



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년08월28일

(11) 등록번호 10-2148185

(24) 등록일자 2020년08월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C09K 11/02 (2006.01) *C09K 11/58* (2006.01)
B82Y 20/00 (2017.01)
- (52) CPC특허분류
C09K 11/02 (2013.01)
C09K 11/58 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-0112156
- (22) 출원일자 2018년09월19일
 심사청구일자 2018년09월19일
- (65) 공개번호 10-2019-0143781
- (43) 공개일자 2019년12월31일
- (30) 우선권주장
 1020180071390 2018년06월21일 대한민국(KR)
- (56) 선행기술조사문헌
 Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol., 7,
 045013 (2016).*
- *는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자
 연세대학교 산학협력단
 서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
- (72) 발명자
 이동일
 서울특별시 강서구 우현로 67 (화곡동, 강서힐스테이트)
- 표경림
 서울특별시 마포구 월드컵북로 202-7 (성산동)
- 한상명
 전라북도 전주시 완산구 전주천동로 58 (교동)
- (74) 대리인
 특허법인 하나

전체 청구항 수 : 총 7 항

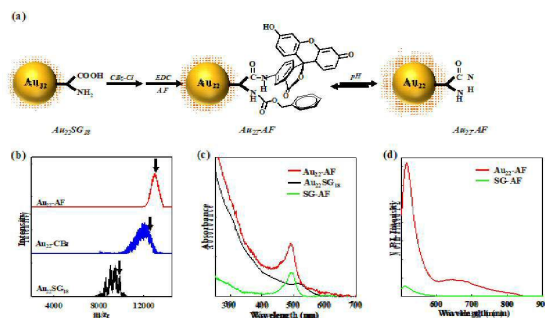
심사관 : 송이화

(54) 발명의 명칭 금 나노클러스터 복합체 및 그 제조방법

(57) 요약

본 발명의 일 실시예는, 리간드로 보호된 금 나노클러스터에 있어서, 상기 리간드 중 적어도 일부가 플루오르세인계 화합물로 변성된 금 나노클러스터 복합체 및 그 제조방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

B82Y 20/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014M1A8A1074219

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기후변화대응기술개발사업

연구과제명 다 전자 전달 나노입자를 이용한 선택적 CO₂ 전환 전기화학 촉매의 개발(2/3, 3단계)

기 여 율 1/2

주관기관 연세대학교

연구기간 2018.04.01 ~ 2019.01.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017R1A2B3006651

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 거대원자입자 기반 맞춤형 전기화학 촉매 개발연구(2/5)

기 여 율 1/2

주관기관 연세대학교

연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

리간드로 보호된 금 나노클러스터에 있어서,
 상기 리간드 중 적어도 일부가 플루오르세인계 화합물로 변성되고,
 상기 플루오르세인계 화합물은 하나 이상의 아민기를 포함하고,
 상기 금 나노클러스터는 pH에 따른 발광 특성을 가지고, pH 4.3에서의 발광 강도($PL_{4.3}$)에 대한 pH 7.8에서의 발광 강도($PL_{7.8}$)의 비($PL_{7.8}/PL_{4.3}$)는 46이상인 금 나노클러스터 복합체.

청구항 2

제1항에 있어서,
 상기 리간드는 유기 싸이올계 화합물인 금 나노클러스터 복합체.

청구항 3

제2항에 있어서,
 상기 유기 싸이올계 화합물은 그 말단에 적어도 하나의 카르복실기를 포함하는 금 나노클러스터 복합체.

청구항 4

제3항에 있어서,
 상기 카르복실기가 상기 플루오르세인계 화합물로 변성된 금 나노클러스터 복합체.

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항에 있어서,
 상기 플루오르세인계 화합물은 6-아미노플루오르세인인 금 나노클러스터 복합체.

청구항 7

제1항에 있어서,
 상기 금 나노클러스터는 10~50개의 금(Au) 원자로 이루어진 금 나노클러스터 복합체.

청구항 8

삭제

청구항 9

제1항에 있어서,
 상기 금 나노클러스터 복합체의 pH 4.3에서의 발광 강도($PL_{4.3}$)에 대한 pH 7.8에서의 발광 강도($PL_{7.8}$)의 비($PL_{7.8}/PL_{4.3}$)는 100 이상인 금 나노클러스터 복합체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 금 나노클러스터 복합체 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 세포 내 pH는 세포 대사, 신호 전달, 증식, 세포 사멸 및 소포 트래픽(vesicle trafficking)을 비롯한 많은 과정에서 중요한 역할을 하며, 세포 기관에서 엄격히 조절된다. 전형적인 포유류 세포의 경우, 세포 내 pH는 리소솜에서 4.7, 미토콘드리아에서 8.0 등으로 매우 다양하다. 비정상 세포 내 pH는 부적절한 세포 기능을 반영할 수 있으며, 암 및 알츠하이머와 같은 일부 일반적인 질병에서 관찰된다. 세포 내 pH는 엄격히 조절되기 때문에 작은 pH 변화는 세포 내 거동을 극적으로 변화시킬 수 있다. 예를 들어, 정상 세포(pH 7.2)에 비해 형질 전환된 세포의 pH는 0.3~0.5 가량 높아지고 세포 사멸은 0.3~0.4 낮아진 값에서 발생한다. 따라서, 넓은 pH 범위에서 작은 pH 변화를 정확하고 기민하게 감지할 수 있는 방법을 개발할 필요가 있다.

[0003] 세포 내 pH를 측정하는 방법으로는 H^+ 이온선택성 미세전극, 핵자기공명(NMR), 세포에 삽입된 대사산물 또는 pH 표시자 분석, pH 민감성 탐침을 이용한 흡광 및 형광 분광법 등이 있다. 이 중 형광 분광법은 손상되지 않은 세포와 세포 내 구획의 pH를 우수한 공간 및 시간 해상도로 모니터링할 수 있다는 장점이 있다. 유기 염료는 세포 내 pH를 감지하기 위한 pH 탐침으로 광범위하게 개발되어 왔다. 다만, 이들 pH 민감성 형광단(fluorophores)은 전형적으로 열등한 광퇴색 저항성을 나타내어, 장시간 동안 이미징 실험에서 이들의 사용이 제한된다. 또한, 이들은 세포 내에서 응집되거나 빠른 세포 누출을 겪는 경향이 있으며, 이는 또한 세포 내 pH의 장기 모니터링에서 이들의 사용을 제한한다.

[0004] 또한, 밝은 발광 및 우수한 광 안정성을 나타내는 반도체 양자점(QD)을 기반으로 한 형광 탐침이 개발되었다. 특히, QD는 QD 공여체 및 pH 민감성 형광단 수용체를 포함하는 Forster 공명 에너지 전달(Forster resonance energy transfer, FRET) pH 센서에서 유용한 것으로 알려졌다. 다만, 이들의 고유한 독성은 생물학적 응용 분야에서의 광범위한 사용을 제한한다.

[0005] 싸이올레이트로 보호된 금 나노클러스터는 고유의 광학, 전기화학 및 촉매 특성으로 인해 주목받고 있다. 이러한 나노클러스터는 특정 조성에서 특별한 안정성을 가지므로, 원자적으로 균질한 나노클러스터는 선택적 합성법으로부터 다양한 크기로 얻어질 수 있다. 상기 금 나노클러스터는 불연속적인 전자 전이를 나타내며, 분자와 같은 특성을 나타낸다. 특히, 이러한 나노클러스터는 생물학적 센싱 및 이미징을 위한 광학 탐침의 개발에 중요한 관심을 불러일으킨 주목할만한 광발광(photoluminescence: PL)을 보여준다. 종래 본 연구 그룹은 적절한 표면처리를 통해 고발광 Au_{22} 나노클러스터를 제조, 설계하는 방법을 보고한 바 있다. 피렌을 Au_{22} 에 결합시킴으로써, Au_{22} 의 광발광은 피렌에 의한 강화 효과 및 공명 에너지 전달에 의해 극적인 증가를 나타낸다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 전술한 종래 기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로, 본 발명의 목적은 pH 민감성이 개선된 금 나노클러스터 복합체 및 그 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명의 일 측면은, 리간드로 보호된 금 나노클러스터에 있어서, 상기 리간드 중 적어도 일부가 플루오르세인계(fluorescein) 화합물로 변성된 금 나노클러스터 복합체를 제공한다.

[0008] 일 실시예에 있어서, 상기 리간드는 유기 싸이올계 화합물일 수 있다. 상기 유기 싸이올계 화합물은 헥산싸이올(hexanethiol, C6S)을 포함하는 알칸싸이올, p-머캅토펜올, 방향족 알칸싸이올, 페닐알칸싸이올, 싸이올레이티드폴리(에틸렌글리콜), (r-머캅토프로필)-트리메톡시실란, 글루타싸이온, 3-머캅토-1-프로판설퍼네이트 및 이들 중 2 이상의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 하나일 수 있고, 바람직하게는, 그 말단에 적어도 하나의 카르복실기를 포함하는 것일 수 있고, 더 바람직하게는, 글루타싸이온일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0009] 일 실시예에 있어서, 상기 카르복실기가 상기 플루오르세인계 화합물로 변성될 수 있다. 상기 플루오르세인계

화합물은 하나 이상의 아민기를 포함할 수 있고, 이 때, 상기 카르복실기(-COOH) 및 상기 아민기(-NH₂)가 상호 반응하여 아마이드 결합을 생성할 수 있다. 예를 들어, 상기 플루오르세인계 화합물은 6-아미노플루오르세인일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0010] 일 실시예에 있어서, 상기 금 나노클러스터는 10~50개, 바람직하게는, 10~30개, 더 바람직하게는, 10~25개의 금 (Au) 원자로 이루어질 수 있다.

[0011] 일 실시예에 있어서, 상기 금 나노클러스터 복합체는 pH에 따른 발광 특성을 가질 수 있다. 구체적으로, 상기 금 나노클러스터 복합체의 pH 4.3에서의 발광 강도(PL_{4.3})에 대한 pH 7.8에서의 발광 강도(PL_{7.8})의 비 (PL_{7.8}/PL_{4.3})는 100 이상, 바람직하게는, 160 이상, 더 바람직하게는, 200 이상일 수 있다.

발명의 효과

[0012] 본 발명의 일 측면에 따른 금 나노클러스터 복합체는, Au₁₈, Au₂₂, Au₂₅와 같은 금 나노클러스터에 pH 반응성 염료인 아미노플루오르세인(AF)을 결합시킴으로써 pH 민감성이 우수하다. AF에서 Au₂₂로 예상되는 공명 에너지 전달과는 달리, Au₂₂의 비-열화(non-thermalized) 상태에서 AF로의 초고속 에너지 전달은 정상상태 광발광 측정에서 관찰되었다. 상기 금 나노클러스터 복합체에서의 초고속 에너지 전달은 4.3~7.8의 pH 범위에서 현저한 pH 대조 발광을 일으킬 수 있다. 또한, 상기 금 나노클러스터 복합체는 높은 pH 민감성, 우수한 광 안정성 및 세포 내 pH 측정에 대한 낮은 독성을 나타낸다.

[0013] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은, (a) 본 발명의 실시예에 따른 복합체의 제조방법을 도식화한 것이고, (b) 본 발명의 실시예 및 비교예에 따른 복합체의 MALDI 질량 스펙트럼이고, (c) 본 발명의 실시예 및 비교예에 따른 복합체의 흡광 스펙트럼이고, (d) 본 발명의 실시예 및 비교예에 따른 복합체의 PL 스펙트럼이다.

도 2는, 본 발명의 실시예 및 비교예에 따른 복합체의 ¹H NMR 스펙트럼이다.

도 3은 본 발명의 비교예에 따른 복합체의 pH 의존성 흡광 및 PL 특성을 나타낸다.

도 4는 본 발명의 실시예 및 비교예에 따른 복합체의 pH 의존성 광학 특성을 나타낸다.

도 5는 본 발명의 실시예 및 비교예에 따른 복합체의 PL 여기 스펙트럼이다.

도 6 및 도 7은 본 발명의 실시예 및 비교예에 따른 복합체의 pH 의존성 광학 특성을 나타낸다.

도 8은 본 발명의 실시예에 따른 복합체의 코어 내 상태 이완 및 비-열화된 에너지 전달의 경쟁 경로를 도식화한 것이다.

도 9 내지 도 12는 본 발명의 실시예 및 비교예에 따른 복합체와 공동 배양된 HeLa 세포의 세포 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하에서는 첨부한 도면을 참조하여 본 발명을 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 따라서 여기에서 설명하는 실시예로 한정되는 것은 아니다. 그리고 도면에서 본 발명을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.

[0016] 명세서 전체에서, 어떤 부분이 다른 부분과 "연결"되어 있다고 할 때, 이는 "직접적으로 연결"되어 있는 경우뿐 아니라, 그 중간에 다른 부재를 사이에 두고 "간접적으로 연결"되어 있는 경우도 포함한다. 또한 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 구비할 수 있다는 것을 의미한다.

[0017] 이하, 첨부된 도면을 참고하여 본 발명의 실시예를 상세히 설명하기로 한다.

- [0018] 재료
- [0019] 벤질 클로로포르메이트(CBz-Cl, $\geq 98\%$), 소듐 바이카보네이트(NaHCO_3 , 99.7%), (1-에틸-3-(3-다이메틸아미노프로필)카르보다이미드 하이드로클로라이드(EDC, $\geq 98\%$), 소듐 포스페이트 다이베이직 다이하이드레이트(BioUltra, $\geq 98\%$), 소듐 포스페이트 모노베이직 다이하이드레이트(BioUltra, $\geq 99\%$), 2,5-다이하이드록시벤조산(DHB, 98%), 트리플루오로아세트산(TFA, 99%) 및 듀테륨 옥사이드(99.9 atom% D)는 Sigma-Aldrich에서 구득하였다.
- [0020] 6-아미노플루오르세인(AF)($\geq 95\%$)는 Tokyo Chemical Industry에서, 아세톤 및 아세토니트릴은 Burdick and Jackson에서 구득하였다. 테트라하이드로퓨란(THF, extra pure grade)은 덕산에서 구득하였고, 탈염 컬럼(Amicon ultra-4 centrifugal filter units)은 Merck Millipore의 것을 사용하였다.
- [0021] 생 세포 실험에서, 헬라 세포(KCLB No. 10002)는 한국세포주은행에서 구득하였고, 둘베코 수정 이글 배지(DMEM), 소태아 혈청(FBS), 페니실렌-스트렙토마이신(100X), 및 둘베코 인산 완충 생리식염수(DPBS, catalog number LB 001-02)는 웰진에서 구득하였다. 포름알데히드용액(36.5~38wt% in H_2O) 및 니제리신 소듐 염($\geq 98\%$)은 Sigma-Aldrich에서 구득하였고, Cell Counting Kit-8 용액은 도진도에서 구득하였다. 물은 Millipore Milli-Q system(18.2 M Ω cm)으로 정수하였고, 모든 물질은 정제없이 구득한 그대로의 것을 사용하였다.
- [0022] 플루오르세인 결합된 $\text{Au}_{22}\text{SG}_{18}$ (Au_{22} -AF)의 제조
- [0023] 출발물질인 $\text{Au}_{22}\text{SG}_{18}$ 나노클러스터는 "K. Pyo, V. D. Thanthirige, K. Kwak, P. Pandurangan, G. Ramakrishna and D. Lee, *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, 137, 8244" 등에 기재된 방법에 따라 합성될 수 있다.
- [0024] 0.1 M NaHCO_3 용액 1mL에 용해된 10mg의 $\text{Au}_{22}\text{SG}_{18}$ 나노클러스터 및 THF 1mL에 용해된 CBz-Cl(39 μL , CBz : Au_{22} = 270)을 30mL의 신틸레이션 바이알(pH 8.3)에 넣었다. 실온에서 3시간 동안 격렬하게 교반한 후, THF를 증발시키고 미 반응 CBz 및 다른 불순물을 3kDa 컷-오프 탈염 컬럼을 사용하여 제거하였다.
- [0025] pH 5.3 PBS 완충액(2mL)에 용해된 Au_{22} -CBz(5mg)의 용액에 6mg의 EDC(EDC/ Au_{22} -CBz = 36)를 첨가하였다. 혼합물을 30 분 간 교반한 후, pH 9.0 PBS 완충액을 첨가하여 용액 pH를 조정한 후, 3kDa 컷-오프 컬럼을 사용하여 탈염시켰다. 이 과정을 pH가 7.2에 도달할 때까지 반복하였다. 그 후, pH 7.2 PBS 완충액에 용해된 아미노플루오르세인(32mg, AF/ Au_{22} -CBz = 90)을 EDC 결합된 Au_{22} -CBz 용액에 첨가하고, 반응 혼합물을 16 시간 동안 교반하였다.
- [0026] 최종적으로, 미반응 플루오르세인 및 반응 불순물은 여액이 플루오르세인의 흡수 스펙트럼이 나타나지 않을 때까지 10kDa 컷-오프 탈염 컬럼을 사용하여 완전히 제거하였다. 플루오르세인 결합된 글루타티온(SG-AF)과 플루오르세인 결합된 $\text{Au}_{25}\text{SG}_{18}$ (Au_{25} -AF)도 유사하게 합성되었다.
- [0027] 플루오르세인 결합된 Au_{22} 나노클러스터 (Au_{22} -AF)
- [0028] 도 1(a)는 플루오르세인(AF) 결합된 $\text{Au}_{22}\text{SG}_{18}$ (Au_{22} -AF, SG: 글루타티온)의 제조과정을 도식화한 것이다. 출발물질인 $\text{Au}_{22}\text{SG}_{18}$ 나노클러스터는 "K. Pyo, V. D. Thanthirige, K. Kwak, P. Pandurangan, G. Ramakrishna and D. Lee, *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, 137, 8244" 등에 기재된 방법에 따라 합성될 수 있다.
- [0029] Au_{22} 나노클러스터는 수용성이 높고 665nm 부근에서 6.5%의 양자 수율로 넓은 방출을 나타낸다. 잠재적인 클러스터 간 결합을 억제하기 위해, 글루타티온의 1차 아민기를 우선 벤질클로로포르메이트(CBz-Cl)로 보호하였다. 정밀하게 조절된 pH 조건에서 1-에틸-3-(3-다이메틸아미노프로필)카르보다이미드 하이드로클로라이드(EDC)를 이용한 아미드 커플링 반응을 통해 AF를 CBz-보호된 Au_{22} 나노클러스터에 결합시켰다. AF가 결합된 Au_{22} 는 Au_{22} -AF로 약칭되며, AF가 결합된 글루타티온(SG-AF) 또한 유사하게 합성되었다.
- [0030] 합성된 Au_{22} -AF는 MALDI 질량 분광법 및 ^1H NMR 분광법에 의해 확인되었다. 도 1(b)를 참고하면, $\text{Au}_{22}\text{SG}_{18}$ 의 질량 스펙트럼은 m/z 9,865Da에서 원상태 이온(intact ion)을 보여주며, 8,000~9,500Da의 m/z 범위에서 $\text{Au}_{18}\text{SG}_{14}$, $\text{Au}_{19}\text{SG}_{15}$, $\text{Au}_{20}\text{SG}_{16}$ 및 $\text{Au}_{21}\text{SG}_{17}$ 양이온에 상응하는 단편 이온을 보여준다.

- [0031] CBz로 보호된 $Au_{22}(Au_{22}-CBz)$ 의 질량 스펙트럼은 $Au_{22}-CBz$ 로부터 생성된 단편 이온으로 구성된 10,400~12,300 Da의 m/z 범위에서 넓은 피크를 나타낸다. 화살표는 18개의 CBz기로 완전히 보호된 Au_{22} 양이온에 상응하는 12,261Da의 m/z 값을 나타낸다. $Au_{22}-AF$ 의 질량 스펙트럼은 또한 $Au_{22}-AF$ 의 원상태 이온과 단편 이온으로 구성된 12,000~13,700Da의 m/z 범위에서 넓은 피크를 나타낸다.
- [0032] 구체적으로, 화살표는 18개의 CBz 및 2개의 AF로 결합된 $Au_{22}-AF$ 이온에 상응하는 m/z 값(12,936Da)을 나타낸다. 도 2에 표시된 1H NMR 분석결과는 Au_{22} 나노클러스터에 평균 16개의 CBz 및 2개의 AF가 결합된 유사한 결과를 보여준다. 이러한 결과는 Au_{22} 나노클러스터의 무결성이 표면개질 과정 동안 잘 보존되었음을 암시한다.
- [0033] pH에 따른 흡광 및 광발광
- [0034] Shimadzu UV-vis-NIR 분광 광도계(UV-3600) 및 Scinco 형광 분광계(Fluoro Mate FS-2)를 사용하여 $Au_{22}SG_{18}$, $Au_{22}-CBz$ 및 $Au_{22}-AF$ 나노클러스터의 UV-vis 흡광 및 PL 스펙트럼을 얻었다. 푸리에 변환 NMR 측정은 25℃에서 Bruker Avance II 400MHz 분광기로 수행되었다. NMR 샘플은 600mg의 D_2O 에 5mg의 나노클러스터 샘플을 용해시킴으로써 제조되었다. 결합된 Au_{22} 나노클러스터의 질량 스펙트럼은 표준 UV 질소 레이저(337nm)가 장착된 MALDI 질량 분석기(Bruker Daltonics)를 사용하여 얻었다. 가속 전압은 15kV로 유지되었으며 스펙트럼은 선형 양이온 모드로 수집되었다. 매트릭스로서 DHB로 포화된 0.1% 트리플루오로아세트산을 함유하는 1 : 1 H_2O-CH_3CN 중의 3mM 나노클러스터 용액으로 MALDI 플레이트를 스폿팅하여 샘플을 제조하였다.
- [0035] 도 1(c)의 $Au_{22}-AF$ 의 흡광 스펙트럼은 490nm에서 AF의 특이적 흡광을 명확하게 보여준다. Au_{22} 흡광도를 이용하여 $Au_{22}-AF$ 의 흡광도를 보정한 후 SG-AF의 흡광도와 비교하면, $Au_{22}-CBz$ 에 평균 2 개의 AF가 결합되어 있음을 확인할 수 있다. 그러나 도 1(d)에서 $Au_{22}-AF$ 의 광발광(PL) (여기 파장=490nm) 강도는 SG-AF의 PL (여기 파장=490nm) 강도보다 훨씬 높다는 것을 알 수 있다. 인산염 완충 식염수(PBS) 용액(pH 7.8)에서 $Au_{22}-AF$ 와 SG-AF의 농도는 490nm에서 동일한 흡광도를 나타내도록 조정되었다. 극적으로 강화된 AF 발광은 $Au_{22}-AF$ 에서 AF의 PL 과정에서 Au_{22} 로부터 일정한 기여가 있음을 시사한다.
- [0036] AF, 카르복시플루오르세인 및 플루오르세인 이소싸이오시아네이트(FITC)와 같은 플루오르세인 유도체는, pH 의존적 발광을 나타낸다. 이러한 광발광에서 관찰되는 pH 의존성은 pK_a 보다 pH가 높을 때 발생하는 산 해리 및 스피로사이클 개환(spirocyclic ring-opening) 과정과 관련된다.
- [0037] $Au_{22}-AF$ 에서 AF의 PL 강화에 있어서, Au_{22} 의 역할을 더 잘 이해하기 위해 pH 4.3~7.8의 다양한 PBS 완충액에서 $Au_{22}-AF$ 의 흡광 및 PL 스펙트럼을 모니터링하였고, 동일한 AF 농도에서 얻어진 SG-AF의 스펙트럼과 비교하였다. 도 3에서, 용액의 pH가 4.3에서 7.8로 증가하면 490nm에서 SG-AF의 흡광도가 약 8배 증가하였다. 마찬가지로, 515nm에서 PL (여기 파장=490nm) 강도는 pH가 4.3에서 7.8로 증가하면 10배 증가하였다. pH에 의존적인 흡광도와 PL의 증가를 비교하면, PL의 증가는 주로 SG-AF의 pH 의존성 흡광으로부터 발생한다고 볼 수 있다. 도 4(a)에서, 490nm에서 $Au_{22}-AF$ 에서의 AF 흡광도는 용액의 pH가 4.3에서 7.8로 증가할 때 8배 증가하였다. 그러나 517nm에서 $Au_{22}-AF$ 의 PL (여기 파장=490nm) 강도는 pH를 4.3에서 7.8로 증가시키면 165배까지 급격히 증가하였다. 도 4(c)에서 $Au_{22}-AF$ 및 SG-AF에 대한 pH 증가에 따른 PL 증가를 비교할 수 있고, $Au_{22}-AF$ 에서 AF의 PL 증가에 있어서 Au_{22} 가 중요한 역할을 가짐을 알 수 있다.
- [0038] 도 4(d)의 $Au_{22}-AF$ 의 여기 스펙트럼(excitation spectrum, 발광 파장=517nm)은 분명히 AF의 PL에서 Au_{22} 의 역할을 뒷받침한다. 285, 320 및 490nm에서 피크가 있는 AF의 스펙트럼 특징 외에도 300~460nm 영역에서 넓은 여기가 있다. 넓은 여기 프로파일은 $Au_{22}SG_{18}$ 의 발광 파장이 790nm일 때의 여기 스펙트럼의 특징과 일치하며, $Au_{22}-AF$ 에서 AF의 PL 강화에 Au_{22} 의 기여를 암시한다. 도 5를 참고하면, 넓은 여기 프로파일(발광 파장=517nm)은 pH가 4.3에서 7.8로 증가함에 따라 AF 피크와 함께 증가한다. 보편적으로 Förster 공명 에너지 전달 과정을 통해 금 나노입자의 주위에서 형광 소광(fluorescence quenching)이 일어나는 것으로 알려져 있다. 종래 피렌 결

합된 Au₂₂ 시스템에 대한 연구에서, 전자 이동 비활성화 경로가 차단될 때 피렌으로부터 Au₂₂로의 공명 에너지 전달이 효과적으로 발생하여 Au₂₂의 극적인 PL 향상을 유도한다는 것을 보여주었다. AF(517nm) 및 Au₂₂(665nm)의 방출 에너지 및 방출과 흡수 사이의 스펙트럼 중첩을 고려하면, AF로부터 Au₂₂로의 효율적인 공명 에너지 전달을 기대할 수 있다. 반면, 도 4(d) 및 도 5의 Au₂₂-AF의 여기 스펙트럼(발광 파장=517nm)을 보면, SG-AF의 여기 스펙트럼(발광 파장=517nm)에 비해 Au₂₂의 여기 스펙트럼에서 나타나는 특징적인 파장 영역에서 추가적인 증가가 있음을 확인할 수 있다. 이는 pH 증가에 따라 Au₂₂에서 AF로의 역방향 에너지 이동이 증가하는 것으로 이해할 수 있다.

[0039] 초고속 에너지 전달 및 코어 내 상태 이완

[0040] 여기 상태의 Au₂₂-AF에서 일어날 수 있는 코어 내 상태 이완과 초고속 에너지 전달 과정은 경쟁 관계에 있다.

[0041] 초고속 에너지 전달은 pH 6.5 이상에서 현저히 빨라지고, 동시에 pH가 증가함에 따라 코어 내 상태 이완이 점차 느려진다. 높은 pH에서 코어 내 상태 이완이 느린 이유는, 명확하지 않지만, 코어 내 상태 이완이 Au₂₅ 및 다른 금 나노클러스터에서 Au₁₃ 코어를 둘러싸는 리간드 껍질에 의해 영향을 받을 수 있다고 보고된 바 있다. 더 높은 pH에서 형성되는 AF의 2가 음이온(dianionic) 형태는 Au₂₅ 나노클러스터에서 관찰된 것과 같이 코어 내 상태 이완에 영향을 미치는 리간드 껍질에 약간의 변화를 유도할 수 있다.

[0042] 초고속 이완 과정의 경쟁적 성격을 보여주는 많은 연구가 있었다. 메탈로포피린 및 [Ru(bpy)₃]²⁺ 2분자 연구에서, Harriman et al.은 비-열화 상태에서 내부 전환 및 초고속 에너지 전달 간의 경쟁을 보여주었다. 최근의 연구는 공여자 방출과 수용체 흡수 간의 스펙트럼 중첩에 의존하는 일반화된 공명 에너지 전달 이론이 비-열화(non-thermalized)된 여기 상태로부터의 여기 에너지 전달에 적용될 수 있음을 보여주었다.

[0043] 도 4(a)는 AF의 흡수 면적이 pH가 증가함에 따라 증가함을 보여준다. 따라서 더 높은 pH에서는 더 높은 스펙트럼 중첩이 예상되어 에너지 전달 속도가 빨라지고 에너지 전달 효율이 향상된다. 즉, 스펙트럼 중첩 면적이 pH 증가에 따라 증가함에 따라, 에너지 전달 속도가 증가하고 코어 내 상태 이완에 비해 우세하게 된다. 경쟁하는 초고속 에너지 전달 및 코어 내 상태 이완은 도 8에 도시된다.

[0044] 기존에 비-열화된 에너지 전달은 높은 여기 상태가 상당히 오래 지속되는 포르피린 및 카로티노이드와 같은 특정 분자 시스템에서만 관찰되었다. 금 나노클러스터의 에너지 전달은 상승된 pH에서 코어 내 상태 이완보다 빠르기 때문에 Au₂₂의 비-열화된 여기 상태를 수반할 수 있다. 이는 금 나노클러스터에서 비-열화 된 에너지 전달을 보여주는 일 예시이다. 또한, 피코초 이하의 여기 에너지 전달은 광합성 광 수확 시스템에서 활용될 수 있다. Au₂₂-AF에 대한 분석 결과는 금 나노클러스터의 고온 여기 상태를 이용하고 그러한 상태에서부터 에너지 전달을 실현하는 것이 실제로 가능하다는 것을 분명히 보여준다. 계측기의 반응 한계보다 짧은 수명을 갖는 초고속 이완을 나타내는 금 나노입자와는 달리, 지연된 코어 내 상태 이완을 갖는 Au₂₂의 분자형 불연속 에너지 레벨 구조는 도 8에 도시된 것과 같이 비-열화된 상태에서 효율적인 에너지 전달을 가능하게 한다.

[0045] 비-열화된 Au₂₂에서 AF로의 에너지 전달은 형광단이 결합된 금 나노클러스터에서 Förster 공명 에너지 전달에 대해 전형적으로 관찰된 시간보다 현저히 빠르다. 에너지 전달 속도의 증가는 높은 pH에서 강화된 스펙트럼 중첩에 기인한 것으로 이해된다.

[0046] 플루오르세인 결합된 Au₂₅ 나노클러스터 (Au₂₅-AF)

[0047] 더 높은 여기 상태로부터의 에너지 전달이 다른 금 나노클러스터에서 관찰되는지 여부를 보기 위해, AF가 결합된 Au₂₅SG₁₈ 나노클러스터가 아마이드 커플링 반응을 통해 유사하게 합성되었다. 합성된 AF가 결합된 Au₂₅SG₁₈(Au₂₅-AF)은 평균 16개의 CBz 및 2개의 AF로 보호되었다(도 2).

[0048] 분자 시스템에서의 내부 전환과 비교하여, Au₂₅ 나노클러스터에서의 코어 내 상태 이완은 이전의 초고속 발광 상향 변환 연구에서 보고된 바와 같이 매우 느리다.

[0049] 따라서, 비-열화된 에너지 전달은 보다 높은 여기 상태로부터 발생할 수 있다. 도 6은 다양한 PBS 완충액(pH

4.3~7.8)에서의 Au₂₅-AF의 광학 특성을 보여준다. 도 6(a)에서 볼 수 있듯이, 490nm에서의 흡광도는 pH가 4.3에서 7.8로 증가함에 따라 약 8.5배 증가하여 AF의 개환 및 2가 음이온 형성을 반영한다. 또한, 517nm에서 Au₂₅-AF의 PL(여기 파장=490nm)은 극적으로 향상되었다(도 6(b)).

[0050] 도 6(c)와 비교하면, PL 향상은 약 46배 증가하였고, 이는 SG-AF의 10배 증가보다 크다. 그러나 PL 향상은 Au₂₂-AF에서 관찰된 것보다 작다. 이는 Au₂₂보다 낮은 PL 양자 수율을 보이는 Au₂₅와 AF 간의 더 작은 스펙트럼 중첩에 기인할 수 있다. 도 6(d)의 여기 스펙트럼(발광 파장=517nm)은 300~450nm 영역에서 넓은 여기 프로파일을 나타내어, AF의 PL에 대한 Au₂₅의 기여를 확인할 수 있다. 이와 같이, 여기 상태에서부터 고유한 에너지 전달은 Au₂₂에 제한되는 것은 아니며, 다른 금 나노클러스터 시스템에서도 관찰될 수 있다.

[0051] 플루오르세인 결합된 Au₁₈ 나노클러스터 (Au₁₈-AF)

[0052] 더 높은 여기 상태에서부터의 에너지 전달이 다른 금 나노클러스터에서 관찰되는지 여부를 보기 위해, AF가 결합된 Au₁₈SG₁₄ 나노클러스터가 아마이드 커플링 반응을 통해 유사하게 합성되었다. 합성된 AF가 결합된 Au₁₈SG₁₄(Au₁₈-AF)은 평균 12개의 CBz 및 1개의 AF로 보호되었다.

[0053] 도 7은 두 PBS 완충액(pH 4.3, 7.8)에서의 Au₁₈-AF의 광학 특성을 보여준다. 도 7(b)에서 볼 수 있듯이 517nm에서 Au₁₈-AF의 PL(여기 파장=490nm)은 pH를 4.3에서 7.8로 증가시키면 약 260배까지 급격히 향상되었다.

[0054] 세포 내 pH 센싱

[0055] 세포 내 pH의 정확한 측정은 세포 활동을 이해하고 세포 내 약물 전달 시스템의 개발에 중요하다. 현저하게 pH 의존적인 Au₂₂-AF의 PL은 세포 내 pH 지표로 적용될 수 있다.

[0056] 세포 내 pH를 모니터링하기 위해, 약 490nm의 단일 여기 파장을 갖는 역 형광 현미경(inverted fluorescence microscopy)을 사용하여 Au₂₂-AF와 공동 배양한 HeLa 세포의 세포 이미지를 얻었다. 비교를 위해 SG-AF와 공동 배양한 HeLa 세포의 이미지도 얻었다. HeLa 세포와 공동 배양된 Au₂₂-AF 및 SG-AF의 농도는 동일한 양의 AF를 갖도록 조정되었다.

[0057] HeLa 세포(ATCC CCL 243)를 10%(v/v) 소태아 혈청(FBS)과 1%(v/v) 페니실린-스트렙토 마이신이 첨가된 DMEM 배지에서 5% CO₂ 대기압 배양기에서 37°C로 배양하였다. HeLa 세포를 2.0mL의 DMEM 배지에 5×10⁴ 세포 밀도로 유리 바닥 공초점 접시에 접종하고 37°C, 5% CO₂에서 24시간 동안 배양하였다. HeLa 세포를 DPBS 용액으로 세척한 후, 2.0mL의 새로운 배지에서 Au₂₂-AF 및 SG-AF(AF 최종 농도 40 μM)를 첨가하여 5% CO₂의 가습된 배양기에서 37°C에서 3 시간 동안 HeLa 세포와 공동 배양하였다. 과량의 Au₂₂-AF 및 SG-AF를 DPBS 용액으로 완전히 세척한 후 5분 간 포름알데히드로 고정시켰다. PL 이미징은 DPBS 용액으로 2회 세척한 후에 수행하였다. Au₂₂-AF 및 SG-AF의 PL 이미지는 50 μM 니제리신의 존재하에서 상이한 pH 조건(4.5~7.5)에서 CCD 카메라 및 오일 침지 대물 렌즈(Olympus UPlanSApo, 60×/1.35)가 장착된 Olympus IX71 도립 현미경에 기록되었다. 여기 필터(BrightLine®Fluorescence filter 482/35), 이색성 필터(FF506-Di02) 및 방출 필터(BrightLine®Fluorescence filter 525/15)를 사용하여 Au₂₂-AF 및 SG-AF의 형광 현미경 분석이 이루어졌다. 이미지 데이터는 ImageJ 소프트웨어로 처리하였다. Au₂₂-AF(또는 SG-AF)의 광 안정성을 평가하기 위해, HeLa 세포를 Au₂₂-AF(또는 SG-AF)와 함께 3 시간 동안 배양하였다. 완전히 세척한 후, HeLa 세포를 2.0mL DMEM 배지에 보관하고 수은 램프가 장착된 도립 현미경을 사용하여 분석하였다. 생 세포 이미지는 형광 현미경 하에서 여기 필터(밴드 패스 482/35 또는 쇼트 패스 450nm)를 사용하여 연속 조명하에 획득하였다.

[0058] 완전히 세척한 후, 세포 내 pH 및 세포 외 pH를 균질화하는 니제리신(nigericin)의 존재하에서 돌베코 인산 완충 생리식염수(DPBS)를 사용하여 pH를 조정하였다. 도 9(a) (및 도 10)에서, HeLa 세포에서 Au₂₂-AF의 PL은 pH가 증가함에 따라 급격히 증가한다. 도 9(b)에서 pH 의존성 PL의 강도는 pH가 4.5에서 7.5로 증가함에 따라 약 30배 이상 증가한 반면에, SG-AF로 배양된 HeLa 세포에서는 PL의 강도 증가가 약 1.2배에 불과하였다.

[0059] Au₂₂-AF 및 SG-AF의 PL의 강도 증가는 각각 도 4에서 발견된 165배 및 10배 보다 작으므로 세포 내 환경에 의한

약간의 간섭이 있음을 알 수 있다. 그럼에도 불구하고, HeLa 세포에서 Au₂₂-AF에 대해 발견된 pH 대조 PL은 현저하다. 또한, 도 9(b)에서 pH 의존성 PL은 5.0~7.5의 pH 범위에서 실질적으로 선형이다. pH 감응 범위는 pH 의존성 형광단의 pKa에 의해 제한되며, 이는 일반적으로 $pKa \pm 1$ 의 pH 범위에서 S자형 검량선(sigmoidal calibration curve)을 나타낸다. Au₂₂-AF에는 다양성자 산(polyprotic acid)인 18개의 글루타티온으로 보호된 Au₂₂에 결합된 2개의 AF 부분이 있다. 따라서, AF의 해리는 리간드 껍질에 다가 산이 존재함으로써 상당한 영향을 받을 수 있으며, 도 9(b)에 도시된 바와 같이 넓은 pH 범위에서 실질적으로 선형인 검량선을 유도할 것으로 예상된다.

[0060] pH 민감성 유기 염료의 빠른 광퇴색은 종종 세포 과정을 추적하기 위해 장시간 동안 시간 경과 PL 이미징을 필요로 하는 세포 내 환경의 연구에 문제를 유발할 수 있다. 예를 들어, 일반적인 pH 지시약인 FITC는 5분 이내에 80% 이상 퇴색된다. 또한, 시아닌 염료(Cy3, Cy5, Cy7)는 20 분 이내에 거의 완전하게 퇴색되는 것으로 알려져 있다.

[0061] Au₂₂ 나노클러스터는 뛰어난 광 안정성을 나타내므로 Au₂₂에서 AF로의 에너지 전달은 Au₂₂-AF에서의 AF의 광 안정성을 향상시킬 것으로 기대된다. Au₂₂-AF의 광 안정성을 조사하기 위해 HeLa 세포와 함께 배양된 Au₂₂-AF의 생 세포 이미지는 도 11과 같이 여기 필터(band pass 482/35nm)를 사용하여 45분 간 수은 램프를 조사한 상태에서 촬영되었다. 비교를 위해 SG-AF의 생 세포 이미지도 얻었다. 도 11에서, Au₂₂-AF 및 SG-AF에서 관찰된 PL 감소는 45분 간 각각 10% 및 34%이며, Au₂₂-AF의 광 안정성이 개선되었음을 알 수 있다. 이는 광 안정성이 뛰어난 Au₂₂에 의한 에너지 전달 효과에 기인할 수 있다. 이 효과는 Au₂₂-AF가 AF의 여기 파장에서 멀리 떨어진 <450nm에서 여기될 때 더 중요해진다. 도 12에서, Au₂₂-AF의 PL 감소는 4%에 불과하지만 SG-AF의 PL 감소는 거의 60%이며, 이러한 파장(<450nm)에서 에너지 전달 기여가 강화되었음을 알 수 있다.

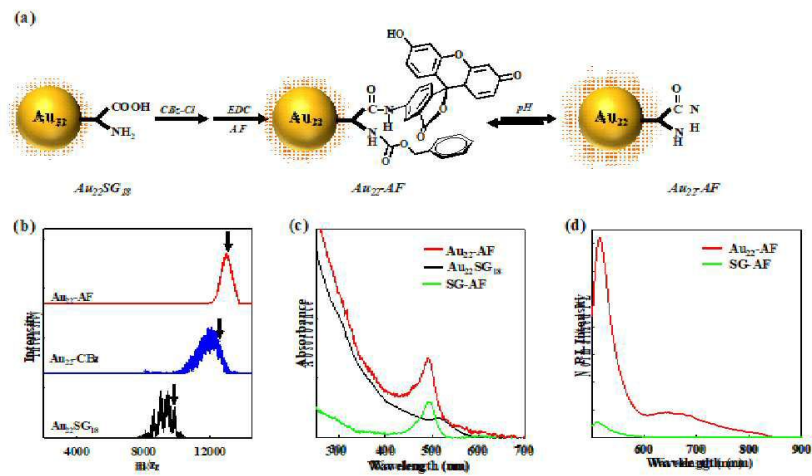
[0062] 상기와 같이, Au₂₂ 나노클러스터에 결합된 AF는 현저한 pH 대조 발광 특성을 가진다. pH가 증가함에 따라 Au₂₂의 비-열화된 여기 상태에서 AF로의 초고속 에너지 전달 속도는 증가하여 pH가 4.3에서 7.8로 증가함에 따라 발광의 약 160배 이상 증가를 유도하였다. 에너지 전달 및 결과적인 PL 향상은 AF가 결합된 Au₂₅, Au₁₈ 나노클러스터에서도 관찰되었다. 이러한 금 나노클러스터 시스템에서 관찰된 독특한 에너지 전달은 코어 내 상태 이완을 지연시키는 금 나노클러스터의 분자와 같은 불연속적 에너지 레벨 구조에 기인할 수 있다. pH의 증가에 따라 Au₂₂ 공여자와 AF 수용체 간의 스펙트럼 중첩이 증가하며, 이로 인해 에너지 전달 속도가 증가할 수 있다. 세포 내 환경에서 Au₂₂-AF는 우수한 pH 민감성과 넓은 동역학적 범위를 나타낸다. 또한, Au₂₂-AF는 우수한 광 안정성 및 최소한의 독성을 포함하는 세포 내 pH 센싱에 많은 이점을 가진다. Au₂₂-AF의 표면은 다양한 표적제 및/또는 약물로 쉽게 기능화될 수 있으므로 다양한 세포 내 감지 및 약물 전달을 위한 강력한 플랫폼을 제공할 수 있다.

[0063] 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

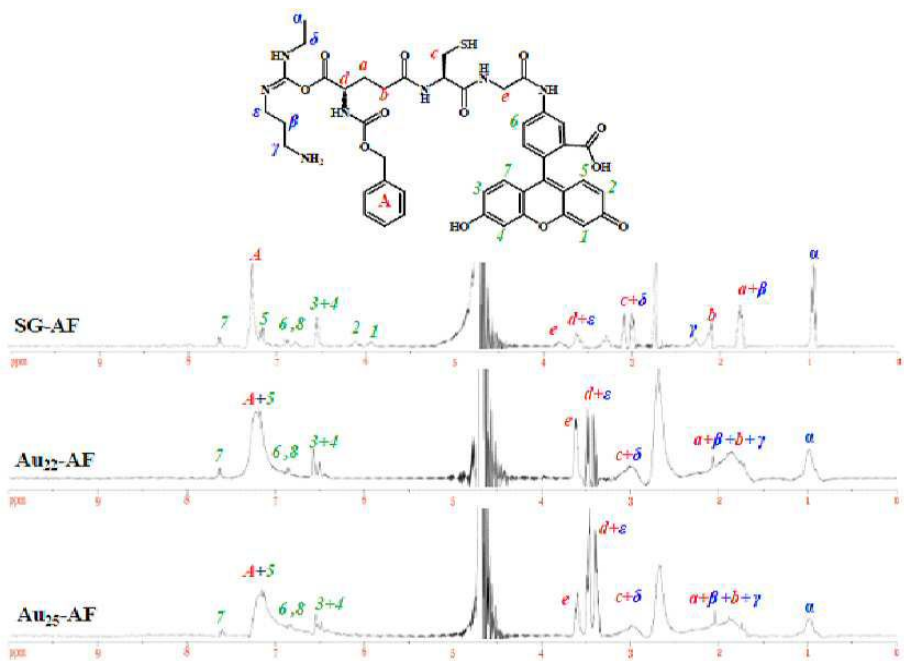
[0064] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

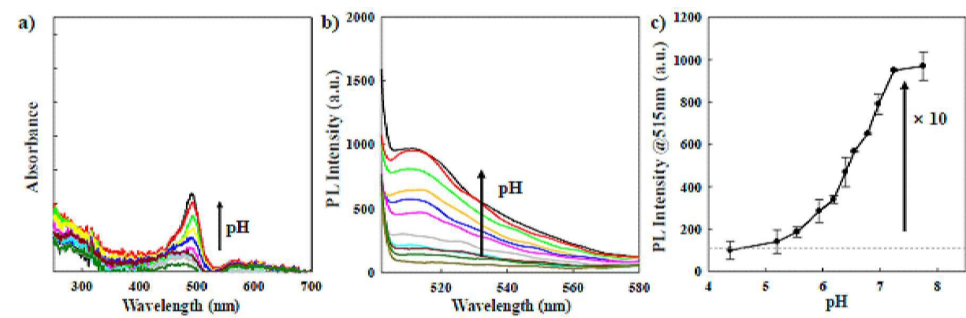
도면1



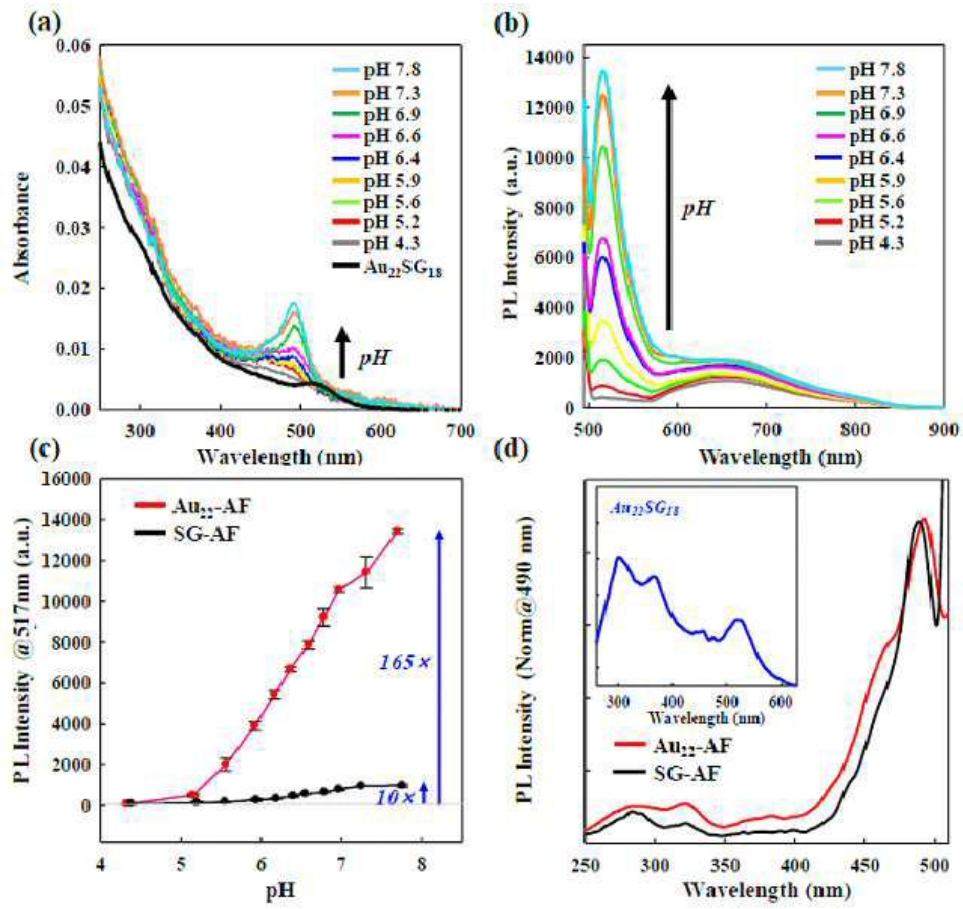
도면2



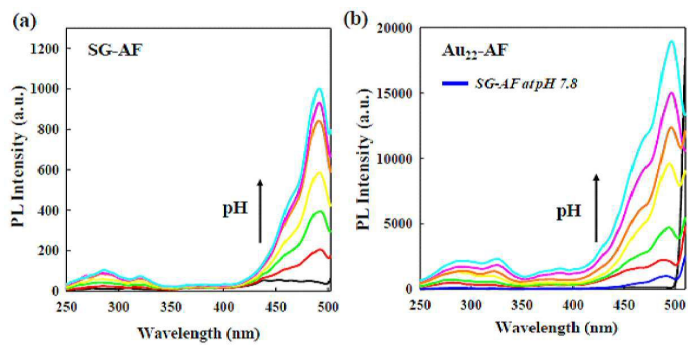
도면3



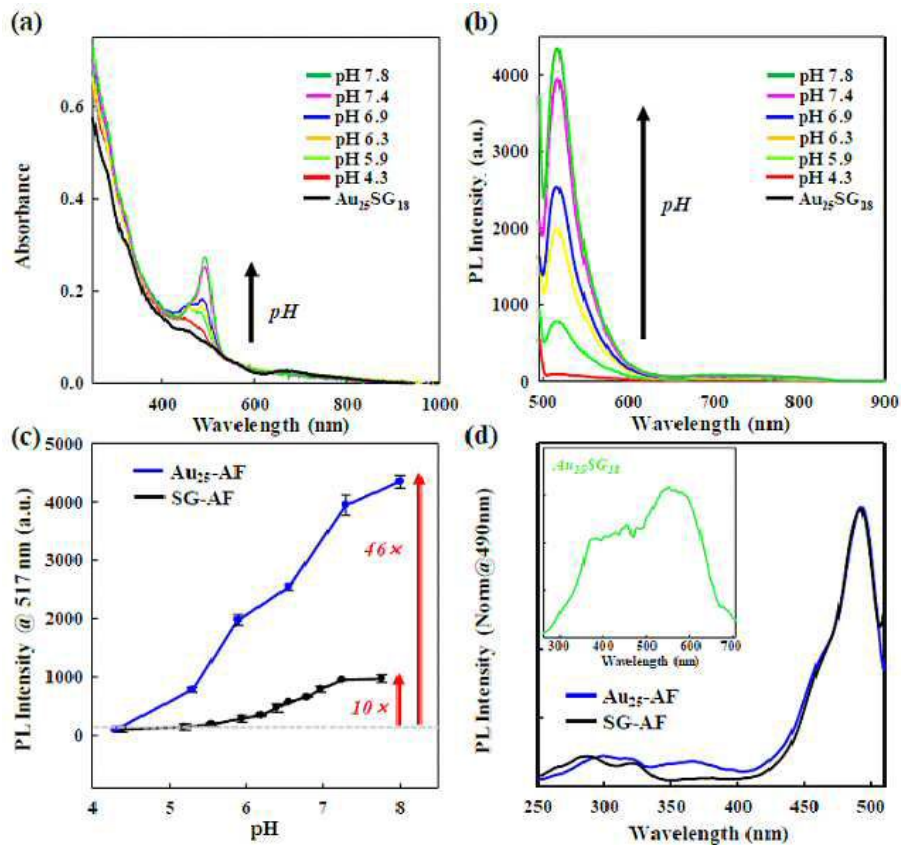
도면4



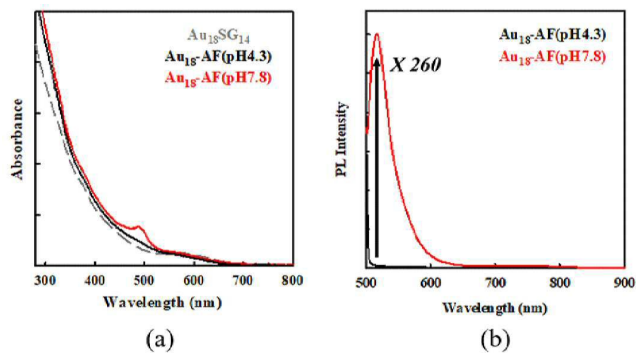
도면5



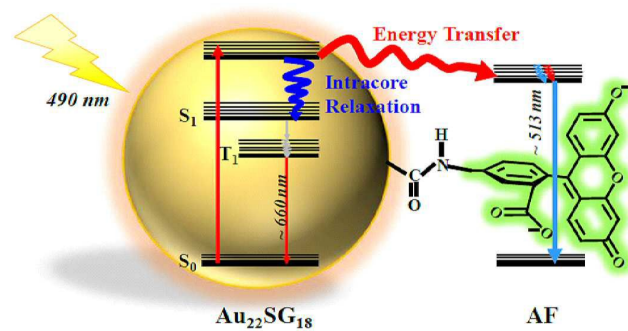
도면6



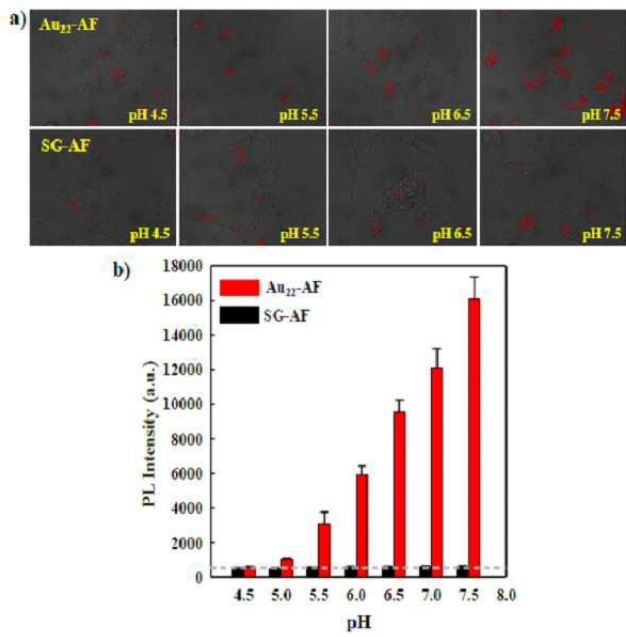
도면7



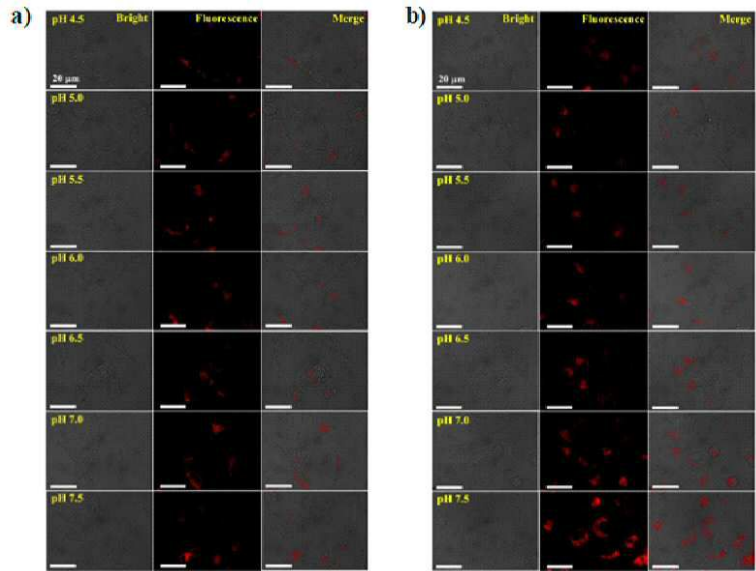
도면8



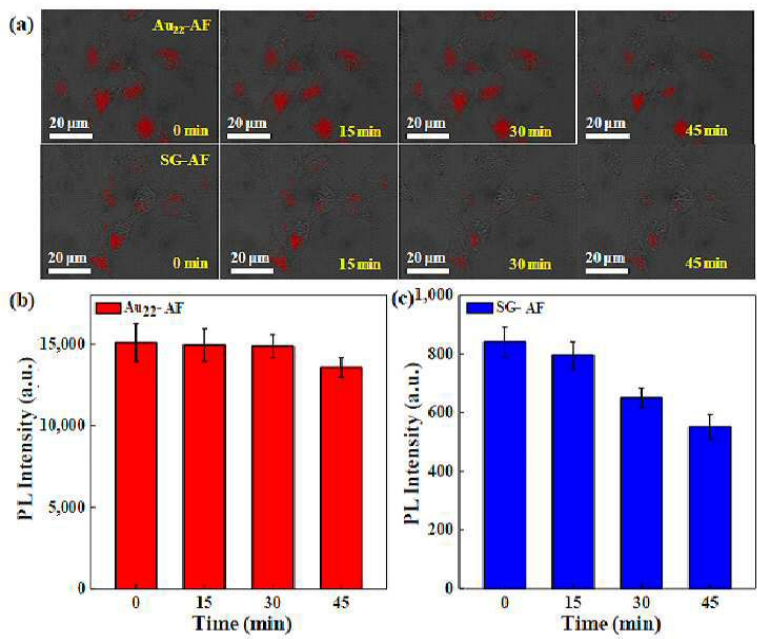
도면9



도면10



도면11



도면12

