md. S.K., Jaiswal, A., Paul, A., Ghosh, S.S. and Chattopadhyay, A. (2012) Presence of amorphous carbon nanoparticles in food caramels. *Nature Scientific Reports*, 2, Article number: 383. doi:10.1038/srep00383
- [0931] Paliyath, G., Bakovic, M. and Shetty, K. (2011). *Functional foods, nutraceuticals and degenerative disease prevention*, Wiley-Blackwell, Oxford, UK, 392 pages.
- [0932] Park, S., Baker, J.O., Himmel, M.E., Parilla, P.A., Johnson, D.K. (2010). Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *BMC Biotechnol. Fuels*, 3, 10-20.
- [0933] Ramasamy, T., Kandasamy, U, Hinabindhu, R. and Kona, K. (2009) Nanocochleate - A New Drug Delivery System. *FABAD J. Pharm. Sci.*, 34, 91-101.
- [0934] Rico, C.M., Majumdar, S., Duarte-Gardea, M., Peralta-Videa, J.R. and Gardea -Torresdey, J.L. (2011) Interaction of Nanoparticles with Edible Plants and Their Possible Implications in the Food Chain. *J. Agr. Food. Chem.*, 59, 3485-3498.
- [0935] Rounds, C.M., Lubeck, E., Hepler, P.K. and Winship, L.J. (2011) Propidium iodide competes with Ca²⁺ to label pectin in pollen tubes and Arabidopsis root hairs. *Plant Physiol.*, 157, 175-187.
- [0936] Saura-Calixto, F. and Diaz-Rubio, M.E. (2007a). Polyphenols associated with dietary fibre in wine- A wine polyphenols gap? *Food Res Int.*: 40: 613-619.
- [0937] Saura-Calixto, F., Serrano, J. and Goni, I. (2007b). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101: 492-501.
- [0938] Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C. and Jimenez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45(4): 287-306
- [0939] Seifert, G.J. and Roberts, K. (2007) The Biology of Arabinogalactan Proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 58, 137-161.
- [0940] Sessa, M., Tsao, R., Liu, R., Ferrari, G. and Donsu, F. (2011). Evaluation of the stability and antioxidant activity of nanoencapsulated resveratrol during in vitro digestion. *J. Agr. Food Chem.*, 59, 12352-12360.
- [0941] Shi, L. and Gunasekaran, S. (2008) Preparation of pectin-ZnO nanocomposites. (2008). *Nanoscale Research Letters*, 3:491-495.

- [0942] Spencer, J.P.E. and Rice-Evans, C.A. (2003) Metabolism in the small intestine and gastrointestinal tract. In *Flavonoids in Health and disease*, Rice-Evans C, Packer L (Eds.); Marcel Dekker, Inc. New York: 363-389.
- [0943] Sriamornsak, P. (2011) Application of pectin in oral drug delivery. *Expert Opinion on Drug. Deliv.*, 8, 1009-1023.
- [0944] Strom, A.; Ribelles, P.; Lundin, L.; Norton, I.; Morris, E.R.; Williams, A.K. Influence of pectin fine structure on the mechanical properties of calcium-pectin and acid-pectin gels. *Biomacromolecules* 2007, 8, 2668-2674.
- [0945] Urias-Orona, V., Rascon-Chu, A., Lizardi-Mendoza, J., Carvajal-Millán, E., Gardea, A.A., and Ramirez-Wong, B. (2010). A Novel Pectin Material: Extraction, Characterization and Gelling Properties, 11, 3686-3695.
- [0946] Verma, A. K., Chanchal, A., Kumar, A. (2011) Potential of Negatively charged pectin nanoparticles encapsulating Paclitaxel: Preparation & Characterization. *IEEE.*, 978, 1-8.
- [0947] Yadav, N., Morris, G. A., Harding, S. E., Ang, S. and Adams, G. G. (2009) Various non-injectable delivery systems for the treatment of diabetes mellitus. *Endo. Metabol. & Imm. Disord. - Drug Targ.* 2009, 9, 1-13.
- [0948] Yamashita, K. et al. (2011) Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice *Nature Nanotech.*, 6, 321-328.
- [0949] Zhao, N., Bagaria, H.G., Wong, M.S. and Zu, Y. (2011) A nanoparticle that is both tumor cell-selective and cancer gene-specific for anaplastic large cell lymphoma. *J. Nanobiotechnol.*, 9, 1-12.
- [0950] Zhang, H.Y., Arab Tehrani, E., Kahn, C.J.F., Poncet, M. and Cleymand, L.F. (2012) Effects of nanoliposomes based on soya, rapeseed and fish lecithins on chitosan thin films designed for tissue engineering. *Carbohydrate Polymers.*, 88, 618-627.
- [0951] Agarwala, R., Singh, V., Journey, P., Shib, L., Sreenivasan, S.V., and Roy, K. (2013). Mammalian cells preferentially internalize hydrogel nanodiscs over nanorods and use shape-specific uptake mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* , 110, 17247-17252.
- [0952] Barenholz, Y. (2012) Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *J. Controlled Release*, 160, 117-134.
- [0953] Cabral, H., Matsumoto, Y., Mizuno, K., Chen, Q., Murakami, M., Kimura, M., Terada, Y., Kano, M.R., Miyazono, K., Uesaka, M., Nishiyama, N. and Kataoka, K. (2011) Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size., *Nature Nanotechnol.*, 6., 815-823.
- [0954] Chandra, A., Nair, M.G. and Lezzoni, A. (1992). Evaluation and characterization of the anthocyanin pigments in tart cherries (*Prunus cerasus* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 40, 967-969.
- [0955] Kai-Hua Chow, E. and Ho, D. (2013) Cancer nanomedicine: From drug delivery to imaging. *Sci. Transl. Medicine.*, 5, (216) 1-12.
- [0956] Clifford, M. and Brown, J.E. (2006) Dietary flavonoids and health- Broadening the perspective In *Flavonoids Chemistry biochemistry and applications*, Andersen OM, Markham KR (Eds.); Taylor and Francis, New York, NY: 320-370.
- [0957] Dahlman, J.E. Barnes, C. et al. (2014) In vivo endothelial siRNA delivery using polymeric nanoparticles with low molecular weight. *Nature Nanotechnol.*, 2014, 9, 648-654.
- [0958] Del Rio, D., Borges, G. and Crozier, A. (2010) Berry Flavonoids and phenolics: bioavailability and evidence of protective effects. *Brit. J. Nutr.*, 104: S 67-S90.
- [0959] Gao, Y., Gu, W., Chen, L., Xu, Z., Li, Y. (2008). The role of daidzein-loaded sterically stabilized

solid lipid nanoparticles in therapy for cardio-cerebrovascular diseases. *Biomaterials.*, 29, 4129-4136.

- [0960] Garcia-Alonso, J., Rosa, G., Vidal-Guevera, M.L. and Periago, M.J. (2006) Acute intake of phenolic rich juice improves antioxidant status in healthy subjects. *Nutr. Res.*, 26: 330-339.
- [0961] Gonzalez-Gallego, J., Victoria Garcla-Mediavilla, M., Sanchez-Campos, S. and Tunon, M.J. (2010) Fruit polyphenols, immunity and inflammation. *British J. Nutr.*, 104: S15-S27.
- [0962] Hakimuddin, F., Paliyath, G. and Meckling, K. (2004). Selective cytotoxicity of a red grape wine flavonoid fraction against MCF-7 cells, *Breast Cancer Res. Treatment.* 85:65-79.
- [0963] Hakimuddin, F., Paliyath, G. and Meckling, K. (2006). Red wine polyphenols cause selective cytotoxicity in MCF-7 cells by disrupting calcium signaling, mitochondrial function and the cell cycle. *J. Agric. Food Chem.*, 54:7912-7923.
- [0964] Hakimuddin, F., Tiwari, K., Paliyath, G. and Meckling, K. (2008). Grape and wine polyphenols down-regulate the expression of signal transduction genes and inhibit the growth of estrogen receptor-negative mda-mb231 tumors in nu/nu mouse xenografts. *Nutr. Res.*, 28:702-713.
- [0965] Hakimuddin, F. and Paliyath, G. (2011). Cancer prevention by polyphenols: Influence on signal transduction and gene expression. In *Functional foods, nutraceuticals and degenerative disease prevention*. Eds Paliyath G, Bakovic M, Shetty K. Wiley-Blackwell, Oxford, UK, pp 283-321.
- [0966] Holt, E.M., Steffen, L.M., Moran, A., Basu, S., Steinberger, J., Ross, J., Hong, C.P. and Sinaiko, A.R. (2009). Fruit and vegetable consumption and its relation to markers of inflammation and oxidative stress in adolescents. *J Am Diet Assoc.*, 109: 414-421.
- [0967] Iversen, T.G., Skotland, T. and Sandvig, K. (2011). Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies. *Nano Today*, 6, 176-185.
- [0968] Jacob, J.K. and Paliyath, G. (2008) Physico-chemical characteristics of nanovesicle-carbohydrate complexes in grape juice, *J. Agr. Food Chem.*, 56, 1305-1315.
- [0969] Jacob, J.K., Tiwari, K., Correa-Betanzo, J., Misran, A, Chandrasekaran, R and G. Paliyath. (2012) Biochemical basis for functional ingredient design from fruits. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, 3, 79-104.
- [0970] Jensen, G.S., Wu, X, Patterson, K.M, Barnes, J., Carter, S.G., Scherwitz, L.S., Beaman, R., Endres, J.R. and Schauss, A.G. (2008) In vitro and in vivo antioxidant and antiinflammatory capacities of an antioxidant rich fruit and berry juice blend. Results of a pilot and randomized double blind, placebo controlled, crossover study. *J. Agric. Food Chem.*, 56: 8326-8333.
- [0971] Karlsen, A., Retterstol, L., Laake, P., Paur, I., Kjolsrud-Bohn, S., Sandvik, L. and Blomhoff, R. (2007) Anthocyanins inhibit, Nuclear Factor kappa B-activation in monocytes and reduce plasma concentration of pro-inflammatory mediators in healthy adults. *Journal of Nutrition*, 137, 1951-1954.
- [0972] Kelley, D.S., Rasooly, R., Jacob, R.A., Kader, A.A., and Mackey, B.E. (2006). Consumption of bing sweet cherries lowers circulating concentrations of inflammation markers in healthy men and women. *J.Nutr.*, 136: 981-986.
- [0973] Kunzmann, A., Andersson, B., Thurnherr, T., Krug, H., Scheynius, A. and Fadeel, B. (2011) Toxicology of engineered nanomaterials: Focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1810, 361-373.
- [0974] Lewinski, N., Colvin, V. and Drezek, R. (2008) cytotoxicity of nanoparticles. *Small*, 4, 26-49.
- [0975] Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. and Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Amer. J. Clin. Nutr.*, 79:727-747

- [0976] Maynard, A. D. (2006) Nanotechnology: Assessing the risks. *Nanotoday*, 1, 22-33.
- [0977] Morton, S.W., Lee, M.J., Deng, Z.J., Dreaden, E.C. Siouve, E., Shopsowitz, K. E., Shah, N.J., Yaffe, M.B., Hammond, P.T. (2014) A Nanoparticle-Based Combination Chemotherapy Delivery System for Enhanced Tumor Killing by Dynamic Rewiring of Signaling Pathways. *Science Signalling.*, 7, 1-11.
- [0978] Palashuddin, Md. S.K., Jaiswal, A., Paul, A., Ghosh, S.S. and Chattopadhyay, A. (2012) Presence of amorphous carbon nanoparticles in food caramels. *Nature Scientific Reports*, 2, Article number: 383. doi:10.1038/srep00383
- [0979] Ramasamy, T., Kandasamy, U, Hinabindhu, R. and Kona, K. (2009) Nanocochleate - A New Drug Delivery System. *FABAD J. Pharm. Sci.*, 34, 91-101.
- [0980] Saura-Calixto, F. and Diaz-Rubio, M.E. (2007a). Polyphenols associated with dietary fibre in wine- A wine polyphenols gap? *Food Res Int.*; 40: 613-619.
- [0981] Sessa, M., Tsao, R., Liu, R., Ferrari, G. and Donsu, F. (2011). Evaluation of the stability and antioxidant activity of nanoencapsulated resveratrol during in vitro digestion. *J. Agr. Food Chem.*, 59, 12352-12360.
- [0982] Shah, B.P., Pasquale, N., De, G., Tan, T., Ma, J. and Lee, K-B. (2014). Core shell nanoparticle-based peptide therapeutics and combined hyperthermia for enhanced cancer cell apoptosis. *ACS Nano*, 8, 9379-9387.
- [0983] Smith, B.R., Ghosn, E.E.B., Rallapalli, H., Prescher, J.A., Larson, T., Herzenberg, L.A. and Gambhir, S.S. (2014) Selective uptake of single-walled carbon nanotubes by circulating monocytes for enhanced tumour delivery. *Nature Nanotechnol.*, 9, 481-487.
- [0984] Verma, A. K., Chanchal, A., Kumar, A. (2011) Potential of Negatively charged pectin nanoparticles encapsulating Paclitaxel: Preparation & Characterization. *IEEE.*, 978, 1-8.
- [0985] Willcox, J.K., Ash, S.L. and Catignani, G.L. (2004). Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44: 275-295.
- [0986] Yamashita, K. et al. (2011) Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice *Nature Nanotech.*, 6, 321-328.
- [0987] Zhao, N., Bagaria, H.G., Wong, M.S. and Zu, Y. (2011) A nanoparticle that is both tumor cell-selective and cancer gene-specific for anaplastic large cell lymphoma. *J. Nanobiotechnol.*, 9, 1-12.
- [0988] Zhu, G., Mei, L., and Tan W. (2014) Nanomedicine. *The Scientist Magazine*, August 22nd 2014.
- [0989] Atkins, M.B.; Regan, M.; McDermott, D. Update on the role of interleukin 2 and other cytokines in the treatment of patients with stage IV renal carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2004, 10, 6342S-6346S.
- [0990] Atkins, M.B.; Lotze, M.T.; Dutcher, J.P.; Fisher, R.I.; Weiss, G.; Margolin, K.; Abrams, J.; Sznol, M.; Parkinson, D.; Hawkins, M.; et al. High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: Analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J. Clin. Oncol.* 1999, 17, 2105-2116. Balkwill, F. (2006). TNF- α in promotion and progression of cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 25: pp. 409-416.
- [0991] Balkwill, F. (2009). Tumour necrosis factor and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 9, 361-371.
- [0992] Chang, K.J., Reid, T., Senzer, N., et al., (2012). Phase I evaluation of TNFerade Biologic plus chemoradiotherapy before esophagectomy for locally advanced resectable esophageal cancer, *Gastrointestinal Endoscopy*, 75: pp. 1139-1146, 2012.
- [0993] Commins SP, Borish L & Steinke JW (2010) Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 125(2 Suppl 2): S53-72.
- [0994] Dougan, M., and Dranoff, G. (2009). Immune therapy for cancer. *Annual Review of Immunology* 27: 83-117.

- [0995] Eferl, R., and Wagner, E.F. (2003). AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* 3: 859-868.
- [0996] Heikkilä, K., Ebrahim, S., and Lawlor, D.A. (2008) Systematic review of the association between circulating interleukin-6 (IL-6) and cancer. *European Journal of Cancer* 44: pp. 937-945.
- [0997] Herman, J.M., Wild, A.T., Wang H., et al., 2013. Randomized phase III multi-institutional study of TNFerade biologic with fluorouracil and radiotherapy for locally advanced pancreatic cancer: final results. *Journal of Clinical Oncology*, 31: pp. 886-894.
- [0998] Hodge, D.R., Hurt, E.M., and Farrar, W.L. 2005. The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *European Journal of Cancer*, 41: pp. 2502-2512.
- [0999] Karin, M. (2006). Nuclear factor-kappa B in cancer development and progression. *Nature* 441, 431-436.
- [1000] Laveti, D., Kumar, M., Hemalatha, R., Sistla, R., Naidu, V.G., Talla, V., Verma, V., Kaur, N., and Nagpal, R., (2013) Anti-inflammatory treatments for chronic diseases: a review, *Inflamm. Allergy Drug Targets* 12: 349-361.
- [1001] Lee S and Margolin K (2011) Cytokines in cancer immunotherapy. *Cancers* 3: 3856-3893.
- [1002] Lust, J.A., Lacy, M.Q., Zeldenrust, S.R., Dispenzieri, A., Gertz, M.A., Witzig, T.E., Kumar, S., Hayman, S.R., Russell, S.J., Buadi, F.K., et al. (2009). Induction of a chronic disease state in patients with smoldering or indolent multiple myeloma by targeting interleukin 1beta-induced interleukin 6 production and the myeloma proliferative component. *Mayo Clin. Proc.* 84, 114-122.
- [1003] Popa, C., Netea, M.G., Van Riel, J P. L. C. M., Van Der Meer, W. M., and Stalenhoef, A. F. H. (2007) The role of TNF- α in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *Journal of Lipid Research* vol. 48: pp. 751-762.
- [1004] Thornton, A.M.; Donovan, E.E.; Piccirillo, C.A.; Shevach, E.M. Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J. Immunol.* 2004, 172, 6519-6523.
- [1005] Waldner, M.J., and Neurath, M.F. (2009). Colitis-associated cancer: the role of T cells in tumor development. *Semin. Immunopathol.* 31, 249-256.
- [1006] Zhang, J.Y., Green, C.L., Tao, S., and Khavari, P.A. (2004). NF-kappa B RelA opposes epidermal proliferation driven by TNFR1 and JNK. *Genes Dev.* 18, 17-22.
- [1007] Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., and Kroemer, G. (2008). Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 59-73.
- [1008] Aprikian, O., Duclos, V., Guyot, S., et al., (2003) Apple pectin and a polyphenol-rich apple concentrate are more effective together than separately on cecal fermentations and plasma lipids in rats. *J. Nutr.*, 133, 1860-1865.
- [1009] Azeredo, H.M.C., Mattoso, L.H.C., Wood, D., Williams, T.G., Avena-Bustillos, R.J. and McHugh, T.H. (2009) Nanocomposite edible films from mango puree reinforced with cellulose nanofibers. *J. Food. Sci.*, 74, Nr 5, N31-N35.
- [1010] Cabral, H., Matsumoto, Y., Mizuno, K., Chen, Q., Murakami, M., Kimura, M., Terada, Y., Kano, M.R., Miyazono, K., Uesaka, M., Nishiyama, N. and Kataoka, K. (2011) Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size., *Nature Nanotechnol.*, 6., 815-823.
- [1011] Clifford, M. and Brown, J.E. (2006) Dietary flavonoids and health- Broadening the perspective In *Flavonoids Chemistry biochemistry and applications*, Andersen OM, Markham KR (Eds.); Taylor and Francis, New York, NY: 320-370.
- [1012] Dangles, O. and Dufour, C. (2006). Flavonoid-protein interactions. In *Flavonoids: Chemistry,*

biochemistry & applications, ed. Andersen O, Markham K. 443-69. Boca Raton, FL: CRC Press.

- [1013] David, I., Atefynub, M.N., Cyta, A., Ienaocu, I., Pop, R., Tynasie, C., and Balcu, I. (2009) Study of polyphenols from *Vaccinium Myrtillus* L. frozen fruits. *J. Agroalimentary Processes and Technol.* 15 (3), 348-352.
- [1014] Del Rio, D., Borges, G. and Crozier, A. (2010) Berry Flavonoids and phenolics: bioavailability and evidence of protective effects. *Brit. J. Nutr.*, 104: S 67-S90.
- [1015] Deng, Z. J., Liang, M., Monteiro, M., Toth, I. and Minchin, R. F. (2011) Nanoparticle-induced unfolding of fibrinogen promotes Mac-1 receptor activation and inflammation. *Nature Nanotech.* 6, 39-44.
- [1016] Discher, D. E. and Eisenberg, A. (2002) Polymer vesicles. *Science* 297, 967-973.
- [1017] Fu, J.T.; Rao, M.A. (2001) Rheology and structure development during gelation of low-methoxyl pectin gels: The effect of sucrose. *Food Hydrocolloid.*, 15, 93-100.
- [1018] Gao, Y., Gu, W., Chen, L., Xu, Z., Li, Y. (2008). The role of daidzein-loaded sterically stabilized solid lipid nanoparticles in therapy for cardio-cerebrovascular diseases. *Biomaterials.*, 29, 4129-4136.
- [1019] Gorinstein, S., Haruenkit, R., Poovarodom, S., Park, Y-S., Vearasilp, S., Suhaj, M., Ham, K-S., Heo, B-G., Cho, J.Y., and Jang, H.G. 2009. The comparative characteristics of snake and kiwi fruits. *Food and Chem. Toxicol.*, 47, 1884-1891.
- [1020] IOM (Institute of Medicine) (2009) Nanotechnology in food products: Workshop Summary. Washington, DC: The National Academies Press.
- [1021] Iversen, T.G., Skotland, T. and Sandvig, K. (2011). Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies. *Nano Today*, 6, 176-185.
- [1022] Jacob, J.K. and Paliyath, G. (2008) Physico-chemical characteristics of nanovesicle-carbohydrate complexes in grape juice, *J. Agr. Food Chem.*, 56, 1305-1315.
- [1023] Kacurakova, M., Capek, P., Sasinkova, N., Wellner, A., and Ebrigerova, A. (2000) FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides. *Carbohydrate Polym.*, 43, 195-203.
- [1024] Kunzmann, A., Andersson, B., Thurnherr, T., Krug, H., Scheynius, A. and Fadeel, B. (2011) Toxicology of engineered nanomaterials: Focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1810, 361-373.
- [1025] Lewinski, N., Colvin, V. and Drezek, R. (2008) cytotoxicity of nanoparticles. *Small*, 4, 26-49.
- [1026] Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. and Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Amer. J. Clin. Nutr.*, 79:727-747.
- [1027] Marcus, S.E., Verhertbruggen, Y., Hervé, C., Ordaz-Ortiz, J.J., Farkas, V., Pedersen, H.L., Willats, W.G.T. and Knox, J.P. (2008). Pectic homogalacturonan masks abundant sets of xyloglucan epitopes in plant cell walls. *BMC Plant Biol.*, 8, 60-72.
- [1028] Maynard, A. D. (2006) Nanotechnology: Assessing the risks. *Nanotoday*, 1, 22-33.
- [1029] McCann, M.C., Shi, J., Roberts, K. And Carpita, N.C. (1994) Changes in pectin structure and localization during the growth of unadapted and NaCl-adapted tobacco cells. *Plant J.*, 5, 773-785.
- [1030] Mishra, R.K., Banthia, A.K. and Majeed, A.B.A. (2012) Pectin based formulations for biomedical applications: A Review. *Aian J. Pharm. Clin. Res.*, 5, 1-7.
- [1031] Mishra, R.K., Banthia, A.K. and Majeed, A.B.A. (2011). Development and characterization of pectin/gelatin hydrogel membranes for wound dressing. *Int. J. Plast. Technol.*, 15, 82-95.

- [1032] Negi, P.S. and Handa, A.K. (2008) Structural deterioration of the produce: The breakdown of cell wall components. In, Post Harvest Biology and Technology of Fruits, Vegetables and Flowers (Eds)
- [1033] Paliyath, G., D.P. Murr, A.K. Handa and S. Lurie, Blackwell Publications, Iowa, pp 162-194.
- [1034] Nishiyama N (2007) Nanocarriers shape up for long life. *Nature Nanotechnol.*, 2, 203-205.
- [1035] Padayachee, A., Netzel, G., Netzel, M., Day, L., Zabaras, D., Mikkelsen, D. and Gidley, M. (2012) Binding of polyphenols to plant cell wall analogues - Part 1: Anthocyanins. *Food Chemistry*, 134, 155-161.
- [1036] Palashuddin, Md. S.K., Jaiswal, A., Paul, A., Ghosh, S.S. and Chattopadhyay, A. (2012) Presence of amorphous carbon nanoparticles in food caramels. *Nature Scientific Reports*, 2, Article number: 383. doi:10.1038/srep00383
- [1037] Paliyath, G., Bakovic, M. and Shetty, K. (2011). Functional foods, nutraceuticals and degenerative disease prevention, Wiley-Blackwell, Oxford, UK, 392 pages.
- [1038] Park, S., Baker, J.O., Himmel, M.E., Parilla, P.A., Johnson, D.K. (2010). Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *BMC Biotechnol. Fuels*, 3, 10-20.
- [1039] Ramasamy, T., Kandasamy, U, Hinabindhu, R. and Kona, K. (2009) Nanocochleate - A New Drug Delivery System. *FABAD J. Pharm. Sci.*, 34, 91-101.
- [1040] Rico, C.M., Majumdar, S., Duarte-Gardea, M., Peralta-Videa, J.R. and Gardea -Torresdey, J.L. (2011) Interaction of Nanoparticles with Edible Plants and Their Possible Implications in the Food Chain. *J. Agr. Food. Chem.*, 59, 3485-3498.
- [1041] Rounds, C. M., Lubeck, E., Hepler, P. K., and Winship, L. J., (2011) Propidium iodide competes with Ca²⁺ to label pectin in pollen tubes and Arabidopsis root hairs. *Plant Physiol.*, 157, 175-187.
- [1042] Saura-Calixto, F. and Diaz-Rubio, M.E. (2007a). Polyphenols associated with dietary fibre in wine- A wine polyphenols gap? *Food Res Int.*; 40: 613-619.
- [1043] Saura-Calixto, F., Serrano, J. and Goni, I. (2007b). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101: 492-501.
- [1044] Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémy, C. and Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45(4): 287-306
- [1045] Seifert, G.J. and Roberts, K. (2007) The Biology of Arabinogalactan Proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 58, 137-161.
- [1046] Sessa, M., Tsao, R., Liu, R., Ferrari, G. and Donsu, F. (2011). Evaluation of the stability and antioxidant activity of nanoencapsulated resveratrol during in vitro digestion. *J. Agr. Food Chem.*, 59, 12352-12360.
- [1047] Shi, L. and Gunasekaran, S. (2008) Preparation of pectin-ZnO nanocomposites. (2008). *Nanoscale Research Letters*, 3:491-495.
- [1048] Spencer, J.P.E. and Rice-Evans, C.A. (2003) Metabolism in the small intestine and gastrointestinal tract. In *Flavonoids in Health and disease*, Rice-Evans C, Packer L (Eds.); Marcel Dekker, Inc. New York: 363-389.
- [1049] Sriamornsak, P. (2011) Application of pectin in oral drug delivery. *Expert Opinion on Drug. Deliv.*, 8, 1009-1023.
- [1050] Ström, A.; Ribelles, P.; Lundin, L.; Norton, I.; Morris, E.R.; Williams, A.K. Influence of pectin fine structure on the mechanical properties of calcium-pectin and acid-pectin gels. *Biomacromolecules*

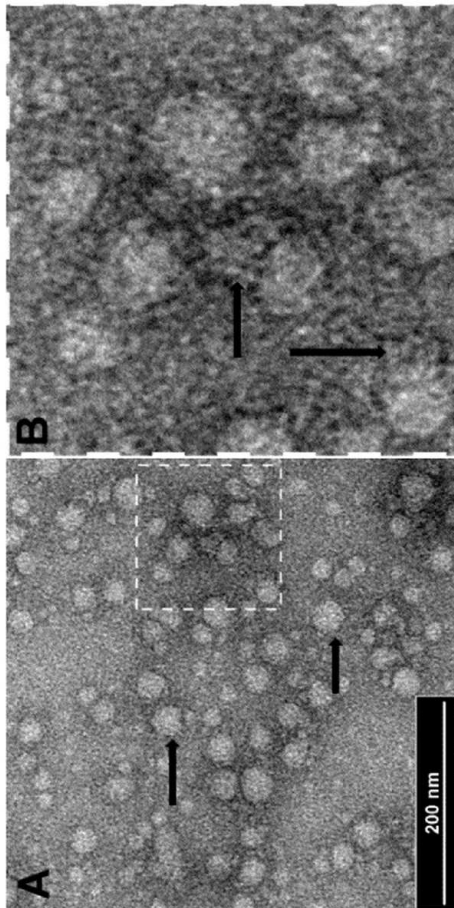
2007, 8, 2668-2674.

- [1051] Urias-Orona, V., Rascón-Chu, A., Lizardi-Mendoza, J., Carvajal-Millán, E., Gardea, A.A., and Ramírez-Wong, B. (2010). A Novel Pectin Material: Extraction, Characterization and Gelling Properties, 11, 3686-3695.
- [1052] Verma, A. K., Chanchal, A., Kumar, A. (2011) Potential of Negatively charged pectin nanoparticles encapsulating Paclitaxel: Preparation & Characterization. IEEE., 978, 1-8.
- [1053] Yadav, N., Morris, G. A., Harding, S. E., Ang, S. and Adams, G. G. (2009) Various non-injectable delivery systems for the treatment of diabetes mellitus. Endo. Metabol. & Imm. Disord. - Drug Targ. 2009, 9, 1-13.
- [1054] Yamashita, K. et al. (2011) Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice Nature Nanotech., 6, 321-328.
- [1055] Zhao, N., Bagaria, H.G., Wong, M.S. and Zu, Y. (2011) A nanocomplex that is both tumor cell-selective and cancer gene-specific for anaplastic large cell lymphoma. J. Nanobiotechnol., 9, 1-12.
- [1056] Zhang, H.Y., Arab Tehrany, E., Kahn, C.J.F., Poncot, M. and Cleymand, L.F. (2012) Effects of nanoliposomes based on soya, rapeseed and fish lecithins on chitosan thin films designed for tissue engineering. Carbohydrate Polymers., 88, 618-627.
- [1057] Chang, D., Lei, J., Cui, H., Lu, N., Sun, Y, Zhang, X., Gao, C and Yin, Y. 2012. Carbohydrate Polymers., 88, 663-669.
- [1058] Gao, Y., Gu, W., Chen, L., Xu, Z and Li, Y. 2008. The role of daidzein-loaded sterically stabilized solid lipid nanoparticles in therapy for cardio-vascular diseases. Biomaterials, 29, 4129-4136.
- [1059] Gao, J and Xu, B. 2009. Applications of nanomaterials inside cells. Nano Today, 4, 37-51.
- [1060] Jacob, J.K. and G. Paliyath (2008) Physico-chemical characteristics of nanovesicle-carbohydrate complexes in grape juice, J. Agr. Food Chem., 56, 1305-1315.
- [1061] Lewinski, N., Colvin, V., and Rebekah, D. 2008. Cytotoxicity of nanoparticles. Small., 4, 26-49.
- [1062] Maynard, A. 2006. Nanotechnology: Assessing the risks. Nanotoday, 1, 22-33.
- [1063] Paliyath, G. and J.E. Thompson (1990) Evidence for early changes in membrane structure during post-harvest development of cut carnation flowers, New Phytologist, 114, 555-562
- [1064] Ramasamy, T., Kandasamy, U, Hinabindhu, R and K. Kiran. (2009). Nanocochleate- a new drug delivery system, FABAD J. Pharm. Sci., 34, 91-101.
- [1065] Sessa, M., R. Tsao, R. Liu, G. Ferrari, and F. Donsi. (2011) Evaluation of the stability and antioxidant activity of nanoencapsulated resveratrol during in vitro digestion, J. Agr. Food Chem., 59, 12352-12360.
- [1066] Yao, K., G. Paliyath, R.W. Humphrey, F.R. Hallet and J.E. Thompson (1991) Identification and characterization of non-sedimentable lipid-protein microvesicles enriched in phospholipid degradation products, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 88, 2269-2273
- [1067] Yao, K., G. Paliyath and J.E Thompson (1991) Non-sedimentable microvesicles from senescing bean cotyledons contain gel phase-forming phospholipid degradation products, Plant Physiol., 97, 502-508.
- [1068] Zhang, N., Ping, Q., Huang, G., Xu, W., Cheng, Y., and Han, X. 2006. Lectin-modified solid lipid nanoparticles as carriers for oral administration of insulin. Internat. J. Pharmaceut., 327, 153-159.
- [1069] Zhang, H. Y., Tehrany E.A., Kahn, C.J.F., Poncot, M, Linder M and F, Cleymand. 2012. Effects of nanoliposomes based on soya, rapeseed and fish lecithin on chitosan thin films designed for tissue engineering. Carb. Polymers., 88, 618-627.

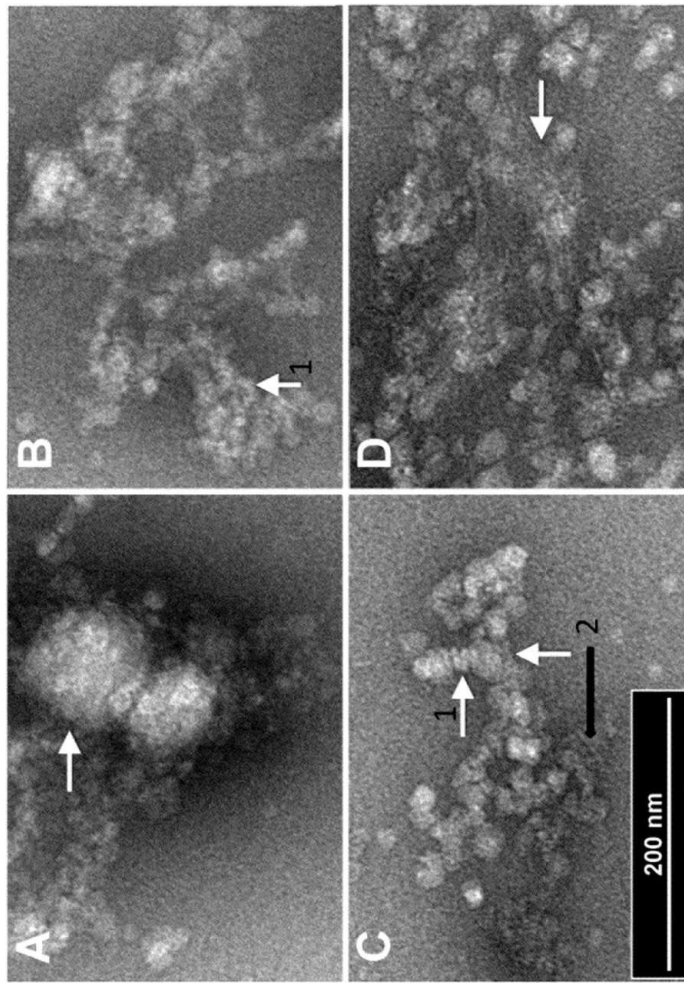
- [1070] Zhao, N., Bagaria, H.G., Wong, M.S. and Zu, Y. 2011. A nanocomplex that is both tumour cell selective and cancer gene specific for anaplastic large cell lymphoma. J. Nanobiotechnol., 9, 2-14.
- [1071] Zheng, D., Gilijohann, A, Chen, D.L., Massich, M.D., Wang, X-Q., Lordanov, H., Mirkin, C.A. and Paller, A.S. 2012. Topical delivery of siRNA based spherical nucleic acid nanoparticle conjugates for gene regulation. Proc. Natl. Acad. Scii.(USA), 109, 11975-11980.
- [1072] J. Correa-Betanzo a, E. Allen-Vercoe b, J. McDonald b, K. Schroeter b, M. Corredig a, G. Paliyath (2014) Stability and biological activity of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) polyphenols during simulated in vitro gastrointestinal digestion. Food Chemistry 165 (2014) 522-531;
- [1073] Julieta Correa-Betanzo, Priya Padmanabhan,, Milena Corredig, Jayasankar Subramanian, and Gopinadhan Paliyath (2015) Complex Formation of Blueberry (*Vaccinium angustifolium*) anthocyanins during Freeze-Drying and Its Influence on Their Biological Activity. J. Agric. Food Chem. 2015, 63, 2935-2946).
- [1074] 본 명세서 및 명세서의 다른 곳에서 인용된 모든 참고 문헌은 그 전체가 본 명세서에 참고로 포함된다.

도면

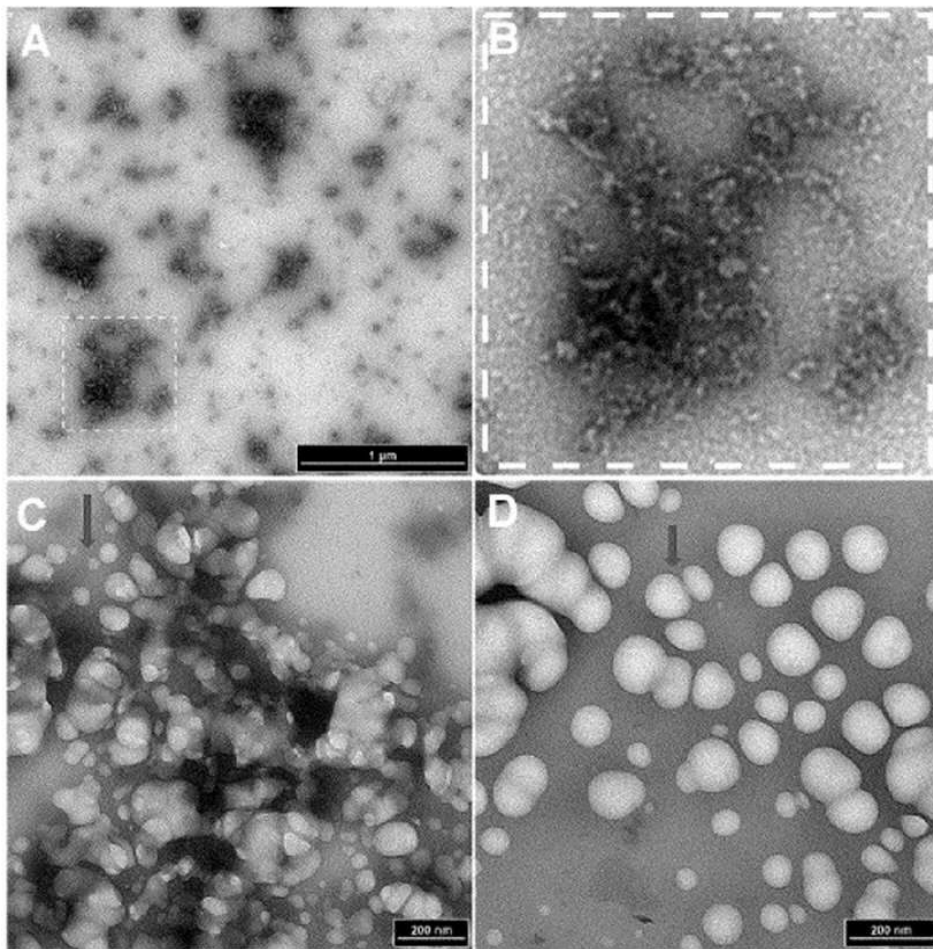
도면1



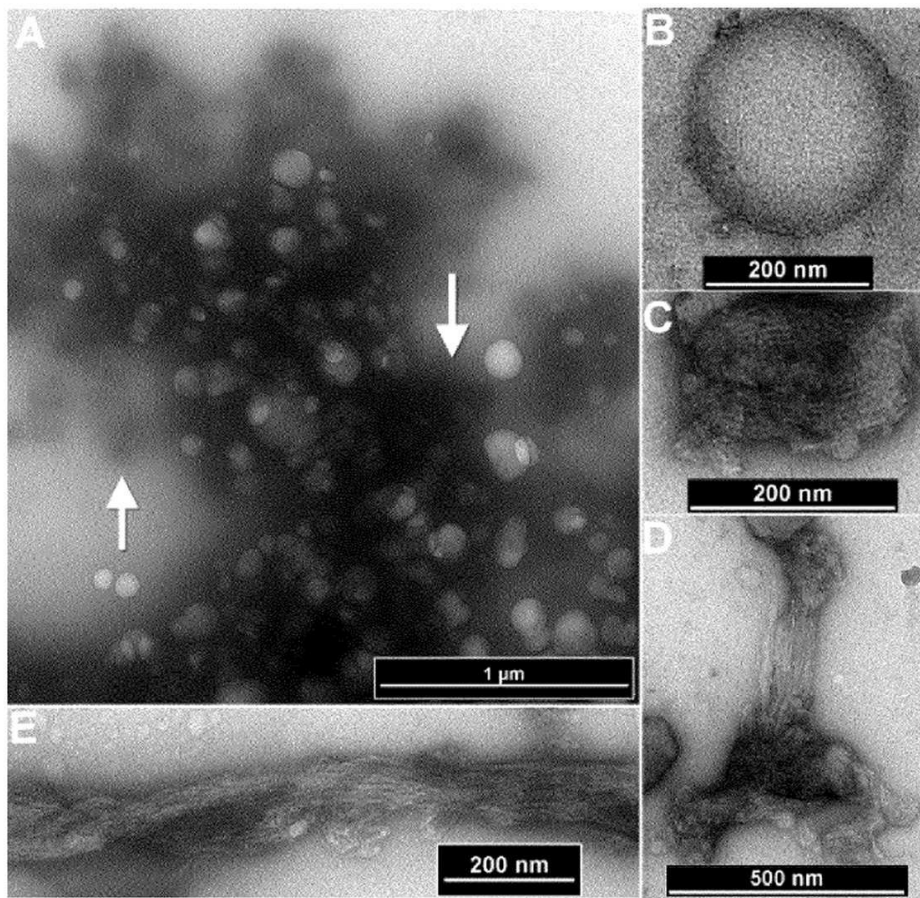
도면2



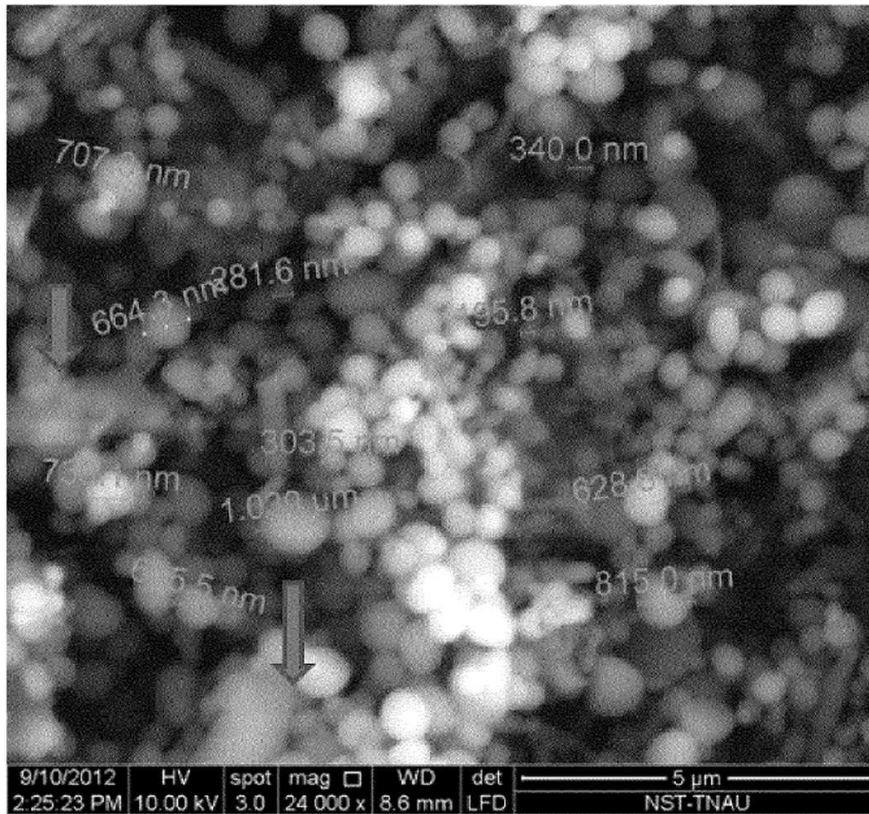
도면3



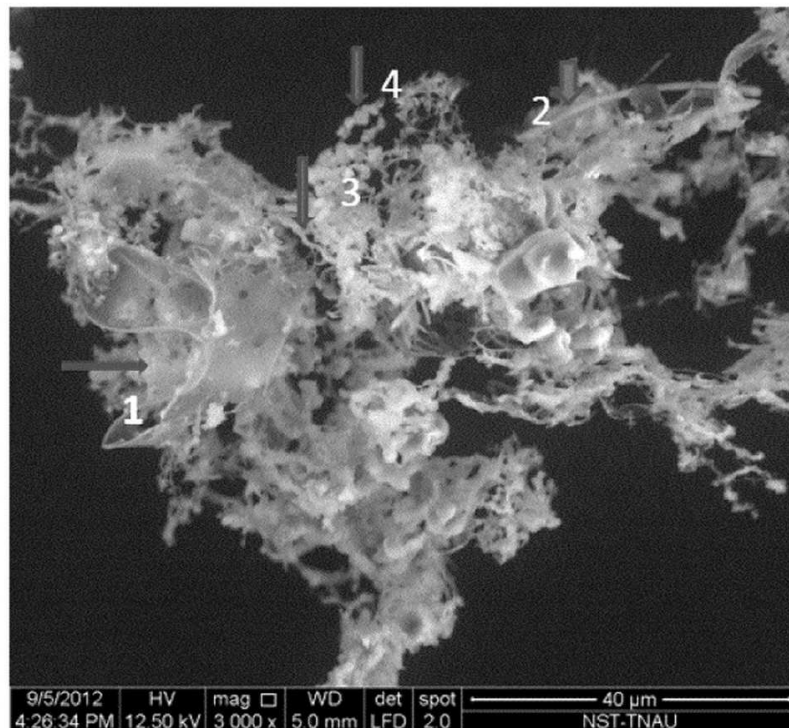
도면4



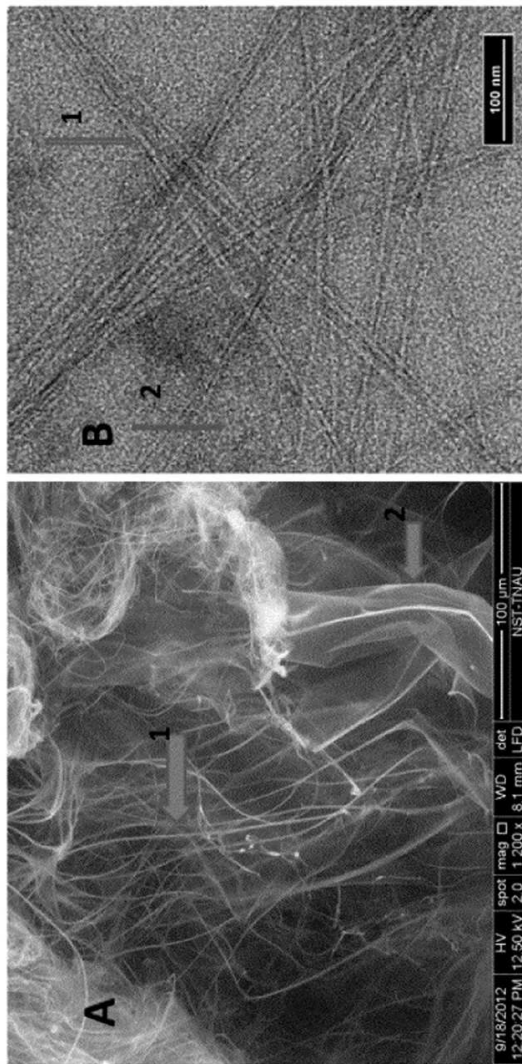
도면5



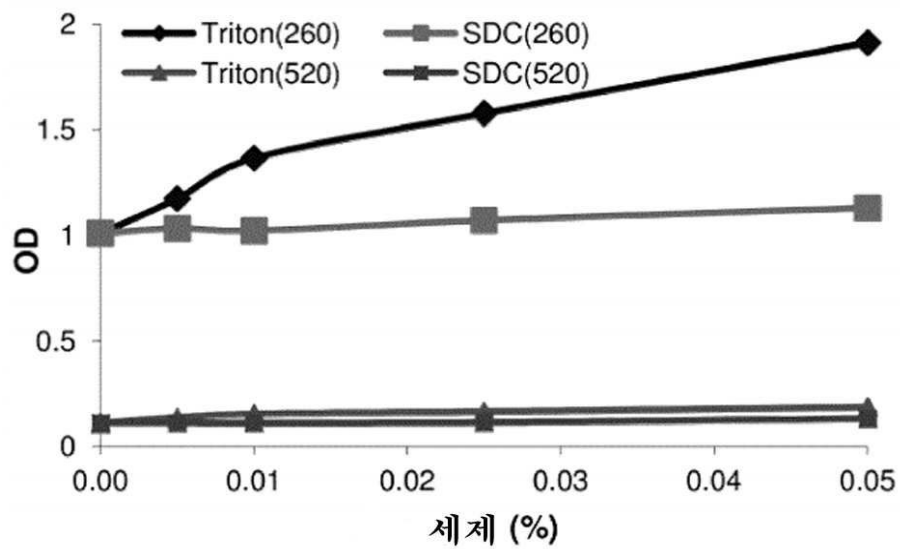
도면6



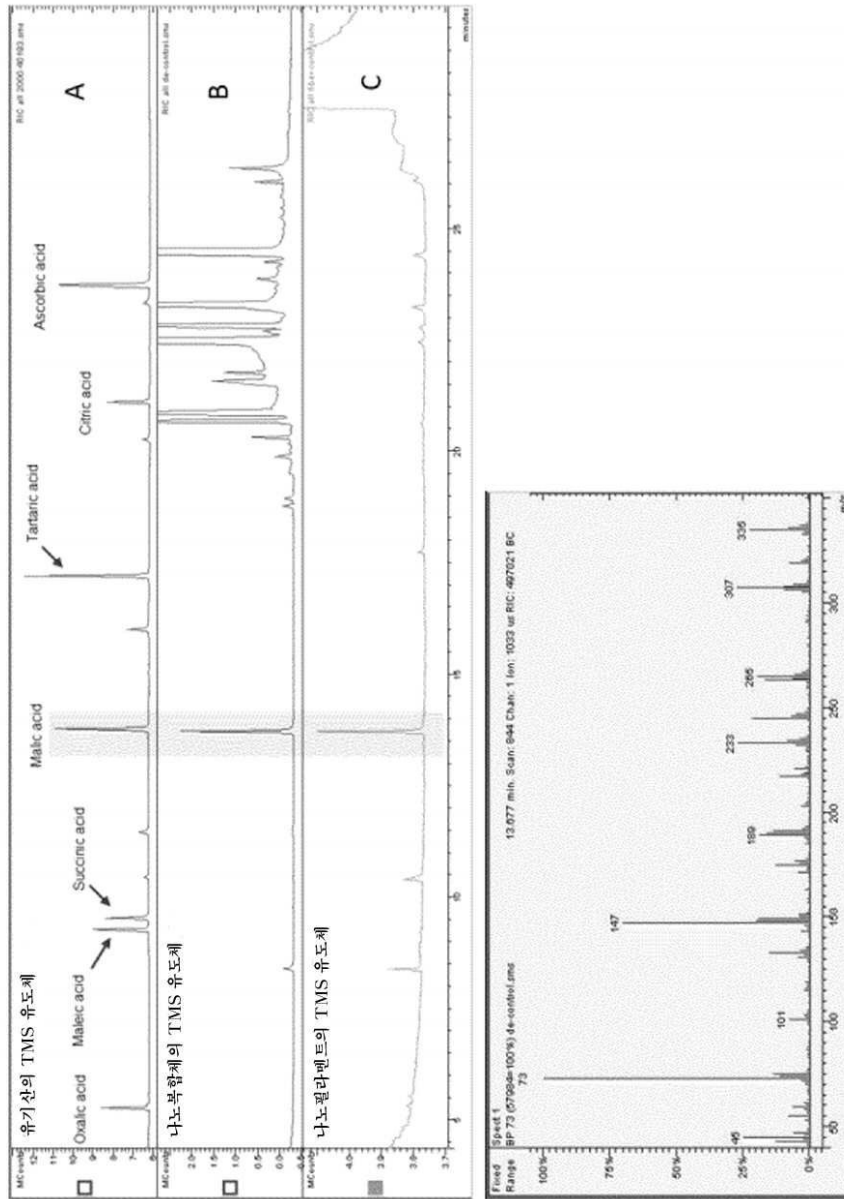
도면7



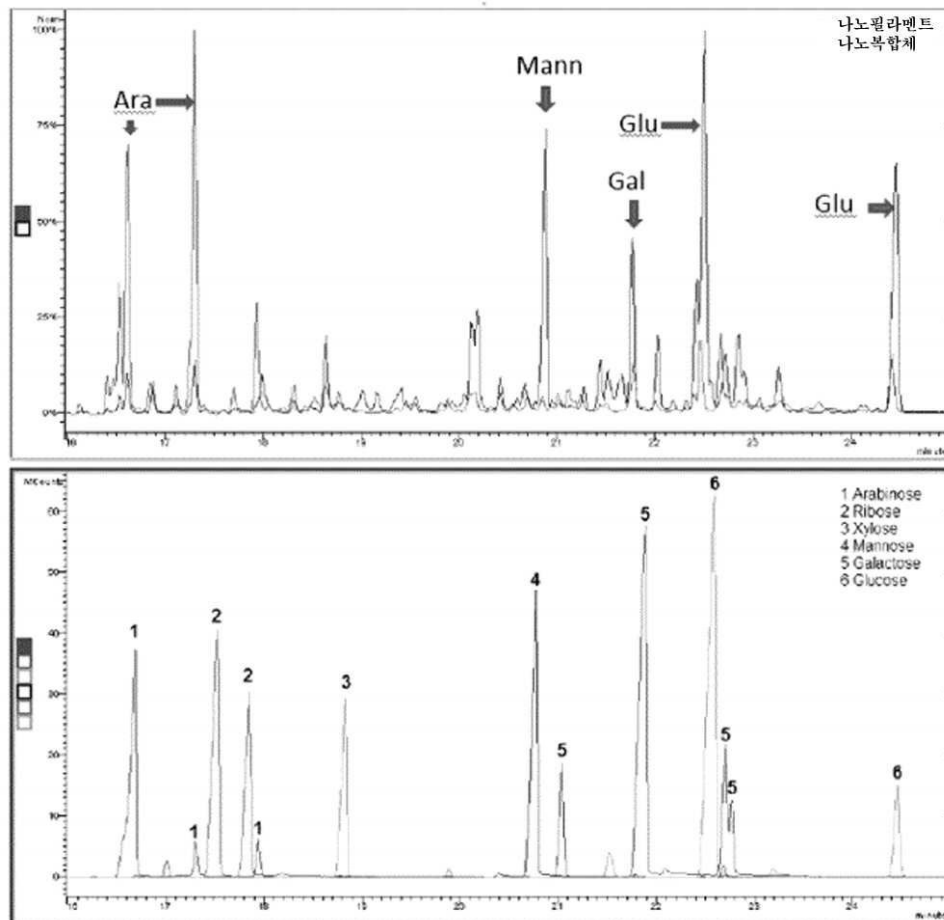
도면8



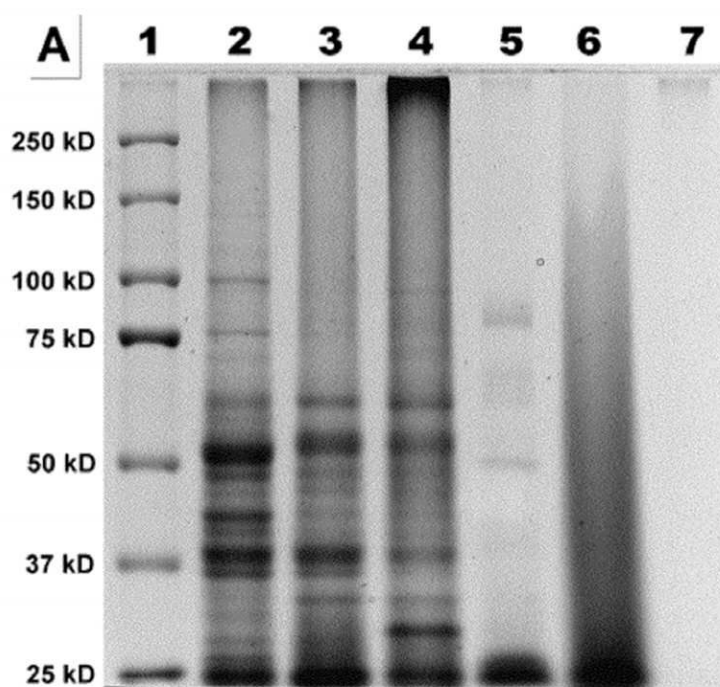
도면9



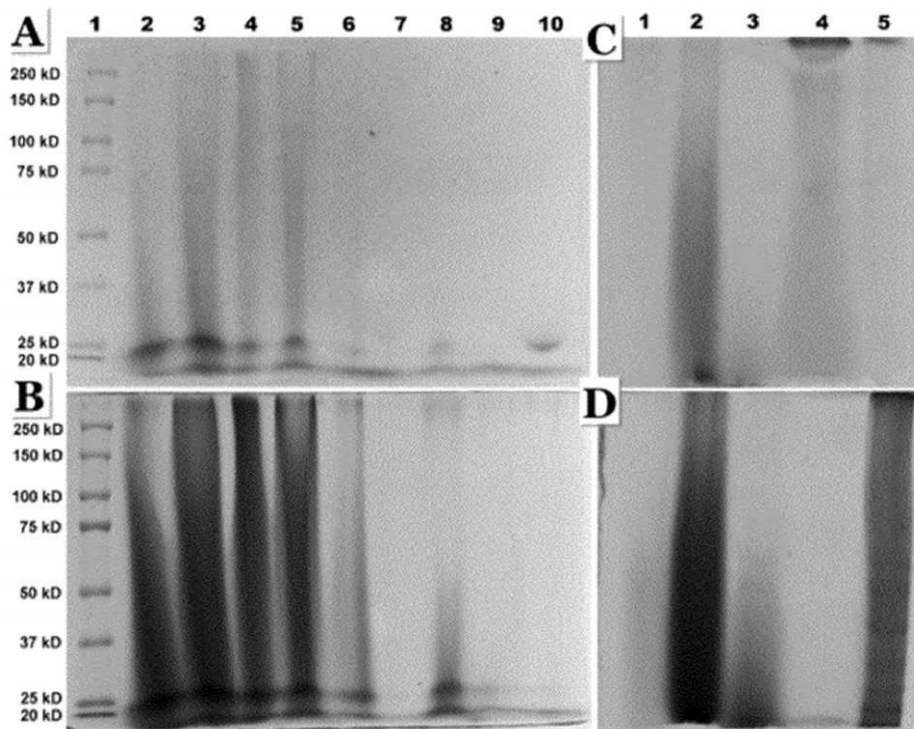
도면10



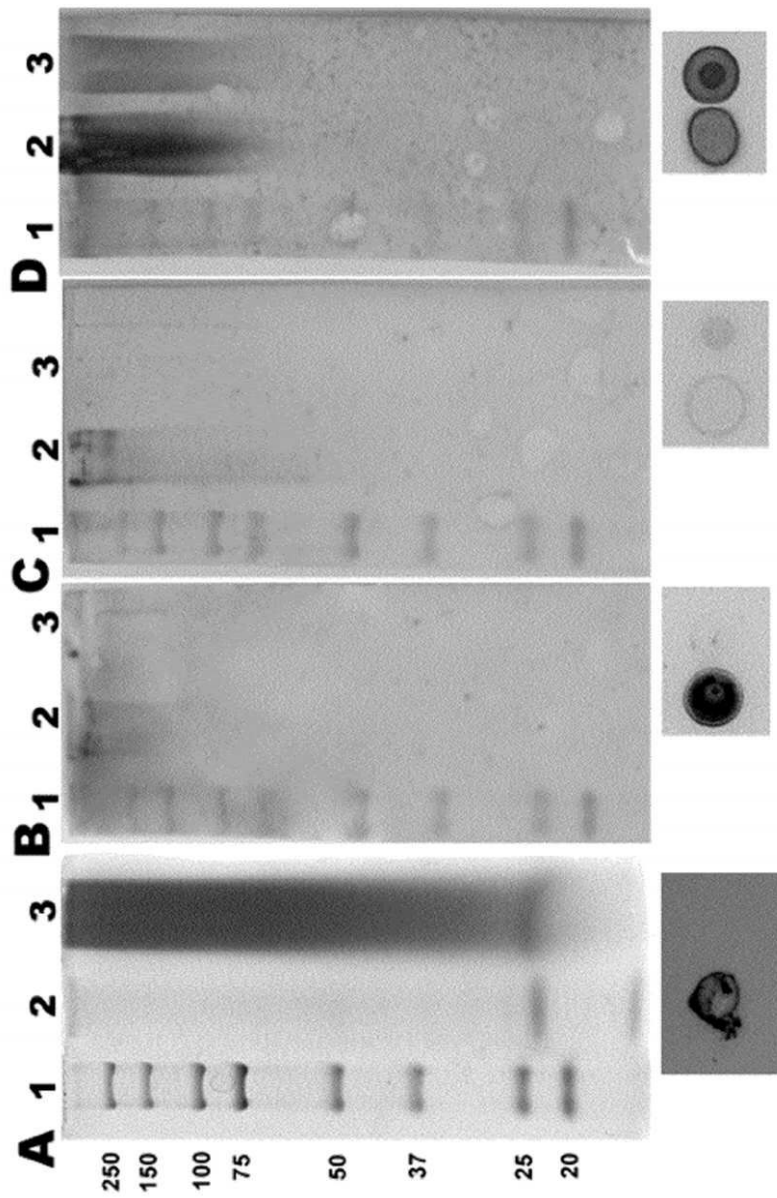
도면11



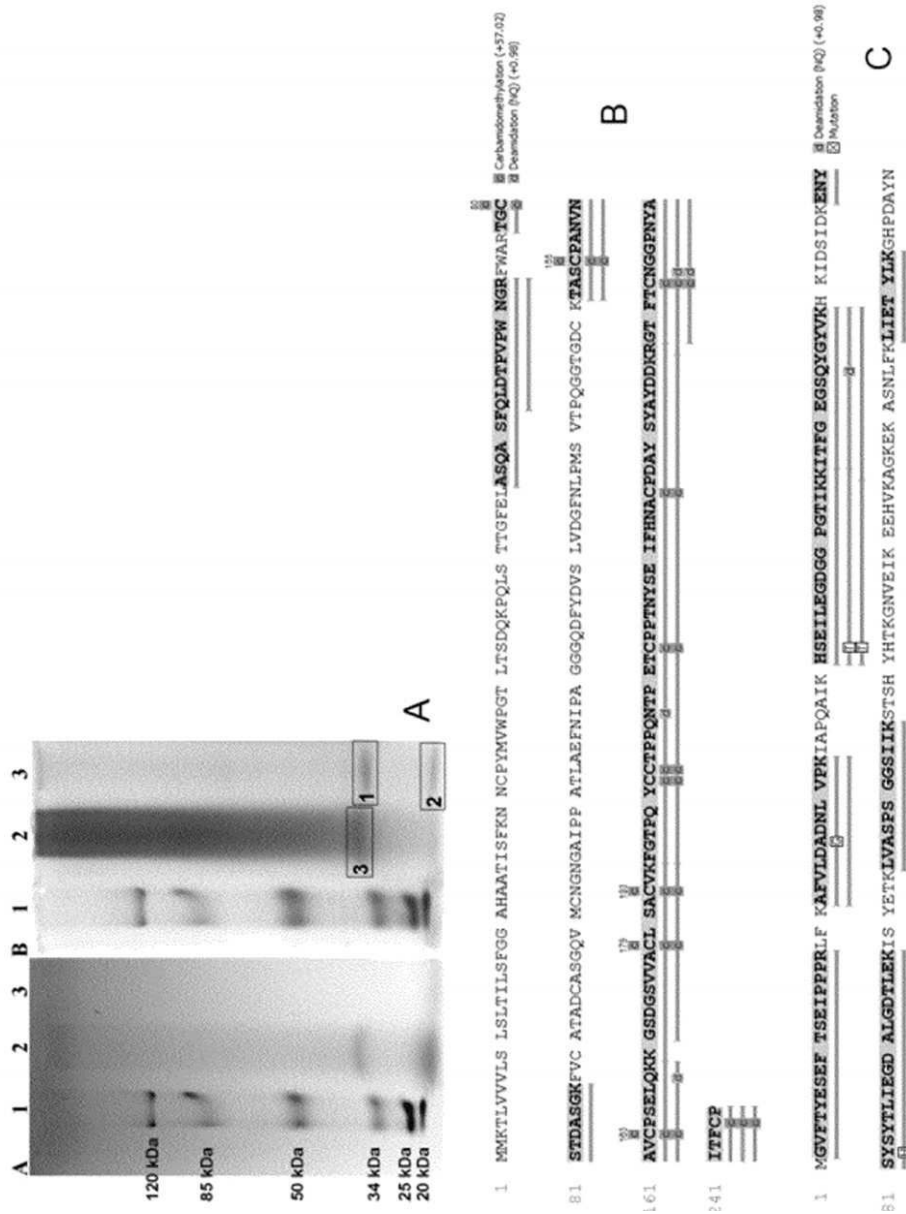
도면12



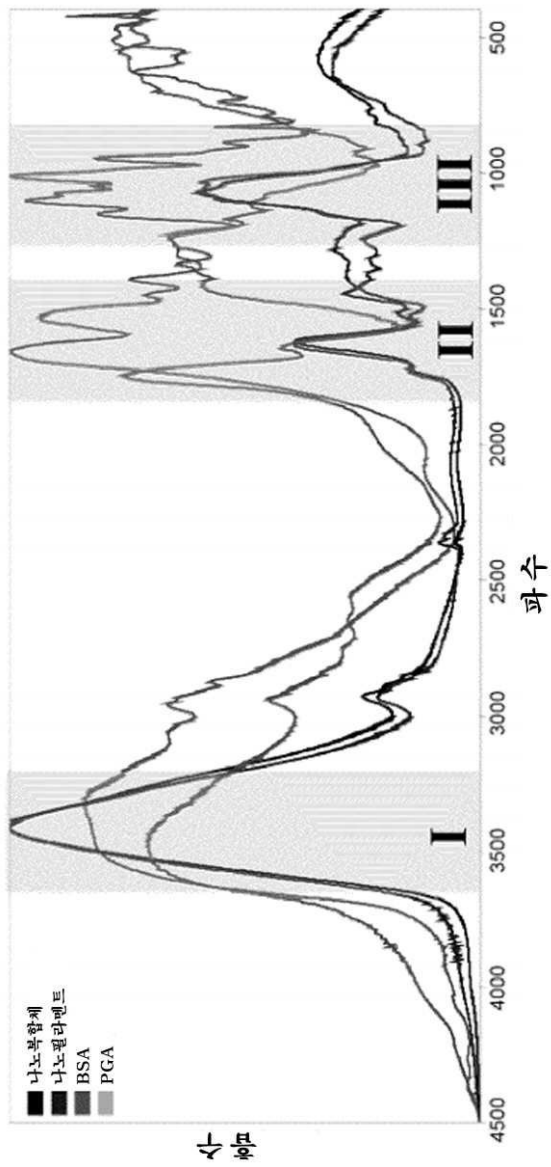
도면13



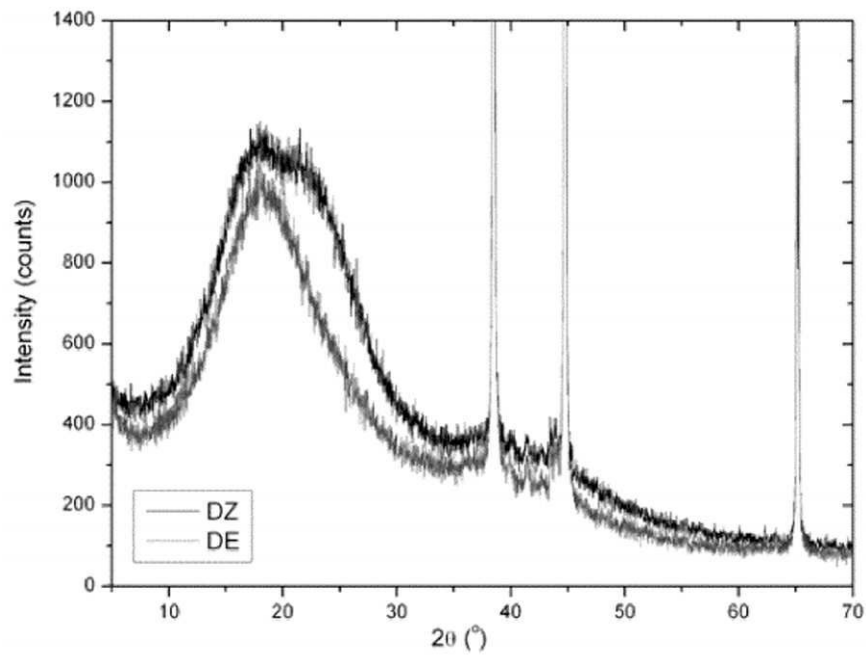
도면14



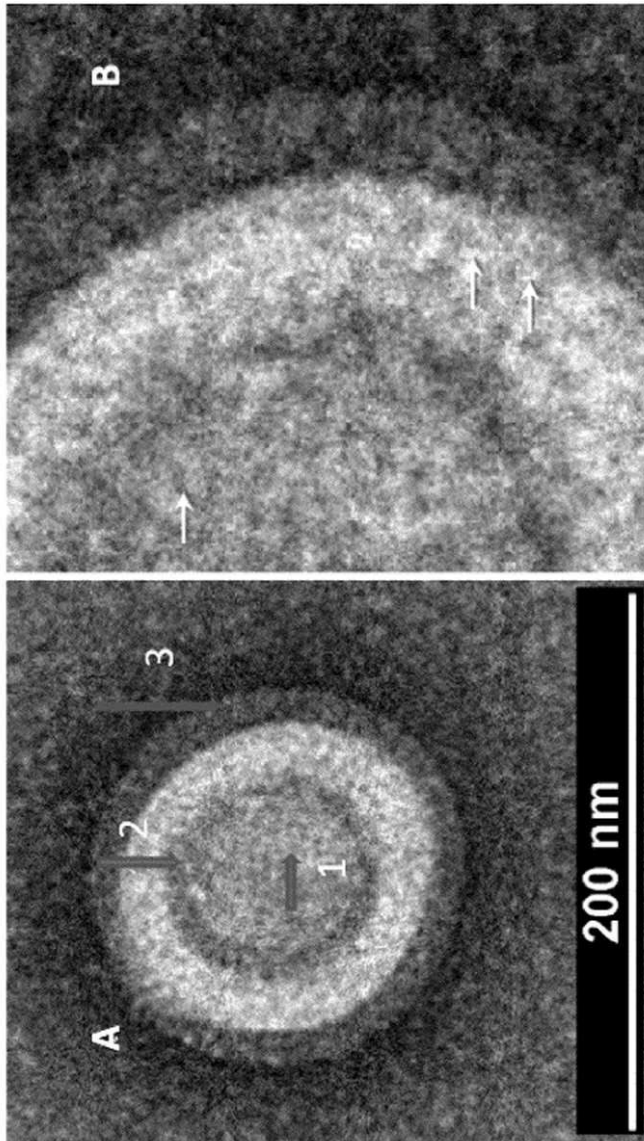
도면15



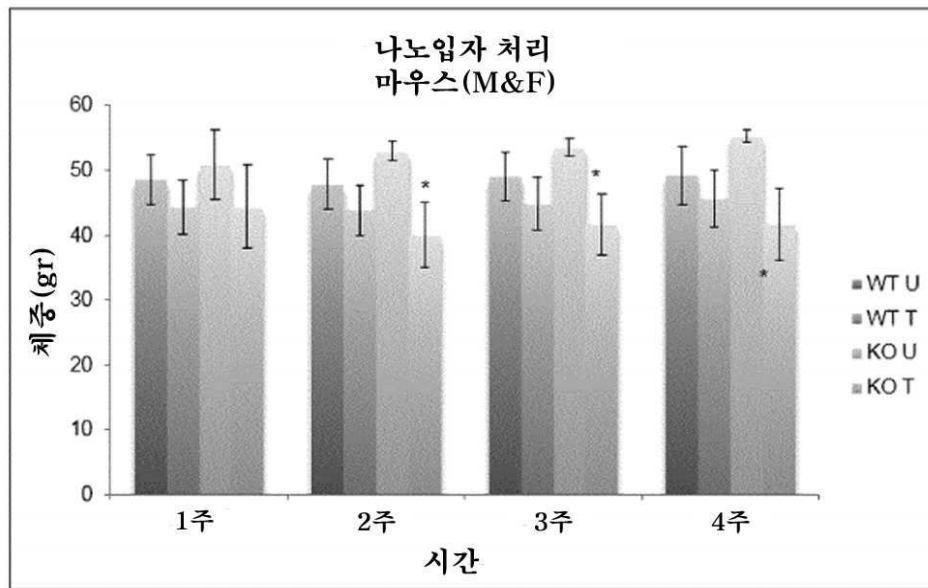
도면16



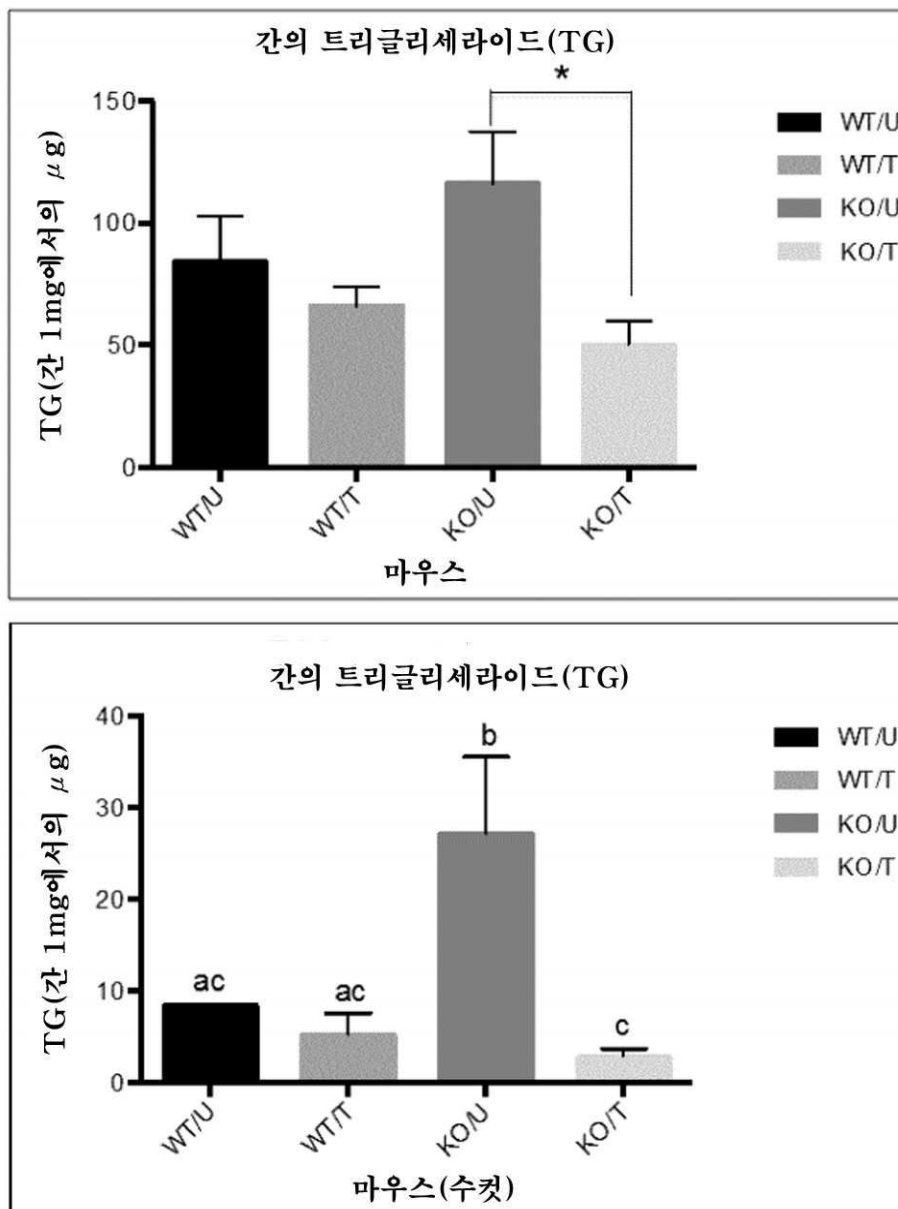
도면17



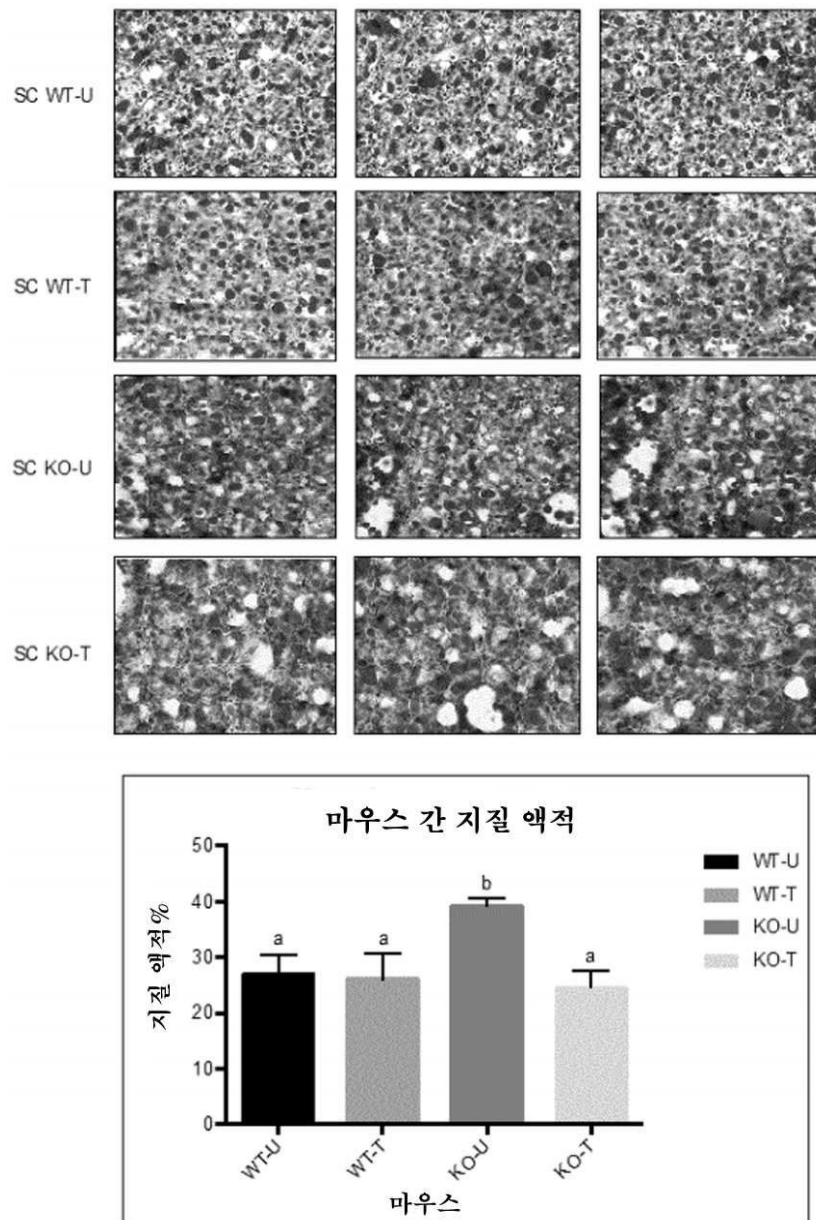
도면18



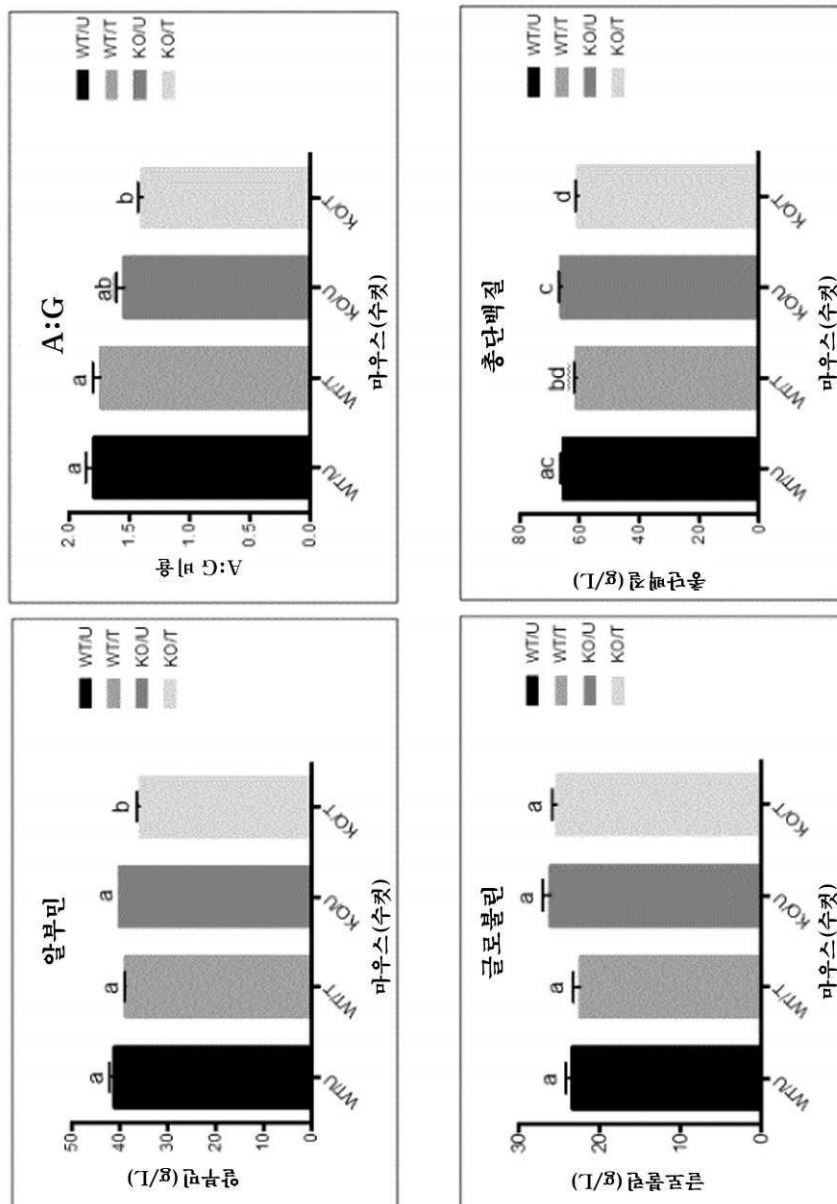
도면19



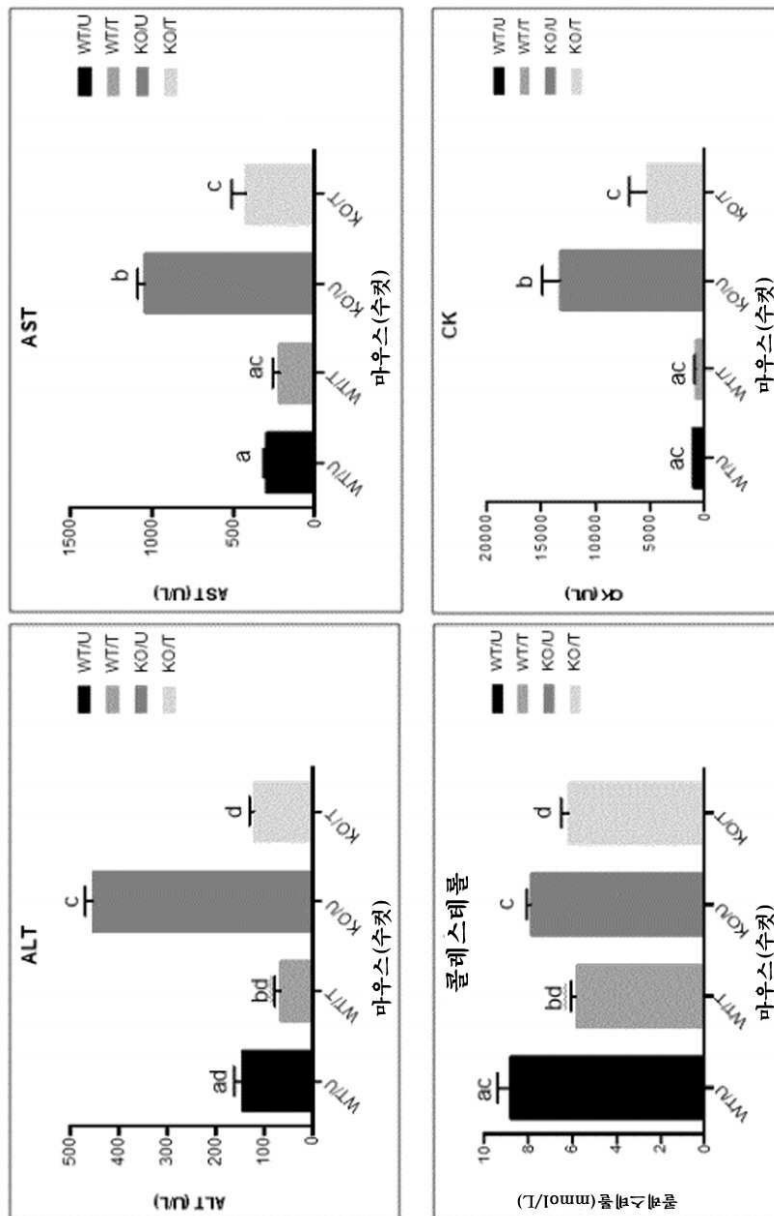
도면20



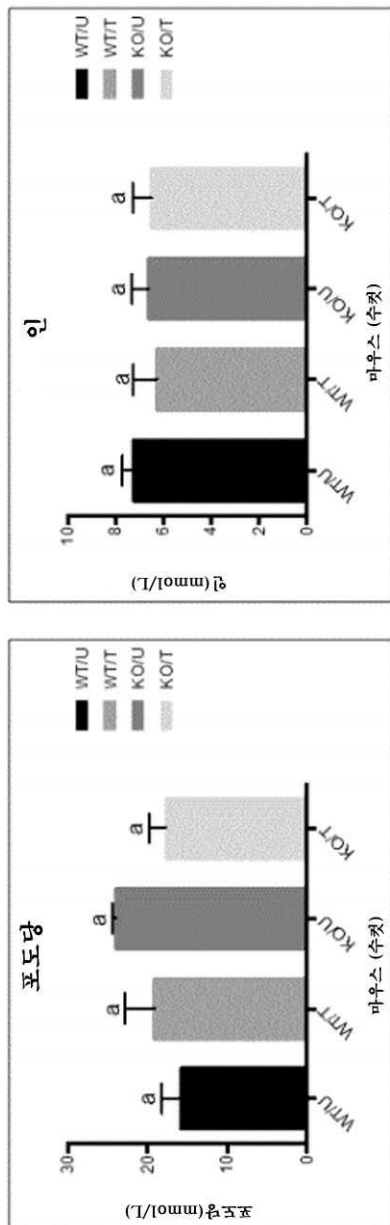
도면21



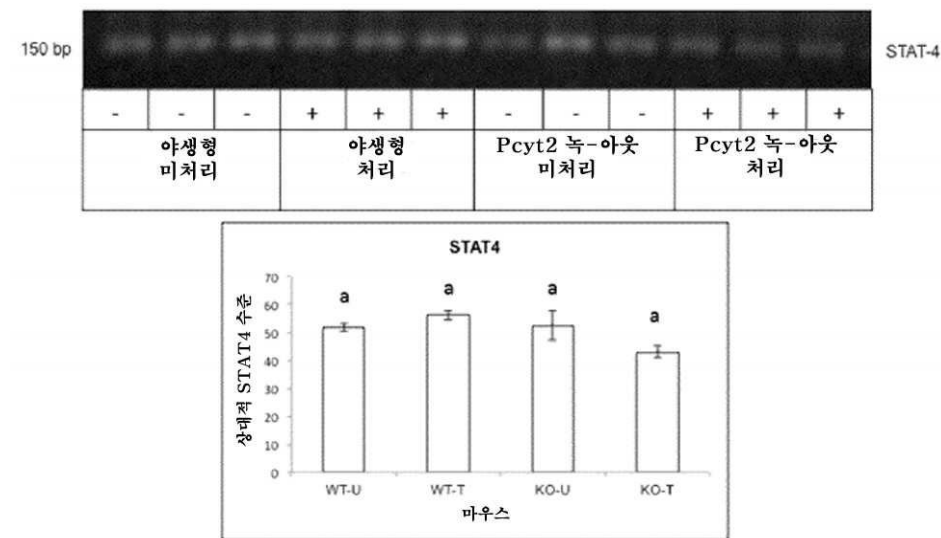
도면22



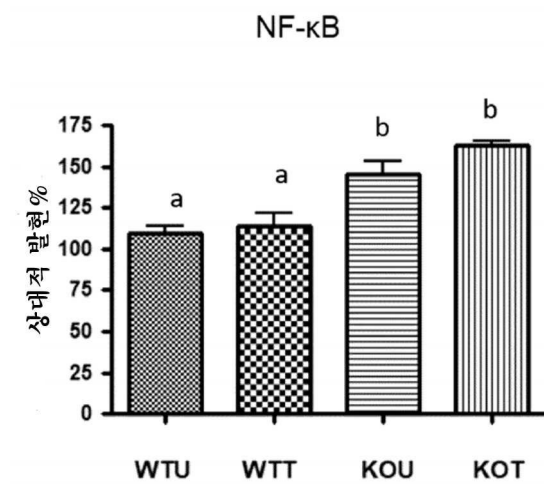
도면23



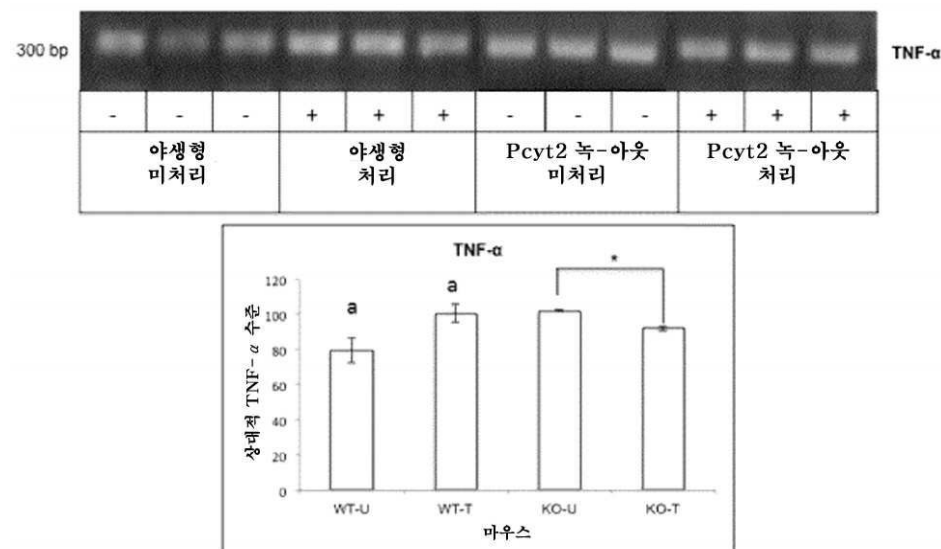
도면24



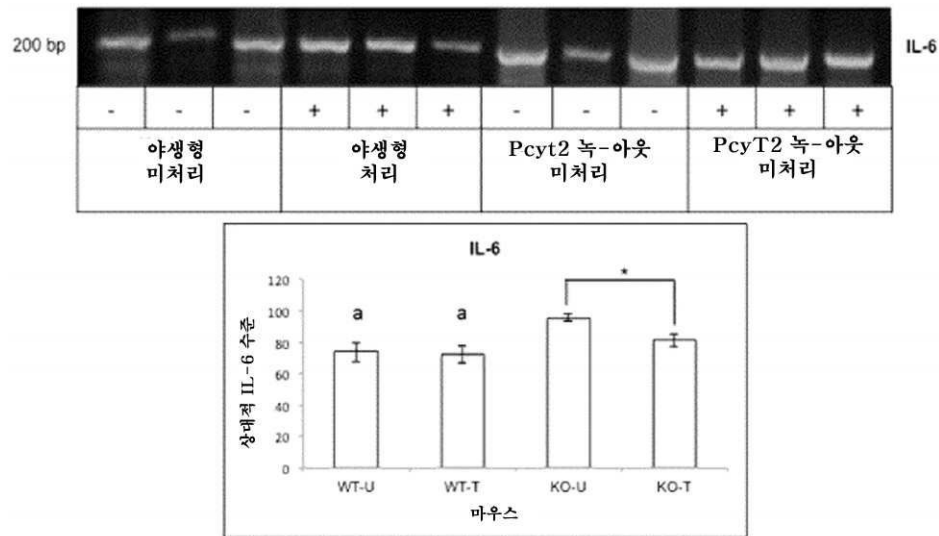
도면25



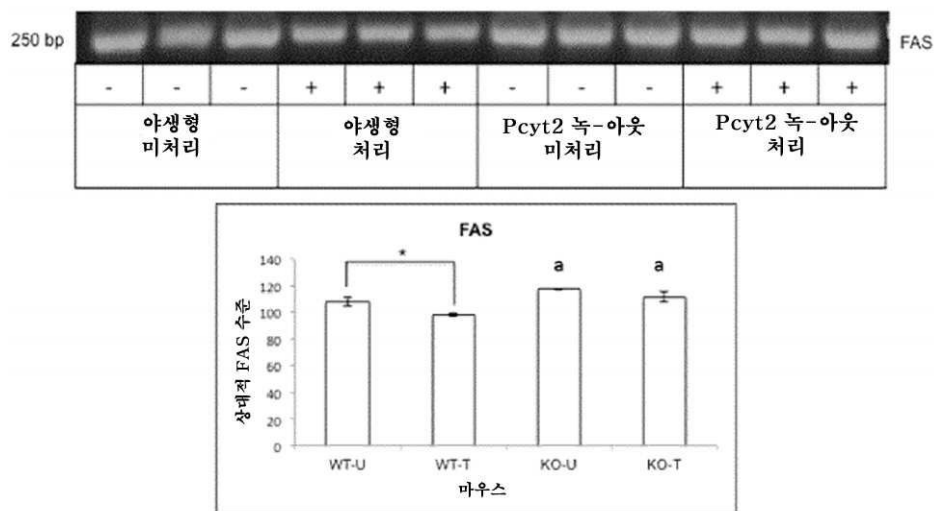
도면26



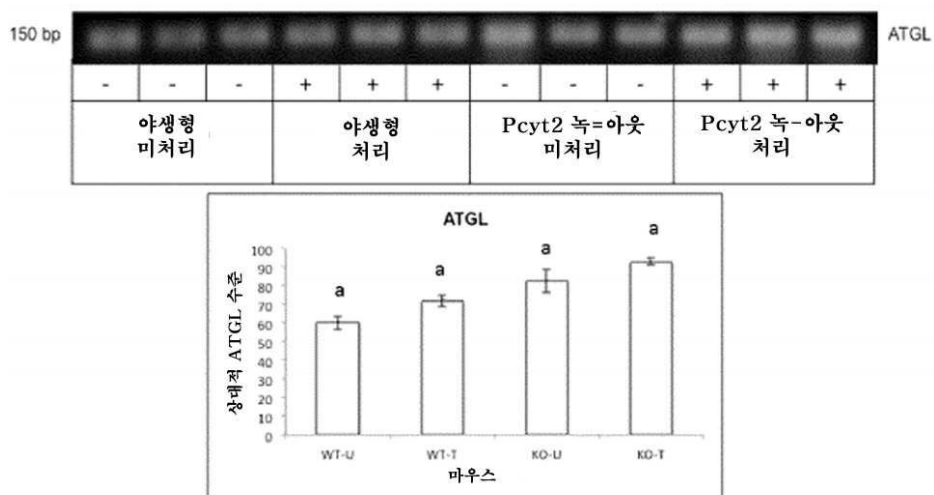
도면27



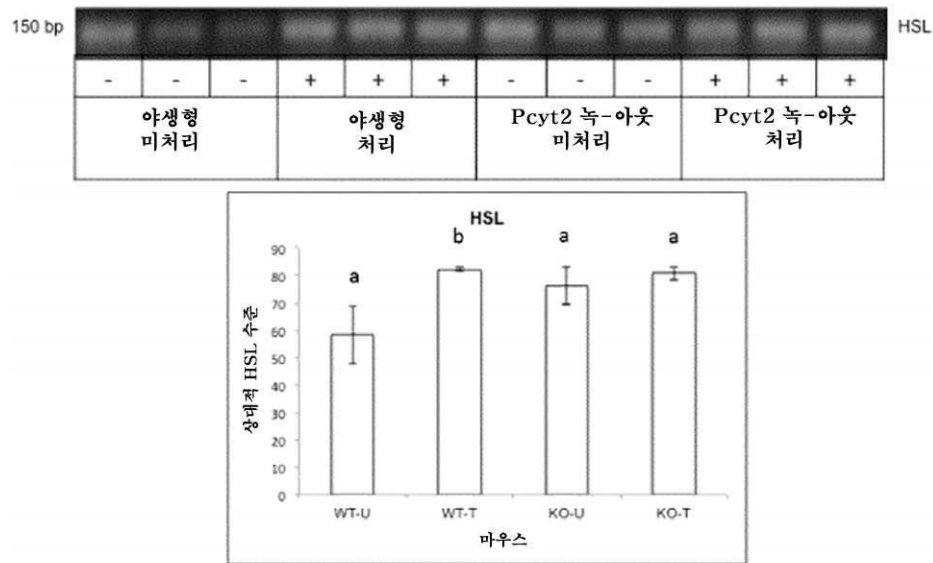
도면28



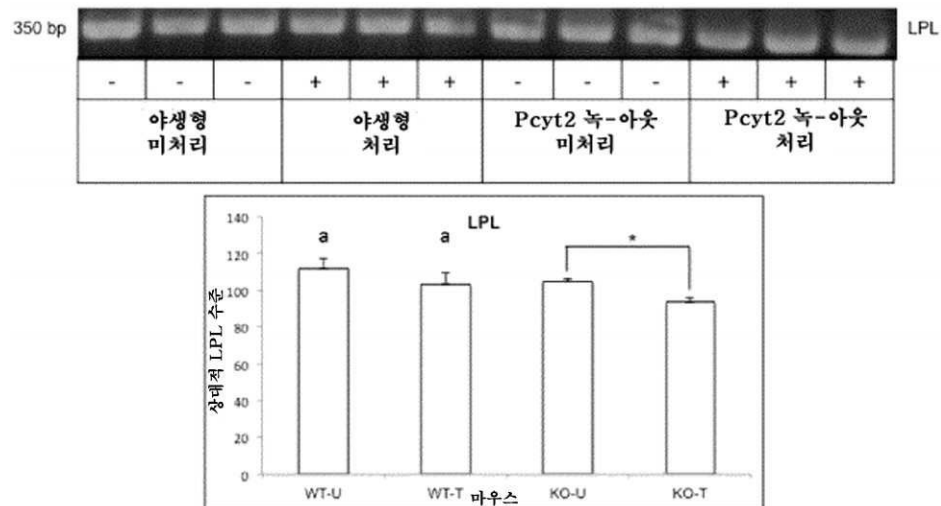
도면29



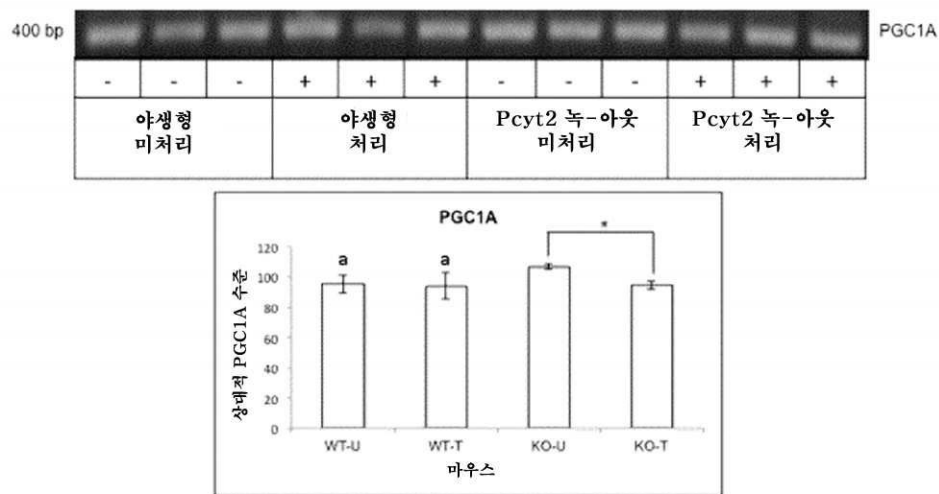
도면30



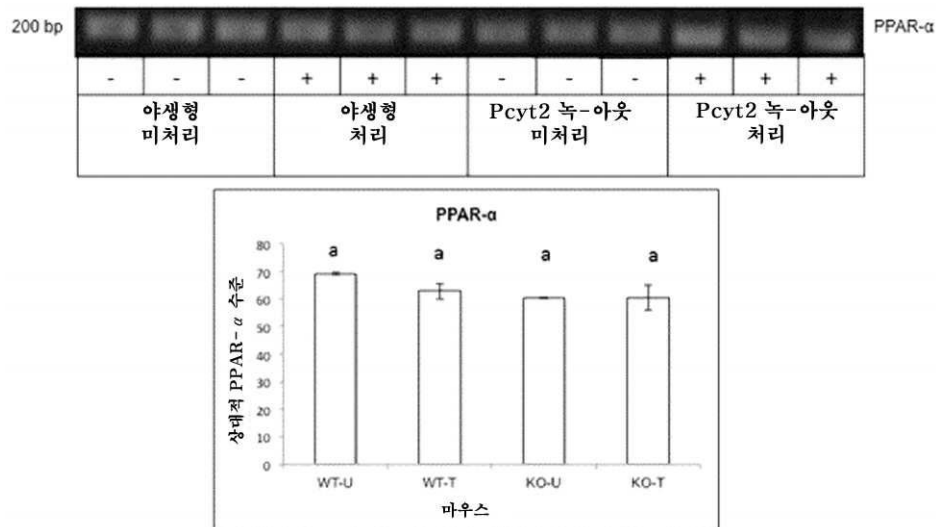
도면31



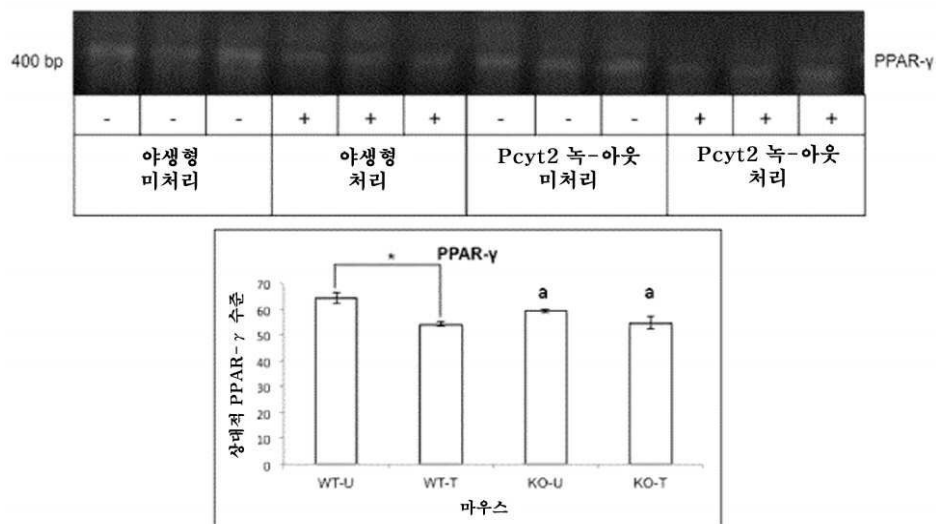
도면32



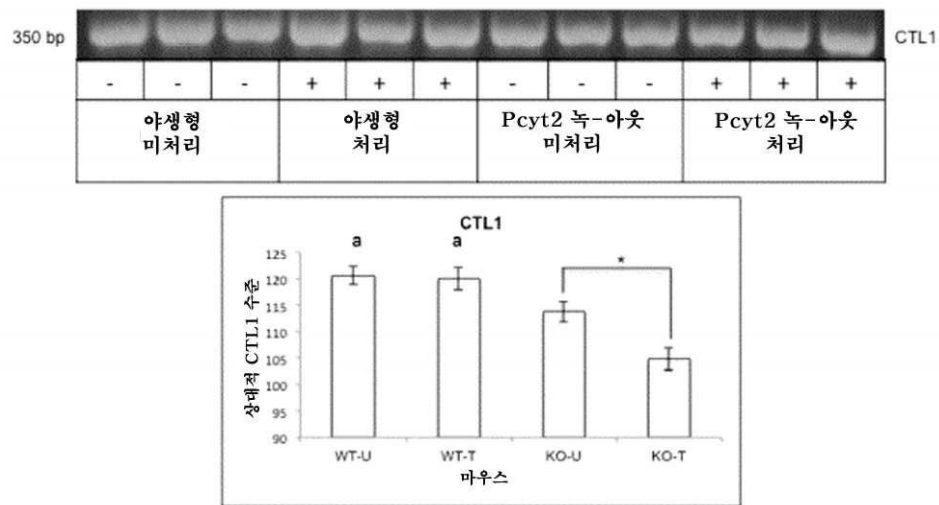
도면33



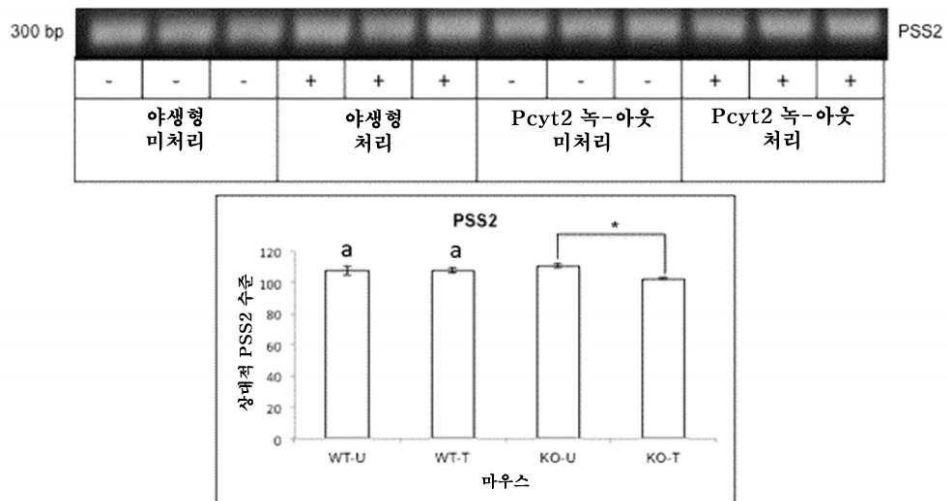
도면34



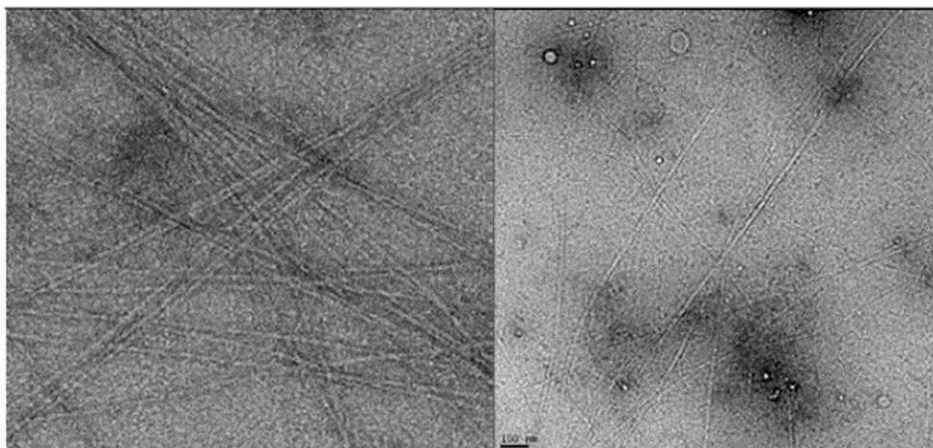
도면35



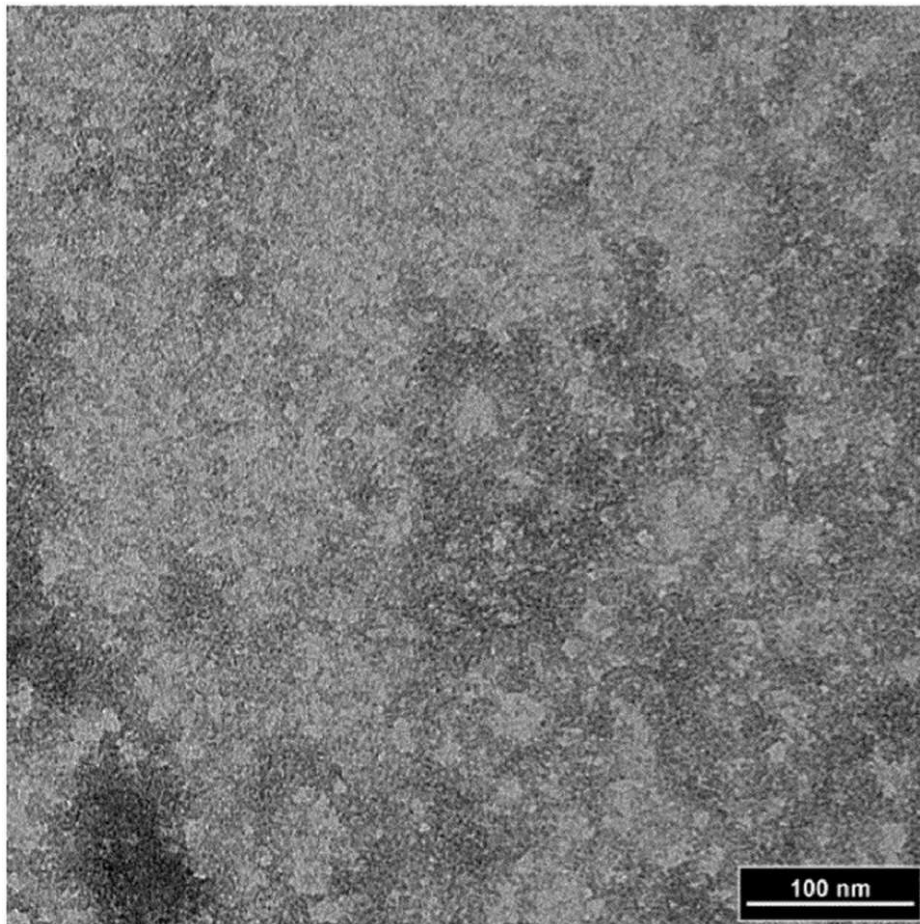
도면36



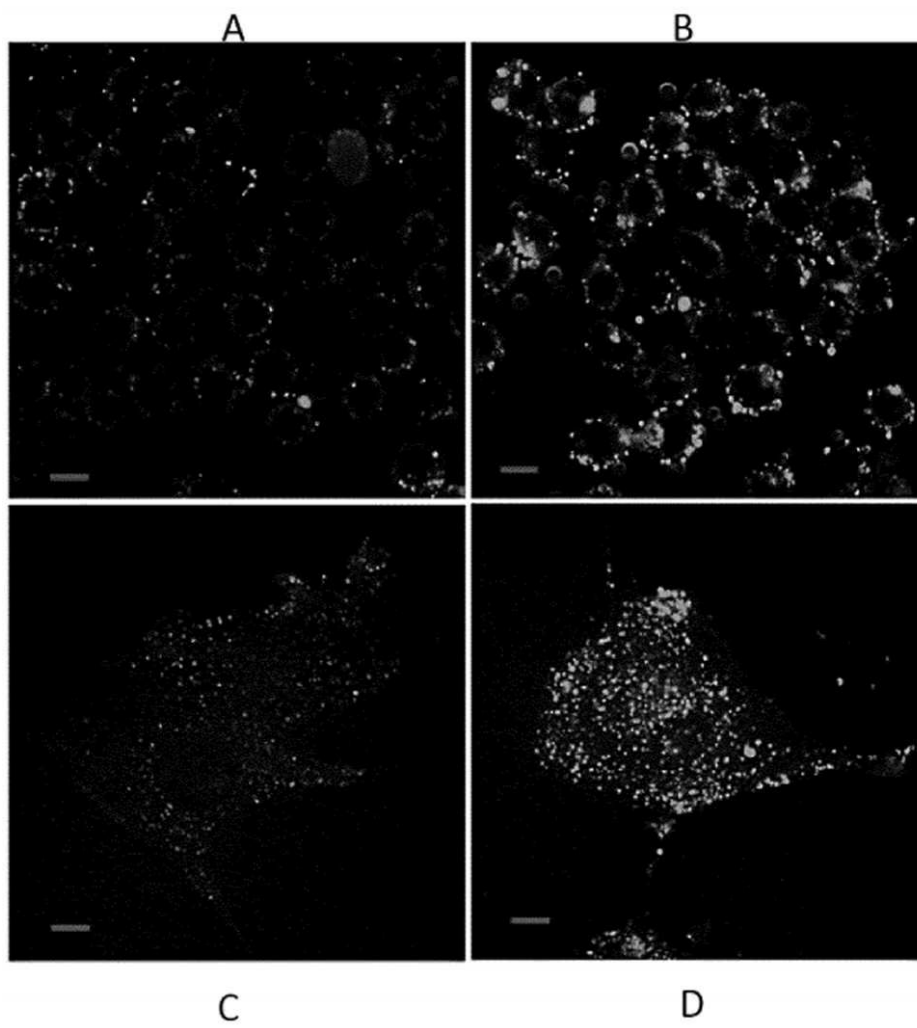
도면37



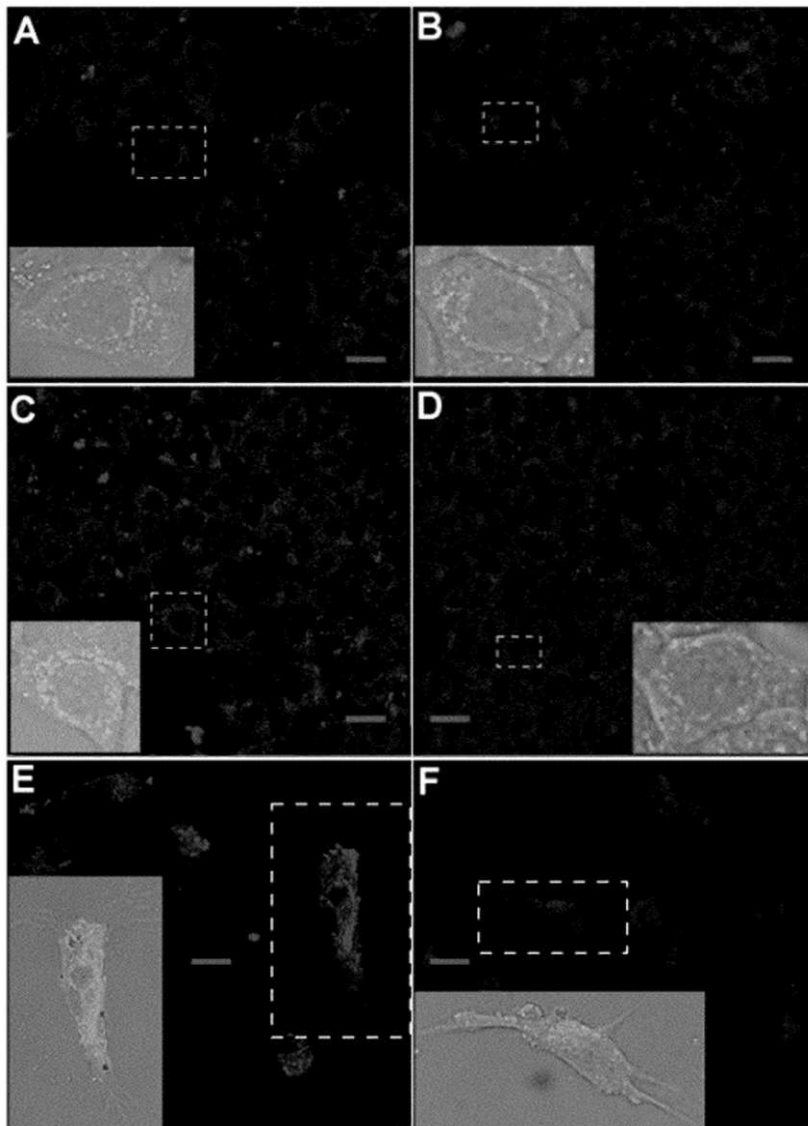
도면38



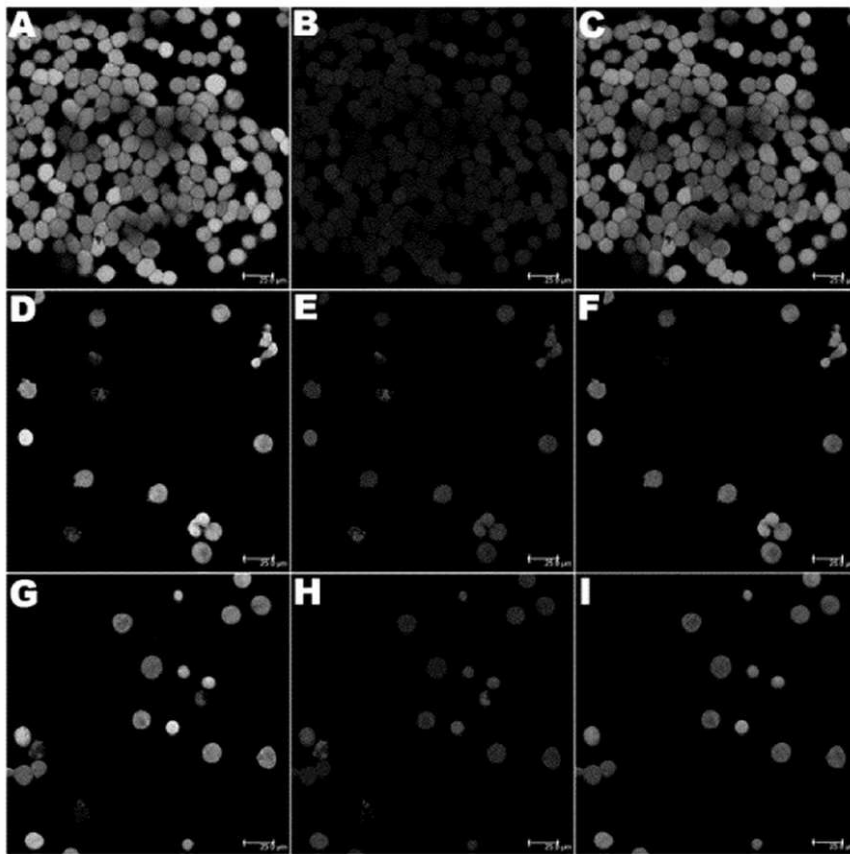
도면39



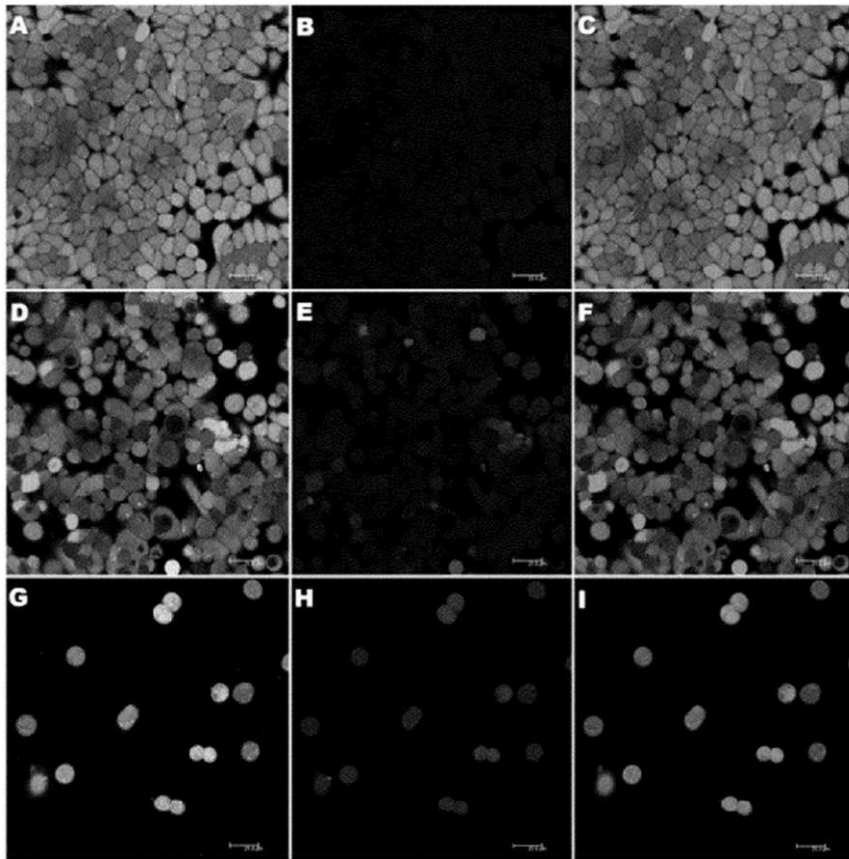
도면40



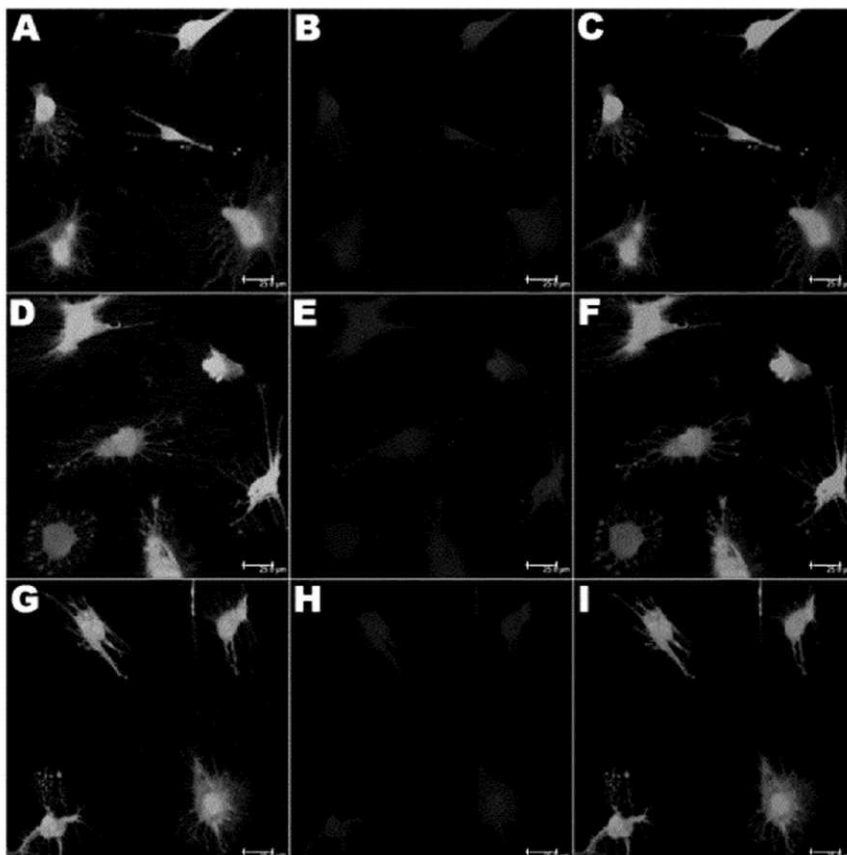
도면41



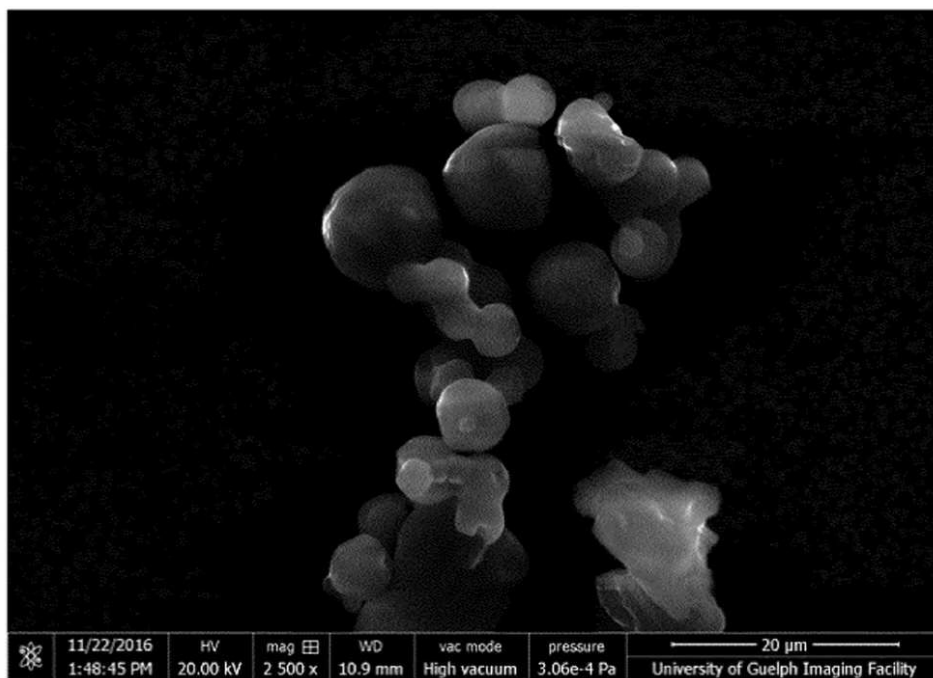
도면42



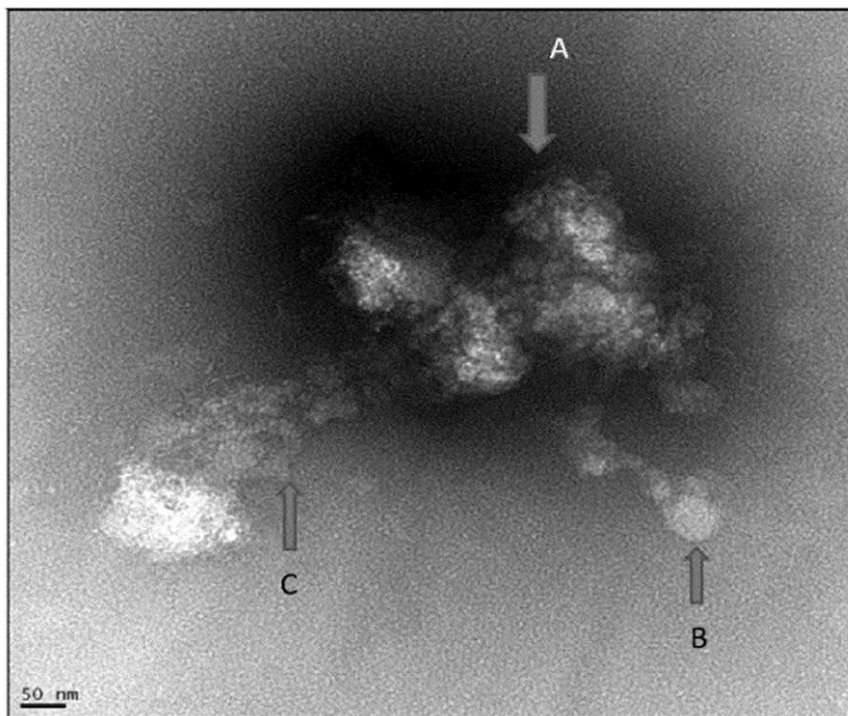
도면43



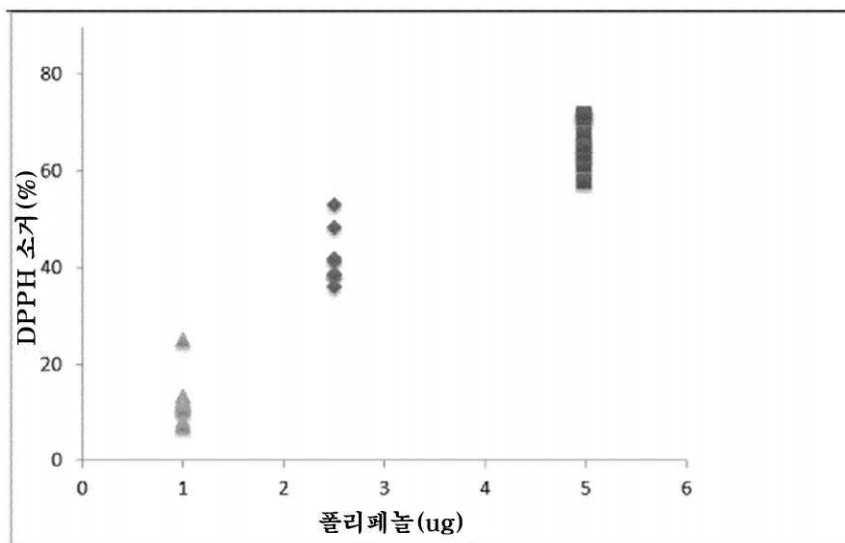
도면44



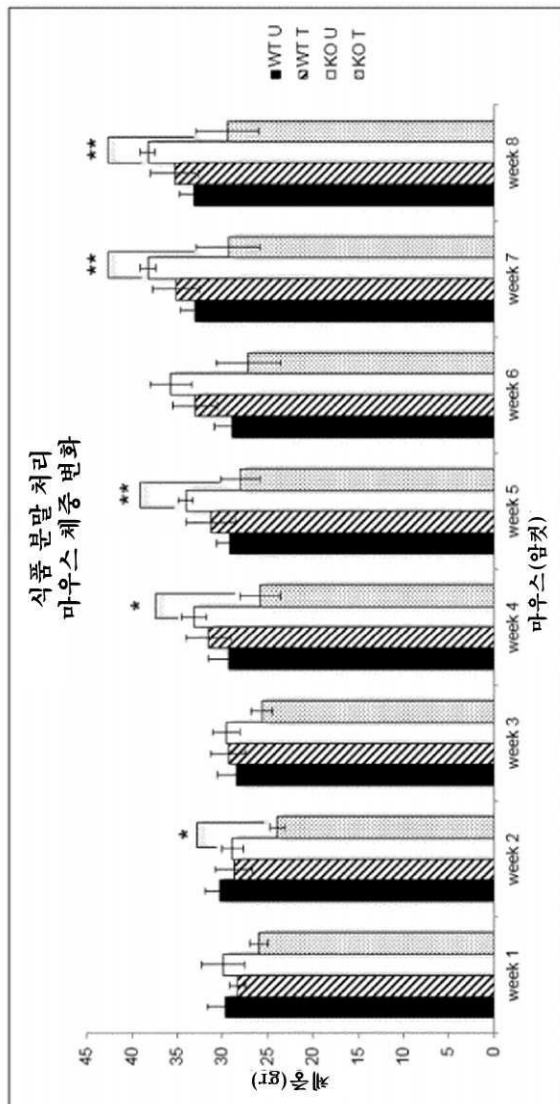
도면45



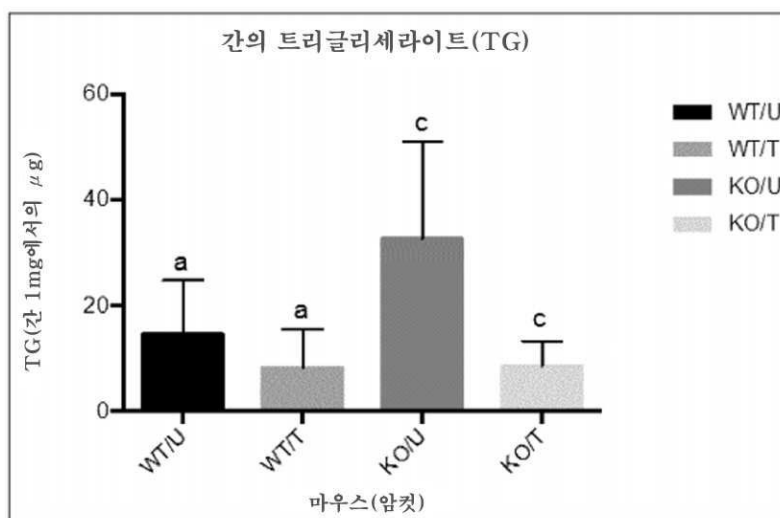
도면46



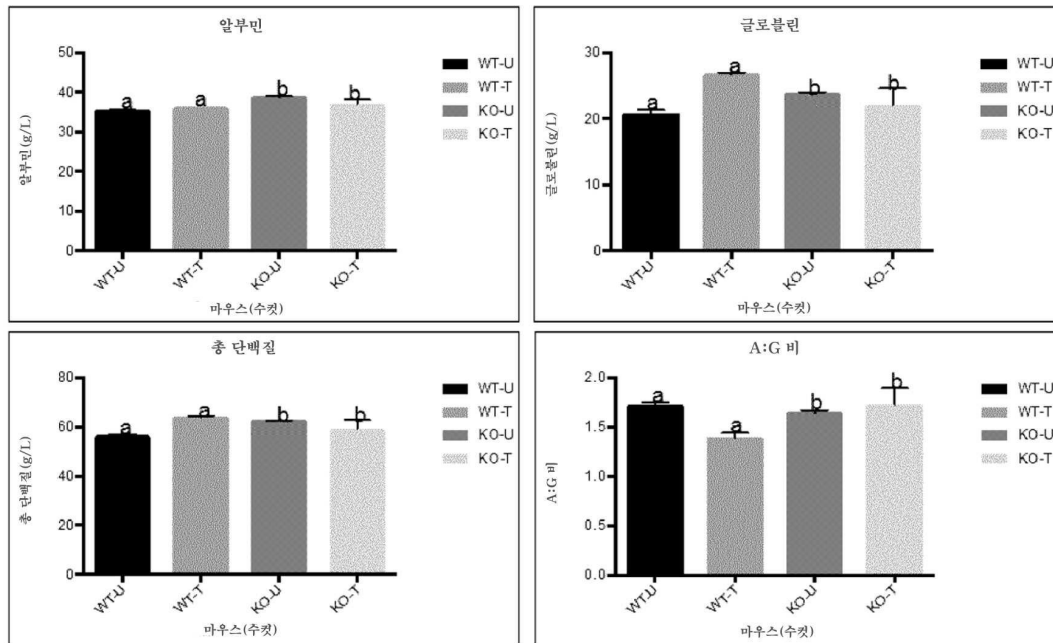
도면47



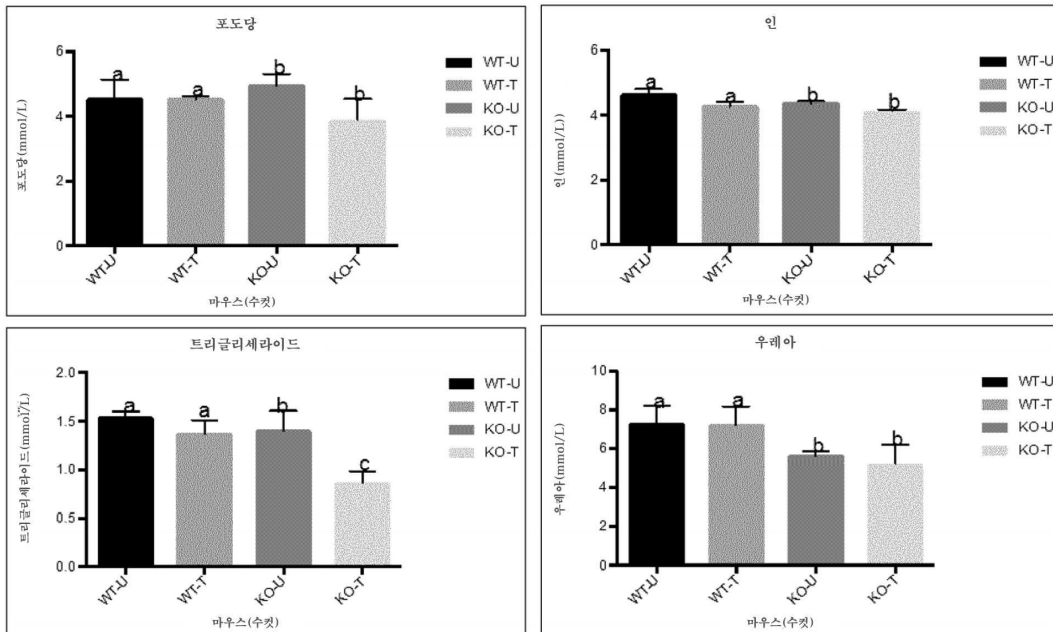
도면48



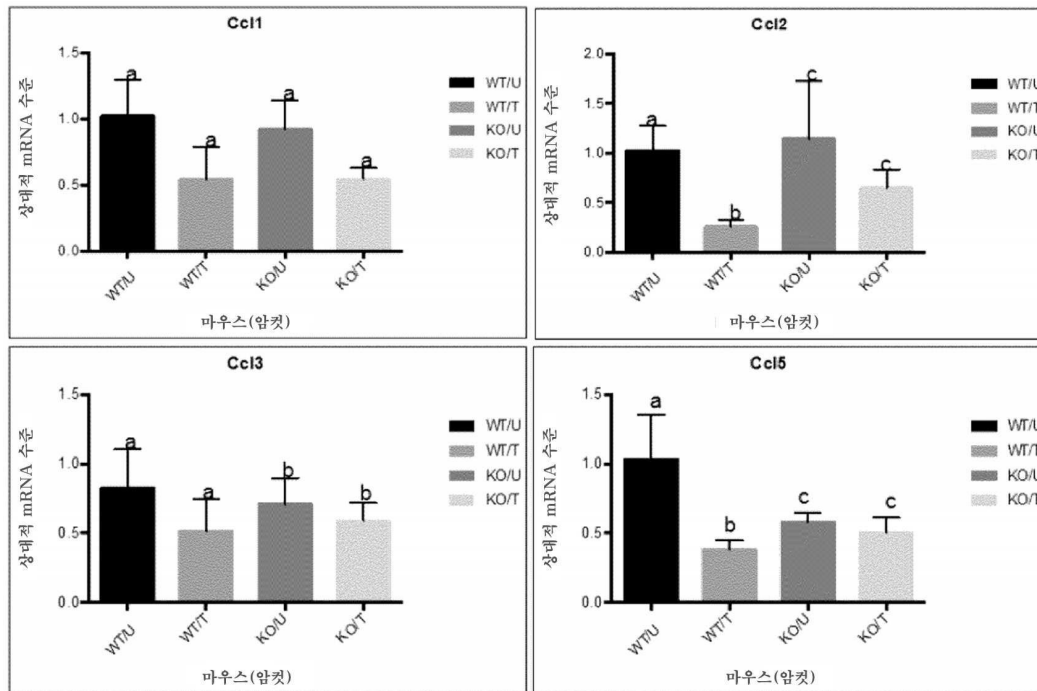
도면49



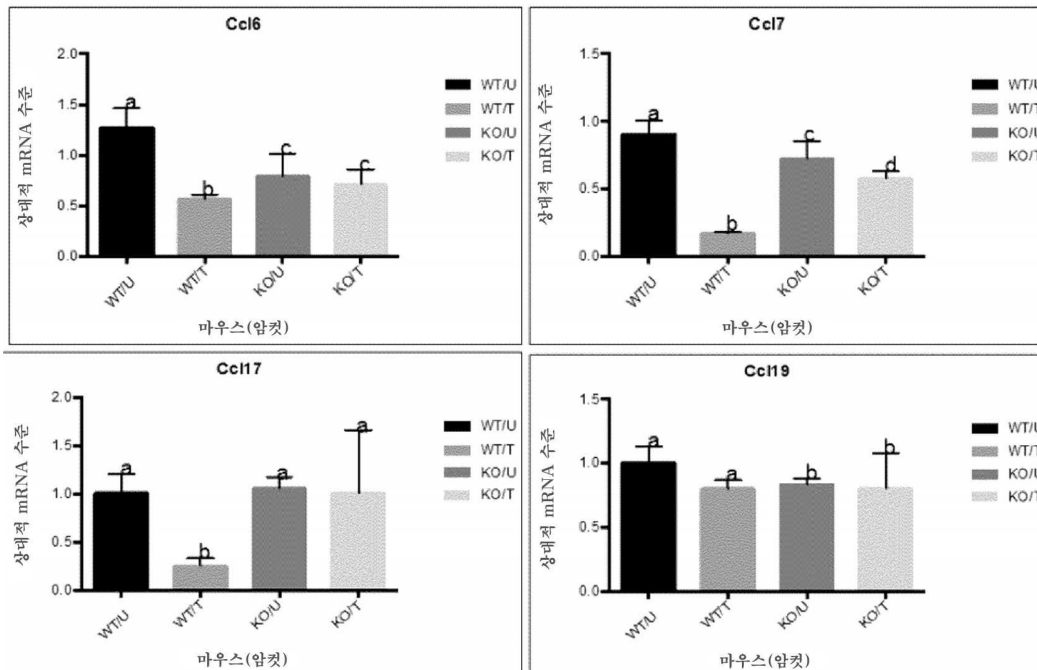
도면50



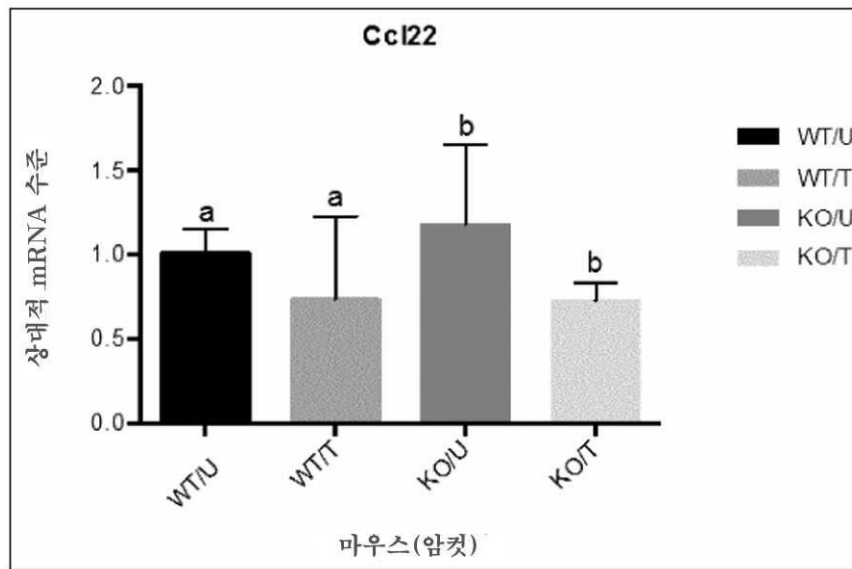
도면51



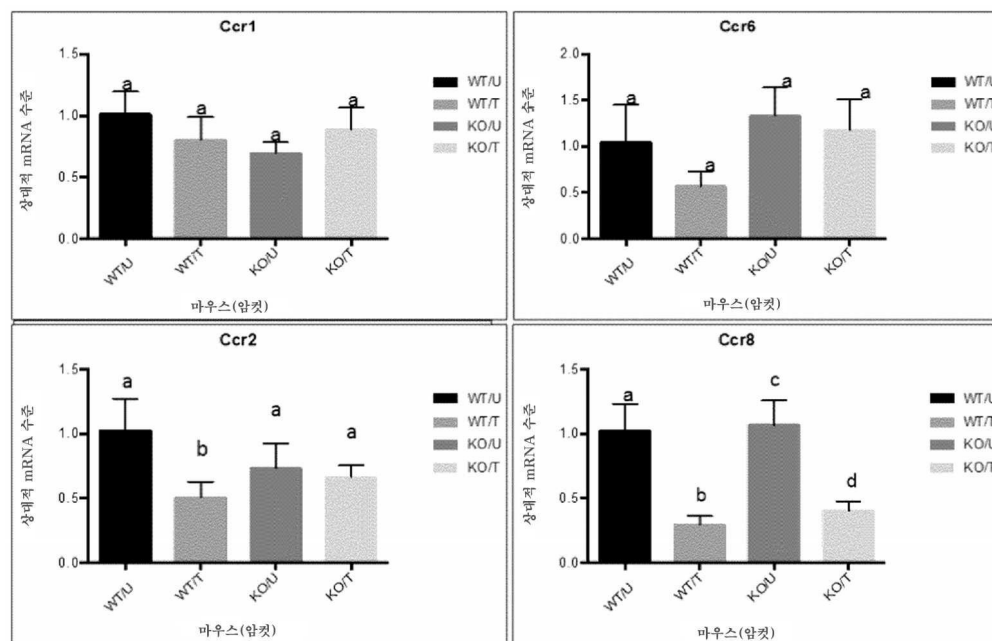
도면52



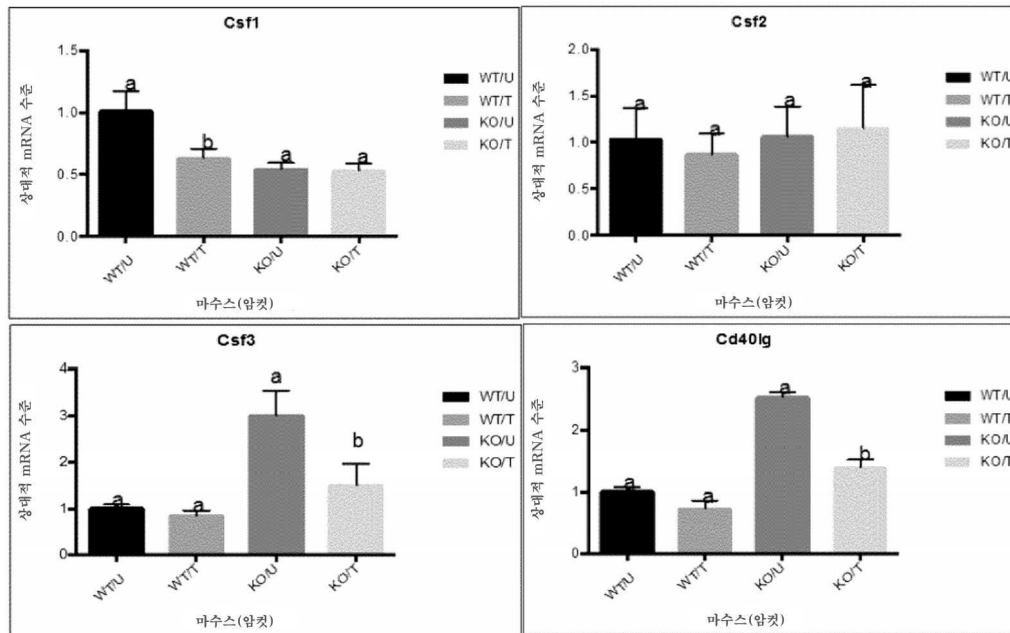
도면53



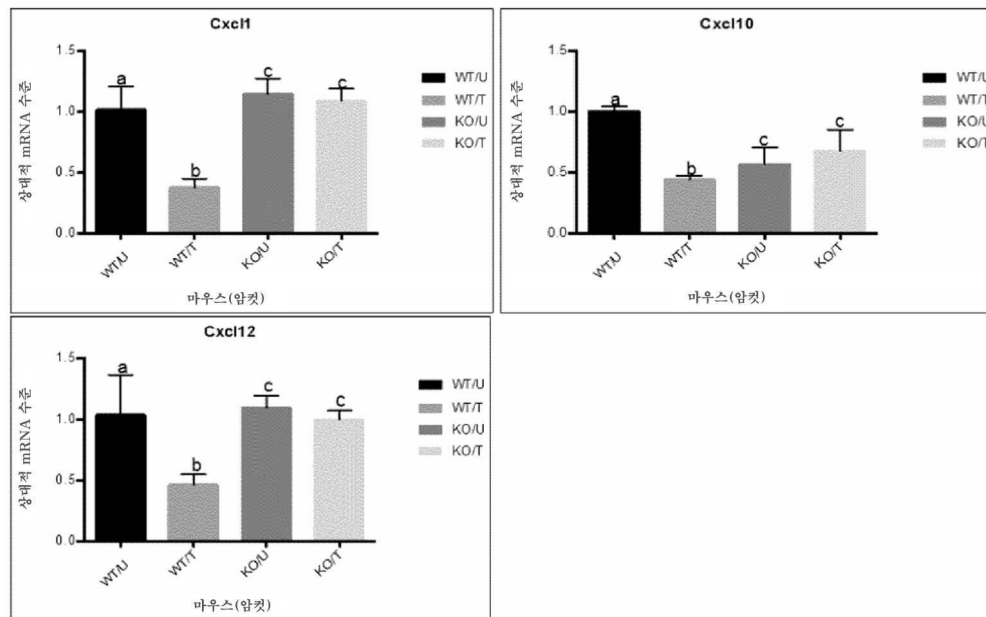
도면54



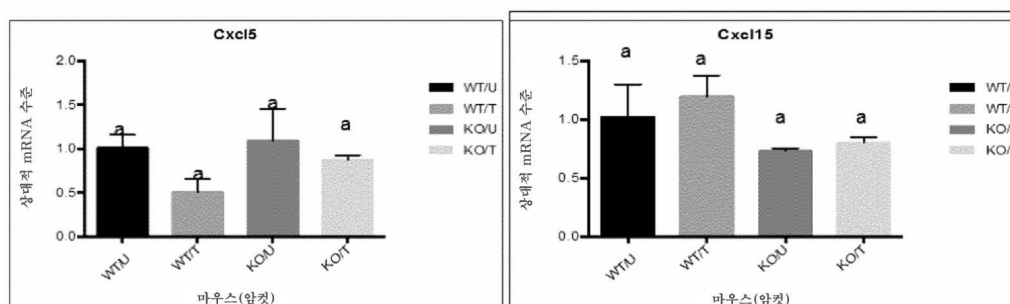
도면55



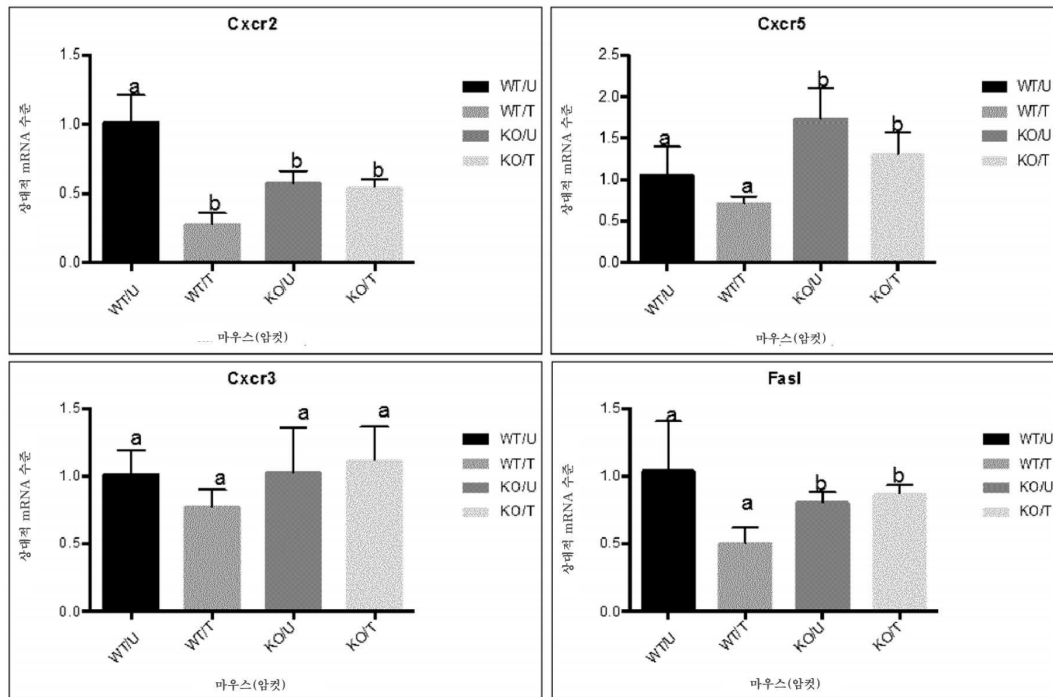
도면56



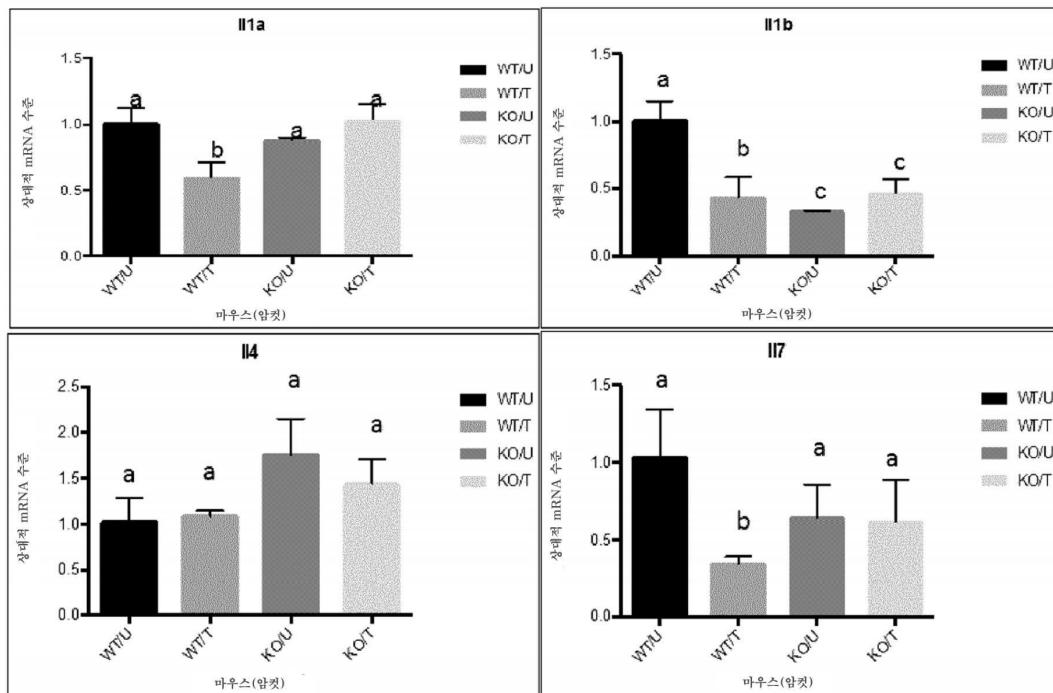
도면57



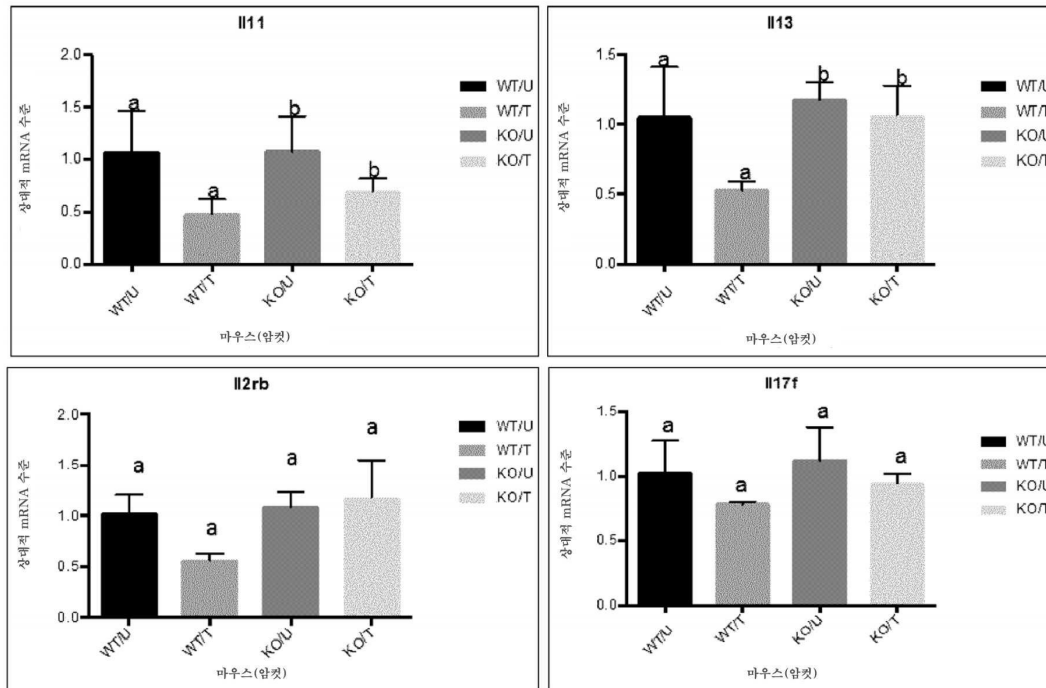
도면58



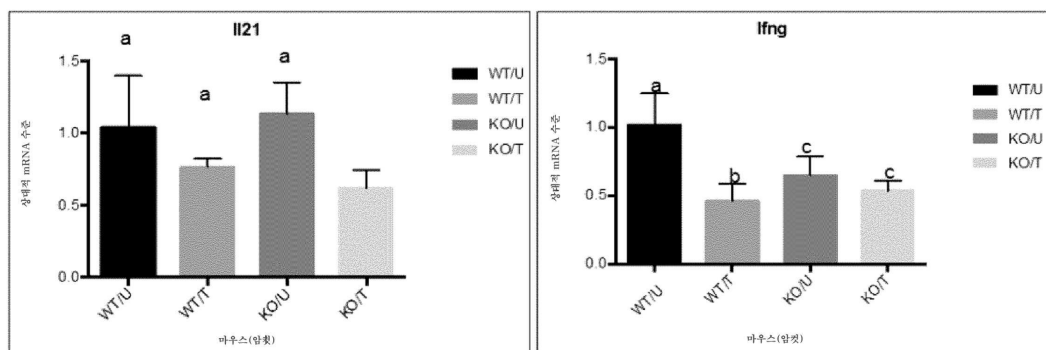
도면59



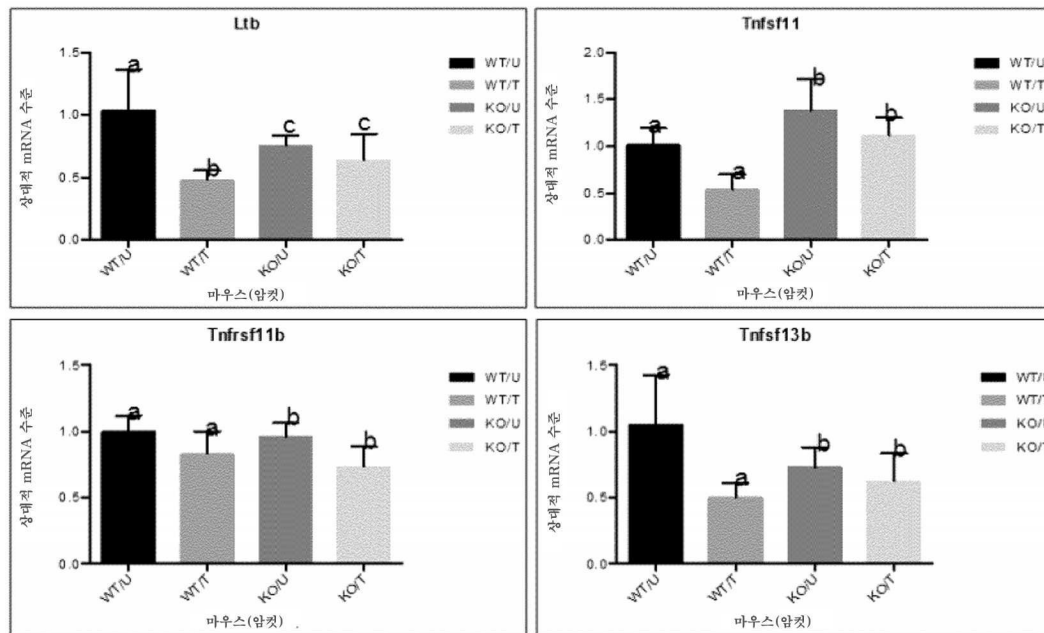
도면60



도면61



도면62



도면63

