



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0150423
(43) 공개일자 2016년12월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/16 (2006.01) A61K 47/02 (2006.01)
A61K 47/30 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)
A61K 49/06 (2006.01) A61K 49/08 (2006.01)
A61K 49/18 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/16 (2013.01)
A61K 47/02 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0088382

(22) 출원일자 2015년06월22일

심사청구일자 2015년06월22일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

이상천

서울특별시 동대문구 경희대로 26, 경희대학교 치의학전문대학원 719호 (회기동)

안철희

서울특별시 용산구 서빙고로 67, 103동 3402호 (용산동5가, 파크타워아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 하나

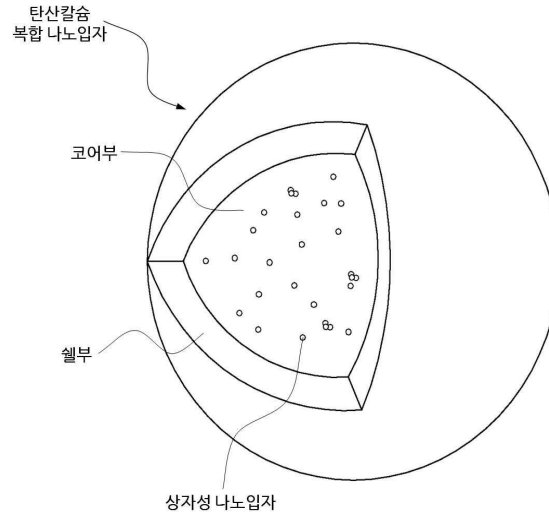
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 상자성 나노입자를 포함하는 탄산칼슘 복합 나노입자, 및 이를 포함하는 초음파 및 자기공명 이중 방식의 조영제 조성물

(57) 요약

본 발명은 상자성 나노입자를 포함하는 탄산칼슘 복합 나노입자 및 이를 포함하는 이중 방식의 조영제 조성물에 관한 것으로, 상기 탄산칼슘 복합 나노입자는 탄산칼슘을 포함하는 코어부; 상기 코어부에 도입된 상자성 나노입자; 및 이온성 제1고분자 및 비이온성의 친수성 제2고분자로 구성된 공중합체를 포함한다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 47/30 (2013.01)
A61K 47/48 (2013.01)
A61K 49/06 (2013.01)
A61K 49/08 (2013.01)
A61K 49/1824 (2013.01)
A61K 49/1851 (2013.01)

(72) 발명자

이재원

서울특별시 동대문구 회기로 166, 504호 (KB빌딩, 회기동)

이홍재

서울특별시 용산구 이촌로87길 21, 106동 1908호 (이촌동, 이촌아파트)

전성익

서울특별시 관악구 서림3길 69-9, 101호 (신림동)

김은철

서울특별시 강남구 영동대로128길 15, 1동 802호 (삼성동, 홍실아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2013R1A2A2A01009239
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	미네랄화 기반 암 치료 및 실시간 예후 영상화용 나노융합소재 개발
기 여 율	1/2
주관기관	경희대학교
연구기간	2015.06.01 ~ 2016.05.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2012R1A5A2051388
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	선도연구센터지원사업
연구과제명	나노융합 생체소재 기반 치아와 치주조직 재생 연구
기 여 율	1/2
주관기관	경희대학교
연구기간	2014.09.01 ~ 2015.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

탄산칼슘을 포함하는 코어부;

상기 코어부에 도입된 상자성 나노입자; 및

이온성 제1고분자 및 비이온성의 친수성 제2고분자로 구성된 공중합체를 포함하는 탄산칼슘 복합 나노입자.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 상자성 나노입자는 망간 화합물, 가돌리늄 화합물, 에르븀 화합물, 크롬 화합물, 철 화합물, 코발트 화합물, 및 니켈 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 탄산칼슘 복합 나노입자.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 제1고분자 및 상기 탄산칼슘은 상기 코어부를 형성하고, 상기 제2고분자는 상기 코어부의 외주면을 둘러싸는 셸부를 형성하는 탄산칼슘 복합 나노입자.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 제1고분자는 양이온형 또는 음이온형인 탄산칼슘 복합 나노입자.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 제1고분자는 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 제2고분자는 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리옥사졸린, 폴리(N-비닐피롤리돈), 폴리비닐알콜, 폴리히드록시에틸 메타크릴레이트, 텍스트란 또는 메틸셀룰로스인 탄산칼슘 복합 나노입자.

청구항 7

제1항에 있어서,

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

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 코어부에 담지된 약물을 더 포함하는 탄산칼슘 복합 나노입자.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 약물은 저분자량 약물, 유전자 약물, 단백질 약물 또는 이의 혼합물인 탄산칼슘 복합 나노입자.

청구항 10

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 탄산칼슘 복합 나노입자를 포함하는 초음파 및 자기공명 이중 방식의 조영제 조성물.

청구항 11

제8항 또는 제9항의 탄산칼슘 복합 나노입자를 포함하는 약물 전달체 조성물.

청구항 12

(a) 이온성 제1고분자 및 비이온성의 친수성 제2고분자로 구성된 공중합체 수용액, 및 칼슘염 수용액을 혼합하는 단계;

(b) 상기 (a)단계의 혼합물에 상자성 나노입자를 첨가하는 단계; 및

(c) 상기 (b)단계의 혼합물에 탄산염 수용액을 첨가하여 반응시키는 단계를 포함하는 탄산칼슘 복합 나노입자의 제조방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 (a)단계에서 상기 공중합체의 이온기 및 상기 칼슘염의 몰비는 10:1 내지 10:10인 탄산칼슘 복합 나노입자의 제조방법.

청구항 14

제12항에 있어서,

상기 공중합체 수용액, 상기 칼슘염 수용액 및 상기 탄산염 수용액의 pH는 7.0 내지 9.0인 탄산칼슘 복합 나노입자의 제조방법.

청구항 15

제12항에 있어서,

상기 (a)단계 이후에 약물을 첨가하여 혼합하는 단계를 더 포함하는 탄산칼슘 복합 나노입자의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 상자성 나노입자를 포함하는 탄산칼슘 복합 나노입자 및 이를 포함하는 이중 방식의 조영제 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 암 조직의 산성 pH 조건하에서 이산화탄소 및 상자성 나노입자를 동시에 방출시키므로 초음파 및 자기공명 이중 방식의 조영제로서 사용될 수 있는 탄산칼슘 복합 나노입자에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 최근 이중 방식 영상 시스템에 대한 의학적, 산업적 관심이 점차 증가하고 있다. 한 가지 진단 정보만을 제공하는 전통적인 진단 방법과 달리 상호보완적인 진단이 동시에 수행되면 단일 진단 정보만을 이용할 때 나타나는 한계점을 극복할 수 있으며 질병 부위에 대한 종합적이고 정확한 정보를 획득할 수 있다.
- [0004] 특히, 실시간으로 영상화가 가능한 초음파 영상법 및 영상의 해상도와 품질이 우수한 자기공명 영상법은 임상 진단 과정에서 자주 혼용되는 이중 방식 영상 시스템이다. 이중 방식 영상 시스템은 정확한 진단 정보를 획득할 수 있으므로 더욱 정확한 정보를 제공할 수 있는 이중 방식 시스템에 대한 수요는 세계적으로 증가하고 있는 추세이다.
- [0005] 상기 초음파 및 자기공명 이중 방식 조영을 위하여, 통상적으로 초상자성 나노입자 담지 미세기포(microbubble)가 개발된 바 있다. 상기 미세기포는 1 내지 8 마이크로미터 정도의 크기를 가진 퍼플루오로카본(perfluorocarbon), 공기(air), 질수(N_2) 등의 기체가 봉입된 입자에 산화철 나노입자가 담지되어 있는 형태로 구성된다. 상기 구조는 기체 상태의 중심부(core)를 고분자나, 계면활성제, 단백질, 지질 등의 유연한 껍질(shell)이 감싸고 있는 형태지만, 미세기포 형태의 조영제는 인체 투여시 혈액 내에서 안정하게 순환하기 어려울 뿐만 아니라, 암 조직 등 표적 부위에 대한 침투가 어렵기 때문에 암 조직 영역에 대한 영상화에 한계점을 가진다.
- [0006] 상기 한계점을 극복하기 위하여, 최근 혈류 내에서 자유롭게 순환하며 EPR(enhanced permeation and retention) 효과에 의해 암 조직에 대한 침투가 가능한 이산화탄소 방출형 나노입자가 개발되었다. 상기 나노입자는 폴리에스터 주쇄에 카보네이트 사이드 그룹이 결합된 형태로 자가 조립(self-assembly) 방식으로 형성되며 체내 주입시 카보네이트의 가수 분해로 인해 이산화탄소를 방출할 수 있다. 상기 나노입자는 암 조직의 초음파 조영제로 사용될 수 있으나, 혈액 내 주입 직후부터 이산화탄소를 발생시키며 고분자 사이드그룹으로 카보네이트가 결합되어 있으므로 이산화탄소의 발생량이 제한적인 문제점이 있다.
- [0007] 또한, 상기 문제점을 극복하기 위해, 탄산칼슘 코어 및 고분자 쉘로 구성된 나노입자가 개발되었으며, 상기 나노입자는 세포 내 산성 pH에서 용해되어 이산화탄소 기체를 발생시킬 수 있었으나 이중 방식의 조영 영상을 제공할 수 없었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명은 전술한 종래기술의 문제점을 해결하기 위하여 초음파 영상 및 자기공명 영상을 동시에 제공할 수 있으며 암 조직 등 표적 부위에 대한 침투능이 우수한 나노입자를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 상기 나노입자를 포함하는 이중 방식의 조영제 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명의 일 측면에 따르면, 탄산칼슘을 포함하는 코어부; 상기 코어부에 도입된 상자성 나노입자; 및 이온성 제1고분자 및 비이온성의 친수성 제2고분자로 구성된 공중합체를 포함하는 탄산칼슘 복합 나노입자가 제공된다.
- [0013] 일 실시예에 따르면, 상기 상자성 나노입자는 마간 화합물, 가돌리늄 화합물, 에르븀 화합물, 크롬 화합물, 철 화합물, 코발트 화합물, 및 니켈 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [0014] 일 실시예에 따르면, 상기 제1고분자 및 상기 탄산칼슘은 상기 코어부를 형성하고, 상기 제2고분자는 상기 코어부의 외주면을 둘러싸는 쉘부를 형성할 수 있다.
- [0015] 일 실시예에 따르면, 상기 제1고분자는 양이온형 또는 음이온형일 수 있다.
- [0016] 일 실시예에 따르면, 상기 제1고분자는 폴리(아스파르트산), 폴리(L-글루탐산), 히아루론산, 알긴산, 폴리(아크릴산), 폴리(메타크릴산), 키토산, 폴리에틸렌이민, 폴리(L-라이신), 폴리비닐포스페이트, 폴리에틸렌글리콜메타크릴레이트 포스페이트, 카르복시메틸셀룰로스 또는 헤파린일 수 있다.
- [0017] 일 실시예에 따르면, 상기 제2고분자는 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리옥사졸린, 폴리(N-비닐피롤리돈), 폴리비닐알콜, 폴리히드록시에틸메타크릴레이트, 텍스트란 또는 메틸셀룰로스일 수 있다.
- [0018] 일 실시예에 따르면, 상기 공중합체는 AB형 블록 공중합체 또는 그래프트 공중합체일 수 있다.
- [0019] 일 실시예에 따르면, 상기 탄산칼슘 복합 나노입자는 상기 코어부에 담지된 약물을 더 포함할 수 있다.
- [0020] 일 실시예에 따르면, 상기 약물은 저분자량 약물, 유전자 약물, 단백질 약물 또는 이의 혼합물일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 탄산칼슘 복합 나노입자를 포함하는 초음파 및 자기공명 이중 방식의 조영제 조성물이 제공된다.
- [0022] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 탄산칼슘 복합 나노입자를 포함하는 약물 전달체 조성물이 제공된다.
- [0023] 본 발명의 다른 측면에 따르면, (a) 이온성 제1고분자 및 비이온성의 친수성 제2고분자로 구성된 공중합체 수용액, 및 칼슘염 수용액을 혼합하는 단계; (b) 상기 (a)단계의 혼합물에 상자성 나노입자를 첨가하는 단계; 및 (c) 상기 (b)단계의 혼합물에 탄산염 수용액을 첨가하여 반응시키는 단계를 포함하는 탄산칼슘 복합 나노입자의 제조방법이 제공된다.
- [0024] 일 실시예에 따르면, 상기 (a)단계에서 상기 공중합체의 이온기 및 상기 칼슘염의 몰비는 10:1 내지 10:10일 수 있다.
- [0025] 일 실시예에 따르면, 상기 공중합체 수용액, 상기 칼슘염 수용액 및 상기 탄산염 수용액의 pH는 7.0 내지 9.0일 수 있다.
- [0026] 일 실시예에 따르면, 상기 (a)단계 이후에 약물을 첨가하여 혼합하는 단계를 더 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [0028] 본 발명에 따르면, 상기 탄산칼슘 복합 나노입자는 혈류 내에서 안정한 상태로 존재하지만, 암세포에 도달 후 용해되므로 표적 특이적인 진단정보를 제공할 수 있다.
- [0029] 또한, 상기 탄산칼슘 복합 나노입자는 암세포의 pH 조건에서 상자성 나노입자 및 이산화탄소를 동시에 방출하므로 초음파 및 자기공명 이중 방식의 조영 영상을 제공할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 특허청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0032] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 탄산칼슘 복합 나노입자의 자가 조립 생성 방식을 도식화 한 것이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 탄산칼슘 복합 나노입자의 안정된 상태의 구조 및 작용을 도식화 한 것이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 탄산칼슘 복합 나노입자의 산성 조건 하의 구조 및 작용을 도식화 한 것이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 탄산칼슘 복합 나노입자의 암 조직 내의 작용원리를 도식화 한 것이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 탄산칼슘 복합 나노입자의 TEM 이미지 및 TEM-관련 EDS mapping 데이터를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 중합체(PEG₁₁₃-PAsp₃₃) 및 탄산칼슘 복합 나노입자의 FT-IR 데이터를 나타낸 것이다.

도 7는 pH를 달리했을 때 본 발명의 일 실시예에 따른 탄산칼슘 복합 나노입자로부터 생성된 이산화탄소의 양을 측정한 결과이다.

도 8은 pH를 달리했을 때 본 발명의 일 실시예에 따른 탄산칼슘 복합 나노입자에 의한 시험관 내 초음파 이미지 및 시간-의존적 초음파 조영 세기를 나타낸 것이다.

도 9은 pH를 달리했을 때 본 발명의 일 실시예에 따른 탄산칼슘 복합 나노입자에 의한 시험관 내 자기공명 이미지 및 자기공명 조영 세기를 나타낸 것이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 탄산칼슘 복합 나노입자의 시험관 내 칼슘이온 방출 프로파일을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0033] 이하에서는 첨부한 도면을 참조하여 본 발명을 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 하기에서 설명하는 실시예로 한정되는 것은 아니다. 또한, 도면에서 본 발명을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략될 수 있다.
- [0034] 본 명세서에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 판례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 또한, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있으며, 이 경우 해당되는 발명의 설명 부분에서 상세히 그 의미를 기재할 것이다. 따라서 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.
- [0035] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [0036] 수치 범위는 상기 범위에 정의된 수치를 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최대의 수치 제한은 낮은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼 모든 더 낮은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최소의 수치 제한은 더 높은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼 모든 더 높은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 수치 제한은 더 좁은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼, 더 넓은 수치 범위 내의 더 좋은 모든 수치 범위를 포함할 것이다. 본 명세서에 제공된 제목은 다양한 면 또는 전체적으로 명세서의 참조로서, 하기의 구현예를 제한하는 것으로 이해되어서는 안 된다.
- [0037] 이하 도면을 참조하여 본 발명을 더욱 상술한다.
- [0039] 본 발명의 일 측면에 따르면, 탄산칼슘을 포함하는 코어부; 상기 코어부에 도입된 상자성 나노입자; 및 이온성 제1고분자 및 비이온성의 친수성 제2고분자로 구성된 공중합체를 포함하는 탄산칼슘 복합 나노입자가 제공된다.
- [0040] 상기 탄산칼슘 복합 나노입자는 코어-셸 구조로서 상기 상자성 나노입자가 도입된 탄산칼슘 코어부를 포함하고, 상기 탄산칼슘 복합 나노입자는 특정 pH 조건 하에서 용해되어 상기 상자성 나노입자 및 이산화탄소를 방출할 수 있다.
- [0041] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 탄산칼슘 복합 나노입자의 안정된 상태의 구조 및 작용을 도식화 한

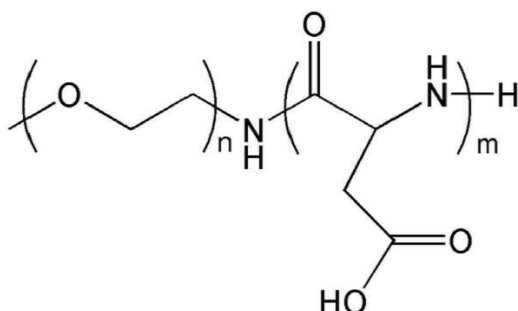
것이며, 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 탄산칼슘 복합 나노입자의 산성 조건 하의 구조 및 작용을 도식화한 것이다.

- [0042] 도 2 및 도3에 나타난 바와 같이, 상기 탄산칼슘을 포함하는 탄산칼슘 복합 나노입자의 코어부는 pH 7.0 이상의 염기성 조건하에서 용해되지 않으나, pH 4.0 내지 pH 6.5의 산성 조건하에서 용해될 수 있다. 즉, 상기 탄산칼슘 복합 나노입자는 pH가 7.0을 초과하는 혈류 내에서 안정한 상태로 존재하지만, 암 조직(pH 6.3 미만), 세포 내의 엔도솜(pH 5.0 미만) 및 라이소솜(pH 4.5 미만)의 낮은 pH 조건에서 코어부가 용해되어 이산화탄소 및 상기 코어부에 도입된 상자성 나노입자를 방출할 수 있다.
- [0043] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 탄산칼슘 복합 나노입자의 암 조직 내의 작용원리를 도식화한 것이다. 도 4에 나타난 바와 같이, 상기 탄산칼슘 복합 나노입자는 혈류 내에서 안정한 상태로 자유롭게 순환하며, 투과 상승 및 저류(EPR) 효과에 의해 암 조직에 침투하여 이산화탄소 및 상자성 나노입자를 방출할 수 있다.
- [0044] 일 실시예에 따르면, 상기 상자성 나노입자는 망간 화합물, 가돌리늄 화합물, 에르븀 화합물, 크롬 화합물, 철 화합물, 코발트 화합물, 및 니켈 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0045] 한편, 상기 탄산칼슘 복합 나노입자는 이온성 제1고분자 및 비이온성의 친수성 제2고분자로 구성된 공중합체를 포함할 수 있다.
- [0046] 일 실시예에 따르면, 상기 제1고분자 및 상기 탄산칼슘은 상기 코어부를 형성할 수 있고, 상기 제2고분자는 상기 코어부의 외주면을 둘러싸는 셸부를 형성할 수 있다. 상기 이온성 제1고분자는 탄산칼슘의 핵 형성 및 성장을 위한 주형으로 작용하여 탄산칼슘 코어부를 형성할 수 있으며, 상기 비이온성의 친수성 제2고분자는 수화된 셸부를 형성하고 분출과, 투과 상승 및 저류(enhanced permeation and retention, EPR) 효과를 위한 장기적인 순환에 기여할 수 있다.
- [0047] 상기 제1고분자는 상기 탄산칼슘과 함께 상기 코어부를 형성할 수 있는 이온성의 임의의 고분자일 수 있고, 상기 제2고분자는 상기 셸부를 형성할 수 있는 비이온성의 친수성 고분자일 수 있으며, 그 종류는 특별히 제한되지 않는다.
- [0048] 즉, 상기 코어-셸 구조의 복합 나노입자를 형성하는 상기 제1고분자는 탄산칼슘과 함께 상기 나노입자 내부에 위치하여 하나 이상의 코어 구조를 형성할 수 있으며, 상기 제1고분자와 연결된 상기 제2고분자는 친수성으로 인하여 상기 코어부를 둘러싸며 상기 나노입자의 외부 영역을 형성할 수 있다.
- [0049] 한편, 상기 복합 나노입자는 내부가 다중 코어를 이루는 경우, 상기 나노입자의 표면은 바람직하게는 상기 제2고분자로만 구성될 수 있다. 이때, 상기 탄산칼슘 및 상기 제1고분자가 응집되어 형성된 코어부는 상기 제2고분자의 일부를 포함할 수 있으나, 상기 복합 나노입자는 통상적인 코어-셸 구조로서 지칭될 수 있는 모든 나노입자 구조를 포괄할 수 있다.
- [0050] 일 실시예에 따르면, 상기 제1고분자는 양이온형 또는 음이온형일 수 있으며, 상기 제1고분자는 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 있다.
- [0051] 또한, 상기 제2고분자는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리옥사졸린(polyoxazoline), 폴리(N-비닐피롤리돈)(poly(N-vinylpyrrolidone)), 폴리비닐알코올(poly(vinyl alcohol)), 폴리히드록시에틸메타크릴레이트(polyhydroxyethyl methacrylate), 덱스트란(dextran) 또는 메틸셀룰로스(methylcellulose)일 수 있다.
- [0052] 상기 공중합체는 상기 이온성의 고분자 및 비이온성의 친수성 고분자로 구성되면 족하나, 바람직하게는 AB형 블록 공중합체 또는 그라프트 공중합체일 수 있다.
- [0053] 구체적으로, 상기 공중합체는 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), 폴리옥사졸린-히아루론산, 폴리옥사졸린-알긴산, 폴리옥사졸린-폴리(아크릴산), 폴리옥사졸린-폴리(메타크릴산), 폴리옥사졸린-키토산, 폴리옥사졸린-폴리에틸렌이민, 폴리옥사졸린-폴리(L-라이신), 폴리(N-비닐피롤리돈)-폴리(아스파르트산), 폴리(N-비

닐피롤리돈)-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, 또는 메틸셀룰로스-폴리(L-라이신)일 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, 또는 메틸셀룰로스-그래프트 폴리(L-라이신)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0054] 일 실시예에 따르면, 상기 AB형 블록 공중합체는 하기 화학식 1의 화합물(Poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid), PEG-PAsp)일 수 있다.

[0055] [화학식 1]



[0056]

- [0057] 상기 식에서, n은 10 내지 1000의 정수이고, m은 10 내지 300의 정수일 수 있고, 바람직하게는 n은 20 내지 200의 정수이고, m은 20 내지 100의 정수일 수 있다.
- [0058] 일 실시예에 따르면, 상기 탄산칼슘 복합 나노입자는 상기 코어부에 담지된 약물을 더 포함할 수 있으며, 상기 약물은 저분자량 약물, 유전자 약물, 단백질 약물 또는 이의 혼합물일 수 있다.
- [0059] 일 실시예에 따르면, 상기 저분자량 약물은 항암제로서 독소루비신(doxorubicin), 닥티토마이신(dactinomycin), 미토마이신(mitomycin), 블레오마이신(bleomycin) 시타라바인(cytarabine), 아자세르진(azaserzine), 메클로레타민(mechlorethamine), 시클로포스파마이드(cyclophosphamide), 트리에틸렌멜라민(triethylenemelamine), 트레오설판(treosulfan), 레티노익산(retinoic acid), 빈블라스틴(vinblastine) 또는 빈크리스틴(vincristine)일 수 있고, 항염증제로서 아스피린(aspirin), 살리실레이트(salicylates), 이부프로펜(ibuprofen), 플루로비프로펜(Flurobiprofen), 피록시캄(pyroccikam), 나프로센(naproxen), 페노프로펜(fenoprofen), 인도메타신(indomethacin), 페닐부타존(phenyltazone), 메소트렉세이트(methotrexate), 메클로레타민(mechlorethamine), 텍사메타손(dexamethasone), 프레드니솔론(prednisolone), 셀레콕시브(celecoxib), 발데콕시브(valdecoxib), 니메술리드(nimesulide), 코르티손(cortisone) 또는 코르티코스테로이드(corticosteroid)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0060] 또한, 상기 유전자(gene) 약물은 작은 간섭 리보핵산(small interfering RNA, siRNA), 작은 헤어핀 리보핵산(small hairpin RNA, shRNA), 마이크로 리보핵산(microRNA, miRNA), 또는 플라스미드 데옥시리보핵산(plasmid DNA)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0061] 또한, 상기 단백질(protein) 약물은 단일클론 항체(monoclonal antibody) 계열의 트라스트주맵(trastuzumab), 리투시맵(rituximab), 베바시주맵(bevacizumab), 세투시맵(cetuximab), 보테조밍(bortezomib), 엘로티닙(erlotinib), 제피티닙(gefitinib), 이매티닙 메실레이트(imatinib mesylate), 수니티닙(sunitinib); 효소(enzyme) 계열의 L-아스파라지나제(L-asparaginase); 호르몬(hormone) 계열의 트리톨레린 아세테이트(triptorelin acetate), 메제스트롤 아세테이트(megestrol acetate), 플루타미드(flutamide), 비카루타마 이드(bicalutamide), 고세레린(goserelin); 시토크롬 c(cytochrome c), 또는 p53 단백질일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0062] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 탄산칼슘 복합 나노입자를 포함하는 초음파 및 자기공명 이중 방식의 조영제 조성물이 제공된다.
- [0063] 즉, 상기 탄산칼슘 복합 나노입자는 암 조직의 pH 조건에서 초음파 조영을 위한 이산화탄소 기포를 생성하는 동시에 자기공명 조영을 위한 상자성 나노입자를 방출할 수 있으므로, 다양한 종류의 암을 진단하기 위한 초음파 및 자기공명 이중 방식의 조영제로서 활용될 수 있다.
- [0064] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 탄산칼슘 복합 나노입자를 포함하는 약물 전달체 조성물이 제공된다.
- [0065] 즉, 상기 탄산칼슘 복합 나노입자는 혈류 내에서는 용해되지 않고 안정한 특성을 나타내는 반면, 산성의 pH 조건에서 용해되는 용해 거동을 나타내므로, 암 조직 등 낮은 pH 조건에서 용해가 일어나 탄산칼슘에 담지되어 있는 약물을 방출할 수 있으므로 약물 전달체로서 사용될 수 있다.
- [0066] 한편, 상기 탄산칼슘 복합 나노입자는 혈류 내에서는 용해되지 않고 안정하며 암 조직 및 세포 내에서는 약물의 방출을 유도할 수 있으므로 정맥 주사제 형태로 투여될 수 있다.
- [0067] 즉, 상기 탄산칼슘 복합 나노입자는 혈액 내 pH에서 용해가 일어나지 않아 담지된 약물을 손실없이 안전하게 표적 조직으로 수송할 수 있으며, 산성의 pH 조건인 표적 조직 도달 후 탄산칼슘 미네랄이 용해되어 담지된 약물을 방출할 수 있으므로, 정맥 주사제로서 투여되는 경우 약물 전달 효과가 우수하다.
- [0068] 한편, 본 발명의 다른 측면에 따르면, (a) 이온성 제1고분자 및 비이온성의 친수성 제2고분자로 구성된 공중합체 수용액, 및 칼슘염 수용액을 혼합하는 단계; (b) 상기 (a)단계의 혼합물에 상자성 나노입자를 첨가하는 단계; 및 (c) 상기 (b)단계의 혼합물에 탄산염 수용액을 첨가하여 반응시키는 단계를 포함하는 탄산칼슘 복합 나노입자의 제조방법이 제공된다.
- [0069] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 탄산칼슘 복합 나노입자의 자가 조립 생성 방식을 도식화 한 것이다. 도 1에 본 발명의 일 실시예로서 113의 EG 단위 및 33의 Asp 단위를 갖는, 폴리(에틸렌 글리콜)-b-폴리(L-아스파테이트)(PEG₁₁₃-PASP₃₃)를 공중합체로 이용하여 탄산칼슘 복합 나노입자의 자발적인 형성을 유도하는 과정을 도식화

하였다.

- [0070] 상기 탄산칼슘 복합 나노입자는 특정 공중합체, Ca^{2+} 양이온, 상자성 나노입자 및 CO_3^{2-} 음이온이 연속적으로 첨가된 후 단일 반응 용기(one-pot) 내에서 자가 조립되어 생성될 수 있다. 상기 코어-셸 구조의 탄산칼슘 복합 나노입자는 탄산칼슘 및 이온성 제1고분자에 의해 형성된 복합 코어(core) 영역 내에 in-situ로 상자성 나노입자가 도입되고 비이온성의 친수성 고분자가 형성하는 셸(shell) 영역이 외곽을 둘러싸며 자발적으로 형성될 수 있다.
- [0071] 구체적으로, 상기 (a)단계에서 상기 제1고분자 및 상기 제2고분자로 구성된 공중합체 수용액, 및 상기 칼슘염 수용액이 혼합될 수 있다. 상기 칼슘염은 염화칼슘, 수산화칼슘 또는 질산칼슘일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0072] 일 실시예에 따르면, 상기 (a)단계에서 상기 공중합체의 이온기 및 상기 칼슘염의 몰비는 10:1 내지 10:10일 수 있다. 상기 공중합체 및 칼슘염의 몰비가 상기 범위를 벗어난 경우 상기 탄산칼슘 복합 나노입자가 효율적으로 형성되지 않거나, 탄산칼슘만으로 이루어진 나노입자가 형성될 수 있으므로 적절하게 제어하는 것이 바람직하다.
- [0073] 상기 (b)단계에서 상자성 나노입자는 상기 (a)단계의 혼합물에 첨가될 수 있으며, 상기 상자성 나노입자는 물에 용해된 수용액상으로 첨가될 수 있다.
- [0074] 상기 (c)단계에서 상기 탄산염 수용액이 상기 (b)단계의 혼합물에 첨가될 수 있다. 상기 탄산염은 탄산나트륨, 탄산수소나트륨, 탄산수소암모늄, 탄산암모늄, 탄산수소칼륨, 또는 탄산칼륨일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0075] 일 실시예에 따르면, 상기 탄산염은 상기 (b)단계의 혼합물 중에 존재하는 칼슘염, 즉, 상기 (a)단계의 칼슘염과 1:2 내지 2:1의 몰비로 첨가될 수 있다. 상기 탄산염 및 칼슘염의 몰비가 상기 범위를 벗어나면 반응 효율이 저하될 수 있으므로 반응 조건 및 작업 환경 등을 고려하여 적절히 제어할 수 있으며, 바람직하게는 동일 몰비로 첨가될 수 있다.
- [0076] 또한, 상기 (c)단계의 반응 시간은 5시간 내지 15시간일 수 있다. 상기 반응 시간이 짧으면 반응이 완료되지 않을 수 있고, 상기 반응 시간이 길면 부반응에 의한 부산물이 과도하게 생성될 수 있으므로, 반응 시간을 적절하게 제어하는 것이 바람직하다.
- [0077] 상기 (c)단계의 반응 온도는 10℃ 내지 30℃일 수 있다. 상기 반응 온도가 과도하게 낮으면 반응 효율이 저하될 수 있고, 상기 반응 온도가 과도하게 높으면 부반응에 의한 부산물이 과다 생성될 수 있으므로, 반응 조건 및 작업 환경 등을 고려하여 적절하게 제어하는 것이 바람직하다.
- [0078] 한편, 상기 공중합체 수용액, 상기 칼슘염 수용액 및 상기 탄산염 수용액의 pH는 7.0 내지 9.0일 수 있다. 또한, 상기 (b)단계에서 상기 상자성 나노입자가 수용액상으로 첨가되는 경우, 상기 상자성 나노입자 수용액의 pH는 7.0 내지 9.0일 수 있다. 상기 수용액의 pH가 상기 범위를 벗어나면 반응 효율이 저하되어 탄산칼슘이 생성되지 않거나 생성 속도가 과도하게 저하될 수 있으므로, 적정 범위로 유지하는 것이 바람직하다.
- [0079] 일 실시예에 따르면, 상기 탄산칼슘 복합 나노입자의 제조방법은 (d) 상기 (c) 단계의 반응물을 원심 분리하여 상층액을 회수하는 단계; (e) 상기 (d)단계의 상층액을 삼투 교환하는 단계; 및 (f)상기 삼투 교환된 용액을 동결건조하는 단계를 더 포함할 수 있다. 즉, 상기 (c)단계 이후에 상기 반응액은 원심 분리되고, 상기 분리된 상층액은 삼투 교환 후 동결 건조될 수 있다.
- [0080] 상기 원심분리는 800 내지 1200 rpm으로 2분 내지 5분 동안 수행될 수 있으며, 상기 삼투 교환은 삼투막 백을 이용하여 수행될 수 있다. 상기 삼투막 백의 분자량 제한은 250,000 내지 350,000일 수 있으며, 바람직하게는 300,000일 수 있다.
- [0081] 상기 탄산칼슘 복합 나노입자는 상기 삼투 교환된 상층액을 -15℃ 내지 -50℃에서 동결 건조시켜 분말 형태로 수득될 수 있다.
- [0082] 일 실시예에 따르면, 상기 (a)단계 이후에 약물을 첨가하여 혼합하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 약물은 상기 (a)단계 이후 수용액상으로 첨가될 수 있으며, 나노입자의 생성 과정에서 상기 코어부 내에 담지될 수 있다.

[0083] 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자라면 본 발명의 기재내용에 기초하여 각 구성의 도입 비율이나 중합 비율, 반응 시간 등을 변화시켜 적용할 수 있을 것이며, 상기 변형에도 불구하고 동등한 기술적 효과가 구현되는 경우라면, 본 발명의 기술적 사상에 포괄된다고 할 것이다.

[0084] 이하 본 발명의 내용을 실시예를 통해 더욱 구체적으로 설명한다.

[0086] 제조예 1: PEG-PAsp 공중합체의 제조

[0087] 상기 상자성 나노입자가 도입된 탄산칼슘 복합 나노입자를 제조하기 위하여 메톡시-폴리(에틸렌글리콜)-아민(Methoxy-Poly(Ethylene Glycol)-amine; mPEG-NH₂, Mn = 5000 g/mol)은 SUNBIO 사(Seoul, Korea)로부터 구입하여 사용하였다. 또한, β-벤질 L-아스파테이트(β-Benzyl L-aspartate; BAsp), 트리포스겐(triphosgene), 염화칼슘(calcium chloride; CaCl₂), 탄산나트륨(sodium carbonate; Na₂CO₃), 디메틸포름아미드(dimethylformamide; DMF), 아르세나조 III(arsenazo III), 가돌리늄(III) 아세테이트 산화물(gadolinium(III) acetate hydrate), 암모늄 아세테이트(ammonium acetate)는 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo)로부터 구입하였다. 테트라메틸암모늄 수산화물(Tetramethylammonium hydroxide; TMAH)은 Tokyo Chemical Industry Co., Ltd (Tokyo, Japan)로부터 구입하였다. 모든 다른 화합물 및 용매는 분석용 등급이며 추가적인 정제과정 없이 사용하였다.

[0088] 먼저, 113개 EG 단위 및 33개 BAsp 단위를 갖는 폴리(에틸렌글리콜)-b-폴리(β-벤질-L-아스파테이트)(PEG₁₁₃-PAsp₃₃)를 합성하였다.

[0089] 건조 DMF(100 mL) 중의 CH₃O-PEG-NH₂(1 g, 0.2 mmol) 교반 용액에 질소 하, 35℃에서 BAsp-NCA(2.99 g, 12 mmol)를 첨가하였으며, 상기 반응을 24 시간 동안 유지시켰다. PEG₁₁₃-PBAsp₃₃를 DMF로부터 디에틸 에테르로 반복적으로 침전시켜 분리하였다(수율 61%). 이어서, 벤질기를 제거하기 위하여 상기 블록 공중합체(2 g)를 0.1 N NaOH(100 mL)로 처리함으로써 PEG₁₁₃-PBAsp₃₃의 탈보호를 수행하였다. 상기 수용액은 24 시간 동안 막(Molecular weight cut-off(MWCO): 3500)에 의해 투석되었으며, 동결 건조되었다.

[0090] 상기 탄산칼슘 복합 나노입자의 무기화를 위한 주형(nanotemplate)으로서 PEG-PAsp의 이중블록 공중합체를 합성하였다. 낮은 독성 및 면역원성을 위하여, FDA-승인된 PEG 및 생분해성 폴리(아미노산)를 선택하여 사용하였다. PEG-PAsp는 고분자 개시제(macroinitiator)로서 CH₃O-PEG-NH₂의 존재 하에 β-벤질 L-아스파테이트 N-카복시안하이드라이드(BAsp-NCA)의 중합 및 추가적인 탈보호 과정에 의해 제조되었다. 1H-NMR 분석으로 PEG-PAsp의 합성을 확인한 결과 EG 대 PAsp의 성분비가 113:33으로 확인되었다.

[0092] 제조예 2: 상자성 나노입자(Gd₂O₃)가 도입된 탄산칼슘 복합 나노입자의 제조

[0093] 이중블록 공중합체 상에 탄산칼슘으로 인 시츄 무기화(in-situ mineralization)하고 무기화 코어 내로 Gd₂O₃ 나노입자를 도입하여 탄산칼슘 복합 나노입자를 제조하였다. 먼저, 준비된 PEG₁₁₃-PAsp₃₃(200 mg, 0.023 mmol)을 pH 8의 수용액에 용해시킨 후 CaCl₂ 수용액(2 mL, 0.75 mmol)과 혼합하였다. 칼슘이온(Ca²⁺)에 대한 아스파테이트(Asp)의 몰 농도비는 1:1로 하였다. 2시간 경과 후, Gd₂O₃ 나노입자(20mg)를 첨가하고 2시간 동안 상온에서 교반하였다. 마지막으로, 이중블록 공중합체 상에 탄산칼슘 무기화를 개시하기 위하여 Na₂CO₃ 수용액(2 mL, 0.75 mmol)을 상기 혼합물에 서서히 적가하고, 상온에서 12시간 동안 격렬히 교반하였다.

[0094] 반응하지 않은 이온종 및 담지되지 않은 Gd₂O₃ 나노입자를 제거하기 위하여, 막(Molecular weight cut-off(MWCO): 300 kDa)을 이용하여 용액을 증류수에서 4시간 동안 투석하고, 동결 건조하여 흰색분말을 수득하였다. 1M HNO₃ 수용액에 Gd₂O₃-도입 탄산칼슘 무기화 나노입자를 붕괴시킨 후 ICP-AES를 사용하여 Gd₂O₃ 나노입자 도입 함량(loading content)을 결정하였다. Gd₂O₃-미도입 무기화 나노입자는 상기 Gd₂O₃ 나노입자를 첨가하는 단계를 제외하고는 동일한 방법으로 제조되었다.

- [0096] 실험예 1: 상자성 나노입자(Gd_2O_3)가 도입된 탄산칼슘 복합 나노입자의 특성분석 및 혈청안정성 조사
- [0097] 상자성 나노입자(Gd_2O_3)가 도입된 탄산칼슘 복합 나노입자의 직경 및 크기분포를 동적광산란분석(dynamic light scattering analysis)으로 측정하였다. 상기 무기화된 탄산칼슘 복합 나노입자를 PBS 용액(1 mg/ml, pH 7.4)에 분산시키고 수조형 초음파처리기를 이용하여 10분 동안 초음파 처리하였으며, 90 플러스 입자 크기 분석(Brookhaven Instruments Corporation)을 이용하여 동적광산란 측정을 수행하였다.
- [0098] 상기 상자성 나노입자(Gd_2O_3)가 도입된 탄산칼슘 복합 나노입자의 형태는 200kV의 가속 전압에서 구동한 투과 전자 현미경(transmission electron microscopy; TEM, JEM-2100F, JEOL)에 의해 결정되었다. 각각의 시료를 증류수에 용해시키고 탄소 코팅된 200 메쉬 구리 그리드 상에 떨어뜨렸다. 200kV의 가속 전압에서 구동한 INCA(Oxford)를 구비한 JEM-2100F(JEOL)을 이용하여 TEM-결합 에너지-분산 X-선 광전자 분광(TEM-associated energy-dispersive X-ray photoelectron spectroscopy; EDS) 측정을 수행하였다. 무기화된 탄산칼슘 복합 나노입자의 면적을 원자 성분을 보여주는 EDS mapping으로 평가하였다. 혈청안정성을 확인하기 위하여, 동적광산란 분석을 사용하였다.
- [0099] 상기 탄산칼슘 복합 나노입자(2mg)를 인산완충용액(PBS, pH 7.4)과 혈청용액(1ml, 50% fetal bovine serum)에 침지시켰다. 적정 시간 간격으로, 분산된 광 세기(scattered light intensity; SLI)를 분석하였으며 초기 SLI(SLI0)와 비교하였다.
- [0100] 도 5(a)는 염색 과정 없이 무기화된 탄산칼슘 코어부의 형태 및 다형체의 특성을 보여준다. TEM 이미지는 나노입자의 크기가 대략 300 내지 400 nm임을 나타내었다. 도 5(b)의 EDS mapping은 상기 탄산칼슘 복합 나노입자가 상기 Gd_2O_3 와 탄산칼슘 미네랄을 구성하는 Ca, O, 및 Gd를 주로 함유하고 있음을 나타낸다.
- [0101] 또한, 도 6에 나타난 바와 같이 FT-IR ($CaCO_3$ peak at $877cm^{-1}$)을 통해 바테라이트(vaterite) 형태의 탄산칼슘의 존재가 확인되었다. 또한, ICP-AES를 이용해 Gd_2O_3 나노입자 도입량이 9.09 wt%임을 확인하였다.
- [0103] 실험예 2: 상자성 나노입자(Gd_2O_3)가 도입된 탄산칼슘 복합 나노입자의 기체 발생량 분석
- [0105] 상기 상자성 나노입자(Gd_2O_3)가 도입된 탄산칼슘 복합 나노입자로부터 발생한 기체의 양은 사중극자 질량 분광계(Prisma QME 200, Germany)에 의해 측정되었다. 상기 기기는 Faraday cup 검출기를 포함한다. 발생한 증기를 0.058 mA의 방출 전류, 8 eV의 전자 에너지, 및 750의 해상도로 분석하였다. 시료 챔버는 터보 분자 펌프(Pfeiffer vacuum, CA, USA)로 진공화시켰으며 상온에서 측정하였다. 2 ml의 완충수용액(pH 7.4 및 pH 6.4의 인산염완충액) 및 20 mg의 탄산칼슘 복합 나노입자를 샘플러에 각각 투입하였다. 챔버 내 완충용액을 진공 조건 하에서 동결시키고 완충용액에 30분 노출 후 해빙시켰다. 대조군으로서, 인산염 완충용액 내 존재하는 잔류 이산화탄소의 양(pH 7.4) 및 인산염 완충용액 내 PEG-PAsp 중합체로부터 발생하는 이산화탄소의 양(pH 7.4)을 동일한 방법으로 측정하였다. 상기 탄산칼슘 복합 나노입자로부터 발생한 이산화탄소 기체의 양은 37°C에서 pH 제어 하에 질량 분광계를 이용하여 측정하였다.
- [0106] 도 7에 나타난 바와 같이, pH 7.4 완충용액 내에 존재하는 이산화탄소의 양(0.070 cc/atm)을 대조군으로 사용하였다. 또한, PEG-PAsp 중합체로부터 발생한 이산화탄소의 양(pH 7.4 (0.068 cc/atm)은 pH 7.4 완충용액 내 이산화탄소의 존재하는 잔류 이산화탄소의 양과 거의 차이가 없어, PEG-PAsp 중합체가 이산화탄소 기체를 발생시키지 않음을 확인하였다. 반면, 상기 무기화 Gd_2O_3 -NP는 pH 6.4 완충용액에서 상당량의 이산화탄소 기체(0.798 cc/atm)를 발생시켰으나, pH 7.4에서 발생된 이산화탄소는 0.159 cc/atm에 불과하였다.
- [0107] pH 수준이 감소될 때, $CaCO_3$ 의 수용해도는 급격하게 증가할 수 있다. 탄산칼슘 미네랄은 산과 반응하여 탄산을 생성하고 CO_3^{2-} 의 농도가 감소하므로 $CaCO_3$ 가 더욱 용해될 수 있으며, 결과적으로 탄산은 CO_2 기체를 방출할 수 있다.
- [0108] 따라서, 상기 무기화 Gd_2O_3 -NP는 pH-감응성 기체-생성 특성으로 인해 암 조직의 산성 환경에서 암 조직을 표적으로 하는 초음파 조영제로서 활용 가능하다.

[0110] 실험예 3: 시험관 내 초음파 영상화

[0111] 상기 상자성 나노입자(Gd_2O_3)가 도입된 탄산칼슘 복합 나노입자의 시험관 내 초음파 영상화는 완충용액(pH 7.4 및 pH 6.4의 인산염 완충액) 내에서 수행하였다.

[0112] 아가-겔 내에 500 μl 에펜도르프 튜브를 삽입한 다음 팬텀 겔이 냉각된 후에 상기 튜브를 제거하여 제조한 팬텀 겔 플레이트(phantom gel plate)를 시험관 내 조건으로서 사용하였다. 초음파 이미지는 정적 상태(static state)로 40 MHz에서 RMV 706 변환기가 장착된 Visualsonics Vevo 770®(High-Resolution Micro-Imaging System, Visualsonics, Toronto, Canada)을 통해 획득하였다.

[0113] 나노입자 용액(25 mg/mL)은 다양한 pH 조건에서 제조되었다. 각각의 시료에 대한 초음파 세기의 변화를 60분까지 측정하고, 물 대조군의 초음파 세기를 표준화 과정에 따라 상기 시료 세기로부터 차감하였다.

[0114] 도 8에 나타난 바와 같이, 상기 무기화 Gd_2O_3 -NP(pH 7.4)는 초음파 이미지 하에 임계적인 음향 반사 조영(acoustic reflectivity contrast)을 보이지 않았다. 즉, pH 7.4 조건에서 시각화하기 위한 충분한 이산화탄소 기체를 생성하지 않는 무기화 Gd_2O_3 -NP가 초음파 조영성(echogenic)을 가지지 않기 때문이다. 반면, 상기 무기화 Gd_2O_3 -NP의 초음파 조영 이미지는 약한 산성 pH 조건(pH 6.4)에서 유의적으로 증가하였다.

[0115] 상기 결과는 이산화탄소 기체 발생량과 관련이 있으며, 특정 세포의 pH(암 조직의 산성 pH 6.4)에서 조영 증강을 나타내는 무기화 Gd_2O_3 -NP의 현미경 이미지는 이산화탄소 기포의 생성이 초음파 필드 하의 공명(resonance)으로 인한 것임을 보여주었다.

[0116] 특히, 상기 무기화 Gd_2O_3 -NP의 pH-감응성 기체 생성 특성을 이용하여, 암 조직 및 정상 조직을 초음파 이미징 하에 실시간으로 정확하게 구별할 수 있다. 또한, 상기 Gd_2O_3 -NP는 암 조직 진단을 위한 Gd_2O_3 나노입자 기초의 자기공명 이미징을 동시에 수행할 수 있다.

[0118] 실험예 4: 시험관 내 자기공명 영상화

[0119] 상기 상자성 나노입자(Gd_2O_3)가 도입된 탄산칼슘 복합 나노입자의 시험관 내 자기공명 영상화는 완충용액(pH 7.4 및 pH 6.4의 HEPES 완충액) 내에서 수행되었다. 아가-겔 내에 500 μl 에펜도르프 튜브를 삽입한 다음 팬텀 겔이 냉각된 후에 상기 튜브를 제거하여 제조한 팬텀 겔 플레이트(phantom gel plate)를 시험관 내 조건으로서 사용하였다. 자기공명 이미지는 정적 상태(static state)로 Agilent 9.4T 160/AS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)을 사용하여 획득하였다. 나노입자 용액(25 mg/mL)을 다양한 pH에서 제조되었으며, 각각의 시료에 대한 자기공명 세기의 변화는 10분 경과 후 측정되었다.

[0120] 도 9에 나타난 바와 같이, 상기 무기화 Gd_2O_3 -NP(pH 7.4)는 자기공명 이미지 하에 임계적인 T1-강조신호(T1-weighted signal)을 보이지 않았다. 즉, $CaCO_3$ 코어부는 pH 7.4 하에서 수성 환경으로부터 Gd_2O_3 나노입자를 차폐하였다. 반면, 무기화 Gd_2O_3 -NP의 자기공명 조영 이미지는 약한 산성 pH 조건(pH 6.4)에서 유의적으로 증가하였다.

[0121] 즉, 상기 결과는 특정 세포의 pH(암 조직의 산성 pH 6.4) 내에서 $CaCO_3$ 코어부의 용해에 따라 Gd_2O_3 나노입자의 방출이 유도되어 물 분자와의 상호작용이 가능해지기 때문임을 시사한다.

[0122] 특히, 상기 무기화 Gd_2O_3 -NP의 pH-감응성 Gd_2O_3 나노입자 방출 특성을 이용하여, 암 조직 및 정상 조직을 자기공명 이미징 하에 높은 해상도로 정확하게 구별할 수 있다.

[0124] 실험예 5: 상자성 나노입자(Gd_2O_3)가 도입된 탄산칼슘 복합 나노입자의 시험관 내 칼슘이온 방출량 분석

[0125] 상기 상자성 나노입자(Gd_2O_3)가 도입된 탄산칼슘 복합 나노입자로부터 칼슘이온(Ca^{2+})의 시험관 내 방출 거동을

완충수용액(HCl로 조정된 pH 7.4 인산염 완충액 및 pH 6.4 완충용액) 내에서 확인하였다. 각각의 방출 용액 내에 분산시킨 후, 무기화 Gd_2O_3 -NP(3 mg/ml)를 투석 막 백(MWCO: 3,500, Spectra/Por®)에 투입하였다. 10ml의 각각의 방출 매질 내에 전체적으로 잠긴 막 백을 70 rpm으로 셰이킹하였다. 방출 매질은 일정 시간 간격으로 새로운 것으로 교체되었다. 칼슘 이온의 누적량은 UV-VIS 분광광도계를 사용하여 Ca^{2+} 이온과 아르세나조 III(arsenazo III) complex의 656nm에서의 흡광도를 측정함으로써 분석되었다.

[0126] 도 10에 나타난 바와 같이, 무기화 Gd_2O_3 -NP는 인산염 완충식염수(PBS, pH 7.4)에서 24 시간 후에도 칼슘이온을 단지 18% 방출하였으며, 이는 무기화 Gd_2O_3 -NP의 코어부는 중성 pH에서 안정하게 유지되고 있음을 시사한다.

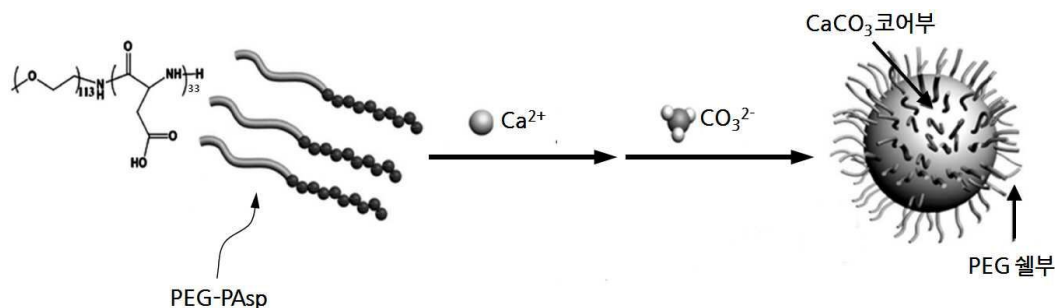
[0127] 한편, 무기화 Gd_2O_3 -NP는 산성 용액(pH 6.4)에서 24시간 후에 칼슘이온을 76%까지 급속하게 방출하였다. 즉, 상기 결과는 탄산칼슘 코어부는 산성 용액에 용해되며 초음파 및 자기공명 이중 방식 조영을 위하여 이산화탄소 및 Gd_2O_3 나노입자를 동시에 방출 수 있음을 시사한다.

[0129] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

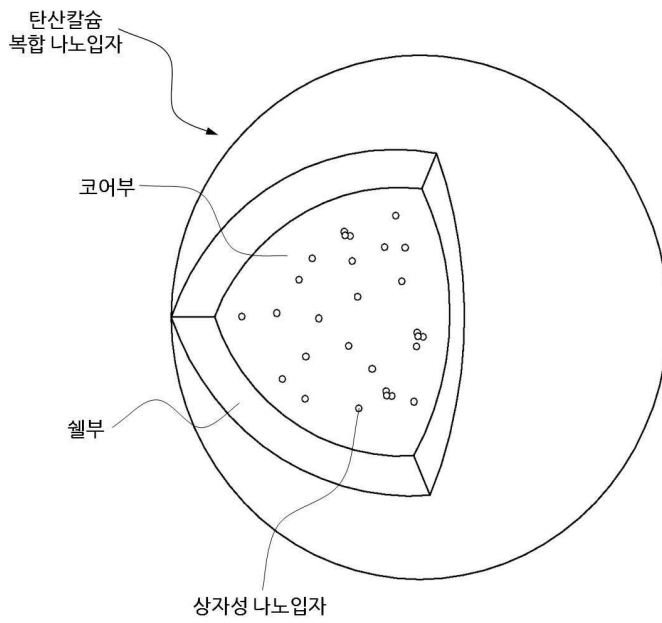
[0130] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

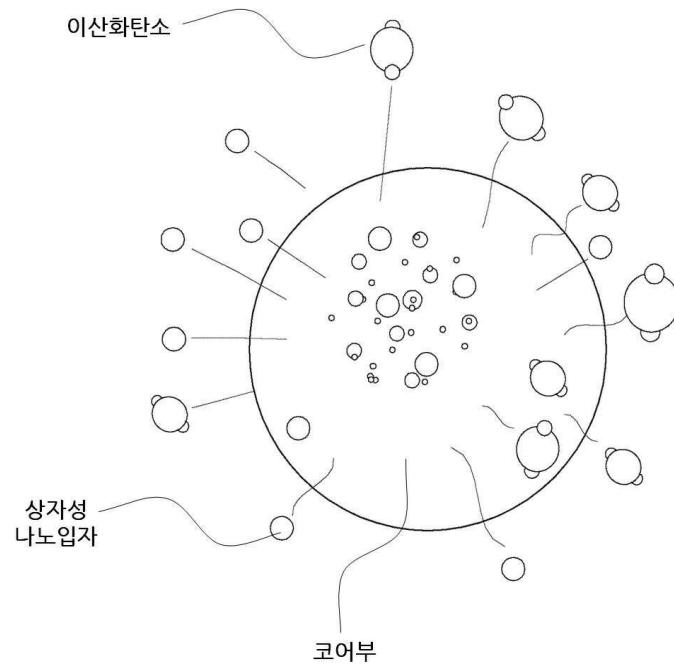
도면1



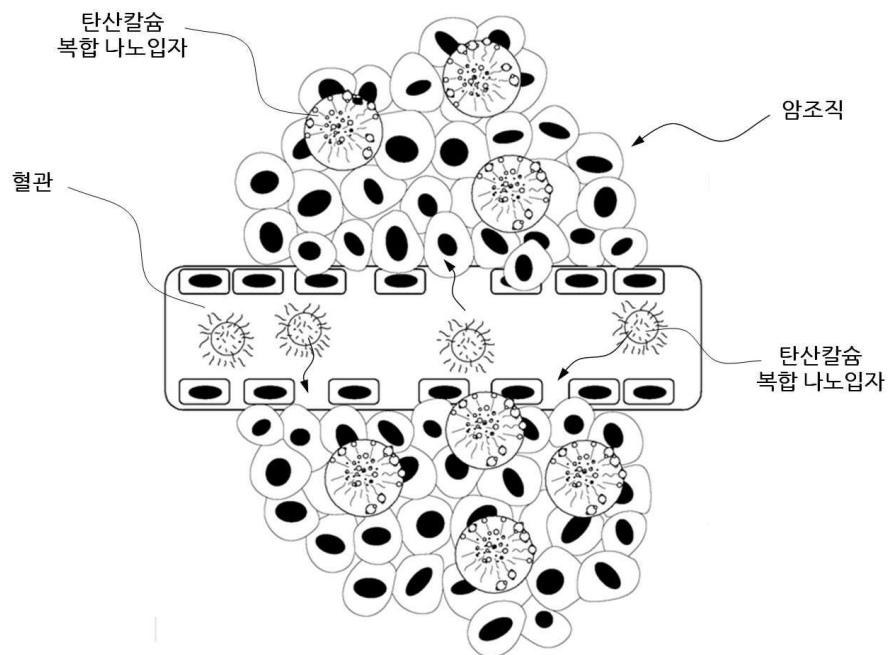
도면2



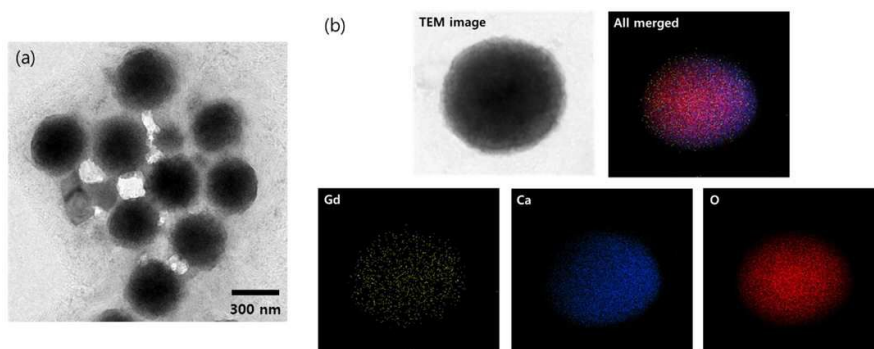
도면3



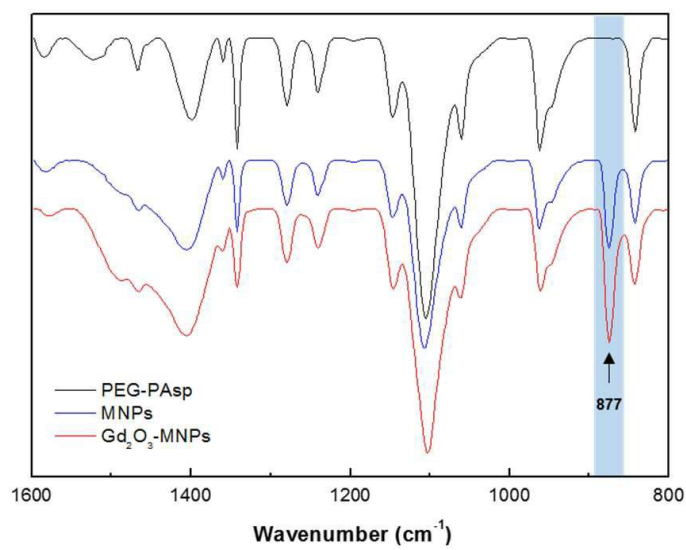
도면4



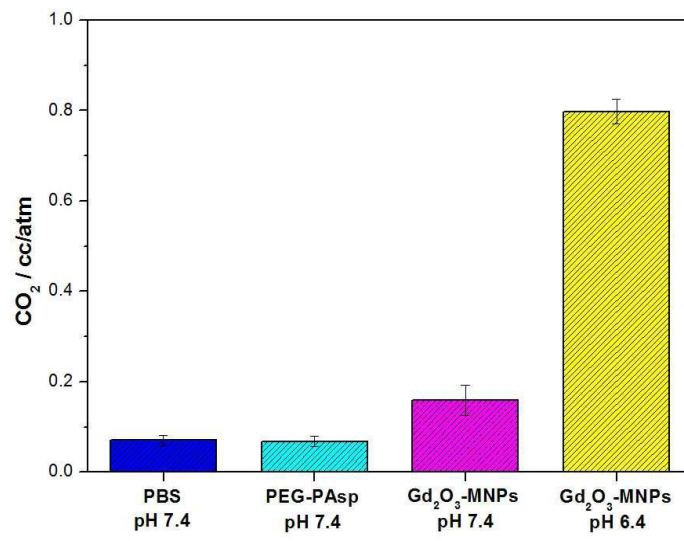
도면5



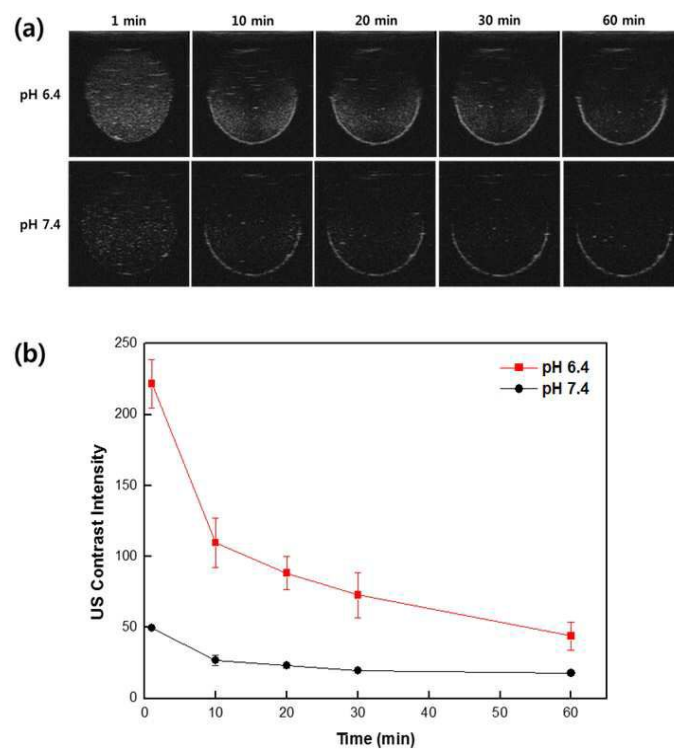
도면6



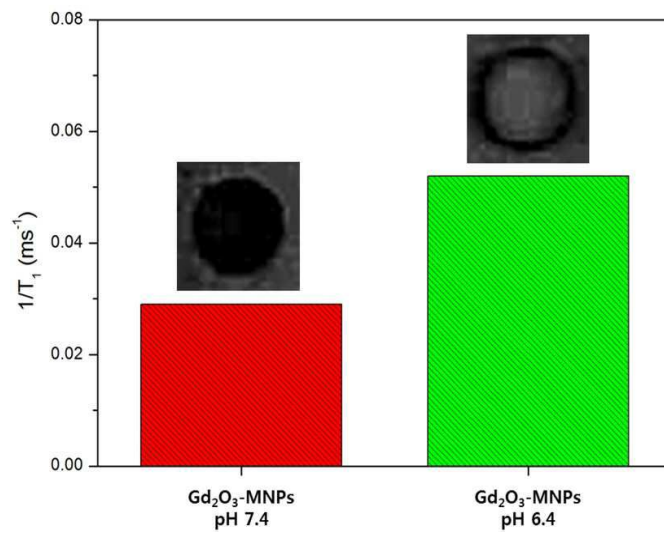
도면7



도면8



도면9



도면10

