(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0099881
(43) 공개일자 2023년07월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 33/34 (2006.01) *A61K 33/26* (2006.01)
A61K 49/18 (2006.01) *A61K 9/14* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 33/34 (2013.01)
A61K 33/26 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0189295
(22) 출원일자 2021년12월28일
심사청구일자 2021년12월28일

(71) 출원인
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
기초과학연구원
대전광역시 유성구 엑스포로 55(도룡동)
(72) 발명자
현택환
서울특별시 관악구 관악로 1 서울대학교
구사강
서울특별시 관악구 관악로 1 서울대학교
(74) 대리인
강문호

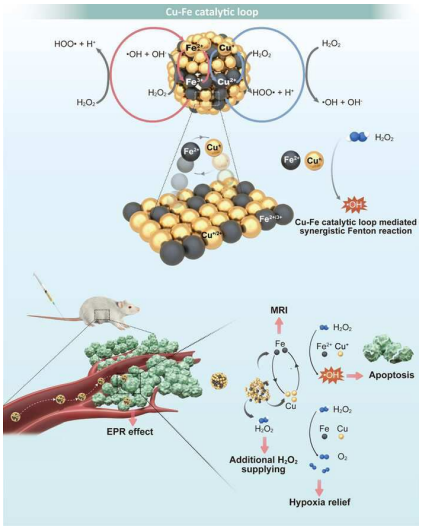
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **구리-철 페록사이드 나노입자**

(57) 요 약

구리-철 페록사이드 나노입자가 제공된다. 상기 구리-철 페록사이드 나노입자는 구리-철 페록사이드를 포함한다. 상기 구리-철 페록사이드 나노입자는 종양 미세환경에서 구리 이온 및 철 이온을 방출할 수 있다. 상기 구리-철 페록사이드 나노입자는 종양 미세환경에서 과산화수소를 방출할 수 있고, ·OH와 산소를 생성할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 49/1818 (2013.01)
A61K 9/14 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711134284
과제번호	IBS-R006-D1-2021-A00
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	기초과학연구원
연구사업명	기초과학연구원연구운영비지원(R&D)
연구과제명	나노입자의 합성과 의료, 에너지 분야 응용
기 여 율	1/1
과제수행기관명	서울대학교 산학협력단
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

구리-철 페록사이드를 포함하는 구리-철 페록사이드 나노입자.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 구리-철 페록사이드 나노입자는 종양 미세환경에서 구리 이온 및 철 이온을 방출하는 것을 특징으로 하는 구리-철 페록사이드 나노입자.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 구리 이온은 Cu^{+} 및 Cu^{2+}를 포함하고,

상기 철 이온은 Fe^{2+} 및 Fe^{3+}를 포함하며,

상기 Cu^{+}는 상기 Fe^{3+}에서 상기 Fe^{2+}로의 전환을 촉진하는 것을 특징으로 하는 구리-철 페록사이드 나노입자.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 구리-철 페록사이드 나노입자는 구리 대 철의 비율이 5:5 ~ 8:2인 것을 특징으로 하는 구리-철 페록사이드 나노입자.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 구리-철 페록사이드 나노입자는 구리 대 철의 비율이 7:3인 것을 특징으로 하는 구리-철 페록사이드 나노입자.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 구리-철 페록사이드 나노입자는 종양 미세환경에서 과산화수소를 방출하는 것을 특징으로 하는 구리-철 페록사이드 나노입자.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 구리-철 페록사이드 나노입자는 종양 미세환경에서 $\cdot OH$ 를 생성하는 것을 특징으로 하는 구리-철 페록사이드 나노입자.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

상기 구리-철 페록사이드 나노입자는 종양 미세환경에서 산소를 생성하는 것을 특징으로 하는 구리-철 페록사이드 나노입자.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

상기 구리-철 페록사이드 나노입자는 종양 미세환경에서 종방향 이완성이 증가하는 것을 특징으로 하는 구리-철 페록사이드 나노입자.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

상기 구리-철 페록사이드 나노입자의 농도를 조절하는 것에 의해 MR 이미지의 밝기가 조절되는 것을 특징으로 구리-철 페록사이드 나노입자.

청구항 11

제 1 항에 있어서,

상기 구리-철 페록사이드 나노입자는 종양 치료에 사용되는 종양 치료용 나노입자인 것을 특징으로 하는 구리-철 페록사이드 나노입자.

청구항 12

제 1 항에 있어서,

상기 구리-철 페록사이드 나노입자는 MRI 조영에 사용되는 MRI 조영제용 나노입자인 것을 특징으로 하는 구리-철 페록사이드 나노입자.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 구리-철 페록사이드 나노입자에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 펜톤 반응을 이용하여 독성이 높은 하이드록실 라디칼(·OH)을 생성하는 화학역학 치료(Chemodynamic Therapy, CDT)는 정상 세포에 부작용을 거의 미치지 않으면서 암 세포의 세포 사멸을 유발할 수 있는 종양 치료 기술 중 하나이다. 그러나, 기존의 화학역학 치료는 종양 미세환경의 약한 산성 조건에서 반응 속도가 낮아 ·OH를 효과적으로 생성하기가 어려워 치료 효과가 미흡한 문제가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0003] 본 발명은 화학역학 치료에 적용될 수 있는 나노입자를 제공한다.

[0004] 본 발명은 신규의 구리-철 페록사이드 나노입자를 제공한다.

[0005] 본 발명의 다른 목적들은 다음의 상세한 설명과 첨부한 도면으로부터 명확해 질 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명의 실시예들에 따른 구리-철 페록사이드 나노입자는 구리-철 페록사이드를 포함한다.

[0007] 상기 구리-철 페록사이드 나노입자는 종양 미세환경에서 구리 이온 및 철 이온을 방출할 수 있다. 상기 구리 이온은 Cu^{+} 및 Cu^{2+}를 포함할 수 있고, 상기 철 이온은 Fe^{2+} 및 Fe^{3+}를 포함할 수 있으며, 상기 Cu^{+}는 상기 Fe^{3+}에서 상기 Fe^{2+}로의 전환을 촉진할 수 있다.

[0008] 상기 구리-철 페록사이드 나노입자는 구리 대 철의 비율이 5:5 ~ 8:2일 수 있다. 상기 구리-철 페록사이드 나노입자는 구리 대 철의 비율이 7:3일 수 있다.

[0009] 상기 구리-철 페록사이드 나노입자는 종양 미세환경에서 과산화수소를 방출할 수 있다. 상기 구리-철 페록사이드 나노입자는 종양 미세환경에서 ·OH 를 생성할 수 있다. 상기 구리-철 페록사이드 나노입자는 종양 미세환경에서 산소를 생성할 수 있다.

[0010] 상기 구리-철 페록사이드 나노입자는 종양 미세환경에서 종방향 이완성이 증가할 수 있다. 상기 구리-철 페록사이드 나노입자의 농도를 조절하는 것에 의해 MR 이미지의 밝기가 조절될 수 있다.

[0011] 상기 구리-철 페록사이드 나노입자는 종양 치료에 사용되는 종양 치료용 나노입자일 수 있다. 상기 구리-철 페록사이드 나노입자는 MRI 조영에 사용되는 MRI 조영제용 나노입자일 수 있다.

발명의 효과

[0012] 본 발명의 실시예들에 따른 구리-철 페록사이드 나노입자는 신규 소재로서 종양 치료에 우수한 효과를 가질 수 있다. 또, 상기 구리-철 페록사이드 나노입자는 종양 등의 질병 진단 및 모니터링에도 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 본 발명의 실시예들에 따른 구리-철 페록사이드 나노입자에 의한 시너지 펜톤 반응을 설명하기 위한 도면이다.

도 2는 Cup 나노입자 및 7CFp 나노입자의 Cu 2p XPS(X-ray photoelectron spectroscopy) 분석 결과를 나타낸다.

도 3은 Cup 나노입자 및 7CFp 나노입자의 ESR(electron spin resonance) 분석 결과를 나타낸다.

도 4는 Cup 나노입자 및 7CFp 나노입자 내 C=O, O-O, 및 산소 빈자리의 양적 분포를 나타낸다.

도 5는 CFp 나노입자의 시너지 촉매 루프를 개략적으로 나타낸다.

도 6은 pH 7.4 및 pH 6에서 각각 CFp 나노입자의 Cu 이온 및 Fe 이온의 누적 방출 프로파일을 나타낸다.

도 7은 pH 7.4 및 pH 6에서 각각 CFp 나노입자의 환원된 상태의 Cu 이온의 비율을 나타낸다.

도 8은 pH 7.4 및 pH 6에서 각각 CFp 나노입자의 환원된 상태의 Fe 이온의 비율을 나타낸다.

도 9는 pH 6에서 CFp 나노입자의 ·OH 생성 효율을 나타낸다.

도 10은 pH 6에서 펜톤 반응 동안 Fep 나노입자 및 7CFp 나노입자에서 용해되는 Fe^{2+}/Fe^{3+} 비율의 변화를 나타낸다.

도 11은 pH 6에서 Cup 나노입자, Fep 나노입자, 및 7CFp 나노입자의 O_2 생성 프로파일을 나타낸다.

도 12는 pH 6 및 pH 7.4에서 7CFp 나노입자의 MRI r_1 값을 나타낸다.

도 13은 저산소의 pH 6에서 PBS 또는 나노입자 처리 후 DCFH-DA 염색된 U87MG 세포의 형광 강도를 나타낸다.

도 14는 정상 산소 또는 저산소의 pH 6에서 PBS 또는 7CFp 나노입자 처리 후 U87MG 세포의 형광 강도를 나타낸다.

도 15는 7CFp 나노입자의 정맥 주입 전과 주입 후 24시간 뒤의 U87MG 종양 보유 마우스의 T1 강조 MR 이미지를 나타낸다.

도 16은 도 15에서 종양 대 정상 조직의 MRI 신호 강도 비율을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 이하, 실시예들을 통하여 본 발명을 상세하게 설명한다. 본 발명의 목적, 특징, 장점은 이하의 실시예들을 통해 쉽게 이해될 것이다. 본 발명은 여기서 설명되는 실시예들에 한정되지 않고, 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 여기서 소개되는 실시예들은 개시된 내용이 철저하고 완전해질 수 있도록 그리고 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 제공되는 것이다. 따라서, 이하의 실시예들에 의하여 본 발명이 제한되어서는 안 된다.

[0016] 본 발명의 실시예들에 따른 구리-철 페록사이드 나노입자는 구리-철 페록사이드를 포함한다.

[0017] 상기 구리-철 페록사이드 나노입자는 종양 미세환경에서 구리 이온 및 철 이온을 방출할 수 있다. 상기 구리 이온은 Cu^{+} 및 Cu^{2+}를 포함할 수 있고, 상기 철 이온은 Fe^{2+} 및 Fe^{3+}를 포함할 수 있으며, 상기 Cu^{+}는 상기 Fe^{3+}에서 상기 Fe^{2+}로의 전환을 촉진할 수 있다.

[0018] 상기 구리-철 페록사이드 나노입자는 종양 미세환경에서 과산화수소를 방출할 수 있고, ·OH와 산소를 생성할 수 있다.

[0020] [구리-철 페록사이드 나노입자의 합성예]

[0021] PVP(3g)를 15ml의 증류수에 용해시켜 PVP 용액을 형성한다. 소정의 비율로 $CuCl_2 \cdot 2H_2O$(0.02M) 및 $FeCl_2 \cdot 4H_2O$(0.02M)를 함유하는 2개의 수용액 혼합물을 상기 PVP 용액에 첨가하고 교반한다. NaOH(30mL, 0.02M) 및 H_2O_2(600μL, 9.8M)를 첨가하고, 30분 동안 빠르게 교반한다. 반응 후 초원심분리를 통해 구리-철 페록사이드 나노입자를 증류수로 여러 번 세척하고 0.2μm 필터를 사용하여 여과한다.

[0023] 도 1은 본 발명의 실시예들에 따른 구리-철 페록사이드 나노입자에 의한 시너지 펜톤 반응을 설명하기 위한 도면이다.

[0024] 도 1을 참조하면, 상기 구리-철 페록사이드(CFp) 나노입자는 향상된 종양 치료를 위해 종양 미세환경에 대한 감응성 방식으로 시너지 펜톤 반응(synergistic Fenton reaction)을 촉매한다. CFp 나노입자는 EPR(Enhanced Permeability and Retention) 효과에 의해 종양 세포를 표적으로 하고 종양 미세환경의 약산성 조건에서 분해되어 유리 금속 이온(free metal ion)과 과산화수소(H_2O_2)를 방출하며, 이들 모두는 시너지 펜톤 반응을 유도한다. 방출된 Cu 이온 및 Fe 이온은 상응하는 단일 금속 성분 나노입자에 의해 방출될 수 있는 것보다 더 낮은 산화 상태에서 더 큰 부분으로 Cu-Fe 촉매 루프를 통해 펜톤 반응을 협력적으로 촉진하여 종양에서 독성 ·OH 수준을 증가시킨다.

[0025] 가장 높은 Cu^{+}/Cu^{2+} 비율 및 Fe^{2+}/Fe^{3+} 비율을 얻기 위해 적절한 비율로 두 종류의 양립가능한 금속 이온을 결합하는 것이 단일 유형 금속 이온에 비해 촉매 성능에서 큰 개선을 가져올 수 있다. 특히, 7:3의 최적 Cu:Fe 비율로 합성된 CFp 나노입자(7CFp 나노입자)는 동물 실험에서 3.7mg/kg의 낮은 용량으로 종양을 성공적으로 제거할 수 있었다. 종양 미세환경에서 선택적으로 발생하는 이러한 시너지 펜톤 촉매 효과는 암 치료 효능이 향상되고 정상 조직에 미치는 영향이 최소화된 향상된 CDT(Chemodynamic therapy)에 유용한 기반을 제공한다. 7CFp 나노입자의 우수한 O_2 생성 특성은 임상에서 고형 종양 치료 실패의 주요 원인이었던 종양 저산소증을 완화할 수 있다. 또, 7CFp 나노입자의 pH 감응성 분해는 자기공명영상(MRI)으로 종양 부위를 찾는 것을 가능하게 하여 조기 암 진단을 위한 또 다른 유용성을 제공한다.

[0027] CFp 나노입자($Cu_xFe_{1-x}p$, x = 1, 0.8, 0.7, 0.5, 0.2 및 0일 때 각각 Cup, 8CFp, 7CFp, 5CFp, 2CFp 및 Fep로 표시됨)는 종양 미세환경에서 조성 의존적 상승 촉매 작용을 조사하기 위해 다양한 Cu 대 Fe 비율로 합성하였다. CFp 나노입자는, 예를 들어, 3nm 크기와 7nm의 평균 유체역학 직경을 가질 수 있으며 물에 잘 분산되어 암을 수동적으로 표적화하는 데 유리하다. EDS(energy-dispersive spectroscopy)에 의한 원소 매핑에 따르면 Cu 원소 및 Fe 원소는 나노입자 전체에 걸쳐 공존하며 균일하게 분포한다. XRD(X-ray diffraction) 분석에 따르면 7CFp 나노입자는 Cup 나노입자와 Fep 나노입자 사이의 중간 패턴을 나타낸다.

[0029] 도 2는 Cup 나노입자 및 7CFp 나노입자의 Cu 2p XPS 분석 결과를 나타낸다. 환원된 상태의 Cu^{+}는 Fe^{3+}에서 Fe^{2+}로의 전환과 펜톤 유사 반응을 통한 ·OH 생성 모두에서 중요한 역할을 하는데, XPS(X-ray photoelectron

spectroscopy) 분석을 수행하여 CFp 나노입자의 표면 구성과 원자가 전자 상태를 확인하였다.

[0030] 도 2를 참조하면, Cu $2p_{3/2}$ 및 Cu $2p_{1/2}$에 두 개의 개별 Cu 피크가 할당된다. 해당 결합 에너지는 Cup 나노입자의 경우 933.5eV 및 953.5eV이며, 7CFp 나노입자의 경우 932.7eV 및 952.3eV의 더 낮은 값으로 이동한다. 또, Cup 나노입자에 대해 약 943eV에서 관찰된 Cu^{2+}의 특징적인 위성 피크는 7CFp 나노입자에서는 더 약한 것으로 측정되었다. 이러한 결과는 7CFp 나노입자가 Cup 나노입자에 비해 Cu^{2+}의 비율이 더 낮으므로 Cu^{+}/Cu^{2+} 비율이 더 높다는 것을 나타낸다. 또, Cu^{+}/Cu^{2+} 비율은 7CFp 나노입자에서는 1.69이고, Cup 나노입자에서는 0.52로, 7CFp 나노입자가 Cup 나노입자보다 3배 이상 더 높은 것으로 나타났다. 이러한 환원 경향은 Cu-Fe 이종 시스템에서 산소 빈자리(oxygen vacancy)의 증가된 결합과 과잉 전자의 이동에 기인한다.

[0032] 도 3은 Cup 나노입자 및 7CFp 나노입자의 ESR 분석 결과를 나타내고, 도 4는 Cup 나노입자 및 7CFp 나노입자 내 C=O, O-O, 및 산소 빈자리의 양적 분포를 나타낸다. ESR(electron spin resonance) 분광법을 이용하여 7CFp 나노입자에서 산소 빈자리의 증가를 확인할 수 있고, Cup 나노입자 및 7CFp 나노입자의 산소 빈자리 농도는 O 1s에 대한 XPS 분석에 의해 정량화된다.

[0033] 도 3을 참조하면, 7CFp 나노입자는 g-인자 = 2.003에서 강한 ESR 신호를 나타내며, 이는 산소 빈자리에 갇힌 짝을 이루지 않은 전자에 해당한다. 대조적으로 Cup 나노입자에서는 훨씬 약한 신호가 감지된다.

[0034] 도 4를 참조하면, 7CFp 나노입자의 산소 빈자리 농도는 4.04%로 계산되었으며, Cup 나노입자(1.29%)의 산소 빈자리 농도보다 3배 이상 더 크다. 또, 암세포에서 펜톤 반응을 위한 H_2O_2 공급에 기여하는 퍼옥소기(O-O)의 농도는 7CFp 나노입자의 경우 1.4%로 Cup 나노입자(0.71%)에 비해 2배 더 크다.

[0035] XPS 및 ESR 데이터는 7CFp 나노입자에 더 많은 산소 빈자리와 퍼옥소기가 존재함을 보여주며, 이는 각각 Cu 이온에 대한 환원 경향을 야기하고 종양에서 H_2O_2 공급을 위한 추가 공급원으로 작용하여 더 높은 치료 효과를 유도한다.

[0037] 라만 분광법을 이용하여 7CFp 나노입자에서 O-O 결합의 존재를 확인할 수 있다. 853cm^{-1}에서의 피크는 O-O 신축 진동에 할당되며, 이는 각각 852.6cm^{-1} 및 850.6cm^{-1}에서 Cup 나노입자 및 Fep 나노입자에서도 관찰된다. 그러나 산화구리 나노입자 및 산화철 나노입자의 라만 스펙트럼에서는 이러한 피크가 관찰되지 않는다. 7CFp 나노입자의 H_2O_2 자가 공급 능력을 확인하기 위해 과망간산칼륨 기반 비색 분석을 적용하여 산성 조건에서 나노입자에 의한 H_2O_2 형성을 평가하였다. 과망간산칼륨 용액이 7CFp 나노입자와 반응하면 7CFp 나노입자에서 생성된 H_2O_2에 의해 과망간산염 이온(MnO_4^-)이 망간 이온(Mn^{2+})으로 환원되어 용액의 색이 보라색에서 무색으로 변한다. 또, 7CFp 나노입자 이외의 다른 CFp 나노입자도 H_2O_2 생성 활성을 갖는 것으로 확인되었다. 그러나, 산화구리 나노입자와 산화철 나노입자는 식별 가능한 색상 변화가 관찰되지 않는다.

[0039] 도 5는 CFp 나노입자의 시너지 촉매 루프를 개략적으로 나타낸다.

[0040] 도 5를 참조하면, CFp 나노입자는 약산성의 종양 미세환경에 반응하여 Cu 이온 및 Fe 이온을 방출하고, 방출된 Cu 이온 및 Fe 이온은 촉매 루프를 형성하여 서로 다른 산화 상태를 갖는 금속 이온 간의 상호 전환을 촉진하여 시너지 펜톤 반응을 유도한다. 상기 CFp 나노입자의 시너지 효과는 금속 이온의 독립적인 작용보다는 Cu^{+}에 의한 Fe^{3+}에서 Fe^{2+}로의 전환과 밀접하게 관련된다는 점에서 종래의 화학역학 치료 시스템과 차별화된다.

[0042] 도 6은 pH 7.4 및 pH 6에서 각각 CFp 나노입자의 Cu 이온 및 Fe 이온의 누적 방출 프로파일을 나타내고, 도 7은 pH 7.4 및 pH 6에서 각각 CFp 나노입자의 환원된 상태의 Cu 이온의 비율을 나타내며, 도 8은 pH 7.4 및 pH 6에서 각각 CFp 나노입자의 환원된 상태의 Fe 이온의 비율을 나타낸다. Cu 이온 및 Fe 이온의 pH 의존적 방출은 각

각 pH 7.4 및 6 완충액을 사용하여 정상적인 생리학적 및 약산성 종양 미세환경 조건을 모델링하여 확인되었다.

[0043] 도 6을 참조하면, Cu와 Fe의 93% 이상이 pH 6에서 24시간 이내에 이온으로 방출되지만 pH 7.4에서는 미미한 수준이다. 이러한 결과는 CFp 나노입자가 약산성의 종양 미세환경에서 Cu 이온 및 Fe 이온으로 분해된다는 것을 나타낸다.

[0044] ·OH를 생성하기 위한 펜톤 반응의 촉매 성능은 낮은 산화 상태인 Fe^{2+} 및 Cu^{+} 이온의 가용성에 따라 달라진다. 따라서 Fe^{2+} 및 Cu^{+} 이온의 더 많은 부분을 방출할 수 있는 CFp 나노입자는 Cup 나노입자 또는 Fep 나노입자에 비해 더 높은 펜톤 촉매 효율을 나타낼 수 있다. Cu^{+} 이온은 Fe^{3+}에서 Fe^{2+} 이온으로의 환원도 적극적으로 촉진한다.

[0045] 도 7 및 도 8을 참조하면, 다양한 Cu:Fe 조성에서 합성된 CFp 나노입자의 용해된 Cu^{+}/Cu^{2+} 비율 및 Fe^{2+}/Fe^{3+} 비율을 조사하였다. pH 6에서 7CFp 나노입자는 Cu와 Fe 모두에서 가장 높은 환원 상태 비율을 나타내며 값은 Cup 나노입자 및 Fep 나노입자의 값의 각각 3.7배 및 7.9배이다. 그러나 pH 7.4에서는 나노입자 간에 차이가 감소한다.

[0047] 도 9는 pH 6에서 CFp 나노입자의 ·OH 생성 효율을 나타낸다.

[0048] 도 9를 참조하면, Cu 이온과 Fe 이온 사이의 시너지 효과는 7CFp 나노입자의 펜톤 촉매 작용을 향상시키며, 가장 높은 Cu^{+}/Cu^{2+} 비율 및 Fe^{2+}/Fe^{3+} 비율에서 가장 높은 ·OH 생성 성능을 나타낸다. Cu-Fe 산화환원 사이클이 이온화된 Cu와 Fe에 의해서 활성화된다는 것은 펜톤 반응에서 효율 증가가 주로 Fe^{3+} 이온의 Cu^{+} 매개 환원에서 기인한다는 것을 나타낸다. 시너지 작용으로 인한 이러한 현저한 향상은 약산성 종양 미세환경과 유사한 pH 6 조건에서 나타나는 반면, 조성에 의한 펜톤 반응성의 차이는 정상 조직 유사 pH 7.4에서는 미미해진다. 즉, 7CFp 나노입자-매개 펜톤 반응은 종양 미세환경에 특이적이고 Cu-Fe 촉매 루프에서 더 높은 Cu^{+}/Cu^{2+} 비율 및 Fe^{2+}/Fe^{3+} 비율이 ·OH 생성을 증폭한다. pH 5.5에서 훨씬 더 큰 펜톤 효율을 얻을 수 있지만, 종양 미세환경의 약산성 조건을 보다 적절하게 모방하기 위해 pH 6을 표준으로 사용하였다.

[0050] 도 10은 pH 6에서 펜톤 반응 동안 Fep 나노입자 및 7CFp 나노입자에서 용해되는 Fe^{2+}/Fe^{3+} 비율의 변화를 나타낸다.

[0051] 도 10을 참조하면, 용해되는 Fe^{2+}/Fe^{3+} 비율은 펜톤 반응 동안 7CFp 나노입자에 의해 지속적으로 증가하며, 단일 금속 성분의 Fep 나노입자와 뚜렷한 대조를 이룬다. 이는 Cu-Fe 바이메탈 시스템에서 Cu 이온의 도움으로 Fe^{3+}에서 Fe^{2+}로의 전환 효율이 향상되었음을 나타낸다.

[0053] 도 11은 pH 6에서 Cup 나노입자, Fep 나노입자, 및 7CFp 나노입자의 O_2 생성 프로파일을 나타낸다. 촉매 활성의 시너지 효과는 우수한 O_2 생성 특성으로 이어지며, 이는 7CFp 나노입자의 시간 의존적 O_2 생성 프로파일을 단일 금속 성분의 Cup 나노입자 및 Fep 나노입자의 생성 프로파일과 비교함으로써 확인된다.

[0054] 도 11을 참조하면, 7CFp 나노입자는 O_2 생성 효율 측면에서 다른 나노입자보다 우수하다. 또, 7CFp 나노입자의 O_2 생성은 종양의 실제 세포 내 농도를 반영하는 100 μM H_2O_2를 갖는 종양 미세환경 유사 저산소 조건에서도 발생할 수 있다.

[0056] 도 12는 pH 6 및 pH 7.4에서 7CFp 나노입자의 MRI r_1 값을 나타낸다. 도 12에 삽입된 이미지는 pH 6에서 T1 강조 MR 이미지를 나타낸다.

[0057] 도 12를 참조하면, 7CFp 나노입자의 pH 감응성 분해와 그에 따른 Fe 이온 방출은 T1 MRI를 용이하게 한다. 종방

향 이완성(r_1)은 pH 6의 종양 미세환경과 같은 산성 조건에 노출되면 pH 7.4의 $0.18mM^{-1}s^{-1}$에서 $3.58mM^{-1}s^{-1}$로 크게 증가한다. 또, 7CFp 나노입자의 농도에 따라 MR 이미지의 밝기가 달라진다. 따라서, 7CFp 나노입자의 농도를 조절하여 MR 이미지의 밝기를 조절할 수 있다. 이 MRI 대비 향상은 종양 치료 및 진단에 7CFp 나노입자가 효과적으로 사용될 수 있음을 나타낸다.

[0059] 7CFp 나노입자를 이용하여 가장 공격적이고 저산소 상태인 종양 세포 중 하나로 알려진 인간 교모세포종 암 세포주(U87MG)에 대하여 시험관 내 연구를 수행하였다. Cup 나노입자와 Fep 나노입자의 물리적 혼합물(Cup+Fep 나노입자), Cup 나노입자, 및 Fep 나노입자는 Cu-Fe 바이메탈 과산화물 나노입자의 시너지 효과를 명확하게 구별하기 위해 대조군으로 사용하였다. 나노입자에 의해 유도된 ·OH에 의해 DCFH-DA(2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate)를 산화시킨 후 DCF(2',7'-dichlorofluorescein)의 녹색 형광 신호를 측정하여 7CFp 나노입자의 세포내 ·OH 생성 활성을 평가하였다.

[0061] 도 13은 저산소의 pH 6에서 PBS 또는 나노입자 처리 후 DCFH-DA 염색된 U87MG 세포의 형광 강도를 나타낸다.

[0062] 도 13을 참조하면, 7CFp 나노입자로 처리된 U87MG 세포는 PBS(phosphate-buffered saline) 처리 그룹에 비해 현저하게 향상된 녹색 형광을 나타낸다. 반대로, Fep 나노입자로 처리된 세포는 무시할 만한 형광을 나타내며, Cup 나노입자 및 Cup+Fep 나노입자로 처리된 세포에서는 약간 증가한 형광만 관찰된다. 이러한 결과는 Cu 이온과 Fe 이온의 물리적 혼합이 약간의 시너지 효과를 가져올 수 있지만 전자 교환이 더 활발하게 일어날 수 있는 바이메탈 페록사이드 시스템이 시너지 효과를 현저히 향상시킬 수 있음을 나타낸다.

[0064] 7CFp 나노입자가 O_2 생성 활성으로 종양 세포의 저산소증을 완화할 수 있는지 여부를 조사하였다. U87MG 세포를 저산소 대기(각각 1, 5, 및 94vol%의 O_2, CO_2 및 N_2)에 노출시켜 저산소 조건을 설정하였다. 저산소 상태에서 상향 조절되는 저산소증 유발 인자 1α(HIF-1α)를 저산소증 정도를 결정하는 마커로 사용하고 F-액틴을 대조 염색을 위해 공동 염색하였다. 낮은 산소 조건에 노출된 암세포는 HIF-1α를 강력하게 발현하는 것으로 나타났다.

[0066] 도 14는 정상 산소 또는 저산소의 pH 6에서 PBS 또는 7CFp 나노입자 처리 후 U87MG 세포의 형광 강도를 나타낸다.

[0067] 도 14를 참조하면, 암세포가 7CFp 나노입자로 처리되면 형광 강도는 나노입자 농도에 비례하여 감소하였고, 저산소증이 7CFp 나노입자에 의해 생성된 O_2에 의해 약화되었다.

[0069] 살아있는 세포와 죽은 세포의 염색 분석을 이용하여 종양 미세환경에서 7CFp 나노입자에 의한 암세포 사멸을 조사하였다. 저산소 및 약산성 조건(pH 6)에서 다양한 유형의 나노입자와 24시간 배양 후, 살아있는 세포와 죽은 세포를 각각 녹색 및 적색 형광 염료로 염색하였다. 7CFp 나노입자로 처리된 대부분의 암세포는 죽었으며, 7CFp 나노입자가 암세포 사멸 효율이 가장 높은 것으로 나타났다. 다른 유형의 암세포에 대한 적용 가능성을 조사하기 위해 HeLa 세포에 대한 7CFp 나노입자의 촉매 효과를 테스트하였고, 7CFp 나노입자가 암세포 사멸 효율이 가장 높은 것으로 나타났다.

[0070] 또, 정상 산소 및 중성 pH 조건에서 정상 세포(AML12)에 대한 7CFp 나노입자의 세포 독성 실험을 수행하였고, 7CFp 나노입자는 AML12 세포에 심각한 독성을 나타내지 않는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 7CFp 나노입자가 정상 세포에 대하여 해로운 영향을 미치지 않으면서 우수한 종양 특이적 독성을 갖는다는 것을 나타낸다.

[0072] 도 15는 7CFp 나노입자의 정맥 주입 전과 주입 후 24시간 뒤의 U87MG 종양 보유 마우스의 T1 강조 MR 이미지를 나타내고, 도 16은 도 15에서 종양 대 정상 조직의 MRI 신호 강도 비율을 나타낸다. U87MG 종양 보유 마우스 모델을 사용하여 7CFp 나노입자의 생체 내 치료 효능을 검증할 수 있다. 종양 내 나노입자 축적과 MRI 조영 증강 효과를 평가하기 위해 7CFp 나노입자를 정맥 주사하였다.

[0073] 도 15 및 도 16을 참조하면, 종양 영역의 T1 강조 MR 신호는 투여 후 24시간에 상당히 증가하였다. 이것은 종양 미세환경에서 7CFp 나노입자의 축적 및 분해의 증가에 기인한다. 또, 7CFp 나노입자의 분해에 의한 금속 이온의 방출은 MR 신호를 강화할 수 있다.

[0075] 금속 원소의 생체 분포 분석에 따르면 주입된 7CFp 나노입자의 상당 부분이 EPR 효과를 통해 종양 영역으로 전달되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 유체역학적 직경이 작은 7CFp 나노입자가 종양에 효과적으로 국소화되어 암 치료 및 진단에 적합하다는 것을 나타낸다.

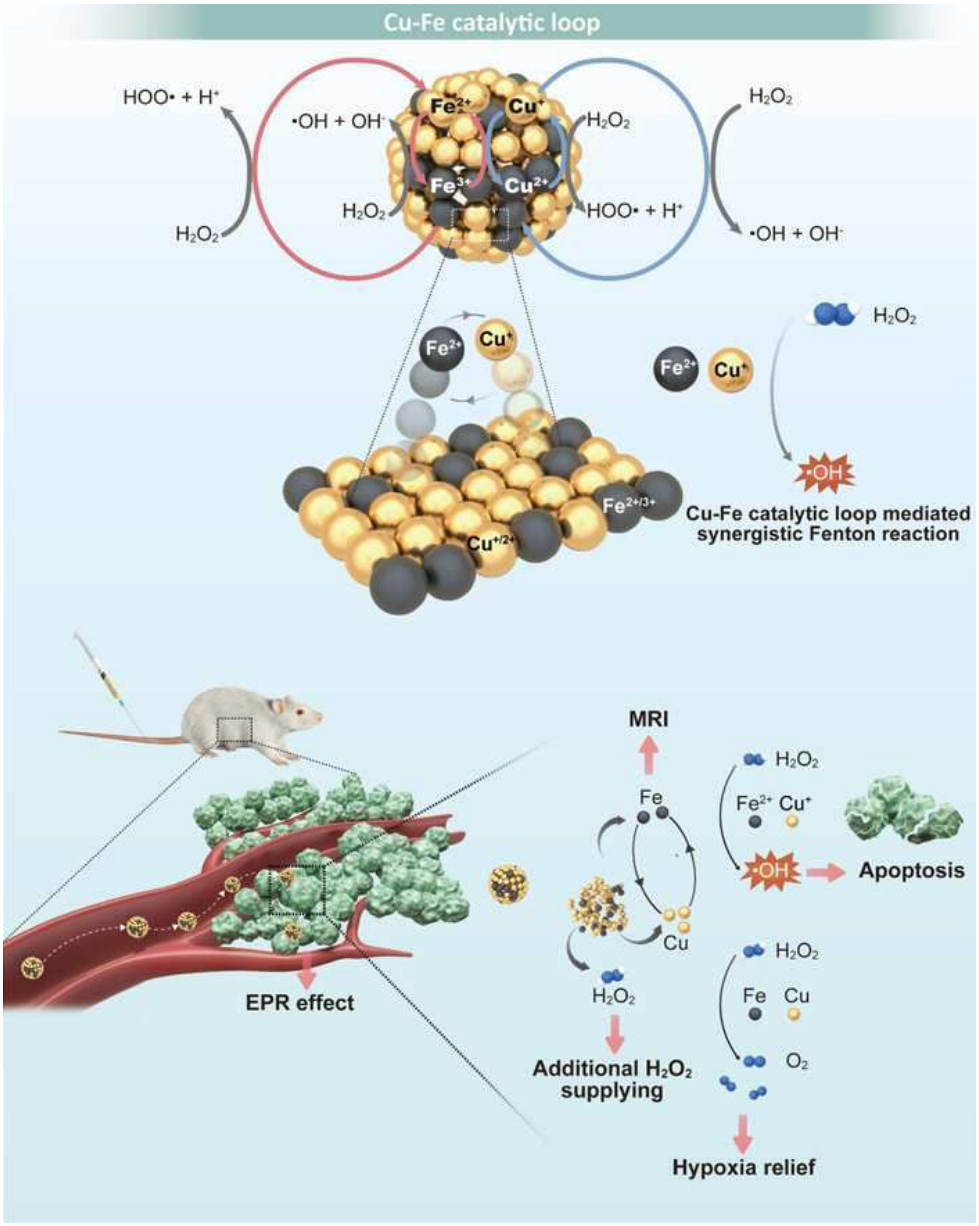
[0076] 또, 시너지 펜턴 촉매 활성을 갖는 7CFp 나노입자가 저용량에서도 암을 치료할 수 있는지 여부를 연구하였다. 7CFp 나노입자의 생체 내 치료 효능은 종양 부피 변화를 모니터링하여 평가되었다. 이를 위해 U87MG 종양 보유 마우스를 무작위로 5개 그룹으로 나누고 식염수, Cup 나노입자, Fep 나노입자, Cup+Fep 나노입자, 7CFp 나노입자를 각각 3.7mg/kg의 용량으로 정맥 주사하였다. 7CFp 나노입자 처리 그룹의 종양 성장은 식염수 주입 대조 그룹의 종양의 급속한 성장에 비해 거의 완전히 억제되었다. 그리고, 7CFp 나노입자가 종양 미세환경에서 Cup 나노입자, Fep 나노입자 및 Cup+Fep 나노입자보다 훨씬 더 효과적인 항종양 시너지 활성을 통해 저용량에서 우수한 생체 내 종양 치료 효능을 갖는 것으로 나타났다. 모든 처리 그룹에서 체중의 유의한 변화나 주요 기관의 조직학적 이상 징후는 없었다.

[0078] 병리학적 분석을 통해 다양한 나노입자의 치료 효과를 더 비교하기 위해, 치료 후 절제된 종양 절편에 대해 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 염색을 수행하였다. 괴사성 또는 세포자멸사 종양 세포의 높은 비율이 7CFp 나노입자 처리 그룹에서 관찰되는 반면, 다른 그룹에서는 상대적으로 낮은 비율로 관찰된다. 7CFp 나노입자의 치료 효능은 면역형광 염색에 의해 확인될 수 있으며, O_2 생성 및 저산소증 감쇠 활성은 종양 조직에서 HIF-1α 발현 수준을 추정하여 평가되었다. HIF-1α가 종양 조직 전체에 걸쳐 높게 발현되는 대조 그룹과 비교하여, HIF-1α 발현은 7CFp 나노입자 처리 후 유의하게 억제된다. 7CFp 나노입자에 의해 유발된 종양 세포 사멸의 메커니즘을 더 명확히 하기 위해 TUNEL(terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) 분석을 수행하여 세포 사멸의 마지막 단계에서 발생한 DNA 분열을 감지하였다. 7CFp 나노입자는 ·OH에 의한 DNA 손상을 유도하여 암세포의 심각한 세포자멸사를 유발하는 것으로 나타났다.

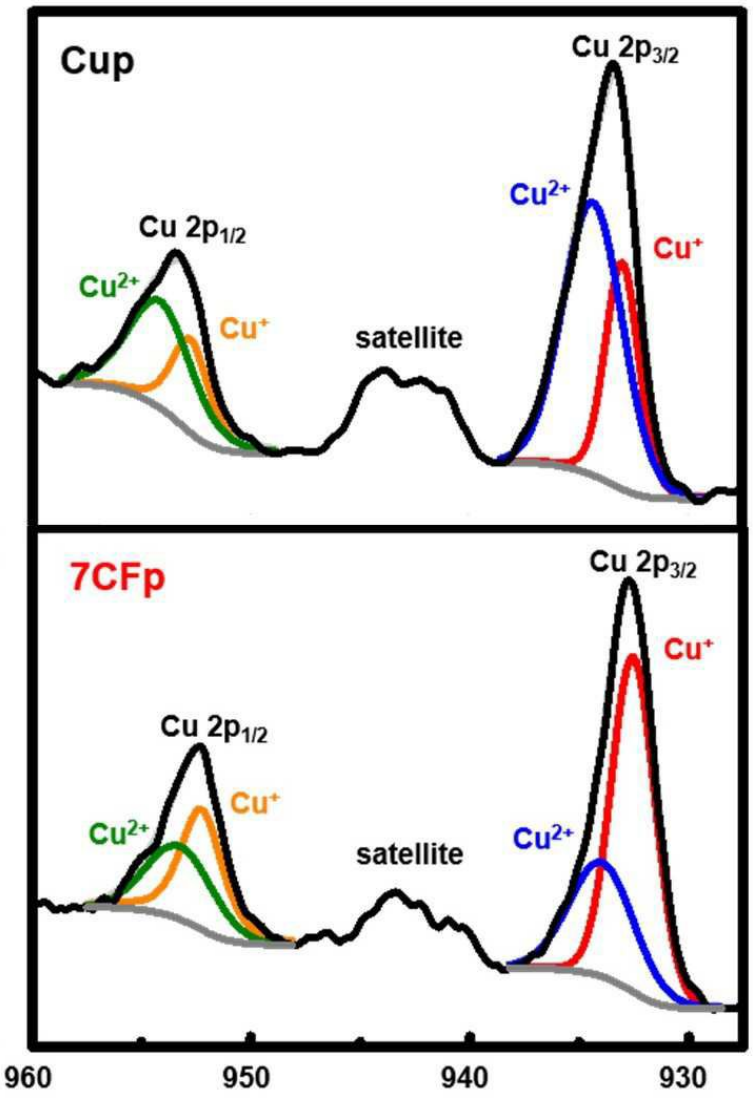
[0080] 이제까지 본 발명에 대한 구체적인 실시예들을 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

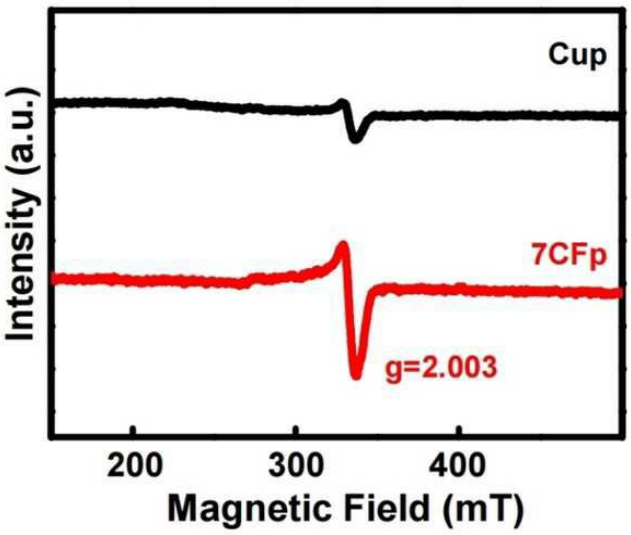
도면1


Cu-Fe catalytic loop
HOO• + H+
•OH + OH-
H2O2
H2O2
H2O2
HOO• + H+
H2O2
•OH + OH-
Fe2+
Cu+
Fe3+
Cu2+
Fe2+
Cu+
H2O2
Fe2+
Cu+
•OH
Fe2+/3+
Cu+/2+
Cu-Fe catalytic loop mediated synergistic Fenton reaction
MRI
Fe
H2O2
Fe2+ Cu+
•OH
Apoptosis
Cu
H2O2
H2O2
Fe Cu
O2
Additional H2O2 supplying
Hypoxia relief
EPR effect

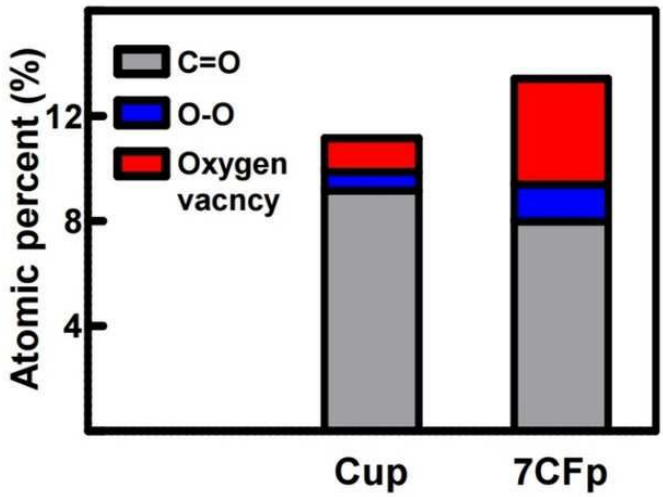
도면2


Cup
Cu 2p3/2
Cu2+
Cu 2p1/2
Cu+
satellite
7CFp
960
950
940
930

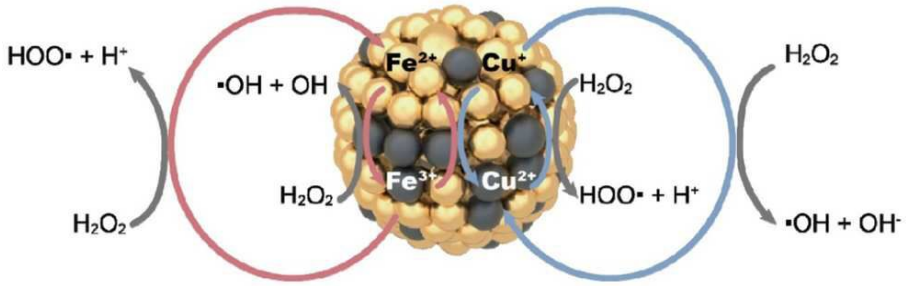
도면3


Cup
7CFp
g=2.003
Intensity (a.u.)
200
300
400
Magnetic Field (mT)

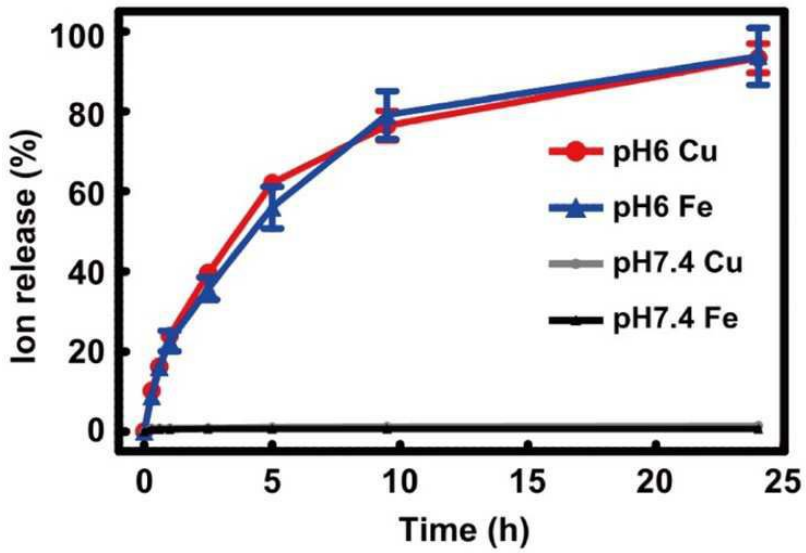
도면4


C=O
O-O
Oxygen vacncy
Atomic percent (%)
12
8
4
Cup
7CFp

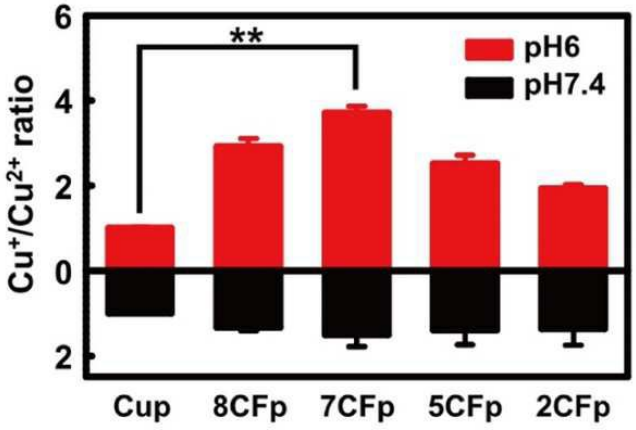
도면5


HOO· + H+
·OH + OH
Fe2+
Cu+
H2O2
H2O2
Fe3+
Cu2+
HOO· + H+
H2O2
·OH + OH-

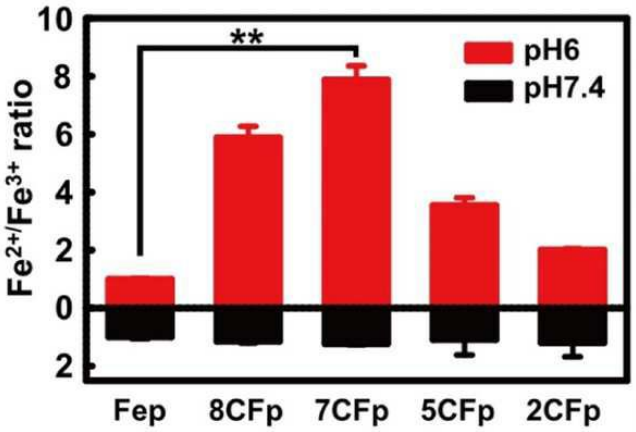
도면6


Ion release (%)
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
Time (h)
pH6 Cu
pH6 Fe
pH7.4 Cu
pH7.4 Fe

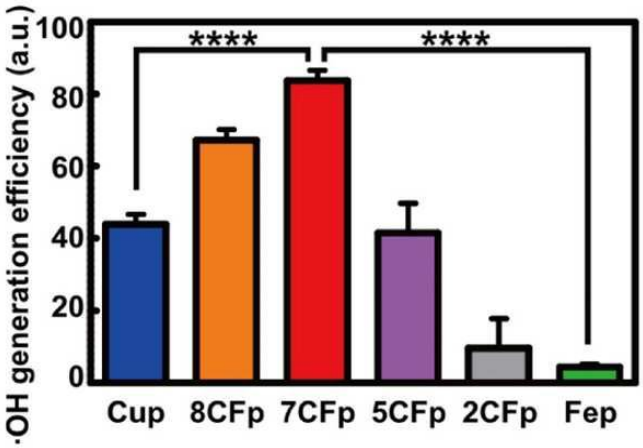
도면7


**
pH6
pH7.4
Cu+/Cu2+ ratio
6
4
2
0
2
Cup
8CFp
7CFp
5CFp
2CFp

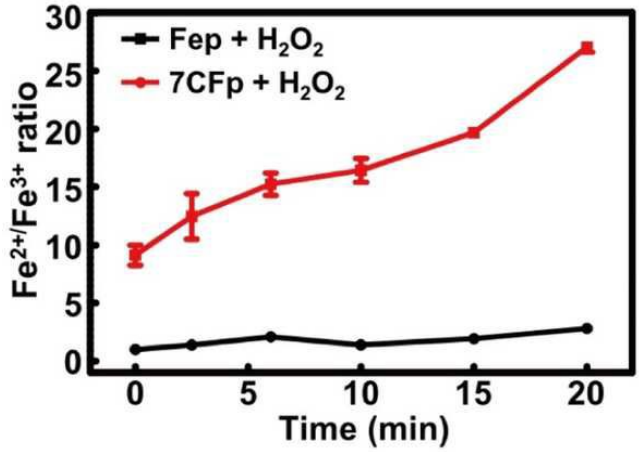
도면8


**
pH6
pH7.4
Fe2+/Fe3+ ratio
10
8
6
4
2
0
2
Fep
8CFp
7CFp
5CFp
2CFp

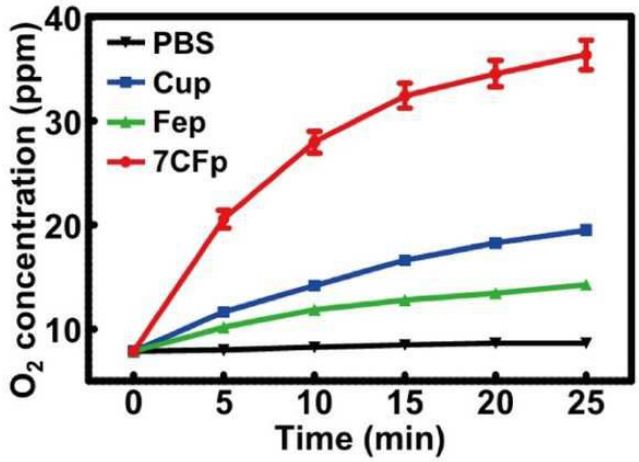
도면9


****
****
·OH generation efficiency (a.u.)
100
80
60
40
20
0
Cup
8CFp
7CFp
5CFp
2CFp
Fep

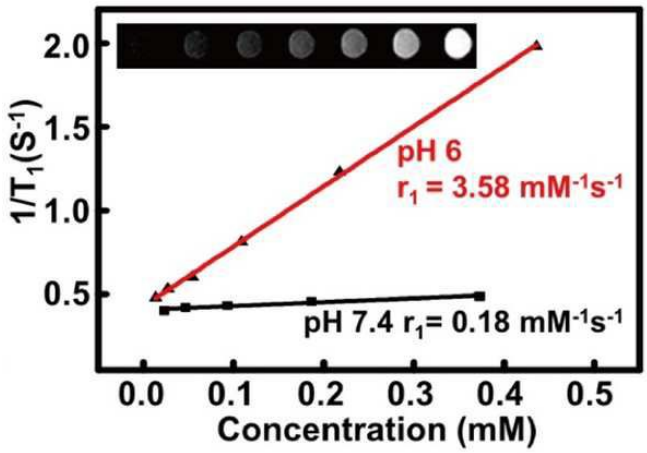
도면10



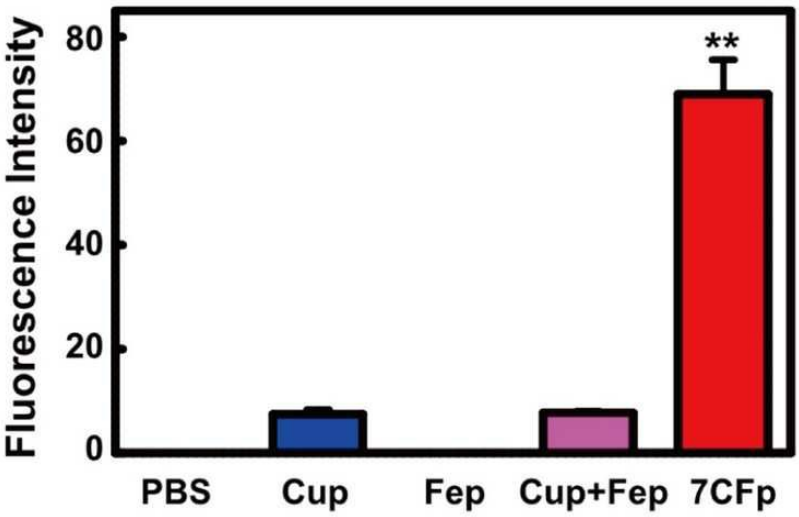
도면11



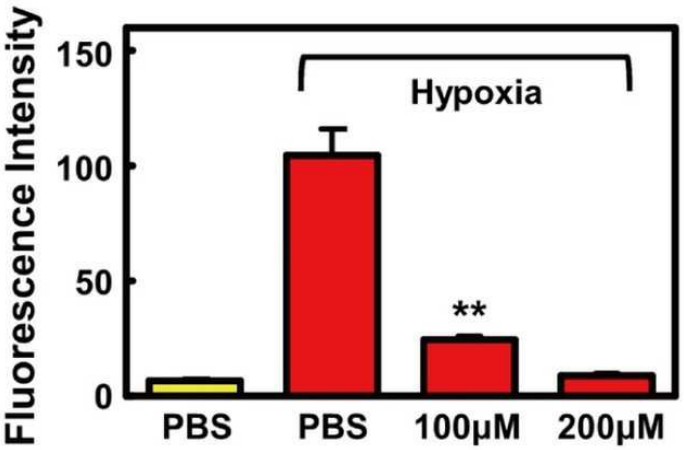
도면12



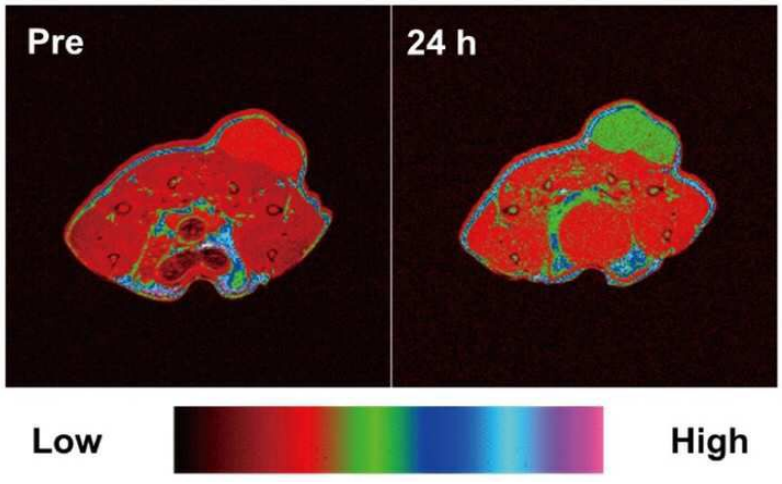
도면13



도면14



도면15



도면16

