(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0079364
(43) 공개일자 2020년07월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 49/22 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 49/223 (2013.01)
A61K 2123/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0168173
(22) 출원일자 2018년12월24일
심사청구일자 2018년12월24일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
김현철
서울특별시 영등포구 63로 7, B동 501호 (여의도동, 은하아파트)
장용호
서울특별시 마포구 독막로29길 42 201호 (신수동)
김도연
서울시 성북구 성북로4길 52, 110동 705호
(74) 대리인
김현진

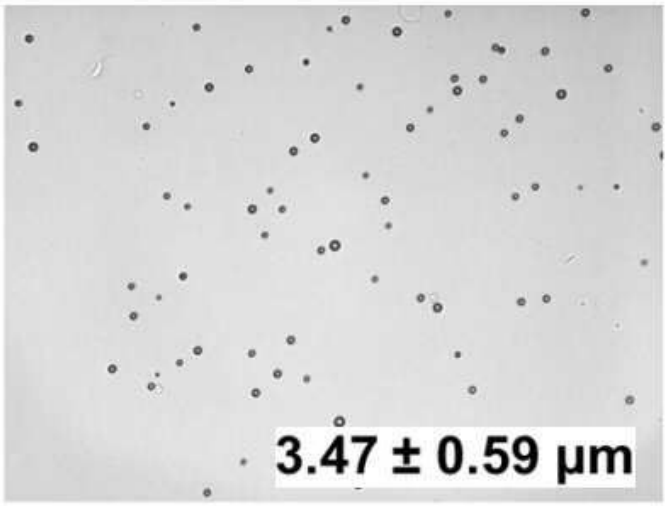
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **세포외 소포 기반의 초음파 조영제용 마이크로버블 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 세포외 소포 기반의 초음파 조영제용 마이크로버블 및 이의 제조방법에 대한 것으로, 더욱 상세하게는 멤브레인 형성물질에 일정 비율의 세포외 소포를 혼합하여 마이크로버블을 제조함으로써, 안정성이 향상되어 신체 내에서 보다 오래기간 동안 그 기능을 유지할 수 있고, 특정 세포나 조직으로 조영제를 효과적으로 유도할 수 있어, 초음파 조영을 효과를 극대화 할 수 있는 세포외 소포 기반의 초음파 조영제용 마이크로버블 및 이의 제조방법에 대한 것이다.

대 표 도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 H15C2797010017
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
연구사업명 유망보건의료기술사업
연구과제명 간암의 경동맥화학색전술 치료를 위한 항암제 함유 나노입자 · 마이크로버블 기반 차세대 약물전달시스템의 개발: 복합체 in vitro 평가 및 제조공정 최적화
기 여 율 0.5/0.5
주관기관 서강대학교 산학협력단
연구기간 2017.11.01 ~ 2018.08.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2017R1A2B2003194
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 중견연구자지원사업
연구과제명 질병의 복합적 특성 분석을 위한 광음향/초음파 - 공명 마이크로버블의 실시간 다중 표적 광음향 이미징 기술 개발
기 여 율 0.5/0.5
주관기관 서강대학교 산학협력단
연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

기체와, 상기 기체를 에워싸는 멤브레인을 포함하는 마이크로버블에 있어서,

상기 멤브레인은 멤브레인 형성물질과 세포외 소포가 융합되어 형성되는 것을 특징으로 하는 초음파 조영제용 마이크로버블.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 멤브레인의 형성물질은 지질이 사용되는 것을 특징으로 하는 초음파 조영제용 마이크로버블.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 세포외 소포는 초음파 조영을 목적하는 세포로부터 분리된 세포외 소포가 사용되는 것을 특징으로 하는 초음파 조영제용 마이크로버블.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 세포외 소포는 멤브레인 형성물질과 세포외 소포의 혼합물 대비 1 내지 25중량%로 사용되는 것을 특징으로 하는 초음파 조영제용 마이크로버블.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 세포외 소포는 멤브레인 형성물질과 세포외 소포의 혼합물 대비 5 내지 15중량%로 사용되는 것을 특징으로 하는 초음파 조영제용 마이크로버블.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 세포외 소포는 엑소좀 또는 마이크로비시클이 사용되는 것을 특징으로 하는 초음파 조영제용 마이크로버블.

청구항 7

모세포로부터 세포외 소포를 분리하는 세포외 소포 분리단계와; 멤브레인 형성물질과 상기 세포외 소포 분리단계에서 얻은 세포외 소포를 포함하는 혼합용액을 준비하는 혼합용액 형성단계와; 상기 혼합용액에 가스를 공급한 후 물질적 힘을 가해 가스를 에워싸며 멤브레인 형성물질과 세포외 소포가 융합되어 형성된 멤브레인을 가지는 마이크로버블을 형성하는 가스충진단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 초음파 조영제용 마이크로버블의 제조방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 세포외 소포 분리단계에서는 초음파 조영을 목적하는 세포로부터 세포외 소포를 분리하는 것을 특징으로 하는 초음파 조영제용 마이크로버블의 제조방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 세포외 소포는 멤브레인 형성물질과 세포외 소포의 혼합물 대비 1 내지 25중량%로 사용되는 것을 특징으로 하는 초음파 조영제용 마이크로버블.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 혼합용액 형성단계에서 세포외 소포는 멤브레인 형성물질과 세포외 소포의 혼합물 대비 5 내지 15중량%로 사용되는 것을 특징으로 하는 초음파 조영제용 마이크로버블의 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 세포외 소포 기반의 초음파 조영제용 마이크로버블 및 이의 제조방법에 대한 것으로, 더욱 상세하게는 멤브레인 형성물질에 일정 비율의 세포외 소포를 혼합하여 마이크로버블을 제조함으로써, 안정성이 향상되어 신체 내에서 보다 오래기간 동안 그 기능을 유지할 수 있고, 특정 세포나 조직으로 조영제를 효과적으로 유도할 수 있어, 초음파 조영을 효과를 극대화 할 수 있는 세포외 소포 기반의 초음파 조영제용 마이크로버블 및 이의 제조방법에 대한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 초음파 조영은 다른 의료 진단 방법과 다르게 방사선을 사용하지 않아 안전하고 실시간으로 영상을 구현할 수 있으며, 가격이 저렴하여 현재 많이 활용되고 있는 진단 기술이다. 하지만, 낮은 해상도와 분해능으로 인해 정확한 진단을 내리기 어려운 한계점을 가지고 있어, 이를 해결하기 위하여 마이크로버블을 이용한 초음파 조영제를 사용하고 있다. 상기 마이크로버블은 하기의 특허처럼 수 ~ 수십 마이크로미터의 직경을 가지는 미세기포로, 내부에 기체를 포함하고 있으며 표면물질(예컨대, 지질, 단백질, 고분자 등의 유기물질)이 상기 기체를 에워싸는 형태를 가진다. 즉, 조영제용 마이크로버블은 유기물질로 이루어진 쉘 내부에 기체가 충진된 형태를 가진다.

[0003] <특허문헌>

[0004] 공개특허 제10-2015-0109064호(2015. 10. 01. 공개) "약물을 함유한 나노입자가 결합된 이중-목적 PAT/초음파 조영제 및 이의 제조방법"

[0005] 하지만, 현재 상용화된 초음파 조영제는 신체 내에서 불안정하여 빠르게 그 기능을 잃는 문제가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로,

[0007] 본 발명은 신체 내에서 보다 오래가고 특정 세포 또는 조직의 초음파 조영을 극대화 할 수 있는 세포외 소포 기반의 초음파 조영제용 마이크로버블 및 이의 제조방법을 제공하는데 그 목적이 있다.

[0008] 또한, 본 발명은 멤브레인 형성물질에 일정 비율의 세포외 소포를 혼합하여 마이크로버블을 제조함으로써, 안정성이 향상되어 신체 내에서 보다 오래기간 동안 그 기능을 유지할 수 있는 세포외 소포 기반의 초음파 조영제용 마이크로버블 및 이의 제조방법을 제공하는데 그 목적이 있다.

[0009] 또한, 본 발명은 모세포의 membrane protein 종류 및 표적 세포의 세포막 특성 등에 의해 특정 세포에 높은 선택적 표적능을 보이는 세포외 소포를 이용하여, 특정 세포나 조직으로 조영제를 효과적으로 유도할 수 있는 세포외 소포 기반의 초음파 조영제용 마이크로버블 및 이의 제조방법을 제공하는데 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 앞서 본 목적을 달성하기 위하여 다음과 같은 구성을 가진 실시예에 의해 구현된다.

[0011] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 초음파 조영제용 마이크로버블은 기체와, 상기 기체를 에워싸는 멤브레인을 포함하며, 상기 멤브레인은 멤브레인 형성물질과 세포외 소포가 융합되어 형성되는 것을 특징으로 한다.

[0012] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 초음파 조영제용 마이크로버블에 있어서 상기 멤브레인의 형성물질은 지질이 사용되는 것을 특징으로 한다.

[0013] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 초음파 조영제용 마이크로버블에 있어서 상기 세포외 소포는 초음파 조영을 목적하는 세포로부터 분리된 세포외 소포가 사용되는 것을 특징으로 한다.

[0014] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 초음파 조영제용 마이크로버블에 있어서 상기 세포외 소포는 멤브레인 형성물질과 세포외 소포의 혼합물 대비 1 내지 25중량%로 사용되는 것을 특징으로 한다.

[0015] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 초음파 조영제용 마이크로버블에 있어서 상기 세포외 소포는 멤브레인 형성물질과 세포외 소포의 혼합물 대비 5 내지 15중량%로 사용되는 것을 특징으로 한다.

[0016] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 초음파 조영제용 마이크로버블에 있어서 상기 세포외 소포는 엑소좀 또는 마이크로비시클이 사용되는 것을 특징으로 한다.

[0017] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 초음파 조영제용 마이크로버블의 제조방법은 모세포로부터 세포외 소포를 분리하는 세포외 소포 분리단계와; 멤브레인 형성물질과 상기 세포외 소포 분리단계에서 얻은 세포외 소포를 포함하는 혼합용액을 준비하는 혼합용액 형성단계와; 상기 혼합용액에 가스를 공급한 후 물질적 힘을 가해 가스를 에워싸며 멤브레인 형성물질과 세포외 소포가 융합되어 형성된 멤브레인을 가지는 마이크로버블을 형성하는 가스충진단계;를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0018] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 초음파 조영제용 마이크로버블의 제조방법에 있어서 상기 세포외 소포 분리단계에서는 초음파 조영을 목적하는 세포로부터 세포외 소포를 분리하는 것을 특징으로 한다.

[0019] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 초음파 조영제용 마이크로버블의 제조방법에 있어서 상기 세포외 소포는 멤브레인 형성물질과 세포외 소포의 혼합물 대비 1 내지 25중량%로 사용되는 것을 특징으로 한다.

[0020] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 초음파 조영제용 마이크로버블의 제조방법에 있어서 상기 혼합용액 형성단계에서 세포외 소포는 멤브레인 형성물질과 세포외 소포의 혼합물 대비 5 내지 15중량%로 사용되는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0021] 본 발명은 앞서 본 실시예에 의해 다음과 같은 효과를 얻을 수 있다.

[0022] 본 발명은 신체 내에서 보다 오래가고 특정 세포 또는 조직의 초음파 조영을 극대화 할 수 있는 효과가 있다.

[0023] 또한, 본 발명은 멤브레인 형성물질에 일정 비율의 세포외 소포를 혼합하여 마이크로버블을 제조함으로써, 안정성이 향상되어 신체 내에서 보다 오래기간 동안 그 기능을 유지할 수 있는 효과가 있다.

[0024] 또한, 본 발명은 모세포의 membrane protein 종류 및 표적 세포의 세포막 특성 등에 의해 특정 세포에 높은 선택적 표적능을 보이는 세포외 소포를 이용하여, 특정 세포나 조직으로 조영제를 효과적으로 유도할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 종래의 마이크로버블(MBs)과, 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로버블(EV-MBs)의 모식도.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 다른 마이크로버블의 제조에 사용되는 마이크로 플루이딕 채널의 이미지.

도 3 및 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로버블의 광학현미경 이미지.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로버블의 현광현미경 이미지.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로버블의 안정성 분석 결과를 나타내는 도표.

도 7은 세포외 소포의 함유 비율에 따른 마이크로버블의 안정성 분석 결과를 나타내는 도표.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로버블의 공명주파수 분석 결과를 나타내는 도표.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로버블의 초음파 조영능을 확인하기 위한 초음파 이미지.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로버블의 표적능을 확인하기 위한, 공초점 현미경 이미지.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로버블의 표적능을 평가하기 위한, 유세포 측정기(Flow cytometry)를 이용한 분석결과를 나타내는 도표.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 이하에서는 본 발명에 따른 세포외 소포 기반의 초음파 조영제용 마이크로버블 및 이의 제조방법을 첨부된 도면을 참조하여 상세히 설명한다. 특별한 정의가 없는 한 본 명세서의 모든 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 기술자가 이해하는 당해 용어의 일반적 의미와 동일하고 만약 본 명세서에 사용된 용어의 의미와 충돌하는 경우에는 본 명세서에 사용된 정의에 따른다. 또한, 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 공지 기능 및 구성에 대해 상세한 설명은 생략한다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0028] 본 발명의 일 실시예에 따른 세포외 소포 기반의 초음파 조영제용 마이크로버블을 도 1 내지 11을 참조하여 설명하면, 상기 마이크로버블은 기체와, 상기 기체를 에워싸는 멤브레인을 포함한다.

[0029] 상기 마이크로버블은 체내에 주입되어 초음파 조영제로 사용되는데, 멤브레인(membrane)이 내부의 기체(core gas)를 에워싸는 형태를 가지며, 상기 기체는 공지된 기체를 제한 없이 사용할 수 있으며, 일 예로서 이산화탄소, 헬륨, 질소, 아르곤, 설퍼 헥사플루오라이드, 퍼플루오르화 기체 등을 사용할 수 있다. 상기 기체는 불소가스가 포함된 불화물이 바람직하고, 예로는 퍼플루오로프로판(C_3F_8), 설퍼헥사플루오라이드(SF_6), 퍼플루오로펜탄(perfluoropentane), 데카플루오로부탄(decafluorobutane) 및 퍼플루오로헥산(perfluorohexane) 등이 있다.

[0030] 상기 멤브레인은 멤브레인 형성물질과 세포외 소포가 융합되어 형성되는데, 멤브레인 형성물질은 마이크로버블의 멤브레인을 형성하기 위한 종래의 물질이 사용될 수 있으며, 예컨대 단백질 또는 지질이 사용될 수 있으며 바람직하게는 인지질이 사용될 수 있다. 상기 세포외 소포(Extracellular vesicle)는 멤브레인 형성물질에 혼합사용되어 상기 멤브레인 형성물질과 함께 멤브레인을 형성하는 구성으로, 다양한 세포의 exosome, microvesicle 등이 사용될 수 있다. 상기 세포외 소포는, 물리적 방법 등을 포함하여 여러 방법에 의해 모세포로부터 분리될 수 있으며, 초음파 조영을 목적하는 세포로부터 분리된 세포외 소포가 사용되는 것이 바람직하며, 멤브레인의 형성물질(단백질 또는 지질)과 세포외 소포의 혼합물 대비 1 내지 25중량%로 사용되는 것이 바람직하며, 5 내지 15중량%로 사용되는 것이 더욱 바람직하다. 세포외 소포가 25중량%보다 많이 사용되는 경우 멤브레인 형성할 수 없게 된다. 종래 마이크로버블을 형성시 지질 등을 이용하여 멤브레인을 형성하는데 이 경우 제조된 마이크로버블의 안정성이 떨어지게 되므로, 본 발명은 기존 멤브레인 형성물질(지질 등)에 세포외 소포가 일정 비율로 혼합사용되어, 즉 기존 멤브레인 형성물질과 세포외 소포가 융합되어 멤브레인을 형성하므로, 마이크로버블의 안정성을 향상시킬 수 있고, 세포외 소포의 막단백질의 존재로 인해 특정 세포로의 표적능을 가지게 되어, 특정 세포 또는 조직의 초음파 조영을 극대화할 수 있다.

[0032] 본 발명의 다른 실시예에 따른 세포외 소포 기반의 초음파 조영제용 마이크로버블의 제조방법을 설명하면, 상기 마이크로버블의 제조방법은 세포외 소포 분리단계, 혼합용액 형성단계, 가스충진단계 등을 포함한다.

[0033] 상기 세포외 소포 분리단계는 모세포로부터 세포외 소포를 분리하는 단계로, 물리적 방법 등을 포함하여 공지의 여러 방법이 사용될 수 있다. 상기 세포외 소포는 모세포의 막 조성과 동일(또는 유사)한 막 조성을 가지며 모세포의 세포질 부분 등을 포함하므로, 상기 세포외 소포 분리단계에서 초음파 조영을 목적하는 세포로부터 세포외 소포를 분리하고, 이를 이용하여 마이크로버블을 형성하는 경우, 상기 마이크로버블의 목적하는 세포로의 표적능을 향상시킬 수 있게 된다.

[0034] 상기 혼합용액 형성단계는 마이크로버블의 멤브레인을 형성하기 위한 물질(단백질, 지질 등)과 상기 세포외 소포 분리단계에서 얻은 세포외 소포를 포함하는 혼합용액을 준비하는 단계로, 바람직하게는 상기 세포외 소포는 마이크로버블의 멤브레인을 형성하기 위한 물질 및 세포외 소포의 혼합물 대비 1 내지 25중량%로 사용되는 것이

바람직하며, 5 내지 15중량%로 사용되는 것이 더욱 바람직하다. 상기 세포외 소포가 위 수치 범위(5 내지 15중량%)에서 사용되는 경우 제조된 마이크로버블의 안정성을 더욱 향상시킬 수 있다.

[0035] 상기 가스충진단계는 상기 혼합용액에 가스를 공급한 후 물질적 힘을 가해 가스를 에워싸며, 멤브레인 형성물질과 세포외 소포가 융합되어 형성된 멤브레인을 가지는 마이크로버블을 형성하는 단계로, 상기 가스충진단계는 종래의 vial mixer, 미세 유체 시스템을 이용한 방법이 이용될 수 있다. 예컨대, vial mixer를 이용한 방법의 경우 혼합용액이 들어있는 vial에 기체를 채우고 vial mixer를 이용하여 흔들어 버블을 형성하게 되며, 미세 유체 시스템을 이용한 방법의 경우 혼합용액과 기체를 프루이딕 채널에 주입해 버블을 형성하게 된다. 위와 같은 방법에 의해 만들어진 마이크로버블은 향상된 안정성을 가지고 세포 표적능이 뛰어나 초음파 조영능을 극대화할 수 있으며, 마이크로버블의 특징을 그대로 가져올 수 있으므로 기존의 마이크로버블처럼 약물을 담지 할 수 있고, microfluidics system을 사용할 수 있기 때문에 버블의 크기를 보다 정확하게 조절할 수 있어 서로 다른 공명주파수를 통한 multicolor imaging하는 것도 가능하다.

[0037] 이하, 실시예를 통해서 본 발명을 보다 상세히 설명하기로 한다. 하지만, 이들은 본 발명을 보다 상세하게 설명하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 권리범위가 이에 한정되는 것은 아니다.

[0039] <실시예 1> 초음파 조영제용 마이크로버블의 제조

[0040] 1. 세포외 소포를 포함하는 마이크로버블의 제조(vial mixer 방법 이용)

[0041] (1) 세포외 소포(Extracellular Vesicle, EV)로는 MIA-PACA-2 AR 세포의 microvesicle(MV)이 사용되었으며, 구체적으로 cell medium(DMEM)을 100.000g로 11시간 원심분리하여 상층액만 취한 EV free DMEM을 사용하여 이틀 동안 MIA-PACA-2 AR 세포를 배양한 후, 상기 medium을 300g로 10분 원심분리하여 상층액을 취하고(cell 제거), 상기 상측액을 2,000g로 10분 원심분리 후 상층액을 취하고(cell debris 제거), 상기 상측액을 10,000g로 30분을 원심분리한 후 침전물을 얻은 후 PBS로 분산시켜 다시 10,000g로 30분을 원심분리하여 분순물을 제거하여 마이크로비시클(MV)를 얻었다.

[0042] (2) 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DSPC)와, 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[succinyl(polyethylene glycol)-2000](DSPE-PEG2k)를 9:1의 몰비로 혼합한 후 1mg/vial이 되도록 chloroform에 녹이고 질소를 통해 chloroform을 증발시켜 건조된 phospholipid를 형성하였다.

[0043] (3) 상기 건조된 phospholipid와 MV를 9:1의 질량비로 혼합하고 1mg/ml이 되게 PBS를 넣고 bath sonicator로 건조된 phospholipid를 수용액 상으로 분산시킨 뒤, tip sonicator로 amplitude 20%, cycle 100%로 30초 동안 sonication, 30초 휴식의 과정을 3번 반복한 후, C_3F_8 가스를 vial에 가득 채우고 vial mixer를 이용하여 20s간 흔들어 만들어진 버블을 15ml snap tube로 옮겨 5분간 중력 하에서 버블이 떠오르기는 기다려서, 떠오른 버블을 제거하고 나머지를 5ml 주사기에 옮겨 용액의 양이 2ml이 되게 PBS를 추가하고, 주사기 입구를 파라필름으로 봉한 뒤 20g로 1분간 원심분리 시킨 후, 떠오른 버블을 제거하고 다시 용액을 2ml로 만들고 위 과정을 반복하여, 원심분리 후 용액이 투명해질 때까지 위 과정을 반복하여 세포외 소포를 포함하는 마이크로버블(Microvesicle-Microbubble, MV-MB)을 얻었다. 상기 MV-MB는 GP 용액(glycerol와 propylene glycol이 1:1의 부피로 혼합되어 형성)이 10% 포함된 PBS 200ul와 혼합된 후 1ml syringe에 보관되었다.

[0044] 2. 마이크로버블의 제조

[0045] 상기 건조된 phospholipid와 MV의 혼합물 대신에 상기 건조된 phospholipid를 사용한 것을 제외하고는 다른 조건을 실시예 1의 1과 동일하게 하여 마이크로버블(Microbubble, MB)를 얻었다.

[0046] 3. 세포외 소포를 포함하는 마이크로버블의 제조(미세유체시스템 이용)

[0047] (1) PDMS base와 경화제(curing agent)를 10:1의 질량비로 혼합하여 Silicon wafer틀(mould) 위에 부어 경화시킨 뒤, 적절한 크기로 다듬어서 도 2에 도시된 형태의 마이크로 플루이딕 채널을 제조하고, A 부위에 기체를 공급하는 관을 연결하고, B 부위에 용액을 공급하는 관을 연결하였다.

[0048] (2) 실시예 1의 1에서 얻은 건조된 phospholipid와 MV를 9:1의 질량비로 혼합하고 1mg을 취해 용매(4mg/ml NaCl, 2% v/v Tween20, DW) 900ul와 혼합하고 bath sonicator를 이용해 분산시키고, GP 용액 100ul를 추가로

넣고 bath sonicator를 이용해 분산시켜 유기물질 용액을 얻었다. A 부위를 통해 C_3F_8 가스를 공급하고, B 부위를 통해 상기 유기물질 용액을 공급하여(가스의 압력은 15.4psi이고, 용액의 압력은 29.7psi이고, flow rate는 55.6ul/min이 되도록 함), 세포외 소포를 포함하는 마이크로버블을 제조하였다.

[0050] <실시예 2> 초음파 조영제용 마이크로버블의 물성 확인

[0051] 1. 실시예 1의 1에서 제조된 MV-MB와 실시예 1의 2에서 제조된 MB를 광학현미경을 이용하여 촬영하고 입자 크기 분석 프로그램을 통한 입자 크기를 측정하여 도 3에 나타내었다. 또한, 실시예 1의 3에서 제조된 세포외 소포를 포함하는 마이크로버블을 대해서도 광학현미경을 이용하여 촬영하고 입자 크기 분석 프로그램을 통한 입자 크기를 측정하여 도 4에 나타내었다.

[0052] 2. 도 3을 보면, 세포외 소포가 포함되어도 마이크로버블이 잘 형성됨을 알 수 있고, MB의 경우 3.5um의 평균 크기를 가지고 MV-MB의 경우 3.9um의 평균 크기를 가지는 것을 확인할 수 있어 세포외 소포의 추가로 인해 마이크로버블 크기에 큰 변화가 없음을 알 수 있다. 또한, 도 4를 통해 vial mixer 방법뿐만 아니라 미세유체시스템을 이용하여도 세포외 소포가 포함된 마이크로버블을 제조할 수 있음을 알 수 있다.

[0054] <실시예 3> 초음파 조영제용 마이크로버블의 구성 성분 확인

[0055] 1. amine 작용기가 있어야 결합할 수 있는 형광 염료 Alexa-555-NHS(즉, 단백질을 타겟팅하는 형광 염료)를 이용하여 실시예 1의 1 및 2에서 제조된 MB와 MV-MB를 염색한 후, 현광 현미경을 이용하여 촬영하여 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0056] 2. 도 5를 보면, MB와 달리 MV-MB의 경우 멤브레인 전체에 걸쳐 형광이 발현되는 것을 확인할 수 있어, MV-MB에는 막단백질이 잘 분포되어 있음을 알 수 있다.

[0058] <실시예 4> 초음파 조영제용 마이크로버블의 안정성 평가

[0059] 1. 실시예 1의 1 및 2에 따라 제조되어 밀봉 상태로 보관 중인 MB와 MV-MB를 시간에 따라 광학현미경으로 촬영하고 입자 크기 분석 프로그램을 이용하여 입자 크기를 분석하여, 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0060] 2. 도 6을 보면, MB의 경우 시간에 따라 점점 크기가 작아져 24 시간 안에 완전히 사라지는데 반해, MV-MB의 경우 48시간 까지는 크기 변화가 거의 없는 것을 확인할 수 있어, MV-MB가 MB보다 안정성이 현저하게 뛰어남을 알 수 있다.

[0062] <실시예 5> 세포외 소포 비율에 따른 초음파 조영제용 마이크로버블의 안정성 평가

[0063] 1. 건조된 phospholipid와 MV의 혼합 질량비를 달리한 것을 제외하고는 다른 조건을 실시예 1의 1과 동일하게 하여 MV-MB를 제조하였다.

[0064] 2. 실시예 1의 1 및 2에서 제조한 MB(0%), MV-MB(10%), 실시예 5의 1에서 제조한 MV-MB들(5, 15, 20%)을 100분의 1로 희석해서 UV/Vis spectrometry로 흡광도를 측정하여 안정성을 평가하여 그 결과를 도 7에 나타내었다. 도 7에서 X%는 MV의 질량/(phospholipid의 질량+MV의 질량)×100의 값을 나타낸다.

[0065] 3. 도 7을 보면, 실시예 4의 실험 결과와 마찬가지로 세포외 소포가 포함되지 않은 마이크로버블(MV)의 경우 시간이 지남에 따라 급격하게 안정성이 떨어짐을 확인할 수 있으며, 세포외 소포가 5 내지 15% 포함된 마이크로버블(MV-MB)의 경우 오랜 시간 동안 높은 안정성을 가지고, 세포외 소포가 20% 포함된 마이크로버블(MV-MB)의 경우 상대적으로 안정성이 떨어짐을 확인할 수 있어, 세포외 소포를 일정 비율로 포함시킬 때 마이크로버블의 안정성을 더욱 높일 수 있음을 알 수 있다.

[0067] <실시예 6> 초음파 조영제용 마이크로버블의 안정성 평가

[0068] 1. 실시예 1의 1 및 2에서 제조된 MB와 MV-MB에 대하여, 공명주파수를 분석하여 그 결과를 도 8에 나타내었고,

초음파 영상을 얻어 도 9에 나타내었다. 공명주파수 분석은 MB와 MV-MB를 희석한 후 0.2MHz 간격으로 초음파를 쏜 후 초음파 감쇠량을 측정하여 초음파 감쇠가 가장 큰 부분을 확인하였으며, 초음파 영상은 마이크로버블을 agarose를 통해 만든 gel phantom에 위치시킨 후 영상을 획득하는 종래의 방법이 이용되었으며, 이 과정에서 2-5MHz의 transducer를 이용하는 상용화된 초음파 진단기기가 사용되었다.

[0069] 2. 도 8을 보면 MB(4MHz)와 MV-MB(3.6MHz)는 약간의 공명주파수 차이가 있음을 확인할 수 있으나 그 차이가 의료용 초음파로써 의미 있는 수준이 아님을 확인할 수 있고, 도 9를 보면 세포외 소포가 혼합되어도 초음파 조영능에는 유의미한 변화가 없음을 확인할 수 있어, MV-MB가 현재의 초음파 시스템에 그대로 적용이 가능하여 높은 상용화 가능성을 가짐을 알 수 있다.

[0071] <실시예 7> 초음파 조영제용 마이크로버블의 표적능 확인

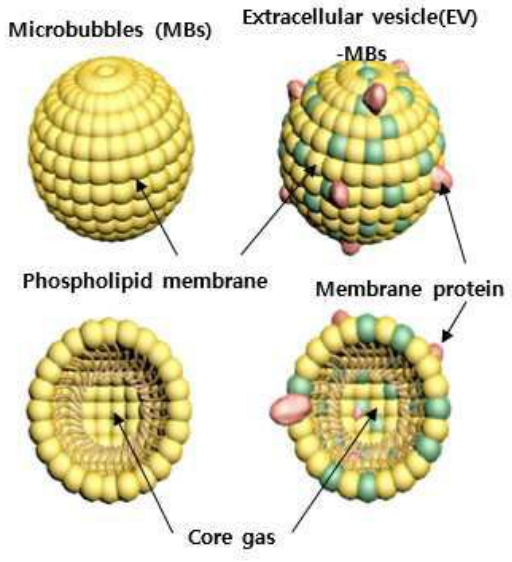
[0072] 1. 실시예 1의 1 및 2에서 제조된 MV-MB의 세포 표적능을 평가하기 위해, 공초점 현미경을 이용하여 이미지화하여 그 결과를 도 10에 나타내었고, 유세포 측정기(Flow cytometry)를 이용하여 분석하여 그 결과를 도 11에 나타내었다. 공초점 현미경을 이용한 분석은 형광염료 DAPI로 염색된 MIA-PACA-2 세포(1×10^5) 및 HUVEC 세포(1×10^5) 각각에 형광염료 DiI로 염색된 MV-MB를 처리하여 수행하였다. 또한, 유세포 측정기를 이용한 분석은 MIA-PACA-2 세포(1×10^4) 및 HUVEC 세포(1×10^4) 각각에 형광 염료 DiO가 표지된 MVO-MB를 처리한 후 FACCS를 통해 형광량을 측정하여 수행하였다.

[0073] 2. 도 10 및 11을 보면, MV-MB는 정상세포인 HUVEC 세포에 비해 MIA-PACA-2 세포에 더 많이 표적되는 것을 확인할 수 있어, 진단하고자 하는 세포로부터 분리된 세포외 소포가 포함된 마이크로버블을 이용하여, 목적하는 세포 또는 조직의 초음파 조영을 극대화할 수 있음을 알 수 있다.

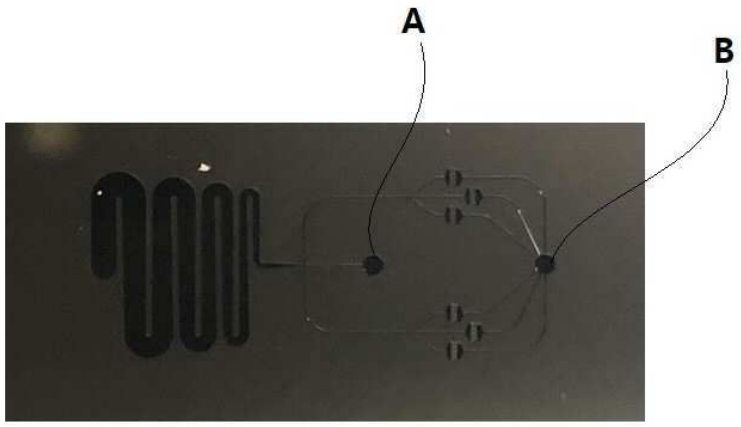
[0075] 이상에서, 출원인은 본 발명의 바람직한 실시예들을 설명하였지만, 이와 같은 실시예들은 본 발명의 기술적 사상을 구현하는 일 실시예일 뿐이며 본 발명의 기술적 사상을 구현하는 한 어떠한 변경예 또는 수정예도 본 발명의 범위에 속하는 것으로 해석되어야 한다.

도면

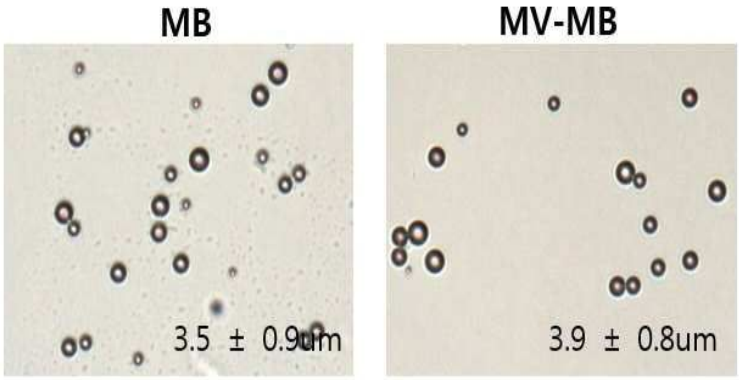
도면1



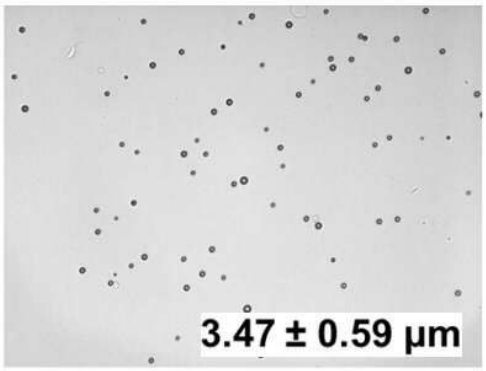
도면2



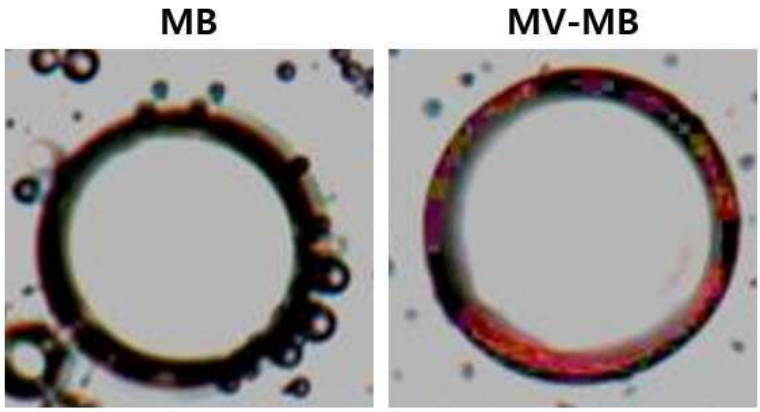
도면3



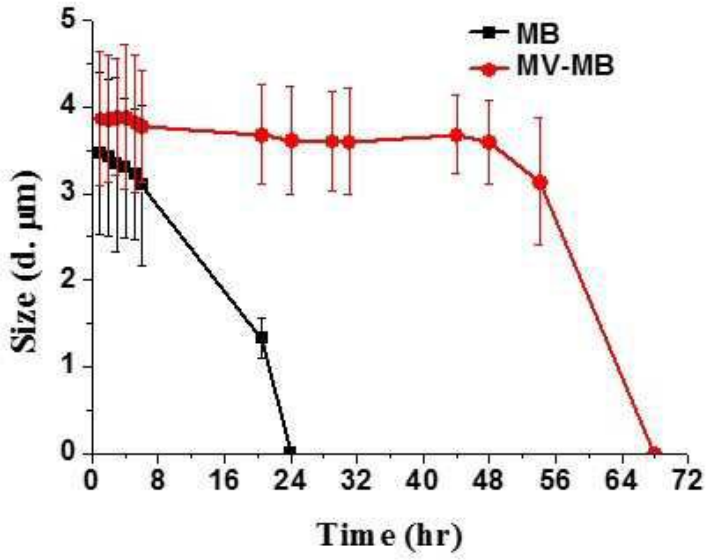
도면4



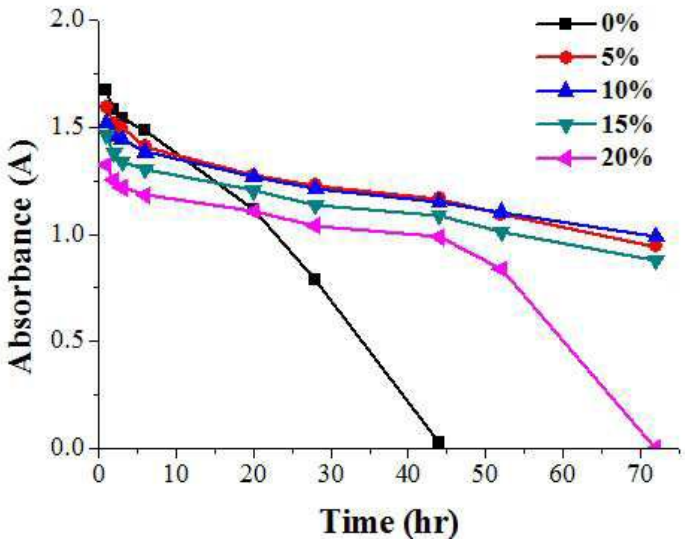
도면5


MB
MV-MB

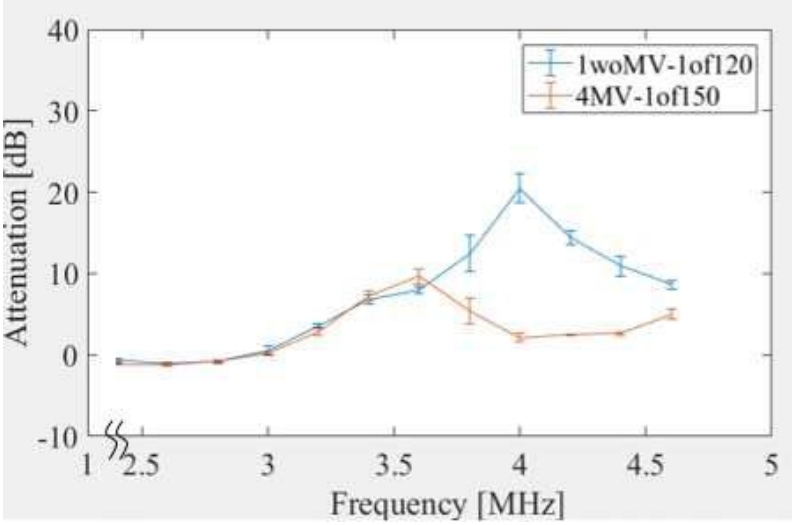
도면6


MB
MV-MB
Size (d. μm)
Time (hr)
0
1
2
3
4
5
0
8
16
24
32
40
48
56
64
72

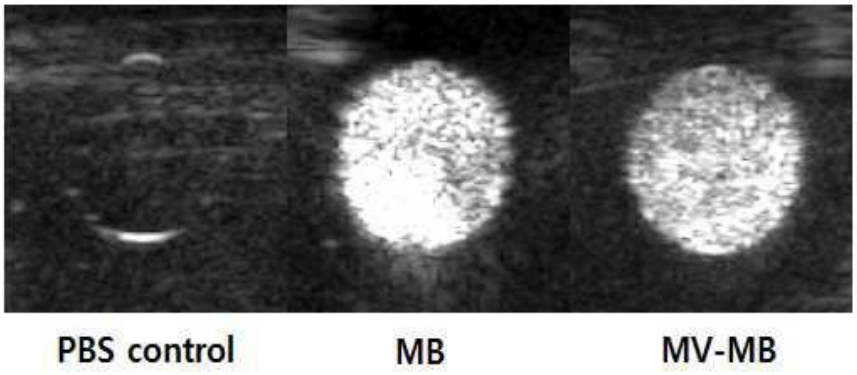
도면7


0%
5%
10%
15%
20%
Absorbance (A)
Time (hr)
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
0
10
20
30
40
50
60
70

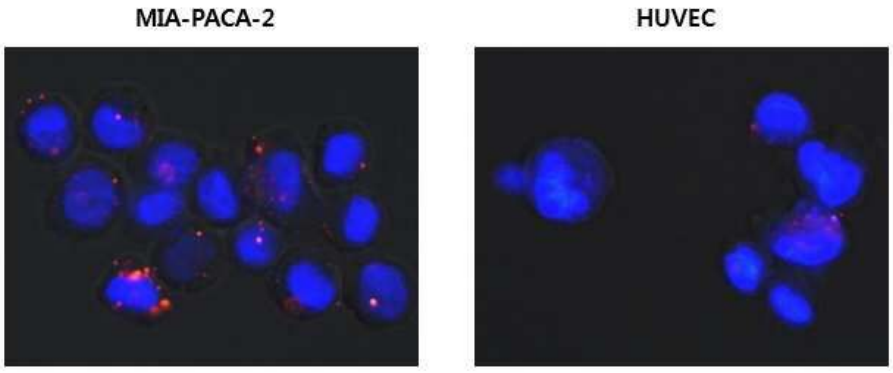
도면8


40
30
20
10
0
-10
Attenuation [dB]
1
2.5
3
3.5
4
4.5
5
Frequency [MHz]
1woMV-1of120
4MV-1of150

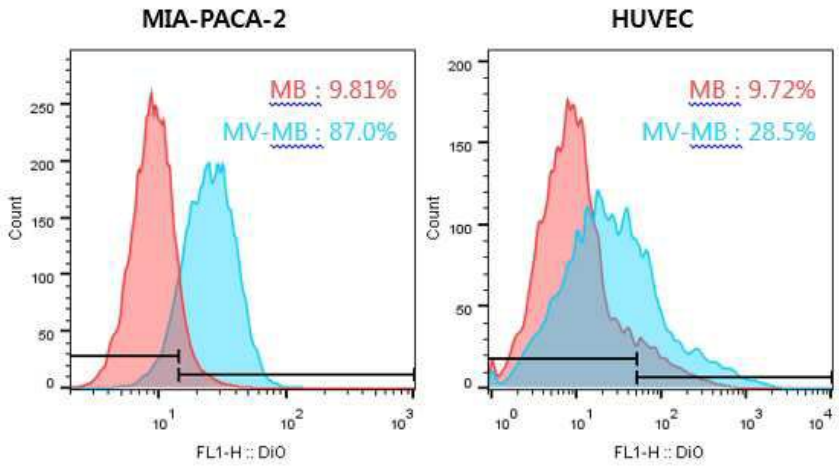
도면9


PBS control
MB
MV-MB

도면10


MIA-PACA-2
HUVEC

도면11


MIA-PACA-2
MB : 9.81%
MV-MB : 87.0%
Count
FL1-H :: DiO
HUVEC
MB : 9.72%
MV-MB : 28.5%
Count
FL1-H :: DiO