



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0023391
(43) 공개일자 2023년02월17일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 41/00</i> (2020.01) <i>A61K 49/22</i> (2006.01)
 <i>A61K 9/51</i> (2006.01) <i>A61P 35/00</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A61K 41/0052</i> (2013.01)
 <i>A61K 41/0057</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2021-0105490
 (22) 출원일자 2021년08월10일
 심사청구일자 2021년08월10일</p> | <p>(71) 출원인
 충남대학교산학협력단
 대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)</p> <p>(72) 발명자
 김소연
 대전광역시 서구 둔산남로 127 목련아파트 205동 902호
 이승화
 대전광역시 중구 계백로1716번길 87 센트럴파크3 단지아파트 309-301</p> <p>(74) 대리인
 특허법인 플러스</p> |
|---|--|

전체 청구항 수 : 총 19 항

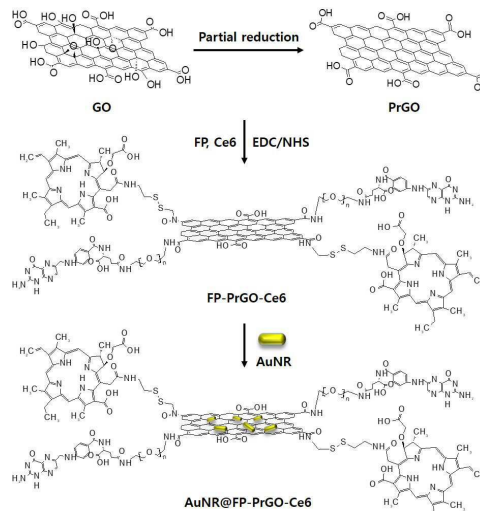
(54) 발명의 명칭 **나노복합전달체 및 이의 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 나노복합전달체 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 더 상세하게는 빛에 의해 반응성 산소종 및 열을 생성하여 암세포의 광역학/광열 치료 및 표적 치료가 가능하며, 광 음향 이미지를 통해 진단이 가능한 나노복합전달체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명의 나노복합전달체는 카르복실기를 포함하는 그래핀산화물(Graphene Oxide, GO), 상기 그래핀산화물에 결합된 암 표적화 리간드 및 상기 그래핀산화물에 결합된 광증감제를 포함하는 그래핀 복합체; 및 상기 그래핀 복합체와 결합된 금속광열입자;를 포함한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 49/225 (2013.01)

A61K 9/5115 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711114654
과제번호	2019029845
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구/개인연구
연구과제명	근적외선 민감성 상향변환 나노구조체를 이용한 심부암의 고효율 영상진단 및 광역
학적 치료시스템의 개발	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	충남대학교 산학협력단
연구기간	2018.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

카르복실기를 포함하는 그래핀산화물(Graphene Oxide, GO), 상기 그래핀산화물에 결합된 암 표적화 리간드 및 상기 그래핀산화물에 결합된 광증감제를 포함하는 그래핀 복합체; 및
상기 그래핀 복합체와 결합된 금속광열입자;를 포함하는, 나노복합전달체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 그래핀산화물은 엣지 영역에 상기 카르복실기가 위치하는 환원된 그래핀산화물(reduced Graphene Oxide, rGO)인, 나노복합전달체.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 광증감제와 상기 그래핀산화물은 이황화결합을 포함하는 연결기로 결합되는, 나노복합전달체.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 암 표적화 리간드는 친수성 중합체에 결합되어 있는 것인, 나노복합전달체.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 친수성 중합체는 폴리에틸렌글리콜을 포함하며, 상기 암 표적화 리간드는 상기 폴리에틸렌글리콜의 일 말단에 공유결합된 것인, 나노복합전달체.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 암 표적화 리간드는 암 표적성 단백질, 암 표적성 펩타이드(Peptide), 암 표적성 애프타머(Aptamer) 및 엽산(Folic Acid, FA)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인, 나노복합전달체.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 광증감제는 상기 광증감제는 프탈로시아닌계(Phthalocyanine) 화합물, 포르피린계(Porphyrins) 화합물, 플루오레세인(Fluorescein)계 화합물 및 클로린계(Chlorins) 화합물로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 또

는 둘 이상을 포함하는 것인, 나노복합전달체.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 금속광열입자는 금 나노로드(Au nanorod, AuNR)를 포함하는, 나노복합전달체.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 나노복합전달체의 입경은 50 내지 1000nm인, 나노복합전달체.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 금 나노로드의 장축 길이는 상기 그래핀산화물의 장축의 길이보다 작은, 나노복합전달체.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 나노복합전달체에 9,10-안트라센디일-비스(메틸렌)디말로산 (9,10-Anthracenediyl-bis(methylene)dimalonic acid, ABMDMA)을 첨가하고, 670nm의 레이저 200mW/cm²를 조사하고 30분 후 측정된 ABMDMA의 형광강도가 초기 형광강도에 대해 20% 미만인, 나노복합전달체.

청구항 12

제1항에 있어서,

상온(20±5℃)에서, 880nm의 근적외선(NIR) 레이저 1W/cm² 조사 시, 10분 이내에 온도가 50℃ 이상으로 상승하는, 나노복합전달체.

청구항 13

제1항에 있어서,

하기 식 1에 따른 광열 변환 효율(η (%))이 50% 이상인, 나노복합전달체.

[식 1]

$$\eta(\%) = \frac{\frac{m_d C_d}{\tau_s} (T_{\max} - T_{\text{surr}}) - Q_0}{I(1 - 10^{-A_{880}})}$$

(상기 식 1에서, h는 열전달 계수, S는 샘플 용기의 표면적, T_{max}는 샘플 최대온도, T_{surr}는 샘플 주변의 초기 온도, Q₀는 용매에서 빛의 흡수와 관련된 열, I는 레이저 출력, A₈₈₀은 880nm에서 샘플 흡광도, τ_s 는 특성 열적 시

간 상수, m_d 는 탈이온수 질량(1g) 및 C_d 는 탈이온수 열용량(4.2J/g))

청구항 14

제1항 내지 제13항중 어느 한 항에 있어서,
상기 나노복합전달체는 암 치료용인, 나노복합전달체.

청구항 15

(S1) 그래핀산화물을 부분 환원시켜 엣지 영역에 카르복실기가 위치하는 환원된 그래핀산화물(reduced graphene oxide, rGO)을 준비하는 단계;
(S2) 상기 환원된 그래핀산화물을 암 표적화 리간드를 포함하는 중합체 및 광증감제를 포함하는 화합물과 공유결합하여 그래핀 복합체를 수득하는 단계; 및
(S3) 상기 그래핀 복합체에 금속광열입자를 혼입시키는 단계;를 포함하는, 나노복합전달체 제조방법.

청구항 16

제15항에 있어서,
상기 (S2) 단계는
(S2-1) 상기 광증감제에 아민기를 도입하는 단계; 및
(S2-2) 상기 암 표적화 리간드를 포함하는 중합체 및 아민기가 도입된 상기 광증감제를 그래핀산화물과 공유결합시키는 단계;를 포함하는, 나노복합전달체 제조방법.

청구항 17

제16항에 있어서,
상기 (S2-1)에서, 상기 광증감제는 카르복실산기를 포함하는, 나노복합전달체 제조방법.

청구항 18

제17항에 있어서,
상기 (S2-1)에서,
상기 광증감제에 아민기를 도입하는 단계는,
상기 광증감제와 이황화결합을 포함하는 디아민계 화합물이 공유결합하는, 나노복합전달체 제조방법.

청구항 19

제16항에 있어서,
상기 (S3)단계에서, 상기 그래핀 복합체 : 상기 금속광열입자의 부피비는 1.5~3 : 1인, 나노복합전달체 제조방법

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 나노복합전달체 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 더 상세하게는 빛에 의해 반응성 산소종 및 열을 생성하여 암세포의 광역학/광열 치료 및 표적 치료가 가능하며, 광 음향 이미지를 통해 진단이 가능한 나노복합전달체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 광역학 치료법(photo dynamic therapy: PDT)은 광증감제(photo-sensitizer)를 이용한 비침습적 치료 기술을 일컫는 것으로, 광증감제를 치료 부위에 투여시킨 후, 특정 파장의 빛을 조사시켜 생성된 반응성 산소종(일항산소, 산소 라디칼, superoxide 및 peroxide 등)을 통해 암세포를 자멸(apoptosis) 또는 괴사(necrosis) 시킬 수 있다.

[0003] 광열 치료법(photo thermal therapy: PTT) 역시, 비침습적 치료 기술 중 하나로, 광열인자를 투여한 이후에 질환 부위에 근적외선 레이저를 조사함으로써 발생하는 열에너지를 통해 암세포를 제거하는 치료 방법이다.

[0004] 이와 같은 광역학 치료방법 및 광열 치료법은 기존의 항암치료나 방사선 치료에서 보이는 부작용을 현저히 줄이면서도 암 치료 효과는 극대화할 수 있는 장점이 있으나, 일정 수준 이상의 치료 효과를 기대하기 어렵다는 단점이 있다.

[0005] 이에, 최근에는 대한민국 등록특허공보 제10-1928161호 '금 나노클러스터 함유 양친성 고분자 나노조립체 기반 광열 및 광역학 치료용 약물 전달체 및 이의 제조방법' 및 대한민국 등록특허공보 제10-1419254호 '효소 반응성 그라핀 옥사이드/생체 고분자-광감각제 나노복합체 및 이를 포함하는 형광 영상 진단 또는 광역학/광열 치료용 조성물'에 개시된 바와 같이, 광역학 치료법(PDT) 및 광열 치료법(PTT)을 동시에 수행할 수 있는 PDT/PTT 나노복합체들이 개발되었다.

[0006] 그러나, 상술한 PDT/PTT 나노복합체들은 광열인자와 광증감제를 결합하기 위해, 비교적 광열 효과가 떨어지는 특정 단일 광열인자를 포함함에 따라, 설계 치에 비해, 암세포 치료 효과가 비교적 높지 않다. 즉, 종래 PDT/PTT 나노복합체들은 광열인자 및 광증감제를 동시에 포함함에도 불구하고, 광역학 치료법 및 광열 치료법의 동시 사용에 의한 시너지 효과가 비교적 높지 못하는 단점이 있으며, 광증감제에 의한 광역학 치료능에 기댈에 따라, 암 치료를 위해서 종래 광증감제를 사용하는 것과 큰 차이가 없다.

[0007] 이에, 상술한 PDT/PTT 나노복합체들은 결합된 광증감제에 의해, 분산성이 저하됨에 따라 암세포가 아닌 정상 세포에 축적되어 치료효과를 저하시킬 수 있으며, 이를 해결하기 위해 친수성 중합체를 결합시킬 경우, 분산성을 높여 암세포가 체내에 축적되는 것은 방지할 수 있으나, 암세포 치료에 충분한 양이 전달되기 위해서는 용량을 높여서 투여해야 한다는 문제점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) (특허 문헌 1) : 대한민국 등록특허공보 제10-1928161호
(특허문헌 0002) (특허 문헌 2) : 대한민국 등록특허공보 제10-1419254호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 빛에 의해 반응성 산소종 및 열을 생성하여, 광역학 및 광열 치료법의 시너지 효과에 의한 우수한 암세포 치료능을 가지는 나노복합전달체를 제공하는 것이다.

[0010] 또한, 본 발명의 목적은 암세포 표적화가 가능하며, 광 음향 이미지를 통해 진단이 가능한 나노복합전달체를 제공하는 것이다.

[0011] 또한, 본 발명의 목적은 비교적 간단한 방법으로 암세포의 광역학/광열 치료 및 표적 치료가 가능한 나노복합전달체를 제조할 수 있는 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명에 따른 나노복합전달체는 카르복실기를 포함하는 그래핀산화물(Graphene Oxide, GO), 상기 그래핀산화물에 결합된 암 표적화 리간드 및 상기 그래핀산화물에 결합된 광증감제를 포함하는 그래핀 복합체; 및 상기 그래핀 복합체와 결합된 금속광열입자;를 포함한다.
- [0013] 본 발명의 일 실시예에 따른 나노복합전달체에 있어서, 상기 그래핀산화물은 엷지 영역에 상기 카르복실기가 위치하는 환원된 그래핀산화물(reduced Graphene Oxide, rGO)일 수 있다.
- [0014] 본 발명의 일 실시예에 따른 나노복합전달체에 있어서, 상기 광증감제와 상기 그래핀산화물은 이황화결합을 포함하는 연결기로 결합될 수 있다.
- [0015] 본 발명의 일 실시예에 따른 나노복합전달체에 있어서, 상기 암 표적화 리간드는 친수성 중합체에 결합되어 있는 것일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 일 실시예에 따른 나노복합전달체에 있어서, 상기 친수성 중합체는 폴리에틸렌글리콜을 포함하며, 상기 암 표적화 리간드는 상기 폴리에틸렌글리콜의 일 말단에 공유결합된 것일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 일 실시예에 따른 나노복합전달체에 있어서, 상기 암 표적화 리간드는 암 표적성 단백질, 암 표적성 펩타이드(Peptide), 암 표적성 압타머(Aptamer) 및 엷산(Folic Acid, FA)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 일 실시예에 따른 나노복합전달체에 있어서, 상기 광증감제는 상기 광증감제는 프탈로시아닌계(Phthalocyanine) 화합물, 포르피린계(Porphyrins) 화합물, 플루오레세인(Fluorescein)계 화합물 및 클로린계(Chlorins) 화합물로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상을 포함하는 것일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 일 실시예에 따른 나노복합전달체에 있어서, 상기 금속광열입자는 금 나노로드(Au nanorod, AuNR)를 포함할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 일 실시예에 따른 나노복합전달체에 있어서, 상기 나노복합전달체의 입경은 50 내지 1000nm일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 일 실시예에 따른 나노복합전달체에 있어서, 상기 금 나노로드의 장축 길이는 상기 그래핀산화물의 장축의 길이보다 작을 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일 실시예에 따른 나노복합전달체에 있어서, 상기 나노복합전달체에 9,10-안트라센디일-비스(메틸렌)디말로산 (9,10-Anthracenediyl-bis(methylene)dimalonic acid, ABMDMA)을 첨가하고, 670nm의 레이저 200mW/cm²를 조사하고 30분 후 측정된 ABMDMA의 형광강도가 초기 형광강도에 대해 20% 미만일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일 실시예에 따른 나노복합전달체에 있어서, 상온(20±5℃)에서, 880nm의 근적외선(NIR) 레이저 1W/cm² 조사 시, 10분 이내에 온도가 50℃ 이상으로 상승할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 일 실시예에 따른 나노복합전달체에 있어서, 하기 식 1에 따른 광열 변환 효율($\eta(\%)$)이 50% 이상일 수 있다.
- [0025] [식 1]

$$\eta(\%) = \frac{\frac{m_d C_d}{\tau_s} (T_{\max} - T_{\text{surr}}) - Q_0}{I(1 - 10^{-A_{880}})}$$

- [0026]
- [0027] (상기 식 1에서, h는 열전달 계수, S는 샘플 용기의 표면적, T_{max}는 샘플 최대온도, T_{surr}는 샘플 주변의 초기 온도, Q₀는 용매에서 빛의 흡수와 관련된 열, I는 레이저 출력, A₈₈₀은 880nm에서 샘플 흡광도, τ_s 는 특성 열적 시간 상수, m_d는 탈이온수 질량(1g) 및 C_d는 탈이온수 열용량(4.2J/g))
- [0028] 본 발명의 일 실시예에 따른 나노복합전달체에 있어서, 상기 나노복합전달체는 암 치료용일 수 있다.
- [0029] 본 발명에 따른 나노복합전달체 제조방법은 (S1) 그래핀산화물을 부분 환원시켜 엷지 영역에 카르복실기가 위치하는 환원된 그래핀산화물(reduced graphene oxide, rGO)을 준비하는 단계; (S2) 상기 환원된 그래핀산화물을

암 표적화 리간드를 포함하는 중합체 및 광증감제를 포함하는 화합물과 공유결합하여 그래핀 복합체를 수득하는 단계; 및 (S3) 상기 그래핀 복합체에 금속광열입자를 혼합시키는 단계;를 포함한다.

[0030] 본 발명의 일 실시예에 따른 나노복합전달체 제조방법에 있어서, 상기 (S2) 단계는 (S2-1) 상기 광증감제에 아민기를 도입하는 단계; 및 (S2-2) 상기 암 표적화 리간드를 포함하는 중합체 및 아민기가 도입된 상기 광증감제를 그래핀산화물과 공유결합 시키는 단계;를 포함할 수 있다.

[0031] 본 발명의 일 실시예에 따른 나노복합전달체 제조방법에 있어서, 상기 (S2-1)에서, 상기 광증감제는 카르복실산기를 포함할 수 있다.

[0032] 본 발명의 일 실시예에 따른 나노복합전달체 제조방법에 있어서, 상기 (S2-1)에서, 상기 광증감제에 아민기를 도입하는 단계는, 상기 광증감제와 이황화결합을 포함하는 디아민계 화합물이 공유결합할 수 있다.

[0033] 본 발명의 일 실시예에 따른 나노복합전달체 제조방법에 있어서, 상기 (S3)단계에서, 상기 그래핀 복합체 : 상기 금속광열입자의 부피비는 1.5~3 : 1일 수 있다.

발명의 효과

[0034] 본 발명에 따른 나노복합전달체는 우수한 반응성 산소종 생성능 및 광열 전환능을 가지며, 우수한 광역학/광열 치료 효과를 가질 수 있다.

[0035] 또한, 본 발명에 따른 나노복합전달체는 암 세포 표적 치료가 가능하여, 소량 투여시에도 우수한 치료효과를 가질 수 있다.

[0036] 또한, 본 발명에 따른 나노복합전달체는 광열 전환된 열에너지를 통해, 광 음향 이미지를 통한 신속한 암 진단이 가능한 나노복합전달체를 제공하는 것이다.

[0037] 아울러, 본 발명에 따른 나노복합전달체 제조방법은 암세포의 광역학/광열 치료 및 표적 치료가 가능한 나노복합전달체를 효율적으로 제조할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 나노복합전달체 제조단계를 모식화한 모식도,
 도 2는, 본 발명의 일 실시예에 따른 나노복합전달체의 그래핀산화물의 라만 스펙트럼 측정 결과,
 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 나노복합전달체의 적외선분광법(FT-IR) 측정 결과,
 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 나노복합전달체의 X선 광전자 분광법(XPS) 측정 결과,
 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 나노복합전달체의 투과전자현미경(TEM) 이미지,
 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 나노복합전달체의 UV-Vis선 흡광 스펙트럼 측정 결과,
 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 나노복합전달체의 동적 광산란(DLS)을 통한 크기 분포를 나타내는 그래프,
 도 8은, 본 발명의 일 실시예에 따른 나노복합전달체의 분산성을 육안으로 확인하기 위한 사진,
 도 9 내지 도 10은, 본 발명의 일 실시예에 따른 나노복합전달체의 ABMDMA의 형광을 측정 결과,
 도 11 내지 도 18은, 본 발명의 일 실시예에 따른 나노복합전달체의 광열 효과 측정 결과,
 도 19 내지 도 20은 본 발명의 일 실시예에 따른 나노복합전달체의 광 음향 이미지 측정 결과,
 도 21 내지 도 23은 본 발명의 일 실시예에 따른 나노복합전달체의 암세포 내 공 초점 레이저 스캐닝 현미경 이미지,
 도 24 내지 도 28은 본 발명의 일 실시예에 따른 나노복합전달체의 암세포 제거능 측정 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 본 명세서에서 사용되는 기술 용어 및 과학 용어에 있어서 다른 정의가 없다면, 이 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 이해하고 있는 의미를 가지며, 하기의 설명 및 첨부 도면에서 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 공지 기능 및 구성에 대한 설명은 생략한다.

- [0040] 또한, 본 명세서에서 사용되는 단수 형태는 문맥에서 특별한 지시가 없는 한 복수 형태도 포함하는 것으로 의도할 수 있다.
- [0041] 또한, 본 명세서에서 특별한 언급 없이 사용된 단위는 중량을 기준으로 하며, 일 예로 % 또는 비의 단위는 중량 % 또는 중량비를 의미하고, 중량%는 달리 정의되지 않는 한 전체 조성물 중 어느 하나의 성분이 조성물 내에서 차지하는 중량%를 의미한다.
- [0042] 또한, 본 명세서에서 사용되는 수치 범위는 하한치와 상한치와 그 범위 내에서의 모든 값, 정의되는 범위의 형태와 폭에서 논리적으로 유도되는 증분, 이중 한정된 모든 값 및 서로 다른 형태로 한정된 수치 범위의 상한 및 하한의 모든 가능한 조합을 포함한다. 본 발명의 명세서에서 특별한 정의가 없는 한 실험 오차 또는 값의 반올림으로 인해 발생할 가능성이 있는 수치범위 외의 값 역시 정의된 수치범위에 포함된다.
- [0043] 본 명세서의 용어, '포함한다'는 '구비한다', '함유한다', '가진다' 또는 '특징으로 한다' 등의 표현과 등가의 의미를 가지는 개방형 기재이며, 추가로 열거되어 있지 않은 요소, 재료 또는 공정을 배제하지 않는다.
- [0044] 종래, 광역학 치료법(photo dynamic therapy: PDT) 및 광열 치료법(photo thermal therapy: PTT)을 동시에 수행하여 암 치료 효과를 높일 수 있도록, 광역학 치료용인 광증감제(photo-sensitizer)와 광열 치료용인 광열인자를 결합한 PDT/PTT 나노복합체들이 개발되었다. 그러나, 광열인자와 광증감제를 결합하기 위해, 비교적 광열 효과가 떨어지는 특정 단일 광열인자를 포함함에 따라, 설계 치에 비해, 암세포 치료 효과가 비교적 높지 않았다. 즉, 종래 PDT/PTT 나노복합체들은 광열인자 및 광증감제를 동시에 포함함에도 불구하고, 광역학 치료법 및 광열 치료법의 동시 사용에 의한 시너지 효과가 비교적 높지 못하는 단점이 있으며, 광증감제에 의한 광역학 치료능에 의존함에 따라, 암 치료를 위해서 종래 광증감제를 사용하는 것과 큰 차이가 없다는 문제점이 있다.
- [0045] 또한, PDT/PTT 나노복합체들은 치료효과가 저하될 수 있을 정도로 분산성이 높지 못한 단점이 있고, 분산성을 개선시키기 위해 친수성 중합체를 포함할 수 있으나, 친수성 중합체가 포함됨에 따라 암세포 치료에 충분한 양이 전달되기 위해서는 용량을 높여서 투여해야 한다는 문제점이 후속적으로 발생하게 된다.
- [0046] 본 발명에 따른 나노복합전달체는 카르복실기를 포함하는 그래핀산화물(Graphene Oxide, GO), 상기 그래핀산화물에 결합된 암 표적화 리간드 및 상기 그래핀산화물에 결합된 광증감제를 포함하는 그래핀 복합체; 및 상기 그래핀 복합체와 결합된 금속광열입자;를 포함함에 따라, 광 조사시 우수한 반응성 산소종 생성능을 가짐과 동시에 및 광열 전환능을 가지며, 광역학 및 광열 치료법의 시너지 효과에 의한 우수한 암 치료 효과를 가질 수 있다. 구체적으로, 금속광열입자 및 그래핀산화물에 의해 광열 치료능을 가질 수 있고, 광증감제에 의해 광역학 치료능을 가질 수 있으나, 하나의 나노복합전달체 내에 이들을 복합화함으로써 매우 현저한 암 치료 효과를 가질 수 있다. 또한, 암 세포 표적 치료가 가능하여, 암세포 외의 체내 세포에 축적되는 것을 방지할 수 있으며, 소량 투여시에도 우수한 암 치료 효과를 가질 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 나노복합전달체는 광 조사시 광 흡수율 및 광열 전환능이 우수하여, 전환된 열에너지를 통해, 광 음향 이미지를 통한 신속한 암 진단이 가능함과 동시에 암 치료를 유도할 수 있다.
- [0047] 구체적으로, 나노복합전달체는 그래핀 복합체와 금속광열입자를 포함하는 것으로, 그래핀 복합체는 카르복실기를 포함하는 그래핀산화물, 그래핀산화물에 결합된 암 표적화 리간드 및 그래핀산화물에 결합된 광증감제를 포함한다.
- [0048] 카르복실기를 포함하는 그래핀산화물은 단일층 탄소 원자의 2차원 결정으로 구성된 그래핀 상에 카르복실기가 결합된 구조를 갖는 화합물을 의미하는 것으로, 빛에 반응하여 열을 생성해 내는 특성, 즉 광열인자 특성을 가진다.
- [0049] 그래핀산화물은 카르복실기 외에 하이드록실기, 에테르기 및 에폭시기와 같은 산소그룹이 더 결합된 구조를 가질 수 있으나, 바람직하게는 카르복실기를 제외한 나머지 산소그룹은 환원되어 결합이 제거된 그래핀산화물(reduced graphene oxide, rGO), 즉, 부분 환원된 그래핀산화물(partially reduced graphene oxide, PrGO)으로, 옻지 영역에 카르복실기가 위치할 수 있다.
- [0050] 이와 같은 부분 환원된 그래핀산화물(PrGO)은 라만 스펙트럼이 그래핀산화물(GO)과 유사하며, 환원된 그래핀산화물(rGO)과는 구별된다. 구체적인 일 예로, 라만 스펙트럼 ID/IG가 1 내지 1.2, 상세하게, 1.12 내지 1.18일 수 있다.
- [0051] 이와 같은 부분 환원된 그래핀산화물(PrGO)은 그래핀산화물(GO) 대비 그래핀의 중심부, 즉, 그래핀의 옻지영역을 제외한 부분에 결합이 제거됨으로써 더 우수한 광 흡수율 및 광열 전환능을 가질 수 있다. 이에 따라 부분

환원된 그래핀산화물(PrGO)은 우수한 광열 치료 효과를 가질 수 있으며, 환원된 그래핀산화물(rGO) 대비 우수한 분산성을 가질 수 있다. 구체적으로, 부분 환원된 그래핀산화물(PrGO)는 생리식염수 내에 분산된 후 24시간 동안 상온에서 보관될 시에도 분산성이 유지된다.

- [0052] 그래핀산화물의 크기는 광열 치료 효과를 가지는 것이라면 한정되지 않으나, 바람직하게는 10 내지 1000nm, 구체적으로, 200 내지 700nm의 길이의 장축을 가지는 것 일 수 있다. 상기 범위에서 후술할 금속광열입자와 결합이 용이할 수 있다.
- [0053] 광증감제는 상술한 그래핀산화물에 결합되는 것으로, 빛에 반응하여 여기 됨에 따라 반응성 산소종을 생성하는 특성을 가질 수 있다. 즉, 광증감제에 의해 나노복합전달체는 광역학 치료능을 가질 수 있다.
- [0054] 광증감제는 프탈로시아닌계(Phthalocyanine) 화합물, 포르피린계(Porphyrins) 화합물, 플루오레세인(Fluorescein)계 화합물 및 클로린계(Chlorins) 화합물로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상을 포함할 수 있다.
- [0055] 구체적으로, 상기 광증감제는 아연-프탈로시아닌(Zinc-phthalocyanine), 구리-프탈로시아닌(Copperphthalocyanine), 포토프린(Photofrin), 포토젬(Photogem), 라다클로린(Radachlorin), 클로린 e6(Chlorine6, Ce6), 페오포라이드 A(Pheophorbide A) 및 로즈벵갈(Rose Bengal)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상 일 수 있으나, 바람직하게, 광증감제는 그래핀산화물과 공유결합에 유리하도록 카르복실산기를 포함하는 것일 수 있으며, 비한정적인 일 구체예로, 카르복실산기를 함유하며 다량의 반응성 산소종 생산이 가능한 클로린 e6(Chlorine6, Ce6)일 수 있다.
- [0056] 또한, 상기 광증감제는 그래핀산화물과 $\pi-\pi$ stacking, 공유결합 등을 통해 결합될 수 있으나, 바람직하게는 광증감제와 그래핀산화물은 이황화결합(*-SS*)을 포함하는 연결기로 결합될 수 있다. 구체적으로, 이황화결합을 포함하는 연결기는 말단에 아민기를 포함하는 지방족 디아민계 화합물에 의해 유래될 수 있다. 보다 구체적으로, 이황화결합을 포함하는 디아민계 화합물에 의해 광증감제와 그래핀산화물이 결합될 수 있으며, 이때, 이황화결합을 포함하는 디아민계 화합물의 아민기 각각에 광증감제와 그래핀산화물의 카르복실산기가 아마이드결합을 형성하며 공유결합될 수 있다. 이처럼 이황화결합을 포함하는 연결기로 결합된 광증감제와 그래핀산화물은 높은 결합력을 통해, 많은 양의 광증감제 또는 약물의 안정적인 전달이 가능할 수 있으며, 이황화결합이 특정 빛의 파장대에서 결합이 끊어짐에 따라 목적하고자 하는 위치에서만 광증감제가 작용하는 표적효과가 향상될 수 있다.
- [0057] 암 표적화 리간드는 암세포에 대해 선택성을 갖도록 하기 위한 것으로, 구체적으로 암 표적화 리간드가 그래핀산화물에 공유결합됨으로써 암세포 표면에 존재하는 수용체(receptor) 등과 상호작용할 수 있으며, 능동적으로 나노복합전달체가 암세포에 표적화될 수 있다. 이에 따라 정상 조직에는 나노복합전달체가 실질적으로 존재하지 않아, 광조사시 정상 조직에서의 광독성을 현저히 감소시킬 수 있어 매우 높은 암 치료 효과를 얻을 수 있다.
- [0058] 상기 암 표적화 리간드는 암 표적성 단백질, 암 표적성 펩타이드 (Peptide), 암 표적성 앵타머(Aptamer) 및 엽산(Folic Acid, FA)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으며, 구체적인 예로, anti-CA-IX-항체, Carbonic anhydrase, cyclic RGD 펩타이드, 17개 아미노산으로 구성된 암세포 투과성 BR2 펩타이드, 트랜스페린(Transferrin), NGR 펩타이드, GE11 펩타이드, LHRH 펩타이드, Sgc8, SZT01, TSA14 및 엽산으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [0059] 상기 암 표적화 리간드는 친수성 중합체에 결합되어 있을 수 있다. 친수성 중합체는 폴리에틸렌글리콜(polyethylen glycol, PEG)를 포함하는 중합체일 수 있으며, 암 표적화 리간드는 폴리에틸렌글리콜의 일 말단에 공유결합된 것일 수 있다. 구체적으로 폴리에틸렌글리콜은 말단에 아민기를 포함하는 것으로, 말단에 카르복실산기를 포함하는 암 표적화 리간드 및 그래핀산화물과 아마이드결합을 형성하며 공유결합될 수 있다.
- [0060] 폴리에틸렌글리콜은 의료용 소재로서 비독성이고 면역 작용에 거부 반응이 없어 뛰어난 생체적합성을 나타내어 약물전달 및 조직공학 분야에서 바람직하게 사용될 수 있다. 상기 폴리에틸렌 글리콜 주쇄를 포함하는 중합체의 중량 평균 분자량(Mw)은 500 내지 20,000일 수 있으나 이에 제한받지 않는다.
- [0061] 이와 같은 암 표적화 리간드를 포함하는 나노복합전달체는 특정 암세포를 표적화할 수 있을 뿐만 아니라, 나노복합전달체의 수용액에서의 용해도 및 분산성 또한 증가시킬 수 있다. 이에 따라 특정 암세포에 대한 높은 표적화, 보다 긴 혈류체류(systemic circulation) 시간의 확보 및 정상세포에 대한 독성을 최소화하고 특정 암세포에 대한 선택적인 광독성을 기대할 수 있다.

- [0062] 금속광열입자는 빛 조사시 열을 발생할 수 있는 금속으로, 종래 광열 치료에 사용된 금속이라면 한정되지 않으나, 바람직하게, 금 나노입자 일 수 있으며, 더욱 바람직하게, 금 나노로드(Au nanorod, AuNR)일 수 있다. 금 나노로드는 매우 우수한 생체 안정성을 가질 뿐만 아니라, 800nm 대의 근적외선 빛을 흡수함에 따라, 비교적 낮은 파장대의 빛이 투과하지 못하는 부피가 큰 암세포도 광열 치료를 할 수 있다.
- [0063] 이와 같은 금 나노로드는 생체 내 적용성 및 광열 치료 효과를 고려하여, 종횡비가 1 : 1.1~10, 구체적으로 1 : 3~7일 수 있으나, 이에 한정되진 않는다.
- [0064] 금나노로드는 광열 효능을 나타낼 수 있는 것이라면, 크기가 한정되지 않으나, 그래핀산화물에 결합되기 위해, 그래핀산화물의 장축 길이보다 작은 장축을 가지는 것이 바람직하다. 구체적으로, 금나노로드의 장축 길이는 10 내지 150nm, 구체적으로 50 내지 120nm일 수 있다.
- [0065] 이처럼, 나노복합전달체는 카복실기를 포함하는 그래핀산화물(Graphene Oxide, GO), 그래핀산화물에 결합된 암 표적화 리간드 및 그래핀산화물에 결합된 광증감제를 포함하는 그래핀 복합체 및 그래핀 복합체와 결합된 금속광열입자를 포함함에 따라, 우수한 암세포 표적능 및 치료능을 가질 수 있다.
- [0066] 이와 같은 나노복합전달체의 크기는 생체내 투여 가능한 크기라면 한정되지 않으나, 장축이 50 내지 1000nm, 구체적으로 200 내지 700nm일 수 있다. 나노복합전달체는 하나 이상의 금속광열입자를 포함할 수 있으며, 바람직하게 2개 이상, 비한정적으로 100개 이하의 금속광열입자를 포함함으로써 우수한 광열 효과를 구현할 수 있다.
- [0067] 나노복합전달체는, 상술한 바와 같이 우수한 광역학 및 광열 치료 효과를 가진다. 구체적으로, 빛 조사시 종래 대비 다량의 반응성 산소종을 유도할 수 있으며, 높은 온도로 광열 전환이 가능하다.
- [0068] 구체적으로, 나노복합전달체에 9,10-안트라센디일-비스(메틸렌)디말로산(9,10-Anthracenediyl-bis(methylene)dimalonic acid, ABMDMA)을 첨가하고, 670nm의 레이저 200mW/cm²를 조사하고 30분 후 측정된 ABMDMA의 형광강도가 초기 형광강도에 대해 20% 미만, 구체적으로, 10%미만, 더욱 구체적으로 2 내지 5%일 수 있다. 이는, 반응성 산소종에 의해 저하되는 ABMDMA의 형광강도를 통해 반응성 산소종 생성능을 평가한 것으로, 이처럼 나노복합전달체는 우수한 반응성 산소종 생성능을 가질 수 있다.
- [0069] 또한, 상온(20±5℃)에서, 880nm의 근적외선(NIR) 레이저 1W/cm² 조사 시, 10분 이내에 온도가 50℃ 이상, 구체적으로 50℃ 내지 60℃로 상승하는 우수한 광열 전환능을 가질 수 있다.
- [0070] 또한, 본 발명의 나노복합전달체는 하기 식 1에 따른 광열 변환 효율(η (%))이 50% 이상, 구체적으로 60 내지 80%일 수 있다.
- [0071] [식 1]

$$\eta(\%) = \frac{\frac{m_d C_d}{\tau_s} (T_{\max} - T_{\text{surr}}) - Q_0}{I(1 - 10^{-A_{880}})}$$

- [0072]
- [0073] (상기 식 1에서, h는 열전달 계수, S는 샘플 용기의 표면적, T_{max}는 샘플 최대온도, T_{surr}는 샘플 주변의 초기 온도, Q₀는 용매에서 빛의 흡수와 관련된 열, I는 레이저 출력, A₈₈₀은 880nm에서 샘플 흡광도, τ_s 는 특성 열적 시간 상수, m_d는 탈이온수 질량(1g) 및 C_d는 탈이온수 열용량(4.2J/g))
- [0074] 이와 같은 나노복합전달체는 우수한 광열 치료능을 가질 뿐만 아니라, 높은 효율로 광에너지를 열에너지로 전환시키며, 이때 열 팽창에 의한 방출되는 초음파를 시각적으로 검출하는 광 음향 이미지 기법을 통해, 암 진단이 가능할 수 있다. 또한, 나노복합전달체는 암 조직 주변의 정상조직에도 쌓이지 않고 특정 암 조직에 표적화되어 축적됨에 따라, 표적-대비-배경신호 비(target-to-background signal ratio)가 우수하여 광 음향 이미지를 통한 암 진단 신뢰도가 매우 높을 수 있다.
- [0075] 본 발명의 일 양태에 있어서, 나노복합전달체는 암 치료용으로 사용될 수 있으며, 상술한 바와 같이 우수한 광역학 및 광열 치료 효과를 가짐과 동시에 우수한 암세포 표적능을 가짐에 따라, 우수한 암 치료능을 가질 수 있다. 구체적으로, 배양된 암세포에 상기 광증감제의 농도가 0.25μg/ml인 나노복합구조체를 투입 후, 5분 동안 670nm 레이저 100mW/cm² 및 880nm 레이저 1W/cm²를 조사한 후, 24시간 배양한 뒤 세포 생존율이 20%미만일 수 있

다.

- [0076] 한편, 본 발명은 나노복합전달체 제조방법을 제공하며, 상기 나노복합전달체 제조방법은 (S1) 그래핀산화물을 부분 환원시켜 엷지 영역에 카르복실기가 위치하는 환원된 그래핀산화물(reduced graphene oxide, rGO)을 준비하는 단계; (S2) 상기 환원된 그래핀산화물을 암 표적화 리간드를 포함하는 중합체 및 광증감제를 포함하는 화합물과 공유결합하여 그래핀 복합체를 수득하는 단계; 및 (S3) 상기 그래핀 복합체에 금속광열입자를 혼입시키는 단계;를 포함한다. 이와 같은 나노복합체전달체 제조방법은 암세포의 광역학/광열 치료 및 표적 치료가 가능한 나노복합전달체를 효율적으로 제조할 수 있다.
- [0077] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 나노복합전달체 제조방법은 상술한 본 발명의 나노복합전달체를 제조하기 위한 것 일 수 있다.
- [0078] 구체적으로, (S1) 단계는 그래핀산화물을 부분 환원시켜 엷지 영역에 카르복실기가 위치하는 환원된 그래핀산화물(reduced graphene oxide, rGO), 즉, 부분 환원된 그래핀산화물 (partially reduced graphene oxide, PrGO)을 준비하는 단계이다. 구체적으로, 일반적인 그래핀산화물은 카르복실기 외에 하이드록실기, 에테르기 및 에폭시기와 같은 산소그룹이 더 결합된 구조를 가지나, (S1) 단계는 엷지영역에 위치하는 카르복실기를 제외한 나머지 산소그룹은 환원시켜 높은 광열 효과를 가짐과 동시에 우수한 분산성을 가지는 부분 환원된 그래핀산화물을 수득할 수 있도록 한다.
- [0079] (S1) 단계는 그래핀산화물을 부분 환원시킬 수 있는 방법이라면 한정되지 않으나, 구체적인 일 예로, 그래핀산화물 수용액에 수산화나트륨 및 아세트산을 첨가한 후 초음파 처리하여 제조할 수 있다.
- [0080] (S2) 단계는 그래핀 복합체를 제조하는 단계로, (S1) 단계에서 부분 환원된 그래핀산화물을 암 표적화 리간드를 포함하는 중합체 및 광증감제를 포함하는 화합물과 공유결합하는 단계이다.
- [0081] (S2) 단계에서, 암 표적화 리간드를 포함하는 중합체는 친수성 중합체와 암 표적화 리간드가 결합된 화합물을 의미하는 것으로, 구체적으로, 폴리에틸렌글리콜의 말단에 염산이 공유결합된 유도체일 수 있다. 예를 들어, 폴리에틸렌글리콜의 적어도 하나 이상의 말단이 아민기를 포함할 경우 염산은 카르복실산기를 포함하기 때문에 통상적인 커플링제를 이용하여 아미드 결합을 통하여 폴리에틸렌글리콜의 말단이 염산과 공유결합된 유도체가 얻어질 수 있다.
- [0082] (S2) 단계에서, 광증감제는 프탈로시아닌계(Phthalocyanine) 화합물, 포르피린계(Porphyrins) 화합물, 플루오레세인(Fluorescein)계 화합물 및 클로린계(Chlorins) 화합물로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상을 포함할 수 있으며, 바람직하게, 광증감제는 아민기와 공유결합을 형성할 수 있도록 카르복실산기를 포함하는 것일 수 있으며, 비한정적인 일 구체예로, 카르복실산기를 함유하며 다량의 반응성 산소종 생산이 가능한 클로린 e6 (Chlorine6, Ce6)일 수 있다.
- [0083] 구체적으로, (S2) 단계는 (S2-1) 광증감제에 아민기를 도입하는 단계 및 (S2-2) 암 표적화 리간드를 포함하는 중합체 및 아민기가 도입된 상기 광증감제를 그래핀산화물과 공유결합 시키는 단계를 포함할 수 있다.
- [0084] 구체적으로, (S2-1) 단계에서, 광증감제에 아민기를 도입하는 단계는 광증감제와 이황화결합을 포함하는 디아민계 화합물이 공유결합하는 것으로, 이황화결합을 포함하는 디아민계 화합물의 아민기와 카르복실기를 포함하는 광증감제를 커플링제를 통해 결합시켜 수행될 수 있다. (S2-1) 단계에서, 이황화결합을 포함하는 디아민계 화합물과 광증감제는 아미드결합에 의해 공유결합되며, 높은 결합력을 통해 견고히 결합될 수 있다. 이황화결합을 포함하는 디아민계 화합물은 일 구체예로, 시스타민 디하이드로클로라이드(cystamine dihydrochloride, CA)일 수 있으나, 이에 한정되진 않는다.
- [0085] (S2-2) 단계는 암 표적화 리간드를 포함하는 중합체 및 아민기가 도입된 광증감제 즉, 광증감제를 포함하는 화합물을 그래핀산화물과 공유결합 시켜 그래핀 복합체를 제조하는 단계이다. 구체적으로, (S2-2) 단계에서, 그래핀산화물의 엷지영역에 위치하는 카르복실산기와 광증감제를 포함하는 화합물의 아민기가 결합되고, 또한, 그래핀산화물의 카르복실산기와 암 표적화 리간드를 포함하는 중합체의 아민기가 각각 결합된다. 이때, 카르복실산기와 아민기는 커플링제를 통해 공유결합시킬 수 있다.
- [0086] (S2) 단계에서 사용되는 커플링제는 일 구체예로, N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride(EDC) 및 N-hydroxysuccinimide(NHS)일 수 있으나 이에 한정되진 않는다.
- [0087] (S3) 단계는, (S2) 단계에서 제조된 그래핀 복합체에 금속광열입자를 혼입시키는 단계로, 그래핀 복합체 및 금속광열입자를 결합시켜 최종적으로 나노복합전달체를 수득하는 단계이다. (S3) 단계에서, 그래핀 복합체 : 금속

광열입자의 부피비는 1.5~3 : 1, 구체적으로 1.7 내지 2.5일 수 있으나 이에 한정되진 않는다. 다만, 상기 범위에서, 그래핀 복합체 및 금속광열입자가 비교적 강한 결착력으로 결착될 수 있으며, 금속광열입자의 투입량 대비 우수한 광열효과를 얻을 수 있다.

[0088] 금속광열입자는 빛 조사시 열을 발생할 수 있는 금속으로, 종래 광열 치료에 사용된 금속이라면 한정되지 않으나, 바람직하게, 금 나노입자일 수 있으며, 더욱 바람직하게, 금 나노로드(Au nanorod, AuNR)일 수 있다.

[0089] 이와 같은 나노복합체전달체 제조방법은 상술한 바와 같이, 암세포의 광역학/광열 치료 및 표적 치료가 가능한 나노복합체전달체를 제조할 수 있으며, 복잡한 장비 및 설게 없이, 간단한 화학반응을 이용한 제조법을 통해, 용이하게 제조할 수 있어, 산업상 이용 가능성이 매우 우수하다.

[0090] 이하 본 발명을 실시예를 통해 상세히 설명하나, 이들은 본 발명을 보다 상세하게 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 권리범위가 하기의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0091] (제조예 1)_금나노로드(AuNR) 제조

[0092] 금나노로드는 시드매개 성장법(seed-mediated growth method)을 통해 제조하였다.

[0093] 먼저, 100mM의 헥사데실트리메틸암모늄 브로마이드(hexadecyltrimethylammonium bromide, CTAB) 10ml 용액에 10mM의 염화금(III)수화물 (gold (III) chloride hydrate, HAuCl₄) 250 μ l 및 10mM의 4 $^{\circ}$ C 수소화붕소나트륨(sodium borohydride, NaBH₄) 600 μ l를 투입 및 혼합하여 갈색 빛의 시드용액을 수득하였다.

[0094] 그 다음, 100mM의 CTAB 100ml과 10mM의 HAuCl₄ 5ml를 10mM의 질산은(AgNO₃) 1ml의 과 혼합시킨 후, 1M의 염산 2ml와 100mM 아스코르브산(ascorbic acid) 800 μ l를 첨가하여 성장용액을 수득하였다.

[0095] 이후, 제조된 시드용액과 성장용액을 혼합하여 3시간 동안 반응시킨 후, 3,500rpm에서 7분 동안 원심분리하여 침전된 금나노로드를 수득한 뒤, 수득한 금나노로드를 증류수에 분산하고, 14,000rpm으로 3회 원심분리하여, 상등액에 포함된 CTAB를 제거하고, 침전된 균일한 크기를 가지는 금나노로드를 수득하였다.

[0096] (제조예 2)_부분 환원된 그래핀산화물 (PrGO) 제조

[0097] 1. 그래핀산화물(GO)제조.

[0098] 흑연 플레이크 250mg에 황산(H₂SO₄) 7.5ml를 혼합하고 아이스 베스에서 15분 동안 혼합시킨 후, 과망가니즈산 칼륨(KMnO₄) 750mg를 투입하고, 50 $^{\circ}$ C에서 3시간 동안 반응시켰다. 그리고, 17.5ml의 증류수를 주입한 후, 15분 동안 혼합시킨 후, 75ml의 증류수를 더 주입하고 25 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 교반하여 반응시켰다. 이후, 혼합물을 상온(25 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C)에서 냉각시킨 뒤, 10ml의 H₂O₂를 투입한 다음 125ml의 10% HCl을 투입하여 5000rpm에서 7분 동안 원심 분리하여 정제하였다. 그 다음, 24시간 동안 건조시킨 후, 아이스 베스에서 프로브 초음파기(30kHz, 3시간)를 통해 불순물을 제거하여 시트 형의 그래핀산화물을 수득하였다.

[0099] 2.PrGO 제조

[0100] 제조된 그래핀산화물을 수산화나트륨(NaOH) 1.4g 및 클로로 아세트산(chloroacetic acid) 1g을 60ml의 그래핀산화물 용액(2.5 mg/ml)에 첨가한 후, 80 $^{\circ}$ C에서 두시간 동안 20 kHz으로 초음파 처리하였다. 이후, 염산을 첨가하여 불순물을 제거하고, 4000rpm에서 20분 동안 원심분리하여 상등액을 제거하고 침전된 반응생성물을 수득하였다. 그 다음 pH가 중성이 될 때까지 PrGO를 증류수에 분산하고 원심분리를 반복하여 정제된 PrGO를 수득하였다.

[0101] 3. rGO제조

[0102] 상기 제조된 그래핀산화물을 하이드라진(hydrazine, N₂H₄)와 반응시켜, 완전히 환원된 그래핀산화물을 수득하였다.

[0103] (제조예 3) 친수성 중합체를 포함하는 암 표적화 리간드 제조

[0104] 엽산(Folic Acid, FA)를 다이메틸 설펍사이드 dimethyl sulfoxide (DMSO) 2ml에 용해시킨 다음 20mg의 N-하이드록시석신이미드(N-hydroxysuccinimide, NHS) 첨가하고, 질소 분위기 하, 상온(25 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C)에서 30분 동안 교반시켰다.

[0105] 그 다음, 500mg의 양 말단에 아민기를 가지는 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol bis(amine), 중량평균분자

량 3,400)와 40mg의 N-(3-디메틸아미노프로필)-N'다이이미드 하이드로 클로라이드(N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC) 및 10 μ l의 트라이메틸아민(Trimethylamine, TEA)를 투입한 후, 24 시간 동안 교반하면서 반응시켰다. 이후, 2kDa 분자량 컷-오프(molecular weight cut-off, MWCO) 멤브레인 튜브를 사용하여 28시간 동안 미반응 화합물을 제거하였다.

[0106] 이후, 동결건조시켜 FA 및 PEG가 결합된 FP를 수득하였다.

[0107] (제조예 4) 아민기가 도입된 광증감제 제조

[0108] DMSO에 용해된 클로린 e6 (Chlorine6, Ce6) 2mg/ml를 30분 동안 질소가스를 주입하면서 NHS 25mg과 교반시켰다. 그 다음, 시스타민 디하이드로클로라이드 (cystamine dihydrochloride, CA) 76mg, EDC 130mg 및 TEA 472 μ l를 첨가하고 동일 교반 조건에서 24시간 동안 교반하여, 아민 말단기를 포함하는 Ce6를 수득하였다.

[0109] (실시예 1)

[0110] 제조예 2에서 제조된 PrGO를 증류수에 용해시킨 PrGO용액(0.4mg/ml) 50ml에 NHS 18mg을 첨가하고, 30분 동안 교반시켰다. 이후, 제조예 3에서 제조된 FP 20mg, 제조예 4에서 제조된 아민 말단기를 포함하는 Ce6 20mg, EDC 30mg 및 TEA 30 μ l를 순차적으로 첨가하고 24시간 동안 반응시켜 그래핀 복합체(FP-PrGO-Ce6)를 제조하였다. 반응이 완료된 후, 반응 생성물을 10000rpm에서 20분 동안 원심분리하여 미 반응물을 제거하였다. 그 다음 제조된 그래핀 복합체와 제조예 1에서 제조한 금나노로드를 2:1 부피비로 어두운 곳에서 혼합하여 나노복합전달체 (AuNR@FP-PrGO-Ce6)를 수득하였다.

[0111] (비교예 1)

[0112] 실시예 1에 있어서, 제조예 3에서 제조된 FP대신, 메틸기가 도입된 폴리에틸렌글리콜(CH₃-PEG-NH₂, 이하 CH₃P)을 사용한 것을 제외하고, 실시예 1과 동일한 방법으로 나노복합전달체(AuNR@CH₃P-PrGO-Ce6)를 제조하였다.

[0113] 도 1은 실시예1에서 제조한 나노복합전달체 제조단계를 모식화한 모식도가 도시되어 있다.

[0114] 도 1을 참조하면, 제조예 2에서 그래핀산화물(GO)이 부분 환원되어, 엣지 영역에 카르복실기가 위치하는 부분 환원된 그래핀산화물(PrGO)이 제조되며, 제조예 3에서 제조된 FP 및 제조예 4에서 제조된 아민 말단기를 포함하는 Ce6가 PrGO와 각각 공유결합되어 그래핀 복합체를 형성한다. 이후, 제조예 1에서 제조된 금나노로드가 그래핀 복합체와 결합되어 나노복합전달체가 제조된다.

[0115] 도 2는 제조예 2에서 제조된 그래핀산화물(GO), 환원된 그래핀산화물(rGO), 부분 환원된 그래핀산화물(PrGO)의 라만 스펙트럼 결과이다.

[0116] 도 2를 참조하면, 제조예 2에서 제조된 PrGO는 GO와 유사한 ID/IG 값, 상세하게 1.16을 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0117] 도 3은 실시예에서 제조한 나노복합전달체의 적외선분광법(FT-IR), 도 4는 X선 광전자 분광법(XPS) 측정 결과가 도시되어 있다. 도 3 내지 도 4를 참조하면, 나노복합전달체가 성공적으로 합성되었음을 확인할 수 있었다.

[0118] 도 5는 제조예 및 실시예 1의 투과전자현미경(TEM) 이미지이다. 구체적으로, 도 5(a)는 제조예 1에서 제조한 AuNR, 도 5(b)는 제조예 2에서 제조한 GO, 도 5(c)는 제조예 2에서 제조한 PrGO, 도 5(d)는 실시예 1에서 제조한 나노복합전달체의 TEM 이미지이다.

[0119] 도 5를 참조하면, 제조예 1에서 제조한 AuNR는 비교적 균일한 크기로 제조되었으며, 약 6의 종횡비를 가지고, 장축 길이가 약 60nm의 길이를 가짐을 알 수 있었다. 또한, 제조된 나노복합전달체는 약 700nm의 크기를 가지며, 그래핀 복합체에 다수의 AuNR이 성공적으로 결합되어 있음을 확인할 수 있었다.

[0120] 도 6은 실시예 1의 나노복합전달체의 UV-Vis 흡광 스펙트럼 측정 결과가 도시되어 있다.

[0121] 도 6을 참조하면, 실시예 1의 나노복합전달체는 AuNR, PrGO 및 그래핀 복합체 (FP-PrGO-Ce6)가 나타내는 스펙트럼 피크를 모두 가짐을 확인할 수 있었으며, 성공적으로 합성되었음을 확인할 수 있었으며, 다양한 광 파장대에서 흡광 능력을 가질 수 있음을 알 수 있었다.

[0122] 도 7은 실시예 1의 나노복합전달체의 동적 광산란(DLS)를 통한 크기 분포를 나타내는 그래프이다.

[0123] 도 7을 참조하면 rGO에 비해 비교적 작은 크기 분포를 가짐을 확인할 수 있었다. 이는 나노복합전달체의 합성 과정에서, Ce6와 FP가 결합됨에 따라 응집된 그래핀산화물이 더 작은 입경의 그래핀산화물로 박리됨으로써 분산

성이 더욱 향상되었음을 시사하는 것이다.

[0124] 도 8은 실시예 1의 나노복합전달체의 분산성을 육안으로 확인하기 위한 사진으로, 생리식염수 내 실시예 1의 나노복합전달체를 혼합한 후 24시간 동안 상온에서 보관할 시, rGO의 경우 침전되나, PrGO는 GO와 유사하게 분산성이 유지됨을 확인 할 수 있었으며, 나노복합전달체 역시 비교적 침전 없이 균일하게 분산되어 있음을 확인할 수 있었다.

[0125] (실험예 1) 광역학 치료능 실험

[0126] 광역학 치료 효과를 조사하기 위해, ABMDMA 형광강도 감소율을 통한 반응성 산소종 생성능을 평가하였다. 9,10-안트라센디일-비스(메틸렌)디말로산 (9,10-Anthracenediyl-bis(methylene)dimalonic acid, ABMDMA)는 반응성 산소종(일항산소)과 결합될 시 고유의 형광능이 저하된다. 이를 이용하여, ABMDMA의 형광강도 감소율을 통해, 나노복합전달체의 반응성 산소종 생성능을 측정하였다.

[0127] 구체적으로, 실험군으로, 6mM 농도로 ABMDMA를 첨가한 200 μ l의 PBS에 나노복합전달체(AuNR@FP-PrGO-Ce6)가 용해된 수용액(20mg/ml) 3ml를 투입하고, 비교군으로, 6mM 농도로 ABMDMA를 첨가한 200 μ l의 인산완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)에 3ml의 Ce6를 투입하였다. 각 샘플에 예 670nm 레이저 (50, 100, 200, 400mW/cm²)를 30분 동안 조사하고, ABMDMA의 형광강도 감소는 2분 마다 측정되었다. ABMDMA의 흡광 피크는 분광형광 광도계(spectro-fluorophotometer)를 통해 실시간으로 모니터링 되었다.

[0128] 도 9 내지 도 10은 ABMDMA의 형광을 측정 결과가 도시되어 있다. 구체적으로, 도 9는 비교군의 시간에 따른 ABMDMA 형광강도 측정결과 그래프, 도 10은 실험군의 시간에 따른 ABMDMA 형광강도 측정결과 그래프이다.

[0129] 도 9 내지 도 10을 참조하면, 비교군 및 실험군 모두 비교적 광 세기에 따라 형광강도 감소율이 증가하였으나, 비교군의 경우 형광강도가 초기 형광강도에 비해 최대 약30%까지만 감소하였으며, 실시예 1을 투입한 실험군의 경우 최대 약 10%미만까지 형광강도가 감소함을 확인하였다.

[0130] (실험예 2) 광열 치료능 실험

[0131] 1. 광열 효과

[0132] 광열 치료 효과를 조사하기 위해 물, GO, AuNR 및 AuNR@FP-PrGO-Ce6을 동일한 농도로 각각 750 μ l 마이크로 튜브에 넣고 880nm의 근적외선 1W/cm²을 10분 동안 조사하며, 열 화상 카메라로 실시간 동안 샘플들을 모니터링하고, Flir Tools 소프트웨어를 통해 온도변화를 측정하였다. 각 샘플들은 10분 동안 30초마다 기록되었다. 또한, AuNR@FP-PrGO-Ce6의 샘플은 광 강도를 0.5W/cm², 0.75W/cm², 1W/cm² 및 1.25W/cm²로 변화시켜 측정하였다.

[0133] 2. 광열 변환 효율

[0134] 광열 변환 효율을 조사하기 위해, PrGO, AuNR 및 AuNR@FP-PrGO-Ce6에 880nm 근적외선 1W/cm²를 온도가 안정된 상태로 포화될 때까지 조사한 후, 근적외선 조사없이 상온(20 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C)으로 냉각시켰다. 이와 같은 가열 및 냉각 사이클을 5회 반복하였다.

[0135] 광열 변환 효율은 하기 식 1에 따라 측정하였다.

[0136] [식 1]

$$\eta(\%) = \frac{\frac{m_d C_d}{\tau_s} (T_{\max} - T_{\text{surr}}) - Q_0}{I(1 - 10^{-A_{880}})}$$

[0137] [0138] (상기 식 1에서, h는 열전달 계수, S는 샘플 용기의 표면적, T_{max}는 샘플 최대온도, T_{surr}는 샘플 주변의 초기 온도, Q₀는 용매에서 빛의 흡수와 관련된 열, I는 레이저 출력, A₈₈₀은 880nm에서 샘플 흡광도, τ_s 는 특성 열적 시간 상수, m_d는 탈이온수 질량(1g) 및 C_d는 탈이온수 열용량(4.2J/g))

- [0139] 이때, τ_s 는 가열 및 냉각 사이클에서, 시간에 따른 자연로그 그래프의 기울기를 통해 얻을 수 있다.
- [0140] 도 11 내지 도 18은, 본 발명의 일 실시예에 따른 AuNR@FP-PrGO-Ce6의 광열 치료효과 측정 결과가 도시되어 있다. 구체적으로, 도 11은 샘플들의 시간에 따른 온도 변화 그래프이며, 도 12 샘플들의 시간에 따른 열화상 카메라 측정 이미지이며, 도 13은 광 강도에 따른 AuNR@FP-PrGO-Ce6의 온도 변화를 나타내는 그래프, 도 14는 광 강도에 따른 AuNR@FP-PrGO-Ce6의 온도 변화를 나타내는 열화상 카메라 측정 이미지이다. 또한, 도 15는 AuNR@FP-PrGO-Ce6, AuNR 및 PrGO의 가열-냉각 곡선 그래프, 도 16은 AuNR@FP-PrGO-Ce6의 가열-냉각 사이클 그래프, 도 17는 가열-냉각 사이클의 시간에 따른 자연로그 그래프, 도 18은 상기 식 1로 계산된 광열 변환 효율 측정 결과를 나타내는 그래프이다.
- [0141] 도 11 내지 도 18을 참조하면, 광 조사 시, AuNR@FP-PrGO-Ce6는 동일한 광 조사 시, 타 샘플들에 비해 매우 높은 온도로 가열됨을 확인할 수 있었으며, 광량에 따라 다양하게 온도 조절이 가능함을 확인할 수 있었다. 또한, 광열 변환 효율이 매우 우수함을 확인할 수 있었다.
- [0142] **(실험예 3) 광 음향 이미지를 통한 암 진단능 실험**
- [0143] 암 진단 가능성을 평가하기 위해, 광 음향(PA) 이미지를 측정하였다. 광 음향 이미지는 펄스 레이저에 의해 유도된 열팽창 신호를 이미징화 하는 기술이다. FP-PrGO-Ce6, AuNR, and AuNR@FP-PrGO-Ce6에 가변 파장 680-900nm를 조사하였다. 멀티 스펙트럼 광 음향 단층 촬영 (MOST) 측정은 상용 PAT 시스템 (inVision256-TF; iThera Medical GmbH) 및 산란, 흡수 한천 팬텀을 사용하여 수행되었다.
- [0144] 도 19 내지 도 20은 나노복합전달체의 광 음향 이미지 측정 결과가 도시되어 있다. 구체적으로, 도 19는 샘플들의 광 음향 이미지 가시성 여부를 PA진폭 및 이미지로 나타낸 것이며, 도 20은 나노복합전달체 농도에 따른 광 음향 이미지 가시성 여부를 PA진폭 및 이미지로 나타낸 것이다.
- [0145] 도 19 내지 도 20을 참조하면, 본 발명의 나노복합전달체는 우수한 광 음향 이미지의 가시성을 가짐을 확인할 수 있었다.
- [0146] **(실험예 4) 암세포 표적능 실험**
- [0147] MCF7 (염산 수용체 과발현 세포주) 및 A549 (염산 수용체 결핍 세포주) 암세포를 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. 두 암세포 모두 1×10^5 의 밀도로 37° C에서 24시간 동안 배양하였다. 이 세포들을 1mL의 배지에서 4시간 동안 Ce6, 비교예 1의 나노복합전달체(AuNR@CH₃P-PrGO-Ce6), 실시예 1의 나노복합전달체(AuNR@FP-PrGO-Ce6)과 각각 혼합하여 배양하였다. 4시간 후, PBS로 3회 세척하고 포르말데히드로 고정하였다. 세포핵과 F-액틴을 염색하기 위해 4',6-Diamidine-2-phenylindole (DAPI) 및 Alexa Fluor 488 phalloidin 용액을 첨가하고 실온에서 20분 동안 보관하였다. 염색은 어두운 곳에서 수행되었으며 세포의 형광 이미지는 공 초점 레이저 스캐닝 현미경 (confocal laser scanning microscope, CLSM)을 사용하여 분석하였다.
- [0148] 또한, Ce6, AuNR@CH₃P-PrGO-Ce6 및 AuNR@FP-PrGO-Ce6 각각의 세포 흡수는 flow cytometry으로 측정하였다. MCF7 및 A549 암세포를 1×10^5 의 밀도로 37° C에서 24 시간 동안 배양한 후, 배지를 4시간 동안 배양된 Ce6, AuNR@CH₃P-PrGO-Ce6 및 AuNR@FP-PrGO-Ce6을 포함하는 신선한 RPMI 1640 배지로 교체하여 보관하였다. 그 다음, 0.2%의 트립신-EDTA 750 μ L를 처리하여 세포를 분리한 후 PBS로 3회 세척하고 5분간 원심분리하였다. 얻어진 샘플을 200 μ L의 PBS에 분산시키고 flow cytometry 으로 분석하였다.
- [0149] 도 21 내지 도 23은 본 발명의 일 실시예에 따른 나노복합전달체의 암세포 내 공 초점 레이저 스캐닝 현미경 이미지 및 형광강도 분석결과이다. 구체적으로 도 21은 각 샘플들을 투여한 A549 세포 CLSM 이미지, 도 22는 각 샘플들을 투여한 MCF7 세포 CLSM 이미지, 도 23은 각 샘플들의 염색에 의한 형광강도(MFI)를 측정한 그래프이다.
- [0150] 도 21 내지 도 23을 참조하면, 타 샘플들에 비해 실시예 1의 나노복합전달체가 투입된 샘플이 우수한 표적능을 통해, 암세포에 다량 흡착되었음을 형광강도로 확인할 수 있었다.
- [0151] **(실험예 5) 암세포 제거능 실험**
- [0152] 1. 나노복합전달체 독성 평가
- [0153] MCF7 및 A549 세포를 1×10^5 의 밀도로 RPMI 1640 배지에서 37° C 및 24시간 동안 배양한 후 다양한 농도(5, 10,

15, 20 μ g/ml, Ce6 equiv.)의 AuNR@FP-PrGO-Ce6을 첨가한 다음 Cell counting kit-8 (CCK-8)을 이용하여 평균 세포 생존율을 분석하였다.

[0154] 2. 광 독성 평가

[0155] MCF7 및 A549 세포를 1×10^5 의 밀도로 RPMI 1640 배지에서 37° C 및 24시간 동안 배양한 후, 670nm 레이저를 100mW/cm² 5분, 880nm 레이저를 1W/cm² 5분 또는 670nm 레이저를 100mW/cm² 및 880nm 레이저 1W/cm²를 동시에 5분 조사한 후 Cell counting kit-8 (CCK-8)을 이용하여 평균 세포 생존율을 분석하였다.

[0156] 3. 암세포 제거능 평가

[0157] MCF7 및 A549 세포를 1×10^5 의 밀도로 RPMI 1640 배지에서 37° C 및 24시간 동안 배양한 후 다양한 농도 (0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 μ g/ml, Ce6 equiv.)의 Ce6, AuNR@CH₃P-PrGO-Ce6 및 AuNR@FP-PrGO-Ce6 샘플을 각 세포에 투입한 후, 670nm 레이저 100mW/cm² 및 880nm 레이저 1W/cm²를 동시에 5분 동안 조사한 후, Cell counting kit-8 (CCK-8)을 이용하여 평균 세포 생존율을 분석하였다.

[0158] 도 24 내지 도 28은 AuNR@FP-PrGO-Ce6의 암세포 제거능 측정 결과이다. 구체적으로 도 24는 AuNR@FP-PrGO-Ce6의 세포 독성 평가 결과이며, 도 25는 광의 세포 독성 평가 결과이다. 그리고 도 26은 나노전달복합체 농도에 따른 실시예 및 비교예들의 암세포(A549 세포) 제거능 측정 결과이며, 도 27은 나노전달복합체 농도에 따른 실시예 및 비교예들의 암세포(MCF7 세포) 제거능 측정 결과이고, 도 28은 광열 효과 및 광역학 효과의 시너지 효과를 나타내는 그래프이다.

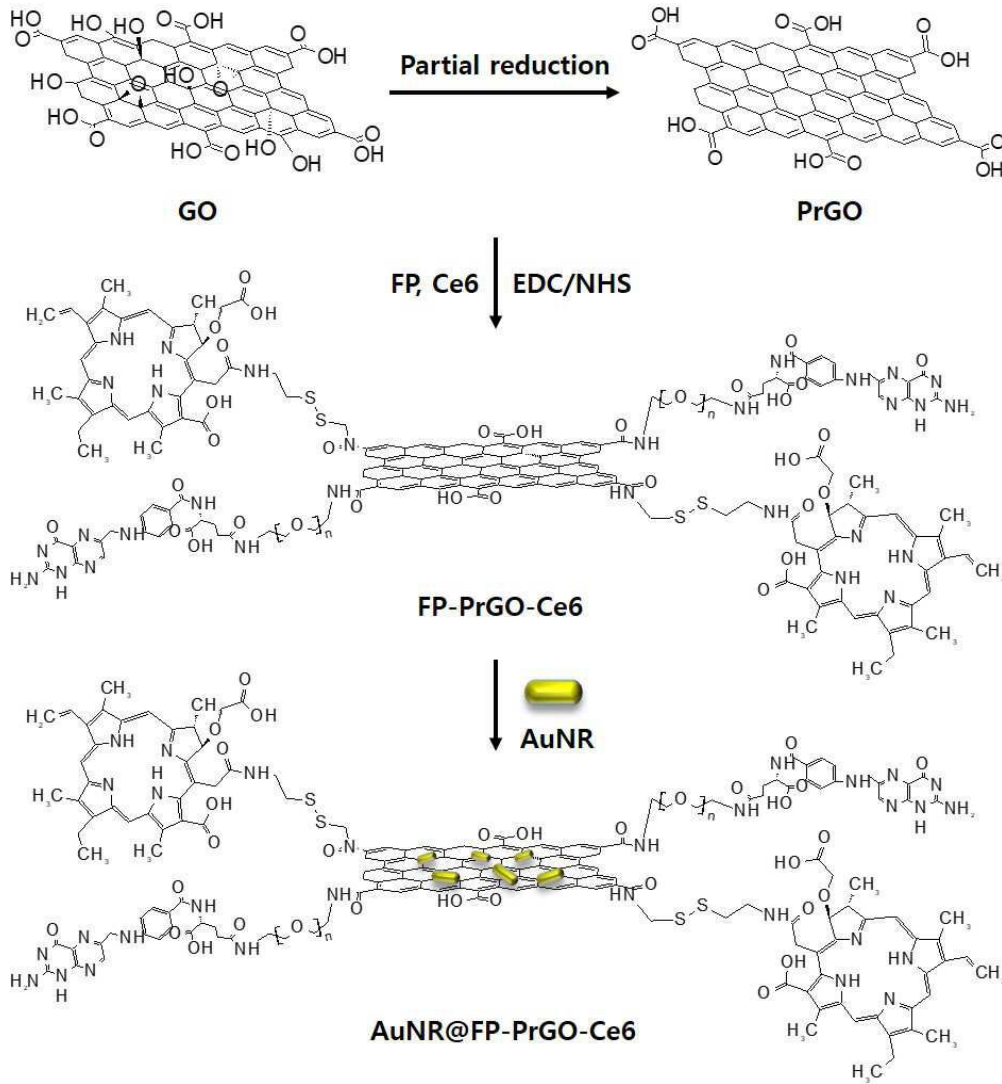
[0159] 도 24 내지 28을 참조하면 본 발명의 나노복합전달체 및 광에 의한 세포 독성이 없으며, 본 발명의 나노복합전달체의 경우 암세포 생존율이 최대 10% 미만으로 매우 우수한 암세포 제거능을 가짐을 확인할 수 있다.

[0160] 이상과 같이 본 발명에서는 특정된 사항들과 한정된 실시예 및 도면에 의해 설명되었으나 이는 본 발명의 보다 전반적인 이해를 돕기 위해서 제공된 것일 뿐, 본 발명은 상기의 실시예에 한정되는 것은 아니며, 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이러한 기재로부터 다양한 수정 및 변형이 가능하다.

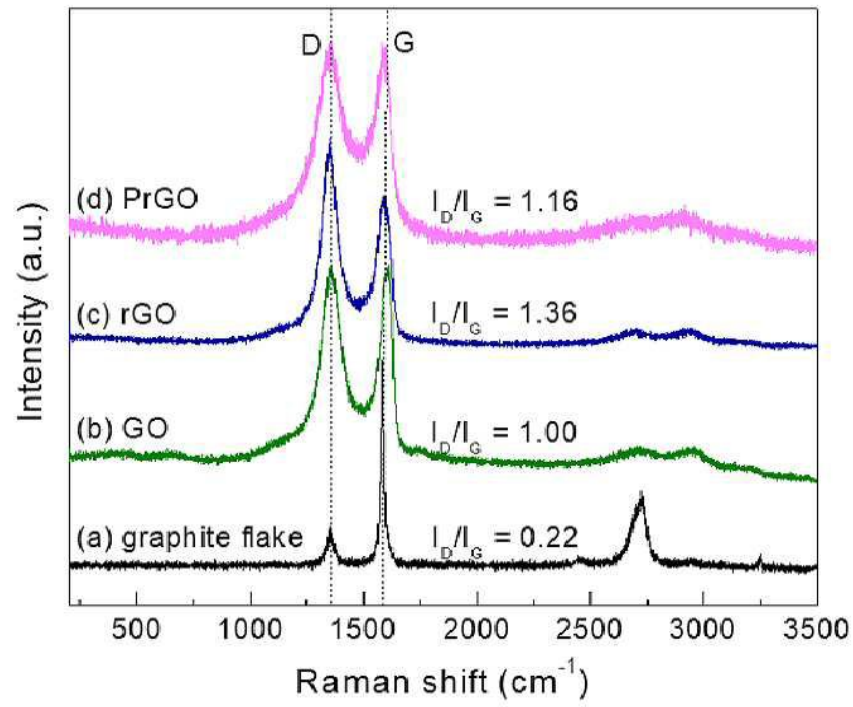
[0161] 따라서, 본 발명의 사상은 설명된 실시예에 국한되어 정해져서는 아니되며, 후술하는 특허청구범위뿐 아니라 이 특허청구범위와 균등하거나 등가적 변형이 있는 모든 것들은 본 발명 사상의 범주에 속한다고 할 것이다.

도면

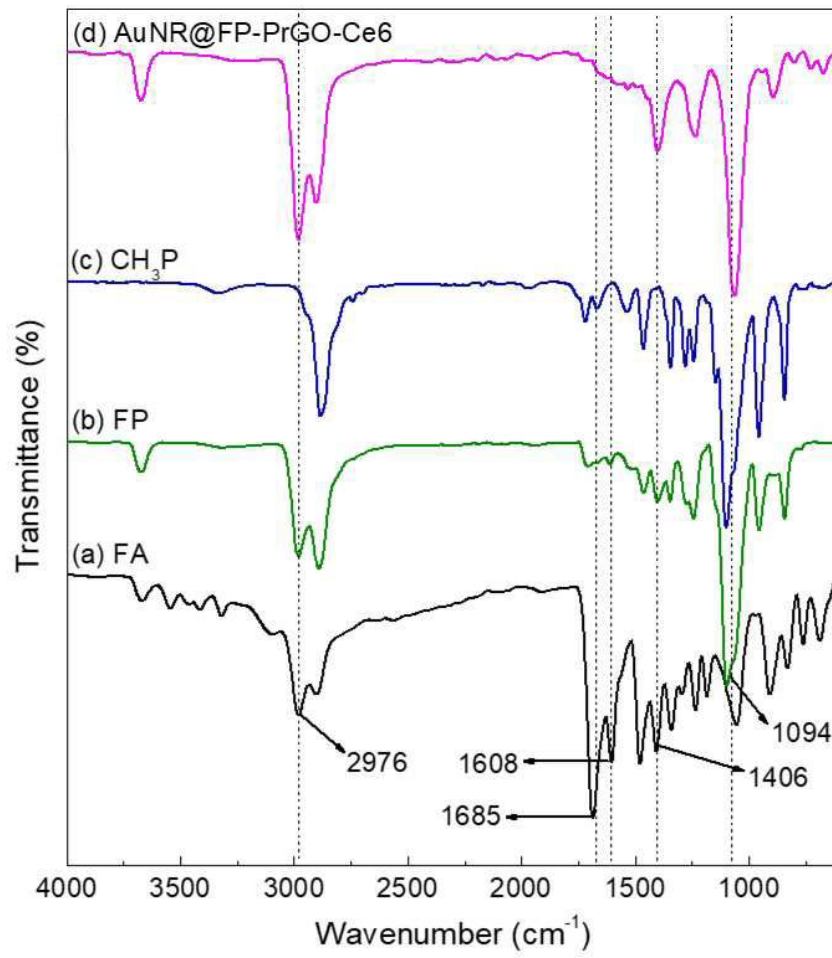
도면1



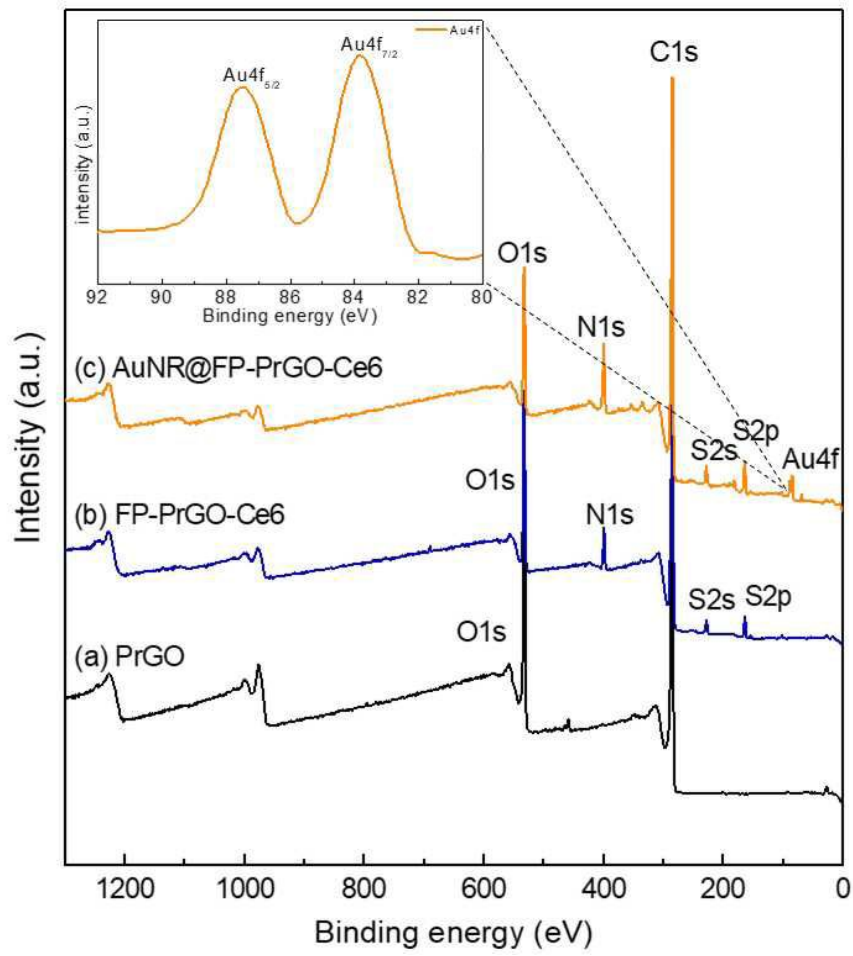
도면2



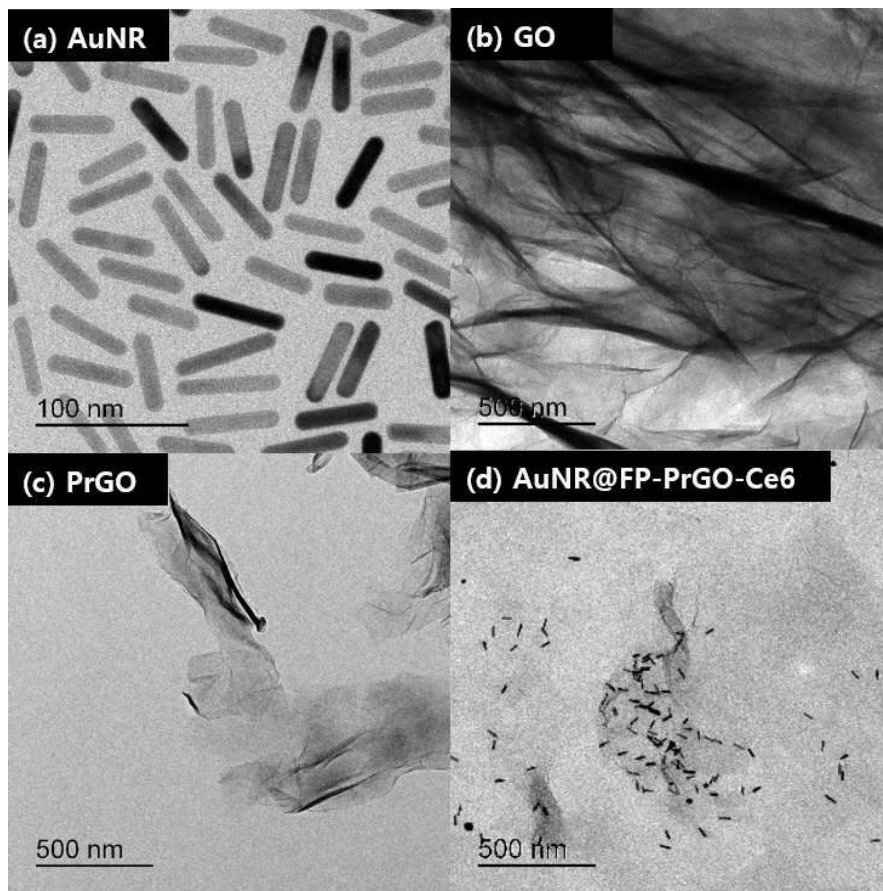
도면3



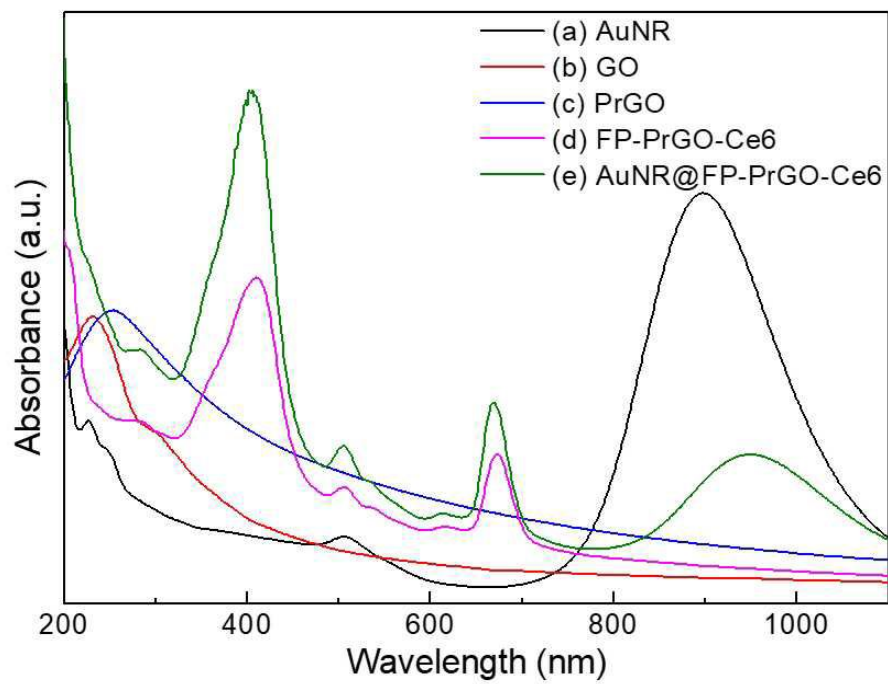
도면4



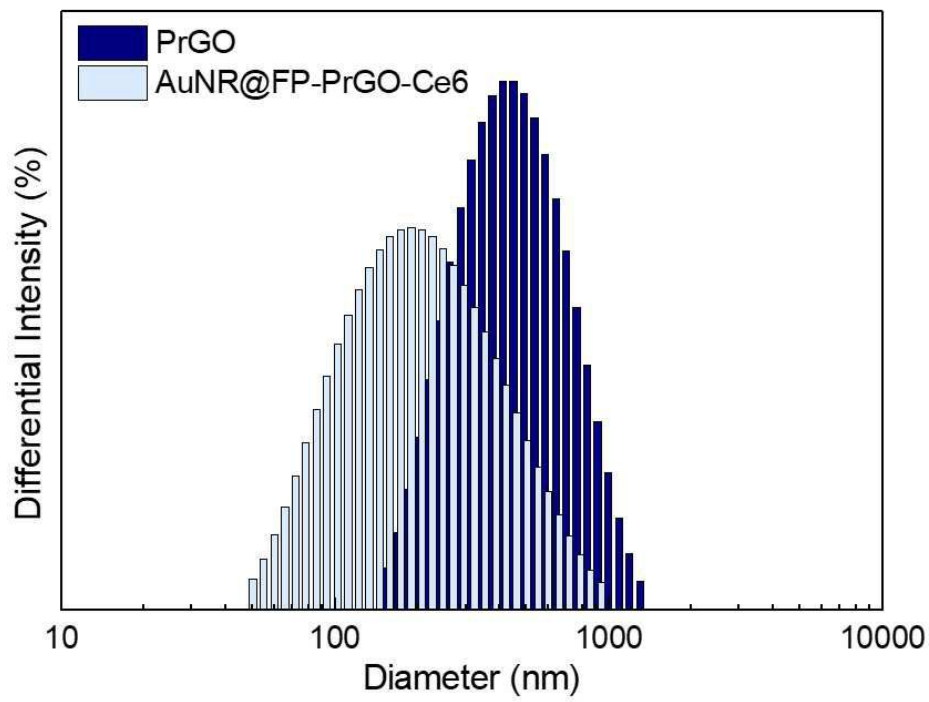
도면5



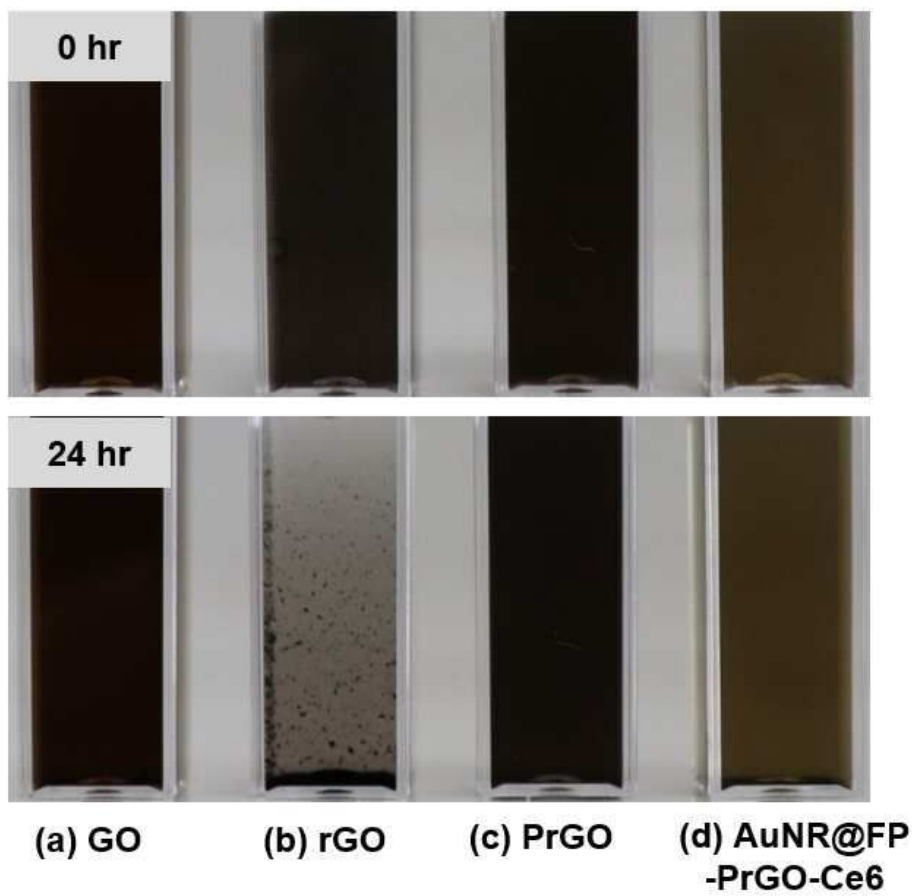
도면6



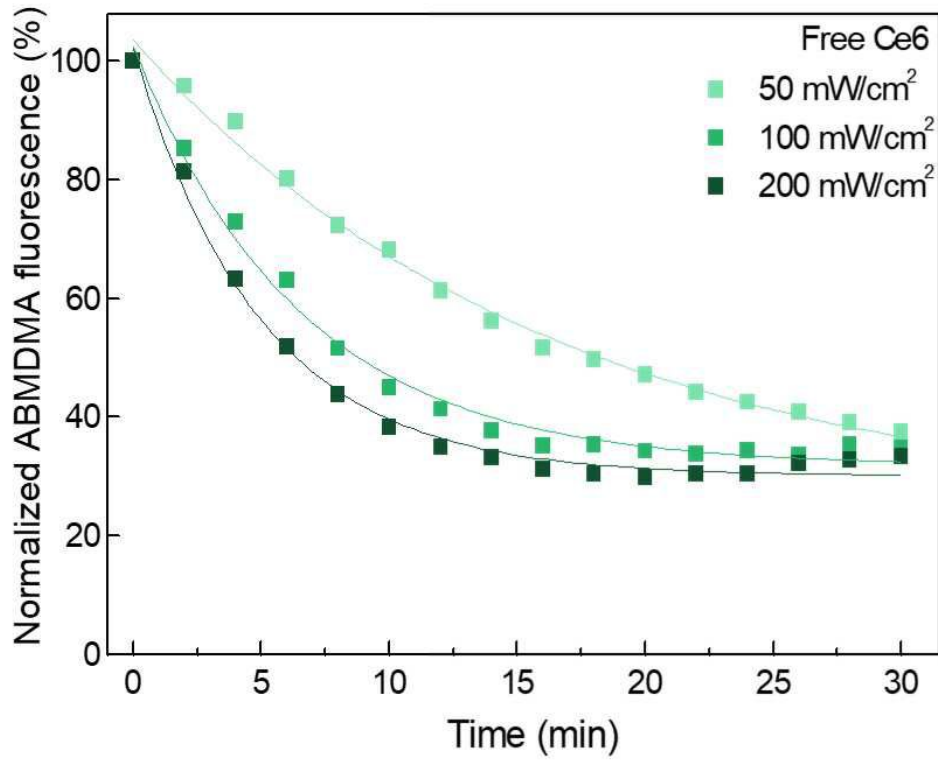
도면7



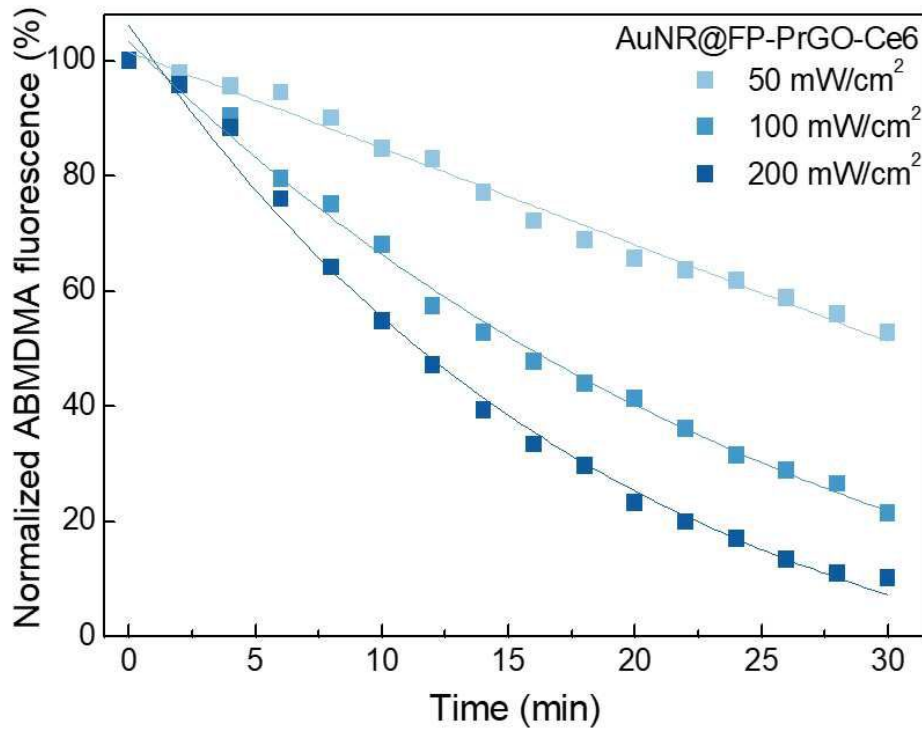
도면8



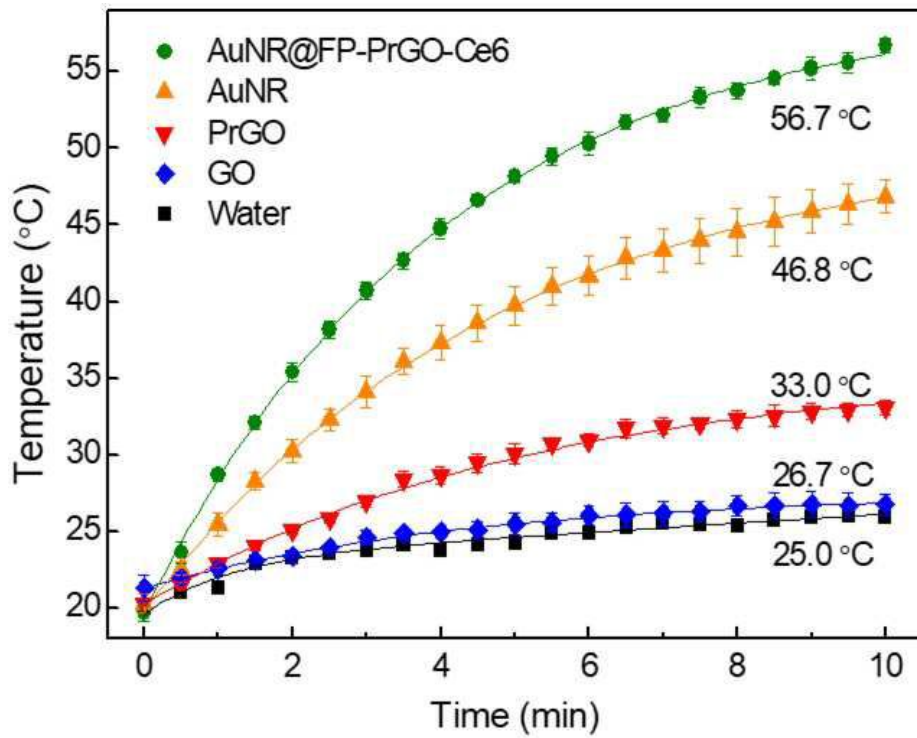
도면9



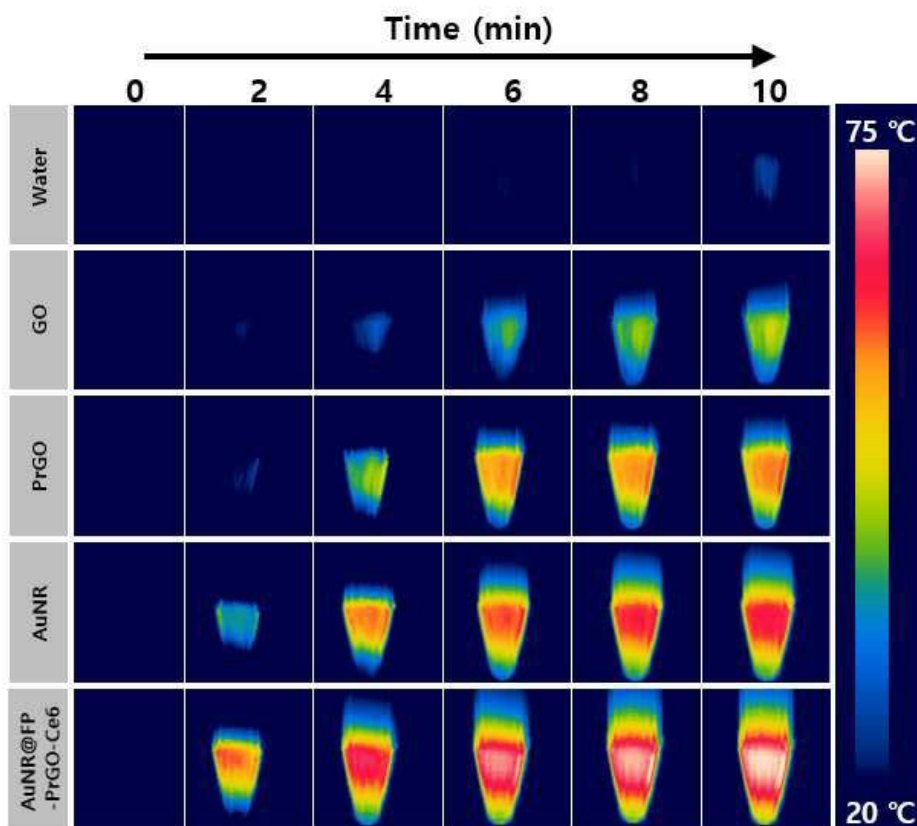
도면10



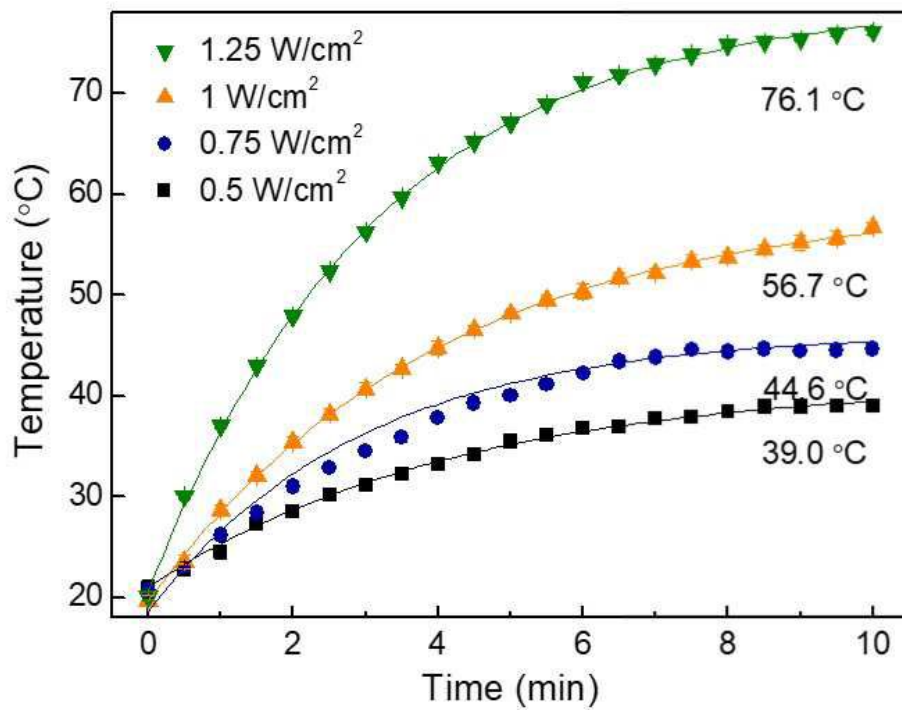
도면11



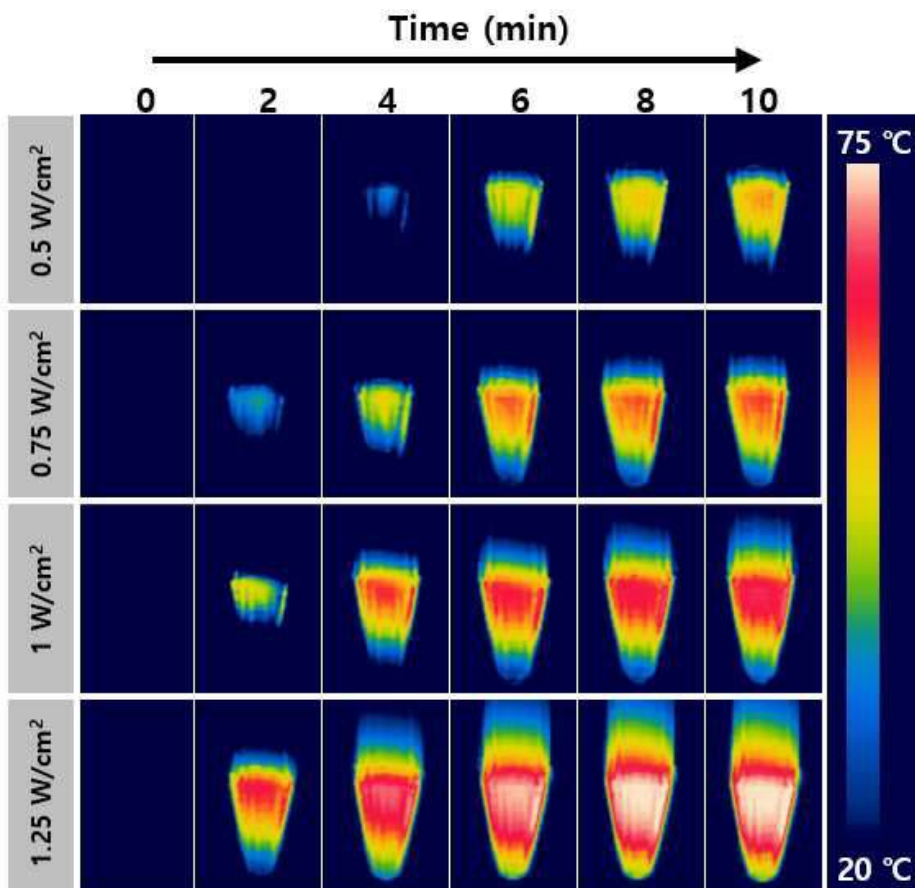
도면12



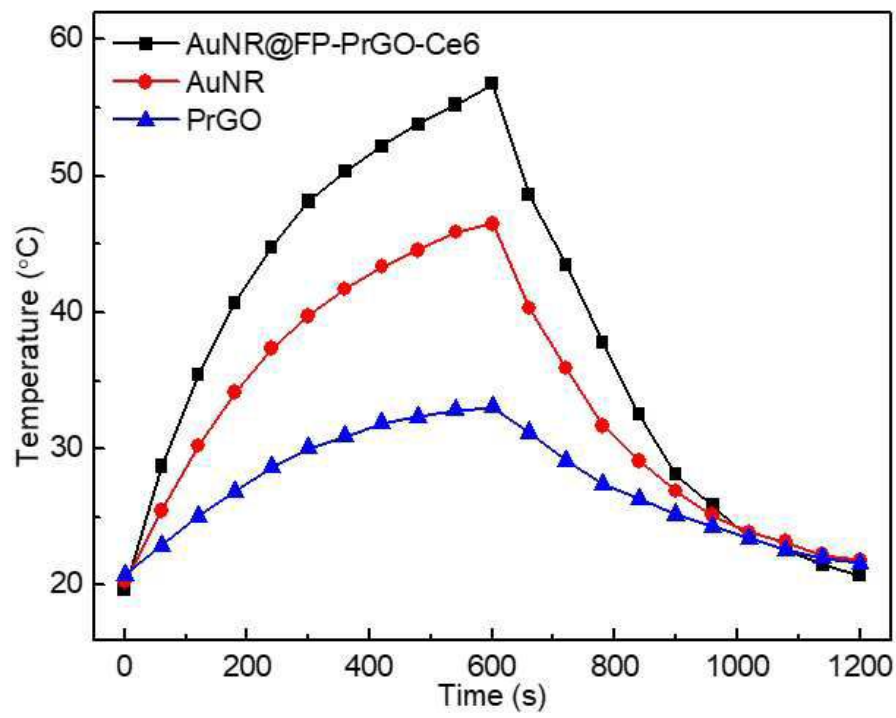
도면13



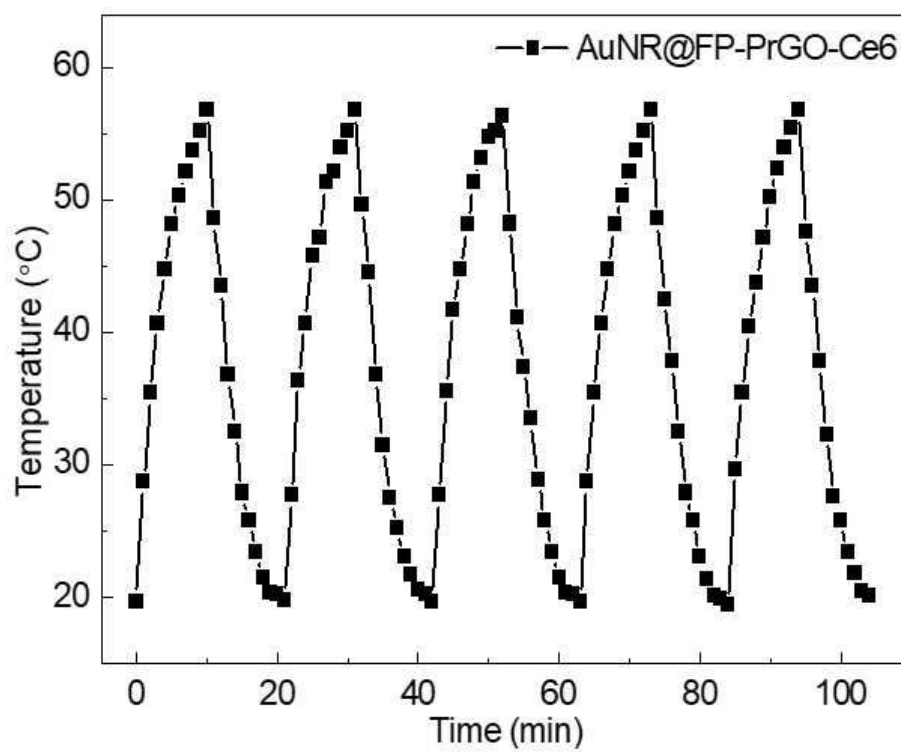
도면14



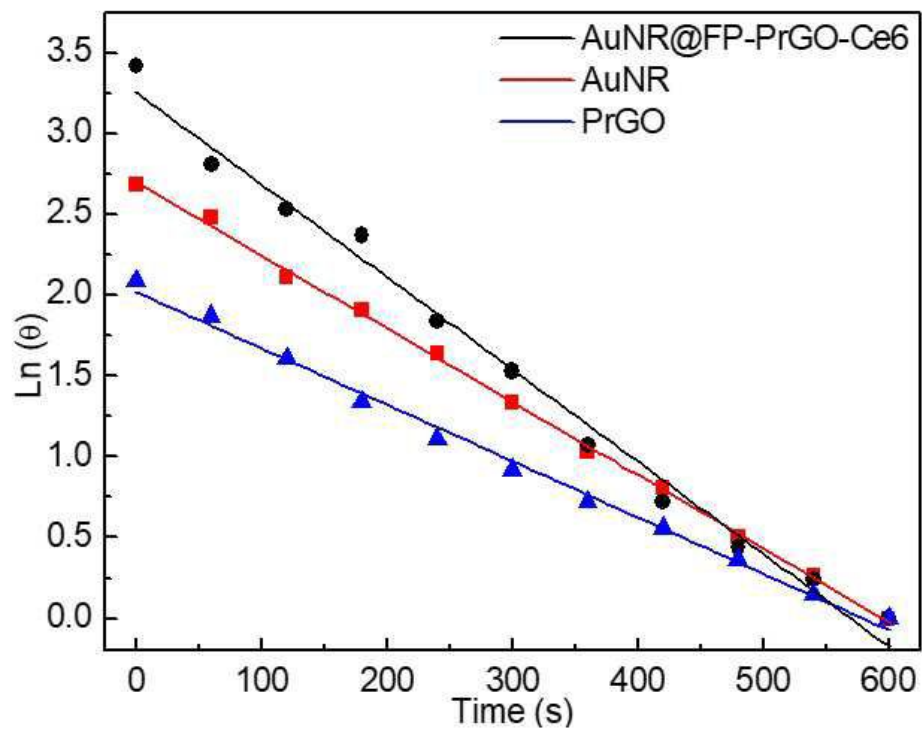
도면15



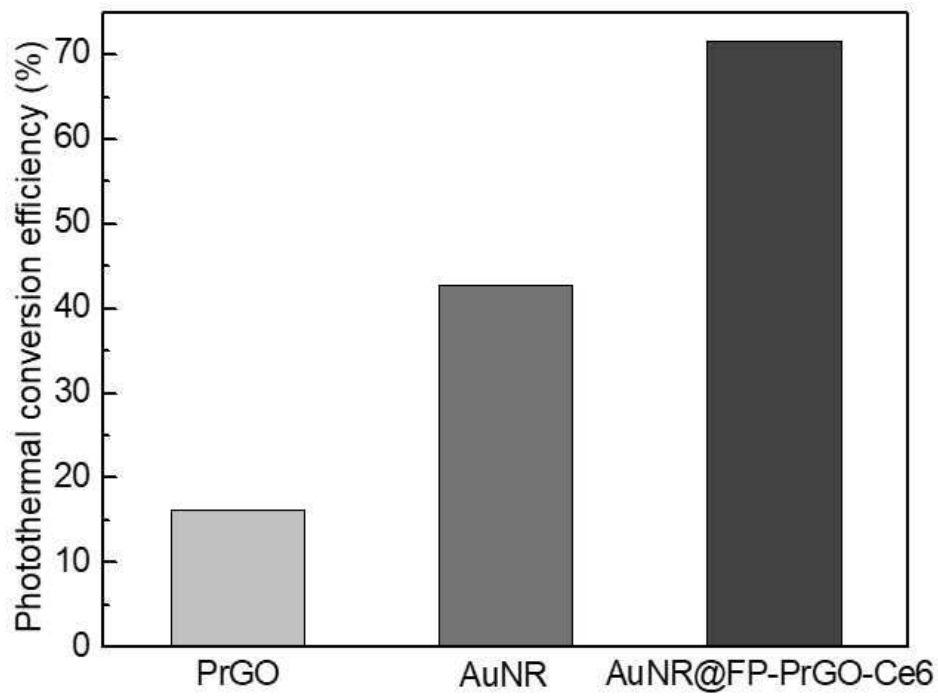
도면16



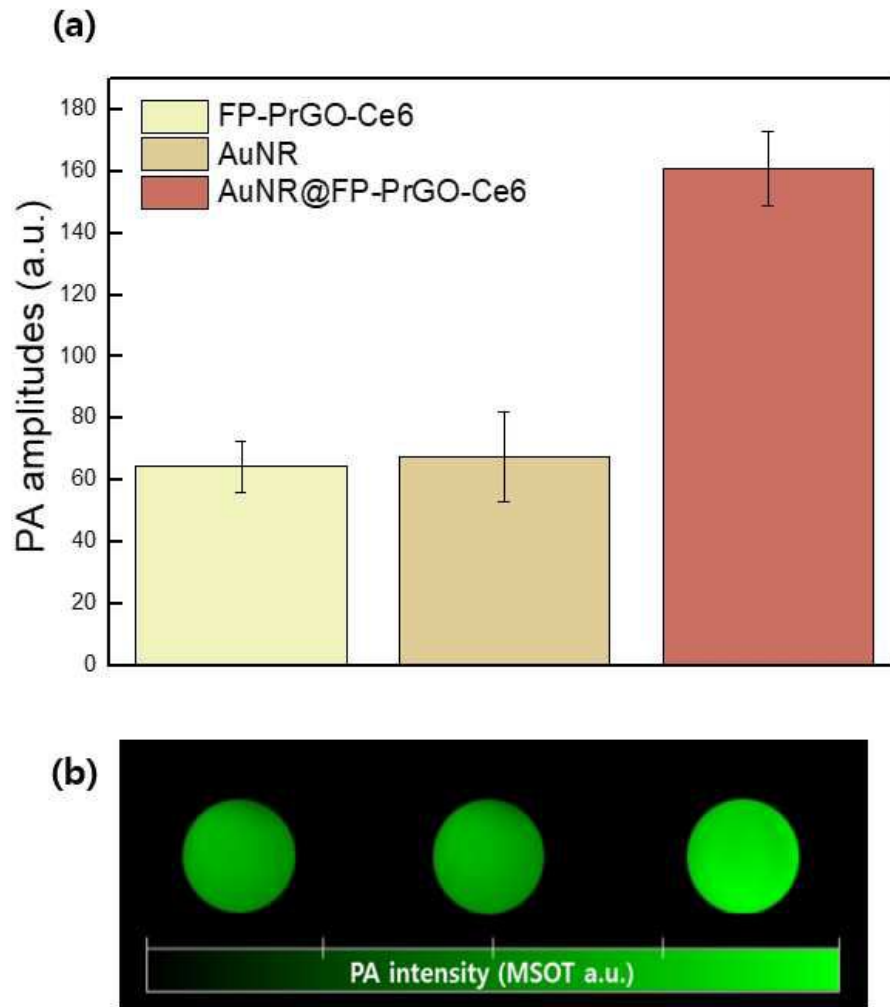
도면17



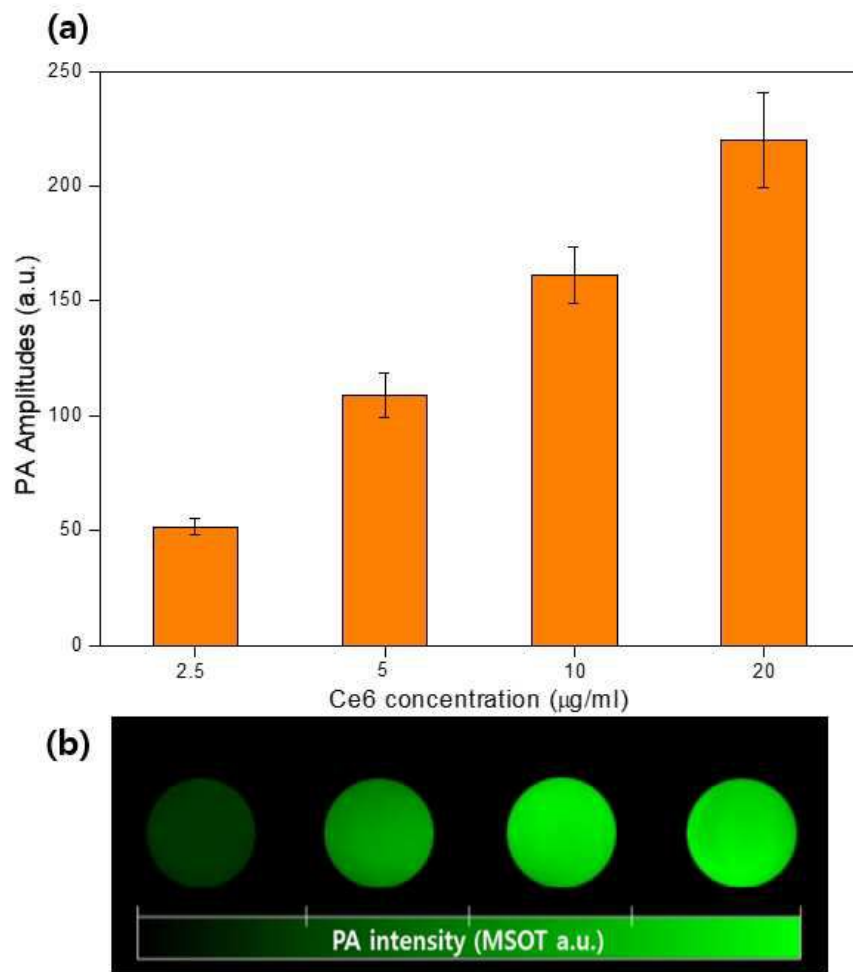
도면18



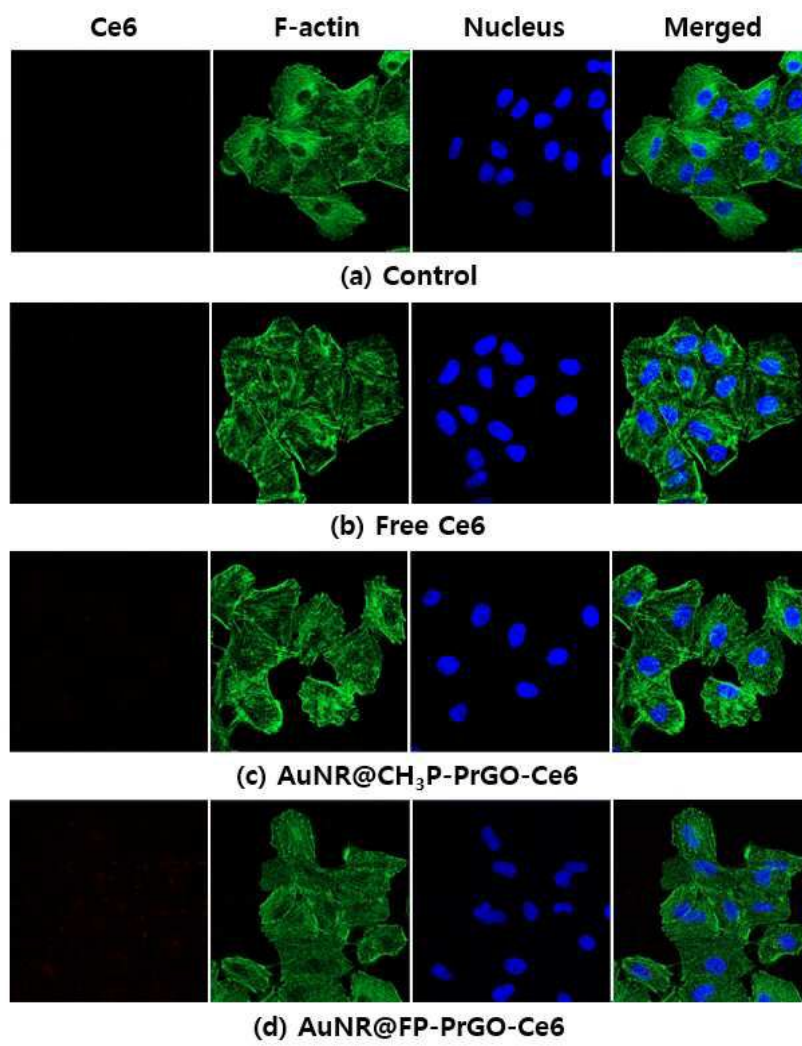
도면19



도면20

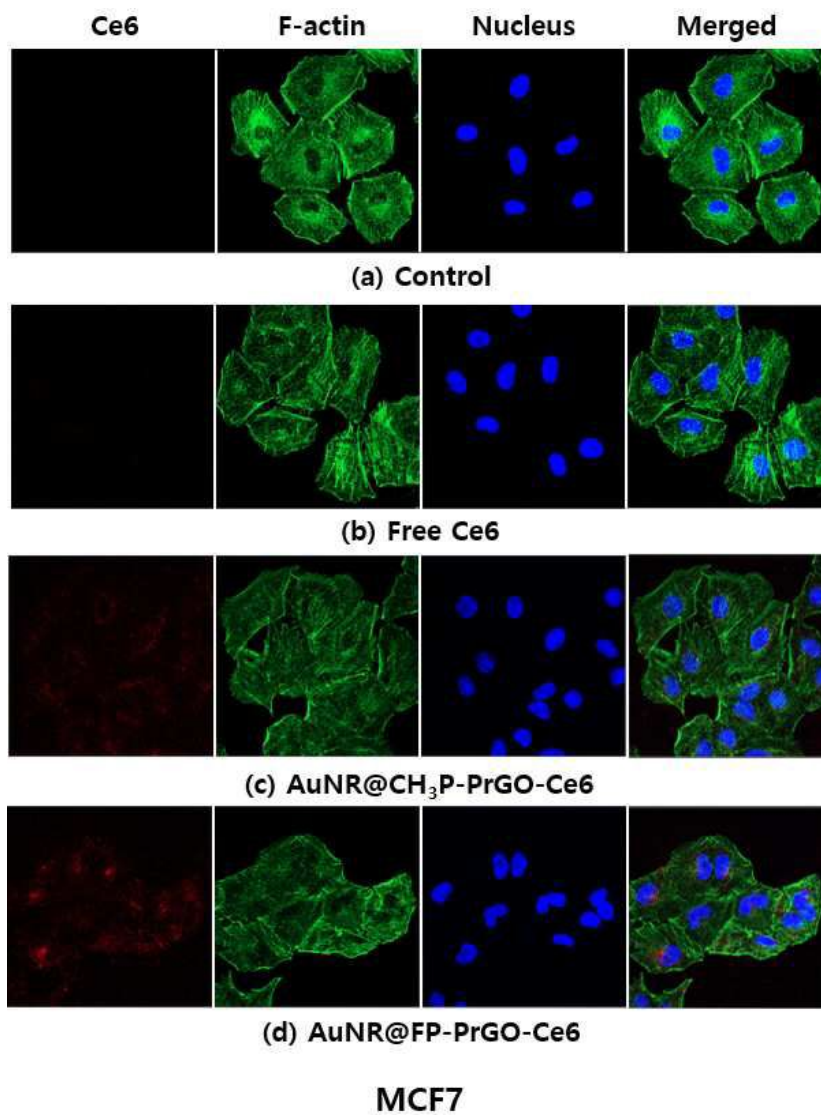


도면21

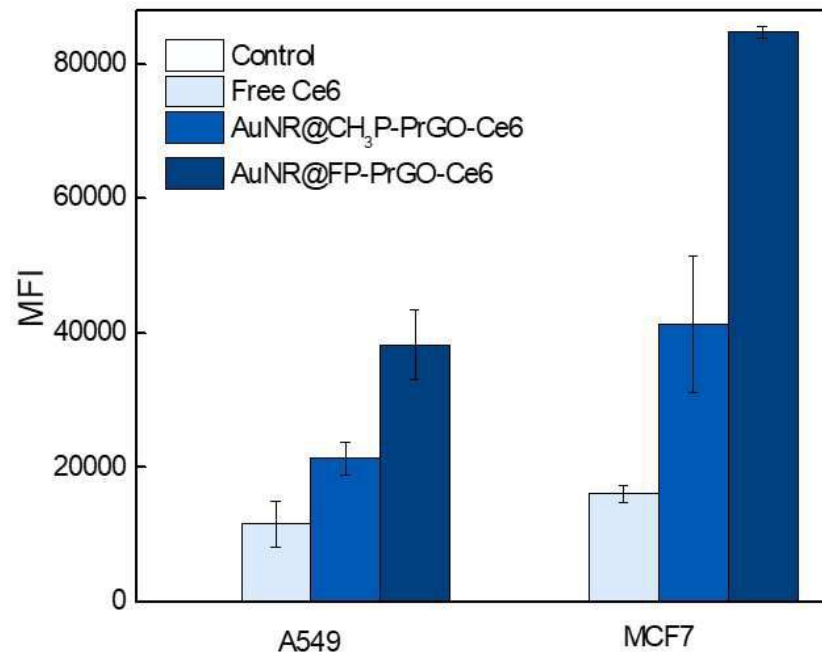


A549

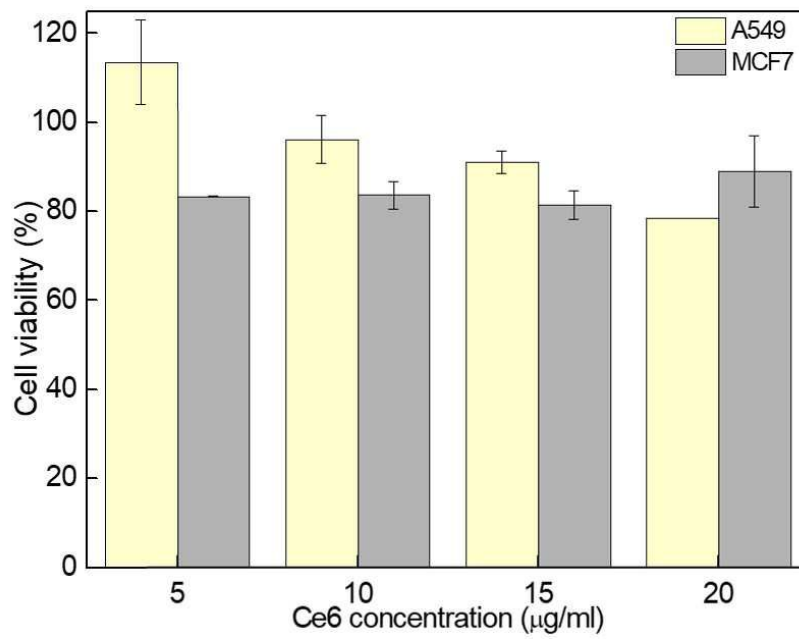
도면22



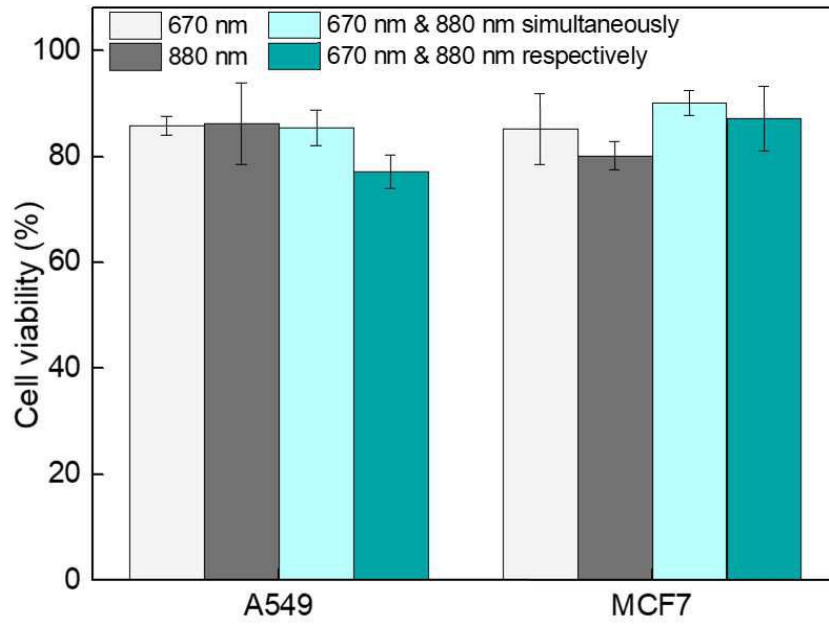
도면23



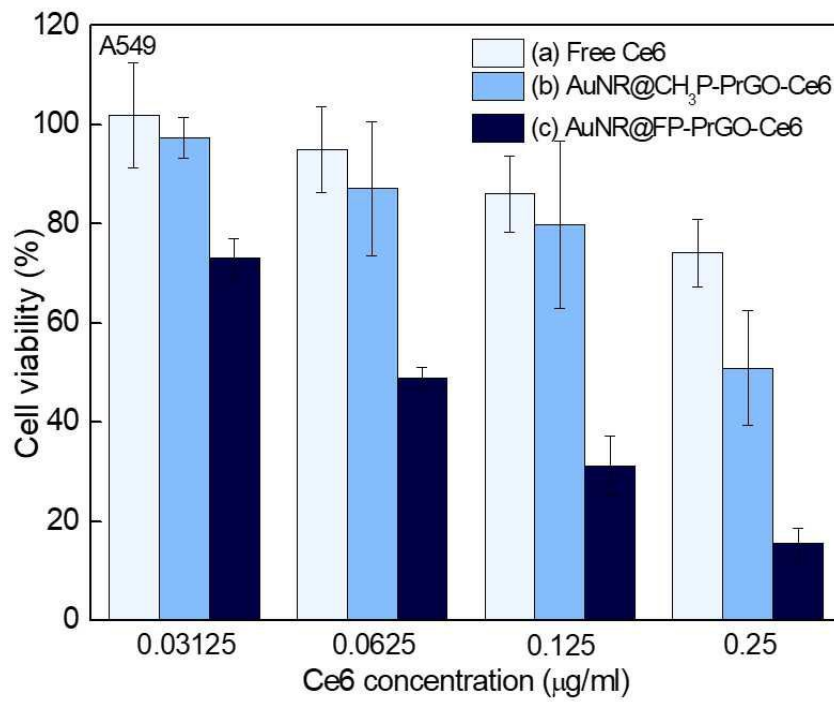
도면24



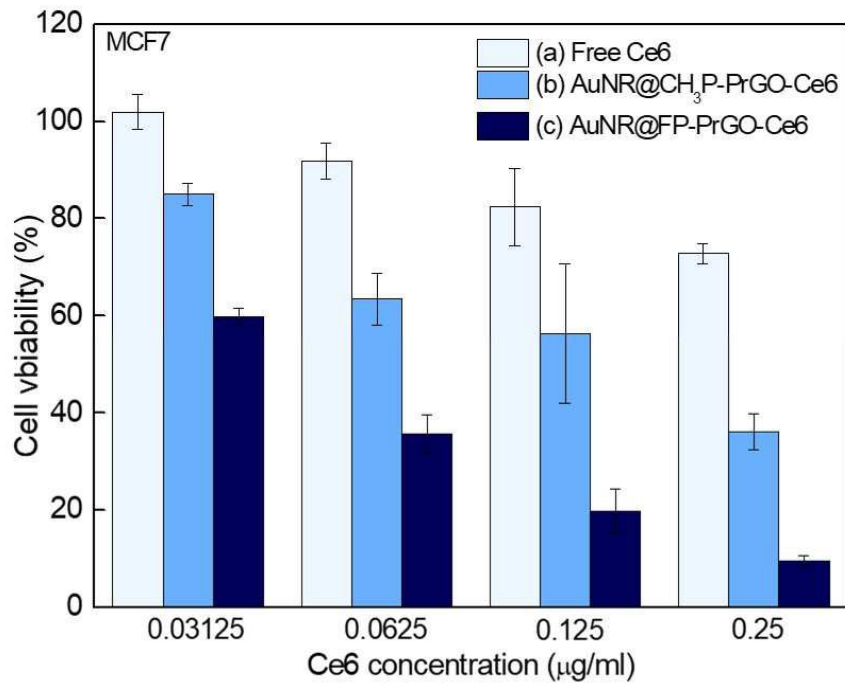
도면25



도면26



도면27



도면28

