(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0039337
(43) 공개일자 2020년04월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*A61K 9/51* (2006.01) *A61K 35/28* (2015.01)
*A61P 9/10* (2006.01) *C12N 5/0775* (2010.01)
(52) CPC특허분류
*A61K 9/5115* (2013.01)
*A61K 35/28* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0119131
(22) 출원일자 2018년10월05일
심사청구일자 2018년10월05일

(71) 출원인
**성균관대학교산학협력단**
경기도 수원시 장안구 서부로 2066 (천천동, 성균관대학교내)
**경희대학교 산학협력단**
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
**방석호**
경기도 수원시 장안구 서부로 2066, 제 2공학관 25403
**임광범**
경기도 수원시 장안구 서부로 2066, 제 2공학관 26405A
*(뒷면에 계속)*
(74) 대리인
**남건필, 박종수, 차상윤**

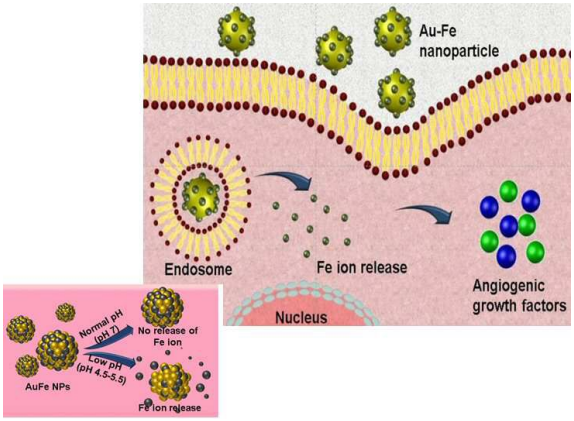
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **혈관신생 성장인자 분비 촉진용 나노입자, 이를 이용한 조정배지의 제조 방법, 조정배지 및 이를 포함하는 주사제 조성물**

## (57) 요 약

본 발명의 혈관신생 성장인자 분비 촉진용 나노입자, 이를 이용한 조정배지의 제조 방법, 조정배지 및 이를 포함하는 주사제 조성물에서, 본 발명의 나노입자는 pH 민감성(pH sensitve) 분해성 금-철 나노입자이고, 산성 pH 범위에서 철 이온을 방출하는 것을 특징으로 한다.

*대 표 도* - 도1



(52) CPC특허분류
***A61K 9/0019*** (2013.01)
***A61P 9/10*** (2018.01)
***C12N 5/0667*** (2013.01)
*C12N 2500/24* (2013.01)
(72) 발명자
**김영환**
경기도 수원시 장안구 서부로 2066, 제 2공학관 26405A
**유태경**
서울특별시 마포구 독막로42길 2, 107동 1201호(염리동, 마포자이)
**정의영**
서울특별시 구로구 오리로22길 26-4, 102동 101호(궁동, 선우스위트빌라)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 HI17C1728010018
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
연구사업명 질환극복기술개발
연구과제명 줄기세포 미세환경 조절이 가능한 창상 치료용 생체모사 기반 고점착 패치 개발
기 여 율 25/100
주관기관 성균관대학교산학협력단
연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2018M3A9E2023255
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 바이오.의료기술개발
연구과제명 심근경색 치료용 줄기세포 담지 생분해성 신개념 3D 패치 효능 및 전임상 연구
기 여 율 12.5/100
주관기관 성균관대학교산학협력단
연구기간 2018.04.01 ~ 2018.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2017R1A5A1070259
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 집단연구지원
연구과제명 진단/치료용 고분자소재 연구센터
기 여 율 2.5/100
주관기관 성균관대학교산학협력단
연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2015R1C1A1A01055224
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(미래부)
연구과제명 금-전이금속 복합체 나노입자를 이용한 인간 유래 중간엽 줄기세포의 ex vivo 혈관 생성 능력 조절을 통한 허혈성 질환 및 항암 치료법 개발
기 여 율 10/100
주관기관 성균관대학교산학협력단
연구기간 2017.11.01 ~ 2018.10.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2014R1A5A1009799
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 선도연구센터지원사업
연구과제명 결정 기능화 공정기술 센터
기 여 율 16.67/100
주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2014.05.01 ~ 2021.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2015R1C1A1A01054109
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 신진연구
연구과제명 백금 저감 및 안전성 향상 연료전지 촉매 개발을 위한 10nm 이하의 크기 및 1nm이하의 Pt 두께를 가지는 Pd/Pt core/shell 나노입자 제조공정 개발
기 여 율 16.67/100
주관기관 경희대학교 산학협력단
연구기간 2015.11.01 ~ 2018.10.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2016M3D1A1021143
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 미래소재디스커버리사업
연구과제명 프랙탈 구조 알케미 촉매를 이용한 과산화수소 및 암모니아 합성 반응시스템 개발 및 반응 메커니즘 해석
기 여 율 16.66/100
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2016.05.01 ~ 2022.04.30

# *명 세 서*

## *청구범위*

### 청구항 1

pH 민감성(pH sensitve) 분해성 금-철 나노입자이고,

산성 pH 범위에서 철 이온을 방출하는 것을 특징으로 하는,

혈관신생 성장인자 분비 촉진용 나노입자.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 산성 pH 범위는 pH 4 내지 pH 5인 것을 특징으로 하는,

혈관신생 성장인자 분비 촉진용 나노입자.

### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 혈관신생 성장인자는 섬유아세포성장인자(Fibroblast growth factor2, FGF2) 및 혈관내피성장인자(Vascular endothelial growth factor, VEGF) 중 적어도 어느 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는,

혈관신생 성장인자 분비 촉진용 나노입자.

### 청구항 4

산성 pH 범위에서 철 이온을 방출하는 pH 민감성 분해성 금-철 나노입자를 세포 배양 배지에 첨가하는 단계; 및

세포를 배양하는 단계를 포함하는,

조정배지의 제조 방법.

### 청구항 5

제4항에 있어서,

상기 금-철 나노입자는 3 μg/ml 이하의 농도로 세포 배양 배지에 첨가하는 것을 특징으로 하는,

조정배지 제조 방법.

### 청구항 6

제4항에 있어서,

상기 금-철 나노입자는 세포 내로 유입되어 세포의 혈관신생 성장인자 분비를 촉진하는 것을 특징으로 하는,

조정배지 제조 방법.

**청구항 7**

제6항에 있어서,

상기 혈관신생 성장인자는 섬유아세포성장인자 및 혈관내피성장인자 중 적어도 어느 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는,

조정배지 제조 방법.

**청구항 8**

제4에 있어서,

상기 세포는 인간 지방유래 줄기세포인 것을 특징으로 하는,

조정배지 제조 방법.

**청구항 9**

산성 pH 범위에서 철 이온을 방출하는 pH 민감성 분해성 금-철 나노입자를 포함하는 세포 배양 배지로부터 배양된 세포 배양액을 포함하는,

조정배지.

**청구항 10**

산성 pH 범위에서 철 이온을 방출하는 pH 민감성 분해성 금-철 나노입자를 포함하는 세포 배양 배지로부터 배양된 세포 배양액을 포함하는 조정배지를 유효성분으로 포함하는,

주사제 조성물.

**청구항 11**

제10항에 있어서,

상기 주사제 조성물은 허혈성 질환(ischemic disease)용 주사제 조성물인 것을 특징으로 하는,

주사제 조성물.

## *발명의 설명*

### *기 술 분 야*

[0001] 본 발명은 혈관신생 성장인자 분비 촉진용 나노입자에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 세포의 혈관신생 성장인자 분비를 촉진하는 나노입자와 이를 이용하여 다량의 혈관신생 성장인자를 포함하는 조정 배지를 제조하는 방법과 이에 의해 제조된 조정 배지, 그리고 이를 포함하는 주사제 조성물에 관한 것이다.

### *배 경 기 술*

[0002] 허혈성 질환은 세계적으로 주된 사망원인 중 하나로, 허혈성 질환에서 일단 발생한 손상을 회복시키는 것은 매우 어려우며, 특히 허혈성 족부 질환의 경우 현재로써는 환부의 외과적 제거 이외에는 뚜렷한 치료 방법이 없으며 재생이 불가능하다. 현재 줄기세포와 성장 인자 등을 환부에 주입하여 허혈성 질환에 수반되는 조직 손상을 최소화하는 방법을 목표로 하고 있으나, 줄기세포를 직접 인체에 이식하는 줄기세포 이식법의 경우, 자가 조직 유래 세포가 아닐 경우, 환부에 세포를 이식할 때 발생하는 다양한 형태의 면역반응은 질환 치료에 부정적인 영향을 미칠 뿐만 아니라 추가적인 체내 손상 및 2차 부작용을 일으킬 위험성이 매우 높다. 또한 이식된 줄기세포

가 체내에서 암 조직으로 성장할 가능성 또한 배제할 수 없어 잠재적인 위험성이 존재하여 임상 적용에 한계가 있다. 게다가, 자가 조직 유래 줄기세포를 질환 치료에 사용한다고 하더라도, 줄기세포가 환부에 이식되었을 때, 환부의 비정상적인 미세환경(혈관 부재로 인한 산소, 영양분 공급 저하, 면역반응 등)으로 인해 이식된 대부분의 세포 환부에 생착되지 못하고 짧은 시간 내에 사멸한다. 또한, 기존 줄기세포 이식법은 이러한 낮은 세포 생존율과 생착율을 극복하고 체내 줄기세포 이식 후 치료효과를 보기 위하여 줄기세포를 외부에서 추가 증식시킨 후 대량으로 이식한다. 그러나 이러한 방식은 환자에게 획득할 수 있는 자가 줄기세포의 초기 수득량이 제한적이고, 추가적인 외부 증식 배양과정에서 많은 비용과 시간이 소모되기 때문에, 환자에게 비용면에서 부담을 줌과 동시에 빠른 질환 치료에 걸림돌이 되고 있다.

[0003] 한편, 줄기세포 이식법의 대안으로서, 줄기세포 배양액인 조정배지(conditioned medium)를 환부에 주입함으로써 질환을 치료하는 방식이 제시되었다. 이러한 조정배지 주사법은 줄기세포 배양액을 사용하고, 줄기세포 자체는 사용하지 않기 때문에 줄기세포 직접 주사법에 비해 자가 유래 조직 여부에 따른 면역반응, 줄기세포 주입으로 인한 암 조직 형성, 이식되는 줄기세포의 낮은 생존율 및 생착률에 대한 문제점을 극복할 수 있다. 그러나 기존 배양액의 주사량(부피)에 비하여 줄기세포로부터 분비되는 성장인자의 양이 적어 질환치료 또는 조직재생 효과를 보일 수 있는 성장인자 농도 수치에 근접하기 어려우며, 이에 따라 치료 효과 또한 낮아진다는 단점이 있다.

[0004] 이를 극복하기 위해서는 줄기세포 배양액 단위 부피 당 줄기세포로부터 분비되는 성장인자의 양을 비약적으로 높일 필요가 있으며, 현재 이러한 문제점을 해결하기 위해 줄기세포 내 특정 유전자를 도입시키거나 특수한 세포 배양법 도입, 지속적인 줄기세포 계대 배양을 통한 대량의 성장인자 확보 및 농축 등의 방법이 제시되고 있다. 하지만 세포배양 과정에서 외부 유전자 등을 도입할 경우, 효율적인 유전자 도입을 위해 사용되는 유전자 전달용 합성 고분자 등의 추가 사용으로 실질적인 임상적용 가능 물질이라는 허가를 받기에 많은 장애물이 존재하고, 성장인자 농축 과정 또한 많은 비용과 시간이 추가로 소모되어 효율성이 떨어진다. 특히, 대량의 줄기세포 확보 및 성장인자 확보를 위해서 줄기세포의 배양시간이 증가될 경우 잦은 계대 배양 수 증가로 인해 줄기세포능 저하, 변성, 성장인자 방출량 이상 등 자연스럽게 발생하는 추가 문제점들을 해결하기 어렵다.

[0005] 따라서, 효과적으로 혈관 재생시킬 수 있는 치료제와 연구기법이 더 필요한 실정이다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 일 목적은 혈관신생 성장인자 분비 촉진용 나노입자를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 나노입자를 이용하여 다량의 혈관신생 성장인자를 함유하는 조정 배지의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 나노입자를 이용하여 형성된 다량의 혈관신생 성장인자를 함유하는 조정 배지를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조정 배지를 유효성분으로 포함하는 주사제용 조성물을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0010] 본 발명의 일 목적을 위한 혈관신생 성장인자 분비 촉진용 나노입자는 pH 민감성(pH sensitve) 분해성 금-철 나노입자이고, 산성 pH 범위에서 철 이온을 방출하는 것을 특징으로 한다.

[0011] 일 실시예에서, 상기 산성 pH 범위는 pH 4 내지 pH 5일 수 있다.

[0012] 일 실시예에서, 상기 혈관신생 성장인자는 섬유아세포성장인자(Fibroblast growth factor2, FGF2) 및 혈관내피성장인자(Vascular endothelial growth factor, VEGF) 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다.

[0013] 본 발명의 다른 목적을 위한 조정 배지의 제조 방법은 산성 pH 범위에서 철 이온을 방출하는 pH 민감성 분해성 금-철 나노입자를 세포 배양 배지에 첨가하는 단계 및 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

[0014] 일 실시예에서, 상기 금-철 나노입자는 3 μg/ml 이하의 농도로 세포 배양 배지에 첨가할 수 있다.

[0015] 일 실시예에서, 상기 금-철 나노입자는 세포 내로 유입되어 세포의 혈관신생 성장인자 분비를 촉진할 수 있다.

[0016] 이때, 상기 혈관신생 성장인자는 섬유아세포성장인자 및 혈관내피성장인자 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있

다.

[0017] 일 실시예에서, 상기 세포는 인간 지방유래 줄기세포일 수 있다.

[0018] 본 발명의 또 다른 목적을 위한 조정 배지는 산성 pH 범위에서 철 이온을 방출하는 pH 민감성 분해성 금-철 나노입자를 포함하는 세포 배양 배지로부터 배양된 세포 배양액을 포함한다.

[0019] 본 발명의 이와 다른 목적을 위한 주사제 조성물은 산성 pH 범위에서 철 이온을 방출하는 pH 민감성 분해성 금-철 나노입자를 포함하는 세포 배양 배지로부터 배양된 세포 배양액을 포함하는 조정배지를 유효성분으로 포함한다.

[0020] 일 실시예에서, 상기 주사제 조성물은 허혈성 질환(ischemic disease)용 주사제 조성물일 수 있다.

## *발명의 효과*

[0021] 본 발명의 혈관신생 성장인자 분비 촉진용 나노입자, 이를 이용한 조정배지의 제조 방법, 조정배지 및 이를 포함하는 주사제 조성물에 따르면, 본 발명은 산성 pH 범위에서 철 이온을 방출하는 금-철 나노입자를 제공할 수 있고, 본 발명의 나노입자는 세포 내로 유입되어 세포에서 혈관신생 성장인자 분비를 촉진할 수 있다. 이때, 본 발명의 나노입자는 세포 내포 작용에 의해 세포 내로 유입될 수 있어, 직접적이고 순간적인 과량의 이온이 세포 내부로 유입되어 발생하는 세포 사멸 방지하고, 세포 생존율을 높일 수 있다. 또한, 본 발명의 나노입자가 방출하는 철 이온의 영향으로 줄기세포의 혈관신생 성장인자 방출량을 향상시키므로, 세포 배양액(조정배지) 내 고농도의 혈관신생 성장인자가 형성될 수 있고, 이에 따라, 본 발명의 조정배지는 세포 배양 시 투입되는 혈청을 배제하고 단시간 내 혈관신생 성장인자의 분비를 증진시킬 수 있기 때문에 실질적인 질환치료가 가능하다. 이에, 본 발명의 조정배지를 유효성분으로 포함하는 허혈성 질환용 주사제 조성물을 제공할 수 있고, 본 발명의 주사제 조성물은 우수한 효과를 나타낼 수 있다.

## *도면의 간단한 설명*

[0022] 도 1은 본 발명의 금-철 나노입자에 의한 세포 혈관신생 성장인자 분비 촉진을 설명하기 위한 모식도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 금-철 나노입자의 제조 방법을 설명하기 위한 도면이다.

도 3은 본 발명의 금-철 나노입자의 TEM 이미지를 나타내는 도면이다.

도 4는 본 발명의 금-철 나노입자의 세포 내 유입 여부를 설명하기 위한 도면이다.

도 5는 본 발명의 금-철 나노입자의 세포독성도를 설명하기 위한 도면이다.

도 6은 본 발명의 금-철 나노입자 처리 후 인간 지방유래 줄기세포에서 발현되는 혈관신생 성장인자 유전자 발현량을 설명하기 위한 도면이다.

도 7은 본 발명의 하지 허혈 유도 모델을 설명하기 위한 도면이다.

도 8은 본 발명의 금-철 나노입자를 처리한 조정배지를 면역결핍 마우스 하지 허혈 유도 모델에 주사한 4주 후 결과 그래프를 나타낸다.

도 9는 면역결핍 마우스 하지허혈 유도 후 치료 4주차 다리 조직 $CD31^+$ 혈관 정량 및 면역염색 데이터를 나타내는 도면이다.

도 10는 면역결핍 마우스 하지허혈 유도 후 치료 4주차 다리 조직 평활근 알파 액틴(Smooth muscle alpha actin)$^+$ 혈관 정량 및 면역염색 데이터를 나타내는 도면이다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0023] 이하, 첨부한 도면을 참조하여 본 발명의 실시예에 대해 상세히 설명한다. 본 발명은 다양한 변경을 가할 수 있고 여러 가지 형태를 가질 수 있는 바, 특정 실시예들을 도면에 예시하고 본문에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나 이는 본 발명을 특정한 개시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 각 도면을 설명하면서 유사한 참조부호를 유사한 구성요소에 대해 사용하였다.

[0024] 본 출원에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시 예를 설명하기 위해 사용된 것으로서 본 발명을 한정하려는 의도

가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 출원에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 단계, 동작, 구성요소, 부분품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 단계, 동작, 구성요소, 부분품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0025] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0026] 본 발명의 혈관신생 성장인자(angiogenic growth factors) 분비 촉진용 나노입자는 pH 민감성(pH sensitive) 분해성 금-철 나노입자이다.

[0027] 본 발명의 금-철 나노입자는 pH에 의해 분해 가능한 나노크기의 입자로서, 산성 pH 범위에서 상기 나노입자로부터 철이 이온화되어 철 이온을 방출한다. 이때, 상기 산성 pH 범위는 pH 4 내지 5일 수 있다.

[0028] 본 발명의 금-철 나노입자는 세포 배양액에 첨가되어 세포의 혈관신생 성장인자 분비를 촉진할 수 있다.

[0029] 도 1은 본 발명의 금-철 나노입자에 의한 세포 혈관신생 성장인자 분비 촉진을 설명하기 위한 모식도이다.

[0030] 도 1을 참조하면, 본 발명의 금-철 나노입자는 나노 단위의 크기를 가지기 때문에 세포 배양액에 투입될 경우, 세포의 내포작용 과정에 의하여 자연스럽게 세포 내부로 유입된다. 내포 작용은 세포가 외부 물질을 내포라는 소낭형성을 통해 세포 내부로 유입시키는 과정으로, 본 발명의 금-철 나노입자는 내포에 갇힌 상태로 이동하게 된다. 이때, 내포의 낮은 pH 환경(pH 4-5)에 의해, 산성 pH 범위에서 분해되는 pH 민감성 분해성 나노입자인 본 발명의 금-철 나노입자로부터 철 이온으로 이온화되고, 철 이온은 내포 외부로 방출되어 세포 내에 제공된다. 세포로 방출된 철 이온은 세포 내 미토콘트리아를 자극하여 혈관신생 성장인자 분비 증진을 유도한다. 즉, 본 발명의 금-철 나노입자에 의해 세포 혈관신생 성장인자 분비능이 향상된다.

[0031] 일반적으로 용액 상태의 금속이온을 일반 세포 및 줄기세포에 직접 처리할 경우, 금속이온을 수용액 자체로 직접 세포에 처리하기 때문에 세포 표면에 존재하는 이온채널을 이용한 세포 내 강제유입 과정에서 비정상적인 대량의 에너지가 소비되어 종국에는 세포의 사멸을 유도할 수 있다. 또한, 순간적으로 유입되는 과량의 금속이온은 세포 내 에너지 생성기관인 미토콘드리아 등의 세포소기관의 손상을 유발하여 추가적인 세포의 사멸을 유도할 수 있다.

[0032] 그러나, 본 발명의 금-철 나노입자의 경우, 상기에서 설명한 바와 같이, 세포 내포 작용을 통해 세포 내부로 유입되기 때문에 세포의 에너지 소모량의 매우 낮고, 정밀한 양의 입자를 내포를 통해 전달함으로써 순간적인 과량의 이온 유입을 방지하여 미토콘드리아와 같은 세포 소기관의 손상을 막아 세포의 사멸을 유도하지 않을 뿐만 아니라, 혈관신생 성장인자 분비 증가 등의 세포거동을 조절할 수 있다. 즉, 본 발명의 금-철 나노입자는 세포에 무해하게 세포 내부로 금속 이온을 제공할 수 있고, 이에 따라 혈관신생 성장인자 분비 증가 등의 세포 거동을 용이하게 조절할 수 있다.

[0033] 한편, 본 발명의 나노입자에서 금은 전이금속인 철과 비교하여 낮은 pH에서도 안정성을 가져 철 이온과 달리 세포 내로 방출되지 않으며, 내포 내에 잔존하여 본 발명의 나노입자가 세포 내부로 유입되었다는 정량화 근거를 제시함과 동시에 유전자, 약물, 바이오 이미징 등 추가 기능을 부여할 수 있다.

[0034] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 금-철 나노입자의 제조 방법을 설명하기 위한 도면이다.

[0035] 도 2를 참조하면, 본 발명의 금-철 나노입자의 제조 방법은 환원제를 첨가한 고분자 용액을 교반하면서, 상기 고분자 용액에 금 전구체 용액 및 철 전구체 용액을 각각 적가하여, 금-철 나노입자를 형성하는 단계를 포함한다.

[0036] 이때, 일례로, 상기 고분자 용액은 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone, PVP) 용액일 수 있고, 상기 환원제는 소듐 보로하이드라이드(Sodium borohydride, $NaBH_4$)일 수 있다.

[0037] 상기 고분자 용액을 교반하면서 금 전구체 용액 및 철 전구체 용액을 각각 적가하면, 금 및 철을 포함하는 나노입자가 형성된다. 일례로, 상기 금 전구체는 금(III) 클로라이드 하이드라이트(Gold(III) chloride hydrate, $HAuCl_4$-$xH_2O$)일 수 있고, 철 전구체는 철(III) 클로라이드(Iron(III) chloride, $FeCl_3$)일 수 있다.

[0038] 상기 금-철 나노입자를 형성하는 단계에서 형성된 금 및 철을 포함하는 금-철 나노입자는, 상기 용액을 원심분리하여 상기 용액으로부터 분리할 수 있다.

[0039] 이에 대한 보다 상세한 설명은 하기에서 실시예를 들어 보다 구체적으로 설명하기로 한다.

[0040] 본 발명의 조정배지 제조 방법은 상기에서 설명한 본 발명의 금-철 나노입자를 세포 배양 배지에 첨가하고, 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

[0041] 상기 세포는 줄기세포를 의미할 수 있고, 일례로, 인간 지방유래 중간엽 줄기세포일 수 있다. 줄기세포 배양과정에서 사용되는 세포 배양액은 줄기세포가 분비하는 성장인자가 포함되어 있다. 이때, 본 발명에 따라 금-철 나노입자가 첨가된 세포 배양 배지에서 세포를 배양하는 경우, 상기에서 설명한 것과 같이, 금-철 나노입자가 세포 내포작용에 의해 세포 내로 유입되고, 이때, 내포의 낮은 pH 환경에 의해 나노입자로부터 철 이온이 방출된다. 방출된 철 이온은 세포의 혈관신생 성장인자의 분비를 촉진하고, 이에, 다량의 혈관신생 성장인자를 포함하는 조정배지를 형성할 수 있다. 이때, 상기 형관신생 성장인자는 섬유아세포성장인자(Fibroblast growth factor2, FGF2) 및 혈관내피성장인자(Vascular endothelial growth factor, VEGF) 중 적어도 어느 하나를 포함한다.

[0042] 한편, 상기 금-철 나노입자는 3 μg/ml 이하의 농도로 세포 배양 배지에 첨가할 수 있다. 상기 금-철 나노입자를 세포 배양 배지 단위부피당 3 μg/ml를 초과하여 첨가하는 경우, 세포에 독성을 유발하여 세포를 사멸시킬 수 있다.

[0043] 본 발명에 따르면, (줄기)세포의 혈관신생 성장인자 분비를 증가시킬 수 있는 본 발명의 금-철 나노입자를 줄기세포 배양액에 첨가함으로써, 세포 내포 작용에 의해 금속 이온을 세포 내로 제공하기 때문에 세포사멸을 방지할 수 있으면서, 동시에 금-철 나노입자로부터 방출된 철 이온에 의해 줄기세포로부터 혈관신생 성장인자의 분비량을 증진시킬 수 있다. 이에 따라, 줄기세포 조정배지 내 혈관신생 성장인자의 농도를 비약적으로 증진시킬 수 있고, 때문에, 본 발명의 조정배지는 혈관신생이 필요한 질환에 우수한 치료 효과를 나타낼 수 있다.

[0044] 즉, 본 발명에 따른 조정배지는 줄기세포로부터 혈관신생 성장인자 분비가 증가되어 조정배지 내 다량의 혈관신생 성장인자를 포함하기 때문에, 기존의 줄기세포 이식법이 환부에 이식된 줄기세포의 낮은 생존율 및 생착률, 암 조직 변화 등으로 치료효과 미미하다는 점과 잠재적인 위험성이 있다는 문제 및 이를 극복하기 위한 대안으로 제시된 줄기세포 조정배지 주사법이 조정배지 내 혈관신생 성장인자의 농도 자체가 낮아 실질적인 치료 효과를 보기 어려운 것과 달리, 본 발명의 조정 배지를 통해 실질적인 이를 통해 효과적으로 혈관신생을 유도할 수 있고, 이에 따라, 본 발명에 따른 조정배지를 유효성분으로 하여 허혈성 질환(ischemic disease)을 치료하기 위한 치료제로서 이용할 수 있다. 일례로, 본 발명의 조정배지는 허혈성 질환용 주사제 조성물로서 이용할 수 있다.

[0045] 이하에서는, 보다 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 금-철 나노입자와 이를 합성하는 방법, 그리고 본 발명의 금-철 나노입자를 이용한 조정배지 제조 및 이의 허혈성 질환에서의 효과 등에 대해 설명하기로 한다.

[0046] **금-철 나노입자의 제조**

[0047] (1) 재료

[0048] 금(III) 클로라이드 하이드라이트(Gold(III) chloride hydrate, $HAuCl_4$-$xH_2O$, 99.995%), 철(III) 클로라이드(Iron(III) chloride, $FeCl_3$, 98%), 폴리(비닐 피롤리돈)(Poly(vinyl pyrrolidone), PVP, MW = 55,000 Da), 소듐 보로하이드라이드(Sodium borohydride, $NaBH_4$)는 Aldrich 사에서 구매하였고 추가적인 정제 없이 사용하였다. 탈이온수 기반으로 PVP, $NaBH_4$, $HAuCl_4$, $FeCl_3$ 용액들 준비하였다.

[0049] (2) 합성

[0050] 본 발명의 일 실시예에 따른 금-철 나노입자를 합성하기 위해, 20 mL 유리 바이알(vial)에 폴리(비닐 피롤리돈)(Poly(vinyl pyrrolidone), PVP, MW = 55,000 Da) 1.11 % (w/v) 9 mL를 준비하고 소듐 하이드록시드(Sodium hydroxide, NaOH, 98%) 0.4 % (w/v) 1 mL를 첨가하였다. 이어서, 금(III) 클로라이드 하이드라이트($HAuCl_4$) 0.4 % (w/v)와 철(III) 클로라이드(Iron(III) chloride, $FeCl_3$, 98%) 0.2 % (w/v)를 교반상태에서 한 방울씩 각각 총 1 mL을 첨가하였다. 그 다음, 상온에서 15분간 반응시키고 원심분리기(8000 rpm, 15분) 통해 합성된 나노입자를 수득하였다. 합성된 나노입자는 탈이온수(DI water)와 아세톤으로 각각 2회씩 씻어내고 탈이온수에 재

분산시켰다.

[0051] **금-철 나노입자의 TEM 이미지**

[0052] 투과전자현미경(JEM-1010, JEOL Ltd.)을 이용하여 제조된 본 발명의 금-철 나노입자의 TEM 이미지를 확인하고, 이의 EDS(energy dispersive spectroscopy)를 확인하였다. 그 결과를 도 3에 나타낸다.

[0053] 도 3은 본 발명의 금-철 나노입자의 TEM 이미지를 나타내는 도면이다.

[0054] 도 3의 A는 본 발명의 금-철 나노입자의 TEM 이미지를 나타내고, B는 이의 EDS 분석 결과를 나타낸다.

[0055] 도 3을 참조하면, 본 발명에 따라, 금과 철로 이루어진 나노 크기의 금-철 나노입자가 제조되었음을 확인할 수 있다.

[0056] **금-철 나노입자의 세포 내 유입**

[0057] 인간 지방유래 줄기세포 8 X $10^5$ 세포/접시(cells/dish)에 금-철 나노입자 3 μg/ml의 농도를 갖는 16 mL 배양액에 인간 지방유래 중간엽 줄기세포를 12시간 배양하고, 카놉스키(Karnovsky's) 고정을 이용하여 4시간 동안 4 ℃에 방치 후 차가운 0.05 M 카코딜레이트 버퍼(cacodylate buffer)로 세척하였다. 그 다음, 세포를 1% 사산화오스뮴(osmium tetraoxide)에서 4 ℃로 2 시간 동안 고정시키고, 차가운 증류수로 두 번 세척하였다. 이어서, 샘플을 0.5% 우라닐 아세테이트(uranyl acetate)에서 4 ℃에 하룻밤 동안 넣어두었다. 그 다음, 에탄올(30, 50, 70, 80, 90, 95, 100%)을 이용하여 순차적으로 탈수를 하고, 프로필렌 옥사이드(propylene oxide)로 행군 다음, 스퍼 레진(Spurr's resin)에 70 ℃로 24시간 동안 넣어두었다. 이어서, 100 nm의 굵기를 가진 얇은 부분을 울트라마이크로톰(ultramicrotome) (Leica)을 이용하여 얻고, 200-메쉬(mesh) 구리 그리드에 올려서 투과전자현미경(JEM-1010, JEOL Ltd.)을 이용하여 관찰하였다. 그 결과를 도 4에 나타낸다.

[0058] 도 4는 본 발명의 금-철 나노입자의 세포 내 유입 여부를 설명하기 위한 도면으로, 금-철 나노입자를 처리한 세포의 TEM 이미지를 나타낸다.

[0059] 도 4를 참조하면, 본 발명의 금-철 나노입자를 첨가한 후 세포 배양 시, 세포 내에 본 발명의 금-철 나노입자가 존재함을 확인할 수 있다(도 4의 중앙 이미지 (붉은색 화살표) 참조). 즉, 본 발명의 금-철 나노입자를 세포와 함께 배양 시, 세포에 금-철 나노입자가 유입되어 세포 내에 나노입자가 존재함을 확인할 수 있다.

[0060] **금-철 나노입자의 세포독성도**

[0061] 본 발명의 금-철 나노입자의 세포독성도를 확인하기 위해, 1.5 X $10^4$개의 인간 지방유래 중간엽 줄기세포에 금-철 나노입자를 농도별로 처리한 후, 24시간 뒤 세포 독성도를 (Cell counting kit-8, Dojindo Molecular Technologies, Inc., Rockville, MD, USA) 분석 방법으로 확인하였다. CCK-8 분석 방법은 포르마잔 염료(formazan dye)를 이용하여 세포 내 탈수소효소(dehydrogenase) 활성을 보는 방법으로, 살아 있는 세포의 수는 포르마잔 염료의 양에 비례한다.

[0062] 구체적으로, 다양한 농도의 금-철 합금 나노입자를 24시간 동안 24-웰 플레이트에 성장시킨 세포에 처리하고 PBS로 3회 세척하였다. 그 후 새로운 세포 배양액으로 교체한 뒤, CCK-8 용액을 각각의 웰(well)에 첨가한 후 2시간 동안 인큐베이터에 보관하였다. 이어서, 450 nm에서의 흡광도를 플레이트 리더(plate reader)기로 측정하여 살아 있는 세포의 퍼센트(%)를 측정하고, 이를 통해 세포독성도를 확인하였다. 그 결과를 도 5에 나타낸다.

[0063] 도 5는 본 발명의 금-철 나노입자의 세포독성도를 설명하기 위한 도면이다.

[0064] 도 5에서, * p 값은 비처리군 대비 < 0.05를 의미한다.

[0065] 도 5를 참조하면, 세포 배양액 단위부피 당 3 μg/ml 농도의 금- 철 나노입자를 처리할 때까지는 금-철 나노입자를 처리하지 않은 세포 (0 μg/ml)와 비교하여 통계학적으로 세포 독성도에 차이를 보이지 않음을 확인할 수 있다. 즉, 본 발명의 금-철 나노입자는 세포 배양액 단위부피 당 3 μg/ml 농도까지 인간 지방유래 줄기세포에서 세포독성도를 나타내지 않음을 확인할 수 있다.

[0066] **금-철 나노입자의 혈관신생 성장인자 발현**

[0067] 1.0 X $10^5$개의 인간 지방유래 줄기세포에 최대 3 μg/ml 금-철 나노입자를 처리하여 12시간 동안 배양한 뒤, qRT-PCR(Quantitative real-time polymerase chain reaction)을 통해 혈관신생 성장인자인 섬유아세포성장인자(Fibroblast growth factor2, FGF2)와 혈관내피성장인자(Vascular endothelial growth factor, VEGF)의 mRNA

발현을 비교하였다.

[0068] 구체적으로, 다양한 농도별로 금-철 나노입자가 처리된 샘플들을 TRIzol 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 통해 용해(lysis)하였다. 전체적인 RNA는 클로로포름(chloroform, Sigma, St. Louis, USA)을 통해 추출하며 이소프로판올(isopropanol, Sigma)을 통해 농축시켰다. 상층액을 제거하고 RNA 펠렛(pellet)을 헹군 후 75% (v/v) 에탄올에 헹구고 공기 중에 건조한 다음, 0.1% (v/v) 디에틸 피로카보네이트-처리 수(diethyl pyrocarbonate-treated water, Sigma)에 녹였다.

[0069] 이어서, qRT-PCR을 하기 위해, SsoAdvancedTM Universal SYBR Green Supermix 키트 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)와 CFX ConnectTM real-time PCR 검출 시스템 (Bio-Rad)을 사용하였다. qRT-PCR을 위한 프라이머(primer)들은 다음과 같다: 인간 GAPDH (forward 5'-GTC GGA GTC AAC GGA TTT GG-3', reverse 5'-GGG TGG AAT CAA TTG GAA CAT-3'), 인간 VEGF (forward 5'-GAG GGC AGA ATC ATC ACG AAG T-3', reverse 5'-CAC CAG GGT CTC GAT TGG AT-3'), 인간 FGF2 (forward 5'-GAC GGC AGA GTT GAC GG-3', reverse 5'-CTC TCT CTT CTG CTT GAA GTT-3'). qRT-PCR 결과는 도 6에 나타낸다.

[0070] 도 6은 본 발명의 금-철 나노입자 처리 후 인간 지방유래 줄기세포에서 발현되는 혈관신생 성장인자 유전자 발현량을 설명하기 위한 도면이다.

[0071] 도 6에서, * p 값은 비처리군 대비 < 0.05를 의미한다.

[0072] 도 6을 참조하면, 본 발명의 금-철 나노입자 처리 후 인간 지방유래 줄기세포에서 발현되는 혈관신생 성장인자 유전자 발현량이 모두 증가하였으며, 특히, 3 μg/ml 농도의 나노입자를 12시간 처리한 세포 실험군에서 가장 높은 혈관신생 성장인자 유전자 발현이 나타남을 확인할 수 있다.

[0073] 즉, 본 발명의 금-철 나노입자를 첨가하여 배양된 세포에서 혈관신생 성장인자 분비가 촉진됨을 확인할 수 있다.

[0074] **조정배지 제조**

[0075] (1) 세포 배양

[0076] Lonza 사(Bazel, Switzerland)에서 인간 지방유래 중간엽 줄기세포 구입하여 사용하였으며, 10% (v/v) 소태아혈청(Fetal bovine serum (FBS), Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)과 1% (v/v) 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin, Gibco BRL)이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco BRL)의 혼합 용액을 배양액으로 사용하였다. 세포 배양은 37 ℃, 공기 중의 5% (v/v) $CO_2$ 함유한 95% 습도유지 환경의 항온 인큐베이터에서 이루어졌고, 세포 배양액은 3일 주기로 교체하였다. 세포 계대수 8 이하의 세포를 실험에 사용하였으며, 계대 수가 8을 넘을 경우 폐기하였다.

[0077] (2) 조정배지 준비

[0078] 150 mm 세포 배양(cell culture) 접시에 0.8 X $10^6$ 개의 인간 지방유래 중간엽 줄기세포를 배양하고, 본 발명의 금-철 나노입자를 3 μg/ml 농도로 포함하는 무혈청 배지 16 mL로 12시간 동안 배양하였다. 조정배지를 수득하기 위해, 무혈청 배양 전 세포는 인산-완충 식염수(Phosphate-buffered saline (PBS), Gibco BRL)를 이용하여 3회 세척한 후 무혈청 배지로 교체하였다. 이후 이틀 간 세포를 배양한 다음, 조정배지를 수거하여, 본 발명의 일 실시예에 따른 조정배지를 제조하였다.

[0079] **조정배지의 in vitro 및 in vivo 실험**

[0080] 본 발명에 따른 조정배지의 주사 주입을 통한 혈관신생을 통한 질환치료 효과를 확인하기 위해, in vitro 및 in vivo 실험을 수행하였다. 본 발명에서 모든 동물실험은 성균관대학교 동물실험 윤리 위원회의 검열을 거쳐 인증된 실험방법으로 진행하였으며, 동물실험 및 동물 사육은 SPF 시설 내에 절차를 준수하여 진행하였다(IACUC 번호 : SKKUIACUC-17-5-3-4).

[0081] (1) 하지허혈 마우스 모델링

[0082] 4주령의 암컷 면역결핍 마우스 (BALB/c-nu, 20-25 g body weight, Orient, Seongnam, Gyeonggi, Korea)를 자일라진(xylazine) (10 mg/kg)와 케타민(ketamine) (100 mg/kg)으로 마취시킨 다음, 넙적다리 동맥과 그 주위 혈관들을 6-0 비단 봉합사(silk suture, AILEE, Busan, Korea)로 단단히 묶었다. 이어서, 외장골동맥과 그 상류 동맥들을 묶은 다음, 외장골동맥의 갈래의 분기점부터 복재정맥과 슬와동맥으로 나뉘어지는 말단까지 절제하여

모델링을 진행하였다. 하지 허혈 유도 모델 정량 분석을 위한 지표는 도 7에 나타낸 것과 같다.

[0083] 도 7은 본 발명의 하지 허혈 유도 모델을 설명하기 위한 도면이다.

[0084] 도 7에서 좌측 이미지는 다리 구제(limb salvage), 중간 이미지는 발가락 괴사(Toe necrosis), 우측 이미지는 다리 손실(Limb loss)을 나타낸다.

[0085] (2) 하지허혈 모델링 마우스에 대한 처리 및 치료

[0086] 동맥절개를 통해 하지허혈 모델링 된 마우스들을 하지허혈 유도 (비처리(No treatment, NT)), 하지허혈 유도 후 조정배지 주사 (일반 조정배지(Normal conditioned medium, NC)), 그리고 본 발명의 금-철 나노입자를 처리한 세포에서 수거한 조정배지 주사 (금-철 나노입자 조정배지(AuFe NPs conditioned medium, AC)) 군으로 설정하였다. 어떠한 처리 없이 하지허혈만 유도된 NT 그룹을 음성 대조군으로 설정하였고, 금-철 나노입자를 처리한 세포로부터 수거한 조정배지와 일반 세포 배양을 통해 수거한 조정배지는 매일 200 ㅅl씩 하지허혈 유도 부위(중앙 대퇴부의 두덩정강근)에 4일 동안 주사하였다. 그 결과를 도 8에 나타낸다.

[0087] 도 8은 본 발명의 금-철 나노입자를 처리한 조정배지를 면역결핍 마우스 하지 허혈 유도 모델에 주사한 4주 후 결과 그래프를 나타낸다.

[0088] 도 8에서, NT는 비처리군, NC는 일반 조정배지, AC는 본 발명에 따른 조정배지를 나타낸다.

[0089] 도 8을 참조하면, 금-철 나노입자를 첨가한 조정배지를 주사한 실험군 (AC)에서 기존 조정배지 (나노입자를 사용 없이 수거한 인간 지방유래 줄기세포 배양액, NC) 또는 음성 대조군 (치료를 하지 않은 하지허혈 유도 마우스, NT)에 비해 비약적으로 증가된 외형적 변화를 보이는 것을 확인할 수 있다.

[0090] 즉, 본 발명에 따른 금-철 나노입자의 첨가가 줄기세포의 혈관신생 성장인자 분비를 유도하고, 이에 따라 하지허혈 모델링 마우스에 우수한 효과를 나타내었음을 확인할 수 있다.

[0091] (3) 하지허혈 모델링 마우스의 다리 조직 수득 및 조직염색

[0092] 하지허혈 모델링 마우스들은 28일차에 마취 후 절차에 맞게 샘플링하였다. 수거된 다리는 O.C.T 컴파운드(optical cutting temperature compound, SciGen Scientific, Gardenas, CA, USA)에 담아 냉동시켰다. 이후 10 μm 두께로 박편시킨 후 샘플을 얻어 다음과 같은 방법으로 염색하였다: 박편들은 anti-CD31 항체 (Abcam, Cambridge, UK)와 anti-SM alpha-actin 항체 (Abcam)로 염색하고, 시각화를 위해 플루오레신 이소티오시아네이트-컨쥬케이션된(fluorescein isothiocyanate-conjugated) 2차 항체 (Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA)를 이용하였다. 염색된 조직들은 4,6-디아미디노-2-페닐인돌(4,6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)을 통해 염색됐고 형광현미경 (Ti-U, Nikon, Tokyo, Japan)을 이용하여 관찰되었다. 그 결과를 도 9 및 10에 나타낸다,

[0093] 도 9는 면역결핍 마우스 하지허혈 유도 후 치료 4주차 다리 조직 $CD31^+$ 혈관 정량 및 면역염색 데이터를 나타내고, 도 10는 면역결핍 마우스 하지허혈 유도 후 치료 4주차 다리 조직 평활근 알파 액틴(Smooth muscle alpha actin)$^+$ 혈관 정량 및 면역염색 데이터를 나타내는 도면이다.

[0094] 도 9 및 10에서 파란색은 세포핵을 나타내고, 초록색은 혈관인자(도 9 및 10에서 각각 CD31 및 평활근 알파 액틴)를 나타낸다.

[0095] 도 9 및 10을 참조하면, 본 발명의 금-철 나노입자를 첨가한 조정배지는 $CD31^+$ 및 평활근 알파 액틴$^+$인 미세혈관이 비교군 (NC) 및 음성 대조군 (NT)에 비해 통계학적으로 유의미하게 증가하였으며, 면역염색 결과에서도 허혈 조직에서 발견되는 미세혈관의 개수가 증가한 것을 확인할 수 있다. 이것은 도 8을 참조하여 확인한 바와 일치하는 결과로서, 본 발명의 금-철 나노입자를 첨가함으로써 제조된 조정배지가 기존 조정배지 사용에 비해 혈관신생 효과가 뛰어남을 의미한다.

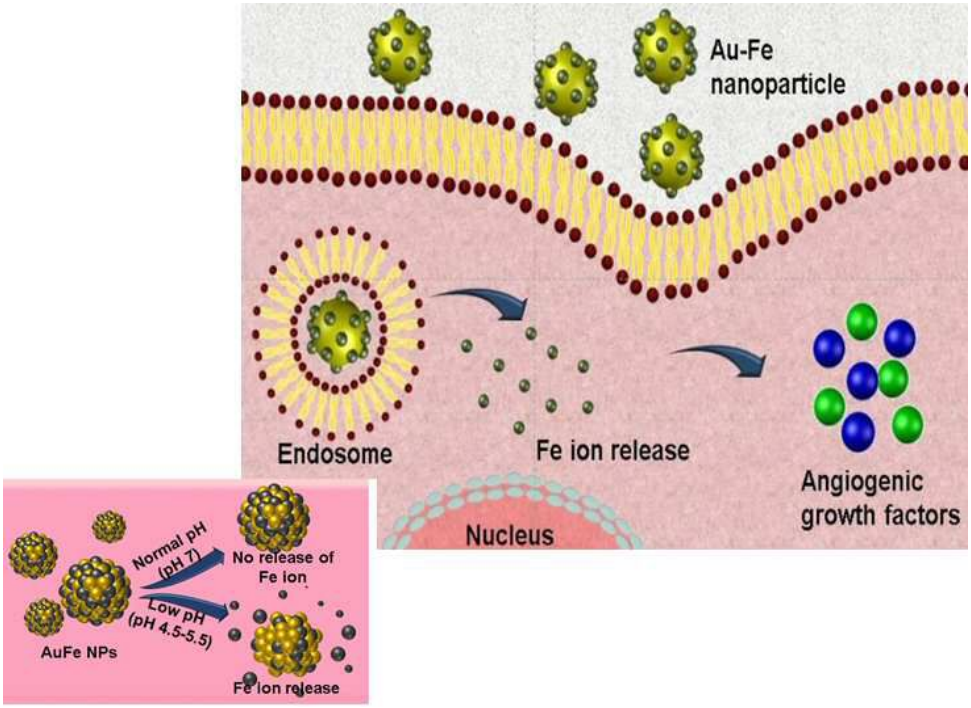
[0096] 따라서, 상기에서 검토한 바에 따르면, 본 발명에 따라 제조된 분해성 금-철 나노입자를 인간 성체 지방유래 줄기세포의 한 종류인 중간엽 줄기세포에 유입시켜, 세포로부터 방출되는 혈관신생 성장인자의 양을 추가적인 외부 유전자, 약물 또는 화합물의 사용 없이 비약적으로 증진시킬 수 있음을 확인할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 금-철 나노입자를 기존 세포 배양법에 접목시켜 세포 배양배지 내 혈관신생 성장인자의 농도가 향상된 배양액(조정배지)을 제조할 수 있으며, 고농도 혈관신생 성장인자 포함하는 본 발명의 조정배지를 주사법을 이용하여 주입하는 경우 마우스 하지허혈 모델에서 혈관신생을 증가됨을 유전자, 단백질 발현을 통한 조직 형성 단계

에서 확인할 수 있으며, 최종적인 허혈질환 부위의 손상(자연적 절단)이 크게 완화됨을 확인할 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 조정배지는 기존 세포 배양액(조정배지)을 환부에 주입하는 치료법의 성장인자 치료농도 한계 및 비분해성 나노입자의 체내 잔존 문제를 극복하면서 우수한 혈관신생 효과를 나타낼 수 있고, 줄기세포 기반 조정배지의 질환 치료효과 적용 분야에서 효과적으로 적용 가능함을 확인할 수 있다.

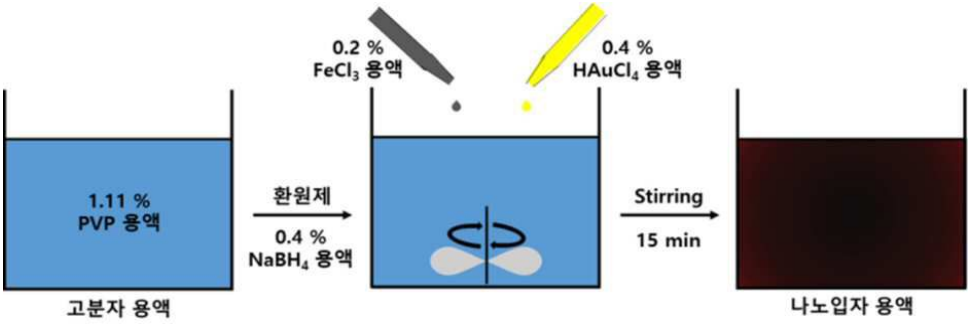
[0097] 상기에서는 본 발명의 바람직한 실시예를 참조하여 설명하였지만, 해당 기술 분야의 숙련된 당업자는 하기의 특허 청구 범위에 기재된 본 발명의 사상 및 영역으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서 본 발명을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있음을 이해할 수 있을 것이다.

## 도면

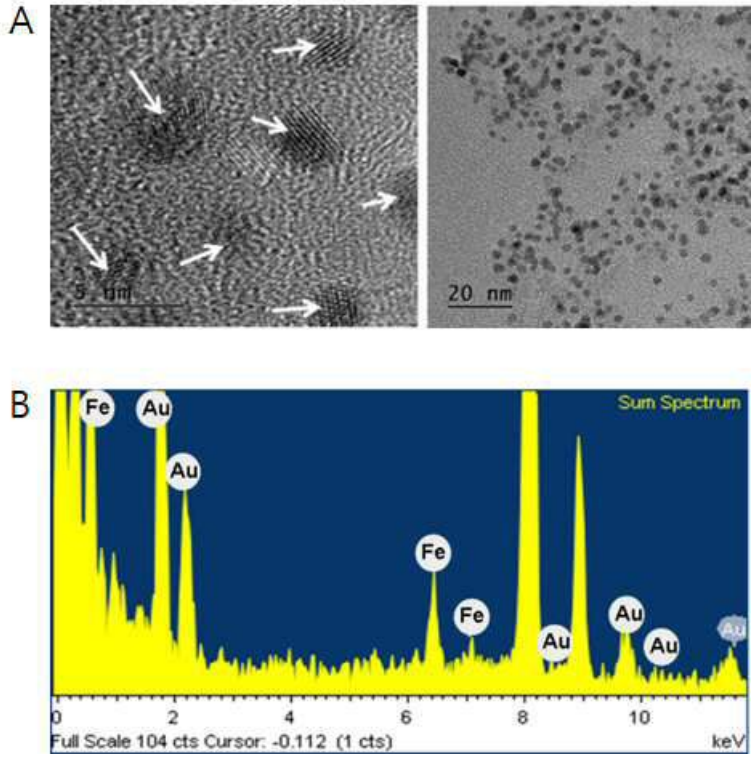
### 도면1



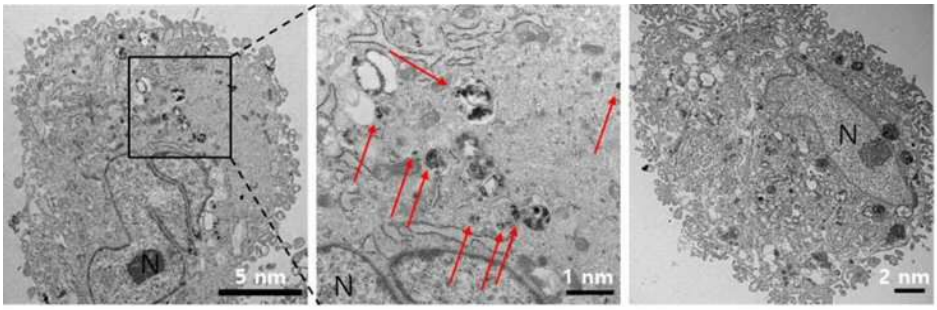

### 도면2



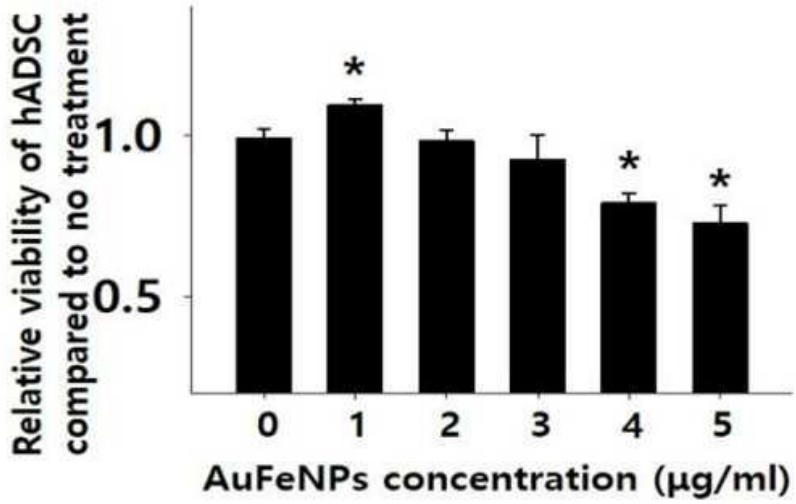
도면3


A
5 nm
20 nm
B
Fe
Au
Au
Fe
Fe
Au
Au
Au
Sum Spectrum
0
2
4
6
8
10
Full Scale 104 cts Cursor: -0.112 (1 cts)
keV

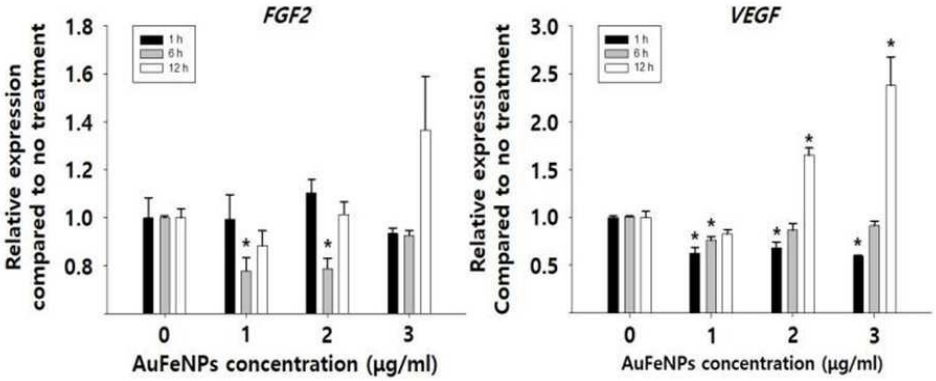
도면4


N
5 nm
N
1 nm
N
2 nm

도면5

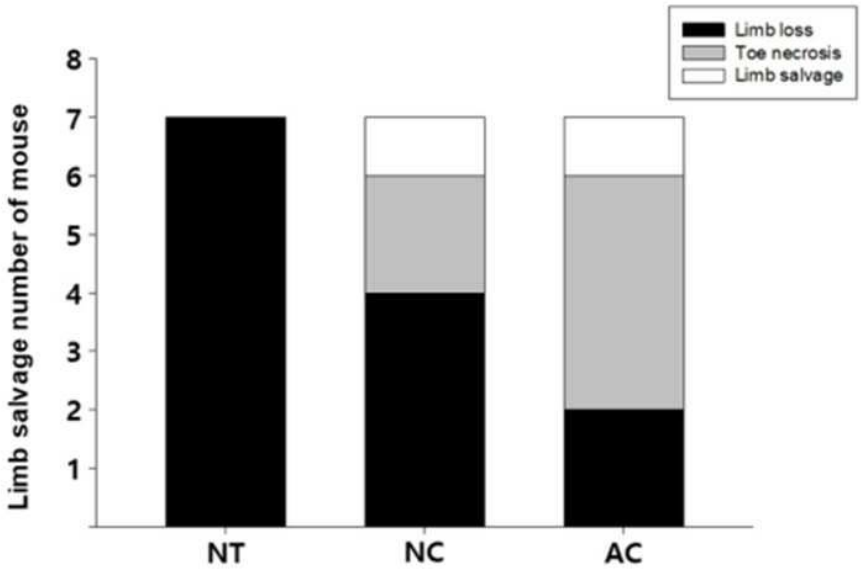

Relative viability of hADSC compared to no treatment
1.0
0.5
*
*
*
0
1
2
3
4
5
AuFeNPs concentration (μg/ml)

도면6

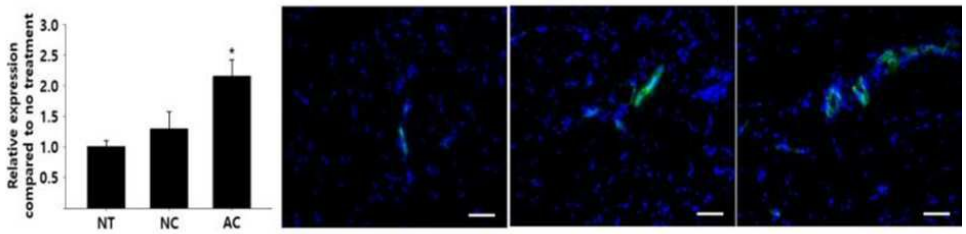

FGF2
Relative expression compared to no treatment
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
1 h
6 h
12 h
0
1
2
3
AuFeNPs concentration (μg/ml)
VEGF
Relative expression Compared to no treatment
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
1 h
6 h
12 h
0
1
2
3
AuFeNPs concentration (μg/ml)

도면7

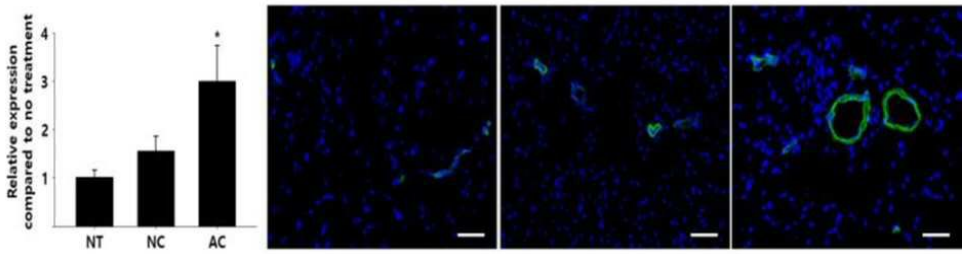
도면8


Limb loss
Toe necrosis
Limb salvage
Limb salvage number of mouse
8
7
6
5
4
3
2
1
NT
NC
AC

도면9


Relative expression compared to no treatment
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
*
NT
NC
AC

도면10


Relative expression compared to no treatment
4
3
2
1
*
NT
NC
AC