(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0121499
(43) 공개일자 2024년08월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*A61K 41/00* (2020.01) *A61K 9/14* (2006.01)
*A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*A61K 41/0052* (2013.01)
*A61K 9/14* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0014224
(22) 출원일자 2023년02월02일
심사청구일자 2023년02월02일

(71) 출원인
**국립부경대학교 산학협력단**
부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교내 (대연동)
(72) 발명자
**오정환**
부산광역시 남구 분포로 111 ,106동1006호(용호동, 엘지메트로시티)
**수딥 몬달**
부산광역시 남구 유엔로157번나길 80, 1층 오른쪽
*(뒷면에 계속)*
(74) 대리인
**네이트특허법인**

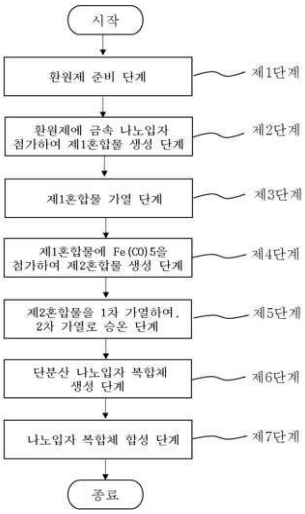
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **종양치료용 나노입자 복합체(Au-Fe3O4) 및 이의 제조방법**

## (57) 요 약

독성이 적어 생체 적합하고, 광열효과가 우수한 종양치료용 나노입자 복합체 및 이의 제조방법이 개시되어 있다. 이 개시된 나노입자 복합체는 흡광물질로서 금속나노입자 및 자성물질로서 산화철을 포함할 수 있다.

*대 표 도* - 도1



(52) CPC특허분류
*A61P 35/00* (2018.01)
(72) 발명자
**박수민**
부산광역시 남구 수영로 324, A동 1015호

**최재엽**
부산광역시 해운대구 센텀동로 26, B동 1048호 한화꿈에그린센텀

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

| | |
|---|---|
| 과제고유번호 | 1711172971 |
| 과제번호 | 2022R1A5A8023404 |
| 부처명 | 과학기술정보통신부 |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단 |
| 연구사업명 | 집단연구지원 |
| 연구과제명 | 스마트짐 기반 액티브 시니어 헬스케어 중개연구 센터 |
| 기 여 율 | 1/1 |
| 과제수행기관명 | 부경대학교 |
| 연구기간 | 2022.06.01 ~ 2023.02.28 |

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

종양치료용 나노입자 복합체에 있어서,

흡광물질로서 금속 나노입자; 및

자성물질로서 산화철을 포함하는 종양치료용 나노입자 복합체.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 금속 나노입자는 Au 나노입자를 포함하는 것을 특징으로 나노입자 복합체.

### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 산화철은 Fe3O4를 포함하는 것을 특징으로 하는 나노입자 복합체.

### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 나노입자 복합체는 상기 금속 나노입자와 상기 산화철이 1.5 ~ 2.5 : 7.5 ~ 8.5의 비율로 포함되는 것을 특징으로 하는 나노입자 복합체.

### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 나노입자 복합체의 농도는 10mM이상이고, 광열 효과가 발휘될 수 있는 이상적인 온도는 50 ~ 60℃인 것을 특징으로 하는 나노입자 복합체.

### 청구항 6

종양치료용 나노입자 복합체 제조방법에 있어서,

환원제를 준비하는 제1단계;

질소 또는 불활성 분위기 하에서 상기 환원제에 금속 나노입자를 첨가하여 제1혼합물을 생성하는 제2단계;

상기 제1혼합물을 가열하는 제3단계;

가열된 상기 제1혼합물에 Fe(CO)5을 첨가하여 제2혼합물을 생성하는 제4단계;

상기 제2혼합물을 1차 가열하고, 1차 가열된 제2혼합물을 승온하는 제5단계;

승온된 제2혼합물을 실온에 냉각시키고, 공기중에 노출한 후 이소프로필 알코올을 첨가하여 단분산 나노입자 복합체를 생성하는 제6단계; 및

상기 단분산 나노입자 복합체를 원심분리하여 나노입자 복합체를 합성하는 제7단계를 포함하는 나노입자 복합체 제조방법.

**청구항 7**

제6항에 있어서,

상기 7단계가 완료된 상기 나노입자 복합체를 헥산에 재분산하는 것을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 나노입자 복합체 제조방법.

**청구항 8**

제6항에 있어서,

상기 제2단계에서,

금속 나노입자는 Au 나노입자를 포함하는 것을 특징으로 하는 나노입자 복합체 제조방법.

**청구항 9**

제6항에 있어서,

상기 제6단계에서,

제2혼합물을 공기중에 노출시킴으로써 산소가 풍부한 산화철을 획득하여 광열, 광역학 효과가 우수한 나노입자 복합체를 제조하는 것을 특징으로 하는 나노입자 복합체 제조방법.

**청구항 10**

제9항에 있어서,

상기 산화철은 Fe304를 포함하는 것을 특징으로 하는 나노입자 복합체 제조방법.

**청구항 11**

종양치료제에 있어서,

제1항의 나노입자 복합체를 포함하는 종양치료제.

## *발명의 설명*

### *기 술 분 야*

[0001] 본 발명은 종양치료용 나노입자 복합체(Au-Fe304) 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 흡광물질로서 금속 나노입자와 자성물질로서 산화철을 포함하므로써, 종양을 진단하고 치료할 수 있는 종양치료용 나노입자 복합체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

### *배 경 기 술*

[0003] 암은 비정상적 세포분열에 의한 원인으로 예측할 수 없는 전이로 인해 사망률이 높은 질병이다. 암은 생명과 직결되는 문제로 수십년 전부터 치료방법에 대해 활발하게 연구가 진행되고 있다.

[0004] 암을 치료하는 방법에는 종양 제거, 항암치료, 방사선 치료 등에 의존하고 있다. 하지만 암의 진행과 성장 속도, 종양의 종류와 특성이 개인마다 다르기 때문에 사전 대응과 예측이 어려운 문제가 있다. 또한 암을 치료하는데 외과적인 수술이 불가능한 경우, 항암치료나 방사선 치료는 한계가 있다.

[0005] 따라서 이러한 한계를 극복하기 위해 일반적으로 단일 나노입자가 사용되고 있지만 진단 및 치료 등 여러 기능을 지닐 수 없으므로 암 치료의 보조적인 역할을 하는데 그치고 있다.

[0006] 따라서 이러한 문제를 해결하기 위해 금속 나노입자와 자성물질이 포함된 복합체가 주목을 받고 있는 현실이다. 금속 나노입자로서 금 나노입자는 독특한 광학적 및 생물학적 특성 때문에 암진단뿐만 아니라 광열, 광역학, 약물 및 유전자 전달, 바이오이미징, 플라즈몬 바이오센서와 같은 각각의 치료 용도에 맞게 다양하게 사용되고 있다. 또한 자성 나노입자는 독특한 모양과 크기, 생체적합성으로 인해 세포치료, 자기공명영상, 조직 수복, 표적 부위에 약물 전달 등에 이용되고 있다.

[0007] 이러한 다양한 특성들을 이용하여 암 진단 및 치료에 금 나노입자와 자성물질이 포함된 복합체에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있지만, 생체적합성, 안정성, 광열효과 측면 등에서 미흡한 실정이다.

[0008] 아래의 특허문헌 1에는 종양 치료용 나노 복합체 및 이의 제조방법이 개시되어 있다. 특허문헌 1에 개시된 발명은 방사선 크기를 증가시키는 제1성분 및 자기장 인가에 의해 열을 발생하는 제2성분 포함한 것으로 암을 진단 및 치료하는 복합체이다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 공개특허공보 10-2021-0130358(공개일 2021.11.01.)

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 상기한 바와 같은 점들을 감안하여 창안된 것으로서, 빛을 흡수하여 열을 방출하는 흡광물질로서 금속 나노입자와 열을 방출하는 자성물질인 산화철을 포함하므로써, 독성이 적은 생체 적합한 종양치료용 나노입자 복합체(Au-Fe3O4) 및 이의 제조방법을 제공하는데 목적이 있다.

### 과제의 해결 수단

[0013] 상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명에 따른 종양치료용 나노입자 복합체는 흡광물질로서 금속 나노입자 및 자성물질로서 산화철을 포함할 수 있다.

[0014] 상기 금속 나노입자는 Au 나노입자를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0015] 상기 산화철은 Fe3O4를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0016] 상기 나노입자 복합체는 상기 금속 나노입자와 상기 산화철이 1.5 ~ 2.5 : 7.5 ~ 8.5의 비율로 포함되는 것을 특징으로 한다.

[0017] 상기 나노입자 복합체의 농도는 10mM이상이고, 광열 효과가 발휘될 수 있는 이상적인 온도는 50 ~ 60℃인 것을 특징으로 한다.

[0018] 상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명에 따른 나노입자 복합체의 제조방법은 환원제를 준비하는 제1단계, 질소 또는 불활성 분위기 하에서 상기 환원제에 금속 나노입자를 첨가하여 제1혼합물을 제조하는 제2단계, 상기 제1혼합물을 가열하는 제3단계, 가열된 상기 제1혼합물에 Fe(CO)5을 첨가하여 제2혼합물을 생성하는 제4단계, 상기 제2혼합물을 1차 가열하고, 1차 가열된 제2혼합물을 승온하는 제5단계, 승온된 제2혼합물을 실온에 냉각시키고, 공기중에 노출한 후 이소프로필 알코올(IPOH)을 첨가하여 단분산 나노입자 복합체를 생성하는 제6단계 및

상기 단분산 나노입자 복합체를 원심분리하여 나노입자 복합체를 합성하는 제7단계를 포함할 수 있다.

[0019] 상기 7단계가 완료된 상기 나노입자 복합체를 헥산에 재분산하는 것을 더 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0020] 상기 제2단계에서 금속 나노입자는 Au 나노입자를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0021] 상기 제6단계에서 제2혼합물을 공기중에 노출시킴으로써 산소가 풍부한 산화철을 획득하여 광열, 광역학 효과가 우수한 나노입자 복합체를 제조하는 것을 특징으로 한다.

[0022] 상기 산화철은 Fe3O4를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0023] 종양치료제는 상기 나노입자 복합체를 포함할 수 있다.

## *발명의 효과*

[0025] 본 발명에 따른 종양치료용 나노입자 복합체는 흡광물질로서 금속 나노입자 및 자성물질로서 산화철을 포함함으로써, 생체적합성, 안정성, 광열 및 광역학 등의 효과 등을 극대화하여 종양을 치료하는데 용이 적용할 수 있다.

[0026] 본 발명에 따른 나노입자 복합체의 제조방법은 환원제를 준비하는 제1단계, 질소 또는 불활성 분위기 하에서 상기 환원제에 금속 나노입자를 첨가하여 제1혼합물을 생성하는 제2단계, 상기 제1혼합물을 가열하는 제3단계, 가열된 상기 제1혼합물에 Fe(CO)5을 첨가하여 제2혼합물을 생성하는 제4단계, 상기 제2혼합물을 1차 가열하고, 1차 가열된 제2혼합물을 승온하는 제5단계, 승온된 제2혼합물을 실온에 냉각시키고, 공기중에 노출한 후 이소프로필 알코올(IPOH)을 첨가하여 단분산 나노입자 복합체를 생성하는 제6단계 및 상기 단분산 나노입자 복합체를 원심분리하여 나노입자 복합체를 합성하는 제7단계를 포함함으로써, 온도 변화가 큰 금속 나노입자와 산소가 풍부한 산화철이 포함된 복합체로서 광열, 광역학 효과가 뛰어난 나노입자 복합제의 공정을 제공한다.

## *도면의 간단한 설명*

[0028] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 종양치료용 나노입자 복합체의 제조공정을 나타낸다.

도 2는 본 발명의 실시예에 따른 나노입자 복합체의 자외선-가시광선(UV-vis)스펙트럼을 나타낸다.

도 3은 본 발명의 실시예에 따른 나노입자 복합체의 X선 회절(XRD) 분석을 나타낸다.

도 4는 본 발명의 실시예에 따른 나노입자 복합체의 푸리에 변환 적외선(FTIR) 스펙트럼 분석을 나타낸다.

도 5는 본 발명의 실시예에 따른 나노입자 복합체의 전계방출 투과전자현미경(FETEM) 분석 사진이다.

도 6은 본 발명의 실시예에 따른 나노입자 복합체의 입자크기의 분포를 나타낸다.

도 7은 본 발명의 실시예에 따른 나노입자 복합체의 농도에 따른 최고 온도를 나타낸다.

도 8은 본 발명의 실시예에 따른 나노입자 복합체의 근적외선(NIR) 조사 노출 시간 증가에 따른 온도 변화를 나타낸다.

도 9는 본 발명의 실시예에 따른 나노입자 복합체의 안정성 시험 결과이다.

도 10은 본 발명의 실시예에 따른 나노입자 복합체의 광열효과를 나타낸다.

도 11은 본 발명의 실시예에 따른 나노입자 복합체의 세포독성 시험 결과이다.

도 12는 본 발명의 실시예에 따른 나노입자 복합체의 암세포에 대한 세포독성 시험 결과이다.

도 13은 본 발명의 실시예에 따른 나노입자 복합체를 종양이 자란 쥐에 주입후, 종양 치료 과정을 나타낸다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0029] 본 명세서에 기재되는 모든 용어는 본 발명의 기능을 고려하여 현재 널리 사용되는 일반적인 용어를 선택하였으나, 이는 당해 기술분야의 통상의 기술자의 의도, 관례 또는 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라 질 수 있다. 또한 본 발명에서 발명자가 임의의 용어를 특정한 경우, 발명의 설명부분에서 그 의미를 기재할 것이다. 따라서

본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 실질적인 의미와 본 발명의 설명에 기재된 전반에 걸친 내용을 토대로 해석되어야 한다.

[0030] 이하 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예에 따른 종양치료용 나노입자 복합체 및 이의 제조방법을 상세히 설명하기로 한다. 도면에서 본 발명을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 동일 또는 유사한 구성요소에 대해서는 동일한 참조 부호를 사용하기로 한다.

[0031] 본 발명은 종양치료용 나노입자 복합체 및 이의 제조방법을 제공한다.

[0032] 본 발명의 실시예에 따른 종양치료용 나노입자 복합체는 흡광물질로서 금속 나노입자 및 자성물질로서 산화철을 포함할 수 있다.

[0033] 본 발명의 실시예에 따른 나노입자 복합체는 흡광물질로서 금속 나노입자를 포함할 수 있다. 상기 금속 나노입자는 Pt, Au, Ag, Agbr, NiO, SiO2, TiO2 중에서 선택된 적어도 어느 하나 이상의 나노입자를 포함할 수 있다. 바람직하게는 본 발명에서 금속 나노입자는 Au 나노입자를 포함할 수 있다.

[0034] 상기 Au 나노입자는 Au 입자 크기가 나노미터 사이즈에 있는 입자이다. 따라서 Au 나노입자는 벌크(bulk)상태와는 전혀 다른 물리적 및 화학적 성질을 가질 수 있다. 즉, Au 나노입자는 가단성이 크고 쉽게 변하지 않는 성질을 가지고 있다. 또한 Au 나노입자는 완전한 구 모양이 아니라 불규칙한 모양으로 되어 있으며, 각각의 모양과 크기에 따라 상태와 색상이 다르다. 즉, 모양과 크기에 따라 흡수 및 반사되는 파장에 따라 색상을 달리한다. 또한 Au 나노입자는 빛을 흡수하여 열을 방출하는 광학적 특성뿐만 아니라 생물학적 특성 때문에 다양한 분야에 사용될 수 있다. 즉, 종양 진단뿐만 아니라 광열, 광역학, 약물 및 유전자 전달, 바이오이미징, 플라즈몬 바이오센서와 같은 치료 응용 분야에도 사용될 수 있다.

[0035] 상기 Au 나노입자의 평균 입자크기는 4.41 ~ 6.29nm인 것을 특징으로 한다. 다만 상기 Au 나노입자의 평균 입자크기는 응용분야에 따라 크기가 다를 수 있으므로 이에 제한되는 것은 아니다.

[0036] 따라서 본 발명에서 상기 Au 나노입자의 평균 입자크기가 범위 초과인 경우, 체내에 주입했을 때, 혈관의 지름 등을 고려할 때 혈류를 방해하는 문제를 야기할 수 있다.

[0037] 본 발명에서 Au 나노입자가 포함된 나노입자 복합체를 종양 부위에 주입후에 레이저를 조사하면, 빛을 흡수한 Au 나노입자는 열을 방출하여 종양 세포를 파괴할 수 있다.

[0038] 본 발명의 실시예에 따른 나노입자 복합체는 자성물질로서 산화철을 포함할 수 있다. 상기 산화철은 Fe304, γ-Fe203 중에서 선택된 어느 하나를 포함할 수 있다. 바람직하게는 본 발명에서 산화철은 Fe304를 포함할 수 있다. 본 발명에서 '산화철'은 산화철 나노입자를 의미한다.

[0039] 상기 자성물질인 산화철은 독성이 적어 생체에 적합하고, 독특한 모양과 크기 때문에 세포치료, 자기공명영상(MRI), 조직수선, 표적부위에 약물 전달 같은 생의학적 응용분야에 이용되고 있다.

[0040] 상기 산화철은 Fe304를 포함할 수 있다. Fe304는 광물 자철광으로 자연에서 발생한다. 또한 Fe304는 본 발명인 나노입자 복합체의 합성과정에서 생성될 수 있다. Fe304는 강자성 물질로서 합성 방법에 따라 입자 크기 및 형태가 달라질 수 있다. Fe304의 형태는 Fe2+이온이 팔면체 부위의 절반을 차지하고, Fe3+가 나머지 팔면체 부위와 사면체 부위를 가로질러 고르게 분할되는 입방 밀착된 산화물 이온배열로 구성된 입방 역스피넬 구조를 갖는다. 또한 Fe304는 팔면체 부위의 Fe2+ 및 Fe3+ 이온의 전자 스핀이 결합되고 사면체 부위의 Fe3+ 이온의 스핀이 결합되지만 전자와 반 평행하기 때문에 강자성의 성질을 가질 수 있다. 또한 Fe304는 열적 안정성이 우수한 성질을 가지고 있다.

[0041] 따라서 Fe304의 구조와 성질로 인해, 본 발명에서는 바람직하게 상기 산화철은 산소가 풍부한 Fe304인 것을 특징으로 한다. 산소가 풍부한 상기 Fe304은 레이저를 조사하더라도 열적 안정성으로 온도 변화 및 유지가 보다 안정적일 수 있다. 상기 Fe304 나노입자의 평균 입자크기는 8.56 ~ 12.70nm인 것을 특징으로 한다. 다만, 실험방법과 사용되는 물질의 용량과 비율에 따라 달라질 수 있으므로 이에 제한되는 것은 아니다.

[0042] 상기 산화철은 γ-Fe203를 포함할 수 있다. 제2산화철의 준안정한 상인 상기 γ-Fe203는 산소이온의 적층배열이 ABCABC의 입방조밀구조를 이루는 역스피넬 구조로 Fe이온이 공공(vacancy)로 존재하는 결함을 갖는 입방정계 구조이다. 또한 γ-Fe203의 이론 밀도는 4.87g/cm3이고 강자성의 성질을 갖는다. 따라서 γ-Fe203는 자성염료와 자기기록 재료로 사용될 수 있다.

[0043] 본 발명의 실시예에 따른 나노입자 복합체는 상기 금속 나노입자와 상기 산화철이 1.5 ~ 2.5 : 7.5 ~ 8.5의 비

율로 포함될 수 있다. 또한 나노입자 복합체의 평균 입자크기는 10.82 ~ 15.28nm인 것을 특징으로 한다. 나노입자 복합체의 입자의 크기는 8 ~ 20nm인 것을 특징으로 한다.

[0044] 따라서 상기 금속 나노입자와 상기 산화철의 비율이 범위 밖인 경우에는 금속 나노입자 및 산화철 각각이 분리된 채 역할을 할 수 있으므로, 빛을 흡수하고 열을 방출하는 양이 적게 되어, 결국 온도변화가 적어짐에 따라 종양을 파괴하는 효과가 어려울 수 있다. 또한 상기 나노입자 복합체의 평균 입자크기 또는 나노입자 복합체의 입자크기가 범위 밖인 경우에는 생체적합성 측면에서 문제를 야기할 수 있으며, 치료 효능 또한 우수하지 않을 수 있다. 또한 나노입자 복합체의 크기가 범위 초과인 경우에는 혈류를 방해할 수도 있고, 혈관 내로 통과할 수 없는 어려움이 따를 수 있다.

[0045] 본 발명의 실시예에 따른 나노입자 복합체의 농도는 10mM이상이고, 광열 효과가 발휘될 수 있는 이상적인 온도는 50 ~ 60℃이상인 것을 특징으로 한다. 즉, 종양의 상태와 크기에 따라 농도는 이에 제한되는 것은 아니지만 광열효과가 발휘되기 위해서는 바람직하게는 상기 나노입자 복합체의 농도는 10mM이상일 수 있다. 또다른 예로서 상기 나노입자 복합체의 농도는 10 ~ 100mM을 포함할 수 있다. 또한 레이저 조사시 나노입자 복합체가 주입된 종양세포의 사멸을 위한 광열효과가 발휘되는 나노입자 복합체의 이상적인 온도는 50℃ 이상인 것을 특징으로 한다. 또다른 예로서 나노입자 복합체의 이상적인 온도는 50 ~ 70℃인 것을 특징으로 한다. 또다른 예로서 나노입자 복합체의 이상적인 온도는 50 ~ 60℃인 것을 특징으로 한다.

[0046] 따라서 나노입자 복합체의 농도가 범위 밖인 경우에는 본 발명인 나노입자 복합체의 효과 발휘가 어려울 수 있다. 또한 상기 나노입자 복합체의 이상적인 온도가 범위 미만인 경우에는 광열효과 발휘가 어려울 수 있으며, 범위 초과인 경우에는 지나친 높은 온도로 주위 조직에 열적 손상을 미칠 수 있다.

[0047] 이와 같이 흡광물질인 금속 나노입자 및 자성물질인 산화철을 포함하는 종양치료용 나노입자 복합체는 독성이 적어 생체에 적합한 물질로서 레이저 등의 조사시 빛을 흡수하여 열을 방출하는 광열 및 광역학 효과가 우수하여 온도변화에 의해 종양세포를 파괴할 수 있다.

[0048] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 종양치료용 나노입자 복합체의 제조공정을 나타낸다. 이하 도면을 참조하여 본 발명인 나노입자 복합체의 제조방법을 상세히 설명하기로 한다.

[0049] 도 1을 참조하면, 본 발명의 실시예에 따른 종양치료용 나노입자 복합체의 제조단계는 크게 7가지 공정으로 이루어질 수 있다. 즉, 환원제를 준비하는 제1단계, 상기 환원제에 금속 나노입자를 첨가하여 제1혼합물을 생성하는 제2단계, 제1혼합물을 가열하는 제3단계, 제1혼합물에 Fe(CO)5을 첨가하여 제2혼합물을 생성하는 제4단계, 제2혼합물을 1차 가열하여, 2차 가열로 승온하는 제5단계, 단분산 나노입자 복합체를 생성하는 제6단계 및 나노입자 복합체를 합성하는 제7단계를 포함할 수 있다.

[0050] 제1단계는 환원제를 준비하는 단계이다. 상기 환원제의 종류와 비율로 본 발명인 나노입자 복합체의 형상과 크기를 조절할 수 있다. 본 발명에서는 바람직하게 상기 환원제는 올레산(oleic acid, OA) 및 올레일아민(oleylamin, OAm)이 포함된 1-옥타데센(1-Octadecebe, ODE)을 포함할 수 있다. 환원제인 상기 1-옥타데센은 질소 또는 불활성기체 분위기 하에서 유해가스를 배출하는 용도로 사용되는 소정의 장비에 준비할 수 있다. 상기 질소 또는 불활성기체 분위기에서 본 발명인 나노입자 복합체를 제조하는 것은 화재 또는 바람직하지 않은 반응의 위험을 줄이기 위함이다.

[0051] 상기 올레산(oleic acid, OA)은 올리브유에 포함되어 있는 지방산의 주성분으로 오메가-9 불포화지방산이다. 올레산은 녹는점 13.3℃ 또는 16.2℃, 끓는점 223℃, 비중 0.89 갖는다. 상기 올레산은 1-옥타데센에 포함되어 환원제로서 본 발명인 나노입자 복합체의 성장과 합성에 영향을 줄 수 있다. 본 발명인 나노입자 복합체의 합성 후에 상기 올레산은 원심분리법, 투석법, 필터여과법 등을 통해 제거될 수 있다. 본 발명에서는 바람직하게 원심분리법에 의해 올레산은 제거될 수 있다. 따라서 원심분리법에 의해 환원제인 올레산이 충분히 제거되지 않으면 본 발명인 나노입자 복합체의 생체 독성을 야기할 수 있다.

[0052] 상기 올레일아민(oleylamin, OAm)은 분자식이 C18H35NH2인 유기화합물로 올레산과 관련된 불포화지방 아민이다. 올레일아민은 계면활성제 또는 계면활성제의 전구체로 주로 사용된다. 또한 올레일아민은 금속 나노입자의 합성에 주로 사용되는 유기화합물이다. 따라서 상기 올레일 아민은 1-옥타데센에 포함되어 환원제로서 본 발명인 나노입자 복합체의 성장과 합성에 영향을 줄 수 있다. 본 발명인 나노입자 복합체의 합성 후에 상기 올레일아민은 원심분리법, 투석법, 필터여과법 등을 통해 제거될 수 있다. 본 발명에서는 바람직하게 원심분리법에 의해 올레일아민은 제거될 수 있다. 따라서 원심분리법에 의해 환원제인 올레일아민이 충분히 제거되지 않으면 본 발명인 나노입자 복합체의 생체 독성을 야기할 수 있다.

[0053] 상기 1-옥타데센(1-octadecene, ODE) 은 분자식이 C18H36인 유기화합물이다. 1-옥타데센의 구조는 원자의 배열과 각 해당 원자들 간의 화학결합으로 결정된다. 상기 1-옥타데센은 환원제로서 본 발명인 나노입자 복합체의 성장과 합성에 영향을 줄 수 있다. 또한 본 발명인 나노입자 복합체의 합성과정은 고온에서 진행되므로 끓는점이 높은 1-옥타데센은 환원제로서 용매 역할을 할 수 있다. 본 발명인 나노입자 복합체의 합성 후에 상기 1-옥타데센은 원심분리법, 투석법, 필터여과법 등을 통해 제거될 수 있다. 본 발명에서는 바람직하게 원심분리법에 의해 1-옥타데센은 제거될 수 있다. 따라서 원심분리법에 의해 환원제인 1-옥타데센이 충분히 제거되지 않으면 본 발명인 나노입자 복합체의 생체 독성을 야기할 수 있다.

[0054] 제2단계는 제1단계에서 준비한 환원제에 금속 나노입자를 첨가하여 제1혼합물을 생성하는 단계이다. 상기 금속 나노입자는 Au 나노입자를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0055] 상기 Au 나노입자는 수계 및 유기용매법에 의해 합성될 수 있다. 본 발명에서는 바람직하게 유기용매법을 선택할 수 있다. 유기용매 합성법에 의해 Au 나노입자는 아래의 5가지 공정으로 합성될 수 있다.

[0056] 제2-1단계는 티트랄린(tetralin), 올레일아민(oleyamine, OAm) 및 HAuCl4(3H2O)을 혼합하여 제2-1혼합물을 생성하는 단계이다. 즉, 티트랄린(tetralin. TL), 올레일아민(oleyamine, OAm) 및 HAuCl4(3H2O)을 10 ~ 15분간 교반하여 제2-1혼합물을 생성할 수 있다. 상기 티트랄린은 나프탈렌을 접촉수소화시켜 획득된 방향족 탄화수소로서 무색의 액체이다. 티트랄린은 녹는점 36.3℃, 끓는점 207.2℃, 비중 0.971 갖는다. 티트랄린은 물에 녹지 않으나 에탄올, 에테르, 벤젠 등의 유기용매에 잘 녹는다. 상기 올레일아민은 분자식이 C18H35NH2인 유기화합물로 올레산과 관련된 불포화지방 아민이다. 올레일아민은 계면활성제 또는 계면활성제의 전구체로 주로 사용된다. 따라서 환원제, 계면활성제등의 종류와 비율은 Au 나노입자의 형상과 크기를 제어할 수 있다.

[0057] 따라서 상기 제2-1혼합물은 상기 티트랄린 및 상기 올레일아민이 6.5 ~ 7 : 2.5 ~ 3의 부피비로 혼합물을 생성한후, 상기 혼합물 전체 100중량부에 대하여 상기 HAuCl4(3H2O)은 0.3 ~ 0.5중량부를 포함할 수 있다.

[0058] 제2-2단계는 환원제인 1,2-테트라데칸디올(1,2-Tetradecanedio)을 제2-1혼합물에 첨가하여 제2-2혼합물을 생성하는 단계이다. 상기 환원제로서 1,2-데트라데칸디올, 1,2-헥사데칸디올, 에틸렌글리콜, 테트라에틸렌글리콜. 1,2-옥탄디올, 1,2-도데칸디올, 수산화소듐, 수소화붕소소듐 중에서 어느 하나 선택할 수 있다. 본 발명에서 환원제로서 1,2-데트라데칸디올을 사용할 수 있다. 상기 1,2-테트라데칸디올의 구조는 원자의 배열과 각 해당 원자들 간의 화학결합으로 결정될 수 있다. Au 나노입자의 합성에 사용되는 상기 1,2-테트라데칸디올은 환원제로서 Au 나노입자의 형상과 크기를 제어할 수 있다. 환원제로서 상기 수산화소듐, 상기 수소화붕소소듐(NaBH4) 등의 강한 염기성 환원제를 이용하여 Au 나노입자를 성장시킬 수 있지만, 정제과정에서 충분히 제거되지 않는 경우, 본 발명인 나노입자 복합체 활용 시 독성을 유발하여 생체에 적용하는데 문제를 야기할 수 있다.

[0059] 따라서 상기 제2-2혼합물은 상기 제2-1혼합물 전제 100중량부에 대하여 상기1,2-테트라데칸디올 0.90 ~ 1.00중량부를 첨가하여 생성될 수 있다.

[0060] 제2-3단계는 상기 제2-2혼합물을 300 ~ 340rpm으로 교반하면서 1.5 ~ 2시간동안 190 ~ 200℃이를 때가지 가열하는 단계이다. 혼합물의 양에 따라 달라질 수 있으므로 교반 속도와 시간은 이에 한정되는 것은 아니다. 따라서 교반 속도나 시간이 범위 밖인 경우에는 Au 나노입자의 성장이 고르게 나타나지 않을 수 있으므로, Au 나노입자가 올바르게 합성되지 않을 수 있다.

[0061] 제2-4단계는 제2-2혼합물이 보라색으로 변하면 실온으로 식히는 단계이다. 상기 제2-2혼합물 색깔이 보라색 이전에는 검은색 및 진한 갈색으로 보일 수 있다. 따라서 상기 제2-2혼합물이 검은색 및 진한 갈색인 경우에는 Au 나노입자가 제대로 합성되지 않을 수 있다.

[0062] 제2-5단계는 식힌 제2-2혼합물에 에탄올을 첨가하여 세수하고, 원심분리하여 Au 나노입자 생성 단계이다. 즉, 상기 제2-5단계가 완료되면 콜로이드 용액인 Au 나노입자를 생성할 수 있다. 상기 Au 나노입자의 평균 입자크기는 4.41 ~ 6.29nm인 것을 특징으로 하지만 이에 제한되는 것은 아니다. 또한 Au 나노입자는 Au 콜로이드 용액이라고 호칭될 수 있다. 상기 제2-5단계는 에탄올 세수 및 원심분리에 의해 제2-1단계 및 제2-2단계에서 첨가된 계면활성제 및 환원제가 제거된 Au 나노입자를 생성하기 위함이다. 상기 원심분리는 1000 ~ 1200rpm으로 10 ~ 15분간 진행할 수 있다. 상기 원심분리는 계면활성제 및 환원제가 충분히 제거되기 위해 2 ~ 3회 반복할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다

[0063] 따라서 상기 계면활성제 및 환원제가 충분하게 제거되지 않는 경우, Au 나노입자가 포함된 본 발명인 나노입자 복합체의 종양치료시 생체 독성을 야기할 수 있다.

[0064] 제2-6단계는 제2-5단계에서 생성된 Au 나노입자(Au 콜로이드 용액)를 헥산(hexane)에 재분산(re-disperse)하는 단계를 더 포함할 수 있다. 헥산에 상기 Au 나노입자를 재분산하는 것은 Au 나노입자의 응집을 억제하기 위함이다. 즉, 본 발명인 나노입자 복합체의 특성이 제대로 발휘되기 위해서는 보다 안정적이고 균일한 콜로이드 상태인 Au 나노입자가 필요하기 때문이다.

[0065] 따라서 상기 헥산 및 상기 Au 나노입자의 함량은 제조되는 최종 나노입자 복합체의 농도 및 양에 따라 달리할 수 있다. 즉, 농도가 높은 나노입자 복합체를 제조하기 위해서는 헥산의 양을 적게 추가할 수 있다. 반면 농도가 낮은 나노입자 복합체를 제조하기 위해서는 헥산의 양을 많이 추가할 수 있다.

[0066] 제3단계는 제1혼합물을 가열하는 단계이다. 상기 Au 나노입자가 포함된 제1혼합물을 120 ~ 130℃에 도달할 때까지 가열할 수 있다. 상기 가열은 제1혼합물에 포함된 헥산을 증발시키고, 잔류 수분을 제거할 수 있다. 따라서 가열온도가 범위 밖인 경우에는 본 발명인 나노입자 복합체에 불순물이 포함되어 추후 종양치료시 생체 독성으로 문제를 야기할 수 있다.

[0067] 제4단계는 가열된 제1혼합물에 Fe(CO5)를 첨가하여 제2혼합물을 생성하는 단계이다.

[0068] 제5단계는 제2혼합물을 2단계에 걸쳐 가열하는 단계이다. 즉, 제2혼합물을 270 ~ 300℃까지 1차 가열한 다음, 1차 가열된 제2혼합물을 환류하기 위해 2℃/min씩 300℃까지 제2차 가열하여 승온할 수 있다. 상기 2단계의 가열은 온도 상승 과정에서 화학적 반응이 일어나는데, 갑작스러운 온도 상승의 경우, 단계별 화학 반응을 유도하기 어렵기 때문이다. 상기 환류는 본 발명인 나노입자 복합체의 형태 형성 및 변형에 필요한 에너지를 공급하기 위함이다.

[0069] 제6단계는 단분산 나노입자 복합체를 생성하는 단계이다. 즉, 300℃까지 승온된 제2혼합물을 실온에 냉각시키고, 공기중에 노출한 후 이소프로필 알코올(IPOH)을 첨가하여 단분산 나노입자 복합체를 생성할 수 있다. 제2혼합물을 공기중에 노출시킴으로써 산소가 풍부한 산화철을 획득하여 광열, 광역학 효과가 우수한 나노입자 복합체를 제조할 수 있다. 상기 산화철은 Fe3O4를 포함하는 것을 특징으로 한다. 따라서 산소가 풍부한 상기 Fe3O4은 자성이 강하고, 열적 안정성이 우수하기 때문에 레이저 조사시 온도 변화 및 유지가 보다 안정적이기 때문이다

[0070] 제7단계는 나노입자 복합체 합성 단계이다. 즉, 제6단계에서 생성된 단분산 나노입자 복합체를 원심분리하여 나노입자 복합체인 Au-Fe3O4를 합성할 수 있다. 상기 원심분리는 5000 ~ 6000rpm으로 10 ~ 15분간 진행할 수 있다. 상기 원심분리는 3회이상 진행할 수 있다. 상기 원심분리는 올레산(OA), 올레일아민(OAm) 및 1-옥타데센을 제거하기 위함이다. 따라서 원심분리시 속도와 시간이 범위 밖인 경우에는 상기 환원제인 올레산, 올레일아민, 1-옥타데센이 충분히 제거되지 않아서 향후에 본 발명인 나노입자 복합체의 종양치료시 생체 독성을 야기할 수 있다.

[0071] 또한 상기 제7단계가 완료된 상기 나노입자 복합체를 헥산(hexane)에 재분산하는 것을 더 포함할 수 있다. 상기 나노입자 복합체를 헥산에 재분산함으로써 응집을 억제하여 안정적인 보관뿐만 아니라 특성 분석을 용이하게 할 수 있다. 즉, 제7단계의 원심분리에 의해 본 발명인 나노입자 복합체인 Au-Fe3O4 비가역적으로 응집되어 고유의 광학적 특성을 잃을 수 있다. 따라서 이러한 문제를 해결하기 위해 나노입자 복합체인 Au-Fe3O4가 응집되지 않도록 헥산에 재분산하는 것은 중요할 수 있다.

[0072] 따라서 상기 헥산 및 상기 나노입자 복합체의 함량은 제조되는 최종 나노입자 복합체의 농도 및 양에 따라 달리할 수 있다. 즉, 농도가 높은 나노입자 복합체를 제조하기 위해서는 헥산의 양을 적게 추가할 수 있다. 반면 농도가 낮은 나노입자 복합체를 제조하기 위해서는 헥산의 양을 많이 추가할 수 있다. 또한 UV-vis(자외선-가시광선)통해 상기 나노입자 복합체 샘플의 농도를 측정하고, 상기 샘플로부터 일부를 추출하여 헥산을 첨가함으로써 희석시키는 방식으로 상기 나노입자 복합체의 농도를 조절할 수 있다.

[0073] 위와 같은 공정을 통해, 금속 나노입자인 Au 나노입자와 산화철인 Fe3O4를 포함한 생체 적합하고, 안정적이고, 광열 및 광역학 효과가 우수한 나노입자 복합체인 Au-Fe3O4를 제조할 수 있다.

[0074] 또한 본 발명의 실시예에 따라 제조된 나노입자 복합체는 종양치료제에 포함될 수 있다. 즉 상기 종양치료제는 본 발명인 나노입자 복합체를 포함할 수 있다.

[0076] 이하, 제조예 및 실시예들을 예시한다. 하기의 제조예 및 실시예들은 본 발명의 이해를 돕도록 하기 위해 제공

되는 것일 뿐이다.

[0078] <Au 나노입자 및 Au-Fe3O4 나노입자 복합체 제조>

[0079] [합성예] - Au 나노입자 합성

[0080] 20ml 티트랄린(tetralin), 2.96ml 올레일아민(oleyamine, OAm) 및 0.4g의HAuCl4(3H2O)을 10분동안 교반하여 제2-1혼합물을 생성하였다. 상기 제2-1혼합물 전체 중량부에 대하여 환원제인 1,2-테트라데칸디올(1,2-Tetradecanedio) 0.92중량부를 첨가하여 제2-2혼합물을 생성하였다. 상기 제2-2혼합물을 300rpm으로 1.5시간동안 190℃ 될 때까지 교반하였다. 상기 제2-2혼합물이 보라색으로 변하면 실온으로 식힌 다음, 에탄올을 첨가하여 불순물이 충분히 제거될 수 있도록 세수하고 1000rpm으로 10분동안 원심분리하여 Au 나노입자를 합성하였다. 합성된 Au 나노입자의 응집을 억제하기 위하여 헥산에 재분산하여 콜로이드 용액 상태인 Au 나노입자(Au 콜로이드 용액)를 합성하였다.

[0082] [실시예] - 나노입자 복합체(Au-Fe3O4) 제조

[0083] 질소 분위기하에서 1ml의 올레산(OA) 및 1ml의 올레일아민(OAm)이 포함된 20ml의 1-옥타데산인 환원제를 준비하였다. 상기 환원제에 상기 합성예에 따라 합성된 Au 나노입자를 첨가하여 제1혼합물을 생성하였다. 헥산 또는 잔류수분을 제거하기 위하여 제1혼합물을 120℃에 도달때까지 가열하였다. 가열된 제1혼합물에 Fe(CO)5를 첨가하여 제2혼합물을 생성하였다. 상기 제2혼합물을 270℃까지 천천히 1차 가열한 다음, 제1차 가열된 제2혼합물을 환류하기 위해 2℃/min으로 300℃까지 승온하는 2차 가열을 하였다. 2차 가열된 제2혼합물을 실온에 냉각시키고, 공기중에 노출시켜 Fe3O4를 생성하고, 이소프로필 알코올(IPOH)을 첨가하여 단분산 나노입자 복합체인 Au-Fe3O4를 생성하였다. 단분산 나노입자 복합체인 Au-Fe3O4를 3회의 원심분리로 정제하여 계면활성제 및 환원제인 올레산, 올레일아민, 1-옥타데산을 제거하여 나노입자 복합체인 Au-Fe3O4를 제조하였다. 상기 Au-Fe3O4를 UV-vis(자외선-가시광선)분광기로 농도를 측정한 후, 상기 Au-Fe3O4의 농도조절 및 응집을 피하기 위하여 Au-Fe3O4를 헥산에 재분산하여 10mM, 20mM, 30mM, 40mM 및 50mM 농도인 각각의 Au-Fe3O4를 제조하였다.

[0085] [비교예] - 0mM, 2mM, 4mM, 8mM 각각의 나노입자 복합체의 제조

[0086] 나노입자 복합체의 농도를 2mM, 4mM, 8mM로 제조하는 것을 제외하고 실시예 1과 동일하게 나노입자 복합체인 Au-Fe3O4를 제조하였다. 또한 0mM 농도의 비교예는 나노입자 복합체가 없는 상용화된 PBS(Phosphate buffer saline)를 의미한다.

[0088] < 시험예 >

[0089] [시험예 1] - 나노입자의 형태적 및 물리적 특성

[0090] UV-vis : 나노입자의 식별, 물리적 특성 등을 조사하는데 흡광도 스펙트럼은 UV-vis(자외선-가시광선) 분광기(JASCO, Japan)을 이용하여 획득하였다.

[0091] XRD : 나노입자의 결정구조를 위해 XRD(PW1700, Philips. X-ray Diffractometer) 측정은 Cu Ka 방사선( λ = 1.542Å )으로 PANalytical(X'Pert3-Powder, 네덜란드)를 사용하여 수행하였다.

[0092] FTIR : 나노입자의 분자구조와 기능기는 FT-4100(JASCO, Japan)일 이용하여 FTIR(Fourier Transform infrared) 분광기로 확인하였다.

[0093] FETEM : 나노입자의 구조 등을 관찰하기 위하여 FETEM(field emission transmission electron microscope)을 이용하였다.

[0094] 도 2는 본 발명의 실시예에 따른 나노입자 복합체의 자외선-가시광선(UV-vis) 스펙트럼을 나타내고, 도 3은 본 발명의 실시예에 따른 나노입자 복합체의 X선 회절(XRD) 분석을 나타내고, 도 4는 본 발명의 실시예에 따른 나노입자 복합체의 푸리에 변환 적외선(FTIR) 스펙트럼 분석을 나타내고, 도 5는 본 발명의 실시예에 따른 나노입자 복합체의 전계방출 투과전자현미경(FETEM) 분석 사진이다. 도 6은 본 발명의 실시예에 따른 나노입자 복합체

의 입자크기의 분포를 나타낸다.

[0095] 도 2를 참조하면, 나노입자들의 물리적 특성을 조사하기 위해 UV-vis를 이용하여 Au 나노입자, Fe304 나노입자, Au-Fe304를 식별하고 조사한 결과, Au 나노입자는 국부적인 표면 플라즈몬 공명(localilzed surface plasmon resonance, LSPR)로 인해 500 ~ 600nm 흡광하였으나, 근적외선 영역(800 ~ 1000nm)에서 흡광이 매우 낮은 것을 확인할 수 있었다. 반면 자성물질인 Fe304 나노입자의 경우에는 강한 흡수 피크없이 400 ~ 1000nm에서 연속적인 흡광을 나타내었다. 또한 본 발명인 Au-Fe304는 Au 나노입자에 비해 흡광 피크가 오른쪽으로 이동한 것을 확인할 수 있었다. 따라서 본 발명인 Au-Fe304 흡광 피크의 이동은 Fe304의 결합으로 인한 Au 전하 변화로 발생한 것을 알 수 있었다. 또한 종양치료를 위한 나노입자는 근적외선 영역에서 흡광도가 높을수록 열에 의한 종양치료효과가 우수한바, Au으로 이루어진 나노입자보다 자성물질인 Fe304가 포함된 본 발명인 Au-Fe304는 광열, 광역학 치료에 우수한 형태의 나노입자임을 확인할 수 있었다.

[0096] 도 3을 참조하면, 각각의 나노입자의 결정구조를 조사하기 위해 x선 회절(XRD)분석을 수행한 결과, Au 나노입자의 경우는 2Θ=38.2, 44.5, 64.5, and 77.6° 이고, Fe304 나노입자의 경우는 2Θ=30.1, 35.4, 43.0, 53.5, 57.0, and 62.5° 임을 확인하였다. 또한 본 발명인 Au-Fe304 나노입자 복합체의 경우는 Au 나노입자 및 Fe304 나노입자의 2Θ 값을 모두 나타낸 것을 확인할 수 있었다. 따라서 본 발명인 Au-Fe304에는 Au 나노입자와 Fe304가 균일하게 구성된 것을 알 수 있었다. 즉, 나노입자의 고른 분포를 통해 균일한 구성을 가질 수 있으며, 해당 나노입자의 온도 변화 또한 전반적인 부위에서 발생하게 되어 전체적인 종양 세포 사멸효과를 가져올 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0097] 도 4를 참조하면, FTIR 스펙트럼은 작용기 검출 및 공유결합 정보를 조사하기 위한 것으로, Au 나노입자, Fe304 나노입자 및 Au-Fe304 나노입자에서 O-H그룹은 파수간격 3028 cm-1 ~ 3400 cm-1에서 스트레칭 진동하는 것을 알 수 있었고, 1633 cm-1 피크는 O-H변형과 관련이 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한 Au 나노입자의 경우 Fe304 나노입자에 비해 특정 피크가 검출되지 않는 것을 확인할 수 있었다. 또한 Au 나노입자 및 Fe304 나노입자의 피크는 본 발명인 Au-Fe304 나노입자 복합체의 피크와 일치함을 알 수 있었다. 따라서 본 발명인 Au-Fe304는 Au 나노입자와 Fe304 나노입자의 합성임을 알 수 있었다.

[0098] 도 5를 참조하면, FETEM으로 관찰한 결과, 본 발명인 Au-Fe304 눈사람 모양임을 확인할 수 있었다.

[0099] 도 6를 참조하면, 본 발명인 나노입자 복합체인 Au-Fe304의 입자크기는 8 ~ 20nm이고, 평균 입자크기는 10.82 ~ 15.28nm임을 알 수 있었다.

[0101] [시험예 2] - 농도에 따른 나노입자 복합체(Au-Fe304)의 광열효과 테스트

[0102] 시험방법 : 광열효과를 확인하기 위해 서로 다른 농도(0,2,4,6.8 및 10mM)로 합성된 Au-Fe304를 12-well 플레이트에 놓고, 10분동안 1.0W/cm2 출력 밀도로 808nm 레이저를 조사하였다

[0103] 평가방법 : 온도변화가 50℃ 이상인 경우에 광열효과가 우수하다고 고려될 수 있다.

[0104] 도 7은 본 발명의 실시예에 따른 나노입자 복합체의 농도에 따른 최고 온도를 나타낸다.

[0105] 도 7를 참조하면, 적외선 열화상 카메라로 온도변화를 기록한 결과, 광열효과로 인해 Au-Fe304 용액이 가열되기 시작했으며, 0mM의 최고온도는 34.6℃, 2mM의 최고온도는 37.6℃, 4mM의 최고온도는 42.4℃, 6mM의 최고온도는 48.5℃, 8mM의 최고온도는 54.3℃, 10mM의 최고온도는 68.4℃로, 농도가 증가함에 따라 온도변화가 큰 것을 확인할 수 있었다. 즉, 온도변화는 용액에 포함된 나노입자 복합체의 입자수에 비례하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 광열효과가 발생하기 위해서 적합한 온도는 50℃ 이상으로 본 발명인 Au-Fe304의 이상적인 농도는 8mM이지만, 바람직하게는 10mM이상임을 알 수 있었다.

[0107] [시험예 3] - 출력밀도에 따른 나노입자 복합체(Au-Fe304)의 광열 및 안정성 테스트

[0108] 시험방법 : 안정성을 확인하기 위해서 도 7에서 이상적인 농도인 10mM인 Au-Fe304 용액을 12-well 플레이트에 놓고 서로 다른 출력 밀도로 근적외선(NIR) 레이저 조사시 온도변화를 3초마다 기록하였다.

[0109] 평가방법 : 반복된 광열 시험시 편차가 없는 경우 안정성이 우수하다고 고려될 수 있다.

[0110] 도 8은 본 발명의 실시예에 따른 나노입자 복합체의 근적외선(NIR) 조사 노출 시간 증가에 따른 온도 변화를 나

타내고, 도 9는 본 발명의 실시예에 따른 나노입자 복합체의 안정성 시험 결과이다.

[0111] 도 8을 참조하면, 본 발명인 Au-Fe304에 서로 다른 출력 밀도로 근적외선(NIR)레이저 조사시 온도변화를 기록 결과, 0.5W/cm2의 출력 밀도는 천천히 50℃이상으로 가열되었다. 반면 1.0W/cm2 및 1.5W/cm2 출력 밀도로 근적외선(NIR) 레이저 조사시 종양절제에서 이상적인 광열효과가 발휘될 수 있는 이상적인 온도에 도달하는데 약 1 ~ 2분이 소요되는 것을 알 수 있었다.

[0112] 도 9를 참조하면, 또한 10mM의 Au-Fe304의 광열성능은 5회의 반복된 레이저 조사시에서도 편차(discernible recession )없이 안정적임을 확인할 수 있었다.

[0114] [시험예 4] - 10mM 나노입자 복합체(Au-Fe304)의 광열효과 및 광열변환 효율 테스트

[0115] 시험방법 : 광열효과와 광열변환 효율($\eta$)을 평가하기 위해 10mM Au-Fe304 용액을 레이저 출력밀도 1.0W/cm2에서 약 182초 동안 808nm 레이저를 조사하고 약 560초 동안 오프(1회의 온/오프 주기) 시켰습니다. 그런 다음 10mM Au-Fe304를 상온으로 식히면서 탐침 온도계와 적외선 열화상 카메라로 온도를 기록하였습니다.

[0116] [광열변환 효율식]

[0117] $$\eta = \frac{hS(T_{max} - T_{amb}) - Q_{dis}}{I(1 - 10^{-A_{808}})}$$

[0118] h는 열전달계수, S는 용기의 표면적, Tmax 및 Tamb는 최대 정상 상태 온도 및 주변 온도, Qdis는 용매와 용기가 흡수한 빛의 열 발산량, I는 레이저 출력 밀도, A808은 808nm에서 나노입자 복합체인 Au-Fe304의 흡광도 강도를 나타낸다.

[0119] 도 10은 본 발명의 실시예에 따른 나노입자 복합체의 광열효과를 나타낸다.

[0120] 도 10를 참조하면, 본 발명의 실시예에 따라 제조된 10mM 나노입자 복합체인 Au-Fe304는 레이저 조사시 최대 정상 상태 온도(Tmax)는 57.8℃, 주변 온도(Tamb)는 28.0℃로서 Au-Fe304의 온도 변화(Tmax-Tamb)는 29.8℃였습니다. 따라서 본 발명의 실시예에 따른 10mM Au-Fe304는 광열효과가 발휘되기 위한 이상적인 온도인 50 ~ 60℃에 도달하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 상기 광열변환 효율식에 대입한 결과 광열변환 효율($\eta$)이 약 32.88%임을 확인할 수 있었다.

[0122] [시험예 5] - 나노입자 복합체(Au-Fe304)의 세포독성 테스트

[0123] 시험방법 : 세포독성을 조사하기 위해, MDA-MB-231 세포주를 이용하여 MTT 분석을 수행하였다. MDA-MB-231세포를 96-well 플레이트에 각각의 웰에 104개의 세포 밀도로 배양후에, 서로 다른 농도(2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40, and 50mM)로 합성된 100μL Au-Fe304에 6시간동안 처리하였다. MTT를 각각의 웰에 첨가하고 3시간 동안 배양하였다. 대조군은 본 발명인 나노입자 복합체인 Au-Fe304에 노출되지 않는 샘플이다. 본 발명에서 'MDA-MB-231'은 유방암 세포주를 의미한다.

[0124] 평가방법 : 세포생존율이 80%이상인 경우에 독성이 적은 것으로 고려될 수 있다.

[0125] 도 11는 본 발명의 실시예에 따른 나노입자 복합체의 세포독성 시험 결과이다.

[0126] 도 11을 참조하면, 농도와 상관없이 모든 Au-Fe304는 MDA-MB-231세포에서 85%이상의 세포 생존율을 보였다. 따라서 Au-Fe304는 생체 적합한 물질임을 알 수 있었다.

[0128] [시험예 6] - 나노입자 복합체(Au-Fe304)의 암세포에 대한 세포독성 테스트

[0129] 시험방법 : 암세포에 대한 Au-Fe304의 잠재적 광열 독성을 평가하기 위해 PTT(Photothermal)후에 MTT 분석을 수행하였다.

[0130] 평가방법 : 암세포에 대한 세포독성에서는 암세포 생존율이 20%이하인 경우에 세포독성이 적고 광열효과가 우수하다고 고려될 수 있다.

[0131] 도 12은 본 발명의 실시예에 따른 나노입자 복합체의 암세포에 대한 세포독성 시험 결과이다.

[0132] 도 12를 참조하면, 레이저 조사시 농도가 증가함에 따라 MDA-MB-231 세포 생존율이 가파르게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 10mM 이상의 Au-Fe3O4를 첨가한 실험군에서는 20%이하의 암세포 생존율을 확인할 수 있었다. 따라서 본 발명인 Au-Fe3O4는 10mM이상에서 세포독성이 적고, 광열효과가 우수한 것을 알 수 있었다.

[0134] [시험예 7] - 나노입자 복합체의 종양 치료 테스트

[0135] 시험방법 : 쥐에 종양세포를 주입하고, 종양이 실험가능한 크기((10mm X 10mm X 10mm)로 충분히 자란 이후, 해당 부위에 본 발명인 나노입자 복합체인 Au-Fe3O4를 주입하여 종양 세포 및 부위에 나노입자 복합체가 분포되도록 한 후, 808nm 레이저를 해당 부위에 일정 시간 동안 조사하였다. 레이저를 조사하는 과정에서 레이저와 나노입자 복합체가 반응하여 나노입자 복합체는 열을 발생시키고, 해당 열을 통해서 종양세포를 사멸하는지 여부를 약 3주 동안 쥐의 피부, 종양 부위의 증상 및 변화, 행동 변화 등을 확인하는 방법으로 수행하였다.

[0136] 도 13는 본 발명의 실시예에 따른 나노입자 복합체를 종양이 자란 쥐에 주입후, 종양 치료 과정을 나타낸다.

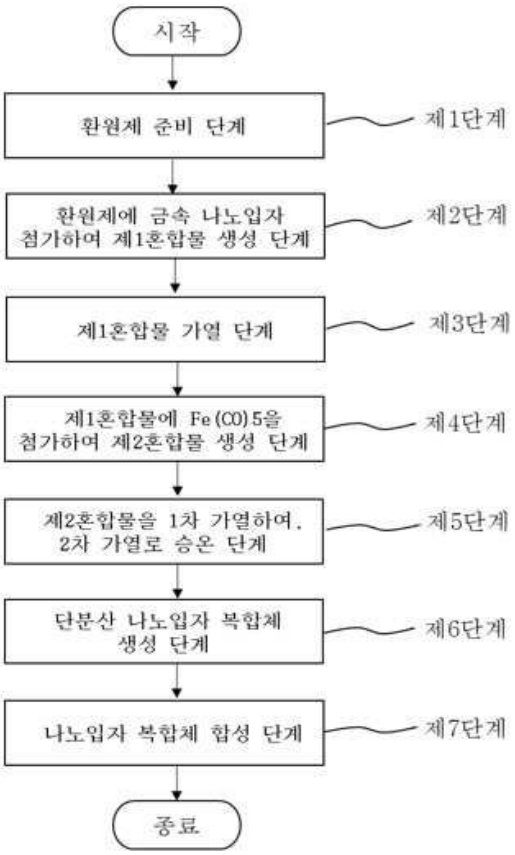
[0137] 도 13를 참조하면, 본 발명인 나노입자 복합체를 종양이 자란 쥐에 주입한 후, 레이저 조사를 통해 광열치료를 진행하고 3주 동안의 치료 경과를 살펴본 결과, 종양 주위의 조직에 이상 반응을 일으키지 않고 종양이 치료된 것을 확인할 수 있었다.

[0138] 이와 같이 본 발명의 실시예에 따라 제조된 나노입자 복합체는 생체에 적용하기에 적합하고, 안정성이 우수할 뿐만 아니라. 광열 및 광역학 측면에서 우수한 효과가 있음을 알 수 있었다.

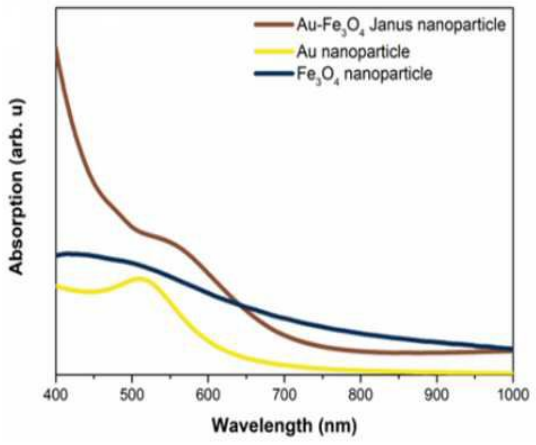
[0139] 상기 실시예들은 예시적인 것에 불과한 것으로, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 사람이라면, 이로부터 다양한 변형 및 균등한 타 실시예가 가능하다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호범위는 청구범위에 기재된 발명의 기술적 사상에 의해 정해져야만 할 것이다.

## 도면

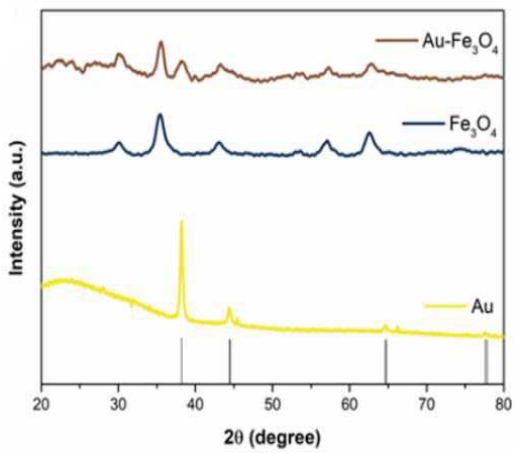
### 도면1


시작
환원제 준비 단계
제1단계
환원제에 금속 나노입자 첨가하여 제1혼합물 생성 단계
제2단계
제1혼합물 가열 단계
제3단계
제1혼합물에 Fe(CO)5을 첨가하여 제2혼합물 생성 단계
제4단계
제2혼합물을 1차 가열하여, 2차 가열로 승온 단계
제5단계
단분산 나노입자 복합체 생성 단계
제6단계
나노입자 복합체 합성 단계
제7단계
종료

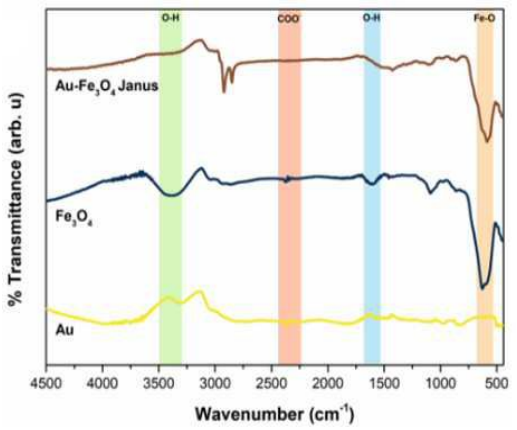
### 도면2


Au-Fe3O4 Janus nanoparticle
Au nanoparticle
Fe3O4 nanoparticle
Absorption (arb. u)
400
500
600
700
800
900
1000
Wavelength (nm)

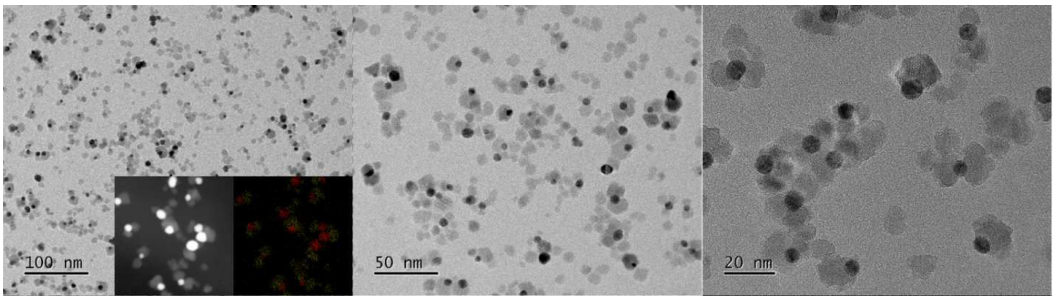
도면3


Au-Fe3O4
Fe3O4
Au
Intensity (a.u.)
20
30
40
50
60
70
80
2θ (degree)

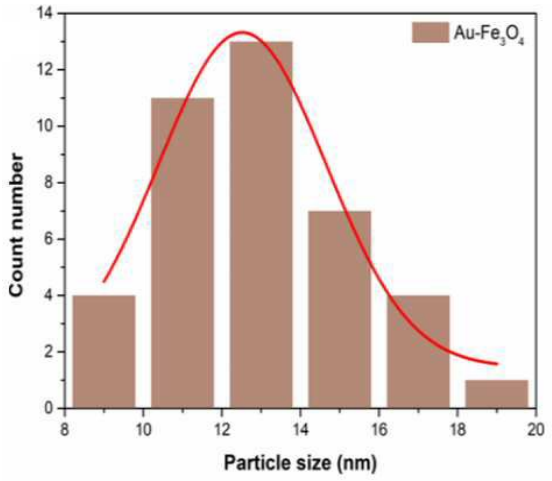
도면4


O-H
COO
O-H
Fe-O
Au-Fe3O4 Janus
Fe3O4
Au
% Transmittance (arb. u)
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
Wavenumber (cm-1)

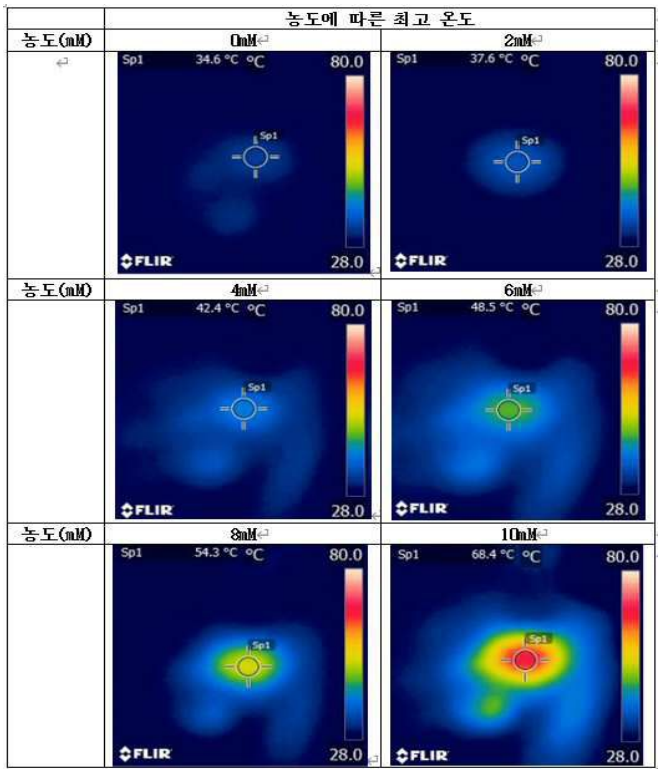
도면5


100 nm
50 nm
20 nm

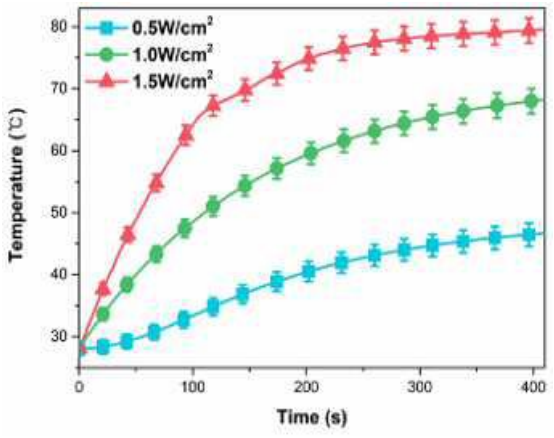
도면6


Au-Fe3O4
Count number
Particle size (nm)
0
2
4
6
8
10
12
14
8
10
12
14
16
18
20

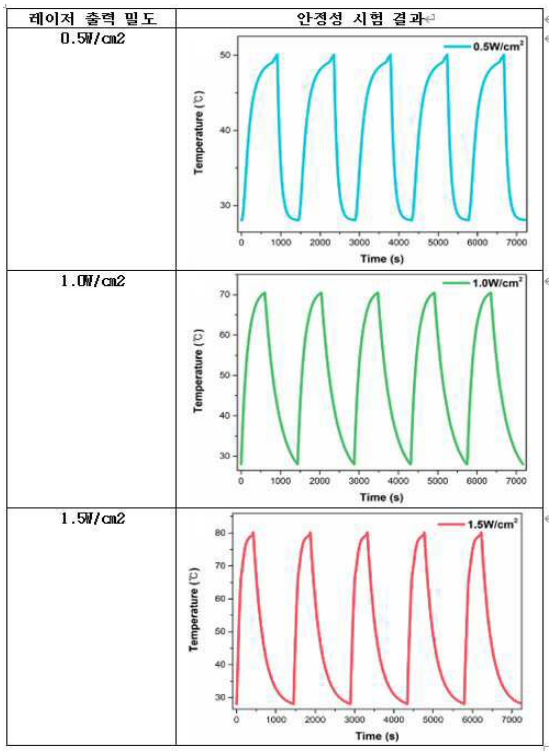
도면7


농도에 따른 최고 온도
농도(mM)
0mM
2mM
4mM
6mM
8mM
10mM
34.6 °C
37.6 °C
42.4 °C
48.5 °C
54.3 °C
68.4 °C
80.0
28.0
FLIR

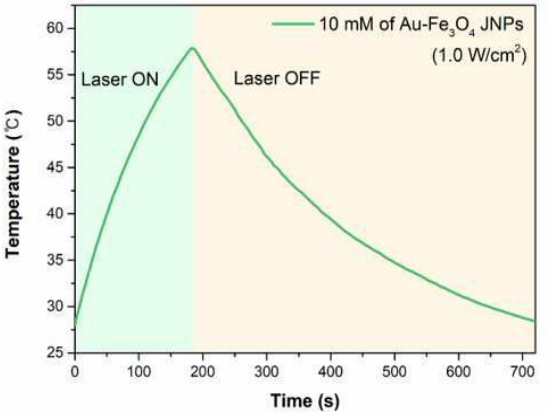
도면8


0.5W/cm²
1.0W/cm²
1.5W/cm²
Temperature (℃)
Time (s)

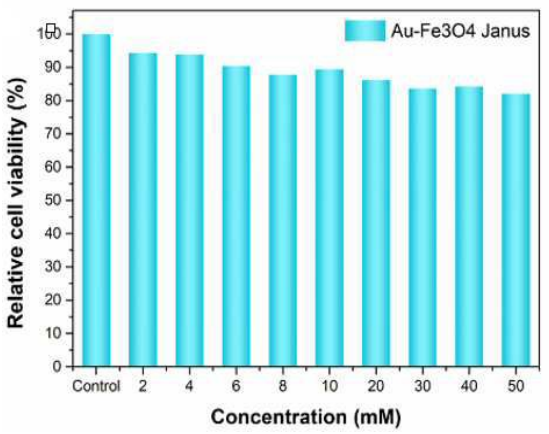
도면9


레이저 출력 밀도
안정성 시험 결과
0.5W/cm2
1.0W/cm2
1.5W/cm2
Temperature (℃)
Time (s)

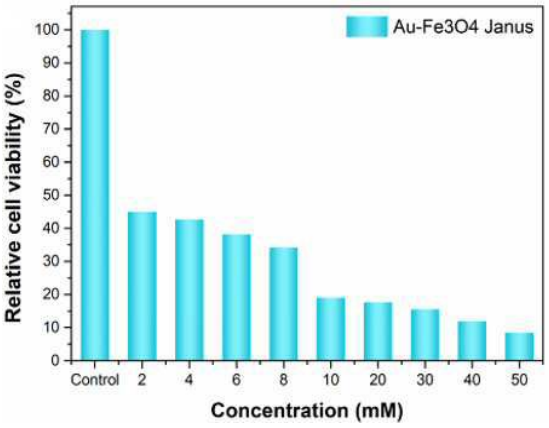
도면10


10 mM of Au-Fe3O4 JNPs
(1.0 W/cm²)
Laser ON
Laser OFF
Temperature (℃)
Time (s)

도면11




도면12




도면13

