

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2015년 4월 23일 (23.04.2015)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호

WO 2015/056960 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 38/40 (2006.01) A61K 47/40 (2006.01)
A61K 33/26 (2006.01) A61K 47/30 (2006.01)
A61K 33/32 (2006.01)

구 여울로 161, Jeollabuk-do (KR). 정혜종 (CHUNG, Hea Jong); 560-011 전라북도 전주시 완산구 당산로 101, Jeollabuk-do (KR). 이회관 (LEE, Heui Kwan); 560-764 전라북도 전주시 완산구 당산로 101, Jeollabuk-do (KR). 조해국 (CHO, Hea Guk); 501-011 광주시 동구 남문로 676, Gwangju (KR). 유재각 (YU, Jae Gak); 325-811 충청남도 서천군 서면 원두리 626, Chungcheongnam-do (KR).

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2014/009641

(22) 국제출원일:

2014년 10월 14일 (14.10.2014)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2013-0123051 2013년 10월 16일 (16.10.2013) KR
10-2014-0109008 2014년 8월 21일 (21.08.2014) KR

(71) 출원인: 주식회사 지니스 (JINIS CO., LTD.) [KR/KR]; 565-902 전라북도 완주군 봉동읍 둔산리 948-9, Jeollabuk-do (KR).

(72) 발명자: 김현진 (KIM, Hyeon Jin); 565-901 전라북도 완주군 봉동읍 둔산리 948-9, Jeollabuk-do (KR). 홍성출 (HONG, Seong Tshool); 560-011 전라북도 전주시 완산

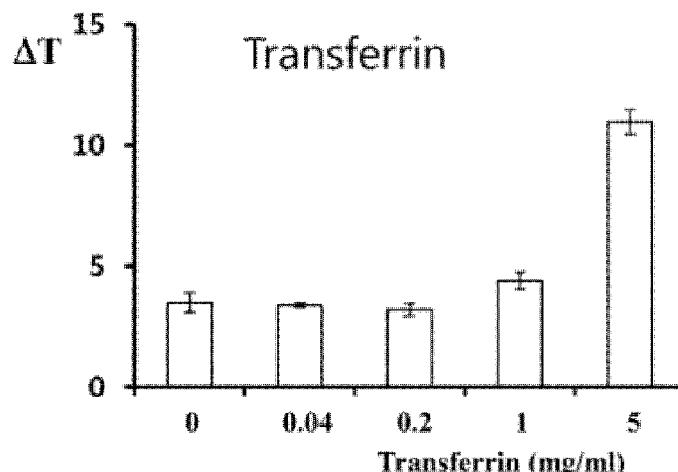
(74) 대리인: 경진영 (KYUNG, Jin Young) 등; 135-911 서울시 강남구 테헤란로 7길 8, BYC 빌딩 1004호, Seoul (KR).

(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, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: SENSITIZING COMPOSITION USING ELECTROMAGNETIC WAVES FOR THERMAL THERAPY OF CANCERS, AND CANCER THERAPY USING SAME

(54) 발명의 명칭 : 전자기파를 이용한 암 온열치료용 감작제 조성물 및 이를 이용한 암 치료 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a sensitizing composition using electromagnetic waves for the thermal therapy of cancers, and cancer therapy using same. More particularly, the present invention relates to a sensitizing composition using electromagnetic waves to increase sensitivity for cancer treatment, and cancer therapy using same. The sensitizing composition using electromagnetic waves for the thermal therapy of cancers according to the present invention includes metal ions, a metal ion binding material, "apotransferrin to which metal ions are non-covalently bonded" (transferrin), or an apotransferrin inducer to which metal ions are non-covalently bonded. Since the sensitizing composition for the thermal therapy of cancers according to the present invention has target selectivity for cancers when administered to the human body, metal ions are selectively delivered to cancer tissue. Therefore, heat generation in cancer tissue in which the metal ions are accumulated is increased when thermal therapy of cancers using electromagnetic waves is performed. Thus, it is possible to maximize the cancer treating efficacy of the thermal therapy of cancers using electromagnetic waves. Further, since it is possible to significantly increase cancer treating efficacy without pain and side effects, the present invention is expected to be widely used for anticancer treatment. Also, since it is possible to combine other cancer therapies such as chemotherapy and radiotherapy, the probability of complete recovery from cancer can be increased.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]

WO 2015/056960 A1



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

- (84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM,
KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, 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, 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 제 21 조(3))

본 발명은 전자기파를 이용한 암 온열치료용 감작제 조성물 및 이를 이용한 암 치료 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 전자기파를 이용하여 암 치료시 감수성을 증가시키는 암 온열치료용 감작제 조성물 및 이를 이용한 암 치료 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 전자기파를 이용한 암 온열치료용 감작제 조성물은 금속이온, 금속이온 결합물, "금속이온이 비공유 결합된 아포트랜스페린"(트랜스페린) 또는 금속이온이 비공유 결합된 아포트랜스페린 유도체를 포함한다. 본 발명에 따른 암 온열치료용 감작제 조성물은 체내에 투여시 암 표적지향성을 가지고 있어 금속이온을 암조직에 선택적으로 전달시키므로, 전자기파를 이용한 암 온열치료시 금속이온이 축적된 암조직에서 열 발생이 증가되어 전자기파를 이용한 암 온열치료의 암 치료 효능을 극대화 시킬 수 있다. 또한, 고통과 부작용이 없이 암 치료 효능을 혈저히 향상시킬 수 있으므로, 항암 치료에 널리 이용될 것으로 기대되며, 화학 요법, 방사선 요법 등 다른 암 치료방법과도 병용 가능하므로, 암의 완치 가능성을 높일 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 전자기파를 이용한 암 온열치료용 감작제 조성물 및 이를 이용한 암 치료 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 전자기파를 이용한 암 온열치료용 감작제 조성물 및 이를 이용한 암 치료 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 전자기파를 이용하여 암 치료시 감수성을 증가시키는 암 온열치료용 감작제 조성물 및 이를 이용한 암 치료 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 최근 현대 의학의 급격한 발달로 암에 대한 조기진단이 가능해지고 동시에 수술, 방사선, 그리고 항암제 약물요법 등과 같은 다양한 암 치료 방법이 개발되어 암을 극복할 수 있는 가능성이 보이기 시작하고 있다. 하지만 현재까지 개발된 암 치료법들은 암을 근본적으로 치료하기보다는 단순히 암환자들의 생존기간을 연장시키는 정도에 불과하다. 따라서 효과적이면서도 부작용이 적은 암 치료 방법을 개발할 필요성이 절실하다.
- [3] 암 치료에서 보편적으로 수행되고 있는 치료법으로는 수술요법, 항암제 약물요법, 그리고 방사선 치료법이 있다. 수술요법은 조기 암에는 가장 좋은 치료방법이나 암이 다른 조직으로 전이된 경우에는 좋은 치료 효과를 기대하기가 어렵다.
- [4] 방사선 치료법과 항암제 약물요법은 암 치료 효과가 낮을 뿐 아니라, 정상조직에도 영향을 미쳐 위장장애, 면역기능 저하, 식욕부진, 전신쇠약, 탈모 등 다양한 부작용들을 야기시키는 것으로 알려졌다. 이러한 기존 암치료 방법의 한계점을 보완하기 위하여 현재 여러 종류의 암 치료 방법들이 개발되고 있으며, 그 중 대표적인 것이 열 치료 항암요법이다(Wust et al., The Lancet Oncology, 2002, 3:487-497).
- [5] 암 세포의 고유한 특성중 하나는 열 적응 능력이 정상 세포에 비해 현저히 떨어진다는 것이다(Wust et al., The Lancet Oncology, 2002, 3:487-497). 열 치료 항암요법은 이처럼 열 적응 능력이 결여된 암세포의 특성을 이용하여 암 조직 및 주변의 온도를 42°C 이상으로 올려 암을 치료하는 항암요법이다. 열 치료 항암요법 과정에서 암 조직의 온도를 올리면, 주변 정상 세포는 열 충격에 저항하여 생존할 수 있지만 암 세포는 열 적응 능력이 떨어지기 때문에 고열에 적응하지 못하고 사멸한다. 열 치료 항암요법 과정에서 암 조직의 온도를 높이기 위해 초음파를 이용하는 방법, 접촉에 의한 열전달 방법, 전자기파를 이용하는 방법 등과 같은 여러 가지 방법들이 개발되었다. 하지만, 현재 열치료 항암요법에서 가장 일반적이고 효과적인 방법은 전자기파를 조사하여 암 조직에 열을 발생시키는 전자기파를 이용한 암 온열치료이다(유럽공개특허

제2174689호, 미국등록특허 제4323056호, 국제특허출원 제2002-172198호, 한국등록특허 제1125200호, 국제특허출원 제2010-043372호, 국제특허출원 제2009-013630호).

- [6] 전자기파(electromagnetic waves)는 전기장과 자기장이 시간에 따라 변하면서 발생하는 파동으로서; 감마선, X-선, 자외선, 가시광선, 적외선, 마이크로웨이브, 라디오 전파 등이 모두 전자기파이다. 전자기파가 극성물질을 통과하면 전자기파는 극성물질의 분자운동을 자극하여 열을 발생하기 때문에 기본적으로 모든 전자기파는 열 치료 항암요법에 활용되어질 수 있지만, 현재 "전자기파를 이용한 암 온열치료"에서는 13.56 MHz radio frequency의 고주파를 가장 보편적으로 사용하고 있다.
- [7] "전자기파를 이용한 암 온열치료"에 이용되는 전자기파는 유전가열(dielectric heating)이라는 과정을 통해 열을 발생시킨다. 인체의 대부분을 구성하는 물 분자는 산소와 수소원자 간 비대칭적 결합으로 쌍극자 모멘트를 가지게 된다. 이 물 분자의 쌍극자 모멘트 때문에, "전자기파를 이용한 암 온열치료" 시 전자기파에 노출된 물 분자가 전자기파의 진동수만큼 분자회전을 거듭하면서 분자들끼리 밀고 당기거나 충돌을 거듭하게 되며, 그 결과 전자기파가 노출된 조직에서 열이 발생하는 것이다. 암 세포에만 전자기파를 노출시킬 수 있다면, 열 적응 능력이 부족한 암세포의 특성 때문에 효율적으로 암세포를 사멸시킬 수 있다. 하지만 전자기파를 정상세포에는 노출시키지 않고 암 세포에만 노출시키는 것은 신체의 구조적물리적 한계로 인해 거의 불가능하다. 따라서, 전자기파와 같은 물리적 파장을 암 조직에 방사하여 암을 치료하는 것은 한계가 있으며, "전자기파를 이용한 암 온열치료"는 항암제 약물요법이나 방사선요법 보다는 암 치료 효능이 뛰어나지 않아, "전자기파를 이용한 암 온열치료"가 단독으로 암 치료에 쓰이기보다는 항암제 약물요법이나 방사선요법에 보조적 수단 정도로만 활용되고 있다.
- [8] 전자기파를 이용한 암 온열치료의 치료 효능을 높일 수 있는 가장 좋은 방법은, 온열치료용 감작제를 투여한 후 전자기파를 이용한 암 온열치료를 시행하는 것이다.
- [9] 현재까지 시도된 온열치료용 감작제는 금, 산화철 등과 같은 금속 성분에 기초한 나노입자이다(국제특허출원 제2009-091597호, 국제특허출원 제2012-036978호, 국제특허출원 제2012-177875호, 미국등록특허 제6541039호, 한국등록특허 제0802139호). 금속은 전자기파와 매우 잘 반응하여 고열을 발생시킨다. 따라서 금속 성분이 정상세포에는 축적되지 않고 암세포에만 축적되도록 한 후, 전자기파를 방사하면 암 치료 효능이 극대화 될 수 있을 것이다. 하지만 현재까지 금속 성분을 암 조직에만 선택적으로 전달할 수 있는 기술은 개발되지 못했고, "전자기파를 이용한 암 온열치료용 감작제"라는 개념 또한 구현되지 못한 실정이다.
- [10] 금이나 산화철과 같은 금속나노입자는 암 조직에 대한 선택성이 없어 암

조직뿐 아니라 정상 조직에도 축적되게 되는데, 이 때 전자기파를 처리하면 나노입자가 위치한 모든 부위에서 열 발생에 의해 정상 조직에도 손상을 일으키게 된다. 또한 금속나노입자는 생체에서 분해되거나 방출되지 않아 안전성이 낮은 문제가 있다. 따라서 이러한 금속성분에 기초한 나노입자는 온열치료용 감작제로 상용화에 실패하였고, 아직까지 전 세계적으로 온열치료용 감작제가 상용화된 사례는 없다.

[11]

[12] 사람을 포함한 모든 생명체에는 다양한 종류의 금속 성분이 체내 필수 구성성분으로 존재한다. 생명체의 체내에 존재하는 금속성분은 금속 그 자체로 존재하지 않고 대부분 이온 상태로 존재하여 생명유지에 필요한 다양한 기능을 수행한다. 마그네슘, 망간, 철 등과 같은 금속이온들은 생명유지를 위해 인체가 섭취해야 할 필수 영양분이다. 인체로 흡수된 금속이온들은 혈액에서 독립적으로 존재하지 않고 트랜스페린(transferrin)이라는 금속이온 전달 단백질과 결합한 상태로 존재한다. 철 이온과 아직 결합되어 있지 않은 아포트랜스페린(apotransferrin)에 철 이온이 하나 결합되면 모노페리 트랜스페린(monoferrie transferrin), 두 개 결합되면 디페리 트랜스페린(diferric transferrin) 또는 홀로트랜스페린(holo-transferrin)이라고 한다. 인간의 혈청에서 약 70%의 트랜스페린 단백질은 철 이온과 아직 결합되어 있지 않은 아포트랜스페린(apotransferrin)으로 존재하고 나머지 30% 정도의 트랜스페린은 철 이온이 결합된 아포트랜스페린 즉 monoferrie transferrin 또는 diferric transferrin인 것으로 알려져 있다(Huebers et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. 78:2572-2576). 따라서 혈액에는 언제든지 외부에서 유입되는 금속이온과 결합할 수 있는 아포트랜스페린이 다량 존재한다.

[13]

"금속이온이 비공유 결합된 아포트랜스페린"(트랜스페린)은 혈액을 따라 운반되다가 트랜스페린 수용체(transferrin receptor)와 결합하여 엔도사이토시스(endocytosis)를 통해 세포 내로 들어가 금속이온을 전달하고, 금속이온이 떨어져 나간 트랜스페린, 즉 아포트랜스페린(apotransferrin)은 엑소사이토시스(exocytosis)를 통해 세포 밖으로 나가 다시 금속이온과 결합함으로써 대사 과정이 순환하게 된다. 트랜스페린에 결합된 금속이온을 세포 내로 전달하는데 가장 중요한 역할을 하는 트랜스페린 수용체는 정상 세포에서보다 암 세포에서 과발현되는 것으로 알려졌다.

[14]

암세포는 세포대사 과정에서 금속이온을 조효소로 하는 효소를 절대적으로 필요로 하므로 혈액에 존재하는 금속이온을 강하게 흡수한다. 앞서 설명했듯이 혈액에는 금속이온이 독립적으로 존재하는 것이 아니라 트랜스페린과 결합한 형태로 존재하기 때문에 암세포가 혈액에서 흡수하는 금속이온은 실질적으로 트랜스페린에 결합된 금속이온이다. 트랜스페린이 운반하는 철은 DNA 합성, 세포분열 주기, 대사 조절 등 분열하는 세포의 다양한 기능을 수행하는 각종 효소들의 필수적 보인자 및 조절인자로 쓰인다. 이들 효소들은 대사과정에 핵심

역할을 수행하기 때문에 암세포는 빠른 대사과정을 유지하기 위해 철이 다량 필요하여 트랜스페린을 강력하게 받아들이는 특성이 있다. 즉, 암세포는 철이 정상 세포보다 많이 필요하여, 철을 전달하는 단백질인 트랜스페린에 대한 수용체가 과발현되어 있고, 그 결과 혈액 내 트랜스페린이 암조직으로 잘 전달되는 특성을 가지는데, 이를 트랜스페린의 암 표적지향성이라고 한다. 이와 같은 트랜스페린의 암 표적지향성을 이용하여 트랜스페린을 부착시킨 항암제 나노입자들이 공지되어 있다 (미국공개특허 제2009-0181048호, 유럽공개특허 제2216341호, 유럽공개특허 제1369132호).

[15] 이처럼, 트랜스페린을 암 표적 지향물질로 이용한 예는 있으나, 아직까지 "금속이온이 비공유 결합된 아포트랜스페린"(트랜스페린)을 온열치료용 감작제로 이용한다는 보고는 없었다.

[16] 이에, 혈액의 금속이온을 강하게 흡수하는 암세포의 특성과 전자기파에 민감하게 반응하는 금속의 특성을 인지한 본 발명자들은 전자기파를 이용한 암 온열치료 감작제로 금속 혹은 금속화합물 대신 금속이온을 암 환자에게 투여할 경우; 1) 혈액에 주입된 금속이온은 혈액에 과량 존재하는 아포트랜스페린과 결합하여 트랜스페린화되고; 2) 금속이온이 비공유 결합된 아포트랜스페린은 암세포에 과발현된 트랜스페린 수용체에 의해 암세포에 선택적으로 전달되므로 트랜스페린에 의해 전달되는 금속이온 농도가 암세포에서 높아질 것이고; 3) 여기에 전자기파를 이용한 온열치료를 시행하면 금속이온이 축적된 암세포에서 열 발생이 집중적으로 일어나 정상세포에 대한 손상을 최소화하면서 암세포만 집중적으로 사멸시킬 수 있다는 사실을 확인하고 본 발명을 완성하였다. 또한 본 발명자들은 "금속이온이 비공유 결합된 아포트랜스페린"을 온열치료용 감작제로 암 환자에게 투여하고 "전자기파를 이용한 암 온열치료"를 시행하여도 상기에서 기술한 바와 같이 암 치료가 혁신적으로 개선된다는 사실을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[17]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[18] 본 발명의 목적은 암 조직에만 금속이온을 선택적으로 전달함으로써, "전자기파를 이용한 암 온열치료" 시 암 조직에만 열 발생이 극대화되어 암을 치료할 수 있는 암 온열치료용 감작제 조성물, 이를 포함하는 암 온열치료용 키트 및 이를 이용하는 암 치료방법을 제공하는데 있다.

과제 해결 수단

[19] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 전자기파를 이용한 암 온열치료용 감작제 조성물을 제공한다.

[20] 본 발명에 있어서, 상기 감작제는 금속이온, 금속이온 결합물, 금속이온이 비공유 결합된 아포트랜스페린 및 금속이온이 비공유 결합된 아포트랜스페린

유도체로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.

- [21] 본 발명에 있어서, 상기 금속이온은 철(iron) 이온, 망간(manganese) 이온, 아연(zinc) 이온, 구리(copper) 이온, 마그네슘(magnesium) 이온, 비스무트(bismuth) 이온, 루테늄(ruthenium) 이온, 티타늄(titanium) 이온, 갈륨(gallium) 이온, 인듐(indium) 이온, 바나딜(vanadyl) 이온, 크로미움(chromium) 이온, 알루미늄(aluminum) 이온 및 플루토늄(plutonium) 이온으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [22] 본 발명에 있어서, 상기 금속이온 결합물은 금속이온에 덱스트란(dextran), 수크로즈(sucrose), 글루코네이트(gluconate), 소르비톨(sorbitol), 폴리사카라이드(polysaccharide), 시트레이트(citrate), 카복시말토스(carboxymaltose), 페루목시톨(ferumoxytol), 이소말토사이드(isomaltoside), 말토스(maltose), 전분(starch), 셀룰로오스(cellulose), 클로라이드(chloride), 설피아이트(sulfate), 푸마레이트(fumurate) 및 알부민(albumin)을 포함하는 군으로부터 선택되는 결합물이 비공유 결합되어 있는 것을 특징으로 한다.
- [23] 본 발명에 있어서, 상기 아포트랜스페린 또는 아포트랜스페린 유도체는 인간 또는 포유동물 유래 혈청 단백질이거나 재조합 단백질인 것을 특징으로 한다.
- [24] 본 발명에 있어서, 상기 감작제는 0.01~100mg/ml 농도인 것을 특징으로 한다.
- [25] 본 발명에 있어서, 상기 암 온열치료용 감작제 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [26] 본 발명은 또한, 전자기파를 이용한 암 온열치료용 감작제 조성물 및 전자기파를 조사하는 장치를 포함하는 암 온열치료용 키트를 제공한다.
- [27] 본 발명은 또한, (a) 인간을 제외한 동물에 상기 암 온열치료용 감작제 조성물을 투여하여 암 치료에 대한 감수성을 증가시키는 단계 및 (b) 전자기파를 처리하는 단계를 포함하는 암 치료방법을 제공한다.
- [28] 본 발명에 있어서, 상기 암 온열치료용 감작제 조성물은 1~250mg/kg 용량으로 투여하는 것을 특징으로 한다.
- [29] 본 발명에 있어서, 상기 전자기파는 감마선, X-선, 자외선, 가시광선, 적외선, 마이크로웨이브 및 라디오 전파로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [30] 본 발명에 있어서, 상기 암 치료방법은 화학 치료(chemotherapy), 방사선 치료(radiation therapy), 생물학적 치료(biological therapy), 면역치료(immunotherapy) 및 광역동 치료(photodynamic therapy)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 치료방법을 병행하는 것을 특징으로 한다.
- [31] **발명의 효과**
- [32] 본 발명에 따른 암 온열치료용 감작제 조성물은 암 표적지향성을 가지고 있어

금속이온을 암조직에 선택적으로 전달시키므로, 전자기파를 이용한 암 온열치료시 금속이온이 축적된 암조직에서 열 발생이 증가되어 전자기파를 이용한 암 온열치료의 암 치료 효능을 극대화시킬 수 있다.

[33]

도면의 간단한 설명

[34] 도 1은 본 발명의 실험예 3에 따라 전자기파 처리 전과 후의 아포트랜스페린 수용액 온도를 열화상카메라로 측정한 사진이다. 과 온도 변화 차이를 나타낸 그래프이다.

[35] 도 2는 본 발명의 실험예 3에 따라 전자기파 처리 전과 후의 아포트랜스페린 수용액 온도 변화 차이를 나타낸 그래프이다.

[36] 도 3은 본 발명의 실험예 3에 따라 전자기파 처리 전과 후의 트랜스페린 수용액 온도를 열화상카메라로 측정한 사진이다.

[37] 도 4는 본 발명의 실험예 3에 따라 전자기파 처리 전과 후의 트랜스페린 수용액 온도 변화 차이를 나타낸 그래프이다.

[38] 도 5는 본 발명의 실험예 3에 따라 전자기파 처리 전과 후의 트랜스페린 배양 정상세포 온도를 열화상카메라로 측정한 사진이다.

[39] 도 6은 본 발명의 실험예 3에 따라 전자기파 처리 전과 후의 트랜스페린 배양 정상세포 온도 변화 차이를 나타낸 그래프이다.

[40] 도 7은 본 발명의 실험예 3에 따라 전자기파 처리 전과 후의 트랜스페린 배양 암세포 온도를 열화상카메라로 측정한 사진이다.

[41] 도 8은 본 발명의 실험예 3에 따라 전자기파 처리 전과 후의 트랜스페린 배양 암세포 온도 변화 차이를 나타낸 그래프이다.

[42] 도 9는 본 발명의 실시예 1에 따라 생리식염수(control)를 암이 유도된 마우스(Tumor xenograft mouse)에 각각 투여하고 전자기파를 처리하는 온열치료시, 정상 조직과 암 조직 부위(화살표)를 열화상카메라로 측정한 사진과 온도 변화 차이를 나타낸 그래프이다 (White bar: 정상 조직, Black bar: 암 조직).

[43] 도 10은 본 발명의 실시예 1에 따라 온열치료용 감작제(iron sucrose)를 암이 유도된 마우스(Tumor xenograft mouse)에 각각 투여하고 전자기파를 처리하는 온열치료시, 정상 조직과 암 조직 부위(화살표)를 열화상카메라로 측정한 사진과 온도 변화 차이를 나타낸 그래프이다 (White bar: 정상 조직, Black bar: 암 조직).

[44] 도 11은 본 발명의 실시예 1에 따라 온열치료용 감작제(transferrin)를 암이 유도된 마우스(Tumor xenograft mouse)에 각각 투여하고 전자기파를 처리하는 온열치료시, 정상 조직과 암 조직 부위(화살표)를 열화상카메라로 측정한 사진과 온도 변화 차이를 나타낸 그래프이다 (White bar: 정상 조직, Black bar: 암 조직).

[45] 도 12는 본 발명의 실시예 1에 따라 암이 유도된 마우스(Tumor xenograft mouse)에 식염수 또는 금속이온 결합물을 투여한 후 전자기파를 처리한 마우스의 암조직 크기를 바이오형광으로 분석한 결과이다((A):무처리,

(B):생리식염수, (C):iron gluconate, (D):iron sucrose, (E):iron carboxymaltose, (F):iron dextran, (G):iron starch, (H):transferrin).

[46] 도 13은 본 발명의 실시예 1에 따라 암이 유도된 마우스(Tumor xenograft mouse)에 식염수, iron sucrose, iron dextran 및 transferrin을 투여한 후 전자기파를 처리한 마우스의 암조직 크기를 바이오형광으로 분석한 결과이다.

[47]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[48] 본 발명에서는 독성 및 부작용이 없으면서, 암 조직에 대한 표적지향성이 있는 물질을 이용하여 금속 이온을 암 세포에만 전달할 수 있는 감작제로 이용할 경우, "전자기파를 이용한 암 온열치료"의 암조직 선택성과 암치료 효능을 높일 수 있을 것으로 예측하였다.

[49] 즉, 암 조직에 대한 표적지향성이 있고, 독성 문제가 없는 생체유래 물질을 이용하여 금속 이온을 정상 세포가 아닌 암세포에만 전달시켜 암세포의 금속이온 농도를 증가시킨 후, "전자기파를 이용한 암 온열치료"를 시행할 경우, 암 치료 효능을 극대화시킬 수 있다는 것을 확인하고자 하였다.

[50]

이에 본 발명에서는 "금속이온과 비공유 결합된 아포트랜스페린"(트랜스페린)을 "전자기파를 이용한 암 온열치료"용 감작제로 암 이식 동물모델(tumor xenograft mouse model)에 혈관주사로 투여한 후, 전자기파를 처리하였다. 그 결과, (1) 암세포에 과발현된 트랜스페린 수용체에 의해 트랜스페린이 정상세포보다 암세포에 선택적으로 전달되고; (2) 트랜스페린에 결합되어 있던 금속이온의 분리로 정상세포보다 암세포 내 금속이온 농도가 높아지고; (3) 전자기파 처리 시 암조직의 증가된 금속이온이 열 발생을 더욱 증가시키고; (4) 발생된 열에 의해 암세포의 사멸이 증가되어 결과적으로 전자기파를 이용한 암 온열치료의 암 치료 효능이 극대화 된 것을 확인할 수 있었다.

[51]

또한 본 발명에서는 "금속이온과 비공유 결합된 아포트랜스페린"(트랜스페린) 대신 금속이온을 감작제로 암 이식 동물모델(tumor xenograft mouse model)에 투여하여도 혈액으로 유입된 금속이온이 혈액에 과량 존재하는 아포트랜스페린과 결합하여 트랜스페린화되므로, 금속이온을 온열치료용 감작제로 암 환자에게 투여하고 전자기파를 이용한 암 온열치료를 시행하여도, 상기에서 기술한 효과와 동일하거나 더 좋은 항암 효과를 얻을 수 있다는 것을 확인하였다.

[52]

따라서, 본 발명은 일 관점에서, 전자기파를 이용한 암 온열치료용 감작제 조성물에 관한 것이다.

[53]

상기 감작제란 온열치료시 암치료 효능을 높여주기 위해 사용되는 것으로, 체내에 투여시 암조직에 대한 표적지향성을 가지면서 암조직에서 열 발생을 증폭시켜 주는 특징을 가진다.

- [54] 상기 감작제는 금속이온, 금속이온 결합물, 금속이온이 비공유 결합된 아포트랜스페린 및 금속이온이 비공유 결합된 아포트랜스페린 유도체로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.
- [55] 본 발명에 있어서, 상기 금속이온은 철(iron) 이온, 망간(manganese) 이온, 아연(zinc) 이온, 구리(copper) 이온, 마그네슘(magnesium) 이온, 비스무트(bismuth) 이온, 루테늄(ruthenium) 이온, 티타늄(titanium) 이온, 갈륨(gallium) 이온, 인듐(indium) 이온, 바나딜(vanadyl) 이온, 크로미움(chromium) 이온, 알루미늄(aluminum) 이온, 플루토늄(plutonium) 이온 등을 예시할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [56] 상기 금속이온 결합물은 금속이온에 덱스트란(dextran), 수크로즈(sucrose), 글루코네이트(gluconate), 소르비톨(sorbitol), 폴리사카라이드(polysaccharide), 시트레이트(citrate), 카복시말토스(carboxymaltose), 페루목시톨(ferumoxytol), 이소말토사이드(isomaltoside), 말토스(maltose), 전분(starch), 셀룰로오스(cellulose), 클로라이드(chloride), 설피아이트(sulfate), 푸마레이트(fumurate) 및 알부민(albumin) 포함하는 군으로부터 선택되는 결합물이 비공유 결합된 것으로써, 약제로 사용할 수 있는 결합물이라면 제한없이 이용될 수 있으며, iron dextran, iron sucrose, iron gluconate, iron carboxymaltose, iron isomaltoside, iron ferumoxytol, iron sorbitol, iron polysaccharide, ferric citrate, ferrous gluconate, ferrous sulfate, ferrous fumurate, magnesium chloride, gallium citrate, aluminium citrate 등을 예시할 수 있으나 이에 한정되지 않는다.
- [57] 상기 금속이온은 전하를 가지므로 극성, 즉 쌍극자모멘트를 가지고 있어 전자기파 처리시 분자운동이 증폭되어 열이 발생하게 되므로, 금속 자체보다 전자기파에 민감하게 반응하는 감작제 특성을 가진다.
- [58] 상기 감작제로 금속이온 또는 금속이온 결합물을 암 환자에 투여시, 1) 혈액에 주입된 금속이온은 혈액에 과량 존재하는 아포트랜스페린과 결합하여 트랜스페린화되고; 2) 트랜스페린은 암세포에 과발현된 트랜스페린 수용체에 의해 암세포에 선택적으로 전달되므로 트랜스페린에 의해 전달되는 금속이온 농도가 암세포에서 높아질 것이고; 3) 여기에 전자기파를 이용한 온열치료를 시행하면 금속이온이 축적된 암세포에서 열 발생이 집중적으로 일어나 정상세포에 대한 손상을 최소화하면서 암세포만 집중적으로 사멸시키는 특징을 가진다.
- [59] 상기 감작제로 금속이온이 비공유 결합된 아포트랜스페린 및 금속이온이 비공유 결합된 아포트랜스페린 유도체를 암 환자에 투여시, 1) "금속이온이 비공유 결합된 아포트랜스페린"(트랜스페린)은 혈액을 따라 돌다가 암세포에 과발현된 트랜스페린 수용체에 의해 암세포에 선택적으로 전달되므로 트랜스페린에 의해 전달되는 금속이온 농도가 암세포에서 높아질 것이고; 2) 여기에 전자기파를 이용한 온열치료를 시행하면 금속이온이 축적된 암세포에서

열 발생이 집중적으로 일어나 정상세포에 대한 손상을 최소화하면서 암세포만 집중적으로 사멸시키는 특징을 가진다.

- [60] 상기 트랜스페린은 혈액에 많이 분포하는 단백질로, 철과 같은 금속이온과 결합하고 혈액을 돌다가 트랜스페린 수용체를 가지고 있는 세포들에게 금속이온을 전달하는 역할을 하는 메탈로프로테인(metalloprotein)을 의미한다.
- [61] 상기 아포트랜스페린 또는 아포트랜스페린 유도체는 암 표적지향성을 갖고, 철, 망간, 아연 등의 금속이온과 결합이 가능한 것이라면 특별한 제한없이 인간 또는 포유동물 유래 혈청 단백질이거나 재조합 단백질인 것을 사용할 수 있다.
- [62] 상기 트랜스페린은 아포트랜스페린에 금속이온이 비공유 결합된 형태의 트랜스페린이 바람직하며, 철 이온과 결합된 형태의 트랜스페린(iron-bound transferrin)으로는 모노페리 트랜스페린(monoferic transferrin), 디페리 트랜스페린(diferic transferrin), 홀로트랜스페린(holo-transferrin), 페리 아세틸 트랜스페린(ferric acetyl transferrin) 등을 예시할 수 있다.
- [63] 상기 트랜스페린은 특히 암조직에 과발현되어 있는 트랜스페린 수용체와 결합하여 암세포 안으로 전달되고, 결합하고 있던 금속이온을 암세포 내로 유리시켜서, 결국 암조직에 선택적으로 금속이온을 전달할 수 있는 것을 특징으로 한다.
- [64] 철, 망간, 아연 등과 같은 금속이온은 강한 전하를 띤 이온이므로 물 분자의 쌍극자모멘트 보다 훨씬 강력한 극성을 갖는데, 강한 극성을 가진 금속이온이 전자기파에 노출되면 분자운동이 증폭되어 열 발생이 극대화된다.
- [65] 상기 트랜스페린은 암 환자에 투여시, 1) 암세포에 과발현된 트랜스페린 수용체에 의해 트랜스페린이 정상세포보다 암세포에 선택적으로 전달되고; 2) 트랜스페린에 결합되어 있던 금속이온의 분리로 정상세포보다 암세포 내 금속이온 농도가 높아지고; 3) 전자기파 처리 시 암조직의 증가된 금속이온이 열 발생을 더욱 증가시켜; 4) 발생한 열에 의해 암세포의 사멸이 증가하게 되어 암치료 효능을 가지는 특징을 가진다.
- [66] 상기 암 온열치료용 감작제 조성물은 특별히 제한되지는 않으나, 감작제의 농도가 0.01~100mg/ml인 것이 바람직하다. 상기 농도가 0.01mg/ml 미만인 경우에는 과량의 부피로 투여해야 하는 불편함이 있고, 100mg/ml을 초과할 경우 제조가 어려운 문제점이 있다.
- [67] 본 발명에 있어서, 상기 암 온열치료용 감작제 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체나 윤활제, 습윤제, 유화제, 혼탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [68]
- [69] 본 발명은 다른 관점에서 상기 암 온열치료용 감작제 조성물 및 전자기파를 조사하는 장치를 포함하는 암 온열치료용 키트에 관한 것이다.
- [70] 본 발명의 암 온열치료용 감작제 조성물은 암과 관련된 다양한 질병, 예를 들어 위암, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 방광암,

결장암, 자궁경부암 등을 치료하는데 이용될 수 있으므로, 전자기파를 조사하는 장치를 포함하는 암 온열치료용 키트에 포함될 수 있다.

[71] 상기 전자기파(electromagnetic waves)는 전기장과 자기장이 시간에 따라 변하면서 발생하는 파동으로서, 감마선, X-선, 자외선, 가시광선, 적외선, 마이크로웨이브, 라디오 전파 등을 예시할 수 있으며, 본 발명에서는 통상적인 전자기파 조사 장치를 이용할 수 있다.

[72] 본 발명은 또 다른 관점에서 (a) 인간을 제외한 동물에 상기 암 온열치료용 감작제 조성물을 투여하여 암 치료에 대한 감수성을 증가시키는 단계 및 (b) 전자기파를 처리하는 단계를 포함하는 암 치료방법에 관한 것이다.

[73] 상기 암 온열치료용 감작제 조성물은 상기 금속이온, 금속이온 결합물, 금속이온이 비공유 결합된 아포트랜스페린, 또는 금속이온이 비공유 결합된 아포트랜스페린 유도체를 주사에 적합한 물, 생리식염수 등의 용액에 0.01~100mg/ml 농도로 녹여 사용하는 것이 바람직하다.

[74] 전자기파를 이용한 암 온열치료의 효과를 위해서는 암 온열치료용 감작제 조성물의 투여 용량은 금속이온 및 금속이온 결합물의 경우에는 0.1~50mg/kg 범위가 바람직하며, 금속이온이 비공유 결합된 아포트랜스페린 및 그 유도체의 경우에는 0.1~200mg/kg 용량 범위가 바람직하다.

[75] 상기 전자기파를 이용한 암 온열치료의 바람직한 효과를 위해서는 암 온열치료용 감작제 조성물을 투여한 후 1~48시간 이내에 전자기파를 이용한 암 온열치료를 시행하는 것이 바람직하다.

[76] 상기 전자기파를 이용한 암 온열치료 요법은 공지의 온열치료 요법에 의해 용이하게 결정되어 사용될 수 있다. 예를 들어, 13.56 MHz 고주파를 출력하는 온열치료기로 30~60분간 조사하는 치료를 1주일에 2회 이상 4주 이상 시행할 수 있다.

[77] 본 발명에 따른 암 치료방법은 기존의 항암요법과 연계 또는 병행하여 사용함으로써 암의 치료 효과를 개선할 수 있다. 기존의 항암요법으로는 화학 치료(chemotherapy), 방사선 치료(radiation therapy), 생물학적 치료(biological therapy), 면역치료(immunotherapy) 및 광역동 치료(photodynamic therapy) 등을 예시할 수 있다.

[78]

발명의 실시를 위한 형태

[79] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[80]

[81] 실험 예 1. 금속이온의 발열능 평가

- [82] 인체로 섭취되는 경구용 또는 주사제용 금속이온은 염과 결합된 결합물 형태이거나 탄수화물(carbohydrate) 또는 단백질과 같은 고분자와 결합된 결합물 형태이다. 금속이온과 결합되는 염으로는 시트레이트(citrate), 클로라이드(chloride), 설페이트(sulfate), 푸마레이트(fumurate) 등을 예시할 수 있으며 이로 인한 결합물로는 황산제일철(ferrous sulfate), 푸마르산제일철(ferrous fumurate), 글루코네이트제일철(ferrous gluconate) 등을 예시할 수 있다.
- [83] 금속이온과 결합되는 탄수화물로는 단당류인 글루코네이트(gluconate), 이당류인 수크로즈(sucrose), 말토스(maltose), 다당류인 이소말토사이드(isomaltoside), 카르복시말토스(carboxymaltose), 덱스트란(dextran), 스타치(starch), 셀룰로오스(cellulose) 등의 사카라이드(saccharides)가 있고, 금속이온과 결합되는 단백질로는 트랜스페린(transferrin), 알부민(albumin) 등을 예시할 수 있다.
- [84] 본 실험예에서는 금속이온과 염 결합물인 ferrous sulfate 용액을 다음과 같이 준비하여 전자기파를 처리한 후 온도를 측정함으로써 금속이온 결합물의 발열능을 확인하였다. 또한 금속이온과 탄수화물 결합물인 iron gluconate, magnesium sucrose, iron sucrose, iron isomaltoside, iron carboxymaltose, iron dextran, iron starch complex 용액을 다음과 같이 준비하여 전자기파를 처리한 후 온도를 측정함으로써 금속이온 결합물의 발열능을 확인하였다.
- [85] ferrous sulfate 용액은 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g을 중류수 10ml에 넣고 30분 이상 저어서 녹인 후 $0.22\mu\text{m}$ 필터를 통과시켜 제조한 다음, 멸균 중류수로 희석하여 사용하였다.
- [86] iron gluconate 용액은 (sodium ferric gluconate complex)은 Sanofi사의 Ferrlecit 제품을 멸균 중류수로 희석하여 사용하였다.
- [87] magnesium sucrose 용액은 $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 83.6mg와 sucrose 150mg을 중류수 10ml에 넣고 30분 이상 저어서 녹인 후 $0.22\mu\text{m}$ 필터를 통과시켜 제조한 다음, 중류수를 이용하여 희석하여 사용하였다.
- [88] iron sucrose 용액 (ferric hydroxide sucrose complex)은 먼저 설탕 100mg을 중류수 50ml에 넣고 90°C에서 녹인 후 계속 저으면서 5M NaOH 1ml을 첨가하여 sucrose 수용액을 제조한 다음, FeCl_3 0.9g을 중류수 50ml에 넣고 20분 이상 저어서 녹인 0.01M FeCl_3 수용액을 90°C의 sucrose 수용액에 첨가한 후, 5M NaOH 용액을 방울씩 떨어뜨리며 pH 12로 조정하였다. 다음으로, 80°C에서 2시간 동안 반응시킨 후 5,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 ferric hydroxide sucrose complex를 얻어내고 중류수로 세척하고 건조시킨 후 사용하였다.
- [89] iron isomaltoside complex, iron carboxymaltose complex와 iron starch complex 역시 iron sucrose를 제조한 방법에서 탄수화물만 바꾸어서 제조하여 준비하였다.
- [90] 상기의 금속이온 결합물을 금속이온 10 mg/ml 농도로 준비한 후 0.1ml을 96-well plate에 3 well씩 분주하였다. 이때, 대조군으로는 중류수 0.1ml을

사용하였다. 96-well plate를 고주파온열암치료기(EHY-2000, Oncothermia)에서 100W의 energy dose로 5분간 노출시킨 후 5분 후 온도를 열화상카메라(E60, 한국렌탈, 한국)로 측정하고, 전자기파 처리 전과 후의 온도 변화 차이를 표 1에 나타내었다.

[91] 표 1

[Table 1]

	delta Temp. (°C)
control	0.5
ferrous sulfates	3.3
magnesium sucrose	5.2
iron sucrose	4.7
iron gluconate	5.7
iron isomaltoside	3.2
iron carboxymaltose	5.8
iron dextran	6.4
iron starch	4.5

[92]

[93] 표 1로부터, 금속이온 탄수화물 복합체에 고주파를 처리하면 대조군인 중류수 처리군보다 온도가 3~6°C 이상 상승하는 것을 확인할 수 있었다.

[94]

[95] 실험 예 2. 금속이온의 아포트랜스페린 결합능 평가

[96] 금속이온의 아포트랜스페린 결합능을 평가하기 위해 철 이온(ferric iron, FeIII+)의 농도에 따라 트랜스페린 결합능(Unsaturated Iron-Binding Capacity, UIBC)을 다음과 같이 측정하였다.

[97] 먼저 철 이온 수용액을 만들기 위해 FeCl_3 (Sigma Aldrich, USA) 3.6g을 중류수 400ml에 넣고 20분 이상 저어서 녹인 후 5M NaOH 용액을 방울씩 떨어뜨리며 계속 저으면서 pH 9로 맞추었다. 적갈색의 침전물이 보이면 90°C에서 2시간 동안 저어준 후 5,000rpm으로 5분간 원심분리하여 침전된 ferric hydroxide를 얻어내고 중류수로 세척한 후 건조시켰다. 분말형태의 ferric hydroxide을 중류수에 녹여 1, 10, 50, 200, 500g/dL 농도의 철 이온 수용액(ferric hydroxide solution)을 준비하였다. 각 농도의 철 이온 수용액에 apotransferrin(Sigma Aldrich, USA)을 200mg/dL이 되도록 첨가하고 vortex로 1분간 섞은 후 37°C에서 30분간 apotransferrin과 철 이온을 반응시켰다.

[98] 아포트랜스페린의 철 이온 결합능(Unsaturated Iron-binding capacity)을 측정하기 위해 Ferrozine colorimetric method를 이용하였다. iron standard로는

Ferrous chloride를 Hydroxylamine hydrochloride에 500 g/dL 농도로 준비하고, 실험군에는 apotransferrin과 철 이온의 반응액을 준비하였다. 먼저 0.5M의 Tris buffer(pH8) 2ml을 모든 시험관에 분주하였다. 다음 blank 시험관에는 중류수 1ml, standard 시험관에는 중류수 0.5ml과 iron standard 0.5ml, 그리고 test 시험관에는 apotransferrin과 철 이온의 반응액 0.5ml과 iron standard 0.5ml을 넣은 후 vortex로 1분간 섞었다.

[99] 560nm에서 spectrophotometer 값을 제로로 한 후 흡광도 A1을 측정하였다. 다음 16.6mM 농도의 Ferrozine Hydroxylamine hydrochloride 용액을 501씩 넣은 후 vortex로 1분간 섞었다. 모든 시험관을 37°C에서 10분간 배양한 후, 560nm에서 흡광도 A2를 측정하였다. 560nm에서의 흡광도 A_{560} 는 흡광도 A2에서 흡광도 A1을 뺀 값으로 계산하고, 표 2에 나타내었다.

[100] Unsaturated Iron-binding capacity (UIBC)는 다음 식으로 계산되었다.

$$\text{UIBC} = [\text{standard conc.}] - [\text{standard conc.}] \times \frac{\text{Test } A_{560}}{\text{Standard } A_{560}}$$

[102] 표 2

[Table 2]

iron conc.($\mu\text{g}/\text{dL}$)	0	10	50	200	500
UIBC ($\mu\text{g}/\text{dL}$)	500	498	481	332	119

[103]

[104] 표 2에서와 같이, 철 이온과 아포트랜스페린의 혼합용액에서는 철 이온이 아포트랜스페린과 결합하여 monoferric 및 diferric 트랜스페린으로 되면서 철 이온과의 결합능(Unsaturated Iron-Binding Capacity, UIBC)이 500 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 에서 119 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[105]

[106] 실험 예 3: 금속이온이 비공유 결합된 아포트랜스페린의 온도 발열능 평가

[107] "금속이온이 비공유 결합된 아포트랜스페린"(트랜스페린)의 발열능을 평가하기 위하여 철이 결합되어 있지 않은 아포트랜스페린 및 철이 결합되어 있는 아포트랜스페린 수용액에 전자기파를 처리한 후 온도를 측정하였다. 철 이온이 결합되어 있지 않은 아포트랜스페린(Sigma Aldrich, USA) 수용액을 0, 0.04, 0.2, 1, 5mg/ml 농도로 희석한 후 각 농도별로 0.1ml을 96-well plate에 분주하여 준비하였다.

[108] 철 이온이 결합된 아포트랜스페린을 준비하기 위해서는 다음과 같이 철 이온 수용액과 아포트랜스페린을 반응시켰다. FeCl₃(Sigma Aldrich, USA) 3.6g을 중류수 400ml에 넣고 20분 이상 저어서 녹인 후 5M NaOH 용액을 방울씩 떨어뜨리며 계속 저으면서 pH 9로 맞추었다. 적갈색의 침전물이 보이면 90°C에서 2시간 동안 저어주면서 배양한 후 5,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 침전된 ferric hydroxide를 얻어내고 중류수로 세척한 후 건조시켰다. 분말형태의

ferric hydroxide을 중류수에 녹여 100 μ g/dL 농도의 철 이온 수용액(ferric hydroxide solution)을 준비하였다. 철 이온 수용액에 아포트랜스페린을 500mg/dL이 되도록 첨가하고 vortex로 1분간 섞은 후 37°C에서 30분간 아포트랜스페린과 철 이온을 반응시켰다. 철 이온이 결합된 아포트랜스페린 용액을 0, 0.04, 0.2, 1, 5mg/ml 농도로 희석한 후 각 농도별로 0.1ml을 96-well plate에 분주하여 준비하였다.

- [109] 아포트랜스페린 수용액 plate 및 철 이온이 결합된 아포트랜스페린(트랜스페린) 수용액 plate를 고주파온열암치료기(EHY-2000, Oncothermia)에서 100W의 energy dose로 3분간 노출시키기 전과 후의 온도를 열화상카메라 (E60, 한국렌탈, 한국)로 측정하고, 그 온도 변화 차이를 도 1~4에 나타내었다.
- [110] 도 1~4에 도시된 바와 같이, 아포트랜스페린 수용액의 전자기파 처리 전후의 온도변화는 모든 처리 농도에서 3°C 미만으로 유지된 반면, 철이온이 결합되어 있는 아포트랜스페린(트랜스페린) 수용액의 전자기파 처리 전후의 온도변화는 1mg/ml에서 4.4°C 상승하고 5mg/ml에서는 10.9°C 상승한 것을 확인할 수 있었다.
- [111]
- [112] **실험 예 4: 금속이온이 비공유 결합된 아포트랜스페린의 *in vitro* 암세포 온도 상승능 평가**
- [113] 금속이온이 비공유 결합된 아포트랜스페린에 의한 온도 상승능을 *in vitro* 세포실험으로 평가하였다. 트랜스페린 수용체가 과발현되어 있는 암 세포주 NCI-H460 (Califer Life Sciences)를 배양한 후 1×10^3 cells/ml 농도의 세포현탁액 0.1ml을 96-well plate에 분주하고 37°C CO₂ 배양기에서 12시간 배양하였다. 또한 대조군으로 인간 정상 세포 stromal cell를 배양하여 3×10^3 cells/ml 농도 0.1ml을 96-well plate에 분주하고 37°C CO₂ 배양기에서 12시간 배양하였다.
- [114] 준비된 정상세포주 plate와 암세포주 plate 각각에 철 이온이 결합된 아포트랜스페린(트랜스페린) 수용액을 0, 0.04, 0.2, 1 또는 5mg/ml이 되도록 첨가한 후 37°C CO₂ 배양기에서 4시간 배양하였다. 트랜스페린과 세포 배양을 완료한 plate를 DMEM 배지로 세척하여 세포 내로 유입되지 않은 트랜스페린을 제거하였다. 다음으로 각 plate를 고주파온열암치료기(EHY-2000, Oncothermia)에서 100W의 energy dose로 3분간 노출시킨 후 온도 변화를 열화상카메라(E60, 한국렌탈, 한국)로 측정하고, 그 결과를 도 5~8에 나타내었다.
- [115] 도 5~8에 도시된 바와 같이, 정상세포주에서 전자기파 처리 전후의 온도변화는 모든 처리 농도에서 7°C 내외로 유지된 반면, 암세포주의 경우 전자기파 처리 전후의 온도변화는 1mg/ml에서 11.9°C 상승하고, 5mg/ml에서는 12.6°C 상승한 것을 확인할 수 있었다.
- [116] 즉, 도 5~8로부터 트랜스페린을 투여한 후, 전자기파를 처리할 경우 트랜스페린의 농도에 따른 온도 상승이 정상세포주보다 암세포주에 더 선택적임을 확인할 수 있었다.
- [117]

- [118] 실험 예 5: 금속이온의 *in vivo* 암조직 축적 평가
- [119] 금속이온을 투여시 실제로 암조직에 축적되는지를 *in vivo* 동물실험으로 평가하기 위해 먼저 암 이식(tumor xenograft) 동물모델을 다음과 같이 제작하였다. 폐암 세포주 NCI-H460-luc2(Califer Life Sciences)을 배양한 후, 5×10^6 의 세포를 6~8주령의 암컷 BALB/c 무흉선 누드 마우스(athymic nude mouse)(다물사이언스)의 피하에 주사한 다음, 10일 정도 키우면서 암 조직이 100mm^3 이상 자라도록 하여 암 이식(tumor xenograft) 동물모델을 제작하였다.
- [120] 확립된 tumor xenograft BALB/c 무흉선 누드 마우스에 실험 예 1에서 제조된 magnesium sucrose, iron sucrose, iron dextran 금속이온 수용액을 0.2mg/ml 농도로 희석한 후 1mg/kg 용량이 되도록 0.1ml 정맥 주사하였다. 24시간 경과 후 ICP-MS 측정을 위해서 각 조직을 1g 떼어내어 얼음 수조에서 조직 분쇄기로 갈은 후 분쇄액 1ml 을 -60°C , $7\mu\text{mHg}$ 진공 상태로 24시간동안 건조시켰다. 건조된 분말에 2ml 의 6N HCl 을 첨가한 후 밀폐된 유리반응기 안에 넣고 55°C 배양기에서 배양시켰다. 12시간 이상 경과한 후 각 시료를 vortex하고, $1,000\text{rpm}$ 으로 15분간 원심분리 시켜, 상층액을 질소 가스로 건조시키고, 다시 0.01N HCl 1ml 을 넣고 vortex한 후 $1,000\text{rpm}$ 으로 15분간 원심분리하였다. 상층액을 회수한 후 정상 조직과 암 조직에서의 금속이온의 농도를 Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS; Varian 800-MS, Palo Alto, US)로 측정하였다.

- [121] 표 3는 magnesium sucrose를 암이 유도된 마우스(Tumor xenograft mouse)에 투여한 후, 정상 조직과 암 조직 부위에 축적된 금속이온의 농도를 ICP-MS로 측정한 결과이다.

[122] 표 3

[Table 3]

	Saline	Mg-Sucrose	Fold increase
Tumor	58.5 ± 24.8	137.7 ± 74.1	2.4
Liver	195.4 ± 12.6	145.1 ± 98.5	0.7
Muscle	193.5 ± 7.9	378.4 ± 212.3	2.0
Spleen	200.5 ± 2.1	419.2 ± 115.2	2.1
Brain	126.8 ± 8.7	113.9 ± 11.6	0.9

- [123] 표 3에 나타낸 바와 같이, magnesium sucrose 투여시 암 조직의 magnesium ion 농도가 2.4배 이상 증가하였다.

[124]

- [125] 표 4는 iron sucrose을 암이 유도된 마우스(Tumor xenograft mouse)에 투여한 후, 정상 조직과 암 조직 부위에 축적된 금속이온의 농도를 ICP-MS로 측정한 결과이다.

[126] 표 4

[Table 4]

	Saline	Fe-Sucrose	Fold increase
Tumor	13.5±1.34	44.4±3.9	3.29
Liver	74.5±7.5	168.2±37.3	2.26
Kidney	56.9±7.5	59.8±4.1	1.05
Heart	32.2±1.8	99.2±2.8	3.08
Muscle	29.5±4.2	28.9±22.1	0.98
Stomach	27.8±3.8	83.1±27.7	2.99
Brain	22.5±3.7	46.2±8.6	2.05

[127] 표 4에 나타낸 바와 같이, iron sucrose 투여시 암 조직의 iron ion 농도가 3.3배 이상 증가하였으며, 이는 간, 신장, 심장, 위, 뇌 등 주요 장기보다 높았다.

[128]

[129] 표 5는 iron dextran을 암이 유도된 마우스(Tumor xenograft mouse)에 투여한 후, 정상 조직과 암 조직 부위에 축적된 금속이온의 농도를 ICP-MS로 측정한 결과이다.

[130] 표 5

[Table 5]

	Saline	Fe-Dextran	Fold increase
Tumor	13.5±1.34	46.8±6.6	3.47
Liver	74.5±7.5	115.5±17.3	1.55
Kidney	56.9±7.5	59.8±15.6	1.05
Heart	32.2±1.8	92.1±5.8	2.86
Muscle	29.5±4.2	65.7±30.4	2.23
Stomach	27.8±3.8	54.1±12.8	1.95
Brain	22.5±3.7	36.4±3.4	1.62

[131] 표 5에 나타낸 바와 같이, iron dextran 투여시 암 조직의 철 이온의 농도가 대조군에 비해 3.4배 이상 증가하였으며, 이는 간, 신장, 심장, 위, 뇌 등 주요 장기에서의 증가율보다 현저히 높았다.

[132]

[133] 실험 예 6: 금속이온이 비공유 결합된 아포트랜스페린의 *in vivo* 암조직 축적능 평가

[134] "금속이온이 비공유 결합된 아포트랜스페린"(트랜스페린)의 암 조직 축적능을 평가하기 위하여 철이 결합되어 있는 트랜스페린 수용액을 쥐에 투여한 후 정상

조직과 암 조직에서의 금속이온의 농도를 측정하였다. 철 이온이 결합된 아포트랜스페린(트랜스페린) 수용액을 4mg/ml로 준비한 후 16mg/kg 용량으로 0.1ml 정맥 주사하였다. 24시간 경과 후 실험에 5와 동일한 방법으로 각 조직을 채취하여 금속이온의 농도를 Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS; Varian 800-MS, Palo Alto, US)로 측정하였다.

[135] 표 6은 "철 이온이 결합된 아포트랜스페린"(트랜스페린)을 암이 유도된 마우스(Tumor xenograft mouse)에 투여한 후, 정상조직과 암조직 부위에 측정된 철 이온의 농도를 ICP-MS로 측정한 결과이다.

[136] 표 6

[Table 6]

	Saline	Transferrin	Fold increase
Tumor	13.5±1.34	43.9±9.7	3.25
Liver	74.5±7.5	94.7±8.1	1.27
Lung	28.3±6.1	43.9±17.9	1.55
Kidney	56.9±7.5	41.2±1.7	0.72
Heart	32.2±1.8	70.1±12.3	2.18
Muscle	29.5±4.2	25.7±5.2	0.87
Stomach	27.8±3.8	46.4±14.9	1.67
Brain	22.5±3.7	28.4±3.5	1.26

[137] 표 6에 나타낸 바와 같이, 철 이온이 결합된 아포트랜스페린(트랜스페린) 투여시 암조직의 철 이온의 농도가 대조군에 비해 3.2배 이상 증가하였으며 이는 간, 신장, 심장, 위, 뇌 등 주요 장기에서의 증가율보다 현저히 높았다.

[138]

[139] 실시예 1: 온열치료용 감작제의 투여 및 전자기파를 이용한 암 온열치료

[140] 암세포는 비정상적인 분열을 계속하기 위해 급속한 세포분열에 필요한 영양성분들을 급격히 받아들이는 대신 대사 조절능이 떨어진다. 실제 암세포는 트랜스페린 수용체를 과발현시켜 세포분열에 필요한 철을 많이 받아들이지만, 열 조절능이 떨어져 정상 세포에 비해 고열에 상대적으로 민감한 것으로 알려져 있다. 따라서 암세포에만 집중적으로 열을 가하면 암세포의 선택적 사멸이 가능하다. 암세포에 대한 표적지향성을 가지는 트랜스페린은 암 세포에 과발현된 트랜스페린 수용체를 통해 암세포에 철을 집중적으로 전달하는데 이때 암세포에 전자기파를 처리시 온도 상승에 의한 암세포 사멸이 가능할 것으로 예측되었다.

[141] 본 실시예 1에서는, 실험예에서 우수한 온도 상승능이 확인된 금속이온 결합물을 온열치료용 감작제로 사용하여 암 이식(tumor xenograft) 동물모델의

온열치료시 항암 효능 가능성을 확인하였다.

- [142] 이를 위해 폐암 세포주 NCI-H460-luc2(Califer Life Sciences)을 배양한 후, 5×10^6 의 세포를 6~8주령의 암컷 BALB/c 무흉선 누드 마우스(athymic nude mouse)(다물사이언스)의 피하에 주사한 다음, 10일 정도 키우면서 암 조직이 100mm^3 이상 자라도록 하여 암의 치료 효능을 연구하기 위한 암 이식(tumor xenograft) 동물모델을 제작하였다.
- [143] 다음으로 온열치료용 감작제 조성물인 iron sucrose을 실험 예 1의 방법으로 준비한 후 확립된 tumor xenograft 마우스에 1mg/kg 용량이 되도록 0.2mg/ml 농도의 iron sucrose 수용액을 0.1ml 정맥 주사하였다.
- [144] 또한 온열치료용 감작제 조성물인 "철 이온이 결합된 아포트랜스페린"(트랜스페린)을 실험 예 3의 방법으로 준비한 후 확립된 tumor xenograft 마우스에 20mg/kg 용량이 되도록 5 mg/ml 농도의 transferrin 수용액을 0.1ml 정맥 주사하였다.
- [145] 대조군에는 생리식염수를 투여하였다. 투여하고 4시간 경과 후, 고주파온열암치료기(EHY-2000, Oncothermia)에서 100W 의 energy dose로 3분간 조사한 다음 정상 조직과 암 조직의 온도를 열화상카메라(E60, 한국렌탈, 한국)로 촬영하고, 그 결과를 도 9~11에 나타내었다.
- [146] 도 9~11에 도시된 바와 같이, 대조군의 경우 전자기파 처리 전후 정상조직과 암조직에서의 온도가 모두 1°C 정도 상승한 수준으로 차이가 없었다. 그러나, iron sucrose 투여군의 경우 전자기파 처리 전후의 온도변화가 정상조직은 1°C , 암조직은 1.9°C 로 차이가 있었으며, 철 이온이 결합된 아포트랜스페린(트랜스페린) 투여군의 경우 역시 전자기파 처리 전후의 온도변화가 정상조직은 1°C , 암조직은 2°C 로 차이가 있었다. 즉 도 9~11로부터 온열치료용 감작제를 투여한 쥐의 암 조직에 전자기파를 처리할 경우 암 조직에 전달된 철 이온의 발열에 따라 정상조직보다 암조직에서 온도 상승이 증가함을 확인할 수 있었다.
- [147] 다음으로, 상기 금속이온 결합물을 온열치료용 감작제로 이용하여 온열치료시 암 치료 가능성을 확인하였다. 폐암 세포주 NCI-H460-luc2 (Califer Life Sciences)을 배양한 후, 5×10^6 의 세포를 6~8주령의 암컷 BALB/c 무흉선 누드 마우스(athymic nude mouse)(다물사이언스)의 피하에 주사한 다음, 10일 정도 키우면서 암 조직이 100mm^3 이상 자라도록 하여 암의 치료 효능을 연구하기 위한 암 이식(tumor xenograft) 동물모델을 제작하였다.
- [148] 다음으로 온열치료용 감작제 조성물인 금속이온 결합물을 실험 예 1의 방법으로 준비한 후 확립된 tumor xenograft 마우스에 금속이온 단당류 결합물(iron gluconate), 금속이온 이당류 결합물(iron sucrose), 금속이온 올리고당 결합물(iron isomaltoside), 금속이온 다당류 결합물(iron carboxymaltose, iron dextran, iron starch)을 1mg/kg 용량이 되도록 0.1ml 정맥 주사하였다.
- [149] 또한 온열치료용 감작제 조성물인 철 이온이 결합된

아포트랜스페린(트랜스페린)을 실험에 3의 방법으로 준비한 후 확립된 tumor xenograft 마우스에 20mg/kg 용량이 되도록 0.1ml 정맥 주사하였다.

- [150] 4시간 경과 후 고주파온열암치료기(EHY-2000, Oncothermia)에서 100W의 energy dose로 10분간 온열치료하는 과정을 주 3회 4주간 진행하였다. 이때, 무처리군과 생리식염수 처리군을 대조군으로 진행하였다. 마지막 주에 암 조직 크기를 분석하기 위해서는 바이오형광 이미징(bioluminescence imaging)를 수행하였다. 루시페라아제(luciferase) 발현 암 세포주인 NCI-H460-luc2를 발광시키기 위해 D-luciferin(Xenogen, USA)을 150mg luciferin/kg/d의 농도로 쥐에 복강주사하고, 이소플루레인 가스(isoflurane gas)와 산소를 혼합해 흡입마취시킨 후, Xenogen imager(IVIS 200)로 발광된 암세포를 중첩 촬영하고, Igor Pro imaging analysis software를 이용해 분석하고, 그 결과를 도 12에 나타내었다.
- [151] 도 12는 본 발명의 실시예 1에 따라 암이 유도된 마우스(Tumor xenograft mouse model animal)에 무처리 (A), 생리식염수 (B), iron gluconate (C), iron sucrose (D), iron carboxymaltose (E), iron dextran (F), iron starch (G) 및 transferrin (H)을 투여하고 고주파 온열치료 후 마우스 모델의 암조직 크기를 바이오형광으로 분석한 결과이다.
- [152] 도 12에 도시된 바와 같이, 무처리군(A) 및 생리식염수 처리군(B)과는 달리 금속이온 결합물 투여군(C~H)의 경우 온열치료 후 암의 크기가 분명히 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 특히 iron sucrose (D), iron dextran (F) 및 transferrin (H) 처리군에서는 온열치료를 통한 암 치료 효과가 가장 우수하였다.
- [153]
- [154] 끝으로, 온열치료 감작제로 사용시 항암 효과가 가장 우수한 것으로 확인된 iron sucrose, iron dextran 및 transferrin을 온열치료용 감작제로 사용하여 전자기파를 이용한 온열치료시 암의 완치 가능성 여부를 확인하였다. 이를 위해 tumor xenograft BALB/c 무흉선 누드 마우스에 생리식염수, iron dextran, iron sucrose, 및 철 이온이 결합된 아포트랜스페린(transferrin) 수용액을 격일로 주 3회 정맥 주사하고 4시간 경과 후 고주파온열암치료기(EHY-2000, Oncothermia)에서 100W의 energy dose로 30분 이상 온열치료하는 과정을 4주간 진행하면서 1주일 간격으로 암 조직의 크기를 모니터링하였다. iron dextran과 iron sucrose 투여군에는 각각 0.2mg/ml 농도의 iron dextran 또는 iron sucrose 수용액을 0.1ml 정맥 주사하였고, transferrin 투여군에는 5mg/ml 농도의 transferrin 수용액을 0.1ml 정맥 주사하였다. 이때, 무처리군과 생리식염수 투여군을 대조군으로 진행하였다.
- [155] 암 조직 크기를 분석하기 위해서는 바이오형광 이미징(bioluminescence imaging)를 1주 간격으로 수행하고, Igor Pro imaging analysis software를 이용해 분석한 다음, 그 결과를 도 13에 나타내었다.
- [156] 도 13에 도시된 바와 같이, 최초 암 조직의 크기와 4주 후 암 조직의 크기를 바이오형광 이미지로 비교한 결과, 무처리 대조군에 비해 생리식염수 처리군의

경우 초기에는 다소 암의 성장을 저해하는 듯 보였으나 시간이 경과하면서 효능이 감소하였다. iron dextran을 감작제로 투여한 실험군과 iron sucrose를 감작제로 투여한 실험군의 경우 전자기파를 이용한 온열치료시 암의 성장 속도가 분명히 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 트랜스페린 투여군의 경우에는 뚜렷하게 암의 성장을 억제하고 크기를 감소시키다가 시험 종료 시점인 4주 후에는 완전히 사라지는 놀라운 항암 효능을 확인할 수 있었다.

[157]

[158] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[159]

산업상 이용가능성

[160] 본 발명에 따른 암 온열치료용 감작제 조성물을 이용하면 암세포만 선택적으로 금속성분을 축적시킬 수 있어, 고통과 부작용이 없으면서도 암 치료 효능이 현저히 향상된 가장 이상적인 항암 치료법이 될 수 있어, 항암 치료에 널리 이용될 것으로 기대되며, 화학 요법, 방사선 요법 등 다른 암 치료방법과도 병용 가능하므로, 암의 완치 가능성을 높일 수 있다.

[161]

청구범위

[청구항 1]

전자기파를 이용한 암 온열치료용 감작제 조성물.

[청구항 2]

제1항에 있어서, 상기 감작제는 금속이온, 금속이온 결합물, 금속이온이 비공유 결합된 아포트랜스페린 및 금속이온이 비공유 결합된 아포트랜스페린 유도체로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 전자기파를 이용한 암 온열치료용 감작제 조성물.

[청구항 3]

제2항에 있어서, 상기 금속이온은 철(iron) 이온, 망간(manganese) 이온, 아연(zinc) 이온, 구리(copper) 이온, 마그네슘(magnesium) 이온, 비스무트(bismuth) 이온, 루테늄(ruthenium) 이온, 티타늄(titanium) 이온, 갈륨(gallium) 이온, 인듐(indium) 이온, 바나딜(vanadyl) 이온, 크로미움(chromium) 이온, 알루미늄(aluminum) 이온 및 플루토늄(plutonium) 이온으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 암 온열치료용 감작제 조성물.

[청구항 4]

제2항에 있어서, 상기 금속이온 결합물은 금속이온에 텍스트란(dextran), 수크로즈(sucrose), 글루코네이트(gluconate), 소르비톨(sorbitol), 폴리사카라이드(polysaccharide), 카복시말토스(carboxymaltose), 페루목시톨(ferumoxytol), 이소말토사이드(isomaltoside), 시트레이트(citrate), 클로라이드(chloride), 설페이트(sulfate), 푸마레이트(fumurate), 말토스(maltose), 전분(starch), 셀룰로오스(cellulose) 및 알부민(albumin)을 포함하는 군으로부터 선택되는 결합물이 비공유 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 암 온열치료용 감작제 조성물.

[청구항 5]

제2항에 있어서, 상기 아포트랜스페린 또는 아포트랜스페린 유도체는 인간 또는 포유동물 유래 혈청 단백질이거나 재조합 단백질인 것을 특징으로 하는 암 온열치료용 감작제 조성물.

[청구항 6]

제1항에 있어서, 상기 감작제는 0.01~100mg/ml 농도인 것을 특징으로 하는 암 온열치료용 감작제 조성물.

[청구항 7]

제1항에 있어서, 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 암 온열치료용 감작제 조성물.

[청구항 8]

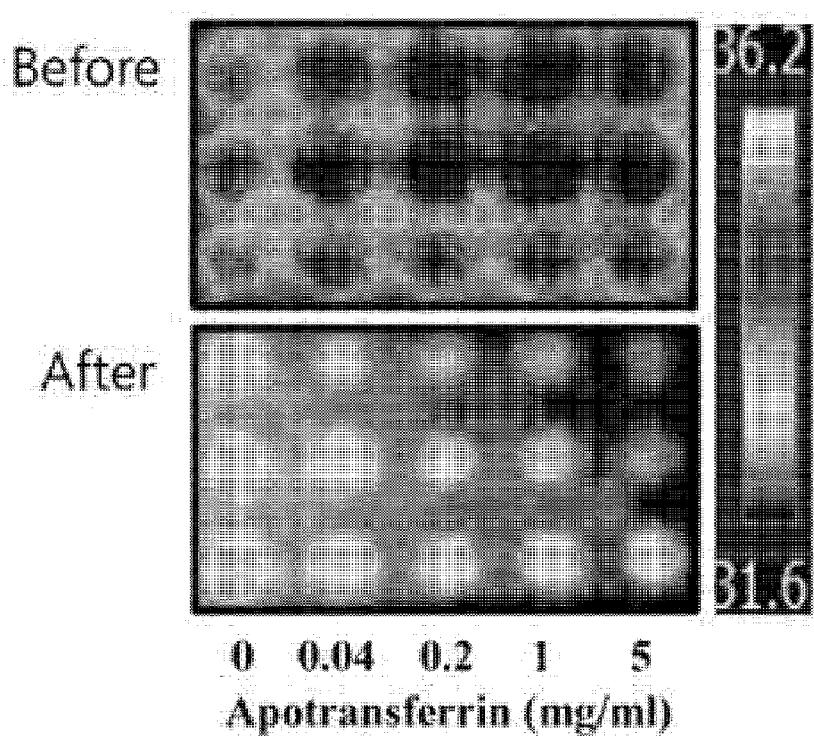
제1항의 전자기파를 이용한 암 온열치료용 감작제 조성물 및 전자기파를 조사하는 장치를 포함하는 암 온열치료용 키트.

[청구항 9]

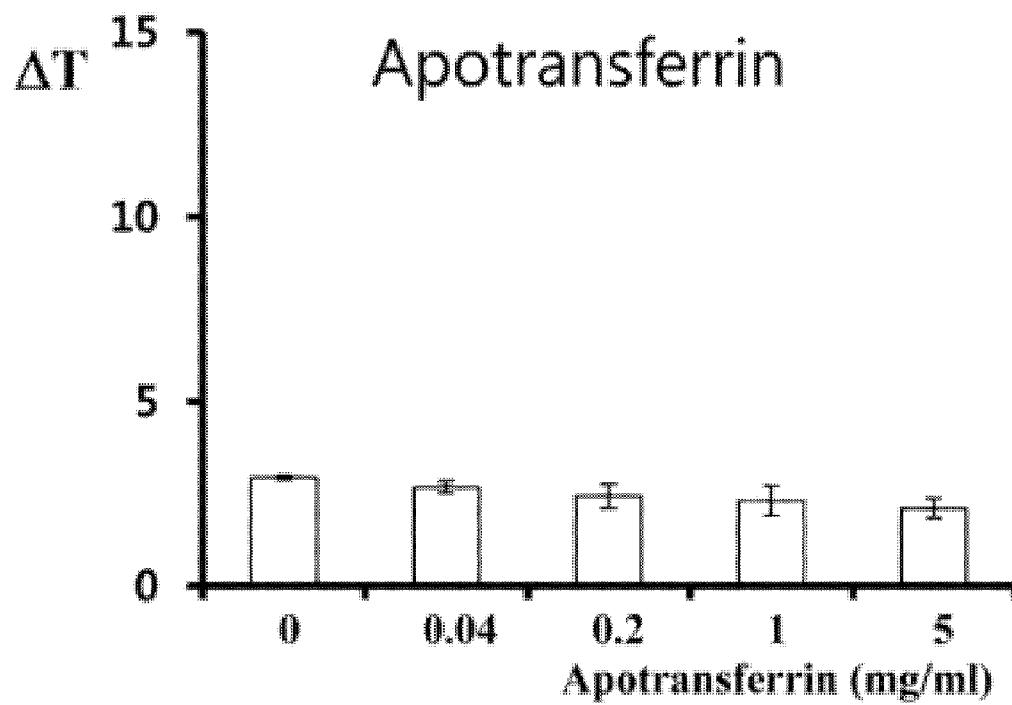
(a) 인간을 제외한 동물에 제1항의 암 온열치료용 감작제 조성물을 투여하여 암 치료에 대한 감수성을 증가시키는 단계; 및
 (b) 전자기파를 처리하는 단계를 포함하는 암 치료방법.

- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 암 온열치료용 감작제 조성물이 금속이온 또는 금속이온 결합물인 경우에는 0.1~50mg/kg 용량으로, 금속이온이 비공유 결합된 아포트랜스페린 또는 그 유도체인 경우에는 0.1~200mg/kg 용량으로 투여하는 것을 특징으로 하는 암 치료방법.
- [청구항 11] 제9항에 있어서, 상기 전자기파는 감마선, X-선, 자외선, 가시광선, 적외선, 마이크로웨이브 및 라디오 전파로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 암 치료방법.
- [청구항 12] 제9항에 있어서, 화학 치료(chemotherapy), 방사선 치료(radiation therapy), 생물학적 치료(biological therapy), 면역치료(immunotherapy) 및 광역동 치료(photodynamic therapy)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 치료방법을 병행하는 것을 특징으로 하는 암 치료방법.

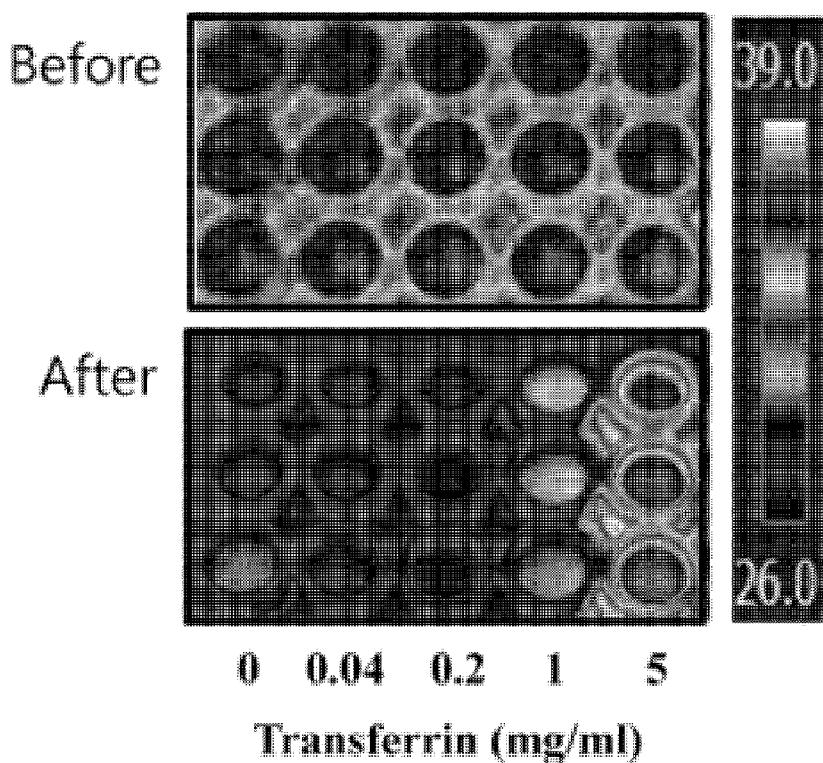
[Fig. 1]



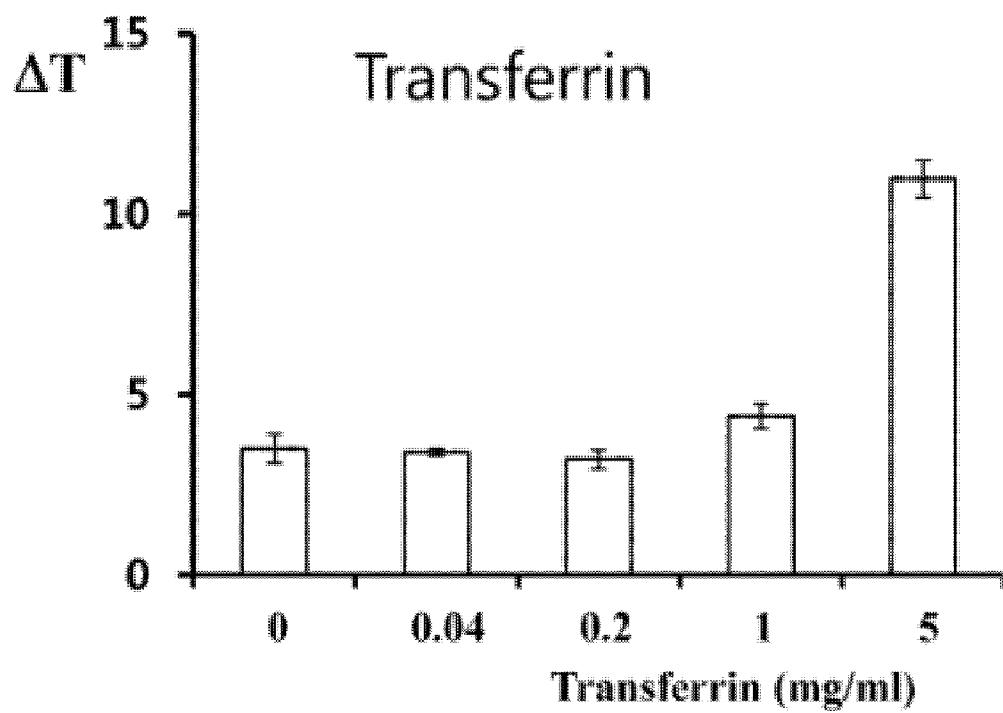
[Fig. 2]



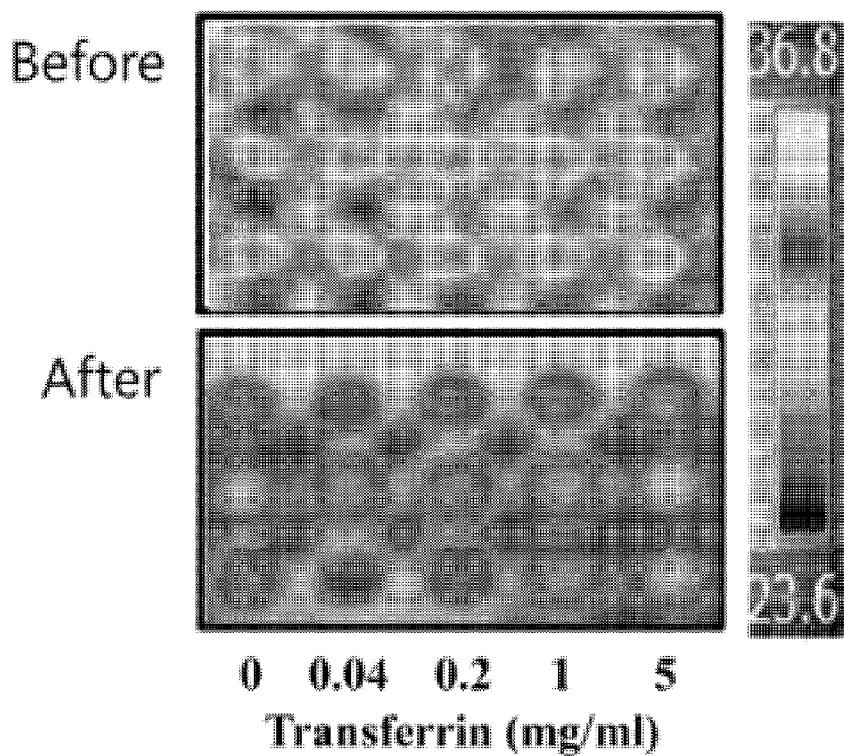
[Fig. 3]



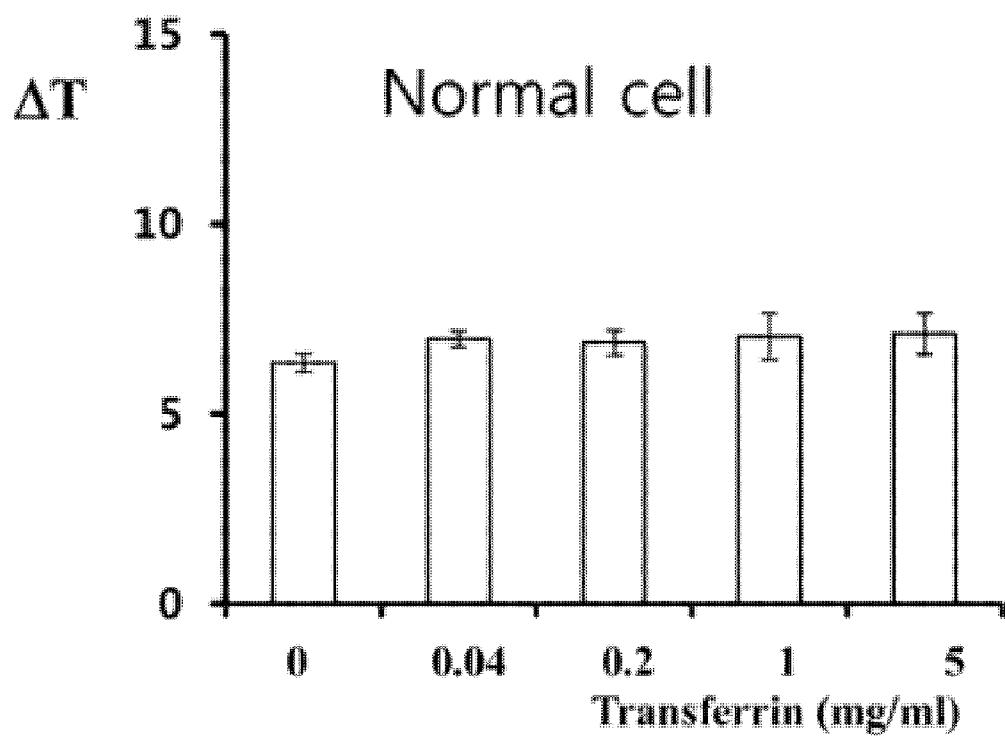
[Fig. 4]



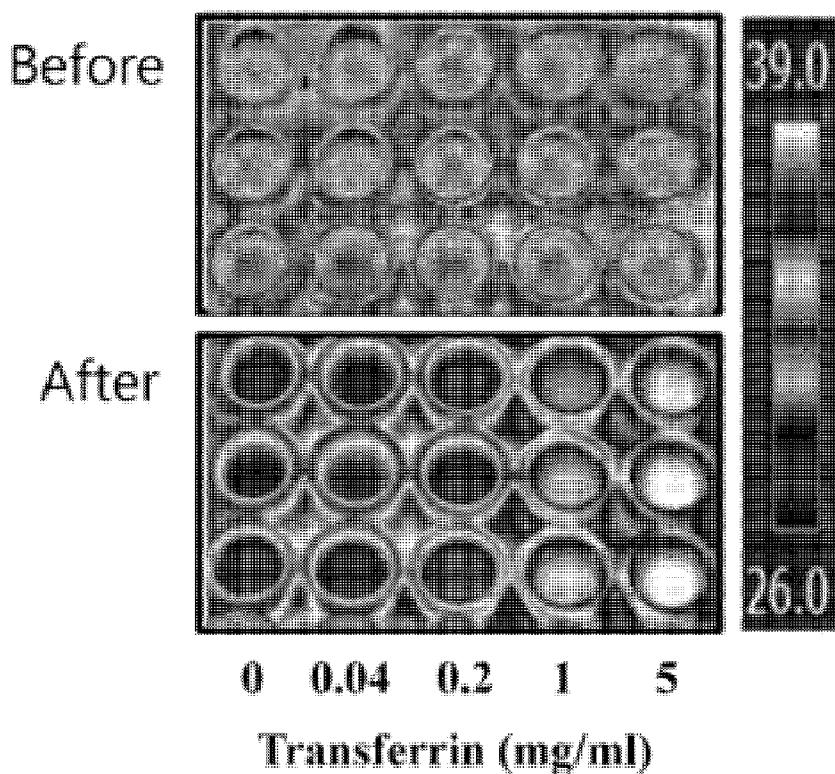
[Fig. 5]



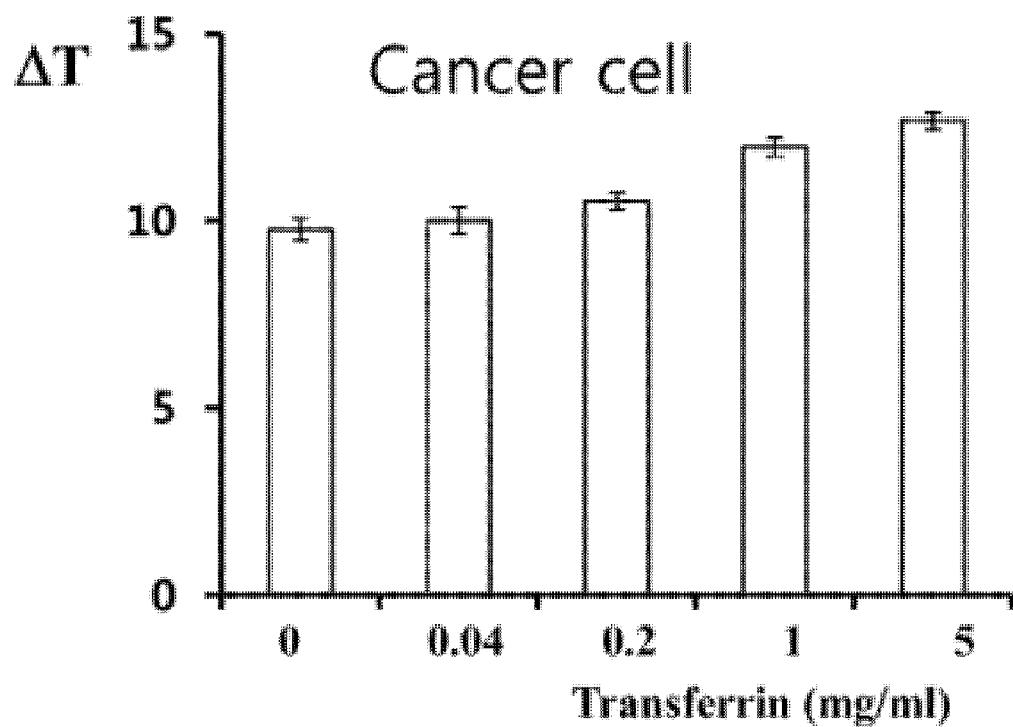
[Fig. 6]



[Fig. 7]

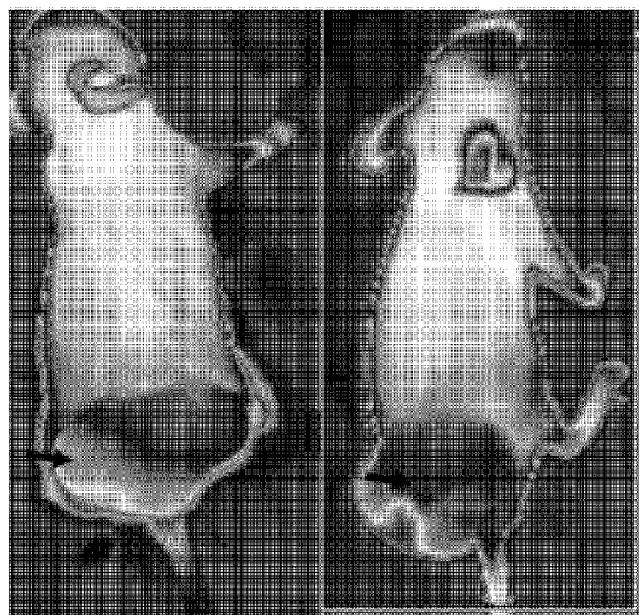
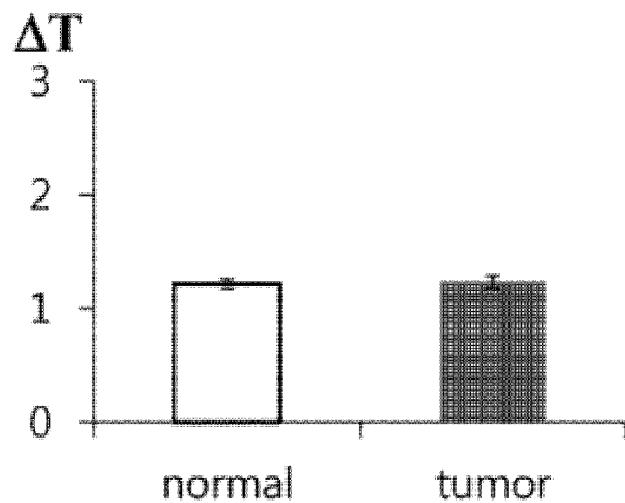


[Fig. 8]



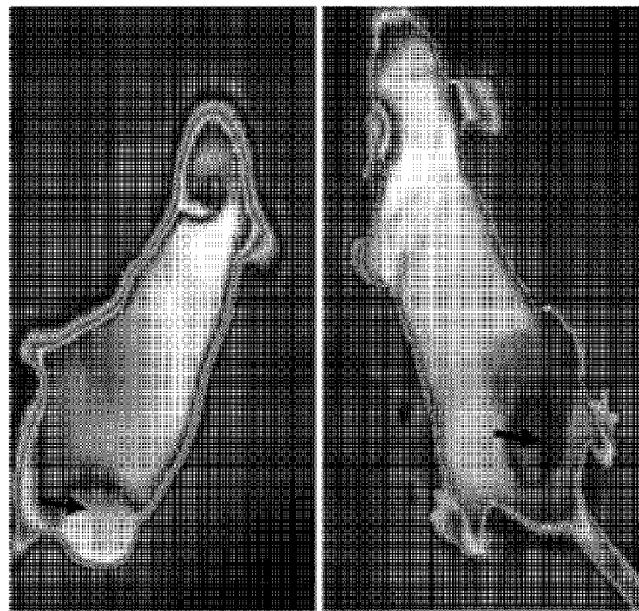
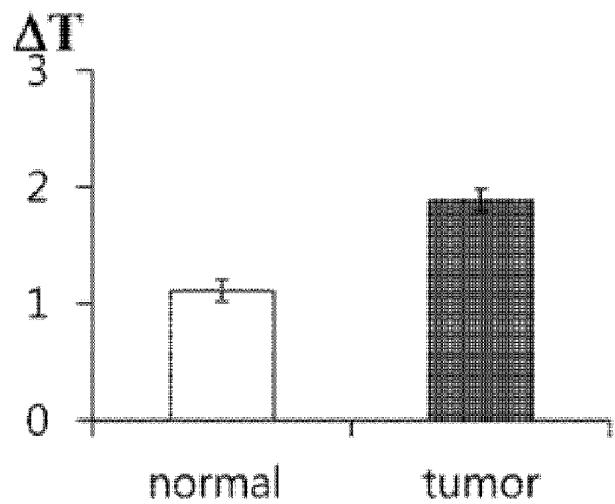
[Fig. 9]

(A) Control



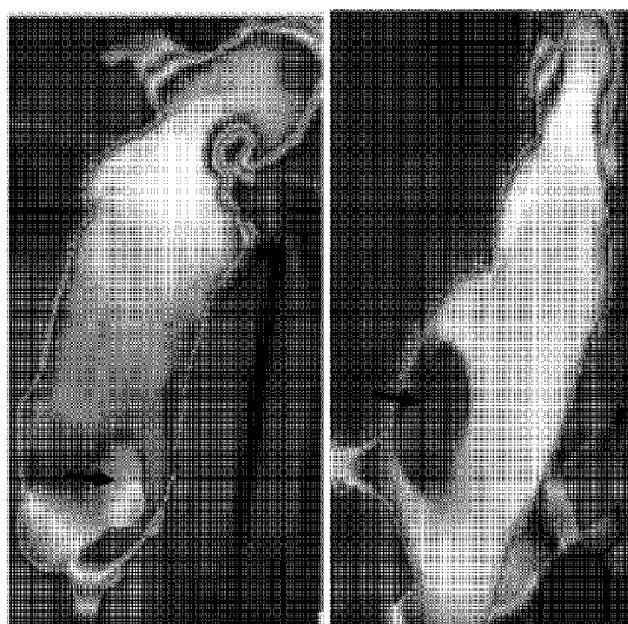
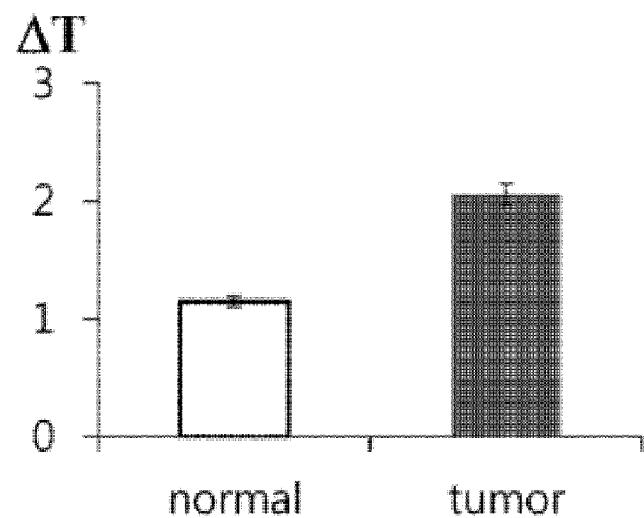
[Fig. 10]

(B) Iron sucrose

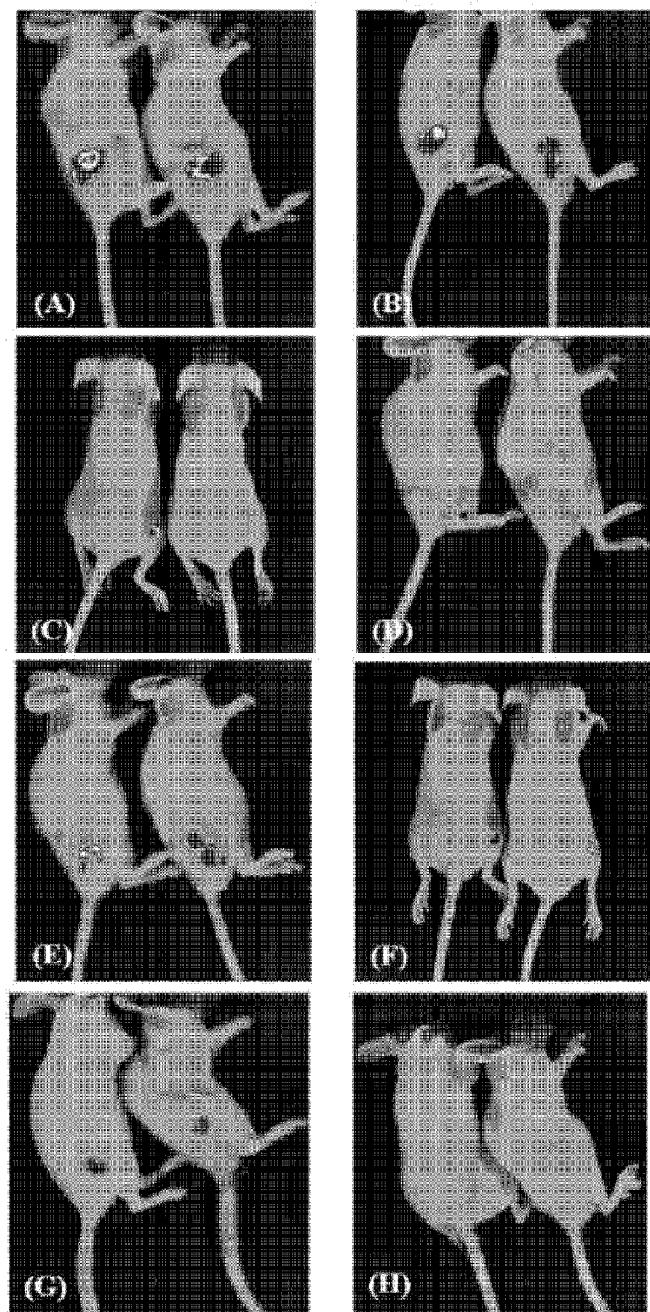


[Fig. 11]

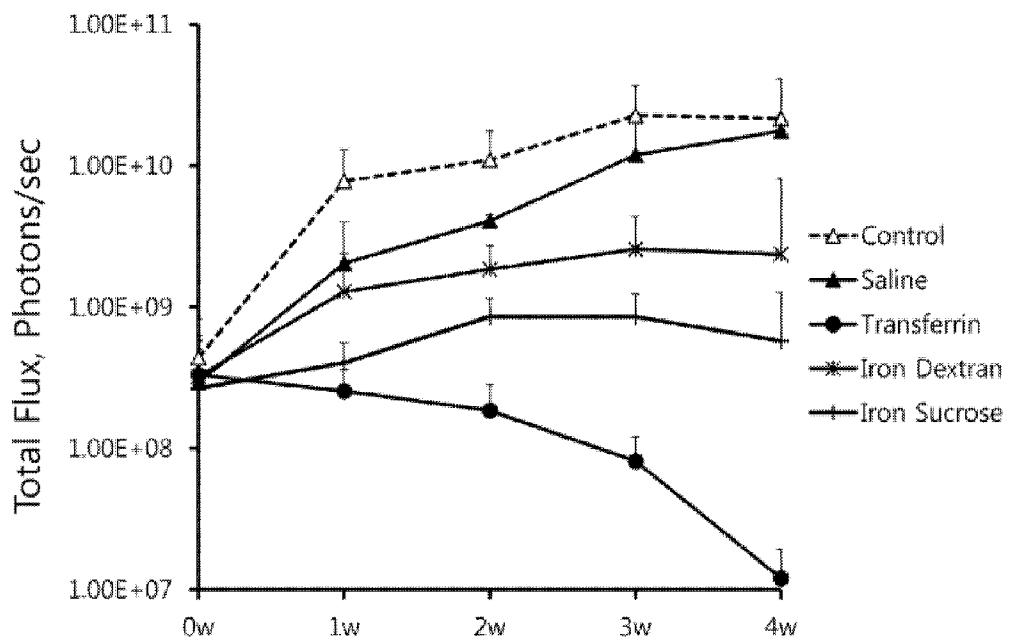
(C) Transferrin



[Fig. 12]



[Fig. 13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/009641

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/40(2006.01)i, A61K 33/26(2006.01)i, A61K 33/32(2006.01)i, A61K 47/40(2006.01)i, A61K 47/30(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 38/40; A61K 39/05; C07K 14/79; A61N 5/10; A61B 18/04; A61B 5/055; A61P 35/00; A61N 2/00; A61K 31/197; A61B 18/18; A61K 33/26; A61K 33/32; A61K 47/40; A61K 47/30

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: cancer thermotherapy, sensitizer, electromagnetic wave, transferrin, apotransferrin, anticancer drug, metal, iron ion

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2013-0197295 A1 (KRISHNAN, S. et al.) 01 August 2013 See abstract, claim 1 etc.	1-12
Y	US 2009-0181048 A1 (KAMEI, D. T. et al.) 16 July 2009 See figure 1 etc.	1-12
A	KR 10-2013-0079492 A (TOKYO UNIVERSITY OF AGRICULTURE EDUCATIONAL CORPORATION et al.) 10 July 2013 See background art etc.	1-12
A	WO 2012-177875 A1 (LOCKHEED MARTIN CORPORATION et al.) 27 December 2012 See abstract etc.	1-12
A	WO 2012-036978 A1 (TRUSTEES OF DARTMOUTH COLLEGE et al.) 22 March 2012 See abstract, figure 8B, paragraph [003] etc.	1-12
A	WO 2009-013630 A2 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS et al.) 29 January 2009 See abstract, claim 1 etc.	1-12



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
- "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

26 JANUARY 2015 (26.01.2015)

Date of mailing of the international search report

27 JANUARY 2015 (27.01.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/009641

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2013-0197295 A1	01/08/2013	EP 2242539 A2 EP 2242539 A4 US 2011-052672 A1 WO 2009-091597 A2 WO 2009-091597 A3	27/10/2010 31/08/2011 03/03/2011 23/07/2009 30/12/2009
US 2009-0181048 A1	16/07/2009	WO 2009-149393 A2 WO 2009-149393 A3	10/12/2009 21/01/2010
KR 10-2013-0079492 A	10/07/2013	CN 103096884 A EP 2617416 A1 JP 05-522421 B2 WO 2012-035747 A1	08/05/2013 24/07/2013 18/06/2014 22/03/2012
WO 2012-177875 A1	27/12/2012	WO 2013-019883 A2 WO 2013-019883 A3	07/02/2013 04/04/2013
WO 2012-036978 A1	22/03/2012	US 2010-0047180 A1 US 2011-0104073 A1 WO 2008-140831 A2 WO 2008-140831 A3	25/02/2010 05/05/2011 20/11/2008 31/12/2008
WO 2009-013630 A2	29/01/2009	AU 2008-278713 A1 AU 2008-278713 B2 CA 2694512 A1 CA 2694512 C EP 2192953 A2 EP 2192953 B1 ES 2320837 A1 ES 2320837 B1 ES 2392006 T3 JP 05-465174 B2 JP 2010-534499 A US 2011-0034974 A1 US 8463397 B2 WO 2009-013630 A3	29/01/2009 13/06/2013 29/01/2009 16/09/2014 09/06/2010 19/09/2012 28/05/2009 04/03/2010 03/12/2012 09/04/2014 11/11/2010 10/02/2011 11/06/2013 22/05/2009

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 38/40(2006.01)i, A61K 33/26(2006.01)i, A61K 33/32(2006.01)i, A61K 47/40(2006.01)i, A61K 47/30(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 38/40; A61K 39/05; C07K 14/79; A61N 5/10; A61B 18/04; A61B 5/055; A61P 35/00; A61N 2/00; A61K 31/197; A61B 18/18; A61K 33/26; A61K 33/32; A61K 47/40; A61K 47/30

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: 암 온열치료법, 침작제, 전자기파, 트랜스페린, 아포트랜스페린, 항암제, 금속, 철 이온

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	US 2013-0197295 A1 (KRISHNAN, S. 외 3명) 2013.08.01. 초록, 청구항 1 등 참조	1-12
Y	US 2009-0181048 A1 (KAMEI, D. T. 외 5명) 2009.07.16. 그림 1 등 참조	1-12
A	KR 10-2013-0079492 A (학교법인 도쿄농업대학 외 1명) 2013.07.10. 배경기술 등 참조	1-12
A	WO 2012-177875 A1 (LOCKHEED MARTIN CORPORATION 외 2명) 2012.12.27. 초록 등 참조	1-12
A	WO 2012-036978 A1 (TRUSTEES OF DARTMOUTH COLLEGE 외 2명) 2012.03.22. 초록, 그림 8B, 식별번호 [003] 등 참조	1-12
A	WO 2009-013630 A2 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS 외 3명) 2009.01.29. 초록, 청구항 1 등 참조	1-12

 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

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2015년 01월 26일 (26.01.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 01월 27일 (27.01.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82 42 472 3473

심사관

조경주

전화번호 +82-42-481-3486



국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2014/009641

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2013-0197295 A1	2013/08/01	EP 2242539 A2 EP 2242539 A4 US 2011-052672 A1 WO 2009-091597 A2 WO 2009-091597 A3	2010/10/27 2011/08/31 2011/03/03 2009/07/23 2009/12/30
US 2009-0181048 A1	2009/07/16	WO 2009-149393 A2 WO 2009-149393 A3	2009/12/10 2010/01/21
KR 10-2013-0079492 A	2013/07/10	CN 103096884 A EP 2617416 A1 JP 05-522421 B2 WO 2012-035747 A1	2013/05/08 2013/07/24 2014/06/18 2012/03/22
WO 2012-177875 A1	2012/12/27	WO 2013-019883 A2 WO 2013-019883 A3	2013/02/07 2013/04/04
WO 2012-036978 A1	2012/03/22	US 2010-0047180 A1 US 2011-0104073 A1 WO 2008-140831 A2 WO 2008-140831 A3	2010/02/25 2011/05/05 2008/11/20 2008/12/31
WO 2009-013630 A2	2009/01/29	AU 2008-278713 A1 AU 2008-278713 B2 CA 2694512 A1 CA 2694512 C EP 2192953 A2 EP 2192953 B1 ES 2320837 A1 ES 2320837 B1 ES 2392006 T3 JP 05-465174 B2 JP 2010-534499 A US 2011-0034974 A1 US 8463397 B2 WO 2009-013630 A3	2009/01/29 2013/06/13 2009/01/29 2014/09/16 2010/06/09 2012/09/19 2009/05/28 2010/03/04 2012/12/03 2014/04/09 2010/11/11 2011/02/10 2013/06/11 2009/05/22