

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0039239 (43) 공개일자 2012년04월25일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 33/08 (2006.01) A61K 33/06 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01) (21) 출원번호 10-2010-0100829 (22) 출원일자 2010년10월15일 심사청구일자 2010년10월15일		(71) 출원인 인하대학교 산학협력단 인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동) (72) 발명자 이중무 경기도 고양시 일산동구 산두로 128, 건영 912-303 (정발산동, 밤가시마을) 홍찬석 인천광역시 남구 소성로 120, 동아풍림아파트 115동 701호 (학익동) 강정우 경기도 안양시 만안구 석수로 40, 5동 503호 (석수동, 럭키아파트) (74) 대리인 이원희

전체 청구항 수 : 총 8 항

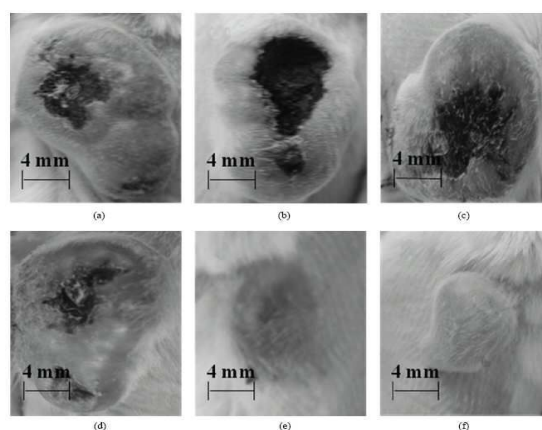
(54) 발명의 명칭 대장암 치료용 약학적 조성물 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 5.0 ~ 12.0 질량% 염화나트륨 수용액에 산화티타늄 나노튜브 3.75~7.5 질량%를 포함하는 것을 특징으로 하는 대장암 치료용 약학적 조성물이다. 상기 대장암 치료용 약학적 조성물은 근적외선을 조사하면 발열하는 산화티타늄 나노튜브의 성질을 이용한 것으로 염화나트륨 수용액과 결합하여 발열효과를 높이는 역할을 하게 한다. 또한 상기 대장암 치료용 약학적 조성물을 이용한 치료는 여러 차례에 걸쳐 이루어지는 것보다는 한 번에 충분한 시간동안 근적외선을 조사하는 것이, 다른 조직에 손상을 주지 않고 완벽하게 종양세포를 제거할 수 있게 한다.

본 발명에 따른 대장암 치료용 약학적 조성물은 산화티타늄 나노튜브를 이용한 광열치료법으로 순수하게 열을 이용하는 방법으로 고통과 부작용이 거의 없으며 치료 후 수 일 내에 나노튜브가 체외로 배출되기 때문에 인체에 축적되지 않는다는 장점이 있다.

대표도 - 도10



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 41376-1

부처명 교육과학기술부

연구사업명 중견연구자 지원 사업

연구과제명 TiO₂ 나노튜브에 의한 광열 암 치료기술 개발

주관기관 인하대학교 산학협력단

연구기간 2010.05.01 ~ 2011.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

5.0~12.0 질량% 염화나트륨 수용액에 산화티타늄 나노튜브 3.75~7.5 질량%를 포함하는 것을 특징으로 하는 대장암 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 5.0~12.0% 염화나트륨 수용액에 포함된 산화티타늄 나노튜브의 입자 길이는 220 nm 이하인 것을 특징으로 하는 대장암 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

산화티타늄 나노튜브 입자를 제조하는 단계 (단계 1);

0.5~12.0 질량% 염화나트륨 수용액을 제조하는 단계 (단계 2); 및

상기 단계 2에서 제조된 염화나트륨 수용액에 상기 단계 1에서 제조된 산화티타늄 나노튜브 입자를 분산시키는 단계(단계 3)를 포함하는 것을 특징으로 하는 대장암 치료용 약학적 조성물의 제조방법.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 단계 1의 산화티타늄 나노튜브 입자를 제조하는 단계는

산화티타늄 나노튜브를 제조하는 단계 (단계 a);

상기 산화티타늄 나노튜브를 분산 용매에 분산시켜 파쇄하는 단계 (단계 b);

파쇄된 산화티타늄 나노튜브 입자를 필터링하는 단계 (단계 c); 및

분산 용매를 제거하는 단계 (단계 d)로 이루어지는 것을 특징으로 하는 대장암 치료용 약학적 조성물의 제조방법.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 단계 a에서 제조되는 산화티타늄 나노튜브는 양극산화법, 전기화학적 식각법, 졸-겔법, 수열법, 종자성장법 및 형틀을 포함하는 군으로부터 선택되는 1종의 방법으로 제조되는 것을 특징으로 하는 대장암 치료용 약학적 조성물의 제조방법.

청구항 6

제 4항에 있어서, 상기 단계 b에 사용하는 분산용매는 에탄올인 것을 특징으로 하는 대장암 치료용 약학적 조성물의 제조방법.

청구항 7

제 4항에 있어서, 상기 단계 c의 필터링은 길이가 220nm 이하인 산화티타늄 나노튜브 입자가 통과하도록 수행되는 것을 특징으로 하는 대장암 치료용 약학적 조성물의 제조방법.

청구항 8

제 4항에 있어서, 상기 단계 d에서 분산용매의 제거는 동결건조에 의하여 수행되는 것을 특징으로 하는 대장암 치료용 약학적 조성물의 제조방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 대장암 치료용 약학적 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 암은 가장 다루기 힘든 질병들 중의 하나이며, 환자들의 완치를 위해 끊임없이 연구되고 있다. 또한, 병원에서는 암을 치료하기 위해 약물 치료, 방사선치료, 유전자치료 등등의 기술들이 이용되고 있다. 이러한 치료들은 환자에게 치료 가능성의 희망을 주는 동시에, 많은 부작용과 고통을 수반하게 된다. 특히 약물 치료에 의한 부작용으로 탈모, 면역력 약화, 피로감 등등을 들 수가 있으며, 환자들에게 큰 불편함을 주고 있다. 이러한 부작용을 극복하기 위한 노력으로는 최근 개발된 표적형 나노입자기술과 같은 새로운 약물전달시스템이 있다. 이 기술은 암세포 주변의 신생혈관들을 통해 항암제가 전달되어 정상세포는 살아 있는 상태로 유지하면서 암세포만 치료하는 것이다.

[0003] 현재의 가장 확실한 암세포 치료방법으로는 조기에 진단하는 것으로 95% 이상 완치가 가능하다. 조기진단을 통해 암세포를 초기에 발견하면, 전이가 일어날 가능성이 작을 뿐 아니라, 재발 가능성이 작으며, 암세포의 크기가 상대적으로 작아 쉽게 제거될 수 있다. 한 예로 미국 국립 암센터(NCI)에서는 암 진단 및 치료기술 개발에 박차를 가하고 있다. 이러한 연구에서의 핵심기술은 나노기술과 바이오기술이다. 나노기술은 화학적으로 제조되거나 개질된 물질이 나노크기의 입자를 형성하면서 생체내의 세포나 분자들과 상호 작용하는 것이다. 나노입자는 기본적으로 녹는점, 자기적 성질 그리고 색깔 같은 물리화학적 성질의 조절이 가능하다. 또한, 생체 또는 의료용 장비로의 적용이 가능하다.

[0004] 광역학 치료법(photodynamic therapy)은 기존의 표준 암치료법인 수술이나 방사선 요법, 약물요법의 부작용 및 암치료 이후의 후유증 문제를 해결할 수 있으면서도 환자의 생명연장과 삶의 질을 향상시킬 수 있다는 장점 때문에, 우리가 궁극적으로 나아가야 할 치료법 중의 하나로 대단한 관심을 받고 있다. 광역학 치료에 사용되는 광증감제가 1993년 처음 암 치료를 위하여 사용이 공식 승인된 이후로, 미국, 유럽 및 일본 등 선진국에서는 몇몇의 암의 종류와 초기 암들에 대한 암 치료에 사용하고 있으며, 새로이 개발된 광증감제들도 승인을 받기 위하여 현재 임상 시험 중에 있다.

[0005] 또한, 광역학 치료를 위한 광감작제에 대한 연구도 활발히 이루어지고 있다. 대한민국 등록특허 제 100773450000호는 인돌-3-아세트산(Indole-3-acetic acid; IAA)을 광감작제(Photosensitizer)로서 사용한 것으로, 상기 발명은 광선에 의하여 활성화되는 성질을 갖는 IAA를 함유하는 광역학적 치료(photodynamic therapy, PDT)용 광감작제, 이를 포함하는 광역학 치료용 키트 및 광역학 치료용 조성물에 관한 것이다. 상기 발명에 따르면 IAA는 광감작제로 사용이 가능하고, IAA와 광선조사를 병용하여 사용하면 암 또는 각종 질환의 치료에 적용할 수 있으며, 정상세포에 대해서는 무해한 반면 병변 세포만 선택적으로 괴사시키는 효과가 있다. 하지만 상기와 같은 광역학적 치료법이 더 많은 병원에서 행해지기 위해서는 광학장비의 발전도 중요하다. 레이저와 광섬유 제조 기술이 발전함에 따라 광역학 치료에 사용되는 레이저 장비의 가격이 낮아지긴 했지만 보통은 레이저 하나에 한 가지 파장만을 사용할 수 있기 때문에, 더 나은 효율의 광증감제가 임상 사용에 승인을 받더라도 이를 사용하여 환자를 치료하기 위해서는 레이저를 추가로 구입해야 하는 부담이 있다.

[0006] 광열 암 치료기술(Cancer Thermotherapy)은 암 치료 시 위험하고 비용이 많이 드는 수술에 의하지 않고, 환자의 혈관에 약물을 주사한 후 종양 부위에 근적외선을 쏘여 종양을 한 겹씩 벗겨냄으로써 쉽게 암을 치료하는 기술이다. 상기 '광열'이란 광을 조사했을 때 열이 발생함을 의미한다. 이 광열 치료법은 외과수술법에 비해 비파괴적이고 간단하며 부작용이 적다. 또한 전신 마취가 불필요하고 환자의 고통도 거의 없으며, 안정과 회복을 위

한 기간이 짧을 뿐만 아니라 여러 차례 반복 치료가 가능한 이점도 있다. 대한민국 공개특허 제 2008-0035926호는 자성 금 나노 외각(Mag-GNS)의 높은 광흡수를 통한 암세포의 치료제로서의 용도 및 치료 방법에 관한 것이다. Mag-GNS 표면의 목표 지향성 리간드를 통해 암세포에 선택적으로 Mag-GNS를 집적할 수 있고, MRI를 통하여 암을 조기에 진단하고, 진단한 암세포에 NIR 파장의 레이저를 조사함으로써 선택적으로 암세포만 괴사시킬 수 있다는 장점이 있다. 하지만 금을 재료를 사용하고 있어 가격이 비싸다는 단점이 있다.

[0007] 본 발명자들은 산화티타늄에 근적외선을 조사하면 열을 발산하는 광열 특성을 갖는 것에 주목하고, 인체에 적용 시 유해한 활성산소의 양이 극히 적으므로 고통과 부작용이 거의 없을 것으로 판단하였다. 또한 산화티타늄 나노튜브는 광열 암치료제로 많이 연구되고 있는 금 나노입자나 탄소나노튜브 보다 광열 특성이 우수하며, 제조 공정이 간단하고 가격이 저렴하며 쉽게 구할 수 있다는 장점이 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 대장암 치료용 약학적 조성물을 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 대장암 치료용 약학적 조성물의 제조방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 대장암 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 산화티타늄 나노튜브 입자를 제조하는 단계 (단계 1); 5.0~12.0 질량% 염화나트륨 수용액을 제조하는 단계 (단계 2); 및 상기 염화나트륨 수용액에 산화티타늄 나노튜브 입자를 혼합하는 단계 (단계 3)를 포함하는 것을 특징으로 하는 대장암 치료용 약학적 조성물의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따라 제조된 대장암 치료용 약학적 조성물은 산화티타늄 나노튜브를 포함하는 것으로 산화티타늄 나노튜브에 근적외선을 조사할 때 산화티타늄 나노튜브로부터 방출되는 열을 이용하는 것이며, 정상세포는 해치지 않고 암세포만을 선택적으로 파괴하고, 치료과정에서 발생하는 인체에 유해한 활성산소의 양이 극히 적으므로 고통과 부작용이 거의 없이 암을 치료할 수 있는 효과가 있다. 광역동 요법으로는 피부 가까이 위치한 암세포만 제거할 수 있지만, 본 발명에 따른 대장암 치료용 약학적 조성물에 조사하는 근적외선은 인체를 잘 투과하므로 체내 깊숙이 위치하는 암세포도 제거할 수 있는 효과가 있다. 또한 산화티타늄 나노튜브는 간단한 전기화학적 방법으로 대량 생산이 가능하므로 값싸게 공급할 수 있으며, 독성이 없고 미생물에 의하여 인체에 무해한 물질로 잘 분해되는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 산화티타늄 나노튜브의 SEM 사진이고,

도 2는 파쇄된 산화티타늄 나노튜브 입자의 SEM 사진이고,

도 3은 산화티타늄 나노튜브, 금 나노튜브 및 탄소나노튜브에 대한 NIR 조사시간에 따른 온도변화의 그래프이고,

도 4는 산화티타늄 나노튜브, 금 나노튜브 및 탄소나노튜브에 대한 흡광도 그래프이고,

도 5는 산화티타늄 나노튜브 각각의 분산용액에 대한 NIR 조사시간에 따른 온도변화의 그래프이고,

도 6은 산화티타늄 나노튜브/염화나트륨 수용액에 대한 NIR 조사 전/후의 XRD 그래프이고,

도 7은 산화티타늄 나노튜브의 농도에 따른 세포 생존율의 그래프이고,
 도 8은 사멸세포를 염색한 광학현미경 사진이고,
 도 9는 비교예 1, 2 및 실시예 1에 대한 세포 유속분석기의 그래프이고,
 도 10은 본 발명에 따른 약학적 조성물의 동물실험결과 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0015] 본 발명은,
- [0016] 5.0~12.0 질량% 염화나트륨 수용액에 산화티타늄 나노튜브 3.75 % ~ 7.5 질량% 포함하는 것을 특징으로 하는 대장암 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0017] 상기 대장암 치료용 약학적 조성물은 산화티타늄 나노튜브를 포함하는 것으로 산화티타늄 나노튜브에 근적외선을 조사할 때 산화티타늄 나노튜브로부터 방출되는 열을 이용한 것으로 정상세포는 해치지 않고 암세포만을 선택적으로 파괴하며 치료과정에서 발생하는 인체에 유해한 활성산소의 양이 극히 적으므로 고통과 부작용이 거의 없이 암을 치료할 수 있는 효과가 있다. 광역동 요법으로는 피부 가까이 위치한 암세포만 제거할 수 있지만, 본 발명에 따른 대장암 치료용 약학적 조성물에 조사하는 근적외선은 인체를 잘 투과하므로 체내 깊숙이 위치하는 암세포도 제거할 수 있으며, 산화티타늄 나노튜브는 간단한 전기화학적 방법으로 대량 생산이 가능하므로 값싸게 공급할 수 있으며, 독성이 없고 미생물에 의하여 인체에 의한 무해한 물질로 잘 분해되는 효과가 있다.
- [0018] 상기 염화나트륨 수용액에 분산시킨 산화티타늄 나노튜브 입자들에 적외선을 조사할 경우 티타늄 이온과 나트륨 이온이 반응하여 소디오플루오로티타네이트(Na_2TiF_6)를 형성하는데, 상기 티타늄 이온과 나트륨 이온이 반응하는 동안 발열이 강하게 일어나 암세포를 제거할 수 있게 된다. 상기 염화나트륨 수용액의 농도는 5.0~12.0 질량%인 것이 바람직하며, 5.0 % 미만인 경우 티타늄이온과 나트륨 이온과의 반응으로 인한 발열의 효과가 작을 수 있으며, 12.0 %를 초과하는 경우는 고나트륨증이나 고염소혈증을 유발할 수 있는 문제점이 있다.
- [0019] 상기 5 ~ 12.0 질량% 염화나트륨 수용액에 3.75 ~ 7.5 질량%의 산화티타늄 나노튜브 입자를 분산시킨 것이 바람직하다. 상기 산화티타늄 나노튜브 입자의 함량이 3.75 질량% 미만인 경우 암세포를 제거하는 데 있어 필요한 발열량이 부족한 문제점이 있으며, 7.5 질량%를 초과하여 함유하는 경우 체내에 과량 축적되거나 체외로 배출되는데 오랜 시간이 소요되며, 장기 내에 축적되어 부작용을 일으킬 수 있는 문제가 있다.
- [0020] 상기 5.0~12.0 질량% 염화나트륨 수용액에 포함된 산화티타늄 나노튜브 입자의 길이는 220 nm 이하인 것이 바람직하다. 일반적으로 인체의 모세혈관의 직경은 8~20 μm 이나, 미세 모세혈관의 직경은 나노크기를 가지며, 암세포의 모세혈관의 직경은 일반 모세혈관보다 큰 80~200 nm이다. 또한 산화티타늄 나노튜브 입자 크기가 10 nm 이하이면 세망내피계(RES)로써 신장에서 배출되므로 40~200 nm인 것이 더욱 바람직하다.
- [0021] 또한, 본 발명은
- [0022] 본 발명은 산화티타늄 나노튜브 입자를 제조하는 단계 (단계 1);
- [0023] 5.0 ~ 12.0 질량% 염화나트륨 수용액을 제조하는 단계 (단계 2); 및
- [0024] 상기 단계 2에서 제조된 염화나트륨 수용액에 상기 단계 1에서 제조된 산화티타늄 나노튜브 입자를 분산시키는 단계 (단계 3)를 포함하는 것을 특징으로 하는 대장암 치료용 약학적 조성물의 제조방법을 제공한다.

- [0025] 이하, 본 발명을 각 단계별로 상세히 설명한다.
- [0026] 본 발명에 따른 단계 1은 산화티타늄 나노튜브 입자를 제조하는 단계로서 하기의 단계를 수행함으로써 제조된다.
- [0027] 상기 단계 1에서 산화티타늄 나노튜브 입자를 제조하는 단계는
- [0028] 산화티타늄 나노튜브를 제조하는 단계 (단계 a);
- [0029] 산화티타늄 나노튜브를 분산용매에 분산시켜 파쇄하는 단계 (단계 b);
- [0030] 파쇄된 산화티타늄 나노튜브 입자를 필터링하는 단계 (단계 c); 및
- [0031] 분산 용매를 제거하는 단계 (단계 d)를 포함한다.
- [0032] 본 발명에 따른 단계 a는 산화티타늄 나노튜브를 제조하는 단계이다. 산화티타늄 나노튜브는 양극산화법, 전기 화학적 식각법, 졸-겔법, 수열법, 종자성장법 및 형틀을 포함하는 군으로부터 선택되는 1종의 방법으로 제조되는 것이 바람직하고, 양극산화법으로 제조되는 것이 더욱 바람직하다. 상기 양극산화법을 이용하여 제조되는 산화티타늄 나노튜브는 얇은 티타늄 호일로써 티타늄을 공급하고 에틸렌글리콜을 용매로 0.3%의 불화암모늄 및 2 부피%의 물을 혼합한 것을 전해액으로 사용하여 60 V의 전압으로 17시간 동안 양극산화법을 수행함으로써 제조되는데, 상기 방법으로 제조된 산화티타늄 나노튜브는 길이가 길면서도 고도로 정렬되어 있는 산화티타늄 나노튜브를 제조할 수 있다는 장점이 있다.
- [0033] 본 발명에 따른 단계 b는 산화티타늄 나노튜브를 분산용매에 분산시켜 파쇄하는 단계이다. 상기 단계 a에서 제조된 산화티타늄 나노튜브를 에탄올에 넣고 초음파 발생장치에 넣어 분산시켜 파쇄한다. 에탄올을 분산용매로 사용함으로써 산화티타늄 나노튜브의 멸균을 동시할 수 있다는 장점이 있다.
- [0034] 본 발명의 단계 c의 필터링은 길이가 220 nm 이하인 산화티타늄 나노입자가 통과하도록 수행되는 것이 바람직하다. 일반적으로 인체의 모세혈관의 직경은 8~20 μm 이나, 미세모세혈관의 직경은 나노크기를 가지며, 암세포의 모세혈관의 직경은 일반 모세혈관보다 큰 80~200 nm이다. 또한 산화티타늄 나노튜브 입자 크기가 10 nm 이하이면 세망내피계(RES)로써 신장에서 배출되므로 40~200 nm인 것이 더욱 바람직하다.
- [0035] 본 발명에 따른 단계 d는 분산용매를 제거하는 단계이다. 상기 분산용매는 동결건조에 의하여 제거되는 것이 바람직하나, 상기 산화티타늄 나노튜브의 물성이나 형태를 변형시키지 않으며 멸균상태를 유지할 수 있다면 이에 한정되지 않는다.
- [0036] 본 발명에 따른 단계 2는 5.0~12.0 질량% 염화나트륨 수용액을 제조하는 단계이다. 상기 염화나트륨 수용액은 산화티타늄 나노튜브와 혼합 후 적외선을 조사할 경우 티타늄 이온과 나트륨 이온이 반응하여 소듐플루오로티타네이트(Na_2TiF_6)를 형성함과 동시에 강한 발열이 발생하는데, 상기 염화나트륨 수용액의 농도는 발열량 및 체액에서의 염분 농도를 고려한 것이다. 제조된 염화나트륨 수용액은 멸균하여 사용한다.
- [0037] 본 발명에 따른 단계 3은 상기 단계 2에서 제조된 염화나트륨 수용액에 상기 단계 1에서 제조된 산화티타늄 나노튜브 입자를 분산시키는 단계이다. 상기 단계 2에서 제조된 산화티타늄 나노튜브 입자를 분산용매와 같이 초음파 발생장치에 넣어 6시간 동안 분쇄 및 분산을 수행하여 대장암 치료용 약학적 조성물을 제조한다.

- [0038] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다. 단, 하기의 실시예는 발명을 예시하는 것일 뿐, 내용이 하기의 실시예에 의하여 제한되는 것은 아니다.
- [0039] <실시예 1> 210 mg 티타늄나노튜브/ 4 mL NaCl 분산 조성물의 제조
- [0040] 단계 1. 산화티타늄 나노튜브(TiNTs) 입자의 제조
- [0041] 실험에 앞서 사용되는 모든 재료는 에탄올을 이용하여 세정하였다. 두께가 250 μm 인 티타늄(99.7%) 호일은 약 20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2전극 전기화학전지(two-electrode electrochemical cell)에서 정전위전기분해의 대상으로 하고, 백금 호일을 상대전극으로 사용하여 DC 전원 공급기에 연결하여 60 V의 전압으로 17시간 동안 양극산화 하였다. 이때 전해액은 에틸렌글리콜에 0.3 중량% 불화암모늄 및 2부피%의 물을 혼합하여 사용하였다.
- [0042] 제조된 산화티타늄 나노튜브를 에탄올에 넣고 초음파 발생장치를 이용하여 6시간 동안 파쇄하여 산화티타늄 나노튜브의 길이를 220 nm 이하로 하고, 220 nm 포어 사이즈의 필터를 이용하여 필터링하여 220 nm를 초과하는 산화티타늄 나노튜브는 제거하였다. 필터를 빠져나온 산화티타늄 나노튜브 입자가 분산되어 있는 에탄올을 제거하기 위하여 동결건조 하였으며, 에탄올을 완벽하게 제거하고 멸균상태로 보관하였다.
- [0043] 단계 2. 염화나트륨 수용액의 제조
- [0044] 5.0% 염화나트륨 수용액을 제조하고, 오토클레이브를 이용하여 멸균하였다.
- [0045] 단계 3. 염화나트륨 수용액에 산화티타늄 나노튜브 입자를 분산시키는 단계
- [0046] 상기 단계 1에서 제조된 산화티타늄 나노튜브 입자 210 mg을 상기 단계 2에서 제조된 9.0% 염화나트륨 수용액 4 mL에 넣고 초음파발생장치를 이용하여 6시간 동안 분산시켜 염화나트륨 수용액에 산화티타늄 나노튜브 입자가 분산된 조성물을 제조하였다.
- [0047] <비교예 1> 0 mg 산화티타늄 나노튜브/ 4 mL NaCl 분산 조성물의 제조
- [0048] 상기 실시예 1의 단계 2에서 제조된 염화나트륨 수용액 4 mL을 채취하였다.
- [0049] <비교예 2> 50 mg 산화티타늄 나노튜브/ 4 mL NaCl 분산 조성물의 제조
- [0050] 산화티타늄 나노튜브 입자 함량이 50 mg인 것을 제외하고는 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 수행하여 제조하였다.
- [0051] <비교예 3> 110 mg 산화티타늄 나노튜브/ 4 mL NaCl 분산 조성물의 제조
- [0052] 산화티타늄 나노튜브 입자 함량이 110 mg인 것을 제외하고는 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 수행하여 제조하였다.
- [0053] <실험예 1> 파쇄 전 산화티타늄 나노튜브 형태 관찰
- [0054] 파쇄 전의 산화티타늄 나노튜브의 형태를 관찰하기 위하여 상기 실시예 1의 단계 1에서 제조된 파쇄전의 산화티타늄 나노튜브를 SEM을 이용하여 관찰하고, 도 1에 나타내었다.
- [0055] 도 1에 따르면, 산화티타늄 나노튜브의 내부 직경은 100 nm이고 산화티타늄 나노튜브 층의 두께는 160 μm 임을 확인하였다. 또한 나노튜브는 가지런히 잘 정돈된 형태로 제조되어 있음을 확인할 수 있다.

[0056] <실험예 2> 파쇄 후 산화티타늄 나노튜브 입자의 형태 관찰

[0057] 파쇄 후의 산화티타늄 나노튜브 입자의 형태를 관찰하기 위하여 상기 실시예 1의 단계 1에서 제조된 파쇄후의 산화티타늄 나노튜브 입자를 TEM을 이용하여 관찰하고, 도 2에 나타내었다.

[0058] 도 2에 나타난 바와 같이 220 nm 이하의 길이로 잘 파쇄 되었음을 알 수 있다.

[0059] <실험예 3> 근적외선(NIR) 조사 시간에 따른 광열특성 조사

[0060] 근적외선 조사 시간 및 각 나노튜브의 재질에 따른 광열특성을 알아보기 위하여 산화티타늄 나노튜브(TiNTs, 실시예 1), 금 나노튜브(AuNTs) 및 탄소나노튜브(SWCNTs)에 대하여 하기와 같은 과정을 수행한 후 근적외선을 조사하였으며, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0061] 상기 실시예 1의 단계 1에서 제조된 파쇄 전의 산화티타늄 나노튜브를 증류수에 넣어 5시간 동안 초음파 발생장치를 이용하여 파쇄하고 200 ℃에서 베이킹(baking) 하였다. 또한 금 나노튜브(AuNTs) 및 탄소 나노튜브(SWCNTs)를 나노코크스(Nanocs)와 일진 나노테크에서 제조하여 건조 상태로 판매되는 것을 구매하여 사용하였다. 레이저 다이오드 드라이버(모델명 : KS3-11321-503, BWT Beijing Ltd.)의 레이저 다이오드 바는 길이가 120 cm이고 직경 375 μ m의 핵 및 개구수(numerical aperture)가 0.22인 섬유와 연결하였다. 상기 사용된 샘플들의 온도는 IR 온도계(모델명 : AZ9950)를 이용하여 30초 마다 측정하였다. 파장은 808 nm 이며, 레이저 강도는 300 mW/cm² 로 조사하였다.

[0062] 금 나노튜브의 온도는 초기 10분 동안 상승하는 경향을 보였으나, 10분이 경과한 이후부터는 약 38 ℃를 유지하였다. 또한 탄소나노튜브도 비슷한 경향을 보였으며, 20분 경과 후 약 47 ℃에 도달하였다. 마지막으로 산화티타늄 나노튜브는 레이저를 조사한 초기 5분 동안 급속한 온도 변화를 보이며 상승하였고, 20분이 경과하자 약 70 ℃에 이르는 온도변화를 보였다. 상기의 결과로 적외선 조사 시 산화티타늄 나노튜브가 가장 높은 광열효과를 나타내는 것을 확인하였다.

[0063] <실험예 4> 파장에 따른 흡광도 측정

[0064] 파장에 따른 흡광도를 측정하기 위하여 산화티타늄 나노튜브(TiNTs), 금 나노튜브(AuNTs) 및 탄소나노튜브(SWCNTs)에 대하여 파장에 따른 흡광도를 UV/Vis/IR 분광기(모델명 : UV-2450, 시마즈)를 이용하여 측정하였으며, 그 결과를 도 4에 나타내었다. 상기 나노튜브들은 상기 실험예 3에서 사용된 것과 동일한 것을 사용하였다.

[0065] 도 4에 나타난 바와 같이 파장 600 nm 내지 800 nm의 영역에서 각 나노튜브에 대한 흡광도는 거의 변화가 없이 일정하다는 것을 알 수 있었으며, 가장 높은 흡광도를 나타내는 것은 산화티타늄 나노튜브임을 알 수 있다.

[0066] <실험예 5> 분산용매에 대한 NIR 조사 시간과 온도와의 관계 측정

[0067] 분산용매에 대한 NIR 조사 시간과 온도와의 관계를 알아보기 위하여 산화티타늄 나노튜브 입자(220 nm 이하)와 산화티타늄(TiO₂) 나노튜브를 염화나트륨 수용액, PBS 및 증류수에 분산시킨 것에 상기 실험예 3에서 레이저 세기가 170 mW/cm²인 것을 제외하고는 상기 실험예 3과 동일한 방법으로 수행하였으며, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0068] 도 5에 나타난 바와 같이 NIR을 조사한지 20분 후 TiO₂ NT/증류수의 온도 보다 TiO₂ NT/NaCl 및 TiO₂ NT/PBS의 온도가 4 ℃와 3 ℃ 각각 더 높은 것을 보여주고 있다. 이것은 염화나트륨 수용액 및 PBS가 추가적인 발열효과를 부여한다는 것을 알 수 있게 한다. 또한 분산 용매 없이 파쇄된 산화티타늄 나노튜브 입자의 온도 변화가 가장 크게 나타났다. 상기 결과는 발열된 열이 사용한 용매들을 가열하는데 소비된 것으로 판단된다.

[0069] <실험예 6> 산화티타늄 나노튜브에 근적외선 조사 전/후의 물질 변화 확인

- [0070] 근적외선 조사 전/후의 물질 변화를 확인하기 위하여 상기 실시예 1에서 제조된 산화티타늄 나노튜브/염화나트륨 수용액 대하여 XRD(X-ray diffraction)를 사용하여 관찰하고, 그 결과를 도 6에 나타내었다.
- [0071] 도 6에 나타낸 바에 따르면, 근적외선을 조사하기 전에는 NaCl 및 TiO₂의 피크만이 있는 반면, 근적외선 조사 후에는 NaCl 및 TiO₂의 피크뿐만 아니라 Na₂TiF₆의 피크가 생성되어 있음을 볼 수 있다. 상기의 결과는 근적외선 조사 전에는 NaCl 및 TiO₂의 결정만이 존재하였으나, 근적외선을 조사함으로써 Na₂TiF₆의 결정이 생성된 것을 알 수 있으며, 상기 물질이 생성되는 과정에서 발열이 일어남을 알 수 있다.
- [0072] **<실험예 7> 산화티타늄 나노튜브 농도에 따른 세포 생존율**
- [0073] 산화티타늄 나노튜브의 농도에 따른 세포의 생존율을 알아보기 위하여 비교예 1, 3 및 실시예 1에서 제조된 산화티타늄 나노튜브/NaCl 대하여 CT-26을 이용하여 하기와 같은 실험을 수행하였으며, 그 결과를 도 7에 나타내었다.
- [0074] CT-26(murine colon cancer cell line)을 DMEM(Dulbeccos's modified Eagle's medium)에서 배양한 후 24-웰 플레이트에 1×10^5 개의 세포를 각 웰에 파종하고 37 °C의 온도 및 5 % CO₂를 포함하는 분위기에서 24시간 배양하였다. 배양 후 웰의 배양액을 제거하고 세포는 PBS(phosphate buffered saline)를 이용하여 세정하였다. 각 웰에 DMEM 2 mL를 주입한 후 비교예 1, 3 및 실시예 1을 0.2 mL을 주입하였다. 웰의 벽면에서 분리된 CT-26 셀을 배양하지 않고 순환 석영 큐벳에 옮겨 담은 후 300 mW/cm²의 근적외선을 20분간 조사하였다.
- [0075] 근적외선 조사 후 세포의 생존 정도를 알아보기 위하여 각 웰에 MTT(Dimethyl thiazolyl diphenyl tetrazolium salt) 에세이 용액을 첨가하였다. 상기 MTT 에세이 용액은 10 mL의 PBS에 50 mg의 MTT 파우더를 녹인 후 필터링하여 준비하였다. 각 플레이트의 모든 웰에 대하여 배양액을 제거한 후, 180 μ L의 DMEM 및 20 μ L의 MTT 용액을 첨가하고 37 °C의 온도로 4시간 동안 5% CO₂ 분위기에서 배양하였다. 상기 웰플레이트의 모든 용액을 제거하고 200 μ L의 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 각 모든 샘플에 주입하고 강하게 피펫팅한 후 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정하고, 그 결과를 도 7에 나타내었다.
- [0076] 도 7에 나타낸 바에 따르면, 근적외선을 조사하지 않은 경우 산화티타늄 나노튜브 입자의 함량에 관계없이 세포의 대부분이 살아있음을 알 수 있다. 반면, 근적외선을 조사한 경우 산화티타늄 나노튜브의 농도가 높을수록 세포의 생존율은 낮아지는 것을 알 수 있다. 또한, 산화티타늄 나노튜브를 함유하지 않은 경우(비교예 1)를 근적외선을 조사하는 경우에도 10% 이상의 세포가 사멸하는 것을 볼 수 있다.
- [0077] **<실험예 8> 세포 사멸의 확인**
- [0078] 세포사멸을 확인하기 위하여 실시예 1에서 제조된 산화티타늄 나노튜브/NaCl 조성물에 대하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- [0079] 상기 실험예 7의 세포의 배양에서부터 근적외선 조사까지 동일하게 수행하고, 0.4%의 트리판 블루(trypsin blue dye)를 10 μ L 주입하여 각 플레이트의 웰 바닥에 부착된 셀을 염색하고 광학현미경을 이용하여 관찰하고, 그 결과를 도 8에 나타내었다.
- [0080] 도 8에 나타낸 바에 따르면, 화살표 부분(염색된 부분)이 사멸한 세포를 나타내는 것으로, 세포가 사멸한 것을 볼 수 있다.
- [0081] **<실험예 9> 세포 사멸의 모드 및 세포 생존율**
- [0082] 비교예 1, 2 및 실시예 1에 대하여 세포 사멸의 모드 및 세포 생존율을 알아보기 위하여 아넥신 V-FITC(Annexin V-fluorescein isothiocyanate) 세포사멸(apoptosis) 에세이를 하기와 같이 실험을 수행하였다.
- [0083] 비교예 1, 2 및 실시예 1과 동일하게 제조하되 5% NaCl 용액 2 mL과 폴리에틸렌글리콜(PEG) 2 mL을 혼합한 혼합 용액을 분산용액으로 사용한 것을 제외하고는 상기 비교예 1, 2 및 실시예 1과 동일하게 약학적 조성물을 제조

하였다. 상기 제조된 조성물 0.2 mL을 각각 배양된 CT-26 셀 2×10^6 개를 넣고 300 mW/cm^2 의 근적외선을 20분 동안 조사한 후, 차가운 PBS로 2번 세정하고 아넥신 결합 버퍼 5 μL 에 아넥신 V-FITC 및 프로피디움 아이오다이드 (PI, Propidium iodide)를 5 μL 를 넣어 염색하였다. 상기 염색된 셀을 488 nm의 아르곤 레이저를 갖춘 세포 유속분석기(FACScalibur flow cytometer)를 이용하여 분석하고 도 9 및 표 1에 나타내었다.

표 1

	비교예 1 + PEG	비교예 1 + PEG + NIR	산화티타늄 나노튜브	비교예 2 + PEG + NIR	실시예 1 + PEG + NIR
세포괴사	1.51	1.87	0.98	48.41	91.58
후기 세포사멸	0.05	0.27	0.55	1.00	7.07
전기 세포사멸	0.02	0.11	2.08	49.82	1.35
살아있는 세포	98.42	97.75	96.39	0.77	0.00

도 9는 세포유속분석기의 결과로 사분면으로 나누어 보았을 때, 왼쪽 상단에서부터 시계 반대방향으로 세포괴사, 살아있는 세포, 전기 세포사멸, 후기 세포사멸을 뜻한다. 또한 X축은 아넥신 V-FITC, Y축은 PI로 염색된 세포 수를 뜻한다. 도 9의 결과를 상기 표 1에 옮겨 나타낸 바에 따르면, 산화티타늄 나노튜브의 농도가 높을수록 괴사한 세포의 비율 및 후기 세포사멸의 비율이 높아지며, 산화티타늄 나노튜브 입자가 가장 높은 농도로 함유된 실시예 1에 근적외선을 조사한 경우 대장암 세포가 모두 제거되었음을 확인하였다. 또한 산화티타늄 나노튜브의 농도가 낮은 경우 세포형태와 내부의 생화학적 변화로 세포가 죽는 세포사멸(apoptosis)의 비율이 높은 반면, 산화티타늄 나노튜브의 농도가 높을 경우 자극에 의해 일어나는 세포의 죽음인 세포괴사(necrosis)의 비율이 높음을 알 수 있었다.

<실험예 10> 산화티타늄 나노튜브의 농도에 따른 종양크기 변화

산화티타늄 나노튜브의 농도에 따른 종양크기의 변화를 알아보기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

동물 사육 및 모든 실험 절차는 동물실험에 대한 법칙 및 규제에 의거하여 진행되었다. 실험을 위하여 사용한 마우스는 생후 6~7주이며, 무게가 28~31 g인 마우스로서 각 실험군 마다 3마리씩 사용하였다. CT-26 대장암 세포를 각 마우스의 등에 이식한 후 분리된 케이지에 넣어 먹이와 물을 주어 사육하였다. 종양의 크기는 1주 이내에 직경이 1 cm 이하로 자랐다. 근적외선 조사 24시간 전에 케타민(100 mg/mL)과 림폰(100 mg/mL)을 9 : 1로 섞어 40 μL 를 주사하여 마취하고, 피부를 덮고 있는 털을 밀었다. 7 mm 이하인 종양에 100 μL 의 비교예 3 및 실시예 1을 직접 주사하고, 300 mW/cm^2 의 근적외선을 하기 표 2에 기재된 바와 같이 근적외선을 조사하였으며, 2회 이상의 근적외선 조사를 할 경우 48시간 경과 후 조성물을 동량으로 주사한 후 방사선을 조사하였으며, 결과를 표 2 및 도 10에 나타내었다.

먼저, 산화티타늄 나노튜브의 농도와 파괴된 종양과의 관계를 알아보기 위하여 조사한 근적외선의 세기를 300 mW/cm^2 , 조사 시간을 20분씩 2회로 고정하고 a 및 d의 경우를 살펴보면 산화티타늄을 다량 포함하고 있는 조성물이 많은 양의 종양을 파괴한 것을 볼 수 있다. 방사선의 세기가 다른 b 및 d의 경우는 방사선의 세기가 강할수록, 방사선의 세기가 같을 경우 조사시간이 길수록 종양 파괴의 효과가 크다는 것을 알 수 있었다. 또한, 실시예 1의 조성물을 주사하고 같은 세기의 근적외선을 같은 시간 조사하였을지라도 연속적으로 1회 조사한 경우 종양 파괴의 효과가 클 뿐 아니라 피부의 손상정도가 작다는 것은 도 10의 (e)를 통하여 확인할 수 있었다.

표 2

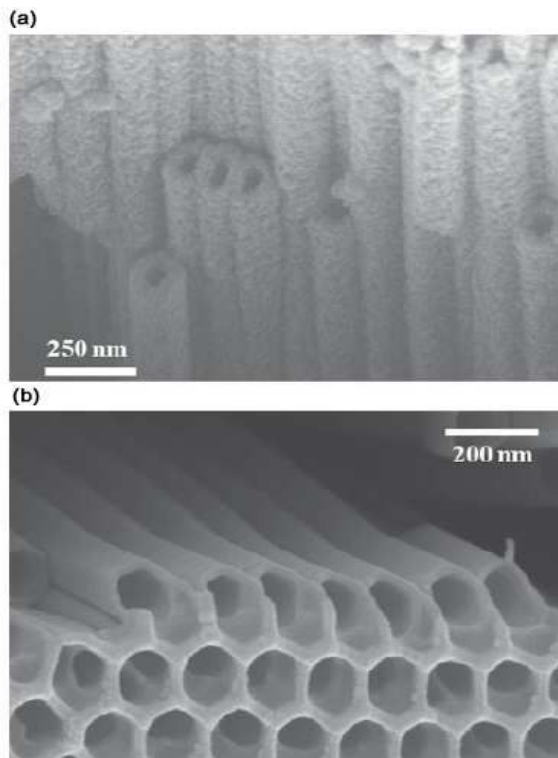
	레이저 세기 (mW/cm^2)	조사 시간(분)	조성물 (mg/mL)	마우스 (마리)	파괴된 종양 평균 직경(mm)
(a)	300	20+20	실시예 1	3	4.4
(b)	400	20+20	실시예 1	3	6.5
(c)	300	20+20+20	실시예 1	3	5.2
(d)	300	20+20	비교예 3	3	2.7
(e)	300	60	실시예 1	3	4.3
(f)	0	0	0	3	0

[0091] 반면, 도 10에서 확인할 수 있는 바와 같이 (e)를 제외한 산화티타늄 나노튜브를 주입하지 않은 경우보다 산화티타늄 나노튜브를 주입한 경우 종양의 크기가 더 커진 것을 볼 수 있는데, 이는 종양의 성장속도가 빨라졌기 때문이다. 상기와 같이 종양의 성장속도가 빨라지게 된 이유는 공기 중의 산소분자와 조직의 탄소, 수소 및 산소와 같은 원소의 반응으로 인한 것으로 판단되는데, 산화티타늄 나노튜브가 주입된 부분에서 탄화가 개시되고 종양에 주사된 산화티타늄 나노튜브는 다량($100\ \mu\text{l} \times 2$ 회 이상)이 주입되어 주변의 세포, 외피 및 피하조직으로 확산되는 것으로 볼 수 있다. 종양 표면의 일부가 탄화되면, 탄화된 종양세포는 근적외선의 이상적인 흡수체로 작용하여 종양의 탄화가 가속화되는 것으로 알려져 있다. (e)의 경우는 산화티타늄 나노튜브의 주입량이 $100\ \mu\text{l}$ 으로 1회만 주입되어 양이 적으며 1회만 주사하므로 주변 세포로 확산되지 않게 되며, 근적외선의 조사 시간이 길어 충분한 효력을 발휘할 수 있는 것이다.

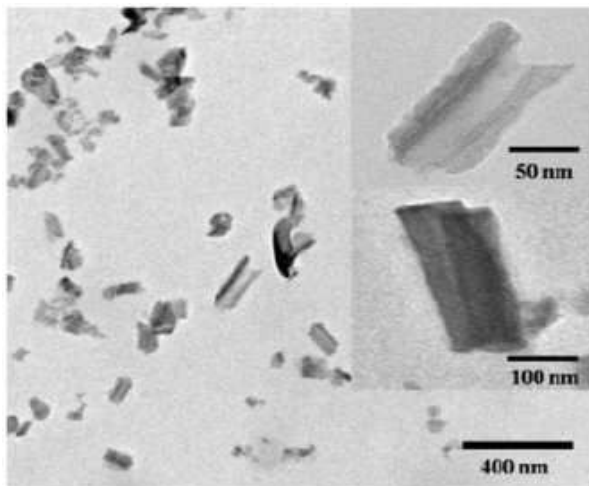
[0092] 결과적으로 종양의 크기에 알맞은 소량의 대장암 치료용 조성물을 주사하여, 충분한 근적외선의 조사시간을 주는 것이 본 발명에 따른 대장암 치료용 조성물을 사용하는 방법이 될 것임을 보여주는 것이다.

도면

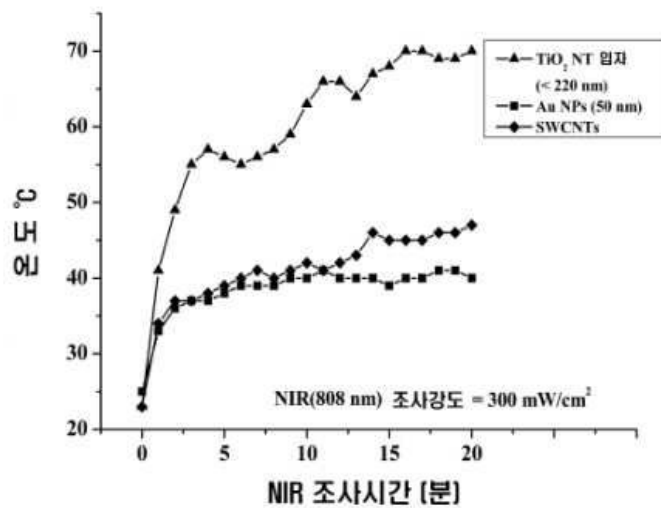
도면1



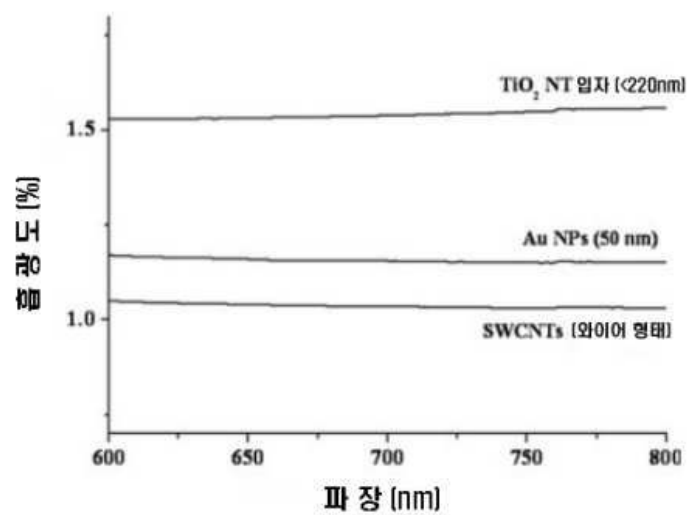
도면2



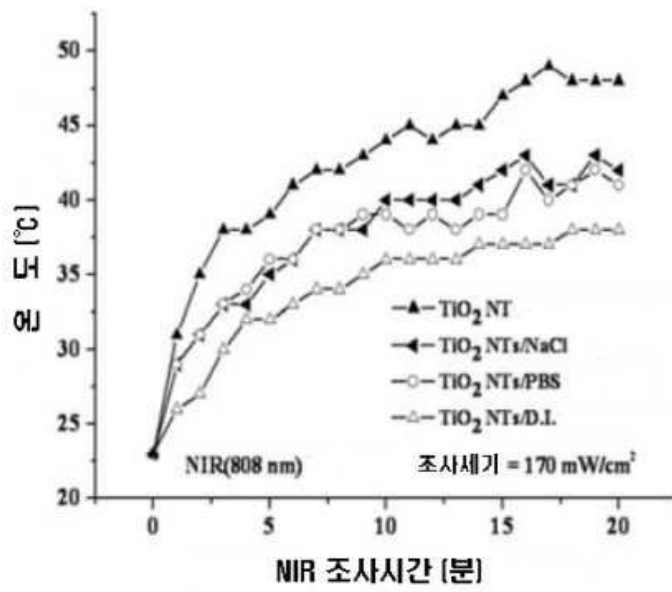
도면3



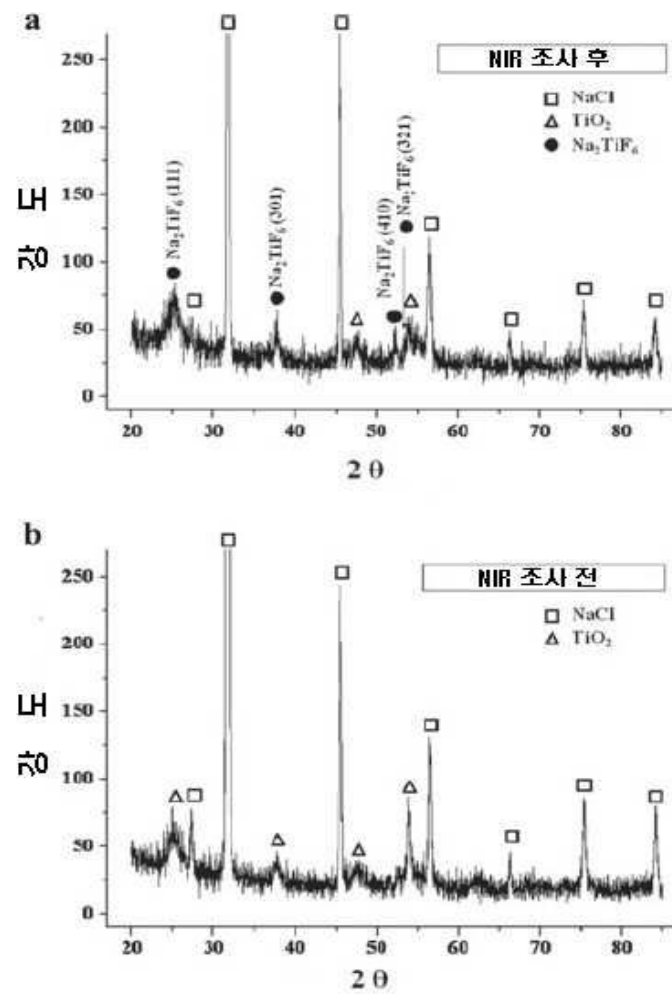
도면4



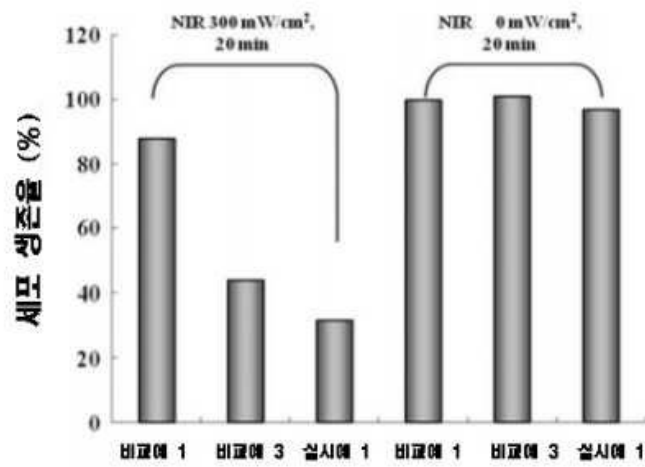
도면5



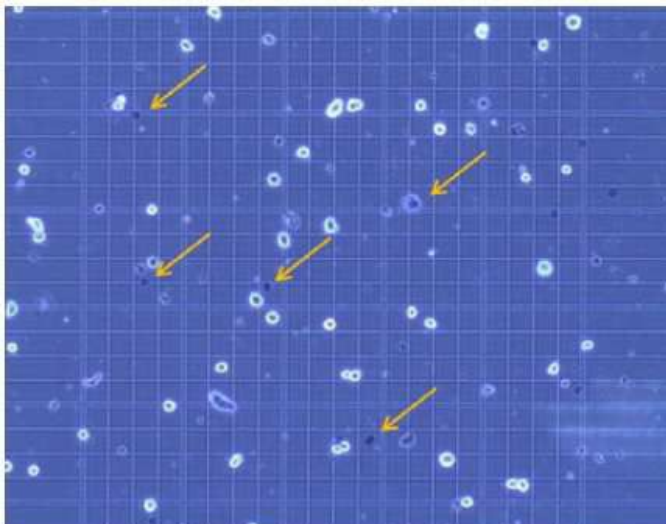
도면6



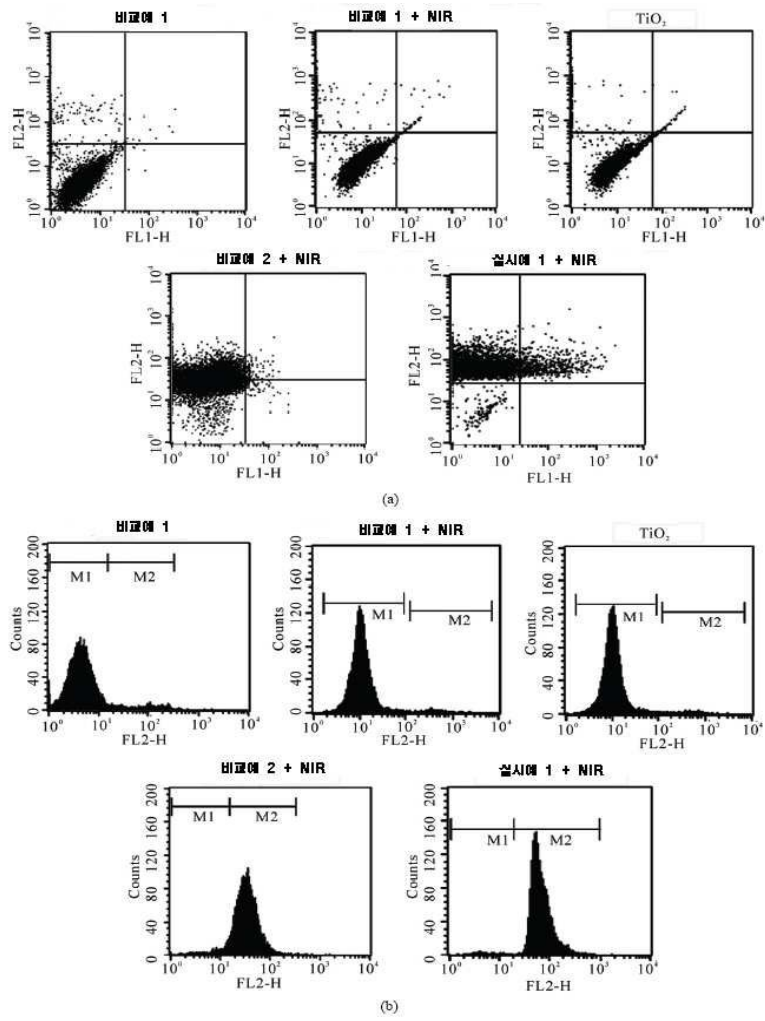
도면7



도면8



도면9



도면10

