



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0097413
(43) 공개일자 2011년08월31일

(51) Int. Cl.

B82B 1/00 (2006.01) B82B 3/00 (2006.01)

A61K 49/06 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0017245

(22) 출원일자 2010년02월25일

심사청구일자 2010년02월25일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제 캠퍼스내

성균관대학교산학협력단

경기 수원시 장안구 천천동 300 성균관대학교내

(72) 발명자

이인수

경기도 수원시 영통구 영통2동 988-2 동아아파트 717동 802호

변승호

경기도 성남시 분당구 수내동 파크타운 롯데APT 128동 303호

이정희

서울특별시 송파구 문정동 문정래미안아파트 120동 701호

(74) 대리인

유수미

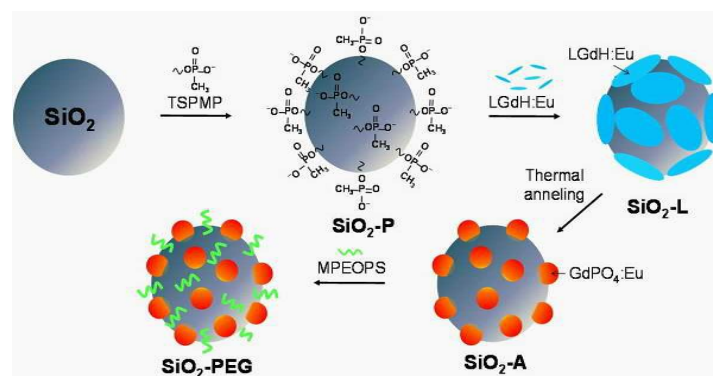
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 실리카 나노구, 그의 제조방법 및 그를 포함하는 MRI 조영제

(57) 요약

본 발명은 광학 활성 이온이 도핑된 $GdPO_4$ 의 나노입자가 엠보싱(embossing)되고 폴리(에틸렌글리콜){poly(ethylene glycol): PEG}기로 변형된 실리카 나노구, 그의 제조방법 및 그를 포함하는 MRI 조영제에 관한 것이다. 본 발명에 따른 실리카 나노구는 형광성 및 자기 이완 성질을 가지며 용이하게 수성 콜로이드 현탁액을 형성할 수 있어 세포 표지화에서 형광 및 MR 이미징을 위한 다기능(multimodal) 조영제로서 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

광학 활성 이온이 도핑된 GdPO_4 의 나노입자가 엠보싱(embossing)되고 폴리(에틸렌글리콜){poly(ethylene glycol): PEG}기로 변형된 실리카 나노구.

청구항 2

제1항에 있어서, 광학 활성 이온이 Eu^{3+} , Tb^{3+} , Pr^{3+} , Nd^{3+} , Pm^{3+} , Sm^{3+} , Dy^{3+} , Ho^{3+} , Er^{3+} , Yb^{3+} 또는 Lu^{3+} 인 것을 특징으로 하는 실리카 나노구.

청구항 3

제1항에 있어서, 실리카 나노구의 평균 크기가 100 내지 700 nm이고, 광학 활성 이온이 도핑된 GdPO_4 의 나노입자의 평균 크기가 10 내지 70 nm인 것을 특징으로 하는 실리카 나노구.

청구항 4

제1항에 있어서, 광학 활성 이온이 도핑된 GdPO_4 의 나노입자가 실리카 나노구의 표면에 부착되어 엠보싱 형태를 이루고, PEG기가 실리카 나노구의 표면에 결합된 것을 특징으로 하는 실리카 나노구.

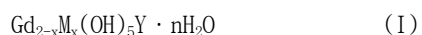
청구항 5

광학 활성 이온이 도핑된 GdPO_4 의 나노입자가 엠보싱(embossing)되고 폴리(에틸렌글리콜){poly(ethylene glycol): PEG}기로 변형된 실리카 나노구의 제조방법으로서,

(i) 하기 화학식 (I)의 광학 활성 이온이 도핑된 층상 가돌리늄 히드록사이드(layered gadolinium hydroxide: LGdH)의 박리된(delaminated) 층들을 메틸포스포네이트기로 변형된 실리카 나노구의 표면에 어셈블링(assembling)하여 광학 활성 이온이 도핑된 LGdH의 나노시트로 코팅된 실리카 나노구를 수득하는 단계;

(ii) 상기 광학 활성 이온이 도핑된 LGdH의 나노시트로 코팅된 실리카 나노구를 어닐링시켜 광학 활성 이온이 도핑된 GdPO_4 의 나노입자가 엠보싱된 실리카 나노구로 변환시키는 단계; 및

(iii) 상기 광학 활성 이온이 도핑된 GdPO_4 의 나노입자가 엠보싱된 실리카 나노구를 PEG기로 변형시키는 단계를 포함하는 제조방법:



상기 식에서,

M은 광학 활성 이온이고,

x는 0.01 내지 0.4이며,

Y는 F^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- 또는 SO_4^{2-} 이고,

n은 0.5 내지 4이다.

청구항 6

제5항에 있어서,

M이 Eu^{3+} , Tb^{3+} , Pr^{3+} , Nd^{3+} , Pm^{3+} , Sm^{3+} , Dy^{3+} , Ho^{3+} , Er^{3+} , Yb^{3+} 또는 Lu^{3+} 이고,

Y는 Cl^- 이며,

n은 1 내지 3인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 단계 (i)에서 화학식 (I)의 광학 활성 이온이 도핑된 LGdH 및 메틸포스포네이트기로 변형된 실리카 나노구를 용매에 현탁시키고, 현탁액을 초음파처리하여 광학 활성 이온이 도핑된 LGdH의 나노시트로 코팅된 실리카 나노구를 수득하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 용매가 포르마마이드, 에탄올, 메탄올, 프로판올 또는 물인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 9

제5항에 있어서, 단계 (ii)에서 어닐링이 600 내지 800 °C에서 수행되는 것 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 10

제5항에 있어서, 단계 (iii)에서 광학 활성 이온이 도핑된 $GdPO_4$ 의 나노입자가 엠보싱된 실리카 나노구를 2-[메톡시(폴리에틸렌옥시)프로필]트리메톡시실란 (2-[methoxy(polyethylenoxy)propyl]trimethoxysilane: MPEOPS)로 처리하여 PEG기로 변형시키는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 11

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 실리카 나노구를 약학적으로 허용되는 담체와 함께 포함하는 MRI 조영제.

청구항 12

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 실리카 나노구를 약학적으로 허용되는 담체와 함께 포함하는 세포 표지화에서 광학 및 MR 이미지를 위한 다기능(multimodal) 조영제.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 실리카 나노구, 그의 제조방법 및 그를 포함하는 MRI 조영제에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 수성 콜로이드 현탁액으로 안정하게 분산될 수 있고, MRI 조영능이 우수할 뿐만 아니라 형광성을 가지는 실리카 나노구, 그의 제조방법 및 그를 포함하는 MRI 조영제에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 층상 히드록사이드(layered hydroxide)는 촉매, 흡착제, 나노복합체(nanocomposite) 및 약물전달체와 같은 다양한 분야에서의 이용가능성으로 인해 상당한 주목을 받아 왔다. 최근에는, $RE_2(OH)_5X \cdot nH_2O$ (RE = 희토류, X = 음이온)의 일반식으로 나타내는 일련의 층상 희토류 히드록사이드(layered rare-earth hydroxide: LRH)가 합성되어 희토류 이온의 유용한 성질과 층상 이중 히드록사이드(layered double hydroxide: LDH)의 호스트-게스트(host-guest) 화학을 결합한 독특한 능력으로 인해 광범위한 관심을 끌었다. 본 발명자들에 의해 출원되어 현재 계류중인 대한민국 특허출원 제2008-0111561호에는 층상 가돌리늄 히드록사이드를 넓은 물 접근성(water-accessible) 표면적과 층들 사이에 기능성 분자를 함유하는 능력을 이용하여 자기 공명 이미징(magnetic resonance imaging: MRI) 조영제(contrast agent)로서 사용할 수 있음이 개시되어 있다.

[0003] 그러나, 독성의 염려가 있는 Gd^{3+} 이온의 농도를 더 낮출 수 있으면서 형광성을 가지는 물질의 개발이 절실히 요구되어 왔다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명자들은 실리카 나노구의 표면을 층상 가돌리늄 히드록사이드로 박막 코팅하고 어닐링시켜 고농도의 상자성 이온을 MR 표면에 집중시킴으로써 보다 개선된 MRI 조영제를 제조할 수 있음을 알아내고 본 발명을 완성하게 되었다.

[0005] 따라서 본 발명의 목적은 수성 콜로이드 현탁액으로 안정하게 분산될 수 있고, MRI 조영능이 현저히 우수할 뿐만 아니라 형광성을 가지는 실리카 나노구를 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 상기 실리카 나노구의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 실리카 나노구를 포함하는 MRI 조영제를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 광학 활성 이온이 도핑된 $GdPO_4$ 의 나노입자가 엠보싱(embossing)되고 폴리(에틸렌글리콜){poly(ethylene glycol): PEG}기로 변형된 실리카 나노구에 관한 것이다.

[0009] 상기 광학 활성 이온은 광형광성을 나타낼 수 있는 이온을 의미하며, Eu^{3+} , Tb^{3+} , Pr^{3+} , Nd^{3+} , Pm^{3+} , Sm^{3+} , Dy^{3+} , Ho^{3+} , Er^{3+} , Yb^{3+} , Lu^{3+} 등을 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0010] 본 발명의 실리카 나노구의 평균 크기는 100 내지 700 nm가 바람직하며, 광학 활성 이온이 도핑된 $GdPO_4$ 의 나노입자의 평균 크기는 10 내지 70 nm가 바람직하다.

[0011] 본 발명의 실리카 나노구는 광학 활성 이온이 도핑된 $GdPO_4$ 의 나노입자가 실리카 나노구의 표면에 부착되어 엠보싱 형태를 이루고, PEG기가 역시 실리카 나노구의 표면에 결합되어 있다.

[0012] 이에 따라, 본 발명의 실리카 나노구는 형광성 및 상자성의 안정한 콜로이드 현탁액을 형성할 수 있어 광학 및 MR 이미징을 결합한 다기능(multimodal) 프로브로서 사용될 수 있다.

[0013] 다른 한편으로, 본 발명은 광학 활성 이온이 도핑된 $GdPO_4$ 의 나노입자가 엠보싱(embossing)되고 폴리(에틸렌글리콜){poly(ethylene glycol): PEG}기로 변형된 실리카 나노구의 제조방법에 관한 것으로서, 본 발명의 제조방법은

[0014] (i) 하기 화학식 (I)의 광학 활성 이온이 도핑된 층상 가돌리늄 히드록사이드(layered gadolinium hydroxide: LGdH)의 박리된(delaminated) 층들을 메틸포스포네이트기로 변형된 실리카 나노구의 표면에 어셈블링(assembling)하여 광학 활성 이온이 도핑된 LGdH의 나노시트로 코팅된 실리카 나노구를 수득하는 단계;

[0015] (ii) 상기 광학 활성 이온이 도핑된 LGdH의 나노시트로 코팅된 실리카 나노구를 어닐링시켜 광학 활성 이온이 도핑된 $GdPO_4$ 의 나노입자가 엠보싱된 실리카 나노구로 변환시키는 단계; 및

[0016] (iii) 상기 광학 활성 이온이 도핑된 $GdPO_4$ 의 나노입자가 엠보싱된 실리카 나노구를 PEG기로 변형시키는 단계를 포함한다.

[0017] $Gd_{2-x}M_x(OH)_5Y \cdot nH_2O$ (I)

[0018] 상기 식에서,

[0019] M은 광학 활성 이온, 바람직하게는 Eu^{3+} , Tb^{3+} , Pr^{3+} , Nd^{3+} , Pm^{3+} , Sm^{3+} , Dy^{3+} , Ho^{3+} , Er^{3+} , Yb^{3+} 또는 Lu^{3+} 이고,

[0020] x는 0.01 내지 0.4이며,

[0021] Y는 F^- , Cl^- , Br^- , NO_3^- 또는 SO_4^{2-} , 바람직하게는 Cl^- 이고,

[0022] n은 0.5 내지 4, 바람직하게는 1 내지 3이다.

[0023] 상기 화학식 (I)의 광학 활성 이온이 도핑된 LGdH는 참고문헌[Y.-s. Yoon, B.-I. Lee, K. S. Lee, G. H. Im,

S.-H. Byeon, J. H. Lee and I. S. Lee, *Adv. Func. Mater.* 2009, **19**, 3375]에 개시된 방법에 따라 용이하게 제조할 수 있다.

- [0024] 또한, 메틸포스포네이트기로 변형된 실리카 나노구는 참고문헌[R. P. Bagwe, L. R. Hilliard and W. Tan, *Langmuir* 2006, 22, 4357]에 개시된 방법을 이용하여 용이하게 제조할 수 있다. 실리카 나노구의 평균 크기는 100 내지 700 nm가 바람직하며, 약 500 nm가 보다 바람직하다.
- [0025] 상기 단계 (i)은 광학 활성 이온이 도핑된 LGdH 및 메틸포스포네이트기로 변형된 실리카 나노구를 용매, 바람직하게는 포르마마이드, 에탄올, 메탄올, 프로판올 또는 물에 현탁시키고, 현탁액을 초음파처리하여 수행하는 것이 바람직하다. 이 때 광학 활성 이온이 도핑된 LGdH의 나노시트가 정전기적 상호작용에 의해 메틸포스포네이트기로 변형된 실리카 나노구에 균일하게 부착되어 광학 활성 이온이 도핑된 LGdH의 나노시트로 코팅된 실리카 나노구가 생성되는 것으로 생각된다.
- [0026] 상기 단계 (ii)에서 어닐링은 고온, 바람직하게는 600 내지 800 °C에서 수행하는 것이 바람직하다. 어닐링 온도가 600 °C 보다 낮을 경우에는 LGdH의 나노시트가 $GdPO_4$ 의 나노입자로 변환되지 않는다. 어닐링 온도가 증가할수록 더 큰 나노입자가 더 적은 수로 형성되며, 이는 입자가 응집 및 성장을 하기 때문인 것으로 생각된다. 고온 어닐링시 LGdH의 나노시트가 실리카 표면에 고정된 메틸포스포네이트기와 반응하여 $GdPO_4$ 의 나노입자가 형성되는 것으로 생각된다.
- [0027] 고온 어닐링에 의해 광학 활성 이온이 도핑된 LGdH의 나노시트를 광학 활성 이온이 도핑된 $GdPO_4$ 의 나노입자로 변환시키면 광루미네선스성(photoluminescence property)이 현저히 증가되는데, 이는 광학 활성 이온이 도핑된 LGdH의 루미네선스에 강하게 영향을 주는 히드록실기가 감소하기 때문인 것으로 생각된다.
- [0028] 상기 단계 (iii)에서는 물 및 생체 적합성을 갖는 실리카 나노구를 제조하기 위해, 상기 광학 활성 이온이 도핑된 $GdPO_4$ 의 나노입자가 엠보싱된 실리카 나노구를 바람직하게는 2-[메톡시(폴리에틸렌옥시)프로필]트리메톡시실란 (2-[methoxy(polyethylenoxy)propyl]trimethoxysilane: MPEOPS)로 처리하여 폴리(에틸렌글리콜)기로 변형시킨다. 이에 의해, 실리카 나노구가 비독성, 비면역원성, 비항원성 및 단백질 내성 PEG 사슬로 코팅되며, PEG기로 변형된 실리카 나노구는 물에 용이하게 분산되어 콜로이드 현탁액을 형성한다.
- [0029] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 광학 활성 이온이 도핑된 $GdPO_4$ 의 나노입자가 엠보싱되고 PEG기로 변형된 실리카 나노구의 제조방법을 개략적으로 나타낸 공정도로서, 실리카 나노구를 나트륨 3-(트리히드록실실릴)프로필메틸포스포네이트 (sodium 3-(trihydroxysilyl)propylmethylphosphonate: TSPMP)로 처리하여 메틸포스포네이트기로 변형된 실리카 나노구(SiO_2 -P)를 수득하고, 상기 실리카 나노구(SiO_2 -P)의 표면에 Eu 이온이 도핑된 LGdH(LGdH:Eu)를 어셈블링하여 Eu 이온이 도핑된 LGdH의 나노시트로 코팅된 실리카 나노구(SiO_2 -L)를 수득한 다음, 상기 실리카 나노구(SiO_2 -L)를 어닐링시켜 Eu 이온이 도핑된 $GdPO_4$ ($GdPO_4$:Eu)의 나노입자가 엠보싱된 실리카 나노구(SiO_2 -A)로 변환시키고, 상기 실리카 나노구(SiO_2 -A)를 MPEOPS로 처리하여 PEG기로 변형시켜 본 발명에 따른 Eu 이온이 도핑된 $GdPO_4$ 의 나노입자가 엠보싱되고 PEG기로 변형된 실리카 나노구(SiO_2 -PEG)를 제조하는 공정을 나타낸 도이다.
- [0030] 다른 한편으로, 본 발명은 광학 활성 이온이 도핑된 $GdPO_4$ 의 나노입자가 엠보싱(embossing)되고 폴리(에틸렌글리콜){poly(ethylene glycol): PEG}기로 변형된 실리카 나노구를 약학적으로 허용되는 담체와 함께 포함하는 MRI 조영제, 특히 세포 표지화에서 광학 및 MR 이미지를 위한 다기능(multimodal) 조영제에 관한 것이다.
- [0031] 본 발명의 MRI 조영제는 MR 말초 혈관조영법, 신장 혈관조영법, 관상 대동맥 혈관조영법, 뇌 혈관조영법, 폐 혈관조영법 등에 사용될 수 있으며, 경구 또는 비경구 투여 형태로 제형화될 수 있다. 예를 들어, 비경구 제형은 바람직하게는 본 발명의 화합물을 포함하는 멸균 수용액 또는 현탁액을 포함하며, 약학적 수용액 또는 현탁액의 다양한 제조기술이 당업계에 공지되어 있다. 상기 용액은 또한 약학적으로 허용되는 완충제, 가용화제, 계면활성제, 점도조절제, 안정제, 항산화제, 전해질 등을 포함할 수 있다.
- [0032] 경구 투여용 제형은 매우 다양할 수 있으며, 이는 당업계에 공지되어 있다. 일반적으로 그러한 제형은 진단적

유효량의 본 발명에 따른 화합물을 포함하는 수용액 또는 현탁액을 포함한다. 그러한 경구 제형은 선택적으로 완충제, 계면활성제, 보조제(adjutant) 등을 포함할 수 있다. 또한 경구 투여용 제형은 향미료 및 기타 관능성을 증가시키기 위한 성분을 포함할 수 있다.

[0033] 본 발명에 따른 MRI 조영제는 MR 영상의 목적하는 증강을 달성하는데 유효한 양으로 투여된다. 그러한 투여량은 화상 형성 방식, 측정 방식, 측정 부위 등에 따라 광범위하게 변할 수 있다.

발명의 효과

[0034] 본 발명에 따른 광학 활성 이온이 도핑된 $GdPO_4$ 의 나노입자가 엠보싱되고 폴리(에틸렌글리콜)기로 변형된 실리카 나노구는 형광성 및 자기 이완 성질을 가지며 용이하게 수성 콜로이드 현탁액을 형성할 수 있어 세포 표지화에서 형광 및 MR 이미징을 위한 다기능(multimodal) 조영제로서 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 광학 활성 이온이 도핑된 $GdPO_4$ 의 나노입자가 엠보싱되고 PEG기로 변형된 실리카 나노구의 제조방법을 개략적으로 나타낸 공정도이다.

도 2는 메틸포스포네이트기로 변형된 실리카 나노구(SiO_2 -P), Eu 이온이 도핑된 LGdH의 나노시트로 코팅된 실리카 나노구(SiO_2 -L), Eu 이온이 도핑된 $GdPO_4$ 의 나노입자가 엠보싱된 실리카 나노구(SiO_2 -A) 및 Eu 이온이 도핑된 $GdPO_4$ 의 나노입자가 엠보싱되고 PEG기로 변형된 실리카 나노구(SiO_2 -PEG)의 TEM 이미지(위) 및 SEM 이미지(아래)이다.

도 3은 실리카 나노구(SiO_2 -L) 및 실리카 나노구(SiO_2 -A) 분말을 자연광(위) 및 254 nm 여기광(아래)으로 촬영한 사진이다.

도 4는 실리카 나노구(SiO_2 -L) 및 실리카 나노구(SiO_2 -A) 분말을 275 nm에서 UV 조사하여 얻은 형광 스펙트럼이다.

도 5는 실리카 나노구(SiO_2 -PEG)를 다양한 농도로 함유하는 수성 현탁액을 자연광(위) 및 254 nm 여기광(아래)으로 촬영한 사진이다.

도 6은 실리카 나노구(SiO_2 -PEG)를 다양한 농도로 함유하는 수성 현탁액을 265 nm에서 UV 조사하여 얻은 형광 스펙트럼이다.

도 7은 다양한 Gd 농도의 실리카 나노구(SiO_2 -PEG)의 수성 현탁액으로부터 얻은 T_1 - 및 T_2 -가중된 MRI이다.

도 8은 실리카 나노구(SiO_2 -PEG)의 Gd 농도에 대한 T_1^{-1} 및 T_2^{-1} 을 나타낸 그래프이다.

도 9는 $GdPO_4$:Eu로부터 적색 형광의 CLSM 이미지 (중간), 4',6-디아미디노-2-페닐인돌(4',6-diamidino-2-phenylindole: DAPI)로 염색된 세포핵의 CLSM 이미지 (좌) 및 실리카 나노구(SiO_2 -PEG)와 배양 전 (위) 및 후 (아래)의 MDA-MB-435s 세포에 대한 적색 형광과 청색 형광 이미지의 중첩 이미지(우)이다.

도 10은 실리카 나노구(SiO_2 -PEG)와 다양한 농도로 배양한 MDA-MB-435s 세포의 T_1^{-1} 및 T_2^{-1} 가중된 MRI이다.

도 11은 MCF-7 세포에 대한 실리카 나노구(SiO_2 -PEG)의 세포독성을 Gd 농도의 함수로서 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 이하, 실시예에 의해 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오직 본 발명을 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업자에게 있어서 자명하다.

[0037] **제조예 1: Eu 이온이 도핑된 LGdH(LGdH:Eu)의 제조**

- [0038] 수산화칼륨(KOH) 용액 (0.1 M, 100 ml)를 $GdCl_3 \cdot 6H_2O$ (1.67g, 6.34 mmol) 및 $EuCl_3 \cdot 6H_2O$ (0.182g, 0.634mmol)를 함유한 수용액 (100 ml)에 서서히 가하고 60 °C에서 15 분 동안 반응시켰다. 반응 현탁액을 냉각시킨 후, 생성된 LGdH:Eu를 원심분리하고 물로 3회 세척하였다.
- [0039]
- [0040] **제조예 2: 메틸포스포네이트기로 변형된 실리카 나노구(SiO_2 -P)의 제조**
- [0041] 테트라에틸오르토실리케이트(tetraethylorthosilicate: TEOS) (6.32 ml, 28.5mmol)를 NH_4OH 의 물/EtOH 혼합용액 (63.5 ml)에 가하고 상온에서 30 분 동안 교반하였다. 그런 다음 나트륨 3-(트리히드록실실릴)프로필메틸포스포네이트 (sodium 3-(trihydroxysilyl)propylmethylphosphonate: TSPMP) (2ml, 10.5 mmol) 수용액을 반응용액에 주입하고 2 시간 동안 교반하였다. 생성된 표면에 메틸포스포네이트기를 가지는 실리카 나노구(SiO_2 -P)를 원심분리에 의해 수집하였다. 수집된 실리카 나노구(SiO_2 -P)를 EtOH에 재분산시키고 원심분리에 의해 회수하였다. 실리카 나노구(SiO_2 -P)를 EtOH 현탁액으로 분산시키고 원심분리하는 과정을 3회 반복하여 정제하였다.
- [0042] 수득한 실리카 나노구(SiO_2 -P)의 투과전자현미경(transmission electron microscopy: TEM) 및 주사전자현미경(scanning electron microscopy: SEM) 분석결과를 도 2에 나타내었다.
- [0043] **실시예 1: Eu 이온이 도핑된 LGdH의 나노시트로 코팅된 실리카 나노구(SiO_2 -L)의 제조**
- [0044] 제조예 2에서 수득한 실리카 나노구(SiO_2 -P) (100 mg) 및 제조예 1에서 수득한 LGdH:Eu (20 mg)을 포름아마이드(formamide) 용액 (20 ml)에서 혼합하고 20 분 동안 초음파처리하였다. 생성된 실리카 나노구(SiO_2 -L)를 저속 회전 (3000 rpm)으로 원심분리하여 수집하였다. 수집된 실리카 나노구(SiO_2 -L)를 물에 재분산시키고 원심분리에 의해 회수하였다. 분리된 실리카 나노구(SiO_2 -L) 고체를 상온에서 진공하에 완전 건조시켰다.
- [0045] 수득한 실리카 나노구(SiO_2 -L)의 TEM 및 SEM 분석결과를 도 2에 나타내었다. 도 2에서 삽입 이미지는 가돌리늄 원소(녹색) 및 인 원소(적색)에 대한 에너지 분산 X-선 분광법(energy dispersive X-ray spectroscopy: EDX) 원소맵이다.
- [0046] 또한 수득한 실리카 나노구(SiO_2 -L)를 자연광(위) 및 254 nm 여기광(아래)으로 사진 촬영하여 그 결과를 도 3에 나타내었다.
- [0047] 아울러 실리카 나노구(SiO_2 -L)를 275 nm에서 UV 조사하여 얻은 형광 스펙트럼을 도 4에 나타내었다.
- [0048] **실시예 2: Eu 이온이 도핑된 $GdPO_4$ ($GdPO_4$:Eu)의 나노입자가 엠보싱된 실리카 나노구(SiO_2 -A)의 제조**
- [0049] 실시예 1에서 수득한 실리카 나노구(SiO_2 -L) 분말을 노(furnace)에서 5 °C/분의 가열속도로 가열하고, 400 °C, 500 °C, 600 °C, 700 °C 및 800 °C에서 4 시간 동안 공기 중에서 어닐링시켜 실리카 나노구(SiO_2 -A)를 수득하였다.
- [0050] 수득한 실리카 나노구(SiO_2 -A)의 TEM 및 SEM 분석결과를 도 2에 나타내었다.
- [0051] SiO_2 -A-400, SiO_2 -A-500, SiO_2 -A-600, SiO_2 -A-700 및 SiO_2 -A-800은 각각 400 °C, 500 °C, 600 °C, 700 °C 및 800 °C에서 어닐링시켜 수득한 실리카 나노구(SiO_2 -A)를 의미한다. 도 2에서 삽입 이미지는 가돌리늄 원소(녹색) 및 인 원소(적색)에 대한 EDX 원소맵이다.
- [0052] 또한 수득한 실리카 나노구(SiO_2 -A)를 자연광(위) 및 254 nm 여기광(아래)으로 사진 촬영하여 그 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3으로부터 실리카 나노구(SiO_2 -L)은 루미네선스를 나타내지 않는 반면, 실리카 나노구(SiO_2 -A)는 254 nm UV 조사시 적색 루미네선스를 나타내며 어닐링 온도가 증가할수록 밝기가 현저히 증가하는 것을 확

인할 수 있었다.

[0053] 아울러 실리카 나노구($\text{SiO}_2\text{-A}$)를 275 nm에서 UV 조사하여 얻은 형광 스펙트럼을 도 4에 나타내었다. 도 4로부터 실리카 나노구($\text{SiO}_2\text{-A}$)는 Eu^{3+} 이온의 $^5\text{D}_0\text{-}^7\text{F}_1$ 및 $^5\text{D}_0\text{-}^7\text{F}_2$ 전이에 해당하는 590 및 615 nm 주위에 중심을 둔 전형적인 방출 밴드를 나타내며 방출 강도는 어닐링 온도가 증가함에 따라 증가함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 온도가 증가할수록 더 많은 양의 LGdH:Eu 가 $\text{GdPO}_4\text{:Eu}$ 로 변환되기 때문인 것으로 생각된다.

[0054] **실시예 3: Eu 이온이 도핑된 GdPO_4 의 나노입자가 엠보싱되고 PEG기로 변형된 실리카 나노구($\text{SiO}_2\text{-PEG}$)의 제조**

[0055] 700 °C의 어닐링 온도로 실시예 2에서 수득한 실리카 나노구($\text{SiO}_2\text{-A}$) (30mg) 및 2-[메톡시(폴리에틸렌옥시)프로필]트리메톡시실란 (2-[methoxy(polyethylenoxy)propyl]trimethoxysilane: MPEOPS) (1 ml)를 에탄올에서 혼합하였다. 그런 다음 소량의 NH_4OH 용액을 생성된 현탁액에 가하여 반응을 개시하고 12 시간 동안 교반하였다. 생성된 실리카 나노구($\text{SiO}_2\text{-PEG}$)를 원심분리에 의해 회수하고 물로 수회 세척하였다.

[0056] 수득한 실리카 나노구($\text{SiO}_2\text{-PEG}$)는 물에 용이하게 분산되어 콜로이드 현탁액을 형성하였다.

[0057] 수득한 실리카 나노구($\text{SiO}_2\text{-PEG}$)의 TEM 및 SEM 분석결과를 도 2에 나타내었다. 도 2로부터 $\text{GdPO}_4\text{:Eu}$ 나노입자 및 $\text{GdPO}_4\text{:Eu}$ 나노입자가 엠보싱된 실리카 나노구의 형태가 PEG 변형 반응 동안 유의적인 변화를 보이지 않음을 알 수 있었다.

[0058] 또한 수득한 실리카 나노구($\text{SiO}_2\text{-PEG}$)를 0 mg/ml, 0.13 mg/ml, 0.03 mg/ml, 0.06 mg/ml 및 0.25 mg/ml의 Gd 농도로 함유하는 수성 현탁액을 각각 자연광(위) 및 254 nm 여기광(아래)으로 사진 촬영하여 그 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5로부터 실리카 나노구($\text{SiO}_2\text{-PEG}$)의 현탁액은 UV 여기광으로 조사시 적색 형광을 나타냄을 확인할 수 있었다. 따라서 실리카 나노구($\text{SiO}_2\text{-PEG}$)는 광학 프로브로서 사용될 수 있다.

[0059] 아울러 상기 수성 현탁액을 265 nm에서 UV 조사하여 얻은 형광 스펙트럼을 도 6에 나타내었다. 도 6으로부터 실리카 나노구($\text{SiO}_2\text{-PEG}$) 현탁액의 방출 스펙트럼은 PEG로 변형되지 않은 실리카 나노구($\text{SiO}_2\text{-A}$) 분말과 유사한 형광 밴드를 나타내고 형광 강도는 실리카 나노구의 농도에 거의 비례함을 확인할 수 있었다.

[0060] **실험예 1: MRI 이완 성질 측정**

[0061] 실시예 3에서 수득한 실리카 나노구($\text{SiO}_2\text{-PEG}$)의 수성 현탁액의 자기 이완 성질(magnetic relaxation property)을 경사 진폭(gradient amplitude)이 80 mT/m이고 슬루율(slew rate)이 200 ms/m인 3.0 T 사람 임상 MRI 스캐너(Philips, Achieva ver. 1.2, Philips Medical Systems, Best, The Netherlands)를 사용하여 분석하였다. 실리카 나노구($\text{SiO}_2\text{-PEG}$)는 세로 이완 시간(T_1) 및 가로 이완 시간(T_2) 모두를 감소시켰다. 따라서 도 7에서 보듯이, 밝은 신호 및 어두운 신호 증가가 각각 T_1 - 및 T_2 -가중된(weighted) 이미지에서 관찰되었다. Gd 농도의 함수로서 이완율(relaxation rate)을 측정하여 결정한 실리카 나노구($\text{SiO}_2\text{-PEG}$)의 비이완성(specific relaxivity)은 도 8에서 보듯이, r_1 and r_2 에 대해 각각 $1.6 (\text{s} \cdot \text{mM})^{-1}$ 및 $30.6 (\text{s} \cdot \text{mM})^{-1}$ 이었다. 실리카 나노구($\text{SiO}_2\text{-PEG}$)의 만족스러운 이완성은 실리카 나노구($\text{SiO}_2\text{-PEG}$)가 MRI 조영제로서 유용함을 나타낸다.

[0062] **실험예 2: 공초점 레이저 주사 현미경(CLSM) 분석**

[0063] 사람 유방암 세포주, MDA-MB-435s 세포를 성장 배지(L-15 with L-glutamin, 1% antibiotic-antimycotic, 10% fetal bovine serum)에서 37 °C로 0 % CO_2 의 습윤 공기에서 유지하였다. 세포를 주기적으로 계대배양하고 세포 흡수 실험 24 시간 전에 재접종하였다.

[0064] MDA-MB-435s 세포를 세포 흡수 실험 24 시간 전에 챔버 슬라이드에 웰당 5×10^3 세포의 밀도로 플레이팅하였다.

세포를 실리카 나노구(SiO_2 -PEG)와 37 °C에서 2 시간 동안 배양하였다. 가돌리늄 원자의 농도는 1 μM 이었다. 그런 다음, 세포를 차가운 PBS로 3회 세척하고 세포를 4% 파라포름알데하이드 용액에 고정시켰다. 슬라이드를 DAPI 봉입제(mounting medium)로 커버하고 세포를 Bio-rad Radiance 2100 Confocal Microscope System을 사용하여 544 nm 여기원으로 이미징하였다.

[0065] 도 9에서 볼 수 있는 바와 같이, 544 nm에서 여기한 공초점 레이저 주사 현미경(confocal laser scanning microscopy: CLSM) 분석 결과는 세포내에 위치하고 세포질 영역에 국한된 실리카 나노구(SiO_2 -PEG)로부터 적색 형광 이미지를 나타내었으며, 이는 실리카 나노구(SiO_2 -PEG)를 세포 표지화에서 형광 이미징을 위해 사용할 수 있음을 나타낸다. 대조적으로, 실리카 나노구(SiO_2 -PEG)가 없는 대조 시험은 형광을 나타내지 않았다.

[0066] 실험예 3: 생체의(in vitro) MRI 분석

[0067] 실험예 2와 동일한 방법으로 MDA-MB-435s 세포를 실리카 나노구(SiO_2 -PEG)와 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 1 mg/ml 의 Gd 농도로 배양하고 원심분리하였다. 생성된 세포 펠릿을 1% 아가로스 용액과 혼합하고, 혼합물을 에펜도르프 튜브(Eppendorf-tube)에 옮겼다. 아가로스과 혼합된 세포의 T_1 - 및 T_2 -가중된(weighted) MRI를 경사 진폭이 80 mT/m이고 슬루율이 200 ms/m인 3.0 T 사람 임상 MRI 스캐너(Philips, Achieva ver. 1.2, Philips Medical Systems, Best, The Netherlands)를 사용하여 수행하였다.

[0068] 그 결과, 도 10에서 볼 수 있는 바와 같이 비처리된 세포의 대조 샘플과 비교하여 농도 의존적 신호 증가가 T_1 - 및 T_2 -가중된(weighted) 이미지 모두에서 관찰되었다. T_1 -가중된 MRI에서 현저히 밝은 대비 및 T_2 -가중된 MRI에서 어두운 대비가 실리카 나노구(SiO_2 -PEG)의 농도가 증가함에 따라 발견되었으며, 이는 실리카 나노구(SiO_2 -PEG)가 세포 표지화에서 MR 이미징을 위해 효과적임을 나타낸다.

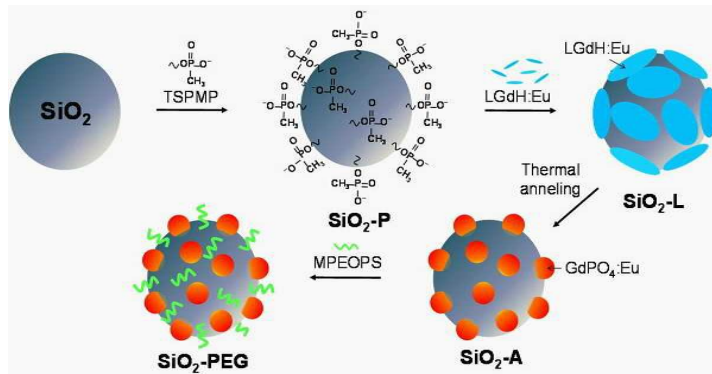
[0069] 실험예 4: 세포독성 평가

[0070] 세포 생존율은 MCF-7 세포를 성장배지(RPMI 1640 and Leibovitz's L-15 media with L-glutamin, 1% antibiotic-antimycotic, 10% fetal bovine serum)에서 37 °C로 5 % CO_2 의 습윤 공기에서 유지하여 측정하였다.

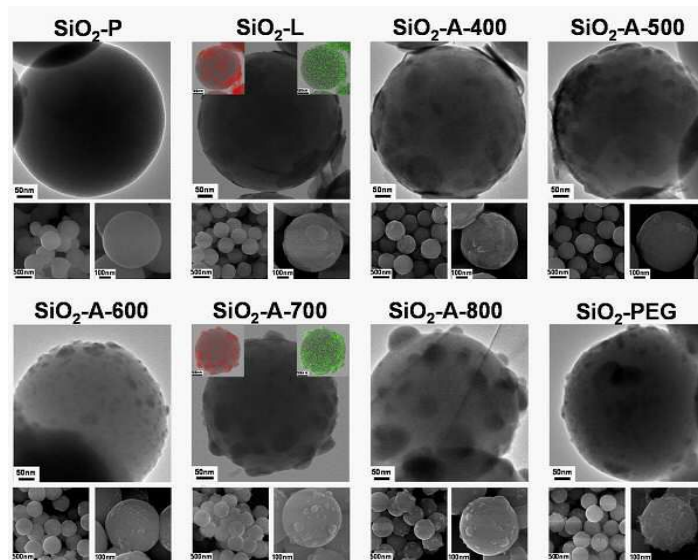
[0071] 실시예 3에서 수득한 실리카 나노구(SiO_2 -PEG)의 생체의 세포독성(*in vitro* cytotoxicity)을 MTT 분석법[참고문헌: Mosmann, T. *J. Immunol. Methods* 1983, 65, 55; Gerlier, D., Thomasset, N. *J. Immunol. Methods* 1986, 94, 57]을 이용하여 세포성장 저해율을 측정하여 평가하였다. 구체적으로, 세포를 96 웰 플레이트에 5×10^3 세포/ml의 밀도로 플레이트하고 실리카 나노구(SiO_2 -PEG)로 72 시간 동안 처리하였다. 처리 후에 세포를 세척하고 0.5mg의 MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 넣고 3 시간 동안 배양하였다. 세포 생존율을 처리된 세포의 수 대 비처리된 대조 세포의 수의 비로 나타내었다. 가돌리늄 원자의 농도에 따른 세포 생존율을 도 11에 나타내었다. 실리카 나노구(SiO_2 -PEG)는 100 μM 의 Gd 농도까지 유의적인 세포독성을 나타내지 않았으며, 이는 실리카 나노구(SiO_2 -PEG)가 세포 표지화에서 형광 및 MR 이미징에 적합함을 나타낸다.

도면

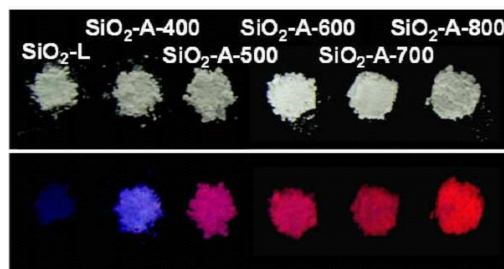
도면1



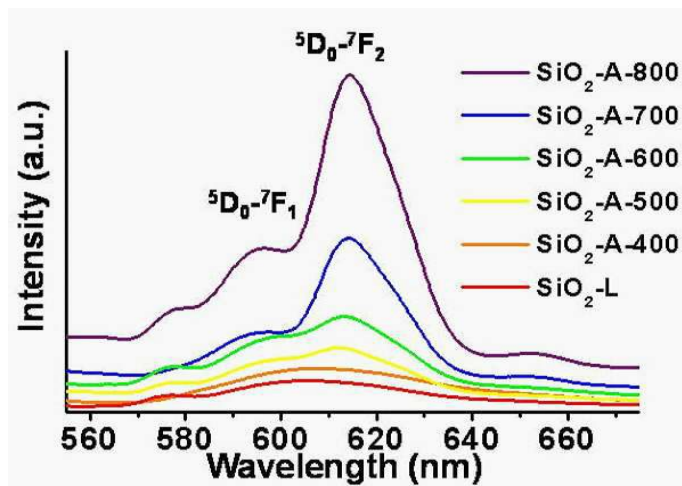
도면2



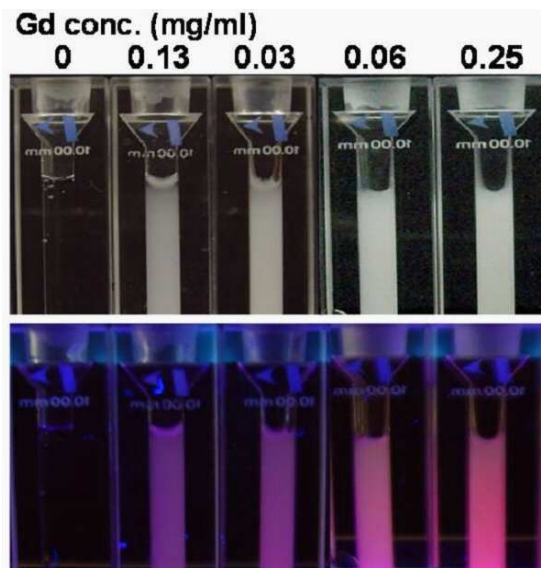
도면3



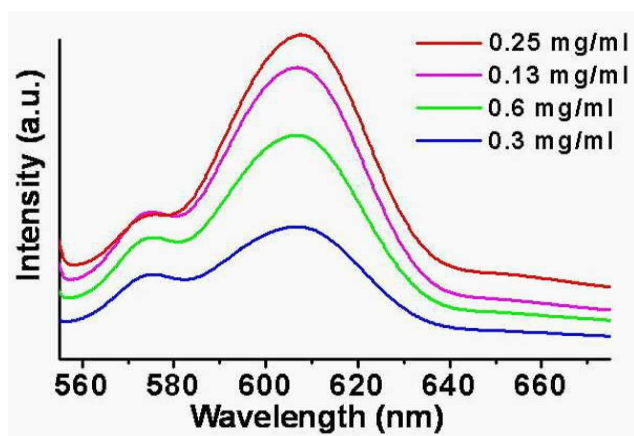
도면4



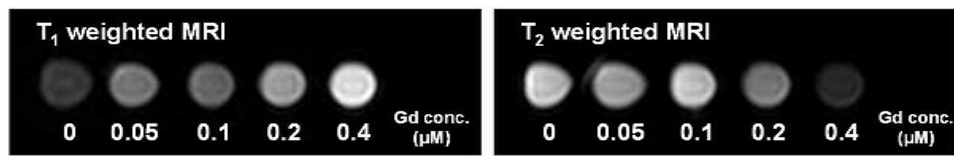
도면5



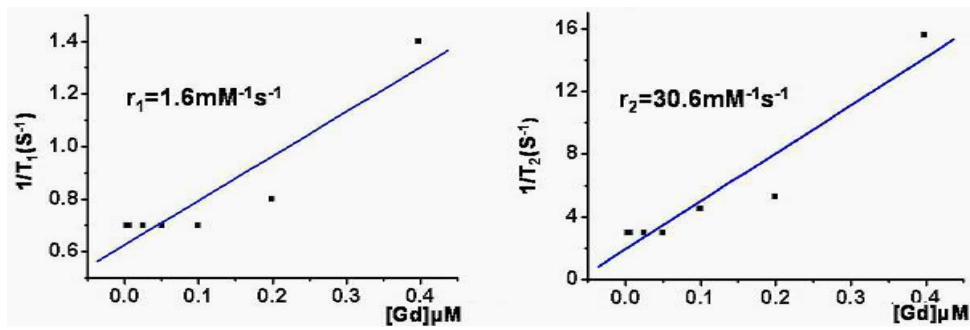
도면6



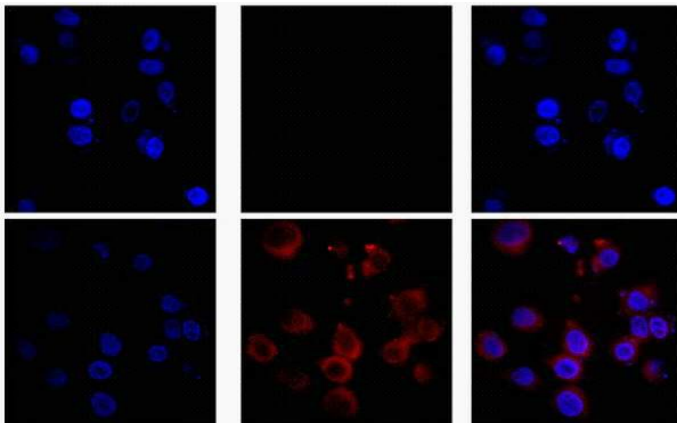
도면7



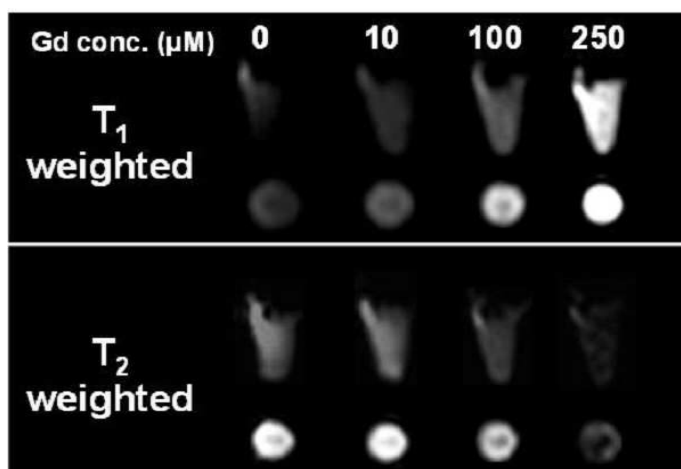
도면8



도면9



도면10



도면11

