

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0043352 (43) 공개일자 2012년05월04일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) B82B 3/00 (2006.01) C01B 31/02 (2006.01) B01J 19/10 (2006.01) (21) 출원번호 10-2010-0104611 (22) 출원일자 2010년10월26일 심사청구일자 2010년10월26일		(71) 출원인 경상대학교산학협력단 경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동) (72) 발명자 강동우 경상남도 진주시 하대로 142, 102동 203호 (하대동, 현대아파트) 남태현 경상남도 진주시 평거동 191번지 들말홍한타운아파트 110동 405호 (뒷면에 계속) (74) 대리인 김순웅

전체 청구항 수 : 총 17 항

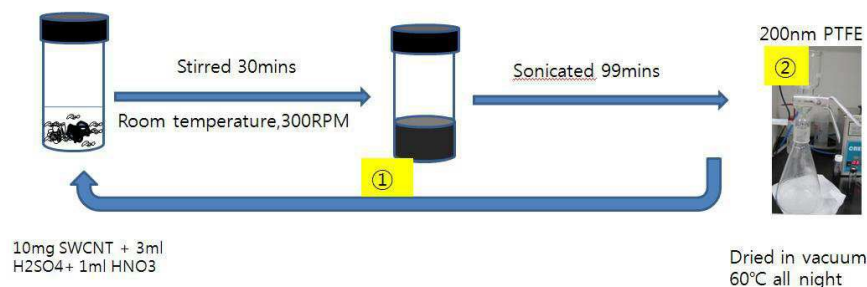
(54) 발명의 명칭 생체 내 면역독성 감소를 위한 고분산 탄소나노튜브의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 (i) 탄소나노튜브를 강산 용매에 혼입하여 산소를 함유하는 작용기를 상기 탄소나노튜브의 표면에 도입하는 단계; (ii) 상기 탄소나노튜브를 상기 용매 중에서 초음파 처리하는 단계; 및 (iii) 상기 (i) 단계 및 (ii) 단계를 연속하여 반복하는 단계를 포함하는, 분산성 탄소나노튜브의 제조방법에 관한 것이다.

대표도 - 도2

Method 2:



(72) 발명자

이소영

대구광역시 수성구 수성로75길 17-2, 103동 502호
(수성동1가, 수성해원드림빌)

왕문평

경상남도 진주시 진주대로 501, 402동 104호 (가좌
동, 경상대학교)

김상현

대구광역시 수성구 동원로 135, 503동 103호 (만촌
동, 메트로팰레스)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2010-0002178
부처명	교육과학기술부
연구사업명	미래유망파이오니아사업
연구과제명	인체이식 가능 융합형 나노 배터리
주관기관	경상대학교
연구기간	2010.04.01 ~ 2011.03.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2010-0016245
부처명	교육과학기술부
연구사업명	일반연구자 사업
연구과제명	나노 구조체를 이용한 인체 조직의 재생 및 면역반응
주관기관	경상대학교
연구기간	2010.05.01 ~ 2011.04.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2010-0003359
부처명	교육과학기술부
연구사업명	지역대학 우수과학자
연구과제명	나노 물질의 독성 및 염증반응
주관기관	경상대학교
연구기간	2010.05.01 ~ 2011.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

- (i) 탄소나노튜브를 강산 용매에 혼입하여 산소를 함유하는 작용기를 상기 탄소나노튜브의 표면에 도입하는 단계;
- (ii) 상기 탄소나노튜브를 상기 용매 중에서 초음파 처리하는 단계; 및
- (iii) 상기 (i) 단계 및 (ii) 단계를 연속하여 반복하는 단계를 포함하는, 분산성 탄소나노튜브의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 강산 용매는 황산, 질산 또는 이들의 혼합용액인 분산성 탄소나노튜브의 제조방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 (i) 단계는 탄소나노튜브를 황산과 질산의 비율이 3:1인 혼합 용액에서 실온에서 250 내지 320 RPM의 속도로 15분 내지 45분간 교반하는 단계를 포함하는 것인 분산성 탄소나노튜브의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 산소를 함유하는 작용기는 카르보닐기, 히드록시기 또는 카르복실기인 분산성 탄소나노튜브의 제조방법.

청구항 5

제4항에 있어서 상기 산소를 함유하는 작용기는 카르복실기인 분산성 탄소나노튜브의 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 (ii) 단계는 20 내지 25KHz 주파수 범위에서 80분 내지 120분 동안 초음파 처리를 하는 것을 특징으로 하는 분산성 탄소나노튜브의 제조방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 (iii) 단계는 상기 (i) 단계 및 (ii) 단계를 연속하여 1 내지 3회 반복하는 단계로 이루어지는 것인, 분산성 탄소나노튜브의 제조방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 탄소나노튜브는 단일벽 탄소나노튜브 또는 다중벽 탄소나노튜브인 분산성 탄소나노튜브의 제조방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 제조방법에 따라 제조된 분산성 탄소나노튜브.

청구항 10

- (i) 탄소나노튜브를 강산 용매에 혼입하여 산소를 함유하는 작용기를 상기 탄소나노튜브의 표면에 도입하는 단계;
- (ii) 상기 탄소나노튜브를 상기 용매 중에서 초음파 처리하는 단계; 및
- (iii) 상기 (i) 단계 및 (ii) 단계를 연속하여 반복하는 단계를 포함하는, 세포독성이 완화된 탄소나노튜브-약물 복합체의 제조방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 (i) 단계는 탄소나노튜브를 황산과 질산의 비율이 3:1인 혼합 용액에서 실온에서 250 내지 320 RPM의 속도로 15분 내지 45분간 교반하는 단계를 포함하는 것인 탄소나노튜브-약물 복합체의 제조방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 산소를 함유하는 작용기는 카르보닐기, 히드록시기 또는 카르복실기인 탄소나노튜브-약물 복합체의 제조방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 산소를 함유하는 작용기는 카르복실기인 탄소나노튜브-약물 복합체의 제조방법.

청구항 14

제10항에 있어서, 상기 (ii) 단계는 20 내지 25KHz 주파수 범위에서 80분 내지 120분 동안 초음파 처리를 하는 것을 특징으로 하는 탄소나노튜브-약물 복합체의 제조방법.

청구항 15

제10항에 있어서, 상기 (iii) 단계는 상기 (i) 단계 및 (ii) 단계를 연속하여 1 내지 3회 반복하는 단계로 이루어지는 것인, 탄소나노튜브-약물 복합체의 제조방법.

청구항 16

제10항에 있어서, 상기 탄소나노튜브는 단일벽 탄소나노튜브 또는 다중벽 탄소나노튜브인 탄소나노튜브-약물 복합체의 제조방법.

청구항 17

제10항 내지 제16항의 제조방법에 따라 제조된, 세포독성이 완화된 탄소나노튜브-약물 복합체.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 분산성이 우수한 탄소나노튜브를 제조하는 방법 및 상기 탄소나노튜브의 분산도 조절에 의해 면역독성을 억제하는 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 산 작용기를 탄소나노튜브의 표면에 도입하고 초음파 처리를 한 후 상기 과정을 반복하여 분산성이 우수한 탄소나노튜브를 제조하는 방법 및 상기 탄소나노튜브의 분산도 조절에 의해 면역독성을 억제하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 일반적으로, 탄소나노튜브는 흑연면(graphite sheet)이 나노 크기의 직경으로 둥글게 말려 관 모양을 이루고 있으며 관의 지름이 수~ 수십 나노미터 수준으로 극히 작은 영역의 물질이다. 이와 같은 탄소나노튜브가 우수한 기계적 강도, 전기 전도도 및 열전도도, 뛰어난 전계 방출 특성, 고효율의 수소 저장매체 특성 등을 지니는 신소재로 알려지면서, 이들 특성을 이용하여 고성능 첨단 신소재를 제조하기 위한 노력이 활발하다.

[0003] 그러나 상기와 같은 탄소나노튜브의 뛰어난 특성에도 불구하고 열화학 기상증착법이나 아크방전법을 이용한 탄소나노튜브 합성과정에서 탄소나노튜브 간에 발생하는 응집현상은 기계적 강도와 전도특성을 향상시킬 수 있는 3차원적 네트워크 구조형성을 방해하는 등 탄소나노튜브의 응용분야를 제한하는 요소이다. 따라서, 전자정보통신, 환경, 에너지 및 의약 분야 등 다양한 분야에서 응용을 가속화하기 위해서는 상기 응집현상을 개선할 수 있는 우수한 탄소나노튜브의 분산기술에 대한 개발이 필요한 실정이다.

[0004] 지금까지 보고된 탄소나노튜브의 표면을 개질하는 방법은 크게 두 가지로 분류된다. 하나는 물리적 개질을 통한 분산성 향상으로 계면활성제를 첨가하거나 고분자를 이용한 탄소나노튜브의 표면 개질방법이 있고, 다른 하나는 황산 혹은 질산 등과 같은 산성용액을 이용하여 탄소나노튜브를 산화시킴으로서 말단(ends) 및 옆면(sidewall)의 일부에 화학적 작용기를 도입하거나, 이러한 화학적 작용기를 바탕으로 이차적으로 다양한 물질들을 화학적으로 결합시켜 탄소나노튜브의 표면 특성을 개질하기도 하였다. 그러나, 상기 탄소나노튜브의 물리적 표면 개질법은 계면활성제나 고분자 코팅에 의한 가역적 표면 개질법으로 pH, 온도, 시간 등의 분산 조건에 따라 분산제와 탄소나노튜브와의 결합력이 달라지기 때문에 용매 내 분산 안정성이 쉽게 변화하는 단점을 가지고 있다. 이와 달리 탄소나노튜브의 화학적 표면 개질법은 비가역적 표면개질법으로서 물리적 표면 개질법과는 달리 영구적으로 표면을 개질하기 때문에 분산제의 안정성 변화에 따른 용매 내 분산 안정성 변화는 거의 없는 장점이 있다. 그러나 아직까지 짧은 시간에 화학적 표면 개질법을 기본으로 하여 손쉽게 탄소나노튜브의 분산성을 제어할 수 있는 조건 및 방법이 개발되지 않은 실정이다.

[0005] 한편, 생명공학기술 및 나노기술의 발달에 힘입어 나노 입자를 의료분야, 예를 들면 분자진단기술(molecular diagnostics), 약물에 나노입자를 결합하여 생체 내 타겟 세포로 운반가능한 나노-약물 복합체의 개발 등에 적용시키고자 하는 시도가 활발해지고 있다. 그러나 최근 탄소나노튜브가 세포에 독성을 일으킨다는 연구결과가 발표되면서 생체 내 탄소나노튜브의 독성을 감소시킬 수 있는 방법에 대한 요구가 증가하고 있다.

[0006] 이에 본 발명자는 탄소나노튜브의 분산성이 개선될 때 세포독성이 감소된다는 것에 착안하여 탄소나노튜브의 분산성을 개선하기 위한 여러 방법을 시도해 본 결과, 종래 강산을 이용한 분산방법에 추가적인 방법을 도입한 경우 우수한 분산도를 가진 탄소나노튜브를 얻었으며 이러한 방법에 의해 제조된 개선된 분산도를 갖는 탄소나노튜브가 감소된 세포 독성을 가짐을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 종래 강산을 이용한 분산방법에 비해 개선된 분산도를 갖는 탄소나노튜브 제조방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 분산성이 우수한 탄소나노튜브 제조방법을 포함하는 세포독성이 완화된 탄소나노튜브-약물 복합체의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 (i) 탄소나노튜브를 강산 용매에 혼입하여 산소를 함유하는 작용기를 상기 탄소나노튜브의 표면에 도입하는 단계; (ii) 상기 탄소나노튜브를 상기 용매 중에서 초음파 처리하는 단계; 및 (iii) 상기 (i) 단계 및 (ii) 단계를 연속하여 반복하는 단계를 포함하는, 분산성 탄소나노튜브의 제조방법을 제공한다.
- [0010] 본 발명에서 용어 "탄소나노튜브"란 탄소 원자 1개가 3개의 다른 탄소 원자와 결합되어 이루어진 벌집모양의 평면형 탄소구조가 말려서 튜브모양을 가지며, 통상 직경이 1 내지 100나노미터(nm)이고, 길이는 수 나노미터(nm)부터 수십 마이크로미터(μm)인 높은 종횡비(aspect ratio)를 갖는 탄소재료를 말한다. 상기 탄소나노튜브에는 여러가지 종류가 있으며, 그 중 길이 방향을 축으로 감싸고 있는 벽의 개수에 따라서 2개 이상의 벽으로 이루어진 다중벽 나노튜브(multi-walled nanotube, MWCNT), 1개의 벽만으로 이루어진 단일벽 나노튜브(single-walled nanotube, SWCNT)로 나눌 수 있다. 본 발명에서 탄소나노튜브는 이들 모두를 종류의 제한없이 포함하나, 바람직하게는 단일벽 탄소나노튜브이다. 본 발명에서 사용가능한 탄소나노튜브의 직경은 1 내지 30nm일 수 있으나, 바람직하게는 1 내지 20nm이고, 가장 바람직하게는 1 내지 5nm일 수 있다.
- [0011] 본 발명에서 용어 "강산 용매"란 황산, 질산, 염산 또는 이들의 1 종 이상의 혼합용액을 포함하며, 바람직한 일 예로서 황산과 질산을 일정 비율로 혼합한 용액을 사용할 수 있다.
- [0012] 본 발명에서 용어 "산소를 함유하는 작용기"라 함은 산소를 함유하며 기능화를 위한 것이라면 제한이 없으나, 구체적인 예로서 카르보닐기($-\text{C}=\text{O}$), 히드록시기($-\text{OH}$), 또는 카르복실기($-\text{COOH}$)를 포함하는 작용기를 들 수 있으며, 바람직하게는 각종 약물을 로딩(loading)하는 과정에 필수적인 카르복실기이다.
- [0013] 본 발명의 제조방법에서 상기 (i) 단계는 탄소나노튜브를 강산 용매에 혼입하여 산소를 함유하는 작용기를 탄소나노튜브의 팁 부분과 표면에 화학적으로 산화(oxidization)시킴으로써 $-\text{C}=\text{O}$, $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$ 등의 작용기를 도입하는 단계로 이루어질 수 있다. 이때, 용매 상에서 탄소나노튜브는 이와 같은 표면 기능화(surface functionalization)를 통해 물 분자와의 인력이 증가하고, 탄소나노튜브는 음으로 대전되면서 정전기적 반발력이 생성된다. 이로 인해 탄소나노튜브간의 van der Waals 인력을 극복하여 탄소나노튜브 분산 용액을 얻을 수 있으며 이러한 산 처리 과정에서 open tip 이 형성될 수도 있다. 본 발명의 구체적인 일 예로서, 상기 (i) 단계는 탄소나노튜브를 황산과 질산의 비율이 3:1인 혼합 용액에서 실온에서 250 내지 320 RPM의 속도로 15분 내지 45분간 교반하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0014] 본 발명의 제조방법에서, 상기 (ii) 단계는 상기 탄소나노튜브를 상기 용매 중에서 초음파 처리하는 단계로 이루어지며, 20 내지 25KHz 주파수 범위, 바람직하게는 20 내지 22KHz 주파수 범위에서 80분 내지 120분 동안, 바람직하게는 90분 내지 110분 동안 초음파 처리를 할 수 있다. 초음파 처리를 80분 미만으로 하면 분산성이 저하될 수 있는 문제점이 있으며, 초음파 처리를 120분 초과해서 하더라도 분산의 정도가 크게 증가하지 않는다.
- [0015] 본 발명의 제조방법에서, 상기 (iii)단계는 상기 (i) 단계 및 (ii) 단계를 연속하여 반복하는 단계로 이루어지며, 이는 (i)단계 및 (ii) 단계를 수행한 후에 다시 (i) 단계 및 (ii) 단계를 순서대로 반복하는 것이다. 이 경우, 상기 반복하는 횟수는 1 내지 3회가 바람직하며, 가장 바람직하게는 한 번 반복하는 것이다.
- [0016] 종래에는 상기 (i) 단계만을 수행하였으므로 산 작용기에 의한 표면 기능화의 정도가 바람직한 정도에 이르지 않았고, 시간이 지나면서 분산정도가 약해지는 등의 단점이 있었으나, 본 발명의 상기 (ii) 단계 및 (iii) 단계 공정을 추가함으로써 용매 내에서의 분산성이 현저하게 개선되는 효과를 가져올 수 있다. 또한, 종래의 초음파 처리 단계만을 이용하여 탄소나노튜브를 분산시킨 경우 분산은 가능하지만 탄소나노튜브 분산 용액의 농도가 증가할수록 콜로이드 안정성이 감소하면서 서로 뭉치게 되는 단점이 있는데, 본 발명은 탄소나노튜브의 표면의 기능화를 통해 탄소나노튜브와 액체 미디어 간의 상호작용에 영향을 주어 이러한 단점을 개선하고, 탄소나노튜브의 분산에 있어서의 작용성 또는 기능성의 정도가 미치는 결정적인 영향을 고려하여, 강산에서 일정한 시간 동안의 화학적 산화 단계 및 초음파 처리 단계를 조합하고 이를 반복시킴으로써 양 방법의 분산에 있어서의 시너지 효과를 극대화한 것이다.
- [0017] 뿐만 아니라, 종래 강산을 이용한 분산 방법에서는 강산에 탄소나노튜브를 혼합한 후 14시간 내지 24시간 동안 교반하는 과정을 거쳐야 하므로 원하는 분산도를 가지는 탄소나노튜브를 제조하기 위해서는 많은 시간이 소요되

었으나, 본 발명의 분산 방법에 따르면 4시간 정도면 동일한 수준의 분산도를 가지는 탄소나노튜브를 얻을 수 있어 간편하면서도 빠른 장점이 있다.

- [0018] 본 발명에 따른 제조방법에 의할 때, 물에서의 분산성의 경우, 종래 방법에 의해 분산한 탄소나노튜브는 시간이 일주일일 경과하면 서로 뭉쳐서 침전물이 바닥에 쌓이지만 본 발명에 따라 분산한 탄소나노튜브는 일주일일 지나도 바닥에 뭉치지 않고 완전히 물에 분산되어 있는 결과를 보임을 알 수 있었다 (도 4 참조). 이는 분산제 등 별도의 유기용매를 사용하지 않고 간단한 방법을 사용하여, 종래 알려진 기능성 도입 방법에 비하여 분산도를 획기적으로 개선한 것으로 볼 수 있다.
- [0019] 본 발명의 분산성 탄소나노튜브의 제조방법은 상기에서 기술한 단계 이외에도 초음파 처리를 한 후 회석, 여과 및 건조 단계를 추가로 더 포함할 수 있다. 본 발명의 구체적인 일 예로서, 본 발명의 제조방법은 강산에서의 처리 → 초음파 처리 → 강산에서의 처리 → 초음파 처리 → 회석 → 여과 → 건조 단계로 구성될 수 있다.
- [0020] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 제조방법에 따라 제조된 분산성 탄소나노튜브를 제공하는 것이다. 본 발명의 분산성 탄소나노튜브는 종래의 탄소나노튜브보다 물에서의 분산성이 우수한 효과를 갖는다.
- [0021] 다른 하나의 양태에서, 본 발명은 (i) 탄소나노튜브를 강산 용매에 혼입하여 산소를 함유하는 작용기를 상기 탄소나노튜브의 표면에 도입하는 단계; (ii) 상기 탄소나노튜브를 상기 용매 중에서 초음파 처리하는 단계; 및 (iii) 상기 (i) 단계 및 (ii) 단계를 연속하여 반복하는 단계를 포함하는, 세포독성이 완화된 탄소나노튜브-약물 복합체의 제조방법을 제공한다.
- [0022] 상기 탄소나노튜브-약물 복합체의 제조방법에서 각 단계는 상기 분산성 탄소나노튜브의 제조방법의 각 단계에 관하여 기술된 내용이 그대로 적용된다.
- [0023] 최근 단일벽 탄소나노튜브를 생쥐와 래트에 주입한 인 비보 실험에서 일시적인 염증 및 폐세포의 손상이 생길 수 있다는 연구결과 (Lam et al., 2004; Warheit et al., 2004)가 발표되는 등 탄소나노튜브에 세포독성이 있음이 알려지면서 이와 관련된 다양한 연구가 진행되고 있다. 특히, 탄소나노튜브의 응집 상태가 세포독성과 연관이 있을 수 있다는 관측도 나오고 있다(Peter Wick et al., Toxicology Letter 168, 2007). 본 발명자 또한 탄소나노튜브의 대식세포에 대한 세포 독성 결과를 확인하였고, 분산도 차이에 따라 세포독성 결과에 차이가 있음을 확인하였다 (도 6 참조). 따라서, 탄소나노튜브를 항암제 및 약물 전달체로서 사용하고자 할 때 인체독성의 부작용을 줄이기 위해서는 탄소나노튜브의 세포독성 효과를 감소시킬 수 있도록 제조하는 것이 필요하다. 이에, 본 발명은 이러한 탄소나노튜브-약물 복합체의 생체적합성을 높일 수 있는 제조방법을 고안하여 이러한 문제점을 해결하고 있다.
- [0024] 본 발명의 구체적인 일 예로서, 종래 방법에 의해 분산된 단일벽 탄소나노튜브와 본 발명에 따른 제조방법에 의해 분산된 단일벽 탄소나노튜브가 세포독성에 미치는 영향을 알아보기 위해 면역세포인 대식 세포의 세포독성 실험을 한 결과, 본 발명의 제조방법에 의한 경우 종래 방법보다 세포독성이 훨씬 적게 나타난 것을 확인하였다 (도 6 참조). 따라서, 본 발명의 제조방법에 의해 제조된 분산도가 개선된 탄소나노튜브를 캐리어로 사용하여 약물과 결합할 경우(hybrid structure) 종래보다 세포독성을 줄임으로 인해, 생체 적합성이 우수한 탄소나노튜브-약물 복합체를 제조할 수 있음을 알 수 있다.
- [0025] 또한, 본 발명자는 탄소나노튜브의 분산도에 따른 세포독성의 차이와 관련하여 반응산소종(reactive Oxygen Species (ROS))을 측정 한 결과, 본 발명에 따라 카르복실기로 개질된 단일벽 탄소나노튜브가 종래방법에 따라 분산된 단일벽 탄소나노튜브보다 ROS를 적게 유발하여 세포독성이 감소하는 것을 알 수 있었다 (도 7 참조).
- [0026] 본 발명에서 용어 "탄소나노튜브-약물 복합체"란 탄소나노튜브가 약물과 화학적 또는 물리적으로 결합된 복합체를 의미한다. 상기 화학적 결합은 화학반응을 통한 화학결합을 의미하고, 물리적인 결합은 흡착(adsorption), 응집(cohesion), 사슬 엉킴(entanglement), 갇힘(entrapment) 등과 같은 물리적 고정뿐만 아니라 반데르 발스 결합과 같은 전기적 상호작용이 그 단독으로 또는 상기 물리적 고정과 함께 작용하여 발생하는 비화학적 고정을 포함하는 개념이다.
- [0027] 본 발명의 구체적인 일 예로서 상기 복합체에서 탄소나노튜브는 약물을 생체 내 타겟 부위에 도달하도록 도와주

는 캐리어로서 역할을 할 수 있으며, 단백질 또는 단백질 약물 등과 결합하기 위해 수용체-리간드의 특이적 결합 또는 항원-항체의 특이적 결합과 같은 상보적인 화학결합을 유도하기 위해 상기 탄소나노튜브는 다당류, 단백질 또는 폴리머 등이 결합된 것일 수 있으며, 상기 결합은 공유결합 또는 비공유 결합을 모두 포함한다. 또한, 본 발명의 산 작용기가 도입된 탄소나노튜브는 약물과의 결합을 용이하게 하기 위해 상기 산 작용기를 바탕으로 이차적으로 다양한 물질들을 추가로 화학적으로 결합시킬 수 있다.

[0028] 본 발명에서 용어 "약물" 또는 "단백질 약물"이란 약리활성을 가지는 것으로서 폴리펩타이드, 단백질 등을 포함하며, BMP, VEGF, FGF, PDGF 등과 같은 성장인자, 케모킨, 세포외 기질 단백질 등을 포함하며, 모든 종류의 항암제를 포함한다. 상기 항암제의 구체적인 예로는 도세탁셀(Docetaxel), 시스플라틴(cis-platin), 캄토세신(camptothecin), 파클리탁셀(paclitaxel), 타목시펜(Tamoxifen), 아나스테로졸(Anastrozole), 글리벡(Gleevec), 5-플루오로우라실(5-FU), 플록슈리딘(Floxuridine), 류프로리드(Leuprolide), 플로타미드(Flutamide), 졸레드로네이트(Zoledronate), 독소루비신(Doxorubicin), 빈크리스틴(Vincristine), 겐시타빈(Gemcitabine), 스트렙토조토신(Streptozocin), 카보플라틴(Carboplatin), 토포테칸(Topotecan), 셀레코시브(celecoxib), 발데코시브(valdecobix), 니메술리드(nimesulide), 코르티손(cortisone) 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

발명의 효과

[0029] 본 발명은 종래의 화학적 처리방법에 초음파 처리단계를 추가하고 이를 반복하는 단계를 포함하는 탄소나노튜브의 제조방법에 관한 것으로서, 이러한 제조방법에 의할 때 우수한 물 분산도를 갖는 탄소나노튜브를 얻을 수 있고, 이러한 탄소나노튜브는 세포독성을 획기적으로 감소시킬 수 있으므로 항암제 및 약물 전달체에 적용시 안전성이 우수한 생체 재료로서 사용할 수 있는 효과를 가진다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 강산을 이용하여 탄소나노튜브를 분산시킨 종래 방법(method 1로 표시함)의 개략도를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명에 따른 분산방법(method 2로 표시함)을 개략적으로 나타낸 것이며, ①은 30분 동안 교반한 후 99분 동안 초음파 처리한 과정을 반복하는 것을 표시한 것이고, ②는 상기 ①과정 후에 진행되는 과정임을 표시한 것이다.

도 3은 본 발명에 따른 분산방법 및 이에 의해 제조된 단일벽 탄소나노튜브를 증류수에 분산시켜 분산 정도를 측정하는 과정을 나타낸 것이다.

도 4는 실시예 1에 나타난 종래 방법과 본 발명 각각에 의해 분산시킨 탄소나노튜브의 1주일 후 물에서의 분산도를 나타낸 것이다. 왼쪽이 종래 방법(method 1)에 의한 결과이며, 오른쪽이 본 발명의 방법(method 2)에 의한 결과이다.

도 5는 대식세포가 단일벽 탄소나노튜브를 세포 내로 uptake 했을 때를 형광 현미경으로 확인한 실험 데이터로서, Blue 형광은 세포 내 핵을 염색한 것이고, Red 형광은 세포 내 actin을 염색한 것이다. 그리고 세포 내 까만 부분이 세포가 uptake한 단일벽 탄소나노튜브이다. 도 5에서 (a)는 단일벽 탄소나노튜브를 처리하지 않은 control 세포를 찍은 것이고, (b)는 종래 방법에 의해 분산시킨 단일벽 탄소나노튜브(COOH-1로 표시함)를 uptake한 결과이며, (c)는 본 발명에 의해 분산시킨 단일벽 탄소나노튜브(COOH-2로 표시함)를 uptake한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 method 1 및 method 2에 의해 COOH로 개질되고 분산도가 다른 단일벽 탄소나노튜브를 각각 농도 별로 처리했을 때(0.1ug/ml, 1ug/ml, 10ug/ml) 나타난 대식 세포의 세포독성(MTT) 실험결과를 나타낸 것이다(* p<0.05). 여기서 사용된 H₂O₂는 positive control로 사용되었다.

도 7은 method 1 및 method 2에 의해 COOH로 개질되고 분산도가 다른 단일벽 탄소나노튜브의 분산도에 따른 반응산소종(reactive Oxygen Species (ROS))을 측정한 결과를 나타낸 것이다(* p<0.05). 여기서 사용된 FeSO₄는 positive control로 사용되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0031] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0032] 실시예 1: 카르복실기를 작용기로서 갖는 단일벽 탄소나노튜브의 제조
- [0033] 종래 방법에 의한 단일벽 탄소나노튜브의 제조
- [0034] 본원발명에 따른 방법의 결과와 비교를 위해, 종래 방법에 의해 분산시킨 탄소나노튜브를 제조하였다. 먼저, 단일벽 탄소나노튜브(single wall carbon nanotube, 이하 SWCNT라고도 함)(Purified singlewall nanotube purchased from SES research Inc.(Huoston, TX77092 USA) Lot QS-0552 catalog#900-1351: diameter is 1-5nm) 10mg 을 3 ml의 H_2SO_4 와 1 ml의 HNO_3 혼합액(H_2SO_4 : 97%, HNO_3 : 60.0~62.0%)에 넣고 상온에서 300RPM으로 14시간 동안 교반시킨 후 증류수 (SWCNT/ distilled water=1mg/20ml)로 용액을 희석하였다. 희석된 용액을 0.2um membrane filter를 이용하여 여과한 후, 마지막으로, 여과지에 달라붙은 파우더를 진공상태로 60℃에서 밤새 건조하여 카르복실기로 개질된 단일벽 탄소나노튜브를 제조하였다. 상기 종래 방법에 따른 단일벽 탄소나노튜브의 제조공정은 도 1에 나타내었다.
- [0035] 비교를 위해, 상기 종래 방법을 method 1이라 칭하고, 상기 method 1에 의해 제조된 탄소나노튜브를 COOH-1로 표시하였다.
- [0036] 본원발명에 의한 단일벽 탄소나노튜브의 제조
- [0037] SWCNT(Purified singlewall nanotube purchased from SES research Inc.(Huoston, TX77092 USA) Lot QS-0552 catalog#900-1351: diameter is 1-5nm) 10mg 을 3 ml의 H_2SO_4 와 1 ml의 HNO_3 혼합액(H_2SO_4 : 97%, HNO_3 : 60.0~62.0%)에 넣고 상온에서 300RPM으로 30분 동안 교반하였다. 그런 다음, ultra sonic machine (220V/60Hz, ultrasonic frequency: 20KHz)을 이용하여 99분간 초음파 처리를 하였다. 상기 초음파 처리과정시 온도는 약 20℃에서 70℃로 상승하였다. 그런 다음, 다시 상온에서 300RPM으로 30분 동안 교반하고, ultra sonic machine (220V/60Hz, ultrasonic frequency: 20KHz)을 이용하여 99분간 초음파 처리를 하였다. 그런 다음, 상기 초음파 처리한 용액을 증류수(SWCNT/ distilled water=1mg/20ml)로 희석한 후 0.2um membrane filter를 이용하여 여과하였다. 마지막으로, 여과지에 달라붙은 파우더를 진공상태로 60℃에서 밤새 건조하여, 보다 많은 카르복실기로 개질된 단일벽 탄소나노튜브를 얻었다.
- [0038] 비교를 위해 상기 본원발명에 따른 분산 방법을 method 2라 칭하고, 상기 method 2에 의해 제조된 탄소나노튜브를 COOH-2로 표시하였다 (도 2 참조).
- [0039] 상기 method 1 및 method 2에 의한 증류수(pH=7)에서의 분산도를 비교하기 위해, 상기 method 1 및 method 2에 의해 제조된 COOH 작용기를 가지는 개질된 탄소나노튜브 10mg을 각각 10ml의 증류수와 혼합시키고 10분 동안 초음파 처리한 후, 2000RPM에서 5분 동안 침전시켰다. 그런 다음, 상청액을 수거하여 바닥 침전물을 여과하고 60℃에서 밤새 건조하였다. 상기 침전물의 양을 측정하고, 용액에 분산된 CNT 양을 계산하여 용액의 농도를 얻었다. method 2에 의해 분산도 측정과정을 도 3에 나타내었다.
- [0040] 그 결과, method 1에 의해 제조된 탄소나노튜브는 일주일이 지나면 서로 뭉쳐서 침전물이 바닥에 쌓이지만, method 2에 의해 COOH 작용기를 가지는 개질된 탄소나노튜브의 경우 바닥에 뭉치지 않고 완전히 물에 분산되는 결과를 보였다(도 4 참조). 이를 통해, 본 발명에 의한 분산방법에 의할 때, 종래 분산방법보다 더 많은 카르복실기로 개질되어 분산도가 우수한 탄소나노튜브를 얻을 수 있음을 알 수 있었다.

[0041] 실시예 2: SWCNT의 세포 내 uptake 확인 실험

[0042] 4-well plate에 대식세포를 넣어 4시간 동안 배양하여 안정시킨 뒤, SWCNT-COOH-1과 SWCNT-COOH-2를 10ug/ml의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. PBS로 2회 세척한 후, 3.7% paraformaldehyde를 이용하여 고정하였다. 고정 후 PBS로 수세한 다음 40분 동안 fluorescent phalloidin conjugate solution (50ug/ml, actin 염색시약)으로 염색을 시행하였다. 염색이 끝난 뒤 PBS로 세척한 뒤에 DAPI로 5분 동안 염색을 시행하였다. DAPI(세포핵 염색시약) 염색 후 다시 PBS로 1회 세척을 한 뒤, 샘플을 현미경용 슬라이드에 mounting하여 LSM 5 exciter (Carl Zeiss, Jena, Germany)을 이용하여 관찰하였다.

[0043] 그 결과, SWCNT가 세포내에 어떻게 uptake 되는지를 확인 할 수 있었고, 보다 확실한 세포내 분포를 확인하기 위해 세포내 actin (Red 형광)과 핵(Blue 형광)을 함께 염색하여 현미경 관찰을 하였다. 그리고 분산도를 다르게 한 SWCNT-COOH-1과 SWCNT-COOH-2 샘플 간에서 대식세포내 uptake 차이는 크지 않은 것으로 나타났다 (도 5 참조).

[0044]

[0045] 실시예 3: SWCNT-COOH의 분산도에 따른 대식 세포의 세포독성 실험

[0046] 96-well plate에 대식세포를 넣어 4시간 안정화시킨 다음, SWCNT-COOH-1과 SWCNT-COOH-2를 농도별로(0.1ug/ml, 1ug/ml, 10ug/ml) triplicate씩 (n=3) 처리하여 24시간 동안 배양하였다. H₂O₂는 positive control로 사용하였다. 24시간 반응 뒤, MTT solution (5mg/ml)을 20ul씩 각 well에 넣어준 후 2시간 동안 배양하였다. 배양 후 상층액을 제거한 다음 100ul의 DMSO를 넣어주어 MTT 반응으로 생긴 formazan crystal을 잘 녹여주었다. 그런 다음, Anthos 210 spectrophotometer로 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0047] 그 결과, 도 6에서 보듯이 분산도를 다르게 공정하여 만든 COOH-1(상기 종래 방법에 의해 분산시킨 탄노나노튜브를 말함, 이하 같음)과 COOH-2(상기 본 방법에 의해 분산시킨 탄노나노튜브를 말함, 이하 같음)는 대조군과 비교하였을 때 모두 농도 의존적으로 세포를 죽이는 것을 확인할 수 있었고, COOH-1과 COOH-2를 비교하였을 때는 1ug/ml, 10ug/ml 농도에서 COOH-2가 COOH-1보다 세포독성이 훨씬 적게 있는 것으로 유의성 있게 나타났다. 따라서 분산도를 높여 공정한 COOH-2가 면역세포인 대식세포에서 독성이 더 약한 것을 알 수 있었다.

[0048] 실시예 4: SWCNT-COOH의 분산도에 따른 Reactive Oxygen Species (ROS) 측정실험

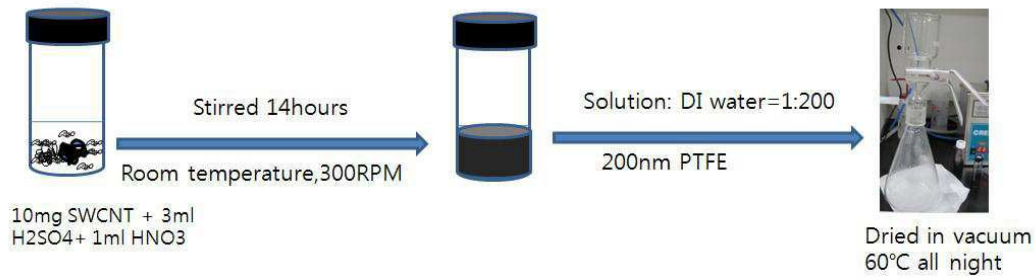
[0049] black 96-well plate에 대식세포를 넣어 4시간 안정화시킨 다음, SWCNT-COOH-1과 SWCNT-COOH-2를 10ug/ml 농도로 quadruple씩 (n=4) 처리하여 12시간 동안 배양한다. F₂SO₄는 positive control로 사용하였다. 12시간 반응 뒤, 각 well에 DHR 형광물질을 최종 10uM 농도로 넣어 1시간 동안 염색시켰다. 염색 후, PBS로 2번 세척해 준 다음, 다시 PBS 100μl을 넣어주었다. 그런 다음, 이것을 fluorescent plate reader로 excitation 480nm, emission 525nm의 파장에서 측정하였다.

[0050] Oxidative stress를 유발하여 세포 독성을 일으키는 반응산소종(ROS)을 측정해 본 결과, COOH-1이 COOH-2보다 ROS를 유의적으로 더 많이 생성하는 것으로 확인되었다 (* p<0.05). 이러한 결과로부터 COOH-2가 COOH-1보다 세포독성이 덜 나타나는 것은 COOH-2가 COOH-1보다 ROS를 적게 생성하기 때문임을 알 수 있었다 (도 7 참조).

도면

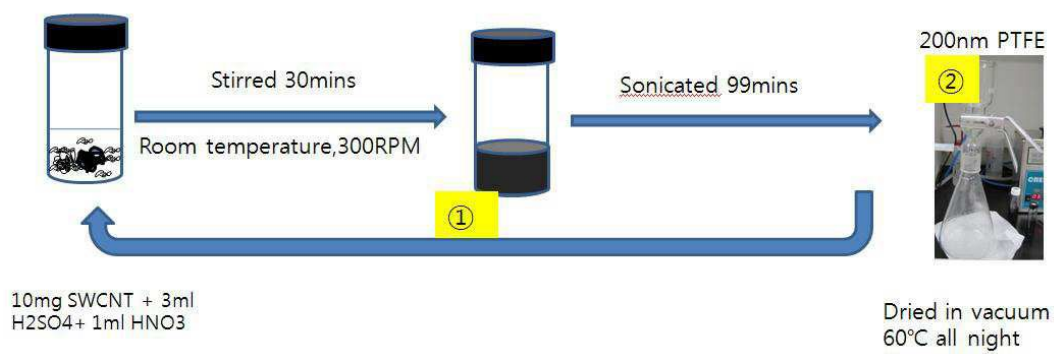
도면1

Method 1:



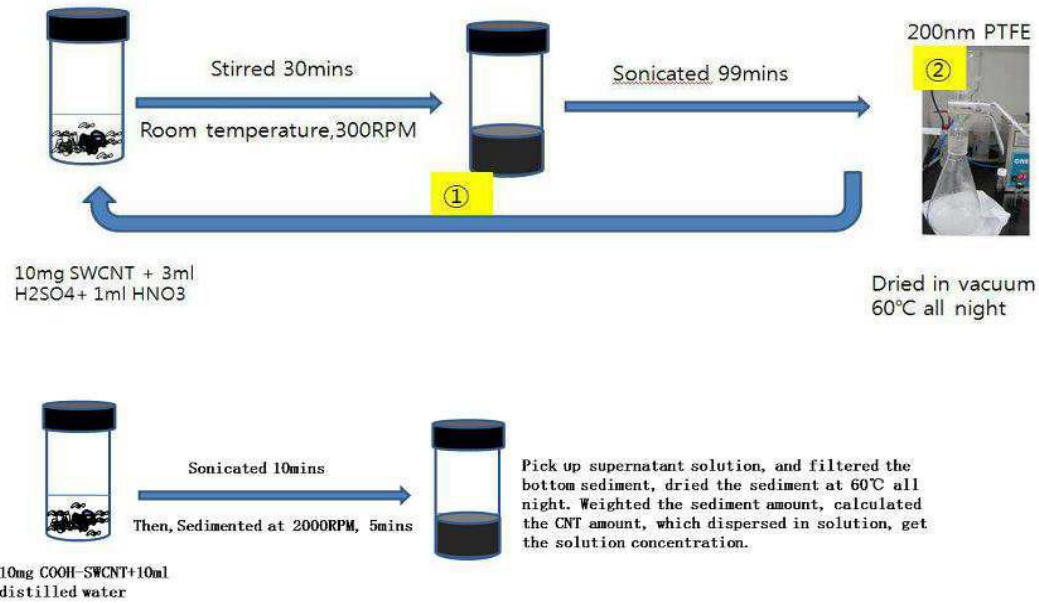
도면2

Method 2:

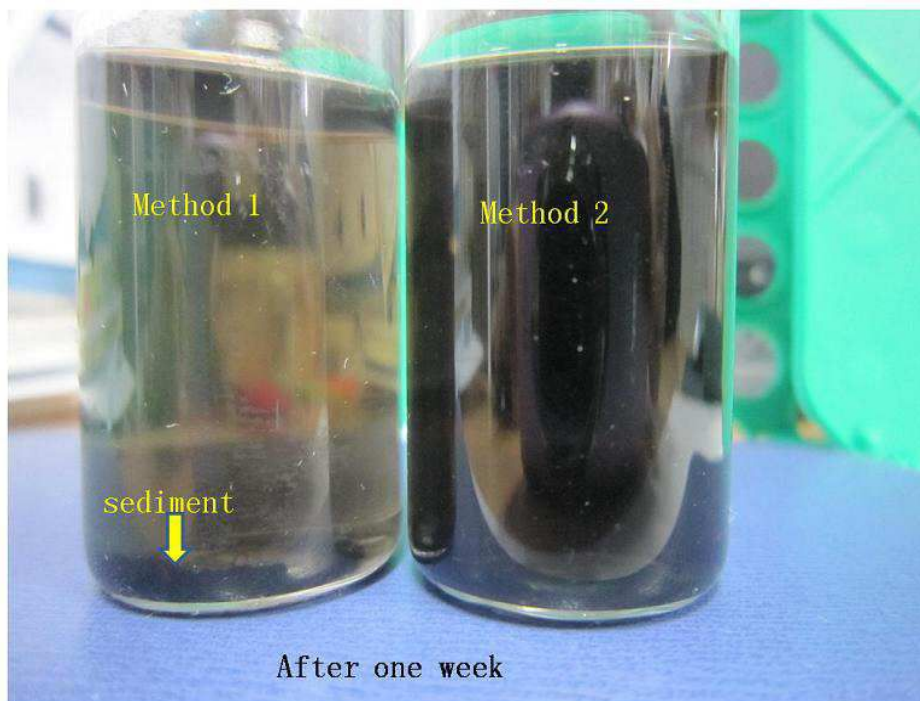


도면3

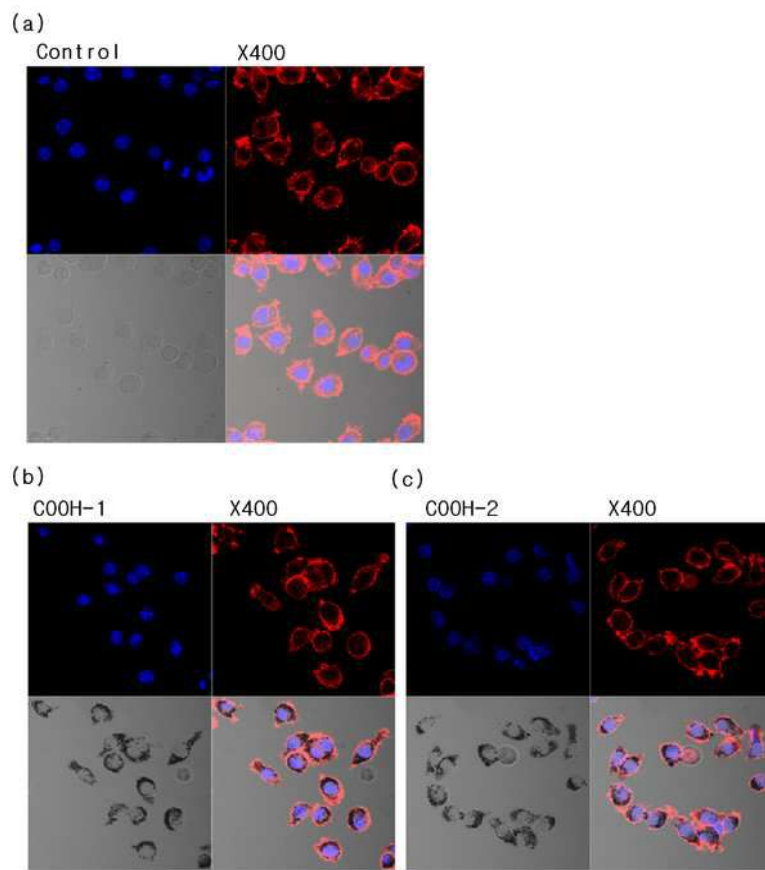
Method 2:



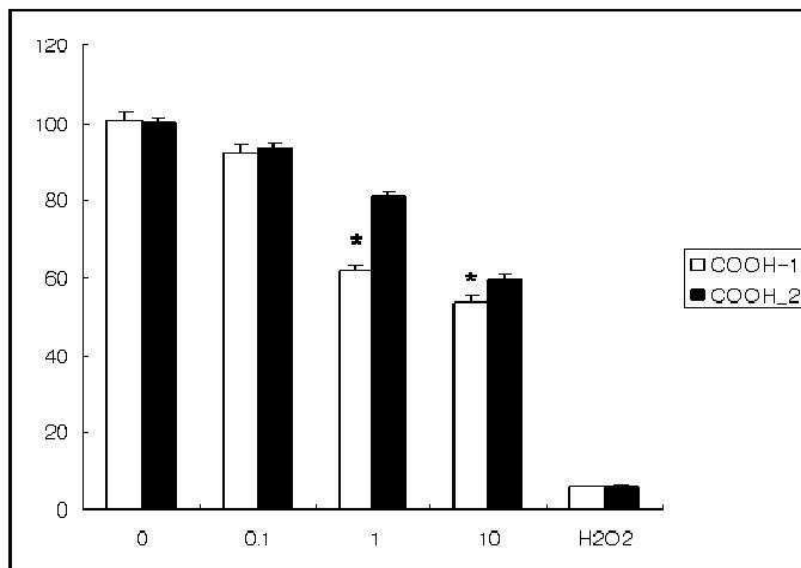
도면4



도면5

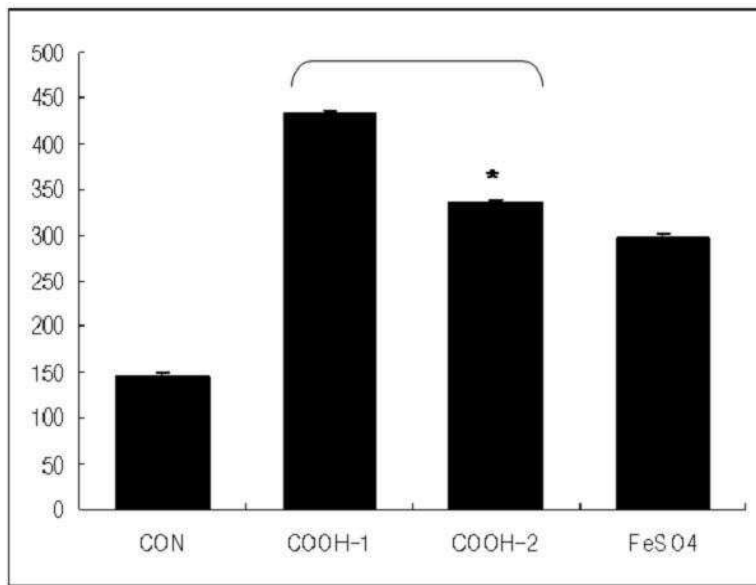


도면6



* p<0.05

도면7



* $p < 0.05$