(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0082439
(43) 공개일자 2020년07월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C09K 11/02 (2006.01) *C09K 11/77* (2006.01)
B82Y 20/00 (2017.01) *B82Y 30/00* (2017.01)
B82Y 40/00 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C09K 11/02 (2013.01)
C09K 11/7728 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0173039
(22) 출원일자 2018년12월28일
심사청구일자 2018년12월28일

(71) 출원인
건양대학교산학협력단
충청남도 논산시 대학로 121 (내동)
(72) 발명자
김도경
대전광역시 서구 관저북로 87 원앙마을1단지아파트 106동 1903호
박환우
대전광역시 서구 관저동로90번길 47 느리울아파트11단지 1101동 1303호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인도담, 김대영

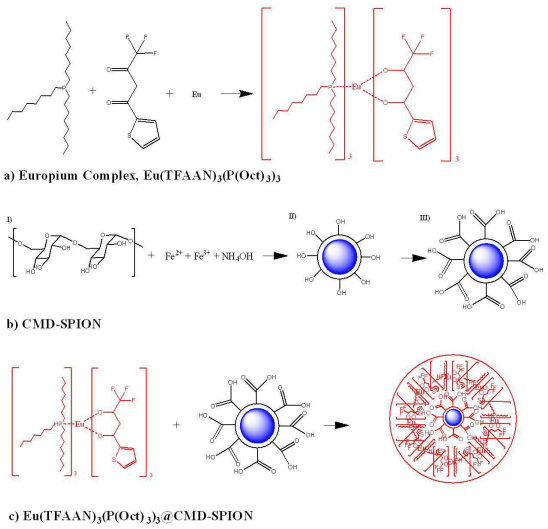
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **란타나이드 금속 착제 및 자성 나노입자가 포함된 무독성 형광자성나노입자 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 형광자성나노입자 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 (a)유로퓸 착제를 합성하는 단계; (b)초상자성 나노입자를 제조하는 단계; (c) (b) 단계에서 얻어진 초상자성 산화철 나노입자에 에피클로로하이드린을 이용하여 가교결합을 하고 모노클로로 아세트산을 이용하여 카르복실기를 활성화하는 단계; (d) 상기 (a) 및 (c) 단계에서 얻어진 각각의 물질을 혼합하여 나노입자 표면에 유로퓸 착물을 코팅하는 단계; 를 통해 제조되는 형광자성나노입자에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
B82Y 20/00 (2013.01)
B82Y 30/00 (2013.01)
B82Y 40/00 (2013.01)
C01P 2004/64 (2013.01)
C01P 2006/42 (2013.01)
C01P 2006/60 (2013.01)

(72) 발명자
신종대
대전광역시 서구 관저북로 14 원앙마을4단지아파트 414동 1909호
정영길
대전광역시 유성구 노은서로172번길 23
이남섭
대전광역시 서구 둔산로 155, 106동 1108호(둔산동, 크로바아파트)
한승연
대전광역시 유성구 상대남로 26, 913동 1503호(상대동, 도안신도시9블록 트리풀시티아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2017R1A2B4005167
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 중견연구자지원사업
연구과제명 세포투과성 펩타이드를 이용한 생리활성물질 전달체 및 magnetofection 시스템 개발
기 여 율 25/100
주관기관 건양대학교
연구기간 2017.03.01 ~ 2022.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2015R1A5A1009701
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 선도연구센터지원사업
연구과제명 인간화 돼지 연구센터
기 여 율 25/100
주관기관 건국대학교
연구기간 2015.06.01 ~ 2022.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2017R1A6A1A03015713
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 대학중점연구소지원사업
연구과제명 저출산 위기극복을 위한 연구플랫폼 구축과 신개념 치료법 개발
기 여 율 25/100
주관기관 건양대학교
연구기간 2017.06.02 ~ 2026.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 HI17C1238
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
연구사업명 질환극복기술개발
연구과제명 유산 및 조산의 염증조절을 통한 치료기술 개발
기 여 율 25/100
주관기관 건양대학교
연구기간 2017.05.01 ~ 2022.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

(a) 유로퓸 클로라이드를 증류수에 녹인 용액과, 2-(4,4,4-트리플루오로아세토아세틸)나프탈렌과 트리옥틸포스파인을 에탄올에 녹인 용액을 혼합 후 메틸메타크릴산을 첨가하고 암모니아를 이용하여 pH를 조절한 후 중탕 가열함으로 유로퓸 착제를 합성하는 단계;

(b) 염화철 (III) 6 수화물과, 염화 철 (II) 4 수화물 및 탄수화물을 증류수에 용해하고, 질소 가스를 흘려 용존 산소를 제거한 후 암모니아를 첨가하고 가열 및 교반, 세척 공정을 이용하여 초상자성 산화철 나노입자를 제조하는 단계;

(c) 상기(b) 단계에서 얻어진 초상자성 산화철 나노입자에 에피클로로 하이드린을 이용하여 가교결합을 하고 모노클로로 아세트산을 이용하여 카르복실기를 활성화하는 단계; 및

(d) 상기 (a) 및 (c) 단계에서 얻어진 각각의 물질을 나노입자 : 유로퓸 착물을 질량대비 0.1내지 1:0.5로 혼합하여 나노입자 표면에 유로퓸 착물을 코팅하는 단계; 를 통해 제조되는 것을 특징으로 하는 란타나이드 금속 착제 및 자성 나노입자가 포함된 무독성 형광자성나노입자 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 탄수화물은 분자량 1000 ~ 100000 범위의 덱스트란을 사용하는 것을 특징으로 하는 란타나이드 금속 착제 및 자성 나노입자가 포함된 무독성 형광자성나노입자 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 초상자성 산화철 나노입자는 산화철(II)과 산화철(III)을 1:2의 몰비로 혼합하여 제조한 것을 특징으로 하는 란타나이드 금속 착제 및 자성 나노입자가 포함된 무독성 형광자성나노입자 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 탄수화물의 가교제는 소듐 트리메타포스페이트, 소듐 트리폴리포스페이트, 에피클로로 하이드린이고, 그 중 에피클로로 하이드린 가교 결합하는 것을 특징으로 하는 란타나이드 금속 착제 및 자성 나노입자가 포함된 무독성 형광자성나노입자 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 (c)단계는 유로퓸 착제와의 화학적 결합을 위해 덱스트란에 카르복실기를 활성화하고 모노클로로 아세트산과 소듐하이드로 옥사이드를 첨가하여 교반하며, 교반 시간은 12시간에서 100시간 내에서 행하여 제조되는 것을 특징으로 하는 란타나이드 금속 착제 및 자성 나노입자가 포함된 무독성 형광자성나노입자 제조방법.

청구항 6

제1항, 제2항, 제3항, 제4항, 제5항 중 어느 한 항에 따른 제조방법에 따라 제조되는 것을 특징으로 하는 란타나이드 금속 착제 및 자성 나노입자가 포함된 무독성 형광자성나노입자.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 형광자성나노입자 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 in vitro 상에서 공초점 현미경으로 추적 가능하고 in-vivo 상에서 MRI를 이용하여 비침습적으로 입자의 추적이 가능한 형광자성나노입자를 개발하여 다용도 나노 탐침 시스템에 이용하는 란타나이드 금속 착제 및 자성 나노입자가 포함된 무독성 형광자성나노입자 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 비 침습 형광 프로브는 분자 수준에서 약물의 효능을 평가하는데 필요하며 약물의 효능 평가는 약물을 세포에 투여한 후 특정 발현을 추적함으로써 생물학적 관점에서 중요하다.

[0003] 형광 프로브는 고감도 및 공간 분해능을 가지므로 특정 파장의 여기 후에 분자에서 방출 된 빛을 추적하는 데 탁월한 성능을 보이고 있다. 바이오 이미징 프로브로 선택하는 가장 중요한 요소 중 하나는 특정 세포 소기류 또는 하위 세포 사이트에 쉽게 국한/내재화하는 데 필요한 유기 분자/입자이다.

[0004] 현재 광 프로브는 두 가지 범주로 분류되며 그 하나는 FITC, Alexa Fluor, TRITC, Cy3, Cy5, Cy7, GFP, YFP 및 CFP 등과 같은 유기 분자이고 다른 하나는 다음과 같은 무기 물질 양자점 CdSe/ZnS, InP/ZnS, CuInS/ZnS 및 CH3NH3PbX3 (X = Cl, Br, I)등이 있다.

[0005] 양자점은 생물 의학 응용 분야에서 검출, 바이오 마커(biomarker) 및 영상 조제 (imaging agent)로 매우 일반적으로 사용되는 물질이지만, 살아있는 세포에서의 양자점의 비효율적인 흡수는 나노 의약에서의 사용에 문제가 되고 있다.

[0006] 살아있는 세포의 낮은 위치를 분석하기 위해서는 높은 용량의 양자점이 필요하므로 양자점 표면에 존재하는 물질과 작용기에 따라 세포막의 투과성을 이해함으로써 생의학 용도로 효과적인 양자점을 설계하는 전략을 수립하는 것이 중요하다.

[0007] 자외선 하에서 빛을 방출하는 물질인 란타나이드 착물의 합성은 광범위한 적용 범위 때문에 광범위하게 연구되어왔다. 최근에는 란타나이드 착체가 기존의 형광 물질에 비해 낮은 세포 독성 및 높은 양자 수율, 광표백 방지 특성이 강하기 때문에 나노 의학에서 많이 이용되고 있으며 특히, 진단 키트, 미세 화학 검출, 세포 표지 등에 사용되어지고 있다.

[0008] 현재 자성체 나노 입자는 다양한 질환의 진단 및 치료 효과를 향상시키기 위해 개발되어 왔으며, 현재까지 개발된 나노 크기의 물질 중 가장 많이 연구된 물질이다.

[0009] 초 상자성 산화철 나노 입자는 자기적 특성, 외부 자기장하에서 자화되는 특성, 생체 적합성, 생체 적합성 물질로 코팅한 후 높은 분산성과 세포 내 흡수 및 짧은 혈액 반감기를 포함한 고유한 특성을 가지고있다.

[0010] 이러한 이점은 약물, 단백질 및 나노 의학 응용을 위한 탐침 수송에 가장 효과적인 매개 변수이다.

[0011] 이에 본 발명자들은 in vitro 상에서 공초점 현미경으로 추적 가능하고 in-vivo상에서 MRI를 이용하여 비침습적으로 입자의 추적이 가능하여 다용도 나노 탐침 시스템에 이용하는 형광자성나노입자를 제시한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0012] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1348074호 (2013.12.26.)

비특허문헌

[0013] (비특허문헌 0001) Wang, L.; Li, B.; Xu, F.; Li, Y.; Xu, Z.; Wei, D.; Feng, Y.; Wang, Y.; Jia, D.; Zhou, Y. Visual in vivo degradation of injectable hydrogel by real-time and non-invasive tracking using carbon nanodots as fluorescent indicator. Biomaterials 2017, 145, 192-206

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명의 목적은 in vitro 상에서 공초점 현미경으로 추적 가능하고 in-vivo상에서 MRI를 이용하여 비침습적으로 입자의 추적이 가능한 형광자성나노입자를 개발하여 다용도 나노 탐침 시스템에 이용하기 위한 란타나이드 금속 착제 및 자성 나노입자가 포함된 무독성 형광자성나노입자 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기와 같은 목적을 위해 본 발명은 (a) 유로퓸 클로라이드를 증류수에 녹인 용액과, 2-(4,4,4-트리플루오로아세토아세틸)나프탈렌과 트리옥틸포스파인을 에탄올에 녹인 용액을 혼합 후 메틸메타크릴산을 첨가하고 암모니아를 이용하여 pH를 조절한 후 중탕 가열함으로 유로퓸 착제를 합성하는 단계; (b) 염화철 (III) 6 수화물과, 염화 철 (II) 4 수화물 및 탄수화물을 증류수에 용해하고, 질소 가스를 흘려 용존 산소를 제거한 후 암모니아를 첨가하고 가열 및 교반, 세척 공정을 이용하여 초상자성 산화철 나노입자를 제조하는 단계; (c) 상기(b)단계에서 얻어진 초상자성 산화철 나노입자에 에피클로로 하이드린을 이용하여 가교결합을 하고 모노클로로 아세트산을 이용하여 카르복실기를 활성화하는 단계; 및 (d) 상기 (a) 및 (c) 단계에서 얻어진 각각의 물질을 나노입자 : 유로퓸 착물을 질량대비 0.1내지 1:0.5로 혼합하여 나노입자 표면에 유로퓸 착물을 코팅하는 단계; 를 통해 제조되는 것을 특징으로 하는 제조방법이다.

[0016] 그리고 상기 탄수화물은 분자량 1000 ~ 100000 범위의 덱스트란을 사용하는 것을 특징으로 한다.

[0017] 또한, 상기 초상자성 산화철 나노입자는 산화철(II)과 산화철(III)을 1:2의 몰비로 혼합하여 제조한 것을 특징으로 한다.

[0018] 아울러, 상기 탄수화물의 가교제는 소듐 트리메타포스페이트, 소듐 트리폴리포스페이트, 에피클로로 하이드린이고, 그 중 에피클로로 하이드린 가교 결합한다.

[0019] 그리고 상기 (c)단계는 유로퓸 착제와의 화학적 결합을 위해 덱스트란에 카르복실기를 활성화하고 모노클로로 아세트산과 소듐하이드로 옥사이드를 첨가하여 교반하며, 교반 시간은 12시간에서 100시간 내에서 행하여 제조된다.

[0020] 또한, 상기와 같은 목적을 위해 란타나이드 금속 착제 및 자성 나노입자가 포함된 무독성 형광자성나노입자는 앞서 설명한 방법을 통해 제조되는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0022] 본 발명에 따른 란타나이드 금속 착제 및 자성 나노입자가 포함된 무독성 형광자성나노입자 제조방법에 의하면, 형광 프로브를 통해 고감도 및 공간 분해능을 가지므로 특정 파장의 여기 후에 분자에서 방출된 빛을 추적하는 데 탁월한 성능을 보이는 효과가 있다.

[0023] 그리고 본 발명에 의하면, in vitro 상에서 공초점 현미경으로 추적 가능하고 in-vivo상에서 MRI를 이용하여 비침습적으로 입자의 추적이 가능한 형광 자성 나노입자를 통해, 다용도 나노 탐침 시스템에 이용하기 위한 형광자성 나노입자의 그 제조에 의해 추가적인 질병추적자를 결합하여 특정 질환을 MRI를 이용하여 병변의 확인 가능할 뿐만 아니라 수술시에 UV 하에서 정확한 병변을 추적하여 정확하고 완전하게 절제가능하게 하는 프로브를 제공하는 강점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 본 발명에 따른 형광자성나노입자의 모식도,

도 2는 본 발명에 따른 형광자성나노입자의 제조방법을 도시한 순서도,

도 3은 본 발명에 따른 제조된 가교결합된 초상자성 산화철 나노입자의 표면에 카르복실기를 활성화한 것과 유로퓸 착물과 결합 후의 투과 전자 현미경 사진,

도 4는 본 발명에 따른 제조된 가교결합된 초상자성 산화철 나노입자의 표면에 카르복실기를 활성화한 것과 유로퓸 착물과 결합한 후의 DSC 열분석 그래프,

도 5는 본 발명에 따른 제조된 유로퓸 착물과 카르복실기를 활성화한 초상자성 산화철 나노입자의 농도에 따른 여기 및 발광 파장 스펙트럼,

도 6은 본 발명에 따른 가교결합된 초상자성 산화철 나노입자의 표면에 카르복실기를 활성화한 것과 유로퓸 착물과 결합한 후의 제타전위 그래프와 형광자성나노입자의 일광 및 UV 조건에서의 사진,

도 7은 본 발명에 따른 제조된 유로퓸 착물과 카르복실기를 활성화한 초상자성 산화철 나노입자의 FT-IR 스펙트라,

도 8은 본 발명에 따른 EK293T 및 HepG2 세포에서의 $Eu(TFAAN)_3(P(Oct)_3)_3$@CMD-SPION의 세포 독성 분석 결과,

도 9는 본 발명에 따른 HEK293T 및 HepG2 세포에서의 $Eu(TFAAN)_3(P(Oct)_3)_3$@CMD-SPION의 세포 내 흡수 및 분포 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 이하 실시예를 바탕으로 본 발명을 상세히 설명한다. 본 발명에 사용된 용어, 실시예 등은 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고 통상의 기술자의 이해를 돕기 위하여 예시된 것에 불과할 뿐이며, 본 발명의 권리범위 등이 이에 한정되어 해석되어서는 안 된다.

[0026] 본 발명에 사용되는 기술 용어 및 과학 용어는 다른 정의가 없다면 이 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 이해하고 있는 의미를 나타낸다.

[0027] 이하의 실시 예들은 개시된 내용이 철저하고 완전해질 수 있도록 그리고 당업자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 제공되는 것으로, 그것의 상보적인 실시 예들도 포함한다.

[0028] 본 명세서에서, 단수형은 문구에서 특별히 언급하지 않는 한 복수형도 포함한다. 명세서에서 사용되는 '포함한다(comprise)' 및/또는 '포함하는(comprising)'은 언급된 구성요소는 하나 이상의 다른 구성요소의 존재 또는 추가를 배제하지 않는다.

[0029] 이하의 특정 실시예들의 기술에 있어, 여러 특정적인 내용은 발명을 더 구체적으로 설명하고 이해를 돕기 위해 작성되었으나, 이 분야의 지식을 갖고 있는 당업자는 이러한 여러 가지의 특정적인 내용이 없어도 사용될 수 있다는 것을 인지할 수 있다. 어떤 경우에는, 발명을 기술하는 데 있어서 흔히 알려졌으면서 발명과 크게 관련 없는 부분들은 본 발명을 설명하는 데 있어 혼돈을 막기 위해 기술하지 않음을 미리 언급해 둔다.

[0031] 본 발명은 형광 프로브를 통해 고감도 및 공간 분해능을 가지므로 특정 파장의 여기 후에 분자에서 방출된 빛을 추적하는 데 탁월한 성능을 가지는 란타나이드 금속 착제 및 자성 나노입자가 포함된 무독성 형광자성나노입자 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

[0032] 이를 위해 본 발명은 (a) 유로퓸 클로라이드를 증류수에 녹이며, 2-(4,4,4-트리플루오로아세토아세틸)나프탈렌과 트리옥틸포스파인을 에탄올에 녹인 용액을 일정 몰비로 혼합 후 메틸메타크릴산을 첨가하고 암모니아를 이용하여 pH를 조절한 후 중탕가열 함으로서 유로퓸 착제를 합성하는 단계; (b) 염화철 (III) 6 수화물, 염화 철 (II) 4 수화물 및 탄수화물을 증류수에 용해한 후 질소 가스를 흘려 용존 산소를 제거한 후 암모니아를 첨가하고 가열 및 교반, 세척 공정을 이용하여 초상자성 산화철 나노입자를 제조하는 단계; (c) 상기(b)단계에서 얻어진 초상자성 산화철 나노입자에 에피클로로 하이드린을 이용하여 가교결합을 하고 모노클로로 아세트산을 이용하여 카르복실기를 활성화하는 단계; 및 (d) 상기 (a) 및 (c) 단계에서 얻어진 각각의 물질을 나노입자 : 유로퓸 착물을 질량대비 0.1내지 1:0.5로 혼합하여 나노입자 표면에 유로퓸 착물을 코팅하는 단계; 를 통해 무독성

형광자성나노입자를 제조하도록 구성된다.

[0033] 상기 초상자성 산화철 나노입자는 산화철(II), 산화철(III), 코발트 페라이트, 징크 페라이트, 니켈 페라이트, 망간 페라이트, 철, 코발트, 니켈, 망간, FeAu, FePt, CoNi 중에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하고 공침법에 의해 수용액상서에 제조하는 나노입자이다.

[0034] 이때 초상자성 산화철 나노 입자는 합성 시 사용되는 용매는 증류수, 메탄올, 에탄올, 중 선택되는 하나 또는 어느 하나 이상의 혼합물일 수 있다.

[0035] 그리고 상기 초상자성 산화철 나노입자는 산화철(II)과 산화철(III)을 1:2의 몰비로 혼합하여 제조한다.

[0036] 상기 탄수화물은 트리오스, 테트로오스, 펜토오스, 헥소오스, 또는 헵토오스를 포함하는 이의 알도오스 또는 케토오스 형태의 단당류 또는 다당류 또는 이의 조합이다.

[0037] 이때, 상기 트리오스가 상기 탄수화물 반응물의 역할을 하거나, 다른 당 또는 다당류와 조합하여 사용되는 경우, 알도트리오스 당 또는 케토트리오스 당, 가령 각각 글리세르알데히드 및 디히드록시아세톤이 사용된다.

[0038] 또한, 상기 테트로오스가 상기 탄수화물 반응물의 역할을 하거나, 다른 당 또는 다당류와 조합하여 사용되는 경우, 알도테트로오스 당, 가령 에리트로스 및 트레오스 및 케토테트로오스 당, 에리트룰로오스가 사용된다.

[0039] 또한, 상기 펜토오스가 상기 탄수화물 반응물의 역할을 하거나, 다른 당 또는 다당류와 조합하여 사용되는 경우, 알도펜토오스 당, 가령 리보오스, 아라비노오스, 자일로오스, 및 릭소오스; 및 케토펜토오스 당, 가령 리불로오스, 아라불로오스, 자일룰로오스, 및 릭술로오스가 사용된다.

[0040] 그리고 상기 헥소오스가 상기 탄수화물 반응물의 역할을 하거나, 다른 당 또는 다당류와 조합하여 사용되는 경우, 알도헥소오스 당, 가령 글루코오스 (즉, 덱스트로오스), 만노오스, 갈락토오스, 알로오스, 알토오스, 탈로오스, 굴로오스, 및 이도오스; 및 케토헥소오스 당, 가령 프룩토오스, 프시코오스, 소르보오스, 덱스트란 및 타가토오스가 사용된다.

[0041] 이에 따라 상기 탄수화물은 단당류, 이당류와 다당류의 조합에 의해 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 한다.

[0042] 이때, 상기 탄수화물 중 덱스트란을 사용하고 분자량의 범위는 1,000-100,000의 범위가 바람직하며 합성 후 추가적인 화학반응으로 분자를 쪼갤수 있으므로 특정화하지 않는다.

[0044] 그리고 상기 탄수화물의 가교제는 소듐 트리메타포스페이트, 소듐 트리폴리포스페이트, 에피클로로 하이드린이고, 그 중 에피클로로 하이드린 가교 결합하는 것을 특징으로 한다.

[0045] 이때, 유로퓸 착제와의 화학적 결합을 위해 덱스트란에 카르복실기를 활성화하는 단계로, 모노클로로 아세트산과 소듐하이드로 옥사이드를 첨가하여 교반하며 교반 시간은 12시간에서 100시간 내에서 행하고 바람직하게는 24시간 반응을 하여 제조한다.

[0047] 본 발명의 유로퓸과 β-diketone을 이용한 착물을 제조하는 단계는 일반적인 단계이나 바람직하게는 카르복실기와 아크릴기를 포함하는 화합물인 아크릴릭산 또는 그 유도체, 즉 폴리에틴렌-co 아크릴릭산, 폴리아크릴 아마이드-co-아크릴릭산, 폴리-엔-아이소프로필아크릴아마이드-co-아크릴릭산, 폴리아크릴릭 산, 메타크릴산 엔-하이드록시썩신이미드에스터, 폴리에틸렌-co-메타크릴릭산, 3-(2-푸리)아크릴릭산 중 선택되는 어느 하나 또는 조합하여 사용할 수 있으며, 이의 사용은 어떠한 경우에도 서로 분리되기 어려운 구조체로 최종적으로 구조체의 물리/화학적 안정성을 크게 증대 시킨다.

[0048] 바람직하게는 유로퓸 착물은 유로퓸 클로라이드를 증류수에 녹여 농도 20mmol, 2-(4,4,4-트리플루오로아세토아세틸)나프탈렌을 에탄올에 녹여 20mmol, 트리옥틸포스파인을 에탄올에 녹여 20mmol이 되도록 한 용액을 일정비율로 혼합 후 암모니아를 이용하여 pH를 조절한 후 중탕가열 함으로서 유로퓸 착제를 합성한다.

[0050] 후술되는 실시예에서 합성의 예를 보여주며 이는 예시일 뿐 특별히 몰비의 비율을 한정하지는 않는다.

[0051] 이하, 실시 예를 통해 보다 자세하게 기술한다.

실 시 예 1

[0053] (a) 유로퓸 착제를 합성하는 단계

[0054] $Eu(TFAAN)_3(P(Oct)_3)_3$ 조성을 갖는 유로퓸 착물은 다음과 같이 합성하였다.

[0055] 0.366g 염화 유로퓸 6 수화물을 증류수 50mL에 용해 시켰다. 동일한 방법으로, 0.266 g 2- (4,4,4- 트리플루오로아세토아세틸) 나프탈렌 및 0.370 g 트리옥틸포스핀을 50 mL 에탄올에 용해 시켰다.

[0056] 저장 용액으로부터 2mL Eu(III), 6mL TFAAN, 6mL $P(Oct)_3$, 20uL 메틸메타크릴산 및 100uL NH_4OH를 뚜껑이 있는 20mL 유리병에 옮기고 자기 교반하에 수조에서 온도를 60℃로 증가시킨다.

[0057] 암모니아를 이용하여 pH를 조절하며, pH9 내지 pH13으로 조절하는 것이 바람직하다.

[0058] 생성물을 원심 분리하여 침전시키고, 증류수로 3회 세척한 후 70℃의 진공 오븐에서 24시간 동안 건조 시켰다. $Eu(TFAAN)_3(P(Oct)_3)_3$ 의 합성 모식도를 도 1 (a)에 나타내었다.

[0060] (b) 초상자성 산화철 나노입자를 제조하는 단계

[0061] 입자 합성 전에 산소를 제거하기 위해 N_2 가스를 30분 동안 용액에 직접 유입시켰다.

[0062] 5.46g 염화철 (III) 6 수화물 및 1.99g 염화 철 (II) 4 수화물을 H_2O 90mL 및 진한 HCl 500㎕을 첨가하여 모든 염이 완전히 용해될 때까지 수조에서 60℃로 가열한다.

[0063] 투명한 용액을 얻은 후, 용액을 H_2O로 채워 최종 부피를 100mL로 하여 $[Fe^{2+}]$ = 200mM, $[Fe^{3+}]$ = 100mM으로 준비하였다. 1g의 덱스트란 T-10 (Mw 10,000)을 10mL의 철이온 스톡에 용해 시키고 90mL의 H_2O를 첨가하였다.

[0064] 덱스트란이 완전히 용해된 후, 용액을 얼음 바스에서 30분 동안 용액을 안정화 시킨다. 10mL의 농축 암모니아를 첨가한 후 자석 교반하에서 30분 동안 유지하였다. 혼합물의 온도를 70℃로 올리고 추가적으로 30분간 반응을 유지하였다.

[0065] 생성물을 25℃로 냉각시킨 후, 검정색 고체 물질을 네오디뮴 자석으로 회수하고, 상등액을 경사 분리로 제거하였다. 고체 침전물을 H_2O로 5회 세척하여 미반응 염 및 부산물을 제거하였다.

[0066] 수득된 덱스트란 코팅된 초상자성 나노입자를 100mL H_2O에 분산시켜 얼음 조에서 1분 동안 probe sonicate에 의해 매우 안정한 콜로이드 용액을 만들었다.

[0068] (c) 초상자성 나노입자에 에피클로로 하이드린을 이용하여 가교결합을 하고 모노클로로 아세트산을 이용하여 카르복실기를 활성화하는 단계

[0070] (c)-1 가교결합 덱스트란 코팅된 초상자성 산화철 나노 입자의 합성 단계

[0071] 상기 (b)단계에서 합성한 초상자성 나노입자는 둘러싸인 덱스트란 분자 사이의 가교 결합을 통해 덱스트란을 입자 표면에 견고하게 결합시킨다.

[0072] 강력한 자기 교반하에 10mL의 5M NaOH를 덱스트란 코팅된 초상자성 나노입자의 분산 용액에 첨가한다.

[0073] 5mL의 에피클로로 하이드린을 혼합물에 첨가하고 25℃에서 24시간 동안 격렬하게 쉐이커로 수성층과 유기층 사이의 상분리를 피하도록 유지하였다.

[0074] 반응 완결 후, 혼합물 용액을 무게 - 컷오프 (MWCO = 12,400)를 갖는 투석 튜빙 셀룰로오스 멤브레인에 넣어 5L

증류수에 대해 투석하였다.

[0075] 증류수를 5시간 동안 1시간마다 신선한 것으로 교체하고 밤새 방치하였다. H_2O의 전도도는 전도도 측정기로 모니터링하여 세척 진행의 종료 지점을 조절하였다.

[0076] 용액을 진공 건조기로 최종 부피가 20 mL가 될 때까지 농축시키고 가교 결합된 데스트란 코팅된 초상자성 산화철 나노입자를 합성하였다.

[0078] (c)-2 가교결합 덱스트란 코팅된 초상자성 산화철 나노 입자의 카르복시메틸기 활성화

[0079] 덱스트란에 카르복시메틸기를 활성화시키기 위해, 다음 공정으로 수행하였다.

[0080] 상기 (c)-1 단계에서 합성한 가교결합 덱스트란 코팅된 초상자성 산화철 나노입자 10mL에 10mL의 0.1 M NaOH를 25℃에서 30분 동안 자력교반한다.

[0081] 0.443g 모노클로로아세트산을 용액에 첨가하고 오일 배스에서 N_2를 흘려주면서 60℃로 승온시키고 반응을 60분 동안 유지하였다.

[0082] 반응이 완료된 후 카르복시메틸기 활성화된 가교결합 덱스트란 코팅된 초상자성 산화철 나노 입자를 5L 증류수에 투석하여 불순물을 제거하고 최종 생성물은 4℃에서 보관한다.

[0084] (d) 유로퓸 착제 결합된 카르복시메틸기 활성화된 가교결합 덱스트란 코팅된 초상자성 산화철 나노 입자 자기형광 복합체

[0085] 10mL 탈 이온수에 상기 (c)단계에서 제조된 30mg 카르복시메틸기 활성화된 가교결합 덱스트란 코팅된 초상자성 산화철 나노 입자를 10mL 에탄올에 용해된 (a)단계에서 합성한 1mg $Eu(TFAAN)_3(P(Oct)_3)_3$에 첨가하고 1시간 동안 자기 교반하에 오일 배스에서 80℃로 가열하였다.

[0086] 8시간 동안 연속적으로 분자 컷-오프 12,500을 갖는 멤브레인 튜빙을 사용하여 샘플을 5L 탈 이온수에 대해 투석하였다.

[0088] 실험예 1 : 투과전자 현미경을 이용한 입경 및 입형 측정

[0089] 본 발명에서 형광자성 나노입자의 입도 및 입형은 투과전자 현미경으로 분석하였으며, 이는 도 3에 나타냈다.

[0090] 도 3은 제조된 가교결합된 초상자성 산화철 나노입자의 표면에 카르복실기를 활성화한 것과 유로퓸 착물과 결합한 후의 투과 전자 현미경 사진이다.

[0091] SPIONs의 평균 입자 직경은 불규칙한 모양으로 약 12nm였으며, $Eu(TFAAN)_3(P(Oct)_3)_3$ 접합 후, 입자는 약간의 응집을 갖는다.

[0092] 그림 3 (b)에 도시된 바와 같이, 회색 분자는 $Eu(TFAAN)_3(P(Oct)_3)_3$ 이며, 원심 분리 또는 네오디뮴 자석과 같은 외부 자력을 가함으로써 에탄올로 세척하여 제거 할 수 있다.

[0094] 실험예 2 : DSC 열분석을 이용한 특성 확인

[0095] 본 발명에서 형광자성 나노입자의 물리화학적 특성은 DSC 열분석으로 확인하였으며, 이는 도 4에 나타냈다.

[0096] 도 4는 제조된 가교결합된 초상자성 산화철 나노입자의 표면에 카르복실기를 활성화한 것과 유로퓸 착물과 결합한 후의 DSC 열분석 그래프이다.

[0097] CMD-SPION는 75℃ 및 164.6℃에서 흡열 피크를 나타내었고, 136℃에서 발열 피크를 보였다.

[0099] 실험예 3 : 초상자성 산화철 나노입자의 농도에 따른 스펙트럼 분석

[0100] 본 발명에서는 형광스펙트로미터를 이용하여 초상자성 산화철 나노입자의 농도에 따른 여기와 발광 파장을 분석하였으며, 이는 도 4에 나타냈다.

[0101] 도 5는 제조된 유로퓸 착물과 카르복실기를 활성화한 초상자성 산화철 나노입자의 농도에 따른 여기 및 발광 파장 스펙트럼이다.

[0102] 도 5 (a)는 초상자성 산화철 나노입자의 농도에 따른 발광 파장 스펙트럼이고, 도 5 (b)는 초상자성 산화철 나노입자의 농도에 따른 여기 파장 스펙트럼이며, 최고 여기파장은 360nm에서, 최고 발광파장은 621nm에서 측정되었다.

[0103] 도 5 (a)에서 알 수 있듯이, 모든 발광 스펙트럼은 유로퓸$^{3+}$의 전형적인 f-f전이특성을 보이며 적색의 발광을 나타낸다. 최대 발광피크는 $^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ 전이가 나타나는 621nm이고, $^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ 전이는 597nm에서, $^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$전이는 584nm에서 일어나는 것을 확인할 수 있었으며, CMD-SPION의 첨가로 인한 PL 특성의 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

[0104] 621nm에서는, CMD-SPION에 대한 $Eu(TFAAN)_3(P(Oct)_3)_3$의 농도가 증가함에 따라, $^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$는 가우시안 형태로 비례적으로 증폭된다.

[0105] $Eu(TFAAN)_3(P(Oct)_3)_3$ 및 $Eu(TFAAN)_3(P(Oct)_3)_3$@CMD-SPIONS의 PL은 $^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ 및 $^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$의 PL intensity 비율에 의해 분석된다.

[0106] $^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ 전이는 자기 쌍극자 전이에 해당하는 비교적 강하고 독립적인 강도 값을 가지며, 본질적으로 배위 환경에 영향을 받지 않는다.

[0107] 반대로, $^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$의 강도 값은 EuIII 주변의 물리 화학적 변화 값에 의해 영향을 받는 전기 쌍극자 전이이다.

[0109] 실험예 4 : 가교결합된 초상자성 산화철 나노입자의 표면에 카르복실기를 활성화한 것과 유로퓸 착물과 결합한 후의 제타전위

[0110] 도 6 (a)는 가교결합된 초상자성 산화철 나노입자의 표면에 카르복실기를 활성화한 것과 유로퓸 착물과 결합 한 후의 제타전위를 도시한 그래프이다.

[0111] Zeta(ζ) 포텐셜은 입자의 표면 전하의 크기를 정량화함으로써 콜로이드 안정성의 적절한 지표로 사용되며, 이 값은 일반적으로 콜로이드 분산의 안정성을 해석하고 조작하는 데 사용된다.

[0112] CMD-SPIONs의 ζ-전위는 9.7mV이고, CMD-SPIONs에서 킬레이트 화 된 $Eu(TFAAN)_3(P(Oct)_3)_3$은 -17mV로 바뀐다.

[0113] 그리고 도 6 (b)는 일광에서의 사진, 도 6 (c)는 365nm의 일광 +UV 하에서의 사진, 도 6 (d)는 365nm, UV 하에서의 발광사진이며, 좌측의 시료는 CMD-SPION이고, 우측의 시료는 CMD-SPIONs에 킬레이트된 $Eu(TFAAN)_3(P(Oct)_3)_3$이다.

[0114] 도 6 (d)에서 CMD-SPIONs에 킬레이트된 $Eu(TFAAN)_3(P(Oct)_3)_3$ 는 365nm에서 UV 하에서 적색을 나타내는 아주 밝은 형광을 나타내는 것을 확인할 수 있다.

[0116] 실험예 5 : FT-IR 스펙트라 분석

[0117] 도 7은 제조된 유로퓸 착물과 카르복실기를 활성화한 초상자성 산화철 나노입자의 FT-IR 스펙트라이다.

[0118] $Eu(TFAAN)_3(P(Oct)_3)_3$, CMD-SPIONs, $Eu(TFAAN)_3(P(Oct)_3)_3$ @CMD-SPIONs의 FT-IR 스펙트라는 3,300 cm^{-1} 부근에서 흡수 피크를 나타내고, 2,922 cm^{-1} 에서는 C-H의 sp^3 결합에 할당될 수 있다.

[0119] CMD 스펙트럼에서는 1,250 cm^{-1} 에서 변형진동 δ(C-OH)이 나타나고, 1,150 cm^{-1} 에서 ν(C-O) 진동이 나타나는 것을 확인할 수 있다.

[0120] 그리고 $Eu(TFAAN)_3(P(Oct)_3)_3$ 스펙트럼에서, 1,462 cm^{-1} 에서의 흡수는 C=C 결합에 기인하고, 1,688 cm^{-1}은 C=O 결합에 귀속된다.

[0121] CMD-SPION상에서 킬레이트 화 된 $Eu(TFAAN)_3(P(Oct)_3)_3$ 및 $Eu(TFAAN)_3(P(Oct)_3)_3$에서 P=O(1,061 cm^{-1}) 결합의 신축 진동대가 나타나며, 이러한 결과는 $Eu(TFAAN)_3(P(Oct)_3)_3$이 자성 나노 입자에 연속적으로 그라프팅 되었음을 의미한다.

[0123] 실험예 6 : 세포독성 분석

[0124] HEK293T 및 HepG2 세포에서의 $Eu(TFAAN)_3(P(Oct)_3)_3$@CMD-SPION의 세포 독성을 측정하였으며, 이는 도 8에 나타냈다.

[0125] $Eu(TFAAN)_3(P(Oct)_3)_3$ 킬레이트 된 CMD-SPION의 상이한 농도 및 배양 시간의 세포 독성 효과를 WST 분석을 사용하여 HEK293T 및 HepG2 세포에서 평가하였다.

[0126] 도 8 (a)는 HEK293T 및 HepG2 세포를 표시된 농도의 $Eu(TFAAN)_3(P(Oct)_3)_3$@CMD-SPION로 6시간 동안 처리하였다. 세포 생존력은 WST-1 분석에 의해 측정되었다. 데이터는 평균 ±s.e.m로 나타낸다.

[0127] $Eu(TFAAN)_3(P(Oct)_3)_3$ 킬레이트 된 CMD-SPION(10-240 μg/mL)의 다른 농도로 처리 한 지 6시간 후, 10-240 μg/mL 농도 범위의 세포 생존력이 95% 이상이었다.

[0128] $Eu(TFAAN)_3(P(Oct)_3)_3$ 킬레이트 된 CMD-SPION은 240 μg / mL의 농도에서도 HEK293T 및 HepG2 세포에 독성이 없었다.

[0129] 도 8 (b)는 HEK293T 및 HepG2 세포를 72 μg/ml $Eu(TFAAN)_3(P(Oct)_3)_3$@CMD-SPION으로 표시된 시간 동안 처리하였다. 세포 생존력은 WST-1 분석에 의해 측정되었다. 데이터는 평균 ±s.e.m로 나타낸다.

[0130] $Eu(TFAAN)_3(P(Oct)_3)_3$ 킬레이트 된 CMD-SPIONs로 처리하였을 때 상기 모든 두 세포 유형에서 세포 생존력의 유의한 차이는 관찰되지 않았다.

[0131] 도 8 (c)와 도 8 (d)는 HEK293T(c) 및 HepG2 세포(d)를 지시된 농도의 $EEu(TFAAN)_3(P(Oct)_3)_3$@CMD-SPION으로 24 시간 동안 처리하였다. 세포를 Muse Annexin V 및 Dead Cell 시약으로 염색 한 다음 Muse Cell Analyzer로 세포 사멸을 분석하였다.

[0132] 각 패널의 사사분면 그림은 괴사성 세포(왼쪽 위), 후기 세포 사멸 세포 (오른쪽 위), 생존 세포(왼쪽 아래) 및 초기 세포 사멸 세포(오른쪽 아래)를 보여준다.

[0133] 도 8 (c) 및 도 8 (d)에 도시된 바와 같이, $Eu(TFAAN)_3(P(Oct)_3)_3$ 킬레이트 된 CMD-SPION으로 처리 된 두 세포 모두 비히클-처리된 세포와 유사한 플롯을 나타냈다.

[0134] 따라서, HEK293T 및 HepG2 세포에서 측정된 세포 생존율은 $Eu(TFAAN)_3(P(Oct)_3)_3$@CMD-SPION이 세포 생존 능력에 영향을 미치지 않으며 10 내지 240μg/mL 범위의 세포 사멸 및 괴사를 변화시키지 않음을 보여 준다.

[0136] 실험예 7 : 세포 내 형광자성나노입자의 흡수 및 분포 사진

[0137] 도 9는 HEK293T 및 HepG2 세포에서의 $Eu(TFAAN)_3(P(Oct)_3)_3$@CMD-SPION의 세포 내 흡수 및 분포를 나타낸 사진이다.

[0138] 4시간 동안 72 μg/mL 농도의 비히클(Control) 또는 $Eu(TFAAN)_3(P(Oct)_3)_3$@CMD-SPION으로 처리 한 HEK293T (a) 및 HepG2 세포 (b)의 대표 이미지이며, 핵은 DAPI(파란색)로 염색되었다.

[0139] $Eu(TFAAN)_3(P(Oct)_3)_3$@CMD-SPION의 세포 내 섭취는 형광 현미경을 사용하여 HEK293T 및 HepG2 세포에서 평가되

었다.

[0140] HEK293T 및 HepG2 세포에 의한 $Eu(TFAAN)_3(P(Oct)_3)_3$@CMD-SPION의 내부화는 1시간 배양 후에 관찰되지 않았다.

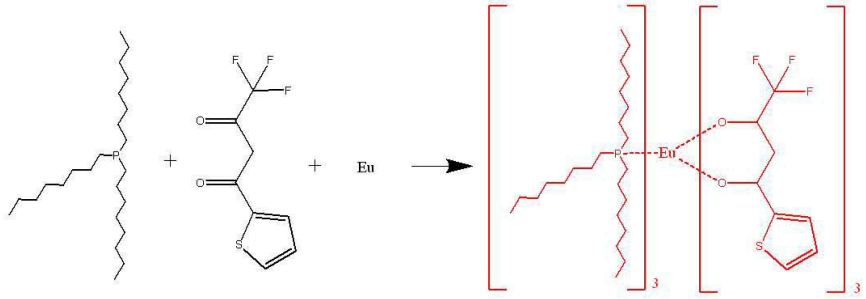
[0141] 농도 배양 4시간 후, $Eu(TFAAN)_3(P(Oct)_3)_3$@CMD-SPION로부터의 적색 형광은 주로 세포 독성 없이 세포질에 위치하였다.

[0142] 6시간 인큐베이션 한 후 두 세포에서 $Eu(TFAAN)_3(P(Oct)_3)_3$@CMD-SPION의 세포 흡수가 일어나 세포질 내에 분포되었다.

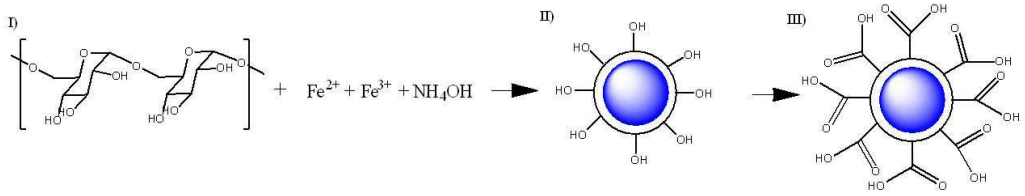
[0144] 본 발명의 권리는 위에서 설명된 실시예에 한정되지 않고 청구범위에 기재된 바에 의해 정의되며, 본 발명의 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 청구범위에 기재된 권리범위 내에서 다양한 변형과 개작을 할 수 있다는 것은 자명하다.

도면

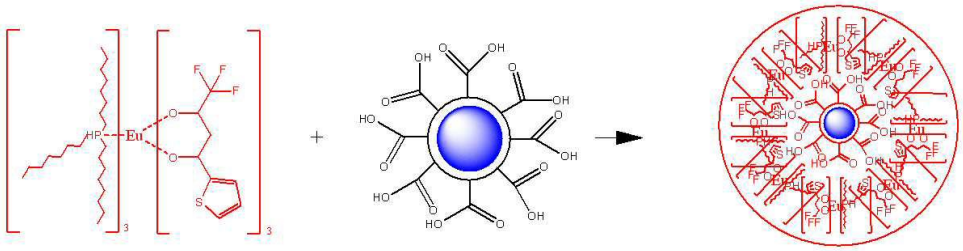
도면1



a) Europium Complex, $Eu(TFAAN)_3(P(Oct)_3)_3$

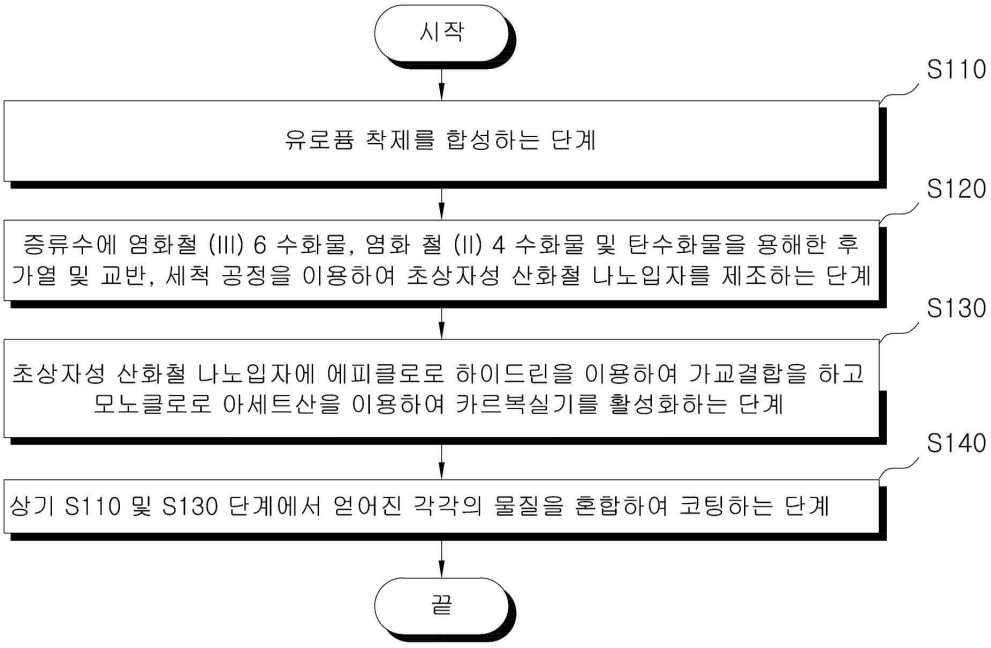


b) CMD-SPION

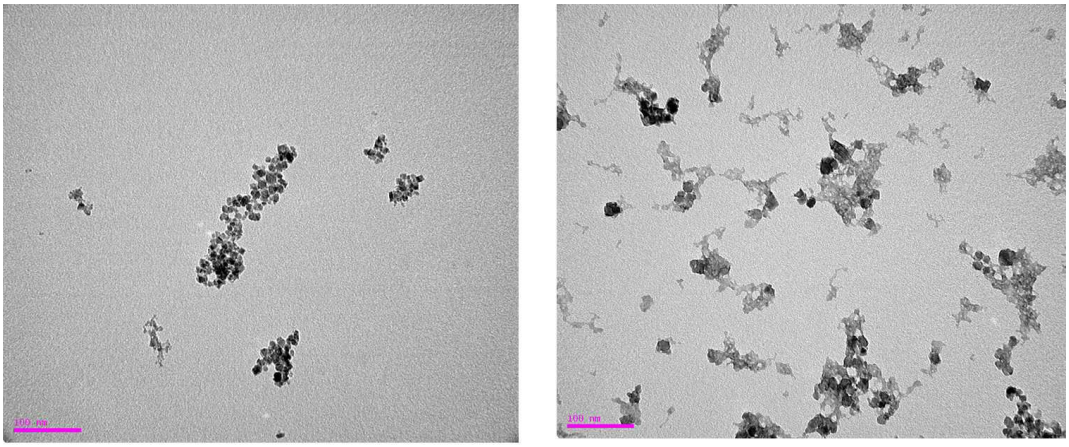


c) $Eu(TFAAN)_3(P(Oct)_3)_3$@CMD-SPION

도면2

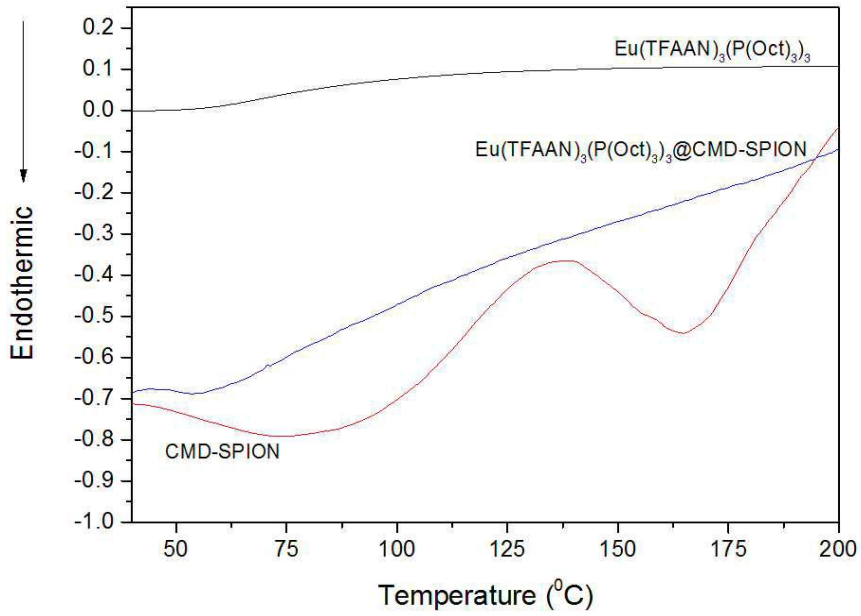

시작
S110
유로퓸 착제를 합성하는 단계
S120
증류수에 염화철 (III) 6 수화물, 염화 철 (II) 4 수화물 및 탄수화물을 용해한 후 가열 및 교반, 세척 공정을 이용하여 초상자성 산화철 나노입자를 제조하는 단계
S130
초상자성 산화철 나노입자에 에피클로로 하이드린을 이용하여 가교결합을 하고 모노클로로 아세트산을 이용하여 카르복실기를 활성화하는 단계
S140
상기 S110 및 S130 단계에서 얻어진 각각의 물질을 혼합하여 코팅하는 단계
끝

도면3

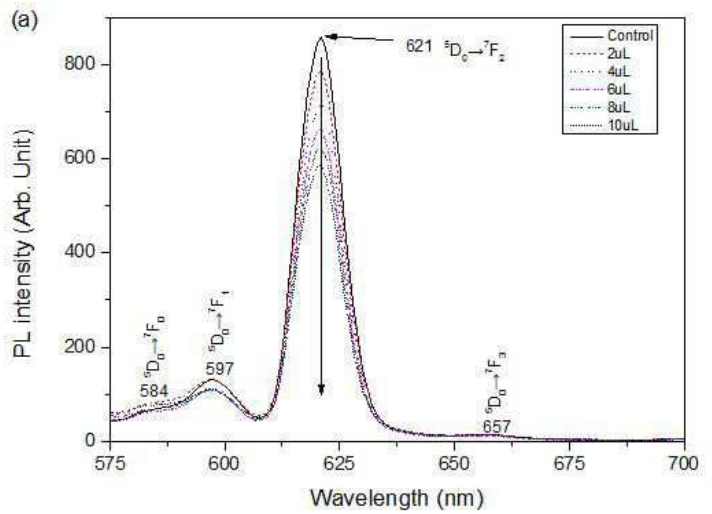


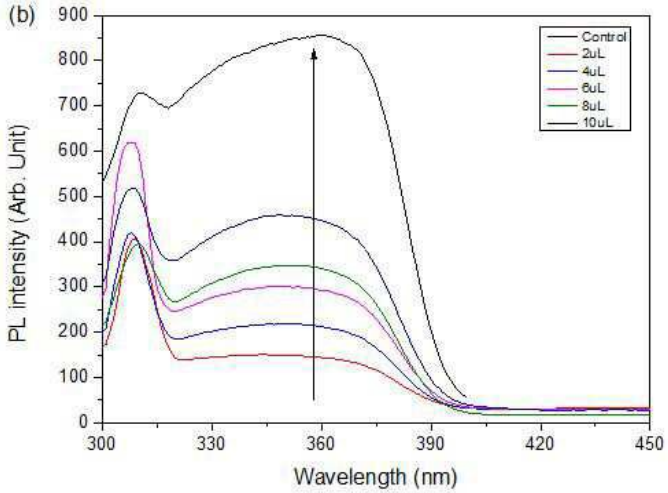
(a)　　(b)

도면4

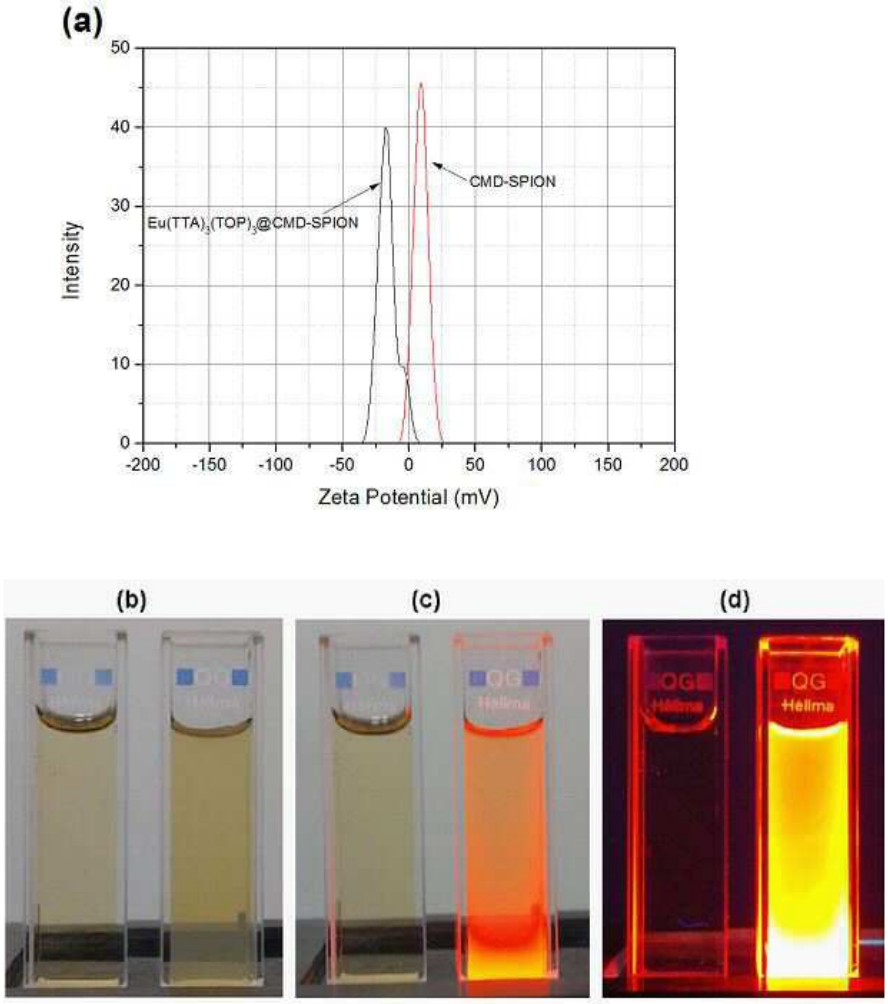

Eu(TFAAN)3(P(Oct)3)3
Eu(TFAAN)3(P(Oct)3)3@CMD-SPION
CMD-SPION
Endothermic
Temperature (0C)
0.2
0.1
0.0
-0.1
-0.2
-0.3
-0.4
-0.5
-0.6
-0.7
-0.8
-0.9
-1.0
50
75
100
125
150
175
200

도면5

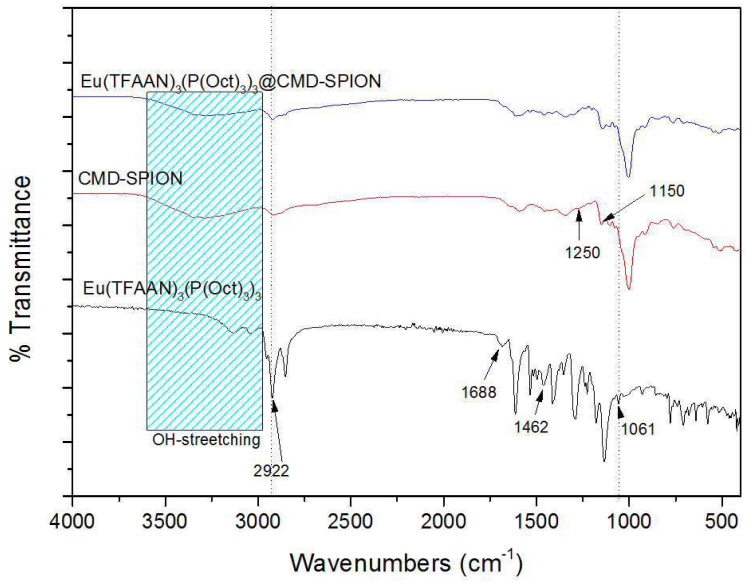

(a)
PL intensity (Arb. Unit)
Wavelength (nm)
621 $^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$
584
597
657
Control
2uL
4uL
6uL
8uL
10uL


(b)
PL intensity (Arb. Unit)
Wavelength (nm)
Control
2uL
4uL
6uL
8uL
10uL

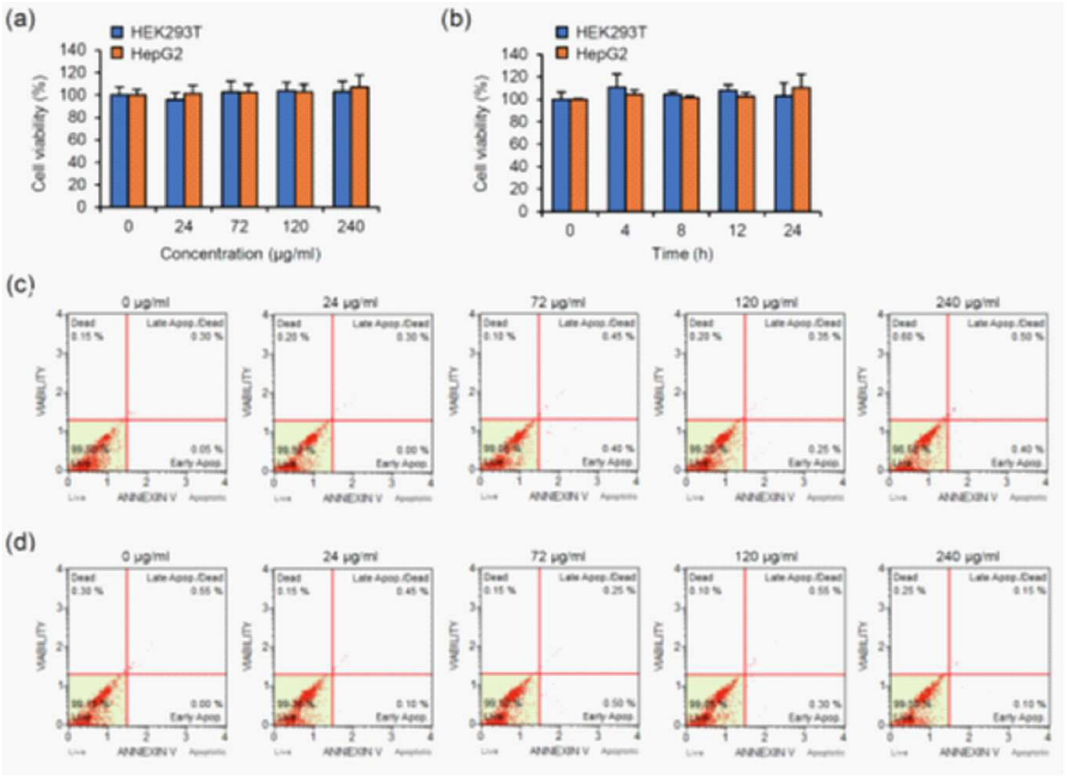
도면6


(a)
Intensity
Zeta Potential (mV)
CMD-SPION
Eu(TTA)3(TOP)3@CMD-SPION
(b)
(c)
(d)

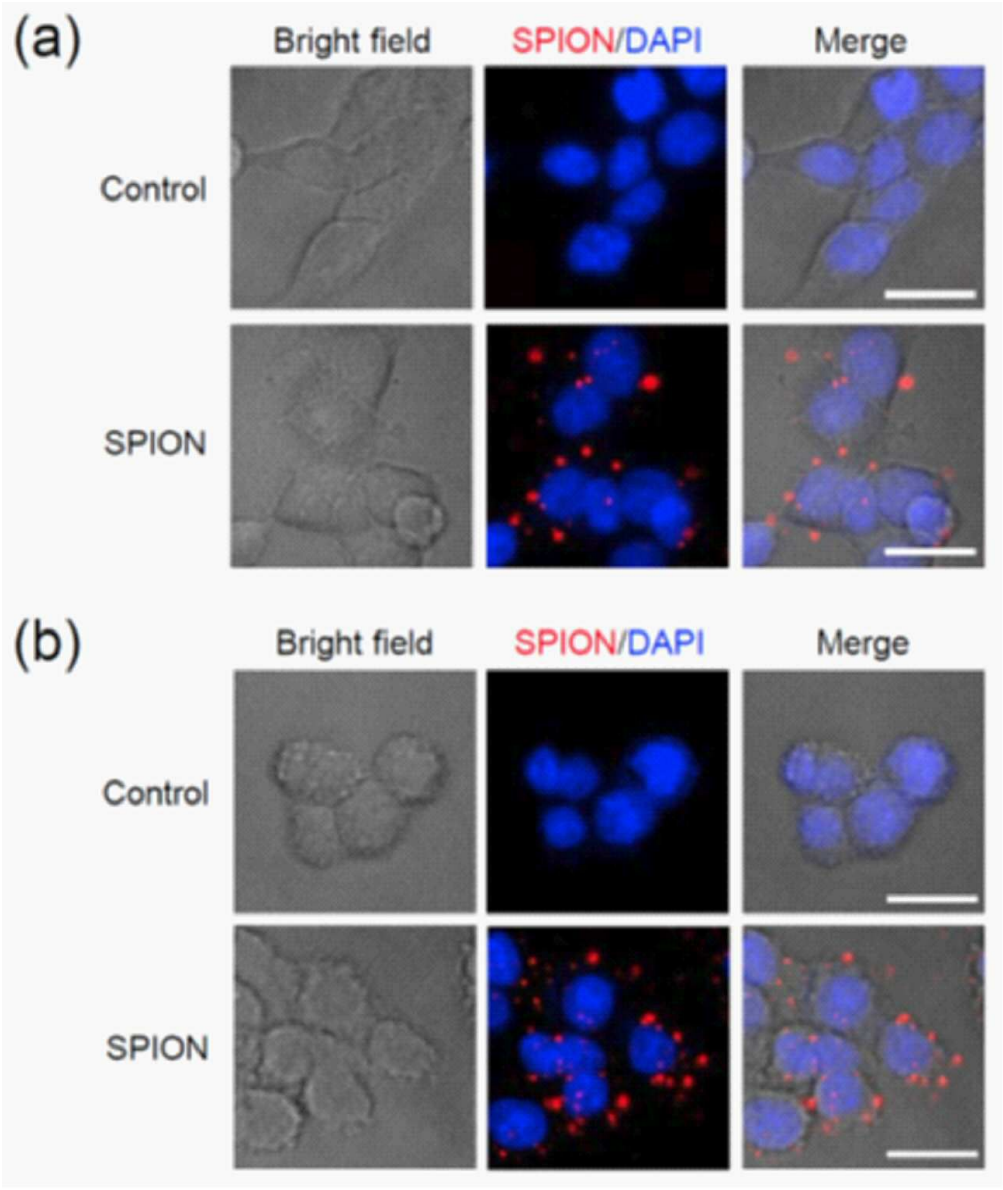
도면7


Eu(TFAAN)3(P(Oct)3)3@CMD-SPION
CMD-SPION
Eu(TFAAN)3(P(Oct)3)3
% Transmittance
Wavenumbers (cm-1)
OH-streetching
2922
1688
1462
1061
1150
1250

도면8


(a)
HEK293T
HepG2
Cell viability (%)
Concentration (μg/ml)
(b)
Time (h)
(c)
(d)
0 μg/ml
24 μg/ml
72 μg/ml
120 μg/ml
240 μg/ml
VABILITY
ANNEXIN V

도면9


(a)
Bright field
SPION/DAPI
Merge
Control
SPION
(b)
Bright field
SPION/DAPI
Merge
Control
SPION