



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0099013
(43) 공개일자 2018년09월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C09K 11/02 (2006.01) A61K 49/18 (2006.01)
C08B 37/00 (2006.01) C09K 11/77 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C09K 11/02 (2013.01)
A61K 49/1824 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0025936

(22) 출원일자 2017년02월28일

심사청구일자 2017년02월28일

(71) 출원인

창원대학교 산학협력단

경상남도 창원시 의창구 창원대학교 20(퇴촌동)

(72) 발명자

이용일

경상남도 창원시 성산구 원이대로 774, 108동
2405호 (상남동, 성원아파트)

아미드 살라

경상남도 창원시 의창구 창이대로483번길 40-1(사
림동)

(74) 대리인

김정수

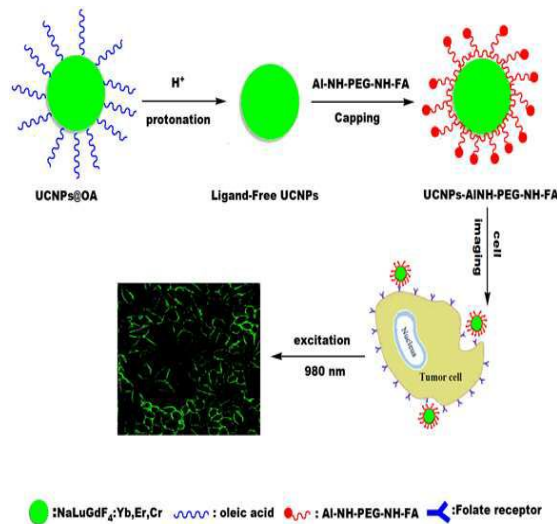
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 알지네이트 기반 생체적합성 양친매성 중합체로 기능화된 바이오 이미징용 업컨버전 발광 나노 입자

(57) 요약

본 발명은 업컨버전(upconversion) 형광체 입자; 및 상기 업컨버전 형광체 입자 표면을 기능화하는 알지네이트 기반 양친매성 중합체(alginate-based amphiphilic polymer)를 포함하는 바이오 이미징용 업컨버전 나노 입자에 대한 것으로서, 본 발명에 따른 바이오 이미징용 업컨버전 나노 입자는, 표면에 알긴산을 기반으로 합성된 신규한 양친성 중합체로 그 표면이 개질됨으로써, 우수한 상향 변환(upconversion) 발광 특성, 고도의 수분산성, 탁월한 안정성, 암 세포 등에 대한 세포 특이적 표적화 기능 및 생체 적합성을 가져 시험관 내(in vitro)는 물론 생체 내(in vivo) 바이오 이미징용 표지 물질로서 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C08B 37/0084 (2013.01)

C09K 11/7766 (2013.01)

G01N 33/587 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 10057848

부처명 중소기업청

연구관리전문기관 창업진흥원

연구사업명 2016년 창업선도대학사업

연구과제명 나노·바이오 이미징 및 초감도 나노형광 소재 개발

기 여 율 1/2

주관기관 창원대학교

연구기간 2016.07.01 ~ 2017.03.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016-0225

부처명 산업통산부

연구관리전문기관 한국산업기술진흥원

연구사업명 지역산업 창의융합 R & D

연구과제명 암조기진단 상향변환 나노표적입자 광학영상시스템 개발

기 여 율 1/2

주관기관 나우비전

연구기간 2016.05.01 ~ 2017.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

업컨버전(upconversion) 형광체 입자; 및

상기 업컨버전 형광체 입자 표면을 기능화하는 알지네이트 기반 양친매성 중합체(alginate-based amphiphilic polymer)를 포함하는 바이오 이미징용 업컨버전 나노 입자.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 알지네이트 기반 양친매성 중합체는 페그화(PEGylation)된 알지네이트인 것을 특징으로 하는 바이오 이미징용 업컨버전 나노 입자.

청구항 3

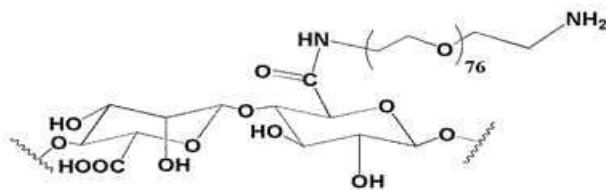
제2항에 있어서,

상기 알지네이트 기반 양친매성 중합체는, 알긴산(alginic acid)을 폴리(에틸렌글리콜)비스(아민) ($H_2N-PEG-NH_2$)과 반응시켜 형성된 중합체($Al-NH-PEG-NH_2$)인 것을 특징으로 하는 바이오 이미징용 업컨버전 나노 입자.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 알지네이트 기반 양친매성 중합체는 하기 화학식으로 표시되는 중합체인 것을 특징으로 하는 바이오 이미징용 업컨버전 나노 입자:



청구항 5

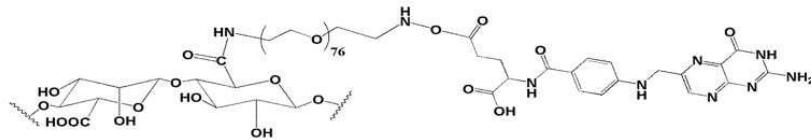
제2항에 있어서,

상기 알지네이트 기반 양친매성 중합체는, 알긴산(alginic acid)을 폴리(에틸렌글리콜)비스(아민) ($H_2N-PEG-NH_2$)과 반응시켜 형성된 중합체에 엽산(folate, FA)를 추가로 결합시켜 형성된 중합체($Al-NH-PEG-NH-FA$)인 것을 특징으로 하는 바이오 이미징용 업컨버전 나노 입자.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 알지네이트 기반 양친매성 중합체는 하기 화학식으로 표시되는 중합체인 것을 특징으로 하는 바이오 이미징용 업컨버전 나노 입자:



청구항 7

제1항에 있어서,

상기 알지네이트 기반 양친매성 중합체는, 리간드가 없는(ligand-free) 업컨버전형광체 입자의 표면을 기능화하는 것을 특징으로 하는 바이오 이미징용 업컨버전 나노 입자.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 업컨버전 형광체 입자는, $\text{NaAGdF}_4\text{:B}_1, \text{B}_2$ (단, 상기 A는 란타늄 원소이고, 상기 B_1 및 B_2 는 서로 다른 희토류 원소임)에 Cr^{3+} 이 동시 도핑된(co-doped) 형광체로 이루어진 것을 특징으로 하는 바이오 이미징용 업컨버전 나노 입자.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 A는 Y, Tb, Dy, Ho, Tm, Lu, La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm 및 Eu로 이루어진 군으로부터 선택된 1종인 것을 특징으로 하는 바이오 이미징용 업컨버전 나노 입자.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 B_1 및 B_2 는 서로 상이하며 각각 Yb, Er, Sc, Y, La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Tm, 및 Lu로 이루어진 군으로부터 선택된 1종인 것을 특징으로 하는 바이오 이미징용 업컨버전 나노 입자.

청구항 11

제8항에 있어서,

상기 Cr^{3+} 의 함량이 1 내지 30 mol%인 것을 특징으로 하는 바이오 이미징용 업컨버전 나노 입자.

청구항 12

제8항에 있어서,

상기 업컨버전 형광체 입자는 750 내지 1500 nm 파장의 광(light)을 흡수하여 400 내지 700 nm 파장의 광을 방출하는 것을 특징으로 하는 바이오 이미징용 업컨버전 나노 입자.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 기재된 바이오 이미징용 업컨버전 나노 입자를 포함하는 바이오 표지 물질.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 바이오 이미징용 나노 입자 에 대한 것으로서, 보다 상세하게는, 알지네이트를 기반으로 하는 생체적합성 양친매성 중합체로 기능화된 바이오 이미징용 나노 입자 에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 고령화 사회로 접어들면서 질병 예방 및 조기 검진의 중요성이 대두됨에 따라 질병 조기 진단 시스템의 개발이 중요시되고 있다. 혈청 및 체액을 이용한 진단 시스템에서 나아가 체내에 직접 적용하여 조직 및 기관 내 질환 발병 유무를 판단하기 위한 생체 진단 시스템의 개발이 활발히 진행되고 있다. 특히 나노 크기의 무기, 유기 소재는 독특한 구조적 특성을 기반으로 생체 진단 소재로 개발하기 위한 노력이 지속되고 있으며, 특히 형광을 띠는 나노소재는 높은 민감도와 편의성으로 인해 각광받고 있다.
- [0003] 종래부터 세포 및 조직의 이미징에 널리 이용되어 왔던 유기 형광물질(organic fluorophore) 및 형광 단백질(fluorescent protein)을 포함하는 기존의 생체 표지(bio label) 물질은 고강도 세포 이미징 실험에 사용시 높은 광표백(photobleaching) 속도가 문제된다. 또한, 형광물질 화합물은 화학 및 대사성 열화에 대해 취약해 장기 세포 추적 분석에 제약이 따른다.
- [0004] 또한, 양자점(Quantum Dot: QD)는 높은 양자 수율, 강한 형광성, 우수한 광안정성, 좁은 발광선폭 및 넓은 자외선(UV) 여기 범위를 가져, 분자 표지, 나아가 세포 및 생체 내 이미징에 대한 광범위한 응용을 가능하게 하는 반면, QD의 독성 및 화학적 불안정성에 대한 우려가 해소되지 않고 있다.
- [0005] 뿐만 아니라, 전술한 기존의 생체 표지들의 여기(excitation)는 통상적으로 자외선(UV) 또는 단파장 방사선을 필요로 하기 때문에, (i) 낮은 신호 대 잡음비(signal-to-noise ratio), (ii) 단파장 여기광의 낮은 고유 광 침투 깊이(inherent light-penetration depth), 그리고 (iii) 세포의 심각한 광 손상(photo damage) 가능성 등의 결점을 가진다.
- [0006] 따라서, 상기한 문제점을 가지는 종래의 생체 표지 물질에 대한 적합한 대안으로서 적외선(IR) 광에 의해 여기될 수 있는 생체 표지로서 근적외선-가시광선(NIR-to-visible) 업컨버전 나노 입자(upconversion nanoparticle, UCNP)를 고려할 수 있다.
- [0007] 근적외선 광은 인체에 안전하며 생체 조직을 수인치(inch)까지 관통할 수 있으므로, 근적외선 광이 UCNP의 가시광 형광을 유발하는 데 사용될 수 있다면 생체 내 세포 이미징에서 UCNP의 응용 가능성을 발견할 수 있다. UCNP는 다광자(multiphoton) 메커니즘을 통해 장파장 광(근적외선 광)의 여기 하에 단파장의 광을 발광해 새로운 종류의 형광성 생체 표지로 떠오르고 있다.
- [0008] UCNP의 특징으로는 높은 양자 수율, 좁은 방출 피크, 매우 큰 안티스톡스 이동(Anti-Stokes shift), 우수한 화학적 안정성 및 낮은 독성을 들 수 있다. UCNP의 여기를 위해서는 적외선(IR) 방사를 사용하기 때문에, 자외선(UV) 방사시 흔히 나타나는 자가형광 autofluorescence)이 없어 신호 대 잡음비 및 감지 감도가 향상될 수 있다. 또한, 강한 침투력을 갖는 적외선 조사는 세포에 덜 유해하기 때문에 UCNP는 세포 이미징을 위한 기존의 형광 생체 표지의 유망한 대안이며 생물학적 및 임상적 응용 분야에서 우수한 잠재력을 가지고 있다.
- [0009] 한편, UCNP의 표면 기능화(surface functionalization)는 생물 의학 응용 분야에 필수적으로서, 물에 안정하고 생체 적합성을 가지도록 할 뿐만 아니라 생체 물질 등의 특정 부위(moiety)와의 결합을 위한 활성 자리를 제공한다. UCNP의 표면 기능화는 대부분 SiO_2 또는 양친매성 고분자로 소수성 나노 입자를 캡슐화하는 것에 국한되어 있다.
- [0010] SiO_2 코팅의 경우, SiO_2 로 이루어진 캡슐화 층의 두께와 모양에 대한 정확한 제어가 어려울 수 있다. 한편, UCNP는 양친매성 중합체를 이용한 나노 입자 코팅을 통해 물에 분산될 수 있다. 예를 들어, Zhang et al.은 폴리(에틸렌 이민)으로 코팅된 크기 약 50 nm인 코팅 나노 입자가 일부 세포주에 전달되었다고 보고한 바 있다. Chow et al. 또한 소수성 나노 입자를 양친매성 폴리(아크릴산)으로 코팅함으로써 친수성으로 변환시켰다고 보고하였다. 이 과정에서, 양친매성 공중합체의 소수성 부분은 UCNP 표면층의 유기 기능기를 대체한다기보다 끼워지는(interleaved) 것이다. 그러나, 이러한 소수성 상호 작용은 약하기 때문에 결과적으로 나노 입자로부터 고분자 화합물이 탈착되어 입자의 응집을 일으킬 수 있다는 문제점을 가진다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0011] (비특허문헌 0001) Stephens, D. J.; Allan, V. J., Light Microscopy Techniques for Live Cell Imaging. Science (New York, N.Y.) 2003, 300 (5616), 82.

- (비특허문헌 0002) Wang, Y.; Shyy, J. Y. J.; Chien, S., Fluorescence Proteins, Live-Cell Imaging, and Mechanobiology: Seeing Is Believing. Annual review of biomedical engineering 2008, 10 (1), 1-38.
- (비특허문헌 0003) Jaiswal, J. K.; Mattoussi, H.; Mauro, J. M.; Simon, S. M., Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates. Nat Biotech 2003, 21 (1), 47-51.
- (비특허문헌 0004) Byrne, S. J.; Williams, Y.; Davies, A.; Corr, S. A.; Rakovich, A.; Gun'ko, Y. K.; Rakovich, Y. P.; Donegan, J. F.; Volkov, Y., "Jelly dots": synthesis and cytotoxicity studies of CdTe quantum dot-gelatin nanocomposites. Small 2007, 3, 1152-1156.
- (비특허문헌 0005) le Masne de Chermont, Q.; Chanac, C.; Seguin, J.; Pell, F.; Maestrejean, S.; Jolivet, J.-P.; Gourier, D.; Bessodes, M.; Scherman, D., Nanoprobes with near-infrared persistent luminescence for in vivo imaging. Proceedings of the National Academy of Sciences 2007, 104 (22), 9266-9271.
- (비특허문헌 0006) West, J. L.; Halas, N. J., Engineered Nanomaterials for Biophotonics Applications: Improving Sensing, Imaging, and Therapeutics. Annual review of biomedical engineering 2003, 5 (1), 285-292.
- (비특허문헌 0007) Auzel, F., Upconversion and Anti-Stokes Processes with f and d Ions in Solids. Chemical Reviews 2004, 104 (1), 139-174.
- (비특허문헌 0008) Wang, X.; Li, Y., Monodisperse nanocrystals: general synthesis, assembly, and their applications. Chemical Communications 2007, (28), 2901-2910.
- (비특허문헌 0009) Ehlert, O.; Thomann, R.; Darbandi, M.; Nann, T., A Four-Color Colloidal Multiplexing Nanoparticle System. ACS Nano 2008, 2 (1), 120-124.
- (비특허문헌 0010) Li, Z.; Zhang, Y.; Jiang, S., Multicolor Core/Shell-Structured Upconversion Fluorescent Nanoparticles. Advanced Materials 2008, 20 (24), 4765-4769.
- (비특허문헌 0011) Michalet, X.; Pinaud, F. F.; Bentolila, L. A.; Tsay, J. M.; Doose, S.; Li, J. J.; Sundaresan, G.; Wu, A. M.; Gambhir, S. S.; Weiss, S., Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics. Science (New York, N.Y.) 2005, 307 (5709), 538.
- (비특허문헌 0012) Meiser, F.; Cortez, C.; Caruso, F., Biofunctionalization of Fluorescent Rare-Earth-Doped Lanthanum Phosphate Colloidal Nanoparticles. Angewandte Chemie International Edition 2004, 43 (44), 5954-5957.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 본 발명은 상기한 종래 기술의 문제점을 해결하기 위해 우수한 상향 변환(upconversion) 발광 특성, 우수한 수분산성, 탁월한 안정성, 세포 특이적 표적화 기능 및 생체 적합성을 동시에 가지는 바이오 이미징용 업컨버전 나노 입자의 제공을 그 목적으로 한다.

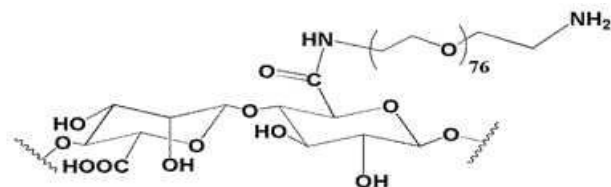
과제의 해결 수단

- [0013] 상기한 바와 같은 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 업컨버전(upconversion) 형광체 입자 및 상기 업컨버전 형광체 입자 표면을 기능화하는 알지네이트 기반 양친매성 중합체(alginate-based amphiphilic polymer)를 포함하는 바이오 이미징용 업컨버전 나노 입자를 제안한다.
- [0014] 또한, 상기 알지네이트 기반 양친매성 중합체는 페그화(PEGylation)된 알지네이트인 것을 특징으로 하는 바이오 이미징용 업컨버전 나노 입자를 제안한다.
- [0015] 또한, 상기 알지네이트 기반 양친매성 중합체는, 알긴산(alginic acid)을 폴리(에틸렌글리콜)비스(아민) (H_2N-

PEG-NH₂)과 반응시켜 형성된 중합체(AI-NH-PEG-NH₂)인 것을 특징으로 하는 바이오 이미징용 업컨버전 나노 입자를 제안한다.

- [0016] 또한, 상기 알지네이트 기반 양친매성 중합체는 하기 화학식 1로 표시되는 중합체(AI-NH-PEG-NH₂)인 것을 특징으로 하는 바이오 이미징용 업컨버전 나노 입자를 제안한다.:

화학식 1

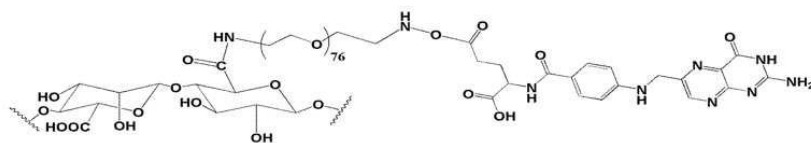


[0017]

- [0018] 또한, 상기 알지네이트 기반 양친매성 중합체는, 알긴산(alginic acid)을 폴리(에틸렌글리콜)비스(아민) (H₂N-PEG-NH₂)과 반응시켜 형성된 중합체에 엽산(folate, FA)를 추가로 결합시켜 형성된 중합체(AI-NH-PEG-NH-FA)인 것을 특징으로 하는 바이오 이미징용 업컨버전 나노 입자를 제안한다.

- [0019] 또한, 상기 알지네이트 기반 양친매성 중합체는 하기 화학식 2로 표시되는 중합체인 것을 특징으로 하는 바이오 이미징용 업컨버전 나노 입자를 제안한다.

화학식 2



[0020]

- [0021] 또한, 상기 알지네이트 기반 양친매성 중합체는 페그화(PEGylation)된 알지네이트인 것을 특징으로 하는 바이오 이미징용 업컨버전 나노 입자를 제안한다.

- [0022] 또한, 상기 알지네이트 기반 양친매성 중합체는, 리간드가 없는(ligand-free) 업컨버전형광체 입자의 표면을 기능화하는 것을 특징으로 하는 바이오 이미징용 업컨버전 나노 입자를 제안한다.

- [0023] 또한, 상기 업컨버전 형광체 입자는, NaAgdF₄:B₁, B₂ (단, 상기 A는 란타늄 원소이고, 상기 B₁ 및 B₂는 서로 다른 희토류 원소임)에 Cr³⁺이 동시 도핑된(co-doped) 형광체로 이루어진 것을 특징으로 하는 바이오 이미징용 업컨버전 나노 입자를 제안한다.

- [0024] 또한, 상기 A는 Y, Tb, Dy, Ho, Tm, Lu, La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm 및 Eu로 이루어진 군으로부터 선택된 1종인 것을 특징으로 하는 바이오 이미징용 업컨버전 나노 입자를 제안한다.

- [0025] 또한, 상기 B₁ 및 B₂는 서로 상이하며 각각 Yb, Er, Sc, Y, La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Tm, 및 Lu로 이루어진 군으로부터 선택된 1종인 것을 특징으로 하는 바이오 이미징용 업컨버전 나노 입자를 제안한다.

- [0026] 또한, 상기 Cr³⁺의 함량이 1 내지 30 mol%인 것을 특징으로 하는 바이오 이미징용 업컨버전 나노 입자를 제안한다.

- [0027] 또한, 상기 업컨버전 형광체 입자는 750 내지 1500 nm 파장의 광(light)을 흡수하여 400 내지 700 nm 파장의 광을 방출하는 것을 특징으로 하는 바이오 이미징용 업컨버전 나노 입자를 제안한다.

[0028] 그리고, 본 발명은 발명의 다른 측면에서, 상기 바이오 이미징용 업컨버전 나노 입자를 포함하는 바이오 표지 물질을 제안한다.

발명의 효과

[0029] 본 발명에 따른 바이오 이미징용 업컨버전 나노 입자는, 표면에 알긴산을 기반으로 합성된 신규한 양친성 중합체로 그 표면이 개질됨으로써, 우수한 상향 변환(upconversion) 발광 특성, 고도의 수분산성, 탁월한 안정성, 암 세포 등에 대한 세포 특이적 표적화 기능 및 생체 적합성을 가져 시험관 내(*in vitro*)는 물론 생체 내(*in vivo*) 바이오 이미징용 표지 물질로서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 Al-NH-PEG-NH-FA가 캡핑된 UCNP의 제조 및 이를 이용한 바이오 이미징 메커니즘의 일례를 보여주는 개략도이다.

도 2는 본원 실시예에서 업컨버전 나노 입자의 표면 기능화를 위해 사용되는 알지네이트 기반 알지네이트 기반 양친매성 중합체(Al-NH-PEG-NH₂ 및 Al-NH-PEG-NH-FA)의 합성 과정을 나타낸 도면이다.

도 3은 (a) 올레산염 캡핑된 UCNP, (b) 올레산염이 없는 UCNP, (c) Al-NH-PEG-NH₂가 캡핑된 UCNP 및 (d) Al-NH-PEG-NH-FA가 캡핑된 UCNP에 대한 FT-IR 스펙트럼이다.

도 4는 (a) Al-NH-PEG-NH₂ 및 (b) Al-NH-PEG-NH-FA의 ¹H-NMR 스펙트럼이다.

도 5는 (a) UCNP, (b) Al-NH-PEG-NH₂가 캡핑된 UCNP, 및 (c) Al-NH-PEG-NH-FA가 캡핑된 UCNP의 XRD 패턴이다.

도 6은 UC-YbErCr의 EDX 스펙트럼이다.

도 7은 (a) UCNP의 TEM 이미지 (b) UCNP의 HRTEM 이미지 (내삽도: SAED), (c) Al-NH-PEG-NH₂가 캡핑된 UCNP의 TEM 이미지(내삽도: HRTEM 이미지), (d) Al-NH-PEG-NH₂가 캡핑된 UCNP의 크기 분포도, (e) Al-NH-PEG-NH-FA가 캡핑된 UCNP의 TEM 이미지(내삽도: HRTEM 이미지), (f) Al-NH-PEG-NH-FA가 캡핑된 UCNP의 크기 분포도이다.

도 8a는 UCNP, UCNP-Al-NH-PEG-NH₂ 및 UCNP-Al-NH-PEG-NH-FA의 UV-Vis 흡수 스펙트럼이다.

도 8b는 UCNP, UCNP-NH-PEG-NH₂ 및 UCNP-Al-NH-PEG-NH-FA의 UC 발광 스펙트럼이다,

도 9는 Cr³⁺가 도핑된 NaLuGdF₄:Yb, Er의 다중 포톤 흡수 기작 매커니즘(multi-photon absorption process mechanism)을 개략적으로 나타낸 도면이다.

도 10은 형광법에 의해 결정된 Al-NH-PEG-NH₂ 및 Al-NH-PEG-NH-FA의 임계 미셀 농도(CMC)를 나타낸 그래프이다.

도 11a는 UCNP-Al-NH-PEG-NH₂ 및 UCNP-Al-NH-PEG-NH-FA과 함께 24 시간 동안 배양하고 표준 MTT 방법으로 정량 분석한 후의 HeLa 세포 생존률을 나타낸 그래프이다.

도 11b는 UCNP-Al-NH-PEG-NH₂ 및 UCNP-Al-NH-PEG-NH-FA과 함께 24 시간 동안 배양하고 표준 MTT 방법으로 정량 분석한 후의 KB 세포 생존률을 나타낸 그래프이다.

도 12는 UCNP-Al-NH-PEG-NH₂와 함께 1 시간 동안 배양한 후의 HeLa 세포(a: 명시야 이미지, b: 암시야 이미지) 및 KB 세포(c: 명시야 이미지, d: 암시야 이미지)에 대한 형광 이미지이다.

도 13은 UCNP-Al-NH-PEG-NH-FA와 함께 1 시간 동안 배양한 후의 HeLa 세포(a: 명시야 이미지, b: 암시야 이미지) 및 KB 세포(c: 명시야 이미지, d: 암시야 이미지)에 대한 형광 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기능 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 것이다.

- [0032] 본 발명의 개념에 따른 실시예는 다양한 변경을 가할 수 있고 여러 가지 형태를 가질 수 있으므로 특정 실시예들을 도면에 예시하고 본 명세서 또는 출원에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나 이는 본 발명의 개념에 따른 실시예를 특정한 개시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0033] 본 명세서에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 실시된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부분품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부분품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0034] 이하, 본 발명을 상세히 설명하도록 한다.
- [0035] 본 발명에 바이오 이미징용 업컨버전 나노 입자는, 업컨버전(upconversion) 발광 특성을 가지는 형광체 입자와 상기 업컨버전 형광체 입자 표면을 기능화하는 알지네이트 기반 양친매성 중합체(alginate-based amphiphilic polymer)를 포함하여 이루어진다.
- [0036] 이때, 상기 알지네이트 기반 양친매성 중합체는 알긴산(alginic acid)를 페그화(PEGylation)시킨 페그화된 알지네이트인 것이 바람직한데, 이와 같이 페그화된 알지네이트를 업컨버전 나노 입자의 표면 개질제로 사용함으로써 종양 세포 등의 표적 세포에 대한 능동적 표적화 및 영상화 목적을 효과적으로 달성할 수 있다,
- [0037] 특히, 페그화된 알지네이트 내의 알지네이트와 폴리에틸렌글리콜의 공유 결합은 옵소닌(opsonin)에 의한 인식(recognition)으로부터 업컨버전 나노 입자를 보호함으로써, 종양 세포의 능동적 표적화를 달성하기 위한 선결 조건인 연장된 혈액 순환 프로파일(blood circulation profile)을 가능케 한다.
- [0038] 일례로, 상기 페그화된 알지네이트는 알긴산(alginic acid)을 폴리(에틸렌글리콜)비스(아민) ($H_2N-PEG-NH_2$)과 반응시켜 얻어지는 중합체($Al-NH-PEG-NH_2$)일 수 있다.
- [0039] 나아가, 상기 페그화된 알지네이트는 상기 중합체($Al-NH-PEG-NH_2$)에 엽산(folate, FA)를 추가로 접합(conjugation)시켜 형성된 중합체($Al-NH-PEG-NH-FA$)일 수 있다. 엽산은 다양한 암 세포에서 과발현(overexpression)되는 엽산 수용체(folate receptor, FR)에 높은 친화성을 나타내기 때문에, 페그화된 알지네이트에 엽산을 추가로 접합함으로써 암 세포에 대한 특이적 결합을 현저히 증가시키고 부작용을 최소화하는 효과를 기대할 수 있다.
- [0040] 한편, 상기 알지네이트 기반 양친매성 중합체는, 리간드가 없는(ligand-free) 업컨버전형광체 입자의 표면을 기능화해서 바이오 이미징용 업컨버전 나노 입자를 형성시킬 수 있다.
- [0041] 상기 업컨버전 형광체 입자는 $NaAGdF_4:B_1, B_2$ (단, 상기 A는 란타넘 원소이고, 상기 B_1 및 B_2 는 서로 다른 희토류 원소임)에 Cr^{3+} 이 동시 도핑된(co-doped) 형광체로 이루어질 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0042] 여기서, 상기 A는 Y, Tb, Dy, Ho, Tm, Lu, La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm 및 Eu로 이루어진 군으로부터 선택된 1종일 수 있고, 또한, 상기 B_1 및 B_2 는 서로 상이하며 각각 Yb, Er, Sc, Y, La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Tm, 및 Lu로 이루어진 군으로부터 선택된 1종일 수 있다.
- [0043] 또한, 상기 Cr^{3+} 의 함량은 바람직하게 1 내지 30 mol%일 수 있다.
- [0044] 이하, 본 명세서를 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.
- [0045] 그러나, 본 명세서에 따른 실시예들은 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 명세서의 범위가 아래에서 상술하는 실시예들에 한정되는 것으로 해석되지 않는다. 본 명세서의 실시예들은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 명세서를 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0046] **<실시예> 알지네이트 기반 생체적합성 양친매성 중합체로 기능화된 업컨버전 나노 입자의 제조**
- [0047] (1) $Al-NH-PEG-NH_2$ 및 $Al-NH-PEG-NH-FA$ 중합체의 합성 및 특성 분석
- [0048] 본 실시예에서는 도 1에 예시적으로 나타낸 바와 같이 세포 이미징에 사용될 수 있는 수분산성, 생체 적합성의 업컨버전 나노 입자(UCNP)를 생성하기 위해 UCNP의 표면 개질에 이용할 수 있는 신규한 알지네이트 기반 생체적

합성 양친매성 중합체를 제조하고자 한다.

[0049] 우선, 도 2를 참조하면, 알긴산(alginic)의 페그화(PEGylation)를 위해 폴리(에틸렌글리콜)비스(아민) (poly(ethyleneglycol)bis(amine, $H_2N-PEG_{3400}-NH_2$)과 알긴산의 카르복시기를 반응시켜 생리학적으로 안정한 아미드 결합을 생성시켜 알지네이트 기반 양친매성 중합체(AI-NH-PEG-NH₂)를 얻었다.

[0050] 그리고, 염산과 결합된 알지네이트 기반 양친매성 중합체(AI-NH-PEG-NH-FA)는 3 단계 절차로 합성 하였다,

[0051] 즉, (i) 알긴산을 과량의 PEG 비스아민(PEG bis-amine)과 반응시켜 AI-NH-PEG-NH₂를 형성시키고; (ii) FA-NHS를 얻기 위해 NHS으로 염산(FA)을 활성화시키고; (iii) AI-NH-PEG-NH₂을 FA-NHS와 결합시켜 AI-NH-PEG-NH-FA를 제조하였다.

[0052] 두번째 NH₂가 FA(표적화 부위)를 접합시키는데 필요하기 때문에, AI-NH-PEG-NH-AI 이합체(dimer)의 형성을 막기 위해 과량의 PEG 비스아민이 사용되었다. 카르보디이미드carbodiimide-activated로 활성화된 염산은 글루타메이트 잔기의 α 또는 γ 카르복시기를 통해 커플링 될 수 있으므로, 반응 조건은 원위(distal) γ 카르복시 잔기의 결합을 지지하도록 선택되었다. 염산 사슬에 의해 부과되는 입체 장애(steric hindrance) 제한으로 인해 염산 유도체는 주로 γ-연결 이성질체로 구성 될 것으로 예상된다. AI-NH-PEG-NH₂의 특성 분석은 FT-IR 및 ¹H-NMR에 의해 수행되었다. AI-NH-PEG-NH₂ 중합체에서 유리 아미노기의 존재는 닐히드린 분석(Ninhydrin assay)에 의해 확인되었다. 닐히드린 기반 분석에서 닐히드린은 1차 아민과 반응하여 루만의 보라색(Ruhemann's purple)으로 알려진 짙은 청색 또는 보라색의 발색단(chromophore)을 형성한다. 첫 번째 접합 후, 염산 분자를 접합시키기 위해 -NH₂의 47.5%가 AI-NH-PEG-NH₂ 중합체에 남았다. FT-IR 차트(도 3의 b)의 1636 cm⁻¹ (아미드 C = O) 및 1511 cm⁻¹ (N-H 결합)의 진동 주파수로부터, 활성화된 알긴산에 PEG이 접합되었음이 확인되었다. AI-NH-PEG-NH-FA의 FT-IR 차트(도 3의 c)는 AI-NH-PEG-NH₂ 스펙트럼에서와 유사한 피크를 나타내었으며, 1482과 1511 사이의 새로운 피크의 출현은 염산의 프테린(pterin) 및 페닐 고리에 기인한 것이며, 1607에서의 피크는 염산의 NH 진동의 굴곡 모드(bending mode)와 관련이 있으며, 염산 부분의 자유 카르복실기에 기인한 1710 cm⁻¹에서의 C = O의 신축 진동 피크가 나타난다. ¹H-NMR 또한 알지네이트 양성자와 함께 PEG 비스-아민 및 염산의 양성자의 존재를 NMR 스펙트럼(도 4)에서 확인시켜줬다. δ = 2.1에서 4.8ppm까지의 피크의 출현은 알긴산의 H 양성자와 관련이 있다. 2.65에서 3.5ppm의 피크는 PEG 블록의 CH₂ 양성자에 대한 것이다(도 4의 a). 또한, 7.62 ppm에서 아미드 그룹의 H 존재에 대한 신호가 나타났다. AI-NH-PEG-NH₂ 중합체를 공유 결합성 아미드 결합을 반영하는 FT-IR이 정전기 상호 작용의 결과가 아니라는 것을 확인하기 위해 0.1 M HCl 용액으로 세척 하였다. 또한, 염산 잔기의 AI-NH-PEG-NH₂와의 결합은 염산의 양성자에 해당하는 δ = 6.5-11.0 ppm에서의 신호의 존재로 확인되었다(도 4의 b). AI-NH-PEG-NH₂ 및 AI-NH-PEG-NH-FA의 특성에 대한 자세한 내용은 Supporting Information에 기술되어 있다.

[0053] (2) NaLuGdF₄ : Yb, Er, Cr UCNP의 합성 및 표면 개질

[0054] 올레산(OA) 리간드로 캡핑된 단분산 UCNP (NaLuGdF₄ : Yb, Er, Cr)가 저온에서 용해열(solvolothermal) 합성을 통해 준비되었다. NaLuGdF₄ : Yb, Er에 대한 Cr³⁺의 도핑은 녹색 가시광 상향 변환 발광을 현저하게 증가시켰고, 15mol % Cr³⁺를 함유한 시료에서 최대 발광 강도가 관찰되었다. 이어서, 소수성 UCNP를 염산(HCl)을 사용하여 수성상으로 옮겨 OA를 제거한 후, 합성된 양친매성 알긴산 중합체(AI-NH-PEG-NH₂ 및 AI-NH-PEG-NH-FA)로 캡핑하였다. 알지네이트 양친매성 고분자를 이용한 UCNP의 효과적인 표면 개질은 FT-IR, XRD 및 TEM에 의해 입증되었다. UCNP, 리간드가 없는(ligand-free) UCNP 및 알지네이트 기반 양친매성 중합체로 개질된 UCNP의 표면에 있는 작용기는 FT-IR 스펙트럼으로 확인되었다. NaLuGdF₄:Yb, Er, Cr UCNP의 표면은 계면 활성제 및 캐핑 리간드 역할을 하는 올레산 층으로 캡핑된다. 도 3의 a에 도시된 바와 같이, 올레산은 약 3425cm⁻¹의 투과 밴드(transmission band)를 나타내며, 하이드록실기(hydroxyl group)의 신장 진동에 대응한다. 올레산 사슬의 C = C의 알켄 신축으로 인한 밴드가 3009 cm⁻¹로 나타났다. 2965와 2875 cm⁻¹에 있는 두 개의 피크는 올레산 분자의 긴 알킬 사슬에 존재하는 메틸렌 그룹의 비대칭 및 대칭 인장 진동에 각각 대응된다. 1740 cm⁻¹에서의 밴드는 올

레산에서 $C = O$ 의 신축 진동에 해당한다. 1625 및 1480 cm^{-1} 의 피크는 카복실기(COO^-)의 비대칭 및 대칭 인장 진동과 각각 관련된다. 또한, 약 735 cm^{-1} 의 밴드는 금속 양이온에 배위하는 $C-O$ 신축 진동과 관련되어 있어 올레산과 무기 구성 요소 사이의 화학 결합이 형성됨을 시사한다. 카르복실레이트 신장과 함께 3009 cm^{-1} 에서의 알켄 신장 ($C = C$)의 소멸 및 2965 및 2875 cm^{-1} 에서의 메틸렌기 피크의 2 개의 비대칭 및 대칭 신장 진동에 의해 UCNP로부터 올레산염 리간드의 제거가 드러났다.

[0055] 1643과 1020 cm^{-1} 에 두 개의 밴드가 존재하는데, 이들은 각각 $-COO^-$, $C-O$ 기에 기인한다(도 3의 b). 이러한 결과는 올레산염으로 캡핑된 UCNP의 경우, 올레산 분자가 COO^- 기와 표면상의 금속 이온 사이의 배위를 통해 UCNP 상에 화학적으로 흡착된다는 것을 확인시켜준다. 이는 올레산염으로 캡핑된 산화철 나노 입자에 대해 이전에 관찰된 바 있다. 도 3의 c는 $Al-NH-PEG-NH_2$ 로 개질된 UCNP의 FT-IR 스펙트럼을 도시한다. 중첩된 아민과 하이드록실기의 신축 진동 밴드는 3450 cm^{-1} 에 나타난다. $C-O$ 결합의 대칭 인장 진동에 기인하는 강한 투과 밴드는 스펙트럼에서 1125 cm^{-1} 에서 명확하게 볼 수 있다. 또한, 2918 및 2850 cm^{-1} 에서의 두 개의 피크는 각각 PEG 비스아민 사슬에 존재하는 메틸렌기의 비대칭 및 대칭 인장 진동에 상응한다. 1636 cm^{-1} 및 1511 cm^{-1} 의 피크는 (아미드 $C = O$) 및 ($N-H$ 결합)에 각각 대응된다. 도 2d는 UCNP- $Al-NH-PEG-NH-FA$ 스펙트럼이며, $Al-NH-PEG-NH-FA$ 에 의한 UCNP의 표면 개질은 파수(wavenumber)에서의 약간의 천이를 동반하면서 UCNP- $Al-NH-PEG-NH_2$ 스펙트럼에서와 유사한 피크를 나타내며, 새로운 피크가 나타났으며 950 cm^{-1} 의 피크는 염산 부분의 방향족 치환에 해당되며, 1482 내지 1511 cm^{-1} 사이의 피크는 염산의 프테린 및 페닐 고리로 인한 피크이며, 1607 cm^{-1} 에서의 피크는 염산의 NH 진동의 굴곡 모드와 관련이 있으며 염산 부분의 자유 카르복실기에 기인해 $C = O$ 의 신축 진동 피크가 1710 cm^{-1} 에서 나타난다. FT-IR 데이터는 합성된 UCNP가 신규의 합성된 알지네이트 양친매성 중합체로 성공적으로 개질되었음을 시사한다.

[0056] UCNPs, UCNP- $Al-NH-PEG-NH_2$ 및 UCNP- $Al-NH-PEG-NH-FA$ 나노 물질의 형성에 대한 추가적인 증거는 XRD 분석을 통해 얻어졌다. 도 5는 β -UC-YbErCr (JCPDF No 27-0726)의 표준 데이터와 함께, 합성된 UCNP, UCNP- $Al-NH-PEG-NH_2$ 및 UCNP- $Al-NH-PEG-NH-FA$ 나노 물질의 XRD 패턴을 보여준다.

[0057] 올레산으로 안정화된 UCNP의 경우, 모든 회절 피크는 도 5의 a에 도시된 육방정 β -UC-YbErCr (JCPDF No. 27-0726)로 쉽게 인덱싱 될 수 있다. 반면에, 크롬 이온은 보다 큰 전기 음성도(1.6eV)를 가지고 있기 때문에, 원료 전구체와 빠르게 반응하여 새로운 상을 형성할 수 있으며, 2θ 각이 19.17° , 22.46° , 31.89° 인 각 피크 (별표로 표시)는 Na_3CrF_6 (JCPDS No. 74-1314)(011), (002) 및 (111)에 대응한다. 그러나 육방정 상이 지배적이며, UCNP- $Al-NH-PEG-NH_2$ 와 UCNP- $Al-NH-PEG-NH-FA$ 의 XRD 패턴 (도 5의 b 및 c)은 모체인 UCNP@올레산염과 동일하다. 따라서, 육방정상 구조는 중합체 캡핑에 의해 영향을 받지 않았다. 또한, 중합체 캡핑은 UCNP의 상이한 결정 평면에 대해 상이한 친화력을 나타내지 않았다. $NaLuGdF_4$ 호스트 내로의 Cr^{3+} 이온의 혼입은 EDX 스펙트럼에 의해 확인되었다(도 6). 한편, 표면 미개질 및 표면 개질된 $NaLuGdF_4 : Yb, Er, Cr$ UCNP의 크기 및 형태는 TEM에 의해 분석하였다. 표면 개질 전의 UCNP의 전형적인 TEM 이미지가 도 7의 a에 도시되어 있으며, 이에 따르면 UCNP는 평균 직경이 약 7 nm 로 균일한 크기를 가지며 잘 분산되어 있다. 고해상도 투과 전자 현미경(HRTEM) 이미지(도 7의 b)에 나타난 면간 거리는 β -UC-YbErCr (JCPDF No. 27-0726)의 $(10\bar{1}0)$ 면 및 $(11\bar{2}0)$ 면의 d-스페이싱 값에 각각 대응하는 0.50 및 0.29 nm 인 것으로 드러났다 UCNP는 탁월한 결정성을 갖는 육각형 구조를 특징으로 하는데, 이는 도 3b의 내삽도에서 밝혀지는 것처럼 높은 발광성의 희토류 입자를 얻는데 유리하다. $Al-NH-PEG-NH_2$ 와 $Al-NH-PEG-NH-FA$ 에 의한 표면 개질 후, UCNP의 크기는 각각 약 $20 \pm 0.2\text{ nm}$ 및 $26 \pm 0.5\text{ nm}$ 로 증가하였으며(저배율 TEM 이미지를 이용해 300 개 이상의 나노 입자를 평가함), 이는 표면 미개질된 UCNP의 표면에 폴리머 층이 형성되었기 때문이다(도 7의 c 내지 f). 생성된 UCNP- $Al-NH-PEG-NH_2$ 는 UCNP- $Al-NH-PEG-NH-FA$ 와 동일한 형태학적 특성을 유지하며(도 7의 c 및 e), 이로부터 상기 2 개의 배위 중합체는 전체 입자의 내부 구조를 파괴하지 않으면서 표면에 노출된 란타나이드(lanthanide) 이온과만 반응해 표면을 개질함을 보여준다.

[0058] <실험예 1> 실시예 1에서 제조된 나노 입자 나노 입자의 광학 특성 분석

[0059] UCNPs-A1-NH-PEG-NH₂ 및 UCNPs-A1-NH-PEG-NH-FA를 갖는 UCNP의 광학 특성은 UV-vis 흡수(도 8a)와 UCL(도 8b)에 의해 특성 분석이 이루어졌다. 도 8a에 따르면 UCNP의 스펙트럼이 200-400nm의 범위에서 흡수 피크를 나타내지 않으며, A1-NH-PEG-NH₂을 이용한 표면 개질 후에는, 약 282nm에서 전형적인 흡수 피크를 나타내는데, 이는 양친매성 알지네이트 구조 내의 카복실산기 내의 카보닐의 $n \rightarrow \pi^*$ 전이에 해당한다. UCNP-A1-NH-PEG-NH-FA는 염산의 에논(enone) 부위의 $\pi - \pi^*$ 및 $n - \pi^*$ 전이로 인한 293 nm와 360 nm에서의 특징적인 흡수 밴드를 보였다. 이 결과 또한 UCNP가 A1-NH-PEG-NH₂ 및 A1-NH-PEG-NH-FA 중합체로 성공적으로 개질되었음을 증명한다. 이들 폴리머 캡핑된 UCNP는 다이오드 레이저의 파장 980 nm 근적외선광 하에서 여기될 때 육안으로 볼 수 있는 녹색 빛을 방출한다. 980 nm 파장의 여기 하에 물에서 1 mg/mL의 분산 농도를 갖는 UCNP와 표면 개질된 UCNP의 상향 변환 발광 스펙트럼이 도 8b에 도시되어 있고, 해당 에너지 준위 다이어그램은 도 9에 나타났다. 표면 개질 후, NaLuGdF₄ : Yb, Er, Cr UCNP는 물에서 안정적이며 여전히 강한 UC 발광을 방출한다. 모든 나노 입자는 500 내지 700nm의 범위에서 3개의 구분되는 밴드를 나타났다. 517 ~ 535 nm 및 535 ~ 561 nm 범위에서의 강력한 녹색 발광은 $^2H_{11/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$ 및 $^4S_{3/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$ 전이에 각각 대응하며, 658에서 670 nm에서의 약한 적색 발광은 $^4F_{9/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$ 전이에 대응된다. 분명히, 980 nm 레이저로 여기된 콜로이드 용액의 UC 발광은 녹색으로 나타난다. 동일한 분산 농도에서 유사한 상향 변환 발광 강도가 관찰되었는데, 이는 2 개의 중합체 캡핑이 UCNP의 발광 효율에 유사한 영향을 미침을 나타낸다. UCNP가 캡핑된 고분자는 표면 미개질된 UCNP에 비해 발광 강도가 약간 감소하는데, 이는 양친매성 알지네이트 중합체의 표면 패시베이션(passivation) 효과에 기인해 상향 변환 에너지 전달 과정 동안 복사 재결합(radiative recombination) 과정이 감소함에 따른 것일 수 있다.

[0060] <실험예 2> 실시예 1에서 제조된 알긴산 양친매 바이오 폴리머의 임계 미셀 농도 측정

[0061] 합성된 알지네이트 양친매성 중합체, A1-NH-PEG-NH₂ 및 A1-NH-PEG-NH-FA는 수성 매질에서 쉽게 자기 조립되어 미셀(micelle)을 형성할 수 있다. 임계 미셀 농도(critical micelle concentration, CMC)는 양친매성 물질의 중요한 특성으로 미셀 형성 능력을 나타낸다. A1-NH-PEG-NH₂와 A1-NH-PEG-NH-FA의 미셀화 거동을 플루오레세인(fluorescein)을 프로브로 사용하는 형광법을 이용하여 조사하였다. 도 10은 중합체 농도의 대수(logarithm)에 대한 형광 강도의 변화를 도시한다. A1-NH-PEG-NH₂ 또는 A1-NH-PEG-NH-FA 농도가 증가하여 미셀을 형성함에 따라, 미셀 내로의 플루오레세인의 혼입은 형광 강도의 증가를 초래하였다. CMC 값은 두 선의 교차점에서 결정될 수 있다. 그림 5는 염산과 양친매성 알지네이트가 결합함에 따라 CMC 값이 감소함을 보여준다. A1-NH-PEG-NH-FA (0.317 mM)는 A1-NH-PEG-NH₂ (0.631 mM)보다 CMC 값이 약간 낮으며, 이는 염산의 중성 특성 때문일 수 있다. CMC 값이 낮은 A1-NH-PEG-NH-FA가 미셀을 쉽게 형성 할 수 있고 고도로 희석된 조건에서도 코어-셸 구조를 유지할 수 있다. 친수성 블록의 분자량이 소수성 블록의 분자량을 초과하면 중합체가 물에 효과적으로 분산되어 미셀을 형성 할 수 있음을 알 수 있다. 합성된 양친매성 알지네이트 중합체의 CMC 계산 값은 천연 생체 고분자와 합성 미셀 모두에 대한 문헌 값의 범위보다 낮다. 예를 들어, 이전에 합성된 알지네이트 기반의 양친매성 물질의 CMC 값은 1.35 g/L 및 0.002-0.003 g/L이며, 기존 계면활성제인 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-polyethylene glycol-2000의 CMC 값은 ~ 0.035 g / L이다.

[0062] <실험예 3> 실시예 1에서 제조된 나노 입자 나노 입자의 세포 독성 분석(Cell Cytotoxicity Assay)

[0063] 합성된 양친매성 알지네이트 중합체는 NaLuGdF₄ : Yb, Er, Cr UCNP를 캡핑해 우수한 수분산성 및 높은 콜로이드 안정성, 그리고, 높은 상향 변환 발광 강도와 긴 발광 수명을 나타냈다. 독성은 농도, 수력학적(hydrodynamic) 크기, 표면 전하 및 투여 경로 등과 같은 여러 요인에 기인할 수 있으므로, UCNP-A1-NH-PEG-NH₂ 및 UCNP-A1-NH-PEG-NH-FA 나노 물질의 세포 독성을 조사 할 필요가 있다. UCNP-A1-NH-PEG-NH₂ 및 UCNP-A1-NH-PEG-NH-FA 나노 물질의 세포 독성을 조사하기 위해, HeLa 및 KB 세포에 대해 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 분석을 사용하여 24 시간 후 세포 증식에 대한 UCNP-A1-NH-PEG-NH₂ 및 UCNP-A1-NH-PEG-NH-FA의 효과를 측정 하였다. UCNP-A1-NH-PEG-NH₂ 및 UCNP-A1-NH-PEG-NH-FA의 부재 또는 55, 111 및 333 μg/L의 존재 하에서 세포의 증식에 유의한 차이는 관찰되지 않았다(도 11a 및 11b). 하기 식에 따라 계산된 세포 생존율(cellular viability)은 24 시간 후 HeLa 및 KB 세포에 대해 각각 93 % 및 85 % 이상인 것으로 평가되었다.

[0064] HeLa 세포에 대한 UCNP-A1-NH-PEG-NH₂ 및 UCNP-A1-NH-PEG-NH-FA의 세포 독성은 KB 세포에 비해 현저히 낮았으며

투여량에 의존하지 않았다. 이러한 차이는 HeLa 세포와 대비해 KB 종양 세포가 엽산 수용체 매개성 세포내 이입(endocytosis)을 통한 UCNP-A1-NH-PEG-NH-FA를 특이적으로 흡수함에 따른 것으로 설명될 수 있다.

[0065] 세포 생존율 (%) = (처리군의 평균 Abs 값) / (대조군의 평균 Abs 값) × 100

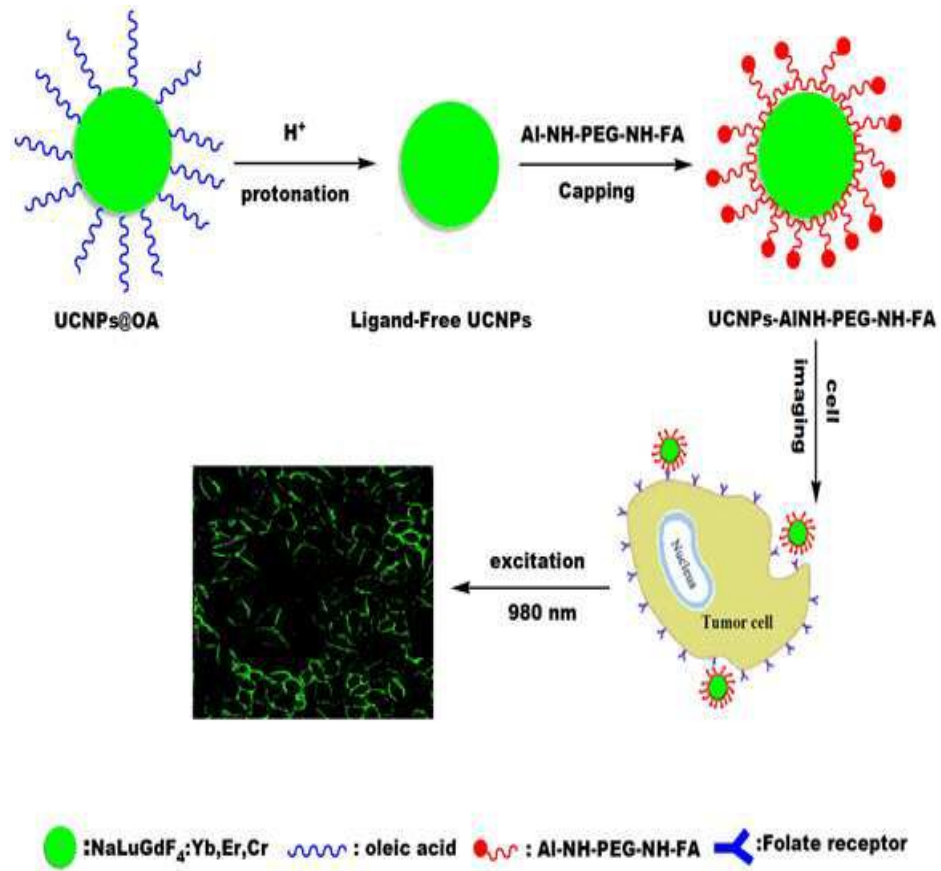
[0066] UCNP-A1-NH-PEG-NH₂와 UCNP-A1-NH-PEG-NH-FA는 24 시간 동안 333 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 의 높은 용량에서도 HeLa와 KB 세포 모두에 대해 낮은 세포 독성을 갖는 것으로 볼 수 있다. PEG를 링커로 선택한 이유는 두 가지이다. 먼저, PEG는 생물학적 시스템과 우수한 상용성을 가지므로 나노 입자의 정상 조직에 대한 원치 않는 독성을 줄일 수 있다. 다른 한편으로는, PEG 분자의 긴 사슬 끝에 엽산을 맞추면 수용체와의 FA 결합에 대한 입체적 장애를 감소시킬 수 있고 암세포의 표적 효능을 향상시킬 수 있다. UCNP-A1-NH-PEG-NH₂ 및 UCNP-A1-NH-PEG-NH-FA는 낮은 세포 독성, 우수한 수용성, 적절한 나노 크기 및 강력한 상향 변환 발광으로 인해 바이오 이미징 응용 적용에 대해 추가로 살펴보았다.

[0067] <실험예 4> 실시예 1에서 제조된 나노 입자 나노 입자를 이용한 세포 이미징

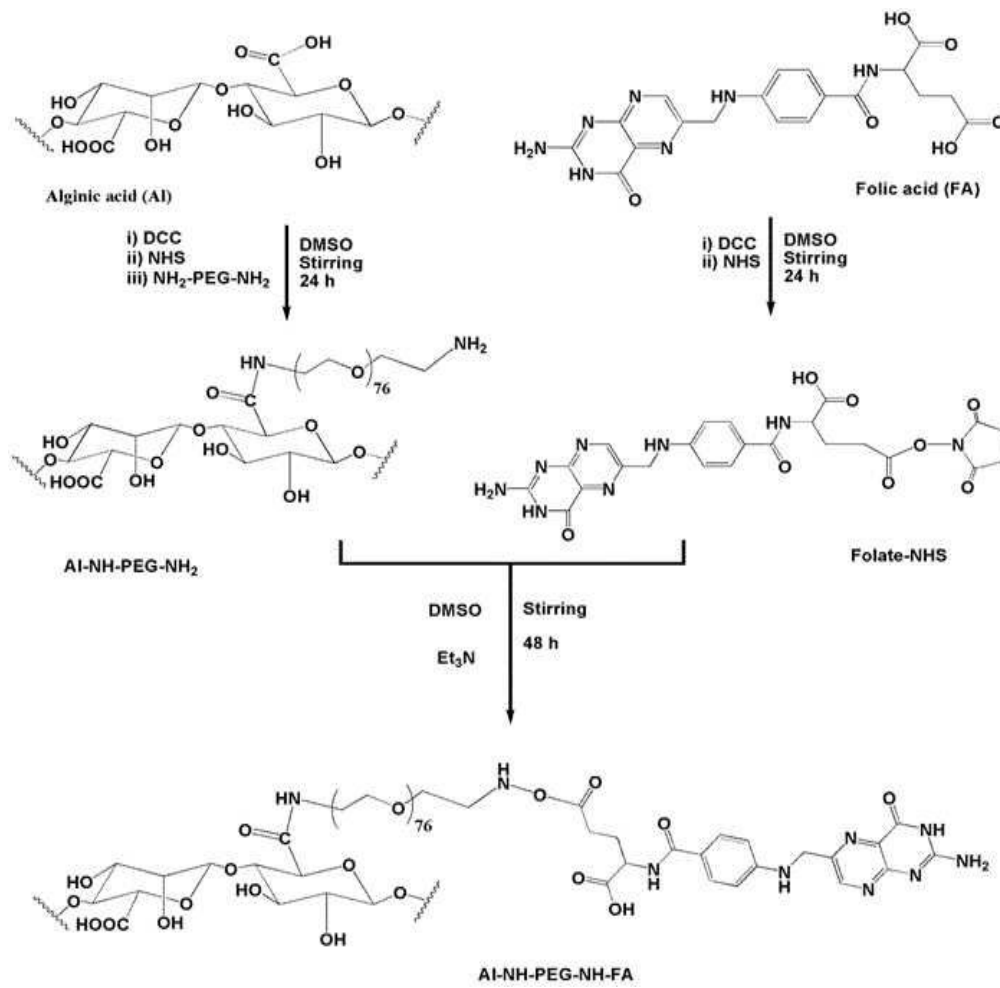
[0068] 엽산(FA)은 엽산 수용체(FR)에 대한 고친화성 리간드로 잘 알려져 있으며, FA 결합(FA-conjugated) 분자 프로브 또는 나노 입자를, HeLa 및 KB 세포주와 같은 FR 과발현(FR-overexpressing) 암세포 주로 표적화 전달하는데 널리 사용되어 왔다. KB(높은 엽산 수용체 발현) 및 HeLa(낮은 엽산 수용체 발현, 음성 대조군으로 사용) 세포를 각각 UCNP-A1-NH-PEG-NH₂ 및 UCNP-A1-NH-PEG-NH₂(333 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)를 포함하는 MEM 및 DMEM 중에서 37 °C에서 1 시간 동안 배양하였다. 과량의 나노 입자를 제거하기 위해 PBS로 세포를 씻은 후, 37 °C에서 10 분간 4 % 포름알데히드로 고정시킨 후 다시 PBS로 3 번 헹구 낸 후 980 nm 근적외선 레이저가 장착된 공(共)초점 현미경(confocal microscope)을 사용하여 이미지화했다. 엽산과 결합하지 않고 아미노기로 개질된 UCNP (UCNP-A1-NH-PEG-NH₂)를 동일한 생리 조건에서 HeLa 및 KB와 함께 배양하여 비특이적 결합을 조사하였다. 도 12의 a 내지 도 12의 d에 도시된 바와 같이, UCNP-A1-NH-PEG-NH₂와 세포 사이의 비특이적 결합으로 인해 세포 표면에 약간의 발광이 관찰되었다. 그러나, 비특이적 결합으로부터의 녹색 발광은 매우 약해 세포 이미징에 거의 영향을 미치지 않았다. 도 13의 a 내지 도 13의 d에 도시된 바와 같이, 엽산으로 개질된 UCNP (UCNP-A1-NH-PEG-NH-FA)는 980 nm에서 근적외선 레이저 여기 하에 HeLa 세포에서 약한 발광이 관찰(도 13의 b)된 반면, KB 세포는 HeLa 세포보다 많은 양의 엽산 수용체를 발현함에 따라 강한 발광을 보였다(도 13의 d). UCL과 명시야(bright field) 영상은, UCNP-A1-NH-PEG-NH-FA 상의 FA와 KB 세포상의 FR 사이의 대단히 특이적인 상호 작용에 기인해 KB 세포의 표면으로부터 유래하는 상향 변환 발광을 보여준다. 이러한 사실은 우수한 생체 적합성을 갖는 UCNP가 엽산 결합으로 인해 세포막 상의 표적을 인식하고, UCL이 세포 이미징에 충분할 정도로 강했다는 것을 나타낸다. 명시야(bright field)와 암시야(dark field)에서의 세포의 모양과 위치는 UCNP와 세포 사이의 특이적 상호작용을 잘 보여준다(도 13의 c 및 d). 이러한 결과는 UCNP-A1-NH-PEG-NH-FA가 선택적으로 KB 세포의 표면에 축적되어 과발현된 FR을 가진 KB 세포의 표적 이미징을 위한 표적화 제제로 사용될 수 있음을 입증한다. 근적외선은 인체에 해롭지 않고 몇 인치 깊이까지 침투할 수 있기 때문에, 분자, 세포 및 조직 이미징을 위해 근적외선 레이저를 이용한 나노 입자를 여기하는 기술은 임상 응용 분야에 있어서 매우 매력적이다. 본 발명에 따른 양친매성 알지네이트로 캡핑된 UCNP는 근적외선광에 의해 여기되고 강한 발광을 나타내는데, 암의 조기 발견 및 진단을 위해 발광성 바이오 표지로 사용될 수 있다.

도면

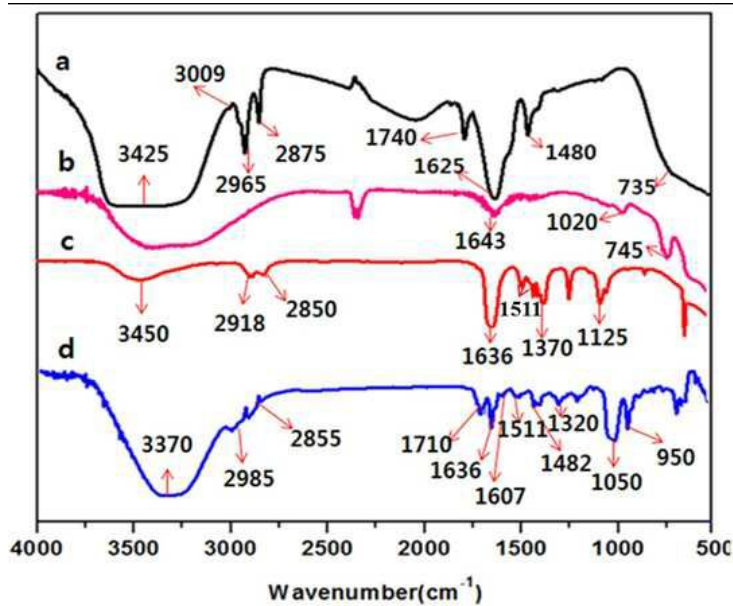
도면1



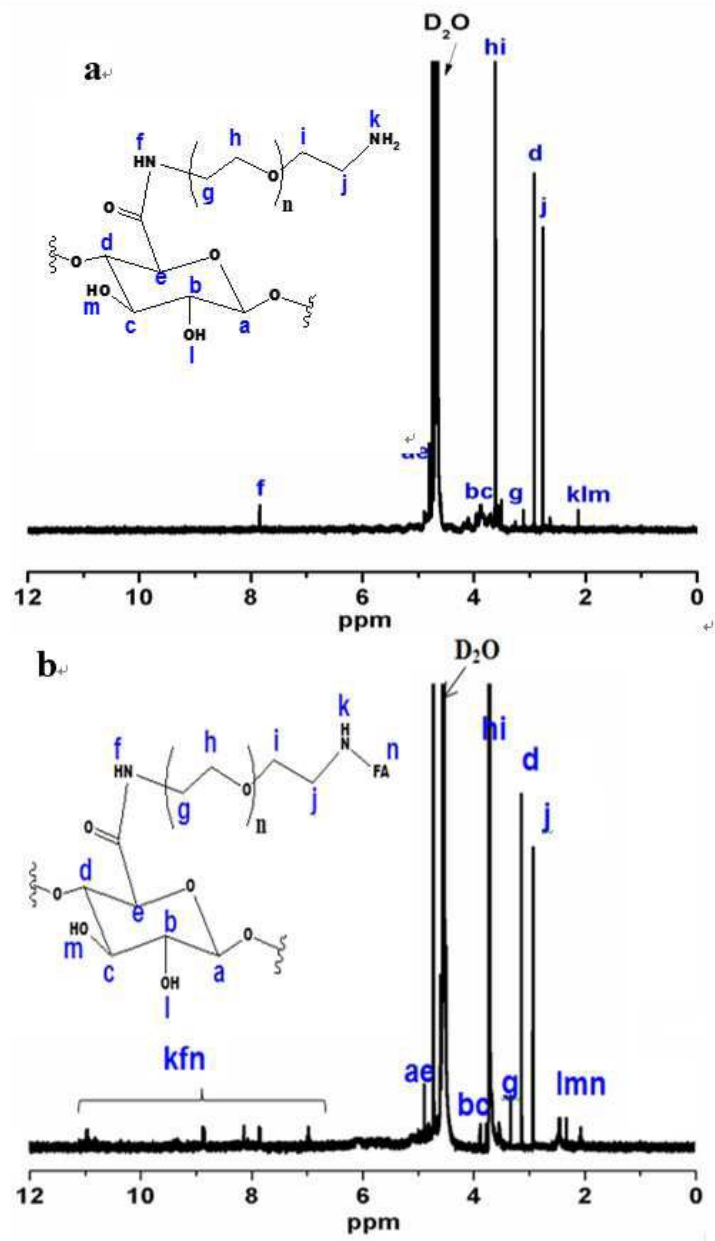
도면2



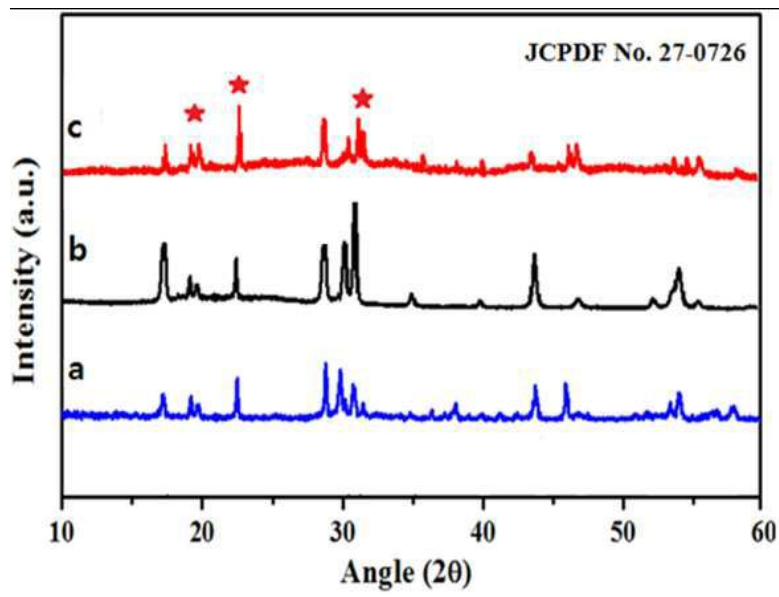
도면3



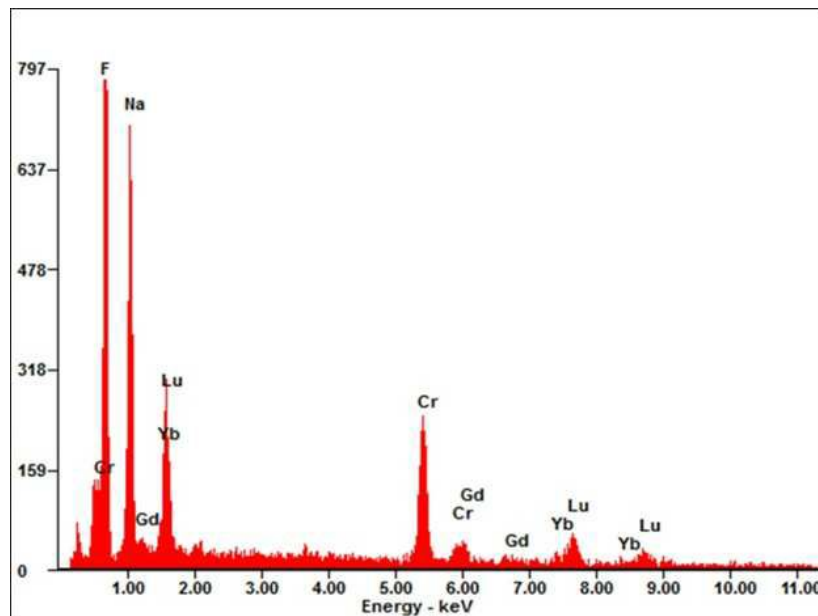
도면4



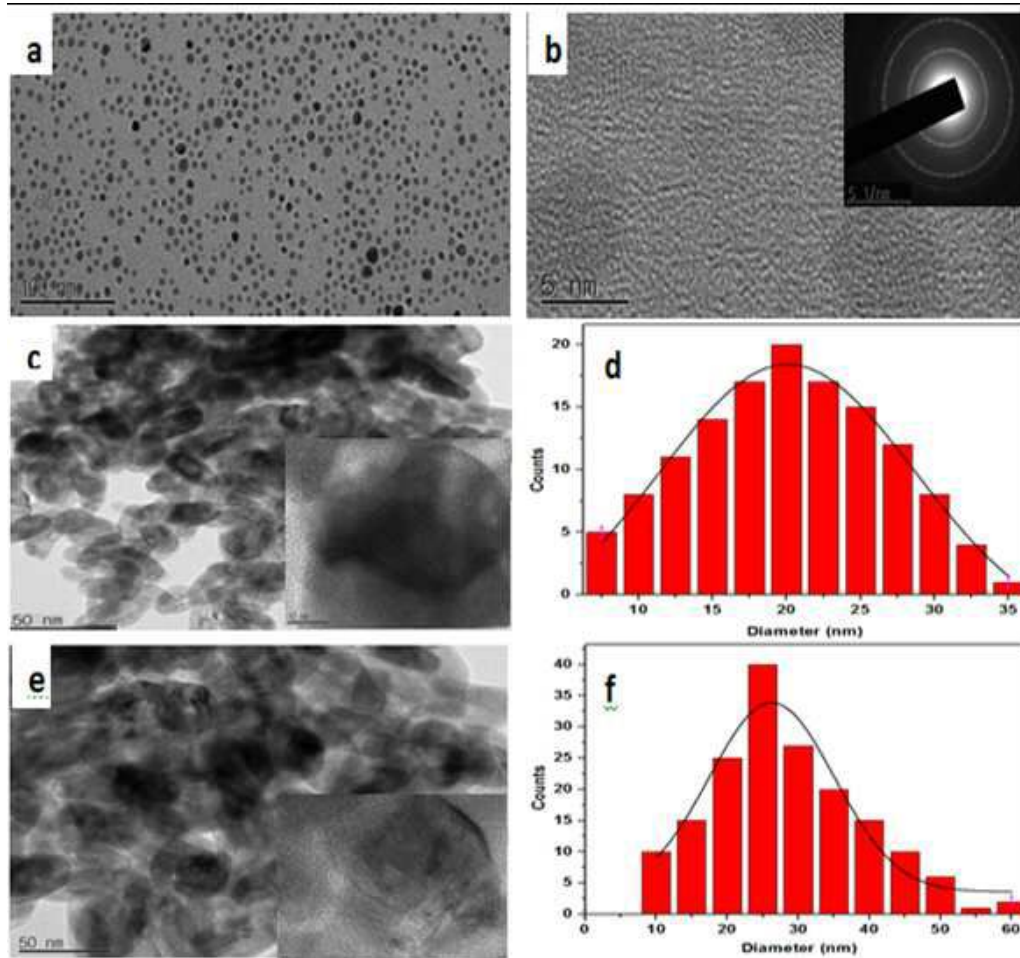
도면5



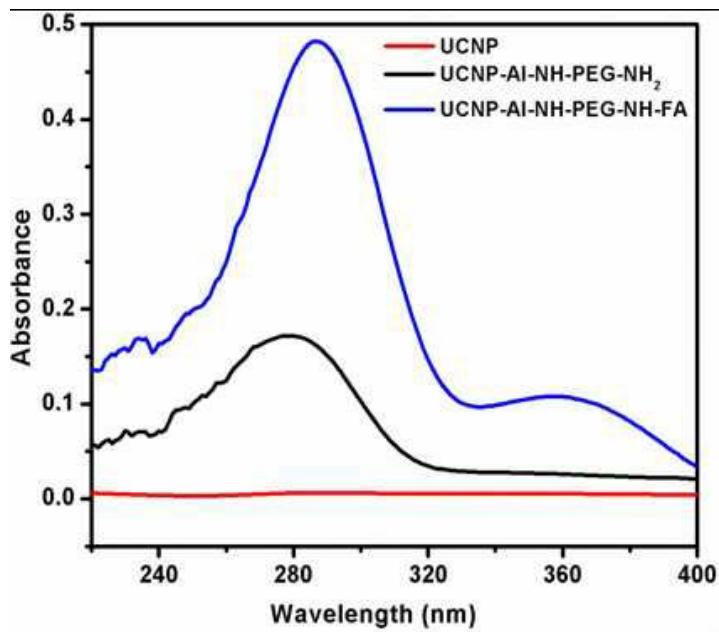
도면6



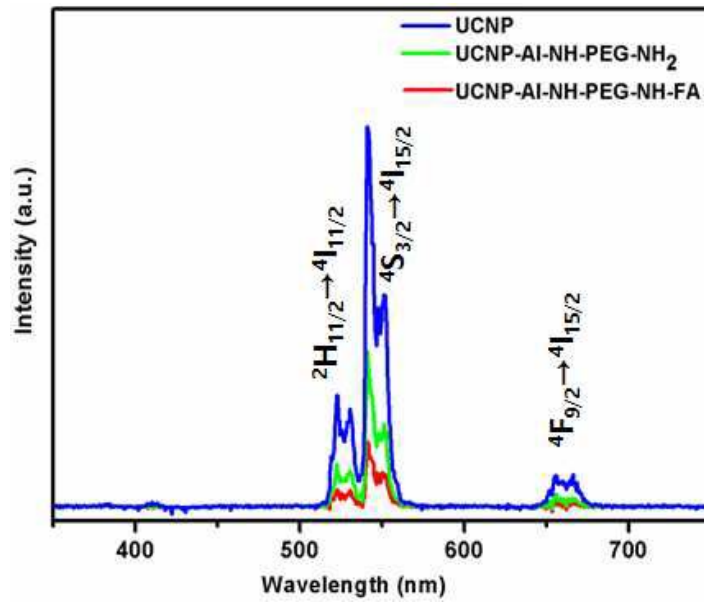
도면7



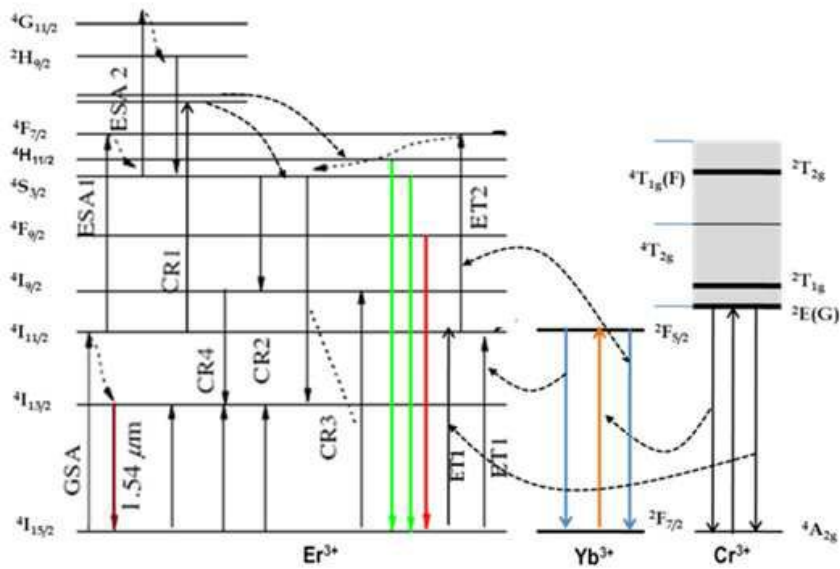
도면8a



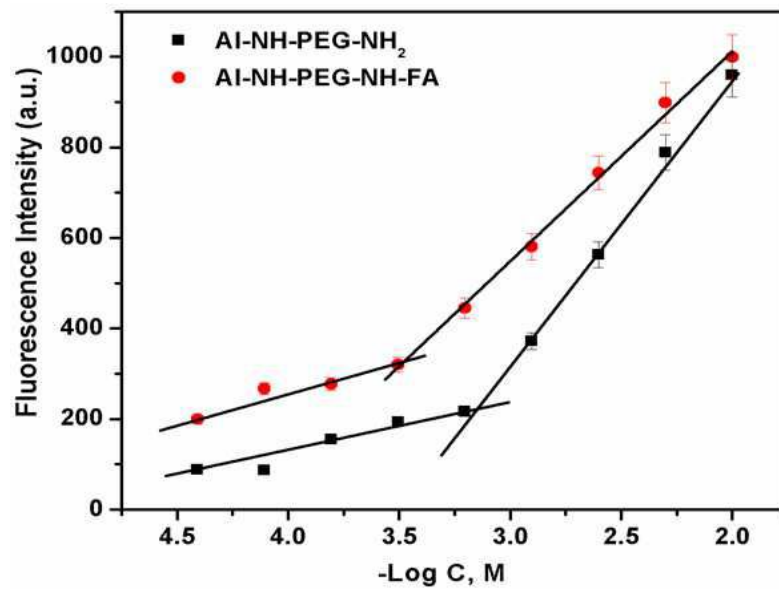
도면8b



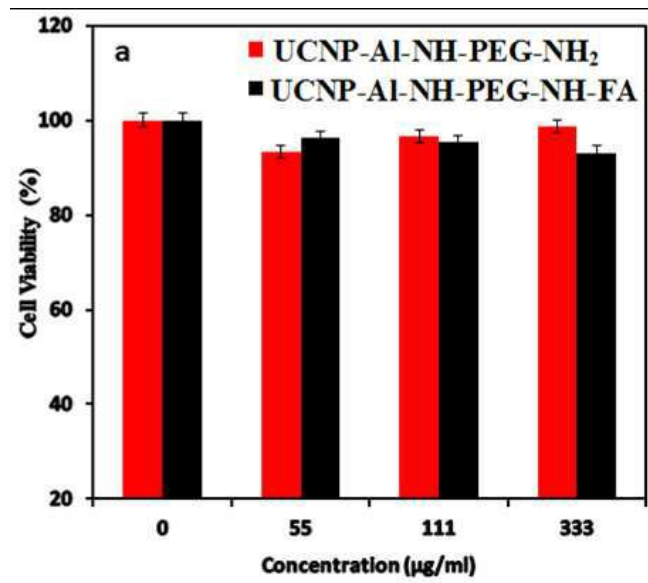
도면9



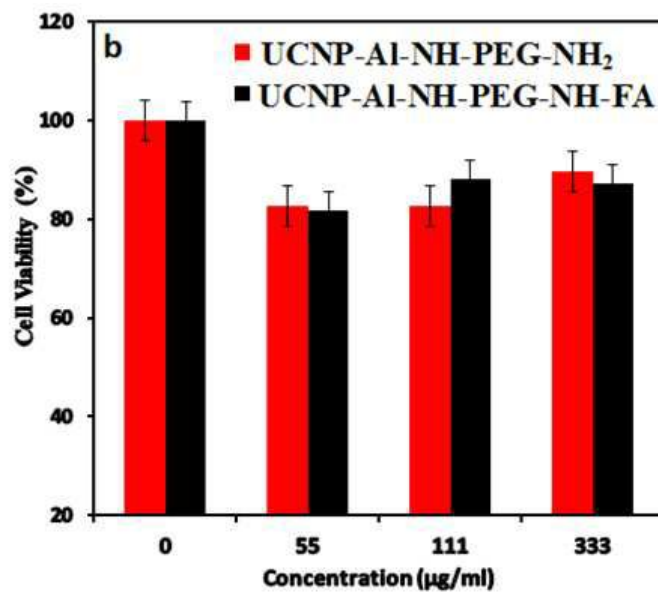
도면10



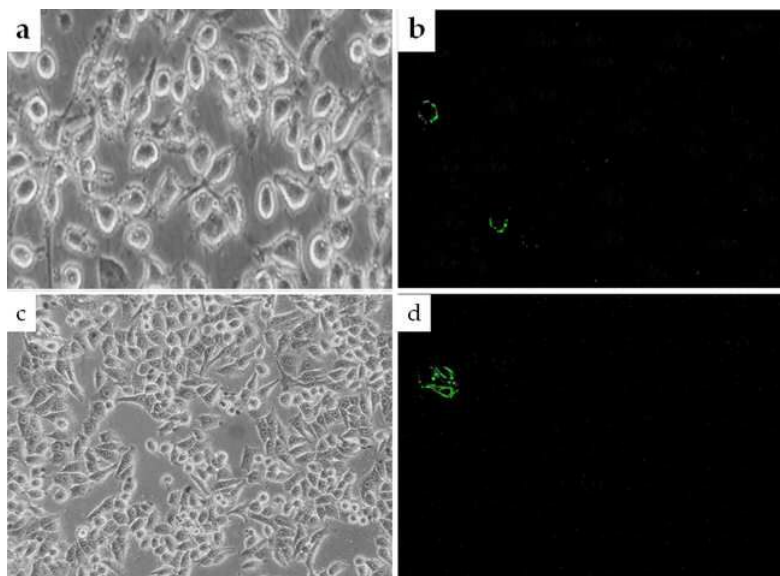
도면11a



도면11b



도면12



도면13

