

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2023-0117824
(43) 공개일자 2023년08월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/00 (2006.01) A61K 47/18 (2017.01)
A61K 9/06 (2006.01) A61K 9/51 (2006.01)
A61L 31/04 (2006.01) A61L 31/14 (2006.01)
A61L 31/16 (2006.01) A61M 37/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/0009 (2013.01)
A61B 10/0045 (2019.05)

(21) 출원번호 10-2022-0014028

(22) 출원일자 2022년02월03일
심사청구일자 2022년02월03일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

강희민

서울특별시 강남구 개포로110길 50 래미안루체하임 111동 604호

김유리

서울특별시 마포구 토정로5길 9 일신건영 휴먼빌 아파트 101동 803호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최훈식

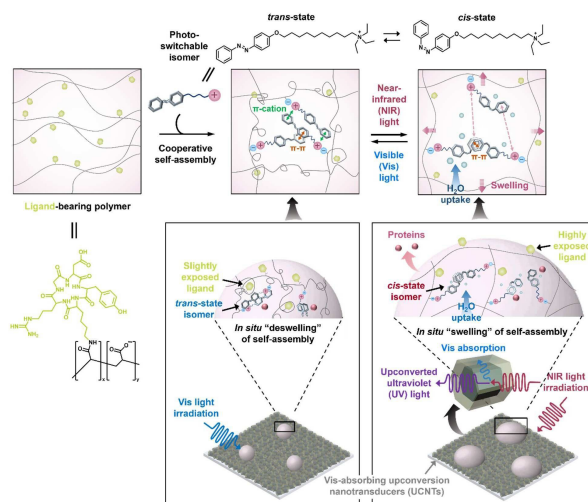
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 광에너지에 의해 조절되는 자가 조립형 복합체 및 이를 포함하는 나노시스템

(57) 요약

본 발명에 의하면 광에너지를 조사하여 자가 조립형 복합체 및 이를 포함하는 나노시스템을 조절함으로써 생체 시료를 수집할 수 있고 생체 내 물질을 전달할 수 있고 대식세포의 부착 및 분극화를 조절할 수 있는 나노시스템을 제공할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 47/186 (2013.01)
A61K 9/06 (2013.01)
A61K 9/513 (2013.01)
A61L 31/04 (2013.01)
A61L 31/145 (2013.01)
A61L 31/16 (2013.01)
A61M 37/0069 (2013.01)
A61M 2205/0244 (2013.01)

(72) 발명자

배진휴

경기도 화성시 동탄대로시범길 19 동탄역시범더샵
 센트럴시티 1402동 2201호

이성규

경기도 시흥시 인선길 63 숲속마을아파트 231동
 802호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711130532
과제번호	2020R1C1C1011038
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	나노 리간드 주기성의 제어와 동적인 제시를 통한 세포의 부착과 재생성 특성의 조절
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

강나연

서울특별시 성북구 안암로9가길 54 202호

명세서

청구범위

청구항 1

리간드 및 음으로 하전된 폴리머를 포함하는 폴리머 복합체; 및
양으로 하전되어 상기 폴리머 복합체와 결합하고, 광에너지에 의하여 이성질화하는 광전환 이성질체;를 포함하고,
상기 광전환 이성질체는 가역적으로 시스(cis) 이성질체 또는 트랜스(trans) 이성질체로 구비되고,
상기 광전환 이성질체의 이성질화에 의하여 부피가 가역적으로 팽창 또는 수축하는 것인,
광에너지에 의해 조절되는 자가 조립형 복합체.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 자가 조립형 복합체는 수용성 액체가 있는 환경에서 광에너지에 의해 가역적으로 팽창 및 수축하고,
상기 자가 조립형 복합체는 상기 수용성 액체가 있는 환경에서 하이드로겔 형태로 구비되고,
상기 자가 조립형 복합체가 팽창하는 과정에서 상기 수용성 액체를 흡수하고,
상기 자가 조립형 복합체가 수축하는 과정에서 상기 수용성 액체를 방출하는,
광에너지에 의해 조절되는 자가 조립형 복합체.

청구항 3

제2항에 있어서,
상기 자가 조립형 복합체에 흡수된 수용성 액체는 채취하여 분석할 수 있고,
상기 수용성 액체는 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 침, 뇌척수액, 눈물, 땀, 대변, 복수, 양수, 정액, 유(milk), 세포 배지, 조직 추출물 및 암 조직 중 적어도 어느 하나 이상을 포함하는,
광에너지에 의해 조절되는 자가 조립형 복합체.

청구항 4

제2항에 있어서,
상기 광전환 이성질체의 이성질화에 따라 상기 자가 조립형 복합체는 최대 팽창 또는 최대 수축할 수 있고,
상기 자가 조립형 복합체는 자외선 조사 후 상기 최대 팽창할 때까지 30초 내지 90초가 소요되고,
상기 자가 조립형 복합체의 상기 최대 팽창 시의 중량은 상기 최대 수축 시의 중량의 3배 내지 5배인,
광에너지에 의해 조절되는 자가 조립형 복합체.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 자가 조립형 복합체는 상기 자가 조립형 복합체의 내부에 전달물질을 더 포함하고,
 상기 전달물질은 상기 자가 조립형 복합체가 팽창하여 방출되고,
 상기 전달물질은 상기 자가 조립형 복합체가 수축시에 내부에 유지되는,
 광에너지에 의해 조절되는 자가 조립형 복합체.

청구항 6

제5항에 있어서,
 상기 전달물질은 단백질, 핵산 및 소분자 약물 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있고,
 상기 단백질은 사이토카인(cytokine), 케모카인(chemokine), 면역 항암치료 항체, 성장 인자, 보툴리눔 독소(botulinum toxin) 및 항원 중 적어도 어느 하나를 포함하고,
 상기 핵산은 메신저 RNA(mRNA), 마이크로 RNA(micro RNA) 및 플라스미드 DNA(plasmid DNA) 중 적어도 어느 하나를 포함하는,
 광에너지에 의해 조절되는 자가 조립형 복합체.

청구항 7

제1항에 있어서,
 상기 자가 조립형 복합체는 하나 이상의 폴리머 복합체와, 하나 이상의 광전환 이성질체를 포함하고,
 상기 자가 조립형 복합체는,
 상기 폴리머 복합체가 서로 이웃하는 폴리머 복합체 또는 상기 광전환 이성질체와 결합되고, 상기 광전환 이성질체가 서로 이웃하는 광전환 이성질체와 상호작용하여 형성되고,
 상기 광전환 이성질체와 서로 이웃하는 광전환 이성질체의 상호작용은 π -양이온 상호작용 및 π - π 상호작용 중 적어도 어느 하나를 포함하는,
 광에너지에 의해 조절되는 자가 조립형 복합체.

청구항 8

제1항에 있어서,
 상기 광전환 이성질체는 자외선에 의하여 시스 이성질체로 변환하여 상기 자가 조립형 복합체가 팽창하고,
 상기 광전환 이성질체는 가시광선에 의하여 트랜스 이성질체로 변환하여 상기 자가 조립형 복합체가 수축하는,
 광에너지에 의해 조절되는 자가 조립형 복합체.

청구항 9

제1항에 있어서,
 상기 폴리머는 카르복시메틸 셀룰로오스(carboxymethyl cellulose), 히알루론산(hyaluronic acid), 알지네이트(alginate), 폴리(L-글루탐산)(poly(L-glutamic acid)), 폴리(L-아스파르트산)(poly(L-aspartic acid)), 폴리아크릴산(PAA, polyacrylic acid), 젤라틴 및 콜라겐 중 적어도 어느 하나를 포함하는,
 광에너지에 의해 조절되는 자가 조립형 복합체.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 리간드는 브라시카스테롤(brassicasterol), 스티그마스테롤(stigmasterol), 아스코르브 산(ascorbic acid), 사이아노코발라민(cyanocobalamin), 토코페롤(tocopherol), 레티놀(retinol), 아미노부티르 산(aminobutyric acid), 아민-보크 하이드로클로라이드(amine-Boc hydrochloride), 사이클로 RGD(cyclo RGD), VH 032 아마이드-PEG2-아민(VH 032 amide-PEG2-amine), 히스타민(histamine), 티라민(tyramine), 베타-페닐에틸아민(β -phenylethylamine), 트립타민(tryptamine), 세로토닌(serotonin), 푸트레신(putrescine), 카다베린(cadaverine), 스퍼미딘(spermidine) 및 스퍼민(spermine) 중 적어도 어느 하나를 포함하는,

광에너지에 의해 조절되는 자가 조립형 복합체.

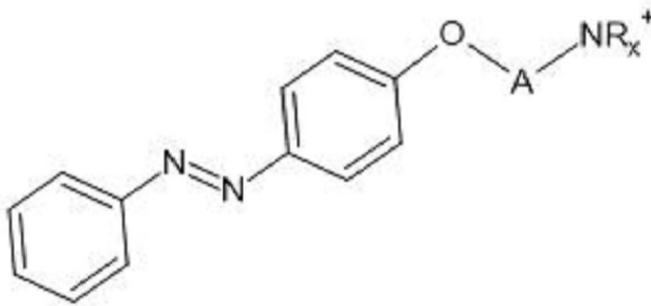
청구항 11

제1항에 있어서,

상기 광전환 이성질체의 트랜스 이성질체는 화학식 1의 구조를 가지는,

광에너지에 의해 조절되는 자가 조립형 복합체:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서 A는 C0 내지 C15 중 어느 하나이고, R은 수소, 메틸, 에틸 및 프로필 중 어느 하나이고, X는 1 내지 3 중 어느 하나의 정수이다.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 자가 조립형 복합체 중에,

상기 광전환 이성질체와 상기 폴리머 복합체는 0.1:10 내지 1.0:10의 중량비로 포함되는,

광에너지에 의해 조절되는 자가 조립형 복합체.

청구항 13

제1항에 있어서,

상기 광전환 이성질체는 시스 이성질체로 변환되어 상기 자가 조립형 복합체를 팽창시키고,

상기 자가 조립형 복합체와 대식세포의 부착 및 M2 분극을 촉진하거나, 또는

상기 광전환 이성질체는 트랜스 이성질체로 변환되어 상기 자가 조립형 복합체를 수축시키고,

상기 자가 조립형 복합체와 대식세포의 부착을 억제하고 M1 분극을 촉진하는,

광에너지에 의해 조절되는 자가 조립형 복합체.

청구항 14

제1항 및 제13항 중 어느 한 항에 따른 광에너지에 의해 조절되는 자가 조립형 복합체;

상기 자가 조립형 복합체의 적어도 일부가 구비되는 기관; 및

상기 기관에 결합한 상향변환 나노입자;를 포함하고,

상기 상향변환 나노입자는,

코어셸부, 및 상기 코어셸부의 표면에 코팅되는 코팅부,를 포함하고,

상기 코어셸부는 적외선을 흡수하여 상기 적외선의 에너지를 자외선 또는 가시광선 중 적어도 어느 하나로 상향 변환시키고,

상기 코팅부는 상기 코어셸부에서 상향변환된 가시광선을 흡수하고,

상기 상향변환 나노입자는 상기 코어셸부에서 상향변환된 자외선을 방출하는,

광에너지에 의해 조절되는 나노시스템.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 코어셸부는 970nm 내지 990nm 파장의 빛을 흡수하는,

광에너지에 의해 조절되는 나노시스템.

청구항 16

제14항에 있어서,

상기 코어셸부는 중심부에 구비되는 코어와, 상기 코어의 외면을 감싸도록 구비되는 셸을 포함하고,

상기 코어는 NaYbF_4 , NaYF_3 , NaGdF_4 , KGdF_4 , YOF , BaLaF_5 , LaF_3 , NaLuF_4 및 SrF_2 중 적어도 어느 하나를 포함하고,

상기 셸은 CaF_2 , $\text{Na}(\text{Yb,Gd})\text{F}_4$, NaGdF_4 및 TiO_2 중 적어도 어느 하나를 포함하고,

상기 코어셸부는 도펀트로 도핑되고,

상기 도펀트는 Yb^{3+} , Tm^{3+} , Ln^{3+} 및 Er^{3+} 중 적어도 어느 하나를 포함하는,

광에너지에 의해 조절되는 나노시스템.

청구항 17

제14항에 있어서,

상기 코팅부는 제1 코팅제 및 제2 코팅제 중 적어도 어느 하나를 포함하고,

상기 제1 코팅제는 β -카로틴(β -carotene), 커큐민(curcumin), 형광단백질(fluorescent protein), R-피코에리트린(R-phycoerythrin), 로다민(rhodamine), FDB-003, FDB-004 및 FDB-005 중 적어도 어느 하나를 포함하고,

상기 제2 코팅제는 트윈 20(Tween 20), 트윈 80(Tween 80), 소듐 올레이트(sodium oleate), 소듐 도데실 설페이트(SDS, sodium dodecyl sulphate), 소듐 도데실 벤젠 설포네이트(sodium dodecyl benzene sulphonate), 소

듬 스테아레이트(sodium stearate), 도데실아민 하이드로클로라이드(dodecylamine hydrochloride), 스팬-60(span-60), 스팬-80(span-80), 폴리에틸렌 옥사이드(polyethylene oxide) 및 도데실 베타인(dodecyl bataine) 중 적어도 어느 하나를 포함하는, 광에너지에 의해 조절되는 나노시스템.

청구항 18

제17항에 있어서,
상기 제1 코팅체는 420nm 내지 500nm 파장의 빛을 흡수하는,
광에너지에 의해 조절되는 나노시스템.

청구항 19

제14항에 있어서,
상기 나노시스템은 생체 내부에서 작동하되, 생체 외부에서 인가되는 광에너지에 의하여 조절되고,
상기 나노시스템에 생체 외부에서 적외선이 인가되는 경우, 생체 내부에서 상기 광전환 이성질체는 시스 이성질체로 변환되고, 상기 자가 조립형 복합체는 생체 내부에서 팽창하고,
상기 나노시스템에 생체 외부에서 가시광선이 인가되는 경우, 생체 내부에서 상기 광전환 이성질체는 트랜스 이성질체로 변환되고, 상기 자가 조립형 복합체는 생체 내부에서 수축하는,
광에너지에 의해 조절되는 나노시스템.

청구항 20

제13항에 있어서,
상기 자가 조립형 복합체는 수용성 액체가 있는 환경에서 광에너지에 의해 가역적으로 팽창 및 수축하고,
상기 나노시스템에 적외선을 조사하여 상기 자가 조립형 복합체가 팽창하여 상기 수용성 액체를 흡수하고,
상기 나노시스템에 가시광선을 조사하여 상기 자가 조립형 복합체가 수축하여 상기 수용성 액체를 방출하는,
광에너지에 의해 조절되는 나노시스템.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 광에너지에 의해 조절되는 자가 조립형 복합체 및 이를 포함하는 나노시스템에 관한 것으로, 보다 상세하게는 광에너지를 흡수하여 이성질화하는 자가 조립형 복합체 및 이를 포함하는 나노시스템에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 해능으로 처리할 수 있는 독특한 기회를 제공한다. 모양, 생물학적 및 화학적 활성, 유전 상수 및 굴절률을 빛의 제어 하에 가역적으로 전환할 수 있는 화합물은 분자 프로브에서 분자 나노 기술 및 광 약학에 이르는 영역에서 광범위한 응용 분야에 적용될 수 있다.

[0004] 아조벤젠 및 이의 유도체는 이러한 화합물의 주요 예 중 하나이다. 광범위한 실험 조건 하에서 광 안정성 및 기능적 활성과 같은 유리한 특성은 여러 측면에서 광변색성 시스템의 추가 개발 및 적용의 가능성을 가진다. 아조

벤젠은 기능적 거동에 기초하여, 광 여기시 N=N 결합의 가역적 트랜스 (E) → 시스 (Z) 이성질화가 가능하다. 따라서, 아조벤젠의 흡수 스펙트럼은 오랫동안 관심을 끌었다.

[0005] 또한 생체에 적용되는 검사, 치료 등은 생체에 무해하고 최대한 생체가 훼손되지 않는 방법이 요구된다.

[0006] 이러한 아조벤젠 및 이의 유도체의 광전환 특성을 이용하여, 생체에 비침습적으로 적용할 수 있는 기술을 개발할 필요가 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2014-0107810호(2014.09.05. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 광에너지를 이용하여 자가 조립형 복합체 및 이를 포함하는 나노시스템을 조절하여 생체 시료를 채취할 수 있고, 생체 내에 물질을 전달할 수 있고, 대식세포의 부착 및 분극화를 조절하는 기술을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 일측면에서 따르면, 본 발명의 실시예들은 리간드 및 음으로 하전된 폴리머를 포함하는 폴리머 복합체; 및 양으로 하전되어 상기 폴리머 복합체와 결합하고, 광에너지에 의하여 가역적으로 이성질화하는 광전환 이성질체;를 포함하고, 상기 광전환 이성질체는 가역적으로 시스(cis) 이성질체 또는 트랜스(trans) 이성질체로 구비되고, 상기 광전환 이성질체의 이성질화에 의하여 부피가 가역적으로 팽창 또는 수축하는 것인, 광에너지에 의해 조절되는 자가 조립형 복합체를 포함할 수 있다.

[0012] 일 실시예에 있어서, 상기 자가 조립형 복합체는 수용성 액체가 있는 환경에서 광에너지에 의해 가역적으로 팽창 및 수축하고, 상기 자가 조립형 복합체는 상기 수용성 액체가 있는 환경에서 하이드로겔 형태로 구비되고, 상기 자가 조립형 복합체가 팽창하는 과정에서 상기 수용성 액체를 흡수하고, 상기 자가 조립형 복합체가 수축하는 과정에서 상기 수용성 액체를 방출하는 것일 수 있다.

[0013] 일 실시예에 있어서, 상기 자가 조립형 복합체에 흡수된 수용성 액체는 채취하여 분석할 수 있고, 상기 수용성 액체는 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 침, 뇌척수액, 눈물, 땀, 대변, 복수, 양수, 정액, 유(milk), 세포 배지, 조직 추출물 및 암 조직 중 적어도 어느 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다.

[0014] 일 실시예에 있어서, 상기 광전환 이성질체의 이성질화에 따라 상기 자가 조립형 복합체는 최대 팽창 또는 최대 수축할 수 있고, 상기 자가 조립형 복합체는 자외선 조사 후 상기 최대 팽창할 때까지 30초 내지 90초가 소요되고, 상기 자가 조립형 복합체의 상기 최대 팽창시의 중량은 상기 최대 수축시의 중량의 3배 내지 5배인 것일 수 있다.

[0015] 일 실시예에 있어서, 상기 자가 조립형 복합체는 내부에 전달물질을 더 포함하고, 상기 전달물질은 상기 자가 조립형 복합체가 팽창하여 방출되고, 상기 전달물질은 상기 자가 조립형 복합체가 수축시에 내부에 유지되는 것일 수 있다.

[0016] 일 실시예에 있어서, 상기 전달물질은 단백질, 핵산 및 소분자 약물 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있고, 상기 단백질은 사이토카인(cytokine), 케모카인(chemokine), 면역 항암치료 항체, 성장 인자, 보툴리눔 독소(botulinum toxin) 및 항원 중 적어도 어느 하나를 포함하고, 상기 핵산은 메신저 RNA(mRNA), 마이크로 RNA(micro RNA) 및 플라스미드 DNA(plasmid DNA) 중 적어도 어느 하나를 포함하는 것일 수 있다.

[0017] 일 실시예에 있어서, 상기 자가 조립형 복합체는 하나 이상의 폴리머 복합체와, 하나 이상의 광전환 이성질체를

포함하고, 상기 자가 조립형 복합체는, 상기 폴리머 복합체가 서로 이웃하는 폴리머 복합체 또는 상기 광전환 이성질체와 결합되고, 상기 광전환 이성질체가 서로 이웃하는 광전환 이성질체와 상호작용하여 형성되고, 상기 광전환 이성질체와 서로 이웃하는 광전환 이성질체의 상호작용은 π -양이온 상호작용 및 π - π 상호작용 중 적어도 어느 하나를 포함하는 것일 수 있다.

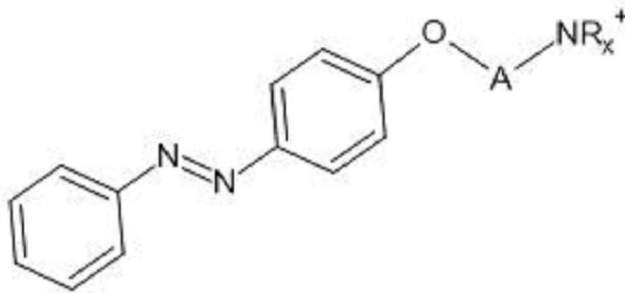
[0018] 일 실시예에 있어서, 상기 광전환 이성질체는 자외선에 의하여 시스 이성질체로 변환하여 상기 자가 조립형 복합체가 팽창하고, 가시광선에 의하여 트랜스 이성질체로 변환하여 상기 자가 조립형 복합체가 수축하는 것일 수 있다.

[0019] 일 실시예에 있어서, 상기 폴리머는 카르복시메틸 셀룰로오스(carboxymethyl cellulose), 히알루론산(hyaluronic acid), 알지네이트(alginate), 폴리(L-글루탐산)(poly(L-glutamic acid)), 폴리(L-아스파르트산)(poly(L-aspartic acid)), 폴리아크릴산(PAA, polyacrylic acid), 젤라틴 및 콜라겐 중 적어도 어느 하나를 포함하는 것일 수 있다.

[0020] 일 실시예에 있어서, 상기 리간드는 브라시카스테롤(brassicasterol), 스티그마스테롤(stigmasterol), 아스코르브 산(ascorbic acid), 사이아노코발라민(cyanocobalamin), 토코페롤(tocopherol), 레티놀(retinol), 아미노부티르 산(aminobutyric acid), 아민-보크 하이드로클로라이드(amine-Boc hydrochloride), 사이클로 RGD(cyclo RGD), VH 032 아마이드-PEG2-아민(VH 032 amide-PEG2-amine), 히스타민(histamine), 티라민(tyramine), 베타-페닐에틸아민(β -phenylethylamine), 트립타민(tryptamine), 세로토닌(serotonin), 푸트레신(putrescine), 카다베린(cadaverine), 스퍼미딘(spermidine) 및 스퍼민(spermine) 중 적어도 어느 하나를 포함하는 것일 수 있다.

[0021] 일 실시예에 있어서, 상기 광전환 이성질체의 트랜스 이성질체는 화학식 1의 구조를 가질 수 있다.

[0022] [화학식 1]



[0023]

[0024] 상기 화학식 1에서 A는 C0 내지 C15 중 어느 하나이고, R은 수소, 메틸, 에틸 및 프로필 중 어느 하나이고, X는 1 내지 3 중 어느 하나의 정수이다.

[0025] 일 실시예에 있어서, 상기 자가 조립형 복합체 중에, 상기 광전환 이성질체와 상기 폴리머 복합체는 0.1:10 내지 1.0:10의 중량비로 포함될 수 있다.

[0026] 일 실시예에 있어서, 상기 광전환 이성질체는 시스 이성질체로 변환되어 상기 자가 조립형 복합체를 팽창시키고, 상기 자가 조립형 복합체와 대식세포의 부착 및 M2 분극을 촉진하거나, 또는 상기 광전환 이성질체는 트랜스 이성질체로 변환되어 상기 자가 조립형 복합체를 수축시키고, 상기 자가 조립형 복합체와 대식세포의 부착을 억제하고 M1 분극을 촉진하는 것일 수 있다.

[0028] 또한 본 발명에 있어서, 일 실시예는 상기 광에너지에 의해 조절되는 자가 조립형 복합체, 상기 자가 조립형 복합체의 적어도 일부가 구비되는 기관; 및 상기 기관에 결합한 상향변환 나노입자;를 포함하고, 상기 상향변환 나노입자는, 코어셸부, 및 상기 코어셸부의 표면에 코팅되는 코팅부,를 포함하고, 상기 코어셸부는 적외선을 흡수하여 상기 적외선의 에너지를 자외선 또는 가시광선 중 적어도 어느 하나로 상향변환시키고, 상기 코팅부는 상기 코어셸부에서 상향변환된 가시광선을 흡수하고, 상기 상향변환 나노입자는 상기 코어셸부에서 상향변환된 자외선을 방출하는, 광에너지에 의해 조절되는 나노시스템을 더 포함할 수 있다.

[0029] 일 실시예에 있어서, 상기 코어셸부는 970nm 내지 990nm 파장의 빛을 흡수하는 것일 수 있다.

[0030] 일 실시예에 있어서, 상기 코어셸부는 중심부에 구비되는 코어와, 상기 코어의 외면을 감싸도록 구비되는 셸을

포함하고, 상기 코어는 NaYbF_4 , NaYF_3 , NaGdF_4 , KGdF_4 , YOF , BaLaF_5 , LaF_3 , NaLuF_4 및 SrF_2 중 적어도 어느 하나를 포함하고, 상기 셸은 CaF_2 , Na(Yb,Gd)F_4 , NaGdF_4 및 TiO_2 중 적어도 어느 하나를 포함하고, 상기 코어셸부는 도펀트로 도핑되고, 상기 도펀트는 Yb^{3+} , Tm^{3+} , Ln^{3+} 및 Er^{3+} 중 적어도 어느 하나를 포함하는 것일 수 있다.

[0031] 일 실시예에 있어서, 상기 코팅부는 제1 코팅제 및 제2 코팅제 중 적어도 어느 하나를 포함하고, 상기 제1 코팅제는 β -카로틴(β -carotene), 커큐민(curcumin), 형광단백질(fluorescent protein), R-피코에리트린(R-phycoerythrin), 로다민(rhodamine), FDB-003, FDB-004 및 FDB-005 중 적어도 어느 하나를 포함하고, 상기 제2 코팅제는 트웬 20(Tween 20), 트웬 80(Tween 80), 소듐 올레이트(sodium oleate), 소듐 도데실 설페이트(SDS, sodium dodecyl sulphate), 소듐 도데실 벤젠 설페이트(sodium dodecyl benzene sulphonate), 소듐 스테아레이트(sodium stearate), 도데실아민 하이드로클로라이드(dodecylamine hydrochloride), 스팬-60(span-60), 스팬-80(span-80), 폴리에틸렌 옥사이드(polyethylene oxide) 및 도데실 베타인(dodecyl bataine) 중 적어도 어느 하나를 포함하는 것일 수 있다.

[0032] 일 실시예에 있어서, 상기 제1 코팅제는 420nm 내지 500nm 파장의 빛을 흡수할 수 있다.

[0033] 일 실시예에 있어서, 상기 나노시스템은 생체 내부에서 작동하되, 생체 외부에서 인가되는 광에너지에 의하여 조절되고, 상기 나노시스템에 생체 외부에서 적외선이 인가되는 경우, 상기 광전환 이성질체는 시스 이성질체로 변환되고, 상기 자가 조립형 복합체는 팽창하고, 상기 나노시스템에 가시광선이 인가되는 경우, 상기 광전환 이성질체는 트랜스 이성질체로 변환되고, 상기 자가 조립형 복합체는 수축하는 것일 수 있다.

[0034] 일 실시예에 있어서, 상기 자가 조립형 복합체는 수용성 액체가 있는 환경에서 광에너지에 의해 가역적으로 팽창 및 수축하고, 상기 나노시스템에 적외선을 조사하여 상기 자가 조립형 복합체가 팽창하여 상기 수용성 액체를 흡수하고, 상기 나노시스템에 가시광선을 조사하여 상기 자가 조립형 복합체가 수축하여 상기 수용성 액체를 방출하는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0036] 본 발명에 의하면 광에너지를 이용하여 자가 조립형 복합체 및 이를 포함하는 나노시스템을 조절하여 생체 시료를 채취할 수 있고, 생체 내에 물질을 전달할 수 있고, 대식세포의 부착 및 분극화를 조절하는 기술을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 의한 나노시스템을 이용하여 대식세포의 부착 및 분극화를 조절하고, 물질 전달을 조절하는 것을 모식적으로 나타낸 도면이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 의한 광전환 이성질체의 합성 메커니즘이다.

도 3는 본 발명의 일 실시예에 의한 광전환 이성질체의 합성 단계별 화합물의 ^1H NMR 분석이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 의한 광전환 이성질체의 측정을 분석한 것이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 의한 리간드가 부착된 폴리머의 합성 메커니즘이다.

도 6는 본 발명의 일 실시예에 의한 자가 조립형 복합체의 형성 메커니즘 모식도 및 광전환 이성질체의 상호작용의 수를 비교한 것이다.

도 7는 본 발명의 일 실시예에 의한 자가 조립형 복합체의 이성질화에 따른 MD 시뮬레이션 분석 결과이다.

도 8 및 9는 본 발명의 일 실시예에 의한 상향변환 나노입자의 특성 분석을 분석한 결과이다.

도 10는 본 발명의 일 실시예에 의한 상향변환 나노입자에서 코팅부의 유무에 따른 형광을 분석한 결과이다.

도 11는 본 발명의 실시예 1을 이용하여 자가 조립형 복합체의 팽창/수축을 실험한 결과이다.

도 12 및 13은 본 발명의 일 실시예에 의한 나노시스템을 이용하여 대식세포 부착 실험을 한 결과 및 모식도이

다.

도 14 내지 17은 본 발명의 일 실시예에 의한 비교예를 이용하여 대식세포 부착 실험을 한 결과이다.

도 18 및 19는 본 발명의 일 실시예에 의한 나노시스템을 이용하여 자가 조립형 복합체의 팽창/수축에 대한 시간 제어 시험 결과이다.

도 20 내지 23은 본 발명의 일 실시예에 의한 나노시스템을 이용하여 대식세포의 분극화 조절 실험을 한 결과이다.

도 24 내지 26은 본 발명의 일 실시예에 의한 나노시스템을 이용하여 물질 전달 조절 실험을 한 결과이다.

도 27는 본 발명의 일 실시예에 의한 나노시스템의 생체 내 안정성을 실험한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 기타 실시예들의 구체적인 사항들은 상세한 설명 및 도면들에 포함되어 있다.

[0040] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 첨부되는 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있으며, 이하의 설명에서 달리 명시되지 않는 한, 본 발명에 성분, 반응 조건, 성분의 함량을 표현하는 모든 숫자, 값 및/또는 표현은, 이러한 숫자들이 본질적으로 다른 것들 중에서 이러한 값을 얻는 데 발생하는 측정의 다양한 불확실성이 반영된 근사치들이므로, 모든 경우 "약"이라는 용어에 의해 수식되는 것으로 이해되어야 한다. 또한, 본 기재에서 수치범위가 개시되는 경우, 이러한 범위는 연속적이며, 달리 지적되지 않는 한 이러한 범위의 최소값으로부터 최대값이 포함된 상기 최대값까지의 모든 값을 포함한다. 더 나아가, 이러한 범위가 정수를 지칭하는 경우, 달리 지적되지 않는 한 최소값으로부터 최대값이 포함된 상기 최대값까지를 포함하는 모든 정수가 포함된다

[0041] 또한, 본 발명에서 범위가 변수에 대해 기재되는 경우, 상기 변수는 상기 범위의 기재된 종료점들을 포함하는 기재된 범위 내의 모든 값들을 포함하는 것으로 이해될 것이다. 예를 들면, "5 내지 10"의 범위는 5, 6, 7, 8, 9, 및 10의 값들뿐만 아니라 6 내지 10, 7 내지 10, 6 내지 9, 7 내지 9 등의 임의의 하위 범위를 포함하고, 5.5, 6.5, 7.5, 5.5 내지 8.5 및 6.5 내지 9 등과 같은 기재된 범위의 범주에 타당한 정수들 사이의 임의의 값도 포함하는 것으로 이해될 것이다. 예를 들면, "10% 내지 30%"의 범위는 10%, 11%, 12%, 13% 등의 값들과 30%까지를 포함하는 모든 정수들 뿐만 아니라 10% 내지 15%, 12% 내지 18%, 20% 내지 30% 등의 임의의 하위 범위를 포함하고, 10.5%, 15.5%, 25.5% 등과 같이 기재된 범위의 범주 내의 타당한 정수들 사이의 임의의 값도 포함하는 것으로 이해될 것이다.

[0043] 본 명세서에서 용어의 의미는 다음과 같다.

[0044] "광전환 이성질체"는 특정 파장의 광을 흡수하여 트랜스 이성질체 또는 시스 이성질체로 전환되는 화합물을 의미한다. "자가 조립체", 또는 "자가 조립형 복합체"는 리간드가 부착된 폴리머와 광전환 이성질체가 조립된 것을 의미한다. "상향변환 나노입자"는 흡수한 적외선을 상향변환시키는 기능을 가지고 코어셸부에 코팅부가 코팅된 것을 의미한다. "상향변환 나노입자가 코팅된 기관"은 상기 상향변환 나노입자가 기관의 표면을 전체적으로 코팅하고 있는 기관을 의미한다. "나노시스템"은 상기 상기 상향변환 나노입자가 코팅된 기관에 상기 자가 조립형 복합체의 적어도 일부가 결합한 것을 의미하고, 특정 파장의 광을 흡수하여 이성질화함으로써 수용성 액체의 흡수를 조절하고, 세포의 부착 및 분극화를 조절하고, 담지된 물질의 방출을 조절할 수 있는 시스템을 의미한다.

[0045] 또한 광, 광에너지, 빛 및 빛에너지는 동일한 의미로 사용될 수 있다.

[0047] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 의한 나노시스템에 빛을 조사하여 대식세포의 부착 및 분극화를 조절하고, 자가 조립형 복합체에 담지된 물질의 방출을 조절하는 것을 모식적으로 나타낸 도면이다.

[0049] 본 발명의 실시예는 광에너지에 의하여 조절되는 자가 조립형 복합체에 대한 것으로, 상기 자가 조립형 복합체

는 리간드 및 음으로 하전된 폴리머를 포함하는 폴리머 복합체; 및 양으로 하전되어 상기 폴리머 복합체와 결합하고, 광에너지에 의하여 가역적으로 이성질화하는 광전환 이성질체;를 포함하는 자가 조립형 복합체를 포함할 수 있다. 상기 광전환 이성질체는 광에너지에 의해 이성질화하여 상기 자가 조립형 복합체를 가역적으로 팽창 또는 수축시키고, 상기 광전환 이성질체의 시스(cis) 이성질체는 상기 자가 조립형 복합체를 팽창시키고, 상기 광전환 이성질체의 트랜스(trans) 이성질체는 상기 자가 조립형 복합체를 수축시킬 수 있다.

[0051] 상기 자가 조립형 복합체는 하나 이상의 폴리머 복합체와, 하나 이상의 광전환 이성질체를 포함하고, 상기 자가 조립형 복합체는, 상기 폴리머 복합체가 서로 이웃하는 폴리머 복합체 또는 상기 광전환 이성질체와 결합되고, 상기 광전환 이성질체가 서로 이웃하는 광전환 이성질체와 상호작용하여 형성되는 것일 수 있다.

[0052] 구체적으로 상기 자가 조립형 복합체는 복수개의 폴리머 복합체와, 복수개의 광전환 이성질체가 서로 결합되거나, 또는 상호작용하여 형성될 수 있다. 예컨대, 상기 자가 조립형 복합체를 구성하는 상기 폴리머 복합체와 폴리머 복합체 사이에는 물리적 또는 화학적 결합이 형성되고, 상기 폴리머 복합체와 상기 광전환 이성질체 사이에는 정전기적 결합이 형성되고, 상기 광전환 이성질체와 광전환 이성질체 사이에 상호작용이 형성되어 상기 자가 조립형 복합체가 형성될 수 있다.

[0053] 상기 자가 조립형 복합체의 팽창 및 수축은 이와 같은 상기 광전환 이성질체와 광전환 이성질체 사이의 상호작용이 변경되면서 이루어질 수 있다.

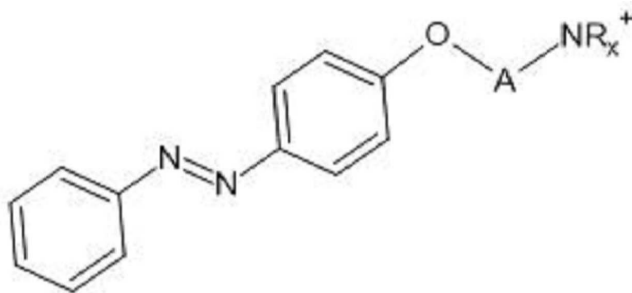
[0055] 상기 광전환 이성질체는 방향족 작용기를 포함할 수 있고, 상기 방향족 작용기에 의하여 상기 광전환 이성질체와 광전환 이성질체 사이에 상호작용이 형성될 수 있다. 상기 광전환 이성질체와 광전환 이성질체 사이의 상호작용은 광전환 이성질체와 이웃한 광전환 이성질체 사이에 형성된다고 말할 수 있고, 여기에서 이웃한다는 것은 어떤 광전환 이성질체의 주변에 다른 광전환 이성질체가 존재하는 것을 말할 수 있다.

[0056] 상기 광전환 이성질체와 광전환 이성질체 사이의 상호작용은 어느 한 광전환 이성질체의 방향족 작용기와 다른 광전환 이성질체의 양이온 사이에 π -양이온 상호작용(π -cation interaction)을 형성하는 것일 수 있다. 또한 상기 광전환 이성질체와 광전환 이성질체 사이의 상호작용은 어느 한 광전환 이성질체의 방향족 작용기와 다른 광전환 이성질체의 방향족 작용기 사이에 π - π 상호작용(π - π interaction)을 형성하는 것일 수 있다.

[0058] 상기 광전환 이성질체의 방향족 작용기는 벤젠 작용기일 수 있다. 상기 광전환 이성질체는 트랜스 이성질체 및 시스 이성질체 중 어느 한 형태로 존재할 수 있으며, 더 안정한 형태는 트랜스 이성질체일 수 있다. 상기 광전환 이성질체의 시스 이성질체는 가시광선을 흡수하여 트랜스 이성질체로 이성질화할 수 있다. 또한 상기 트랜스 이성질체는 자외선을 흡수하여 시스 이성질체로 이성질화할 수 있다. 이와 같은 트랜스 이성질체와 시스 이성질체 사이의 전환은 가역적으로 반복하여 빠르게 형성될 수 있다.

[0059] 상기 광전환 이성질체의 트랜스 이성질체는 화학식 1의 구조를 가질 수 있다.

[0060] [화학식 1]

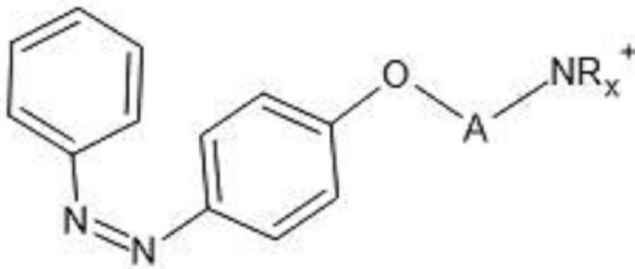


[0061]

[0062] 상기 화학식 1에서 A는 C0 내지 C15 중 어느 하나이고, R은 수소, 메틸, 에틸, 및 프로필 중 어느 하나일 수 있고, X는 1 내지 3 중 어느 하나인 정수이다. 상기 X는 바람직하게는 3일 수 있다. 구체적으로, A는 C1 내지 C15, 또는 C1 내지 C10일 수 있다.

[0063] 또한 상기 광전환 이성질체의 시스 이성질체는 화학식 2의 구조를 가질 수 있다.

[0064] [화학식 2]



[0065]

[0066] 상기 화학식 2에서 A는 C0 내지 C15 중 어느 하나이고, R은 수소, 메틸, 에틸, 및 프로필 중 어느 하나일 수 있고, X는 1 내지 3 중 어느 하나인 정수이다. 상기 X는 바람직하게는 3일 수 있다. 구체적으로, A는 C1 내지 C15, 또는 C1 내지 C10일 수 있다.

[0068] 상기 자가 조립형 복합체에서 상기 광전환 이성질체와 상기 폴리머 복합체는 0.1:10 내지 1.0:10의 중량비를 가지고 포함될 수 있다. 상기 자가 조립형 복합체는 광에너지에 의하여 가역적으로 수축 및 팽창할 수 있으며, 상기 광전환 이성질체와 상기 폴리머 복합체의 중량비를 제어함으로써, 수축 및 팽창의 크기 및/또는 속도의 차이를 다양하게 변화시킬 수 있다.

[0070] 상기 폴리머 복합체에서 상기 폴리머는 상기 자가 조립형 복합체의 전체적인 프레임을 형성할 수 있다. 상기 자가 조립형 복합체가 수축할 때, 상기 폴리머 복합체는 응축될 수 있다. 또한 상기 자가 조립형 복합체가 팽창할 때, 상기 폴리머 복합체는 응축이 풀어질 수 있다. 상기 폴리머는 음으로 하전된 부위를 포함하고 있어 상기 광전환 이성질체가 정전기적으로 결합할 수 있는 부위를 제공할 수 있다. 상기 폴리머는 카르복실레이트기(carboxylate)를 가질 수 있다.

[0071] 상기 폴리머는 카르복시메틸 셀룰로오스(carboxymethyl cellulose), 히알루론산(hyaluronic acid), 알지네이트(alginate), 폴리(L-글루탐산)(poly(L-glutamic acid)), 폴리(L-아스파르트산)(poly(L-aspartic acid)), 폴리아크릴산(PAA, polyacrylic acid), 젤라틴 및 콜라겐 중 적어도 어느 하나일 수 있다.

[0073] 상기 폴리머 복합체에서 상기 리간드는 상기 폴리머에 결합하여 존재할 수 있다. 상기 자가 조립형 복합체가 수축하면 상기 폴리머가 코일링되고 응축되어 상기 리간드 대부분이 상기 자가 조립형 복합체 내부에 존재하고, 상기 자가 조립형 복합체의 외부에는 상기 리간드의 인식이 어려울 수 있다. 따라서 상기 자가 조립형 복합체 외부에 노출되는 리간드는 매우 적을 수 있다. 반대로 상기 자가 조립형 복합체가 팽창하면 상기 폴리머가 언코일링(uncoiling)되고, 적어도 일부는 서로 이격되어 상기 리간드의 대부분이 상기 자가 조립형 복합체의 외부로 드러나고, 상기 자가 조립형 복합체의 외부에서 상기 리간드의 인식이 쉬워질 수 있다. 따라서 상기 자가 조립형 복합체 외부에 노출되는 리간드는 상대적으로 증가할 수 있다.

[0074] 상기 리간드는 세포 부착 성질을 가지고, 세포가 부착을 위해 인식하는 부위일 수 있다. 따라서 상기 자가 조립형 복합체가 팽창하는 경우에는 상기 자가 조립형 복합체의 외부에 구비되는 세포가 인식하는 상기 리간드의 수 및 밀도가 커질 수 있기 때문에, 상기 세포의 부착이 증가할 수 있다. 반대로 상기 자가 조립형 복합체가 수축하는 경우에는 상기 자가 조립형 복합체의 외부에 구비되는 세포가 인식하는 상기 리간드의 수 및 밀도가 작아질 수 있기 때문에, 상기 세포의 부착이 감소할 수 있다.

[0075] 상기 리간드는 하이드록실 그룹(-OH, hydroxyl group) 및 아미노 그룹(-NR₃, amino group) 중 적어도 하나를 포함할 수 있다.

[0076] 상기 리간드는 브라시카스테롤(brassicasterol), 스티그마스테롤(stigmasterol), 아스코르브 산(ascorbic acid), 사이아노코발라민(cyanocobalamin), 토코페롤(tocopherol), 레티놀(retinol), 아미노부티르 산(aminobutyric acid), 아민-보크 하이드로클로라이드(amine-Boc hydrochloride), 사이클로 RGD(cyclo RGD), VH

032 아마이드-PEG2-아민(VH 032 amide-PEG2-amine), 히스타민(histamine), 티라민(tyramine), 베타-페닐에틸아민(β -phenylethylamine), 트립타민(tryptamine), 세로토닌(serotonin), 푸트레신(putrescine), 카다베린(cadaverine), 스퍼미딘(spermidine) 및 스퍼민(spermine) 중 적어도 어느 하나일 수 있다.

- [0078] 상기 자가 조립형 복합체는 상기 폴리머 복합체에 의하여 프레임의 형태로 형성될 수 있으며, 상기 프레임의 내부 공간을 가질 수 있다. 상기 프레임의 내부 공간에는 전달물질을 담지할 수 있다.
- [0079] 상기 전달물질은 상기 자가 조립형 복합체에 담지되어 상기 전달물질의 작용 부위까지 운반될 수 있다. 상기 전달물질은 상기 자가 조립형 복합체가 팽창할 때 상기 자가 조립형 복합체 밖으로 방출될 수 있고, 상기 자가 조립형 복합체가 수축할 때에는 방출되지 않을 수 있다. 따라서 상기 자가 조립형 복합체가 수축할 때에는 상기 전달물질은 상기 자가 조립형 복합체 내부에 유지될 수 있다. 상기 전달물질은 상기 자가 조립형 복합체가 팽창할 때 일정시간 동안 지속적으로 방출될 수 있다.
- [0080] 상기 전달물질은 상기 폴리머 복합체에 대하여 1:100 내지 1:1000의 중량비로 포함될 수 있다. 예컨대, 본 실시예에 따른 자가 조립형 복합체는 전술한 범위로 상기 전달물질과 상기 폴리머 복합체의 중량비를 제어함으로써 상기 자가 조립형 복합체 내부에 담지되는 전달물질의 양 또는/및 전달물질의 종류를 다양하게 변형할 수 있고, 상기 전달물질의 방출 속도를 제어할 수 있다.
- [0081] 상기 전달물질은 단백질, 핵산 및 소분자 약물 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다. 구체적으로 상기 단백질은 사이토카인(cytokine), 케모카인(chemokine), 면역 항암치료 항체, 성장 인자, 보툴리눔 독소(botulinum toxin) 및 항원 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다. 또한 구체적으로 상기 핵산은 메신저 RNA(mRNA), 마이크로 RNA(micro RNA) 및 플라스미드 DNA(plasmid DNA) 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다.
- [0082] 더 구체적으로 상기 전달물질은 사이토카인일 수 있고, 바람직하게는 ANG, BDNF, CCL1, CCL11, CCL13, CCL15, CCL17, CCL18, CCL2, CCL20, CCL22, CCL23, CCL24, CCL26, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CSF1, CSF2, CSF3, CX3CL1, CXCL1, CXCL10, CXCL12, CXCL13, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL8, CXCL9, EGF, FGF4, FGF6, FGF7, FGF9, FLT3LG, GDNF, HGF, IFNG, IGF1, IGFBP1, IGFBP2, IGFBP3, IGFBP4, IL10, IL12A, IL13, IL15, IL16, IL1A, IL1B, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, KITLG, LEP, LIF, LTA, MIF, NTF3, NTF4, OSM, PDGFB, PGF, PPBP, SPP1, TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3, THPO, TIMP1, TIMP2, TNF, TNFRSF11B, TNFSF14, TPO, VEGFA 및 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자 (GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) 중 적어도 어느 하나일 수 있다.
- [0083] 또한 더 구체적으로 상기 전달물질은 케모카인일 수 있고, 바람직하게는 IFN 감마, IFNL1, AXL, BTC, CCL13, CCL14, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, CCL4, CCL7, CCL8, CXCL1, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL16, CXCL2, CXCL3, CXCL5 및 CXCL6 중 적어도 어느 하나일 수 있다.
- [0084] 또한 더 구체적으로 상기 전달물질은 면역 항암치료 항체일 수 있고, 바람직하게는 anti-PD-1 항체 및 anti-PD-L1 항체 중 적어도 어느 하나일 수 있다.
- [0085] 또한 더 구체적으로 상기 전달물질은 성장인자일 수 있고, 바람직하게는 혈관내피형성 성장인자(VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor), 골형성 단백질(BMP, Bone morphogenetic protein), 전환성장인자 β (TGF- β , Transforming growth factor- β) 및 인슐린 유사 성장인자(IGF, Insulin-Like growth factor) 중 적어도 어느 하나일 수 있다.
- [0086] 또한 더 구체적으로 상기 전달물질은 소분자 약물일 수 있고, 바람직하게는 덱사메타손(dexamethasone), 비타민 B3, 비타민C, 독소루비신(doxolubicin), 아데노신(adenosine), 트리암시놀론(triamcinolone), 비스테로이드 항염증제(NSAIDs, non-steroidal anti-inflammatory drugs), 알란토인(Allantoin) 및 겐타마이신(Gentamicine) 중 적어도 어느 하나일 수 있다.
- [0088] 상기 자가 조립형 복합체는 수용성 액체가 있는 환경에서 광에너지의 조사에 의하여 가역적으로 팽창 및 수축하고, 상기 자가 조립형 복합체가 팽창하여 상기 수용성 액체를 흡수하고, 상기 자가 조립형 복합체가 수축하여 상기 수용성 액체를 방출하는 것일 수 있다. 따라서 상기 자가 조립형 복합체는 상기 수용성 액체를 흡수하여 하이드로겔 형태로 구비될 수 있다. 예컨대, 상기 자가 조립형 복합체는 하이드로겔은 형성된 하이드로겔이 합

쳐져 더 큰 하이드로겔을 형성할 수 있다.

- [0089] 상기 자가 조립형 복합체가 팽창할 때 수용성 액체를 흡수할 수 있고, 상기 자가 조립형 복합체가 수축할 때는 수용성 액체를 방출할 수 있다. 상기 자가 조립형 복합체는 수용성 액체가 있는 환경에서 거동할 수 있고, 극친수성 환경에서 거동할 수 있다. 따라서 상기 자가 조립형 복합체의 주변은 수용성 액체를 포함할 수 있고, 상기 자가 조립형 복합체는 수용성 액체를 주변으로부터 흡수하거나 주변으로 방출할 수 있다.
- [0090] 또한 상기 자가 조립형 복합체의 내부는 수축한 상태에서도 약간의 수용성 액체를 포함하고 있을 수 있다. 따라서 상기 자가 조립형 복합체가 팽창하여 수용성 액체를 흡수하였다가 수축하여 수용성 액체를 방출하는 경우에도, 상기 자가 조립형 복합체의 내부에는 약간의 수용성 액체를 포함할 수 있다.
- [0091] 상기 광전환 이성질체의 이성질화에 따라 상기 자가 조립형 복합체가 수용성 액체를 흡수 또는 방출할 때에, 상기 자가 조립형 복합체는 최대 팽창 또는 최대 수축할 수 있다. 여기에서 최대 팽창 및 최대 수축은 광전환 이성질체의 이성질화 또는/및 수용성 액체의 흡수-방출에 의하여 상기 자가 조립형 복합체 내의 결합 내지 상호작용이 유지되는 한도에서 최대한으로 팽창하거나 수축하는 것을 말한다. 상기 자가 조립형 복합체의 최대 팽창과 최소 팽창은 매우 빠른 속도로 전환될 수 있다. 예를 들어 상기 자가 조립형 복합체는 최대 수축에서 자외선을 조사 후 30초 내지 90초의 시간 내에 최대 팽창에 도달할 수 있다.
- [0092] 또한 상기 자가 조립형 복합체의 최대 팽창은 흡수된 수용성 액체에 의하여 중량이 증가할 수 있다. 상기 자가 조립형 복합체의 최대 팽창시의 중량은 최대 수축시의 중량의 3배 내지 5배일 수 있다.
- [0093] 예를 들어 상기 자가 조립형 복합체의 상기 광전환 이성질체가 자외선을 흡수하면 시스 이성질화되고, 이때 상기 자가 조립형 복합체가 팽창하면서 상기 자가 조립형 복합체의 내부로 수용성 액체가 흡수될 수 있다. 또한 예를 들어 상기 자가 조립형 복합체의 상기 광전환 이성질체가 가시광선을 흡수하면 트랜스 이성질화되고, 이때 상기 자가 조립형 복합체가 수축하면서 상기 자가 조립형 복합체 내부에 있던 수용성 액체가 방출될 수 있다.
- [0094] 구체적으로 상기 자가 조립형 복합체에 빛을 조사하여 상기 광전환 이성질체가 자외선을 흡수하면 시스 이성질화가 일어날 수 있다. 상기 시스 이성질체는 π - π 상호작용은 잘 형성하나, π -양이온 상호작용은 형성하기 어려울 수 있다. 상기 시스 이성질체가 형성하는 상호작용이 약해짐에 따라 상기 자가 조립형 복합체는 팽창할 수 있고, 이때 주변에 있는 수용성 액체가 흡수될 수 있다. 또한 이때 상기 자가 조립형 복합체 내부에 담지되어 있는 경우에는 상기 전달물질이 방출될 수 있고, 상기 폴리머 복합체에 부착된 리간드가 외부로 많이 노출될 수 있다.
- [0095] 또한 구체적으로 상기 자가 조립형 복합체에 빛을 조사하여 상기 광전환 이성질체가 가시광선을 흡수하면 트랜스 이성질화가 일어날 수 있다. 상기 트랜스 광전환 이성질체는 π -양이온 및 π - π 상호작용을 모두 형성할 수 있다. 상기 광전환 이성질체가 형성하는 상호작용이 강해짐에 따라 상기 자가 조립형 복합체는 수축될 수 있고, 이 때 상기 자가 조립형 복합체 내부의 수용성 액체가 주변으로 방출될 수 있다. 이때에는 상기 자가 조립형 복합체 내부에 담지되어 있는 경우에는 상기 전달물질의 방출이 억제될 수 있고, 상기 폴리머 복합체에 부착된 리간드가 외부에 거의 노출되지 않을 수 있다.
- [0096] 상기 자가 조립형 복합체 내부로 수용성 액체가 흡수되는 경우, 상기 수용성 액체의 흡수는 상기 자가 조립형 복합체가 팽창하는 것을 도울 수 있다. 또한 상기 자가 조립형 복합체 내부의 수용성 액체가 방출되는 경우, 상기 수용성 액체의 방출은 상기 자가 조립형 복합체가 수축하는 것을 도울 수 있다.
- [0097] 상기 수용성 액체는 물, 수용성 분자 및 생체 내에서 체액에 존재할 수 있는 생체 분자 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다. 상기 수용성 액체는 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 침, 뇌척수액, 눈물, 땀, 대변, 복수, 양수, 정액, 유(milk), 세포 배지, 조직 추출물 및 암 조직 중 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0099] 상기와 같은 자가 조립형 복합체의 가역적으로 팽창 및 수축하는 특성을 이용하여, 상기 자가 조립형 복합체를 생체 내에 이식하여 활용할 수 있다.
- [0100] 상기 자가 조립형 복합체는 피부, 조직 및 장기와 같은 부위에 이식할 수 있다. 이때 상기 자가 조립형 복합체에 광에너지를 조사하여 해당 부위의 수용성 액체를 흡수하도록 조작할 수 있고, 상기 자가 조립형 복합체를 회수하여 흡수한 수용성 액체를 추출하여 생체 시료로 이용할 수 있다. 상기 생체 시료는 질병 검사, 세포 분석 등에 활용될 수 있다.

- [0101] 또한 상기 자가 조립형 복합체는 혈관 및 림프관과 같은 생체 내 관에 이식될 수 있다. 이 때 상기 자가 조립형 복합체에 광에너지를 조사하여 해당 부위의 수용성 액체를 흡수하도록 조작할 수 있다. 또한 상기 자가 조립형 복합체에 광에너지를 조사하여 관 내에서 팽창하도록 하여 관 내에 흐르는 액체의 흐름을 막거나 관의 성장을 방해할 수 있다. 예를 들어 상기 자가 조립형 복합체를 혈관 내에서 팽창하도록 조작하여 암세포의 성장을 방해할 수 있다. 이 경우 상기 자가 조립형 복합체에 항암제가 담지되어 있는 경우에는 암의 치료를 유도할 수 있다.
- [0102] 또한 상기 자가 조립형 복합체는 상기 전달물질을 담지하여 생체 내에 이식될 수 있다. 이 때 상기 자가 조립형 복합체에 광에너지를 조사하여 상기 전달물질의 방출을 조절할 수 있다. 따라서 상기 자가 조립형 복합체를 이용하여 원하는 부위에 상기 전달물질을 직접적으로 빠르게 전달할 수 있다.
- [0103] 또한 상기 자가 조립형 복합체는 예를 들어 대식세포와 같은 세포와 함께 이식될 수 있다. 이 때 상기 자가 조립형 복합체에 광에너지를 조사하여 이식된 부위에서 대식세포의 부착 및 분극화를 조절할 수 있다. 상기 자가 조립형 복합체는 생체 내부 또는 생체 외부에 구비되어 부피가 가역적으로 팽창 또는 수축할 수 있으며, 상기 광에너지는 상기 생체 내부 또는 생체 외부에서 상기 자가 조립형 복합체로 인가될 수 있다. 구체적으로, 상기 자가 조립형 복합체가 생체 내부에 있는 경우에, 상기 광에너지를 생체 외부에서 인가하여도 상기 자가 조립형 복합체는 가역적으로 부피가 팽창 또는 수축할 수 있다.
- [0105] 또한 본 발명의 실시예에 있어서 광조사에 의해 거동하는 나노시스템은, 상기 광조사에 의해 거동하는 자가 조립형 복합체; 상기 자가 조립형 복합체의 적어도 일부와 결합되는 기관; 및 상기 기관에 결합한 상향변환 나노입자;를 포함할 수 있다. 상기 상향변환 나노입자는, 코어셸부, 및 상기 코어셸부의 표면에 코팅되는 코팅부,를 포함하고, 상기 코어셸부는 적외선을 흡수하여 상기 적외선의 에너지를 가시광선 또는 자외선으로 상향변환시키고, 상기 코팅부는 상기 코어셸부에서 상향변환된 가시광선을 흡수하고, 상기 상향변환 나노입자는 상기 코어셸부에서 상향변환된 자외선을 방출하는 것일 수 있다.
- [0107] 상기 코어셸부는 중심부에 구비되는 코어와, 상기 코어의 외면 전체를 감싸도록 구비되는 셸을 포함할 수 있다. 상기 코어셸부는 특정 파장의 광을 흡수하고, 흡수한 광의 에너지를 상향변환시킬 수 있다.
- [0108] 예를 들어 상기 코어셸부는 적외선을 흡수하여 자외선으로 변환시킬 수 있다. 이 과정에서 흡수된 적외선은 가시광선 및 자외선 중 적어도 하나로 변환될 수 있다.
- [0109] 상기 코어셸부는 970nm 내지 990nm 파장의 빛을 흡수하는 것일 수 있다.
- [0111] 상기 코어셸부에서 코어는 NaYbF_4 , NaYF_3 , NaGdF_4 , KGdF_4 , YOF , BaLaF_5 , LaF_3 , NaLuF_4 및 SrF_2 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다. 또한 상기 코어셸부에서 셸은 CaF_2 , $\text{Na}(\text{Yb}, \text{Gd})\text{F}_4$, NaGdF_4 및 TiO_2 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다.
- [0112] 또한 상기 코어는 도펀트로 도핑될 수 있고, 상기 도펀트는 Yb^{3+} , Tm^{3+} , Ln^{3+} 및 Er^{3+} 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다. 바람직하게는 상기 도펀트에서 Yb^{3+} 및 Tm^{3+} 중 적어도 어느 하나는 필수적으로 도핑되는 것일 수 있다.
- [0114] 상기 코어셸부는 상기 코어셸부의 외면을 전체적으로 감싸는 코팅부로 코팅될 수 있다. 상기 코팅부는 상기 코어셸부에서 변환된 광에서 가시광선을 흡수하고 자외선을 흡수하지 않을 수 있다. 다시 말하면 상기 코어셸부에서 흡수된 적외선으로부터 변환된 광 중에서, 가시광선은 상기 코팅부에 의해 흡수되고 자외선만 외부로 방출될 수 있다. 따라서 상기 코팅부에 의하여 상기 상향변환 나노입자는 적외선을 흡수하여 자외선을 선택적으로 방출할 수 있다.
- [0115] 따라서 상기 코팅부는 420nm 내지 500nm 파장의 빛을 흡수하고, 320nm 내지 380nm 파장의 빛을 흡수하지 않을 수 있다.

- [0116] 상기 코팅부는 제1 코팅제 및 제2 코팅제를 혼합하여 형성될 수 있다. 상기 제1 코팅제는 상기 코어셀부에서 상향변환된 가시광선을 흡수할 수 있고 자외선을 흡수하지 않을 수 있으며, 바람직하게는 염료일 수 있다. 상기 제2 코팅제는 상기 제1 코팅제가 안정적으로 코팅될 수 있도록 도울 수 있으며, 바람직하게는 계면활성제일 수 있다. 상기 제2 코팅제는 상기 제1 코팅제의 표면을 감싸는 형태일 수 있다.
- [0117] 상기 제1 코팅제는 염료일 수 있고, β -카로틴(β -carotene), 커큐민(curcumin), R-피코에리트린(R-phycoerythrin), 로다민(rhodamine), FDB-003, FDB-004 및 FDB-005 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다.
- [0119] 상기 제2 코팅제는 계면활성제일 수 있고, 양이온성 계면활성제, 음이온성 계면활성제, 비이온성 계면활성제 및 양쪽성 계면활성제 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다.
- [0120] 상기 제2 코팅제는 양이온성 계면활성제를 포함할 수 있고, 소듐 올레이트(sodium oleate), 소듐 도데실 설페이트(SDS, sodium dodecyl sulphate), 소듐 도데실 벤젠 설포네이트(sodium dodecyl benzene sulphonate) 및 소듐 스테아레이트(sodium stearate) 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다.
- [0121] 또한 상기 제2 코팅제는 음이온성 계면활성제를 포함할 수 있고, 도데실아민 하이드로클로라이드(dodecylamine hydrochloride)을 포함할 수 있다.
- [0122] 또한 상기 제2 코팅제는 비이온성 계면활성제를 포함할 수 있고, 트웬 20(Tween 20), 트웬 80(Tween 80), 스팬-60(span-60), 스팬-80(span-80) 및 폴리에틸렌 옥사이드(polyethylene oxide) 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다.
- [0123] 또한 상기 제2 코팅제는 양쪽성 계면활성제를 포함할 수 있고, 도데실 베타인(dodecyl betaine)일 수 있다.
- [0125] 상기 광에너지에 의해 조절되는 나노시스템에서, 상기 상향변환 나노입자는 상기 기관에 결합하고, 상기 자가 조립형 복합체는 상기 기관 및 상기 상향변환 나노입자 중 적어도 어느 하나에 결합한 것일 수 있다.
- [0126] 상기 나노시스템에 적외선을 조사하여 상기 광전환 이성질체를 시스 이성질화시킬 수 있다. 이 때 상기 자가 조립형 복합체는 가역적으로 부피가 팽창 또는 수축할 수 있다.
- [0127] 예컨대, 상기 자가 조립형 복합체가 팽창하는 경우 상기 자가 조립형 복합체 내부로 수용성 액체가 흡수될 수 있으며, 상기 자가 조립형 복합체에 상기 전달물질이 담지된 경우 상기 전달물질이 상기 자가 조립형 복합체 밖으로 방출될 수 있다. 상기 나노시스템에 조사된 적외선은 상기 상향변환 나노입자를 통해 자외선으로 상향변환될 수 있고, 상기 광전환 이성질체는 상향변환된 자외선을 흡수하여 시스 이성질화할 수 있다.
- [0128] 또는 상기 나노시스템에 가시광선을 조사하여 상기 광전환 이성질체를 트랜스 이성질화시킬 수 있다. 이 때 상기 자가 조립형 복합체가 수축하고, 상기 자가 조립형 복합체 내부에 있는 상기 수용성 액체가 방출될 수 있다. 상기 나노시스템에 조사된 가시광선은 상기 상향변환 나노입자에 흡수되지 않고, 직접 상기 광전환 이성질체에 흡수되어 트랜스 이성질화를 유도할 수 있다.
- [0129] 여기에서 상기 자가 조립형 복합체가 팽창하여 수용성 액체를 흡수하고 담지된 상기 전달물질을 방출할 수 있다. 또는 상기 자가 조립형 복합체가 수축하여 수용성 액체를 방출할 수 있고, 이때에는 담지된 상기 전달물질이 방출되지 않을 수 있다.
- [0131] 또한 상기 자가 조립형 복합체는 상기 자가 조립형 복합체에 세포 부착성 리간드를 포함하고 있어 세포의 부착 및 분극화를 조절할 수 있다. 상기 세포는 대식세포일 수 있다.
- [0132] 상기 자가 조립형 복합체에 자외선을 조사하면 상기 광전환 이성질체는 자외선을 흡수하여 시스 이성질화하여 상기 자가 조립형 복합체를 팽창시킬 수 있다. 이 때 상기 리간드가 상기 자가 조립형 복합체의 외부로 많이 노출되고, 대식세포의 부착 및 M2 분극을 촉진할 수 있다.
- [0133] 또는 상기 자가 조립형 복합체에 가시광선을 조사하면 상기 광전환 이성질체를 트랜스 이성질화시키고, 상기 자가 조립형 복합체는 수축할 수 있다. 이 때 상기 리간드가 자가 조립형 복합체의 외부로 거의 노출되지 않고, 대식세포의 부착을 억제하고 M1 분극을 촉진할 수 있다.

- [0134] 상기 자가 조립형 복합체가 상기 기관 및 상향변환 나노입자와 함께 상기 나노시스템을 형성하는 경우에는, 상기 나노시스템에 적외선을 조사하여 대식세포의 부착 및 M2 분극화를 촉진할 수 있고, 상기 나노시스템에 가시광선을 조사하여 대식세포의 부착을 억제하고 M1 분극화를 촉진할 수 있다.
- [0136] 이와 같은 적외선 또는 가시광선은 생체의 외부에서 조사되어 생체의 내부에 있는 상기 나노시스템에 작용할 수 있다.
- [0137] 자외선은 상기 광전환 이성질체를 시스 이성질화하지만 생체독성이 높고 생체투과성이 낮은 문제가 있을 수 있다. 또한 상향변환 나노입자를 이용하지 않고 광전환 이성질체를 이용하거나, 종래의 상향변환 물질을 이용하는 경우 생체에 유해한 자외선을 조사해야 하기 때문에 문제가 될 수 있었다. 반면 상기 나노시스템에 직접 조사되는 적외선 및 가시광선은 생체에 무해하고 상기 상향변환 나노입자가 포함된 나노시스템의 거동을 조절할 수 있다. 따라서 상기 상향변환 나노입자를 포함하는 경우 자외선을 직접 조사하지 않고 상기 나노시스템을 조절할 수 있다.
- [0139] 따라서 상기 나노시스템은 생체에 무해한 적외선 및 가시광선을 생체 외부에서 조사하여 생체 내부에 있는 나노시스템의 거동을 조절하고, 이에 의하여 수용성 액체의 흡수를 조절하고, 물질 전달을 조절하고, 대식세포의 부착 및 분극화를 조절할 수 있다.
- [0141] 이하 본 발명의 실시예 및 비교예를 기재한다. 그러나, 하기 실시예들은 본 발명의 바람직한 일 실시예일뿐 본 발명의 권리 범위가 하기 실시예들에 의하여 제한되는 것은 아니다.
- [0143] **[제조예]**
- [0144] **1. 광전환 이성질체의 합성**
- [0145] 자가 조립형 복합체의 수축/팽창을 가역적으로 조절하는 광전환 이성질체로서, Azo-C10-N⁺를 합성하였다.
- [0146] 우선 4-아미노페놀(4-aminophenol, 27.49mmol) 3.00g 및 나이트로소벤젠(nitrosobenzene, 30.24mmol) 3.24g를 아세트산(acetic acid) 100mL와 2구 둥근 바닥 플라스크에서 혼합하고, 이어서 실온, N₂ 조건에서 밤새 교반하여 Azo-OH를 합성하였다. 이 혼합 용액에 DI 워터를 첨가하여 레드쉬-브라운(reddish-brown) 색의 침전물을 수득하였다. 이 침전물을 에틸 아세테이트(EA, ethyl acetate)를 이용하여 수집하고 MgSO₄를 이용하여 건조시킨 후, MgSO₄를 여과하여 제거하고 EA는 증발시켜 제거하였다. 마지막으로 6:1(v/v)의 헥세인/에틸 아세테이트를 용리액(eluent)으로 하여 겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하였다.
- [0147] 자가 조립형 복합체 내에서 Azo-C10-N⁺ 분자의 아로마틱 그룹과 양이온 사이의 인터랙션을 용이하게 하기 위하여, 아로마틱 그룹과 Br 사이에 소수성 꼬리를 형성하여 간격을 주었다. 이러한 Azo-C10-Br 분자를 얻기 위해 Azo-OH에 1,10-다이브로모데케인(1,10-dibromodecane)를 결합하였다. Azo-OH(2.52mmol) 0.5g을 다이메틸포름아마이드(DMF, dimethylformamide) 40mL에 녹이고, 여기에 소듐 하이드라이드(sodium hydride, 5.04mmol) 40mL을 아이스 베스(ice bath) 안에서 첨가하였다. 이 용액을 30분 동안 교반하고, 1,10-다이브로모데케인(12.60mmol) 3.78g을 포함하는 DMF 5mL를 첨가하고, 이어서 실온에서 밤새 저어주었다. 그 후, 이 용액에 메탄올(methanol) 5mL를 첨가하여 반응을 퀸칭(quenching)하고, 여기에서 합성된 Azo-C10-Br을 DI 워터 및 다이클로로메테인(dichloromethane)의 혼합물을 이용하여 추출하였다. 다이클로로메테인에 용해시킨 Azo-C10-Br을 DI 워터를 제거하기 위하여 MgSO₄로 건조시키고, 이어서 용리제로서 1:4(v/v)의 다이클로로메테인/헥세인이 포함된 겔 칼럼 크로마토그래피를 이용하여 MgSO₄를 여과하여 제거하고 다이클로로메테인은 증발시켰다.
- [0148] 이 후 Azo-C10-Br 분자에서 Br은 질소 양이온을 가지는 트라이에틸아민(triethylamine)으로 대체되고, 아로마틱 그룹과 질소 양이온 사이에 소수성 꼬리에 의한 간격이 있는 Azo-C10-N⁺ 분자를 생성하였다. 이 분자는 π -양이온(π -cation) 및 π - π 상호작용(π - π interaction)을 통해 적층되어 리간드가 포함된 자가 조립형 복합체를 형성하였다. Azo-C10-Br(0.72mmol) 0.3g 및 트라이에틸아민(8.63mmol) 0.87g을 포함하는 아세트나이트릴

(acetonitrile) 40mL의 혼합 용액을 N_2 조건, 60°C에서 밤새 교반하였다. 아세토나이트릴을 증발시킨 후, 황색(yellow) 고체 생성물을 테트라하이드로퓨란(THF, tetrahydrofuran)에 용해하여 과량의 트라이에틸아민을 제거하였다. 이 용액에 헥세인을 첨가하여, Azo-C10-N⁺ 생성물을 침전시키고, 이를 여과하고 진공 오븐에서 건조시켰다.

[0150] 2. 리간드를 포함하는 폴리머 합성

[0151] 자가 조립형 복합체에 세포 부착성 RGD 리간드를 결합하기 위하여, 리간드가 있고 음으로 하전된 폴리머인 폴리 아크릴산(PAA, polyacrylic acid)을 양으로 하전되어 적층된 Azo-C10-N⁺ 분자와 정전기적으로 결합시켰다. 여기에서 RGD 리간드는 아민 그룹을 가진 리신 잔기가 있는 환형-RGDyK(cyclo-RGDyK, cyclo-Arg-Gly-Asp-d-Tyr-Lys)를 사용하였다.

[0152] RGDyK의 아민 그룹과 PAA의 카르복실레이트 그룹 사이에 (벤조트리아졸-1-일록시)트리스(다이메틸아미노)포스포늄 헥사플루오로포스페이트[BOP, (benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate]가 매개된 아마이드 연결을 통해 RGD 리간드와 PAA를 연결하였다. PAA(Mw=1800Da, 0.065mmol) 116mg, 환형-RGDyK(RGD 리간드 펩타이드, AnaSpec Inc., 0.016mmol) 10mg, BOP(0.129mmol) 57.1mg, 및 하이드록시벤조트리아졸 하이드레이트(HOBT, hydroxybenzotriazole hydrate, 0.129mmol) 17.4mg을 N,N-다이아이소프로필에틸아민(DIPEA, N,N-diisopropylethylamine, 0.258mmol)을 포함하는 DMF 2mL에서 함께 혼합하였다.

[0153] 이 혼합물을 실온, N_2 조건에서 밤새 격렬하게 교반하였다. 리간드가 부착된 PAA를 선택적으로 수집하기 위하여, 생성물을 500Da의 분자량 컷오프(cut-off)를 갖는 투석백(dialysis bag)을 이용하여 DI 워터에 대해 투석하였다.

[0155] 3. 자가 조립형 복합체 준비

[0156] 리간드가 부착된 자가 조립형 복합체를 수축/팽창하는 가역적 광전환을 위하여, 리간드가 부착된 PAA(16.8 μ mol)을 포함하는 생리학적 수용액인 인산염 완충 식염수(PBS, phosphate-buffered saline) 3mL를 Azo-C10-N⁺(Mw=438.7Da, 3.42 μ mol)를 포함하는 PBS 3mL와 10분 동안 초음파처리하여 혼합하였고, 이들이 정전기적 상호작용을 통해 연결된 자가 조립형 복합체를 제조하였다.

[0157] 이 후, 상기 용액을 1000rpm에서 10분 동안 간단하게 원심분리하고, 균일한 리간드가 부착된 자가 조립형 복합체(큰 침전물은 제거하였다)가 포함된 상등액을 수집하였다.

[0159] 4. 상향변환 나노입자 합성

[0160] UV가 없는(따라서 상대적으로 조직 투과성인) 이중 파장 광자극(NIR 및 Vis light)으로 나노 어셈블리의 수축/팽창을 조절하기 위하여, 상향변환 나노입자(UCNT, upconversion nanotransducer)를 합성하였다.

[0161] (1) 코어셸부 제조

[0162] 상기 상향변환 나노입자의 코어셸부($NaF_4 \cdot Rb, Tm @ NaYF_4$)를 제조하였다. 코어셸부의 코어 위에 등각 껍질 코팅(conformal shell coating)을 통해, 표면 결합으로부터 발생하는 광발광의 소멸을 제한하기 위해 코어셸부의 표면을 부동태화하였고, 이는 조사된 NIR을 상향변환시켜 높은 광발광 강도의 UV를 방출하게 해주었다.

[0163] 코어셸부에서 49% Yb- 및 1% Tm-도핑된 $NaYF_4$ 코어는 이트륨(III)클로라이드 헥사하이드레이트($YCl_3 \cdot 6H_2O$, yttrium(III)chloride hexahydrate, 99.99%) 0.5mmol, 이터븀(III)클로라이드 헥사하이드레이트($YbCl_3 \cdot 6H_2O$, ytterbium (III) chloride hexahydrate, 99.99%) 0.49mmol, 툴륨(III)클로라이드 헥사하이드레이트($TmCl_3 \cdot 6H_2O$, thulium(III) chloride hexahydrate, 99.99%) 1mmol, 올레익 애시드(oleic acid, 90%) 6mL 및 옥타데센(octadecene, 90%) 15mL를 3구 플라스크에서 혼합하고, 이어서 150°C에서 40분 동안 가열하여 제조하였다. 그 후 NaOH 2.5mmol 및 NH_4F 4mmol을 포함하는 메탄올(methanol) 10mL를 혼합액에 첨가한 후, 40분 동안 교반하였다. 그 후, 메탄올을 증발시키고, 혼합 용액을 320°C, Ar 분위기에서 60분 동안 가열하였다. 이 혼합 용액을 에

탄올(ethanol)로 3회 세척하고, 합성된 코어($\text{NaYF}_4:\text{Yb,Tm}$)을 사이클로헥세인(cyclohexane) 10mL에 분산시켰다.

[0164] NaYF_4 셸은 코어 위에 표면 결함을 최소화하고 광발광 강도를 높이기 위하여 에피택셜 성장(epitaxial growth)으로 형성하였다. $\text{YCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1mmol, 올레익 애시드 6mL 및 1-옥타데센 15mL를 3구 플라스크에서 혼합하여 혼합 용액을 만들고, 150℃에서 40분 동안 가열하였다. 그 후, 이 혼합 용액에 상기에서 제조한 코어 현탁액 10mL, 및 NaOH 2.5mmol과 NH_4F 4mmol을 포함하는 메탄올 용액을 차례로 첨가하고, 40분 동안 교반하였다. 메탄올을 증발시킨 후, 이 혼합 용액을 Ar 분위기에서 60분 동안 320℃까지 가열한 후, 에탄올로 3회 세척하였다.

[0165] 마지막으로, 제조된 코어@셸부($\text{NaYF}_4:\text{Yb,Tm}@\text{NaYF}_4$)를 사이클로헥세인 10mL에 분산시켰다.

[0167] (2) 코어셸부에 코팅부 형성

[0168] 자가 조립형 복합체에 광에너지를 조사하여 선택적인 이성질화를 유도하기 위하여 상향변환 나노입자에 NIR를 조사하여 Vis light뿐 아니라 UV까지 최대한으로 상향변환시킬 수 있도록 제조하였다. 이를 위해, 상기 (1)에서 제조한 코어셸부의 표면에 400nm 내지 500nm 범위의 가시광선을 흡수하는 자연 염료(β -carotene)를 코팅하였고, 이 코팅부는 광전환 이성질체를 트랜스 이성질화할 수 있는 상향변환된 가시광선을 흡수하였다.

[0169] 코어셸부(10 mg/mL) 500 μL , 임상적으로 사용되는 천연 염료인 베타-카로틴(β -carotene, 1 mg/mL) 100 μL 및 임상적으로 사용되는 Tween 80(10mg/mL) 200 μL 를 포함하는 사이클로헥세인 용액을 격렬하게 볼텍싱(vortexing) 혼합하였다. 이 용액을 공기-건조(air-dried)하여 사이클로헥세인을 증발시키고, 건조된 잔류물을 DI 워터 2mL에 분산시켰다. 이 후 이 분산액을 연속적으로 초음파처리하고, 형성된 상향변환 나노입자(코어@셸@코팅부)가 뭉치지 않도록 2분 동안 교반하였다.

[0170] 수득한 상향변환 나노입자는 사용 전에 암실에서 저장하였다.

[0172] (3) 상향변환 나노입자가 코팅된 기관 형성

[0173] (2)에서 제조한 상향변환 나노입자를 유리 기관의 표면에 전체적으로 코팅하였다.

[0174] 세포 배양 등급의 유기 기관 및 실리콘 기관(천연 산화 규소 표면이 형성되어 유리 기관과 유사한 표면 화학을 가짐)을 12mm X 12mm 크기로 잘라 실험에 사용하였다. 상기 기관들을 HCl에 30분 동안 담가 표면을 깨끗하게 하고, H_2SO_4 를 1시간 동안 처리하여 하이드록실 그룹(hydroxyl group)을 활성화하였다. 그 후, 기관들을 DI 워터로 3회 행구고, 상향변환 나노입자 400 μL 를 포함하는 DI 워터에서 인큐베이션하여 기관의 표면에 상향변환 나노입자를 코팅하였다. 이 후 40℃의 건조 오븐에서 6시간 동안 건조시켰다.

[0175] 상향변환 나노입자 표면은 기관 표면의 하이드록실 그룹과 친수성 상호작용을 형성하여 균일하게 분산되었고, 상향변환 나노입자는 기관 표면을 전체적으로 덮었다. 이 상향변환 나노입자가 코팅된 기관은 추가로 천연 염료(β -carotene) 400 μL 를 포함하는 DI 워터로 코팅된 후, 40℃의 오븐에서 6시간 동안 완전히 건조되었다.

[0176] 이렇게 제조된 기관은 세포 배양 전에 1시간 동안 UV light로 살균되었다.

[0178] 5. 나노시스템 준비

[0179] 위에서 제조한 자가 조립형 복합체 및 상향변환 나노입자가 코팅된 기관을 결합시켜 나노시스템을 준비하였다.

[0180] 상향변환 나노입자가 코팅된 기관을 자가 조립형 복합체 1mL를 포함하는 생리학적 수용액(PBS)에서 실온 조건으로 30분 동안 인큐베이션하고, 둘베코 포스페이트-버퍼드 살린(D-PBS, Dulbecco's phosphate-buffered saline)으로 세척하였다.

[0181] 이 과정에서 상향변환 나노입자와 자가 조립형 복합체 사이의 친수성 상호작용에 의하여, 자가 조립형 복합체가 상향변환 나노입자가 코팅된 기관에 결합하고 퍼진 형태(spread shape)를 형성하였다.

[0182] 따라서, 광에너지를 조사하여 광전환 이성질체를 이성질화 함으로써 자가 조립형 복합체를 가역적으로 수축/팽창시킬 수 있는 나노시스템이 제조되었다.

- [0184] **[실시예]**
- [0185] 상기의 제조예에 의하여 실시예를 제조하였다.
- [0186] **1. 실시예 1**
- [0187] Azo-C10-N+구조의 광전환 이성질체를 RGD 리간드가 부착되어 있는 PAA 폴리머에 정전기적으로 결합시켜 자가 조립형 복합체를 형성하였다.
- [0188] 또한 NaYF₄:Yb,Tm@NaYF₄@코팅부 구조의 상향변환 나노입자를 기관 위에 친수성 상호작용을 통해 전체적으로 코팅하였다. 코팅부 중 내층을 형성하는 염료는 β-카로틴을 사용하였고, 내층의 표면을 계면활성제인 Tween 80으로 전체적으로 코팅하여 코팅부 중 외층을 형성하였다.
- [0189] 상기 자가 조립형 복합체를 상기 상향변환 나노입자의 외층에 친수성 상호작용으로 부착하였다.
- [0190] 상기 자가 조립형 복합체의 내부는 염료로서 β-카로틴(β-carotene)을 담지하였다.
- [0192] **2. 실시예 2**
- [0193] 상기 실시예 1에서 자가 조립형 복합체 내에 담지되는 물질을 로다민으로 바꾸고 나머지를 동일하게 하여 제조하였다.
- [0195] **2. 실시예 3**
- [0196] 상기 실시예 1에서 자가 조립형 복합체 내에 담지되는 물질을 IL-4로 바꾸고 나머지를 동일하게 하여 제조하였다.
- [0198] **[비교예]**
- [0199] **1. 비교예 1**
- [0200] 상기 실시예 1에서 자가 조립형 복합체 및 상향변환 나노입자를 제외하고 기관만 있는 물질을 제조하였다.
- [0201] **2. 비교예 2**
- [0202] 상기 실시예 1에서 기관 위에 셸과 코팅부를 제외하고 코어만 있는 상향변환 나노입자 및 자가 조립형 복합체가 있는 물질을 제조하였다.
- [0203] **3. 비교예 3**
- [0204] 상기 실시예 1에서 기관 위에 코팅부를 제외하고 코어셸부만 있는 상향변환 나노입자 및 자가 조립형 복합체가 있는 물질을 제조하였다.
- [0205] **4. 비교예 4**
- [0206] 상기 실시예 1에서 상향변환 나노입자가 제외되고 기관 위에 자가 조립형 복합체가 있는 물질은 제조하였다.
- [0207] **5. 비교예 5**
- [0208] 상기 실시예 1에서 자가 조립형 복합체를 제외하고 기관 위에 상향변환 나노입자가 있는 물질을 제조하였다.
- [0209] **6. 비교예 6**
- [0210] 상기 실시예 1에서 기관 위에 리간드가 없는 자가 조립형 복합체 및 상향변환 나노입자가 있는 물질을 제조하였다.

[0213] **[실험 방법]**

[0214] **1. ^1H NMR 분광법(^1H NMR spectrometry)**

[0215] Azo-OH, Azo-C10-Br, 및 Azo-C10-N⁺ 분자에서 일련의 화학 결합 변화를 확인하기 위하여, ^1H NMR 분광(Bruker Advance 400 spectrometer, 400 MHz)을 이용하였다.

[0216] 분석에 앞서, Azo-OH를 중수소화 다이메틸 설펡사이드(DMSO-d₆)에 용해시키고, Azo-C10-Br 및 Azo-C10-N⁺는 중수소화 클로로포름(CDCl₃)에 용해시켰다. 특성 피크는 각 시료들의 합성 후 색인화되었다.

[0217] Azo-OH의 시료는 노란-오렌지 색상(yellow-orange color)이었다(1.4g, 수율:25.7%). Azo-OH(400 MHz, DMSO-d₆, δ (ppm))의 ^1H NMR은 10.34 (s, 1H), 7.84-7.82 (m, 4H) 7.59-7.49 (m, 3H), 6.99-6.95 (m, 2H)였다. Azo-OH 분자의 특성 피크로 페놀릭 그룹이 확인되었다.

[0218] Azo-C10-Br 분자의 시료는 노란-오렌지 색상(yellow-orange color)이었다(0.5g, 수율:47.6%). Azo-C10-Br(400 MHz, CDCl₃, δ (ppm))의 ^1H NMR은 7.93-7.85 (m, 4H), 7.52-7.41 (m, 3H), 7.00-6.99 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 4.05-4.02 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.42-3.39 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.89-1.78 (m, 4H), 1.51-1.38 (m, 4H), 1.32 (s, 8H)였다. Azo-C10-Br 분자의 특성 피크에서는 이터(ether) 그룹이 확인되었다.

[0219] Azo-C10-N⁺ 분자의 시료는 노란 색상(yellow color)이었다(0.24g, 수율:64.9%). Azo-C10-N⁺(400 MHz, CDCl₃, δ (ppm))의 ^1H NMR은 7.92-7.86 (m, 4H), 7.52-7.42 (m, 3H), 7.02-6.99 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 4.06-4.03 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.54-3.46 (m, 6H), 3.29-3.25 (m, 2H), 1.49-1.33 (m, 25H)이었다. Azo-C10-N⁺ 분자의 특성 피크로서 3차 아민(tertiary amine)의 α -하이드로젠이 확인되었다.

[0221] **2. 분자 역학 시뮬레이션(Molecular dynamic simulation)**

[0222] trans-Azo-C10-N⁺와 비교하여 cis-Azo-C10-N⁺의 물 흡수량이 더 많은 것을 확인하기 위하여, Schrodinger Suites (Schrodinger)를 이용하여 수화 에너지를 계산하여 물에 대한 Azo-C10-N⁺ 각각의 친화도를 결정하였다.

[0224] (1) 분자의 예비 컨포머에 대한 검색은 다음의 매개변수를 가지고 MacroModel을 통해 수행하였다.

[0225] 1) 포스 필드(force field) : OPLS3

[0226] 2) 용매 : H₂O

[0227] 3) 포스 필드에서 충전

[0228] 4) 컷오프(cutoff) : 없음

[0229] 5) 최소화 방법 : PRCG

[0230] 6) 최대 반복 횟수 : 2,500

[0231] 7) 수렴(converge on): 구배-gradient)

[0232] 8) 수렴 임계값(convergence threshold) : 0.05

[0233] 9) 형태 탐색 방법(conformational search method) : 혼합 비틀림/저모드(torsional/low-mode) 샘플링

[0234] 10) 비틀림 샘플링 옵션 : 중간

[0235] 11) 최대 단계 수 : 1,000

[0236] 12) 구조 절약을 위한 에너지 창(energy window for saving structures): 21 kJ/mol

[0237] 13) 최대 원자 편차 컷오프를 사용한 중복 컨포머 제거 : 0.5

- [0239] (2) 미세 기하 최적화(fine geometry optimization)은 다음의 매개변수를 가지는 밀도 기능 이론(DFT, density functional theory)에 기반하여 Jaguar 모듈로 수행하였다.
- [0240] 1) 이론 : B3LYP-D3
- [0241] 2) 전하 : 1
- [0242] 3) 기준 : 6-31G**
- [0243] 4) 스핀 다중도 : 1
- [0244] 5) 해밀턴 식(Hamiltonian) : 비상대론적(nonrelativistic)
- [0245] 6) SCF 정확도 수준 : 빠름
- [0246] 7) 초기 추측 : 원자 겹침
- [0247] 8) 수렴 기준 : 최대 반복횟수 48회, 에너지 변화 $5e-05$, 및 RMS 밀도 행렬 변화 횟수(RMS density matrix change) $5e-06$
- [0248] 9) 융합 계획 : DIIS
- [0249] 10) 용매화 모델 : H₂O
- [0250] 11) 기체상 기준 에너지 : 최적화된 기체상 구조
- [0252] (3) MD 시뮬레이션은 다음의 매개변수를 가지는 Schrodinger Suites에서 Desmond 모듈을 통해 아크릴산을 가지는 두 개의 Azo-C10-N⁺에 대한 패킹 모드를 사용함으로써 자가 조립형 복합체 내에 주요 분자간 상호작용을 조사하기 위하여 수행되었다.
- [0253] 1) 포스 필드(force field) : OPLS3e
- [0254] 2) 용매 모델 : TIP4PD
- [0255] 3) 이온 배치 : 2개의 브롬화물 이온
- [0256] 4) 경계 조건(boundary conditions) : 사방정계 상자 형태(orthorhombic box shape), 상자 크기 계산 방법(버퍼)
- [0257] 5) 시뮬레이션 시간 : 20ns, 기록 간격 : 40ps
- [0258] 6) 대략적인 프레임 수 : 500
- [0259] 7) 앙상블 클래스(ensemble class) : NPT
- [0260] 8) 온도 : 300 K
- [0261] 9) 압력 : 1.01325 bar
- [0262] 10) 온도 조절기 방식(thermostat method): 노즈-후버 체인(Nose-Hoover chain)
- [0263] 11) 쿨롱 상호작용 컷오프 반경(coulombic interaction cutoff radius) : 9.0Å. 매 10 프레임 마다 분자간 상호작용을 분석하였다.
- [0265] **3. UV-Vis 분광법(UV-Vis spectroscopy)**
- [0266] Azo-C10-N⁺ 분자의 이성질 상태의 흡수 스펙트럼을 확인하기 위하여, UV-Vis 분광계 측정(Agilent 8453)은 UV light(365nm, $0.25W/cm^2$, 30s) 또는 Vis light(448nm, $0.2W/cm^2$, 30s)를 교대로 처리하여 200nm 내지 700nm 범위의 파장에서 수행하였다.
- [0267] 315nm 및 345nm에서의 최대 흡수 피크는 자가 조립형 복합체 각각의 cis-Azo-C10-N⁺ 및 trans-Azo-C10-N⁺에 해당하는 것이었다. 빠른 UV 처리(365nm, $0.25W/cm^2$, 30s) 후 다양한 시간 포인트에서 Azo-C10-N⁺ 분자의 잔류 시

스-비율(백분율)은 다양한 시간 포인트에서의 375nm에서 상대적인 흡수 값을 이용하여 결정하였다. UV 처리 후 약 375nm에서 더 낮은 흡수 값은 시스-비율을 나타내고, 반면 Vis 처리 후 약 375nm에서 더 높은 흡수 값은 트랜스-비율을 나타냈다. 가시광선-흡수 자연 염료인 베타-카로틴(β -carotene)의 UV-Vis 흡수 스펙트럼도 측정하였다.

[0269] 4. 투과 전자 현미경(TEM, Transmission electron microscopy)

[0270] 상향변환 나노입자의 코어 및 코어셸의 크기와 형태의 균일성을 TEM 이미징(Tecnai F20, FEI)으로 특성화하였다.

[0272] 5. 상향변환 나노입자(코어셸부)의 고해상도 투과 전자 현미경(HR-TEM, High resolution-transmission electron microscopy)

[0273] HR-TEM 이미징(Tecnai F20, FEI)는 원자 분해능에서 코어 및 코어셸의 격자 무늬를 식별하기 위하여 200kV의 작동 전압에서 수행되었다. 이웃하는 격자 무늬 사이의 평균 간격은 육방정 결정상(hexagonal crystalline phase)을 확인하기 위하여 라벨링 되었고, 코어 위에서 에피택셜 성장된 셸을 확인하였다.

[0275] 6. 상향변환 나노입자(코어셸부)의 고각 환형 암시야 주사 투과 전자 현미경(HAADF-STEM, High-angle annular dark field-scanning transmission electron microscopy)

[0276] 상향변환 나노입자에서 코어셸 나노구조의 크기 및 형태의 균일성을 특성화하기 위하여, HAADF-STEM 이미징은 Talos 200x TEM(FEI co.)를 이용하여 6의 스팟 크기, 2nm의 프로브 크기를 이용하여 200kV에서 수행하였다. 이미지에서 상향변환 나노입자의 셸은 코어보다 약간 더 어둡게 나타났다.

[0278] 7. 에너지 분산 X선 분광 매핑(EDS, Energy-dispersive X-ray spectroscopy mapping)

[0279] 상향변환 나노입자의 코어와 셸에서 F 및 Y 원소의 균일한 분포와 코어에만 존재하는 Yb 및 Tm 원소의 존재를 확인하기 위하여, HAADF-STEM에 사용된 것과 동일한 설정으로 EDS 매핑을 수행하였다.

[0281] 8. 동적 광산란 분석(DLS, dynamic light scattering analysis)

[0282] 상향변환 나노입자의 코어 및 코어셸의 균일한 직경 분포를 확인하기 위하여 실온에서 DLS 분석(Zetasizer Nano ZS, Malvern, UK)을 수행하였다. 이에 의하여 34 ± 0.9 nm 크기의 코어가 47 ± 1.2 nm 크기의 코어셸로 성장하는 것을 확인하였다.

[0284] 9. 광발광 측정(photoluminescence measurement)

[0285] 가시광선을 흡수하는 천연 염료(β -carotene)로 코팅된 상향변환 나노입자의 효율을 확인하기 위하여, 980nm NIR 다이오드 레이저를 조사하는 Hitachi F-7000 분광 광도계를 이용하여 광발광 스펙트럼을 분석하였다. 코어, 코어@셸, 및 코어@셸@코팅부를 각각 측정하였다. 광발광 강도는 340nm에서 UV 영역의 최대 피크 강도로 정규화되었다. UV 대 Vis 광발광의 비율은 UV(340nm)의 최대 피크 강도를 청색 Vis 영역(450nm)으로 나누어 계산되었다. UV 피크는 Tm^{3+} 원소에서 $^1I_6 \rightarrow ^3F_4$ 및 $^1D_2 \rightarrow ^3H_6$ 의 전자 전이에서 유래한 반면, 청색 피크는 Tm^{3+} 원소에서 $^1D_2 \rightarrow ^3F_4$ 및 $^1G_4 \rightarrow ^3H_6$ 의 전자 전이에서 유래하였다.

[0287] 10. 주사 전자 현미경(SEM, scanning electron microscopy)

[0288] 기관 표면이 상향변환 나노입자로 완전히 코팅되었는지 확인하기 위하여, SEM 이미징(FEI, Quanta 250 FEG)을

수행하였다. SEM 이미지가 전에, 상향변환 나노입자가 코팅된 기판을 완전히 건조시킨 후, 90초 동안 백금 코팅하였다.

[0290] 11. 자가 조립형 복합체의 형성과정에서 형광 염료를 담지하여 자가 조립형 복합체의 형광 추적

[0291] 형광을 통하여 자가 조립형 복합체를 추적하기 위하여, 리간드가 부착된 PAA($16.8\mu\text{mol}$)를 포함하는 PBS 3mL를 Azo-C10-N⁺ 분자($3.42\mu\text{mol}$)를 포함하는 PBS 3mL와 혼합하고, 5분 동안 초음파 처리하였다. 그 후, 여기에 0.2M 적색 형광 로다민 6G 염료(red-fluorescent rhodamine 6G dye) 30 μL 를 포함하는 PBS 용액을 첨가하고, 자가 조립형 복합체 내에 염료(로다민 6G)를 담지하기 위하여 이 혼합 용액을 5분 동안 더 초음파 처리하였다. 이 용액을 1000rpm에서 10분 동안 원심분리한 후, 담지되지 않은 로다민 6G가 남아있는 상층액을 버렸다. 로다민 6G가 담지된 자가 조립형 복합체 1mL를 상향변환 나노입자가 코팅된 기판 위에 실온에서 30분 동안 처리하여 부착시켰다. 그 후, 이 기판 위의 자가 조립형 복합체의 수를 가시화 및 정량화하기 위하여, 이 기판을 공초점 현미경으로 이미지화하였다.

[0293] 12. 자가 조립형 복합체에서 RGD 리간드 수의 정량화

[0294] 자가 조립형 복합체에 포함된 RGD 리간드가 포화되어 광이성질체 전환 중에 일정하게 유지되는지 확인하기 위하여, Nanodrop A280 방법(NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermofisher Scientific)을 사용하였다. 자가 조립형 복합체는 PBS에서 합성되고, UV light(365nm , 0.25 W/cm^2 , 1분 동안 조사) 처리하여 팽창시키고 Vis light(448nm , 0.2 W/cm^2 , 10분 동안 조사) 처리하여 수축시켰다. 이 후 원심분리(1000rpm에서 10분 동안 수행)하고, $1.2\mu\text{m}$ 기공 크기의 주사기 필터를 이용하여 자가 조립형 복합체를 여과하였다. 상층액에서 반응하지 않고 남아있는 리간드가 부착된 PAA의 양은 PAA에 결합한 cyclo-RGDyK(cyclo-Arg-Gly-Asp-d-Tyr-Lys)의 티로신(tyrosine) 그룹을 추적하여 측정하였다. 자가 조립형 복합체에 결합하지 않는 리간드의 양은 초기에 첨가된 리간드가 부착된 PAA의 양으로부터 상층액에 있는 반응하지 않은 리간드가 부착된 PAA의 양을 빼서 결정하였다. 측정된 리간드의 수는 계산된 자가 조립형 복합체의 수로 나누어 자가 조립형 복합체 당 리간드의 수를 결정하였다.

[0296] 13. 자가 조립형 복합체 전환 시 팽창 정도

[0297] 자가 조립형 복합체의 물 흡수가 매개된 팽창을 확인하기 위하여, 팽창 정도를 습윤 중량의 비로 계산하였고, 이는 UV 처리가 매개된 팽창(0.25 W/cm^2 에서 365nm), 또는 Vis 처리가 매개된 수축(0.2 W/cm^2 에서 448nm) 후에 측정하고, 자가 조립형 복합체의 건조 중량으로 나누었다. Azo-C10-N⁺ 1.5mg을 포함하는 PBS 3mL 및 리간드가 부착된 PAA 30mg을 포함하는 PBS 3mL를 혼합하고, 자가 조립형 복합체 형성을 유도하기 위하여 10분 동안 초음파 처리하였다. UV 또는 Vis 처리하고, 1000rpm에서 10분 동안 원심분리하고 상층액을 폐기하여 반응하지 않은 PAA를 제거한 후, 자가 조립형 복합체의 습윤 중량을 측정하였다. 습윤 자가 조립형 복합체는 공기 중에 7일 동안 건조시키고 건조 중량을 측정하였다. 팽창 정도는 자가 조립형 복합체의 습윤 중량에 대한 건조 중량의 비로 계산되었다.

[0299] 14. 기판 상에서 빠르고 가역적인 자가 조립형 복합체의 수축/팽창에 대한 실시간 공초점 현미경 이미징

[0300] 기판 위에서 자가 조립형 복합체가 빠르고 가역적으로 수축/팽창하는 것을 실시간 이미징으로 확인하기 위하여, 실시간 공초점 현미경 이미징(K1 Fluo, Nanoscope systems)을 수행하였다. 자가 조립형 복합체의 선평명한 이미징은 위하여, 자가 조립형 복합체 400 μL 를 포함하는 용액에 기판을 인큐베이션하여 친수성 상호작용을 통해 유리 기판에 자가 조립형 복합체를 부착시켰다. 영상 및 타임-랩스 스냅샷 이미지로 제작된 실시간 이미징은 1분 동안 UV light(0.25 W/cm^2 에서 365nm)를 조사하여 자가 조립형 복합체를 팽창시킨 후 이어서 9분 동안 Vis light(0.2 W/cm^2 에서 448nm)를 조사하여 수축시켜 수행하였다. 타임-랩스 스냅샷 이미지는 자가 조립형 복합체가 동일 평면에 초점이 맞춰져 있는 것을 확인하고, 측면 팽창 및 수축을 확인하였다.

[0301] 또한 이 이미지들은 단위 면적당 자가 조립형 복합체의 수를 정량화(4992.7 ± 233.0 자가조립체/ mm^2)하는데 사용하였고, 기관 위에서 수축/팽창할 때 자가 조립형 복합체의 직경 및 측면 영역을 측정하는데 사용하였다. 단위 면적당 자가 조립형 복합체의 수에 각 자가 조립형 복합체의 측면 영역을 곱하여 자가 조립형 복합체의 전체 측면 영역의 퍼센트를 구하였다.

[0303] 15. 세포 조절을 위해, 각각 NIR 및 Vis light 조명을 통해 자가 조립형 복합체의 수축 및 팽창 전환

[0304] 나노시스템에서 NIR을 UV light로 변환하여 자가 조립형 복합체의 수축/팽창을 원격으로 조절하는 효과를 시험하기 위하여, 대식세포를 이용하여 실험하였다. 상향변환 나노입자가 코팅된 기관만으로 실험한 경우에는 표면을 불활성화하여 자가 조립형 복합체의 세포 조절 효과를 위한 후속 부착을 방지하였다. 대식세포(RAW 264.7, ATCC의 5번 계대)를 나노시스템 위에 5.3×10^4 cells/ cm^2 (0h에만 배양)의 밀도로 플레이팅하고, 10 열 비활성화된 소 태아 혈청 및 50U/ml의 페니실린과 스트렙토마이신 항생제가 보충된 기본 성장 배지(DMEM, Dulbecco Modified Eagle Medium)에서 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 기관에는 자가 조립형 복합체의 팽창/수축을 유도하기 위하여 NIR(980nm, 1W/ cm^2 , 1분 동안 조사) 또는 Vis light(448nm, 0.2W/ cm^2 , 10분 동안 조사)를 번갈아 가면서 반복하여 조사하였다.

[0305] 세포 기능(예: 대식세포의 염증/재생 특성)에 대한 이러한 원격 제어의 효과는 염증성 M1 분극 배지(10ng/mL의 지질다당류 포함) 또는 재생성 M2 분극 배지(인터루킨(IL)-4 및 IL-3을 각각 20ng/mL씩 포함)에서 조사되었다. 대식세포의 부착 및 염증/재생 기능 특성 사이의 상관관계는 ROCK(억제제인 Y27632를 50 μM 포함), 액틴 중합(억제제인 사이토칼라신 D를 2 μg/mL 포함), 및 미오신 II(억제제인 블레비스타틴을 10 μM 포함)의 특정 약리학적 억제제를 사용하여 조사하였다.

[0306] 음성 대조군은 자가 조립형 복합체/상향변환 나노입자, 상향변환 나노입자, 상향변환 나노입자의 셀과 코팅부, 상향변환 나노입자에서 코팅부 또는 자가 조립형 복합체 중 어느 하나가 없는 나노시스템을 이용하여 실험하였다.

[0308] 16. 공초점 면역형광 영상(confocal immunofluorescence imaging)

[0309] 나노시스템 위에 세포를 배양하고 자가 조립형 복합체를 팽창/수축시켜 원격으로 조절하는 효과를 평가하기 위하여, 공초점 면역형광 이미징을 수행하였다.

[0310] 배양된 대식세포는 D-PBS로 2회 세척하고, 4% 파라포름알데하이드(PFA, paraformaldehyde)로 10분 동안 고정 한 후, D-PBS로 4회 세척하였다. 고정된 대식세포는 차단 버퍼(3% 소 혈청 알부민 및 0.1% Triton-X 100를 포함하는 PBS)를 이용하여 37°C에서 1시간 동안 차단 및 투과화시켰고, 이어서 차단버퍼를 이용하여 4°C에서 16시간 동안 1차 항체와 함께 인큐베이션하였다.

[0311] 이 후 0.5%(v/v) Tween 20을 포함하는 PBS로 4회 세척하고, 대식세포는 2차 항체 및 팔로이딘(phalloidin)을 포함하는 차단버퍼를 이용하여 실온에서 45분 동안 처리하였다. 이후, 대식세포를 0.5%(v/v) Tween 20을 포함하는 PBS로 4회 세척하고, DAPI 안티페이드로 덮은 후 유리 슬라이드에 장착하였다.

[0312] 면역형광 염색된 대식세포는 모든 그룹에 대하여 동일한 레이저 노출 및 이미지 획득 세팅된 공초점 현미경 (LSM700, Carl Zeiss)을 이용하여 이미지화된 후, ImageJ 소프트웨어를 이용하여 정량적으로 분석하였다. 세포 부착 수는 5개의 다른 이미지로부터 DAPI-양성 세포 핵을 이용하여 계산되었고, 반면 부착된 세포 면적 및 신장 인자(장축과 단축의 비율)는 5개의 다른 이미지로부터 F-액틴 염색된 세포를 이용하여 계산하였다. 세포의 단백질 발현은 5개의 다른 이미지들을 이용하여 F-액틴 염색된 세포의 단백질 형광 강도를 정량화하여 계산하였다.

[0314] 17. 웨스턴 블로팅 분석(Western blotting analysis)

[0315] 나노시스템을 팽창/수축함으로써 대식세포에 대한 효과를 정량화하기 위하여 웨스턴 블로팅 분석을 수행하였다. 배양된 대식세포의 전체 단백질은 10 μL의 단백질 분해 억제제 각테일을 혼합한 400 μL의 PRO-PREP™ 단백질 추출 용액(iNtRON biotechnology)을 적용하여 추출하였다. 추출된 단백질 농도는 Thermo Scientific제 Pierce제

BCA Protein Assay Kit를 이용하여 정량화하였다. 추출된 단백질들은 변성시키고 폴리아크릴아마이드 소듐 도데실 설페이트-겔(SDS-gel, polyacrylamide sodium dodecyl sulfate-gels, 10%)를 이용하여 110V에서 55분 동안 겔 전기영동하여 분리하였고, 그 후 120V에서 90분 동안 폴리비닐리덴 플루오라이드(PVDF, polyvinylidene fluoride) 멤브레인으로 옮겼다. 옮긴 단백질은 0.1% Tween 20(TBST) 버퍼를 포함하는 트리스-버퍼드 살린(tris-buffered saline)으로 10분 동안 세척하고, 차단 버퍼(5% 탈지유를 포함하는 TBST)로 4℃에서 밤새 차단하였다.

[0316] 그 후, iNOS (135 kDa), Arg-1 (37 kDa), 및 GAPDH (36 kDa)에 대한 1차 항체가 용해된 차단 버퍼를 차단된 단백질에 실온에서 1시간 동안 적용하였다. 이렇게 처리된 단백질은 그 후 TBST 버퍼로 각각 5분 간격으로 3회 세척하고 항-HRP-접합된 2차 항체로 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 단백질은 TBST 버퍼로 세척되고 ECL 웨스턴 블로팅 시약(Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, MERCK-Millipore)으로 처리하였다. 그 후 단백질은 Linear Image Quant LAS 4000 화학발광 이미징 시스템을 이용하여 분석되었다. 표적 단백질의 발현 수준은 GAPDH의 그것에 대하여 정규화한 후 제시하였다.

[0318] **18. 자가 조립형 복합체에 이중 파장 광(dual-wavelength light)을 매개로 한 단백질 전달의 시간 조절 원격 제어**

[0319] 자가 조립형 복합체가 이중 파장으로 조절된 단백질 전달 운반체로서 사용될 수 있는지 조사하기 위하여, 리간드가 부착된 PAA(16.8 μmol)를 포함하는 PBS 3mL를 Azo-C10-B+ 분자(3.42 μmol)를 포함하는 PBS 3mL와 혼합한 후, 5분 동안 초음파 처리하였다. 그 후, 여기에 재조합 쥐 IL-4(Peprotech, catalog #: 214-14, 10 $\mu\text{g/mL}$) 60 μL 를 포함하는 PBS를 첨가하고, 이어서 자가 조립형 복합체 위에 IL-4 단백질이 로딩되도록 5분 동안 볼텍싱하였다. 그 후 용액은 1000rpm에서 15분 동안 원심분리하고, 로딩되지 않은 IL-4를 포함하는 상등액을 버렸다. PBS 40mL을 단백질이 로딩된 자가 조립형 복합체에 부드럽게 첨가하여 현탁시킨 후, 100kDa 분자량 컷오프를 갖는 투석 백에 넣었다. UV light (365 nm, 0.25 W/cm²) and Vis light (448 nm, 0.2 W/cm²)를 단백질이 로딩된 자가 조립형 복합체에 30분 간격으로 각각 1분 동안 2회 조사하였다. 다양한 시간 지점에서, 투석액을 통과한 상등액 400 μL 를 수집하여, 반응하지 않은 자가 조립형 복합체를 제거하기 위하여 10000rpm에서 15분 동안 원심분리하였다. 상등액은 적절하게 희석시키고, 방출된 IL-4 단백질의 농도를 ELISA(Abcam, catalog #: ab100710)를 이용하여 정량화하였다. 이에 의하여 최종적으로 자가 조립형 복합체의 시간 조절된 팽창/수축에 대한 누적 단백질 방출 프로파일이 얻어졌다.

[0321] **19. 생체 내에서, NIR 및 Viv light 조사를 통해 자가 조립형 복합체의 팽창/수축 전환**

[0322] 생체 내에서 NIR 및 Vis light 조사를 이용하여 숙주 세포 조절의 효과를 확인하기 위한 개념 증명으로서, 나노시스템을 마우스에 피하(subcutaneous) 이식하였다.

[0323] 고려대학교 동물관리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인을 얻은 후, 생후 2개월된 balb/c 마우스 44마리를 알파산(alfaxan) 및 롬퐀(rompun)을 2:1(v/v)로 혼합한 용액 100 μL 를 복강 내 주사하여 마취하였다. 염증이 선호된 초기 숙주 반응에 대응하기 위해 숙주 세포에 단백질(재생성/항염증성 IL-4)이 일정하게 전달되도록 하기 위하여, IL-4 단백질을 로딩하기 위하여 나노시스템 1mL를 포함하는 PBS를 이용하여 실온에서 30분 동안 인큐베이션 하였다. 그 후, IL-4 단백질이 로딩된 나노시스템을 1.8cm 길이의 절개부를 통해 마우스의 등에 이식한 후, 봉합하였다. 이식 후 0시간 및 12시간에, 마우스의 등(기관을 향하여)에 NIR(980nm, 1W/cm², 1분 동안 조사) 또는 Vis(448nm, 0.2W/cm², 10분 동안 조사) 레이저를 외부에서 번갈아가며 반복하여 조사하여 자가 조립형 복합체의 팽창/수축을 촉진하였다.

[0324] 자가 조립형 복합체의 생체 내 안정성을 확인하기 위하여, 로다민 6G(rhodamine 6G)가 캡슐화된 나노시스템도 이식하고 공초점 이미징을 통해 분석하였다. 이식 전 및 이식 후 6시간에, 적색 형광 나노시스템이 확인되었고, 이를 ImageJ 소프트웨어를 이용하여 정량화하였다. 이식 후 24시간에 나노시스템에 부착된 숙주 대식세포는 공초점 면역형광 이미징 및 유세포 분석으로 분석하였다. 전염증성 iNOS 및 전재생성 Arg-1 마커 중 어느 하나가 발현되는 숙주 세포는 숙주 대식세포로 확인되었다. 나노시스템의 생체 내에서 국소적 및 전체적인 독성은 조직학적 분석을 통해 평가되었다.

20. 생체 내 세포 조절의 유세포 분석(Flow cytometry analysis of cell regulation in vivo)

숙주 세포 조절에 (UV-free)NIR 및 Vis light 조사가 미치는 영향을 정량적으로 분석하기 위하여, 유세포 분석을 수행하였다. 이식 후 24시간 후에 회수된 나노시스템을 10% FBS를 포함하는 ice-cold PBS로 부드럽게 세척하고, 이어서 숙주 세포를 수집하기 위하여 3000rpm으로 5분 동안 원심분리하였다. 수집된 세포들은 4% PFA로 10분 동안 재현탁된 후, 3% BSA를 포함하는 PBS로 1시간 동안 암실에서 차단되었다. 차단된 세포는 3% BSA를 포함하는 PBS에서 염증성(CD68) 또는 재생성(CD163) 1차 항체로 1시간 동안 적절한 아이소타입 대조군이 있는 암실에서 처리되었다. 그 후, 세포는 원심분리한 후 PBS로 세척하고, 이어서 3% BSA를 포함하는 PBS에서 2차 형광 항체로 30분 동안 암실에서 처리되었다. 형광 라벨된 세포는 3% BSA, 1% 소듐 아자이드(sodium azide)를 포함하는 PBS로 세척한 후, FACS Calibur를 이용하여 분석하고, BD CellQuest Pro 소프트웨어(BD Biosciences)를 이용하여 정량화하였다. 이 데이터는 각각의 아이소타입 대조군으로 정규화한 후 평균 형광 강도의 히스토그램을 생성하기 위하여 FlowJo 소프트웨어를 이용하여 분석하였다.

21. 국소 및 전신 생체 내 독성

나노시스템의 재료에는 임상 시험 중인 상향변환 나노입자 뿐 아니라 β -카로틴(β -carotene) 염료 및 Tween 80도 포함되어 있지만, 이것들이 생체 내에서 (UV-free)NIR 및 Vis light를 조사함으로써 잠재적인 독성을 나타내는지 실험하였다.

우선 나노시스템을 마우스에 피하(subcutaneous) 이식하였다. 조직학적 분석은 이식 전 및 이식 후 7일에 세포 구조를 확인하기 위하여 수행되었다. 피하 조직은 생체 내 국소적인 독성을 평가하기 위하여 분석되었고, 반면 다양한 장기(예를 들어, 간, 신장, 비장 및 심장)는 생체 내 전체적인 독성을 평가하기 위하여 분석되었다. 다양한 조직 및 장기들은 4% PFA를 이용하여 48시간 동안 고정되었다. 그 후 고정된 조직 샘플을 DI 워터로 세척하고, 에탄올-DI 워터 혼합물에서 에탄올의 농도 구배(순서대로 70%, 80%, 90%, 95%, 및 100% 에탄올)를 이용하여 1시간 동안(각각 2번씩) 탈수하였고, 이어서 60°C에서 밤새 파라핀 포매(paraffin embedding)하였다. 파라핀 포매 샘플의 5 μ m 두께 부분을 마이크로톰(HistoCore Multicut, Leica RM2125 RTS Biosystem)을 이용하여 절단하고, 유리 슬라이드에 장착하고, 자일렌 대체물을 이용하여 파라핀을 제거한 다음, DI 워터-에탄올 혼합물에서 에탄올의 농도 구배(순서대로 70%, 80%, 90%, 95%, 및 100% 에탄올)를 이용하여 재수화(re-hydrate)하였다. 재수화된 부분은 나노시스템을 이식하여 NIR 또는 Vis light 조사하기 전과 7일 후의 다양한 조직 및 장기의 세포 조직에서 생기는 변화를 조사하기 위하여 헤마톡실린 및 에오신(H&E, hematoxylin and eosin) 용액으로 탈수하고 유리 슬라이드로 장착하였다.

22. 통계 분석

모든 실험은 독립적으로 2회 또는 3회 재현되었다. Graphpad Prism 8 소프트웨어는 모든 통계 처리에 사용되었다. 그룹들 사이에 통계적으로 유의미한 차이는 0.05 미만의 p 값으로 설정되었다. Two-tailed Student's t-test는 두 개의 그룹 비교에 사용되었고, 반면 Tukey-Kramer post-hoc 테스트를 이용한 일원 분산 분석(ANOVA)은 다중 그룹 비교에서 수행되었다.

하기의 실험 및 도면에서 NIR, Vis(또는 Vis light) 및 UV는 해당 광을 조사하였다는 의미이다. 즉 예를 들어 NIR-Vis는 NIR 광을 조사한 후 Vis light를 조사하였다는 의미이다.

상향변환 나노입자에서 코어(core)는 셸 및 코팅부가 없이 코어만 있는 구조를 의미한다. 또한 상향변환 나노입자에서 코어셸, 코어셸부, 코어@셸, 코어@셸부, 및 core@shell은 코팅부가 없이 코어와 그 표면을 전체적으로 감싸는 셸만 있는 구조를 의미한다. 또한 상향변환 나노입자에서 구성 요소의 제한이 없는 경우, 및 core@shell@dye는 코어셸의 표면을 코팅부가 전체적으로 감싸는 구조로 상향변환 나노입자를 의미한다.

[실험예 1] 나노시스템의 특성 분석

1. 광전환 이성질체의 특성 분석

- [0341] 자가 조립형 복합체의 자가 조립을 매개하는 광전환 이성질체로서 Azo-C10-N⁺ 분자를 합성하였다.
- [0342] Azo-C10-N⁺ 분자의 합성 메커니즘은 도 2에 도시하였다. 우선 Azo-OH를 합성한 후, 방향족 그룹과 Br 사이에 소수성 꼬리 스페이서를 포함하는 Azo-C10-Br로 변환하였다. 이 후 Azo-C10-Br 분자의 Br은 π -양이온 및 π - π 상호작용을 통해 자가 조립형 복합체에서 적층시킬 수 있는 Azo-C10-N⁺ 분자를 획득하기 위하여 N⁺로 대체되었다.
- [0343] 해당 분자들의 합성을 확인하기 위하여 ¹H NMR 스펙트럼을 도 3에 도시하였다. Azo-OH, Azo-C10-Br 및 Azo-C10-N⁺ 분자의 ¹H NMR 스펙트럼은 페놀 그룹(10.34ppm), 이터 그룹(4.05ppm) 및 4차 아민의 α -수소(3.54-3.25ppm)의 특성 피크를 보여주었고, 광전환 가능한 Azo-C10-N⁺ 분자가 성공적으로 합성된 것을 보여준다.
- [0345] 도 4는 Azo-C10-N⁺ 분자의 분자 역학 시뮬레이션(MD, Molecular dynamics simulation)을 분석하여 나타낸 것이다.
- [0346] 분자 역학 시뮬레이션은 Azo-C10-N⁺ 분자의 트랜스- 및 시스- 상태 전환이 분자 내 적층 및 물의 흡수를 조절한다는 것을 나타낸다. 트랜스 및 시스 상태의 Azo-C10-N⁺ 분자에 대한 MD 시뮬레이션의 스냅샷은 Azo-C10-N⁺ 분자의 분자내 π 상호작용이 트랜스 상태에서 촉진되는 것을 보여준다(도 4a). 이는 질소 양이온과 소수성 꼬리 스페이서가 Azo-C10-N⁺ 분자의 적층을 매개하기 때문이다.
- [0347] MD 시뮬레이션의 20ns에서 Azo-C10-N⁺ 분자의 π -양이온 상호작용에 대한 히트맵 차트(heat map chart) 및 빈도수는 이들 상호작용이 시스 상태보다 트랜스 상태에서 매우 촉진된다는 것을 더 확인시켜 준다. 반면 π - π 상호작용의 정도는 시스와 트랜스 상태가 비슷하다. 이와 같은 특성은 도 6b, c 및 도 4b, c를 통해 확인할 수 있다.
- [0348] Azo-C10-N⁺ 분자의 각 이성질체에 대한 밀도 기능 이론(DFT, density functional theory) 계산에 대한 수치도 도 4d, e에 도시하였다. 시스 상태의 Azo-C10-N⁺ 분자가 더 높은 수소화 에너지 및 더 큰 극성 표면적을 나타내는 것을 보여주고, 이는 트랜스 상태보다 물에 대한 친화도가 매우 큰 것을 가리킨다.
- [0349] 종합하면, π -양이온 상호작용이 억제된 *cis*-Azo-C10-N⁺ 분자의 꼬인 구조는 분자의 극성 및 친수성을 향상시키고, 따라서 물을 흡수하여 자가 조립형 복합체의 팽창을 촉진시킨다. 또한 이와 대조적으로, 상대적으로 덜 극성인 *trans*-Azo-C10-N⁺ 분자에서의 π -양이온 상호작용은 자가 조립형 복합체 안으로 물이 흡수하는 것을 억제하여 자가 조립형 복합체를 조밀하게 만든다
- [0351] **2. 리간드가 부착된 폴리머 및 자가 조립형 복합체의 특성 분석**
- [0352] 자가 조립형 복합체에 RGD 리간드를 도입하기 위하여, 리간드가 부착되고 음으로 하전된 폴리머를 합성하고, 여기에 정전기적 상호작용을 통해 적층된 Azo-C10-N⁺ 분자를 결합시켰다. 여기에서 폴리머는 폴리아크릴산(PAA, polyacrylic acid)를 사용하였고, RGD 리간드는 아민 그룹을 가진 라이신 잔기가 있는 환형-RGDyK를 사용하였다. PAA의 카르복실레이트 그룹에 리간드가 결합하는 과정은 도 5에 도시하였다.
- [0353] 자가 조립형 복합체는 π -양이온 및 π - π 상호작용을 통해 Azo-C10-N⁺ 분자의 적층을 촉진하는 것과 동시에 리간드가 부착된 PAA가 묻쳐지는 것을 매개로 형성될 수 있다. 이러한 자가 조립형 복합체의 형성 과정은 도 6a에 모식적으로 도시하였다.
- [0355] 상기 자가 조립형 복합체의 Azo-C10-N⁺ 분자의 트랜스 및 시스 형태를 이용한 MD 시뮬레이션을 수행하여 도 7에 도시하였다.
- [0356] 도 7a는 트랜스 및 시스 상태에서 Azo-C10-N⁺ 분자가 아크릴산과 연결된 상태로 남아 있는 것을 보여준다.
- [0357] 자가 조립형 복합체 내에서 *cis*-Azo-C10-N⁺ 분자의 안정성(예를 들어, 수명)을 평가하기 위하여, 시스 상태를 촉진하기 위해 UV light를 조사한 후 시스 상태에서 트랜스 상태로 시간 분해 전환(time-resolved conversion)을 조사하였다. 이를 위해 UV-Vis 분광을 이용하여 실험하여 도 7b-e에 도시하였다.
- [0358] UV-Vis 분광법 결과는 트랜스 상태 형성을 위한 가시광선 처리 후 최대 피크 강도는 345nm를 나타내고, 시스 상

태 형성을 위해 0시간에서 UV 처리 후에는 315nm를 나타냈다. 이 결과에서 30초 동안 UV 처리하고 24시간이 되는 시점에 시스 상태가 거의 80% 이상 남아있는 것을 확인할 수 있고, 일 규모(day-scale)의 시스 상태의 안정성을 확인할 수 있다(도 7b, c).

[0359] 이렇게 시스 상태의 긴 수명은 트랜스 상태에서 흡수 피크의 청색 편이(blue-shifted)를 나타내도록 설계된 아조벤젠 유도체와 상응하는 것이다. 30초 동안 UV 처리 후 이어서 30초 동안 Vis 처리하는 것을 5 사이클 이상 반복하는 UV-Vis 흡수 스펙트럼 및 시간-의존 잔류 시스 집단은 5 사이클 동안 시스와 트랜스 집단 사이에 빠르고 가역적인 변환이 가능하다는 것을 확인시켜준다(도 7d, e).

[0361] 3. 상향변환 나노입자의 특성 분석

[0362] UV가 없는(따라서 조직 투과적인) 자극을 통해 자가 조립형 복합체의 가역적인 팽창/수축을 원격을 조절하기 위하여, NIR을 UV light로 상향변환 시키는 상향변환 나노입자를 합성하였다. 상향변환 나노입자는 표면 결합을 방지하기 위하여 코어 위에 셸을 에피택셜 성장(epitaxial growth)시켜 코어@셸 구조($\text{NaYF}_4\text{:Yb,Tm@NaYF}_4$)로 설계되었다. 상향변환 나노입자에 대한 분석 결과는 도 8 및 9에 도시하였다.

[0363] 도 8a 및 도 9의 HR-TEM 이미지는 합성된 코어와 셸이 크기 분포와 형태가 균일하게 합성된 것을 보여준다. 또한 이미지는 코어($\text{NaYF}_4\text{:Yb,Tm}$)와 셸(NaYF_4) 모두 결합이 없는 육방정 결정 구조를 가지는 것을 보여준다. 해당 도면의 HAADF-STEM 이미지와 EDS 매핑은 코어와 셸 구조에 F 및 Y 원소가 균일하게 분포되어 있는 것뿐 아니라 Yb 및 Tm 도펀트 원소가 코어에만 균일하게 존재하는 것을 보여준다.

[0364] 도 8b는 합성된 상향변환 나노입자의 코어가 NIR(980nm) 여기 이하의 UV 및 Vis(푸른색) 영역에서 광발광 피크를 나타내는 것을 보여준다. 또한 도 8b, c는 상향변환 나노입자의 셸이 코어 위에서 에피택셜 성장했을 때, 코어셸의 형광 강도와 직경이 코어만 있을 때와 비교하여 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있다.

[0365] 도 10은 상향변환 나노입자에서 코팅부의 유무에 따른 형광을 분석한 결과이다. NIR이 변환된 UV(NIR-converted-UV) light에 의해 자가 조립형 복합체의 팽창을 매개하는 cis-Azo-C10-N+ 형성을 선택적으로 유도하기 위하여, NIR에서 UV 또는 Vis로 변환을 천연 염료를 이용하여 최대화하였다. 여기에서 사용한 천연 염료는 청색 영역에서 가시광선을 흡수하는 β -카로틴이다. 반면 trans-Azo-C10-N+ 형성은 자가 조립형 복합체의 가시광선에 의하여 유도될 수 있으며, 이 때 자가 조립형 복합체는 수축된다.

[0366] 따라서 NIR은 cis-Azo-C10-N+를 선택적으로 유도하기 위하여 Vis를 넘어 UV light로 변환된 필요가 있다. 결국 코어셸은 NIR을 조사하여 cis-Azo-C10-N+를 형성하기 위하여 가시광선을 흡수하는 염료로 표면을 코팅하여 상향변환 나노입자를 수득할 수 있다. 도 8d는 이렇게 형성된 상향변환 나노입자를 기관위에 코팅한 것을 나타내는 도면이다. NIR(980nm)이 여기된 광발광 스펙트럼은 340nm의 UV 영역 피크로 정규화되고, 코어, 코어셸 및 코팅부까지 형성된 상향변환 나노입자로 갈수록 450nm에서의 피크 강도가 점차 감소하였다(도 8e). NIR이 여기된 광발광에 대한 도면(도 8f)은 코어셸에서는 청색 광발광이 매우 강하게 나타나지만, 코팅부까지 형성된 상향변환 나노입자로 갈수록 강도가 현저하게 감소하는 것을 확인할 수 있다.

[0367] 도 8g에서는 UV(340nm)와 Vis(450nm)의 광발광 강도비를 정량화하여 나타내고, 상향변환 나노입자에서 NIR에서 UV로 상향변환되는 것이 NIR에서 Vis light로 상향변환되는 것보다 더 선호되는 것을 보여준다.

[0368] 도 8d 및 도 10b, c는 친수성 상호작용을 통해 상향변환 나노입자가 기관의 표면을 균일한 분포로 전체적으로 덮고 있는 것을 확인할 수 있고, 매우 높은 UV/Vis의 강도비를 나타낸다.

[0369] 따라서, 이와 같은 결과들은 상향변환 나노입자가 NIR을 UV로 선택적으로 상향변환시키고, 그 강도 또한 강하게 나타나는 것을 확인시켜준다.

[0371] 4. 나노시스템 특성 분석

[0372] 자가 조립형 복합체를 상향변환 나노입자가 코팅된 기관에 친수성 상호작용을 통해 결합시켜 나노시스템을 형성하였다. 이 나노시스템은 NIR을 조사하면 NIR이 상향변환 나노입자를 통해 UV로 상향변환되고, 이 UV가 자가 조립형 복합체를 자극하여 자가 조립형 복합체의 광변환 이성질체(Azo-C10-N+)를 시스 이성질화하여 자가 조립형 복합체를 팽창시킨다. 또한 나노시스템에 Vis light를 조사하면 자가 조립형 복합체의 광변환 이성질체가 트랜

스 이성질화하여 자가 조립형 복합체를 수축시킨다.

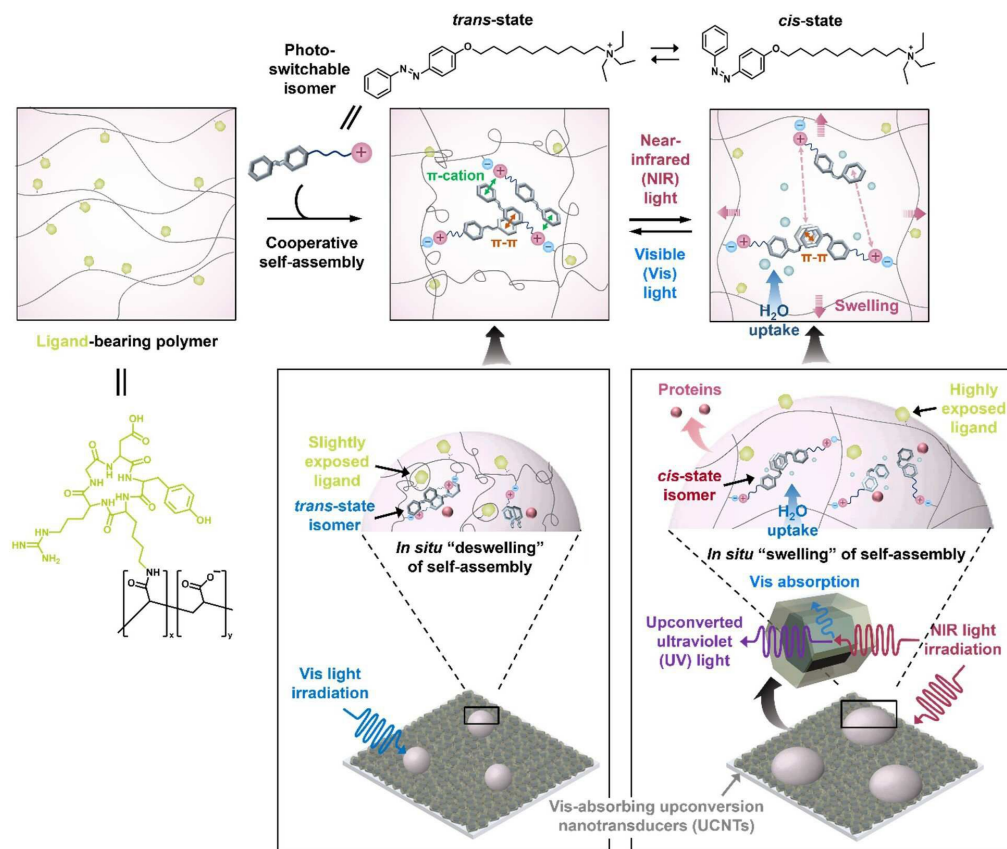
- [0373] 이러한 나노시스템의 거동을 확인하기 위하여 자가 조립형 복합체에 로다민(rhodamine)을 담지하여 팽창/수축 실험을 수행하고, 그 결과를 도 11에 도시하였다.
- [0374] 도 11a는 자가 조립형 복합체 안에 로다민이 담지되는 과정을 모식적으로 나타낸 도면이다. 도 11b는 자가 조립형 복합체의 형광 이미지이고, 자가 조립형 복합체에 담지된 로다민에 의하여 강한 적색 형광이 나타나는 것을 확인할 수 있다.
- [0375] 도 11c는 자가 조립형 복합체의 팽창/수축에 따른 여러 가지 수치를 정량화하여 나타낸 그래프이다. 자가 조립형 복합체 당 리간드의 수는 이중 파장 빛으로 자가 조립형 복합체를 조절하여 팽창/수축시킨 후 조사하였고, 팽창($2.23 \pm 0.11 \times 10^{10}$) 및 수축($2.03 \pm 0.03 \times 10^{10}$) 상태에서 거의 유사했다.
- [0376] 이는 리간드의 포화 수보다 노출 수가 중요한 것을 의미한다. 또한 광이 매개되어 팽창된 상태에서 자가 조립형 복합체의 완전히 포화된 습윤 중량을 건조 중량으로 나눈 것은 팽창 상태에서는 물을 흡수하기 때문에 수축 상태와 비교할 때 308%까지 매우 증가하였다. 자가 조립형 복합체의 팽창은 Azo-C10-N+ 분자의 적층 구조가 감소됨으로써 리간드가 부착된 폴리머가 꼬이는 것을 방지하고, 넓어진 자가 조립형 복합체 내부로 물을 흡수한다. 이때 폴리머에 부착된 리간드가 외부로 매우 노출된다. 이와 대조적으로, 자가 조립형 복합체의 수축은 Azo-C10-N+ 분자의 적층 구조가 증가하여 자가 조립형 복합체의 내부 구조가 조밀하게 되고 폴리머의 코임도 증가한다. 따라서 자가 조립형 복합체 내부로 물이 흡수되지 못하고, 폴리머에 부착된 리간드도 외부에 약간만 노출되게 된다.
- [0377] 도 11d는 자가 조립형 복합체의 실시간 공초점 현미경 이미지의 스냅샷이고, 자가 조립형 복합체를 1분 동안 팽창시키고 이어서 9분 동안 수축시켜 변화를 확인한 것이다. 도면에서 자가 조립형 복합체의 팽창/수축에 따라 축 변화는 최소화되는 반면 측면(lateral) 팽창/수축이 일어나는 것을 확인할 수 있다. 이는 자가 조립형 복합체와 기관 표면 사이에 가역적인 친수성 상호작용에 기인한 것이다.
- [0378] 자가 조립형 복합체의 팽창/수축에 대한 도 11c-e를 종합하면, 자가 조립형 복합체의 가역적인 팽창/수축에 따라 직경, 측면 단면적 및 전체 단면적의 백분율은 각각 매우 큰 차이를 가지고 가역적으로 증가되고 감소되었다. 자가 조립형 복합체의 전체 단면적의 백분율은 자가 조립형 복합체의 팽창/수축에 의하여 세포의 부착을 민감하고 일시적으로 조절할 수 있다는 것을 의미한다.
- [0380] **[실험예 2]** 나노시스템의 대식세포 부착 조절 실험
- [0381] 나노시스템의 팽창/수축하는 특성을 이용하여 세포의 부착 및 분극화를 조절할 수 있는지 실험하였다. 이를 위해 폴리머에 부착된 리간드를 세포 부착성 RGD 리간드(Arg-Gly-Asp)를 이용하였다. 세포 타입은 세포와 자가 조립형 복합체 사이의 직접적인 상관관계를 조사하기 위하여 자가 조립형 복합체의 크기($3-5 \mu\text{m}$)와 비슷한 대식세포를 사용하였다.
- [0382] 대식세포를 나노시스템 위에 위치시키고 NIR(980nm , $1\text{W}/\text{cm}^2$, 1분 동안 조사) 및 Vis light(448nm , $0.2\text{W}/\text{cm}^2$, 10분 동안 조사)를 조사하였고, 조사된 NIR은 UV로 상향변환되었다.
- [0383] 도 12 및 13은 나노시스템이 대식세포에 작용하는 효과를 실험한 결과 및 나노시스템에 의한 대식세포의 부착 과정을 모식적으로 나타낸 도면이다.
- [0384] 도 12a, b에서 NIR 그룹의 공초점 면역형광 이미지를 통해, 높은 부착 세포 수, 크기 및 신장에서 리간드가 매우 노출되고 인테그린 $\beta 1$ 조립체, F-액틴 필라멘트, 및 초점 부착 복합체의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있고, 이는 대식세포가 팽창한 자가 조립형 복합체에 쉽게 부착된다는 것을 의미한다.
- [0385] 또한 도 14 내지 17은 음성 대조군에 대한 실험 결과이고, 각각 순서대로 나노시스템에서 상향변환 나노입자가 없는 경우 및 기관만 있는 경우, 상향변환 나노입자가 코어만으로 형성된 경우, 상향변환 나노입자가 코어셸부만 있는 경우, 자가 조립형 복합체 또는 리간드가 없는 경우에 대한 실험 결과이다. 각 음성 대조군에서 NIR 또는 Vis light의 조사에도 불과하고 대식세포의 부착 세포, 부착된 세포 면적 및 세포의 신장 인자에 유의미한 변화가 없는 것을 확인할 수 있다. 이는 나노시스템에서 상향변환 나노입자의 각 구성요소, 리간드가 세포 부착 및 조절에 필수적 요소라는 것을 의미한다.

- [0387] 도 18 및 19는 나노시스템에 NIR 또는 Vis light를 교대로 조사한 후 세포 부착의 효과를 실험한 결과이다.
- [0388] 각각 0시간 및 12시간에 NIR 또는 Vis light를 조사하였고, 12시간 및 36시간에 세포 부착을 관찰하였다. 실험 그룹은 조사 방식에 따라 각각 "NIR-NIR", "NIR-Vis", "Vis-NIR", 및 "Vis-Vis"그룹으로 만들었다.
- [0389] 주목할 것은, "NIR-Vis" 그룹에서, 12시간에 NIR이 매개된 팽창으로 인해 세포 부착이 촉진되고, 36시간에서는 Vis가 매개된 수축으로 인해 세포 부착이 가역적으로 억제되었다. 이는 우리의 광전환 가능한 나노시스템이 Vis light에 의해 유도된 자가 조립형 복합체 내에서 cis-Azo-C10-N+ 분자의 장시간(24h) 안정성에 기여된 시간-조절 세포 부착을 효율적으로 할 수 있다는 것을 의미한다(도 7b, c 참조).
- [0390] 따라서 이와 같은 결과는 나노시스템에 NIR 또는 Vis light를 조사하여 대식세포의 부착을 조절할 수 있다는 것을 의미한다.
- [0392] **[실험예 3]** 나노시스템의 광전환에 따른 대식세포의 분극화 실험
- [0393] 다음으로 나노시스템을 이용하여 대식세포의 부착을 조절하고 이어서 대식세포의 분극화를 조절할 수 있는지 실험하였고, 그 결과를 도 20 내지 23에 도시하였다.
- [0394] 대식세포에서 세포골격 F-액틴 필라멘트의 뚜렷한 조립을 포함하는 강력한 세포 부착 및 세포의 신장된 형태의 부착 복합체가 전재생성/항염증성 기능을 가지도록 자극하는 ROCK(rho-associated protein kinase)를 활성화하는 것으로 밝혀져있다.
- [0395] 공초점 면역형광 이미지 및 웨스턴 블로팅 이미지는 NIR이 뒤에 조사되는 그룹("NIR-NIR" 및 "Vis-NIR" 그룹)이 각 배치 조건에서 전재생성/항염증성 기능을 나타내고, 반대로 Vis가 뒤에 조사되는 그룹("NIR-Vis" 및 "Vis-Vis" 그룹)은 높은 전염증성 기능을 나타내는 것을 확인할 수 있다(도 20, 21).
- [0396] 또한 세포 부착을 방해하는 각 단백질들의 억제제를 넣고 실험한 경우 전재생성/항염증성 기능이 손상되는 것을 확인할 수 있고, 이는 세포 부착 및 세포의 기능 사이에 상관관계가 있다는 것을 확인시켜주는 것이다(도 22, 23). 이 실험에서 각 단백질들은 ROCK, 액틴 중합, 및 미오신 II이고 이에 대한 억제제로서 각각 Y27632, 사이토칼라진 D(cytochalasin D) 및 블레비스타틴(blebbistatin)을 사용하였다.
- [0398] 이와 같은 결과는 나노시스템에 NIR 또는 Vis light를 조사하여 대식세포의 부착뿐 아니라 분극화까지 조절할 수 있다는 것을 의미한다.
- [0400] **[실험예 4]** 나노시스템의 광전환에 따른 단백질 전달 실험
- [0401] 나노시스템에 NIR 또는 Vis light를 조사하여 자가 조립형 복합체의 팽창/수축되는 시간을 조절함으로써, 나노시스템을 이용한 물질 전달을 할 수 있는지 실험하였고, 실험 결과를 도 24에 도시하였다.
- [0402] 도 24a는 NIR 또는 Vis light 조사에 의하여 광전환 이성질체인 Azo-C10-N+이시스 및 트랜스로 이성질화하여 물질이 전달되는 과정을 모식적으로 나타낸 것이다. Azo-C10-N+ 분자는 시스 및 트랜스 형태에 따라 분자 내 상호작용에 의해 리간드가 부착된 PAA와 얹히거나 풀어지게 된다. 여기서 전달 물질은 인터루킨-4(IL-4) 단백질을 사용하였고, 자가 조립형 복합체 내에 담지되었다.
- [0403] 도 24b에서 0분 및 30분에 나노시스템에 Vis light를 1분 동안 조사하여 자가 조립형 복합체를 수축시키면 담지된 단백질이 60분 동안 자가 조립형 복합체 안에서 유지된다. 그러나 60분 및 90분에 나노시스템에 UV(NIR에서 상향변환된 UV)를 1분 동안 조사하여 자가 조립형 복합체를 팽창시키면 60분부터 담지된 단백질이 시간에 따라 확산되어 자가 조립형 복합체 밖으로 나오는 것을 확인할 수 있다.
- [0404] 따라서 나노시스템에 NIR 또는 Vis light를 조사하여 자가 조립형 복합체 내에 담지된 물질을 특정 부위에 전달할 수 있으며, 전달되는 시간 역시 조절할 수 있다.

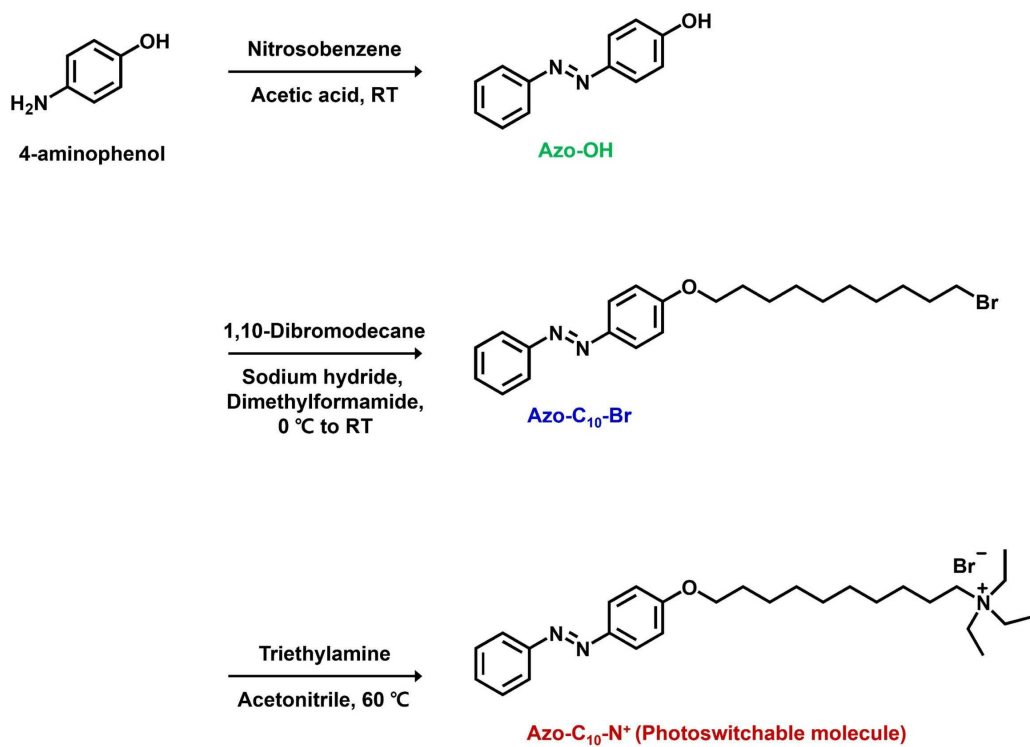
- [0406] **[실험예 5]** 나노시스템의 생체 내 실험
- [0407] 나노시스템을 생체 내에 주입하여 대식세포 및 물질 전달에 관한 실험을 수행하였다.
- [0408] 실험 과정에서 나노시스템의 거동은 조직 및 폐, 심장 및 뇌와 같은 장기를 모방하고, 이는 액체의 이동을 통해 자가 조립형 복합체의 팽창/수축이 반복되어 생체고분자 네트워크의 구조를 동적으로 변경하는 것을 확인할 수 있었다. 숙주 대식세포는 초기 염증 반응을 조절하여 섬유증(fibrosis) 및 조직 재생성 같은 후기 반응을 조절하는 중요한 역할 때문에 본 실험에서 분석되었다.
- [0409] 우선 전재생성 IL-4 단백질이 담지된 나노시스템을 마우스의 피하에 이식한 후 시험관에서와 생체 내에서의 빛에 의한 안정성이 동일한지 관찰하였고, 도 24c, d에 도시하였다. 면역형광 이미지와 이를 정량화한 그래프 모두에서 이식된 나노시스템의 수가 거의 변하지 않는 것을 확인할 수 있다.
- [0410] 또한 공초점 면역형광 및 유세포 분석은 팽창이 매개된 단백질 방출되고 높은 리간드 노출이 뒤의 반응에서 나타나도록 설계된 "NIR-NIR" 및 "Vis-NIR" 그룹에서 수행하고 도 24e, 25 및 26에 도시하였다. 여기에서 "Vis-NIR" 및 "Vis-Vis" 그룹과 비교하여 호중구의 모집과 함께 숙주 대식세포의 부착 및 전재생성/항염증성 기능이 시너지 효과를 내어 촉진되는 것을 확인할 수 있다.
- [0411] 도 27은 나노시스템에 NIR 또는 Vis light를 조사한 경우에 생체에 무독성을 실험한 결과이다. 무독성 실험은 7일 동안 수행되었고, 국소 피하 조직 및 간, 신장, 비장, 심장과 같은 전체 장기들에 대하여 조사하였다. 도면은 나노시스템 이식 전, 이식 후 7일 및 빛 조사 후 7일에 각 부위에 대한 이미지이고, 특별한 세포 구조의 차이는 발견되지 않았다.
- [0412] 상기 나노시스템은 UV없이 가역적으로 조절할 수 있는 시스템이고, 이는 생체에 유해한 UV를 이용하지 않고 NIR 및 Vis light를 조사하여 대식세포 및 물질 전달을 조절할 수 있는 것을 의미한다.
- [0414] 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구의 범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구의 범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

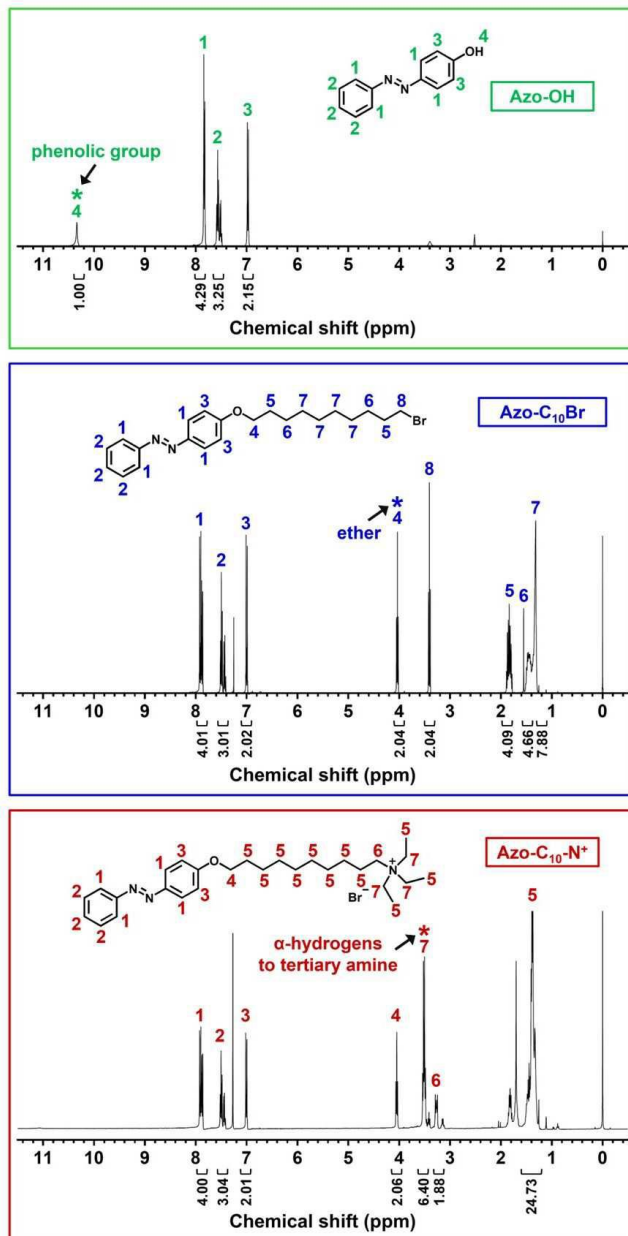
도면1



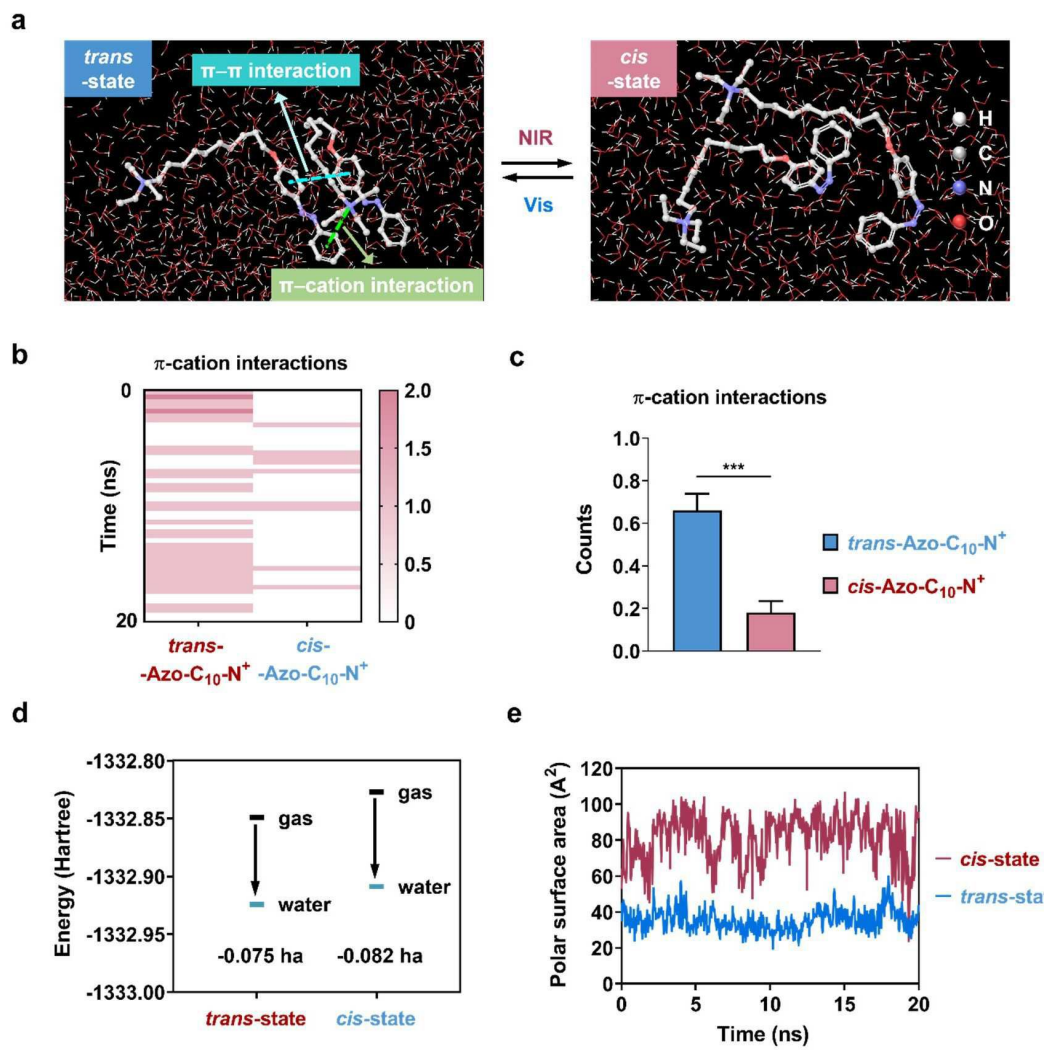
도면2



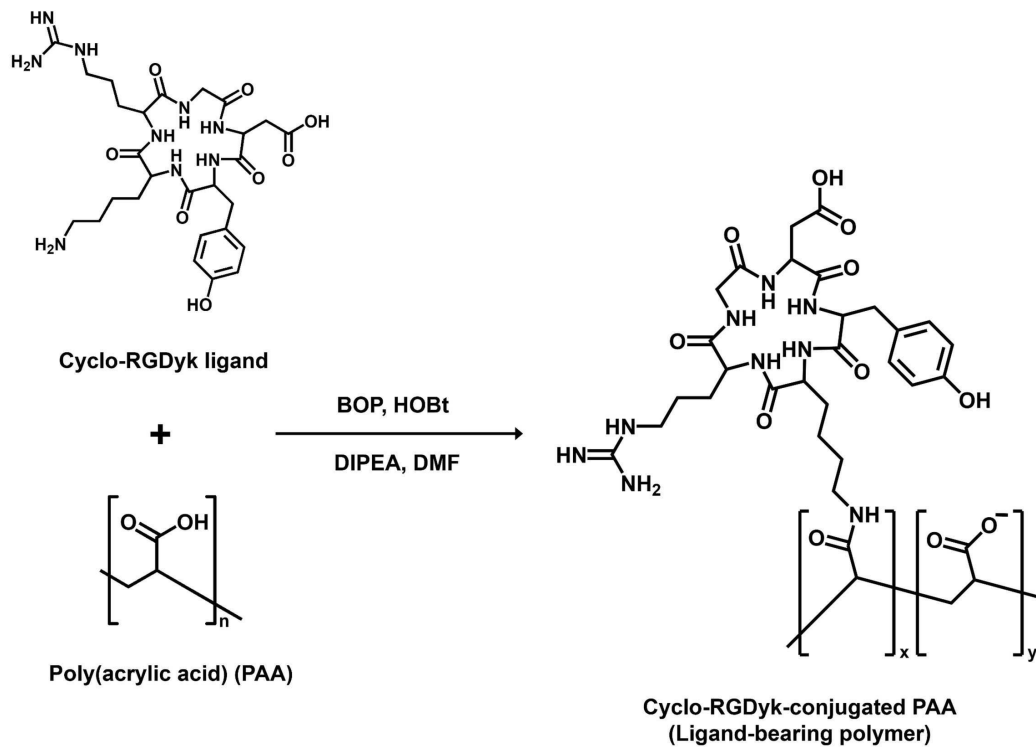
도면3



도면4

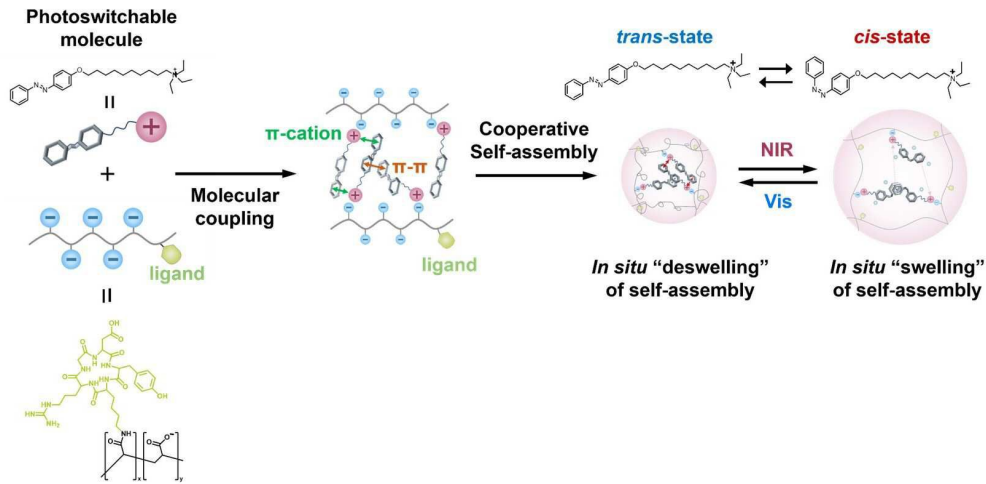


도면5

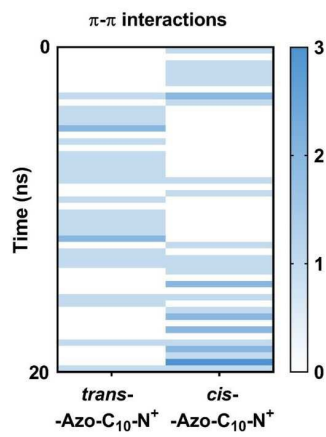


도면6

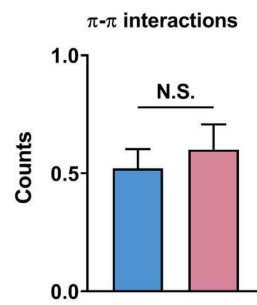
a



b

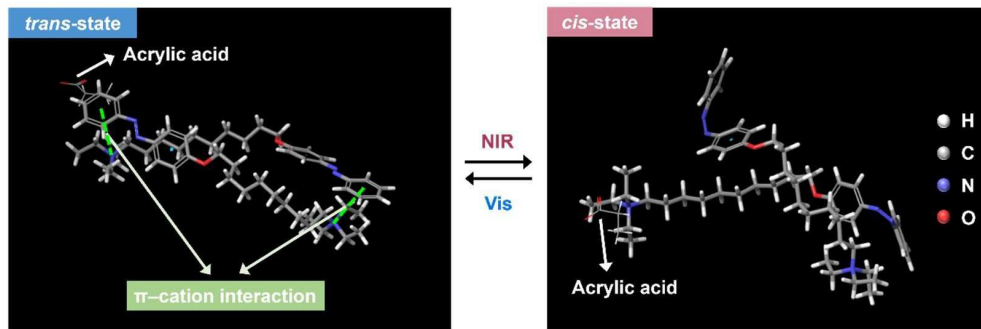


c

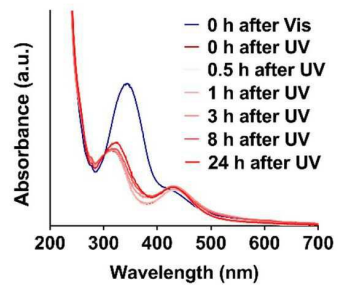


도면7

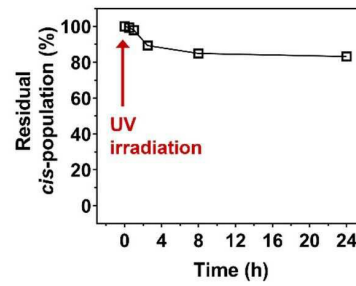
a



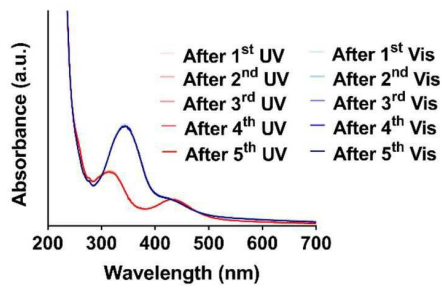
b



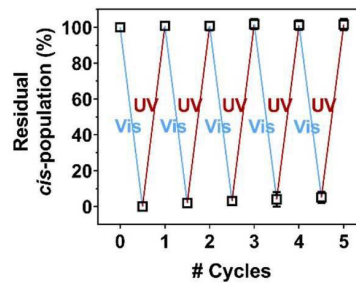
c



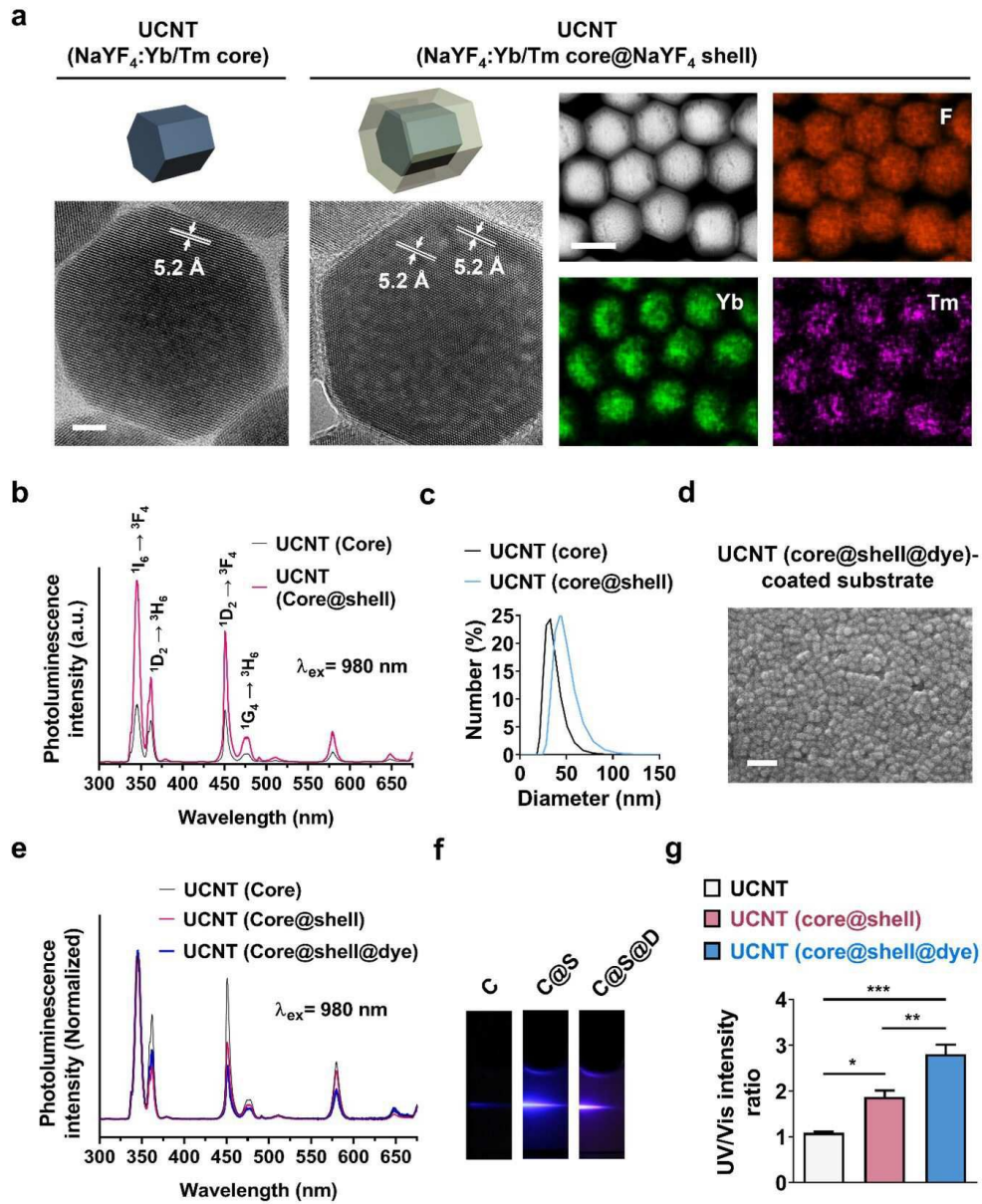
d



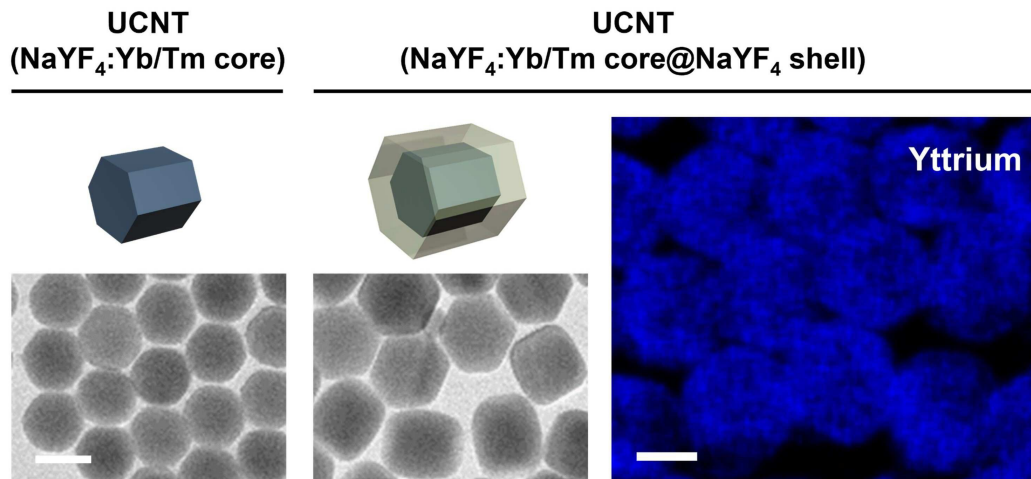
e



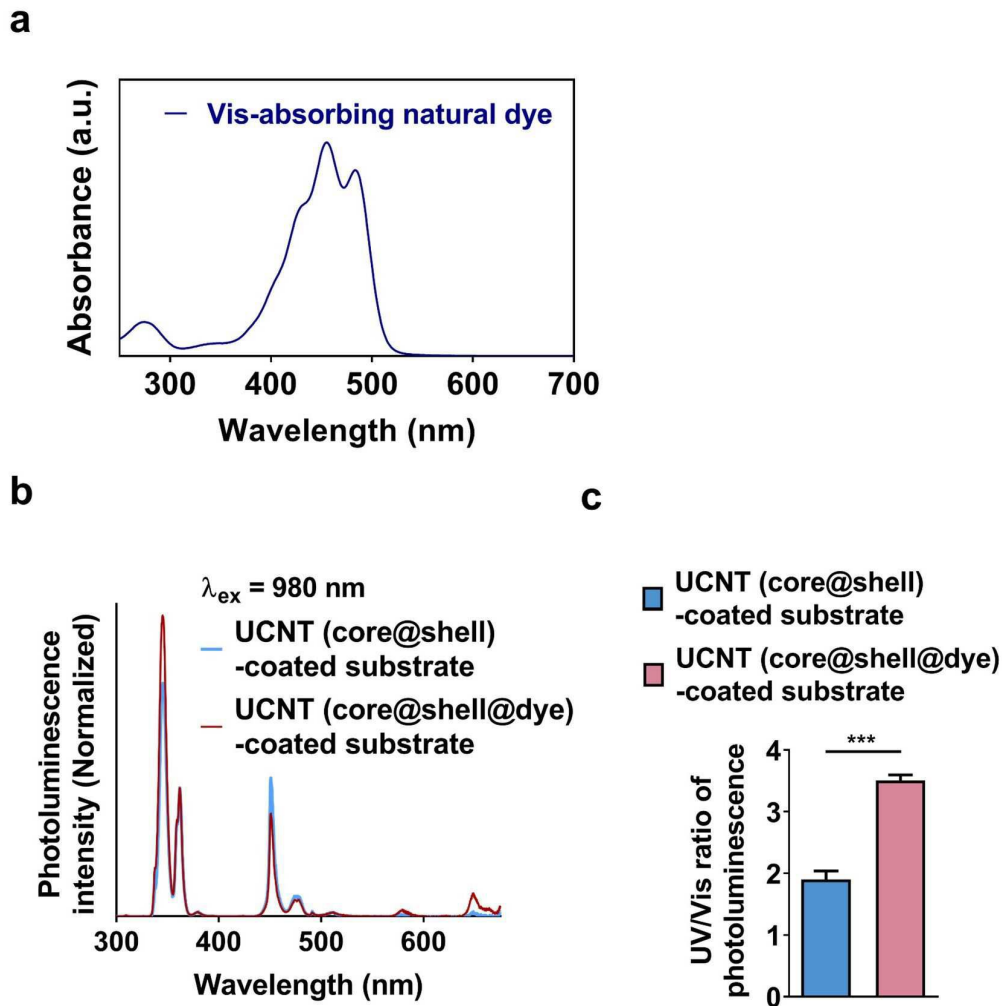
도면8



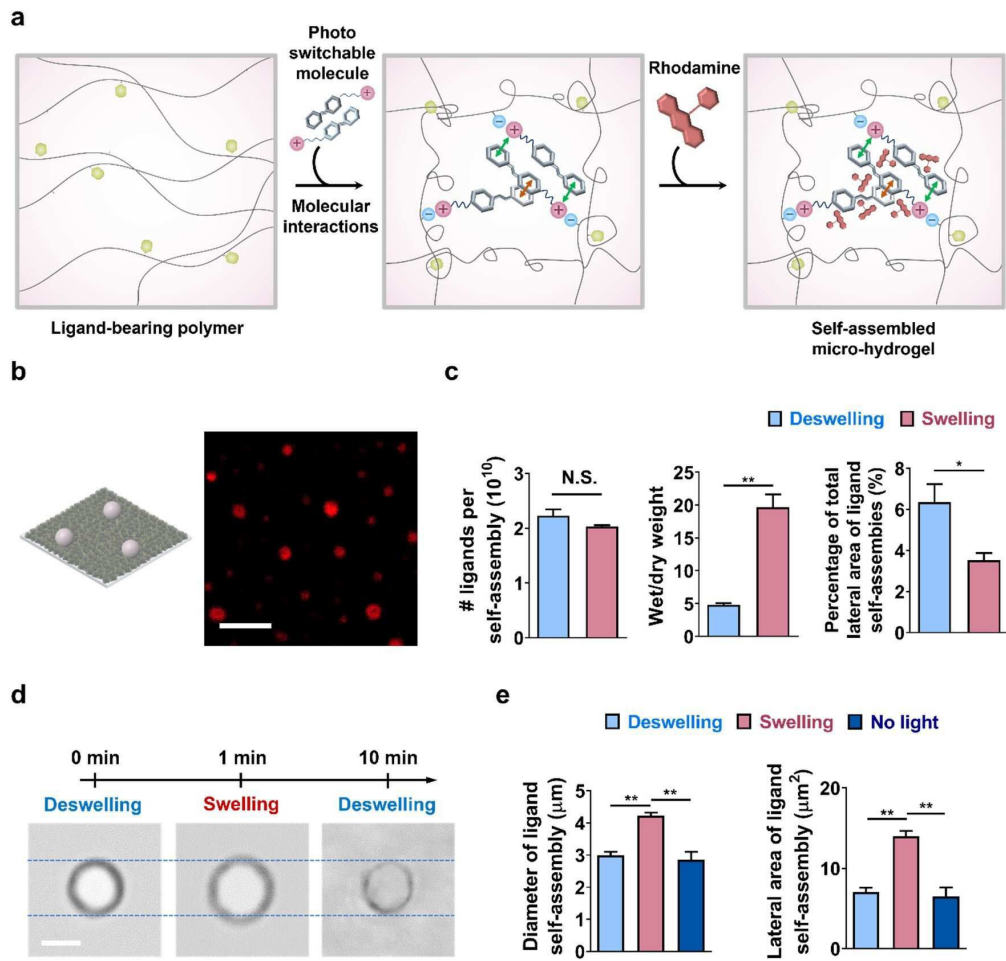
도면9



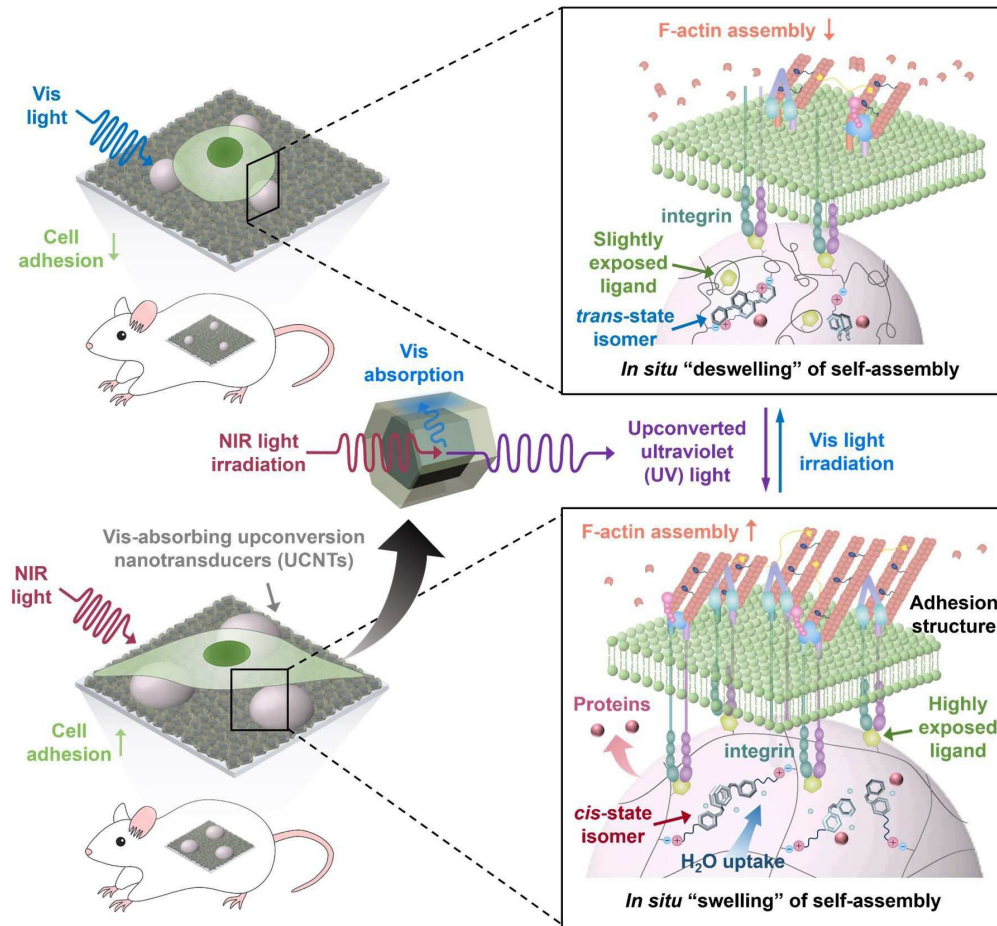
도면10



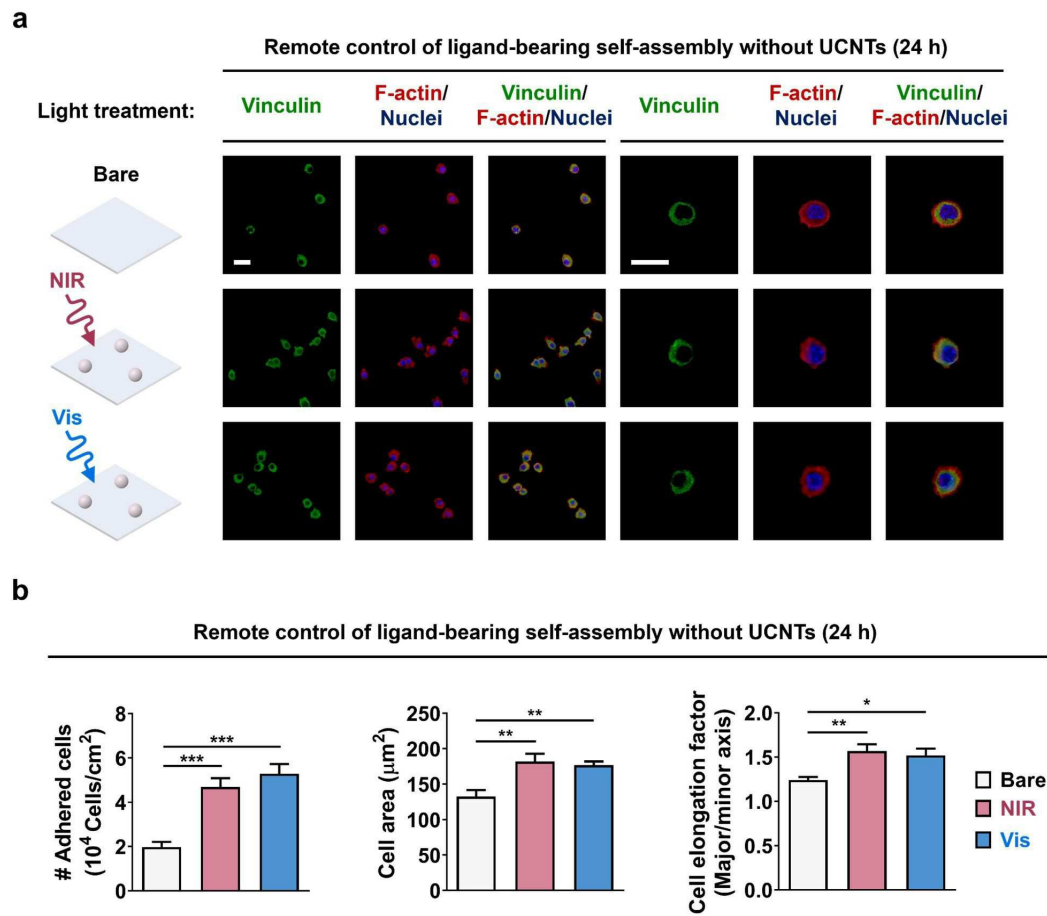
도면11



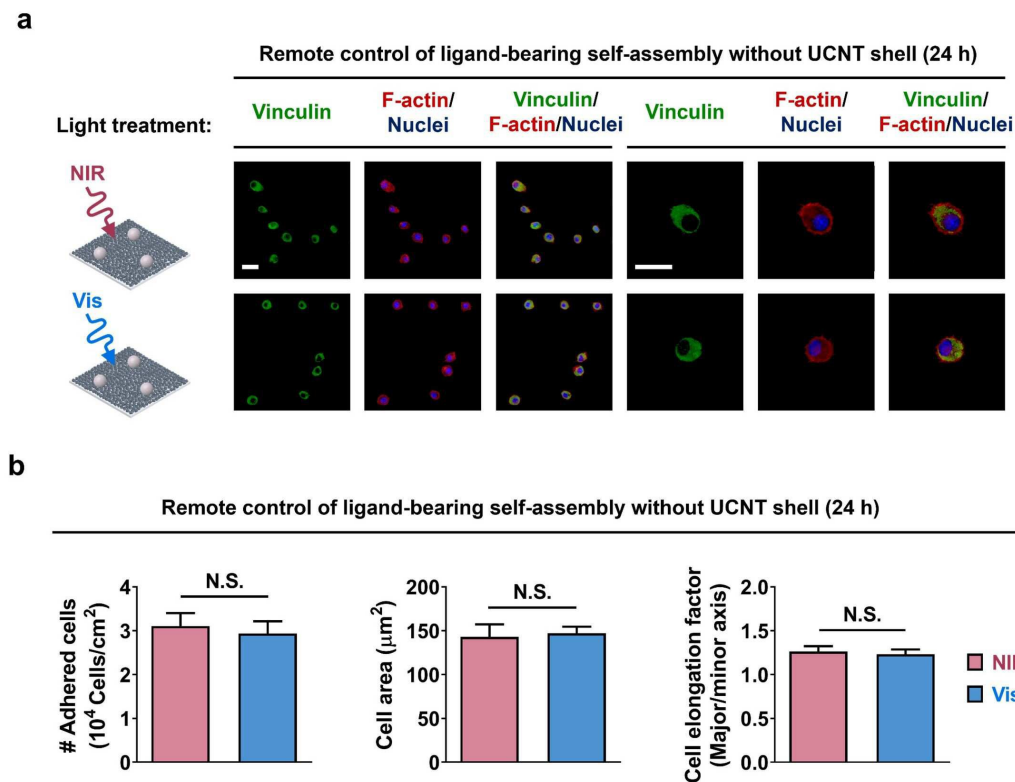
도면13



도면14

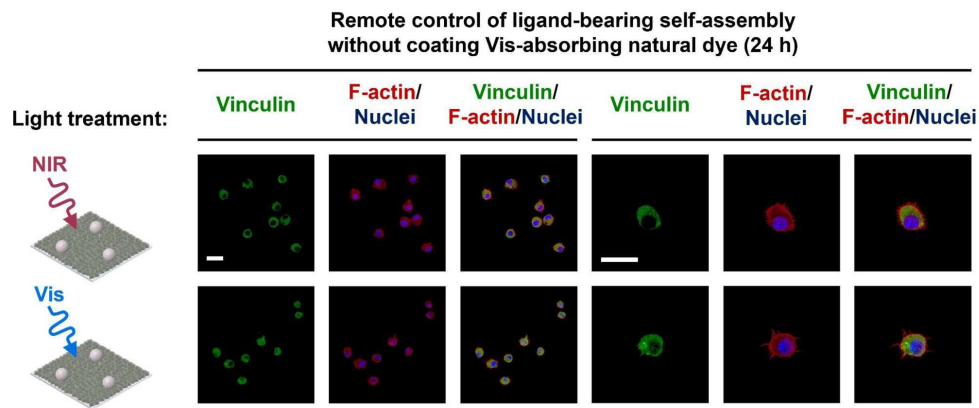


도면15



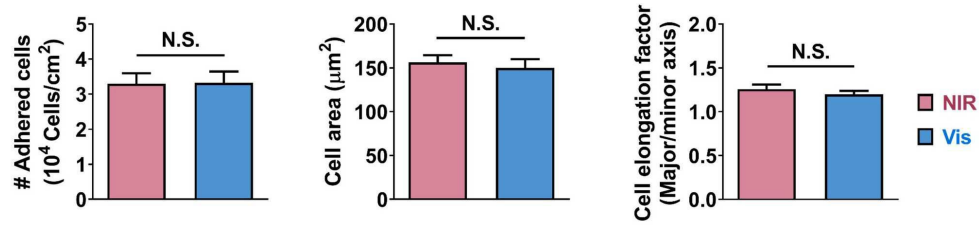
도면16

a

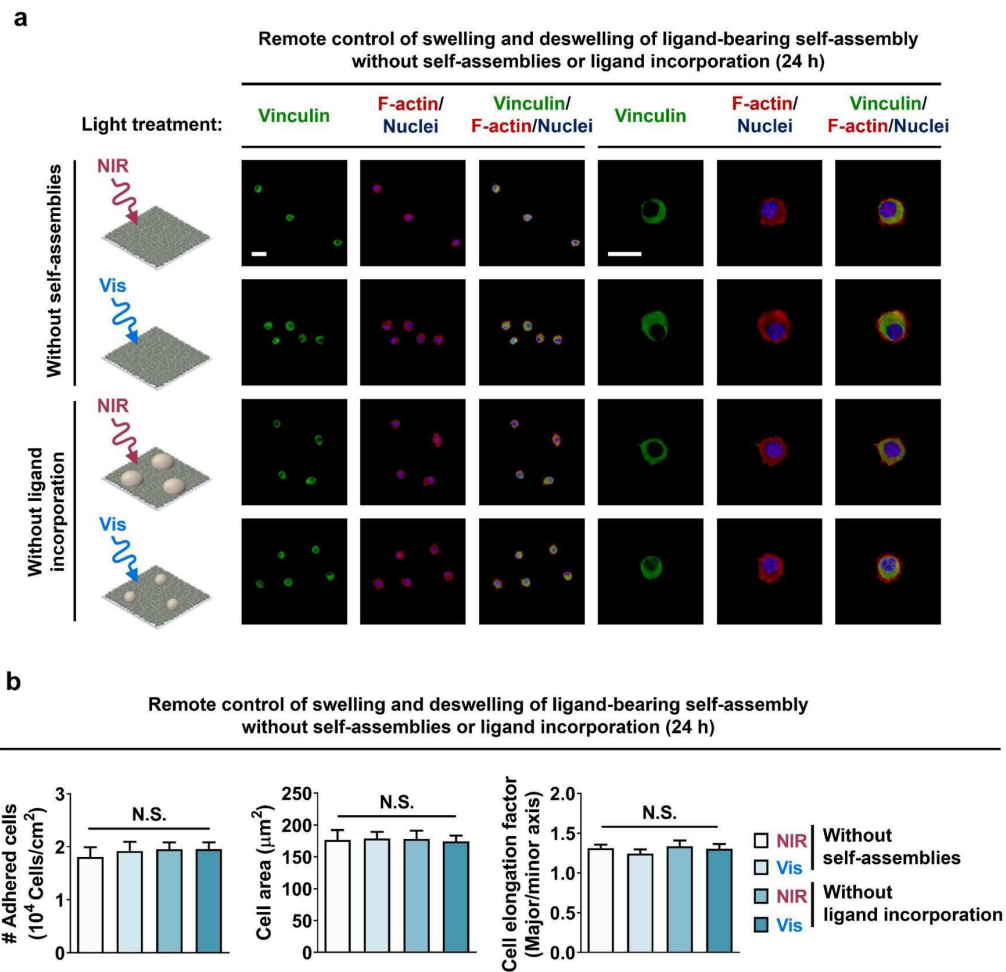


b

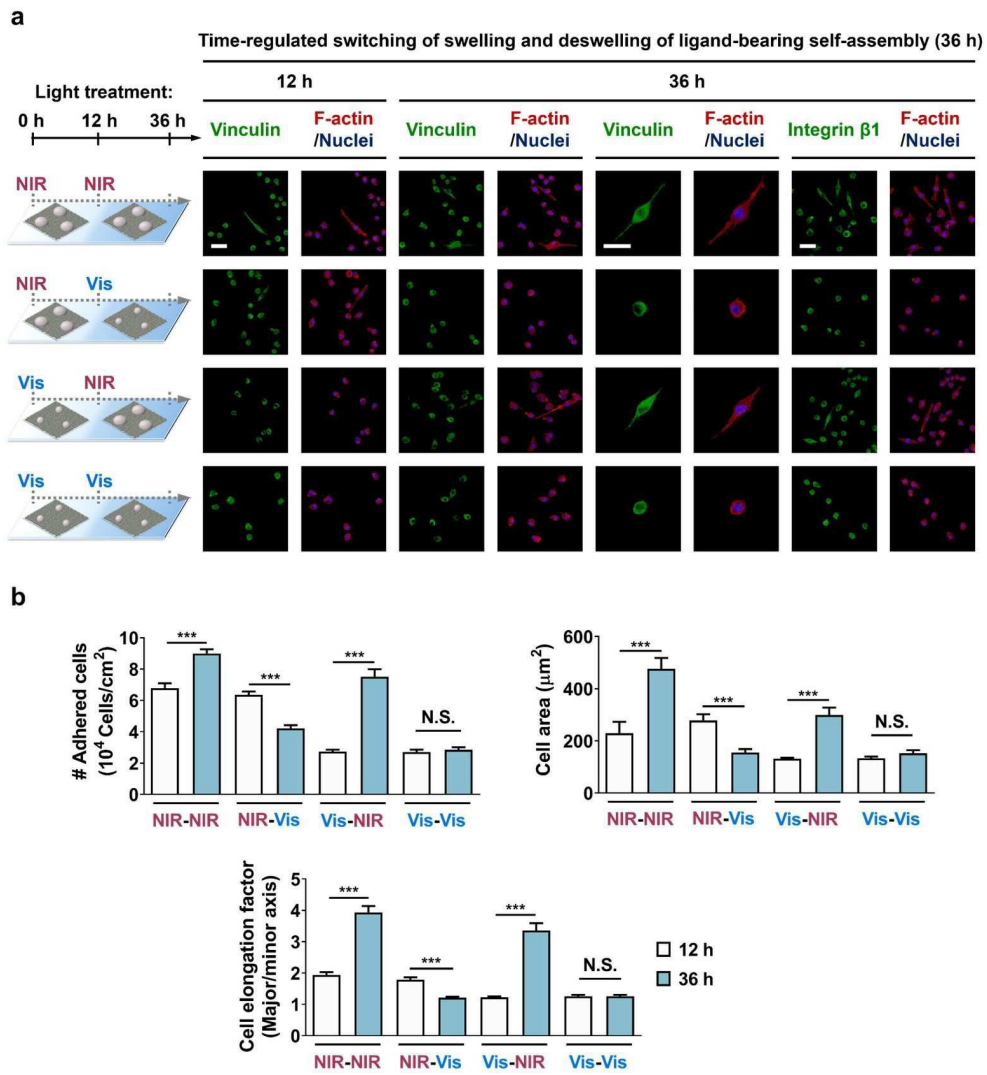
Remote control of ligand-bearing self-assembly without coating Vis-absorbing natural dye (24 h)



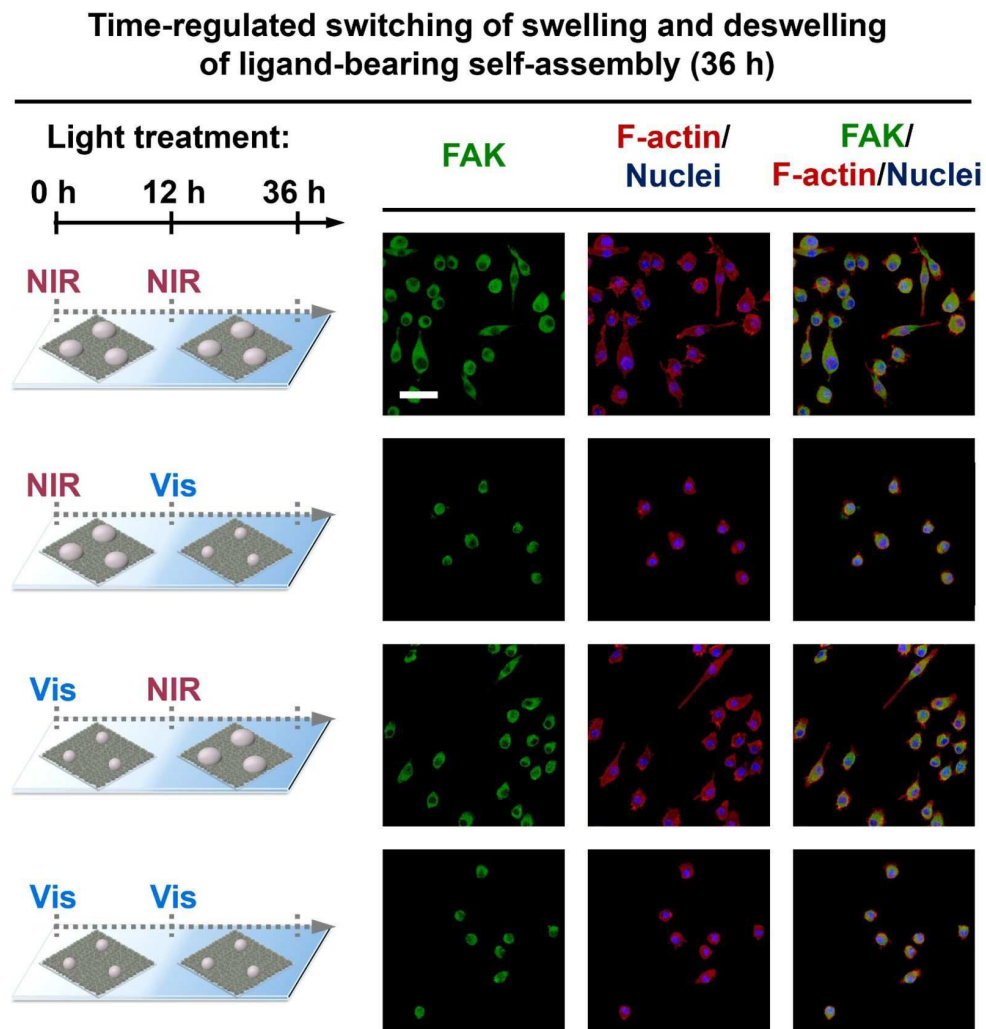
도면17



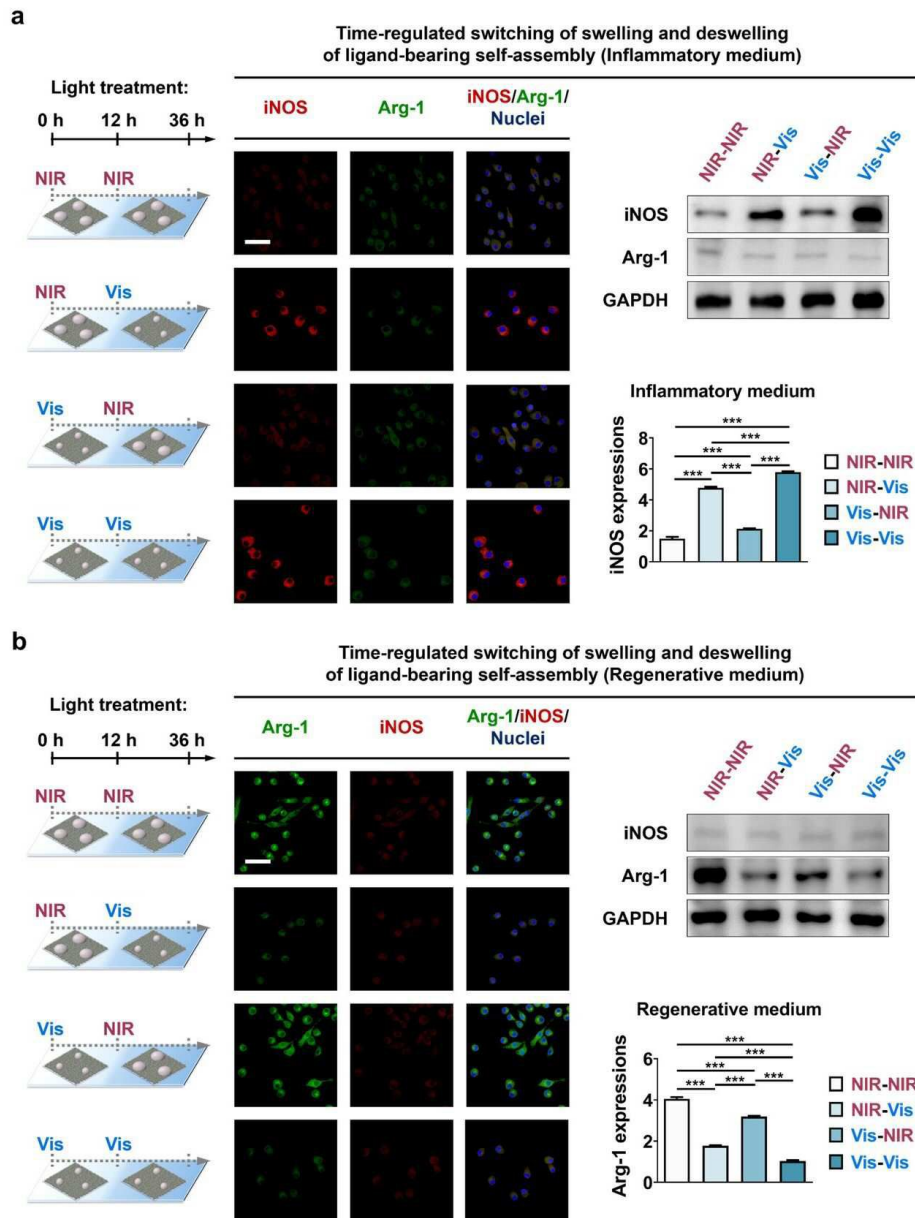
도면18



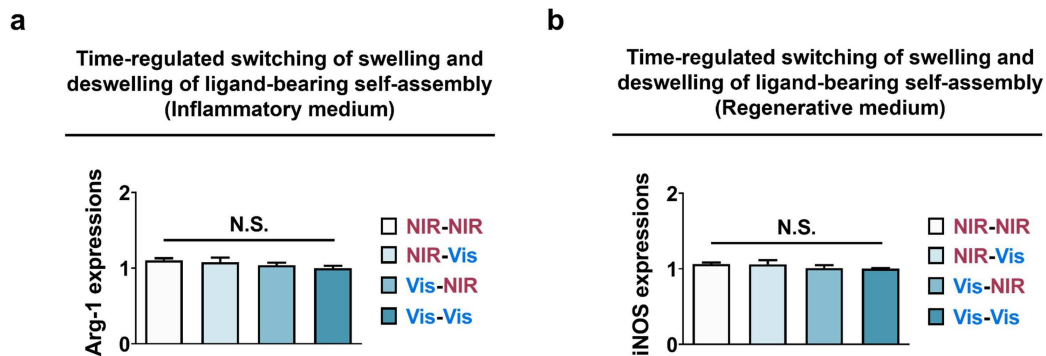
도면19



도면20



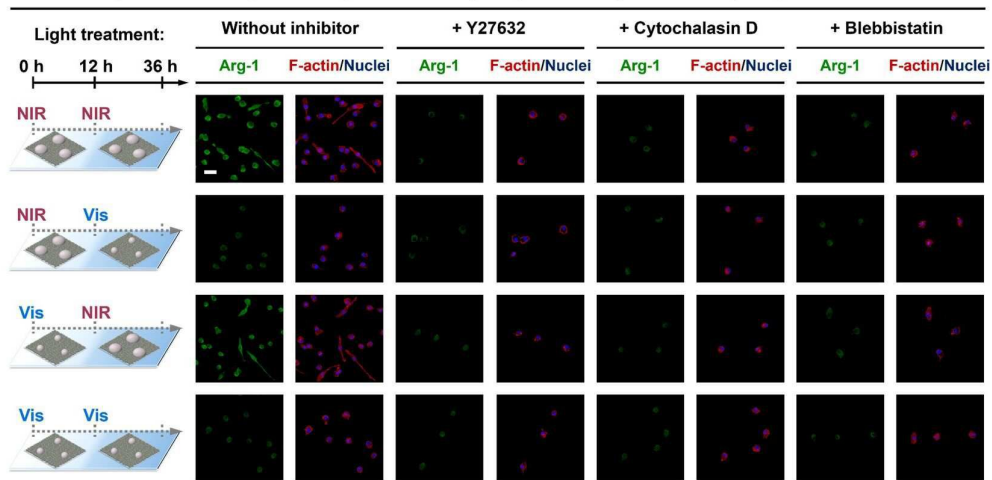
도면21



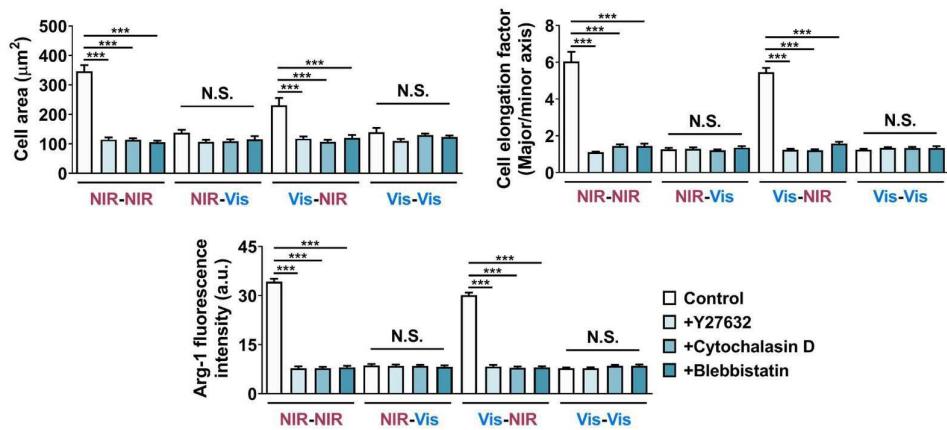
도면23

a

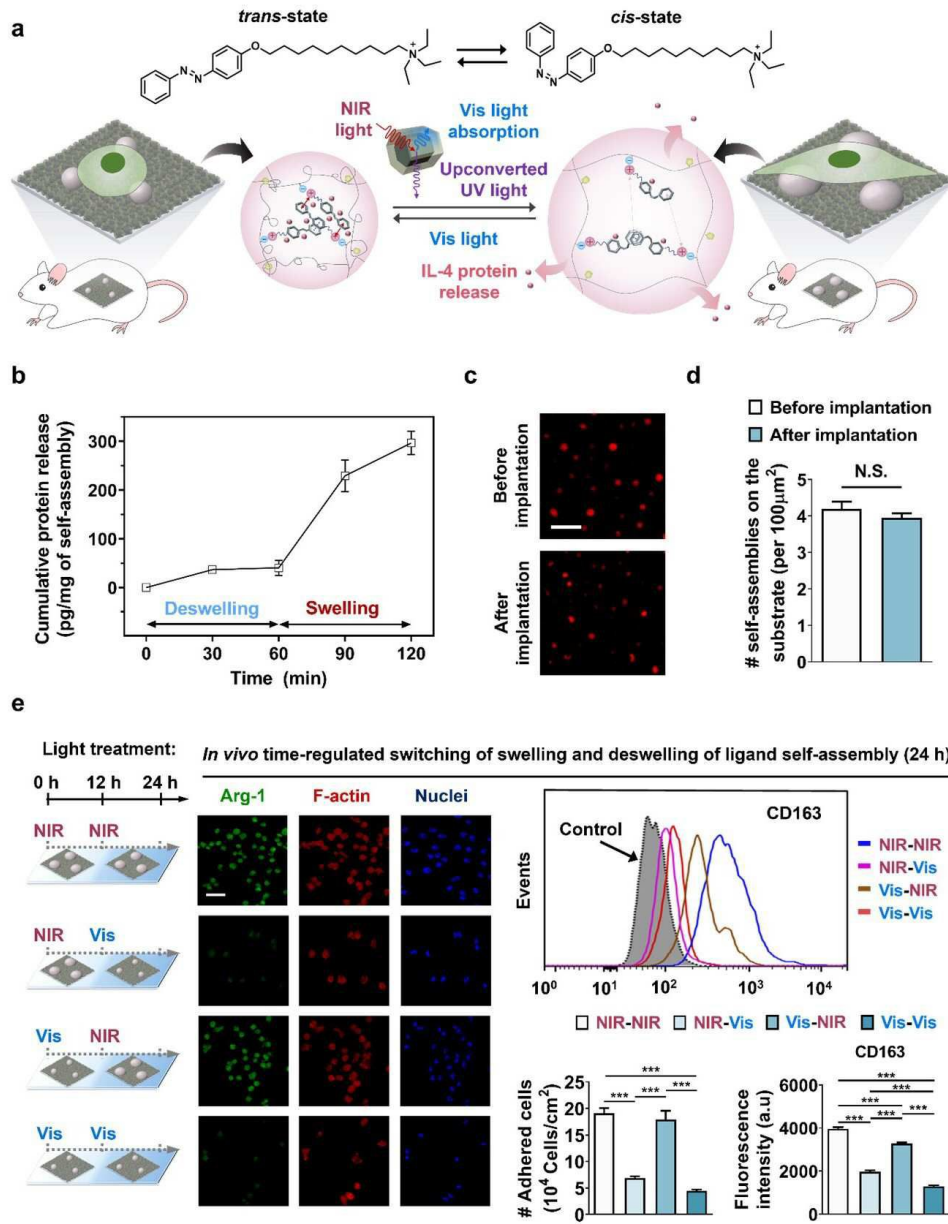
Time-regulated switching of swelling and deswelling of ligand-bearing self-assembly (Regenerative medium)



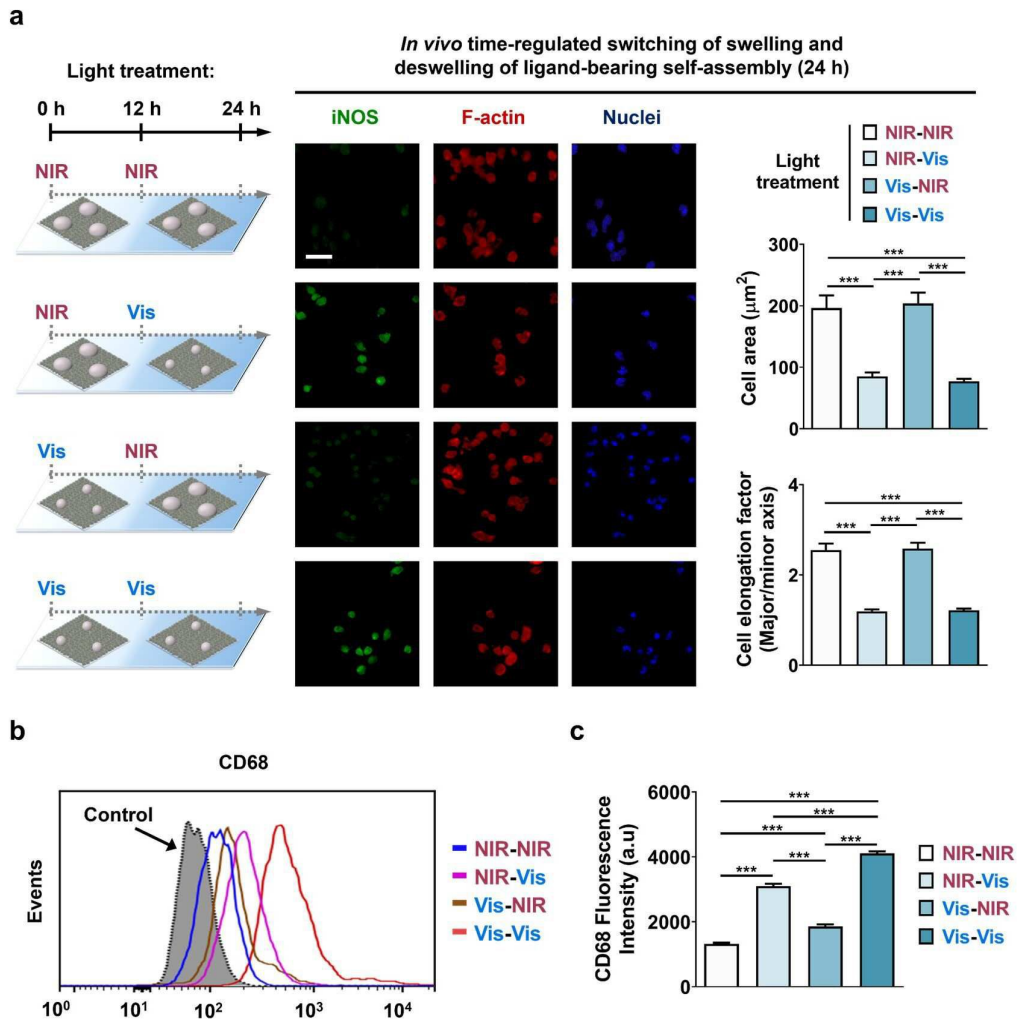
b



도면24

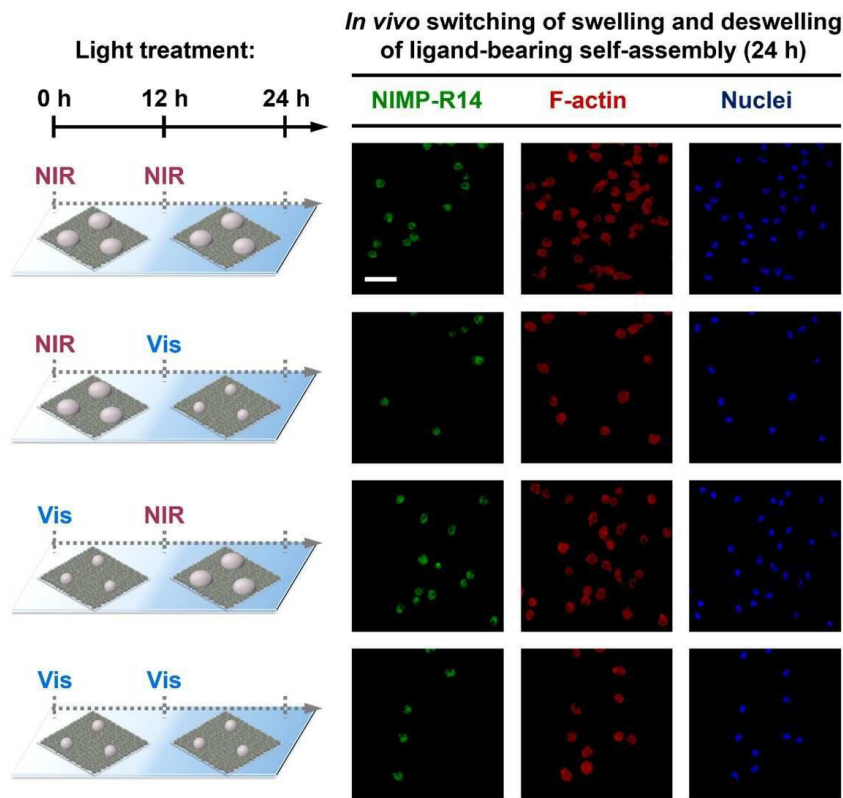


도면25

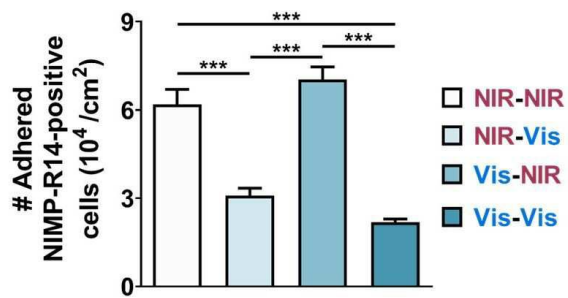


도면26

a



b



도면27

