



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0040644
(43) 공개일자 2015년04월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 49/04 (2006.01) A61K 47/30 (2006.01)

A61K 9/16 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0119412

(22) 출원일자 2013년10월07일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

서울대학교산학협력단

서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

(72) 발명자

이진규

서울 강남구 도곡로18길 35, 2동 606호 (도곡동, 현대아파트)

주국연

서울 관악구 신림로68길 28-6, 301호 (신림동, 월드로피스텔)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

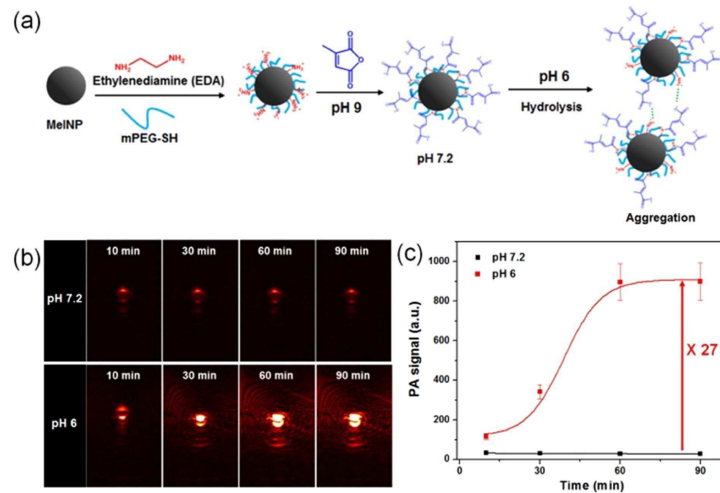
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 멜라닌 나노입자를 포함하는 광음향 영상화제

(57) 요약

본 발명은 질병의 진단 및/또는 치료에 유용하게 사용될 수 있는 멜라닌 나노입자를 포함하는 광음향 영상화제에 관한 것이다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

장진호

서울 양천구 목동동로 130, 1429동 503호 (신정동,
목동14단지아파트)

강지운

서울 마포구 창전로 26, 105동 1501호 (신정동, 서
강GS아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

멜라닌 나노입자를 포함하는 광음향 영상화제.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 멜라닌 나노입자는 응집되어 광음향 신호가 증폭되는 것을 특징으로 하는, 광음향 영상화제.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 멜라닌 나노입자는 아민기 또는 티올기를 가진 분자로 표면 처리된 것을 특징으로 하는, 광음향 영상화제.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 멜라닌 나노입자는 30 nm 내지 600 nm의 직경을 가지는 것을 특징으로 하는, 멜라닌 나노입자.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 멜라닌 나노입자는 오징어 먹물에서 추출한 것을 특징으로 하는, 멜라닌 나노입자.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 멜라닌 나노입자는 도파민, DOPA 또는 시스테인의 멜라닌 전구체로부터 합성된 것을 특징으로 하는, 멜라닌 나노입자.

청구항 7

제2항에 있어서, 상기 멜라닌 나노입자는 산성 조건에서 응집되는 것을 특징으로 하는, 광음향 영상화제.

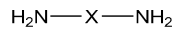
청구항 8

제7항에 있어서, 상기 산성 조건은 pH 2 내지 6인 것을 특징으로 하는, 광음향 영상화제.

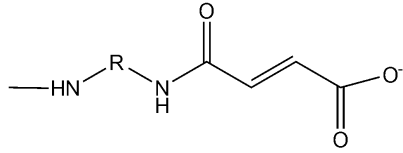
청구항 9

제7항에 있어서, 상기 멜라닌 나노입자의 표면에, 하기 화학식 1 및 2로 표시되는 화합물이 개질된 것을 특징으로 하는, 광음향 영상화제:

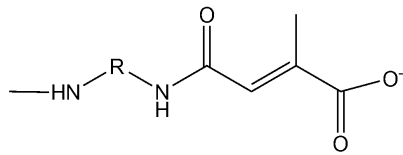
[화학식 1]



[화학식 2]



또는



상기 식에서,

R는 C₁₋₆ 알킬렌이다

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 멜라닌 나노입자는 표면에 폴리에틸렌글리콜이 추가로 개질된 것을 특징으로 하는, 광음향 영상화제.

청구항 11

제2항에 있어서, 상기 멜라닌 나노입자는 금속이온 존재 하에 응집되는 것을 특징으로 하는, 광음향 영상화제.

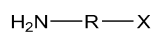
청구항 12

제11항에 있어서, 금속이온은 Na, Mg, Al, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Cd 또는 Pb인 것을 특징으로 하는, 광음향 영상화제.

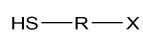
청구항 13

제7항에 있어서, 상기 멜라닌 나노입자의 표면에, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 및 하기 화학식 2로 표시되는 화합물이 개질된 것을 특징으로 하는, 광음향 영상화제:

[화학식 3]



[화학식 4]



상기 식에서, X는 -COOH, -NH₂, 카테콜 또는 포스페이트이다.

청구항 14

제2항에 있어서, 상기 멜라닌 나노입자는 특정 생체 분자 존재 하에 응집되는 것을 특징으로 하는, 광음향 영상화제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 질병의 진단 및/또는 치료에 유용하게 사용될 수 있는 멜라닌 나노입자를 포함하는 광음향 영상화제에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 광음향 효과에 기초한 광음향 영상화는 멜라닌 및 헤모글로빈과 같은 내재적 생물학적 분자를 가시화함으로써 생물학적 정보를 제공하는 생물물리학적 영상화 양식(modality)으로서 많은 관심을 받고 있다. 생물물리학적 영상화로서 광음향 영상화의 높은 감지력은 높은 민감성, 다중모드 영상화 및 영상-유도(image-guided) 치료법을 갖는 실시간 및 표적화된 영상화를 아우르는 진단 및 치료의 관점에서 나노물질의 광음향 반응에 기초한 외생 조영제(exogenous contrast agent)의 개발에 의해 보다 가속화되고 있다.

[0003] 이와 관련하여, 광음향 효과를 나타내는 적합한 나노 탐침의 개발은 광음향 영상화의 효율성을 향상시키고 다양한 생물물리학적 적용을 최적화하기 위한 나노기술에 있어서 중요한 기술적 이슈이다. 게다가, 광음향 효과를 나타내는 나노 탐침의 개발 및 인공적 조작은 나노물질에 기반한 광음향 영상화의 기본적인 이해에 대한 다른 중요한 통찰력을 제공할 수 있다. 원칙적으로, 광음향 효과는 표적을 국부적으로 가열하여 결과로서 열팽창을 유발하는 짧은 펄스 방사(short-pulsed radiation)의 흡수를 통한 음파의 생성에 기인한다. 흡광계수와 흡수된 광자를 열로 전환하는 전환효율은 분자수준 흡수체와 같은 나노물질에 기초한 광음향 영상화에 있어서 광음향 신호를 생성하는 주요 인자임에도 불구하고, 나노물질의 표면환경은 광음향 효과의 효율을 결정하는 다른 변수를 제공한다. 열적 팽창을 수반하는 광음향 효과는 나노물질로부터 주위 매질로의 열적 변환을 통해 국부적으로 가열된 주변 매질로부터 생성되므로, 열적 전달 및 발산 다이내믹스와 관련된 표면 환경은 나노물질에 기초한 광음향 효과를 생성하는 민감한 인자이다.

[0004] 따라서, 나노물질에 기초한 광음향 반응에 대한 기본적인 이해를 위한 새로운 형태의 나노물질의 개발 및 조작은 광음향 영상화를 일으키는 조영제를 고안하고 최적화하는 것에 대한 중요한 단서를 제공할 수 있다.

[0005] 한편, 멜라닌(melanin)은 식물, 동물, 원생 생물 등 여러 생명체들의 다양한 부위에 존재하는 생물학적 고분자(bio-polymer)로서, 흑갈색의 유멜라닌(eumelanin)과 황적색의 페오멜라닌(pheomelanin)으로 분류된다. 상기 유멜라닌은 3,4-디하이드록시-L-페닐알라닌(3,4-dihydroxy-L-phenylalanine, L-DOPA) 또는 2-(3,4-디하이드록시페닐)에틸아민(2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethylamine, dopamine)으로부터 파생된 것이고, 상기 페오멜라닌은 시스테인(cysteine), 글루타티온(glutathione) 등의 머캡토기(-SH) 함유 물질 존재하에서 L-DOPA 또는 도파민(dopamine)으로부터 파생된 것이다. 여기서, 유멜라닌은 포유류에서 우세하게 존재하는 형태의 멜라닌으로서, 카테콜아민(catecholamine)의 산화로 유발된 o-퀴논(o-quinones)의 아민기(amine group) 부분의 분자 내 첨가(intramolecular addition)에 의해 형성된 인돌 유닛(indole units)을 포함하는 불균일한 구조의 생체 고분자로 알려져 있다.

[0006] 이러한 멜라닌은 오징어 먹물 등에 존재하는 등 자연계에 존재하는 물질이므로 종래 자연계로부터 분리하여 얻을 수 있고, 또는 효소에 의한 반응이나 산화제에 의한 반응을 포함하는 인공합성 방법에 의해서도 얻을 수 있다.

[0007] 이에 본 발명자들은 광음향 영상화를 위한 나노물질의 개발 및 이의 신호를 증폭시킬 수 있는 방법을 찾기 위하

여 예의 연구노력한 결과, 아미드기를 갖는 화합물 및 카르복시산을 갖는 화합물을 표면에 도입한 멜라닌 나노입자가 산성조건에서 선택적으로 응집되며 응집시 이의 광음향 신호를 급격히 향상시킬 수 있으므로 상기 표면을 개질한 나노입자를 산성을 나타내는 병변 검출을 위한 조영제로 사용할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 질병의 진단 및/또는 치료에 유용하게 사용될 수 있는 멜라닌 나노입자를 포함하는 광음향 영상화제를 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 멜라닌 나노입자를 포함하는 광음향 영상화제를 제공한다.

[0010] 본 발명에서 사용하는 용어 "광음향"이란, 물질이 빛을 흡수하여 국부적으로 온도가 상승하고 이것이 압력으로 서 물질 중을 전파하는 현상을 의미하는 것으로, 미소한 빛의 흡수를 고감도로 측정할 수 있고 또한 일반 광학적 방법으로는 측정하기 어려운 시료의 측정도 가능하기 때문에 분광법에 이용된다. 본 발명에서 사용하는 용어 "광음향 영상화제"란, 이러한 광음향 효과를 나타내는 물질을 의미하는 것으로, 이의 신호를 측정하여 영상화할 수 있는 물질을 의미하는 것으로, 광음향 효과에 기초하여 개발된 혼성 생물학적인 영상화 양태(hybrid biomedical imaging modality)이다. 상기 광음향 영상화는 비-이온화 레이저 펄스(non-ionizing laser pulse)를 조사하며, 상기 레이저에 의해 전달된 에너지는 조직 또는 조영제에 의해 흡수되고 열로 전환되어 일시적인 열탄성 팽창(transient thermoelastic expansion)을 유발하며 나아가 광대역(wideband; 예컨대, MHz)의 초음파 방출을 유도한다. 이때 생성되는 초음파는 초음파 변환기에 의해 검출되어 영상을 형성한다. 방출되는 초음파 방출 즉, 광음향 신호의 세기는 국부 에너지 축적(local energy deposition)에 비례한다. 상기 광음향 영상화는 조사된 광을 흡수하여 발생하는 현상이므로 광학적 흡수(optical absorption)은 상기 광음향 영상화를 위한 중요한 요소이다. 생물학적 조직에서 광학적 흡수는 헤모글로빈 또는 멜라닌과 같은 내재적 분자에 의해 또는 외부로부터 도입된 조영제(contrast agent)에 의한다.

[0011] 본 발명에 따른 광음향 영상화제는 의학적 영상화에 있어서 용이한 검출을 위해 투여되는 물질로서, 체내에 투여되므로 매우 안전한 물질이어야 하며 즉시 발현될 수 있어야 하고 드물기는 하지만 피검자에서 알레르기 반응 등이 없어야 한다. 본 발명에서는 이러한 광음향 영상화제로서 체내에서 안전하고 광음향 효과가 우수한 멜라닌 나노입자를 사용한다.

[0012] 본 발명에서 사용하는 용어 "멜라닌 나노입자"는, 나노미터 수준의 평균 직경을 갖는 매우 작은 멜라닌 입자를 의미한다. 바람직하게는 상기 멜라닌 나노입자는 30 nm 내지 600 nm의 직경을 가질 수 있다.

[0013] 상기 멜라닌 나노입자는 아민기 또는 티올기 등의 작용기와 반응성이 높아 이러한 작용기를 갖는 화합물로 멜라닌 나노입자의 표면을 용이하게 개질할 수 있다.

[0014] 상기 멜라닌 나노입자는 자연계에 존재하는 것을 분리하여 사용할 수 있다. 예컨대, 오징어 먹물로부터 추출하여 사용할 수 있다. 또는 도파민, DOPA 또는 시스테인의 멜라닌 전구체로부터 합성하여 사용할 수 있다. 예컨대, 도파민· HX^+ 함유 수용액(여기서, HX^+ 는 산입)과 염기(base)의 화학 반응에 의해 형성된 도파민을 산화시키면서 중합반응(polymerization)시켜 멜라닌을 제조할 수 있다. 상기 염기 첨가시 도파민· HX^+ 와 염기의 물비를 조절하면, 멜라닌을 일정한 형상을 갖는 입자 상태로 제조할 수 있고, 나아가 나노미터 수준으로 입자 크기가 조절된 멜라닌 입자를 제조할 수 있다.

[0015] 본 발명에서 사용되는 멜라닌 나노입자는 그 자체로 광음향 효과가 있기 때문에 특별한 개질 없이도 광음향 영상화제로 사용할 수 있다. 멜라닌 나노입자만으로는 광음향 신호는 약하고 원하는 위치 예컨대 암이나 염증성 질환과 같은 질병의 병변에 특이적으로 신호를 발생하는 것이 아니므로, 바람직하게는 멜라닌 나노입자를 응집시키는 것으로 그 신호를 강화할 수 있다.

[0016] 놀랍게도, 본 발명에 따른 멜라닌 나노입자는 특정 조건에서 응집되는 것을 확인하였고, 이에 따라 광음향 신호가 강화된다는 것을 확인하였다. 본 발명에 따른 멜라닌 나노입자가 응집되는 조건은 다양할 수 있다. 일례로, 본 발명에 따른 멜라닌 나노입자는 산성 조건에서 응집될 수 있으며, 금속이온 존재 하에 응집될 수 있으며, 또는 생체 분자 존재하에 응집될 수 있다. 이의 조건을 구체적으로 설명한다.

[0017] 먼저, 본 발명에 따른 멜라닌 나노입자는 산성 조건에서 응집될 수 있으며, 이는 멜라닌 나노입자의 표면에 산성 조건에서 응집할 수 있는 기능기를 도입함으로써 가능하다.

[0018] 산성 조건에서 응집할 수 있는 기능기의 일례로는, 카르복시기와 아민기를 들 수 있다. 카르복시기와 아민기는 산성 조건에서 이온화하여 서로 인력이 생기므로, 본 발명에 따른 멜라닌 나노입자의 표면에 이러한 카르복시기와 아민기를 가지는 화합물을 도입하면, 특정 산성 조건에서 이온화하여 각각 이웃한 멜라닌 나노입자 표면의 카르복시기 및 아민기와 인력이 생겨 멜라닌 나노입자가 서로 응집할 수 있다.

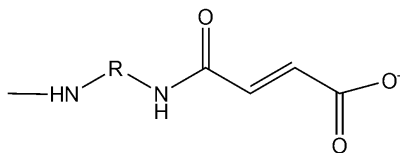
[0019] 상기 산성 조건은 바람직하게는 pH 2 내지 6인 것이 바람직하다. 이러한 특징으로 인해 본 발명에 따른 멜라닌 나노입자는 광음향 영상화에 의한 병변의 진단에 유용하게 사용될 수 있다. 일반적으로, 염증성 질환, 암질환 등의 다양한 질환이 나타나는 병변에서 국부적으로 세포 환경이 산성을 띠게 된다. 따라서, 본 발명에 따른 표면이 개질된 나노입자를 체내에 주입하면 체내를 순환하다가 산성을 띠는 병변에서 응집되어 강한 광음향 신호를 방출할 수 있다. 특히, 멜라닌 나노입자의 경우 흡수파장이 약 700 nm로 상대적으로 투과성이 높은 적외선에 가까운 장파장을 흡수하고 음파를 방출하므로 체외에서 병변을 진단할 수 있는 장점이 있다.

[0020] 상기 카르복시기 또는 아민기를 가지는 화합물의 일례는 각각 하기 화학식 1 및 2로 표시되는 화합물이다.

[0021] [화학식 1]

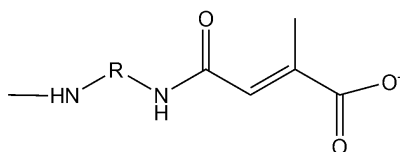
[0022] $\text{H}_2\text{N}-\text{X}-\text{NH}_2$

[0023] [화학식 2]



[0024]

[0025] 또는



[0026]

[0027] 상기 식에서,

- [0028] R는 C_{1-6} 알킬렌이다
- [0029] 상기 화학식 1 및 2는 모두 아민기를 가지고 있으며, 이러한 아민기(화학식 1의 경우 하나의 아민기)를 통하여 멜라닌 나노입자의 표면에 개질될 수 있다. 개질된 멜라닌 나노입자는 상기 화학식 1 및 2의 말단의 아민기와 카르복시기를 가지고 있기 때문에, 특정 산성 조건에서 이온화하여 각각 이웃한 멜라닌 나노입자 표면의 카르복시기 및 아민기와 인력이 생겨 멜라닌 나노입자가 서로 응집할 수 있다.
- [0030] 바람직하게 상기 X는 에틸렌($-CH_2CH_2-$)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 X는 멜라닌 나노입자가 응집체를 형성하는 경우, 입자 간에 일정한 간격을 유지하여 개별 입자의 열장(thermal field) 중첩에 의해 증폭된 광음향 신호를 발생시킬 수 있도록 할 수 있는 한, 제한없이 선택될 수 있다.
- [0031] 또한, 본 발명의 멜라닌 나노입자는 표면에 폴리에틸렌글리콜이 추가로 개질될 수 있다. 본 발명에서 사용되는 폴리에틸렌글리콜은 멜라닌 나노입자가 수용액에 잘 분산될 수 있도록 한다. 상기 폴리에틸렌글리콜의 분자량은 1 kDa 내지 40 kDa인 것이 바람직하다. 이와 같이 수용액에 대한 분산성이 향상된 나노입자는 체내에서 오래 존재할 수 있으므로 주사제나 경구투여제 등으로 전신투여하여도 상기 멜라닌 나노입자가 특정 조직이나 세포에 도달할 수 있는 충분한 시간을 확보할 수 있다. 상기 폴리에틸렌글리콜은 말단의 티올기를 통하여 멜라닌 나노입자의 표면에 개질될 수 있으며, 따라서 일반식 mPEG-SH인 것이 바람직하다.
- [0032] 본 발명에 따른 멜라닌 나노입자가 응집되는 다른 조건으로서, 금속이온 존재 하에 응집될 수 있다.
- [0033] 금속 이온 존재하에 멜라닌 나노입자가 응집할 수 있는 기능기의 일례로는, 금속 이온과 배위결합이 가능한 기능기를 들 수 있다. 본 발명에 따른 멜라닌 나노입자의 표면에 금속 이온과 배위결합이 가능한 기능기를 가지는 화합물이 도입된 경우, 금속 이온 존재시 이러한 기능기가 금속 이온과 배위결합하게 되고, 또한 금속 이온이 다른 기능기와 배위 결합하게 되어, 결과적으로 멜라닌 나노입자가 응집할 수 있다. 상기 금속 이온은 Na, Mg, Al, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Cd, Pb 등의 전이금속 및 알칼리 토금속인 것이 바람직하다. 또한, 상기 금속 이온과 배위결합이 가능한 기능기를 가지는 화합물의 일례는 하기 화학식 3 또는 4로 표시되는 화합물을 들 수 있다.
- [0034] [화학식 3]
- [0035] H_2N-R-X
- [0036] [화학식 4]
- [0037] $HS-R-X$
- [0038] 상기 식에서, X는 $-COOH$, $-NH_2$, 카테콜, 또는 포스페이트이다.
- [0039] 상기 화학식 3 및 4는 아민기 또는 티올기를 가지고 있으며, 이러한 아민기또는 티올기를 통하여 멜라닌 나노입자의 표면에 개질될 수 있다. 개질된 멜라닌 나노입자는 상기 화학식 3 및 4의 말단의 금속 이온과 배위결합이 가능한 기능기를 가지고 있기 때문에, 금속 이온이 존재하게 되면 복수의 멜라닌 나노입자가 금속 이온과 배위결합하여 멜라닌 나노입자가 서로 응집할 수 있다.
- [0040] 본 발명에 따른 멜라닌 나노입자가 응집되는 다른 조건으로서, 특정 생체 분자 존재 하에 응집될 수 있다.

발명의 효과

[0041] 본 발명에 따른 멜라닌 나노입자를 포함하는 광음향 영상화제는 암이나 염증분위와 같은 병변의 조건에서 응집되어 광음향 신호를 현저히 향상시킬 수 있다. 또한 물에 잘 분산되고, 세포 독성이 없으며, 생체 내 잔류시간이 길어 광음향 영상화제로서 질병의 진단 및/또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0042] 도 1은 본 발명의 구체적인 실시예에 따라 합성된 멜라닌-유사 나노입자의 (a) TEM 이미지, 및 상기 나노입자의 (b) 물농도 및 (c) 흡광도에 대한 광음향 신호를 나타낸 도이다. 비교예로는 메틸렌블루 및 금 나노로드를 사용하였다.

도 2는 본 발명에 따른 멜라닌 나노입자의 응집에 따른 광음향 신호에 대한 영향을 나타낸 도이다. (a)는 산성 조건에서 응집되도록 고안된 멜라닌 나노입자의 표면 개질 및 응집을 나타낸 개략도이다. 나노입자 표면에 도입된 시트라콘아미드는 산성조건에서 가수분해하여 입자 상의 양성 표면전하를 변화시켜 결과적으로 나노입자의 응집을 유도한다. (b)는 중성조건과 비교하여 산성조건에서 표면 개질된 멜라닌 나노입자를 포함하는 튜브의 광음향 종단면 이미지(photoacoustic slice vertical images)를 나타낸 도이다. (c)는 산성 및 중성조건에서 개별 함유물로부터의 시간에 대한 광음향 신호케적을 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명에 따른 표면 개질된 멜라닌 나노입자의 산성 및 중성조건에서 유체역학적 반경(hydrodynamic radii) 및 광학적 특성을 나타낸 도이다. (a)는 산성 및 중성조건에서 시간에 따른 유체역학적 반경의 변화를 나타낸 도이다. (b)는 산성 및 중성조건에서 시간에 따른 광학적 산란에 의한 흡광도($\lambda=700\text{ nm}$)의 변화를 나타낸 도이다. (c)는 산성조건에서 표면 개질된 멜라닌 나노입자의 시간에 따른 광음향 신호, 유체역학적 반경 및 흡광도($\lambda=700\text{ nm}$) 변화를 함께 나타낸 도이다. 시간이 지남에 따라 응집이 진행되어 입자의 유체역학적 반경이 증가하고 이에 따라 광음향 신호의 비선형적으로 증가하였다.

도 4는 멜라닌 나노입자의 응집에 따른 광음향 신호의 증폭 및 이에 대한 기전을 나타낸 도이다. (a)는 입자크기 변화에 따른 광음향 신호의 변화를 나타낸 도이며, (b)는 농도와 광음향 신호의 상관관계를 나타낸 도이다. (c)는 나노입자화된 광음향 영상화제로부터의 광음향 신호 발생 및 입자의 응집에 따른 신호 증폭을 설명하는 기전을 개략적으로 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0044] 제조예 1: 멜라닌 나노입자의 제조

[0045] 대한민국 등록특허 제10-1227322호에 기재된 방법에 따라 멜라닌 나노입자를 제조하였다.

[0046] 구체적으로, 도파민 하이드로클로라이드(Dopamine hydrochloride; (3,4-dihydroxyphenethylamine)HCl) 180 mg을 탈이온수(deionized water) 90 mL에 용해시켜 물 농도가 약 10.5 mmol/L인 도파민·HCl 함유 수용액(pH = 6.8)을 제조하였다. 이후, 도 7에 도시된 바와 같이, 상기 도파민·HCl 함유 수용액을 50℃의 온도에서 1N의 NaOH 760 μL 와 혼합하여(도파민·HCl : NaOH = 1 : 0.8 몰 비율) 중화반응시키면서, 5 시간 동안 공기 중에서 교반하여 중합반응을 수행하였다. 이어서, 교반 후 얻은 반응 생성물을 상온하에서 약 18,000 rpm의 속도로 약 20분간 원심 분리하여 정제하되, 이를 3회 반복하였다. 이후, 약 4,000 rpm의 속도로 약 10분간의 원심분리를 통해 크기 선별(size selection)을 실시하여 물에 분산되어 있는 멜라닌 입자 70 mg을 얻었는데, 이때 수득된 멜라닌 입자는 약 80 ~ 100 nm의 지름을 갖는 구형이었다.

[0047] 여기서, 상기 혼합 용액이 자발적으로 산화함에 따라, 도파민·HCl 함유 수용액의 pH는 약 6.8에서 NaOH의 첨가 직후 약 9.25로 변화하였다가, 점점 중성으로 변하여 NaOH 첨가 후 약 5 시간 후에는 pH 6.6 정도로 변화하였다. 이때, 상기 혼합 용액의 색은 투명 → 옅은 노란색(pale yellow) → 어두운 갈색(dark brown)으로 변화하였다. 상기 수득한 멜라닌 입자의 투과전자현미경(Transmission electron microscope, TEM) 이미지를 도 1(a)에 나타내었다.

- [0048] 상기 멜라닌 나노입자로부터의 광물리적 특성을 확인하기 위하여 5 mJ/cm^2 의 레이저 흐름을 적용하여 $\lambda=700 \text{ nm}$ 에서 광음향 반응을 물농도에 대해 플롯하여 멜라닌 나노입자의 광음향 신호 향상능을 널리 사용되는 외생(exogenous) 광음향 영상화 조영제인 금 나노로드 및 메틸렌블루(methylene blue)와 비교하여 평가하였다. 물농도에 상응하는 광음향 신호 증가율에 있어서 메틸렌블루 및 금 나노로드는 멜라닌 나노입자에 비해 각각 15.1 및 8.1배 더 높은 값을 나타내었다. 광음향 효과의 효율성이 흡수 및 흡수된 광자의 열로의 전환율에 임계적으로 의존함을 고려하여, 멜라닌 나노입자의 열적 전환율을 상응하는 흡광도에 대해 광음향 신호를 플롯하여 측정할 수 있다. 도 1c에 나타난 바와 같이, 나노입자화된 유기흡수체인 멜라닌 나노입자는 플라즈몬 나노입자보다 다소 더 높은 향상된 신호를 나타내었으며 한편, 메틸렌블루는 멜라닌 나노입자보다 2.2배 더 높은 반응을 나타내었다. 단량체의 초분자적(supramolecular) 나노응집체(nanoaggregate)로서 묘사된 폴리도파민의 최근 제안된 구조적 모델로부터 멜라닌 나노입자의 구조가 자연적 멜라닌의 광물리적 특성과 관련된 자연적 멜라닌의 구조와 유사함을 확인하였다.
- [0049] 따라서, 멜라닌 나노입자의 광음향 향상능은 생물계에서 광보호기능을 유발하는 자연적 멜라닌의 광-물리적 특성을 대표하는 넓은 띠 흡수 및 강한 비방사성 방출 특성을 유도하는 그 구조적 특성으로부터 유래할 수 있다.
- [0050] **실시예 1: 멜라닌 나노입자의 표면 개질 및 나노입자의 응집**
- [0051] 멜라닌 나노입자의 응집과 광음향 반응 간의 상관관계를 연구하기 위하여, 입자의 표면에 가수분해되기 쉬운 시트라콘산 아마이드(citraconic amide)를 도입함으로써 산성 환경에서 응집되도록 멜라닌 나노입자의 표면을 개질하였다(도 2a).
- [0052] 멜라닌 나노입자의 표면은 마이클 첨가 반응의 Schiff 염기를 통해 아민 또는 티올기로 기능화된 분자로 용이하게 개질될 수 있으므로, 잠재적 생체적합성 및 무수 시트라콘산과의 추가적인 반응을 위한 아민 말단기를 제공하기 위하여 mPEG-SH와 에틸렌디아민의 혼합물을 도입하였다.
- [0053] 구체적으로, 30 mg의 mPEG-SH(2kDa)과 90 μmol 의 에틸렌디아민을 10 mL의 MeINP용액(1 mg/mL)에 넣고 1시간 동안 격렬히 교반시킨 후 여러 번의 원심분리와 재분산을 통해 mPEG-SH와 에틸렌디아민으로 표면처리된 MeINP를 얻을 수 있었다. 이후 30 μmol 의 시트라콘산과 포스페이트 버퍼 용액(pH 9) 5 mL를 표면처리된 5 mL의 MeINP용액(1 mg/mL)에 첨가하여 12시간 동안 격렬히 교반시킨 후 여러 번의 원심분리와 재분산을 통해 시트라콘산이 반응된 MeINP를 얻을 수 있었다.
- [0054] 멜라닌 나노입자 상에 도입된 일차 아민기는 무수 시트라콘산과 반응하여 아마이드결합을 형성하였으며, 이때 각 단계에서 제타전위를 특정하여 표면 개질의 각 단계를 모니터링할 수 있었다. 멜라닌 나노입자에 대한 모든 표면 개질 단계 후 상기 입자는 산성 환경에서 특이적으로 응집되었다. 반면, 개질되지 않은 멜라닌 나노입자 및 PEG화한 멜라닌 나노입자는 중성 및 산성환경 모두에서 각각 비특이적 응집 또는 안정성을 나타내었다. 상기 멜라닌 나노입자의 표면 개질과정 및 pH 변화에 따른 응집 기전을 도 2(a)에 나타내었다.
- [0055] 산성조건에서 개질된 멜라닌 나노입자 표면으로부터의 광음향 신호의 변이를 측정하여 중성조건에서의 결과와 비교하여 광음향 반응의 응집 유도 증폭을 확인하였다. 도 2에 나타난 바와 같이, 산성조건에서 표면 개질된 멜라닌 나노입자를 포함하는 튜브의 광음향 종단면 이미지는 시간이 지남에 따라 증가하는 세기를 나타내는 반면 중성조건에서의 결과는 안정하였다. 각 함유물(inclusion)으로부터 광음향 신호의 시간 궤적(time course)은 산성조건에 노출된 후 1시간까지 증가하는 신호 세기를 나타내었으며, 향상된 세기는 90분까지 안정하였다. 흥미롭게도, 향상된 광음향 신호는 중성조건에서의 결과와 비교하여 27배 더 높은 값을 나타내었다(도 2c).

[0056] 실시예 2: 나노입자의 응집에 의한 광음향 신호의 비선형적 증가

[0057] 표면 개질된 멜라닌 나노입자로부터의 광음향 신호의 현저한 증폭은 이들의 물리적 응집과 밀접하게 관련되었다. 멜라닌 나노입자의 pH-유도 응집을 가능하게 한 표면 화학의 결과로서, 멜라닌 나노입자의 유체역학적 반경(hydrodynamic radius)은 산성조건에서 증가되어 중성조건에서의 결과보다 10.8배 높은 값을 나타내었다(도 3a). 특히, 산성조건에서 유체역학적 반경의 증가율은 약 60 내지 90분에 포화되었으며, 이는 광음향 신호의 증폭에서의 경향과 일치하였다.

[0058] 광음향 반응의 변화에 관여하는 다른 인자는 나노입자화된 흡수체(absorber)에 의한 흡수이다. 이러한 견지에서, 유체역학적 반경의 증가로 인해 광학적 산란의 발생에 의해 유도되는 흡수($\lambda=700$ nm)의 증가는 광음향 신호의 응집-유도 증폭과 관련된 중요한 인자일 수 있다. 그러나, 광학적 산란에 의한 흡광도 변화는 중성조건에서의 결과와 비교하여 단지 1.3배 더 높으며 광음향 신호 및 유체역학적 반경의 변화에 비교하면 무시할 만하다. 또한 광학적 산란 증가율은 산성조건에 노출 후 30분 이내에서 안정화되며 이는 광음향 신호 및 유체역학적 반경에 대한 결과와 일치하지 않는다. 따라서, 변화량 및 그 경향에 있어서 물리적 응집이 광학적 산란보다 광음향 신호의 현저한 증가를 유도하는 주된 인자일 수 있다.

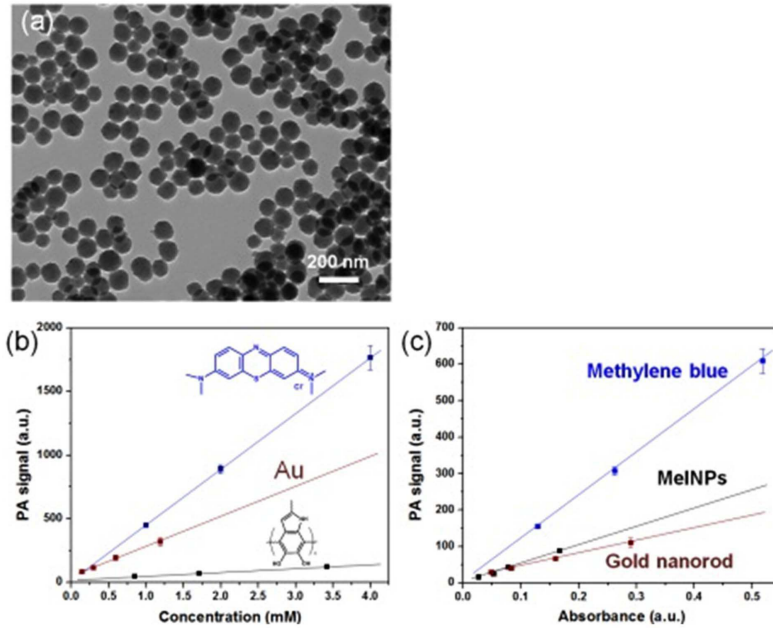
[0059] 멜라닌 나노입자로부터의 광음향 반응의 증폭이 여기 과정에서 광학적 산란의 변이 보다는 주로 이들의 물리적 응집에 의해 촉진됨을 고려할 때, 광음향 반응과 물리적 응집 간의 상관관계는 광음향 신호를 멜라닌 나노입자의 물리적 응집과 관련된 유체역학적 반경의 함수로 플롯팅함으로써 나타낼 수 있다(도 4a). 멜라닌 나노입자로부터의 광음향 신호의 증폭은 응집된 나노입자 주위의 열적 프로파일의 중첩에 의한 국부적 가열의 증가에 의해 유발될 수 있는 유체역학적 반경에 비선형적으로 비례한다. 본 발명에서 멜라닌 나노입자의 응집을 통한 광음향 반응의 증가는 최근 보고된 실리카의 응집을 통한 광음향 반응의 증폭에 대한 결과와 일치하며 이에 대한 제안된 기전은 도 4c에 나타난 바와 같이 나노입자화된 흡수체의 응집에 의해 유도된 광음향 반응의 증폭을 설명하기에 타당하다. 광음향 반응은 일반적으로 나노입자를 둘러싼 유체가 펄스로 주어지는 레이저 에너지를 흡수하는 나노입자에 의해 국부적으로 가열된 환경으로부터 생성된다. 광음향 반응의 증폭은 레이저 펄스폭의 시간 범위 내에서 나노입자 주위 유체의 온도 프로파일의 기울기에 대략적으로 비례하며 결과적으로 광음향 반응의 신호 세기는 나노입자로부터 주변 용매로의 열전달 및 주변 용매의 열발산 다이내믹스의 변화를 유도하는 표면환경에 의해 민감하게 영향을 받는다. 그러나, 상기 모델시스템에는 멜라닌 나노입자를 통한 물리적 응집을 제외하고는 열적다이내믹스와 관련된 표면환경 변화에 기여하는 인자가 존재하지 않는다. 따라서, 멜라닌 나노입자의 응집을 통한 광음향 반응의 증폭은 주로 멜라닌 나노입자를 둘러싼 유체의 중첩된 열유동장(thermal field)으로부터 유래되는 것으로 예상된다.

[0060] 추가적으로, 멜라닌 나노입자의 농도와 광음향 신호의 비선형 상관관계는 광음향 신호의 증폭이 향상된 음파를 유도하는 나노입자 주변의 열충의 커플링에 의해 유도됨을 제시한다. 나노입자의 농도가 증가함에 따라 브라운 운동을 하는 각각의 단일 나노입자 간의 접촉 기회가 증가될 수 있으므로, 펄스로 주어지는 레이저 흐름 하에서 각각의 멜라닌 나노입자 간의 열적 커플링 가능성은 멜라닌 나노입자의 농도에 따라 증가할 수 있다. 도 4b에 나타난 바와 같이, 물에 균일하게 분산된 멜라닌 나노입자는 1 mg/ml에 달할 때까지 농도에 대해 선형적 광음향 신호 세기를 나타내었으나, 2 mg/ml을 초과하는 농도에서 비선형적 광음향 신호 세기를 나타내었다.

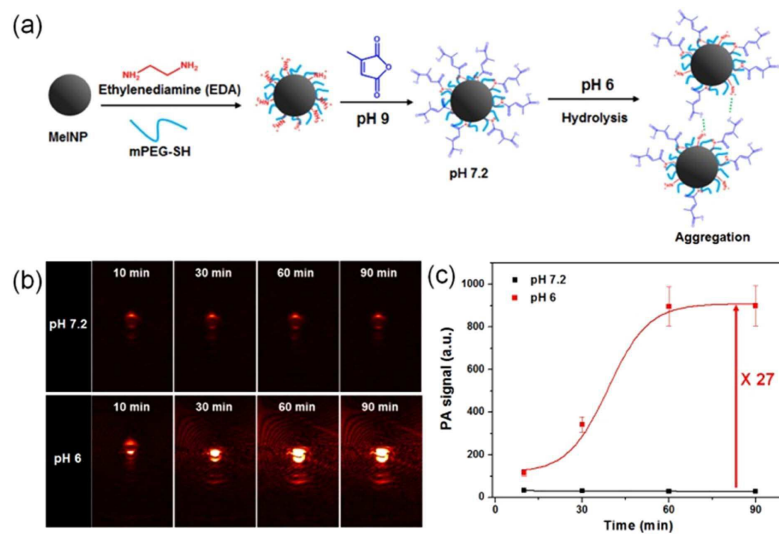
[0061] 그 결과로서, 멜라닌 나노입자로부터의 광음향 신호의 증폭은 열적 커플링에 대한 확률을 증가시키는 임계 농도를 초과하는 농도의 증가를 통해 균일하게 분산된 멜라닌 나노입자 수용액에서 생성될 수 있으며, 광음향 반응의 증폭을 유도하는 응집은 광음향 반응과 임계 농도를 초과하는 농도 간의 비선형적 상관관계에 의해 확인할 수 있었다.

도면

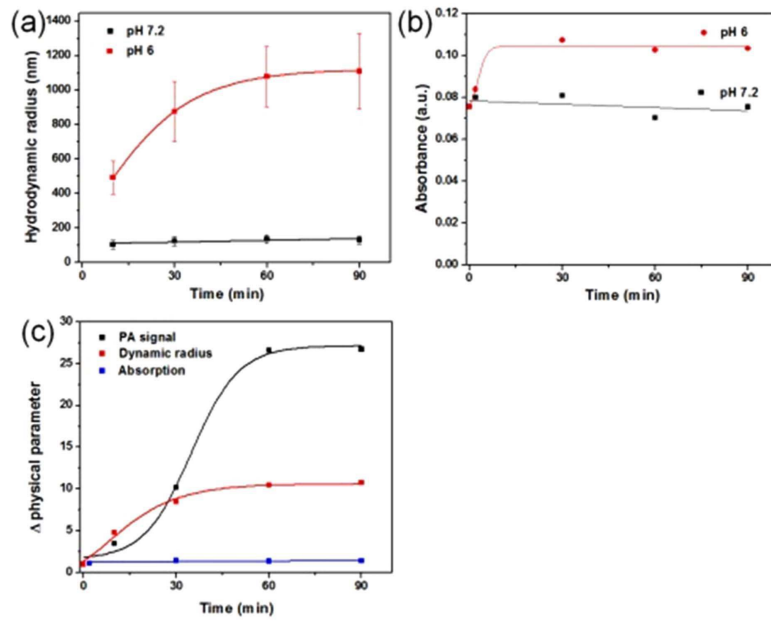
도면1



도면2



도면3



도면4

