(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년02월15일
(11) 등록번호 10-2215201
(24) 등록일자 2021년02월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/51 (2006.01) *A61K 31/415* (2006.01)
A61K 31/573 (2021.01) *A61K 38/095* (2019.01)
A61P 29/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/5115 (2013.01)
A61K 31/415 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0072768
(22) 출원일자 2019년06월19일
심사청구일자 2019년06월19일
(65) 공개번호 10-2020-0001500
(43) 공개일자 2020년01월06일
(30) 우선권주장
1020180073416 2018년06월26일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
JP2016529310 A
KR1020190060491 A

(73) 특허권자
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
(72) 발명자
홍석만
경기도 성남시 분당구 판교원로 237, 703동 504호(판교동, 판교원마을7단지아파트)
홍석륜
서울특별시 강남구 학동로68길 29, 103동 1101호 (삼성동, 삼성동힐스테이트1단지아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인리체

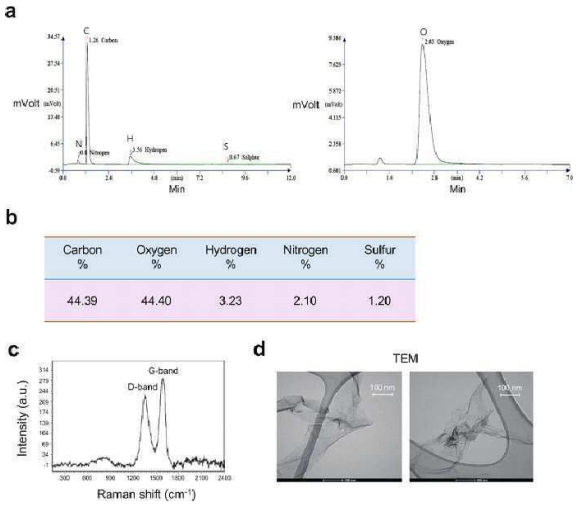
전체 청구항 수 : 총 6 항 심사관 : 한정희

(54) 발명의 명칭 **나노 산화 그래핀을 포함하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 산화정도가 높은 나노 사이즈의 그래핀을 포함하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로서, 특히 iNKT 세포의 면역반응에 관련한 염증성 질환에 우수한 예방 또는 치료효과를 나타낸다. 또한, 약물을 담지할 수 있는 안정적인 전달체로서도 기능하여 염증성 질환의 예방 또는 치료효과를 증대시킬 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 31/573 (2013.01)
A61K 38/095 (2019.01)
A61P 29/00 (2018.01)

(72) 발명자
이성원
충청남도 천안시 서북구 성정8길 14, 206호(성정동, 활림2차목련아파트)

박현정
경기도 안산시 단원구 와동공원로8길 54, 401호(와동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345272097
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(교육부)
연구과제명	아토피 피부염에서 SRG3의 면역 조절 기능 연구
기 여 율	5/10
과제수행기관명	세종대학교
연구기간	2017.11.01 ~ 2018.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345277806
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명	그래핀연구소
기 여 율	3/10
과제수행기관명	세종대학교
연구기간	2018.03.01 ~ 2019.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345252042
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축
연구과제명	그래핀 산화물의 패혈증 조절 기전 연구
기 여 율	2/10
과제수행기관명	세종대학교 산학협력단
연구기간	2016.11.01 ~ 2017.10.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

탄소원자 대비 산소원자의 비율이 0.9 내지 1.0인 나노 산화 그래핀을 포함하는 iNKT 세포 매개 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서, 상기 iNKT 세포 매개 염증성 질환은 패혈증, 패혈성 쇼크, 류마티스 관절염, 천식, 염증성 장질환, 비염, 피부염, 위염 및 호산구성 식도염으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 그래핀은 직경이 100 내지 200nm 인 것인 조성물.

청구항 7

청구항 1에 있어서,

상기 그래핀은 수소원자 2.7 내지 3.8% wt, 질소원자 1.5 내지 2.5% wt 및 황원자 0.5 내지 1.5% wt를 더 포함하는 것인 조성물.

청구항 8

청구항 1에 있어서,

상기 그래핀은 셀레콕십 (celecoxib), 메토트렉세이트 (Methotrexate), 설파살라진 (Sulfasalazine), 5-aminosalicylic acid, 레미케이드 (Remicade), 레플루노마이드 (Leflunomide), 하이드록시클로로퀸 (Hydroxychloroquine), 오마리주맙 (omalizumab), 프레드니손 (Prednisone), 글라티라머 아세테이트 (Glatiramer acetate), 핀골리모드 (Fingolimod), 베타페론 (Betaferon), 레비프 (Rebif), 아보넥스 (Avonex), 유파다시티닙 (Upadacitinib), 코센틱스 (Cosentyx), 스텔라라 (Stelara), 코르티코스테로이드 (Corticosteroid), 바소프레신 (Vasopressin), 노르에피네프린 (Norepinephrine), 아미노글리코시드 (Aminoglycoside), 플루오르퀴놀론 (Fluoroquinolone), 오셀타미비르 (Oseltamivir) 및 자나 미비르 (Zanamivir)로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인 약물을 담지한 것인 조성물.

청구항 9

청구항 8에 있어서,

상기 약물은 셀레콕십 (celecoxib), 메토트렉세이트 (Methotrexate), 설파살라진 (Sulfasalazine), 5-aminosalicylic acid, 레미케이드 (Remicade), 레플루노마이드 (Leflunomide), 하이드록시클로로퀸 (Hydroxychloroquine), 오마리주맙 (omalizumab), 프레드니손 (Prednisone), 글라티라머 아세테이트 (Glatiramer acetate), 핀골리모드 (Fingolimod), 레비프 (Rebif), 아보넥스 (Avonex), 유파다시티닙 (Upadacitinib), 코르티코스테로이드 (Corticosteroid), 바소프레신 (Vasopressin), 노르에피네프린 (Norepinephrine), 아미노글리코시드 (Aminoglycoside), 플루오르퀴놀론 (Fluoroquinolone), 오셀타미비르 (Oseltamivir) 및 자나 미비르 (Zanamivir)로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인 조성물.

청구항 10

청구항 8에 있어서,

상기 약물은 코르티코스테로이드 (Corticosteroid), 바소프레신 (Vasopressin), 노르에피네프린 (Norepinephrine), 아미노글리코시드 (Aminoglycoside), 플루오르퀴놀론 (Fluoroquinolone), 오셀타미비르 (Oseltamivir) 및 자나 미비르 (Zanamivir)로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 나노 산화 그래핀을 포함하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 그래핀(graphene)은 흑연을 의미하는 그래파이트(graphite)와 화학에서 탄소 이중결합을 가진 분자를 뜻하는 접미사 -ene을 결합한 합성어이다. 상기 그래핀은 탄소원자들이 무수히 연결된 6각형의 벌집 모양의 구조를 갖는다. 즉, 탄소 원자 한 층으로 되어 있는 두께 0.35 ㎚의 2차원 평면 형태의 얇은 막 구조이다. 그래핀은 간단한 구조이지만, 높은 전기전도성 및 열전도성, 높은 기계적 강도와 경도, 독특한 광학적 성질, 그리고 화학적 안정성 등 다양한 차원의 뛰어난 물리화학적 성질들을 나타낸다. 그래핀의 세포 내 흡수는 얇은 막 형태로 인해 비교적 제한적이다. 따라서, 세포 안전성 측면에서 식균작용 및 막 표면 흡착 등의 다양한 경로로 세포에 흡수되는 탄소 나노튜브에 비해 유리한 점이 있다.

[0004] 그래핀 소재가 기존의 탄소소재를 뛰어넘는 다양한 물리화학적 성질을 가지고 있는 것이 지속적으로 보고되고 있기 때문에, 최근에는 그래핀 재료를 생물학적 생체기술 분야에서 이용하려는 연구적 시도가 증가되고 있다. 동시에 그래핀 재료의 생물학적 응용에 대한 뛰어난 특성들도 밝혀지기 시작하였다. 현재 그래핀의 생물학적 응용분야는 조직 재생을 위한 세포 지지체, 약물 혹은 유전자 전달 운반체, 바이오이미징과 바이오센서를 위한 탐지물질, 기능성 바이오 멤스 소재, 그리고 신경 인터페이스로써의 이용 등이 있다. 이러한 그래핀의 생물학적 응용에서 가장 유망한 분야 중 하나는, 아직도 활발한 기술개발이 전개되고 있으며, 고성능의 재료적 기능성이 필요한 조직공학 분야이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제2016-0127207호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 나노 산화 그래핀을 포함하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공함에 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 1. 탄소원자 대비 산소원자의 비율이 0.8 이상인 나노 산화 그래핀을 포함하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[0010] 2. 위 1에 있어서,

[0011] 상기 염증성 질환은 패혈증, 패혈성 쇼크, 류마티스 관절염, 골관절염, 강직 척추염, 혈관염, 흉막염, 심장막염, 허혈 관련 염증, 염증성 동맥류, 신장염, 간염, 만성 폐염증 질환, 기관지 염증, 비염, 피부염, 위염, 대장염, 과민성대장증후군, 감염에 의한 열 또는 근육통, 비염, 기관지염, 간염, 천식, 류마티스 관절염, 제 1형 당뇨병, 염증성 장질환, 호산구 식도염, 급성 호중구성 피부염, 아토피성 피부염, 지루성 피부염, 다발성 경화증 및 건선으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인 조성물.

[0012] 3. 위 1에 있어서,

[0013] 상기 염증성 질환은 패혈증, 패혈성 쇼크, 류마티스 관절염, 천식, 제 1형 당뇨병, 염증성 장질환 및 다발성 경화증으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인 조성물.

[0014] 4. 위 1에 있어서,

[0015] 상기 염증성 질환은 패혈증인 조성물.

[0016] 5. 위 1에 있어서,

[0017] 상기 그래핀은 탄소원자 대비 산소원자의 비율이 0.9 내지 1.1인 것인 조성물.

[0018] 6. 위 1에 있어서,

[0019] 상기 그래핀은 직경이 100 내지 200nm 인 것인 조성물.

[0020] 7. 위 1에 있어서,

[0021] 상기 그래핀은 수소원자 2.7 내지 3.8% wt, 질소원자 1.5 내지 2.5% wt 및 황원자 0.5 내지 1.5% wt를 더 포함하는 것인 조성물.

[0022] 8. 위 1에 있어서,

[0023] 상기 그래핀은 셀레콕십 (celecoxib), 메토트렉세이트 (Methotrexate), 설파살라진 (Sulfasalazine), 5-aminosalicylic acid, 레미케이드 (Remicade), 레플루노마이드 (Leflunomide), 하이드록시클로로퀸 (Hydroxychloroquine), 오마리주맙 (omalizumab), 프레드니손 (Prednisone), 글라티라머 아세테이트 (Glatiramer acetate), 핀골리모드 (Fingolimod), 베타페론 (Betaferon), 레비프 (Rebif), 아보넥스 (Avonex), 유파다시티닙 (Upadacitinib), 코센틱스 (Cosentyx), 스텔라라 (Stelara), 코르티코스테로이드 (Corticosteroid), 바소프레신 (Vasopressin), 노르에피네프린 (Norepinephrine), 아미노글리코시드 (Aminoglycoside), 플루오르퀴놀론 (Fluoroquinolone), 오셀타미비르 (Oseltamivir) 및 자나 미비르 (Zanamivir)로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인 약물을 담지한 것인 조성물.

[0024] 9. 위 8에 있어서,

[0025] 상기 약물은 셀레콕십 (celecoxib), 메토트렉세이트 (Methotrexate), 설파살라진 (Sulfasalazine), 5-aminosalicylic acid, 레미케이드 (Remicade), 레플루노마이드 (Leflunomide), 하이드록시클로로퀸 (Hydroxychloroquine), 오마리주맙 (omalizumab), 프레드니손 (Prednisone), 글라티라머 아세테이트 (Glatiramer acetate), 핀골리모드 (Fingolimod), 레비프 (Rebif), 아보넥스 (Avonex), 유파다시티닙 (Upadacitinib), 코르티코스테로이드 (Corticosteroid), 바소프레신 (Vasopressin), 노르에피네프린 (Norepinephrine), 아미노글리코시드 (Aminoglycoside), 플루오르퀴놀론 (Fluoroquinolone), 오셀타미비르 (Oseltamivir) 및 자나 미비르 (Zanamivir)로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인 조성물.

[0026] 10. 위 8에 있어서,

[0027] 상기 약물은 코르티코스테로이드 (Corticosteroid), 바소프레신 (Vasopressin), 노르에피네프린 (Norepinephrine), 아미노글리코시드 (Aminoglycoside), 플루오르퀴놀론 (Fluoroquinolone), 오셀타미비르

(Oseltamivir) 및 자나 미비르 (Zanamivir)로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인 조성물.

발명의 효과

[0029] 본 발명은 산화정도가 높은 나노 사이즈의 그래핀을 포함하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로서, 특히 iNKT 세포를 포함하는 T 세포의 면역반응에 관련한 염증성 질환에 우수한 예방 또는 치료 효과를 나타낸다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 (a)GO의 전자적 분석 raw data, (b)GO 내 원소 함량(%) 분석결과, (c)GO의 raman spectrum, (d)GO의 TEM image를 각각 나타낸 것이다.

도 2는 (a)α-GalCer 매개 패혈성 쇼크를 쥐에 도입하는 실험의 모식도, (b)쇼크 도입 14시간 후 쥐의 비장 세포 내 iNKT, NK 및 γδ T 세포들의 빈도, (c)수지상세포와 대식세포에서 MHC II, MHC I, CD86 및 CD1d 분자의 표면 발현량과 IL12 및 IL6의 세포 내 발현량을 각각 나타낸 것이다.

도 3은 실시예 3-2의 $CD4^+$ T 세포($KJ1\text{-}26^+CD3\varepsilon^+CD4^+$)의 세포 내 IFNγ, IL4 및 IL17의 생산량을 나타낸 것이다.

도 4는 (a)도 2(a)의 패혈성 쇼크 유도 후 14시간 경과된 쥐들의 간에서 얻은 iNKT 세포 및 NK 세포 내 사이토카인(IFNγ and TNFα) 생산량 및 CD69 발현량, (b) WT, Jα18 KO 및 Vα14 TCR Tg B6 쥐들에 α-GalCer (2 μg/mouse)/D-GalN (10 mg/mouse)의 정맥 내 주입에 이어 PBS 또는 GO (50 μg)를 주입한 후, 72시간 동안 쥐들의 생존률, (c) 간 iNKT 세포 내 IFNγ 와 TNFα의 생산량을 각각 나타낸 것이다.

도 5는 (a)GO 농도변화에 따른 iNKT 세포들의 세포 내 IFNγ, IL4 및 TGFß 생산량, (b)α-GalCer 유도 면역반응에서 GO 자극된 iNKT 세포의 영향을 측정하는 실험의 모식도, (c)Jα18 KO 쥐로부터 분리된 수지상세포와 함께 배양된 iNKT 세포들의 GO 농도변화에 따른 세포 내 IFNγ 생산량을 각각 나타낸 것이다.

도 6은 (a)PBS 또는 GO의 정맥 내 주입 5일 후 쥐들의 총 비장 $CD4^+$ T 세포들 중 $Foxp3^+CD25^+$ Treg 세포의 빈도 및 (b)$CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg 세포의 GITR 및 FR4 발현량; (c)PBS 또는 GO의 정맥 내 주입 14시간 후 쥐들의 비장 내 수지상세포 ($CD11c^+$), 대식세포 ($CD11c^-CD11b^+F4/80^+$) 및 iNKT 세포 ($CD3\varepsilon^+\alpha GC/CD1d\ dimer^+$) 의 FACS plots, (d)상기 세포들의 절대적 수, (e)상기 세포들 내 TGFß의 생산량, (f)비장 $CD4^+$ T 세포들 중 $CD25^+Foxp3^+$ Treg 세포의 빈도 및 (g)비장 $CD25^+Foxp3^+$ Treg 세포 내 GITR 및 FR4의 발현량을 각각 나타낸 것이다.

도 7은 rGO(reduced Graphene oxide)와 GO 간 염증성 반응 억제능 비교한 것으로서, 탄소 대비 산소의 비율이 낮을수록 염증성 반응 억제능이 감소하고, 오히려 염증을 증가시킬 수 있음을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0034] 본 발명은 나노 산화 그래핀을 포함하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0036] 상기 그래핀(Graphene)은 기본 골격 탄소가 산화된 형태의 것으로서, 탄소에 결합된 수소원자가 탄소보다 더 강한 전기음성도를 갖는 원자, 즉 질소(N), 산소(O) 또는 황(S) 등으로 치환된 형태를 갖는 것일 수 있다.

[0037] 상기 그래핀은 다양한 작용기로 치환된 형태일 수 있고, 예를 들어, 에폭시기(epoxy), 카르복실기(carboxyl), 하이드록시기(hydroxyl) 또는 싸이올기(thiol) 등일 수 있다.

[0038] 상기 그래핀은 산화 그래핀(Graphene oxide)으로서, 산화의 정도가 높은 것일 수 있다. 예를 들어, 탄소원자(C) 대비 산소원자(O)의 비율이 0.8 이상 또는 0.9 이상일 수 있고, 바람직하게는 0.9 내지 1.1일 수 있는데, 상기 비율이 1.0에 근접할수록 산화 그래핀의 염증성 질환 예방 또는 치료에 있어서 선천면역세포의 염증성 사이토카인 분비 억제 효과를 더 우수하게 발휘할 수 있는 것으로 판단된다.

[0039] 상기 그래핀은 산소원자(O) 외 수소원자(H), 질소원자(N) 또는 황원자(S)를 추가적으로 포함할 수 있고, 각각의 비율은 예를 들면 각각 1.0 내지 5.0% wt, 0.5 내지 4.0% wt, 0.2 내지 4.0% wt 또는 각각 2.0 내지 4.5% wt,

1.0 내지 3.0% wt, 0.3 내지 3.0% wt일 수 있고, 바람직하게는 각각 2.7 내지 3.8% wt, 1.5 내지 2.5% wt, 0.5 내지 1.5% wt일 수 있다.

[0041] 상기 그래핀의 사이즈는 나노(nm) 사이즈의 것으로서, 복강 내, 근육 내 또는 혈관 내 주입 등에 적절한 사이즈를 갖는다.

[0042] 상기 그래핀은 10 내지 500nm, 또는 50 내지 300nm 의 직경을 갖는 것일 수 있으나, 혈류 내 전달 효율 및 과도한 염증반응의 효과적 억제의 측면에서 바람직하게는 100 내지 200nm 의 직경을 갖는 것일 수 있다.

[0043] 상기 그래핀은 약물을 담지하여 약물을 전달하는 약물의 전달체로서 활용될 수 있다. 이 경우, 상기 그래핀은 나노미터 단위의 작은 직경을 갖는 미세한 크기의 것으로서, 약물 담지시에도 크지 않은 부피를 가져 표적세포 내 약물을 우수한 효율로 전달할 수 있다.

[0044] 상기 그래핀이 약물의 담지체로 사용되는 경우, 당업계의 공지된 약물의 담지체와 함께 사용될 수 있고, 함께 사용할 수 있는 담지체로는 liposome, lipofectamine, dendrimer, micelle, mesoporous silica particle, aminoclay, hydrogel으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있다.

[0045] 상기 그래핀이 담지하는 약물은 특별한 제한이 없으나, 상기 그래핀의 염증성 질환의 예방 또는 치료 효과를 고려할 때, 염증성 질환 예방 또는 치료용 약물임이 바람직하다.

[0046] 상기 약물로는 예를 들어, 셀레콕십 (celecoxib), 메토트렉세이트 (Methotrexate), 설파살라진 (Sulfasalazine), 5-aminosalicylic acid, 레미케이드 (Remicade), 레플루노마이드 (Leflunomide), 하이드록시클로로퀸 (Hydroxychloroquine), 오마리주맙 (omalizumab), 프레드니손 (Prednisone), 글라티라머 아세테이트(Glatiramer acetate), 핀골리모드 (Fingolimod), 베타페론 (Betaferon), 레비프 (Rebif), 아보넥스 (Avonex), 유파다시티닙 (Upadacitinib), 코센틱스 (Cosentyx), 스텔라라 (Stelara), 코르티코스테로이드 (Corticosteroid), 바소프레신 (Vasopressin), 노르에피네프린 (Norepinephrine), 아미노글리코시드 (Aminoglycoside), 플루오르퀴놀론 (Fluoroquinolone), 오셀타미비르 (Oseltamivir) 및 자나 미비르 (Zanamivir)로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있고; iNKT 세포 매개 염증성 질환의 예방 또는 치료의 측면에서 셀레콕십 (celecoxib), 메토트렉세이트 (Methotrexate), 설파살라진 (Sulfasalazine), 5-aminosalicylic acid, 레미케이드 (Remicade), 레플루노마이드 (Leflunomide), 하이드록시클로로퀸 (Hydroxychloroquine), 오마리주맙 (omalizumab), 프레드니손 (Prednisone), 글라티라머 아세테이트 (Glatiramer acetate), 핀골리모드 (Fingolimod), 레비프 (Rebif), 아보넥스 (Avonex), 유파다시티닙 (Upadacitinib), 코르티코스테로이드 (Corticosteroid), 바소프레신 (Vasopressin), 노르에피네프린 (Norepinephrine), 아미노글리코시드 (Aminoglycoside), 플루오르퀴놀론 (Fluoroquinolone), 오셀타미비르 (Oseltamivir) 및 자나 미비르 (Zanamivir)로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있으나; 패혈증의 예방 또는 치료의 측면에서 바람직하게는 코르티코스테로이드 (Corticosteroid), 바소프레신 (Vasopressin), 노르에피네프린 (Norepinephrine), 아미노글리코시드 (Aminoglycoside), 플루오르퀴놀론 (Fluoroquinolone), 오셀타미비르 (Oseltamivir) 및 자나 미비르 (Zanamivir)로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있다.

[0048] 상기 그래핀을 포함하는 본 발명의 조성물은 염증성 질환의 예방 또는 치료 효과를 갖는다.

[0049] 상기 '치료'란 상기 그래핀 또는 이를 포함하는 조성물의 투여로 염증성 질환의 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 대한의학협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 본 발명의 조성물이 효과가 있는 질환의 정확한 기준을 알고, 개선, 향상 및 치료된 정도를 판단할 수 있을 것이다.

[0050] 상기 '예방'은 상기 그래핀 또는 이를 포함하는 조성물의 투여로 염증성 질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 염증성 질환에 치료효과가 있는 본 발명의 조성물은 초기 증상 또는 증상이 나타나기 전에 복용할 경우 이러한 질환을 예방할 수 있다는 것은 당업자에게 자명할 것이다.

[0051] 상기 염증성 질환으로는 예를 들어, 패혈증, 패혈성 쇼크, 류마티스 관절염, 골관절염, 강직 척추염, 혈관염, 흉막염, 심장막염, 허혈 관련 염증, 염증성 동맥류, 신장염, 간염, 만성 폐염증 질환, 기관지 염증, 비염, 피부염, 위염, 대장염, 과민성대장증후군, 감염에 의한 열 또는 근육통, 비염, 기관지염, 간염, 천식, 류마티스 관절염, 제 1형 당뇨병, 염증성 장질환, 호산구 식도염, 급성 호중구성 피부염, 아토피성 피부염, 지루성 피부염, 다발성 경화증 및 건선으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있고; iNKT 세포 매개 염증성 질환으로서 패혈증, 패혈성 쇼크, 류마티스 관절염, 천식, 제 1형 당뇨병, 염증성 장질환 및 다발성 경화증으로 이루

어진 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있으나, 바람직하게는 패혈증일 수 있다.

[0053] 본 발명의 조성물은 동시에 또는 연속적으로 투여가능하며, 이들 혼합물을 단독으로 또는 염증성 질환의 치료를 위한 다른 약학적 활성성분과 병행하여 투여될 수 있다.

[0054] 본 발명의 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 희석제, 보존제, 안정화제, 습윤제, 유화제, 용해제, 감미제, 착색제, 삼투압 조절제, 산화방지제 등의 부형제를 더 포함할 수 있다. 구체적으로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘, 스테아레이트, 광물유 등을 들 수 있다.

[0055] 본 발명의 조성물의 투여방법은 제형에 따라 용이하게 선택될 수 있으며, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 예를 들면, 산제, 정제, 환제, 과립제, 당의정, 경질 또는 연질의 캡슐제, 액, 에멀젼, 현탄액, 시럽제, 엘릭서, 외용제, 좌제, 멸균 주사용액 등의 형태로 제형화되어 전신 또는 국소적으로 경구 또는 비경구 투여될 수 있으며, 특히 경구 투여가 바람직하다.

[0056] 경구 투여를 위한 고형 제형에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제형은 본 발명의 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 슈크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제형으로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0057] 비경구 투여를 위한 제형에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0058] 더 나아가 본 발명의 조성물을 포함하는 약학 조성물은 당해 기술 분야의 공지된 적절한 방법을 사용하여 또는 레밍턴의 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 바람직하게 제형화될 수 있다.

[0059] 본 발명의 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양할 수 있고, 여러 가지 조건에 따라 변동가능하다. 투여횟수는 원하는 범위 내에서 하루에 1회, 또는 수회로 나누어 투여할 수 있으며, 투여 기간도 특별히 한정되지 않는다. 또한, 본 발명의 조성물은 그대로 경구투여하는 것 이외에, 임의의 음식물에 첨가하여 일상적으로 섭취할 수도 있다.

[0061] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[0063] **실시예 1. 실험조건 및 방법**

[0064] **1. 실험용 쥐와 시약조건**

[0065] 야행성(WT) C57BL/6(B6), TLR4-mutant(C3H/HeJ) 및 TLR4-WT(C3H/HeN) 쥐는 Central Laboratory Animal, Inc.(서울, 한국)에서 구매하였다. Jα18 KO B6 쥐는 Dr. M. Taniguchi(RIKEN, 요코하마, 일본)로부터 제공받았고, invariant Vα14 TCR transgenic (Tg) B6 쥐는 Dr. A. Bendelac(시카고 대학, 시카고, IL, 미국)로부터 제공받았다. Balb/c background의 DO11.10 OVA-specific TCR Tg 쥐가 실험에서 사용되었다. 실험에 사용된 모든 쥐들은 탄생 후 6 내지 12주가 경과된 것들이고, 세종대학교에서 유지된 것들이다. 모든 쥐들은 온도가 조절된 조건에서 식음의 자유조건 하 12 시간 light/12 시간 dark cycle로 유지되었다. 모든 쥐들은 고압 증기 멸균 수돗물과 γ-irridated 살균 식단이 제공되었다. 모든 동물 실험은, 성별과 나이가 일치하는 쥐가 사용되었고, 세종대학교 Institutional Animal Care and Use Committee(IACUC, SJ-20161103)로부터 허가 받았으며, 관련 가이드라인과 규정을 준수하며 수행되었다. α-GalCer(KRN7000)는 Enzo Life Sciences, Inc (Farmingdale, NY, 미국)에서 구매하였고, Nano graphene oxide (NANO-GO-P)는 Graphene Supermarket(Calverton, NY, 미국)에서 구매하였으며, 상기 산화 그래핀은 저장용액으로서 증류수에 분산되었다(10mg/ml).

[0067] **2. Graphene Oxide(GO)의 물성측정**

[0068] 원소분석(C,H,N,S)은 텅스텐 무수물 및 구리선을 촉매로 하여 Flash EA-2000 Elemental Analyzer (Thermo

Finnigan, Milano, Italy)로 수행하였다. 산소(O) 함량은 니켈 도금된 탄소 및 석영 튜닝을 촉매로 하여 Flash EA-1112 (Thermo Scientific, The Netherlands) 원소분석기로 수행하였다. Raman spectroscopy는 532nm 파장에서 Micro-Raman spectrophotometer (Nanofinder FLEX G, Lambda Ray)로 수행하였다. GO의 형태적 특성은 high resolution transmission electron microscopy (TEM) (Talos F200X microscope operating at 200 kV, FEI)로 관찰하였고, TEM 이미징의 표본은 sample 방울을 구리 격자에 살포하고 진공에서 증발시키며 수행되었다.

[0070] **3. 패혈성 쇼크의 도입**

[0071] 패혈성 쇼크를 도입하기 위해, 쥐에 전달체(vehicle) 또는 GO 중 하나를 정맥 주입한 이후에 α-GalCer (2 μg/mouse)와 2-amino-2deoxy-D-galactose (D-galactosamine) (25 mg/mouse)를 복강 주입 하였다. 모든 쥐들은 상기 주입 후 72시간동안 α-GalCer/D-GalN-유도 치사여부가 지속적으로 관찰되었다.

[0073] **4. 유세포 분석**

[0074] 후술하는 단클론항체들(mAbs)은 BD Biosciences (San Jose, USA)에서 얻었다: allophycocyanin (APC)-, or phycoerythrin (PE)-conjugated anti-NK1.1 (clone PK-B6); APC-, or PE-Cy7-conjugated anti-CD11c (clone HL3); PE-Cy7-conjugated anti-GITR (clone DTA-1); PE-conjugated anti-MHC II (clone M5/114.15.2); APC-, or PE-Cy7-conjugated anti-CD3ε (clone 145-2C11); PE-conjugated anti-CD1d (clone 1B1); PE-Cy7-conjugated anti-CD11b (clone M1/70); PE-conjugated anti-CD40 (clone 3/23); PE-Cy7-conjugated anti-CD69 (clone H1.2.F3); PE-conjugated anti-IL12p40 (clone C15.6); biotin-conjugated anti-CD86 (clone GL1); APC-conjugated anti-F4/80 (clone BM8); PE-conjugated anti-TNFα (clone XP6-XT22); PE-conjugated anti-IL6 (clone MP5-20F3); PE-conjugated anti-IL4 (clone BVD6-24G2); APC-, or PE-Cy7-conjugated anti-CD4 (clone RM4-5); and PE-conjugated anti-IgG1 (κ isotype control). 후술하는 단클론항체들(mAbs)은 eBioscience에서 얻었다: fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-KJ1-26 (clone KJ1-26); PE-conjugated anti-IL17A (clone eBio17B7); PE- or FITC- conjugated anti-Foxp3 (clone NRRF-30); PE-conjugated anti-TGFß1/LAP (clone TW7-16B4); PE-conjugated anti-FR4 (clone eBio12A5); and PE-conjugated anti-IFNγ (clone XMG1.2). 분석 data는 FACSCalibur™ flow cytometer (Becton Dickinson, USA)를 사용하여 얻었고, FlowJo software (Tree Star, USA)로 분석하였다.

[0075] 표면 염색을 위하여 얻은 세포들은 찬 0.5% BSA-containing PBS (FACS buffer)로 2번 수세한 후 Fc 수용체 blocking을 위해 얼음위에서 anti-CD16/CD32 단클론항체들과 함께 10분간 배양되었다. 그 후, 세포들은 형광라벨된 단클론항체로 염색되었다. 유세포 분석 data는 FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickson, San Jose, CA, USA)를 사용하여 얻었고, FlowJo software (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA)로 분석하였다.

[0077] **5. iNKT 세포의 CD1d/α-GalCer dimer 염색**

[0078] iNKT 세포(Invariant Natural Killer T 세포)을 특이적으로 염색하기 위해, mCD1d/Ig 융합 단백질(CD1d dimer; mouse CD1d dimerX, BD Biosciences)을 40배의 몰 초과량의 α-GalCer (in PBS containing 0.5% Tween 20)와 함께 37°C에서 밤새 배양하였다. 이 후, α-GalCer가 로딩된 mCD1d/Ig 융합 단백질과 FITC- or APC-conjugated anti-mouse IgG1 Ab (clone A85-1, BD PharMingen, San Diego, CA)를 1:2 비율로 혼합한 후, 2시간 동안 상온에서 배양하였다.

[0080] **6. 세포 내 사이토카인 염색**

[0081] 세포 내 염색을 수행하기 위하여, 비장에서 얻은 단일 세포 현탁액을 10 μg/ml의 세포 내 단백질 수송 저해제(brefeldin A)와 함께 37℃의 RPMI 배지에서 2시간 동안 배양하였다. 세포들은 세포 특이적 표면 마커들을 위해 염색되었고, PBS 내 4% paraformaldehyde에 고정되었으며, 4℃의 FACS buffer로 수세되었고, 투과성 세포들은 anti-cytokine mAbs(PE-conjugated anti-IL12p40, anti-IL4, anti-TNFα, anti-IL6, anti-IFNγ, anti-IL17A, and anti-TGFß1; PE-conjugated rat IgG isotype control mAbs)로 상온에서 30분 동안 염색되었다. 전사 인자들을 위한 세포 내 염색은 Foxp3/transcription factor staining buffer set kit (eBioscience, USA)을 이용하여 mAbs(PE- or FITC-conjugated anti-Foxp3; or PE-conjugated rat IgG isotype control mAbs)와 함께 수행되었다. 샘플들(5,000 세포 이상)은 BD FACSCalibur을 사용하여 얻었고, Tree Star FlowJo software package로 분석하였다.

[0083] **7. 간 백혈구의 분리**

[0084] 쥐들은 ketamine 40 mg/kg와 xylazine 4 mg/kg 조합을 사용하여 마취되었고, PBMCs를 혈관으로부터 제거하기

위해 차가운 멸균 PBS를 좌심실을 통해 관류시켰다. 간은 관류 후 제거되어 가위, 메스로 작은 조각으로 잘라냈고, collagenase type IV(Sigma, St. Louis, MO, USA; 2.5 mg/ml)와 DNase I(Promega, Madison, USA; 1 mg/ml)로 15분 동안 37℃에서 분해시켰다. 그 후, 분해된 조직들은 combination C Tubes와 gentleMACSTM dissociator (Miltenyi, Germany)를 이용하여 단일 세포 현탁액으로 해리시켰고, 70-μm-pore cell strainer를 이용하여 여과하였으며, 세포들은 PBS(10% FBS)로 한 번 수세하였다. 단핵 세포들은 불연속적인 Percoll gradient 이후 40/70% Percoll interphase에서 획득하였다. 단핵 세포들의 수는 염색 전 PBS 수세 후에 0.4% trypan blue (Welgene, Seoul, Korea)와 a hemocytometer를 이용하여 결정되었다.

[0086] **8. MACS(Magnetic Activated Cell Sorting)에 의한 세포 분리**

[0087] 비장으로부터의 단일 세포 현탁액은 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 10% FBS, 5 mM 2-mercaptoethanol 및 100 units/mL penicillin-streptomycin이 보충된 RPMI 1640 (Gibco BRL, USA) medium 로 구성된 RPMI complete 배지에서 재부유시켰다. iNKT 세포들에 $NK1.1^+$ iNKT cell isolation kit (Miltenyi, Germany)를 이용하여 양분을 공급하였다. 상기 iNKT 세포들의 수는 MACS. $CD11c^+$ 수지상세포 및 $CD4^+$ T 세포들이 MACS system (Miltenyi, Germany)을 이용하여 쥐로부터 분리된 후 >88%의 순도를 보였다. $CD11c^+$ 수지상세포 및 $CD4^+$ T 세포의 수는 MACS 후 >94%의 순도를 보였다.

[0089] **9. In vivo helper T 세포 분화 측정**

[0090] DO11.10 TCR Tg Balb/c 쥐에 GO 또는 vehicle를 정맥 주입 후 α-GalCer (2 μg)와 $OVA_{323-339}$ peptide (100 μg)를 복강 내 주사하여 면역시켰다. 5일 후, $CD4^+$ T 세포들은 면역된 쥐로부터 분리되었고, $OVA_{323-339}$ (10 μg/ml)로 10:1의 비율로 pulse된 수지상세포와 함께 배양되었다. 사이토카인의 생산량은 세포 내 사이토카인 염색으로 결정되었다.

[0092] **10. 통계적 분석**

[0093] VassarStats (http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html)를 이용한 Two-way ANOVA 분석이 수행되었다. $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$ 및 $^{\#\#\#}P<0.001$은 two-way ANOVA에서 상당한 차이임을 나타낸다. 두 그룹의 비교를 위해 Excel(Microsoft, USA)을 이용하여 Unpaired two-tailed Student's t-test를 수행하였다. $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ 및 $^{***}P<0.001$은 unpaired two-tailed Student's t-test에서 상당한 차이로서 간주된다.

[0095] **실시예 2. GO의 물성 분석**

[0096] GO 원소 분석의 raw data를 도 1(a)에 나타내었고, GO 내 C,O,H,N,S의 %를 도 1(b)에 나타내었다. C,H,N과 같은 주요 유기 원소는 일반적으로 원소 분석기에 의해 결정되는데, 도 1(a)(b)를 참조할 때, C와 O의 GO내 함량이 유사하여 산소/탄소 비율이 1.0에 가까움을 확인할 수 있다.

[0097] GO의 구조적 정보를 알려주는 Raman spectrum은 Raman spectrophotometer에 의해 측정되었고, 이를 도 1(c)에 나타내었다. 도 1(c)를 참조하면, 스펙트럼은 sp^2 탄소의 E2g 포논의 first-order scattering으로부터 야기된 $1570cm^{-1}$에서의 강한 G band를 보이는 반면, 평면 내 sp^2 도메인의 size와 관련된 $1350cm^{-1}$의 강한 D band 역시 보여준다. Raman spectrum에서의 D band 강도 증가는 더 많은 sp^2 도메인의 형성을 나타낸다.

[0098] GO의 형태학적 분석결과를 나타내는 TEM 이미지를 도 1(d)에 나타내었고, 이를 참조하면, GO는 나노미터 단위의 작은 직경을 지니고 있음을 확인할 수 있다.

[0100] **실시예 3. GO의 α-GalCer 매개 면역반응 억제능 분석**

[0101] **1. 선천적 면역반응 억제**

[0102] α-GalCer 유도 면역 반응에 대한 GO의 영향을 측정하기 위한 실험을 도 2(a)에 도식화하여 나타내었다. WT B6 쥐에 α-GalCer (2 μg) 또는 PBS control을 복강 내 주입하였고, 동시에 GO (50 μg) 또는 PBS control 중 어느 하나를 정맥 내 주입하였다. 비장 세포들은 각각 실험 군에서 상기 주입 14시간 후에 얻었다.

[0103] 총 비장 세포들은 B6 쥐로부터 분리되었다. iNKT, NK 및 γδ T 세포들의 빈도는 각각 $NK1.1^+CD3\varepsilon^+$, $NK1.1^+CD3$

ε⁻ 및 TCRγδ⁺CD3ε⁺ 집단에 게이팅 함으로써 측정되었고 그 결과를 도 2(b)에 나타내었다. iNKT, NK 및 γδ T 세포에 의한 세포 내 IFNγ와 TNFα 생산량은 유세포 분석에 의해 결정되었으며 그 평균값들 ±SD 또한 도 2(b)에 나타내었다(unpaired two-tailed Student's t-test; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001; n = 4 per group in the experiment). 도 2(b)를 참조하면, GO를 처리한 경우 iNKT, NK 및 γδ T 세포에 의한 세포 내 IFNγ와 TNFα 생산량이 처리하지 않은 경우보다 감소함을 확인할 수 있는데, 이는 GO가 CD1d-restricted iNKT 세포의 활성에 의해 개시된 염증성 반응을 억제할 수 있음을 나타낸다.

[0104] 수지상세포와 대식세포에서 MHC II, MHC I, CD86 및 CD1d 분자의 표면 발현량과 IL12 및 IL6의 세포 내 발현량을 분석하였고, 이 결과 및 평균값들 ±SD를 도 2(c)에 나타내었다(unpaired two-tailed Student's t-test; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001; n = 4 per group in the experiment). 도 2(c)를 참조하면, GO를 처리한 경우 수지상세포와 대식세포에서 MHC II, MHC I, CD86 및 CD1d 분자의 표면 발현과 IL12 및 IL6의 세포 내 발현 모두 처리하지 않은 경우보다 감소함을 확인할 수 있는데, 이는 GO가 APC(Antigen Presenting Cell)-의존 방식의 α-GalCer-triggered iNKT 세포 활성을 억제할 수 있음을 나타낸다.

[0106] **2. 후천적 면역반응 억제**

[0107] DO11.10 TCR Tg 쥐에 GO (50 μg) 또는 GO + α-GalCer (2 μg) 중 어느 하나를 주입하였다. 주입 5일 후 비장의 $CD4^+$ T 세포를 쥐로부터 분리한 후, in vitro에서 OVA 항원을 pulse한 수지상세포로 24시간 동안 다시 자극하였다. $CD4^+$ T 세포($KJ1\text{-}26^+CD3\varepsilon^+CD4^+$)의 세포 내 IFNγ, IL4 및 IL17의 생산량은 유세포 분석을 통해 평가되었고, 그 결과 및 평균값들 ±SD를 도 3에 나타내었다(n = 4 per group in the experiment; unpaired two-tailed Student's t-test; **P<0.01, ***P<0.001). 도 3을 참조하면, Two-way ANOVA (treatment (GO) X treatment (α-GalCer)) 분석결과는 두 가지 요소들 간 상호작용을 확인할 수 있고, GO를 처리한 경우 $CD4^+$ T 세포($KJ1\text{-}26^+CD3\varepsilon^+CD4^+$)의 세포 내 IFNγ, IL4 및 IL17의 생산량이 처리하지 않은 경우보다 감소함을 확인할 수 있다.

[0109] **실시예 4. GO의 α-GalCer/D-GalN 유도 패혈성 쇼크 억제능 분석**

[0110] 도 2(a)의 패혈성 쇼크 유도 쥐들로부터 간 백혈구를 α-GalCer/D-GalN 주입 14시간 후 얻었다. 각 실험군의 간에서 얻은 iNKT 세포 및 NK 세포 내 사이토카인(IFNγ and TNFα) 생산량 및 CD69 발현량은 유세포 분석법에 의해 분석되었고, 그 결과 및 평균값들 ±SD를 도 4(a)에 나타내었다(unpaired two-tailed Student's t-test; *P<0.05, **P<0.01; n = 4 per group in the experiment). 도 4(a)를 참조하면, GO를 처리한 경우 상기 iNKT 세포 및 NK 세포 내 사이토카인(IFNγ and TNFα) 생산량 및 CD69 발현량은 처리하지 않은 경우보다 감소함을 확인할 수 있다.

[0111] WT, Jα18 KO(iNKT cell-deficient) 및 Vα14 TCR Tg(iNKT cell-overexpressing) B6 쥐들에 α-GalCer (2 μg/mouse)/D-GalN (10 mg/mouse)의 정맥 내 주입에 이어 PBS 또는 GO (50 μg)를 주입한 후, 72시간 동안 쥐들의 생존률을 관찰한 결과를 도 4(b)에 나타내었다(n = 4 in Jα18 KO-PBS 또는 GO; n = 6 in WT-PBS or GO; n = 6 in Vα14 TCR Tg-PBS 또는 GO in the experiment). 도 4(b)를 참조하면, GO를 처리한 경우 α-GalCer/D-GalN 유도 패혈성 쇼크에 의한 사망률이 처리하지 않은 경우보다 낮음을 확인할 수 있다.

[0112] 각 실험군의 간 iNKT 세포 내 IFNγ 와 TNFα의 생산량을 유세포 분석에 의해 측정한 결과 및 평균값들 ±SD를 도 4(c)에 나타내었다(unpaired two-tailed Student's t-test; **P<0.01, ***P<0.001; n = 3 in WT-PBS; n = 4 in WT-GO in the experiment). 도 4(c)를 참조하면, 간 iNKT 세포 내 IFNγ 와 TNFα의 생산량은 처리하지 않은 경우보다 낮음을 확인할 수 있다.

[0113] 상기 도 4(a)(b)(c)를 종합할 때, GO 매개 iNKT 세포의 기능적 변화는 심각한 패혈성 쇼크로 인한 사망률을 감소시키는데 기여할 수 있음을 확인할 수 있다.

[0115] **실시예 5. GO 자극 iNKT 세포의 Treg 세포 증식 유도능 분석**

[0116] **1. GO 자극에 의한 iNKT 세포의 면역조절 표현형으로의 전환**

[0117] B6 쥐로부터 분리된 iNKT 세포들은 GO (6.25, 12.5, 25, and 50 μg/ml)와 함께 10시간 동안 배양되었고, 그 후 2시간 동안 PMA/ionomycin으로 자극되었다. iNKT 세포들의 세포 내 IFNγ, IL4 및 TGFß 생산량은 유세포 분석에 의해 결정되었고, 그 결과 및 평균값들 ±SD을 도 5(a)에 나타내었다(unpaired two-tailed Student's t-

test; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001; n = 4 per group in the experiment). 도 5(a)를 참조하면, GO의 농도 의존적으로 IFNγ 와 IL4의 생산량은 점차 감소하나, TGFβ의 생산량은 점차 증가함을 확인할 수 있는데, 이는 GO가 TGFβ의 생산량 증가를 유도하여 iNKT 세포의 Treg 세포(regulatory T 세포)로의 전환을 유도함을 알 수 있다.

[0118] α-GalCer 유도 면역반응에서 GO 자극된 iNKT 세포의 영향을 측정하는 실험의 모식도를 도 5(b)에 나타내었다. B6 쥐에서 분리된 iNKT 세포들은 GO로 자극되었고, 6시간 후 Lympholyte-M을 이용한 밀도차 원심분리에 의해 남아있는 GO로부터 분리되었다. Jα18 KO 쥐로부터 분리된 수지상세포는 14시간 동안 α-GalCer 또는 전달체 존재하 GO 자극된 iNKT 세포와 함께 배양되었다. 상기 iNKT 세포 내 IFNγ 생산량은 유세포 분석으로 측정하였고, 그 결과와 평균값 ±SD는 도 5(c)에 나타내었다 (unpaired two-tailed Student's t-test; *P<0.05, **P<0.01; n = 3 per group in the experiment). 도 5(c)를 참조하면, GO의 농도 의존적으로 iNKT 세포 내 IFNγ 생산량이 감소함을 확인할 수 있는데, 이는 GO가 APCs(Antigen Presenting Cells)를 통해 iNKT 세포들을 조절할 수 있음에 더하여, 세포 내적인 방식으로 iNKT 세포의 표현형을 조절할 수 있음을 나타내는 것이다.

[0120] **2. GO 매개 iNKT 세포 표현형 변화의 Treg 세포 증식 유도**

[0121] WT B6 쥐에 PBS 또는 GO (50 μg) 중 어느 하나를 정맥 내 주입하고, 5일 후 비장 세포들을 각 그룹의 쥐로부터 분리하였다. 각 실험군의 총 비장 $CD4^+$ T 세포들 중 $Foxp3^+CD25^+$ Treg 세포의 빈도 및 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg 세포의 GITR 및 FR4 발현량은 유세포 분석을 통해 측정되었고, 그 결과 및 평균값 ±SD를 도 6(a)(b)에 나타내었다(unpaired two-tailed Student's t-test; ***P<0.001; n = 4 per group in the experiment). 도 6(a)를 참조하면, GO를 처리한 경우 Treg 세포의 빈도가 처리하지 아니한 경우에 비해 2배 이상 증가된 것을 확인할 수 있고, 도 6(b)를 참조하면, GO를 처리한 경우 Treg 세포 관련 분자인 GITR과 FR4의 발현 빈도가 처리하지 아니한 경우에 비해 증가된 것을 확인할 수 있다.

[0122] WT B6 쥐에 PBS 또는 GO (50 μg) 중 어느 하나를 정맥 내 주입하고, 14시간 후 총 비장세포들을 각 그룹의 쥐로부터 분리하였다. 각 실험군의 비장 내 수지상세포 ($CD11c^+$), 대식세포 ($CD11c^-CD11b^+F4/80^+$) 및 iNKT 세포 ($CD3\varepsilon^+$αGC/CD1d $dimer^+$) 의 FACS plots을 도 6(c)에 나타내었고, 상기 세포들의 절대적 수를 도 6(d)에 나타내었으며, 상기 세포들 내 TGFβ의 생산량 측정결과 및 평균값 ±SD를 도 6(e)에 나타내었고, 이들 모두는 유세포 분석에 의해 측정되었다(unpaired two-tailed Student's t-test; ***P<0.001; n = 4 per group in the experiment). GO 처리여부에 따른 결과를 비교할 때, 도 6(c)(d)의 경우 비장 내 수지상세포 ($CD11c^+$), 대식세포 ($CD11c^-CD11b^+F4/80^+$) 및 iNKT 세포 ($CD3\varepsilon^+$αGC/CD1d dimer+) 수의 차이가 거의 없고, 도 6(e)의 경우 iNKT 세포 내 TGFβ 발현량의 경우만 차이가 있음을 확인할 수 있는데, 이는 GO 자극 후 초기 단계에서는 iNKT 세포가 Treg 세포로의 분화 시작 핵심요소인 TGFβ 생산의 주된 원천으로서 역할함을 나타낸다. 또한, 각 그룹의 쥐로부터 분리된 총 비장 $CD4^+$ T 세포들 중 $CD25^+Foxp3^+$ Treg 세포의 빈도 및 비장 $CD25^+Foxp3^+$ Treg 세포 내 GITR 및 FR4의 발현량을 유세포 분석에 의해 측정하여 그 결과를 도 6(f), 도 6(g)에 각각 나타내었는데, Jα18 KO B6 쥐는 Treg 세포의 빈도 및 GITR, FR4의 발현량의 변화가 미미한 반면 WT B6 쥐는 Treg 세포의 빈도 및 GITR, FR4의 발현량이 크게 증가한 것으로 보아, GO 유도 Treg 세포의 증식에 iNKT 세포가 관련되어 있다는 사실을 확인할 수 있다.

[0124] **실시예 6. rGO와 GO 간 염증성 반응 억제능 비교**

[0125] GO 또는 rGO 내 C와 O 원소의 %를 도 7a에 나타내었다. GO내 탄소/산소 비율이 1.0 정도이며, rGO는 탄소 대비 산소의 비율이 낮아 0.29임을 확인할 수 있다.

[0126] WT B6 쥐에 α-GalCer (2 μg) 또는 PBS control을 복강 내 주입하였고, 동시에 GO (50 μg), rGO (50 μg) 또는 PBS control 중 어느 하나를 정맥 내 주입하였다. 비장 세포들은 각각 실험 군에서 상기 주입 14시간 후에 얻었다.

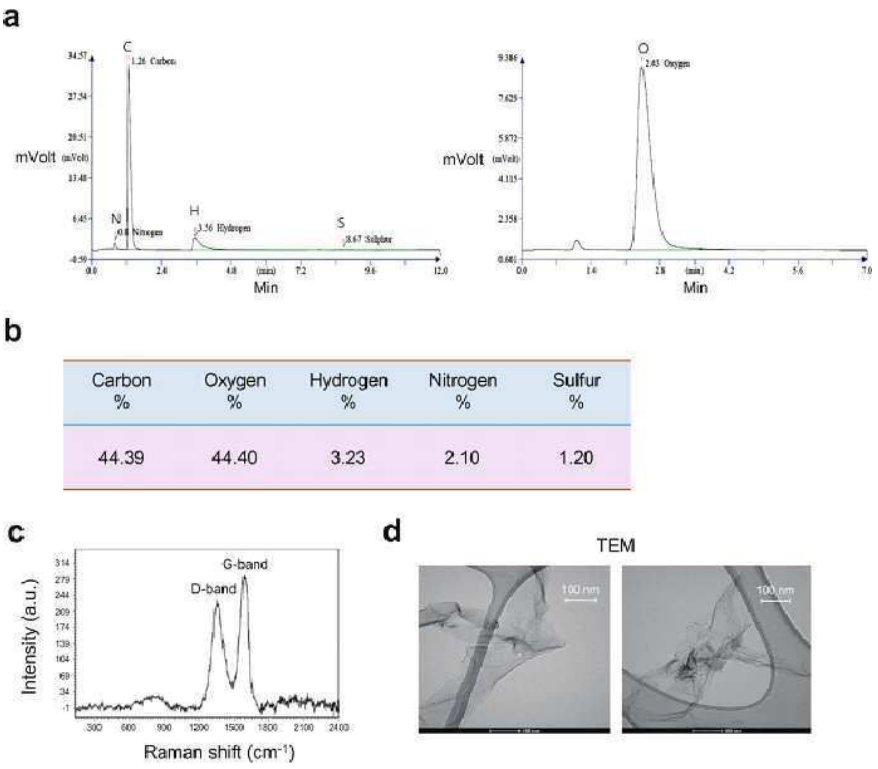
[0127] 총 비장 세포들은 B6 쥐로부터 분리되었다. 수지상세포와 대식세포에서 IL12와 TNFα의 세포 내 발현량과 iNKT 및 NK 세포에서 IFNγ와 TNFα 발현량은 유세포 분석에 의해 결정되었으며 그 평균값들 ±SD 또한 도 7b, 7c에 나타내었다(unpaired two-tailed Student's t-test; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001; n = 4 per group in the experiment).

[0128] 도 7b, 7c를 참조하면, GO를 처리한 경우 수지상세포, 대식세포, iNKT 및 NK 세포에 의한 세포 내 염증성 사이

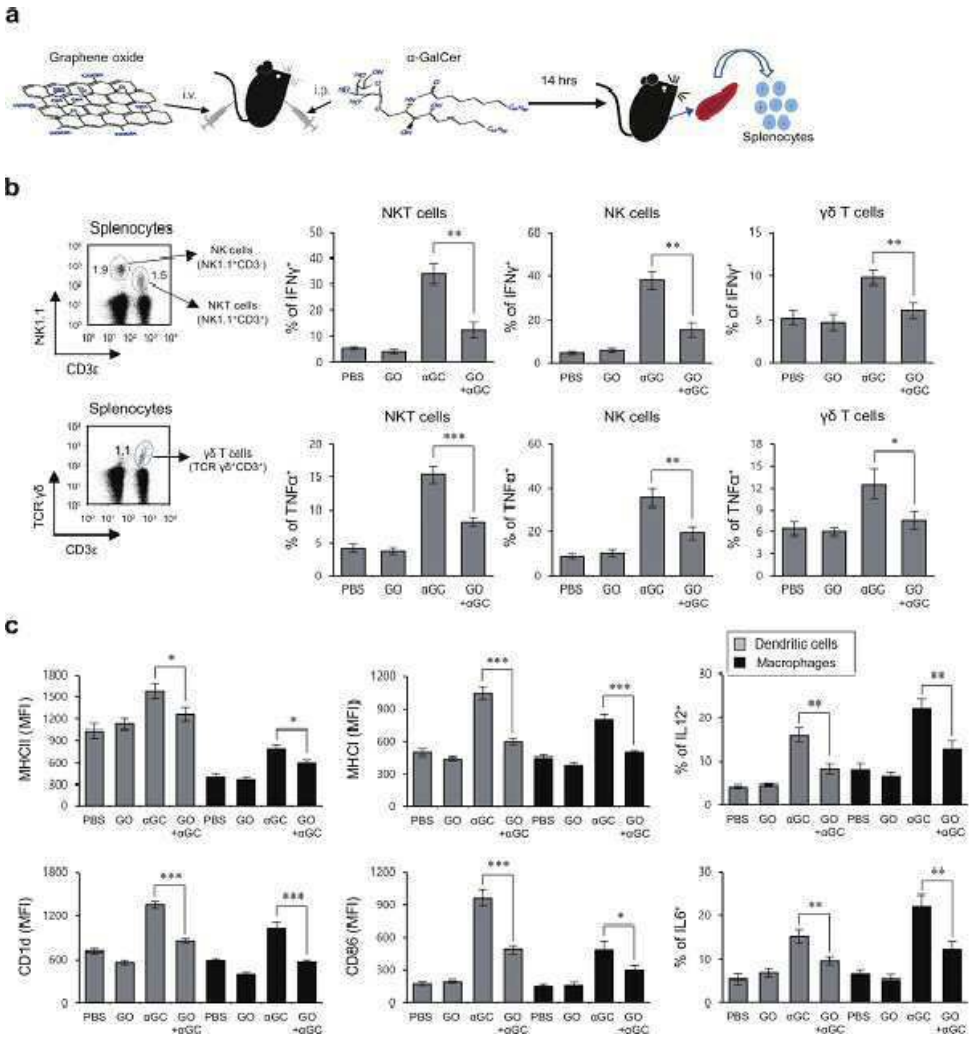
토카인 생산량이 처리하지 않은 경우보다 감소하였지만, rGO를 처리한 경우 이러한 세포에서의 사이토카인 분비가 오히려 증가함을 확인할 수 있는데, 이는 GO와 비교하여 탄소 대비 산소의 비율이 낮을수록 CD1d-restricted iNKT 세포의 활성에 의해 개시된 염증성 반응의 억제 능력이 감소하고 오히려 염증을 증가시킬 수 있음을 나타낸다.

도면

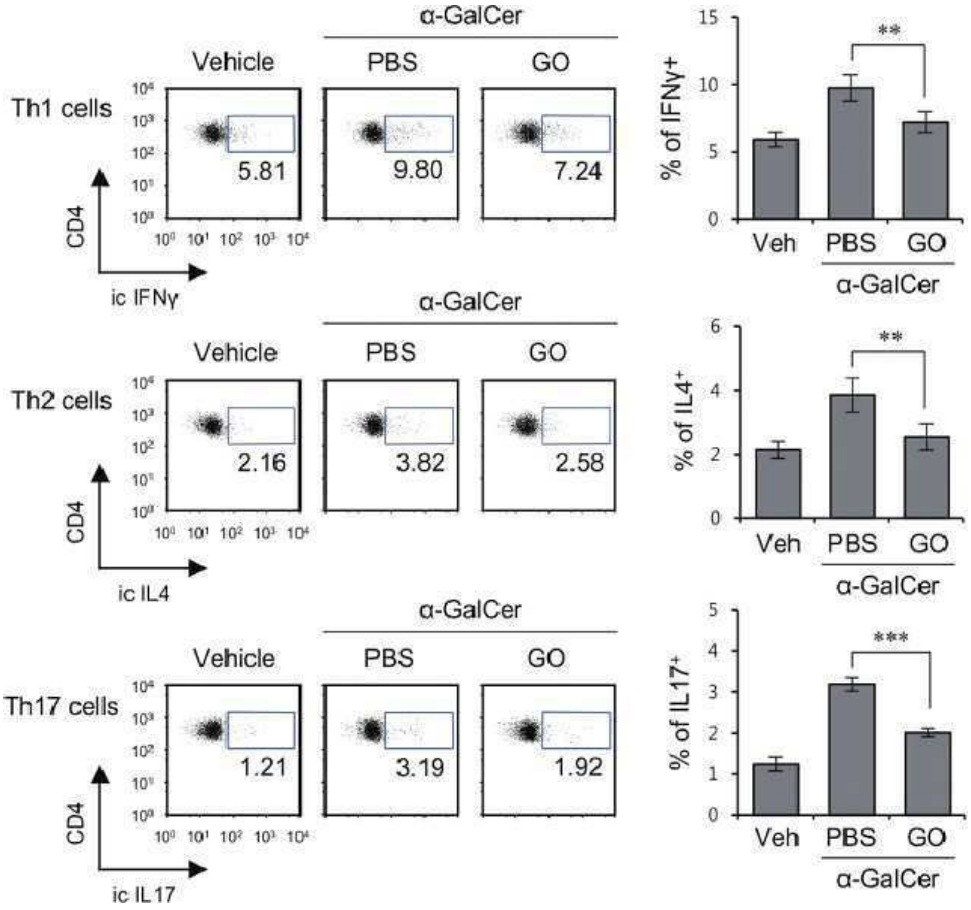
도면1



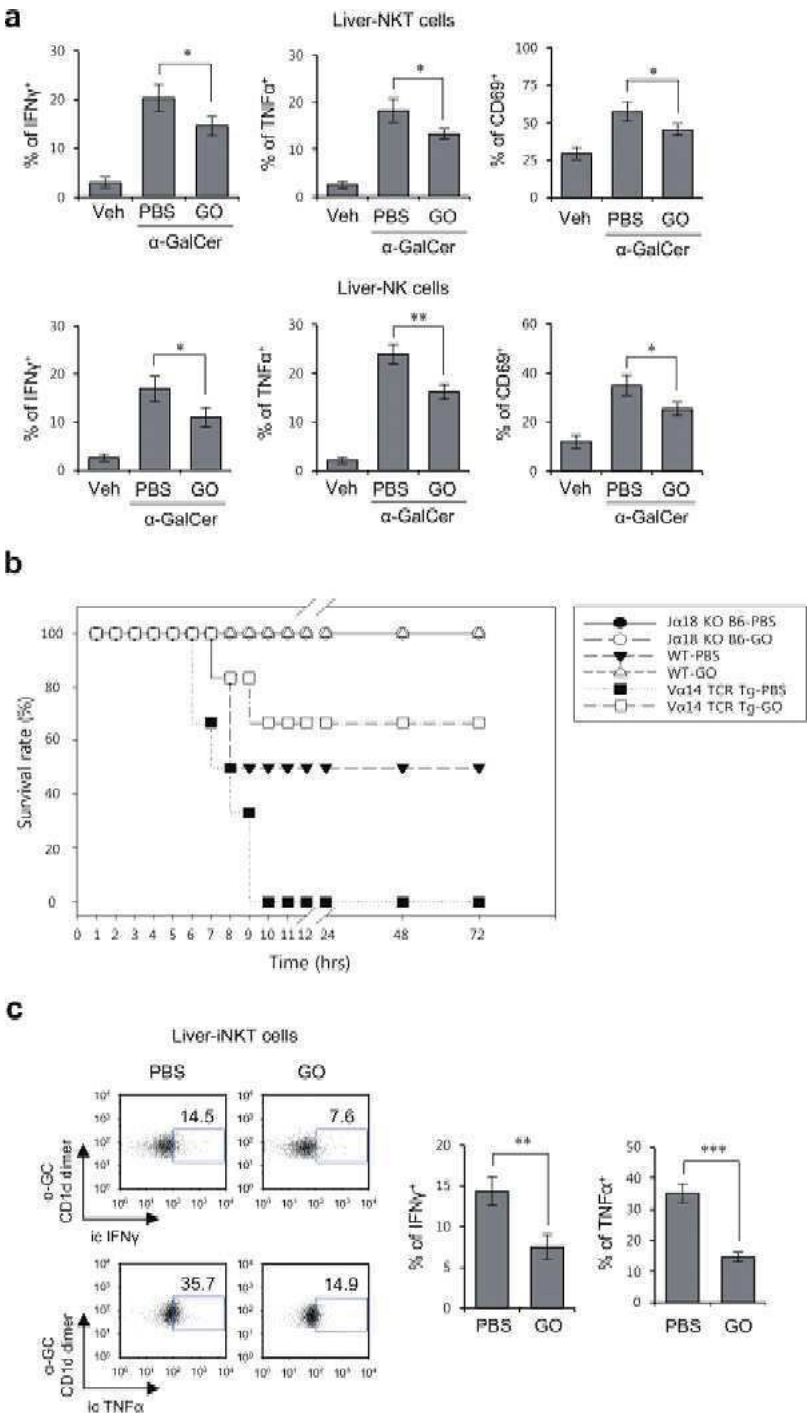
도면2


a
Graphene oxide
i.v.
i.p.
α-GalCer
14 hrs
Splenocytes
b
Splenocytes
NK cells (NK1.1+CD3-)
NKT cells (NK1.1+CD3+)
NK1.1
CD3ε
NKT cells
NK cells
γδ T cells
% of IFNγ+
PBS
GO
αGC
GO +αGC
γδ T cells (TCR γδ+CD3+)
TCR γδ
% of TNFα+
c
Dendritic cells
Macrophages
MHCII (MFI)
MHCI (MFI)
% of IL-12+
CD1d (MFI)
CD86 (MFI)
% of IL6+

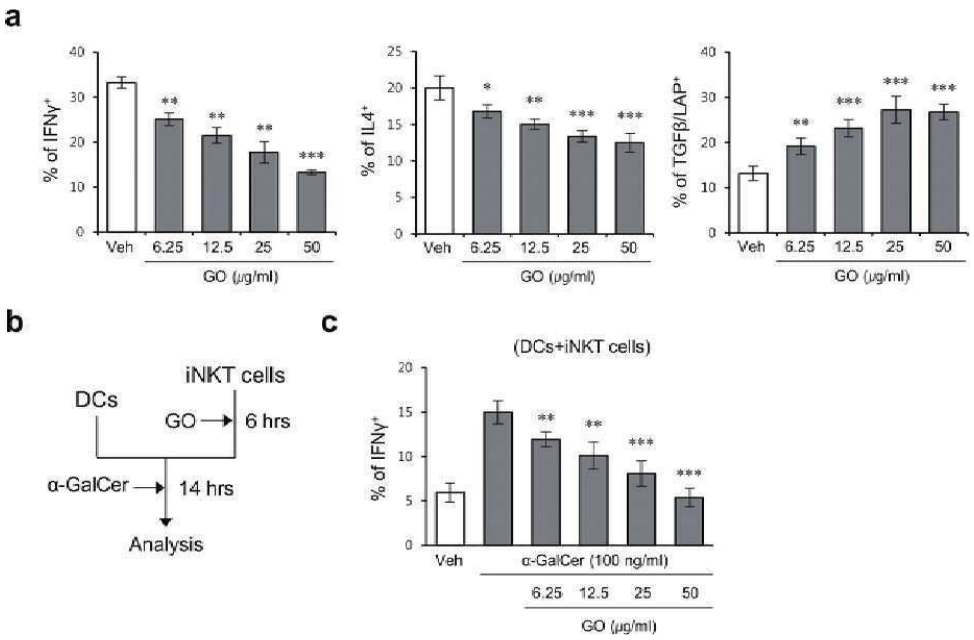
도면3


α-GalCer
Vehicle
PBS
GO
Th1 cells
5.81
9.80
7.24
CD4
ic IFNγ
% of IFNγ+
Veh
PBS
GO
α-GalCer
Th2 cells
2.16
3.82
2.58
ic IL4
% of IL4+
Th17 cells
1.21
3.19
1.92
ic IL17
% of IL17+

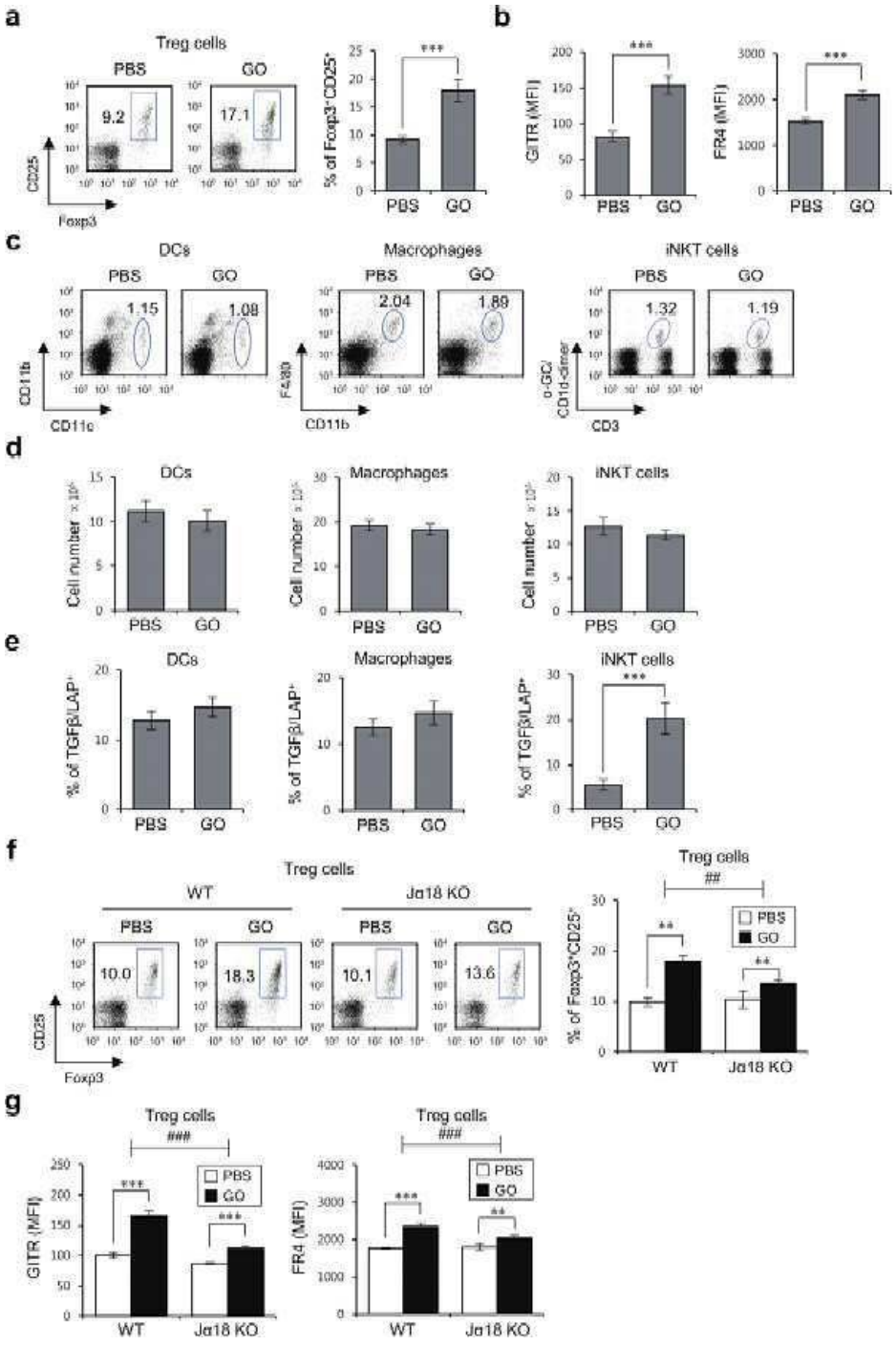
도면4


a
Liver-NKT cells
% of IFNγ+
% of TNFα+
% of CD69+
Veh
PBS
GO
α-GalCer
Liver-NK cells
b
Survival rate (%)
Time (hrs)
Jα18 KO B6-PBS
Jα18 KO B6-GO
WT-PBS
WT-GO
Vα14 TCR Tg-PBS
Vα14 TCR Tg-GO
c
Liver-iNKT cells
PBS
GO
14.5
7.6
35.7
14.9
α-GC CD1d dimer
ic IFNγ
ic TNFα
% of IFNγ+
% of TNFα+

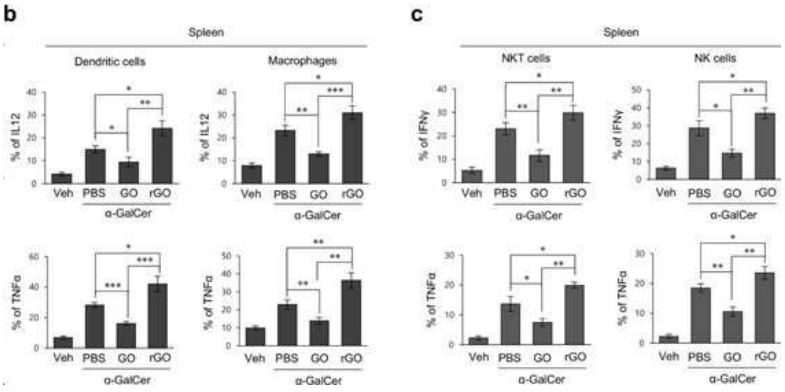
도면5


a
% of IFNγ+
% of IL4+
% of TGFβ/LAP+
Veh
6.25
12.5
25
50
GO (μg/ml)
b
iNKT cells
DCs
GO
6 hrs
α-GalCer
14 hrs
Analysis
c
(DCs+iNKT cells)
% of IFNγ+
Veh
α-GalCer (100 ng/ml)
6.25
12.5
25
50
GO (μg/ml)

도면6


a
Treg cells
PBS
GO
9.2
17.1
CD25
Foxp3
% of Foxp3+CD25+
PBS
GO
b
GITR (MFI)
FR4 (MFI)
c
DCs
Macrophages
iNKT cells
1.15
1.08
2.04
1.89
1.32
1.19
CD11b
CD11c
F4/80
α-GC/CD1d-dimer
CD3
d
DCs
Macrophages
iNKT cells
Cell number
e
% of TGFβ/LAP+
f
Treg cells
WT
Jα18 KO
10.0
18.3
10.1
13.6
g
Treg cells

도면7

a

Graphene oxide		Reduced graphene oxide	
Carbon (%)	44	Carbon (%)	75
Oxygen (%)	44	Oxygen (%)	22
O/C ratio	1.00	O/C ratio	0.29