

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 6월 25일 (25.06.2020) WIPO | PCT

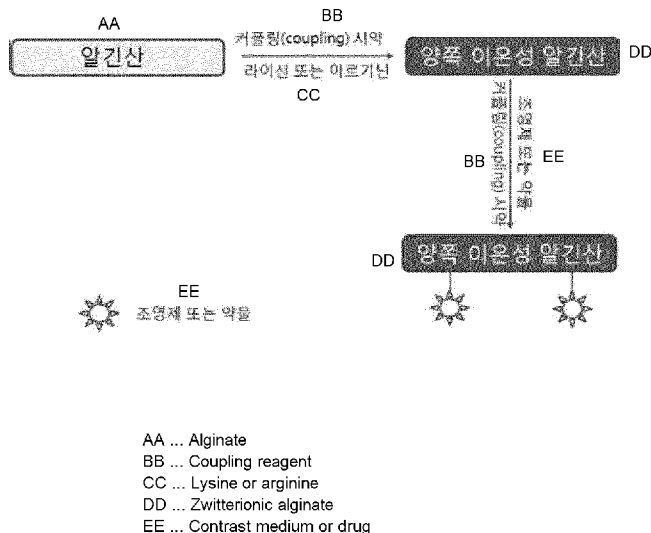


(10) 국제공개번호
WO 2020/130489 A1

- (51) 국제특허분류:
C08B 37/00 (2006.01) A61K 47/61 (2017.01)
A61K 47/36 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
A61K 49/12 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 49/04 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01) C08G 65/32 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2019/017609
- (22) 국제출원일: 2019년 12월 12일 (12.12.2019)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2018-0167393 2018년 12월 21일 (21.12.2018) KR
- (71) 출원인: 국립암센터 (NATIONAL CANCER CENTER)
[KR/KR]; 10408 경기도 고양시 일산동구 일산로 323,
Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 최용두 (CHOI, Yongdoo); 10408 경기도 고
양시 일산동구 일산로 323, Gyeonggi-do (KR). 이혜리
(LEE, Hyeri); 10408 경기도 고양시 일산동구 일산로
323, Gyeonggi-do (KR). 이연 (LI, Yan); 03787 서울시 서
대문구 연세로7안길 50, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인(유)화우 (YOON & YANG (IP) LLC);
06175 서울시 강남구 테헤란로108길 11, 4층, Seoul
(KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국
내 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC,
EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU,

(54) Title: ZWITTERIONIC ALGINATE DERIVATIVE AND CONTRAST MEDIUM COMPOSITION CONTAINING SAME

(54) 발명의 명칭: 양쪽이온성 알긴산 유도체 및 이를 포함하는 조영제 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to: a zwitterionic alginate derivative; a contrast medium composition containing the derivative; a pharmaceutical composition for preventing or treating cancer or inflammatory diseases; a method for preparing the derivative; and a method for preparing the contrast medium composition or the pharmaceutical composition. The alginate derivative of the present invention is zwitterionic so as to avoid non-specific interactions with serum proteins present in a cell culture solution or blood, and inhibits non-specific intake thereof to organs or tissues other than a target organ or tissue so as to form a conjugate with an image contrast medium or a drug while enabling stable circulation in the blood, thereby being applicable to a contrast medium composition or a pharmaceutical composition. In addition, the delivery efficiency of a contrast medium and a drug with respect to target cancer cells can be remarkably increased, and diagnostic imaging and treatment effects can also be greatly improved.

(57) 요약서: 본 발명은 양쪽이온성 알긴산(alginate) 유도체; 상기 유도체를 포함하는 조영제 조성물; 암 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물; 상기 유도체의 제조 방법 및 상기 조영제 조성물 또는 약학 조성물의 제조 방법에 관한 것이다. 본 발명의 알긴산 유도체는 양쪽이온성을 가짐으로써 세포 배양액 또는 혈액 등에 존재하는 혈청 단백질과의 비특이적 상호작용을 회피하고, 목적으로 하는 기관 또는 조직 이외의 다른 기관 또는 조직에 대한 비특이적 섭취가 저해되어 혈액 내에서 안정적인 순환이 가능하면서도, 영상 조영제 또는 약물과 결합체를 형성하여 조영제 조성물 또는 약학적 조성물로 활용될 수 있다. 또한, 표적으로 하는 암세포에 대한 조영제와 약물의 전달 효율을 획기적으로 높일 수 있을 뿐 아니라, 영상 진단 및 치료 효과도 크게 향상시킬 수 있다.



ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, 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, 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 역
내 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), 유
럽 (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 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 양쪽이온성 알긴산 유도체 및 이를 포함하는 조영제 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 양쪽이온성 알긴산(alginate) 유도체; 상기 유도체를 포함하는 조영제 조성물; 암 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물; 상기 유도체의 제조방법 및 상기 조영제 조성물 또는 약학 조성물의 제조방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 질병을 치료하는 데 있어서 질병으로 인해 야기되는 생체 내의 형태학적, 기능적인 변화를 초기 단계에 탐지하는 것이 중요한데, 예컨대, 암을 치료할 때 종양의 부위와 크기를 탐지하는 것은 효과적인 치료 설계의 상당히 중요한 요인에 해당한다. 이렇게 질병으로 인한 생체 내 변화를 탐지하기 위한 목적으로 공지된 방법으로, 천공 등에 의한 생체검사, X선 영상, 자기공명영상(MRI), 초음파 영상 및 형광영상 등의 다양한 영상화 진단법이 존재한다.
- [4] 이러한 영상화 진단법에는 적절한 영상 조영제가 사용되는데, 사용하는 영상법에 따라서 각 영상신호를 증폭 또는 감소시키는 특성을 갖는 아이오딘계 화합물, 금속 착물, 나노입자, 버블 또는 염료 등의 형태를 지닌 조영제를 사용한다. 일례로서, 형광영상 조영제는 특정 파장을 가지는 여기광에 노출시켜 형광을 방출하는 기능을 한다. 영상화 진단법 수행 시 개체는 체외로부터 여기광에 노출되며, 체내의 형광 조영제는 형광을 방출하여 이를 감지하는 원리로 질병의 증상, 경과 등을 진단할 수 있다.
- [5] 그러나, 기존에 알려진 *in vitro* 및 *in vivo* 형광 영상 진단 시에 사용되는 조영제들은 세포 배양액 및 혈액 내에 존재하는 여러 종류의 혈장 단백질들과 비특이적으로 결합하면서 질병 병소에 조영제가 특이적으로 축적되는 것이 방해되거나, 정상 조직에 비특이적 축적이 일어남으로써 질병 부위의 정확한 영상 진단이 어렵게 되거나, 빠른 속도로 체외로 배출되어 단시간에 영상 진단을 해야 하는 기술적인 문제가 존재하였다.
- [6] 이러한 배경 하에 본 발명자들은 혈청 단백질과의 비특이적인 상호작용이 일어나지 않아 정확한 진단을 가능하게 하고 체내에 보다 오랜 시간 동안 안정적으로 체류할 수 있는 물질을 발굴하고자 예의 노력한 결과, 라이신(lysine) 또는 아르기닌(arginine)을 결합시킴으로써 양쪽이온성 특성을 갖는 알긴산 유도체를 사용할 경우, 목적하지 않는 기관 또는 조직에 조영제가 비특이적으로 섭취되는 것을 예방할 수 있으면서도, 일정 시간 후에도 높은 농도로 체내에 체류할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[7]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본 발명의 하나의 목적은 양쪽이온성 알긴산(alginate) 유도체를 제공하는 것이다.
- [9] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 알긴산 유도체를 포함하는 조영제 조성물을 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 알긴산 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 암 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [11] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 알긴산 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 암 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료방법을 제공하는 것이다.
- [12] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 알긴산 유도체의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [13] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 조영제 조성물 또는 약학 조성물의 제조방법을 제공하는 것이다.

[14]

과제 해결 수단

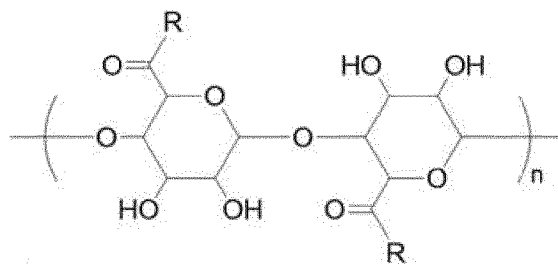
- [15] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 출원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[16]

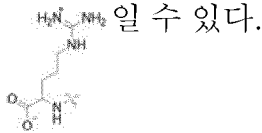
- [17] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는 양쪽이온성 알긴산(alginate) 유도체를 제공하는 것으로, 상기 알긴산 유도체는 알긴산에 라이신 또는 아르기닌을 결합시킴으로써 양쪽이온성을 갖는 것을 특징으로 한다. 구체적으로, 상기 양쪽이온성 알긴산 유도체는 하기 화학식 1로 표시될 수 있다.

[18] [화학식 1]

[19]



- [20] 상기 화학식 1에서 n은 1 내지 3000의 정수일 수 있으며, 상기 R은 라이신 또는



- [21] 본 발명에서 용어 “알긴산”은 해조류에 포함된 다당류의 일종이자, $\beta(1\rightarrow4)$ -D-만유로닉산(mannuroinic acid)과 $\alpha(1\rightarrow4)$ -L-글유로닉산(guluronic acid) 잔기로 구성된 선상의 우론산 중합체로서, 화학식은 $(C_6H_8O)_n$ 이고, 분자량은 20,000 내지 240,000로 알려져 있다. 알긴산의 중합도 등 성질은 추출에 사용한 해조류의 종류, 출처, 해조류를 채집한 계절 등에 따라 달라질 수 있으며, 만유로닉산과 글유로닉산의 구성, 배열 및 함량에 따라 달라질 수 있다. 본 발명에서 사용된 알긴산은 평균 분자량의 범위가 100,000 내지 1,000,000이며, 15 내지 600 mPa·s의 점도, 만유로닉산 : 글루로닉산의 함량 비율이 1.0 내지 2.0 사이의 값을 지니는 것이나, 본 발명의 알긴산 유도체의 합성에 사용될 수 있는 한 알긴산의 분자량, 점도, 만유로닉산과 글루로닉산의 배열 순서, 함량 비율 등은 특별히 제한되지 않는다.
- [22] 본 발명의 알긴산 유도체는 양쪽이온성을 나타내어, 조영제로 사용 시 세포 배양액 또는 혈액 등에 존재하는 혈청 단백질과의 비특이적 상호작용을 회피할 수 있는 것을 특징으로 하며, 이는 알긴산과 라이신(lysine) 또는 아르기닌(arginine)이 직접 결합됨으로써 나타나는 효과이다. 보다 구체적으로, 본 발명의 알긴산 유도체는 EDC/sulfo-NHS coupling 반응을 이용하여 알긴산과 라이신 또는 아르기닌이 아마이드 결합을 형성하여 합성될 수 있으며, 상기 라이신 또는 아르기닌은 L-form(즉, L-lysine 또는 L-arginine)일 수 있으나, 이에 특별히 제한되지 않는다.
- [23] 또한, 본 발명의 알긴산 유도체는 EDC 및 sulfo-NHS의 커플링 반응을 이용하여 알긴산 유도체와 L-라이신 또는 L-아르기닌을 반응하여 결합시킨 것으로, 결합 후에도 알긴산 유도체가 양쪽이온성을 유지하게 되어 세포 배양액 또는 혈액 등에 존재하는 혈청 단백질과 비특이적 상호작용 회피할 수 있다.
- [24] 본 발명의 일 실시예에서는, 인산완충액(PBS), 인도시아닌 그린(indocyanine gree, ICG), 형광염료가 결합된 음이온성 알긴산(Alg@ZWA) 및 형광염료가 결합된 양쪽이온성 알긴산 유도체 (Alg-lys@ZW38)를 준비하여 동일 용량으로 쥐의 꼬리정맥을 통하여 주사하였다. 그 결과, ICG를 주입한 경우 20분 이내에 주입한 ICG의 대부분이 간에 축적이 되어 있었으며, 24시간 이후에는 형광신호가 거의 검출되지 않는 것을 확인하였다. 형광염료가 결합된 알긴산(Alg@ZWA)의 경우에도 주입 후 20분 내에 많은 양이 소변으로 배출되고, 주입 1시간 이후에는 생체 내에서의 형광신호가 약해졌으며, 주입 3시간 이후부터는 간에서만 일부 형광신호가 관찰되었다. 반면, 형광염료가 결합된 양쪽이온성 알긴산 유도체(Alg-lys@ZW38)의 경우, 쥐의 몸 전체에 걸쳐서 24시간 동안 형광신호가 발생하는 것을 확인하였는바, 이는 본 발명의 양쪽이온성 알긴산 유도체에 조영제가 결합된 경우, 간에서의 비특이적 축적이

예방되고 나아가 혈액 내 체류 시간도 현저히 증가시킬 수 있음을 나타내는 것이다.

[25]

[26] 본 발명의 알긴산 유도체는 알긴산과 라이신 또는 아르기닌이 직접 결합된 화합물뿐만 아니라, 혈액 내 체류 시간 향상과 비특이적 상호작용 억제 효과를 더욱 증진시키기 위하여 상기 알긴산 유도체에 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG)이 추가로 결합된 것일 수 있다.

[27]

상기 화학식 1로 표시되는 단위 화합물 내에 결합되는 PEG의 분자량, 결합 위치 및 개수는 목표로 하는 생체 내 체류 시간과 응용 분야에 따라서 당업계의 통상의 기술자가 각각 다르게 적용할 수 있다. 구체적으로, PEG는 상기 화학식 1로 표시되는 단위 화합물 내에 존재하는 라이신 또는 아르기닌 잔기의 말단 아민 그룹($-NH_3^+$)에 결합되거나 카르복실 그룹($-COO^-$)에 결합될 수 있다. 또한, PEG는 본 발명의 양쪽이온성 알긴산 유도체 한 분자 당 존재하는 전체 아민 그룹 또는 카르복실 그룹 숫자의 최대 50% 까지 결합될 수 있으며, 보다 구체적으로 양쪽이온성 알긴산 유도체 한 분자 당 존재하는 전체 아민 그룹 또는 카르복실 그룹 숫자의 1 내지 20%와 결합될 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다.

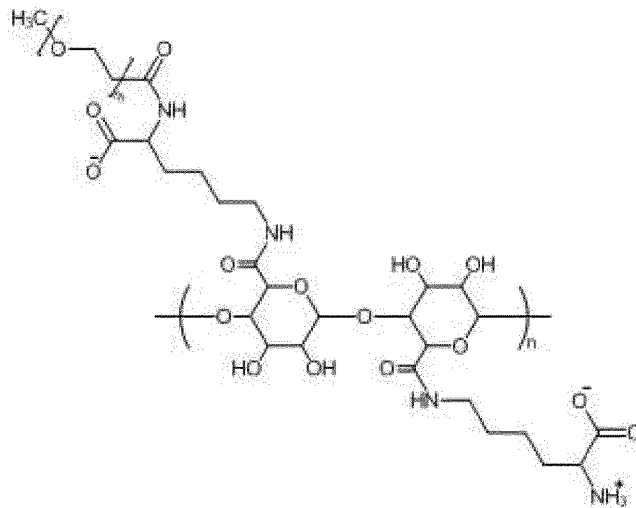
[28]

보다 구체적인 예로, 본 발명의 알긴산 유도체는 하기 화학식 2로 표시되는 양쪽이온성 알긴산 유도체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[29]

[화학식 2]

[30]



[31]

상기 화학식 2에서 n 은 1 내지 3000의 정수일 수 있으며, m 은 6 내지 1,000의 정수일 수 있다.

[32]

[33]

본 발명의 양쪽이온성 알긴산 유도체는 화학식 1로 표시되는 알긴산 유도체에 메톡시 폴리에틸렌글리콜 석신이미딜 N-하이드록시석신이미드 에스터(methoxy polyethyleneglycol succinimidyl N-hydroxysuccinimide ester, mPEG_{5K}-NHS) 또는 mPEG_{5K}-SPA를 반응시켜 합성될 수 있으나, 이를 위해 PEG를 제공하여 상기 알긴산 유도체에 결합시킴으로써 혈액 내의 체류시간을 증가시키기 위한

목적으로 사용할 수 있는 물질이라면 이에 특별히 제한되지 않는다. 즉, 본 발명의 알긴산 유도체는 PEG를 결합시킴으로써 개체의 혈액 내 체류시간이 보다 더 증가되고 혈액 등에 존재하는 혈청 단백질과 비특이적 상호작용이 억제되는 것을 특징으로 한다.

- [34] 한편, 본 발명에서 알긴산 유도체는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 이외에 상기 화합물의 일부를 화학적으로 변화시켜 얻어지는 유사한 화합물로서, 양쪽이온성을 나타내며 개체 내에서 보다 긴 시간 동안 체류할 수 있는 특징을 나타내는 한 이에 제한없이 포함될 수 있음은 당업자에게 자명하다.

[35]

- [36] 또한, 본 발명의 알긴산 유도체는 상기 양쪽이온성 알긴산 유도체에 영상 조영제 또는 약물이 추가로 결합된 것일 수 있다. 상기 “영상 조영제”는 자기공명영상 조영제(MRI 조영제), CT(computed tomography) 조영제, 또는 형광염료일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [37] 상기 “자기공명영상 조영제”는 체내에 주입되어 조직의 이완율을 변화시킴으로써 조직간 이완도의 차이를 벌리고, MRI 시그널의 변화를 유발하여 조직간의 대조를 보다 선명하게 하는 역할을 한다. 상기 자기공명영상 조영제로는 가돌리늄 조영제가 대표적이고, 구체적으로 이온화 가돌리늄(Gd)(III) 착물과 중성 가돌리늄(Gd)(III) 착물이 있으며, 보다 구체적으로 가돌리늄 착화합물, 망간 착화합물, 구리(Copper)(II) 착화합물, 산화철 나노입자 및 산화망간 나노입자일 수 있으나, 이에 특별히 제한되지 않는다.

- [38] 상기 “CT 조영제”는 X선 촬영시 음영을 명확하게 하기 위해 사용하는 물질로, 요오드화 조영제 또는 바륨 조영제 등일 수 있으나 이에 특별히 제한되지 않는다. 구체적으로, 요오드화 조영제는 X선을 통과시키지 않는 요오드를 함유하는 것으로, 질환 병변이 있는 조직과 정상 조직에 요오드가 분포되는 정도가 다르기 때문에 X선 촬영이나 X선을 사용한 CT 검사 등에서 X선 흡수 차이를 크게 나타나게 만들어서 조직이나 병변의 상태를 명확하게 대조시킬 수 있다. 상기 요오드화 조영제는 이옥시탈라민산(ioxitalamic acid), 이오헥솔(iohexol), 이오파미돌(iopamidol), 이오버솔(ioversol), 이오프로미드(iopromid), 이오메프롤(iomeprol), 이오비트리돌(iobitridol) 또는 이오딕산올(iodixanol)일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 바륨은 물에 녹지 않는 흰색 가루로, 바륨 조영제는 X선을 통과시키지 않는다. 특수한 X선 검사나 CT 촬영, 소화관 조영시 바륨 조영제를 마시고 촬영을 하면 소화관 윤곽이 명확히 드러날 수 있다. 구체적으로, 상기 바륨 조영제는 황산바륨(barium sulfate)일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

- [39] 본 발명에 있어서 상기 “형광염료”는 플루오레세인 (Fluorescein), CR110 : 카복시로다민 110 : 로다민 그린(상표명), TAMRA : 카복시테트라메틸로다민 : TMR, 카복시로다민 6G : CR6G, BODIPY FL(상표명) : 4, 4-디플루오로-5, 7-디메틸-4-보라-3a, 4a-디아자-s-인다센-3-프로피온산, BODIPY 493/503(상표명)

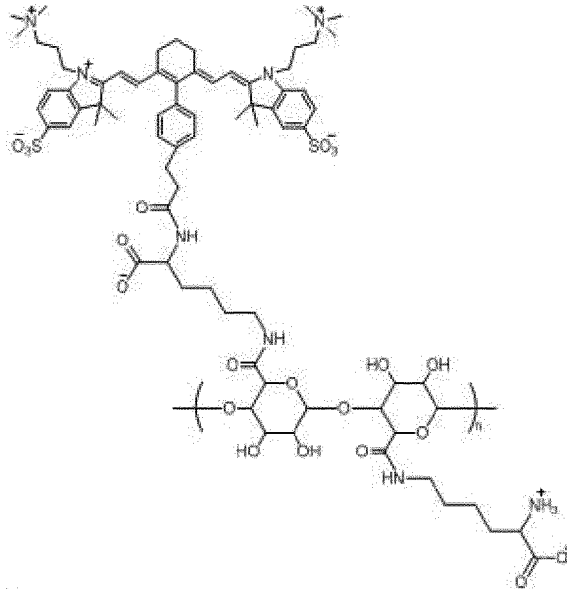
: 4, 4-디플루오로-1, 3, 5, 7-테트라메틸-4-보라-3a,
 4a-디아자-s-인다센-8-프로피온산, BODIPYR6G(상표명) : 4,
 4-디플루오로-5-(4-페닐-1,3-부타디에닐)-4-보라-3a,
 4a-디아자-s-인다센-3-프로피온산, BODIPY 558/568(상표명) : 4,
 4-디플루오로-5-(2-티에닐)-4-보라-3a, 4a-디아자-s-인다센-3-프로피온산,
 BODIPY 564/570(상표명) : 4, 4-디플루오로-5-스티릴-4-보라-3a,
 4a-디아자-s-인다센-3-프로피온산, BODIPY 576/589(상표명) : 4,
 4-디플루오로-5-(2-피롤릴)-4-보라-3a, 4a-디아자-s-인다센-3-프로피온산, BODIPY
 581/591(상표명) : 4, 4-디플루오로-5-(4-페닐-1, 3-부타디에닐)-4-보라-3a,
 4a-디아자-s-인다센-3-프로피온산, EvoBlue10(상표명), EvoBlue30(상표명),
 MR121, ATTO 655(상표명), ATTO 680(상표명), ATTO 700(상표명), ATTO
 MB2(상표명), Alexa Fluor 350(상표명), Alexa Fluor 405(상표명), Alexa Fluor
 430(상표명), Alexa Fluor 488(상표명), Alexa Fluor 532(상표명), Alexa Fluor
 546(상표명), Alexa Fluor 555(상표명), Alexa Fluor 568(상표명), Alexa Fluor
 594(상표명), Alexa Fluor 633(상표명), Alexa Fluor 680(상표명), Alexa Fluor
 700(상표명), Alexa Fluor 750(상표명), Alexa Fluor 790(상표명), Flamma
 496(상표명), Flamma 507(상표명), Flamma 530(상표명), Flamma 552(상표명),
 Flamma 560(상표명), Flamma 575(상표명), Flamma 581(상표명), Flamma
 648(상표명), Flamma 675(상표명), Flamma 749(상표명), Flamma 774(상표명),
 Flamma 775(상표명), Rhodamine Red-X(상표명), Texas Red-X(상표명),
 5(6)-TAMRA-X(상표명), 5TAMRA(상표명), 시아닌(Cyanine) 계열 염료 (Cy5,
 Cy5.5, Cy7, IR820), 인도시아닌 그린(Indocyaninegreen, ICG) 또는 ZW800(ZW800
 NHS ester) 등 일 수 있으며, 이에 특별히 제한되지 않는다.

[40] 상기 화학식 1로 표시되는 단위 화합물에 결합되는 조영제의 결합 위치 및 개수는 응용 분야에 따라서 당업계의 통상의 기술자가 각각 다르게 적용할 수 있다. 구체적으로, 상기 조영제(형광염료)는 상기 화학식 1로 표시되는 단위 화합물 내에 존재하는 라이신 또는 아르기닌 잔기의 말단 아민 그룹($-NH_3^+$)에 결합되거나 카르복실 그룹($-COO^-$)에 결합될 수 있다. 또한, 상기 조영제는 본 발명의 본 발명의 양쪽이온성 알긴산 유도체 한 분자 당 존재하는 전체 아민 그룹 또는 카르복실 그룹 숫자의 최대 50% 까지 결합될 수 있으며, 보다 구체적으로 양쪽이온성 알긴산 유도체 한 분자 당 존재하는 전체 아민 그룹 또는 카르복실 그룹 숫자의 1 내지 20%와 결합될 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다.

[41] 보다 구체적인 예로, 본 발명의 알긴산 유도체는 상기 화학식 1로 표시되는 알긴산 유도체에 형광염료인 ZW800 NHS ester를 반응하여 결합된 형태로, 하기 화학식 3으로 표시되는 것일 수 있으나 이에 특별히 제한되는 것은 아니다.

[42] [화학식 3]

[43]



[44] 상기 화학식 3에서 n은 1 내지 3000의 정수일 수 있다.

[45]

[46] 본 발명에 있어서 상기 약물은 대상 질환에 적절한 약물을 선택할 수 있으며, 예를 들어 상기 약물은 항암제, 항염증제, 마취제, 항바이러스제, 항박테리아제, 치료용 항체, 항생제, 면역치료제 또는 광감작제(광감작제)일 수 있으며, 보다 구체적으로 항암제 또는 항염증제일 수 있으나 이에 특별히 제한되지 않는다.

[47] 상기 “항암제”는 독소루비신, 고시폴, 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리톡시맵, 엘로티닙, 네라티닙, 라파티닙, 제피티닙, 반데타닙, 니로티닙, 세마사닙, 보수티닙, 악시티닙, 세디라닙, 레스타우르티닙, 트라스투주맵, 게피티니브, 보르테조미드, 수니티닙, 카보플라틴, 베바시주맵, 시스플라틴, 세톡시맵, 비스큐알BUM, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라머스틴, 겐투주맵오조가마이신, 이브리투모맵튜세탄, 헵타플라틴, 메칠아미노레블린산, 암사크린, 알렘투주맵, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산홀름 키토산, 켄시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시티딘, 메토트렉세이트, 우라실, 시타라빈, 플루오로우라실, 플루다가빈, 에노시타빈, 플루타미드, 데시타빈, 머캅토프린, 티오구아닌, 클라드리빈, 카르모퍼, 랄티트렉세드, 도세탁셀, 파클리탁셀, 이리노테칸, 벨로테칸, 토포테칸, 비노렐빈, 에토포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 테니포시드, 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 미톡산트론, 미토마이신, 블레로마이신, 다우노루비신, 닥티노마이신, 피라루비신, 아클라루비신, 페프로마이신, 템시롤리무스, 테모졸로마이드, 부셀판, 이포스파미드, 사이클로포스파미드, 멜파란, 알트레틴, 다카바진, 치오테파, 니무스틴, 클로람부실, 미토라톨, 레우코보린, 트레토닌, 엑스메스탄, 아미노글루테시미드, 아나그렐리드, 나벨빈, 파드라졸, 타목시펜, 토레미펜, 테스토라톤, 아나스트로졸, 레트로졸, 보로졸,

비칼루타미드, 로무스틴 및 카르무스틴으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [48] 상기 “항염증제”는 살리실레이트(salicylates), 이부프로펜 (ibuprofen), 나프로센(naproxen), 페노프로펜(fenoprofen), 인도메타신(indomethacin), 페닐타존(phenyltazone), 메소트렉세이트(methotrexate), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 메클로에타민(mechlorethamine), 덱사메타손(dexamethasone), 프레드니솔론(prednisolone), 셀레콕시브(celecoxib), 발데콕시브(valdecoxib), 니메술리드(nimesulide), 코르티손(cortisone) 및 코르티코스테로이드(corticosteroid)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

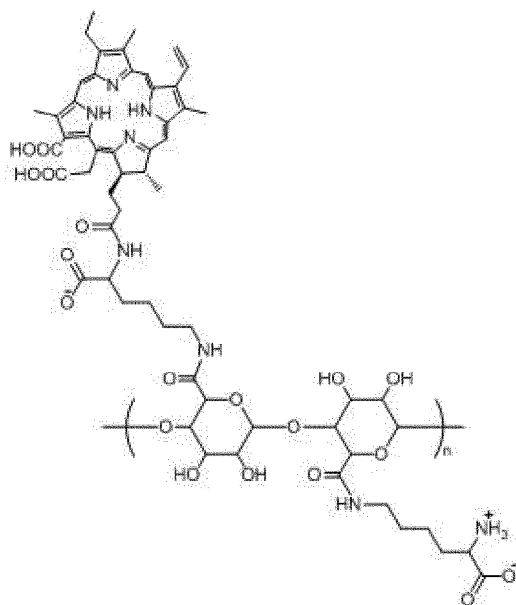
- [49] 상기 “광감각제”는 빛에 민감한 반응을 보이는 물질을 인체 내에 투여하는 의약품으로, 주로 암 치료나 피부 질환, 관절염을 목적으로 사용될 수 있다. 구체적으로, 상기 광감각제는 헤마토 포르피린 유도체(Hemato Porphyrin Derivative), 아미노 레부리닉산(ALA) 또는 클로린(Chlorin)일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

- [50] 상기 화학식 1로 표시되는 단위 화합물에 결합되는 약물의 결합 위치 및 개수는 응용 분야에 따라서 당업계의 통상의 기술자가 각각 다르게 적용할 수 있다. 구체적으로, 상기 약물(광감각제)은 상기 화학식 1로 표시되는 단위 화합물 내에 존재하는 라이신 또는 아르기닌 잔기의 말단 아민 그룹($-NH_3^+$) 또는 카르복실 그룹($-COO^-$)에 결합할 수 있으며, 알긴산 유도체에 대해 1 내지 20 w/w % 비율로 결합할 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다.

- [51] 보다 구체적인 예로, 본 발명의 알긴산 유도체는 하기 화학식 4로 표시될 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다.

- [52] [화학식 4]

- [53]



- [54] 상기 화학식 4에서 n은 1 내지 3000의 정수일 수 있다.

[55]

[56] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 알긴산 유도체를 포함하는 조영제 조성물을 제공하는 것이다. 상기 알긴산 유도체는 전술한 바와 같다.

[57] 본 발명에서 용어 “조영제 조성물”은 영상진단 검사 또는 시술 시 특정 조직이나 혈관이 잘 보일 수 있도록 인체에 투여하는 물질을 의미하는 것으로, 성분에 따라 요오드화 조영제, 가돌리늄 조영제, 바륨 조영제 등으로 구분되며, 일반적으로 X선 촬영 및 CT 촬영에는 요오드화 조영제와 바륨 조영제가 사용되고, MRI(magnetic resonance imaging, 자기공명검사)에는 가돌리늄 조영제가 사용된다. 본 발명에 있어서, 상기 조영제 조성물은 상기 알긴산 유도체에 영상 조영제가 추가로 결합된 화합물을 포함하는 것일 수 있다.

[58]

[59] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 알긴산 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는, 암 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다. 또한, 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 알긴산 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 암 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료방법을 제공하는 것이다. 상기 알긴산 유도체는 전술한 바와 같다.

[60] 즉, 상기 약학 조성물은 본 발명의 알긴산 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 약제학적으로 유효한 양만큼 포함할 수 있으며, 상기 알긴산 유도체는 상기 영상 조영제 및/또는 약물이 결합된 형태를 의미하는 것일 수 있다.

[61] 구체적으로, 상기 약학적 조성물은 뇌척수종양, 두경부암, 폐암, 유방암, 흉선종, 중피종, 식도암, 위암, 대장암, 간암, 췌장암, 담도암, 신장암, 방광암, 전립선암, 고환암, 생식세포종, 난소암, 자궁 경부암, 자궁 내막암, 림프종, 급성 백혈병, 만성 백혈병, 다발성 골수종, 육종, 악성 흑색종 또는 피부암 등의 암; 녹내장, 백내장, 노인성 황반병성 등의 안과질환; 동맥경화, 뇌경색, 혈관 재협착 등의 혈관질환; 관절염; 자가면역질환; 충치, 치주농양, 치조골염, 만성 치주염, 치은염 등의 치과질환; 또는 당뇨병의 예방 또는 치료용일 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다.

[62] 본 발명에서 용어 “약학적으로 허용 가능한 염”은 투여되는 본 발명의 알긴산 유도체가 갖는 생물학적 활성과 물성들을 손상시키지 않는 제형을 의미한다. 구체적으로, 상기 약학적으로 허용가능한 염은 약학적으로 허용되는 음이온을 함유하는 무독성 산부가염을 형성하는 산, 예를 들어, 염산, 황산, 질산, 인산, 브롬화수소산, 요드화수소산 등과 같은 무기산, 타타르산, 포름산, 시트르산, 아세트산, 트리클로로아세트산, 트리플로로아세트산, 글루콘산, 벤조산, 락트산, 푸마르산, 말레인산, 살리신산 등과 같은 유기 카본산, 메탄설폰산, 에탄설폰산,

벤젠설폰산, p-톨루엔설폰산 등과 같은 설폰산 등에 의해 형성된 산부가염을 포함한다. 보다 구체적으로, 약학적으로 허용되는 카르복실산 염에는, 리튬, 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘 등에 의해 형성된 금속염 또는 알칼리 토금속 염, 라이신, 아르기닌, 구아니딘 등의 아미노산 염, 디시클로헥실아민, N-메틸-D-글루카민, 트리스(히드록시메틸)메틸아민, 디에탄올아민, 콜린 및 트리에틸아민 등과 같은 유기염 등이 포함될 수 있다.

- [63] 본 발명에서 용어 "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 일반적으로 0.001 내지 1000 mg/kg의 양, 바람직하게는 0.05 내지 200 mg/kg, 보다 바람직하게는 0.1 내지 100 mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다. 본 발명의 목적상, 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯하여, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다.

- [64] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있으며, 상기 담체와 함께 제제화되어 식품, 의약품, 사료 첨가제 및 음용수 첨가제 등으로 제공될 수 있다. 본 발명의 용어 "약학적으로 허용 가능한 담체"란, 생물체를 자극하지 않으면서 주입되는 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 의미할 수 있다. 본 발명에 사용 가능한 상기 담체의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되고 약학적으로 허용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 상기 담체의 비제한적인 예로는, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사 용액, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 이때, 상기 담체는 비자연적인 담체(non-naturally occurring carrier)를 포함할 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 생리식염수, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유, 덱스트린, 칼슘 카보네이트, 프로필렌글리콜 및 리퀴드 파라핀으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 통상의 담체, 부형제 또는 희석제 모두 사용 가능하다. 상기 성분들은

상기 약학 조성물의 유효성분인, 약물에 결합된 알긴산 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염에 독립적으로, 또는 조합하여 추가될 수 있다.

[65] 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함될 수 있으며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스(sucrose) 또는 락토스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌 글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[66] 본 발명의 약학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.

[67] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있다. 그 투여용량에 특별한 제약은 없고, 체내 흡수도, 체중, 환자의 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 유효량 범위를 고려하여 제조하도록 하며, 이렇게 제형화 된 단위 투여형 제제는 필요에 따라 약제의 투여를 감시하거나 관찰하는 전문가의 판단과 개인의 요구에 따라 전문화된 투약법을 사용하거나 일정 시간 간격으로 수회 투여할 수 있다.

[68] 또한, 상기 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비 내 투여될 수 있으나, 이에 특별히 제한되지는 않는다.

[69]

[70] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 알긴산 유도체의 제조방법을 제공하는 것이다. 상기 알긴산 유도체는 전술한 바와 같다.

[71] 구체적으로, 상기 제조방법은 (a) 알긴산에 EDC 및 sulfo-NHS를 처리하는 단계; 및 (b) EDC 및 sulfo-NHS가 처리된 알긴산을 라이신(lysine) 또는 아르기닌(alanine)과 반응시키는 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[72] 상기 “EDC(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide)”는 일반적으로 하이드로클로라이드(hydrochloride)로 얻어지는 수용성 카르보디이미드(carbodiimide)로서, 펩타이드 합성, 핵산에 대한 단백질 가교결합

등에 사용될 수 있으며, 대형 생체 분자의 고정화를 위해 N-하이드록시석신이미드(NHS, N-hydroxysuccinimide)와 함께 사용될 수 있다. 구체적으로, 상기 NHS는 “sulfo-NHS(N-hydroxysulfoxuccinimide)”일 수 있다.

[73] 본 발명의 일 실시예에서는 EDC 및 sulfo-NHS의 커플링 반응을 이용하여 알긴산 유도체와 L-라이신을 반응하여 결합시켰고, 이를 통해 결합 후에도 알긴산 유도체가 양쪽이온성을 유지하게 되어 세포 배양액 또는 혈액 등에 존재하는 혈청 단백질과 비특이적 상호작용 회피할 수 있다.

[74]

[75] 또한, 상기 알긴산 유도체의 제조방법은 상기 (b) 단계 이후에 (c) 라이신 또는 아르기닌이 결합된 알긴산 유도체와 폴리에틸렌글리콜(PEG)을 반응시키는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있으며, 또는 알긴산에 폴리에틸렌글리콜 먼저 결합시키고 상기 (b) 단계를 거쳐 양쪽이온성 알긴산 유도체를 제조하는 것일 수 있다.

[76] 상기 (c) 라이신 또는 아르기닌이 결합된 알긴산 유도체와 폴리에틸렌글리콜을 반응시키는 단계는 상기 알긴산 유도체에 메톡시 폴리에틸렌글리콜 석신이미딜 N-하이드록시석신이미드 에스터(methoxy polyethyleneglycol succinimidyl N-hydroxysuccinimide ester, mPEG_{5K}-NHS) 또는 mPEG_{5K}-SPA를 반응시키는 것일 수 있으나, 이외에도 PEG를 제공하여 상기 알긴산 유도체에 결합시킴으로써 혈액 내의 체류시간을 증가시키기 위한 목적으로 사용할 수 있는 물질이라면 이에 제한되지 않는다. 즉, 상기 제조방법에 의해 제조된 알긴산 유도체는 PEG가 결합된 것으로서 개체의 혈액 내 체류시간이 보다 더 증가되는 것을 특징으로 한다.

[77]

[78] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 알긴산 유도체를 포함하는 조영제 조성물 또는 약학 조성물의 제조방법을 제공하는 것이다. 상기 알긴산 유도체, 조영제 및 약학 조성물은 전술한 바와 같다.

[79] 구체적으로, 상기 조영제 조성물 또는 약학 조성물의 제조방법은 상기 알긴산 유도체의 제조방법에 따라 제조된 양쪽이온성 알긴산 유도체와, 영상 조영제 또는 약물을 반응시키는 단계를 포함할 수 있으며, 이를 통해 제조된 알긴산 유도체는 영상 조영제 또는 광감각제를 비롯한 약물이 결합된 화합물 형태로, 상기 영상 조영제 및 약물은 전술한 바와 같다.

[80]

발명의 효과

[81] 본 발명의 알긴산 유도체는 양쪽이온성을 가짐으로써 세포 배양액 또는 혈액 등에 존재하는 혈청 단백질과의 비특이적 상호작용을 회피하고, 목적으로 하는 기관 또는 조직 이외의 다른 기관 또는 조직에 대한 비특이적 섭취가 저해되어 혈액 내에서 안정적인 순환이 가능하면서도, 영상 조영제 또는 약물과 결합체를

형성하여 조영제 조성물 또는 약학적 조성물로 활용될 수 있다. 또한, 표적으로 하는 암세포에 대한 조영제와 약물의 전달 효율을 획기적으로 높일 수 있을 뿐 아니라, 영상 진단 및 치료 효과도 크게 향상시킬 수 있다.

[82]

도면의 간단한 설명

- [83] 도 1은 알긴산으로부터 양쪽이온성 알긴산 유도체를 제조하는 과정 및 양쪽이온성 알긴산 유도체에 조영제 또는 약물을 결합하는 과정을 보여주는 모식도이다.
- [84] 도 2a는 알긴산과 라이신(lysine)을 결합시켜 양쪽이온성 알긴산 유도체를 합성하는 개략도이다.
- [85] 도 2b는 알긴산과 아르기닌(arginine)을 결합시켜 양쪽이온성 알긴산 유도체를 합성하는 개략도이다.
- [86] 도 3의 A는 라이신을 결합하여 합성한 양쪽이온성 알긴산 유도체(Alg-lys)의 $^1\text{H-NMR}$ 측정 결과이며, 도 3의 B는 라이신을 결합하여 합성한 양쪽이온성 알긴산 유도체의 FT-IR 측정 결과이다.
- [87] 도 4의 A는 아르기닌을 결합하여 합성한 양쪽이온성 알긴산 유도체(Alg-arg)의 $^1\text{H-NMR}$ 측정 결과이며, 도 4의 B는 아르기닌을 결합하여 합성한 양쪽이온성 알긴산 유도체의 FT-IR 측정 결과이다.
- [88] 도 5는 라이신이 결합된 양쪽이온성 알긴산 유도체에 ZW-800 NHS ester 염료를 결합시키는 합성 개략도이다.
- [89] 도 6a는 ZW-800 형광염료, Alg-lys@ZW4, Alg-lys@ZW11, Alg-lys@ZW38의 UV-vis 흡광 스펙트럼이고, 도 6b는 ZW-800 형광염료, Alg-lys@ZW4, Alg-lys@ZW11, Alg-lys@ZW38의 형광 스펙트럼이며, 도 6c는 Alg-lys@ZW4, Alg-lys@ZW11 및 Alg-lys@ZW38에 대한 형광 소광 비율을 분석한 표이다.
- [90] 도 7a는 ZW-800 NHS ester 형광물질의 농도별 흡광도 검정곡선이며, 도 7b는 ZW-800 NHS ester 형광물질의 농도별 형광 스펙트럼이다.
- [91] 도 8은 Alg-lys@ZW4, Alg-lys@ZW11 및 Alg-lys@ZW38를 인산완충액(PBS)에 용해시킨 후 촬영한 사진이다.
- [92] 도 9은 인산완충액(PBS), ICG, Alg-lys@ZW4, Alg-lys@ZW11, Alg-lys@ZW38이 담긴 튜브를 촬영한 근적외선 형광 영상($\lambda_{\text{ex}}=780\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=845\text{ nm}$)이다.
- [93] 도 10은 알긴산에 ZW-800 amine dye를 결합시킨 Alg@ZWA의 합성 개략도이다.
- [94] 도 11a는 ZW-800 amine 형광물질과 Alg-lys@ZWA의 수용액을 동일한 형광염료 농도($2.1\mu\text{M}$)로 준비하고 측정한 UV-vis 흡광 스펙트럼이며, 도 11b는 ZW-800 amine 형광물질과 Alg-lys@ZWA의 수용액을 동일한 형광염료 농도($2.1\mu\text{M}$)로 준비하고 측정한 형광 스펙트럼이다.
- [95] 도 12a는 인산완충액, ICG, Alg-lys@ZW38, Alg@ZWA를 쥐의 꼬리 정맥을

통하여 주입하고, 등 쪽 방향에서 촬영한 시간별 형광영상 사진이며, 도 12b는 쥐의 심장 부근에서의(Region of interest, ROI) 시간에 따른 형광세기 값의 변화를 나타낸 그래프이다.

- [96] 도 13는 인산완충액, ICG, Alg-lys@ZW38, Alg@ZWA를 쥐의 꼬리 정맥을 통하여 주입하고, 배 쪽 방향에서 촬영한 시간별 형광영상 사진이다.
- [97] 도 14a는 KIMICA사의 알긴산에 대한 ¹H-NMR 분석 결과이며, 도 14b는 KIMICA사의 알긴산에 라이신을 결합시켜 합성한 양쪽이온성 알긴산 유도체에 대한 ¹H-NMR 분석 결과이다.
- [98] 도 15a는 ZW-800 형광물질이 결합된 양쪽이온성 알긴산 유도체(Alg(KIMICA)-lys@ZW-800)와 ZW-800 NHS ester 형광물질(2.9 μ M)에 대한 UV-vis 흡광 스펙트럼이며, 도 15b는 ZW-800 형광물질이 결합된 양쪽이온성 알긴산 유도체(Alg(KIMICA)-lys@ZW-800)와 ZW-800 NHS ester 형광물질(2.9 μ M)에 대한 형광 스펙트럼이다.
- [99] 도 16은 양쪽이온성 알긴산 유도체에 폴리에틸렌글리콜을 결합시켜서 Alg-lys-mPEG_{5K}를 합성하는 과정을 보여주는 개략도이다.
- [100] 도 17a는 합성된 Alg-lys-mPEG_{5K}의 ¹H-NMR 분석 결과이며, 도 17b는 합성된 알긴산, 양쪽이온성 알긴산 및 mPEG_{5K}가 결합된 양쪽이온성 알긴산(Alg-lys-mPEG_{5K})의 FT-IR 분석 결과이다.
- [101] 도 18a는 Alg-lys-mPEG_{5K}에 ZW-800를 결합시킨 Alg-lys-mPEG_{5K}@ZW-800과 ZW-800 NHS ester 형광물질에 대한(3.9 μ M) UV-vis 흡광 스펙트럼이며, 도 18b는 Alg-lys-mPEG_{5K}에 ZW-800를 결합시킨 Alg-lys-mPEG_{5K}@ZW-800과 ZW-800 NHS ester 형광물질에 대한 (3.9 μ M) 형광 스펙트럼이다.
- [102] 도 19는 양쪽이온성 알긴산 유도체와 광감각제인 chloroin c6를 결합시킨 Alg-lys@Ce6의 합성과정에 대한 개략도이다.
- [103] 도 20a는 인산완충액(PBS)에 용해된 광감각제 (Ce6) 및 Alg-lys@Ce6의 UV-vis 흡광 스펙트럼이며, 도 20b는 인산완충액(PBS)에 용해된 광감각제 (Ce6) 및 Alg-lys@Ce6의 형광 스펙트럼이다. 도 20c는 일항산소 분석 키트를 이용하여 빛을 조사한 경우 Alg-lys@Ce6로부터 일항산소 생성을 분석한 결과이다.
- [104] 도 21은 암세포에 광감각제(Ce6)와 Alg-lys@Ce6를 동일 농도로 처리한 후에 얻은 공초점 형광 현미경 사진이다. Ce6를 처리한 경우에 비해 Alg-lys@Ce6를 처리한 경우 암세포 내로 섭취 및 전달되는 양이 크게 향상됨을 알 수 있다.
- [105] 도 22는 암세포에 광감각제(Ce6)와 Alg-lys@Ce6를 처리하고, 670 nm 파장의 빛을 조사한 후, 세포 생존율을 분석한 결과이다.

[106]

발명의 실시를 위한 형태

- [107] 이하, 본 발명을 하기 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들

실시예만으로 한정되는 것은 아니다.

[108]

[109] 실시예 1: 라이신(Lysine)이 결합된 양쪽이온성(zwitterionic) 알긴산 유도체의 제조 및 분석

[110]

[111] 1-1: 라이신이 결합된 양쪽이온성 알긴산 유도체 제조

[112] 양쪽이온성 알긴산 유도체를 합성하기 위해, 알긴산의 카르복시기에 커플링제를 이용해 라이신의 아민기와의 결합을 통해 공유 결합체를 형성함으로써 양쪽이온성 알긴산 유도체를 제조하였다. 유도체 제조에 사용된 알긴산은 씨그마알드리치사의 알긴산 나트륨염(cas no. 9005-38-3, average molecular weight = 190,000) 제품을 사용하였다(도 2a).

[113] 구체적으로, 알긴산에 라이신을 결합시키기 위하여 다양한 커플링제를 사용할 수 있는데, 본 발명에서는 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC)와 sulfo-N-hydroxysuccinimide(sulfo-NHS)을 사용하여 알긴산의 카르복시기를 활성화하여 알긴산-NHS ester를 얻고 여기에 라이신을 결합하는 과정을 수행하였다. 알긴산 50 mg을 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid buffer (MES, 0.1 M, pH 5.7) 10 mL에 용해시킨 후, 알긴산 반응 몰수의 1.2배 몰수에 해당하는 EDC와 1.3배 몰수에 해당하는 sulfo-NHS를 첨가하여 상온에서 약 30분 동안 교반하였다. 이후 상기 용액에서 반응하지 않은 EDC를 비활성화 시키고자 2-mercaptoethanol(14.3 M)을 7 μ L(최종농도 20 mM)을 주사한 후 상온에서 20분간 교반하였다. 상기 용액에 대해 PD-10 컬럼을 이용하여 용액 내의 미반응물 및 불순물을 제거하고, 인산완충액 (PBS, 0.1 M, pH 7.4)으로 용매 교환을 실시하였다. 이후 알긴산의 5배 몰수에 해당하는 라이신을 첨가하고 상온에서 하루 동안 교반하였다. 반응을 마친 상기 용액에 대하여 증류수에서 하루 동안 투석(dialysis)을 진행하여 합성물 내의 미반응물 및 부산물을 제거하고, 동결건조를 통해 분말 형태의 라이신 결합된 양쪽이온성 알긴산 유도체를 수득하였다.

[114]

[115] 1-2: 제조된 양쪽이온성 알긴산 유도체의 구조 분석

[116] 상기 실시예 1-1에서 제조된 양쪽이온성 알긴산 유도체(lysine conjugated alginic acid)에 대하여, ^1H 핵자기공명 분광광도계(^1H -NMR, 400 MHz NMR Spectrometer, Jeol JNM-LA400 with LFG, JEOL, Japan)와 적외선분광광도계(FT-IR, FT-IR Spectrophotometer, Nicolet 6700, Thermo Scientific, USA)를 이용하여 구조를 분석하였다(도 3).

[117]

구체적으로, 알긴산(alginate)과 양쪽이온성 알긴산 유도체의 ^1H -NMR 스펙트럼을 비교하였을 때 양쪽이온성 알긴산 유도체의 ^1H -NMR 스펙트럼 중 2.8 ppm 부근에서 보이는 lysine 수소 피크의 알긴산 대비 비율 계산을 통하여, 알긴산의 카르복시기의 약 100%가 라이신과 결합되어 있는 것으로

확인되었다(도 3의 A). 한편, 알긴산과 양쪽이온성 알긴산 유도체의 FT-IR 스펙트럼을 나타낸 그래프로부터, 알긴산의 경우 알긴산의 수산기 및 카르복시기의 -OH 스트레칭에 따른 특징적인 봉우리가 3300 cm^{-1} 및 1619 cm^{-1} 에서 나타났으며, 양쪽이온성 알긴산 유도체의 경우 알긴산의 -COO-의 대칭 및 비대칭 스트레칭에 의하여 나타나던 1600 cm^{-1} 과 1409 cm^{-1} 과 부근의 피크가 사라지고, 1645 cm^{-1} 의 amide I 및 1550 cm^{-1} 의 amide II 와 같이 -CONH-에 의한 피크가 나타난 것을 확인하였다(도 3의 B). 이로부터, 알긴산의 카르복시기와 라이신의 아민기가 아마이드 결합을 형성하며 알긴산과 라이신 사이에 공유 결합이 형성된 것을 확인하였다.

[118]

[119] 실시예 2: 아르기닌(Arginine)이 결합된 양쪽이온성 알긴산 유도체의 제조 및 분석

[120]

[121] 2-1: 아르기닌이 결합된 양쪽이온성 알긴산 유도체 제조

[122] 아르기닌이 결합된 양쪽이온성 알긴산 유도체를 합성하기 위해, 알긴산의 카르복시기에 커플링제를 이용해 아르기닌의 아민기와 결합을 통해 공유 결합체를 형성함으로써 양쪽이온성 알긴산 유도체를 제조하였다(도 2b).

[123] 구체적으로, 상기 실시예 1-1과 같이 EDC/sulfo-NHS 커플링제를 사용해 알긴산을 활성화시켜 알긴산-NHS ester 결합물을 얻고 여기에 아르기닌을 결합하는 과정을 수행하였다. 알긴산 50 mg을 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid buffer(MES, 0.1 M, pH 5.7) 10 mL에 용해시킨 후, 알긴산 반응 몰수의 1.2배 몰수에 해당하는 EDC와 1.3배 몰수에 해당하는 sulfo-NHS를 첨가하여 상온에서 약 30분 동안 교반하였다. 이후 상기 용액에서 반응하지 않은 EDC를 비활성화 시키고자 2-mercaptoethanol(14.3 M)을 $7\mu\text{L}$ (최종농도 20 mM)을 주사한 후 상온에서 20분간 교반하였다. 상기 용액에 대해 PD-10 컬럼을 이용하여 용액 내의 미반응물 및 불순물을 제거하고, Sodium bicarbonate (NaHCO_3 , 50 mM, pH 9.0)으로 용매 교환을 실시하였다. 이후 알긴산의 5배 몰수에 해당하는 아르기닌을 첨가하여 상온에서 하루 동안 교반하였다. 반응을 마친 상기 용액에 대하여 증류수에서 하루 동안 투석(dialysis)을 진행하여 합성물 내의 미반응물 및 부산물을 제거하고, 동결건조를 통해 분말 형태의 아르기닌이 결합된 양쪽이온성 알긴산 유도체를 수득하였다.

[124]

[125] 2-2: 제조된 양쪽이온성 알긴산 유도체의 구조 분석

[126] 상기 실시예 2-1에서 제조된 양쪽이온성 알긴산 유도체(arginine-conjugated alginic acid)에 대하여, ^1H 핵자기공명 분광광도계(^1H -NMR, 400 MHz NMR Spectrometer, Jeol JNM-LA400 with LFG, JEOL, Japan)와 적외선분광광도계(FT-IR, FT-IR Spectrophotometer, Nicolet 6700, Thermo Scientific, USA)를 이용하여 구조를 분석하였다(도 4).

[127] 구체적으로, 알긴산(alginate)과 양쪽이온성 알긴산 유도체의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼을 비교하였을 때 양쪽이온성 알긴산 유도체의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼 중 1.6 ppm과 1.8 ppm 부근에서 보이는 아르기닌의 수소 피크 대비 알긴산 피크의 비율 계산을 통하여, 알긴산의 카르복시기의 약 100%가 아르기닌이 결합되어 있는 것으로 확인되었다(도 4의 A). 한편, 알긴산과 양쪽이온성 알긴산 유도체의 FT-IR 스펙트럼을 나타낸 그래프로부터, 알긴산의 경우 알긴산의 수산기 및 카르복시기의 -OH 스트레칭에 따른 특징적인 봉우리가 3300 cm^{-1} 및 1619 cm^{-1} 에서 나타났으며, 양쪽이온성 알긴산 유도체의 경우 1580 cm^{-1} 과 1400 cm^{-1} 에서 아르기닌 -COO-의 대칭 및 비대칭 스트레칭에 의한 피크가 나타났으며, 1690 cm^{-1} 의 -CONH-에 의한 피크가 나타난 것을 확인하였다(도 4의 B). 이로부터, 알긴산의 카르복시기와 아르기닌의 아민기가 amide 결합을 형성하며 알긴산과 아르기닌 사이에 공유 결합이 형성된 것을 확인하였다.

[128]

[129] 실시예 3: 양쪽이온성 알긴산 유도체에 근적외선 형광염료인 ZW-800을 결합한 형광영상 조영제 제조 및 분석

[130]

[131] 3-1: 양쪽이온성 알긴산 유도체에 ZW-800을 결합한 형광영상 조영제의 제조

[132] 근적외선 형광염료인 ZW-800의 NHS ester와 양쪽이온성의 아민기와 공유결합체를 제조하였다(도 5). ZW-800 NHS ester는 물질량 1001.28 g/mol , 최대 여기 파장 754 nm , 최대 방출 파장 775 nm 를 갖는 근적외선 형광물질이다.

[133] 구체적으로, 양쪽이온성 알긴산 유도체에 ZW-800 NHS ester 근적외선 형광물질을 결합하기 위하여, 실시예 1에서 합성한 양쪽이온성 알긴산 유도체 대비 근적외선 형광염료 ZW-800 NHS ester의 반응 몰 비율을 1:10, 1:50, 1:100로 하여 각각 합성을 진행하였다. 먼저 15 mg 의 알긴산 유도체를 3 mL 의 Sodium bicarbonate (NaHCO_3 , 50 mM , $\text{pH } 8.5$)에 용해하여 5 mg/mL 의 농도로 균질하게 혼합하고, 상기 반응 비율과 같이 0.86 , 3.87 , 8.65 mg 의 ZW-800 NHS ester 형광염료를 각각 첨가하고 하루 동안 교반하여 반응하였다. 반응을 마친 용액을 투석막 튜브(MWCO 10 kDa)에 넣고, 2일 동안 PBS(0.1 M , $\text{pH } 7.4$)와 증류수에서 투석함으로써 미반응물을 제거하였다. 이후, 동결 건조를 통하여 분말 형태의 ZW-800이 공유 결합된 형광염료-양쪽이온성 알긴산 유도체(Alg-lys@ZW)를 수득하였다.

[134]

[135] 3-2: 형광 영상 조영제의 분광학적 특성 분석

[136] 광학측정 분석을 통해, 양쪽이온성 알긴산 유도체 대비 ZW-800 형광염료의 반응몰수의 비율이 1:10인 경우, 알긴산 유도체 한 분자당 약 4개의 ZW-800 형광염료가 결합되었으며, 반응몰수의 비율이 1:50의 경우 알긴산 유도체 한 분자 당 약 11개의 ZW-800 형광염료가 결합되었고, 반응몰수의 비율이 1:100의 경우 알긴산 유도체 한 분자 당 약 38개의 ZW-800 형광염료가 결합되었음을

확인하였다(도 6c).

[137] 이러한 결과를 바탕으로, 알긴산 유도체 대비 ZW-800 형광염료의 반응몰수 비율이 1:10, 1:50, 1:100인 형광염료-알긴산 유도체를 각각 실제 반응한 ZW-800 형광염료의 몰수로 나타낸 Alg-lys@ZW4, Alg-lys@ZW11, Alg-lys@ZW38의 UV-vis 흡광 스펙트럼을 측정하였다(도 6a). 또한, 각각의 형광염료-알긴산 유도체의 형광 스펙트럼($\lambda_{ex} = 660 \text{ nm}$)으로부터 모든 결합체에서 강한 형광이 발생하였으며 형광소광(fluorescence quenching)은 거의 일어나지 않음을 확인하였다(도 6b 및 6c).

[138] 0.1M PBS 수용액 상에서 ZW-800 형광염료의 농도에 따른 흡광 교정 곡선 및 형광염료의 농도별 스펙트럼을 확인하였으며(도 7a 및 7b), 인산완충액(PBS)에 Alg-lys@ZW4, Alg-lys@ZW11, Alg-lys@ZW38을 각각 용해시킨 경우 합성된 모든 결합체가 수용액에 잘 분산되어 있음을 확인하였다(도 8).

[139] 또한, 인산완충액, ICG 및 제조된 각각의 형광염료-양쪽이온성 알긴산 유도체 Alg-lys@ZW4, Alg-lys@ZW11, Alg-lys@ZW38를 1.5 mL 튜브에 1 mL씩 담은 후, 근적외선 형광 영상 장비로 촬영한 결과, ICG는 수용액 상에서 서로 응집이 일어나면서 형광이 약하게 발생하였고, 양쪽이온성 알긴산 유도체에 형광염료를 결합시킨 경우 결합체가 수용액상에서 골고루 잘 녹아있고 강한 형광을 발생시킴을 확인하였다(도 9).

[140]

[141] **실시예 4: 알긴산에 ZW-800 amine 염료를 결합시킨 형광영상 조영물 제조, 분석 및 동물실험 결과**

[142]

[143] **4-1: 알긴산에 ZW-800 amine 염료를 결합시킨 형광영상 조영물 제조**

[144] 양쪽이온성 알긴산 유도체에 형광염료를 결합시킨 결합체의 대조군으로, 알긴산에 ZW-800염료를 결합시킨 Alg@ZWA를 제조하였다(도 10). 구체적으로, 알긴산의 카르복시기를 EDC/sulfo-NHS 커플링제와 반응시키고, 이를 ZW-800 amine과 반응시킴으로써 ZW-800과 알긴산의 결합체인 Alg@ZWA를 제조하였다. 상기 ZW-800 amine(분자량 887 g/mol)는 최대 여기 파장 753nm, 최대 방출 파장 772nm를 갖는 근적외선 형광물질이며, 알긴산은 씨그마알드리치사 분자량 190,000 Da의 제품(cas no. 9005-38-3)을 사용하였다.

[145] 먼저, 20 mg의 알긴산을 0.1 M 농도의 MES buffer에 녹인 뒤 10.37 mg의 EDC와 3.68 mg의 sulfo-NHS를 첨가하여 상온에서 30분 동안 교반하였다. 반응이 끝난 후 PD-10 컬럼을 이용하여 미반응물을 분리하고, 4.9 mg의 ZW-800 amine 형광물질을 첨가하여 하루 동안 교반하여 반응하였다. 반응을 마친 용액에 대하여 증류수에서 2일 동안 투석(dialysis, MWCO 10kDa)을 진행하여 합성물 내의 미반응물 및 부산물을 제거하였다. 이후 동결건조 실시하여 분말 형태의 ZW-800이 공유 결합된 형광염료-알긴산 결합체(Alg@ZWA)를 수득하였다.

[146]

[147] **4-2: 형광염료-알긴산 결합체(Alg@ZWA)의 분광학적 특성 분석**

[148] 광학 측정 분석을 통하여 알긴산 한 분자 당 실제 반응한 ZW-800 amine 몰수를 측정하였다. 그 결과, Alg@ZWA 결합체의 UV-vis 흡광 측정을 통해 알긴산 한 분자 당 약 1.2개의 ZW-800 amine이 반응하여 결합되어 있음을 확인하였다(도 11a). 또한, 알긴산에 ZW-800이 공유 결합된 Alg@ZWA 결합체의 형광 평가($\lambda_{ex} = 660 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 774 \text{ nm}$)를 수행한 결과, 합성된 Alg@ZWA 내의 형광염료는 형광소광(quenching)없이 형광 발생이 잘 되는 것을 확인하였다(도 11b).

[149]

[150] **4-3: 양쪽이온성 알긴산 유도체-형광염료 결합체와 알긴산-형광염료 결합체(Alg@ZWA)의 동물 시험 성능 평가**

[151] 양쪽이온성 알긴산 유도체에 ZW-800 NHS ester 형광염료를 공유결합 시킨 Alg-lys@ZW38와 알긴산에 ZW-800 amine 형광염료를 결합시킨 Alg@ZWA의 생체 내 거동을 동물실험을 통하여 분석하였다. 구체적으로, ICG, Alg-lys@ZW38, Alg@ZWA에 대하여 $10 \text{ nmol dye}/100 \mu\text{L}$ 의 농도로 녹이고, 이를 누드마우스의 꼬리 정맥을 통하여 투여한 뒤 20 분, 1 시간, 3 시간, 6 시간, 24 시간째에 IVIS 영상장비를 사용하여 근적외선 형광 영상을 촬영하였다($\lambda_{ex}=780 \text{ nm}$, $\lambda_{em}=845 \text{ nm}$).

[152] 그 결과, ICG는 정맥 투여 후 빠른 속도가 혈액에서 제거가 되면서 간을 제외한 다른 곳에서의 형광 신호가 급격히 감소하였다. Alg@ZWA는 한 시간까지는 형광신호가 몸 전체에 걸쳐서 나타났으나 그 이후에는 몸에서의 형광신호가 매우 낮아진 것으로 나타났는데, 이것은 혈액에 순환중인 결합체가 거의 없다는 것을 나타내는 결과이다. 반면, 양쪽이온성 알긴산 유도체에 형광염료를 공유결합 시킨 Alg-lys@ZW38 결합체의 경우, 24시간 까지 몸 전체에 걸쳐서 형광신호가 발생함을 관찰 할 수 있었다. 이는 본 발명의 양쪽이온성 알긴산 유도체를 이용한 결합체가 단백질과의 비특이적 상호작용을 회피할 수 있고, 목적으로 하는 기관 또는 조직 외에 간 등에 대한 비특이적 섭취가 저해되어 혈액 내에서 안정적인 순환이 가능하며, 혈액 내 체류 시간이 획기적으로 향상됨을 나타내는 결과이다(도 12a).

[153] 또한, 마우스의 등쪽의 심장 부근에서의 형광 ROI 값을 수치화하여 그래프로 나타낸 경우, 각 형광물질들의 체내 주입 20분 후 Alg-lys@ZW38 결합체는 ICG의 ROI 값 대비 약 3.8배 높은 형광 수치를 나타낸 반면, Alg@ZWA 결합체의 ROI 값은 ICG 형광 값과 거의 유사한 형광 수치(ICG의 형광 수치의 0.998배)임을 확인하였다. 특히, 24시간째의 ICG, Alg-lys@ZW38, Alg@ZWA의 형광 ROI 값을 비교하였을 때 Alg-lys@ZW38 결합체의 경우에 월등한 형광 세기뿐만 아니라 장시간 동안 체내 전 영역에서 순환되는 것을 확인하였다(도 12b).

[154] 나아가, 각 형광물질들의 체내 주입 후 생체 내 거동을 더욱 명확히 확인하고자 마우스의 배 쪽을 촬영한 형광 영상을 비교하였다(도 13). 그 결과, ICG의 경우 투여 20분 째에 투여한 ICG가 대부분 간에 섭취되어 있었으며, 그 이후에는

소장으로 배출되어 사라지는 양상을 나타내었다. Alg@ZWA의 경우 투여 1시간까지 체내 전 영역에 순환하며 점차 소변으로 배출되었고, 투여 3시간째에는 Alg@ZWA 결합체 대부분이 사라지고 일부 적은 양의 형광물질이 간에서 잔존하는 형광 신호를 보이며, 24시간까지 간 조직 부근에서만 형광 신호가 지속되었다. 반면, Alg-lys@ZW38 결합체는 체내 주입 24시간 후까지 혈류를 통해 체내에 순환되며, 체내의 전 영역에 걸쳐 형광 신호가 관찰되었다. 즉, 체내에 주입된 Alg-lys@ZW38은 간 조직에 대한 비특이적 섭취가 억제되고 주입 후 24시간에 걸쳐 서서히 방광을 통해 체외로 배출되었다. 이로부터 본 발명의 양쪽이온성 알긴산 유도체는 알긴산을 사용하였을 경우보다 결합된 조영제 또는 약물의 혈액 내 체류 시간을 획기적으로 향상 시켜 줄 수 있음을 확인하였다.

[155]

[156] 실시예 5: 고분자량의 양쪽 이온성 알긴산 유도체-근적외선 형광물질 결합체 제조 및 분석

[157]

[158] 5-1: 고분자량의 양쪽 이온성 알긴산 유도체-근적외선 형광물질 결합체 제조

[159] 결합체의 혈액 내 체류시간은 분자량이 커질수록 증가하는 것으로 알려져 있는바, 상기 실시예 1에서 사용한 씨그마알드리치사의 190kDa 알긴산보다 고분자량의 일본 KIMICA사의 알긴산 제품 I-5(viscosity of 1 w/v% aqueous solution at 20°C = 500 to 600 mPa·s average molecular weight = 800kDa)를 이용하여 양쪽이온성 알긴산 유도체를 합성하고, 형광염료 결합체의 합성도 잘 되는지를 시험하였다.

[160]

상기 실시예 1과 같이 EDC/sulfo-NHS 커플링제를 사용하여 알긴산을 활성화시켜 알긴산-NHS ester 결합물을 얻고, 여기에 라이신을 결합하였다. 구체적으로, 알긴산 50 mg을 MES buffer (MES, 0.1 M, pH 5.7) 10 mL에 용해시킨 후, 알긴산 반응 물수의 1.2배 물에 해당하는 EDC와 1.3배 물에 해당하는 sulfo-NHS를 첨가하여 상온에서 약 30분 동안 교반하였다. 이후 상기 용액의 반응하지 않은 EDC를 비활성화 시키고자 2-mercaptoethanol (14.3 M)을 7μL(최종농도 20 mM) 주사한 후 상온에서 20분간 교반하였다. 상기 용액에 대해 PD-10 컬럼을 이용하여 용액 내의 미반응물 및 불순물을 제거하고, phosphate buffer (PBS, 0.1 M, pH 7.4)로 용매 교환을 실시하였다. 이후 알긴산의 5배 물수에 해당하는 과량의 라이신을 첨가하고 이를 상온에서 하루 동안 교반하였다. 반응을 마친 상기 용액에 대하여 증류수에서 하루 동안 투석(dialysis)을 진행하여 합성물 내의 미반응물 및 부산물을 제거하고, 동결건조를 통해 분말 형태의 라이신 결합된 양쪽이온성 알긴산 유도체 (Alg(KIMICA)-lys)를 수득하였다.

[161]

나아가, 상기 실시예 1에서 사용한 하버드 의과대학 최학수 교수 연구팀의 ZW-800의 NHS ester 형광물질(MW 1001.28 g/mol, 최대 여기 파장 754 nm, 최대

방출 파장 775 nm)과 상기 양쪽이온성 알긴산 유도체가 결합된 결합체를 제조하였다.

- [162] 구체적으로, 상기 결합체를 제조하기 위하여 10 mg의 상기 양쪽이온성 알긴산 유도체를 2 mL의 Sodium bicarbonate (NaHCO_3 , 50 mM, pH 8.5)에 용해하여 5 mg/mL의 농도로 균질하게 혼합하였다. 이후 5.64 mg의 ZW-800 NHS ester 형광염료를 첨가하고 하루 동안 교반하여 반응하였다. 반응을 마친 상기 용액은 투석막 튜브(MWCO 10kDa)에 담아 2일 동안 PBS(0.1 M, pH 7.4)와 증류수로 투석함으로써 미반응 화학물질을 제거하였다. 상기 용액을 동결 건조하여 분말 상태의 결합체를 얻었다.

[163]

- [164] **5-2: 고분자량의 양쪽 이온성 알긴산 유도체-근적외선 형광물질 결합체의 구조 분석**

- [165] 상기 실시예 5-1에서 사용한 알긴산 및 이를 이용하여 제조된 양쪽이온성 알긴산 유도체(lysine conjugated alginic acid)에 대하여, ^1H 핵자기공명 분광광도계(^1H -NMR, 400 MHz NMR Spectrometer, Jeol JNM-LA400 with LFG, JEOL, Japan)를 이용하여 구조를 분석하였다. 그 결과, KIMICA사의 알긴산과 양쪽이온성 알긴산 유도체의 ^1H -NMR 스펙트럼 비교하였을 때, 양쪽이온성 알긴산 유도체의 ^1H -NMR 스펙트럼 중 2.8 ppm 부근에서 보이는 라이신 수소 피크의 알긴산 대비 비율 계산을 통하여, 알긴산의 카르복시기마다 라이신이 약 100%가 라이신과 결합되어 있는 것으로 계산되었다(도 14a 및 14b).

- [166] 또한, 형광염료 결합체인 Alg(KIMIKA)-lys@ZW-800에 대한 분광학적 특성 평가를 수행한 결과, 양쪽이온성 알긴산 유도체 한 분자 당 1.1개의 ZW-800 형광물질이 결합됨을 확인하였다(도 15a). 한편, 흡광 최대 파장이 763 nm에서 770 nm로 장파장 쪽으로 7 nm 이동되었으며, 동일 농도의 형광염료와 비슷한 형광 세기를 보임을 확인하였다(도 15b).

[167]

- [168] **실시예 6: PEG가 결합된 양쪽이온성 알긴산 유도체-근적외선 형광물질 결합체 제조 및 분석**

[169]

- [170] **6-1: PEG가 결합된 양쪽이온성 알긴산 유도체-근적외선 형광물질 결합체 제조**

- [171] 상기 실시예 1에서 제조된 양쪽이온성 알긴산 유도체에 mPEG_{5K}(mPEG, mPEG_{5K}-SPA, succinimidyl PEG, NANOCS, MW 5000Da)를 추가로 결합시킴으로써, 결합체의 분자량을 증가시키고 단백질과의 비특이적 상호작용을 더욱 예방할 수 있는 PEG 결합 양쪽이온성 알긴산 유도체를 합성하였다. 구체적으로, 실시예 1에서 제조된 양쪽이온성 알긴산 유도체 15 mg을 5 mL의 Tris buffer (0.1 M, pH 8.5) 용액에 넣어 녹인 뒤, 34 mg의 mPEG-NHS (molecular weight 5 KDa)를 첨가하여 하루 동안 교반하여 반응하였다. 반응을 마친 상기 용액 내의 미반응 분자 및 불순물을 제거하기 위하여 증류수에서 2일 동안 투석(MWCO 10kDa)을

진행하였고, 정제된 상기 용액에 대해 동결건조를 실시하여 분말 형태의 양쪽이온성 알긴산 유도체에 mPEG_{5K}가 결합되어 있는 Alg-lys-mPEG_{5K}를 수득하였다.

- [172] 나아가, 상기 PEG가 결합된 양쪽이온성 알긴산 유도체(Alg-lys-mPEG_{5K})에 ZW-800 NHS ester 근적외선 형광물질을 결합하기 위하여, 상기 실시예 3과 유사한 방법을 사용하였다. 구체적으로, 10 mg의 Alg-lys-mPEG_{5K}를 2 mL의 Sodium bicarbonate (NaHCO₃, 50 mM, pH 8.5)에 첨가하여 5 mg/mL의 농도로 균질하게 혼합하였다. 이후 5.48 mg의 ZW-800 NHS ester 형광염료를 첨가하여 하루 동안 교반하여 반응을 진행하였다. 반응을 마친 상기 용액은 투석막 튜브(MWCO 10kDa)에 담아 2일 동안 PBS (0.1 M, pH 7.4)와 증류수로 투석함으로써 미반응물을 제거하였다. 투석막 튜브로 빼낸 용액을 동결 건조하여 분말 형태의 고분자량 양쪽이온성 알긴산 유도체-근적외선 형광물질 결합체(Alg-lys-mPEG_{5K}@ZW-800)를 수득하였다.

[173]

- [174] **6-2: PEG가 결합된 양쪽이온성 알긴산 유도체-근적외선 형광물질 결합체의 구조 분석**

- [175] 양쪽이온성 알긴산 유도체에 mPEG_{5K}가 공유 결합되어 있는 결합체 (Alg-lys-mPEG_{5K})에 대하여, ¹H 핵자기공명 분광광도계(¹H-NMR, 400 MHz NMR Spectrometer)와 적외선분광광도계(FT-IR)를 이용하여 구조를 분석하였다. 제조된 양쪽이온성 알긴산 유도체에 mPEG_{5K}가 공유 결합되어 있는 결합체(Alg-lys-mPEG_{5K})의 ¹H-NMR 스펙트럼 비교에서, 3.6 ppm에서 보이는 PEG backbone의 특정 피크의 위치 확인 및 피크의 알긴산 고유피크의 면적 대비 비율 계산을 통해 양쪽이온성 알긴산 유도체 단량체 하나 당 약 9%의 mPEG_{5K}가 결합되며 있음을 확인하였다(도 17a).

- [176] 또한, 알긴산과 양쪽이온성 알긴산 유도체 및 양쪽이온성 알긴산 유도체에 mPEG_{5K}가 공유 결합되어 있는 결합체의 FT-IR 스펙트럼을 비교하였다(도 17b). 구체적으로, 알긴산 경우 알긴산의 수산기 및 카르복시기의 -OH 스트레칭에 따른 특징적인 봉우리는 3300 cm⁻¹ 및 1619 cm⁻¹에서 나타났다. 양쪽이온성 알긴산 유도체의 경우 알긴산의 -COO⁻의 대칭 및 비대칭 스트레칭에 의하여 나타났던 1599 cm⁻¹과 1409 cm⁻¹과 부근의 피크가 사라지고, 1645 cm⁻¹의 amide I 및 1550 cm⁻¹의 amide II 와 같이 -CONH-에 의한 피크가 확인되었다. 이로부터 알긴산의 카르복시기와 라이신의 아민이 아마이드 결합을 형성하며 알긴산과 라이신 사이에 결합이 일어난 것을 확인하였다. 특히, 양쪽이온성 알긴산 유도체에 mPEG_{5K}가 공유 결합되어 있는 결합체의 IR 스펙트럼의 경우, 2883 cm⁻¹과 1720 cm⁻¹과 부근에서 새로운 피크가 나타나는 것을 확인하였으며, 이는 mPEG_{5K}-SPA의 특정 피크로서 이와 같은 결과를 바탕으로 양쪽이온성 알긴산 유도체에 mPEG_{5K}가 공유 결합하여 결합체가 형성되었음을 확인하였다.

[177]

[178] **6-3: Alg-lys-mPEG와 형광염료 결합체(Alg-lys-mPEG@ZW-800)의 분광학적 특성 평가**

[179] Alg-lys-mPEG_{5K}와 형광염료의 결합체(Alg-lys-mPEG_{5K}@ZW-800)에 대한 흡광 및 형광 스펙트럼을 분석한 결과, 흡광 스펙트럼을 통해 양쪽이온성 알긴산 유도체 한 분자 당 59개의 ZW-800 형광물질이 결합됨을 확인하였으며(도 18a), 형광 스펙트럼을 통해 형광염료 결합체 형성 후 자유 염료 대비 약 29% 정도의 형광 감소가 있었으나 결합체 형성이 잘 되었고 강한 형광을 발생할 수 있음을 확인하였다(도 18b).

[180]

[181] **실시예 7: 양쪽이온성 알긴산 유도체-광감각제 결합체(Alg-lys@Ce6)의 제조 및 분광학적 특성 평가**

[182]

[183] **7-1: 양쪽이온성 알긴산 유도체-광감각제 결합체(Alg-lys@Ce6)의 제조**

[184] 양쪽이온성 알긴산 유도체와 조영제(또는 약물)의 결합체 합성에 관한 일 예로서, 광감각제인 chlorin e6(Ce6)와 양쪽이온성 알긴산 유도체의 결합체(Alg-lys@Ce6)를 제조하였다(도 19). 제조시 사용된 알긴산은 190kDa 분자량의 씨그마알드리치사의 알긴산나트륨염 (cas no. 9005-38-3) 제품을 구매하여 사용하였다.

[185] 구체적으로, 양쪽이온성 알긴산 유도체 내에 존재하는 라이신 말단기 숫자의 3%에 해당하는 비율(알긴산 유도체 한 분자 당 약 32개의 Ce6)로 Ce6와 공유결합을 형성하도록 합성을 진행하였다. 먼저 Ce6의 카르복시기를 활성화시키기 위하여 2.03 mg의 Ce6을 1 mL의 PBS buffer (0.1 M, pH 7.4)에 녹여 0.78 mg의 EDC와 1.11 mg의 sulfo-NHS를 첨가한 후 30분 동안 교반하여 반응하였다. 20 mg의 양쪽이온성 알긴산 유도체를 3 mL의 MES buffer (0.1 M, pH 7.4)에 용해하여 Ce6 반응용액과 섞어준 뒤 하루 동안 교반하였다. 반응을 마친 상기 용액 내의 미반응 분자 및 불순물을 제거하기 위하여 phosphate buffer (PB, 0.1M, pH 7.5)와 증류수를 이용하여 2일 동안 투석(MWCO 10kDa)을 진행하고, 정제된 상기 용액에 대해 동결건조를 실시하여 분말 형태의 결합체를 수득하였다.

[186]

[187] **7-2: 양쪽이온성 알긴산 유도체-광감각제 결합체(Alg-lys@Ce6)의 분광학적 특성 평가**

[188] 상기 결합체(Alg-lys@Ce6)의 합성을 확인하기 위해 이에 대한 분광학적 특성 평가를 실시하였다. 광감각제인 Ce6와 상기 결합체를 인산완충액(PBS)에 녹이고 UV-vis 흡광분석을 실시한 결과, 양쪽이온성 알긴산 유도체 한 분자 당 약 22개의 Ce6가 결합됨을 확인하였다(도 20a). 또한, 형광 스펙트럼을 분석한 결과, 결합체 형성 후 광감각제의 광학 특성이 잘 유지가 되었음을 알 수 있었으며, 이는 결합체의 광역학 치료 효과가 잘 보존됨을 나타내는 결과이다(도 20b).

[189] 또한, 제조된 양쪽이온성 알긴산유도체-광감각제 결합체의 일항 산소 발생 특성을 확인하기 위해 일항산소 검출 시약인 SOSG(Singlet oxygen sensor green, Molecular Probe Inc. Eugene, OR, USA)를 이용하여 670 nm 레이저를 조사하면서 30초 간격으로 일항 산소 발생을 측정하였다. 그 결과, 양쪽이온성 알긴산 유도체에 결합된 광감각제의 일항산소 발생이 단독의 광감각제를 사용한 경우보다 약간 더 높음을 확인하였다(도 20c). 이러한 결과는 Ce6가 수용액상에서 제한된 용해도 때문에 응집 현상이 일어나고, 응집된 광감각제 간의 소광(quenching) 효과로 인하여 일항 산소 발생이 원래 보다 낮게 나타났기 때문이다. 또한, Alg-lys@Ce6의 경우 광감각제가 알긴산 유도체에 결합 후 친수성이 높아지고 광감각제 간의 응집현상이 억제되었기 때문에 Ce6보다 일항산소의 발생량이 더 높게 측정이 되었다. 즉, 이는 광감각제가 결합된 양쪽이온성 알긴산 유도체가 안정한 결합체를 형성하여 향후 광역학 치료제로서 사용될 수 있음을 나타낸다.

[190]

[191] **7-3: 암세포에 대한 양쪽이온성 알긴산 유도체-광감각제 결합체(Alg-lys@Ce6)의 섭취 시험**

[192] 생쥐 편평세포 암종(mouse squamous cell carcinoma) 세포주인 SCC7은 우태아혈청 (FBS) 10% 및 페니실린/스트렙토마이신 1%를 포함하는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Media) 배지를 이용하여 37°C, 5% 이산화탄소 및 표준 습도 조건하에서 배양하였다. 이후 SCC7 세포를 LabTek II Chambered Coverglass의 각 웰마다 5×10^4 개씩 넣고, 세포가 잘 부착되도록 24시간 동안 배양하였다. 양쪽이온성 알긴산 유도체-광감각제 결합체(Alg-lys@Ce6)와 자유 광감각제(free Ce6)를 Ce6기준 2.5 μ M 농도로 세포에 5시간 동안 처리하였다. 그 후 세포에 섭취되지 않은 광감각제를 세척을 통해 제거하고, 새로운 세포배양액을 첨가한 후에 공초점 형광 현미경을 통해 세포 섭취를 확인하였다(λ_{ex} 633 nm, λ_{em} 650 nm long-pass filter). 광감각제를 처리하지 않은 암세포주를 대조군(control)로 사용하였다. 그 결과, 도 21에 도시한 바와 같이 기존의 free Ce6를 처리한 것과 비교하여 Alg-lys@Ce6의 형광세기가 무려 25.5배 높은 것으로 분석되었으며, 이것은 free Ce6에 비교하여 Alg-lys@Ce6의 암세포 내로의 섭취량이 25배 이상 높다는 것을 나타내는 결과이다.

[193]

[194] **7-4: 암세포에 대한 양쪽이온성 알긴산 유도체-광감각제 결합체(Alg-lys@Ce6)의 항암효과 측정**

[195] SCC7 암세포에 대조군인 free Ce6와 본 발명에 의한 양쪽이온성 알긴산 유도체-광감각제 결합체(Alg-lys@Ce6)를 농도별(각각 1, 2.5 및 5 μ M)로 처리한 후 5시간 동안 암조건(dark condition)에서 배양하고, 세척한 후 새로운 세포 배지로 교환하였다. 이후 670 nm 레이저를 이용하여 암세포에 빛을 조사해 주었다(10 J/cm²). 추가로 24시간 동안 배양한 뒤, CCK-8 assay 분석방법을

이용하여 각각에서 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과, 도22에 도시한 바와 같이 기존의 free Ce6는 5 μ M 농도에서도 광역학 치료 후 암세포가 거의 죽지 않았으나, Alg-lys@Ce6는 2.5 μ M 농도로 처리 후 광역학 치료를 시행한 경우에도 대부분의 암세포가 사멸하였음을 확인하였다. 이러한 결과로부터 본 발명의 양쪽이온성 알긴산 유도체에 광감각제를 결합시킨 경우 암세포 내로의 광감각제 전달 및 섭취가 매우 향상될 수 있을 뿐 아니라, 암세포 치료 효과도 현저히 향상이 될 수 있음을 알 수 있다.

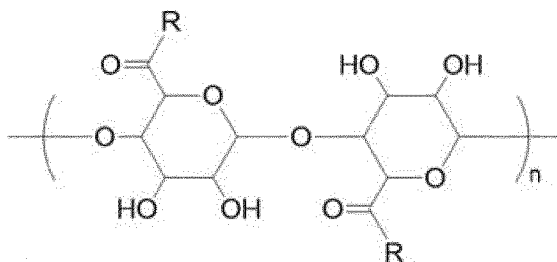
[196]

[197] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

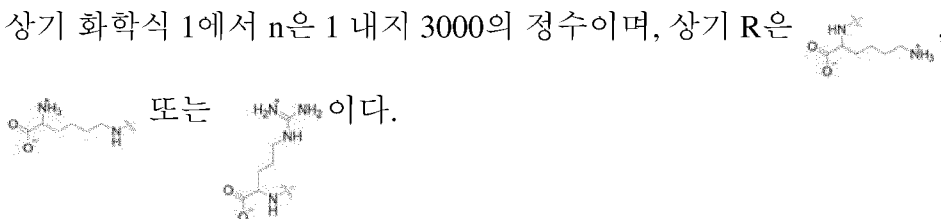
청구범위

[청구항 1] 하기 화학식 1로 표시되는, 양쪽이온성 특성을 갖는 알긴산(alginate) 유도체:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서 n은 1 내지 3000의 정수이며, 상기 R은



[청구항 2] 제1항에 있어서, 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG)이 추가로 결합된 것인, 양쪽이온성 알긴산 유도체.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 영상 조영제 또는 약물이 추가로 결합된 것인, 양쪽이온성 알긴산 유도체.

[청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 영상 조영제는 자기공명영상 조영제(MRI 조영제), CT(computed tomography) 조영제, 또는 형광염료인 것인, 양쪽이온성 알긴산 유도체.

[청구항 5] 제3항에 있어서, 상기 약물은 항암제, 항염증제, 마취제, 항바이러스제, 항박테리아제, 치료용 항체, 항생제, 면역치료제 또는 광감각제인 것인, 양쪽이온성 알긴산 유도체.

[청구항 6] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 양쪽이온성 알긴산 유도체를 포함하는, 조영제 조성물.

[청구항 7] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 양쪽이온성 알긴산 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는, 암 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

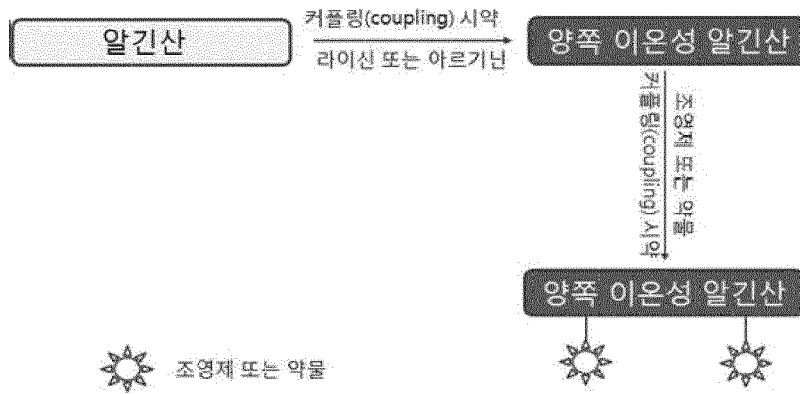
[청구항 8] (a) 알긴산에 EDC 및 sulfo-NHS를 처리하는 단계; 및
(b) EDC 및 sulfo-NHS가 처리된 알긴산을 라이신(lysine) 또는 아르기닌(arginine)과 반응시키는 단계를 포함하는, 양쪽이온성 알긴산 유도체의 제조방법.

[청구항 9] 제8항에 있어서, (c) 라이신(lysine) 또는 아르기닌(arginine)이 결합된 알긴산 유도체와 폴리에틸렌글리콜을 반응시키는 단계를 추가로 포함하는 것인, 양쪽이온성 알긴산 유도체의 제조방법.

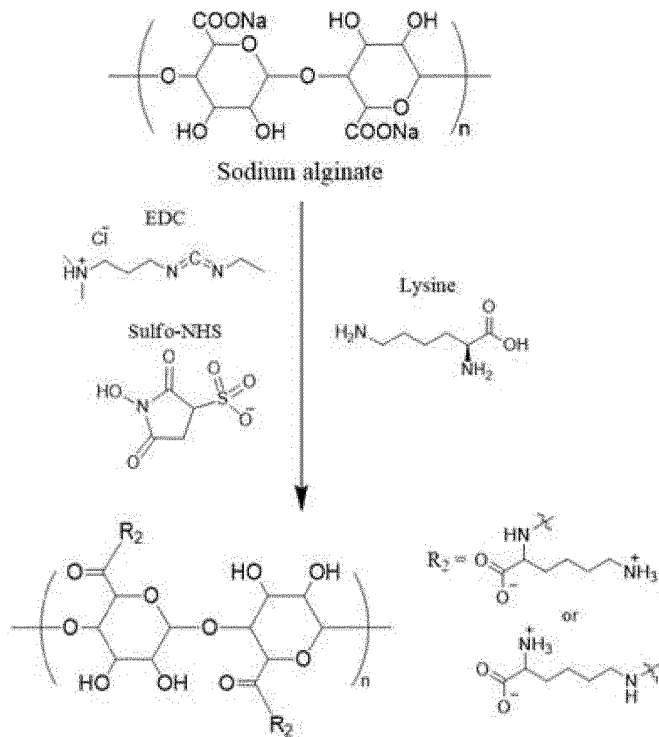
[청구항 10] 제8항 또는 제9항의 제조방법에 따라 제조된 양쪽이온성 알긴산

유도체와 영상 조영제 또는 약물을 반응시키는 단계를 포함하는, 조영제 조성물 또는 약학 조성물의 제조방법.

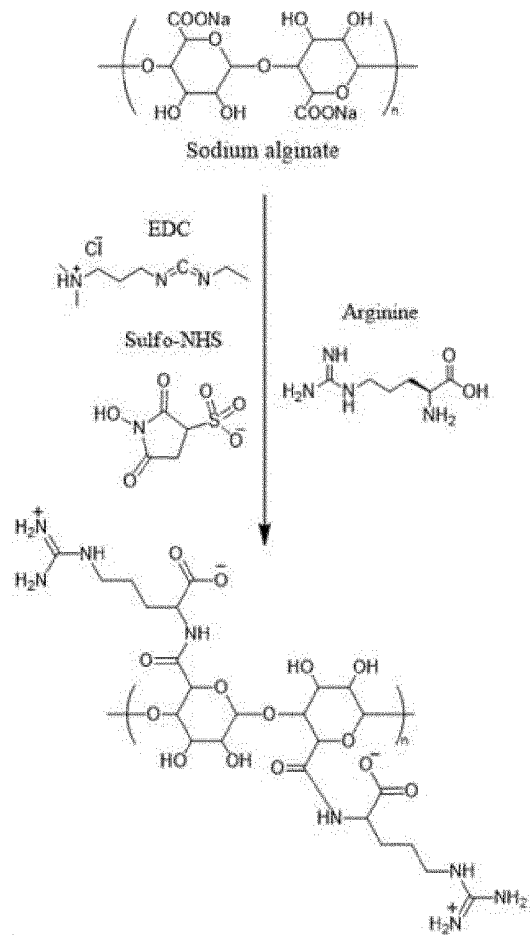
[도1]



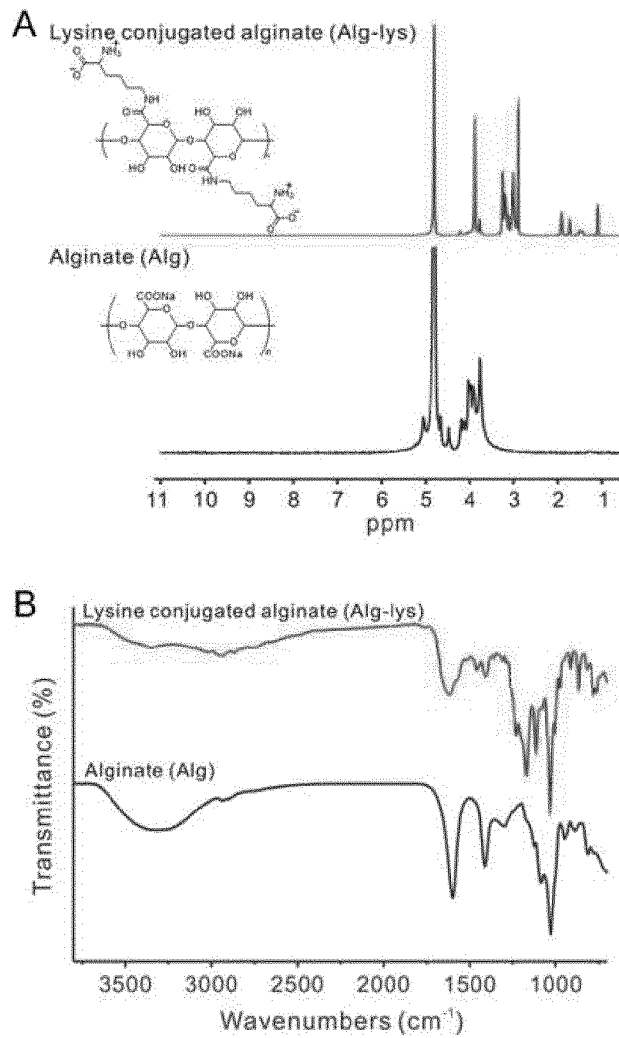
[도2a]



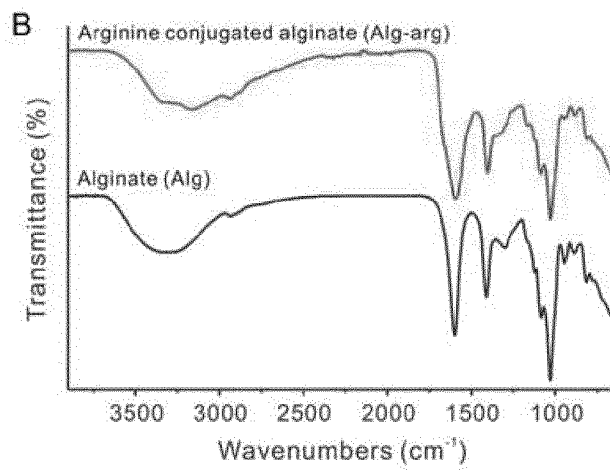
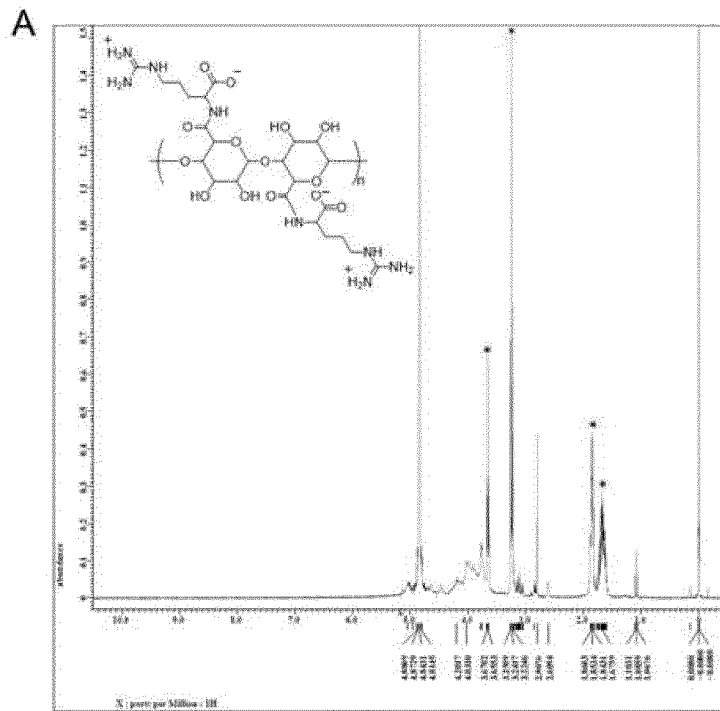
[도2b]



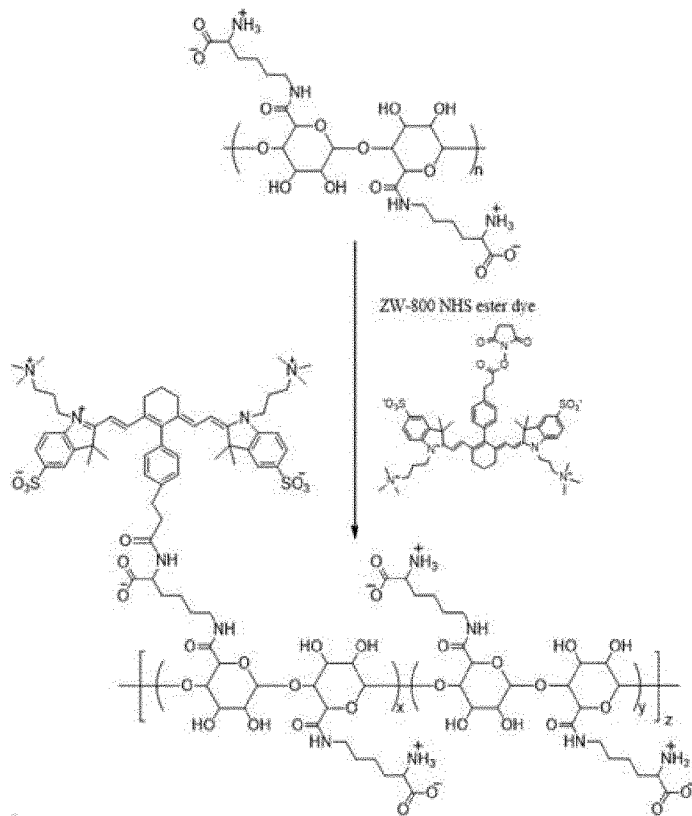
[도3]



[도4]

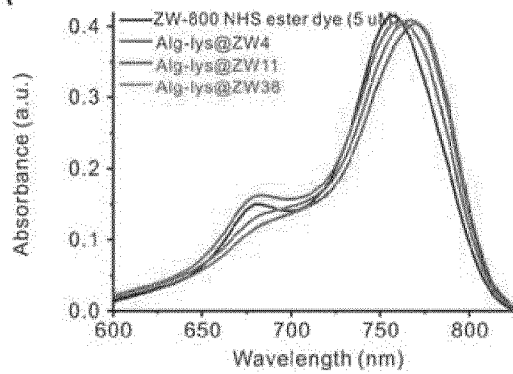


[도5]



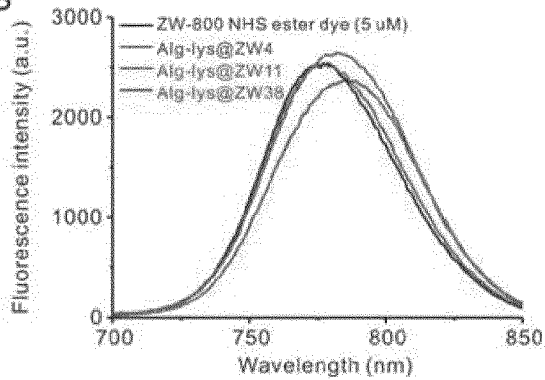
[도6a]

A



[도6b]

B

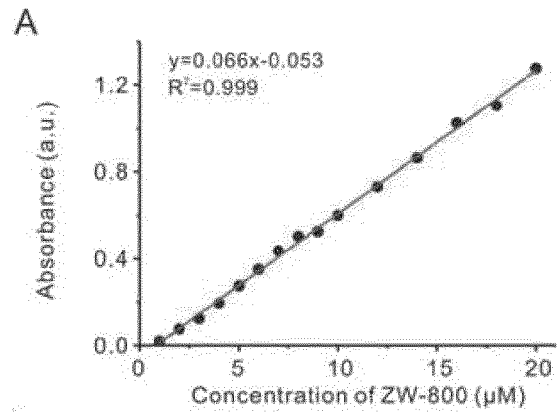


[도6c]

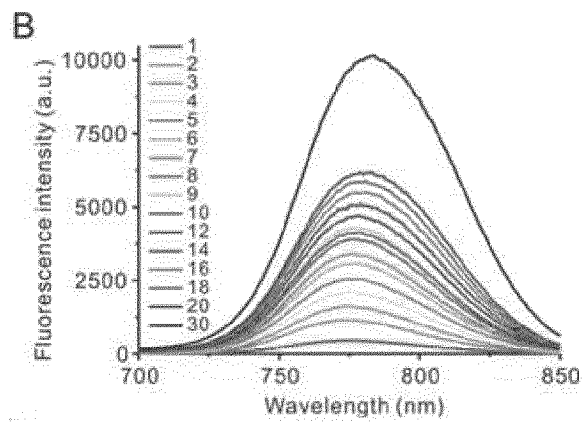
C

	Reaction ratio	Coupling ratio	Fluorescence quenching%
Zwitterionic Alginate-ZW800 (1)	1:10	1:4	0
Zwitterionic Alginate-ZW800 (2)	1:50	1:11	6.3
Zwitterionic Alginate-ZW800 (3)	1:100	1:38	0.3

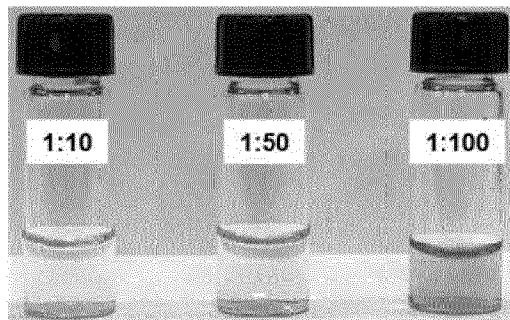
[도7a]



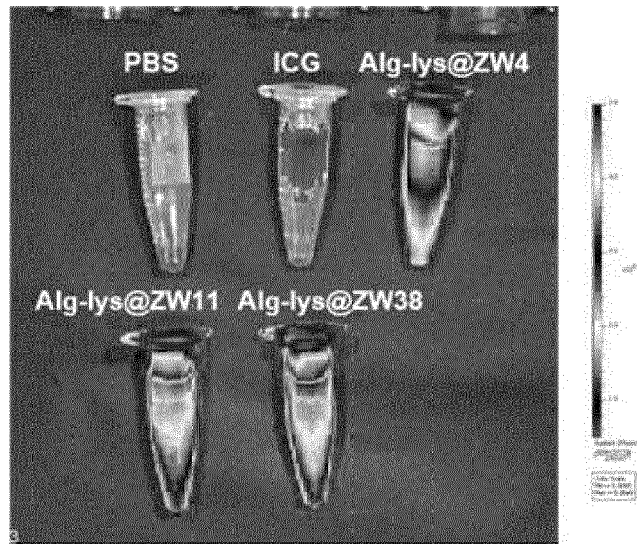
[도7b]



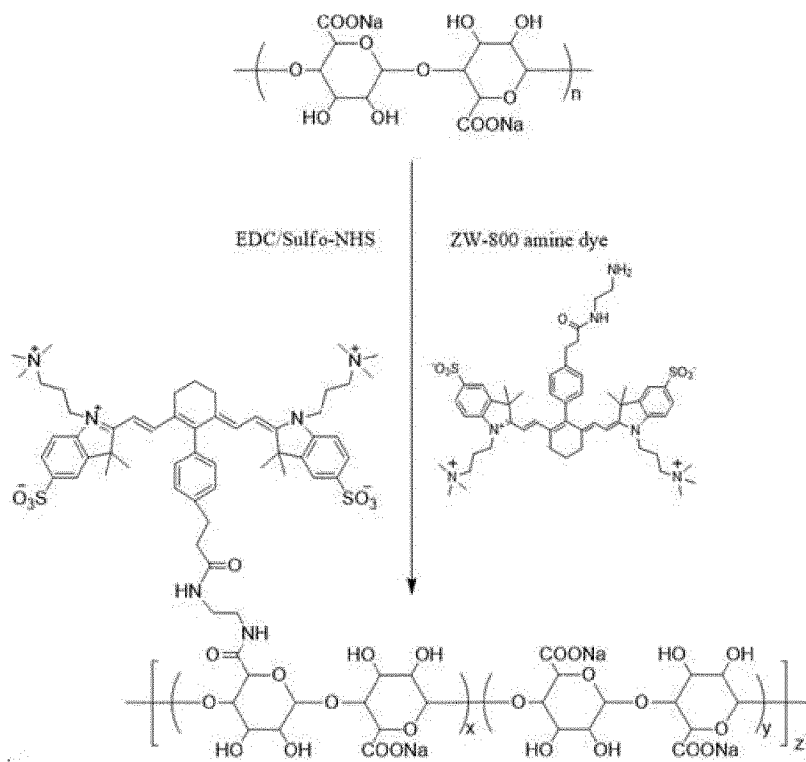
[도8]



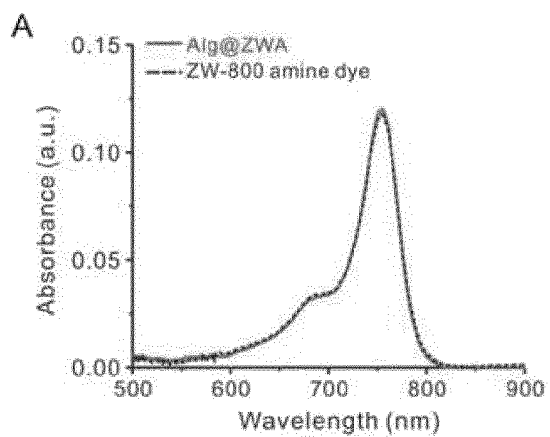
[도9]



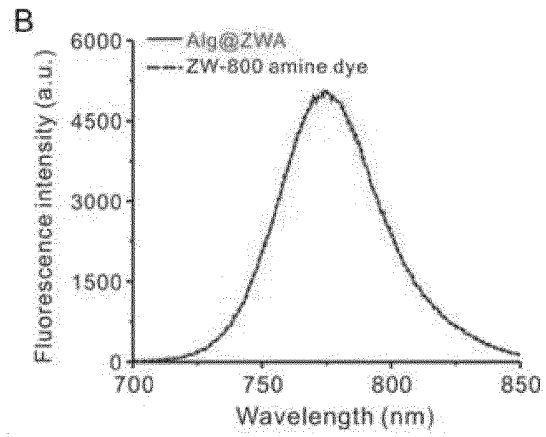
[도10]



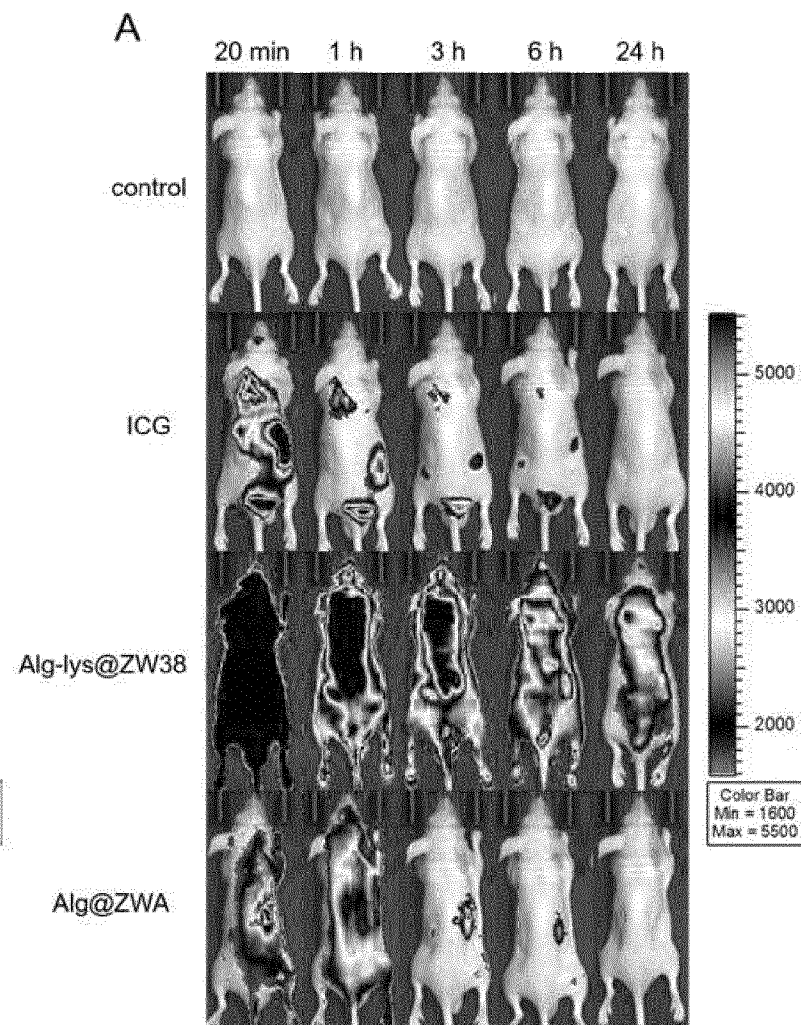
[도11a]



[도11b]

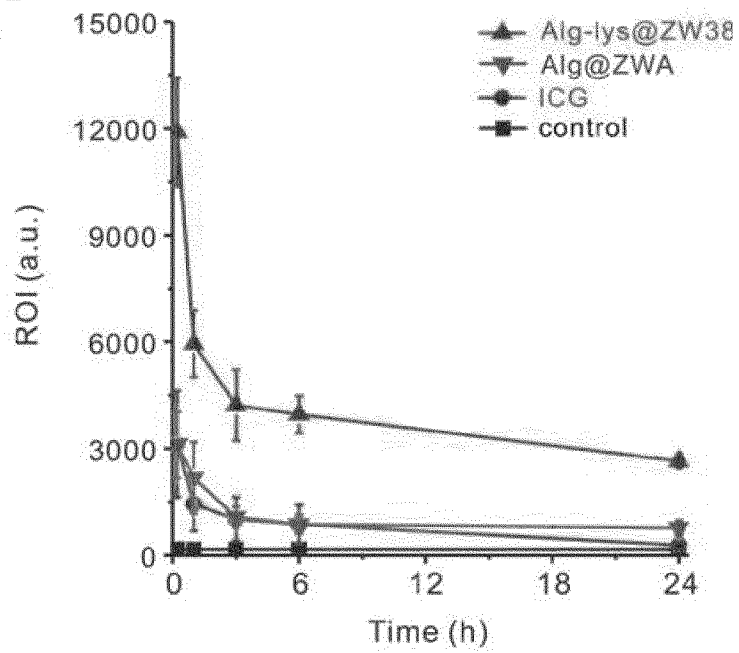


[도12a]

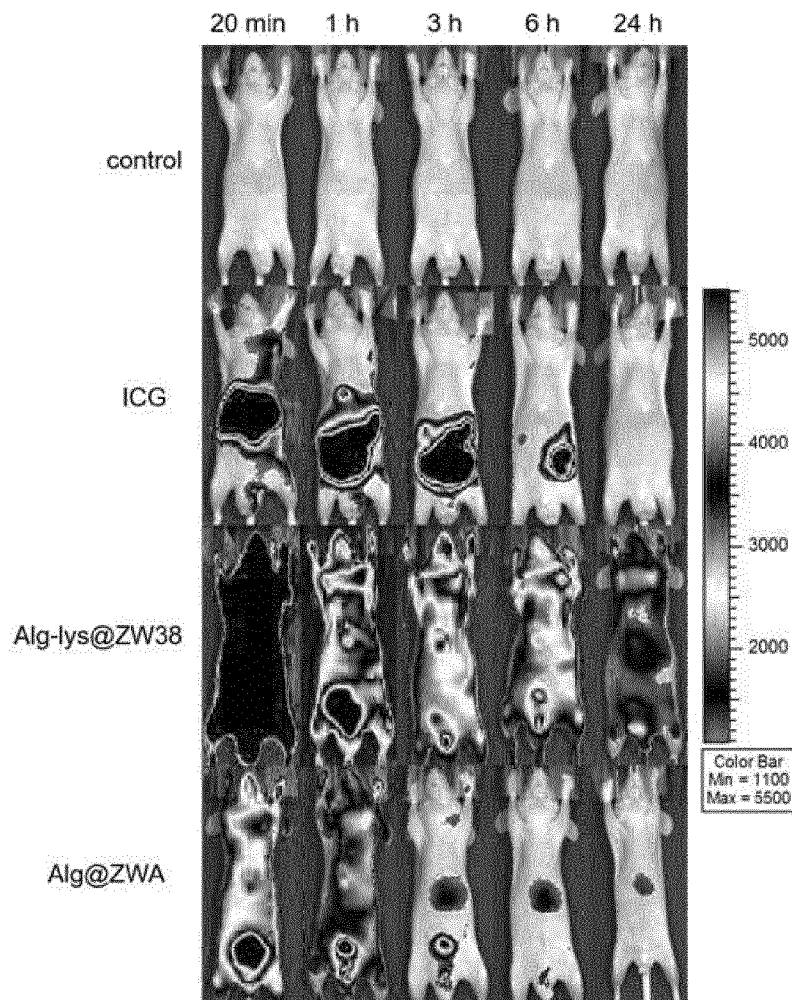


[도12b]

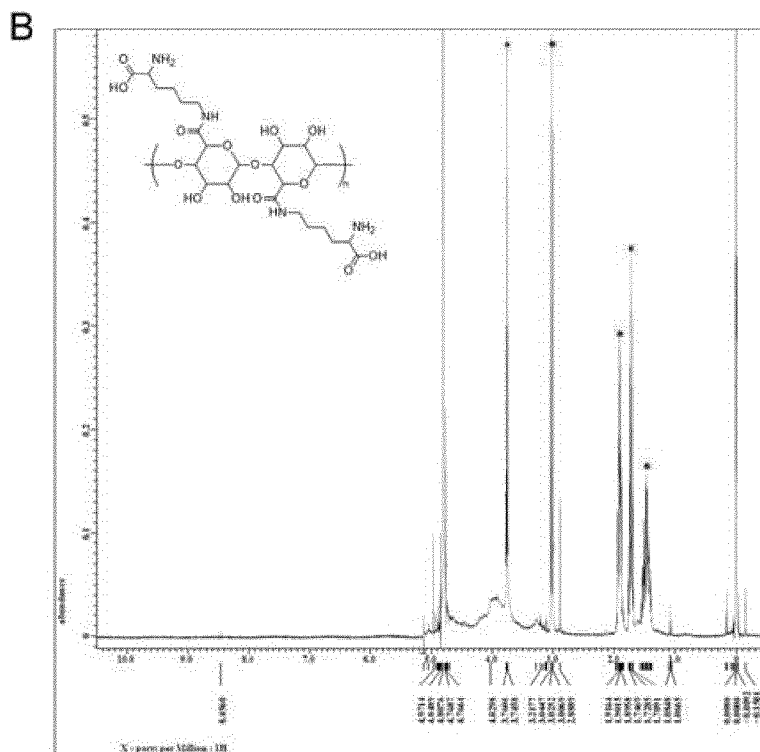
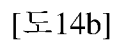
B



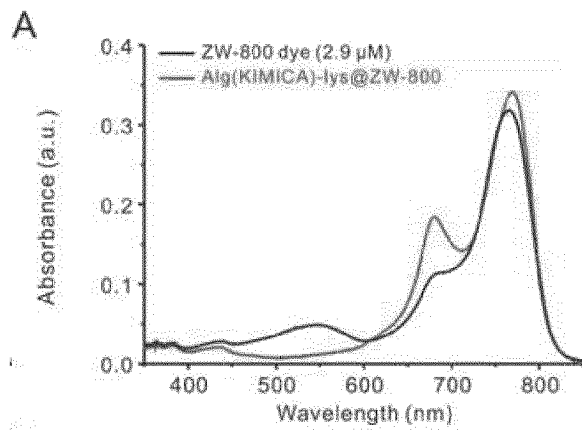
[도13]



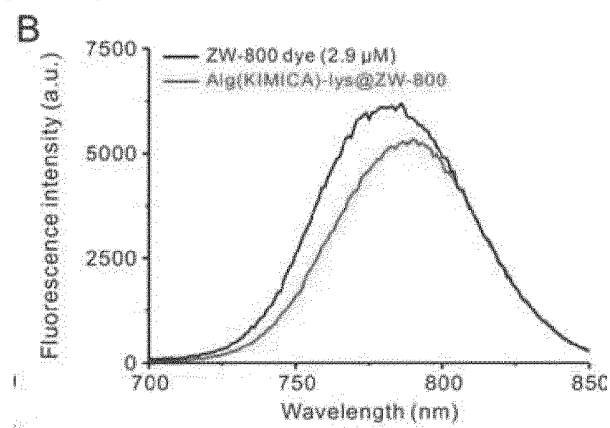
A



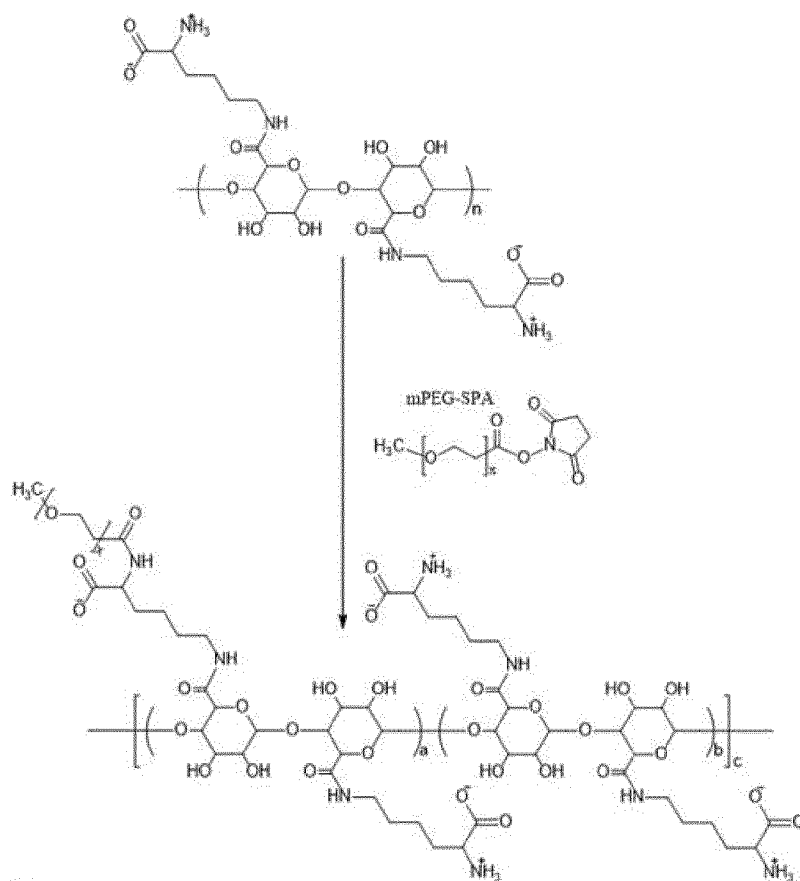
[도15a]



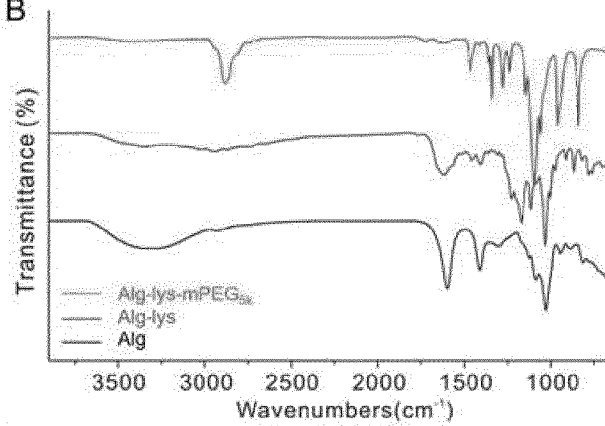
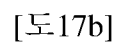
[도15b]



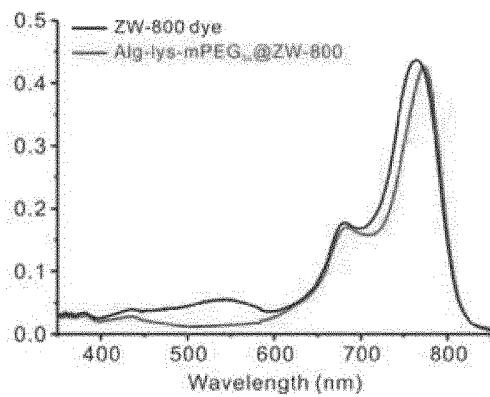
[도16]



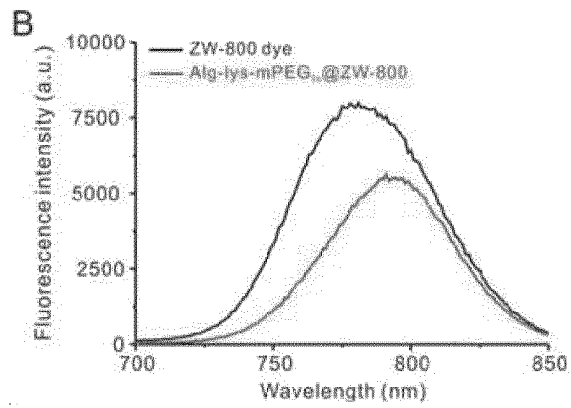
A



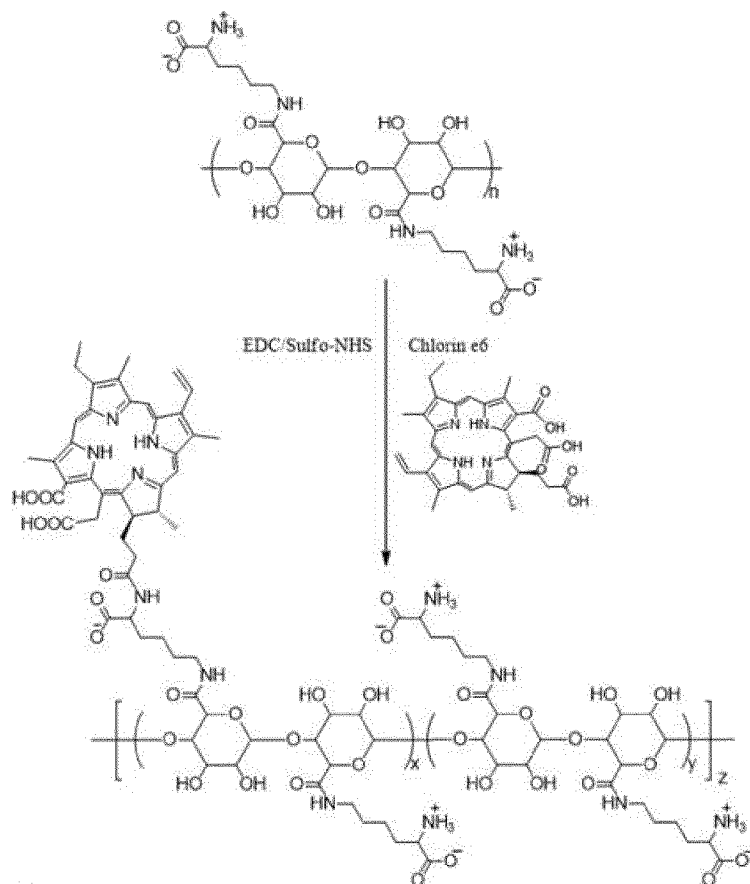
[518a]



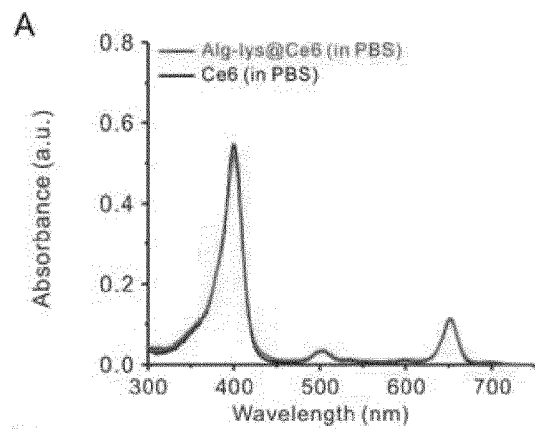
[도18b]



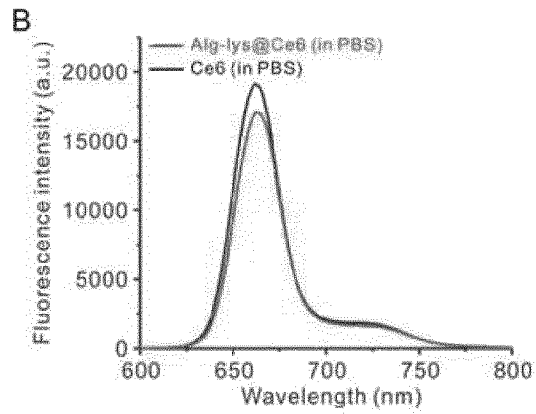
[도19]



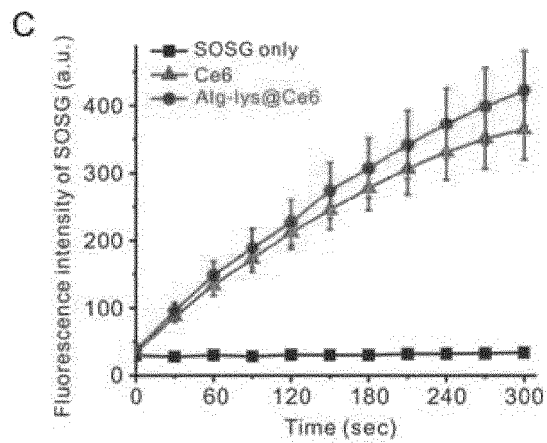
[도20a]



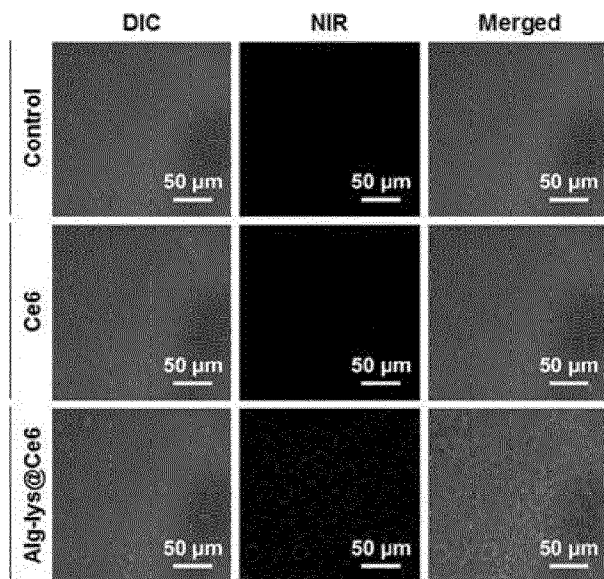
[도20b]



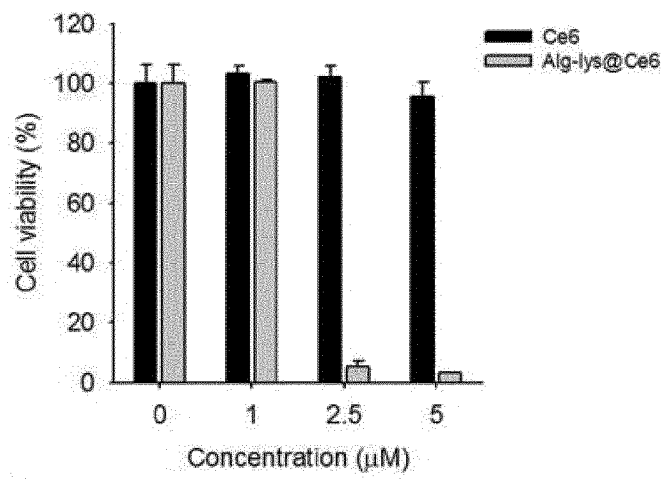
[도20c]



[도21]



[도22]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/017609

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C08B 37/00(2006.01)i, A61K 47/36(2006.01)i, A61K 49/12(2006.01)i, A61K 49/04(2006.01)i, A61K 49/00(2006.01)i, A61K 47/61(2017.01)i, A61K 45/06(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i, A61P 29/00(2006.01)i, C08G 65/32(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)

C08B 37/00; A61K 47/36; A61K 47/48; A61K 49/12; A61K 49/18; A61K 9/16; C08B 37/04; C08G 69/40; C08L 5/04; A61K 49/04; A61K 49/00; A61K 47/61; A61K 45/06; A61P 35/00; A61P 29/00; C08G 65/32

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: alginate, contrast medium, EDC, sulfo-NHS, lysine, arginine

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2018-127819 A1 (THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL) 12 July 2018 See claims 1, 13; paragraph [0232].	1-10
A	CN 107693803 A (DONGHUA UNIVERSITY et al.) 16 February 2018 See the entire document.	1-10
A	WO 2013-185032 A1 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 12 December 2013 See the entire document.	1-10
A	CN 103848925 A (HUAQIAO UNIVERSITY) 11 June 2014 See the entire document.	1-10
PX	KR 10-2041246 B1 (NATIONAL CANCER CENTER) 06 November 2019 See the entire document. "The above document is the published document for the earlier application that serves as the basis for claiming priority of the present international application."	1-10



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

01 APRIL 2020 (01.04.2020)

Date of mailing of the international search report

02 APRIL 2020 (02.04.2020)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/017609

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2018-127819 A1	12/07/2018	AU 2018-205823 A1 CA 3048785 A1 CN 110198959 A EP 3565848 A1 JP 2020-504778 A US 2019-0322770 A1	18/07/2019 12/07/2018 03/09/2019 13/11/2019 13/02/2020 24/10/2019
CN 107693803 A	16/02/2018	CN 107693803 B	06/03/2020
WO 2013-185032 A1	12/12/2013	CA 2876139 A1 CN 104684546 A EP 2858630 A1 EP 2858630 A4 HK 1209021 A1 JP 2015-520194 A JP 2018-172415 A US 2015-0147276 A1	12/12/2013 03/06/2015 15/04/2015 24/02/2016 24/03/2016 16/07/2015 08/11/2018 28/05/2015
CN 103848925 A	11/06/2014	CN 103848925 B	20/01/2016
KR 10-2041246 B1	06/11/2019	None	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C08B 37/00(2006.01)i, A61K 47/36(2006.01)i, A61K 49/12(2006.01)i, A61K 49/04(2006.01)i, A61K 49/00(2006.01)i, A61K 47/61(2017.01)i, A61K 45/06(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i, A61P 29/00(2006.01)i, C08G 65/32(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C08B 37/00; A61K 47/36; A61K 47/48; A61K 49/12; A61K 49/18; A61K 9/16; C08B 37/04; C08G 69/40; C08L 5/04; A61K 49/04; A61K 49/00; A61K 47/61; A61K 45/06; A61P 35/00; A61P 29/00; C08G 65/32

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: 알긴산 (alginate), 조영제 (contrast medium, contrast agent), EDC, sulfo-NHS, 라이신(lysine), 아르기닌(arginine)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	WO 2018-127819 A1 (THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL) 2018.07.12 청구항 1, 13; 단락 [0232]	1-10
A	CN 107693803 A (DONGHUA UNIVERSITY 등) 2018.02.16 전문	1-10
A	WO 2013-185032 A1 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE) 2013.12.12 전문	1-10
A	CN 103848925 A (HUAQIAO UNIVERSITY) 2014.06.11 전문	1-10
PX	KR 10-2041246 B1 (국립암센터) 2019.11.06 전문 '위 문헌은 본 국제출원의 우선권주장의 기초가 되는 선출원의 공개된 공보임'	1-10

☐ 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

“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 “X”에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

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

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

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2020년 04월 01일 (01.04.2020)

국제조사보고서 발송일

2020년 04월 02일 (02.04.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



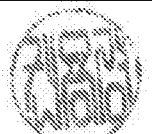
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

권용경

전화번호 +82-42-481-3371



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2018-127819 A1	2018/07/12	AU 2018-205823 A1 CA 3048785 A1 CN 110198959 A EP 3565848 A1 JP 2020-504778 A US 2019-0322770 A1	2019/07/18 2018/07/12 2019/09/03 2019/11/13 2020/02/13 2019/10/24
CN 107693803 A	2018/02/16	CN 107693803 B	2020/03/06
WO 2013-185032 A1	2013/12/12	CA 2876139 A1 CN 104684546 A EP 2858630 A1 EP 2858630 A4 HK 1209021 A1 JP 2015-520194 A JP 2018-172415 A US 2015-0147276 A1	2013/12/12 2015/06/03 2015/04/15 2016/02/24 2016/03/24 2015/07/16 2018/11/08 2015/05/28
CN 103848925 A	2014/06/11	CN 103848925 B	2016/01/20
KR 10-2041246 B1	2019/11/06	없음	