



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0116779
(43) 공개일자 2017년10월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 49/18 (2006.01) A61K 49/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 49/1818 (2013.01)
A61K 49/0019 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0044802
(22) 출원일자 2016년04월12일
심사청구일자 2016년04월12일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
곽민석
부산광역시 수영구 장대골로 8-6, 1304호(파크블
루V)
이창환
서울특별시 서초구 효령로 391, 10동 1006호(서초
동, 무지개아파트)
(74) 대리인
위병갑

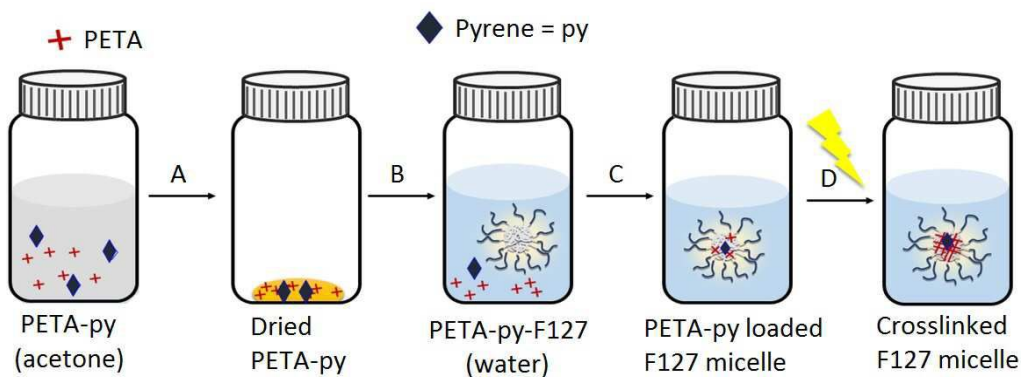
전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 sIPN 구조가 코어에 형성된 형광 이미징용 표지나노입자

(57) 요약

본 발명은 sIPN 구조가 코어에 형성된 형광 이미징용 표지나노입자에 관한 것으로, 본 발명에 따른 sIPN(Semi-Interpenetrating Network) 구조가 코어에 형성된 형광 이미징용 표지나노입자는 다양한 소수성 유기형광염료를 적용가능하고, 다수의 화학 기능기를 표면에 정밀히 도입할 수 있으며, 미셀 코어에 sIPN 구조가 형성됨에 따라 미셀의 안정성이 현저히 향상되는 효과가 있으며, 생체이미징시에 종래 염료에 비해 체내 순환시간이 향상되고, BBB(blood brain barrier)를 통과할 수 있어 뇌 진단에도 사용될 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 49/0054 (2013.01)

A61K 49/1809 (2013.01)

C09C 2210/50 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2014R1A1A2059063

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공분야기초연구사업

연구과제명 구형단백질의 모델이 되는 나노입자 라이브러리와 표면 물성에 따른 세포상호작용

기 여 율 75/100

주관기관 부경대학교 산학협력단

연구기간 2014.11.01 ~ 2017.04.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI13C1887010015

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료연구개발사업

연구과제명 알츠하이머병에 관여하는 Uba6의 핵심 표적 단백질들의 확인 및 작용기작 규명

기 여 율 25/100

주관기관 울산대학교 산학협력단

연구기간 2015.11.01 ~ 2016.10.31

제1항에 있어서,

상기 유기형광염료는 파이렌, Lumogen F violet 570, 3-티오펜핵실, Lumogen F yellow 083, 2,3-디메틸-5,8-디-티오펜-2-일퀴옥살린 (KIM A), Lumogen F orange 240, 나프토티아디아졸, 4,7-디-티오펜-2-일벤조[1,2,5]티아디아졸 (KIM B), Lumogen red 350, Se-벤조티아디아졸, Nile red 및 프탈로시아닌으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종인 것을 특징으로 하는 형광 이미징용 표지나노입자.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 가교제는 PET4A (Pentaerythritol tetraacrylate), 또는 PET3A (Pentaerythritol triacrylate)인 것을 특징으로 하는 형광 이미징용 표지나노입자.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 형광 이미징용 표지나노입자의 크기는 3-20 nm인 것을 특징으로 하는 형광 이미징용 표지나노입자.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 형광 이미징용 표지나노입자는 생체 이미징, 세포 이미징 또는 단분자 이미징에 사용되는 것을 특징으로 하는 형광 이미징용 표지나노입자.

청구항 9

양친매성 트리블록공중합체를 정제수에 용해하여 중합체 용액을 준비하는 단계(단계 1);

유기형광염료를 유기 용매에 용해하여 염료 용액을 준비하는 단계(단계 2);

가교제를 유기용매에 용해하여 가교제 용액을 준비한 다음, 여기에 상기 단계 2에서 준비한 염료 용액을 첨가하고, 유기용매를 증발시켜 바이알 밑바닥에 가교제-염료 필름을 형성하는 단계(단계 3);

상기 단계 3의 바이알에 상기 단계 1에서 준비한 중합체 용액을 첨가하여 미셀 용액을 준비하는 단계(단계 4);

가교제의 미셀 코어 내재화(internalization)를 위해 양친매성 트리블록공중합체의 임계미셀온도 보다 높은 50-70℃로 가열하는 단계(단계 5); 및

UV를 조사하여 미셀 내부에 봉입된 가교제를 가교하여 sIPN(Semi-Interpenetrating Network) 구조를 형성하는 단계(단계 6);

를 포함하는 형광 이미징용 표지나노입자의 제조방법.

청구항 10

제10항에 있어서,

상기 유기형광염료는 파이렌, Lumogen F violet 570, 2,3-디메틸-5,8-디-티오펜-2-일퀴옥살린 (KIM A), 4,7-디-티오펜-2-일벤조[1,2,5]티아디아졸 (KIM B) 및 Nile red로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 11

유기형광염료를 유기용매에 용해하고, 용매를 모두 증발시킨 바이알 A를 준비하는 단계(단계 1);
 가교제를 유기용매에 용해하고, 용매를 모두 증발시킨 바이알 B를 준비하는 단계(단계 2);
 양친매성 트리블록공중합체를 정제수에 용해하여 중합체 용액을 준비하는 단계(단계 3);
 상기 단계 3에서 준비한 중합체 용액을 단계 1의 바이알 A에 붓고 혼합하는 단계(단계 4);
 상기 단계 4에서 준비한 용액을 단계 2에서 준비한 바이알 B에 붓는 단계(단계 5);
 가교제의 미셀 코어 내재화(internalization)를 위해 양친매성 트리블록공중합체의 임계미셀온도 보다 높은 50-70℃로 가열하는 단계(단계 6); 및
 UV를 조사하여 미셀 내부에 봉입된 가교제를 가교하여 sIPN(Semi-Interpenetrating Network) 구조를 형성하는 단계(단계 7);
 를 포함하는 형광 이미징용 표지나노입자의 제조방법.

청구항 12

제11항에 있어서,
 상기 유기형광염료는 3-티오펜헥실, Lumogen F yellow 083, Lumogen F orange 240, 나프토티아디아졸, Lumogen red 350 및 Se-벤조티아디아졸로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 13

양친매성 트리블록공중합체를 유기용매에 용해하고, 여기에 유기형광염료를 혼합한 다음 유기용매를 증발시켜, 중합체-염료 필름을 밀바닥에 형성시킨 바이알 A를 준비하는 단계(단계 1);
 상기 단계 1의 바이알 A에 정제수를 붓고, 초음파 처리하고 교반한 다음, 실린지 필터로 여과하는 단계(단계 2);
 가교제를 유기용매에 용해시킨 다음, 유기용매를 증발시켜 가교제 필름을 밀바닥에 형성시킨 바이알 B를 준비하는 단계(단계 3);
 단계 2에서 준비한 용액을 단계 3의 바이알 B에 붓고 교반하는 단계(단계 4);
 가교제의 미셀 코어 내재화(internalization)를 위해 양친매성 트리블록공중합체의 임계미셀온도 보다 높은 50-70℃로 가열하는 단계(단계 5); 및
 UV를 조사하여 미셀 내부에 봉입된 가교제를 가교하여 sIPN(Semi-Interpenetrating Network) 구조를 형성하는 단계(단계 6);
 를 포함하는 형광 이미징용 표지나노입자의 제조방법.

청구항 14

제13항에 있어서,
 상기 유기형광염료는 프탈로시아닌인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 15

양친매성 트리블록공중합체를 유기용매에 용해하고, 여기에 유기형광염료를 함께 혼합한 용액 A를 준비하는 단

계(단계 1);

상기 단계 1의 용액 A에서 유기용매와 정제수가 투석 멤브레인을 통해 빠져나오고 들어가는 평형과정을 통해 양친매성 트리블록공중합체 중심에 유기형광염료가 내재된 수용액 B를 준비하는 단계(단계 2);

가교제를 유기용매에 용해시킨 다음, 유기용매를 증발시켜 가교제 필름을 밑바닥에 형성시킨 바이알 B를 준비하는 단계(단계 3);

단계 2에서 준비한 수용액 B를 단계 3의 바이알 B에 붓고 교반하는 단계(단계 4);

가교제의 미셀 코어 내재화(internalization)를 위해 양친매성 트리블록공중합체의 임계미셀온도 보다 높은 50-70℃로 가열하는 단계(단계 5); 및

UV를 조사하여 미셀 내부에 봉입된 가교제를 가교하여 sIPN(Semi-Interpenetrating Network) 구조를 형성하는 단계(단계 6);

를 포함하는 형광 이미징용 표지 나노입자의 제조방법.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 유기형광염료는 프탈로시아닌인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 17

양친매성 트리블록공중합체와 유기형광염료를 고체상태에서 용융하여 혼합한 다음 밑바닥에 형성시킨 바이알 A를 준비하는 단계(단계 1);

상기 단계 1의 바이알 A에 가교제를 혼합하여 바이알 B를 준비하는 단계(단계 2);

상기 단계 2의 바이알 B에 정제수를 붓고, 초음파 처리하고 교반한 다음, 실린지 필터로 여과하는 단계(단계 3);

가교제의 미셀 코어 내재화(internalization)를 위해 양친매성 트리블록공중합체의 임계미셀온도 보다 높은 50-70℃로 가열하는 단계(단계 4); 및

UV를 조사하여 미셀 내부에 봉입된 가교제를 가교하여 sIPN(Semi-Interpenetrating Network) 구조를 형성하는 단계(단계 5);

를 포함하는 형광 이미징용 표지 나노입자의 제조방법.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 유기형광염료는 프탈로시아닌인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 19

제9항, 제11항, 제13항, 제15항 또는 17항에 있어서,

상기 가교제의 함량은 양친매성 트리블록공중합체 100 중량부 대비 2.3-3.0 중량부인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 20

제9항, 제11항, 제13항, 제15항 또는 17항에 있어서,
상기 UV 조사 시간은 4-8분인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 21

제9항, 제11항, 제13항, 제15항 또는 17항에 있어서,
상기 형광 프로브의 함량은 양친매성 트리블록공중합체 100 중량부 대비 0.12 중량부 이하인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 22

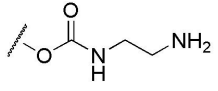
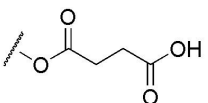
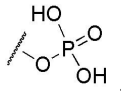
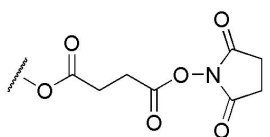
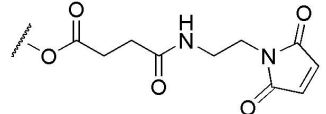
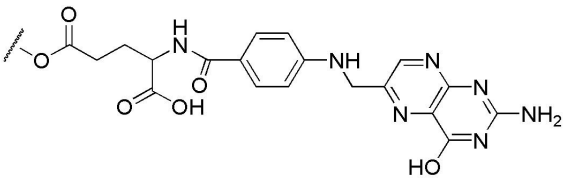
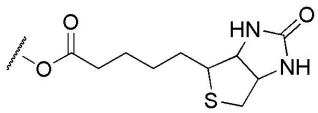
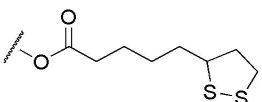
제9항, 제11항, 제13항, 제15항 또는 17항에 있어서,
UV 조사 직전 단계에서 준비한 미셀 용액의 용량은 8-12 mL, 1-2 mL 또는 100 mL인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 23

제9항, 제11항, 제13항, 제15항 또는 17항에 있어서,
상기 단계 1의 양친매성 트리블록공중합체는 PEO-block-PPO-block-PEO 구조인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 24

제23항에 있어서,

상기 양친매성 트리블록공중합체의 양말단 하이드록시기는 $-SH$, $-SO_3H$, , , , , , , , , 또는  으로 개질되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 25

제24항에 있어서,

상기 양말단이 개질되지 않은 양친매성 트리블록공중합체 및 1종 이상의 양말단이 개질된 양친매성 트리블록공중합체의 혼합 개체비율은 0-100:100-0인 것을 특징으로 하는 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 sIPN 구조가 코어에 형성된 미셀에 형광염료를 담지한 표지나노입자의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 대부분의 유기형광염료들은 열악한 수성 용해성을 가지고 있고, 이는 임상시험 등을 성공적으로 통과하기 위한 새로운 유기형광염료가 해결해야 할 필수불가결한 물성이다. 환자 혹은 생물시료에 대한 형광염료의 사용성을 향상시키기 위하여 유기합성 방법의 기능기 도입 외에도 수용성을 확보하기 위한 여러가지 시도들이 소수성 유기형광염료들을 용해시키는 데에 있어서 사용되어 왔다. 그러한 시도들 중의 몇 가지 방법은 밀링(milling), 사이클로텍스트린과의 복합체형성(complexation), 염의 형성, 및 계면활성제 또는 고분자소재 미셀들(polymeric micelles)을 사용하는 분산(dispersion) 등이다. 이러한 방법들은 각각 장점 및 단점들을 가지고 있으며, 따라서 유기형광염료를 수용성 환경에서 사용하기 위한 향상된 접근 방법들이 매우 요구되고 있는 실정이다.

[0005] 고분자소재 미셀들은 양친매성(amphiphilic) 블록 또는 그래프트 공중합체들(copolymers)이 자기조립(self-assembly)하여 형성한다. 고분자 미셀들은 콜로이드성 약물 전달 시스템에 이용되어 주목받아 왔다. 이러한 콜로이드 시스템에서, 공중합체의 소수성 블록은 소수성 카고 분자(hydrophobic cargo molecules) 담지를 위한 "마이크로 혹은 나노 컨테이너(micro-/ nanocontainer)"를 형성하는 중심부(core)를 형성한다. 상기 미셀들의 친수성 부분은 외부의 수성 환경과 중심부 사이의 계면(interface)을 안정화시키는 바깥 껍질(outer shell)을 형성한다. 계면활성제 기반 미셀 시스템들과 비교할 때에, 고분자 기반 미셀들은 낮은 임계 미셀 농도(critical micelle concentration, CMC) 및 감소된 독성(reduced toxicity)과 같은 장점들을 가진다. 이러한 장점들에도 불구하고, 현재까지 미셀 시스템은 생분해성, 생체적합성 (biocompatibility), 캡슐화 효율 (encapsulation efficiency), 안정성, 그 제형들의 임상적 부작용, 및 알려진 미셀적 제형의 제조와 관련한 어려움 및 비용으로 인하여 다소 제한적으로 약물전달 등에 응용되어 왔다. 따라서, 고분자소재 미셀 약물전달 시스템의 장점을 포함하는 동시에 향상된 생체적합성을 가지고 또한 제조가 보다 용이하고 비용이 덜 드는 새로운 미셀 시스템 개발이 절실하다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 생체적합성이 확보된 고분자 미셀의 중심부에 소수성 유기형광염료 및 가교제를 함유하도록 다양한 방법으로 용액을 제조한 후에, UV 조사 및 온도 상승을 통해 미셀 중심부를 반상호침투 구조화(semi-interpenetrating network, sIPN)하여 얻은 나노입자가 다양한 소수성 유기형광염료를 중심부에 담지 가능하고, 미셀 중심부에 sIPN 구조가 형성됨에 따라서 나노구조의 안정성이 현저히 향상되는 효과가 있으며, 세포 및 생체이미징이 다양한 파장에서 가능하고, 특히 체내 순환시간이 향상되며, BBB(blood brain barrier)를 통과할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 공개특허공보 10-2013-7025324호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 sIPN(Semi-Interpenetrating Network) 구조가 중심부에 형성된 형광 이미징용 표지나노입자를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 상기 형광 이미징용 표지나노입자의 제조방법 1-5를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위하여,

[0015] 본 발명은 미셀을 형성하는 양친매성 트리블록공중합체;

[0016] 미셀 코어에 봉입되는 유기형광염료; 및

[0017] 미셀 코어에 봉입되어 sIPN(Semi-Interpenetrating Network) 구조를 형성하는 가교제;

[0018] 를 포함하는 sIPN(Semi-Interpenetrating Network) 구조가 코어에 형성된 형광 이미징용 표지나노입자를 제공한다.

[0019] 여기서, 상기 양친매성 트리블록공중합체는 PEO-block-PP0-block-PEO 구조인 것을 사용할 수 있다. 이때, 상기 양친매성 트리블록공중합체의 양말단은 하이드록시기로 구성되어 있고, 이를 다양한 작용기로 개질하여 사용할 수 있다. 또한, 양말단이 개질되지 않은 양친매성 트리블록공중합체 및 1종 이상의 양말단이 개질된 양친매성 트리블록공중합체를 사용 목적에 적합한 혼합비율로 사용할 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명은 양친매성 트리블록공중합체를 정제수에 용해하여 중합체 용액을 준비하는 단계(단계 1);

[0022] 유기형광염료를 유기 용매에 용해하여 염료 용액을 준비하는 단계(단계 2);

[0023] 가교제를 유기용매에 용해하여 가교제 용액을 준비한 다음, 여기에 상기 단계 2에서 준비한 염료 용액을 첨가하고, 유기용매를 증발시켜 바이알 밑바닥에 가교제-염료 필름을 형성하는 단계(단계 3);

[0024] 상기 단계 3의 바이알에 상기 단계 1에서 준비한 중합체 용액을 첨가하여 미셀 용액을 준비하는 단계(단계 4);

[0025] 가교제의 미셀 코어 내재화(internalization)를 위해 양친매성 트리블록공중합체의 임계미셀온도 보다 높은 50-70℃로 가열하는 단계(단계 5); 및

[0026] UV를 조사하여 미셀 내부에 봉입된 가교제를 가교하여 sIPN(Semi-Interpenetrating Network) 구조를 형성하는 단계(단계 6);

[0027] 를 포함하는 형광 이미징용 표지나노입자의 제조방법을 제공한다.

[0029] 나아가, 본 발명은 유기형광염료를 유기용매에 용해하고, 용매를 모두 증발시킨 바이알 A를 준비하는 단계(단계 1);

[0030] 가교제를 유기용매에 용해하고, 용매를 모두 증발시킨 바이알 B를 준비하는 단계(단계 2);

[0031] 양친매성 트리블록공중합체를 정제수에 용해하여 중합체 용액을 준비하는 단계(단계 3);

[0032] 상기 단계 3에서 준비한 중합체 용액을 단계 1의 바이알 A에 붓고 혼합하는 단계(단계 4);

[0033] 상기 단계 4에서 준비한 용액을 단계 2에서 준비한 바이알 B에 붓는 단계(단계 5);

[0034] 가교제의 미셀 코어 내재화(internalization)를 위해 양친매성 트리블록공중합체의 임계미셀온도 보다 높은 50-70℃로 가열하는 단계(단계 6); 및

[0035] UV를 조사하여 미셀 내부에 봉입된 가교제를 가교하여 sIPN(Semi-Interpenetrating Network) 구조를 형성하는 단계(단계 7);

- [0036] 를 포함하는 형광 이미징용 표지나노입자의 제조방법을 제공한다.
- [0038] 또한, 본 발명은 양친매성 트리블록공중합체를 유기용매에 용해하고, 여기에 유기형광염료를 혼합한 다음 유기용매를 증발시켜, 중합체-염료 필름을 밑바닥에 형성시킨 바이알 A를 준비하는 단계(단계 1);
- [0039] 상기 단계 1의 바이알 A에 정제수를 붓고, 초음파 처리하고 교반한 다음, 실린지 필터로 여과하는 단계(단계 2);
- [0040] 가교제를 유기용매에 용해시킨 다음, 유기용매를 증발시켜 가교제 필름을 밑바닥에 형성시킨 바이알 B를 준비하는 단계(단계 3);
- [0041] 단계 2에서 준비한 용액을 단계 3의 바이알 B에 붓고 교반하는 단계(단계 4);
- [0042] 가교제의 미셀 코어 내재화(internalization)를 위해 양친매성 트리블록공중합체의 임계미셀온도 보다 높은 50-70℃로 가열하는 단계(단계 5); 및
- [0043] UV를 조사하여 미셀 내부에 봉입된 가교제를 가교하여 sIPN(Semi-Interpenetrating Network) 구조를 형성하는 단계(단계 6);
- [0044] 를 포함하는 형광 이미징용 표지나노입자의 제조방법을 제공한다.
- [0046] 나아가, 본 발명은 양친매성 트리블록공중합체를 유기용매에 용해하고, 여기에 유기형광염료를 함께 혼합한 용액 A를 준비하는 단계(단계 1);
- [0047] 상기 단계 1의 용액 A에서 유기용매와 정제수가 투석 멤브레인을 통해 빠져나오고 들어가는 평형과정을 통해 양친매성 트리블록공중합체 중심에 유기형광염료가 내재된 수용액 B를 준비하는 단계(단계 2);
- [0048] 가교제를 유기용매에 용해시킨 다음, 유기용매를 증발시켜 가교제 필름을 밑바닥에 형성시킨 바이알 B를 준비하는 단계(단계 3);
- [0049] 단계 2에서 준비한 수용액 B를 단계 3의 바이알 B에 붓고 교반하는 단계(단계 4);
- [0050] 가교제의 미셀 코어 내재화(internalization)를 위해 양친매성 트리블록공중합체의 임계미셀온도 보다 높은 50-70℃로 가열하는 단계(단계 5); 및
- [0051] UV를 조사하여 미셀 내부에 봉입된 가교제를 가교하여 sIPN(Semi-Interpenetrating Network) 구조를 형성하는 단계(단계 6);
- [0052] 를 포함하는 형광 이미징용 표지 나노입자의 제조방법을 제공한다.
- [0054] 마지막으로, 본 발명은 양친매성 트리블록공중합체와 유기형광염료를 고체상태에서 용융하여 혼합한 다음 밑바닥에 형성시킨 바이알 A를 준비하는 단계(단계 1);
- [0055] 상기 단계 1의 바이알 A에 가교제를 혼합하여 바이알 B를 준비하는 단계(단계 2);
- [0056] 상기 단계 2의 바이알 B에 정제수를 붓고, 초음파 처리하고 교반한 다음, 실린지 필터로 여과하는 단계(단계 3);
- [0057] 가교제의 미셀 코어 내재화(internalization)를 위해 양친매성 트리블록공중합체의 임계미셀온도 보다 높은 50-70℃로 가열하는 단계(단계 4); 및
- [0058] UV를 조사하여 미셀 내부에 봉입된 가교제를 가교하여 sIPN(Semi-Interpenetrating Network) 구조를 형성하는 단계(단계 5);
- [0059] 를 포함하는 형광 이미징용 표지 나노입자의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0061] 본 발명에 따른 sIPN(Semi-Interpenetrating Network) 구조가 코어에 형성된 형광 이미징용 표지나노입자는 다양한 소수성 유기형광염료를 적용가능하고, 다수의 화학 기능기를 표면에 정밀히 도입할 수 있으며, 미셀 코어에 sIPN 구조가 형성됨에 따라서 미셀의 안정성이 현저히 향상되는 효과가 있으며, 생체이미징시에 종래 염료에 비해 체내 순환시간이 향상되고, BBB(blood brain barrier)를 통과할 수 있어 뇌 진단에도 사용될 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0063] 도 1은 제법 1의 개략도이다.
 도 2는 제법 2의 개략도이다.
 도 3은 제법 3의 개략도이다.
 도 4a - 도 4c는 실시예 1-12에서 사용한 유기형광염료의 화학구조식이다.
 도 5는 임계미셀온도(CMT) 테스트 이후에 실시예 1 및 비교예 1의 흡광(a) 및 형광(b) 스펙트라이다.
 도 6은 가교제(PETA) 함량에 따른 파이렌의 흡광값을 나타낸 그래프이다.
 도 7은 UV 조사 시간에 따른 흡광 세기를 측정한 그래프이다.
 도 8은 반응 온도에 따른 흡광(a) 및 형광(b) 스펙트라이다.
 도 9는 상온 및 CMT 이하의 온도에서 측정한 파이렌 함량의 영향으로서 파이렌 흡광 커브를 나타낸다.
 도 10은 파이렌 함량에 따른 형광 스펙트라이다.
 도 11은 5 mL 바이알에서 0.5, 1, 2 및 3 mL 미셀 용액에 따른 흡광 및 형광을 측정한 스펙트라이다.
 도 12는 20 mL 바이알에서 15, 10 및 5 mL 미셀 용액에 따른 흡광 및 형광을 측정한 스펙트라이다.
 도 13은 실시예 1에서 제조한 F127-py-PETA sIPN 미셀을 PCR 테스트 후에 흡광을 측정한 스펙트라이다.
 도 14는 염기성 환경에서 실시예 1 및 비교예 1에서 제조한 미셀의 흡광 스펙트라이다.
 도 15는 실시예 1 및 비교예 1의 흡광(Abs) 및 형광(Flu) 스펙트라이다.
 도 16은 실시예 8(KIM B)에서 제조한 미셀을 처리한 TC1(폐암 세포)의 공초점 현미경 이미지이다(a-e는 control, 폴리머 농도 0.001%, 0.0005%, 0.0002%, 0.0001%의 미셀이고, f-g는 0.0002% 및 0.0001% 폴리머 농도의 미셀을 처리한 TC1 폐암 세포의 100배 확대 이미지이다).
 도 17은 실시예 12(프탈로시아닌) 및 대조군으로서 ICG를 마우스에 투입한 in vivo 및 ex vivo 형광 이미지이다(도 17a: 실시예 12 (50 μ g) in vivo, 도 17b: ICG (100 μ g) in vivo, 도 17c: ICG (100 μ g) ex vivo, 도 17d: 실시예 12 (50 μ g) ex vivo).
 도 18은 실시예 1-12에서 사용한 유기형광염료의 흡광 스펙트라이다.
 도 19는 실시예 1-12에서 사용한 유기형광염료의 발광 스펙트라이다.
 도 20은 실시예 1-12에서 제조한 미셀 용액을 촬영한 사진이다.
 도 21은 실시예 1에서 제조한 F127-py-PETA sIPN의 DLS 및 TEM 측정 결과이다.
 도 22는 F127 및 F127-PO(OH)₂ 혼합 개체비율(0-100%)을 달리하여 제조한 형광이미징용 표지나노입자 샘플의 전기영동 사진이다(사진에서 '0%'는 F127-PO(OH)₂ 100%이다).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0080] 본 발명에 따른 형광 이미징용 표지나노입자에 있어서, 상기 유기형광염료는 300-900 nm의 자외선-가시광선-적외선 파장 영역에서 광자를 흡수 후 여기되어 다시 발광하는 유기물질이다. 즉, 파이렌, Lumogen[®] F violet 570, 3-티오펜헥실, Lumogen[®] F yellow 083, 2,3-디메틸-5,8-디-티오펜-2-일퀴옥살린 (KIM A), Lumogen[®] F orange 240, 나프토티아디아졸, 4,7-디-티오펜-2-일벤조[1,2,5]티아디아졸 (KIM B), Lumogen[®] red 350, Se-벤조티아디아졸, Nile red, 프탈로시아닌 등을 사용할 수 있고, 이에 제한하지 않는다. 상기 유기형광염료의 화학구조식을 도 4a - 도 4c에 나타내었다.
- [0081] 즉, 유기용매에 용해 가능한 폴리아로마틱 하이드로카본, 티오펜 유도체, 나프탈렌이미드 유도체, 페릴렌 및 터틸렌이미드 유도체, 나프토티아디아졸 유도체, 벤조티아디아졸, 옥사존 유도체, 프탈로시아닌 유도체 등을 형광염료로서 사용할 수 있다.
- [0083] 본 발명에 따른 형광 이미징용 표지나노입자에 있어서, 상기 가교제는 다수의 아크릴, 메타크릴레이트, 비닐 작용기에 자외선, 열, 광개시제의 사용을 통하여 라디칼을 생성함으로써 최종적으로 망상구조 형성이 가능한 시약을 사용할 수 있다. 구체적으로, PET4A (Pentaerythritol tetraacrylate), PET3A (Pentaerythritol triacrylate) 등을 사용할 수 있고, 본 발명에서는 일례로 PET4A를 사용하였다.
- [0084] 여기서, 자외선을 통하여 가교할 경우 UV 조사시간은 4-8분일 수 있고, 광개시제를 추가로 포함할 경우에는 UV 조사 시간을 6분 이하로 할 수 있다.
- [0086] 본 발명에 따른 형광 이미징용 표지나노입자는, 세포 주입을 고려하여 3-100 nm, 바람직하게는 3-50 nm, 더욱 바람직하게는 3-20 nm인 것이 바람직하다. 만약, 100 nm를 초과할 경우 세포사멸 등의 결과를 가져올 수 있다.
- [0088] 본 발명에 따른 형광 이미징용 표지나노입자는 생체 이미징, 세포 이미징, 단분자 이미징 등에 사용할 수 있다.
- [0089] 상기 생체이미징은 본 발명에 따른 표지나노입자를 생체에 주입하여 타겟으로 하는 장기(organ)를 관찰할 수 있다. 이때 표지나노입자는 타겟으로 하는 장기에 따라서 그 구성을 최적화할 수 있다.
- [0090] 상기 세포 이미징은 암세포, 정상세포 또는 줄기세포에 적용할 수 있다. 암세포의 예로는 A549, HeLa, MDA-MB-436, AGS, RKO, SK-MEL-2, SK-MEL-28, SNU8, PC9, HepG2, MDA-MB-231, TC1, HT-29, SH-SY5Y (neuroblastoma), LN-229 (glioblastoma), K563, HL-60 (Leukemia), primary cells: B16(melanoma), THP-1(leukemia), BMDC (bone marrow-derived cells) 등에 사용할 수 있다. 정상세포의 예로는 BEAS-2B, HEK293T 등에 사용할 수 있다. 줄기세포의 예로는 mESC 등에 사용할 수 있다.
- [0092] **제조방법 1**
- [0093] 본 발명은 하기 단계를 포함하는 형광 이미징용 표지나노입자의 제조방법 1을 제공한다. 제조방법 1에 대한 개략도를 도 1에 나타내었다.
- [0094] 양친매성 트리블록공중합체를 정제수에 용해하여 중합체 용액을 준비하는 단계(단계 1);
- [0095] 유기형광염료를 유기 용매에 용해하여 염료 용액을 준비하는 단계(단계 2);
- [0096] 가교제를 유기용매에 용해하여 가교제 용액을 준비한 다음, 여기에 상기 단계 2에서 준비한 염료 용액을 첨가하고, 유기용매를 증발시켜 바이알 밑바닥에 가교제-염료 필름을 형성하는 단계(단계 3);
- [0097] 상기 단계 3의 바이알에 상기 단계 1에서 준비한 중합체 용액을 첨가하여 미셀 용액을 준비하는 단계(단계 4);
- [0098] 가교제의 미셀 코어 내재화(internalization)를 위해 양친매성 트리블록공중합체의 임계미셀온도 보다 높은 50-70℃로 가열하는 단계(단계 5); 및
- [0099] UV를 조사하여 미셀 내부에 봉입된 가교제를 가교하여 sIPN(Semi-Interpenetrating Network) 구조를 형성하는

단계(단계 6).

- [0101] 본 발명에 따른 제조방법 1에 있어서, 상기 단계 1은 양친매성 트리블록공중합체를 정제수에 용해하여 중합체 용액을 준비하는 단계이다. 상기 양친매성 트리블록공중합체의 예는 상술한 바와 같다.
- [0103] 본 발명에 따른 제조방법 1에 있어서, 상기 단계 2는 유기형광염료를 유기 용매에 용해하여 염료 용액을 준비하는 단계이다. 여기서, 상기 유기형광염료의 예는 상술한 바와 같고, 바람직하게는 파이렌, Lumogen F violet 570, 2,3-디메틸-5,8-디-티오펜-2-일퀴옥살린 (KIM A), 4,7-디-티오펜-2-일벤조[1,2,5]티아디아졸 (KIM B), 또는 Nile red를 사용할 수 있다. 상기 유기용매로는 아세톤, 클로로포름, 디클로로메탄, 테트라클로로카본, 헥산, 톨루엔, 에틸아세테이트, 디에틸에테르, N,N-디메틸포름아미드, 디메틸술폰사이드, 테트라하이드로퓨란 등을 사용할 수 있다.
- [0104] 상기 유기형광염료의 함량은 양친매성 트리블록공중합체 100 중량부 대비 0.12 중량부 이하, 바람직하게는 0.08-0.12 중량부로 사용할 수 있다. 만약, 0.12 중량부 초과할 경우 가교제 함유량이 적어져 안정성이 저하되거나 형광염료가 응집(aggregation)되어 광학적 성질이 저하되는 문제가 있을 수 있다.
- [0106] 본 발명에 따른 제조방법 1에 있어서, 상기 단계 3은 가교제를 유기용매에 용해하여 가교제 용액을 준비한 다음, 여기에 상기 단계 2에서 준비한 염료 용액을 첨가하고, 유기용매를 증발시켜 20 ml 바이알 밑바닥에 가교제-염료 필름을 형성하는 단계이다. 여기서, 가교제의 예는 상술한 바와 같고, 유기용매로는 아세톤, 클로로포름, 디클로로메탄, 테트라클로로카본, 헥산, 톨루엔, 에틸아세테이트, 디에틸에테르, N,N-디메틸포름아미드, 디메틸술폰사이드, 테트라하이드로퓨란 등을 사용할 수 있다. 상기 가교제의 함량은 트리블록공중합체 100 중량부 대비 2.3-3.0 중량부 사용하는 것이 바람직하다. 만약, 2.3 중량부 미만일 경우 미셀의 안정성이 유지되지 못하는 문제가 있을 수 있고, 3.0 중량부 초과할 경우 미셀 코어가 오그라지는 현상으로 인해 염료의 로딩 함량이 감소하는 문제가 있을 수 있다.
- [0108] 본 발명에 따른 제조방법 1에 있어서, 상기 단계 4는 상기 단계 3의 20 ml 바이알에 상기 단계 1에서 준비한 중합체 용액을 첨가하여 미셀 용액을 준비하는 단계이다. 여기서, 단계 4에서 준비한 UV 조사하기 전의 미셀 용액의 함량은 8-12 mL가 바람직하다. 만약, 8 mL 미만일 경우 임계미셀온도 이하에서 미셀의 안정성이 저하되는 문제가 있을 수 있고, 12 mL 초과할 경우 로딩이 원활하지 않은 문제가 있을 수 있다. 보다 적은 양의 제조에는 4 ml 바이알을 이용하여 1-2 ml 용액을 제조하며, 보다 많은 양의 제조에는 250 ml 이상의 초차를 이용하여 약 40-50%의 용액 부피를 제조할 수 있다.
- [0110] 본 발명에 따른 제조방법 1에 있어서, 상기 단계 5는 가교제의 미셀 코어 내재화(internalization)를 위해 양친매성 트리블록공중합체의 임계미셀온도(Critical Micelle Temperature, CMT) 보다 높은 50-70℃로 가열하는 단계이다. 여기서, UV 조사 전에 단계 4에서 준비한 미셀 용액의 온도가 50℃ 미만일 경우 가교제의 라디칼 중합이 효과적으로 일어나지 못하는 문제가 있을 수 있고, 70℃ 초과할 경우 용액 내의 미셀들이 높은 온도에 의해 안정하지 않은 문제가 있을 수 있다.
- [0112] 본 발명에 따른 제조방법 1에 있어서, 상기 단계 6은 UV를 조사하여 미셀 내부에 봉입된 가교제를 가교하여 sIPN(Semi-Interpenetrating Network) 구조를 형성하는 단계이다. 여기서, UV 조사는 1-3 W/cm² 세기로 4-8분, 바람직하게는 5-7분, 특히 바람직하게는 6분 동안 조사할 수 있다. 만약, UV 조사 시간이 4분 미만일 경우 미셀 코어에 sIPN 구조 형성이 완전하지 않아 미셀의 안정성이 저하되는 문제가 있을 수 있고, 8분 초과일 경우 유기형광염료의 광퇴색이 발생하는 문제가 있을 수 있다. UV 조사 4분 미만의 제조법이 필요한 특수한 경우에는 광개시제 (벤조페논 등)를 사용하여 단축할 수 있다.

[0114] **제조방법 2**

- [0115] 본 발명은 하기 단계를 포함하는 형광 이미징용 표지나노입자의 제조방법 2를 제공한다. 제조방법 2에 대한 개략도를 도 2에 나타내었다.
- [0116] 유기형광염료를 유기용매에 용해하고, 용매를 모두 증발시킨 바이알 A를 준비하는 단계(단계 1);
- [0117] 가교제를 유기용매에 용해하고, 용매를 모두 증발시킨 바이알 B를 준비하는 단계(단계 2);
- [0118] 양친매성 트리블록공중합체를 정제수에 용해하여 중합체 용액을 준비하는 단계(단계 3);
- [0119] 상기 단계 3에서 준비한 중합체 용액을 단계 1의 바이알 A에 붓고 혼합하는 단계(단계 4);
- [0120] 상기 단계 4에서 준비한 용액을 단계 2에서 준비한 바이알 B에 붓는 단계(단계 5);
- [0121] 가교제의 미셀 코어 내재화(internalization)를 위해 양친매성 트리블록공중합체의 임계미셀온도 보다 높은 50-70℃로 가열하는 단계(단계 6); 및
- [0122] UV를 조사하여 미셀 내부에 봉입된 가교제를 가교하여 sIPN(Semi-Interpenetrating Network) 구조를 형성하는 단계(단계 7).
- [0124] 본 발명에 따른 제조방법 2에 있어서, 상기 단계 1은 유기형광염료를 유기용매에 용해하고, 용매를 모두 증발시킨 바이알 A를 준비하는 단계이다. 여기서, 상기 유기형광염료의 예는 상술한 바와 같고, 바람직하게는 상기 유기형광염료는 3-티오펜헥실, Lumogen F yellow 083, Lumogen F orange 240, 나프토티아디아졸, Lumogen red 350, 또는 Se-벤조티아디아졸을 사용할 수 있다. 상기 유기용매로는 아세톤, 클로로포름, 디클로로메탄, 테트라클로로카본, 헥산, 톨루엔, 에틸아세테이트, 디에틸에테르, N,N-디메틸포름아미드, 디메틸술폰, 테트라하이드로퓨란 등을 사용할 수 있다.
- [0125] 상기 유기형광염료의 함량은 양친매성 트리블록공중합체 100 중량부 대비 0.12 중량부 이하, 바람직하게는 0.08-0.12 중량부로 사용할 수 있다. 만약, 0.12 중량부 초과할 경우 가교제 함유량이 적어져 안정성이 저하되거나 형광염료가 응집(aggregation) 되어 광학적 성질이 저하되는 문제가 있을 수 있다.
- [0127] 본 발명에 따른 제조방법 2에 있어서, 상기 단계 2는 가교제를 유기용매에 용해하고, 용매를 모두 증발시킨 바이알 B를 준비하는 단계이다. 여기서, 가교제의 예는 상술한 바와 같고, 유기용매로는 아세톤, 클로로포름, 디클로로메탄, 테트라클로로카본, 헥산, 톨루엔, 에틸아세테이트, 디에틸에테르, N,N-디메틸포름아미드, 디메틸술폰, 테트라하이드로퓨란 등을 사용할 수 있다. 상기 가교제의 함량은 양친매성 트리블록공중합체 100 중량부 대비 2.3-3.0 중량부 사용하는 것이 바람직하다. 만약, 2.3 중량부 미만일 경우 미셀의 안정성이 유지되지 못하는 문제가 있을 수 있고, 3.0 중량부 초과할 경우 미셀 코어가 오그라지는 현상으로 인해 염료의 로딩 함량이 감소하는 문제가 있을 수 있다.
- [0129] 본 발명에 따른 제조방법 2에 있어서, 상기 단계 3은 양친매성 트리블록공중합체를 정제수에 용해하여 중합체 용액을 준비하는 단계이다. 상기 양친매성 트리블록공중합체의 예는 상술한 바와 같다.
- [0131] 본 발명에 따른 제조방법 2에 있어서, 상기 단계 4는 상기 단계 3에서 준비한 중합체 용액을 단계 1의 바이알 A에 붓고 혼합하는 단계이다.
- [0133] 본 발명에 따른 제조방법 2에 있어서, 상기 단계 5는 상기 단계 4에서 준비한 용액을 단계 2에서 준비한 바이알 B에 붓는 단계이다. 여기서, 단계 5에서 준비한 UV 조사하기 전의 미셀 용액의 함량은 8-12 mL가 바람직하다. 만약, 8 mL 미만일 경우 임계미셀온도 이하에서 미셀의 안정성이 저하되는 문제가 있을 수 있고, 12 mL 초과할 경우 로딩이 원활하지 않은 문제가 있을 수 있다. 보다 적은 양의 제조에는 4 mL 바이알을 이용하여 1-2 mL 용액을 제조하며, 보다 많은 양의 제조에는 250 mL 이상의 초자를 이용하여 약 40-50%의 용액 부피를 제조할 수

있다.

- [0135] 본 발명에 따른 제조방법 2에 있어서, 상기 단계 6은 제조방법 1의 단계 5와 동일하고, 상기 단계 7은 제조방법 1의 단계 6과 동일하다.
- [0137] **제조방법 3**
- [0138] 본 발명은 하기 단계를 포함하는 형광 이미징용 표지나노입자의 제조방법 3을 제공한다. 제조방법 3에 대한 개략도를 도 3에 나타내었다.
- [0139] 양친매성 트리블록공중합체를 유기용매에 용해하고, 여기에 유기형광염료를 혼합한 다음 유기용매를 증발시켜, 중합체-염료 필름을 밀바닥에 형성시킨 바이알 A를 준비하는 단계(단계 1);
- [0140] 상기 단계 1의 바이알 A에 정제수를 붓고, 초음파 처리하고 교반한 다음, 실린지 필터로 여과하는 단계(단계 2);
- [0141] 가교제를 유기용매에 용해시킨 다음, 유기용매를 증발시켜 가교제 필름을 밀바닥에 형성시킨 바이알 B를 준비하는 단계(단계 3);
- [0142] 단계 2에서 준비한 용액을 단계 3의 바이알 B에 붓고 교반하는 단계(단계 4);
- [0143] 가교제의 미셀 코어 내재화(internalization)를 위해 양친매성 트리블록공중합체의 임계미셀온도 보다 높은 50-70℃로 가열하는 단계(단계 5); 및
- [0144] UV를 조사하여 미셀 내부에 봉입된 가교제를 가교하여 sIPN(Semi-Interpenetrating Network) 구조를 형성하는 단계(단계 6).
- [0146] 본 발명에 따른 제조방법 3에 있어서, 상기 단계 1은 양친매성 트리블록공중합체를 유기용매에 용해하고, 여기에 유기형광염료를 혼합한 다음 유기용매를 증발시켜, 중합체-염료 필름을 밀바닥에 형성시킨 바이알 A를 준비하는 단계이다. 상기 양친매성 트리블록공중합체의 예는 상술한 바와 같다. 상기 유기형광염료의 예는 상술한 바와 같고, 바람직하게는 프탈로시아닌을 사용할 수 있다. 상기 유기용매로는 아세톤, 클로로포름, 디클로로메탄, 테트라클로로카본, 헥산, 톨루엔, 에틸아세테이트, 디에틸에테르, N,N-디메틸포름아미드, 디메틸술폰사이드, 테트라하이드로퓨란 등을 사용할 수 있다.
- [0147] 상기 유기형광염료의 함량은 양친매성 트리블록공중합체 100 중량부 대비 0.12 중량부 이하, 바람직하게는 0.08-0.12 중량부로 사용할 수 있다. 만약, 0.12 중량부 초과할 경우 가교제 함유량이 적어져 안정성이 저하되거나 형광염료가 응집(aggregation) 되어 광학적 성질이 저하되는 문제가 있을 수 있다.
- [0149] 본 발명에 따른 제조방법 3에 있어서, 상기 단계 2는 상기 단계 1의 바이알 A에 정제수를 붓고, 초음파 처리하고 교반한 다음, 실린지 필터로 여과하는 단계이다. 여기서 상기 실린지 필터는 0.2-0.5 μ m를 사용할 수 있다.
- [0151] 본 발명에 따른 제조방법 3에 있어서, 상기 단계 3은 가교제를 유기용매에 용해시킨 다음, 유기용매를 증발시켜 가교제 필름을 밀바닥에 형성시킨 바이알 B를 준비하는 단계이다. 여기서, 가교제의 예는 상술한 바와 같고, 유기용매로는 아세톤, 클로로포름, 디클로로메탄, 테트라클로로카본, 헥산, 톨루엔, 에틸아세테이트, 디에틸에테르, N,N-디메틸포름아미드, 디메틸술폰사이드, 테트라하이드로퓨란 등을 사용할 수 있다. 상기 가교제의 함량은 양친매성 트리블록공중합체 100 중량부 대비 2.3-3.0 중량부 사용하는 것이 바람직하다. 만약, 2.3 중량부 미만일 경우 미셀의 안정성이 유지되지 못하는 문제가 있을 수 있고, 3.0 중량부 초과할 경우 미셀 코어가 오그라지는 현상으로 인해 염료의 로딩 함량이 감소하는 문제가 있을 수 있다.
- [0153] 본 발명에 따른 제조방법 3에 있어서, 상기 단계 4는 단계 2에서 준비한 용액을 단계 3의 바이알 B에 붓고 교반

하는 단계이다.

- [0155] 본 발명에 따른 제조방법 3에 있어서, 상기 단계 5는 제조방법 1의 단계 5와 동일하고, 상기 단계 6은 제조방법 1의 단계 6과 동일하다.
- [0157] 본 발명에 따른 sIPN(Semi-Interpenetrating Network) 구조가 코어에 형성된 형광 이미징용 표지나노입자는 다양한 소수성 유기형광염료를 적용가능하고, 미셀 코어에 sIPN 구조가 형성됨에 따라서 미셀의 안정성이 현저히 향상되는 효과가 있으며, 생체이미징시에 종래 염료에 비해 체내 순환시간이 향상되고, BBB(blood brain barrier)를 통과할 수 있어 뇌 진단에도 사용될 수 있는 효과가 있다.
- [0159] **제조방법 4**
- [0160] 본 발명은 하기 단계를 포함하는 형광 이미징용 표지나노입자의 제조방법 4를 제공한다.
- [0161] 양친매성 트리블록공중합체를 유기용매에 용해하고, 여기에 유기형광염료를 함께 혼합한 용액 A를 준비하는 단계(단계 1);
- [0162] 상기 단계 1의 용액 A에서 유기용매와 정제수가 투석 멤브레인을 통해 빠져나오고 들어가는 평형과정을 통해 양친매성 트리블록공중합체 중심에 유기형광염료가 내재된 수용액 B를 준비하는 단계(단계 2);
- [0163] 가교제를 유기용매에 용해시킨 다음, 유기용매를 증발시켜 가교제 필름을 밑바닥에 형성시킨 바이알 B를 준비하는 단계(단계 3);
- [0164] 단계 2에서 준비한 수용액 B를 단계 3의 바이알 B에 붓고 교반하는 단계(단계 4);
- [0165] 가교제의 미셀 코어 내재화(internalization)를 위해 양친매성 트리블록공중합체의 임계미셀온도 보다 높은 50-70℃로 가열하는 단계(단계 5); 및
- [0166] UV를 조사하여 미셀 내부에 봉입된 가교제를 가교하여 sIPN(Semi-Interpenetrating Network) 구조를 형성하는 단계(단계 6).
- [0168] 본 발명에 따른 제조방법 4에 있어서, 상기 단계 1은 양친매성 트리블록공중합체를 유기용매에 용해하고, 여기에 유기형광염료를 함께 혼합한 용액 A를 준비하는 단계이다. 상기 양친매성 트리블록공중합체의 예는 상술한 바와 같다. 상기 유기형광염료의 예는 상술한 바와 같고, 바람직하게는 프탈로시아닌을 사용할 수 있다. 상기 유기용매로는 아세톤, 클로로포름, 디클로로메탄, 테트라클로로카본, 헥산, 톨루엔, 에틸아세테이트, 디에틸에테르, N,N-디메틸포름아미드, 디메틸술폰사이드, 테트라하이드로퓨란 등을 사용할 수 있다.
- [0169] 상기 유기형광염료의 함량은 양친매성 트리블록공중합체 100 중량부 대비 0.12 중량부 이하, 바람직하게는 0.08-0.12 중량부로 사용할 수 있다. 만약, 0.12 중량부 초과할 경우 가교제 함유량이 적어져 안정성이 저하되거나 형광염료가 응집(aggregation) 되어 광학적 성질이 저하되는 문제가 있을 수 있다.
- [0171] 본 발명에 따른 제조방법 4에 있어서, 상기 단계 2는 상기 단계 1의 용액 A에서 유기용매와 정제수가 투석 멤브레인을 통해 빠져나오고 들어가는 평형과정을 통해 양친매성 트리블록공중합체 중심에 유기형광염료가 내재된 수용액 B를 준비하는 단계이다. 구체적으로, 단계 1의 용액 A를 투석 멤브레인이 구비된 용기의 한쪽에 붓고, 투석 멤브레인의 반대쪽에 정제수를 부어, 용액 A의 유기용매와 정제수가 서로 평형과정이 일어나도록 유도하여 수용액 B를 준비할 수 있다.
- [0173] 본 발명에 따른 제조방법 4에 있어서, 상기 단계 3은 가교제를 유기용매에 용해시킨 다음, 유기용매를 증발시켜 가교제 필름을 밑바닥에 형성시킨 바이알 B를 준비하는 단계이다. 여기서, 가교제의 예는 상술한 바와 같고, 유기용매로는 아세톤, 클로로포름, 디클로로메탄, 테트라클로로카본, 헥산, 톨루엔, 에틸아세테이트, 디에틸에테

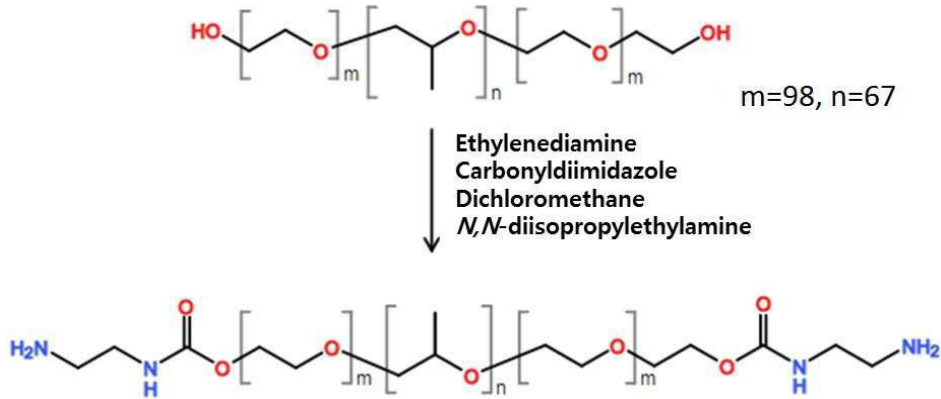
르, N,N-디메틸포름아미드, 디메틸술폰사이드, 테트라하이드로퓨란 등을 사용할 수 있다. 상기 가교제의 함량은 양친매성 트리블록공중합체 100 중량부 대비 2.3-3.0 중량부 사용하는 것이 바람직하다. 만약, 2.3 중량부 미만일 경우 미셀의 안정성이 유지되지 못하는 문제가 있을 수 있고, 3.0 중량부 초과할 경우 미셀 코어가 오그라지는 현상으로 인해 염료의 로딩 함량이 감소하는 문제가 있을 수 있다.

- [0175] 본 발명에 따른 제조방법 4에 있어서, 상기 단계 4는 단계 2에서 준비한 수용액 B를 단계 3의 바이알 B에 붓고 교반하는 단계이다.
- [0177] 본 발명에 따른 제조방법 4에 있어서, 상기 단계 5는 제조방법 1의 단계 5와 동일하고, 상기 단계 6은 제조방법 1의 단계 6과 동일하다.
- [0179] **제조방법 5**
- [0180] 본 발명은 하기 단계를 포함하는 형광 이미징용 표지나노입자의 제조방법 5를 제공한다.
- [0181] 양친매성 트리블록공중합체와 유기형광염료를 고체상태에서 용융하여 혼합한 다음 밀바닥에 형성시킨 바이알 A를 준비하는 단계(단계 1);
- [0182] 상기 단계 1의 바이알 A에 가교제를 혼합하여 바이알 B를 준비하는 단계(단계 2);
- [0183] 상기 단계 2의 바이알 B에 정제수를 붓고, 초음파 처리하고 교반한 다음, 실린지 필터로 여과하는 단계(단계 3);
- [0184] 가교제의 미셀 코어 내재화(internalization)를 위해 양친매성 트리블록공중합체의 임계미셀온도 보다 높은 50-70℃로 가열하는 단계(단계 4); 및
- [0185] UV를 조사하여 미셀 내부에 봉입된 가교제를 가교하여 sIPN(Semi-Interpenetrating Network) 구조를 형성하는 단계(단계 5).
- [0187] 본 발명에 따른 제조방법 5에 있어서, 상기 단계 1은 양친매성 트리블록공중합체와 유기형광염료를 고체상태에서 용융하여 혼합한 다음 밀바닥에 형성시킨 바이알 A를 준비하는 단계이다. 상기 양친매성 트리블록공중합체의 예는 상술한 바와 같다. 상기 유기형광염료의 예는 상술한 바와 같고, 바람직하게는 프탈로시아닌을 사용할 수 있다.
- [0188] 상기 유기형광염료의 함량은 양친매성 트리블록공중합체 100 중량부 대비 0.12 중량부 이하, 바람직하게는 0.08-0.12 중량부로 사용할 수 있다. 만약, 0.12 중량부 초과할 경우 가교제 함유량이 적어져 안정성이 저하되거나 형광염료가 응집(agggregation) 되어 광학적 성질이 저하되는 문제가 있을 수 있다.
- [0190] 본 발명에 따른 제조방법 5에 있어서, 상기 단계 2는 상기 단계 1의 바이알 A에 가교제를 혼합하여 바이알 B를 준비하는 단계이다. 여기서, 가교제의 예는 상술한 바와 같다. 상기 가교제의 함량은 양친매성 트리블록공중합체 100 중량부 대비 2.3-3.0 중량부 사용하는 것이 바람직하다. 만약, 2.3 중량부 미만일 경우 미셀의 안정성이 유지되지 못하는 문제가 있을 수 있고, 3.0 중량부 초과할 경우 미셀 코어가 오그라지는 현상으로 인해 염료의 로딩 함량이 감소하는 문제가 있을 수 있다.
- [0192] 본 발명에 따른 제조방법 5에 있어서, 상기 단계 3은 상기 단계 2의 바이알 B에 정제수를 붓고, 초음파 처리하고 교반한 다음, 실린지 필터로 여과하는 단계이다. 여기서 상기 실린지 필터는 0.2-0.5 μ m를 사용할 수 있다.
- [0194] 본 발명에 따른 제조방법 5에 있어서, 상기 단계 4는 제조방법 1의 단계 5와 동일하고, 상기 단계 5는 제조방법 1의 단계 6과 동일하다.

[0196] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0198] <제조예 1> 'F127' 양말단 하이드록시기의 아민 개질 (F127-NH₂)

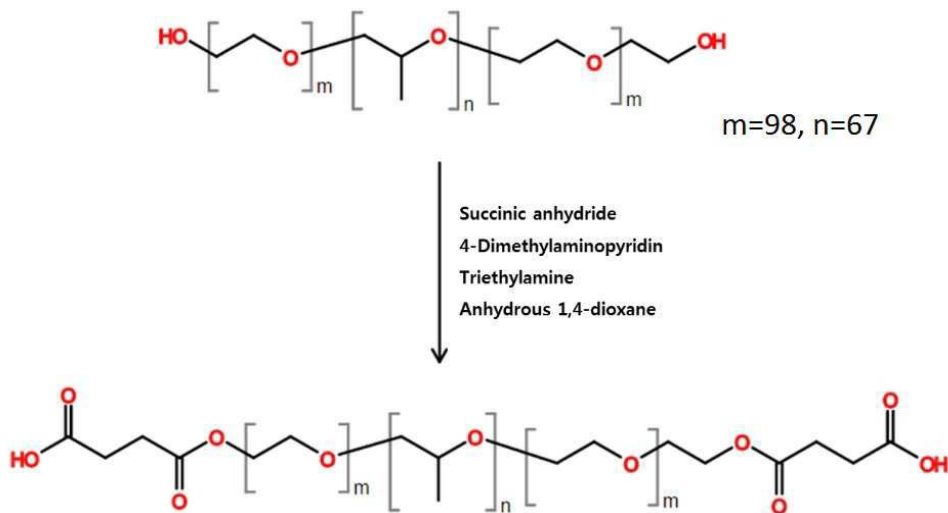
[0199] 참조문헌(*Chem. Commun.* **2010**, *46* (27), 4935-4937)에 공지되어 있는 하기 방법을 이용하여, 플루로닉 F127 (EO₉₈PO₆₇EO₉₈, MW=12600)의 양말단 하이드록시기를 아민기로 개질하였다.



[0200]

[0202] <제조예 2> 'F127' 양말단 하이드록시기의 카르복실산 개질 (F127-COOH)

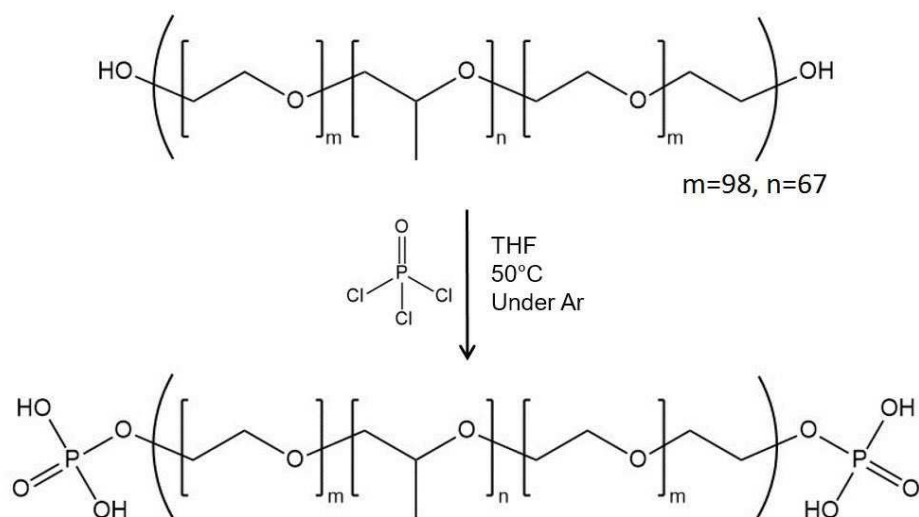
[0203] 참조문헌(*J Nanomedic Nanotechnol*, **2011** 2 (114) 2157-7439)에 공지되어 있는 하기 방법을 이용하여, 플루로닉 F127 (EO₉₈PO₆₇EO₉₈, MW=12600)의 양말단 하이드록시기를 카르복실산기로 개질하였다.



[0204]

[0206] <제조예 3> 'F127' 양말단 하이드록시기의 포스페이트 개질 (F127-PO(OH)₂)

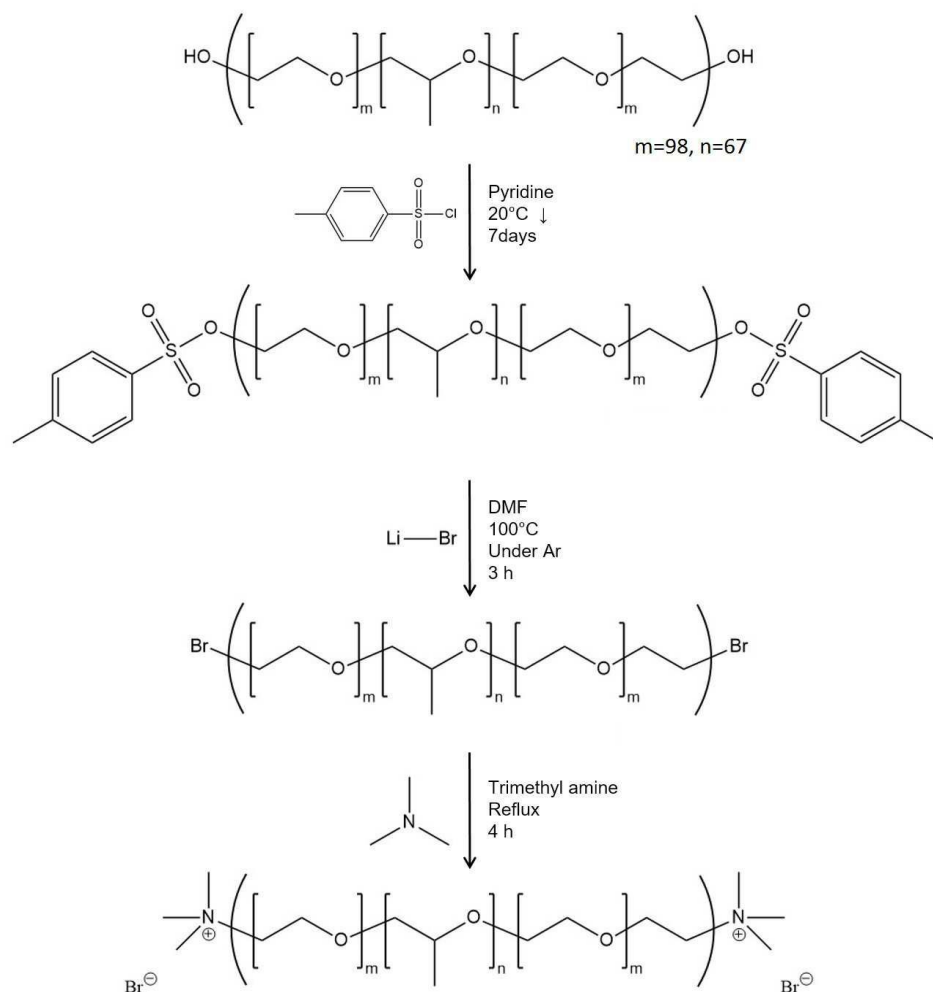
[0207] 참조문헌(*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2014** 58 (2), 966 -977)에 공지되어 있는 하기 방법을 이용하여, 플루로닉 F127 (EO₉₈PO₆₇EO₉₈, MW=12600)의 양말단 하이드록시기를 포스페이트기로 개질하였다.



[0208]

[0210] <제조예 4> 'F127' 양말단 하이드록시기의 트리메틸암모늄 개질 (F127- $N(CH_3)_3Br$)

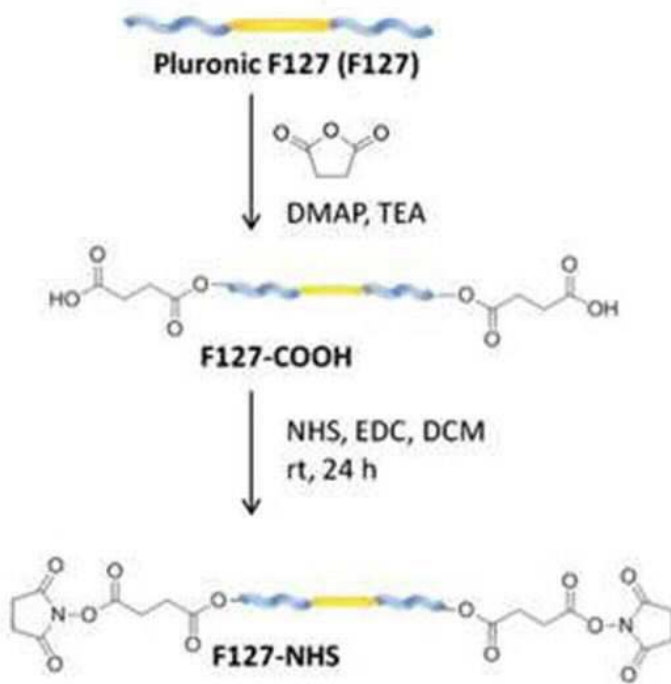
[0211] 참조문헌(*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, 13 (7), 1381-1384)에 공지되어 있는 하기 방법을 이용하여, 플루로닉 F127 ($EO_{98}PO_{67}EO_{98}$, MW=12600)의 양말단 하이드록시기를 트리메틸암모늄기로 개질하였다.



[0212]

[0214] <제조예 5> 'F127' 양말단 하이드록시기의 NHS 에스테르 개질 (F127-NHS ester)

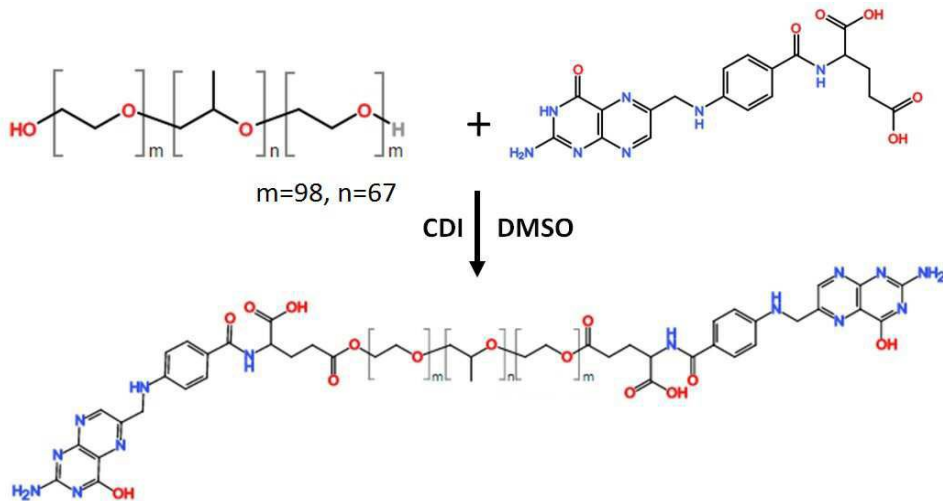
[0215] 참조문헌(*RSC Adv.*, **2014** 20 (4), 10076-10089)에 공지되어 있는 하기 방법을 이용하여, 플루로닉 F127 ($\text{EO}_{98}\text{PO}_{67}\text{EO}_{98}$, MW=12600)의 양말단 하이드록시기를 NHS 에스테르기로 개질하였다. NHS 에스테르는 1차 아민을 가진 말레이미드(maleimide)로 변환할 수 있다.



[0216]

[0218] <제조예 6> 'F127' 양말단 하이드록시기의 염산 개질 (F127-염산)

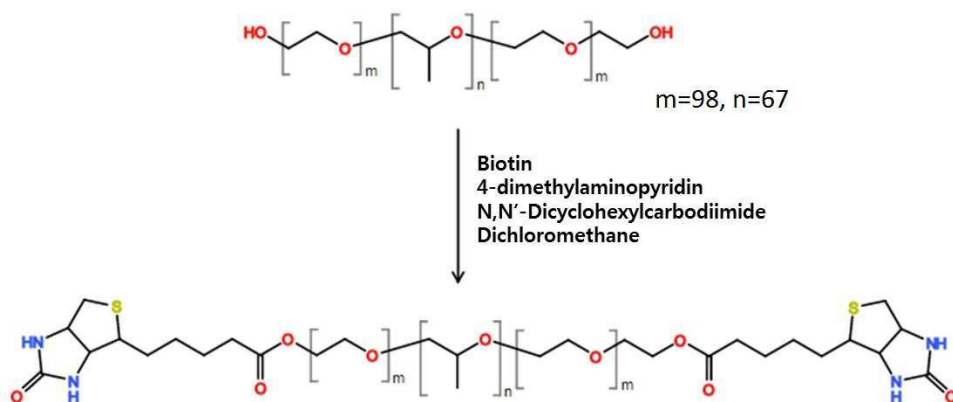
[0219] 참조문헌(*Biomaterials*, **2009**, 30 (28), 5114-5124)에 공지되어 있는 하기 방법을 이용하여, 플루로닉 F127 ($\text{EO}_{98}\text{PO}_{67}\text{EO}_{98}$, MW=12600)의 양말단 하이드록시기를 염산으로 개질하였다.



[0220]

[0222] <제조예 7> 'F127' 양말단 하이드록시기의 바이오틴 개질 (F127-바이오틴)

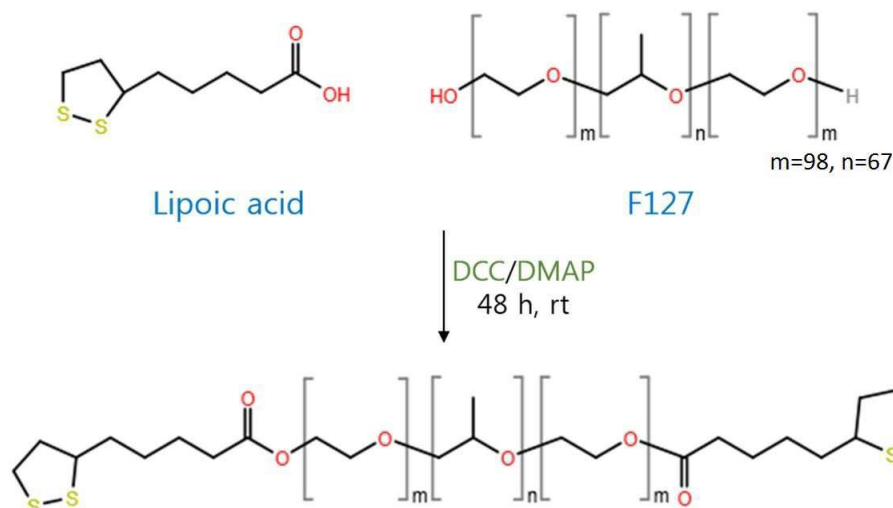
[0223] 참조문헌(*Journal of Applied Polymer Science*, **2010**, 115 (3), 1573-1580)에 공지되어 있는 하기 방법을 이용하여, 플루로닉 F127 ($\text{EO}_{98}\text{PO}_{67}\text{EO}_{98}$, MW=12600)의 양말단 하이드록시기를 바이오틴으로 개질하였다.



[0224]

[0226] <제조예 8> 'F127' 양말단 하이드록시기의 리포산 개질 (F127-리포산)

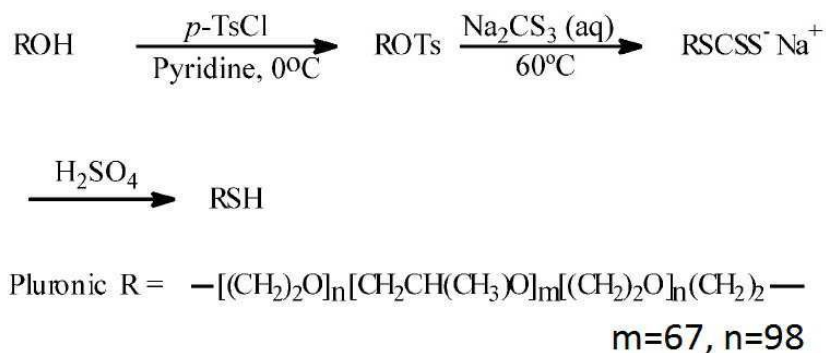
[0227] 참조문헌(*Journal of Applied Polymer Science*, 2010, 115 (3), 1573-1580)에 공지되어 있는 하기 방법을 이용하여, 플루로닉 F127 ($\text{EO}_{98}\text{PO}_{67}\text{EO}_{98}$, MW=12600)의 양말단 하이드록시기를 리포산으로 개질하였다.



[0228]

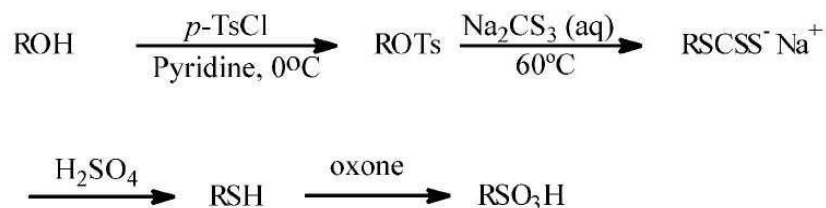
[0230] <제조예 9> 'F127' 양말단 하이드록시기의 티올 개질 (F127-SH)

[0231] 참조문헌(*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 13 (2003), 1381-1384)에 공지되어 있는 하기 방법을 이용하여, 플루로닉 F127 ($\text{EO}_{98}\text{PO}_{67}\text{EO}_{98}$, MW=12600)의 양말단 하이드록시기를 티올로 개질하였다.



[0234] <제조예 10> 'F127' 양말단 하이드록시기의 설폰산 개질 (F127-SO₃H)

[0235] 참조문헌(*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 13 (2003), 1381-1384)에 공지되어 있는 하기 방법을 이용하여, 플루로닉 F127 (EO₉₈PO₆₇EO₉₈, MW=12600)의 양말단 하이드록시기를 설폰산으로 개질하였다.



[0236]

[0238] <실시예 1> 파이렌 함유한 'F127-py-PETA sIPN 미셀'의 제조

[0239] 단계 1-4: 'F127-py-PETA (미셀) 용액'의 준비

[0240] 플루로닉 F127 (EO₉₈PO₆₇EO₉₈, MW=12600) 5 g을 팔콘튜브에 담고 정제수 45 g을 첨가하여 'F127 용액'을 준비하였다. 상기 F127 용액을 완전한 용해를 위해 냉장고에 하룻밤 동안 두었다.

[0241] 미셀 내부 소수성 환경에 존재하는 것을 추적하기 위한 형광 프로브로서 파이렌(Pyrene)을 사용하였다. 파이렌 10 mg을 아세톤 5 mL에 용해하여 '파이렌 용액' (2 mg/mL)을 깨끗한 바이알에 준비하였다.

[0242] PETA (Pentaerythritol tetraacrylate) 1 g을 아세톤에 용해하여, 총용량이 10 mL가 되도록 'PETA 용액' (100 mg/mL)을 준비하였다.

[0243] 상기 PETA 용액 0.25 mL를 깨끗한 바이알에 담겨 있는 상기 파이렌 용액 0.5 mL에 부은 다음, 상온(25°C)에서 하룻밤 동안 용매를 증발시켜, 바이알의 밑바닥에 'PETA-파이렌 필름'을 형성시켰다.

[0244] 상기 PETA-파이렌 필름이 밑바닥에 형성된 바이알에 상기 F127 용액 10 mL를 첨가하고, 상온에서 하룻밤 동안 셰이커(200rpm)로 혼합하여, 'F127-py-PETA 용액'을 준비하였다. 상기 'F127-py-PETA 용액'은 플루로닉 F127 1 g(10% w/w, volume 10 mL), 파이렌 1 mg 및 PETA 25 mg으로 구성된다.

[0246] 단계 5-6: UV 조사를 통한 PETA 가교로 'F127-py-PETA sIPN 미셀'의 제조

[0247] 플루로닉 F127에 의해 형성된 미셀 코어에 sIPN(Semi-Interpenetrating Network) 구조를 형성하기 위하여 UV 조사를 실시하였다. 여기서, UV 조사는 "Lumen Dynamic (OmniCure series 2000, filter 320-500 nm)" 장치를 이용하였고, 조작 조건은 1.5 W/cm² 세기로 6분 동안 조사하였다. 여기서, UV 조사 전에 상기에서 준비한 'F127-py-PETA 용액'에 아르곤 가스를 주입하였다.

[0248] PETA (Pentaerythritol tetraacrylate)의 미셀 코어 내재화(internalization)를 향상하기 위해, UV 조사 전에 'F127-py-PETA 용액'의 온도를 CMT(Critical Micelle Temperature) (50°C) 보다 높도록 10분간 올렸다.

[0249] 최종생성물을 0.2μm 실린지 필터(Ministart[®] Sartorius Stedium)로 여과하여 'F127-py-PETA sIPN 미셀'을 제조하였고, 이를 깨끗한 바이알에 보관하였다.

[0251] 본 실시예 1에 대한 제법 1의 개략도를 도 1에 나타내었다.

[0253] <실시예 2> Lumogen[®] F violet 570을 함유한 'F127-violet-PETA sIPN 미셀'의 제조

- [0254] 실시예 1의 단계 1에서 형광 염료로 파이렌 대신 Lumogen[®] F violet 570을 사용한 것과, 형광 염료를 용해하는 용매로 아세톤 대신 클로로포름을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일하게 실시하여 'F127-violet-PETA sIPN 미셀'을 제조하였다.
- [0256] <실시예 3> 3-티오펜헥실을 함유한 'F127-Thio-PETA sIPN 미셀'의 제조
- [0257] 단계 1-5: 'F127-Thio-PETA 용액'의 준비
- [0258] 3-티오펜헥실 1 mg을 클로로포름에 용해하여 20 mL 용량의 '바이알 A'에 두고 용매를 상온에서 모두 증발시켰다.
- [0259] 또 다른 20 mL 용량의 '바이알 B'에 PETA (Pentaerythritol tetraacrylate) 25 mg을 아세톤에 용해한 다음 용매를 상온에서 모두 증발시켰다.
- [0260] 플루로닉 F127 (EO₉₈PO₆₇EO₉₈, MW=12600) 5 g을 팔콘튜브에 담고 정제수 45 g을 첨가하여 'F127 용액'을 준비하고, 이를 상기 바이알 A에 첨가하고 30℃에서 5분간 초음파 처리하여 혼합하고, 용해를 위해 40℃에서 15분간 열을 가하고 셰이커로 하룻밤 동안 교반하였다.
- [0261] 다음으로, 바이알 A의 F127-염료 혼합용액을 상기 바이알 B에 붓고, 셰이커(200 rpm)로 하룻밤 동안 교반하였다.
- [0263] 단계 6-7: UV 조사를 통한 PETA 가교로 'F127-Thio-PETA sIPN 미셀'의 제조
- [0264] UV 조사 단계는 실시예 1의 단계 2와 동일하게 실시하여, 'F127-Thio-PETA sIPN 미셀'을 제조하였고, 이를 깨끗한 바이알에 보관하였다.
- [0266] 본 실시예 3에 대한 제법 2의 개략도를 도 2에 나타내었다.
- [0268] <실시예 4> Lumogen[®] F yellow 083을 함유한 'F127-yellow-PETA sIPN 미셀'의 제조
- [0269] 실시예 3의 단계 1에서 형광 염료로 파이렌 대신 3-티오펜헥실을 사용한 것을 제외하고는 실시예 3과 동일하게 실시하여 'F127-yellow-PETA sIPN 미셀'을 제조하였다.
- [0271] <실시예 5> KIM A를 함유한 'F127-KIM A-PETA sIPN 미셀'의 제조
- [0272] 실시예 1의 단계 1에서 형광 염료로 파이렌 대신 KIM A (2,3-Dimethyl-5,8-di-thiophen-2-ylquinoxaline)를 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일하게 실시하여 'F127-KIM A-PETA sIPN 미셀'을 제조하였다.
- [0274] <실시예 6> Lumogen[®] F orange 240을 함유한 'F127-orange-PETA sIPN 미셀'의 제조
- [0275] 실시예 3의 단계 1에서 형광 염료로 파이렌 대신 Lumogen[®] F orange 240을 사용한 것을 제외하고는 실시예 3과 동일하게 실시하여 'F127-orange-PETA sIPN 미셀'을 제조하였다.
- [0277] <실시예 7> 나프토티아디아졸을 함유한 'F127-Nap-PETA sIPN 미셀'의 제조
- [0278] 실시예 3의 단계 1에서 형광 염료로 파이렌 대신 나프토티아디아졸을 사용한 것을 제외하고는 실시예 3과 동일하게 실시하여 'F127-Nap-PETA sIPN 미셀'을 제조하였다.

- [0280] <실시예 8> KIM B를 함유한 'F127-KIM B-PETA sIPN 미셀'의 제조
- [0281] 실시예 1의 단계 1에서 형광 염료로 파이렌 대신 KIM B (4,7-Di-thiophen-2-ylbenzo[1,2,5]thiadiazole)를 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일하게 실시하여 'F127-KIM B-PETA sIPN 미셀'을 제조하였다.
- [0283] <실시예 9> Lumogen[®] red 350을 함유한 'F127-red-PETA sIPN 미셀'의 제조
- [0284] 실시예 3의 단계 1에서 형광 염료로 파이렌 대신 Lumogen[®] red 350을 사용한 것을 제외하고는 실시예 3과 동일하게 실시하여 'F127-red-PETA sIPN 미셀'을 제조하였다.
- [0286] <실시예 10> Se-벤조티아디아졸을 함유한 'F127-Se-PETA sIPN 미셀'의 제조
- [0287] 실시예 3의 단계 1에서 형광 염료로 파이렌 대신 Se-벤조티아디아졸을 사용한 것을 제외하고는 실시예 3과 동일하게 실시하여 'F127-Se-PETA sIPN 미셀'을 제조하였다.
- [0289] <실시예 11> Nile red를 함유한 'F127-Nile-PETA sIPN 미셀'의 제조
- [0290] 실시예 1의 단계 1에서 형광 염료로 파이렌 대신 Nile red를 사용한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일하게 실시하여 'F127-Nile-PETA sIPN 미셀'을 제조하였다.
- [0292] <실시예 12> 프탈로시아닌을 함유한 'F127-Pc-PETA sIPN 미셀'의 제조
- [0293] 단계 1-4: 'F127-Pc-PETA 용액'의 준비
- [0294] 20 mL 용량의 '바이알 A'에 폴루로닉 F127 500 mg이 클로로포름에 용해된 용액을 붓고, 클로로포름에 용해된 프탈로시아닌(Pc) 2.5 mg을 첨가하였다. 상기 혼합용액에서 클로로포름을 회전농축기(PC 3001 Vario Pro Vacuu brand)로 증발시켜 바이알의 밑바닥에 'F127-Pc 필름'을 형성시켰다.
- [0295] 다음으로, 상기 바이알 A에 정제수 10 mL를 붓고 30℃에서 1분간 초음파 처리하였다. 초음파 처리된 샘플을 하룻밤 동안 교반한(200rpm) 다음, 0.2 μ m 실린지 필터(Ministart[®] Sartorius Stedium)로 여과하였다.
- [0296] 또 다른 바이알 B에 PETA (Pentaerythritol tetraacrylate) 25 mg을 아세톤에 용해시킨 다음 아세톤을 상온에서 증발시켜 PETA 필름을 형성시켰다.
- [0297] 상기 바이알 A에서 준비된 용액을 바이알 B에 혼합하고 상온에서 하룻밤 동안 교반하여(200 rpm), 'F127-Pc-PETA 용액'을 준비하였다.
- [0299] 단계 5-6: UV 조사를 통한 PETA 가교로 'F127-Pc-PETA sIPN 미셀'의 제조
- [0300] UV 조사 단계는 실시예 1의 단계 2와 동일하게 실시하여, 'F127-Pc-PETA sIPN 미셀'을 제조하였고, 이를 깨끗한 바이알에 보관하였다.
- [0302] 본 실시예 12에 대한 제법 3의 개략도를 도 3에 나타내었다.
- [0304] 하기 표에 실시예 1-12에서 사용한 형광 염료와 형광 염료 용해에 사용한 용매 및 여기 파장(λ_{ex})을 정리하여 기입하였고, 도 4a - 도 4c에 형광 염료의 화학구조식을 나타내었다.

표 1

	형광 염료	용매	λ_{ex} (nm)
실시예 1 (제법1)	파이렌	Acetone	330
실시예 2 (제법1)	Lumogen [®] F violet 570	Chloroform	350
실시예 3 (제법2)	3-티오펜헥실	Acetone	370
실시예 4 (제법2)	Lumogen [®] F yellow 083	Chloroform	440
실시예 5 (제법1)	KIM A	Acetone	390
실시예 6 (제법2)	Lumogen [®] F orange 240	Chloroform	500
실시예 7 (제법2)	나프토티아디아졸	Chloroform	470
실시예 8 (제법1)	KIM B	Acetone	470
실시예 9 (제법2)	Lumogen [®] red 350	Chloroform	540
실시예 10 (제법2)	Se-벤조티아디아졸	Acetone	470
실시예 11 (제법1)	Nile red	Acetone	540
실시예 12 (제법3)	프탈로시아닌	Chloroform	690

<비교예 1> 'F127-py 미셀'의 제조

실시예 1에서 PETA (Pentaerythritol tetraacrylate)를 첨가하지 않고, UV 조사를 하지 않은 것을 제외하고는 동일하게 실시하여, 'F127-py 미셀'을 제조하였다.

<실험예 1> 임계 미셀 온도(critical micelle temperature, CMT) 테스트

CMT(critical micelle temperature) 평가를 위해 샘플(sIPN and micelle)을 CMT 보다 낮은 온도에서 하룻밤 동안 배양한 다음, 4℃에서 10분간 14000rpm으로 원심분리하였다. 샘플의 원심분리 후 상청액(supernatant)을 깨끗한 튜브로 옮기고, 이를 CMT 평가에 이용하였다.

구체적으로, 실시예 1에서 제조한 'F127-py-PETA sIPN 미셀'을 CMT 이하의 온도에서 안정성 테스트를 하였다. 주어진 농도(10%)에서, 플루로닉 F127의 CMT는 17℃이다. 실시예 1 및 비교예 1에서 파이렌의 흡광 및 형광 세기는 도 5에 나타내었고, 관련 데이터를 하기 표 2에 나타내었다.

도 5는 CMT 테스트 이후에 실시예 1 및 비교예 1의 흡광(a) 및 형광(b) 스펙트라이다.

표 2

샘플	흡광		세기 비율 (4℃/ 25℃)
	25℃	4℃	
비교예 1	2.080	0.359	0.173
실시예 1	1.990	1.920	0.964

상기 표 2에 나타난 바와 같이, CMT 테스트 이후 실시예 1에서 파이렌의 높은 흡광 세기가 나타나는 한편, 비교예 1에서는 형광 세기 감소가 나타났다. 상기에서 얻은 결과는, CMT 온도 이하에서 실시예 1은 미셀 구조가 해리되지 않고 유지할 수 있음을 나타낸다.

<실험예 2> sIPN 형성 최적 조건 탐색

PETA (Pentaerythritol tetraacrylate) 가교제 함량:

sIPN 형성을 위한 PETA 최적 함량을 알아보기 위하여, 플루로닉 F127 함량 1g(10% w/w, volume 10 mL) 대비

PETA 함량을 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 5, 7.5, 10, 20, 30, 40 중량부로 준비한 것을 제외하고는, 실시예 1과 동일하게 실시하여 'F127-py-PETA sIPN 미셀'을 준비하였다. PETA의 효과는 CMT 이하의 온도에서 파이렌 흡광 변화를 모니터링하여 평가하였다.

[0323] sIPN 형성에 PETA 함량의 효과는 도 6 및 하기 표 3에 나타내었다.

[0325] 도 6은 PETA 함량에 따른 파이렌의 흡광값을 나타낸 그래프이다.

표 3

[0327]

PETA (플루로닉 F127 100 중 량부 대비 중량부)	흡광 세기		세기 비율 (4℃/25℃)
	25℃	4℃	
0	3.00	0.10	0.30
0.5	2.93	0.15	0.50
1	2.87	0.30	0.10
1.5	2.80	0.82	0.29
2	2.75	0.73	0.27
2.5	2.71	2.65	0.98
5	1.72	1.56	0.91
7.5	1.65	1.58	0.96
10	1.21	1.10	0.91
20	0.12	0.12	0.98
30	0.08	0.07	0.87
40	0.71	0.07	0.97

[0329] 미셀 코어에서 PETA의 중합도는 PETA 함량에 큰 영향을 받는다. PETA의 높은 함량은 강한 나노-네트워크를 형성할 수 있지만, 미셀 코어가 오그라지는 현상으로 인해 형광 염료의 로딩 용량은 감소한다.

[0331] 상기 표 3에 나타난 바와 같이, sIPN 형성을 위한 PETA의 최적 함량은 2.5 중량부인 것으로 나타났다. PETA 함량 2.5 미만에서, CMT 테스트 후에 시료의 흡광 및 형광 세기의 확연한 감소가 나타나 불안정한 나노입자 형성이 관찰되었다. 반면에 PETA 함량이 2.5 중량부 초과할 경우에는 흡광 세기가 역시 감소되었는데, 이는 코어의 오그라짐 현상에 따른 것이다.

[0333] UV 조사 시간:

[0334] sIPN 형성을 위한 UV 조사 최적 시간을 알아보기 위하여, UV 조사 시간을 0, 3, 6, 9, 12, 15, 30, 45, 60 분 동안 조사한 것을 제외하고는, 실시예 1과 동일하게 실시하여 'F127-py-PETA sIPN 미셀'을 준비하였다.

[0335] 코어 내부 가교에 UV 조사 시간의 영향은 도 7 및 표 4에 나타내었다. 구체적으로 실시예 1에서 UV 조사 시간을 달리한 것을 제외하고는 동일하게 실시하여 시료들을 제조한 다음 흡광 세기를 측정하여 평가하였다.

[0337] 도 7은 UV 조사 시간에 따른 흡광 세기를 측정한 그래프이다.

표 4

[0339]

UV 조사 시간 (min)	흡광 세기		세기 비율 (4℃/25℃)
	25℃	4℃	

0	2.97	0.12	0.30
3	2.83	0.98	0.50
6	2.90	2.78	0.10
9	2.25	2.22	0.29
12	1.51	1.45	0.27
15	1.37	1.34	0.98
30	1.22	1.22	0.91
45	1.01	1.00	0.96
60	0.80	0.70	0.91

[0340] 미셀 코어 내부에서 강한 sIPN 형성은 UV 조사에 의한 PETA 중합에 기인한다. 그러나, 과도한 UV 조사 시간은 광퇴색(photobleaching)을 야기하기 때문에, 유기 분자에 해로울 수 있다. 그러므로, 미셀의 우수한 안정성 및 광학 특성을 얻기 위해서는, 최적의 UV 조사 시간이 필요하다.

[0341] 상기 표 4에 나타난 바와 같이, UV 조사 시간은 6분이면 안정한 미셀을 형성하는데 충분하다. UV 조사 시간 6분 미만일 경우, CMT 테스트 후에 파이렌의 낮은 흡광 세기가 나타나 sIPN 형성이 완전하지 않은 것을 알 수 있다. 한편, UV 조사 시간이 6분 초과일 경우, 흡광은 역시 감소하는 것으로 나타나, 파이렌의 광퇴색이 관찰되었다.

[0343] **UV 조사시의 반응온도:**

[0344] sIPN 형성을 위한 UV 조사시의 최적 온도를 알아보기 위하여, UV 조사시의 온도를 25, 35, 50℃로 설정한 것을 제외하고는, 실시예 1과 동일하게 실시하여 'F127-py-PETA sIPN 미셀'을 준비하였다. sIPN 형성에 있어서 반응 온도의 영향을 UV 흡광값 측정을 통해 평가하였고, 이를 하기 도 8 및 표 5에 나타내었다.

[0346] 도 8은 반응 온도에 따른 흡광(a) 및 형광(b) 스펙트라이다.

표 5

[0348]

반응 온도 (℃)	흡광 세기		세기 비율 (4℃/25℃)
	25℃	4℃	
25	0.36	0.09	0.27
35	0.39	0.12	0.30
50	0.36	0.33	0.92

[0350] 상기 표 5에 나타난 바와 같이, 반응 온도가 50 ℃일 때, 미셀 코어에서 sIPN이 형성되었다. 반응 온도 50 ℃ 초과에서 UV 조사할 경우 더욱 가교되는 경향이 있는데, 이는 이 온도에서 국부 결정 용융이 가교 영역에서 비정질상을 이끌기 때문이다. 나아가, 상승한 온도에서, PETA는 미셀의 코어로 더 쉽게 내재화될 수 있다.

[0352] **형광 프로브 함량:**

[0353] sIPN 형성을 위한 형광 프로브 최적 함량을 알아보기 위하여, 파이렌 함량을 0.25, 0.5, 0.75, 1 mg으로 첨가한 것을 제외하고는, 실시예 1과 동일하게 실시하여 'F127-py-PETA sIPN 미셀'을 준비하였다.

[0355] 도 9는 상온 및 CMT 이하의 온도에서 측정한 파이렌 함량의 영향으로서 파이렌 흡광 커브를 나타낸다. 상세한 흡광 및 세기 비율을 하기 표 6에 나타내었다.

표 6

파이렌 함량 (mg)	흡광 세기		세기 비율 (4℃/25℃)
	25℃	4℃	
0.25	0.37	0.31	0.83
0.5	0.29	0.26	0.91
0.75	0.18	0.15	0.83
1	0.12	0.11	0.89

상기 표 6에 나타난 바와 같이, 파이렌 함량은 미셀 안정성에 확연한 영향을 나타내지는 않았다.

추가로, 파이렌 함량의 효과로서 파이렌 여기 2합체의 형성 역시 조사하였다. 파이렌 여기 2합체가 존재하지 않는 파이렌 함량을 조사하였고, 이를 도 10에 나타내었다.

도 10은 파이렌 함량에 따른 형광 스펙트라이다.

도 10에 나타난 바와 같이, 파이렌 여기 2합체는 파이렌 1 mg 포함 샘플에서만 관찰되었고, 나머지 샘플에서는 관찰되지 않았다(130.64 A.U.). sIPN 형성을 위한 최적의 파이렌 함량은 미셀의 안정성 및 로딩 함량을 고려하여 파이렌 1 mg 포함 샘플이었다.

'F127-py-PETA (미셀) 용액'의 용량:

sIPN 형성을 위한 미셀 용액의 최적 용량을 알아보기 위하여, 실시예 1의 단계 1-4에서 준비한 'F127-py-PETA (미셀) 용액'의 용량이 0.5, 1, 2, 3, 5, 10, 15 mL가 되도록 준비한 것을 제외하고는, 실시예 1과 동일하게 실시하여 'F127-py-PETA sIPN 미셀'을 준비하였다. 본 실험에서 역시 플루로닉 F127 1 g, 파이렌 1 mg 및 PETA 25 mg으로 구성되고, 미셀 용액의 함량을 변화하면 실험하였다.

구체적으로, 20 mL 및 5 mL 용량의 바이알을 사용하였다. 20 mL 바이알에서는 15, 10 및 5 mL 미셀 용액 함량을 평가하였고, 5 mL 바이알에서는 0.5, 1, 2 및 3 mL 미셀 용액 함량을 평가하였다. 모든 시료에서 PETA: py: F127의 비율은 0.025:0.001:1이었다. 본 실험의 결과는 도 11-12 및 표 7에 나타내었다.

도 11은 5 mL 바이알에서 0.5, 1, 2 및 3 mL 미셀 용액에 따른 흡광 및 형광을 측정한 스펙트라이다.

도 12는 20 mL 바이알에서 15, 10 및 5 mL 미셀 용액에 따른 흡광 및 형광을 측정한 스펙트라이다.

표 7

미셀 용액 함량 (mL)	흡광 세기		세기 비율 (4℃/25℃)
	25℃	4℃	
20 mL 바이알			
15	2.17	1.70	0.78
10	2.68	2.24	0.84
5	5.53	2.93	0.53
5 mL 바이알			
3	7.53	8.70	0.87
2	2.34	4.94	0.47

1	0.88	2.83	0.31
0.5	2.15	2.86	0.75

상기 표 7에 나타난 바와 같이, 미셀 용액 10 mL 샘플에서 최적의 나노-네트워크를 형성함을 알 수 있었다. 미셀 용액 5 mL 샘플의 경우 상온에서는 흡광 세기가 10 mL 샘플에 비해 약 2배로 나타나지만, CMT 이하의 온도(4℃)에서는 흡광 세기가 급격히 줄어드는 것으로 나타났다. 미셀 코어 내부의 고농도 파이렌이 PETA에 의해 가리워질 수 있다. 또한, 5 mL 바이알 샘플 실험결과를 작은 용매(정제수) 함량에서 sIPN 형성이 가능함을 알 수 있었다.

<실험예 3> sIPN 미셀의 안정성 평가

PCR test:

급격한 온도변화에 대한 'F127-py-PETA sIPN 미셀'의 내구성을 테스트하기 위하여, 30회의 열처리 및 냉처리를 실시하였다. PCR 샘플을 3분간 원심분리한 후, 상온에서 분광 측정하였다. PCR 테스트는 펠티어 기반의 열순환기(Peltier-based thermal cycler, 제조사: Ssufine, 모델명: fine cycler C100)를 이용하여 측정하였다.

약물전달체로서 실시예 1에서 제조한 'F127-py-PETA sIPN 미셀'은 DNA와 함께 기능화되는 것을 고려하여야 한다. 안정한 'F127-py-PETA sIPN 미셀'과 DNA의 사용을 위해서는, PCR 처리후 안정성이 요구된다. 실시예 1에서 제조한 'F127-py-PETA sIPN 미셀'의 PCR 결과를 도 13에 나타내었고, 관련 흡광 결과를 표 8에 나타내었다.

도 13은 실시예 1에서 제조한 F127-py-PETA sIPN 미셀을 PCR 테스트 후에 흡광을 측정한 스펙트라이다.

표 8

	흡광 세기 (PCR 테스트 후)			비율 (ref/25℃)
	Ref 25℃	25℃	4℃	
비교예 1	2.21	1.44	0.16	0.65
실시예 1	1.93	1.36	1.04	0.70

PCR 테스트 후, 실시예 1 및 비교예 1 모두 흡광의 감소를 나타내었다. PCR 테스트 후, 실시예 1 및 비교예 1의 안정성 값은 각각 70.3% 및 69.9%로 나타나, PCR 처리에도 함께 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

NaOH test:

실시예 1에서 제조한 'F127-py-PETA sIPN 미셀'과 비교예 1에서 제조한 'F127-py 미셀' 0.7 mL 각각을 에펜도르프 튜브(Axygen® scientific)에서 NaOH (0.5 M, 0.7 mL)와 혼합하였다. 상기 혼합물을 상온에서 1시간 동안 평형화하고(equilibrated), UV/Vis 및 형광 측정으로 NaOH 첨가에 의한 효과를 측정하였고, 그 결과를 도 14 및 표 9에 나타내었다.

도 14는 염기성 환경에서 실시예 1 및 비교예 1에서 제조한 미셀의 흡광 스펙트라이다.

표 9

	흡광 세기 (NaOH 0.5 M 혼합)			세기 비율 (NaOH r.t./ref)
	Ref 25℃	25℃	4℃	
비교예 1	3.13	2.08	0.30	0.66

실시예 1	1.99	1.60	1.50	0.81
-------	------	------	------	------

[0395] 도 14 및 표 9에 나타난 바와 같이, 실시예 1의 경우 NaOH를 혼합한 이후에도 sIPN 나노입자는 안정하였을 뿐만 아니라, CMT 테스트 후에도 안정함을 알 수 있었다. 비교예 1의 안정성은 NaOH 배양 후에 실시예 1에 비해 낮았다.

[0397] <실험예 4> UV/Vis 및 형광 분광을 통한 형광 프로브 로딩 용량 및 안정성 평가

[0398] 실시예 1에서 제조한 'F127-py-PETA sIPN 미셀'의 로딩 용량 및 안정성을 파이렌 흡광 및 형광 스펙트럼 변화를 측정하여 평가하였다. 흡광 스펙트럼은 Shimadzu UV-2600 UV-Vis 분광기를 이용하였다(300-400 nm 파장대 측정). 상기 형광 스펙트럼은 JASCO FP-6300 분광기를 이용하였다(여기 파장 336 nm). 발광(emission) 스펙트럼은 360-520 nm 영역을 기록하였다. 상기 흡광 및 형광 측정은 상온에서 실시하였다.

[0399] 구체적으로, 실시예 1에서 제조한 'F127-py-PETA sIPN 미셀'의 흡광(300-400 nm) 및 발광(360-520 nm) 스펙트럼을 측정하였다. 파이렌의 흡광 스펙트럼은 308, 321 및 336 nm에서 3개의 피크를 나타내었다.

[0401] 도 15는 실시예 1 및 비교예 1의 흡광(Abs) 및 형광(Flu) 스펙트럼이다.

[0403] 도 15에 나타난 바와 같이, 실시예 1에 비해 비교예 1의 파이렌의 흡광이 조금 더 높게 나타났다. 미셀 코어의 가교 형성에 따라서 파이렌의 로딩 용량은 감소하였다. 파이렌 모노머에 대한 360-420 nm 영역에서 발광 피크를 기록하였고, 430-520 nm 영역에서, 473 nm에서 맥시멈 피크와 함께 광범위 구조-적은 밴드(broad structure-less band) 관찰되었고, 파이렌의 여기 2중체(excimer) 형광을 나타낸다. 동일한 파이렌 농도에서, 실시예 1에 비하여 비교예 1에서 더 높은 파이렌의 여기 2중체 발광이 발견되었다. 미셀 코어 내부의 나노-네트워크 형성은 2개의 파이렌 분자 사이에서 $\pi-\pi$ 적층 상호작용의 가능성을 감소시켰다. 파이렌의 형광 세기(모노머 피크)는 관찰된 것보다 높아야 하지만, 파이렌 분자는 여기 2중체로 전환시켰다. 여기 2중체 밴드의 세기가 감소하는 동안 모노머 밴드의 세기는 감소하였다. 형광 밝기 및 양자효율 등 광학특성의 조절을 위하여 위와 같이 유기형광 염료의 로딩 양과 제법을 최적화할 필요가 있다.

[0405] <실험예 5> 형광 양자수율(Φ_f) 값 측정

[0406] 형광 양자 수율값(Φ_f)은 형광단(fluorophore)의 내재적 성질이고, 신규 형광 프로브의 광학적 성질 규명을 위해 중요하다. 형광 양자 수율값은 하기 수식 1로 표현되고, 이 결과를 하기 표 12에 나타내었다. 형광 양자 수율값은 분자가 형광(fluoresce) 또는 인광(phosphoresce)을 낼 가능성을 평가하는데 이용된다. 높은 형광을 내는 분자의 경우, 형광 양자 수율값은 1에 가깝고, 반대는 0에 가깝다.

[0407] 구체적으로, 형광 양자수율(Φ_f) 값은 Hamamatsu Photonics K.K.으로부터 적분구(integrating sphere) 셋업 C9920-02를 이용하였다. 실시예 1-12에서 제조한 모든 샘플들은 모두 다른 여기 파장에서 여기되었다. 용매(아세톤 또는 클로로포름) 3.5 mL에 형광 프로브 저장 용액(1 mg/mL) 10-50 μ L를 첨가하여, 유기 용매에서 형광 프로브의 순 양자수율을 측정하였다. 형광 양자수율(fluorescence quantum yield, FQY) 값 측정을 위한 실시예 1-12의 샘플 농도는 원래 폴리머 농도 (10% w/w)를 2번 희석하였다. 실시예 1(파이렌) 및 실시예 5(KIM A)를 제외한 모든 샘플들은 동일한 희석 인자로 희석하였고, 실시예 1 및 실시예 5는 각각 13번 및 4번 희석하였다. 형광 양자수율(Φ_f) 값은 PLQ 소프트웨어로부터 직접 얻었다. 흡광 스펙트럼은 Shimadzu UV-2600 UV-Vis 분광기를 이용하였고, 흡광 스펙트럼은 300-750 nm 영역을 기록하였다. 형광 스펙트럼은 JASCO FP-6300 분광기를 이용하였다.

수학식 1

$$\text{형광양자수율값}(\Phi_f) = \frac{N_{em}(\lambda_{ex})}{N_{abs}(\lambda_{ex})}$$

상기 수학식 1에서,

' $N_{em}(\lambda_{ex})$ '는 방출된 광자의 수이고,

' $N_{abs}(\lambda_{ex})$ '는 흡수된 광자의 수이다.

표 10

실시예	형광 프로브	유기 용매에서 형광 프로브의 형광 양자 수율값 (Φ_f)	실시예에서 제조한 미셀에서의 형광 양자 수율값 (Φ_f)
1	파이렌	0.150	0.469
2	Lumogen® F violet 570	1.068	0.865
3	3-티오펜헥실	0.081	0.068
4	Lumogen® F yellow 083	0.995	0.600
5	KIM A	0.912	0.952
6	Lumogen® F orange 240	0.959	0.805
7	나프토티아디아졸	0.365	0.500
8	KIM B	0.896	0.839
9	Lumogen® red 350	0.987	0.612
10	Se-벤조티아디아졸	0.700	0.001
11	Nile red	0.853	0.477
12	프탈로시아닌	0.482	0.034

상기 표 10에 나타난 바와 같이, 실시예 1-12에서 제조한 미셀에 포함된 유기형광염료들의 형광을 막지 않음을 알 수 있다. KIM A 및 KIM B는 신규로 합성한 염료이고, 이들은 높은 양자 수율값 때문에 전자 장치에서 형광 염료로서 응용될 수 있다. 파이렌의 경우, 고농도의 파이렌에서 높은 $\pi-\pi$ 적층 상호작용은 파이렌 포함 미셀에서 희석이 필요하다. 미셀에 포함된 프탈로시아닌의 낮은 형광 양자 수율 값은 고분자 체인 내부에서 프탈로시아닌의 응집에 의해 야기되는 형광 꺼짐 현상으로서 설명된다.

<실험예 6> 세포 흡수 실험

세포내 흡수 실험을 위해, TC1 세포(3×10^5 cells/cm²)를 6-웰플레이트에 씨딩하고, 12시간 후에 실시예 8(KIM B)에서 제조한 'F127-KIM B-PETA sIPN 미셀'을 세포에 첨가하였다. 세포 흡수 실험을 위한 폴리머 미셀의 물랄 농도는 0.01, 0.002 및 0.005%(w/w)이었다. 샘플들은 공초점현미경(Zeiss, LSM 7100)으로 관찰하기 전에 12시간 배양하였고, 관찰 결과를 도 16에 나타내었다.

도 16은 실시예 8(KIM B)에서 제조한 미셀을 처리한 TC1(폐암 세포)의 공초점 현미경 이미지이다(a-e는 control, 폴리머 농도 0.001%, 0.0005%, 0.0002%, 0.0001%의 미셀이고, f-g는 0.0002% 및 0.0001% 폴리머 농도의 미셀을 처리한 TC1 폐암 세포의 100배 확대 이미지이다).

- [0423] 도 16에 나타난 바와 같이, 초록 형광은 세포 내에서 KIM B에 의한 것이다. 모든 농도에서 초록 형광이 관찰되었다. TC1 세포에서 관찰된 초록 형광은 실시예 8에서 제조한 미셀이 식균작용의 객실(endocytic compartment)에서 축적되는 것을 나타낸다. 여기서, 유기형광염료로서 KIM B를 세포 흡수 실험에서 선택한 것은 586 nm에서 여기 장파장 및 600 nm 주변의 강한 발광을 나타내기 때문이다.
- [0425] <실험예 7> 동물 이미징 평가
- [0426] 실시예 12(프탈로시아닌)에서 제조한 미셀의 생체 적합성을 알아보기 위하여, 마우스의 in vivo 및 ex vivo 형광 이미지를 관찰하였다.
- [0427] 구체적으로, 수컷 무흉선증 누드 마우스 (BALB/c nu/nu) orientbio로부터 구입하였고, 무병(pathogen-free) 환경에서 사육하였다. 실험 처리를 위해서, 7주간 사육한 BALB/c 누드 마우스를 실험에 사용하였다. 마우스는 1.5% 이소플루란 흡입으로 마취시켰고, 정맥에 ICG(IndoCyanine Green) (0.5 mg/kg), 프탈로시아닌(0.25 mg/kg) 또는 프탈로시아닌(0.5 mg/kg)를 주사하였다. in vivo 형광 이미지는 Xenogen IVIS spectrum (Perkin Elmer)를 이용하여 시간별로 측정하였다.
- [0429] 도 17은 실시예 12(프탈로시아닌) 및 대조군으로서 ICG를 마우스에 투입한 in vivo 및 ex vivo 형광 이미지이다 (도 17a: 실시예 12 (50 μ g) in vivo, 도 17b: ICG (100 μ g) in vivo, 도 17c: ICG (100 μ g) ex vivo, 도 17d: 실시예 12 (50 μ g) ex vivo).
- [0431] 도 17a-d에 나타난 바와 같이, 실시예 12(프탈로시아닌)에서 제조한 미셀을 주입한 마우스에서 형광 시그널이 관찰되었다. 주입 후에 인큐베이션 시간이 길어질수록, 형광 시그널은 더욱 강하게 나타났다. 동물 이미징에서 이미징 프로브로서 실시예 12에서 제조한 미셀의 가능성은 시중에서 판매되고 있는 이미징 프로브인 ICG(IndoCyanine Green)와 비교하였다. 주입 후 1시간 인큐베이션 때에는, 실시예 12에서 제조한 미셀은 ICG에 비해 더 느리게 분포하였지만, 1시간 이후에는 실시예 12에서 제조한 미셀을 주입한 모든 마우스에서 강한 형광이 명확하게 나타났다. 나아가, 실시예 12에서 제조한 미셀을 주입한 마우스의 경우 주입 후 48시간 경과시에도 여전히 강한 시그널이 나타났지만, ICG를 주입한 마우스에서는 형광 시그널이 나타나지 않았다. 이는 실시예 12에서 제조한 미셀이 ICG에 비해 혈액 내에서 더 긴 순환시간을 갖는 것을 의미한다. 본 실험에서 다른 흥미있는 발견은 실시예 12에서 제조한 미셀을 주입한 마우스의 경우 뇌 영역에서 강한 형광이 나타나, BBB(blood brain barrier)를 통과할 수 있음을 보여준다는 점이다.
- [0432] 또한, ex vivo 이미징에서 생리적 환경하에 실시예 12에서 제조한 미셀의 안정성을 보여준다. 이러한 결과는 실시예 12에서 제조한 미셀이 혈액 흐름에서 안정함을 나타낸다. 이러한 결과는 in vivo 및 ex vivo 연구를 위한 이미징 프로브로서 실시예 12에서 제조한 미셀이 응용가능함을 나타낸다.
- [0434] <실험예 8> 실시예 1-12에서 제조한 미셀에 포함되는 유기형광염료의 광학 특성
- [0435] 본 실험에서는 UV/Vis 파장 영역에서 흡광 및 발광 스펙트라를 갖는 실시예 1-12에서 제조한 미셀을 사용하였다. 실시예 1(파이렌) 및 실시예 11(Nile red)에서 사용한 염료는 시중에서 구입가능하고, 나머지 실시예 2-10 및 실시예 12에서 사용한 염료는 새로이 합성하여 사용하였다.
- [0436] 화학구조에 기반하여, 본 실험에서는 2개의 그룹으로 형광 프로브를 분류하여 실험하였다. 첫 번째 그룹은 평면 구조 및 높은 공액(conjugated) 탄소계를 갖는 형광 프로브로서, 파이렌, lumogen violet, lumogen yellow, lumogen orange, lumogen red, nile red 및 프탈로시아닌(Pc)이다. 두 번째 그룹은 티오펜 그룹 및 다른 무거운 원자(예를 들어, 셀레늄, 브롬 및 황)를 갖는 형광 프로브로서, 3-티오펜헥실, KIM A, KIM B Se-벤조티아디아졸, 나프토티아디아졸이다.
- [0437] 실시예 1-12에서 제조한 미셀에 로딩된 유기형광염료의 광학 특성은 도 18-19에 나타내었고, 표 11-12에 이들의 흡광 및 형광 데이터를 나타내었다.

[0439] 도 18은 실시예 1-12에서 사용한 유기형광염료의 흡광 스펙트라이다.

[0441] 도 19는 실시예 1-12에서 사용한 유기형광염료의 발광 스펙트라이다.

표 11

[0443]

실시예	형광 프로브	최대 흡광 파장 (nm)	흡광 세기
1	파이렌	337, 321, 308	1.95;1.67;0.82
2	Lumogen [®] F violet 570	378	0.33
3	3-티오펜헥실	360	1.87
4	Lumogen [®] F yellow 083	445;474	0.09;0.11
5	KIM A	407	0.33
6	Lumogen [®] F orange 240	335.5;491;527	0.46;0.48;0.59
7	나프토티아디아졸	470	0.01
8	KIM B	455	0.79
9	Lumogen [®] red 350	580	0.67
10	Se-벤조티아디아졸	473	0.10
11	Nile red	543	1.04
12	프탈로시아닌	670	1.42

표 12

[0445]

실시예	형광 프로브	최대 발광 파장 (nm)	발광 세기(A.U.)
1	파이렌	374, 385	678.57;582.23
2	Lumogen [®] F violet 570	435	206.74
3	3-티오펜헥실	439	125.66
4	Lumogen [®] F yellow 083	485.5;518.5	136.26;94.72
5	KIM A	529.5	72.347
6	Lumogen [®] F orange 240	538.5;576.5	188.12;134.30
7	나프토티아디아졸	544	219.5
8	KIM B	586	336.47
9	Lumogen [®] red 350	605	107
10	Se-벤조티아디아졸	610	18.38
11	Nile red	626	561.22
12	프탈로시아닌	727	574.68

[0447] 평면 구조(파이렌, 프탈로시아닌 및 루모겐 염료들)를 갖는 형광 프로브들이 대부분 높은 흡광 및 발광 세기를 나타냈다. 첫 번째 그룹의 형광 프로브에서 높은 공액 π 전자가 UV 및 가시광 영역에서 우수한 광학 특성을 갖기 때문에 주요한 원인일 수 있다. 평면성 분자들은 이셀 코어에 형광 프로브가 쉽게 포함되도록 기여할 수 있다. 상기 표 11의 흡광 세기에 기반하여, 유기형광염료들은 높은 세기부터 낮은 세기 순으로 다음과 같이 나열할 수 있다: 파이렌, 3-티오펜헥실, 프탈로시아닌(Pc), Nile red, KIM B, lumogen red, lumogen orange, KIM A, lumogen violet, Se-벤조티아디아졸, 나프토티아디아졸 및 lumogen yellow.

[0448] 실시예 1-12에서 제조한 미셀의 유기 형광 프로브의 형광 스펙트라는 UV/Vis 영역(373-734 nm) 영역에 놓여 있다. 이러한 사실은 실시예 1-12에서 사용한 유기형광염료 이외의 다양한 염료 역시 광학 특성에 영향을 받지 않고 사용할 수 있음을 의미한다. 형광 세기에 기반한 형광 프로브는 높은 세기로부터 낮은 세기 순으로 다음과 같이 나열할 수 있다: 파이렌, 프탈로시아닌(Pc), Nile red, KIM B, 나프토티아디아졸, lumogen F violet,

lumogen F orange, lumogen yellow, 3-티오펜헥실, lumogen red, KIM A 및 Se-벤조티아디아졸. UV 광원(365 nm) 하에서, 실시예 1-12에서 제조한 미셀은 다양한 색상을 나타내고, 이를 도 20에 나타내었다.

[0450] <실험예 9> 양말단이 개질된 양친매성 트리블록공중합체의 비율에 따른 형광 이미징용 표지나노입자의 전기영동 평가

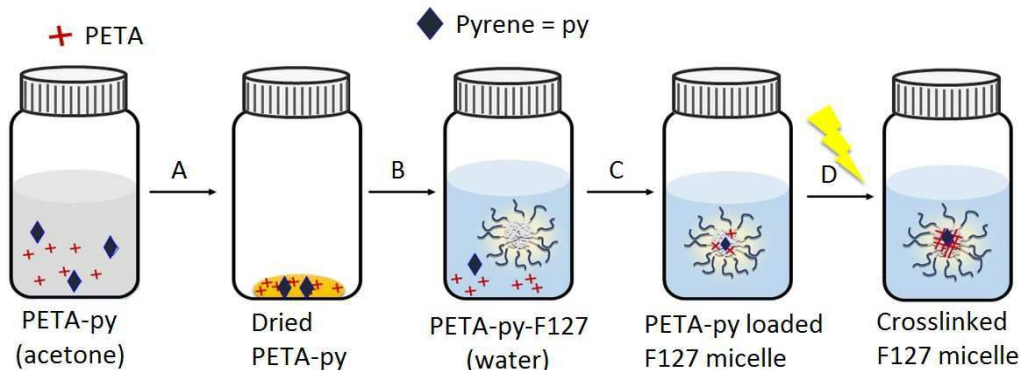
[0451] 양친매성 트리블록공중합체로 'F127-PO(OH)₂(제조예 3)' 및 'F127'의 혼합 개체비율(0-100%)을 달리한 것을 제외하고는 실시예 1과 동일하게 실시하여 제조한 샘플을 전기영동으로 평가하였고, 그 결과를 도 22에 나타내었다.

[0453] 도 22는 F127 및 F127-PO(OH)₂ 혼합 개체비율(0-100%)을 달리하여 제조한 형광이미징용 표지나노입자 샘플의 전기영동 사진이다(사진에서 '0%'는 F127-PO(OH)₂ 100%이다).

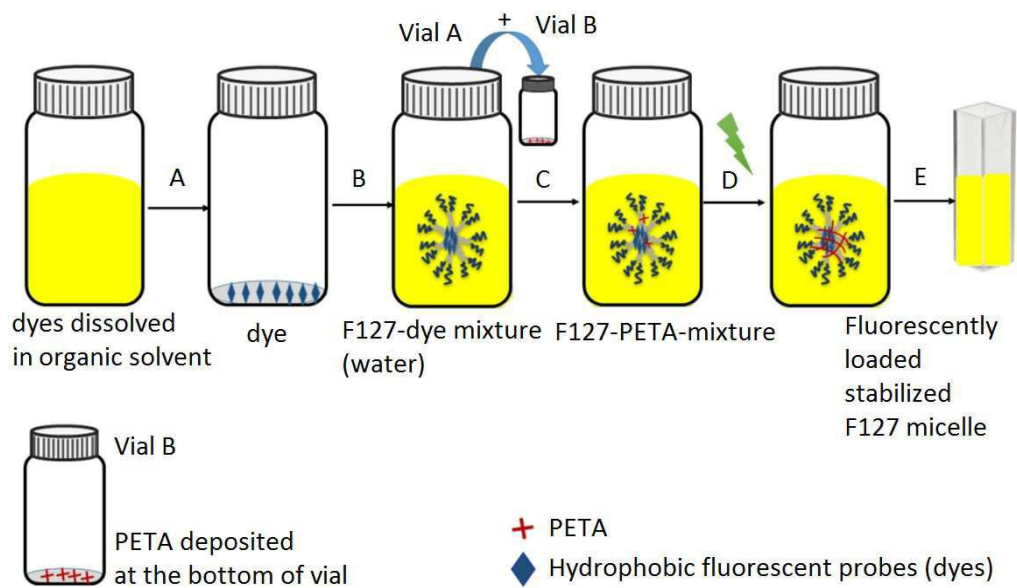
[0455] 도 22에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 형광이미징용 표지나노입자는 원하는 표면 작용기를 원하는 비율로 개질이 용이하므로, 다양한 생물학적 적용 가능성을 확보할 수 있다. 구체적으로, 생물학적 적용의 예로는 passive/active 세포섭취, 조직섭취, 암세포 표적화 등에 응용할 수 있고, 생결합에 적용의 예로는 항체결합, 단백질 표지, 핵산 표지 등에 응용할 수 있으며, 나노과학적 적용의 예로는 분자이미징시 마커로 활용(예를 들어, avidin-biotin 상호작용), 금나노입자 등과 결합 형성에 적용할 수 있다.

도면

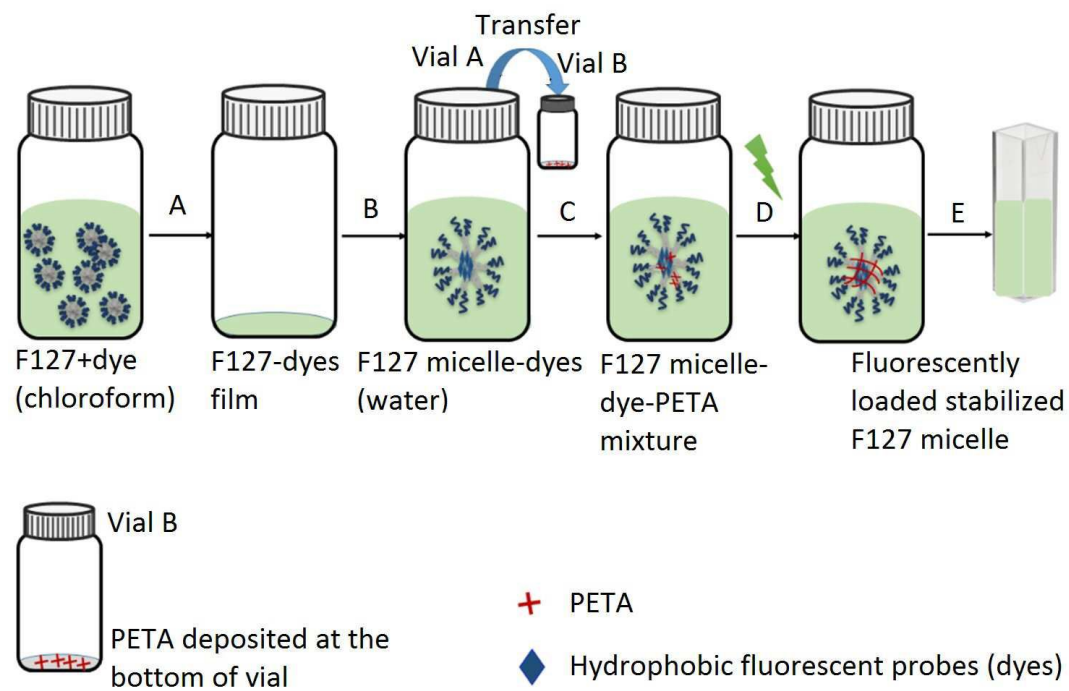
도면1



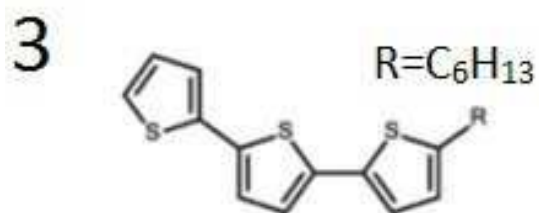
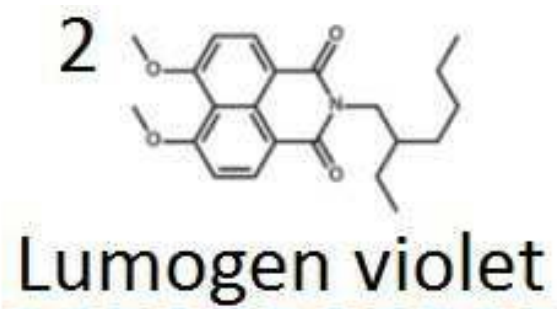
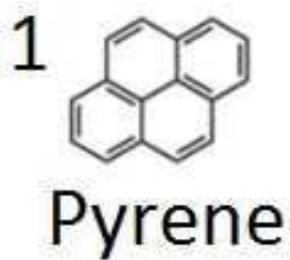
도면2



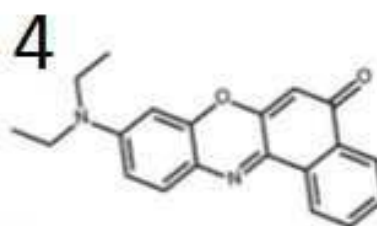
도면3



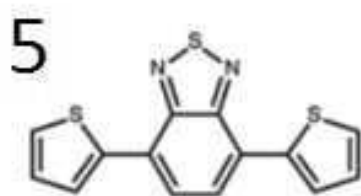
도면4a



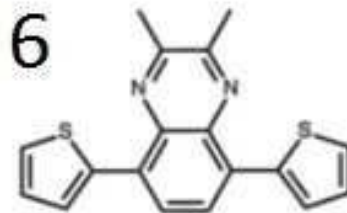
3-Thiophene hexyl



Nile Red



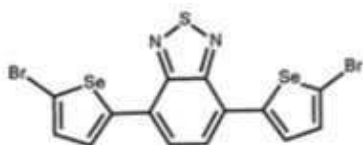
KIM B*



KIM A

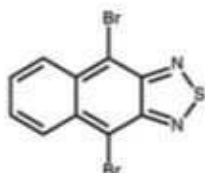
도면4b

7



Se-benzothiadiazole

8



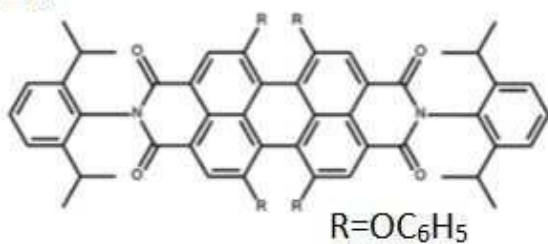
Naphthothiadiazole

9



Lumogen yellow

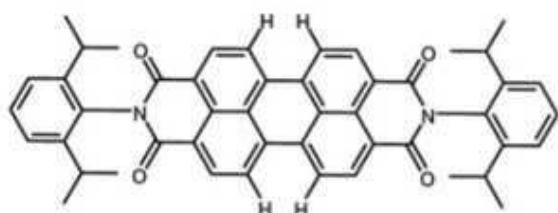
10



Lumogen red

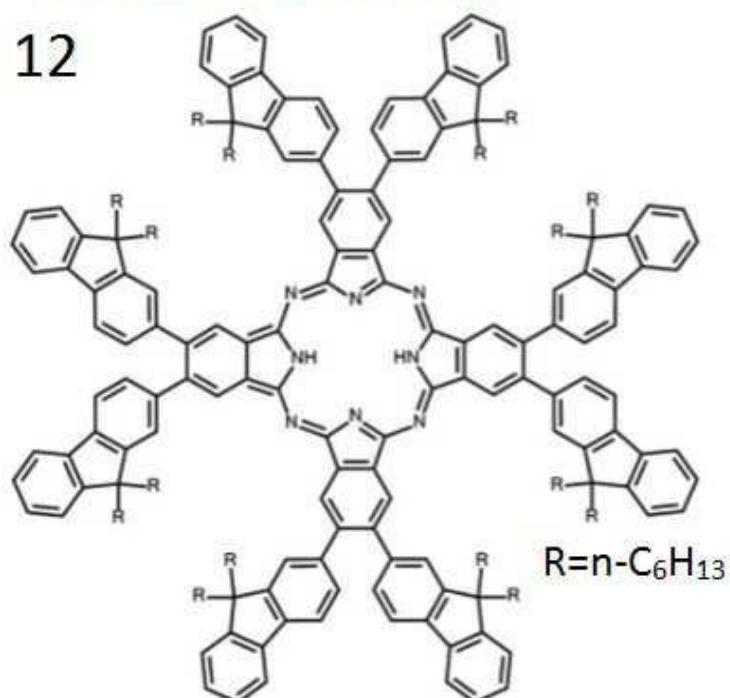
도면4c

11



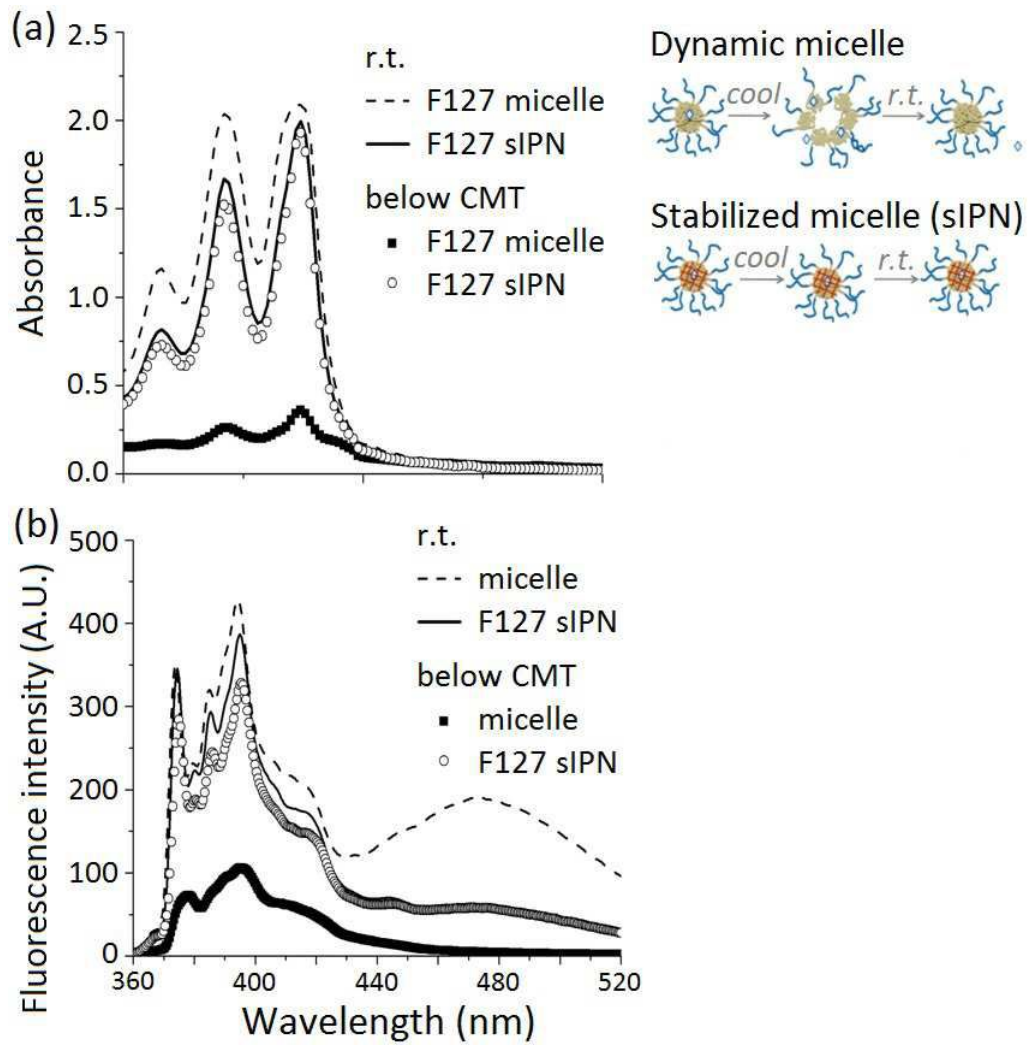
Lumogen orange

12

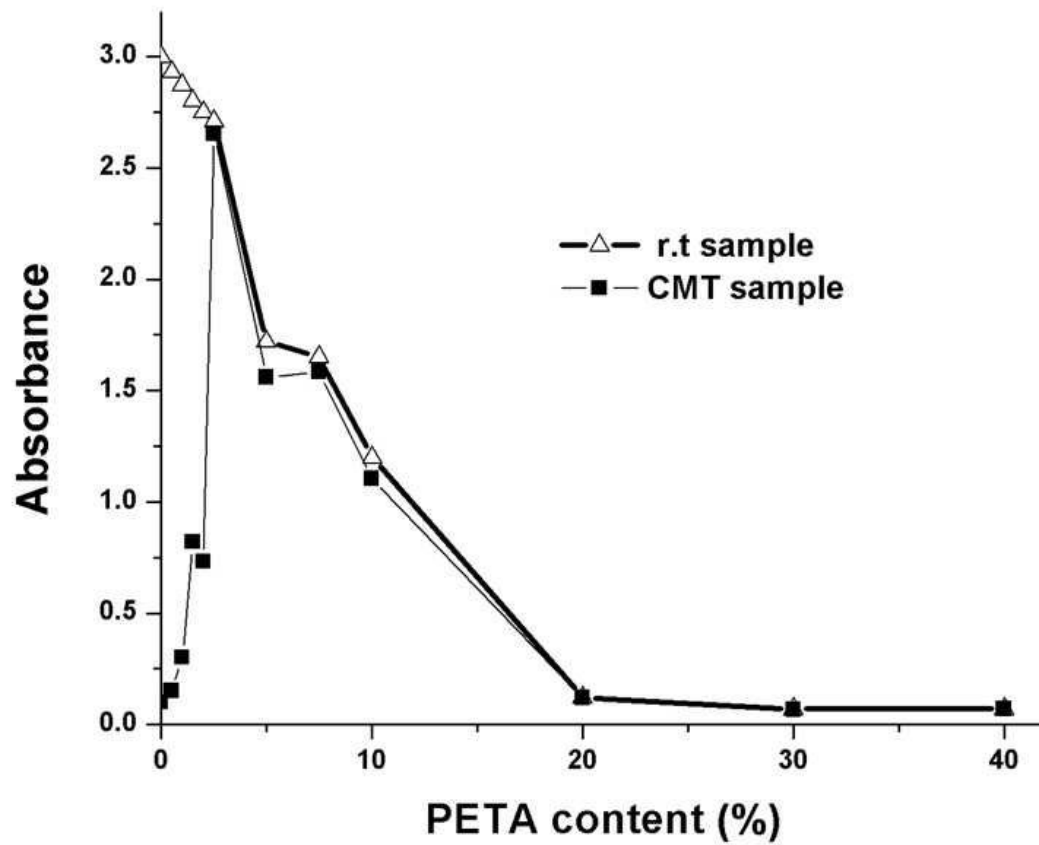


Phthalocyanine

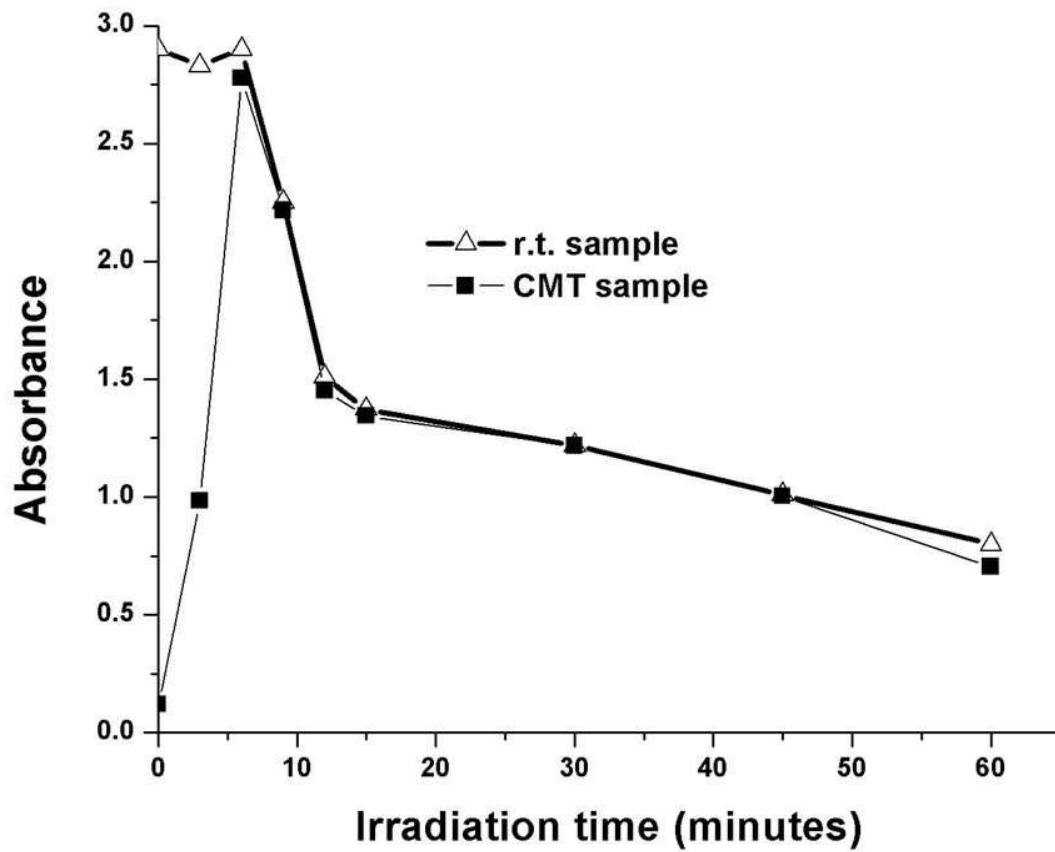
도면5



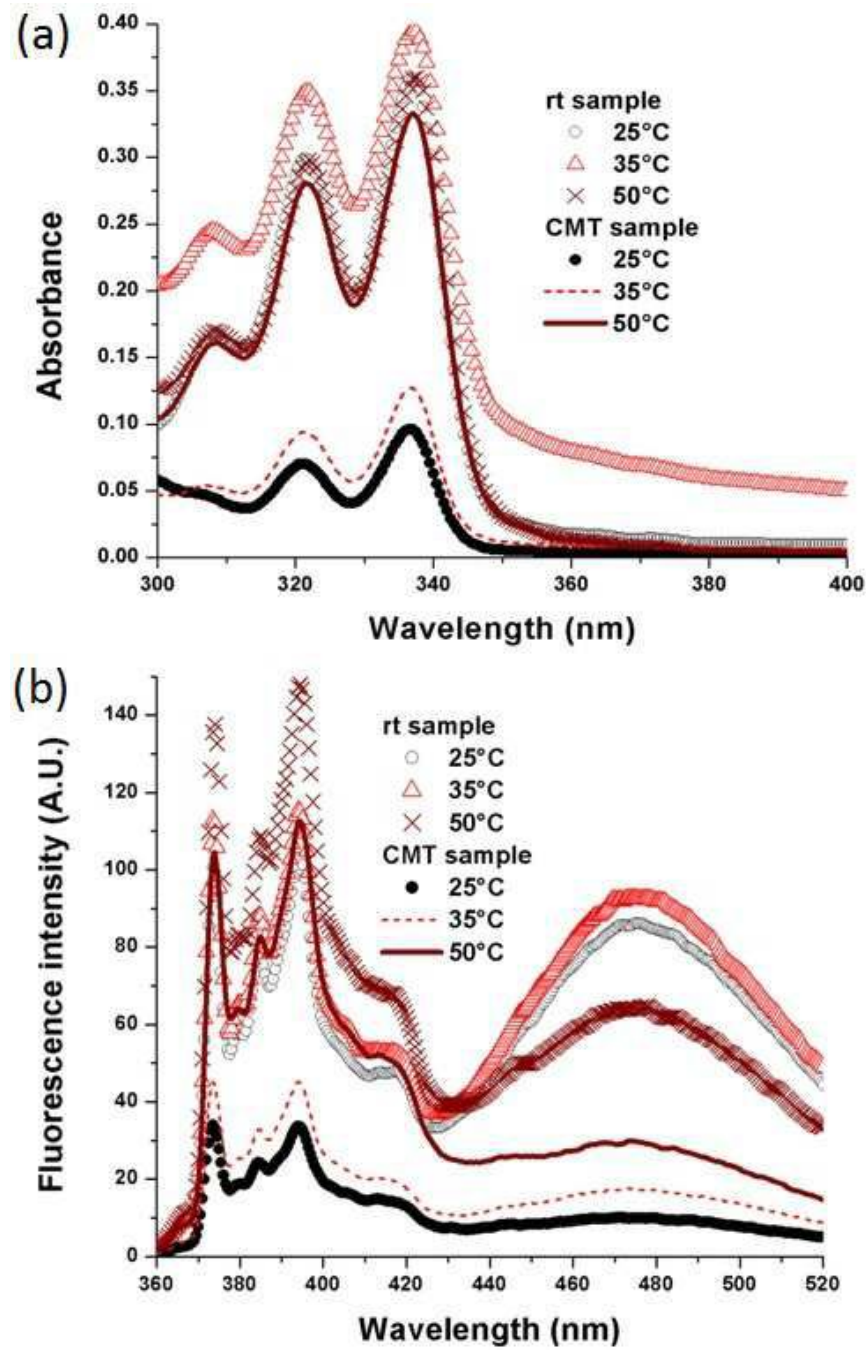
도면6



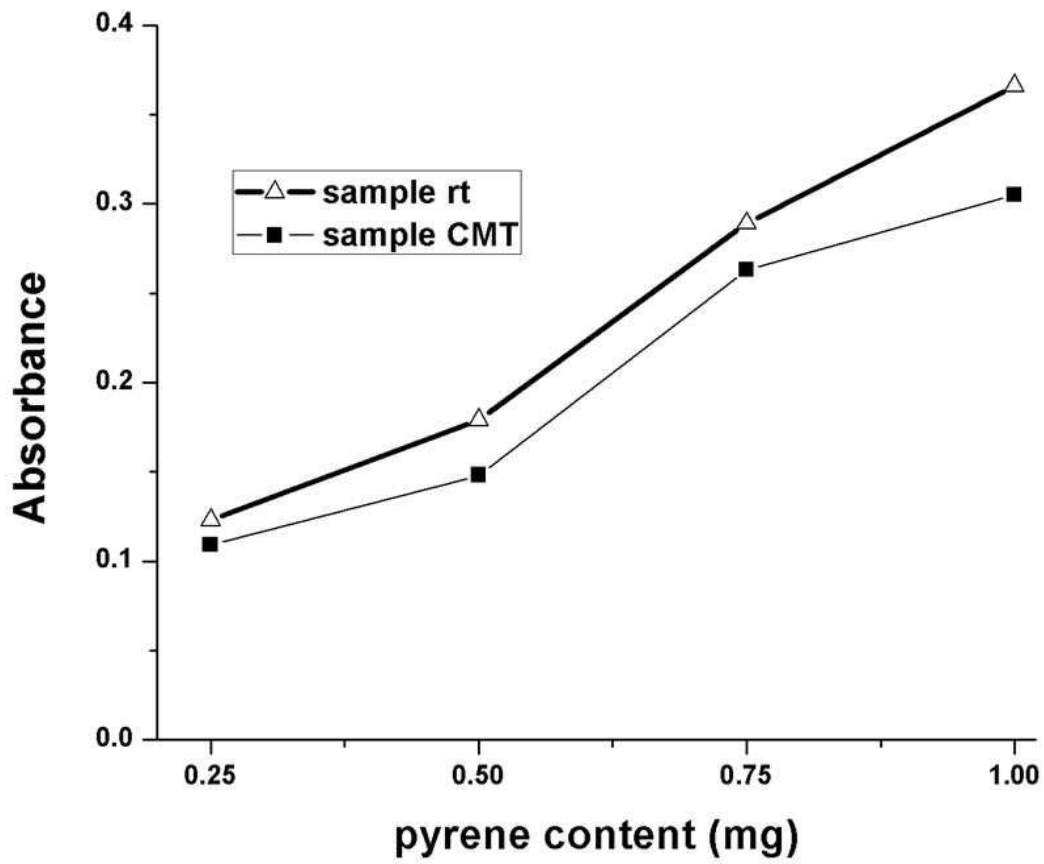
도면7



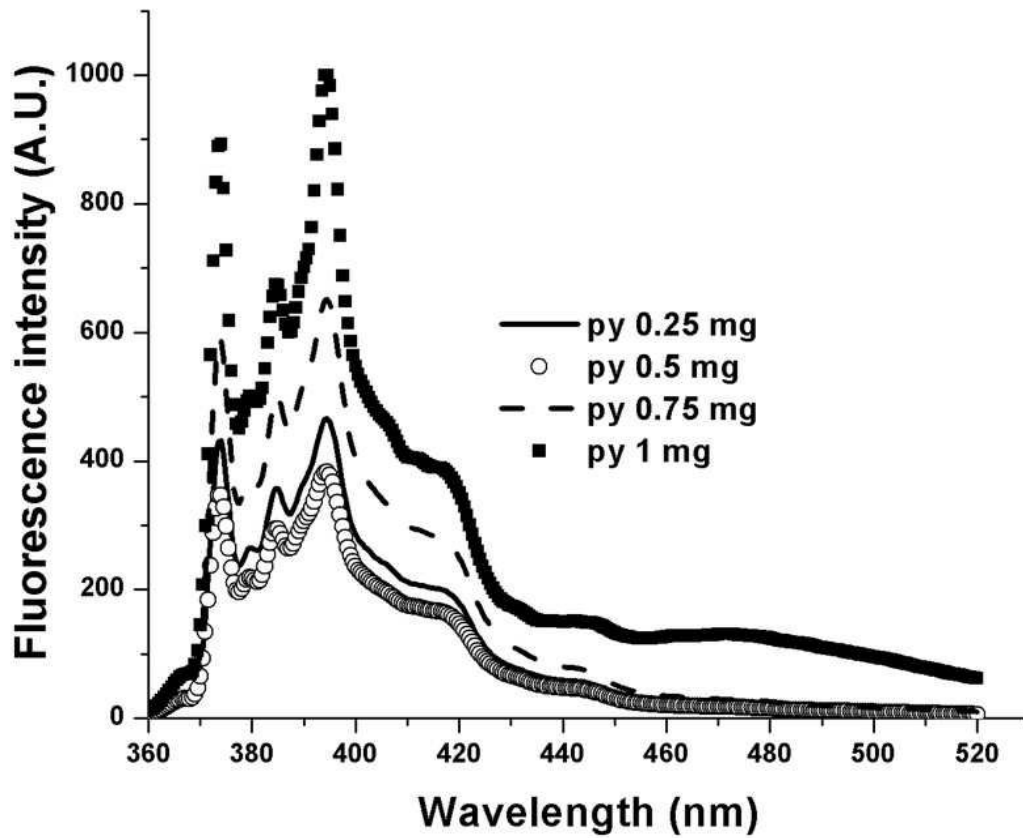
도면8



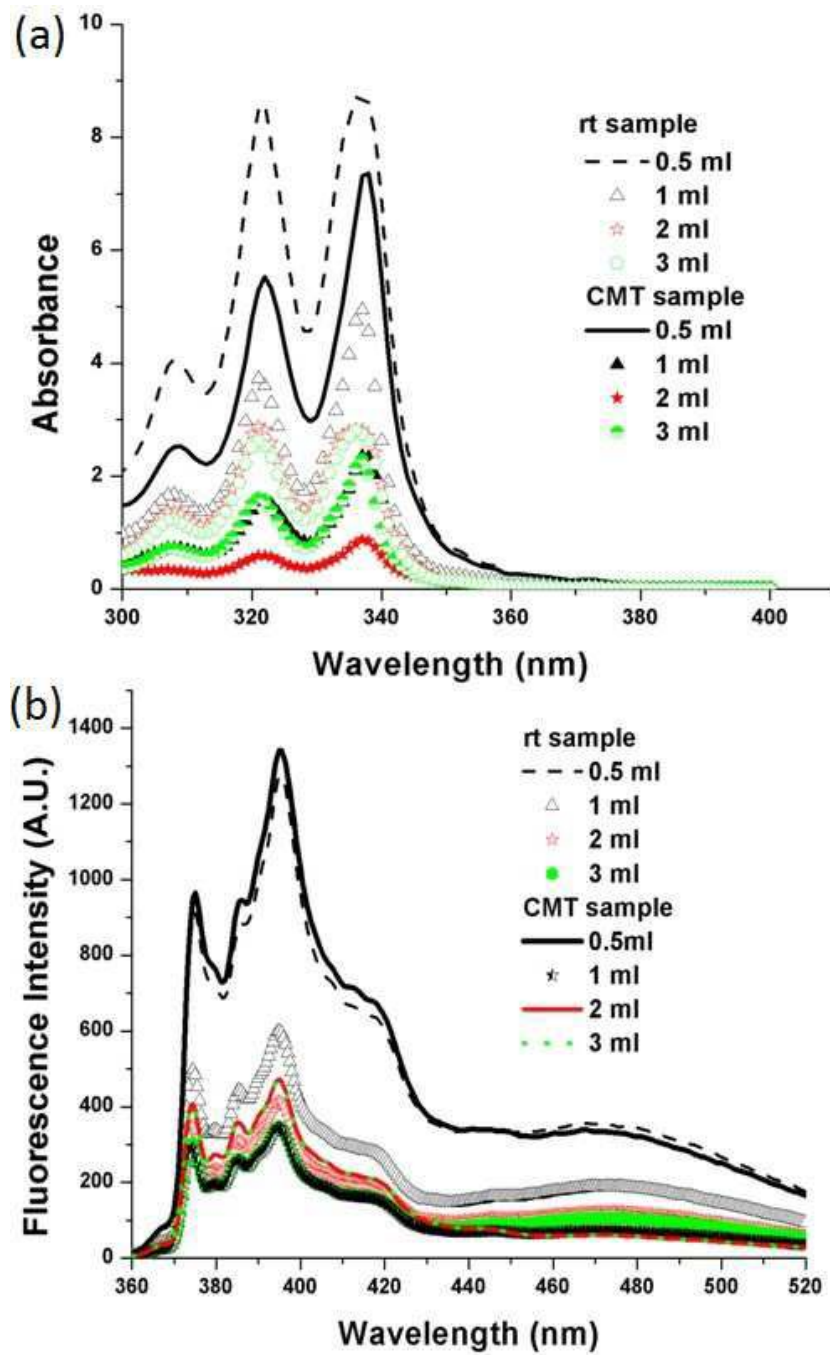
도면9



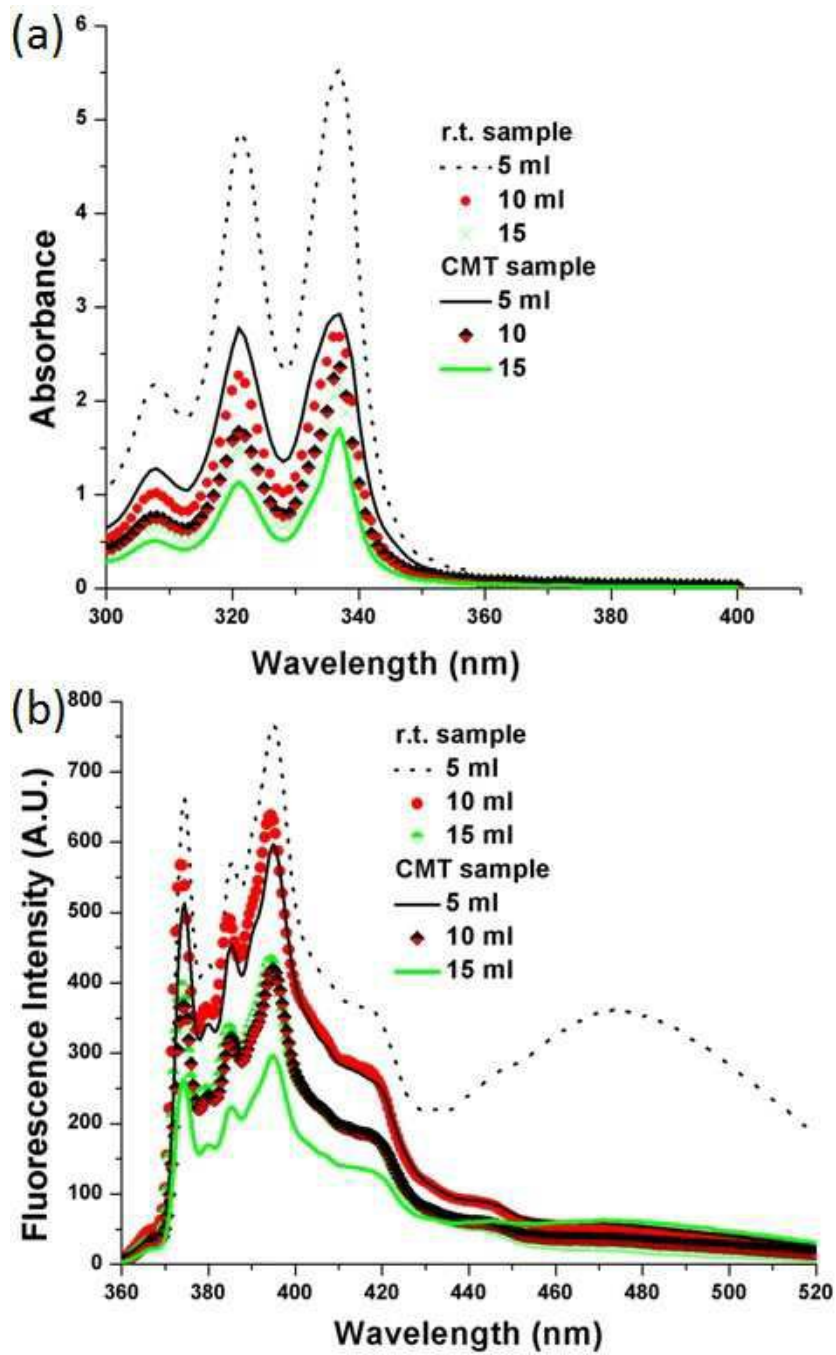
도면10



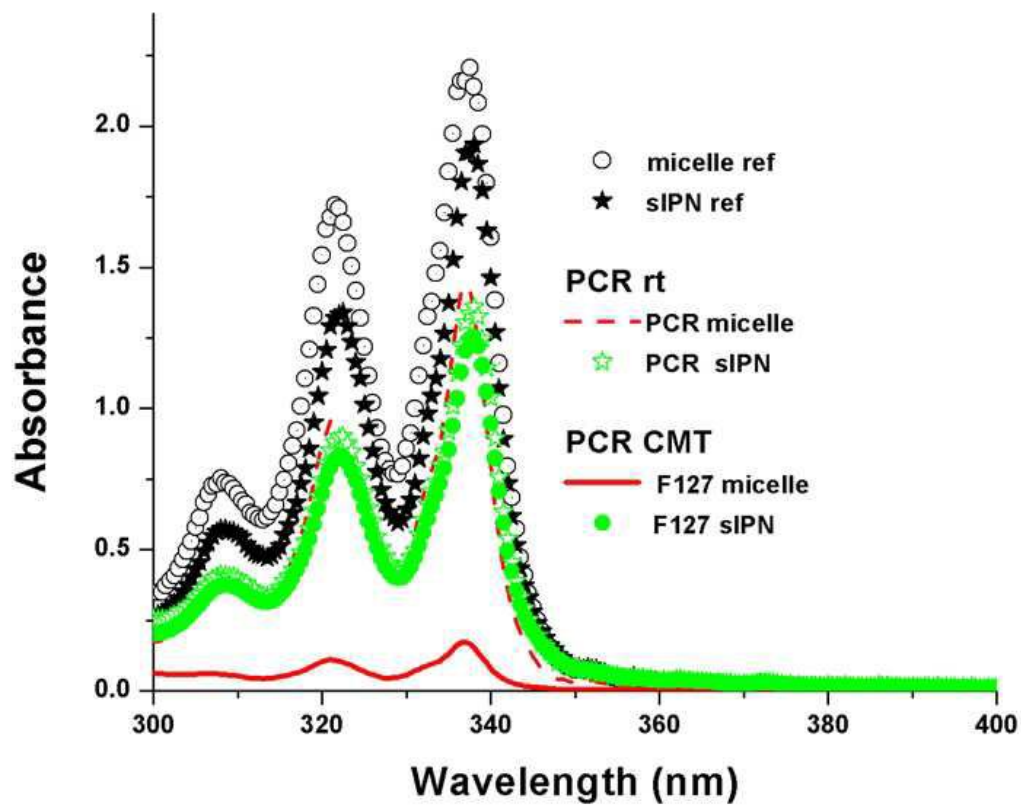
도면11



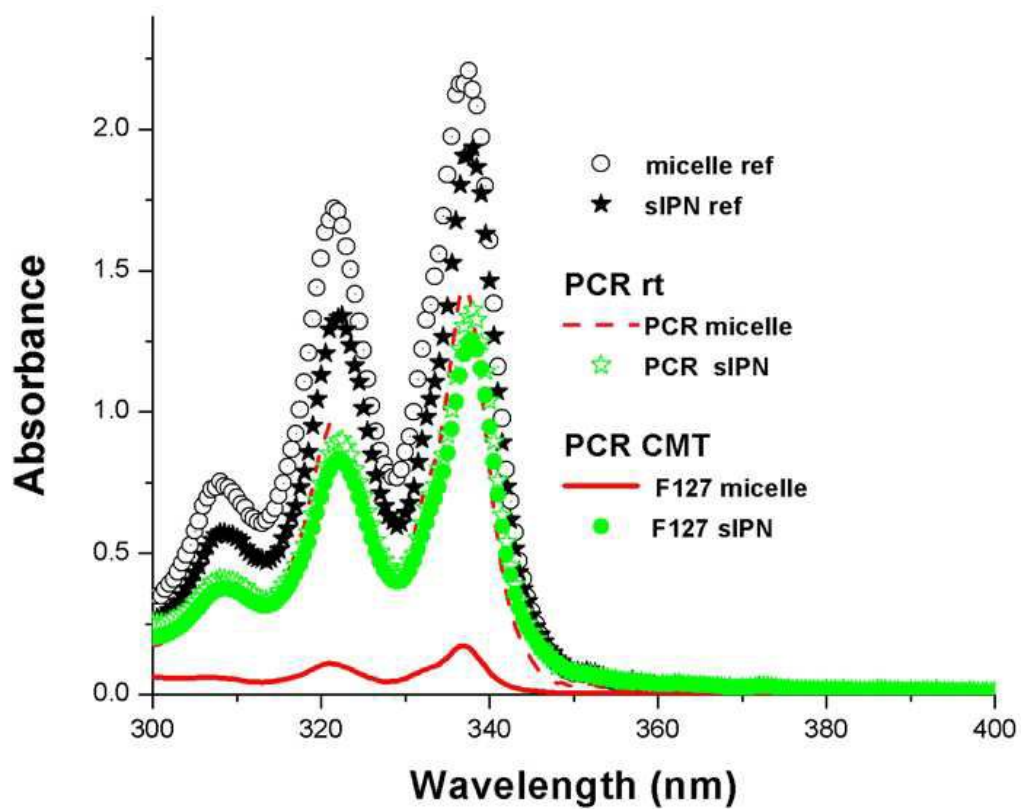
도면12



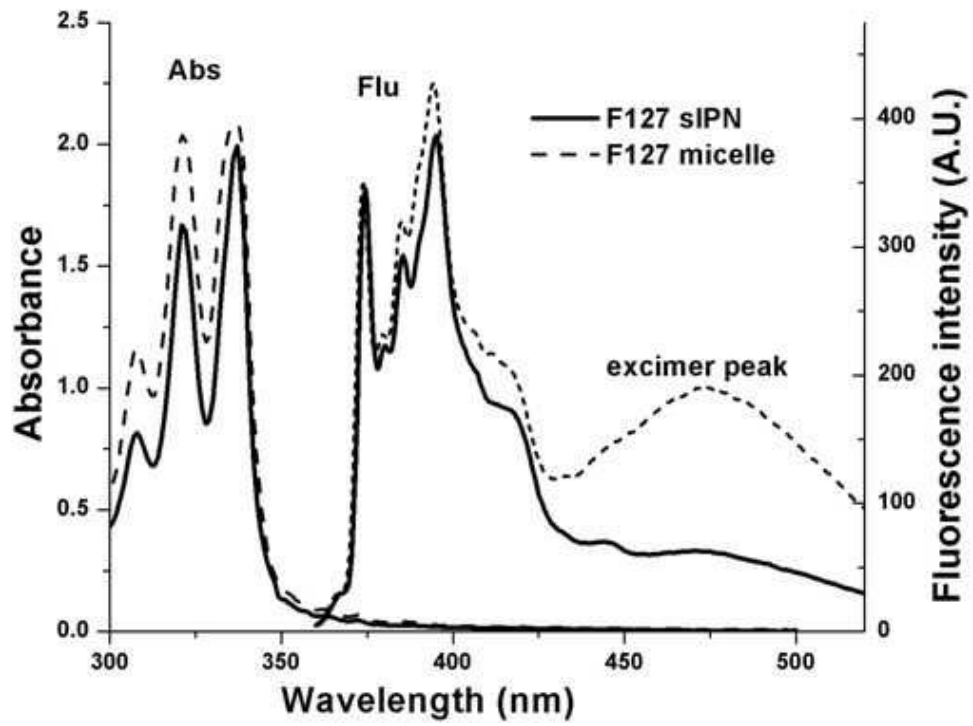
도면13



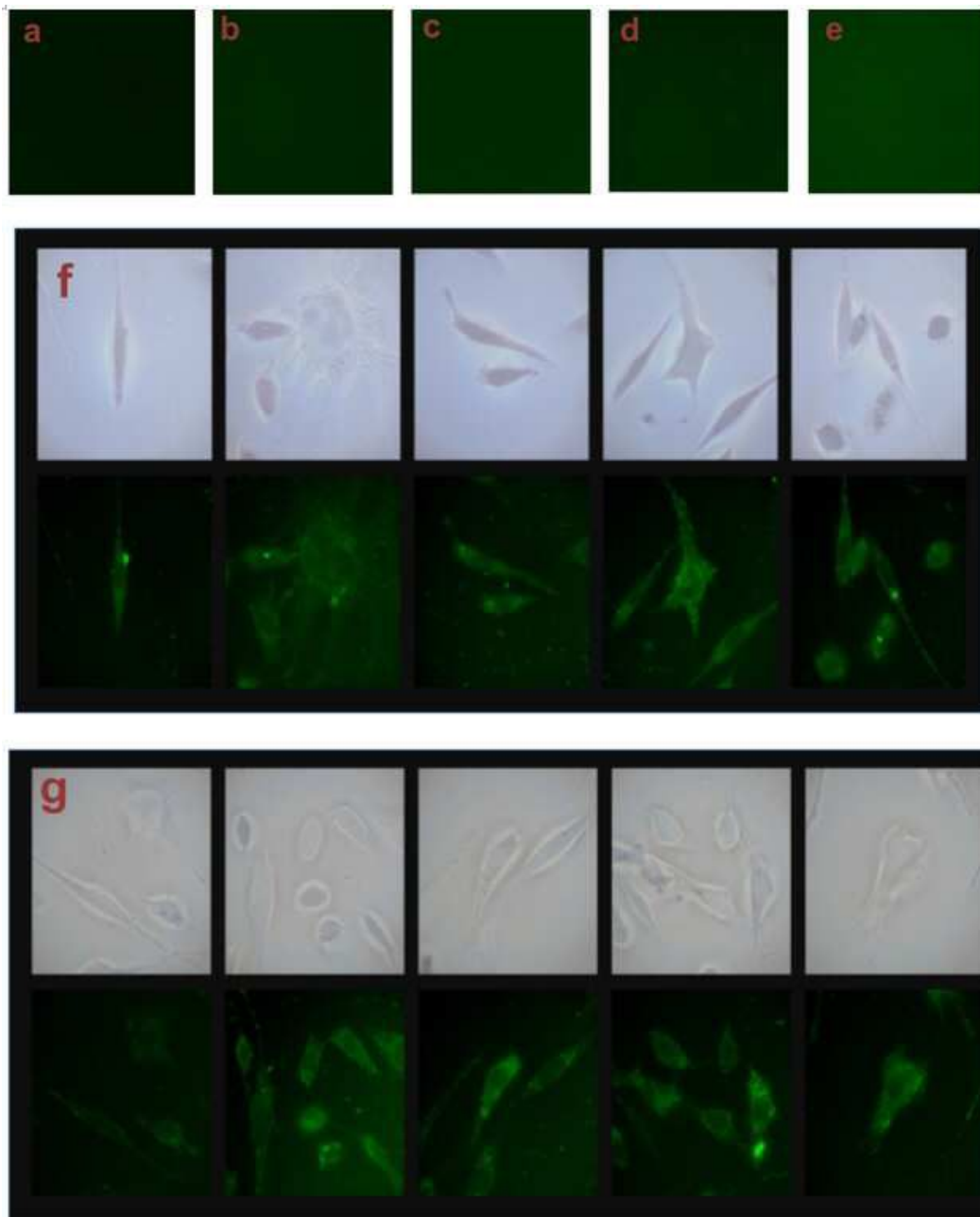
도면14



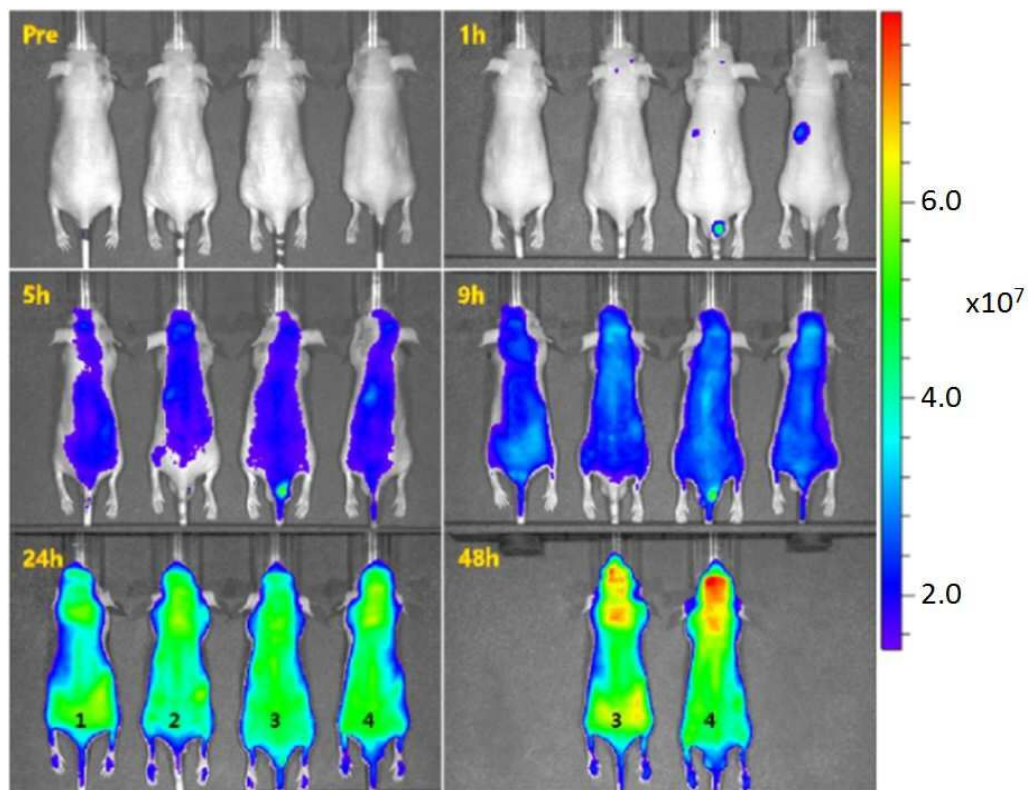
도면15



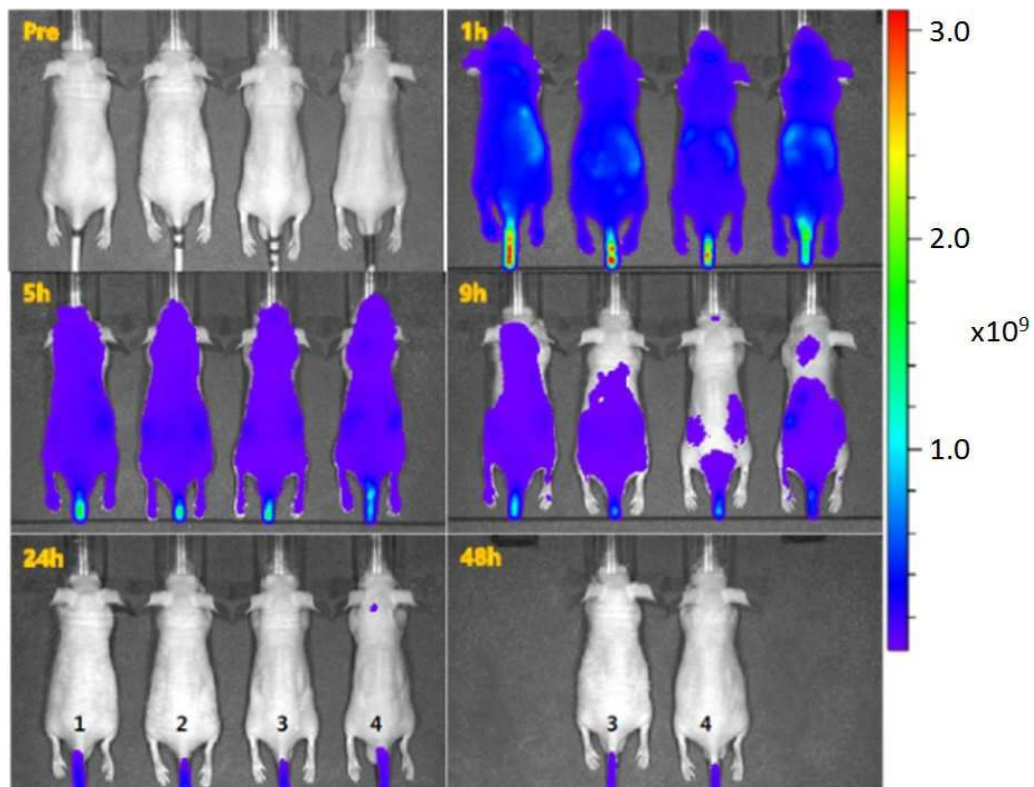
도면16



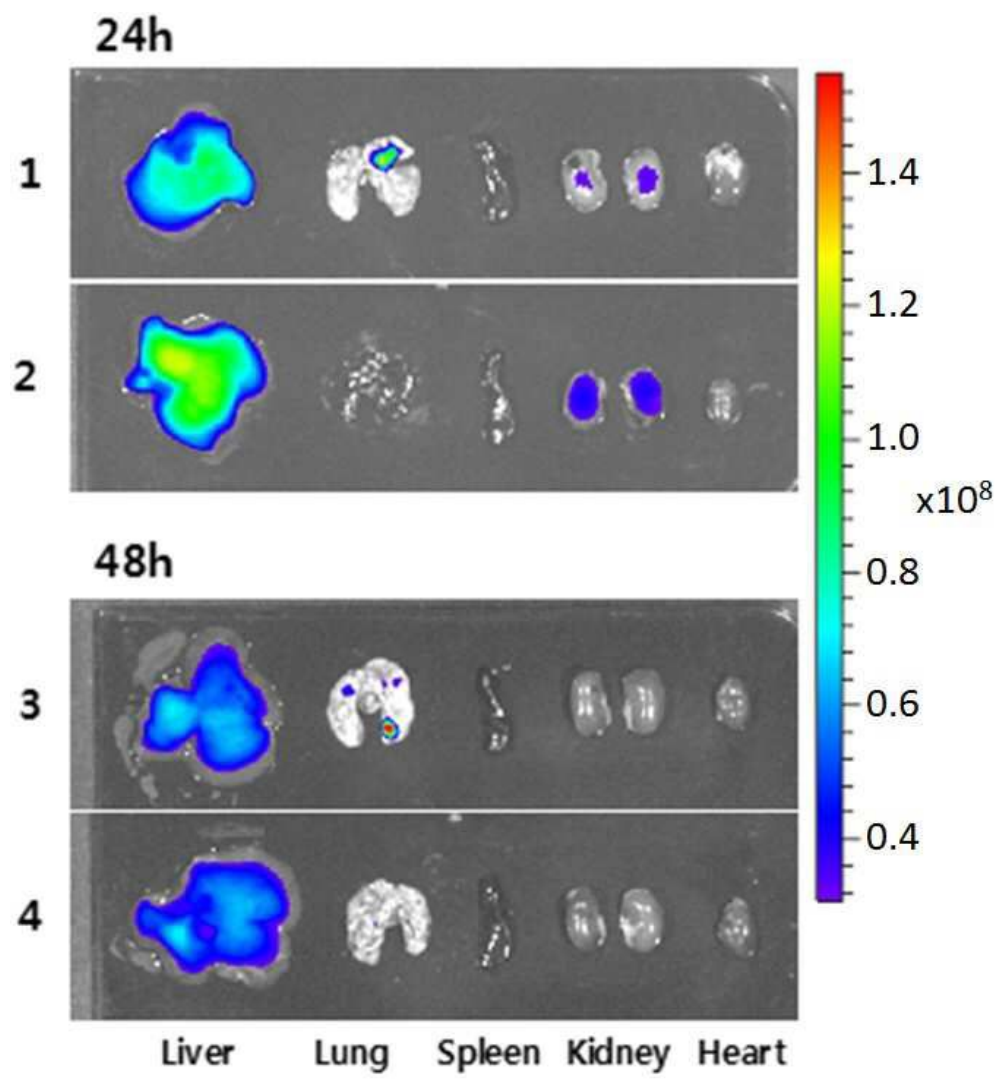
도면17a



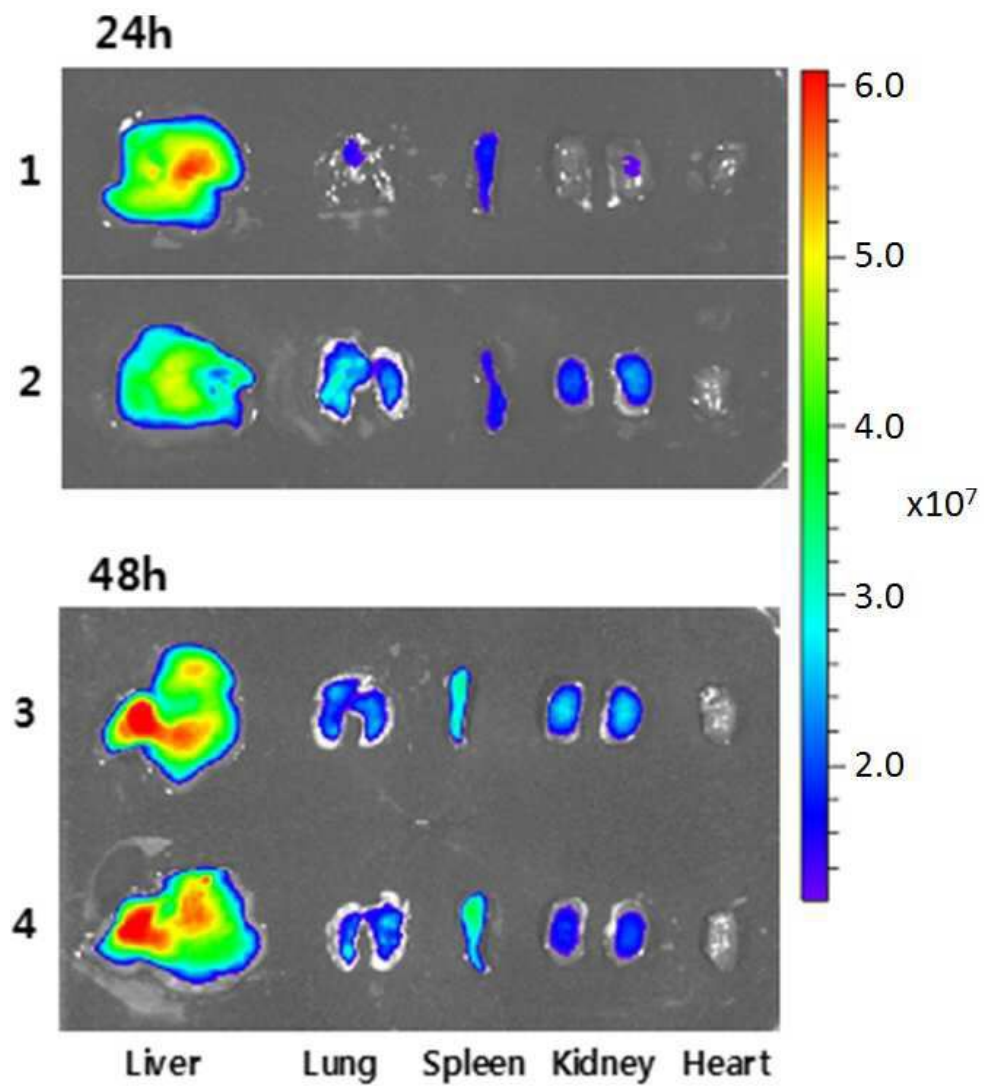
도면17b



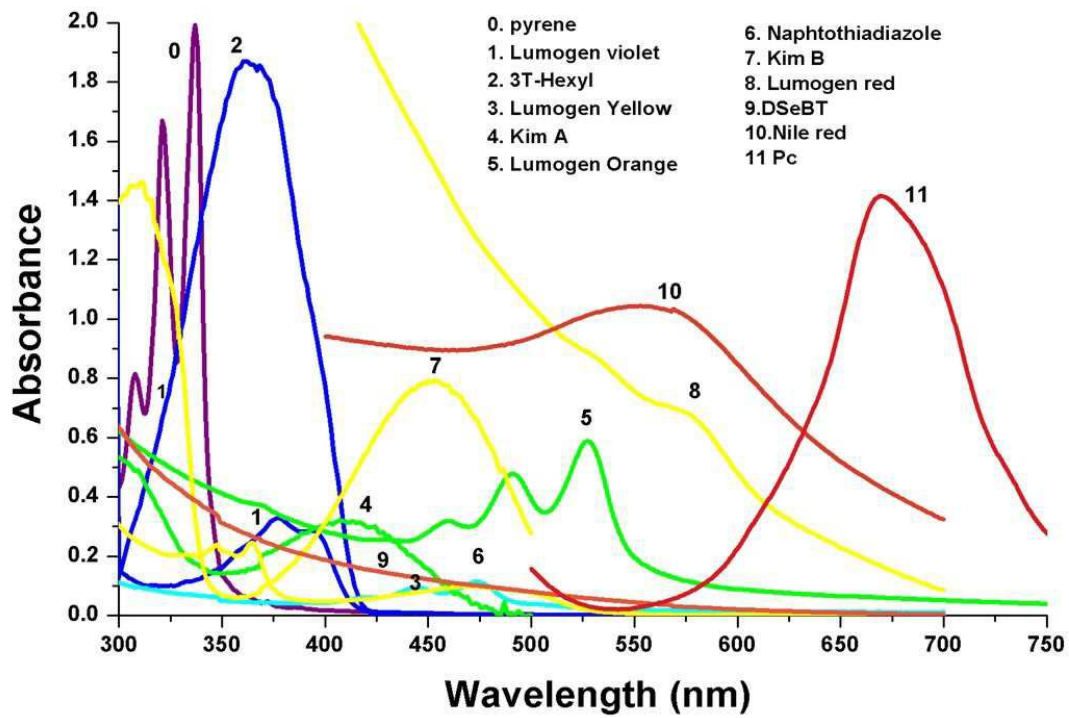
도면17c



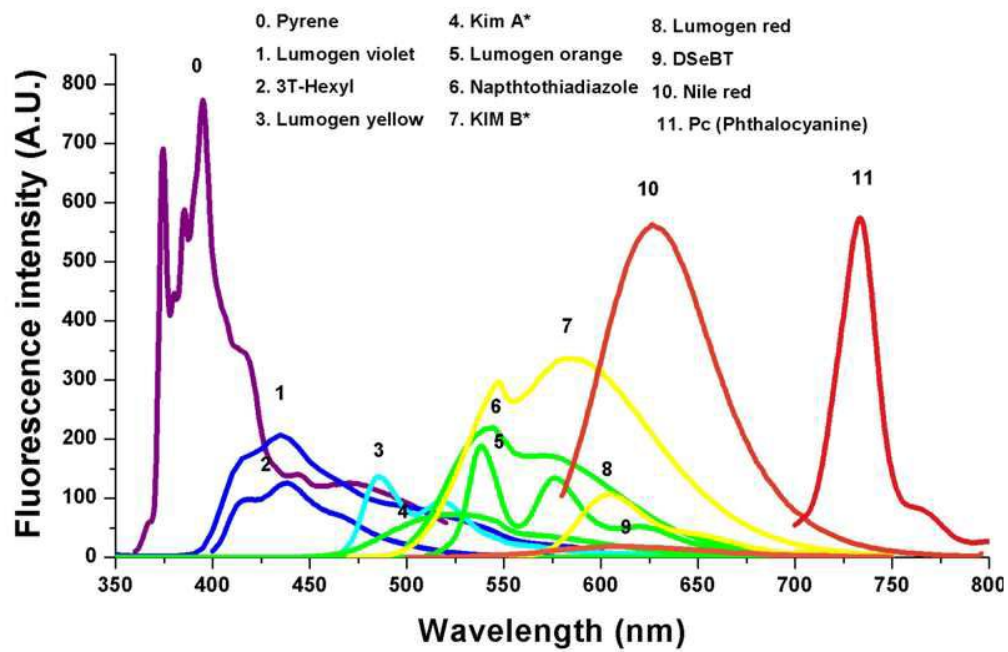
도면17d



도면18



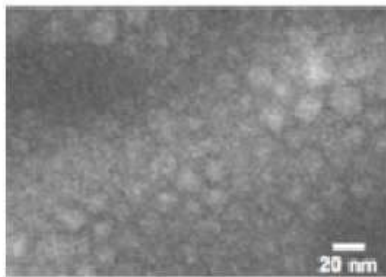
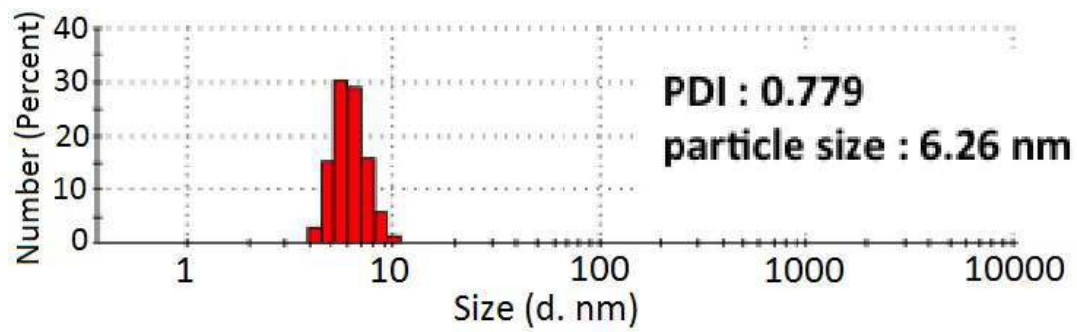
도면19



도면20



도면21



도면22

