



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0021148
(43) 공개일자 2011년03월04일

(51) Int. Cl.

C01F 17/00 (2006.01) *A61K 49/06* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0078770

(22) 출원일자 2009년08월25일

심사청구일자 2009년08월25일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제 캠퍼스내

성균관대학교산학협력단

경기 수원시 장안구 천천동 300 성균관대학교내

(72) 발명자

이인수

경기도 수원시 영통구 영통2동 988-2 동아아파트 717동 802호

변승호

경기도 성남시 분당구 수내동 파크타운 롯데APT 128동 303호

이정희

서울특별시 송파구 문정동 문정래미안아파트 120동 701호

(74) 대리인

유수미

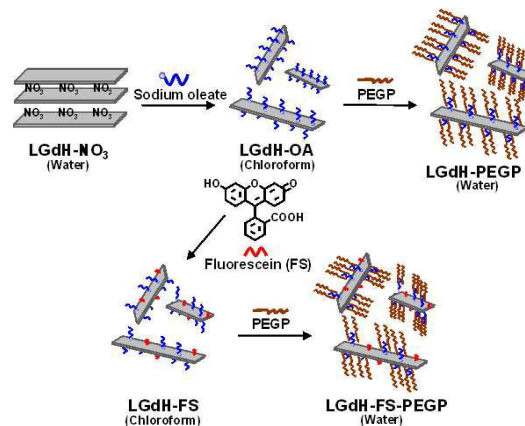
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 표면개질된 층상 가돌리늄 히드록사이드, 그의 제조방법 및 그를 포함하는 MRI 조영제

(57) 요약

본 발명은 표면개질된 층상 가돌리늄 히드록사이드(LGdH), 그의 제조방법 및 그를 포함하는 MRI 조영제에 관한 것이다. 본 발명의 표면개질된 층상 가돌리늄 히드록사이드는 LGdH 층들의 표면을 PEG-인지질로 개질하여 수성 콜로이드 현탁액으로 안정하게 분산될 수 있고 생리적 현탁액의 낮은 pH 환경에서도 안정하다. 또한 본 발명의 표면개질된 층상 가돌리늄 히드록사이드는 층들이 완전히 층간박리되어 MRI 조영능도 우수하므로 효과적인 MRI 조영제로서 사용가능하다. 아울러, 본 발명의 표면개질된 층상 가돌리늄 히드록사이드는 형광성 분자를 추가로 도입하여 MRI 및 형광 이미징을 위한 다기능 프로브로서도 활용가능하다.

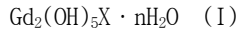
대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

폴리(에틸렌글리콜){poly(ethylene glycol): PEG} 말단기를 가지는 인지질(phospholipid)로 표면개질된 하기 화학식 (I)의 층상 가돌리늄 히드록사이드(layered gadolinium hydroxide: LGdH):



상기 식에서,

X는 탄소수 4 내지 30의 지방산염 음이온이고,

n은 0.5 내지 4이다.

청구항 2

제1항에 있어서, n이 1 내지 3인 것을 특징으로 하는 층상 가돌리늄 히드록사이드.

청구항 3

제1항에 있어서, 지방산염이 올레산염, 팔미트산염, 스테아르산염 또는 리놀레산염인 것을 특징으로 하는 층상 가돌리늄 히드록사이드.

청구항 4

제1항에 있어서, 폴리(에틸렌글리콜) 말단기를 가지는 인지질이 1,2-디팔미토일-*sn*-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌글리콜)] (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)]), 1,2-디미리스토일-*sn*-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌글리콜)] (1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)]) 또는 1,2-디스테아로일-*sn*-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌글리콜)] ((1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)])) 인 것을 특징으로 하는 층상 가돌리늄 히드록사이드.

청구항 5

제1항 또는 제4항에 있어서, 폴리(에틸렌글리콜) 사슬의 분자량이 200 내지 40,000인 것을 특징으로 하는 층상 가돌리늄 히드록사이드.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, LGdH 층들이 완전히 층간박리되어 있고, 폴리(에틸렌글리콜) 말단기를 가지는 인지질이 층간 음이온인 지방산염 음이온을 통해 LGdH 층들의 표면에 부착되어 있는 구조를 가지는 것을 특징으로 하는 층상 가돌리늄 히드록사이드.

청구항 7

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 지방산염 음이온의 일부가 형광성 음이온 분자로 치환된 것을 특징으로 하는 층상 가돌리늄 히드록사이드.

청구항 8

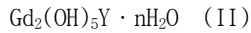
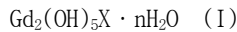
제7항에 있어서, 형광성 음이온 분자가 플루오레세인 음이온 분자인 것을 특징으로 하는 층상 가돌리늄 히드록사이드.

청구항 9

(i) 하기 화학식 (II)의 LGdH를 지방산염과 반응시켜 층들이 층간박리된 하기 화학식 (I)의 층상 가돌리늄 히드록사이드를 수득하는 단계; 및

(ii) 층들이 층간박리된 하기 화학식 (I)의 층상 가돌리늄 히드록사이드를 폴리(에틸렌글리콜){poly(ethylene glycol): PEG} 말단기를 가지는 인지질(phospholipid)로 변형시키는 단계를 포함하는, 표면개질된 하기 화학식

(I)의 층상 가돌리늄 히드록사이드의 제조방법:



상기 식에서,

Y는 F^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- 또는 SO_4^{2-} 이고,

X는 탄소수 4 내지 30의 지방산염 음이온이며,

n은 0.5 내지 4이다.

청구항 10

제9항에 있어서,

Y가 NO_3^- 이고,

n이 1 내지 3인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 11

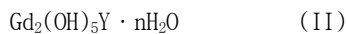
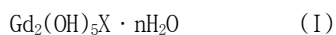
제9항에 있어서, 지방산염으로 지방산의 나트륨염 또는 칼륨염을 사용하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 12

(i') 하기 화학식 (II)의 LGdH를 지방산염과 반응시켜 층들이 층간박리된 하기 화학식 (I)의 층상 가돌리늄 히드록사이드를 수득하는 단계;

(ii') 층들이 층간박리된 하기 화학식 (I)의 층상 가돌리늄 히드록사이드를 형광성 분자와 반응시켜 형광성 음이온 분자가 도입된 하기 화학식 (I)의 층상 가돌리늄 히드록사이드를 수득하는 단계; 및

(iii') 형광성 음이온 분자가 도입된 하기 화학식 (I)의 층상 가돌리늄 히드록사이드를 폴리(에틸렌글리콜){poly(ethylene glycol): PEG} 말단기를 가지는 인지질(phospholipid)로 변형시키는 단계를 포함하는, 형광성 분자를 함유하는 표면개질된 하기 화학식 (I)의 층상 가돌리늄 히드록사이드의 제조방법:



상기 식에서,

Y는 F^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- 또는 SO_4^{2-} 이고,

X는 탄소수 4 내지 30의 지방산염 음이온이며,

n은 0.5 내지 4이다.

청구항 13

제12항에 있어서,

Y가 NO_3^- 이고,

n이 1 내지 3인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 지방산염으로 지방산의 나트륨염 또는 칼륨염을 사용하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 15

제12항에 있어서, 단계 (ii')가 염기의 존재하에 수행되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 염기가 트리에틸아민인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 17

제12항에 있어서, 단계 (ii')에서 지방산염 음이온의 일부가 형광성 음이온 분자와 교환되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 18

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 층상 가돌리늄 히드록사이드를 약학적으로 허용되는 담체와 함께 포함하는 MRI 조영제.

청구항 19

제7항에 따른 층상 가돌리늄 히드록사이드를 포함하는 MRI 및 형광 이미징을 위한 다기능 프로브.

청구항 20

제8항에 따른 층상 가돌리늄 히드록사이드를 포함하는 MRI 및 형광 이미징을 위한 다기능 프로브.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 표면개질된 층상 가돌리늄 히드록사이드, 그의 제조방법 및 그를 포함하는 MRI 조영제에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 수성 콜로이드 현탁액으로 안정하게 분산될 수 있고, 생리적 현탁액의 낮은 pH 환경에서도 안정하며, MRI 조영능도 우수한 표면개질된 층상 가돌리늄 히드록사이드, 그의 제조방법 및 그를 포함하는 MRI 조영제에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 층상 희토류 히드록사이드(layered rare-earth hydroxide: LRH)는 양전하를 가지는 3가 희토류 이온의 히드록사이드 층들로 구성된 것을 제외하고는, 구조적으로 히드로탈사이트형(hydrotaalcite-type) 층상 이중 히드록사이드(layered double hydroxide: LDH)와 유사한 일종의 음이온성 클레이(clay)이다. $RE_2(OH)_5X \cdot nH_2O$ (RE = 희토류, X = 음이온)의 일반식으로 나타내는 일련의 LRH가 최근에 합성되어 희토류 이온의 유용한 성질과 LDH의 호스트-게스트(host-guest) 화학을 결합한 독특한 능력으로 인해 점차 관심을 끌고 있다.

[0003] 본 발명자들에 의해 출원되어 현재 계류중인 대한민국 특허출원 제2008-0111561호에는 층상 가돌리늄 히드록사이드(layered gadolinium hydroxide: LGdH)가 T₁-가중된 자기 공명 이미징(magnetic resonance imaging: MRI)에서 효과적인 조영제로 사용될 수 있음이 개시되어 있다. LGdH를 조영제로 사용하는 경우 주요 장점은 LGdH가 박리되어(delaminated) 대부분의 MR 활성 Gd³⁺ 이온을 물 접근성(water-accessible) 표면에 노출시킴으로써 조영제를 낮은 투여량으로 사용할 수 있다는 것이다. 아울러, LGdH는 히드록사이드 층들 사이에 기능성 분자를 함유하여, MRI와 기타 임상 치료를 결합한 다기능 시스템을 제공할 수 있다.

[0004] 그러나, LGdH를 효과적으로 임상에 사용하기 위하여, 높은 조영능을 유지하면서 장기간 동안 혈류에 체류할 수 있도록 완전히 층간박리된(exfoliated) 층들이 안정하게 분산되고, 생리적 현탁액의 낮은 pH 환경에서의 안정성이 증가된 LGdH의 개발이 절실히 요구되어 왔다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0005] 본 발명자들은 MRI 조영제로서 보다 개선된 층상 가돌리늄 히드록사이드(LGdH)를 개발하기 위해 예의 연구 검토한 결과, LGdH 층들의 표면을 개질함으로써 층들을 완전히 층간박리시키고, 물 및 생체 적합성을 개선하며, 산에 대한 내성을 증진시킬 수 있음을 발견하고 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0006] 따라서 본 발명의 목적은 수성 콜로이드 현탁액으로 안정하게 분산될 수 있고, 생리적 현탁액의 낮은 pH 환경에서도 안정하며, MRI 조영능도 우수한 표면개질된 층상 가돌리늄 히드록사이드를 제공하는 것이다.
- [0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 표면개질된 층상 가돌리늄 히드록사이드의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 표면개질된 층상 가돌리늄 히드록사이드를 포함하는 MRI 조영제를 제공하는 것이다.

과제 해결수단

- [0009] 본 발명은 폴리(에틸렌글리콜){poly(ethylene glycol): PEG} 말단기를 가지는 인지질(phospholipid)로 표면개질된 하기 화학식 (I)의 층상 가돌리늄 히드록사이드(layered gadolinium hydroxide: LGdH)에 관한 것이다.
- [0010] $Gd_2(OH)_5X \cdot nH_2O$ (I)
- [0011] 상기 식에서,
- [0012] X는 탄소수 4 내지 30의 지방산염 음이온이고,
- [0013] n은 0.5 내지 4, 바람직하게는 1 내지 3이다.
- [0014] 상기 지방산염으로는 포화지방산염과 불포화지방산염을 모두 사용할 수 있으며, 예를 들어 올레산염, 팔미트산염, 스테아르산염, 리놀레산염 등을 사용할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 가장 바람직하게는 올레산염을 사용한다.
- [0015] 또한, 상기 폴리(에틸렌글리콜) 말단기를 가지는 인지질로는 인지질의 말단에 PEG 사슬이 1개 또는 2개 연결된 형태를 사용할 수 있으며, 예를 들어, 1,2-디팔미토일-*sn*-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌글리콜)] (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)]), 1,2-디미리스토일-*sn*-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌글리콜)] (1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)]), 1,2-디스테아로일-*sn*-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌글리콜)] ((1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)])) 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이 때, PEG 사슬의 분자량은 200 내지 40,000이 바람직하며, 350 내지 4,000이 보다 바람직하다.
- [0016] 본 발명의 표면개질된 층상 가돌리늄 히드록사이드는 LGdH 층들이 완전히 층간박리되어 있고, 폴리(에틸렌글리콜) 말단기를 가지는 인지질(PEG-인지질)이 층간 음이온인 지방산염 음이온을 통해 LGdH 층들의 표면에 부착되어 있는 구조를 가진다. 따라서 본 발명의 표면개질된 층상 가돌리늄 히드록사이드는 LGdH 층들이 비독성, 비면역원성, 비항원성 및 단백질 내성 PEG 사슬의 겹칠로 코팅되어 있는 구조를 형성하여 수성 매질에 안정하게 분산되고 산성에서도 안정성이 우수하며, 완전히 층간분리되어 있는 구조로 인해 MRI 조영능이 우수하다.
- [0017] 본 발명의 표면개질된 층상 가돌리늄 히드록사이드는 상기 지방산염 음이온의 일부를 형광성 음이온 분자로 치환하여 형광성 분자를 도입할 수 있다. 형광성 분자로는 카르복실산기, 포스폰산기 및 술폰산기와 같이 음이온을 형성하는 작용기를 가지는 형광성 분자, 예를 들어 플루오레세인(fluorescein) 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0018] 본 발명의 형광성 분자를 함유하는 표면개질된 층상 가돌리늄 히드록사이드는 형광성의 수성 콜로이드를 형성할 수 있어, MRI 및 형광 이미징을 위한 다기능 프로브로서 활용가능하다.
- [0019] 다른 한편으로, 본 발명은 표면개질된 상기 화학식 (I)의 층상 가돌리늄 히드록사이드(LGdH)의 제조방법에 관한 것으로서, 본 발명의 제조방법은
- [0020] (i) 하기 화학식 (II)의 LGdH를 지방산염과 반응시켜 층들이 층간박리된 상기 화학식 (I)의 층상 가돌리늄 히드

록사이드를 수득하는 단계; 및

- [0021] (ii) 층들이 층간박리된 상기 화학식 (I)의 층상 가돌리늄 히드록사이드를 폴리(에틸렌글리콜){poly(ethylene glycol): PEG} 말단기를 가지는 인지질(phospholipid)로 변형시키는 단계를 포함한다.
- [0022] $Gd_2(OH)_3Y \cdot nH_2O$ (II)
- [0023] 상기 식에서,
- [0024] Y는 F^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- 또는 SO_4^{2-} , 가장 바람직하게는 NO_3^- 이고,
- [0025] n은 0.5 내지 4, 바람직하게는 1 내지 3이다.
- [0026] 상기 화학식 (II)의 LGdH는 본 발명자들에 의해 출원되어 현재 계류중인 대한민국 특허출원 제2008-0111561호에 개시된 방법을 사용하여 제조할 수 있다.
- [0027] 상기 단계 (i)은 지방산염을 포함하는 수용액에 상기 화학식 (II)의 LGdH를 가한 다음 교반하여 수행하는 것이 바람직하다. 상기 화학식 (II)의 LGdH를 지방산염과 반응시키면 층간 음이온인 Y가 지방산염 음이온으로 교환되어 상기 화학식 (I)의 LGdH가 제조되며, 화학식 (I)의 LGdH는 지방산염 음이온의 긴 사슬로 인해 층들이 층간 박리되고, 유기 현탁액으로 분산될 수 있다.
- [0028] 상기 지방산염으로는 지방산의 나트륨염 또는 칼륨염과 같은 알칼리금속염을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0029] 상기 단계 (ii)는 층간박리된 화학식 (I)의 LGdH와 PEG-인지질을 유기용매, 가장 바람직하게는 클로로포름에서 혼합하여 수행할 수 있다. 단계 (ii)에서는 층간박리된 층들을 PEG-인지질로 변형시켜 비극성 표면을 PEG 사슬의 겹질로 코팅되도록 한다.
- [0030] 또 다른 한편으로, 본 발명은 형광성 분자를 함유하는 표면개질된 상기 화학식 (I)의 층상 가돌리늄 히드록사이드(LGdH)의 제조방법에 관한 것으로서, 본 발명의 제조방법은
- [0031] (i') 하기 화학식 (II)의 LGdH를 지방산염과 반응시켜 층들이 층간박리된 상기 화학식 (I)의 층상 가돌리늄 히드록사이드를 수득하는 단계;
- [0032] (ii') 층들이 층간박리된 상기 화학식 (I)의 층상 가돌리늄 히드록사이드를 형광성 분자와 반응시켜 형광성 음이온 분자가 도입된 상기 화학식 (I)의 층상 가돌리늄 히드록사이드를 수득하는 단계; 및
- [0033] (iii') 형광성 음이온 분자가 도입된 상기 화학식 (I)의 층상 가돌리늄 히드록사이드를 폴리(에틸렌글리콜){poly(ethylene glycol): PEG} 말단기를 가지는 인지질(phospholipid)로 변형시키는 단계를 포함한다.
- [0034] $Gd_2(OH)_3X \cdot nH_2O$ (II)
- [0035] 상기 식에서,
- [0036] Y는 F^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- 또는 SO_4^{2-} , 가장 바람직하게는 NO_3^- 이고,
- [0037] n은 0.5 내지 4, 바람직하게는 1 내지 3이다.
- [0038] 상기 단계 (ii')는 염기의 존재하에 수행되는 것이 바람직하다. 구체적으로 층간박리된 상기 화학식 (I)의 층상 가돌리늄 히드록사이드를 형광성 분자와 소량의 염기를 포함하는 유기 현탁액에 가한 다음 교반하여 수행되는 것이 바람직하다. 층간박리된 상기 화학식 (I)의 층상 가돌리늄 히드록사이드를 형광성 분자와 반응시키면 층간 음이온인 지방산 음이온이 형광성 음이온 분자와 교환된다. 이때, 형광성 분자를 소량으로 사용하여 지방산 음이온의 일부가 형광성 음이온 분자와 교환되도록 하는 것이 바람직하다. 형광성 분자를 과량으로 사용하면, 대부분의 지방산염 음이온이 형광성 음이온 분자와 교환되어 분산성이 나쁜 침전물이 생성된다.
- [0039] 상기 형광성 분자로는 플루오레세인(fluorescein) 등, 상기 염기로는 트리에틸아민 등, 상기 유기 현탁액으로는

클로로포름과 메탄올의 혼합 현탁액 등을 사용할 수 있다.

[0040] 상기 단계 (i') 및 (iii')에 대한 설명은 상기 단계 (i) 및 (ii)에 대한 설명과 동일하므로 중복을 피하기 위해 상술하지 않는다.

[0041] 도 1은 Y가 NO_3^- 인 화학식 (II)의 LGdH, 올레산나트륨 및 플루오레세인을 사용한 본 발명의 일 실시예에 따른 표면개질된 층상 가돌리늄 히드록사이드(LGdH)의 제조방법을 개략적으로 나타낸 공정도이다. 도 1에서 LGdH- NO_3 는 Y가 NO_3^- 이고 $n \approx 1.0$ 인 화학식 (II)의 LGdH, LGdH-OA는 X가 올레산염 음이온인 화학식 (I)의 LGdH, LGdH-PEGP는 PEG-인지질로 표면개질된 LGdH-OA, LGdH-FS는 형광성 음이온 분자가 도입된 LGdH-OA, LGdH-FS-PEGP는 PEG-인지질로 표면개질된 LGdH-FS를 나타낸다.

[0042] 다른 한편으로, 본 발명은 표면개질된 상기 화학식 (I)의 층상 가돌리늄 히드록사이드(LGdH)를 약학적으로 허용되는 담체와 함께 포함하는 MRI 조영제에 관한 것이다. 본 발명에 따른 MRI 조영제는 형광성 분자를 함유하는 표면개질된 상기 화학식 (I)의 층상 가돌리늄 히드록사이드(LGdH)를 사용할 경우 MRI 및 형광 이미징을 위한 다기능 프로브로서도 사용될 수 있다.

[0043] 본 발명의 MRI 조영제는 MR 말초 혈관조영법, 신장 혈관조영법, 관상 대동맥 혈관조영법, 뇌 혈관조영법, 폐 혈관조영법 등에 사용될 수 있으며, 경구 또는 비경구 투여 형태로 제형화될 수 있다. 예를 들어, 비경구 제형은 바람직하게는 본 발명의 화합물을 포함하는 멸균 수용액 또는 현탁액을 포함하며, 약학적 수용액 또는 현탁액의 다양한 제조기술이 당업계에 공지되어 있다. 상기 용액은 또한 약학적으로 허용되는 완충제, 가용화제, 계면활성제, 점도조절제, 안정제, 항산화제, 전해질 등을 포함할 수 있다.

[0044] 경구 투여용 제형은 매우 다양할 수 있으며, 이는 당업계에 공지되어 있다. 일반적으로 그러한 제형은 진단적 유효량의 본 발명에 따른 화합물을 포함하는 수용액 또는 현탁액을 포함한다. 그러한 경구 제형은 선택적으로 완충제, 계면활성제, 보조제(adjuvant) 등을 포함할 수 있다. 또한 경구 투여용 제형은 향미료 및 기타 관능성을 증가시키기 위한 성분을 포함할 수 있다.

[0045] 본 발명에 따른 MRI 조영제는 MR 영상의 목적하는 증강을 달성하는데 유효한 양으로 투여된다. 그러한 투여량은 화상 형성 방식, 측정 방식, 측정 부위 등에 따라 광범위하게 변할 수 있다.

효 과

[0046] 본 발명의 표면개질된 층상 가돌리늄 히드록사이드는 LGdH 층들의 표면을 PEG-인지질로 개질하여 LGdH의 물 및 생체 적합성을 개선하고 산에 대한 내성을 증진시켜, 콜로이드 현탁액으로 안정하게 분산될 수 있고 생리적 현탁액의 낮은 pH 환경에서도 안정하다. 또한 본 발명의 표면개질된 층상 가돌리늄 히드록사이드는 층들이 완전히 층간박리되어 MRI 조영능도 우수하므로 효과적인 MRI 조영제로서 사용가능하다.

[0047] 아울러, 본 발명의 형광성 분자를 함유하는 표면개질된 층상 가돌리늄 히드록사이드는 형광성의 수성 콜로이드를 형성할 수 있어, MRI 및 형광 이미징을 위한 다기능 프로브로서도 활용가능하다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0048] 이하, 실시예에 의해 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오직 본 발명을 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업자에게 있어서 자명하다.

[0049] 실시예 1: LGdH-OA의 제조

[0050] $\text{Gd}_2(\text{OH})_5\text{NO}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ($n \approx 1.0$) (LGdH- NO_3) (2.00 g)을 올레산나트륨 (4.00 g)을 포함하는 수용액 (100 ml)에 분산시키고 상온에서 24시간 동안 교반하였다. 생성된 LGdH-OA를 여과하여 회수하고 물로 수 회 세척하였다.

[0051] 생성된 LGdH-OA의 분말 X선 회절(XRD) 패턴은 도 2의 (b)에서 보듯이 층상 화합물에 특징적인 일련의 강한 (00l) 반사(reflection)를 나타내었다. 층간 간격은 이온교환 반응 후에 0.85 nm에서 4.6 nm로 확장되었으며,

이는 LGdH의 층간에 긴 사슬의 올레산염 음이온이 삽입되었음을 의미한다.

[0052] 도 3에서 보듯이, 출발물질인 LGdH-NO₃의 적외선(IR) 스펙트럼은 약 1384 cm⁻¹에서 질산염 이온의 ν_3 mode에 해당하는 예리한 밴드를 나타내었으나, 그러한 밴드가 올레산염 음이온 교환된 LGdH의 IR 스펙트럼에서는 관찰되지 않았다. 1558 및 1458 cm⁻¹ 부근에서의 강한 밴드는 각각 $\nu_{as}(\text{COO}^-)$ 및 $\nu_s(\text{COO}^-)$ 로 인한 것이다. IR 스펙트럼에서의 이러한 차이는 LGdH 집합(gallery)의 층간에서 NO₃⁻가 올레산염 음이온으로 성공적으로 교환되었음을 입증한다.

[0053] 열중량분석(thermogravimetry: TG) 및 원소분석(elemental analysis: EA)은 호스트로부터 NO₃⁻가 교환되고 올레산염 음이온 및 올레산이 삽입되어 Gd₂(OH)₅(올레산염 음이온)(올레산)_{0.63} · 1.5H₂O (LGdH-OA)가 생성되었음을 나타내었다.

[0054] 생성된 LGdH-OA 분말을 톨루엔 및 클로로포름과 같은 비극성 유기용매에 분산시킬 경우, LGdH-OA 층들이 쉽게 층간박리되었으며, 생성된 안정한 콜로이드 현탁액은 도 4에서 보듯이 레이저를 조사할 경우 분명한 틴달 광산란 효과(Tyndall light scattering effect)를 나타내었다.

[0055] LGdH-OA 현탁액이 기질(substrate)에 남기는 석출물(deposit)의 원자력 현미경(atomic force microscopy: AFM) 분석은 도 5에서 보듯이, 평균 두께 및 측면 크기가 각각 4.0 (± 0.4) nm 및 130 (± 60) nm인 초박 나노시트의 분산을 나타내었다. AFM 이미지에서 관찰된 층 두께는 표면에 올레산염 음이온을 가지는 단층의 두께에 필적하였으며, 이는 층들의 층간박리를 입증한다.

[0056] 실시예 2: LGdH-PEGP의 제조

[0057] 실시예 1에서 수득한 LGdH-OA (30 mg)을 CHCl₃ 용매에서 1,2-디스테아로일-*sn*-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌글리콜)-2000] (1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000]) (mPEG-2000 PE, Avanti Polar Lipids, Inc.) (90 mg)과 혼합하고 상온에서 30분 동안 교반하였다. 용매를 증발시키고 진공에서 완전히 제거한 다음 물 (50 ml)를 가하고, 생성된 현탁액을 800 nm의 구멍 직경을 가지는 여과막으로 여과하였다. 생성된 LGdH-PEGP를 초원심분리와 증류수에 재분산하는 과정을 반복하여 정제하였다.

[0058] 생성된 LGdH-PEGP는 수성 현탁액에서 우수한 콜로이드 안정성을 나타내었다. 도 6에서 보듯이 LGdH-PEGP 수성 현탁액의 레이저 조사는 틴달 산란 효과를 나타내었고, 이는 콜로이드 현탁액의 생성을 입증한다.

[0059] 실시예 3: LGdH-FS의 제조

[0060] 실시예 1에서 수득한 LGdH-OA (30 mg)을 플루오레세인 유리산 (0.6 mg) 및 트리에틸아민 (20 μl)를 포함하는 CH₃Cl/CH₃OH (7 : 3) 혼합 현탁액 (50 ml)에 가하고 상온에서 30분 동안 교반하였다. 생성된 LGdH-FS 고체를 초원심분리와 CH₃Cl/CH₃OH 혼합물로 세척하는 과정을 반복하여 정제하였다.

[0061] 생성된 소량의 플루오레세인을 가지는 LGdH 분말은 도 7 및 8에서 보듯이 유기용매에 쉽게 분산되어 층간박리된 층들의 형광성 콜로이드를 형성하였다.

[0062] LGdH-FS의 방출 스펙트럼은 도 9에서 보듯이, 형광성 밴드가 유리 플루오레세인 분자에 비해 약간 블루-시프트(blue-shift)됨을 나타내었다.

[0063] LGdH-FS에 포함된 플루오레세인 분자의 양은 교환 반응 후에 남아 있는 플루오레세인의 양에 의해 측정하였을 때, 1 몰의 Gd 이온 당 2.5 × 10⁻³ 몰이었다.

[0064] 실시예 4: LGdH-FS-PEGP의 제조

- [0065] 실시예 3에서 수득한 LGdH-FS (30 mg)을 CHCl_3 용매에서 1,2-디스테아로일-*sn*-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌글리콜)-2000] (1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000]) (mPEG-2000 PE, Avanti Polar Lipids, Inc.) (90 mg)과 혼합하고 상온에서 30분 동안 교반하였다. 용매를 증발시키고 진공에서 완전히 제거한 다음 물 (50 ml)를 가하고, 생성된 현탁액을 800 nm의 구멍 직경을 가지는 여과막으로 여과하였다. 생성된 LGdH-FS-PEGP를 초원심분리와 증류수에 재분산하는 과정을 반복하여 정제하였다.
- [0066] 생성된 LGdH-FS-PEGP는 도 10 및 11에서 보듯이 플루오레세인을 함유하고 PEG 껍질에 의해 싸여 있다.
- [0067] LGdH-FS-PEGP 현탁액이 기질(substrate)에 남기는 석출물(deposit)의 AFM 분석은 도 12에서 보듯이, 평균 두께 및 측면 크기가 각각 $6 (\pm 1)$ nm 및 $130 (\pm 60)$ nm인 초박 나노시트의 분산을 나타내었으며, 이는 층들의 층간박리를 입증한다.
- [0068] **실험예 1: 수성 콜로이드 현탁액의 안정성 평가**
- [0069] 실시예 4에서 수득한 LGdH-FS-PEGP의 수성 콜로이드 현탁액을 상온에서 한달 이상 방치한 결과, 침전이 전혀 검출되지 않았다. 이러한 우수한 안정성은 생의학적 응용에 필수적이다.
- [0070] **실험예 2: 산성 용액에서의 안정성 평가**
- [0071] 실시예 4에서 수득한 LGdH-FS-PEGP의 안정성을 여러 pH의 완충 현탁액에서 평가하였다. pH 4.6 및 3.0에서 12 시간 동안 처리한 후에 분리된 상등액은 각각 3% 및 8%의 분해(dissolution)을 나타내었다. 표면개질 전의 LGdH가 pH 4.6 및 3.0에서 1시간 내에 각각 33% 및 50%의 분해를 나타낸 사실과 비교하면, 이러한 훨씬 낮은 분해율은 표면개질에 의해 산 내성이 현저히 증가되었음을 나타낸다.
- [0072] **실험예 3: 세포독성 평가**
- [0073] 실시예 4에서 수득한 LGdH-FS-PEGP의 생체의 세포독성(in-vitro cytotoxicity)을 MCF-7 세포에서 MTT 분석법 [참고문헌: Mosmann, T. J. Immunol. Methods 1983, 65, 55; Gerlier, D., Thomasset, N. J. Immunol. Methods 1986, 94, 57]을 이용하여 측정하고, 그 결과를 Gd 농도의 함수로서 도 13에 나타내었다. 결과는 4회 실험의 평균값을 표준 편차와 함께 나타낸 것이다. 도 13에서 보듯이, LGdH-FS-PEGP는 10 μM 의 Gd 농도까지 유의적인 세포독성을 나타내지 않았다.
- [0074]
- [0075] **실험예 4: MRI 이완성질 측정**
- [0076] 실시예 4에서 수득한 LGdH-FS-PEGP 현탁액의 이완 성질(relaxation property)을 3.0 T 사람 임상 스캐너 (Philips, Achieva ver. 1.2, Philips Medical Systems, Best, The Netherlands)를 사용하여 분석하였다. LGdH-FS-PEGP은 세로 이완 시간(T_1) 및 가로 이완 시간(T_2) 모두를 감소시켰다. 따라서 도 14(a) 및 (b)에서 보듯이, 밝은 신호 및 어두운 신호 증가가 각각 T_1 - 및 T_2 -가중된(weighted) 이미지에서 관찰되었다. Gd 농도의 함수로서 이완율(relaxation rate)을 측정하여 결정한 LGdH-FS-PEGP의 비이완성(specific relaxivity)은 도 14(c) 및 (d)에서 보듯이, r_1 and r_2 에 대해 각각 $1.72 (\text{s} \cdot \text{mM})^{-1}$ 및 $31.56 (\text{s} \cdot \text{mM})^{-1}$ 이었다. LGdH-FS-PEGP의 r_2 값은 표면개질되지 않은 LGdH에 비해 현저히 증가된 반면, r_1 값은 약간 감소되었다. LGdH-FS-PEGP의 높은 r_2/r_1 비(18)은 LGdH-FS-PEGP가 MRI에서 T_2 -조영제로 유용할 수 있음을 나타낸다.
- [0077] **실험예 5: 마우스 생체내 MRI**
- [0078] 실시예 4에서 수득한 LGdH-FS-PEGP의 조영능을 마우스의 복부 MRI 실험에 의해 관찰하였다. LGdH-FS-PEGP (ICP-AES에 의해 측정된 Gd = 2.21 μg)을 마우스에 20 mg/kg 체중으로 정맥주사한 후, 현저한 신호 손실이 복

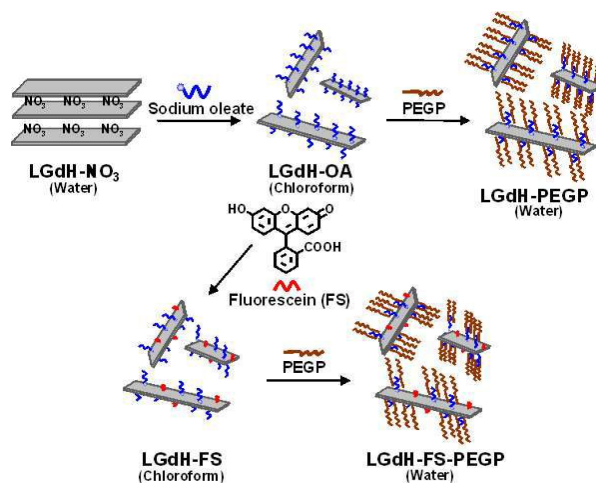
부의 T_2 가중된 MRI에서 유도되었다. 도 15에서 보듯이, 비장(spleen)과 간(liver)은 주사된 LGdH-FS-PEGP로 인해 MRI에서 어렵게 나타났으며, 이는 실험 기간 내내 관찰되었다.

도면의 간단한 설명

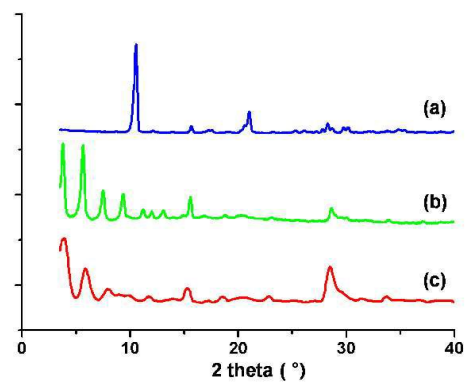
- [0079] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 표면개질된 층상 가돌리늄 히드록사이드(LGdH)의 제조방법을 개략적으로 나타낸 공정도이다.
- [0080] 도 2는 (a) LGdH-NO₃, (b) LGdH-OA 및 (c) LGdH-FS의 X선 회절 패턴을 나타낸 도이다.
- [0081] 도 3은 (a) LGdH-NO₃, (b) LGdH-OA 및 (c) LGdH-FS의 적외선 스펙트럼을 나타낸 도이다.
- [0082] 도 4는 LGdH-OA의 클로로포름 현탁액의 틴달 효과를 나타내는 사진이다.
- [0083] 도 5는 클로로포름 콜로이드의 석출물로부터 무작위로 선택된 LGdH-OA 층들의 AMF 이미지를 나타낸 도이다.
- [0084] 도 6은 LGdH-PEGP의 수성 현탁액의 틴달 효과를 나타내는 사진이다.
- [0085] 도 7은 LGdH-FS의 클로로포름 현탁액의 틴달 효과를 나타내는 사진이다.
- [0086] 도 8은 LGdH-FS의 클로로포름 현탁액의 365 nm 여기광 하에서의 형광성을 나타내는 사진이다.
- [0087] 도 9는 490 nm 여기광에서 (a) LGdH-FS, (b) CHCl₃/CH₃OH 혼합 용매 중의 플루오레세인 유리산 및 (c) 물 중의 플루오레세인 나트륨염의 형광 스펙트럼을 나타낸 도이다.
- [0088] 도 10은 LGdH-FS-PEGP의 수성 현탁액의 틴달 효과를 나타내는 사진이다.
- [0089] 도 11은 LGdH-FS-PEGP의 수성 현탁액의 365 nm 여기광 하에서의 형광성을 나타내는 사진이다.
- [0090] 도 12는 수성 콜로이드의 석출물로부터 무작위로 선택된 LGdH-FS-PEGP 층들의 AMF 이미지를 나타낸 도이다.
- [0091] 도 13은 MCF-7 세포에 대한 LGdH-FS-PEGP의 세포독성을 Gd 농도의 함수로서 나타낸 그래프이다.
- [0092] 도 14의 (a) 및 (b)는 각각 LGdH-FS-PEGP의 수성 현탁액의 T_1 - 및 T_2 -가중된(weighted) MRI를 나타내고, (c) 및 (d)는 각각 Gd 농도에 대한 T_1^{-1} 및 T_2^{-1} 을 나타낸 그래프이다.
- [0093] 도 15는 마우스 몸체의 T_2 -가중된(weighted) MRI를 나타낸 도이다.

도면

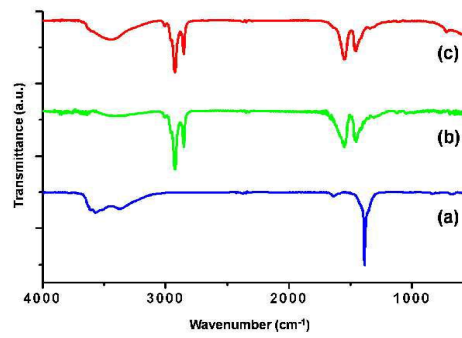
도면1



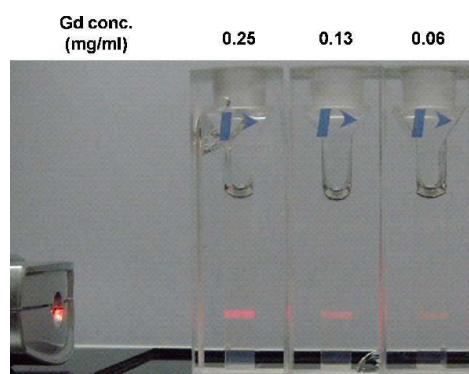
도면2



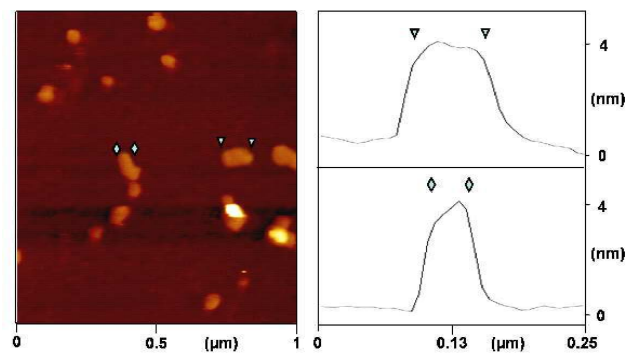
도면3



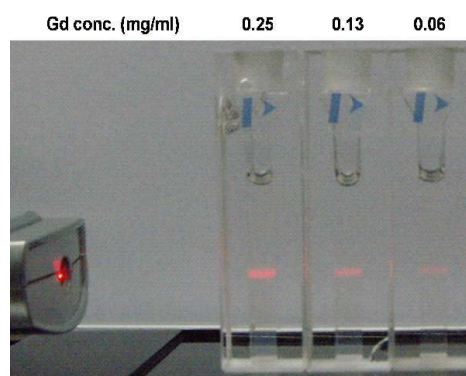
도면4



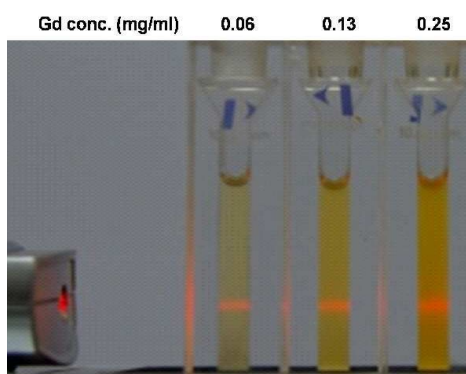
도면5



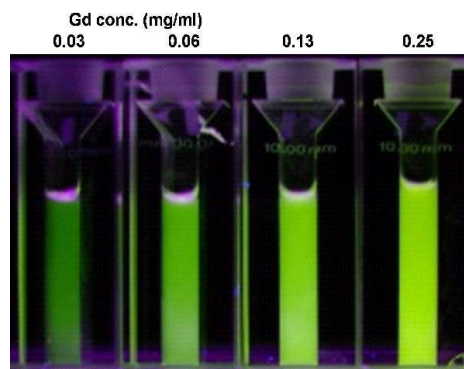
도면6



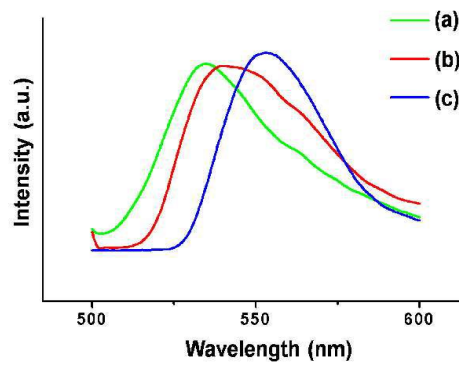
도면7



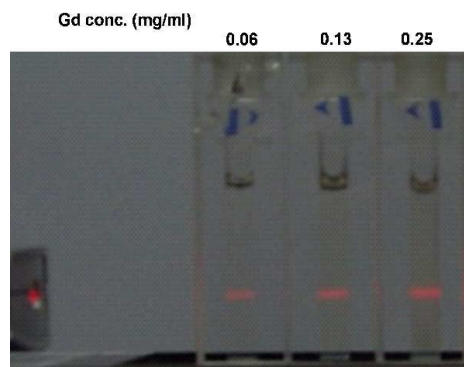
도면8



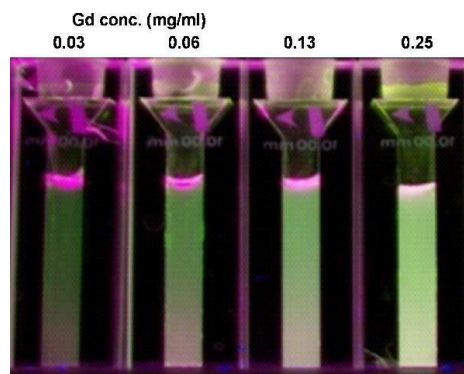
도면9



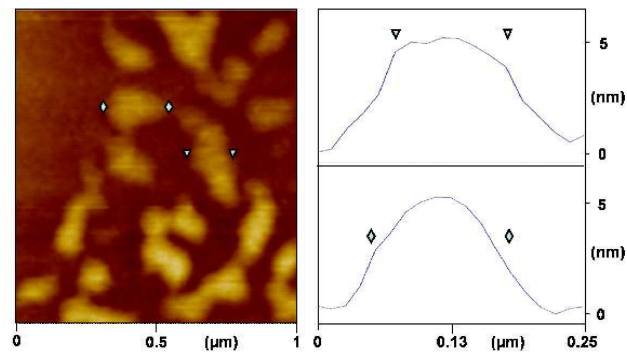
도면10



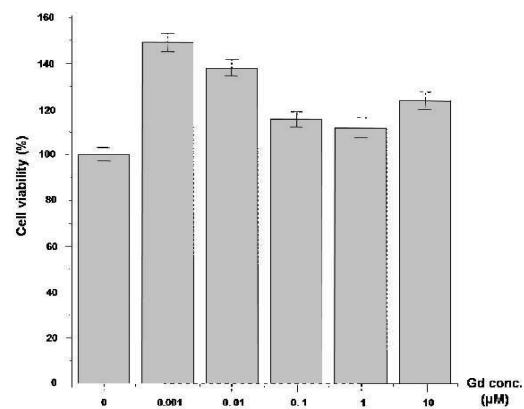
도면11



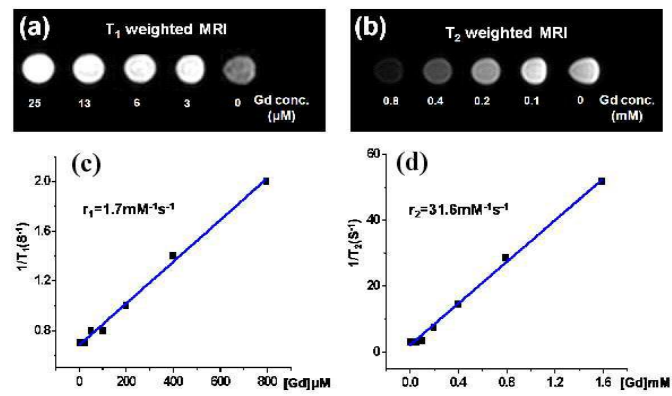
도면12



도면13



도면14



도면15

