



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0030264
(43) 공개일자 2010년03월18일

(51) Int. Cl.

B82B 3/00 (2006.01) C09K 11/06 (2006.01)

G01N 33/553 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0089139

(22) 출원일자 2008년09월10일

심사청구일자 2008년09월10일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교

(72) 발명자

함승주

서울특별시 마포구 상암동 월드컵 파크 아파트
7단지 706동 901호

서진석

서울특별시 서초구 서초동 1436-14(6/4) 서초아이
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인다나

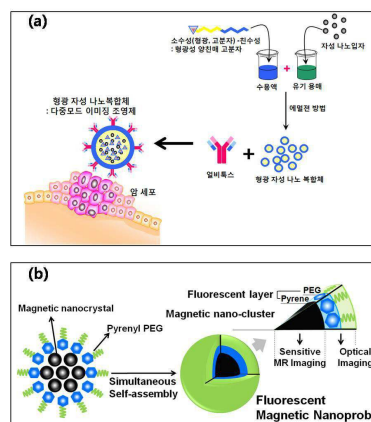
전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 형광 자성 나노복합체 및 그 제조방법

(57) 요약

본 발명은 형광 자성 나노복합체 및 그 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 자성 나노입자를 둘러싸는 형광성의 양친매성 화합물 층을 포함하되, 상기 양친매성 화합물 층에는 조직 특이적 결합성분이 결합할 수 있는 나노복합체로서, 수용액에서 안정하고 우수한 자기적 성질과 높은 형광성을 나타내며 상기 조직 특이적 결합성분에 따른 표적지향이 가능하여 다중모드 조영제 조성물로 사용할 수 있는 표적지향성을 갖는 형광 자성 나노복합체 및 그 제조방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

허용민

서울특별시 광진구 광장동 현대 아파트 501-507

양재문

서울특별시 서대문구 신촌동 134 연세대학교 제1공학관 A143호

임은경

서울특별시 서대문구 신촌동 134 연세대학교 제1공학관 A143호

윤호근

경기도 고양시 덕양구 행신동 소만마을 풍림아파트 801동 205호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2007-8-1158

부처명 한국과학재단

연구사업명 바이오 기술 개발

연구과제명 나노 프로브 기반 테라헤르쯔/광학 다중생체 영상 시스템 개발

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2007년 10월 01일 ~ 2012년 09월 30일

특허청구의 범위

청구항 1

자성 나노입자; 및

형광 물질을 포함하는 하나 이상의 소수성 영역과 하나 이상의 친수성 영역을 가지는 양친매성 화합물을 포함하되,

상기 양친매성 화합물이 자성 나노입자를 둘러싸고 있는 것을 특징으로 하는 자성 나노복합체.

청구항 2

제1항에 있어서,

자성 나노입자는 금속, 자성 물질 또는 자성 합금인 것을 특징으로 하는 자성 나노복합체.

청구항 3

제2항에 있어서,

자성 물질은 Co, Mn, Fe, Ni, Gd, Mo, MM'_2O_4 , 및 M_xO_y (M 및 M'는 각각 독립적으로 Co, Fe, Ni, Mn, Zn, Gd, 또는 Cr을 나타내고, x 및 y는 각각 식 " $0 < x \leq 3$ " 및 " $0 < y \leq 5$ " 을 만족한다.)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는 자성 나노복합체.

청구항 4

제1항에 있어서,

자성 나노입자는 유기성 표면안정제와 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 자성 나노복합체.

청구항 5

제1항에 있어서,

소수성 영역은 형광물질; 또는 형광물질이 결합된 소수성 화합물인 것을 특징으로 하는 자성 나노복합체.

청구항 6

제5항에 있어서,

소수성 화합물은 포화 지방산, 불포화 지방산 또는 소수성 고분자인 것을 특징으로 하는 자성 나노복합체.

청구항 7

제6항에 있어서,

소수성 고분자는 폴리포스파젠, 폴리락티드, 폴리락티드-코-글리콜라이드, 폴리카프로락톤, 폴리안하이드라이드, 폴리말릭산 또는 그 유도체, 폴리알킬시아노아크릴레이트, 폴리하이드록시부틸레이트, 폴리카보네이트, 폴리오르소에스테르, 소수성 폴리 아미노산 및 소수성 비닐계열 고분자로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는 자성 나노복합체.

청구항 8

제5항에 있어서,

형광물질은 파이렌, 텍사스 레드, 플로레스세인아민, 닐 블루, 닐 레드 및 양자점(quantum dots)으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는 자성 나노복합체.

청구항 9

제1항에 있어서,

친수성 영역은 폴리알킬렌글리콜(PAG), 폴리에테르이미드(PEI), 폴리비닐피롤리돈(PVP), 친수성 폴리 아미노산

(PAA), 친수성 비닐계 고분자 및 친수성 아크릴계 고분자로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 자성 나노복합체.

청구항 10

자성 나노입자; 및

형광 물질을 포함하는 하나 이상의 소수성 영역과 하나 이상의 친수성 영역을 가지는 양친매성 화합물을 포함하되,

상기 양친매성 화합물이 자성 나노입자를 둘러싸고 있고,

상기 친수성 영역은 조직 특이적 결합성분과 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 자성 나노복합체.

청구항 11

제10항에 있어서,

조직 특이적 결합성분은 항원, 항체, RNA, DNA, 합체(hapten), 아비딘(avidin), 스트렙타비딘(streptavidin), 뉴트라비딘(neutravidin), 프로테인 A, 프로테인 G, 렉틴(lectin), 셀렉틴(selectin), 방사선 동위원소 표지성 분 및 종양마커와 특이적으로 결합할 수 있는 물질로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는 자성 나노복합체.

청구항 12

자성 나노입자; 및

형광 물질을 포함하는 하나 이상의 소수성 영역과 하나 이상의 친수성 영역을 가지는 양친매성 화합물을 포함하되,

상기 양친매성 화합물이 자성 나노입자를 둘러싸고 있고,

상기 친수성 영역은 조직 특이적 결합성분과 결합되어 있으며,

상기 소수성 영역에 약제학적 활성 성분이 결합 또는 봉입되어 있는 것을 특징으로 하는 자성 나노복합체.

청구항 13

제12항에 있어서,

약제학적 활성성분은 항암제, 항생제, 호르몬, 호르몬길항제, 인터루킨, 인터페론, 성장 인자, 종양 괴사 인자, 엔도톡신, 림포독시, 유로키나제, 스트렙토키나제, 조직 플라스미노겐 활성제, 프로테아제 저해제, 알킬포스포콜린, 방사선 동위원소로 표지된 성분, 심혈관계 약물, 위장관계 약물 및 신경계 약물로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는 자성 나노복합체.

청구항 14

자성 나노입자를 용매에서 합성하는 단계;

친수성 화합물; 및 소수성 화합물 또는 소수성 형광물질을 결합시켜 양친매성 화합물 합성하는 단계; 및

양친매성 화합물을 상기 자성 나노입자의 표면에 부가하여 자성 나노복합체를 제조하는 단계

를 포함하는 자성 나노복합체의 제조방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 자성 나노입자를 합성하는 단계는

a) 용매의 존재 하에서 자성 나노입자 전구체와 유기성 표면안정제를 혼합하는 단계; 및

b) 상기 혼합물을 가열하여 자성 나노입자 전구체를 열분해하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 자성 나노복합체의 제조방법.

청구항 16

제14항에 있어서, 양친매성 화합물을 합성하는 단계는

- c) 친수성 화합물 및 소수성 화합물을 결합시켜 양친매성 화합물을 합성하는 단계;
- d) 가교제를 이용하여 상기 양친매성 화합물의 소수성 화합물 부분에 형광물질의 결합영역을 제공하는 단계; 및
- e) 상기 양친매성 화합물의 형광물질 결합영역과 형광물질을 결합시키는 단계를 포함하거나,
- f) 가교제를 이용하여 친수성 화합물 부분에 소수성 형광물질의 결합영역을 제공하는 단계; 및
- g) 상기 소수성 형광물질 결합영역과 소수성 형광물질을 결합시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 자성 나노복합체의 제조방법.

청구항 17

제14항에 있어서, 자성 나노복합체를 제조하는 단계는

- h) 자성 나노입자를 유기용매에 용해시켜 오일상을 제조하는 단계;
- i) 양친매성 화합물을 용해시켜 수상을 제조하는 단계;
- j) 상기 오일상과 수상을 혼합하여 에멀전을 형성하는 단계; 및
- k) 상기 에멀전에서 오일상을 분리하여 에멀전형 자성 나노복합체를 제조하는 단계를 포함하거나,
- l) 자성 나노입자 및 양친매성 화합물을 용매에서 분산시켜 현탁액을 제조하는 단계; 및
- m) 상기 현탁액에서 용매를 분리하여 서스펜스형 자성 나노복합체를 제조하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 자성 나노복합체의 제조방법.

청구항 18

제14항에 있어서,

자성 나노복합체를 제조하는 단계는 양친매성 화합물 내에 약제학적 활성성분을 결합 또는 봉입하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 자성 나노복합체의 제조방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 약제학적 활성성분의 결합 단계는

- n) 가교제를 이용하여 양친매성 화합물의 일부에 약제학적 활성성분의 결합영역을 제공하는 단계; 및
- o) 상기 약제학적 활성성분의 결합영역과 약제학적 활성성분을 결합시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 자성 나노복합체의 제조방법.

청구항 20

제18항에 있어서, 약제학적 활성성분의 봉입 단계는 약제학적 활성성분과 자성 나노입자를 함께 용해시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 자성 나노복합체의 제조방법.

청구항 21

제14항에 있어서,

- p) 가교제를 이용하여 친수성 화합물 부분에 활성 성분 결합영역을 제공하는 단계; 및
- q) 상기 활성성분 결합영역과 조직 특이적 결합성분을 결합시키는 단계를 포함하는 조직 특이적 결합성분을 나노복합체의 표면에 결합시키는 단계는 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 자성 나노복합체의 제조방법.

청구항 22

제1항에 따른 자성 나노복합체; 및

약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조영제 조성물.

청구항 23

제10항에 따른 자성 나노복합체; 및

약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 표적 지향형 지능형 조영제 조성물.

청구항 24

제12항에 따른 자성 나노복합체; 및

약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 동시 진단 및 치료용 조영제 조성물.

청구항 25

제1항에 따른 자성 나노복합체; 및

진단 프로브를 포함하는 다중 진단 프로브.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 형광 자성 나노복합체 및 그 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 자성 나노입자를 둘러싸는 형광성의 양친매성 화합물 층을 포함하되, 상기 양친매성 화합물 층에는 조직 특이적 결합성분이 결합할 수 있는 나노복합체로서, 수용액에서 안정하고 우수한 자기적 성질과 높은 형광성을 나타내며 상기 조직 특이적 결합성분에 따른 표적지향이 가능하여 다중모드 조영제 조성물로 사용할 수 있는 표적지향성을 갖는 형광 자성 나노복합체 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 나노기술은 물질을 원자, 분자 수준에서 조절 및 제어하는 기술로서 신물질, 또는 신소재 창출에 적합하여 그 응용분야가 전자, 재료, 통신, 기계, 의학, 농업, 에너지, 및 환경 등 매우 다양하다.
- [0003] 현재 나노기술은 다양하게 발전하고 있으며 크게 세 가지 분야로 나눌 수 있다. 첫째, 나노소재로 극미세한 크기의 새로운 물질과 재료를 합성하는 기술. 둘째, 나노소자이면서 나노크기의 재료들을 조합하거나 배열하여 일정한 기능을 발휘하는 장치를 제조하는 기술. 셋째, 나노-바이오라 불리는 나노기술을 생명공학에 응용하는 기술.
- [0004] 특히, 나노-바이오 분야에서 자성 나노입자들은 생체 물질의 분리, 자기공명 영상 진단 프로브, 거대자기저항 센서를 포함한 바이오 센서, 마이크로 유체계 센서, 약물/유전자 전달, 및 자성 고온치료 등의 넓은 응용범위에 걸쳐 사용되고 있다.
- [0005] 구체적으로 자성 나노입자는 분자 자기공명영상의 진단 프로브(조영제)로 사용될 수 있다. 자성 나노입자는 나노입자 주변의 물 분자 내 수소원자의 스핀-스핀 이완시간을 단축시켜 자기공명영상 신호를 증폭시키는 효과를 나타내 지금까지 공명 영상 진단에 널리 사용되고 있다.
- [0006] 또한, 자성 나노입자는 거대 자기-저항 바이오센서(Giant magnetic resistance (GMR) sensor)의 프로브 물질로 작용할 수 있다. 자성 나노입자가 거대자기저항 바이오센서 표면에 패팅되어 있는 생체 분자를 감지하여 결합하면, 자성입자에 의해 거대자기저항 센서의 전류 신호가 변하게 되고 이를 이용하면 생체분자를 선택적으로 검출할 수 있다(US 6,452,763 B1; US 6,940,277 B2; US 6,944,939 B2; US 2003/0133232 A1).
- [0007] 또한 자성 나노입자는 생체분자의 분리에도 응용될 수 있다. 예를 들면, 특정한 생체 마커를 발현하는 세포와 다른 여러 가지 세포들이 섞여 있을 때, 자성 나노입자가 특정한 생체 마커와 선택적으로 결합하게 한 후, 외부에서 자기장을 걸어주면 자기장 방향으로 원하는 세포만 분리할 수 있다(Whitehead *et al.* US patent 4,554,088, US 5,665,582, US 5,508,164, US 2005/0215687 A1). 또한 세포의 분리뿐만 아니라, 단백질, 항원, 펩타이드, DNA, RNA 및 바이러스 등 다양한 생체분자의 분리에 응용될 수 있다. 또한 자성 나노입자는 자성 마

이크로 유체 센서에 응용되어 생체분자를 분리 및 검출할 수 있다. 칩 위에 매우 작은 채널을 만들어 그 안에 자성 나노입자를 흘려줌으로써 마이크로 단위의 유체계에서 검출과 분리가 가능하다.

[0008] 한편, 자성 나노입자는 약물 또는 유전자 전달을 통한 생체 치료에도 사용될 수 있다. 자성 나노입자에 화학적인 결합 또는 흡착을 통해 약물 또는 유전자를 싣고 외부 자기장을 이용하여 원하는 위치로 이동시켜 원하는 특정 부위에 약물 및 유전자를 방출할 수 있게 하여 선택적인 치료효과를 가져올 수 있게 한다(US 6,855,749).

[0009] 자성 나노입자의 생체 치료로의 응용의 또 하나의 예로서, 자성 스핀 에너지를 이용한 고온 치료를 들 수 있다(US 6,530,944 B2, US 5,411,730). 자성 나노입자는 외부에서 라디오 주파수의 교류전류를 흘려주면 스핀 플립핑(flipping) 과정을 통해 열을 방출하게 된다. 이때 나노입자 주변의 온도가 40℃ 이상이 되면 세포가 높은 열에 의해 죽게 되어 질병 세포를 선택적으로 사멸시킬 수 있다.

[0010] 자성 나노입자들이 전술한 용도에 이용되기 위해서는 자기적 성질이 우수하고, 생체 내 즉 수용성 환경에서 안정적으로 운반 및 분산되어야 하며, 생체 활성물질과 쉽게 결합할 수 있어야 한다. 이러한 조건을 만족시키기 위하여 현재까지 다양한 기술들이 개발되어 왔다.

[0011] 미국특허 US 6,274,121호는 산화철과 같은 금속을 포함한 상자성 나노입자에 관한 것으로 상기 나노입자의 표면에 조직 특이적인 결합물질, 진단 또는 약제학적 활성물질과 커플링(coupling)될 수 있는 결합 자리를 포함하는 무기물질을 부착한 나노입자를 개시하고 있다. 미국특허 US 6,638,494호는 산화철과 같은 금속을 포함한 상자성 나노입자에 관한 것으로 상기 나노입자의 표면에 특정한 카르복실산을 부착하여 중력 또는 자기장에서 나노입자가 응집 및 침전되는 것을 방지하는 방법을 개시하고 있다. 상기 특정한 카르복실산으로는 말레산, 타르타르산, 글루카르산과 같은 지방족 디카르복실산 또는 시트르산, 시클로헥산, 트리카르복실산과 같은 지방족 폴리디카르복실산이 이용되었다. 미국 공개특허 US 2004/58457호는 단층(monolayer)으로 둘러싸인 기능성 나노입자에 관한 것으로 상기 단층에는 이중기능성(bifunctional) 펩타이드가 부착되며 상기 펩타이드에는 DNA 및 RNA를 포함한 다양한 생폴리머(biopolymer)가 결합할 수 있다. 영국특허 GB 223,127호는 단백질 주형 내 자기 나노입자 형성 스텝을 포함한 자기 나노입자 성분의 제조방법에 관한 것으로 아포페리틴에 자성 나노입자를 캡슐화하는 방법을 기술하였다. 미국특허 US 2003/190,471호는 이중미셀(bi-micellar vesicle)안에서 망간 아연 산화물로 나노입자를 형성시키는 방법에 관한 것으로, 형성된 자성 나노입자의 열처리 과정을 통해 향상된 성질을 나타내는 나노입자를 기술하고 있다. 미국특허 US 2005/130,167는 16-머캅토헥사데카노산(16-mercaptohexadecanoic acid)으로 둘러싸인 수용성 자성 나노입자의 합성과 합성된 자성 나노입자에 상 전이제(transfection agent)인 TAT 펩타이드를 이용하여 세포내 자기적 라벨링(intracellular magnetic labeling)으로 실험 쥐 내의 바이러스 및 mRNA 검출을 기술하고 있다. 대한민국 특허출원 제 10-1998-0705262호는 녹말 코팅과 임의의 폴리알킬렌 옥사이드 코팅을 구비한 초상자성 철 산화물 코어 입자를 포함하는 입자와 이를 포함하는 MRI 조영제를 개시하고 있다.

[0012] 그러나 상기 방법들로 제조된 수용성 나노입자는 다음과 같은 단점을 갖고 있다. 즉, 전술한 문헌들에서 개시된 나노입자는 주로 수용액에서 합성하는데 이러한 경우 나노입자의 크기 조절이 어렵고 합성된 나노입자는 불균일한 크기 분포도를 나타낸다. 또한, 저온에서 합성되기 때문에 나노입자의 결정성이 낮으며, 비화학양론적 화합물(non-stoichiometric compound)이 형성되는 경향이 있다. 따라서 상기 방법들로 제조된 나노입자는 수용액에서 콜로이드 안정성이 떨어져 생체 응용 시 뭉침 및 큰 비선택성 결합 등을 나타내는 문제점을 갖고 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0013] 본 발명의 목적은 종래기술의 단점을 해결하고자 안출된 것으로, 수용액에서 안정하고 우수한 자기적 성질을 나타내며 표적지향이 가능한 자성 나노복합체 및 그 제조방법을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 상기 우수한 물성을 갖는 자성 나노복합체를 포함하는 조영제 조성물, 또는 다중 진단 프로브를 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

[0016] 자성 나노입자; 및

- [0017] 형광 물질을 포함하는 하나 이상의 소수성 영역과 하나 이상의 친수성 영역을 가지는 양친매성 화합물을 포함하
되,
- [0018] 상기 양친매성 화합물이 자성 나노입자를 둘러싸고 있는 것을 특징으로 하는 자성 나노복합체(I)를 제공한다.
- [0019] 본 발명은 또한
- [0020] 자성 나노입자; 및
- [0021] 형광 물질을 포함하는 하나 이상의 소수성 영역과 하나 이상의 친수성 영역을 가지는 양친매성 화합물을 포함하
되,
- [0022] 상기 양친매성 화합물이 자성 나노입자를 둘러싸고 있고,
- [0023] 상기 친수성 영역은 조직 특이적 결합성분과 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 자성 나노복합체(II)를 제공한
다.
- [0024] 본 발명은 또한
- [0025] 자성 나노입자; 및
- [0026] 형광 물질을 포함하는 하나 이상의 소수성 영역과 하나 이상의 친수성 영역을 가지는 양친매성 화합물을 포함하
되,
- [0027] 상기 양친매성 화합물이 자성 나노입자를 둘러싸고 있고,
- [0028] 상기 친수성 영역은 조직 특이적 결합성분과 결합되어 있으며,
- [0029] 상기 소수성 영역에 약제학적 활성 성분이 결합 또는 봉입되어 있는 것을 특징으로 하는 자성 나노복합체(III)
를 제공한다.
- [0030] 본 발명은 또한
- [0031] 자성 나노입자를 용매에서 합성하는 단계;
- [0032] 친수성 화합물; 및 소수성 화합물 또는 소수성 형광물질을 결합시켜 양친매성 화합물 합성하는 단계; 및
- [0033] 양친매성 화합물을 상기 자성 나노입자의 표면에 부가하여 자성 나노복합체를 제조하는 단계
- [0034] 를 포함하는 자성 나노복합체의 제조방법을 제공한다.
- [0035] 본 발명은 또한
- [0036] 본 발명의 자성 나노복합체(I); 및
- [0037] 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조영제 조성물을 제공한다.
- [0038] 본 발명은 또한
- [0039] 본 발명의 자성 나노복합체(II); 및
- [0040] 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 표적 지향형 지능형 조영제 조성물을 제공한다.
- [0041] 본 발명은 또한
- [0042] 본 발명의 자성 나노복합체(III); 및
- [0043] 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 동시 진단 및 치료용 조영제 조성물을 제공한다.
- [0044] 본 발명은 또한
- [0045] 본 발명의 자성 나노복합체; 및
- [0046] 진단 프로브를 포함하는 다중 진단 프로브를 제공한다.

효 과

- [0047] 본 발명의 자성 나노복합체는 자성 나노입자가 형광성을 지닌 양친매성 화합물로 코팅되어 수용액에서 안정하고

우수한 자기적 성질과 높은 형광성을 나타내며 표적지향이 가능하여 다중모드 조영제 조성물, 약물전달체, 또는 다중모드 진단 프로브 등에 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0048] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.
- [0049] 본 발명은
- [0050] 자성 나노입자; 및
- [0051] 형광 물질을 포함하는 하나 이상의 소수성 영역과 하나 이상의 친수성 영역을 가지는 양친매성 화합물을 포함하되,
- [0052] 상기 양친매성 화합물이 자성 나노입자를 둘러싸고 있는 것을 특징으로 하는 자성 나노복합체에 관한 것이다.
- [0053] 본 발명의 자성 나노복합체는 첫째, 형광성과 양친매성을 동시에 지닌 화합물이 수불용성 나노입자를 수용성 매질 중에서도 안정하게 분산시켜 생체이용률을 극대화시킬 수 있고, 둘째, 양친매성 화합물의 작용기에 조직 특이적 결합성분이 결합되어 있어 나노복합체가 표적지향성을 가질 수 있고, 셋째, 상기 양친매성 화합물에 약제학적 활성성분이 결합 또는 봉입될 수 있는 특징이 있다.
- [0054] 또한, 본 발명의 자성 나노복합체는 제조방법에 따라 하나 이상의 자성 나노입자를 형광성의 양친매성 화합물이 둘러싸고 있는 에멀전형 자성 나노복합체, 또는 하나의 자성 나노입자가 형광성의 양친매성 화합물과 결합되는 서스펜션형 자성 나노복합체를 포함할 수 있다.
- [0055] 상기 자성 나노복합체는 대한민국 특허공보 제10-0604976호에 기재된 치환방법(substitution method) 또는 대한민국 특허공보 제10-0819378호에 기재된 부가방법(addition method)을 통하여 제조될 수 있으나, 바람직하게는 부가방법을 통해 형광성의 양친매성 화합물이 자성 나노입자와 결합하여 제조될 수 있다.
- [0056] 즉, 본 발명에 따른 자성 나노복합체는 나노입자의 표면에 양친매성 화합물을 부가하여 양친매성 화합물의 소수성 영역이 나노입자의 표면과 결합하고, 양친매성 화합물의 친수성 영역이 나노복합체의 최외곽에 분포하고 있는 것이다. 여기서 양친매성 화합물의 소수성 영역은 수소결합, 반데르발스력, 및 극성 인력 등의 물리적 결합에 의하여 나노입자의 표면과 결합한다. 따라서 상기 소수성 영역은 소수성 영역의 매트릭스 내에 나노입자를 분포시키거나, 나노입자의 표면과 결합하는 역할을 할 뿐만 아니라, 필요에 따라서 소수성 영역의 매트릭스 내에 약물을 물리적으로 봉입하거나, 소수성 영역의 일 말단에 약물을 화학적으로 결합시킬 수 있다. 한편 양친매성 화합물의 친수성 영역은 나노복합체의 최외곽에 분포하여 수불용성의 나노입자를 수용성 매질 중에서도 안정화시켜 생체 이용률을 극대화시킬 수 있다.
- [0057] 상기 자성 나노복합체는 직경이 5 내지 200 nm인 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는, 에멀전형 나노복합체는 30 내지 200 nm, 서스펜션형 나노복합체는 10 내지 50 nm인 것이 좋다.
- [0058] 상기 자성 나노입자는 자성을 가지고, 직경이 1 내지 1000 nm, 보다 바람직하게는 2 내지 100 nm인 입자라면 특별히 제한하지는 않는다. 가장 바람직하게는 상기 직경을 갖는 금속, 자성 물질, 또는 자성 합금이 좋다.
- [0059] 상기 금속은 특별히 제한하지는 않으나, Pt, Pd, Ag, Cu, 또는 Au 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다.
- [0060] 상기 자성 물질은 특별히 제한하지는 않으나, Co, Mn, Fe, Ni, Gd, Mo, MM'_2O_4 , 또는 M_xO_y (M 및 M'는 각각 독립적으로 Co, Fe, Ni, Mn, Zn, Gd, 또는 Cr을 나타내고, x 및 y는 각각 식 " $0 < x \leq 3$ " 및 " $0 < y \leq 5$ "을 만족한다.) 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다.
- [0061] 상기 자성 합금은 특별히 제한하지는 않으나, CoCu, CoPt, FePt, CoSm, NiFe, 또는 NiFeCo 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다.
- [0062] 또한, 상기 자성 나노입자는 양친매성 화합물과의 결합을 안정화시키기 위하여 유기성 표면안정제와 결합될 수 있다. 자성 나노입자와 유기성 표면안정제의 결합은 자성 나노입자의 전구물질에 유기성 표면안정제가 배위하여 착화합물을 형성하여 이루어진다.
- [0063] 상기 유기성 표면안정제(surface stabilizer)는 상기 나노입자의 상태와 크기를 안정화시킬 수 있는 유기 기능성 분자를 의미하며 예를 들어 계면활성제를 들 수 있다.
- [0064] 상기 계면활성제는 알킬 트라이메틸암모늄 할라이드(alkyl trimethylammonium halide)를 포함하는 양이온 계면

활성제; 올레산(oleic acid), 라우르산(lauric acid), 또는 도데실산(dodecylic acid)과 같은 포화 또는 불포화 지방산, 트리옥틸포스핀 옥사이드(trioctylphosphine oxide: TOPO), 트리옥틸포스핀(trioctylphosphine: TOP), 또는 트리부틸포스핀(tributylphosphine)과 같은 트리알킬포스핀 또는 트리알킬포스핀옥사이드, 올레익아민(oleic amine), 트리옥틸아민(trioctylamine), 또는 옥틸아민(octylamine)과 같은 알킬아민(alkyl amine), 또는 알킬티올(alkyl thiol)을 포함하는 중성 계면활성제; 및 소듐 알킬 설페이트(sodium alkyl sulfate), 또는 소듐 알킬 포스페이트(sodium alkyl phosphate)을 포함하는 음이온 계면활성제를 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 특히, 나노입자의 안정화 및 균일한 크기 분포를 고려할 때, 포화 또는 불포화 지방산 및/또는 알킬아민을 사용하는 것이 바람직하다.

- [0065] 또한, 상기 양친매성 화합물은 매트릭스 내에 나노입자를 분포시키거나, 나노입자의 표면과 결합할 수 있고, 필요에 따라 약제학적 활성성분을 물리적으로 봉입하거나 고분자의 일 말단에 화학적으로 결합시킬 수 있다.
- [0066] 상기 양친매성 화합물은 형광물질을 포함하는 하나 이상의 소수성 영역 및 하나 이상의 친수성 영역을 가지는 양친매성 화합물일 수 있다.
- [0067] 상기 소수성 영역은 형광 물질 또는 형광물질이 결합된 소수성 화합물을 포함한다. 상기 소수성 화합물은 포화 지방산, 불포화 지방산 또는 소수성 고분자 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다.
- [0068] 상기 포화 지방산은 특별히 제한되지 않으나, 부티르산, 카프로산, 카프릴산, 카프릭산, 라우르산(도데실산), 미리스트산, 팔미트산, 스테아르산, 에이코사노산, 또는 도코사노산 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다.
- [0069] 상기 불포화 지방산은 특별히 제한되지 않으나, 올레산, 리놀레산, 리놀렌산, 아라키돈산, 에이코사펜타노산, 도코사헥사노산, 또는 에르크산 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다.
- [0070] 상기 소수성 고분자는 특별히 제한되지 않으나, 폴리포스파젠, 폴리락티드, 폴리락티드-코-글리콜라이드, 폴리 카프로락톤, 폴리안하이드라이드, 폴리말릭산 또는 그 유도체, 폴리알킬시아노아크릴레이트, 폴리하이드록시부틸레이트, 폴리카보네이트, 폴리오르소에스테르, 소수성 폴리 아미노산, 또는 소수성 비닐계열 고분자 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다.
- [0071] 상기 소수성 형광물질은 특별히 제한되지는 않으나, 파이렌, 텍사스 레드, 플로레스세인아민, 닐 블루, 닐 레드, 또는 양자점(quantum dots) 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다.
- [0072] 상기 친수성 영역은 폴리알킬렌글리콜(PAG), 폴리에테리미드(PEI), 폴리비닐피롤리돈(PVP), 친수성 폴리 아미노산(PAA), 친수성 비닐계 고분자, 또는 친수성 아크릴계 고분자 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다.
- [0073] 본 발명은 또한
- [0074] 자성 나노입자; 및
- [0075] 형광 물질을 포함하는 하나 이상의 소수성 영역과 하나 이상의 친수성 영역을 가지는 양친매성 화합물을 포함하되,
- [0076] 상기 양친매성 화합물이 자성 나노입자를 둘러싸고 있고,
- [0077] 상기 친수성 영역은 조직 특이적 결합성분과 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 자성 나노복합체(II)에 관한 것이다.
- [0078] 본 발명에 따른 자성 나노 복합체는 친수성 영역에 조직 특이적 결합성분을 도입하여 자성 나노복합체에 표적지향성을 제공할 수 있다.
- [0079] 상기 조직 특이적 결합성분은 특별히 제한하지는 않으나, 항원, 항체, RNA, DNA, 합텐(hapten), 아비딘(avidin), 스트렙타비딘(streptavidin), 뉴트라비딘(neutravidin), 프로테인 A, 프로테인 G, 렉틴(lectin), 셀렉틴(selectin), 방사선 동위원소 표지성분, 또는 종양 마커와 특이적으로 결합할 수 있는 물질 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다.
- [0080] 본 발명의 상기 나노 복합체는 종양과 관련된 다양한 질병, 예를 들어 위암, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 방광암, 결장암 및 자궁경부암을 진단 및/또는 치료하는데 이용될 수 있다.
- [0081] 이와 같은 종양 세포는 정상 세포에서는 거의 또는 전혀 생산되지 않는 특정 물질을 발현 및/또는 분비하는데 이들을 일반적으로 “종양 마커(tumor marker)” 라고 명명한다. 그러한 종양 마커와 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 상기 수용성 나노입자의 활성성분 결합영역에 결합시켜 만든 나노 복합체는 종양 진단에 유용하게 이

용될 수 있다. 당업계에는 다양한 종양 마커뿐만 아니라 이들과 특이적으로 결합할 수 있는 물질이 공지되어 있다.

[0082] 또한 본 발명에서 종양 마커는 작용 기작에 따라 리간드, 항원, 수용체, 및 이들을 코딩하는 핵산으로 분류할 수 있다.

표 1

종류	종양 마커의 예	활성성분의 예
리간드	시냅토타그민 I의 C2	포스파티딜세린
	아넥신 V	
	인테그린	인테그린 수용체
	VEGF	VEGFR
	안지오포이에틴 1, 2	Tie2 수용체
	소마토스타틴	소마토스타틴 수용체
	바소인테스티날 펩타이드	바소인테스티날 펩타이드 수용체
항원	암성 태아성 항원	허셉틴 (Genentech, USA)
	HER2/neu 항원	
	전립선 특이 항원	리툭산 (Genentech, USA)
수용체	폴산 수용체	폴산

[0083]

[0084] 종양 마커가 리간드인 경우에는 상기 리간드와 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 본 발명에 따른 나노복합체의 활성성분으로 도입할 수 있는데 상기 리간드와 특이적으로 결합할 수 있는 수용체 또는 항체가 적합할 것이다. 본 발명에서 이용 가능한 리간드 및 이와 특이적으로 결합할 수 있는 수용체의 예로는 시냅토타그민의 C2(synaptotagmin의 C2)와 포스파티딜세린, 아넥신 V(annexin V)와 포스파티딜세린, 인테그린(integrin)과 이의 수용체, VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor)와 이의 수용체, 안지오포이에틴(angiopoietin)과 Tie2 수용체, 소마토스타틴(somatostatin)과 이의 수용체, 바소인테스티날 펩타이드(vasointestinal peptide)와 이의 수용체 등이 있지만 이에 제한되는 것은 아니다.

[0085] 종양 마커가 항원인 경우 상기 항원과 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 본 발명에 따른 나노복합체의 활성성분으로 도입할 수 있는데 상기 항원과 특이적으로 결합할 수 있는 항체가 적합할 것이다. 본 발명에서 이용 가능한 항원 및 이와 특이적으로 결합하는 항체의 예로는 암성 태아성 항원(carcinoembryonic antigen - 대장암 표지 항원)과 허셉틴(Genentech, USA), HER2/neu 항원(HER2/neu antigen - 유방암 표지 항원)과 허셉틴, 전립선 특이 항원(prostate-specific membrane antigen - 전립선암 표지 항원)과 리툭산(IDCE/Genentech, USA) 등이 있다.

[0086] 종양 마커가 “수용체”인 대표적인 예는 난소암 세포에서 발현되는 폴산 수용체가 있다. 상기 수용체와 특이적으로 결합할 수 있는 물질(폴산 수용체의 경우에는 폴산)이 본 발명에 따른 나노복합체의 활성성분으로 도입될 수 있는데 상기 수용체와 특이적으로 결합할 수 있는 리간드 또는 항체가 적합할 것이다.

[0087] 상술한 바와 같이 항체는 본 발명에 있어서 특히 바람직한 활성성분이다. 항체는 특정 대상과만 선택적이고 안정적으로 결합하는 성질을 갖고 있으며, 항체의 Fc 영역에 있는 리신의 -NH₂, 시스테인의 -SH, 아스파라긴산 및 글루탐산의 -COOH는 수용성 나노복합체의 활성성분 결합영역 작용기와 결합하는데 유용하게 이용될 수 있기 때문이다.

[0088] 이러한 항체는 상업적으로 입수하거나 당업계에 공지된 방법에 따라 제조할 수 있다. 일반적으로 포유동물(예, 마우스, 랫트, 염소, 토끼, 말 또는 양)을 적절한 양의 항원으로 1회 이상 면역화시킨다. 일정 시간 후 역가가 적정 수준에 이르렀을 때, 포유동물의 혈청으로부터 회수한다. 회수한 항체는 원하는 경우 공지된 공정을 이용하여 정제하고 사용 시까지 냉동 완충된 용액에 저장할 수 있다. 이러한 방법의 상세한 사항은 당업계에 잘 알려져 있다.

[0089] 한편, 상기 “핵산”은 전술한 리간드, 항원, 수용체 또는 이의 일부분을 코딩하는 RNA 및 DNA를 포함한다. 핵산은 당업계에 알려진 바와 같이 상보적인 서열 간에 염기쌍(base pair)을 형성하는 특징을 갖고 있기 때문에

특정 염기서열을 갖는 핵산은 상기 염기서열에 상보적인 염기서열을 갖는 핵산을 이용하여 검출할 수 있다. 상기 효소, 리간드, 항원, 수용체를 코딩하는 핵산과 상보적인 염기서열을 갖는 핵산을 본 발명에 따른 나노복합체의 활성성분으로 이용할 수 있다.

[0090] 또한, 핵산은 5' - 및 3' - 말단에 -NH₂, -SH, -COOH 등의 작용기가 있어 활성성분 결합영역의 작용기와 결합하는데 유용하게 이용될 수 있다.

[0091] 이러한 핵산은 당업계에 공지된 표준 방법에 의해, 예를 들면 자동 DNA 합성기(예, 바이오써치, 어플라이드 바이오시스템스 등으로부터 구입할 수 있는 것)를 사용하여 합성할 수 있다. 예로서, 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드는 문헌(Stein *et al. Nucl. Acids Res.* 1988, vol.16, p.3209)에 기술된 방법에 의해 합성할 수 있다. 메틸포스포네이트 올리고뉴클레오타이드는 조절된 유리 중합체 지지체를 사용하여 제조할 수 있다(Sarin *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1988, vol.85, p.7448).

[0092] 본 발명은 또한

[0093] 자성 나노입자; 및

[0094] 형광 물질을 포함하는 하나 이상의 소수성 영역과 하나 이상의 친수성 영역을 가지는 양친매성 화합물을 포함하되,

[0095] 상기 양친매성 화합물이 자성 나노입자를 둘러싸고 있고,

[0096] 상기 친수성 영역은 조직 특이적 결합성분과 결합되어 있으며,

[0097] 상기 소수성 영역에 약제학적 활성 성분이 결합 또는 봉입되어 있는 것을 특징으로 하는 자성 나노복합체(III)에 관한 것이다.

[0098] 즉, 본 발명의 자성 나노복합체(I)의 양친매성 화합물의 소수성 영역 내에 약제학적 활성성분을 물리적으로 봉입하거나 그 일 말단에 화학적으로 결합시킬 수 있다.

[0099] 상기 약제학적 활성성분은 특별히 제한하지는 않으나, 항암제, 항생제, 호르몬, 호르몬길항제, 인터루킨, 인터페론, 성장 인자, 종양 괴사 인자, 엔도톡신, 림포독시, 유로키나제, 스트렙토키나제, 조직 플라스미노겐 활성화제, 프로테아제 저해제, 알킬포스포콜린, 방사선 동위원소로 표지된 성분, 심혈관계 약물, 위장관계 약물, 또는 신경계 약물 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다.

[0100] 한편, 상기 소수성 영역에 존재하는 약제학적 활성성분은 물리적 봉입, 화학적 봉입, 또는 이 둘의 조합 또한 가능하다. 에멀전 방법과 서스펜션 방법에 의해 자성 나노복합체가 제조되는 중에 양친매성 고분자의 소수활성 성분과 항암제의 물리적인 결합을 통해 약물의 봉입이 이루어지게 된다. 또한 자성 나노복합체를 구성하는 양친매성 고분자의 소수활성성분의 결합영역과 화학적 결합이 가능한 항암제의 경우 적당한 가교제를 사용하여 양친매성 고분자의 소수활성성분 결합영역과 항암제의 결합이 가능하여 자성 나노복합체에 약물의 봉입이 이루어질 수 있다.

[0101] 본 발명에 따른 치료 방법에서 이용될 수 있는 항암제로는 이에 제한되는 것은 아니지만 에피루비신(Epirubicin), 도세탁셀(Docetaxel), 겐시타빈(Gemcitabine), 파클리탁셀(Paclitaxel), 시스플라틴(cisplatin), 카르보플라틴(carboplatin), 텍솔(taxol), 프로카르바진(procarbazine), 시클로포스파미드(cyclophosphamide), 디악티노마이신(dactinomycin), 다우노루비신(daunorubicin), 에토포시드(etoposide), 타목시펜(tamoxifen) 독소루비신(doxorubicin), 미토마이신(mitomycin), 블레오마이신(bleomycin), 플리코마이신(plicomycin), 트랜스플라티늄(transplatinum), 빈블라스틴(vinblastin) 및 메토티렉세이트(methotrexate) 등이 있다.

[0102] 본 발명은 또한

[0103] 친수성 화합물; 및 소수성 화합물 또는 소수성 형광물질을 결합시켜 양친매성 화합물 합성하는 단계; 및

[0104] 양친매성 화합물을 상기 자성 나노입자의 표면에 부가하여 자성 나노복합체를 제조하는 단계

[0105] 를 포함하는 자성 나노복합체의 제조방법에 관한 것이다.

[0106] 본 발명의 자성 나노복합체의 제조방법을 단계별로 다음과 같이 구체적으로 설명한다.

[0107] 상기 자성 나노입자를 합성하는 단계는 자성 나노입자 전구체와 유기성 표면안정제를 용매에서 반응시키는 단계

로,

- [0108] a) 용매의 존재 하에서 자성 나노입자 전구체와 유기성 표면안정제를 혼합하는 단계; 및
- [0109] b) 상기 혼합물을 가열하여 자성 나노입자 전구체를 열분해하는 단계를 포함하는 것이 바람직하다.
- [0110] 상기 단계 a)는 표면안정제가 포함된 용매에 나노입자 전구체를 투입하여 혼합시키는 단계이다.
- [0111] 상기 자성 나노입자 및 유기성 표면안정제의 구체적인 종류는 상술한 바와 같다.
- [0112] 자성 나노입자 전구체는 금속과 $-CO$, $-NO$, $-C_6H_5$, 알콕사이드(alkoxide) 또는 기타 공지의 리간드가 결합된 금속화합물을 사용할 수 있으며, 예를 들어 아이언 펜타카르보닐(iron pentacarbonyl, $Fe(CO)_5$), 페로센(ferrocene), 또는 망간카르보닐($Mn_2(CO)_{10}$) 등의 금속 카르보닐계열의 화합물; 또는 철 아세틸아세토네이트($Fe(acac)_3$) 등의 금속 아세틸아세토네이트 계열의 화합물 등의 다양한 유기금속화합물들을 사용할 수 있다.
- [0113] 또한, 자성 나노입자 전구체는 금속과 Cl^- , 또는 NO_3^- 등의 공지된 음이온과 결합된 금속이온을 포함한 금속염을 사용할 수 있으며, 예를 들어 삼כל로로화철($FeCl_3$), 이כל로로화철($FeCl_2$), 또는 철 나이트레이트($Fe(NO_3)_3$) 등을 사용할 수 있다.
- [0114] 또한, 합금 나노입자와 복합 나노입자 합성에서는 상술한 2종 이상의 금속의 전구체의 혼합물을 사용할 수 있다.
- [0115] 또한, 단계 a)에서 사용 가능한 용매는 나노입자 표면에 유기성 표면안정제가 배워된 착화합물의 열분해 온도에 근접하는 높은 끓는점을 갖는 것이 바람직하며, 예를 들어 옥틸 에테르(octyl ether), 부틸 에테르(butyl ether), 헥실 에테르(hexyl ether), 또는 데실 에테르(decyl ether)와 같은 에테르계 화합물; 피리딘, 또는 테트라하이드로퓨란(THF)과 같은 헤테로고리화합물; 톨루엔, 자일렌, 메시틸렌, 또는 벤젠과 같은 방향족화합물; 디메틸설폭사이드(DMSO)와 같은 설폭사이드화합물; 디메틸포름아마이드(DMF)와 같은 아마이드화합물; 옥틸알코올, 또는 데칸올과 같은 알코올; 펜탄, 헥산, 헵탄, 옥탄, 데칸, 도데칸, 테트라데칸, 또는 헥사데칸과 같은 탄화수소; 또는 물 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다.
- [0116] 상기 단계 a)의 반응 조건은 특별히 제한되지 않으며, 자성 나노입자의 전구체 및 표면안정제의 종류에 따라 적절히 조절할 수 있다. 반응은 실온 또는 그 이하의 온도에서도 형성될 수 있으나, 통상적으로는 30 내지 200℃의 범위로 가열 및 유지시키는 것이 바람직하다.
- [0117] 상기 단계 b)는 자성 나노입자 전구체를 열분해하여 나노입자를 성장시키는 단계이다.
- [0118] 이때 반응조건에 따라 균일한 크기 및 형상의 금속 나노입자를 형성할 수 있으며, 열분해 온도 역시 자성 나노입자 전구체 및 표면안정제의 종류에 따라 적절히 조절할 수 있다. 바람직하게는 50 내지 500℃에서 반응시키는 것이 좋다.
- [0119] 상기 단계 b)에서 제조된 나노입자는 공지의 수단을 통하여 분리 및 정제할 수 있다.
- [0120] 상기 양친매성 화합물을 합성하는 단계는
- [0121] c) 친수성 화합물 및 소수성 화합물을 결합시켜 양친매성 화합물을 합성하는 단계;
- [0122] d) 가교제를 이용하여 상기 양친매성 화합물의 소수성 화합물 부분에 형광물질의 결합영역을 제공하는 단계; 및
- [0123] e) 상기 양친매성 화합물의 형광물질 결합영역과 형광물질을 결합시키는 단계를 포함하는 것이 바람직하다.
- [0124] 또는, 상기 양친매성 화합물을 합성하는 단계는
- [0125] f) 가교제를 이용하여 친수성 화합물 부분에 소수성 형광물질의 결합영역을 제공하는 단계; 및
- [0126] g) 상기 소수성 형광물질 결합영역과 소수성 형광물질을 결합시키는 단계를 포함하는 것이 바람직하다.
- [0127] 상기 단계들에서 사용되는 친수성 고분자, 소수성 고분자, 또는 소수성 형광물질의 구체적인 종류는 상술한 바와 같다.
- [0128] 본 발명의 자성 나노복합체의 제조방법에 있어서, 자성 나노복합체의 제조단계는 상기 단계에서 제조된 나노입자의 표면에 형광성의 양친매성 화합물을 결합시키는 단계로, 에멀전에 의한 방법과 서스펜션에 의한 방법으로

나눌 수 있다.

- [0129] 상기 에멀전에 의한 방법에 따른 자성 나노복합체를 제조하는 단계는
- [0130] h) 자성 나노입자를 유기용매에 용해시켜 오일상을 제조하는 단계;
- [0131] i) 양친매성 화합물을 용해시켜 수상을 제조하는 단계;
- [0132] j) 상기 오일상과 수상을 혼합하여 에멀전을 형성하는 단계; 및
- [0133] k) 상기 에멀전에서 오일상을 분리하여 에멀전형 자성 나노복합체를 제조하는 단계를 포함하는 것이 바람직하다.
- [0134] 상기 단계를 거침으로써 하나 이상의 자성 나노입자가 양친매성 화합물 코팅에 의해 형광을 띠는 자성 나노복합체가 제조될 수 있다.
- [0135] 상기 서스펜션에 의한 방법에 따른 자성 나노복합체를 제조하는 단계는
- [0136] l) 자성 나노입자 및 양친매성 화합물을 용매에서 분산시켜 현탁액을 제조하는 단계; 및
- [0137] m) 상기 현탁액에서 용매를 분리하여 서스펜스형 자성 나노복합체를 제조하는 단계를 포함하는 것이 바람직하다.
- [0138] 상기 단계를 거침으로써, 하나의 자성 나노입자가 양친매성 화합물과 결합하여 형광을 띠는 자성 나노복합체가 제조될 수 있다.
- [0139] 또한, 양친매성 화합물 내에 약제학적 활성성분을 물리적으로 봉입하거나, 그 일 말단에 화학적으로 결합시키는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0140] 상기 약제학적 활성성분을 화학적으로 결합시키는 단계는
- [0141] n) 가교제를 이용하여 양친매성 화합물의 일부에 약제학적 활성성분의 결합영역을 제공하는 단계; 및
- [0142] o) 상기 약제학적 활성성분의 결합영역과 약제학적 활성성분을 결합시키는 단계를 포함하는 것이 바람직하다.
- [0143] 또한, 상기 약제학적 활성성분을 물리적으로 봉입하는 단계는 약제학적 활성성분과 자성 나노입자를 함께 용해시키는 것이 바람직하다.
- [0144] 본 발명의 자성 나노복합체의 제조방법에 있어서, 상기 조직 특이적 결합성분을 나노복합체의 표면에 결합시키는 단계는 형광 자성 나노복합체의 표면을 가교제를 이용하여 조직 특이적 결합성분을 화학적으로 결합시켜 세포 표적 효율을 향상시키는 단계이다.
- [0145] 상기 조직 특이적 결합성분을 나노복합체의 표면에 결합시키는 단계는
- [0146] p) 가교제를 이용하여 친수성 화합물 부분에 활성 성분 결합영역을 제공하는 단계; 및
- [0147] q) 상기 활성성분 결합영역과 조직 특이적 결합성분을 결합시키는 단계를 포함하는 조직 특이적 결합성분을 나노복합체의 표면에 결합시키는 단계를 포함하는 것이 바람직하다.
- [0148] 상기 단계에서 이용 가능한 조직 특이적 결합성분의 구체적인 종류는 상술한 바와 같다.
- [0149] 또한, 상기 단계 d), f), n) 및 p)에 있어서, 이용 가능한 가교제는 특별히 제한되지는 않으나, N,N,N',N',N'-펜타메틸다이에틸렌트리아민 (N,N,N',N',N'-pentamethyldiethylenetriamine, PMDETA), 1,4-디이소티오시아나토벤젠(1,4-Diisothiocyanatobenzene), 1,4-페닐린 디이소시아네이트(1,4-Phenylene diisocyanate), 1,6-디이소시아나토헥산(1,6-Diisocyanatohexane), 4-(4-말레이미도페닐)뷰트릭산 노말-하이드록시숙신이미드 에스터(4-(4-Maleimidophenyl)butyric acid N-hydroxysuccinimide ester), 포스겐(Phosgene solution), 4-(말레이미도)페닐 이소시아네이트(4-(Maleinimido)phenyl isocyanate), 1,6-헥산디아민(1,6-Hexanediamine), p-니트로페닐클로로포르메이트(p-Nitrophenyl chloroformate), 노말-하이드록시숙신이미드(N-Hydroxysuccinimide), 1,3-디사이클로헥실카르보이미드(1,3-Dicyclohexylcarbodiimide), 1,1'-카르보닐디이미다졸(1,1'-Carbonyldiimidazole), 3-말레이미도벤조익산 노말-하이드록시숙신이미드 에스터(3-Maleimidobenzoic acid N-hydroxysuccinimide ester), 에틸렌디아민(Ethylenediamine), 비스(4-니트로페닐)카르보네이트(Bis(4-nitrophenyl) carbonate), 숙시닐 클로라이드(Succinyl chloride), N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카르보이미드 하이드로클로라이드(N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide Hydrochloride), N,N'-디숙신

이미딜 카르보네이트(N,N'-Disuccinimidyl carbonate), N-숙신이미딜3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트(N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate), 또는 숙시닉 언하이드라이드(succinic anhydride) 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다.

[0150] 상기 가교제는 양친매성 화합물 및 형광 자성 나노복합체의 표면의 일부와 반응하여 -COOH, -CHO, -NH₂, -SH, -CONH₂, -PO₃H, -PO₄H, -SO₃H, -SO₄H, -OH, -NR₄⁺X⁻, -술포네이트, -니트레이트, -포스포네이트, -숙신이미딜기, -말레이미드기, 또는 -알킬기와 같은 활성 성분의 결합영역을 제공한다.

[0151] 상기 q) 단계의 형광 자성 나노복합체의 표면의 활성성분 결합영역과 조직 특이적 결합성분의 활성성분의 결합은 각 활성성분의 종류 및 이의 화학식에 따라 변화될 수 있으며, 그 대표적인 예를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

I	II	III
R-NH ₂	R'-COOH	R-NHCO-R'
R-SH	R'-SH	R-SS-R
R-OH	R'-(에폭시기)	R-OCH ₂ C(OH)CH ₂ -R'
RH-NH ₂	R'-(에폭시기)	R-NHCH ₂ C(OH)CH ₂ -R'
R-SH	R'-(에폭시기)	R-SCH ₂ C(OH)CH ₂ -R'
R-NH ₂	R'-COH	R-N=CH-R'
R-NH ₂	R'-NCO	R-NHCONH-R'
R-NH ₂	R'-NCS	R-NHCSNH-R'
R-SH	R'-COCH ₂	R'-COCH ₂ S-R
R-SH	R'-O(C=O)X	R-OCH ₂ C(=O)O-R'
R-(아지리딘기)	R'-SH	R-CH ₂ CH(NH ₂)CH ₂ S-R'
R-CH=CH ₂	R'-SH	R-CH ₂ CHS-R'
R-OH	R'-NCO	R'-NHCOO-R
R-SH	R'-COCH ₂ X	R-SCH ₂ CO-R'
R-NH ₂	R'-CON ₃	R-NHCO-R'
R-COOH	R'-COOH	R-(C=O)O(C=O)-R' + H ₂ O
R-SH	R'-X	R-S-R'
R-NH ₂	R'CH ₂ C(NH ₂ ²⁺)OCH ₃	R-NHC(NH ₂ ²⁺)CH ₂ -R'
R-OP(O ₂ ⁻)OH	R'-NH ₂	R-OP(O ₂ ⁻)-NH-R'
R-CONHNH ₂	R'-COH	R-CONHN=CH-R'
R-NH ₂	R'-SH	R-NHCO(CH ₂) ₂ SS-R'
I: 활성성분 결합영역의 작용기 II: 활성성분 III: I과 II의 반응에 따른 결합예		

[0152] 본 발명의 자성 나노복합체의 제조방법은 일반적으로 침전물로 생성되는 자성 나노복합체를 통상의 방법, 예를 들어, 원심분리 또는 여과를 통해 분리하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0154] 상기과 같은 본 발명에 따른 제조방법은 본 명세서의 일부로 인용되는 대한민국 특허공보 제10-0819378호에 기재된 내용에 따라 실시할 수 있다.

[0155] 본 발명은 또한 본 발명의 자성 나노복합체(I), 자성 나노복합체(II) 또는 자성 나노복합체(III); 및

[0156] 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조영제 조성물에 관한 것이다.

[0157] 본 발명의 자성 나노복합체는 약제학적 활성성분과 화학적으로 결합하거나 물리적인 봉입을 통해 자성 나노입자와 형광성을 동시에 포함하고, 조직 특이적 결합성분이 상기 나노복합체의 표면에 결합되어 있어 표적지향이 가능하여 자기공명 및 광학 영상 장치 등을 통해 표적 부위의 이미징이 가능한 조영제로 사용할 수 있다.

[0158] 상기 약제학적으로 허용가능한 담체는 의약 분야에서 통상 사용되는 담체 및 비히클을 포함하며, 구체적으로 이온 교환 수지, 알루미늄, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질(예, 사람 혈청 알부민), 완충 물질(예, 각종 인산염, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 포화 식물성 지방산의 부분적인 글리세라이드 혼합물), 물, 염 또는 전해질(예, 프로타민 설페이트, 인산수소이소나트륨, 인산수소삼칼륨, 염화나트륨 및 아연 염), 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸

셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌 글리콜 또는 양모지 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

- [0159] 또한, 본 발명의 조영제 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 유화제, 현탁제, 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0160] 한 양태로서, 본 발명에 따른 조영제 조성물은 비경구 투여를 위한 수용성 용액으로 제조할 수 있으며, 바람직하게는 한스 용액(Hank's solution), 링거 용액(Ringer's solution) 또는 물리적으로 완충된 염수와 같은 완충 용액을 사용할 수 있다. 수용성 주입(injection) 현탁액은 소듐 카르복시메틸셀룰로즈, 솔비톨 또는 텍스트란과 같이 현탁액의 점도를 증가시킬 수 있는 기질을 첨가할 수 있다.
- [0161] 본 발명의 조영제 조성물의 다른 바람직한 양태는 멸균 주사용 수성 또는 유성 현탁액의 멸균 주사용 제제의 형태일 수 있다. 이러한 현탁액은 적합한 분산제 또는 습윤제(예를 들면 트윈 80) 및 현탁화제를 사용하여 본 분야에 공지된 기술에 따라 제형화할 수 있다.
- [0162] 또한, 상기 멸균 주사용 제제는 무독성의 비경구적으로 허용되는 희석제 또는 용매 중의 멸균 주사 용액 또는 현탁액(예를 들면 1,3-부탄디올 중의 용액)일 수 있다. 사용될 수 있는 비휘발 및 용매로는 만니톨, 물, 링거 용액 및 등장성 염화나트륨 용액이 있다. 또한, 멸균 비휘발성 오일이 통상적으로 용매 또는 현탁화 매질로서 사용된다. 이러한 목적을 위해 합성 모노 또는 디글리세라이드를 포함하여 자극성이 적은 비휘발성 오일은 그 어느 것도 사용할 수 있다.
- [0163] 본 발명의 조영제 조성물은 진단 대상에서 분리한 조직 또는 세포에 투여하여 형광 자성 나노복합체가 발산하는 신호를 감지하여 영상을 획득하는데 이용될 수 있다.
- [0164] 상기 형광 자성 나노복합체에 의해 발산되는 신호를 감지하기 위해서는 자기공명영상장치(MRI)와 광학 이미징의 이용이 바람직하다.
- [0165] 자기공명영상장치는 강력한 자기장 속에 생체를 넣고 특정 주파수의 전파를 조사하여 생체조직에 있는 수소 등의 원자핵에 에너지를 흡수시켜 에너지가 높은 상태로 만든 후, 상기 전파를 중단하여 상기 수소 등의 원자핵 에너지가 방출되게 하고 이 에너지를 신호로 변환하여 컴퓨터로 처리하여 영상화한 장치이다. 자기 또는 전파는 골에 방해받지 않기 때문에 단단한 골 주위 또는 뇌나 골수의 종양에 대하여 종단, 횡단, 임의의 각도에서 선명한 입체적인 단층상을 얻을 수 있다. 특히 상기 자기공명영상장치는 T2 스핀-스핀 이완 자기공명영상장치인 것이 바람직하다.
- [0166]
- [0167] 본 발명의 형광 자성 나노복합체는 생체 분자의 분리, 진단 또는 치료 등의 나노 프로브 및 약물 또는 유전자 전달체(delivery vehicle)등에 이용할 수 있다.
- [0168] 자성 나노복합체를 이용한 생체 진단의 한 대표적인 예로서 분자 자기공명영상 진단 또는 자기 이완 센서(magnetic relaxation sensor)를 들 수 있다. 자성 나노복합체는 그 크기가 커짐에 따라 더 큰 T2 조영효과를 나타내는데, 이러한 성질을 이용하면 생체 분자를 검출하는 센서로 사용될 수 있다. 즉, 특정한 생체 분자가 자성 나노복합체의 영김을 유도하게 되면 이에 의해 T2 자기 공명 영상 효과가 증대된다. 이러한 차이를 이용하여 생체 분자를 검출한다.
- [0169] 또한, 본 발명의 형광 자성 나노복합체는 거대 자기-저항 바이오센서(Giant magnetic resistance(GMR) sensor)의 진단 물질로 이용할 수 있다. 자성 나노복합체는 기존의 마이크로 미터(10^{-6} m) 크기의 비드(US 6,452,763 B1; US 6,940,277 B2; US 6,944,939 B2; US 2003/0133232 A1)보다 더 우수한 자기적 특징, 수용액에서의 콜로이드 안정성, 낮은 비선택성 결합을 나타낼 수 있으므로, 기존 거대자기저항 바이오 센서의 검출한계를 크게 높일 수 있는 가능성을 갖고 있다.
- [0170] 또한, 본 발명의 형광 자성 나노복합체는 자성 마이크로 유체 센서를 이용한 분리 및 검출, 약물 또는 유전자의 전달, 자성 고온 치료법에 이용될 수 있다.
- [0171] 본 발명은 또한 본 발명의 자성 나노복합체; 및
- [0172] 진단 프로브를 포함하는 다중 진단 프로브에 관한 것이다.
- [0173] 상기 진단 프로브는 T1 자기공명 영상 진단 프로브, 광학 진단 프로브, CT 진단 프로브, 또는 방사선 동위원소 등을 사용할 수 있다.

- [0174] 상기 다중 진단 프로브는 예를 들면, 수용성 자성 나노복합체에 T1 자기공명 영상 진단 프로브를 결합시키면 T2 자기공명영상 및 T1자기공명영상 진단을 동시에 진행할 수 있고, 광학 진단 프로브를 결합시키면 자기공명 영상과 광학 이미징을 동시에 할 수 있으며, CT 진단 프로브를 결합시키면 자기공명영상과 CT 진단을 동시에 할 수 있다. 또한 방사선 동위원소와 결합시키면 자기공명영상과 PET, SPECT 진단을 동시에 할 수 있다.
- [0175] 상기 T1 자기공명 영상 진단 프로브로는 Gd 화합물, 또는 Mn화합물 등을 포함하며, 광학 진단 프로브로는 유기 형광 염료(dye), 양자점, 또는 염료 표지(dye labelled) 무기 지지체(예 SiO_2 , Al_2O_3)를 포함하며, CT 진단 프로브로는 I(요오드) 화합물, 또는 금 나노 입자를 포함하고, 방사선 동위원소로는 In, Tc, 또는 F 등을 포함한다.
- [0176] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것 일뿐, 어떠한 의미로도 본 발명을 제한하지 않는다.
- [0177] <제조예 1> 포화지방산을 이용한 고민감도 자성 나노입자의 제조
- [0178] 7nm의 마그네타이트(MnFe_2O_4)는 각각 0.6몰의 도데실산, 도데실 아민을 215℃의 벤질에테르 용매에서 철 트리아세틸아세토네이트와 망가네즈 트리아세틸아세토네이트(Aldrich)를 2시간 동안 가열하고, 315℃에서 1시간 동안 열분해 화학반응(thermal decomposition)하여 합성하였다.
- [0179] 12nm 마그네타이트 나노입자는 도데실산(0.2몰), 도데실 아민 (0.1몰), 상기 7nm의 마그네타이트 나노입자 (10mg/mL) 및 철 트리아세틸아세토네이트와 망가네즈 트리아세틸아세토네이트 포함하는 벤질에테르 용액을 115℃에서 30분, 215℃에서 2시간, 315℃에서 1시간 가열하여 제조하였다.
- [0180] 제조된 자성 나노입자의 투과전자현미경 사진을 도 2a에 도시하였다.
- [0181] <제조예 2> 양친매성 화합물의 소수성 부분에 소수성 형광물질이 결합된 형광성의 양친매성 화합물의 중합
- [0182] 첫 번째 단계로, HO-PCL-Br를 합성하기 위하여 90mL의 증류된 톨루엔(toluene)에서 3.44g(0.0175mol)의 2-하이드록시에틸-2'-브로모프로피오네이트(2-hydroxyethyl 2'-bromopropionate)을 공비적으로 건조시키고, 30g의 ϵ -카프로락톤(ϵ -caprolactone)을 상기 하이드록시에틸-2'-브로모프로피오네이트 용액에 첨가하였다. 개시제로 0.14g(0.35mmol)의 스테이너스 옥토에이트($\text{Sn}(\text{Oct})_2$)를 120℃에서 첨가하여 중합반응을 개시하였고, 반응 혼합물을 질소 분위기에서 24시간 동안 교반하였다. 반응물을 톨루엔으로부터 1L의 헥산(n-hexane)으로 침전시켜 93% 수율로 HO-PCL-Br를 중합하였다.
- [0183] 두 번째로, 고분자 개시제로 3g(11.8mmol)의 HO-PCL-Br와 0.49g(7.1mmol)의 쿠퍼(I)브로마이드(Cu(I)Br)를 가열 건조된 둥근 플라스크에 첨가하였다. 10mL의 톨루엔과 터트-부틸 메타아크릴레이트(tert-butyl methacrylate, tBMA)를 질소(N_2) 가스로 탈기하고, 상기 플라스크에 첨가한 후, 1.48g(7.1mmol)의 N,N,N',N',N'-펜타메틸다이에틸렌트리아민(N,N,N',N',N'-pentamethyldiethylenetriamine, PMDETA)를 가교제로 첨가하였다. 반응 온도를 85℃로 유지하면서 15시간 동안 중합 반응시켰다. 중합된 공중합 고분자를 실리카 컬럼을 통과시킨 뒤, 테트라하이드로퓨란(tetrahydrofuran, THF)에서 헥산(n-hexane)으로 침전시켰다. 1,3-디사이클로헥시카르보이미드(1,3-dicyclohexylcarbodiimide, DCC)를 이용하여 PCL 블록 말단에 형광물질인 파이렌(pyrene)을 결합시켜 파이렌-PCL-b-폴리터트부틸메타아크릴레이트(pyrene-labeled PCL-b-poly(tert-butyl methacrylate, Py-PCL-b-PtBMA)를 합성하였다.
- [0184] 마지막 단계로, 3g의 Py-PCL-b-PtBMA 고분자와 10mL의 트리플루오로아세트산(trifluoroacetic acid, TFA)을 10mL의 메틸렌 클로라이드(methylene chloride, MC)에 첨가하여 Py-PCL-b-PtBMA의 블로킹된 카르복시 구조를 활성화시켰다. 투석 멤브레인(molecular weight cut off(MWCO): 1000)을 이용하여 수용상에서 24 시간 동안 투석시킨 뒤, 감압 동결 건조를 실시하였다.
- [0185] 제조된 Py-PCL-b-PMAA의 상대 분자량이 4,200Da 임을 젤 퍼미에이션 크로마토그래피(gel permeation chromatography, GPC)를 이용하여 확인하였다. 제조된 Py-PCL-b-PMAA를 핵자기공명(NMR)으로 3.97ppm 근처에서 PLC의 피크를, 7.9~8.3ppm 근처에서 파이렌 피크를 확인하였고, 1.49ppm에서 터트 부틸 에스터의 피크가 사라짐을 확인하였다.
- [0186] <제조예 3> 친수성 고분자의 일 부분에 소수성 형광물질이 결합된 형광성의 양친매성 화합물의 중합
- [0187] Pyrene-PEG를 합성하기 위하여 친수성인 모노메톡시 폴리에틸렌 글라이콜(Mw: 5,000Da) 5g(0.001mol), 소수성

형광물질로 1-파이레닉부티르산(Mw: 288.34Da) 0.288g(0.001mol), N,N'-다이사이클로헥실카르보다이마이드(dicyclohexylcarbodiimide) 1.86g(0.009mol) 및 4-다이메틸아미노피리딘(4-dimethylaminopyridine) 1.01g(0.009mol)을 100mL의 메틸렌 클로라이드에 녹이고 트리에틸렌 1.25mL(0.009mol)를 첨가하여 48시간 동안 실온에서 질소 분위기에서 반응시켰다. 반응물 중 다이사이클로헥실 우레아를 200nm의 기공 크기의 셀룰로우스 아세테이트 필터로 제거하였다. 회전식 증발 건조기를 이용하여 유기용매를 제거한 뒤, 다이클로로메탄을 첨가하고, 에테르에 침전시켜 합성된 Py-PEG 를 정제하였다.

- [0188] FT-IR로 제조된 Py-PEG의 에스테르 결합을 $1,737\text{cm}^{-1}$ 에서 확인하였고, $3,500\text{cm}^{-1}$ 및 $1,695\text{cm}^{-1}$ 에서 모노메톡시 폴리에틸렌 글라이콜의 하이드록시기와 1-파이레닉부티르산의 카르복시기의 사라짐을 확인하였다(도 3).
- [0189] 핵자기공명(NMR)으로 3.65ppm 근처에서 모노메톡시 폴리에틸렌 글라이콜의 피크를, 7.82 및 8.12ppm 근처에서 1-파이레닉부티르산의 피크를 확인하였다(도 4).
- [0190] 젤 퍼미에이션 크로마토그래피(gel permeation chromatography, GPC)를 이용하여 Py-PEG의 분자량이 5,288Da임을 확인하였다(도 5).
- [0191] 특히, Py-PEG의 임계미셀농도(critical micelle concentration)와 수용상과 유기용매상에서 용해도와 형광성의 정도를 형광분광기로 측정하여 형광성의 양친매성 화합물임을 확인하였다(도 6, 7).
- [0192] <실시예 1> 에멀전형 형광 자성 나노복합체의 제조
- [0193] 상기 제조예 1에서 제조한 자성 나노입자 5mg 및 상기 제조예 2에서 제조한 형광성의 양친매성 화합물 50 mg를 오일상인 10mL의 다이클로로메탄(dichloromethane)에 용해시켰다. 이 오일상을 20mL의 수용상과 혼합시킨 후 이 혼합물을 450W의 초음파에 의해 10분 동안 포화시켰다. 상기 에멀전을 12시간 동안 교반하여 오일상을 증발시키고 원심분리(RPM: 20,000)를 통하여 불순물이 제거된 형광 자성 나노복합체를 제조하였다. 제조된 입자는 2mL의 PBS(pH 7.4) 용액에 재 분산시켰고, 크기와 제타전위는 동적 레이저 광 산란법을 사용하여 확인하였다. 또한, 투과 전자 현미경을 사용하여 확인하였으며, 이를 각각 도 2b에 도시하였다. 또한, FT-IR 을 통하여 형광성의 양친매성 화합물 합성을 확인하여 도 9a 에 도시하고, X선 회절 분석법(XRD)을 통하여 형광 자성 나노복합체 안의 자성 나노입자의 결정성 보전여부를 확인하고 도 9b에 도시하였다. 진동 시료 마그네토미터(vibration sample magnetometer, VSM)을 이용하여 초상자성임을 확인하고 이를 도 10a에 도시하였다.
- [0194] <실시예 2> 에멀전형 형광 자성 나노복합체의 제조
- [0195] 오일상인 10mL의 헥산(n-hexane)에 용해된 제조예 1에서 제조한 자성 나노입자 50 mg 와 20mL의 수용상에 용해된 상기 제조예 3에서 제조한 형광성의 양친매성 화합물 200mg 를 혼합시킨 후 이 혼합물을 450W의 초음파에 의해 10분 동안 포화시켰다. 상기 에멀전을 12시간 동안 교반하여 오일상을 증발시키고 30 분 동안 원심분리(RPM: 18,000)를 통하여 불순물이 제거된 형광 자성 나노복합체를 제조하였다. 제조된 입자는 10mL의 초 순수(Deionized water, DW)(pH7.4) 용액에 재 분산시켰고, 크기와 제타전위는 동적 레이저 광 산란법을 사용하여 확인하였다. 투과 전자 현미경을 사용하여 확인하였으며, 이를 각각 도 2c에 도시하였다. 또한, 열분석기(Thermogravimetric Analyzer, TGA)과 X선 회절 분석법(X-ray diffraction, XRD)를 통하여 형광 자성 나노복합체 안의 자성 나노입자의 로딩 비율과 결정성 보전여부를 확인하였고, 도 9c, 9d에 도시하였다. 진동 시료 마그네토미터(vibration sample magnetometer, VSM)을 이용하여 초상자성임을 확인하였고 이를 도 10b에 도시하였다. 형광 자성 나노입자가 초 순수 용액에서만 아니라 다양한 pH 와 염화나트륨의 농도의 수상 용액에서도 형광성을 유지하며 안정성을 확보함을 확인하고, 도 11 및 12에 도시하였다.
- [0196] <실시예 3> 표적지향성을 갖는 형광 자성 나노복합체의 제조
- [0197] 상기 실시예 1에서 제조한 형광 자성 나노복합체 1mg와 Cetuximab 1mg과 human IgG 1mg을 각각 PBS용액 0.4mL에 분산시켰다. 상기 용액에 N-hydroxysuccinimide(2.0mM) 및 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (2.0mM)을 넣고, 4시간 뒤에 이 혼합물을 Sephacryl S-300 column과 ultra centrifugal filter를 이용하여 결합하지 않은 Cetuximab을 분리하였다. Cetuximab 수용체가 과발현된 세포와 대조군 세포를 통하여 형광 자성 나노복합체의 표적지향성을 확인하였다.
- [0198] <실험예 1> 형광 자성 나노복합체의 자기적 특성(자기이력곡선 및 포화자화값)의 분석
- [0199] 자기장 하에서 형광 자성 나노복합체의 자기적 민감도를 평가하기 위하여, 상기 실시예 1 및 2에서 제조된 형광 자성 나노복합체의 자기이력곡선(magnetic hysteresis loop) 및 포화자화값(saturation of magnetization)을

진동시료 자력계(VSM, Model 7300, Lakershore)를 사용하여 평가하였다. 도 10은 측정된 자기이력곡선을 도시한 도면이다.

- [0200] 도 10에 나타난 바와 같이, 300K에서 관찰된 자성 나노입자의 이력곡선(hysteresis loop)은 자기이력(magnetic hysteresis)이 없는 상태에서 초상자성 거동(superparamagnetic behavior)을 나타낸 형상이었다. 또한, 상기 실시예 1에서 제조된 형광 자성 나노입자는 1.5T에서 52.5emu/g의 포화자화값을 지녔으며(도 10a), 상기 실시예 2에서 제조된 형광 자성 나노입자는 0.8T에서 41.9emu/g의 포화자화값을 지녔다. 형광성의 양친매성 화합물 층의 존재로 인해, 형광 자성 나노입자의 포화자화값은 자성 나노입자보다 낮게 나타났다(도 10b).
- [0201] <실험예 2> 형광 자성 나노복합체의 MR 조영효과 분석
- [0202] 상기 실시예 1 및 2에서 제조된 형광 자성 나노복합체의 MRI 조영제로서의 활용 가능성을 확인하기 위하여, r_2 (T2 relaxivity coefficients)의 측정을 통해 자성 나노복합체의 MR 조영 효과를 조사하였다.
- [0203] 구체적으로, MR 영상 시험은, Micro-47 surface coil을 갖는 1.5 T clinical MRI instrument(Intera, Philips Medical System)를 사용하여 수행하였다. 자성 나노복합체의 r_2 (T2 relaxivity coefficients with unit of $\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$)값은 실온에서 CPMG(Carr-Purcell-Meiboom-Gill) 시퀀스(sequence)를 사용하여 측정하였다($\text{TR} = 10\text{s}$, 32 echoes with 12 ms even echo space, number of acquisitions = 1, point resolution of $156 \times 156 \mu\text{m}$, section thickness of 0.6 mm).
- [0204] 도 13에 나타난 바와 같이, 1.5T에서 형광 자성 나노복합체의 농도가 증가함에 따라, r_2 가 명백히 증가하였다. 비록 포화자화값은 작지만, 자성 나노입자의 클러스터링 효과(clustering effect)에 의하여 높은 r_2 값을 얻었다. 또한, 농도가 증가하면서 현저히 어두운 MR contrast를 제공하였다. 따라서, MR 영상 프로브(MR imaging probe)로서의 형광 자성입자는 분자 영상(molecular imaging)용으로 충분한 자기적 특성을 보유하고 있음을 확인할 수 있었다.
- [0205] <실험예 3> 형광 자성 나노복합체의 형광성과 자성의 동시 존재 확인
- [0206] 상기 실시예 1 및 2에서 제조된 형광 자성 나노복합체는 형광물질(파이렌, Pyrene)이 결합된 형광성의 양친매성 화합물층의 중심에는 자성 나노입자로 구성되어 있다. 형광 자성 나노복합체는 외부 자기장(Nd-B-Fe 자석, 0.35T)에 의하여 민감하게 정렬하며 파이렌의 형광성을 띄는 것을 도 14및 15에서 확인하였다. 도 14a는 외부 자기장이 작용하지 않는 상태에서 정지된 입자상태를 나타내고, 도 14b와 도 14c는 외부 자기장 작용하에서 정렬된 입자상태를 나타낸다. 또한, 도 15는 외부자기장이 작용하지 않은 상태($t: 0\text{sec}$)에서 외부자기장이 작용된 후 8초 후 정렬된 입자 상태를 나타낸다.
- [0207] <실험예 4> 표적지향성을 갖는 형광 자성 나노복합체의 표적지향성 확인
- [0208] 상기 실시예 3에서 제조된 조직 특이적 결합성분이 결합된 형광 자성 나노복합체의 특정세포에 대한 표적지향성을 실험하였다.
- [0209] 형광 자성 나노복합체를 각각 Cetuximab 수용체가 과 발현된 세포(A431) 와 대조군 세포(MCF-7) 1×10^6 개에 처리한 후, 30분 동안 배양시키고 PBS로 3회 세척하였다. PBS 세척 후, PBS 400 μl 를 첨가하고 표적지향성을 정량적으로 분석하기 위하여 위의 처리한 형광 자성 나노복합체에 FITC(fluorescein isothiocyanate)가 결합된 2차 표적지향 리간드(goat anti-human IgG)를 처리 후 암실에서 4°C 에서 45분 동안 배양하였다. 이어 CellQuest 소프트웨어가 있는 FACScan(Beckton-Dickinson, Sunnyvale, CA, USA)으로 유세포 분석을 실시하였다.
- [0210] 도 16에 나타난 바와 같이, 형광 자성 나노복합체는 Cetuximab 수용체가 과발현된 세포에서 높은 FITC의 형광 강도를 나타냄으로써 특정 세포에 대한 표적지향성이 있음을 확인하였다.
- [0211] 이는 형광 자성 나노복합체를 처리한 세포에 대한 현미경, MR, optical 이미징을 통하여 추가적으로 확인하였다.
- [0212] 도 17에 나타난 바와 같이, 형광 자성 나노복합체 파이렌 형광성과 2차 조직 특이적 결합성분의 FITC의 형광성을 현미경 이미징을 통하여 확인하였다.
- [0213] 또한, 도 18에 나타난 바와 같이, 표적지향세포(A431)가 대조군 세포(MCF-7)에 비하여 어두운 MR 이미징과 높은

r_2 값을 나타냄을 관찰하였다.

- [0214] 또한, 도 19에 나타난 바와 같이, A431 조건에서 MCF-7과 비교하여 2차 조직 특이적 결합성분의 FITC의 형광성이 높았다.
- [0215] 상기 결과를 통해, 효과적으로 형광 자성 나노복합체가 표적 지향됨을 확인하였다.
- [0216] <시험예 5> 형광 자성 나노복합체의 세포 친화도 확인
- [0217] 상기 실시예 2에서 제조된 자성 나노복합체의 세포 친화도 시험을 실시하였다. 6-웰에 세포(NIH 3T6.7)를 웰 당 1×10^6 개를 분주하고, 12 시간 동안 배양시키고 PBS로 3회 세척하였다. PBS 세척 후, $2.7 \mu\text{g/mL}$ 의 농도의 형광 자성 나노복합체를 처리한 후, 24 시간 추가 배양하였다. PBS 세척 후, 트립신으로 형광 자성 나노복합체를 처리한 세포와 처리하지 않은 세포를 각각 1×10^6 개 세포의 현미경, MR, UV 이미징을 통하여 추가적으로 확인하였다. 형광 자성 나노복합체 파이렌 형광성을 현미경 이미징을 통하여 확인하였고, 도 20에 도식화하였다.
- [0218] 도 20에 나타난 바와 같이, 형광 자성 나노복합체를 처리한 세포가 처리하지 않은 세포에 비하여 밝은 UV 이미징과 어두운 MR 이미징, 높은 r_2 값을 얻었다. 이를 통하여 형광 자성 나노복합체의 세포 친화도와 세포내에서도 형광성과 자성이 유지됨을 확인하였다.

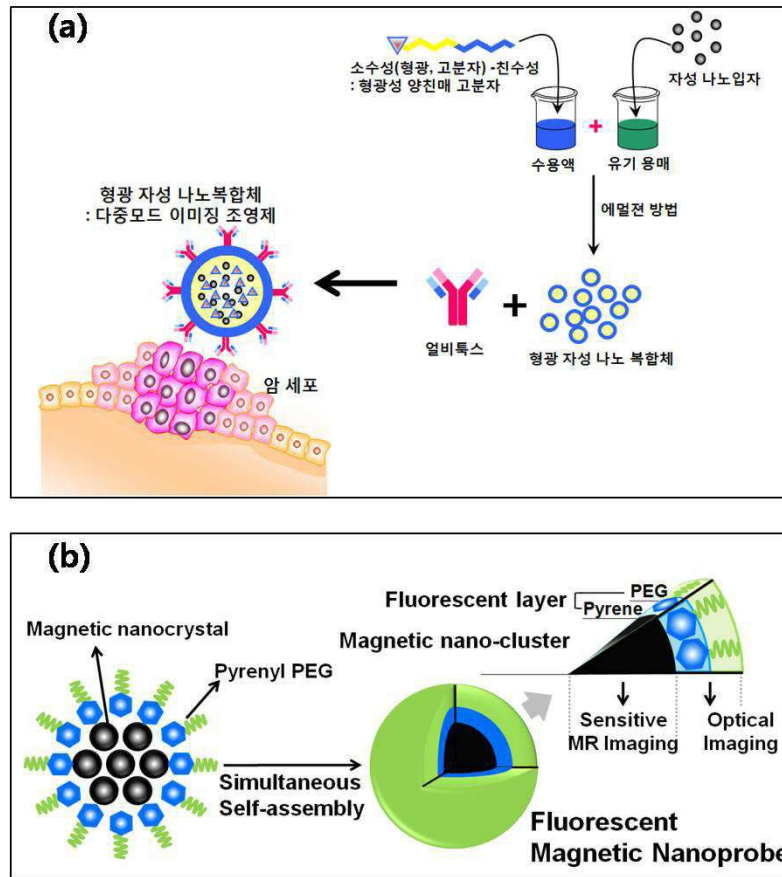
도면의 간단한 설명

- [0219] 도 1은 본 발명의 형광 자성 나노복합체의 제조방법을 도시한 모식도이다.
- [0220] 도 2는 본 발명의 자성 나노입자 또는 형광 자성 나노복합체의 투과전자현미경(TEM) 사진도이다.
- [0221] 도 3은 본 발명의 형광성의 양친매성 화합물의 FT-IR 결과를 나타낸 것이다.
- [0222] 도 4는 본 발명의 형광성의 양친매성 화합물의 핵자기공명 결과를 나타낸 것이다.
- [0223] 도 5는 본 발명의 형광성의 양친매성 화합물의 젤 퍼미에이션 크로마토그래피 결과를 나타낸 것이다.
- [0224] 도 6은 본 발명의 형광성의 양친매성 화합물의 임계미셀농도를 나타낸 것이다.
- [0225] 도 7은 본 발명의 형광성의 양친매성 화합물의 수용상과 유기용매상에서 용해도 및 형광 강도를 나타낸 것이다.
- [0226] 도 8은 본 발명의 형광 자성 나노복합체의 수용상의 안정도를 나타낸 사진이다.
- [0227] 도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 형광 자성 나노복합체의 FT-IR 결과(a), X선 회절패턴(b, d) 및 열분석 결과(c)를 도시한 그래프이다.
- [0228] 도 10은 본 발명의 형광 자성 나노복합체의 자기적 특성을 나타낸 것이다.
- [0229] 도 11은 본 발명의 형광 자성 나노복합체의 초순수용액에서의 형광 강도를 나타낸 것이다.
- [0230] 도 12는 본 발명의 형광 자성 나노복합체의 pH 및 염화나트륨의 농도에 따른 수상에서의 형광 강도를 나타낸 것이다.
- [0231] 도 13은 본 발명의 형광 자성 나노복합체의 MR 영상 시험 결과를 나타낸 것이다.
- [0232] 도 14 및 15는 본 발명의 형광 자성 나노복합체의 자기장 안에서의 이동성을 나타낸 형광현미경 사진도이다.
- [0233] 도 16은 본 발명의 형광 자성 나노복합체가 처리된 세포에서 FITC 결과를 도시한 것이다.
- [0234] 도 17은 본 발명의 표적지향성을 갖는 형광 자성 나노복합체에 대한 형광현미경 사진도(a~d)이고, e는 형광 자성 나노복합체와 FITC의 파장에 따른 형광세기를 도시한 그래프이다.
- [0235] 도 18은 본 발명의 표적지향성을 갖는 형광 자성 나노복합체의 표적지향성 정도를 세포별로 자기공명 영상과 이완성(R_2)의 변화를 통해 나타내는 그래프이다.
- [0236] 도 19는 본 발명의 표적지향성을 갖는 형광 자성 나노복합체의 표적지향성 정도를 세포별로 형광영상과 형광세기의 변화를 통해 나타내는 그래프이다.
- [0237] 도 20은 본 발명의 형광 자성 나노복합체를 처리한 세포에서 광학현미경, 자기공명 영상 및 이완성(R_2)의 변화

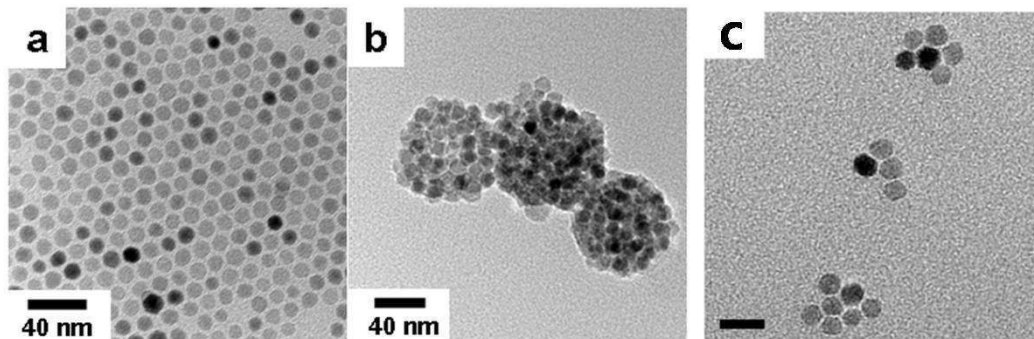
를 나타낸 것이다.

도면

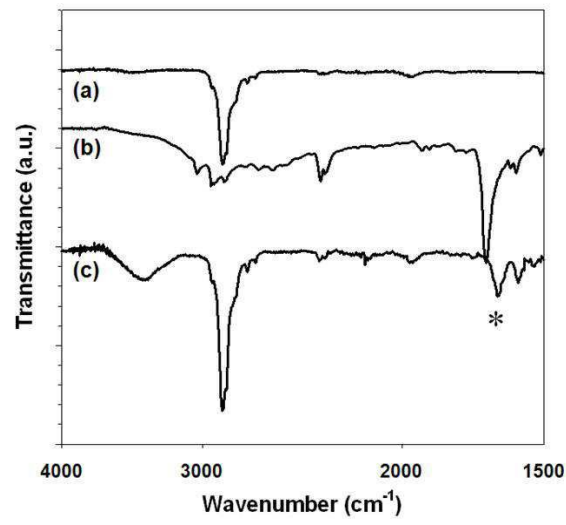
도면1



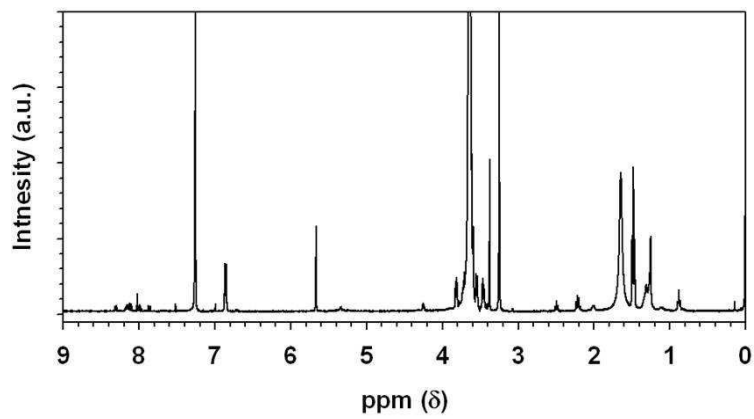
도면2



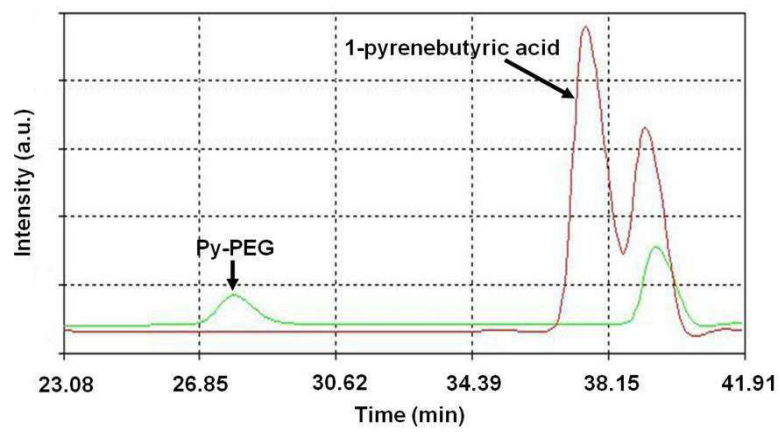
도면3



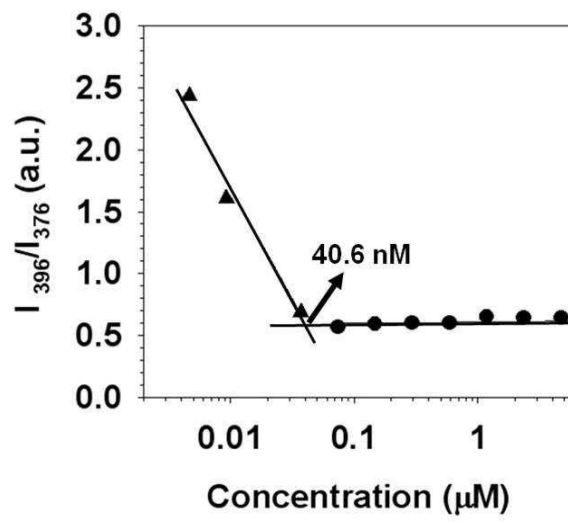
도면4



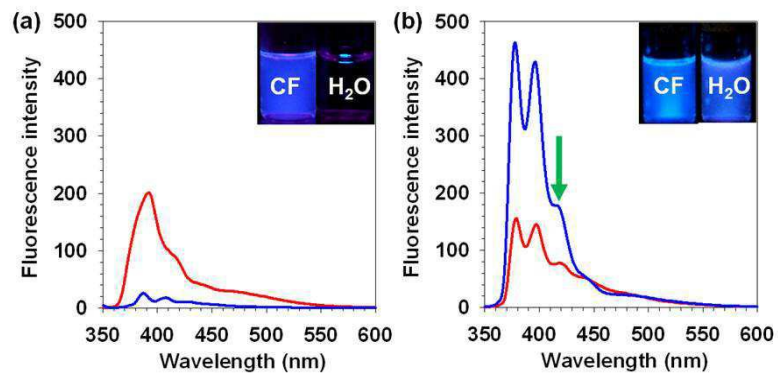
도면5



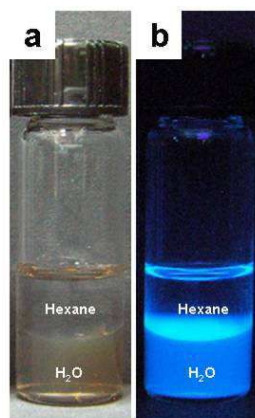
도면6



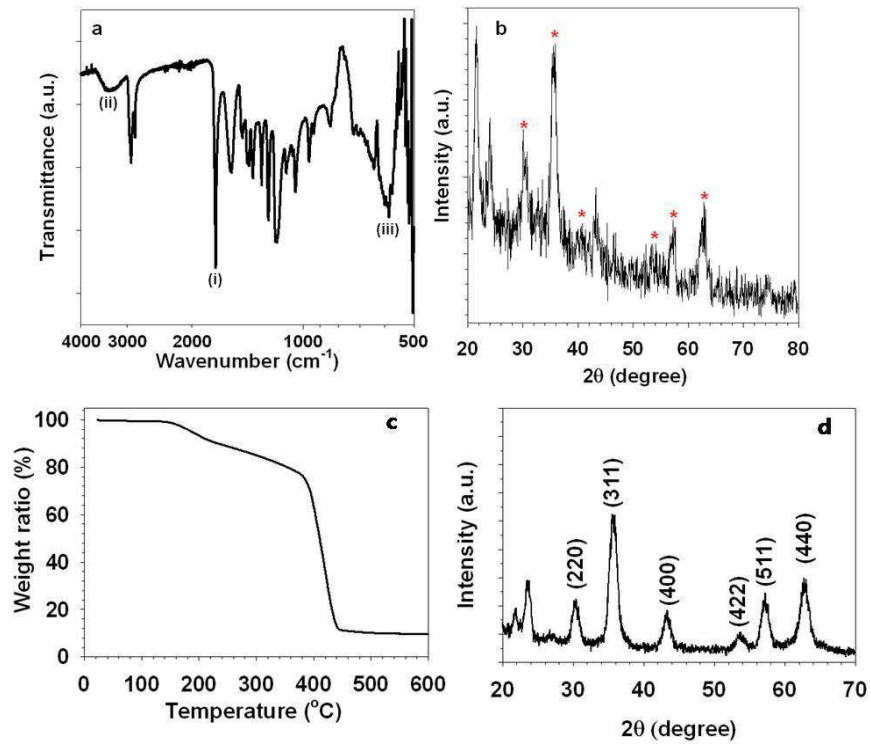
도면7



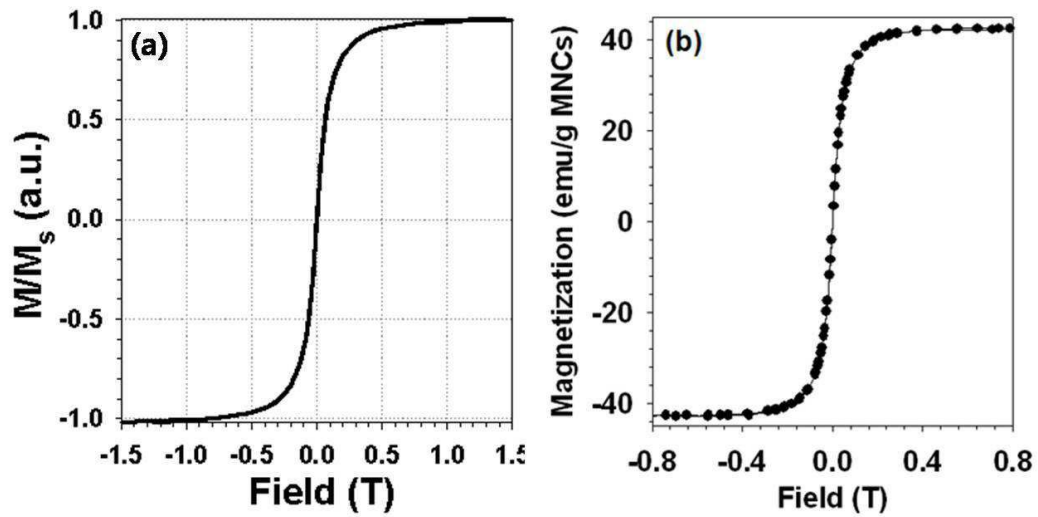
도면8



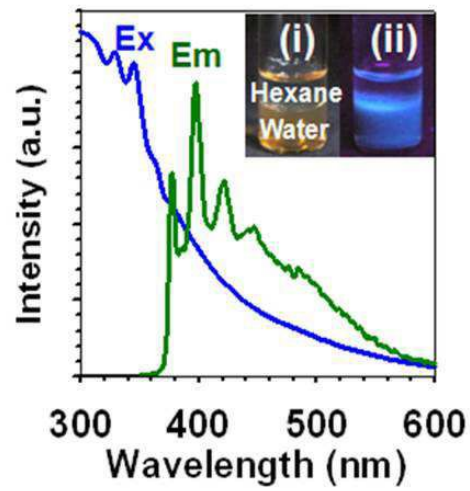
도면9



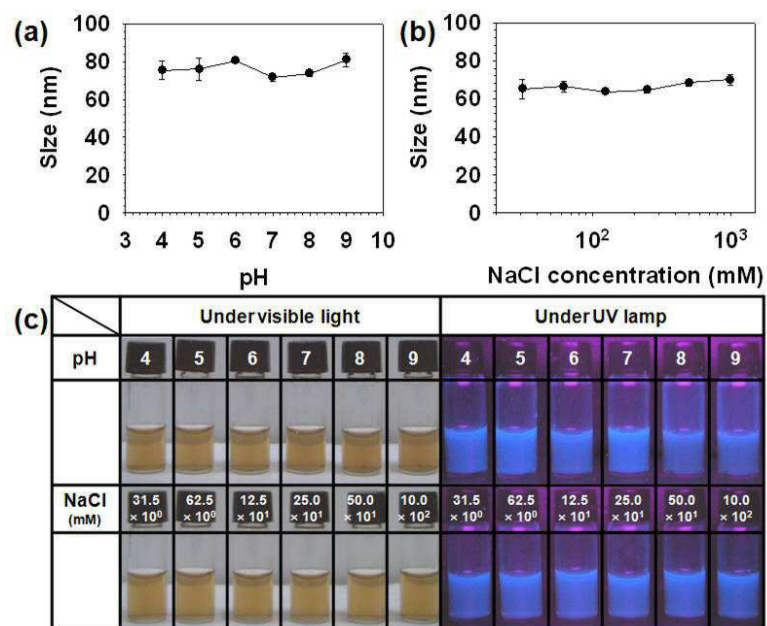
도면10



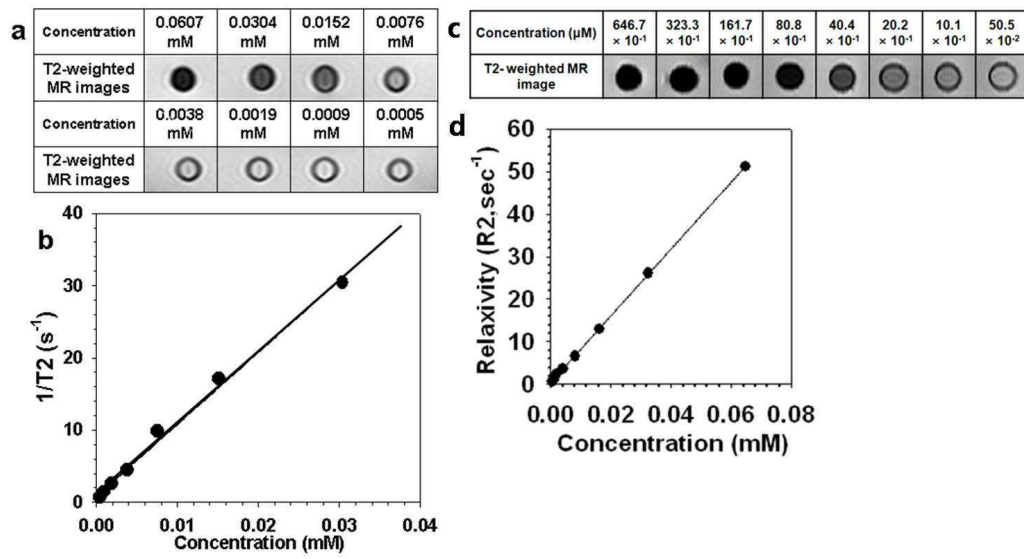
도면11



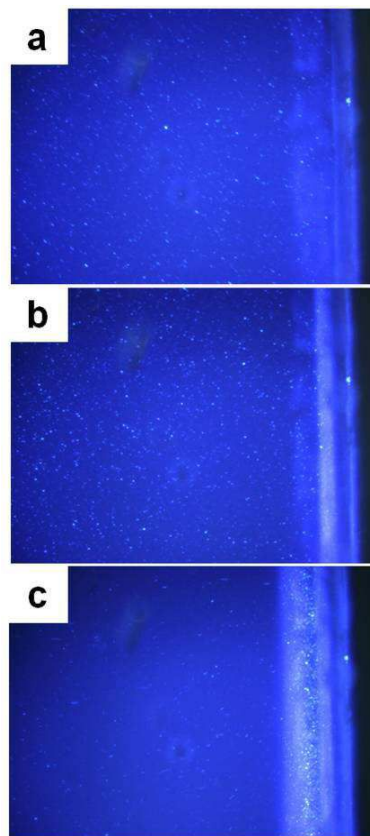
도면12



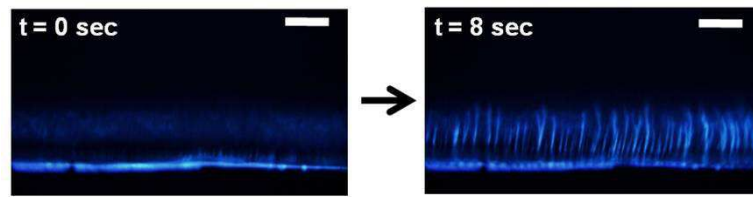
도면13



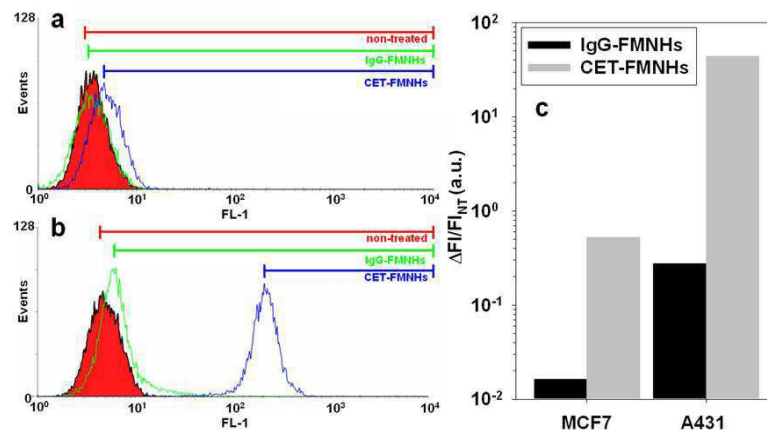
도면14



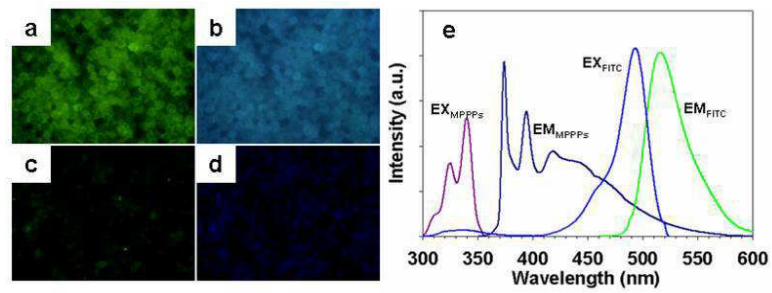
도면15



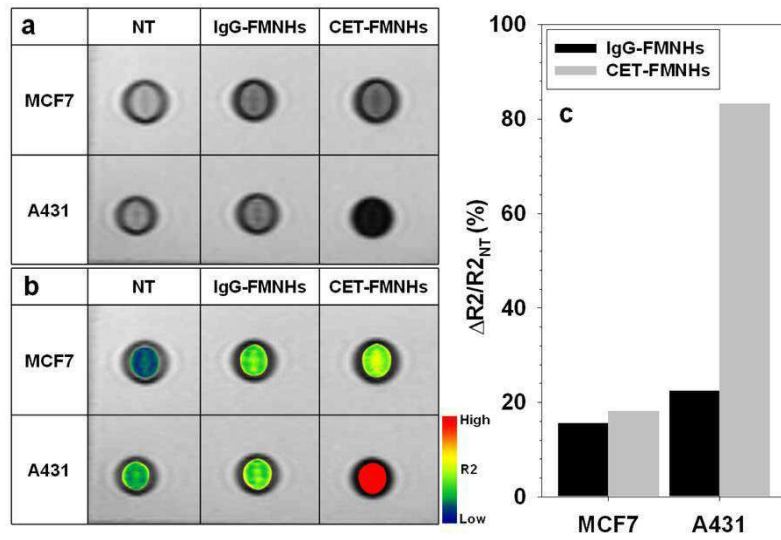
도면16



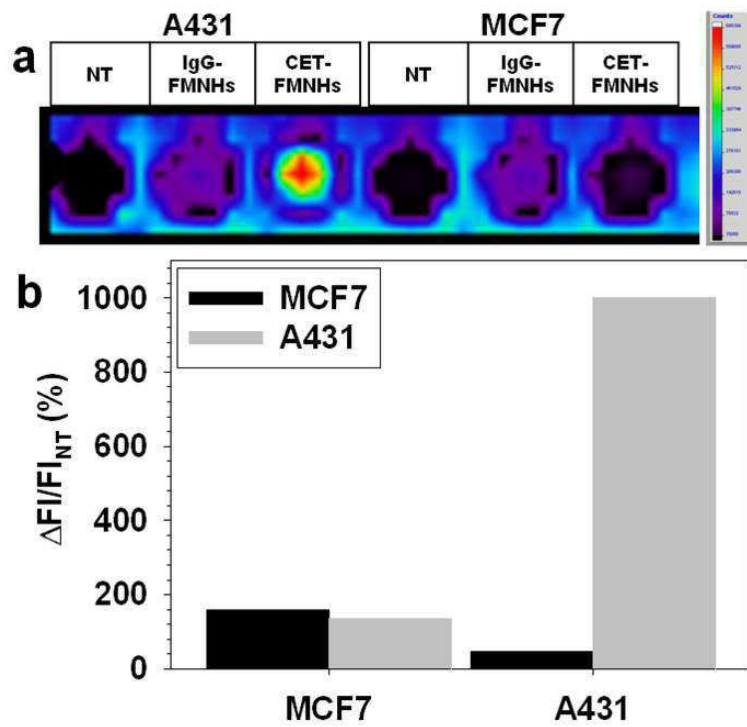
도면17



도면18



도면19



도면20

