



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0043718
(43) 공개일자 2013년05월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 49/12 (2006.01) A61K 49/08 (2006.01)

A61K 49/06 (2006.01) A61K 9/16 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0107772

(22) 출원일자 2011년10월21일

심사청구일자 2011년10월21일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

한국기초과학지원연구원

대전광역시 유성구 과학로 169-148 (어은동)

(72) 발명자

임용택

대전광역시 서구 둔산동 LG한마루 106-803

박혜선

대전광역시 유성구 은구비로 6, 전원빌딩 403호
(지족동)

홍관수

충청북도 청원군 오창읍 각리 637-1 한라비발디아
파트 808동 603호

(74) 대리인

특허법인 충청

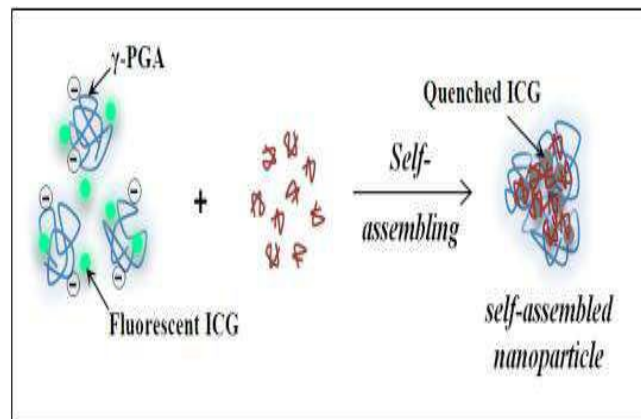
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 피에이치 감응성 광학 영상 프로브 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 형광염료가 봉입되어 있는 자기조립 입자의 pH-감응성 광학 영상 프로브에 관한 것으로서, pH-감응성 고분자와 음이온성 고분자로 형성된 자기조립입자에 근적외선 형광염료를 봉입되어 있다. 본 발명의 H-감응성 광학 영상 프로브 입자 내에서 소멸된 염료의 형광신호가 pH 변화에 의해 회복되어 나타나는 현상을 이용하여 특정 세포에 대한 선택적 형광 신호 증가를 감지할 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2011-0027684
부처명	교육과학기술부
연구사업명	특정기초핵심-공동
연구과제명	면역세포기반 암치료 효능향상을 위한 생체친화 나노메디컬소재 개발
주관기관	한국연구재단
연구기간	2011.09.01 ~ 2012.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	A0011032011
부처명	교육과학기술부
연구사업명	국가연구시설장비선진화지원사업
연구과제명	림프관 연구용 근적외선 형광 표식 시약 및 장비 개발
주관기관	한국기초과학지원연구원
연구기간	2011.06.01 ~ 2012.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

소수성 pH 감응성 고분자(A), 친수성 음이온성 고분자(B) 및 양친성 근적외선 형광염료(C)를 포함하고, 수용액 중에서 친수성 음이온성 고분자(B)가 소수성 pH 감응성 고분자(A)를 감싸며 형성된 자기조립 입자이며, 상기 형광염료(C)가 고분자(A) 및 고분자(B) 사이에서 물리적으로 접촉하며 입자 내에 봉입되어 자가 형광소멸(self-quenching)되는 것을 특징으로 하는, pH-감응성 광학 영상 프로브.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

약산성 조건에서 자기조립 입자가 붕괴(deassembling)되고, 형광염료(C)가 방출되어 형광 발색되는 것을 특징으로 하는, pH-감응성 광학 영상 프로브.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 소수성 pH 감응성 고분자(A)는

폴리베타아미노에스터(PBAE), 폴리아크릴산(poly acrylic acid, PAA), 폴리메타크릴산(poly methacrylic acid, PMAA), 폴리말레인안하이드라이드(poly maleic anhydride, PMA), N,N-디메틸아미노에틸 메타크릴레이트(dimethylaminoethyl methacrylate, DMAEMA), 폴리(N(ω)-메타크릴로일 글리실-L-류신, 폴리아마이드, 폴리(L-리신 이소프탈아마이드), 페닐알라닌, 이미다졸이 포함된 고분자 물질 및 이들의 혼합물 또는 공중합체로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, pH-감응성 광학 영상 프로브.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 친수성 음이온성 고분자(B)는 폴리글루탐산(Polyglutamic acid), 폴리아크릴산(Polyacrylic acid), 알긴산(Alginate), 카라기난(Carrageenan), 히알루론산(Hyaluronic acid), 폴리스타이렌술포산염(Poly(styrene sulfonate)), 카복시메틸셀룰로스(Carboxymethylcellulose), 셀룰로오스황산염(Cellulose sulfate), 덱스트란 황산염(Dextran sulfate), 헤파린(Heparin), 헤파린황산염(Heparin sulfate), 폴리메틸렌코구아니딘(Poly(methylene-co-guanidine)) 및 콘드로이틴황산염(Condroitin sulfate)으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는, pH-감응성 광학 영상 프로브.

청구항 5

제 2 항에 있어서,

상기 양친성 근적외선 형광염료(C)는 시아닌 계열인 cy3.5, cy5, cy5.5, cy7, ICG, Cypate, ITCC, NIR820, NIR2, IRDye78, IRDye80, IRDye82 와 Oxazine 계열의 Cresy Violet, Nile Blue, Oxazine 750, Rhodamines 계열의 Rhodamine800, Texas Red, 및 이들의 혼합물 또는 복합체로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, pH-감응성 광학 영상 프로브.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

표면에 세포에 감지될 수 있는 표적물질이 결합되어 있는 것을 특징으로 하는, pH-감응성 광학 영상 프로브.

청구항 7

하기 단계들을 포함하는 제 1 항에 따른 pH-감응성 광학 영상 프로브의 제조방법:

- (i) 음이온성 고분자가 함유된 용액과 근적외선 형광염료가 함유된 용액을 혼합한 수용액을 수득하는 단계; 및
- (ii) pH 감응성 고분자를 포함하는 용액을 첨가하여 자기조립 입자를 형성하는 단계.

명세서

기술분야

- [0001] 본 발명은 근적외선 형광물질을 봉입하고 있는 pH-감응성 광학 영상 프로브에 관한 것이며, 또한 상기 pH-감응성 광학 영상 프로브를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] 인체 내부의 특정 기관이나 세포를 선택적으로 감지하여 이미지화하는 데에 사용되는 전달체 혹은 추적체로서, 자기공명영상(MRI) 조영제나 방사능 동위원소를 이용한 기술(PET)이 사용되고 있다. 그러나 고가의 비용 문제와 방사능 노출로 인한 거부감, 검사시의 오염물의 처리 등의 문제점들이 여전히 남아있어 보다 간단하고 친환경적인 방법의 다른 분자 영상 방법의 개발이 요구되고 있다.
- [0003] 한편 형광 염료를 사용한 광학 이미징 기술의 개발에 있어서도 사용되는 형광 염료의 낮은 피부침투도와 인체유해성으로 인한 제약이 여전히 남아있다. 또한 이와 같은 추적체 역할을 하는 입자들의 대부분은 인체 내 특정 기관이나 세포로 입자 분포가 재분배되면서 이에 따라 증가된 신호가 감지되는 것이 대부분이다. 즉 신호의 민감성이나 효율이 높지 않다는 문제가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0004] 본 발명의 목적은 간단하고 인체 무해하며 신호 민감성이 우수한 pH-감응성 근적외선 광학 영상 프로브를 제공하는 것이다.
- [0005] 본 발명의 다른 목적은 상기 pH-감응성 근적외선 광학 영상 프로브의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0006] 이에 본 발명에서는 생체친화성 고분자와 인체 무해한 근적외선 형광염료를 이용하여 나노입자 프로브를 제조하고, pH 변화에 따라 특정 세포 내에서만 형광 신호가 감지되는 원리를 개발하여 광학 영상 프로브의 세포 특이성과 민감성을 높이고자 한다.
- [0007] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 소수성 pH 감응성 고분자(A), 친수성 음이온성 고분자(B), 및 양친성 근적외선 형광염료(C)를 포함하고, 수용액 중에서 친수성 음이온성 고분자(B)가 소수성 pH 감응성 고분자(A)를 감싸며 형성된 자기조립 입자이며, 상기 형광염료(C)가 고분자(A) 및 고분자(B) 사이에서 물리적으로 접촉하며 입자 내에 봉입되고 형광소멸(quenching)되는 것을 특징으로 하는 pH-감응성 광학 영상 프로브를 제공한다.
- [0008] 본 발명의 pH-감응성 광학 영상 프로브는 약산성 조건에서 자기조립 입자가 붕괴(deassembling)되고, 형광염료(C)가 방출되어 형광 발색될 수 있다. 즉, 상기 양친성 근적외선 형광염료(C)는 입자내 봉입된 상태에서 자가형광소멸(self-quenching)되고 pH 변화에 따라 입자로부터 방출되어 상태에서 형광을 띄는 물질을 사용하는 것을 특징으로 한다.
- [0009] 상기 소수성 pH 감응성 고분자(A)는 폴리메타아미노에스터(PBAE), 폴리아크릴산(poly acrylic acid, PAA), 폴리메타크릴산(poly methacrylic acid, PMAA), 폴리말레인안하이드라이드(poly maleic anhydride, PMA), N,N-디메틸아미노에틸 메타크릴레이트(dimethylaminoethyl methacrylate, DMAEMA), 폴리(N(ω)-메타크릴로일 글리실-L-류신, 폴리아마이드, 폴리(L-리신 이소프탈아마이드), 페닐알라닌, 이미다졸이 포함된 고분자 물질, 및 이들의 혼합물 또는 공중합체로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나 이에 한정되지 않는다.
- [0010] 또한, 상기 친수성 음이온성 고분자(B)는 폴리글루탐산(Polyglutamic acid), 폴리아크릴산(Polyacrylic acid), 알긴산(Alginate), 카라기난(Carrageenan), 히알루론산(Hyaluronic acid), 폴리스타이렌술포산염(Poly(styrene sulfonate)), 카복시메틸셀룰로스(Carboxymethylcellulose), 셀룰로오스황산염(Cellulose sulfate), 텍스트란황산염(Dextran sulfate), 헤파린(Heparin), 헤파린황산염(Heparin sulfate), 폴리메틸렌코구아니딘

(Poly(methylene-co-guanidine)) 및 콘드로이틴황산염(Chondroitin sulfate)으로 구성된 군에서 선택될 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0011] 상기 양친성 근적외선 형광염료(C)는 입자내 봉입된 상태에서 자가 형광소멸(self-quenching)되고 pH 변화에 따라 입자로부터 방출되어 상태에서 형광을 띄게 되는 형광염료일 수 있다. 일 예에서, 시아닌 계열인 cy3.5, cy5, cy5.5, cy7, ICG, Cypate, ITCC, NIR820, NIR2, IRDye78, IRDye80, IRDye82 와 Oxazine 계열의 Cresy Violet, Nile Blue, Oxazine 750, Rhodamines 계열의 Rhodamine800, Texas Red, 및 이들의 혼합물 또는 복합체로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0012] 하나의 실시예에서, 상기 pH-감응성 광학 영상 프로브의 표면에 세포에 감지될 수 있는 표적물질이 결합되어 선택적 세포 감지에 활용될 수 있다.

[0013] 본 발명의 또 하나의 실시예에서, 하기 단계들을 포함하는 pH-감응성 광학 영상 프로브의 제조방법을 제공한다.

[0014] (i) 음이온성 고분자가 함유된 용액과 근적외선 형광염료가 함유된 용액을 혼합한 수용액을 수득하는 단계; 및 (ii) pH 감응성 고분자를 포함하는 용액을 첨가하여 자기조립 입자를 형성하는 단계.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따른 광학 영상 프로브는 근적외선 형광 염료가 봉입되어 있는 pH-감응성 고분자 조립체로서 이를 이용하여 특정 세포에 대한 선택적 형광 신호 감지가 가능하다. 또한 본 발명에 따른 방법으로 형광 염료가 봉입된 pH-감응성 자기조립 입자를 쉽고 빠르게 제조하여 세포내 pH 변화에 따라 소멸되었던 형광신호 회복을 관찰할 수 있고, 특정 세포에서의 형광 신호 감지가 가능한 근적외선 광학영상 프로브로서 활용 가능한 입자를 제조할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 형광 염료인 인도시아닌그린(ICG)이 봉입되어 있는 pH-감응성 감마-PGA/PBAE 자기조립 나노입자의 제조 방법이다;

도 2는 pH-감응성 감마-PGA/PBAE 자기조립 나노입자의 세포내 이동에서 형광 신호 회복과정의 모식도이다;

도 3은 ICG가 봉입되어 있는 pH-감응성 감마-PGA/PBAE 자기조립 나노입자의 크기분포(좌)와 전자투과현미경(TEM) 사진이다.

도 4는 ICG가 봉입되어 있는 pH-감응성 감마-PGA/PBAE 자기조립 나노입자(실선)와 동일 농도의 ICG(점선)의 흡광도(좌)와 형광신호(우) 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 5는 ICG가 봉입되어 있는 pH-감응성 감마-PGA/PBAE 자기조립 나노입자를 동결건조 후 pH 7.4 용액(점선)과 pH 5.2 용액(실선)에 각각 재분산 한 후 얻은 형광신호 스펙트럼이다.

도 6은 ICG가 봉입되어 있는 pH-감응성 감마-PGA/PBAE 자기조립 나노입자를 대식세포인 RAW264.7 세포에 처리한 후 37℃ 배양기에 2시간 배양 후 얻은 그림이다. (좌)는 처리 직후의 그림이고, (우)는 처리 2시간 후의 그림을 나타낸다(청색은 염색된 핵을 나타내고, 적색은 ICG의 형광신호를 나타낸다).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명은 생체친화성 pH-감응성 고분자를 이용한 자기조립 입자에 근적외선 형광염료를 봉입하여, 입자 내에서 소멸되었던 염료의 형광신호가 pH 변화에 감응하여 회복되는 “ON/OFF switchable” 시스템으로서, 선택적 세포 감지에 활용할 수 있는 광학영상 기법을 제공한다.

[0018] 형광 프로브와 관련된 선행문헌 일본공개특허 제2010-053354호에는 폴리글루탐산과 수민감성 형광물질이 화학적 결합된 형태로서 pH 의존적으로 입체형태가 랜덤코일형에서 나선형으로 변화하면서 형광 강도가 변화되는 프로브를 제공한다. 동 선행문헌에서는 수민감성 형광물질을 이용하는 바 pH변화에 따라 형광물질 자체의 형광특성이 변화한다.

[0019] 이와 달리, 본 발명에 따른 프로브에서 형광염료는 고농도에서 자가형광 소멸(self-quenching) 현상을 나타내는 형광물질을 이용하여, 형광물질 자체가 pH에 따라 형광신호가 다르게 나타나는 것이 아니라, 입자내 봉입(encapsulation)과 방출(release)에 따른 ‘형광물질의 농도 변화’에 의해 형광 신호가 자가소멸되거나 회복되

는 현상을 이용한다.

- [0020] pH-감응성 광학 영상 프로브
- [0021] 본 발명은 소수성 pH 감응성 고분자(A), 친수성 음이온성 고분자(B), 및 양친성 근적외선 형광염료(C)를 포함하는 pH-감응성 광학 영상 프로브에 관한 것이다.
- [0022] 상기 친수성 음이온성 고분자(B)는 수용액 중에서 소수성 pH 감응성 고분자(A)를 감싸며 자기조립 입자를 형성한다. 즉, 수용액 중에서 소수성 pH 감응성 고분자(A)가 물에 녹아있던 친수성 음이온성 고분자(B)에 의해 둘러싸여 물로부터 보호(protection) 받게 되고 이 때문에 입자 내부에는 소수성 pH 감응성 고분자(A)가 외부에는 친수성 음이온성 고분자(B)가 감싸는 형태가 형성된다.
- [0023] 상기 근적외선 형광염료(C)는 양친성을 갖는 바 양 고분자(A) 및 고분자(B) 사이에서 물리적으로 접촉하며 입자 내에 봉입된다. 본 발명에서 형광염료(C)는 입자 내에 봉입되어 농도가 높아지면서 자가 형광소멸(self-quenching)되고 pH 변화에 따라 입자로부터 방출되어 저농도가 되었을 때에는 형광발광하는 것을 사용한다. 상기 형광염료(C)는 고분자(A) 및 고분자(B) 사이에서 화학적 결합이 아닌 물리적 접촉에 의한 소수성 결합(phobic-phobic interaction) 상태에 있기 때문에 형광염료(C)가 입자외부로 방출되었을 때 본래의 형광 특징을 그대로 나타내며 입자로부터 분리될 수 있다.
- [0024] 본 발명의 pH-감응성 광학 영상 프로브 입자는 약산성 조건에서 자기조립 입자가 붕괴(de-assembling)되고, 형광염료(C)는 방출되어 저농도가 되면서 형광 발색될 수 있다. 여기서, 약산성 조건은 소수성 pH 감응성 고분자(A)의 pKa 값에 대응하는 바, 예를 들어 pH6.5 이하의 약산성 분위기에서 PBAE는 사슬의 분해로 인해 분해되는 특성을 갖기 때문에 PBAE와의 자기조립에 의해 만들어진 입자는 pH6.5 이하의 약산성 분위기에서 더 이상 입자 형태를 유지하지 못하고 붕괴되는 현상을 나타낸다. 이에 하나의 예에서, 상기 약산성 조건은 pH6.5 내지 pH5.2의 범위일 수 있다.
- [0025] 본 발명에서 상기 고분자(A) 및 고분자(B)는 모두 생체 내 이용에 적합하도록 생체 내에 존재하는 효소에 의하여 분해가능하고, 생체에 대한 독성이 없으며, 항원성이 없는 것이 바람직하다.
- [0026] 이에, 상기 소수성 pH 감응성 고분자(A)는 폴리메타아미노에스터(PBAE)를 포함하여 폴리아크릴산(poly acrylic acid, PAA), 폴리메타크릴산(poly methacrylic acid, PMAA), 폴리말레인안하이드라이드(poly maleic anhydride, PMA), N,N-디메틸아미노에틸 메타크릴레이트(dimethylaminoethyl methacrylate, DMAEMA), 폴리(N(ω)-메타크릴로일 글리실-L-류신 등의 pH 감응성 유기 고분자와 폴리아마이드, 폴리(L-리신 이소프탈아마이드), 페닐알라닌 등의 소수성 아미노산 및 이미다졸이 포함된 고분자 물질 등을 포함하는 pH 감응성 유기 고분자 혹은 이들의 혼합물 또는 공중합체일 수 있으나 이에 한정된 것은 아니다.
- [0027] 또한, 상기 친수성 음이온성 고분자(B)는 폴리글루탐산(Polyglutamic acid), 폴리아크릴산(Polyacrylic acid), 알긴산(Alginate), 카라기난(Carrageenan), 히알루론산(Hyaluronic acid), 폴리스타이렌술포산염(Poly(styrene sulfonate)), 카복시메틸셀룰로스(Carboxymethylcellulose), 셀룰로오스황산염(Cellulose sulfate), 덱스트란 황산염(Dextran sulfate), 헤파린(Heparin), 헤파린황산염(Heparin sulfate), 폴리메틸렌코구아니딘(Poly(methylene-co-guanidine)) 및 콘드로이틴황산염(Condroitin sulfate)으로 구성된 군에서 선택될 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0028] 본 발명에서 양친성 근적외선 형광염료(C)는 입자내 봉입된 상태에서 고농도가 되면 자가 형광소멸(self-quenching)되고 pH 변화에 따라 입자로부터 방출되어 저농도가 된 상태에서 형광을 띄게 되는 것이라면 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 시아닌 계열인 cy3.5, cy5, cy5.5, cy7, ICG를 포함할 수 있다. 본 발명에 사용되는 다른 종류의 근적외선 형광 염료로는 Cypate, ITCC, NIR820, NIR2, IRDye78, IRDye80, IRDye82 와 Oxazine 계열의 Cresy Violet, Nile Blue, Oxazine 750 및 Rhodamines 계열의 Rhodamine800, Texas Red 및 이들의 혼합물 또는 복합체로 구성된 군에서 선택되는 유기물질일 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0029] 또한, 본 발명에서 pH-감응성 광학 영상 프로브의 입자 크기는 특별히 제한되지 않으며, 대략 20 ~ 2000 nm 크기의 나노입자일 수 있다. 입자 크기가 20 미만이거나 2000 nm를 초과하면 세포내로의 도입 효율이 낮은 문제점이 있다.
- [0030] 본 발명의 일 구체예에서는 생체 친화적인 pH 감응성 고분자로서 폴리메타아미노에스터(PBAE)와 생체 안정성이 높은 근적외선 형광 염료인 인도시아닌그린(ICG)을 사용하여 pH-감응성 근적외선 광학 나노입자 프로브를 제조

하였다.

- [0031] 상기 PBAE는 세포내로의 효과적인 트랜스펙션(transfection) 특성을 가지며 pH에 따라 감응하는 용해성을 나타내는 고분자이다. 또한 생체친화적인 분해성을 갖기 때문에 고분자를 기반으로 하는 나노전달체의 유용한 재료로서 사용되는 물질로 알려져 다양한 나노전달체 연구에 활용되고 있다.
- [0032] 상기 인도시아닌그린(indocyanine green, ICG)은 근적외선 영역(700 - 1300 nm)에서의 형광신호를 나타내는 형광염료로서 미국 FDA의 승인을 받아 인체 적용이 허용되는 매우 생체친화적인 형광염료이다. 특히, 피부침투도가 높은 근적외선 영역대의 흡수·형광 특성을 갖기 때문에 인체에 사용될 때에 높은 신호 감지율을 나타낼 수 있고, 구조적으로 친수성기와 소수성기를 모두 가진 양친성의 성격을 갖는다.
- [0033] 이러한 ICG의 활용기대에 따라 몇몇 의학 분야에서의 적용이 이루어지고 또 시도되고 있지만, 몇 가지 제약에 의해 다양한 분야에서의 활용이 제한되고 있다. ICG는 높은 생체안정성을 가짐에도 불구하고, 매우 낮은 양자효율을 나타내어 신호감지의 어려움을 주는데 이를 극복하기 위해 염료를 고농도로 처리할 때에는 자가 형광 소멸이 심하게 나타나 문제 해결이 어려워진다. 또한 구조적으로 다른 물질과의 결합작용기가 존재하지 않으므로 ICG를 포함하는 입자 형태의 프로브 제조나 변형에 어려움이 있으며, 습한 환경에서 빠른 분해성을 나타내어 수용액 상에서 낮은 안정성을 갖기도 한다. 이에 따라 높은 양자효율을 나타내며 안정적으로 입자내부에 ICG는 봉입하여 유지하는 기술이 요구되고 있는 바, 본 발명에서는 ICG의 양친성 성질을 이용하여 고분자로 이루어진 자기조립 입자 내부에 안정적으로 ICG를 봉입하는 기술을 개발하였음을 장점으로 한다.
- [0034] 이와 관련하여 도 1에는 본 발명에 따른 pH-감응성 광학 영상 프로브의 제조방법이 나타나 있고 도 2에는 세포 내 이동 경로에서 입자의 형광 신호 회복의 모식도가 나타나 있다.
- [0035] 먼저 도 1을 참조하면 pH-감응성 고분자로서 폴리베타아미노에스터(PBAE)를 사용하였으며, 형광염료로는 생체무해한 근적외선 형광 염료인 인도시아닌그린(ICG)을 사용하였다. 소수성의 PBAE를 친수성 환경에서 보호하고 또한 보다 안정적인 입자 형성을 위해 친수성의 음이온성 고분자인 감마-PGA가 함께 사용되었다. 감마-PGA와 ICG가 용해되어있는 친수성 환경에 PBAE를 도입하면 고분자간 자기조립에 의해 입자가 형성되고 입자 내부에 ICG가 봉입된다. 입자 외면에 친수성의 PGA가 위치하고 내면에 소수성의 PBAE가 위치하며 형광색소가 대략 두 고분자의 경계에 위치하고 있다.
- [0036] 봉입된 형광색소(ICG)는 고농도로 존재시에 자가 형광소멸 현상(self-quenching)에 의해 형광 신호가 감소되는 특성을 가지고 있다. 이렇게 형광 소멸된 입자가 낮은 pH 환경에 놓이면, 입자를 이루고 있던 PBAE의 분해가 가속화되면서 입자 내부에 봉입되었던 ICG가 불안정한 상태에 놓이며 입자로부터 방출된다. 방출된 ICG는 소멸 상태에서 벗어나 본래의 형광 신호를 회복하게 된다.
- [0037] 여기서, ICG가 자가 형광소멸을 나타내는 농도(threshold value)는 본 발명자의 실험 결과상 대략 0.05 mg/ml로 측정되었다. 0.05 mg/ml 이하에서는 농도에 따라 형광 신호가 점차 증가하지만, 0.05 mg/ml 이상에서는 자가 형광소멸에 의해 형광 신호가 오히려 감소하게 된다. 본 발명의 실시에서 ICG는 수용액 상에 0.01 mg/ml 의 농도로 녹아있다가 PABE 첨가되어 입자가 형성되면서 입자 내에 봉입되어 고농도로 밀집된다. 이에 따라, 입자내 고농도의 ICG는 자가 형광소멸 효과를 나타내는 threshold 값 이상의 고농도로 밀집되면서 형광 신호를 나타내지 못한다. 이에, 하나의 바람직한 예에서 자기조립 입자 내 형광염료(C)의 농도는 0.05 mg/ml 이상일 수 있다.
- [0038] 본 발명자의 실험에 따르면 입자내 봉입된 ICG의 흡광 신호가 free ICG 보다 약간 장파장쪽으로 이동(shift)되어 나타나는 것을 볼 때, 고분자와 ICG 사이에 소수성 결합이 존재하는 것으로 생각할 수 있으며, ICG가 다시 입자 밖으로 방출되는 경우, 본래의 흡광 파장을 회복하는 것을 보면 화학적 결합이 아닌 소수성 상호 결합(phobic-phobic interaction)에 의한 물리적 결합이 존재할 수 있다.
- [0039] 또한, PGA와 ICG 만의 혼합물에서는 흡광 파장의 shift 가 나타나지 않으며, PBAE를 첨가한 입자 형성 후에만 흡수파장의 shift 가 관찰되는 것으로 보아 ICG는 주로 PBAE와 소수성 결합을 이루고 있으며, ICG의 양친성 특성에 따라 PGA의 친수성 분위기 하에서도 ICG가 입자 내에 적절히 존재하며 PGA와 PBAE의 자기조립 구조를 방해하지 않고 잘 봉입되어 있는 것을 알 수 있었다.
- [0040] 도 2를 참조하여 본 발명에 따른 pH-감응성 광학 영상 프로브가 세포 내로 도입되었을 때의 거동을 살펴보면, 본 도면에서는 특정 세포에 특이적으로 결합하는 물질을 입자 표면에 결합하여 세포내로 도입(ex. antibody-mediated endocytosis)되는 응용예를 나타낸 것으로 이러한 경우 특정 세포에 대해 선택적으로 신호가 감지되는 입자의 개발이 가능함을 나타낸다.

- [0041] 세포 내로 도입된 pH-감응성 광학 영상 프로브입자는 pH가 낮은 엔도솜(pH5~6, late endosome)으로 이동하게 되고, 낮은 pH 환경에서 구조체를 이루고 있던 PBAE의 붕괴에 의해 ICG가 방출된다. ICG는 프로브 입자 내부에서는 형광 소멸된 상태로 있다가 낮은 pH 상태로 가면 자기조립 입자의 빠른 분해가 이루어지면서 구조체의 붕괴로 형광 신호가 회복된다.
- [0042] 일 실시예에서 본 발명의 pH-감응성 광학 영상 프로브는 입자 표면에 세포 특이적 물질이 결합되어 있을 수 있다. 이에 특정 세포에 대한 선택적인 감지가 가능하게 하는 광학 영상 나노프로브를 제조할 수 있다.
- [0043] 상기 세포특이적 물질은 예를 들어 항체, 단편화 항체, 리셉터 결합 분자 등을 들 수 있다. 본 발명의 프로브의 용도는 특별히 제한되지 않으며 예를 들어 염증이나 종양의 부위(pH5~6 정도)에 있어서 pH-감응성 형광 센싱을 가능하게 한다. 또한, 본 발명의 프로브 입자는 세포내 수송이나 단백질 분해 기구를 이해하기 위한 프로브로서 유용하다. 예를 들어 세포 내 엔도솜 내의 산성 환경을 검출하는 것이 가능한 형광 프로브이다. 이와 같은 프로브는 세포 생물학 분야에 있어서 응용을 기대할 수 있다.
- [0044] pH-감응성 광학 영상 프로브의 제조방법
- [0045] 본 발명은 소수성 pH-감응 고분자와 친수성 고분자를 이용하여 자기조립 나노입자를 쉽고 빠르게 제조하고 입자 내부에 형광 염료가 비교적 안정적으로 봉입되어 있는 pH-감응성 광학 영상 프로브의 제조 방법을 제공한다.
- [0046] 일 실시예에서, 하기 단계들을 포함하는 pH-감응성 광학 영상 프로브의 제조방법을 제공한다.
- [0047] (i) 음이온성 고분자가 함유된 용액과 근적외선 형광염료가 함유된 용액을 혼합한 수용액을 수득하는 단계; 및
- [0048] (ii) pH 감응성 고분자를 포함하는 용액을 첨가하여 자기조립 입자를 형성하는 단계.
- [0049] 상기 단계(i)에서 반응용매는 물이고, 단계(ii)에서 pH 감응성 고분자는 메탄올에 고농도로 용해된 용액 상태일 수 있다.
- [0050] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0051] 시약 및 재료
- [0052] - 폴리베타아미노에스터(PBAE)는 1-(2-amino ethyl)pyrrolidine으로서 1,4-butandiol diacrylate 와 5-amino-1-pentanol를 이용하여 Michael addition 방법으로 본 실험실에서 합성되었으며, 분자량은 8,000 Da 정도로 확인되었다(한국고분자시험연구소).
- [0053] - 감마-PGA는 분자량이 50,000 Da인 수용성 형태(salt form)로 (주)바이오리더스에서 제공되었으며, 인도시아닌 그린은 (주)동인당 제약으로부터 구입하였다.
- [0054] - 입자의 재분산시 PBS(phosphate buffered saline, pH7.4) 용액을 사용하였으며, pH5.2 용액 제조시 PBS 용액에 1N HCl 용액을 첨가하였다.
- [0055] [실시예 1]
- [0056] pH-감응성 광학 영상 프로브 입자 제조
- [0057] 감마-PGA와 ICG는 각각 4mg/ml, 1 mg/ml의 농도로 수용액(DW) 상에서 stock solution을 제조한다. PBAE는 12 mg/ml의 농도로 메탄올 용액 상에서 stock solution을 제조한다.
- [0058] DW 18.3 ml을 준비하여 감마-PGA와 ICG stock solution을 각각 1 ml, 0.5 ml을 첨가하여 교반하여 준 후, PBAE (메탄올상)용액을 0.5 ml 첨가한다. 각 시료의 최종 농도는 감마-PGA, ICG, PBAE가 각각 0.2, 0.01, 0.3 mg/ml 이 되도록 한다. 혼합된 용액은 1.5 시간 동안 상온에서 500 rpm의 속도로 교반하고, 모든 과정에서 ICG가 장시간 빛에 노출되지 않도록 한다.

[0059] 도 3은 형성된 입자의 입도 분석을 통한 입자 크기 분포(좌)와 전자투과 현미경(TEM) 이미지(우)이다. 형성된 입자는 대략 250 nm 크기의 분포를 갖는 것으로 나타났다.

[0060] [실시예 2]

[0061] pH-감응성 광학 영상 프로브 입자의 분광 분석

[0062] pH-감응 나노입자의 흡광도와 형광 신호 분석은 UV-Vis spectrophotometer와 fluorescence spectrometer((주) 신코, 한국)를 사용하였으며, 형광 신호는 765 nm를 여기파장으로 하여 측정하였다. 흡광도와 형광 신호는 입자 제조 후에 즉시 측정하였다.

[0063] 입자의 pH에 의한 형광 신호 변화를 알아보기 위해, 제조한 입자용액에서 동일량을 분취하여 동결 건조 후, 각 입자 파우더에 처음과 동일한 양의 pH7.4, pH5.2 용액을 첨가하여 분산시킨다. 분산시킨 후 즉시 형광신호를 측정하였다.

[0064] 도 4는 입자 형성에 사용한 ICG의 흡광도(좌)와 형광 스펙트럼(우)을 나타낸 것으로, 순수한 ICG(점선)가 입자 내로 도입(실선)되면서 염료 주변 환경 변화에 따라 나타내는 상태 변화를 나타낸다. 형광 스펙트럼에서 나타나듯이 입자 내에 봉입된 ICG는 형광 소멸이 완전히 이루어져 신호가 감지되지 않는 것을 알 수 있다.

[0065] 도 5는 형성된 입자를 동결 건조 후 각각 pH7.4(점선), pH5.2(실선) 용액에 재분산 하였을 때의 형광 신호 변화를 나타낸 것으로, pH7.4 용액에 재분산 된 경우 동결건조 이전의 상태와 같이 형광 소멸 상태가 유지되었으며, pH5.2 용액에 재분산시 앞서 언급한 것처럼 입자 봉입에 의한 형광 신호 증가가 감지되었다. 이 신호차이는 대략 4.5배 정도이며, 이는 입자가 pH에 감응하여 "ON/OFF switchable" 시스템으로 활용 가능성을 나타낸다.

[0066] [실시예 3]

[0067] pH-감응성 광학 영상 프로브 입자의 세포 실험

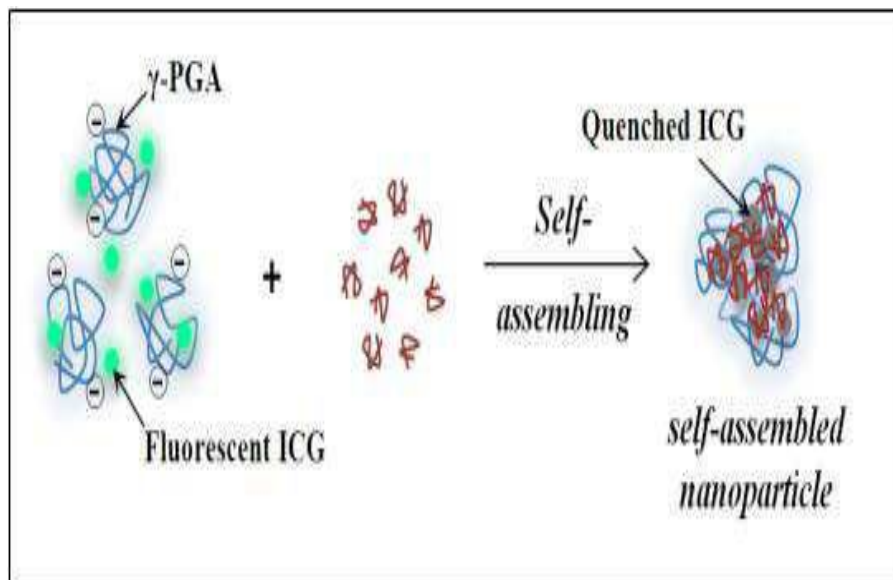
[0068] 형성된 입자에 대한 "in vitro" 실험으로서, 제조한 입자는 25v/v%의 비율로 대식세포인 RAW264.7세포에 처리한다. 처리 직후 이미지를 얻고, 37℃ 배양기에서 2시간 동안 배양한 후 다시 이미지를 관찰하였다. 모든 이미지는 세포외부의 입자를 세척하지 않은 상태에서 관찰하였다. 세포내 입자의 ICG 형광 신호 관찰에 사용된 필터는 여기파장이 775/60nm이고 검출파장이 845/55 nm인 필터를 사용하였다.

[0069] 도 6은 대식세포인 RAW264.7 세포에 입자를 처리하고 세포의 식세포작용에 의해 입자가 세포내로 이동한 후 나타내는 그림이다. 왼쪽은 입자 처리 직후의 그림이고, 오른쪽은 입자 처리 2시간 후의 그림으로서 세포에 처리된 입자는 세척되지 않은 상태이다. 세포에 처리된 입자는 세포외부에서는 형광 신호가 감지되지 않지만, 세포내로 도입된 입자의 경우 형광신호가 회복되어 나타나는 것을 확인할 수 있다.

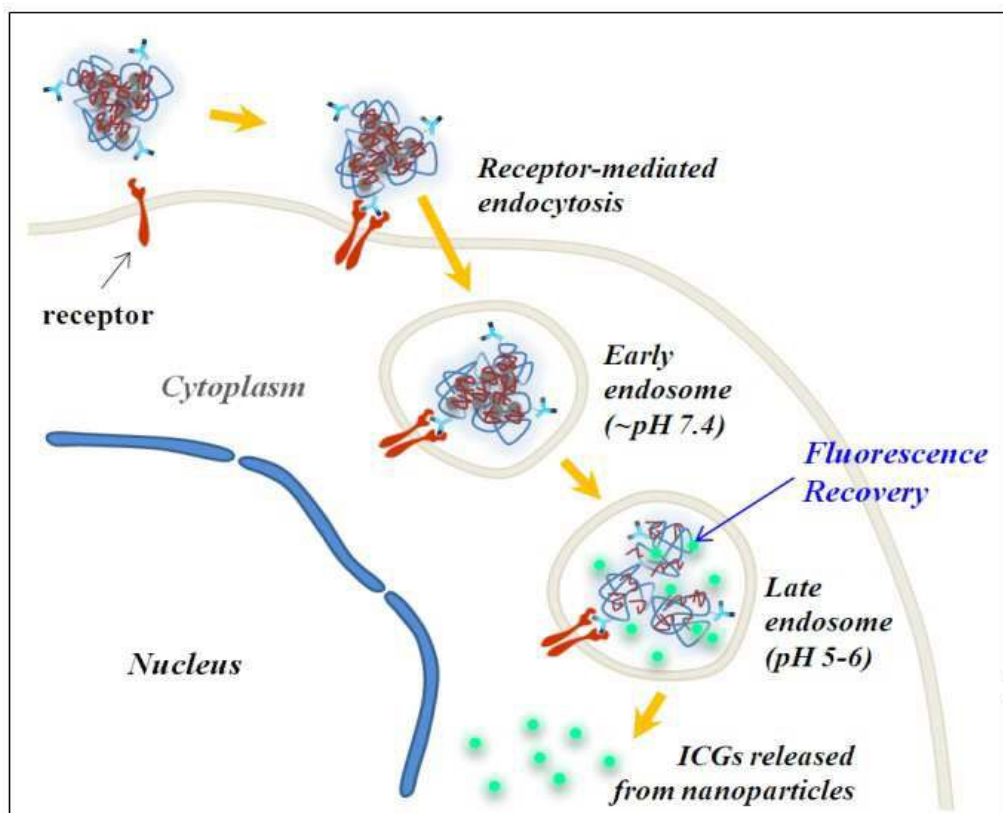
[0070] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

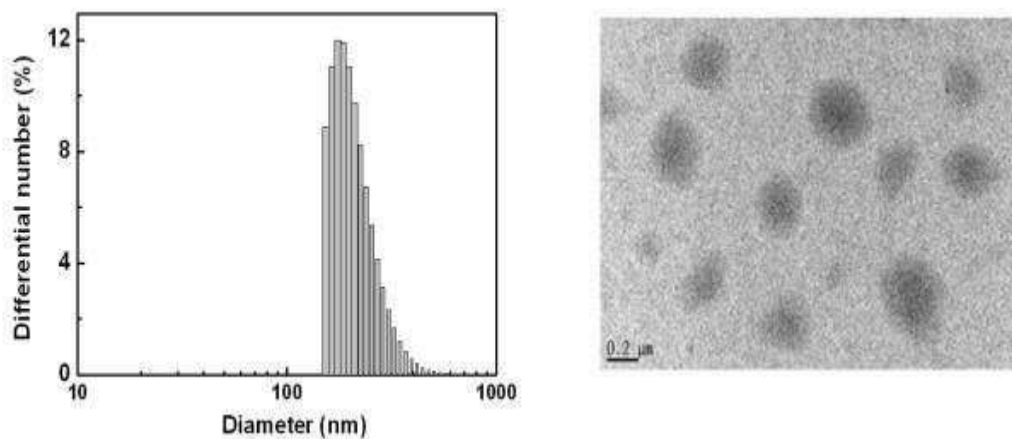
도면1



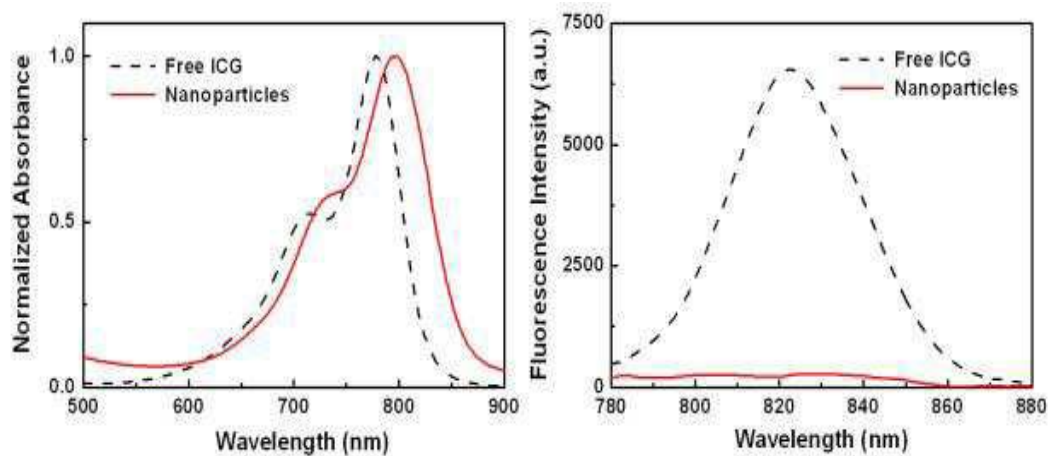
도면2



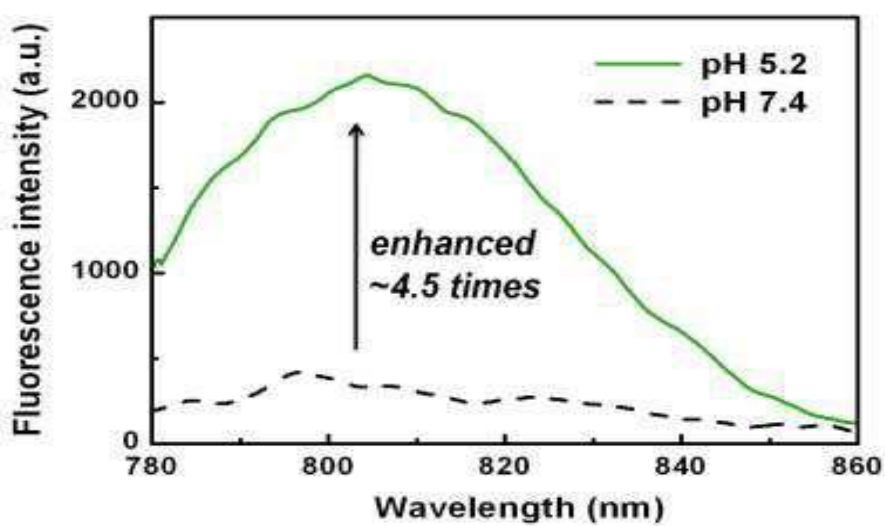
도면3



도면4



도면5



도면6

