



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0141609
(43) 공개일자 2016년12월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/48 (2006.01) A61K 49/18 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/48861 (2013.01)
A61K 49/1824 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0077557
(22) 출원일자 2015년06월01일
심사청구일자 2015년06월01일

(71) 출원인
건양대학교산학협력단
충청남도 논산시 대학로 121 (내동)
(72) 발명자
김도경
대전광역시 서구 관저북로 87 원앙마을1단지아파트 106동 1903호
김민철
서울특별시 용산구 이촌로64길 15 LG한강자이아파트 103동 1202호
(74) 대리인
김대영

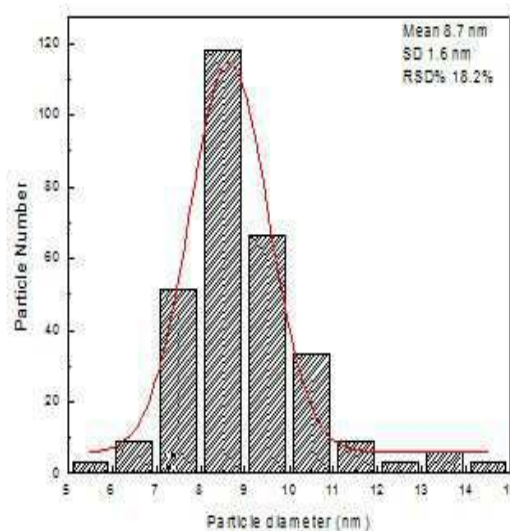
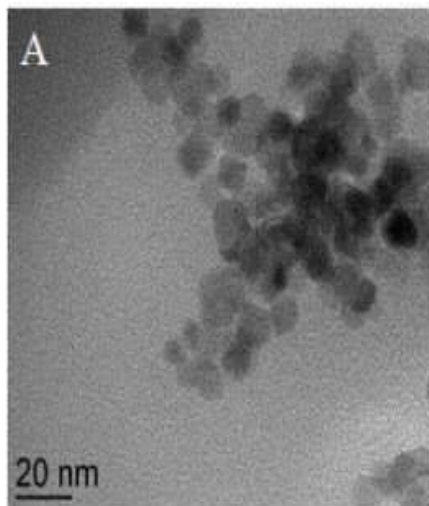
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 초상자성 산화물 자성나노입자 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 (1) 무기물을 증류수에 희석하여 1 내지 10 ℃의 온도로 냉각하여 스톱용액을 제조하는 단계, (2) 상기 (1) 단계에서 얻어진 스톱용액을 증류수에 희석 후, 알칼리수를 투입하고 50 내지 80 ℃의 온도에서 30 내지 60분 동안 반응하여 침전물을 얻는 공침단계, (3) 상기 (2) 단계에서 얻어진 침전물 질량대비 산화제(나노입자:산화제)를 1:1 내지 1:30 으로 투입하고 50 내지 80 ℃의 온도에서 10 내지 30분 동안 반응하는 산화단계, (4) 상기 (3) 단계에서 얻어진 침전물의 질량 대비 아미노산(산화 나노입자:아미노산)을 1:1 내지 1:10 로 첨가 후 상온에서 1 내지 24시간 동안 교반하는 단계 및 (5) 상기 (4) 단계에서 얻어진 물질에 표적지향적 리간드, 활성화제를 투입 후, 상온에서 3 내지 5시간 동안 교반하는 단계의 초상자성 산화물 자성나노입자 및 이의 제조방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C01G 49/0018 (2013.01)

C01G 49/06 (2013.01)

C01G 49/08 (2013.01)

C01P 2004/64 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

- (1) 무기물을 증류수에 희석하여 1 내지 10 °C의 온도로 냉각하여 스톱용액을 제조하는 단계;
- (2) 상기 (1) 단계에서 얻어진 스톱용액을 증류수에 희석 후, 알칼리수를 투입하고 50 내지 80 °C의 온도에서 30 내지 60분 동안 반응하여 침전물을 얻는 공침단계;
- (3) 상기 (2) 단계에서 얻어진 침전물 질량대비 산화제(나노입자:산화제 무게비)를 1:1 내지 1:30로 투입하고 50 내지 80 °C의 온도에서 10 내지 30분 동안 반응하는 산화단계;
- (4) 상기 (3) 단계에서 얻어진 침전물의 질량 대비 아미노산(산화 나노입자:아미노산)을 1:1 내지 1:10로 첨가 후 상온에서 1 내지 24시간 동안 교반하는 단계; 및
- (5) 상기 (4) 단계에서 얻어진 물질에 표적지향적 리간드, 활성화제를 투입 후, 상온에서 3 내지 5시간 동안 교반하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 초상자성 산화물 자성나노입자.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 (1) 단계에서 무기물은 산화철(II), 산화철(III), 코발트 페라이트, 징크 페라이트, 니켈 페라이트, 망간 페라이트 중에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 초상자성 산화물 자성나노입자.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 (3) 단계에서 상기 산화제는 과산화제, FeCl_3 , $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$, CoF_3 , FeF_3 , MnF_3 , $2\text{KHSO}_5 \circ \text{KHSO}_4 \circ \text{K}_2\text{SO}_4$, 퍼요오드산, 요오드산, 바나듐(V) 옥사이드, 바나듐(IV, V) 옥사이드, 암모늄 바나테이트, 암모늄 퍼옥소 모노설페이트, 암모늄 클로라이트, 암모늄 클로레이트, 암모늄 요오데이트, 암모늄 나이트레이트, 암모늄 퍼보레이트, 암모늄 퍼클로레이트, 암모늄 퍼요오데이트, 암모늄 퍼설페이트, 암모늄 하이포클로라이트, 암모늄 텅스테이트, 나트륨 퍼설페이트, 나트륨 하이포클로라이트, 나트륨 퍼보레이트, 칼륨요오데이트, 칼륨퍼망가네이트, 칼륨퍼설페이트, 질산, 칼륨퍼설페이트, 칼륨하이포클로라이트, 테트라메틸암모늄클로라이트, 테트라메틸암모늄클로레이트, 테트라메틸암모늄 요오데이트, 테트라메틸암모늄 퍼보레이트, 테트라메틸암모늄 퍼클로레이트, 테트라메틸암모늄 퍼요오데이트, 테트라메틸암모늄 퍼설페이트, 테트라부틸암모늄 퍼옥소모노설페이트, 퍼옥소 모노황산, 질산 제2철, 퍼아세트산, 1,4-벤조퀴논, 톨루퀴논, 다이메틸-1,4-벤조퀴논, 클로라닐, 알록산, N-메틸모폴린 N-옥사이드, 트라이메틸아민 N-옥사이드 중에서 선택되는 어느 하나 이상 또는 이들의 혼합물인 것을 특징으로 하는 초상자성 산화물 자성나노입자.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 (4) 단계에서 아미노산은 알라닌, 시스테인, 아스파르트산, 글루탐산, 페닐알라닌, 글라이신, 히스티딘, 아이소류신, 라이신, 류신, 메티오닌, 아스파라긴, 피롤라이신, 프롤린, 글루타민, 아르기닌, 세린, 트레오닌, 셀레노시스테인, 발린, 트립토판, 타이로신 중에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 초상자성 산화물 자성나노입자.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 (5) 단계에서 표적지향적 리간드는 하일루론산, RGD 펩타이드, NGR 아미노펩타이드, 트랜스페린,

플레이트, 갈락토사민 중 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 초상자성 산화물 자성나노입자.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 (5) 단계에서 활성화제는 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카보디이미드 하이드로클로라이드, 1-알킬-3-(3-디메틸아미노프로필)카보디이미드, 1-에틸-3-(3-(트리메틸아미노)프로필)카보디이미드, 1-씨클로헥실-3-(2-모르폴리노에틸)카보디이미드 중 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 초상자성 산화물 자성나노입자.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 (5) 단계에서 반응 보조제를 추가적으로 투입하는 것을 특징으로 하는 초상자성 산화물 자성나노입자.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 반응 보조제는 N-하이드록시석신이미드, 1-하이드록시벤조트리아졸, 3,4-디히드로-3-히드록시-4-옥소-1,2,3-벤조트리아진, 설폰-N-히드록시설포숙신이미드 중에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 초상자성 산화물 자성나노입자.

청구항 9

자성나노입자는

- (1) 무기물을 증류수에 희석하여 1 내지 10 ℃의 온도로 냉각하여 스톡용액을 제조하는 단계;
- (2) 상기 (1) 단계에서 얻어진 스톡용액을 증류수에 희석 후, 알칼리수를 투입하고 50 내지 80 ℃의 온도에서 30 내지 60분 동안 반응하여 침전물을 얻는 공침단계;
- (3) 상기 (2) 단계에서 얻어진 나노입자 질량대비 산화제(나노입자:산화제 무게비)를 1:1 내지 1:30로 투입하고 50 내지 80 ℃의 온도에서 10 내지 30분 동안 반응하는 산화단계;
- (4) 상기 (3) 단계에서 얻어진 나노입자 질량 대비 아미노산(산화 나노입자:아미노산)을 1:1 내지 1:10 로 첨가 후 상온에서 3 내지 5시간 동안 교반하는 단계; 및
- (5) 상기 (4) 단계에서 얻어진 물질에 표적지향적 리간드, 활성화제를 투입 후, 상온에서 3 내지 5시간 동안 교반하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 초상자성 산화물 자성나노입자 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 초상자성 산화물 자성나노입자 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 무기물 나노입자 표면을 산화제로 처리하여 수산기 (-OH)기를 활성화한 후 아미노산을 중간 링커로 사용하여 히알루론산 (hyaluronic acid)을 공유결합 함으로써 특이적 암세포 표적성을 갖는 초상자성 산화물 나노입자를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 초상자성 나노입자는 나노의학 분야, 즉 자기공명 이미지 조영제, 표적지향형 약물 전달체, 고주파 온열 암치료 등 여러 분야에 사용이 가능한 물질이다. 특히 초상자성 나노입자는 능동형 또는 수동형 표적지향 형태로 치료 약물을 세포내부로 전달할 수 있는 획기적인 기술로 인지되어 지고 있다. 특히 수용체매개 세포내 이입과 확산에 의한 침투는 수동형 세포막 투과의 일종으로 나노입자나 생체 분자와 같은 세포외부의 물질이 세포내부로 모여지는 원인이다. 직접적인 세포수용과는 다르게 수용체매개 세포내 이입에 의한 약물전달법은 입자의 크기나 분자량에 제한을 받지 않으므로 좀 더 광범위하게 적용이 가능한 기술이다.

- [0003] 대부분의 경우 특정한 생체활성 분자를 자성나노입자 표면에 결합하는 방법을 이용하여 표적 지향형 물질, 치료 물질, 진단물질 등을 효율적으로 전달하여 각각의 특성을 필요로 하는 물질의 전달효과를 극대화 하는 것이 가능하다. 표면에 코팅을 하지 않은 자성나노입자의 경우 공기 중 산화, 산성하에서의 분해 및 응집 등의 문제점을 가지고 있다.
- [0004] 상기의 문제점을 해결하기 위한 방안으로 표면을 보호하기 위한 생체적합특성과 스텔스기능을 갖는 물질로 코팅하거나 펩타이드, 압타머, 항체 또는 병변 사이트에 과다 발현된 시그널이 추적 가능한 작은 분자물질 등을 자성나노입자 표면에 결합시키는 연구들이 현재 이루어지고 있다. 그중에서 능동적 표적지향법의 장점은 약물전달체 표면에 특이한 표적물질을 결합하여 특정한 종양세포에만 선택적으로 약물을 전달 할 수 있으며 병변조직이 갖는 특이성질, 즉, 온도, pH, 저산소증 등의 물성을 이용하여 병변부위로 선택적으로 원하는 물질을 보내는 기술이다.
- [0005] 현재 무기물이나 금속성분 나노입자의 표면처리/코팅 기술로 합성과 동시에 유기물로 코팅하는 기술이 주로 이용되어 지고 있다. 예를 들어 마이크로 에멀전법으로 나노입자를 합성하는 경우 들어가는 계면활성제는 합성 후 나노입자의 세척 공정을 거치게 되어 있으나, 추가적인 분산제를 투여해야만 수용액상에서 분산이 가능하다는 문제점이 있다. 또한 이미 계면활성제로 코팅되어 있는 나노입자표면의 작용기를 활성화시키기에는 기술적으로 어려운 실정이다.
- [0006] 또 다른 방법으로는 고분자 물질인 텍스트라이나 녹말과 같은 수용성 하이드로젤과 금속염을 수용액상에 녹인 후 pH를 변화시켜 공침시키는 방법이 있으며, 이 방법의 장점은 고분자 매트릭스 상에서 나노입자를 제조함으로써 입자간의 인력을 배제할 수 있어 단분산된 나노입자를 제조 가능하며 추후 공정에 의해 가교반응을 유도하여 고분자 물질을 코팅할 수 있다. 하지만 문제점으로 코팅에 사용되어지는 고분자 물질의 분자량이 상대적으로 큰 물질인 경우가 대부분이다.
- [0007] 또한, 다른 예로는 고온 열분해 법에 의해 유기금속 물질을 합성하는 방법이 있으며, 이는 합성시 입자 크기 조절용으로 사용되어진 지방산 물질을 기술적으로 제거하기 어려우며, 이 경우 수용액상의 분산이 불가능하여 추가적인 상전이 물질을 처리하여 사용되고 있다.
- [0008] 또한, 다른 예로 여러 가지 기능성 고분자 물질을 결합하여 코팅하는 방법으로 실란과 폴리에틸렌글리콜을 포함하는 고분자물질을 이용하여 나노입자의 합성 후 열경화에 의해 나노입자 표면에 실리카를 코팅하는 방법 등이 있다. 하지만 상기 열거한 방법들은 바이오 관련 기술로의 응용을 위해서는 제한적일 수밖에 없으며, 수용액 분산을 위해 추가적으로 처리하는 고분자 물질로 인해 입자의 최종크기가 증가 하며 고분자 물질의 분자량에 따라 혈관내에서의 응집 현상을 배제하기 힘들다. 또한 표면작용기의 활성화 없이는 표적 지향형 리간드를 추가적으로 결합시킬 수가 없으므로 기존의 코팅기술과는 다른 새로운 방법이 요구 되어지는 실정이다.
- [0009] 일반적으로 초상자성 나노입자의 표면에는 제한적인 수의 수산기가 있으며, 이 제한적인 수산기가 추가적인 생체활성분자의 결합을 어렵게 만드는 원인으로 작용되며, 반면 나노입자를 혈관에 사용하는데 있어서 혈관내의 혈액과 만나 혈전 또는 혈액응고가 형성되는 문제점이 있다.
- [0010] 혈액-입자 상호 작용은 혈액 입자의 호환성, 즉 혈액 응고 캐스케이드(진성 및 외인성 경로) 및 복잡한 혈액 응고 과정(단백질 흡착, 혈소판 부착 및 활성화를 포함 함)을 포함하는 것에 영향을 미친다.
- [0011] 낮은 피브리노겐 흡착 및 낮은 혈소판 유착은 혈액 적합성을 달성하기 위해 필수적이고, 또한 피브리노겐 흡착에 있어 자성나노입자 표면에 "antibiofouling" 특성을 갖는 표면을 형성함으로써 표면 습윤성 및 표면 조도를 조정하여 혈소판 흡착 및 활성화를 방지할 수 있다.
- [0012] 생물학적으로 불활성 물질은 일반적으로 물-분산성, 생체 적합성 및 단백질 또는 펩티드와 같은 생체 물질의 접합을 향상시키는 물질을 사용한다. 그러나, 나노 입자의 표면에 단백질의 비 특이적 흡착은 생체내에 주입 시 자주 발생하는 문제이며, 이는 세망 내피 체계 (RES)에 의해 빠르게 제거되는 부작용이 나타난다. 세망 내피 체계는 대식세포 시스템 또는 단핵 세포 시스템으로 선천면역시스템의 일부이다.
- [0013] 만일 나노 입자를 세망 내피 체계가 인식하지 못하는 antibiofouling 분자로 코팅하는 경우, 이 입자들은 간, 비장이나 림프절 등 여러 장기에 모이게 된다. 이러한 장기에 응집되는 단점을 이용하여, 세망 내피 체계 메커니즘에 의해 간, 비장 및 림프절의 맵핑에 성공적으로 사용될 수 있다.
- [0014] 또한 초상자성 나노입자 표면에 작인 결합분자를 공유결합 시킴으로서 표면에 "영향을 미치는 분자"를 결합한 나노캐리어 플랫폼으로 이용할 수 있다. 도파민을 자성 나노입자에 결합시킨 경우도 보고되어 지고 있으며 실

란분자를 입자 표면에 결합하여 특이적으로 입자 표면에 여러 가지 종류의 작용기를 활성화 시킨 것도 보고되고 있다.

[0015] 히알루론산은 N-아세틸-D-글루코사민과 D-글루쿠론산으로 이루어진 반복 단위가 선형으로 연결되어 있는 생체 고분자 물질로, 안구의 유리액, 관절의 활액, 담벼슬 등에 많이 존재한다. 여기서 히알루론산이라는 용어는 히알루론산과 그의 양이온염을 모두 지칭하는 말이다.

[0016] 히알루론산의 종래기술로는 미국특허 제4,937,270(1990.06.26.)호에서는 히알루론산의 카르복시기를 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride(EDC)를 이용하여 수용액상에서 활성화시킨 후, 작용기가 하나인 아민과 반응시켜 아마이드 결합을 형성시키면 물에 대한 용해도가 감소한다고 기재되어 있으며, 미국특허 제5,017,229(1990.05.21)호에서는 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride를 이용하여 여러 가지 다가음이온 다당류와 히알루론산을 교차 결합시킬 수 있다고 기재되어 있다.

[0017] 종래의 기술은 주로 히알루론산자체를 가교결합형 유도체 제조에 관한 것으로 한정되어져 있으며, 특히 기존의 나노입자 표면코팅기술은 고분자물질을 물리적으로 흡착시키거나 온도에 의해 경화시키는 방법을 사용하고 있다. 이러한 기술들의 한계점은 최종 유기 복합물질의 크기가 코어물질에 비해 상대적으로 크기가 너무 크며 합성 시 사용되어진 고분자 물질이나 계면활성제등이 제한적이므로 추가적인 작용기 활성화가 어려운 문제점 등이 있다. 이러한 문제점들을 해결하기 위하여 본 발명에서는 고분자 물질이나 계면활성제를 사용하지 않고 초상자성 나노입자의 표면에 산화제를 이용하여 직접적으로 수산화기를 활성화함과 동시에 특정 작용기를 갖는 링커 물질을 화학적으로 결합하여 특이적으로 암세포 표적성 물질인 히알루론산을 직접 공유결합시킴으로, 최종적으로 무기물 산화철 나노입자와 유기물 히알루론산의 유기 복합체를 제조하였으며 수용액상에서 우수한 분산성과 안정성을 갖는 물질을 제조 방법에 관한 것이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0018] (특허문헌 0001) 미국특허 제4,937,270(1990.06.26.)

(특허문헌 0002) 미국특허 제5,017,229(1990.05.21)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0019] 본 발명의 첫 번째 목적은 산화제를 사용하여 무기물의 표면에 수산화기를 활성화 시키고, 아미노산을 결합하여 작용기가 활성화된 초상자성 산화물 나노입자의 제조방법을 제공한다.

[0020] 본 발명의 두 번째 목적은 아미노산이 활성화된 무기물 나노입자표면에 표적지향 리간드인 히알루론산을 공유결합하여 암세포에 선택적으로 결합 가능한 자성나노입자의 제조 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0021] 본 발명에서는 (1) 무기물을 증류수에 희석하여 1 내지 10 ℃의 온도로 냉각하여 스톱용액을 제조하는 단계; (2) 상기 (1) 단계에서 얻어진 스톱용액을 증류수에 희석 후, 알칼리수를 투입하고 50 내지 80 ℃의 온도에서 30 내지 60 분 동안 반응하여 침전물을 얻는 공침단계; (3) 상기 (2) 단계에서 얻어진 나노입자 질량대비 산화제(나노입자:산화제)를 1:1 내지 1:30 로 투입하고 50 내지 80 ℃의 온도에서 10 내지 30 분 동안 반응하는 산화단계; (4) 상기 (3) 단계에서 얻어진 나노입자의 질량 대비 아미노산(산화 나노입자:아미노산)을 1:1 내지 1:10 로 첨가 후 상온에서 3 내지 5 시간 동안 교반하는 단계; 및 (5) 상기 (4) 단계에서 얻어진 물질에 표적지향 리간드, 활성화제를 투입 후, 상온에서 3 내지 5 시간 동안 교반하는 단계의 초상자성 산화물 자성나노입자를 제공한다.

[0022] 일 실시예로 상기 (1) 단계에서 무기물은 산화철(II), 산화철(III), 코발트 페라이트, 징크 페라이트, 니켈 페라이트, 망간 페라이트 중에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0023] 일 실시예로 (3) 단계에서 상기 산화제는 과산화제, FeCl_3 , $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$, CoF_3 , FeF_3 , MnF_3 , 2KHSO_5 ○

$\text{KHSO}_4 \circ \text{K}_2\text{SO}_4$, 퍼요오드산, 요오드산, 바나듐(V) 옥사이드, 바나듐(IV, V) 옥사이드, 암모늄 바나데이트, 암모늄 퍼옥소모노설페이트, 암모늄 클로라이트, 암모늄 클로레이트, 암모늄 요오데이트, 암모늄 나이트레이트, 암모늄 퍼보레이트, 암모늄 퍼클로레이트, 암모늄 퍼요오데이트, 암모늄 퍼설페이트, 암모늄 하이포클로라이트, 암모늄 텅스테이트, 나트륨 퍼설페이트, 나트륨 하이포클로라이트, 나트륨 퍼보레이트, 칼륨요오데이트, 칼륨퍼망가네이트, 칼륨퍼설페이트, 질산, 칼륨퍼설페이트, 칼륨하이포클로라이트, 테트라메틸암모늄클로라이트, 테트라메틸암모늄클로레이트, 테트라메틸암모늄 요오데이트, 테트라메틸암모늄 퍼보레이트, 테트라메틸암모늄 퍼클로레이트, 테트라메틸암모늄 퍼요오데이트, 테트라메틸암모늄 퍼설페이트, 테트라부틸암모늄 퍼옥소모노설페이트, 퍼옥소모노황산, 질산 제2철, 피아세트산, 1,4-벤조퀴논, 톨루퀴논, 다이메틸-1,4-벤조퀴논, 클로라닐, 알록산, N-메틸포폴린 N-옥사이드, 트라이메틸아민 N-옥사이드 중에서 선택되는 어느 하나 이상 또는 이들의 혼합물일 수 있다.

[0024] 일 실시예로 상기 (4) 단계에서 아미노산은 알라닌, 시스테인, 아스파르트산, 글루탐산, 페닐알라닌, 글라이신, 히스티딘, 아이소류신, 라이신, 류신, 메티오닌, 아스파라긴, 피롤라이신, 프롤린, 글루타민, 아르기닌, 세린, 트레오닌, 셀레노시스테인, 발린, 트립토판, 타이로신 중에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0025] 일 실시예로 (5) 단계에서 활성화제는 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카보디이미드 하이드로클로라이드, 1-알킬-3-(3-디메틸아미노프로필)카보디이미드, 1-에틸-3-(3-(트리메틸아미노)프로필)카보디이미드, 1-씨클로헥실-3-(2-모르폴리노에틸)카보디이미드 중 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0026] 일 실시예로 (5) 단계에서 반응 보조제를 추가적으로 투입할 수 있다.

[0027] 본 발명에서는 (1) 무기물을 증류수에 회석하여 1 내지 10 °C의 온도로 냉각하여 스톱용액을 제조하는 단계; (2) 상기 (1) 단계에서 얻어진 나노입자를 증류수에 회석 후, 알칼리수를 투입하고 50 내지 80 °C의 온도에서 30 내지 60 분 동안 반응하여 침전물을 얻는 공침단계; (3) 상기 (2) 단계에서 얻어진 침전물 질량대비 산화제(나노입자:산화제)를 1:1 내지 1:30로 투입하고 50 내지 80 °C의 온도에서 10 내지 30 분 동안 반응하는 산화단계; (4) 상기 (3) 단계에서 얻어진 나노입자의 질량 대비 아미노산(산화 나노입자:아미노산)을 1:1 내지 1:10로 첨가 후 상온에서 3 내지 5 시간 동안 교반하는 단계; 및 (5) 상기 (4) 단계에서 얻어진 물질에 표적지향 리간드, 활성화제를 투입 후, 상온에서 3 내지 5 시간 동안 교반하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 초상자성 산화물 나노입자 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0028] 본 발명은 무기물 표면에 산화제를 이용하여 작용기를 활성화시킨 후 저 분자 물질인 아미노산을 링커물질로 사용하여 나노입자 표면에 추가적인 화학결합이 가능하게 하여 유무기 이종물질을 결합하였으며, 제조되는 유무기 복합체는 수용액 상에서 고분산성, 고안정성 특성을 나타낸다.

[0029] 또한 링커 물질인 아미노산이 활성화된 무기물 나노입자표면에 암표적 물질인 히알루론산을 공유결합에 의해 결합시켜 암세포에 선택적으로 결합이 가능한 자성나노입자의 제조 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 자성나노입자의 투과전자 현미경 사진 및 입도분포도 그래프이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 글루탐산이 자성나노 입자의 표면에 결합하는 모식도 및 히알루론산 결합의 모식도를 도시한 것이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 자성나노입자의 FT-IR 스펙트럼을 도시한 것이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 자성나노입자의 제타전위 변화를 도시한 것이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 자성나노입자의 세포독성결과를 도시한 것이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 자성나노입자에 세포 배양 후 공침현미경으로 관찰한 사진이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 자성나노입자의 철분농도 측정값을 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 본 발명을 용이하게 실

시할 수 있는 바람직한 실시 예를 포함한 발명의 구성을 상세히 설명한다. 본 발명의 각 도면에 있어서, 구조물들의 사이즈나 치수는 본 발명의 명확성을 기하기 위하여 실제보다 확대하거나 축소하여 도시한 것이고, 특징적 구성이 드러나도록 공지 구성들은 생략하여 도시하였으므로 도면으로 한정하지는 아니한다. 본 발명의 바람직한 실시 예에 대한 원리를 상세하게 설명함에 있어 관련된 공지 기능 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략한다.

[0032] 본 발명의 초상자성 산화물 자성나노입자는 (1) 무기물을 증류수에 희석하여 1 내지 10 °C의 온도로 냉각하여 스톡용액을 제조하는 단계, (2) 상기 (1) 단계에서 얻어진 스톡용액을 증류수에 희석 후, 알칼리수를 투입하고 50 내지 80 °C의 온도에서 30 내지 60분 동안 반응하여 침전물을 얻는 공침단계, (3) 상기 (2) 단계에서 얻어진 나노입자 질량대비 산화제(나노입자:산화제)를 1:1 내지 1:30 로 투입하고 50 내지 80 °C의 온도에서 10 내지 30분 동안 반응하는 산화단계, (4) 상기 (3) 단계에서 얻어진 침전물의 질량 대비 아미노산(산화 나노입자:아미노산)을 1:1 내지 1:10 로 첨가 후 상온에서 3 내지 5시간 동안 교반하는 단계 및 (5) 상기 (4) 단계에서 얻어진 물질에 표적지향 리간드, 활성화제를 투입 후, 상온에서 3 내지 5시간 동안 교반하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 초상자성 산화물 자성나노입자를 제공한다.

[0033] 본 발명에서 상기 (1) 단계에서 무기물은 자성나노입자 또는 자성나노클러스터일 수 있으며, 예로는 금속물질, 자성물질 또는 자성합금이 포함될 수 있다. 상기 금속물질의 예로는 Pt, Pd, Ag, Cu 및 Au로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 들 수 있고, 자성물질의 예로는 Co, Mn, Fe, Ni, Gd, Mo, MxMy(상기에서 M 및 M'은 각각 독립적으로 Co, Fe, Ni, Mn, Zn, Gd 또는 Cr을 나타내고, x 및 y은 각각 식 $0 < x \leq 3$ 및 $0 < y \leq 5$ 를 만족한다.)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 들 수 있으며, 자성 합금의 예로는 CoCu, CoPt, FePt, CoSm, NiFe 및 NiFeCo로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0034] 바람직하게는 상기 무기물은 표면에 수산기를 가지고 있으며 외부 자장 하에서 자성특성을 띠는 초상자성 물질을 사용할 수 있고, 보다 바람직하게는 산화철(II), 산화철(III), 코발트 페라이트, 징크 페라이트, 니켈 페라이트, 망간 페라이트 중에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0035] 본 발명에서, 상기 (1) 단계에서 무기물 질량대비 5 내지 10배의 증류수를 사용하여 희석한 후 1 내지 10 °C의 온도로 냉각하여 스톡용액을 제조할 수 있다.

[0036] 또한, 상기 무기물은 초상자성 산화물 자성나노입자 100 중량부에 대하여 10 내지 60 중량부의 양으로 포함되는 것이 바람직하다. 상기 함량이 10 중량부 미만인 경우, 초상자성 자성나노입자의 전체적인 자기적 특성이 저하될 우려가 있으며, 60 중량부를 초과하는 경우, 과량의 자성체로 인해 입자의 안정성이 감소될 수 있으며, 상기의 범위에 한정되는 것은 아니다.

[0037] 본 발명에서 상기 (1) 단계에서 얻어진 스톡용액을 증류수에 희석 후, 암모니아수를 투입하고 50 내지 80 °C의 온도에서 30 내지 60분 동안 반응하여 침전물을 얻는 공침단계가 이루어진다.

[0038] 이때, 나노입자 질량대비 20 내지 25배의 증류수로 희석 후, 1 내지 5도의 온도로 냉각한다. 이후 냉각된 나노입자 질량대비 알칼리수를 1:1 내지 1:10로 투입 후 교반하면서 온도를 상승시켜 50 내지 80 °C의 온도에서 30 내지 60분간 반응하며, 바람직하게는 70 °C의 온도에서 30분간 반응할 수 있으며, 반응종료 후 얻어진 침전물을 증류수를 사용하여 3회 이상 세척 후, 증류수에 재분산 후, 1 내지 5 °C의 온도에 보관한다.

[0039] 상기 알칼리수는 수산화나트륨 또는 암모니아일 수 있으며 바람직하게는 암모니아를 사용한다. 여기서, 상기 알칼리수를 저온에서 첨가하여 입자를 합성함으로써 입자의 크기를 균일하게 할 수 있으며, 온도를 서서히 증가시켜 가열함으로써 입자를 결정화할 수 있다. 이때 질소 또는 불활성 가스를 반응기 내로 흘려주어 산화를 방지할 수 있다.

[0040] 본 발명에서 상기 (2) 단계 후, (3) 상기 (2) 단계에서 얻어진 나노입자 질량대비 산화제(나노입자:산화제)를 1:1 내지 1:30로 투입하고 50 내지 80 °C의 온도에서 10 내지 30 분 동안 반응하는 산화단계가 이루어진다.

[0041] 상기 산화제는 과산화제, FeCl_3 , $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$, CoF_3 , FeF_3 , MnF_3 , $2\text{KHSO}_5 \circ \text{KHSO}_4 \circ \text{K}_2\text{SO}_4$, 퍼요오드산, 요오드산, 바나듐(V) 옥사이드, 바나듐(IV, V) 옥사이드, 암모늄 바나테이트, 암모늄 퍼옥소모노셀레이트, 암모늄 클로라이트, 암모늄 클로레이트, 암모늄 요오데이트, 암모늄 나이트레이트, 암모늄 퍼보레이트, 암모늄 퍼클로레이트, 암모늄 퍼요오데이트, 암모늄 퍼셀레이트, 암모늄 하이포클로라이트, 암모늄 텅스테이트, 나트륨 퍼셀레이트, 나트륨 하이포클로라이트, 나트륨 퍼보레이트, 칼륨요오데이트, 칼륨퍼망가네이트, 칼륨퍼셀레이트, 질

산, 칼륨퍼설페이트, 칼륨하이포클로라이트, 테트라메틸암모늄클로라이트, 테트라메틸암모늄클로레이트, 테트라메틸암모늄 요오데이트, 테트라메틸암모늄 퍼보레이트, 테트라메틸암모늄 퍼클로레이트, 테트라메틸암모늄 퍼요오데이트, 테트라메틸암모늄 퍼설페이트, 테트라부틸암모늄 퍼옥소모노설페이트, 퍼옥소모노황산, 질산 제2철, 퍼아세트산, 1,4-벤조퀴논, 톨루퀴논, 다이메틸-1,4-벤조퀴논, 클로라닐, 알록산, N-메틸모폴린 N-옥사이드, 트라이메틸아민 N-옥사이드 중에서 선택되는 어느 하나 이상 또는 이들의 혼합물일 수 있으며, 바람직하게는 과산화수소를 사용하여 입자의 표면을 산화시켜 수산화기를 활성화할 수 있다.

[0042] 본 발명에서 상기 (3) 단계 이후, (4) 상기 (3) 단계에서 얻어진 나노입자의 질량 대비 아미노산(산화 나노입자:아미노산)을 1:1 내지 1:10로 첨가 후 상온에서 1 내지 24시간 동안 교반하는 단계가 이루어진다.

[0043] 상기 아미노산의 예로는 알라닌, 시스테인, 아스파르트산, 글루탐산, 페닐알라닌, 글라이신, 히스티딘, 아이소류신, 라이신, 류신, 메티오닌, 아스파라긴, 피롤라이신, 프롤린, 글루타민, 아르기닌, 세린, 트레오닌, 셀레노시스테인, 발린, 트립토판, 타이로신 중에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 글루탐산을 침전물을 첨가 후 상온에서 3 내지 5시간 반응할 수 있다.

[0044] 이때, 글루탐산이 입자표면에 결합하게 되며, 결합되지 않은 미 반응물 제거를 위해서는 분자량이 10,000 내지 15,000의 다이알리시스 백을 사용하여 24 내지 48 시간동안 세척할 수 있다.

[0045] 본 발명은 상기 (4) 단계 이후, (5) 상기 (4) 단계에서 얻어진 물질에 표적지향적 리간드, 활성화제를 투입 후, 상온에서 3 내지 5시간 동안 교반하는 단계가 이루어지며, 바람직하게는 공유결합에 의해 초상자성 나노입자 표면에 부착될 수 있다.

[0046] 상기 표적지향 리간드는 하일루론산, RGD 펩타이드, NGR 아미노펩타이드, 트랜스페린, 폴레이트, 갈락토사민, 칼락토사민과 같은 비항체형과 항체형인 Anti-VEGFR, Anti-ERBB2, Anti-CD20, 22, 19, 33, 25, Anti-HLA-DR10베타, Anti-tenascin, Anti-CEA, Anti-MUC1, Anti-TAG72 중 선택되는 어느 하나일 수 있고, 상기 활성화제는 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카보디이미드하이드로클로라이드(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride, EDC), 1-알킬-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드(1-alkyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide), 1-에틸-3-(3-(트리메틸아미노)프로필)카보디이미드(1-ethyl-3-(3-(trimethylammonio)propyl)carbodiimide, ETC), 1-썬클로헥실-3-(2-모르폴리노에틸)카보디이미드(1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl)carbodiimide, CMC) 중 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0047] 또한, 상기 (5) 단계에서 반응 보조제를 추가적으로 투입할 수 있으며, 반응 보조제는 N-하이드록시석신이미드(N-Hydroxysuccinimide, NHS), 1-하이드록시벤조트리아졸(1-hydroxybenzotriazole, HOBt), 3,4-디히드로-3-히드록시-4-옥소-1,2,3-벤조트리아진(3,4-dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazine, HOOBt), 1-히드록시-7-아자벤조트리아졸(1-hydroxy-7-azabenzotriazole, HOAt), 설폰-N-히드록시설폰숙신이미드(N-hydroxysulfosuccinimide, Sulfo-NHS) 중에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0048] 바람직하게는 표적지향적 리간드로 하일루론산, 활성화제는 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카보디이미드 하이드로클로라이드, 반응 보조제는 N-하이드록시석신이미드를 사용할 수 있다. 또한 자성나노입자:표적지향 리간드:활성화제:반응보조제는 질량대비 1:1:0.5:3 내지 1:1.5:1:6의 비율로 혼합하여 사용할 수 있으며, 상온에서 4시간 반응할 수 있다. 또한, 반응하지 않은 미반응물은 분자량이 10,000 내지 15,000의 다이알리시스 백을 사용하여 24 내지 48 시간동안 세척할 수 있다.

[0049] 본 발명에서 상기 하일루론산은 히드로겔 성분으로, 일반적으로 히드로겔은 충분한 양의 물에 노출되었을 때, 녹거나 해리되지 않고 3차원적 형태를 유지할 수 있는 친수성 물질을 의미한다. 본 발명에서와 같이 입자의 표면에 히드로겔이 존재함으로써, 자성나노입자가 생체에 주입될 경우, 히드로겔은 생체 내 물 분자와 결합을 이루게 되며, 이는 자성나노입자 내부에 있는 소수성의 아미노산 및 자성체 무기물이 안정하게 존재할 수 있도록 하는 역할을 할 수 있다. 또한, 물 분자와 결합을 이룬 히드로겔은 생체 내 면역 단백질의 접근을 막아 면역 반응을 억제하여 자성나노입자가 생체 내에서 제거되지 않고 오랜 시간동안 순환될 수 있도록 할 수 있다.

[0050] 이때, 상기 하일루론산은 분자량이 10,000 내지 2,000,000인 것을 사용하는 것이 바람직하며, 상기 범위의 미만일 경우, 하일루론산의 종양 마커에 대한 선택적 반응성이 떨어질 우려가 있고, 상기 범위를 초과하는 경우, 초상자성 산화물 자성나노입자 제조 시 용액의 점도가 증가하여 입자의 조작성이 낮아지는 문제가 발생할 수 있다.

[0051] 본 발명은 (1) 무기물을 증류수에 희석하여 1 내지 10 °C의 온도로 냉각하여 스톱용액을 제조하는 단계, (2) 상기 (1) 단계에서 얻어진 스톱용액을 증류수에 희석 후, 알칼리수를 투입하고 50 내지 80 °C의 온도에서 30 내지

60 분 동안 반응하여 침전물을 얻는 공침단계, (3) 상기 (2) 단계에서 얻어진 나노입자 질량대비 산화제(나노입자:산화제)를 1:1 내지 1:30로 투입하고 50 내지 80 °C의 온도에서 10 내지 30분 동안 반응하는 산화단계, (4) 상기 (3) 단계에서 얻어진 나노입자 질량 대비 아미노산(산화 나노입자:아미노산)을 1:1 내지 1:10 첨가 후 상온에서 3 내지 5시간 동안 교반하는 단계 및 (5) 상기 (4) 단계에서 얻어진 물질에 표적지향 리간드, 활성화제를 투입 후, 상온에서 3 내지 5시간 동안 교반하는 단계의 초상자성 산화물 자성나노입자 제조방법을 제공한다.

[0052] 본 발명에서 상기 제조방법을 통해 얻어진 초상자성 산화물 자성나노입자의 평균 직경은 5 내지 20 nm일 수 있으며, 바람직하게는 5 내지 10 nm일 수 있다. 상기 평균직경이 5 nm 미만인 경우, 약제학적 활성 성분 및/또는 자성체의 효율이 저하될 수 있고, 20 nm 이상일 경우 혈관내 사용에 어려울 수 있으며 또한 안정성의 문제가 발생될 수 있다.

[0053] 이하, 실시예를 통해 보다 자세하게 설명한다.

[0054] (실시예)

[0055] 실시예 1

[0056] 실시예 1-1. 공침법에 의한 자성나노입자의 합성 (B-SPIONs)

[0057] 질소가스를 30 분간 흘려주어 산소를 제거한 증류수 250 mL에 33.79 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 12.43 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 을 용해하여 스톡용액을 제조한다.

[0058] 제조된 스톡용액 1.6 mL을 38 mL의 증류수에 희석하고, 4 °C로 냉각시킨다. 스톡용액을 냉각상태에서 교반하며 2 mL 암모니아수를 첨가하고 온도를 서서히 70 °C까지 상승시킨 후 30 분 동안 반응시킨다.

[0059] 반응 후 얻어진 검은색 침전물을 회토류자석을 이용하여 침전시킨 후 증류수를 사용하여 3회 세척한다. 세척 후 증류수에 재분산하여 자성나노입자의 최종 농도는 10 mg/mL로 4 °C에서 보관한다.

[0060] 실시예 1-2. 자성나노 입자 표면의 수산화기 활성화(OH-SPIONs)

[0061] 실시예 1-1에서 제조한 자성나노입자 10 mL (총 중량 100 mg)에 100 μL 의 과산화수소를 첨가한 후 80 °C에서 20 분 동안 가열한다. 수산기가 활성화된 자성나노입자는 얼음 바스에서 10 분 동안 초음파 분산한 후 4 °C에서 보관한다.

[0062] 실시예 1-3. 자성나노 입자 표면에 글루탐산 활성화 (GA-SPIONs)

[0063] 실시예 1-2에서 합성한 수산기가 활성화된 자성나노입자 10 mL (총 중량 100 mg)에 100 mg의 글루탐산을 첨가한 후 실온에서 3 시간 반응한다. 결합되지 않은 미반응물은 분자량 1,200 cut off 가능한 다이알리시스 백을 사용하여 2 일 동안 세척하여 제거한다.

[0064] 실시예 1-4. 자성나노 입자 표면에 히알루론산 활성화 (HA-SPIONs)

[0065] 96 mg EDC, 15 mg NHS 그리고 3 mL 히알루론산을 실시 예 1-3에서 제조된 글루탐산 활성화된 자성나노입자 5 mL (총 중량 50 mg)와 혼합하여, 상온에서 4 시간 동안 교반한다. 결합되지 않은 미 반응물은 분자량 1,200 cut off 가능한 다이알리시스 백을 사용하여 2 일 동안 세척하여 제거한 후, 4 °C에서 보관한다.

[0066] (비교예)

[0067] 비교예 1. 아가로스 결합된 자성나노입자의 제조 (AgA-SPIONs)

[0068] 실시예 1과 동일하게 실시하되, 실시예 1-4에서 사용한 히알루론산 대신 아가로스 사용하였다.

[0069] (실험예)

[0070] 자성나노입자의 평가

[0071] 일반적으로 자성나노입자의 평가는 투과전자 현미경을 이용하여 입도 및 입형을 관찰하였으며 다이아몬드가 부착된 ATR이 장착된 FT-IR 스펙트럼을 이용하여 각각의 반응스텝이 진행되는 동안 자성나노입자의 표면의 작용기 활성화 여부를 측정하였다. 또한 제타 전위측정에 의해 작용기가 활성화된 자성나노입자의 수용액 상에서의 표면 전하값의 변화를 pH를 변화시키며 측정하였다. 또한 히알루론산 활성화된 자성나노입자의 세포내 uptake특성 및 독성실험을 실시하였으며, 공침현미경을 이용하여 형광표지를 붙인 HA-SPIONs의 세포내 uptake를 관찰 하였다.

- [0072] 투과전자 현미경을 이용한 입경 및 입형 측정
- [0073] 상기 실시예 1에 의한 공침 반응에 의해 합성 되어진 초상자성 산화물 자성나노입자를 투과전자 현미경 JEOL 2100F (200 kV)을 이용하여 관찰하였으며, 이는 도 1에 나타내었다.
- [0074] 본 발명의 도 1 A를 통해, 초상자성 산화물 자성나노입자의 평균크기는 8.7nm의 구형 형상을 나타내며, 자성나노입자의 크기는 최대 15 nm를 넘지 않아 혈관내 주사에 용이한 것으로 사료된다.
- [0075] FTIR을 이용한 표면의 작용기 활성화 및 결합여부 측정
- [0076] 도 2는 상기 실시 예 1-1 내지 1-4의 각 단계에 따른 자성나노입자의 표면형태를 도시한 것이며, 도 3은 실시예 1을 통해 얻어진 초상자성 산화물 자성나노입자를 ATR이 장착된 FT-IR 스펙트럼 (Bruker Alpha FTIR)로 밴드 값을 측정한 결과를 나타내었다.
- [0077] 도 3은 실시 예 1-1에서 제조된 자성 나노입자 (B-SPIONs), 실시 예 1-2에서 제조된 자성나노입자 (OH-SPIONs), 실시 예 1-3에서 제조된 자성나노입자 (GA-SPIONs) 및 실시 예 1-4에서 제조된 그리고 자성 나노입자 (HA-SPIONs)의 FTIR 스펙트럼을 나타내었다. 결과적으로 HA-SPIONs 스펙트럼에서 보면 $1,030\text{ cm}^{-1}$ 에서 나타나는 C-N 스트레칭은 1차 아민과 연관된 것으로 GA-SPIONs 표면에 히알루론산이 전부 결합되지 않은 것이며, 이는 결과적으로 HA-SPIONs 표면에 카복실기와 아민기가 모두 활성화 되어 있는 상태로 추가적인 생체분자를 결합시키는 데는 더 많은 장점이 있다.
- [0078] 입자표면전하 분석 및 안정화 여부 측정 상기 실시 예 1-1 내지 1-4의 단계별로 제조한 자성나노입자의 표면 전하 및 콜로이드 안정성을 제타전위를 사용하여 분석하였으며, 이는 도 4를 통해 확인할 수 있다.
- [0079] 제타전위는 Zeta-Sizer HA300 (Malvern, UK)을 이용하여 측정하였으며, $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 증류수에 분산하였다. pH에 변화에 따른 제타전위 변화값을 측정하기 위해 0.1 N NaOH와 0.1 N HCl을 이용하여 pH를 변화시키며 측정하였다.
- [0080] 본 발명의 도 4는 제조된 공침 합성 후 실시예 1-1에서 제조된 자성 나노입자 (B-SPIONs), 실시 예 1-2에서 제조된 자성나노입자 (OH-SPIONs), 실시 예 1-3에서 제조된 자성나노입자 (GA-SPIONs), 실시 예 1-4에서 제조된 자성 나노입자 (HA-SPIONs) 및 비교 예 1의 자성나노입자(AgA-SPIONs)의 제타전위를 변화를 도시한 것이다.
- [0081] 도 4에서 확인할 수 있듯이, HA-SPIONs의 등전점이 pH 7.3에서 pH 3.1로 크게 낮아 졌으며, pH 3 내지 12의 범위에서 표면 전하값이 0 이하 값을 갖는 것을 알 수 있다. 또한, 비교 예 1의 AgA-SPIONs 경우 등전점이 없으며 표면전하는 0 이하 값을 보여준다. 결과적으로, 제타전위 상으로 pH=5이상의 경우 제타전위 값이 -30 이하로 콜로이드가 침전없이 안정한 것을 알 수 있다.
- [0082]
- [0083] 세포독성 측정
- [0084] 도 5는 실시예 1-1에서 제조된 자성 나노입자 (B-SPIONs), 실시예 1-3에서 제조된 자성나노입자(GA-SPIONs), 실시 예 1-4에서 제조된 자성 나노입자(HA-SPIONs)의 세포독성을 측정한 것이다.
- [0085] 세포독성 측정은 실시예 1을 통해 얻어진 자성나노입자를 DMEM (10 % fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 1 % penicillin/streptomycin)을 이용하여 25 cm^2 세포배양 플라스크에서 습기가 있는 5 % CO_2 , 37 ℃ 분위기하에서 세포를 배양하였다.
- [0086] 본 발명의 도 5에서 확인할 수 있듯이, B-SPIONs 경우 저 농도인 20 $\mu\text{g/mL}$ 에서도 세포독성을 나타내는 반면, HA-SPIONs 경우 10배 많은 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서도 세포 생존률 85 %의 값을 확인할 수 있듯이, 히알루론산이 입자의 표면에 결합되어 코팅되면서 독성이 낮아지는 것으로 사료된다.
- [0087] 자성나노입자 uptake 및 세포생존 측정
- [0088] 상기 실시예 1에서 제조된 HA-SPIONs의 자성나노입자의 세포내 uptake 및 세포 생존 측정을 확인하기 위해 Fluorescein isothiocyanate (FITC)와 HA-SPIONs를 결합하였으며, PKH 26을 사용하여 세포벽을 염색하여 공침 현미경으로 관찰하였다.
- [0089] 세포와 자성나노입자를 배양 후 100 μL 2 μM calcein AM 과 4 μM EthD-1 solution (in PBS)을 세포배양 플

라스크에 첨가한 후 실온 암실에서 30분간 반응하였다. 염색된 세포는 즉시 레이저 공침현미경 (Olympus)을 사용하여 관찰하였다.

[0090] 본 발명에서 도 6은 히알루론산 결합 된 자성나노입자 (HA-SPIONs)에 FITC를 결합한 후 a) 6 시간, b) 8 시간, c) 12 시간, d) 24 시간을 세포 배양 후 공침현미경으로 관찰한 사진이다. 결과적으로, HA-SPIONs의 6 시간 배양 후 A459 세포 멤브레인에 응집되어있는 것을 확인할 수 있으며, 이는 입자 표면의 히알루론산 수용기인 암세포 표면의 CD44와의 친화성 때문인 것으로 사료된다. 8 시간 배양 후 세포내부의 녹색은 HA-SPIONs의 세포외부의 멤브레인 결합 후 세포 내부로 대식작용에 의해 세포내부로 들어간 것을 확인할 수 있다.

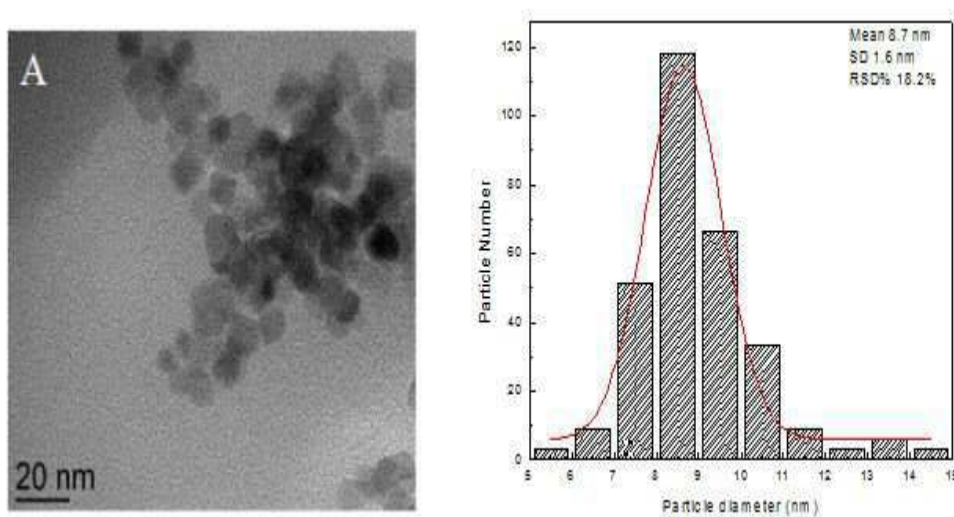
[0091] 철분 농도 분석에 의한 세포내 자성나노입자 uptake 측정

[0092] 상기 실시 예 1에서 제조된 HA-SPIONs이 히알루론산 수용기인 암세포 표면의 CD44와의 친화성 때문에 세포 uptake가 많이 일어난 것인지를 확인하기 위해 비교예 1에서 제조된 AgA-SPIONs을 세포배양 후 세포내부의 철분 농도를 측정하였으며 그 결과는 도 7에 나타내었다.

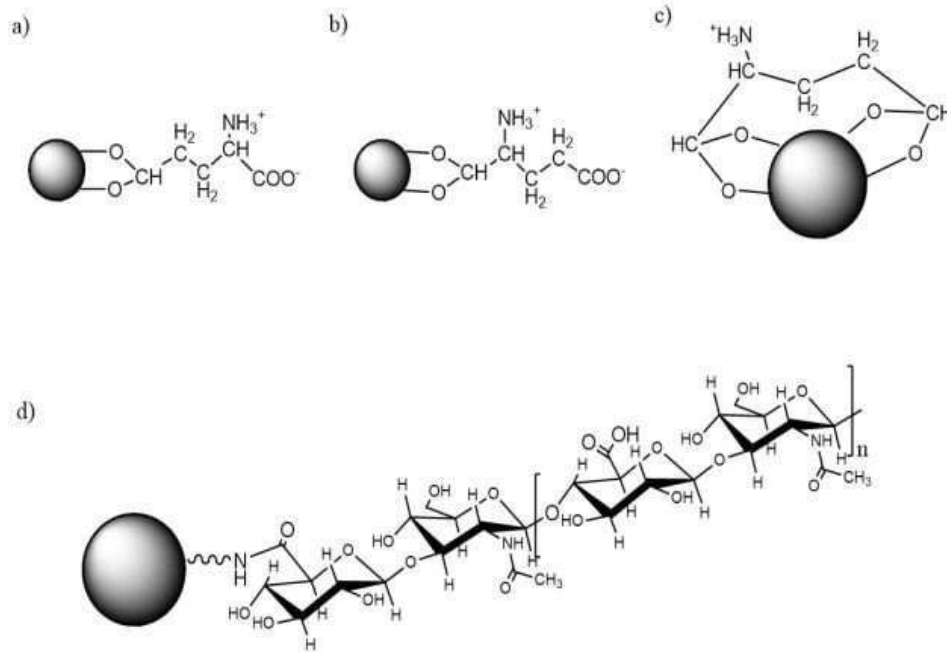
[0093] 결과적으로, HA-SPIONs의 경우 AgA-SPIONs에 비해 상대적으로 많은 철분 농도를 보이고 있으며, 이는 입자 표면의 히알루론산 수용기와 암세포 표면의 CD44와의 친화성 때문인 것으로 사료된다.

도면

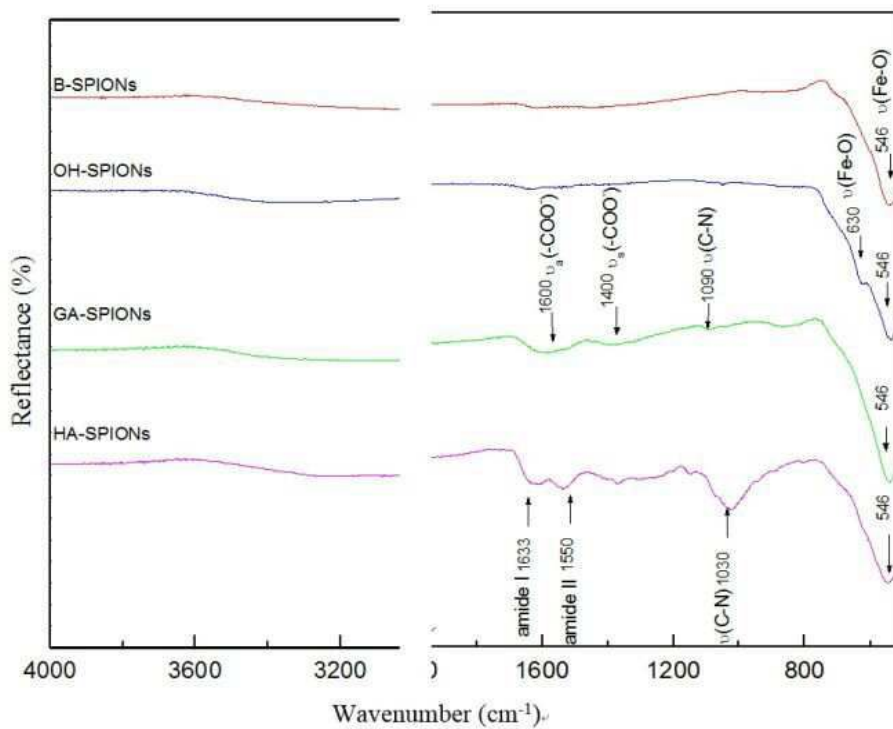
도면1



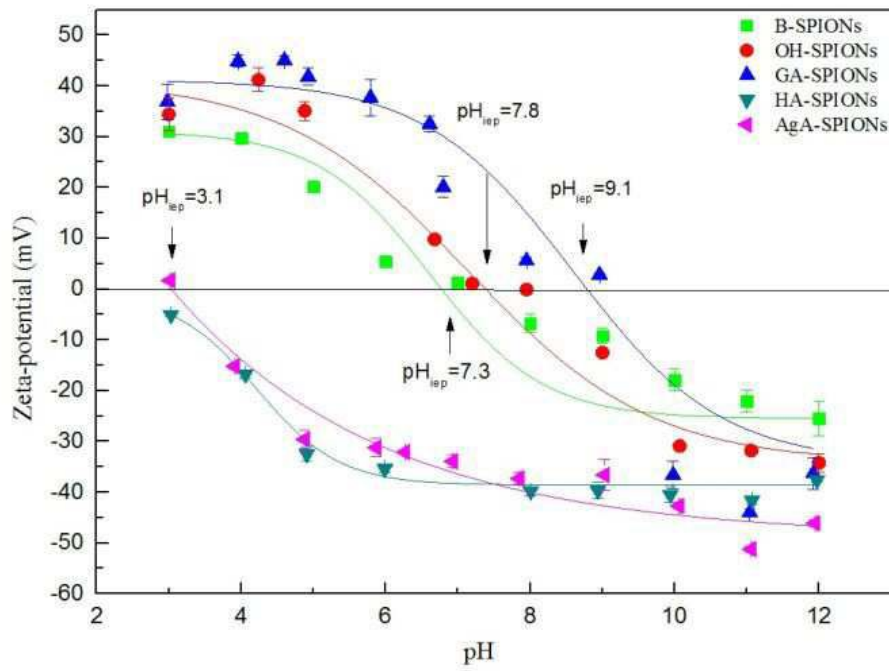
도면2



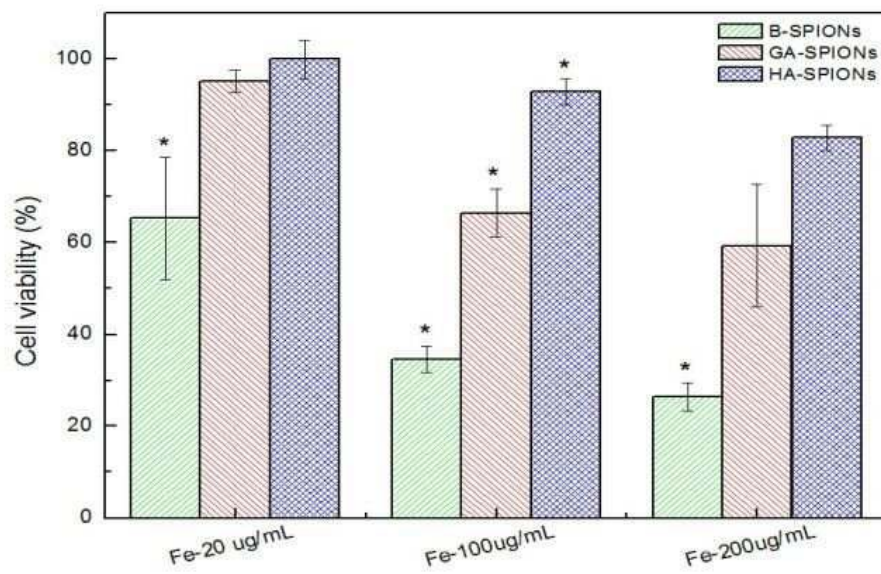
도면3



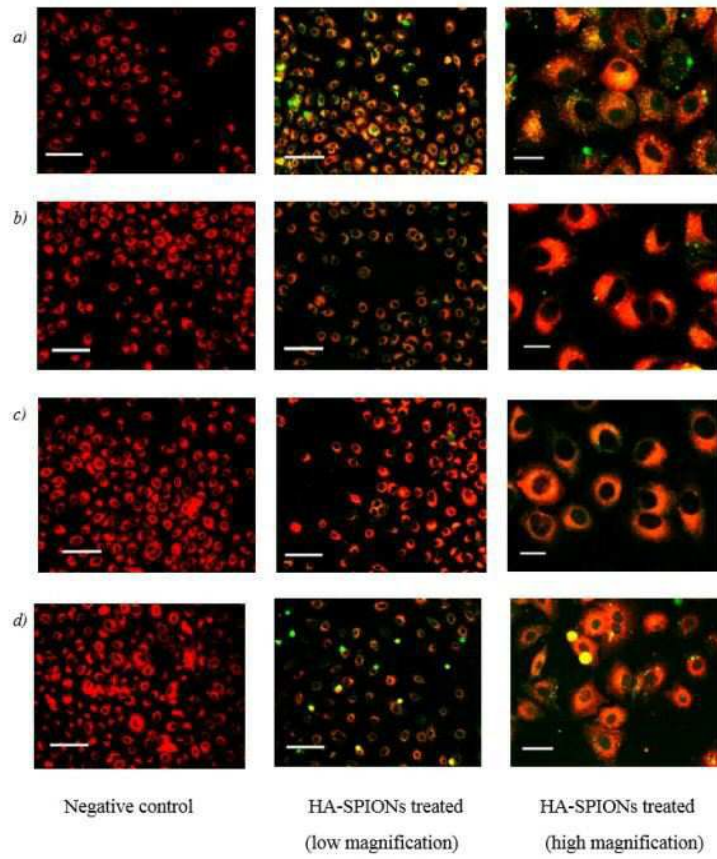
도면4



도면5



도면6



도면7

