



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0026896
(43) 공개일자 2014년03월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 33/44 (2006.01) A61K 47/02 (2006.01)
A61K 47/30 (2006.01) A61K 31/7042 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0092645

(22) 출원일자 2012년08월23일

심사청구일자 2012년08월23일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

강동우

경남 진주시 초장로14번길 29, 203동 2102호 (초전동, 초전2차푸르지오아파트)

강상수

경남 진주시 신안들말길 58, 202동 102호 (신안동, 평거현대아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김남식, 양기혁, 한윤호, 이인행

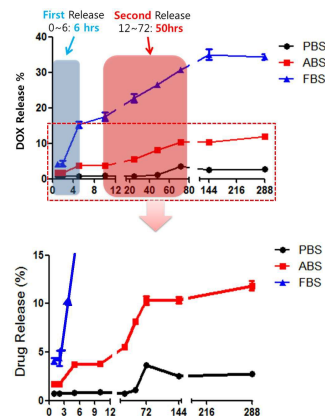
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 암세포의 내성을 억제한 탄소나노튜브 기반 항암제의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 암 내성을 극복할 수 있는 항암제를 제공하기 위하여, (a) 다중벽 탄소나노튜브의 표면을 카복실기로 개질시키는 단계; (b) 상기 카복실화된 다중벽 탄소나노튜브를 pH 5.2~5.5의 조건에서 EDC(N-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride) 링커를 결합하는 단계; 및 (c) 상기 EDC 링커가 결합된 다중벽 탄소나노튜브를 pH 5.9~6.2의 조건에서 항암제와 결합시키는 단계를 포함하는, 탄소나노튜브 기반의 항암제의 제조방법 및 이를 이용하여 제조된 항암제를 제공한다.

대표도 - 도5a



(72) 발명자

최정일

경상남도 진주시 망진산길4번길 2

남태현

경상남도 진주시 신안들말길 47 205-1107

특허청구의 범위

청구항 1

- (a) 다중벽 탄소나노튜브의 표면을 카복실기로 개질시키는 단계;
- (b) 상기 카복실화된 다중벽 탄소나노튜브를 pH 5.2~5.5의 조건에서 EDC(N-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride) 링커를 결합하는 단계; 및
- (c) 상기 EDC 링커가 결합된 다중벽 탄소나노튜브를 pH 5.9~6.2의 조건에서 항암제와 결합시키는 단계를 포함하는, 탄소나노튜브 기반의 항암제의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 다중벽 탄소나노튜브는 5 내지 50 nm의 직경을 갖는, 탄소나노튜브 기반의 항암제의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,
상기 다중벽 탄소나노튜브는 100 내지 350 nm의 길이를 갖는, 탄소나노튜브 기반의 항암제의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,
상기 다중벽 탄소나노튜브의 표면은 10~35% 카복실기를 갖도록 개질된, 탄소나노튜브 기반의 항암제의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서,
상기 항암제는 EDC(N-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride) 링커에 의하여 카복실화된 다중벽 탄소나노튜브에 공유적으로 결합된, 탄소나노튜브 기반의 항암제의 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서,
상기 항암제는 아민 계열 화합물인, 탄소나노튜브 기반의 항암제의 제조방법.

청구항 7

제6항에 있어서,
상기 항암제는 독소루비신(doxorubicin), 에피루비신(epirubicin), 아드리아마이신(adriamycin), 시스-플라틴(cis-platin), 미토마이신-C 또는 다우노마이신(daunomycin)인, 탄소나노튜브 기반의 항암제의 제조방법.

청구항 8

제1항에 있어서,
추가로 상피세포성장인자(epidermal growth factor, EGF)가 항암제와 함께 결합될 수 있는, 탄소나노튜브 기반의 항암제의 제조방법.

청구항 9

제1항에 있어서,
상기 간암, 대장암, 자궁경부암, 신장암, 위암, 전립선암, 유방암, 뇌종양, 폐암, 자궁암, 결장암, 방광암, 혈

액암 및 췌장암으로 구성되는 군으로부터 선택되는 암의 치료에 사용되는, 탄소나노튜브 기반의 항암제의 제조 방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 단계 (a)는 다중벽 탄소나노튜브를 강산 용매에 혼입한 후, 초음파 처리하여 카복실기를 표면에 도입시키는, 탄소나노튜브 기반의 항암제의 제조방법.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 단계 (b)는 상온에서 MES(2-morpholinoethanesulfonic acid) 용액에 카복실화된 탄소나노튜브를 분산시킨 후, NHS(N-hydroxysuccinimide) 용액을 첨가하고, 초음파 처리를 수행하여 EDC 링커를 결합시키는, 탄소나노튜브 기반의 항암제의 제조방법.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 단계 (c)는 0~20℃에서 14~18시간 동안 교반하여 항암제를 결합시키는, 탄소나노튜브 기반의 항암제의 제조방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 제조방법에 의하여 제조된, 탄소나노튜브 기반의 항암제.

청구항 14

제13항의 탄소나노튜브 기반의 항암제를 암에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 암 치료방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 암은 간암, 대장암, 자궁경부암, 신장암, 위암, 전립선암, 유방암, 뇌종양, 폐암, 자궁암, 결장암, 방광암, 혈액암 또는 췌장암인, 암 치료방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 나노기술을 적용한 항암제의 제조방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 종래의 공유결합의 약물 결합율을 증가시키면서, 항암치료 과정의 가장 큰 문제점으로 지적되어오던 약물 부작용을 해소할 수 있는 탄소나노튜브 기반의 항암제의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 암을 치료하기 위한 방법으로는 수술을 통한 치료, 방사선 치료 그리고 항암제 투여를 통한 치료 등이 있으나 이러한 치료방법들은 부작용이 수반되거나, 암의 진행 정도에 따라 시술이 제한적으로 적용된다. 특히, 항암제는 거듭된 연구결과 양적인 측면에서는 그 종류가 늘었지만, 질적인 측면에서는 큰 변화가 없었다. 그 이유는 항암제 대부분이 분열이 왕성한 세포의 세포주기를 멈추게 하고 사멸케 하는 메커니즘으로 작동하기 때문이며, 이로 인해 암세포 이외에도 정상적으로 분열하는 세포를 공격해서 항암제의 대표적 부작용인 탈모, 식욕부진 그리고 백혈구 감소로 인한 면역력 저하 등이 일어난다.

[0003] 항암제의 부작용을 최소화하기 위해 표적항암제의 개발이 활발히 일어나고 있으며, 현재까지 18종 이상의 표적항암제가 개발되어 임상에 적용되고 있으며, 200여종 이상이 임상실험 중이다. 하지만 이러한 표적항암제는 같

은 종류의 암이라도 특정 표적인자가 나타난 환자에게 효과가 있다는 한계가 있으며, 표적치료제는 장기간에 걸쳐서 투여해야하기 때문에 내성을 유발하는 문제가 있다. 이를 보완하기 위해서 표적치료제를 기존의 강력한 항암제와 병합하는 콕테일 요법과 여러 표적인자를 동시에 공격함으로써, 단 시간에 암을 제거하는 단일약물을 사용하는 방법 등이 있는데, 이것 또한 심각한 부작용을 유발할 위험성을 내포하고 있다.

[0004] 탄소나노튜브(carbon nanotubes)는 기계적, 시각적, 화학적 특성으로 인하여, 이미징(imaging), 암 치료 등을 포함한 다양한 생물의학 분야에서 적용되고 있다(Liu Z, *et al.*, *Nano Res.*, 2:85, 2009; De La Zerda A, *et al.*, *Nat. Nanotechnol.*, 3(9):557-62, 2008; Cherukuri P, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 126(48):15638-9, 2004; Welsher K., *et al.*, *Nano Lett.*, 8(2):586-90, 2008; Zavaleta C, *et al.*, *Nano Lett.*, 8(9):2800-5, 2008). 약물전달체로서 탄소나노튜브는 세포내이입(endocytosis)을 통하여 항암제(Liu Z, *et al.*, *ACS Nano.*, 1(1):50-6, 2007; Bianco A, *et al.*, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 9(6):674-9, 2005), 플라스미드 DNA(Liu Y, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44:4782, 2005), 및 siRNA(small interfering RNA)(Kam NW, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 127(36):12492-3, 2005)을 포함한 다양한 생체분자를 세포내로 효과적으로 전달하는, 시험관내(*in vitro*)전달체로 연구되고 있다. 종래의 탄소나노튜브를 이용한 약물전달체에 관한 기술 분야는 단일벽 탄소나노튜브(single wall carbon nanotube)을 이용하여 항암제를 전달하는 방법에 관한 연구가 대다수 이루어져왔다. 단일벽 탄소나노튜브의 표면을 PEG(polyethylene glycol)을 이용하여 코팅한 후, π - π 스택킹(stackings)을 이용하여 항암제를 로딩하는 방법이 주로 연구되어 있다(Liu *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 48:7668-7672, 2009; Liu *et al.*, *ACS. NANO.*, 1(1):50-56, 2007; Liu *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 8438-8439, 2007).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 종래의 탄소나노튜브를 이용한 항암제 분야는 대부분 파이 결합을 이용하여 항암제를 탄소나노튜브에 결합시켰다. 이는 공유결합에 비하여 파이 결합이 탄소나노튜브로 결합되는 항암제의 비율이 현저히 높고, 탄소나노튜브로부터 항암제가 빠르게 방출(release)되는 특성으로 단시간 내에 항암제의 효과를 극대화할 수 있기 때문이다. 그러나 상술한 특성으로 인하여 항암제에 대하여 내성이 있는 암을 치료하는 경우 탄소나노튜브로부터 방출되는 약물이 빠른 속도로 암 세포로부터 배출(pumping out)되는 결과를 초래하기 때문에, 나노기술이 적용되지 않은 항암제 보다 더 우수한 항암 효과를 제공한다고 보기 어렵다. 또한, 종래의 공유결합을 이용한 탄소나노튜브에 항암제를 결합하는 경우, 적재율이 낮아 충분한 약효를 기대하기 어려웠다. 또한 강력한 공유결합으로 인하여 암 세포 내에서 탄소나노튜브로부터 항암제가 분리되지 않을 것으로 예상되어 그 치료효과가 현저히 낮을 것으로 예상되어 왔다.

[0006] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 포함하여 여러 문제점들을 해결하기 위한 것으로서, 종래의 탄소나노튜브에 공유결합에 의한 약물 결합물을 증가시키면서, 강력한 결합력으로 인하여 오히려 암 세포내에서 서서히, 지속적으로 탄소나노튜브로부터 방출되는 특성을 이용하여 소량으로도 충분한 항암 효과를 제공할 수 있는 탄소나노튜브 기반의 항암제의 제조 방법 및 이를 이용하여 제조된 항암제를 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명의 일 관점에 따르면, (a) 다중벽 탄소나노튜브의 표면을 카복실기로 개질시키는 단계; (b) 상기 카복실화된 다중벽 탄소나노튜브를 pH 5.2~5.5의 조건에서 EDC(N-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride) 링커를 결합하는 단계; 및 (c) 상기 EDC 링커가 결합된 다중벽 탄소나노튜브를 pH 5.9~6.2의 조건에서 항암제와 결합시키는 단계를 포함하는, 탄소나노튜브 기반의 항암제의 제조방법이 제공된다.

[0008] 상기 제조방법에 있어서, 상기 다중벽 탄소나노튜브는 5 내지 50 nm의 직경을 가질 수 있으며, 100 내지 350 nm의 길이를 가질 수 있다.

[0009] 또한, 상기 다중벽 탄소나노튜브의 표면은 10~35% 카복실기를 갖도록 개질될 수 있다.

[0010] 또한, 상기 항암제는 EDC(N-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride) 링커에 의하여 카복실화된 다중벽 탄소나노튜브에 공유적으로 결합될 수 있다. 상기 항암제는 상기 항암제는 아민 계열 화합물일 수 있으며, 독소루비신(doxorubicin), 에피루비신(epirubicin), 아드리아마이신(adriamycin), 시스-플라틴(cis-platin), 미토마이신-C 또는 다우노마이신(daunomycin)일 수 있다.

- [0011] 상기 항암제는 상기 다중벽 탄소나노튜브에 대하여 17~35 중량%, 바람직하게는 23~35중량%, 더욱 바람직하게는 23~30 중량%로 적재될 수 있고, 적재량은 다중벽 카본 나노튜브의 카복실기의 정도 및 pH 조절에 따른 약물 결합 방식에 의존한다. 본 발명자들은 본 발명의 일 실시예를 통하여 제조된 항암제-탄소나노튜브 공유결합체는 탄소나노튜브에 공유결합된 항암제의 양이 증가함에 따라 전체적인 구조가 변화할 정도로 더욱 강력하게 결합함을 확인하였다(도 1f 내지 도 1i 참조). 즉, 본 발명의 일 실시예에 따른 탄소나노튜브 기반의 항암제는 종래의 공유결합에 비하여 항암제의 적재량을 증가시켰으며, 이러한 적재량의 증가는 탄소나노튜브와 항암제 사이의 결합력의 증가를 야기하고, 실제 항암제-탄소나노튜브 공유결합체가 체내에 도입되었을 때, 암세포 내에서 항암제와 탄소나노튜브 사이의 해리속도가 감소하여 항암제를 아주 서서히 지속적으로 방출시킴으로써, 항암제 내성암을 포함한 암세포에 대한 항암효과를 극대화시킬 수 있음을 의미한다.
- [0012] 또한, 상기 제조방법에 있어서, 추가로 상피세포성장인자(epidermal growth factor, EGF)를 포함할 수 있다. EGF 수용체는 폐암세포에서 과발현된다는 것이 알려져 있어, 이러한 특성을 이용하여 EGF를 포함하는 항암제를 암 조직으로 타겟팅될 수 있게 한다.
- [0013] 또한, 상기 제조방법에 있어서, 상기 간암, 대장암, 자궁경부암, 신장암, 위암, 전립선암, 유방암, 뇌종양, 폐암, 자궁암, 결장암, 방광암, 혈액암 및 췌장암으로 구성되는 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0014] 상기 제조방법에 있어서, 상기 단계 (a)는 다중벽 탄소나노튜브를 강산 용매에 혼입한 후, 초음파 처리하여 카복실기를 표면에 도입시킬 수 있다. 상기 강산은 황산, 질산 또는 이들의 혼합물일 수 있으며, 황산과 질산이 3:1~1:3의 비율로 혼합된 용액을 이용하여 제조될 수 있다. 상기 초음파 처리는 산 용액 상태에서 처리할 수 있으며, 이러한 산 처리와 초음파 처리 단계는 1회 내지 3회 반복할 수 있다.
- [0015] 상기 제조방법에 있어서, 상기 단계 (b)는 상온에서 MES(2-morpholinoethanesulfonic acid) 용액에 카복실화된 탄소나노튜브를 분산시킨 후, NHS(N-hydroxysuccinimide) 용액을 첨가하고, 초음파 처리를 수행하여 EDC링커를 결합시킬 수 있다. 상기 NHS 용액과 EDC 용액은 MES 용액(40~60 mM, pH 6.0~6.3)를 용매로 이용하여 제조될 수 있으며, 예를 들어 상기 카복실화된 탄소나노튜브 1 중량부를 기준으로, MES 용액(40~60 mM, pH 6.0~6.3) 0.1~1 중량부, NHS 용액(350~450 mM) 0.1~1 중량부, 및 EDC 용액(15~25 mM) 0.1~0.5 중량부를 첨가하여 제조될 수 있다.
- [0016] 상기 제조방법에 있어서, 상기 단계 (c)는 0~20℃에서 14~18시간 동안 교반하여 항암제를 결합시킬 수 있다. 20℃를 초과하는 온도에서 짧은 시간 동안 교반하여도 항암제는 탄소나노튜브에 결합될 수 있으나, 이렇게 결합된 항암제는 탄소나노튜브와의 결합력이 매우 낮다는 문제가 있다. 본 발명은 상술한 온도 및 시간 조건은 탄소나노튜브에 약물을 강력하게 결합시킬 수 있는 최적의 조건임을 증명하였다.
- [0017] 본 발명의 다른 관점에 따르면, 상술한 제조방법에 의하여 제조된, 탄소나노튜브 기반의 항암제가 제공된다.
- [0018] 본 발명의 일 실시예에 따른 탄소나노튜브 기반의 항암제는 종래의 파이-파이 결합에 비하여 탄소나노튜브와 항암제 사이의 결합력이 증가되고, 적재율이 감소되었다. 그러나 종래의 공유결합을 이용한 탄소나노튜브 기반의 항암제에 비하여 적재율이 약 2배 정도 증가한 것을 특징으로 한다. 이러한 적재율의 증가에 따라, 탄소나노튜브와 독소루비신 사이의 결합력이 증가하며, 이는 탄소나노튜브에 결합된 독소루비신이 구조적으로 변형을 통해서 확인되었다(도 1f 내지 도 1i 참조). 즉, 공유결합을 이용하여 항암제의 적재율을 상승시킨 탄소나노튜브 기반의 항암제는 암 세포 내에서 서서히 지속적으로 탄소나노튜브로부터 방출되어 항암제 내성 암에 대한 항암효과를 제공하는 효과를 제공하며, 더불어 미량으로 이러한 효과를 제공할 수 있어 항암제 자체의 독성 부작용을 감소시킨다.
- [0019] 상기 항암제는 약학적으로 허용되는 담체를 더 포함할 수 있다.
- [0020] 상기 약제학적 조성물은 비경구로 투여되는 것이 바람직하고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입 등으로 투여할 수 있다.
- [0021] 상기 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 적합한 1일 투여량은, 100 µg/kg 내지 1 mg/kg(체중)이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 몇 주간 수회 나누어 투여할 수 있다.
- [0022] 또한, 상기 본 발명의 일 실시예에 따른 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가

진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

- [0023] 아울러, 본 발명의 일 실시예에 따른 조성물은 일반적인 항암제 투여량인 5 mg/kg ~ 30 mg/kg 보다 매우 미량인 100 μ g/kg 내지 1 mg/kg의 용량으로 투여될 수 있으며, 상기 투여량은 환자의 나이, 성별 및 상태에 따라 적절히 조절될 수 있다.
- [0024] 본 발명의 다른 관점에 따르면, 상술한 탄소나노튜브 기반의 항암제를 암에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 암 치료방법이 제공된다.
- [0025] 상기 암은 간암, 대장암, 자궁경부암, 신장암, 위암, 전립선암, 유방암, 뇌종양, 폐암, 자궁암, 결장암, 방광암, 혈액암 또는 췌장암일 수 있다.
- [0026] 상기 암에 걸린 개체는 인간 또는 인간을 제외한 포유동물일 수 있다.
- [0027] 또한, 상기 항암제는 아민 계열 화합물일 수 있으며, 독소루비신(doxorubicin), 에피루비신(epirubicin), 아드리아마이신(adriamycin), 시스-플라틴(cis-platin), 미토마이신-C 또는 다우노마이신(daunomycin) 등 일 수 있다.

발명의 효과

- [0028] 상기한 바와 같이 이루어진 본 발명의 일 실시예에 따르면, 암 세포 사멸효과 항암제의 독성 부작용을 감소시킨 탄소나노튜브 기반의 항암제를 구현할 수 있다. 물론 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

- [0029] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 탄소나노튜브 기반의 항암제의 특성을 확인한 그림으로, 도 1a는 다중벽 탄소나노튜브의 표면을 카복실화 처리한 것을 개략적으로 도시한 도이며, 도 1b와 도 1c는 FT-IR과 TGA 분석을 통하여 다중벽 탄소나노튜브의 표면이 성공적으로 카복실화된 것을 확인한 결과이며, 카본 나노튜브 중량대비 카복실화가 약 30% 이상 되었음을 알 수 있다. 도 1d와 도 1e는 UV-vis 분석을 통하여 EDC 링커가 연결된 카복실화된 다중벽 탄소나노튜브(EDC-MWCNT-COOH)에 항암제인 독소루비신과 에피루비신이 공유결합된 것을 확인한 결과이며 적재량은 25% 이상임을 알 수 있다. 도 1f 내지 도 1i는 본 발명의 일 실시예에 따른 탄소나노튜브 기반의 항암제에서 공유결합에 의하여 강력하게 결합되어 구조 변화가 유도된 것을 확인한 그래프이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 탄소나노튜브 기반의 항암제인 DOX-MWCNT 또는 EPI-MWCNT의 암 세포 사멸효과를 확인한 그래프로, 도 2a는 EPI-MWCNT의 폐암 세포에서의 항암 효과를, 도 2b는 DOX-MWCNT의 폐암 세포에서의 항암 효과를, 도 2c는 DOX-MWCNT의 유방암 세포에서의 항암 효과를 독소루비신 단일 항암제와 비교한 그래프이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 탄소나노튜브 기반의 항암제인 DOX-MWCNT의 생체 내(*in vivo*)항암효과를 확인한 결과로서, 도 3a는 유방암 세포를 이식하여 제조한 종양 동물 모델에 DOX-MWCNT를 투여하였을 때 24일 후 Dox 단일 투여에 비해 유방암세포 조직의 부피 성장이 느려지는 것을 확인한 그래프이고, 도 3b는 종양의 무게가 감소하는 것을 확인한 그래프이며, 도 3c는 종양의 부피가 감소하는 것을 확인한 사진이며, 도 3d는 헤마톡살린-에오신 염색을 통하여 관찰한 종양 조직을 촬영한 사진이다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 탄소나노튜브 기반의 항암제인 DOX-MWCNT를 유방암 세포를 이식하여 제조한 종양동물에 투여한 후, 조직 내에 분포 정도를 시간대 별로 확인한 그래프이다.
- 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 탄소나노튜브 기반의 항암제인 DOX-MWCNT의 흡수(uptake) 및 방출(efflux) 정도를 확인한 결과로서, 도 5a는 약물방출 정도를 확인한 그래프로서 혈액(FBS:pH=7.2) 및 세포 내부(ABS:pH=5)에서 2차에 걸친 약물 방출(1차 방출: 6 시간, 및 2차 방출: 50시간)을 나타내며, 도 5b는 유방암 세포에 DOX-MWCNT 처리 2시간 경과 후, DOX-MWCNT의 흡수정도를 독소루비신 약물과 비교한 사진과 분석 그래프이며, 도 5c는 DOX-MWCNT 및 DOX 처리 후 2시간 경과 후, 약물을 제거한 후 시간대 별로(2~24시간) DOX-MWCNT의 약물 방출 정도(efflux)를 독소루비신 약물과 비교한 사진과 분석 그래프이며, 도 5d는 MRP1(암세포에서 작동하는 약물 pumping 단백질) mRNA 발현 수준을 통한 본 발명의 일 실시예에 따른 탄소나노튜브 기반의 항암제의 non-efflux

효과를 확인한 그래프이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 탄소나노튜브 기반의 항암제인 DOX-MWCNT를 유방암 세포를 이식하여 제조한 종양동물에 투여한 후, 사이토카인 및 간 효소를 분석한 결과(도 6a), 및 탄소나노튜브를 정상 마우스에 투여한 후, 간 클리어런스(clearance)를 확인하기 위한 간 조직 사진(도 6b) 및 상기 간 조직을 헤마톡살린-에오신 염색한 사진(도 6c)이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0030] 본 문서에서 사용되는 용어를 정의하면 하기와 같다.
- [0031] 본 문서에서 사용되는 “유효량”은 상술한 본 발명의 치료 효능을 발휘하는 데 충분한 양을 의미한다.
- [0032] 본 문서에서 사용되는 “약제학적으로 허용되는 담체”는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 탄수화물류 화합물(예: 락토스, 아밀로스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 셀룰로스, 등), 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 염 용액, 알코올, 아라비아 고무, 식물성 기름(예: 옥수수 기름, 목화 종자유, 두유, 올리브유, 코코넛유), 폴리에틸렌 글리콜, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences(19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0033] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0034] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0035] 본 발명은
- [0036] (a) 다중벽 탄소나노튜브의 표면을 카복실기로 개질시키는 단계;
- [0037] (b) 상기 카복실화된 다중벽 탄소나노튜브를 pH 5.2~5.5의 조건에서 EDC(N-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride) 링커를 결합하는 단계; 및
- [0038] (c) 상기 EDC 링커가 결합된 다중벽 탄소나노튜브를 pH 5.9~6.2의 조건에서 항암제와 결합시키는 단계를 포함하는, 탄소나노튜브 기반의 항암제의 제조방법이 제공된다.
- [0039] 본 발명의 일 실시예에 따른 제조방법은 종래의 공유결합의 낮은 적재율을 EDC 링커 결합과 항암제 결합시의 pH를 변화시킴으로써 개선하였으며, 이러한 본 발명의 조건에 의하여 항암제가 강력하게 결합되어 단일 항암제 및 파이 결합을 이용하여 제조된 탄소나노튜브 기반의 항암제에 비하여 소량으로도 현저히 우수한 항암 효과가 있음을 입증하였다.
- [0040] 우선, 본 발명의 일 실시예에 따른 EDC 링커 결합 및 항암제 결합시의 pH 변화 조건은 종래의 pH 5~7 범위 내에서 선택되는 하나의 pH만을 이용하는 방법을 개량한 것이다. 일반적으로 탄소나노튜브에 EDC 링커를 결합시키는 pH 조건과 항암제를 결합시키는 pH 조건을 동일하게 적용하여 나노기술이 적용된 항암제를 제조하였다. 그러나 EDC 링커가 안정적으로 결합할 수 있는 pH는 4~6인 반면, 항암제가 EDC 링커를 통하여 탄소나노튜브에 결합할 수 있는 최적의 pH는 7~8이기 때문에, 항암제가 탄소나노튜브에 결합되는 pH 범위는 EDC 링커와 탄소나노튜브의 결합을 약화시켜, 결과적으로 항암제가 탄소나노튜브에 안정적으로 적정량이 결합될 수 없도록 한다. 이에, 본 발명자는 EDC 링커와 항암제가 모두 안정적이면서 강력하게 결합될 수 있는 2 단계의 pH 변화 조건 및 이러한 결합이 실제로 강력하게 유지될 수 있는 온도, 시간의 실험조건을 최적화하였다.
- [0041] 본 발명자들은 본 발명의 일 실시예를 통하여 제조된 항암제-탄소나노튜브 공유결합체는 탄소나노튜브에 공유결합된 항암제의 양이 증가함에 따라 전체적인 구조가 변화할 정도로 더욱 강력하게 결합함을 확인하였다(도 1f 내지 도 1i 참조). 즉, 본 발명의 일 실시예에 따른 탄소나노튜브 기반의 항암제는 종래의 공유결합에 비하여 항암제의 적재량을 증가시켰으며, 이러한 적재량의 증가는 탄소나노튜브와 항암제 사이의 결합력의 증가를 야기하고, 실제 항암제-탄소나노튜브 공유결합체가 체내에 도입되었을 때, 암세포 내에서 항암제와 탄소나노튜브 사이의 해리속도가 감소하여 항암제를 아주 서서히 지속적으로 방출시킴으로써, 항암제 내성 암을 포함한 암세포에 대한 항암효과를 극대화시킬 수 있음을 의미한다.

[0042] 즉, 본 발명의 일 실시예에 따른 제조방법은 카복실 정도, pH 변화의 조건을 최적화함으로써, 종래의 공유결합을 이용한 탄소나노튜브 기반의 항암제에 비하여 항암제 적재율을 약 2배 이상 증가시켰다. 이러한 증가한 적재율은 강력한 결합력으로 항암제가 탄소나노튜브에 결합됨으로써, 결론적으로 암 세포 내에서 장시간에 서서히 탄소나노튜브로부터 항암제가 배출됨에 따라, 미량의 항암제 사용으로도 우수한 항암 효과를 제공할 수 있으며, 이에 따른 항암제 부작용을 저하시킬 수 있다. 또한, 항암제를 펌핑(pumping out)하는 항암제 내성 암 세포에서 치료효과를 극대화시킨다. 이는 종래의 과량의 항암제 투여 부작용을 개선할 수 있게 하며, 파이결합을 이용하여 제조된 탄소나노튜브 기반의 항암제의 항암제 내성 암 세포에 대한 낮은 치료 효과를 극복할 수 있게 한다. 아울러, 장시간 동안 항암제가 암 세포내에 머물면서 지속적으로 배출되기 때문에, 암 세포의 분열 및 증식 시기에 효과적으로 항암 효과를 발휘할 수 있다.

[0043] 이하, 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 더 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예 및 실험예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예 및 실험예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.

[0044] 실시예 1: 탄소나노튜브 기반 항암제의 제조

[0045] 1-1: 카복실화된 다중벽 탄소나노튜브의 제조(MWCNT-COOH)

[0046] 나노 튜브는 반데르발스인력(van der Waals attraction)에 의하여 쉽게 응집되는 특성이 있어, 분산시키기 어려운 문제가 있다. 이에, 탄소 나노튜브의 말단 및 결함부위(defect sites)의 탄소 원자를 산화시키기 위하여 산(acid)을 이용하였다. 산 용매를 이용하여 산소를 함유하는 작용기를 탄소나노튜브의 표면에 산화시킴으로써, 카복실기(carboxylic group)와 같은 작용기를 도입할 수 있다. 상기와 같이 카복실기가 표면에 도입되어, 표면 기능화(surface functionalization)된 탄소나노튜브를 하기와 같이 제조하였다.

[0047] 상기 다중벽 탄소나노튜브의 표면에 카복실기를 도입하는 방법은 (a) 강산 용매에 탄소나노튜브를 혼입하여, 산소를 함유하는 작용기를 탄소나노튜브의 표면에 화학적으로 산화시켜 도입하는 단계, 및 (b) 상기 산 용매 중에서 초음파 처리하는 단계를 통하여 수행되었다. 구체적으로, 다중벽 탄소나노튜브(multi-wall carbon nanotube, MWCNT)는 직경이 10~30 nm 범위인 SES research 제품(lot NT-0140, catalog # 900-1260, Inc USA) 20 mg을 H₂SO₄(98%) 9 mL과 HNO₃(65%) 3 mL을 3:1의 부피비율로 혼합한 후, 30분 동안 초음파처리(sonicate)하였다.

[0048] 이때, 초음파 처리는 20~25 KHz 주파수 범위에서 80 분내지 120분 동안 처리하였다. 주파수 범위는 20~22 KHz일 수 있으며, 이때에는 90분 내지 110분 동안 초음파 처리할 수 있다. 이러한 과정에 의하여 응집된 나노튜브 구조가 절단되고 길이 짧은 다발의 구조로 되었으며, 초음파 처리 시 발생하는 충격파(shockwave)는 부유 상태의 고체 입자를 더욱 분산된 상태로 만들었다. 그 후, 상기 용액에 50℃에서 24시간동안 열을 가하면서, 마그네틱 바(magnetic bar)를 이용하여 300 rpm의 속도로 교반하였다. 상기의 산 용매와 반응하는 단계와 초음파 처리 단계를 1회 반복하였다.

[0049] 상기 단계를 통하여 화학적으로 기능화된 MWCNT(MWCNT-COOH)는 10 μm 직경의 필터 멤브레인(membrane)(Millipore, lot: ROBA95509)을 이용하여 여과시킨 후, 상기 필터 멤브레인을 16~20시간 동안 60℃에서 진공상태로 건조시켰다. 그 후, 본 발명자는 상기 화학적으로 기능화된 MWCNT-COOH를 스테인레스 철 재질의 의료용 스크레이브(scrape)를 이용하여 상기 필터 멤브레인에서 긁어냈다. 상술한 실험 단계를 통하여 나노튜브의 표면의 결함 위치(defect site)에 카복실 잔기(-COOH)가 생성되었다(도 1a 참조). 탄소나노튜브의 결함 부위를 카복실화시키는 변형은 물 또는 유기용매 내에서 탄소 나노튜브의 용해성을 증가시킨다.

[0050] 1-2: EDC 링커가 연결된 다중벽 탄소나노튜브의 제조(EDC-MWCNT-COOH)

[0051] EDC는 단백질 결합에 사용되는 “zero-length cross-linker”이다. 상기 결합은 연속된 2개의 반응에 의하여 완성된다. 우선 EDC는 카복실기와 반응하여 O-acylisourea 중간 반응물을 생성하고, 상기 중간 반응물은 아민기와 반응하여 안정적인 아마이드(amide)결합을 생성하게 된다. 그러나 상기 O-acylisourea 중산 반응물은 매우 불안정하기 때문에 쉽게 가수분해된다. 이러한 불안정성으로 인하여 결합 효율이 매우 낮다. 이러한 이유로 NHS(N-hydroxysuccinimide)를 첨가하여 O-acylisourea 중산 반응물을 NHS 에스테르(ester)로 변환시켜 중산 반응물의 안정성을 증가시켰으며, 결과적으로 결합 효율이 10~20배 증가되었다.

- [0052] 구체적으로, MWCNT-COOH에 EDC 링커를 결합시키는 반응은 약 산성을 띠는 MES 버퍼(2-morpholinoethanesulfonic acid)내에서 수행하였다. MES 버퍼(low moisture content $\geq 99\%$, sigma-aldrich CAT: M3671)는 용액의 pH를 조절하기 위하여 사용하였다. 우선, 3.2 mg의 MWCNT-COOH를 1.6 ml의 MES 버퍼(50 mM, pH 5.5)에 넣은 후, 팁 소니케이터(tip sonicator)(company: Misonix sonicators, Product: sonicator 4000)를 이용하여 3초 on/3초 off의 주기로 5분 동안 분산시켰다. 그 후, MES 버퍼(50 mM, pH 5.5)에 1.6 ml NHS(400 mM)(N-hydroxysuccinimide, Cas: 06066-82-6)를 혼합한 용액을 상기 초음파 분쇄된 용액에 첨가한 후, 30분 동안 Rocker를 사용하여 혼합하였다. 그 후, EDC 10 ml 용액(20 mM)(N-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride; sigma, lot: 040M17411V)을 상기 초음파 처리 용액에 첨가하고 30분 동안 Rocker로 혼합시켜, EDC 링커가 연결된 탄소나노튜브(EDC-MWCNT-COOH)를 제조하였다.
- [0053] 상기 혼합액은 4 센트리콘 YM-50 필터 튜브(Amicon ultra-15, 50K device-50000 NMWL, TM millipore, USA)에 넣고 2,000 rpm의 속도로 원심분리한 후, MES 버퍼(50 mM)로 3회 또는 그 이상 세척하였으며, 이때 1회에 20분 동안 원심분리를 수행하였다.
- [0054] 그리고 상기 MWCNT-COOH 5 mg을 PBS(phosphate buffered saline) 5 ml에서 팁 소니케이터를 이용하여 3초 on/3초 off의 조건으로 5분 동안 초음파 분쇄를 더 수행하였으며, 이 상태를 하기 약물을 로딩한 탄소나노튜브 기반의 항암제에 대한 대조군으로 이용하였다.
- [0055] **1-3: 탄소나노튜브 기반의 항암제의 제조**
- [0056] 본 발명의 일 실시예에 따른 탄소나노튜브 기반의 항암제는 종래의 공유결합을 이용한 항암제에 비하여 항암제의 결합율이 증가되었다. 종래의 기술에 비하여 항암제의 결합율을 증가시키기 위하여, EDC 링커 결합과 약물 결합시의 pH를 조절하였다. EDC 링커가 가장 잘 붙는 조건인 pH 4-6 범위 가운데, pH 5.5를 선택하여 EDC 링커를 최대한 결합유도 하였고, 약물을 결합시킬 때에는 pH 6으로 상향시켜 약물 적재 최대화 조건인 pH 7-8을 충족하진 못하여도 EDC의 중성화(hydrolysis)를 억제할 수 있는 pH 범위로 조절하였다. 이렇게 2 번에 걸친 pH(pH 5.5 및 6)의 변화는 EDC 링커 결합을 안정적으로 유지하는 동시에 약물의 적재를 최대화함으로써 강력한 공유결합을 유도할 수 있다.
- [0057] 구체적으로, 상술한 바와 같이 EDC 링커가 안정적으로 결합되면서 약물의 적재를 증가시키기 위해서는 하기와 같이 실험을 수행하였다. 상기 실시예 1-2로부터 수득한 EDC-MWCNT 용액을 항암제인 독소루비신(Doxorubicin, DOX)(Sigma-aldrich, Cat#D1515)또는 에피루비신 하이드로클로라이드(epirubicin hydrochloride, EPI)(Sigma-aldrich, Cat#9406)를 혼합하였다. 이때, EDC-MWCNT와 약물은 1:1 의 농도 비율로 혼합시키고, 플랫폼 교반기(platform shaker)에서 14-18시간 동안 4℃에서 교반시켰다. 교반 후, 약물 또는 약물과 EGF가 로딩된 EDC-MWCNT 용액은 센트리콘 YM-50 필터 튜브를 이용하여 2,000 rpm에서 원심분리를 수행하였으며, 상층액을 제거함으로써 결합하지 못한 잔여 약물을 제거하였다. 그 후, 약물이 로딩된 MWCNT(Dox-MWCNT, EPI-MWCNT)는 PBS 5 ml에 녹여서, 하기 실험에 사용하였다.
- [0058] **1-4: 약물 및 EGF가 로딩된 MWCNT의 제조**
- [0059] 상기 실시예 1-2로부터 수득한 EDC-MWCNT 용액을 EGF(Sigma, E9644)와 독소루비신(DOX)또는 에피루비신 하이드로클로라이드(EPI)을 혼합하였다. 이때, 혼합 비율은 EDC-MWCNT : 약물(독소루비신 또는 에피루비신) : EGF=5:5:1 이다. 그 후, 플랫폼 교반기(platform shaker)에서 14-18시간 동안 4℃에서 교반시켰다. 교반 후, 약물 또는 약물과 EGF가 로딩된 EDC-MWCNT 용액은 센트리콘 YM-50 필터 튜브를 이용하여 2,000 rpm에서 원심분리를 수행하여, 상층액을 제거함으로써 결합하지 못한 잔여 약물을 제거하였다. 그 후, 약물이 로딩된 MWCNT(Dox-MWCNT, EPI-MWCNT)또는 약물과 EGF가 로딩된 MWCNT(Dox-EGF-MWCNT, EPI-EGF-MWCNT)는 PBS 5 ml에 녹였다.
- [0060] **1-5: 약물과 EGF가 결합된 조성물의 제조**
- [0061] EGF가 연결된 독소루비신(DOX-EGF)또는 에피루비신(EPI-EGF)는 상기 실시예 1-4에 기재된 방법과 동일한 방법으로 제조되었으며, 약물(독소루비신 또는 에피루비신) : EGF의 혼합비율은 5:1이었다.

표 1

[0062] 본 발명의 일 실시예의 탄소나노튜브 기반의 항암제

	명칭	약칭
다중벽 탄소나노튜브	multi walled carbon nanotube	MWCNT

독소루비신	doxorubicin	Dox
에피루비신	epirubicin	EPI
카복실화된 탄소나노튜브	MWCNT-COOH	MWCNT-COOH
카복실화된 탄소나노튜브 + EDC 링커	EDC-MWCNT-COOH	EDC-MWCNT
카복실화된 탄소나노튜브 + 항암제	Dox-MWCNT-COOH	DOX-MWCNT
	EPI-MWCNT-COOH	EPI-MWCNT
카복실화된 탄소나노튜브 + EGF+항암제	Dox-EGF-MWCNT	DOX-EGF-MWCNT
	EPI-EGF-MWCNT	EPI-EGF-MWCNT
EGF + 항암제		DOX-EGF
		EPI-EGF

[0063] **실시예 2: 종양 동물모델의 제조**

[0064] 암컷(n=15) BALB/c 누드 마우스(20 g, 경상대학교 의학전문대학원 실험동물실)는 온도가 조절되며, 명주기(6:00-18:00), 자유식이 조건에서 사육하였다.

[0065] 종양 동물모델을 제조하기 위하여, 유방암 세포인 MDA-MB-231 세포를 왼쪽 등 부위에 5×10^6 개씩 이식하였다. 이식 후, 2 주가 경과한 후, 종양의 크기가 한쪽 변이 4 mm가 넘었을 때, 하기 실험예에 사용하였다.

[0066] **실험예 1: 탄소나노튜브 기반의 항암제의 특성확인**

[0067] **1-1: FT-IR 분석을 통한 탄소나노튜브의 카복실화 확인**

[0068] 다중벽 탄소나노튜브의 카복실화를 확인하기 위하여 FT-IR(Fourier Transform Infrared Spectroscopy)을 수행하였다.

[0069] 그 결과, 도 1b에 나타난 바와 같이, 카복실화된 MWCNT의 경우(MWCNT-COOH)의 스펙트럼은 적외선 파수에서 피크를 나타냈으며, 구체적으로 1580과 1710 파수(wave number, cm^{-1})부근에서 -C-C=O- 결합과 -C=O- 결합에 해당하는 피크가 관찰되었다. 이러한 결과는 카복실기가 MWCNT의 표면에 성공적으로 부착되었음을 입증하는 것이다. 반면, 카복실화 처리를 하지 않은 MWCNT의 스펙트럼에서는 적외선 흡수가 매우 낮게 나타남으로써, -C-C=O- 결합과 -C=O- 결합이 존재하지 않음을 확인할 수 있었다(도 1b 참조).

[0070] **1-2: TGA 분석을 통한 탄소나노튜브의 카복실화 확인**

[0071] 다중벽 탄소나노튜브의 카복실화를 확인하기 위하여 열분석(Thermal Gravimetric Analysis; TGA)을 수행하였다. 구체적으로, TGA 분석을 수행하기 전에 카복실화하지 않은 다중벽 탄소나노튜브(MWCNT)와 카복실화된 다중벽 탄소나노튜브(MWCNT-COOH)를 60℃, 진공상태에서 가열하여 수분을 완전히 증발시킨 후, TGA 분석을 수행하였다. 상기 TGA 분석은 Q50 TGA(TA, USA)기기를 이용하여, 10℃/분, N₂=100 ml/분의 조건에서 수행되었다.

[0072] 그 결과, 도 1c에 나타난 바와 같이, MWCNT-COOH는 카복실화하지 않은 MWCNT에 비하여 약 35% 정도 무게가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 MWCNT의 기능화된 사이드 체인(functional side chain)의 소실에 의한 것으로 파악되었다. 역으로, MWCNT의 카복실화 정도는 소실된 무게의 정도라고 할 수 있다(도 1c 참조).

[0073] **1-3: UV-vis 분석을 이용한 탄소나노튜브와 항암제의 결합 확인**

[0074] 상기 실시예 1의 제조방법의 카복실화된 탄소나노튜브에 항암제가 정상적으로 결합여부를 UV-vis(UV-Visible)흡수 스펙트럼을 통하여 확인하였으며, 이때 분광계(X-ma 3000 series, Human corporation, South Korea)를 이용하였다.

[0075] 구체적으로, 카본나노튜브에 적재된 항암용량을 측정하기 위하여 PBS에 저장된 나노 항암제를 10~30배 정도 희석하여 용액 상태에서 UV-vis(UV-Visible)흡수 스펙트럼은 분광계(X-ma 3000 series, Human corporation, South Korea)를 이용하여 측정하였다. 상기 MWCNT-COOH에 대한 대조군으로 항암제를 결합하지 않은 COOH-MWCNT를 이용하였다.

[0076] 그 결과, 도 1d 및 1e에 나타난 바와 같이, 독소루비신과 에피루비신과 같은 상기 약물이 결합된 나노항암제는 약 490 nm에서 피크가 관찰되었다. 이러한 결과는 약물이 탄소나노튜브에 성공적으로 결합되었음을 의미한다.

[0077] 또한, 도 1e에 나타난 바와 같이, EGF가 추가적으로 결합된 EGF-EPI-MWCNT도 약 490 nm 부근에서 피크가 감소된 것을 감안한다면 일정량의 EGF가 탄소나노튜브에 약물과 함께 결합된 것을 확인할 수 있었다(도 1e 참조).

[0078] **1-4: 탄소나노튜브와 독소루비신 항암 약물의 결합력 측정**

[0079] 본 발명의 일 실시예에 따른 탄소나노튜브 기반의 항암제에 있어서, 공유결합에 의한 탄소나노튜브와 항암 약물의 결합 정도를 관찰하기 위하여, 물리적으로 결합시킨(physically or non-specifically conjugated) 항암제를 탄소나노튜브에 결합시킨 독소루비신의 형광을 비교 분석하였다. 이때, 탄소나노튜브와 항암제를 물리적으로 결합시킨 항암제는 탄소나노튜브와 항암제를 단순한 파이펫팅을 이용하여 혼합하여 결합시킨 항암약물을 의미하며, 탄소나노튜브 및 항암제를 동일한 양으로 공유 결합시킨 항암제와 비교분석하였다. 또한, 전체 실험에 대한 대조군으로 독소루비신 단일 약물을 이용하였다. 형광광도계(Luminescence spectrometer, Perkin Elmer)를 이용, 독소루비신으로부터 방출되는 형광정도를 분석하여 카본 나노물질에 부착된 항암제의 구조적인 변화정도를 결합된 방식 및 결합정도와 비교하여 분석하였다. 독소루비신은 그 자체로 형광을 나타내는 화합물이기 때문에, 독소루비신의 형광의 강도의 감소는 독소루비신이 탄소나노튜브와 강력하게 결합됨에 따라 구조적인 변화가 일어났다는 것을 의미한다.

[0080] 그 결과, 도 1f에 나타난 바와 같이, 독소루비신 단일 항암 약물은 형광이 매우 높으며, 탄소나노튜브, 탄소나노튜브와 공유적으로 결합된 항암제(DOX-MWCNT, covalently conjugated) 및 물리적으로 결합된 항암제(DOX-MWCNT, physically conjugated)는 형광이 매우 낮은 것을 관찰할 수 있었다. 이에, 독소루비신을 제외하고 형광의 세기를 비교한 결과, 공유적으로 결합된 탄소나노튜브로부터 관찰되는 형광의 세기가 물리적으로 결합된 탄소나노튜브 기반의 항암제에 비하여 약 88%정도 감소하는 것을 관찰할 수 있었다.

[0081] 독소루비신의 형광의 세기를 100%로 하였을 때, 물리적으로 결합된 MWCNT-DOX은 약 6.3%의 형광을 나타내며, 공유결합을 통하여 결합된 MWCNT-DOX는 약 0.8%의 형광을 나타내며, 형광이 크게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 형광의 세기를 결합방법에 따라 비교해 보면, 물리적으로 결합된 MWCNT-DOX를 100%로 보았을 때, 공유적으로 결합된 MWCNT-DOX는 약 12%의 형광을 나타냈다. 이러한 형광세기의 감소는 탄소나노튜브에 의한 간섭 및 강력한 공유결합에 의한 독소루비신의 구조적 변화에 의한 것으로, 본 발명의 일 실시예에 따른 공유결합을 이용하여 제조된 탄소나노튜브 기반의 항암제에 강력하게 항암제가 결합되어 있음을 입증하는 결과이다.

[0082] 이어, 본 발명자는 결합된 약물의 양을 달리하여 물리적 결합과 공유결합을 이용하여 제조한 탄소나노튜브 기반의 항암제의 퀀칭(quenching) 정도를 형광을 통하여 확인하였다. 독소루비신 항암 약물을 10, 17 및 28.9%의 조건으로 탄소나노튜브에 결합시켰다. 10% 결합은 독소루비신과 탄소나노튜브를 1:4의 중량비율로, 17%는 2:1의 중량비율로, 29%는 1:1의 중량비율로 상기 실시예 1에 기재된 방법에 따라 공유결합 시켰으며, 공유결합으로부터 계산된 카본 나노튜브 및 항암제 농도를 동일하게 준비하여 혼합한 후, 물리적 결합을 유도하기 위하여 파이펫팅(pipetting)을 충분히 수행하였다.

[0083] 그 결과, 도 1g, 1h 및 1i에 나타난 바와 같이, 결합시키는 약물의 양이 증가함에 따라, 형광의 세기가 더욱 크게 차이나는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 상기 도 1f의 결과와 동일하게 물리적 결합에 비하여 공유결합을 이용하였을 때, 형광의 세기가 감소하며, 독소루비신이 더욱 강력하게 탄소나노튜브에 결합되어 있음을 재확인할 수 있었다. 또한, 물리적 결합과 공유 결합간의 결합력의 차이는 독소루비신의 양이 증가함에 따라 더욱 증가하였다(도 1g, 1h 및 1i).

[0084] **실험예 2: 시험관 내(*in vitro*) 실험을 통한 탄소나노튜브 기반의 항암제의 효과 확인**

[0085] 폐암세포인 A549와 유방암세포인 MDA-MB-231를 이용하여 본 발명의 일 실시예에 따른 탄소나노튜브 기반의 항암제의 암세포 사멸 효과를 확인하였다.

[0086] **2-1: 폐암세포에 대한 항암 효과 확인**

[0087] A549 세포(1×10⁴ 세포/웰(well) CAT: CRL-1658, company: ATCC)는 96웰 플레이트에서 배양하였으며, 웰당 1×10⁴ 세포의 비율로 심었으며, 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)이 포함된 DMEM 배지에서 배양되었다. 이때, 배양기는 CO₂ 5% 조건에서 37℃의 온도로 습기가 있는 상태로 유지하였다. 24시간 동안 상기 세포를 각각 배양하고, MWCNT-COOH, EPI, EPI-EGF, EPI-EGF-MWCNT를 각 웰당 0.086, 0.172, 0.345, 0.69, 1.38 μmol/L의 비율로 처리하고, 48시간 동안 더 배양하였다. 그 후, 플레이트내의 약물 용액을 제거한 후, 1 mg/ml 농도의 MTT 시약(3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-

2,5-diphenyltetrazolium bromide)을 웰당 100 μ l씩 첨가하고, 37℃에서 1시간 더 배양하였다. 그 후, DMSO 용액을 웰당 100 μ l씩 첨가한 후, 마이크로플레이트 리더기(Model 680, Bio-Rad)를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0088] 그 결과, 도 2a에 나타난 바와 같이, 탄소나노튜브(MWCNT-COOH)를 처리한 군에 비하여 에피루비신이 포함된 약물을 처리한 군(EPI-EGF, EPI-EGF, EPI-MWCNT, EPI-EGF-MWCNT)를 처리한 군에서 폐암세포의 생존율이 낮은 것을 확인할 수 있었다. 또한, 에피루비신이 포함된 약물을 처리한 군 사이에서는 본 발명의 일 실시예에 따른 카복실화된 다중벽 탄소나노튜브에 에피루비신을 결합시켰을 때(EPI-MWCNT, EPI-EGF-MWCNT), 폐암 세포에 대한 세포사멸 효과가 미량(1 μ MOL/L)의 항암제 처리량에서도 매우 우수하였다(도 2a).

[0089] 이어, 본 발명자는 독소루비신이 포함된 약물(DOX-EGF, DOX-MWCNT, DOX-EGF-MWCNT)를 상기와 동일한 폐암세포인 A549에 처리하였다. 처리 약물을 제외한 조건을 모두 동일하였다. 그 결과, 에피루비신의 암 세포 사멸효과와 유사하게 독소루비신 역시 본 발명의 일 실시예에 따른 카복실화된 다중벽 탄소나노튜브에 결합되었을 때 가장 우수한 폐암 세포 사멸효과를 나타냈다(도 2b).

[0090] 2-2: 유방암 세포에 대한 항암 효과 확인

[0091] 이어, 본 발명자는 유방암 세포주를 이용하여 본 발명의 일 실시예에 따른 탄소나노튜브 기반의 항암제의 암 세포 사멸 효과를 확인하였다.

[0092] MDA-MB-231 세포(CAT: HTB-26, company: ATCC)를 96웰 플레이트에서 배양하였으며, 웰당 3×10^5 세포의 비율로 심었으며, 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)이 포함된 DMEM 배지에서 배양되었다. 이때, 배양기는 CO₂ 5% 조건에서 37℃의 온도로 습기가 있는 상태로 유지하고, 24시간 동안 상기 세포를 각각 배양하였다. 그 후, MWCNT-COOH, DOX, 및 DOX-MWCNT를 각 웰당 100, 200, 400, 900, 1800, 3200 ng/ml의 비율로 처리하고, 48시간 동안 더 배양하였다. 그 후, 플레이트내의 약물 용액을 제거한 후, 1 mg/ml 농도의 MTT 시약(3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드)을 웰당 100 μ l 첨가하고, 37℃에서 1시간 더 배양하였다. 그 후, DMSO 용액을 웰당 100 μ l 첨가한 후, 마이크로플레이트 리더기(Model 680, Bio-Rad)를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0093] 그 결과, 도 2c에 나타난 바와 같이, 본 발명의 일 실시예에 따른 탄소나노튜브 기반의 항암제인 DOX-MWCNT를 약 400 ng/ml의 농도로 처리시의 유방암 세포 사멸 효과가 독소루비신 단일 약물을 약 1000 ng/ml로 처리하였을 때의 효과와 동일한 것을 확인할 수 있었다(도 2c).

[0094] 종합하면, 상기 결과는 본 발명의 일 실시예에 따른 카복실화된 다중벽탄소나노튜브를 이용하여 제조한 항암제는 저용량으로도 독소루비신 단일 약물을 고용량으로 처리시의 효과를 제공할 수 있으며, 이는 극미량으로도 다양한 암 세포에 적용할 수 있음을 입증한 것이다. 또한, 독소루비신, 에피루비신 이외에도 아민기를 가진 다양한 약물에 적용이 가능함을 의미하는 것이다.

[0095] 실험예 3: 생체 내(in vivo)실험을 통한 탄소나노튜브 기반의 항암제의 효과 확인

[0096] 본 발명의 일 실시예에 따른 탄소나노튜브 기반의 항암제의 효과를 확인하기 위하여, BALB/c nude 마우스에 투여한 후, 종양의 크기변화(도 3a), 체중변화, 종양의 무게 및 변화(도 3b, 3c), 조직변화(도 3d)를 관찰하였다.

[0097] 구체적으로, 상기 실시예 2에서 MDA-MB-231 세포를 이식하여 제조한 종양동물 모델에 본 발명의 일 실시예에 따른 탄소나노튜브 기반의 항암제를 저용량(550 μ g/ml) 또는 고용량(4.5 mg/ml)으로 3회에 걸쳐 7일 간격으로 정맥투여 한 후, 24일 동안 변화를 관찰하였다. 이때, 투여 전을 0일로 하였을 때, 2, 9, 및 16일째에 정맥으로 투여하였다.

[0098] 3-1: 종양의 무게 및 크기변화

[0099] BALB/c nude 마우스에 유방암 세포를 이식한지 2주가 경과한 후, 본 발명의 일 실시예에 따른 탄소나노튜브 기반의 항암제를 투여한 후, 24일 동안 관찰하였다. 약물투여 전 0일에 측정한 종양의 크기를 1로 잡고, 이후 3일 혹은 4일 간격으로 종양의 크기를 측정하여, 종양 크기변화를 관찰하였다. 그 결과, 도 3a에 나타난 바와 같이, 본 발명의 일 실시예에 따른 탄소나노튜브 기반의 항암제는 동량의 독소루비신에 비하여 항암효과가 우수하였으며, 이러한 효과의 차이는 550 μ g/kg 저용량 군에서 더욱 현저히 나타났다.

- [0100] 항암제를 24일 동안 투여한 후, 마우스를 에틸에테르로 마취시켜, 희생시키고, 종양조직을 채취하고 무게를 측정하였다. 이때 각 군의 유의성을 비교하기 위하여, Prism(GraphPad Software, Inc.)을 이용하여 One-way ANOVA(analysis of variance)로 통계처리 하였다(**P<0.01, ***P<0.001).
- [0101] 그 결과, 도 3b에 나타난 바와 같이, 독소루비신과 DOX-MWCNT를 투여한 군에서 종양 조직의 크기가 감소하였으며, DOX-MWCNT를 투여한 군의 경우 저용량(550 μ g/kg)을 투여하였을 때에도 비투여 대조군에 비하여 유의하게 종양 조직의 크기가 감소하였다. 반면, 독소루비신의 경우 고용량(4.5 mg/kg)을 투여하였을 때에만 대조군에 비하여 유의하게 종양 조직의 크기가 감소하였다.
- [0102] 또한, 이러한 결과는 각 실험군으로부터 종양을 분리한 후 종양의 크기를 비교한 도 3c에서도 동일하였다. 상기도 3b의 그래프와 유사하게 독소루비신과 탄소나노튜브 기반의 항암제를 투여한 군에서 종양의 크기가 감소하는 경향을 나타냈으며, 독소루비신 고용량(4.5 mg/kg)과 탄소나노튜브 기반의 항암제 저용량(550 μ g/kg)을 투여한 군의 종양의 크기가 유사하였다(도 3c).
- [0103] 고용량의 독소루비신 투여에 의하여 나타나는 암 세포 사멸효과가 본 발명의 일 실시예에 따른 탄소나노튜브 기반의 항암제의 경우, 약 1/10배 정도의 저용량을 투여하였을 때에도 나타났다. 따라서, 독소루비신 약물 자체의 독성 부작용을 피할 수 있으면서, 우수한 항암 효과를 기대할 수 있다.
- [0104] **3-2: 종양 조직의 조직병리학적 관찰**
- [0105] BALB/c nude 마우스에 유방암 세포를 이식한지 2주가 경과한 후, 본 발명의 일 실시예에 따른 탄소나노튜브 기반의 항암제를 투여한 후, 24일 동안 관찰하였다. 그 후, 에틸에테르에 마취시켜, 희생시키고, 종양조직을 채취하였다. 채취한 종양조직의 무게를 측정한 후, 채취한 종양은 10% 포르말린에 24시간동안 고정시키고, 흐르는 물로 씻어준 후, 70, 80, 90, 95, 100% 에탄올에 차례로 담겨서 탈수 시킨다. 그 후 자일렌(xylene)으로 투명화시키고, 파라핀(paraffin)으로 포매한 후, 5 μ m의 두께로 절편을 만들어 유리 슬라이드 글라스에 올려놓고, 헤마톡살린-에오신 염색(Hematoxylin and Eosin, H&E)을 실시하여 광학현미경으로 관찰하였다.
- [0106] 그 결과, 도 3e에 나타난 바와 같이, 독소루비신(Dox)을 저용량(550 μ g/kg) 및 고용량(4.5 mg/kg)으로 투여한 군의 조직은 비투여 대조군(Cont.)에 비하여 세포 사멸이 증가하여, 조직 가운데 구멍이 뚫려 있는 것을 관찰할 수 있었다. 반면, 본 발명의 일 실시예에 따른 DOX-MWCNT의 경우 저용량을 처리한 군에서 독소루비신 단일 약물에 비하여 암 세포 사멸효과가 현저히 우수하였다. 이러한 결과는 상기도 3a 내지 d로부터 확인된 결과와 마찬가지로, 본 발명의 일 실시예에 따른 탄소나노튜브 기반의 항암제가 종양세포에 대한 항암효과가 우수하며, 독소루비신 단일 약물에 비하여 약물자체의 독성으로 인한 부작용을 낮출 수 있음을 입증하는 것이다.
- [0107] **실험예 4: 탄소나노튜브 기반의 항암제 투여 후 생체 내 분포**
- [0108] 본 발명의 일 실시예에 따른 탄소나노튜브 기반의 항암제를 생체 내(*in vivo*) 투여를 수행하였을 때, 생체 내 분포 정도를 확인하였다.
- [0109] 구체적으로, BALB/c nude 마우스에 본 발명의 일 실시예에 따른 DOX-MWCNT 또는 독소루비신을 2 mg/kg으로 정맥주사한 후, 투여 30분 및 6시간이 경과한 후 동물을 희생시켰다. 그 후, 종양, 심장, 폐, 간, 비장, 신장, 위장, 소장, 근육 및 혈액 샘플을 채취하여, 독소루비신의 양을 측정하였다. 혈액은 1% SDS, 1% Triton X-100, 40 mM Tris Acetate, 10 mM EDTA, 10 mM DTT를 포함하는 라이시스 버퍼(lysis buffer)로 녹인 후, 이소프로판올(isopropanol)에 0.75 M 염산을 첨가하여, 15시간 동안 20℃에 방치한 후, 독소루비신을 추출하였다. 나머지 조직 샘플(100 mg)은 0.25 M sucrose, 40 mM Tris Acetate, 10 mM EDTA를 포함하는 버퍼를 0.5 ml 첨가하여 분쇄기를 이용하여 분쇄한 후, 그 중 0.2 ml에 0.1 ml의 10% Triton X-100을 첨가한 후 강하게 교반기로 섞어주고, 이소프로판올(isopropanol)에 0.75 M 염산을 첨가하여, 15시간 동안 -20℃에 방치한 후, 독소루비신을 추출하였다. 이렇게 추출한 독소루비신을 플레이트 리더(plate reader)기로 측정하여 각 샘플내의 함량을 측정하였다.
- [0110] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 본 발명의 일 실시예에 따른 DOX-MWCNT가 종양 조직 내에 약 1.5~2배가량 함량이 더 높았으며, 이에 따른 치료 효과를 예측할 수 있다. 또한, 장기별로 살펴보면 폐, 간 조직으로 많이 분포하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 본 발명의 일 실시예에 따른 탄소나노튜브 기반의 항암제가 독소루비신 단일 약물에 비하여 치료효과가 우수하며, 간암 및 폐암의 치료에 유용하게 적용할 수 있음을 의미하는 것이다.

[0111] **실험예 5: 탄소나노튜브 기반의 항암제의 세포내 흡수(uptake) 및 유출(efflux)**

[0112] **5-1: 약물 방출 속도**

[0113] 본 발명의 일 실시예에 따른 탄소나노튜브 기반의 항암제의 약물 방출 속도는 DOX-MWCNT를 PBS(phosphate buffered saline; pH 7.0)와 ABS(Acetate buffered saline; pH 5.0)에 각각 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 녹인 후, 37°C 배양기에서 로커(rocker)로 흔들어주며, 1, 2, 5, 10, 24, 48, 72, 120, 및 240 시간 동안 방치하였다. 각 시간 샘플은 15,000 rpm으로 15분간 Amicon[®] Ultra Centrifugal Filters-50K Membrane(Millipore, Carrigtwohill, Co. Co가, Ireland)를 이용하여 필터한 후, 플레이트 리더기(plate reader)를 이용하여 470 nm 에서 여기(excitation)하고 590 nm 파장에서 측정하였다.

[0114] 그 결과, 도 5a에 나타난 바와 같이, 0~6시간, 12~72시간에 2차례에 걸쳐서 약물이 서서히 방출되는 것을 확인할 수 있었으며, 약물 방출 속도가 6시간(first release) 및 50시간(second release) 동안 지속적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 암세포의 내부에서의 항암제의 2차 방출(12~72)은 일반적으로 암세포의 증식기간(12~48시간)에 해당되며, 이 시기에 집중적으로 탄소나노튜브로부터 항암제가 지속적으로 방출되어 유효한 항암 효과를 제공한다는 것을 의미한다. 또한, PBS에서보다 ABS에서의 방출 속도가 다소 증가하였는데, PBS는 생체 내 중성 pH 조건의 환경을 의미하며, ABS는 엔도솜에 의한 물질이동의 최종단계인 리소좀(lysosome)내부의 pH 5.0인 상태에 해당되므로, 본 발명의 일 실시예에 따른 DOX-mwCNT의 ABS와 PBS에서의 방출 속도 비교 결과는 DOX-MWCNT가 생체내로 투여된 후, 안정적인 상태로 세포로 전달되어 세포 내에서 탄소나노튜브로부터 방출될 수 있음을 시사한다.

[0115] **5-2: 세포 내로의 흡수(uptake) 및 유출(efflux) 정도**

[0116] 본 발명의 일 실시예에 따른 탄소나노튜브 기반의 항암제의 세포 내로의 흡수(uptake) 및 유출(efflux) 정도를 처리 농도 및 처리 시간에 따라 관찰하였다. 이때, 대조군으로 독소루비신 단일 약물을 처리한 군을 이용하였다.

[0117] 본 발명의 일 실시예에 따른 DOX-MWCNT과 독소루비신을 웰당 1×10^4 세포의 비율로 24웰 플레이트에 배양된 MDA-MB-231 유방암 세포에 12.5, 50, 200 ng/ml로 각각 처리한 후, 2시간 경과 후 세포를 고정하고, 형광현미경에서 594 nm 파장으로 관찰하였다(도 5b). 독소루비신 자체가 형광물질이므로, 관찰되는 형광의 세기로 세포 내에 흡수된 독소루비신 또는 DOX-mwCNT의 양을 판단하였다. 도 5b에서 독소루비신 처리 농도에 따른 유방암 세포로부터의 유출(efflux) 정도를 비교하였다. Dox와 DOX-MWCNT 처리군에서 독소루비신의 형광 강도가 처리농도에 비례하여 증가하며, 상기 군 사이에서는 큰 차이가 나타나지 않는 것으로 관찰되었다. 결론적으로 처리 농도에 따른 카본 나노항암제의 암세포 흡수율(uptake)은 기존의 항암제와 비교하여 비슷하거나 약간 증가하는 것으로 분석되었다(도 5b).

[0118] 또한, 본 발명의 일 실시예에 따른 DOX-MWCNT과 독소루비신을 웰당 1×10^4 세포의 비율로 24웰 플레이트에 배양된 MDA-MB-231 유방암 세포에 100 ng/ml로 각각 처리하였다. DOX-MWCNT와 독소루비신 처리 2시간 이후, 배양액을 제거하고 PBS로 세 번 세척하고, 항암제가 제거된 배지를 첨가하여 24시간 동안 MDA-MB-231 유방암 세포의 유출(efflux) 정도를 형광현미경으로 관찰하였다(도 5c). 도 5c에서 배양액에서 독소루비신을 제거한 후, 0, 2, 6, 12, 24시간이 경과한 후의 독소루비신의 유출(efflux)을 형광현미경을 통하여 관찰한 결과, 24시간이 경과한 후에는 독소루비신의 형광 강도가 본 발명의 일 실시예에 따른 DOX-MWCNT에 비하여 1/3배가량 감소하였으며, 이러한 차이는 처리량이 증가할수록 더욱 크게 나타났다. 이때, 0 시간은 독소루비신을 제거하고, PBS 버퍼로 세포를 세척한 후 2시간 이 경과한 시점을 의미한다.

[0119] 이러한 결과는 본 발명의 일 실시예에 따른 탄소나노튜브 기반의 항암제(DOX-MWCNT)는 공유결합에 의하여 탄소나노튜브에 강력하게 결합되어 있기 때문에, 항암제 내성에 대한 방출(efflux)을 무력화(nullify)시키며 단일 항암제에 비하여 세포 내에 머무는 시간이 길고, 암 세포의 증식 기간 동안 지속적으로 약물을 방출한다는 것을 입증하는 것이다. 즉, 본 발명의 일 실시예에 따른 탄소나노튜브를 적용한 항암제는 미량의 용량만으로도 항암제의 치료학적 효과를 증가시킬 수 있으며, 항암제에 대한 내성을 가진 암에 대하여도 극대화된 치료효과를 증가시킬 수 있음을 의미한다.

[0120] **5-3: 암세포의 펌핑(pumping)작용 분석**

[0121] 본 발명의 일 실시예에 따른 탄소나노튜브 기반의 항암제가 항암제에 대하여 내성을 갖는 암에 대하여 치료학적

효과가 있는지의 여부를 MRP1(multiple drug resistance protein 1)발현을 통하여 확인하였다. MRP1 유전자는 다중약물내성(multi drug resistance)을 갖는 암 세포에서 과발현된다는 것이 보고된 바 있으며, MRP1 발현 억제에 의하여 MRP1 기질 약물의 치료효과가 증가한 결과가 보고된 바 있다(Kuss, B. J., *et al.*, *Int. J. Cancer*, 98, 128-133, 2002).

[0122] 본 발명의 일 실시예에 따른 DOX-MWCNT 또는 독소루비신을 MRP1이 발현되는 것으로 알려진 MDA-MB-231 유방암 세포를 6 웰 플레이트에 4x10⁵세포/웰의 비율로 심은 후, 독소루비신과 DOX-MWCNT를 100 ng/ml로 2시간 동안 처리하였다. 이에 대한 대조군으로 탄소나노튜브를 348 ng/ml로 동일시간 처리하였다.

[0123] 처리 2시간 후, MWCNT, Dox, DOX-MWCNT가 포함되지 않은 10% FBS가 포함된 DMEM 배지로 교환한 후, 2, 6, 12, 24, 36 시간대 별로 세포로부터 RNA를 분리하여, MRP1 mRNA 수준을 관찰하였다. 이때, TRIZOL(invitrogen, USA)과 클로로포름(chloroform)을 이용하여 상기 세포로부터 RNA를 분리하였으며, 그 후 동량의 아이소프로판올(isopropanol)에 상기 RNA를 2시간 이상 반응시킨 후, 정량하여 RT-PCR(reverse transcriptase PCR)을 수행하였다.

[0124] 그 결과, 도 5d에 나타난 바와 같이 본 발명의 일 실시예에 따른 탄소나노튜브 기반의 항암제를 처리한 세포에서는 MRP1의 발현이 지속적으로 유지되는 반면, 독소루비신의 경우 처리 6시간 이후 MRP1의 발현이 감소하였다. 이러한 결과는 본 발명의 일 실시예에 따른 탄소나노튜브 기반의 항암제가 유방암 세포내에서 지속적으로 분비됨에 따라 MRP1이 항암제를 배출(pumping)하기 위해서 발현이 감소하지 않고 유지되고 있음을 입증하는 것이다. 즉, 본 발명의 일 실시예에 따른 탄소나노튜브 기반의 항암제는 지속적으로 탄소나노튜브로부터 항암제가 배출되고 있어, 장시간동안 치료효과를 제공할 수 있음을 시사한다.

[0125] 실험예 6: 탄소나노튜브 기반의 항암제의 세포 독성

[0126] 6-1: 사이토카인 및 간 효소를 이용한 안정성 평가

[0127] 본 발명의 일 실시예에 따른 탄소나노튜브 기반의 항암제의 안정성을 확인하기 위하여, 실시예 2의 종양동물 모델에 투여한 후, 사이토카인(cytokine)및 간 효소를 측정하였다.

[0128] 구체적으로, 실시예 2의 종양동물 모델에 독소루비신 또는 DOX-MWCNT를 저용량(550 μ g/ml)또는 고용량(4.5 mg/kg)으로 투여한 후, 2일이 경과한 후 혈액을 채취하여 TNF-alpha, IFN-gamma, IL-2, IL-4, IL-6, GOT 및 GPT를 분석하였다(녹십자 의뢰). 이에 대한 대조군으로는 PBS만 투여한 마우스의 혈액 샘플을 이용하였다. 실시된 실험 방법은 다음과 같다. 실험예 3에서 희생시킨 쥐의 종양과 장기를 적출하기 전 우심실에서 혈액을 각 개체당 500 μ l씩 채취하고, 진공시험관(vacutainer)에 담아 원심분리기에 15분 동안 분당 3000회로 혈장을 분리하였다. 이후 20℃로 냉동시켜 녹십자의료재단 의학유전체연구소에 분석을 의뢰하였다.

[0129] 그 결과, 도 6a에 나타난 바와 같이, 본 발명의 일 실시예에 따른 탄소나노튜브 기반의 항암제를 투여한 군은 대조군과 유사하거나 낮은 수준으로 사이토카인이 분비되는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 간 효소인 GOT와 GPT 수치를 통하여 본 발명의 일 실시예에 따른 탄소나노튜브 기반의 항암제의 안정성을 확인할 수 있었다.

[0130] 6-2: 간 클리어런스(clearance) 분석

[0131] BALB/c nude 마우스에 본 발명의 일 실시예에 따른 MWCNT를 10 mg/kg으로 1회 정맥주사한 후, 1, 4, 및 12주가 경과한 후, 마우스를 희생시켰다. 희생시킨 마우스는 개복하여 장기를 관찰하였다. 그 결과, 폐와 간 조직에 탄소나노튜브의 분포가 집중되어 있었다. 그러나 정맥주사 후, 1, 4, 및 12주의 시간이 경과함에 따라, 간의 MWCNT 잔존량이 감소하는 것이 관찰되었다(도 6b 참조).

[0132] 이어, 헤마톡살린-에오신 염색 방법을 이용하여, 탄소나노튜브가 집중되어 분포된 간 조직의 손상도를 확인하였다. 간 조직은 10% 포르말린에 24시간 동안 고정시키고, 흐르는 물로 씻어준 후, 70, 80, 90, 95, 100% 에탄올에 차례로 담궈서 탈수시켰다. 그 후 자일렌(xylene)으로 투명화시키고, 파라핀(paraffin)포매한 후, 5 μ m의 두께로 절편을 만들어 유리 슬라이드 글라스에 올려놓고, 헤마톡살린-에오신 염색(Hematoxylin and Eosin, H&E)을 실시하여 광학현미경으로 관찰하였다.

[0133] 그 결과, 도 6c에 나타난 바와 같이, MWCNT를 투여한 간 조직은 탄소나노튜브가 잔존되어 있어, 조직 내에 검은 색 점이 관찰되었으나, 시간이 경과함에 따라 이러한 MWCNT의 잔존량이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다(도 6c 참조). 이러한 결과는 MWCN 투여에 의하여 관찰되는 간 조직 집중적인 분포 및 잔존은 시간이 경과함에 따라 간

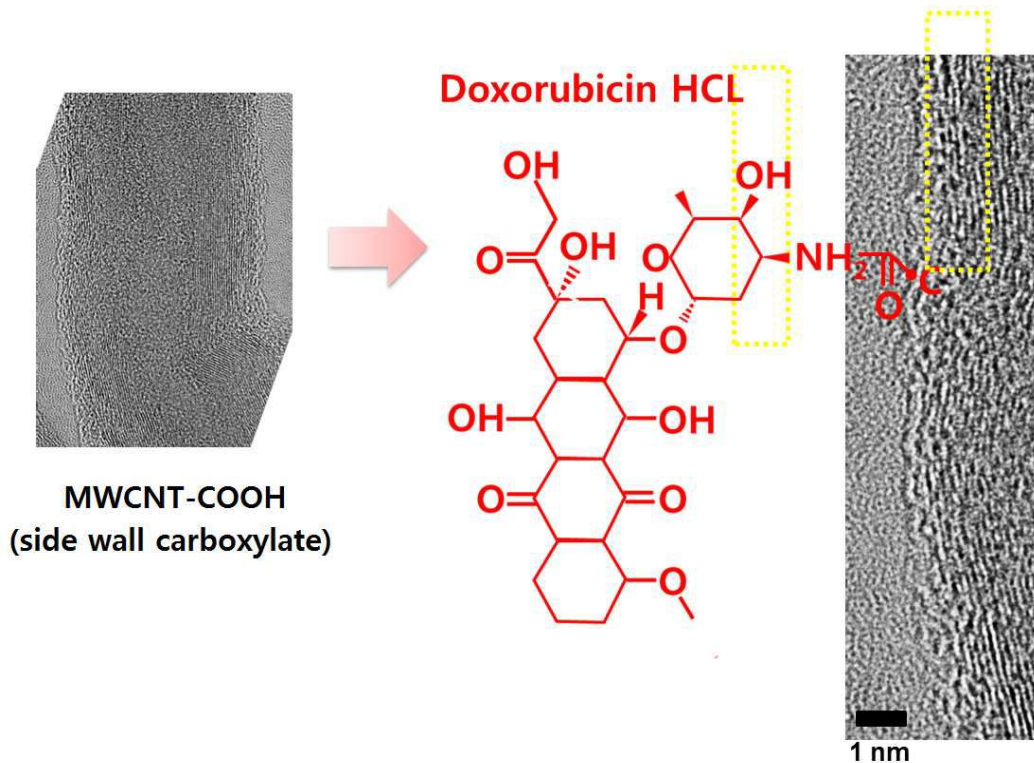
자체의 정화작용에 의해서 해결될 수 있음을 입증하는 것이다. 또한, MWCN가 간 조직에 집중적으로 분포되는 정도에 비하여, 간 손상의 정도가 매우 미미하였기 때문에, 본 발명의 일 실시예에 따른 탄소나노튜브 기반의 항암제가 생체 내(*in vivo*)독성 문제를 유발하지 않는다는 것을 의미한다.

[0134] 즉, 본 발명은 공유결합을 이용하여 제조된 탄소나노튜브 기반의 항암제에 있어서, 항암제 적재율을 상승시킬 수 있는 최적화된 제조방법에 관한 것으로서, 카복실화 정도 pH 조건을 조절함에 따라, 항암제가 안정적이며 강력하게 결합되어 항암 효과를 제공할 수 있음을 입증한 것이다. 본 발명의 제조방법은 항암제의 적재율 향상에 따른 탄소나노튜브와 항암제 사이의 결합력이 안정적이며, 적재율이 향상됨에 따라 더욱 강력하게 결합되어 있음을 실시예를 통하여 입증하였으며, 이러한 제조방법에 따라 제조된 탄소나노튜브 기반의 항암제가 종래의 나노기술이 적용된 항암제에 비하여 용량 대비 우수한 항암효과를 제공할 수 있을 뿐만 아니라, 항암제 내성 암에 대한 적용할 수 있음을 입증한 것이다.

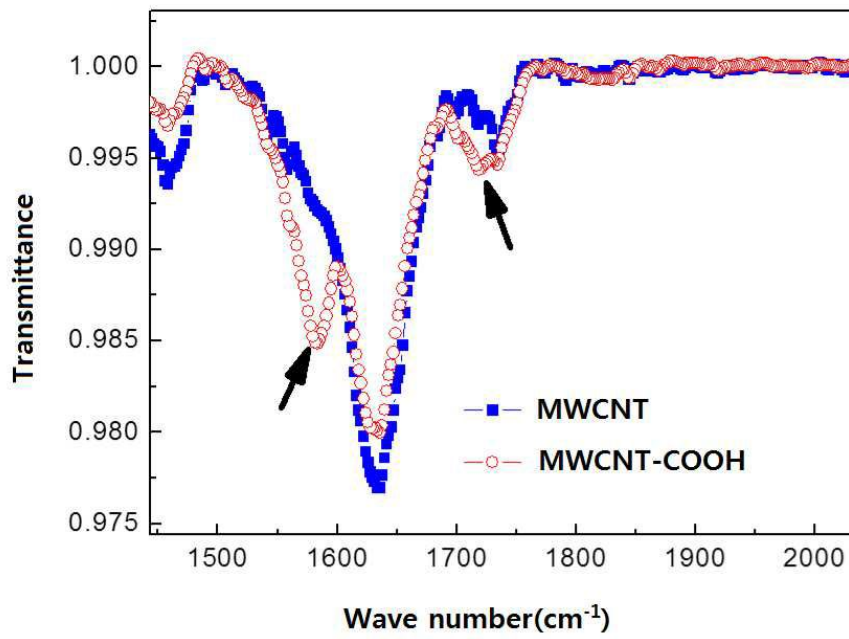
[0135] 본 발명은 도면에 도시된 실시예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

도면

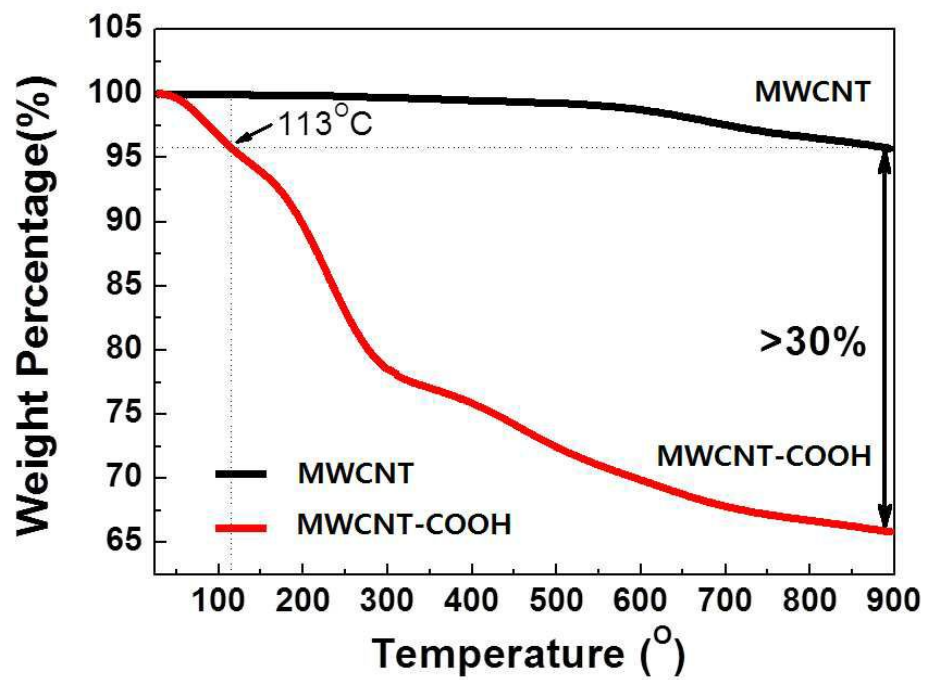
도면1a



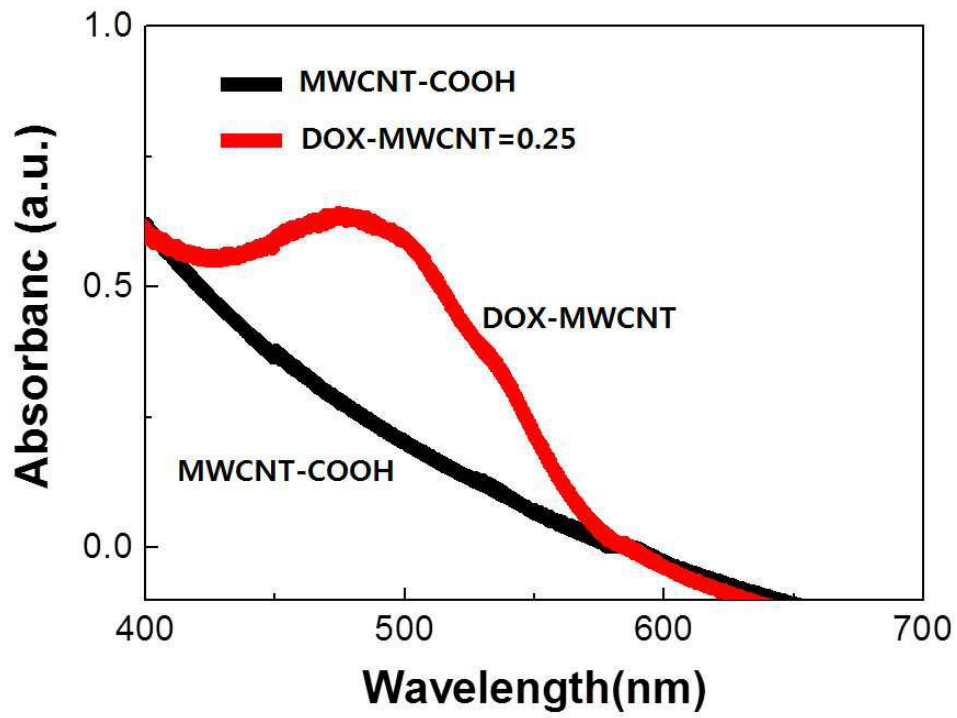
도면1b



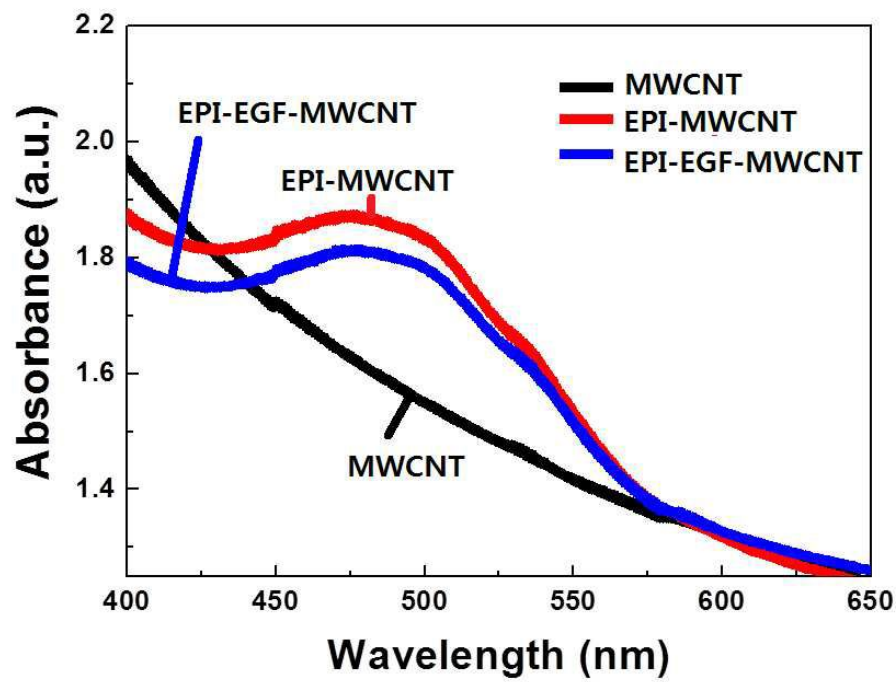
도면1c



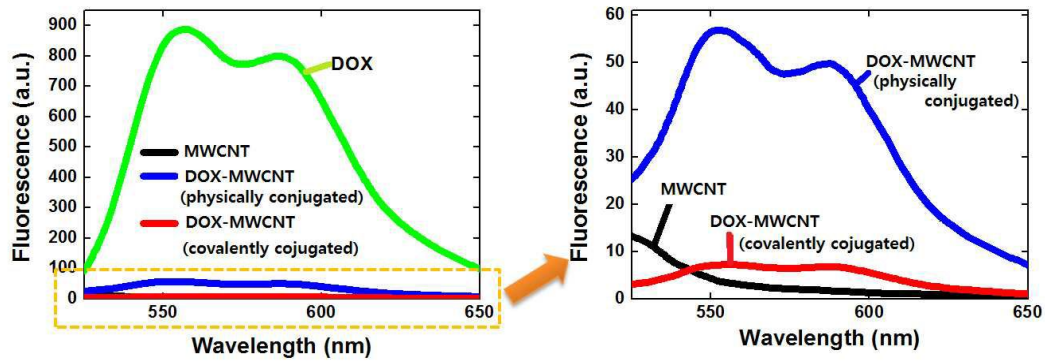
도면1d



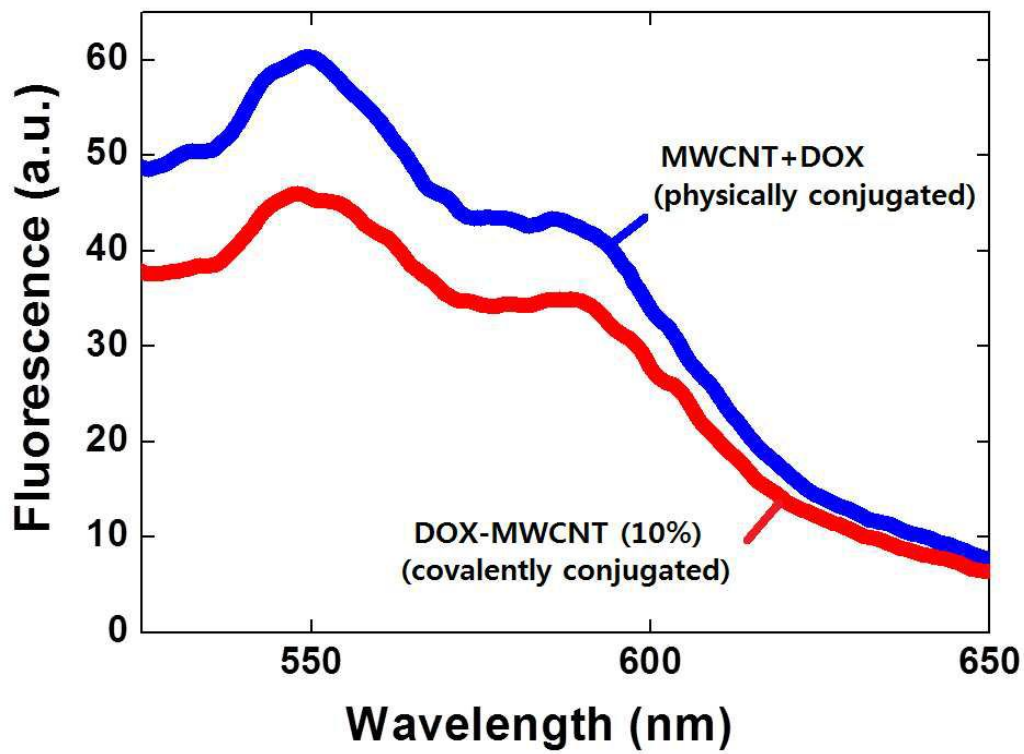
도면1e



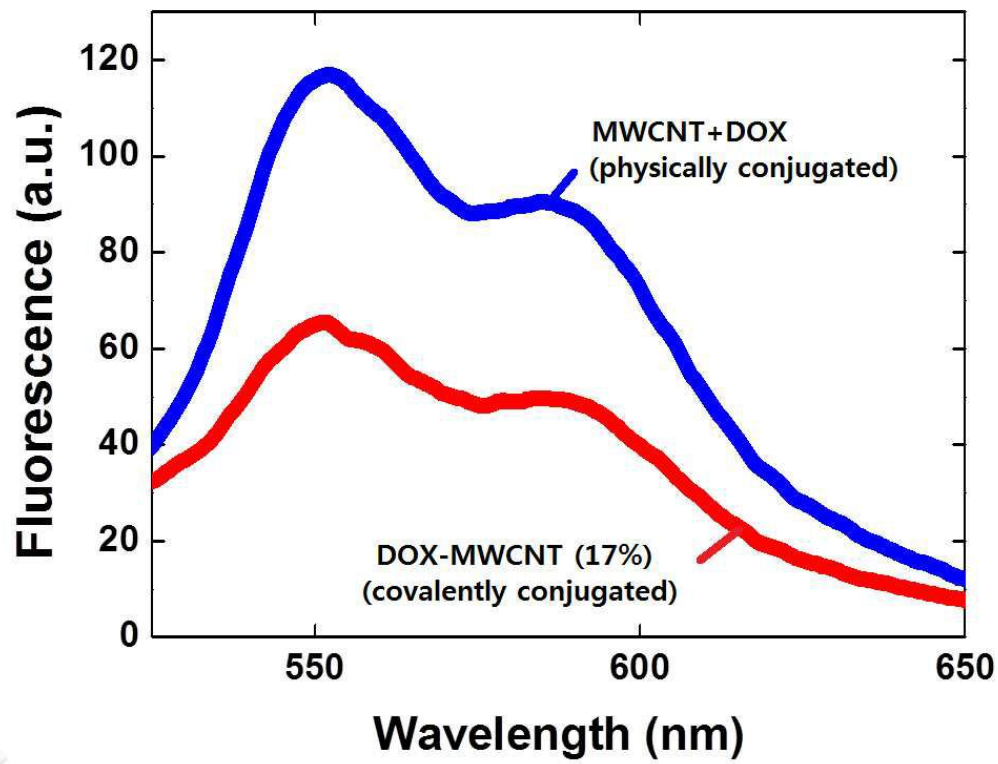
도면1f



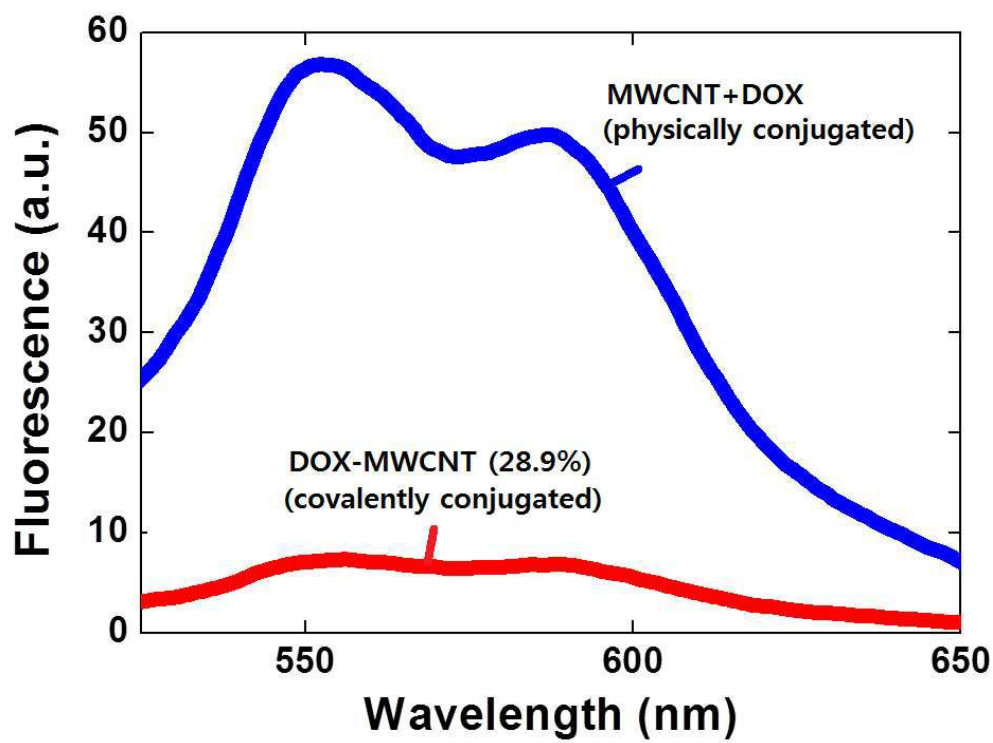
도면1g



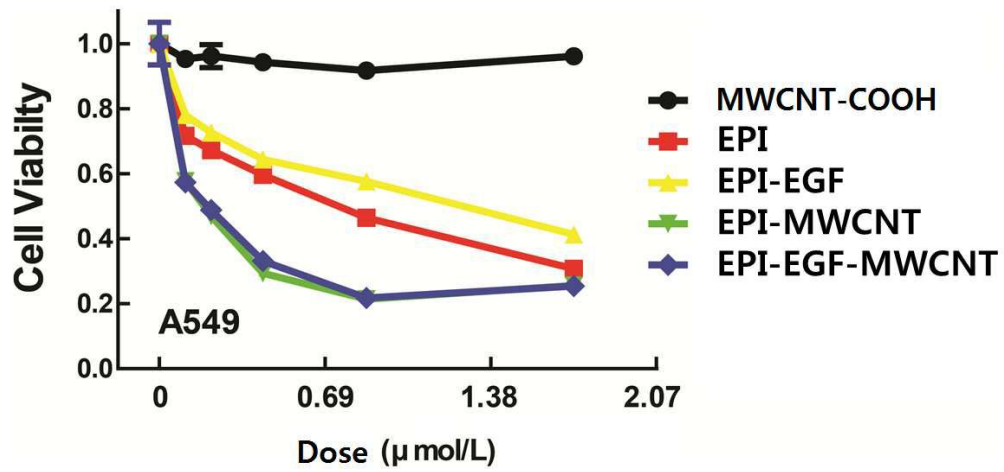
도면1h



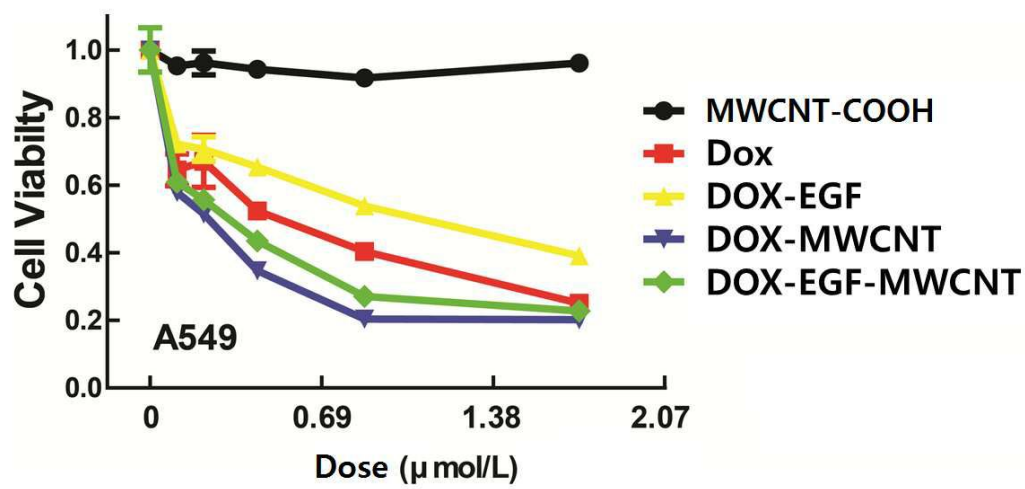
도면1i



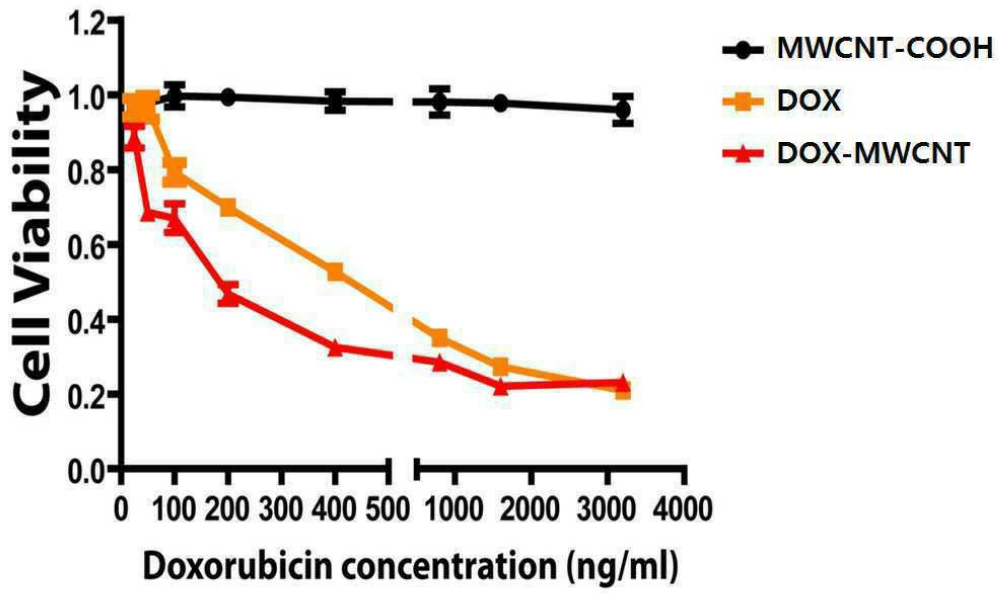
도면2a



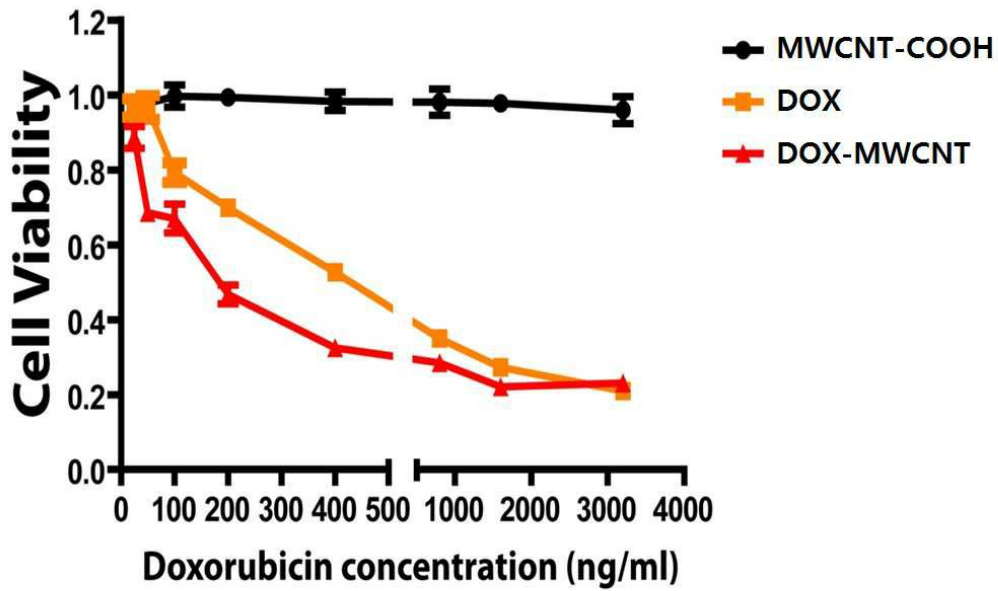
도면2b



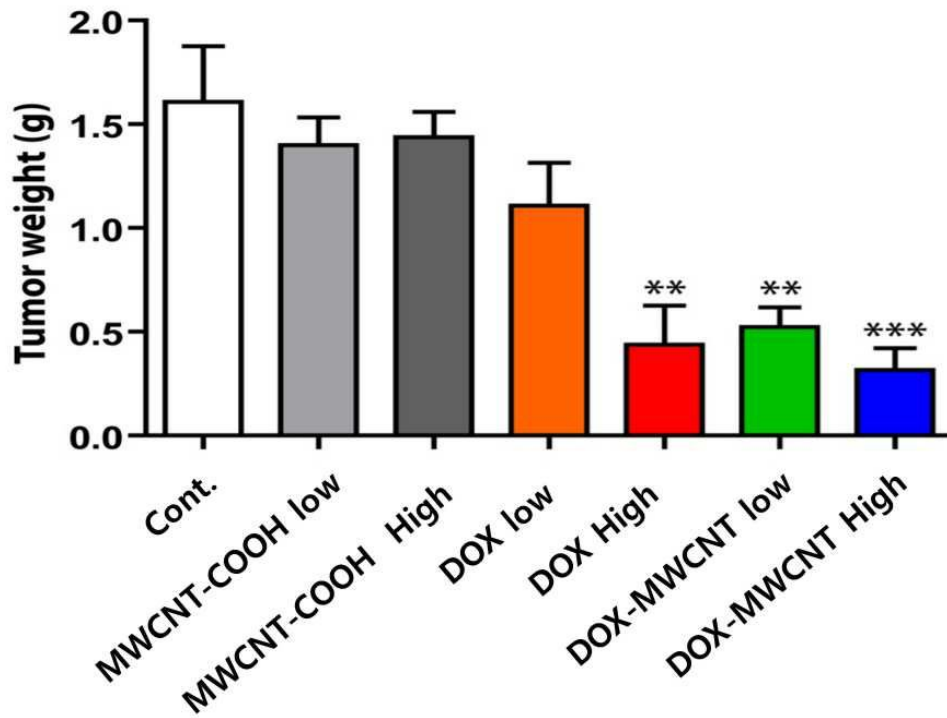
도면2c



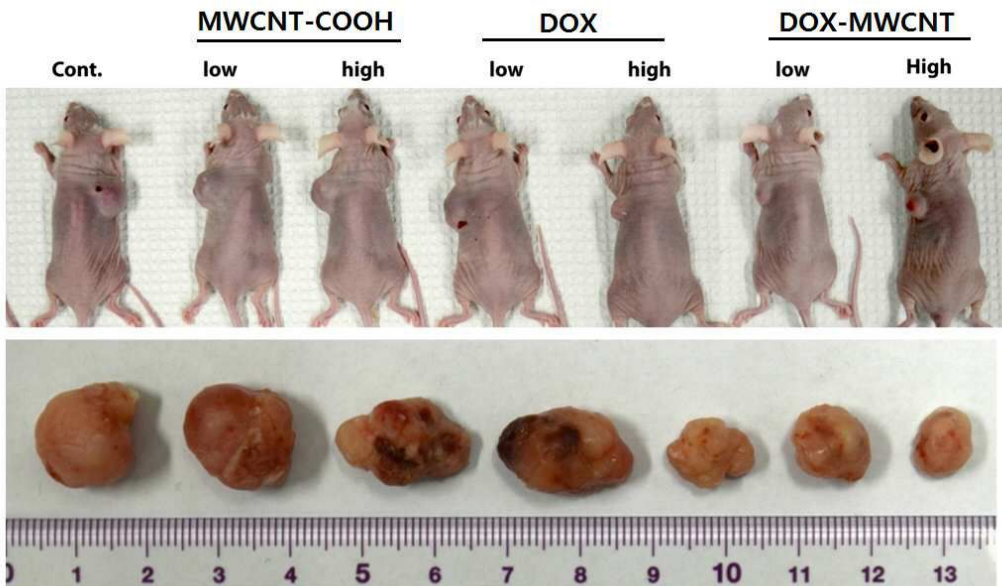
도면3a



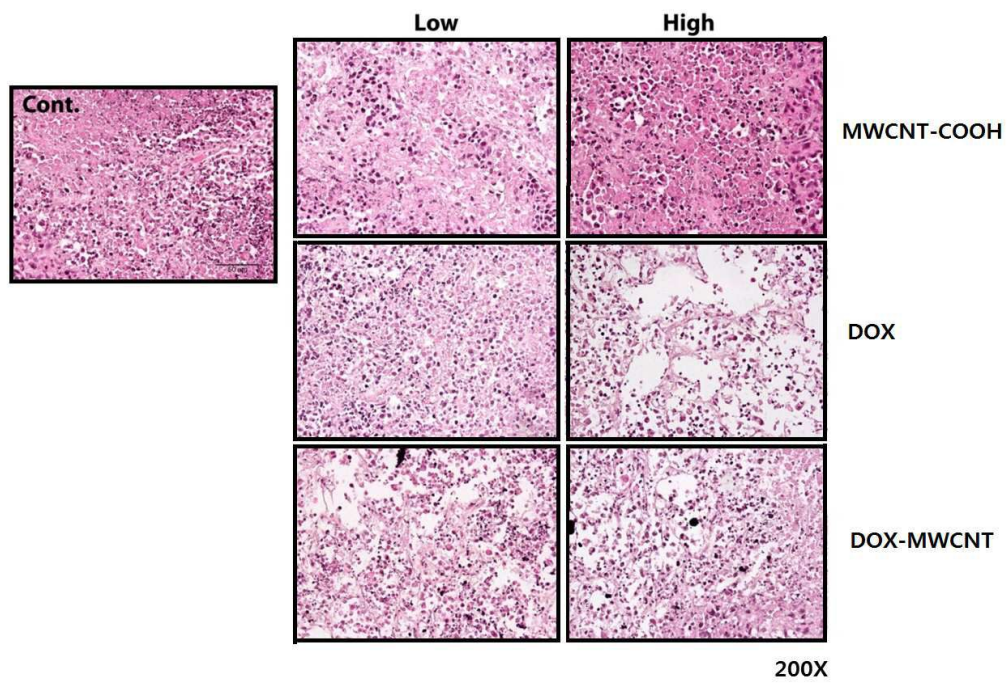
도면3b



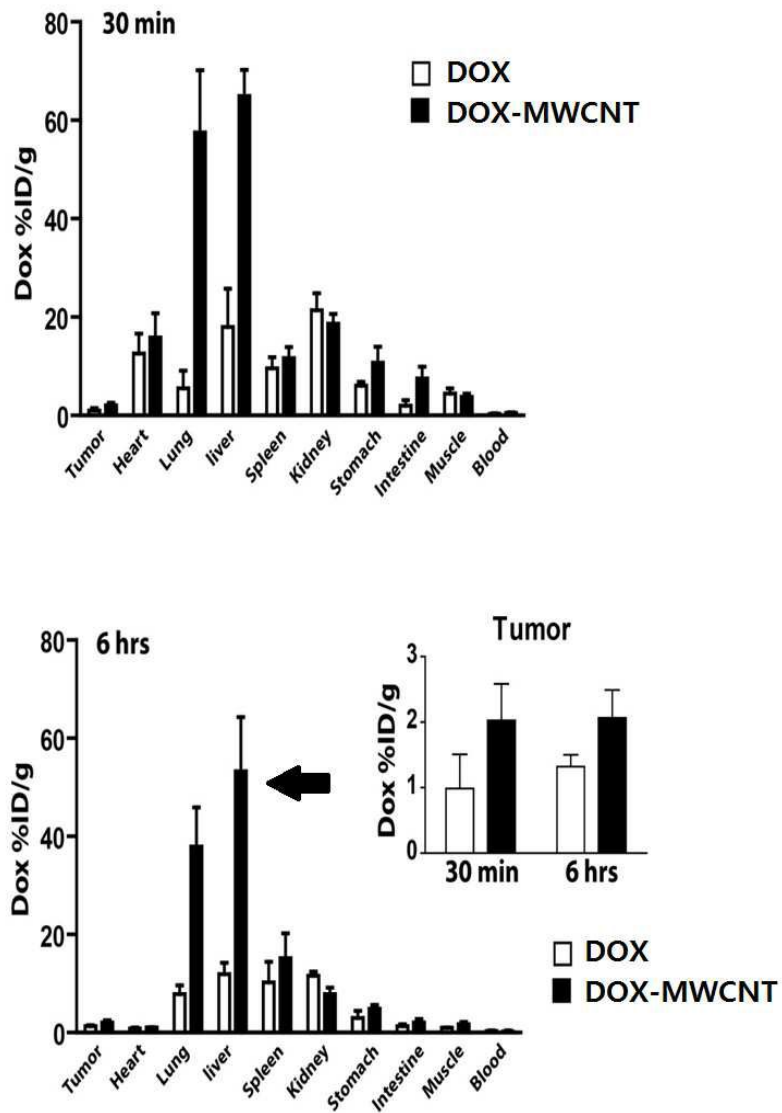
도면3c



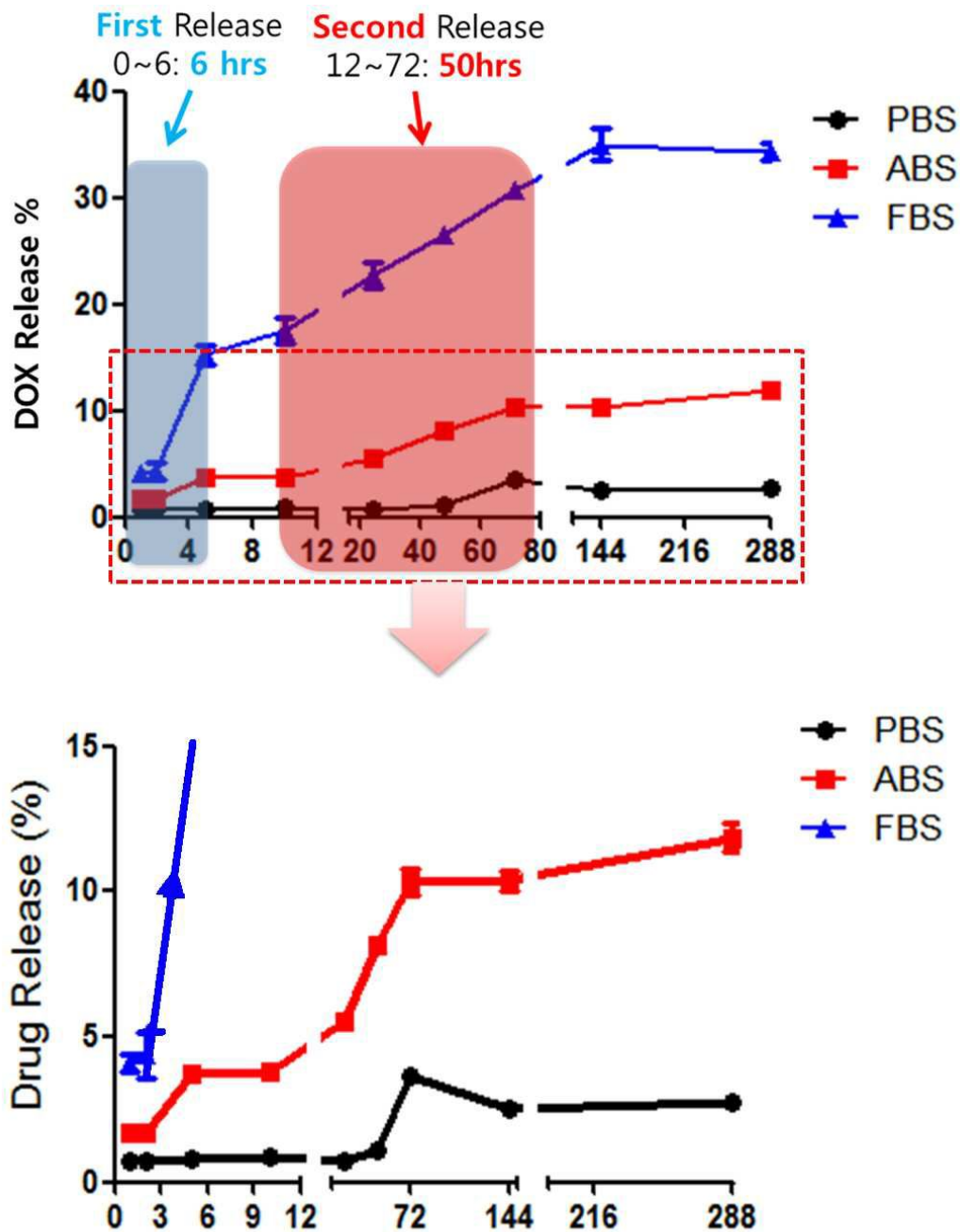
도면3d



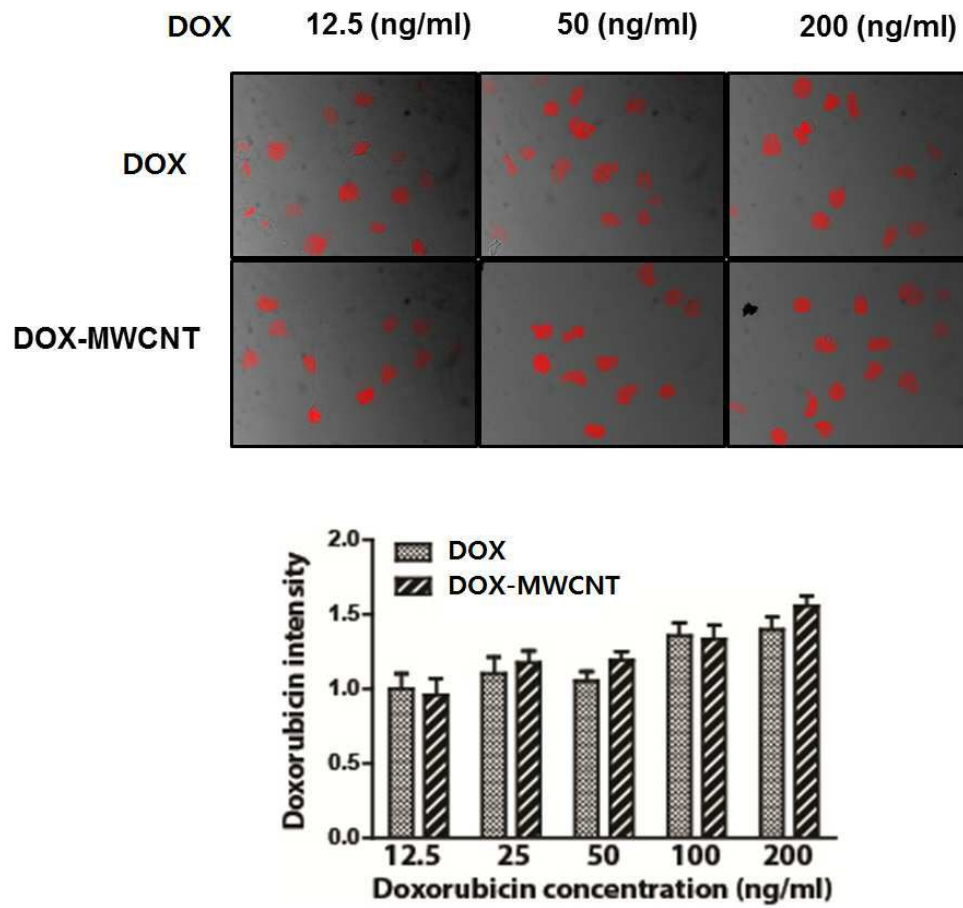
도면4



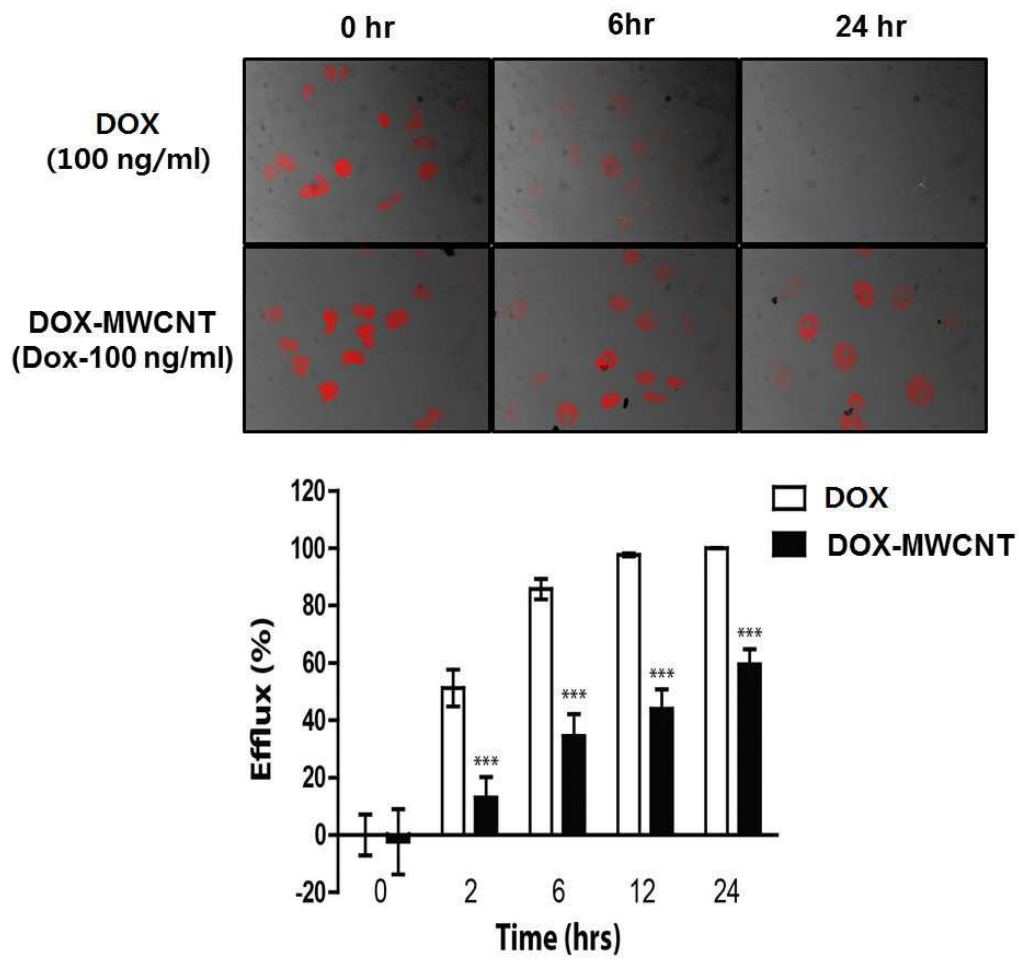
도면5a



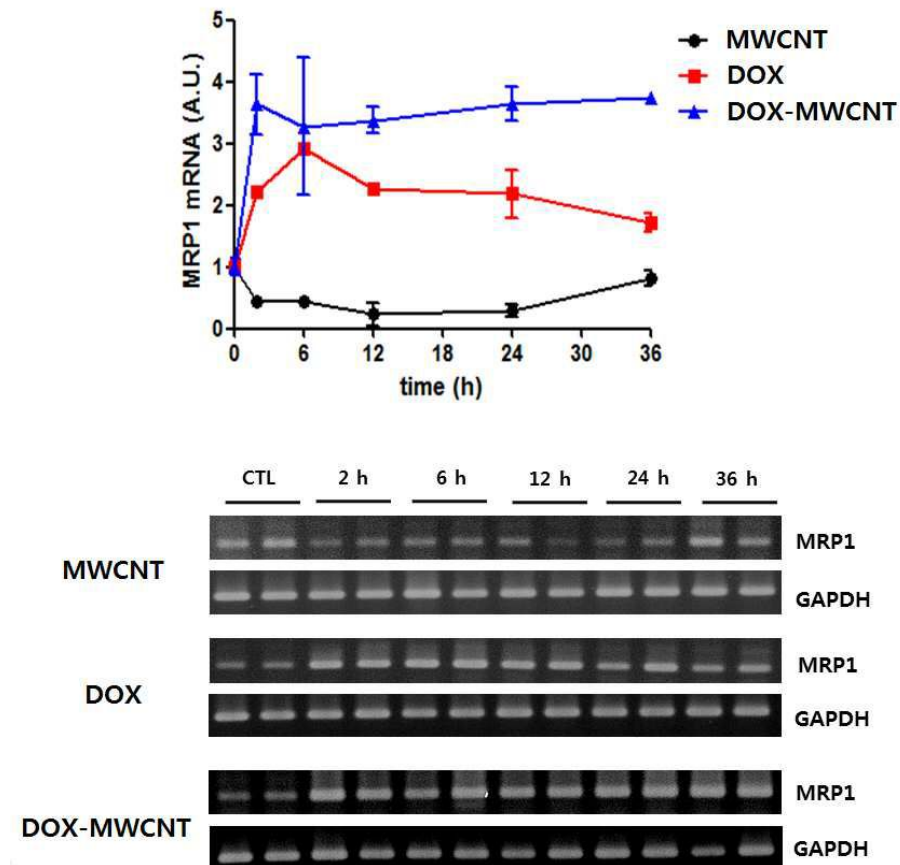
도면5b



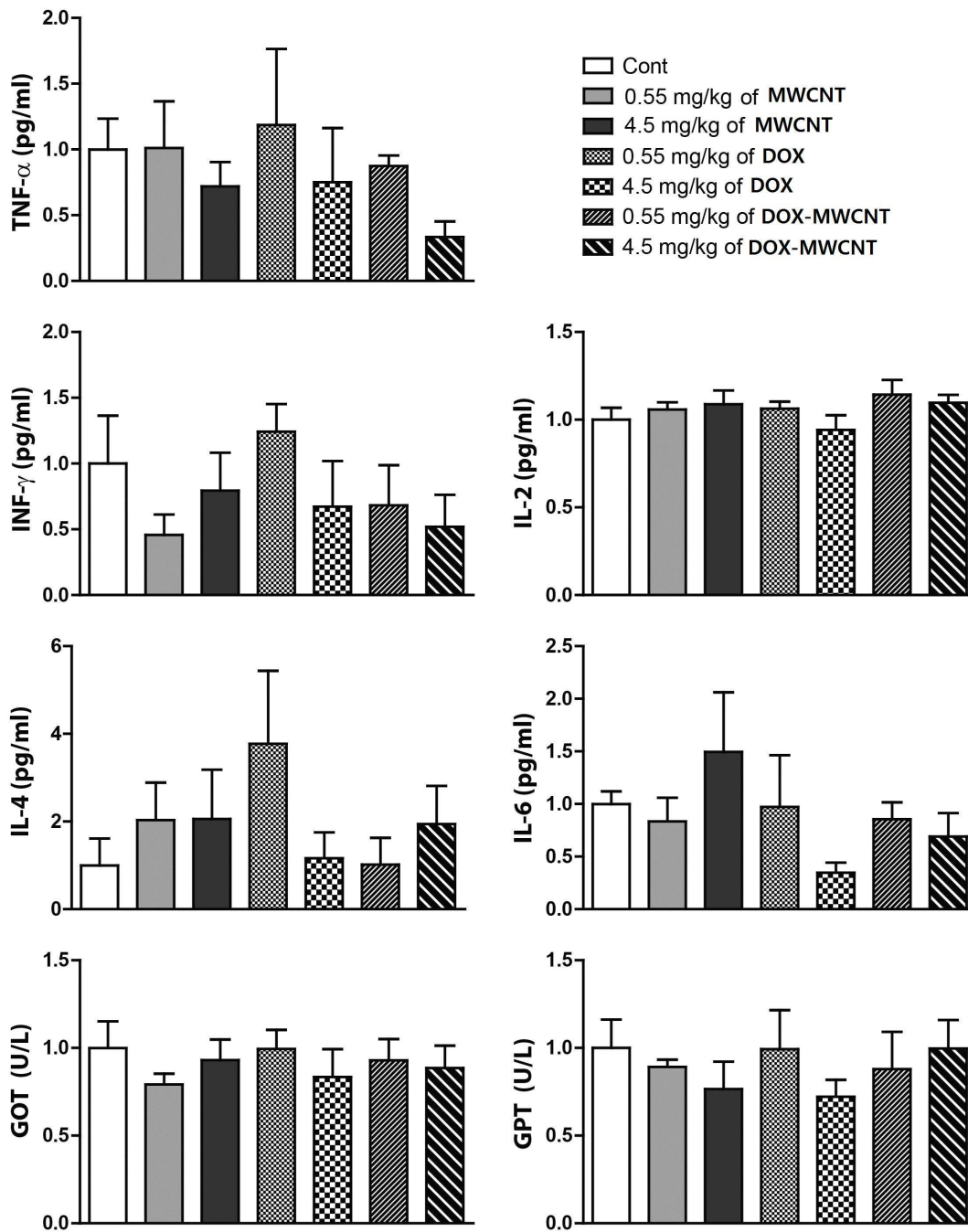
도면5c



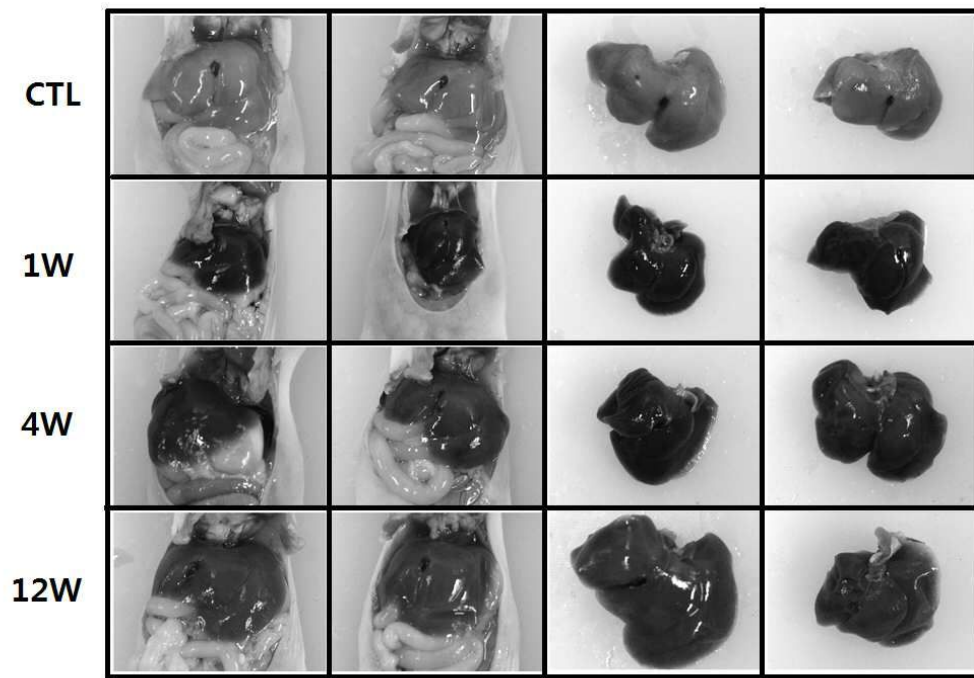
도면5d



도면6a



도면6b



도면6c

