(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0107309
(43) 공개일자 2008년12월10일

(51) Int. Cl.
A61K 33/24 (2006.01) *A61K 33/00* (2006.01)
C08K 3/38 (2006.01) *C08K 3/22* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0053131
(22) 출원일자 2008년06월05일
심사청구일자 없음
(30) 우선권주장
1020070055271 2007년06월05일 대한민국(KR)

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내
(72) 발명자
최진호
서울 강서구 등촌동 I-Park 아파트 114-1901
전이랑
경기도 성남시 분당구 야탑동 탑마을대우아파트 212-301
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
리앤목특허법인

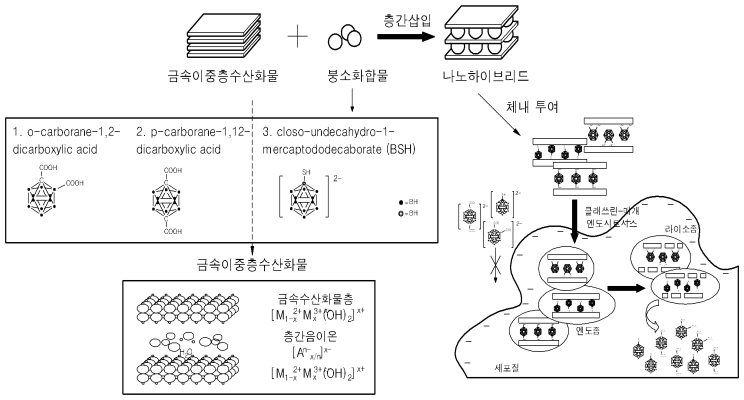
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 붕소 화합물의 금속 이중층 수산화물과의 나노 혼성체, 그제조방법, 및 그 나노 혼성체를 포함하는 붕소 중성자 포획치료용 약학 조성물

(57) 요 약

본 발명은 붕소 중성자 포획 치료용 붕소 화합물이 금속 이중층 수산화물의 층내에 도입되어 혼성화된, 붕소화합물의 금속 이중층 수산화물과의 나노 혼성체, 그 제조방법, 및 그 나노 혼성체를 포함하는 붕소 중성자 포획 치료에 이용될 수 있는 약학 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도2



(72) 발명자

최수진

서울특별시 서대문구 연희동 103-6 라이온스톤 306호

오제민

서울특별시 서초구 서초4동 1685 삼풍아파트 16-1406

특허청구의 범위

청구항 1

붕소 중성자 포획 치료용 붕소 화합물이 무독성 금속 이중층 수산화물의 층내에 도입되어 혼성화된, 붕소화합물의 금속 이중층 수산화물과의 나노 혼성체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 금속 이중층 수산화물을 구성하는 2 가의 금속은 마그네슘(Mg^{2+}), 칼슘(Ca^{2+}), 아연(Zn^{2+}), 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되고, 상기 금속 이중층 수산화물을 구성하는 3가의 금속은 알루미늄(Al^{3+}), 철(Fe^{3+}), 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 나노 혼성체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 붕소 화합물은 소듐 머캅토운데카하이드로-클로소-도데카보레이트(BSH), 보로노-페닐알라닌(BPA), *o*-카보레인-1,2-디카르복실산, *p*-카보레인-1,12-디카르복실산, 및 이들의 조합으로 구성된 그룹에서 선택되는 것을 특징으로하는 나노 혼성체.

청구항 4

제1항에 있어서, 입도가 100 내지 300 nm인 것을 특징으로 하는 나노 혼성체.

청구항 5

염기 용액 내에 붕소 중성자 포획 치료용 붕소 화합물을 용해한 다음, 2가 금속염 및 3가 금속염의 수용액으로 pH 7~9로 적정하는 것을 포함하는 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 나노 혼성체를 제조하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 염기 용액은 수산화나트륨 또는 암모니아의 수용액인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 2가 금속염은 질산아연, 염화아연, 질산마그네슘, 또는 염화마그네슘이고, 3가 금속염은 질산알루미늄 또는 염화알루미늄인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 나노 혼성체를 포함하는 붕소 중성자 포획 치료용 약학 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 붕소 화합물의 금속 이중층 수산화물과의 나노 혼성체에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 붕소 중성자 포획 치료에 매우 효과적이고 안전하게 사용될 수 있는 붕소 중성자 포획 치료용 붕소 화합물의 금속 이중층 수산화물과의 나노 혼성체, 그 제조방법, 및 그 나노 혼성체를 포함하는 붕소 중성자 포획 치료에 이용될 수 있는 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 붕소 중성자 포획 치료란 항암 치료의 일종으로서, 종양에 친화력이 있는 붕소-10을 함유한 화합물을 미리 주사한 뒤 0.025 eV의 저에너지 열중성자 또는 열외중성자 빔을 조사하면 붕소가 중성자를 포획하면서 헬륨과 리튬으로 분해되고 이 과정에서 생물학적 영향이 매우 큰 MeV 단위의 강력한 에너지를 가진 알파 입자($^{4}He^{2+}$)를 방출하는 핵분열 반응을 이용하는 것으로, 이러한 핵분열 반응에서 방출되는 알파 입자가 암세포를 선택적으로 제거

하여 암을 치료할 수 있다. 이러한 붕소 중성자 포획 치료법의 원리에 대한 모식도를 도 1에 나타내었다. 이러한 붕소 중성자 포획 치료의 주된 대상은 악성 뇌신경교종과 피부암인 흑색종이고, 그 밖에 다른 다양한 암에 대해서도 연구가 진행되고 있다.

<3> 따라서, 붕소 중성자 포획 치료는 일정량 수준의 붕소 원자가 낮은 독성을 가지면서 암세포에 선택적으로 전달되기만 한다면, 체외에서 중성자를 조사함에 따라 암세포만을 제거할 수 있게 된다. 중성자를 포획하기 전의 붕소원자는 방사능 활성을 갖고 있지 않고 중성자 또한 단독으로는 인체에 무해한 수준이기 때문에 이 둘이 결합하기 전에 항암치료 효과가 극대화되도록 여러 인자를 변화시킬 수 있다는 점에서 학문적으로나 의학적으로 다양한 연구가 활발히 진행되고 있다.

<4> 붕소 중성자 포획 치료제가 지녀야 할 특징은 치료하고자 하는 암 부위에 따라 다양한데, 우선적으로 높은 붕소 함량을 갖는 치료제의 안정성 확보, 특정 암조직으로의 선택적 타게팅 효과, 암세포 내로의 높은 투과성, 및 치료제의 생체에 대한 무독성이 필요하다. 이러한 다양한 조건들을 만족시키는 붕소 중성자 포획 치료제를 얻기 위하여, 다양한 붕소 화합물을 합성하기 위한 연구는 물론 이러한 붕소 화합물의 전달체에 대한 연구가 진행되어 왔다.

<5> 미국 특허공개 US2005/0165426A1의 "Carboranylporphyrins and uses thereof"에서는 테트라페닐포르피린을 붕소화합물과 접합하여 붕소중성자포획치료와 광역동 치료(photodynamic therapy)에 함께 쓰일 수 있는 전달체를 개발하였고, 미국 특허공개 US 2003/0165426A1 "Use of novel metalloporphyrins as imageable tumor-targeting agents for radiation therapy"에서는 카보레인 케이지(carborane cage)를 갖는 할로겐화 포르피린을 개발하였으며, 미국특허 US 6,517,808 "Methods for boron delivery to mammalian tissue"에서는 리포좀 이중층에 붕소 화합물을 캡슐화하여 전달체로 개발한 바 있다. 이 외에도 미국 특허공개 US 2002/0160969A1에서는 붕소 화합물에 뉴클레오시드와 올리고뉴클레오티드를 도입함으로써 암세포에 대한 선택성을 부여하였고, 국제 특허공개 WO 98/09973 "Boron-containing amino carboxylic acid compounds and uses thereof"에서는 안정한 붕소가 치환된 방향족 탄화수소에 아미노카르복실산을 연결시킨 화합물을 개발하였으며, 국제 특허공개 WO 96/00090 "Boron-containing hormone analogs and methods of their use in imaging or killing cells having hormone receptors"에서는 붕소 화합물에 특정 리간드를 부착시켜서 특정 호르몬과 연관이 있는 세포에 선택적으로 붕소 화합물이 축적될 수 있는 새로운 화합물을 개발하였다. 비슷하게 국제 특허공개 WO00/43401 "Boron steroid mimics and pharmaceutical compounds"에서는 붕소 헤테로고리 스테로이드 유사체를 개발하여 에스트로겐 의존적인 암세포를 치료할 수 있는 붕소 중성자 포획 치료제를 개발한 바 있다.

<6> 앞서 살펴본 바와 같이, 지금까지 붕소 중성자 포획 치료제에 대한 다양한 연구가 진행되어 왔거나 진행중이다. 특히 특정 암세포에 대한 선택성을 부여하기 위해 붕소 화합물에 다양한 리간드 또는 핵산과 같은 특정 세포와의 반응 그룹을 부착시키는 연구가 활발히 진행되고 있으며, 또한 많은 양의 붕소를 암세포에 효율적으로 전달하기 위한 전달체를 개발하는 연구가 진행 중이다. 그러나, 현재 붕소 화합물을 운반하기 위한 전달체로서 무기 약물 전달체에 대한 연구는 이루어진 바가 없다.

<7> 또한, 상기한 바와 같은 종래의 방법에 따르면, 붕소 중성자 포획 치료를 효과적으로 하기 어려우며, 효과적인 붕소 중성자 포획 치료를 위해서는 붕소 화합물을 암세포에 대한 세포막 투과율과 암세포에 대한 선택성을 만족스러울 정도로 향상시킬 수 있는 새로운 방법이 필요하다.

<8> 한편, 금속이중층수산화물(Layered Double Hydroxide: LDH)은 하이드로탈사이트(hydrotalcite) 유사 화합물이라고도 불리며, 아연과 알루미늄의 이중층 수산화물 구조로 이루어진 하이드로탈사이트와 유사한 구조를 가지면서 아연와 알루미늄의 금속이 다른 2가와 3가의 금속으로 치환될 수 있는 화합물을 말한다. 금속 이중층 수산화물은 층 내의 3가 금속 이온의 존재 때문에 층 자체가 양전하로 하전되어 있어, 층 내에 다양한 음이온을 도입시킬 수 있다. 그러나, 이러한 금속이중층수산화물은 붕소 중성자 포획 치료법과 같은 특이적인 방사능 항암요법에 이용되는 붕소 화합물의 약물 전달체로서 이용된 예는 전혀 없다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<9> 이에 본 발명자들은 붕소 중성자 포획 치료에 이용되는 다양한 붕소 화합물을 보다 효과적으로 종양 치료에 이용될 수 있도록 하는 방법에 대해 연구한 결과, 붕소 화합물을 금속 이중층 수산화물의 층 내에 도입하여 혼성화시키면 붕소 화합물의 암세포에 대한 세포막 투과율이 현저히 향상될 뿐만 아니라, 암세포에 대한 선택성이

현저히 증가되어 정상 세포에 대한 세포 독성을 현저히 감소시키면서 붕소 중성자 포획 치료에 적은 양으로도 효과적으로 이용될 수 있다는 것을 발견하여 본 발명을 완성하게 되었다.

<10> 따라서, 본 발명의 목적은 붕소 중성자 포획 치료에 적은 양으로도 효과적으로 이용될 수 있는 붕소 화합물의 신규 나노 혼성체를 제공하는 것이다.

<11> 본 발명의 다른 목적은 상기 붕소 중성자 포획 치료에 적은 양으로도 효과적으로 이용될 수 있는 붕소 화합물의 신규 나노 혼성체를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

<12> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 붕소 화합물의 신규 나노 혼성체를 포함하는 붕소 중성자 포획 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

<13> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 붕소 중성자 포획 치료용 붕소 화합물이 금속 이중층 수산화물의 층 내에 도입되어 혼성화된, 붕소 화합물의 금속 이중층 수산화물과의 나노 혼성체를 제공한다.

<14> 본 발명의 다른 측면에 있어서, 본 발명은 염기 용액 내에 붕소 중성자 포획 치료용 붕소 화합물을 용해한 다음, 2가 금속염 및 3가 금속염의 수용액으로 pH 7~9로 적정하는 것을 포함하는, 상기 붕소화합물 및 금속 이중층 수산화물의 나노 혼성체의 제조방법을 제공한다.

<15> 본 발명의 또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 상기 붕소 화합물의 금속 이중층 수산화물과의 나노 혼성체를 포함하는 붕소 중성자 포획 치료용 약학 조성물을 제공한다.

<16> 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

<17> 본 발명이 제공하는 신규한 붕소 화합물의 금속 이중층 수산화물과의 나노 혼성체는 붕소 중성자 포획 치료용 붕소 화합물이 금속 이중층 수산화물의 층 내에 도입되어 혼성화된 형태를 갖는 것을 특징으로 한다.

<18> 상기 나노 혼성체를 구성하는 금속 이중층 수산화물은 하나 이상의 2 가 금속 및 하나 이상의 3가 금속을 포함하며, 상기 2 가 금속은 마그네슘(Mg^{2+}), 칼슘(Ca^{2+}), 아연(Zn^{2+}), 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택될 수 있고, 상기 3가 금속은 알루미늄(Al^{3+}), 철(Fe^{3+}), 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 나노 혼성체의 제조에 특별한 제한이 있거나 인체에 독성이 없는 것이라면 당해 기술분야에 공지되어 있는 임의의 금속 이중층 수산화물이 이용될 수 있다.

<19> 상기 나노 혼성체를 구성하는 붕소 화합물로는 금속 이중층 수산화물과 혼성체를 형성하기 위해서, 수용액에서 음전하를 띠거나 알칼리 조건 하에서 음이온을 나타내면서, 붕소 중성자 포획 치료에 효과적으로 이용될 수 있다면 임의의 붕소 화합물이 이용될 수 있다. 또한, 붕소 중성자 포획 치료에 효과적으로 이용될 수 있기 위해서는 분자당 붕소의 함량이 높은 붕소 화합물을 이용하는 것이 바람직하다. 이러한 붕소 화합물로는 바람직하게는 FDA의 안전성 승인을 받은 소듐 머캅토운데카하이드로-클로소-도데카보레이트(BSH), 보로노-페닐알라닌(BPA), 알칼리 조건 하에서 음이온으로 존재할 수 있는 카르복실기를 포함한 붕소 화합물인 *o*-카보레인-1,2-디카르복실산 또는 *p*-카보레인-1,12-디카르복실산 등이 대표적으로 이용될 수 있다. BPA를 제외한 상기 대표적인 세 화합물 모두 정이십면체의 각 모서리에 붕소를 10~12 개 포함하고 있는 분자로서 분자당 붕소함량이 높은 화합물이다.

<20> 본 발명이 제공하는 신규한 붕소 화합물의 금속 이중층 수산화물과의 나노 혼성체는 입도가 100 내지 300 nm 인 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 100 내지 200 nm 이다. 이는 세포 투과 효과를 높이고 나아가 후에 생체 내에 투여할 시, 모세혈관이 막히지 않고, 세포에 물리적 충격을 가하지 않게 하기 위한 것이다. 본 발명의 나노 혼성체가 너무 작아 50 nm에도 미치지 못할 경우에는 폐의 모세혈관을 막아 문제가 될 수 있다.

<21> 상기 본 발명이 제공하는 신규한 붕소 화합물의 금속 이중층 수산화물과의 나노 혼성체는 염기 용액 내에 붕소 중성자 포획 치료용 붕소 화합물을 용해한 다음, 2가 금속염 및 3가 금속염의 수용액으로 pH 7~9로 적정하는 것을 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있다.

<22> 상기 염기 용액은 수산화나트륨 또는 암모니아의 수용액이 이용될 수 있으며, 이러한 염기 용액은 0.1 ~ 0.2 M로 맞추는 것이 바람직하다. 염기 용액의 농도가 너무 진하면 금속 이중층 수산화물이 침전되는 속도가 빨라져 생성물의 입도가 너무 작거나 또는 엉겨 붙게 될 수 있어 문제가 되기 때문이다.

<23> 상기 2가 금속염은 상기 제조하고자 하는 혼성체를 구성하는 금속 이중층 수산화물을 구성하는 2 가 금속염을 이용하며, 바람직하게는 질산 아연. 염화 아연, 질산 마그네슘, 염화 마그네슘, 또는 이들의 혼합물이 이용될 수 있다. 상기 3가 금속염 또한 상기 제조하고자 하는 혼성체를 구성하는 금속 이중층 수산화물을 구성하는 3 가 금속염을 이용하며, 바람직하게는 질산 알루미늄, 염화 알루미늄 또는 이들의 혼합물이 이용될 수 있다.

<24> 상기 붕소 화합물의 금속 이중층 수산화물과의 나노 혼성체는, 우선 염기 용액 내에 붕소 중성자 포획 치료용 붕소 화합물을 원하는 용도로 용해한 다음, 2가 금속염 및 3가 금속염의 수용액으로 적정하여 pH 7~9로 하면, 금속 이중층 수산화물이 형성됨과 동시에 상기 붕소 화합물이 금속 이중층 수산화물의 층내에 도입되어 혼성화됨으로써 본 발명의 나노 혼성체가 침전으로 얻어질 수 있다. 상기 붕소 화합물의 염기 용액의 pH를 7 미만이 되도록 적정한 경우에는 나노 혼성체가 형성되지 않고 3가 금속의 수산화물로서 침전되어 문제가 되며, pH를 9를 초과할 정도로만 적정할 경우에는 나노 혼성체가 형성되지 않고 2가 금속의 수산화물로서 침전되어 문제될 수 있다.

<25> 상기 본 발명의 붕소 화합물의 금속 이중층 수산화물과의 나노 혼성체는 상기 제조 방법에서의 금속 이온의 농도, 금속 이온 간의 비율, 적정 속도, 및 총 반응시간 등의 조건에 따라, 제조되는 나노 혼성체의 조성, 입형, 및 입도가 달라질 수 있다. 앞서 설명한 같이 본 발명이 나노 혼성체의 입도에 따라 투여되는 생체의 모세 혈관을 막거나 폐의 모세혈관을 막아 문제가 될 수 있에 생체에 독성을 유발할 수 있다. 따라서, 상기 본 발명의 나노 혼성체를 제조시 원하는 입도를 갖는 나노 혼성체를 균질하게 획득하는 것이 중요하다. 앞서 설명한 바와 같이, 본 발명의 나노 혼성체는 바람직하게는 100 내지 300 ㎚, 더 바람직하게는 100 내지 200 ㎚ 의 입도를 갖는 것이 바람직하며, 이러한 입도의 나노 혼성체를 균질하게 얻기 위해서는 붕소 화합물의 염기 용액에 2 가 금속염 및 3 가 금속염의 수용액으로 적정하여 나노 혼성체를 침전시키는 총 반응시간을 총 20~24 시간으로 하는 것이 바람직하다. 또한, 금속이온의 농도는 0.1~0.2 M, 2가 금속의 3가 금속에 대한 비율은 1.8~2.2(특히 Zn/Al의 경우), 적정 속도는 15~20 μL/초로 하는 것이 바람직하다.

<26> 상기 본 발명이 제공하는 붕소 화합물의 금속 이중층 수산화물과의 나노 혼성체는 혼성화 전의 자유로운 붕소 화합물에 비해 암세포에 대한 세포막 투과율이 현저히 향상될 뿐만 아니라, 암세포에 대한 선택성이 현저히 증가되어 세포 독성을 유발하지 않고 적은 양으로도 붕소 중성자 포획 치료에 효과적으로 이용될 수 있다. 또한, 붕소 화합물이 금속 이중층 수산화물의 층상에 삽입되어, 붕소 화합물이 안정성이 증가될 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 상기 본 발명의 붕소 화합물의 금속 이중층 수산화물과의 나노 혼성체를 포함하는 붕소 중성자 포획 치료용 약학 조성물을 제공한다.

<27> 상기 본 발명이 제공하는 붕소 화합물의 금속 이중층 수산화물과의 나노 혼성체가 형성되어 암세포에 높은 투과율로 작용하는 방식을 도 2에 모식적으로 나타내었다. 도 2에 나타낸 바와 같이, 금속 이중층 수산화물의 층간에 삽입되어 혼성화된 붕소 화합물은 세포막에 클라쓰린 의존성 엔도사이토시스에 의해 용이하게 세포막을 투과하지만, 금속 이중층 수산화물과 혼성화되지 않고 단독으로 존재하는 자유로운 붕소 화합물은 세포 내에 용이하게 도입되지 않는다. 본 발명이 제공하는 붕소 화합물의 금속 이중층 수산화물과의 나노 혼성체가 이와 같이 높은 세포막 투과율을 나타낸다는 것은 하기 실시예에서 암세포에 대한 혼성체의 세포 투과 실험에 의해 확인되었다.

<28> 상기 본 발명의 붕소 중성자 포획 치료용 약학 조성물은 종래에 알려져 있는 붕소 중성자 포획 치료법과 동일한 방식으로 종양의 치료에 이용될 수 있다. 즉, 본 발명의 약학 조성물을 미리 주사한 뒤 중성자를 조사함으로써 붕소 중성자 포획 치료법에 이용될 수 있다.

<29> 상기 본 발명의 붕소 중성자 포획 치료용 약학 조성물은 상기 붕소 화합물의 금속 이중층 수산화물과의 나노 혼성체 이외에 약제학적으로 주사제로서 통상적으로 이용되는 첨가제를 포함할 수 있다. 이러한 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 용해 보조제, 완충제, 안정화제, 무통화제, 또는 보존제 등이 있다.

<30> 본 발명의 붕소 중성자 포획 치료용 약학 조성물은 붕소 중성자 포획 치료법이 효과가 있는 모든 종류의 악성 종양의 치료에 효과가 있으며, 대표적으로 악성 뇌신경교종, 피부암인 흑색종 등의 치료에 이용될 수 있다.

<31> 본 발명의 붕소 중성자 포획 치료용 약학 조성물은 금속 이중층 수산화물의 층간에 혼성화되지 않은 붕소 화합물에 비해 암세포에 대한 선택성 및 암세포에 대한 세포막 투과율이 현저히 증가하므로, 나노 혼성체를 형성하지 않는 붕소 화합물의 붕소 중성자 포획 치료법에 이용되는 투여량에 비해 적은 투여량으로 치료에 이용될 수 있다. 이러한 투여량은 질병의 종류, 질병의 진행 정도, 환자의 성별, 연령, 체중, 인종 등에 따라 달라질 수 있으나, 성인 남성의 경우 혼성체에 포함되는 붕소를 기준으로 5 ㎎/㎏ 내지 15 ㎎/㎏ 투여할 수 있으며, 이는

처방하는 의사의 판단에 따라 가감될 수 있다.

효 과

<32> 상기 설명한 바와 같이, 본 발명에 따른 붕소 화합물과 금속 이중층 수산화물의 나노 혼성체는 암세포에 대한 세포막 투과율이 현저히 향상될 뿐만 아니라 암세포에 대한 선택성이 현저히 증가되어, 정상 세포에 대한 세포 독성을 현저히 감소시키면서 적은 투여량으로도 붕소 중성자 포획 치료에 효과적으로 이용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<33> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 더욱 상세히 설명한다. 하지만, 하기 실시예는 예시적인 것에 지나지 않으며, 결코 본 발명을 제한하고자 하는 것은 아니다.

<34> **실시예**

<35> 하기 실시예에서는 붕소화합물-금속이중층수산화물 나노 혼성체를 본 발명의 일 구현예에 따라 제조하고, 그 물리화학적 구조 분석을 위해 X-선을 이용한 회절분석과 적외선 분광분석을 실시하였으며 주사 전자현미경을 통해 나노 혼성체의 입형 및 입도를 분석하였다.

<36> 모든 세포 실험은 뇌암 세포인 U-343과 U-87에서 이루어졌으며, 세포 독성 여부는 MTT 어세이를 통해 확인하였다.

<37> 세포 투과 실험은 각 세포에 붕소 함량을 동일하게 맞춘 나노 혼성체와 자유 붕소 화합물을 각각 처리하여 시간별로 세포 내의 붕소의 양을 유도결합플라즈마-원자방출분광분석을 통해 측정하였다. 붕소중성자포획반응은 암세포 내의 붕소가 축적된 양에 의해 좌우되기 때문에 세포 투과 정도가 높을수록 우수한 치료제라고 할 수 있으며, 따라서 세포 내 붕소의 농도는 매우 중요한 결과에 해당된다.

<38> **실시예 1**

<39> 붕소화합물-금속이중층수산화물 나노 혼성체를 다음과 같이 합성하였다. 세 가지 붕소화합물인 소듐 머캅토운데카하이드로-클로소-도데카보레이트(BSH), *o*-카보레인-1,2-디카르복실산(*o*-CB), 및 *p*-카보레인-1,12-디카르복실산(*p*-CB)를 각각 알루미늄의 몰수의 1.3 배가 되도록 0.1 M의 수산화나트륨 수용액에 용해시킨 뒤 아연 질산염과 알루미늄 질산염의 비율이 2:1이 되도록 혼합한 0.5 M 금속염 증류수 용액으로 pH가 8이 될 때까지 천천히 적정하였다. 상온에서 24시간 반응 결과 침전으로서 얻어진 각각의 생성물을 건조하여 본 발명에 따른 나노 혼성체를 제조하였다.

<40> 상기 제조된 각각 나노 혼성체의 X-선 회절 패턴을 도 3a에 나타내었다(a: BSH-LDH, b: *p*-CB-LDH, c: *o*-CB-LDH).

<41> 또한, 상기 제조된 각각 나노 혼성체의 적외선 분광분석 결과를 도 4에 나타내었다.

<42> 상기 X-선 회절 패턴과 적외선 분광분석 결과에 따르면, 상기 제조된 각각의 나노 혼성체는 도 3b에 나타낸 바와 같은 구조 모식도를 갖는다는 것을 알 수 있다. 각각의 나노 혼성체는 잘 정렬된 층상형 구조를 갖고 있으며, 모든 붕소화합물은 하나의 층으로 배열되어 층 내부에 삽입되어 있음을 알 수 있다. 또한 혼성화 과정에서 각각의 붕소 화합물이 산성형으로 존재하기 위해 카르복실산의 수소가 떨어지는 것을 제외하고는 별다른 화학적 변형을 가져오지 않음을 확인하였다.

<43> 또한, 상기 제조된 BSH-LDH의 나노 혼성체의 입형 및 입도를 보여주는 주사 전자현미경 사진을 도 5에 나타내었다. 도 5에 따르면, 나노 혼성체는 300 nm 이하의 균일한 입형 및 입도를 갖는 것으로 나타났다.

<44> **실시예 2**

<45> MTT 어세이를 통해 상기 실시예 1에서 제조된 각각의 나노 혼성체의 세포 독성을 평가하였다. 노란색 화합물인 MTT 테트라졸륨염은 살아있는 세포에서 탈수소 효소 작용으로 인해 비수용성의 보라색 포르마잔 결정으로 환원되므로, MTT 테트라졸륨염의 존재 하에서 세포가 처리한 화합물에 의해 시간별로 성장이 억제 또는 증가되는 정도를 반영할 수 있다. MTT 어세이는 이러한 MTT 테트라졸륨염이 세포 성장의 억제 또는 증가를 반영하는 현상을 이용한 것이다.

<46> 뇌암 세포인 U-343과 U-87을 웰 당 5 X 10^3개씩 되도록 깔은 뒤 상기 실시예 1에서 제조된 붕소화합물-금속이중

층수산화물 나노 혼성체와 자유 붕소화합물을 농도별로 처리하여 37℃ CO_2 배양기에 세포를 두었다. 화합물을 처리한지 72 시간이 지난 세포에 MTT 라벨링 시약을 처리하고 4 시간 뒤 계면활성제를 처리하여 생성된 포르마잔을 용해시켰다. 포르마잔이 생성된 정도를 570 nm에서의 흡광도를 측정하여 알아보았다. 그 결과를 도 6에 나타내었다. 도 6a는 뇌암 세포인 U-343에 대한 결과이며, 도 6b는 뇌암 세포 U-87에 대한 결과이다.

<47> 그 결과 *o*-CB 단독을 제외한 모든 경우 처리 농도가 250 μg/mL 까지는 세포의 증식과 생존에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타나 크게 독성이 없음을 알 수 있다.

<48> 자유 붕소화합물 분자에 비해 금속이중층수산화물에 캡슐화시킨 나노 혼성체가 약간의 독성을 나타내었으나, 이는 하기 실시예 3에서의 실험 결과인 도 7에 도시한 세포 투과 정도 결과에 나타난 바와 같이 우수한 전달체인 금속이중층수산화물과 나노 혼성체를 형성함으로 인해 다량의 붕소화합물이 세포 내로 들어감으로 인한 결과임을 알 수 있다.

<49> **실시예 3**

<50> 상기 실시예 1에서 제조된 각각의 나노 혼성체에 대한 세포 투과 실험을 실시하였다. 대조군으로서 나노 혼성체를 형성하지 않은 자유로운 붕소 화합물을 이용하였다.

<51> 뇌암 세포인 U-343과 U-87을 1.5 X 10^6 개씩 3 mL의 세포 배지에 깔았으며, 모든 화합물을 붕소 농도가 60 μg/mL가 되도록 하여 세포에 처리하였다. 시간 별로 30 분, 1, 2, 4, 8 시간 뒤에 세포를 PBS로 씻어내고 용해시킨 뒤 유도결합플라즈마-원자방출분광분석을 위해 산으로 처리하였다.

<52> 유도결합플라즈마-원자방출분광분석 결과를 도 7a 및 도 7b에 나타내었다. 도 7a는 뇌암 세포인 U-343에 대한 결과이며, 도 7b는 뇌암 세포 U-87에 대한 결과이다.

<53> 붕소 농도 분석 결과 대조군과는 다르게 본 발명에서 개발된 나노 혼성체 물질들이 세포 투과 정도가 매우 높음을 알 수 있다. 대조군에 비해 1 시간에서 최대 55배까지 세포 내 붕소 농도가 증가되었으며 장시간 유지되는 세포 내 붕소 농도도 대조군보다 20배 이상 높게 유지되었다. 또한 그 농도는 20 μg B/10^6 세포로 이는 붕소중성자포획치료로 암세포를 제거하는데 충분한 농도이다. 또한, 본 발명에 따른 나노 혼성체 물질은 세포 내 최대 농도가 50 μg B/10^6 세포인 것으로 나타났으며, 이는 붕소중성자포획치료로 암세포를 제거하는데 필요한 농도 (0.02 μg B/10^6 세포)에 비해 훨씬 높은 농도이다.

<54> **실시예 4**

<55> 상기 실시예 1에서 제조된 나노 혼성체 중 ^{10}BSH-LDH와 나노 혼성체를 형성하지 않은 자유로운 붕소 화합물로 ^{10}BSH에 대한 세포 중성자 조사 실험을 실시하였다. 대조군으로서 화합물을 처리하지 않은 세포에 중성자 조사 실험을 실시하였다.

<56> 뇌암 세포인 U-87을 웰 당 1 X 10^6 개씩 2 mL의 세포 배지에 깔았으며, 모든 화합물을 붕소 농도가 30, 45, 60 μg/mL가 되도록 하여 세포에 처리하였다. 1 시간 뒤에 세포를 PBS로 씻어내고 깨끗한 배지를 다시 채워준 다음 중성자를 조사하였다. 중성자 조사 시간은 20, 40, 60 분으로 하였으며 이는 각각 1 X 10^{12} n/cm^2, 2 X 10^{12} n/cm2, 3 X 10^{12} n/cm^2의 열중성자속에 해당한다. 실험 후 세포의 생존은 군집 형성 능력으로 평가하였다.

<57> 처리된 각 군의 세포의 생존율을 도 8a 및 8b에 나타내었다. 도 8a는 대조군으로서 U-87 암세포에 중성자를 각각 20분, 40분, 60분간 조사했을 때 세포의 생존율을 나타낸 그래프이다. 도 8a에 따르면, 대조군 세포의 경우 20분 조사 시 세포에 미치는 여향이 거의 없었으며 60분 조사 시 약 60 %의 세포 생존율을 보였다.

<58> 도 8b는 U-87 암세포에 ^{10}BSH와 ^{10}BSH-LDH를 각각 처리한 후 중성자를 조사하였을 때 대조군 대비 세포의 군집형성능력을 나타낸 그래프이다(a: ^{10}BSH 처리한 세포에 중성자 20분 조사, b: ^{10}BSH-LDH 처리한 세포에 중성자 20분 조사, c: ^{10}BSH 처리한 세포에 중성자 40분 조사, d: ^{10}BSH-LDH 처리한 세포에 중성자 40분 조사, e: ^{10}BSH처리한 세포에 중성자 60분 조사, f: ^{10}BSH-LDH 처리한 세포에 중성자 60분 조사).

<59> 도 8b의 결과에 따르면, ^{10}BSH를 처리한 세포의 경우, 20분 조사 시에는 처리한 붕소의 농도와 관계없이 대조군

과 거의 비슷한 생존율을 보여 중성자에 의한 세포 파괴 효과가 거의 없음을 알 수 있다. 40분과 60분 동안 중성자를 조사한 세포의 경우, 모든 농도에서 대조군 대비 45 내지 55 %의 생존율을 보였다. 반면 ^{10}BSH-LDH 나노 혼성체를 처리한 세포의 경우, 모든 붕소 농도에서 20, 40, 및 60분 처리한 경우 모두에서 세포 생존율이 0 %인 것으로 나타나, 낮은 열중성자속과 적은 붕소 농도로도 0 %의 세포 생존율을 보였다.

<60> 각 군에 대해 광학 현미경을 통해 세포를 관찰해 보았다. 광학 현미경을 통해 관찰한 결과를 도 9a 내지 도 9c에 나타내었다. 도 9a는 중성자를 20분 조사 후 (1 X 10^{12} n/cm^2)의 U-87 세포를 현미경으로 관찰한 결과이다. 도 9b는 중성자를 40분 조사 후 (1 X 10^{12} n/cm^2)의 U-87 세포를 현미경으로 관찰한 결과이다. 도 9c는 중성자를 60분 조사 후 (1 X 10^{12} n/cm^2)의 U-87 세포를 현미경으로 관찰한 결과이다. 상기 도 9a 내지 9c에서 (a)는 화합물을 처리하지 않은 세포로서 대조군이고, (b), (c), (d)는 ^{10}BSH를 각각 붕소 농도로 30, 45, 60 μg/mL 씩 처리한 세포이고, (e), (f), (g)는 ^{10}BSH-LDH를 각각 붕소 농도로 30, 45, 60 μg/mL 씩 처리한 세포이다.

<61> 도 9a 내지 9c에 나타난 결과에 따르면, ^{10}BSH가 처리된 세포와 ^{10}BSH-LDH가 처리된 세포의 생존율 차이를 극명하게 알 수 있었다. 모든 세포는 중성자 조사를 한 뒤 10 일 후에 관찰을 해본 결과이다. ^{10}BSH가 처리된 세포는 각 열중성자속의 대조군과 비슷하게 관찰되었으며 ^{10}BSH-LDH가 처리된 세포에서는 세포를 관찰할 수 없었다.

도면의 간단한 설명

<62> 도 1은 붕소중성자포획치료의 원리를 나타낸 모식도 이다.

<63> 도 2는 붕소 화합물의 금속 이중층 수산화물과의 나노 혼성체가 형성되어 암세포에 높은 투과율로 작용하는 방식을 나타낸 모식도이다.

<64> 도 3a는 본 발명의 일 구현예에 따라 제조된 각각의 붕소화합물-금속이중층수산화물 나노 혼성체의 X-선 회절 패턴이다(a: BSH-LDH, b: *p*-CB-LDH, c: *o*-CB-LDH).

<65> 도 3b는 본 발명의 일 구현예에 따라 제조된 각각의 붕소화합물-금속이중층수산화물 나노 혼성체의 구조 모식도를 나타낸 것이다.

<66> 도 4는 본 발명의 일 구현예에 따라 제조된 각각의 붕소화합물-금속이중층수산화물 나노 혼성체의 적외선 분광분석 스펙트럼이다.

<67> 도 5는 본 발명의 일 구현예에 따라 제조된 각각의 붕소화합물-금속이중층수산화물 나노 혼성체의 주사 전자현미경 사진이다.

<68> 도 6a는 본 발명의 일 구현예에 따라 제조된 각각의 붕소화합물-금속이중층수산화물의 암세포 U-343 세포에 대한 독성 평가 결과를 나타낸 그래프이다.

<69> 도 6b는 본 발명의 일 구현예에 따라 제조된 각각의 붕소화합물-금속이중층수산화물의 암세포 U-87 세포에 대한 독성 평가 결과를 나타낸 그래프이다.

<70> 도 7a는 본 발명의 일 구현예에 따라 제조된 각각의 붕소화합물-금속이중층수산화물을 암세포 U-343 세포에 처리했을 때 세포 내 시간 별 붕소 축적 농도를 유도결합플라즈마-원자방출분광분석로 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

<71> 도 7b는 본 발명의 일 구현예에 따라 제조된 각각의 붕소화합물-금속이중층수산화물을 암세포 U-87 세포에 처리했을 때 세포 내 시간 별 붕소 축적 농도를 유도결합플라즈마-원자방출분광분석로 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

<72> 도 8a는 U-87 암세포에 중성자를 각각 20분, 40분, 60분간 조사했을 때 세포의 생존율을 나타낸 그래프이다.

<73> 도 8b는 U-87 암세포에 ^{10}BSH와 ^{10}BSH-LDH를 처리한 후 중성자를 조사하였을 때 대조군 대비 세포의 군집형성능력을 나타낸 그래프이다(a: ^{10}BSH처리한 세포에 중성자 20분 조사, b: ^{10}BSH-LDH처리한 세포에 중성자 20분 조사, c: ^{10}BSH처리한 세포에 중성자 40분 조사, d: ^{10}BSH-LDH처리한 세포에 중성자 40분 조사, e: ^{10}BSH처리한

세포에 중성자 60분 조사, f: ^{10}BSH-LDH처리한 세포에 중성자 60분 조사)

<74> 도 9a는 U-87 세포에 중성자를 20분 조사 후 (1 X 10^{12} n/cm^2)의 U-87 세포를 현미경으로 관찰한 결과이다.

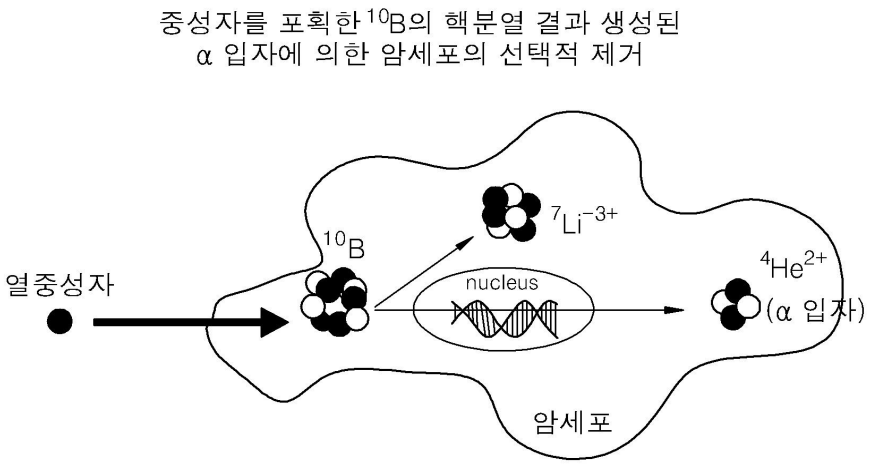
<75> 도 9b는 U-87 세포에 중성자를 40분 조사 후 (1 X 10^{12} n/cm^2)의 U-87 세포를 현미경으로 관찰한 결과이다.

<76> 도 9c는 U-87 세포에 중성자를 60분 조사 후 (1 X 10^{12} n/cm^2)의 U-87 세포를 현미경으로 관찰한 결과이다.

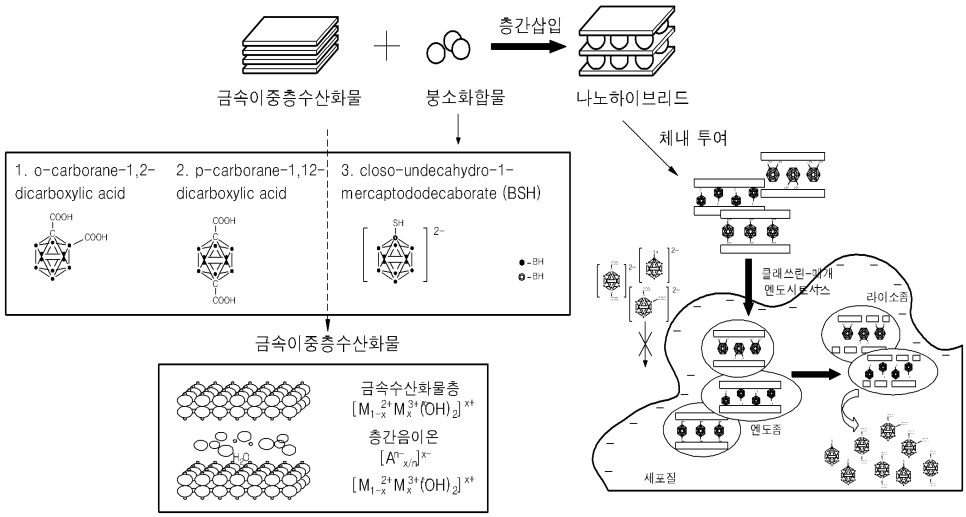
<77> 상기 도 9a 내지 9c에서 (a)는 화합물을 처리하지 않은 세포로서 대조군이며, (b), (c), (d)는 ^{10}BSH를 각각 붕소 농도로 30, 45, 60 μg/mL 씩 처리한 세포이다. (e), (f), (g)는 ^{10}BSH-LDH를 각각 붕소 농도로 30, 45, 60 μg/mL 씩 처리한 세포이다.

도면

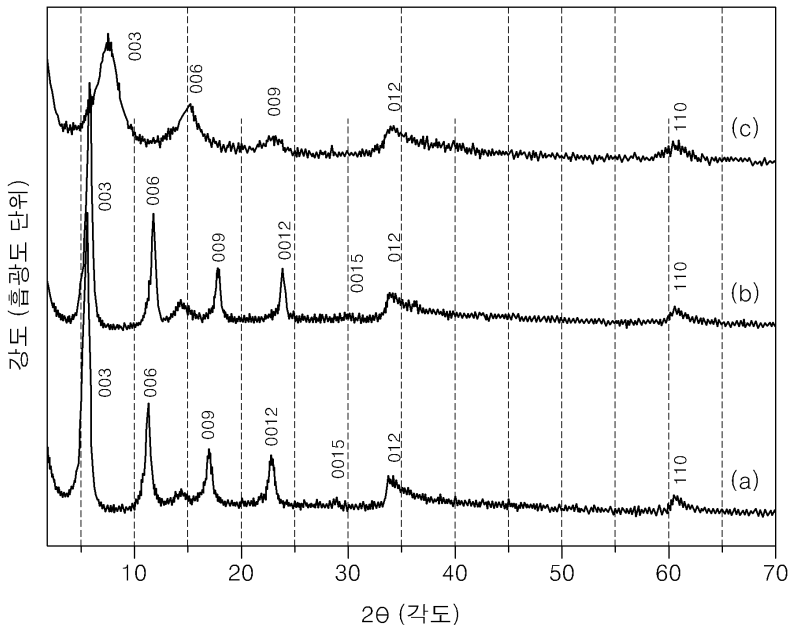
도면1



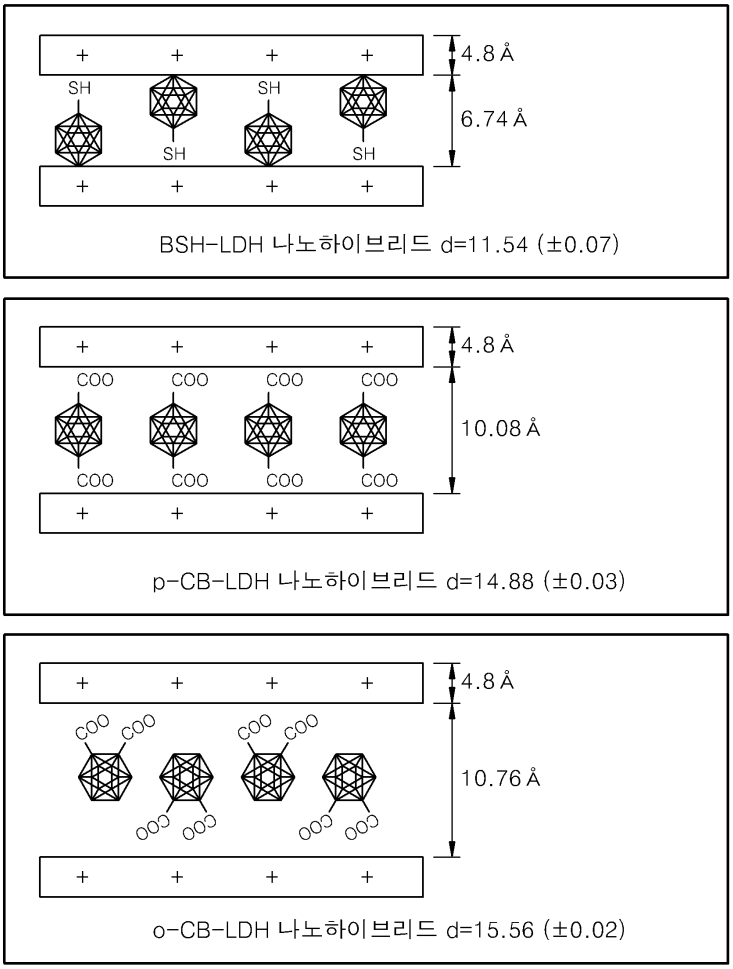
도면2



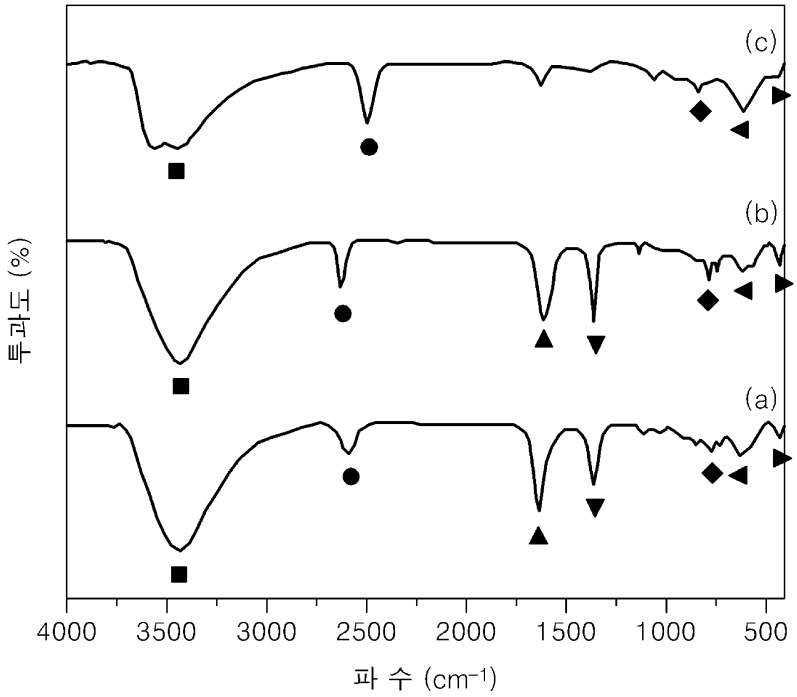
도면3a


강도 (흡광도 단위)
2θ (각도)
003
006
009
012
0012
0015
110
(a)
(b)
(c)
10
20
30
40
50
60
70

도면3b


4.8 Å
6.74 Å
SH
BSH-LDH 나노하이브리드 d=11.54 (±0.07)
10.08 Å
COO
p-CB-LDH 나노하이브리드 d=14.88 (±0.03)
10.76 Å
o-CB-LDH 나노하이브리드 d=15.56 (±0.02)

도면4



● ν (BH) : 2500~2600 cm^{-1}

▲ ν_{2S}(COO) : 1655 cm^{-1}

▼ ν_S (COO) : 1400 cm^{-1}

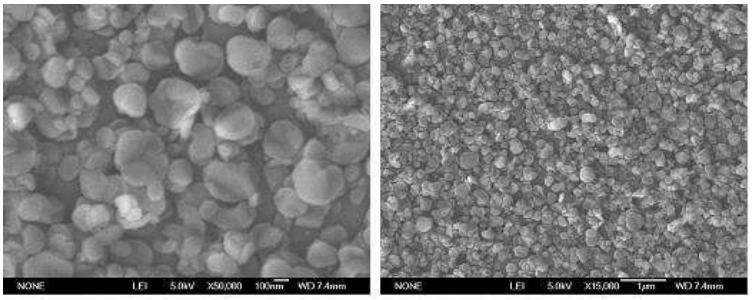
◆ ν (BB) : 780 cm^{-1}

■ ν (OH) : 3400 cm^{-1}

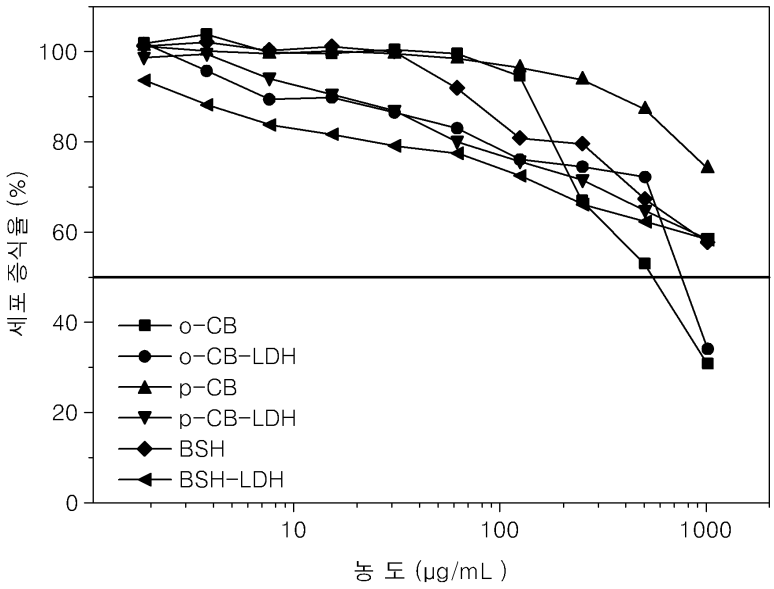
◀ ν (MO) : 620 cm^{-1}

▶ δ (OMO) : 430 cm^{-1}

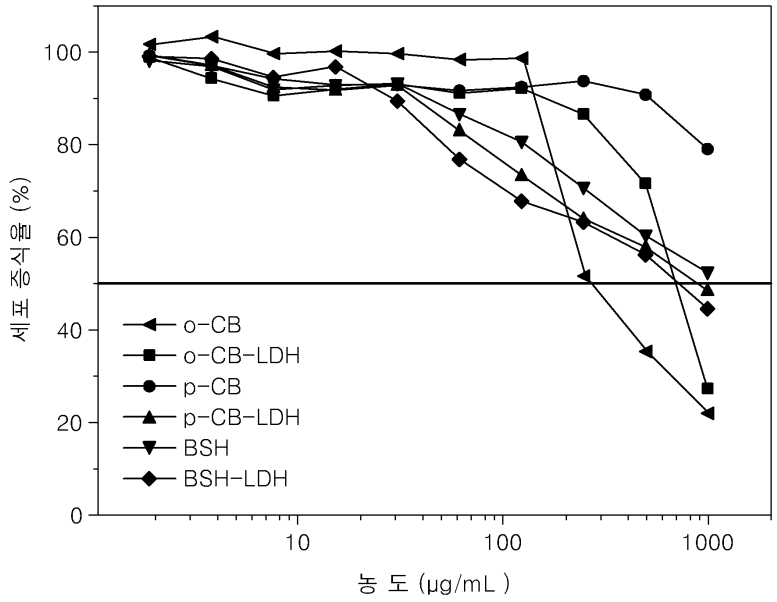
도면5



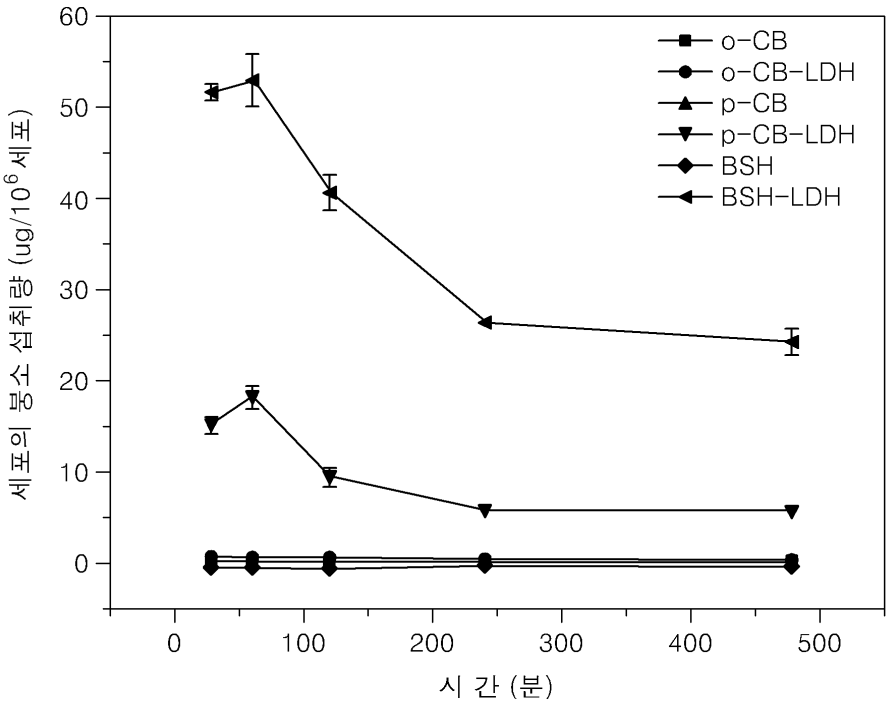
도면6a


세포 증식율 (%)
100
80
60
40
20
0
10
100
1000
농 도 (μg/mL)
o-CB
o-CB-LDH
p-CB
p-CB-LDH
BSH
BSH-LDH

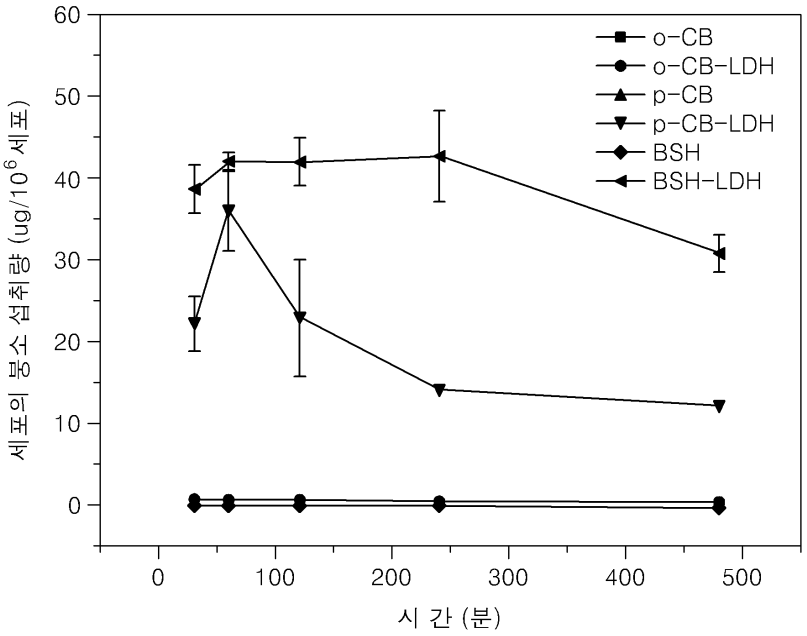
도면6b


세포 증식율 (%)
100
80
60
40
20
0
10
100
1000
농 도 (μg/mL)
o-CB
o-CB-LDH
p-CB
p-CB-LDH
BSH
BSH-LDH

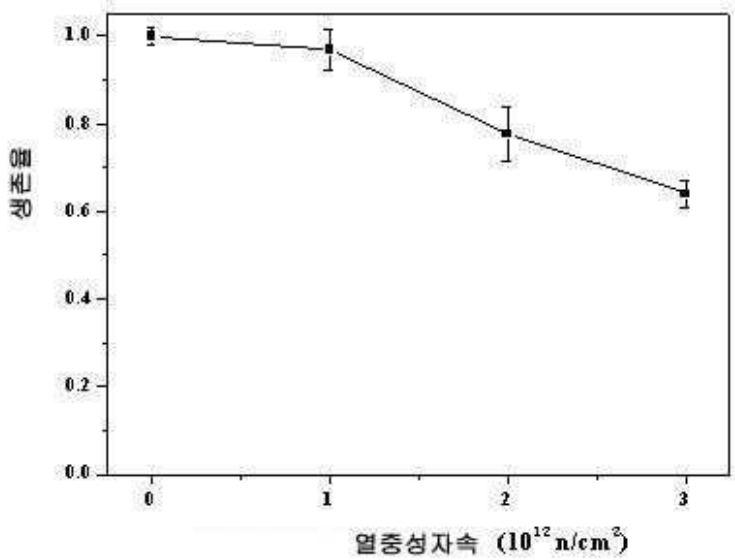
도면7a


60
50
40
30
20
10
0
0
100
200
300
400
500
세포의 붕소 섭취량 (ug/10^6 세포)
시 간 (분)
o-CB
o-CB-LDH
p-CB
p-CB-LDH
BSH
BSH-LDH

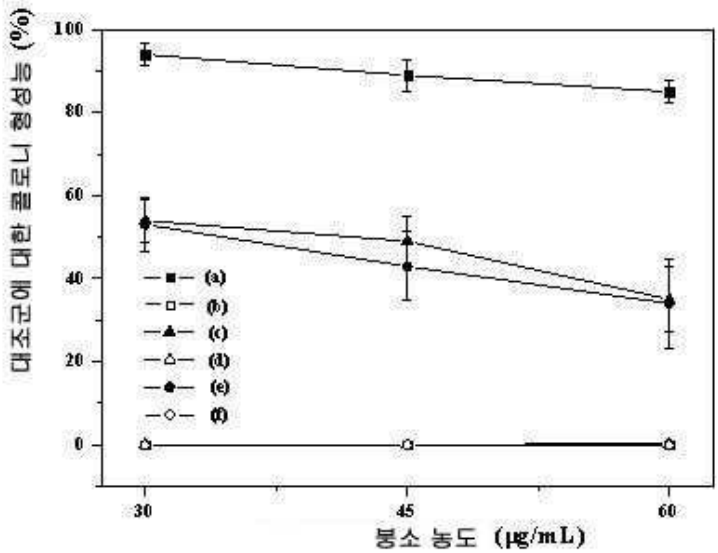
도면7b


60
50
40
30
20
10
0
0
100
200
300
400
500
세포의 붕소 섭취량 (ug/10^6 세포)
시 간 (분)
o-CB
o-CB-LDH
p-CB
p-CB-LDH
BSH
BSH-LDH

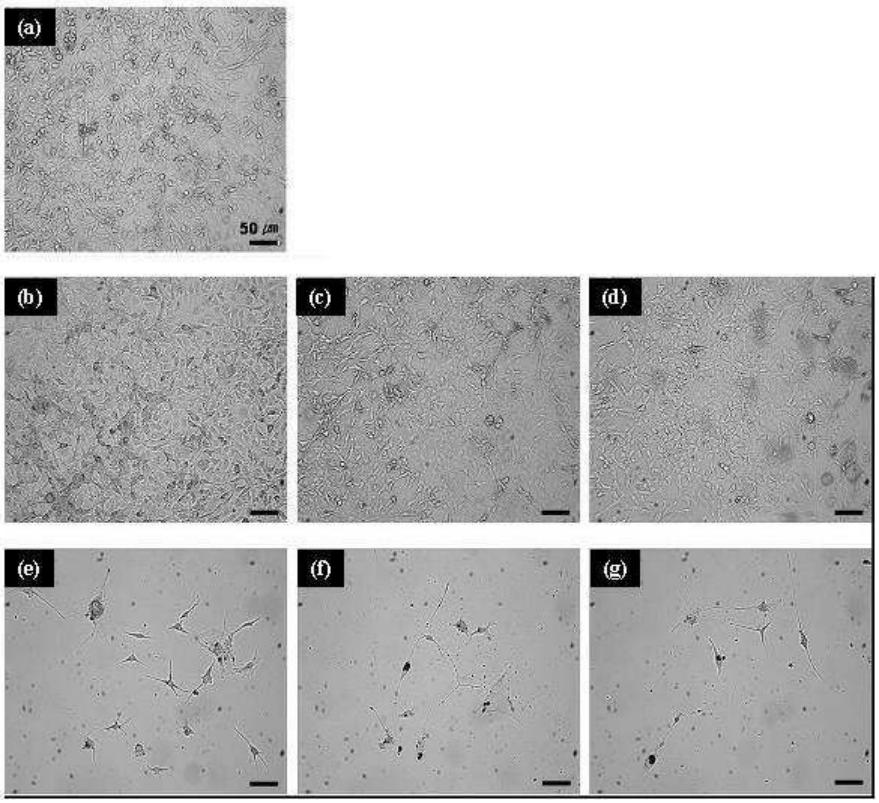
도면8a


생존율
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
1
2
3
열중성자속 (10^{12} n/cm^2)

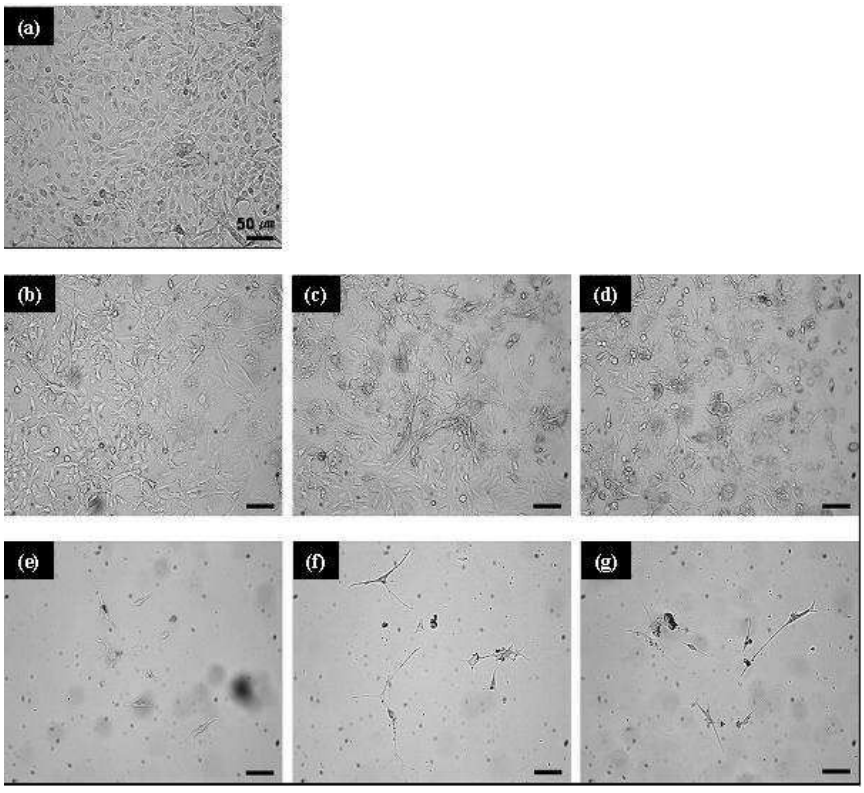
도면8b


대조군에 대한 콜로니 형성능 (%)
100
80
60
40
20
0
(a)
(b)
(c)
(d)
(e)
(f)
30
45
60
붕소 농도 (μg/mL)

도면9a



도면9b



도면9c

