



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년04월14일
(11) 등록번호 10-2100988
(24) 등록일자 2020년04월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/58 (2006.01) G01N 21/64 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/586 (2013.01)
G01N 21/6486 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0034288
(22) 출원일자 2019년03월26일
심사청구일자 2019년03월26일
(56) 선행기술조사문헌
Science Advances, 2016, Vol. 2, pp 1-9
KR1020180122128 A
KR101464100 B1
EP02579027 A1

(73) 특허권자
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
강태욱
서울특별시 양천구 목동중앙로 143, 101동 406호
이영재
경기도 고양시 덕양구 화신로 47, 106동 1008호
장정우
서울특별시 송파구 올림픽로35길 104, 15동 807호
(74) 대리인
최우성

전체 청구항 수 : 총 21 항

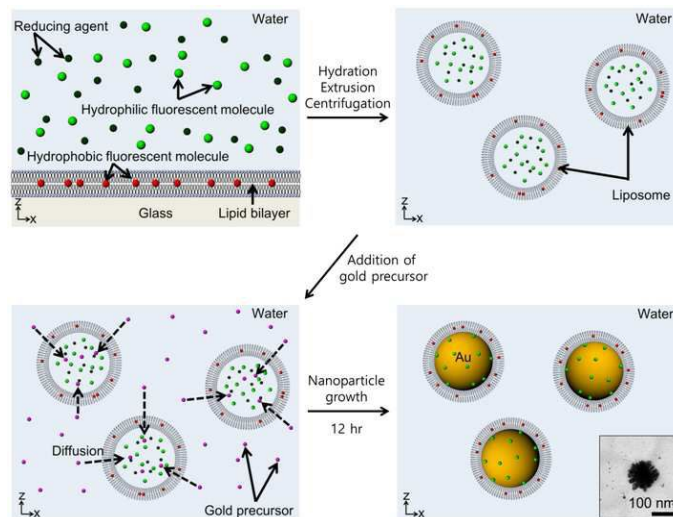
심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 리포솜과 금속 나노 입자에 기반한 형광이 발현되는 세포 이미징 프로브 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 명세서에는 리포솜과 금속 나노 입자에 기반한 형광이 발현되는 세포 이미징 프로브 및 이의 제조방법이 개시된다. 상기 리포솜은, 지질 이중층; 상기 리포솜 내부에 담지된 금속 나노 입자 코어; 및 상기 지질 이중층에 삽입된 소수성 형광 분자 및 상기 리포솜 내부에 담지된 친수성 형광 분자 중 하나 이상의 형광 분자를 포함한다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 2016R1A2B3014157
 부처명 과학기술정보통신부
 연구관리전문기관 재단법인 한국연구재단
 연구사업명 이공분야기초연구사업
 연구과제명 프로그래밍 기법을 이용한 자기조립체 기반 차세대 플라스모닉 복합 나노구조체 개발 및
 응용
 기여율 1/2
 주관기관 서강대학교 산학협력단
 연구기간 2019.03.01 ~ 2019.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 2016R1A6A1A03012845
 부처명 과학기술정보통신부
 연구관리전문기관 재단법인 한국연구재단
 연구사업명 이공분야기초연구사업
 연구과제명 뇌질환 약물 평가 기능 나노바이오칩 개발
 기여율 1/2
 주관기관 서강대학교 산학협력단
 연구기간 2019.01.01 ~ 2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

지질로 형성된 리포솜을 포함하고,

상기 리포솜은,

지질 이중층;

상기 리포솜 내부에 담지된 금속 나노 입자 코어; 및

상기 지질 이중층에 삽입된 소수성 형광 분자 및 상기 리포솜 내부에 담지된 친수성 형광 분자 중 하나 이상의 형광 분자를 포함하는, 세포 이미징을 위한 프로브.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 프로브는 세포 외부에서 형광 신호가 꺼지고 세포 내부에서 형광 신호가 켜지는 것인, 세포 이미징을 위한 프로브.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 금속 나노 입자 코어와 형광 분자 사이의 거리는 10 nm 이하인 것인, 세포 이미징을 위한 프로브.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 프로브는 지질 이중층에 삽입된 소수성 형광 분자와 리포솜 내부에 담지된 친수성 형광 분자를 포함하는 것인, 세포 이미징을 위한 프로브.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 금속 나노 입자는 Au, Ag 및 Pt로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상인 것인, 세포 이미징을 위한 프로브.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 형광 분자의 방출 밴드 (emission band)의 파장 범위는 금속 나노 입자 코어의 흡수 밴드 (absorption band)의 파장 범위에 속하는 것인, 세포 이미징을 위한 프로브.

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 소수성 형광 분자는 나일 레드 (Nile Red), 보디피 (BODIPY, 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene) 및 시아닌 (cyanine)으로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상인 것인, 세포 이미징을 위한 프로브.

청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 친수성 형광 분자는 플루오레세인 (fluorescein), 로다민 (rhodamine), 쿠마린 (coumarine) 및 알렉사 (Alexa)로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상인 것인, 세포 이미징을 위한 프로브.

청구항 9

제 7항 또는 제 8항에 있어서,

상기 리포솜 내부에 담지된 금속 나노 입자 코어는 Au인 것인, 세포 이미징을 위한 프로브.

청구항 10

세포; 및

상기 세포 내 도입되는 세포 이미징을 위한 프로브를 포함하고,

상기 세포 이미징을 위한 프로브는 지질로 형성된 리포솜을 포함하고,

상기 리포솜은 지질 이중층; 상기 리포솜 내부에 담지된 금속 나노 입자 코어; 및 상기 지질 이중층에 삽입된 소수성 형광 분자 및 상기 리포솜 내부에 담지된 친수성 형광 분자 중 하나 이상의 형광 분자를 포함하는, 세포 이미징을 위한 광학적 검출 키트.

청구항 11

제 10항에 있어서,

상기 프로브는 세포 외부에서 형광 신호가 꺼지고 세포 내부에서 형광 신호가 켜지는 것인, 세포 이미징을 위한 광학적 검출 키트.

청구항 12

제 10항에 있어서,

상기 금속 나노 입자 코어와 형광 분자 사이의 거리는 10 nm 이하인 것인, 세포 이미징을 위한 광학적 검출 키트.

청구항 13

제 10항에 있어서,

상기 프로브는 지질 이중층에 삽입된 소수성 형광 분자와 리포솜 내부에 담지된 친수성 형광 분자를 포함하는 것인, 세포 이미징을 위한 광학적 검출 키트.

청구항 14

제 10항에 있어서,

상기 형광 분자의 방출 밴드 (emission band)의 파장 범위는 금속 나노 입자 코어의 흡수 밴드 (absorption band)의 파장 범위에 속하는 것인, 세포 이미징을 위한 광학적 검출 키트.

청구항 15

소수성 형광 분자가 삽입된 지질 이중층을 형성하는 단계;

환원제를 리포솜 내부에 담지시키는 단계; 및

금속 나노체 용액을 첨가하여 리포솜 내부에 금속 나노 입자 코어를 형성하는 단계를 포함하는 세포 이미징을 위한 프로브의 제조방법.

청구항 16

제 15항에 있어서,

상기 환원제는 친수성 형광 분자와 함께 리포솜 내부에 담지시키는 것인, 세포 이미징을 위한 프로브의 제조방법.

청구항 17

지질 이중층을 형성하는 단계;

친수성 형광 분자와 환원제를 리포솜 내부에 담지시키는 단계; 및

금속 나노체 용액을 첨가하여 리포솜 내부에 금속 나노 입자 코어를 형성하는 단계를 포함하는 세포 이미징을 위한 프로브의 제조방법.

청구항 18

제 17항에 있어서,

상기 지질 이중층은 소수성 형광 분자를 삽입하여 형성하는 것인, 세포 이미징을 위한 프로브의 제조방법.

청구항 19

제 15항 내지 제 18항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제조방법은 지질을 유기용매에 용해시킨 다음 빛을 차단하고 건조시켜 지질 이중층을 형성하는 것인, 세포 이미징을 위한 프로브의 제조방법.

청구항 20

제 15항 내지 제 18항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제조방법은 환원제를 포함하는 수용액을 지질 이중층에 가하여 중탕 가열 처리 및 초음파 처리한 후 압출하여 리포솜을 형성하는 것인, 세포 이미징을 위한 프로브의 제조방법.

청구항 21

제 15항 내지 제 18항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제조방법에서 금속 나노체를 포함하는 용액의 금속 나노체 농도는 형광 분자를 포함하는 용액의 형광 분자 농도의 1배 내지 3배이고, 상기 형광 분자는 친수성 또는 소수성인 것인, 세포 이미징을 위한 프로브의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 명세서에는 리포좀과 금속 나노 입자에 기반한 형광이 발현되는 세포 이미징 프로브 및 이의 제조방법이 개시된다.

배경 기술

[0002] 형광 신호가 세포의 외부와 내부에서 항상 발현되는 이미징 프로브 (fluorescence always-on probes)는 바이오 이미징 (세포 이미징, 세포 내 분자 검출 등) 분야에서 널리 활용되고 있다. 하지만, 이러한 프로브의 비특이적 세포 내 도입 (non-specific endocytosis)은 원하지 않는 잘못된 형광 신호를 나타낼 수 있다. 반면, 세포 외부에서는 형광이 발현되지 않지만 세포 내 도입에 의해 형광을 나타내는 "형광이 켜지는 프로브 (fluorescence turn-on probes)"는 타겟 주변의 배경 신호가 약하기 때문에 (high signal to noise ratio) 더 선명하고 특이적인 이미지를 얻을 수 있다는 장점이 있다.

[0003] 형광이 켜지는 프로브를 합성하는 방법으로서 다음의 기술이 사용되고 있다.

[0004] 먼저 형광 분자의 자가 조립 (assembly)과 분해 (disassembly)를 이용하는 방법이 있다. 소수성 형광 분자는 물 속에서 조립되어 구조체를 만들 수 있고, 이 상태에서는 형광 신호의 자가 소멸 (self-quenching)에 의하여 형광 신호가 나오지 않는다. 하지만 세포 내부에서 분해되면 분자 사이의 거리가 충분히 멀어지므로 형광이 다시 발현된다. 그러나, 이 방법에는 주로 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BODIPY)와 같은 형광 분자가 이용되는데, 이 분자는 매우 소수성이기 때문에 물에 용해되기 힘들고, 세포에 적용하였을 때 이미징 목표 기관에 도달하지 못하고 세포 이하 막 부분 (subcellular membrane)에 축적되는 문제가 있다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 친수성 작용기 (이온성 작용기 또는 비이온성 폴리에틸렌글리콜 성분 등)로 기능화한다면 수용액 상에서 용해도는 증가시킬 수 있지만, 세포 막 투과성 (cell membrane permeability)이 감소하는 단점이 있다.

[0005] 다른 방법으로, DNA나 실리카를 이용하여 금 나노 입자의 표면에 유기 형광 분자를 직접 붙이는 방법이 있다. 이 방법에서는 유기 형광 분자의 발광 띠 (emission band)와 금 나노 입자의 흡수대 (absorption band)의 파장 범위가 겹치고, 둘 사이의 거리가 10 nm 이하라면 형광 공명 에너지 전달 (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) 현상이 일어나게 되는데, 이 현상에 의한 형광 신호 소멸 (fluorescence quenching)을 이용한다. 하지만, 이 방법은 외부에 형광 분자나 DNA가 존재하여 세포막 투과성이 떨어질 뿐만 아니라, 물에 녹는 친수성 형광 분자만 사용해야 한다는 한계를 지닌다.

[0006] 유기 형광 분자들은 바이오 이미징 측면에서 각자의 장단점이 있기 때문에 친수성/소수성에 관계 없이 모든 형광 분자를 사용하는 것이 매우 필수적이다. 예를 들어, 현재 상용화되어 있는 로다민 형광 분자의 경우 양이온성이기 때문에 세포막 투과성이 높고, 음이온성인 미토콘드리아를 이미징하기에는 효과적이지만, 세포 이미징에 사용하기에는 한계가 있다. 또한, BODIPY의 경우에도 상대적으로 높은 광 안정성 (photostability), 중성 전하 (neutral charge), 높은 형광 양자 수율 (fluorescence quantum yield)을 가지기 때문에 각광받는 형광 분자이지만, 소수성이기 때문에 생리학적 환경에서 사용이 어렵다.

[0007] 따라서, 높은 세포막 투과성을 가지며 친수성/소수성 형광 분자를 모두 사용할 수 있는, 형광이 켜지는 이미징 프로브의 합성이 실제 바이오 응용을 위하여 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) KR 10-1670842 B1

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 일 측면에서, 본 명세서는 형광 신호가 세포 내부에서만 발현되는 세포 이미징을 위한 프로브를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 다른 측면에서, 본 명세서는 형광 신호가 세포 내부에서만 발현되는 세포 이미징을 위한 프로브의 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 일 측면에서, 본 명세서에 개시된 기술은 지질로 형성된 리포솜을 포함하고, 상기 리포솜은, 지질 이중층; 상기 리포솜 내부에 담지된 금속 나노 입자 코어; 및 상기 지질 이중층에 삽입된 소수성 형광 분자 및 상기 리포솜 내부에 담지된 친수성 형광 분자 중 하나 이상의 형광 분자를 포함하는, 세포 이미징을 위한 프로브를 제공한다.

[0012] 예시적인 일 구현예에서, 상기 프로브는 세포 외부에서 형광 신호가 꺼지고 세포 내부에서 형광 신호가 켜지는 것일 수 있다.

[0013] 예시적인 일 구현예에서, 상기 금속 나노 입자 코어와 형광 분자 사이의 거리는 10 nm 이하인 것일 수 있다. 상기 거리는 금속 나노 입자 코어의 임의의 지점 A와 형광 분자의 임의의 지점 B 사이의 거리를 의미하는 것으로 최단 거리를 의미하는 것일 수 있다.

[0014] 예시적인 일 구현예에서, 상기 프로브는 지질 이중층에 삽입된 소수성 형광 분자와 리포솜 내부에 담지된 친수성 형광 분자를 포함하는 것일 수 있다.

[0015] 예시적인 일 구현예에서, 상기 금속 나노 입자는 Au, Ag 및 Pt로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상인 것일 수 있다.

[0016] 예시적인 일 구현예에서, 상기 형광 분자의 방출 밴드 (emission band)의 파장 범위는 금속 나노 입자 코어의 흡수 밴드 (absorption band)의 파장 범위에 속하는 것일 수 있다.

[0017] 예시적인 일 구현예에서, 상기 소수성 형광 분자는 나일 레드 (Nile Red), 보디피 (BODIPY, 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene) 및 시아닌 (cyanine)으로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상인 것일 수 있다.

[0018] 예시적인 일 구현예에서, 상기 친수성 형광 분자는 플루오레세인 (fluorescein), 로다민 (rhodamine), 쿠마린 (coumarine) 및 알렉사 (Alexa)로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상인 것일 수 있다.

[0019] 예시적인 일 구현예에서, 상기 리포솜 내부에 담지된 금속 나노 입자 코어는 Au인 것일 수 있다.

[0020] 다른 측면에서, 본 명세서에 개시된 기술은 세포; 및 상기 세포 내 도입되는 세포 이미징을 위한 프로브를 포함하고, 상기 세포 이미징을 위한 프로브는 지질로 형성된 리포솜을 포함하고, 상기 리포솜은 지질 이중층; 상기 리포솜 내부에 담지된 금속 나노 입자 코어; 및 상기 지질 이중층에 삽입된 소수성 형광 분자 및 상기 리포솜 내부에 담지된 친수성 형광 분자 중 하나 이상의 형광 분자를 포함하는, 세포 이미징을 위한 광학적 검출 키트를 제공한다.

[0021] 예시적인 일 구현예에서, 상기 프로브는 세포 외부에서 형광 신호가 꺼지고 세포 내부에서 형광 신호가 켜지는 것일 수 있다.

[0022] 예시적인 일 구현예에서, 상기 금속 나노 입자 코어와 형광 분자 사이의 거리는 10 nm 이하인 것일 수 있다. 상기 거리는 금속 나노 입자 코어의 임의의 지점 A와 형광 분자의 임의의 지점 B 사이의 거리를 의미하는 것으로 최단 거리를 의미하는 것일 수 있다.

[0023] 예시적인 일 구현예에서, 상기 프로브는 지질 이중층에 삽입된 소수성 형광 분자와 리포솜 내부에 담지된 친수성 형광 분자를 포함하는 것일 수 있다.

- [0024] 예시적인 일 구현예에서, 상기 형광 분자의 방출 밴드 (emission band)의 파장 범위는 금속 나노 입자 코어의 흡수 밴드 (absorption band)의 파장 범위에 속하는 것일 수 있다.
- [0025] 다른 측면에서, 본 명세서에 개시된 기술은 소수성 형광 분자가 삽입된 지질 이중층을 형성하는 단계; 환원제를 리포솜 내부에 담지시키는 단계; 및 금속 나노체 용액을 첨가하여 리포솜 내부에 금속 나노 입자 코어를 형성하는 단계를 포함하는 세포 이미징을 위한 프로브의 제조방법을 제공한다.
- [0026] 예시적인 일 구현예에서, 상기 환원제는 친수성 형광 분자와 함께 리포솜 내부에 담지시키는 것일 수 있다.
- [0027] 다른 측면에서, 본 명세서에 개시된 기술은 지질 이중층을 형성하는 단계; 친수성 형광 분자와 환원제를 리포솜 내부에 담지시키는 단계; 및 금속 나노체 용액을 첨가하여 리포솜 내부에 금속 나노 입자 코어를 형성하는 단계를 포함하는 세포 이미징을 위한 프로브의 제조방법을 제공한다.
- [0028] 예시적인 일 구현예에서, 상기 지질 이중층은 소수성 형광 분자를 삽입하여 형성하는 것일 수 있다.
- [0029] 예시적인 일 구현예에서, 상기 제조방법은 지질을 유기용매에 용해시킨 다음 빛을 차단하고 건조시켜 지질 이중층을 형성하는 것일 수 있다.
- [0030] 예시적인 일 구현예에서, 상기 제조방법은 환원제를 포함하는 수용액을 지질 이중층에 가하여 중탕 가열 처리 및 초음파 처리한 후 압출하여 리포솜을 형성하는 것일 수 있다.
- [0031] 예시적인 일 구현예에서, 상기 제조방법에서 금속 나노체를 포함하는 용액의 금속 나노체 농도는 형광 분자를 포함하는 용액의 형광 분자 농도의 1배 내지 3배이고, 상기 형광 분자는 친수성 또는 소수성인 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0032] 일 측면에서, 본 명세서에 개시된 기술은 형광 신호가 세포 내부에서만 발현되는 세포 이미징을 위한 프로브를 제공하는 효과가 있다.
- [0033] 다른 측면에서, 본 명세서에 개시된 기술은 형광 신호가 세포 내부에서만 발현되는 세포 이미징을 위한 프로브의 제조방법을 제공하는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0034] 도 1은 본 명세서의 일 실시예에 있어서, 친수성과 소수성 유기 형광 분자를 모두 가진 리포솜 기반의 세포 내부에서 형광이 켜지는 이미징 프로브 제작 방법에 대한 개략도이다.
- 도 2는 본 명세서의 일 실시예에 있어서, 유기 형광 분자 (Nile Red, Fluorescein)가 리포솜 내부에 있을 때와 없을 때, 이미징 프로브의 내부 코어인 금 나노 입자가 합성되기 전후의 특성을 투과전자현미경 (Transmission electron microscopy)으로 분석한 결과이다.
- 도 3은 본 명세서의 일 실시예에 있어서, 유기 형광 분자 (Nile Red, Fluorescein)가 리포솜 내부에 있을 때와 없을 때, 이미징 프로브의 내부 코어인 금 나노 입자가 합성되기 전후의 특성을 자외선-가시광선 분광법 (UV-vis spectroscopy)으로 분석한 결과이다.
- 도 4a는 본 명세서의 일 실시예에 있어서, 코어인 금 나노 입자가 없을 때의 리포솜에 대해 형광 분자의 발광띠 (emission band)에 맞는 두 종류의 형광 필터 (Filter 1 - Nile Red, Filter 2 - Fluorescein)로 형광 신호를 관찰한 이미지이다 (Exposure time : 1200 ms, Scale bar : 50 μm).
- Filter 1: Filter set 43 HE Cy3 (Excitation: 540 nm ~ 560 nm, Emission: 570 nm ~ 640 nm), Nile Red 검출
- Filter 2 : Filter set 43 HE eGFP (Excitation: 450 nm ~ 490 nm, Emission: 500 nm ~ 550 nm), Fluorescein 검출
- 도 4b는 본 명세서의 일 실시예에 있어서, 코어인 금 나노 입자가 있을 때의 리포솜에 대해 상기와 같이 두 종류의 형광 필터로 금 나노 입자에 의한 형광 소멸을 관찰한 이미지이다.
- 도 5a 내지 5c는 본 명세서의 일 실시예에 있어서, 금 나노 입자 코어와 함께 다른 종류의 유기 형광 분자를 조합하였을 때 형광 소멸을 관찰한 이미지이다.

도 6은 본 명세서의 일 실시예에 있어서, 세포 내부에서 형광이 켜지는 이미징 프로브를 인간 신경 아세포종 SH-SY5Y 세포 (Human neuroblastoma SH-SY5Y cell)에 적용하여 세포를 관찰한 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0035] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0036] 일 측면에서, 본 명세서에 개시된 기술은 지질로 형성된 리포솜을 포함하고, 상기 리포솜은, 지질 이중층; 상기 리포솜 내부에 담지된 금속 나노 입자 코어; 및 상기 지질 이중층에 삽입된 소수성 형광 분자 및 상기 리포솜 내부에 담지된 친수성 형광 분자 중 하나 이상의 형광 분자를 포함하는, 세포 이미징을 위한 프로브를 제공한다.
- [0037] 본 명세서에 따른 프로브는 금속 나노 입자에 의한 형광 공명 에너지 전달 현상 (fluorescence resonance energy transfer, FRET)을 이용하여 임의의 형광 분자가 가지는 신호를 세포 내부에서만 발현하도록 하였다. 더욱 구체적으로, 리포솜 내부에 있는 형광 분자들이 금속 나노 입자 코어에 의해 형광이 소멸되었다가, 세포 내로 들어가게 되면 형광 신호가 다시 발현된다.
- [0038] 예시적인 일 구현예에서, 상기 프로브는 세포 외부에서 형광 신호가 꺼지고 세포 내부에서 형광 신호가 켜지는 것일 수 있다.
- [0039] 예시적인 일 구현예에서, 상기 리포솜을 형성하는 지질은 중성, 음전하성, 양전하성을 포함하며, 골격을 형성하는 탄소의 수가 10 내지 20개인 것을 포함할 수 있다.
- [0040] 예시적인 일 구현예에서, 상기 리포솜은 직경이 10 μm 이하, 5 μm 이하, 1 μm 이하, 30 내지 200 nm, 또는 30 내지 100 nm의 크기를 갖는 것일 수 있다.
- [0041] 예시적인 일 구현예에서, 상기 금속 나노 입자는 Au, Ag 및 Pt로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상인 것일 수 있다.
- [0042] 상기 소수성 형광 분자는 물과 잘 섞이지 않고 지질 이중층 사이에 삽입될 수 있는 것으로, 예시적인 일 구현예에서, 소수성 유기 형광 분자인 것일 수 있다.
- [0043] 상기 친수성 형광 분자는 물과 잘 섞이며 리포솜 내부에 담지될 수 있는 것으로, 예시적인 일 구현예에서, 친수성 유기 형광 분자인 것일 수 있다.
- [0044] 예시적인 일 구현예에서, 상기 형광 분자의 방출 밴드 (emission band)의 파장 범위는 금속 나노 입자 코어의 흡수 밴드 (absorption band)의 파장 범위에 속하는 것일 수 있다.
- [0045] 예시적인 일 구현예에서, 상기 소수성 형광 분자는 금속 나노 입자 코어의 흡수 밴드 (absorption band)와 일치하는 방출 밴드 (emission band)를 갖는 나일 레드 (Nile Red), 보디피 (BODIPY, 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene) 및 시아닌 (cyanine)으로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상인 것일 수 있다.
- [0046] 예시적인 일 구현예에서, 상기 친수성 형광 분자는 금속 나노 입자 코어의 흡수 밴드와 일치하는 방출 밴드를 갖는 플루오레세인 (fluorescein), 로다민 (rhodamine), 쿠마린 (coumarine) 및 알렉사 (Alexa)로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상인 것일 수 있다.
- [0047] 본원에서 언급한 상기 형광 분자는 그 유도체를 모두 포함하는 것을 의미한다.
- [0048] 예시적인 일 구현예에서, 리포솜 내부의 금속 나노 코어가 구형, 큐브 형상, 별 형상 또는 덴드리머 (dendrimer) 형상일 때에는 흡수대의 범위가 500 nm ~ 600 nm이며, 발광대가 이와 일치하는 친수성 유기 형광 분자 플루오레세인 (Fluorescein), 알렉사 (Alexa) 또는 로다민 (Rhodamine)과 소수성 유기 분자 나일 레드 (Nile Red), 보디피 (BODIPY) 또는 시아닌-3 (Cy-3)을 조합하여 사용할 수 있다.
- [0049] 예시적인 일 구현예에서, 리포솜 내부의 금속 나노 코어가 막대 형상일 경우 흡수대의 범위가 600 nm ~ 1000 nm이며, 발광대가 이와 일치하는 친수성 유기 형광 분자 알렉사와 소수성 유기 형광 분자 인도시아닌 그린 (Indocyanine Green, ICG) 또는 시아닌-5 (Cy-5)를 조합하여 사용할 수 있다.
- [0050] 예시적인 일 구현예에서, 상기 리포솜은 DNA, RNA, 단백질, 약물 등의 기타 물질을 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0051] 다른 측면에서, 본 명세서에 개시된 기술은 상기 세포 이미징을 위한 프로브의 제조방법으로, 소수성 형광 분자가 삽입된 지질 이중층을 형성하는 단계; 친수성 형광 분자와 환원제를 리포솜 내부에 담지시키는 단계; 및 리

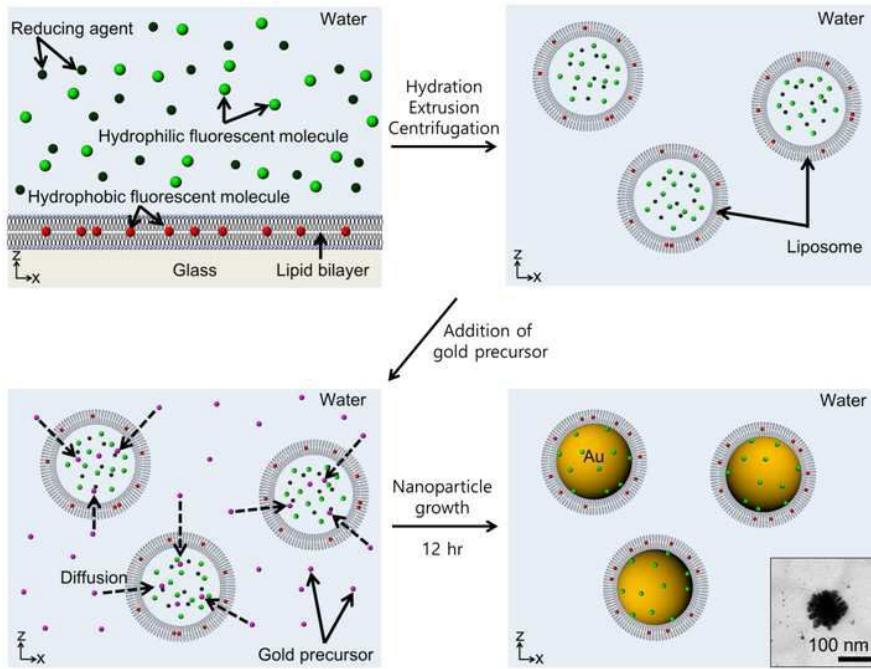
포즘 내부에 금속 나노 입자 코어를 형성하는 단계를 포함하는 세포 이미징을 위한 프로브의 제조방법을 제공한다.

- [0052] 예시적인 일 구현예에서, 상기 지질 이중층을 형성하는 단계는 소수성 형광 분자와 지질을 함께 건조시켜 얇은 막을 형성하는 것일 수 있다.
- [0053] 예시적인 일 구현예에서, 상기 친수성 형광 분자와 환원제를 리포솜 내부에 담지시키는 단계는 친수성 형광 분자와 환원제가 녹아 있는 수용액으로 지질 막을 수화시켜 리포솜을 형성하는 것일 수 있다.
- [0054] 예시적인 일 구현예에서, 상기 환원제는 유기 환원제 또는 무기 환원제일 수 있으며, 이에 제한하는 것은 아니나 시트르산나트륨 (Sodium citrate), 하이드록시아민 (Hydroxyamine), 아스코르브산 (Ascorbic acid) 및 보로하이드라이드 나트륨 (Sodium borohydride)으로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상인 것일 수 있다.
- [0055] 예시적인 일 구현예에서, 상기 방법은 원심분리를 이용하여 리포솜 외부에 존재하는 친수성 형광 분자와 환원제를 제거하는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0056] 예시적인 일 구현예에서, 상기 금속 나노 입자 코어를 형성하는 단계는 친수성 형광 분자와 환원제가 담지된 리포솜 내부로 금속 전구체를 확산시키고, 상기 금속 전구체와 환원제를 반응시켜 금속 나노 입자 코어를 형성하는 것일 수 있다.
- [0057] 도 1은 본 명세서의 일 실시예에서, 리포솜을 기반으로 하여 친수성과 소수성 유기 형광 분자를 가진 이미징 프로브를 제작하는 방법을 보여주는 개략도이다.
- [0058] 도 1에 도시된 바와 같이, 소수성 유기 형광 분자는 인지질과 함께 클로로포름에 분산되어 있으며 이를 진공펌프에서 건조시킨다. 그렇게 되면 얇은 인지질 필름과 함께 소수성 상호 작용에 의하여 소수성 형광 분자가 인지질 이중층 사이에 삽입된다.
- [0059] 다음으로, 얇은 인지질 필름이 있는 용기에 친수성 유기 형광 분자와 환원제를 포함하는 수용액을 넣은 다음 수화시키면 친수성 형광 분자와 환원제가 내부에 존재하는 리포솜이 형성된다. 원심분리 과정을 통하여 리포솜 외부의 친수성 형광 분자와 환원제를 제거하면 친수성 형광 분자와 환원제가 존재하는 리포솜이 선택적으로 수득된다.
- [0060] 다음으로, 상기 리포솜 용액에 금속 전구체를 넣으면 금속 이온이 리포솜 내부로 확산되며, 환원제에 의해 리포솜 내부에서 선택적으로 환원되어 금속 나노 입자 코어가 형성된다.
- [0061] 본 명세서에 개시된 리포솜 내부에는 친수성 형광 분자와 금속 나노 입자 코어가 있으며, 지질 이중층 사이에는 소수성 형광 분자가 삽입된다. 본 명세서에 따른 세포 이미징을 위한 프로브는 리포솜을 기반으로 하기 때문에 친수성/소수성에 관계없이 필요한 형광 분자를 자유롭게 선택할 수 있다. 친수성과 소수성 형광 분자를 동시에 사용 가능하므로 이미징하고자 하는 목표에 따라 실험방법을 간소화할 수 있는 이점이 있다.
- [0062] 또한, 외부가 지질로 코팅되어 있기 때문에 높은 세포막 투과성을 가져 더욱 선명한 형광 이미지를 얻을 수 있으며 형광 분자나 금속 나노 입자가 외부로 노출되는 현상이 방지되어 버퍼 용액과 같은 생리학적 환경에서 높은 콜로이드 안정성을 가질 수 있다. 이에 따라 생체에 적합하여 다양한 바이오 이미징 분야에 활용될 수 있다.
- [0063] 상기 프로브는, 금속 나노 입자 코어에 의한 형광 공명 에너지 전달 현상에 의해 형광이 소멸되었다가, 세포 내부로 들어가면 다시 발현되기 때문에 선명하고 특이적인 세포 이미지를 얻을 수 있다.
- [0064] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0065] **실시예.**
- [0066] (1) 인지질 이중층 사이에 소수성 유기 형광 분자가 삽입된 얇은 인지질 이중층 필름을 형성하는 단계
- [0067] DSPC (distearoylphosphatidylcholin) 1 mg과 소수성 유기 형광 분자의 최종 농도가 100 μ M이 되도록 만든 클로로포름 용액 500 μ l을 둥근바닥플라스크에 넣어주고, 빛을 차단한 뒤 진공펌프 내에서 6 시간 동안 건조하였다.
- [0068] (2) 리포솜 내부에 친수성 유기 형광 분자와 환원제를 담지시키는 단계

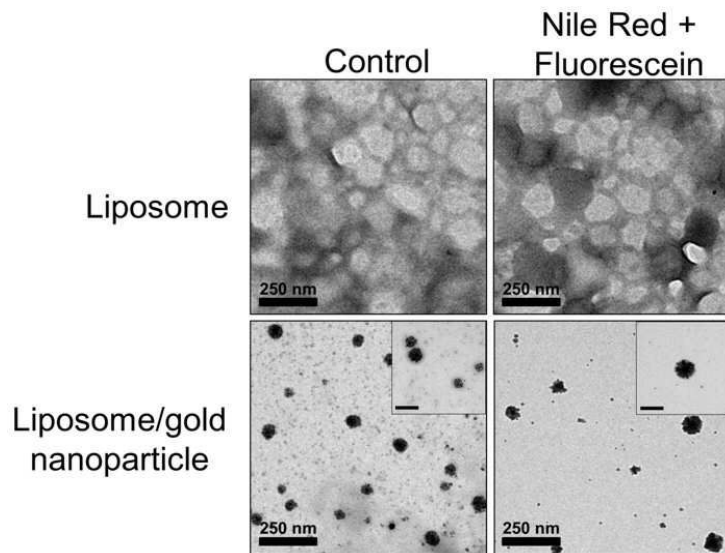
- [0069] 300 mM 아스코르브산, 100 μ M 플루오레세인이 녹아 있는 수용액을 수산화나트륨을 이용하여 pH 5로 적정하고, 상기 인지질 이중층 필름이 있는 둥근바닥플라스크에 넣어주었다. 그리고 65 $^{\circ}$ C 물 증탕으로 5분 및 초음파 처리 2분을 3회 반복한 뒤 100 nm 필터를 이용하여 65 $^{\circ}$ C에서 압출하여 리포솜을 형성하였다.
- [0070] (3) 금속 전구체를 리포솜 내부로 확산시켜 리포솜 내부에 금속 나노 입자 코어를 형성하는 단계
- [0071] 리포솜 외부에 남아 있는 친수성 유기 형광 분자와 환원제를 제거하기 위하여 13,200 rpm 및 5 $^{\circ}$ C에서 24분간 원심분리를 3회 진행하였다. 원심분리를 통해 가라앉은 펠릿을 제외한 나머지를 제거하였으며, 증류수를 통한 반복적인 세척 및 원심분리를 통해 친수성 유기 형광 분자와 환원제가 담지된 리포솜을 선택적으로 확보하였다. 이후 금속 전구체 ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)가 최종적으로 200 μ M이 되도록 넣어준 뒤 12시간 동안 상온에서 방치하였다. 이 온화 상태가 조절된 금속 전구체 용액과 환원제가 담지된 리포솜을 상온에서 혼합하면 특정한 pH에서만 존재하는 중성화 상태의 금속 전구체는 인지질막을 파괴하지 않고 통과하여 리포솜 내부로 전달되었다. 리포솜 내부로 전달된 금속 전구체는 리포솜 내부에 담지된 환원제와 선택적으로 반응하여 인지질막의 손상없이 리포솜 내부에 금속 입자 코어를 형성하였다.
- [0072] 도 2는 본 명세서의 실시예에서, 금 전구체를 넣기 전과 후를 투과전자현미경 (transmission electron microscopy)으로 분석한 결과이다. 비교예 (Control)는 친수성과 소수성 유기 형광 분자가 모두 없는 경우이다.
- [0073] 구체적으로, 도 2의 각 사진은 각각 형광 분자들이 있을 때와 없을 때, 그리고 금속 전구체를 넣기 전과 후의 4가지 실험군을 투과전자현미경을 통해 관찰한 것이고, 리포솜 안에서 성장한 금속 나노 입자 코어를 확인하였다.
- [0074] 도 3은 본 명세서의 실시예에서, 형광 분자들이 있을 때와 없을 때, 그리고 금속 전구체를 넣기 전과 후의 4가지 실험군을 자외선-가시광선 분광법 (UV-vis spectroscopy)으로 분석한 결과이다.
- [0075] 도 4a는 본 명세서의 실시예에서, 형광 분자들이 있을 때와 없을 때 금속 나노 입자 코어가 형성되기 전에 리포솜 입자를 두 종류의 필터로 관찰한 형광 현미경 이미지이다.
- [0076] 구체적으로, 도 4a는 금속 전구체를 넣기 이전의 형광 분자 유무의 차이에 따른 결과를 비교한 것이며 도 4b는 금속 전구체를 넣은 이후의 형광 분자 유무의 차이에 따른 결과를 비교한 것이다. 형광필터 1은 나일 레드, 형광필터 2는 플루오레세인을 검출할 수 있는 파장 검출 영역을 가지고 있으며, 유리 기판 위에 시료 20 μ l를 올려 주고 커버글라스로 덮은 뒤 노출 시간은 1200 ms로 고정하여 관찰한 결과이다. 형광필터 1은 흡수파장 540 nm ~ 560 nm, 방출파장 570 nm ~ 640 nm인 형광을 측정할 수 있으며 나일 레드는 흡수파장과 방출파장이 각각 549 nm, 638 nm이다. 형광필터 2는 흡수파장 450 nm ~ 490 nm, 방출파장 500 nm ~ 550 nm인 형광을 측정할 수 있으며 플루오레세인은 흡수파장과 방출파장이 각각 490 nm, 525 nm이다.
- [0077] 도 4a의 이미지에서 두 종류의 필터에서 동일한 위치에 형광 신호가 나타나는 것은 하나의 리포솜 안에 친수성 형광 분자인 플루오레세인과 소수성 형광 분자인 나일 레드가 동시에 존재한다는 증거가 된다.
- [0078] 도 4b는 본 명세서의 실시예에서, 금속 나노 입자 코어가 리포솜 내부에서 성장하였을 경우, 형광 분자들이 있을 때와 없을 때 리포솜 입자를 두 종류의 필터로 관찰한 형광 현미경 이미지이다. 두 종류의 형광필터 모두에서 형광 신호가 관찰되지 않았으며, 이는 금속 나노 입자 코어에 의한 형광 소멸에 의한 것이다.
- [0079] 도 5a 내지 도 5c는 서로 다른 종류의 유기 형광 분자를 조합하여 형광 현미경으로 분석한 결과이다. 로다민 6G (Rhodamine 6G), 로다민 B (Rhodamine B), 테트라메틸로다민 라이신 텍스트란 4 (Tetramethylrhodamine Lysine Dextran 4)는 방출파장이 모두 500 nm ~ 600 nm이므로 흡수띠가 일치하는 구형 금 나노 입자 코어와 함께 사용할 수 있음을 확인하였다. 금 나노 입자 코어가 자라기 전 리포솜 상태에서는 형광 신호가 나타나지만, 금 나노 입자 코어가 자라고 난 이후에는 형광 신호가 사라지는 것을 관찰할 수 있었다.
- [0080] 도 6은 본 명세서의 실시예에서, 세포 이미징을 위한 프로브를 실제 세포에 적용하여 형광 현미경으로 분석한 결과이다. 세포에 적용하였을 때 형광 신호가 다시 나오는 것을 관찰할 수 있었다.
- [0081] 이상, 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시 태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의해 정의된다고 할 것이다.

도면

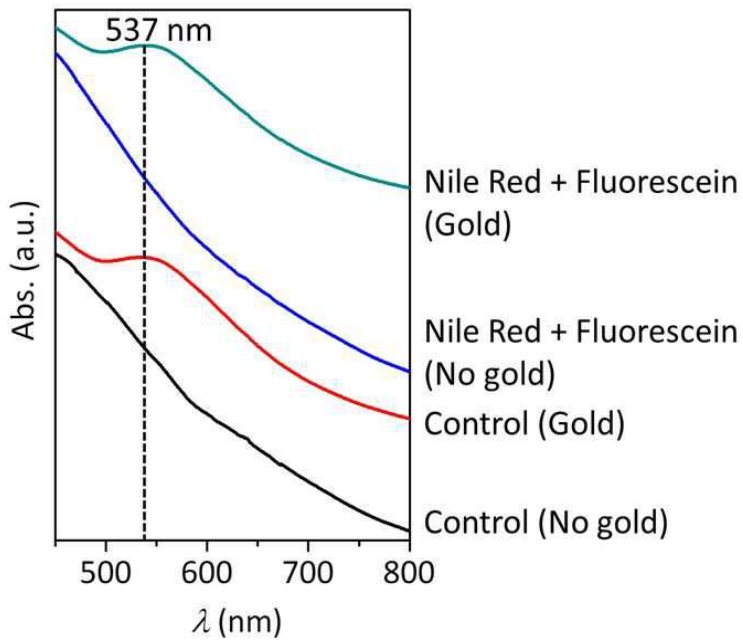
도면1



도면2

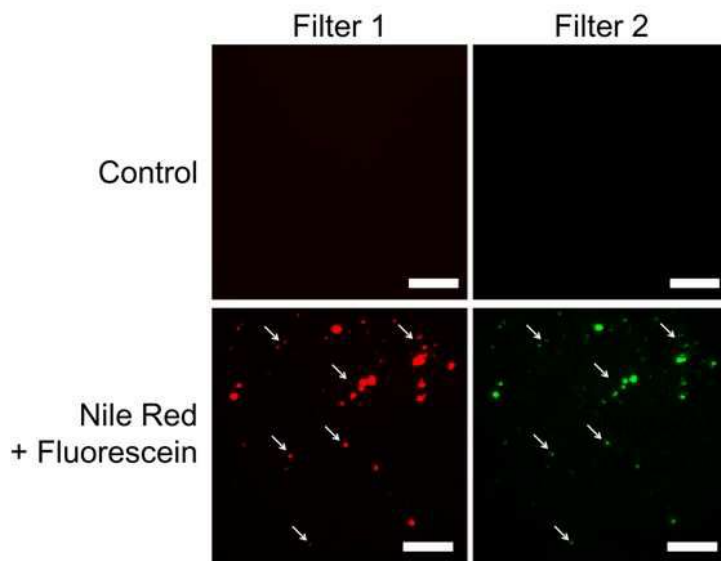


도면3



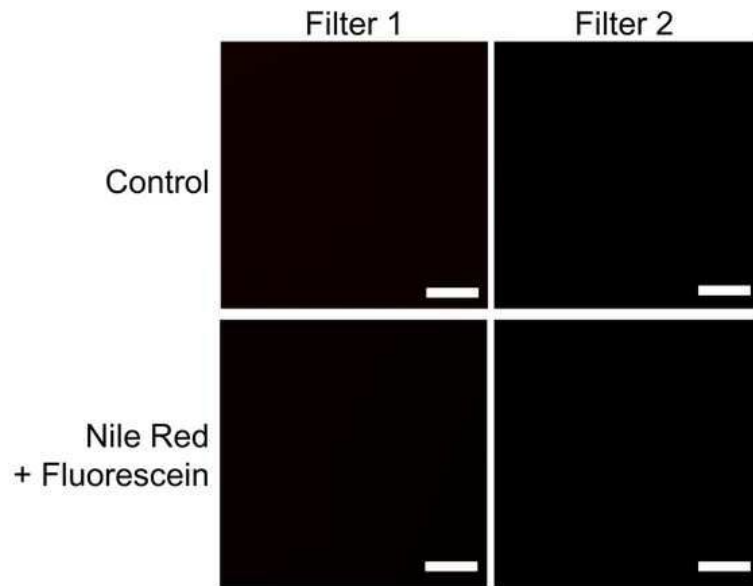
도면4a

Liposome

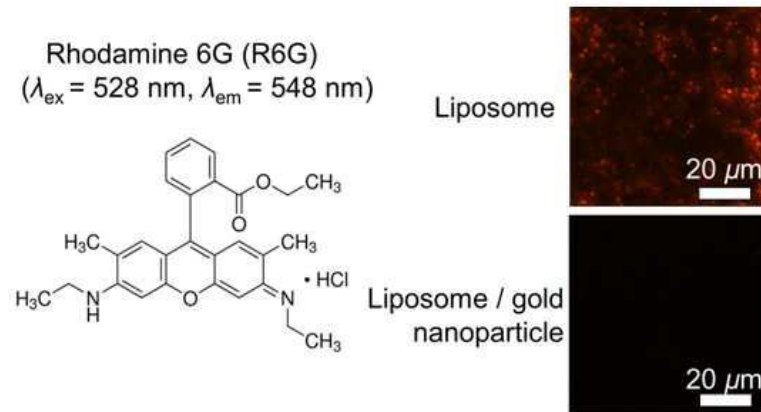


도면4b

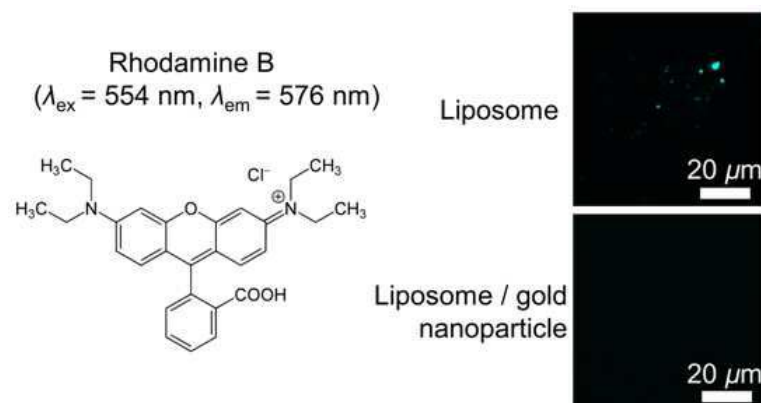
Liposome / gold nanoparticle



도면5a

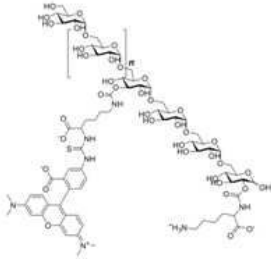


도면5b

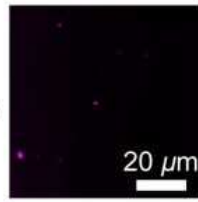


도면5c

Tetramethylrhodamine Lysine
Dextran 4 (TLD4)
($\lambda_{ex} = 555 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 580 \text{ nm}$)



Liposome



Liposome / gold
nanoparticle



도면6

