

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2012년 8월 9일 (09.08.2012)



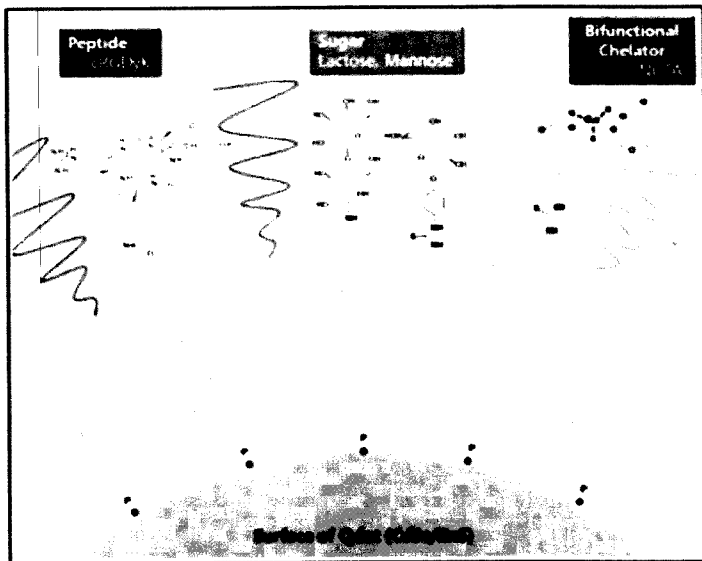
(10) 국제공개번호  
WO 2012/105801 A2

- (51) 국제특허분류: B82B 1/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/000749
- (22) 국제출원일: 2012년 1월 31일 (31.01.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2011-0010203 2011년 2월 1일 (01.02.2011) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 서울대학교 산학협력단 (SNU R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 서울시 관악구 신림동 산 56-1, 151-742 Seoul (KR).
- (72) 발명자: 곁
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 정재민 (JEONG, Jae Min) [KR/KR]; 서울시 서초구 반포2동 신반포한신아파트 23동 1205호, 137-767 Seoul (KR). 이영경 (LEE, Young Kyoung) [KR/KR]; 서울시 성북구 동소문동 5가 59-14, 136-035 Seoul (KR). 이동수 (LEE, Dong Soo) [KR/KR]; 서울시 서초구 서초3동 1467-62 서초5차 대림이편한세상아파트 502동 1205호, 137-868 Seoul (KR). 경준기 (CHUNG, June-Key) [KR/KR]; 서울시 송파구 거여동 291 거여2단지 동아아파트 201동 803호, 138-110 Seoul (KR). 이명철 (LEE, Myung Chul)
- (74) 대리인: 이원희 (LEE, Won Hee); 서울시 강남구 역삼동 642-16 성지하이츠 2차 8층, 135-080 Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: NANOPARTICLE COATED WITH LIGAND INTRODUCED WITH LONG HYDROPHOBIC CHAIN AND METHOD FOR PREPARING SAME

(54) 발명의 명칭: 긴 소수성 사슬이 도입된 리간드로 코팅된 나노입자 및 이의 제조방법



[도 1]

(57) Abstract: The present invention relates to a nanoparticle having a linker connected to a long alkane or alkene chain, and a method for preparing the nanoparticle. The alkyl chain of C<sub>10-30</sub> introduced with a ligand of the present invention can be coated on a hydrophobic nanoparticle through a noncovalent bond, enabling easy introduction of various ligands to the nanoparticle, and the nanoparticle having various functional groups prepared using the method can be applied to fluorescent detection, MRI, raman spectroscopy, optical detection, PET, SPECT, or gamma image device, and the ligand of the visualization agents can be modified to be used for new vessels detection, cancer cell detection, immunocyte detection, hepatocyte detection, cell death detection, and gene detection.

(57) 요약서: 본 발명은 긴 알칸 또는 알켄 사슬에 연결된 링커를 포함하는 나노입자 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 리간드가 도입된 C<sub>10-30</sub>의 알킬 사슬을 비공유 결합으로 소수성 나노입자에 코팅함으로써 나노입자에 다양한 리간드를 용이하게 도입할 수 있고, 상기 방법에 의해

제조된 다양한 기능을 가진 나노입자를 형광탐지, MRI, 라만 분광, 광학탐지, PET, SPECT 또는 감마영상 장치에 적용될 수 있고, 상기 영상화제의 리간드를 변화시켜 신생혈관탐지, 암세포 탐지, 면역세포 탐지, 간세포 탐지, 세포사멸 탐지, 유전자 탐지에 유용하게 사용될 수 있다.

WO 2012/105801 A2

**공개:**

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

## 【명세서】

## 【발명의명칭】

긴 소수성 사슬이 도입된 리간드로 코팅된 나노입자 및 이의 제조방법

## 【기술분야】

<1> 본 발명은 긴 소수성 사슬이 도입된 리간드로 코팅된 나노입자 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

<2>

## 【배경기술】

<3> 나노입자(nanoparticle)란 입자 크기가 수 nm에서 수백 nm 크기의 범주에 속하는 입자를 말한다. 이러한 나노입자 기술은 21세기 첨단 산업의 근간이 되는 핵심기술로서 나노 기술의 중요 부분을 차지하고 있다.

<4> 상기 나노입자는 벌크 입자와는 다른 빛, 전기 및 자기 등의 독특한 물성을 나타내어 전자기, 광학, 촉매, 센서, 저장, 약물전달시스템, 조직 공학, 진단 시료 등의 다양한 응용 분야에서 뛰어난 성능을 나타내고, 나노입자의 제조 기술은 광범위한 응용 분야를 가진 차세대 유망 기술로 부각되고 있다.

<5> 특히, 나노입자를 이용한 의약학 분야는 시장 규모로 2007년 33억 9,000만 달러에서 2012년에는 260억 달러로 확대될 것으로 예측될 정도로 부가가치가 높을 뿐만 아니라, 나노입자에 특이성을 부여하는 것은 특정 조직에 선택적으로 나노입자를 운반하는 기술을 체내 적용할 수 있고, 조직염색학이나 세포결합분석 등 시험관 내 연구분야에도 유용하게 이용될 수 있다.

<6>

<7> 나노입자의 표면에 각종 리간드를 도입하는 것은 나노입자에 특정 조직에 대한 특이성을 부여하고자 함도 있지만, 두 가지 이상의 다른 리간드를 도입하여 두 가지 이상의 표적에 결합할 수 있는 특이성을 부여할 수 있고, 이로 인해 생체 내 혹은 생체 외에서 특정 수용체나 항원 등에 특이적으로 결합시킬 수 있을 뿐만 아니라, 하나의 나노입자에 방사성동위원소, 광학활성물질, 자성체 등에서 선택되는 여러개의 탐지자를 결합시켜 다양한 탐지 방법을 제공할 수 있다.

<8>

<9> 종래 다양한 탐지 원리에 의한 탐지방법이 널리 개발됨으로써, 여러 가지 방법을 동시에 적용하고, 여러 가지 종류의 목표를 동시에 특이적으로 탐지해 낼 수 있는 나노입자 탐지자가 개발되고 있다.

<10> 예를 들면, 표피성장인자 수용체(epidermal growth factor receptor; EGFR)

와 사이클린의존성 인산화효소 저해제(Cyclin-Dependent Kinase 1; CDKI)에 동시 특이성을 가진 양쪽 특이성 항체를 만들어, 세포표면에 있는 EGFR에 먼저 결합하여 세포내로 들어간 다음, 세포 속의 CDK에 결합하는 것이 보고된 바 있고 (Cornelissen B, et al., *Cancer Biother Radiopharm*, 24:163-173, 2009), 특정 암 세포에 결합하는 항원결합조각(fragment antigenbinding; Fab) 분절과 히스타민-석시닐-글라이신(HSG) 분절을 가지는 양쪽 특이성 엔지니어드 항체를 이용하여 2스텝 영상에 응용된 경우도 보고된 바 있다(Sharkey RM, et al., *Cancer Biother Radiopharm*, 25:1-12, 2010).

<11> 또한, 대한민국 공개특허 제2009-0044293호에서는 소수성 나노입자의 일부 표면을 친수성으로 부분 개질한 후, 친수성기에 원하는 기능성 분자를 도입하고, 전체적으로 소수성을 나타내는 기능성 나노입자를 제조한 후, 나노입자 표면의 나머지 부분을 친수성으로 전환시켜 생체 친화성 및 표적지향성을 모두 갖는 바이오-이미지용 나노입자를 개시하였고, 대한민국 공개특허 제2008-0037734호에서는 카드뮴 셀레나이트 코어 및 황화 아연 셸로 이루어진 양자점의 표면에 시스테아민과 수용성 단당류가 결합된 생체적합성 분자영상용 양자점을 개시하고 있다.

<12>

<13>

그러나, 종래 나노입자는 제조된 직후 소수성의 성질을 나타내어 수용성 환경에서 일어나는 현상이 대부분인 생물학적 혹은 의약학적 연구에 그대로 적용될 수 없으므로 친수성 잔기를 도입하는 부가적인 공정을 수행하여 제조해야 하는 문제가 있다. 또한, 나노입자는 체내에서 이물질로 인식되기 때문에 체내에 투여 즉시 망상내피계에 섭취되는 문제가 있다. 따라서 이를 억제하기 위하여 상기 나노입자에 PEG와 같은 폴리머를 코팅하는 부가적인 공정이 요구된다.

<14>

한편, 상기 친수성으로 처리한 나노입자에 각종 리간드를 도입하기 위해 주로 공유결합을 형성하는 화학반응을 수행하였으나, 이러한 화학반응은 반응의 온도, pH, 불순물의 존재 유무, 각종 시약의 농도 차이, 빛 등 수많은 인자에 의하여 효율성이 떨어지고, 특히, 두가지 이상의 결합 반응시에는 그 오차가 더욱 커지면서 변수가 복잡하게 되어 반응의 예측이 어려울 뿐만 아니라 재현성도 저하되는 문제가 있다.

<15>

<16>

이에, 본 발명자들은 이러한 문제점을 해결하기 위해 다양한 종류의 소수성 나노입자에 단순하고 재현성 높게 다양한 종류의 리간드를 도입하는 방법을 연구하던 중, 하나의 긴 알킬사슬에 리간드를 결합시킨 물질을 합성하고, 이를 비공유 결

합을 통해 소수성 나노입자에 코팅시킴으로써, 소수성 나노입자에 다양한 리간드를 용이하게 도입시키는 방법을 알아내고 본 발명을 완성하였다.

&lt;17&gt;

**【발명의 내용】**

**【기술적 과제】**

&lt;18&gt;

본 발명의 목적은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물의 알킬부분(R)이 소수성 나노입자 표면에 비공유결합을 통해 코팅된 나노입자를 제공하는 데 있다.

&lt;19&gt;

[화학식 1]

**R-A-L**

&lt;20&gt;

(상기 R, A 및 L은 본 명세서에 정의한 바와 같다).

&lt;21&gt;

&lt;22&gt;

본 발명의 다른 목적은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 용해시킨 수용액에 소수성 나노입자를 첨가하고, 교반, 가열 및 초음파 조사의 용해 수단을 선택적으로 또는 복합적으로 적용하여 용해시키는 단계를 포함하는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 알킬부분(R)이 비공유 결합을 통해 표면에 코팅된 나노입자의 제조 방법을 제공하는 데 있다.

&lt;23&gt;

본 발명의 또 다른 목적은 상기 나노입자를 이용한 영상화제를 제공하는 데 있다.

&lt;24&gt;

**【기술적 해결방법】**

&lt;25&gt;

상기 목적을 달성하기 위하여,

&lt;26&gt;

본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 알킬부분(R)이 소수성 나노입자 표면에 비공유결합을 통해 코팅된 나노입자를 제공한다:

&lt;27&gt;

[화학식 1]

**R-A-L**

&lt;28&gt;

(상기, R, A 및 L은 본 명세서에서 정의한 바와 같다).

&lt;29&gt;

&lt;30&gt;

또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 용해시킨 수용액에 소수성 나노입자를 첨가하고, 교반, 가열 및 초음파 조사의 용해 수단을 선택적으로 또는 복합적으로 적용하여 용해시키는 단계를 포함하는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 알킬부분(R)이 비공유 결합을 통해 표면에 코팅된 나노입자의 제조방법을 제공한다.

&lt;31&gt;

나아가, 본 발명은 상기 나노입자를 이용한 영상화제를 제공한다.

&lt;32&gt;

**【유리한 효과】**

&lt;33&gt;

본 발명의 C<sub>10-30</sub>의 알킬 사슬이 도입된 리간드를 비공유 결합으로 소수성 나노입자에 코팅함으로써 소수성 나노입자에 다양한 리간드를 용이하게 도입할 수 있고, 상기 방법에 의해 제조된 다양한 기능을 가진 나노입자를 형광탐지, MRI, 라만 분광, 광학탐지, PET, SPECT 또는 감마영상 장치에 적용될 수 있고, 상기 영상화제의 리간드를 변화시켜 신생혈관탐지, 암세포 탐지, 면역세포 탐지, 간세포 탐지, 세포사멸 탐지, 유전자 탐지에 유용하게 사용될 수 있다.

&lt;34&gt;

**【도면의 간단한 설명】**

&lt;35&gt;

도 1은 본 발명의 일실시예에 따른 나노입자의 모식도이다.

&lt;36&gt;

도 2는 본 발명의 일실시예에 따른 나노입자의 인스턴트 얇은 막 크로마토그래피-실리카겔(ITLC-SG)를 분석한 그래프이다.

&lt;37&gt;

도 3은 본 발명의 일실시예에 따른 동위원소가 표지 된 나노입자의 안정성을 나타낸 그래프이다.

&lt;38&gt;

도 4는 본 발명의 일실시예에 따른 나노입자의 결합력을 나타내는 그래프이다.

&lt;39&gt;

도 5는 본 발명의 일실시예에 따른 나노입자의 시험관 내 세포결합을 나타내는 세포형광염색 도면이다.

&lt;40&gt;

도 6은 본 발명의 일실시예에 따른 나노입자의 체외 세포결합을 나타내는 세포형광염색 도면이다.

&lt;41&gt;

도 7은 본 발명의 일실시예에 따른 나노입자의 체내 세포결합을 나타내는 세포형광염색 도면이다.

&lt;42&gt;

도 8은 본 발명의 일실시예에 따른 동위원소가 표지 된 나노입자의 암이식 마우스내 체내분포를 나타내는 PET 도면이다.

&lt;43&gt;

도 9는 본 발명의 일실시예에 따른 동위원소가 표지 된 나노입자의 허혈 모델 마우스의 체내 세포 결합을 나타내는 마에스트로 이미징 시스템 도면이다.

&lt;44&gt;

도 10은 본 발명의 일실시예에 따른 동위원소가 표지 된 나노입자의 허혈 모델 마우스의 체내 세포 결합을 나타내는 세포형광염색 도면이다.

&lt;45&gt;

도 11은 본 발명의 일실시예에 따른 동위원소가 표지 된 나노입자를 투여한 정상 마우스의 PET 결과를 나타낸 도면이다.

&lt;46&gt;

도 12는 본 발명의 일실시예에 따른 동위원소가 표지 된 나노입자를 투여한

정상 마우스의 간과 비장의 형광 현미경 결과를 나타낸 도면이다.

<47>

【발명의 실시를 위한 최선의 형태】

<48>

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<49>

<50>

본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 알킬 또는 알케닐 사슬이 도입된 리간드를 제공한다:

<51>

【화학식 1】



<52>

(화학식 1에서,

<53>

상기 L은 리간드로써, 아미노산, 펩타이드, 단백질, 핵산, 비타민, 호르몬, 신경전달물질 킬레이트화제 및 당으로 이루어진 군으로부터 선택되고;

<54>

상기 A는 링커로써,  $-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}=\text{}$ ,  $-\text{C}\equiv\text{}$ ,  $-\text{N}-$ ,  $-\text{NH}-$ ,  $-\text{N}=\text{}$ ,  $-\text{O}-$ ,  $-\text{S}-$ ,  $-\text{CS}-$ ,  $-\text{CO}-$ ,  $-\text{PO}_4\text{H}-$ ,  $-\text{PO}_3\text{H}-$ ,  $-\text{PO}_2\text{H}-$  및 -벤젠-의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되고; 및

<55>

상기 R은  $\text{C}_{10}\text{-C}_{30}$ 의 알킬 또는 알케닐이고;

<56>

이때, R이 알케닐인 경우, 사슬 중에 이중결합을 5개 이하로 포함할 수 있다).

<57>

<58>

상기 L은 바람직하게, RGD, 콜레시스토키닌, 뉴로텐신, EGF, VEGF, MMP(메트릭스 메탈로프로테이네이즈; matrix metalloproteinase), 옥트레오타이드, 봄베신, TN14003, VIP(혈관활성 장내 펩타이드; vasoactive intestinal peptide), MSH(멜라닌세포자극호르몬; melanocyte stimulating hormone), 서브스텐스 P(통증유발물질; Substance P), 라이신 글루타메이트 유레아, 시스테인, 글루타메이트 유레아 항체, Pro항체, 항체의 분절, 앵타머, 엽산, 비오틴, IRDye, NOTA, DOTA-SCN, NO2A, DO2A, DO3A, DTPA, HYNIC, 이미노다이아세테이트 유도체 또는 이들의 Ga-68, Ga-67, In-111, Y-90, Lu-177, Tc-99m, Cu-64, I-123, I-124, I-131, Zr-89, Sc-44, Gd 표지화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상이고, 더욱 바람직하게는 RGD, NOTA-SCN, DOTA-SCN, 락토즈, 만노즈, 로다민 및 인도시아닌그린으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종이다.

<59>

- <60> 바람직하게 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은;
- <61> cRGDyK-스테아레이트, NOTA-SCN-스테아릴아민, DOTA-SCN-스테아릴아민, 락토즈-스테아릴아민, 만노즈-SCN-스테아릴아민, 로다민-SCN-스테아릴아민 및 인도시아닌그린-스테아릴아민으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상이다.
- <62>
- <63> 이때, RGD는 Arg-Gly-Asp로 구성되는 펩타이드이고;
- <64> cRGDyK는 Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys이 사이클형태로 된 펩타이드이고;
- <65> NOTA는 1,4,7-트리아자시클로노난-1,4,7-트리아세트산이고;
- <66> NOTA-SCN은 2-(p-이소치오시아나토벤질)-1,4,7-트리아자시클로노난-1,4,7-트리아세트산이고;
- <67> DOTA는 1,4,7,10-테트라아자시클로테트라데칸-1,4,7,10-테트라아세트산이고;
- <68> DOTA-SCN은 2-(p-이소치오시아나토벤질)-1,4,7,10-테트라아자시클로테트라데칸-1,4,7,10-테트라아세트산이고;
- <69> DO2A는 1,4,7,10-테트라시클로도데칸-1,7-다이아세테이트이고; 및
- <70> DO3A는 1,4,7-트리카복시메틸-1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7-트리아세트산이다.
- <71> DTPA는 다이에틸렌트리아민펜타아세트산이고; 및
- <72> HYNIC은 하이드라지노니코틴산이다.
- <73>
- <74> 또한, 본 발명은 상기 알킬 또는 알케닐 사슬이 도입된 리간드(R-A-L)의 알킬부분(R)이 소수성 나노입자 표면에 비공유결합을 통해 코팅된 나노입자를 제공한다.
- <75> 상기 나노입자는 도 1에 나타낸 바와 같이, 나노입자 표면에 리간드가 도입된 알킬 또는 알케닐 사슬이 결합되어 있다. 이 때 상기 화학식 1에 포함되지 않는 디터전트를 같이 사용하여 나노입자 표면을 코팅할수도 있다. 이 때 사용되는 디터전트로는 바람직하게는 트윈 60 또는 트윈 80이 될 수가 있다.
- <76>
- <77> 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 C<sub>10-30</sub> 알킬 사슬이 도입된 리간드는 꼬리가 하나이므로, 물에 녹이면 리포솜을 형성하지 않고, 미셀을 형성하거나 기름 방울을 나노 크기로 잘게 나누어 녹이는 유화작용을 한다. 이때 기름 방울 대신 각종 소수성의 나노입자를 둘러싸게 하면 리간드를 결합한 나노입자가 되는 것이다.

<78> 따라서, 본 발명에 따른 하나의 알킬기 꼬리를 가지는 리간드는; 리간드를 나노입자에 공유결합으로 결합시키는 데 필요한 여러 가지 화학반응시약을 대신할 수 있다.

<79>

<80> 나아가, 본 발명은 유기용매에 녹아 있는 소수성 나노입자를 유기용매를 제거하거나 있는 그대로 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 녹인 용액에 첨가하고, 교반, 가열 및 초음파 조사의 용해 수단을 선택적으로 또는 복합적으로 적용하여 용해시키는 단계를 포함하는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물의 알킬부분(R)이 비공유 결합을 통해 표면에 코팅된 나노입자의 제조방법을 제공한다:

<81>

[화학식 1]



<82>

<83> (상기 R, A 및 L은 본 명세서에서 정의한 바와 같다).

<84>

<85> 본 발명에 따른 나노입자의 제조방법은 유기용매에 녹인 소수성 나노입자에서 유기용매를 증발시켜 제거하거나 제거하지 않고 그대로 둔 상태로 상기 화학식 1로 표시되는 화합물과 PEG 유도체 및 하나의 긴 알칸 또는 알켄사슬을 포함한 디터전트를 포함한 수용액과 혼합하고, 교반, 가열 및 초음파 조사의 용해 수단을 선택적으로 또는 복합적으로 적용함으로써 상기 화학식 1의 R부분의 알칸 또는 알켄이 나노입자 표면에 결합하고 L부분의 리간드가 밖으로 노출한 나노입자를 제조할 수 있다. 상기 제조된 혼합 용액을 겔필트레이션 또는 울트라필트레이션을 수행하여 분리하여 사용할 수도 있으나 이에 한정하지 않는다.

<86>

<87> 본 발명에 따른 상기 소수성 나노입자는 불용성 무기물로 이루어진 소수성 표면을 가진 나노입자로부터 선택되고, 바람직하게는 양자점을 사용할 수 있다. 또한 상기 소수성 나노입자는 유기화합물의 폴리머나 덴드리머 등으로부터 선택될 수 있다. 나아가, 제조한 유기 혹은 무기 나노입자의 표면이 수용성인 경우, 소수성인 알칸 또는 알켄 체인을 나노입자의 표면에 공유결합하여 표면을 소수성으로 바꾸어서 사용할 수 있다.

<88>

바람직하게는 주기율표상의 II족 원소인 아연, 카드뮴 및 납 중의 1 원소와 주기율표상의 VI족 원소인 황, 셀레늄 및 텔루륨 중의 1 원소로 구성되는 반도체 나노입자, 금속 나노입자 및 금속화합물 나노입자(이 때의 금속은 주기율표상 알칼리토류 또는 전이원소에 속하는 모든 금속과 알루미늄, 갈륨, 인듐, 탈륨, 게르마

납, 주석, 납, 안티모니, 비스무스, 폴로늄, 붕소, 실리콘, 텔루륨을 포함하고 바람직하게는 금 나노입자, 은 나노입자, 백금 나노입자, 철 나노입자, 산화철 나노입자, 산화망간 나노입자, 황화안티모니 나노입자, 황화철 나노입자 등을 들 수 있다), 인조유기폴리머 나노입자(PVC, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 폴리 카보네이트, 등을 들 수 있다), 덴드리머 나노입자, 폴리라이신 나노입자, 키토산 나노입자, 실리콘이나 실리콘 화합물 나노입자 및 당 나노입자 또는 이들의 조합으로 만들어진 나노입자로 이루어지는 군으로부터 선택되어 사용할 수 있고, 더욱 바람직하게는 양자점을 사용할 수 있다.

&lt;89&gt;

<90> 소수성 나노입자를 녹이는데 사용가능한 유기용매는 클로로포름, 메틸렌클로라이드(MC), 에틸아세테이트(EtOAc), 에테르, 아세톤, 헥산 등의 휘발성 용매를 사용할 수 있고, 바람직하게는 클로로포름을 사용할 수 있다.

&lt;91&gt;

<92> 구체적으로, 소수성 나노입자를 클로로포름에 현탁시키고, 질소를 불어 클로로포름을 증발시키고 상기 화학식 1의 화합물과 디터전트를 포함하는 수용액을 첨가한 후, 70 °C의 온도에서 3시간 동안 강력하게 교반하여 얻을 수 있다.

&lt;93&gt;

상기의 방법으로 제조된 나노입자는 도 1에 나타낸 바와 같이 나노입자 표면에 알칸 또는 알켄 사슬이 도입된 리간드가 결합되어있다.

&lt;94&gt;

<95> 또한, 본 발명은 상기 나노입자를 이용한 영상화제를 제공한다.

&lt;96&gt;

이때, 본 발명에 따른 나노입자를 이용한 영상화제는 형광탐지, MRI, 라만 분광, 광학탐지, PET, SPECT, 감마영상 장치에 적용 가능한 진단용 영상화제로 사용할 수 있다.

&lt;97&gt;

또한, 상기 영상화제는 리간드를 변화시켜 신생혈관탐지, 암세포탐지, 면역세포 탐지, 간세포 탐지, 세포사멸 탐지, 유전자 탐지에 적용될 수 있다.

&lt;98&gt;

<99> 본 발명의 나노입자에 ~~감마선이나 양전자 방출핵종으로 표지할 경우 투과력이 우수하여 영상화제로 사용할 수 있지만, 알파선이나 베타선 방출핵종으로 표지할 경우 분자를 이온화시켜서 파괴하는 성질이 강하므로 악성 세포를 사멸하는 치료제로 사용할 수가 있다.~~

&lt;100&gt;

또한, 본 발명의 나노입자는 외부에서 가하여 주는 초음파나 전자기파 또는 입자성 방사선에 의하여 열, 오제전자, 광전자, 콤프턴 산란 전자, X-선 등의 2차

방사선을 방출하여 악성 세포를 사멸하므로 이를 이용한 치료제로도 사용할 수가 있다.

<101>

**【발명의 실시를 위한 형태】**

<102>

이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

<103>

단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

<104>

<105>

**<실시예 1> RGD-스테아레이트의 합성**

<106>

c(RGDyK)(0.010 g, 0.02 mmol)을 클로로포름(0.5 ml)에 녹이고 트리에틸아민(TEA)(0.007 ml, 0.05 mmol)을 가하여 실온에서 하룻밤 저어주었다. 스테아로일 클로라이드(0.015 g, 0.05 mmol)을 가하여 실온에서 하룻밤 더 저어 주면서 반응하였다. 반응 종결은 질량분석으로 c(RGDyK) 피크가 없어지고 RGD-스테아레이트 피크가 나타나는 것으로 확인하였다. 반응혼합물은 물로 세척한 후 유기층을 분리하여 농축하였다. 다시 아세트나이트릴(1 ml)에 녹여 재결정하여 8 mg의 최종 생성물을 얻었다. 수율: 57%. 질량스펙트럼( $ESI^+$ ), ( $M+H^+$ ): 886.6.

<107>

<108>

**<실시예 2> NOTA-SCN-스테아릴아민의 합성**

<109>

2-(p-이소치오시아나토벤질)-1,4,7-트리아자시클로노난-1,4,7-트리아세트산(NOTA-SCN, 0.020 g, 0.04 mmol)을 클로로포름(1 ml)에 녹이고 TEA(0.012 ml, 0.09 mmol)을 가하여 실온에서 저어 주었다. 스테아릴아민(0.014 g, 0.05 mmol)을 반응혼합물에 가하고 20시간 동안 실온에서 저어 주었다. 반응 종결은 질량분석으로 NOTA-SCN 피크가 없어지고 NOTA-SCN-스테아릴아민 피크가 나타나는 것으로 확인하였다. 에테르(3 ml × 2)에서 2 회 재결정하여 26 mg의 최종 생성물을 얻었다. 수율: 72%. 질량스펙트럼( $ESI^+$ ), ( $M+H^+$ ): 720.5.

<110>

<111>

**<실시예 3> DOTA-SCN-스테아릴아민의 합성**

<112>

2-(p-이소치오시아나토벤질)-1,4,7,10-테트라아자시클로테트라데칸-1,4,7,10-테트라아세트산(DOTA-SCN, 0.020 g, 0.04 mmol)을 클로로포름(1 ml)에 녹이고 TEA(0.015 ml, 0.10 mmol)을 가하여 실온에서 저어 주었다. 스테아릴아민(0.015 g, 0.06 mmol)을 반응혼합물에 가하고 하룻밤 저어 주었다. 반응 종결은 질량분석으로 SCN-DOTA 피크가 없어지고 SCN-DOTA-스테아릴아민 피크가 나타나는 것

으로 확인하였다. 에테르(3 ml × 2)에서 2회 재결정하여 23 mg의 최종 생성물을 얻었다. 수율: 77%. 질량스펙트럼( $ESI^+$ ), ( $M+H^+$ ): 821.5.

&lt;113&gt;

&lt;114&gt; &lt;실시예 4&gt; 락토즈-스테아릴아민의 합성

<115> 스테아릴아민(0.020 g, 0.07 mmol)을 MeOH(2 ml)에 녹이고 여기에 물(5 ml)에 녹인  $\alpha$ -락토즈(0.267 g, 0.74 mmol)을 가하여 0 °C에서 잘 섞어 준 다음, MeOH(1 ml)과 초산(4  $\mu$ l)에 녹인 소듐 시아노보로하이드라이드(0.007 g, 0.11 mmol)를 한 방울씩 가하면서 잘 저어 주었다. 반응 종결은 질량분석으로 락토즈 피크가 없어지고 락토즈-스테아릴아민 피크가 나타나는 것으로 확인하였다. 실리카겔 칼럼 크로마토그래피(2 × 5 cm, 헥산/에틸아세테이트)로 분리하여 30 mg의 최종 생성물을 흰색 고체 형태로 얻었다. 수율: 68%. 질량스펙트럼( $ESI^+$ ), ( $M+H^+$ ): 596.4.

&lt;116&gt;

&lt;117&gt; &lt;실시예 5&gt; 만노즈-스테아릴아민의 합성

<118>  $\alpha$ -D-만노피라노실-페닐이소치오시아네이트(0.014 g, 0.04 mmol)을 클로로포름(2 ml)에 녹이고 TEA(0.012 ml, 0.09 mmol)을 가한 다음 스테아릴아민(0.012 g, 0.04 mmol)을 가하고 실온에서 잘 저어 주었다. 반응이 진행됨에 따라 혼탁한 반응액이 맑게 변했다. 15시간 동안 저으면서 반응한 다음 질량분석으로  $\alpha$ -D-만노피라노실-페닐이소치오시아네이트 피크가 없어지고 만노즈-스테아릴아민 피크가 나타나는 것으로 반응종결을 확인하였다. 실리카겔 칼럼 크로마토그래피로(2 × 5 cm, 헥산/에틸아세테이트) 분리하여 26 mg의 최종 생성물을 크림색 고체 형태로 얻었다. 수율: 77%. 질량스펙트럼( $ESI^+$ ), ( $M+H^+$ ): 583.4.

&lt;119&gt;

&lt;120&gt; &lt;실시예 6&gt; 로다민-스테아릴아민의 합성

<121> 로다민 B-이소치오시아네이트(0.015 g, 0.03 mmol)을 클로로포름(1 ml)에 녹이고 TEA(0.012 ml, 0.08 mmol)을 가하여 30분 동안 실온에서 저어 주었다. 스테아릴아민(0.013 g, 0.04 mmol)을 반응혼합물에 가하고 15시간 더 저어 주면서 반응시켰다. 반응 종결은 질량분석으로 로다민 피크가 없어지고 로다민-스테아릴아민 피크가 나타나는 것으로 확인하였다. 실리카겔 칼럼 크로마토그래피(2 × 5 cm, 헥산/에틸아세테이트)로 분리정제하여 16 mg의 적포도주색 고체의 최종 생성물을 얻었다. 수율: 74%. 질량스펙트럼( $ESI^+$ ), ( $M+H^+$ ): 769.5.

&lt;122&gt;

- <123> <실시예 7> 인도시아닌그린-스테아릴아민의 합성
- <124> 시아뉴릭 클로라이드(5 mg, 0.0271 mmol)를 TEA(10  $\mu$ l, 0.0813 mmol)에 녹이고 얼음/소금조에서 고체가 생길 때까지 약 20분간 교반 한 후, 메틸렌클로라이드(0.2 ml)를 반응혼합물에 가하여 고체를 녹이고, 인도시아닌그린(22.5 mg, 0.0271 mmol)과 스테아릴아민(7.5 mg, 0.0271 mmol)을 가하여 얼음/소금조에서 30분 더 저어주었다. TLC로 생성물을 분석하고 실리카겔 칼럼 크로마토그래피를 수행하여 분리정제하였다. 수율: 56%(15 mg). Mass spectrum(ESI+), (M+MeCN<sup>+</sup>): 1044.62.
- <125>
- <126> <실시예 8> PEG결합 QD655 양자점의 제조
- <127> 종래의 트윈 60(Tween 60; 시그마-알드리치)은 친수성 PEG 머리에 소수성 스테아릴기가 결합한 계면활성제이고, 양자점인 QD655와 QD545는 인비트로젠(Carlsbad, CA, U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다.
- <128> QD655(100 pmol)를 불활성기체 환경에서 증발시켜 용매를 제거한 후, 트윈 60의 4% 수용액 2 ml를 건조한 QD655와 섞은 다음 하룻밤 동안 70 °C로 가열하면서 섞어 주었다. 상기 반응혼합물은 시그마-알드리치에서 구입한 세파크릴<sup>®</sup>(Sephacryl<sup>®</sup>)S-300 HR 칼럼(V<sub>0</sub>=7.5 ml, V<sub>d</sub>=20 ml)으로 봉산완충액을 흘려서 분리하였다. 상기 분획은 플루오로미터와 흡광분광계로 측정하였다.
- <129> 코팅된 양자점 용액은 울트라필트레이션(Amicon Ultracel-100 kDa cutoff)으로 농축하였고, 최종 농도는 UV-가시광선 흡광도로 결정하였다. 분리한 코팅된 양자점의 수력학적 반경과 크기 분포는 다이내믹 라이트 스퀀터링(DLS, Malvern Zetasizer Nano ZS90 system, Marlvern Instrument Ltd., U.K.)과 투과전자현미경(TEM, JRM-1400, JEOL, Japan)으로 측정하였다.
- <130> 다이내믹 라이트 측정은 코팅된 양자점 용액을 증류수로 희석하고 1분 동안 소니케이션 한 다음 실시하였으며, 25 °C에서 90° 각도로 산란되어 나오는 부피-퍼센트로부터 입자의 크기와 분포를 구하였다.
- <131> 네거티브-스테인 TEM 영상을 찍기 위해 탄소로 코팅된 구리 그리드에 코팅된 양자점 용액을 한 방울 떨어뜨린 후, 우라닐 아세테이트 포화용액으로 염색한 다음 가속 전압을 80 keV로 하여 촬영하였다.
- <132>
- <133> <실시예 9> PEG결합 QD545 양자점의 제조
- <134> QD545(100 pmol)을 불활성기체 환경에서 증발시켜 용매를 제거한 후, 클로로포름(50  $\mu$ l)에 현탁시키고, 6%의 트윈 60 수용액(2 ml)을 넣어 준 후, 70 °C에서 3

시간 동안 강력하게 교반 하였다.

<135>           상기 반응혼합물의 분리 정제, 농도측정, 수력학적 반경 및 크기분포 측정은 코팅된 실시예 8과 동일한 방법으로 수행하였다.

<136>

<137>           <실시예 10> RGD-QD655의 제조

<138>           상기 실시예 8에서 4% 트윈 60을 사용하는 대신, 상기 실시예 1에서 제조된 RGD-스테아릴아민을 5 mol% 포함하는 4% 트윈 60 수용액 2 ml을 사용하여 상기 실시예 8과 동일한 방법으로 QD655에 코팅하고 분리하여 RGD-QD655를 제조하였다.

<139>

<140>           <실시예 11> NOTA-QD655의 제조

<141>           상기 실시예 8에서 4% 트윈 60을 사용하는 대신, 상기 실시예 2에서 제조된 NOTA-스테아릴아민을 2 mol%로 포함하는 4% 트윈 60 수용액 2 ml을 사용하여 상기 실시예 8과 동일한 방법으로 QD655에 코팅하고 분리하여 NOTA-QD655를 제조하였다.

<142>

<143>           <실시예 12> NOTA-RGD-QD655의 제조

<144>           상기 실시예 8에서 4% 트윈 60을 사용하는 대신, 상기 실시예 1에서 제조된 RGD-스테아릴아민 5 mol%와 상기 실시예 2에서 제조된 SCN-NOTA-스테아릴아민을 2 mol% 포함하는 4% 트윈 60 수용액 2 ml을 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시예 8과 동일한 방법으로 QD655에 코팅하고 분리하여 NOTA-RGD-QD655를 제조하였다.

<145>

<146>           <실시예 13> Lac-QD545의 제조

<147>           상기 실시예 8에서 6% 트윈 60을 사용하는 대신, 상기 실시예 4에서 제조된 락토즈-스테아릴아민을 5 mol% 포함하는 6% 트윈 60 수용액 2 ml을 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시예 8과 동일한 방법으로 QD545에 코팅하고 분리하여 Lac-QD545를 제조하였다.

<148>

<149>           <실시예 14> Man-QD655의 제조

<150>           상기 실시예 8에서 4% 트윈 60을 사용하는 대신, 상기 실시예 5에서 제조된 만노즈-스테아릴아민을 2 mol% 포함하는 4% 트윈 60 수용액 2 ml을 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시예 8과 동일한 방법으로 QD655에 코팅하고 분리하여 Man-QD655를 제조하였다.

<151>

<152> <실시예 15> NOTA-Man-QD655의 제조

<153> 상기 실시예 8에서 4% 트윈 60을 사용하는 대신, 상기 실시예 2에서 제조된 NOTA-스테아릴아민을 2 mol% 포함하고, 실시예 5에서 제조된 만노즈-스테아릴아민을 5 mol% 포함하는 4% 트윈 60 수용액 2 ml을 상기 실시예 8과 동일한 방법으로 QD655에 코팅하고 분리하여 NOTA-Man-QD655를 제조하였다.

<154>

<155> <실시예 16> NOTA-Lac-QD545의 제조

<156> 상기 실시예 8에서 6% 트윈 60을 사용하는 대신, 상기 실시예 2에서 제조된 NOTA-스테아릴아민을 2 mol% 포함하고, 실시예 4에서 제조된 락토즈-스테아릴아민을 5 mol% 포함하는 6% 트윈 60 수용액 2 ml를 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시예 8과 동일한 방법으로 QD545에 코팅하고 분리하여 NOTA-Lac-QD655를 제조하였다.

<157>

<158> <실시예 17> 로다민-산화철나노입자의 제조

<159> 산화철 나노입자 5 mg을 2 ml 유리바이알에 넣고 1 ml의 클로로포름을 가한 다음 5분간 초음파를 가하여 잘 분산시켰다. 상기 실시예 6에서 제조된 로다민-스테아릴아민 5 mol%를 포함하는 4% 트윈 60 수용액 2 ml을 상기 실시예 8과 동일한 방법으로 산화철나노입자에 코팅하고, 아미콘 필터로 분리하여 로다민-산화철나노입자를 제조하였다.

<160>

<161> <실시예 18> NOTA-Man-산화철나노입자의 제조

<162> 상기 실시예 2에서 합성한 NOTA-SCN-스테아릴아민 2 mol%와 실시예 5에서 제조된 만노즈-스테아릴아민 2 mol%를 포함하는 8% 트윈 60 용액을 80 °C로 가열하고 여기에 산화철 나노입자의 클로로포름 분산액(5 mg/mL) 0.1 ml를 떨어뜨린 다음 30분동안 초음파를 가하여 분산시킨 다음 80 °C에서 한시간 더 가열한 후, 다시 1시간 더 초음파를 가하여 분산시켰다. 반응혼합물을 세파크릴 S500(Sephacryl S500) 컬럼을 통과시켜 분리 정제하여 NOTA-Man-산화철나노입자를 제조하였다.

<163>

<164> <실험예 1> 안정성시험

<165> 상기 실시예 8 내지 17에서 제조된 코팅된 양자점을 4 °C에서 한 달 동안 보관하면서 총 형광강도를 측정하였고, 또한 DLS(Dynamic light scattering; 입경측정)를 측정하여 입자의 크기를 측정하였으며, 투과전자현미경인 TEM으로 입자의 형

태를 관찰하였다.

<166> 그 결과 총 형광광도와 입자크기의 변화가 없어서 안정함을 알 수 있었다.

<167>

<168> <실험예 2> 방사성동위원소 표지 실험

<169> 상기 실시예 2에서 제조된 NOTA-SCN-스테아릴아민을 2 mol% 포함하는 트윈 60으로 코팅한 실시예 11의 양자점(NOTA-QD655, 50 nM, 100  $\mu$ l)에 2 M 초산나트륨 완충액(300  $\mu$ l, pH 5.2)을 가하고 잘 섞어 준 후,  $^{68}\text{GaCl}_3$ (in 0.5 ml of 0.1 M HCl, 300~500 MBq)를 첨가하여 47  $^{\circ}\text{C}$ 에서 25분 동안 반응을 수행하였다. 표지 효율은 인스턴트 앵은 막 크로마토그래피-실리카겔(ITLC-SG; instant thin layer chromatography)를 0.1 M 구연산용액으로 전개하여 측정하였다.

<170> 그 결과, 표지 되지 않은  $^{68}\text{Ga}$ 은 용매 전단부까지 올라갔고, 표지 된 양자점은 원점에 남아 있는 것을 확인하였고, 표지효율은 98%이상으로 나타났다. 표지 된 양자점은 NAP-10 칼럼(GE Healthcare, U.S.A.)을 이용하여 생리식염수를 흘려주어 분리하였고, 방사능은 아미콘(Amicon) 여과장치를 이용하여 농축하였다. 분리 후 방사 화학적 순도는 99%보다 높게 나타났다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.

<171>

<172> <실험예 3> 방사성동위원소 표지된 양자점의 안정성 실험

<173> 상기 실험예 4의 방사성 동위원소가 표지 된 양자점의 안정성을 확인하기 위하여 하기 실험을 수행하였다.

<174> Ga-68로 표지 된  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-QD655 양자점을 PBS(pH 7.2~7.4, 0.5 ml)에 녹여 실온에 2시간 동안 안정성을 측정하고, 사람 혈청(0.5 ml)에 녹여 37  $^{\circ}\text{C}$ 에서 2 시간 동안 안정성을 측정하였다. 안정성 측정을 위한 방사 화학적 순도 측정은 실험예 2의 ITLC-SG 조건으로 수행하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.

<175>

<176> 도 3에 나타낸 바와 같이, PBS(실온)에서는 2시간 후에 97%가 넘고 사람 혈청(37  $^{\circ}\text{C}$ )에서는 2시간 후에 96%가 넘는 안정성을 나타내었다.

<177> 이는  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-QD655를 실온에서 두었을 때와 혈청에 넣어 37  $^{\circ}\text{C}$ 에서 배양하였을 때에 관계없이 안정한 것으로 확인되었다.

<178>

<179> <실험예 4> 시험관 내 동위원소표지 양자점 결합실험

<180> 본 발명에 따른 실시예 10의 RGD가 코팅된 양자점이  $\alpha v\beta 3$  인티그린에 결합

하는지 확인하기 위하여 <sup>68</sup>Ga-NOTA-RGD-QD655와 <sup>68</sup>Ga-NOTA-QD655를 U87MG(사람 글리 오마 세포, αvβ3 발현 강함), A431(사람 편평상피종, αvβ3 발현 약함), MCF-7(사람 유방암세포, αvβ3 발현 약함)과 결합실험을 수행하였다.

<181>            상기 각각의 세포들을 돌베코의 인산염완충-생리식염액(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline; DPBS)로 세척하고, 세포결합 실험용 완충액(pH 7.4, 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1%(wt/vol) 우혈청알부민)으로 한 번 더 세척하였다. 각 세포들은 0.37 MBq의 각각의 표지 된 양자점을 포함한 세포결합 실험용 완충액(1 ml)과 5% 이산화탄소 존재하에 37 °C에서 15분간 반응을 수행하였다.

<182>            실시에 10의 RGD 결합 양자점이 선택적으로 세포에 섭취가 되는지를 확인하기 위하여 cRGDyK(10 μM)를 포함하고 있는 <sup>68</sup>Ga-NOTA-RGD-QD655도 같이 반응시켜 블로킹 연구도 병행하였다. 상기 배양액을 제거하여 세포섭취를 중단시키고 냉각시킨 DPBS로 3회 세척하였다. 1% SDS 용액(0.5 ml/well)으로 세포를 녹여 내어 감마 카운터로 방사능을 측정하였다. BCA(BCA Protein assay kit, Pierce) 방법으로 단백질 양을 측정하여 방사능 섭취량을 단백질 mg당 섭취율로 표준화하였다. 그 결과를 표 1 및 도 4에 나타내었다.

<183>            【표 1】

	세포섭취율(%)		
	RGD-QD(실시에 10)	QD(대조군)	cRGD 저해(100 μM)(비교군)
U87MG(글리 오마 세포)	9.64±0.70	5.47±0.25	5.65±0.59
MCF-7(편평 상피종양 세포)	5.57±1.15	5.36±1.44	6.51±0.54
A431(유방암 세포)	5.50±0.76	5.44±0.30	5.57±0.66

<184>            상기 표 1 및 도 4에 나타낸 바와 같이, <sup>68</sup>Ga-NOTA-RGD-QD655는 αvβ3 인티그린을 발현하는 U87MG 세포에만 결합하는 것으로 나타났고, 다른 세포에는 결합하지 않는 것으로 나타났으며, 이를 cRGD로 블로킹하였을 때는 U87MG 세포에도 결합하지 않는 것으로 나타났으나, <sup>68</sup>Ga-NOTA-QD655는 어떠한 세포주에도 결합하지 않는 것으로 나타났다.

<185>

- <186> <실험예 5> 시험관 내 양자점 세포 형광 염색 실험
- <187> 본 발명에 따른 양자점에 대한 콘포칼 영상을 얻기 위하여 실험하기 하루 전날 8-웰 유리 챔버 슬라이드(Lab-Tek Chamber Slide System, Nalge Nunc Interantional)에  $1.5 \times 10^4$  cell/chamber씩의 세포를 깔아 주었다.
- <188> 세포가 안정화된 후, 따뜻한 세포결합 실험용 완충액으로 세척하여 주고, 실시예 8의 PEG-QD655 또는 실시예 10의 RGD-QD655를 50 nM씩 포함한 세포결합용 완충액 200  $\mu$ l씩을 가하여 15분 동안 반응시켰다. 세포결합 완충액을 제거하여 결합 반응을 종결시키고 냉각한 DPBS로 3회 세척하였다. 세포는 3.7% 파라포름알데히드 용액으로 고정한 다음 DAPI 용액으로 마운팅 하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다.
- <189>
- <190> 도 5에 나타낸 바와 같이, 실시예 10의 RGD-QD655는  $\alpha v \beta 3$  인티그린을 발현하는 U87MG 세포에만 결합하는 것으로 나타났고, 실시예 8의 PEG-QD655는 어떠한 세포에도 결합하지 않는 것으로 나타났으나, 실시예 10의 RGD-QD655는 cRGDyK에 의하여 U87MG 결합이 블로킹 되었다.
- <191>
- <192> <실험예 6> 체외 양자점 조직형광염색 실험
- <193> U87MG( $2 \times 10^5$  cells/0.1 ml) 세포를 Balb/c 누드마우스의 한쪽 대퇴부에 피하주사하여 종양모델을 만들었다. 종양의 크기가  $1 \text{ cm}^3$  이상이 되었을 때 종양 조직을  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 에서 7  $\mu\text{m}$ 의 냉동 절편을 만들어서 슬라이드 글라스에 붙이고 아세톤으로  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 에서 20분간 고정하였다. 10%(v/v) 우태아 혈청에 실온에서 30분간 배양하고, 실시예 10의 RGD-QD655(30 nM, 100  $\mu$ l)를 가하여  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 에서 하룻밤 배양하여 형광염색하였다. 실시예 10의 RGD-QD655를 결합하기 전에 cRGDyK(500 nM)를 1분 전에 가하여 블로킹 실험도 하였다. 공초점 현미경에서 세포핵을 관찰하기 위하여 DAPI 용액으로 마운팅하였다. QD655는 488 nm 그리고 DAPI와 QD545는 405 nm의 레이저로 스캐닝하여 콘포칼 영상을 얻었다. 그 결과를 도 6에 나타내었다.
- <194>
- <195> 도 6에 나타낸 바와 같이, 실시예 10의 RGD-QD655는  $\alpha v \beta 3$  인티그린을 발현하는 U87MG 종양조직에 결합하는 것으로 나타났다(a). 반면, 실시예 8의 PEG-QD655는 결합하지 않았으나(b), 실시예 10의 RGD-QD655는 cRGDyK에 의하여 U87MG 결합이 블로킹 되는 것으로 나타났다(c).
- <196>

- <197> <실험예 7> 체내 양자점 조직형광염색 실험
- <198> U87MG( $2 \times 10^5$  cells/0.1 ml)와 A431( $1 \times 10^7$  cells/0.1 ml) 세포를 양쪽 대퇴부에 피하주사하여 종양을 만든 Balb/c 누드마우스에 실시예 8의 RGD-QD655(120 nM, 0.1 ml)을 꼬리정맥으로 주사하였다. 음성 컨트롤로는 실시예 8의 PEG-QD655(127 nM, 0.1 ml)을 주사하였다. 투여한 지 1 시간 후에 마우스를 희생시킨 다음 장기를 적출하여 노란색 필터를 사용한 입사광을 이용하여 마에스트로 이미징 시스템(Maestro imaging system)을 이용하여 형광영상을 얻었다.
- <199> 또한, 종양을 OCT 미디엄(Tissue-Tek O.C.T. compound, Sakura, Finetek)에 넣어 7  $\mu$ m 두께의 냉동 절편을 얻어서 슬라이드글라스에 붙이고 3.7%(v/v) 파라포름알데히드 용액으로 고정한 다음 DAPI 용액으로 마운팅하여 콘포칼 현미경으로 관찰하였다. 그 결과를 도 7에 나타내었다.
- <200>
- <201> 도 7에 나타낸 바와 같이, 실시예 10의 RGD-QD655를 정맥주사시,  $\alpha v \beta 3$  인티그린을 발현하는 U87MG 종양조직에 섭취되었지만, 발현하지 않는 A431 종양조직에는 섭취되지 않는 것으로 나타났으며, 실시예 8의 PEG-QD655는 어떠한 종양 조직에도 섭취되지 않았다.
- <202>
- <203> <실험예 8> 동위원소 표지 양자점 PET
- <204> 상기 실험예 2와 같이 Ga-68을 표지한  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-RGD-QD655(30-40 MBq in 0.1 ml normal saline)를 U87MG 암세포를 키운 마우스에 꼬리정맥을 통한 정맥주사를 하고 1 시간 후에 아이소플루란으로 마취한 다음 PET을 촬영하였다. 블로킹 연구를 위하여는 cRGDyK(1 mM)을 동시에 주사하였다. 그 결과를 도 8에 나타내었다.
- <205>
- <206> 도 8에 나타낸 바와 같이, 실시예 10의 RGD-QD655를 정맥주사시  $\alpha v \beta 3$  인티그린을 발현하는 U87MG 종양조직에 섭취되는 것을 확인하였고, 발현하지 않는 A431 종양조직에는 섭취되지 않았고, 정상조직 중에는 주로 간에 섭취되는 것이 나타났다(a). cRGDyK를 같이 주사한 경우에는 두 종양조직에 모두 섭취되지 않고 간에만 섭취하는 것으로 나타났다(b).
- <207>
- <208> <실험예 9> 뒷다리 허혈 모델 마우스의 RGD-QD655의 체내 결합 실험
- <209> 본 발명에 따른 실시예 10의 RGD-QD655 양자점의 허혈성 조직에서 발현되는

$\alpha v\beta 3$  결합 유무를 확인하기 위하여 하기 실험을 수행하였다.

<210>

<211>

10주 된 ICR 마우스의 왼쪽 대퇴동맥을 묶어서 뒷다리에 허혈 모델을 만들었다. 묶은지 1주일 후 실시예 10의 RGD-QD655(50 nM, 0.15 ml)을 꼬리 정맥으로 정맥주사 한 후, 허혈을 만든 대퇴부의 근육과 반대쪽 대퇴부의 근육을 잘라내어 마에스트로 이미징 시스템(Maestro Imaging System)으로 형광을 관찰하였다.

<212>

또한, 조직을 냉동절편(7  $\mu$ m)을 얻어 DAPI 염색을 하여 형광현미경으로 관찰하였고, 음성 컨트롤로는 실시예 8의 PEG-QD655를 사용하였다. 그 결과를 도 9에 나타내었다.

<213>

<214>

도 9에 나타낸 바와 같이, 실시예 10의 RGD-QD655를 정맥주사 후 근육을 잘라서 마에스트로 이미징 시스템으로 형광을 관찰한 결과, 허혈을 유발한 근육(a)이 정상근육(b)보다 높은 섭취를 보이는 것으로 나타났다. 이는 허혈을 유발한 조직에 신생혈관이 형성되면서  $\alpha v\beta 3$  인티그린이 발현됨을 보여준다.

<215>

또한, 도 10에 나타낸 바와 같이, 상기 허혈을 유발한 근육과 정상근육을 형광현미경으로 관찰한 결과, 허혈을 유발한 조직(a, b, c)이 허혈을 유발하지 않는 조직(d, e, f)보다 더 진한 형광으로 나타나는 것으로 관찰되었다.

<216>

이때, a 및 d는 형광과 DAPI 영상을 겹친 것이고, b 및 e는 형광영상, 그리고 c 및 f는 DAPI 영상을 나타낸다.

<217>

<218>

<실험예 10>  $^{68}\text{Ga-NOTA-Man-QD655}$ 와  $^{68}\text{Ga-NOTA-Lac-QD545}$ 를 투여한 정상 마우스의 PET 영상

<219>

간과 비장에는 만노스 수용체를 가진 쿠퍼 세포가 많이 존재하고, 간세포에는 갈락토즈 수용체가 많이 존재하여 만노스를 결합한 나노입자는 간과 비장에 많이 섭취되고 갈락토즈를 결합한 나노입자는 간에 많이 섭취되는 것이 보고되어 있으며, 또한 락토즈는 갈락토즈를 포함하고 있으므로 락토즈를 결합한 나노입자도 간에 많이 섭취되는 것이 보고되어 있어, 본 발명에 따른  $^{68}\text{Ga-NOTA-Man-QD655}$ 와  $^{68}\text{Ga-NOTA-Lac-QD545}$  양자점을 투여한 마우스의 PET 영상을 측정하기 위하여 하기 실험을 수행하였다.

<220>

상기 실시예 15 및 16에서 제조된 NOTA-Man-QD655와 NOTA-Lac-QD655를 실험예 2의 방법으로 Ga-68로 표지한 다음,  $^{68}\text{Ga-NOTA-Man-QD655}$ (10.36 MBq/0.15 ml)과

$^{68}\text{Ga}$ -NOTA-Lac-QD545(14.8 MBq/0.08 ml)를 정상 ICR 마우스의 꼬리 정맥으로 주사하고 30분 후에 PET-CT를 촬영하였다. 그 결과를 도 11에 나타내었다.

<221>

<222> 도 11에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-Man-QD655 및  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-Lac-QD545를 주사한 마우스의 PET과 CT 영상을 겹쳐서 확인한 결과,  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-Man-QD655는 간과 비장에 섭취되는 것을 확인되었고(a),  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-Lac-QD545는 주로 간에 섭취가 많이 되고, 비장에는 섭취가 낮은 것을 확인할 수 있었다.

<223>

<224> <실험예 11> NOTA-Man-QD655와 NOTA-Lac-QD545를 동시 투여한 정상 마우스의 간과 비장조직 형광 현미경 관찰

<225> 상기 실시예 13 및 14에서 제조된 Man-QD655(70 nM, 30  $\mu\text{l}$ )와 Lac-QD545(70 nM, 120  $\mu\text{l}$ )를 혼합하여, 6주 된 정상 ICR 마우스에 꼬리정맥으로 정맥주사하고 20분 후에 희생시켜, 간과 비장을 적출하여 OCT 컴파운드에 넣어서 -20  $^{\circ}\text{C}$ 에서 냉동한 다음 7  $\mu\text{m}$  두께의 냉동 절편을 만들고 DAPI 용액으로 염색하여 형광현미경으로 관찰하였다. 그 결과를 도 12에 나타내었다.

<226>

<227> 도 12에 나타낸 바와 같이, 푸른색 DAPI는 간 세포핵의 분포를 나타내고, 초록색 Lac-QD545는 간의 대부분을 차지하는 간세포에 의하여 섭취되었지만, 비장에는 섭취되지 않는 것으로 나타났다. 또한, 붉은색 Man-QD655는 간세포에 비하여 훨씬 적은 쿠퍼세포에 의하여 섭취가 되었음을 보여준다.

<228>

<229> 따라서 본 발명에 따른 나노입자는 형광탐지, MRI, 라만 분광, 광학탐지, PET, SPECT 또는 감마영상 장치에 적용될 수 있고, 상기 영상화제의 리간드를 변화시켜 신생혈관탐지, 암세포 탐지, 면역세포 탐지, 간세포 탐지, 세포사멸 탐지, 유전자 탐지에 유용하게 사용될 수 있다.

## 【청구의 범위】

## 【청구항 1】

하기 화학식 1로 표시되는 알칸 또는 알켄사슬이 도입된 리간드(R-A-L)의 알킬부분(R)이 소수성 나노입자 표면에 비공유결합을 통해 코팅된 나노입자:

[화학식 1]



화학식 1에서,

상기 L은 아미노산, 펩타이드, 단백질, 핵산, 비타민, 호르몬, 신경전달물질, 당, 킬레이트화제 및 형광염료로 이루어진 군으로부터 선택되는 리간드이고;

상기 A는  $-CH_2-$ ,  $-CH=$ ,  $-C\equiv$ ,  $-N-$ ,  $-NH-$ ,  $-N=$ ,  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-CS-$ ,  $-CO-$ ,  $-PO_4H-$ ,  $-PO_3H-$ ,  $-PO_2H-$  및 -벤젠-의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 링커이고; 및

상기 R은  $C_{10}$ ~ $C_{30}$ 의 알칸 또는 알켄이고;

이때, R이 알켄인 경우, 사슬 중에 이중결합을 5개 이하로 포함할 수 있다.

## 【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 L은 RGD, 콜레시스토키닌, 뉴로텐신, EGF, VEGF, MMP(메트릭스 메탈로프로테이네이즈; matrix metalloproteinase), 옥트레오타이드, 붐베신, TN14003, VIP(혈관활성 장내 펩타이드; vasoactive intestinal peptide), MSH(멜라닌세포자극호르몬; melanocyte stimulating hormone), 서브스턴스 P(통증 유발물질; Substance P), 라이신 글루타메이트 유레아, 시스테인 글루타메이트 유레아, 항체, 항체의 분절, 앵타머, 엽산, 비오틴, NOTA, DOTA-SCN, NO2A, DO2A, DO3A, DTPA, HYNIC, 이미노디아아세테이트 유도체 또는 이들의 Ga-68, Ga-67, In-111, Y-90, Lu-177, Tc-99m, Cu-64, I-123, I-124, I-131, Zr-89, Sc-44, Gd 표지 화합물, 갈락토즈, 락토즈, 만노즈, 로다민, 인도시아닌그린, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, Cy7.5, 알렉사 플로어(Alexa Fluor), 오레곤 그린(Oregon Green), 퍼시픽 블루 염색제(Pacific Blue dye), IRDye로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 나노입자.

## 【청구항 3】

제1항에 있어서, 상기 소수성 나노입자는 주기율표상의 II족 원소인 아연,

카드뮴 및 납 중의 1 원소와 주기율표상의 VI족 원소인 황, 셀레늄 및 텔루륨 중의 1 원소로 구성되는 반도체 나노입자, 금속 나노입자 및 금속화합물 나노입자, 실리콘 또는 실리콘 화합물 나노입자, 인조유기폴리머 나노입자, 텐드리머 나노입자, 폴리라이신 나노입자, 키토산 나노입자, 당 나노입자 또는 이들의 조합으로 만들어진 나노입자로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 나노입자.

#### 【청구항 4】

제1항에 있어서, 상기 나노입자는 PEG 유도체 및 하나의 긴 알칸 또는 알켄 사슬을 포함한 디터전트의 알칸 또는 알켄 부분이 소수성 나노입자 표면에 비공유 결합을 통해 더 코팅되는 것을 특징으로 하는 나노입자.

#### 【청구항 5】

유기용매에 녹아 있는 소수성 나노입자를 유기용매를 제거하거나 있는 그대로 하기 화학식 1로 표시되는 화합물과 PEG 유도체 및 하나의 긴 알칸 또는 알켄 사슬을 포함한 디터전트를 포함한 수용액과 혼합하고, 교반, 가열 및 초음파 조사의 용해 수단을 선택적으로 또는 복합적으로 적용하여 분산시키는 단계를 포함하는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물의 알킬부분(R)이 비공유 결합을 통해 표면에 코팅된 나노입자의 제조방법:

[화학식 1]



(상기 화학식 1의 R, A 및 L은 제1항에 정의한 바와 같다).

#### 【청구항 6】

제5항에 있어서, 상기 소수성 나노입자는 주기율표상의 II족 원소인 아연, 카드뮴 및 납 중의 1 원소와 주기율표상의 VI족 원소인 황, 셀레늄 및 텔루륨 중의 1 원소로 구성되는 반도체 나노입자, 금속 나노입자 및 금속화합물 나노입자, 실리콘 또는 실리콘 화합물 나노입자, 인조유기폴리머 나노입자, 텐드리머 나노입자, 폴리라이신 나노입자, 키토산 나노입자, 당 나노입자 또는 이들의 조합으로 만들어진 나노입자로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

#### 【청구항 7】

제1항의 나노입자를 이용한 영상화제.

**【청구항 8】**

제7항에 있어서, 상기 영상화제는 형광탐지, MRI, 라만 분광, 광학탐지, PET, SPECT, 감마영상 장치에 적용되는 것을 특징으로 하는 나노입자를 이용한 영상화제.

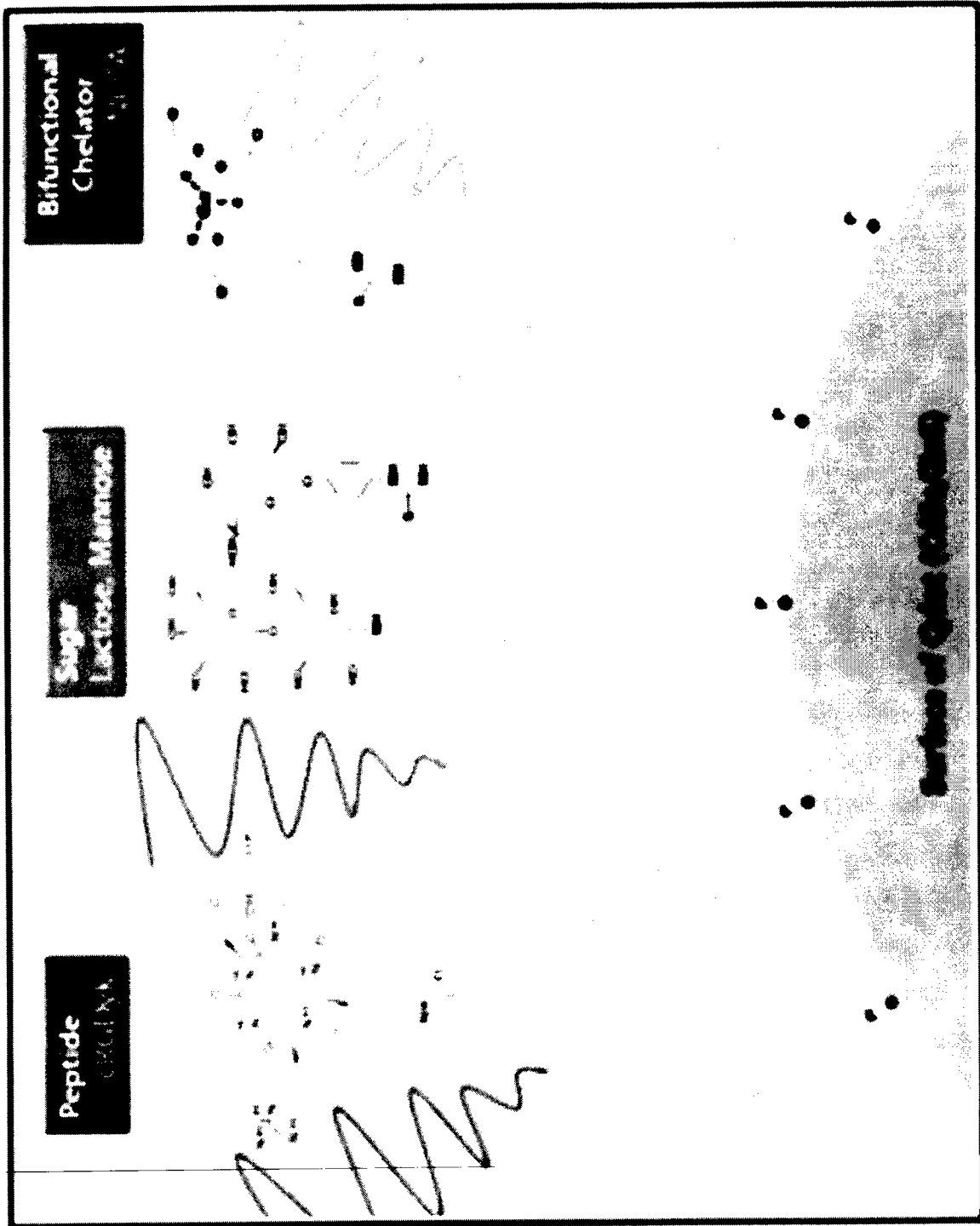
**【청구항 9】**

제7항에 있어서, 상기 영상화제는 리간드를 변화시켜 신생혈관탐지, 암세포 탐지, 면역세포 탐지, 간세포 탐지, 세포사멸 탐지, 유전자 탐지에 적용되는 것을 특징으로 하는 나노입자를 이용한 영상화제.

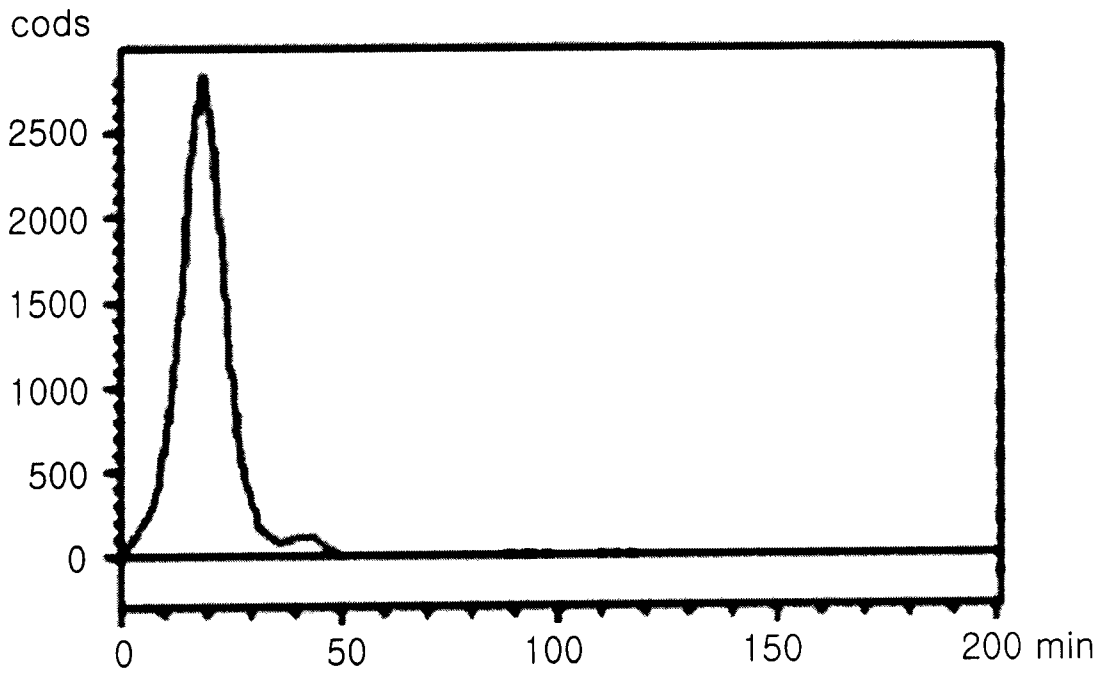
**【청구항 10】**

알파선이나 베타선을 방출하거나, 외부에서 가하는 초음파나 전자기파 또는 입자성 방사선을 흡수하여 열 또는 2차 방사선을 방출하여 악성세포를 사멸하는 것을 특징으로 하는 제1항의 나노입자를 이용한 치료제.

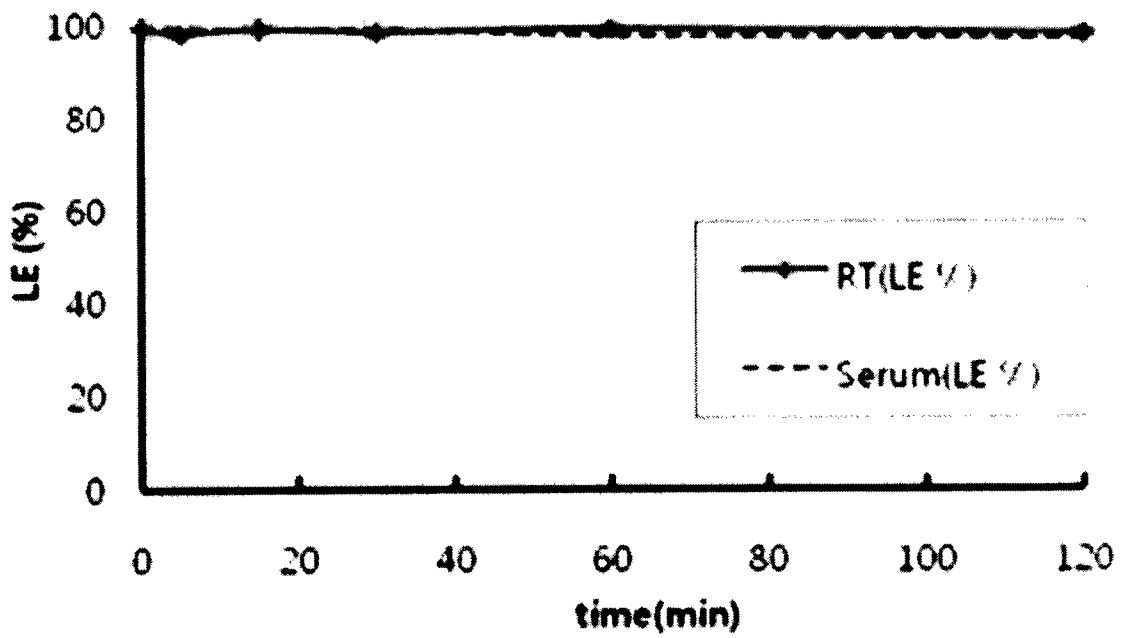
【도 1】



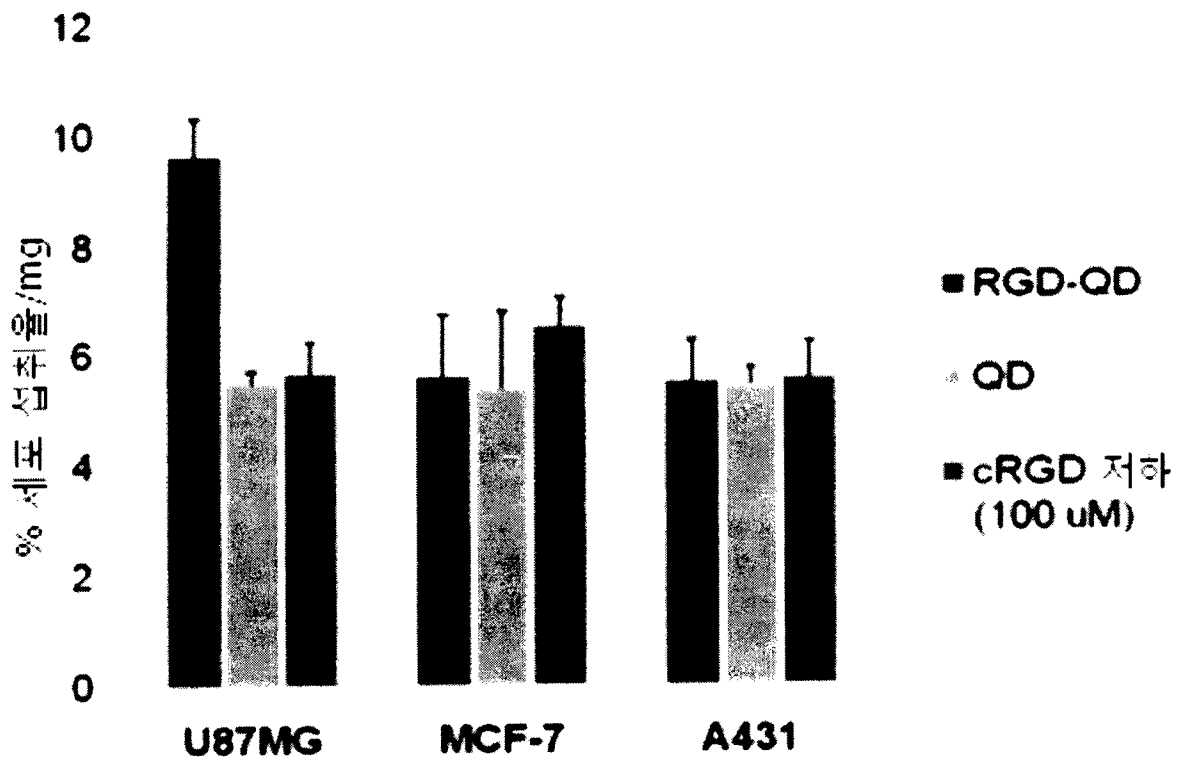
【도 2】



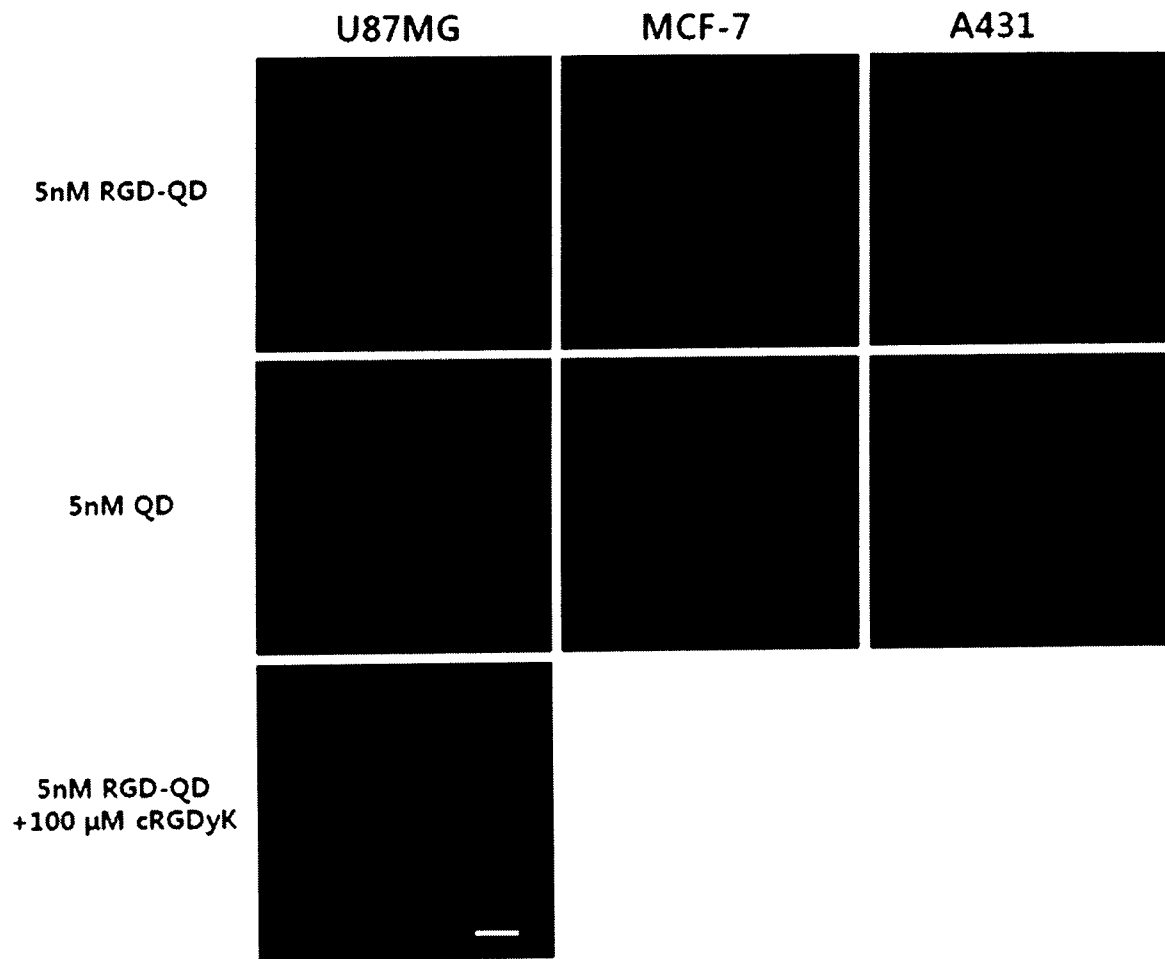
【도 3】



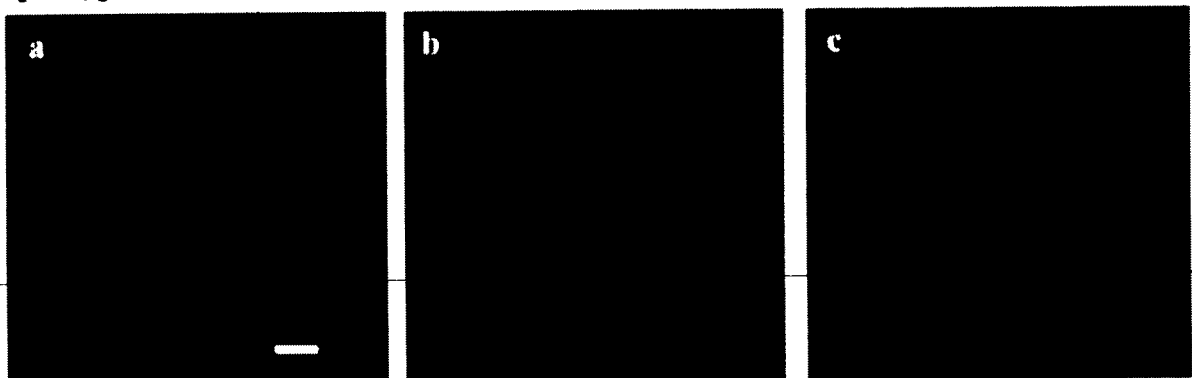
【도 4】



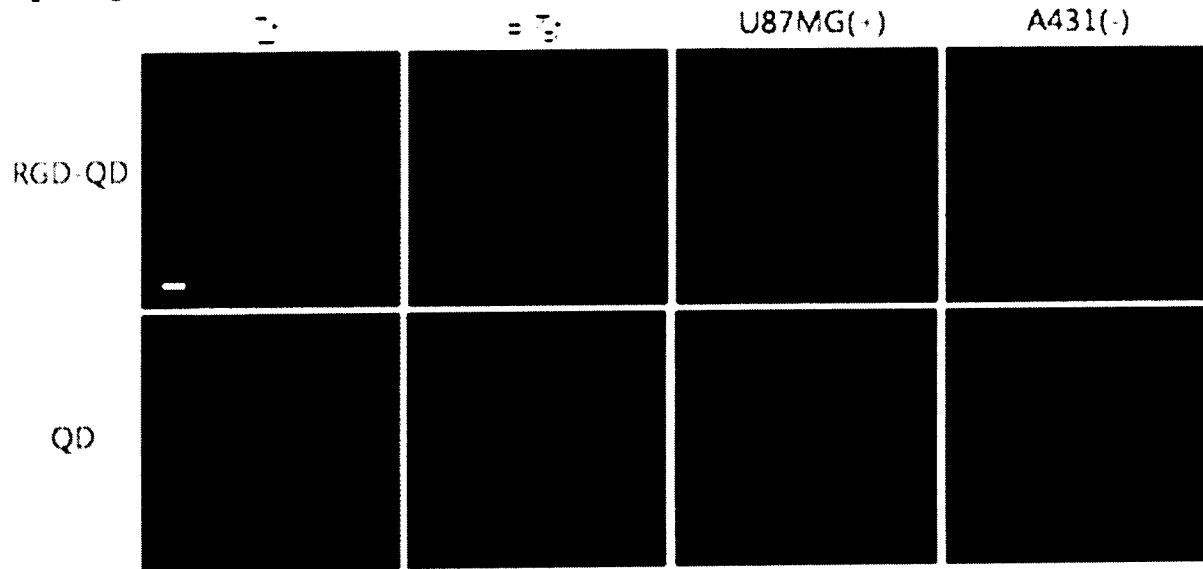
【도 5】



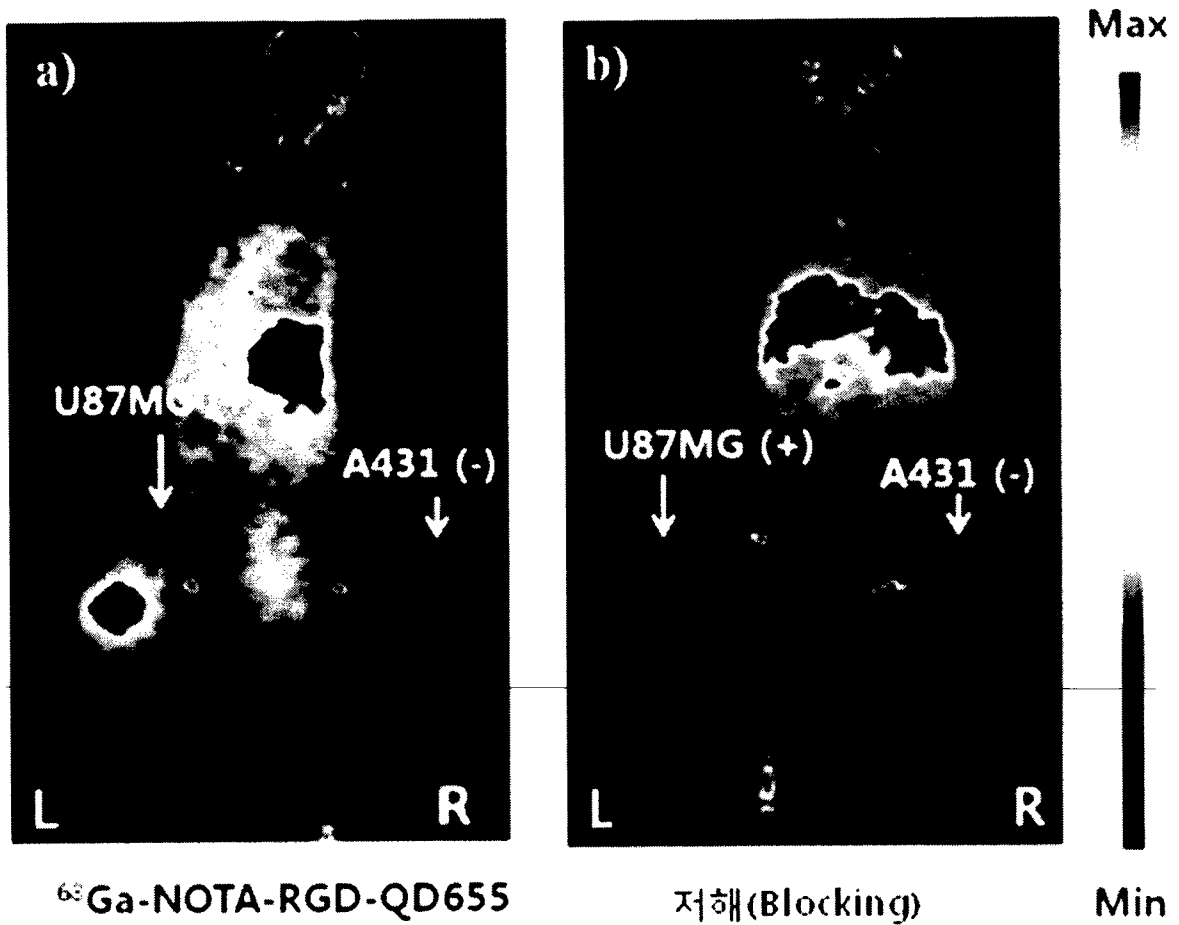
【도 6】



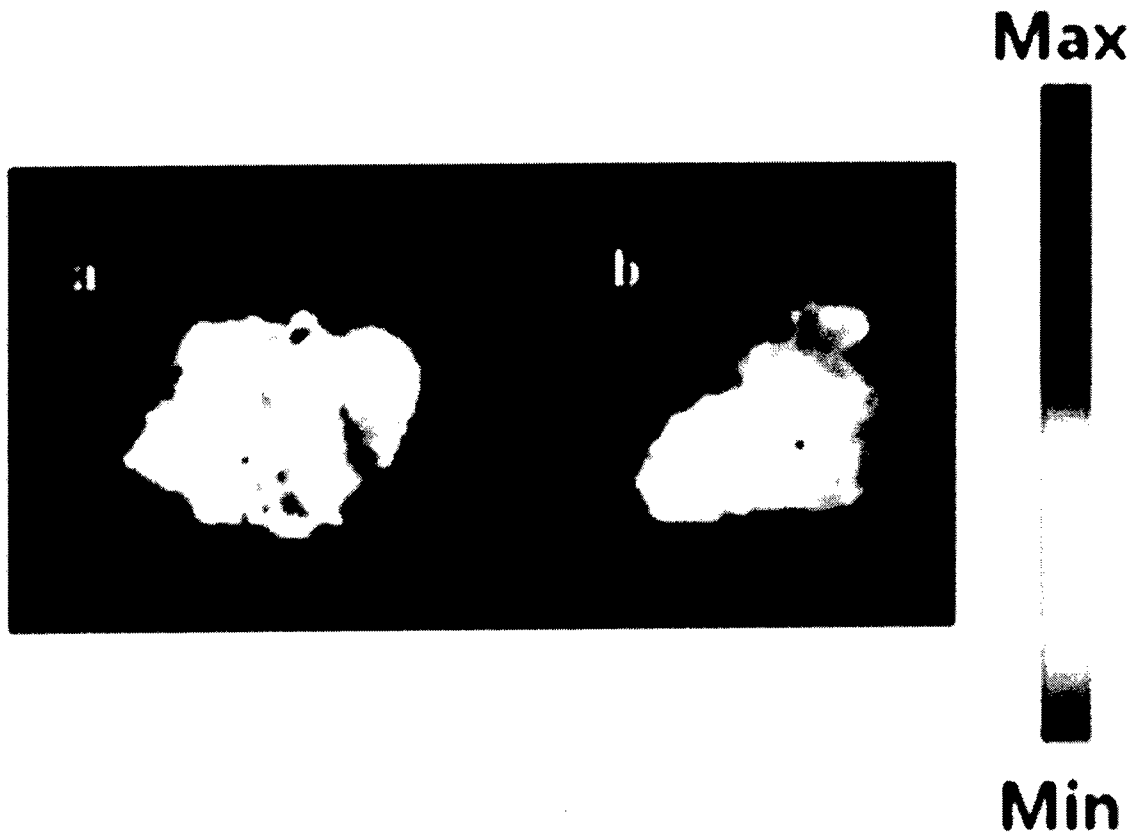
【도 7】



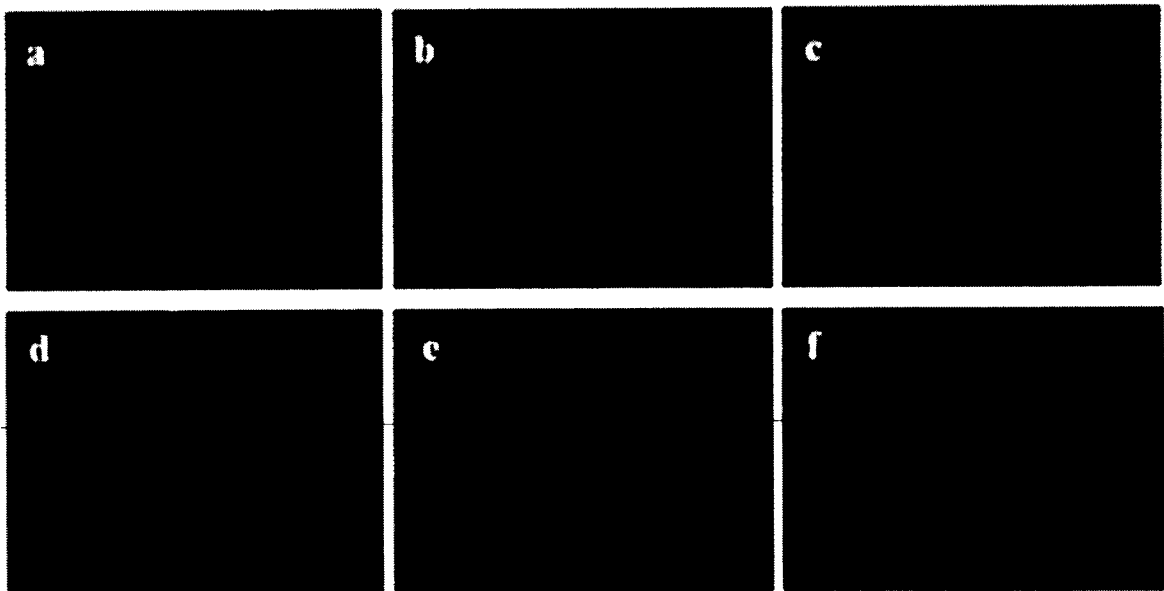
【도 8】



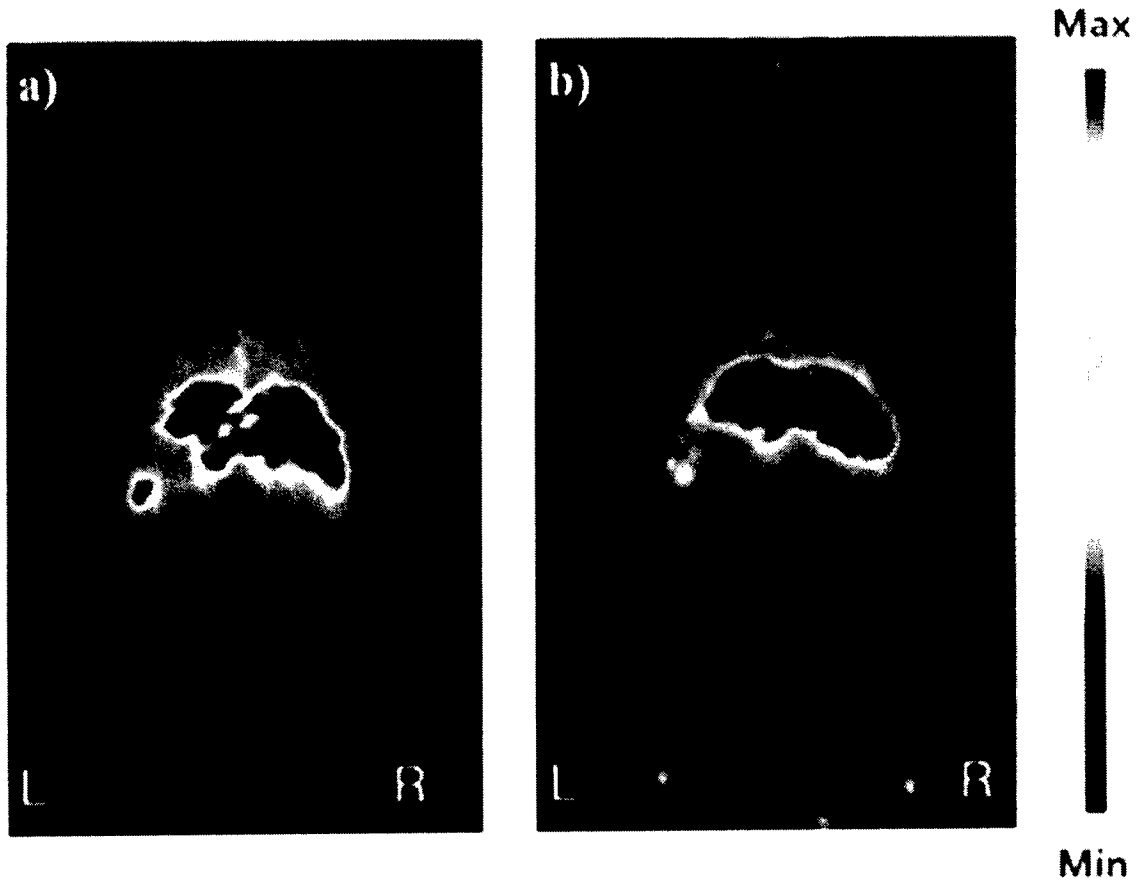
【도 9】



【도 10】



【도 11】



【도 12】

