

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0041800

(43) 공개일자 2025년03월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 41/00 (2020.01) A61K 31/403 (2006.01)

A61K 9/51 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 41/0052 (2013.01)

A61K 31/403 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0124660

(22) 출원일자 2023년09월19일

심사청구일자 2023년09월19일

(71) 출원인

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

(72) 발명자

정봉근

서울특별시 마포구 백범로 35 서강대학교 리저과
학관 618호

임재현

서울특별시 마포구 백범로 35 서강대학교 리저과
학관 618호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최우성

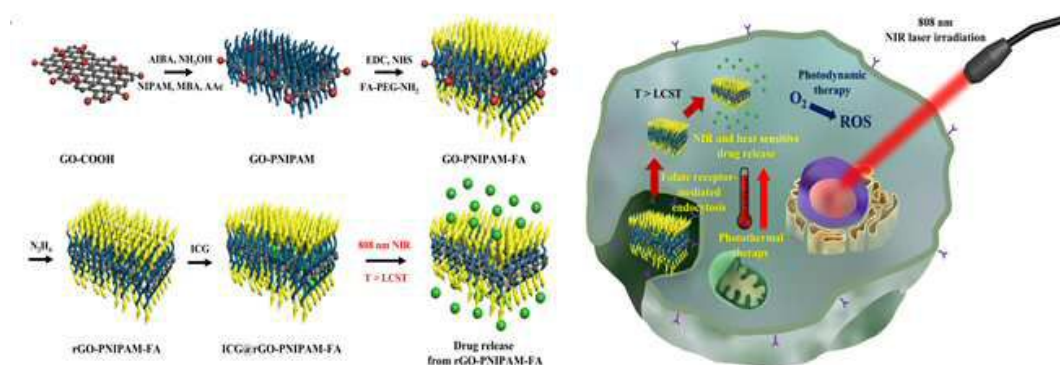
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 다제내성 암의 광열 및 광역학 치료가 가능한 그래핀 옥사이드 나노 복합체 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 향상된 광열 치료와 광역학 치료를 동시에 수행할 수 있는 다제내성(Multiple Drug-Resistance) 암세포 표적 환원 그래핀 옥사이드 나노 복합체와 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 나노 복합체는 환원 그래핀, 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)-아크릴산 및 염산을 포함함으로써, 다제내성 암세포 표적 기능이 우수하고, 특히, 인도시아닌 그린을 포함한 항암제를 내부에 캡슐화 시키는 경우, 다제내성 암에 대하여 광열 및 광역학 치료의 시너지 효과를 갖는다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 41/0057 (2013.01)
A61K 9/5115 (2013.01)
A61K 9/5123 (2013.01)
A61K 9/5138 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A61K 2300/00 (2023.05)

유정현

서울특별시 마포구 백범로 35 서강대학교 리찌과학
관 618호

(72) 발명자

최형우

서울특별시 마포구 백범로 35 서강대학교 리찌과학
관 618호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711181531
과제번호 2022R1A2C2003724
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
연구과제명 기능성 전기자극칩과 다공성 나노소재를 이용한 역분화 줄기세포에서 신경세포 분화

연구

기 여 율 30/100
과제수행기관명 서강대학교
연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711179437
과제번호 00070316
부처명 과학기술정보통신부, 보건복지부
과제관리(전문)기관명 (재단)범부처재생의료기술개발사업단
연구사업명 범부처재생의료기술개발사업
연구과제명 유전체 변이에 의한 배양적응 전분화능줄기세포 탐지 및 제거가 가능한 안전성 확보

기술 개발

기 여 율 30/100
과제수행기관명 서강대학교, 서울대학교산학협력단
연구기간 2023.01.01 ~ 2023.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711198532
과제번호 00259341
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 해외우수연구기관협력허브구축사업
연구과제명 서강-유엔 신종 감염병 테라노스틱스 융합연구센터
기 여 율 20/100
과제수행기관명 서강대학교
연구기간 2023.07.01 ~ 2023.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711197702
과제번호 CP23008M
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 나노융합기술원
연구사업명 한국과학기술원부설 나노융합기술원지원(R&D)
연구과제명 넥스트 웨이브 (포스트 코로나) 대응 언컨택트 디지털 PCR 개발
기 여 율 20/100
과제수행기관명 서강대학교, 나노융합기술원
연구기간 2023.01.01 ~ 2023.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

광열 치료 및 광역학 치료를 위한 다제내성(Multiple Drug-Resistance) 암세포 표적 환원 그래핀 옥사이드 나노 복합체로서,

상기 나노 복합체는 환원 그래핀 옥사이드; 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)-아크릴산; 및 엽산을 포함하는, 환원 그래핀 옥사이드 나노 복합체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)-아크릴산은 환원 그래핀 옥사이드 표면에 결합된 것을 특징으로 하는, 환원 그래핀 옥사이드 나노 복합체.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 엽산은 상기 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)-아크릴산 표면에 결합된 것을 특징으로 하는, 환원 그래핀 옥사이드 나노 복합체.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 나노 복합체의 형상은 구형인, 환원 그래핀 옥사이드 나노 복합체.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 나노 복합체의 직경은 30 내지 38.5 °C에서 400 내지 600nm 인 것을 특징으로 하는, 환원 그래핀 옥사이드 나노 복합체.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 나노 복합체의 제타 전위는 -21.5 내지 -18.5 mV 인 것을 특징으로 하는, 환원 그래핀 옥사이드 나노 복합체.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 나노 복합체에 항암제가 담지된 것을 특징으로 하는,

환원 그래핀 옥사이드 나노 복합체.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 항암제는 인도시아닌 그린(indocyanine green, ICG)인 것을 특징으로 하는,

환원 그래핀 옥사이드 나노 복합체.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 나노 복합체는 상기 인도시아닌 그린에 담지된 나노 복합체 총 중량을 기준으로 상기 인도시아닌 그린을 8 내지 20 중량%로 포함하는, 환원 그래핀 옥사이드 나노 복합체.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 나노 복합체의 제타 전위는 -33.5 내지 -29.5 mV 인 것을 특징으로 하는,

환원 그래핀 옥사이드 나노 복합체.

청구항 11

제8항에 있어서,

상기 나노 복합체에 근적외선을 조사할 때, 5 내지 25℃의 온도가 상승하는 것을 특징으로 하는, 환원 그래핀 옥사이드 나노 복합체.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 나노 복합체는 다제내성 유방암 세포를 표적하는 것을 특징으로 하는, 환원 그래핀 옥사이드 나노 복합체.

청구항 13

광열 치료 및 광역학 치료를 위한 다제내성(Multiple Drug-Resistance) 암세포 표적 환원 그래핀 옥사이드 나노 복합체의 제조 방법으로서,

상기 방법은 그래핀 옥사이드(GO)에 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)-아크릴산(PNIPAM-AAc)을 결합시켜 그래핀 옥사이드-폴리(N-이소프로필아크릴아미드)-아크릴산 나노 복합체(GO-PNIPAM)를 제공하는 제1단계;

상기 GO-PNIPAM-AAc에 엽산을 결합시켜 그래핀 옥사이드-폴리(N-이소프로필아크릴아미드)-아크릴산-엽산 나노 복합체(GO-PNIPAM-AAc-FA)를 제공하는 제 2단계;

상기 GO-PNIPAM-AAc-FA를 환원시켜 환원 그래핀 옥사이드-폴리(N-이소프로필아크릴아미드)-아크릴산-엽산 나노 복합체(rGO-PNIPAM-AAc-FA)를 제공하는 제 3단계;를 포함하는, 환원 그래핀 옥사이드 나노 복합체의 제조 방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 rGO-PNIPAM-AAc-FA에 항암제를 담지시키는 제 4단계;를 더 포함하는 환원 그래핀 옥사이드 나노 복합체의 제조 방법.

청구항 15

제13항에 있어서,

상기 제 1단계는 GO 표면에 카르복실기(-COOH)를 도입한 뒤, PNIPAM-AAc를 결합시키는 것인, 환원 그래핀 옥사이드 나노 복합체의 제조 방법.

청구항 16

제13항에 있어서,

상기 제 2단계는 엽산-폴리에틸렌글리콜-아민(FA-PEG-NH₂)과 접합시킴으로써 상기 엽산을 결합시키는 것인, 환원 그래핀 옥사이드 나노 복합체의 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 명세서는 광열 치료와 광역학 치료를 동시에 수행할 수 있는 다제내성 암세포 표적 환원 그래핀 옥사이드 나노복합체와 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 암을 치료하는 데 있어서 나노 의약품은 향상된 침투력 및 유지력(Enhanced Permeability and Retention, EPR) 효과를 통해 종양 부위에 효과적으로 축적되어 비특이적 조직에서 화학 요법 약물의 분포를 줄이고 과도한 국소 약물 농도로 인한 부작용을 개선할 수 있다고 알려져 있다.

[0004] 최근 암 치료법으로 광열 치료 및 광역학 치료 등의 새로운 암 치료법이 등장하였다. 광열 치료는 정상세포보다 열에 약한 암세포의 약점을 이용해 체외에서 근적외선을 적용하여 암세포를 제거하는 방법이며, 광열 작용제가 근적외선 하에서 빛을 열로 변환하여 암을 사멸시키는 방식이다. 광역학 치료는 암 조직에만 선택적으로 광감작제가 축적되고 이에 맞는 특정 파장의 빛을 조사하여 광감각제를 활성화시키면, 활성 산소를 생성하여 표적 암 세포에 작용하여 암 조직만을 특이적으로 제거하는 방법이다.

[0005] 단일 광열 치료나 단일 광역학 치료 각각으로는 암을 완벽하게 치료하는 것에 제한이 되기 때문에, 최근 암 치료 경향은 단독적인 방법으로만 시술하는 것을 벗어나 광열 치료와 광역학 치료 각자의 장점을 증대시키고 단점을 보완하는 융합치료가 연구되고 있다.

[0006] 암세포가 화학요법제의 세포독성에 높은 내성을 갖게 되는 다제내성(MDR, multi-drug resistance)은 점차 암세포의 생존율과 재발율을 증가시켜 화학요법의 비효율적인 치료를 초래하게 된다. MDR의 잠재적 메커니즘 중 P-당단백질(P-gp) 과발현은 MDR 암세포의 화학 요법 효능 감소와 밀접하게 연관되어 있다. 왜냐하면 이 단백질이 약물 축적을 억제하고 암세포에서 치료제의 유출을 유도하기 때문이다. 이러한 단점은 다양한 나노크기의 담체(예: 고분자, 리포솜, 유무기 하이브리드 나노입자)에 화학약물과 P-gp 억제제(예: 소분자, 소형 간섭 RNA(siRNA))를 포함하는 공동 전달 시스템을 통해 해결될 수 있다. 그러나 기존의 나노 규모 DDS(drug delivery system)는 낮은 약물 로딩 용량, 특정 암세포에 대한 낮은 표적화 능력, 나노입자에서 캡슐화된 인자의 통제되지 않은 방출 등으로 인해 개발에 어려움을 겪고 있다. 추가적으로, P-gp 관련 소분자 또는 siRNA의 캡슐화 능력은 나노크기 담체의 내부 구조 및 표면 전하에 의해 많은 영향을 받는다.

[0007] 따라서, 기존 그래핀 옥사이드 기반 나노입자에 의한 다약제 내성 암세포의 치료를 위한 광치료의 조합 요법은 아직 연구가 필요한 실정이며, 원치 않는 약물 방출 및 표적 기능의 부재와 같은 한계로 인해 임상적 사용에 방해가 되고 있다는 한계가 존재한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제 2096469호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 예시적인 구현예들에서는, 일측면에서, 온도 변화 및 근적외선 조사에 의한 약물방출과 광열치료가 가능한 나노복합체 및 그 제조방법을 제공하고자 한다.

[0011] 본 발명의 예시적인 구현예들에서는, 다른 일측면에서, 다제내성 암 표적 기능, 근적외선 조사로 매개되는 광열 및 광역학 치료에 시너지 효과를 발휘하는 나노복합체 및 그 제조방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명의 예시적인 구현예들에서는, 광열 치료 및 광역학 치료를 위한 다제내성(Multiple Drug-Resistance) 암세포 표적 환원 그래핀 옥사이드 나노 복합체로서, 상기 나노 복합체는 환원 그래핀 옥사이드; 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)-아크릴산; 및 엽산을 포함하는, 환원 그래핀 옥사이드 나노 복합체를 제공한다.
- [0014] 예시적인 일 구현예에서, 상기 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)-아크릴산은 환원 그래핀 옥사이드 표면에 결합된 것이 바람직하다.
- [0015] 예시적인 일 구현예에서, 상기 엽산은 상기 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)-아크릴산 표면에 결합된 것이 바람직하다.
- [0016] 예시적인 일 구현예에서, 상기 나노 복합체의 형상은 구형인 것이 바람직하다.
- [0017] 예시적인 일 구현예에서, 상기 나노 복합체의 직경은 30 내지 38.5 °C에서 400 내지 600nm 인 것이 바람직하다.
- [0018] 예시적인 일 구현예에서, 상기 나노 복합체의 제타 전위는 -21.5 내지 -18.5 mV 인 것이 바람직하다.
- [0019] 예시적인 일 구현예에서, 상기 나노 복합체에 항암제가 담지된 것이 바람직하다.
- [0020] 예시적인 일 구현예에서, 상기 항암제는 인도시아닌 그린(indocyanine green, ICG)인 것이 바람직하다.
- [0021] 예시적인 일 구현예에서, 상기 나노 복합체는 상기 인도시아닌 그린에 담지된 나노 복합체 총 중량을 기준으로 상기 인도시아닌 그린을 8 내지 20 중량%로 포함하는 것이 바람직하다.
- [0022] 예시적인 일 구현예에서, 상기 나노 복합체의 제타 전위는 -33.5 내지 -29.5 mV 인 것이 바람직하다.
- [0023] 예시적인 일 구현예에서, 상기 나노 복합체에 근적외선을 조사할 때, 5 내지 25°C의 온도가 상승하는 것이 바람직하다.
- [0024] 예시적인 일 구현예에서, 상기 나노 복합체는 다제내성 유방암 세포를 표적하는 것이 바람직하다.
- [0025] 본 발명의 예시적인 구현예들에서는 또한, 광열 치료 및 광역학 치료를 위한 다제내성(Multiple Drug-Resistance) 암세포 표적 환원 그래핀 옥사이드 나노 복합체의 제조 방법으로서, 상기 방법은 그래핀 옥사이드(GO)에 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)-아크릴산(PNIPAM-AAc)을 결합시켜 그래핀 옥사이드-폴리(N-이소프로필아크릴아미드)-아크릴산 나노 복합체(GO-PNIPAM-AAc)를 제공하는 제1단계; 상기 GO-PNIPAM-AAc에 엽산을 결합시켜 그래핀 옥사이드-폴리(N-이소프로필아크릴아미드)-아크릴산-엽산 나노 복합체(GO-PNIPAM-AAc-FA)를 제공하는 제 2단계; 상기 GO-PNIPAM-AAc-FA를 환원시켜 환원 그래핀 옥사이드-폴리(N-이소프로필아크릴아미드)-아크릴산-엽산 나노 복합체(rGO-PNIPAM-AAc-FA)를 제공하는 제 3단계;를 포함하는, 환원 그래핀 옥사이드 나노 복합체의 제조 방법을 제공한다.
- [0026] 예시적인 일 구현예에서, 상기 방법은, 상기 rGO-PNIPAM-AAc-FA에 항암제를 담지시키는 제 4단계를 더 포함하는 것이 바람직하다.
- [0027] 예시적인 일 구현예에서, 제 1단계는 GO 표면에 카르복실기(-COOH)를 도입한 뒤, PNIPAM-AAc를 결합시키는 것이 바람직하다.
- [0028] 예시적인 일 구현예에서, 제 2단계는 엽산-폴리에틸렌글리콜-아민(FA-PEG-NH₂)과 접합시킴으로써 상기 엽산을 결합시키는 것이 바람직하다.

발명의 효과

- [0030] 본 발명의 예시적인 구현예들의 환원 그래핀 옥사이드 나노 복합체는 환원 그래핀 옥사이드, 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)-아크릴산 및 엽산을 포함함으로써 다제내성 암세포의 표적능이 매우 우수하다. 또한, 본 발명의 나노 복합체 내부에 항암제를 담지하는 경우 광열 및 광역학 치료제로써의 시너지 효과가 발휘될 수 있다. 특히 저농도의 항암제를 담지하더라도 광열 치료 효과가 우수하며, 담지 약물의 무분별한 방출 및 담지 약물에 의한 부작용을 최소화 할 수 있고, 특정 온도 이상에서만 선택적으로 담지된 약물을 방출시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0032]

도 1은 ICG 캡슐화 rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체의 개략적인 합성 과정 및 이를 통한 다약제 내성 유방암 세포에서의 광열-광역학 치료의 개요에 대한 도식이다.

도 2A는 GO-COOH, rGO-PNIPAM-AAc-FA, ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA의 TEM 사진이다.

도 2B는 서로 다른 온도에서 rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체의 DLS 분석한 결과이다.

도 2C는 GO, GO-COOH, GO-PNIPAM, GO-PNIPAM-AAc-FA, rGO-PNIPAM-AAc-FA, 및 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체의 제타 전위를 나타낸 그래프이다.

도 3A는 rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체의 FT-IR 스펙트럼이다.

도 3B는 FA, rGO-PNIPAM-AAc-FA, ICG, ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체의 UV-VIS 스펙트럼이다.

도 4A는 인도시아닌 그린에 의한 광열 효과를 비교하기 위해 rGO-PNIPAM-AAc-FA와 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA에 808 nm 근적외선을 조사한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 4B 및 4C는 나노 복합체의 농도(50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$)와 808 nm 근적외선의 세기(1.0, 1.5, 2 W/cm^2)에 따른 온도 상승을 관찰한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 4D는 808nm NIR (1 W/cm^2)을 10분간 3회 on/off 사이클로의 조사한 후의 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA(100 $\mu\text{g/ml}$) 나노복합체의 광안정성 평가 결과이다.

도 5A는 시간별 808nm NIR 조사 후 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체를 포함하는 DPBF 솔루션의 UV-VIS 스펙트럼이다.

도 5B는 GO-PNIPAM-AAc-FA 및 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체의 ROS 생성 곡선이다.

도 6A는 25, 37, 50 $^{\circ}\text{C}$ 에서 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체의 열 반응성 ICG 방출 프로파일이다.

도 6B는 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체의 열+NIR 레이저 반응성 ICG 방출 거동을 나타낸 그래프이다.

도 7은 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체와 배양된 세포들의 세포 흡수 이미지이다.

도 8은 NIR 레이저 조사 혹은 조사 없이 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체로 처리된 MCF-7/ADR 세포에서의 세포 내 ROS 검출 이미지이다.

도 9A는 농도별 rGO-PNIPAM-AAc-FA 및 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체로 처리 후 808nm NIR 레이저를 조사한(3 W/cm^2 , 5분) MCF-7/ADR 세포의 정량적 생존율을 나타낸 그래프이다.

도 9B는 시너지 광열 치료 (photothermal therapy, PTT) 및 광역학 치료 (photodynamic therapy, PDT) 효과를 확인하기 위해 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체 80 $\mu\text{g/mL}$ 처리 후 NIR 레이저를 조사하거나 (3 W/cm^2 , 5분) 조사하지 않은 MCF-7/ADR 세포의 Live/Dead assay의 형광 이미지(초록: 생존, 빨강: 사멸)이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033]

용어 정의

[0034]

본 명세서에서 나노란 100nm이하를 의미한다.

[0035]

본 명세서에서 GO란 그래핀 옥사이드(Graphene Oxide)를 의미한다.

[0036]

본 명세서에서 rGO란 환원 그래핀 옥사이드(reduced Graphene Oxide)를 의미한다.

[0037]

본 명세서에서 PNIPAM은 폴리(N-이소프로필아크릴아마이드) (poly(N-isopropylacrylamide))를 의미한다.

[0038]

본 명세서에서 AAc는 아크릴산(acrylic acid)을 의미한다.

[0039]

본 명세서에서 PNIPAM-AAc는 PNIPAM와 아크릴산이 공중합하여 결합된 것을 의미한다.

- [0040] 본 명세서의 FA는 엽산(folic acid)을 의미한다.
- [0041] 본 명세서에서 GO-PNIPAM-AAc-FA는 그래핀 옥사이드, PNIPAM-AAc 및 엽산이 결합된 것을 의미한다.
- [0042] 본 명세서에서 rGO-PNIPAM-AAc-FA는 GO-PNIPAM-AAc-FA가 환원된 것을 의미한다.
- [0043] 본 명세서에서 ICG는 인도시아닌 그린(indocyanine green)을 의미한다.
- [0044] 본 명세서에서 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA는 rGO-PNIPAM-AAc-FA 내부에 인도시아닌그린이 담지된 것을 의미한다.
- [0046] 예시적인 구현예들의 설명
- [0047] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0048] 일 측면에서, 본 발명은 광열 치료 및 광역학 치료를 위한 다제내성(Multiple Drug-Resistance) 암세포 표적 환원 그래핀 옥사이드 나노 복합체로서, 상기 나노 복합체는 환원 그래핀 옥사이드; 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)-아크릴산; 및 엽산을 포함하는 환원 그래핀 옥사이드 나노 복합체를 제공한다.
- [0049] 상기 다제내성(Multiple Drug-Resistance) 암세포란 2종 이상의 약제에 내성을 가진 암세포를 의미한다.
- [0050] 예시적인 일 구현예에서, 상기 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)-아크릴산은 환원 그래핀 옥사이드 표면에 결합될 수 있다.
- [0051] 예시적인 일 구현예에서, 상기 엽산은 상기 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)-아크릴산 표면에 결합될 수 있다. 예를 들어, 상기 엽산은 엽산-폴리에틸렌글리콜-아민(FA-PEG-NH₂)의 형태로 상기 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)-아크릴산 표면에 도입될 수 있다. 본 발명의 나노 복합체는 상기 엽산을 포함함으로써, 엽산 수용체 매개 세포내 이입을 가능하게 한다.
- [0052] 예시적인 일 구현예에서, 상기 나노 복합체의 형상은 구형일 수 있다.
- [0053] 예시적인 일 구현예에서, 상기 나노 복합체의 직경은 30 내지 38.5 °C에서 400 내지 600nm 일 수 있고, 바람직하게는 410 내지 650nm, 420 내지 600nm, 430 내지 550nm일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 420 내지 525nm일 수 있다.
- [0054] 예시적인 일 구현예에서, 상기 나노 복합체의 제타 전위는 -21.5 내지 -18.5 mV일 수 있고, 바람직하게는 -21.4 내지 -18.75 mV, -21.3 내지 -19 mV 일 수 있고, 더욱 바람직하게는 -21.2 내지 -19.25mV 일 수 있다.
- [0055] 예시적인 일 구현예에서, 상기 나노 복합체에 항암제가 담지될 수 있다. 예를 들어, 상기 항암제는 당업계 공지의 항암제를 포함하는 것일 수 있다.
- [0056] 예시적인 일 구현예에서, 상기 항암제는 인도시아닌 그린(indocyanine green, ICG)일 수 있다.
- [0057] 예시적인 일 구현예에서, 상기 나노 복합체는 상기 인도시아닌 그린에 담지된 나노 복합체 총 중량을 기준으로 상기 인도시아닌 그린을 8 내지 20 중량%로 포함할 수 있고, 바람직하게는 상기 9 내지 18중량%, 10 내지 16 중량%로 포함할 수 있고, 더욱 바람직하게는 11 내지 14 중량%로 포함할 수 있다.
- [0058] 예시적인 일 구현예에서, 상기 인도시아닌 그린을 담지한 나노 복합체의 제타 전위는 -33.5 내지 -29.5 mV 일 수 있고, 바람직하게는 -33.25 내지 -29.75 mV, -33 내지 -30 mV 일 수 있고, 더욱 바람직하게는 -33 내지 -30.25mV 일 수 있다.
- [0059] 예시적인 일 구현예에서, 상기 나노 복합체에 근적외선을 조사할 때, 5 내지 25°C의 온도가 상승하는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 근적외선은 바람직하게는 808nm NIR 레이저일 수 있다. 또한, 상기 나노 복합체에 근적외선을 조사할 때, 바람직하게는, 7.5 내지 22.5°C, 10 내지 20°C의 온도가 상승하는 것일 수 있고, 더욱 바람직하게는, 12.5 내지 17.5°C 상승하는 것일 수 있다.
- [0060] 예시적인 일 구현예에서, 상기 나노 복합체는 다제내성 유방암 세포를 표적하는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 다제내성 유방암 세포는 human MCF-7/ADR일 수 있다.
- [0061] 아울러, 본 발명의 나노복합체의 ICG 방출은 NIR 레이저 조사에 의해 낮은 임계 용액 온도 (Lower Critical Solution Temperature, LCST) 이상에서 효과적으로 촉진될 수 있다. ICG@rGO-PNIPAM-FA 나노복합체가 엽산 수용체 매개 세포 내 이입을 통해 MDR 유방암세포(MCF-7/ADR)로 내재화되어 광열 및 광역학 치료에 탁월한 시너지

효과를 보여 항암 효과를 극대화할 수 있다.

[0062] 예시적인 일 구현예에서, 광열 치료 및 광역학 치료를 위한 다제내성(Multiple Drug-Resistance) 암세포 표적 환원 그래핀 옥사이드 나노 복합체의 제조 방법으로서, 상기 방법은 그래핀 옥사이드(GO)에 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)-아크릴산(PNIPAM-AAc)을 결합시켜 그래핀 옥사이드-폴리(N-이소프로필아크릴아미드)-아크릴산 나노 복합체(GO-PNIPAM)를 제공하는 제1단계; 상기 GO-PNIPAM-AAc에 엽산을 결합시켜 그래핀 옥사이드-폴리(N-이소프로필아크릴아미드)-아크릴산-엽산 나노 복합체(GO-PNIPAM-AAc-FA)를 제공하는 제 2단계; 상기 GO-PNIPAM-AAc-FA를 환원시켜 환원 그래핀 옥사이드-폴리(N-이소프로필아크릴아미드)-아크릴산-엽산 나노 복합체(rGO-PNIPAM-AAc-FA)를 제공하는 제 3단계;를 포함하는 환원 그래핀 옥사이드 나노 복합체의 제조 방법을 제공한다.

[0063] 예시적인 일 구현예에서, 상기 rGO-PNIPAM-AAc-FA에 항암제를 담지시키는 제 4단계;를 더 포함할 수 있다.

[0064] 예시적인 일 구현예에서, 상기 제 1단계는 GO 표면에 카르복실기(-COOH)를 도입한 뒤, PNIPAM-AAc를 결합시킬 수 있다.

[0065] 예시적인 일 구현예에서, 상기 제 2단계는 엽산-폴리에틸렌글리콜-아민(FA-PEG-NH₂)과 접합시킴으로써 상기 엽산을 결합시키는 것일 수 있다.

[0067] 이하, 실시예 등을 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 청구범위에 기재된 기술적 사상과 실질적으로 동일한 구성을 갖고 동일한 작용 효과를 이루는 것은 어떠한 것이라도 본 발명의 기술적 범위에 포함된다.

[0069] 용어 정의

[0070] 본 명세서에서 나노란 100nm이하를 의미한다.

[0071] 본 명세서에서 GO란 그래핀 옥사이드(Graphene Oxide)를 의미한다.

[0072] 본 명세서에서 rGO란 환원 그래핀 옥사이드(reduced Graphene Oxide)를 의미한다.

[0073] 본 명세서에서 PNIPAM은 폴리(N-이소프로필아크릴아마이드) (poly(N-isopropylacrylamide))를 의미한다.

[0074] 본 명세서에서 AAc는 아크릴산(acrylic acid)을 의미한다.

[0075] 본 명세서에서 PNIPAM-AAc는 PNIPAM와 아크릴산이 공중합하여 결합된 것을 의미한다.

[0076] 본 명세서의 FA는 엽산(folic acid)을 의미한다.

[0077] 본 명세서에서 GO-PNIPAM-AAc-FA는 그래핀 옥사이드, PNIPAM-AAc 및 엽산이 결합된 것을 의미한다.

[0078] 본 명세서에서 rGO-PNIPAM-AAc-FA는 GO-PNIPAM-AAc-FA가 환원된 것을 의미한다.

[0079] 본 명세서에서 ICG는 인도시아닌 그린(indocyanine green)을 의미한다.

[0080] 본 명세서에서 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA는 rGO-PNIPAM-AAc-FA 내부에 인도시아닌그린이 담지된 것을 의미한다.

[0082] 예시적인 구현예들의 설명

[0083] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0084] 일 측면에서, 본 발명은 광열 치료 및 광역학 치료를 위한 다제내성(Multiple Drug-Resistance) 암세포 표적 환원 그래핀 옥사이드 나노 복합체로서, 상기 나노 복합체는 환원 그래핀 옥사이드; 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)-아크릴산; 및 엽산을 포함하는 환원 그래핀 옥사이드 나노 복합체를 제공한다.

[0085] 상기 다제내성(Multiple Drug-Resistance) 암세포란 2종 이상의 약제에 내성을 가진 암세포를 의미한다.

[0086] 예시적인 일 구현예에서, 상기 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)-아크릴산은 환원 그래핀 옥사이드 표면에 결합될 수 있다.

- [0087] 예시적인 일 구현예에서, 상기 염산은 상기 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)-아크릴산 표면에 결합될 수 있다. 예를 들어, 상기 염산은 염산-폴리에틸렌글리콜-아민(FA-PEG-NH₂)의 형태로 상기 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)-아크릴산 표면에 도입될 수 있다. 본 발명의 나노 복합체는 상기 염산을 포함함으로써, 염산 수용체 매개 세포내 이입을 가능하게 한다.
- [0088] 예시적인 일 구현예에서, 상기 나노 복합체의 형상은 구형일 수 있다.
- [0089] 예시적인 일 구현예에서, 상기 나노 복합체의 직경은 30 내지 38.5 °C에서 400 내지 600nm 일 수 있고, 바람직하게는 410 내지 650nm, 420 내지 600nm, 430 내지 550nm일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 420 내지 525nm일 수 있다.
- [0090] 예시적인 일 구현예에서, 상기 나노 복합체의 제타 전위는 -21.5 내지 -18.5 mV일 수 있고, 바람직하게는 -21.4 내지 -18.75 mV, -21.3 내지 -19 mV 일 수 있고, 더욱 바람직하게는 -21.2 내지 -19.25mV 일 수 있다.
- [0091] 예시적인 일 구현예에서, 상기 나노 복합체에 항암제가 담지될 수 있다. 예를 들어, 상기 항암제는 당업계 공지의 항암제를 포함하는 것일 수 있다.
- [0092] 예시적인 일 구현예에서, 상기 항암제는 인도시아닌 그린(indocyanine green, ICG)일 수 있다.
- [0093] 예시적인 일 구현예에서, 상기 나노 복합체는 상기 인도시아닌 그린에 담지된 나노 복합체 총 중량을 기준으로 상기 인도시아닌 그린을 8 내지 20 중량%로 포함할 수 있고, 바람직하게는 상기 9 내지 18중량%, 10 내지 16 중량%로 포함할 수 있고, 더욱 바람직하게는 11 내지 14 중량%로 포함할 수 있다.
- [0094] 예시적인 일 구현예에서, 상기 인도시아닌 그린을 담지한 나노 복합체의 제타 전위는 -33.5 내지 -29.5 mV 일 수 있고, 바람직하게는 -33.25 내지 -29.75 mV, -33 내지 -30 mV 일 수 있고, 더욱 바람직하게는 -33 내지 -30.25mV 일 수 있다.
- [0095] 예시적인 일 구현예에서, 상기 나노 복합체에 근적외선을 조사할 때, 5 내지 25°C의 온도가 상승하는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 근적외선은 바람직하게는 808nm NIR 레이저일 수 있다. 또한, 상기 나노 복합체에 근적외선을 조사할 때, 바람직하게는, 7.5 내지 22.5°C, 10 내지 20°C의 온도가 상승하는 것일 수 있고, 더욱 바람직하게는, 12.5 내지 17.5°C 상승하는 것일 수 있다.
- [0096] 예시적인 일 구현예에서, 상기 나노 복합체는 다제내성 유방암 세포를 표적하는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 다제내성 유방암 세포는 human MCF-7/ADR일 수 있다.
- [0097] 아울러, 본 발명의 나노복합체의 ICG 방출은 NIR 레이저 조사에 의해 낮은 임계 용액 온도 (Lower Critical Solution Temperature, LCST) 이상에서 효과적으로 촉진될 수 있다. ICG@rGO-PNIPAM-FA 나노복합체가 염산 수용체 매개 세포 내 이입을 통해 MDR 유방암세포(MCF-7/ADR)로 내재화되어 광열 및 광역학 치료에 탁월한 시너지 효과를 보여 항암 효과를 극대화할 수 있다.
- [0098] 예시적인 일 구현예에서, 광열 치료 및 광역학 치료를 위한 다제내성(Multiple Drug-Resistance) 암세포 표적 환원 그래핀 옥사이드 나노 복합체의 제조 방법으로서, 상기 방법은 그래핀 옥사이드(GO)에 폴리(N-이소프로필아크릴아미드)-아크릴산(PNIPAM-AAc)을 결합시켜 그래핀 옥사이드-폴리(N-이소프로필아크릴아미드)-아크릴산 나노 복합체(GO-PNIPAM)를 제공하는 제1단계; 상기 GO-PNIPAM-AAc에 염산을 결합시켜 그래핀 옥사이드-폴리(N-이소프로필아크릴아미드)-아크릴산-염산 나노 복합체(GO-PNIPAM-AAc-FA)를 제공하는 제 2단계; 상기 GO-PNIPAM-AAc-FA를 환원시켜 환원 그래핀 옥사이드-폴리(N-이소프로필아크릴아미드)-아크릴산-염산 나노 복합체(rGO-PNIPAM-AAc-FA)를 제공하는 제 3단계;를 포함하는 환원 그래핀 옥사이드 나노 복합체의 제조 방법을 제공한다.
- [0099] 예시적인 일 구현예에서, 상기 rGO-PNIPAM-AAc-FA에 항암제를 담지시키는 제 4단계;를 더 포함할 수 있다.
- [0100] 예시적인 일 구현예에서, 상기 제 1단계는 GO 표면에 카르복실기(-COOH)를 도입한 뒤, PNIPAM-AAc를 결합시킬 수 있다.
- [0101] 예시적인 일 구현예에서, 상기 제 2단계는 염산-폴리에틸렌글리콜-아민(FA-PEG-NH₂)과 접합시킴으로써 상기 염산을 결합시키는 것일 수 있다.
- [0103] 이하, 실시예 등을 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기

위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 청구범위에 기재된 기술적 사상과 실질적으로 동일한 구성을 갖고 동일한 작용 효과를 이루는 것은 어떠한 것이라도 본 발명의 기술적 범위에 포함된다.

[제조예]

1. 재료의 준비

GO 용액은 Graphene Supermarket, Inc(Ronkonkoma, NY, USA)에서 구입하였다. NIPAM, N,N'-메틸렌비스아크릴아미드(MBA), AAc, N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카르보디이미드 염산염(EDC), N-히드록시숙신이미드(NHS) 및 2,2'-아조비스(2-메틸프로피온아미딘) 이염산염(AIBA)은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 염산-폴리에틸렌글리콜-아민(FA-PEG-NH₂, 5 kDa)은 Nanocs, Inc.(New York, NY, USA)에서 구입하였다. 메톡시 PEG 아민(CH₃-PEG-NH₂, 5 kDa)은 SunBio Co.(Gunpo, Korea)에서 구입하였다. ICG, 1,3-디페닐이소벤조푸란(DPBF) 및 3-(4,5-디메틸티오졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드(MTT)는 Tokyo Chemical Industry Co., Ltd(Tokyo, Japan)에서 구입하였다. 마우스 섬유아세포(NIH-3T3), 인간 폐암종(A549), 인간 MCF-7 및 MCF-7/ADR 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 구입하였다. Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM), Roswell Park Memorial Institute(RPMI) 1640 배지, Dulbecco 인산염 완충 식염수(DPBS), 태아 소 혈청(FBS), 40,6-diamidino-2-phenylindole(DAPI), 항생제 및 live/dead 이중 염색 키트는 Thermo Fisher Scientific Inc.(Waltham, MA, USA)에서 구입하였다.

2. GO-PNIPAM-AAc 나노복합체의 합성

GO-PNIPAM-AAc 나노복합체를 합성하기 위해 50mL GO 용액(1mg/mL)을 1시간 동안 초음파 처리하였다. NaOH 2.4g과 클로로아세트산 2.0g을 첨가하고 용액을 3시간 동안 초음파 처리하여 GO 표면에 카르복실기를 도입하였다. 생성된 용액을 MWCO(Molecular Weight Cut Off) 3.5 kDa 막을 사용하여 탈이온수(DW)에서 3일 동안 투석하여 잔류 화학물질을 제거하였다. PNIPAM을 도입하기 위해 20mg의 GO-COOH를 20mL의 DW에 용해시키고 20mg의 AIBA를 첨가하였다. 수산화암모늄을 사용하여 pH를 10으로 조정하고 용액을 70℃에서 교반하였다. 2시간 후, NIPAM 20mg, MBA 2mg, AAc 2 μL를 용액에 첨가하고 질소 대기 하에 80℃에서 3시간 동안 교반하였다. GO-PNIPAM-AAc 나노복합체는 DW에 대한 MWCO 6-8 kDa 투석막을 사용하여 2일 동안 정제하고 동결 건조하여 얻었다.

3. rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체 합성

MDR 유방암 세포에 대한 표적화 능력과 강화된 콜로이드 안정성은 EDC/NHS 커플링 반응을 사용하여 GO-PNIPAM 표면에 NH₂-PEG-FA를 접합시킴으로써 제공될 수 있다. 처음에 10mg의 GO-PNIPAM-AAc를 PBS(pH 5.8)에 용해시키고 30분간 초음파를 처리하였다. 40mg의 EDC와 44mg의 NHS를 첨가하고 용액을 1시간 동안 초음파를 처리하였다. 다음으로 FA-PEG-NH₂ 5 mg을 첨가하고 18시간 동안 교반하였다. 반응하지 않은 화학물질을 제거하기 위해 GO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체를 투석막(MWCO: 6-8 kDa)으로 48시간 동안 정제하였다. GO-PNIPAM-AAc-FA의 환원 공정은 나노복합체를 0.05% 히드라진 일수화물로 처리한 후 85℃에서 15분간 가열하여 수행되었다. rGO-PNIPAM-AAc-FA는 투석막(3.5 kDa)을 사용하여 1일 동안 정제한 후 동결건조를 통해 얻었다. 대조군으로서 rGO-PNIPAM-AAc-PEG 나노복합체는 동일한 프로토콜로 합성되었다.

4. ICG 캡슐화 rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체 합성

rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체에 NIR 레이저 매개 광제를 캡슐화하기 위해 10mg의 rGO-PNIPAM-AAc-FA(10mL, 1mg/mL)를 10분 동안 초음파를 처리하였다. 5 mg/mL의 ICG를 rGO-PNIPAM-AAc-FA 용액에 적가(dropwise)한 후 암실에서 24시간 동안 격렬하게 교반하였다. 캡슐화되지 않은 ICG를 원심분리(14,000rpm, 10분)로 제거하고 DW로 세척하였다. ICG가 탑재된 rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체는 동결 건조를 통해 얻어졌다. rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체에서 ICG의 존재는 780 nm에서 UV-vis 분광학(UV 1800, Tokyo, Japan)에 의해 추정되었다.

[0119] [실험예]

[0121] 1. rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체의 특성 분석

[0122] (1) 실험 방법

[0123] rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체의 크기, 형태 및 표면 거칠기는 투과전자현미경(TEM, JEM-ARM200F, Tokyo, Japan)을 통해 관찰하였다. rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체의 표면 전하 및 LCST 측정은 Zetasizer Nano ZS90(Malvern Instruments, Malvern, UK)을 사용하여 측정되었다. rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체의 화학 구조를 확인하기 위해 푸리에 변환 적외선 분광법(FT-IR, Vertex 70, Bruker Inc., Billerica, MA, USA)을 사용했다. rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체에 캡슐화된 ICG는 UV-vis 분광법(UV 1800, Tokyo, Japan)으로 확인되었다.

[0125] (2) 실험결과

[0126] 808nm NIR 레이저 조사 하에서 ICG의 높은 로딩 용량과 온도 반응을 제공하기 위해 PNIPAM 단량체를 라디칼 중합에 의해 GO 나노시트에 결합시키고 이어서 AAc를 PNIPAM-GO 혼합 용액에 첨가하여 LCST를 증가시켰다. PNIPAM 구조로 캡슐화된 ICG와 PEG-FA의 접합을 통해 나노복합체는 MDR 유방암 세포의 세포내 흡수가 가능함을 보여주었고 NIR 레이저 조사 하에서 MDR 유방암 치료 효과를 향상시킬 수 있었다(도 1).

[0127] 열 반응성 GO 나노복합체의 크기와 형태는 TEM으로 평가되었다(도 2A). GO-COOH는 $209 \pm 5.43\text{nm}$ 였으며 GO 나노시트의 고유한 구형 모양을 나타냈다. 그러나 rGO-PNIPAM 및 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체의 형태는 PNIPAM-AAc 사슬이 rGO 표면에서 확장되었기 때문에 조밀하게 응집된 어두운 점으로 변경되었다. 또한, 나노복합체의 직경은 230 ± 5.32 및 $233.4 \pm 15.92 \text{ nm}$ 로 극적으로 증가했는데, 이는 NH_2 -PEG-FA가 rGO-PNIPAM 나노복합체의 말단에 접합되고 ICG 분자가 rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체에 캡슐화되었음을 나타낸다. rGO 나노복합체에 형성된 PNIPAM-AAc의 열 반응 특성을 DLS 분석으로 조사했다. 온도가 증가함에 따라 rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체의 직경 변화를 관찰했다.

[0128] 도 2B에서 볼 수 있듯이, $30\sim 38^\circ\text{C}$ 에서 나노복합체의 직경은 변하지 않고 약 470nm 로 유지되었다. 대조적으로, 39°C 이상에서 rGO-PNIPAM 나노복합체의 직경은 $150\sim 170 \text{ nm}$ 로 크게 감소했다. 이 결과는 PNIPAM 사슬에서 공중합된 AAc에 의해 친수성 그룹이 증가하여 PNIPAM-AAc의 상 변화를 초래한다는 것을 나타낸다. 따라서 rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체의 LCST는 39°C 로 고정되었다. 또한, 기존 AAc가 없는 온도 감응형 고분자 PNIPAM의 경우 LCST가 32°C 정도로 알려져 있는 반면, 본 발명의 나노 복합체는 LCST가 더 높아짐으로써 온도에 따른 약물 방출 거동 제어능이 매우 우수함을 확인하였다. 따라서 본 연구에서 개발된 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA는 39°C 이상에서의 선택적 방출이 가능하여 약물 방출에 따른 부작용을 줄이고, 인도시아닌 그린에 의한 다재내성 암에 대한 광열 및 광역학 치료 효과를 극대화시킬 수 있다.

[0129] 도 2C는 각 변형 과정을 통해 얻은 rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체의 제타 전위를 보여준다. 원래의 GO($-27.3 \pm 1.48\text{mV}$)와 비교하여 GO-COOH는 클로로아세트산에 의한 GO 표면의 추가 카르복실기로 인해 강한 음전하($-32.7 \pm 1.16\text{mV}$)를 나타냈다. GO-PNIPAM 및 GO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체는 각각 $-36.2 \pm 2.35 \text{ mV}$ 및 $-24.1 \pm 2.03 \text{ mV}$ 로 기록되었다. 이러한 값의 변화는 음전하를 띤 PNIPAM-AAc 및 양전하를 띤 NH_2 -PEG-FA와의 접합에서 파생되었다. 환원 공정 후, rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체는 $-20.2 \pm 0.85\text{mV}$ 로 약간 감소하여, GO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체의 잔류 수산기가 제거됨을 뒷받침하였다. ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체는 $-31.6 \pm 1.27\text{mV}$ 로 측정되었으며, 이는 rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체에 캡슐화된 음전하 ICG 분자에 기인한 것이다.

[0130] rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체의 화학 구조는 도 3A의 FT-IR 분광학으로 분석되었다. GO-COOH는 각각 C=O 및 O-H 진동에 해당하는 1735cm^{-1} 과 3400cm^{-1} 에서 두 개의 주요 피크를 나타냈다. GO-PNIPAM 나노복합체의 스펙트럼에서 PNIPAM-AAc 도메인으로 인해 1100 , 1381 및 1587cm^{-1} 에서 C-N, N-H 및 C=O의 신축 진동이 관찰되었다. NH_2 -PEG-FA 결합 후, GO-PNIPAM-AAc-FA 나노 복합체는 1350 , 1460 , 940 및 1080 cm^{-1} 에서 새로운 진동 피크를 나타냈고, 이는 PEG 체인에서 $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$ 백본 스트레칭 및 $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$ 비대칭 및 대칭 진동의 존재를 나타낸다.

화학적 환원에 의해 rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체의 스펙트럼은 약 3400cm^{-1} 의 O-H 신축 진동에서 감소하였다. 그러나 FA 분자는 rGO-PNIPAM-AAc-FA 스펙트럼에서 특정 피크를 검출할 수 없었는데, 그 이유는 FA와 PEG가 유사한 화학 구조로 구성되었기 때문이었다. rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체에서 FA의 존재를 확인하기 위해 UV-vis 분광학을 사용했으며, 도 3B의 FA 및 rGO-PNIPAM-AAc-FA에서 280nm의 흡수 피크가 관찰되었다. 또한 나노복합체에 캡슐화된 ICG도 동일한 분석 방법으로 평가되었다. rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체는 NIR 영역(750-1100nm)에서 흡수 피크를 나타내지 않았지만, ICG로 캡슐화된 rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체는 동일한 파장 범위에서 강한 흡수 피크를 나타냈다. 이러한 결과는 각각 280 및 780 nm에서 FA 및 ICG의 고유 흡수 피크를 통해 rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체의 캡슐화된 ICG뿐만 아니라 FA의 집합을 검증했다. 또한, UV-vis 스펙트럼에서 780nm의 흡수 피크는 rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체에 캡슐화된 ICG 분자의 양을 제공했으며 ICG의 로딩 용량은 12.2%로 결정되었다. 이 값은 순수한 rGO 나노시트에 직접 로딩된 ICG의 로딩 용량(6%)보다 ICG의 로딩 용량이 상대적으로 더 높았으며, 이는 rGO 나노복합체의 PNIPAM-AAc가 소수성 상호작용을 통해 ICG와의 복합체화를 개선하였으며, 향상된 약물 담지 능력이 있음을 나타낸다.

2. NIR 레이저 조사 하에서 rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체의 광열 및 광역학 효과 분석

(1) 실험 방법

ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체의 NIR 레이저 매개 광열 특성은 실시간 온도 모니터링을 통해 평가되었다. rGO-PNIPAM-AAc-FA 및 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체를 다양한 농도(50, 100 및 $200\ \mu\text{g/mL}$)의 DW에 용해시키고 808 nm NIR 레이저(BWF2, BWF Inc., Sweden)를 1W/cm^2 의 전력 밀도에서 10분간 조사했다. 레이저 출력 밀도의 효과는 출력 밀도(1.0 , 1.5 및 $2.0\ \text{W/cm}^2$)가 서로 다른 나노복합체 용액의 온도를 증가시켜 모니터링하였다. 또한 808nm NIR 레이저에 대해 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 용액($100\ \mu\text{g/mL}$)의 광열 안정성을 조사했다. 용액을 10분 동안 NIR 레이저 조사에 노출시킨 후 3주기 동안 냉각시켰다. 나노복합체의 온도 변화는 열전쌍 디지털 온도계(DTM-318, Tecpel Co., Taiwan)로 기록되었다. 또한 NIR 레이저에 의한 ROS 생성을 통해 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체의 광역학적 특성을 입증했다. DPBF는 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체로부터 ROS 생성을 결정하기 위해 사용되었다. ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 용액($200\ \mu\text{L}$, PBS 중 $0.1\ \text{mg/mL}$)을 DMSO($1\ \text{mg/mL}$) 중 $10\ \mu\text{L}$ 의 DPBF 용액과 균질하게 혼합했다. 혼합 용액을 서로 다른 시간 간격으로 1W/cm^2 의 전력 밀도로 808nm NIR 레이저에 노출시켰다. 비교를 위해 rGO-PNIPAM-AAc-FA 용액을 동일한 방식으로 처리했다. DPBF의 해당 흡수 스펙트럼은 UV-vis 분광법($410\ \text{nm}$ 파장)을 사용하여 측정되었다.

(2) 실험 결과

1) rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체의 광열 및 광안정 효율성

ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체의 광열 및 광안정 특성은 808 nm NIR 레이저 조사 하에서 실시간 온도 모니터링 온도 변화를 통해 확인되었다(도 4).

rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체에 캡슐화된 ICG에 의해 향상된 PTT를 확인하기 위해 rGO-PNIPAM-AAc-FA 및 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체를 808nm NIR 레이저(1W/cm^2) 조사에 10분 동안 노출하였다.

인도시아닌 그린에 의한 광열 효과를 비교하기 위해 rGO-PNIPAM-AAc-FA와 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA를 준비하여 808 nm 근적외선을 조사한 결과, rGO-PNIPAM-AAc-FA는 그래핀 자체의 광열 효과로 인해 9°C 의 온도상승을 보이거나 인도시아닌 그린에 담지된 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노 복합체의 경우 동일 실험 조건에서 약 15.1°C 까지 온도가 증가하는 것이 관찰되었으며, 이는 나노 복합체에 담지된 인도시아닌 그린에 의한 시너지 효과를 나타냄을 확인한 것이다 (도 4A).

또한 다양한 세기의 808nm NIR 레이저 (1.0 , 1.5 , $2\ \text{W/cm}^2$)를 조사하면서 다양한 농도(50 , 100 , $200\ \mu\text{g/mL}$)에서의 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체를 온도 변화를 조사하였다(도 4B 및 도 4C).

근적외선 조사에 따른 발열 손실을 관찰하기 위해 나노 복합체에 근적외선을 반복적으로 조사한 결과 열 손실이 발생하지 않아 광열 치료로 사용할 수 있는 가능성을 확인하였다(도 4D)

[0144] 2) NIR 레이저 조사 하에서 rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체의 광역학적 특성

[0145] 나노복합체의 NIR 레이저 매개 광역학 특성을 조사하기 위해 DPBF 프로브를 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체의 ROS 검출에 적용했다. 도 5A에서는 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체와 DPBF 프로브를 혼합한 후 2분마다 808nm NIR 레이저 조사($1W/cm^2$)를 조사한 다음 UV-vis 분광법을 사용했다. DPBF 프로브가 ROS와 반응하면 프로브가 분해되고 o-dibenzoylbenzene이 형성되어 410nm에서 감소된 흡수 강도를 유도한다. 410 nm의 흡수 피크는 NIR 레이저 조사 시간에 따라 점차 감소함을 확인하였다. 도 5B에서 볼 수 있듯이 808nm NIR 레이저 조사 하에서 ICG가 없는 rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체는 상대적 흡수를 변화시키지 않은 반면, DPBF 프로브가 있는 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체는 상대적 흡수가 지속적으로 감소하는 것으로 나타났다. 또한, 상대적으로 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA의 혼합물과 DPBF 프로브가 NIR 레이저 조사에 노출되지 않은 경우, 410nm에서의 흡수는 변하지 않았다. 이는 rGO-PNIPAM-AAc-FA에서는 활성 산소가 발생하지 않은 반면, ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA의 경우 근적외선 조사에 따라 지속적인 활성 산소가 발생된 것으로 해석된다. 이러한 결과는 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체가 808nm NIR 레이저 조사에 의해 다량의 ROS를 효과적으로 생성할 수 있음을 나타낸다.

[0147] 3. rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체의 NIR 및 열반응성 ICG 방출 분석

[0148] (1) 실험 방법

[0149] rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체의 열 반응성 ICG 방출을 연구하기 위해 1mL의 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 용액 (1mg/mL)을 준비하고 25, 37 및 50°C에서 교반했다. 미리 결정된 시간 간격(0-72시간) 후에 각 샘플의 상층액을 원심분리(14,000rpm, 5분)로 수집하고 동일한 부피의 새로운 PBS로 교체했다. rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체로부터 방출된 ICG는 형광 분광학에 의해 추정되었다. 또한, rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체로부터 NIR 레이저 매개 ICG 방출을 확인했다. ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 용액(1 mg/mL)을 37°C에 놓고 미리 결정된 시점(pre-determined time point)에서 10분 동안 조사하였다. 대조군으로는 NIR 레이저 조사 없이 25 및 37°C에 놓인 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 용액을 사용했다. 방출된 ICG는 전술한 방법으로 결정하였다.

[0151] (2) 실험 결과

[0152] 열 반응을 통한 ICG 방출을 밝히기 위해 다양한 온도(25, 37 및 50°C에서 72시간 동안 rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체의 ICG 방출 거동을 관찰했다. 도 6A에서 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체를 25°C와 37°C에 놓았을 때 캡슐화된 ICG가 각각 19%와 24%로 방출되었다. 이미 도 2B(38~40°C 사이)에서 rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체의 LCST를 얻었다. rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체의 PNIPAM-AAc의 전체 고분자 네트워크가 수소 결합을 통해 팽윤 상태로 남아 있기 때문에 LCST 하에서 나노복합체로부터의 누적 ICG 방출이 억제되었다. LCST 이하의 방출 프로파일과 비교하여 나노복합체에서 방출된 ICG는 50°C에서 49%로 증가했다. 이 결과는 2배 이상 높아, PNIPAM-AAc가 감소된 수소 결합으로 소수성 상태로 변형되어, 앞에서 설명한 바와 같이, LCST 위의 폴리머 네트워크 붕괴에 의해 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노 복합체에서 ICG 방출을 가속화할 수 있음을 나타낸다. 또한 도 6B에서 rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체의 열 및 NIR 레이저 반응 ICG 방출능을 조사하였다. ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체를 1시간 간격으로 5분 동안 NIR 레이저 조사($1W/cm^2$)에 노출시켜 37°C에 두었다. 5시간 동안 NIR 레이저 조사에 의해 방출된 ICG의 총량은 36%에 도달한 반면, NIR 레이저 조사 없이 25 및 37°C에서 나노복합체의 ICG는 무시할 만큼 방출되었다(9.6 및 11.7%). 열 및 NIR 레이저 반응 rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노 복합체는 대조군에 비해 많은 양의 ICG 방출을 보여 NIR 레이저 조사가 rGO에 의해 나노 복합체의 LCST에 대한 온도 상승을 유도하여 rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노 복합체의 ICG 방출을 가속화할 수 있었다. 따라서 본 발명의 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체는 열 및 NIR 레이저 조사를 통한 이중 자극을 통해 제어된 약물 방출 시스템에 사용될 수 있으며, 온도감응성 고분자 (PNIPAM-AAc) 도입을 통해 온도에 따른 약물 방출 제어 뿐만 아니라 근적외선에 의한 제어도 가능함을 확인하였다.

[0154] 4. rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체의 세포독성 분석

[0155] (1) 실험 방법

[0156] rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체의 세포 생존력 테스트는 MTT 분석으로 수행되었다. 정상(NIH-3T3 섬유아세포), 인간 폐암종(A549) 및 인간 유방암(MCF-7, MCF-7/ADR) 세포를 96웰 플레이트에 1×10^4 개 세포의 밀도로 접종했다. 그리고 CO2 인큐베이터에서 24시간 동안 배양하였다. 다양한 농도(10-100 $\mu\text{g/mL}$)의 100 μL 의 rGO-PNIPAM-AAc-FA 및 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체를 각 웰에 처리하고 96웰 플레이트를 24시간 동안 배양하였다. 세포를 DPBS로 세척하고 MTT 제제(0.5 mg/mL)를 포함하는 새로운 배지를 첨가하고 추가로 4시간 동안 배양하였다. 배양 배지를 조심스럽게 제거하고 200 μL 의 DMSO를 첨가했다. NIH-3T3, A549, MCF-7 및 MCF-7/ADR 세포의 세포 생존율은 iMark™ 마이크로플레이트 리더(Bio-rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 정량화되었다.

[0158] (2) 실험 결과

[0159] rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체의 세포독성 분석은 정상(NIH-3T3 섬유아세포), 유방암(MCF-7) 및 MDR 유방암(MCF-7/ADR) 세포를 사용하여 수행되었다. 다양한 농도(20-100 $\mu\text{g/mL}$)의 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체로 처리된 NIH-3T3, MCF-7 및 MCF-7/ADR 세포의 세포 생존력을 보여주었다. NIH-3T3, MCF-7 및 MCF-7/ADR의 생존 세포 비율은 고농도의 나노복합체(100 $\mu\text{g/mL}$)에서도 85% 이하로 감소하지 않았다. 또한, ICG 없이 rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체를 처리한 세포 생존율도 동일한 방식으로 관찰되었다. 이전 결과와 유사하게 ICG 없이 rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체로 처리한 세포도 높은 세포 생존율을 보여 모든 농도에서 85% 이상을 나타냈다. 이러한 결과는 rGO-PNIPAM-AAc-FA 및 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체가 우수한 생체적합성을 나타냄을 입증했다.

[0161] 5. rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체의 MDR 유방암 표적 세포 흡수 분석

[0162] (1) 실험 방법

[0163] 유방암(MCF-7, MCF-7/ADR) 세포에 대한 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체의 표적화 능력은 공초점 현미경(CLSM 900, Carl Zeiss, Germany)으로 평가되었다. NIH-3T3, A549, MCF-7 및 MCF-7/ADR 세포를 8웰 배양 플레이트에 웰당 2×10^4 세포의 밀도로 시딩하고 밤새 배양하였다. 세포를 무혈청 배지에서 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체로 4시간 동안 처리하였다. 잔여 나노복합체를 제거하기 위해 세포를 PBS로 여러 번 세척한 후 4% 파라포름알데히드로 실온에서 15분 동안 고정시켰다. 이후 세포를 실온에서 15분 동안 0.1% Triton X-100 및 4% BSA로 처리했다. 세포를 4°C에서 1일 동안 Alexa Fluor 594 phalloidin(1:200, Invitrogen, USA)으로 염색하고 4,6-diamidino-2-phenylindole(DAPI, Thermo Fisher Scientific, USA)로 15분 동안 염색했다. ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체의 FA 매개 세포 흡수와 비교하여 메톡시-PEG-아민($\text{CH}_3\text{-PEG-NH}_2$)은 rGO-PNIPAM에 접합되었으며 ICG는 이후에 캡슐화되었다(ICG@rGO-PNIPAM- CH_3). 세포를 동일한 프로토콜로 염색하고 공초점 현미경으로 세포 흡수 이미지를 얻었다.

[0165] (2) 실험 결과

[0166] 엽산 수용체 음성 세포(NIH-3T3, A549) 및 양성 세포(MCF-7, MCF-7 / ADR)에 대한 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체의 선택적 세포 흡수를 추가로 조사했다(도 7). ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체와 함께 배양한 후 형광 이미지를 얻었다. 세포핵은 파란색(DAPI)으로 염색되었고, 세포질은 녹색(phalloidin 594)으로 표시되었으며, 세포 내 국소화된 ICG는 빨간색으로 표시되었다. ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체가 포함된 엽산 수용체 양성(MCF-7, MCF-7/ADR) 세포에서는 상대적으로 강한 적색 형광이 분포되었다. 그러나 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체로 처리된 정상(NIH-3T3) 및 폐암(A549) 세포는 ICG의 형광을 나타내지 않았다. 또한 대조군으로 ICG@rGO-PNIPAM- CH_3 (FA 없음) 나노복합체를 준비하고 엽산 수용체 양성 세포에 처리했다. 예상한 대로 MCF-7 및 MCF-7/ADR 세포는 나노복합체에 FA가 없기 때문에 ICG와 관련된 어떠한 형광도 나타내지 않았다. 따라서, 이 결과는 rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체가 엽산 수용체 매개 세포내이입을 통해 유방암 세포에 선택적으로 내재화되었음을 시사한다.

[0168] 6. rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체의 세포내 NIR 레이저 매개 ROS 생성 분석

[0169] (1) 실험 방법

[0170] ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체로 처리된 유방암(MCF-7, MCF-7/ADR) 세포의 ROS 생성은 DCFDA 분석으로 정량화되었다. MCF-7 및 MCF-7/ADR 세포를 1×10^4 세포의 밀도로 시딩하고 GO-PNIPAM-AAc-FA 및 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA($60 \mu\text{g/mL}$)와 함께 6시간 동안 배양했다. 세포 내 ROS 생성을 평가하기 위해 세포를 808 nm NIR 레이저(3 W/cm^2) 조사에 5분 동안 노출시켰다. 이어서, 세포를 DPBS로 여러 번 세척하고 DCFDA($20 \mu\text{M}$)를 함유한 새로운 배지와 함께 45분 동안 배양하였다. MCF-7 및 MCF-7/ADR 세포의 형광 신호는 역형광 현미경(Olympus IX73, Tokyo, Japan)을 사용하여 검출되었다.

[0172] (2) 실험 결과

[0173] ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체의 NIR 레이저 매개 ROS 생성은 MDR 유방암 세포에 산화 스트레스를 제공하고 효과적인 면역원성 세포사멸을 유도했다. NIR 레이저 조사를 통해 유방암 세포의 세포 내 ROS를 평가하기 위해 상업적인 세포 내 ROS 지표인 DCFDA 프로브를 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노 복합체와 혼합하여 유방암 세포를 처리했으며 808nm NIR 레이저 조사에 노출되었다. 도 8에서 NIR 레이저를 조사한 MCF-7/ADR 세포의 형광 강도는 다른 것을 확인하였다. ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체로 처리된 MCF-7/ADR 세포가 NIR 레이저 조사에 노출되지 않은 경우 녹색 신호가 표시되지 않았다. 대조적으로, ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체 및 근적외선 레이저 조사로 처리된 세포에서 형광 강도가 가장 높았다. 또한 ICG@PINPAM-FA 나노복합체가 유방암 세포(MCF-7)에서 처리됨에 따라 나노복합체와 NIR 레이저 조사에 의한 세포내 ROS 생성을 관찰했다(그림 S4). 예상한 바와 같이, 근적외선 레이저를 조사하지 않은 MCF-7 세포에서는 녹색 형광 강도가 나타나지 않았으나, 808 nm 근적외선 레이저를 조사한 MCF-7 세포에서는 녹색 신호가 현저하게 발현되었다.

[0174] 따라서, ICG@PNIPAM-FA 나노복합체는 유방암 세포에 내재화될 수 있으며 NIR 레이저 조사를 통해 다량의 세포 독성 ROS를 생성할 수 있음을 확인하였다.

[0176] 7. rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체의 시너지 치료 효능 분석

[0177] (1) 실험 방법

[0178] 유방암 세포에 대한 NIR 레이저 조사를 통한 rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체의 결합된 PTT-PDT 효과는 MTT 분석으로 평가되었다. MCF-7/ADR 세포를 96웰 플레이트(1×10^4 개 세포/웰)에 시딩하고 24시간 동안 배양했다. 이어서, 세포를 rGO-PNIPAM-AAc-FA 및 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체로 다양한 농도($20-80 \mu\text{g/mL}$)로 처리했다. 4시간 동안 배양한 후, 세포에 808 nm NIR 레이저(3 W/cm^2) 조사를 5분간 조사했다. 또한, NIR 레이저 조사 하에서 시너지 치료 효과를 시각화하기 위해 live/dead 분석을 수행했다. MCF-7 및 MCF-7/ADR 세포를 rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체와 함께 4시간 동안 배양하고 NIR 레이저 조사에 5분 동안 노출시켰다. 세포를 칼세인 AM과 에티디움 호모다이어-1로 20분 동안 염색하고 여러 번 세척했다. 마지막으로 Olympus IX73 현미경으로 라이브/데드 이미지를 얻었다.

[0180] (2) 실험 결과

[0181] MDR 유방암 세포에 대한 NIR 레이저 매개 PTT 및 PDT 치료를 통한 복합 치료 효능을 확인하기 위해 MCF-7/ADR 세포를 다양한 농도의 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체($20-80 \mu\text{g/mL}$)와 함께 배양하고 세포독성 테스트가 수행되었다(도 9A). 대조군에서는 ICG 없이 rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체로 처리한 MCF-7/ADR 세포를 NIR 레이저 조사(5분, 3 W/cm^2)에 노출시켰다. MCF-7/ADR 세포의 생존력은 나노 복합체에 대한 용량 의존성을 보였으며 점차 51%로 감소했는데, 이는 rGO-PNIAPM-AAc-FA 나노 복합체가 염산 수용체 내세포화를 통해 MCF-7/ADR에 내재화되었고, NIR 레이저 매개 rGO 기반 PTT 단독으로 MCF-7/ADR 세포가 사멸했기 때문이다. 그러나 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체와 함께 배양된 MCF-7/ADR 세포에 808 nm NIR 레이저 조사를 조사하면 세포 생존율이 크게 감소하여 약 22%에 도달했다. MCF-7/ADR 세포의 이러한 강력한 치료 효능은 ICG 및 rGO를 통한 향상된 PTT와 NIR 레이저 매개 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체에 의한 풍부한 ROS 생성에 기인한다. 또한 MDR 유방암 세포의 시너지 치료 효능을 시각화하기 위해 live/dead 분석을 수행했다. 도 9B에서 볼 수 있듯이 MCF-7 세포는

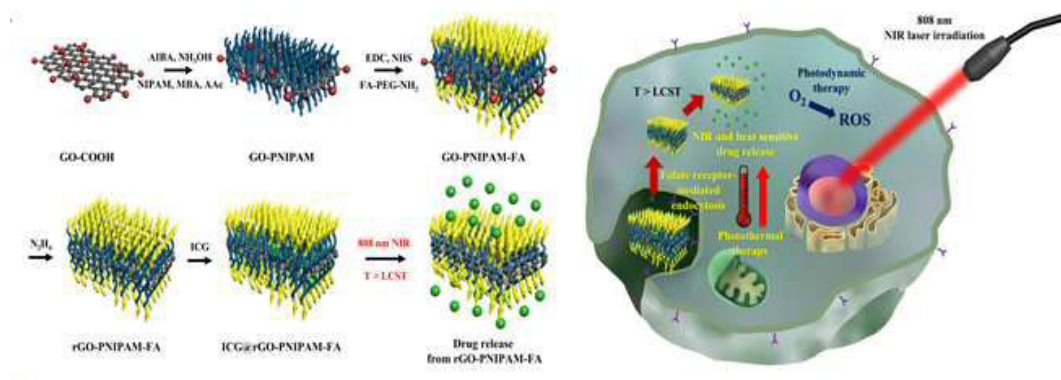
808 nm NIR 레이저 조사에만 노출되었지만 대부분의 세포는 녹색 형광을 나타내어 NIR 레이저 조사만으로는 세포의 세포 독성을 유발하지 않았음을 나타냈다. rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체와 NIR 레이저 조사를 모두 처리한 MCF-7/ADR 세포에서 NIR 레이저 매개 PTT 효과로 인해 다수의 MCF-7/ADR 세포가 적색 형광으로 변경되었다. 마지막으로, MCF-7/ADR 세포에 처리된 ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체를 근적외선 레이저 조사에 노출시켰을 때, 강화된 PTT 및 PDT 효과를 통한 시너지 치료 효능으로 대부분의 MCF-7/세포가 사멸되었다.

[0183] 결론적으로, 본 실험들을 통해 열 반응성 rGO 나노복합체를 제조하고 MDR 유방암 세포에 대한 PTT와 PDT의 결합 치료 효능을 평가하였다. 다용도의 나노크기 담체를 제조하기 위해 열 반응성 PNIPAM-AAc가 라디칼 중합을 통해 GO 나노시트에 직접 도입됨으로써 우수한 LCST를 제공할 수 있음을 확인하였다. rGO-PNIPAM-AAc 말단에 NH_2 -PEG-FA를 접합시킴으로써 rGO-PNIPAM 나노복합체는 수용액에서 나노 규모의 분산을 향상시키고 MDR 유방암 세포에 대한 표적화 능력을 보여주었다. 광치료 효능을 향상시키기 위해 ICG 분자는 소수성 상호작용을 통해 rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체에 캡슐화되어 808 nm NIR 레이저 조사를 통해 풍부한 ROS 생성 및 국소적인 온도 상승을 발생시킬 수 있음을 확인하였다. ICG@rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체는 유방암 세포에 대한 엽산 수용체 매개 세포내이입을 통해 세포 흡수를 나타냈으며, 또한 시너지 PTT 및 PDT 효과에 의해 MCF-7/ADR 세포의 치료 효능을 향상시켰다.

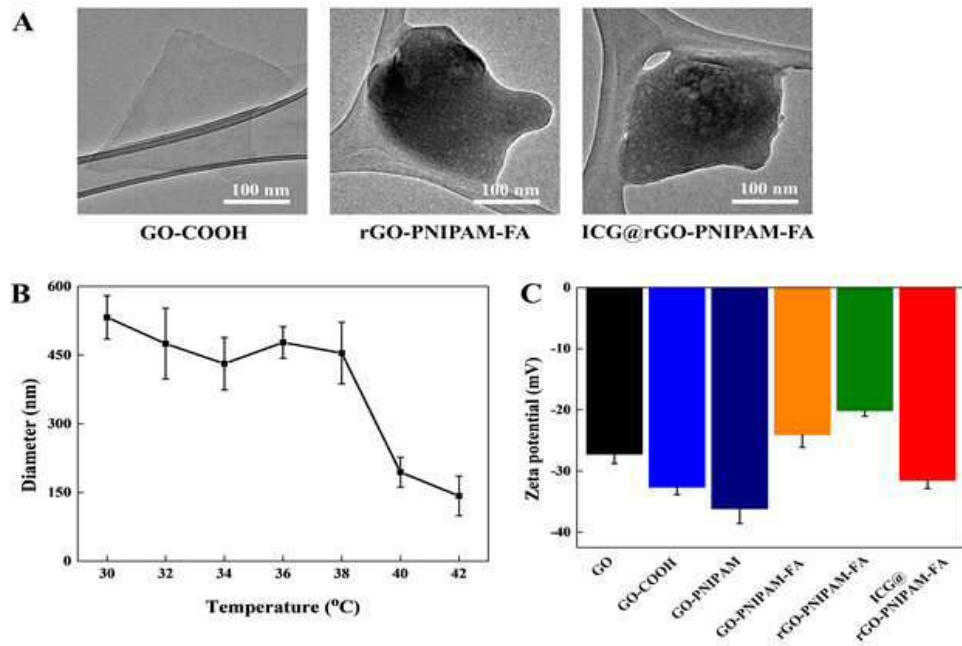
[0184] 따라서 본 발명의 rGO-PNIPAM-AAc-FA 나노복합체는 광열 및 광역학의 복합 치료 효과를 통해 MDR 암 치료를 위한 다기능 담체로 사용될 수 있다.

도면

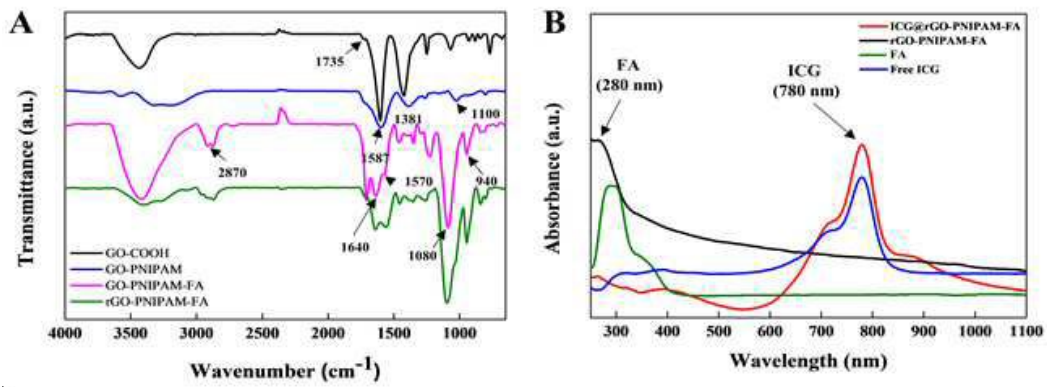
도면1



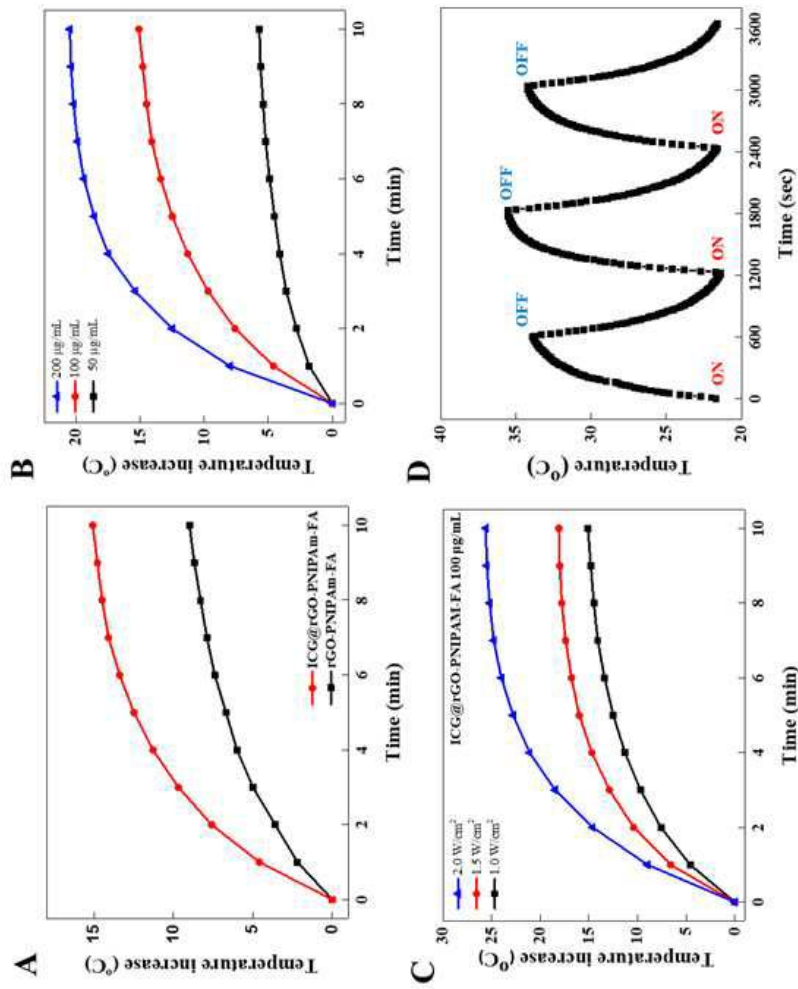
도면2



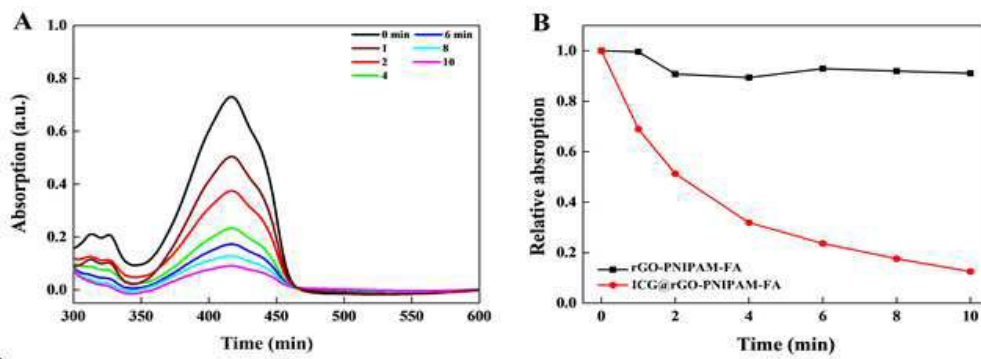
도면3



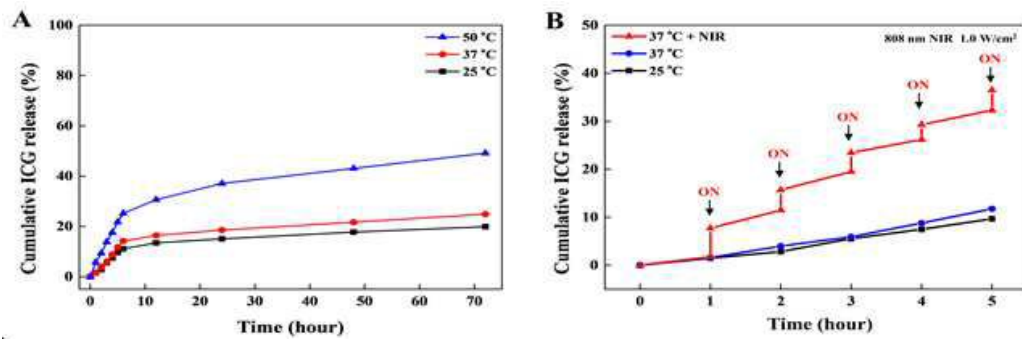
도면4



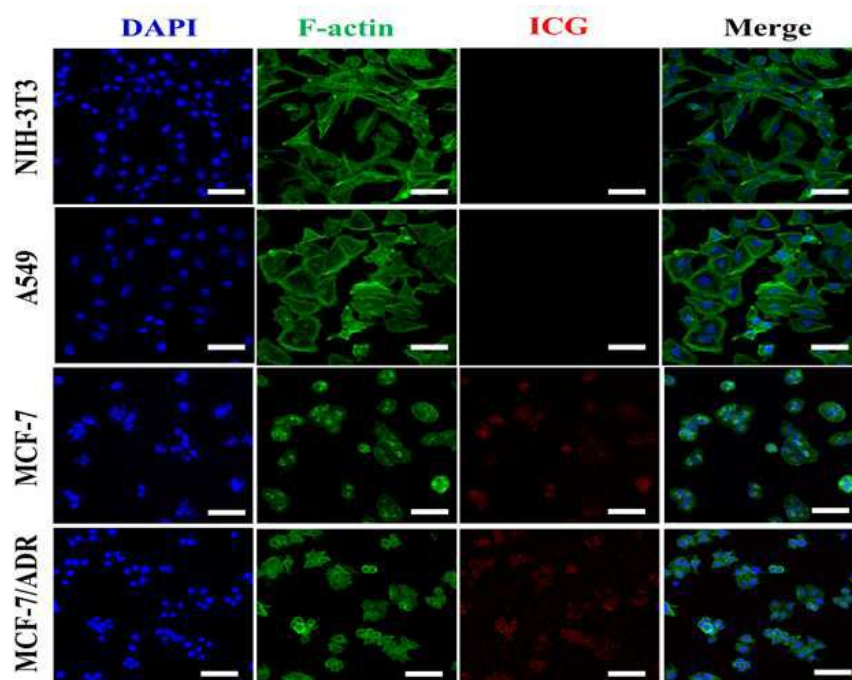
도면5



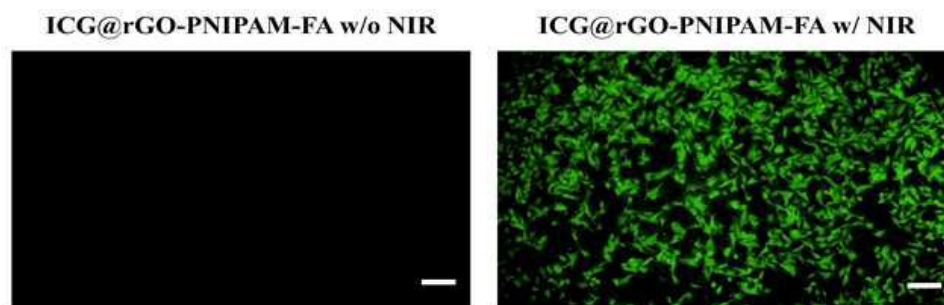
도면6



도면7



도면8



도면9

