(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0040788
(43) 공개일자 2014년04월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61B 18/00 (2006.01) *A61N 2/02* (2006.01)
A61B 18/12 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0024883(분할)
(22) 출원일자 2014년03월03일
심사청구일자 2014년03월03일
(62) 원출원 특허 10-2012-0009965
원출원일자 2012년01월31일
심사청구일자 2012년01월31일
(30) 우선권주장
1020110010114 2011년02월01일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울시 성북구 안암로 145 (안암동)
(72) 발명자
김영근
서울 강남구 압구정로61길 37, 72동 1109호 (압구정동, 한양아파트)
박정래
미국 메사추세스 01810 앤도버, 2201, 로우웰 스트리트 아파트
최성희
미국 아이다호 83843 모스코우 화이트 애비뉴 2451
(74) 대리인
특허법인다나

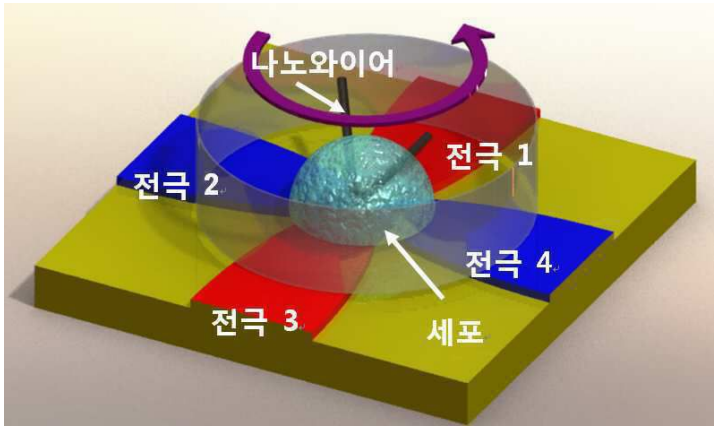
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **회전하는 나노선 및 이를 이용한 세포 괴사 유도 방법**

(57) 요 약

본 발명은 이중극자(dipole)를 갖고 있는 자성 나노선(magnetic nanowire)을 제조하여 세포 내에 도입한 후, 교류 자기장 인가에 따른 물리적 회전력을 이용하여 세포를 교반하여 세포를 괴사시키는 세포괴사 방법과 원리를 제시하고 있다. 따라서 본 발명의 세포 괴사 유도용 조성물을 암 세포와 같이 제거가 요구되는 세포에 적용하면, 세포 내로 도입된 나노선이 회전함으로써 세포에 물리적 충격을 가하여 괴사시킬 수 있다. 부가적으로 자기장 인가에 따른 유도전류에 의한 발열로 온열치료 효과를 가미할 수 있으며 나노선 표면에 약물을 부착하여 치료효과를 높일 수도 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20100002191
부처명	미래창조과학부
연구사업명	미래유망파이오니아사업
연구과제명	자성천이제어와 영속발광이 가능한 복합기능마그네틱-포토닉 나노결정 개발
기 여 율	1/1
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2010.03.01 ~ 2011.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

이중극자(dipole)를 갖고 있는 자성 나노선; 및 상변조 4전극을 갖는 세포 괴사 장치를 포함하며, 상기 자성 나노선은 상기 세포 괴사 장치에 의한 교류 자기장 인가 시 회전하여 세포에 물리적인 힘을 가하는 것을 특징으로 하는 세포 괴사 유도용 키트.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 나노선은 금속 나노선, 자성체 나노선, 또는 금속/자성체 복합 나노선인 세포 괴사 유도용 키트.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 금속은 금, 백금, 팔라듐, 구리, 알루미늄 또는 이들의 합금인 세포 괴사 유도용 키트.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 자성체는 니켈, 코발트, 철, 가돌리늄, 이들의 합금 또는 이들의 산화물인 세포 괴사 유도용 키트.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 나노선은 1 내지 1000 ㎚의 직경을 가지며, 1 내지 100 ㎛의 길이를 갖는 것인 세포 괴사 유도용 키트.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 나노선은 양 말단에 전기적 또는 자기적인 이중극자가 형성되어 있는 것인 세포 괴사 유도용 키트.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 나노선은 다층(multilayer) 구조의 바코드(barcode) 형 나노선인 세포 괴사 유도용 키트.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 나노선은 코어쉘(core-shell) 구조의 나노선인 세포 괴사 유도용 키트.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 나노선은 표적 지향성 리간드와 결합되어 있는 것인 세포 괴사 유도용 키트.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 나노선은 약물이 담지되어 있는 것인 세포 괴사 유도용 키트.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 암 세포와 같이 제거가 필요한 세포를 나노선의 회전력을 이용하여 물리적으로 괴사시키는 기술, 즉, 세포 괴사 유도를 위해 사용할 수 있는 나노선에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 나노기술과 의학의 이점을 융합시켜 나노메디컬기술(nanomedical technology)이라고 불리는 새로운 영역을 발굴해 내는 학계와 산업계의 노력이 계속되고 있다. 나노구조(nanostructrue)에 관한 기술은 전자소자, 자성소자, 촉매, 의료 진단 치료 등 다방면에 응용될 수 있다. 특히, 나노틀(nanotemplate)을 이용하여 제작하는 나노선(nanowire)은 크기, 모양, 결정도 등을 쉽게 조절할 수 있어 크게 주목을 받고 있다. 실제로, 나노선은 나노기전시스템, 차세대 고집적 자성 메모리, 연료전지, 나노바이오센서, 세포분리 등 활용범위가 매우 넓다. 나노자성체(nanomagnet)란 구형, 선형 또는 튜브형과 같은 3차원의 구조체로서, 한 차원의 최소단위(두께, 직경 또는 길이)가 수백 나노미터 이하이며, 자기적 특성을 갖는 구조체를 말한다. 이러한 나노자성체는 핵산 및 단백질 진단시약, 자기공명영상(magnetic resonance imaging, MRI)의 조영제, 악성세포에 대한 발열제의 첨단소재로 쓰인다. 더욱이, 상기 나노자성체는 화학요법의 첨가제, 세포막 조절제, 세포분리제 및 표식된(labeled) 세포나 다른 생체분자의 진로추적제, 약물전달제, 바이오센서 등 많은 분야에 적용 가능한 첨단소재로도 쓰인다. 그러나 지금까지 나노선에 자기장을 가하여 빠르게 회전시켜 세포를 파괴함으로써 세포 괴사를 유도하고자 하는 시도에 대해서는 보고된 바 없다.

[0003] 현재 나노메디컬기술에서 가장 활발히 연구되고 있는 소재는 귀금속과 자성체이다. 금(Au)과 같은 귀금속 소재의 경우 생체적합성(biocompatibility)을 갖고 있어 이를 나노기술에 접목시킬 경우 바이오 기술분야에서 응용이 가능하다는 장점을 갖는다. 또한, 금은 표면을 화학적, 생물학적으로 처리하여 생체물질(핵산 및 단백질)과 접합할 수 있도록 생체기능성(biofunctionality)을 부여하기 용이하다. 즉, 금의 표면에 리간드(ligand)를 수식하여 질병표지 인자인 바이오마커(biomarker)나 링커(linker) 등을 부착할 수 있다. 따라서, 의료분야에서는 금을 이용한 고감도 진단(diagnosis), 분석(assay), 약물/유전자 전달 그리고 열치료 등의 개선이 가능하므로, 금에 대한 연구가 활발하다. 한편, 철(Fe)과 같은 소재는 자성 특성을 갖는다는 점에서 매력적이다. 특히 생명과학과 의학에서의 잠재적인 응용분야로 꼽히고 있는, MRI의 조영제, 악성세포에 대한 발열요법, 화학요법과 방사선요법의 첨가제, 세포막 조절, 자성 분리와 세포 배열 그리고 표식된(labeled) 세포나 다른 생체 물질의 진로추적, 약물전달, 특정한 부위를 대상으로 작용하는 약물, 유전자 및 방사선 핵 치료, 그밖에 나노탐침과 바이오센서 분야 등 많은 분야에 적용되는 신기술 분야에서는 나노구조물의 움직임을 제어하기 위해 자기적 성질을 이용하는 연구가 많이 진행되고 있다.

[0004] 다층구조의 바코드(barcode) 나노선과 관련한 연구는 많은 그룹에서 진행되고 있다. 본 발명자 그룹 또한 생체적합성을 갖는 나노선에 대한 연구를 지속적으로 수행해 왔으며, ‘다층 나노선 및 이의 형성방법’에 관해 한국 특허출원 제2006-0107410호(등록특허 제10-0848689호)를 비롯하여 미국, 일본과 유럽에 특허출원을 하였으며, '코어쉘 나노선 및 그 제조 방법‘에 관하여 한국 특허출원 제2008-0053146호를 출원한 바 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 교류 자기장 하에서의 나노선의 물리적 회전력 및 자기유도전류로 인한 열로 인하여 세포를 괴사시킬 수 있는 나노선을 포함하는 세포 괴사 유도용 조성물 및 이를 이용한 세포 괴사 유도 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명은 이중극자를 갖고 있는 자성 나노선을 포함하는 세포 괴사 유도용 조성물 및 이를 이용한 세포 괴사 유도 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0007] 이중극자를 갖는 자성 나노선을 이용하면 자기장 적용시 세포 내에 도입된 나노선이 회전함으로써 세포에 물리적 충격을 가할 수 있고, 부가적으로 자기 유도 전류로 인한 나노선의 발열로 인하여 온열 치료 효과를 거둘 수 있으므로, 세포를 효과적으로 사멸시킬 수 있게 된다.

도면의 간단한 설명

[0008] 도 1은 외부 교류자기장 인가시 나노선이 90도씩 회전할 수 있도록 고안된 상변조 4극 전극을 갖는 세포괴사 유도 장치의 모식도를 보여준다.

도 2(a)는 용액 중에 현탁되어 있는 이중극자가 형성된 자성 나노선의 광학현미경 사진이다. 도 2(b)는 상기 나노선이 자기장 인가시 회전하는 모습을 나타낸 도면이다.

도 3은 자성 나노선이 들어간 암 세포가 교류자기장 인가시 상기 자성 나노선에 의해 회전하는 모습을 관찰한 광학 현미경 사진이다.

도 4는 세포에 내재된 자성 나노선에 교류 자기장을 인가, 회전을 유도하여 이에 따른 염증(inflammation) 반응의 수치를 정량한 결과를 보여준다.

도 5는 이중극자를 갖는 자성 나노선을 생쥐의 종양 부위에 도입하고(도 5A), 여기에 상변조 4전극을 갖는 세포괴사 유도 장치를 이용하여 교류 자기장을 적용함으로써 종양의 괴사를 유도(도 5B)하는 방법을 모식화한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0009] 본 발명은 이중극자를 갖고 있는 자성 나노선을 포함하는 세포 괴사 유도용 조성물 및 이중극자를 갖고 있는 자성 나노선을 이용한 세포 괴사 유도 방법, 즉, 이중극자를 갖고 있는 자성 나노선의 세포 괴사 유도를 위한 용도를 제공한다.

[0010] 이중극자를 갖고 있는 자성 나노선를 이용하여 세포 괴사를 유도하는 조성물 및 방법은 자기장 하에서 나노선을 회전시킴으로써 물리적인 회전력으로 인해 세포의 세포막을 파괴하는 것에 기본 원리를 두고 있다. 또한, 자기장 인가시 나노선에 흐르는 자기유도전류는 세포를 가열하여 사멸하는데 추가적인 역할을 할 수 있다.

[0011] 이중극자를 갖고 있는 자성 나노선을 이용하여 세포 괴사를 유도하는 방법은 도 1을 예로 들어 설명할 수 있다. 도 1은 외부 교류자기장 인가시 나노선이 90도씩 회전할 수 있도록 고안된 세포괴사 장치의 모식도이다. 도 1에서는 설명을 위해 나노와이어가 도입된 세포가 마치 전극 가운데 위치하는 것처럼 예시하였으나, 실제로는 도 5에서 예시한 바와 같이, 살아있는 동물 내의 세포 괴사의 유도가 필요한 조직 또는 세포에 자성 나노선을 도입하고, 자성 나노선을 회전시키는 수단으로서 상변조 4전극을 갖는 세포괴사 장치를 이용하게 된다. 도 1에서 사용한 상변조 4전극을 갖는 세포괴사 장치는 예를 들어 기판 상에 Au 박막을 마이크로패터닝하는 방식으로 형성할 수 있다.

[0012] 본 발명에서 사용되는 나노선은 금속 나노선, 자성체 나노선, 또는 금속-자성체 복합 나노선을 모두 포함한다. 즉, 자성 나노선을 위주로 하되, 단일 자성 나노선, 자성금속과 비자성 금속재료가 합금화된 나노선, 자성체 나노선 표면부에 비자성체로 코팅된 코어-쉘 형태의 나노선, 자성-비자성체가 교대로 적층된 바코드 나노선과 같은 다양한 나노선 구조를 고안하여 원하는 조성과 물리적 특성을 얻을 수 있다. 이러한 나노선에 사용되는 금속으로는 Au, Pt, Pd과 같은 귀금속뿐만 아니라, Fe, Cu, Al 등의 금속, 또는 이들의 합금을 포함할 수 있다. 한편, 상기 나노선에 사용되는 자성체로는 Fe, Co, Ni, Gd, 이들의 합금 및 이들의 산화물 등을 포함한다. 예를 들어, Fe, Co, Ni, Gd, 및 산화철과 같은 강자성 물질이 사용될 수 있다.

[0013] 상기 나노선은 1 내지 1000 nm, 예를 들어, 3 내지 300nm의 직경을 가질 수 있다. 또한, 상기 나노선은 1 내지 100 ㎛의 길이를 가질 수 있다.

[0014] 한편, 나노선이 자기장 하에서 회전할 수 있으려면, 나노선의 양 말단에 이중극자가 형성되어 있어야 한다. 이중극자란 양과 음의 자극 또는 전극이 서로 마주 대하고 있는 것을 말한다. 따라서, 본 발명에 따른 이중극자를 갖고 있는 나노선은 전기적 또는 자기적인 이중극자가 형성되어 있는 것을 의미한다. 본 발명에서 사용되는 나

노선의 소재에 따라 이중극자를 인위적으로 형성시킬 필요성이 있다. 즉, 자성체가 포함되어 있는 나노선 중에는 나노선의 양 말단에 이중극자가 형성되어 있을 수 있으므로 이중극자를 인위적으로 형성시킬 필요성이 없다. 그러나, 나노선 자체에 이중극자가 이미 형성되어 있지 않은 경우에는 전기적 또는 자기적인 방법을 통해 이중극자를 형성시킬 수 있다. 일예로 비자성 금속 나노선 양끝단에 자성 나노선을 형성하거나 비자성 나노선을 자성물질로 코팅하는 방법이 있다. 전기적 또는 자기적인 이중극자의 형성 방법은 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 금속 나노선을 AC 전기장 하에서 상변조 4극 전극(phase-shifted four electrode)을 이용하여 전기적인 이중극자를 형성시킬 수 있다. 또한, 강자성체를 포함하는 나노선을 영구자석으로 자화시키는 방법을 통해 자기적인 이중극자를 형성시킬 수도 있다. 따라서 이중극자를 형성시키는 단계의 적용 여부 및 이중극자를 형성시키는 방법은 나노선의 소재에 따라 달라질 수 있다.

[0015] 도 2(a)는 용액 중에 현탁되어 있는 이중극자가 형성된 자성 나노선의 광학현미경 사진이다. 도 2(b)는 상기 나노선이 자기장 인가시 회전하는 모습을 모식화한 도면이다.

[0016] 도 3은 자성 나노선이 들어간 암 세포가 자기장 인가시 전자기 유도현상에 의해 상기 자성 나노선에 의해 회전하는 모습을 관찰한 광학 현미경 사진이다. 도 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, 이중극자를 갖는 자성 나노선을 이용하면 세포 내에 상기 나노선이 도입되어 회전함으로써 세포에 물리적 충격을 가할 수 있다. 또한, 자기전류로 인한 나노선의 발열로 인하여 세포를 사멸시킬 수 있게 된다.

[0017] 세포가 외부 충격을 받으면 염증 반응을 유발한다. 인터루킨-6는 외상 면역반응과 관련하여 염증을 유발하는 사이토카인(cytokine)의 일종으로 발생량에 따라 세포반응을 정량화할 수 있다. 도 4는 외부 자극의 정도 즉 나노선의 회전속도에 따른 인터루킨-6의 반응량을 보여준다. 나노선의 회전속도가 100~500 rpm에서 세포 반응이 최대값을 보였다. 이 예에서는 인간배아 신장세포(HEK-293)의 인터루킨-6(Interleukin-6) 세포 반응을 관찰하였다. 인터루킨-6는 외상 면역반응과 관련하여 염증을 유발하는 사이토카인(cytokine)이다. (A) 나노선이 회전하지 않고 있을 때의 세포 반응, (B) 5분 동안 100 rpm으로 회전한 나노선에 의한 세포 반응, (C) 약 5분 동안 500 rpm으로 회전한 나노선에 의한 세포 반응, (D) 약 5분 동안 700 rpm으로 회전한 나노선에 의한 인터루킨-6 세포반응의 수치를 정량한 결과로 나노선의 분당 회전수에 따른 세포 반응이 달라짐을 확인할 수 있었고, 나노선의 회전속도가 100~500 rpm에서 세포 반응이 최대값을 보였다. 이 나노선의 회전수 범위에서 인터루킨-6 세포반응이 극대화되어 세포가 사멸이 효과적으로 이루어짐을 알 수 있었다.

[0018] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 나노선은 다층(multilayer) 구조의 바코드(barcode) 형 나노선일 수 있다. 예를 들어, 상기 나노선은 자성체/귀금속 바코드형 다층 나노선일 수 있다. 금과 같은 귀금속은 뛰어난 생체적합성을 제공해 주며, 항체와 같은 표적 지향성 리간드를 결합시킬 수 있는 생체기능성을 부여할 수 있게 해 준다. 또한, 자성체는 자기공명영상 등에 사용할 수 있게 해 준다. 또한, 자성체와 귀금속 모두 자기장 인가시 발열을 통해 암의 온열 치료를 가능하게 해 준다. 이와 같은 바코드형 다층 구조의 나노선 및 그의 제조방법에 대해서는 당업계에 잘 알려져 있다. 본 발명자의 선행 특허인 대한민국 등록특허 제10-0848689호에서는 이에 대해 구체적으로 설명하고 있으며, 이는 본원의 일부로서 본 명세서에서 참조된다.

[0019] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 나노선은 코어쉘 구조의 나노선일 수 있다. 예를 들어, 상기 나노선은 코어 나노선이 자성체이고, 쉘 층이 귀금속으로 이루어진 것일 수 있다. 쉘 층에 귀금속을 포함시킴으로써 생체적합성과 생체기능성을 최대화할 수 있다. 이와 같은 코어쉘 구조의 나노선 및 그의 제조방법에 대해서는 당업계에 잘 알려져 있다. 본 발명자의 선행특허인 대한민국 특허출원 제10-2008-0053146호에서는 이에 대해 구체적으로 설명하고 있으며, 이는 본원의 일부로서 본 명세서에서 참조된다.

[0020] 상기 나노선은 필요에 따라 생체적합적인 고분자 물질로 코팅될 수 있다. 또한, 상기 나노선은 표적 지향성 리간드(ligand)와 결합될 수 있다. 표적 지향성 리간드는 본 발명에 따른 나노선을 이용하여 치료하고자 하는 조직이나 세포에 특이적(specific)으로 도입될 수 있도록 표적화시키는 리간드를 의미한다. 이러한 표적 지향성 리간드로는 핵산, 앱타머, 항원, 항체, 뿐만 아니라, 세포 표면의 특정 수용체와 결합하는 것으로 알려져 있는 화합물 리간드 또한 유용하게 사용할 수 있다. 이러한 핵산, 앱타머, 항원, 항체, 항체, 화합물 리간드의 구체적인 종류는 당업계에 잘 알려져 있다. 표적 지향성 리간드와 나노선 또는 나노선에 코팅된 코팅층 간의 결합은 물리적 결합이나 나노선 또는 코팅층 상에 존재 또는 형성된 기능기 간의 공유 결합을 통해 이루어질 수 있다. 이러한 기능기들은 나노선, 코팅층, 또는 리간드 상에 본래 존재하는 것일 수 있으나, 필요한 경우 상호결합가능한 기능기를 갖도록 코팅층이나 리간드를 개질할 수 있다. 코팅층 상에 존재하는 기능기와 리간드 상에 존재하는 기능기는 서로 결합을 형성할 수 있도록 공지의 기능기 결합예로부터 선택될 수 있다.

[0021] 한편, 본 발명에서 사용되는 나노선은 약물이 담지되어 있는 것일 수 있다. 자기장 하에서 회전하는 나노선은

혈액의 흐름에도 불구하고 혈관 내의 이동이 일반적인 나노선에 비해 자유롭기 때문에 약물전달체로도 유용하게 사용할 수 있다. 나노선에 약물이 담지되어 있는 형태는 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 나노선에 항암제가 담지되어 있는 경우 본 발명의 나노선은 열 치료, 기계적 충격뿐만 아니라 화학요법을 통해 암 세포를 사멸시킬 수 있게 된다.

[0022] 나노 물질을 이용한 암세포의 파괴에 대한 여러 가지 방법들은 제시 되었으나, 아직까지 암세포 파괴 후 어떻게 인체 내부로부터 제거 하느냐에 대한 구체적인 방법은 제시되지 않아, 가령 어느 정도 양의 나노 물질은 배설물과 함께 몸 밖으로 배출된다고 하더라도 배출되지 않고 인체에 남아 있게 될 나노물질이 건강한 세포에게도 어느 정도 유해할 수 있다. 본 발명에 따른 자성 나노선의 사용은 나노선에 의한 세포 괴사 이후에, 자기장을 이용한 자성 나노선의 채취를 용이하게 해 주므로 이러한 문제를 해소할 수 있다.

[0023] 본 발명에 따른 세포 괴사 유도용 조성물은 의약 분야에서 통상 사용되는 담체 및 비히클을 포함할 수 있다. 구체적으로 이온 교환 수지, 알루미나, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질(예, 사람 혈청 알부민), 완충 물질(예, 각종 인산염, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 포화 식물성 지방산의 부분적인 글리세라이드 혼합물), 물, 염 또는 전해질(예, 프로타민 설페이트, 인산수소이나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨 및 아연염), 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌 글리콜 또는 양모지 등을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 본 발명에 따른 세포 괴사 유도용 조성물에는 또한 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 유화제, 현탁제, 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0024] 한 구체예에서, 본 발명에 따른 세포 괴사 유도용 조성물은 비경구 투여를 위한 수용성 용액으로 제조할 수 있으며, 바람직하게는 한스 용액(Hank's solution), 링거 용액(Ringer's solution) 또는 물리적으로 완충된 염수와 같은 완충 용액을 사용할 수 있다. 수용성 주입(injection) 현탁액은 소디움 카르복시메틸셀룰로즈, 솔비톨 또는 덱스트란과 같이 현탁액의 점도를 증가시킬 수 있는 기질을 첨가할 수 있다.

[0025] 본 발명의 세포 괴사 유도용 조성물의 다른 바람직한 양태는 멸균 주사용 수성 또는 유성 현탁액의 멸균 주사용 제제의 형태일 수 있다. 이러한 현탁액은 적합한 분산제 또는 습윤제(예를 들면 트윈 80) 및 현탁화제를 사용하여 본 분야에 공지된 기술에 따라 제형화할 수 있다. 멸균 주사용 제제는 또한 무독성의 비경구적으로 허용되는 희석제 또는 용매 중의 멸균 주사 용액 또는 현탁액(예를 들면 1,3-부탄디올 중의 용액)일 수 있다. 사용될 수 있는 비히클 및 용매로는 만니톨, 물, 링거 용액 및 등장성 염화나트륨 용액이 있다. 또한, 멸균 비휘발성 오일이 통상적으로 용매 또는 현탁화 매질로서 사용된다. 이러한 목적을 위해 합성 모노 또는 디글리세라이드를 포함하여 자극성이 적은 비휘발성 오일은 그 어느 것도 사용할 수 있다.

[0026] 상기 세포 괴사 유도용 조성물을 생체에 투여하는 단계는 의약 분야에서 통상적으로 이용되는 경로를 통해 투여될 수 있으며, 비경구 투여가 바람직하고 예를 들어 정맥내, 복강내, 근육내, 피하 또는 국부 경로를 통하여 투여할 수 있다.

[0027] 본 발명은 또한 이중극자를 갖고 있는 자성 나노선 또는 이를 포함하는 조성물을 이용한 세포 괴사 유도 방법에 관한 것이다. 본 발명은 이중극자(dipole)를 갖고 있는 자성 나노선을 포함하는 조성물을 대상체에 투여하고, 대상체에 자기장을 인가하는 것을 포함하는 세포 괴사 유도 방법을 제공한다. 본 발명에 있어서, 상기 대상체는 인간을 포함하는 포유동물을 의미한다. 본 발명에 따른 이중극자를 갖고 있는 자성 나노선 또는 이를 포함하는 조성물은 특히 세포 괴사의 유도가 필요한 세포 또는 조직에 투여될 수 있다. 도 4는 자성 나노선을 포함하는 조성물을 대상체에 투여하고 교류 자기장을 인가하였을 때 열과 기계적 충격으로 인하여 세포가 사멸되는 과정을 모식화한 것이다. 기계적인 충격과 열 이 두 가지 모두가 세포를 사멸시키는데 사용될 수 있기 때문에 세포 괴사 유도의 효율성을 높일 수 있다.

[0028] 한 구체예에서, 상기 세포 괴사 유도 방법은 상변조 4전극을 갖는 세포 괴사 유도 장치를 이용하여 수행될 수 있다. 한편, 본 발명의 세포 괴사 유도용 조성물을 치료에 적용함에 있어서, 나노선의 회전 속도는 100 내지 500 rpm의 회전속도를 갖도록 하는 것이 바람직하다. 이를 위해, 자기장은 이에 제한되는 것은 아니나 약 100 Hz 내지 1 MHz의 진동수를 갖도록 할 수 있다. 나노선의 회전 속도, 자기장의 세기 등은 당업자에 의해 적절히 조정될 수 있을 것이다.

[0029] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로

구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0030] **[실시예]**

[0031] **제조예 : 나노선의 제조**

[0032] 니켈(Ni) 나노선을 이전 연구와 마찬가지로 아래와 같은 방법으로 생산하였다. 150 nm 평균 기공 지름(average nominal pore diameter)을 지닌 양극산화 알루미늄 (anodized aluminum oxide, AAO)틀의 나노 기공(nanopore) 안에 니켈 나노선을 전착하여 제작하였다. 본 발명에서 사용한 양극산화 알루미늄 나노틀은 알루미늄 호일을 0.3M 옥살산(oxalic acid)에서 양극산화시켜 제조한 것이다. 이 양극산화 알류미늄은 다수의 기공을 가지고 있다. 기공은 지름 150 nm 크기를 가지며, 균일하게 배열된 구조를 가진다. 전기도금을 위한 전해액(electrolyte)은 1 g/L Nickel(II) chloride, 25g/L $Ni(H_2NSO_3)_2$및 H_3BO_3액이 함유된 포함된 니켈 도금액 (nickel electrobath)이다. 니켈의 전착에 앞서, 양극산화 알루미늄 나노틀의 하단부에 열증착법(thermal evaporation)을 이용하여 200 nm 두께의 전도성 금 시드 층(conductive Au seed layer)을 형성시켰다. 이 금막은 전기도금시 음극 전극 역할을 한다. 양극산화 알루미늄 나노틀의 전도성 금 시드층을 카본 페이스트(carbon paste)를 이용하여 슬라이드 글라스(glass slide)에 고정시켰다. 이 양극산화 알루미늄 나노틀의 하단부에 증착된 Au 위에 상온에서 35 mA/cm^2의 전류밀도을 인가하여 나노틀 기공 안에 니켈 이온을 전기도금하여 나노선으로 형성시켰다. 상대전극(counter electrode)으로 백금(Pt)-나이오븀(Nb) 전극을 사용하였다. 나노선 증착 후, 개별의 니켈 나노선을 분리하기 위해 20 wt% 수산화나트륨(NaOH)으로 알루미나 틀(alumina template)을 제거하였다. 그 후, 이소프로필 알코올(isopropyl alcohol, IPA)로 니켈 나노선을 멸균하고, 10 % fetal bovine serum(FBS) 를 첨가한 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배양배지로 옮겼다.

[0033]

[0034] **원리예: 이중자극을 갖는 자성 나노선의 회전 원리**

[0035] 단일 니켈 나노선에서 자화반전(magnetization reversal)은 스위칭 자기장(switching field, H_{sw}) 값으로 정량화되며 가역적이다. 이때 자화는 반대방향으로 움직인다. 이 이동은 자화의 불안정한 상태와 일치한다. 작은 지름의 니켈 나노선의 경우, 이 자화 상태는 컬링 모드(curling mode)의 자화반전(magnetization reversal) 측면에서 진폭의 함수와 인가자기장의 방향을 정량적으로 설명할 수 있다. 연자성(soft magnetic) 나노선은 그들의 직경에 따라 트랜스버스 벽 모드(transverse wall mode)와 볼텍스 벽 모드(vortex wall mode)로 알려진 두 가지 다른 반전 모드로 전환할 수 있다. 얇은 나노선에서, 반전과정은 트랜스버스 벽 모드(transverse wall mode)에서 일어난다. 큰 지름의 나노선에서 반전은 볼텍스 벽 모드(vortex wall mode)에서 일어난다. 나노선의 양쪽 모드는 나노선의 끝부분부터 자구생성(domain nucleation)에 의해 자화반전이 발생하고, 계속적으로 전파된다. 결정자기이방성에너지(magnetocrystalline anisotropic energy)를 무시하면, 연자성(soft magnetic) 나노선에서 자구벽에너지(domain wall energy)는 주로 탈자기에너지(demagnetization energy)와 교환에너지(exchange energy)로 구성된다. 이 두 에너지의 경쟁이 자구벽구조(domain wall structure)를 결정한다.

[0036]

[0037] 자구벽에너지(domain wall energy)는 다음과 같이 극 좌표(polar coordinate)로 작성할 수 있다.

[0038] $$E = \int \left\{ A\left[(\nabla\theta)^2 + (\nabla\vartheta)^2 \sin^2\theta \right] + \varepsilon_m \right\} dV \qquad (1)$$

[0039] 상기 식(1)에서 θ , ϑ 는 각각 자화(magnetization)의 편각(polar angle)과 방위각(azimuthal angle)이다. A는 교환결합에너지밀도(exchange interaction energy density)이고, e_m는 탈자기에너지밀도(demagnetization energy density)이다. 첫 번째 용어는 교환결합에너지이며, 두 번째 용어는 탈자기에너지를 뜻한다.

[0040]

[0041] 트랜스버스 벽 모드(transverse wall mode)에서 볼텍스 벽 모드(vortex wall mode)로의 전환은 트랜스버스 벽

(transverse wall)과 볼텍스 벽(vortex wall)의 에너지가 같아지는 임계직경에서 발생한다. 이 힘은 국부자기장(local field)에 자기평행모멘트를 정렬시키기 위해 자기 나노선을 회전시키고, 나노선의 자기에너지를 최소화하기 위해 높은 자기장 쪽으로 이동시킬 수 있다. 따라서 외부자기장의 적용은 내재화된 강자성 니켈 나노선과 함께 세포의 위치를 변경할 수 있다.

[0042]

[0043] **실험예 1: 회전하는 나노선을 이용한 세포의 괴사 유도**

[0044] 역동적 나노선을 이용하여 살아있는 세포를 제거하기 위해 세포에 나노선을 내재화하고 외부에서 자기장을 조정하여 나노선을 회전시키는 방법을 제시한다. 본 발명의 한 구체예에 따른 나노선 회전을 위한 시스템에서는 도 1에서 볼 수 있는 바와 같이 각각 90° 위상변이에서 동일한 교류 주파수(AC frequency)를 방출하는 4개의 전극을 사용하여 내재화된 나노선을 포함하는 세포를 회전시킨다. 상기 미세전극(microelectrodes)은 유리 기판(glass substrates) 상에 150 nm 두께의 금 필름을 미세가공(microfabrication)함으로써 패터닝된다. 도 1에서는 설명을 위해 나노와이어가 도입된 세포가 마치 전극 가운데 위치하는 것처럼 예시하였으나, 실제로는 도 5에서 예시한 바와 같이, 살아있는 동물 내의 세포 괴사의 유도가 필요한 조직 또는 세포에 자성 나노선을 도입하고, 자성 나노선을 회전시키는 수단으로서 상변조 4전극을 갖는 세포괴사 장치를 이용하게 된다.

[0045] 도 2는 외부에서 적용된 교류 자기장(externally-applied ac magnetic field)에 의해 생성된 나노선의 회전 효과를 묘사하였다. 도 2(a)는 용액 중에 현탁되어 있는 이중극자가 형성된 자성 나노선의 광학현미경 사진이다. 도 2(b)는 상기 나노선이 자기장 인가시 회전하는 모습을 나타낸 도면이다. 세포의 회전으로부터 생긴 저항은 관성모멘트(moment of inertia)에 의해 결정된다. 세포가 20 μm 직경의 구형을 띤다고 가정하면, 관성모멘트(moment of inertia)는 4×10^{-25}kgm^{2}이다. 회전 나노선으로부터 산출된 토크(torque)는 세포를 잠재적으로 움직일 수 있다 ($\mathbf{t}=\mathbf{r}\times\mathbf{F}=3.09\times10^{-23}$N·m,**r**은 단일세포l의 직경이고, **F**는 회전을 위한 힘). 도 3은 교류 자기장에 의해 인간배아신장세포(HEK-293)에 내재화된 니켈 나노선의 회전 양상을 보여주는 광학 현미경 사진이다. 회전 속도는 약 500 rpm이다.

[0046]

[0047] **실험예 2: 교류 자기장으로 조정된 나노선의 회전속도에 따른 세포 사멸 양상**

[0048] 교류 자기장으로 조정된 나노선의 회전속도에 따른 인간배아신장세포(HEK-293)의 세포반응을 관찰하기 위하여 본 발명에서 제시된 나노선을 물리적으로 회전시키는 방법을 이용, 세포의 자극을 유도하여 인터루킨-6(Interleukin-6, I-6) 세포 반응을 관찰하였다. 인터루킨-6는 외상 면역반응과 관련하여 염증을 유발하는 사이토카인(cytokine)이다. 인터루킨-6는 국부적인 조직 트라우마(trauma)에 국부적으로 반응하여, 섬유모세포(fibroblast)에서 확연하게 상향 통제하는 후염증(pro-inflammatory) 사이토카인이다. 나노선에 대한 세포의 염증 반응을 밝혀내기 위해 인터루킨-6의 유전자 발현(gene-expression)이 측정된다. 도 4에서 볼 수 있는 바와 같이, (A) 나노선이 회전하지 않고 있을 때의 세포 반응 (B) 5분 동안 100 rpm으로 회전한 나노선에 의한 세포 반응; (C) 약 5분 동안 500 rpm으로 회전한 나노선에 의한 세포 반응; (D) 약 5분 동안 700 rpm으로 회전한 나노선에 의한 인터루킨-6 세포반응의 수치를 정량한 결과로 나노선의 분당 회전수에 따른 세포 반응이 달라짐을 확인할 수 있었고, 나노선의 회전속도가 100~500 rpm에서 세포 반응이 최대값을 보였다. 이 나노선의 회전수 범위에서 인터루킨-6 세포반응이 극대화되어 세포가 사멸이 효과적으로 이루어짐을 알 수 있었다. 자기장이 적용되지 않은 나노선 만을 주입한 경우에는 현격한 염증이 초래 되지 않았으나, 자기장이 적용되어 회전 속도가 100 rpm으로부터 700 rpm으로 증가함에 따라, 또한 회전 시간이 늘어남에 따라 섬유모세포 배양(fibroblast culture)의 세포 생존율이 최대 60-70% 감소하는 결과를 관찰할 수 있었다.

[0049]

[0050] 교류변조(AC modulation) 진폭(amplitude)과 속도(rate)는 세포 내에서 나노선 회전을 결정짓는 중대한 요인이 되며, 임펄스 교류 변조(impulsed ac modulation)를 조정하여 나노선의 회전수를 변화시킬 수 있다. 짧고 강한 자극은 효과적인 치료를 위해 필요하다. 또한, 자성체인 니켈 나노선에 교류 자기장을 인가함으로써 유도되는 전류에 발생하는 열로 국부적인 온도를 증가시켜 암세포의 괴사를 유도할 수도 있어 하나의 나노선을 이용하여 암세포 괴사를 유도할 수 있는 2가지 방법이 결합된 이점이 있다.

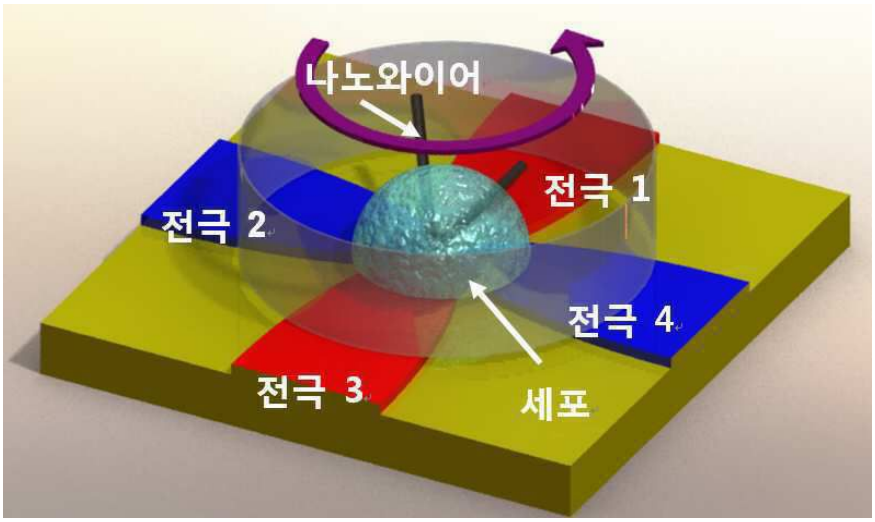
[0051]

[0052] **실험예 3: 회전하는 나노선을 이용한 췌장암 종양을 가진 생쥐의 암세포 괴사 유도**

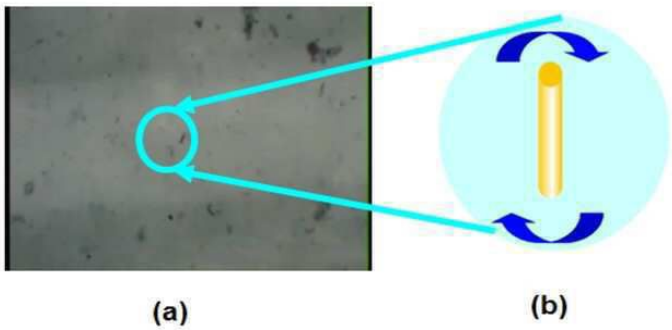
[0053] 건강한 생쥐의 체내에 췌장암 암세포를 주입하여 암종양을 유도 하였다. 도 5는 이중극자를 갖는 자성 나노선을 생쥐의 종양 부위에 도입하고, 여기에 상변조 4전극을 갖는 세포 괴사 유도 장치를 이용하여 교류 자기장을 인가함으로써 종양의 괴사를 유도하는 방법을 모식화한 것이다. 앞에서 서술한 바와 같이 적정한 농도의 나노선을 주입한 후, 상변조 4전극을 갖는 세포 괴사 유도 장치를 나노선이 주입된 종양 가까이 접근시킨 후 교류 자기장을 이용하여 종양 내 나노선의 회전을 유도하였다. 그 결과, 도 6A에서 볼 수 있는 바와 같이, hematoxylin & eosin에 의해 착색(stain)된 암세포의 일부가 괴사된 것을 관찰할 수 있었으며, 도 6B의 DNA 분해 패턴 젤 이미지 에 보이 듯이 laddering보다는 smear된 pattern이 관찰 되어, 회전 나노선에 의해 유도된 암세포의 사멸이 세포자멸(apoptosis) 보다는 괴사(necrosis)에 의한 세포사멸메커니즘(cell death mechanism)에 의해 실행되었음을 밝혀낼 수 있었다.

도면

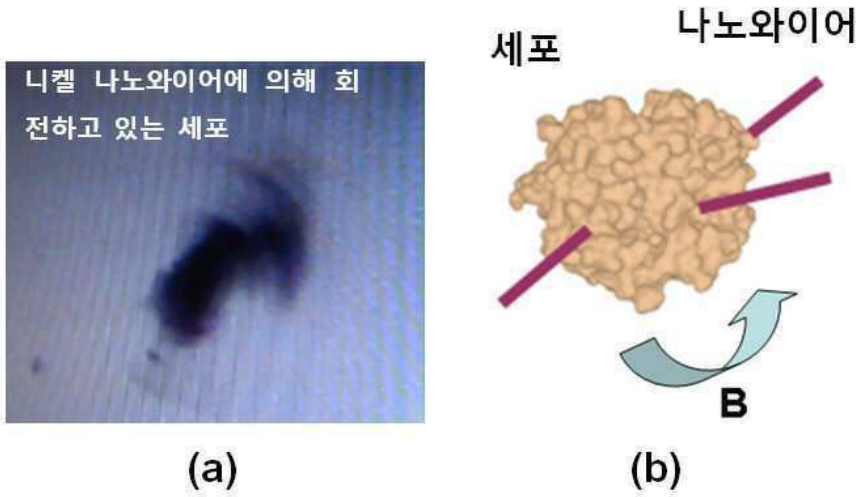
도면1



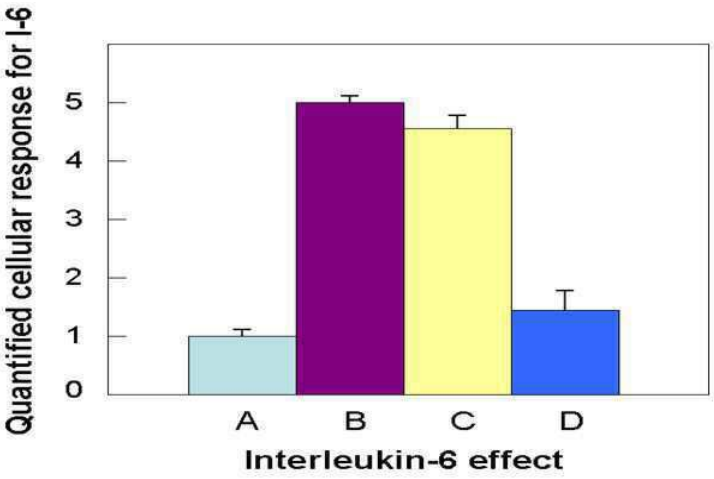
도면2



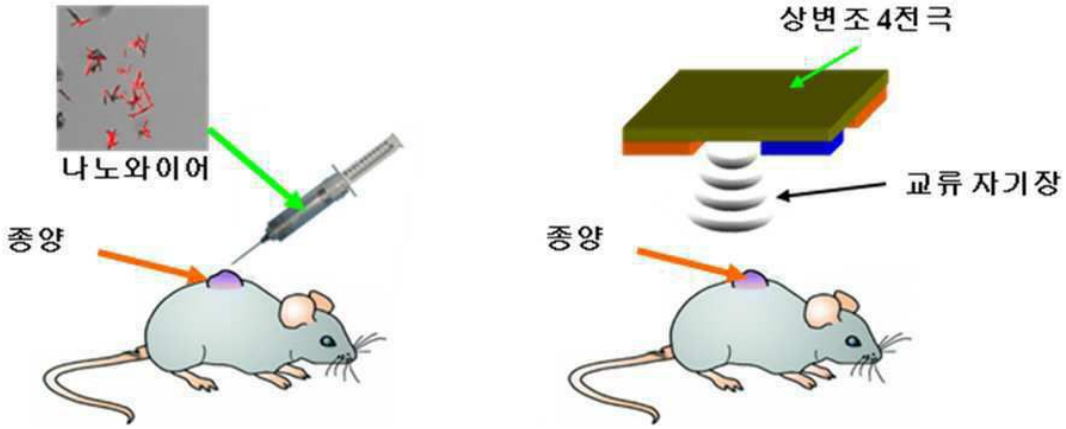
도면3


니켈 나노와이어에 의해 회
전하고 있는 세포
세포
나노와이어
B
(a)
(b)

도면4


Quantified cellular response for I-6
0
1
2
3
4
5
A
B
C
D
Interleukin-6 effect

도면5


나노와이어
종양
상변조4전극
교류자기장
종양

도면6

