

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-515020

(P2014-515020A)

(43) 公表日 平成26年6月26日 (2014. 6. 26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/00 C	4 C 0 8 5
B 8 2 Y 25/00 (2011.01)	B 8 2 Y 25/00	
B 8 2 Y 40/00 (2011.01)	B 8 2 Y 40/00	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 20 頁)

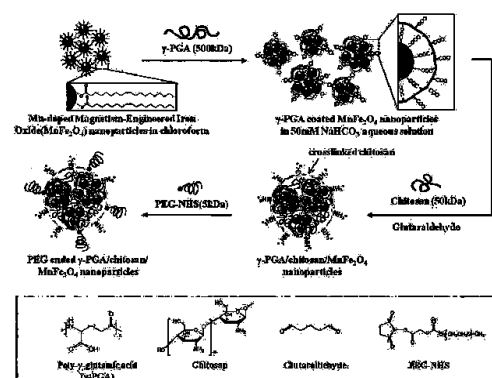
(21) 出願番号	特願2014-503576 (P2014-503576)	(71) 出願人	506010208
(86) (22) 出願日	平成23年4月7日 (2011. 4. 7)		バイオリダーズ コーポレーション
(85) 翻訳文提出日	平成25年12月9日 (2013. 12. 9)		B I O L E A D E R S C O R P O R A T I O N
(86) 国際出願番号	PCT/KR2011/002433		大韓民国, テジョン 305-500, ユ
(87) 国際公開番号	W02012/137999		ソンーク, ヨンサンードン 559
(87) 国際公開日	平成24年10月11日 (2012. 10. 11)	(71) 出願人	513252404
(31) 優先権主張番号	10-2011-0031665		ザ インダストリー アンド アカデミッ
(32) 優先日	平成23年4月6日 (2011. 4. 6)		ク コオペレーション イン チュンナム
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)		ナショナル ユニバーシティ (アイエー
			シー)
			大韓民国, 305-764, テジョン, ユ
			ソンーグ, デハクノ 79

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 陰イオン性高分子及び陽イオン性高分子イオン複合体基盤高感度磁気共鳴映像ナノ造影剤及びその製造方法

(57) 【要約】

本発明は、陰イオン性及び陽イオン性高分子を含有するナノ複合体及びこれらの製造方法に関し、生体親和性高分子物質のポリガンマグルタミン酸 (γ -PGA) とキトサンのイオン性自己組立性を利用して、酸化鉄基盤ナノ粒子を γ -PGA/キトサン高分子複合体内部に封入して製造したポリガンマグルタミン酸 (γ -PGA)/キトサン/マンガン酸化鉄ナノ粒子の複合体及びその製造方法に関する。本発明による陰イオン性ポリガンマグルタミン酸 (γ -PGA) と陽イオン性キトサンを利用したイオン性組み立てを介して、酸化鉄基盤ナノ粒子は高分子複合体内部で封入して、複合体内部に閉じ込められている酸化鉄基盤ナノ粒子が、互いの相互作用により磁気共鳴信号増幅の相乗効果を誘発するため、一つの粒子として存在する時より優れた造影効果を有する特徴がある。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

次の工程を含む陰イオン性高分子及び陽イオン性高分子のイオン結合によって形成された高分子複合体に磁気共鳴映像ナノ造影剤が封入されているナノ粒子複合体の製造方法:

(a) 陰イオン性高分子を含む有機溶媒溶液と磁気共鳴映像ナノ造影剤を含む有機溶媒溶液とを混合して、陰イオン性高分子/磁気共鳴映像ナノ造影剤複合体を取得する工程; 及び

(b) 前記取得された陰イオン性高分子/磁気共鳴映像ナノ造影剤複合体に陽イオン性高分子を添加して、陰イオン性高分子及び陽イオン性高分子のイオン結合によって形成された高分子複合体に磁気共鳴映像ナノ造影剤が封入されているナノ粒子複合体を取得する工程。

10

【請求項 2】

前記陰イオン性高分子は、ポリグルタミン酸、ポリアクリル酸、アルギン酸、カラギナン、ヒアルロン酸、ポリスチレンスルホン酸塩、カルボキシメチルセルロース、セルロース硫酸塩、デキストラン硫酸塩、ヘパリン、ヘパリン硫酸塩、ポリメチレンコグアニジン及びコンドロイチン硫酸塩からなる群から選択されることを特徴とする請求項 1 に記載のナノ粒子複合体の製造方法。

【請求項 3】

前記陽イオン性高分子は、キトサン、ポリエチレンイミン、ポリ L - リジン、ポリジアリルジメチル塩化アンモニウム、ポリアリルアミン、塩酸塩、ポリオルニチン、ポリビニルアミン塩酸塩、ポリ 2 - ジメチルアミノエチルメタクリレート、ポリアミドアミン、デンドリマー及びゼラチンからなる群から選択されることを特徴とする請求項 1 に記載のナノ粒子複合体の製造方法。

20

【請求項 4】

前記磁気共鳴映像ナノ造影剤は、鉄 (Fe)、マンガン (Mn)、コバルト (Co)、ガドリニウム (Gd)、プラセオジウム (Pr)、サマリウム (Sm)、ユーロピウム (Eu)、テルビウム (Tb)、ジスプロシウム (Dy)、ホルミウム (Ho)、エルビウム (Er)、ツリウム (Tm)、イッテルビウム (Yb)、ルテニウム (Lu) 及びこれらの複合体からなるナノ粒子群から選択されることを特徴とする請求項 1 に記載のナノ粒子複合体の製造方法。

30

【請求項 5】

請求項 1 から請求項 4 のいずれか一項に記載の方法で製造され、陰イオン性高分子及び陽イオン性高分子のイオン結合によって形成された高分子複合体に磁気共鳴映像ナノ造影剤が封入されているナノ粒子複合体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、陰イオン性及び陽イオン性高分子を含有するナノ複合体及びその製造方法に関し、生体親和性高分子物質のポリガンマグルタミン酸 (γ -PGA) とキトサンのイオン性自己組立性 (ionic self-assembly) を利用して、酸化鉄基盤ナノ粒子を γ -PGA/キトサン高分子複合体内部に封入して製造したポリガンマグルタミン酸 (γ -PGA)/キトサン/マンガン酸化鉄ナノ粒子の複合体及びその製造方法に関する。

40

【背景技術】

【0002】

磁気共鳴映像 (magnetic resonance imaging, MRI) は、磁場を発生する大きな磁石筒の中に人体が入った後、高周波を発生させて、身体部位にある水素原子核を共鳴させて、各組織から出る信号の差を測定して、コンピュータを介して再構成して、映像化する技術である。磁石で構成された装置から人体に高周波を照射して、人体からこだまのような信号が発散されると、これを受けて、デジタル情報に変換し

50

て、映像化することをいう。

【0003】

磁気共鳴映像 (MRI) は、X線を利用した検査である単純X線撮影やCTとは違って、非電離放射線である高周波を利用する検査であるため、人体には事実上害がないことが重要な長所の一つである。人体に害がない磁場と非電離放射線である高周波を利用して、CTに比べて、造影剤なしで体内軟部組織の優れたコントラストが得られ、そして水素原子核を含有した組織の生化学的特性に関する情報を得ることができる。人体を断面で見せるという点では、CTと似ているがCTでは人体を横で切った形である横断面映像が中心になるが、MRIは、患者の姿勢変化なしに望む方向に応じて、人体に対して横軸方向、縦軸方向、斜め方向等の映像を自由に得ることができる長所もある。

10

【0004】

しかし、人体は、70%以上が水分からなり、その濃度の部分的な差も大きくないために、磁気共鳴信号を映像化する過程でイメージの感度が低い傾向を示すため、同じ臓器内で、正常組織と異常組織を区分するのに限界があり、病気の早期診断が容易ではないことが短所である。

【0005】

MRI造影剤とは、信号の差を極大化させて、磁気共鳴映像の感度を向上させる補助物質として既に臨床に広く利用されており、大きく T_1 と T_2 造影剤に分れるが、 T_1 は標識された部分が周辺の組織より明るく見える効果がある反面、 T_2 は標識された部分が暗く見える効果がある。現在、臨床に利用されている代表的な T_1 造影剤は、ガドリニウムイオン (Gd^{3+}) があって、 T_2 造影剤には酸化鉄ナノ粒子が用いられる。

20

【0006】

最近では、MRI造影剤を利用して、人体内の特定部位を標識して、経時的発達過程を観察するか、または特定細胞又は外部物質を標識して人体内部に取り込ませた後、その移動経路を探索する研究が活発に進められている。これは、これまで究明できなかった疾患の発病原因を明らかにするか、新薬の治療過程、または代謝過程を明らかにできる手がかりを提供する。

【0007】

現在臨床に用いられている代表的な酸化鉄ナノ粒子基盤造影剤は、水溶液相に塩化第一鉄水和物 ($FeCl_2 \cdot H_2O$) と塩化第二鉄水和物 ($FeCl_3 \cdot H_2O$) を溶解させた後、塩基の雰囲気誘導して、鉄イオンを還元させる方法で得られる。この時、多糖類の一種であるデキストラン (Dextran) を添加して、酸化鉄ナノ粒子表面にコーティング膜を形成するようになるが、これは粒子の安全性を維持するためである。このように合成されたナノ粒子は、生体親和性が優れる長所があるが、粒子の大きさが小さく、表面結晶性が落ちて、磁気共鳴信号増幅効果が低い。また、人体内の特定部位を選択的に標識するためのターゲットリガンドを化学的に結合させられる官能基がない短所がある。結果的に、ターゲット指向的な粒子形成が難しく、細胞や分子単位の標識を感知するには、その造影効果が十分ではないとの限界を示している。

30

【0008】

最近、水溶液法で合成された酸化鉄ナノ粒子の代替物質として、有機溶媒相で高温状態で合成された酸化鉄ナノ粒子の応用が注目を浴びているが、この方法は、高温の状態で鉄イオンの粒子形成が徐々に起きるため、その大きさと形が非常に均一に形成され、表面結晶性も非常に優れている。また、合成時粒子安定化のために添加する界面活性剤の量や反応温度を変化させることで、ナノ粒子の大きさを簡単に調節することができる長所がある。最近酸化鉄粒子にマンガンやコバルトのような遷移金属を少量添加することによって信号増幅効果を画期的に向上させたナノ粒子が報告されているが、有機溶媒相で合成を行うため、疎水性を示して、人体内に取り込むためには必ず水溶液相への相転移 (Phase transfer) 過程が必須である。これのため、疎水性ナノ粒子の表面を両親性リン脂質や疎水性基を化学的に導入した生分解性高分子物質でコーティングする方法が利用されているが、このような方法は、粒子安定性と生体適合性の側面から多くの問題がある

40

50

。

【 0 0 0 9 】

また、イオン結合をする陰イオンと陽イオンを含むナノ粒子の製造方法（米国特許出願公開US 2 0 0 9 / 0 1 8 0 9 6 6号明細書）は、金属イオンを磁気共鳴映像造影剤で用いて、陰イオン及び陽イオン性高分子と複合体を形成するか、これはナノ粒子形態の磁気共鳴映像造影剤を利用したものよりは磁気映像共鳴信号の感度が顕著に落ちるものである。また、金属イオンは、毒性が非常に強く、現実的に磁気共鳴映像造影剤として用いることは難しいという問題がある。

【 0 0 1 0 】

そこで、本発明者等は、生体親和性高分子物質であるポリガンマグルタミン酸（ γ PGA）とキトサンのイオン性自己組立性を利用して、磁気共鳴映像ナノ造影剤を製造しようと鋭意努力した結果、酸化鉄基盤ナノ粒子をポリガンマグルタミン酸（ γ PGA）とキトサン高分子複合体内部に封入した場合、磁気共鳴信号を効果的に増加させて、人体内の特定細胞や器官の標識感度を向上させることを確認して、本発明を完成した。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 1 1 】

本発明の目的は、酸化鉄基盤ナノ粒子をポリガンマグルタミン酸（ γ PGA）とキトサン高分子複合体内部に封入して、磁気共鳴信号を効果的に増加させて、人体内の特定細胞や機関の標識感度を向上させるナノ粒子磁気共鳴映像ナノ造影剤を含有する陰イオン性高分子と陽イオン性高分子を含有するナノ粒子複合体の製造方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 2 】

前記目的を解決するために、本発明は（a）陰イオン性高分子を含む有機溶媒溶液と磁気共鳴映像ナノ造影剤を含む有機溶媒溶液を混合して、陰イオン性高分子／磁気共鳴映像ナノ造影剤複合体を取得する工程；及び（b）前記取得された陰イオン性高分子／磁気共鳴映像ナノ造影剤複合体に陽イオン性高分子を添加して、陰イオン性高分子及び陽イオン性高分子のイオン結合によって形成された高分子複合体に磁気共鳴映像ナノ造影剤が封入されているナノ粒子複合体を取得する工程を含む陰イオン性高分子及び陽イオン性高分子のイオン結合によって形成された高分子複合体に磁気共鳴映像ナノ造影剤が封入されているナノ粒子複合体の製造方法を提供する。

【 0 0 1 3 】

本発明はまた、前記方法で製造されて、陰イオン性高分子及び陽イオン性高分子のイオン結合によって形成された高分子複合体に磁気共鳴映像ナノ造影剤が封入されているナノ粒子複合体を提供する。

【 0 0 1 4 】

本発明の他の特徴及び実施態様は、以下の詳細な説明及び添付された特許請求範囲からより一層明白になる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 5 】

【図1】酸化鉄基盤ナノ粒子を封入したポリガンマグルタミン酸（ γ PGA）／キトサン複合体合成方法に関するものである。

【図2】水溶液相に分散したポリガンマグルタミン酸（ γ PGA）／キトサン／酸化鉄基盤ナノ粒子複合体の近くに永久磁石を並べて置いた時、時間経過に応じた粒子の磁性に関する図面である。

【図3】（A）ポリガンマグルタミン酸（ γ PGA）／キトサン／酸化鉄基盤ナノ粒子複合体のDLSを介して、測定した複合体の大きさ；（B）TEMを介して確認した酸化鉄ナノ粒子を封入した γ -PGA／キトサン複合体の内部の様子と粒子の大きさ；及び（C）SEMを介して確認した複合体の粒子の大きさと均質度を示した図面である。

【図4】ポリガンマグルタミン酸（ γ PGA）／キトサン／酸化鉄基盤ナノ粒子複合体の

10

20

30

40

50

M R I 信号増幅効果を示した図面である。

【図5】ポリガンマグルタミン酸 (γ P G A) / キトサン / 酸化鉄基盤ナノ粒子複合体を細胞に処理してプルシアンブルー染色で細胞内の粒子伝達有無の確認及び M R I を介した細胞標識能力を示した図面である。

【発明を実施するための形態】

【0016】

他の方式で定義されない限り、本明細書において使用されたあらゆる技術的及び科学的用語は、本発明が属する技術分野に熟練した専門家によって通常理解されるものと同じ意味を有する。通常、本明細書において使用された命名法及び以下で詳述する実験方法は、本技術分野において周知であり、しかも汎用されるものである。

10

【0017】

一観点において、本発明は、(a) 陰イオン性高分子を含む有機溶媒溶液と磁気共鳴映像ナノ造影剤を含む有機溶媒溶液を混合して、陰イオン性高分子 / 磁気共鳴映像ナノ造影剤複合体を取得する工程；及び (b) 前記取得された陰イオン性高分子 / 磁気共鳴映像ナノ造影剤複合体に陽イオン性高分子を添加して、陰イオン性高分子及び陽イオン性高分子のイオン結合によって形成された高分子複合体に磁気共鳴映像ナノ造影剤が封入されているナノ粒子複合体を取得する工程を含む、陰イオン性高分子及び陽イオン性高分子のイオン結合によって形成された高分子複合体に磁気共鳴映像ナノ造影剤が封入されているナノ粒子複合体の製造方法に関する。

【0018】

20

本発明において、前記陰イオン性高分子は、ポリグルタミン酸 (P o l y g l u t a m i c a c i d) 、ポリアクリル酸 (P o l y a c r y l i c a c i d) 、アルギン酸 (A l g i n a t e) 、カラギナン (C a r r a g e e n a n) 、ヒアルロン酸 (H y a l u r o n i c a c i d) 、ポリスチレンスルホン酸塩 (P o l y (s t y r e n e s u l f o n a t e)) 、カルボキシメチルセルロース (C a r b o x y m e t h y l c e l l u l o s e) 、セルロース硫酸塩 (C e l l u l o s e s u l f a t e) 、デキストラン硫酸塩 (D e x t r a n s u l f a t e) 、ヘパリン (H e p a r i n) 、ヘパリン硫酸塩 (H e p a r i n s u l f a t e) 、ポリメチレンコグアニジン (P o l y (m e t h y l e n e - c o - g u a n i d i n e)) 及びコンドロイチン硫酸塩 (C o n d r o i t i n s u l f a t e) からなる群から選択されることを特徴とする。

30

【0019】

本発明は、生体親和性素材である陰イオン性高分子及び陽イオン性高分子のイオン結合性を利用して、酸化鉄基盤ナノ粒子をコーティングする方法に関し、用いられたポリガンマグルタミン酸 (γ P G A) は、韓国清麹醬から由来したバチルス菌 (B a c i l l u s s u b t i l i s) により生合成された超高分子量の天然アミノ酸高分子物質として、優れた生体適合性と生分解能力を有している。構成アミノ酸であるグルタミン酸に存在する多量のカルボキシル基によって、陰イオン性高分子に分類され、陽イオン性ミネラルとの反応性が優れており、食品添加剤、健康機能食品、化粧品、及び医薬品への多様な応用が期待される。特に、疎水性薬物や有用蛋白質及び抗原を封入する効果が優れて、薬物伝達システム (d r u g d e l i v e r y s y s t e m) に活用しようとする研究が活

40

【0020】

本発明において、前記陽イオン性高分子は、キトサン (C h i t o s a n) 、ポリエチレンイミン (P o l y (e t h y l e n i m i n e)) 、ポリ L - リジン (P o l y (L - l y s i n e)) 、ポリジアリルジメチル塩化アンモニウム (P o l y (d i a l l y l d i m e t h y l a m m o n i u m c h l o r i d e)) 、ポリアリルアミン (P o l y (a l l y l a m i n e)) 、塩酸塩 (h y d r o c h l o r i d e) 、ポリオルニチン (P o l y - o r n i t h i n e) 、ポリビニルアミン塩酸塩 (P o l y (v i n

50

ylamine) hydrochloride)、ポリ2 - ジメチルアミノエチルメタクリレート (Poly (2 - (dimethylamino) ethyl methacrylate))、ポリアミドアミン (Poly (amido amine))、デンドリマー (dendrimer) 及びゼラチン (Gelatin) からなる群から選択されることを特徴とする。

【0021】

本発明の陽イオン性高分子として用いられたキトサンは、海老、カニのような甲殻類から由来する天然動物性食物繊維であり、溶解状態で陽電荷 (+) を帯びる陽イオン性高分子物質である。グルコサミン結合からなるキトサンは、その分子構造が人体組織と非常に類似する構造をなしており、人体親和性が非常に優秀で、免疫反応 (拒否反応) が起きないために、種々の食医薬品分野に応用されている。

10

【0022】

本発明において、前記磁気共鳴映像ナノ造影剤は、鉄 (Fe)、マンガン (Mn)、コバルト (Co)、ガドリニウム (Gd)、プラセオジウム (praseodymium、Pr)、サマリウム (samarium、Sm)、ユーロピウム (europium、Eu)、テルビウム (terbium、Tb)、ジスプロシウム (dysprosium、Dy)、ホルミウム (holmium、Ho)、エルビウム (erbium、Er)、ツリウム (thulium、Tm)、イッテルビウム (ytterbium、Yb)、ルテニウム (lutetium、Lu) 及びこれらの複合体からなるナノ粒子群から選択されることを特徴とする。

20

【0023】

本発明で、磁気共鳴映像ナノ造影剤とは、磁気共鳴映像造影効果が出る酸化鉄ナノ粒子として、有機溶媒で合成したマンガンがドーブされた酸化鉄 ($MnFe_2O_4$) ナノ粒子を用いて、これは短い炭化水素鎖からなる界面活性剤で安定化されていて、疎水性性質を示す。

【0024】

本発明の様態では、陰イオン性高分子としてPGA、陽イオン性高分子としてキトサンを用いて、酸化鉄基盤ナノ粒子を磁気共鳴映像ナノ造影剤として、 γ -PGA/キトサン複合体内部に封入して製造したナノ複合体を提示している。しかし、前記陰イオン性高分子は、ポリグルタミン酸、ポリアクリル酸、アルギン酸、カラギナン、ヒアルロン酸、ポリスチレンスルホン酸塩、カルボキシメチルセルロース、セルロース硫酸塩、デキストラン硫酸塩、ヘパリン、ヘパリン硫酸塩、ポリメチレンコグアニジン及びコンドロイチン硫酸塩からなる群から選択でき、前記陽イオン性高分子は、キトサン、ポリエチレンジアミン、ポリ-L-リジン、ポリジアリルジメチル塩化アンモニウム、ポリアリルアミン、塩酸塩、ポリオルニチン、ポリビニルアミン塩酸塩、ポリ2 - ジメチルアミノエチルメタクリレート、ポリアミドアミン、デンドリマー及びゼラチンからなる群から選択でき、前記磁気共鳴映像ナノ造影剤は、鉄 (Fe)、マンガン (Mn)、コバルト (Co)、ガドリニウム (Gd)、プラセオジウム (Pr)、サマリウム (Sm)、ユーロピウム (Eu)、テルビウム (Tb)、ジスプロシウム (Dy)、ホルミウム (Ho)、エルビウム (Er)、ツリウム (Tm)、イッテルビウム (Yb)、ルテニウム (Lu) 及びこれらの複合体からなるナノ粒子群から選択できることは当業者にとって自明である (Hyon Bin Na. et al., Advanced Materials, 21:2133, 2009; Conroy Sun. et al., Advanced Drug Delivery Reviews, 60:1252, 2008; Jian Lu. et al., Biomaterials, 30:2919, 2009; J. Lee. et al., Nature Medicine, 13:95, 2007)。

30

40

【0025】

他の観点において、本発明は、前記方法で製造され、陰イオン性高分子及び陽イオン性高分子のイオン結合によって形成された高分子複合体に磁気共鳴映像ナノ造影剤が封入されているナノ粒子複合体に関する。

【0026】

本発明の他の様態においては、生体親和的な天然高分子であるポリガンマグルタミン酸

50

(γ PGA)/キトサン複合体内部に酸化鉄基盤ナノ粒子を封入して、優れた磁気共鳴信号増幅効果を示す磁気共鳴映像ナノ造影剤を開発するために、酸化鉄基盤ナノ粒子は、高分子量(500kDa)のポリガンマグルタミン酸(γ PGA)でコーティングして、有機溶媒相から水溶液相に相転移を誘導した。その次に、粒子の均一性と安定性を確保してターゲット特異的リガンドを導入し易しい官能基であるアミン(amine)基を導入するために、キトサンでその表面を再度コーティングした。この時、ポリガンマグルタミン酸(γ PGA)とキトサンは、いかなる化学的な修飾なしに単純なイオン性自分組立で複合体を形成して、生体親和性を一層高めようとした。また、高分子量のポリガンマグルタミン酸(γ PGA)を利用することによって、ポリガンマグルタミン酸(γ PGA)/キトサン複合体内部に相当な数の酸化鉄基盤ナノ粒子が封入される効果を得ることができた。これは、複合体内部に閉じ込められている酸化鉄基盤ナノ粒子の相互作用により、磁気共鳴信号増幅の相乗効果を誘発するため、一つの粒子として存在する時より優れた造影効果を示す。

10

20

30

【0027】

本発明のまた他の様態で、磁気共鳴映像造影効果を示す酸化鉄ナノ粒子として、有機溶媒で合成したマンガンドープされた酸化鉄($MnFe_2O_4$)ナノ粒子を用いた。これは、短い炭化水素鎖からなる界面活性剤で安定化されていて、疎水性性質を有する。従って、粒子は有機溶媒相に均一に分散し、8nm程度の径を有する球状である。マンガンドープされた酸化鉄($MnFe_2O_4$)ナノ粒子を水溶液相に相転移させるために、500kDa分子量のポリガンマグルタミン酸(γ PGA)でコーティングした。ポリガンマグルタミン酸(γ PGA)は、グルタミン酸のガンマ-カルボキシル基とアルファ-アミノ基がアミド結合したガンマ-ポリペプチド形態の構造で、アルファ-カルボキシル基が露出して、陰イオン性を有するようになるが、この部分が酸化鉄ナノ粒子表面を攻撃して、炭化水素界面活性剤を押し出して表面に結合を形成するようになる。その中の一部のカルボキシル基は、結合を形成することなく、外部に露出するため、コーティングされた表面が陰電荷を帯びるようになる。ポリガンマグルタミン酸(γ PGA)がコーティングされたマンガンドープされた酸化鉄($MnFe_2O_4$)ナノ粒子に陽イオン性のキトサンを加えると、イオン性相互作用によって、球状の高分子複合体が形成される。キトサンは、本来N-アセチル-D-グルコサミン単位体からなるキチンという物質を脱アセチル化させて得られる物質であり、本発明で用いたキトサンは、分子量が50kDa程度で脱アセチル化が80%程度である。グルタルアルデヒド(Glutaraldehyde)は、キトサンのアミン基を架橋させ鎖と鎖との間の結合力を増加させる役割を果たす。

【0028】

また、ポリエチレングリコール(Poly(ethylene glycol))を粒子表面に少量結合させることによって、粒子のペギル化(Pegylation)による粒子安定性及び溶解度向上、RES(Reticuloendothelial system)細胞による取り込み(uptake)を防止して、血中半減期を高める効果を与える。

【0029】

MRI relaxivityとは、ナノ粒子が含んでいる磁気性元素、すなわち、鉄(Fe)やマンガンの(Mn)の単位濃度を基準として、 T_1 や T_2 緩和時間が減少する程度を示す値である。これは、造影剤の磁気共鳴信号増幅能力を数値化したもので、 T_2 造影剤の場合 r_2 で表記する。

【実施例】

【0030】

以下、本発明を実施例を挙げて詳述する。これらの実施例は単に本発明をより具体的に説明するためのものであり、本発明の範囲がこれらの実施例に制限されないことは当分野において通常の知識を有する者にとって自明である。

【0031】

実施例1：試薬及び粒子製造

50

実施例 1 - 1 : 試薬の製造

アセチルアセトン鉄(III) (Iron(III) acetylacetonate) とアセチルアセトンマンガン(II) (manganese(II) acetylacetonate) を原料として、有機溶媒である 1 - オクタデセン (1 - octadecene) 上で高温反応して、マンガンがドーブされた酸化鉄ナノ粒子 (MnFe_2O_4) を合成し、この時ナノ粒子の安定剤として界面活性剤であるオレイン酸 (oleic acid) を添加した。そして、分子量 500 kDa のポリガンマグルタミン酸 (γPGA) ((株) バイオリダーズ、韓国)、分子量 50 kDa のキトサン ((株) MIRAE BIOTECH、韓国)、PEG - NHS ((株) サンパイオ、韓国) を準備した。

【0032】

10

実施例 1 - 2 : 酸化鉄ナノ粒子の相転移過程

ポリガンマグルタミン酸 (PGA) (分子量: 500 kDa) を DMSO 溶媒に 10 mg/mL 濃度で溶かし、マンガンがドーブされた酸化鉄 (MnFe_2O_4) ナノ粒子は、クロロホルム (chloroform) 上で 10 mg/mL に分散させた。前記二つの溶液を密閉された容器中において、窒素ガスで泡立ち (bubbling) を 10 分以上続け、窒素雰囲気を作った後、各々の溶液 10 mL を混ぜた後、温度 60 で 2 時間攪拌して、ポリガンマグルタミン酸 / マンガンがドーブされた酸化鉄 (MnFe_2O_4) ナノ粒子を製造した。製造された複合体に溶液に残っている界面活性剤と反応不純物を取り除くために、ヘキサン、エタノール及びクロロホルムを混合した有機溶媒を (hexane : ethanol : chloroform = 2 : 1 : 1) 加えた後、5000 rpm で 10 分間遠心分離した後、上澄み液は捨て、下に残った沈殿物を真空状態デシケーターで一日程度放置し残っている有機溶媒を完全に取り除いた。有機溶媒が完全に取り除かれた複合体に 50 mM の NaHCO_3 溶液を 20 mL 程度加えた後、残った沈殿物が完全に溶けるまでボルテックス (vortexing) し、音波処理 (sonication) を行った後、0.2 μm セルロースフィルター (advantec) を利用してろ過した。

20

【0033】

実施例 1 - 3 : ポリガンマグルタミン酸 (γPGA) / 酸化鉄ナノ粒子とキトサンのイオン性結合複合体形成

キトサンは、水溶液に 10 mg/mL 濃度で溶かし、水 10 mL を攪拌しながら、キトサン溶液 3 mL を添加して、ピペットを利用して、実施例 1 - 2 で準備したポリガンマグルタミン酸 (γPGA) / マンガン酸化鉄 (MnFe_2O_4) ナノ粒子溶液 1 mL を添加し、600 rpm で 2 時間攪拌して、さらに 10 μL のグルタルアルデヒド (glutaraldehyde) を添加して、1 時間攪拌した。ポリガンマグルタミン酸 (γPGA) / キトサン / マンガン酸化鉄 (MnFe_2O_4) ナノ粒子複合体水溶液相に存在するアミン基の定量は、ニンヒドリン (ninhydrin) 法で実施した。この時、標準溶液として L - リジン (L - lysine) 溶液を利用した。

30

【0034】

実施例 1 - 4 : ポリガンマグルタミン酸 (γPGA) / キトサン / 酸化鉄ナノ粒子複合体のペギル化 (pegylation)

前記実施例 1 - 3 で準備したポリガンマグルタミン酸 (γPGA) / キトサン / マンガン酸化鉄 (MnFe_2O_4) ナノ粒子複合体に含まれたアミン基のモル濃度比 2 倍モル濃度の PEG - NHS を 3 次蒸留水に溶かし、二つの溶液の体積を 1 : 1 で混ぜた後、12 時間程度攪拌した。反応しない高分子物質と NHS を取り除くために、5000 rpm で 10 分程度遠心分離し、上澄み液を捨て、沈殿物を 3 次蒸留水に再分散させた後、再度遠心分離して精製した。ポリガンマグルタミン酸 (γPGA) / キトサン / マンガン酸化鉄 (MnFe_2O_4) ナノ粒子複合体の大きさは、DLS、TEM、及び SEM で観察した。

40

その結果、DLS で測定した粒子の大きさは、90 ~ 200 nm の分布を示していることを確認することができた (図 3A)。これは、人体内に取り込ませた時、EPR (enhanced permeation and retention) 効果に適した大き

50

さであり、異常組織でのターゲット指向的な特性を持つ。

T E Mを介して、粒子の大きさと内部を観察してみた結果、相当数のマンガン - 酸化鉄ナノ粒子を球状のポリガンマグルタミン酸 (γ P G A) / キトサン高分子複合体内部にお封入していることが確認された (図 3 B)。これは先に説明したように、マンガン - 酸化鉄ナノ粒子が、高分子複合体内部で相互作用を起こしながら M R I 信号を効果的に増幅させる相乗効果が期待できる。

また、S E Mを介して、粒子の表面形状と大きさを観察した結果、D L Sで測定された大きさと似た90 ~ 200 nm程度の球状の粒子を観察することができた (図 3 C)。

【 0 0 3 5 】

実施例 2 : ポリガンマグルタミン酸 (γ P G A) / キトサン / マンガン酸化鉄 ($MnFe_2O_4$) ナノ粒子複合体の活性測定

実施例 2 - 1 : ポリガンマグルタミン酸 (γ P G A) / キトサン / マンガン酸化鉄 ($MnFe_2O_4$) ナノ粒子の M R I 緩和能 (*r e l a x i v i t y*) 測定

前記の実施例 1 - 3 で準備したポリガンマグルタミン酸 (γ P G A) / キトサン / マンガン酸化鉄 ($MnFe_2O_4$) ナノ粒子複合体溶液の M R I 緩和能は、4 . 7 T 小動物用 M R I を利用して測定し、溶液相に存在する鉄とマンガン元素の定量は、I C P - A E S で測定した。

その結果、ポリガンマグルタミン酸 (γ P G A) / キトサン / マンガン酸化鉄 ($MnFe_2O_4$) ナノ粒子複合体の r_2 は、507 ($Fe + Mn$) $mM^{-1} s^{-1}$ 程度であり、すでに相溶化された水溶液相で合成されたデキストラン基盤酸化鉄粒子の r_2 値より4倍以上増加した数値であることを確認することができた (図 4)。

【 0 0 3 6 】

実施例 2 - 2 : ポリガンマグルタミン酸 (γ P G A) / キトサン / マンガン酸化鉄 ($MnFe_2O_4$) ナノ粒子複合体細胞内伝達

実施例 2 - 1 で製造したナノ粒子複合体を癌細胞の H e L a 細胞内に伝達する実験を実施した。粒子は、25 $\mu g / mL$ 濃度で処理した後、プルシアンブルー (*p r u s s i a n b l u e*) で染色して、伝達有無を確認した。

ポリガンマグルタミン酸 (γ P G A) / キトサン / マンガン酸化鉄 ($MnFe_2O_4$) ナノ粒子複合体の表面は、キトサンのアミン基によって陽電荷を帯びるが、これは一般的に陰電荷を帯びている細胞膜によく付着し、細胞内の伝達が容易との特徴があり、粒子は25 $\mu g / mL$ 濃度で処理した後、プルシアンブルーで染色して、伝達の有無を確認した (図 5)。

【 0 0 3 7 】

実施例 2 - 3 : ポリガンマグルタミン酸 (γ P G A) / キトサン / マンガン酸化鉄 ($MnFe_2O_4$) ナノ粒子複合体で標識された細胞の M R I イメージ

実施例 2 - 2 で粒子を処理した細胞を集めて、4 . 7 T 小動物 M R I 装備で M R I イメージを得ることができた。

ポリガンマグルタミン酸 (γ P G A) / キトサン / マンガン酸化鉄 ($MnFe_2O_4$) ナノ粒子複合体によって標識された細胞は、M R I イメージ上でも確認できるが、標識されない細胞は、周辺の水と共に明るく見られるが、標識された細胞は、暗く示されることを確認することができる。

これらのことから、ポリガンマグルタミン酸 (γ P G A) / キトサン / マンガン酸化鉄 ($MnFe_2O_4$) ナノ粒子複合体が、特定細胞内によく伝達される特性を示し、M R I イメージ結果、少量の粒子だけでも磁気共鳴信号によるイメージ暗化 (*d a r k e n i n g*) 効果が起きることを確認することができた (図 5)。

【 産業上の利用可能性 】

【 0 0 3 8 】

以上説明したように、本発明による陰イオン性ポリガンマグルタミン酸 (γ P G A) と陽イオン性キトサンを利用したイオン性組み立てを介して、酸化鉄基盤ナノ粒子は高分子複合体内部で封入して、複合体内部に閉じ込められている酸化鉄基盤ナノ粒子が、互いの

10

20

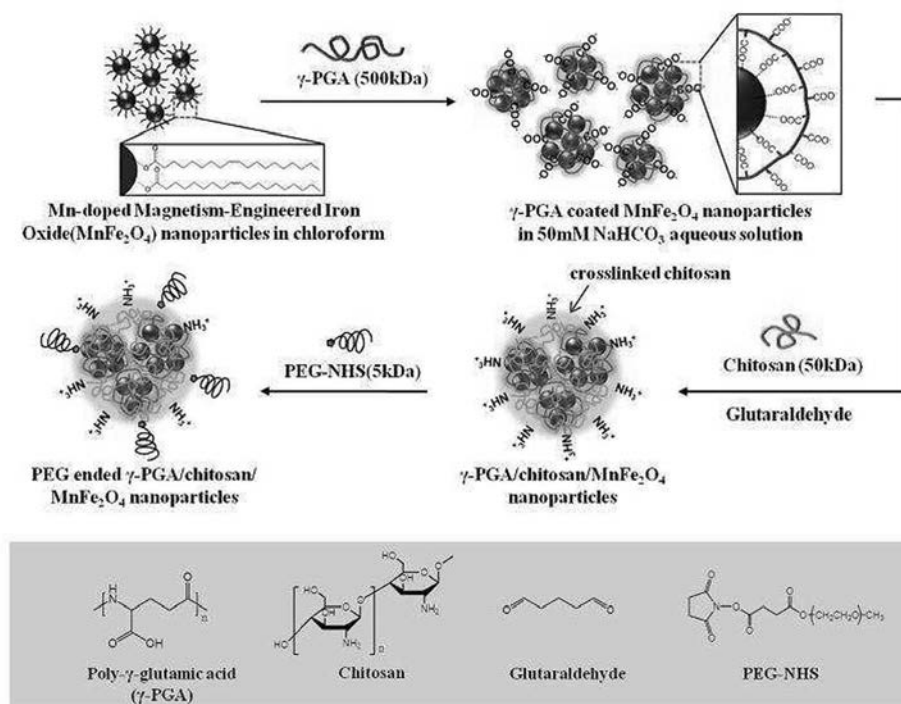
30

40

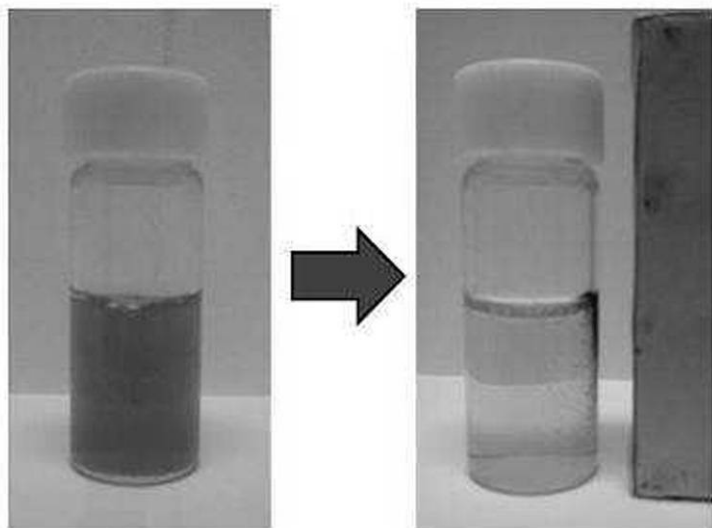
50

【 0 0 3 9 】

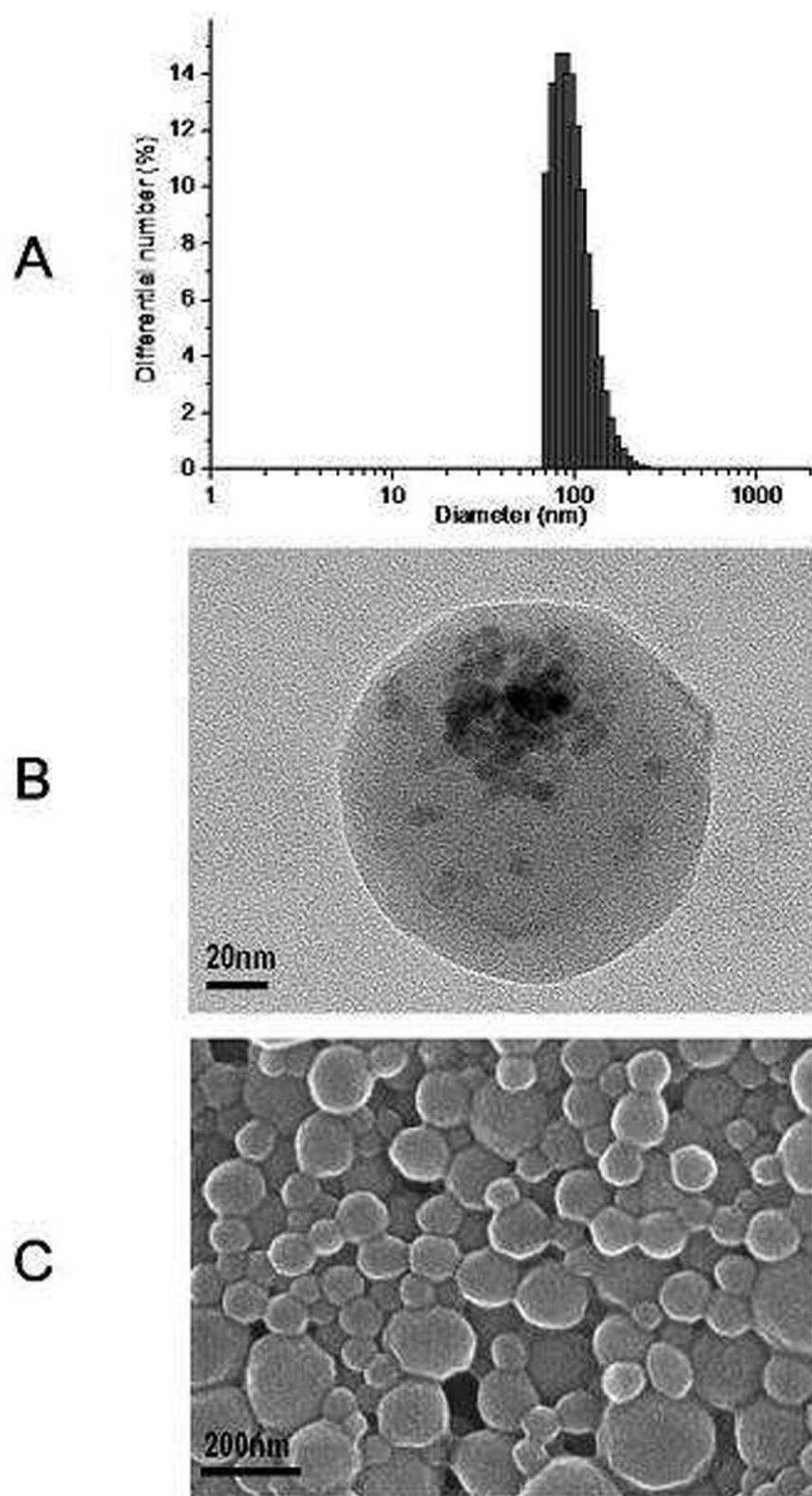
【 図 1 】



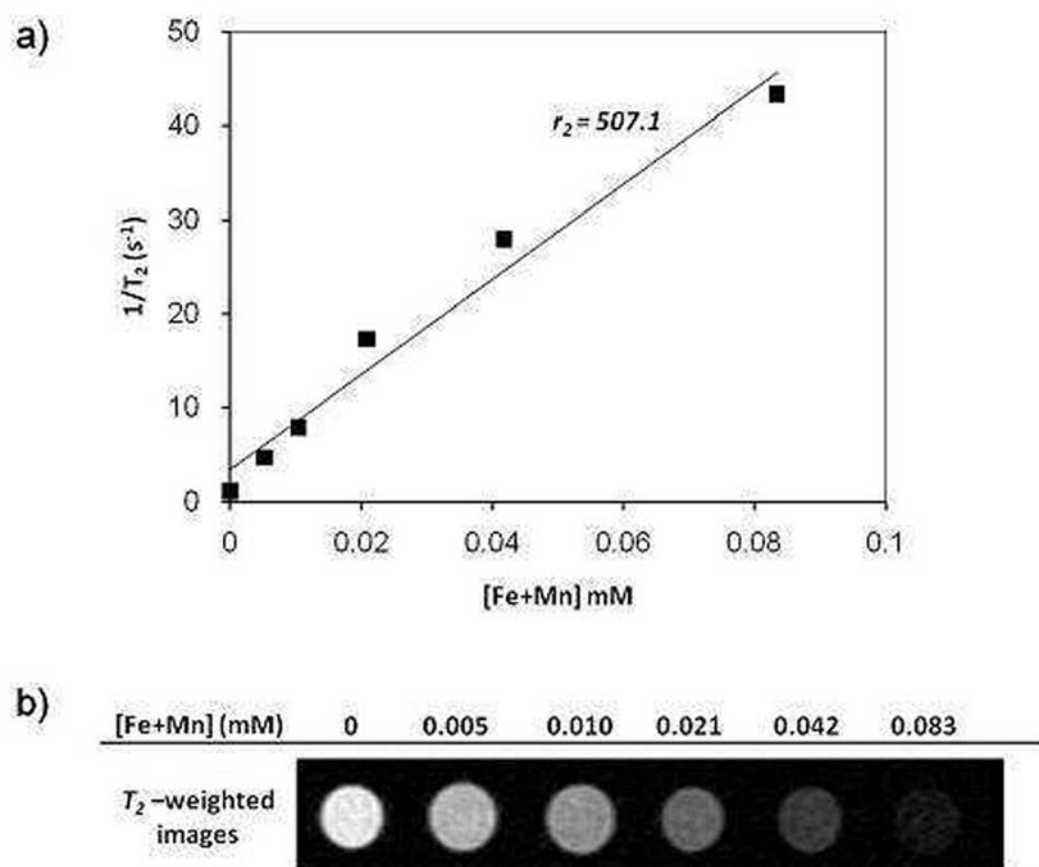
【 図 2 】



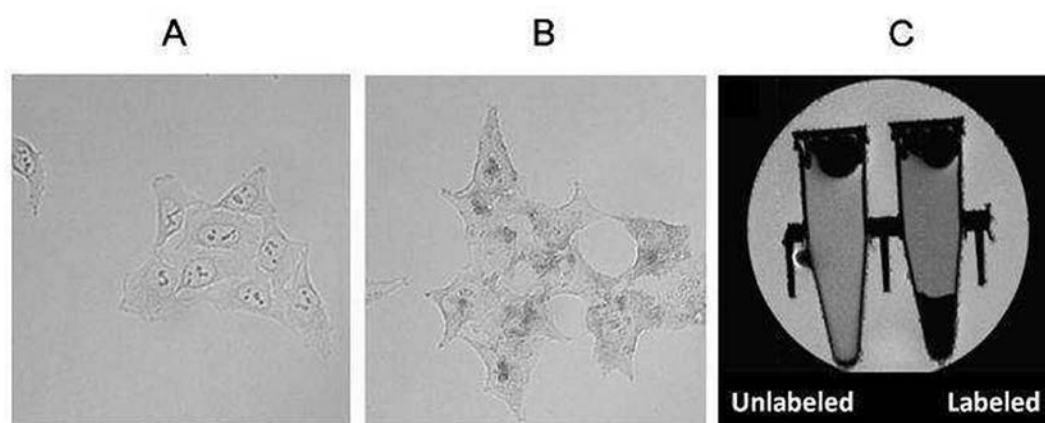
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2011/002433

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>A61K 49/12(2006.01)i, A61K 49/06(2006.01)i, A61K 47/48(2006.01)i, A61K 9/16(2006.01)i, A61K 9/06(2006.01)i</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) A61K 49/12; B82Y 5/00; C01G 23/00; C07K 7/00; G01N 27/12; G01N 33/53; G01N 33/532 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: magnetic resonance imaging, nano agent, anionic polymer, cationic polymer, nanocomposite, MRI		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-0862973 B1 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) 13 October 2008 See abstract, paragraphs <47>-<49>, page 14 example 1 and example 2.	1-5
A	KR 10-2007-0046681 A (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 03 May 2007 See abstract, claims 1-2 and 5.	1-5
A	KR 10-2009-0008838 A (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 22 January 2009 See claims 1-3.	1-5
A	CHEN, ZHIJIN et al., Biocompatible Nanocomplexes for Molecular Targeted MRI Contrast Agent. Nanoscale Res Lett. 2009, Vol.4, pp.618-626. See abstract.	1-5
A	LIN, YU-HSIN et al., Preparation of Nanoparticles Composed of Chitosan/Poly-gamma-Glutamic Acid and Evaluation of Their Permeability through Caco-2 Cells. Biomacromolecules, 2005, Vol.6, pp. 1104-1112. See abstract.	1-5
☒ 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 18 APRIL 2012 (18.04.2012)		Date of mailing of the international search report 18 APRIL 2012 (18.04.2012)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2011/002433

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SABOKTAKIN, MOHAMMAD REZA et al., Synthesis and Characterization of Superparamagnetic Chitosan-Dextran Sulfate Hydrogels as Nano Carriers for Colon-Specific Drug Delivery. Carbohydrate Polymers, 2010, Vol. 81, pp.372-376. See abstract.	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2011/002433

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-0862973 B1	13.10.2008	NONE	
KR 10-2007-0046681 A	03.05.2007	NONE	
KR 10-2009-0008838 A	22.01.2009	NONE	

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2011/002433

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))		
<i>A61K 49/12(2006.01)i, A61K 49/06(2006.01)i, A61K 47/48(2006.01)i, A61K 9/16(2006.01)i, A61K 9/06(2006.01)i</i>		
B. 조사된 분야		
조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 49/12; B82Y 5/00; C01G 23/00; C07K 7/00; G01N 27/12; G01N 33/53; G01N 33/532		
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)) eCOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 자기공명영상, 나노조영제, 음이온성 고분자, 양이온성 고분자, 나노복합제, MRI		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-0862973 B1 (연세대학교 산학협력단) 2008.10.13 요약, 문단번호 <47>~<49>, 제14쪽 실시예1 및 실시예2 참조.	1-5
A	KR 10-2007-0046681 A (한국과학기술연구원) 2007.05.03 요약, 청구항 1-2 및 5 참조.	1-5
A	KR 10-2009-0008838 A (한국생명공학연구원) 2009.01.22 청구항 1-3 참조.	1-5
A	CHEN, ZHIJIN 외 5인, Biocompatible Nanocomplexes for Molecular Targeted MRI Contrast Agent. Nanoscale Res Lett. 2009, Vol.4, pp.618-626. 요약 참조.	1-5
A	LIN, YU-HSIN 외 5인, Preparation of Nanoparticles Composed of Chitosan/Poly-gamma-Glutamic Acid and Evaluation of Their Permeability through Caco-2 Cells. Biomacromolecules, 2005, Vol.6, pp.1104-1112. 요약 참조.	1-5
☒ 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 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가진 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 외문을 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 2012년 04월 18일 (18.04.2012)		국제조사보고서 발송일 2012년 04월 18일 (18.04.2012)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 정부대전청사 팩스 번호 82-42-472-7140		심사관 김은희 전화번호 82-42-481-5590 

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2009년 7월)

국제조사보고서

국제출원번호

PCT/KR2011/002433

C (계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	SABOKTAKIN, MOHAMMAD REZA 외 4인, Synthesis and Characterization of Superparamagnetic Chitosan-Dextran Sulfate Hydrogels as Nano Carriers for Colon-Specific Drug Delivery. Carbohydrate Polymers, 2010, Vol.81, pp.372-376. 요약 참조.	1-5

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지의 계속) (2009년 7월)

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2011/002433

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-0862973 B1	2008.10.13	없음	
KR 10-2007-0046681 A	2007.05.03	없음	
KR 10-2009-0008838 A	2009.01.22	없음	

서식 PCT/ISA/210 (대응특허 추가용지) (2009년 7월)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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

特許法第30条第1項適用申請有り 特許法第184条の14の規定により平成23年改正前特許法第30条第1項の規定を受けようとする特許出願

- (71)出願人 511166998
 ククミン ユニバーシティ インダストリー - アカデミック コオペレーション ファウンデーション
 大韓民国, ソウル 136-702, ソンブク - ク, チョンヌン - ドン, 861-1, ククミン
 ユニバーシティ
- (74)代理人 100090251
 弁理士 森田 憲一
- (74)代理人 100139594
 弁理士 山口 健次郎
- (74)代理人 100185915
 弁理士 長山 弘典
- (72)発明者 ソン ムンヒ
 大韓民国, 305-308, テジョン, ユソン - グ, チャンデ - ドン, 283-4, ギャラリービル, 2-902
- (72)発明者 イム ヨンテク
 大韓民国, 306-778, テジョン, テドク - ク, ソンチョン - ドン, ソンビ マウル アパートメント, 409-1502
- (72)発明者 ノ ヨンウク
 大韓民国, 305-753, テジョン, ユソン - グ, ソンガン - ドン, ソンカン マウル 2 - タンジ, 205-509
- (72)発明者 イ イルハン
 大韓民国, 305-793, テジョン, ユソン - グ, クワンピョン - ドン, デドクテクノベルリ 1 - タンジ, 107-603
- (72)発明者 キム ヒョンミン
 大韓民国, 305-335, テジョン, ユソン - グ, クン - ドン, 474-10
- Fターム(参考) 4C085 HH07 JJ01 KB07 KB08 KB12 KB68 KB70 KB72 KB76 KB79
 KB82