

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0021632 (43) 공개일자 2012년03월09일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) B82B 3/00 (2006.01) C01G 45/02 (2006.01)		(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가 1
(21) 출원번호 10-2010-0077392		(72) 발명자 이광렬 경기도 남양주시 퇴계원면 도제원로 19, 강남아파트 103동 603호
(22) 출원일자 2010년08월11일 심사청구일자 2011년06월30일		(74) 대리인 특허법인다나

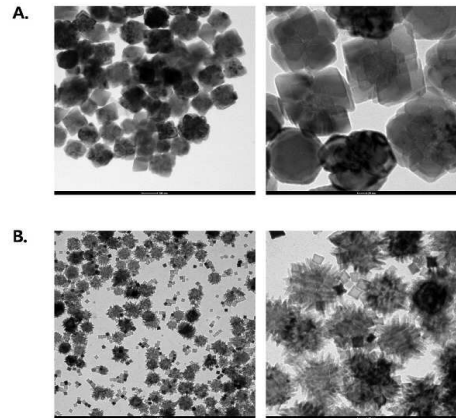
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 신규 산화망간 나노입자 및 이를 포함하는 조영제

(57) 요약

본 발명은 자기공명영상법 및 테라헤르쯔파 영상법에서 조영제로서 사용될 수 있는 새로운 형태의 산화망간 나노입자, 이의 제조 방법, 상기 산화망간 나노입자를 포함하는 조영제 조성물 및 망간 이온을 이용한 테라헤르쯔파 영상법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 침상 표면을 갖는 산화망간 나노입자는 산성을 나타내는 암세포와 근접하게 되는 경우 나노입자 내부의 MnO로부터 Mn²⁺ 이온이 녹아 나와 표면은 성게 모양을 유지하고 내부는 중공이 존재하는 형태를 취하게 되는데 이러한 구조는 표면적을 극대화시켜 T1 조영 효과를 증폭시키고, 또한 방출된 Mn²⁺ 이온으로 인해 다시 한번 T1 조영 효과가 훨씬 증폭되게 되는 이중 증폭 효과를 갖게 되므로, 기존 기술에 비해 매우 현저한 MRI T1 조영 효과를 나타낸다. 또한, 본 발명에 따른 산화망간 나노입자는 위, 폐, 장과 같이 공기를 포함하고 있는 기관에 대한 진단에 어려움이 있는 MRI의 한계점을 극복할 수 있는 테라헤르쯔 조영제로도 이용가능한 다기능성 조영제에 해당하므로 활용도가 매우 우수하다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

망간 전구체, 계면활성제 및 유기 용매를 포함하는 혼합물을 열분해 반응시켜 산화망간 나노입자를 합성하고, 상기 반응물에 에천트를 가하여 상기 산화망간 나노입자를 에칭시키는 것을 포함하는 침상 표면을 갖는 산화망간 나노입자의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 망간 전구체는 망간(II) 아세테이트(manganese(II) acetate), 망간(II) 아세틸아세토네이트(manganese(II) acetylacetonate), 망간(II) 브로마이드(manganese(II) bromide), 망간(II) 카보네이트(manganese(II) carbonate), 망간(II) 클로라이드(manganese(II) chloride), 망간(II) 플루오라이드(manganese(II) fluoride), 망간(II) 아이오다이드(manganese(II) iodide), 망간(II) 나이트레이트(manganese(II) nitrate), 망간(II) 설페이트(manganese(II) sulfate), 이들의 하이드레이트(hydrate), 또는 이들의 혼합물인 침상 표면을 갖는 산화망간 나노입자의 제조 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 계면활성제는 알킬 카복시산, 알킬 아민 또는 이들의 혼합물인 침상 표면을 갖는 산화망간 나노입자의 제조 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 열분해 반응은 망간 전구체, 계면활성제 및 유기 용매를 포함하는 혼합물을 210℃ 내지 340℃ 에서 가열함으로써 수행되는 것인 침상 표면을 갖는 산화망간 나노입자의 제조 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 에천트는 유기산, 유기산을 포함하는 용매, 또는 물인 침상 표면을 갖는 산화망간 나노입자의 제조 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 에칭은 에천트를 반응물에 가하고 240℃ 내지 340℃ 에서 반응시킴으로써 수행되는 것인 침상 표면을 갖는 산화망간 나노입자의 제조 방법.

청구항 7

코어에 아산화망간(Manganese(II) oxide, MnO)을 포함하고, 침상 표면을 갖는 셸(shell)에 사산화삼망간

(Manganese(II,III) oxide , Mn_3O_4)을 포함하는 산화망간 나노입자.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 산화망간 나노입자는 생체적합성 물질로 코팅되어 있는 것인 산화망간 나노입자.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 생체적합성 물질은 폴리머, 지질, 펩타이드, 실리카 및 텍스트란으로 이루어진 군으로부터 선택되는 물질을 포함하는 것인 산화망간 나노입자.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 생체적합성 물질에 표적 지향성 리간드가 결합되어 있는 산화망간 나노입자.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 표적 지향성 리간드는 항체, 앵타머 또는 화합물 리간드인 산화망간 나노입자.

청구항 12

제7항의 산화망간 나노입자를 포함하는 자기공명영상용 조영제.

청구항 13

침상 표면을 갖는 셸(shell)에 사산화삼망간(Manganese(II,III) oxide , Mn_3O_4)을 포함하고, 코어에 중공을 갖는 산화망간 나노입자.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 산화망간 나노입자의 중공에 약물이 담지되어 있는 산화망간 나노입자.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 산화망간 나노입자는 생체적합성 물질로 코팅되어 있는 것인 산화망간 나노입자.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 생체적합성 물질은 폴리머, 지질, 펩타이드, 실리카 및 텍스트란으로 이루어진 군으로부터 선택되는 물질을 포함하는 것인 산화망간 나노입자.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 생체적합성 물질에 표적 지향성 리간드가 결합되어 있는 산화망간 나노입자.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 표적 지향성 리간드는 항체, 앵타머 또는 화합물 리간드인 산화망간 나노입자.

청구항 19

제13항의 산화망간 나노입자를 포함하는 자기공명영상용 조영제.

청구항 20

제7항의 산화망간 나노입자를 포함하는 테라헤르쯔파 영상용 조영제.

청구항 21

제7항의 산화망간 나노입자 또는 망간 이온을 생체에 투여하고, 생체를 테라헤르쯔파에 노출시킨 후 생체 내 망간 이온과 물 간의 테라헤르쯔파의 흡수도의 차이를 측정하고, 이러한 차이를 영상화하는 것을 포함하는 테라헤르쯔파 영상법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 자기공명영상법 및 테라헤르쯔파 영상법에서 조영제로서 사용될 수 있는 새로운 형태의 산화망간 나노입자, 이의 제조 방법, 상기 산화망간 나노입자를 포함하는 조영제 조성물 및 망간 이온을 이용한 테라헤르쯔파 영상법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 현재 암 진단에 가장 효율적이고 가장 많이 이용되고 있는 자기공명영상법(MRI)을 이용한 암 조기 진단에 관한 연구가 한창 진행 중이다. 현재까지 MRI에 사용되어 온 조영제는 금속 이온과 유기 리간드를 이용한 조영제이다. 하지만 금속 이온 및 리간드의 독성으로 인하여 상대적으로 독성이 낮으면서 조영 효과는 높은 조영제의 개발의 필요성이 대두되었고, 이에 나노입자를 이용한 MRI조영제 연구가 현재 활발히 진행되고 있다.

[0003] 현재 진행 중인 MRI 조영제 연구의 80% 이상이 산화철 또는 아철산염 구조의 페라이트 나노입자를 이용한 T2 MRI조영제에 집중되어 있다. 하지만 MRI에서 어두운 이미지를 주는 조영제의 경우 상대적으로 얽혀있거나 다른 장기의 아랫부분에 위치하고 있는 몸 속 장기의 암 진단 시에는 정확한 암 진단이 어렵다.

[0004] 최근 나노입자를 이용한 T1 MRI 조영제의 연구에 대한 몇 개의 초기 논문이 발표되었는데 그 대표적인 예가 MnO

나노입자를 이용한 T1 MRI조영제이다(Angew. Chem. Int. Ed. 2007, 46, 5397-5401). 그러나, 상기 논문은 단순히 산화망간 나노입자의 표면에 있는 Mn 이온에 의하여 T1조영이 이루어진다는 이론에 기인한 논문으로서, 수동적인 T1 MRI 조영제를 제공하는 수준에 그친다. 따라서 능동적인 T1 MRI 조영제의 개발을 이용한 효율적인 MRI 조영제의 개발이 필요하다. 뿐만 아니라 암 세포에 선택적으로 더욱 높은 효율을 발휘할 수 있는 조영제의 개발이 필요하다.

[0005] 한편, MRI에 비하여 상대적으로 암 진단에 관한 광학적 연구는 거의 미미하다. 테라헤르쯔(THz; 10^{12} Hz) 전자기파는 주파수 영역에서 밀리미터파와 원적외선의 사이에 위치하며 진동수가 $0.3 \sim 10$ THz, 파장이 $30 \mu\text{m} \sim 1 \text{mm}$ 에 해당하는 전자기파 영역이다. 이 THz 영역의 전자기파에 대해 화학물질의 경우 다른 파장에서는 볼 수 없는 고유한 지문과 같은 흡수특성을 가지고 있다. 또한 THz 영역의 전자기파는 대부분 물질들에 대해 투과율이 높아서 X-ray처럼 투명하므로 비침습(non-invasive) 검사 및 이미징에 그 어떤 파장 영역보다도 우수한 특성을 가지고 있다. 특히 THz 전자기파는 물에 대한 흡수율이 매우 높아 바이오 물질의 특성분석 및 이미징에 유용하다. 특히, 암세포의 경우, 암세포 내에 포함된 수분량이 정상세포와는 다르기 때문에 THz파에 의해 정밀하게 발견될 수 있는 가능성이 있다.

[0006] 예를 들어, 일반적인 유방암의 치료 목적으로 암 절제술이 시행되는 경우는 근치적 절제술 이후 잘라내고 남은 부위에 여전히 육안으로 관찰되지 않은 암 조직이 남아있을 수 있다. 이러한 잔여 암 조직은 전신으로 전이되는 계기가 될 수도 있으며 또한 보다 넓은 부위에 대해 재시술을 해야 하는 위험이 따른다. 이러한 관점에서 볼 때 수술 중 THz파를 이용해서 실시간으로 국소병변의 맵핑을 3차원적으로 시행하게 되면 더욱 완전한 근치적 절제를 할 수 있게 된다. 즉, 육안으로 관찰되지 않는 병변, 특히 상피내 암종(CIS; Carcinoma In Situ)까지도 정확하고 쉽게 수술 중 즉시 확인할 수 있다. 이는 초기단계의 CIS 병변을 발견해 낼 수 없는 기존 초음파 시술과는 차별화된다. 또한, 기존의 자기공명영상법(MRI)을 이용한 영상 기법은 위, 폐, 장과 같이 공기를 포함하고 있는 인체 기관에 대한 질병의 진단에는 많은 어려움이 있어 테라헤르쯔/광학 영상 기술과 같이 문제점들을 극복할 수 있는 새로운 영상법의 개발이 절실하다. 만일 테라헤르쯔파를 이용하여, 가격이나 해상도면에서 자기공명영상법(MRI)에 필적하거나 그 이상의 성능을 보이는 비파괴적 생체조영법을 개발할 수 있다면 기기설비 및 신조영제라는 두 분야에서 가치를 창출할 수 있다. 최근 발표된 논문에 의하면 테라헤르쯔파를 흡수할 수 있는 가장 좋은 것은 이온 형태의 K, Na 및 Ca가 유일하다. 하지만 상기 이온들은 몸 속에서 독으로 작용하기 쉽다.

[0007]

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 자기공명영상법 및 테라헤르쯔파 영상법에서 조영제로서 사용될 수 있는 새로운 형태의 산화망간 나노입자, 이의 제조방법 및 상기 산화망간 나노입자를 포함하는 조영제 조성물을 제공하고자 한다. 또한, 본 발명은 망간 이온을 이용한 테라헤르쯔파 영상법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 자기공명영상법 및 테라헤르쯔파 영상법에서 조영제로서 사용될 수 있는 새로운 형태의 산화망간 나노입자를 제조하는 방법을 제공한다.

[0010] 보다 구체적으로, 본 발명은 망간 전구체, 계면활성제 및 유기 용매를 포함하는 혼합물을 열분해 반응시켜 산화망간 나노입자를 합성하고, 상기 반응물에 에천트를 가하여 상기 산화망간 나노입자를 에칭시키는 것을 포함하는 침상 표면을 갖는 산화망간 나노입자의 제조 방법을 제공한다.

[0011] 본 발명에 있어서, "산화망간 나노입자"는 아산화망간(Manganese(II) oxide, MnO) 또는 사산화삼망간(Manganese(II,III) oxide, Mn_3O_4)를 포함하는 직경 1nm 내지 1000nm, 바람직하게는 직경 40nm 내지 400nm의 나노입자를 의미한다.

[0012] 또한, "침상 표면을 갖는 산화망간 나노입자"는 산화망간 나노입자의 표면이 마치 성계의 표면처럼 외부로 향해 방사상으로 뻗어있는 침상 돌출부를 갖고 있는 것을 의미한다.

[0013] 본 발명에 따른 침상 표면을 갖는 산화망간 나노입자는 먼저 열분해를 통해 통상적인 구형 또는 팔면체형의 산

화망간 나노입자를 합성하고, 이러한 산화망간 나노입자를 에칭하는 과정을 거쳐 제조된다.

- [0014] 통상적인 구형 또는 팔면체형의 산화망간 나노입자의 합성은 당업계에 공지되어 있는 열분해법을 이용하여 합성할 수 있다.
- [0015] 상기 열분해 반응에서 사용되는 "망간 전구체"는 이를 이용하여 산화망간 나노입자가 제조될 수 있는 것이면 어떠한 것이든 사용가능하며, 이에 제한되는 것은 아니나, 망간(II) 아세테이트(manganese(II) acetate), 망간(II) 아세틸아세토네이트(manganese(II) acetylacetonate), 망간(II) 브로마이드(manganese(II) bromide), 망간(II) 카보네이트(manganese(II) carbonate), 망간(II) 클로라이드(manganese(II) chloride), 망간(II) 플루오라이드(manganese(II) fluoride), 망간(II) 아이오다이드(manganese(II) iodide), 망간(II) 나이트레이트(manganese(II) nitrate), 망간(II) 설페이트(manganese(II) sulfate), 이들의 하이드레이트(hydrate), 또는 이들의 혼합물 등이 사용될 수 있다.
- [0016] 또한, 상기 열분해 과정에서 사용되는 계면활성제로는 올레산, 라우르산, 스테아르산, 미스테르산 또는 헥사데카노익산과 같은 알킬 카복시산(RCOOH, 여기에서 R은 탄소수 4 내지 24, 바람직하게는 탄소수 6 내지 19개의 알킬을 나타낸다); 올레일 아민, 라우릴 아민, 헥사데실 아민, 트리옥틸 아민, 다이옥틸 아민 등과 같은 알킬 아민(RNH₂, 여기에서 R은 탄소수 4 내지 24, 바람직하게는 탄소수 6 내지 19개의 알킬을 나타낸다); 또는 이들의 혼합물을 이용할 수 있다. 상기 알킬 아민으로는 바람직하게는 올레일 아민, 라우릴 아민, 헥사데실 아민과 같은 1차 알킬 아민이 사용될 수 있다.
- [0017] 한편, 상기 열분해 과정에서 사용가능한 유기 용매의 종류는 특별히 제한되지 않으나, 열분해 반응이 일어나는 온도보다 높은 끓는 점을 갖는 것이 바람직하다. 이러한 용매로는 탄소수 5 내지 24의 알칸, 알켄, 알킨, 사이클로알칸 또는 알카디엔과 같은 탄화수소계 화합물; 부틸 에테르, 헥실 에테르, 옥틸 에테르, 데실 에테르 등의 에테르계 화합물, 피리딘, 테트라하이드로퓨란 등의 헤테로고리 화합물, 톨루엔, 자일렌, 메시틸렌, 벤젠 등의 방향족 화합물, 트리옥틸아민, 올레일아민 등 아민류 등이 포함된다.
- [0018] 상기 열분해 반응은 망간 전구체, 계면활성제 및 유기 용매를 포함하는 혼합물을 약 210℃ 내지 340℃ 에서 가열함으로써 수행할 수 있으며, 이러한 열분해 반응은 약 10분 내지 24시간 동안 수행될 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 열분해 반응은 불활성 조건 하에서 수행될 수 있다. 이러한 열분해 과정에서의 계면활성제의 양, 반응시간, 반응온도 등의 조건의 조절은 형성된 산화망간 나노입자의 크기 및 형상을 제어할 수 있다. 예를 들어, 계면활성제의 양을 증가시킬수록 생성된 산화망간 나노입자의 크기는 작아질 수 있다. 반면, 합성 온도가 높아질수록 생성된 산화망간 나노입자의 크기는 커질 수 있다. 이러한 과정을 거쳐 형성된 산화망간 나노입자는 예컨대, 구형 또는 팔면체형의 구조를 가질 수 있다.
- [0019] 산화망간 나노입자에 에천트를 가하여 침상의 표면을 갖는 산화망간 나노입자로 에칭하는 과정은 상기 열분해 반응으로 얻어진 반응물에 직접 에천트를 가하거나, 반응물로부터 분리해 낸 산화망간 나노입자에 에천트를 가함으로써 수행할 수 있다.
- [0020] 상기 과정에서 사용되는 "에천트"로는 유기산, 유기산을 포함하는 용매 또는 물을 사용할 수 있다. 예를 들어, 알킬 카복시산(RCOOH, 여기에서 R은 탄소수 4 내지 24, 바람직하게는 탄소수 6 내지 19개의 알킬을 의미한다), 요산 등과 같은 유기산, 이를 포함하는 유기용매나 물과 같은 용매, 또는 물을 단독으로도 사용할 수 있다.
- [0021] 산화망간 나노입자의 에칭은 이러한 에천트를 산화망간 나노입자 또는 이를 포함하는 반응물에 가하고 약 240℃ 내지 340℃, 바람직하게는 250℃ 내지 340℃에서 반응시킴으로써 수행할 수 있으며, 이러한 에칭은 약 10분 내지 24시간 동안 수행될 수 있다. 240℃ 미만에서는 에칭에 소요되는 시간이 너무 길어질 수 있으며, 용매의 끓는점이 제한되어 있으므로 340℃를 초과할 필요는 없다. 이러한 에칭 과정에서의 에천트의 양, 반응시간, 반응온도 등의 조건의 조절은 형성된 침상 표면을 산화망간 나노입자의 크기 및 형상을 제어할 수 있다. 예를 들어, 에천트의 양을 증가시킬수록 생성된 침상 표면을 갖는 산화망간 나노입자의 크기는 작아질 수 있다. 반응 시간을 높이는 것 역시 나노입자의 크기를 작게 만들 수 있다. 또한 에천트를 주입시키는 시점의 온도가 높을수록 에칭되기 전의 입자의 크기가 크기 때문에 최종적으로 만들어지는 성체 모양의 입자가 커질 수 있다. .
- [0022] 상기 과정을 거쳐 형성된 침상 표면을 갖는 산화망간 나노입자는 반응물을 원심분리하거나, 반응물에 다른 용매를 첨가하여 나노입자를 침전시킴으로써 용이하게 분리, 수득할 수 있다.
- [0023] 이렇게 제조된 침상 표면을 갖는 산화망간 나노입자는, 코어에 아산화망간(Manganese(II) oxide, MnO)을 포함하고, 침상 표면을 갖는 셸(shell)에 사산화망간(Manganese(II,III) oxide, Mn₃O₄)을 포함하는 코어-셸(core-shell)

shell) 구조를 갖는다.

- [0024] 따라서, 본 발명은 또한 코어에 아산화망간(Manganese(II) oxide, MnO)을 포함하고, 침상 표면을 갖는 셸(shell)에 사산화삼망간(Manganese(II,III) oxide, Mn_3O_4)을 포함하는 산화망간 나노입자(이하, 'MnO@ Mn_3O_4 산화망간 나노입자'라고도 언급됨)를 제공한다.
- [0025] 하기 실시예에서 확인할 수 있는 바와 같이, 이러한 코어-셸 구조를 갖는 산화망간 나노입자는 사산화망간을 포함하는 셸이 침상 표면을 갖기 때문에 기존에 보고된 산화망간 나노입자에 비해 비표면적이 매우 넓으며, 이에 따라 T1 조영 효과를 현저히 증폭시킬 수 있다. 또한, 정상조직과는 달리 pH 5.5 정도의 산성을 나타내는 암세포 내에 이러한 산화망간 나노입자가 위치할 경우 코어에 해당하는 아산화망간으로부터 T1 조영 효과를 나타내는 Mn^{2+} 이온이 방출되게 되며, 또한 이로 인해 산화망간 나노입자는 점차적으로 중공을 갖게 되므로 표면적이 더 넓어지게 되므로 T1 조영 효과를 더욱 현저히 증폭시킬 수 있게 된다. 뿐만 아니라, 본 발명에 따른 산화망간 나노입자는 산화망간 나노입자의 코어로부터 방출된 Mn^{2+} 이온은 테라헤르츠파를 흡수하는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 본 발명에 따른 산화망간 나노입자로부터 방출된 Mn^{2+} 이온과 물 간의 테라헤르츠파의 흡수도 차이를 측정하고 이를 영상화하면 테라헤르츠파를 이용한 생체 조영이 가능해진다. 그러므로, 본 발명에 따른 산화망간 나노입자는 MRI 뿐만 아니라 테라헤르츠파 영상법의 조영제로도 사용가능한 장점을 갖는다.
- [0026] 한편, 코어에 아산화망간(Manganese(II) oxide, MnO)을 포함하고, 침상 표면을 갖는 셸(shell)에 사산화삼망간(Manganese(II,III) oxide, Mn_3O_4)을 포함하는 산화망간 나노입자(MnO@ Mn_3O_4 산화망간 나노입자)는 추가적인 과정을 통해 중공을 갖도록 제조할 수 있다. 예를 들어, MnO@ Mn_3O_4 산화망간 나노입자는 낮은 pH 조건에서 코어에 존재하는 Mn^{2+} 이온이 빠져나오게 되므로 MnO@ Mn_3O_4 산화망간 나노입자에 산을 처리함으로써 손쉽게 중공 구조를 형성시킬 수 있다. 그 밖에도 200℃ 내지 300℃, 바람직하게는 230℃ 내지 260℃의 온도에서 올레산 등과 같은 유기산을 넣은 후 반응시켜 주면 표면의 사산화망간만 남고, 안쪽의 아산화망간은 녹아나간다.
- [0027] 따라서, 본 발명은 또한 침상 표면을 갖는 셸(shell)에 사산화삼망간(Manganese(II,III) oxide, Mn_3O_4)을 포함하고, 코어에 중공을 갖는 산화망간 나노입자를 제공한다. 이러한 중공구조를 갖는 산화망간 나노입자는 비표면적의 확대에 의해 향상된 T1 조영 효과를 나타낼 뿐만 아니라, 중공 내에 약물을 담지시킬 수 있으므로 진단과 동시에 치료를 가능하게 하는 장점을 갖는다.
- [0028] 한편, 본 발명에 따른 산화망간 나노입자는 생체 적합성 물질로 코팅될 수 있다. 생체적합성 물질은 생체적합성 물질로서 당업계에 공지된 것이면 어떠한 것이든 사용할 수 있다. 한 구체예에서, 상기 생체적합성 물질은 폴리머, 지질, 펩타이드, 실리카 및 텍스트란으로 이루어진 군으로부터 선택되는 물질을 포함하는 것일 수 있다. 또한 상기 생체적합성 물질들은 보다 나은 생체적합성을 제공하기 위해 추가적으로 개질될 수 있다. 예를 들어, 폴리머에 지질이나 펩타이드를 결합하여 사용하는 것이 가능하다. 생체적합성 폴리머의 구체적인 예로는, 키토산, 엘라스틴, 히알루론산, 알지네이트, 젤라틴, 콜라겐, 셀룰로오스 등의 바이오폴리머나, 폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리에틸렌옥사이드(PEO), 폴리카프로락톤(PCL), 폴리락트산(PLA), 폴리글리콜산(PGA), 폴리[(락틱-co-(글리콜산)) (PLGA), 폴리[(3-하이드록시부티레이트)-co-(3-하이드록시발러레이트) (PHBV), 폴리다이옥산온(PDO), 폴리[(L-락타이드)-co-(카프로락톤)], 폴리(에스테르우레탄) (PEUU), 폴리[(L-락타이드)-co-(D-락타이드)], 폴리[에틸렌-co-(비닐 알코올)] (PVOH), 폴리아크릴산(PAA), 폴리비닐알코올(PVA), 폴리비닐피롤리돈(PVP), 폴리스티렌(PS), 폴리아닐린(PAN) 등과 같은 화학적 폴리머를 사용할 수 있다. 한 구체예에서, 생체적합성 물질은 폴리에틸렌글리콜과 같은 폴리머일 수 있다.
- [0029] 또한, 이러한 생체적합성 물질은 표적 지향성 리간드와 결합될 수 있다. 표적 지향성 리간드는 본 발명에 따른 산화망간 나노입자를 이용하여 조영하고자 하는 조직이나 세포에 도입될 수 있도록 표적화시키는 리간드를 의미한다. 이러한 표적 지향성 리간드로는 항체, 앵타머 뿐만 아니라, 세포 표면의 특정 수용체와 결합하는 것으로 알려져 있는 화합물 리간드 또한 유용하게 사용할 수 있다. 이러한 항체, 앵타머, 화합물 리간드의 구체적인 종류는 당업계에 잘 알려져 있다.
- [0030] 표적 지향성 리간드와 생체적합성 물질을 포함하는 코팅층 간의 결합은 물리적 결합이나 코팅층 상에 존재하는 기능기와 표적 지향성 리간드 상에 존재하는 기능기 간의 공유결합을 통해 이루어질 수 있다. 이러한 기능기들은 코팅층이나 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 결합으로부터 선택될 수 있다. 이러한 공지의 기능기 결합에 중 대표적인 예를

하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0031]

I	II	III
R-NH ₂	R'-COOH	R-NHCO-R'
R-SH	R'-SH	R-SS-R
R-OH	R'-(에폭시기)	R-OCH ₂ C(OH)CH ₂ -R'
RH-NH ₂	R'-(에폭시기)	R-NHCH ₂ C(OH)CH ₂ -R'
R-SH	R'-(에폭시기)	R-SCH ₂ C(OH)CH ₂ -R'
R-NH ₂	R'-COH	R-N=CH-R'
R-NH ₂	R'-NCO	R-NHCONH-R'
R-NH ₂	R'-NCS	R-NHCSNH-R'
R-SH	R'-COCH ₂	R'-COCH ₂ S-R
R-SH	R'-O(C=O)X	R-OCH ₂ (C=O)O-R'
R-(아지리딘기)	R'-SH	R-CH ₂ CH(NH ₂)CH ₂ S-R'
R-CH=CH ₂	R'-SH	R-CH ₂ CHS-R'
R-OH	R'-NCO	R'-NHCOO-R
R-SH	R'-COCH ₂ X	R-SCH ₂ CO-R'
R-NH ₂	R'-CON ₃	R-NHCO-R'
R-COOH	R'-COOH	R-(C=O)O(C=O)-R' + H ₂ O
R-SH	R'-X	R-S-R'
R-NH ₂	R'CH ₂ C(NH ²⁺)OCH ₃	R-NHC(NH ²⁺)CH ₂ -R'
R-OP(O ²⁻)OH	R'-NH ₂	R-OP(O ²⁻)-NH-R'
R-CONHNH ₂	R'-COH	R-CONHN=CH-R'
R-NH ₂	R'-SH	R-NHCO(CH ₂) ₂ SS-R'
I 또는 II: 코팅층 상에 존재하는 기능기 또는 리간드 상에 존재하는 기능기		
III: I과 II의 반응에 따른 결합예		
R 또는 R': 임의의 기능기		

[0032]

본 발명에 따른 산화망간 나노입자는 생체 내로 도입되면 엔도사이토시스에 의해 세포내로 도입될 수 있다. 하기 실시예에서 확인할 수 있는 바와 같이 이미 Mn²⁺ 이온이 빠져나간 중공 구조를 갖는 산화망간 나노입자는 주로 혈관 또는 암조직 바깥표면에 붙어 있는 반면, 본 발명에 따른 산화망간 나노입자는 암조직 주위에 결합한 후 Mn²⁺ 이온이 녹아나오면서 암 세포 사이에 퍼져 나가 암조직 전체를 밝게 조영할 수 있다.

[0033]

한편 본 발명에 따른 산화망간 나노입자에 다른 진단 프로브를 도입할 경우 다중 진단 프로브로 사용될 수 있다. 예를 들면, 본 발명에 따른 산화망간 나노입자에 예컨대 형광물질과 같은 광학 진단 프로브를 결합시키거나 망간 이온이 빠져나간 중공구조에 탑재시키게 되면 자기공명영상과 테라헤르쯔파 영상 외에도 다른 방식의 광학 이미징을 동시에 수행할 수 있으며, CT 진단 프로브를 결합시키거나 망간이온이 빠져나간 중공구조에 탑재시키게 되면 자기공명영상, 테라헤르쯔파영상 및 CT 진단을 동시에 할 수 있다. 또한 방사선 동위원소와 결합시키면 자기공명영상, 테라헤르쯔파영상과 함께 PET, SPECT 진단을 동시에 할 수 있다.

[0034]

따라서, 본 발명은 또한 광학 진단 프로브, CT 진단 프로브 및 방사선 동위원소로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 프로브를 추가로 포함하는 산화망간 나노입자를 제공한다. 이들 프로브는 사용되는 프로브의 작용기나 소수성/친수성 특징에 따라 본 발명에 따른 산화망간 나노입자에 결합시키거나 코팅층에 봉입하여 사용할 수 있다.

[0035]

예컨대, 광학 진단 프로브로는 양자점을 포함하며, CT 진단 프로브로는 I (요오드) 화합물, 금 나노 입자를 포함하고, 방사선 동위원소로는 In, Tc, F 등을 포함한다.

[0036]

또한 본 발명은 코어에 아산화망간(Manganese(II) oxide, MnO)을 포함하고, 침상 표면을 갖는 셸(shell)에 사산

화삼망간(Manganese(II,III) oxide, Mn_3O_4)을 포함하는 산화망간 나노입자를 포함하는 자기공명영상용 조영제를 제공한다. 앞서 설명한 바와 같이 본 발명에 따른 산화망간 나노입자는 넓은 표면적 및 pH에 따른 Mn^{2+} 이온의 방출에 기인해 기존에 보고된 T1 조영제와는 달리 매우 현저한 T1 조영 효과를 나타낸다.

[0037] 본 발명은 또한 침상 표면을 갖는 셸(shell)에 사산화삼망간(Manganese(II,III) oxide, Mn_3O_4)을 포함하고, 코어에 중공을 갖는 산화망간 나노입자를 포함하는 자기공명영상용 조영제를 제공한다. 상기 산화망간 나노입자는 비표면적이 크므로 현저한 T1 조영 효과를 나타낼 뿐만 아니라 내부에 존재하는 중공에 약물을 담지할 수 있게 되므로 이러한 산화망간 나노입자를 포함하는 자기공명영상용 조영제는 진단과 함께 치료를 가능하게 해 준다.

[0038] 또한, 본 발명은 코어에 아산화망간(Manganese(II) oxide, MnO)을 포함하고, 침상 표면을 갖는 셸(shell)에 사산화삼망간(Manganese(II,III) oxide, Mn_3O_4)을 포함하는 산화망간 나노입자를 포함하는 테라헤르쯔파 영상용 조영제를 제공한다. 앞서 설명한 바와 같이, 본 발명에 따른 산화망간 나노입자는 암 세포가 존재하는 pH가 낮은 환경에서 Mn^{2+} 이온을 방출하며, 암세포는 이러한 Mn^{2+} 이온을 세포내에 가두고 있는 특성이 있다. 따라서, 암 조직에 존재하는 Mn^{2+} 이온과 정상 조직에 존재하는 물 간의 테라헤르쯔파의 흡수도 차이를 영상화시킴으로써 암 조직과 정상 조직을 구별해 낼 수 있어 테라헤르쯔 내시경 기법을 통한 암의 치료에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

[0039] 본 발명은 또한 상기 산화망간 나노입자 또는 망간 이온을 생체에 투여하고, 생체를 테라헤르쯔파에 노출시킨 후 생체 내 망간 이온과 물 간의 테라헤르쯔파의 흡수도의 차이를 측정하고, 이러한 차이를 영상화하는 것을 포함하는 테라헤르쯔파 영상법을 제공한다. 본 발명에서는 망간 이온이 테라헤르쯔파를 흡수하며, 물의 테라헤르쯔파 흡수도와 망간 이온의 테라헤르쯔파의 흡수도 간의 차이를 이용하면 암 조직에 존재하는 망간 이온을 탐지함으로써 암 조직의 영상화가 가능함을 처음으로 밝혀냈다. 망간 이온이 암 세포에 도입되어 있기만 하면 테라헤르쯔파 영상법을 적용할 수 있으므로 생체 내 망간 이온의 주입을 위해 사용되는 망간 이온 전구체의 특별히 제한되지 않으며, 생체 내에서 망간 이온을 내놓을 수 있는 것이면 어떠한 것이든지 이용할 수 있다. 다만, 자기공명영상 조영제 및 테라헤르쯔 조영제로 다중적으로 사용할 수 있다는 장점을 고려하면 본 발명에 따른 산화망간 나노입자를 이용하는 것이 바람직할 것이다.

[0040] 본 발명에 따른 자기공명영상용 조영제 또는 테라헤르쯔파 영상용 조영제는 의약 분야에서 통상 사용되는 담체 및 비히클을 포함할 수 있다. 구체적으로 이온 교환 수지, 알루미늄, 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 아연 염), 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 조영제는 또한 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 유화제, 현탁제, 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0041] 한 구체예에서, 본 발명에 따른 조영제는 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 소듐 카르복시메틸셀룰로즈, 솔비톨 또는 텍스트란과 같이 현탁액의 점도를 증가시킬 수 있는 기질을 첨가할 수 있다.

[0042] 본 발명의 조영제의 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 주사용 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.

[0043] 상기 조영제를 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.

발명의 효과

[0044] 본 발명에 따른 침상 표면을 갖는 산화망간 나노입자는 산성을 나타내는 암세포와 근접하게 되는 경우 나노입자 내부의 MnO 로부터 Mn^{2+} 이온이 녹아 나와 표면은 성게 모양을 유지하고 내부는 중공이 존재하는 형태를 취하게 되는데 이러한 구조는 표면적을 극대화시켜 T1 조영 효과를 증폭시키고, 또한 방출된 Mn^{2+} 이온으로 인해 다시 한번 T1 조영 효과가 훨씬 증폭되게 되는 이중 증폭 효과를 갖게 되므로, 기존 기술에 비해 매우 현저한 MRI T1 조영 효과를 나타낸다. 또한, 본 발명에 따른 산화망간 나노입자는 위, 폐, 장과 같이 공기를 포함하고 있는 기관에 대한 진단에 어려움이 있는 MRI의 한계점을 극복할 수 있는 테라헤르츠 조영제로도 이용가능한 다기능성 조영제에 해당하므로 활용도가 매우 우수하다.

도면의 간단한 설명

[0045] 도 1A는 열분해 반응을 통해 형성된 팔면체 모양의 산화망간 나노입자를, 도 1B는 이러한 산화망간 나노입자를 에칭시켜 형성된 침상 표면을 갖는 산화망간 나노입자의 모습을 보여주는 TEM 사진이다.

도 2A는 시간의 변화에 따른 산화망간 나노입자의 조성 변화를 보여주는 XRD 데이터이며, 도 2B는 합성 3일 후 산화망간 나노입자의 조성을 보여주는 XPS 데이터이다.

도 3은 에칭 과정의 온도와 시간의 조절에 따른 산화망간 나노입자의 모양 변화를 보여주는 TEM 사진이다.

도 4는 에칭 과정에서 사용된 유기산의 비율에 따른 산화망간 나노입자의 모양 변화를 보여주는 TEM 사진이다.

도 5는 열분해 과정에서 사용된 아민의 양에 따른 산화망간 나노입자의 크기 변화를 보여주는 TEM 사진이다.

도 6은 에칭 시간의 변화에 따른 산화망간 나노입자의 크기와 모양의 변화를 보여주는 TEM 사진이다.

도 7 및 8은 시간 및 pH에 따른 산화망간 나노입자의 형태 변화를 보여주는 TEM 이미지이다.

도 9는 시간 및 pH에 따른 산화망간 나노입자를 포함하는 완충액의 색 변화를 보여주는 사진이다.

도 10은 시간 및 pH에 따른 산화망간 나노입자의 ICP 분석 결과를 보여준다.

도 11은 pH별 산화망간 나노입자로부터 녹아나온 Mn^{2+} 이온을 이용한 시간에 따른 MRI 데이터를 보여준다.

도 12는 Mn^{2+} 이온의 방출 및 그로 인한 T1 조영 효과의 향상도를 보여주는 ICP 분석 결과이다.

도 13은 Mn^{2+} 이온의 방출 및 그로 인한 T1 조영 효과의 향상도를 보여주는 MRI 분석 결과이다.

도 14는 팔면체 모양의 산화망간 나노입자와 침상 구조를 갖는 산화망간 나노입자의 T1 조영 효과를 비교한 결과를 보여준다.

도 15는 RAW 264.7 세포에서의 $MnO@Mn_3O_4$ 나노입자의 형태 변화를 보여주는 TEM 사진이다.

도 16은 NIH3T6.7 세포에서의 $MnO@Mn_3O_4$ 나노입자의 형태 변화를 보여주는 TEM 사진이다.

도 17은 NIH3T6.7 세포에서의 $MnO@Mn_3O_4$ 나노입자 및 중공 구조의 Mn_3O_4 나노입자의 T1 조영 효과를 보여준다.

도 18은 침상구조의 $MnO@Mn_3O_4$ 나노입자와 중공구조를 갖는 침상모양의 Mn_3O_4 나노입자를 이용하여 쥐의 암세포에서의 T1 조영효과를 비교한 결과를 보여준다.

도 19는 직접 투과방식을 이용한 망간이온의 테라헤르츠 흡수 결과를 보여준다.

도 20은 직접 투과방식을 이용한 침상구조의 $MnO@Mn_3O_4$ 나노입자의 pH4 용액에서의 이온방출에 따른 투과스펙트럼 결과를 보여준다.

도 21은 웨이브 가이드 투과방식을 이용한 Mn^{2+} 이온의 농도에 따른 테라헤르츠 투과 스펙트럼의 결과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] 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.

[0047] [실시예]

[0048] 실시예 1: 침상 표면을 갖는 산화망간 나노입자의 제조-1

[0049] Mn(II) 아세테이트 1.4mmol (0.24916g), 올레산 1.5 mmol (0.4264g), 올레일아민 3.0mmol (0.8043g), 트리옥틸아민 5g을 반응용기(shlenk tube)에 넣었다. 반응 용기에 10-40cc/min의 부피로 아르곤 기체를 흘려주면서 5-10 분 동안 상온에서 270℃까지 50분간 가열하여 열분해시켰다. 그 결과, 도 1A에서 볼 수 있는 바와 같이, 약 100 내지 200nm의 팔면체 모양의 산화망간 나노입자가 생성되었다. 이러한 산화망간 나노입자를 포함하는 반응물에 올레산(1.6mmol, 0.45g)과 트리옥틸아민(2g)의 혼합물을 가열 용기에 주입하고 1시간 동안 에칭시킨 후 반응을 종료하였다. 그 결과, 도 1B에서 볼 수 있는 바와 같이, 성게 모양의 침상 표면을 갖는 산화망간 나노입자가 제조되었다. 위와 같이 제조된 산화망간 나노입자의 구성을 확인하고자, XRD 분석을 수행하였다. 그 결과, 도 2A의 XRD 데이터에서 볼 수 있는 바와 같이, 합성 직후의 산화망간 나노입자는 MnO로 이루어져 있으나 시간이 지남에 따라 Mn_3O_4 또한 함께 관찰되었다. 합성 3일 후 산화망간 나노입자는 도 2B의 XPS 데이터에서 확인할 수 있는 바와 같이, MnO와 Mn_3O_4 가 혼재하고 있음을 확인할 수 있었다. 즉, 합성 직후의 산화망간 나노입자는 MnO로 이루어져 있으나, 공기 중에 노출되면 산화망간 나노입자의 표면이 Mn_3O_4 로 전환됨을 알 수 있다.

[0050] 비교예 1: 산화망간 나노입자의 제조

[0051] Mn(II) 아세테이트 1.4mmol (0.24916g), 올레산 1.5 mmol (0.4264g), 올레일아민 3.0mmol (0.8043g), 트리옥틸아민 5g을 반응용기(shlenk tube)에 넣었다. 반응 용기에 10-40cc/min의 부피로 아르곤 기체를 흘려주면서 5-10 분 동안 상온에서 270℃까지 50분간 가열하여 열분해시켰다. 그 결과, 팔면체 모양의 산화망간 나노입자가 생성되었다. 이러한 산화망간 나노입자를 포함하는 반응물의 온도를 각각 210℃, 240℃로 온도를 낮춘 후에 올레산 1.6mmol (0.45g)과 트리옥틸아민 2g을 넣어주었다. 혼합물을 가열 용기에 주입하고 1시간 동안 에칭시킨 후 반응을 종료하였다. 그 결과, 도 3에서 볼 수 있는 바와 같이, 에칭 현상이 일어나지 않고 팔면체 모양의 산화망간 나노입자가 유지되며 온도를 낮출수록 크기가 증가함을 보인다.

[0052] 실시예 2: 침상 표면을 갖는 산화망간 나노입자의 제조-2

[0053] 실시예 1에서 열분해 반응을 거쳐 형성된 팔면체 모양의 산화망간 나노입자를 포함하는 반응물에 올레산의 비율을 달리하여 에칭을 수행하였다. 올레산 0.8mmol (0.23g)과 트리옥틸아민 2g, 올레산 2.4mmol (0.68g)과 트리옥틸아민 2g, 올레산 5.3mmol (1.5g)과 트리옥틸아민 2g을 각각 넣어주었다. 혼합물을 가열 용기에 주입하고 1시간 동안 에칭시킨 후 반응을 종료하였다. 그 결과, 도 4에서 볼 수 있는 바와 같이, 올레산의 비율에 따라 성게 모양의 침상 표면을 갖는 산화망간 나노입자의 모양이 달라졌다. 올레산의 비율이 적을 시에는 에칭됨이 작고 많을 시에는 크기가 작은 둥근 나노 입자가 만들어진다.

[0054] 실시예 3: 침상 표면을 갖는 산화망간 나노입자의 제조-3

[0055] Mn(II) 아세테이트 1.4mmol (0.24916g), 올레산 1.5mmol (0.4264g), 올레일아민 7.0mmol (1.8724g), 트리옥틸아민 5g을 반응용기(shlenk tube)에 넣었다. 반응 용기에 10-40cc/min의 부피로 아르곤 기체를 흘려주면서 5-10 분 동안 상온에서 270℃까지 50분간 가열하여 열분해시켰다. 그 결과, 처음 반응 시에 올레일아민의 양이 증가되면 도 5A에서 볼 수 있는 바와 같이, 크기가 더 작은 팔면체 모양의 산화망간 나노입자가 생성되었다. 이러한 산화망간 나노입자를 포함하는 반응물에 올레산 0.8mmol (0.23g)과 트리옥틸아민 2g, 올레산 2.4mmol (0.68g)과 트리옥틸아민 2g을 각각 넣어준다. 혼합물을 가열 용기에 주입하고 1시간 동안 에칭시킨 후 반응을 종료하였다. 그 결과, 도 5B에서 볼 수 있는 바와 같이, 초기 반응 시에 올레일아민의 양이 증가할수록 팔면체 모양의 산화망간 나노입자의 크기가 작아짐을 알 수 있고 올레산을 적게 넣을 시에는 에칭과정이 일어나지 않음

을 알 수 있다.

[0056] 실시예 4: 침상 표면을 갖는 산화망간 나노입자의 제조-4

[0057] 실시예 1에서 열분해 반응을 거쳐 형성된 팔면체 모양의 산화망간 나노입자를 포함하는 반응물에 올레산 1.6mmol (0.45g)과 트리옥틸아민 2g의 혼합물을 가열 용기에 주입하고 3시간 동안 예칭시킨 후 반응을 종료하였다. 그 결과, 도 6에서 볼 수 있는 바와 같이, 예칭 과정이 길어져 크기가 작은 성체 모양의 침상 표면을 갖는 산화망간 나노입자가 제조되었다.

[0058] 실시예 5: 생체적합성 물질이 코팅된 침상 표면을 갖는 산화망간 나노입자의 제조

[0059] 상기 실시예 및 비교예에서 제조된 산화망간나노 입자 10mg(0.14mmol)을 4ml의 유기용매(헥산 또는 클로로폼)에 녹였다. 500rpm 내지 1000rpm의 속도로 교반을 시키면서 초음파를 가해주고 100mg(0.058mmol)의 카복시폴리솔베이트-80(carboxylated polysorbate-80 또는 carboxylated Tween-80)가 녹아있는 20 ml의 물에 넣어준 후 30분 정도 반응을 시켜주었다. 반응시 초음파에 의한 반응용기의 온도가 올라가는 것을 막아주기 위하여 초음파기의 물 온도를 4°C로 유지시켜 주었다. 공기 중에서 교반을 시켜서 반응이 끝난 용액에 존재하는 유기용매를 휘발시켰다. 위의 방법은 보편적으로 많이 쓰는 마이크로 에멀전 방법을 본 발명에 맞게 변화 시킨 것으로 나노입자, 폴리솔베이트, 유기용매, 증류수의 양은 크게 중요하지 않으나, 증류수의 양이 유기용매 보다 많아야 한다는 점과 고분자의 구조 붕괴를 막기 위하여 낮은 온도를 유지해주면서 임펠러를 이용하면서 스테어링 해준다는 것이 중요하다.

[0060] 실시예 6: 표적화 리간드가 결합된 침상 표면을 갖는 산화망간 나노입자의 제조

[0061] 실시예 5에 개시된 방법에 따라 제조된, 생체적합성 물질이 코팅된 침상 표면을 갖는 $MnO@Mn_3O_4$ 산화망간 나노입자에 표적화 리간드로서 허셉틴을 결합시켰다. 허셉틴을 결합시키는 방법은 아래와 같다. 실시예 5에서 만들어진 수용액 상의 침상 산화망간 나노입자의 T-80의 양을 기준으로 5당량의 1-에틸-3-[3-디메틸아미노프로필]카보디이미드 하이드로클로라이드와 5 당량의 N-하이드록시설포숙신이미드, 그리고 0.001당량의 허셉틴을 10ml의 PBS버퍼에 녹인 후 반응시켜 준 후 원심분리를 통하여 표적화 리간드가 결합된 침상모양의 산화망간 나노입자를 분리한다.

[0062] 실시예 7: 침상 표면을 갖고 코어에 중공 구조를 갖는 산화망간 나노입자의 제조

[0063] 산화망간 나노입자 중 MnO 가 모두 녹아나와 Mn_3O_4 의 쉘만 남은 중공 구조의 Mn_3O_4 나노입자를 제조하였다. 실시예 5에 따라 제조된 수용액 상의 침상 산화망간 나노입자를 원심분리를 이용하여 침전시켜 분리하였다. 그 후 pH 6 이하의 PBS 완충액 20ml를 넣어주었다. pH 4를 기준으로 48시간이 지나면 95%이상의 입자가 구멍이 뚫리게 된다. 이 후 필요에 따라 실시예 6의 방법에 따라 표적화 리간드를 결합시켰다.

[0064] 실험예 1: 침상 표면을 갖는 산화망간 나노입자의 pH에 따른 망간 이온의 방출 변화 확인

[0065] pH 및 시간에 따른 망간 이온의 방출 변화를 확인하기 위해, 실시예 1 및 실시예 5에 따라 제조된 생체적합성 물질이 코팅된 침상 표면을 갖는 $MnO@Mn_3O_4$ 산화망간 나노입자를 서로 다른 pH를 갖는 완충액(각각 pH3, pH 4, pH 5, pH 6, pH 7.4)에 넣고, 소정의 시간 후 상기 완충액을 원심분리하여 산화망간 나노입자의 형태 변화를 TEM으로 관찰한 후, 완충액에 녹지 않은 산화망간 나노입자에 존재하는 망간의 양과 완충액으로 녹아나온 망간 이온의 양을 각각 IPC(Inductively Coupled Plasma)와 MRI로 측정하였다.

[0066] 도 7은 시간 및 pH에 따른 산화망간 나노입자의 형태 변화를 보여주는 TEM 이미지이다. 도 7에서 볼 수 있는 바와 같이, pH 4 내지 6의 산성 조건 하에서 시간이 흐름에 따라 산화망간 나노입자의 내부에 점차 중공이 형성되는 것을 확인할 수 있다. 반면, 도 8에서 볼 수 있는 바와 같이, pH 3에서는 급속한 속도로 산화망간 나노입자가 붕괴되며, pH 7.4에서는 시간이 흘러도 산화망간 나노입자에는 아무런 영향을 주지 않기 때문에 중공이 형

성되지 않음을 확인할 수 있다. 도 9는 시간 및 pH에 따른 산화망간 나노입자를 포함하는 완충액의 색 변화를 보여주는 사진이다. 도 9에서 알 수 있는 바와 같이, pH 3에서는 산화망간 나노입자의 셀에 해당하는 Mn_3O_4 부분도 녹아서 시간이 지남에 따라 용액이 투명해 지는 것을 확인 할 수 있었다.

[0067] 한편, 도 10 은 시간 및 pH에 따른 산화망간 나노입자의 ICP 분석 결과를 보여준다. 도 10에서 볼 수 있는 바와 같이, pH 7.4에서는 시간이 흘러도 산화망간 나노입자로부터 망간 이온이 거의 방출되지 않은 반면, pH 6 이하에서는 pH가 낮아지고 시간이 흐를수록 망간 이온의 방출이 증가하여 산화망간 나노입자 내에 남아 있는 망간의 양이 점차 감소했음을 알 수 있다. 또한, 도 11은 pH별 산화망간 나노입자로부터 녹아나온 Mn^{2+} 이온을 이용한 시간에 따른 MRI 데이터를 보여준다. 도 11로부터 알 수 있는 바와 같이, pH 6 이하에서는 pH가 낮을수록 시간이 흐름에 따라 망간 이온의 방출이 증가하여 T1 조영 효과가 현저히 증가됨을 알 수 있다. 따라서, 약 pH 5.5를 나타내는 암 세포에서는 본 발명에 따른 산화망간 나노입자로부터 망간 이온이 방출되어 T1 조영 효과를 통해 정상조직과 대별될 수 있을 것으로 예상된다.

[0068] 한편, Mn^{2+} 이온의 방출 및 그로 인한 T1 조영 효과의 향상도를 비교하고자, 상기 실시예 7의 방법에 따라 제조된 중공 구조의 Mn_3O_4 나노입자를 비교군으로 사용하여 각각 ICP(Inductively Coupled Plasma)와 MRI 분석을 수행하였다. 그 결과, 도 12의 ICP결과에서 볼 수 있는 바와 같이 상대적으로 낮은 pH 조건에서 안정한 구조의 Mn_3O_4 의 중공구조의 경우 pH 3과 같은 산도가 강한 조건을 제외하고 녹아나오지 않아서 pH6~pH4에서는 Mn^{2+} 이온을 거의 내어 줄 수 없다는 것을 확인 할 수 있다. 또한, 도 13의 MRI 분석 결과에서 볼 수 있는 바와 같이, 낮은 pH 조건에서 시간이 지남에 따라 Mn^{2+} 이온이 거의 녹아나오지 않아서 Mn^{2+} 에 따른 T1 MR 조영효과의 향상은 없다는 것을 알 수 있다. 상기 결과로부터 중공구조의 Mn_3O_4 나노입자에 비해 $MnO@Mn_3O_4$ 나노입자의 T1 조영 효과가 훨씬 뛰어남을 확인할 수 있다.

[0069] 또한, 침상 구조를 갖는 망간산화물과 일반적인 팔면체 모양의 망간산화물의 T1 조영 효과를 비교하고자 아래와 같이 실험하였다. 먼저, 실시예 1에 의하여 제조된 침상구조의 망간산화물 10mg을 실시예 5에 기재된 방법을 이용하여 물상에서 안정한 침상 구조를 갖는 망간산화물(urchin closed)을 만들었다. 이와 같은 방법으로 만든 침상 구조를 갖는 망간 산화물 10mg을 실시예 7에 기재한 방법을 통하여 중공구조를 갖는 침상구조의 망간산화물(urchin hollow)을 제조하였다. 비교 대조군으로 일반적인 팔면체 모양의 나노입자(Octahedral closed)로는 실시예 1의 열분해 반응을 통해 합성된 팔면체 산화망간 나노입자를 실시예 5에 기재된 방법을 이용하여 수용액 상에서 안정한 팔면체 산화망간 나노입자 10mg을 합성하였다. 또한, 같은 방법으로 만든 팔면체 산화망간 나노입자 10mg을 실시예 7의 방법을 통하여 중공 구조를 갖는 팔면체 모양의 나노입자(Octahedral hollow)를 만들었다. 도 14는 가장 왼쪽부터 왼쪽을 1/2 농도로 묽혀준 용액의 solution MR 이미지이다. 도 14a에서 볼 수 있는 바와 같이 같은 양을 사용하였을 때 표면적이 넓은 침상구조의 망간산화물이 더욱 높은 T1 조영효과를 보여주는 것을 알 수 있다. 또한 도 14b에서 볼 수 있는 바와 같이 중공구조의 T1 이미지 역시 침상구조의 망간산화물이 더욱 넓은 표면적에 의하여 더욱 높은 T1 조영 효율을 보여준다.

[0070] 실험예 2: 침상 표면을 갖는 산화망간 나노입자의 세포 내에서의 형태 변화 확인

[0071] 상기 실시예에 따라 제조된 $MnO@Mn_3O_4$ 나노입자를 세포 내로 도입하고, 상기 나노입자의 세포 내에서의 형태 변화를 관찰하였다.

[0072] 2-(1). RAW 264.7 세포에서의 $MnO@Mn_3O_4$ 나노입자의 형태 변화

[0073] 실시예 1에 따라 제조되고, 실시예 5의 방법에 따라 생체적합성 물질로 코팅된 $MnO@Mn_3O_4$ 나노입자를 물상에 녹인 후 대식세포인 RAW 264.7 세포의 배양액에 가하였다. 그 결과, 도 15에서 볼 수 있는 바와 같이, TEM 관찰을 통하여 배양 30분 후 파고사이토시스에 의해 대식세포 내로 $MnO@Mn_3O_4$ 나노입자가 도입되었음을 확인할 수 있었으며, 시간이 흐름에 따라 점차 세포 내로 도입된 $MnO@Mn_3O_4$ 나노입자가 대식세포 내부의 낮은 pH에 의하여 MnO 부분이 녹아나가면서 내부에 중공이 형성됨을 관찰할 수 있었다.

[0074] 2-(2). NIH3T6.7 세포에서의 $MnO@Mn_3O_4$ 나노입자의 형태 변화

[0075] 실시예 1, 5, 및 6에 따라 제조된 허셉틴이 결합된 $\text{MnO@Mn}_3\text{O}_4$ 나노입자를 Her2/neu가 과발현되어 있는 유방암 세포인 NIH3T6.7 세포의 배양액에 가하였다. 그 결과, 도 16에서 볼 수 있는 바와 같이, 배양 30분 후 엔도사이토시스에 의해 암 세포 내로 $\text{MnO@Mn}_3\text{O}_4$ 나노입자가 도입되었음을 확인할 수 있었으며, 시간이 흐름에 따라 점차 암 세포 내로 도입된 $\text{MnO@Mn}_3\text{O}_4$ 나노입자가 암 세포 내의 특성인 낮은 pH에 의해 상대적으로 약한 MnO 부분이 Mn^{2+} 로 녹아나가면서 내부에 중공이 형성됨을 관찰할 수 있었다.

[0076] **실험예 3: 침상 표면을 갖는 산화망간 나노입자의 인 비트로 T1 조영 효과 확인**

[0077] 상기 실시예에 따라 제조된 $\text{MnO@Mn}_3\text{O}_4$ 나노입자를 유방암 세포 내로 도입하고, 상기 나노입자의 T1 조영 효과를 조사하였다.

[0078] 3-(1). NIH3T6.7 세포에서의 $\text{MnO@Mn}_3\text{O}_4$ 나노입자의 T1 조영 효과

[0079] 실시예 1, 5 및 6에 따라 제조된 허셉틴이 결합된 $\text{MnO@Mn}_3\text{O}_4$ 나노입자를 Her2/neu가 과발현되어 있는 유방암 세포인 NIH3T6.7 세포에 농도별로 처리하고 MRI 조영을 수행하였다. 본 발명에 따른 $\text{MnO@Mn}_3\text{O}_4$ 나노입자의 Mn^{2+} 이온의 방출 및 그로 인한 T1 조영 효과의 향상도를 확인하고자, 실시예 1, 5, 6, 및 7에 따라 제조된 허셉틴이 결합된 중공 구조의 Mn_3O_4 나노입자를 사용하여 동일한 실험을 수행하였다. 그 결과, 도 17에서 볼 수 있는 바와 같이, 아무것도 처리하지 않은 NIH3T6.7 세포는 자기공명영상 신호가 검은색으로 나타나는 반면, $\text{MnO@Mn}_3\text{O}_4$ 나노입자를 처리한 군에서는 처리 농도에 따라 자기공명영상 신호가 회색에서 T1 조영효과가 높음을 나타내는 흰색으로 변화함을 확인할 수 있었다. 또한, 중공 구조의 Mn_3O_4 나노입자를 처리한 군에서는 초기에는 $\text{MnO@Mn}_3\text{O}_4$ 보다 넓은 표면적을 갖고 있어서 시간에 따른 T1 조영시그널이 차이가 많이 보이지 않는 것에 비하여 $\text{MnO@Mn}_3\text{O}_4$ 는 시간에 따라 Mn^{2+} 이온이 예칭되어 나오면서 T1 자기공명영상 시그널이 기존의 Mn_3O_4 보다 더욱 강해졌다.

[0080] **실험예 3: 침상 표면을 갖는 산화망간 나노입자의 인 비보 T1 조영 효과 확인**

[0081] 상기 실시예 1, 5 및 6에 따라 제조된 $\text{MnO@Mn}_3\text{O}_4$ 나노입자를 유방암 세포를 이식시킨 누드 마우스에 정맥 내로 투여하고 MRI를 수행하여 상기 나노입자의 인 비보 T1 조영 효과를 조사하였다. 본 발명에 따른 $\text{MnO@Mn}_3\text{O}_4$ 나노입자의 Mn^{2+} 이온의 방출 및 그로 인한 T1 조영 효과의 향상도를 확인하고자, 실시예 1, 5, 6 및 7에 따라 제조된 허셉틴이 결합된 중공 구조의 Mn_3O_4 나노입자를 비교군으로 사용하여 동일한 실험을 수행하였다. 그 결과, 도 18에서 볼 수 있는 바와 같이, 뿔려있는 나노입자(도 18A)의 경우 혈관에 주로 붙어서 암세포 전체를 조영하는 데는 한계를 보이지만 닫힌 구조의 $\text{MnO@Mn}_3\text{O}_4$ 나노입자(도 18B)의 경우 암세포의 주위에 결합 후 망간 이온이 녹아나오면서 세포사이에 퍼져나가서 암세포 전체를 밝게 조영할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0082] **실험예 4: 직접 투과를 이용한 망간 이온의 테라헤르츠파 조영 효과 확인**

[0083] 테라헤르츠파를 직접 투과시켜 테라헤르츠 투과스펙트럼을 이용하여 1M 망간이온과 물과의 투과스펙트럼을 비교하였다. 일반적으로 테라헤르츠 영역의 빛은 물의 흡수도가 가장 크다. 따라서 실제 의학적 응용이 어려운 이유는 사람의 몸의 70% 이상이 물로 이루어져 있기 때문에 신체 내부조직의 조영제의 응용 가능한 물질이 현재 없었다. 때문에 피부암 또는 유방암과 같은 외부에 가까운 장기의 의학적 응용만 연구가 이루어지고 있다. 따라서 물과 투과 스펙트럼의 차이를 보일 수 있는 물질의 개발이 필요하다,

[0084] 우선 염화망간을 물에 녹여서 수용액의 Mn^{2+} 의 농도를 이용하여 흡수 스펙트럼을 이용하여 망간이온이 테라헤르츠 조영제로 사용 가능한지의 여부를 확인해 보았다. 또한 실험시 세포의 성장 환경에 가장 좋은 PBS 버퍼 상에 녹인 망간 이온의 농도를 통하여 바이오 응용 가능성도 함께 확인하였다. 실험 결과, 도 19에서 볼 수 있는 바와 같이, 물과 PBS버퍼의 흡수도는 4% 정도로 매우 비슷한 흡수율을 보이는 것으로 나타났다. 예비 실험 결과 PBS 버퍼와 PBS 버퍼에 1M의 농도로 녹인 Mn^{2+} 샘플의 투과 스펙트럼 분석한 결과 PBS버퍼보다 1M의 Mn^{2+} 가 더욱 투과율이 높아지는 것을 확인할 수 있었다. 여기서 생성되는 Mn^{2+} 이온과 PBS 버퍼상의 이온들의 클러스터 형성

을 예상해 볼 수 있는데 이때 생성된 클러스터의 경우 PBS 버퍼보다 투과율이 약 20% 높아지는 것을 확인할 수 있었다. 물의 경우 물과 1M의 망간이온의 투과 스펙트럼을 분석 한 결과 물보다 망간이온이 약 10% 흡수가 더 되는 것을 확인하여 망간이온의 테라헤르쯔 조영제의 가능성을 보였다.

[0085] **실험예 5: 직접 투과를 이용한 침상 표면을 갖는 산화망간 나노입자의 테라헤르쯔파 조영 효과 확인**

[0086] 실시예 1 및 5의 방법으로 제조된 침상모양의 산화망간 나노입자를 pH4의 PBS 버퍼와 pH 4로 맞춘 염산 수용액을 이용하여 에칭하여 주었다. 망간이온이 거의 없는 버퍼와 염산수용액에 노출이 되었을 때와 18시간이 지나서 망간이온이 에칭되어 나와서 망간이온이 늘어났을 때의 흡수스펙트럼 분석을 통하여 테라헤르쯔 조영제로써의 응용성을 측정해보았다. 도 20에서 볼 수 있는 바와 같이, PBS 버퍼에 노출되었을때의 경우 시작되었을 때와 시간이 지나서 망간이온이 늘었을 때의 경우 최대 5%의 흡수율이 더 높아지는 것을 보인 것을 통하여 침상표면을 갖는 산화망간 나노입자의 테라헤르쯔 조영제로써의 응용가능성이 있음을 보였다. 또한 염산 수용액 상에서의 경우는 PBS 버퍼보다 더욱 큰 차이를 보였다. 18시간 지난 후의 염산 수용액에서의 망간이온이 약 15%이상 흡수가 잘되는 것을 보여줌으로써 역시 테라헤르쯔 조영제로써의 응용가능성을 더욱 높이는 결과를 보여주었다.

[0087]

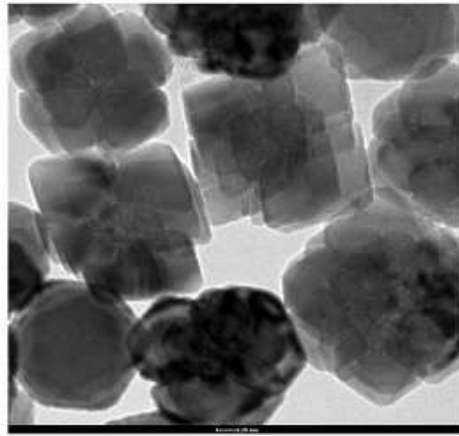
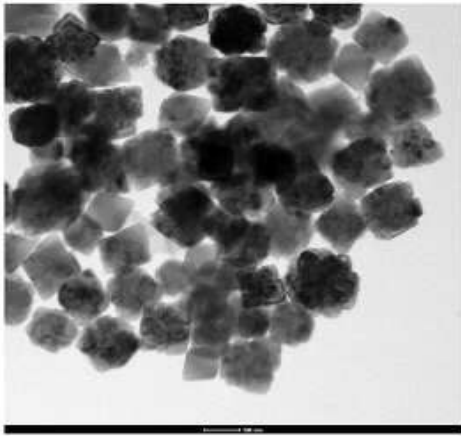
[0088] **실험예 6: 웨이브 가이드 방법을 이용한 망간 이온의 테라헤르쯔파 조영 효과 확인**

[0089] 웨이브 가이드 방법을 이용하여 Mn^{2+} 이온이 테라헤르쯔 조영제로 사용 가능한지 테라헤르쯔 투과스펙트럼을 통하여 예비 실험을 해 보았다. 일반적으로 테라헤르쯔 파장의 빛을 가장 많이 흡수하는 물질은 물로 알려져 있다. 따라서 인체에 사용하기 위해서는 두가지를 만족시켜야한다. 첫째 수용액상에서 물과 대별되는 흡광도를 갖아야하며 또한 농도에 따라서 다른 흡광도를 보여야한다. 도 21은 Mn^{2+} 농도의 변화에 (1M의 Mn^{2+} 와 415 μM 의 Mn^{2+}) 따라 테라헤르쯔 흡수스펙트럼이 최대 약 20% 이상의 차이가 있음을 보여주고 있다. 이는 테라헤르쯔 조영제로써의 가능성을 보였다고 할 수 있는 결과다.

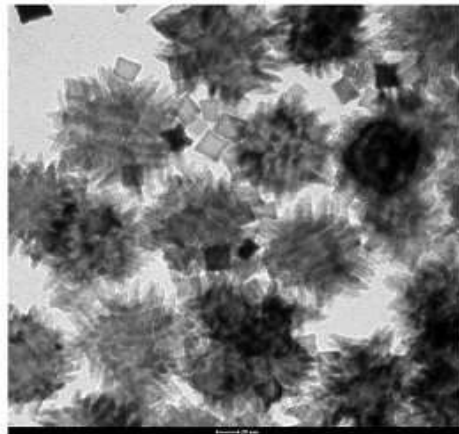
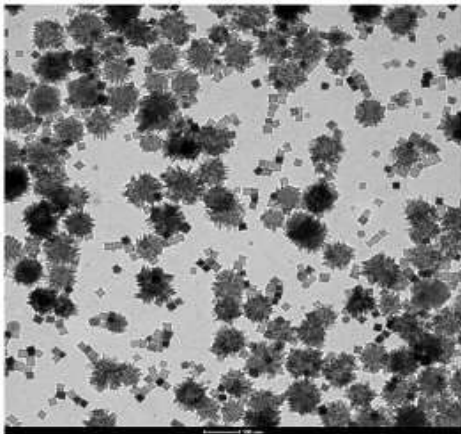
도면

도면1

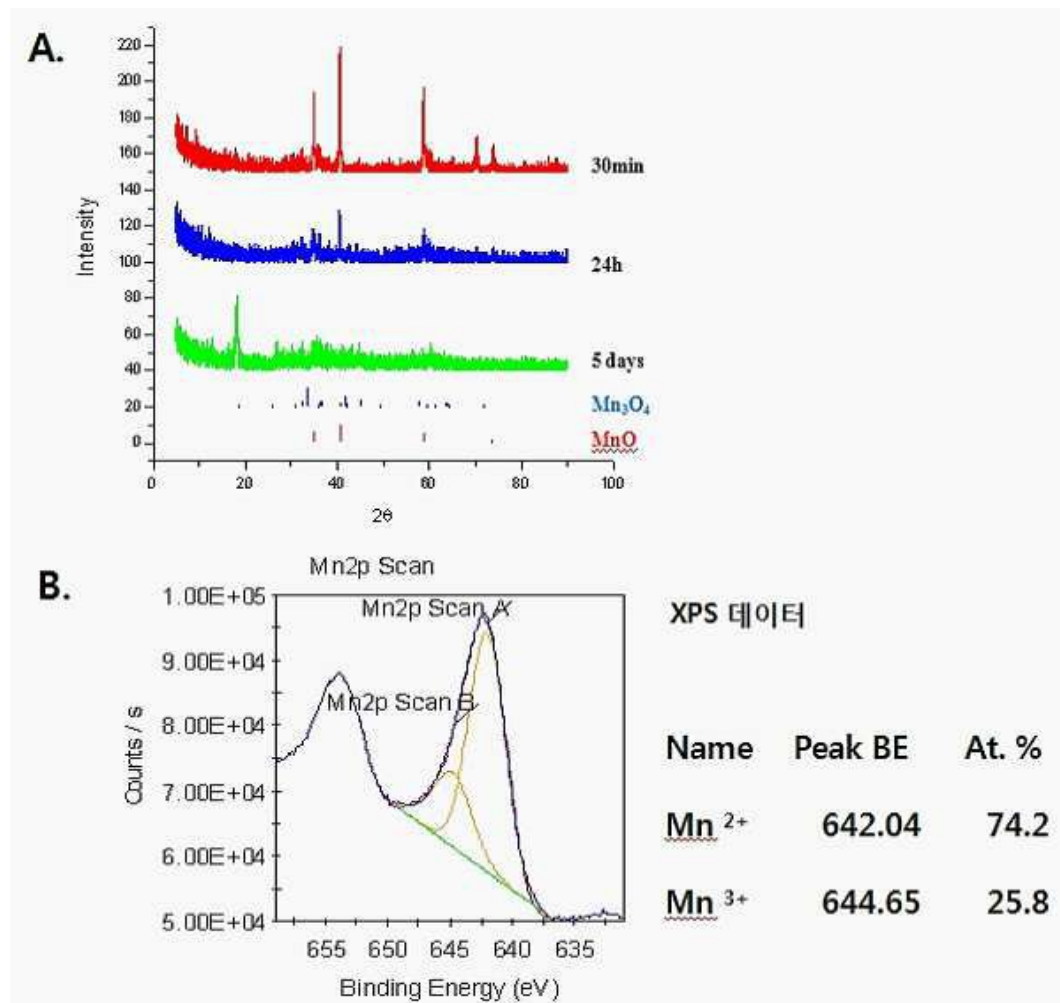
A.



B.

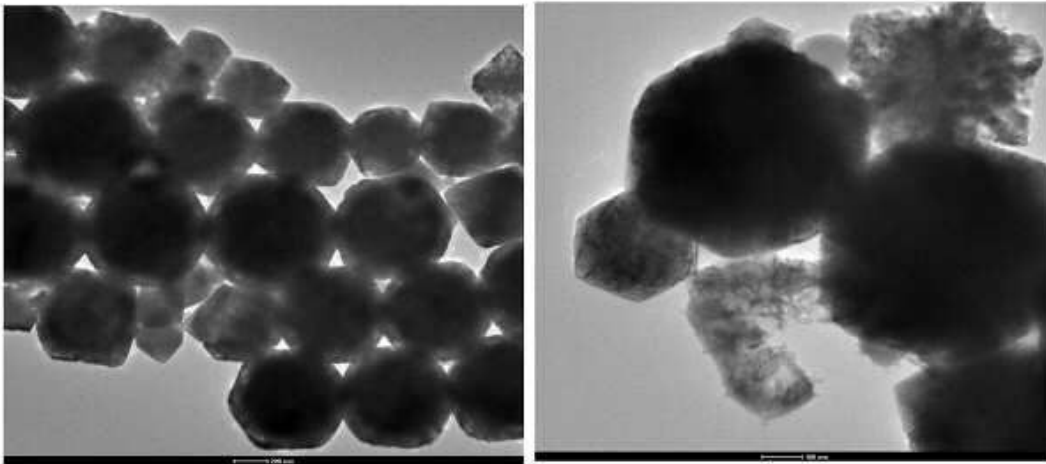


도면2

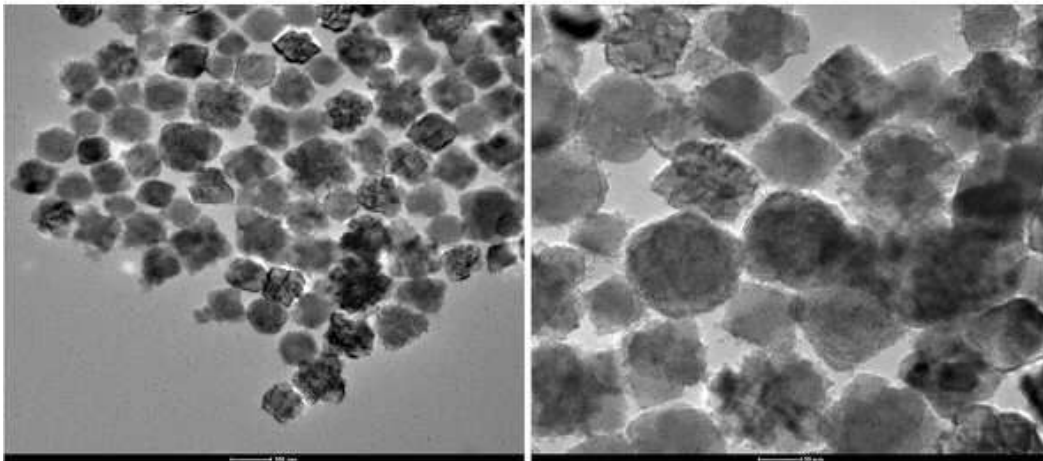


도면3

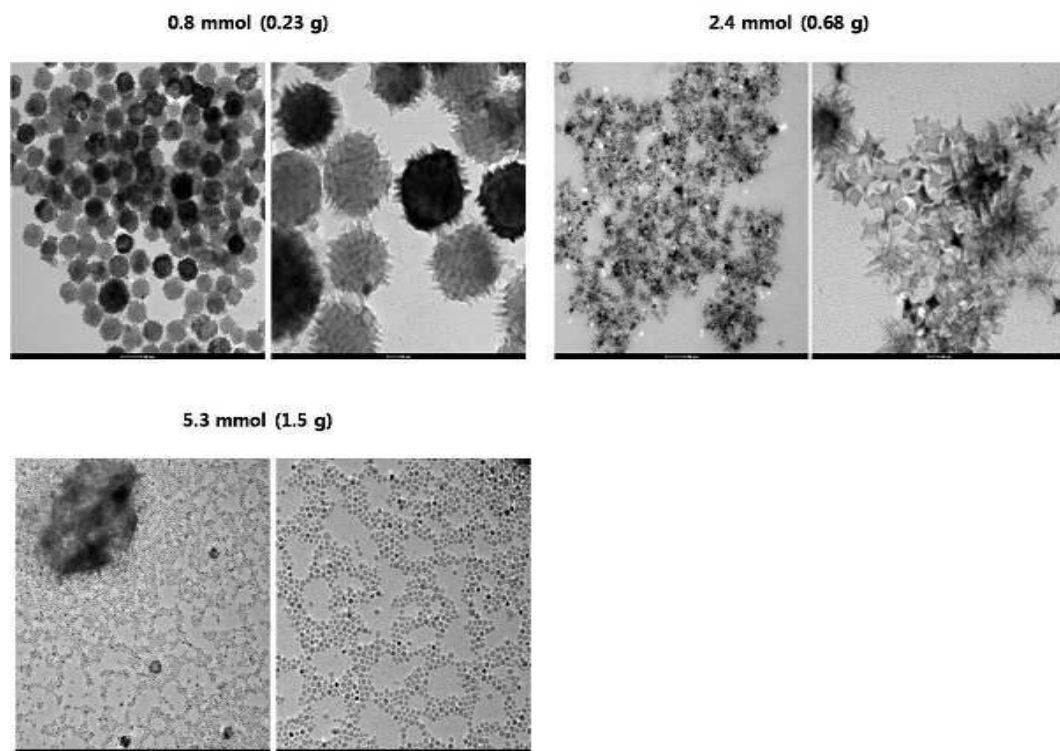
210 °C



240 °C

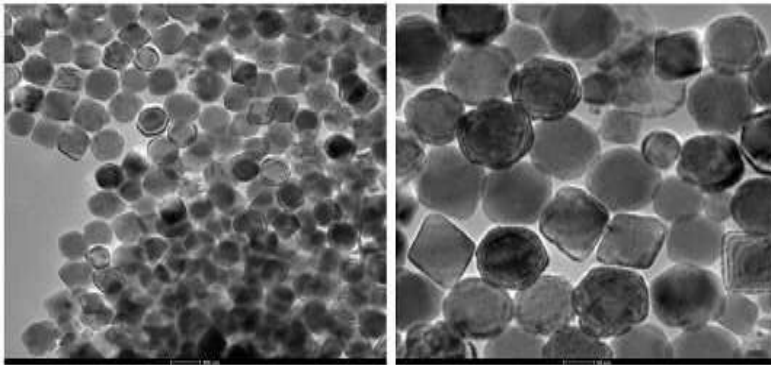


도면4



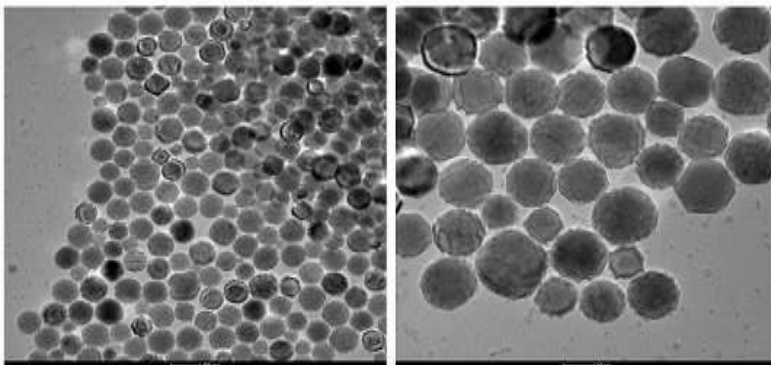
도면5

A.

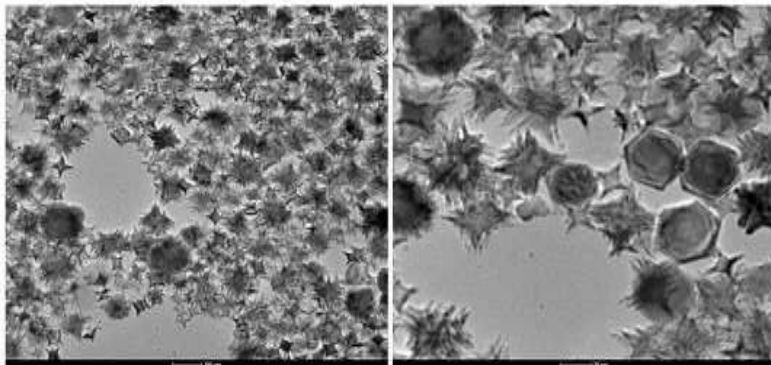


B.

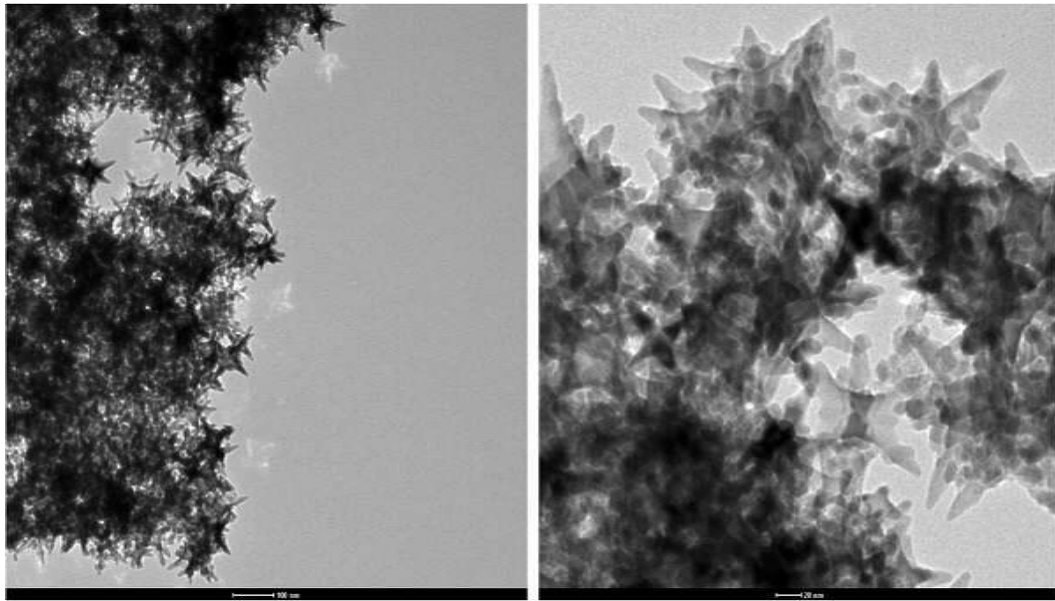
0.8 mmol (0.23 g)



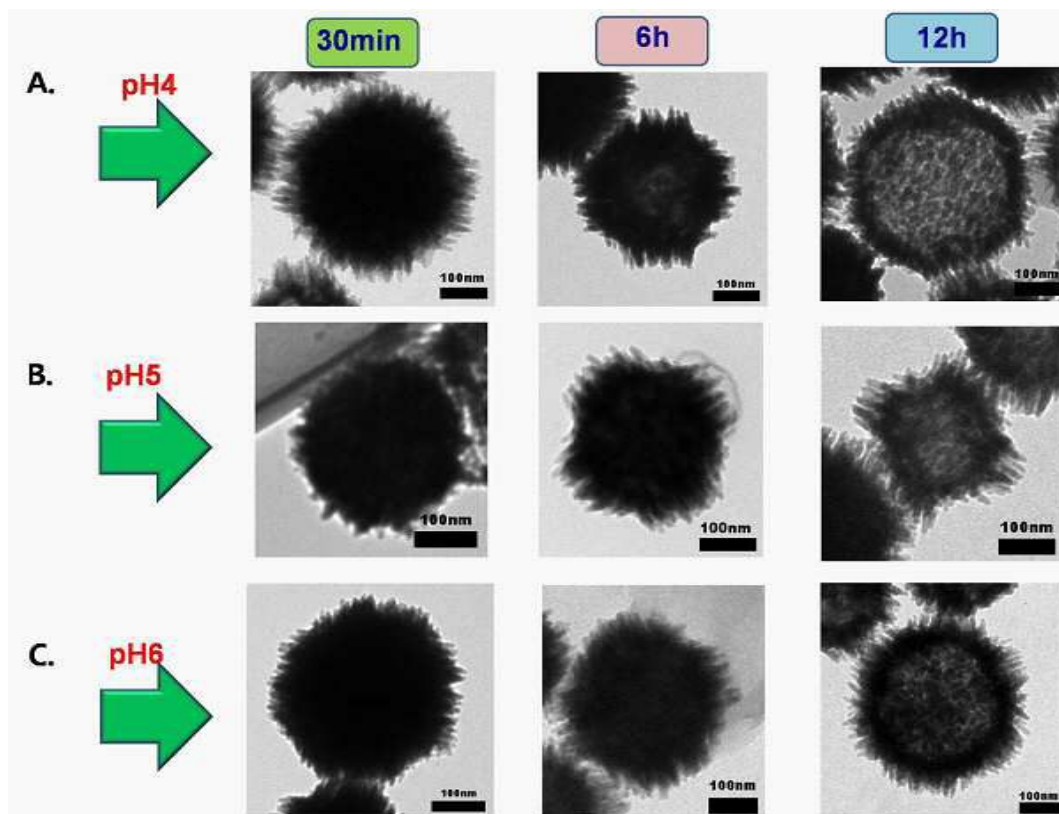
2.4 mmol (0.68 g)



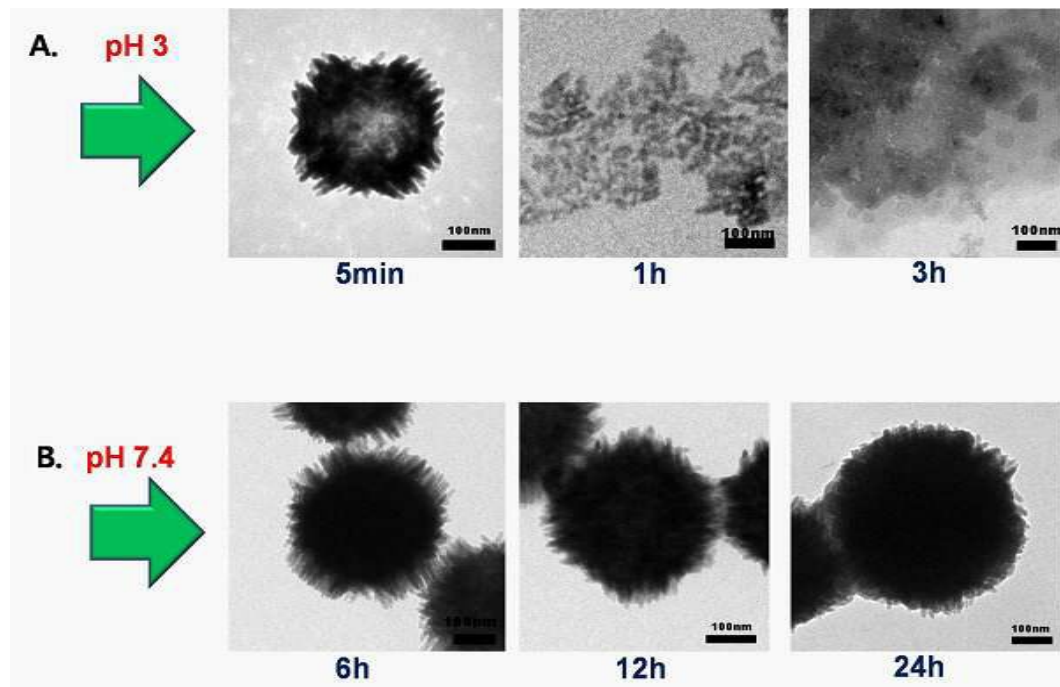
도면6



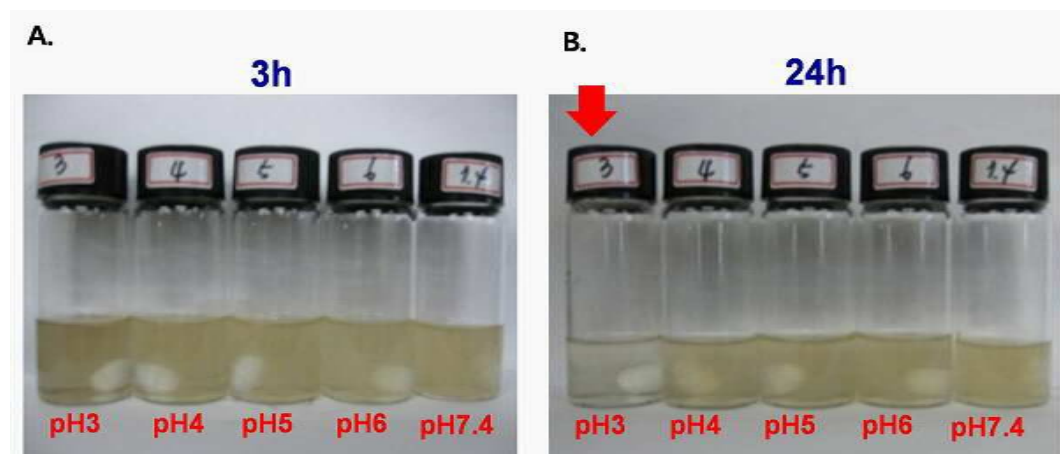
도면7



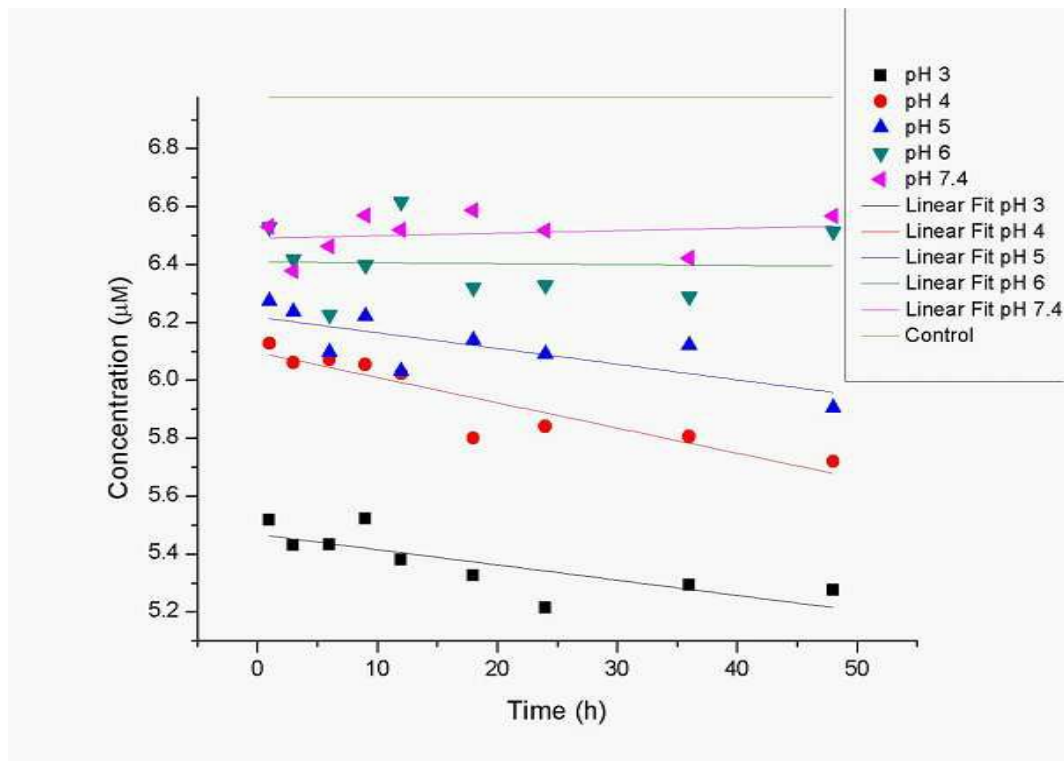
도면8



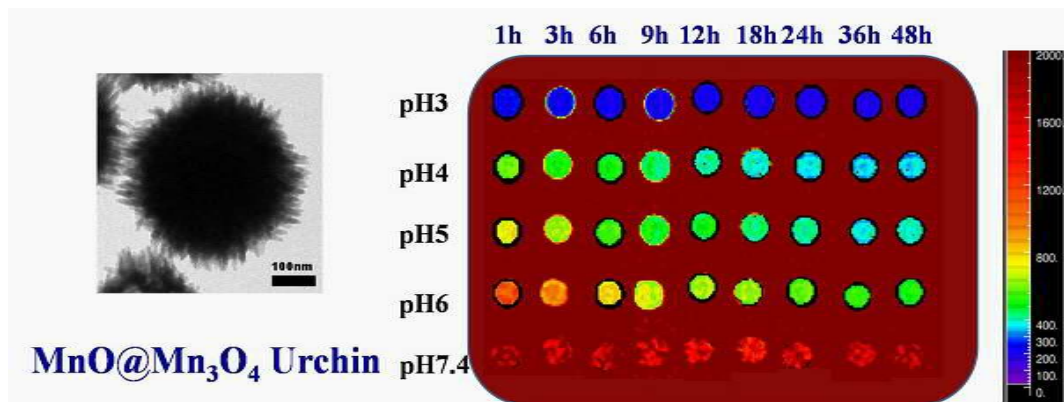
도면9



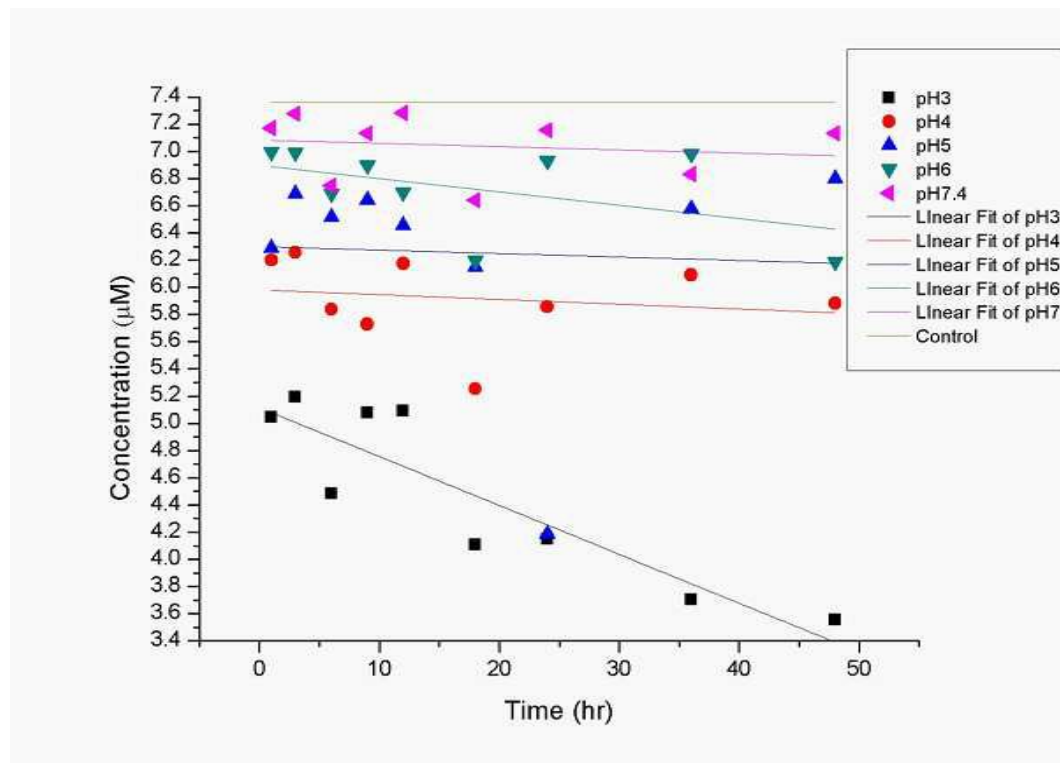
도면10



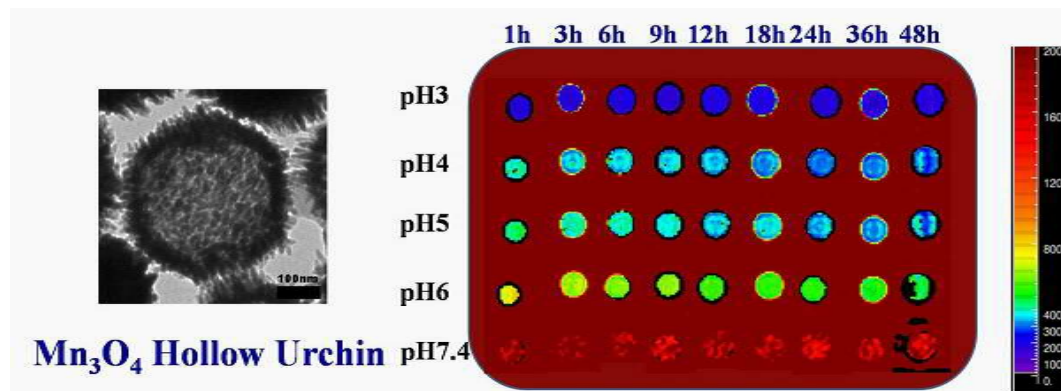
도면11



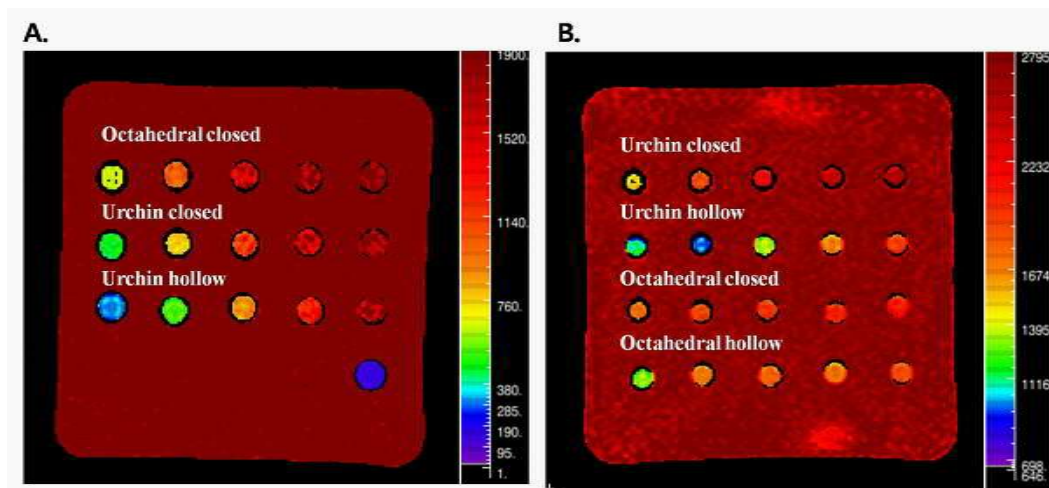
도면12



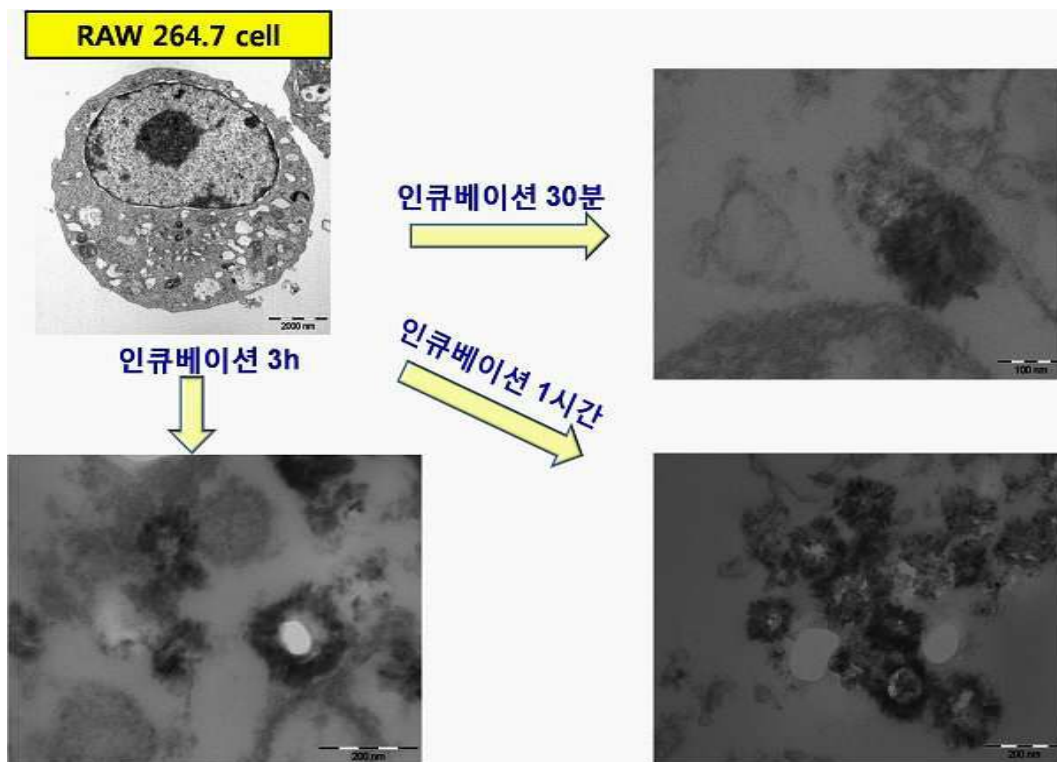
도면13



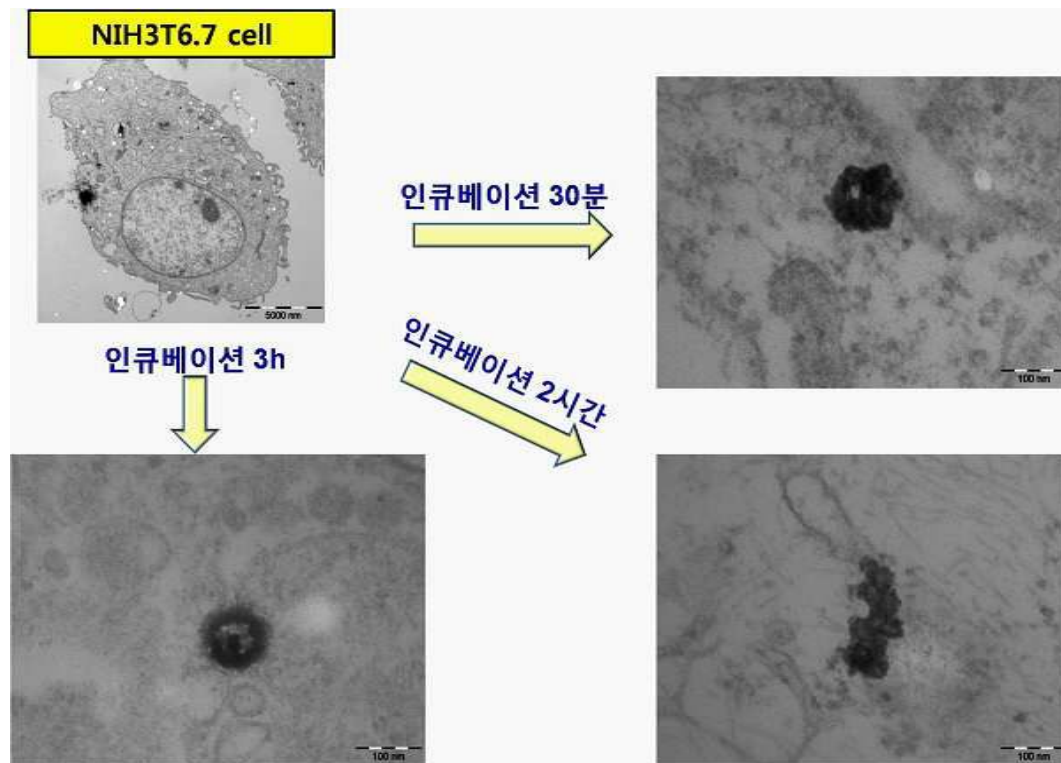
도면14



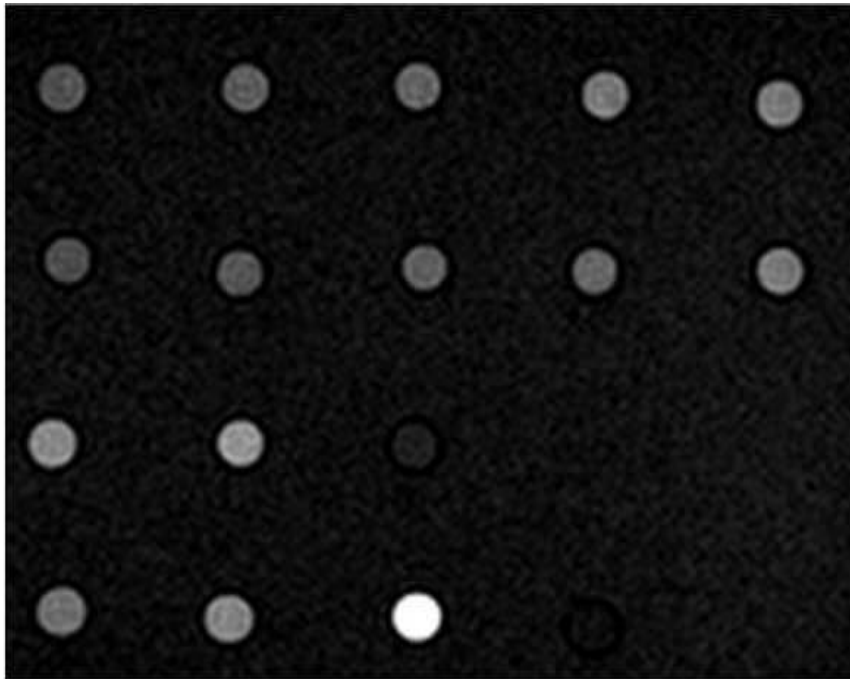
도면15



도면16

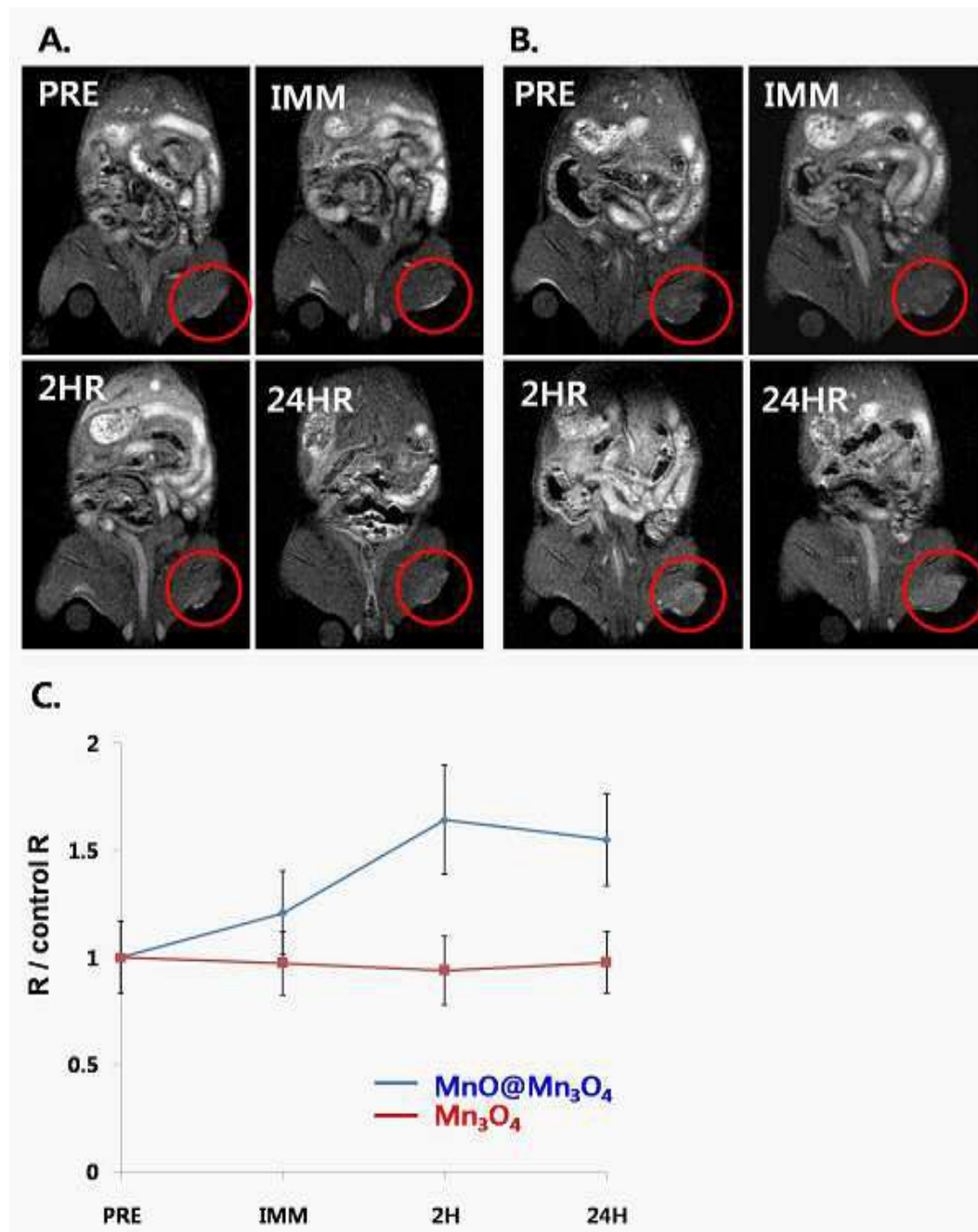


도면17

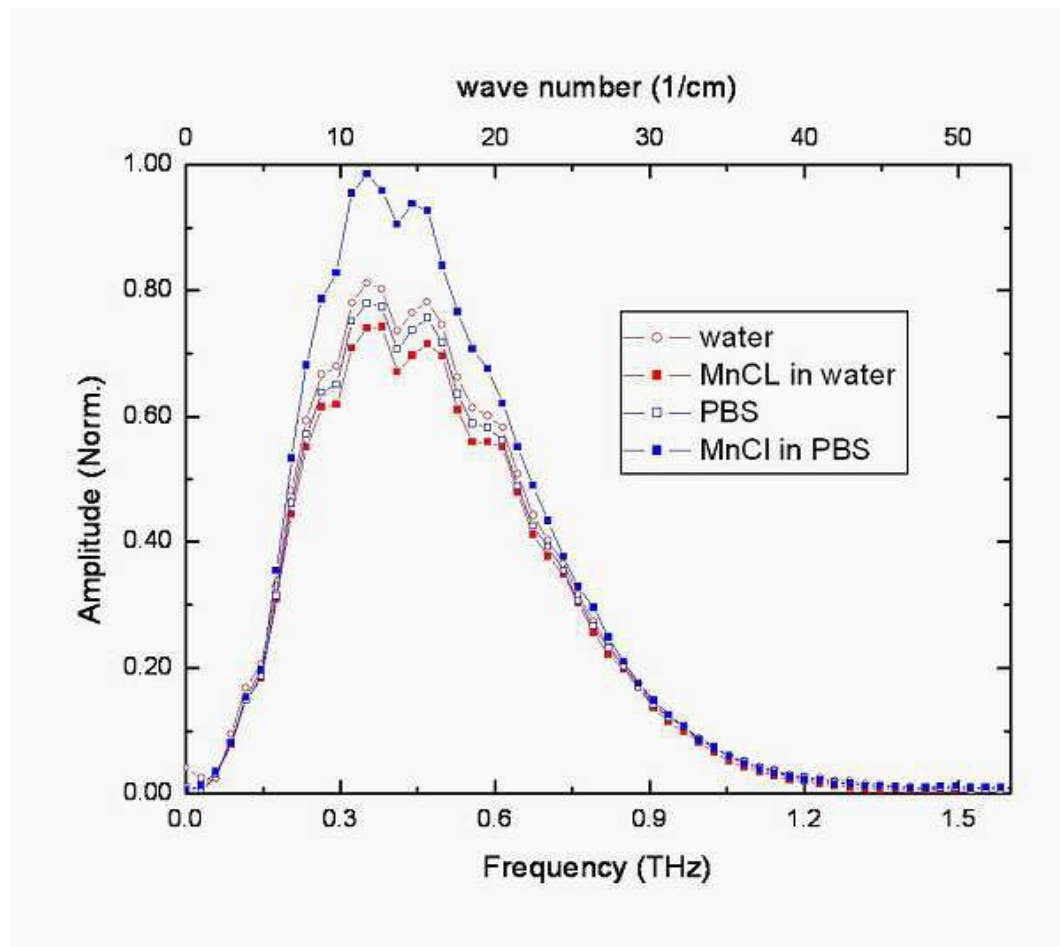


단힌구조 0 분	단힌구조 5 분	단힌구조 10 분	단힌구조 20 분	단힌구조 40 분
중공구조 0 분	중공구조 5 분	중공구조 10 분	중공구조 20 분	중공구조 40 분
단힌구조 80 분	단힌구조 160 분	무처리 세포		
중공구조 80 분	중공구조 160 분	magvist	D.W.	

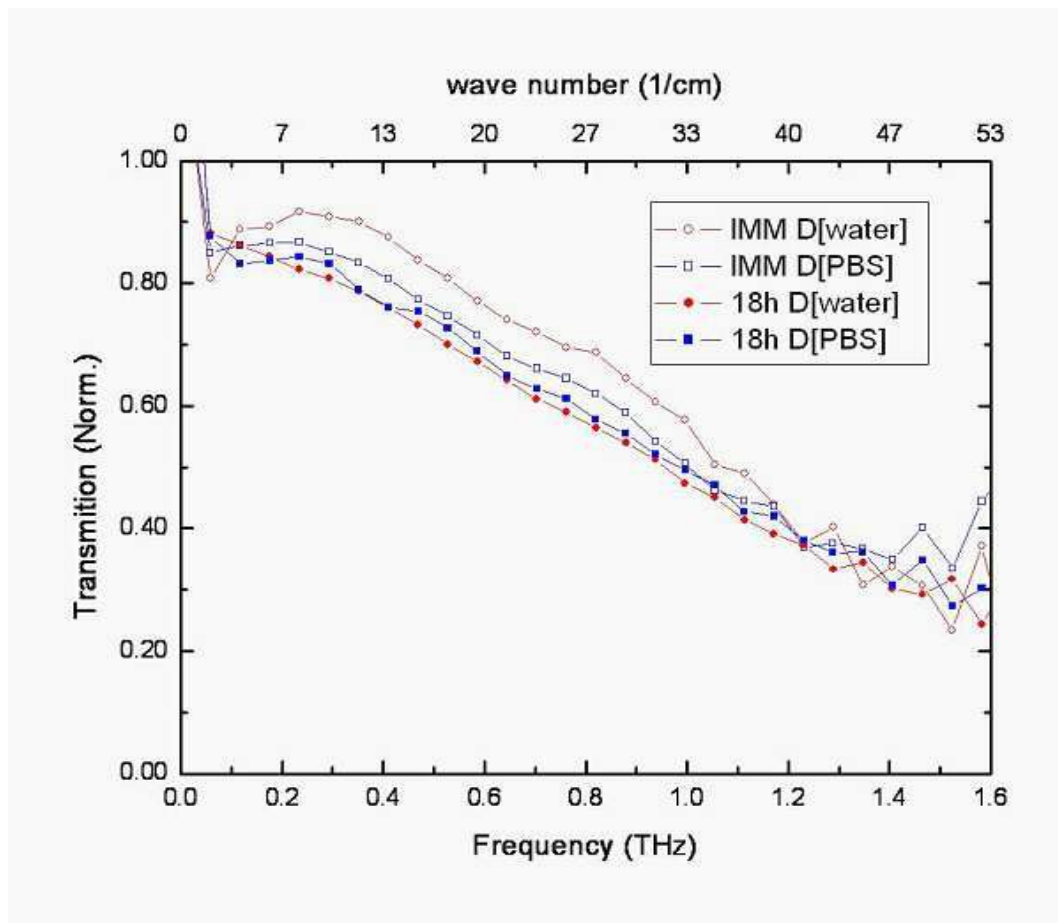
도면18



도면19



도면20



도면21

