



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년07월09일
 (11) 등록번호 10-1416290
 (24) 등록일자 2014년07월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 A61K 9/16 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)
 A61K 31/70 (2006.01) A61K 31/395 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2012-0028370
 (22) 출원일자 2012년03월20일
 심사청구일자 2012년03월20일
 (65) 공개번호 10-2013-0106654
 (43) 공개일자 2013년09월30일
 (56) 선행기술조사문헌
 US20080268468 A1

(73) 특허권자
 한국과학기술연구원
 서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)
 (72) 발명자
 김광명
 서울 구로구 개봉로20길 6, 121동 2201호 (개봉동, 현대아파트)
 권익찬
 서울특별시 노원구 중계동 신안아파트 101-306
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 4 항

심사관 : 한정희

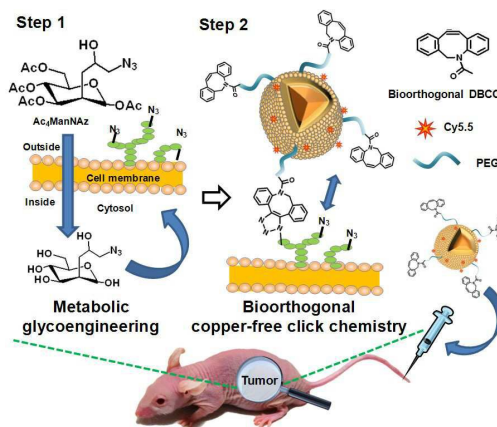
(54) 발명의 명칭 **생물 직교성 무동 클릭 화학을 통한 나노입자의 생체내 표적화 방법**

(57) 요약

본 발명은 생물 직교성 무동 클릭 화학을 이용하여 나노입자를 생체내 표적에 전달하는 방법에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로는 생체 내 투입시 상기 생체 내에서 대사 조작이 가능하며 제1 생물 직교성 관능기를 갖는 전구체를 상기 생체 내로 투입하는 단계; 및 상기 제1 생물 직교성 관능기와 무동 클릭 생물 직교성 반응을 수행할 수 있는 제2 생물 직교성 관능기가 부착된 나노입자를 상기 생체 내로 투입하는 단계를 포함하는 나노입자의 생체 내 표적화 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 표적 부위에서 나노입자의 생체내 축적을 비약적으로 증진시킬 수 있고, 결합된 나노입자가 시간 경과에 따라서 세포 내부로 이동함으로써 나노입자의 생체내 분포를 제어할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

최귀원

서울특별시 동대문구 회기동

구희범

서울 영등포구 선유서로 43, 2동 601호 (문래동6
가, 한신아파트)

이상민

서울 성동구 한림말길 50, 103동 904호 (옥수동,
옥수하이츠아파트)

윤인찬

서울 광진구 능동로 19, 102동 1301호 (자양동, 한
강현대아파트)

특허청구의 범위

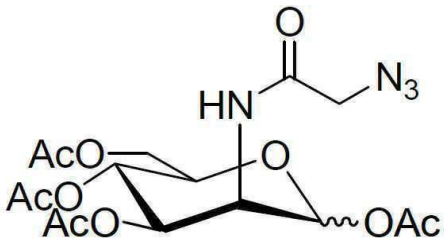
청구항 1

인간을 제외한 생체 내 투입시 상기 인간을 제외한 생체 내에서 대사 당쇄조작이 가능하며 아지드기를 갖는, 하기 화학식 1 내지 3으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 화합물을 상기 인간을 제외한 생체 내로 투입하는 단계; 및

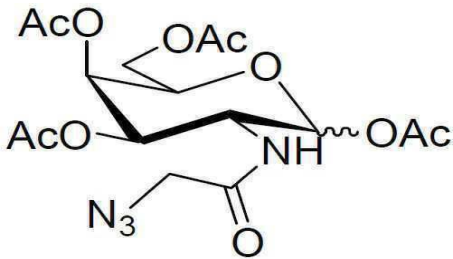
상기 아지드기와 무동 클릭 생물 직교성 반응을 수행할 수 있는, 하기 화학식 4 내지 15로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 화합물이 부착된 나노입자를 상기 인간을 제외한 생체 내로 투입하는 단계

를 포함하는 나노입자의 인간을 제외한 생체 내 표적화 방법:

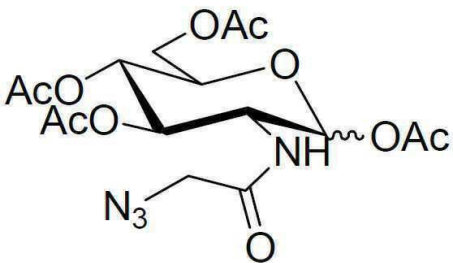
<화학식 1>



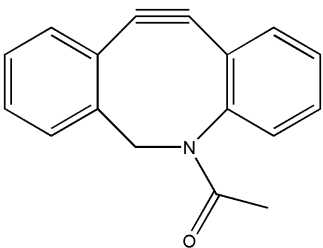
<화학식 2>



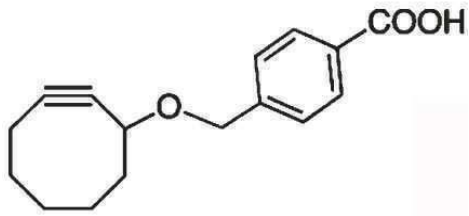
<화학식 3>



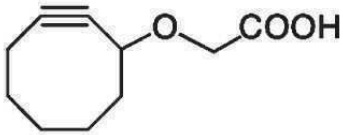
<화학식 4>



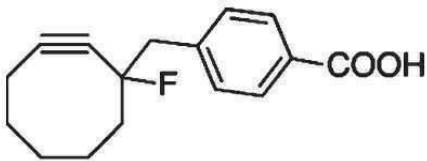
<화학식 5>



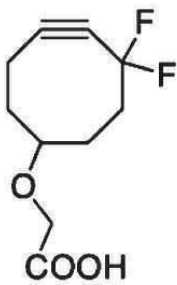
<화학식 6>



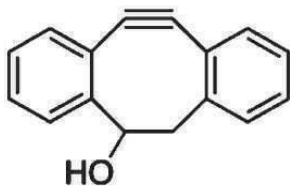
<화학식 7>



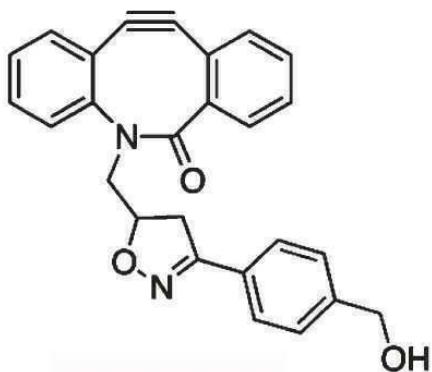
<화학식 8>



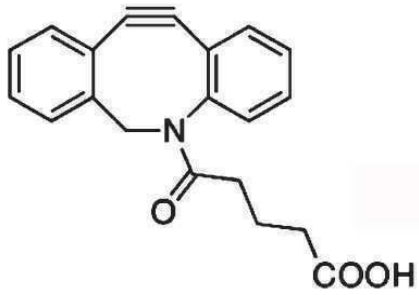
<화학식 9>



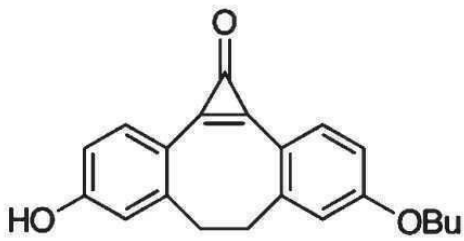
<화학식 10>



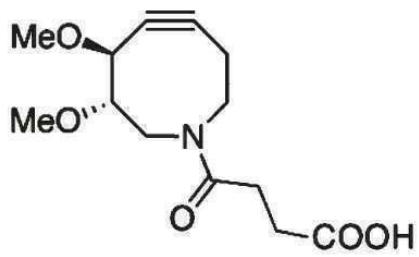
<화학식 11>



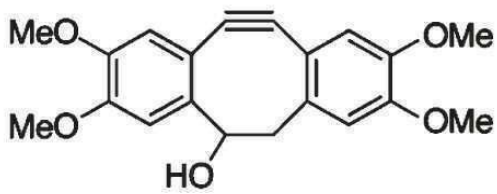
<화학식 12>



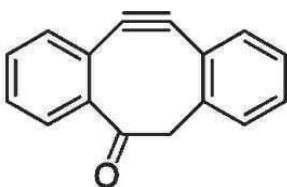
<화학식 13>



<화학식 14>



<화학식 15>



청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 나노입자는 표면에 상기 화학식 4 내지 15로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 화합물의 부착이 가능하고 체내 순환이 가능한 10 nm 내지 1000 nm 크기의 나노입자인 것을 특징으로 하는 나노입자의 인간을 제외한 생체 내 표적화 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 나노입자는 유기 나노입자, 무기 나노입자 또는 유기 무기 복합 나노입자인 것을 특징으로 하는 나노입자의 인간을 제외한 생체 내 표적화 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 유기 나노입자는 리포솜, 마이셀, 고분자 전달체 및 단백질 나노입자로 이루어진 군으로부터 선택된 것이고, 상기 무기 나노입자는 산화철, 금 및 실리카 나노입자로 이루어진 군으로부터 선택된 것임을 특징으로 하는 나노입자의 인간을 제외한 생체 내 표적화 방법.

명세서

기술분야

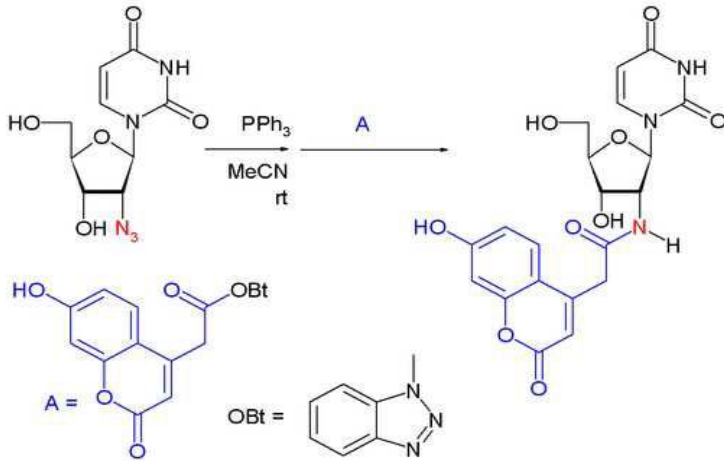
[0001] 본 발명은 생물 직교성 무동 클릭 화학을 이용하여 나노입자를 생체내 표적에 전달하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 생물 직교성 화학 (bioorthogonal chemistry)이란, 2003년에 캐롤린 베르토지 등에 의해서 처음 제안된 개념으로서 (Sletten, Ellen M.; Bertozzi, Carolyn R. "From Mechanism to Mouse: A Tale of Two Bioorthogonal Reactions" Acc. Chem. Res., 2011, 44 (9), pp 666-676), 천연 생화학 과정을 방해하지 않으면서 생체 시스템 내부에서 발생할 수 있는 화학적 반응을 의미하며, 특정 생물 직교성 화합물들은 생체내 생분자들과는 반응하지 않으면서 외부에서 주입되는 특정 비천연 분자들과만 반응한다. 따라서, 이러한 생물 직교성 화학은 크게 다음과 같은 두 단계로 진행된다. 먼저, 세포 기질이 생물 직교성 관능기를 갖도록 변형되어 세포 내로 도입되는데, 이때 세포 기질로는 대사물질, 효소 저해제 등의 물질이 사용되고, 생물 직교성 관능기는 세포 활성에 급격한 변화를 주지 않기 위해서 기질의 구조를 너무 많이 변화시키지 말아야 한다. 다음으로는, 상기 생물 직교성 관능기와 반응하는 대응 관능기를 갖는 프로브를 반응시킴으로써 기질을 표지하게 된다.

[0003] 최근에, 이러한 생물 직교성 화학은 다양한 생물학 관련 분야에서 많은 새로운 혁신을 위한 기틀을 마련하고 있으며, 생물 직교성과 생체 적합성이 있는 생물계에서 이용할 수 있는 직접 화학반응은 화학자와 생물학자 모두로부터 많은 주목을 받고 있다. 예를 들어, 하기 반응식 1로 표시되는 아지드와 포스핀기를 이용한 스타우딩어 연결반응 (Staudinger ligation)은 인 비트로 (in vitro) 및 인 비보 (in vivo) 조건 모두에서 생물 직교성을 나타내지만, 반응 속도가 느리기 때문에 광범위한 적용에 제한을 받는다.

[0004] <반응식 1>

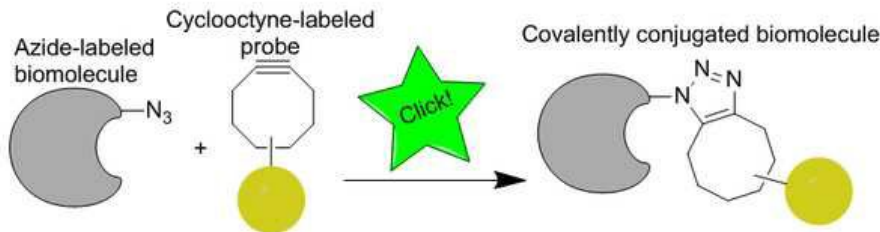


[0005]

[0006] 한편, 베르토지 등은 반응성을 증가시키는 고리-변형물이 큰 (ring-strained) 알킨기에 초점을 맞춰 생체 적합한 무동 (copper-free) 클릭 화학용 아지드기에 대한 대응 물질로서 많은 화학물질을 개발하였으며, 바이스레더 (Weissleder) 등도 반응속도가 극히 빠르고 특이성이 높은 테트라진 고리화 첨가반응을 개발하여 이용하였다.

[0007] 특히, 무동 클릭 화학반응이 필요한 이유는, 전통적인 구리 촉매를 사용하는 아지드-알킨 고리화 첨가반응이 생 접합반응을 위한 매우 신속하고 효과적인 반응임에도 불구하고, Cu(I) 이온이 세포 독성을 갖기 때문에 살아있는 세포에 적용하기에는 한계점이 있기 때문이다. 따라서, 베르토지 등은 구리 촉매를 필요로 하지 않는 무동 클릭 생물 직교성 반응을 개발하였으며 (반응식 2 참조), 이는 하기 반응식에서 볼 수 있는 바와 같이 알킨-아지드 고리화 첨가반응에 의해서 수행된다.

[0008] <반응식 2>



[0009]

[0010] 이들 생물 직교성 화학반응은 많은 분야에 적용되면서 그 가능성이 입증되었다. 특히, 생물 직교성 화학반응은 생물학 분야에서 대사 당쇄조작 (metabolic glycoengineering)과 조합됨으로써 더욱 강력한 용도를 나타내었다. 대사 당쇄조작은 적당한 전구체를 투입함으로써 고유 대사작용을 이용하는 세포에 변형 글리칸 (unnatural glycan)을 도입하는 것이다. 베르토지 연구진은 이러한 특수한 기술을 개척하였고 이러한 기술에 의해서 생물 직교성 화학을 위해 변형 작용기를 도입할 수 있다는 것을 입증한 바 있다. 구체적으로, 이러한 기술은 세포 글리칸의 분석, 3D 세포 조립, 대사 경로 탐구와 제브라피시 (zebrafish) 개발의 시공간 영상화와 같은 다양한 목적에 탁월하게 적용되었다. 그러나, 이 역시도 척추동물에서의 생체내 연구에 대한 보고는 극소수만 있을 뿐이고, 이 분야는 세포 연구에 비해 상대적으로 연구가 활발하지 못하다.

[0011] 한편, 금세기 들어 생의학 분야에서 유망한 대체 재료로서 나노입자가 출현하여 영상화와 나노의약으로서 약물 전달용으로 유용한 도구가 되어 왔다. 능동적 표적화 (active targeting)는 질환 부위에 대한 표적 특이성을 향상시키기 위한 나노입자의 가장 보편적인 방법이다. 능동적 표적화는 표적 세포 표면 위의 적당한 수용체에 결합할 수 있는 항체, 압타머 또는 펩티드와 같은 생물학적 표적 지향 물질을 이용한다. 그러나, 이들 물질에 결합하는 수용체의 양은 처음부터 제한되어 있어 이들 수용체가 포화되면 표적 나노입자의 능력이 제한된다. 또한, 표적 지향성 수용체는 질환 부위에 대한 특이성이 거의 없고, 나노입자는 이들 수용체를 통해 다른 건강한 조직에 축적될 수 있기 때문에, 치료 효율이 감소되거나 의도하지 않은 부작용이 나타날 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

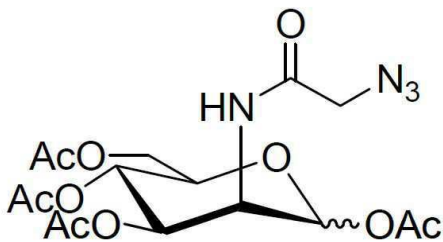
[0012] 따라서, 본 발명은 생물 직교성 무동 클릭 화학을 기초로 하는 새로운 나노입자의 생체내 표적화 방법을 제공함으로써, 표적 부위에서 나노입자의 생체내 축적을 비약적으로 증진시킬 수 있고, 결합된 나노입자가 시간 경과에 따라서 세포 내부로 이동함으로써 나노입자의 생체내 분포를 제어할 수 있는 나노입자의 생체내 표적화 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위해서,
 [0014] 생체 내 투입시 상기 생체 내에서 대사 조작이 가능하며 제1 생물 직교성 관능기를 갖는 전구체를 상기 생체 내로 투입하는 단계; 및
 [0015] 상기 제1 생물 직교성 관능기와 무동 클릭 생물 직교성 반응을 수행할 수 있는 제2 생물 직교성 관능기가 부착된 나노입자를 상기 생체 내로 투입하는 단계
 [0016] 를 포함하는 나노입자의 생체 내 표적화 방법을 제공한다.
 [0017] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 대사 조작은 대사 당쇄조작이다.
 [0018] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 전구체는 하기 화학식 1 내지 3으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 화합물이다:

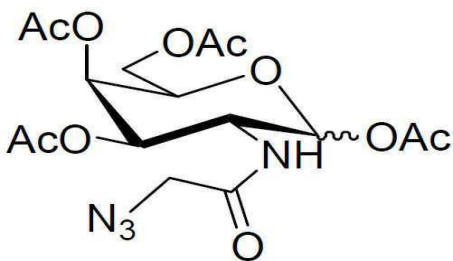
화학식 1

[0019]

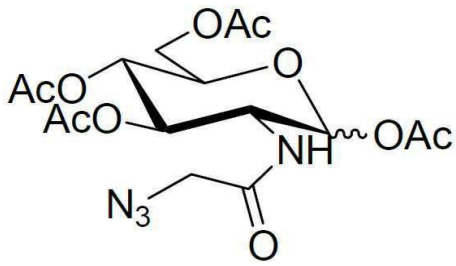


화학식 2

[0020]



화학식 3



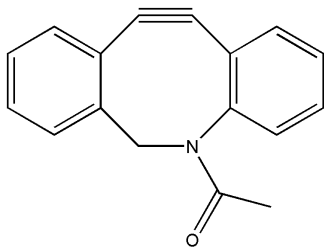
[0021]

[0022] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 상기 제1 생물 직교성 관능기는 아지드기이다.

[0023] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 상기 제2 생물 직교성 관능기는 촉매 없이 생체 내 조건에서 제1 관능기와 반응이 가능한 관능기이다.

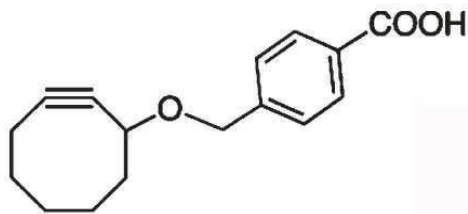
[0024] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 상기 제2 생물 직교성 관능기는 하기 화학식 4 내지 15의 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 화합물이다:

화학식 4



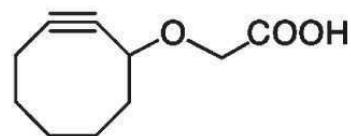
[0025]

화학식 5



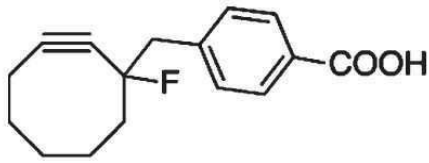
[0026]

화학식 6



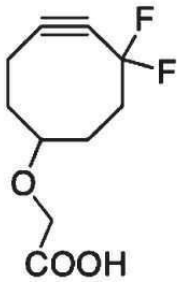
[0027]

화학식 7



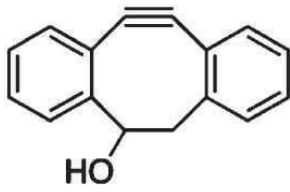
[0028]

화학식 8



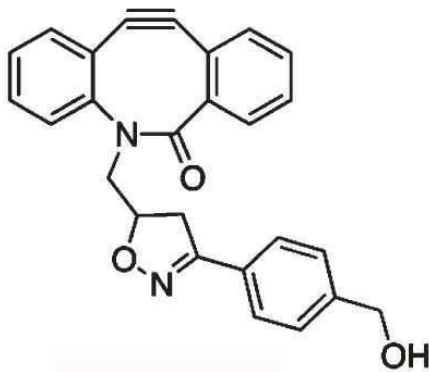
[0029]

화학식 9



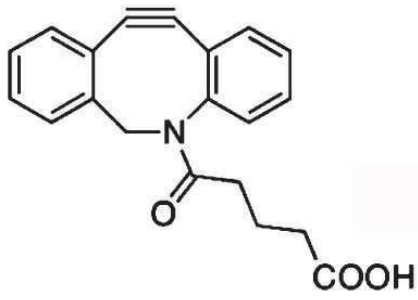
[0030]

화학식 10

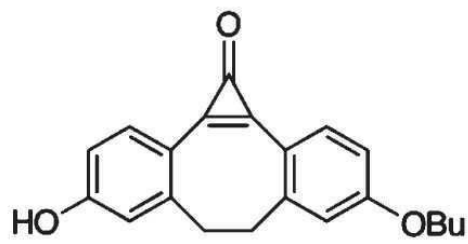


[0031]

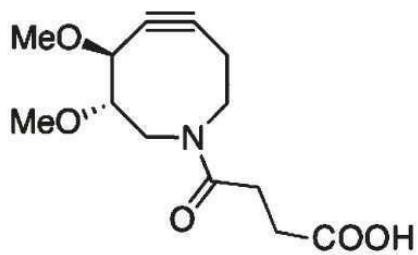
화학식 11



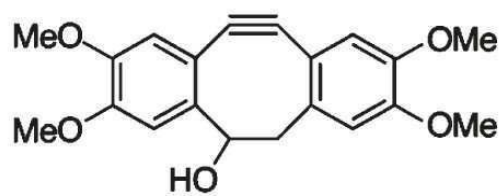
화학식 12



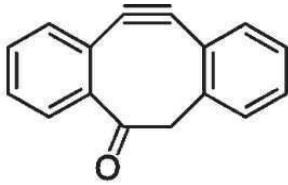
화학식 13



화학식 14



화학식 15



[0036]

[0037]

본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 상기 나노입자는 표면에 상기 제2 생물 직교성 관능기의 부착이 가능하고 체내 순환이 가능한 10 nm 내지 1000 nm 크기의 나노입자이다.

[0038]

본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 상기 나노입자는 유기 나노입자, 무기 나노입자 또는 유무기 복합 나노입자이다.

[0039]

본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 상기 유기 나노입자는 리포솜, 마이셀, 고분자 전달체 및 단백질 나노입자로 이루어진 군으로부터 선택된 것이고, 상기 무기 나노입자는 산화철, 금 및 실리카 나노입자로 이루어진 군으로부터 선택된 것이다.

발명의 효과

[0040]

본 발명에 따르면, 표적 부위에서 나노입자의 생체내 축적을 비약적으로 증진시킬 수 있고, 결합된 나노입자가 시간 경과에 따라서 세포 내부로 이동함으로써 나노입자의 생체내 분포를 제어할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0041]

도 1은 본 발명의 일 구현예에 따른 생물 직교성 무동 클릭 화학 반응을 통한 나노입자의 생체 내 표적화 방법에 대한 개략도이다.

도 2a 내지 2e는 DBCO-관능화된 리포솜 (DBCO-리포)의 변형과정과 세포결합에 대한 도면으로서, 도 2a는 DBCO-리포에 대한 사진 (삽입 도면)과, 형태 및 크기 분포에 대한 그래프이고, 도 2b는 Ac₄ManNAz-처리된 세포들에 대한 쿠마시 염색 및 웨스턴 블랏 분석 결과이고, 도 2c는 Ac₄ManNAz-처리된 세포들에 대한 형광 강도이고, 도 2d는 Ac₄ManNAz-처리된 세포들에 대한 DBCO-리포 결합 영상들이고, 도 2e는 Ac₄ManNAz-처리된 세포들에 있어서 대한 DBCO-리포의 경시적 영상들이다.

도 3a 내지 3d는 종양 보유 마우스 모델에 있어서 DBCO-리포의 인 비보 표적화에 대한 도면으로서, 도 3a는 Ac₄ManNAz-처리된 종양 보유 마우스에 있어서 DBCO-리포의 전신 생분포도이고, 도 3b는 50 mM Ac₄ManNAz-처리된 종양들에 DBCO-리포를 정맥주사한 후 관찰한 Z-단면 영상들이고, 도 3c는 Ac₄ManNAz-처리된 종양 보유 마우스에 있어서 DBCO-리포를 정맥주사한 후 관찰한 엑스 비보 형광 영상들 및 형광 강도이고, 도 3d는 50 mM Ac₄ManNAz-처리된 마우스로부터 추출한 기관에 대한 DBCO-리포를 정맥주사한 후 관찰한 엑스 비보 형광 영상들 및 형광 강도이다.

도 4a 내지 4b는 종양 보유 마우스 모델에 DBCO-리포를 정맥주사한 이후 조직 분석결과로서, 도 4a는 Ac₄ManNAz-처리된 종양 조직들의 쿠마시 염색 및 웨스턴 블랏 분석 결과이고, 도 4b는 Ac₄ManNAz-처리된 종양 조직들에 DBCO-리포를 정맥주사한 이후 관찰된 조직학적 염색 및 형광 영상들이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042]

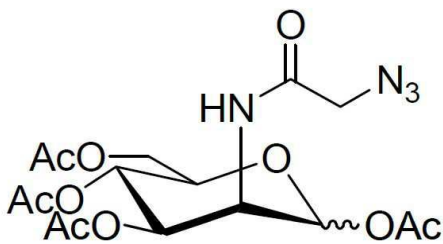
본 발명에서는 생물 직교성 무동 클릭 화학을 통한 나노입자의 생체내 표적화 방법을 제공하고자 한다. 구체적으로, 생물계에서 대사 조작 (metabolic engineering)에 의해 변형 화학 작용기가 표적 부위에서 생성될 수 있는 가능성을 제시하며, 생성된 변형 화학 작용기를 생체내 조건에서 생물 직교성 무동 클릭 화학에 의해 나노입자를 표적에 전달하기 위한 수단으로 사용할 수 있다. 본 발명에 의해서 표적 질환 부위에서 화학 작용기의 투여량 의존적이며 경시적인 생성이 가능하여 생물학적 수용체와 같이 나노입자의 생체내 분포를 제어할 수 있게

된다. 더 나아가, 본 발명에서 사용된 생물 직교성 화학반응은 여타 소분자보다 나노입자에 보다 효과적으로 적용될 수 있는데, 이는 다가 효과 (multivalent effect)와 나노입자의 순환 시간이 길어 세포 표면에 결합할 기회가 더 많아질 수 있기 때문이다. 또한, 하기 실시예로부터 알 수 있는 바와 같이, 본 발명에서는, 세포 표면에 화학적으로 결합되는 이들 나노입자의 세포내 운명을 관찰하였는데, 이러한 사항은 본 발명을 약물 전달 방법으로 적용하기 위해서 매우 중요한 고려사항이 된다.

[0043] 구체적으로, 본 발명에 따른 나노입자의 생체 내 표적화 방법은, 생체 내 투입시 상기 생체 내에서 대사 조작이 가능하며 제1 생물 직교성 관능기를 갖는 전구체를 상기 생체 내로 투입하는 단계; 및 상기 제1 생물 직교성 관능기와 무동 클릭 생물 직교성 반응을 수행할 수 있는 제2 생물 직교성 관능기가 부착된 나노입자를 상기 생체 내로 투입하는 단계를 포함한다.

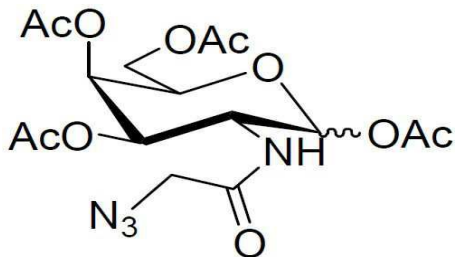
[0044] 상기 전구체로는 알려진 대사 당쇄조작 과정의 전구체인 테트라아세틸화 N-아지도아세틸-D-만노사민 (하기 화학식 1 참조), 테트라아세틸화 N-아지도아세틸-D-갈락토사민 (하기 화학식 2 참조) 및 테트라아세틸화 N-아지도아세틸-D-글루코사민 (하기 화학식 3 참조)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 화합물이 선택될 수 있고, 그 외에도 세포 지질이나, 핵산 단백질 등에 대사 과정을 통하여 도입될 수 있는 전구체라면 제한 없이 사용될 수 있다.

[0045] <화학식 1>



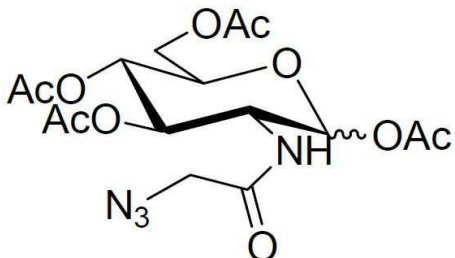
[0046]

[0047] <화학식 2>



[0048]

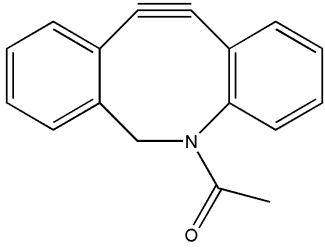
[0049] <화학식 3>



[0050]

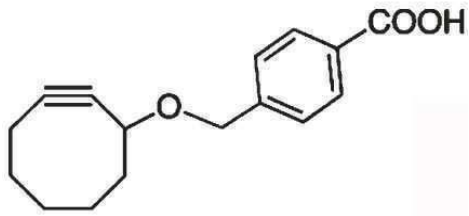
[0051] 또한, 상기 제1 생물 직교성 관능기로는 아지드기 (N₃)기가 대표적이며, 기타 촉매 없이 생체 내 조건에서 제2 생물 직교성 관능기와 반응이 가능한 관능기라면 제한 없이 사용가능하다. 제2 생물 직교성 관능기로는 디벤질 시클로옥탄 (DBC0)기 이외에도, 고리-변형물이 큰 (ring-strained) 알킨기와 같이, 촉매 없이 생체 내 조건에서 제1 관능기와 반응이 가능한 관능기들이 사용될 수 있으며, 예를 들어, 하기 화학식 4 내지 15의 화합물이 사용 가능하다:

[0052] <화학식 4>



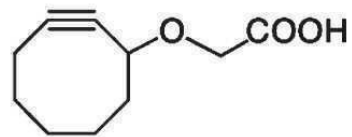
[0053]

[0054] <화학식 5>



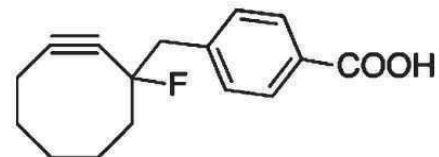
[0055]

[0056] <화학식 6>



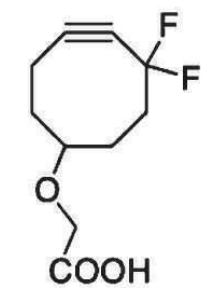
[0057]

[0058] <화학식 7>



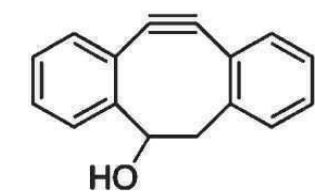
[0059]

[0060] <화학식 8>



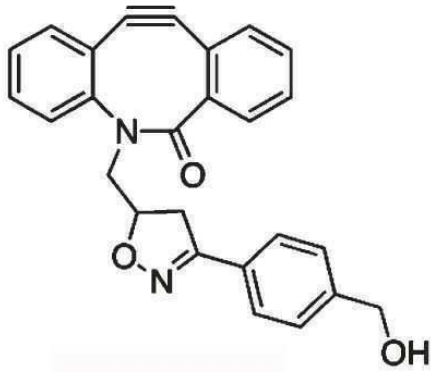
[0061]

[0062] <화학식 9>



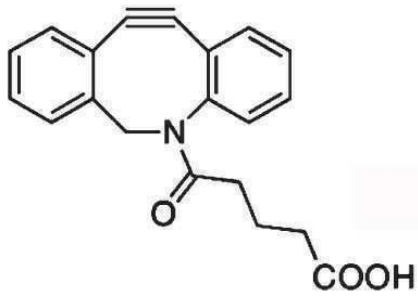
[0063]

[0064] <화학식 10>



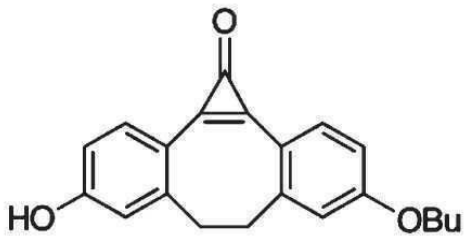
[0065]

[0066] <화학식 11>



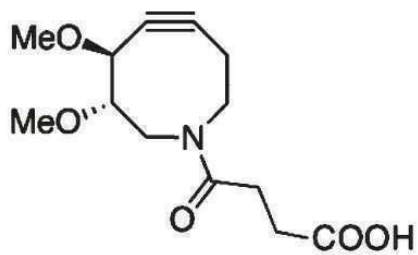
[0067]

[0068] <화학식 12>



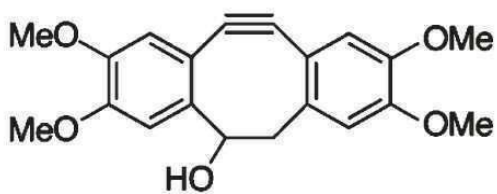
[0069]

[0070] <화학식 13>



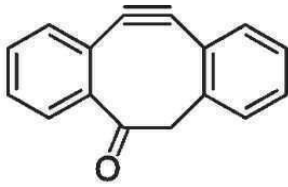
[0071]

[0072] <화학식 14>



[0073]

[0074] <화학식 15>



[0075]

[0076] 한편, 본 발명에 있어서, 나노입자로는 표면에 제2 생물 직교성 관능기의 부착이 가능하고 체내 순환이 가능한 10 nm 내지 1000 nm 크기의 나노입자라면 제한 없이 사용될 수 있으며, 구체적으로는 리포솜, 마이셀, 고분자 전달체, 단백질 나노입자 등의 유기 나노입자, 산화철, 금, 실리카 등의 무기 나노입자, 또는 유무기 복합 나노입자를 예로 들 수 있다.

[0077] 예를 들어, 도 1에는 제1 생물 직교성 관능기를 갖는 전구체로서 테트라아세틸화 N-아지도아세틸-D-만노사민을 사용하고, 제2 생물 직교성 관능기가 부착된 나노입자로서 아민-관능화된 폴리에틸렌글리콜-리포솜에 디벤질 시클로옥틴기가 부착된 물질을 사용하는 경우, 본 발명에 따른 생물 직교성 무동 클릭 화학 반응을 통한 나노입자의 생체 내 표적화 방법에 대한 개략도를 도시하였다. 도 1을 참조하면, 제1 생물 직교성 관능기를 갖는 전구체로 생체 내에 투입된 테트라아세틸화 N-아지도아세틸-D-만노사민 (Ac₄ManNAz)은 세포 내 대사 당쇄조작에 의해서 세포막에 부착된 아지드기를 형성하게 되고, 여기에 제2 생물 직교성 관능기가 부착된 나노입자로서 아민-관능화된 폴리에틸렌글리콜-리포솜에 디벤질 시클로옥틴기가 부착된 물질을 생체 내에 투입하게 되면 세포막에 부착된 아지드기와 디벤질 시클로옥틴기 사이에 무동 클릭 화학 반응이 일어난다. 따라서, 세포막에 결합된 폴리에틸렌글리콜-리포솜은 단순히 세포 표면에 머무는 것이 아니라, 글리칸 고유의 내부화 (internalization) 과정에 의해서 세포 내부로 이동하게 되므로, 본 발명에 따른 방법은 특정 약물을 나노입자를 통해서 세포 내부로 전달하는 약물 전달 기능을 수행하게 되는 것이다.

[0078] 특히, 하기 실시예로부터 알 수 있는 바와 같이, 리포솜을 효율적으로 추적하기 위해 이들을 형광 염료인 Cy5.5로 표지화하여 관찰한 실험 결과에서, 세포에 DBCO-관능화된 리포솜을 처리한 후 세포 표면에 결합된 DBCO-리포의 양은 아지드기가 증가함에 따라 증가하였는데, 이는 무동 클릭 화학의 높은 반응성을 반증하는 것이다. 또한, 동일한 형광 강도를 가진 DBCO-염료 접합체 (DBCO-SETA)의 경우에 비해 DBCO-리포의 형광 강도가 훨씬 높았는데, 이는 나노입자의 다가 효과에서 유래된 것으로 판단되는 바, 이는 DBCO-리포에서 하나의 형광염료 당 약 20개의 DBCO기가 있기 때문으로 추측된다.

[0079] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 하되, 하기 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위하여 서술된 것일 뿐, 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

[0080] **실시예**

[0081] **재료**

[0082] 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DPPC), 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민 (DPPE), 콜레스테롤 (CHOL), 및 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[아미노(폴리에틸렌 글리콜)2000] (DSPE-PEG2000-NH₂)은 Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA)로부터 구입하였다. 셀포-디벤질시클로옥틴-NHS 에스테르 (셀포-DBCO-NHS) 및 디벤질시클로옥틴-SETA650 (DBCO-염료 접합체)는 Click Chemistry Tools (Scottsdale, AZ, USA)로부터 구입하였다. 테트라아세틸화 N-아지도아세틸-D-만노사민 (Ac₄ManNAz)은 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)로부터 구입하였다. 4-(디메틸아미노)피리딘 (DMAP), 4-메틸모르폴린 (NMM), 및 트리스(2-카복시에틸)포스핀 (TCEP)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. Cy5.5의 단일 반응성 히드록시숙신이미드 에스테르 (Cy5.5-NHS)는 Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, USA)로부터 구입하였다. 메탄올, 클로로포름, 및 에테르는 Merck (Darmstadt, Germany)로부터 구입하였다. 모든 다른 화학물질들은 분석급이었으며, 더 이상의 정제 없이 사용하였다.

[0083] **DSPE-PEG2000-DBCO의 합성**

[0084] DSPE-PEG2000-DBCO 는 10 몰 당량의 셀포-DBCO-NHS (22 mg, 35.7 μmole)와 DSPE-PEG2000-NH₂ (10mg, 3.57 μmole)를 10 ml 클로로포름/메탄올 혼합물 (2:1, v/v) 중, 실온에서 6시간 동안 반응시킴으로써 합성하였다. 반응 이후에, 용액을 물 및 메탄올에 대해서, 셀룰로오스 멤브레인 (MWCO 1000: Spectrum Laboratories, CA,

USA)을 사용하여 실온에서 투석시킴으로써 과량의 설포-DBCO-NHS, NMM, DMAP를 제거하였으며, 동결건조시켜서 DSPE-PEG2000-DBCO를 제조하였다. The ¹H 핵자기 공명 (¹H NMR) 스펙트럼은 CDCl₃를 용매로 사용하여 600 MHz에서 측정하였다.

[0085] Cy5.5-표지된 DPPE의 합성

[0086] 형광 추적을 위해서 리포솜을 Cy5.5로 표지하기 위해서, Cy5.5-표지된 DPPE를, 전술한 방법과 동일한 방법에 의해서 Cy5.5-NHS를 DPPE에 접합시킴으로써 합성하였다. 간략히 서술하면, 3.5 ml 클로로포름/메탄을 혼합물 (2:1, v/v)에 용해된 DPPE (3.5 mg, 5 μmole)를 실온에서 Cy5.5-NHS (6 mg, 10 μmole)와 함께 배양하였다. 반응은 실온 암실 조건 하에서 밤새도록 수행하였다. 얻어진 Cy5.5-표지된 DPPE를 에테르 중에서 결정화시키고 진공 하에서 3일 동안 건조하였다.

[0087] DBCO-리포의 제조 및 특성화

[0088] 건조된 지방을 유리 바이알 중에서 DPPC: CHOL: DSPE-PEG2000-DBCO: DPPE-Cy5.5 = 54.5: 35: 10: 0.5 (몰 비율)의 조성물과 함께 클로로포름/메탄을 혼합물 (2:1, v/v) 중에 혼합하였다. DBCO가 없는 대조군 리포솜들은 DSPE-PEG2000-DBCO 대신에 DSPE-PEG2000-NH₂를 포함하였다. 유기용매를 회전 증발기를 사용하여 증발시킴으로써 유리 바이알 벽 상에 부착된 박막 지방 필름을 얻었다. 얻어진 지방 필름을 밤새도록 동결건조시킴으로써 남아있는 소량의 유기용매를 제거하였으며, 와류 혼합에 의해서 PBS (pH = 7.4) 중에 수화 및 분산시켰다. 결과물인 다층막 소포체들 (multilamellar vesicles; MLVs)을 실온에서 30분 동안 보관하였으며, 90W에서 2분 동안 프로브-타입 초음파 파쇄기 (Ultrasonic Processor, Cole-Parmer Inst. co.)를 사용하여 초음파 처리함으로써 나노크기의 작은 단층막 소포체들 (small unilamellar vesicles; SUVs)을 제조하였다. 결과물인 리포솜들을 실온에서 30분 동안 보관한 다음, 주사기 필터 멤브레인을 통하여 통과시켰다 (0.45 μmole, 셀룰로오스 아세테이트, Millipore). 리포솜의 형태는 극저온 투과 전자 현미경 (cryo-TEM)을 사용하여 관찰하였다. cryo-TEM 영상들은, 약 -170°C의 온도에서, 200 kV Tecnai F20 (FEI, Netherlands)으로 얻어졌다. 리포솜들의 평균 직경 및 크기 분포는 Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK)로 측정하였다.

[0089] 세포 배양

[0090] 인간 폐 선암종 세포들 (A549, ATCC, Manassas, VA, USA로부터 구입)을, 가슴 5% CO₂ 공기, 37°C 조건 하에서, 10% 우 태아 혈청 (FBS; Welgene, Daegu, Korea), 100 U/ml 페니실린 및 100 μg/ml 스트렙토마이신 (Welgene, Daegu, Korea)으로 보충된 RPMI-1640 (Welgene, Daegu, Korea) 중에 배양하였다.

[0091] 세포의 웨스턴 블랏 분석

[0092] 당을 함유하지 않거나, 여러 가지 농도의 Ac₄ManNAz (0.5 μM, 5 μM, 및 50 μM의 최종 농도)를 함유하는 10 mL의 배지 중의 A549 세포들을, 플레이트 당 1.5 x 10⁶ 세포의 밀도로, 100 x 20 mm 폴리스티렌 조직 배양 플레이트 상에 접종한 다음, 3일 동안 배양하였다. 세포들을 PBS (pH 7.4)로 2회 세척하고, 세포 굴삭도구를 사용하여 플레이트로부터 수득하였다. 세포들을 3,000 × g에서 5분 동안 원심분리시킴으로써 펠렛화하고, 부유물을 폐기하였다. 세포 펠렛을 프로테아제 저해제 (Complete, EDTA-free)를 함유하는 500 μl의 용균 완충용액 (1% SDS, 100 mM Tris·HCl, pH 7.4) 중에 재현탁시키고, 프로브-타입 초음파 분쇄기를 사용하여 4°C에서 용균시켰다. 초음파 처리된 용균물들을 4°C에서 30분 동안 배양함으로써 단백질을 더욱 용해시켰다. 비용해성 잔류물들은 3,000 × g에서 10분 동안 원심분리시킴으로써 제거하였다. 총 용해성 단백질 농도는 비신크로니닉 산 (bicinchoninic acid; BCA) 단백질 분석법 (Pierce, IL, USA)을 사용하여 측정한 결과, 5 mg/ml였다. 20 μl의 용균액 (5 mg/ml 단백질)을 2 μl의 포스핀-FLAG (5 mM in PBS, pH 7.4) (Sigma, St. Louis, MO, USA)와 함께 37°C에서 6시간 동안 배양하였다. SDS-PAGE 로딩 완충용액을 각각의 시료에 가해주고, 95°C에서 가열해준 이후에, 분획들을 10% SDS-PAGE에 로딩하였다. 단백질을 Hybond P 멤브레인 (Amersham, St. Albans, UK)으로 옮기고, 멤브레인을 TBST (50 mM Tris·HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween20, pH 7.4) 중의 5% 우 태아 혈청 (BSA)으로, 4°C에서 밤새도록 차단하였다. 멤브레인을 TBST로 3회 세척하고, 모노클론 항-FLAG-HRP 항체 (TBST 중에서 1:2,000으로 희석) (Sigma, St. Louis, MO, USA)와 함께 1.5시간 동안 배양하였다. 멤브레인을 TBST로 3회 세척하고, ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Amersham, St. Albans, UK)를 사용하여 전개시켰다.

[0093] 세포 영상화

- [0094] 당을 함유하지 않거나, 50 μM 농도의 Ac₄ManNAz (최종 농도)를 함유하는 2 mL의 배지 중의 A549 세포들을 35 mm 유리바닥 접시에 2 x 10⁴ 세포의 농도로 접종하고 3일 동안 배양하였다. 세포들을 Ca²⁺ and Mg²⁺를 함유하는 PBS (pH 7.4)로 2회 세척하고, 포름알데히드-글루타르알데히드 조합 고정제를 사용하여 실온에서 15분 동안 고정시켰다. 이어서, 세포들을 PBS (pH 7.4)로 린스하고, PBS (pH 7.4) 중의 5% BSA로 실온에서 30분 동안 차단하고, 5% BSA를 함유하는 PBS (pH 7.4) 중의 포스핀-FLAG (200 μM , 최종 농도) (Sigma, St. Louis, MO, USA)와 함께 37°C에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 이후에, 세포들을 0.5% Tween-20 계면활성제를 함유하는 PBS (pH 7.4)로 3회 린스하고, PBS (pH 7.4)로 2회 린스하고, FITC-접합된 M2 항-Flag 항체 (5% BSA를 함유하는 PBS 중에서 1:100으로 희석, pH 7.4) (Sigma, St. Louis, MO, USA)와 함께 실온에서 60분 동안 배양하였다. 세포들을 PBS (pH 7.4)로 2회 세척하고, DAPI (Invitrogen, Carlsbad, CA)로 염색하여 핵을 표지하였다.
- [0095] 당을 함유하지 않거나, 여러 가지 농도의 Ac₄ManNAz (0.5 μM , 5 μM , 및 50 μM 의 최종 농도)를 함유하는 2 mL의 배지 중의 A549 세포들을, 플레이트 당 2 x 10⁴ 세포의 밀도로, 35 mm 유리바닥 접시 상에 접종한 다음, 3일 동안 배양하였다. 실험 이전에, 세포들을 Ca²⁺ and Mg²⁺를 함유하는 PBS (pH 7.4)로 2회 세척하고, 무혈청 트랜스펙션 배지 중에서 2시간 동안 배양하였다. 배양 이후에, 세포들을 Ca²⁺ and Mg²⁺를 함유하는 PBS (pH 7.4)로 2회 세척하고, 포름알데히드-글루타르알데히드 조합 고정제를 사용하여 실온에서 15분 동안 고정시킨 다음, DAPI (Invitrogen, Carlsbad, CA)로 염색하여 핵을 표지하였다. 대조군으로는, 세포들을 무혈청 트랜스펙션 배지 중의 10 mM TCEP (PBS, pH 7.4)로 10분 동안 처리하고, 2 ml 무혈청 트랜스펙션 배지 중에서, 37°C로 30분까지 DBCO-리포 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 배양하였다.
- [0096] 시간-경과 영상화를 위해서, 50 μM 농도의 Ac₄ManNAz (최종 농도)를 함유하는 2 mL의 배지 중의 A549 세포들을 35 mm 유리바닥 접시에 2 x 10⁴ 세포의 농도로 접종하고 3일 동안 배양하였다. 실험 이전에, 세포들을 Ca²⁺ and Mg²⁺를 함유하는 PBS (pH 7.4)로 2회 세척하고, 무혈청 배지 중에서 2시간 동안 배양하였다. A549 세포들을 2 ml 무혈청 트랜스펙션 배지 중에서, 37°C로 1시간까지 DBCO-리포 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 배양하였다. 세포들을 Ca²⁺ and Mg²⁺를 함유하는 PBS (pH 7.4)로 2회 세척하고, 신선한 성장 배지로 대체하였다. 세포들을 10분부터 24시간까지의 서로 다른 시간 지점들에서 고정시켰다.
- [0097] 모든 세포 영상들은 405 Diode (405 nm) 및 HeNe-Red (633 nm) 레이저를 구비한 FluoView FV1000 공초점 레이저 스캐닝 현미경 (Olympus, Tokyo, Japan)을 사용하여 얻었다.
- [0098] 유동 세포계수 분석법 (Flow cytometry analysis)
- [0099] 당을 함유하지 않거나, 여러 가지 농도의 Ac₄ManNAz (0.5 μM , 5 μM , 및 50 μM 의 최종 농도)를 함유하는 2 mL의 배지 중의 A549 세포들을, 웰 당 2 x 10⁴ 세포의 밀도로, 6-웰 플레이트 상에 접종한 다음, 3일 동안 배양하였다. 실험 이전에, 세포들을 Ca²⁺ and Mg²⁺를 함유하는 PBS (pH 7.4)로 2회 세척하고, 무혈청 트랜스펙션 배지 중에서 2시간 동안 배양하였다. A549 세포들을 DBCO-리포, DBCO를 포함하지 않는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 대조군 리포솜, 또는 DBCO-리포와 동일한 형광 강도를 갖는 DBCO-형광 염료 접합체와 함께, 37°C로 1시간까지 2ml 무혈청 트랜스펙션 배지 중에서 배양하였다. 배양 이후에, 세포들을 1mM EDTA 및 1 % FBS (FACS 완충용액)를 함유하는 PBS (pH 7.4)로 37°C에서 배양에 의해서 리프트하였으며, FACS 완충용액으로 2회 세척하였다. 시료 당 50,000 세포들을 유동 세포계수 분석법 (BD FACSCalibur, BD Biosciences, San Jose, CA, USA)에 의해서 분석하고, 얻어진 데이터 분석을 FlowJo 소프트웨어를 사용하여 수행하였다.
- [0100] 인 비보 및 엑스 비보 NIRF 영상화
- [0101] 살아있는 동물들을 사용하는 모든 실험들은 관련법 및 한국과학기술연구원의 원내 가이드라인을 준수하면서 수행하였고, 원내 위원회의 승인 하에 수행되었다. 인 비보 및 엑스 비보 실험들을 위해서, A549 종양세포들을 5주령 수컷 무흉선샘 누드 마우스 (athymic nude mice) (20 g, Institute of Medical Science, Tokyo, Japan)의 양 옆구리에 피하 주사에 의해서 1.0 x 10⁷로 투여하였다. 종양들이 약 100 mm²로 성장하였을 때, 서로 다른 농도의 Ac₄ManNAz (0.5 mM, 5 mM, 및 50 mM 농도의 20 μl)를 왼쪽 종양에, 일 1회 3일 동안, 종양내 주사에 의해서 투여하였으며, 그 동안 동일 부피의 식염수를 오른쪽 종양에 투여하였다 (각 실험군에 대해서 n=5). DBCO-리포 (10 mg/kg), DBCO가 없는 대조군 리포솜 (10 mg/kg), 또는 DBCO-리포와 동일한 형광 강도를 갖는 DBCO-형

광염료 접합체를 2마리의 A549 종양 보유 마우스의 꼬리 정맥 내로 주사하였다. 각각의 생분포 및 시간-의존적 종양 축적 프로파일을 eXplore Optix system (ART Advanced Research Technologies Inc., Montreal, Canada) 을 사용하여 비침투적으로 영상화하였다. 레이저 출력 및 계수 세팅은 포인트 당 13 μ W 및 0.3 s로 최적화되었다. 여기 및 발광 지점들은 선택된 관심 영역 상에서 1 mm 스텝으로 래스터-스캔하여 발광 파장 스캔을 생성하였다. A 670 nm 펄스 레이저 다이오드를 사용하여 Cy5.5 분자들을 여기시켰다. 700nm에서의 근적외선 (NIR) 형광 발광을 수집하고, 급속 광전자증배관 (fast photomultiplier tube; Hamamatsu, Japan) 및 시간-연관성 단일 광자 계수 시스템 (Becker and Hickl GmbH, Berlin, Germany)으로 검출하였다. Analysis Workstation 소프트웨어 (ART Advanced Research Technologies Inc., Montreal, Canada)를 사용하여 1.0 mm 간격에서 20개의 z-단면 영상들을 캡처함으로써 DBCO-리포의 활성 종양 표적화 특성들을 평가하였다. 대조군으로는, 20 μ l의 TCEP 용액 (10 mM)을, DBCO-리포 주사 1시간 이전에 종양내 주사에 의해서 왼쪽 종양에 주사하였다. DBCO-리포의 주사로부터 5시간이 경과한 때, 마우스로부터 주된 장기 및 종양들을 분리해내었다. NIR 형광 영상들을 Cy5.5 발광 필터 (600-700nm; Omega Optical)를 구비한 12-bit CCD (Kodak Image Station 4000 MM, New Haven, CT, USA)로 얻었다. 엑스 비보 NIR 형광 영상들은 KODAK 분자 영상화 소프트웨어를 사용하여 관심 영역들에서 NIR 형광 신호 강도를 측정함으로써 정량화하였다. 모든 수치들은 3가지 동물군에 대해서 평균±표준편차의 형식으로 기재하였다.

[0102] 조직학적 분석

[0103] 분리된 종양 조직들을 4 % (v/v) 완충 포르말린 용액 중에서 고정시키고, 드라이 아이스 상의 최적 절단 온도 (optimum cutting temperature; OCT) 컴파운드 (Sakura, Tokyo, Japan) 상에서 동결시킨 다음, 사용시까지 -80 °C에서 저장하였다. 단면들은 크라이오스태트 (cryostat; 두께 6 μ m) 상에서 절단하고, 폴리-D-라이신을 포함하는 슬라이드 상에 놓고, 45°C에서 건조시킨 다음, 광으로부터 보호하였다. 형광은 IX81-ZDC 초점 이동 보상 현미경 (focus drift compensating microscope; Olympus, Tokyo, Japan)을 사용하여 측정하였다 (여기: 673 nm, 발광: 692 nm).

[0104] 종양 조직의 웨스턴 블랏 분석

[0105] 종양 보유 마우스 모델 및 Ac4ManNAz의 투여는 동일한 방법에 의해서 수행하였다. Ac4ManNAz가 투여되고 24시간이 경과한 시점 (4일째)에서, 종양들을 분리하고, 프로테아제 저해제 (Complete, EDTA-free)를 함유하는 1 ml 용균 완충용액 (1 % SDS, 100 mM Tris·HCl, pH 7.4)으로 옮긴 다음, 균질기 (homogenizer; WiseMix HG-15D, Daihan Scientific, Seoul, Korea)를 사용하여 균질화하였다. 용균액을 4°C에서 30분 동안 배양한 다음, 불용성 잔류물들을 3,000 \times g에서 10 분동안 원심분리시킴으로써 제거하였다. 단백질 농도는 BCA 단백질 분석 키트를 사용하여 측정하였다. 포스핀-FLAG에 의한 스타우딩어 반응, SDS-PAGE 및 웨스턴 블랏 분석은 전술한 바대로 수행하였다.

[0106] 면역조직화학적 분석 (Immunohistochemical analysis)

[0107] 분리된 종양 조직들을 회수하고, 4 % (v/v) 완충 포르말린 용액 중에서 고정하고, 점진적 에탄올 시리즈를 사용하여 탈수시키고, 파라핀에 침지시켰다. 파라핀 조직을 4 μ m 폭으로 박절하고, Histostain[®]-Plus Brod Spectrum (Invitrogen, CA, USA)을 사용하여, 제조업자의 안내문에 따라서 포스핀-FLAG 및 모노클론 항-FLAG-HRP 항체와 조합하여, 면역조직화학적 염색을 수행하였다. 파라핀 박편들을 탈수시키고 Permout SP15-100 Toluene Solution (Fisher Scientific, NJ, USA) 탑재 배지를 사용하여 탑재하고, 광현미경 (BX51, Olympus, Tokyo, Japan)을 사용하여 관찰하였다. 영상들을 디지털 카메라 광현미경 (DP71, Olympus, Tokyo, Japan) 상에 촬영하였다.

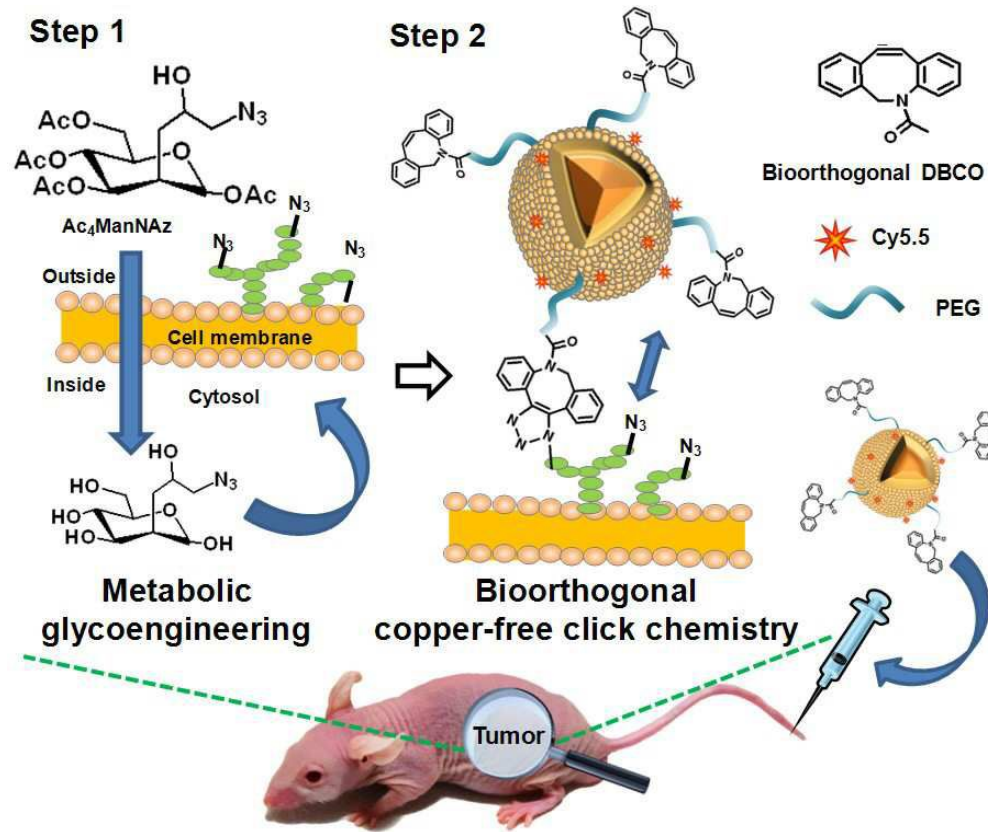
[0108] 평가

[0109] 전술한 실시예에서는, 세포 표면에 주로 편재화된 시알산의 대사 조작을 위해 테트라아실화 N-아지도아세틸-D-만노사민 (Ac4ManNAz)를 선택하여 사용하였으며, 또한, 스타우딩어 반응에서 포스핀에 비해 무동 클릭 화학에 의해 아지드기에 대한 반응성이 높은 디벤질 시클로옥틴 (DBCO)을 생물 직교성 화학 작용기로서 사용하였다. 활성화된 DBCO(설포-DBCO-NHS)를 아민-관능화된 PEG-리포솜에 접합시키고 이들을 종래의 필름 주조법에 의한 제조과정에서 리포솜에 혼입시켰으며, 리포솜을 효율적으로 추적하기 위해 이들을 형광 염료인 Cy5.5로 표지화하였다. 그 결과 얻어지는 리포솜은 CryoTEM 사진과 DLS 데이터에 나타난 바와 같이, 수성 조건에서 안정한 구형의 형상과 75.33 \pm 18.29 nm 크기를 갖는다 (도 2a 참조).

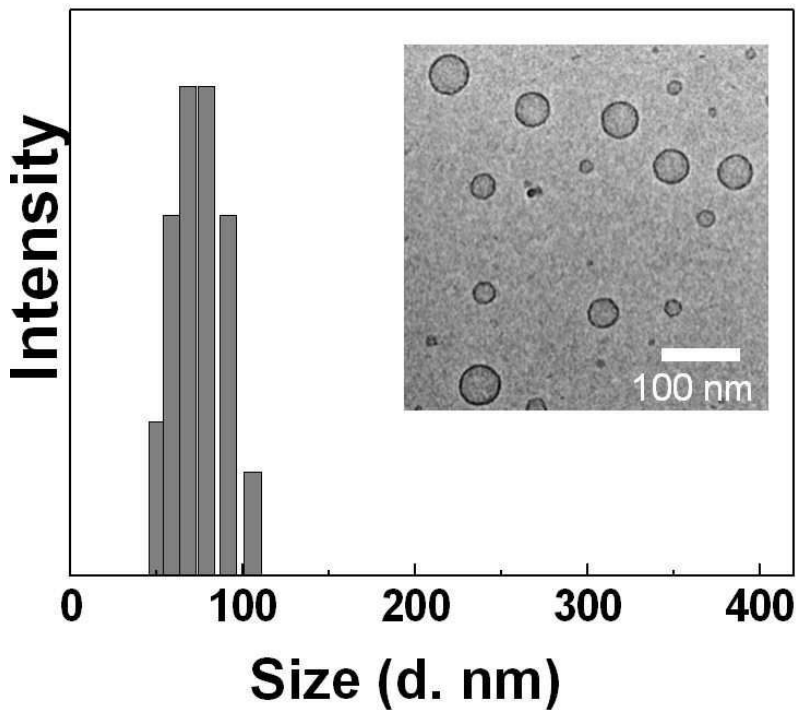
- [0110] A549 인간 폐암 세포주에서 아지드기의 생성, 나노입자 결합 및 이들의 세포 흡수를 시험하였다. 대사 당쇄조작에 의해 Ac₄ManNAz를 투여한 후 변형 아지드기가 A549 세포의 표면에서 생성될 수 있었다. 세포의 쿠마시 블루 염색과 웨스턴 블랏 분석을 통해 도입된 아지드기와 세포 배양 매질 중 Ac₄ManNAz의 농도 간 상관관계를 알 수 있었다 (도 2b 참조). 이들 세포에 DBCO-관능화된 리포솜 (DBCO-리포)를 처리하면, 세포 표면에 결합된 DBCO-리포의 양은 아지드기가 증가함에 따라 증가하였는데, 이는 무동 클릭 화학의 높은 반응성을 보여준다. 흥미로운 것은, 동일한 형광세기를 가진 DBCO-염료 접합체 (DBCO-SETA)의 경우에 비해 형광이 훨씬 높았다는 것이다. 이러한 결과는 DBCO-리포에서 하나의 형광염료 당 약 20개의 DBCO기가 있기 때문에 나노입자의 다가 효과로부터 유래된 것으로 생각한다.
- [0111] 50 μM의 Ac₄ManNAz에서 세포의 형광 강도는 Ac₄ManNAz가 없는 세포의 형광 강도에 비해 약 20배 넘게 증가되었는데, 이를 통해 리포솜의 결합이 크게 강화되었음을 알 수 있다. 세포 표면 위의 아지드기는 환원 조건에서 트리스(2-카르복시에틸)포스핀 (TCEP)에 의해 소멸시킬 수 있다. 세포에 대한 TCEP의 전처리는 결합된 리포솜의 양을 크게 감소시켰는데, 이는 강화된 결합이 DBCO와 아지드기 사이의 화학반응으로부터 비롯되었음을 보여준다. 여기에서 중요한 점은, 시간-경과에 따라 사진을 촬영했을 때 결합된 리포솜이 세포 표면에 머물지 않고 세포 내부로 이동하였다는 것이다. 이는 글리칸의 고유한 내부화 (internalization)와 그 이후 나노입자의 세포내 도입에 따른 것일 수 있는 것으로, 약물을 세포내 전달하는 약물 운반체로서 추가 적용에 있어 의미가 매우 크다 (도 2d 참조).
- [0112] 한편, 생체내 연구를 위해, A549 세포의 피하 이식에 의해 옆구리 양쪽에 2개의 종양을 갖는 이중이식 마우스 모델을 준비하였다. 이후, 3일간 종양내 주사에 의해 좌측 종양에 서로 다른 농도의 Ac₄ManNAz를 투여한 반면, 대조군으로 우측 종양에 염수를 주사하였다. DBCO-리포를 정맥내 주사한 후, 마우스에서 DBCO-리포의 생체내 분포를 생체내 및 생체의 조건에서 형광에 의해 관찰하였다. Ac₄ManNAz-처리한 좌측 종양에 축적된 DBCO-리포의 양은 시험관내 데이터와 유사하게 크게 증가하였다 (도 3a 참조). 이들 2개의 종양의 Z-단면 사진에서는 좌측 종양의 모든 깊이에서 더 높은 형광 강도가 관찰되었는데, 이 또한 전체 종양 조직에서 DBCO-리포의 축적이 높다는 것을 증명하였다 (도 3b 참조). 주사한 지 5시간 후에 절제한 종양군의 형광 사진으로부터 DBCO-리포의 축적량은 처리된 Ac₄ManNAz의 농도에 따라 크게 증가하였음을 알 수 있었다 (도 3c 참조). 50 mM Ac₄ManNAz-처리한 종양의 경우, DBCO-리포의 양은 염수-처리한 대조군보다 거의 2배 높게 증가하였다. 이들 결과는 화학 전구체를 이용한 투여량-의존 방식으로 나노입자의 생체내 분포를 인위적으로 제어할 수 있음을 입증하고 있다. 또한, DBCO가 없는 대조 리포솜을 이용한 대조군과 TCEP로 전처리한 대조군은 2개의 종양의 형광 세기에 있어서 차이를 보이지 않았다. 흥미로운 점은, 동일한 형광수준을 가진 DBCO-SETA는 이들의 순환시간이 짧아 상대적으로 흐릿한 영상을 나타냈다는 것으로, 본 발명이 나노입자에 대해 매우 적합하다는 것을 증명한다. 도 3d는 50 mM Ac₄ManNAz-처리한 종양에 축적된 DBCO-리포의 형광 강도가 간과 신장을 포함하는 다른 모든 기관에 축적된 DBCO-리포의 형광 강도보다 높았음을 나타내었다.
- [0113] 종양 조직 분석은 나노입자의 생체내 분포에 있어서 이들 변화가 생체에서 무동 클릭 화학으로부터 비롯되었다는 것을 유의미하게 보여주었다. 종양 조직의 쿠마시 블루 염색과 웨스턴 블랏 분석 결과 또한 아지드기의 양이 세포 조건과 유사한 투여량-의존 방식으로 증가하였음을 나타내었다 (도 4a 참조). 포스핀-FLAG 펩티드와 FLAG-결합 서양고추냉이 과산화효소(HRP)를 이용한 조직학적 염색은 Ac₄ManNAz-처리한 종양에서 아지드기의 생성량이 높다는 것을 시각적으로 보여주었다 (도 4b 참조). Ac₄ManNAz-처리한 종양 조직에서 DBCO-리포의 짙은 적색 반점들은 생성된 아지드기와 축적된 DBCO-리포의 양의 상관관계를 입증하였다. 이들 결과를 통해 나노입자가 외부에서 투여한 생물 직교성 화학 작용기와 생체내 무동 클릭 화학에 의해 표적 부위로 전달되었다는 사실을 알 수 있었다.

도면

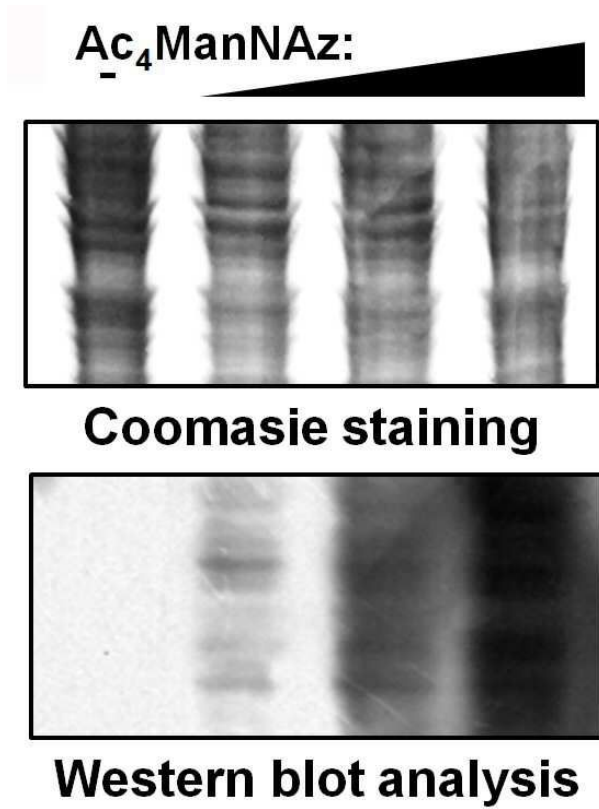
도면1



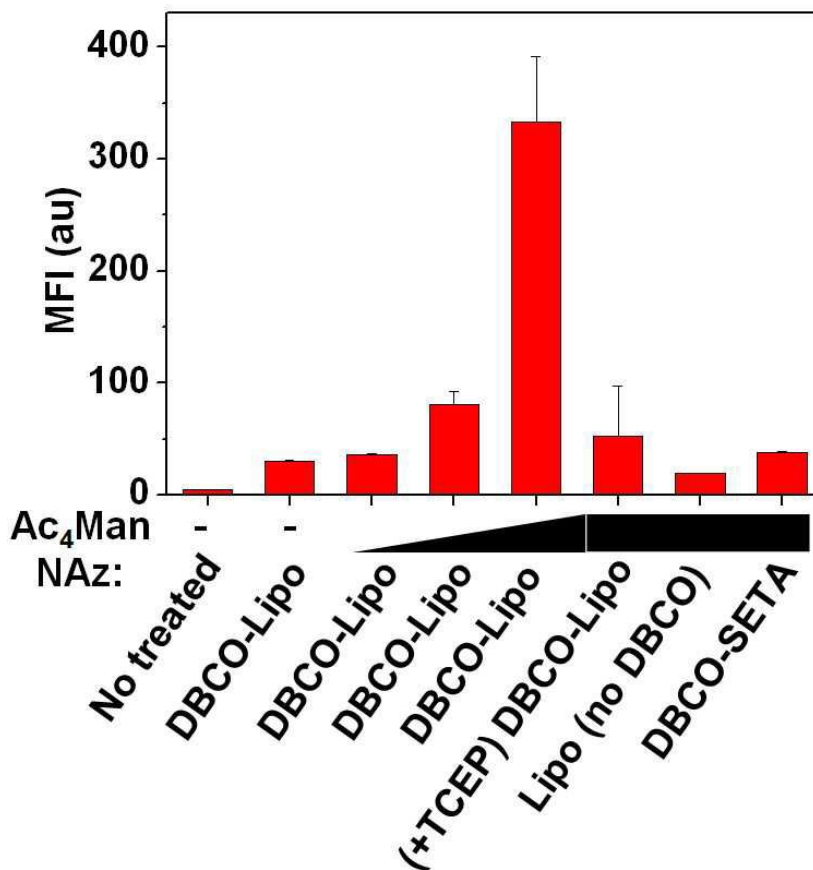
도면2a



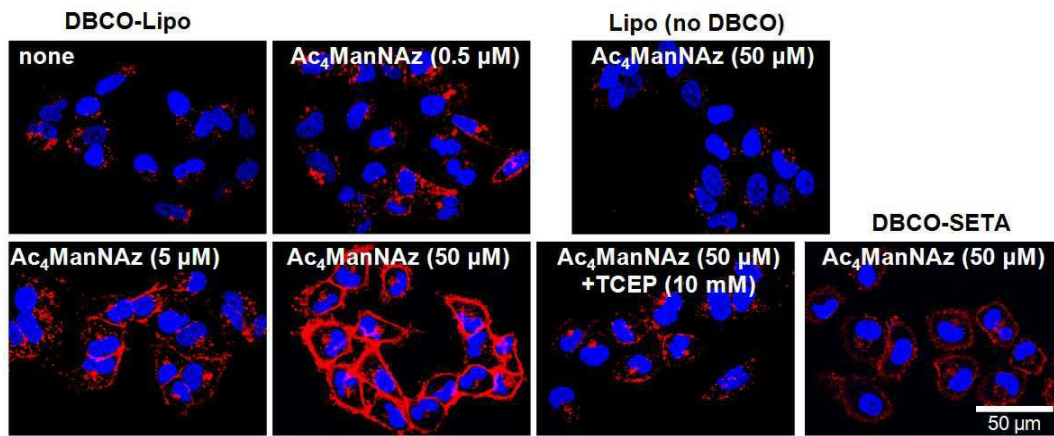
도면2b



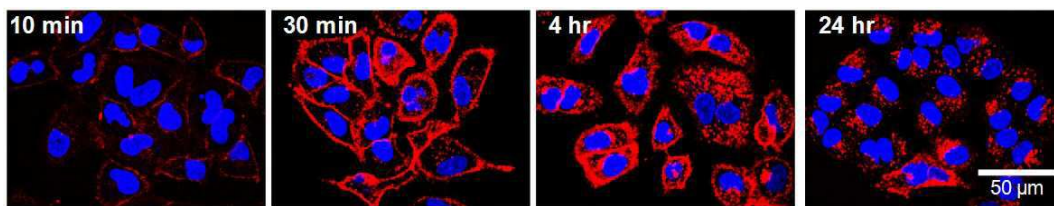
도면2c



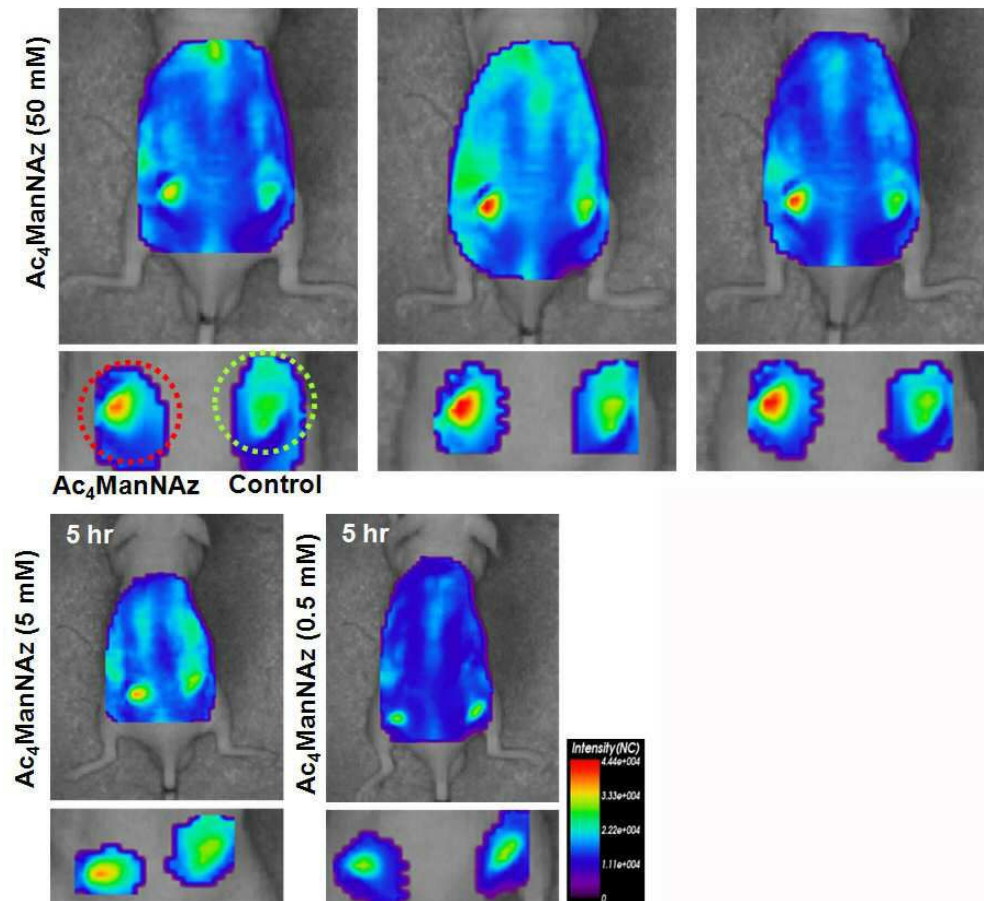
도면2d



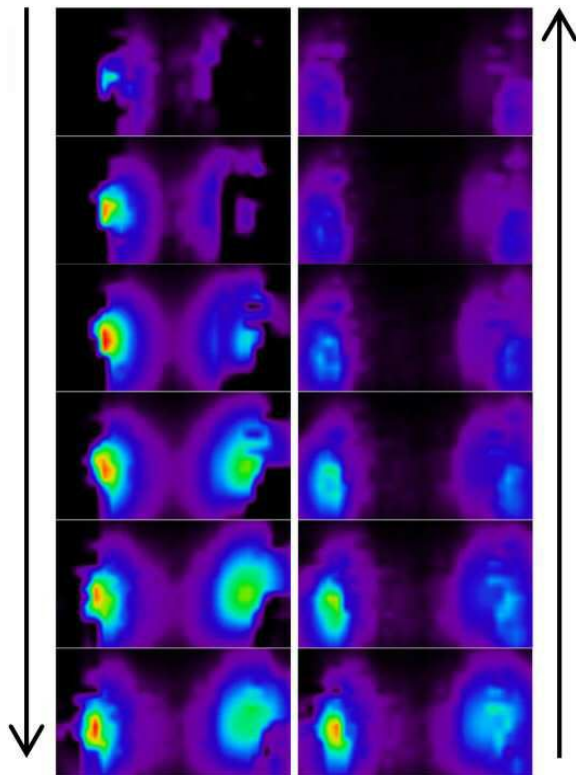
도면2e



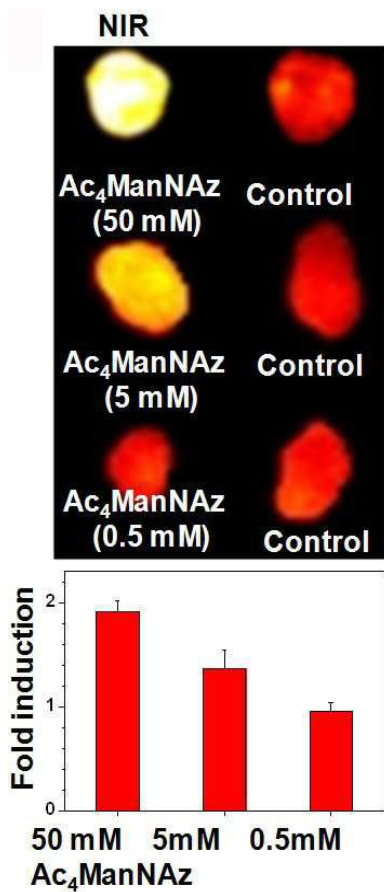
도면3a



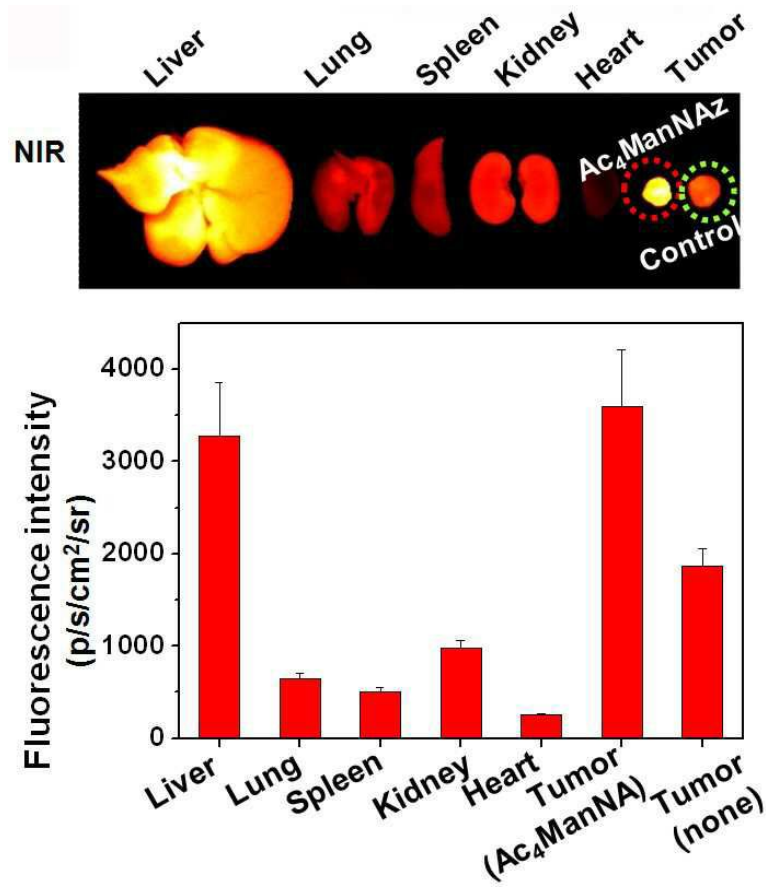
도면3b



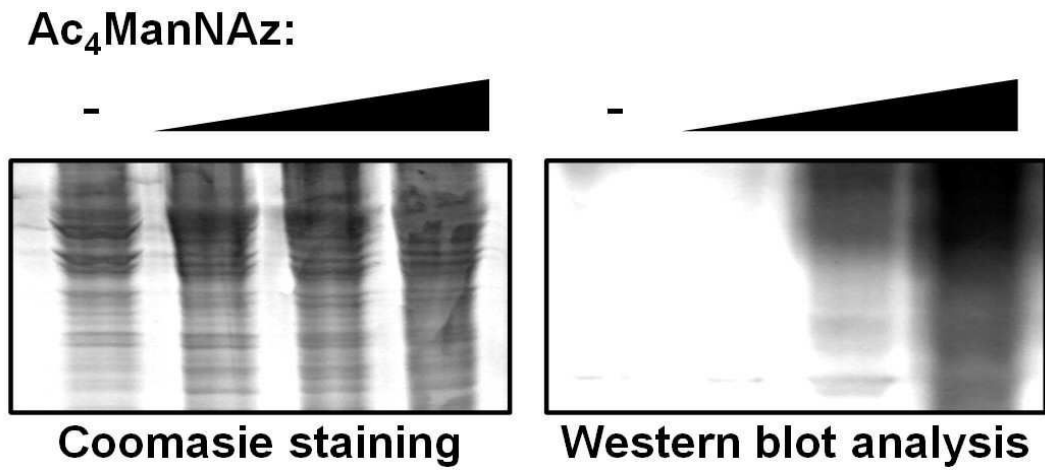
도면3c



도면3d



도면4a



도면4b

