



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0097205

(43) 공개일자 2015년08월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 1/02 (2006.01) *A61K 49/04* (2006.01)

A61K 49/14 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0018448

(22) 출원일자 2014년02월18일

심사청구일자 2014년02월18일

(71) 출원인

국립대학법인 울산과학기술대학교 산학협력단

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

(72) 발명자

박종남

울산 울주군 범서읍 구영로 75-9, 308동 1103호
(우미린1차아파트)

(74) 대리인

특허법인태백

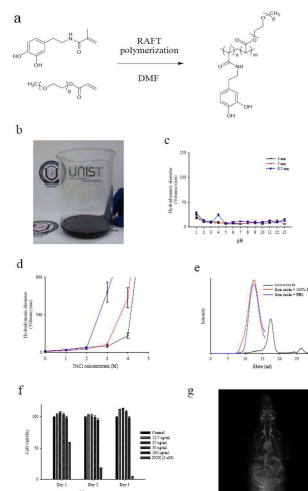
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 나노입자 기반 혈관조영제 제조방법

(57) 요약

본 발명은 나노입자 기반 혈관조영제 제조방법에 관한 것으로서, 나노물질 상에 표면개질방법을 적용하기 위해서 Mefp 유사 올리고머(Mefp like oligomer; MLO)를 디자인하였으며, 코팅제(coating reagent)가 카테콜기(catechol group)와 나노입자의 표면에 결합되어 1,2,3,4-테트라치환된 벤젠 고리(1,2,3,4-tetrasubstituted benzene ring) 구조를 만들어 줌으로써 안정화되는 것을 확인하였다. 또한 본 발명은 상기 제조된 MLO를 이용한 혈관 조영제 제조방법을 제공한다.

대표도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465012780

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 질환극복기술개발

연구과제명 나노재료를 이용한 간담도암의 진단과 치료

기 여 율 1/1

주관기관 울산과학기술대학교 산학협력단

연구기간 2013.04.01 ~ 2014.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

- (1) 도파민 메타아크릴아미드(Dopamine methacrylamide; DMA) 및 mPEG₄₅₀ 아크릴레이트(mPEG₄₅₀ acrylate)을 용매에 녹여 혼합하는 단계;
- (2) 상기 (1) 단계의 혼합물에 0.025 mmol RAFT 시약[트리티오카바메이트(Trithiocarbamate)] 및 0.025 mmol 2,2-아조비스이소부티로니트릴(2,2-Azobisisobutyronitrile; AIBN)을 1 : 0.01-10 부피비로 첨가하여 가역적 첨가-분절 연쇄이동(reversible addition-fragmentation chain transfer; RAFT) 중합하는 단계; 및
- (3) 상기 (2) 단계의 중합물을 25 내지 300℃에서 1분 내지 100시간 동안 반응시키는 단계를 포함하는 홍합 접착 단백질(mussel foot protein; Mefp) 유사 올리고머(MLO) 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 용매는 디메틸포름아미드(Dimethylformamide, DMF)인 것을 특징으로 하는 홍합 접착 단백질(mussel foot protein; Mefp) 유사 올리고머(MLO) 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 MLO는 분자량이 1kD 내지 1,000kD인 것을 특징으로 하는 홍합 접착 단백질(mussel foot protein; Mefp) 유사 올리고머(MLO) 제조방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 홍합 접착 단백질(mussel foot protein; Mefp) 유사 올리고머(MLO).

청구항 5

- (1) 용매에 철 산화물(iron oxide) 나노입자를 분산시키는 단계;
- (2) 제4항에 따른 홍합 접착 단백질(mussel foot protein; Mefp) 유사 올리고머(MLO) 및 아민(amine) 계열 화합물을 상기 (1) 단계의 나노입자가 분산된 용매에 첨가하여 혼합하는 단계; 및
- (3) 상기 (2) 단계의 혼합물을 25 내지 300℃에서 1분 내지 100시간 동안 반응시키는 단계를 포함하는 혈관 조영제 제조방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 아민(amine) 계열 화합물은 2-2(아미노에톡시)에탄올(2-(2-Aminoethoxy)ethanol; AEE), 3-아미노프로판올(3-aminopropanol), 헥실아민(hexylamine) 또는 도데실아민(dodecylamine)인 것을 특징으로 하는 혈관 조영제 제조방법.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 나노입자 기반 혈관조영제 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 홍합(Mussel)은 다양한 물질의 표면에 강하게 붙어 있으며, 매우 거친 바다에서도 바닷물에 저항하여 그 접착성을 유지할 수 있는 특징을 보인다. 수분이 존재하는 상황에서도 접착성을 유지하는 홍합의 이상적인 특징들을 표면 개질에 적용하기 위한 다양한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 화공 재료 및 의료 등의 다양한 분야에서 그 응용 가능성을 타진하고 있다. 이러한 홍합의 접착력은 그 족사(byssus) 구조에 의해 이루어지며, 이 구조는

다양한 종류의 홍합 접착 단백질(mussel foot protein; Mefp)에 의해 구성되며, 이 중 Mefp-3,5가 접착 특징에 큰 역할을 한다고 알려져 있다. 이 단백질에는 카테콜(catechol) 구조와 아민기(amine group)가 많이 존재하고 있는 것으로 알려져 있다. 많은 그룹에서 카테콜 리간드(catechol ligand)를 이용하여 다양한 분야에서 표면 개질에 적용하기 위한 노력을 하고 있다. 특히 최근의 연구에서 Mefp-3,5 구조의 두 가지 기능기(functional group)인 카테콜(catechol)과 아민기(amine group)를 모두 가지고 있는 도파민(dopamine)에 주목하여 도파민(dopamine)을 이용한 폴리도파민(polydopamine) 구조의 코팅법이 개발되었으며, 이는 다양한 분야에 적용되고 있는 상황이다. 폴리도파민(Polydopamine) 구조는 그 표면의 반응성이 매우 뛰어난 접착제 유사 특징(glue like property)을 보이는데, 이러한 특징은 카테콜기(catechol group)의 산화(oxidation)와 밀접한 관련이 있다. 카테콜기(Catechol group)는 O_2 에 의해 매우 쉽게 산화되는 특징을 가지며, 이러한 산화된 카테콜은 접착력에 필요한 응집성(cohesive)과 점착성(adhesive)을 가지기 위한 중간유도체로 생각되고 있다. 이러한 산화(oxidation) 과정에서 결국 환원된 카테콜 형태가 직접적으로 금속과 배위 결합(coordination bonding)을 이루게 되어 그 접착력을 강하게 유지하거나 서로 간의 가교(crosslinking)가 일어난다고 생각하고 있다. 도파민(Dopamine)은 산화 과정을 거친 뒤 생성되는 류코도파민(luekodopamine) 구조에 의한 자가 중합(self polymerization)이 일어나게 되어 가교(crosslinking)에 의해 응집 특징을 가지게 되며, 잔여 카테콜 또는 산화된 퀴논기(quinone group)에 의해 점착 특징이 생기는 것이라 할 수 있다. 이러한 폴리도파민(polydopamine) 구조는 과일에서 큰 충격을 받아 그 셀룰로오스 막(cellulose membrane)을 보호하기 위한 방어 메카니즘의 한 일환으로 참여하는데, 이것은 셀룰로오스 막(cellulose membrane)에 결합을 유도하여 그 보호 부위를 만드는 것과 아주 유사하다. 이러한 폴리도파민 코팅(polydopamine coating)은 다양한 물질에 적용될 수 있으며, 그 표면의 반응성이 매우 커 추가적인 표면 개질(surface modification)이 가능하다. 이러한 코팅방법은 점착성(adhesive property)과 응집성(cohesive property) 모두를 가지고, 기질 독립적(substrate independent)으로 일어나며, 비공유결합(noncovalent interaction), 수소 결합(hydrogen bonding), pi-pi 결합(pi-pi interaction) 및 정전기적 결합(electrostatic interaction)을 가지게 된다.

[0003]

나노물질에 이러한 코팅방법을 적용시키는 데는 문제점이 발생하는데, 금속 산화물(metal oxide) 나노재료에 이러한 도파민(dopamine)을 이용한 코팅 방법은 나노 물질 표면을 에칭(etching)하는 문제점을 가지고 있어 적용하기 힘들다. 이러한 문제를 극복하기 위하여 매우 긴 길이의 카테콜기(catechol group)를 이용하여 이러한 에칭(etching) 과정을 막아 표면 개질에 성공할 수 있지만, 고분자의 합성이 매우 복잡하며 충분한 정도의 안정성을 가지기 힘들기 때문에 적용하기 어려운 많은 문제점들을 가지고 있다. 현재까지 카테콜기(catechol group)를 이용한 표면코팅 방법이 벌크(bulk)한 물질과 나노물질(nanomaterials) 모두에 적용된 방법이 제한적이며, 나노입자 각각을 안정적으로 코팅하여 용매에서의 분산성이 유지되는 것이 매우 어려운 일이라 하겠다.

[0004]

본 발명자들은 나노물질 상에 표면개질방법을 적용하기 위해서 Mefp 유사 올리고머(Mefp like oligomer; MLO)를 디자인하였으며, 코팅제(coating reagent)가 카테콜기(catechol group)와 나노입자의 표면에 결합되어 1,2,3,4-테트라치환된 벤젠 고리(1,2,3,4-tetrasubstituted benzene ring) 구조를 만들어 줌으로써 안정화되는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005]

(특허문헌 0001) 한국공개특허 10-2011-0080781(2011.07.13 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006]

본 발명의 목적은 홍합 접착 단백질(mussel foot protein; Mefp) 유사 올리고머(MLO) 제조방법을 제공하는 데에 있다.

[0007]

본 발명의 다른 목적은 상기 방법에 의해 제조된 홍합 접착 단백질(mussel foot protein; Mefp) 유사 올리고머(MLO)를 제공하는데 있다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 MLO를 이용한 혈관 조영제 제조방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (1) 도파민 메타아크릴아미드(Dopamine methacrylamide; DMA) 및 mPEG₄₅₀ 아크릴레이트(mPEG₄₅₀ acrylate)을 용매에 녹여 혼합하는 단계; (2) 상기 (1) 단계의 혼합물에 0.025 mmol RAFT 시약[트리티오카바메이트(Trithiocarbamate)] 및 0.025 mmol 2,2-아조비스이소부티로니트릴(2,2-Azobisisobutyronitrile; AIBN)을 1 : 0.01-10 부피비로 첨가하여 가역적 첨가-분열 연쇄이동(reversible addition-fragmentation chain transfer; RAFT) 중합하는 단계; 및 (3) 상기 (2) 단계의 중합물을 25 내지 300 °C에서 1분 내지 100시간 동안 반응시키는 단계를 포함하는 혼합 접착 단백질(mussel foot protein; Mefp) 유사 올리고머(MLO) 제조방법을 제공한다. 상세하게는, 상기 MLO는 분자량이 1kD 내지 1,000kD일 수 있다.

[0010] 바람직하게는, 상기 용매는 디메틸포름아미드(Dimethylformamide, DMF)일 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 혼합 접착 단백질(mussel foot protein; Mefp) 유사 올리고머(MLO)를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 (1) 용매에 철 산화물(iron oxide) 나노입자를 분산시키는 단계; (2) 제4항에 따른 혼합 접착 단백질(mussel foot protein; Mefp) 유사 올리고머(MLO) 및 아민(amine) 계열 화합물을 상기 (1) 단계의 나노입자가 분산된 용매에 첨가하여 혼합하는 단계; 및 (3) 상기 (2) 단계의 혼합물을 25 내지 300 °C에서 1분 내지 100시간 동안 반응시키는 단계를 포함하는 혈관 조영제 제조방법을 제공한다.

[0013] 바람직하게는, 상기 아민(amine) 계열 화합물은 2-2(아미노에톡시)에탄올(2-(2-Aminoethoxy)ethanol; AEE), 3-아미노프로판올(3-aminopropanol), 헥실아민(hexylamine) 또는 도데실아민(dodecylamine)일 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0014] 본 발명은 나노입자 기반 혈관조영제 제조방법에 관한 것으로서, 나노물질 상에 표면개질방법을 적용하기 위해서 Mefp 유사 올리고머(Mefp like oligomer; MLO)를 디자인하였으며, 코팅제(coating reagent)가 카테콜기(catechol group)와 나노입자의 표면에 결합되어 1,2,3,4-테트라치환된 벤젠 고리(1,2,3,4-tetrasubstituted benzene ring) 구조를 만들어 줌으로써 안정화되는 것을 확인하였다. 이러한 코팅방법은 대량생산이 가능하며, Co, TiO₂, Al₂O₃, Fe₃O₄ 및 Au 나노입자 등 다양한 금속 및 금속산화물에 적용할 수 있기 때문에 많은 분야에 응용 가능할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 Mefp5 구조의 기능기(functional group)인 카테콜(catechol)과 아민기(amine group) 및 도파민의 구조를 나타낸다.

도 2는 TBC 또는 알리자린(alizarin)과 같은 카테콜(catechol) 및 코팅제(coating reagent)를 소수성 철 산화물 나노입자(hydrophobic iron oxide nanoparticle)에 첨가하여 리간드 교환(ligand exchange)을 시도한 결과를 나타낸다.

도 3은 나노입자 상의 아민 보조 코팅을 나타낸다. (a) RAFT 중합(polymerization)을 통한 Mefp 유사 올리고머(Mefp like oligomer; MLO) 제조 과정을 나타낸다. (b) 그림 규모로 대량의 리간드 교환을 수행한 사진이다. (c) 모든 범위의 pH 조건에서 동적광산란광도계(Dynamic Light Scattering Spectrometer; DLS)를 통한 수분산 철 산화물 안정성을 측정한 결과이다. (d) DLS를 통해 측정한 이온 안정성 결과이다. (e) 3 nm 코어 크기의 수분산 철 산화물에 대한 세럼 결합 시험의 FPLC 결과이다. (f) HeLa 세포주에서 3일 동안 세포독성을 시험한 결과이다. (g) 3 nm 코어 크기의 철 산화물을 혈관조영제로 사용하여 3T에서 얻은 MR 이미지이다.

도 4는 단량체(monomer)와 RAFT의 비율에 대한 그래프이다.

도 5는 올리고머(oligomer) 형성 후 유지되는 각 단량체(monomer)의 조성(composition)을 나타낸다.

도 6은 코팅 전 후의 TEM 사진을 나타낸다.

도 7은 3T에서 체내 MR 이미지 및 시간에 따른 신호 세기(signal intensity)를 나타낸다.

도 8은 카테콜 코팅된 철 산화물의 FT-IR 분석 결과이다.

도 9는 MLO에 아민기(amine group)를 결합시, 자기장(magnetic field)을 걸어 주었을 때의 사진이다.

도 10은 아민기(amine group)에 의한 카테콜의 구조적 변화 기작을 나타낸다.

도 11은 나노물질 상에서 아민 보조 카테콜 리간드 코팅(amine assisted catechol ligand coating)의 모식도를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

< 실시예 >

1. 화합물

4-터트-부틸카테콜(4-*tert*-butylcatechol; TBC), 2-2(아미노에톡시)에탄올(2-(2-Aminoethoxy)ethanol; AEE), 메타크릴레이트 무수물(methacrylate anhydride), 소듐 테트라보레이트 데카하이드레이트(sodium tetraborate decahydrate), 소듐 바이카보네이트(sodium bicarbonate), 도파민(dopamine), 카본 디설파이드(carbon disulfide), 벤질 클로라이드(benzyl chloride), 세슘 카보네이트(cesium carbonate) 및 폴리(에틸렌 글리콜) 메틸 에테르 아크릴레이트(poly(ethylene glycol) methyl ether acrylate)는 Aldrich로부터 구매하였다. 아조 비스이소부틸로니트릴(Azobisisobutyronitrile)은 Junsei로부터 구매하였다.

2. 트리티오카바메이트(Trithiocarbamate) RAFT 시약 합성

각각 40 mmol의 카본 디설파이드(carbon disulfide) 및 세슘 카보네이트(cesium carbonate)를 25℃에서 디메틸 포름아미드(Dimethylformamide, DMF)에 녹였다. 5 ml DMF에 녹인 40 mmol 벤질클로라이드(benzylchloride)를 상기 혼합물에 첨가하고, 12시간 동안 반응시켰다. 반응은 25 ml 차가운 물로 냉각시키고, 70 ml EtOAc로 3번 추출하였다. EtOAc층은 MgSO₄로 건조 및 증발시켰다. 용출 용매로서 EtOAc을 사용하여 실리카 컬럼(Silica column)을 수행하였다.

3. 가역적 첨가-분열 연쇄이동(reversible addition-fragmentation chain transfer; RAFT) 중합을 위한 단량체 제조

도파민 메타아크릴아미드(Dopamine methacrylamide; DMA)는 이전 연구에 따라 합성되었다. mPEG₄₅₀ 아크릴레이트(mPEG₄₅₀ acrylate)는 Aldrich로부터 상업적으로 구매하였다.

4. Mefp 유사 올리고머(Mefp like oligomer; MLO) 제조

0.1 mmol DMA 및 0.4 mmol mPEG₄₅₀ 아크릴레이트(mPEG₄₅₀ acrylate)을 0.025 mmol RAFT 시약[트리티오카바메이트(Trithiocarbamate)] 및 0.025 mmol 2,2-아조비스이소부티로니트릴(2,2-Azobisisobutyronitrile; AIBN) 비율 1 : 1로 DMF에 녹였다. 열렸다 녹이는 과정을 5번 이상 수행하였다. 앰플내의 가스가 제거된 혼합물을 70℃, 12시간 동안 오일 수조에서 반응시켰다. 올리고머 길이(oligomer length)를 조절하기 위해서, RAFT 및 총 단량체 비

율을 변경하였다. 단량체(monomer) 전체 : RAFT 시약은 20:1의 비율이 바람직하나, 10,000:1에서 3:1의 비율까지 조절 가능하다. 또한, RAFT 시약 : AIBN =1:1이 바람직하나, 1:0.01에서 1:10으로 조절 가능하다.

5. 철 산화물 나노입자 합성

철 산화물 나노입자는 철-올레이트(iron-oleate) 복합체 및 올레산(oleic acid)을 열분해하여 합성하였다. 크기 조절을 위해서, 다양한 끓는 점의 용매를 사용하였다.

6. 철 산화물 나노입자의 리간드 교환

12 nm 코어 크기의 철 산화물 리간드 교환을 위해, 1 L 비커에서 1 g의 철 산화물을 10 ml의 헥산(hexane)에 분산시켰다. 각각 10 ml MeOH, CHCl₃ 및 D.W를 첨가하고, 5 g MLO 및 10 ml 코팅제(coating reagen)를 첨가하였다. 혼합물은 70℃에서 15분 동안 강하게 혼합하여 반응시켰다.

7. 혈청(serum) 결합 시험

MLO 코팅된 3 nm 철 산화물을 100% FB 또는 PBS로 37℃에서 6시간 동안 진탕기(orbital shaker)에서 반응시켰다. 혼합물에는 최종 농도는 20 mM 철(Fe)이 포함되어 있었다. PBS 용출액 및 superpose 6 10/300 GL column(GE healthcare)으로 FPLC를 수행하였다.

8. 세포독성 시험(Cytotoxicity test)

HeLa 세포 부유물을 배양 웰(5x10³ cells/well)에 분주하였다. 세포 침전을 위해 하루 뒤에, HeLa 세포를 샘플들 또는 1 μM 독소루비신(doxorubicin)과 함께 배양하였다. 여러 농도의 샘플들을 각각의 웰에 처리하고, 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 플레이트를 배양하였다. 24, 48 및 72시간 후에, 10 μl CCK-8 용액을 플레이트 각각의 웰에 첨가하였다. CCK-8은 4시간 동안 배양기에서 반응시켰다. 세포 배지를 제거한 후, multiplate reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

9. MR 이완성(MR relaxivity)

콜로이드는 인산 완충 식염수(Phosphate Buffered Saline; PBS)에 희석하였다. 또한, MION의 이완성 수치는 3T MRI scanner (Philips' Achieva, 3T)로 측정하였다. 체내(*in vivo*) MR 이미지를 위한 MION의 r_1 및 r_2 를 계산하기 위해서, 본 발명자들은 MION으로 우선 시험관 내(*in vitro*) 이미징을 시도하였다. 0.1125, 0.225, 0.45, 0.9 mM MION을 포함하는 PBS를 제조하였다. T_1 -weighted MR images of the phantom는 TIR 서열을 이용하여 3T MRI scanner를 통해 얻었다. 이미징 파라미터는 다음과 같다: TI = 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 650, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000, 2200, 2400 and 2600 ms, TE = 10ms, flip angle = 90°, TR = 3000ms. T_2 -weighted 및 T_2^* -weighted MR images of the phantom은 물을 이용하여 준비되었고, r_2 및 r_2^* 이완성(relaxivity)은 volume coil을 가진 3T MRI scanner (Philips Achieva, 3T)를 이용하여 얻었다. MESE 및 MEGE 서열은 T_2 및 T_2^* 을 측정하기 위해 사용되었다. T_2 의 측정 파라미터는 다음과 같다: TE = 17.56, 23.41, 29.26, 35.11, 40.96, 52.67, 58.52, 64.37, 70.22 ms, flip angle=90°, TR = 3388 ms. T_2^* 의 측정 파라미터는 다음과 같다: TE = 5.24, 10.19, 15.14, 20.09, 25.04, 30, 34.95, 33.9, 44.85, and 49.8 ms, flip angle = 60°, TR = 3000ms.

10. 체내(*in vivo*) MR 이미징

140g~300g 무게의 수컷 스프래그-다워리 랫트(male Sprague-Dawley rats) 및 마우스 (Orient Bio, Inc., Seongnam, South Korea)의 MION 주입 전후 T1W-FFE 이미지는 3 T MRI scanner(Philips' Achieva, 3T) 상

volume coil을 이용하여 획득하였다. MION (22.4mM, dose - 2.5 mg Fe/kg)은 2×랫트 몸무게/μL로 말초 정맥(peripheral vein)으로 주입하였다. 혈관으로부터 MION 클리어링(clearing)을 검증하기 위해서, 조영제 주입 후 8분 간격으로 T1W-FFE 이미지를 얻었다. 상기 이미지들은 MATLAB (R2012a)의 최대강도투사(maximum intensity projection; MIP) 프로토콜을 이용하여 재구성하였다. T1W-FFE의 이미징 파라미터는 다음과 같다: flip angle = 25, TR = 25 msec, TE = 3.6 ms, field of view FOV = 150x150x35 [mm]³, matrix = 640x640x35, and NEX = 1.

11. 혈관조영술(Angiography)

본 발명자들은 동일한 조건하에서 T₁-weighted MR 이미지를 얻었다. 장기간(long-term) 순환을 확인하기 위해서, 시간-의존적 신호 세기를 측정하였다. 정맥에서의 조영-강화 MR 신호 세기는 1 이상의 높은 수치를 유지하였다. MION 주입으로 인한 2차원적 MIP 이미지는 총경동맥(common carotid artery), 외경정맥(external jugular vein) 및 머리의 표재성 혈관(superficial vessels)에서 신호가 강화되는 것을 나타냈다. 또한, 대동맥(aorta), 겨드랑이 정맥(axillary vein), 경정맥(jugular vein) 및 경동맥(carotid artery)을 포함하는 여러 혈관들에서 조영-강화 이미지를 관찰할 수 있었다. 이러한 이미지 세트로부터, 각각 시간 프레임에서 혈관 주위의 ROI를 작성하고, 혈관 부위의 신호 세기의 평균을 계산함으로써 신호 세기의 변화를 계산하였다(도 7). 마우스에 MION(dose - 2.5 mg Fe/kg) 주입 후, T₁-weighted MIP images에서 신호가 강화되었다. 혈관에서의 신호는 시간에 따라 감소되었다.

12. 결과

본 발명에 따른 표면 개질 방법이 나노물질에도 적용이 가능한지를 확인하기 위하여, TBC 또는 알리자린(alizarin)과 같은 카테콜(catechol)과 코팅제(coating reagent)를 소수성 철 산화물 나노입자(hydrophobic iron oxide nanoparticle)에 첨가하여 리간드 교환(ligand exchange)을 시도하였다. 코팅제(Coating reagent)로써 AEE를 사용하여 철 산화물(iron oxide)을 분산시키는데 성공하였고, 얻어진 산물들은 단량체(monomer)의 특징에 따라 약간의 서로 다른 용해도(solubility)의 차이를 볼 수 있었다(도 2). 즉 TBC의 경우에는 메탄올에서만 분산이 되었다. 생물학적 적용을 위해서는 수분산, 나가서는 완충(buffer) 용액, 및 체액에서 안정화되어야 하기 때문에, 용해도(stability)를 높이기 위해 다결합 사이트(multi binding site)를 갖도록 단량체 리간드(monomer ligand)를 디자인하였다. 카테콜기(catechol group)를 가지는 도파민 메타크릴아미드(Dopamine methacrylamide; DMA)와 mPEG₄₅₀ 아크릴레이트(acylate) 2개의 단량체(monomers)만을 이용하여 RAFT 중합(polymerization)을 시도하였다. mPEG는 나노물질의 친수성(hydrophilicity)을 가져다주는 비-특이적 결합(non-specific binding)이 없는 리간드(ligand)의 특징을 얻기 위해 사용하였다. 이런 Mefp 유사 올리고머(Mefp like oligomer; MLO)는 아주 쉬우며 대량합성이 가능하다(도 3a). 이 2가지 단량체들의 중합은 RAFT 기작에 따라 단량체(monomer)와 RAFT의 비율을 조절하여 단위 길이(unit length)의 조절이 가능하며, 10 kDa 미만이며 20 DP이하의 길이인 올리고머(oligomer)를 사용하였다(도 4). 각 단량체(monomer)의 조성(composition)은 올리고머(oligomer) 형성 후 유지되는 것을 확인하였다(도 5). 이 짧은 MLO와 코팅제(coating reagents)를 이용하여 철 산화물(iron oxide)의 리간드 교환(ligand exchange)을 진행하였고, 그 결과 그램 규모(gram scale)의 대량의 리간드 교환에 성공하였다(도 3b). 본 발명자들은 서로 다른 크기의 올레산에 덮인(oleic acid capped) 철 산화물(iron oxide)을 준비하였으며, 그 TEM 이미지는 도 6과 같다. 대량으로 리간드 교환된 산물은 그 껍질 두께(shell thickness)가 DLS 결과에서 ~ 2 nm의 유체역학적 지름(hydrodynamic diameter)을 보이는 것을 확인할 수 있었으며, 넓은 범위의 pH에서 안정성을 보이며, NaCl 안정성도 우수함을 알 수 있었다(도 3c). 이온 안정성 시험(Ion stability test)에서는 PEG의 뭉치는(entangle) 효과 때문에 크기 의존적인 안정성 정도를 보이지만 상업적으로 구할수 있는 아주 짧은 mPEG₄₅₀은 생물학적으로 적용할 수 있을 정도의 충분한 안정성을 보인다(도 3d). 이러한 얇은 두께의 껍질을 가지는 나노물질이 생물학적 적용을 위해 매우 중요한 비특이적 결합(nonspecific binding) 정도를 측정하기 위하여, 혈청 결합 시험(serum binding test)을 실시하였다. 이러한 비특이적 결합은 생체 내에서 응집이 되거나, 유체에 존재하는 단백질들이 나노입자(nanoparticle) 표면에 달라붙게 되어 원하지 않는 효과를 가져오거나 그 특징을 잃어버리는 결과를 유도할 수 있다. MLO로 치환된 철 산화물(iron oxide)은 혈청(serum)과의 점착성(stickiness)이 거의 없는 것을 볼 수가 있었다(도 3e). 이 같은 결과는 이전의 연구결과들에 비해 월등히 개선된 것이며 완전 세포 배지(complete cell medium)에서 1년이 지나도

어떠한 침전(precipitation)도 생기지 않는 것을 볼 수가 있었다.

[0042]

독성 시험 결과에서도 매우 높은 세포 생존성(cell viability)을 확인할 수 있었다(도 3f). 철 산화물(iron oxide)은 차세대 MRI 조영제(contrast agent)로써 각광받고 있으며 이러한 매우 얇은 두께의 껍질은 매우 높은 값의 MR 이완(relaxation) 값을 보여주고 있었다(표 1 및 표 2). 본 발명자들은 최근의 연구에서 매우 작은 크기의 철 산화물(iron oxide)이 혈관조영제(blood pool contrast agent)로 사용되는 것을 확인하였으며, 이것을 적용하여 동물 모델 랫트(rat)를 이용하여 Phillips 3T instrument에서 그 이미지를 얻었다. 그 결과, 뇌(brain) 뿐만이 아니라 팔 쪽으로 뻗어나가는 혈관들 모두 조영이 되는 효과를 볼 수가 있었다(도 3g). 이러한 매우 향상된 조영효과는 혈관 내에서 50% 이상의 신호 세기(signal intensity)를 1 시간이 지나도록 유지하고 있었다(도 7).

표 1

Size (nm)	r_1 (mM ⁻¹ s ⁻¹)	r_2 (mM ⁻¹ s ⁻¹)	r_2/r_1
3	3.42	13.74	4.02
5	15.94	42.4	2.66
8.5	16.69	64.1	3.84
12	11.75	122.98	10.47

[0043]

표 2

Size (nm)	r_1 (mM ⁻¹ s ⁻¹)	r_2 (mM ⁻¹ s ⁻¹)	r_2/r_1
3	2.34	26.1	8.53
12	2.54	141.72	55.80
DOTAREM	3.78	4.43	1.17

[0044]

[0045]

상기와 같이 아민 보조 카테콜 리간드의 코팅이 어떻게 응집성(adhesive property)을 극명하게 증가시켰는지를 분석하기 위한 실험들을 진행하였다. MLO로 코팅된 철 산화물(iron oxide)의 FT-IR 결과에서, MLO는 DMA에서 나오는 1,2,4-트리치환된 벤젠 고리(1,2,4-trisubstituted benzene ring)가 보이는 850 및 950에서 날카롭고 강한 피크를 볼 수 있으나, 코팅된 철 산화물(iron oxide)에서는 이러한 피크들이 801로 이동(shift)한 것을 알 수 있다. 이것은 모의실험(simulation)과 비교하여 1,2,3,4-테트라치환된 벤젠(1,2,3,4-tetrasubstituted benzene)이 보이는 피크로 3 position에 코팅제(coating reagents)의 아민기(amine group)가 마이클 첨가(michael addition) 유사 반응을 일으켜, 1261 nm에 방향족 아민(aromatic amine)의 피크를 보이게 되는 것으로 보여진다. 여기서 긴 길이의 아미노-mPEG₇₅₀(amino-mPEG₇₅₀)을 코팅제(coating reagent)로써 사용하였을 때, 완벽하게 치환되지 않은 산물을 얻을 수 있었으며, 그 경우에는 DMA의 벤젠 고리(benzene ring)에 접합(conjugation)이 완벽하게 일어나지 않은 것처럼 801, 853, 950 및 1261 nm의 피크 모두를 FT-IR에서 볼 수 있었다(도 8). 또한 다양한 종류의 코팅제(coating reagent)를 철 산화물(iron oxide)의 MLO 치환시 사용하였을 때 DMA와 나노물질 표면 사이로 결합될 정도로 짧은 코팅제(coating reagents)를 사용해야 안정한 산물들을 얻을 수가 있었다.

[0046]

나노물질 코팅을 위해 본 발명자들은 MLO에 아민기(amine group)를 결합시, 분산도가 매우 좋지 않아 자기장

(magnetic field)을 걸어 주었을 때 응집(agggregation)되는 산물들을 얻었으며, DLS 측정 결과 유체역학적 지름(hydrodynamic diameter) > 200 nm 을 얻었다. 이러한 결과는 폴리도파민(polydopamine) 처럼 가교(crosslinking)가 일어나 응집성(cohesive property)를 가지게 되는 구조가 만들어졌다는 증거가 된다(도 9).

상기와 같은 결과들은 코팅제(coating reagent)의 아민기(amine group)가 카테콜기(catechol group)의 벤젠 고리(benzene ring) 구조에 접합(conjugation)이 일어나는 간접적인 증거가 된다(표 3). 이러한 아민 보조 카테콜 리간드 코팅(amine assist catechol ligand coating) 역시 폴리도파민 코팅(polydopamine coating)과 마찬가지로 산소(oxygen)가 필수적으로 요구가 되는데, 이러한 산소는 이전의 결과에서 보여주듯이 카테콜(catechol)의 산화와 관련이 있다.

표 3

Coating reagents	DLS (at pH 7, 3 nm core sized)	Amine group	Availability
2-(2-Aminoethoxy)ethanol	6.0	O	O
3-Aminopropanol	7.2	O	O
Hexylamine	6.1	O	O
Amino PEG ₇₅₀	> 220	O	X
Octadecylamine	> 220	O	X

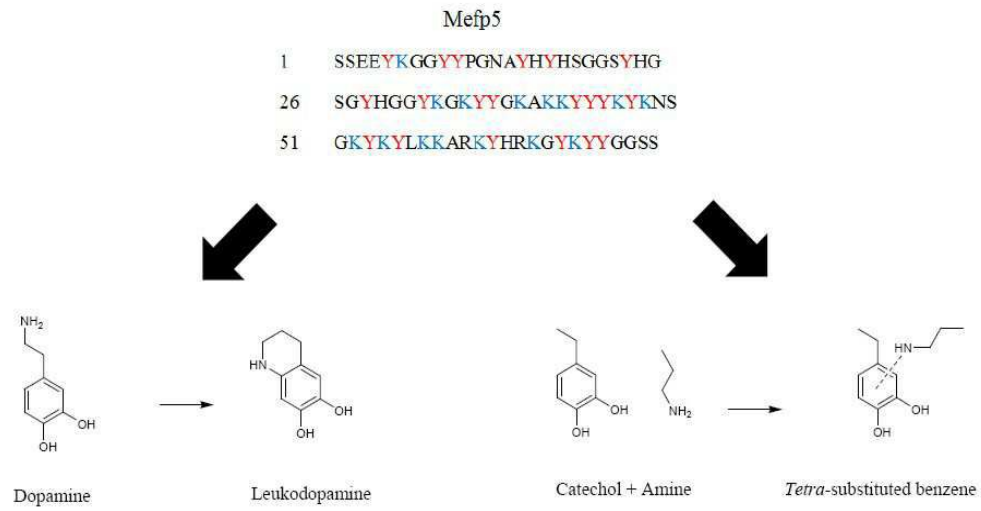
폴리도파민(polydopamine)과는 다르게, 시간에 따라 코팅두께가 증가하지 않는 것으로 보아, 코팅제(coating reagent)에 의해 산화된 카테콜 단량체(catechol monomer)는 서로 간의 가교(cross linking)가 억제되는 것으로 보인다. 이러한 과정은 카테콜레이트기(catecholate group)가 금속 이온에 배위 결합하여 다시 떨어지면서 에칭 과정을 겪기보다는, 이러한 반응이 아민(amine)에 의하여 억제되는 것으로 생각된다. 에칭 과정은 카테콜의 산화에 의해 세미퀴논(semiquinone)이 만들어지는 중간 과정을 겪는데, 이 과정에서 아민(amine)이 마이클 첨가(Michael addition) 반응을 유도하고, 다시 형성된 카테콜레이트(catecholate)가 단단히 금속 이온에 결합하고, 테트라-치환된 벤젠 고리(tetra-substituted benzene ring) 구조를 만드는 것이라고 볼 수가 있다(도 10). 안정화된 방향족 아민(aromatic amine)이 형성되면서 최종적으로 환원된 카테콜 복합체(reduced catechol complex)를 가진다고 생각할 수 있으며, 이러한 새로운 구조는 점착성을 가지는데 매우 중요한 역할을 하는 구조로 볼 수가 있다. 이러한 아민 보조 카테콜 리간드 코팅(amine assisted catechol ligand coating)은 Co, TiO₂, Al₂O₃, Fe₃O₄ 및 Au 나노입자(nanoparticles) 등 다양한 금속 및 금속산화물에 적용이 가능하였다.

본 발명의 새로운 코팅 방법을 나노물질에 적용하여 생물학적 적용(bio-application)을 하기 위해, 우리는 Mefp 유사 올리고머(Mefp like oligomer; MLO) 를 디자인하였으며, 코팅제(coating reagent)가 카테콜기(catechol group)와 나노입자의 표면에 결합되어 1,2,3,4-테트라치환된 벤젠 고리(1,2,3,4-tetrasubstituted benzene ring) 구조를 만들어 줌으로써 안정화되는 것임을 알 수가 있다(도 11).

혼합의 점착력은 상기에서 언급한 대로 크게 2가지로 나뉘게 되는데, 응집성(cohesive) 및 점착성(adhesive)이다. 본 발명자들은 점착성만을 극대화시켜 나노물질에 적용할 수 있는 코팅 방법을 개발하였으며, 그 공정과정 이 쉽고 간단하며 매우 다양한 분야에 적용이 가능하고, 높은 안정성과 응집성을 최소화하여 비-특이적 결합(non-specific binding)을 획기적으로 낮추면서 나노물질을 생물학적으로 응용하기 위한 안정성을 확보하였다. 이러한 코팅방법은 대량생산이 가능하며 카테콜 리간드(catechol ligand)의 특징에 따라 매우 다양한 물질표면에 코팅이 되기 때문에 많은 분야에 적용 가능할 것이다. 또한, 그 기작을 연구하여 이해함으로써, 의료용 접착제(medical glue)의 개발 등 카테콜(catechol)을 이용한 다양한 연구분야에 큰 도움을 줄 수 있다.

도면

도면1



도면2

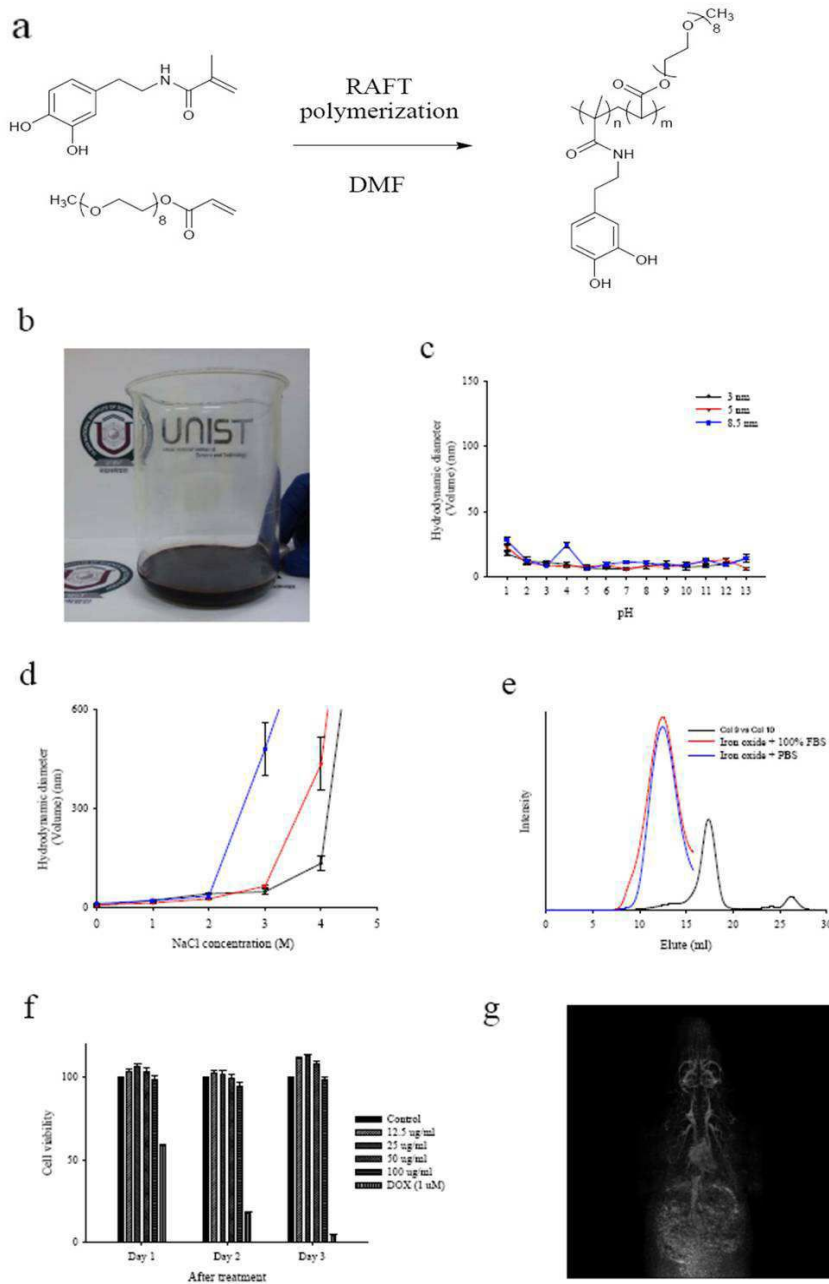


Alizarin coated iron oxide

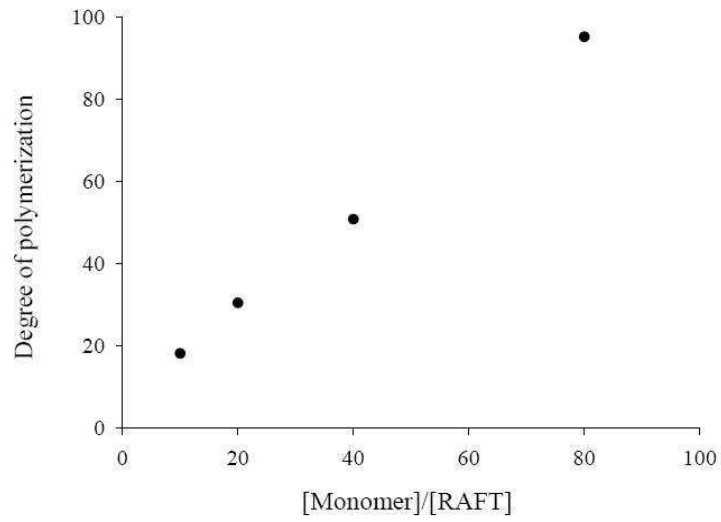


TBC coated iron oxide

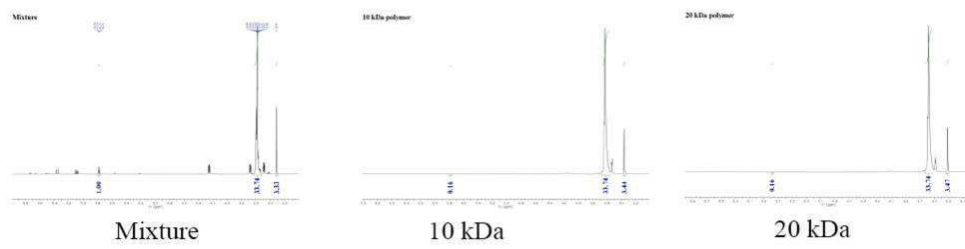
도면3



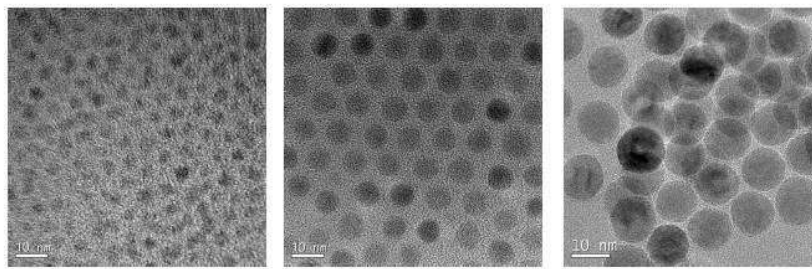
도면4



도면5



도면6

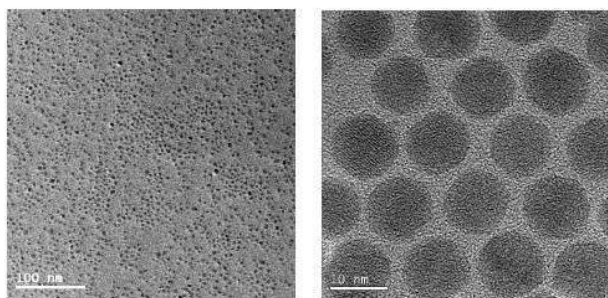


3 nm

8.5 nm

12 nm

Before coating

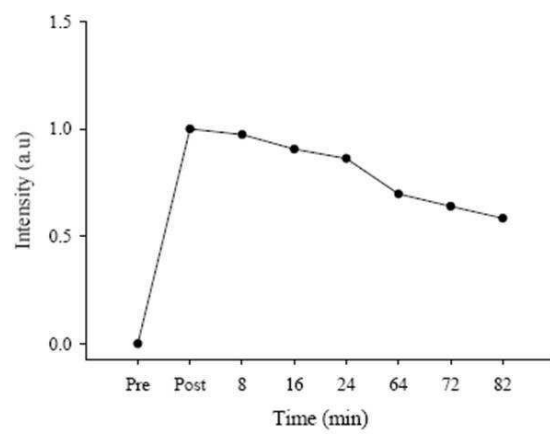
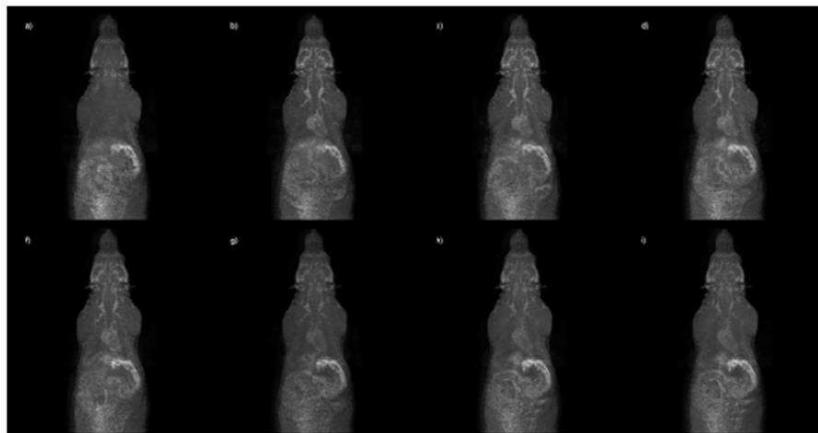


3 nm

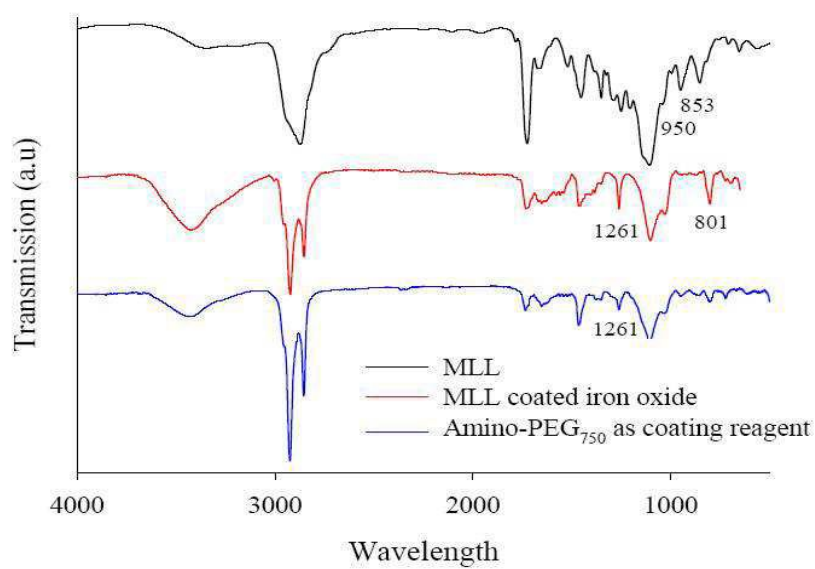
12 nm

MLL coated iron oxide

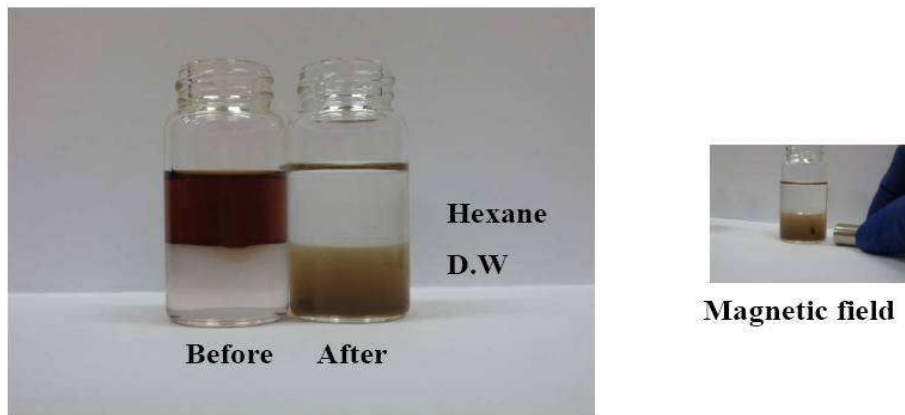
도면7



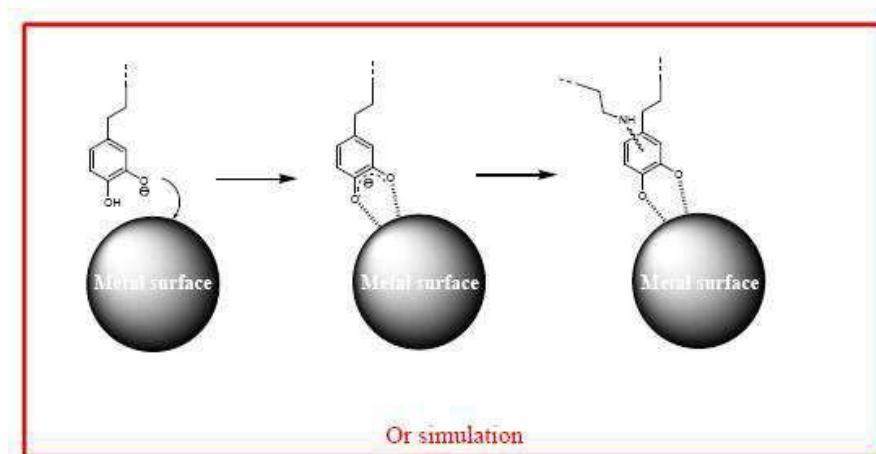
도면8



도면9



도면10



도면11

