



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2014년07월16일  
 (11) 등록번호 10-1417869  
 (24) 등록일자 2014년07월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
 A61K 49/12 (2006.01) A61K 49/08 (2006.01)  
 A61K 49/06 (2006.01) A61K 49/04 (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2012-0036332  
 (22) 출원일자 2012년04월06일  
 심사청구일자 2012년04월06일  
 (65) 공개번호 10-2013-0113822  
 (43) 공개일자 2013년10월16일  
 (56) 선행기술조사문헌  
 KR1020120013519 A\*  
 JP10503281 A\*  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
 원광대학교산학협력단  
 전라북도 익산시 익산대로 501 (신용동)  
 (72) 발명자  
 채규윤  
 전북 익산시 선화로69길 42, 101동 1204호 (부송동, 오페라하우스)  
 록 치충  
 전라북도 익산시 익산대로 460번지 원광대학교 생활관  
 (74) 대리인  
 김순웅

전체 청구항 수 : 총 6 항

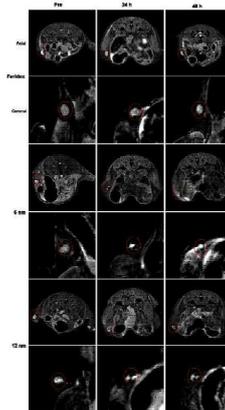
심사관 : 정의준

(54) 발명의 명칭 **인산염이 결합된 고분자로 코팅된 산화철 나노입자를 포함하는 조영제 및 이의 제조방법**

**(57) 요약**

본 발명은 인산염이 결합된 고분자로 코팅된 산화철 나노입자를 포함하는 조영제 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 인산염이 결합된 고분자로 코팅된 산화철 나노입자는 체내 안정성 및 생체 적합성이 뛰어나며, 안정적으로 모든 장기를 조영할 수 있으며, 특히 그동안 조영이 매우 어려웠던 림프절까지 조영할 수 있다.

**대표도** - 도9



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1126
부처명	지식경제부
연구사업명	MR- 차세대 방사선 산업기술 혁신센터
연구과제명	차세대 방사선 산업기술 혁신센터
기여율	1/1
주관기관	원광대학교 산업협력단
연구기간	2011.03.01 ~ 2012.04.03

---

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

고분자와 t-부톡사이드 및 에틸브로모 아세테이트를 반응시켜 제조한 α-하이드록실-ω-카르복실 고분자를 인산염과 반응시켜 얻어진, 인산염이 결합된 고분자로 코팅된 산화철 나노입자를 포함하는 림프절 조영이 가능한 초상자성 T1 및 T2 조영제.

**청구항 2**

삭제

**청구항 3**

삭제

**청구항 4**

제 1항에 있어서, 상기 고분자는 폴리에틸렌글리콜(Polyethyleneglycol, PEG), 폴리아크릴산(Polyacrylic acid, PAA), 폴리비닐피롤리돈(Polyvinylpyrrolidone, PVP), 폴리비닐알콜(Polyvinylalcohol, PVA), 젤라틴(Gelatin), 덱스트란(Dextran), 키토산(Chitosan) 및 풀루란(Pullulan)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 림프절 조영이 가능한 초상자성 T1 및 T2 조영제.

**청구항 5**

제 1항에 있어서, 상기 고분자는 평균 분자량이 100 내지 50000 Da인 것을 특징으로 하는 림프절 조영이 가능한 초상자성 T1 및 T2 조영제.

**청구항 6**

제 1항에 있어서, 상기 산화철은 마그네타이트(magnetite, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) 또는 마그헤마이트(maghemite, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)인 것을 특징으로 하는 림프절 조영이 가능한 초상자성 T1 및 T2 조영제.

**청구항 7**

제 1항에 있어서, 상기 나노입자는 1 내지 20 nm의 크기인 것을 특징으로 하는 림프절 조영이 가능한 초상자성 T1 및 T2 조영제.

**청구항 8**

- (a) 고분자와 t-부톡사이드 및 에틸브로모 아세테이트를 반응시켜 α-하이드록실-ω-카르복실 고분자를 제조하는 단계;
- (b) 상기 α-하이드록실-ω-카르복실 고분자를 인산염과 반응시켜 고분자의 말단에 인산염이 결합된 고분자-인산염 화합물을 제조하는 단계; 및
- (c) 리간드 치환법을 통해 상기 (b) 단계의 고분자-인산염 화합물로 산화철 나노입자를 코팅하는 단계;를 포함하는 제1항 기재의 림프절 조영이 가능한 초상자성 T1 및 T2 조영제의 제조방법.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 인산염이 결합된 고분자로 코팅된 산화철 나노입자를 포함하는 조영제 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 대표적인 단층 촬영 영상 기술인 자기공명 영상은 비침습적으로 3차원 영상을 얻을 수 있는 방법으로, 대조도와 공간 해상도(spatial resolution)가 뛰어나 질병의 진단을 위해 널리 사용되고 있다.

[0003] MRI는 양성자에서 나오는 신호를 측정하여 나타낸 것으로, 인체에 비침습적인 방법으로 진단하였으나, MRI를 위한 조영제(contrast agent)를 사용하면 진단의 민감도와 특이도를 증가시킬 수 있음이 밝혀진 이후, 최근에는 MRI 혈관 조영술, 관류영상에 이르기까지 MRI 조영제의 적용영역이 확대되고 있다.

[0004] MRI 조영제는 생체 내 주입(injection) 후 강력한 외부 자기장과 고주파 에너지에 의해 발생하는 T1, T2 완화시간(relaxation time)의 변화에서 오는 차이를 감지하여 정상 조직과 비정상 조직의 대조도를 증강시킴으로써 국소부위의 해부학적 혹은 기능적 영역에 대한 영상화를 가능케 하는 화학 물질로, 일반적으로 MRI 조영제는 상자성(paramagnetic) 조영제와 초상자성 조영제로 구분된다 (Eur. Radiol. 11: 2319, 2001).

[0005] 상자성 조영제는 T1 강조 영상에서 증강된(밝은) 신호를 나타내기 때문에 양성(positive) 조영제로도 불리며, 가돌리늄(Gd), 망간(Mn) 등의 상자성 전이금속 이온을 이용하여 제조된다. 이러한 상자성 조영제는 이온 자체의 독성이 강하기 때문에 저분자인 DTPA(diethylene triamine pentaacetic acid), DOTA(1,4,7,10-tetraazacyclododecane N,N',N'',N'''-tetraacetic acid) 등의 착화합체나 착화합이 가능한 기능그룹(예: 카르복실기)이 달려있는 생체 친화적인 고분자와의 착화합물 형태로 구현된다. 상자성 조영제는 T1 완화시간 및 T2 완화시간을 줄일 수 있어 T1 조영제 및 T2 조영제 모두로 사용이 가능하다 (Nano Lett. 6: 2427, 2006; Acad. Radiol. 9: S20, 2002). 상자성 조영제는 주로 T1 조영제로 사용되며, 이들의 조영증강 효과는 주로 물 분자와 수화(hydration)하여 T1 완화 시간을 짧게 하는 내구(inner sphere) 기여로 발생하며 일부는 물 분자가 확산에 의해 조영제 스스로가 만들어 내는 자기장에 영향을 받아 자기이완 증강이 발생하는 외구(out sphere) 기여로 발생하기도 한다. 하지만 이러한 상자성 조영제는 생체 독성이 심하며 mM 수준의 영상이 가능하기 때문에  $\mu\text{M}$  수준의 고감도 영상이 가능한 초상자성 조영제에 대한 관심이 보다 높다 (Nano Lett. 6: 2427, 2006; Nat. Med. 13: 95, 2007).

[0006] 임상에 널리 사용되는 초상자성 조영제는 마그네타이트(magnetite,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) 또는 마그헤마이트(maghemite,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ )와 같은 산화철(superparamagnetic iron oxide, SPIO)로 대표되는 초상자성 나노입자(nanoparticle)를 기반으로 제조되며 음성(negative) 조영제로 구분된다. 이들은 수십 나노미터 이하의 크기를 갖는 균일한 입자로 제조하여 안정한 콜로이드 형태로 이루어져 있는 산화철 용액(ferrofluid)으로 제조되어 체내로 투입된다. 초상자성 조영제를 포함하고 있는 조직은 외구 기전에 따라 주변부와의 자화율(susceptibility) 차이에서 발생하는 물 분자 내 양성자 위치에서의 국부 자기장을 왜곡시켜 양성자들이 더욱 빠르게 탈위상(dephasing)하게 만들어 T2 이완이 증강된(T2 이완 시간의 감소) 영상을 획득할 수 있다.

[0007] 초상자성 조영제는 천연 고분자인 덱스트란(dextran)이나 덱스트란의 유도체로 표면코팅이 되어 있는 것들이 상용화 되어 있으며, 이러한 덱스트란 등이 코팅된 초상자성 조영제는 일반적으로 공침법(co-precipitation method; CPM)을 통하여 제조된다 (IEEET. Magn. 17: 1247, 1981). 이를 간단히 설명하면,  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  이온과 저분자량의 덱스트란이 존재하는 상태에서 순간적으로 염기성 용액을 넣어주어 산화철 나노입자가 침전되게 한 후, 원심분리(centrifugation)와 겔 여과(gel filtration)를 통해 크기 선별 공정과 투석을 거쳐 최종적으로 초상자성 조영제를 제조한다 (Magnet. Reson. Med. 29: 599, 1993). 이러한 공침법에 기반한 제조 방법은 조영제의 핵심 부분인 초상자성 나노입자가 상온에서 합성되어 대체로 결정성이 낮고 다양한 크기로 분포하는 문제를 갖고 있다. 반면, 1990년대 초반 개발된 열분해법(thermal decomposition method; TDM)은 합성 이후 크기 선별 공정 없이 고결정성의 나노입자를 합성할 수 있게 해 주는 방법이다 (Angew. Chem. Int. Edit. 46: 4630, 2007; J. Am. Chem. Soc. 126: 273, 2004). 이 방법에서는, 일반적으로  $\text{Fe}^{3+}$  이온을 포함하고 있는 전구체(precursor)를 사용하여  $200^\circ\text{C}$  이상의 고온에서 가열을 하여 초상자성 나노입자를 합성하며, 용매, 전구체, 리간드의 종류 및 양, 열분해 시의 온도변화 등과 같은 공정 변수에 따라 원하는 크기를 1 nm 수준으로 정교하게

조절할 수 있다는 장점이 있다 (Nat. Mater. 3: 891, 2004; J. Am. Chem. Soc. 124: 8204, 2002).

- [0008] 열분해 방법에 의해 합성된 고감도 초상자성 나노입자가 생체 내로 주입하여 사용하는 조영제로 적합하기 위해서는 수용상에서의 분산이 매우 중요하다. 즉, 초상자성 나노입자가 효과적인 조영제로 이용되기 위해서는 높은 포화자기도를 가지면서 작고 균일한 안정된 마그네틱 산화철 용액으로 제조되어야 한다. 이 산화철 용액은  $Fe_3O_4$  나  $Fe_2O_3$ 와 같은 마그네틱 나노입자의 콜로이드 분산용액으로 매우 강한 자기장 하에서도 액체 상태를 유지할 수 있어야 한다. 그러나, 순수한 초상자성 산화철 입자는, 소수성이면서 부피 대 표면적의 비가 크기 때문에 입자들 간에 소수성 인력(hydrophobic interaction)이 강하고 이로 인해 응집이 잘 일어나 클러스터(cluster)를 형성하고, 충분히 안정하지 않으면 본래 구조가 변해서 자기적인 특성이 변할 수 있고, 생체 환경에 노출되게 되면 빠르게 생분해가 일어날 수 있으며, 순수한 산화철 자체만으로는 독성이 있어 인체에 유해하므로 조영제로서의 이용에 제한이 따르는 문제가 있다.
- [0009] 따라서, 이러한 문제를 개선하고 상기 초상자성 나노입자를 포함하는 산화철 용액의 안정성을 유지시키기 위해서는 입자의 표면 개질이 요구된다. 이러한 표면 개질에는 표면 리간드 치환법(exchange method)과 표면 리간드 부가법(addition method)이 널리 사용되고 있다 (J. Am. Chem. Soc. 127: 12387, 2005; Science 307: 538, 2005; Chem. Mat. 19: 3870, 2007).
- [0010] 표면 리간드 치환법은 초상자성 나노입자 표면의 소수성 부분을 친수성 리간드로 치환하는 방법이다. 이때 사용 가능한 친수성 리간드는 카르복실기(carboxyl group)나 다이하이드로페닐기(dihydroxyphenyl group)를 포함하고 있으면 리간드 교환 후 자성체와의 안정한 결합을 유지할 수 있다. 표면 리간드의 교환을 통해 자성 나노입자가 수용상에도 안정하게 분산될 수 있게 된다.
- [0011] 초상자성 나노입자를 수용상에 안정하게 분산시키기 위한 또 다른 방법인 표면 리간드 부가법은 소수성 나노입자를 코팅할 수 있는 양친매성 고분자를 사용하여 이루어진다. 이때 사용될 수 있는 고분자로는 폴리(비닐 알코올)(poly(vinyl alcohol)), 플루오닉(Pluonic) 계열의 상용 계면활성제뿐만 아니라 합성 양친매성 고분자도 가능하다 (Chem. Mat. 19: 3870, 2007; J. Mat. Chem. 17: 2695, 2007; J. Colloid Interf. Sci. 319: 429, 2008; Biomaterials 29: 2548, 2008; J. Magn. Magn. Mater. 317: 34, 2007; Advanced Functional Materials 18: 258, 2008; Angew. Chem. Int. Edit. 46: 8836, 2007). 섞이지 않는 수상(양친매성 고분자 포함 부분)과 유기상(소수성 초상자성 나노입자 포함 부분)을 강제로 유화시키고 그 액적의 크기를 나노 수준으로 낮춘 상태에서 유기 용매를 증발시키게 되면 수용상에 안정하게 분산된 초상자성 나노 조영체가 만들어진다.
- [0012] 현재까지 몇 가지의 조직 특이적 조영체들이 상용화 되어 있다. 예로, 혈관용 조영제(미국 Epix社의 MS325), 간·췌장용 조영제(미국 Advanced Magnetics社의 Ferridex 및 Combidex), 소화기관용 조영제(미국 Advanced Magnetics社의 Gastromark 와 Pharmacyclic社의 Gadolite), 종양세포용 조영제(노르웨이 Nycomed Amersham社의 Teslascan) 등이 있으나, 현재까지 림프절을 효과적으로 확인할 수 있는 MRI 조영제의 개발은 미진한 상태다. 그러나 대부분의 암이 전이에 있어 림프절 전이를 거친다는 점을 고려할 때 암의 림프절 전이 진단에 효과적인 림프절 MRI 조영제의 개발은 매우 중요하다.
- [0013] 이에 본 발명자들은 림프절까지 조영이 가능한 새로운 조영체를 찾기 위한 연구를 계속한 결과, 인산염이 결합된 고분자로 코팅된 산화철 나노입자를 포함하는 조영체가 림프절까지 효과적으로 조영할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

**선행기술문헌**

**특허문헌**

- [0014] (특허문헌 0001) 국내특허출원번호 : 10-2009-7009975

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0015] 본 발명의 목적은 인산염이 결합된 고분자로 코팅된 산화철 나노입자를 포함하는 조영체를 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조영제의 제조 방법을 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

[0017] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 인산염이 결합된 고분자로 코팅된 산화철 나노입자를 포함하는 조영제를 제공한다.

[0018] 또한 본 발명은 상기 조영제의 제조 방법을 제공한다.

**발명의 효과**

[0019] 본 발명의 인산염이 결합된 고분자로 코팅된 산화철 나노입자는 체내 안정성 및 생체 적합성이 뛰어나며, 안정적으로 모든 장기를 조영할 수 있으며, 특히 그동안 조영이 매우 어려웠던 림프절까지 조영할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0020] 도 1 은 인산염이 부착된 폴리에틸렌글리콜(PEG)의 제조 과정을 나타낸 도이다.
- 도 2는 인산염이 부착된 고분자로 코팅된 산화철 나노입자의 제조 과정을 나타낸 도이다.
- 도 3은 인산염이 부착된 고분자로 코팅된 산화철 나노입자의 XPS 측정 결과를 나타낸 도이다 ((a) C1s, (b) O1s, (c) P2p, (d) Fe2p).
- 도 4는 인산염이 부착된 고분자로 코팅된 산화철 나노입자의 EDX 측정 결과를 나타낸 도이다.
- 도 5는 인산염이 부착된 고분자로 코팅된 산화철 나노입자의 FT-IR 측정 결과를 나타낸 도이다 (인산염이 부착된 고분자로 리간드 치환이 일어나기 전(a), 후(b)).
- 도 6은 인산염이 부착된 고분자로 코팅된 산화철 나노입자의 TEM 사진을 나타낸 도이다 (인산염이 부착된 고분자로 리간드 치환이 일어나기 전(a), 후(b)).
- 도 7은 인산염이 부착된 고분자로 코팅된 산화철 나노입자의 세포 독성을 나타낸 도이다.
- 도 8은 인산염이 부착된 고분자로 코팅된 산화철 나노입자를 이용하여 세포 내 MR 사진을 나타낸 도이다 ((a) T1-weighted, (b) T2-weighted).
- 도 9는 인산염이 부착된 고분자로 코팅된 산화철 나노입자를 이용하여 마우스의 림프절의 MR 사진을 나타낸 도이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0021] 이하 본 발명에 대하여 보다 상세히 설명한다.
- [0022] 본 발명에서 용어, "자기공명영상" 이란 시료에 낮은 전자기 에너지를 조사(irradiate) 후에 물 분자로부터 나온 자기공명영상 신호를 검출하는 의학 영상화 방법으로서, 혈류역학을 기반으로 하며 자기공명신호의 변화를 이용한다는 점에서, 분자과학에 기반을 두며 방사성 동위원소를 이용하는 양전자 방사 단층 촬영(PET) 과 차이가 있다.
- [0023] 본 발명에서 용어, "조영제"란 기관, 진단을 목적으로 하여 혈관 및/또는 조직이 보다 잘 보이도록 인위적으로 대조도의 차를 만들어 영상으로 나타내기 위해서 사용되는 제제를 말한다. 조영제는 연구 대상 표면의 가시도 및 대조도를 증가시킴으로써, 질환 및/또는 손상의 존재 여부 및 그 정도를 결정할 수 있다.
- [0024] 상기 조영제는, 생체의 장기 진단 시 체내의 조직 근처에서 T1 또는 T2 이완 시간 (relaxation time)을 줄여서 조영 효과를 높여주는 것을 특징으로 한다.
- [0025] 일 양태로서, 본 발명은 인산염이 결합된 고분자로 코팅된 산화철 나노입자를 포함하는 조영제를 제공한다.

- [0026] 상기 조영제는 초상자성 조영제인 것을 특징으로 한다.
- [0027] 본 발명의 조영제는 생체 및 세포의 모든 부위 (예를 들어, 혈관, 간, 비장, 췌장, 소화기관, 암세포, 거식세포 등)를 조영할 수 있으며, 특히 림프절을 조영할 수 있다.
- [0028] 상기 나노입자는 직경이 1 nm 내지 1,000 nm이며, 바람직하게는 1 nm 내지 200 nm, 가장 바람직하게는 1 nm 내지 20 nm이다. 상기 나노입자의 크기가 200 nm를 초과할 경우, 조영제로서의 기능이 떨어진다.
- [0029] 상기 고분자는 이에 제한되지 않으나, 친수성 폴리 아미노산, 친수성 비닐계열 고분자, 폴리에테르이미드 등 다양한 고분자가 활용될 수 있으며, 폴리에틸렌글리콜(Polyethyleneglycol, PEG), 폴리아크릴산(Polyacrylic acid, PAA), 폴리비닐피롤리돈(Polyvinylpyrrolidone, PVP), 폴리비닐알콜(Polyvinylalcohol, PVA), 젤라틴(Gelatin), 덱스트란(Dextran), 키토산(Chitosan) 및 플루란(Pullulan) 등을 포함하며, 바람직하게는 폴리에틸렌글리콜(Polyethyleneglycol, PEG)이다.
- [0030] 상기 고분자의 평균 분자량은 이에 제한되지 않으나, 100 Da 내지 50,000 Da일 수 있으며, 바람직하게는 200 내지 20000 Da이다. 분자량이 100 Da 미만일 경우에는 산화철을 코팅하기에 충분한 사슬 길이가 되지 못하기 때문에 응집이 일어나 균일한 입자를 얻을 수 없고, 50,000 Da 을 초과할 경우에는 고분자끼리의 응집이 일어나는 문제점이 있어 바람직하지 못하다.
- [0031] 상기 나노입자의 자성물질은 이에 제한되지 않으나, 망간 산화물(MnO), 망간 페라이트(MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>), 철-백금 합금(Fe-Pt alloy), 코발트-백금 합금(Co-Pt alloy) 및 코발트(Co) 등이 이용될 수 있으며, 바람직하게는 마그네타이트(magnetite, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) 또는 마그헤마이트(maghemite, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)와 같은 산화철(superparamagnetic iron oxide, SPIO)이다.
- [0032] 본 발명의 조영제는 상기 나노입자를 약학적으로 허용되는 담체에 포함할 수 있다. 조영제 조성물에 사용 가능한 담체로는 의약 분야에서 통상적으로 사용되는 담체 및 비히클(vehicle)을 포함하며, 예로 알루미나, 솔비톨, 덱스트란, 염, 물, 전해질 등을 들 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 또한, 본 발명의 조영제는 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0033] 본 발명에 따른 조영제는 비경구 투여를 위한 수용성 용액으로 제조할 수 있다. 바람직하게는 한스 용액(Hank's solution), 링거 용액(Ringer's solution) 또는 물리적으로 완충된 염수와 같은 완충용액을 사용할 수 있다. 수용성 주입(injection) 현탁액은 소듐 카르복시메틸셀룰로오스, 솔비톨 또는 덱스트란과 같이 현탁액의 점도를 증가시킬 수 있는 기질을 첨가할 수 있다. 본 발명의 조영제의 다른 바람직한 양태는 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 오일을 사용할 수 있다.
- [0034] 상기 본 발명에 따른 조영제 조성물을 생체 또는 시료에 투여하고, 상기 생체 또는 시료로부터 발산되는 신호를 감지하여 영상을 획득할 수 있다. 이를 통해 원하는 특정 표적 부위의 암 또는 특정 질병의 진단, 생체 신호의 메카니즘 연구 또는 줄기세포의 분화 연구 등에 적용 가능한 생체 이미징 용도로 이용 가능할 것이다.
- [0035] 본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 유용한 투여량 및 특정 투여 방식은 연령, 체중 및 치료될 특정 부위 뿐만 아니라 사용되는 특정 조영제, 고려되는 진단 용도 및 제제의 형태 (예를 들어, 현탁액, 에멀전, 마이크로스피어, 리포솜 등)와 같은 인자에 따라 달라질 것이며, 이는 당업자에게 이미 명백할 것이다. 전형적으로, 투여량은 낮은 수준으로 투여하고, 원하는 진단 효과가 달성될 때까지 증가시킨다. 영상화는 당업자에게 공지된 기술을 이용하여 수행한다. 일반적으로, 조영제의 멸균 수용액은 1 kg(체중) 당 약 0.01 내지 약 1.0 mmole의 투여량 범위 (투여량 범위의 모든 조합 및 하위 조합, 및 이에 포함되는 특정 투여량 포함)로 환자에게 투여할 수 있다.
- [0036] 상기 조영제를 생체 또는 시료에 주입하는 단계는 의약 분야에서 통상적으로 이용되는 경로를 통해 투여될 수 있으며, 비경구 투여가 바람직하고 예를 들어 정맥 내, 복강 내, 근육 내, 피하 또는 국부 경로를 통하여 투여할 수 있다.

- [0037] 또 다른 양태로써, 본 발명은 (a) 고분자의 말단에 인산염을 결합시키는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계의 리간드 치환법을 통해 인산염이 결합된 고분자로 산화철 나노입자를 코팅하는 단계;를 포함하는 조영제의 제조방법을 제공한다.
- [0038] 상기 (a) 단계는 고분자의 말단에 인산염을 결합시키는 단계로, 본 발명의 일 실시예에서는, 먼저 고분자를 유기용매에 가하고, t-부톡사이드와 에틸 브로모아세테이트를 가한 후 반응시켜, α-하이드록실-ω-카르복실 고분자를 제조한다. 그 다음으로, α-하이드록실-ω-카르복실 고분자를 POCl<sub>3</sub>와 반응시켜 고분자-인산염 화합물을 제조한다.
- [0039] 상기 (b) 단계는 인산염이 결합된 고분자로 산화철 나노입자를 제조하는 단계로, 표면 리간드 치환법을 이용하여 제조한다. 본 발명의 일 실시예에서는, 산화철 나노입자를 유기용매에 가하여 녹이고, 상기 (a) 단계에서 제조한 고분자-인산염을 가하여 반응시켜, 인산염이 결합된 고분자로 코팅된 산화철 나노입자를 제조한다. 상기 방법으로 제조된 인산염이 결합된 고분자로 코팅된 산화철 나노입자는 수용액 상에서 안정하게 분산된다.
- [0040] 상기 (a) 단계 및 (b) 단계의 유기용매는 이에 제한되지 않으나, 아세톤, 디클로로메탄, 디클로로에탄, 클로로포름, 에테르, 케톤, 벤젠, 에틸 아세테이트, 메탄올, 에탄올, 헥산, 사염화탄소, 톨루엔, 자일렌, THF(tetrahydrofuran), DMF(dimethylformamide), NMP(N-methyl-2-pyrrolidone), DMSO(dimethyl sulfoxide), DME(dimethylether) 등을 포함한다.
- [0041] 이하 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예 및 실험예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예 및 실험예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예 및 실험예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0042] **실시예 1. 인산염이 결합된 고분자로 코팅된 산화철 나노입자의 합성**
- [0043] **1-1. 인산염이 결합된 고분자의 제조**
- [0044] 인산염이 결합된 고분자의 합성 과정을 도 1에 도시하였다.
- [0045] (a). α-하이드록실-ω-카르복실 PEG의 제조
- [0046] 25℃에서 폴리에틸렌글라이콜(PEG, Polyethylene glycol, M<sub>n</sub>=2000, 25 g, 12.5 mmol)을 톨루엔 150ml에 용해시키고 포타슘 tert-부톡사이드(potassium tert-butoxide, 1.7 g, 15 mmol)를 가하여 반응하였다. 상기 반응 용액을 40 ml의 용액이 남을 때까지 환류시키면서 증류한 후, 남은 용액을 교반하면서 실온에서 식히고, 에틸 브로모아세테이트(ethyl bromoacetate, 3.4 mL, 16 mmol)를 가하고, 하룻밤 동안 반응시켰다. 그 후 필터를 통해 침전물을 제거하고, 여과액을 차가운 에테르를 이용하여 침전시켰다. 상기 과정을 통해 수득한 물질을 1M의 NaOH 50 ml에 녹인 후, 10 g의 NaCl을 첨가하였다. 상기 혼합물을 1시간 동안 교반한 후, pH가 3.0이 되도록 산성화시키고, 디클로로메탄 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 3×100 mL)을 이용하여 추출하였다. 유기 층을 무수 황산 마그네슘 (MgSO<sub>4</sub>)으로 건조시키고, 필터한 후, 차가운 에테르로 침전시키고, 진공(in vacuo)에서 건조시켰다. 순수한 α-하이드록실-ω-카르복실 PEG (α-hydroxyl-ω-carboxyl polyethylene glycol)를 DEAE-Sephadex A-25를 이용한 이온 교환 크로마토그래피를 통해 분리하고, NMR을 통해 확인하였다
- [0047] [<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDC<sub>13</sub>): δ 4.12 (s, -CH<sub>2</sub>-COOH, 2H), 3.63 (s, PEG backbone).]
- [0048] [<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDC<sub>13</sub>): δ 171.72, 72.78, 70.51, 69.22, 61.72.]
- [0049] (b). PEG-인산염 화합물의 제조
- [0050] 5 mmol의 α-하이드록실-ω-카르복실 PEG를 1시간 동안 진공 하에서 처리하고, 15ml의 무수 THF에 녹였다. 이를

격렬하게 교반하면서, 얼음 수조에서  $\text{POCl}_3$  (0.6 mL, 6.35 mmol)을 한 방울씩 첨가하였다. 상기 반응을 통해 수득된 투명한 물질을 상온에서 밤새 교반하였다. 반응은 물을 첨가해주는 것을 통해 quench 되었고, 상기 물질은 클로로포름 (chloroform (3×20 mL))으로 추출하였다. 유기 층을 무수 황산 마그네슘 ( $\text{MgSO}_4$ )으로 건조시키고, 필터한 후, 차가운 에테르로 침전시키고, 진공(in *vacuo*)에서 건조시켰다. 최종적으로 수득한 PEG-인산염 분자를 NMR을 통해 확인하였다.

[0051] [ $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  4.12 (s,  $-\text{CH}_2-\text{COOH}$ , 2H), 3.63 (s, PEG backbone).]

[0052] [ $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  172.20, 70.59, 68.77, 66.17, 63.80.]

[0053] **1-2. 표면 리간드 치환법을 통한 인산염이 결합된 고분자로 코팅된 산화철 나노입자의 제조**

[0054] 표면 리간드 치환법을 통한 인산염이 결합된 고분자로 코팅된 산화철 나노입자의 제조과정을 도 2에 도시하였다. 인산염이 결합된 고분자로 코팅된 산화철 나노입자를 제조하기 위하여, 표면 리간드 치환법 (ligand exchange method)를 이용하였다. 보다 구체적으로는, 6nm크기의  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  산화철 나노 입자를 제조하기 위하여, 기존에 알려져 있던  $\text{Fe}(\text{acac})_3$  의 열분해 및 리간드로 올레산을 쓰는 방법을 이용하여 제조하였다 (Weissleder, R. et al. *Adv. Drug Delivery Rev.* 1995, 16, 321., Kircher, M. F. et al. *L. Cancer Res.* 2003, 63, 8122., Rosler, A.; Vandermeulen, G. W. M. et al. *Drug Delivery Rev.* 2001, 53, 95., Huh, Y. M. et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 12387.) 소수성에서 친수성으로 나노입자를 변환시키기 위해, 먼저 10 mg 의  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  나노입자를 2 mL의 THF에 녹이고, 25 mg의 PEG-인산염 분자를 첨가하였다. 상기 반응물을 60 ° C 에서 12 시간 동안 가열한 후 THF를 제거하고, 5 mL의 물을 첨가한 다음, 이를 200 nm 실린지 필터로 여과하였다. 과량의 고분자를 제거하기 위하여 상기 생성물을 2 일간 탈염수에서 투석을 통해 정제하였고 (MW cutoff of 12 kDa), 감압 하에서 동결건조하였다. 최종적으로 수득한 인산염이 결합된 고분자로 코팅된 산화철 나노입자는 수용액 상에서 안정하게 분산되었다.

[0055] **실험예 1. 인산염이 결합된 고분자로 코팅된 산화철 나노입자의 특성 분석**

[0056] **1-1. XPS 분석**

[0057] 상기 실시예 1에서 제조한 인산염이 결합된 고분자로 코팅된 산화철 나노입자의 표면을 분석하기 위하여, XPS (X-ray photoelectron spectroscopy) 측정기를 이용하여 분석하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0058] 도 3에 나타낸 바와 같이, 6 nm크기의 인산염이 결합된 고분자로 코팅된 산화철 나노입자의 전형적인 스펙트럼이 확인되었다. 이를 구체적으로 살펴보면, C 1s 스펙트럼 (도 3의 (a)) 결과, 285.2, 286.8 및 289.1 eV의 세 피크에서 broad shoulder가 나타났으며, 이것은 각각 C-C, C-O 및 COOH 그룹에 의한 것이다. 또한, O 1s 스펙트럼 (도 3의 (b))결과, 532.7, 531.2 및 529.8 eV에서 피크가 나타났으며, 이것은 C-O, P-O 및 메탈 옥사이드에 있는 산소에 의한 것이다. 또한, P 2p 스펙트럼 (도 3의 (c))결과, 132.5 및 133.5 eV에서 피크가 나타났으며, 이것은 P 2p<sub>3/2</sub> 및 P 2p<sub>1/2</sub>에 의한 것이다. 또한, Fe 2p 스펙트럼 (도 3의 (d)) 결과, 710 및 724 eV에서 피크가 나타났으며, 이것은 Fe-O 결합에 의한 것이고,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 의 스펙트럼의 전형적인 모습이다.

[0059] **1-2. EDX 분석**

[0060] 상기 실시예 1에서 제조한 인산염이 결합된 고분자로 코팅된 산화철 나노입자의 표면을 분석하기 위하여, EDX detector (Horiba)를 갖춘 Hitachi FE-SEM을 이용하여 EDX (Energy dispersive X-ray spectroscopy)를 분석하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0061] 도 4에 나타낸 바와 같이, 인산염이 산화철 나노입자의 표면에 코팅된 것을 확인하였다.

[0062] **1-3. FT-IR 분석**

[0063] 상기 실시예 1에서 제조한 인산염이 결합된 고분자로 코팅된 산화철 나노입자의 표면을 분석하기 위하여, FT-

IR(Shimadzu IRPrestige-21)을 이용하여 분석하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0064] 도 5에 나타난 바와 같이, 리간드 치환 전 (도 5의 (a))과 후 (도 5의 (b))에 밴드의 차이가 있음을 확인하였다. 특히, 리간드 치환 전의 올레산으로 코팅된 산화철 나노 입자는 올레일 사슬의 대칭적인 및 비대칭적인 C-H에 의해 2852 및 2923cm<sup>-1</sup>에서 강한 흡수 밴드를 보여주었으나, 리간드 치환에 의해 인산염이 결합된 고분자로 코팅된 산화철 나노입자에서는 상기 밴드의 세기가 약해지는 것을 확인하였다. 또한, 1735 cm<sup>-1</sup> (C=O)에서의 새로운 흡수 밴드를 통해 카르복실산 그룹이 존재하며, 이를 통해 나노입자 표면에서 리간드 치환이 이루어질 수 있음을 확인하였다.

[0065] **1-4. TEM 분석**

[0066] 상기 실시예 1에서 제조한 인산염이 결합된 고분자로 코팅된 산화철 나노입자의 형태를 분석하기 위하여, 100 kV에서 Hitachi H7650 TEM을 이용하여 TEM (투과전자현미경, Transmission electron microscopy) 사진을 촬영하였다. 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0067] 도 6에 나타난 바와 같이, 인산염이 결합된 고분자로 코팅된 산화철 나노입자는 리간드 치환 전 (도 6의 (a))과 후 (도 6의 (b))에 코어 사이즈에 현저한 변화가 없으며, 수용액 상에서 어떠한 뭉침 없이 안정하게 분산되어 있음을 확인하였다.

[0068] 이상의 실험 결과를 통하여, 실시예 1의 제조방법에 의해 산화철 나노입자에 인산염이 결합된 고분자가 효율적으로 코팅되었으며, 상기 산화철 나노입자는 6nm의 미세하고 균일한 크기로 수용액 상에서 고르게 분산되어 있음을 확인하였다.

[0069] **실험예 2. 세포 독성 조사**

[0070] 실시예 1에서 제조한 인산염이 결합된 고분자로 코팅된 산화철 나노입자의 세포독성을 확인하기 위하여, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 어세이를 수행하였다. 보다 구체적으로는, 마우스 대식세포 (RAW 264.7)를 96웰 플레이트에 세포 농도가 1×10<sup>4</sup> cells/well이 될 때까지, 37℃, 5% CO<sub>2</sub>의 조건에서 배양하였다. 최종 농도가 50, 100, 150 및 200 µg ml<sup>-1</sup> 인 인산염이 결합된 고분자로 코팅된 산화철 나노입자를 상기 세포에 첨가하고, 48시간 동안 배양하였다. 상기 세포를 PBS를 이용하여 2번 세척하고, 새 배지를 다시 채운 후, MTT 시약을 이용하여 세포 독성을 확인하였으며, 이를 도 7에 나타내었다.

[0071] 도 7에 나타난 바와 같이, 인산염이 결합된 고분자로 코팅된 산화철 나노입자는 200 µg ml<sup>-1</sup>의 고농도에서도 세포 독성을 나타내지 않았다. 상기 농도는 종래에 마우스 MRI 조영제로 이용되는 철의 농도를 초과하는 것이다. 따라서, 상기 결과를 통하여 본 발명의 인산염이 결합된 고분자로 코팅된 산화철 나노입자는 세포 독성이 없어 조영제로 이용될 수 있음을 확인하였다.

[0072] **실험예 3. 자기공명 영상 촬영**

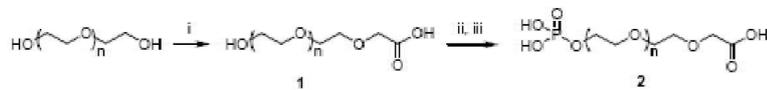
[0073] MR 시스템은 모션 아티팩트(motion artifact)를 최소화하고, 마우스 복부 (abdomen)의 MR 이미지를 스캐닝하는 동안 호흡 마취를 유지하기 위해 디자인되었다. 멀티슬라이스 스핀 에코 T<sub>1</sub>-weighted 이미지 (repetition time [TR], 361.5 ms; echo time [TE], 11 ms; flip angle [FA], 180°; number of signals acquired, 25; field of view [FOV], 25.6X25.6 mm; matrix size, 256X256; slice thickness, 0.5 mm; interslice distance, 0.5 mm; acquisition time, 10 minutes 20 seconds) 및 refocused 에코 T<sub>2</sub>-weighted 이미지 (TR, 3500 ms; TE, 36 ms; FA, 180°; number of signals acquired, 6; FOV, 25.6X25.6 mm; matrix size, 256X256; slice thickness, 0.5 mm; interslice distance, 0.5 mm; acquisition time, 11 minutes 12 seconds)와 함께 turbo rapid acquisition을 포함하는 MR 이미지가 수득되었다.

[0074] **3-1. 세포 내 (in vitro)에서의 MR 촬영**

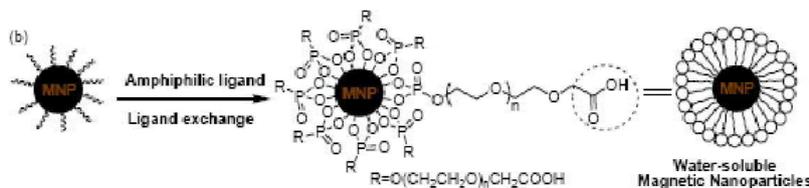
- [0075] 실시예 1에서 제조된 인산염이 결합된 고분자로 코팅된 산화철 나노입자의 MRI 조영제로서의 응용 가능성을 확인하기 위하여, 철 농도를 조절하여 자궁암 세포 (Hela cell) 또는 Raw264.7 세포를 이용하여, 세포 내에서의 MR 촬영을 수행하였다. 대조군으로는 상업적으로 이용되고 있는 산화철 MR 조영제인 Feridex를 이용하였다. 그 결과를 도 8에 나타내었다.
- [0076] 도 8에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 인산염이 결합된 고분자로 코팅된 산화철 나노입자는 크기 및 농도의존적인 T1-weighted 및 T2-weighted 자성 공명 조영제로서의 가능성을 나타내었다. 특히, 인산염이 결합된 고분자로 코팅된 산화철 나노입자는 높은 철 농도에서 높은 T1-weighted 및 낮은 T2-weighted 신호 세기를 나타냈으며, 이를 통해 대조군인 feridex와 비교해서도 T1 및 T2 조영제 증진 물질로 이용될 수 있음을 확인하였다.
- [0077] 3-2. 생체 내 (in vivo)에서의 MR 촬영
- [0078] 10 nm보다 작은 크기의 초상자성 산화철 나노입자는 정맥으로 주입될 수 있으며, 이는 림프절을 검출하는데 이용될 가능성이 있는 물질로 판단되기에, 생체 내에서의 MR 촬영을 수행하였다.
- [0079] 세 마리의 Balb/C 마우스를 가스배출 시스템을 이용한 아이소플루레인(isoflurane, 1% in 100% oxygen)으로 마취하였다. MR 사진을 촬영하고, 꼬리 정맥을 통해 0.2 mmol의 철 농도 (Kg body weight)<sup>-1</sup>의 인산염이 결합된 고분자로 코팅된 산화철 나노입자 (6 nm 또는 12 nm의 크기)를 주입하였다. 대조군으로는 상업적으로 이용되고 있는 산화철 MR 조영제인 Feridex를 이용하였다. 주입 24 시간 및 48 시간 후에 4.7-T animal MRI system (Pharmascan; Bruker, Ettlingen, Germany)을 이용하여 림프절의 T2-weighted MR 사진을 취득하였다. 그 결과를 도 9에 나타내었다.
- [0080] 도 9에 나타낸 바와 같이, 대조군에 비하여, 6 nm 또는 12nm 크기의 인산염이 결합된 고분자로 코팅된 산화철 나노입자는 림프절에 축적되었으며, 주입 24시간 후에, 신호 세기의 현저한 감소를 나타냄을 확인하였다. 상기 결과를 통하여, 본 발명의 인산염이 결합된 고분자로 코팅된 산화철 나노입자는 매우 뛰어난 생체적합성을 가지고 있으며, 오랫동안 혈류 내에서 순환할 수 있음을 확인하였다.

도면

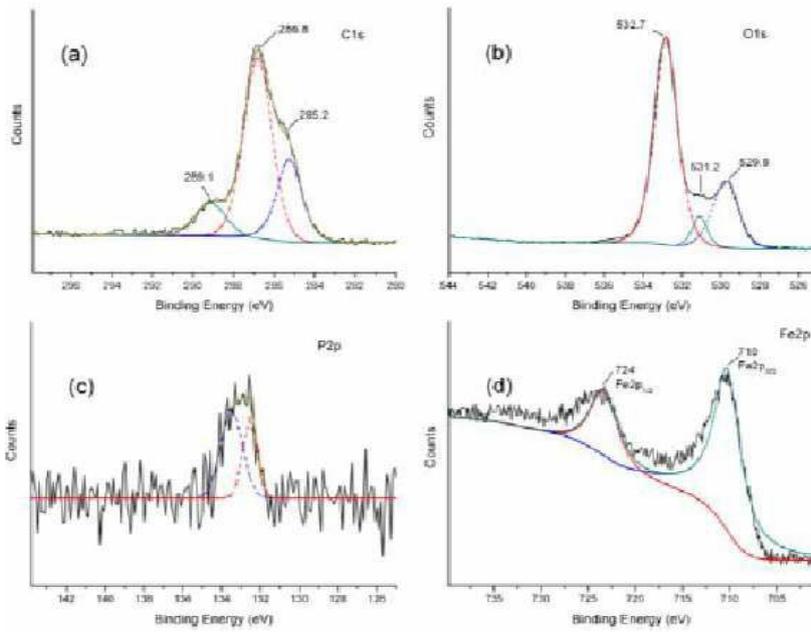
도면1



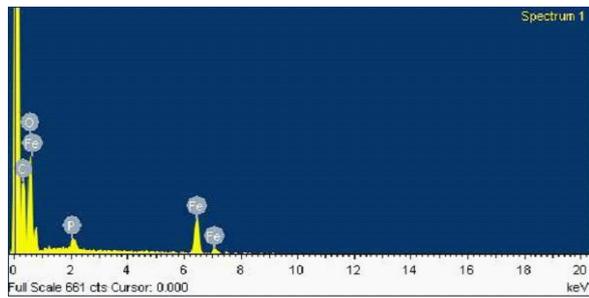
도면2



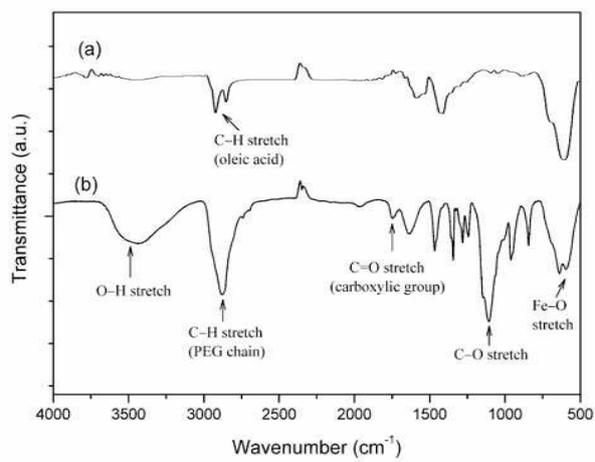
도면3



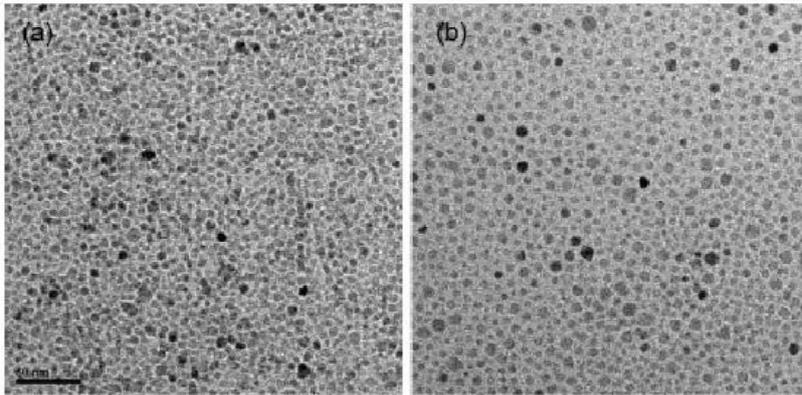
도면4



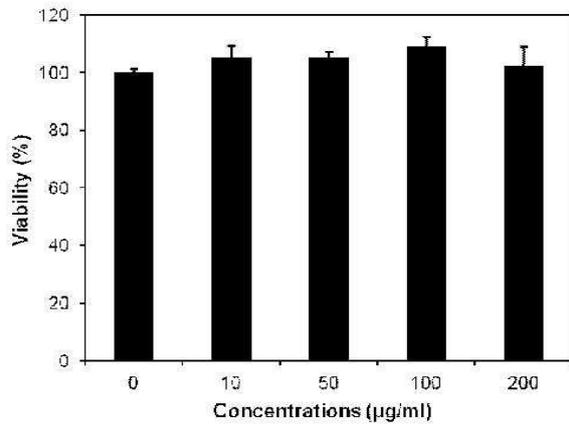
도면5



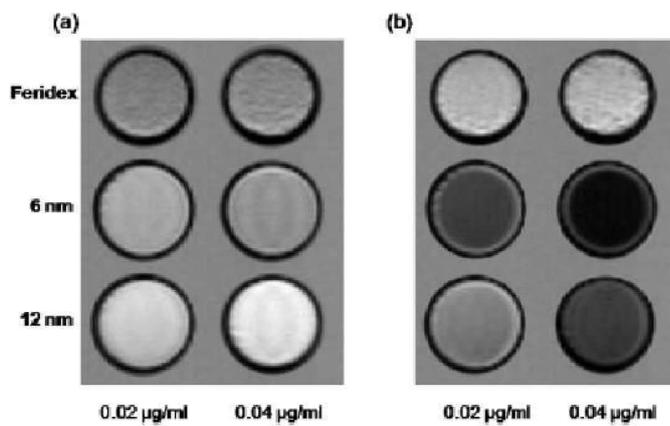
도면6



도면7



도면8



도면9

