(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0013474
(43) 공개일자 2016년02월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 49/04 (2006.01) *A61K 31/409* (2006.01)
A61K 49/08 (2006.01) *A61K 49/12* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0095018
(22) 출원일자 2014년07월25일
심사청구일자 2014년07월25일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
이상천
경기 성남시 분당구 양현로 220, 1003동 204호 (이매동, 이매촌아파트)
박동진
경기 광명시 디지털로 24, 103동 2004호 (철산동, 철산푸르지오하늘채아파트)
민경현
서울 송파구 중대로 24, 207동 1203호 (문정동, 올림픽훼밀리타운)
(74) 대리인
손민

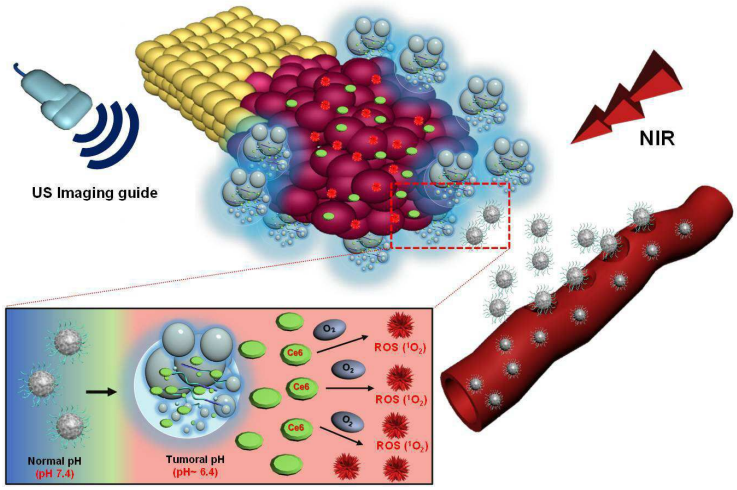
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **광감작제 담지 탄산칼슘 복합 나노입자, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 초음파 조영 및 광역학 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 광감작제 담지 탄산칼슘 복합 나노입자, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 초음파 조영 및 광역학 치료용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 광감작제가 담지된 탄산칼슘 코어 및 고분자 쉘로 구성된 탄산칼슘 복합 나노 입자로서, 혈류 내에서는 안정한 상태로 탄산칼슘의 용해가 일어나지 않아 탄산칼슘 코어 내에 존재하는 광감작제의 방출이 일어나지 않고, 표적화 후 암조직 및 세포 내 엔도좀/라이소좀의 산성 pH에서 용해되어 탄산칼슘 용해에 따라 이산화탄소를 발생시키고 담지된 광감작제의 방출을 유도하여 초음파 조영과 동시에 광역학 치료를 병행할 수 있는 광감작제 담지 탄산칼슘 복합 나노입자, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 초음파 조영 및 광역학 치료용 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



이 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 2013.09.01 ~ 2014.08.31이 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 2014.06.01 ~ 2015.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

광감작제; 탄산칼슘; 및 비이온성의 친수성 폴리머 부분과 이온성 폴리머 부분으로 이루어지는 공중합체를 포함하며,

광감작제가 담지되어 있는 상기 탄산칼슘과 상기 공중합체의 이온성 폴리머 부분이 함께 코어부를 형성하고,

상기 비이온성의 친수성 폴리머 부분이 쉘부를 형성하는, 광감작제 담지 탄산칼슘 복합 나노입자.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 광감작제는 클로린 e6, 포토디타진, 라다클로린(Radachlorin), 2-(1-헥실에틸)-2-디비닐 피로페오포르비드-α(HPPH)[2-(1-hexylethyl)-2-devinylpyropheophorbide-α(HPPH)], 프탈로시아닌(ZnPc, Zinc Phthalocyanine), 피오포바이드 a(Pheophorbide a) 화합물 및 포르피린(phorphyrins) 화합물 또는 이의 조합인, 광감작제 담지 탄산칼슘 복합 나노입자.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 공중합체는 AB형 블록 공중합체 또는 그라프트 공중합체인, 광감작제 담지 탄산칼슘 복합 나노입자.

청구항 4

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

청구항 5

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

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 이온성 폴리머는 폴리(아스파르트산), 폴리(L-글루탐산), 히아루론산, 알긴산, 폴리(아크릴산), 폴리(메타크릴산), 키토산, 폴리에틸렌이민, 폴리(L-라이신), 폴리비닐포스페이트, 폴리에틸렌글리콜메타크릴레이트 포스페이트, 카르복시메틸셀룰로스 또는 헤파린인, 광감작제 담지 탄산칼슘 복합 나노입자.

청구항 7

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

청구항 8

하기 단계를 포함하는 광감작제 담지 탄산칼슘 복합 나노입자의 제조방법:

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

상기 단계 1)의 혼합액에 광감작제를 첨가하여 혼합하는 단계(단계 2); 및

상기 단계 2)의 혼합액에 탄산염 수용액을 첨가하여 반응시키는 단계(단계 3).

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 단계 3) 이후에 하기 단계를 추가로 포함하는 제조방법:

상기 단계 3)의 반응액을 원심분리하여 상층액을 회수하는 단계(단계 4);

상기 상층액을 삼투 교환시키는 단계(단계 5); 및

상기 삼투 교환된 용액을 동결건조시키는 단계(단계 6).

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 단계 1)의 공중합체 내 이온기와 칼슘염의 몰비는 1:0.1 내지 1:1인, 제조방법.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 공중합체 수용액, 칼슘염 수용액 및 탄산염 수용액의 각각의 pH는 7.0 내지 9.0인, 제조방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 제8항 내지 제11항 중 어느 한 항에 기재된 제조방법에 의해 제조된 것을 특징으로 하는 광감작제 담지 탄산칼슘 복합 나노입자.

청구항 13

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 광감작제 담지 탄산칼슘 복합 나노입자를 포함하는 초음파 조영 및 광역학 치료용 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 초음파 조영 및 광역학 치료를 동시에 수행하는 것을 특징으로 하는 초음파 조영 및 광역학 치료용 조성물.

청구항 15

제13항에 있어서, 암에 사용하는 것을 특징으로 하는 초음파 조영 및 광역학 치료용 조성물.

청구항 16

제13항에 있어서, 상기 조성물은 정맥 주사제 형태인 것을 특징으로 하는 초음파 조영 및 광역학 치료용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 광감작제 담지 탄산칼슘 복합 나노입자, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 초음파 조영 및 광역학 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 현재, 암 진단 및 동시 치료가 가능한 나노소재에 대한 관심이 커지고 있다. 진단 및 치료가 개별적으로 이뤄지는 전통적인 방법과는 달리, 진단과 동시에 치료가 이뤄지게 되면 영상화를 통해 질병부위의 위치를 정확하게 파악한 후, 바로 2차적인 처치(treatment)로 치료를 할 수 있어 치료 효율면에서 더 우수하다. 또한, 치료 중 암 부위 영상화를 통해 치료가 적절히 잘 이뤄지고 있는가에 대한 모니터링도 가능하므로 차세대 나노의약품 개발 분야에서 집중하고 있는 분야이다.

[0003] 초음파 조영은 혈관 또는 조직 및 장기의 해부학적인 구조를 영상화 하는데 유용한 기술이며 환자접근성이 용이하고 무해하고 저렴하다는 장점이 있다. 초음파 조영을 위해서는 주로 미세기포(microbubble)가 사용되는데 이는 1-8 마이크로미터 정도의 크기를 가진 과불화탄소(perfluorocarbon), 대기(air), N_2 등의 기체가 봉입된 입자형태로 구성된다. 이러한 구조는 기체상태의 코어(core)를 고분자나, 계면활성제, 단백질, 지질 등의 유연한 쉘(shell)이 감싸고 있는 형태다. 미세기포 형태의 조영제는 인체 투여시 혈액 내에서 안정하게 순환하기 어렵고, 암 조직 등으로의 침투가 어렵기 때문에 암 조직의 영상화를 위해 사용이 제한적이다.

[0004] 최근 혈류 내에서 자유롭게 순환하여 암조직으로의 EPR(enhanced permeation and retention) 효과에 의해 침투가 가능하고 이산화탄소 가스를 발생하는 나노입자가 개발되었다. 자기조립(self-assembly)로 형성되는 나노입자는 폴리에스터 주쇄에 카보네이트 사이드 그룹이 결합된 형태로, 체내 주입시 카보네이트의 가수 분해로 인해 이산화탄소가 발생된다. 나노입자를 암조직의 초음파 조영제로 사용할 수 있다는 점에서 의미있는 연구결과이나, 암조직에 도달하기 전, 혈액내 주입 직후부터 이산화탄소가 발생된다는 점과 고분자 사이드그룹으로 카보네이트가 결합되어있어 발생되는 이산화탄소의 양이 제한적이라는 단점이 있다.

[0005] 또한, 탄산칼슘 코어 및 고분자 쉘로 구성된 나노 입자가 보고되었고 세포 내 엔도좀/라이소좀 산성 pH에서 용해되어 이산화탄소 기체를 발생시킬 수 있는 특성이 알려져 있다.

[0006] 이러한 배경 하에서, 본 발명자들은 초음파 영상을 통한 암 진단 및 동시 광역학 치료법에 의한 암치료가 가능한 광감작제(photosensitizer) 담지형 탄산칼슘 복합 나노입자를 제조하였고, 암조직 pH에서의 이산화탄소 기체 발포를 통한 초음파 영상 및 빛 조사를 통한 방출된 광감작 물질의 활성산소 생성에 따른 암조직 괴사를 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 산성 pH에서 이산화탄소를 발생시키면서 광감작제를 방출시킬 수 있는 탄산칼슘 복합 나노입

자를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 탄산칼슘 복합 나노입자의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 탄산칼슘 복합 나노입자를 포함하는 초음파 조영 및 광역학 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은

[0011] 광감작제; 탄산칼슘; 및 비이온성의 친수성 폴리머 부분과 이온성 폴리머 부분으로 이루어지는 공중합체(block copolymer)를 포함하며,

[0012] 광감작제가 담지되어 있는 상기 탄산칼슘과 상기 공중합체의 이온성 폴리머 부분이 함께 코어부를 형성하고,

[0013] 상기 비이온성의 친수성 폴리머 부분이 쉘부를 형성하는, 광감작제 담지 탄산칼슘 복합 나노입자를 제공한다.

[0014] 본 발명에서, 상기 광감작제는 클로린 e6, 포토디타진, 라다클로린(Radachlorin), 2-(1-헥실에틸)-2-디비닐피로페오포르비드-α(HPPH)[2-(1-hexylethyl)-2-devinylpyropheophorbide-α(HPPH)], 프탈로시아닌(ZnPc, Zinc Phthalocyanine), 피오포바이드 a(Pheophorbide a) 화합물 및 포르피린(phorphyrins) 화합물 또는 이의 조합일 수 있으며, 이에 제한되지는 않는다.

[0015] 본 발명에서, 상기 공중합체는 비이온성의 친수성 폴리머 부분과 이온성 폴리머 부분으로 이루어진 것으로 코어-쉘 구조의 나노입자의 형성을 유도한다. 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 쉘을 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.

[0016] 본 발명에서, 상기 공중합체의 비이온성의 친수성 폴리머 부분은 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG), 폴리옥사졸린(polyoxazoline), 폴리(N-비닐피롤리돈)(poly(N-vinylpyrrolidone)), 폴리비닐알콜(poly(vinyl alcohol)), 폴리히드록시에틸메타크릴에이트(polyhydroxyethyl methacrylate), 덱스트란(dextran) 또는 메틸셀룰로스(methylcellulose)일 수 있으며, 이에 제한되지는 않는다.

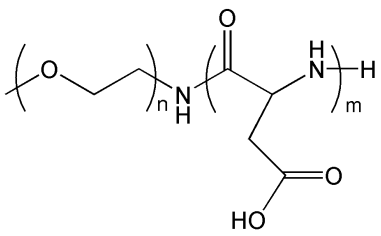
[0017] 본 발명에서, 상기 공중합체의 이온성 폴리머는 양이온형 또는 음이온형일 수 있다. 구체적으로, 상기 이온성 폴리머는 폴리(아스파르트산)(poly(aspartic acid)), 폴리(L-글루탐산)(poly(L-glutamic acid)), 히아루론산(hyaluronic acid), 알긴산(alginic acid), 폴리(아크릴산)(poly(acrylic acid)), 폴리(메타크릴산)(poly(methacrylic acid)), 키토산(chitosan), 폴리에틸렌이민(polyethylenimine), 폴리(L-라이신)(poly(L-lysine)), 폴리비닐포스페이트(polyvinyl phosphate), 폴리에틸렌글리콜메타크릴레이트 포스페이트(polyethyleneglycol methacrylate phosphate), 카르복시메틸셀룰로스(carboxymethyl cellulose) 또는 헤파린(heparin)일 수 있으며, 이에 제한되지는 않는다.

[0018] 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), 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-비닐피롤리돈)-폴리(L-글루탐산), 폴리(N-비닐피롤리돈)-히아루론산, 폴리(N-비닐피롤리돈)-알

긴산, 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), 폴리히드록시에틸메타크릴에이트-폴리(아스파르트산), 폴리히드록시에틸메타크릴에이트-폴리(L-글루탐산), 폴리히드록시에틸메타크릴에이트-히아루론산, 폴리히드록시에틸메타크릴에이트-알긴산, 폴리히드록시에틸메타크릴에이트-폴리(아크릴산), 폴리히드록시에틸메타크릴에이트-폴리(메타크릴산), 폴리히드록시에틸메타크릴에이트-키토산, 폴리히드록시에틸메타크릴에이트-폴리에틸렌이민, 폴리히드록시에틸메타크릴에이트-폴리(L-라이신), 덱스트란-폴리(아스파르트산), 덱스트란-폴리(L-글루탐산), 덱스트란-히아루론산, 덱스트란-알긴산, 덱스트란-폴리(아크릴산), 덱스트란-폴리(메타크릴산), 덱스트란-키토산, 덱스트란-폴리에틸렌이민, 덱스트란-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, 그라프트 공중합체로서, PEG-그라프트 폴리(아스파르트산), PEG-그라프트 폴리(L-글루탐산), PEG-그라프트 히아루론산, PEG-그라프트 알긴산, PEG-그라프트 폴리(아크릴산), PEG-그라프트 폴리(메타크릴산), PEG-그라프트 키토산, PEG-그라프트 폴리에틸렌이민, PEG-그라프트 폴리(L-라이신), 폴리옥사졸린-그라프트 폴리(아스파르트산), 폴리옥사졸린-그라프트 폴리(L-글루탐산), 폴리옥사졸린-그라프트 히아루론산, 폴리옥사졸린-그라프트 알긴산, 폴리옥사졸린-그라프트 폴리(아크릴산), 폴리옥사졸린-그라프트 폴리(메타크릴산), 폴리옥사졸린-그라프트 키토산, 폴리옥사졸린-그라프트 폴리에틸렌이민, 폴리옥사졸린-그라프트 폴리(L-라이신), 폴리(N-비닐피롤리돈)-그라프트 폴리(아스파르트산), 폴리(N-비닐피롤리돈)-그라프트 폴리(L-글루탐산), 폴리(N-비닐피롤리돈)-그라프트 히아루론산, 폴리(N-비닐피롤리돈)-그라프트 알긴산, 폴리(N-비닐피롤리돈)-그라프트 폴리(아크릴산), 폴리(N-비닐피롤리돈)-그라프트 폴리(메타크릴산), 폴리(N-비닐피롤리돈)-그라프트 키토산, 폴리(N-비닐피롤리돈)-그라프트 폴리에틸렌이민, 폴리(N-비닐피롤리돈)-그라프트 폴리(L-라이신), 폴리비닐알콜-그라프트 폴리(아스파르트산), 폴리비닐알콜-그라프트 폴리(L-글루탐산), 폴리비닐알콜-그라프트 히아루론산, 폴리비닐알콜-그라프트 알긴산, 폴리비닐알콜-그라프트 폴리(아크릴산), 폴리비닐알콜-그라프트 폴리(메타크릴산), 폴리비닐알콜-그라프트 키토산, 폴리비닐알콜-그라프트 폴리에틸렌이민, 폴리비닐알콜-그라프트 폴리(L-라이신), 폴리히드록시에틸메타크릴에이트-그라프트 폴리(아스파르트산), 폴리히드록시에틸메타크릴에이트-그라프트 폴리(L-글루탐산), 폴리히드록시에틸메타크릴에이트-그라프트 히아루론산, 폴리히드록시에틸메타크릴에이트-그라프트 알긴산, 폴리히드록시에틸메타크릴에이트-그라프트 폴리(아크릴산), 폴리히드록시에틸메타크릴에이트-그라프트 폴리(메타크릴산), 폴리히드록시에틸메타크릴에이트-그라프트 키토산, 폴리히드록시에틸메타크릴에이트-그라프트 폴리에틸렌이민, 폴리히드록시에틸메타크릴에이트-그라프트 폴리(L-라이신), 덱스트란-그라프트 폴리(아스파르트산), 덱스트란-그라프트 폴리(L-글루탐산), 덱스트란-그라프트 히아루론산, 덱스트란-그라프트 알긴산, 덱스트란-그라프트 폴리(아크릴산), 덱스트란-그라프트 폴리(메타크릴산), 덱스트란-그라프트 키토산, 덱스트란-그라프트 폴리에틸렌이민, 덱스트란-그라프트 폴리(L-라이신), 메틸셀룰로스-그라프트 폴리(아스파르트산), 메틸셀룰로스-그라프트 폴리(L-글루탐산), 메틸셀룰로스-그라프트 히아루론산, 메틸셀룰로스-그라프트 알긴산, 메틸셀룰로스-그라프트 폴리(아크릴산), 메틸셀룰로스-그라프트 폴리(메타크릴산), 메틸셀룰로스-그라프트 키토산, 메틸셀룰로스-그라프트 폴리에틸렌이민, 메틸셀룰로스-그라프트 폴리(L-라이신) 등을 예로 들 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0019] 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.

[0020] [화학식 1]

[0021] 

[0022] 상기 식에서,

[0023] n은 10 내지 1000의 정수이고,

[0024] m은 10 내지 300의 정수이다.

[0025] 바람직하기로, 상기 식에서,

[0026] n은 20 내지 200의 정수이고,

[0027] m은 20 내지 100의 정수이다.

[0028] 본 발명의 광감작제 담지 탄산칼슘 복합 나노입자 내 탄산칼슘은 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 광감작제 담지 탄산칼슘 복합 나노입자 내 탄산칼슘과 상기 탄산칼슘 내에 담지되어 있는 광감작제는 ~pH 7.4의 혈류 내에서는 용해되지 않고 안정한 특성을 나타내는 반면, 암조직 pH(pH ~6.3), 세포 내의 엔도좀(endosome, pH ~5.0) 및 라이소좀(lysosome, ~pH 4.5) 내의 낮은 pH 환경에서는 코어부의 탄산칼슘의 용해가 일어나 이산화탄소를 발생시키면서 탄산칼슘 내에 담지되어 있는 광감작제의 방출을 유도할 수 있는 특성을 나타낸다.

[0029] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 광감작제 담지 탄산칼슘 복합 나노입자의 제조방법을 제공한다.

[0030] 1) 비이온성의 친수성 폴리머 부분과 이온성 폴리머 부분으로 이루어지는 공중합체 수용액, 및 칼슘염 수용액을 혼합하는 단계(단계 1);

[0031] 2) 상기 단계 1)의 혼합액에 광감작제를 첨가하여 혼합하는 단계(단계 2); 및

[0032] 3) 상기 단계 2)의 혼합액에 탄산염 수용액을 첨가하여 반응시키는 단계(단계 3).

[0033] 바람직하기로, 본 발명의 광감작제 담지 탄산칼슘 복합 나노입자의 제조방법은 상기 단계 3) 이후에 하기 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0034] 4) 상기 단계 3)의 반응액을 원심분리하여 상층액을 회수하는 단계(단계 4);

[0035] 5) 상기 상층액을 삼투 교환시키는 단계(단계 5); 및

[0036] 6) 상기 삼투 교환된 용액을 동결건조시키는 단계(단계 6).

[0037] 상기 단계 1은, 비이온성의 친수성 폴리머 부분과 이온성 폴리머 부분으로 이루어지는 공중합체 수용액, 및 칼슘염 수용액을 혼합하는 단계로서, 쉘부를 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 칼슘염의 수용액을 혼합하는 단계이다.

[0038] 상기 단계 1)에서 사용할 수 있는 비이온성의 친수성 폴리머 부분과 이온성 폴리머 부분으로 이루어지는 공중합체의 종류는 상기 광감작제 담지 탄산칼슘 복합 나노입자에 대한 설명 부분과 동일하다.

[0039] 상기 단계 1)에서 사용할 수 있는 칼슘염은 염화칼슘, 수산화칼슘 및 질산칼슘으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0040] 상기 단계 1)의 공중합체 내 이온기와 칼슘염의 몰비는 1:0.1 내지 1:1인 것이 바람직하다. 만일 상기 공중합체와 칼슘염의 몰비가 상기 범위 밖이면 탄산칼슘 복합 나노입자가 형성되지 않거나, 탄산칼슘만으로 이루어진 나

노입자가 형성되는 단점이 있다.

[0041] 상기 단계 2)는, 상기 단계 1)의 혼합액에 광감작제를 첨가하여 혼합하는 단계로서, 코어부를 형성하는 탄산칼슘 내에 담지시키기 위한 광감작제를 상기 단계 1)의 공중합체 수용액과 칼슘염 수용액의 혼합액에 첨가하여 혼합하는 단계이다.

[0042] 상기 단계 2)에서 사용할 수 있는 광감작제의 종류는 상기 광감작제 담지 탄산칼슘 복합 나노입자에 대한 설명 부분과 동일하다.

[0043] 바람직하기로, 상기 광감작제는 물에 용해시켜 수용액의 형태로 첨가될 수 있다.

[0044] 상기 단계 3)은, 상기 단계 2)의 혼합액에 탄산염 수용액을 첨가하여 반응시키는 단계로서, 코어부를 형성하는 탄산칼슘을 얻기 위하여 상기 단계 2)의 혼합액 중에 존재하는 칼슘염과 반응하는 탄산염 수용액을 첨가하여 반응시키는 단계이다.

[0045] 상기 단계 3)에서 사용할 수 있는 탄산염은 탄산나트륨, 탄산수소나트륨, 탄산수소암모늄, 탄산암모늄, 탄산수소칼륨, 탄산칼륨으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0046] 상기 단계 3)의 탄산염은 상기 단계 2)의 혼합액 중에 존재하는 칼슘염 즉, 상기 단계 1)의 칼슘염과 1:2 내지 2:1의 몰비로 첨가될 수 있다. 반응효율면에서 상기 단계 3)의 탄산나트륨은 상기 단계 1)의 칼슘염과 동일한 몰비로 첨가되는 것이 바람직하다.

[0047] 상기 단계 3)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.

[0048] 상기 단계 3)의 반응 온도는 상온, 구체적으로 10 내지 30℃인 것이 바람직하다. 만일 반응 온도가 상기 범위 밖이면 부반응이 발생하는 단점이 있다.

[0049] 상기 단계 1) 및 3)에서 사용하는 공중합체 수용액, 칼슘염 수용액 및 탄산염 수용액의 pH는 7.0 내지 9.0인 것이 바람직하다. 또한, 광감작제가 수용액의 형태로 첨가될 경우, 상기 단계 2)의 광감작제 수용액의 pH도 7.0 내지 9.0인 것이 바람직하다. 만일 상기 수용액들의 pH가 상기 범위 밖이면 탄산칼슘의 형성이 어려운 단점이 있다.

[0050] 상기 단계 4는, 상기 단계 3)의 반응액을 원심분리하여 상층액을 회수하는 단계로서, 반응액을 원심분리하여 광감작제 담지 탄산칼슘 복합 나노입자를 포함하고 있는 상층액을 회수하는 단계이다.

[0051] 상기 단계 4)의 원심분리는 800 내지 1200 rpm으로 2 내지 5분 동안 처리하여 수행할 수 있다.

[0052] 상기 단계 5는, 상기 상층액을 삼투 교환시키는 단계로서, 광감작제 담지 탄산칼슘 복합 나노입자를 포함하고 있는 상층액을 삼투 교환시켜 광감작제 담지 탄산칼슘 복합 나노입자를 걸러내는 단계이다.

[0053] 상기 단계 5)의 삼투 교환은 삼투막 백을 이용하여 수행할 수 있으며, 상기 삼투막 백의 분자량 제한은 2500 내지 3500, 가장 바람직하기로 3000일 수 있다.

[0054] 상기 단계 6은, 상기 삼투 교환된 용액을 동결건조시키는 단계로서, 삼투 교환으로 분리된 광감작제 담지 탄산칼슘 복합 나노입자를 포함하고 있는 용액을 동결건조시켜 분말 형태의 광감작제 담지 탄산칼슘 복합 나노입자를 얻는 단계이다.

[0055] 상기 단계 6)의 동결건조는 -15 내지 -50℃에서 수행할 수 있다.

[0056] 본 발명의 광감작제 담지 탄산칼슘 복합 나노입자의 제조방법은 상기와 같이 공중합체, Ca^{2+} 양이온, 광감작제 및 CO_3^{2-} 음이온을 연속적으로 첨가하여 단일 반응 용기(one-pot) 내에서 반응시킴으로써, 탄산칼슘과 이온성 폴리머 부분이 함께 형성한 복합 코어(core) 내에 in-situ로 광감작제가 담지되고 비이온성의 친수성 폴리머가 형성하는 쉘(shell)이 외곽에 존재하는 방식으로 구형의 코어-쉘 구조의 나노입자를 자발적으로 형성시킬 수 있다.

[0057] 또한, 본 발명은 상기 광감작제 담지 탄산칼슘 복합 나노입자를 포함하는 초음파 조영 및 광역학 치료용 조성물을 제공한다.

[0058] 상기에서 기술한 바와 같이, 본 발명의 광감작제 담지 탄산칼슘 복합 나노입자 내 탄산칼슘은 pH 7.0 이상의 조건에서는 용해되지 않으나, pH 4.0 내지 pH 6.5의 조건에서는 용해되는 용해 거동을 나타냄으로써, 본 발명의 광감작제 담지 탄산칼슘 복합 나노입자 내 탄산칼슘과 상기 탄산칼슘 내에 담지되어 있는 광감작제는 ~pH 7.4의 혈류 내에서는 용해되지 않고 안정한 특성을 나타내는 반면, 암조직 pH(pH ~6.3), 세포 내의 엔도좀(endosome, pH ~5.0) 및 라이소좀(lysosome, ~pH 4.5) 내의 낮은 pH 환경에서는 코어부의 탄산칼슘의 용해가 일어나 이산화탄소를 발생시킬 수 있으며 이와 동시에 탄산칼슘 내에 담지되어 있는 광감작제의 방출을 유도할 수 있으므로 초음파 조영제로서 사용되면서 이와 동시에 빛 조사를 할 경우 방출된 광감작제의 활성 산소 생성에 따른 암세포 사멸을 유도하여 광역학 치료용 조성물로서 병행하여 사용될 수 있다.

[0059] 즉, 본 발명의 초음파 조영 및 광역학 치료용 조성물은 초음파 조영 및 광역학 치료를 동시에 수행할 수 있는 것을 특징으로 한다.

[0060] 본 발명에서, 상기 광감작제 담지 탄산칼슘 복합 나노입자는 구체적으로 암의 진단 및 광역학 치료를 위해 사용할 수 있다.

[0061] 본 발명에서, 상기 조성물은 혈류 내에서는 용해되지 않고 안정하며 암조직 및 세포 내에서는 광감작제의 방출을 유도할 수 있으므로 정맥 주사제 형태로 투여되는 것이 바람직하다.

[0062] 이하, 본 발명의 구성을 도면을 참조하여 상세히 설명한다.

[0063] 도 1은 세포 내 약물 전달체로서의 본 발명의 무기화 나노입자의 작용 원리를 도시한다.

[0064] 나노주형으로서 제공되는 PEG-PAsp의 이중블록 공중합체는 칼슘 및 탄산염 이온의 공급원을 사용하여 무기화되었다. 구체적으로, PAsp 도메인 내 카복실레이트 음이온이 무기화 과정의 핵심 역할을 한다. 칼슘염으로부터 공급된 Ca^{2+} 이온은 Ca과 Asp 내 카복실레이트 전하 간의 이온성 상호작용으로부터 유래한 정전기력으로 인하여 PAsp 도메인 내에 우선적으로 국부화되었다. 탄산염 음이온의 계속적인 부가로 인하여 PAsp 표면에 인접하여 이중 이온성 층이 생성되고, 탄산칼슘의 결정화를 위한 추진력으로 작용하는 부분 과포화를 야기한다. 무기화를 나노입자 내로 제한시키기 위하여, 과포화의 수준을 조절하는 것이 필수적이었다. 따라서, [Asp] 대 [칼슘 이온]의 몰비는 1:1로 고정하여 과포화를 원하는 수준으로 유지함으로써, PAsp 도메인에만 나노주형 매개의 $CaCO_3$ 무기화를 야기하였다. 무기화 과정 중, 친수성 광감작제인 Ce6 삼나트륨염이 이온성 상호작용으로 인하여 내부 $CaCO_3$ 코어 내로 용이하게 담지되었으며 무기화를 포함하는 이러한 모든 과정은 동시에 수행되었다. 외부 PEG 쉘은 나노입자가 면역계를 피하여 혈류 내에 더욱 오랫동안 머무를 수 있도록 돕는다.

[0065] 본 발명의 광감작제 담지 탄산칼슘 유기-무기 복합 나노입자는 초음파 조영을 위한 CO_2 기포를 생성하고 종양 조직의 pH 조건에 감응하여 PDT를 위한 광감작제를 방출할 수 있다. 본 발명의 광감작제 담지 탄산칼슘 유기-무기 복합 나노입자는 다양한 종양에 대해 효과적인 초음파 조영 유도된(guided) 광역학 치료 효과를 나타낼 수 있다.

[0066] 즉, 본 발명의 광감작제 담지 탄산칼슘 복합 나노입자는 초음파 조영을 통해 정확한 암 조직 영역을 확인하면서 빛 조사 하에 광역학 치료를 동시에 수행함으로써 초음파 조영 유도된 광역학 치료를 통해 암 치료시 부작용을 줄이면서 효과적인 치료 효과를 나타낼 수 있는 장점이 있다.

발명의 효과

[0067] 본 발명은 광감작제가 담지된 탄산칼슘 코어 및 고분자 쉘로 구성된 탄산칼슘 복합 나노 입자로서, 혈류 내에서는 안정한 상태로 탄산칼슘의 방출이 일어나지 않아 탄산칼슘 코어 내에 존재하는 광감작제의 방출이 일어나지 않고, 표적화 후 암조직 및 세포 내 엔도좀/라이소좀의 산성 pH에서 용해되어 탄산칼슘 용해에 따라 이산화탄소를 발생시키고 담지된 광감작제의 방출을 유도하여 초음파 조영과 동시에 광역학 치료를 병행할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0068] 도 1은 세포 내 약물 전달체로서의 본 발명의 무기화 나노입자의 합성 경로 및 작용 원리를 도시한 개략도이다.

도 2는 무기화 Ce6-NP의 TEM 이미지 및 복합 나노입자의 $CaCO_3$ 층의 TEM-관련 SAED 패턴(a), 및 TEM-관련 EDS 데이터(b)를 나타낸다.

도 3은 중합체(PEG_{113}-$PAsp_{53}$) 및 무기화 Ce6-NP의 FT-IR 데이터를 나타낸다.

도 4는 다양한 pH에서의 Ce6-NP로부터 생성된 CO_2의 양을 나타내는 그래프이다.

도 5는 다양한 pH에서의 Ce6-NP로부터의 시험관 내 US 이미지(a) 및 시간-의존적 US 조영 세기(b)를 나타낸다.

도 6은 무기화 Ce6-NP의 시험관 내 Ce6 방출 프로파일을 나타낸다.

도 7은 조사 시간에 따른 RNO를 사용하여 관찰된 단일항 산소 생성량을 나타내는 그래프이다.

도 8은 24시간 후 빛 조사시 유리 Ce6 및 무기화 Ce6-NP의 시험관 내 광독성을 나타내는 그래프이다.

도 9는 (a) 유리 Ce6과 함께 빛 조사 없이, (b) Ce6 NP와 함께 빛 조사 없이, (c) 유리 Ce6과 함께 빛 조사

하에, (d) Ce6 NP와 함께 빛 조사 하에 배양된 MCF-7 세포의 생존/사멸 세포 생존력 염색 결과를 나타내는 사진 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0069] 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.

[0070] **실시예 1: Ce6-담지 탄산칼슘 무기화 나노입자(Mineralized Ce6-NP)의 합성**

[0071] 재료

[0072] 메톡시-폴리(에틸렌글리콜)-아민(Methoxy-Poly(Ethylene Glycol)-amine; mPEG-NH_2, Mn = 5000 g/mol)을 IDBIOCHEM 사(Ulsan, Korea)로부터 구입하여 추가적인 과정 없이 사용하였다. β-벤질 L-아스파테이트(β-Benzyl L-aspartate; BAsp), 트리포스겐(triphosgene), 염화칼슘(calcium chloride; $CaCl_2$), 탄산나트륨(sodium carbonate; Na_2CO_3), 디메틸포름아미드(dimethylformamide; DMF), p-니트로소-N,N'-디메틸아닐린(p-nitroso-N,N'-dimethylaniline; RNO), 히스티딘(histidine), 아르세나조 III(arsenazo III)은 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo)로부터 구입하였다. 클로린 e6 삼나트륨염(Chlorin e6 trisodium salt; Ce6 salt)은 Wako Pure chemical Industries, Ltd (Osaka, Japan)로부터 구입하였다. 모든 다른 화합물 및 용매는 분석용 등급이며 추가적인 정제과정 없이 사용하였다.

[0073] PEG-PAsp의 합성

[0074] 이전에 공지된 방법으로, 113개 EG 단위 및 53개 BAsp 단위를 갖는 폴리(에틸렌글리콜)-b-폴리(β-벤질-L-아스파테이트)(PEG_{113}-$PAsp_{53}$)를 합성하였다.

[0075] 건조 DMF(100 mL) 중의 CH_3O-PEG-NH_2(1 g, 0.2 mmol) 교반 용액에 질소 하, 35℃에서 BAsp-NCA(2.99 g, 12 mmol)를 첨가하고, 상기 반응을 추가 24 시간 동안 유지시켰다. PEG_{113}-$PBAsp_{53}$를 DMF로부터 디에틸 에테르로의 반복적인 침전을 통해 분리하였다(수율 88%). 마지막으로, 벤질기를 제거하기 위하여 상기 블록 공중합체(4 g)를 0.1 N NaOH(200 mL)로 처리함으로써 PEG_{113}-$PBAsp_{53}$의 탈보호를 수행하였다. 그 다음 상기 수용액을 24 시간 동안 막(Molecular weight cut-off(MWCO): 1000)을 이용하여 투석한 후, 동결 건조시켰다.

[0076] 본 발명에서는 탄산칼슘 무기화를 위한 나노주형(nanotemplate)을 제조하기 위하여 PEG-PAsp의 이중블록 공중합체를 합성하였다. 낮은 독성 및 면역원성을 위하여, FDA-승인된 PEG 및 생분해성 폴리(아미노산)을 선택하여 사용하였다. PEG-PAsp는 고분자 개시제(macroinitiator)로서 CH_3O-PEG-NH_2의 존재 하에 β-벤질 L-아스파테이트 *N*-카복시안하이드라이드(BAsp-NCA)의 중합 및 추가적인 탈보호 과정에 의해 제조하였다. ^{1}H-NMR 분석으로 PEG-PAsp의 합성을 확인한 결과 EG 대 PAsp의 성분비가 113 : 53임을 알 수 있었다.

[0077] Ce6-담지 탄산칼슘 무기화 나노입자(Mineralized Ce6-NP)의 합성

[0078] 이중블록 공중합체 상에 탄산칼슘으로 인 시츄 무기화(in-situ mineralization)하고 무기화 코어 내로 Ce6을 담지하여 Ce6-담지된 탄산칼슘으로 무기화 나노입자를 제조하였다. 먼저, 준비된 PEG_{113}-$PAsp_{53}$(200 mg, 0.018 mmol)을 pH 8의 수용액에 용해시키고 이어서 $CaCl_2$ 수용액(2 mL, 0.95 mmol)과 혼합하였다. 칼슘이온[Ca^{2+}]에 대한 아스파테이트[Asp] 의 몰농도비는 1:1로 하였다. 2시간 후, Ce6(20mg)을 첨가하고 암실에서 2시간 동안 상온에서 교반하였다. 마지막으로, 이중블록 공중합체 상에 탄산칼슘 무기화를 개시하기 위하여, 탄산나트륨 수용액(Na_2CO_3, 2 mL, 0.95 mmol)을 상기 혼합물에 서서히 적가하고, 상온에서 12시간 동안 격렬히 교반하였다. 반응하지 않은 이온종 및 담지되지 않은 Ce6을 제거하기 위하여, 막(Molecular weight cut-off (MWCO): 3500)을 이

용하여 용액을 증류수에서 12시간 동안 투석하고, 동결건조하여 녹색분말을 수득하였다. 유리 Ce6 염의 1M HCl 수용액으로부터 획득한 표준곡선을 기초로, 1M HCl 수용액에서 UV-Vis 분광광도계를 사용하여 413 nm에서 흡광도를 측정함으로써 Ce6 담지 함량(loading content)을 결정하였다. Ce6-미담지 무기화 나노입자를 Ce6 삼나트륨 염을 첨가하는 단계를 제외하고는 동일한 과정으로 제조하였다.

[0079] **실험예 1: 무기화 Ce6-NP의 특성분석 및 혈청안정성 조사**

[0080] 무기화 Ce6-NPs의 직경 및 크기분포를 동적광산란분석(dynamic light scattering analysis)으로 측정하였다. PBS 용액(1 mg/ml, pH 7.4, 37)에 무기화된 Ce6-NP를 분산시키고 수조형 초음파처리기를 이용하여 10분 동안 초음파 처리하였다. 90 플러스 입자 크기 분석(Brookhaven Instruments Corporation)을 이용하여 동적광산란 측정을 수행하였다. 무기화 Ce6-NPs의 형태는 200kV의 가속 전압에서 구동한 투과 전자 현미경(transmission electron microscopy; TEM, CM30, Philips)에 의해 결정하였다. 각각의 시료를 증류수에 용해시키고 탄소 코팅된 200 메쉬 구리 그리드 상에 떨어뜨렸다. TEM-결합 에너지-분산 X-선 광전자 분광(TEM-associated energy-dispersive X-ray photoelectron spectroscopy; EDS) 측정을 200kV의 가속 전압에서 구동한 DX-4(EDAX)를 구비한 CM30(Philips)을 이용하여 수행하였다. 무기화 나노입자의 면적을 원자 성분을 보여주는 EDS로 평가하였다. 혈청안정성을 확인하기 위하여, 동적광산란분석을 사용하였다. 무기화 Ce6-NP(3mg)를 인산완충염용액(PBS, pH 7.4)과 혈청용액(1ml, 50% fetal bovine serum)에 침지시켰다. 적정 시간 간격으로, 분산된 광 세기(scattered light intensity; SLI)를 분석하고 초기 SLI(SLI_0)와 비교하였다.

[0081] 도 2(A)는 염색 과정 없이 무기 $CaCO_3$ 코어의 형성 및 다형체의 특성을 보여준다. TEM 이미지는 나노입자의 크기가 대략 300 내지 400 nm임을 나타내었다. 에너지-분산 X-선 분광법(EDS)은 무기화 나노입자가 $CaCO_3$ 미네랄을 구성하는 Ca, C, 및 O를 주로 함유함을 보여주었다(도 2(B)). 또한, 본 발명에서는 특히 바테라이트(vaterite) 형태의 $CaCO_3$의 존재를 FT-IR ($CaCO_3$ peak at 745, 877cm^{-1})로 확인할 수 있었다(도 3). UV-VIS 분광계 를 이용해 Ce6 담지량이 5.5 wt%임을 확인하였다. Ce6 담지 후 나노입자의 직경의 변화를 TEM 이미지를 사용하여 조사하였고 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0082]

Sample	무기화 NPs	무기화 Ce6-NPs
Diameter	358.5 nm	360.2 nm

[0083] 상기 표 1을 통해, Ce6-비담지 나노입자 및 10% Ce6-담지 나노입자 간에 크기에 있어 유의적인 차이가 없음을 알 수 있다.

[0084] **실험예 2: 무기화 Ce6-NP로부터의 기체 함량 분석**

[0085] 무기화 Ce6-NP로부터 발생되는 기체의 양은 사중극자 질량 분광계(Prisma QME 200, Germany)를 사용하여 측정하였다. 상기 기기는 Faraday cup 검출기를 구비하였다. 증기를 0.058 mA의 방출 전류, 8 eV의 전자 에너지, 및 750의 해상도로 분석하였다. 시료 챔버는 터보 분자 펌프(Pfeiffer vacuum, CA, USA)로 진공화시켰고 상온에서 측정하였다. 2 ml의 완충수용액(pH 7.4 및 pH 6.4의 인산염완충액) 및 20 mg의 무기화 Ce6-NP를 샘플러에 각각 넣었다. 챔버 내 완충용액을 진공 조건 하에서 동결시키고 완충용액에 30분 노출 후 해빙시켰다. 대조구로서, 인산염 완충용액 내 존재하는 잔류 이산화탄소의 양(pH 7.4) 및 인산염 완충용액 내 PEG-PAsp 중합체로부터의 이산화탄소의 양(pH 7.4, pH 6.4)을 또한 동일한 방법으로 측정하였다.

[0086] 37℃에서 pH 제어 하에 무기화 Ce6-NP로부터 발생된 이산화탄소 기체의 양은 질량 분광계를 사용하여 조사하였다. 도 4에서 보여주듯이, pH 7.4 완충용액 내에 존재하는 이산화탄소의 양(0.020 cc/atm)을 대조구로서 사용하였다. 또한, PEG-PAsp 중합체로부터의 이산화탄소의 양(pH 7.4 (0.020 cc/atm) 및 pH 6.8 (0.019 cc/atm))과 pH 7.4 완충용액 내 이산화탄소의 양 간에 거의 차이가 없었으며, 이로써 PEG-PAsp 중합체 자체는 pH 7.4 및 pH 6.4 완충용액에서 이산화탄소 기포를 생성시키지 않음을 알 수 있다. 놀랍게도, pH 6.4 완충용액에서 무기화 Ce6-NP는 상당량의 이산화탄소 기체(0.076 cc/atm)를 발생시켰으며, 반면에 pH 7.4에서 무기화 Ce6-NP의 기체

함량은 단지 0.025 cc/atm이었다. 이는 대조구 대비 소량의 이산화탄소 생성량이었다. 상기에서 언급된 바와 같이, pH 수준이 감소될 때, $CaCO_3$의 수용해도가 급격하게 증가한다. $CaCO_3$ 미네랄은 산과 반응하여 탄산을 생성하고 이로써 $CO3^{2-}$의 농도가 감소하고 $CaCO_3$가 더욱 용해가능하게 된다. 결과적으로, 탄산은 CO_2 기체를 방출한다.

이러한 독특한 무기화 Ce6-NP의 pH-감응성 기체-생성 특성은 종양의 산성 환경에서의 종양 조직을 표적하기 위한 기체-생성 초음파 조영제로서 잠재성이 있음을 보여준다.

[0087] **실험예 3: 시험관 내 US 영상화**

[0088] 무기화 Ce6-NP의 시험관 내 US 영상화는 완충용액(pH 7.4 및 pH 6.4의 인산염 완충액) 내에서 수행하였다. 아가-겔 내에 500 ㎕ 에펜도르프 튜브를 삽입한 다음 팬텀 겔이 냉각된 후에 상기 튜브를 제거하여 제조한 팬텀 겔 플레이트(phantom gel plate)를 시험관 내 조건으로서 사용하였다. US 이미지는 정적 상태(static state)로 40 MHz에서 RMV 706 변환기가 장착된 Visualsonics Vevo 770®(High-Resolution Micro-Imaging System, Visualsonics, Toronto, Canada)을 사용하여 얻었다. 나노입자 용액(20 mg/mL)을 다양한 pH에서 제조하였다. 각각의 시료에 대한 US 세기의 변화를 180분까지 측정하고, 물 대조구의 US 세기를 표준화 과정에 따라 시료 세기로부터 차감하였다.

[0089] 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0090] 무기화 Ce6-NP(pH 7.4)는 US 이미지 하에 임계적인 음향 반사 조영(acoustic reflectivity contrast)을 보이지 않았다. 이는 pH 7.4 하에서 시각화하기 위한 충분한 이산화탄소 기체를 생성시키지 않는 무기화 Ce6-NP가 초음파 조영성(echogenic)을 가지지 않기 때문이었다. 중요하게는, 무기화 Ce6-NP의 US 조영 이미지는 약한 산성 pH 조건(pH 6.4)에서 유의적으로 증강되었다. pH-감응성 조영 US 이미지의 이러한 우수한 결과는 기체량과 관련이 있으며, 이에 따라 특정 세포의 pH (종양의 산성 pH 6.4) 내에서의 무기화 Ce6-NP의 조영 증강을 나타내는 무기화 Ce6-NP의 현미경 이미지는 이산화탄소 기포의 생성이 US 필드 하의 공명(resonation)으로 인한 것임을 보여주었다. 특히, 본 발명의 새로운 무기화 Ce6-NP의 pH-감응성 기체 생성 특성을 이용함으로써, 정확한 종양 영역과 정상 조직을 US 이미징 하에 실시간으로 잘 구별할 수 있다. 또한, 본 발명의 Ce6-NP는 종양을 위한 Ce6 기초의 광역학 치료를 동시에 수행할 수 있다.

[0091] **실험예 4: 무기화 Ce6-NP로부터의 시험관 내 Ce6 방출**

[0092] 무기화 Ce6-NP로부터 Ce6의 시험관 내 방출 거동을 완충수용액(HCl로 조정된 pH 7.4 인산염 완충액 및 pH 6.4 완충용액) 내에서 조사하였다. 각각의 방출 용액 내에 분산시킨 후, 무기화 Ce6-NP(1 mg/ml)를 투석 막 백(MWCO: 100,000, Spectra/Por®)에 넣었다. 10ml의 각각의 방출 매질 내에 전체적으로 잠긴 막 백을 70 rpm으로 쉐이킹하였다. 방출 매질을 일정 시간 간격으로 새로운 것으로 교체해주었다. Ce6의 누적량을 403nm에서의 흡광도를 계산함으로써 UV-VIS 분광광도계를 사용하여 분석하였다.

[0093] 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0094] 인산염 완충식염수(PBS, pH 7.4)에서 무기화 Ce6-NP는 48 시간 후에도 Ce6을 단지 53%까지 방출하는 것으로 확인되었다. 이는 중성 pH에서 안정한 무기화 내부 코어가 Ce6을 캡슐화하고 2일까지 혈류로의 Ce6 손실을 막기 때문인 것으로 여겨졌다. 다른 한편으로, Ce6은 산성 용액(pH 6.4)에서 12시간 후에 95%까지 무기화 Ce6-NP로부터 급속하게 방출되었다. 따라서, 무기화 코어가 산성 용액에 취약하며 광감작제 전달 시스템을 위하여 효과적인 광감작제 방출 패턴을 야기할 수 있음을 알 수 있다.

[0095] **실험예 5: 무기화 Ce6-NP의 단일항 산소 생성**

[0096] 단일항 산소의 생성은 단일항 산소 트랩(singlet oxygen trap)으로서 히스티딘을 갖는 단일항 산소 검출자로서 p-니트로소-N,N'-디메틸아닐린 (RNO)을 사용하여 측정하였다. 100 ㎕의 증류수 중 RNO (250 μM) 및 300 ㎕의 증류수 중 히스티딘 (0.03 M)을 개별적으로 용해시킨 후 석영 큐벳 내에서 혼합하였다. 유리 Ce6 (20 ㎍) 또는 20 ㎍의 Ce6을 함유하는 Ce6 나노입자를 각각의 700 ㎕의 pH 완충용액(pH 6.4, 7.4) 중에 용해시켰다. 700 ㎕의 각각의 용액을 RNO 용액에 첨가하였다. 상기 용액을 10분 동안 물-포화된 산소로 기포 처리한 후 단일항 산소를

측정한 다음 90분 동안 레이저(671nm, 6Jcm^{-2})로 조사하였다. RNO의 흡광도를 분광광도계(UV-1650pc)를 사용하여 440nm에서 미리 정해진 매 기간마다 모니터링하였다. 초기 RNO 흡수 수준을 100%로 표현하고 RNO 흡수의 탈색도(bleaching)가 단일항 산소의 생성을 나타내었다.

[0097] 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0098] 빛 조사 후, 유리 Ce6의 커브는 100 퍼센트로부터 29 퍼센트로 급격하게 감소하였다. 이를 통해, 단일항 산소가 급속하게 생성됨을 알 수 있다. 특히, 도 7의 그래프는 무기화 Ce6-NP 내 담지된 Ce6으로부터 생성된 단일항 산소 생성량이 유리 Ce6으로부터의 생성량과 거의 유사하였음을 보여준다. 이는 캡슐화된 Ce6이 이들의 다른 구조에도 불구하고 동일한 양의 빛 조사에 의해 동일한 양의 단일항 산소를 생성시킬 수 있음을 나타낸다. 다른 한편으로, 무기화 Ce6-NP는 RNO 농도에 있어 어떠한 실질적인 차이도 보이지 않았으며, 이는 이들이 단일항 산소를 생성하지 않았음을 나타낸다.

[0099] **실험예 6: 세포 광독성**

[0100] MCF-7 세포를 200 ㎕ 내 웰 당 5x10^{3} 세포로 96-웰 플레이트 상에 접종하고, 37℃, 5% CO_2에서 24 시간 동안 인큐베이션시켰다. 그 다음 각각의 웰의 배지를 0.5 내지 10 ㎍/ml의 다양한 농도로 중합체, 무기화 Ce6-NP, 및 유리 Ce6을 함유하는 200 ㎕의 새로운 배지로 교체하고, 상기 플레이트를 37℃, 5% CO_2에서 인큐베이션시켰다. 2시간 후, 배지를 제거하고, PBS로 2회 세척한 다음 새로운 배지를 추가하였다. 시료 처리된 세포를 30분 동안 LED 램프 (670-690 nm, 100 mW/cm^{2})를 사용하여 조사하였다. 이러한 과정 후, 세포를 24시간 동안 추가로 인큐베이션시킨 다음 세포 생존력을 상기 언급한 CCK-8 용액으로 측정하였다.

[0101] 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[0102] 무기화 Ce6-NP 및 유리 Ce6은 모두 비조사된 경우에 세포독성을 보이지 않았다. 그러나, 30분 동안 적정량의 적색 파장의 레이저(670-690 nm, 100 mW/cm^{2})로 조사한 경우, MCF-7 세포는 각각의 시료 내 Ce6의 농도에 따라 광범위한 광독성을 보였다. 놀랍게도, 무기화 Ce6-NP의 광독성은 유리 Ce6보다 더욱 높았다. 이는 음 전하의 유리 Ce6과 비교하여 특정한 세포의 흡수 및 나노입자로부터 Ce6의 급속한 방출로 인한 것으로 여겨졌다. 따라서, 무기화 Ce6-NP는 정상 조직에 대한 부작용을 줄이면서 PDT 치료법에 유용할 수 있다.

[0103] **실험예 7: 생존/사멸((Live/dead) 이미징**

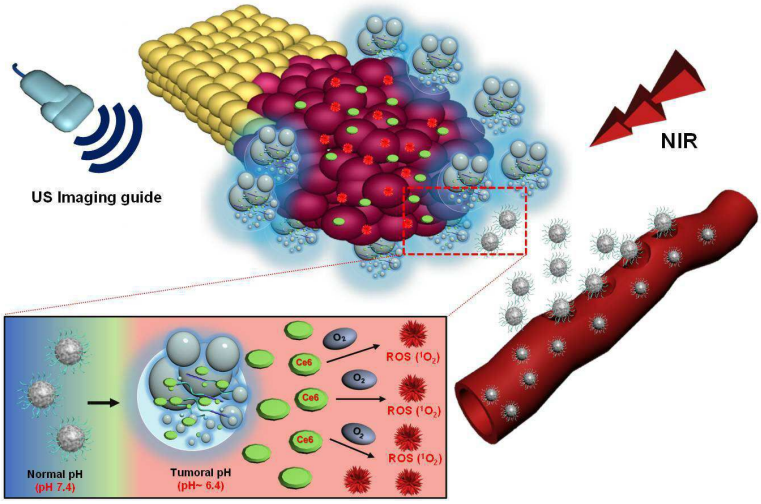
[0104] 광역학 치료를 평가하기 위하여, MCF-7 세포를 10 % FBS, 1 % 페니실린 스트렙토마이신으로 보충된 1 mL의 DMEM 배지 내 2 × 10^{4} 세포/웰의 밀도로 24-웰 세포 배양 플레이트 상에 접종하였다. 24 시간 인큐베이션 후, 배양 배지를 등가의 Ce6 농도(10 ㎍/mL)의 유리 Ce6 및 Ce6-NP를 함유하는 1ml의 무혈청 배지로 교체하였다. 2시간 인큐베이션 후, 세포를 PBS로 3회 세척하고 새로운 배지를 추가하였다. 그 다음 세포를 30분 동안 LED 램프 (670-690 nm, 100 mW/cm^{2}) 로 조사하고 37℃에서 5시간 동안 인큐베이션시킨 후 생존력 염색을 하였다. 생존/사멸 이미지는 생존 세포(녹색)에 대하여는 4 mM calcein AM 1 ㎕, 그리고 사멸 세포(적색)에 대하여는 2 mM EthD-1 4 ㎕를 함유하는 200 ㎕의 PBS 용액 내에서 5분 동안 세포를 인큐베이션시키고 형광 현미경(IX71, Olympus, Japan) 상에서 이미지화 함으로써 측정하였다.

[0105] 그 결과를 도 9에 나타내었다.

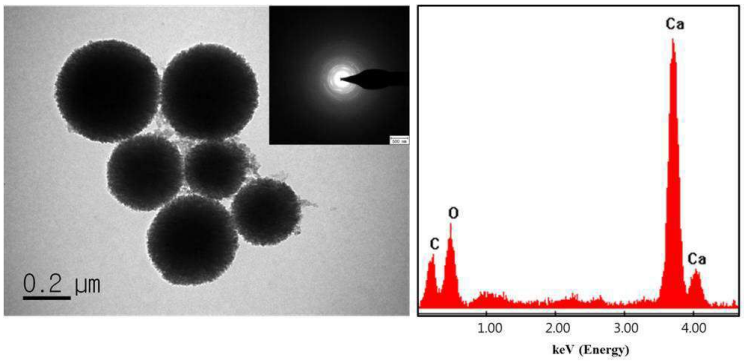
[0106] 생존/사멸 세포 염색을 통해 유리 Ce6의 암세포에 대한 광 독성과 비교하여 탄산칼슘으로 무기화된 Ce6-담지 나노입자의 광 독성 효과가 더 우수하다는 결과를 얻었다.

도면

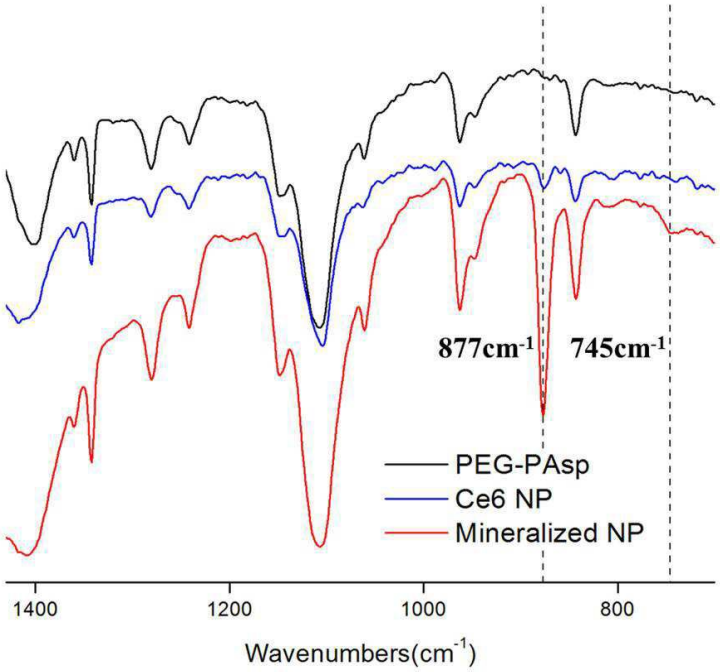
도면1


US Imaging guide
NIR
Ce6
ROS ($^1O_2$)
Normal pH
(pH 7.4)
Tumoral pH
(pH~ 6.4)

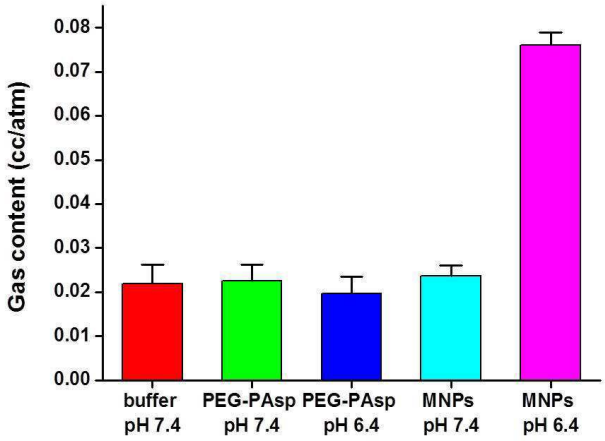
도면2


0.2 μm
Ca
O
C
Ca
1.00
2.00
3.00
4.00
keV (Energy)

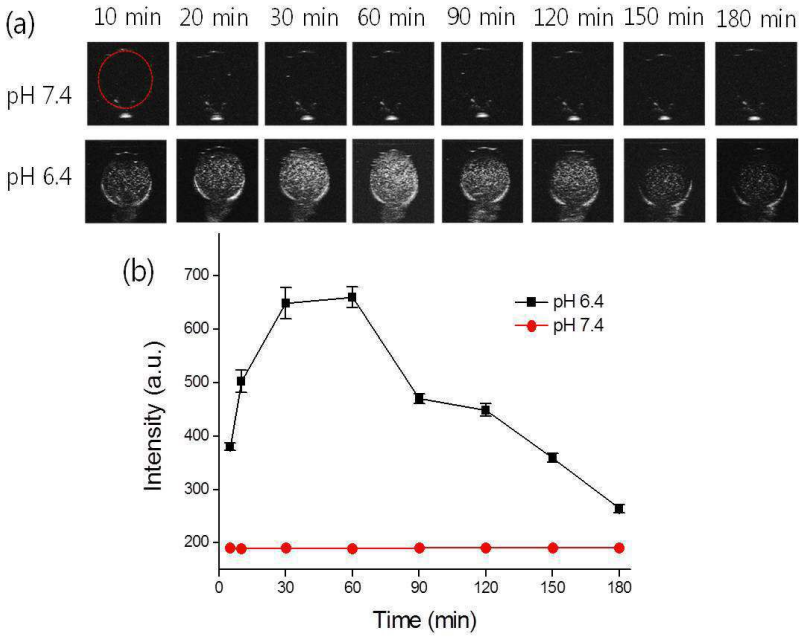
도면3


877cm-1
745cm-1
PEG-PAsp
Ce6 NP
Mineralized NP
1400
1200
1000
800
Wavenumbers(cm-1)

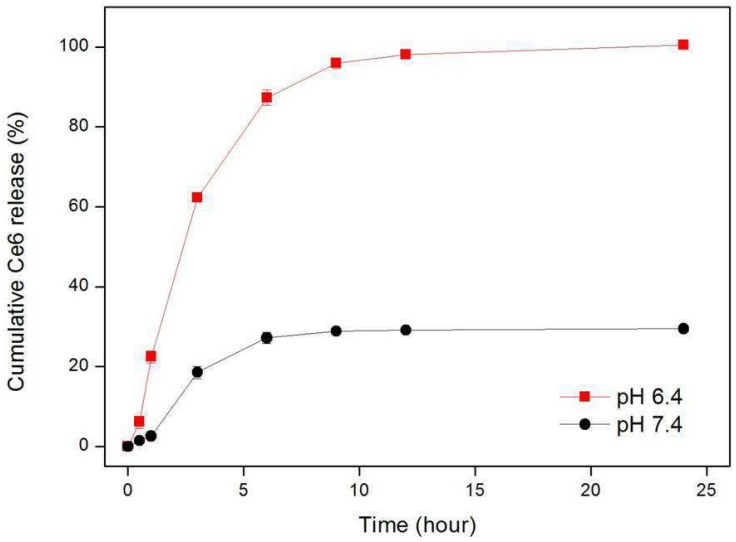
도면4


Gas content (cc/atm)
0.08
0.07
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
buffer pH 7.4
PEG-PAsp pH 7.4
PEG-PAsp pH 6.4
MNPs pH 7.4
MNPs pH 6.4

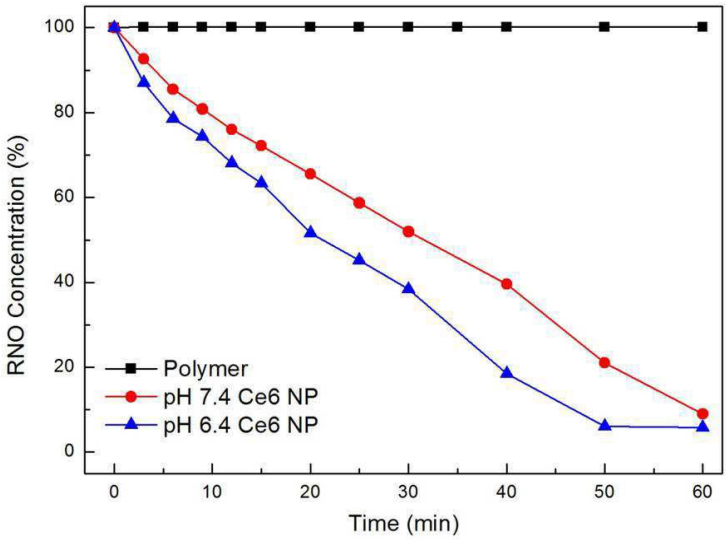
도면5


(a)
10 min
20 min
30 min
60 min
90 min
120 min
150 min
180 min
pH 7.4
pH 6.4
(b)
Intensity (a.u.)
Time (min)
pH 6.4
pH 7.4

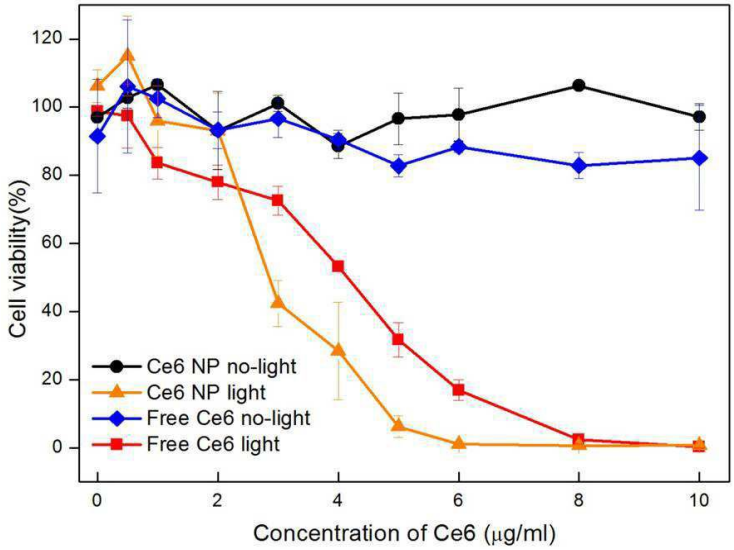
도면6


Cumulative Ce6 release (%)
Time (hour)
pH 6.4
pH 7.4

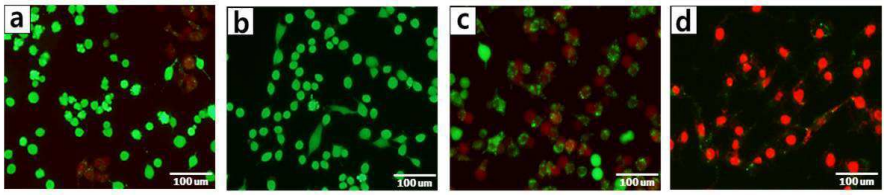
도면7


RNO Concentration (%)
Time (min)
Polymer
pH 7.4 Ce6 NP
pH 6.4 Ce6 NP

도면8


Cell viability(%)
Concentration of Ce6 (μg/ml)
Ce6 NP no-light
Ce6 NP light
Free Ce6 no-light
Free Ce6 light

도면9


a
b
c
d
100 um