



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0067158
(43) 공개일자 2013년06월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/16 (2006.01) A61K 49/12 (2006.01)

A61K 49/06 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0134031

(22) 출원일자 2011년12월13일

심사청구일자 2011년12월13일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)

(72) 발명자

이상천

경기도 성남시 분당구 양현로 220, 1003동 204호 (이매동, 이매촌삼성아파트)

민경현

서울특별시 송파구 문정동 웨미리아아파트 207동 1203호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

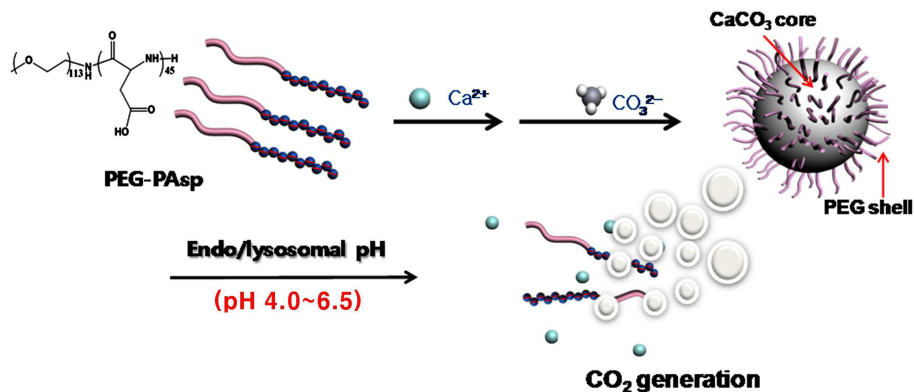
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 pH 감응형 탄산칼슘 복합 나노입자, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 초음파 조영용 조성물

(57) 요약

본 발명은 pH 감응형 탄산칼슘 복합 나노입자, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 초음파 조영용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 탄산칼슘 코어 및 고분자 쉘로 구성된 탄산칼슘 복합 나노 입자로서 세포 내 엔도솜/라이소솜 산성 pH에서 용해되어 이산화탄소 기체를 발생시킬 수 있으며, 특히 암조직에 도달 후 이산화탄소를 발생시키고 탄산칼슘 미네랄이 이산화탄소로 변환되어 고감도의 초음파 영상을 가능하게 하는 조영제로서 사용할 수 있는 pH 감응형 탄산칼슘 복합 나노입자, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 초음파 조영용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이홍재

인천광역시 남동구 논현동 한화꿈에그린아파트 60
8동 1301호

구안나

서울특별시 강서구 공항대로 509, 1328호 (등촌동,
우림보보카운티뷰)

특허청구의 범위

청구항 1

탄산칼슘; 및 비이온성의 친수성 폴리머 부분과 이온성 폴리머 부분으로 이루어지는 공중합체를 포함하며, 상기 탄산칼슘과 상기 공중합체의 이온성 폴리머 부분이 함께 코어부를 형성하고, 상기 비이온성의 친수성 폴리머 부분이 셸부를 형성하는, 탄산칼슘 복합 나노입자.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 공중합체는 AB형 블록 공중합체 또는 그래프트 공중합체인, 탄산칼슘 복합 나노입자.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 비이온성의 친수성 폴리머 부분은 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리옥사졸린, 폴리(N-비닐피롤리돈), 폴리비닐알콜, 폴리히드록시에틸메타크릴레이트, 텍스트란 또는 메틸셀룰로스인, 탄산칼슘 복합 나노입자.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 이온성 폴리머는 양이온형 또는 음이온형인, 탄산칼슘 복합 나노입자.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 이온성 폴리머는 폴리(아스파르트산), 폴리(L-글루탐산), 히아루론산, 알긴산, 폴리(아크릴산), 폴리(메타크릴산), 키토산, 폴리에틸렌아민, 폴리(L-라이신), 폴리비닐포스페이트, 폴리에틸렌글리콜메타크릴레이트 포스페이트, 카르복시메틸셀룰로스 또는 헤파린인, 탄산칼슘 복합 나노입자.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 탄산칼슘 복합 나노입자는 pH 4.0 내지 pH 6.5의 조건 하에서 용해되는 것을 특징으로 하는, 탄산칼슘 복합 나노입자.

청구항 7

하기 단계를 포함하는 탄산칼슘 복합 나노입자의 제조방법:

비이온성의 친수성 폴리머 부분과 이온성 폴리머 부분으로 이루어지는 공중합체 수용액, 및 염화칼슘 수용액을 혼합하는 단계(단계 1); 및

상기 혼합액에 탄산나트륨 수용액을 첨가하여 반응시키는 단계(단계 2).

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 단계 2) 이후에 하기 단계를 추가로 포함하는 제조방법:

상기 단계 2)의 반응액을 원심분리하여 상층액을 회수하는 단계(단계 3);

상기 상층액을 삼투 교환시키는 단계(단계 4); 및
상기 삼투 교환된 용액을 동결건조시키는 단계(단계 5).

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 단계 1)의 공중합체 내 이온기와 염화칼슘의 몰비는 1:0.1 내지 1:1인, 제조방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 공중합체 수용액, 염화칼슘 수용액 및 탄산나트륨 수용액의 각각의 pH는 7.0 내지 9.0인, 제조방법.

청구항 11

제1항의 탄산칼슘 복합 나노입자를 포함하는 초음파 조영용 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 조성물은 정맥 주사제 형태인, 초음파 조영용 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 pH 감응형 탄산칼슘 복합 나노입자, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 초음파 조영용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 탄산칼슘 코어 및 고분자 쉘로 구성된 탄산칼슘 복합 나노 입자로서 세포 내 엔도솜/라이소솜 산성 pH에서 용해되어 이산화탄소 기체를 발생시킬 수 있으며, 특히 암조직에 도달 후 이산화탄소를 발생시키고 탄산칼슘 미네랄이 이산화탄소로 변환되어 고감도의 초음파 영상을 가능하게 하는 조영제로서 사용할 수 있는 pH 감응형 탄산칼슘 복합 나노입자, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 초음파 조영용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 초음파 조영은 혈관 또는 조직 및 장기의 해부학적인 구조를 영상화 하는데 유용한 기술이다. 초음파 조영을 위해서는 주로 미세기포(microbubble)가 사용되는데 이는 1 내지 8 마이크로미터 정도의 크기를 가진 과불화탄소(perfluorocarbon), 공기(air), N₂ 등의 기체가 봉입된 입자형태로 구성된다. 이러한 구조는 기체상태의 중심부(core)를 고분자나, 계면활성제, 단백질, 지질 등의 유연한 껍질(shell)이 감싸고 있는 형태이다. 미세기포형의 조영제는 인체 투여시 혈액 내에서 안정하게 순환하기 어렵고, 암 조직 등으로의 침투가 어렵기 때문에 암 조직의 영상화를 위해 사용이 제한적이다.

[0003] 최근 혈류 내에서 자유롭게 순환하여 암조직으로의 투과 상승 및 저류(enhanced permeation and retention, EPR) 효과에 의해 침투가 가능하고 이산화탄소 가스를 발생하는 나노입자가 개발되었다. 자기조립(self-assembly)으로 형성되는 나노입자는 폴리에스터 주쇄에 카보네이트 사이드 그룹이 결합된 형태로, 체내 주입시 카보네이트의 가수 분해로 인해 이산화탄소가 발생된다. 이는 나노입자를 암조직의 초음파 조영제로 사용할 수 있다는 점에서 의미있는 연구결과이다. 그러나, 암조직에 도달하기 전에 혈액 내 주입 직후부터 이산화탄소가 발생된다는 점과 고분자 사이드 그룹으로 카보네이트가 결합되어 있어 이로 인해 발생하는 이산화탄소의 양이 제한적이라는 단점이 있다.

[0004] 이러한 배경 하에서, 본 발명자들은 탄산칼슘 코어 및 고분자 셀로 구성된 탄산칼슘 복합 나노 입자를 제조하였으며, 상기 탄산칼슘 복합 나노입자가 혈류 내에서는 안정한 상태로 탄산칼슘의 방출이 일어나지 않고, 세포 내 엔도솜/라이소솜의 산성 pH에서 용해되어 탄산칼슘의 방출이 일어나 이산화탄소 기체를 발생시킬 수 있으며, 특히 압조직에 도달 후 이산화탄소를 발생시키고 탄산칼슘 미네랄이 이산화탄소로 변환되므로 많은 양의 이산화탄소를 발생시킬 수 있어 고감도의 초음파 영상을 가능하게 할 조영제로서 사용할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 본 발명의 목적은 산성 pH에서 이산화탄소를 발생시킬 수 있는 탄산칼슘 복합 나노입자를 제공하는 것이다.
- [0006] 본 발명의 다른 목적은 상기 탄산칼슘 복합 나노입자의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0007] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 탄산칼슘 복합 나노입자를 포함하는 초음파 조영용 조성물을 제공하는 것이다.

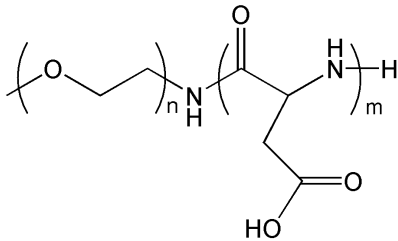
과제의 해결 수단

- [0008] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은
- [0009] 탄산칼슘; 및 비이온성의 친수성 폴리머 부분과 이온성 폴리머 부분으로 이루어지는 공중합체를 포함하며,
- [0010] 상기 탄산칼슘과 상기 공중합체의 이온성 폴리머 부분이 함께 코어부를 형성하고,
- [0011] 상기 비이온성의 친수성 폴리머 부분이 셀부를 형성하는, 탄산칼슘 복합 나노입자를 제공한다.
- [0012] 본 발명에서, 상기 공중합체는 비이온성의 친수성 폴리머 부분과 이온성 폴리머 부분으로 이루어진다. 상기 공중합체의 이온성 폴리머 부분은 광물 즉, 탄산칼슘의 핵 형성 및 성장을 위한 주형으로서 작용할 수 있어 탄산칼슘 코어의 형성에 관여하며, 상기 공중합체의 비이온성의 친수성 폴리머 부분은 수화된 셀을 형성하고, 분출과, 투과 상승 및 저류(enhanced permeation and retention, EPR) 효과를 위한 장기적인 순환에 기여한다. 따라서, 상기 공중합체는 비이온성의 친수성 폴리머 부분과 이온성 폴리머 부분으로 이루어지는 공중합체이면 어느 것이나 가능하며, 바람직하기로 AB형 블록 공중합체(block copolymer) 또는 그라프트 공중합체(graft copolymer)일 수 있다.
- [0013] 본 발명에서, 상기 공중합체의 비이온성의 친수성 폴리머 부분은 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG), 폴리옥사졸린(polyoxazoline), 폴리(N-비닐피롤리돈)(poly(N-vinylpyrrolidone)), 폴리비닐알콜(poly(vinyl alcohol)), 폴리히드록시에틸메타크릴레이트(polyhydroxyethyl methacrylate), 덱스트란(dextran) 또는 메틸셀룰로스(methylcellulose)일 수 있으며, 이에 제한되지는 않는다.
- [0014] 본 발명에서, 상기 공중합체의 이온성 폴리머는 양이온형 또는 음이온형일 수 있다. 구체적으로, 상기 이온성 폴리머는 폴리(아스파르트산)(poly(aspartic acid)), 폴리(L-글루탐산)(poly(L-glutamic acid)), 히아루론산(hyaluronic acid), 알긴산(alginic acid), 폴리(아크릴산)(poly(acrylic acid)), 폴리(메타크릴산)(poly(methacrylic acid)), 키토산(chitosan), 폴리에틸렌이민(polyethylenimine), 폴리(L-라이신)(poly(L-lysine)), 폴리비닐포스페이트(polyvinyl phosphate), 폴리에틸렌글리콜메타크릴레이트 포스페이트(polyethyleneglycol methacrylate phosphate), 카르복시메틸셀룰로스(carboxymethyl cellulose) 또는 헤파린(heparin)일 수 있으며, 이에 제한되지는 않는다.
- [0015] 본 발명에서, 상기 공중합체의 구체적인 예로는 AB형 블록 공중합체로서 PEG-폴리(아스파르트산), PEG-폴리(L-글루탐산), PEG-히아루론산, PEG-알긴산, PEG-폴리(아크릴산), PEG-폴리(메타크릴산), PEG-키토산, PEG-폴리에틸렌이민, PEG-폴리(L-라이신), 폴리옥사졸린-폴리(아스파르트산), 폴리옥사졸린-폴리(L-글루탐산), 폴리옥사졸

린-히아루론산, 폴리옥사졸린-알긴산, 폴리옥사졸린-폴리(아크릴산), 폴리옥사졸린-폴리(메타크릴산), 폴리옥사졸린-키토산, 폴리옥사졸린-폴리에틸렌이민, 폴리옥사졸린-폴리(L-라이신), 폴리(N-비닐피롤리돈)-폴리(아스파르트산), 폴리(N-비닐피롤리돈)-폴리(L-글루탐산), 폴리(N-비닐피롤리돈)-히아루론산, 폴리(N-비닐피롤리돈)-알긴산, 폴리(N-비닐피롤리돈)-폴리(아크릴산), 폴리(N-비닐피롤리돈)-폴리(메타크릴산), 폴리(N-비닐피롤리돈)-키토산, 폴리(N-비닐피롤리돈)-폴리에틸렌이민, 폴리(N-비닐피롤리돈)-폴리(L-라이신), 폴리비닐알콜-폴리(아스파르트산), 폴리비닐알콜-폴리(L-글루탐산), 폴리비닐알콜-히아루론산, 폴리비닐알콜-알긴산, 폴리비닐알콜-폴리(아크릴산), 폴리비닐알콜-폴리(메타크릴산), 폴리비닐알콜-키토산, 폴리비닐알콜-폴리에틸렌이민, 폴리비닐알콜-폴리(L-라이신), 폴리히드록시에틸메타크릴레이트-폴리(아스파르트산), 폴리히드록시에틸메타크릴레이트-폴리(L-글루탐산), 폴리히드록시에틸메타크릴레이트-히아루론산, 폴리히드록시에틸메타크릴레이트-알긴산, 폴리히드록시에틸메타크릴레이트-폴리(아크릴산), 폴리히드록시에틸메타크릴레이트-폴리(메타크릴산), 폴리히드록시에틸메타크릴레이트-키토산, 폴리히드록시에틸메타크릴레이트-폴리에틸렌이민, 폴리히드록시에틸메타크릴레이트-폴리(L-라이신), 텍스트란-폴리(아스파르트산), 텍스트란-폴리(L-글루탐산), 텍스트란-히아루론산, 텍스트란-알긴산, 텍스트란-폴리(아크릴산), 텍스트란-폴리(메타크릴산), 텍스트란-키토산, 텍스트란-폴리에틸렌이민, 텍스트란-폴리(L-라이신), 메틸셀룰로스-폴리(아스파르트산), 메틸셀룰로스-폴리(L-글루탐산), 메틸셀룰로스-히아루론산, 메틸셀룰로스-알긴산, 메틸셀룰로스-폴리(아크릴산), 메틸셀룰로스-폴리(메타크릴산), 메틸셀룰로스-키토산, 메틸셀룰로스-폴리에틸렌이민, 메틸셀룰로스-폴리(L-라이신) 등을 예로 들 수 있고, 그래프트 공중합체로서, PEG-그래프트 폴리(아스파르트산), PEG-그래프트 폴리(L-글루탐산), PEG-그래프트 히아루론산, PEG-그래프트 알긴산, PEG-그래프트 폴리(아크릴산), PEG-그래프트 폴리(메타크릴산), PEG-그래프트 키토산, PEG-그래프트 폴리에틸렌이민, PEG-그래프트 폴리(L-라이신), 폴리옥사졸린-그래프트 폴리(아스파르트산), 폴리옥사졸린-그래프트 폴리(L-글루탐산), 폴리옥사졸린-그래프트 히아루론산, 폴리옥사졸린-그래프트 알긴산, 폴리옥사졸린-그래프트 폴리(아크릴산), 폴리옥사졸린-그래프트 폴리(메타크릴산), 폴리옥사졸린-그래프트 키토산, 폴리옥사졸린-그래프트 폴리에틸렌이민, 폴리옥사졸린-그래프트 폴리(L-라이신), 폴리(N-비닐피롤리돈)-그래프트 폴리(아스파르트산), 폴리(N-비닐피롤리돈)-그래프트 폴리(L-글루탐산), 폴리(N-비닐피롤리돈)-그래프트 히아루론산, 폴리(N-비닐피롤리돈)-그래프트 알긴산, 폴리(N-비닐피롤리돈)-그래프트 폴리(아크릴산), 폴리(N-비닐피롤리돈)-그래프트 폴리(메타크릴산), 폴리(N-비닐피롤리돈)-그래프트 키토산, 폴리(N-비닐피롤리돈)-그래프트 폴리에틸렌이민, 폴리(N-비닐피롤리돈)-그래프트 폴리(L-라이신), 폴리비닐알콜-그래프트 폴리(아스파르트산), 폴리비닐알콜-그래프트 폴리(L-글루탐산), 폴리비닐알콜-그래프트 히아루론산, 폴리비닐알콜-그래프트 알긴산, 폴리비닐알콜-그래프트 폴리(아크릴산), 폴리비닐알콜-그래프트 폴리(메타크릴산), 폴리비닐알콜-그래프트 키토산, 폴리비닐알콜-그래프트 폴리에틸렌이민, 폴리비닐알콜-그래프트 폴리(L-라이신), 폴리히드록시에틸메타크릴레이트-그래프트 폴리(아스파르트산), 폴리히드록시에틸메타크릴레이트-그래프트 폴리(L-글루탐산), 폴리히드록시에틸메타크릴레이트-그래프트 히아루론산, 폴리히드록시에틸메타크릴레이트-그래프트 알긴산, 폴리히드록시에틸메타크릴레이트-그래프트 폴리(아크릴산), 폴리히드록시에틸메타크릴레이트-그래프트 폴리(메타크릴산), 폴리히드록시에틸메타크릴레이트-그래프트 키토산, 폴리히드록시에틸메타크릴레이트-그래프트 폴리에틸렌이민, 폴리히드록시에틸메타크릴레이트-그래프트 폴리(L-라이신), 텍스트란-그래프트 폴리(아스파르트산), 텍스트란-그래프트 폴리(L-글루탐산), 텍스트란-그래프트 히아루론산, 텍스트란-그래프트 알긴산, 텍스트란-그래프트 폴리(아크릴산), 텍스트란-그래프트 폴리(메타크릴산), 텍스트란-그래프트 키토산, 텍스트란-그래프트 폴리에틸렌이민, 텍스트란-그래프트 폴리(L-라이신), 메틸셀룰로스-그래프트 폴리(아스파르트산), 메틸셀룰로스-그래프트 폴리(L-글루탐산), 메틸셀룰로스-그래프트 히아루론산, 메틸셀룰로스-그래프트 알긴산, 메틸셀룰로스-그래프트 폴리(아크릴산), 메틸셀룰로스-그래프트 폴리(메타크릴산), 메틸셀룰로스-그래프트 키토산, 메틸셀룰로스-그래프트 폴리에틸렌이민, 메틸셀룰로스-그래프트 폴리(L-라이신) 등을 예로 들 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0016] 본 발명의 일실시예로서 상기 공중합체는 AB형 블록 공중합체인 하기 화학식 1의 폴리(에틸렌 글리콜)-폴리(아스파르트산)(Poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid), PEG-PAsp)일 수 있다.

[0017] [화학식 1]



[0018]

[0019] 상기 식에서,

[0020] n은 10 내지 1000의 정수이고,

[0021] m은 10 내지 300의 정수이다.

[0022] 바람직하기로, 상기 식에서,

[0023] n은 20 내지 200의 정수이고,

[0024] m은 20 내지 100의 정수이다.

[0025] 본 발명의 탄산칼슘 복합 나노입자는 알칼리성 조건, 즉 pH 7.0 이상의 조건에서는 용해되지 않으나, pH 4.0 내지 pH 6.5의 조건에서는 용해된다. 이러한 용해 거동을 통해, 본 발명의 탄산칼슘 복합 나노입자는 ~pH 7.4의 혈류 내에서는 용해되지 않고 안정한 특성을 나타내는 반면, 암조직 pH(pH ~6.3), 세포 내의 엔도솜(endosome, pH ~5.0) 및 라이소솜(lysosome, ~pH 4.5) 내의 낮은 pH 환경에서는 코어부의 탄산칼슘의 용해가 일어나 탄산칼슘의 방출을 유도할 수 있는 특성을 나타낸다.

[0026] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 탄산칼슘 복합 나노입자의 제조방법을 제공한다.

[0027] 1) 비이온성의 친수성 폴리머 부분과 이온성 폴리머 부분으로 이루어지는 공중합체 수용액, 및 염화칼슘 수용액을 혼합하는 단계(단계 1); 및

[0028] 2) 상기 혼합액에 탄산나트륨 수용액을 첨가하여 반응시키는 단계(단계 2).

[0029] 바람직하기로, 본 발명의 탄산칼슘 복합 나노입자의 제조방법은 상기 단계 2) 이후에 하기 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0030] 3) 상기 단계 2)의 반응액을 원심분리하여 상층액을 회수하는 단계(단계 3);

[0031] 4) 상기 상층액을 삼투 교환시키는 단계(단계 4); 및

[0032] 5) 상기 삼투 교환된 용액을 동결건조시키는 단계(단계 5).

[0033] 상기 단계 1은, 비이온성의 친수성 폴리머 부분과 이온성 폴리머 부분으로 이루어지는 공중합체 수용액, 및 염화칼슘 수용액을 혼합하는 단계로서, 젤부를 형성하는 비이온성의 친수성 폴리머 부분과 탄산칼슘과 함께 코어부를 형성하는 이온성 폴리머 부분으로 이루어지는 공중합체의 수용액과, 상기 이온성 폴리머 부분과 함께 코어부를 형성하는 탄산칼슘을 얻기 위한 염화칼슘의 수용액을 혼합하는 단계이다.

[0034] 상기 단계 1)에서 사용할 수 있는 비이온성의 친수성 폴리머 부분과 이온성 폴리머 부분으로 이루어지는 공중합체의 종류는 상기 탄산칼슘 복합 나노입자에 대한 설명 부분과 동일하다.

[0035] 상기 단계 1)의 공중합체 내 이온기와 염화칼슘의 몰비는 1:0.1 내지 1:1인 것이 바람직하다. 만일 상기 공중합체 내 이온기와 염화칼슘의 몰비가 상기 범위 밖이면 탄산칼슘 복합 나노입자가 형성되지 않거나, 탄산칼슘만으

로 이루어진 나노입자가 형성되는 단점이 있다.

- [0036] 상기 단계 2는, 상기 혼합액에 탄산나트륨 수용액을 첨가하여 반응시키는 단계로서, 코어부를 형성하는 탄산칼슘을 얻기 위하여 상기 단계 1)의 염화칼슘과 반응하는 탄산나트륨 수용액을 첨가하여 반응시키는 단계이다.
- [0037] 상기 단계 2)의 탄산나트륨은 상기 단계 1)의 염화칼슘과 1:2 내지 2:1의 몰비로 첨가될 수 있다. 반응효율면에서 상기 단계 2)의 탄산나트륨은 상기 단계 1)의 염화칼슘과 동일한 몰비로 첨가되는 것이 바람직하다.
- [0038] 상기 단계 2)의 반응 시간은 5 내지 15 시간인 것이 바람직하다. 만일 반응 시간이 상기 하한보다 짧으면 반응이 완료되지 않을 수 있으며 상기 상한보다 길면 부반응이 발생할 수 있는 단점이 있다.
- [0039] 상기 단계 2)의 반응 온도는 상온, 구체적으로 10 내지 30℃인 것이 바람직하다. 만일 반응 온도가 상기 범위 밖이면 부반응이 발생하는 단점이 있다.
- [0040] 상기 단계 1) 및 2)에서 사용하는 공중합체 수용액, 염화칼슘 수용액 및 탄산나트륨 수용액의 pH는 7.0 내지 9.0인 것이 바람직하다. 만일 상기 수용액들의 pH가 상기 범위 밖이면 탄산칼슘의 형성이 어려운 단점이 있다.
- [0041] 상기 단계 3은, 상기 단계 2)의 반응액을 원심분리하여 상층액을 회수하는 단계로서, 반응액을 원심분리하여 탄산칼슘 복합 나노입자를 포함하고 있는 상층액을 회수하는 단계이다.
- [0042] 상기 단계 3)의 원심분리는 800 내지 1200 rpm으로 2 내지 5분 동안 처리하여 수행할 수 있다.
- [0043] 상기 단계 4는, 상기 상층액을 삼투 교환시키는 단계로서, 탄산칼슘 복합 나노입자를 포함하고 있는 상층액을 삼투 교환시켜 탄산칼슘 복합 나노입자를 걸러내는 단계이다.
- [0044] 상기 단계 4)의 삼투 교환은 삼투막 비닐을 이용하여 수행할 수 있으며, 상기 삼투막 비닐의 분자량 제한은 2500 내지 3500, 가장 바람직하기로 3000일 수 있다.
- [0045] 상기 단계 5는, 상기 삼투 교환된 용액을 동결건조시키는 단계로서, 삼투 교환으로 분리된 탄산칼슘 복합 나노입자를 포함하고 있는 용액을 동결건조시켜 분말 형태의 탄산칼슘 복합 나노입자를 얻는 단계이다.
- [0046] 상기 단계 5)의 동결건조는 -15 내지 -50℃에서 수행할 수 있다.
- [0047] 본 발명의 탄산칼슘 복합 나노입자의 제조방법은 상기와 같이 공중합체, Ca^{2+} 양이온 및 CO_3^{2-} 음이온을 연속적으로 첨가하여 단일 반응 용기(one-pot) 내에서 반응시킴으로써, 탄산칼슘과 이온성 폴리머 부분이 함께 복합 코어(core)를 형성하고 비이온성의 친수성 폴리머가 형성하는 셸(shell)이 외곽에 존재하는 방식으로 구형의 코어-셸 구조의 나노입자를 자발적으로 형성시킬 수 있다.
- [0048] 또한, 본 발명은 상기 탄산칼슘 복합 나노입자를 포함하는 초음파 조영용 조성물을 제공한다.
- [0049] 상기에서 기술한 바와 같이, 본 발명의 탄산칼슘 복합 나노입자는 pH 7.0 이상의 조건에서는 용해되지 않으나, pH 4.0 내지 pH 6.5의 조건에서는 용해되는 용해 거동을 나타냄으로써, ~pH 7.4의 혈류 내에서는 용해되지 않고 안정한 특성을 나타내는 반면, 암조직 pH(pH ~6.3), 세포 내의 엔도솜(endosome, pH ~5.0) 및 라이소솜(lysosome, ~pH 4.5) 내의 낮은 pH 환경에서는 코어부의 탄산칼슘의 용해가 일어나 이산화탄소를 발생시킬 수 있으므로 초음파 조영제로서 사용될 수 있다.
- [0050] 본 발명에서, 상기 조성물은 혈류 내에서는 용해되지 않고 안정하며 암조직 및 세포 내에서는 약물의 방출을 유도할 수 있으므로 정맥 주사제 형태로 투여되는 것이 바람직하다.

- [0051] 이하, 본 발명의 구성을 도면을 참조하여 상세히 설명한다.
- [0052] 도 1에 본 발명의 일 실시예로서 113의 EG 단위 및 45의 Asp 단위를 갖는, 폴리(에틸렌 글리콜)-b-폴리(L-아스파테이트)(PEG₁₁₃-PAsp₄₅)를 공중합체로 이용하여 탄산칼슘 복합 나노입자의 자발적인 형성을 유도하는 과정과, 상기 탄산칼슘 복합 나노입자가 세포 내 엔도솜/라이소솜 산성 pH에서 용해되어 이산화탄소 기체를 발생시키는 과정을 도식적으로 나타내었다.
- [0053] 구체적으로, 본 발명에서는 안정한 탄산칼슘 복합 나노입자를 형성하기 위하여, PEG₁₁₃-PAsp₄₅를 첨가하여 CaCO₃ 광물화에 도입하였다. 음이온성 PAsp 블록이 광물 핵 형성/성장 주형으로서 작용할 수 있고 CaCO₃ 코어의 형성에 관여하였다. PEG 블록은 수화된 쉘을 형성하고, 분출과, 투과 상승 및 저류(enhanced permeation and retention, EPR) 효과를 위한 장기적인 순환에 기여할 수 있다(도 1).
- [0054] 본 발명의 일 실시예에서는, 수용액 중에서 CaCl₂, Na₂CO₃ 및 폴리(에틸렌 글리콜)-b-폴리(L-아스파테이트)를 이용하여 기체-생성 탄산칼슘 복합 나노입자를 제조하였다. 또한, 상기 기체-생성 탄산칼슘 복합 나노입자에 대하여 시험관 내(도 3) 및 생체 내(도 4) US 이미징 특성을 조사하여, 이들 특성이 모두 우수함을 확인하였다. 상기 결과와 같은 결과를 통해, 본 발명의 기체-생성 탄산칼슘 복합 나노입자가 세포 내 환경에서 US 조영체로서 이산화탄소 기체를 발생시킬 수 있음을 알 수 있다.
- [0055] 따라서, 본 발명의 기체-생성 탄산칼슘 복합 나노입자는 중앙 이미징 분야에서 신규한 US 조영체로서 제공될 수 있다.

발명의 효과

- [0056] 본 발명은 탄산칼슘 코어 및 고분자 쉘로 구성된 탄산칼슘 복합 나노 입자로서 세포 내 엔도솜/라이소솜 산성 pH에서 용해되어 이산화탄소 기체를 발생시킬 수 있으며, 특히 암조직에 도달 후 이산화탄소를 발생시키고 탄산칼슘 미네랄이 이산화탄소로 변환되어 고강도의 초음파 영상을 가능하게 하는 조영체로서 사용할 수 있는 기체-생성 탄산칼슘 복합 나노입자를 제공할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0057] 도 1은 본 발명의 탄산칼슘 복합 나노입자의 자발적인 형성을 도식적으로 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명의 일실시예에서 제조한 탄산칼슘 복합 나노입자의 TEM 이미지(a) 및 에너지 분산 X-선 분광(b) 분석 결과이다.
- 도 3은 본 발명의 일실시예에서 제조한 탄산칼슘 복합 나노입자 분산액의 시험관 내 초음파 이미징 결과이다. 이때, a는 본 발명의 탄산칼슘 복합 나노입자 분산액의 초음파(US) 이미지이고, b는 다양한 pH에서 본 발명의 탄산칼슘 복합 나노입자 분산액으로부터 얻은 시간-의존적인 US 세기에 대한 그래프이다.
- 도 4는 본 발명의 일실시예에서 제조한 탄산칼슘 복합 나노입자의 생체 내 초음파 조영 결과이다. 이때, a는 주사 직후부터 시간의 함수로서 얻어진 US 이미지를 나타내고, b는 시간의 함수로서 나타낸 초음파 세기 변화를 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0058] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [0059] **제조예 1: PEG-b-PAsp 공중합체의 합성**

- [0060] 113의 EG 단위 및 45의 Asp 단위를 갖는, 폴리(에틸렌 글리콜)-b-폴리(L-아스파테이트)(PEG₁₁₃-PAsp₄₅)를 하기와 같이 합성하였다.
- [0061] 건조 DMF(100 mL) 중의 CH₃O-PEG-NH₂(5 g, 0.0025 mol) 교반 용액에 질소 하, 35℃에서 BAsp-NCA(37.4 g, 0.15 mol)를 첨가하고, 상기 반응을 추가 24 시간 동안 유지시켰다. PEG₁₁₃-PBAsp₄₅를 DMF로부터 디에틸 에테르로의 반복적인 침전을 통해 분리하였다(수율 89%). 마지막으로, 벤질기를 제거하기 위하여 상기 블록 공중합체(4 g)를 0.1 N NaOH(200 mL)로 처리함으로써 PEG₁₁₃-PBAsp₄₅의 탈보호를 수행하였다. 그 다음 상기 수용액을 24 시간 동안 막(Molecular weight cut-off(MWCO): 1000)을 이용하여 투석한 후, 동결 건조시켰다.
- [0062] 공중합체 형성을 확인하기 위하여, 상기에서 얻은 공중합체에 대하여 ¹H NMR 분석을 실시하였다.
- [0063] 그 결과, PEG-b-PAsp 내의 2개의 단량체 단위의 실제적인 비율이 113:45임을 확인하였으며, 상기 공중합체가 좁은 분자량 분포를 나타냄을 확인하였다.
- [0064] **실시에 1: 탄산칼슘 복합 나노입자의 제조**
- [0065] 안정한 CaCO₃ 복합 나노입자를 형성하기 위하여, 먼저 CaCl₂ 수용액(0.1 mL, 5.8 mM)을 pH 8.0에서 PEG₁₁₃-PAsp₄₅의 교반 용액(0.8 mL, 10 g/L)에 첨가하고, 800 rpm에서 교반 하에 3 시간 동안 평형을 유지시켰다. [Asp] 대 [Ca²⁺]의 몰 농도 비율은 1:1이었다. Na₂CO₃ 수용액(0.1 mL, 5.8 mM)을 상기 반응 혼합물에 서서히 적하하고, 상기 용액을 10 시간 동안 상온에서 400 rpm으로 자기적으로 교반하였다. 상기 용액을 투석하여 미반응 이온종을 제거하고, 투석액을 동결건조시켜 무기물의 복합 나노입자 즉, 탄산칼슘 복합 나노입자를 얻었다.
- [0066] **실험예 1: 탄산칼슘 복합 나노입자의 형태 분석**
- [0067] 상기 실시예 1에서 제조한 탄산칼슘 복합 나노입자에 대하여 인산염-완충 식염수(PBS, pH 7.4, 37℃) 용액 중에서 동적 광산란 분석을 실시하였다.
- [0068] 그 결과, 상기 탄산칼슘 복합 나노입자가 240 nm의 평균 직경을 갖는 것으로 확인되었다.
- [0069] 또한, 상기 실시예 1에서 제조한 탄산칼슘 복합 나노입자에 대하여 TEM 이미지 분석을 실시하였다.
- [0070] 그 결과, 상기 탄산칼슘 복합 나노입자가 구형의 형태를 가짐을 확인하였다(도 2a)
- [0071] 또한, 상기 실시예 1에서 제조한 탄산칼슘 복합 나노입자에 대하여 에너지 분산 X-선 분광(Energy-dispersive X-ray spectroscopy, EDX) 분석을 실시하였다.
- [0072] 그 결과, 상기 탄산칼슘 복합 나노입자가 주로, CaCO₃ 광물에 속한, Ca, C 및 O를 함유함을 확인하였다(도 2b).
- [0073] **실험예 2: 시험관 내 초음파 이미징**
- [0074] 에펜도르프 튜브를 아가로즈 겔(3%, w/v)에 끼워 넣고, 상기 실시예 1에서 제조한 탄산칼슘 복합 나노입자 분산액(10%, w/v)을 상기 튜브에 넣었다. US(ultrasound)는 2D 플러스 시퀀스 이미징 모드(2D plus sequence imaging mode)로 수행하였다. US 이미징(Vevo 770 model; Visual Sonic, Toronto, ON, Canada)을 20 MHz 프로브(Acuson model 15 L8)를 이용하여 얻었다.
- [0075] 그 결과를 도 3에 나타내었다.
- [0076] 도 3에서, a는 본 발명의 탄산칼슘 복합 나노입자 분산액의 US 이미지이고, b는 다양한 pH에서 본 발명의 탄산칼슘 복합 나노입자 분산액으로부터 얻은 시간-의존적인 US 세기에 대한 그래프이다.
- [0077] 도 3을 통해, 본 발명의 탄산칼슘 복합 나노입자는 pH 7.4 하에서는 이산화탄소 기체를 발생시키지 않아 초음파 반향적이지 않기 때문에 US 이미지 하에서 초음파 반사 조영 효과를 보이지 않음을 알 수 있다. 그러나, pH 5.0 및 pH 4.0 조건 모두에서 본 발명의 탄산칼슘 복합 나노입자의 US 조영 이미지는 상당히 강화되었다. 이러한 특정한 세포적 pH(엔도솜/라이소솜 pH)에서의 본 발명의 탄산칼슘 복합 나노입자로부터 발생하는 조영 강화는, 이

산화탄소 기포의 발생이 US 필드 하에서 공명(resonance)의 원인이라는 점을 나타낸다. 2D 모드에서 본 발명의 탄산칼슘 복합 나노입자 분산액으로부터 발생하는 조영 강화는 이산화탄소의 존재가 US 필드 하에서 공명의 원인임을 나타낸다.

[0078] 실험예 3: 생체 내 초음파 조영

[0079] 종양의 US 이미지를 입증하기 위하여, 종양-이종 이식편을 갖는 누드 마우스에 본 발명의 탄산칼슘 복합 나노입자 분산액을 종양 내 주사로 투여한 후 시간의 함수로서 US 이미지를 비교하였다.

[0080] 구체적으로, 먼저 6주령 미만의 수컷 누드 마우스($n=3$, 체중 20-25 g)를 이소플루오란 기체(2-3%, v/v)를 이용하여 마취시켰다. 각각의 동물의 허리에 1×10^6 의 편평세포암(SCC-7) 세포를 피하 접종하였다. 세포는 American Type Culture Collection(ATCC)로부터 입수하였으며 50 μ l의 배지 중에 현탁시켰다. 대략 1800 mm³의 종양 부피 ($[ab^2]/2$ 로 계산됨)를 갖는 이종 이식 종양을 갖는 상기 마우스의 종양 주위의 4개 부위에 상기 실시예 1에서 제조한 탄산칼슘 복합 나노입자 분산액(10%, w/v)을 종양 내 주사하였다. 총 투여량은 100 μ l이었다.

[0081] US 이미지는 주사 직후에 얻고, 2D 모드로 시간에 따른 US 조영 변화를 관찰하였다. 또한, 종양 내 강화된 조영의 국소 스팟(localized spot)을 관찰하였다.

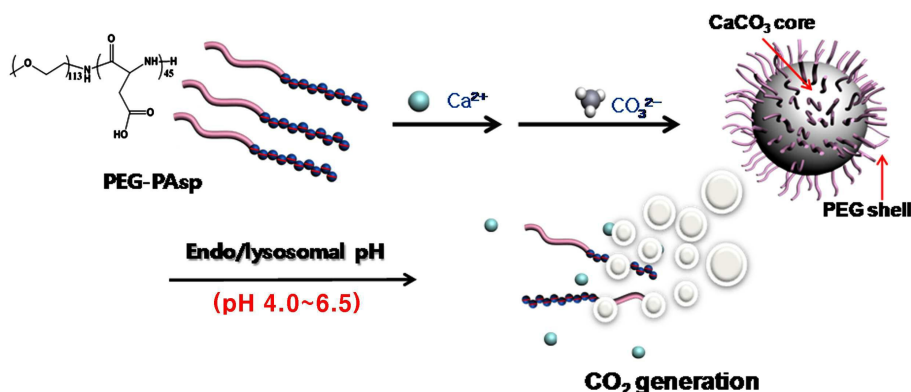
[0082] 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0083] 도 4에서, a는 주사 직후부터 시간의 함수로서 얻어진 US 이미지를 나타내고, b는 시간의 함수로서 나타낸 초음파 세기 변화를 보여주는 그래프이다.

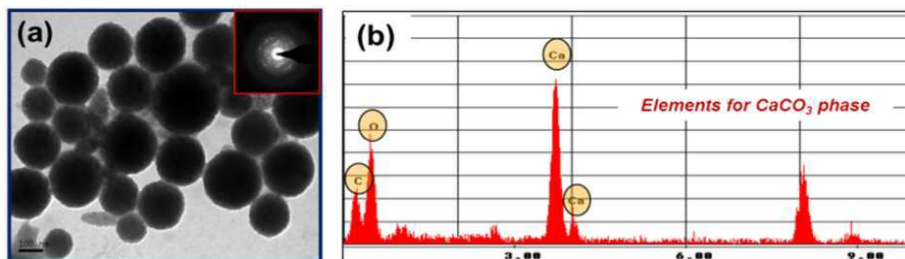
[0084] 도 4b를 통해 알 수 있듯이, 종양 부위 내 탄산칼슘 복합 나노입자의 축적으로 초음파 세기가 증가함을 뚜렷하게 확인할 수 있다. US 세기는 종양 내 투여 후 20%까지 증가하였다. 강화된 조영의 국부 스팟이 나타남을 통해, 종양 조직에서 탄산칼슘 복합 나노입자의 충분한 축적이 발생하고, 이에 따라 생체 내에서 US 이미징이 가능함을 확인하였다.

도면

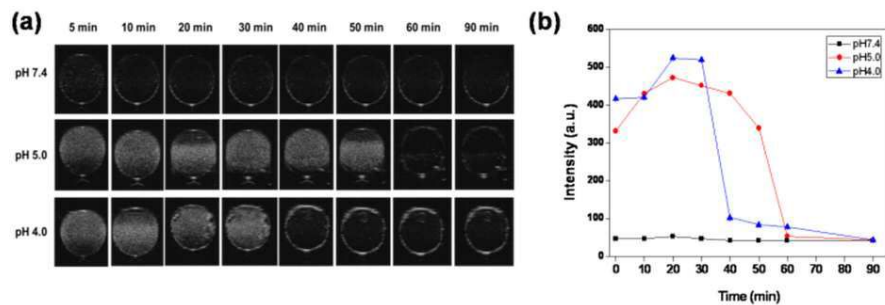
도면1



도면2



도면3



도면4

