(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2024 년 7 월 4 일 (04.07.2024)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2024/144164 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 33/44 (2006.01) *A61P 39/00* (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2023/021501

(22) 국제출원일: 2023 년 12 월 22 일 (22.12.2023)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2022-0190923 2022 년 12 월 30 일 (30.12.2022) KR

(71) 출원인: 서울대학교 산학협력단 (**SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R & DB FOUNDATION**) [KR/KR]; 08826 서울특별시 관악구 관악로 1, Seoul (KR). 그래핀스퀘어케미칼 주식회사 (**GRAPHENE SQUARE CHEMICAL INC.**) [KR/KR]; 37673 경상북도 포항시 남구 청암로 87, 524호, Gyeongsangbuk-do (KR).

(72) 발명자: 홍병희 (**HONG, Byung Hee**); 16420 경기도 수원시 장안구 화산로 85, 120동 1503호, Gyeonggi-do (KR). 양승희 (**YANG, Seung Hee**); 04593 서울특별시 중구 동호로10길 30, 114동 1503호, Seoul (KR). 박종보 (**PARK, Jong Bo**); 08539 서울특별시 금천구 시흥대로 150길 21-58, 604호, Seoul (KR).

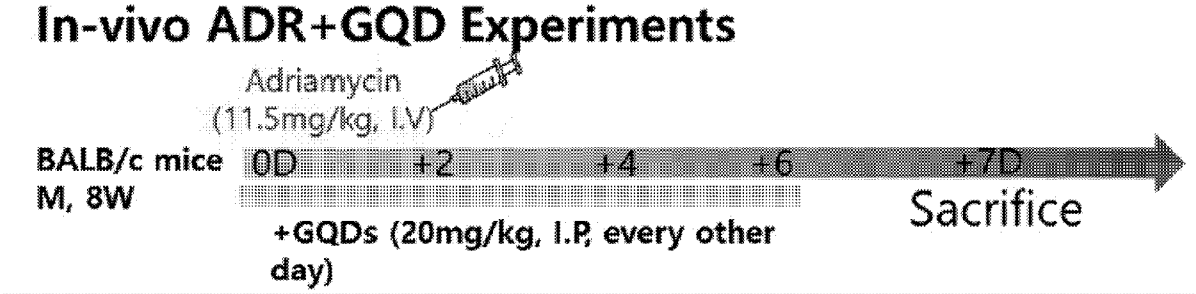
(74) 대리인: 이명진 (**LEE, Myoung-Jin**); 06158 서울특별시 강남구 테헤란로 445, 13층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,

WO 2024/144164 A1

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING GRAPHENE QUANTUM DOTS AS ACTIVE INGREDIENT FOR PREVENTION OR TREATMENT OF CHEMOTHERAPY-INDUCED NEPHROTOXICITY

(54) 발명의 명칭: 그래핀 양자점을 유효성분으로 포함하는 항암제-유도 신독성 예방 또는 치료용 약학적 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition containing graphene nanoparticles as an active ingredient for prevention or treatment of chemotherapy-induced nephrotoxicity. The composition of the present invention was found to inhibit and alleviate renal fibrosis, reduce inflammatory effects, and restore renal functions in a chemotherapy-induced nephrotoxicity model, thus demonstrating therapeutic effects against nephrotoxicity. Additionally, the administration of the composition according to the present invention increases the viability of glomerular cells and shows effects on the restoration of structure and function of mitochondria, and thus the composition is expected to be advantageously used as a prophylactic or therapeutic agent for diseases related to chemotherapy-induced nephrotoxicity.

(57) 요약서: 본 발명은 그래핀 나노입자를 유효성분으로 포함하는 항암제에 의해 유발되는 신장 독성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 조성물은 항암제에 의해 유도된 신장 독성 모델에서 신장의 섬유화를 억제 및 개선하고, 염증 효과를 감소시켰으며, 신장 기능을 회복시킴에 따라 신장 독성 치료 효과를 나타내는 것으로 확인되었다. 또한, 본 발명에 따른 조성물 투여에 의해 사구체 세포 생존력이 증가하고, 미토콘드리아의 구조 및 기능 회복 효과가 나타나 항암제에 의해 유도된 신장 독선 관련 질환의 예방 또는 치료제로 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

[다음 쪽 계속]

SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 그래핀 양자점을 유효성분으로 포함하는 항암제-유도 신독성 예방 또는 치료용 약학적 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 그래핀 양자점을 유효성분으로 포함하는 항암제에 의해 유발되는 신장 독성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[2] 본 출원은 2022년 12월 30일에 출원된 한국특허출원 제10-2022-0190923호에 기초한 우선권을 주장하며, 해당 출원의 명세서 및 도면에 개시된 모든 내용은 본 출원에 원용된다.

배경기술

[3] 암 (cancer) 또는 악성 종양 (malignant tumor)은 현대의 대표적인 난치성 질환 중 하나로 전 세계적으로 매년 환자가 증가하고 있고 한국인에게도 단일 질환으로는 가장 높은 사망률을 나타내며 사회적 경제적 부담을 유발하는 질환이다. 현재 암을 치료하는 방법으로 수술, 방사선 치료, 유전자 치료 등 여러 방법들이 사용되고 있으나, 가장 많이 사용되고 있는 치료방법 중의 하나가 항암제를 투여하는 화학요법 (chemotherapy)이다.

[4] 항암 화학요법은 전신 치료로, 대부분 주사나 경구로 항암제를 투여하면 혈류를 따라 전신에 퍼진다. 그러므로 국소적인 효과보다는 전신에 퍼져있는 미세전이 (micometastasis)에 작용하는 치료이다. 따라서 전신적인 부작용이 많으며 수술이나 방사선 치료에 비해서 그 정도가 매우 심한 편이다. 정상세포와 암세포 간의 약물에 대한 감수성 차이를 이용하여 항암제가 암세포에 대해 선택적으로 작용하도록 하는 것이 화학요법이나 대부분의 항암제가 정상세포와 암세포를 구별하지 못하여 용량 제한적 특성 (dose-limiting toxicity)을 나타내는데 그 문제점이 있다.

[5] 신장은 외인성 독성 물질과 그로 인한 독성 대사체를 흡수-무독화-배설 과정을 통해 체외로 배출시킴으로써 체내의 항상성을 유지하는 데 기여하는 매우 중요한 기관이다. 따라서 신장은 항상 독성 물질에 노출되어 있으므로 약물이나 산화적 스트레스 등에 의한 독성이 발생하기 쉽다 (Ichimura et al., 2008; Rached et al., 2008; Sieber et al., 2009; Ferguson et al., 2008).

[6] 신장 독성을 일으키는 신장 독성 물질은 매우 다양하고, 신장 독성을 일으키는 것으로 알려진 대표적인 물질은 다양한 질환에 사용되는 약물 (drug)이다. 예를 들어, 해열 진통 소염제, 항생제, 카드뮴, 납, 수은, 크롬 등의 중금속 및 무기·유기 중금속 화합물을 포함한 기타 화합물, 또는 오카라톡신, 시트리닌과 같은 곰팡이 독소 등이 있으나, 그 중 가장 강력한 물질은 항암제이다.

[7] 한편, 탄소 기반 나노물질 (Carbon-based nanomaterials, CN)은 생물 감지, 조직공학, 영상, 진단, 약물 전달, 및 암 치료에 널리 사용되는 것으로, 그 중 그래핀 양

자점 (Graphene quantum dots, GQD)은 생체 적합성, 나노크기 규모, 안정적인 형광, 수용성, 낮은 세포독성 등으로 염증 및 산화적 스트레스의 잠재적 치료제로 부상했다. GQD는 α-syn의 피브릴화를 방지하고 신경퇴행성 만성 조건에서 신경세포의 죽음과 시냅스 손실을 구제하는 것으로 아려져 있고, GQD를 이용한 약물 전달 시스템도 개발되는 등 다양한 연구가 진행되고 있다.

[8] 그러나, 이러한 지속적인 연구에도 불구하고 그래핀 양자점을 이용한 항암제로 인해 유발되는 신장 독성 질환 치료제는 아직까지 보고된 바가 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[9] 본 발명의 하나의 목적은 그래핀 양자점 (graphene quantum dot; GQD)을 유효성분으로 포함하는 신장 독성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[10] 본 발명의 다른 목적은 그래핀 양자점 (graphene quantum dot; GQD)을 유효성분으로 포함하는 항암제 부작용 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[11] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물, 및 설명서를 포함하는 항암제 부작용 예방 또는 치료용 키트를 제공하는 것이다.

[12]

[13] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

[14] 본 발명은 그래핀 양자점 (graphene quantum dot; GQD)을 유효성분으로 포함하는 신장 독성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[15] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 항암제에 의해 유도된 신장 독성 질환 환자군에게 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[16] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 항암제는 독소루비신 (doxorubicin), 아미노글리코사이드계 (aminoglycoside) 항생제, 시클로포린 A (cycloporine A), 암포테리신 B (amphotericin B), 및 시스플라티늄 (cisplatinum)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[17] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 하기 중 어느 하나 이상의 활성을 나타낼 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.:

[18] 신장의 항염증, 및 항섬유화 효과;

[19] 신장 구조 및 기능 회복;

[20] 신장 세포의 생존력 증가; 및

[21] 미토콘드리아 기능 및 구조 개선.

[22] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 GQD는 시험관에서 (in vitro) 전체 조성물을 기준으로 0 초과 0.5 μg/ml 이하로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[23] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 GQD는 생체 내 (in vivo) 15 내지 30 mg/kg으로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[24] 본 발명은 그래핀 양자점 (graphene quantum dot; GQD)을 유효성분으로 포함하는 항암제 부작용 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[25] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 항암제 부작용은 신장 독성일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[26] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 항암제와 병용 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[27] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 항암제와 혼합된 혼합제 형태일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[28] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 항암제와 각각 제제화되어 동시에, 별도로, 또는 순차적으로 투여되는 형태일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[29] 본 발명은 상기 조성물, 및 설명서를 포함하는 항암제 부작용 예방 또는 치료용 키트를 제공한다.

[30]

[31] 또한, 본 발명의 그래핀 양자점 (graphene quantum dot; GQD)을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 신장 독성 질환 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[32] 또한, 본 발명의 그래핀 양자점 (graphene quantum dot; GQD)을 유효성분으로 포함하는 조성물의 신장 독성 질환 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

[33] 또한, 신장 독성 질환 예방 또는 치료용 제제를 제조하기 위한 본 발명의 그래핀 양자점 (graphene quantum dot; GQD)을 유효성분으로 포함하는 조성물의 용도를 제공한다.

[34]

[35] 또한, 본 발명의 그래핀 양자점 (graphene quantum dot; GQD)을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 항암제 부작용 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[36] 또한, 본 발명의 그래핀 양자점 (graphene quantum dot; GQD)을 유효성분으로 포함하는 조성물의 항암제 부작용 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

[37] 또한, 항암제 부작용 예방 또는 치료용 제제를 제조하기 위한 본 발명의 그래핀 양자점 (graphene quantum dot; GQD)을 유효성분으로 포함하는 조성물의 용도를 제공한다.

발명의 효과

[38] 본 발명의 조성물은 항암제에 의해 유도된 신장 독성 모델에서 신장의 섬유화를 억제 및 개선하고, 염증 효과를 감소시켰으며, 신장 기능을 회복시킴에 따라 신장 독성 치료 효과를 나타내는 것으로 확인되었다. 또한, 본 발명에 따른 조성물 투여에 의해 사구체 세포 생존력이 증가하고, 미토콘드리아의 구조 및 기능 회복 효과가 나타나 항암제에 의해 유도된 신장 독선 관련 질환의 예방 또는 치료제로 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[39] 도 1은 생체 내 ADR+GQD 동물 실험 모델의 개략도를 나타낸 그림이다.

[40] 도 2a는 ADR+GQD 모델에서의 체중, BUN, 크레아티닌 및 uPro/Cre 비율을 나타낸 그래프이다.

[41] 도 2b 및 도 2c은 ADR+GQD 생쥐의 신장 단면의 사구체 손상, F4/80 발현, MT, 및 Sirius red 염색 결과를 나타낸 사진 및 이를 정량화한 그래프이다.

[42] 도 2d ADR+GQD 모델에서의 CD3+CD4+CD25+ 신장 T세포 및 CD11b +Gr1+CD206+ 신장 대식세포 (KMs)에 대한 대표 유세포 분석 결과를 나타내는 그림이다.

[43] 도 2e는 신장 손상 (Kim-1, ICAM-1, TRPC5), 세포자살 조절인자 (Bax-2, BCL-2), 족세포 손상 (KLF15, WT-1, ZO-1), 및 신장 섬유증 (Col1α1, α-SMA, FN)에 대한 웨스턴 블롯 실험 결과를 정량화한 그래프이다.

[44] 도 2f 및 도 2g는 ADR+GQD 마우스에서 NGAL, TRPC5, 및 8-OHdG에 대한 면역조직화학염색 분석 결과를 나타낸 사진 및 이를 정량화한 그래프이다.

[45] 도 3a 내지 도 3c는 플랫폼별 3D PCA 및 차등발현유전자 (DEG)의 마이크로어레이 분석 결과를 나타낸 3D 이미지 및 그래프이다.

[46] 도 3d 내지 도 3f는 mRNA-seq 분석에 따른 항염 반응, 족세포 동적변화 (podocyte dynamic), 세포외 기질 (ECM), 아폽토시스 과정 (apoptotic process), 산화 스트레스 (oxidative stress), 미토콘드리아 호흡 (mitochondrial respiration), 및 미토콘드리아 기능 장애 (mitochondrial dysfunction) 관련 유전자의 증감 여부를 나타내는 그래프이다.

[47] 도 3g는 전체 유전자 중 미토콘드리아 관련 유전자군의 증감 여부를 나타내는 그래프이다.

[48] 도 3h 및 도 3i는 GSEA 분석 결과 미토콘드리아 기능 호전 관련 유전자의 증감 여부를 나타내는 그래프이다.

[49] 도 3j는 네트워크 분석 (network analysis) 결과 특정 유전자군의 발현에 대한 각 유전자군간의 상호적인 영향을 나타내는 도면이다.

[50] 도 4a 및 도 4b는 아드리아마이신 (2 ng/mL)과 GQD (0.25, 및 0.5 ng/mL)의 두 가지 다른 투여량을 가진 인간 족세포에서 팔로이딘 (Phalloidin), ZO-1, WT-1 KLF-15의 면역 형광 이미징 (IF) 분석 결과를 나타낸 사진이다.

[51] 도 5는 인간 족세포의 알부민-로다민 확산을 나타낸 상대 형광 모식도 및 mRNA 프로필을 나타낸 그래프이다.

[52] 도 6a 및 도 6b는 산화 스트레스 하에서 세포 주기 프로파일 및 사전 세포자멸사 비율을 정량화한 그래프이다.

[53] 도 7a 및 도 7b는 TGF-β 및 H_2O_2 유도 후 살아있는 세포 및 죽은 세포의 대표적인 이미지 및 정량화한 그래프이다.

[54] 도 8a는 스크래치 분석 결과 GQD에 의한 세포 이동 및 증식 증가 효과를 나타내는 이미지이고, 도 8b는 보충 실험 결과를 나타내는 이미지로 도 8a와 상응하는 결과를 나타낸다.

[55] 도 8c는 노화 염색 및 베타-갈락토시다아제 단백질 발현 분석 결과, GQD에 의한 감소 효과를 나타내는 그래프이다.

[56] 도 9a 및 도 9b는 산화 스트레스 조건 하에서의 GQD의 항산화 효과를 나타내는 그래프이다.

[57] 도 10은 산화 스트레스 조건 하에서의 GQD의 사이토카인 억제 효과를 나타내는 그래프이다.

[58] 도 11a 및 도 11b는 GQD에 의한 미토콘드리아 기능 회복 효과를 나타내는 사진 및 그래프이다.

[59] 도 12a 및 도 12b는 화산 플롯 분석 결과 ADR 모델에서 중요한 단백질의 종류를 나타내는 그래프이다.

[60] 도 13a 및 도 13b는 GQD에 의한 세포내 칼슘 투과성 회복 효과를 나타내는 사진 및 그래프이다.

[61] 도 14 내지 도 16은 GQD에 의한 미토콘드리아 대사 활성 효과를 나타내는 그래프 및 이미지이다.

[62] 도 17a 및 도 17b는 GQD에 의한 미토콘드리아 구조 회복 효과를 나타내는 사진이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[63] 본 발명은 그래핀 양자점 (graphene quantum dot; GQD)을 유효성분으로 포함하는 신장 독성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[64] 탄소 원자들로 구성된 저차원 나노물질로는 풀러렌 (fullerene), 탄소나노튜브 (carbon nanotube), 그래핀 (graphene) 및 흑연(graphite) 등이 존재한다. 탄소 원자들이 6각형 모양의 배열을 이루면서 공 모양이 되면 0차원 구조인 풀러렌, 1차원적으로 말리면 탄소나노튜브, 2차원 상으로 원자 한 층으로 이루어지면 그래핀, 3차원으로 쌓이면 흑연으로 구분될 수 있다.

[65] 이 중, 그래핀은 구조적 및 화학적으로 매우 안정할 뿐만 아니라, 한 층의 원자 두께를 가지면서 상대적으로 표면 결함이 적은 구조적 특성으로 인하여 탁월한 전도성을 나타내는 특징을 가진다. 또한, 그래핀은 실리콘보다 100 배 빠르게 전

자를 이동시키고, 이론적으로는 구리보다 약 100 배 정도 많은 전류를 흐르게 할 수 있다.

[66] 한편, 양자점 (Quntum Dot)은 화학 공정을 통해 만드는 나노미터 크기의 반도체 결정체로, 주로 초미세 반도체, 질병진단 시약, 디스플레이 등에 활용된다. 현재 양자점에 대한 연구는 주로 카드뮴이나 납과 같은 독성이 있는 중금속으로 만들어진 양자점이 주를 이루기 때문에, 중금속 양자점은 독성이 있어 체내에 직접 투여되는 물질에 적용하는데 한계가 존재한다. 따라서, 양자점이 시험관 내 (in vitro), 및/또는 생체 내 (in vivo)상에서 얼마의 용량으로 얼마의 효과를 나타내는지가 필수적일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[67] 본 발명에서 사용되는 용어 "그래핀"은 복수개의 탄소 원자들이 서로 공유 결합으로 연결되어 폴리시클릭 방향족 분자를 형성한 것을 의미하는 것으로서, 상기 공유 결합으로 연결된 탄소 원자들은 기본 반복 단위로서 6원환을 형성하나, 5원환 및/또는 7원환을 더 포함하는 것도 가능하다.

[68] 상기 그래핀의 공급원은 통상적으로 탄소를 공급할 수 있는 성분이라면 그 종류가 제한되지 않으며, 예를 들어 탄소 섬유 (carbon fiber, CF), 나노흑연, 고결정성 탄소나노파이버, 흑연 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[69] 본 발명에서 사용되는 용어 "그래핀 양자점 (graphene quantum dots, GQDs)"은 그래핀의 가장 작은 형태로서, 나노-크기 단편을 가진 그래핀을 의미한다. 구체적으로, 상기 그래핀 양자점은, 적절한 가공을 통해 제조되는, 수 nm 수준의 가로, 세로 및 높이를 갖는 그래핀 입자를 의미하는 것으로, 그래핀을 구성 요소로 하는 반도체 결정체를 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 그래핀 양자점은 탄소 섬유 (carbon fiber) 또는 카본 블랙 (carbon black), 흑연 (graphite), 탄소 나노튜브 (carbon nanotube) 등을 열산화 절단 (thermo-oxidative cutting)하여 획득될 수 있으나, 그 제조방법은 이에 제한되지 않는다.

[70] 그래핀 양자점은 높은 용해성, 낮은 독성, 형광 안전성 등 장점을 고루 갖춰 종래의 양자점의 단점을 보완할 수 있는 대체 물질로 주목받고 있으나 다양한 분야에서 적용하여 사용하기 위해서는 결정성이 높고 결함이 적은 고순도의 그래핀 양자점 (GQD)을 제조해야 하나, 아직까지 이러한 결정성이 높고 결함이 적은 고순도의 그래핀 양자점의 제조가 어려워 이에 대한 연구가 보다 필요한 상황이다.

[71] 기존의 양자점은 카드뮴 등의 중금속으로 이루어져 있어, 체내 투입시 독성을 야기할 수 있다는 문제점이 존재하였으나, 그래핀 양자점은 탄소를 구성성분으로 하여 체내 독성 문제를 해결 할 수 있다. 그러나, 이 경우에도 최대 효과를 나타내는 시험관 내 (in vitro), 및/또는 생체 내 (in vivo)에서의 최소한의 적용 용량이 그래핀 양자점 사용에 중요할 수 있다.

[72] 본 발명의 그래핀 양자점은 고체 또는 액체 형태로 존재할 수 있다. 용매화물은 비수성 용매, 예컨대 에탄올, 이소프로판올, DMSO, 아세트산, 에탄올아민 및 에틸 아세테이트를 포함할 수 있고, 또는 결정질 격자에 혼입되는 용매로서 물을

포함할 수 있다. 물이 결정질 격자 내로 혼입된 용매인 용매화물은 전형적으로 "수화물"로 지칭된다. 본 발명은 이러한 모든 용매화물을 포함한다.

[73] 본 발명에 따른 그래핀 양자점은 생체에 적합하도록 당업계에서 알려진 특정 작용기, 제조 방법, 전 및 후처리 방법 등이 사용될 수 있고, 예를 들어, 그래핀 양자점에 낮은 함량의 산소가 함유되도록 친수화 처리될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기의 방법으로 본 발명에 따른 그래핀 양자점은 유해 화학물질 사용 없이 제조될 수 있고, 결정성이 높으며, 결함이 적은 고품질을 특징으로 하므로 생체 적합성이 우수하므로, 특히 적은 용량으로도 생체 내 및/또는 외에서 우수한 신장 절제에 의한 신장 손상으로 유발되는 고혈압 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있다.

[74] 본 발명에서, 그래핀 양자점의 두께, 직경, 높이는 0 초과 100 nm 이내일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[75] 또한, 예를 들어, 그래핀 양자점은 평균 직경이 1 내지 20 nm, 1 내지 18 nm, 1 내지 16 nm, 1 내지 14 nm, 1 내지 12 nm, 1 내지 10 nm, 1 내지 8 nm, 1 내지 6 nm, 1 내지 4 nm, 1 내지 2 nm, 2 내지 19 nm, 2 내지 17 nm, 2 내지 15 nm, 2 내지 13 nm, 2 내지 11 nm, 2 내지 9 nm, 2 내지 7 nm, 2 내지 5 nm, 2 내지 3 nm, 3 내지 18 nm, 3 내지 16 nm, 3 내지 14 nm, 3 내지 12 nm, 3 내지 11 nm, 3 내지 9 nm, 3 내지 7 nm, 3 내지 5 nm, 3 내지 4 nm, 4 내지 11 nm, 4 내지 9 nm, 4 내지 7 nm, 4 내지 5 nm, 5 내지 10 nm, 5 내지 8 nm, 5 내지 6 nm, 6 내지 10 nm, 6 내지 8 nm, 6 내지 7.8 nm, 6 내지 7.5 nm, 6 내지 7.3 nm, 6.3 내지 7.3 nm, 6.5 내지 7.3 nm, 6.7 내지 7.3 nm, 6.8 내지 7.3 nm, 또는 6.76 내지 7.30 nm일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[76] 또한, 예를 들어, 그래핀 양자점은 평균 직경이 15 내지 45 nm, 15 내지 27 nm, 25 내지 35 nm, 35 내지 45 nm 또는 25 내지 45 nm일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[77] 또한, 예를 들어, 그래핀 양자점은 두께가 5 내지 12 nm, 5 내지 9 nm, 또는 5 내지 7 nm, 3 내지 9 nm, 3 내지 7 nm일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[78] 또한, 예를 들어, 그래핀 양자점은 평균 직경이 1 내지 5 nm, 두께가 0.5 내지 2.5 nm 또는 0.5 내지 3 nm일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[79] 또한, 예를 들어, 그래핀 양자점은 평균 높이가 0.5 내지 2.5 nm이고, 평균 직경이 1 내지 5 nm, 1 내지 10 nm, 1 내지 15 nm, 또는 1 내지 20 nm 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[80] 또한, 예를 들어, 그래핀 양자점은 평균 직경이 15 nm 이상이고 평균 높이가 5 nm 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[81] 또한, 예를 들어, 그래핀 양자점은 평균 직경이 약 0.5 내지 약 10 nm 이며 평균 높이가 약 0.1 내지 약 3 nm일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[82] 또한, 예를 들어, 그래핀 양자점은 평균 직경이 약 0.5 내지 약 10 nm, 약 0.7 내지 약 7 nm, 약 0.8 내지 약 6 nm 또는 약 1 내지 약 5 nm 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[83] 또한, 예를 들어, 그래핀 양자점은 평균 높이가 약 0.1 내지 약 3 nm, 약 0.2 내지 약 3 nm, 약 0.3 내지 약 3 nm, 약 0.5 내지 약 3 nm 또는 약 0.5 내지 약 2.5 nm 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[84] 또한, 예를 들어, 그래핀 양자점은 12 nm 이하의 소정의 높이를 갖고 약 15 내지 50 nm의 평균 직경을 갖는 판상형의 입자를 의미할 수 있다. 예를 들어, 평균 직경은 15 내지 45 nm, 15 내지 27 nm, 25 내지 35 nm, 25 내지 45 nm, 또는 35 내지 45 nm일 수 있고, 높이는 5 내지 12 nm, 3 내지 9 nm, 3 내지 7 nm, 5 내지 9 nm, 또는 5 내지 7 nm일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[85] 또한, 예를 들어, 그래핀 양자점은 평균 높이 0.5 내지 2.5 nm 및 평균 직경 1 내지 20 nm를 갖는 입자일 수 있다. 예컨대, 상기 그래핀 양자점은 높이가 0.5 내지 2 nm, 0.5 내지 1.5 nm, 0.5 내지 1 nm, 1 내지 2.5 nm, 1 내지 2 nm, 1 내지 1.5 nm, 1.5 내지 2.5 nm, 1.5 내지 2 nm 또는 2 내지 2.5 nm일 수 있으며, 평균 직경이 1 내지 20 nm, 1 내지 18 nm, 1 내지 16 nm, 1 내지 14 nm, 1 내지 12 nm, 1 내지 10 nm, 1 내지 9 nm, 1 내지 8 nm, 1 내지 7 nm, 1 내지 6 nm, 1 내지 5nm, 1 내지 4 nm, 1 내지 3 nm, 1 내지 2 nm, 2 내지 15 nm, 2 내지 12 nm, 2 내지 10 nm, 2 내지 9 nm, 2 내지 8 nm, 2 내지 7 nm, 2 내지 6 nm, 2 내지 5 nm, 2 내지 4 nm, 2 내지 3 nm, 3 내지 5 nm, 3 내지 4 nm 또는 4 내지 5 nm일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[86]

[87] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 항암제에 의해 유도된 신장 독성 질환 환자군에게 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[88] 또한, 본 발명의 환자군에는 조영제에 의해 유도된 신장 독성 질환 환자군일 수 있고, 염증성 신독성 환자군이 더 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[89] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 항암제는 독소루비신 (doxorubicin), 아미노글리코사이드계 (aminoglycoside) 항생제, 시클로포린 A (cycloporine A), 암포테리신 B (amphotericin B), 및 시스플라티늄 (cisplatinum)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 신장 독성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[90] 또한, 본 발명의 항암제는 항종양 항생제 (antitumor antibiotics), 위상이성질화효소 억제제 (topoisomerase inhibitor), 플래티넘계 (platinum) 항암제, 탁산계 (taxane) 항암제, 및 수용체 티로신 키나아제 억제제 (receptor tyrosine kinase inhibitor)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 항암제를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 임상, 약학, 및 생의학적으로 사용 가능한 모든 항암제가 포함될 수 있다.

[91] 본 발명에서, 항종양 항생제 (antitumor antibiotics)는 액티노마이신 D (actinomycin D), 블레오마이신 설페이트 (bleomycin sulfate), 다우노마이신 (daunomycin), 다우노루비신 (daunorubicin), 독소루비신 (doxorubicin), 이다루비신 (idarubicin), 미토마이신 (mitomycin), 미토마이신-C (mitomycin-C), 및 미트라

마이신 (mitramycin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[92] 본 발명에서, 위상이성질화효소 억제제 (topoisomerase inhibitor)는 이리노테칸 (irinotecan), 캠프토테신 (camptothecin), 노보비오신 (novobiocin), 에피루비신 (epirubicin), 닥티노마이신 (dactinomycin), 암사크린 (amsacrine), 테니포시드 (teniposide), 및 에토포시드 (etoposide)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[93] 본 발명에서, 플래티넘계 (platinum) 항암제는 시스플라틴 (cisplatin), 카르보플라틴 (carboplatin), 및 옥살리플라틴 (oxaliplatin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[94] 본 발명에서, 탁산계 (taxane) 항암제는 파클리탁셀 (paclitaxel) 또는 도세탁셀 (docetaxel) 중 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[95] 본 발명에서, 상기 티로신 키나아제 억제제 (receptor tyrosine kinase inhibitor)는 제피티닙 (gefitinib), 엘로티닙 (erlotinib), 및 아파티닙 (afatinib) 으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[96] 이외에도, 신장 독성을 일으키는 것으로 알려진 화학물질에는 펜아세틴, 아스피린, 인도메타신 등의 비스테로이드성 해열 진통 소염제 퓨로마이신, 다우노마이신, 시클로포스파미드, 페니실라민, 아드리아마이신, 씨스플라틴 등의 항암제, 면역억제제, 아미카신, 겐타마이신, 카나마이신, 네오마이신, 시소마이신, 스트렙토마이신, 토브라마이신 등의 아미노글라이코사이드계 항생제, 세팔로스포린계 항생제, 이미페넴, 멜로페넴 등 카바페넴계 항생제, 카드뮴, 납, 수은, 크롬 등의 중금속 및 무기·유기중금속 화합물, 클로로포름, D-세린, 설폰아미드, 2-브로모에틸렌, 하이드로브로마이드 등의 화합물 또는 오카라톡신, 시트리닌과 같은 곰팡이 독소 등이 있으며 대부분이 화학물질 또는 의약품에 있어서 신장 독성을 일으키는 정확한 기전이 밝혀지지 않은 경우가 다수일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[97] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 하기 중 어느 하나 이상의 활성을 나타낼 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다:

[98] 신장의 항염증, 및 항섬유화 효과;

[99] 신장 구조 및 기능 회복;

[100] 신장 세포의 생존력 증가; 및

[101] 미토콘드리아 기능 및 구조 개선.

[102] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 GQD는 시험관에서 (in vitro) 전체 조성물을 기준으로 0 초과 0.5 μg/ml 이하로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[103] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은, 시험관에서 (in vitro) 실험을 위해 사용될 경우에는, 전체 조성물을 기준으로 0 초과 0.5 μg/ml 이하의 GQD를 포

함할 수 있고, 바람직하게는 0.5 μg/ml의 GQD를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[104] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 GQD는 생체 내 (in vivo) 15 내지 30 mg/kg으로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[105] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 생체 내 (in vivo)에 투여되는 경우에는 대상체의 몸무게를 기준으로 하여 15 내지 30 mg/kg의 GQD를 포함할 수 있고, 바람직하게는 20 mg/kg의 GQD를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[106]

[107] 본 발명은 그래핀 양자점 (graphene quantum dot; GQD)을 유효성분으로 포함하는 항암제 부작용 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[108] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 항암제 부작용은 신장 독성일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[109] 본 발명에서 항암제 부작용 "치료"는 완화, 및/또는 개선을 포함하는 것으로, 항암제 부작용이 치료되는 것 외에도 증상의 정도가 소폭으로 완화 및/또는 개선되거나, 증상의 정도에는 차도가 없으나 실제적으로 생체 내에서 개선되거나, 증상에 따른 고통이 경감되는 등의 모든 형태를 포함할 수 있다.

[110] 특히, 본 발명에서 "신장 독성"은 그 자체의 기능 저하뿐만 아니라 다른 전신적 증상과 함께 나타나는 것이 일반적이므로, 신장 독성으로 인하여 나타날 수 있는 생체 내외의 다른 증상들의 완화, 및/또는 개선 효과를 포함할 수 있으며, 이로 인한 고통의 경감을 포함할 수 있다.

[111] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 항암제와 병용 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[112] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 항암제와 혼합된 혼합제 형태일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[113] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 항암제와 각각 제제화되어 동시에, 별도로, 또는 순차적으로 투여되는 형태일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[114] 본 발명에서 "병용 투여"는 치료 요법의 개별 성분들을 동시, 순차적으로, 또는 개별적으로 투여하는 방식을 모두 포함할 수 있다. 2 이상의 약물을 동시에 또는 순차적으로 투여하거나, 또는 일정한 또는 정해지지 않은 간격으로 교대로 투여하는 등의 방법으로 병용 치료 효과를 얻는 것으로, 병용 치료법은 이에 한정되지 아니하지만, 예를 들어 반응 정도, 반응 속도, 질병 진행까지의 기간 또는 생존 기간을 통해 측정된 효능이 병용 치료법의 성분 중 하나 또는 나머지를 통상적인 용량으로 투약하여 얻을 수 있는 효능보다 치료학적으로 우수하면서 상승효과를 제공할 수 있는 것으로 정의될 수 있다. 예컨대, 본 발명의 조성물은 항암제와 병용 투여됨으로써 항암제에 유발되는 부작용, 특히, 신장 독성 발생 효과를 감

소시키거나, 발생되는 신장 독성 효과를 완화시키거나, 또는 치료할 수 있다. 상기 투여 (처리)는 주사, 복용, 흡입, 분무, 및 도포 등을 모두 포함하는 개념이다.

[115] 따라서, 본 발명에서 본 발명에 따른 조성물은 항암제와 동시에 투여되거나, 미시에 투여되거나, 또는 순차적 투여되는 것을 모두 포함하는 의미일 수 있다. 예를 들어, 미시에 투여되는 경우, 항암제의 종류 또는 조성물에 포함되는 기타 다른 물질의 특성에 따라서 일반적으로 적용되는 시간 차이에 따라 투여되는 경우를 포함한다.

[116] 또한, 상기 약학적 조성물이 순차적 투여를 위한 병용투여용 약학적 조성물인 경우, 항암제 ("제1 성분")가 먼저 투여된 후 본 발명에 따른 조성물 ("제2 성분")이 투여되는 것일 수 있으며, 그 반대 순서도 가능하다. 이는 항암제 또는 조성물 내의 기타 물질의 종류, 환자의 상태, 성별, 또는 나이 등에 따라 적절하게 적용되는 것이다.

[117] 또한, 경우에 따라 본 발명의 조성물 내의 그래핀 양자점의 함량은 질환의 증상, 증상의 진행 정도, 환자의 상태 등에 따라서 적절히 조절 가능하며, 예컨대, 전체 조성물 중량을 기준으로 0.0001 내지 99.9 중량%, 또는 0.001 내지 50 중량%일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 함량비는 용매를 제거한 건조량을 기준으로 한 값이다. 또한 상기 1회의 용량을 나누어 부분적으로 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[118] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 그래핀 양자점은 전체 조성물 대비 0.0001 내지 50 mM의 농도로 함유된 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 보다 구체적으로, 본 발명에 따른 그래핀 양자점은 전체 조성물 대비 0.0001 내지 50 mM, 0.0001 내지 40 mM, 0.0001 내지 30 mM, 0.0001 내지 20 mM, 0.0001 내지 10 mM, 0.0001 내지 9 mM, 0.0001 내지 8 mM, 0.0001 내지 7 mM, 0.0001 내지 6 mM, 0.0001 내지 5 mM, 0.0001 내지 4 mM, 0.0001 내지 3 mM, 0.0001 내지 2 mM, 0.0001 내지 1 mM, 0.0005 내지 10 mM, 0.001 내지 10 mM, 0.005 내지 10 mM, 0.01 내지 10 mM, 0.05 내지 10 mM, 0.1 내지 10 mM, 0.5 내지 10 mM, 1 내지 30 mM, 1 내지 20 mM, 1 내지 15 mM, 1 내지 10 mM, 1 내지 9 mM, 1 내지 8 mM, 1 내지 7 mM, 1 내지 6 mM, 또는 1 내지 5 mM의 농도로 상기 조성물 내에 함유된 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[119] 달리 표현하면, 본 발명의 조성물은 이를 필요로 하는 개체에 1회 투여 또는 도포시, 그래핀 양자점이 전체 조성물 (또는 용매) 대비 0.0001 내지 50 mM의 농도로 투여 (도포)되게 하는 함량으로 그래핀 양자점을 포함할 수 있다. 즉, 본 발명에 있어서 상기 그래핀 양자점은 전체 조성물 (또는 용매) 대비 0.0001 내지 50 mM의 농도로 (이를 필요로 하는 개체에) 투여되는 것일 수 있다.

[120] 본 발명에 따른 조성물은 액상제제의 형태일 수 있다. 본 발명의 조성물이 액상제제인 경우, 그래핀 양자점은 전체 액상제제 대비 0.0001 내지 50 mM의 농도로 포함될 수 있다. 또한, 상기 액상제제는 1회 투여 (도포)시 10 μL 내지 20 mL, 10 μL 내지 10 mL, 10 μL 내지 5 mL, 10 μL 내지 1 mL, 10 μL 내지 900 μL, 10 μL 내지

800 μL, 10 μL 내지 700 μL, 10 μL 내지 600 μL, 10 μL 내지 500 μL, 10 μL 내지 400 μL, 10 μL 내지 300 μL, 10 μL 내지 200 μL, 또는 10 μL 내지 100 μL의 용량으로 투여될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[121] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 항암제는 전체 조성물 대비 0.0001 내지 10 (w/v)%의 농도로 함유된 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 보다 구체적으로, 본 발명에 따른 항암제는 전체 조성물 대비 0.0001 내지 10 (w/v)%, 0.0001 내지 5 (w/v)%, 0.0001 내지 3 (w/v)%, 0.0001 내지 2 (w/v)%, 0.0001 내지 1 (w/v)%, 0.0005 내지 5 (w/v)%, 0.0005 내지 4 (w/v)%, 0.0005 내지 3 (w/v)%, 0.0005 내지 2 (w/v)%, 0.0005 내지 1 (w/v)%, 0.001 내지 5 (w/v)%, 0.001 내지 4 (w/v)%, 0.001 내지 3 (w/v)%, 0.001 내지 2 (w/v)%, 0.001 내지 1 (w/v)%, 0.005 내지 5 (w/v)%, 0.005 내지 4 (w/v)%, 0.005 내지 3 (w/v)%, 0.005 내지 2 (w/v)%, 0.01 내지 5 (w/v)%, 0.01 내지 4 (w/v)%, 0.01 내지 3 (w/v)%, 0.01 내지 2 (w/v)%, 0.05 내지 2 (w/v)%, 0.1 내지 2 (w/v)%, 또는 0.1 내지 1 (w/v)%의 농도로 상기 조성물 내에 함유된 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[122] 또는, 본 발명의 조성물은 이를 필요로 하는 개체에 1회 투여 또는 도포시, 항암제가 전체 조성물 (또는 용매) 대비 0.0001 내지 10 (w/v)%의 농도로 투여 (도포)되게 하는 함량으로 항암제를 포함할 수 있다. 즉, 본 발명에 있어서 상기 항암제는 전체 조성물 (또는 용매) 대비 0.0001 내지 10 (w/v)%의 농도로 (이를 필요로 하는 개체에) 투여되는 것일 수 있다.

[123] 상술한 바와 같이, 본 발명에 따른 조성물은 액상제제의 형태일 수 있으며, 본 발명의 조성물이 액상제제인 경우 상기 항암제는 전체 액상제제 대비 0.0001 내지 10 (w/v)%의 농도로 함유된 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 상기 액상제제는 1회 투여 (도포)시 10 μL 내지 20 mL, 10 μL 내지 10 mL, 10 μL 내지 5 mL, 10 μL 내지 1 mL, 10 μL 내지 900 μL, 10 μL 내지 800 μL, 10 μL 내지 700 μL, 10 μL 내지 600 μL, 10 μL 내지 500 μL, 10 μL 내지 400 μL, 10 μL 내지 300 μL, 10 μL 내지 200 μL, 또는 10 μL 내지 100 μL의 용량으로 투여될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[124] 본 발명의 그래핀 양자점 : 항암제 (예를 들어, 아드리아마이신; 독소루비신)은 1 : 0.01 내지 100의 중량비로 병용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 구체적으로, 상기 그래핀 양자점 : 아드리아마이신은 1 : 0.01 내지 100, 1 : 0.01 내지 80, 1 : 0.01 내지 60, 1 : 0.01 내지 50, 1 : 0.01 내지 40, 1 : 0.01 내지 30, 1 : 0.01 내지 20, 1 : 0.01 내지 10, 1 : 1 내지 100, 1 : 1 내지 80, 1 : 1 내지 50, 1 : 1 내지 20, 1 : 1 내지 10, 1 : 10 내지 100, 1 : 10 내지 50, 1 : 10 내지 40, 1 : 10 내지 30, 1 : 20 내지 100, 1 : 20 내지 80, 1 : 20 내지 50, 1 : 20 내지 40, 1 : 30 내지 100, 1 : 30 내지 80, 1 : 30 내지 50, 1 : 30 내지 40, 1 : 35 내지 40, 또는 1 : 37의 중량비로 병용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[125] 또한, 본 발명의 그래핀 양자점 및 항암제를 각각 액상제제의 형태로 병용하는 경우, 각 액상제제를 혼합하여 혼합제제의 형태로 병용처리할 수 있다. 상기 혼

합제제는, 예컨대, 그래핀 양자점이 0.0001 내지 50 mM의 농도로 포함되어 있는 액상제제를 항암제가 0.0001 내지 10 (w/v)%의 농도로 포함되어 있는 액상제제와 혼합하여 제조할 수 있다. 여기서 상기 그래핀 양자점이 포함된 항암제 : 상기 항암제가 포함된 액상제제는 1 : 0.1 내지 10, 1 : 0.1 내지 5, 1 : 0.1 내지 2, 1 : 0.1 내지 1.5, 1 : 0.1 내지 1, 1 : 0.5 내지 5, 1 : 0.5 내지 2, 1 : 0.5 내지 1.5, 또는 1 : 1의 부피비로 혼합될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 상기 혼합제제는 1회 투여 (도포 혹은 처리)시 10 μL 내지 20 mL, 10 μL 내지 10 mL, 10 μL 내지 5 mL, 10 μL 내지 1 mL, 10 μL 내지 900 μL, 10 μL 내지 800 μL, 10 μL 내지 700 μL, 10 μL 내지 500 μL, 10 μL 내지 400 μL, 10 μL 내지 300 μL, 10 μL 내지 200 μL, 또는 10 μL 내지 100 μL의 용량으로 투여될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[126] 전술한 그래핀 양자점 및 항암제의 처리 농도, 처리 용량 등은 본 발명에 따른 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에게 경구 투여 또는 주사제로 투여하는 때에 특히 적합할 수 있다. 그러나, 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 형태는 구체적인 종류로 제한되는 것은 아니며, 당업자는 당업계의 기술상식을 기초로, 약물 처리 경로, 처리 방식, 병용되는 약물의 종류, 대상체의 상태 등을 고려하여 적절한 용량, 농도, 및 혼합비율 등을 선택할 수 있다.

[127]

[128] 또한, 상기 투여는 투여 시간, 투여 용량, 투여 횟수, 투여 방법 등은 당업계에서 일반적으로 적용될 수 있는 임의의 조건에 따라 행해질 수 있다.

[129] 본 발명에 따른 "약학적 조성물"은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 부형제는 예를 들어, 희석제, 결합제, 붕해제, 활택제, 흡착제, 보습제, 필름-코팅 물질, 및 제어방출 첨가제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.

[130] 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 서방형 과립제, 장용과립제, 액제, 점안제, 엘실릭제, 유제, 현탁액제, 주정제, 트로키제, 방향수제, 리모나아데제, 정제, 서방형정제, 장용정제, 설하정, 경질캅셀제, 연질캅셀제, 서방캅셀제, 장용캅셀제, 환제, 틴크제, 연조엑스제, 건조엑스제, 유동엑스제, 주사제, 캡슐제, 관류액, 경고제, 로션제, 파스타제, 분무제, 흡입제, 패취제, 멸균주사용액, 또는에어로졸 등의 외용제 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 외용제는 크림, 젤, 패치, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니멘트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 등의 제형을 가질 수 있다.

[131] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[132] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

[133] 본 발명에 따른 정제, 산제, 과립제, 캡슐제, 환제, 트로키제의 첨가제로 옥수수전분, 감자전분, 밀전분, 유당, 백당, 포도당, 과당, 디-만니톨, 침강탄산칼슘, 합성규산알루미늄, 인산일수소칼슘, 황산칼슘, 염화나트륨, 탄산수소나트륨, 정제라놀린, 미결정셀룰로오스, 덱스트린, 알긴산나트륨, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 카올린, 요소, 콜로이드성실리카겔, 히드록시프로필스타치, 히드록시프로필메칠셀룰로오스 (HPMC) 1928, HPMC 2208, HPMC 2906, HPMC 2910, 프로필렌글리콜, 카제인, 젖산칼슘, 프리모젤 등 부형제; 젤라틴, 아라비아고무, 에탄올, 한천가루, 초산프탈산셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 포도당, 정제수, 카제인나트륨, 글리세린, 스테아린산, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스, 미결정셀룰로오스, 덱스트린, 히드록시셀룰로오스, 히드록시프로필스타치, 히드록시메칠셀룰로오스, 정제쉘락, 전분호, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 폴리비닐알코올, 폴리비닐피롤리돈 등의 결합제가 사용될 수 있으며, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 옥수수전분, 한천가루, 메칠셀룰로오스, 벤토나이트, 히드록시프로필스타치, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 알긴산나트륨, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 구연산칼슘, 라우릴황산나트륨, 무수규산, 1-히드록시프로필셀룰로오스, 덱스트란, 이온교환수지, 초산폴리비닐, 포름알데히드처리 카제인 및 젤라틴, 알긴산, 아밀로오스, 구아르고무 (Guar gum), 중조, 폴리비닐피롤리돈, 인산칼슘, 겔화전분, 아라비아고무, 아밀로펙틴, 펙틴, 폴리인산나트륨, 에칠셀룰로오스, 백당, 규산마그네슘알루미늄, 디-소르비톨액, 경질무수규산 등 붕해제; 스테아린산칼슘, 스테아린산마그네슘, 스테아린산, 수소화식물유 (Hydrogenated vegetable oil), 탈크, 석송자, 카올린, 바셀린, 스테아린산나트륨, 카카오지, 살리실산나트륨, 살리실산마그네슘, 폴리에칠렌글리콜 4000, 폴리에칠렌글리콜 6000, 유동파라핀, 수소첨가대두유 (Lubri wax), 스테아린산알루미늄, 스테아린산아연, 라우릴황산나트륨, 산화마그네슘, 마크로골 (Macrogol), 합성규산알루미늄, 무수규산, 고급지방산, 고급알코올, 실리콘유, 파라핀유, 폴리에칠렌글리콜지방산에테르, 전분, 염화나트륨, 초산나트륨, 올레인산나트륨, dl-로이신, 경질무수규산 등의 활택제가 사용될 수 있다.

[134] 본 발명에 따른 액제의 첨가제로는 물, 묽은 염산, 묽은 황산, 구연산나트륨, 모노스테아린산슈크로스류, 폴리옥시에칠렌소르비톨지방산에스텔류(트윈에스텔), 폴리옥시에칠렌모노알킬에텔류, 라놀린에텔류, 라놀린에스텔류, 초산, 염산, 암모니아수, 탄산암모늄, 수산화칼륨, 수산화나트륨, 프롤아민, 폴리비닐피롤리돈, 에칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨 등이 사용될 수 있다.

[135] 본 발명에 따른 시럽제에는 백당의 용액, 다른 당류 혹은 감미제 등이 사용될 수 있으며, 필요에 따라 방향제, 착색제, 보존제, 안정제, 현탁화제, 유화제, 점조제 등이 사용될 수 있다.

[136] 본 발명에 따른 유제에는 정제수가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 유화제, 보존제, 안정제, 방향제 등이 사용될 수 있다.

[137] 본 발명에 따른 현탁제에는 아카시아, 트라가칸타, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 미결정셀룰로오스, 알긴산나트륨, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, HPMC 1828, HPMC 2906, HPMC 2910 등 현탁화제가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 계면활성제, 보존제, 안정제, 착색제, 방향제가 사용될 수 있다.

[138] 본 발명에 따른 주사제에는 주사용 증류수, 0.9% 염화나트륨 주사액, 링겔주사액, 덱스트로스주사액, 덱스트로스+염화나트륨주사액, 피이지 (PEG), 락테이티드 링겔주사액, 에탄올, 프로필렌글리콜, 비휘발성유-참기름, 면실유, 낙화생유, 콩기름, 옥수수기름, 올레인산에칠, 미리스트산 이소프로필, 안식향산벤젠과 같은 용제; 안식향산나트륨, 살리실산나트륨, 초산나트륨, 요소, 우레탄, 모노에칠아세트아마이드, 부타졸리딘, 프로필렌글리콜, 트윈류, 니정틴산아미드, 헥사민, 디메칠아세트아마이드와 같은 용해보조제; 약산 및 그 염 (초산과 초산나트륨), 약염기 및 그 염 (암모니아 및 초산암모니움), 유기화합물, 단백질, 알부민, 펩톤, 검류와 같은 완충제; 염화나트륨과 같은 등장화제; 중아황산나트륨 ($NaHSO_3$), 이산화탄소가스, 메타중아황산나트륨 ($Na_2S_2O_5$), 아황산나트륨 (Na_2SO_3), 질소가스 (N_2), 에칠렌디아민테트라초산과 같은 안정제; 소디움비설파이드 0.1%, 소디움포름알데히드 설폭실레이트, 치오우레아, 에칠렌디아민테트라초산디나트륨, 아세톤소디움비설파이트와 같은 황산화제; 벤질알코올, 클로로부탄올, 염산프로카인, 포도당, 글루콘산칼슘과 같은 무통화제; 시엠시나트륨, 알긴산나트륨, 트윈 80, 모노스테아린산알루미늄과 같은 현탁화제를 포함할 수 있다.

[139] 본 발명에 따른 좌제에는 카카오지, 라놀린, 위텝솔, 폴리에틸렌글리콜, 글리세로젤라틴, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 스테아린산과 올레인산의 혼합물, 수바날 (Subanal), 면실유, 낙화생유, 야자유, 카카오버터+콜레스테롤, 레시틴, 라네트왁스, 모노스테아린산글리세롤, 트윈 또는 스판, 임하우젠 (Imhausen), 모놀렌 (모노스테아린산프로필렌글리콜), 글리세린, 아뎁스솔리두스 (Adeps solidus), 부티룸 태고-G (Buytyrum Tego-G), 세베스파마 16 (Cebes Pharma 16), 헥사라이드베이스 95, 코토마 (Cotomar), 히드록코테 SP, S-70-XXA, S-70-XX75 (S-70-XX95), 히드록코테 (Hydrokote) 25, 히드록코테 711, 이드로포스탈 (Idropostal), 마사에스트라리움 (Massa estrarium, A, AS, B, C, D, E, I, T), 마사-MF, 마수폴, 마수폴-15, 네오수포스탈-엔, 파라마운드-B, 수포시로 (OSI, OSIX, A, B, C, D, H, L), 좌제기제 IV 타입 (AB, B, A, BC, BBG, E, BGF, C, D, 299), 수포스탈 (N, Es), 웨코비 (W, R, S, M ,Fs), 테제스터 트리글리세라이드 기제 (TG-95, MA, 57)와 같은 기제가 사용될 수 있다.

[140] 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로스 (sucrose) 또는 락토오스

(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.

[141] 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[142] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 예컨대, 본 발명에 따른 조성물은 이를 필요로 하는 개체에 1일 1회 내지 5회, 1회 내지 3회, 1회 내지 2회, 또는 1회 투여될 수 있다. 이 때, 1회 용량은 항암제에 의해 유도된 부작용, 예를 들어, 신장 독성 또는 항암제에 의해 유도될 가능성이 높은 부작용에 취약한 환자의 상태 등에 따라 조절할 수 있다.

[143] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 본 발명이 속하는 기술분야에 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[144] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구 복용, 피하 주사, 복강 투여, 정맥 주사, 근육 주사, 척수 주위 공간 (경막 내) 주사, 설하 투여, 볼점막 투여, 직장 내 삽입, 질 내 삽입, 안구 투여, 귀 투여, 비강 투여, 흡입, 입 또는 코를 통한 분무, 피부 투여, 경피 투여 등에 따라 투여될 수 있고, 바람직하게는 경구 투여일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[145] 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 이를 필요로 하는 개체에 하루 1회 내지 10회, 1회 내지 5회, 1회 내지 3회, 또는 1회 내지 2회 투여될 수 있고, 1일 내지 10일, 1일 내지 5일, 1일 내지 3일, 또는 1일 간격으로 투여될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[146] 본 발명의 약학적 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 질환의 중등도 등의 여러 관련 인자와 함께 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다. 구체적으로, 본 발명에 따른 조성물의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg 당 0.001 내지 150 mg, 바람직하

게는 0.01 내지 100 mg을 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 질환의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[147] 본 발명에서 "개체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐 (mouse), 쥐 (rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류를 의미한다.

[148] 본 발명에서 "투여"란 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다. 본 발명에서 "예방"이란 목적하는 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 그에 따른 대사 이상 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미하며, "개선"이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[149]

[150] 본 발명은 상기 조성물, 및 설명서를 포함하는 항암제 부작용 예방 또는 치료용 키트를 제공한다.

[151] 본 발명에서, 상기 키트는 항암제의 부작용을 예방 또는 치료하기 위해 더 사용될 수 있는 조성물이 포함되는 도구를 의미할 수 있고, 컨테이너 등을 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 컨테이너는 상기 물질을 포장하는 역할을 할 수 있고, 보관 및 고정하는 역할을 할 수도 있다. 상기 컨테이너의 재질은 예컨대, 플라스틱, 유리병 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[152] 본 발명에서, 상기 키트에는 본 발명에 따른 조성물을 포함하는 샘플, 및 이 외에도 상기 조성물의 취급, 보관 등에 통상적으로 필요한 다른 구성 성분, 조성물, 용액, 장치 등이 포함될 수 있으며, 상기의 물질을 적용하는 선후에는 제한이 없고, 각 물질의 적용은 동시에 진행될 수도 있으며, 미시에 진행될 수도 있다.

[153] 또한, 본 발명의 키트는 필요한 경우 조성물을 투여할 수 있는 도구, 재료, 예를 들어, 가위, 핀셋, 붕대, 주사기, 소독약 등이 더 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[154] 또한, 본 발명의 설명서는 본 발명에 따른 조성물의 취급, 보관, 효과, 투여 방법, 및 투여 용량 등에 대한 조건을 구체적으로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[155]

[156] 본 발명의 일 실시예에서 사용된 키트 및 2차 항체는 하기 표에 따른 키트 및 2차 항체가 사용되었으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[157]

[158]

Product & Vendor	Cat.
Reverse Transcription System, Promega	A3500
Picro Sirius Red Stain Kit, Abcam	Ab150681
Phalloidin Alexa Flour 488, Abcam	A12379
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit, BD Biosciences	556547

[159]

[160] 본 발명의 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 "포함" 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다. 본 발명의 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 "약", "실질적으로" 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로 사용되고, 본 발명의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대적인 수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위해 사용된다.

[161] 본 발명의 명세서 전체에서, 마쿠시 형식의 표현에 포함된 "이들의 조합"의 용어는 마쿠시 형식의 표현에 기재된 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 혼합 또는 조합을 의미하는 것으로서, 상기 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 의미한다.

발명의 실시를 위한 형태

[162] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[163]

[164] **[실시예]**

[165] <u>실험방법</u>

[166] <u>신장 기능 평가</u>

[167] 체중, 혈액 및 소변 샘플은 기준일 또는 아드리마이신 주사 후 7일에 수득하였고, 모든 동물은 소변 단백질 및 소변 크레아티닌 (Cr)을 확인하기 위해 예정된 24시간동안 소변을 수집하였다. 소변 단백질/Cr 비율 (mg/mg)은 소변 단백질 농도 (Hitachi Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)와 자동 분석기 (Hitachi Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)에서 측정한 Cr 농도로 나누어 계산하였다. BUN 수준 (mg/dL) 및 Cr 농도 (mg/dL)는 자동 분석기를 사용하여 변형된 Jaffe 반응의 속도를 계산해 측정되었다. 또한, tail-cuff 방법을 사용하여 혈압을 측정하였다 (Kent Scientific Corporation, Torrington, CT, USA).

[168]

[169] <u>면역조직화학 (조직학적 분석)</u>

[170] 신장 조직을 10% 포르말린에 고정하고 밤새 파라핀에 고정해둔 후, 신장의 4 마이크로미터 두께 부분을 탈파라핀화하고 자일렌과 에탄올로 재수화하였다. 그런 다음 항원 회수를 위해 신장 절편을 시트르산나트륨 (구연산나트륨) 완

충액으로 마이크로웨이브 처리하였다. 내인성 퍼옥시다제 (과산화효소) 활성은 메틸알코올의 3% 과산화수소 용액에 의해 차단되고, 1차 항체와 함께 배양되었다 (표 1, Phalloidin (IF), 8-OHdG (IHC) CCN1, β-galactosidase (WB), (R=rat, M=mouse, H=Human)). 제조업체의 지침에 따라 범용 특이적 항체 (Agilent Dako, Santa Clara, California, USA)를 사용하여 1차 항체를 증폭하였다. 메이어의 헤마톡실린 (Mayer's hematoxylin, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)은 세포핵의 대조염색에 사용되었다.

[171] 신장 섬유증 및 사구체 손상은 Masson's trichrome 및 Periodic Acid-Schiff 염색으로 평가되었다. 시리우스 레드 염색은 신장 섬유증에서 콜라겐 축적을 보여주기 위해 사용되었고, Leica 도립 현미경 (Leica Camera, Wetzlar, Germany)을 사용하여 스테인드 슬라이드를 캡처하였다. 그 후, 5~8개의 필드 (배율 x100 및 x200)를 무작위로 선택한 후 LAS-4000 프로그램 (Leica Camera, Wetzlar, Germany)을 사용하여 양성 영역 (%)을 정량화하였다. 모든 분석은 각 실험군 (사구체 손상 지수)에 대한 지식이 없는 신장 병리학자에 의해 검토 및 확인되었다.

[172]

[173] [표1]

Applications	Antibodies	Vendor	Cat.	Host	Reactivity
WB	GAPDH	Cell Signaling	2118S	Rabbit	H,M,R
WB, IF	KLF15	SantaCruz	Sc-271675	Mouse	H,M,R
WB	α-SMA	Abcam	Ab32575	Rabbit	H,M,R
WB	ICAM-1	Abcam	Ab171123	Mouse	M,R
WB, IHC	TRPC5	Abcam	Ab240872	Mouse	M,R
WB	Bax-2	Cell Signaling	2772S	Rabbit	H,M,R
WB	Bcl-2	SantaCruz	Sc-23960	Mouse	H,M,R
WB	P53	Cell Signaling	2524s	Mouse	H,M,R
WB	P21	SantaCruz	Sc-6246	Mouse	H,M,R
WB, IHC	COL1α1	SantaCruz	Sc-293182	Mouse	H,M,R
WB	FN	Abcam	Ab2413	Rabbit	H,M
IHC	CD68	Abcam	Ab31630	Mouse	H,M,R
IHC	Sod-1	Aviva system Biology	OABB00304	Rabbit	H,M,R

WB	WT-1	Abcam	ab89901	Rabbit	H,M
WB, IHC	NGAL	SantaCruz	sc515876	Mouse	M,R
WB, IF	ZO-1	Abcam	Ab59720	Rabbit	H,M
WB	B-actin	Sigma	065M48	Mouse	H,M,R
IHC	Cytoch rome C	Sigma	MA5-20330	Mouse	H,M
WB	Nephrin	Invitrogen	PA5-20330	Rabbit	H,M,R
IHC	PGC-1	SantaCruz	Sc-518025	Mouse	H,M,R
IHC	CD3e	Abcam	Ab5690	Rabbit	H,M,R
WB	KIM-1 (TIMP1)	R&D S ystems	AF1817	Goat	Mouse
IF (WT-1)	Alexa F lour 488	Invitrogen	A11070	Goat	R
IF (KLF15)	Alexa F lour 555	Invitrogen	A1990314	Goat	M
IF (WT-1)	Alexa F lour 647	Invitrogen	A21242	Goat	M
IF (ZO-1)	Alexa F lour 555	Invitrogen	A21428	Goat	R

[174]

[175] 웨스턴 블로팅 분석

[176] 총 신장 단백질은 단백질 억제제 (Depotase inhibiter, USA, Texas, Depot)와 함께 RIPA 버퍼 (50 mM Tris; HCL, pH 7.3; 150 mM NaCl; 0.1 mM EDTA 1% (vol/vol) 디옥시콜레이트, 1% (vol) 트리톤 X-100, 0.2% NaF, 100 mM Na_3VO_4에 의해 분리되었다. 신장 조직은 TissueLyser 기기 (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 5분 동안 30 스트로크/초로 설정된 RIPA 완충액에서 강철 비드로 분쇄되었다. 미지의 단백질 농도는 BCA 분석에 의해 결정되었다. 구체적으로, 용해물을 글리신-나트륨 도데실 황산나트륨 완충액으로 전기영동하고 얼음 위에서 폴리비닐리덴 디플루오라이드 막 (Millipore, Bedford, MA, USA)으로 이동시킨 후, 차단 용액 (5% 탈지유 및 2% BSA 완충액)을 사용하여 1시간 동안 막을 차단하였다. 그 후, 막을 진탕하면서 4℃에서 밤새 적절한 1차 항체와 함께 인큐베이션하였다 (표 1). TBST에 함유된 5% 탈지유 (한국 경기도 바이오상)에 Horseradish peroxidase-결합 항토끼 및 항마우스 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)를 첨가하고 1시간 동안 배양하였다. ECL 또는 SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity

Substrate (용액 A 및 B, thermos science, Waltham, MA, USA)의 혼합물을 준비하고 멤브레인의 상단과 하단을 덮었으며, 멤브레인은 최적의 노출 시간에서 ImageQuantTM Las 4000 mini (Amersham plc, Amersham, UK)로 시각화되었다. ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)의 겔 분석 절차를 사용하여 농도 측정을 수행하였다.

[177]

[178] 공초점 현미경 검사

[179] 공초점 현미경 이미지에 액세스하기 위해 Leica TCS SP8 STED CW 시스템 (Leica, Wetzlar, Germany)에 장착된 DMI 6000 도립 현미경의 Leica 20x/0.7 개구수 대물렌즈를 사용하였다. 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)이 보라색 (405 nm) 레이저 라인으로 여기되어 핵을 염색하였고 족세포 특이적 1차 항체를 사용하였다 (표 1). Alexa Fluor 488, 611, 405-접합 항체 (Invitrogen, Waltham, MA, USA)는 30% 출력 및 5% 여기력으로 Argon 488 레이저에 의해 여기되었으며, 그 결과, 420 - 480 nm의 방출 스펙트럼이 DAPI에 대해 설정되었다. 또한, AOBS (Acousto-Optical beam splitter)를 사용하여 녹색 및 적색 형광을 위해 500 - 550 nm 및 570 - 620 nm를 형성하였고, 광전자 증배관 검출기 플랫폼을 적용하여 녹색 형광, 적색 형광 또는 진한 적색 형광에 대한 배경 프레임을 방해하지 않고 800개의 검출기 이득에 대한 신호를 증폭하였다. DAPI 신호의 전자기 스펙트럼을 검출하기 위해 100개의 검출기를 확보한 하이브리드 센서 (HyD, Hamamastu, Japan)를 사용하였고, 공초점 현미경의 스캐너 사양은 1 Airy 단위 (66.57 μm)로 4X 라인 평균을 사용하여 400Hz였다. 이미지 픽셀은 LAS-X 프로그램 (Leica, Wetzlar, Germany)의 순차 스캔 모드에서 1024 x 1024 XY였다.

[180]

[181] 그 후, 인간 족세포를 2일 동안 커버슬립에서 배양하고 Mitotracker red (50 nM) (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)로 염색하였다. PBST로 2회 세척한 후 PBS에 녹인 PFA 4%로 15분 동안 고정한 후 PBST로 3회 세척하였다. Triton X-100으로 투과화하고 PBS 중 10% 정상 염소 혈청으로 차단한 후, 세포를 60분 동안 2차 항체 (표 2, Invitrogen, Waltham, MA, USA)와 함께 인큐베이션하고 PBST로 헹구었다. 공초점 현미경은 라이카 공초점 현미경 (Leica, Wetzlar, Germany)을 사용하여 분석하였다.

[182]

[183] [표2]

Applications	Antibodies	Vendor	Cat.	Host	Reactivity
WB	IgG HRP linked Whole Ab	Cell Signaling	7074S	Goat	R

WB	IgG HRP linked Whole Ab	Cell Signaling	7076S	Horse	M

[184]

[185] 정량적 실시간 중합효소 연쇄반응 (PCR)

[186] TRIzol RNA 분리 시약을 사용하여 1차 배양된 족세포에서 총 RNA를 분리하였고, RNA 추출은 웨스턴 블로팅 섹션에 설명된 유사한 방법을 사용하여 준비되었다. AMV 역전사효소 (Promega, Madison, WI, USA) 및 C1000 Touch Thermal Cycler를 사용한 역전사를 위한 편리한 시스템을 사용하여 cDNA 합성의 고려 방법을 수행하였다. SYBR 녹색 염료 기반 정량적 실시간 PCR은 7500 Real-time PCR 시스템 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 사용하여 수행되었으며, 이 때 Thermocycler 조건은 [14 Roles of the IL-33/ST2 pathway in renal allograft rejection, Experimental Cell Research]에 설명된 프로토콜에 의해 설정 및 작동되었다. PCR 프라이머는 표 3과 같고 (각 유전자는 모두 human 종임), mRNA 발현은 글리세르알데히드 3-포스페이트 탈수소효소 (GAPDH) 또는 β-액틴으로 정규화한 후 비교 Ct 방법 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)으로부터 계산되었다.

[187]

[188] [표3]

서열번호	Gene	방향	서열
서열번호 1	GAPDH	F	TCGACAGTCAGCCGCATCT
서열번호 2	GAPDH	R	CCGTTGACTCCGACCTTCA
서열번호 3	FN	F	CCACCCCCATAAGGCATAGG
서열번호 4	FN	R	GTAGGGGTCAAAGCACGAGTCATC
서열번호 5	IL-17R	F	AGACACTCCAGAACCAATTCC
서열번호 6	IL-17R	R	TCTTAGAGTTGCTCTCCACCA
서열번호 7	P21	F	GAGGCCGGGATGAGTTGGGAGGAG
서열번호 8	P21	R	CAGCCGGCGTTTGGAGTGGTAGAA
서열번호 9	IL-8	F	ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGGCT
서열번호 10	IL-8	R	TCTCAGCCCTCTTCAAAACTTCTC
서열번호 11	TRPC5	F	CCCTGAAGATTGTGGCCTATG
서열번호 12	TRPC5	R	AACAGGGATATGAGACGCAAC
서열번호 13	H2AX	F	TCTGTTCTAGTGTTTGAGCCG
서열번호 14	H2AX	R	CACTGGGAACTGGAGGC
서열번호 15	ZO-1	F	GCAGCCACAACCAATTCATAG

서열번호 16	ZO-1	R	GAAAGGTAAGGGACTGGAGATG
서열번호 17	β-actin	F	GGGTCAGAAGGATTCCTATGG
서열번호 18	β-actin	R	CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC
서열번호 19	WT-1	F	GAAAATAGGGGATGGTCCAG
서열번호 20	WT-1	R	CAATGGATTTCCTCACCCAG
서열번호 21	IL-6	F	GGTACATCCTCGACGGCATCT
서열번호 22	IL-6	R	GTGCCTCTTTGCTGCTTTCAC

[189]

[190] Annexin V/요오드화 프로피듐 염색

[191] 아폽토시스 및 괴사의 백분율은 Annexin V/propidium iodide (PI) fluorescein isothiocyanate (FITC) apoptosis kit (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)를 사용하여 측정되었다. 구체적으로, 족세포를 100 μL 결합 완충액에 재현탁시킨 후, 염색을 위해 5 μL의 FITC-conjugated Annexin V (10 mg/mL) 및 10 μL PI (50 mg/mL)를 첨가하고 제조업체의 지침에 설명된 어두운 곳에서 실온에서 15분 동안 배양하였다. 데이터는 BD FACSDiva™ (버전 8.0; BD Biosciences, Becton, Dickinson and Company, CA, USA)를 통해 수집 및 분석되었다.

[192]

[193] 유세포 분석 및 JC-1 분석

[194] T 세포 및 골수 세포의 분석을 위해 아드리아마이신 투여 일주일 후 신장 조직을 채취한 후, Stomacher 80 Biomaster 실험실 패들 블렌더 (Seward Ltd., Worthing, Sussex, UK)를 사용하여 조직을 균질화하였다. 그 후, 단일 세포는 40-μm 세포 여과기 (BD Pharmingen, Franklin Lakes, New Jersey, USA)를 통해 균질액을 통과시켜 분리되었다. 분리된 세포는 40% Percoll (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)에 재현탁한 다음 80% Percoll에 중첩되었다. Percoll 구배는 25℃에서 30분 동안 1000xg에서 원심분리로 분리하였고, T세포에 대한 형광-접합 마우스 모노클로날 항체 CD3e, CD4, CD8e, CD25, CD44 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)와 대식세포군을 대상으로 한 CD11, CD206B (BD)를 배양하였다. 세포내 염색에서 T세포는 제조사 (BD Pharmingen)의 지시에 따라 BD Cytofix/Cytoperm 용액으로 투과시켰고, 항체로 염색되었으며, 1% 파라포름알데히드로 고정되었다. FACS Canto 기기로 형광 신호를 감지하고 FlowJo 소프트웨어 (버전 10.0.7; FlowJo LLC, Ashland, OR, USA)를 FACS 분석에 사용하였다.

[195]

[196] 산화 스트레스는 신장 섬유증 및 섬유화 촉진 신호의 병태생리학에 필수적인 역할을 한다. H_2O_2와 같은 내인성 활성 산소 종은 산화 스트레스로 인한 신장 섬유증의 강력한 유도제이다. 따라서, H_2O_2 (과산화수소 용액, Sigma Aldrich, St. Lewis, MO, USA)에 의해 유도된 산화 스트레스 조건 하에서 미토콘드리아 막 전

위를 분석하기 위하여, 미토프로브 JC-1 분석 키트 (Invitrogen, Carls, Cals, United Statesia)를 거의 수정하지 않고 수행하였다. 50mM CCCP (키트와 함께 제공) 1μL와 H_2O_2 1mM의 두 가지 양성 대조군이 사용되었다. 먼저, 5분 동안 37℃에서 인큐베이션된 후, 각 시료에 JC-1 (200 μM의 10 μL)을 첨가하여 37℃, CO_2 5%에서 30분간 설정하였다. JC-1 염색 후 488 nm 및 633 nm (칸토 프로그램)에서 JC-1에 대한 R-피코에리트린 및 알로피코시아닌이 검출되었다.

[197]

[198] 인간 1차 족세포의 분리

[199] 설명된 프로토콜에 따라 인간 1차 족세포를 분리 및 배양하였다 (Roles of fluid shear stress and retinoic acid in the differentiation of primary cultured human podocytes, Exp. Cell Res 2017). 신장 세포 암종으로 진단된 환자로부터 신장 표본을 외과적으로 제거하였다. 인간 피험자를 대상으로 한 연구는 서울대학교병원 기관심사위원회 (N. 0911-061-301)의 승인을 받았으며 모든 환자는 등록 전에 사전 동의를 받았다. 신장 조직을 스테인레스 스틸 메쉬를 통해 부수고 8일 동안 배양하였다. 성장한 총 신장 세포를 트립신 처리하고 25 μm 공극 크기의 체에 통과시켜 메산지움 세포를 분리하였다. 이들 세포는 간질 세포, 족세포, 및 내피 세포로 구성되어 있기 때문에, 족세포는 유세포 분석을 사용하여 식별 및 분류되었다. Fc 수용체 차단 시약 (1 μg/mL, BD Bioscience, San Jose, CA, USA)을 1 x 10^6 세포에서 처리하였다. 족세포 특이적 바이오마커인 항-포도칼릭신 (Abcam, Cambridge, UK) 및 플루오레세인 이소티오시아네이트-표지된 항-토끼 IgG (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA)를 사용하여 족세포를 식별하였다. 세포에 특이적인 항체를 FACS (fluorescence-activated cell sorting) Calibur 기기 (BD biosciences)를 사용하여 분류 및 분석하였다. 족세포의 선택적 배지의 경우, 20% 소태아 혈청 또는 FBS (Gibco, Grand Island, NY, USA), 1 x 인슐린-트랜스페린-셀레늄 (Gibco), 1 mM HEPES 완충액 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 200 μM L-글루타민 (Gibco), 50 nM 하이드로코르티손 (Sigma-Aldrich), 100 U/mL 페니실린 (Gibco) 및 100 pg/mL 스트렙토마이신 (Gibco)을 사용하였다. H_2O_2 및 아드리아마이신 하에서의 시험관 내 자극에서, 2% FBS는 적절한 세포를 위한 배지를 함유하였다. 신장 세포 성장을 최대화하기 위해 10 μg/mL의 fibronectin (Sigma-Aldrich)을 사용하고 세포 배양 전에 플라스틱 접시에 코팅하였다.

[200]

[201] 인간 족세포의 투과성 분석

[202] 0.4 μm 기공막이 있는 24-웰 플레이트 (NINC A/S, Roskilde, Denmark)에서 Transwell 시스템을 통한 인간 족세포의 수송 속도는 알부민-로다민 수송 분석을 사용하여 측정되었다. 실험에서 알부민-로다민 배지를 포함하는 DMEM/F12 (Invitrogen, Waltham, MA, USA)를 족세포의 단층에 첨가하였다. ADR 2 ng/mL 및 GQD 0.25 및 0.5 μg/mL로 처리하거나 회전력에 의해 유도된 섬유증 조건에서 24

시간 후 하부 웰의 알부민-로다민이 증가하면 알부민-로다민 형광 강도를 측정하고 정량화하였다. 분광 광도계를 사용하여 Ex/Em 550 nm/570 nm에서 미지의 알부민-로다민을 계산하기 위해 표준 곡선이 사용되었다.

[203]

[204] ROS assay ROS 분석

[205] 세포내 활성 산소 종 수준은 형광 분광계 (Partec, Munster, Germany)에 의한 DCF 형광의 동반 증가에 의해 측정되었다. 인간 족세포를 다중 웰 플레이트에 파종하고 H_2O_2 및 GQD (0.25 및 0.5 μg/mL)를 용량 의존적 방식으로 처리한 후, 세포를 10 uM DCFH-DA와 함께 30분 동안 인큐베이션한 다음, 37℃에서 1시간 동안 칠과 함께 인큐베이션하였다. 세포의 형광 강도는 형광 분광계 (Tecan, Research Triangle Park, NC, USA)를 사용하여 측정하였다.

[206]

[207] 세포내 칼슘 측정

[208] 제조업체의 프로토콜에 따라 Fura-2AM 칼슘 유입 분석 키트 (Abcam, Cambridge, United Kingdom)를 사용하여 칼슘 변동을 모니터링하였다. 2 x 10^4 세포는 DMEMF/12 (2% FBS, Gibco)에서 1시간 동안 이오노마이신 (5 mM)을 처리한 96-웰 플레이트, 검은색 투명 바닥 (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) 및 GQD (0.5 μg/mL)에 시드되었다. 칼슘 측정 전에 Fura-2AM이 포함된 1 x Pluronic 혼합물 100μL를 첨가하고 37℃에서 1시간 동안 배양한 다음 실온에서 20분 동안 배양하였다. 마이크로플레이트는 Operetta CLS (PerkinElmer, Waltham, MA, USA)를 사용하여 Ex/Em 340 nm/510 nm 및 Ex/Em 380 nm/510 nm에서 판독되었다.

[209]

[210] 미토콘드리아 호흡 분석

[211] 미토콘드리아 호흡 매개변수는 기초, ATP 생산 연결, 최대 및 양성자 누출 연결 OCR을 포함하는 Seahorse XF ATP 실시간 속도 분석 (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA)을 사용하여 측정되었다. H_2O_2 (0.5 mM) 및 GQD (0.5 μg/mL)가 포함된 족세포를 Seahorse Machine에서 작동하도록 설계된 해마 플레이트에 시딩하였다. 2시간 동안 Pate를 H_2O_2 (0.5 μg/mL 실험 당일, 세포를 REMM (2% FBS, Gibco) 배지로 세척하고 Seahorse XF 매질에서 100,000 cells/180 μL의 농도로 재현탁시켰다. 그 후 플레이트를 1시간 동안 인큐베이션하고 1500 rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 데이터 분석은 Seahorse (미국 캘리포니아주 샌타클래라, Agilent Technologies)의 wave 소프트웨어를 사용하여 수행되었다.

[212]

[213] ATP Assays ATP 분석

[214] ATP 소비는 제조업체가 설명한 대로 발광 ATP 검출 분석 키트 (Abcam, Cambridge, United Kingdom)를 사용하여 측정되었다. 실험적으로 인간 족세포를 인큐베이터에서 1시간 동안 H_2O_2 (1 mM)에 노출시켰다. 그런 다음 샘플을 제조

업체 (Luminescent ATP Detection Assay Kit, Ab113849)가 설명한 대로 처리하고 투명한 다중 웰 플레이트 판독기 Synergy HTX (Bio Tek, Vermont, United States)에서 발광성을 측정하였다. ATP의 양은 ATP 표준으로부터 얻어진 결과로부터 μM 또는 상대 백분율로 계산되었다.

[215]

[216] **실시예 1. 그래핀 양자점의 합성**

[217] 그래핀 양자점 (graphene quantum dots, 이하, GQD)은 탄소섬유 (Carbon Make) 0.9 g을 황산 300 ml 및 질산 100 ml의 혼합물 (삼천화학, 한국)에 80℃에서 24 시간 동안 넣어 합성하였다. 산 제거 후, 용액을 다공성 무기막 필터 (Whatman-Anodisc 47, GE Healthcare, Chicago, IL, USA)로 진공 여과하여 큰 입자를 제거하였고, 용액을 회전 증발시켜 분말 형태의 최종 생성물을 수득하였다.

[218]

[219] **실시예 2. 아드리아마이신 유발 신장 독성 마우스 모델 구축**

[220] 7주 된 수컷 BALB/c 마우스에 11.5 mg/kg의 아드리아마이신 (Adriamycin 또는 ADR, TCI, Tokyo, Japan)을 정맥 주사하였다. 아드리아마이신 처리된 마우스에 아드리아마이신 처리일 기준으로 20 mg/kg의 GQD를 2일 간격 (0일, 2일, 4일, 및 6일)으로 4회 복강 투여하여 ADR 마우스 모델을 확립하였다 (도 1). 아드리아마이신 유도 신장 독소 마우스 모델 (이하, ADR 모델)에서의 마우스의 신장과 비장은 7일에 적출되었다. 모든 동물 실험은 서울대학교병원 임상연구원 기관동물관리 및 이용위원회의 승인과 국가연구회의 실험동물 관리 및 이용 지침에 따라 수행되었다.

[221]

[222] **실시예 3. ADR 모델에서의 그래핀 양자점에 의한 우수한 신장 독성 치료 효과 확인**

[223] 실시예 2에서 확립된 ADR 마우스 모델에서 GQD에 의한 신장 독성 치료 효과를 확인하기 위하여 분석을 실시하였다. 이 때 대조군 및 실험군은 표 4와 같다.

[224]

[225] [표4]

구분	Sham 대조군	ADR군	ADR+GQD군
내용	실시예 2의 Sham 마우스 모델	실시예 2에 따라 아드리아마이신이 처리된 모델	실시예 2에 따라 아드리아마이신 및 GQD가 처리된 모델

[226]

[227] 실시예 3-1. ADR 모델에서의 GQD에 의한 체중 및 신장 손상 개선 효과 확인

[228] 먼저, ADR 모델에 GQD를 처리할 경우의 마우스의 체중을 관찰하였고, 신장 기능을 나타내는 기준으로는 BUN (blood urea nitrogen, 혈액 요소 질소), 크레아

티닌, 및 요단백/크레아티닌 비율 변화를 관찰하여 신장 기능 개선 효과를 분석하였다.

[229]

[230] 그 결과, 체중, BUN, 크레아티닌 및 요단백/크레아티닌 비율에 있어서 Sham 대조군, ADR군, 및 ADR+GQD군순으로 우수한 수준을 나타내는 것으로 확인되었다. 특히, ADR+GQD군은 ADR군 대비 모두 통계적으로 유의한 수준으로 나타나 GQD는 BUN, 크레아티닌 및 요단백/크레아티닌 비율에 대한 감소 효과가 우수한 것으로 확인되었다 (도 2a).

[231]

[232] 실시예 3-2. ADR 모델에서의 GQD에 의한 신장 기능 개선 효과 확인

[233] GQD의 신장 기능 개선 효과를 확인하기 위하여 실시예 3-1과 동일한 대조군 및 실험군으로 (표 4) Sirius red 및 Masson's trichrome 염색에 의한 비정형 세포외 기질 단백질의 축적 수준을 평가하였고, 사구체 손상 지수 (glomerular injury index)는 Periodic Acid Schiff 염색에 의해 평가하였다.

[234]

[235] 그 결과, 사구체 손상, F4/80, MT, 및 sirius 염색 결과 모두 GQD 처리에 의해 개선되는 것으로 나타났다. 구체적으로, 신장 등 대식세포의 대표적인 마커인 F4/80의 신장 발현이 감소되었고, 콜라겐 섬유 침착이 증가된 것으로 확인되었다. 특히, 염색된 세포와 사구체 경화증/세뇨관 손상은 모두 GQD 처리된 마우스에서 유의하게 감소하는 것으로 확인되었다 (도 2b 및 도 2c).

[236]

[237] 실시예 3-3. ADR 모델에서의 GQD에 의한 신장 항염증 효과 확인

[238] ADR 마우스 모델에서 GQD 처리에 따른 신장 염증 세포의 변화를 확인하기 위해 실시예 3-1과 동일한 대조군 및 실험군에 대하여 (표 4) FACS 실험을 수행하였다.

[239]

[240] 그 결과, CD3+CD25+ 조절 T 세포 집단, CD3+CD44+ 이펙터 T 세포 집단, CD3+CD25+CD44+ 이펙터 T 세포 집단, CD11b+Gr-1+ 골수 (비림프성) 세포 집단, 및 CD11b+Gr1+CD206+ 신장의 대식세포 개체군 (KMs)의 비율은 ADR 그룹에 비해 GQD 처리 그룹에서 감소하였다 (도 2d). 이와 같은 결과에 따라 아드리아마이신에 의해 유도된 신장 염증이 현저히 개선되는 것이 확인되었다.

[241]

[242] 실시예 3-4. ADR 모델에서의 GQD에 의한 신장 항섬유화 효과 확인

[243] 실시예 3-1과 동일한 대조군 및 실험군에 대하여 (표 4) GQD의 항섬유화 효과를 확인하기 위하여 신장 손상 (Kim-1, ICAM-1, TRPC5), 세포자살 조절인자 (Bax-2, BCL-2), 족세포 손상 (KLF15, WT-1, ZO-1), 및 신장 섬유증 (Col1α1(Collagen1α1), α-SMA, FN (Fibronectin))에 대한 웨스턴 블롯 실험을 수행하였다.

[244]

[245] 그 결과, 신장 손상 마커인 KIM-1 및 ICAM-1, 세포자살 조절인자인 Bax-2, 족세포 손상 인자인 TRPC5, 및 신장 섬유증 인자인 Col1α1, α-SMA, 및 FN의 단백질 발현이 GQD 처리군에서 유의하게 감소하는 것이 확인되었다. 또한 BCl-2의 증가 및 족세포 분화에 관여하는 전사 인자 (WT-1, ZO-1, KLF-15)가 회복하였다. 이는 GQD가 족세포의 생존성을 향상시키고 항염증, 항아포토시스 및 항섬유화 역할을 하는 것을 의미하는 것이다 (도 2e).

[246]

[247] 실시예 3-5. ADR 모델에서의 GQD에 의한 세뇨관 손상 감소 효과 확인

[248] 실시예 3-1과 동일한 대조군 및 실험군에 대하여 (표 4) ADR+GQD 마우스에서 NGAL, TRPC5, 및 8-OHdG의 면역조직화학염색 분석을 수행하였다. 이 때, NGAL (Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin)은 중성구나 신장 세뇨관의 상피와 결합되어 있는 25 kDa 당단백질로 급성 신손상의 표지자로 사용된다. TRPC5 (transient receptor potential channel 5, 일시적 수용체 단백질 5)는 사구체 족세포 원형질막에 널리 분포된 있는 것으로 세포골격 변화의 중요한 매개체면서, Ca^{2+} 유입의 증가는 사구체 족세포 미토콘드리아 손상의 주요 원인으로 알려져 있다. 또한, 8-OHdG는 8-하이드록시구아노신 (8-Hydroxyguanosine)으로, 구아노신의 산화 유도체인 RNA 뉴클레오사이드이며, 8-OHdG 수준은 RNA 손상을 유발하는 산화 스트레스의 바이오마커로 사용된다.

[249]

[250] 그 결과, GOD 처리에 의해 NGAL, TRPC5 및 8-OHdG의 발현이 ADR군 대비 통계적으로 유의한 수준으로 감소하는 것이 확인되었다. 이는 GQD에 의한 세뇨관 손상의 감소는 NGAL 발현의 감소를 통해 입증된 것을 의미하며, 또한 GQD는 TRPC5의 과발현과 ADR 투여로 인한 산화적 DNA 손상 마커 (8-OHDG)를 유의미하게 완화시키는 것을 의미하는 것이다 (도 2f 및 도 2g).

[251]

[252] **실시예 4. 마이크로어레이 플랫폼 유전자 프로파일링에 따른 ADR 마우스 모델에서의 그래핀 양자점에 의한 우수한 신장 독성 회복 효과 확인**

[253] ADR+GQD 모델의 신장 손상 회복 관련 유전자의 발현 여부 및 수준을 확인하기 위하여 마이크로어레이 플랫폼 유전자 프로파일 분석을 수행하였다. 마이크로어레이 플랫폼 유전자 프로파일 분석은 역치 유전자 발현을 기반으로 분석 및 분화되었다.

[254]

[255] 플랫폼별 3D PCA 및 차등발현유전자 (DEG)의 마이크로어레이 분석 결과, ADR 모델에서 GQD를 처리한 그룹에서 염증, 세포 이동, 세포 사멸 과정, 세포 사멸, 세포외 기질 및 노화 과정과 관련된 유전자의 발현이 유의하게 감소하는 것으로 나타났다. 특히, 족세포 관련 유전자 발현 시그니처의 발현 차이가 현저

하다는 점에서 ADR 모델의 주요 인자가 족세포인 것이 확인되었다 (도 3a 내지 도 3c).

[256]

[257] 또한, mRNA-seq 분석 과정에서 아드리아마이신 유발 신병증 (Adriamycin-induced nephropathy)을 유도했을 때 GQDs 처리 군에서 족세포 동적변화 (podocyte dynamic), 미토콘드리아 호흡 (mitochondrial respiration) 관련 유전자가 증가하는 것이 관찰됐으며, 그와 반대로 산화 스트레스 (oxidative stress), 세포외 매트릭스 (ECM), 염증 반응 (inflammatory response) 관련 유전자들은 감소하는 것이 확인되었다. 결과적으로 그래핀 자체에서 항산화 효과 및 염증 감소 등이 확인되었다 (도 3d 내지 도 3f) (왼쪽 = heat map (Log FC value) + 오른쪽 = Log2 (FC) value) (ADR+GQDs/ADR = ADR 그룹에 비해 ADR+GQDs에 유전 증가 및 감소 변화) .

[258]

[259] 또한, ADR+GQDs 실험에서 total gene을 filtering 후 (p-value < 0.05), 약 6544 gene을 public data인 ToppGene에서 training 후 분석하였다. 그 결과, 미토콘드리아 관련 유전자 군집 (gene cluster)이 상대적으로 다량으로 발현되는 것으로 나타났고, 특히, 미토콘드리아 구조 및 기능 관련 유전자 군집이 많이 카운팅 (counting) 되는 것으로 조사되었다. 이에 따르면 그래핀 치료 효과는 항암 모델 (anticancer model)에서 미토콘드리아 막 전위 향상 (enhancing mitochondrial membrane potential)을 통해 ATP 합성율을 증가시킴에 따라 나타나는 것으로 확인되었다 (도 3g).

[260]

[261] 또한, 현재 유전자 분석에서 많이 활용 되고 있는 gene enrichment analysis tool 인 GSEA (Gene set enrichment analysis)를 수행하였다. 그 결과, 미토콘드리아 기능 호전 관련 유전자가 ADR+GQDs군에서 positive correlation이 보임에 따라 enrichment score (NES)가 높은 것으로 나타났다. 반면, 염증 반응 (inflammatory response, interferon gamma)과 관련된 유전자들은 감소하는 것으로 나타났다 (ADR+GQDs group = negative correlation) (도 3h 및 도 3i).

[262]

[263] 또한, 각 유전자의 관계성을 볼 수 있는 network analysis를 수행한 결과, 도 3j에 따라 특정 유전자군의 발현에 대한 각 유전자군 간의 상호적인 영향이 확인되었다.

[264]

[265] **실시예 5. 마이크로어레이 분석 결과 기반 ADR+GQD 모델에서의 그래핀 양자점에 의한 족세포 활성 효과 확인**

[266] 실시예 4에 따른 마이크로어레이 결과를 기반으로 1차 배양된 인간 족세포를 사용하여 ADR 모델을 만들고 GQD를 처리하여 반응 및 메커니즘을 검증하였다. 구체적으로, 아드리아마이신 (2 ng/mL)과 GQD (0.25, 및 0.5 ng/mL)의 두 가지 다

른 투여량을 가진 인간 족세포에서 팔로이딘 (Phalloidin), ZO-1, WT-1 KLF-15의 면역 형광 이미징 (IF) 분석을 실시하였다.

[267]

[268] 그 결과, 인간 족세포에서 세포 접합 관련 단백질의 면역형광 염색은 족세포의 형태, 수 및 세포골격의 복원을 동반한 GQD 처리에 대한 응답으로 족세포 분화 활성의 더 높은 발현을 나타내었다 (도 4a 및 도 4b).

[269]

[270] **실시예 6. 마이크로어레이 분석 결과 기반 ADR+GQD 모델에서의 그래핀 양자점에 의한 족세포 활성 효과 확인**

[271] ADR+GQD 모델에서의 족세포 기능을 확인하기 위해 알부민-로다민 투과성 시험을 수행하였다. 이 때, 표 5에 따른 대조군 및 실험군에 대하여 각 분석을 실시하였다.

[272]

[273] [표5]

구분	대조군	GQD 0군	GQD 0.25군	GQD 0.5군
내용	-	ADR 10 ng/mL	ADR 10 ng/mL + GQD 0.2 5 μg/mL	ADR 10 ng/mL + GQD 0.5 μg/mL

[274]

[275] 그 결과, 알부민-로다민의 상대 형광은 GQD를 처리한 그룹, GQD 0.25군, 및 GQD 0.5군은 GQD 0군 대비 통계적으로 유의적인 수준으로 감소하는 것으로 나타났다. 특히, GQD 0.5군의 형광 수치는 GQD 0군 대비 1/2 수준에 불과하다는 점에서 현저한 감소 효과가 확인되었다.

[276]

[277] 또한, DNA 손상 마커, H2AX 및 족세포 접합 마커 ZO-1의 mRNA 발현 역시 GQD 처리 그룹이 GQD 0군과는 전혀 반대의 감소 및 증가 양상을 나타내었다. GQD 0.5군은 GQD 0군 대비 통계적으로 유의한 수준으로 감소 및 증가하였고, 특히, 족세포 접합 마커 ZO-1에 대해서는 GQD 0.25군 역시 통계적으로 유의한 수준으로 증가하는 것이 확인되었다 (도 5) (Scale bar, 100 um (B and H). *P < 0.05, **P < 0.01, and ***P < 0.001. Two-tailed unpaired Student's t-test was used for statistical analysis).

[278]

[279] 종합적으로, 이러한 결과는 GQD가 ADR에 의한 신장 손상 전반에 걸쳐 TRPC5 과발현을 억제하고 염증, 세포사멸, 섬유증, DNA 손상을 완화시켜 신장 기능과 세포골격을 유지한다는 것을 시사하는 것이다.

[280]

[281] **실시예 7. 산화 스트레스 모델에서의 GQD에 의한 우수한 세포 생존 효과 확인**

[282] 유세포 측정법에 의한 세포 주기 분석을 수행하여 산화 스트레스 조건 하에 다양한 세포 주기 단계에서 세포 집단의 백분율을 추정하는 등 세포 생존 효과를 분석하였다.

[283]

[284] 실시예 7-1. 산화 스트레스 조건 하에서의 아포톱시스 감소 효과 확인

[285] 산화 스트레스 조건 하에서의 아포톱시스 증감 여부를 분석하여 GQD의 세포 생존 효과를 확인하였다. 이 때, 표 6에 따른 대조군 및 실험군에 대하여 실험을 수행하였다.

[286]

[287] [표6]

구분	대조군	GQD 0군	GQD 0.125군	GQD 0.25군	GQD 0.5군
내용	-	-	H_2O_2 0.5 mM + GQD 0.125 μg/mL	H_2O_2 0.5 mM + GQD 0.25 μg/mL	H_2O_2 0.5 mM + GQD 0.5 μg/mL

[288]

[289] 그 결과, H_2O_2에 의해 유도된 사전 아포톱시스 세포 (pre-apoptotic cells)의 비율은 GQD로 처리되었을 때 유의하게 감소하는 것으로 나타났다. 이와 같은 효과는 0.25 μg/mL의 농도에서부터 나타났고 약 50%의 감소율을 나타내는 것으로 확인되었다 (도 6a 및 도 6b).

[290]

[291] 실시예 7-2. 산화 스트레스 조건 하에서의 세포 사멸 감소 효과 확인

[292] 산화 스트레스 조건 하에서의 세포 사멸 증감 여부를 분석하여 GQD의 세포 생존 효과를 확인하였다. 이 때, 표 7에 따른 대조군 및 실험군에 대하여 실험을 수행하였다.

[293]

[294] [표7]

구분	대조군	TGF-β군	H_2O_2군	GQD 0.5군
내용	-	TGF-β 2 ng/mL	H_2O_2 1 mM	H_2O_2 1 mM + GQD 0.5 μg/mL

[295]

[296] 그 결과, H_2O_2군에서는 12시간 이후에 죽은 세포가 급격히 증가하기 시작하였고, 그 비율은 rTGF-β군의 약 2배인 것으로 나타났다. 그러나, H_2O_2와 GQD를 공동으로 투여한 결과 세포 사멸이 절반으로 감소되었으며, 이는 통계적으로 유의한 수준인 것으로 나타났다 (도 7a 및 도 7b).

[297]

[298] 실시예 7-3. 산화 스트레스 조건 하에서의 세포 이동 및 증식 증가 효과 확인

[299] 산화 스트레스 조건 하에서의 상처 스크래치에 따른 세포 이동 및 증식 활성을 분석하여 GQD의 세포 생존 효과를 확인하였다. 이 때, 표 8에 따른 대조군 및 실험군에 대하여 실험을 수행하였다.

[300]

[301] [표8]

구분	대조군	GQD 0군	GQD 0.25군	GQD 0.5군
내용	-	-	H_2O_2 0.5mM + GQD 0.25 μg/mL	H_2O_2 0.5mM + GQD 0.5 μg/mL

[302]

[303] 그 결과, 상처 스크래치 분석에서 세포 이동 및 증식은 GQD의 농도 의존적으로 활발해지는 것으로 나타났고, 특히, GQD 0.25군에서 유의하게 증가하여 용량 의존적으로 증가하였으며 (도 8a), GQD 1군을 추가한 보충 실험 결과도 도 8a와 상응하는 것으로 확인되었다 (도 8b). 또한, 노화 염색 및 베타-갈락토시다아제 단백질 발현도 H_2O_2와 GQD를 동시 처리했을 때 H_2O_2 처리군 대비 용량 의존적으로 유의하게 감소하였다 (도 8c).

[304]

[305] 실시예 7-4. 산화 스트레스 조건 하에서의 항산화 효과 확인

[306] 산화 스트레스 조건 하에서의 GQD의 항산화 효과를 확인하여 GQD의 세포 생존 효과를 확인하였다. 이 때, 표 9에 따른 대조군 및 실험군에 대하여 β-갈락토시드가수분해효소 및 CCN1에 대한 웨스턴 블랏 분석을, 표 10에 따라 인간 족세포에서의 ROS 분석을, 표 11에 따라 Scratch wound coverage 분석을 수행하였다.

[307]

[308] [표9]

구분	CTL군	GQD 0군	GQD 0.125군	GQD 0.25군	GQD 0.5군
내용	-	H_2O_2 1mM	GQD 0.1 25 μg/mL	GQD 0.25 μg/mL	GQD 0.5 μg/mL

[309]

[310] [표10]

구분	CTL군	H_2O_2군	GQD 0.25군	GQD 0.5군
내용	-	1mM	H_2O_2 1mM + GQD 0.25 μg/mL	H_2O_2 1mM + GQD 0.5 μg/mL

[311]

[312] [표11]

구분	대조군	GQD 0.25군	GQD 0.5군	GQD 1군
내용	-	H_2O_2 0.5mM + GQD 0.25 μg/mL	H_2O_2 0.5mM + GQD 0.5 μg/mL	H_2O_2 0.5mM + GQD 1 μg/mL

[313]

[314] 그 결과, GQD 처리에 따라 통계적으로 유의하게 CCN1 및 β-gal 발현이 감소하는 것으로 나타났다 (도 9a). 또한, ROS 분석 및 Scratch wound coverage 분석에서도 동일한 결과가 나타나 (도 9b), GQD의 항산화 효과가 우수한 것으로 확인되었다.

[315]

[316] 실시예 7-5. 산화 스트레스 조건 하에서의 사이토카인 억제 효과 확인

[317] 산화 스트레스 조건 하에서의 GQD의 사이토카인에 대한 효과를 확인하였다. 이 때, 표 12에 따른 대조군 및 실험군에 대하여 IL-6, p21 및 IL-17R의 mRNA 발현을 분석하였다.

[318]

[319] [표12]

구분	대조군	GQD 0군	GQD 0.125군	GQD 0.25군	GQD 0.5군	GQD 1군
내용	-	H_2O_2 0.5 mM	H_2O_2 0.5 mM + GQD 0.125 μg/mL	H_2O_2 0.5 mM + GQD 0.25 μg/mL	H_2O_2 0.5 mM + GQD 0.5 μg/mL	H_2O_2 0.5 mM + GQD 1 μg/mL

[320]

[321] 그 결과, 염증성 사이토카인, 사이토카인 수용체, 및 세포자멸사 표지자의 mRNA 발현은 H_2O_2 그룹에서 증가하였으나 H_2O_2 및 GQD 처리군 (GQD 0.125군, GQD 0.25군, GQD 0.5군, 및 GQD 1군)에서 상기 수준이 유의하게 완화되는 것이 확인되었다 (도 10).

[322]

[323] 이러한 결과에 따르면 GQD의 족세포 세포 사멸 방지 효과, 이동 및 증식 증가 효과, 항산화 효과, 및 사이토카인 억제 효과가 확인됨에 따라 우수한 세포 생존력 증가 효과가 증명되었다.

[324]

[325] **실시예 8. GQD에 의한 우수한 미토콘드리아 기능 회복 효과 확인**

[326] GQD에 의한 미토콘드리아 기능 회복 효과를 확인하기 위하여 각각의 실험을 수행하였다.

[327]

[328] 실시예 8-1. GQD에 의한 미토콘드리아 단백질 발현 회복 효과 확인

[329] 실시예 3-1과 동일한 대조군 및 실험군에 대하여 (표 4) 미토콘드리아 단백질인 PGC-1, 사이토크롬 C (Cytochrome C), 및 Sod-1에 대한 IHC를 수행하여 GQD와 미토콘드리아의 상호 작용을 평가하였다.

[330]

[331] 그 결과, ADR군에서는 사이토크롬 C의 발현이 증가하였고, PGC-1과 Sod-1의 발현이 감소하였으나, GQD로 처리된 군에서는 사이토크롬 C의 발현이 현저히 감소하였으며, PGC-1과 Sod-1의 발현이 회복되었다 (도 11a 및 도 11b).

[332]

[333] 실시예 8-2. 화산 플롯 분석에 따른 ADR 그룹에서의 중요한 단백질의 종류 확인

[334] 실시예 8-1에 따른 결과로부터 얻은 ADR 그룹에서 가장 생물학적으로 중요한 단백질을 시각화하기 위해 화산 플롯 분석을 실시하였다.

[335]

[336] 그 결과, GQD 처리에 의한 PGC-1과 Sod-1의 증가 및 TRPC5와 8-OHDG 감소 효과가 현저한 것으로 확인되었다. 이 결과는 TRPC5가 ADR 모델에서 GQD의 잠재적 목표물임을 의미하며, 미토콘드리아 기능의 개선 및 회복을 통해 신장 기능을 개선할 수 있는 가능성을 보여주었다. 또한, 이러한 단백질 발현 변화는 H_2O_2 자극에 의한 GQD로 치료한 후 족세포 (포도구)에서 미토콘드리아 단편화의 회복과 일치하였다 (도 12a 및 도 12b).

[337]

[338] 실시예 8-3. GQD에 의한 세포내 칼슘 투과성 및 미토콘드리아 대사 활성 효과 확인

[339] Fura-2 am 기반 세포내 칼슘 신호와 미토콘드리아 대사 활성화를 측정하였다. 이 때, 표 13에 따른 대조군 및 실험군에 대하여 본 실험을 진행하였다.

[340]

[341] [표13]

구분	대조군	H_2O_2군	GQD 0.5군
내용	-	H_2O_2 0.5 mM	H_2O_2 0.5 mM + GQD 0.5 μg/mL

[342]

[343] 먼저, 세포 내 칼슘 투과성에 대한 결과에 따르면, GQD는 족세포에서 아이오노마이신 처리 후 대조군보다 증가된 세포질 칼슘 투과성을 회복시켜 세포 내 칼슘 유입을 크게 감소시키는 것이 확인되었다 (도 13a 및 도 13b).

[344]

[345] 또한, H_2O_2와 GQD를 동시에 투여하였을 때 미토콘드리아 호흡, 기저, 양성자 누출, 및 ATP 생산 측정 결과를 확인한 결과, H_2O_2 자극에 의한 미토콘드리아 호흡수의 감소는 거의 대조군과 비슷한 비율로 감소하는 것이 나타났다. TRPC5의 발현이 감소하는 것은 H_2O_2 및 GQDs 공동 투여군에서도 입증되었다 (도 14).

[346]

[347] 또한, 표 14에 따라 1시간 동안 H_2O_2에 GQD를 처리하여 JC-1 염색하고, 적색/녹색 형광 비율을 측정하여 미토콘드리아 막 전위 변화를 확인하였다.

[348] 그 결과, GQDs 처리군에서 H_2O_2 그룹에 비해 미토콘드리아 막 전위가 2배 더 회복되고 개선되는 것이 확인되었다 (도 15).

[349]

[350] [표14]

구분	대조군	H_2O_2군	GQD 0.25군	GQD 0.5군
내용	-	H_2O_2 1mM	H_2O_2 1mM + GQD 0.25 μg/mL	H_2O_2 1mM + GQD 0.5 μg/mL

[351]

[352] 마지막으로, TRPC5와 다양한 마커 간의 연관성에 대한 선형 회귀 본석을 수행하였다. 그 결과, TRPC5의 발현 수준과 섬유화, 관상해, 염증, 산화적 DNA 손상, 미토콘드리아 손상 사이에는 매우 유의미한 상관관계가 나타났다 (도 16).

[353]

[354] 결과적으로, GQD는 Ca^{2+} 유입을 조절하여 미토콘드리아 손상을 방지하고 호흡 속도를 증가시켜 에너지 대사를 갱신하고 미토콘드리아 생합성을 촉진하는 것이 확인되었다.

[355]

[356] **실시예 9. GQD에 의한 우수한 미토콘드리아 구조 회복 효과 확인**

[357] GQD에 의한 미토콘드리아의 물리적인 구조 회복 효과를 확인하기 위하여 sham대조군, ADR군, 및 ADR+GQD군에서의 미세구조의 변화와 미토콘드리아 형태를 전자현미경으로 조사하였다. 구체적으로, 신장 절편을 2.5% 글루타르알데히드 용액 (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)으로 고정하고, 오스뮴 테트라옥사이드에 후고정한 다음 내장 (LADD Research Industries Inc., Williston, VT, USA)하였다. 투과전자현미경 (TEM) 절편을 uranyl acetate와 lead citrate로 염색하고 JEM-1400 전자현미경 (JEOL Ltd, Akishima, Tokyo, Japan)으로 검사하였다. 각 동물의 1-2개의 사구체의 5개 영역을 무작위 지점에서 촬영하였으며, 최종 배율은 12,000배 및 30,000배였다. 족세포 과정을 연구하기 위해 최종 배율 80,000배에서 무작위 사진을 촬영하였고, 미토콘드리아는 사구체와 세뇨관에서 50,000 및 100,000 배의 최종 배율로 촬영되었다.

[358]

[359] 그 결과, ADR 모델에서 관찰된 사구체 경화증과 발 과정 (foot process) 확산 감소는 GQD 치료를 통해 회복되는 것이 확인되었다 (도 17a). GQD를 이용한 치료로 관에 주조된 히알린 (hyaline), 관 확장, 구조 붕괴, 브러시 경계 손실 등도 회복되었다 (도 17b). 또한 사구체 및 세관에서 미토콘드리아의 형태를 살펴보면 ADR 자극은 미토콘드리아의 팽윤 및 단편화를 동반하였으며, 이상 기형 형성 (융착 및 손실)은 GQDs 처리군에서 완화되었다. 이는 GQD가 미토콘드리아 생합성 작용을 자극하여 손상 부위의 관상피세포 또는 족세포 (포도구)의 복구를 촉진할 수 있음을 나타낸다.

[360]

[361] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야 한다.

산업상 이용가능성

[362] 본 발명의 조성물은 항암제에 의해 유도된 신장 독성 모델에서 신장의 섬유화를 억제 및 개선하고, 염증 효과를 감소시켰으며, 신장 기능을 회복시킴에 따라 신장 독성 치료 효과를 나타내는 것으로 확인되었다. 또한, 본 발명에 따른 조성물 투여에 의해 사구체 세포 생존력이 증가하고, 미토콘드리아의 구조 및 기능 회복 효과가 나타나 항암제에 의해 유도된 신장 독선 관련 질환의 예방 또는 치료제로 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대되는 바, 산업상 이용가능성이 인정된다.

청구범위

[청구항 1] 그래핀 양자점 (graphene quantum dot; GQD)을 유효성분으로 포함하는 신장 독성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 항암제에 의해 유도된 신장 독성 질환 환자군에게 투여되는 것인, 신장 독성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 항암제는 독소루비신 (doxorubicin), 아미노글리코사이드계 (aminoglycoside) 항생제, 시클로포린 A (cycloporine A), 암포테리신 B (amphotericin B), 및 시스플라티늄 (cisplatinum)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 신장 독성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 하기 중 어느 하나 이상의 활성을 나타내는 것인, 신장 독성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물:
신장의 항염증, 및 항섬유화 효과;
신장 구조 및 기능 회복;
신장 세포의 생존력 증가; 및
미토콘드리아 기능 및 구조 개선.

[청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 GQD는 시험관에서 (in vitro) 전체 조성물을 기준으로 0 초과 0.5 μg/ml 이하로 포함되는 것인, 신장 독성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 GQD는 생체 내에서 (in vivo) 15 내지 30 mg/kg으로 포함되는 것인, 신장 독성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 7] 그래핀 양자점 (graphene quantum dot; GQD)을 유효성분으로 포함하는 항암제 부작용 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 항암제 부작용은 신장 독성인 것인, 항암제 부작용 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 9] 제7항에 있어서,
상기 조성물은 항암제와 병용 투여되는 것인, 항암제 부작용 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 10] 제7항에 있어서,
상기 조성물은 항암제와 혼합된 혼합제 형태인 것인, 항암제 부작용 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 11] 제7항에 있어서,
상기 조성물은 항암제와 각각 제제화되어 동시에, 별도로, 또는 순차적으로 투여되는 형태인 것인, 항암제 부작용 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

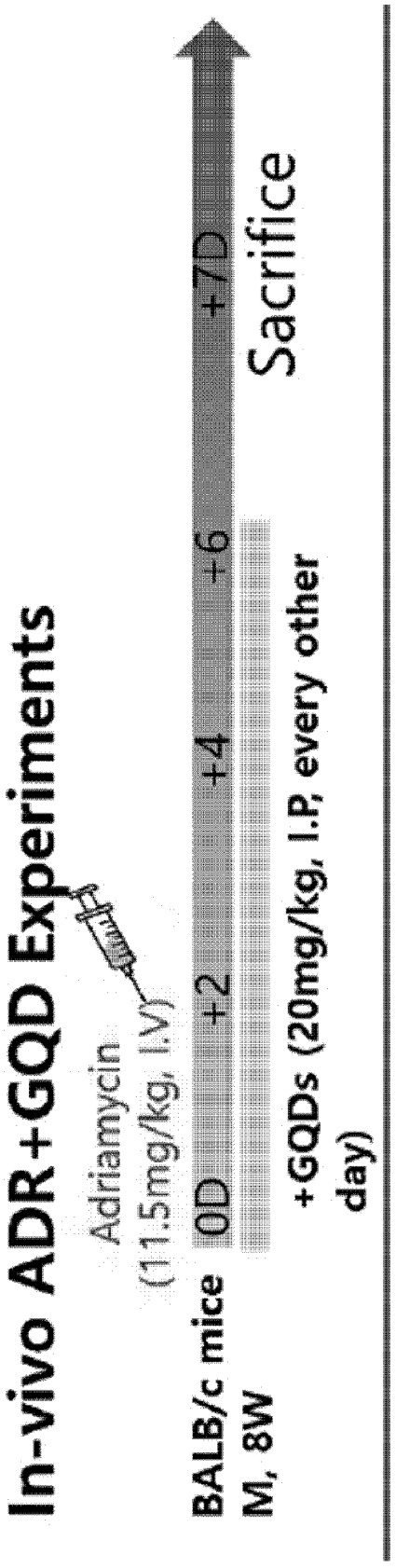
[청구항 12] 제7항의 조성물, 및 설명서를 포함하는 항암제 부작용 예방 또는 치료용 키트.

[청구항 13] 그래핀 양자점 (graphene quantum dot; GQD)을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 신장 독성 질환 예방 또는 치료 방법.

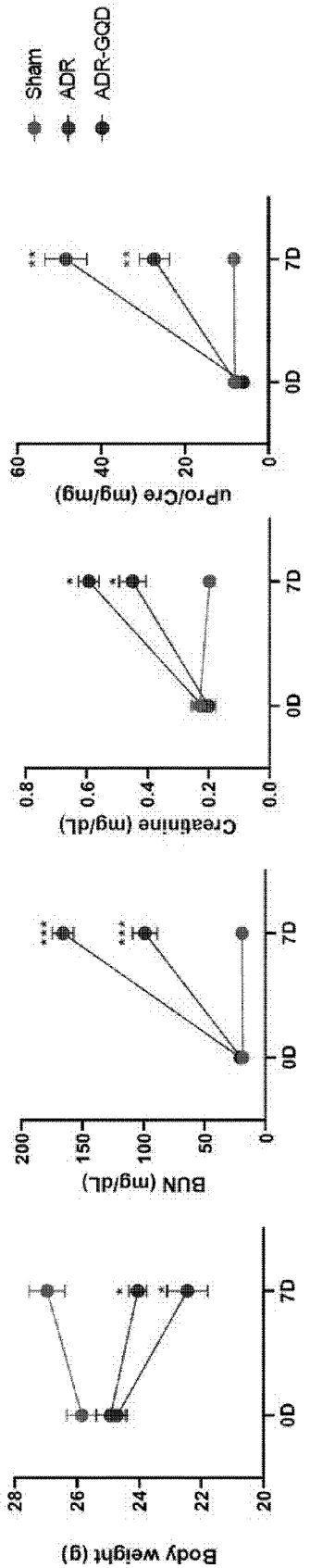
[청구항 14] 그래핀 양자점 (graphene quantum dot; GQD)을 유효성분으로 포함하는 조성물의 신장 독성 질환 예방 또는 치료 용도.

[청구항 15] 신장 독성 질환 예방 또는 치료용 제제를 제조하기 위한 그래핀 양자점 (graphene quantum dot; GQD)을 유효성분으로 포함하는 조성물의 용도.

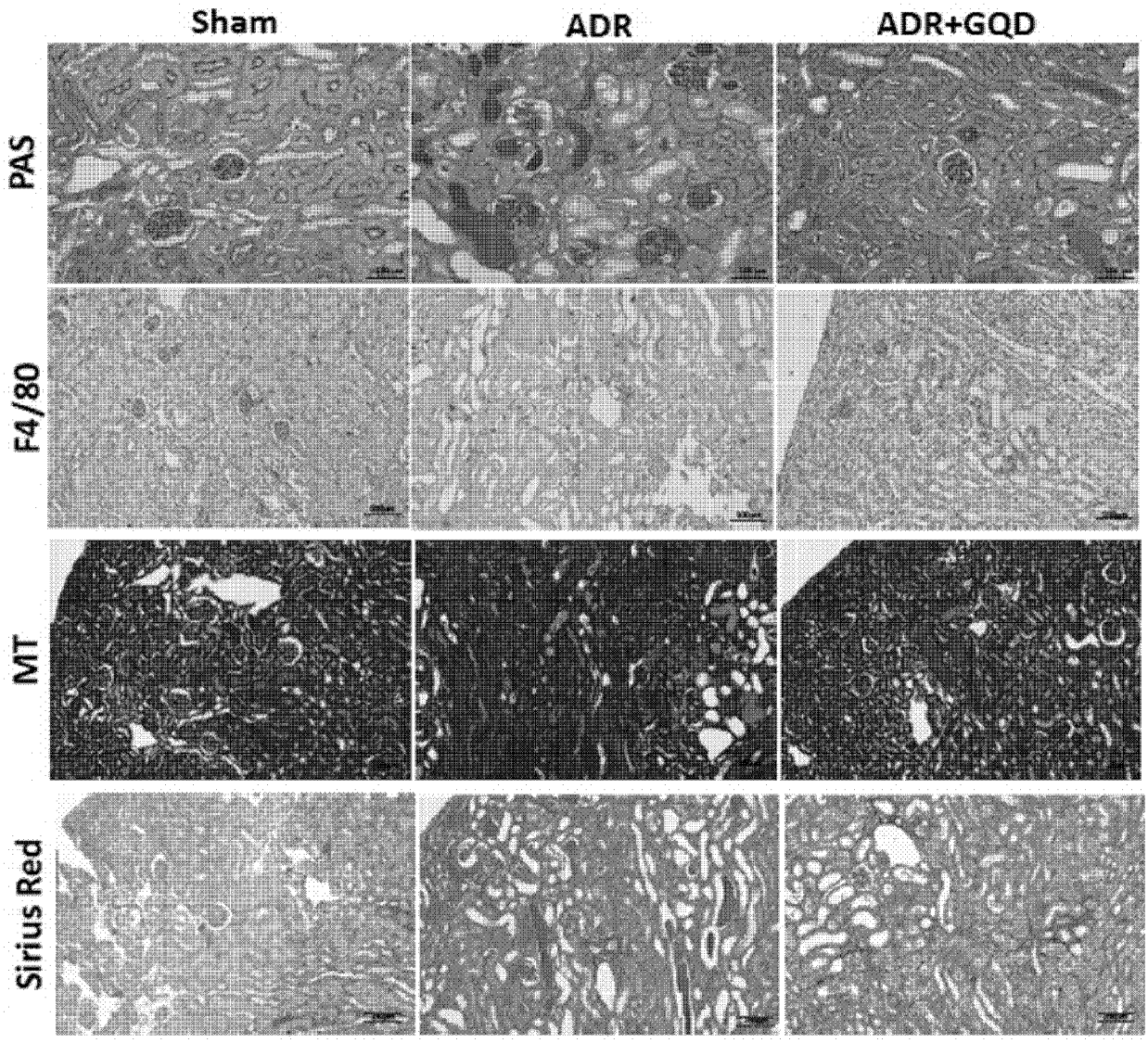
[도1]


In-vivo ADR+GQD Experiments
Adriamycin
(11.5mg/kg, I.V)
BALB/c mice
M, 8W
0D
+2
+4
+6
+7D
Sacrifice
+GQDs (20mg/kg, I.P, every other day)

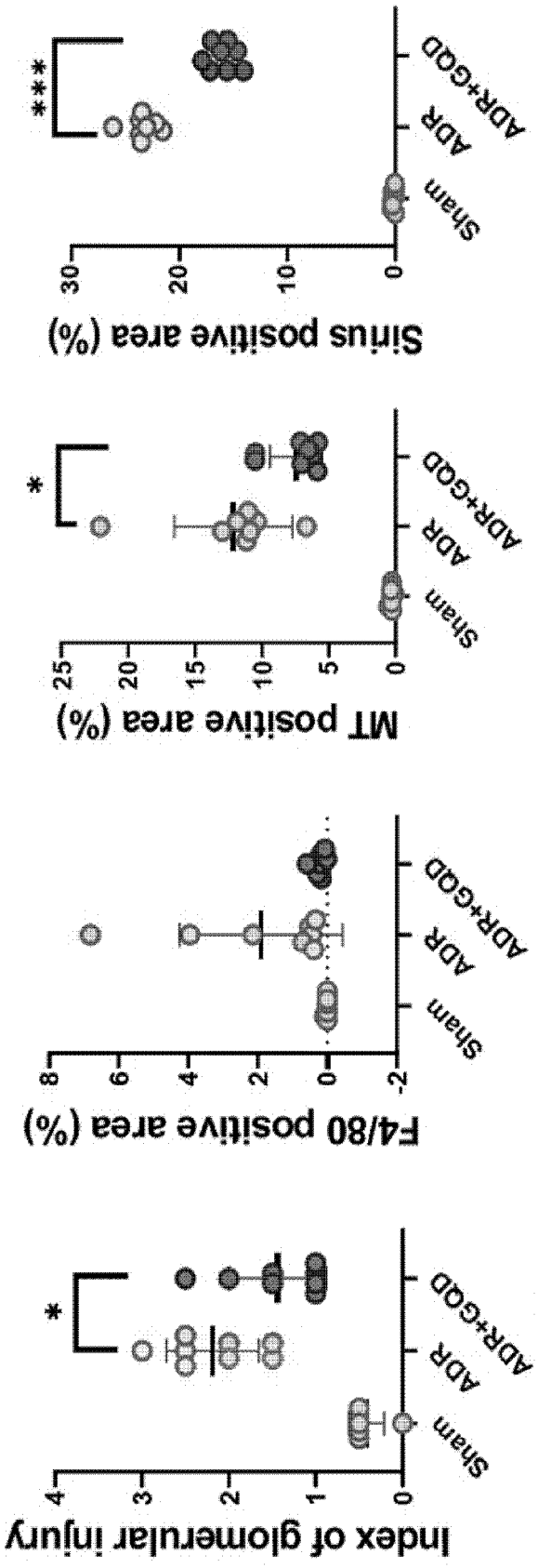
[도2a]


Sham
ADR
ADR-GQD
Body weight (g)
BUN (mg/dL)
Creatinine (mg/dL)
uPro/Cre (mg/mg)
0D
7D

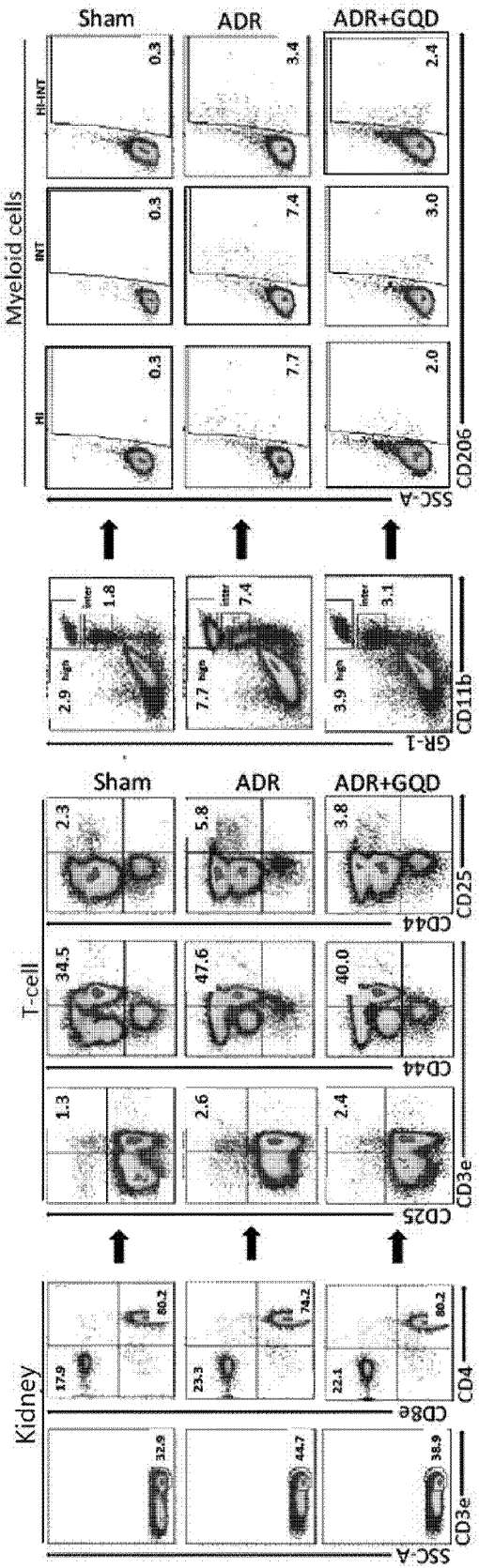
[도2b]



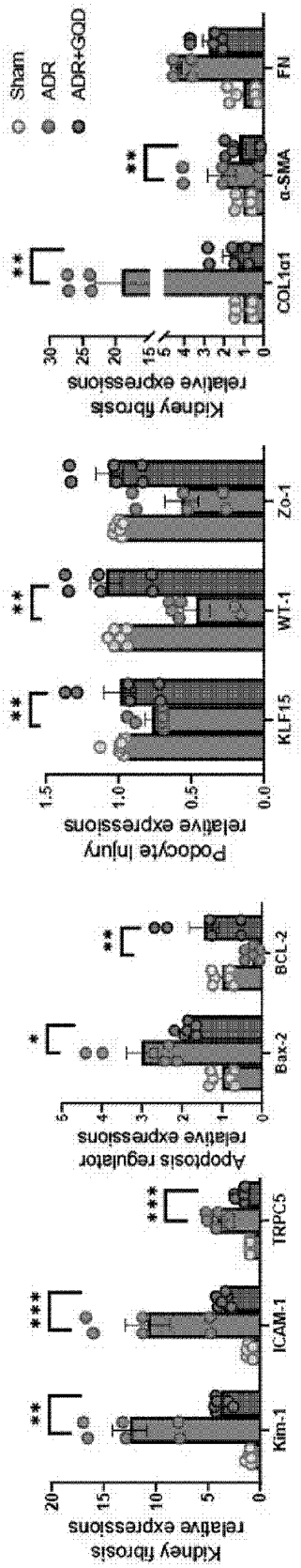
[도2c]


Sirius positive area (%)
MT positive area (%)
F4/80 positive area (%)
Index of glomerular injury
Sham
ADR
ADR+GQD
*
***

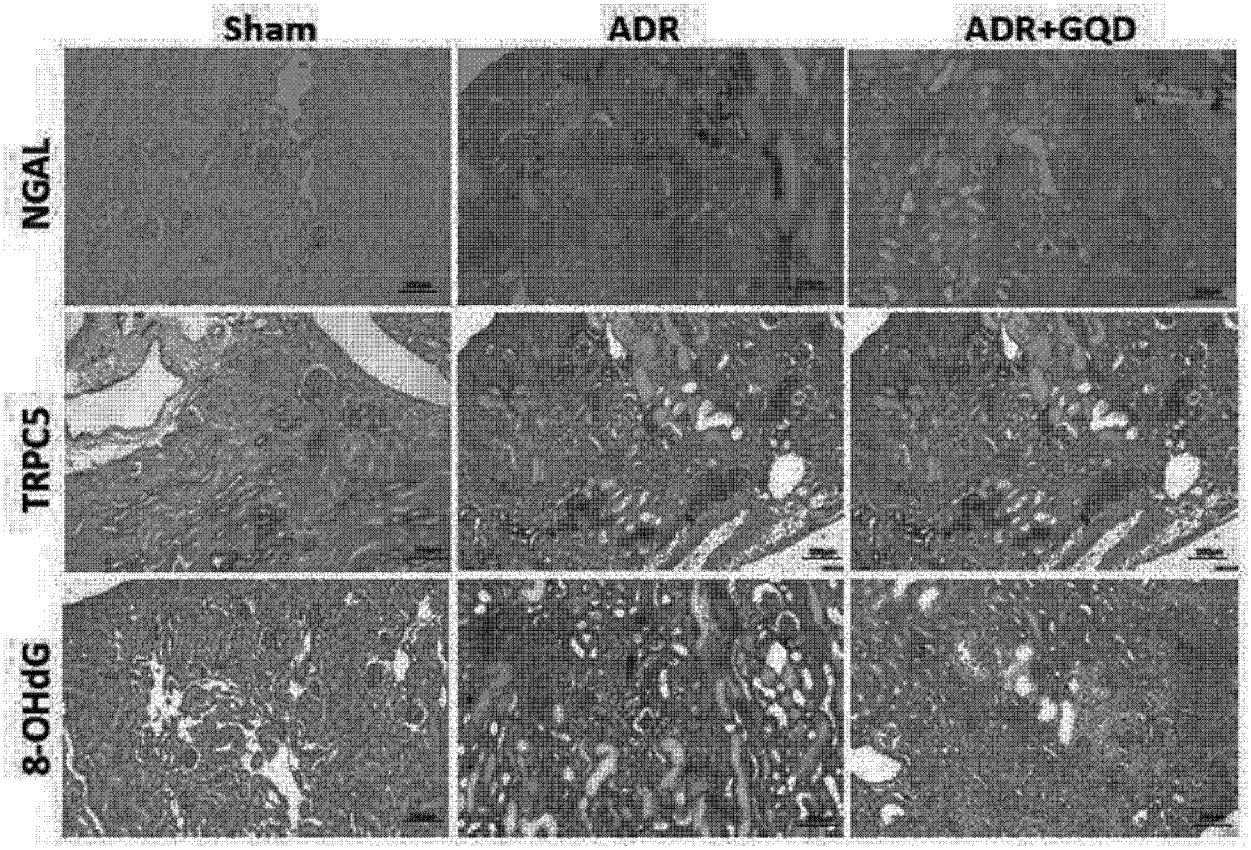
[도2d]


Sham
ADR
ADR+GQD
Myeloid cells
HI-INT
INT
HI
0.3
3.4
2.4
0.3
7.4
3.0
0.3
7.7
2.0
SSC-A
CD206
GR-1
CD11b
inter
high
1.8
2.9
7.4
7.7
3.1
3.9
T-cell
CD44
CD25
2.3
5.8
3.8
34.5
47.6
40.0
CD25
CD3e
1.3
2.6
2.4
Kidney
CD8e
CD4
17.9
80.2
23.3
74.2
22.1
80.2
SSC-A
CD3e
32.9
44.7
38.9

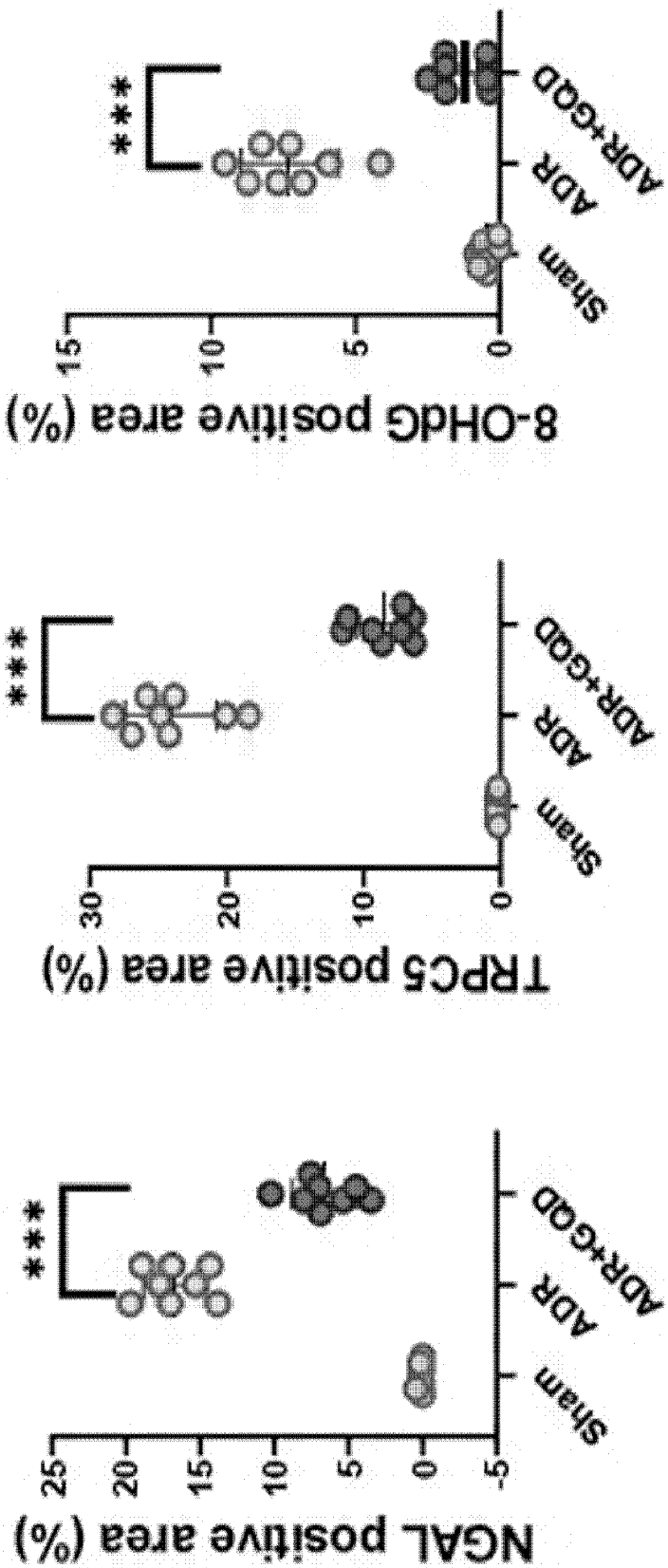
[도2e]


Sham
ADR
ADR+GQD
Kidney fibrosis
relative expressions
COL1α1
α-SMA
FN
Podocyte injury
relative expressions
KLF15
WT-1
Zo-1
Apoptosis regulator
relative expressions
Bax-2
BCL-2
Kidney fibrosis
relative expressions
Kim-1
ICAM-1
TRPC5

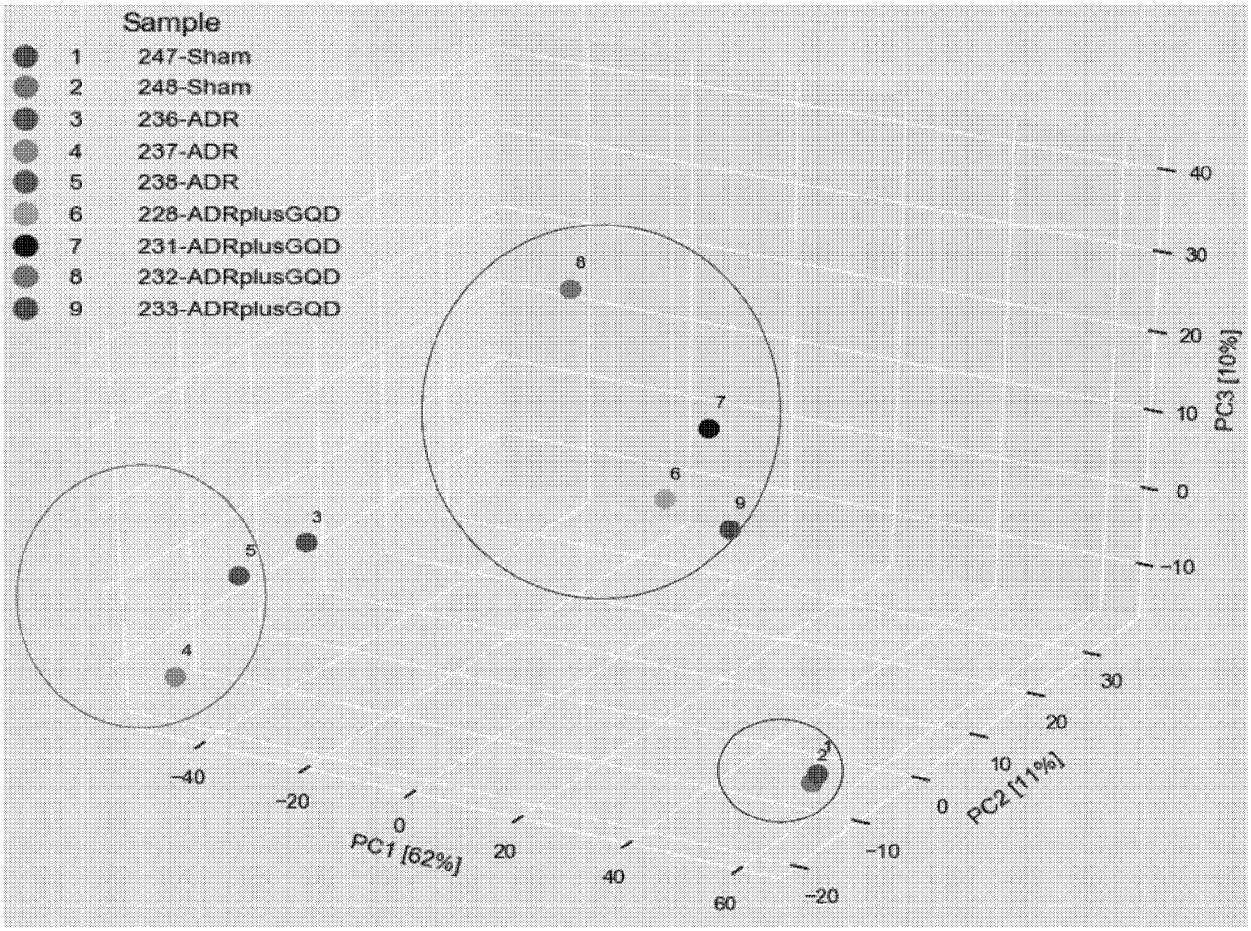
[도2f]



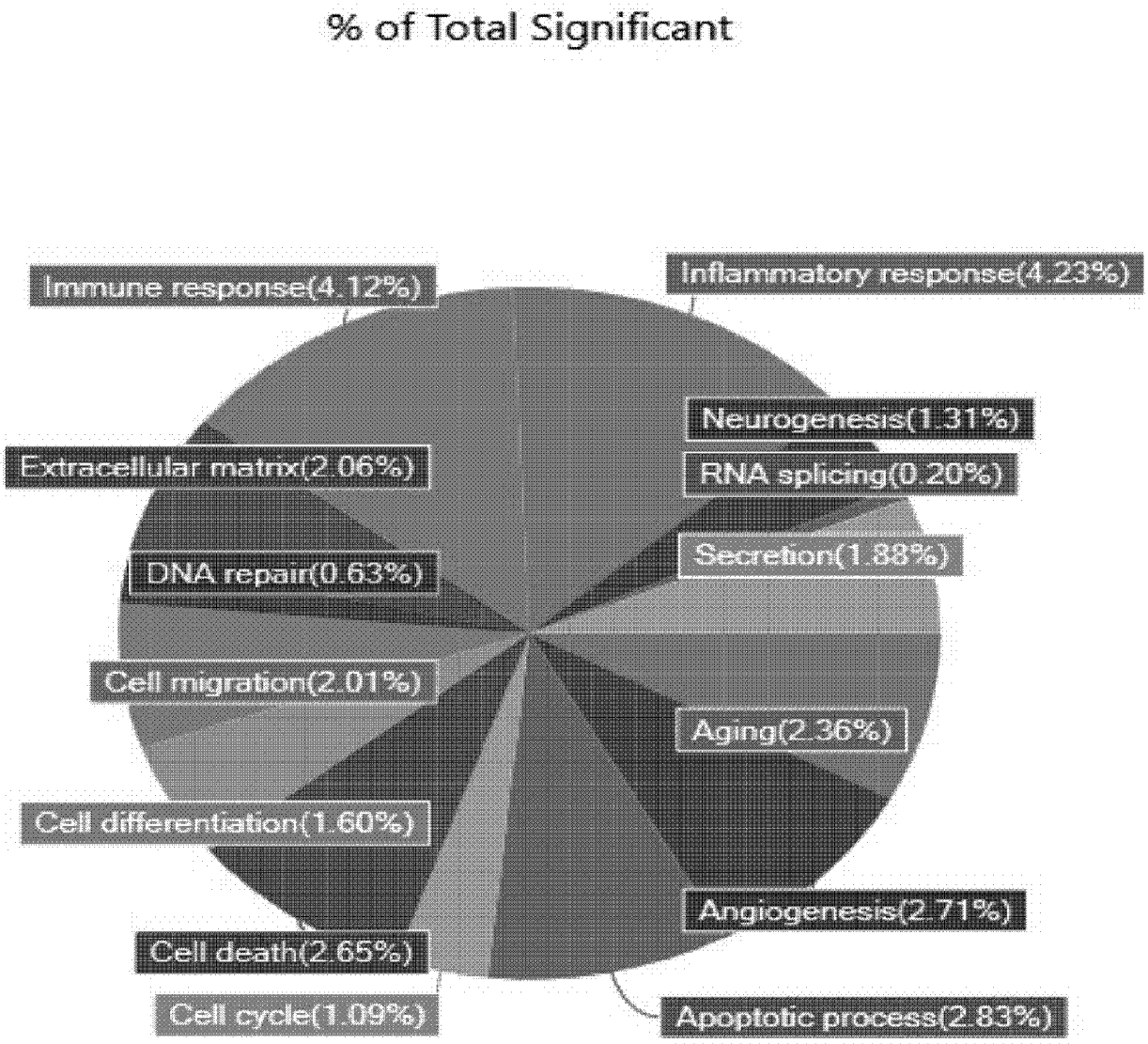
[도2g]


8-OHdG positive area (%)
15
10
5
0
Sham
ADR
ADR+GOD
****
TRPC5 positive area (%)
30
20
10
0
Sham
ADR
ADR+GOD
****
NGAL positive area (%)
25
20
15
10
5
0
-5
Sham
ADR
ADR+GOD
****

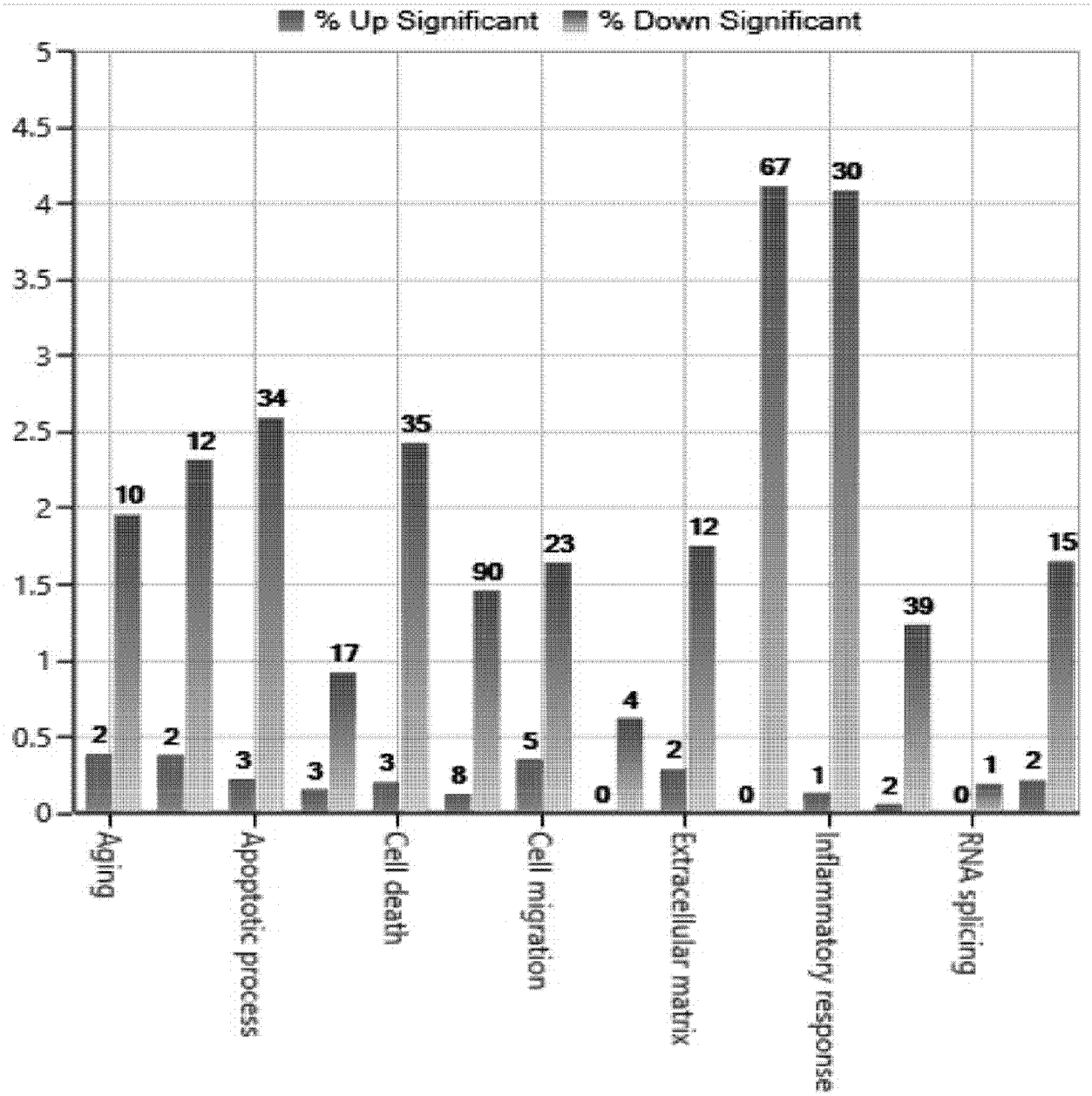
[도3a]


Sample
1 247-Sham
2 248-Sham
3 236-ADR
4 237-ADR
5 238-ADR
6 228-ADRplusGQD
7 231-ADRplusGQD
8 232-ADRplusGQD
9 233-ADRplusGQD
PC1 [62%]
PC2 [11%]
PC3 [10%]

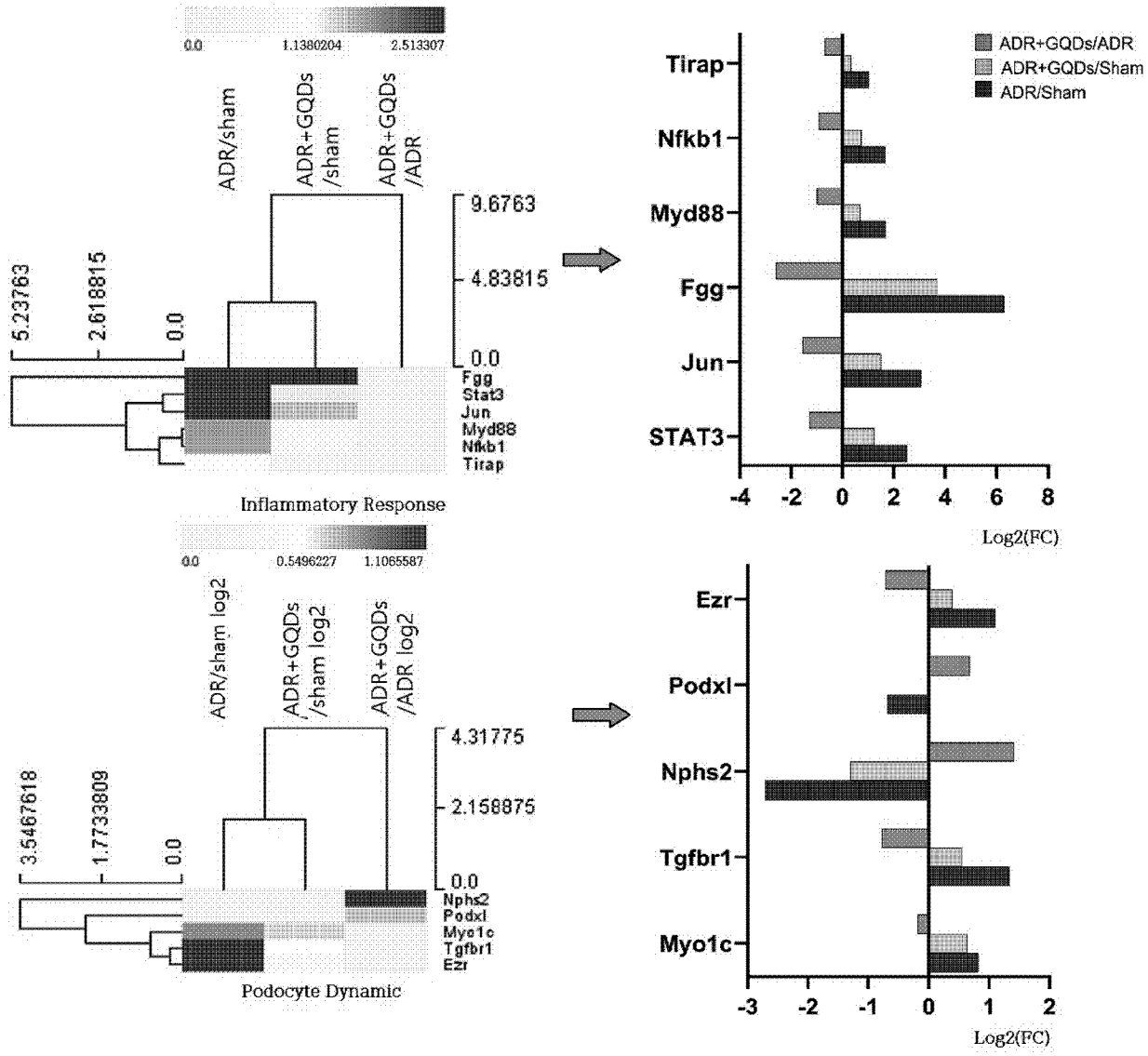
[도3b]


% of Total Significant
Immune response(4.12%)
Inflammatory response(4.23%)
Neurogenesis(1.31%)
Extracellular matrix(2.06%)
RNA splicing(0.20%)
Secretion(1.88%)
DNA repair(0.63%)
Cell migration(2.01%)
Aging(2.36%)
Cell differentiation(1.60%)
Angiogenesis(2.71%)
Cell death(2.65%)
Cell cycle(1.09%)
Apoptotic process(2.83%)

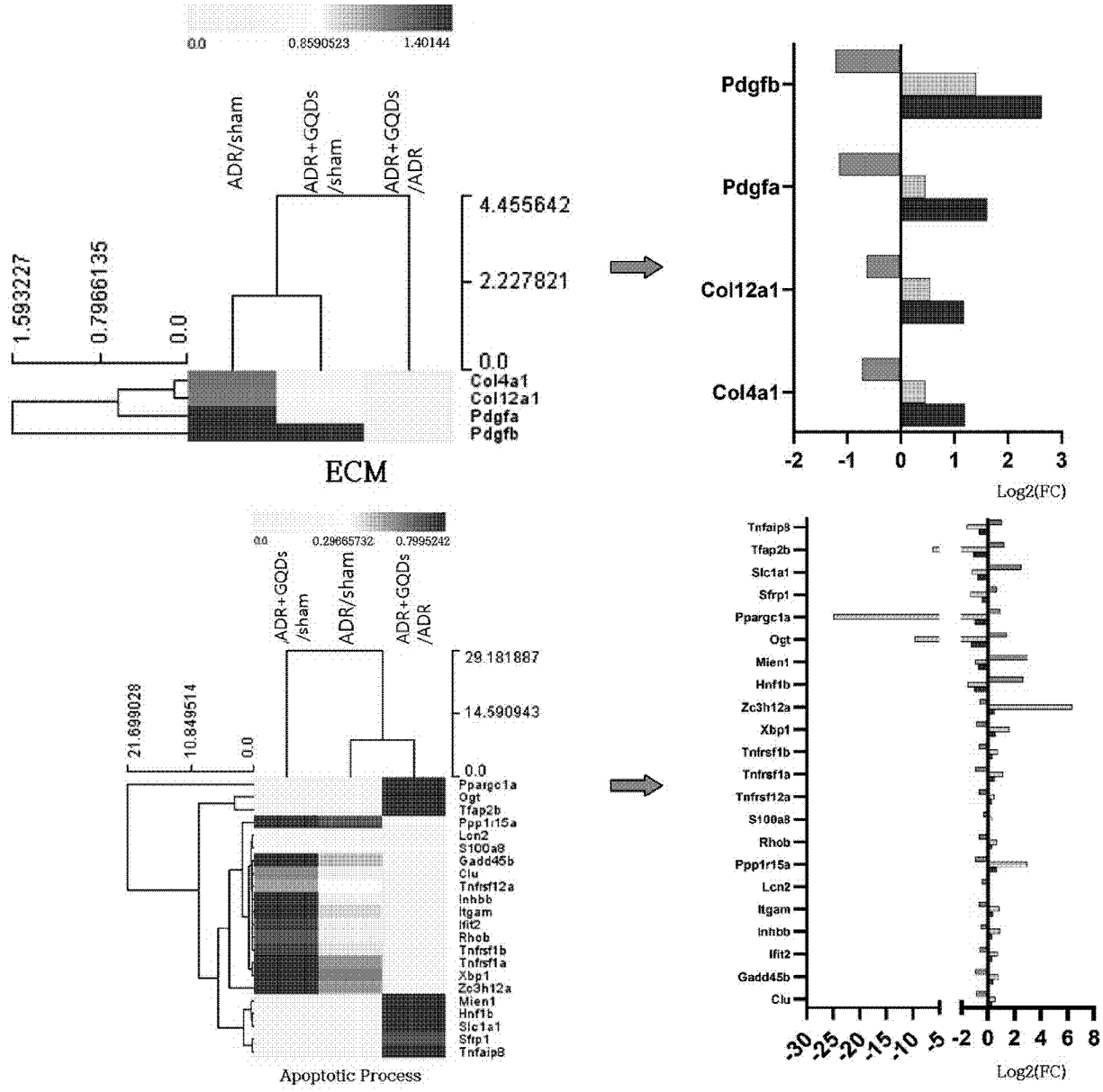
[도3c]


% Up Significant
% Down Significant
5
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
2
10
2
12
3
34
3
17
3
35
8
90
5
23
0
4
2
12
0
67
1
30
2
39
0
1
2
15
Aging
Apoptotic process
Cell death
Cell migration
Extracellular matrix
Inflammatory response
RNA splicing

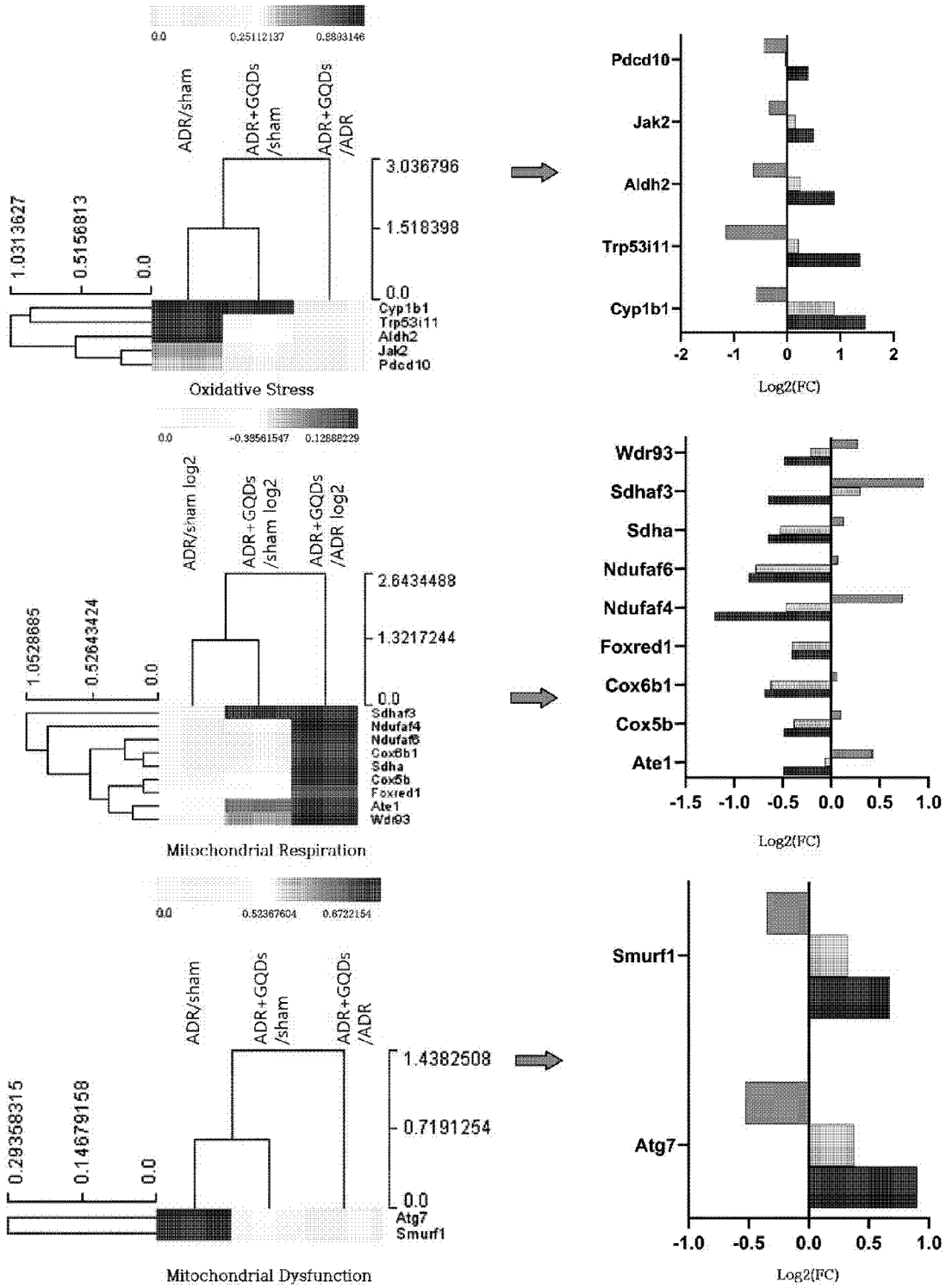
[도3d]


0.0
1.1380204
2.513307
ADR/sham
ADR+GQDs /sham
ADR+GQDs /ADR
9.6763
4.83815
0.0
5.23763
2.618815
0.0
Fgg
Stat3
Jun
Myd88
Nfkb1
Tirap
Inflammatory Response
ADR+GQDs/ADR
ADR+GQDs/Sham
ADR/Sham
Tirap
Nfkb1
Myd88
Fgg
Jun
STAT3
-4 -2 0 2 4 6 8
Log2(FC)
0.0
0.5496227
1.1065587
ADR/sham log2
ADR+GQDs /sham log2
ADR+GQDs /ADR log2
4.31775
2.158875
0.0
3.5467618
1.7733809
0.0
Nphs2
Podxl
Myo1c
Tgfbr1
Ezr
Podocyte Dynamic
Ezr
Podxl
Nphs2
Tgfbr1
Myo1c
-3 -2 -1 0 1 2
Log2(FC)

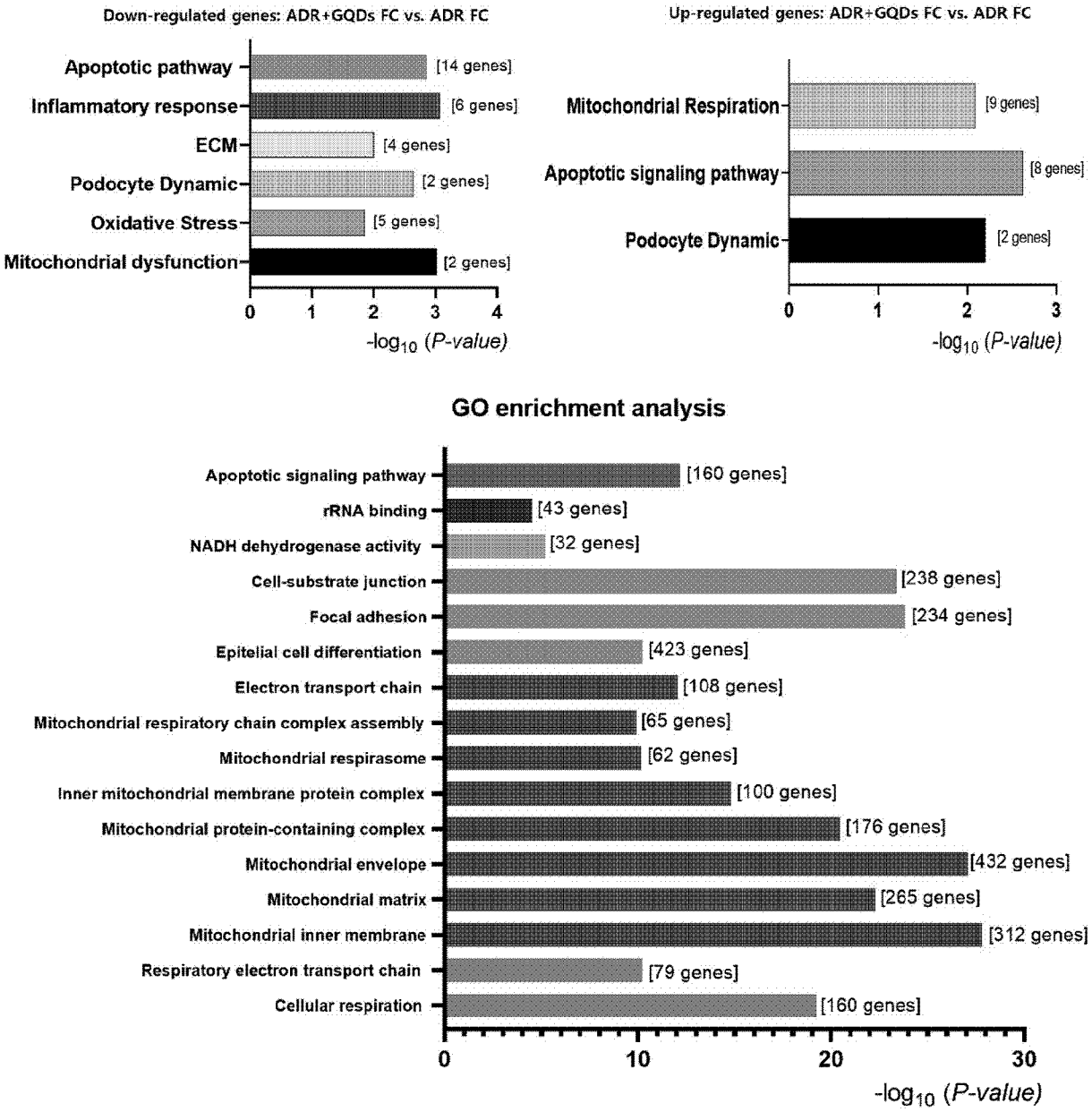
[도3e]


0.0
0.8590523
1.40144
ADR/sham
ADR+GQDs /sham
ADR+GQDs /ADR
1.593227
0.7966135
0.0
4.455642
2.227821
0.0
Col4a1
Col12a1
Pdgfa
Pdgfb
ECM
Pdgfb
Pdgfa
Col12a1
Col4a1
-2
-1
0
1
2
3
Log2(FC)
0.0
0.29665732
0.7995242
ADR+GQDs /sham
ADR/sham
ADR+GQDs /ADR
21.699028
10.849514
0.0
29.181887
14.590943
0.0
Ppargc1a
Ogt
Tfap2b
Ppp1r15a
Lcn2
S100a8
Gadd45b
Clu
Tnfrsf12a
Inhbb
Itgam
Ifit2
Rhob
Tnfrsf1b
Tnfrsf1a
Xbp1
Zc3h12a
Mien1
Hnf1b
Slc1a1
Sfrp1
Tnfaip8
Apoptotic Process
Tnfaip8
Tfap2b
Slc1a1
Sfrp1
Ppargc1a
Ogt
Mien1
Hnf1b
Zc3h12a
Xbp1
Tnfrsf1b
Tnfrsf1a
Tnfrsf12a
S100a8
Rhob
Ppp1r15a
Lcn2
Itgam
Inhbb
Ifit2
Gadd45b
Clu
-30
-25
-20
-15
-10
-5
-2
0
2
4
6
8
Log2(FC)

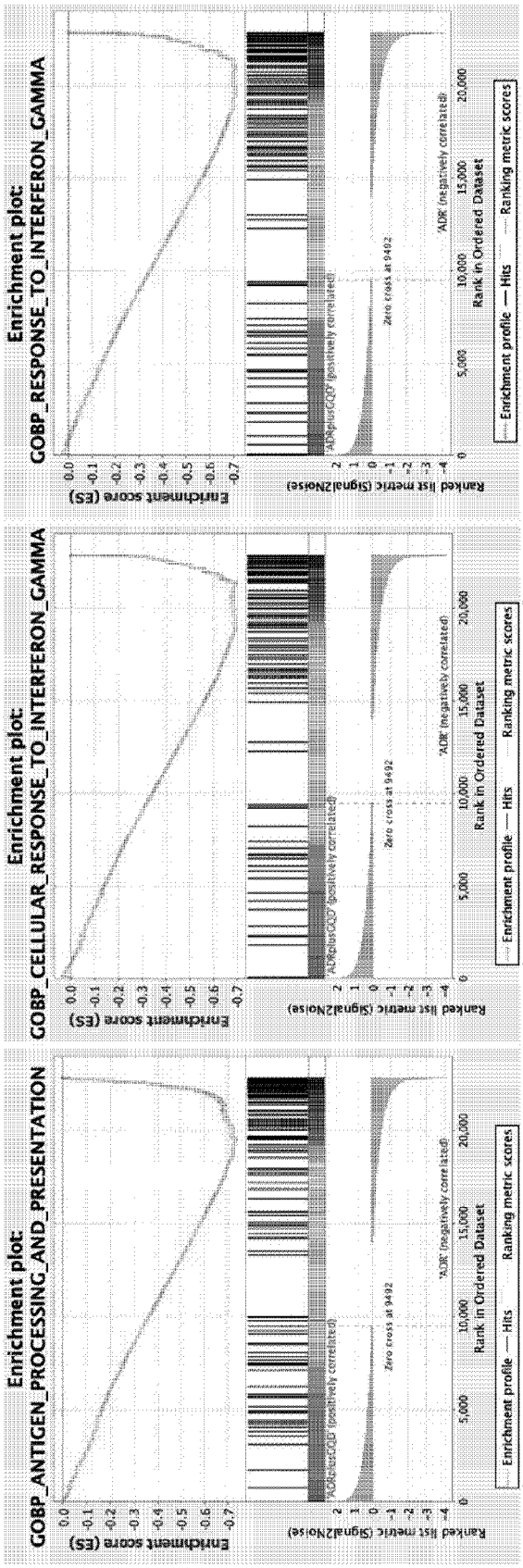
[도3f]


0.0
0.25112137
0.8893146
ADR/sham
ADR+GQDs /sham
ADR+GQDs /ADR
1.0313627
0.5156813
0.0
3.036796
1.518398
0.0
Cyp1b1
Trp53i11
Aldh2
Jak2
Pdcd10
Oxidative Stress
Pdcd10
Jak2
Aldh2
Trp53i11
Cyp1b1
-2
-1
0
1
2
Log2(FC)
0.0
-0.39561547
0.12888229
ADR/sham log2
ADR+GQDs /sham log2
ADR+GQDs /ADR log2
1.0528665
0.52643424
0.0
2.6434488
1.3217244
0.0
Sdhaf3
Ndufaf4
Ndufaf6
Cox6b1
Sdha
Cox5b
Foxred1
Ate1
Wdr93
Mitochondrial Respiration
Wdr93
Sdhaf3
Sdha
Ndufaf6
Ndufaf4
Foxred1
Cox6b1
Cox5b
Ate1
-1.5
-1.0
-0.5
0.0
0.5
1.0
Log2(FC)
0.0
0.52367604
0.6722154
ADR/sham
ADR+GQDs /sham
ADR+GQDs /ADR
0.29358315
0.14679158
0.0
1.4382508
0.7191254
0.0
Atg7
Smurf1
Mitochondrial Dysfunction
Smurf1
Atg7
-1.0
-0.5
0.0
0.5
1.0
Log2(FC)

[도3g]


Down-regulated genes: ADR+GQDs FC vs. ADR FC
Apoptotic pathway
Inflammatory response
ECM
Podocyte Dynamic
Oxidative Stress
Mitochondrial dysfunction
[14 genes]
[6 genes]
[4 genes]
[2 genes]
[5 genes]
[2 genes]
0 1 2 3 4
-log10 (P-value)
Up-regulated genes: ADR+GQDs FC vs. ADR FC
Mitochondrial Respiration
Apoptotic signaling pathway
Podocyte Dynamic
[9 genes]
[8 genes]
[2 genes]
0 1 2 3
-log10 (P-value)
GO enrichment analysis
Apoptotic signaling pathway
rRNA binding
NADH dehydrogenase activity
Cell-substrate junction
Focal adhesion
Epitelial cell differentiation
Electron transport chain
Mitochondrial respiratory chain complex assembly
Mitochondrial respirasome
Inner mitochondrial membrane protein complex
Mitochondrial protein-containing complex
Mitochondrial envelope
Mitochondrial matrix
Mitochondrial inner membrane
Respiratory electron transport chain
Cellular respiration
[160 genes]
[43 genes]
[32 genes]
[238 genes]
[234 genes]
[423 genes]
[108 genes]
[65 genes]
[62 genes]
[100 genes]
[176 genes]
[432 genes]
[265 genes]
[312 genes]
[79 genes]
[160 genes]
0 10 20 30
-log10 (P-value)

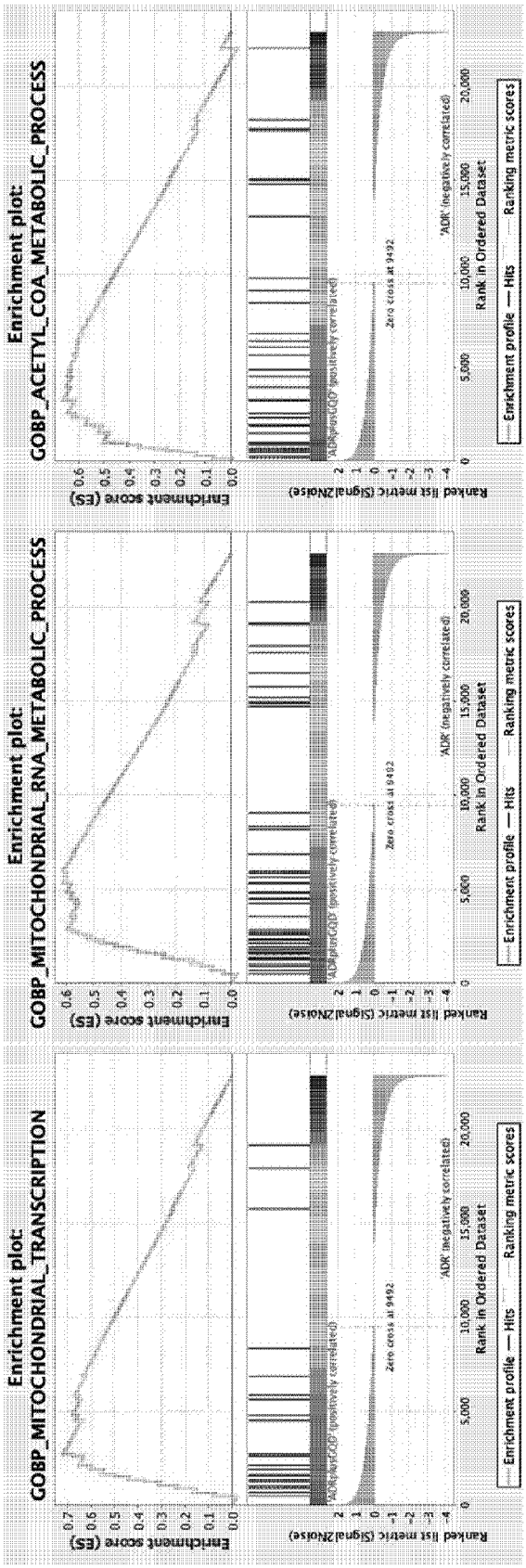
[도3h]



Gene Sets	Downregulated Hallmark Pathway	NG*(Core enrichment)	NES	FDR q-Value	Nom p-Value
GOBP	Antigen processing and presentation	61	-2.33	0	0
GOBP	Cellular Response to Interferon Gamma	61	-2.16	0	0
GOBP	Response to Interferon Gamma	73	-2.27	0	0

*GOBP = Gene Ontology Biological Process, NG = number of genes

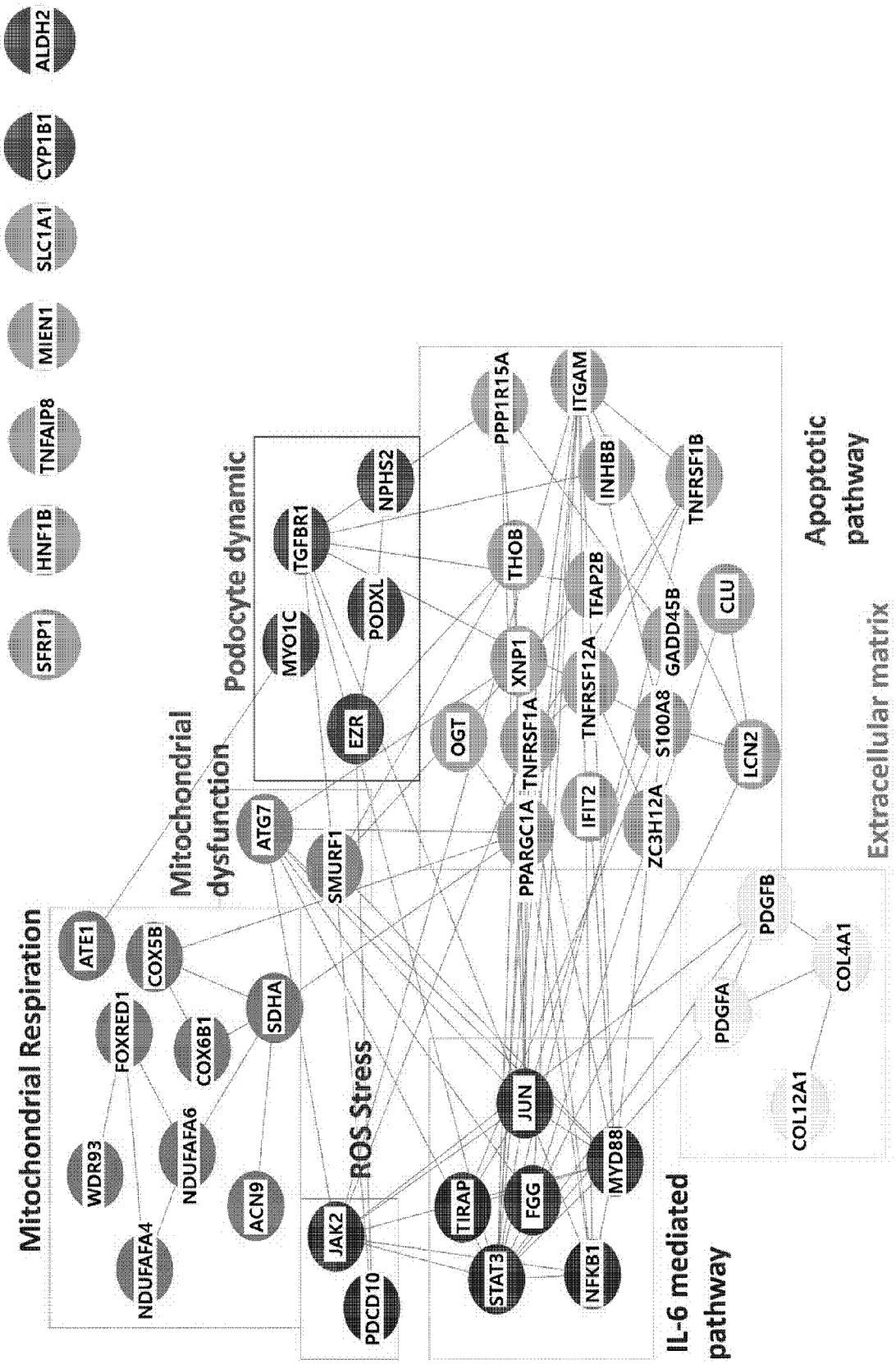
[도3i]



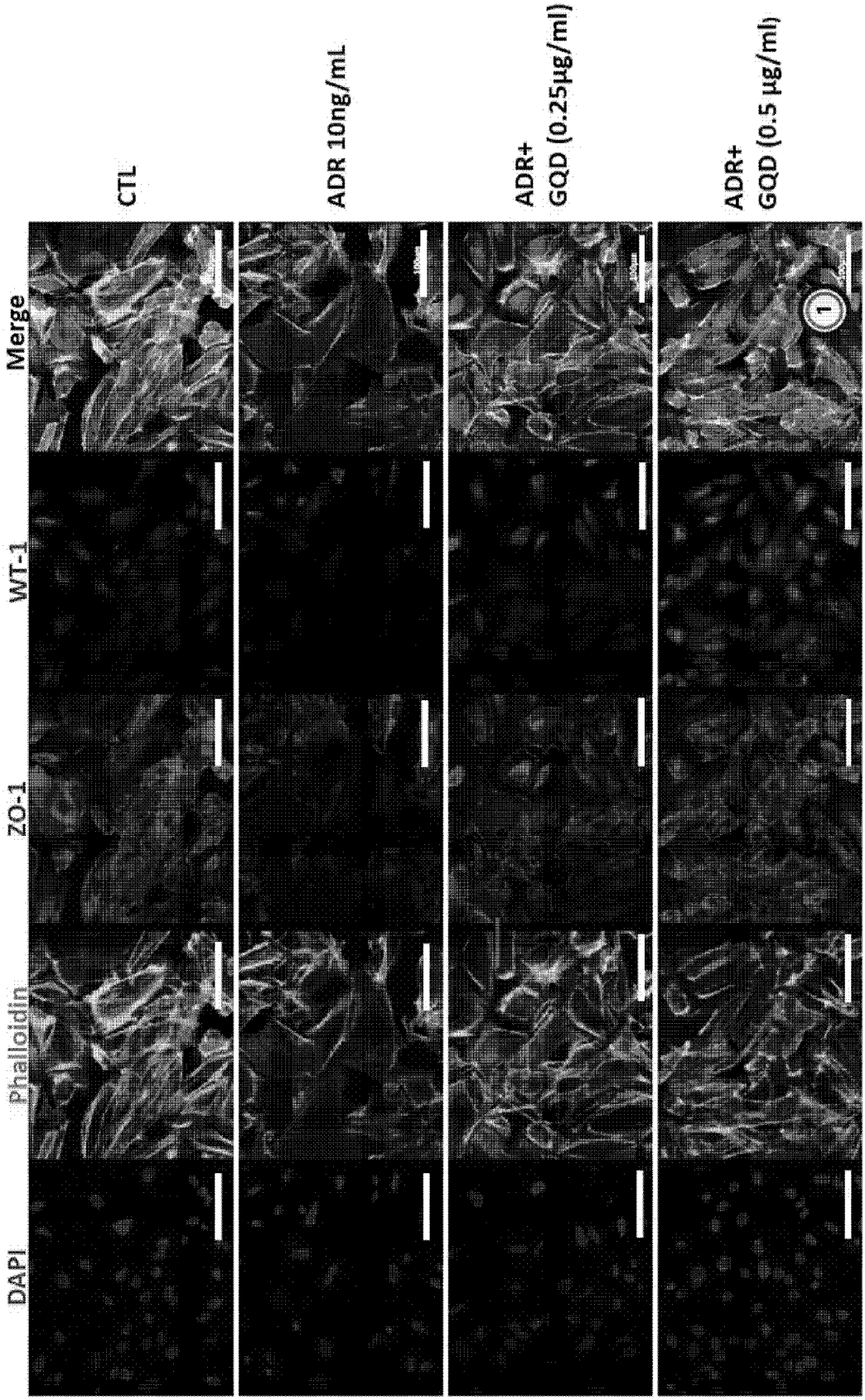
Gene Sets	Upregulated Hallmark Pathway	NG*(Core enrichment)	NES	FDR *q*-Value	Nom *p*-Value
GOBP	Mitochondrial Transcription	12	1.75	0.1087	0.004
GOBP	Mitochondrial RNA metabolic process	33	1.76	0.1225	0
GOBP	Proton Motive Force Driven ATP Synthesis	39	1.85	0.0778	0
GOBP	Acetyl COA Metabolic Process	17	1.81	0.0857	0

*GOBP = Gene Ontology Biological Process, NG = number of genes

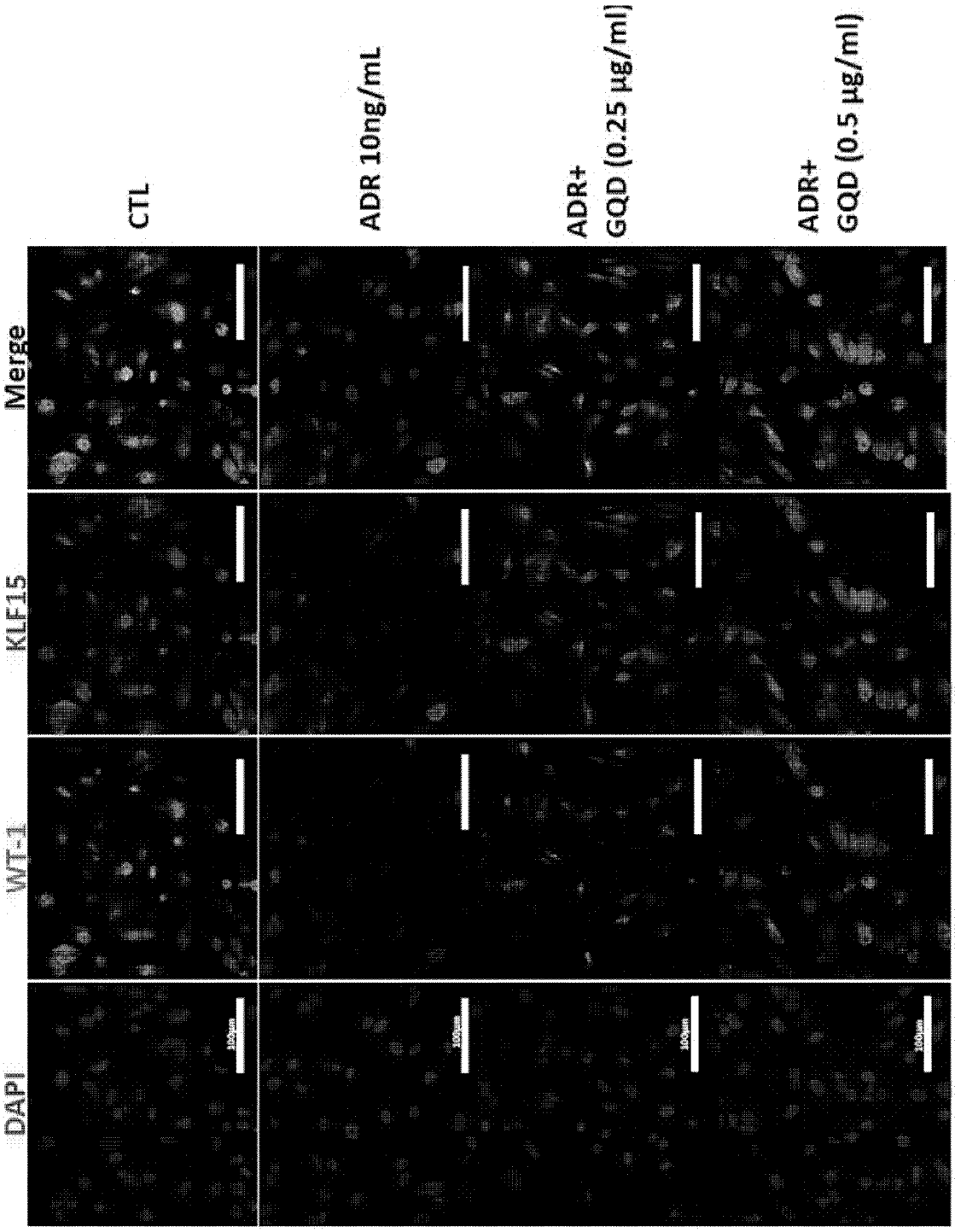
[도3j]


ALDH2
CYP1B1
SLC1A1
MIEN1
TNFAIP8
HNF1B
SFRP1
Mitochondrial Respiration
Mitochondrial dysfunction
Podocyte dynamic
ROS Stress
IL-6 mediated pathway
Apoptotic pathway
Extracellular matrix
ATE1
COX5B
FOXRED1
COX6B1
SDHA
WDR93
NDUFAFA6
ACN9
NDUFAFA4
ATG7
SMURF1
MYO1C
TGFBR1
EZR
PODXL
NPHS2
OGT
PPARGC1A
TNFRSF1A
XNP1
PPP1R15A
THOB
ITGAM
INHBB
TFAP2B
TNFRSF12A
IFIT2
ZC3H12A
S100A8
GADD45B
TNFRSF1B
CLU
LCN2
JAK2
PDCD10
TIRAP
STAT3
JUN
FGG
NFKB1
MYD88
PDGFB
PDGFA
COL4A1
COL12A1

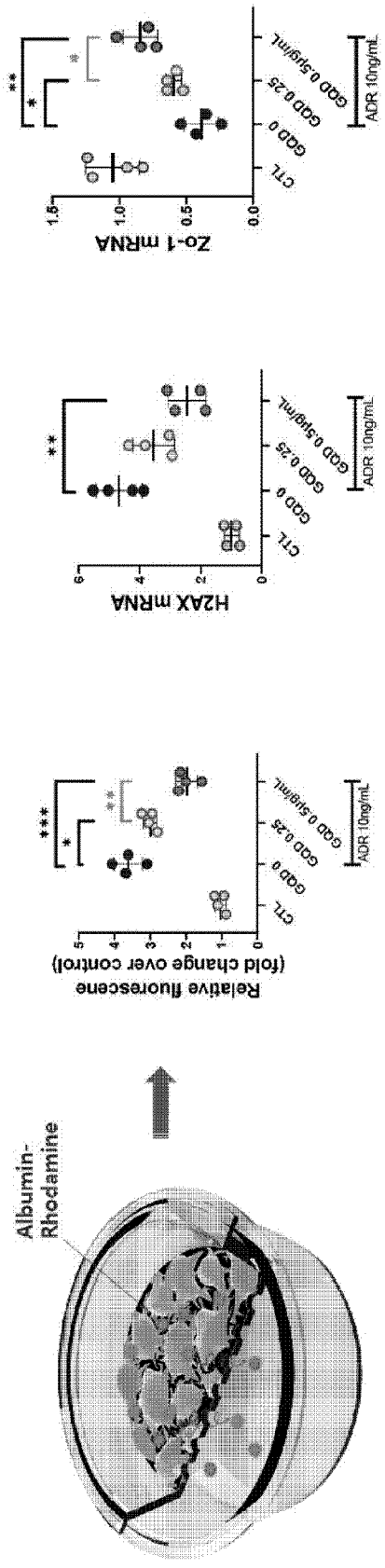
[도4a]


CTL
ADR 10ng/mL
ADR+ GQD (0.25μg/ml)
ADR+ GQD (0.5 μg/ml)
Merge
WT-1
ZO-1
Phalloidin
DAPI

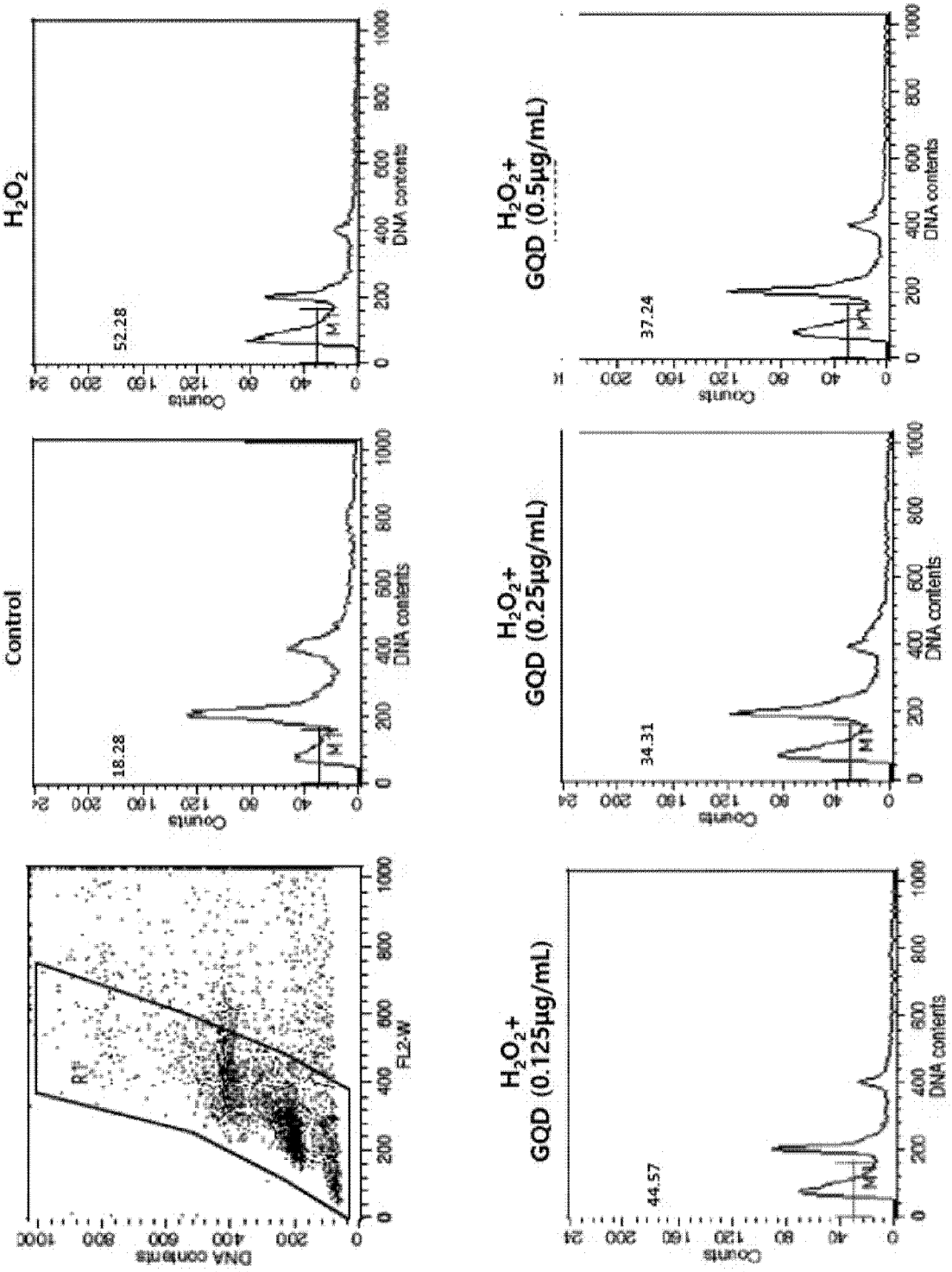
[도4b]


CTL
ADR 10ng/mL
ADR+ GQD (0.25 μg/ml)
ADR+ GQD (0.5 μg/ml)
Merge
KLF15
WT-1
DAPI

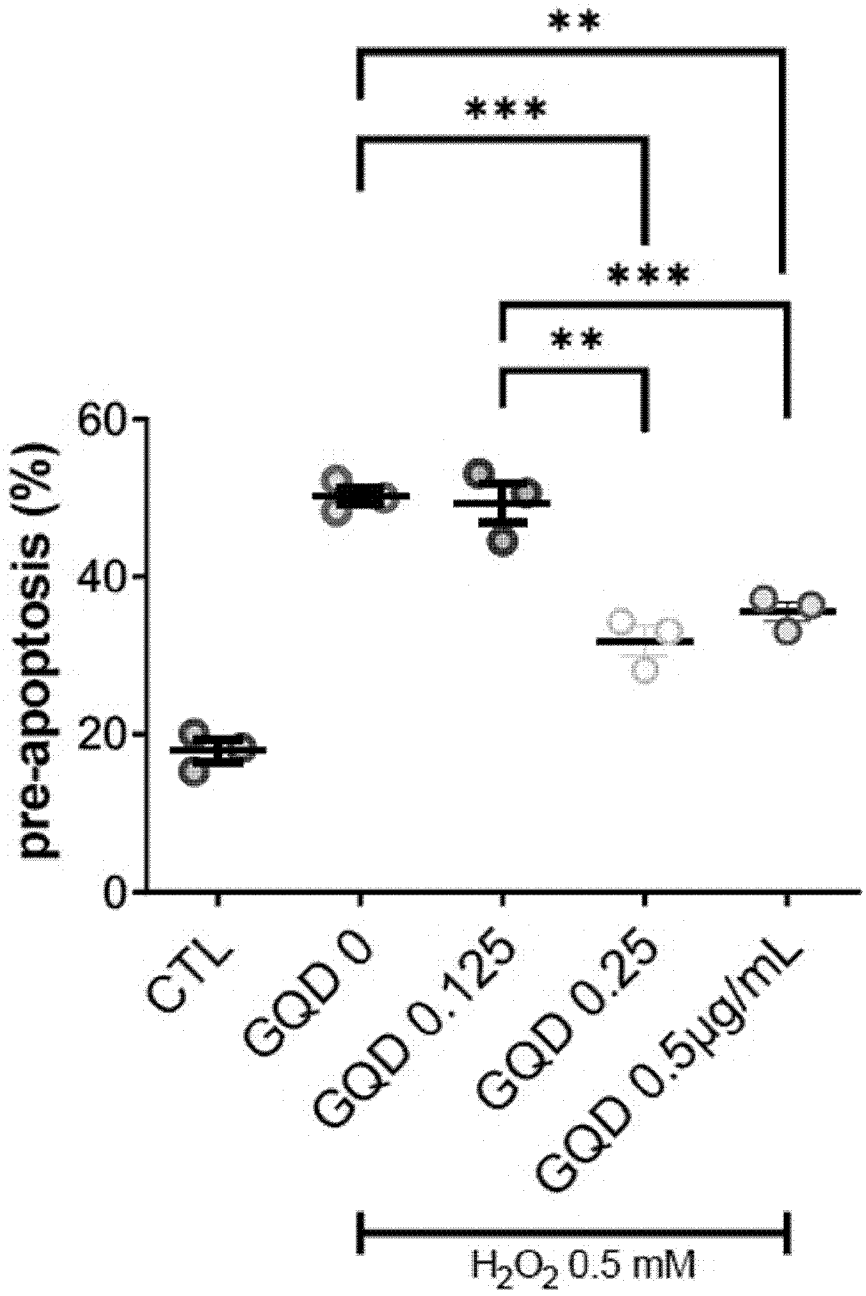
[도5]


Albumin-Rhodamine
Relative fluorescene (fold change over control)
H2AX mRNA
Zo-1 mRNA
CTL
GQD 0
GQD 0.25
GQD 0.5μg/mL
ADR 10ng/mL

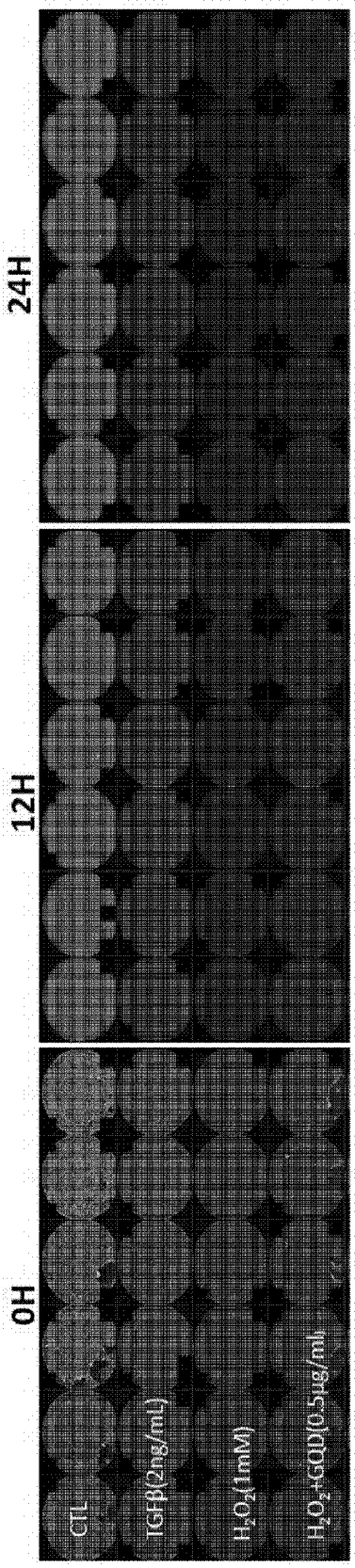
[도6a]


Control
H_2O_2
H_2O_2+ GQD (0.125μg/mL)
H_2O_2+ GQD (0.25μg/mL)
H_2O_2+ GQD (0.5μg/mL)
18.28
52.28
44.57
34.31
37.24
M1
R1
DNA contents
FL2-W
DNA counts
Counts

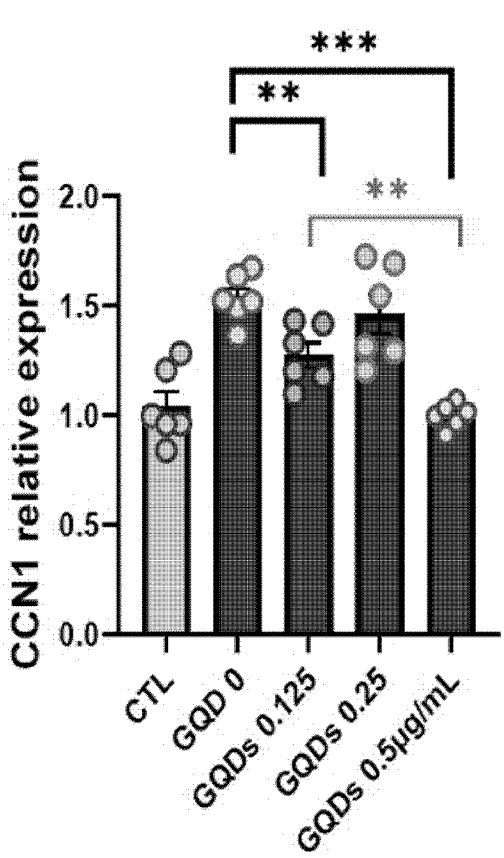
[도6b]

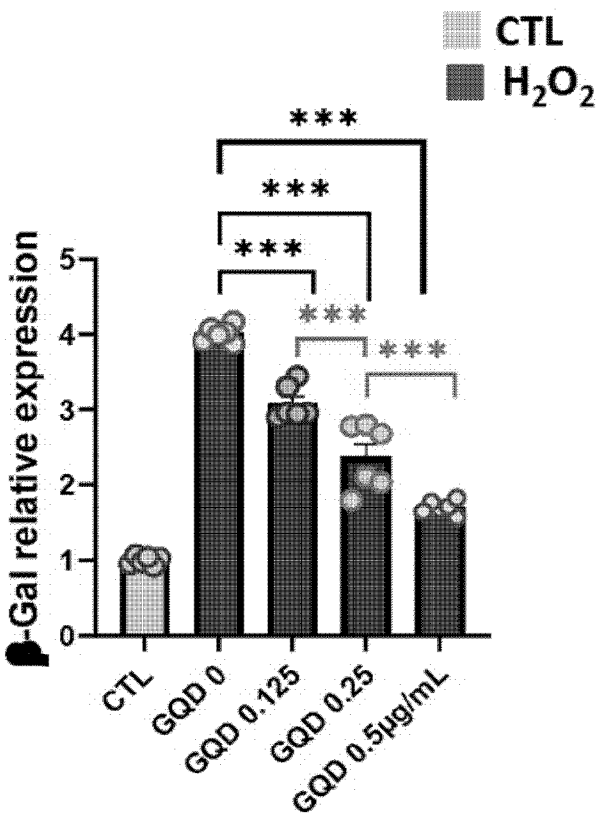

**
***
***
**
pre-apoptosis (%)
60
40
20
0
CTL
GQD 0
GQD 0.125
GQD 0.25
GQD 0.5μg/mL
H2O2 0.5 mM

[도7a]

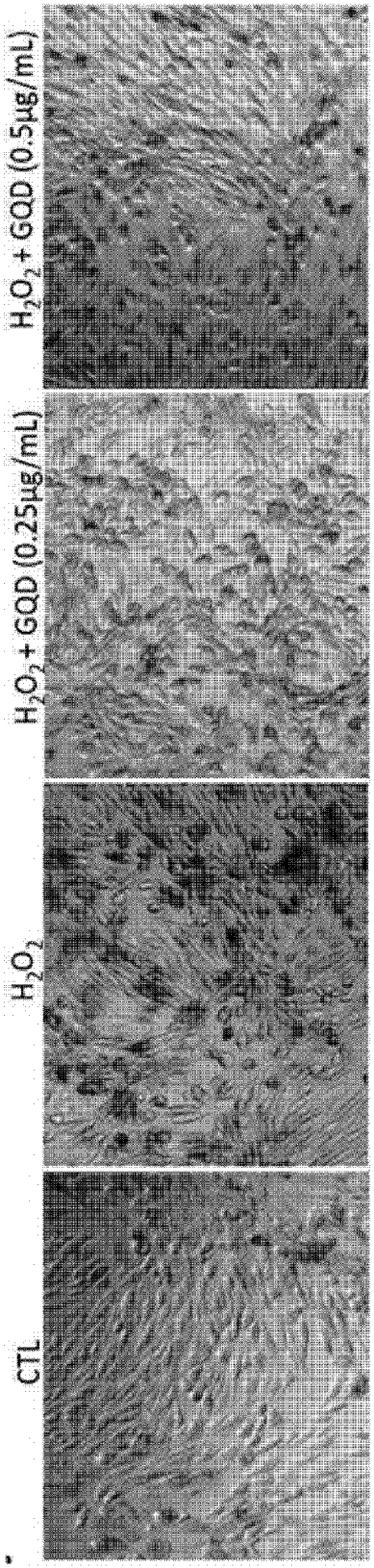


[도7b]

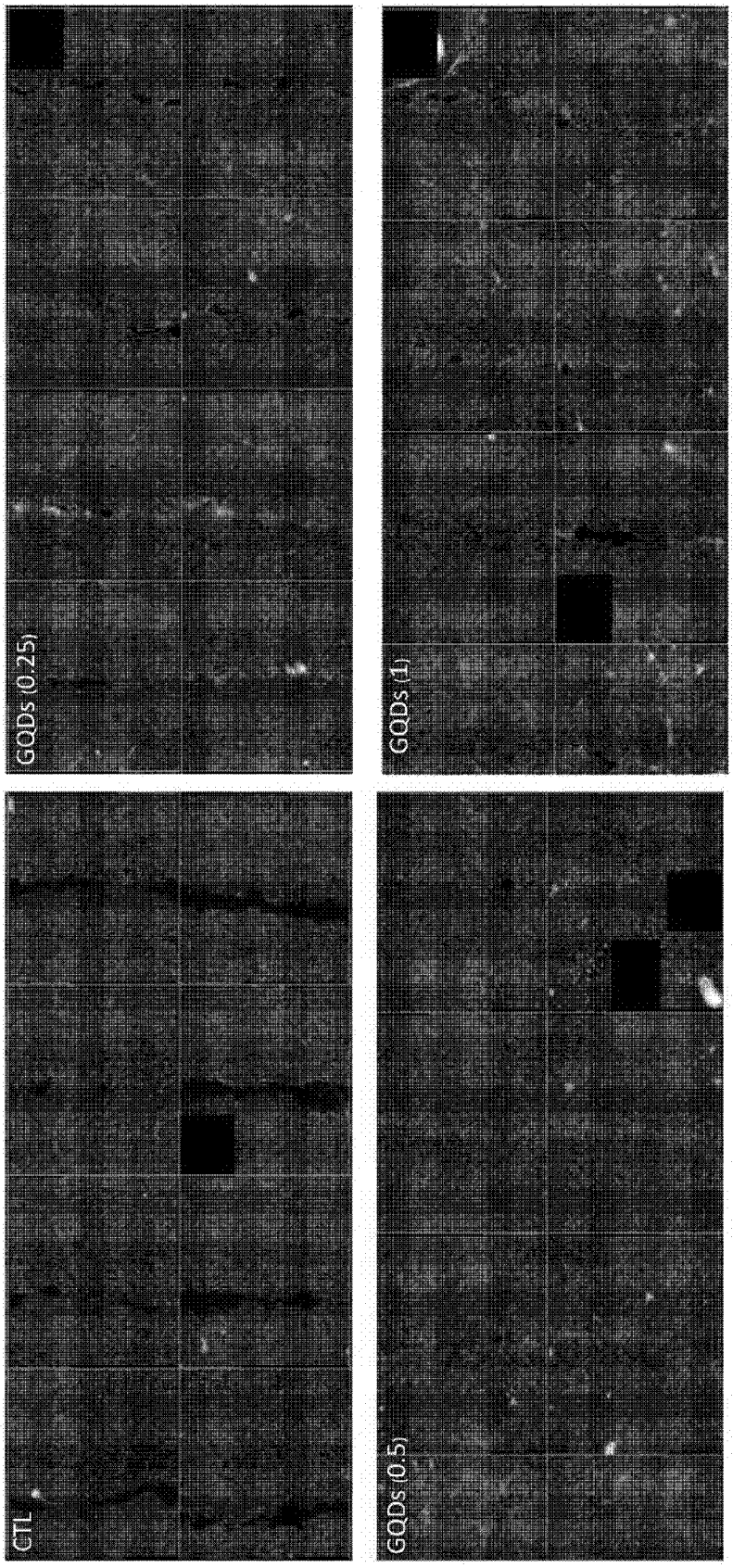

***
**
**
CCN1 relative expression
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
CTL
GQD 0
GQDs 0.125
GQDs 0.25
GQDs 0.5μg/mL


CTL
H2O2
***
***
***
***
***
β-Gal relative expression
5
4
3
2
1
0
CTL
GQD 0
GQD 0.125
GQD 0.25
GQD 0.5μg/mL

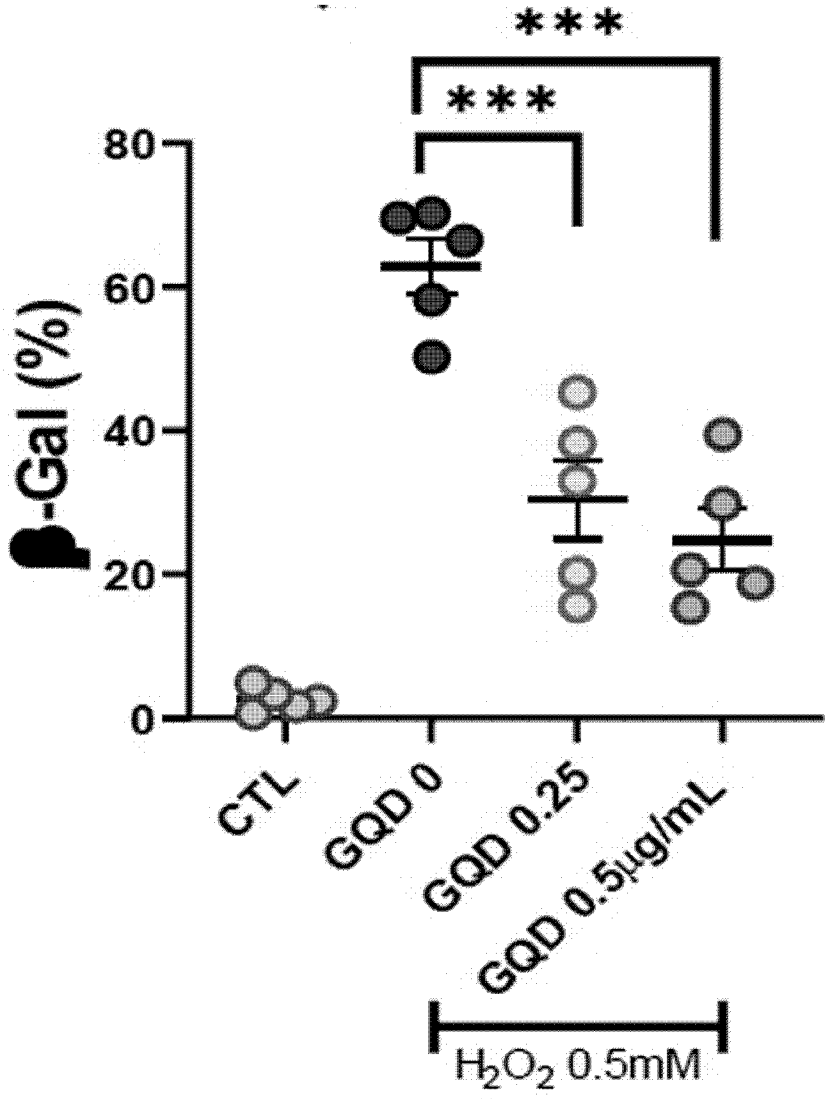
[도8a]



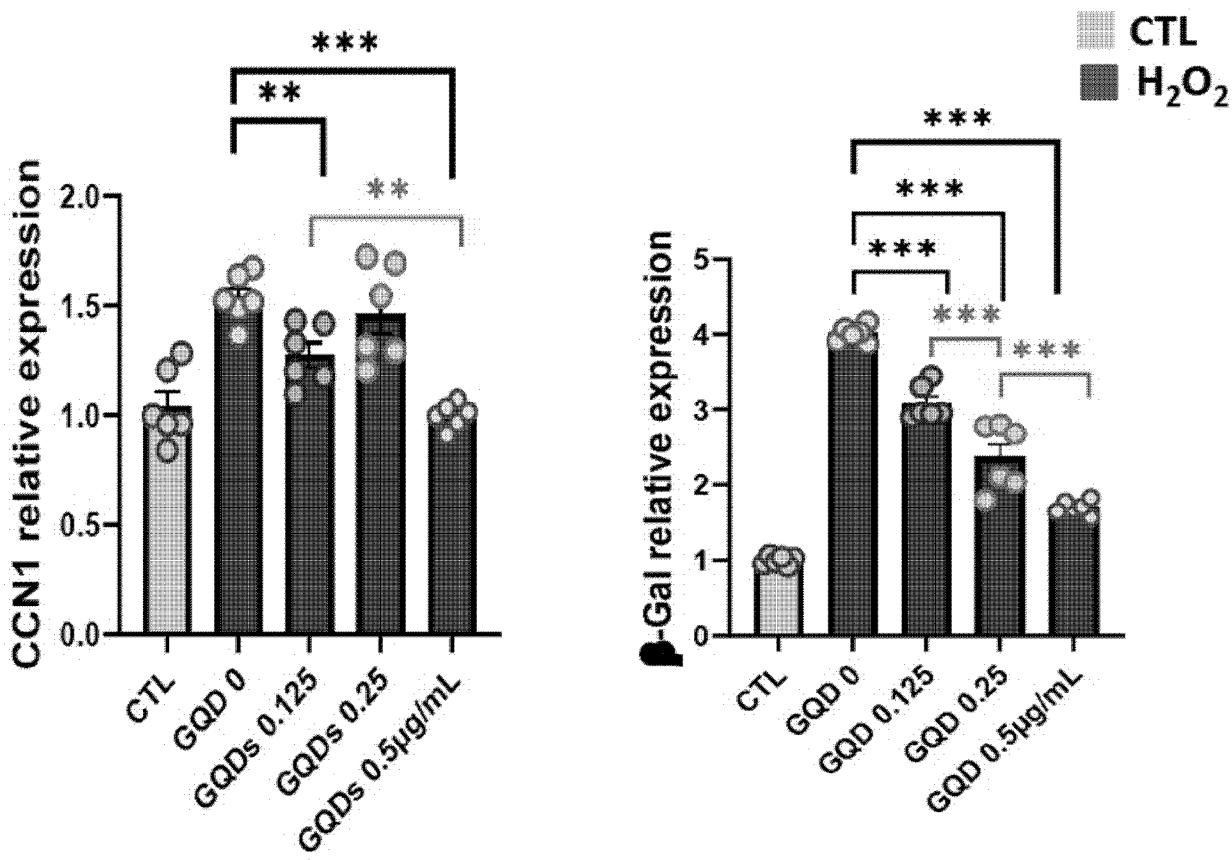
[도8b]



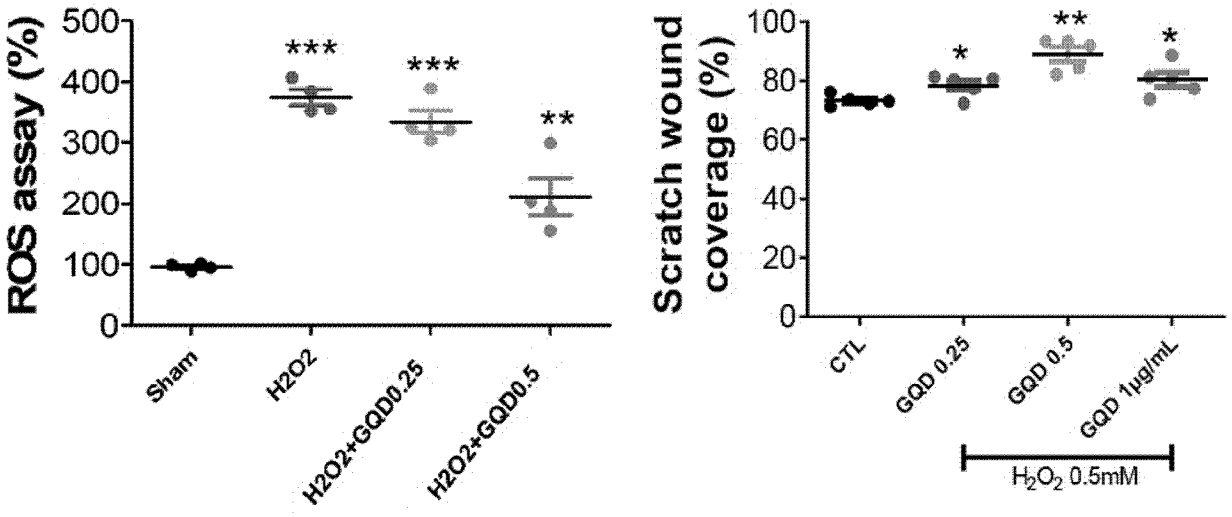
[도8c]



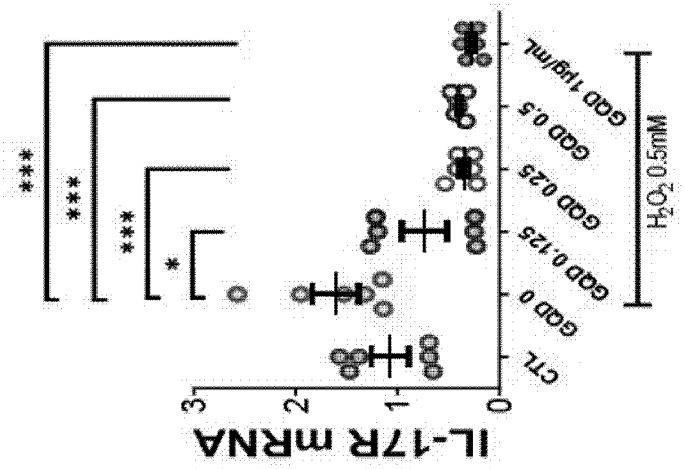
[도9a]

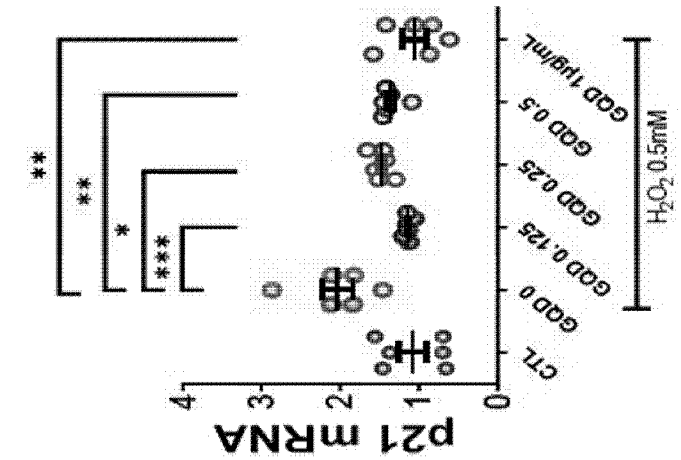

CCN1 relative expression
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
***
**
**
CTL
GQD 0
GQDs 0.125
GQDs 0.25
GQDs 0.5μg/mL
CTL
H2O2
β-Gal relative expression
5
4
3
2
1
0
***
***
***
***
***
CTL
GQD 0
GQD 0.125
GQD 0.25
GQD 0.5μg/mL

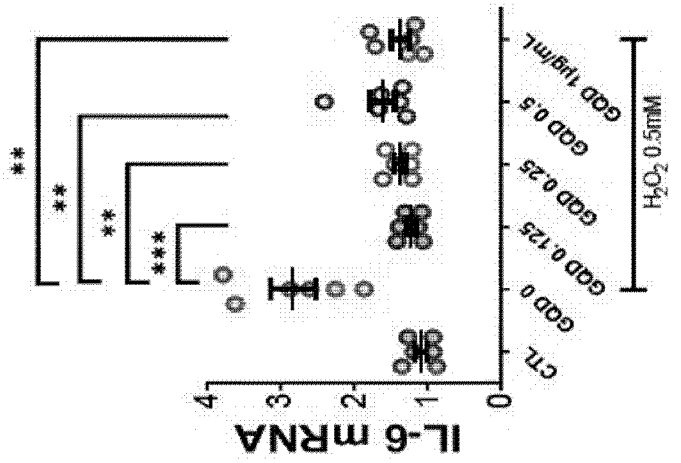
[도9b]


ROS assay (%)
500
400
300
200
100
0
***
***
**
Sham
H2O2
H2O2+GQD0.25
H2O2+GQD0.5
Scratch wound coverage (%)
100
80
60
40
20
0
*
**
*
CTL
GQD 0.25
GQD 0.5
GQD 1μg/mL
H2O2 0.5mM

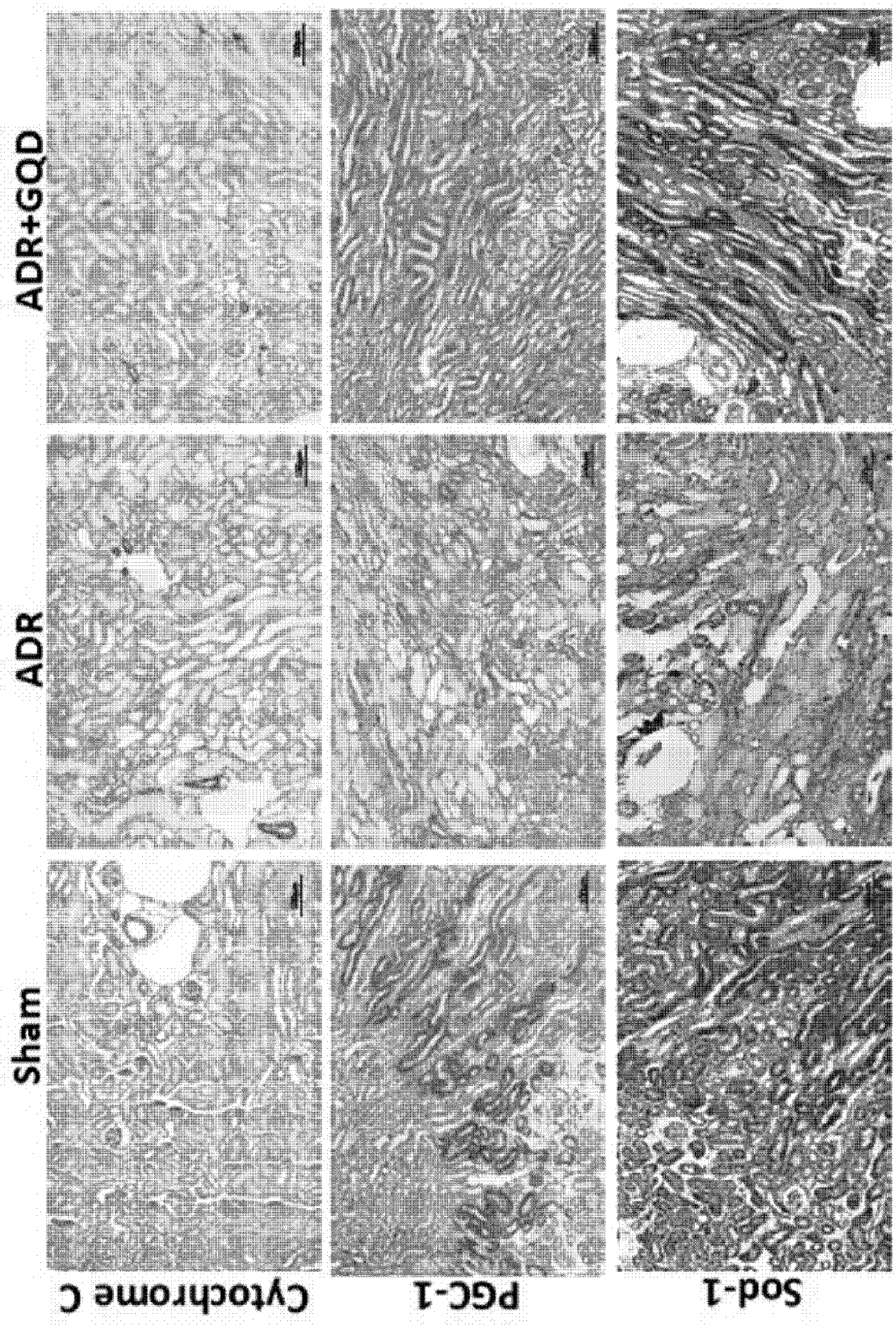
[도10]


IL-17R mRNA
CTL
GOD 0
GOD 0.125
GOD 0.25
GOD 0.5
GOD 1μg/mL
H2O2 0.5mM

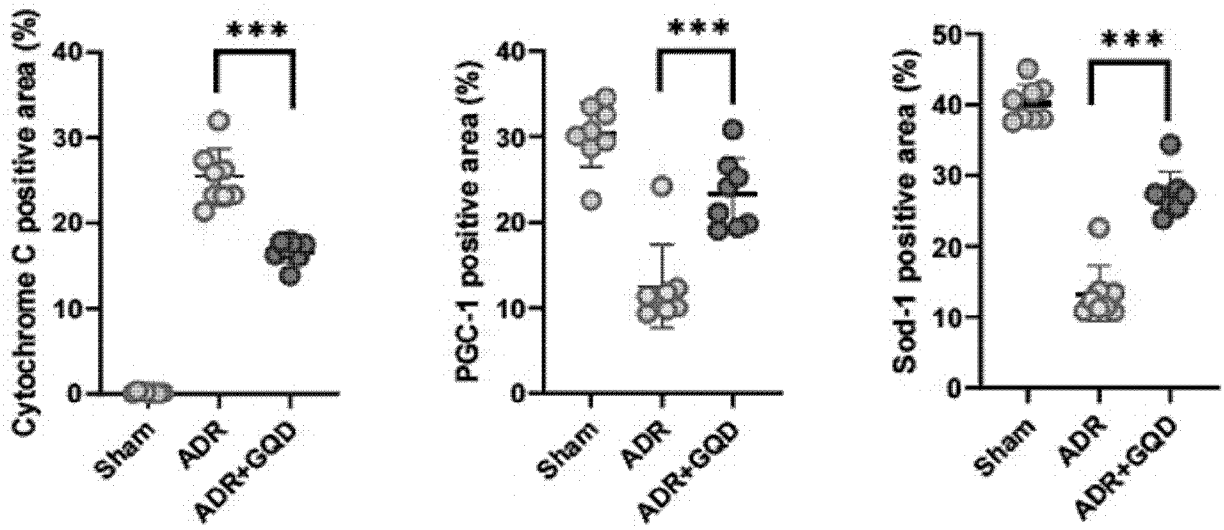

p21 mRNA
CTL
GOD 0
GOD 0.125
GOD 0.25
GOD 0.5
GOD 1μg/mL
H2O2 0.5mM


IL-6 mRNA
CTL
GOD 0
GOD 0.125
GOD 0.25
GOD 0.5
GOD 1μg/mL
H2O2 0.5mM

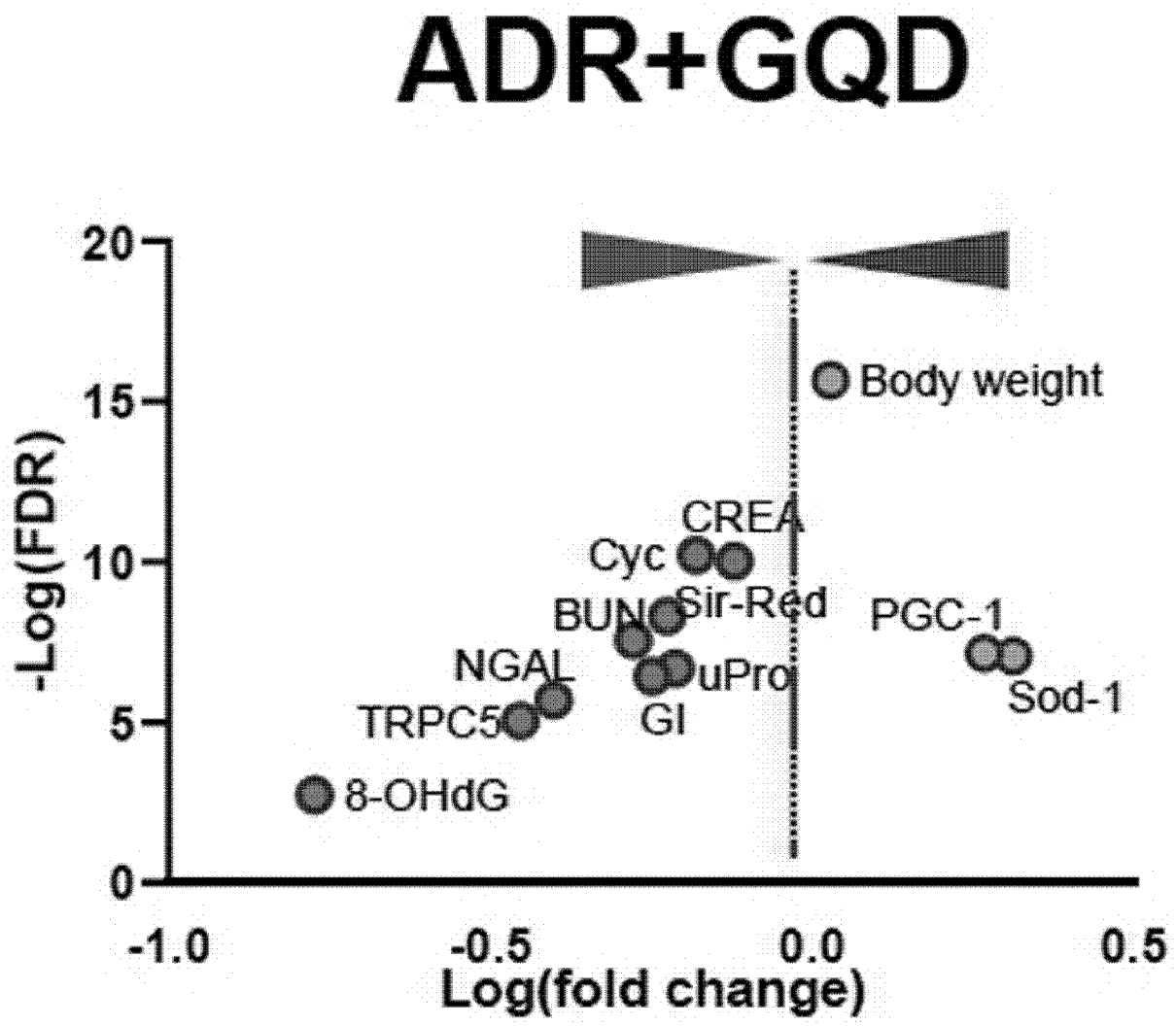
[도11a]



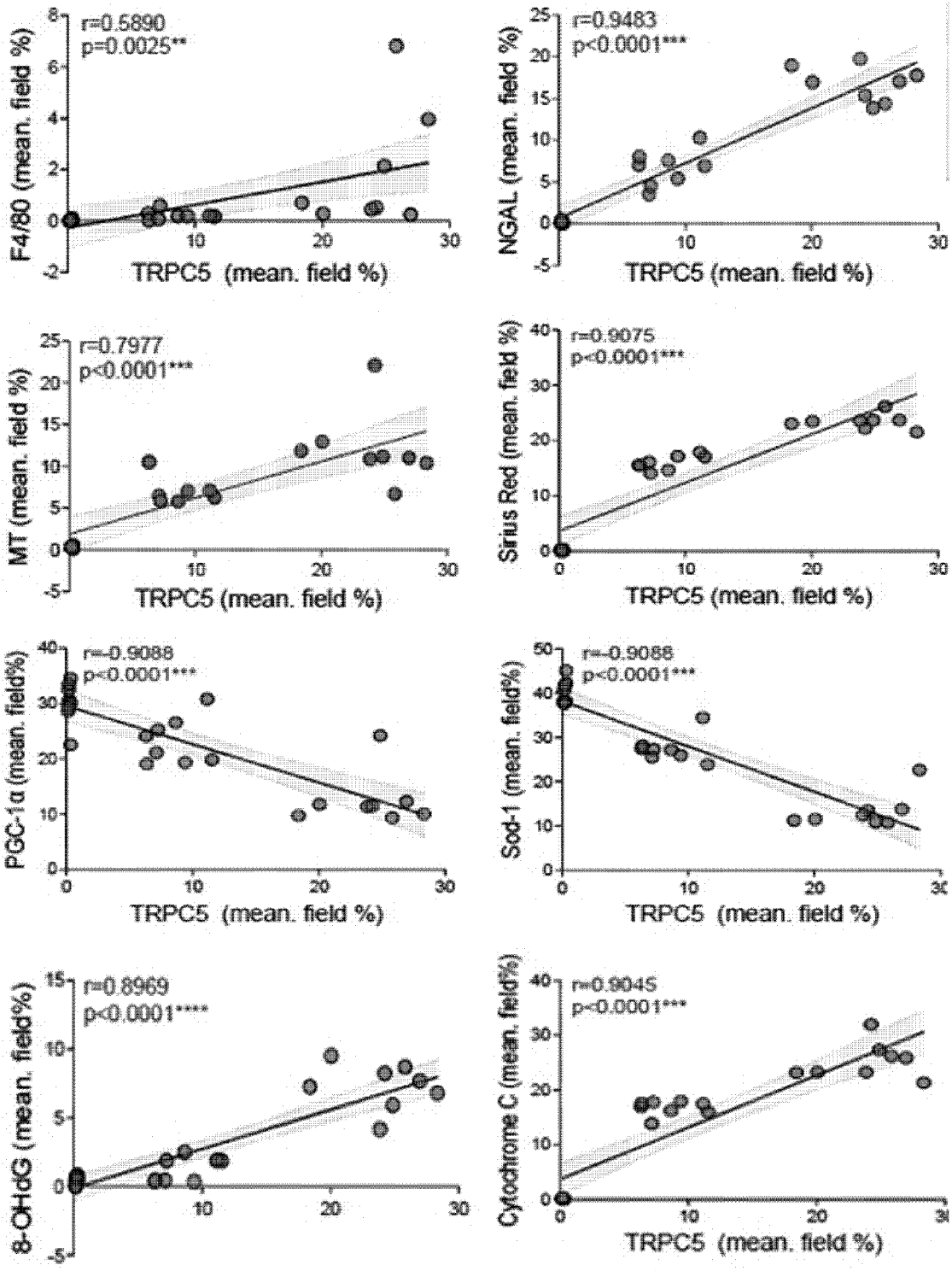
[도11b]


Cytochrome C positive area (%)
PGC-1 positive area (%)
Sod-1 positive area (%)
***
Sham
ADR
ADR+GQD

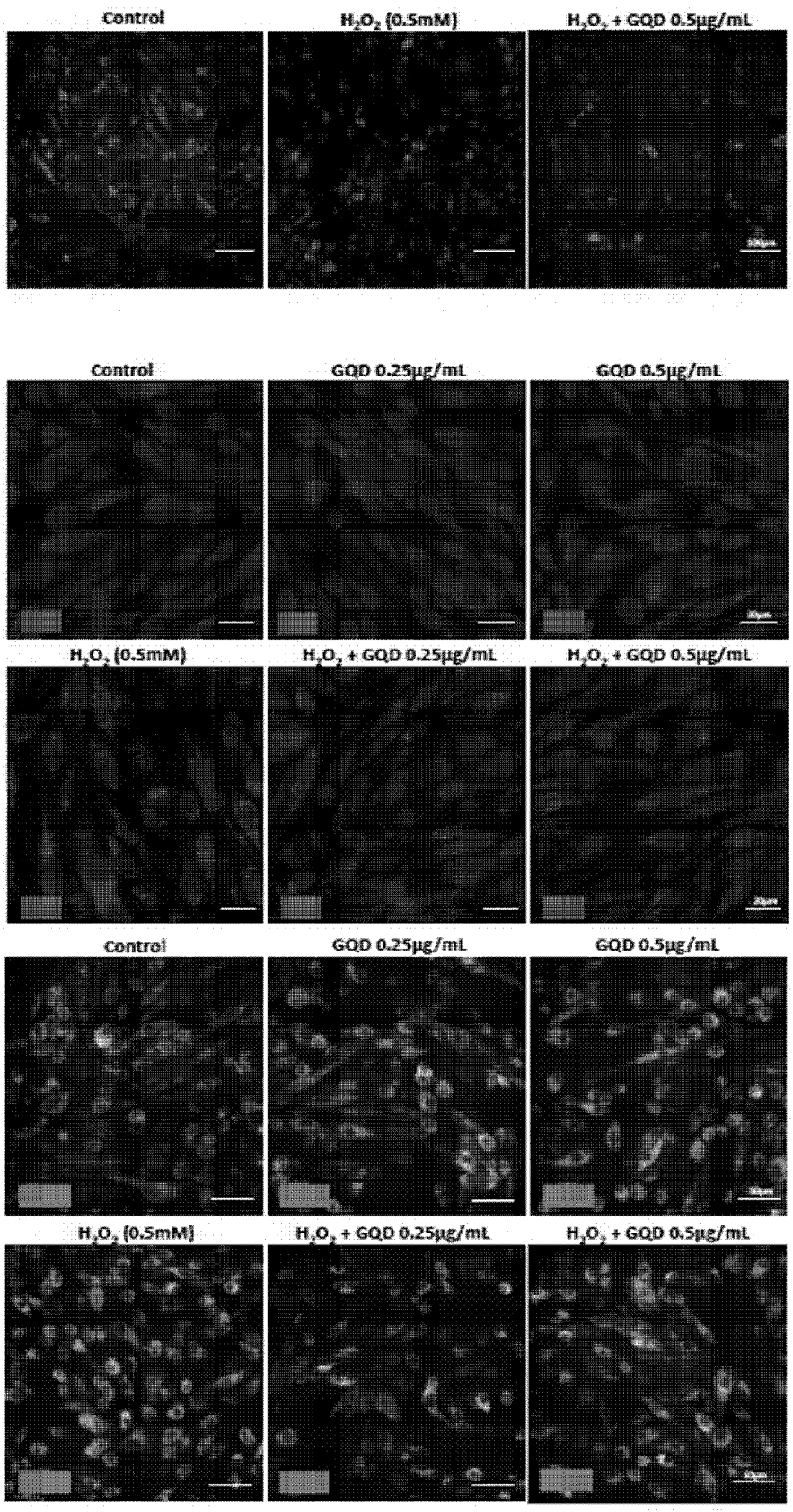
[도12a]


ADR+GQD
-Log(FDR)
Log(fold change)
Body weight
CREA
Cyc
Sir-Red
BUN
PGC-1
NGAL
uPro
Sod-1
TRPC5
GI
8-OHdG

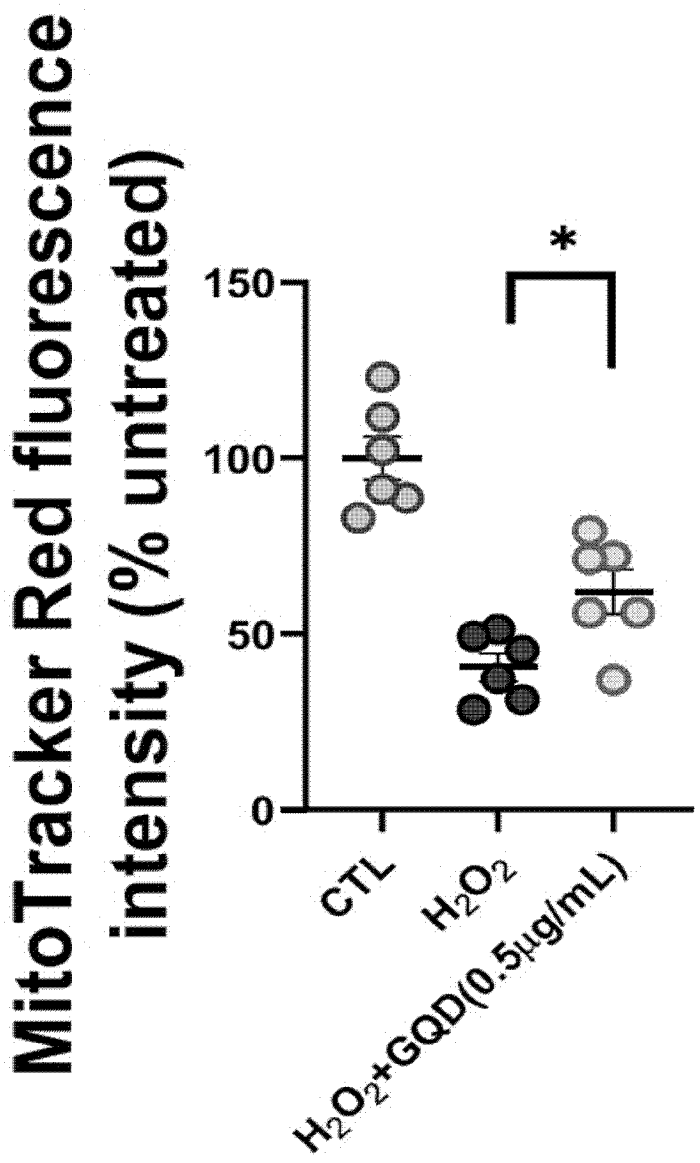
[도12b]


r=0.5890
p=0.0025**
F4/80 (mean. field %)
TRPC5 (mean. field %)
r=0.9483
p<0.0001***
NGAL (mean. field %)
TRPC5 (mean. field %)
r=0.7977
p<0.0001***
MT (mean. field %)
TRPC5 (mean. field %)
r=0.9075
p<0.0001***
Sirius Red (mean. field %)
TRPC5 (mean. field %)
r=-0.9088
p<0.0001***
PGC-1α (mean. field%)
TRPC5 (mean. field %)
r=-0.9068
p<0.0001***
Sod-1 (mean. field%)
TRPC5 (mean. field %)
r=0.8969
p<0.0001****
8-OHdG (mean. field%)
r=0.9045
p<0.0001***
Cytochrome C (mean. field%)
TRPC5 (mean. field %)

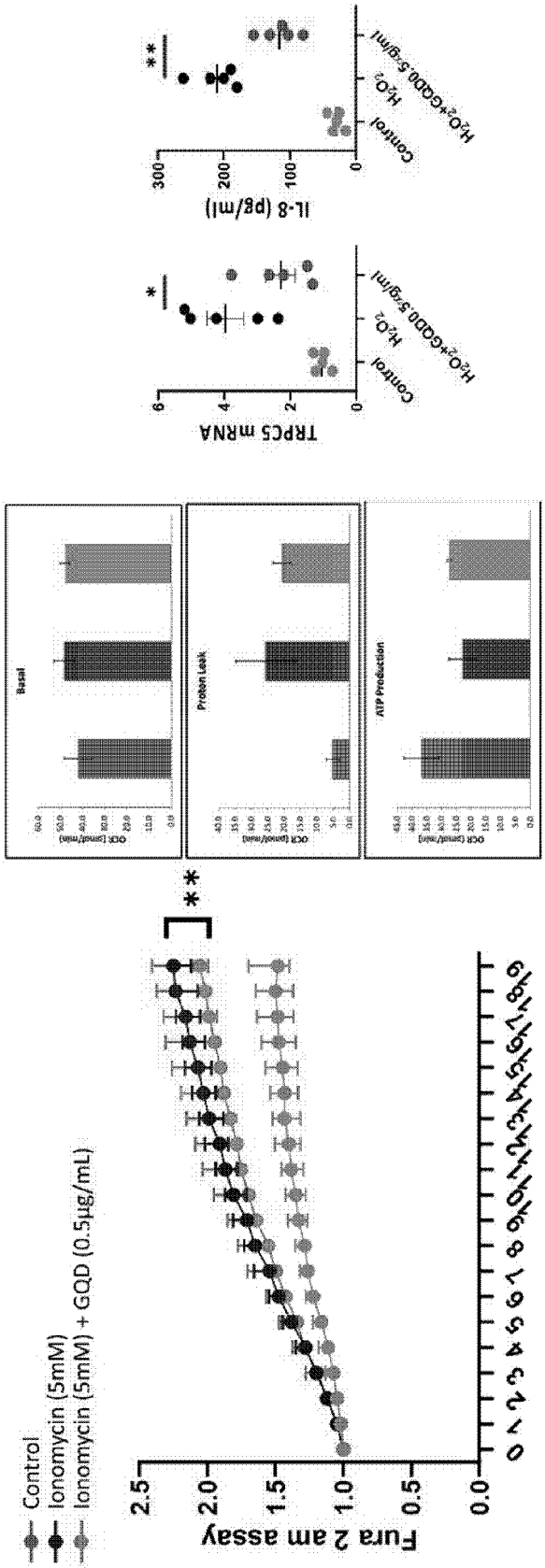
[도13a]


Control
H_2O_2 (0.5mM)
H_2O_2 + GQD 0.5μg/mL
Control
GQD 0.25μg/mL
GQD 0.5μg/mL
H_2O_2 (0.5mM)
H_2O_2 + GQD 0.25μg/mL
H_2O_2 + GQD 0.5μg/mL
Control
GQD 0.25μg/mL
GQD 0.5μg/mL
H_2O_2 (0.5mM)
H_2O_2 + GQD 0.25μg/mL
H_2O_2 + GQD 0.5μg/mL

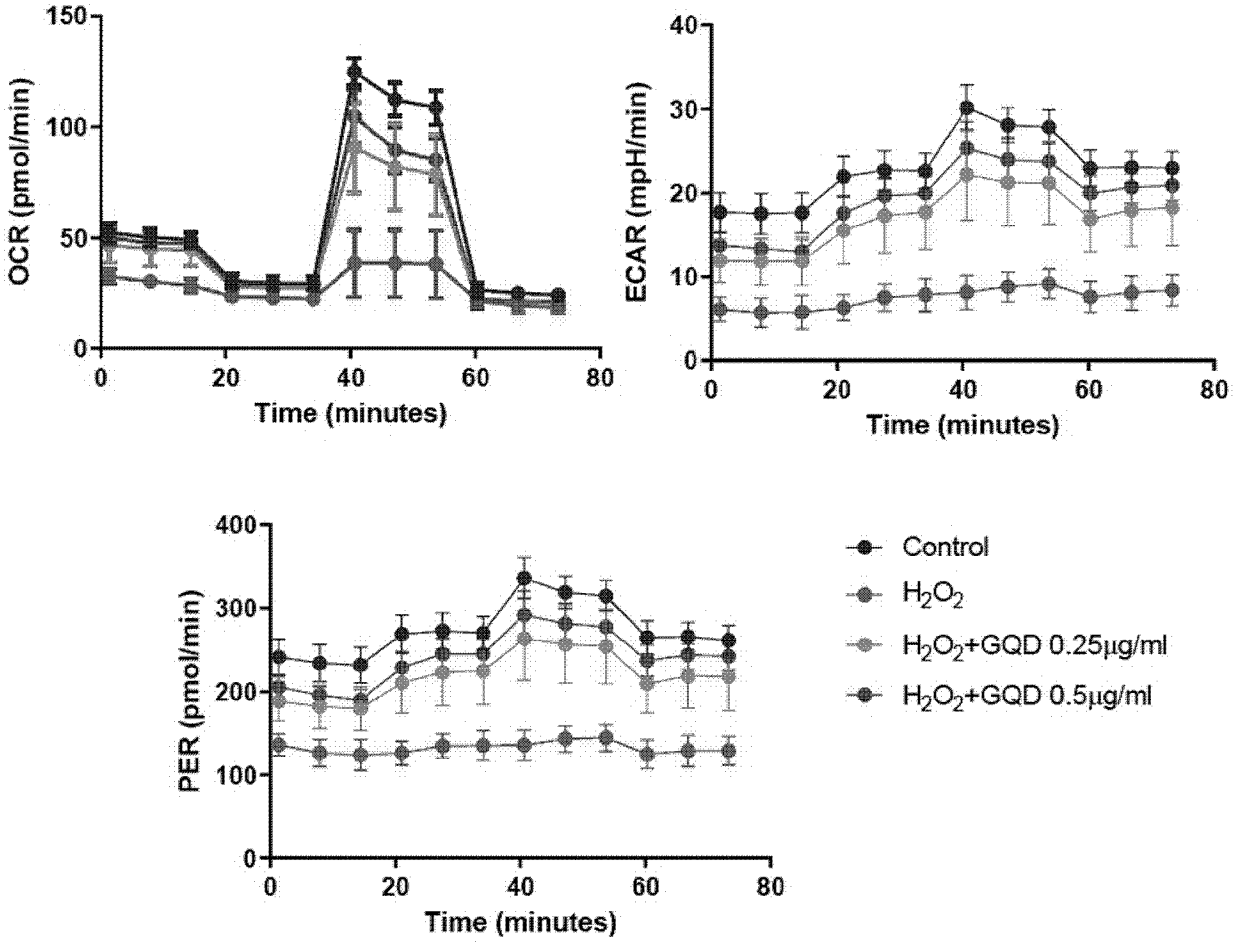
[도13b]


MitoTracker Red fluorescence intensity (% untreated)
150
100
50
0
*
CTL
H2O2
H2O2+GQD(0.5μg/mL)

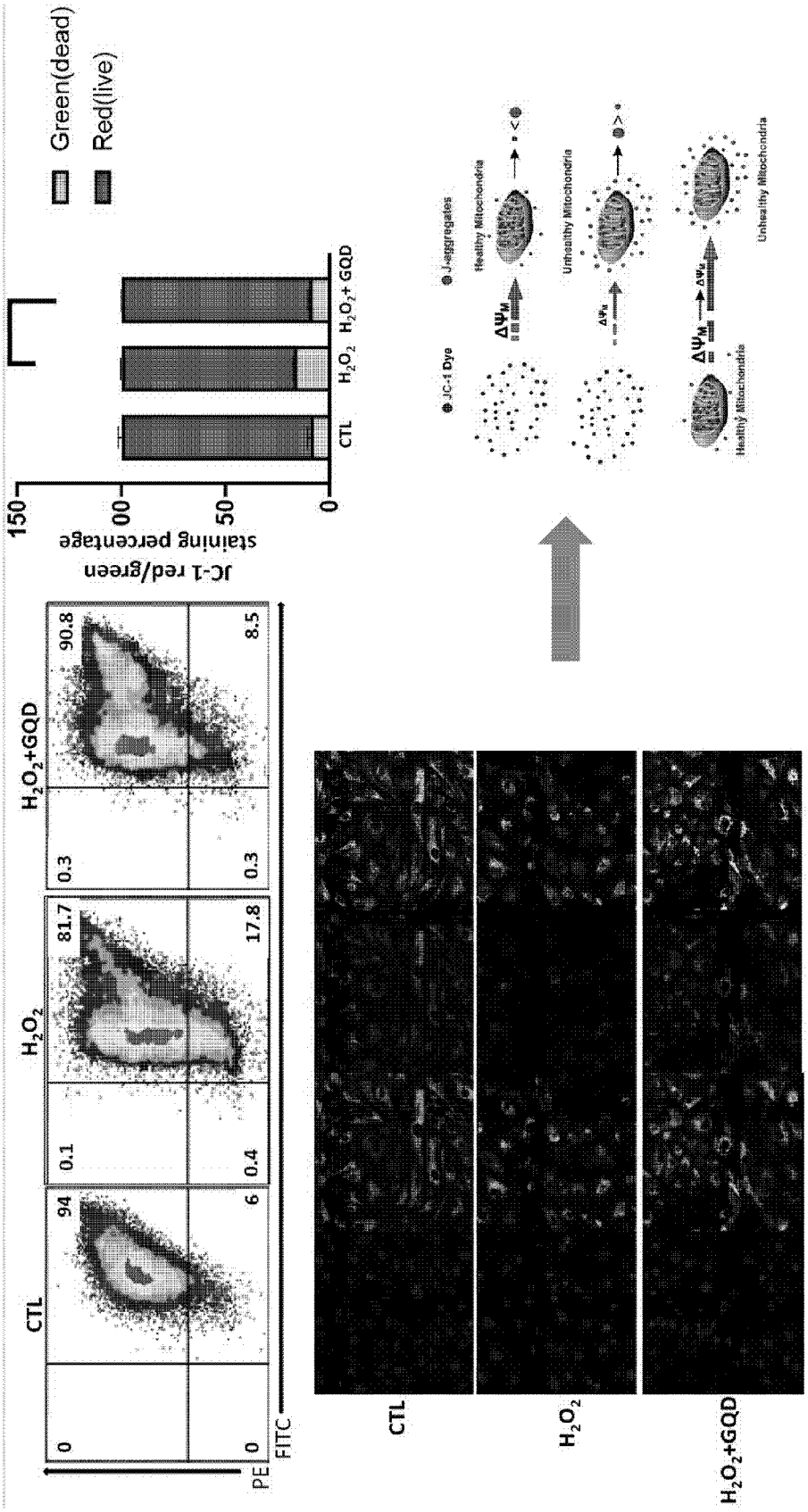
[도14]


Control
Ionomycin (5mM)
Ionomycin (5mM) + GQD (0.5μg/mL)
Fura 2 am assay
Basal
Proton Leak
ATP Production
TRPC5 mRNA
IL-8 (pg/ml)
Control
H2O2
H2O2+GQD0.5ug/ml

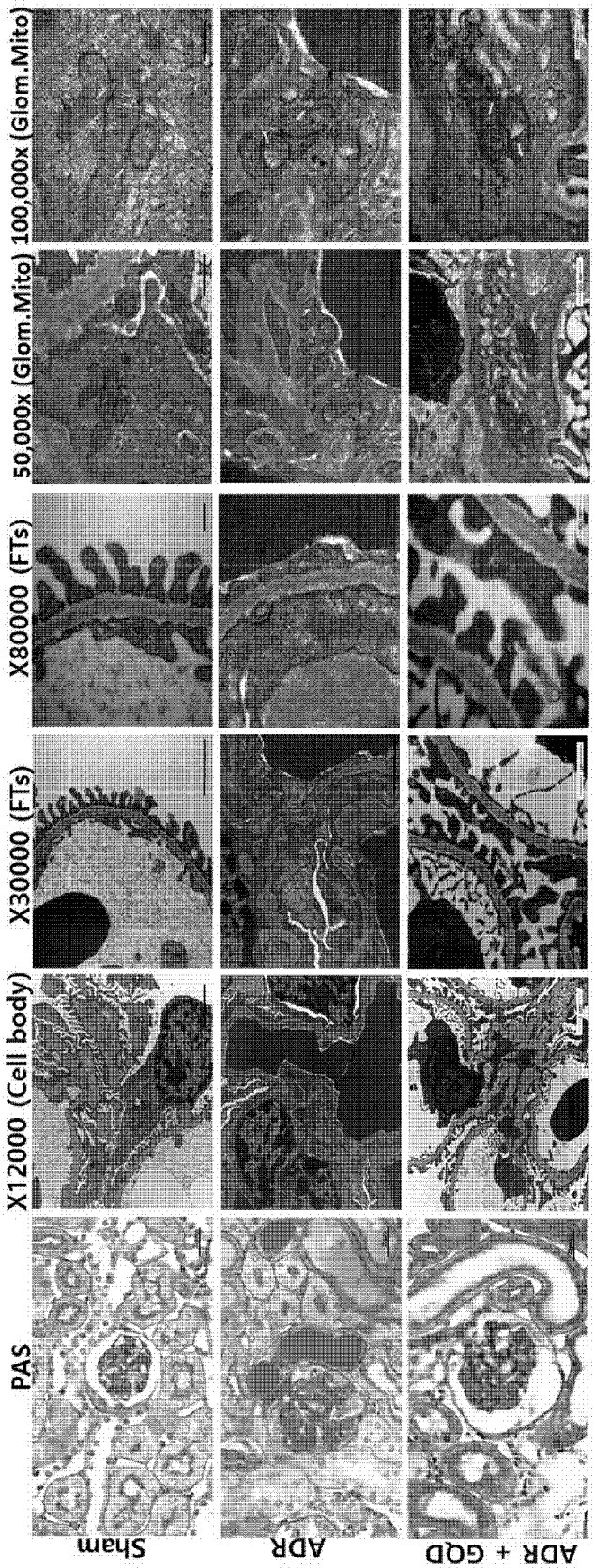
[도15]


OCR (pmol/min)
150
100
50
0
0
20
40
60
80
Time (minutes)
ECAR (mpH/min)
40
30
20
10
0
0
20
40
60
80
Time (minutes)
PER (pmol/min)
400
300
200
100
0
0
20
40
60
80
Time (minutes)
Control
H2O2
H2O2+GQD 0.25μg/ml
H2O2+GQD 0.5μg/ml

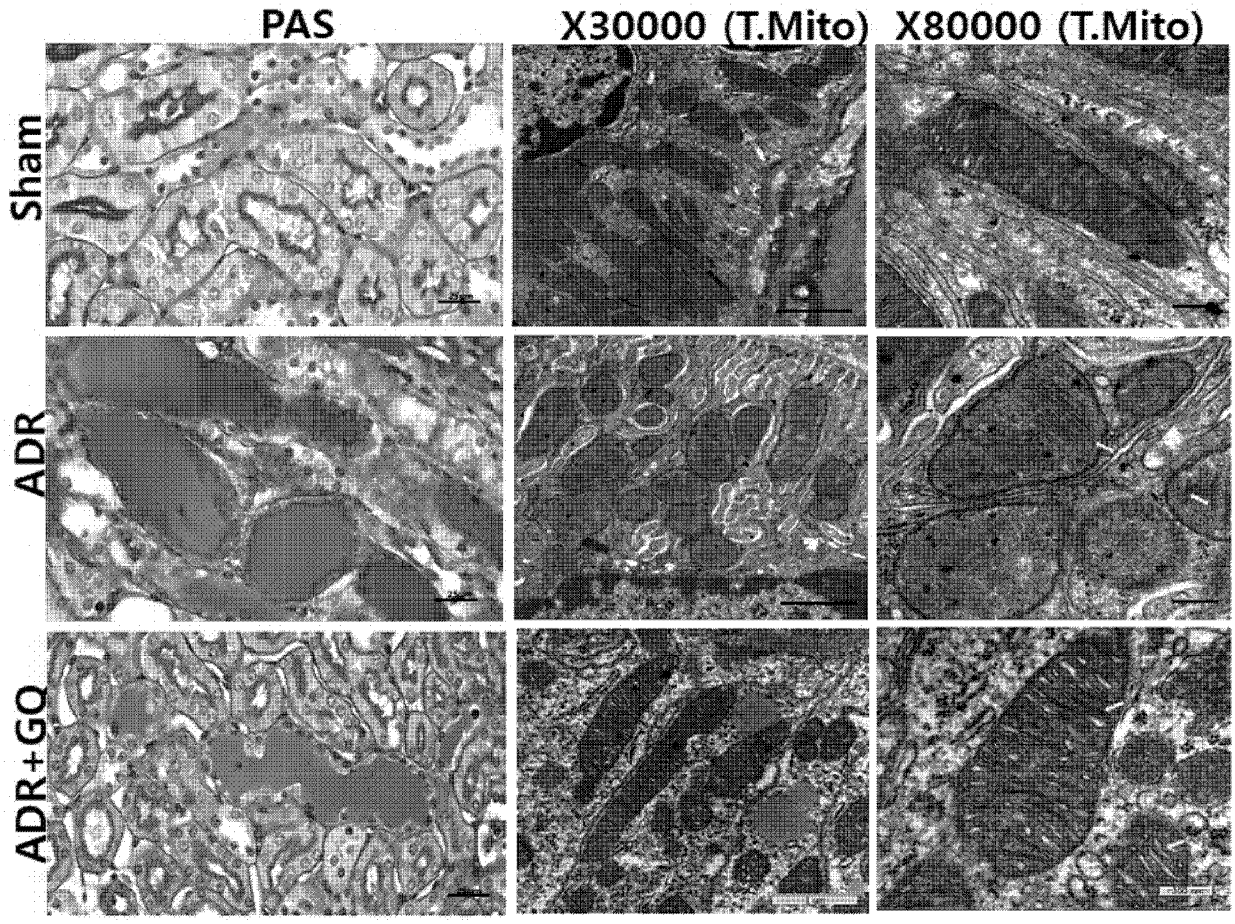
[도16]


Green(dead)
Red(live)
JC-1 red/green staining percentage
150
100
50
0
CTL
H_2O_2
H_2O_2+ GQD
JC-1 Dye
J-aggregates
Healthy Mitochondria
Unhealthy Mitochondria
$\Delta\Psi_M$
CTL
H_2O_2
H_2O_2+GQD
FITC
PE
0
94
6
0.1
0.4
81.7
17.8
0.3
0.3
90.8
8.5

[도17a]


100,000x (Glom.Mito)
50,000x (Glom.Mito)
X80000 (FTs)
X30000 (FTs)
X12000 (Cell body)
PAS
Sham
ADR
ADR + GQD

[도17b]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2023/021501

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 33/44(2006.01)i; **A61P 13/12**(2006.01)i; **A61P 39/00**(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 33/44(2006.01); A61K 31/704(2006.01); A61K 49/00(2006.01); A61P 13/12(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 그래핀 양자점(graphene quantum dot), 신독성(nephrotoxicity), 항암제(anticancer drug)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 10493170 B1 (QIN, Yiru et al.) 03 December 2019 (2019-12-03) See column 5, lines 22-34; example 9; and figures 26 and 27.	7, 9-12
Y		1-6,8,14,15
Y	FOROUTAN, Tahereh et al. Intraperitoneal Injection of Graphene Oxide Nanoparticle Accelerates Stem Cell Therapy Effects on Acute Kidney Injury. Stem Cells and Cloning: Advances and Applications. 11 February 2020 (Online), vol. 13, pp. 21-32. See abstract; page 22, right column and page 27; and figures 5, 9 and 10.	1-6,8,14,15
A	WANG, Huan et al. Phenol-like group functionalized graphene quantum dots structurally mimicking natural antioxidants for highly efficient acute kidney injury treatment. Chem. Sci. 05 August 2020, vol. 11, pp. 12721-12730. See entire document.	1-12,14,15
A	KR 10-2277665 B1 (BIOGRAPHENE INC. et al.) 15 July 2021 (2021-07-15) See entire document.	1-12,14,15

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
08 April 2024	**09 April 2024**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NASROLLAHI, Fatemeh et al. Targeting graphene quantum dots to epidermal growth factor receptor for delivery of cisplatin and cellular imaging. Materials Science & Engineering C. 08 September 2018 (Online), vol. 94, pp. 247-257. See entire document.	1-12,14,15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2023/021501

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2023/021501

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☑ Claims Nos.: **13**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 13 pertains to a method for treatment of the human body by therapy (PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv)).

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2023/021501

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	10493170	B1	03 December 2019	None			
KR	10-2277665	B1	15 July 2021	CN	115397437	A	25 November 2022
				EP	4101456	A1	14 December 2022
				JP	2023-512960	A	30 March 2023
				US	2023-0055621	A1	23 February 2023
				WO	2021-157818	A1	12 August 2021

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2023/021501

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 33/44(2006.01)i; **A61P 13/12**(2006.01)i; **A61P 39/00**(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 33/44(2006.01); A61K 31/704(2006.01); A61K 49/00(2006.01); A61P 13/12(2006.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 그래핀 양자점(graphene quantum dot), 신독성(nephrotoxicity), 항암제(anticancer drug)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	US 10493170 B1 (QIN, YIRU 등) 2019.12.03 컬럼 5, 라인 22-34; 실시예 9; 및 도면 26, 27 참조.	7,9-12
Y		1-6,8,14,15
Y	FOROUTAN, TAHEREH 등, "Intraperitoneal Injection of Graphene Oxide Nanoparticle Accelerates Stem Cell Therapy Effects on Acute Kidney Injury", Stem Cells and Cloning: Advances and Applications, 2020.02.11(Online), 13권, 페이지 21-32 요약; 페이지 22, 우측 컬럼; 페이지 27; 및 도면 5, 9, 10 참조.	1-6,8,14,15
A	WANG, HUAN 등, "Phenol-like group functionalized graphene quantum dots structurally mimicking natural antioxidants for highly efficient acute kidney injury treatment", Chem. Sci., 2020.08.05, 11권, 페이지 12721–12730 전체 문헌 참조.	1-12,14,15
A	KR 10-2277665 B1 (바이오그래핀 주식회사 등) 2021.07.15 전체 문헌 참조.	1-12,14,15

☑ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☑ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌
"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌
"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌
"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2024년04월08일(08.04.2024)	**2024년04월09일(09.04.2024)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 **+82-42-481-8578**

심사관

허주형

전화번호 **+82-42-481-5373**

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2023/021501

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	NASROLLAHI, FATEMEH 등, "Targeting graphene quantum dots to epidermal growth factor receptor for delivery of cisplatin and cellular imaging", Materials Science & Engineering C, 2018.09.08(Online), 94권, 페이지 247-257 전체 문헌 참조.	1-12,14,15

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2023/021501

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

   a. ☑ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록

   b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

      ☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부

2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다

3. 추가 의견:

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2023/021501

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☑ 청구항: **13**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 13은 치료에 의한 사람의 처치방법에 관한 것입니다(PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)).

2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2023/021501

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 10493170 B1	2019/12/03	없음	
KR 10-2277665 B1	2021/07/15	CN 115397437 A	2022/11/25
		EP 4101456 A1	2022/12/14
		JP 2023-512960 A	2023/03/30
		US 2023-0055621 A1	2023/02/23
		WO 2021-157818 A1	2021/08/12