



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0073249
(43) 공개일자 2017년06월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C08F 292/00 (2006.01) C08F 2/38 (2006.01)
C08F 220/70 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 21/77 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C08F 292/00 (2013.01)
C08F 2/38 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0181939
(22) 출원일자 2015년12월18일
심사청구일자 2015년12월18일

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
박종남
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
김성환
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 프렌즈드림

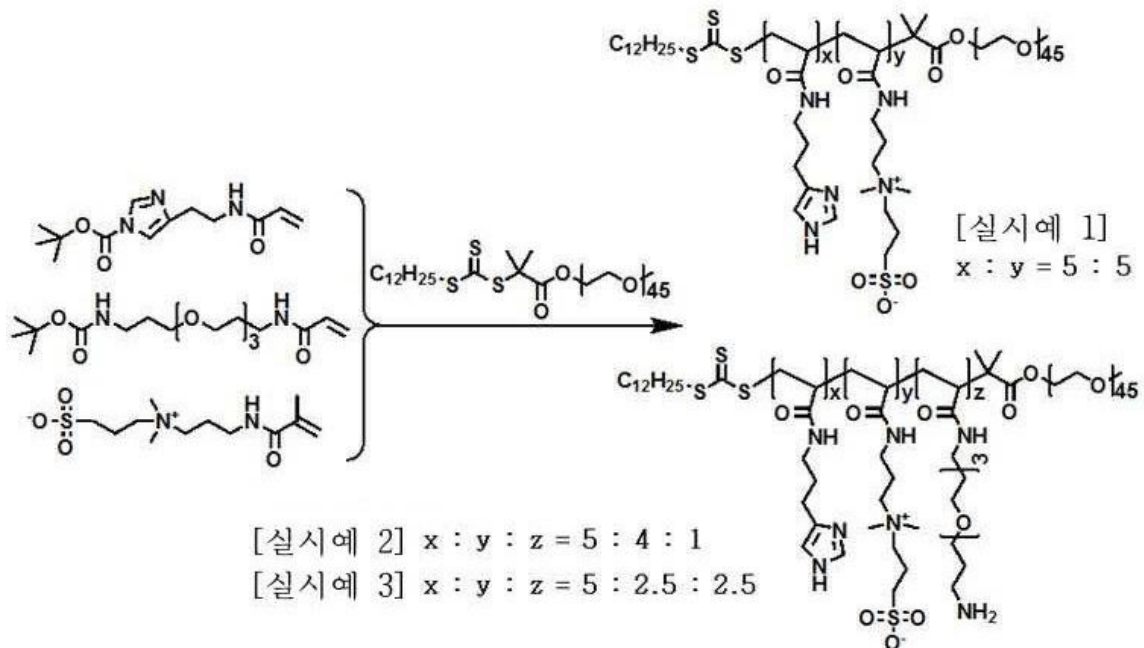
전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 양자점 표면 개질용 랜덤 공중합체의 제조방법 및 이를 이용한 양자점의 표면 개질 방법

(57) 요약

본 발명은 양자점 표면 개질용 랜덤 공중합체의 제조방법 및 이를 이용한 양자점의 표면 개질 방법에 관한 것으로, 더 상세하게는 수중 분산 안정성이 우수하고 생체 표적 분자와의 결합이 원활하며 고유의 광학적 성질이 유지될 수 있도록, 양자점을 표면 개질시킬 수 있는 랜덤 공중합체의 제조방법 및 이를 이용한 양자점의 표면 개질 (뒷면에 계속)

대표도



방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 랜덤 중합체는 양자점과 단순히 혼합하는 것만으로 양자점의 표면을 쉽게 개질시킬 수 있고, 상기 랜덤 중합체로 양자점을 개질시키면, 상기 랜덤 중합체가 기존 양자점의 리간드를 유지한 채 한층 더 둘러싸는 형태가 아니라 양자점 표면의 리간드와 교환되기 때문에 표면 개질된 양자점이 콤팩트(Compact)한 사이즈를 가질 수 있고, 상기 표면 개질 메커니즘이 리간드 교환 반응임에도 불구하고 양자점 표면에 손상을 거의 주지 않아서 표면 개질 후에도 양자점 고유의 광학적 성질이 유지될 수 있으며, 생체 표적 분자와의 결합이 높은 효율로 이루어지고 수중 분산 안정성도 우수한바, 본 발명에 따른 랜덤 중합체로 표면 개질된 양자점은 바이오 분야, 특히 바이오 이미징 분야에 적용이 가능하다.

(52) CPC특허분류

C08F 220/70 (2013.01)

C12Q 1/6886 (2013.01)

G01N 21/77 (2013.01)

G01N 33/57407 (2013.01)

G01N 33/588 (2013.01)

C12Q 2563/103 (2013.01)

(72) 발명자

김현홍

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

윤기철

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제교유번호 1711028381

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 선도연구센터지원

연구과제명 세포 간 신호교신에 의한 암 제어 연구센터

기 여 율 1/1

주관기관 울산과학기술대학교

연구기간 2015.09.01 ~ 2016.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

양자점과 결합력이 있는 화합물, 세포 표적화를 위한 기능기가 도입된 중합체 화합물 및 양쪽성 이온을 갖는 화합물을 혼합하는 단계; 및

상기 혼합된 단량체 혼합물을 가역적 첨가-분절 연쇄이동(reversible addition-fragmentation chain transfer; RAFT) 중합하여 랜덤 공중합체를 생성하는 단계를 포함하는, 양자점 표면 개질용 랜덤 공중합체의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 혼합은 총 몰수를 기준으로 하여 양자점과 결합력이 있는 화합물 0.1 내지 0.9의 몰비, 세포 표적화를 위한 기능기가 도입된 중합체 화합물 0 내지 0.3의 몰비 및 양쪽성 이온을 갖는 화합물 0.05 내지 0.8의 몰비로 혼합하는 것을 특징으로 하는, 양자점 표면 개질용 랜덤 공중합체의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 양자점과 결합력이 있는 화합물은 알과 올레핀, 아크릴레이트, 아크릴아마이드, 비닐 단량체, 스타이릴 단량체, 메타-아크릴레이트 및 메타-아크릴아마이드로 이루어진 군에서 선택된 이중결합의 탄소가 있는 화합물로서, 이미다졸, 카테콜, 피리딘, 피롤, 티오펜, 티아졸, 피라진, 카르복실산, 카르복실레이트, 나프티리딘, 포스핀, 포스핀 옥사이드, 페놀, 1차 아민, 2차 아민, 3차 아민 및 방향족 아민으로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상의 화합물을 포함하는 것을 특징으로 하는, 양자점 표면 개질용 랜덤 공중합체의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 세포 표적화를 위한 기능기가 도입된 중합체 화합물은 알과 올레핀, 아크릴레이트, 아크릴아마이드, 비닐 단량체, 스타이릴 단량체, 메타-아크릴레이트 및 메타-아크릴아마이드로 이루어진 군에서 선택된 이중결합의 탄소가 있는 화합물로서, 1 내지 100개의 에틸렌 글리콜 단량체의 중합체를 가지며, 말단기로 하이드록시, 메톡시 또는 아민을 포함하는 것을 특징으로 하는, 양자점 표면 개질용 랜덤 공중합체의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 양쪽성 이온을 갖는 화합물은 알과 올레핀, 아크릴레이트, 아크릴아마이드, 비닐 단량체, 스타이릴 단량체, 메타-아크릴레이트 및 메타-아크릴아마이드로 이루어진 군에서 선택된 이중결합의 탄소가 있는 화합물로서, 포스포릴콜린, 셀로베타인 또는 카르복실베타인에서 선택된 양쪽성 이온부위를 포함하는 특징으로 하는, 양자점 표면 개질용 랜덤 공중합체의 제조방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 양쪽성 이온을 갖는 화합물은 [3-(메타크릴로일아미노)프로필]디메틸(3-설포프로필)암모늄 하이드록사이드(MPDSAH), (2-(메타크릴로일옥시)에틸 포스포릴콜린)(MPC), [2-(메타크릴로일옥시)에틸]디메틸-(3-설포프로필)암모늄 하이드록사이드, (3-[2-(아크릴아미도)-에틸]디메틸 암모니오)프로판 설포네이트(AEDAPS) 및 (2-아크릴로일아미노-에틸)-(2-카르복시-에틸)-디메틸-암모늄 베타인으로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는, 양자점 표면 개질용 랜덤 공중합체의 제조방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 양자점과 결합력이 있는 화합물, 세포 표적화를 위한 기능기가 도입된 중합체 화합물 및 양쪽성 이온을 갖는 화합물은 각각 BOC(butoxycarbonyl)로 보호된 히스타민 아크릴레이트(Histamine Acrylate; BHA), BOC로 보호된 말단 아민기를 갖는 폴리에틸렌 글리콜 아크릴레이트(BOC Polyethylene glycol Acrylate; BPA) 및 (3-(메타크릴로일아미노)프로필)-디메틸(3-설포프로필)암모늄 하이드록사이드(MPDSAH)인 것을 특징으로 하는, 양자점 표면 개질용 랜덤 공중합체의 제조방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 RAFT 중합은 상기 단량체 혼합물에 디티오에스테르, 잔테이트 및 트리티오카보네이트로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유기황 사슬 전달제, 및 중합개시제를 첨가하여 중합하는 것을 특징으로 하는, 양자점 표면 개질용 랜덤 공중합체의 제조방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 RAFT 중합은 유기황 사슬 전달제, 단량체 혼합물 및 중합개시제를 1: 5: 0.2 내지 1: 300: 0.2의 몰비로 첨가하여 중합하는 것을 특징으로 하는, 양자점 표면 개질용 랜덤 공중합체의 제조방법.

청구항 10

(i) 알파 올레핀, 아크릴레이트, 아크릴아마이드, 비닐 단량체, 스타이릴 단량체, 메타-아크릴레이트 및 메타-아크릴아마이드로 이루어진 군에서 선택된 이중결합의 탄소가 있는 화합물로서, 이미다졸, 카테콜, 피리딘, 피롤, 티오펜, 티아졸, 피라진, 카르복실산, 카르복실레이트, 나프티리딘, 포스핀, 포스핀 옥사이드, 페놀, 1차 아민, 2차 아민, 3차 아민 및 방향족 아민으로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상의 화합물을 포함하는, 양자점과 결합력이 있는 화합물; 및

(ii) 알파 올레핀, 아크릴레이트, 아크릴아마이드, 비닐 단량체, 스타이릴 단량체, 메타-아크릴레이트 및 메타-아크릴아마이드로 이루어진 군에서 선택된 이중결합의 탄소가 있는 화합물로서, 포스포릴콜린, 설포베타인 또는 카르복실베타인에서 선택된 양쪽성 이온부위를 포함하는, 양쪽성 이온을 갖는 화합물이,

디티오에스테르, 잔테이트 및 트리티오카보네이트로 이루어진 군에서 선택되는 하나의 쇠에 공중합 된 랜덤 공중합체를 포함하는, 양자점 표면 개질용 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 랜덤 공중합체는, 상기 디티오에스테르, 잔테이트 및 트리티오카보네이트로 이루어진 군에서 선택되는 하나의 선택에,

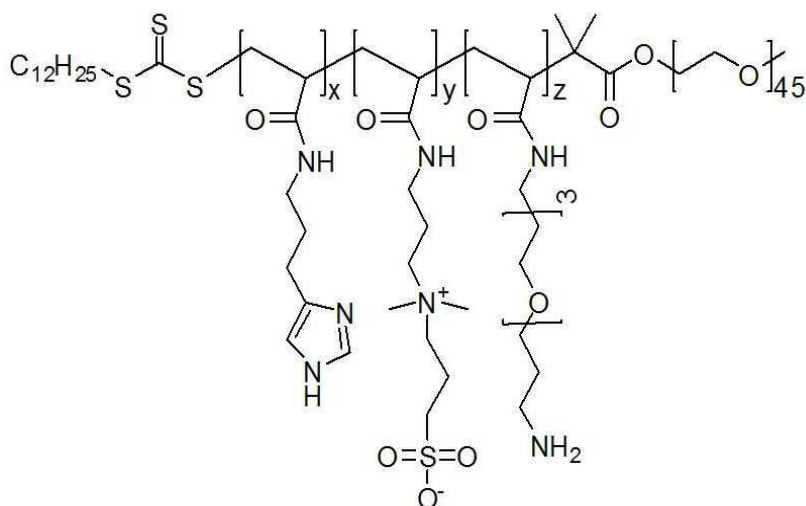
알과 올레핀, 아크릴레이트, 아크릴아마이드, 비닐 단량체, 스타이릴 단량체, 메타-아크릴레이트 및 메타-아크릴아마이드로 이루어진 군에서 선택된 이중결합의 탄소가 있는 화합물로서, 1 내지 100개의 에틸렌 글리콜 단량체의 중합체를 가지며, 말단기로 하이드록시, 메톡시 또는 아민을 포함하는, 세포 표적화를 위한 기능기가 도입된 중합체 화합물이 추가로 공중합된, 양자점 표면 개질용 조성물.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 랜덤 공중합체는 하기 화학식 1로 표현되는 것을 특징으로 하는, 양자점 표면 개질용 조성물;

< 화학식 1 >



상기 식에서,

x , y , z 는 랜덤 공중합체 중의 각 단량체의 평균 몰 분획로서, $0.1 \leq x \leq 0.9$, $0.05 \leq y \leq 0.8$, $0 \leq z \leq 0.3$ 이다.

청구항 13

양자점과 결합력이 있는 화합물, 세포 표적화를 위한 기능기가 도입된 중합체 화합물 및 양쪽성 이온을 갖는 화합물을 혼합하는 단계;

상기 혼합된 혼합물을 가역적 첨가-분절 연쇄이동(reversible addition-fragmentation chain transfer; RAFT) 중합하여 랜덤 공중합체를 합성하는 단계; 및

상기 합성된 랜덤 공중합체를 양자점(Quantum Dots; QDs)에 혼합하는 단계를 포함하는, 양자점의 표면 개질 방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 랜덤 공중합체 및 양자점은 1:0.2 내지 1:5의 중량비로 혼합되는 것을 특징으로 하는, 양자점의 표면 개질 방법.

청구항 15

제10항에 따른 조성물로 표면 개질된 양자점.

청구항 16

제15항에 따른 양자점을 포함하는 생체 표적 분자 탐지용 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 생체 표적 분자는 DNA, RNA, PNA(peptide nucleic acid), LNA(locked nucleic acid), 단백질, 펩타이드, 폴리펩타이드, 탄수화물, 올리고사카라이드, 항체, 앵타머, 염산 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나인 것을 특징으로 하는, 생체 표적 분자 탐지용 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 생체 표적 분자가 염산인 것을 특징으로 하는, 생체 표적 분자 탐지용 조성물.

청구항 19

제16항에 있어서,

상기 생체 표적 분자 탐지용 조성물이 암을 탐지하는 것을 특징으로 하는, 생체 표적 분자 탐지용 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서,

상기 암은 자궁경부암, 아교 모세포종 종양(glioblastoma tumor), 비인두암 표피세포(nasopharyngeal cancer) 및 유방암으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 생체 표적 분자 탐지용 조성물.

청구항 21

제16항에 따른 조성물을 이용하여 생체 표적 분자를 탐지하는 방법.

청구항 22

제21항에 있어서,

상기 탐지 방법은 형광 이미지 분석을 통해 확인하는 것을 특징으로 하는, 생체 표적 분자를 탐지하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 양자점 표면 개질용 랜덤 공중합체의 제조방법 및 이를 이용한 양자점의 표면 개질 방법에 관한 것으

[0001]

로, 더 상세하게는 수중 분산 안정성이 우수하고 생체 표적 분자와의 결합이 원활하며 고유의 광학적 성질이 유지될 수 있도록, 양자점을 표면 개질시킬 수 있는 랜덤 공중합체의 제조방법 및 이를 이용한 양자점의 표면 개질 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 바이오 분야에 있어 반도체와 금속 나노입자는 진단과 치료에 상당한 발전을 가져왔다. 질병의 발생과정을 분자나 단백질 수준의 나노 범위에서 관찰할 수 있다면 질병의 발생 메커니즘에 대한 중요한 정보를 제공할 것이다. 특히 광학적 특성을 보이는 반도체 나노입자는 바이오 이미징에 있어 응용 가능성이 매우 높다. 양자점(Quantum Dots; QDs)은 높은 양자 수득률로 형광을 나타내며, 크기를 조절함으로써 밴드 갭을 조절할 수 있기 때문에 발광되는 빛의 파장대를 용이하게 조절할 수 있는 장점이 있다. 이러한 광학적 특성은 상당히 밝은 이미지를 보이고 안정적이기 때문에 세포의 이미징에 있어 기존에 사용되던 염료(dye)나 단백질 형광단보다 훨씬 효과적인 물질로 기대되고 있다.
- [0003] 그러나 양자점을 바이오 분야에 적용시키기 위해서는, 완충액(buffer)에서의 안정성, 작은 수화반경(hydrodynamic radius), 높은 양자 수득율, 손쉬운 표면 유도화, 체내의 단백질이나 세포 표면과의 비-특이적 결합(non-specific binding)의 최소화, 특이적 표적화(specific targeting) 등이 가능하여야 한다. 이를 위해서 양자점의 표면 개질(surface engineering) 기술이 필요하다.
- [0004] 양자점의 표면 개질 방법은 크게 두 가지가 있다. 하나는 양자점 표면의 소수성 유기 리간드를 친수성 리간드로 직접 치환하는 리간드 교환 방법(ligand oexchange method), 다른 하나는 한국공개특허 제10-2011-0082454호처럼 양자점 표면의 유기 리간드를 그대로 유지한 채 양쪽성 리간드로 둘러싸는 캡슐화 방법(encapsulation method)이 있다. 캡슐화 방법은 기존의 리간드를 유지한 채 수계 분산에 도움을 주는 새로운 리간드를 도입하므로, 양자점의 표면에 결함(defect)을 줄여주지만 입자의 전체적인 크기가 증가하기 때문에 체내 미세조직에 대한 접근성이 떨어진다. 반면, 리간드 교환 방법은 기존의 리간드를 대체하여 치환되기 때문에 캡슐화 방법보다 작은 사이즈를 갖는 양자점을 제조할 수 있어 바이오 분야에 사용하기 위한 양자점을 제조하기에는 리간드 교환 방법이 적합하다. 그러나 리간드 교환 방법으로 양자점 표면을 개질시킬 경우, 양자점 표면에 결함을 생성시켜 여기된 전자와 정공의 재결합을 방해하기 때문에 양자점의 광학적 손실이 크다는 단점이 있다.
- [0005] 또한, 기존 리간드 교환 방법에서는 수계분산을 위한 기능기로 대부분 폴리에틸렌 글리콜(Polyethylene glycol)을 사용하였는데, 폴리에틸렌 글리콜의 길게 반복되는 사슬 구조체로 인하여 표면 개질된 양자점의 전체적인 크기가 증가할 뿐만 아니라 특이적 표적화를 위해 도입한 기능기의 결합 효율을 크게 감소시킨다.
- [0006] 따라서, 짧은 수계 분산 기능기로도 높은 안정성을 보이며 특이적 표적화 효율이 높은 양자점 표면에 결함을 일으키지 않는 리간드 교환 방법을 개발할 필요가 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2011-0082454호(2011.07.19. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 이에 본 발명자는 양자점의 기존 리간드와 교환되어 양자점 표면을 개질시키는 물질을 찾던 중, RAFT(reversible addition-fragmentation chain transfer, 가역적 첨가-분절 연쇄이동) 중합 방법을 이용하여 제조된 랜덤 공중합체를 발견하였고, 상기 랜덤 공중합체로 표면 개질된 양자점이 안정하고 사이즈가 작을 뿐만 아니라 특이적 표적화 효율이 높은 것을 발견하여 본 발명을 완성하였다.
- [0009] 따라서 본 발명의 목적은 양자점 표면 개질용 랜덤 공중합체의 제조방법 및 이에 의해 제조된 랜덤 공중합체를

제공하는 것이다.

- [0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 랜덤 공중합체를 이용하여 양자점을 표면 개질하는 방법 및 상기 방법으로 표면 개질된 양자점을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 양자점을 포함하는 생체 표적 분자 탐지용 조성물 및 이를 이용한 생체 표적 분자 탐지 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

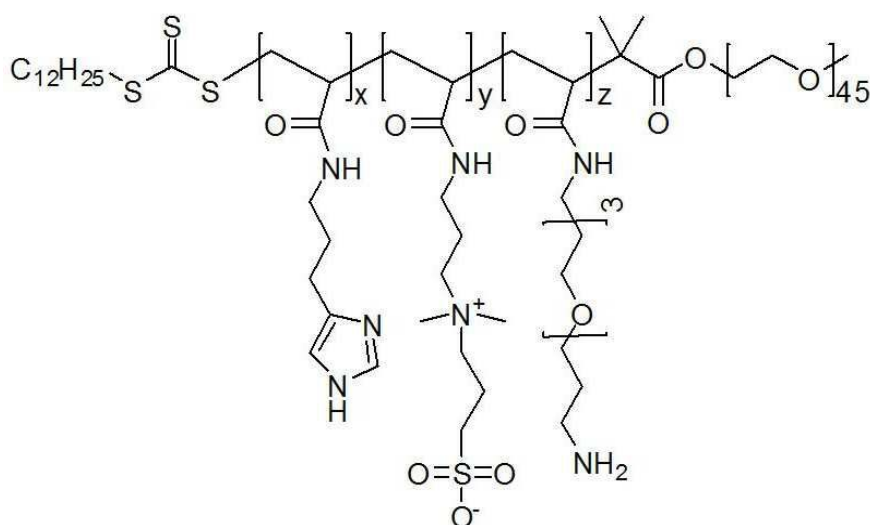
- [0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 양자점과 결합력이 있는 화합물, 세포 표적화를 위한 기능기가 도입된 중합체 화합물 및 양쪽성 이온을 갖는 화합물을 혼합하는 단계, 및 상기 혼합된 단량체 혼합물을 가역적 첨가-분절 연쇄이동(reversible addition-fragmentation chain transfer; RAFT) 중합하여 랜덤 공중합체를 생성하는 단계를 포함하는, 양자점 표면 개질용 랜덤 공중합체의 제조방법을 제공한다.
- [0013] 상기 혼합은 총 물수를 기준으로 하여 양자점과 결합력이 있는 화합물 0.1 내지 0.9의 몰비, 세포 표적화를 위한 기능기가 도입된 중합체 화합물 0 내지 0.3의 몰비 및 양쪽성 이온을 갖는 화합물 0.05 내지 0.8의 몰비로 혼합될 수 있다.
- [0014] 상기 양자점과 결합력이 있는 화합물은 알파 올레핀, 아크릴레이트, 아크릴아마이드, 비닐 단량체, 스타이릴 단량체, 메타-아크릴레이트 및 메타-아크릴아마이드로 이루어진 군에서 선택된 이중결합의 탄소가 있는 화합물로서, 이미다졸, 카테콜, 피리딘, 피롤, 티오펜, 티아졸, 피라진, 카르복실산, 카르복실레이트, 나프티리딘, 포스핀, 포스핀 옥사이드, 페놀, 1차 아민, 2차 아민, 3차 아민 및 방향족 아민으로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상의 화합물을 포함할 수 있다.
- [0015] 상기 세포 표적화를 위한 기능기가 도입된 중합체 화합물은 알파 올레핀, 아크릴레이트, 아크릴아마이드, 비닐 단량체, 스타이릴 단량체, 메타-아크릴레이트 및 메타-아크릴아마이드로 이루어진 군에서 선택된 이중결합의 탄소가 있는 화합물로서, 1 내지 100개의 에틸렌 글리콜 단량체의 중합체를 가지며, 말단기로 하이드록시, 메톡시 또는 아민을 포함할 수 있다.
- [0016] 상기 양쪽성 이온을 갖는 화합물은 알파 올레핀, 아크릴레이트, 아크릴아마이드, 비닐 단량체, 스타이릴 단량체, 메타-아크릴레이트 및 메타-아크릴아마이드로 이루어진 군에서 선택된 이중결합의 탄소가 있는 화합물로서, 포스포릴콜린, 셀포베타인 또는 카르복실베타인에서 선택된 양쪽성 이온부위를 포함할 수 있다.
- [0017] 또한, 상기 양쪽성 이온을 갖는 화합물은 [3-(메타크릴로일아미노)프로필]디메틸(3-설포프로필)암모늄 하이드록사이드(MPDSAH), (2-(메타크릴로일옥시)에틸 포스포릴콜린)(MPC), [2-(메타크릴로일옥시)에틸]디메틸-(3-설포프로필)암모늄 하이드록사이드, (3-[2-(아크릴아미도)-에틸디메틸 암모니오]프로판 설포네이트(AEDAPS) 및 (2-아크릴로일아미노-에틸)-(2-카르복시-에틸)-디메틸-암모늄 베타인으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0018] 상기 양자점과 결합력이 있는 화합물, 세포 표적화를 위한 기능기가 도입된 중합체 화합물 및 양쪽성 이온을 갖는 화합물은 각각 BOC(butoxycarbonyl)로 보호된 히스타민 아크릴레이트(Histamine Acrylate; BHA), BOC로 보호된 말단 아민기를 갖는 폴리에틸렌 글리콜 아크릴레이트(BOC Polyethylene glycol Acrylate; BPA) 및 (3-(메타크릴로일아미노)프로필)-디메틸(3-설포프로필)암모늄 하이드록사이드(MPDSAH)일 수 있다.
- [0019] 상기 RAFT 중합은 상기 단량체 혼합물에 디티오에스테르, 잔테이트 및 트리티오카보네이트로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유기황 사슬 전달제, 및 중합개시제를 첨가하여 중합할 수 있다.
- [0020] 또한, 상기 RAFT 중합은 유기황 사슬 전달제, 단량체 혼합물 및 중합개시제를 1: 5: 0.2 내지 1: 300: 0.2의 몰비로 첨가하여 중합할 수 있다.
- [0021] 본 발명은 (i) 알파 올레핀, 아크릴레이트, 아크릴아마이드, 비닐 단량체, 스타이릴 단량체, 메타-아크릴레이트 및 메타-아크릴아마이드로 이루어진 군에서 선택된 이중결합의 탄소가 있는 화합물로서, 이미다졸, 카테콜, 피리딘, 피롤, 티오펜, 티아졸, 피라진, 카르복실산, 카르복실레이트, 나프티리딘, 포스핀, 포스핀 옥사이드, 페놀, 1차 아민, 2차 아민, 3차 아민 및 방향족 아민으로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상의 화합물을 포함하는, 양자점과 결합력이 있는 화합물, 및 (ii) 알파 올레핀, 아크릴레이트, 아크릴아마이드, 비닐 단량체, 스타이릴 단량체, 메타-아크릴레이트 및 메타-아크릴아마이드로 이루어진 군에서 선택된 이중결합의 탄소가 있는 화합물로서, 포스포릴콜린, 셀포베타인 또는 카르복실베타인에서 선택된 양쪽성 이온부위를

포함하는, 양쪽성 이온을 갖는 화합물이, 디티오에스테르, 잔테이트 및 트리티오카보네이트로 이루어진 군에서 선택되는 하나의 쇠에 공중합 된 랜덤 공중합체를 포함하는, 양자점 표면 개질용 조성물을 제공한다.

[0022] 상기 디티오에스테르, 잔테이트 및 트리티오카보네이트로 이루어진 군에서 선택되는 하나의 쇠에, 알파 올레핀, 아크릴레이트, 아크릴아마이드, 비닐 단량체, 스타이릴 단량체, 메타-아크릴레이트 및 메타-아크릴아마이드로 이루어진 군에서 선택된 이중결합의 탄소가 있는 화합물로서, 1 내지 100개의 에틸렌 글리콜 단량체의 중합체를 가지며, 말단기로 하이드록시, 메톡시 또는 아민을 포함하는, 세포 표적화를 위한 기능기가 도입된 중합체 화합물이 추가로 공중합 될 수 있다.

[0023] 상기 랜덤 공중합체는 하기 화학식 1로 표현될 수 있다.

[0024] < 화학식 1 >



[0025]

[0026] 상기 식에서,

[0027] x , y , z 는 랜덤 공중합체 중의 각 단량체의 평균 몰 분획으로서, $0.1 \leq x \leq 0.9$, $0.05 \leq y \leq 0.8$, $0 \leq z \leq 0.3$ 이다.

[0028] 본 발명은 양자점과 결합력이 있는 화합물, 세포 표적화를 위한 기능기가 도입된 중합체 화합물 및 양쪽성 이온을 갖는 화합물을 혼합하는 단계, 상기 혼합된 혼합물을 가역적 첨가-분열 연쇄이동(reversible addition-fragmentation chain transfer; RAFT) 중합하여 랜덤 공중합체를 합성하는 단계, 및 상기 합성된 랜덤 공중합체를 양자점(Quantum Dots; QDs)에 혼합하는 단계를 포함하는, 양자점의 표면 개질 방법을 제공한다.

[0029] 상기 랜덤 공중합체 및 양자점은 1 : 0.2 내지 1 : 5의 중량비로 혼합될 수 있다.

[0030] 본 발명은 상기 조성물로 표면 개질된 양자점을 제공한다.

[0031] 본 발명은 상기 표면 개질된 양자점을 포함하는 생체 표적 분자 탐지용 조성물을 제공한다.

[0032] 상기 생체 표적 분자는 상기 생체 표적 분자는 DNA, RNA, PNA(peptide nucleic acid), LNA(locked nucleic acid), 단백질, 펩타이드, 폴리펩타이드, 탄수화물, 올리고사카라이드, 항체, 앵타머, 엽산 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나일 수 있고, 바람직하게는 엽산일 수 있다.

[0033] 상기 생체 표적 분자 탐지용 조성물은 암을 탐지할 수 있다.

[0034] 또한, 상기 암은 자궁경부암, 아교 모세포종 종양(glioblastoma tumor), 비인두암 표피세포(nasopharyngeal cancer) 및 유방암으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[0035] 본 발명은 상기 생체 표적 탐지용 조성물을 이용하여 생체 표적 분자를 탐지하는 방법을 제공한다.

[0036] 상기 탐지 방법은 형광 이미지 분석을 통해 확인하는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0037] 본 발명에 따른 랜덤 중합체는 양자점과 단순히 혼합하는 것만으로 양자점의 표면을 쉽게 개질시킬 수 있고, 상기 랜덤 중합체로 양자점을 개질시키면, 상기 랜덤 중합체가 양자점의 표면을 감싸는 것이 아니라 양자점 표면의 리간드와 교환되기 때문에 표면 개질된 양자점이 콤팩트(Compact)한 사이즈를 가질 수 있고, 상기 표면 개질 메커니즘이 리간드 교환 반응임에도 불구하고 양자점 표면에 손상을 거의 주지 않아서 표면 개질 후에도 양자점 고유의 광학적 성질이 유지될 수 있으며, 생체 표적 분자와의 결합이 높은 효율로 이루어지고 수중 분산 안정성도 우수한바, 본 발명에 따른 랜덤 중합체로 표면 개질된 양자점은 바이오 분야, 특히 바이오 이미징 분야에 적용이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도 1은 RAFT 중합에 따른 다중양쪽성이온 리간드(polyzwitterionic Ligand; PZL)의 합성 과정을 나타낸다.

도 2는 물에서의 리간드 교환 후, QD-PZL (— 빨강), QD-PZ(aminoPEG₃)_{10%} (— blue), QD-PZ(aminoPEG₃)_{25%} (— 검정)의 흡광도 스펙트럼 및 QD-PZL (--- 빨강), QD-PZ(aminoPEG₃)_{10%} (--- 파랑), QD-PZ(aminoPEG₃)_{25%} (--- 검정)의 발광(emission) 스펙트럼을 나타내는데, 기능성이 개량된 리간드에 따라 흡광 및 발광의 파장에 있어 약간의 이동(shift)을 보였을뿐 큰 차이는 관찰되지 않는다.

도 3은 양쪽성 이온 QDs의 크기 분석을 나타낸다. (A) QD-PZL (— 빨강), QD-PZ(aminoPEG₃)_{10%} (— 파랑), QD-PZ(aminoPEG₃)_{25%} (— 검정), 엽산(folic acid) 접합 QD-PZ(aminoPEG₃)_{10%} (— 청록), 엽산(folic acid) 접합 QD-PZ(aminoPEG₃)_{25%} (— 회색)의 동적 광산란(Dynamic Light Scattering) 결과이다. (B) 물 및 PBS에서 QD-PZL의 분산 결과이다. (C) 다중양쪽성이온 리간드 교환된 QDs의 TEM 결과를 나타내는데, 이는 QD-PZL의 단분산(QD-PZL) 결과이다.

도 4는 형광 염료 FITC를 가진 아민 기능성 QD-PZLs의 유도체화(Derivatization) 결과를 나타낸다. (A) 미접합 QD-PZ(aminoPEG₃)_{10%} (— 검정), QD-PZ(aminoPEG₃)_{10%}-FITC 혼합물(--- 파랑), QD-PZ(aminoPEG₃)_{10%}-FITC 분리 (— 파랑)의 흡광도 스펙트럼을 나타낸다. (B) 598 nm에서 표준화된 미접합 QD-PZ(aminoPEG₃)_{25%} (— 검정), QD-PZ(aminoPEG₃)_{10%}-FITC 혼합물 (--- 빨강), QD-PZ(aminoPEG₃)_{10%}-FITC 분리 (— 빨강)의 흡광도 스펙트럼을 나타낸다.

도 5는 QD-PZL, QD-PZ(aminoPEG₃)_{10%}, QD-PZ(aminoPEG₃)_{25%} 입자 각각에 대한 물에서의 제타 포텐셜(Zeta potentials)을 나타낸다.

도 6은 QD-PZL 및 QD-PIL의 pH 안정성을 나타낸다.

도 7은 엽산(folic acid)의 함유량이 증가함에 따라 HeLa cells의 엽산(folate) 수용체에 대한 양자점의 특이적 결합이 높아진다는 사실을 나타낸다. (A) HeLa cells 상에 기능성 사이트가 없는 다중양쪽성이온 리간드 교환된 QDs의 비-생체 부착(non-biofouling) 결과를 나타낸다. (B) QD-PZ(aminoPEG₃)_{10%}-FAs 및 (C) QD-PZ(aminoPEG₃)_{25%}-FAs 표적화 된 HeLa cells의 형광 이미지를 나타낸다(488 nm 여기, 480 - 600 nm 방출 스캔). 모든 이미지는 20 μ m 스케일 바로 동일하게 대조하여 나타냈다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 본 발명은 양자점과 결합력이 있는 화합물, 세포 표적화를 위한 기능기가 도입된 중합체 화합물 및 양쪽성 이온을 갖는 화합물을 혼합하는 단계, 및 상기 혼합된 단량체 혼합물을 가역적 첨가-분열 연쇄이동(reversible addition-fragmentation chain transfer; RAFT) 중합하여 랜덤 공중합체를 생성하는 단계를 포함하는, 양자점 표면 개질용 랜덤 공중합체의 제조방법을 제공한다.

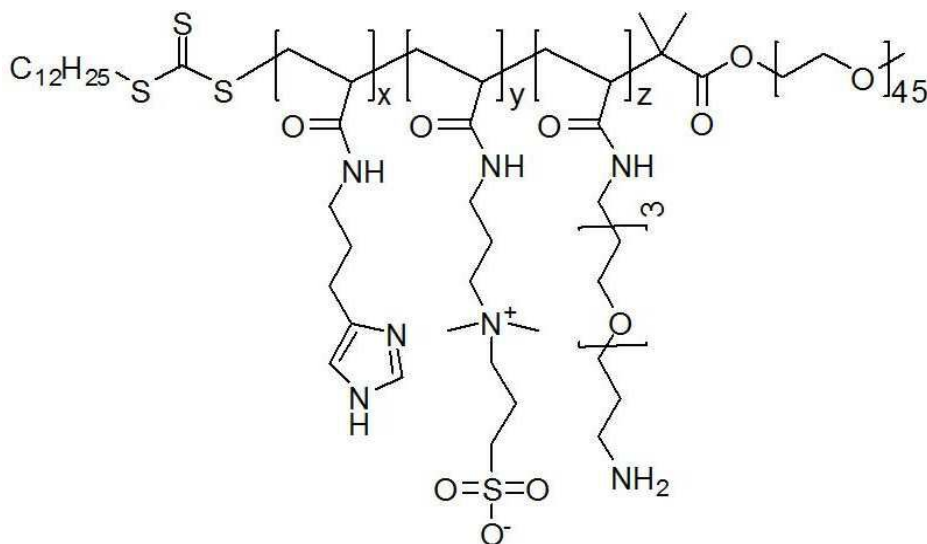
- [0040] 상기 혼합은 총 물수를 기준으로 하여 양자점과 결합력이 있는 화합물 0.1 내지 0.9의 물비, 세포 표적화를 위한 기능기가 도입된 중합체 화합물 0 내지 0.3의 물비 및 양쪽성 이온을 갖는 화합물 0.05 내지 0.8의 물비로 혼합될 수 있다. 만약, 상기 물비를 벗어나면 랜덤 공중합체를 통한 양자점의 표면개질이 불가능하거나, 세포 표적화에 실패하거나, 수-안정성이 저하되는 문제가 야기될 수 있다.
- [0041] 또한, 상기 세포 표적화를 위한 기능기가 도입된 중합체 화합물은 0.001 내지 0.3, 0.01 내지 0.3, 또는 0.1 내지 0.3의 물비로 혼합될 수 있다.
- [0042] 상기 양자점과 결합력이 있는 화합물로는 알파 올레핀, 아크릴레이트, 아크릴아마이드, 비닐 단량체, 스타이릴 단량체, 메타-아크릴레이트 및 메타-아크릴아마이드로 이루어진 군에서 선택된 이중결합의 탄소가 있는 화합물로서, 이미다졸, 카테콜, 피리딘, 피롤, 티오펜, 티아졸, 피라진, 카르복실산, 카르복실레이트, 나프티리딘, 포스핀, 포스핀 옥사이드, 페놀, 1차 아민, 2차 아민, 3차 아민 및 방향족 아민으로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상의 화합물을 포함할 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0043] 상기 세포 표적화를 위한 기능기가 도입된 중합체 화합물로는 알파 올레핀, 아크릴레이트, 아크릴아마이드, 비닐 단량체, 스타이릴 단량체, 메타-아크릴레이트 및 메타-아크릴아마이드로 이루어진 군에서 선택된 이중결합의 탄소가 있는 화합물로서, 1 내지 100개의 에틸렌 글리콜 단량체의 중합체를 가지며, 말단기로 하이드록시, 메톡시 또는 아민을 포함할 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0044] 상기 수분산성 향상을 위한 양쪽성 이온을 갖는 화합물로는 알파 올레핀, 아크릴레이트, 아크릴아마이드, 비닐 단량체, 스타이릴 단량체, 메타-아크릴레이트 및 메타-아크릴아마이드로 이루어진 군에서 선택된 이중결합의 탄소가 있는 화합물로서, 포스포릴콜린, 설포베타인 또는 카르복실베타인에서 선택된 양쪽성 이온부위를 포함할 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0045] 특히, 상기 양쪽성 이온을 갖는 화합물로는 [3-(메타크릴로일아미노)프로필]디메틸(3-설포프로필)암모늄 하이드록사이드(MPDsAH), (2-(메타크릴로일옥시)에틸 포스포릴콜린)(MPC), [2-(메타크릴로일옥시)에틸]디메틸-(3-설포프로필)암모늄 하이드록사이드, (3-
- [0046] [2-(아크릴아미도)-에틸디메틸 암모니오]프로판 설포네이트(AEDAPS) 및 (2-아크릴로일아미노-에틸)-(2-카르복시-에틸)-디메틸-암모늄 베타인으로 이루어진 군에서 선택되는 것이 바람직하다.
- [0047] 보다 구체적으로는, 상기 양자점과 결합력이 있는 화합물, 세포 표적화를 위한 기능기가 도입된 중합체 화합물 및 양쪽성 이온을 갖는 화합물은 각각 BOC(butoxycarbonyl)로 보호된 히스타민 아크릴레이트(Histamine Acrylate; BHA), BOC로 보호된 말단 아민기를 갖는 폴리에틸렌 글리콜 아크릴레이트(BOC Polyethylene glycol Acrylate; BPA) 및 (3-(메타크릴로일아미노)프로필)-디메틸(3-설포프로필)암모늄 하이드록사이드(MPDsAH)일 수 있다.
- [0048] 상기 RAFT 중합은 혼합물에 디티오에스테르, 잔테이트 및 트리티오카보네이트로 이루어진 군에서 선택된 유기황 사슬 전달제와, 중합개시제를 첨가하여 중합할 수 있다.
- [0049] 상기 RAFT 중합은 유기황 사슬 전달제, 혼합물 및 중합개시제를 1: 5: 0.2 내지 1: 300: 0.2의 물비로 첨가하여 중합할 수 있다. 만약, 상기 물비 범위를 벗어나면 중합된 고분자 리간드의 다분산지수(PDI)가 높아지는 문제가 야기될 수 있다.
- [0050] 또한, 본 발명은 (i) 알파 올레핀, 아크릴레이트, 아크릴아마이드, 비닐 단량체, 스타이릴 단량체, 메타-아크릴레이트 및 메타-아크릴아마이드로 이루어진 군에서 선택된 이중결합의 탄소가 있는 화합물로서, 이미다졸, 카테콜, 피리딘, 피롤, 티오펜, 티아졸, 피라진, 카르복실산, 카르복실레이트, 나프티리딘, 포스핀, 포스핀 옥사이드, 페놀, 1차 아민, 2차 아민, 3차 아민 및 방향족 아민으로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상의 화합물을 포함하는, 양자점과 결합력이 있는 화합물, 및
- [0051] (ii) 알파 올레핀, 아크릴레이트, 아크릴아마이드, 비닐 단량체, 스타이릴 단량체, 메타-아크릴레이트 및 메타-아크릴아마이드로 이루어진 군에서 선택된 이중결합의 탄소가 있는 화합물로서, 포스포릴콜린, 설포베타인 또는 카르복실베타인에서 선택된 양쪽성 이온부위를 포함하는, 양쪽성 이온을 갖는 화합물,
- [0052] 디티오에스테르, 잔테이트 및 트리티오카보네이트로 이루어진 군에서 선택되는 하나의 쇠에 공중합 된 랜덤 공중합체를 포함하는, 양자점 표면 개질용 조성물을 제공한다.
- [0053] 상기 랜덤 공중합체 내, 양자점과 결합력이 있는 화합물, 세포 표적화를 위한 기능기가 도입된 중합체 화합물

및 양쪽성 이온을 갖는 화합물의 평균 몰 분율을 각각 x , z , y 라고 했을 때, $0.1 \leq x \leq 0.9$, $0.05 \leq y \leq 0.8$, $0 \leq z \leq 0.3$ 일 수 있다.

[0054] 또한, 상기 z 는 $0.001 \leq z \leq 0.3$, $0.01 \leq z \leq 0.3$, 또는 $0.1 \leq z \leq 0.3$ 일 수 있다.

[0055] 상기 랜덤 공중합체는 본 발명에서 일 구현예로 하기 화학식 1의 화합물로 제조되었다.

[0056] < 화학식 1 >



[0057]

[0058] 상기 식에서,

[0059] x, y, z는 랜덤 공중합체 중의 각 단량체의 평균 몰 분획로서, $0.1 \leq x \leq 0.9$, $0.05 \leq y \leq 0.8$, $0 \leq z \leq 0.3$ 이다.

[0060] 상기 Z의 범위는 $0.001 \leq z \leq 0.3$, $0.01 \leq z \leq 0.3$, 또는 $0.1 \leq z \leq 0.3$ 일 수 있다.

[0061] 본 발명은 양자점과 결합력이 있는 화합물, 세포 표적화를 위한 기능이 도입된 중합체 화합물 및 양쪽성 이온을 갖는 화합물을 혼합하는 단계, 상기 혼합된 혼합물을 가역적 첨가-분열 연쇄이동(reversible addition-fragmentation chain transfer; RAFT) 중합하여 랜덤 공중합체를 합성하는 단계, 및 상기 합성된 랜덤 공중합체를 양자점(Quantum Dots; QDs)에 혼합하는 단계를 포함하는, 양자점의 표면 개질 방법을 제공한다.

[0062] 상기 리간드 교환은 랜덤 공중합체 및 양자점을 1: 0.2 내지 1: 5의 중량비로 혼합할 수 있다. 만약, 상기 중량비를 벗어나면 랜덤 공중합체로 코팅된 양자점의 수-안정성이 저하되는 문제가 야기될 수 있다.

[0063] 본 발명은 상기 랜덤 공중합체로 표면 개질된 양자점을 제공한다.

[0064] 상기 표면 개질된 양자점은 표면에는 양쪽성 이온 분자체가 형성되어 있어 수중 분산 안정성이 우수하고, 생체 표적 물질과 결합이 가능한 기능을 갖는 분자체도 표면에 형성되어 있기 때문에 특이적 표적화(specific targeting)가 가능하다.

[0065] 상기 양자점은 표적 물질에 결합한 후, 형광, 흡광 또는 발광될 수 있다. 이러한 양자점의 광학적 특성을 이용하여, 자기 공명 영상화의 조영제, 생체 내 근적외선 형광 영상화에 사용될 수 있다.

[0066] 본 발명은 상기 표면 개질된 양자점을 포함하는 생체 표적 분자 탐지용 조성물 및 이를 이용한 생체 표적 분자 탐지 방법을 제공한다.

[0067] 상기 생체 표적 분자는 이에 한정되지는 않지만, DNA, RNA, PNA(peptide nucleic acid), LNA(locked nucleic

acid), 단백질, 펩타이드, 폴리펩타이드, 탄수화물, 올리고사카라이드, 항체, 앵타머, 엽산 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나일 수 있고, 바람직하게는 엽산일 수 있다.

[0068] 본 발명에 따른 생체 표적 분자 탐지용 조성물은 암을 탐지할 수 있고, 상기 암은 이에 한정되지는 않지만, 자궁경부암, 아교 모세포종 종양(glioblastoma tumor), 비인두암 표피세포(nasopharyngeal cancer) 및 유방암으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[0069] 본 발명에 따른 표면 개질된 양자점은 상기 서술된 바와 같이, 표적 물질과의 특이적 결합이 가능하고, 표적 물질과 결합하여 형광, 흡광 또는 발광될 수 있는바, 형광 이미지 분석을 통해 탐지할 수 있다.

[0070] 특히, 본 발명의 일실시예에 따르면, 도 1에 도시된 바와 같이 양자점 결합 역할을 하는 히스타민(Histamine)과 비특이성 생물 흡착을 보이는 양쪽성 물질인 (3-(메타크릴로일아미노)프로필)-디메틸(3-설포프로필)암모늄 하이드록사이드 (3-(methacryloylamino)propyl)-dimethyl(3-sulfopropyl)ammonium hydroxide; MPDSA), 그리고 세포 표적화를 위한 기능기를 도입하여 랜덤 공중합체(random copolymer)를 RAFT 중합(polymerization)을 통하여 합성하며, 표적화 그룹(targeting group)을 0%, 10%, 25% 각각 합성하였고, QDs 표면에 기능기들의 수(number)와 작용(working)을 확인하기 위하여 유기 염료(organic dye)인 FITC를 이용하여 연결 전, 후를 UV-spectra로 확인함으로써 나노입자 표면의 1차 아민(primary amine)이 작용함을 확인하였고, 단백질에 대한 낮은 비특이적 결합(nonspecific binding)과 용액 내에서의 높은 안정성, 안정적인 형광방출을 세포 수준의 In vitro 실험에서 비교, 분석하여 입증하였다. 이에, 본 발명자들은 새로운 기능성 양자점을 합성하고 세포 영역에서 암 세포와 같은 특정 물질을 이미지화하는 연구를 진행함으로써 의학용 기능성 양자점이 합성 가능함을 제시하였다.

[0071] 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.

[0072] < 시료의 준비 >

[0073] 1. 출처 및 사양

[0074] 다음에서 언급한 것을 제외한 대부분의 화합물은 Sigma-Aldrich 또는 Fischer Scientific Chemical Company로부터 구매하였다. 중합개시제인 2,2'-아조비스이소부티로니트릴(2,2'-azobisisobutyronitrile; AIBN)은 40℃에서 메탄올로부터 재결정화에 의해 분리되었고, 건조하였다. THF는 사용 전에 Na/벤조페논(Na/benzophenone)으로 증류시켰다. 톨루엔(Toluene) 및 DMF는 CaH₂로 증류시켰다. 중합(Polymerization)은 중합개시제인 2,2'-아조비스이소부티로니트릴(2,2'-azobisisobutyronitrile; AIBN)로 시작되었고, 분자량 조절제로 조절하였다. 가역적 첨가-분열 연쇄이동(reversible addition-fragmentation chain transfer; RAFT) 중합제는 거의 일정한 크기로 준비하였다. 각각의 중합을 위해서, 폴리머의 분자량 및 특성을 확인하면서 '단량체(monomer)' 비율을 달리하였다. 특별히 명시한 것이 아니라면, 모든 반응은 아르곤(argon) 하에서 수행하였다. NMR 스펙트럼은 용매로 CDCl₃ 및 D₂O를 사용하여 Varian VNMRs 600 spectrometer 상에 기록되었다. 각 단계에서의 응집을 확인하기 위해서, 투과 전자현미경(Transmission electron microscopy; TEM)은 200 kV 가속전압(acceleration voltages), 0.23 nm 격자 해상도(lattice resolution), 0.14 nm 점 해상도(point resolution) 및 132 eV EDS 해상도로, JEOL JEM 2100 상에서 수행하였다. 샘플 표본은 탄소 코팅된 Cu grid (200 mesh, EM science) 상에 소량의 용액을 올려놓음으로써 제조되었다. 30분 후, grid 상의 잔여 용액을 필터 페이퍼로 제거하였고, 상기 grid는 8시간 동안 공기-건조시켰다. 동적광산란법(Dynamic Light Scattering; DLS) 실험은 diode laser (637 nm, 4 mW)가 장착된 BI-200SM 상에서 수행되었다. 모든 DLS 데이터는 Dispersion Technology Software (Brookhaven Instruments)에서 처리하였다. 용액의 광학 밀도는 자동 온도 조절기(thermostat) 샘플 홀더 및 자력 교반기가 장착된 JASCO V-670 UV/Vis spectrophotometer로 측정하였다. 580 nm에서의 퍼센트 투과도(percent transmittance)는 다음 식에 의한 용액의 광학 투과도(optical transmittance; O.T)를 계산하여 사용하였다. $O.T = 1 - ((T_{buf} - T_{sol}) / T_{buf})$ 이고, 상기 T_{buf}는 580 nm에서 완충액(buffer)의 % 투과도이며, T_{sol}은 동일 파장에서 용액의 % 투과도이다. 공초점 레이저 주사 형광 현미경(Confocal Laser Scanning Fluorescence Microscopy;

CLSM) 실험은 FluoView 1000 Confocal Microscope (Olympus)으로 수행하였다.

2. 아크릴(Acrylic) NHS의 합성

아크릴(Acrylic) NHS는 BHA(BOC 히스타민 아크릴레이트) 및 BPA(BOC PEG 아크릴레이트) 합성에 있어 최초 화합물로 사용되었다. 우선, 15 mL 건조 THF에 녹인 디사이클로헥실-카르보디이미드(dicyclohexyl-carbodiimide; DCC)(5.145 g, 24.975 mmol) 용액을 60 mL 건조 THF에 녹인 아크릴산(acrylic acid)(1.50 g, 20.82 mmol) 및 N-하이드록시석신이미드(N-hydroxysuccinimide; NHS)(2.865 g, 24.975 mmol) 용액에 4℃에서 혼합하면서 적가하였다. 적가(dropwise addition) 후, 용액을 상온에서 따뜻하게 하고, 4시간 동안 혼합하였다. 침전물은 여과를 통해 제거하였고, 진공상태에서 증발시켰다. 산물을 추가적으로 침전시키기 위해 에틸아세테이트(Ethylacetate)를 첨가하였고, 용액을 다시 여과하였다. 스톡 용액(stock solution)을 제조하기 위해서, 용매를 증발시켰고, 10 mL 무수 DMF 또는 THF 중 하나에 용해시켰다.

3. BOC 히스타민 아크릴레이트(BOC Histamine Acrylate; BHA)의 합성

50 mL DMF에 녹인 히스타민 디하이드로-클로라이드(histamine dihydro-chloride)(2.5 g, 13.59 mmol) 용액을 소듐 바이카보네이트(sodium bicarbonate)(50 mL, 0.3 M) 수용액에 첨가하였다. 미리 합성된 아크릴 NHS를 4℃에서 혼합하면서 적가하였다. 적가 후, 용액을 상온에서 따뜻하게 하고, 12시간 동안 닐하이드린(ninhydrin) 염색을 통해 silica TLC로 확인하였다. 침전물은 여과하여 제거하였다. 산물은 진공 상태에서 증발시켰고, 50 mL DMF에서 재용해시켰다. 추가적으로 여과하였고, 트리에틸아민(triethylamine)(2.27 mL, 16.3 mmol)을 여과 용액에 첨가하였다. 디터트-부틸 디카보네이트(Ditert-butyl dicarbonate)를 4℃에서 혼합하면서 적가하였고, 반응은 상온에서 밤새도록 유지하였다. 원액(crude solution)으로부터 DMF를 분리하기 위해서 물 적정량을 첨가하였고, 상기 용액은 CHCl_3 (4×20 mL)로 추출하였다. 마그네슘 설페이트(Magnesium sulfate)는 물을 건조시키기 위해 사용되었고, 용매는 진공 상태에서 제거되었다. 순수 산물은 silica column(에틸 아세테이트/헥산 구배 비율 변화)를 통해 얻었다. ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7.92 (s, 1H), 7.15 (s, 1H), 6.24 (dd, $J_1 = 1.8$ Hz, $J_2 = 17.0$ Hz, 1H), 6.10 (dd, $J_1 = 9.8$ Hz, $J_2 = 17.0$ Hz, 1H), 5.60 (dd, $J_1 = 1.8$ Hz, $J_2 = 10.0$ Hz, 1H), 3.61 (dt, 2H), 2.70 (t, 2H), 1.55 (s, 9H).

4. BOC PEG 아크릴레이트(BOC PEG Acrylate; BPA)의 합성

디터트-부틸 디카보네이트(Ditert-butyl dicarbonate)(1.98 g, 9.09 mmol)를 DCM (25 mL)에 녹인 4,7,10-트리옥사-1,13-트리데칸디아민(4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine)(10.00 g, 45.45 mmol)에 4℃에서 혼합하며 적가하였다. 적가 후, 용액은 상온에서 따뜻하게 하고, 밤새도록 혼합하였다. 반응하지 않은 시약을 제거하기 위해서, 용액은 물(3×20 mL)과 반응시켰다. 마그네슘 설페이트(Magnesium sulfate)는 물을 건조시키기 위해 사용되었고, 잔여 용매는 진공 상태에서 증발시켰다. 순수 산물(2.53 g, 11.51 mmol)은 소듐 바이카보네이트(sodium bicarbonate)(13.3 mL, 0.3 M) 및 DMF (13.3 mL) 혼합물에 용해시켰다. 상기 용액에 아크릴 NHS(Acrylic NHS)를 4℃에서 혼합하며 적가하였다. 반응은 2시간 동안 닐하이드린(ninhydrin) 염색을 통해 silica TLC로 확인하였다. 원액(crude solution)으로부터 DMF를 분리하기 위해서 물 적정량을 첨가하였고, 상기 용액은 CHCl_3 (4×20 mL)로 추출하였다. 마그네슘 설페이트(Magnesium sulfate)는 물을 건조시키기 위해 사용되었고, 용매는 진공 상태에서 제거되었다. 순수 산물은 silica column (에틸 아세테이트/헥산 구배 비율 변화)를 통해 얻었다. 최종 산물의 결과를 확인하기 위해서 H-NMR을 사용하였다. ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 6.23 (dd, $J_1 = 2.0$ Hz, $J_2 = 17.0$ Hz, 1H), 6.10 (dd, $J_1 = 9.8$ Hz, $J_2 = 17.0$ Hz, 1H), 5.59 (dd, $J_1 = 2.0$ Hz, $J_2 = 9.8$ Hz, 1H), 3.66-3.45 (m, 14H), 3.20 (t, 2H), 1.82-1.75 (m, 4H), 1.42 (s, 12H).

5. 2-(도데실티오키오노티오일티오)-2-메틸프로판산 (2-(Dodecylthiocarbonothioylthio)-2-methylpropanoic acid; TC) 및 TC-말단 폴리(에틸렌 글리콜)(TC-terminated poly(ethylene glycol); PEG-CTA)의 합성

TC는 Aldrich로부터 구매하였고, 일반적인 방법에 따라 합성하였다. TC (7.2 g, 20 mmol) 및 옥사일 클로라이드

(oxalyl chloride)(8.6 mL, 100mmol)를 40 mL 건조 CH_2Cl_2 에 첨가하였고, 가스 증발이 멈출 때까지 상온에서 혼합하였다. 그 후, 잔여 시약은 진공 하에서 제거하였고, 잔여물은 80 mL 건조 CH_2Cl_2 에 재용해시키고, 메톡시 폴리(에틸렌 글리콜)methoxy poly(ethylene glycol) ($M_n = 2000 \text{ g/mol}$) (8 g, 4 mmol in 100mL 건조 CH_2Cl_2)에 첨가하였다. 반응은 24시간 동안 상온에서 혼합하였고, 혼합물은 여분의 차가운 Et_2O 로 침전시키기 전 농축시켰다. 여과를 통해 얻은 미가공(crude) 폴리머는 CH_2Cl_2 에 재용해함으로써 분리하였고, Et_2O 에 침전시켰으며, 진공 하에서 밤새도록 건조하였다. 노란색 분말을 얻었다. ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 4.25 (t, 2H), 3.64(m, 178H), 3.38 (s, 3H), 3.26 (t, 2H), 1.70 (s, 6H), 1.23-1.40 (m, 20H), 0.88 (t, 3H).

[0083] < 실험방법 >

[0084] 1. 정적 광산란(Static Light Scattering; SLS)으로 M_w 측정

[0085] 양쪽성 이온 폴리머(zwitterionic polymer)가 오직 물에만 용해되기 때문에, 중합체의 분자량을 측정하기 위해 SLS가 사용되었다. SLS는 폴리머의 평균 분자량molecular weight (M_w)을 얻기 위해 산란된 빛의 세기를 측정할 수 있는 기술이다. 본 발명자들은 BI-DNDC technique로부터 각각의 샘플 스톡(1~5 mg/mL)에서 측정된 굴절률(refractive index) 수치 $dc/dn = -1.773e^{-02}$ 를 얻었다. 그 후, Zimm plot technique으로부터 분자량 $M_w=2.8 \times 10^4$ 를 얻었다.

[0086] 2. 시험관 내(in vitro) Hela cell 표지 분석

[0087] Hela cells은 우태아혈청((Fetal Bovine Serum; FBS, 10%) 및 페니실린/스트렙토마이신(Penicillin/Streptomycin; PS, 1%)가 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)에 증식시켰다. 그 후, 배양된 세포는 트립신화되었고, DMEM에 2×10^4 cells/mL의 농도로 재현탁되었다. 세포 부유물(500 μL)은 각 챔버의 커버글라스(coverglass) (8 units)로 옮겨졌다. 반응 24시간 후, 세포는 PBS로 조심스럽게 행켰다. 각 챔버에 DMEM 배지(500 μL) 및 QDs (400 $\mu\text{g/mL}$) 접합된 엽산(folic acid)를 첨가하였고, 12시간 동안 반응시켰다. 반응 후, 미결합 QD-PZ(aminoPEG₃)-FAs를 제거하기 위해서, QD-PZ(aminoPEG₃)-FAs 표지된 세포는 조심스럽게 PBS로 행켰고, 세포 생존을 위해 새로운 DMEM 배지(500 μL)를 각 챔버에 첨가하였다. 살아있는 Hela 세포의 형광 이미징은 SIM을 가진 FV1000 및 라이브 형광 현미경(Olympus) 상에서 수행하였다.

[0088] < 실시예 : 랜덤 중합체 및 표면 개질 양자점의 제조 >

[0089] 1. RAFT 중합 방법을 이용한 표면 개질용 중합체 합성

[0090] BHA(양자점과 결합력이 있는 화합물), BPA(세포 표적화 화합물) 및 MPDSA((3-(methacryloylamino)propyl)-dimethyl(3-sulfopropyl)ammonium hydroxide, 양쪽성 이온)의 중합을 위해, RAFT(Reversible Addition-fragmentation chain Transfer) 중합 방법을 사용하였고, RAFT 중합 반응의 시약으로서 트리티오카보네이트 사슬 전달제(trithiocarbonate chain transfer agent) CTA-1 및 AIBN(중합개시제)를 이용하였다.

[0091] 단량체인 BPA (45 mg, 0.125 mmol, in EtOAc), MPDSA (36.5 mg, 0.125 mmol, in MeOH) 및 BHA (66 mg, 0.250 mmol, in EtOAc)와 사슬전달제(20.7944 mg, 0.0088 mmol, in MeOH)의 스톡 용액(stock solution)을 앰플에 첨가하였다. 단량체들과 사슬전달제의 용매는 진공상태에서 제거되었고, 중합개시제인 AIBN (0.3 mg, 0.0018 mmol, in MeOH)을 무수 메탄올(1 mL)에 첨가하였다. 즉, 단량체(BPA+MPDSH+BHA): CTA-1 : AIBN의 몰비는 약 1:56:0.2 이다.

[0092] 앰플은 얼음-펌프-해동(freeze-pump-thaw) 과정을 4회 반복하였으며, 진공 하에서 부탄 토치(butane torch)를 사용하여 밀폐하였다. 앰플은 오일 수조에서 70℃로 밤새도록 가열하였다. 미가공 폴리머를 헥산 및, 에틸 에테르 및 메탄올 혼합물로 씻어냈다. BOC 보호기를 절단하기 위해서 다이옥산(dioxane) 용액에 녹인 4M HCl을 첨가

하였다. 1시간 동안 탈보호(deprotection) 후, 진공상태에서 HCl을 제거하였다. 탈보호된 폴리머는 물에 용해시켰고, pH를 7-8 근처로 맞추기 위해 MeOH (1 M)에 녹인 NaOH 용액을 적가하였다. 용매는 진공상태에서 제거되었고, 그 후, 산물은 물에 용해시켰으며, 용액은 0.2 μm 셀룰로스 실린지 필터를 통해 여과하였다.

[0093] 상기 단량체들의 비율을 하기 표 1과 같이 다양하게 하여 제조하였고, SLS에 의해 측정된 중합체의 분자량은 ~ 28 kDa 였다. 폴리머의 구조는 도 1에 나타났다.

표 1

실시예	생성된 중합체	중합체 조성(몰%)
		50% BHA / 50% MPDSAH
실시예 1	PZL	50% BHA / 10% BPA / 40% MPDSAH
실시예 2	PZ(aminoPEG ₃) _{10%}	50% BHA / 25% BPA / 25% MPDSAH
실시예 3	PZ(aminoPEG ₃) _{25%}	

[0095] 2. 리간드 교환 반응을 통해 표면개질 된 양자점의 제조

[0096] CdSe/CdZnS core/shell² 구조를 가진 양자점(5 mg)을 메탄올에 침전시킨 후, 500 μL 헥산(hexane)에 용해시켰다. 그 후, 상기 중합체(50 mg)를 용해시킨 500 μL 의 메탄올을 첨가한 뒤, 오일 수조에서 60 $^{\circ}\text{C}$ 로 120분 동안 더 혼합하였다.

[0097] 용매에 녹은 양자점-중합체의 결합물질을 에탄올(100 μL), CHCl_3 (100 μL) 및 세척을 위한 여분의 헥산을 첨가하여 침전시켰고, 4000 rpm에서 2분 동안 원심분리한 후, 맑은 상층액은 제거되었다. 펠렛(pellet)은 진공상태에서 건조된 후, PBS(500 μL , pH 7.4)가 첨가되었고, 그 후, 수성 샘플은 사용 전에 0.2 μm 실린지 필터를 통해 여과시켰다.

[0098] 상기 양자점-중합체 결합은 양자점 표면의 Zn^{2+} 및 Cd^{2+} 과 BHA의 이미다졸(imidazole) 그룹 부분이 직접적으로 배위 결합을 함으로서 이루어진다.

[0099] < 실험예 >

[0100] 실험예 1 : 표면 개질된 양자점의 흡광도 스펙트럼 및 형광 스펙트럼

[0101] 표면개질 된 양자점인, QD-PZL, QD-PZ(aminoPEG₃)_{10%} 및 QD-PZ(aminoPEG₃)_{25%}의 흡광도 피크는 aminoPEG의 조성비가 증가함에 따라 약간 증가하였는데, 이는 약간의 적색 이동(red-shift)을 나타냈다(표 2). 또한, 형광 프로파일은 도 2에 나타났다.

표 2

QD 시료	흡광도 (nm)	형광도 (nm)
표면개질 전 양자점	601	605
실시예 1	598	613
실시예 2	596	611
실시예 3	595	604

[0103] 리간드 교환 반응은 양자점 표면에 손상을 줄 수 있어 양자점의 광학적 손실이 크다는 단점이 있는데, 상기 표 2의 결과를 통해, 본 발명의 중합체로 리간드 치환된 양자점은 치환 전의 양자점과 비교해봤을 때 광학적 특성이 비슷하다는 것을 알 수 있고, 이는 양자점 표면에 손상이 거의 없다는 것을 의미한다. 또한, 상기 표 2 및 도 2에서, aminoPEG의 조성비가 증가해도 흡광도 및 형광 스펙트럼에 큰 차이가 없다는 것을 확인할 수 있다.

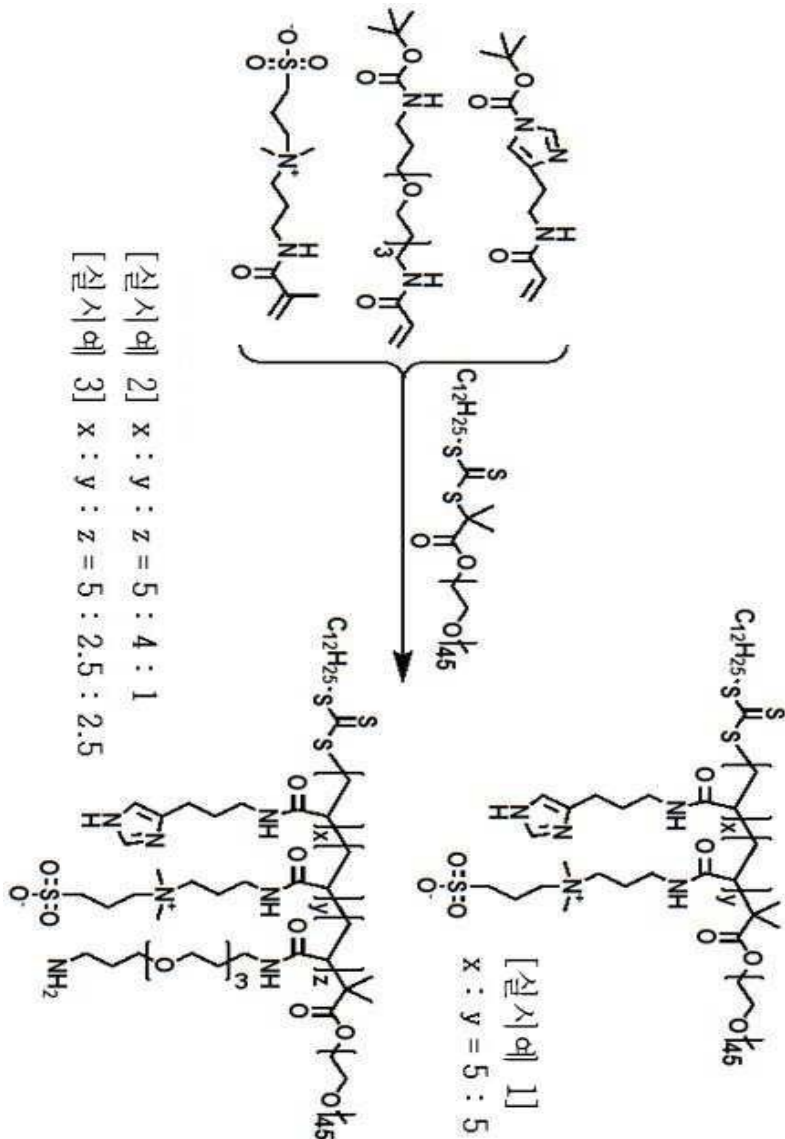
[0104] 실험예 2 : DLS 및 TEM을 통한 수중 분산 안정성 측정

- [0105] QD-PZL의 평균 크기는 7.9 nm로 측정된 반면, QD-PZ(aminoPEG₃)_{10%} 및 QD-PZ(aminoPEG₃)_{25%}은 각각 10.2 및 26.7nm였다. 이는 QD-PZLs에 존재하는 아민 기능기가 주위에 있는 양자점과의 결합을 일으킬 수 있으며, 그 결과 입자간의 응집(aggregation)이 발생한다는 것을 의미한다.
- [0106] 그러나 세포 표적 물질과 아민기를 결합시키면 아민기의 응집을 완화시킬 수 있다. 이를 확인하기 위해서, 아민기에 엽산(folic acid)을 결합시킨 후에 QD-PZLs의 평균 크기를 다시 측정하였다. 아민기에 엽산(folic acid)을 결합시킨 결과, QD-PZ(aminoPEG₃)_{10%} 및 QD-PZ(aminoPEG₃)_{25%}의 평균 크기는 각각 8.0 및 17.4 nm로 감소하였다(도 3A). 이러한 결과는 QD-PZLs 표면에 아민 기능기의 활성도가 높아 입자간의 응집 반응이 발생할 수 있지만, 세포 표적 물질과 결합시키면 아민기의 응집이 완화되는바, 바이오 이미징 용도로 사용하는데 문제가 없다는 것을 의미한다.
- [0107] 또한, 실시예 1로 표면 개질시킨 양자점(QD-PZL)의 안정성이 물 및 PBS 용액에서 입증되었다(도 3B). 또한, TEM 이미지를 통해서 QD-PZL이 물에서 두드러진 응집 없이 고르게 분산된다는 것을 직접적으로 뒷받침한다(도 3C).
- [0108] **실험예 3 : UV에 의한 아민 분석 결과**
- [0109] QDs 표면으로부터 유래한 아민기의 정량 분석을 UV/VIS (Wavelength range : 175~3,300nm, limit resolution : < 0.048 nm) spectrometer로 수행하였다. 형광 염료 분자인, FITC는 아민기에 부착되었다. 그 후, 염료의 유도체화(derivatization) 전후의 샘플 흡광도를 측정하였다. 결과적으로, QD-PZ(aminoPEG₃)_{10%} 및 QD-PZ(aminoPEG₃)_{25%}는 각자의 QD 표면상에 각각 38 및 47개의 아미노기를 가지는 것으로 나타났다. 특정 조건 ([QDs]:[FITC]=1:20 mol/mol) 하에서 FITC로 유도체화(derivatization)를 수행한 경우, QD-PZ(aminoPEG₃)_{10%} 및 QD-PZ(aminoPEG₃)_{25%}에 대한 커플링 수율(coupling yields)은 각각 40 및 70%였다(도 4).
- [0110] **실험예 4 : 제타 포텐셜(Zeta potential) 분석**
- [0111] 표면 개질 된 QDs의 표면 전하는 제타 포텐셜(Zeta potential) 측정 시스템(220V@60Hz)으로 측정하였다. 아민기 없는 QDs는 -1.23 mV 수치를 나타냈으며, 이는 표면 개질에 이용된 QD-PZL이 양쪽성 이온으로 표면에 전하를 띄지 않는 중성 상태로 안정하게 존재한다는 사실을 의미한다. 양전하를 띄는 아민기의 결합 비율이 증가함에 따라 제타 포텐셜(Zeta potential) 수치가 크게 증가하였으며, QD-PZ(aminoPEG₃)_{10%} 및 QD-PZ(aminoPEG₃)_{25%} 수치는 각각 5.47 및 9.69 mV로 나타났다(도 5). 도 5에서 QD-PZL의 제타 포텐셜 값은 중성에 가까웠지만, QD-PZ(aminoPEG₃)_{10%} 및 QD-PZ(aminoPEG₃)_{25%}의 제타 포텐셜 값은 (+) 수치가 증가하는 것을 확인할 수 있고, 이는 (+) 전하를 가지는 아민기를 포함한 단량체가 고분자 중합 과정에서 충분한 비율로 혼합되었음을 의미한다.
- [0112] **실험예 5 : pH 안정성**
- [0113] pH에 따른 QD-PZLs의 안정성을 조사하였다. 실시예 1로 표면 개질된 양자점의 안정성을 PEG를 포함하는 QDs와 비교시, pH 5 이하에서는 안정성이 빠르게 없어지는 PEG 리간드와는 반대로, 양쪽성 이온 폴리머 리간드가 전체 pH 범위 내에서 안정성을 유지하였다(도 6).
- [0114] **실험예 6 : Hela cell에 대한 QD-PZL의 형광 이미징 및 비특이적 결합 특성**
- [0115] 비-생체 부착(non-biofouling) 효과를 증명하기 위해서, Hela cell로 필수적인 시험관 내(*in vitro*) 실험을 수행하였다. 생물학적 이미징 시험은 세포 표면에 엽산(folate) 수용체를 과발현하는 암세포 일종인 Hela cell에 대한 엽산기(folate group)로 표지된 QD-PZLs를 표적화함으로써 수행되었다. QD-PZL, QD-PZ(aminoPEG₃)_{10%} 및 QD-PZ(aminoPEG₃)_{25%} 주입된 Hela cells을 12시간 동안 배양하였고, 그 후 공초점 현미경(confocal microscopy)으로 관찰하였다(도 7). 아민기가 없는 QD-PZL에서는 세포 흡수가 일어나지 않았으나(도 7A), 아민 성분을 증가시키면 세포 흡수가 상당히 증가된다는 결과를 얻었다(도 7B 및 도 7C).

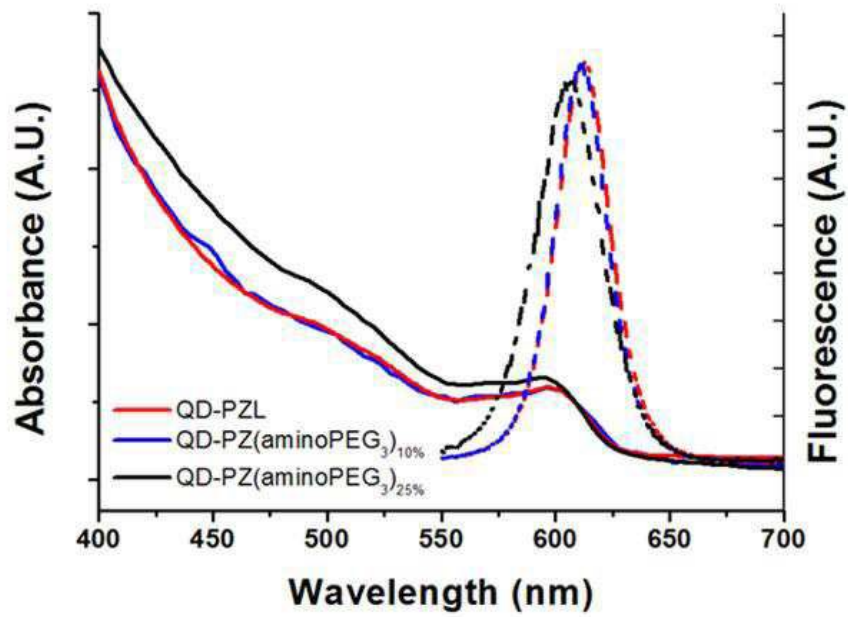
[0116] 이상과 같이, 본 발명은 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 본 발명은 이것에 의해 한정되지 않으며 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 본 발명의 기술 사상과 아래에 기재될 청구범위의 균등 범위 내에서 다양한 수정 및 변형이 가능함은 물론이다.

도면

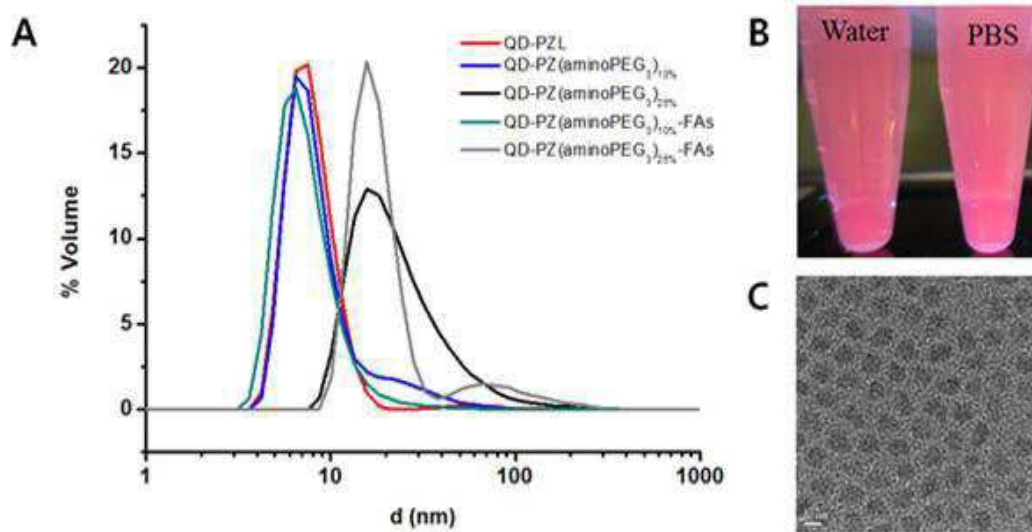
도면1



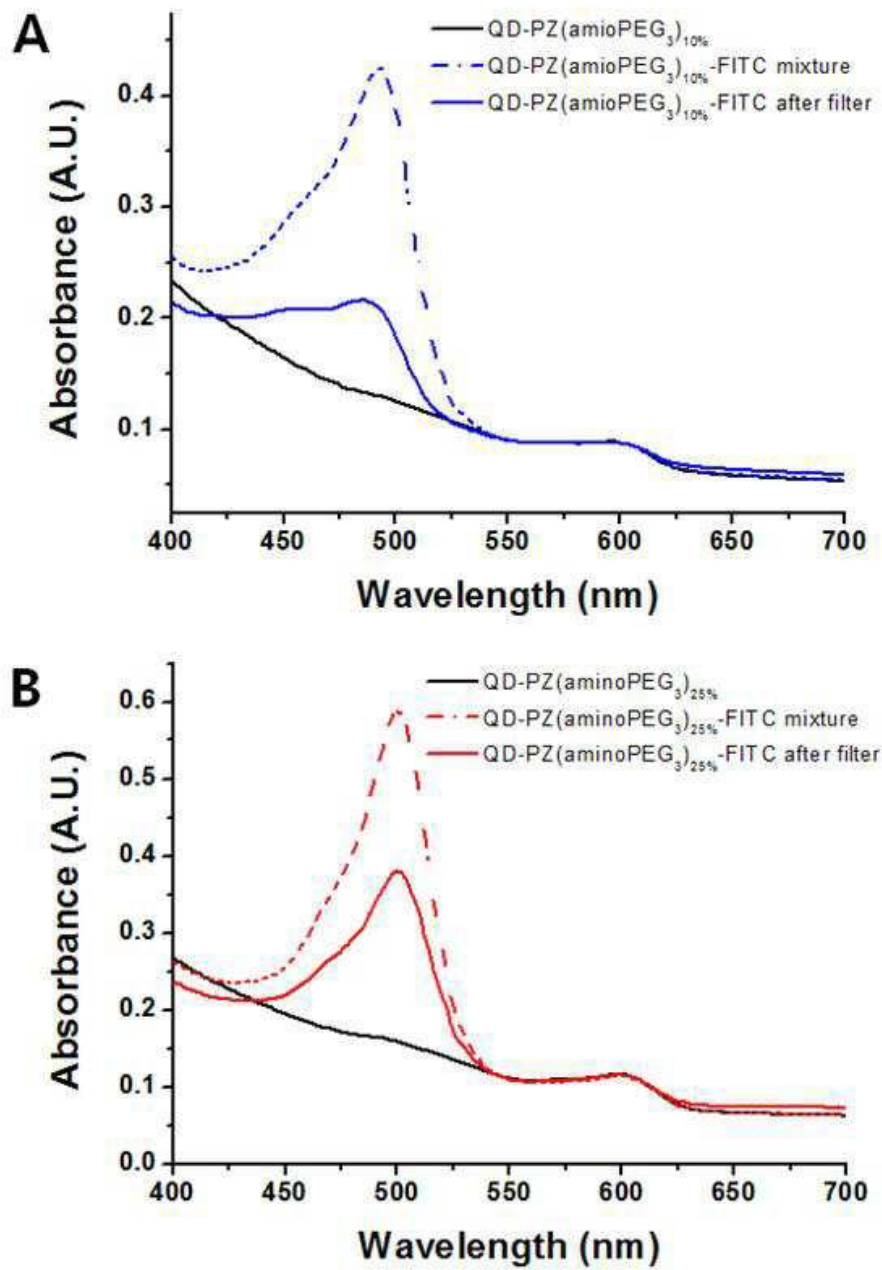
도면2



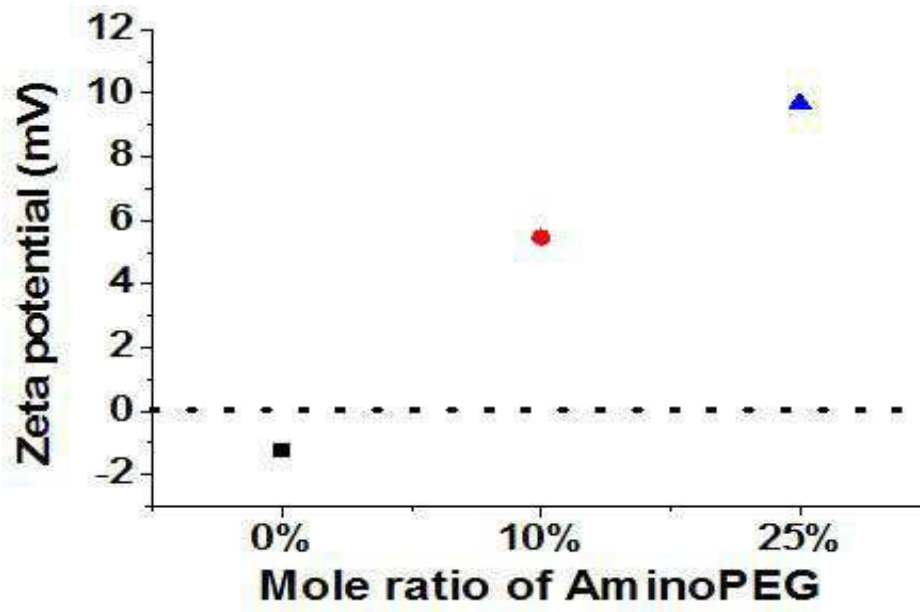
도면3



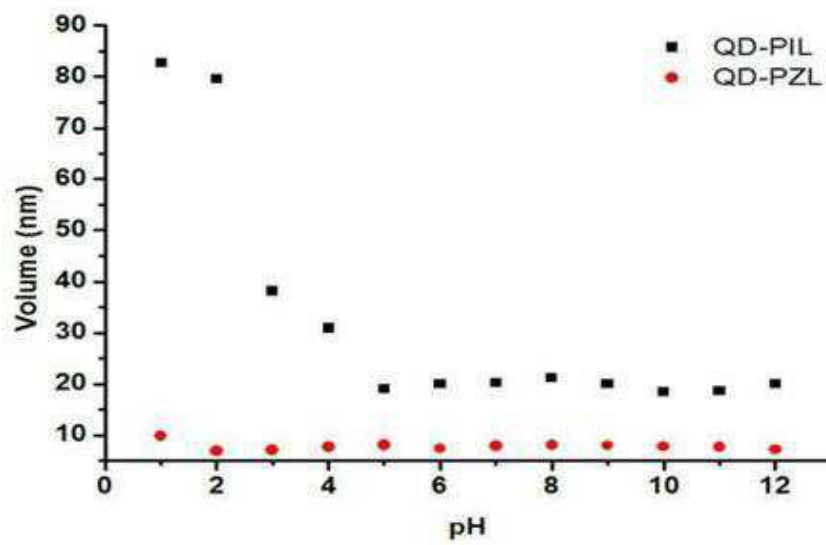
도면4



도면5



도면6



도면7

