



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년10월18일

(11) 등록번호 10-2590683

(24) 등록일자 2023년10월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 49/18 (2006.01) A61K 49/06 (2006.01)

A61K 49/08 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 49/1824 (2013.01)

A61K 49/06 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0088177(분할)

(22) 출원일자 2018년07월27일

심사청구일자 2021년02월18일

(65) 공개번호 10-2018-0088775

(43) 공개일자 2018년08월07일

(62) 원출원 특허 10-2016-0019363

원출원일자 2016년02월18일

심사청구일자 2016년02월18일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020150115760 A

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 16 항

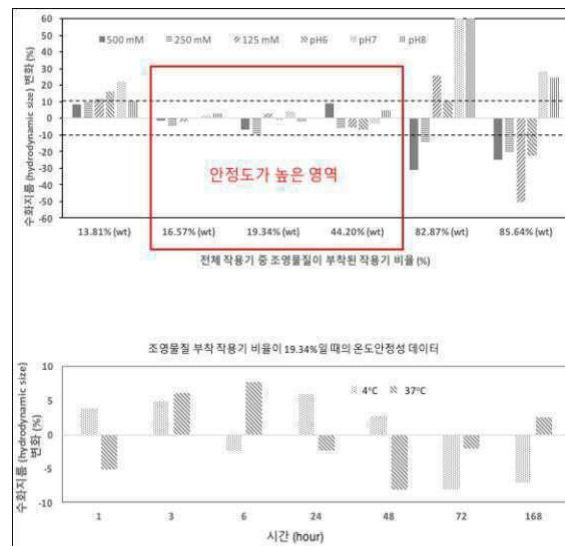
심사관 : 김미화

(54) 발명의 명칭 T1 MRI 조영제로서의 나노입자의 분산 안정도를 증가시키는 방법 및 T1 MRI 조영제 나노입자

(57) 요약

본 발명은 기존의 조영제 특히 T1 조영제를 개선한 것으로서, T1 조영물질을 친수성 작용기가 표면에 노출된 지지체 표면에 부분적으로 코팅하는 전략을 채택하고 있다. 본 발명에서 채택한 부분적 코팅 전략에 의해 T1 조영제 나노입자의 안정성 및 조영능을 모두 개선하며, 이는 매우 흥미로운 기술적 발전이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 49/08 (2013.01)

A61K 49/183 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

Advanced Materials. 20, 제4323-4329

쪽(2008.06.02.)

Langmuir. 24(12), 제6232-6237쪽(2008.)

KR1020070058358 A

KR1020080071463 A

명세서

청구범위

청구항 1

자기 공명 영상 진단에 사용되는 의약적합한(druggable)한 T1 조영제의 제조방법에 있어서,
수화(hydrodynamic) 지름이 1-20 nm인 지지체 입자; 및 지지체 입자 표면의 친수성 화학작용기를 통해 T1 조영 물질이 결합된 것으로, 수화 지름이 2-30 nm이고 친수성 화학작용기로 아민기가 노출되어 있는 T1 조영제를 준비하는 단계:

T1 조영제의 표면에 노출된 아민기를 카르복실기로 치환하여 T1 조영제에 의한 체내 독성을 감소시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 지지체 입자는 친수성 화학작용기를 포함하는 유기중합체, 실리카 또는 금(Au)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 유기중합체는 다당류(polysaccharide)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 다당류는 덱스트란(dextran)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 지지체 입자 표면의 친수성 화학작용기를 통해 T1 조영물질이 결합된 것은 화학결합을 통해 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 지지체 입자의 수화 지름은 1-15 nm, 1-10 nm, 1-8 nm, 1-5 nm, 1-4 nm, 2-15 nm, 2-10 nm, 2-8 nm, 2-5 nm, 2-4 nm, 3-15 nm, 3-10 nm, 3-8 nm, 3-5 nm, 3-4 nm, 4-15 nm, 4-10 nm, 4-8 nm, 4-7 nm 또는 4-5 nm인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 조영제로서의 나노입자의 수화 지름은 2-25 nm, 2-20 nm, 2-15 nm, 2-10 nm, 2-8 nm, 2-6 nm, 2-5 nm, 3-25 nm, 3-20 nm, 3-15 nm, 3-10 nm, 3-8 nm, 3-6 nm, 3-5 nm, 4-25 nm, 4-20 nm, 4-15 nm, 4-10 nm, 4-8 nm, 4-7 nm 또는 4-6 nm인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 2 항에 있어서, 친수성 화학작용기로 아민기가 노출되어 있는 T1 조영제를 준비하는 단계는 상기 유기중합체와 친수성 화학작용기를 갖는 가교제를 반응시켜 유기중합체를 교차결합시켜 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 친수성 화학작용기로 아민기가 노출되어 있는 T1 조영제를 준비하는 단계에서 지지체 입자의 표면에 노출되는 친수성 화학작용기는 지지체 물질 자체로부터 유래된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 8 항에 있어서, 친수성 화학작용기로 아민기가 노출되어 있는 T1 조영제를 준비하는 단계에서 지지체 입자의 표면에 노출되는 친수성 화학작용기는 가교제로부터 유래된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 8 항에 있어서, 상기 친수성 화학작용기를 갖는 가교제는 아민기를 갖는 가교제인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

삭제

청구항 13

제 1 항에 있어서, 상기 T1 조영물질은 철산화물(iron oxide)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 1 항에 있어서, 상기 지지체 입자 100 중량에 대하여 상기 T1 조영물질의 사용량은 0.5-10 wt%, 0.8-7.0 wt%, 0.5-5.0 wt% 또는 0.9-5.0 wt%인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제 1 항에 있어서, 상기 T1 조영물질은 지지체 입자 표면에 있는 친수성 작용기의 14-70%, 14-60%, 14-50%, 14-45%, 15-70%, 15-60%, 15-50%, 15-45%, 16-70%, 16-60%, 16-50% 또는 16-45%에 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제 1 항에 있어서, 상기 T1 조영제로서의 나노입자는 수용액에서 125-500 mM NaCl 농도 변화에 대하여 수화 지름의 변화가 $\pm 10\%$ 이하이고, pH 6-8 변화에 대하여 수화 지름의 변화가 $\pm 10\%$ 이하이며, 4-37°C 온도 변화에 대하여 수화 지름의 변화가 $\pm 10\%$ 이하인 분산 안정성을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제 1 항에 있어서, 상기 T1 조영제로서의 나노입자는 1 mM 농도(금속기준)에서 $2.7-5.0 \text{ s}^{-1}$ 의 T1 이완율(relaxivity)를 나타내는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 T1 MRI 조영제로서의 나노입자의 분산 안정도를 증가시키는 방법 및 T1 MRI 조영제 나노입자에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 나노물질(nanomaterial)은 감소된 크기로 인해서 벌크물질(bulk material)과 다른 새로운 물리적/화학적 성질을 나타낸다. 또한 나노물질에 대한 많은 연구로 크기뿐만 아니라 물질의 조성이나 모양 역시 조절할 수 있게 되면서 나노영역에서의 우수한 물리적/화학적 특성을 구현할 수 있게 되었다. 현재 나노기술은 다양하게 발전하고 있으며 크게 세 가지 분야로 분류되어 있다. 첫째, 나노소재로 극미세한 크기의 새로운 물질과 재료를 합성하는 기술에 관한 것이다. 둘째, 나노소자로 나노 크기의 재료들을 조합하거나 배열하여 일정한 기능을 발휘하는 장치를 제조하는 기술에 관한 것이다. 셋째, 나노기술을 생명공학에 응용하는 기술(나노-바이오)에 관한 것이다.

[0004] 여러 가지 다양한 나노입자 중 자성 나노입자는 생체 물질의 분리, 자기 공명 영상 진단, 거대자기저항센서를 포함한 자기-바이오 센서, 마이크로 유체계 시스템, 약물/유전자 전달, 자성 고온치료 등의 광범위한 나노-바이오 기술에 이용될 수 있다. 특히, 자성 나노입자는 자기 공명 영상(MRI)의 진단제로 사용될 수 있다. MRI는 물분자 내 수소의 핵스핀 이완을 측정하는데, 크게 T1, T2 영상을 측정할 수 있다. MRI 조영제는 T1 조영제와 T2 조영제로 분류되며 T1 또는 T2 신호를 증폭하는 역할을 한다. T1 및 T2는 MRI에서 핵스핀이 여기된 이후에 스핀-격자 완화 시간 또는 스핀-스핀 완화 시간을 각각 의미하며 서로 다른 조영효과를 가져온다.

[0005] T1 조영제는 스핀-격자 이완을 일으킬 수 있는 상자성 물질로 구성되며 T1 조영제가 존재할 때 통상 물과 비교하여 밝은 신호 효과(bright or positive contrast effect)를 나타낸다. T1 조영제로는 Gd 킬레이트 화합물이 주로 사용될 수 있으며 현재 MRI 영상을 획득하기 위해 사용되는 Magnevist(Schering, Germany)는 Gd-DTPA(Gd-diethylene triamine pentaacetic acid)로 구성되어 있다. 이외에도 최근 Gd_2O_3 (C. Riviere et al. J.Am.Chem.Soc. 2007, 129, 5076), MnO(T. Hyeon et al. Angew. Chem. Int. Ed. 2007, 46, 5397) 등의 물질이 T1 조영제로 사용될 수 있음이 보고되어 있다.

[0006] 이에 반하여 T2 조영제는 산화철 나노 입자와 같은 초상자성 나노 입자가 주로 사용되고 있다. 이러한 자성 나노 입자는 외부에서 자기장을 주었을 때 자화되어 유도 자기장을 발생시켜 주변 물 분자의 수소 핵스핀의 스핀-스핀 이완 과정에 영향을 주어 자기공명영상 신호를 증폭시켜 통상 물과 비교하여 어두운 조영효과(dark or negative contrast effect)를 나타낸다. 주로 사용되고 있는 T2 조영제는 산화철 성분을 포함하는 Feridex, Resovist, Combidex 등이 있으며 최근 산화철 성분을 일부 치환함으로써 조영효과를 높인 MEIO(magnetism engineered iron oxide)가 개발되었다(J. Cheon et al. Nature Medicine 2007, 13, 95).

[0007] MRI에서 T1 신호는 높은 신호강도(밝은 신호)를 가지고 있어 T1이 조직 간의 해상도가 뛰어나 해부학적인 구조를 좀 더 명확하게 구별할 수 있다. 또한, T1 영상에서 아급성(亞急性) 출혈(출혈 후 4~14일 경과) 등이 특징적으로 높은 신호강도를 보일 수 있으므로 T1 영상은 병변(病變) 내에서 출혈의 존재여부를 판단하는 데 유용하다는 장점을 가지고 있다.

[0008] 현재 T1 조영제로서 일반적으로 사용되는 금속 킬레이트 계열 물질은 그 작은 크기로 인한 빠른 분자 운동(tumbling rate) 때문에 물 분자 내 수소 핵스핀을 효과적으로 이완시키지 못한다. 한편, 금속 산화물 계열의 나노입자의 경우 금속 킬레이트에 비해 느린 분자운동 속도를 가지며 여러 금속에 의한 협력적인 핵스핀 이완이 가능한 반면 낮은 표면적-체적 비에 의해 그 효과가 제한적이다. 따라서, 이러한 기존의 T1 조영제의 한계를 극복함으로써 보다 효율적인 조영효과를 가지는 T1 MRI 조영제 나노입자의 개발이 요구된다.

[0009] 상술한 종래의 T1 MRI 조영제의 문제점을 극복하기 위하여, 본 발명자는 신규한 T1 MRI 조영제를 개발한 바 있다(WO 2014/107055). 그러나, 본 발명자의 T1 조영제는 보다 의약적합한(druggable)한 물질로 개선시킬 필요가 있으며, 특히 용액에서의 분산 안정성을 개선시킬 필요가 있다.

[0011] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문

헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 본 발명자들은 나노입자 지지체 표면에 T1 조영물질을 코팅하여 조영능이 매우 우수한 조영제를 개발한 바 있다 (WO 2014/107055). 본 발명자들은 상기 T1 조영제의 성능을 개선시키고 보다 의약적합한(druggable)한 특히 용액에서의 분산 안정성이 우수한 T1 조영제를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 T1 조영물질을 지지체 표면에 부분적으로 코팅함으로써, 나노입자 조영제의 분산 안정성을 크게 개선시킬 수 있을 뿐만 아니라, 조영능도 개선시킬 수 있음을 규명하였다.
- [0014] 따라서 본 발명의 목적은 조영제로서의 나노입자의 분산 안정도를 증가시키는 방법을 제공하는 데 있다.
- [0015] 본 발명의 다른 목적은 조영제 나노입자를 제공하는 데 있다.
- [0017] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0019] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 T1 조영제로서의 나노입자의 분산 안정도를 증가시키는 방법을 제공한다:
- [0020] (a) 입자화(particilization) 하는 경우 표면에 친수성 화학작용기를 노출시킬 수 있는 지지체 물질을 선택하는 단계;
- [0021] (b) 상기 지지체 물질을 이용하여 지지체 입자(support particles)를 제조하는 단계; 상기 지지체 입자의 표면은 친수성 화학작용기가 노출되어 있고 상기 지지체 입자의 수화(hydrodynamic) 지름은 1-20 nm이며 ; 및
- [0022] (c) 상기 지지체 입자 상에 T1 조영물질을 코팅하여 T1 조영제로서의 나노입자를 제조하는 단계; 상기 T1 조영물질의 코팅은 상기 지지체 입자 표면의 친수성 작용기 및 상기 조영물질 사이의 결합에 의해 이루어지며; 상기 T1 조영물질의 코팅은 상기 지지체의 표면에 대하여 부분적인 코팅이며; 상기 지지체 입자 상의 친수성의 작용기 중 일부는 지지체 표면에 여전히 노출되어 있으며; 상기 나노입자의 수화 지름은 2-30 nm이다.
- [0024] 본 발명자들은 나노입자 지지체 표면에 T1 조영물질을 코팅하여 조영능이 매우 우수한 조영제를 개발한 바 있다 (WO 2014/107055). 본 발명자들은 상기 T1 조영제의 성능을 개선시키고 보다 의약적합한(druggable)한 특히 용액에서의 분산 안정성이 우수한 T1 조영제를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 T1 조영물질을 지지체 표면에 부분적으로 코팅함으로써, 나노입자 조영제의 분산 안정성을 크게 개선시킬 수 있을 뿐만 아니라, 조영능도 개선시킬 수 있음을 규명하였다.
- [0025] 본 발명자들이 아는 한(To our best knowledge), 조영물질 특히 T1 조영물질을 지지체 표면에 부분적으로 코팅함으로써, 나노입자 조영제의 분산 안정성 및 조영능을 개선시킨 선행 연구는 없으며, 이는 본 발명의 가장 중요한 기술적 특징이다.
- [0027] 본 발명의 방법을 각각의 단계별로 상세하게 설명하면 다음과 같다:
- [0029] 단계 (a): 지지체 물질의 선택
- [0030] 우선, 입자화(particilization) 하는 경우 표면에 친수성 화학작용기를 노출시킬 수 있는 지지체 물질을 선택한다.
- [0031] 본 발명에 적합한 지지체 물질은 조영물질을 수용할 수 있으며, 입자화 하는 경우 표면에 친수성 화학작용기를 노출시킬 수 있는 물질이다. 구체적으로, 본 발명에 적합한 지지체 물질은 친수성 작용기를 갖는 가교제와의 반응에 의해 표면에 친수성 화학작용기를 가질 수 있는 물질이다. 택일적으로, 본 발명에 적합한 지지체 물질은 가교제의 도움 없이 친수성 화학작용기를 지지체 물질 자체가 노출시킬 수 있는 물질이다.
- [0032] 보다 구체적으로, 본 발명에 이용되는 지지체 물질은 친수성 화학작용기를 포함하는 유기중합체, 실리카 또는 금(Au)이다.
- [0033] 본 명세서에서 용어 “유기중합체(organic polymer)”는 유기분자를 단량체(monomer unit)로 가지는 중합체 중

견고성을 가져 조영제 물질(특히, T1 조영제 물질)의 코팅층의 지지물질(supporting material)의 역할을 할 수 있는 모든 물질을 포함한다.

[0034] 지지체로서 본 발명에서 이용되는 친수성 화학작용기를 포함하는 유기중합체는 구체적으로, 다당류(polysaccharide), 단백질(예컨대, 알부민, 아프로티닌 및 라이소자임), 지질 또는 핵산이고, 보다 구체적으로 다당류이다.

[0035] 본 발명에서 이용되는 다당류는 당업계에 공지된 친수성 화학작용기를 포함하는 다양한 다당류를 포함하며, 예를 들어 덱스트란(dextran), 셀룰로오스, 녹말, 글리코젠, 키토산, 스타치오즈, 스트로도우즈, 자이란, 아라반, 헥소산, 프룩탄, 갈락탄, 만난, 아가로펙틴, 알긴산, 가라지난, 헤미셀룰로오즈, 하이프로멜로스, 키틴, 아가로오즈, 덱스트린, 카르복시 메틸셀룰로오스, 글리코젠 덱스트란, 카르보덱스트란, 사이클로덱스트란, 폴루란, 또는 이들의 유도체를 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니다. 보다 구체적으로, 본 발명에서 이용되는 다당류는 덱스트란이다.

[0037] 단계 (b): 지지체 입자의 제조

[0038] 이어, 지지체 물질을 이용하여 지지체 입자(support particles)를 제조한다. 지지체 입자의 표면은 친수성 화학작용기가 노출되어 있고 상기 지지체 입자의 수화(hydrodynamic) 지름은 1-20 nm이다.

[0039] 단계 (b)는 지지체 물질 원료를 이용하여 나노지지체를 제조하는 단계이다.

[0040] 지지체 원료를 이용하여 나노지지체의 제조는, 당업계에 공지된 다양한 나노입자 제조방법을 참조하여 실시할 수 있다.

[0041] 예를 들어, 실리카 나노지지체의 제조방법은 WO 2014/107055에 개시되어 있다. 간단하게 설명하면, 적합한 계면활성제[예컨대, 폴리(옥시에틸렌)노닐페닐에테르와 같은 비이온성 계면활성제]로 역마이셀을 형성하고, 실리카 선구물질인 테트라에톡시실란을 추가한 다음, 상온에서 반응시킴으로써 실리카 나노지지체를 제조할 수 있다.

[0042] 금 나노지지체의 제조방법은 하기의 실시예에 예시되어 있다. 또한, 유기중합체 나노지지체의 제조방법은 하기의 실시예에 예시되어 있다.

[0043] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 단계 (b)는 유기중합체와 친수성 화학작용기를 갖는 가교제를 반응시켜 유기중합체를 교차결합시켜 실시한다.

[0044] 친수성 화학작용기를 갖는 가교제는 반응 전에 가교제 자체에 친수성 화학작용기가 있는 가교제뿐만 아니라, 반응 후에 가교제의 화학 구조가 변화되어 형성되는 친수성 화학작용기가 형성되는 가교제도 포함한다.

[0045] 본 발명에 적합한 가교제는 친수성 화학작용기를 갖는 어떠한 가교제도 포함한다. 예를 들어, 본 발명에 적합한 가교제는 에폭사이드 가교제, 아민 가교제, 언하이드라이드기를 갖는 가교제, 폴리이소시아네이트 가교제 및 이의 조합을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0046] 에폭사이드 가교제의 예는 1-클로로-2,3-에폭시프로판(1-chloro-2,3-epoxypropane: epichlorohydrin), 1,4-사이클로헥산 다이메탄올-다이글라이시딜-에테르, 1,4-부탄다이올다이글라이시딜 에테르, 비스페놀-F 다이글라이시딜 에테르, 이소시아누릭산 트리스-(2,3-에폭시프로필) 에스테르[isocyanuric acid tris-(2,3-epoxypropyl) ester], 네오펜틸글리콜 다이글라이시딜 에테르, 트리페닐올메탄 트리글라이시딜 에테르(triphenylolmethan triglycidyl ether) 및 비스페놀-A 다이글라이시딜 에테르를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0047] 아민 가교제의 예는 에틸렌다이아민, 1,3-프로판 다이아민, 다이에틸렌 트리아민, 트리에틸렌 테트라아민, 테트라에틸렌 펜타민, 아미노에틸 피페라진, 4,7,10-트리옥사-1,13-트리데칸 다이아민, 2,2'-(에틸렌다이옥시) 다이에틸아민, 1,3-비스-(아미노메틸) 사이클로헥산, 1,3-bis-(4-아미노페녹시)벤젠, 4,4'-메틸렌 비스-사이클로헥실아민 및 5-아미노-1,3,3-트리메틸사이클로헥산메틸아민을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0048] 언하이드라이드기를 갖는 가교제의 예는 2,2-비스-(4-프탈릭 언하이드라이드-4-옥시페닐)-프로판, 부탄테트라카르복실산 다이언하이드라이드, 4,4'-옥시비스-프탈릭산 언하이드라이드, 벤조페논-3,3',4,4'-테트라카르복실산 다이언하이드라이드 및 바이페닐-3,3',4,4'-테트라카르복실산 다이언하이드라이드를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0049] 폴리이소시아네이트 가교제의 예는 1,3-비스-(1-이소시아나토-1-메틸에틸)벤젠, 1,3-비스-(이소시아나토메틸)-

사이클로헥산, 헥사메틸렌 다이이소시아네이트, 톨루엔-2,4-다이이소시아네이트, 트리메틸헥사메틸렌 다이이소시아네이트, 메틸렌 다이(페닐이소시아네이트), 4,4'-다이이소시아나토다이사이클로헥실 메탄 및 이소포론 다이이소시아네이트를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0050] 구체적으로, 본 발명에 이용되는 가교제는 에폭사이드 가교제, 아민 가교제 또는 이의 조합이며, 보다 구체적으로 에폭사이드 가교제, 다이아민 가교제 또는 이의 조합이다.

[0051] 보다 더 구체적으로, 본 발명에 이용되는 가교제는 반응기(reactive group)를 2개 갖는 에폭사이드 가교제 및 다이아민 가교제의 조합이다.

[0052] 반응기를 2개 갖는 에폭사이드 가교제를 이용하는 경우, 반응기 모두 에폭시기, 반응기 중 하나는 에폭시기 다른 하나는 할로겐족 원소를 포함할 수 있다.

[0053] 보다 더욱 더 구체적으로, 본 발명에 이용되는 가교제는 반응기 중 하나는 에폭시기 다른 하나는 할로겐족 원소인 에폭사이드 가교제 및 다이아민 가교제의 조합이다. 이 경우, 에폭사이드 가교제가 지지체 물질을 가교시키는 주요 가교제가 된다. 다이아민 가교제는 에폭사이드 가교제와 지지체 물질의 결합에 개입하여 가교 결합 길이를 보다 증가시킨다. 예를 들어, 에폭사이드 가교제 및 다이아민 가교제의 조합에 의해 형성되는 지지체 입자는 “지지체 물질-에폭사이드 가교제-다이아민 가교제-지지체 물질” 이 될 수 있다. 이에, 다이아민 가교제는 가교의 효율성을 향상시키며 가교된 지지체 물질이 바람직한 물성/특성을 갖도록 한다.

[0054] 또한, 다이아민 가교제의 아민기는 조영물질의 코팅을 개선시키는 작용을 한다.

[0055] 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면, 단계 (b)는 유기중합체(예컨대, 텍스트란), 반응기 중 하나는 에폭시기 다른 하나는 할로겐족 원소인 에폭사이드 가교제(예컨대, 에피클로로하이드린) 및 다이아민 가교제(예컨대, 에틸렌다이아민)을 적합한 온도(예컨대, 상온)에서 반응시켜 교차결합된 유기중합체로 이루어진 지지체 입자를 얻는다.

[0056] 제조되는 나노지지체의 수화 지름은 1-20 nm이고, 구체적으로 지지체 입자의 수화 지름은 1-15 nm, 1-10 nm, 1-8 nm, 1-5 nm, 1-4 nm, 2-15 nm, 2-10 nm, 2-8 nm, 2-5 nm, 2-4 nm, 3-15 nm, 3-10 nm, 3-8 nm, 3-5 nm, 3-4 nm, 4-15 nm, 4-10 nm, 4-8 nm, 4-7 nm 또는 4-5 nm이고, 보다 구체적으로 3-15 nm, 3-10 nm, 3-8 nm, 3-5 nm, 3-4 nm, 4-15 nm, 4-10 nm, 4-8 nm, 4-7 nm 또는 4-5 nm이며, 보다 더 구체적으로 3-10 nm, 3-8 nm, 3-5 nm, 3-4 nm, 4-10 nm, 4-8 nm, 4-7 nm 또는 4-5 nm이며, 보다 더욱 더 구체적으로 3-10 nm, 3-8 nm, 4-10 nm, 4-8 nm 또는 4-7 nm이다.

[0057] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 단계 (b)에서 지지체 입자의 표면에 노출되는 친수성 화학작용기는 지지체 물질 자체로부터 유래된 것이다. 예를 들어, SiO₂ 나노지지체를 제조하는 경우에는 SiO₂로부터 유래된 친수성 화학작용기(예컨대, 하이드록실기)가 지지체 입자의 표면에 노출된다. SiO₂ 나노지지체를 제조하는 경우에는 가교제를 이용하지 않는다.

[0058] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 단계 (b)에서 지지체 입자의 표면에 노출되는 친수성 화학작용기는 가교제로부터 유래된 것이다. 상술한 친수성 화학작용기를 갖는 가교제를 이용하는 구현예에서, 나노지지체 입자의 표면에 노출된 친수성 화학작용기는 가교제로부터 유래된 것이다.

[0060] 단계 (c): 지지체 입자 상에 T1 조영물질의 부분적 코팅

[0061] 상기 지지체 입자 상에 T1 조영물질을 코팅하여 T1 조영체로서의 나노입자를 제조한다. T1 조영물질의 코팅은 지지체 입자 표면의 친수성 작용기 및 조영물질 사이의 결합에 의해 이루어지며; T1 조영물질의 코팅은 지지체의 표면에 대하여 부분적인 코팅이며; 지지체 입자 상의 친수성의 작용기 중 일부는 지지체 표면에 여전히 노출되어 있으며; 나노입자의 수화 지름은 2-30 nm이다.

[0062] 본 발명에서 이용되는 T1 조영물질은 당업계에 다양한 T1 조영물질을 포함한다.

[0064] 본 발명에서 이용되는 T1 조영물질은 금속 이온 M^{nt} [M은 Ti^{nt}, V^{nt}, Cr^{nt}, Mn^{nt}, Fe^{nt}, Co^{nt}, Ni^{nt}, Cu^{nt}, Ru^{nt} (0<n≤14) 또는 란타늄족 금속], 금속 산화물, 금속 착화합물, 금속 화합물 또는 이들의 다성분 혼성 구조체이다. 본 발명에서 이용되는 란타늄족 금속의 구체적인 예에는 Eu^{nt}, Gd^{nt}, Tb^{nt}, Dy^{nt}, Ho^{nt}, Er^{nt}, Tm^{nt}, Yb^{nt} 및 Lu^{nt} (0<n≤14)가 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0065] 보다 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 T1 조영물질은 금속 산화물 M_xO_y (M 은 Ti^{n+} , V^{n+} , Cr^{n+} , Mn^{n+} , Fe^{n+} , Co^{n+} , Ni^{n+} , Cu^{n+} , Ru^{n+} ($0 < n \leq 14$) 또는 란탄족 금속으로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상의 금속 원소, $0 < x \leq 16$, $0 < y \leq 8$)이다. 보다 구체적인 예로는, 상기 금속 산화물은 M_xO_y (M = Mn or Fe, $0 < x \leq 4$, $0 < y \leq 4$)이다.
- [0066] 본 발명에서 T1 조영물질로 이용되는 금속 착화합물은 중심 금속과 그 금속에 배위 결합될 수 있는 리간드로 구성된 모든 물질을 말하며 특히, 홀 전자를 가져 자성을 띠는 금속과 배위 리간드로 이루어진 착화합물이다. 구체적인 예로는 M_xL_y (M 은 Ti^{n+} , V^{n+} , Cr^{n+} , Mn^{n+} , Fe^{n+} , Co^{n+} , Ni^{n+} , Cu^{n+} , Ru^{n+} ($0 < n \leq 14$) 또는 란탄족 금속으로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상의 원소, L = 금속과 배위결합을 이룰 수 있는 1종 이상의 리간드, $0 < x \leq 10$, $0 < y \leq 120$)이다. 금속 착화합물로 더욱 구체적으로는 금속 킬레이트, 금속 유기물 구조체 (MOF; metal organic framework) 또는 배위 고분자 (coordination polymer)가 포함된다.
- [0067] 상기 T1 조영물질로 사용 될 수 있는 금속 화합물은 금속 칼코겐 (16족) 화합물, 금속 니코겐 (15족) 화합물, 금속 탄소족 (14족) 화합물 및 금속 붕소족 (13족) 화합물을 포함한다.
- [0068] 본 발명의 구체적인 예로는 구현예에 따르면, 본 발명에서 T1 조영물질로 사용될 수 있는 금속 칼코겐 화합물은 $M^a_xA_z$, 또는 $M^a_xM^b_yA_z$ (M^a =란탄족 원소 (Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Gd, Eu, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, 및 Lu) 및 전이 금속 원소 (Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, 및 Ru)로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상의 원소, M^b =1족 금속 원소, 2족 금속 원소, 13~15족 원소, 17족 원소, 전이 금속 원소, 란탄족, 및 악티늄족 원소로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상의 원소, A 는 O, S, Se, Te, 및 Po로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상의 원소; $0 < x \leq 16$, $0 \leq y \leq 16$, $0 < z \leq 8$), 또는 이들의 다성분 혼성 구조체를 포함하며, 가장 바람직하게는 $M^a_xO_z$, $M^a_xM^b_yO_z$ (M^a =란탄족 원소 (Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Gd, Eu, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, 및 Lu), 및 전이 금속 원소 (Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, 및 Ru)로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상의 원소, M^b =1족 금속 원소, 2족 금속 원소, 13족~15족 원소, 17족 원소, 전이 금속 원소, 란탄족, 및 악티늄족 원소로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상의 원소; $0 < x \leq 16$, $0 \leq y \leq 16$, $0 < z \leq 8$)이다.
- [0069] 상기 T1 조영물질로 사용될 수 있는 금속 니코겐은, 구체적인 예로는 $M^c_xA_z$, $M^c_xM^d_yA_z$ (M^c =란탄족 원소 (Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Gd, Eu, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, 및 Lu), 및 전이 금속 원소 (Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, 및 Ru)로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상의 원소, M^d =1족 금속 원소, 2족 금속 원소, 13~14족 원소, 15족 원소, 17족 원소, 전이 금속 원소, 란탄족 원소, 및 악티늄족 원소로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상의 원소, A 는 N, P, As, Sb, 및 Bi로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상의 원소; $0 < x \leq 24$, $0 \leq y \leq 24$, $0 < z \leq 8$)이다.
- [0070] 상기 T1 조영물질로 사용될 수 있는 금속 탄소족 화합물은, 구체적인 예로는 $M^e_xA_z$, $M^e_xM^f_yA_z$ (M^e =란탄족 원소 (Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Gd, Eu, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, 및 Lu), 및 전이 금속 원소 (Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, 및 Ru)로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상의 원소, M^f =1족 금속 원소, 2족 금속 원소, 13족 원소, 15~17족 원소, 전이 금속 원소, 란탄족 원소, 및 악티늄족 원소로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상의 원소, A 는 C, Si, Ge, Sn, 및 Pb로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상의 원소; $0 < x \leq 32$, $0 \leq y \leq 32$, $0 < z \leq 8$)이다.
- [0071] 상기 T1 조영물질로 사용될 수 있는 금속 붕소족 화합물은, 구체적인 예로는 $M^i_xA_z$, $M^i_xM^j_yA_z$ (M^i =란탄족 원소 (Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Gd, Eu, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, 및 Lu), 및 전이 금속 원소 (Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, 및 Ru)로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상의 원소, M^j =1족 금속 원소, 2족 금속 원소, 14~17족 원소, 전이 금속 원소, 란탄족 원소, 및 악티늄족 원소로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상의 원소, A 는 B, Al, Ga, In, 및 Tl로부터 선택되는 1종 이상의 원소; $0 < x \leq 40$, $0 \leq y \leq 40$, $0 < z \leq 8$)이다.
- [0072] 본 발명에서 이용되는 금속 킬레이트 화합물은 중심 금속과 2개 이상의 작용기로 동시에 결합을 이루는 킬레이

트 리간드를 포함한다. 구체적인 예로는 킬레이트 리간드는 EDTA(ethylenediaminetetracetic acid), DTPA(diethylenetriaminopentaacetic acid), EOB-DTPA(N-[2-[bis(carboxymethyl)amino]-3-(4-ethoxyphenyl)propyl]-N-[2-[bis(carboxymethyl)amino]ethyl]-L-glycine), DTPA-GLU(N,N-bis[2-[bis(carboxymethyl)amino]ethyl]-L-glutamic acid), DTPA-LYS(N,N-bis[2-[bis(carboxymethyl)amino]ethyl]-L-lysine), DTPA-BMA(N,N-bis[2-[carboxymethyl[(methylcarbamoyl)methyl]amino]ethyl]glycine), BOPTA(4-carboxy-5,8,11-tris(carboxymethyl)-1-phenyl-2-oxa-5,8,11-triazatridecan-13-oic acid), DOTA(1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraacetic acid), DO3A(1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-triacetic acid), HPDO3A(10-(2-hydroxypropyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7-triacetic acid) MCTA(2-methyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraacetic acid), DOTMA((α , α' , α'' , α''')-tetramethyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraacetic acid), PCTA(3,6,9,15-tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-triene-3,6,9-triacetic acid), BOPTA(4-carboxy-5,8,11-bis(carboxymethyl)-1-phenyl-12-(phenylmethoxy)methyl-8-phosphomethyl-2-oxa-5,8,11-triazatridecan-12-oid acid), N,N'-[(포스포노메틸이미노)다이-2,1-에타네디일]bis[N-(카르복시메틸)글라이신] (N,N'-phosphonomethylimino-di-2,1-ethanediyl-bis(N-carboxymethyl glycine)), N,N'-[(포스포노메틸이미노)다이-2,1-에타네디일]bis[N-(포스포노메틸)글라이신] (N,N'-phosphonomethylimino-di-2,1-ethanediyl-bis(n-phosphonomethylglycine)), N,N'-[(포스포노메틸이미노)다이-2,1-에타네디일]bis[N-(카르복시메틸)글라이신] (N,N'-(phosphinomethylimino-di-2,1-ethanediyl-bis-(N-(carboxymethyl)glycine)), DOTP(1,4,7,10-tetraazacyclodecane-1,4,7,10-tetrakis(methylphosphonic acid), DOTMP(1,4,7,10-tetraazacyclodecane-1,4,7,10-tetrakis(methyl phosphinic acid) 또는 이들의 유도체를 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0073] 본 발명에서 이용되는 금속 이온, 금속 산화물 금속 착화합물 및 금속 화합물 중 하나 이상의 다성분 혼성 구조체는 구체적인 예로써 무기 화합물에 착화합물 리간드가 추가로 배위되거나 리간드가 무기 화합물의 구성 원소를 치환한 형태를 가지고 있는 화합물이 될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이러한 혼성 구조체의 하나의 구체적인 예로써, $M_2O(CO_3)_2 \cdot H_2O$ ($M = Ti^{n+}, V^{n+}, Cr^{n+}, Mn^{n+}, Fe^{n+}, Co^{n+}, Ni^{n+}, Cu^{n+}, Ru^{n+}$ ($0 < n \leq 14$) 또는 란타늄 족 금속)은 본 발명의 T1 조영제로서 사용될 수 있는데 이는 금속 산화물의 하나인 M_2O_3 의 산소 원자 두개가 CO_3 리간드로 치환된 형태의 다성분 혼성 구조체이다. 또한, T1 조영물질로 사용이 가능한 다성분 혼성 구조체는 이온, 금속, 금속 산화물, 금속 착화합물 및 금속 화합물 중 하나 이상이 혼합되어 다양한 구조 및 형태로 존재될 수 있다.

[0074] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 T1 조영물질은 금속 산화물 M_xO_y (M 은 $Ti^{n+}, V^{n+}, Cr^{n+}, Mn^{n+}, Fe^{n+}, Co^{n+}, Ni^{n+}, Cu^{n+}, Ru^{n+}$ ($0 < n \leq 14$) 또는 란타늄 족 금속으로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상의 금속 원소, $0 < x \leq 16$, $0 < y \leq 8$)이며, 보다 더 구체적으로 M_xO_y ($M = Mn$ or Fe , $0 < x \leq 4$, $0 < y \leq 4$)이고, 보다 더욱 더 구체적으로 철산화물(iron oxide) 즉 M_xO_y ($M = Fe$, $0 < x \leq 4$, $0 < y \leq 4$)이다.

[0075] 표면에 친수성 화학작용기가 노출된 나노지지체에 조영물질을 코팅하는 것은 용이하게 실시할 수 있다. 예를 들어, 하기 실시예에 기재된 바와 같이, 적합한 양의 T1 조영물질과 적합한 온도(예컨대, 상온)에서 교반함으로써 나노지지체에 조영물질을 코팅할 수 있다.

[0076] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 친수성 화학작용기가 노출된 나노지지체에 조영물질을 코팅하는 것은 화학결합을 통해 이루어진다. 상기 화학결합은 예컨대 공유결합, 배위결합, 이온결합, 수소 결합, 친수성 결합, 소수성 결합, 및 반데르발스 결합을 포함한다. 보다 구체적으로, 나노지지체의 표면에 노출된 친수성 화학작용기와 조영물질의 화학결합, 보다 더 구체적으로 공유결합, 배위결합, 이온결합, 수소 결합 및/또는 친수성 결합에 의해 코팅이 이루어진다.

[0077] 본 발명의 가장 중요한 기술적 특징은 조영물질 특히 T1 조영물질을 지지체 표면에 부분적으로 코팅하는 것이다.

[0078] 본 명세서 용어 “부분적 코팅”은 지지체의 표면 전체면적에 걸쳐서 조영물질이 코팅되어 있는 것이 아니라, 그 일부분에만 조영물질이 코팅된 것을 의미한다. 구체적으로, 용어 “부분적 코팅”은 지지체의 표면에 노출된 친수성 작용기의 전체가 아닌 일부분에만 조영물질이 코팅된 것을 의미한다.

- [0079] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 조영물질은 지지체 입자 표면에 있는 친수성 작용기의 14-70%, 14-60%, 14-50%, 14-45%, 15-70%, 15-60%, 15-50%, 15-45%, 16-70%, 16-60%, 16-50% 또는 16-45%에 결합되어 있다. 보다 구체적으로, 조영물질은 지지체 입자 표면에 있는 친수성 작용기의 15-45% 또는 16-45%, 보다 더 구체적으로 15-25%, 16-25%, 15-20% 또는 16-20%에 결합되어 있다. 조영물질이 코팅된 지지체 입자 표면의 친수성 작용기의 비율이 상술한 수치의 범위를 벗어나는 경우에는, 최종적으로 제조된 나노조영제의 안정성 및 조영능력이 크게 감소하는 문제점이 있다(참조: 실시예).
- [0080] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 조영물질이 코팅되어 있는 본 발명의 조영제에서 표면에 여전히 노출되어 있는 작용기는 초기에 표면에 노출된 전체 작용기를 기준으로 하여 30-86%, 40-86%, 50-86%, 55-86%, 30-85%, 40-85%, 50-85%, 55-85%, 30-84%, 40-84%, 50-84% 또는 55-84%이다. 보다 구체적으로, 조영물질이 코팅되어 있는 본 발명의 조영제에서 표면에 여전히 노출되어 있는 작용기는 55-85% 또는 55-84%, 보다 더 구체적으로 75-85%, 75-84%, 80-85% 또는 80-84%이다.
- [0081] 상술한 바와 같이, 나노지지체 표면에 조영물질을 부분적 코팅을 함으로써 나노지지체 표면의 친수성 작용기를 여전히 노출시켜 최종적으로 제조된 나노조영제의 안정성 및 조영능력을 동시에 개선시킨 것은, 매우 흥미로운 기술적 달성이다.
- [0082] 조영물질에 의한 부분적 코팅은 조영물질의 사용량을 조절하여 달성할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 단계 (c)에서 지지체 입자 100 중량에 대하여 조영물질의 사용량은 0.5-10 wt%, 0.8-7.0 wt%, 0.5-5.0 wt% 또는 0.9-5.0 wt%이다. 보다 구체적으로, 단계 (c)에서 지지체 입자 100 중량에 대하여 조영물질의 사용량은 0.6-10 wt%, 0.6-8.0 wt%, 0.6-7.0 wt%, 0.6-6.0 wt%, 0.6-5.0 wt%, 0.7-10 wt%, 0.7-8.0 wt%, 0.7-7.0 wt%, 0.7-6.0 wt%, 0.7-5.0 wt%, 0.8-10 wt%, 0.8-8.0 wt%, 0.8-7.0 wt%, 0.8-6.0 wt%, 0.8-5.0 wt%, 0.9-10 wt%, 0.9-8.0 wt%, 0.9-7.0 wt%, 0.9-6.0 wt% 또는 0.9-5.0 wt%이고, 보다 더 구체적으로 0.9-10 wt%, 0.9-8.0 wt%, 0.9-7.0 wt%, 0.9-6.0 wt% 또는 0.9-5.0 wt%이다.
- [0083] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명에서 아민기를 갖는 가교제를 이용함으로써 나노지지체 표면에 아민기가 노출된 경우, 단계 (b) 또는 (c)는 아민기를 카르복실기로 대체하는 과정을 추가적으로 포함한다. 보다 구체적으로, 단계 (c)에서 조영물질을 코팅한 후에, 표면에 여전히 노출된 아민기를 또 다른 친수성 작용기인 카르복실기로 대체한다. 이러한 카르복실기로의 대체는, 본 발명의 조영제를 보다 의약적합성(druggable)한 형태로 특히 인체 독성을 최소화 할 수 있도록 한다.
- [0084] 본 발명에 의해 제조되는 조영제로서의 나노입자의 수화 지름은 2-30 nm이고, 구체적으로 2-25 nm, 2-20 nm, 2-15 nm, 2-10 nm, 2-8 nm, 2-6 nm, 2-5 nm, 3-25 nm, 3-20 nm, 3-15 nm, 3-10 nm, 3-8 nm, 3-6 nm, 3-5 nm, 4-25 nm, 4-20 nm, 4-15 nm, 4-10 nm, 4-8 nm, 4-7 nm 또는 4-6 nm, 보다 구체적으로 3-25 nm, 3-20 nm, 3-15 nm, 3-10 nm, 3-8 nm, 3-6 nm, 3-5 nm, 4-25 nm, 4-20 nm, 4-15 nm, 4-10 nm, 4-8 nm, 4-7 nm 또는 4-6 nm, 보다 더 구체적으로 3-10 nm, 3-8 nm, 3-6 nm, 3-5 nm, 4-10 nm, 4-8 nm, 4-7 nm 또는 4-6 nm이다.
- [0085] 본 발명에 의해 최종적으로 제조된 T1 나노조영제는 안정성 및 조영능력 모두에서 상당히 개선된 특성을 나타낸다.
- [0086] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 T1 조영제로서의 나노입자는 수용액에서 125-500 mM NaCl 농도 변화에 대하여 수화 지름의 변화가 $\pm 10\%$ 이하이고, pH 6-8 변화에 대하여 수화 지름의 변화가 $\pm 10\%$ 이하이며, 4-37°C 온도 변화에 대하여 수화 지름의 변화가 $\pm 10\%$ 이하인 분산 안정성을 갖는다.
- [0087] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 조영제로서의 나노입자는 농도가 1 mM(금속기준) 일 때 $2.7-5.0 \text{ s}^{-1}$ 의 T1 이완율(relaxivity)를 나타낸다. 이러한 T1 이완율은, 기존에 개발된 T1 조영제와 비교하여 매우 우수한 조영능력을 나타내는 것이다.
- [0089] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 지지체 입자 및 (b) 상기 지지체 입자 상에 코팅된 T1 조영물질을 포함하는 T1 조영제 나노입자에 있어서, 상기 지지체 입자의 표면은 친수성 작용기가 노출되어 있고 상기 지지체 입자의 수화(hydrodynamic) 지름은 1-20 nm이며, 상기 T1 조영물질은 상기 지지체 입자 표면의 친수성 작용기에 결합되어 있고, 상기 T1 조영물질은 상기 지지체 표면에 있는 일부 친수성 작용기에 결합되어 있으며; 상기 지지체 입자 상의 친수성 작용기 중 일부는 지지체 표면에 여전히 노출되어 있으며; 상기 나노입자의 수화 지름은 2-30 nm인 것을 특징으로 하는 T1 조영제 나노입자를 제공한다.
- [0090] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 지지체 물질은 친수성 화학작용기를 포함하는 유기중합체, 실리카 또는 금

(Au)이다.

- [0091] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 유기중합체는 다당류(polysaccharide)이다.
- [0092] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 다당류는 덱스트란(dextran)이다.
- [0093] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 T1 조영물질은 지지체 상에 화학결합을 통해 코팅되어 있다.
- [0094] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 지지체 입자의 수화 지름은 1-15 nm, 1-10 nm, 1-8 nm, 1-5 nm, 1-4 nm, 2-15 nm, 2-10 nm, 2-8 nm, 2-5 nm, 2-4 nm, 3-15 nm, 3-10 nm, 3-8 nm, 3-5 nm, 3-4 nm, 4-15 nm, 4-10 nm, 4-8 nm, 4-7 nm 또는 4-5 nm이다.
- [0095] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 T1 조영제로서의 나노입자의 수화 지름은 2-25 nm, 2-20 nm, 2-15 nm, 2-10 nm, 2-8 nm, 2-6 nm, 2-5 nm, 3-25 nm, 3-20 nm, 3-15 nm, 3-10 nm, 3-8 nm, 3-6 nm, 3-5 nm, 4-25 nm, 4-20 nm, 4-15 nm, 4-10 nm, 4-8 nm, 4-7 nm 또는 4-6 nm이다.
- [0096] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 유기중합체는 친수성 화학작용기를 갖는 가교제에 의해 교차결합된 것이다.
- [0097] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 지지체 입자의 표면에 노출된 친수성 화학작용기는 지지체 물질 자체로부터 유래된 것이다.
- [0098] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 지지체 입자의 표면에 노출된 친수성 화학작용기는 가교제로부터 유래된 것이다.
- [0099] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 친수성 화학작용기를 갖는 가교제는 아민기를 갖는 가교제이다.
- [0100] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 지지체 입자는 표면에 아민기가 노출되어 있으며 상기 노출된 아민기는 카르복실기로 대체된 것이다.
- [0101] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 T1 조영물질은 철산화물(iron oxide)이다.
- [0102] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 T1 조영물질은 지지체 입자 표면에 있는 친수성 작용기의 14-70%, 14-60%, 14-50%, 14-45%, 15-70%, 15-60%, 15-50%, 15-45%, 16-70%, 16-60%, 16-50% 또는 16-45%에 결합되어 있다.
- [0103] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 T1 조영제로서의 나노입자는 수용액에서 125-500 mM NaCl 농도 변화에 대하여 수화 지름의 변화가 ± 10 이고, pH 6-8 변화에 대하여 수화 지름의 변화가 ± 10 이며, 4-37°C 온도 변화에 대하여 수화 지름의 변화가 ± 10 인 분산 안정성을 갖는다.
- [0104] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 T1 조영제로서의 나노입자는 농도가 1 mM(금속기준) 일 때 $2.7-5.0 \text{ s}^{-1}$ 의 T1 이완율(relaxivity)를 나타낸다.

발명의 효과

- [0106] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0107] (a) 본 발명은 기존의 조영제 특히 T1 조영제를 개선한 것으로서, T1 조영물질을 친수성 작용기가 표면에 노출된 지지체 표면에 부분적으로 코팅하는 전략을 채택하고 있다.
- [0108] (b) 구체적인 일 구현예에 따르면, 본 발명에서 T1 조영물질은 지지체 표면의 친수성 작용기에 결합을 하며, 코팅 이후에도 상당한 비율의 친수성 작용기가 여전히 노출되어 있고, 이러한 특징이 본 발명에서 달성한 효과에 상당한 기여를 하고 있다.
- [0109] (c) 본 발명에서 채택한 부분적 코팅 전략에 의해 T1 조영제로서의 나노입자의 안정성 및 조영능을 모두 개선한 것은 매우 흥미로운 것이며, 어떠한 공지기술에도 이러한 전략을 제시하고 있지 않다.

도면의 간단한 설명

- [0111] 도 1은 본 발명에 따라 제조된 나노지지체 표면의 전체 친수성 작용기(아민기) 대비 조영물질이 부착된 작용기의 비율(위쪽 그래프) 및 조영물질 부착한 여전히 노출된 작용기의 비율(아래쪽 그래프)을 나타낸다.
- 도 2는 본 발명의 나노조영제의 안정도를 분석한 결과이다.

도 3은 본 발명의 T1 이완속도를 분석한 결과이다.

도 4는 본 발명의 나노조영제의 동물 독성을 분석한 결과이다.

도 5는 단백질 또는 금을 지지체로 이용하여 제조된 본 발명의 나노지지체 입자의 안정도를 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0112] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0114] 실시예

[0115] 실시예 1: 텍스트란 나노지지체의 합성 및 T₁ 조영물질의 부분적 코팅

[0116] 텍스트란 나노지지체는 텍스트란(분자량 10 kDa, Pharmacosmos, Denmark)의 가교결합(crosslinking)을 통해 합성하였다. 구체적으로, 1.8 g의 텍스트란을 염기성 수용액에 용해시킨 뒤, 가교제인 에피클로로하이드린(epichlorohydrin, 6 mL, Sigma, USA), 에틸렌다이아민(ethylenediamine, 26 mL, Sigma, USA)를 넣어 상온의 항온조에서 24시간 반응시켰다. 반응물은 중공 섬유막 필터(hollow fiber membrane filter, MWCO 10,000, GE Healthcare, Netherlands)를 이용하여 정제하였다. 합성된 텍스트란 나노지지체는 약 4.1 nm의 수화지름을 나타냈다. 합성된 텍스트란 나노지지체에 FeCl₂, FeCl₃ 및 NaOH를 각각 1:2:8 mol 비율로 넣고 상온에서 30분 동안 강하게 자석 교반하여 Fe₃O₄를 T₁ 조영물질로 도입하였다. 합성된 나노입자는 중공 섬유막 필터(MWCO 10,000, GE Healthcare, Netherlands)를 이용하여 정제하였다.

[0118] 실시예 2: 텍스트란 나노지지체에 부착된 T₁ 조영물질의 비율 조절

[0119] 상기 실시예 1의 T₁ 조영물질 도입 단계에서, 전체 텍스트란 나노지지체의 무게(weight)를 100이라 했을 때 T₁ 조영물질(FeCl₂, FeCl₃)의 양(Fe 금속기준)을 다음과 같이 0.1% (wt), 1% (wt), 2.5% (wt), 5.0% (wt), 10.0% (wt), 25% (wt), 50% (wt) 및 100% (wt)로 조절함으로써, 텍스트란 나노지지체에 부착되는 T₁ 조영물질의 비율을 조절하였다. 합성된 나노입자 조영제의 수화지름은 T₁ 조영물질의 양이 증가함에 따라 각각 약 4.7 nm, 4.8 nm, 5.8 nm, 6.5 nm, 7.2 nm, 9.0 nm, 10.0 nm 및 25 nm로 측정되었다. 텍스트란 나노지지체에 부착된 T₁ 조영물질의 정량은 유도결합플라즈마 질량분석기(ICP-MS, PerkinElmer, USA)를 이용하여 실시하였다. 구체적으로, 각 물질에 피라냐 용액(Pirahna solution, H₂O₂와 H₂SO₄의 1:3 비율 혼합액)을 가하여 70℃에서 24시간 가열한 뒤 부피가 10 mL가 되도록 증류수로 희석하였다. 분석결과 상기 지지체 입자 100 중량에 대하여 부착된 조영물질의 양(Fe 금속기준)은 각각 0.1% (wt), 0.99% (wt), 2.44% (wt), 4.76% (wt), 9.09% (wt), 20.0% (wt), 33.3% (wt) 및 50.0% (wt)로 나타났다.

[0121] 실시예 3: 나노지지체 표면의 친수성 작용기 정량

[0122] 상기 실시예 1에서 제조된 나노지지체 표면에는 아민(-NH₂) 작용기가 도입되어 있으므로, 나노지지체 표면의 친수성 작용기 정량에는 잘 알려진 아민 정량법인 TNBSA assay를 사용하였다. 구체적으로, 10 mg/mL 농도의 나노지지체 0.5 mL에 0.01% (w/v) TNBSA(2,4,6-Trinitrobenzene Sulfonic Acid, Thermo, USA) 수용액 0.25 mL을 넣고 37℃에서 2시간 반응시킨 뒤 10% SDS(sodium dodecyl sulfate, Sigma, USA)수용액 0.25 mL과 1 M HCl(Sigma, USA) 0.125 mL를 넣고 339 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 이때, 흡광도로부터 아민기의 양을 정량하기 위해 총 5가지 서로 다른 농도의 Lysine(Sigma, USA) 용액에 대해서 TNBSA assay를 실시하고 흡광을 측정함으로써, 검정곡선을 그렸다.

[0124] 실시예 4: 나노지지체 표면의 전체 작용기 대비 조영물질이 부착된 작용기의 비율 정량

[0125] 조영물질이 도입된 나노지지체와 조영물질 없이 순수한 나노지지체 각각의 아민기 양을 측정하고 비교하여 비율을 정량하였다. 이 때, 나노지지체의 양은 동일하게 하였고, 다음과 같은 식을 통하여 백분율로 계산하였다.

[0126] $\{(\text{순수한 나노지지체의 아민기} - \text{조영물질이 도입된 나노지지체의 아민기}) / (\text{순수한 나노지지체의 아민기})\} \times 100$

[0127] 텍스트란 지지체 100 wt 대비 부착된 T₁ 조영물질의 양이 0.1% (wt), 0.99% (wt), 2.44% (wt), 4.76% (wt),

9.09% (wt) 및 20.0% (wt)로 증가함에 따라, 나노지지체 표면의 전체 작용기 중 조영물질이 부착된 작용기의 비율은 13.81%, 16.57%, 19.34%, 44.20%, 82.87% 및 85.64%로 증가하였다. 즉, 조영물질이 부착된 이후에 나노지지체 표면에 노출된 작용기는 부착된 T_1 조영물질의 양 0.1% (wt), 0.99% (wt), 2.44% (wt), 4.76% (wt), 9.09% (wt) 및 20.0% (wt) 각각에 대하여 86.19%, 83.43%, 80.66%, 55.80%, 17.13% 및 14.36%이다. 부착된 T_1 조영물질의 양이 33.3% (wt) 및 50.0% (wt)일 경우에는 노출된 작용기가 검출되지 않았다(도 1).

[0129] 실시예 5: 나노조영제의 안정도 시험

[0130] 텍스트란 나노조영제의 안정도를 생리학적 환경을 포함하는 다양한 염(salt) 조건, pH 조건, 온도조건에서 시험하였다. 같은 양의 나노조영제에 2 M NaCl(Sigma, USA) 수용액을 적절히 넣어 각각 500 mM, 250 mM 및 125 mM 농도의 염 조건을 만들었다. pH 조건을 위해서는 같은 양의 나노조영제를 0.1 M NaCl 농도의 pH 6, 7 및 8 완충용액에서 인큐베이션 하였다. 온도조건을 위해서는 같은 양의 나노조영제를 각각 37°C, 4°C의 pH 7.4 PBS 용액에서 인큐베이션 하였다.

[0132] 실시예 6: 나노조영제의 안정도 측정

[0133] 텍스트란 나노조영제의 안정도는 나노조영제 수화지름 변화율을 통해 측정하였다. 실시예 7에서 구현한 각 조건들에서의 수화지름이, 상온의 pH 7.4 PBS 용액에서의 수화지름 대비 얼마나 변화하였는지 그 변화율을 백분율로 계산하였다. 모든 수화지름은 제타전위계 (NanoZS Zetasizer, Malvern, UK)를 이용하여 측정하였다.

[0134] 텍스트란 지지체 100 wt 대비 부착된 T_1 조영물질의 양(즉, 노출된 작용기 비율)에 따라 지지체의 안정도가 다르게 나타났다. 구체적으로, 전체 작용기 대비 조영제가 부착된 작용기 비율이 16.57%(노출 비율 83.43%), 19.34%(노출 비율 80.66%) 및 44.20%(노출 비율 55.80%)에서는 염 조건, pH 조건에서 수화지름의 변화율이 10% 미만으로 안정도가 높게 나타난 반면 13.81%(노출 비율 86.19%), 82.87%(노출 비율 17.13%), 85.64%(노출 비율 14.36%)인 경우에는 현저히 높은 수화지름 변화율을 나타내어 불안정성을 보였다. 작용기 비율이 19.34%(노출 비율 80.66%)인 경우 37°C, 4°C의 온도조건에서 168 시간 동안 관찰한 결과, 수화지름의 변화율이 10% 미만으로 안정도가 높게 유지되었다(도 2).

[0136] 실시예 7: 나노조영제의 MRI 조영효과 측정

[0137] 텍스트란 나노조영제의 T_1 -MRI 조영효과(T_1 이완율, T_1 relaxivity)는 3 Tesla MRI 장비(Philips Achieva)를 이용하여 측정하였다. 구체적인 실험 방법은 다음과 같다. 각각의 시료를 1 mM 농도(철 기준)로 물에 분산시켜 PCR 튜브에 담아 지지대에 고정시킨 후, 지지대를 MRI 동물 코일(Animal Coil, Custume made, China)의 중앙에 위치시킨 뒤 다음의 역회복(inversion recovery) MRI 시퀀스를 사용하여 T_1 이완시간을 측정하였다. [TI = 100, 500, 1000, 2000, 및 3000 ms, echo 시간 (TE) = 7.4 ms, FOV = 100 mm, 매트릭스 = 256 × 256, slice 두께 = 2 mm, 및 획득수(acquisition number) = 1]

[0138] 실험결과 T_1 조영효과를 나타내는 척도인 T_1 이완율(T_1 이완시간의 역수, R_1)은 전체 작용기 대비 조영제가 부착된 작용기 비율이 16.57%, 19.34%, 44.20%, 82.87%인 경우 R_1 값이 각각 4.77 s^{-1} , 4.17 s^{-1} , 3.69 s^{-1} 및 2.83 s^{-1} 으로 13.81% ($R_1 = 0.53 \text{ s}^{-1}$), 85.64% ($R_1 = 1.43 \text{ s}^{-1}$)인 경우에 대비하여 최소 2배 ~ 최대 9배 높게 나타났다(도 3).

[0140] 실시예 8: 나노조영제 표면 작용기의 카르복실기로의 치환

[0141] 상기 실시예에서 제조된 아민기를 포함하는 텍스트란 나노조영제(T_1 조영물질이 2.44 wt%인 나노조영제)를 다이메틸설폭사이드(DMSO, Daejung Chemical, Korea) 내에서 석시닉 언하이드라이드(나노지지체 표면에 존재하는 아민기 대비 100 molar excess, Acros, USA)와 12시간 동안 상온에서 자석교반 하에 반응시켰다. 그 후, 전체 용액중 DMSO가 차지하는 비율이 5% 미만이 되도록 증류수로 희석한 뒤 원심분리 막 필터(centrifugal membrane filter, MWCO 10,000, UltraCone, Millipore, USA)를 이용하여 정제하였다.

[0143] 실시예 9: 나노조영제의 동물 독성 시험

[0144] ICR마우스(6주령, 암/수 각각 8마리, 총 16마리)에 텍스트란 나노조영제(아민기 포함하는 것과 카르복실기로 치

환된 것, 2종류 모두 T_1 조영물질이 2.44 wt%인 나노조영제)를 정맥투여 하였다.

[0145] 마우스는 각 군별로 암/수 각각 2마리 씩 총 4마리로 구분하였다(아무것도 주입하지 않은 군, 식염수 주입군, 고용량군 및 중용량군). 투여액은 총 25 mL/kg으로 하고, 2회로 나누어 각각 12.5 mL/kg으로 하였다. 개체별 투여액은 투여 당일의 체중을 기준으로 산출하였다. 투여는 일회용 주사기(1 mL, 26G)를 이용하여 12시간 간격으로 시험계의 미정맥에 약 2 mL/min의 속도로 2회 정맥 투여하였다. 독성의 평가를 위해 투여 후 일반상태(독성징후의 종류, 발현시기, 회복시기 등) 및 사망유무를 관찰하였으며 체중을 측정하였다. 먼저, 표면에 아민기를 포함하는 텍스트란 나노조영제를 주입한 결과 주입용량에 관계없이 모두 사망하였다. 카르복실기로 치환한 나노조영제를 주입한 경우, 중용량군 뿐 아니라 고용량군에서도 사망예가 전혀 관찰되지 않았으며, 시간에 따른 마우스 몸무게 변화도 대조군과 동일하게 증가하였으므로 독성이 없다고 판단되었다(도 4).

[0147] **실시예 10: 단백질 나노지지체 합성 및 T_1 조영물질의 부분적 코팅**

[0148] 단백질 나노지지체는 BSA(bovine serum albumin, Sigma, USA)의 가교결합을 통해 합성하였다. 구체적으로, 12.6 mg의 BSA를 50 mM NaCl (Sigma, USA) 용액에 용해시킨 뒤, 가교제인 에틸렌다이아민(26 μ L, Sigma, USA), EDC[1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride, 9.58 mg, Thermofisher, USA] 및 sulfo-NHS(1.08mg, Thermofisher, USA)를 넣어 상온에서 2시간 반응시켰다. 반응물은 원심분리 막 필터(MWCO 10,000, UltraCone, Millipore, USA)를 이용하여 정제하였다. 합성된 단백질 나노지지체는 약 6.1 nm의 수화지름을 나타냈다. 합성된 단백질 나노지지체에 $FeCl_2$, $FeCl_3$ 및 NaOH를 각각 1:2:8 mol 비율로 넣고 상온에서 30분간 강하게 자석 교반하여 Fe_3O_4 를 T_1 조영물질로 도입하였다. 합성된 나노입자는 원심분리 막 필터(MWCO 10,000, UltraCone, Millipore, USA)를 이용하여 정제하였다. 최종적으로 얻어진 단백질 나노조영제는 약 7.7 nm의 수화지름을 나타냈다.

[0150] **실시예 11: 금 나노지지체 합성 및 T_1 조영물질의 부분적 코팅**

[0151] 금 나노입자는 THPC[tetrakis(hydroxymethyl)phosphoniumchloride, Sigma, USA)의 존재 하에서 클로로아우르산($HAuCl_4$, Sigma, USA)를 환원시켜 합성하였다. 구체적으로, 4 μ L의 THPC를 염기성 수용액에 용해시킨 뒤, 충분히 오랜 시간 동안 자석교반 하였다. 여기에 29.4 mM 농도의 $HAuCl_4$ (0.6 mL)를 넣고 약 10분간 더 자석교반 하였다. 합성된 금 나노입자의 정제는 원심분리 막 필터(MWCO 10,000, UltraCone, Millipore, USA)를 이용하여 실시하였다. 합성된 금 나노지지체는 약 7.8 nm의 수화지름을 나타냈다. 정제된 금 나노입자를 과량의 시스타민(Sigma, USA)과 상온에서 12시간 동안 교반시켜 나노입자 표면에 아민($-NH_2$) 작용기를 도입하였다. 합성된 금 나노입자에 $FeCl_2$, $FeCl_3$ 및 NaOH를 각각 1:2:8 mol 비율로 넣고 상온에서 30분간 강하게 자석 교반하여 Fe_3O_4 를 T_1 조영물질로 도입하였다. 합성된 나노입자는 원심분리 막 필터(MWCO 10,000, UltraCone, Millipore, USA)를 이용하여 정제하였다. 최종적으로 얻어진 금 나노조영제는 약 22 nm의 수화지름을 나타냈다.

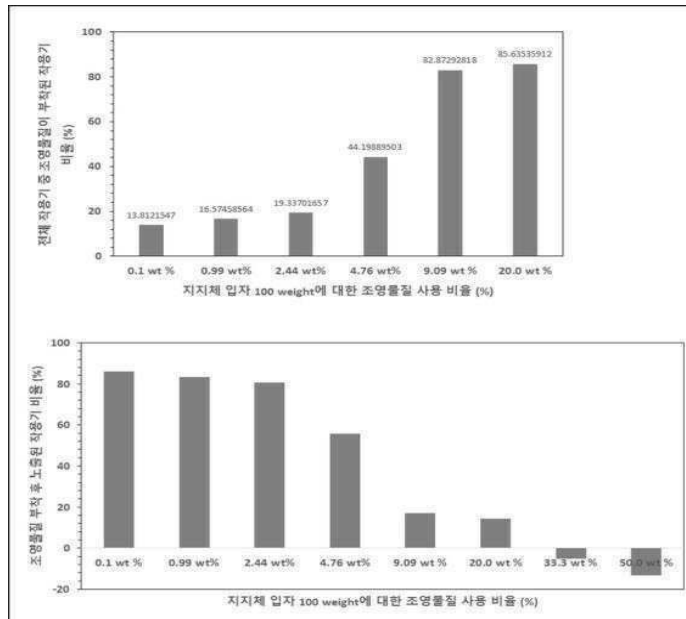
[0153] **실시예 12: 단백질 나노지지체와 금 나노입자지지체의 안정도**

[0154] 실시예 10에서 합성한 단백질 지지체와 실시예 11에서 합성한 금 나노입자 지지체의 경우, 전체 작용기 중 조영물질이 부착된 작용기의 비율은 각각 19.38% 및 30.08%로 측정되었으며 이들 조영제는 10% 미만의 수화지름 변화율로 높은 안정도를 나타내었다(도 5). 상기 조영물질이 부착된 작용기의 비율은 상술한 텍스트란 나노지지체가 높은 안정도를 나타내는 범위의 값이다.

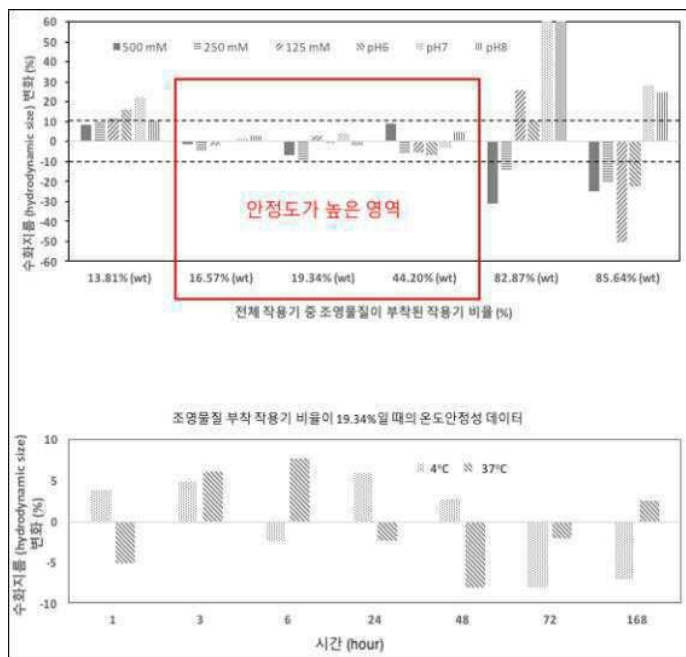
[0156] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

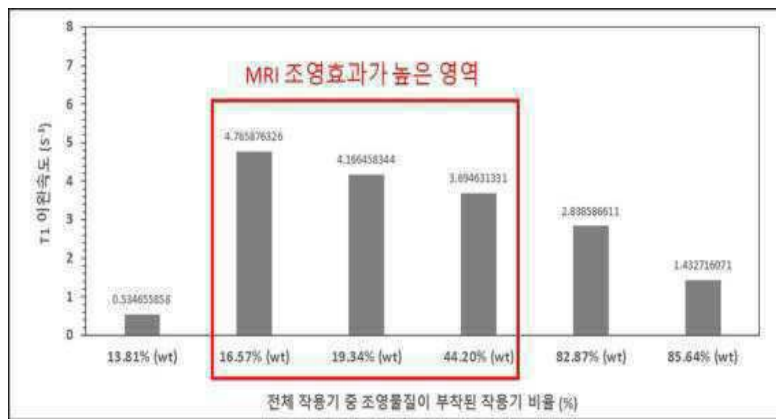
도면1



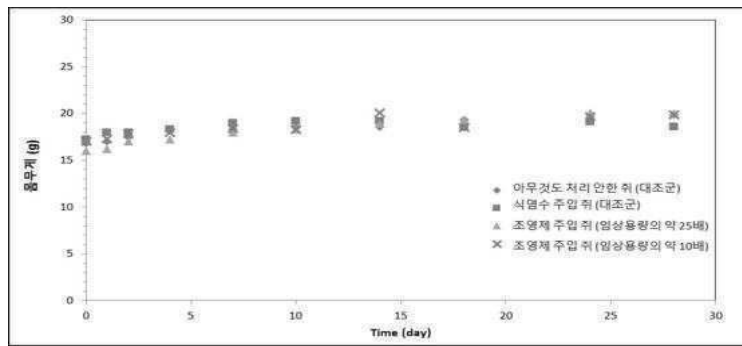
도면2



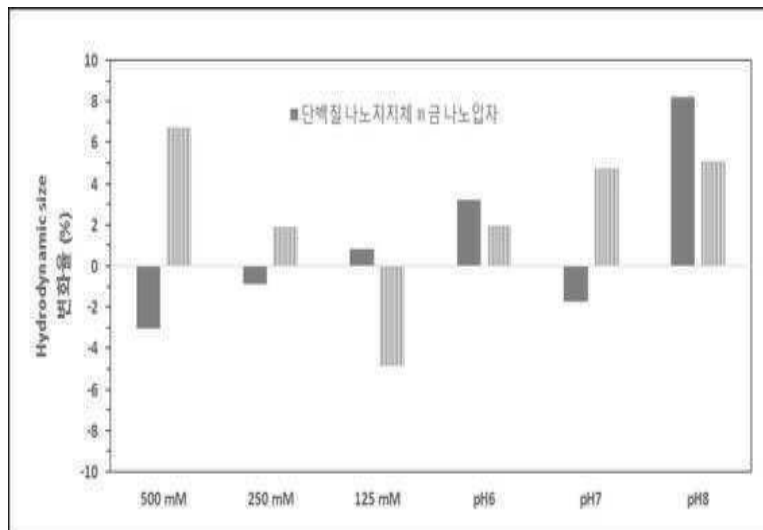
도면3



도면4



도면5



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 2

【변경전】

제 1 항에 있어서, 상기 지지체 물질은 친수성 화학작용기를 포함하는 유기중합체, 실리카 또는 금(Au)인 것을

특징으로 하는 방법.

【변경후】

제 1 항에 있어서, 상기 지지체 입자는 친수성 화학작용기를 포함하는 유기중합체, 실리카 또는 금(Au)인 것을 특징으로 하는 방법.