



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0045434
(43) 공개일자 2020년05월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G03F 7/20 (2006.01) G03F 1/82 (2012.01)
(52) CPC특허분류
G03F 7/2043 (2013.01)
G03F 1/82 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0131577
(22) 출원일자 2019년10월22일
심사청구일자 2019년10월22일
(30) 우선권주장
1020180125845 2018년10월22일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
봉기완
서울특별시 성북구 안암로 145
양재문
서울특별시 서대문구 연세로 50-1
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
정은열, 김태훈

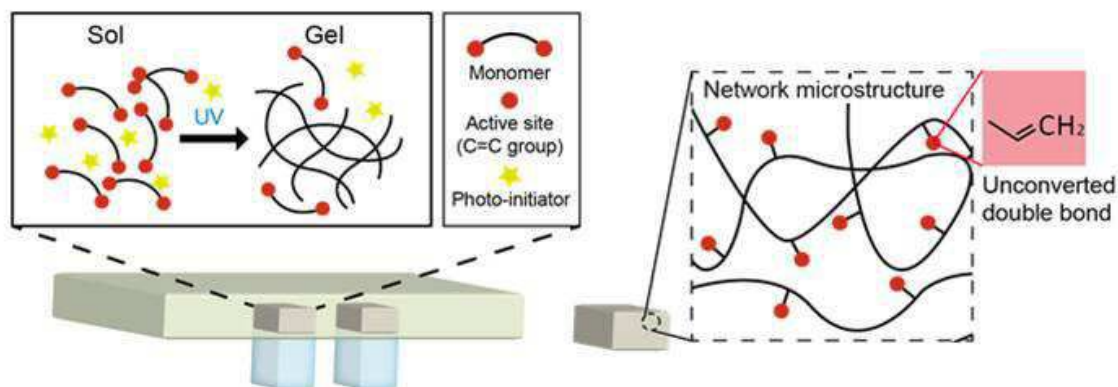
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 미세입자 제조방법

(57) 요약

본 발명은 미세입자 제조방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 미세입자 제조방법은 유체 리소그래피를 이용해, 고분자 네트워크로 이루어지는 미세입자를 합성하는 단계; 및 상기 고분자 네트워크에 연결된 탄소 이중결합 상태의 미반응 말단에, 소정의 결합물질을 결합하는 단계;를 포함한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

문현준

서울특별시 성북구 안암로 145

구민희

서울특별시 서대문구 연세로 50-1

노윤호

서울특별시 성북구 안암로 145

이현지

서울특별시 성북구 안암로 145

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017R1C1B2010867

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공분야기초연구사업-신진연구지원사업

연구과제명 암줄기세포 대사-역학 상관관계 규명 위한 실시간 바이오스코핑 기반 단세포
Mechanotransduction 분석 기술 개발

기 여 율 40/100

주관기관 연세대학교

연구기간 2017.03.01 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2018003676

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 선도연구센터지원사업

연구과제명 ERC 나노-생체유체 검사 연구단

기 여 율 54/100

주관기관 고려대학교

연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017056364

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공분야기초연구사업(신진-유형2)

연구과제명 생체 분자의 고감도 다중 검출을 위한 적층 엔코드 하이드로젤 입자의 개발

기 여 율 6/100

주관기관 고려대학교

연구기간 2017.07.01 ~ 2018.06.30

명세서

청구범위

청구항 1

유체 리소그래피를 이용해, 고분자 네트워크로 이루어지는 미세입자를 합성하는 단계; 및
상기 고분자 네트워크에 연결된 탄소 이중결합 상태의 미반응 말단에, 소정의 결합물질을 결합하는 단계;를 포함하는 미세입자 제조방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,
상기 결합물질은, 고분자 및 생체물질로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 미세입자 제조방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서,
상기 결합물질은, 상기 탄소 이중결합과 결합되는 작용기를 구비하는 미세입자 제조방법.

청구항 4

청구항 3에 있어서,
상기 작용기는, 티올기(thiol group, -SH) 및 아민기(amine group, -NH₂)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 미세입자 제조방법.

청구항 5

청구항 3에 있어서,
상기 결합물질은, 라디칼 반응, 촉매 반응, 또는 용액 상 전자의 이동을 통해, 합성된 상기 미세입자에 가교되는 미세입자 제조방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서,
상기 결합물질이 상기 라디칼 반응을 통해 상기 미세입자에 가교되는 경우, UV 조사를 통한 광개시제의 개시 또는 열에너지를 이용한 열개시제의 개시를 통해 상기 작용기와 상기 탄소 이중결합 사이에 공유결합이 이루어지는 미세입자 제조방법.

청구항 7

청구항 5에 있어서,
상기 결합물질이 상기 촉매 반응을 통해 상기 미세입자에 가교되는 경우, 유기 촉매로 상기 작용기와 상기 탄소

이중결합 사이에 공유결합이 촉매되는 미세입자 제조방법.

청구항 8

청구항 5에 있어서,

상기 결합물질이 상기 용액 상 전자의 이동을 통해 상기 미세입자에 가교되는 경우, 완충용액 또는 극성용매의 전자가 친핵체로 작용하여 상기 작용기와 상기 탄소 이중결합 사이에 공유결합이 이루어지는 미세입자 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 미세입자 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 유체리소그라피로 합성된 미세입자의 미반응 말단 제거를 통해 생체 친화성과 생화학적 안정성이 확보되고, 다수의 미반응 말단을 활용하여 생체 기능성이 부여되는 미세입자 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 복잡한 기하와 생화학적 성질을 갖는 입자는 생체물질의 다중검출(Multiplexed biomolecule sensing), 미세전자 기계 시스템(Microelectromechanical system; MEMS), 자가 조립(Self-assembly), 조직공학(Tissue engineering), 그리고 약물전달(Drug delivery) 등 다양한 분야에서 그 필요성이 대두되고 있다. 입자 합성 기술 중 유체 리소그라피는 다기능성 비대칭 미세입자를 합성하는 기술로 많은 관심을 받고 있다. 하기 선행기술 문헌의 특허문헌에 개시된 바와 같이, 유체 리소그라피는 미세유체 채널 내부에 채워진 전구체에 포토마스크 모양으로 패터닝된 자외선을 조사하여 마스크 모양의 단면을 갖는 미세입자를 합성하는 기술이다. 유체 리소그라피 기술을 통해 합성되는 입자의 단면은 포토마스크의 모양과 크기, 높이는 채널의 높이를 통해 각각 수 μm 에서 수 mm까지 폭넓게 조절될 수 있어, 관형, 등방성 다면체형, 로드(rod) 형, 도넛(donut) 형 등 다양한 모양의 매우 균일한 입자를 합성할 수 있다. 유체 리소그라피가 이루어지는 미세유체 채널 내 전구체의 흐름은 매우 낮은 레이놀즈 수(Reynolds number)를 가져, 서로 다른 흐름이 평행층류(수평 방향), 적층류(수직 방향)로 구조화될 수 있다. 이와 같이 패터닝된 흐름에 자외선을 조사하면 서로 다른 생화학적 성질을 갖는 층이 독립적으로 배열된 입자를 합성할 수 있다.

[0004] 상기 응용 분야 중, 미세입자를 세포 또는 생체 시스템에 활용할 경우(예: 조직공학, 약물전달 등), 입자는 높은 생체 친화성, 생화학적 안정성, 그리고 생체 기능성을 가져야 한다. 위의 세 가지 모두 충족하는 미세입자를 조직공학에 활용할 경우 세포 생장이 극대화될 수 있고, 생체 medium의 성분 또는 대사 산물 등과 반응하지 않아 입자 본연의 성질을 유지할 수 있으며, 세포 또는 생체 시스템에 최적화된 환경을 부여할 수 있다. 이와 같이 생체 친화성, 생화학적 안정성, 생물학적 기능성이 부여된 입자는 세포 배양 및 줄기세포의 배양·분화용 스캐폴드(scaffold), 자가 조립이 가능한 입자에 세포를 배양하여 조직공학용 빌딩블록(building block) 등으로 활용될 수 있다. 전술한 세 가지 조건을 충족하는 입자를 약물전달에 활용할 경우, 약물 전달체가 표적화된 조직 외의 정상 조직에 가하는 독성이 최소화되며, 입자가 생체 시스템의 대사산물 등과 부반응을 발생시키지 않아 입자의 생화학적 성질이 변성되지 않고, 입자 표면의 작용기(단백질, 핵산 등)를 활용하여 특정 조직을 표적(targeting)하며 자극(pH, reduction, reactive oxygen species 등)에 반응하여 약물을 방출하는 약물전달시스템(controlled drug delivery system)에 활용될 수 있다. 이와 같이 생체 친화성, 생화학적 안정성, 그리고 생체 기능성을 갖는 다기능성 비대칭 미세입자는 조직공학 혹은 약물전달 등 생체 응용 분야에 적용될 가능성이 매우 높을 것으로 예상된다.

[0005] 그러나 유체 리소그라피 기술을 통해 합성된 미세입자의 경우에는 생체 친화성 및 생화학적 안정성이 떨어지고, 생물학적 기능성을 갖지 못한다. 이는 전구체가 가교될 때 단량체의 탄소 이중결합 작용기의 상당수가 입자 합성 과정에서 반응하지 못한 채로 네트워크에 결합된 "미반응 말단"을 형성하기 때문이다. 이에 종래 유체 리소그라피를 통해 합성되는 입자에 생체 친화성, 생화학적 안정성 및 생체 기능성을 부여하는 기술이 절실히 요구

되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) KR 10-2008-0070684 A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상술한 종래기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로, 본 발명의 일 측면은 유체 리소그래피로 합성된 미세입자의 미반응 말단을 제거하고, 동시에 이를 활용하여 생체 기능성을 부여할 수 있는 미세입자 제조방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명의 실시예에 따른 미세입자 제조방법은 유체 리소그래피를 이용해, 고분자 네트워크로 이루어지는 미세입자를 합성하는 단계; 및 상기 고분자 네트워크에 연결된 탄소 이중결합 상태의 미반응 말단에, 소정의 결합물질을 결합하는 단계;를 포함한다.

[0011] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 미세입자 제조방법에 있어서, 상기 결합물질은, 고분자 및 생체물질로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0012] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 미세입자 제조방법에 있어서, 상기 결합물질은, 상기 탄소 이중결합과 결합되는 작용기를 구비할 수 있다.

[0013] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 미세입자 제조방법에 있어서, 상기 작용기는, 티올기(thiol group, -SH) 및 아민기(amine group, -NH₂)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0014] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 미세입자 제조방법에 있어서, 상기 결합물질은, 라디칼 반응, 축매 반응, 또는 용액 상 전자의 이동을 통해, 합성된 상기 미세입자에 가교될 수 있다.

[0015] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 미세입자 제조방법에 있어서, 상기 결합물질이 상기 라디칼 반응을 통해 상기 미세입자에 가교되는 경우, UV 조사를 통한 광개시제의 개시 또는 열에너지를 이용한 열개시제의 개시를 통해 상기 작용기와 상기 탄소 이중결합 사이에 공유결합이 이루어질 수 있다.

[0016] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 미세입자 제조방법에 있어서, 상기 결합물질이 상기 축매 반응을 통해 상기 미세입자에 가교되는 경우, 유기 축매로 상기 작용기와 상기 탄소 이중결합 사이에 공유결합이 축매될 수 있다.

[0017] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 미세입자 제조방법에 있어서, 상기 결합물질이 상기 용액 상 전자의 이동을 통해 상기 미세입자에 가교되는 경우, 완충용액 또는 극성용매의 전자가 친핵체로 작용하여 상기 작용기와 상기 탄소 이중결합 사이에 공유결합이 이루어질 수 있다.

[0019] 본 발명의 특징 및 이점들은 첨부도면에 의거한 다음의 상세한 설명으로 더욱 명백해질 것이다.

[0020] 이에 앞서 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이고 사전적인 의미로 해석되어서는 아니 되며, 발명자가 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다.

발명의 효과

- [0022] 본 발명에 따르면, 미세입자를 합성한 후에 탄소 이중결합의 미반응 말단을 처리하므로, 본래 입자의 형태를 그대로 유지하고, 입자 합성의 생산성에 영향 없이, 고도의 생체 친화성과 생화학적 안정성을 확보할 수 있다.
- [0023] 또한, 미반응 말단을 활용하여 입자 합성 후 높은 효율의 생체 기능성을 부여할 수 있다. 입자 합성 과정에서 전구체와 생체물질을 혼합하여 생체물질을 탑재하는 경우에는 최적화되지 않은 환경으로 인해 그 기능이 저하될 수 있고, 전구체 내의 분산도 및 탑재된 상태에서의 분산도가 균일하지 않으며, 탑재되는 양이 현저히 적은 반면, 미반응 말단을 활용하여 입자 합성 후 생체물질을 탑재함으로써, 염농도, pH, 온도 등의 탑재 조건을 최적화할 수 있고, 생체물질의 분산을 최적화하는 반응 medium을 활용하여 높은 기능성을 갖는 생체물질을 균일하게 다량 탑재할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 미세입자 합성 및 합성 후 입자 내부에 존재하는 미반응 말단을 도시한 것이다.
- 도 2는 본 발명의 실시예에 따른 티올-엔 클릭 반응을 이용한 미반응 말단의 처리 및 정량화 반응을 도시한 것이다.
- 도 3은 본 발명의 실시예에 따른 미반응 말단의 정량화 반응 결과 그래프이다.
- 도 4는 유체 리소그래피의 UV 조사 강도 및 시간에 따른 미반응 말단 양의 변화 추이를 나타내는 그래프이다.
- 도 5는 본 발명의 실시예에 따른 미반응 말단 처리의 생화학적 안정성 평가 결과이다.
- 도 6은 본 발명의 실시예에 따른 미반응 말단 처리의 세포 독성 평가 결과이다.
- 도 7은 본 발명의 실시예에 따른 아자-마이클 첨가 반응을 이용한 생체 기능성 부여 반응을 도시한 것이다.
- 도 8은 본 발명의 실시예에 따라 스트렙트아비딘이 탑재된 미세입자의 현미경 관찰 이미지이다.
- 도 9는 본 발명의 실시예에 따라 스트렙트아비딘이 미세입자의 미반응 말단과 반응한다는 것을 확인한 그래프이다.
- 도 10은 본 발명의 실시예에 따른 아자-마이클 첨가 반응을 이용하여 스트렙트아비딘을 탑재하는 경우의 스트렙트아비딘 농도에 따른 탑재량을 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 본 발명의 목적, 특정한 장점들 및 신규한 특징들은 첨부된 도면들과 연관되어지는 이하의 상세한 설명과 바람직한 실시예들로부터 더욱 명백해질 것이다. 본 명세서에서 각 도면의 구성요소들에 참조번호를 부가함에 있어서, 동일한 구성 요소들에 한해서는 비록 다른 도면상에 표시되더라도 가능한 한 동일한 번호를 가지도록 하고 있음에 유의하여야 한다. 이하, 본 발명을 설명함에 있어서, 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 관련된 공지 기술에 대한 상세한 설명은 생략한다.
- [0027] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시형태를 상세히 설명하기로 한다.
- [0029] 본 발명에 따른 미세입자 제조방법은 유체 리소그래피를 이용해, 고분자 네트워크로 이루어지는 미세입자를 합성하는 단계; 및 상기 고분자 네트워크에 연결된 탄소 이중결합 상태의 미반응 말단에, 소정의 결합물질을 결합하는 단계;를 포함한다.
- [0031] 본 발명은 조직공학 또는 약물전달 분야에 적용 가능한 기술로서, 보다 상세하게는 세포 배양 스캐폴드, 조직공학용 빌딩블록, 또는 체내 약물 전달을 위한 약물전달체 등에 요구되는 생체 적합성, 생화학적 안정성, 그리고 생체 기능을 보유한 미세입자의 합성 및 개질 방법에 관한 것이다. 상기의 세 가지 요건이 모두 충족된 미세입자는 세포 배양 스캐폴드 혹은 조직공학용 빌딩블록에서 세포 성장을 극대화하며 수 있고, 대사산물 등과 반응

하지 않아 보다 장기적인 사용이 가능하며, 세포 또는 생체 시스템에 최적화된 환경을 부여할 수 있다. 또한, 약물전달체로 개질된 미세입자를 활용할 경우 미반응 말단에 의한 독성이 최소화되어 표적화된 조직 및 세포 외의 타 조직 및 세포에 가해지는 부작용이 감소하며, 생체 시스템 내의 대사산물 등과의 부반응으로 입자의 생화학적 성질이 변성되지 않아, 특정 조직 및 세포 표적과 약물방출 성능이 증가될 수 있다. 한편, 미세입자의 합성 기술 중에는 유체 리소그래피가 다기능성 비대칭 미세입자를 합성하는 기술로서 많은 관심을 받고 있지만, 입자의 고분자 네트워크를 구성하기 위해 사용되는 단량체의 탄소 이중결합 작용기가 그 네트워크에 연결되어 합성된 입자 내부에 잔존하므로, 유체 리소그래피에 의해 합성된 입자는 세포 독성과 생화학적 불안정성을 보인다. 이에 유체 리소그래피로 합성된 입자의 세포 독성 및 반응성 문제를 해결하기 위한 방안으로서 본 발명이 안출되었다.

[0032] 구체적으로, 본 발명에 따른 미세입자 제조방법은, 미세입자 합성 단계, 및 결합물질 결합 단계를 포함한다.

[0034] 미세입자 합성 단계는, 유체 리소그래피를 이용해 미세입자를 합성하는 공정이다. 유체 리소그래피를 이용해 미세입자를 합성하기 위해서는, 전구체 유체를 마이크로 채널 내로 흘려준 뒤, 마스크를 이용해 채널 내 유체에 UV를 조사한다. 여기서, 전구체 유체는 탄소 이중결합(C=C) 작용기(functional group)를 갖는 광경화성 단량체 및 광개시제를 포함한다. 상기 탄소 이중결합 작용기의 일례로는, 메타아크릴레이트(methacrylate), 말레이미드(maleimide), 비닐술폰(vinyl sulfone), 아크릴레이트(acrylate), 아크릴아미드(acrylamide) 등을 들 수 있다. 또한, 전구체 유체는 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol)과 같은 공극제(porogen)를 더 포함할 수 있고, 이들을 분산시키는 용매로서 탈이온수(DI water)를 사용할 수 있다.

[0035] 이러한 전구체 유체를 사용하여 합성된 미세입자는 광경화성 단량체들이 그물망 형태의 네트워크 구조로 중합된 고분자로 형성된다. 즉, 유체 리소그래피를 통해 합성된 미세입자는 고분자 네트워크로 구성된다. 여기서, 단량체의 탄소 이중결합이 달린 작용기는 세포 독성을 야기하며, 반응성이 높고, 생화학적으로 불안정한 상태에 있지만, 입자가 합성될 때 그 탄소 이중결합이 cross-linking 되며 네트워크를 형성하고, cross-linking 반응을 이룬 탄소 이중결합은 독성과 반응성이 매우 적은 단일결합으로 전환된다. 그러나 유체 리소그래피에서 전구체에 함유된 단량체의 모든 작용기가 전환되는 것은 아니며, 일부 반응하지 못한 탄소 이중결합이 존재한다. 반응하지 않은 탄소 이중결합의 일부는 네트워크에 결합된 상태인데, 단량체의 작용기의 일부가 반응하여 네트워크에 가교되었으나 해당 단량체의 반응하지 않은 작용기가 잔존한다. 이와 같이 반응하지 못하고 네트워크에 연결되어 잔존하는 탄소 이중결합 작용기를 미반응 말단이라고 정의한다. 이러한 미반응 말단은 입자 합성 후 린싱 과정에서도 제거되지 않으므로, 유체 리소그래피를 통해 합성되는 미세입자에도 미반응 말단이 존재하게 된다. 따라서, 유체 리소그래피에 의해 합성된 미세입자의 생체 친화성, 및 생화학적 안정성을 보장할 수 없다.

[0037] 결합물질 결합 단계는, 합성된 미세입자에 소정의 결합물질을 결합하는 공정이다. 여기서, 결합물질은 미반응 말단을 처리하고, 생체 기능성을 부여하기 위해 사용되는 물질로서, 고분자 및 생체물질로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함할 수 있다. 이에 따라 유체 리소그래피로 합성된 입자에 포함된 미반응 말단의 세포 독성 문제를 현저히 줄이고, 입자의 화학적 성질을 보존할 수 있다. 또한, 그 미반응 말단을 활용하여 입자에 생체 기능성을 부여할 수 있다. 즉, 미반응 말단에 RGD 반복서열, 인테그린(integrin), ECM 등과 같은 세포 부착성 물질을 코팅하거나 특정 조직을 표적화하는 물질을 가교할 수 있는 모델 반응을 제시할 수 있다.

[0038] 여기서, 결합물질은 미반응 말단의 탄소 이중결합과 결합할 수 있는 작용기를 구비하여, 합성된 미세입자에 가교될 수 있다. 이때, 입자에 잔존하는 미반응 말단은 아래의 반응을 통해 처리된다.

[0039] [미반응 말단 처리 반응]

[0040] 네트워크(PEG)-C=C (탄소 이중결합 상태의 미반응 말단) + 작용기-고분자 또는 생체물질 → 네트워크-고분자 또는 생체물질 (공유결합 또는 강한상호작용(strong interaction)으로 결합됨)

[0042] 이렇게 탄소 이중결합과 결합하는 결합물질은 티올기(thiol group, -SH) 및 아민기(amine group, -NH₂)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 작용기를 구비할 수 있다. 이 경우, 탄소 이중결합과 티올 사이의 반응을 위해 티올-엔 클릭 반응(thiol-ene click reaction)을 활용하는데, 티올-엔 클릭 반응은 반응 속도가 매우 빠르고, 수율이 거의 100%에 달하며, 반응 과정에서 부반응 또는 부산물 등을 수반하지 않는 장점이 있다.

한편, 탄소 이중결합과 아민 사이의 반응을 위해서는 아자-마이클 첨가 반응(aza-michael addition reaction)을 활용할 수 있다.

[0044] 이러한 반응은 라디칼 반응, 축매 반응, 또는 자발적으로 이루어지는 반응으로써, 결합물질이 합성된 미세입자에 가교될 수 있다.

[0045] 라디칼 반응에 의하는 경우, 입자를 물 또는 용매 등의 medium에 분산시키고, 라디칼 반응을 통해 미반응 말단과 반응할 수 있는 작용기가 달린 고분자 또는 생체물질을 더하여 분산시킨 후에, 광개시제 혹은 열개시제를 첨가하고, 일정 시간 동안 빛(UV) 또는 열에너지를 가함으로써, 탄소 이중결합과 상기 작용기 사이에 공유결합을 유도한다. 이를 통해, 고분자 또는 생체물질이 입자에 탑재되며 미반응 말단이 제거된다. 축매 반응은 축매로 매개되는 반응으로서, 상기 라디칼 반응의 개시제 대신에 유기 축매를 활용함으로써, 탄소 이중결합과 상기 작용기 사이에 공유결합을 유도하여 고분자 또는 생체물질을 탑재시키고 미반응 말단을 제거할 수 있다. 자발적으로 이루어지는 반응은 라디칼 또는 축매 등에 민감한 생체물질 등을 탑재할 때에 적합한 반응으로서, 용액 상 전자의 이동을 통해 결합물질을 미세입자에 가교시킨다. 이 경우, 완충용액 또는 극성용매의 전자가 친핵체로 작용하여 상기 작용기와 탄소 이중결합 사이에 공유결합이 이루어진다. 이때, 탑재할 생체물질이 안정적으로 보존될 수 있는 온도를 선택할 수 있는데, 바람직하게는 0 내지 90 ℃가 적합하다. 완충용액을 사용하는 경우에는 pH 또한 마찬가지로 최적 범위를 선택하는데, 일례로 pH 7 ~ 9 조건을 사용할 수 있다. 일실시예로서, 티올-엔클릭 반응의 경우에는 35 ~ 40℃, pH 7 ~ 8 조건으로, 아자-마이클 첨가 반응의 경우에는 20 ~ 30℃, pH 8 ~ 9 조건으로 수행할 수 있다.

[0047] 이하에서는 구체적인 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0049] 실시예 1: 유체 리소그래피를 통한 미세입자 합성

[0050] 1-1: 미세유체 장치의 제작

[0051] 미세입자 합성을 위한 미세유체 장치를 오토캐드(AutoCAD, Autodesk, 미국)를 이용하여 설계하고, 포토마스크 필름(Han&All Technology, 한국)에 프린트하였다. 음성 포토레지스트 SU-8 25(Microchem, 미국)로 코팅된 실리콘 웨이퍼를 이용하여 일반적인 포토리소그래피 공정으로 SU-8 마스터 몰드를 제작하였다. 미세유체 장치의 패턴을 포함하는 SU-8 마스터의 두께를 24 μ m로 설계하였다. 10:1의 비율로 경화제와 혼합된 PDMS(Polydimethylsiloxane, Sylgard 184, Corning, 미국)를 SU-8 마스터 몰드에 부어, 70℃에서 8시간 동안 경화시켰다. 경화 공정 후에, 생검 펀치(직경 1 mm)로 구멍이 뚫린 패널로의 유체의 주입을 위하여 PDMS 슬랩(slab)을 SU-8 마스터 및 구멍으로부터 제거하였다. 그리고 나서, PDMS 슬랩을 부분적으로 경화된 PDMS-코팅된 슬라이드(20분, 70℃)와 결합시켰다. 최종적으로, 완전한 경화를 위하여 PDMS 장치를 밤새 굳혔다.

[0053] 1-2: 미세입자의 합성

[0054] 정지 유체 리소그래피(Stop Flow Lithography, SFL)를 통해 미세입자를 합성하였다. 간략하게, SFL을 수행하기 위하여, 미세유체 장치 내 유체의 흐름을 제어하기 위한 광원 및 압력 조절기(ITV0031-3BL, SMC pneumatics, 일본)로서 UV 발광 다이오드(Thorlabs, 영국)를 사용하였다. 동기화된 방식으로 UV LED 및 압력 조절기를 제어하기 위하여 자체 제작된 회로 보드 및 랩뷰(LabView, National Instrument, 미국) 코드를 사용하였다. 역전 현미경(Axiovert 200, Zeiss, 독일)에 탑재된 필름 포토마스크(Hanall Technology, 한국)를 통해 UV LED에 의해 미세입자를 합성하였다. SFL 동안, 전구체 용액이 채널 안에 정지할 때, UV(4 mW/cm²)의 주기적 방출(50 ms)에 의해 입자를 합성하였다.

[0055] 전구체 용액은 20% (v/v) PEG700DA(polyethylene glycol diacrylate, Sigma Aldrich, 미국), 공극제(porogen)로서 40% (v/v) PEG200(Polyethylene glycol, Sigma Aldrich), 광개시제로서 5% Darocur 1173(Sigma Aldrich), 35% 탈이온수(DI water)로 구성되었다. 합성된 수화겔 입자를 5x PBS 완충용액(Sigma Aldrich) 및 0.05% (v/v) 트윈-20(Sigma Aldrich)으로 구성된 200 μ l의 혼합물(5x PBST 완충용액)로 미리 채워진 마이크로 튜브관에 수집하였다. 수집된 입자를 약 1분 동안 불텍상하고 원심분리하였다. 그 후 150 μ l의 상청 완충용액을

제거하고, 같은 부피의 새로운 5x PBST에 재부유하여 입자를 행구었다. 행구는 단계를 5번 반복하였다. 최종적으로, 사용 전에, 140 μ l의 5x PBST에 미세입자를 저장하였다.

[0057] 실시예 2: 티올-엔 클릭 반응을 통한 미반응 말단의 처리 및 정량화

[0058] 2-1: FITC-PEG-SH와의 반응

[0059] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 미세입자 합성 및 합성 후 입자 내부에 존재하는 미반응 말단을 도식한 것이고, 도 2는 본 발명의 실시예에 따른 티올-엔 클릭 반응을 이용한 미반응 말단의 처리 및 정량화 반응을 도식한 것이다.

[0060] 실시예 1에 따라 미세입자를 합성한 다음에, 반응하지 않은 단량체, 공극제, 광개시제 등을 제거하기 위해서, 입자를 과량의 물과 에탄올 수용액을 이용하여 린싱했다. 도 1 내지 도 2와 같이, 티올-엔 클릭 반응을 활용하여 형광으로 표지된 thiol (fluorescein isothiocyanate-poly(ethylene glycol)-thiol; FITC-PEG-SH)을 입자의 미반응 말단과 반응시켜 입자에 탑재시키고, 반응하지 않은 FITC-PEG-SH를 린싱했다. 이때 입자의 공극이 FITC-PEG-SH 보다 작을 경우 미반응 말단의 정량화가 어렵기 때문에 입자의 공극 크기를 최적화하여 FITC-PEG-SH의 물질전달 및 반응을 보장하였다.

[0062] 2-2: FITC-PEG-Acrylate와의 반응

[0063] 실시예 1에서 합성된 미세입자에, FITC-PEG-SH와 유사한 분자량을 가졌으나 주어진 반응 조건에서 미반응 말단과 반응할 수 없는 FITC-PEG-Acrylate를 대조군으로 반응시켰다.

[0065] 2-3: 유체 리소그래피 과정에서 UV의 강도 및 조사시간 조절

[0066] 실시예 1에서, UV 강도를 650 ~ 1100 mW/cm² 범위에서, 조사시간을 40 ~ 160 ms 범위에서 조절하면서, 합성 조건에 따른 미반응 말단의 양을 비교하였다.

[0068] 2-4. 미반응 말단의 처리 효과 검증

[0069] 도 3은 본 발명의 실시예에 따른 미반응 말단의 정량화 반응 결과 그래프이고, 도 4는 유체 리소그래피의 UV 조사 강도 및 시간에 따른 미반응 말단 양의 변화 추이를 나타내는 그래프이다.

[0070] FITC-PEG-SH가 탑재된 입자와 FITC-PEG-Acrylate가 탑재된 입자의 형광을 측정하여 미반응 말단의 양을 정량화하고, 그 결과를 도 3에 나타냈다. 그 결과를 살펴보면, FITC-PEG-Acrylate에 비해 FITC-PEG-SH와 반응시킨 경우 약 100배 강한 형광을 나타냈다. 이는 FITC-PEG-SH가 티올-엔 클릭 반응에 의해 탑재되었음을 내포한다.

[0071] 한편, 리소그래피 과정에서 자외선의 강도 및 조사시간을 조절하며 미반응 말단의 상대적인 양을 비교한 도 4를 참고하면, 합성 조건에 따라 서로 다른 미반응 말단의 양을 갖고, 자외선의 강도가 약하고 조사시간이 길어질수록 미반응 말단 양이 감소하였지만, 자외선 조사 조건을 조절하더라도 미반응 말단을 모두 없앨 수는 없다는 것을 알 수 있다. 또한, 낮은 자외선 강도로 160 ms 보다 긴 시간 동안 자외선을 조사할 경우, 미세유체 채널 내 전구체의 미미한 흐름으로 인해 입자의 형태가 원하는 것과 다르게 형성될 뿐 아니라 입자 합성의 생산성이 크게 감소하였다.

[0072] 결국, 유체 리소그래피를 통해 합성된 미세입자에는 많은 양의 미반응 말단이 존재하고, 본 발명에 따른 티올-엔 클릭 반응을 활용한 미반응 말단 처리 기술을 통해서 높은 반응속도와 수율로, 부산물을 생성하지 않고 미반응 말단을 대부분 제거할 수 있음을 알 수 있다. 이 외에도, 티올-엔 클릭 반응은 광범위한 온도와 pH에서 원활히 이루어지므로, 입자의 기존 함유 성분(생체물질, 약제 등)에 최적화된 반응 조건에서 미반응 말단을 처리할 수 있으며, 세포 부착성 물질 또는 약물 표적전달에 사용될 targeting group 등 생체물질에 최적화된 온도와 pH 등의 조건에서 입자에 탑재할 수 있다. 티올-엔 클릭 반응 이외에도 미반응 말단의 탄소 이중결합과 결합하는 작용기를 활용하는 적합한 반응을 설계하여 입자에 존재하는 미반응 말단을 없애거나 생체 기능성을 부여할 수 있다.

- [0074] 2-5. 입자의 반응성 및 세포 독성 평가
- [0075] 도 5는 본 발명의 실시예에 따른 미반응 말단 처리의 생화학적 안정성 평가 결과이다. 도 5의 (좌)는 유체 리소 그라피로 합성된 다층 구조(Red/Blue/Blank)의 입자의 현미경 관찰 이미지이고, 도 5의 A는 미반응 말단이 처리 되지 않은 입자에 FITC-PEG-SH를 반응시킨 후의 현미경 관찰 이미지이며, 도 5의 B는 미반응 말단이 처리된 입 자에 FITC-PEG-SH를 반응시킨 후의 현미경 관찰 이미지이다.
- [0076] 도 6은 본 발명의 실시예에 따른 미반응 말단 처리의 세포 독성 평가 결과이다. 도 6의 A는 세포 생존성 도표로 서, 미반응 말단이 처리되지 않은 입자(untreated)의 경우는 주황색과 적색으로, 미반응 말단이 처리된 입자 (treated)의 경우는 하늘색과 청색으로 표시했다. 도 6의 B는 생존하는 세포 수를 나타내는 이미지이다.
- [0077] 도 5의 (A)는 미반응 말단이 처리되지 않을 경우 Blue/Red/Blank 형광을 갖는 다층 입자가 Green 형광을 띄는 FITC-PEG-SH와 반응하여 입자 본래의 형광 패턴을 확인하기 어려운 것을 보여준다. 이 결과는 입자에 포함된 미 반응 말단이 생체 시스템 내에서 반응하여 입자 본래의 성질이 변화될 수 있음을 시사한다. 또한, 도 6 (untreated)는 미반응 말단이 처리되지 않은 입자가 세포에 야기하는 독성 효과를 나타내며, 배양계에 입자의 농도(혹은 미반응 말단의 농도)가 높아짐에 따라 세포 생존성이 크게 감소하는 것을 보여준다. 반면, 미반응 말 단이 처리된 입자의 경우, 반응성이 크게 감소하여 FITC-PEG-SH와 반응하지 않아 입자 본래의 형광 패턴이 명확 히 드러나며(도 5의 B 참조), 세포 독성이 현저히 감소하여 90% 수준의 생존성이 확보되는 것을 확인하였다(도 6의 (treated) 참조).
- [0079] 2-6. 미반응 말단을 활용한 생체 기능성 부여 시사
- [0080] 도 4에서 유체 리소그라피를 통해 합성된 입자에 상당수의 미반응 말단이 존재함을 확인하였다. 또한, 도 5의 A 에서 입자 합성 중에 탑재된 Red 또는 Blue 형광보다 미반응 말단과 반응하여 탑재된 Green 형광이 현저히 높은 신호를 보이는 것을 확인하였다. 따라서, 미반응 말단을 활용하여 생체물질을 탑재할 경우, 합성 과정에서 함유 되는 것보다 현저히 많은 양을 함유시킬 수 있다. 또한, 합성 과정에서 생체물질을 직접 탑재하기 위해서는 생 체물질이 전구체와 혼합되어야 한다. 하지만, 단백질, 핵산, 항체 등의 생체물질들은 분산매의 염농도, pH, 온 도 등에 매우 민감할 수 있을 뿐 아니라 특히 개시제와 단량체에 대한 상용성이 떨어진다. 따라서, 입자 합성 중 생체물질을 탑재할 경우, 최적화되지 않은 환경으로 인해 그 기능이 저하될 수 있으며, 전구체 내의 분산도 및 탑재된 상태에서의 분산도가 균일하지 않으며, 직접 탑재되는 양은 미반응 말단으로 반응시키는 양에 비해 현저히 적다. 반면, 미반응 말단을 활용하여 입자 합성 후에 생체물질을 탑재할 경우에는 염농도, pH, 온도 등 의 조건을 최적화할 수 있으며, 탑재할 생체물질의 분산을 최적화하는 반응 medium을 활용하면 높은 기능성을 갖는 생체물질을 균일하게 다량 탑재할 수 있다. 본 발명의 실시예에서는 미반응 말단을 활용하여 생체물질을 탑재하는 여러 반응 중에 한 예시로 티올-엔 클릭 반응을 사용하였는데, 티올-엔 클릭 반응은 저온($\sim 0^{\circ}\text{C}$)에서부 터 고온($\sim 100^{\circ}\text{C}$)의 광범위한 온도에서, pH는 산부터 염기까지 폭넓은 범위에서, 물 또는 유기 용매에서 반응이 이루어질 수 있다. 따라서, 사용할 생체물질에 최적화된 온도, pH, 용매를 활용하여 탑재 과정에서 생체물질의 기능성을 유지한 상태로, 매우 균일하게 다량 탑재할 수 있다. 티올-엔 클릭 반응 외에도 적합한 반응을 활용하 여 입자에 생체 기능성을 부여할 수 있다.
- [0082] 실시예 3: 아자-마이클 첨가 반응을 통한 미세입자의 처리 및 생체 기능성 부여
- [0083] 도 7은 본 발명의 실시예에 따른 아자-마이클 첨가 반응을 이용한 생체 기능성 부여 반응을 도시한 것이고, 도 8은 본 발명의 실시예에 따라 스트렙트아비딘이 탑재된 미세입자의 현미경 관찰 이미지이다.
- [0084] 도 7에 도시한 바와 같이, 아자-마이클 첨가 반응을 이용하여 미반응 말단에 아민기를 반응시켜 스트렙트아비딘 (streptavidin)을 결합하였다. 그 반응 후에 biotin-peg-fitc를 통해 스트렙트아비딘의 존재 여부를 확인하였다 (도 8 참조).
- [0086] 도 9는 본 발명의 실시예에 따라 스트렙트아비딘이 미세입자의 미반응 말단과 반응한다는 것을 확인한 그래프이

다. 미세 입자에 아무 처리를 하지 않은 Non-blocked 미세 입자와는 다르게, 사전에 SH-PEG으로 미반응 말단을 제거한 Pre-blocked 미세 입자는 스트렙트아비딘이 결합하지 않는 것을 확인할 수 있었다.

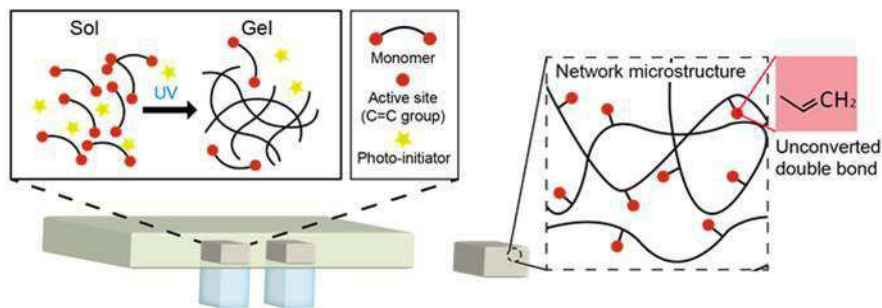
[0088] 도 10은 본 발명의 실시예에 따른 아자-마이클 첨가 반응을 이용하여 스트렙트아비딘을 탑재하는 경우의 스트렙트아비딘 농도에 따른 탑재량을 나타내는 그래프이다. 도 10에서는 스트렙트아비딘 농도를 변화시키면서 입자와 반응한 스트렙트아비딘의 양과, 남아있는 미반응 말단의 양을 정량화하여 표현하였는데, 스트렙트아비딘의 농도가 커질수록 입자와 반응하는 스트렙트아비딘의 양이 증가하고, 입자이 미반응 말단은 감소하는 것을 알 수 있다.

[0090] 이상 본 발명을 구체적인 실시예를 통하여 상세히 설명하였으나, 이는 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명은 이에 한정되지 않으며, 본 발명의 기술적 사상 내에서 당 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의해 그 변형이나 개량이 가능함이 명백하다.

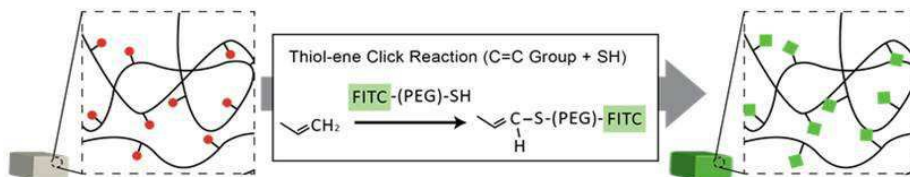
[0091] 본 발명의 단순한 변형 내지 변경은 모두 본 발명의 영역에 속한 것으로 본 발명의 구체적인 보호 범위는 첨부된 특허청구범위에 의하여 명확해질 것이다.

도면

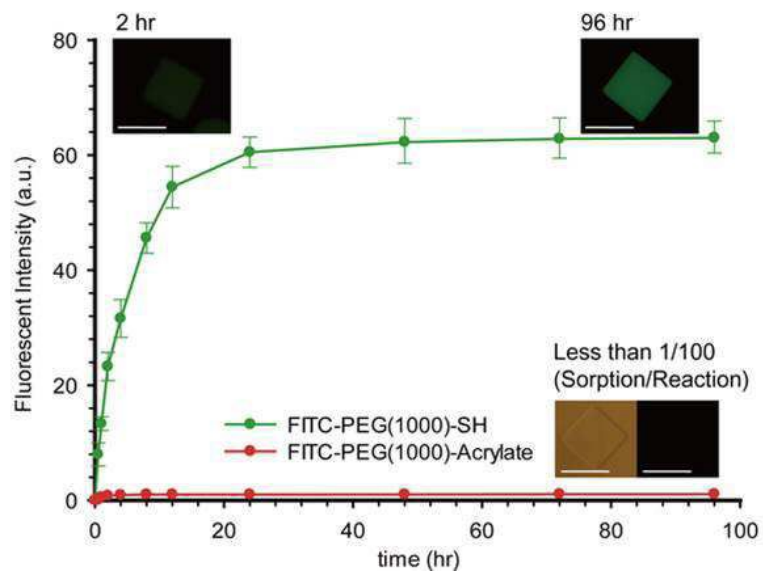
도면1



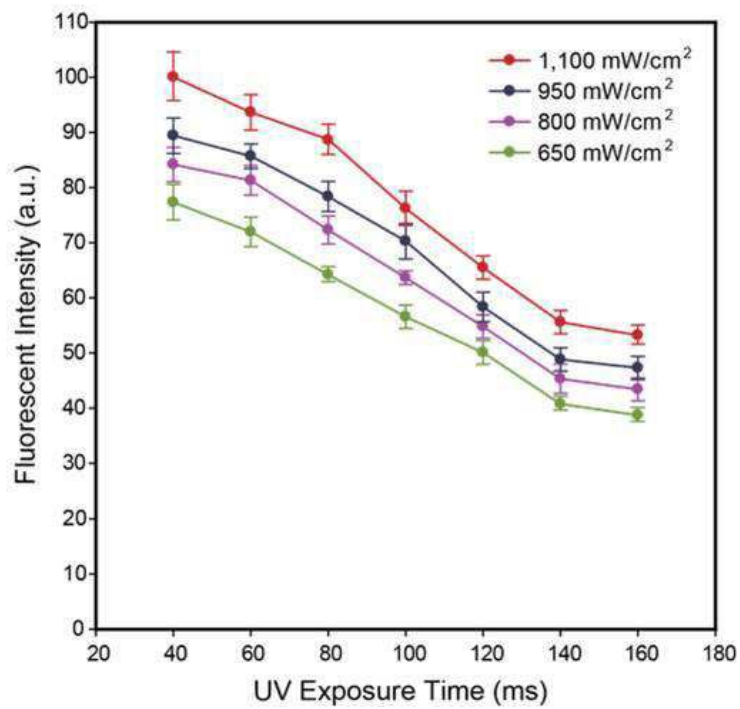
도면2



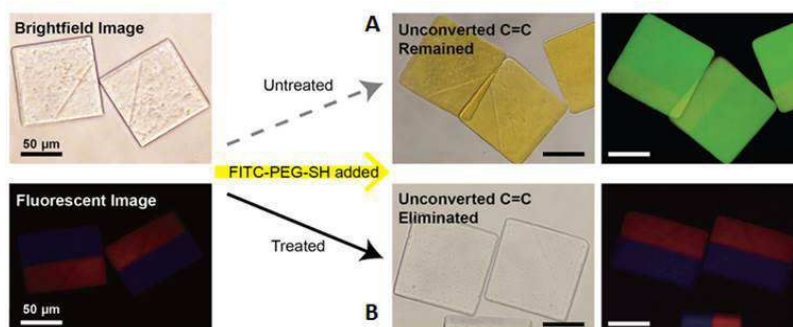
도면3



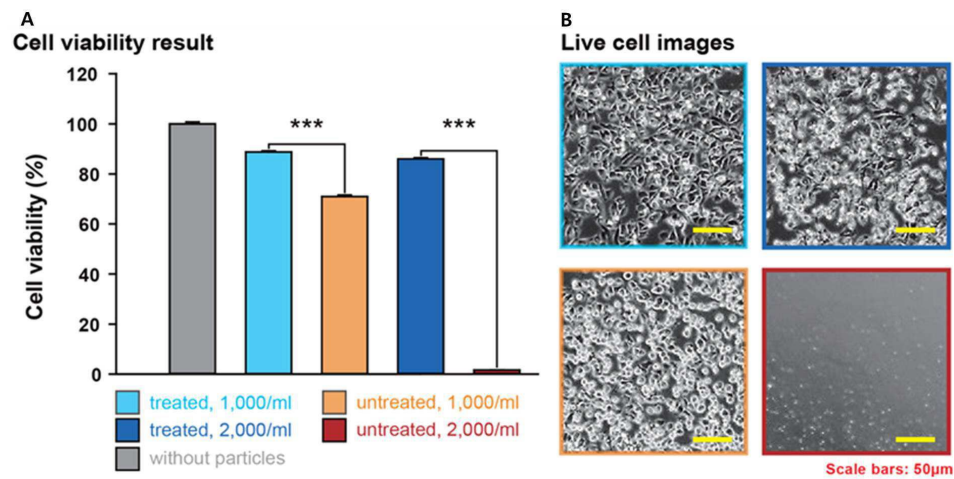
도면4



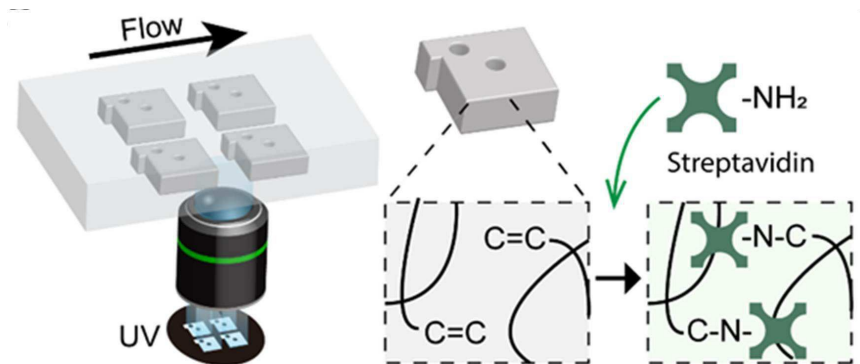
도면5



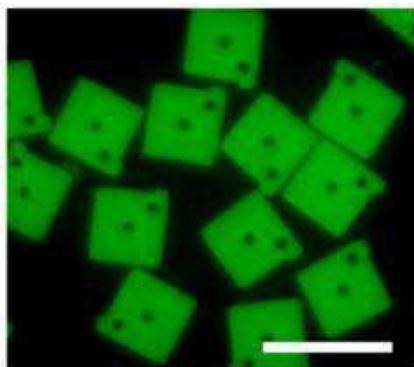
도면6



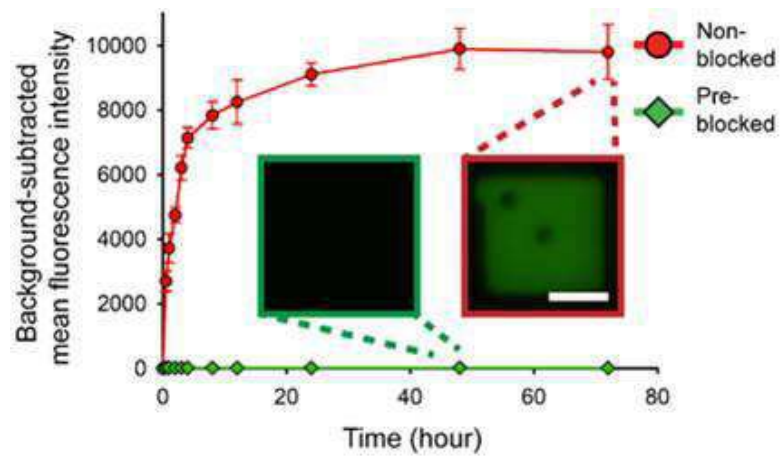
도면7



도면8



도면9



도면10

