



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년09월17일

(11) 등록번호 10-2156911

(24) 등록일자 2020년09월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/543 (2006.01) G01N 21/552 (2014.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/54373 (2013.01)

G01N 21/554 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0130796

(22) 출원일자 2018년10월30일

심사청구일자 2018년10월30일

(65) 공개번호 10-2020-0048586

(43) 공개일자 2020년05월08일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020170135675 A*

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 4 항

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

양재문

서울특별시 서대문구 신촌동 연세로 50-1, 연세의료원 에비슨의생명연구센터 ABMRC 408호

김정훈

서울특별시 서대문구 신촌동 연세로 50-1, 연세의료원 에비슨의생명연구센터 ABMRC 408호

(74) 대리인

특허법인 천지

심사관 : 양경식

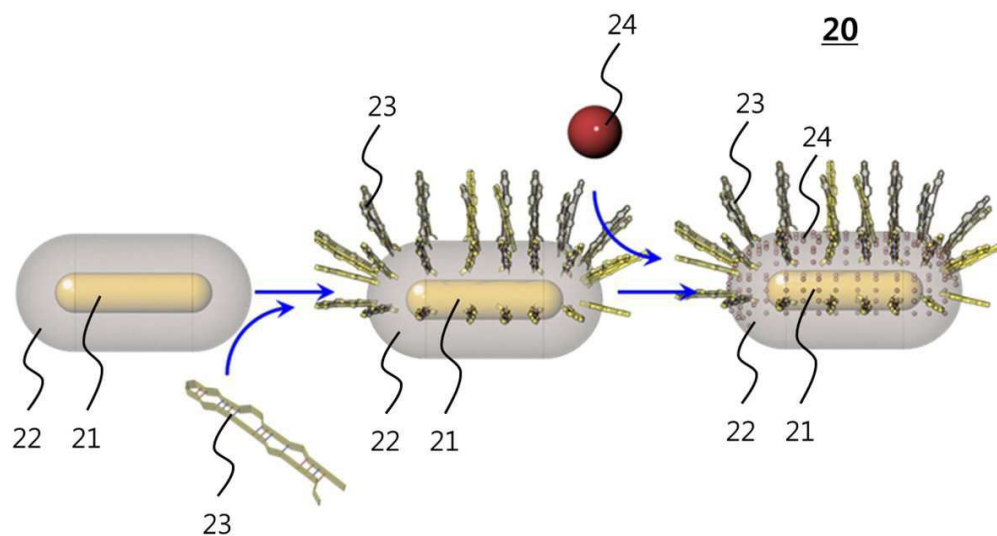
(54) 발명의 명칭 압타 센서

(57) 요약

본 발명은 압타 센서에 관한 것으로서, 상기 압타 센서는 복수개의 마이크로그루브들(microgrooves)을 포함하는 기판, 그리고 상기 기판의 표면에 고정된 금속 나노 구조체를 포함한다.

상기 압타 센서는 국소표면 플라즈몬 공명 현상을 이용하여 생체 분자의 존재유무, 발현량 및 활성을 측정할 수 있고, 생체 분자의 측정을 이용하여 상기 생체 분자와 관련된 질병을 진단할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/54346 (2013.01)

G01N 33/544 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

US20160228549 A1*

Applied Surface Science, vol.427, pp.133-140
(2017.09.05. 온라인 공개)*

KR1020130001886 A

KR1020100073636 A

KR1020170090034 A

KR101255149 B1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

복수개의 마이크로그루브들(microgrooves)을 포함하고 표면에 아민기가 도입된 기판, 그리고
상기 기판의 표면에 공유결합으로 고정된 금속 나노 구조체를 포함하고,
상기 금속 나노 구조체는 금속 나노 입자, 상기 금속 나노 입자를 둘러싸는 도파민을 포함하는 코팅층, 및 상기 코팅층의 관능기에 결합된 압타머를 포함하는 것인 압타 센서.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1 항에 있어서,
상기 압타머는 티올기(-SH)를 포함하고,
상기 압타머는 상기 티올기에 의하여 상기 코팅층의 관능기와 친핵성 결합하는 것인 압타 센서.

청구항 4

제 1 항에 있어서,
상기 금속 나노 구조체는 상기 코팅층의 관능기에 결합된 캡핑제(capping agent)를 더 포함하는 것인 압타 센서.

청구항 5

제 4 항에 있어서,
상기 캡핑제는 2-머캅토에탄올(2-Mercaptoethanol), 에틸아민(Ethylamine), 디에틸 푸마레이트(Diethyl fumarate) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인 압타 센서.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 표적 대상 물질과의 결합력을 향상시켜 정밀한 국소 부위 약물 전달, 질병 진단, 질병 치료, 근적외선 영상화 및 광열 치료에 이용 가능한 압타 센서에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 표면 플라즈몬(Surface Plasmon)이란 도체 표면, 이를테면 금속 박막의 표면을 따라 전파하는 자유전자의 양자화된 진동을 의미한다. 이와 같은 표면 플라즈몬은 프리즘과 같은 유전매체(dielectric medium)를 지나 유전매체의 임계각 이상의 각도로 금속 박막에 입사하는 입사광에 의해 여기되어 공명을 일으키는데, 이를 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance; SPR)이라 한다.

[0003] 단색 입사광을 사용할 때, 공명이 일어나는 입사광의 입사각(공명각) 및 공명이 일어나는 파장(공명파장)은 금속 박막에 근접한 물질의 굴절률 변화에 매우 민감하다. SPR 센서는 이러한 성질을 이용하여 금속 박막에 근접한 물질 즉, 시료의 굴절률 변화로부터 시료의 정량·정성 분석 및 박막인 시료의 두께를 측정하는 데에 이용되어 왔다.

[0004] SPR을 이용한 센서에는 크게 콜로이드 형태(Colloidal)로 분산시킨 용액에 원하는 피분석물을 넣어서 색변화를 관찰하는 감지 방법과 유리나 고분자 유기물 기판을 이용하여 금속 나노 입자를 고정된 뒤 입자 하나에 대한 흡

광 그래프의 개형, 픽의 위치 등의 변화를 감지하는 센서로 구분된다

[0005] 후자의 경우 금속 박막이 아닌 금속으로 이루어진 나노 입자, 나노막대(nanorod) 및 나노구멍(nanohole) 등의 수 nm~수백 nm 크기의 금속 나노 구조체는 외부에서 입사되는 특정한 주파수(파장)의 빛에 의하여 나노 구조체 전도대(conduction band)에 있는 전자들의 집단적 진동(collective oscillation)이 유발되어 전기 쌍극자 특성을 띠게 된다. 그 결과, 해당 주파수 영역의 빛을 강하게 산란 및 흡수를 하게 되는데, 이를 국소표면 플라즈몬 공명(localized surface plasmon resonance; LSPR)이라 한다.

[0006] LSPR에 의한 산란과 흡수는 SPR과는 달리 프리즘 또는 회절격자 없이 단순 투과분광학적 방법에 의하여 소멸 스펙트럼(extinction spectrum) 측정이 가능하다. 소멸 스펙트럼은 흡광 스펙트럼과 산란 스펙트럼의 합인데, 금속 나노 구조체의 경우 소멸 스펙트럼의 대부분이 흡광도가 차지하기 때문에 흡광을 측정하여도 무방하다. 금속 나노 구조체의 외부 입사광에 대한 흡광도 특성, 즉 흡광세기, 흡광스펙트럼의 선폭, 흡광중심 파장 등은 금속의 종류, 금속 나노 구조체의 크기 및 형상에 매우 강한 의존성을 보인다. 뿐만 아니라, SPR과 유사하게, 그들의 흡광 특성은 금속 나노 구조체의 외부환경, 즉 금속 나노 구조체 표면 주위 매질의 복소 유전율에 민감하게 반응하는데, 이러한 성질을 이용한 바이오 센서가 개발되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 특허공개 제2012-0107686호(공개일: 2012년 10월 4일)

(특허문헌 0002) 대한민국 특허공개 제2009-0113990호(공개일: 2009년 11월 3일)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 국소표면 플라즈몬 공명 현상을 이용하여 생체 분자의 존재유무, 발현량 및 활성을 측정할 수 있고, 생체 분자의 측정을 이용하여 상기 생체 분자와 관련된 질병을 진단할 수 있는 압타 센서를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 복수개의 마이크로그루브들(microgrooves)을 포함하는 기판, 그리고 상기 기판의 표면에 고정된 금속 나노 구조체를 포함하고, 상기 금속 나노 구조체는 금속 나노 입자, 상기 금속 나노 입자를 둘러싸는 코팅층, 및 상기 코팅층의 관능기에 결합된 압타머를 포함하는 것인 압타 센서를 제공한다.

[0010] 상기 금속 나노 구조체의 코팅층은 도파민을 포함할 수 있다.

[0011] 상기 압타머는 티올기(-SH)를 포함하고, 상기 압타머는 상기 티올기에 의하여 상기 코팅층의 관능기와 친핵성 결합할 수 있다.

[0012] 상기 금속 나노 구조체는 상기 코팅층의 관능기에 결합된 캡핑제(capping agent)를 더 포함할 수 있다.

[0013] 상기 캡핑제는 2-머캅토에탄올(2-Mercaptoethanol), 에틸아민(Ethylamine), 디메틸 푸마레이트(Diethyl fumarate) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

발명의 효과

[0014] 본 발명의 압타 센서는 국소표면 플라즈몬 공명 현상을 이용하여 생체 분자의 존재유무, 발현량 및 활성을 측정할 수 있고, 생체 분자의 측정을 이용하여 상기 생체 분자와 관련된 질병을 진단할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 압타머를 포함하는 금속 나노 구조체를 제조하는 과정을 개략적으로 나타낸 그림이다.

도 2 내지 도 4는 실험예 1에서 PTFE 주형의 마이크로그루브 패턴 형상을 분석한 결과를 나타내는 이미지 및 그

래프이다.

도 5는 실험예 1에서 기관의 마이크로그루브 패턴의 형상을 분석한 결과를 나타내는 이미지(가) 및 3 차원 OP(Optical Profiler) 이미지(3-dimensional OP image)(나)이다.

도 6은 실험예 1에서 기관의 마이크로그루브 패턴의 형상을 3 차원 OP(Optical Profiler)로 분석한 라인 스캔(line scan) 분석 결과를 나타내는 그래프이다.

도 7은 제조예 1에서 제조된 금 나노 구조체를 주사 투과 전자 현미경(STEM) 및 주사 전자 현미경(SEM)으로 관찰한 결과를 나타내는 사진이다.

도 8 내지 도 12는 제조예 1에서 제조된 금 나노 구조체의 물성을 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 13은 실험예 3에서 기관의 코팅성을 측정한 결과를 나타내는 사진이다.

도 14는 실험예 3에서 압타 센서의 흡광계수를 측정 결과를 나타내는 그래프이다.

도 15 및 도 16은 실험예 3에서 금 나노 구조체의 함량에 따른 흡광계수를 측정한 결과를 나타내는 그래프 및 사진이다.

도 17 및 도 18는 실험예 4에서 압타 센서의 LSPR 분광 결과를 나타내는 그래프이다.

도 19 및 도 20은 실험예 5에서 압타 센서의 표적 분자 검지 능력을 평가한 결과를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 이하, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 실시예에 대하여 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다.
- [0017] 본 발명의 일 실시예에 따른 압타 센서는 기관, 그리고 상기 기관의 표면에 고정된 금속 나노 구조체를 포함한다.
- [0018] 상기 기관은 표면에 복수개의 마이크로그루브들(microgrooves)을 포함한다.
- [0019] 상기 기관의 표면에 형성된 각각의 마이크로그루브는 상기 기관의 표면에서 오목하게 파여져 일 방향으로 길게 연장된 마이크로 크기 또는 나노 크기의 줄 형상이다. 상기 복수개의 마이크로그루브들은 간격을 두고 실질적으로 평행하게 배치되어 패턴(pattern)을 형성할 수 있다.
- [0020] 다만, 상기 각각의 마이크로그루브는 일 방향으로 길게 연장되지만 직선 형상일 필요는 없고 구불구불한 선 형상일 수도 있다. 또한, 상기 마이크로그루브들 사이의 간격은 일정할 필요가 없다. 또한, 상기 마이크로그루브들이 실질적으로 평행하다는 의미는 상기 마이크로그루브들이 가능하면 서로 엇갈리지 않으면서 연장되는 것이 바람직함을 의미하는 것이나, 상기 마이크로그루브들이 평행하지 않거나, 서로 엇갈려도 무방하다.
- [0021] 상기 마이크로그루브들이 연장되는 방향과 수직하는 방향에 따른 단면에서, 각각의 마이크로그루브는 3 개의 꼭지점과 2 개의 변으로 이루어진 역삼각형 형상으로 정의될 수 있다. 이때, 상기 3 개의 꼭지점 중 깊이가 가장 깊은 꼭지점을 골이라 정의하고, 나머지 2 개의 꼭지점을 마루라 정의한다.
- [0022] 이때, 상기 마이크로그루브들의 골의 깊이는 서로 동일하지 않고 제 각각 다를 수 있다. 또한, 각각의 마이크로그루브의 2 개의 마루의 높이도 서로 다를 수 있다. 이에 따라, 상기 마이크로그루브들이 연장되는 방향과 수직하는 방향에 따른 단면 형상은 파장(마루와 마루 사이의 거리)과 진폭(마루와 골 사이의 거리)이 일정한 규칙적인 형상이 아니라, 파장과 진폭이 계속 변하는 무작위적인 형상일 수 있다.
- [0023] 상기 마이크로그루브들을 포함하는 기관은 일 예로 마이크로그루브 패턴이 형성된 PTFE(polytetrafluoroethylene) 주형(mold)을 이용하여, 핫프레스하여 상기 마이크로그루브를 전사시키거나 또는 상기 주형 표면에 액상을 도포한 후 경화시켜 전사시켜 제조하거나, 미국특허공개 제2003/0017421호에서 기재된 레이저 광 간섭 방법에 의해 제조될 수도 있다.
- [0024] 또한, 상기 복수개의 마이크로그루브들을 포함하는 기관은 상업적으로 에드문드 옵틱스사(Edmund Optics Co.), 코요사(Koyo Co.), 신에쓰사(Shinetsu Chemical Co.), 미쓰비시사(Mitsubishi Chemical Co.) 또는 시그마-알드리치사(Sigma-Aldrich)의 제품들을 이용할 수도 있다.

- [0025] 상기 기판은 고유리, 플라스틱, 금속, 실리콘, 석영, 알루미늄, 산화물 결정 또는 이들의 혼합물로 이루어질 수 있다. 예를 들어, 상기 플라스틱은 폴리디메틸실록산(Polydimethylsiloxane, PDMS) 폴리메틸 메타크릴레이트(Polymethyl methacrylate, PMMA), 폴리카보네이트(Polycarbonate, PC), 싸이클릭 올레핀 코폴리머(Cyclic olefin copolymer, COC) 등 일 수 있고, 상기 금속은 니켈, 알루미늄, 철 또는 구리일 수 있으며, 상기 산화물 결정은 SiO_2 , TiO_2 , Ta_2O_5 또는 Al_2O_3 일 수 있다. 다만, 상기 기판으로 상기 폴리디메틸실록산을 이용하는 경우, 핫프레스 공정이 필요 없이 액상 경화 방법을 이용하여 쉽게 마이크로그루브를 전사할 수 있다.
- [0026] 상기 기판이 상기 마이크로그루브들을 포함하는 경우, 상기 금속 나노 구조체가 상기 마이크로그루브들의 골 내에 고정됨에 따라, 상기 금속 나노 구조체들의 응집이 억제된다. 즉, 상기 마이크로그루브들은 상기 금속 나노 구조체들의 콜로이드 모션(colloidal motion)을 억제함으로써, 상기 압타 센서의 검출 성능을 향상시킬 수 있다.
- [0027] 상기 금속 나노 구조체는 금속 나노 입자, 및 상기 금속 나노 입자를 둘러싸고 있는 코팅층을 포함한다.
- [0028] 상기 금속 나노 입자는 금, 은, 구리, 알루미늄, 백금, 실리콘, 게르마늄 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0029] 상기 금속 나노 입자는 직경이 30 nm 내지 100 nm일 수 있고, 보다 상세하게는 40 nm 내지 60 nm일 수 있다. 또한, 상기 금속 나노 입자의 형태가 기둥 형태인 경우 상기 금속 나노 입자의 종횡비는 장축: 단축의 길이가 1:1 내지 10:1일 수 있고, 보다 상세하게 3:1 내지 5:1일 수 있다.
- [0030] 상기 금속 나노 입자의 종횡비가 3:1 이상이면 흡광도 최고값이 650 nm 내지 1000 nm 상에 형성되므로, 물에 대한 흡광도가 낮아 생체분자의 검출 효율을 높일 수 있으나, 상기 금속 나노 입자의 종횡비가 5:1을 초과하면, 상기 금속 나노 입자의 흡광 스펙트럼이 분해능 한계에 도달하여 측정의 용이성이 떨어질 수 있다.
- [0031] 상기 금속 나노 입자의 형태는 본 발명에서 제한이 없고, 일 예를 들면 원기둥, 사각기둥, 삼각기둥, 오각기둥, 육각기둥, 팔각기둥, 구, 반구, 구의 일부분, 타원구, 반타원구, 타원구의 일부분, 사각뿔, 사각쌍뿔, 사각뿔대, 삼각뿔, 삼각쌍뿔, 삼각뿔대, 원뿔, 원뿔대, 링, 큐브(cube) 및 이들의 조합 형태로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 동일 수 있다.
- [0032] 상기 금속 나노 구조체는 상기 금속 나노 입자를 둘러싸는 코팅층을 포함한다.
- [0033] 상기 코팅층은 카테콜(catechol)을 포함하는 화합물을 포함할 수 있고, 상기 카테콜을 포함하는 화합물은 도파민(dopamine), 5,6-디하이드록시인돌(5,6-dihydroxyindole) 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다. 상기 5,6-디하이드록시인돌은 도파민의 아민 잔기(Amine moiety)가 고리화(Cyclization)된 형태이다. 상기 카테콜을 포함하는 화합물 내의 관능기에 마이클 첨가 반응(Michael addition)을 통하여 압타머를 결합시킬 수 있으며, 상기 기판에 다른 추가적인 연결기(linker material)이 없이도 결합될 수 있다.
- [0034] 구체적으로, 상기 카테콜을 포함하는 화합물로 도파민을 포함하고, 상기 도파민의 한쪽 말단에 상기 트리스(하이드록시알킬)아미노알킬(tris(hydroxyalkyl)aminoalkyl)기를 포함하고, 다른 한쪽 말단은 상기 카르복실릭 피롤(Pyrrole-2-carboxylic acid)기를 포함할 수 있다.
- [0035] 상기 금속 나노 입자에 상기 코팅층을 형성하는 방법은 일 예로, 상기 금속 나노 입자와 도파민 염산염을 분산시켜 현탁액을 제조하고, 상기 현탁액을 교반하여 상기 금속 나노 입자의 표면에 상기 코팅층을 형성시킬 수 있다.
- [0036] 상기 현탁액은 완충용액으로 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄 용액을 더 포함할 수 있다. 다만, 상기 완충용액을 pH 8 내지 pH 9로 유지하게 되면 도파민 중합이 빠르게 일어나 금속 나노 입자의 응집(aggregation)을 유발하므로 금속 나노 입자의 코팅제로 바람직하지 않으므로, pH 7 이하로 도파민 중합을 억제하며 반응시키는 것이 바람직하다.
- [0037] 상기 교반 단계는 상기 금속 나노 입자를 분산시킨 현탁액을 1,000 rpm 내지 1,500 rpm의 속도로 1 분 내지 30 분 동안 교반하는 것일 수 있다. 상기 교반은 단순 교반 또는 초음파 교반 방법을 이용할 수 있고, 이를 반복하여 실시할 수 있다.
- [0038] 상기 현탁액의 용매는 벤젠, 노말부탄올, 부틸아세테이트, 사염화탄소, 클로로포름, 시클로헥산, 디클로로에탄, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 디에틸에스터, 헵탄, 헥산, tert-부틸메틸에스터, 메틸에틸케톤, 펜탄, 디이소프로필에스터, 테트라하이드로퓨란, 톨루엔, N-메틸-2-피롤리돈, 아세톤, 아세토니트릴, 사염화탄소, 클로로포

름, 사이클로헥산, 1,2-디클로로에탄, 디클로로메탄, 디에틸에테르, 디메틸 포름아마이드, 디메틸 설펍사이드, 1,4-디옥산, 에탄올, 에틸 아세테이트, 메탄올, 메틸 3급 부틸 에테르(methyl-tert-butyl ether), 1-프로판올, 2-프로판올, 2,2,4-트리메틸펜탄, 물 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0039] 상기 용매는 윤활제, 습윤제, 유화제, 현탁제 또는 보존제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0040] 한편, 상기 금속 나노 구조체를 상기 기관에 효과적으로 결합시키기 위해서, 상기 기관 표면에는 아민기가 도입될 수 있다. 상기 금속 나노 구조체의 표면에는 상기 도파민 등이 코팅이 되어 있기 때문에, 상기 아민화된 기관에 상기 금속 나노 구조체가 마이클 첨가 반응 방식으로 고정될 수 있다.
- [0041] 상기 금속 나노 구조체는 상기 코팅층의 표면에 결합되는 압타머(Aptamer)를 포함한다. 상기 압타머는 단일, 이중 나선의 DNA, RNA 형태로 표적 분자에 결합할 수 있는 물질을 의미한다.
- [0042] 상기 표적 분자는 활성형 바이러스, 활성화된 표면 단백질, 활성형 바이러스의 항원성을 나타내는 단백질 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다. 상기 압타머는 표적 분자에 특이적으로 결합할 수 있는 것이고, 바람직하게는 표적 분자에 상보적으로 결합할 수 있는 구조를 가진 것 일 수 있다.
- [0043] 상기 표적 분자는 바이러스의 표면 단백질에 존재하는 막 융합 단백질일 수 있다. 또한 일 예에 있어서, 인플루엔자 바이러스의 경우 헤마글루티닌(HA)의 융합 펩타이드일 수 있다. 상기 HA의 융합 펩타이드의 검출을 위한 압타머는 상기 융합 펩타이드에 특이적으로 결합할 수 있는 상보적 구조 또는 서열을 포함한다. 또한, 코로나 바이러스인 경우 스파이크 단백질일 수 있고, 파라믹소 바이러스인 경우 F 단백질 일 수 있다.
- [0044] 또한, 상기 압타머는 HER2(Human epithelial growth factor receptor type 2) 단백질에 특이적으로 결합하는 Anti-HER2 압타머일 수 있다. 상기 압타머는 암 전이에 관여하는 HER2 단백질에 매우 특이적으로 결합함으로써, 암, 특히 유방 암 전이를 억제하거나 검출이 가능하다.
- [0045] 상기 압타머의 제조 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 공지된 방법을 이용하여 압타머를 제조, 선별할 수 있다. 또한, 상기 금속 나노 구조체는 상기 압타머를 단일 종류로 포함하거나 2 종류 이상을 함께 포함할 수 있다.
- [0046] 구체적으로 상기 압타머는 티올기(-SH)가 치환된 것으로, 상기 티올기와 상기 금속 나노 입자의 표면을 감싸고 있는 코팅층 사이에 친핵성 결합이 자발적으로 발생하여 별도의 링커 재료 없이 압타머가 고정될 수 있다.
- [0047] 상기 금속 나노 구조체가 상기 압타머를 포함하는 경우, 상기 압타 센서는 활성형 바이러스, 활성화된 표면 단백질이나 활성형 바이러스의 항원성 단백질과 압타머의 특이적 결합 반응의 유무에 따라서 바이러스를 검출할 수 있다.
- [0048] 한편, 상기 금속 나노 구조체는 상기 코팅층의 관능기에 결합된 캡핑제(capping agent)를 더 포함할 수 있다. 즉, 상기 코팅층의 상기 압타머와 결합할 수 있는 잔여 관능기에 상기 캡핑제를 결합시켜 상기 관능기를 종결(termination)시킴으로써, 비특이적 피분석물 결합의 억제하여 압타 센서의 선택성을 향상시킬 수 있다.
- [0049] 상기 캡핑제는 도파민과 중합반응 할 수 있는 어떠한 화합물도 가능하며, 마이클 첨가 반응이 가능한 물질 모두를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 캡핑제는 2-머캅토에탄올(2-Mercaptoethanol), 에틸아민(Ethylamine), 디메틸 푸마레이트(Diethyl fumarate) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나를 포함할 수 있다.
- [0050] 도 1은 상기 압타머를 포함하는 금속 나노 구조체를 제조하는 과정을 개략적으로 나타낸 그림이다.
- [0051] 상기 도 1을 참고하면, 상기 금속 나노 구조체(20)는 상기 금속 나노 입자(21)의 표면에 코팅된 코팅층(22)을 포함하고, 상기 코팅층(22)의 표면에 압타머(23)가 결합될 수 있다. 또한, 선택적으로 상기 코팅층(22)의 상기 압타머(23)와 결합할 수 있는 잔여 관능기에 상기 캡핑제(24)를 결합시킬 수 있다.
- [0052] 상기 압타 센서는 특정 생체 분자의 검출에 이용될 수 있다. 구체적으로, 상기 금속 나노 구조체에 결합되는 압타머에 표적 분자가 결합되는 경우 상기 금속 나노 입자의 국소표면 플라즈몬 공명에 변화가 일어나고 이를 측정함으로써 특정 생체 분자의 존재 여부를 판단할 수 있다.
- [0053] 즉, 상기 국소표면 플라즈몬 공명 신호 변화에 의해, 상기 금속 나노 입자는 외부환경, 즉 상기 금속 나노 입자 표면 주위 매질에 따라 다른 흡광 특성을 나타내게 되고 이러한 특성을 이용하여 생체 분자를 검출할 수 있다.

- [0054] 예를 들어, 상기 압타머로 검출 대상 생체 분자와 특이적으로 결합하는 단백마커를 이용하는 경우, 표적 단백질이 금속 나노 구조체 표면의 압타머에 특이적으로 결합하여 금속 나노 구조체 주변의 굴절률을 변화시키게 된다. 따라서 반응 전후의 국소표면 플라즈몬 공명 신호 변화에 따른 광학적 흡광스펙트럼의 변화를 측정하면 표적 단백마커의 존재 유무를 판별할 수 있다.
- [0055] 또한, 상기 LSPR 신호 변화의 정도는 표적 단백질분해효소의 농도에 의존적이므로 표적 단백질분해효소의 발현량 및 활성도 측정할 수 있다.
- [0056] 특히, 상기 펩타이드 및 표적 생체효소는 특정 질병과 관련이 있다고 알려져 있다. 따라서, 국소표면 플라즈몬 공명 신호 변화의 측정을 통하여, 생체효소의 존재 유무, 발현량 또는 활성을 감지함으로써 해당 관련 질병을 진단하는데 유용한 정보를 제공할 수 있다. 예를 들어, MT1-MMP의 존재 유무, 발현량 또는 활성을 감지함으로써 암의 진단을 위한 정보를 제공할 수 있다.
- [0058] 이하, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 실시예에 대하여 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다.
- [0059] **[제조예 1: 압타 센서의 제조]**
- [0060] 복수개의 마이크로그루브들이 일정 간격을 두고 실질적으로 평행하게 배열된 마이크로그루브 패턴(Microgroove pattern)이 형성된 PDMS(polydimethylsiloxane) 기판을 제조하기 위하여, 마이크로그루브 패턴이 있는 PTFE를 주형(mold)으로 상기 PTFE 표면에 액상 PDMS를 도포한 후 경화시켜 PTFE의 표면을 PDMS에 전사하였다.
- [0061] 상기 마이크로그루브 패턴이 형성된 PDMS를 코르크 보어러(Cork borer)를 이용하여 지름 10 mm 가량의 원형으로 잘랐다.
- [0062] 상기 기판을 30 % (3-아미노프로필)트리에톡시실란((3-aminopropyl)triethoxysilane, APTES)에 밤새(overnight) 담근 뒤 100 % 에탄올, 탈이온수(DI water)로 세척(washing)하고, 추가적인 가열 공정으로 수분을 제거하였다.
- [0063] 한편, 도파민 염산염(Dopamine hydrochloride, CTAB)을 이용하여 금 나노 로드(Gold nanorods, GNRs) 표면에 도파민을 코팅시켰다. 상기 도파민 염산염으로 코팅 된 GNR 을 2 ml의 고순도 탈이온수에 재현탁시킨 후 추가적으로 원심분리 및 상청액 제거를 수행하여 결합되지 않은 도파민을 제거하였다. 상기 도파민이 코팅된 금 나노 로드 현탁액을 20 μ L APTES를 이용하여 표면이 아민화된 PDMS 기판 위에 드랍 코팅 방식을 이용하여 고정화시켰다.
- [0064] 상기 도파민이 코팅된 금 나노 로드에는 티올화된 Anti-HER2 압타머(Thiolated Anti-HER2 aptmer)를 도포하고, 도파민 내 관능기에 마이클 첨가 반응(Michael addition)을 이용하여 Anti-HER2 압타머(70 pmole)를 고정화시켰다.
- [0065] 2-머캅토에탄올(2-Mercaptoethanol, beta Mercapto ethanol, BME)를 이용하여 상기 도파민 내 잔여 마이클 첨가 반응이 가능한 관능기를 종결(termination)시켜 금속 나노 구조체를 제조하였다.
- [0067] **[실험예 1: 기판의 마이크로그루브 패턴 형상 분석]**
- [0068] 상기 실시예 1에서 사용된 PTFE 주형의 마이크로그루브 패턴의 형상을 분석하였고, 그 결과를 각각 도 2 내지 도 4에 나타내었다.
- [0069] 도 2는 상기 PTFE 표면이 전사된 폴리머 기판 표면의 광학 현미경 이미지(Optical microscopic image)이고, 도 3은 상기 PTFE 표면의 3 차원 OP(Optical Profiler) 이미지(3-dimensional OP image)이고, 도 4는 상기 도 3의 a 라인에 따른 표면 거칠기의 OP 스캔 프로파일(OP scanned profiles)을 나타내는 그래프이다.
- [0070] 상기 도 2 내지 도 4를 참고하면, 상기 PTFE의 표면에 채널 형태의 단일 방향 마이크로그루브들이 형성된 것을 알 수 있고, 깊은 홈과 얇은 홈 사이의 거리는 각각 약 150 μ m와, 20 μ m 내지 30 μ m라는 것을 알 수 있다.
- [0071] 또한, 상기 실시예 1에서 제조된 기판의 마이크로그루브 패턴의 형상을 분석하였고, 그 결과를 도 5 및 도 6에 나타내었다.
- [0072] 상기 도 5의 (가)는 상기 기판의 마이크로그루브 패턴의 형상을 나타내는 이미지이고, 상기 도 5의 (나)는 상기 기판의 마이크로그루브 패턴의 3 차원 OP(Optical Profiler) 이미지이고, 상기 도 6은 상기 기판의 마이크로그

루브 패턴의 형상을 3 차원 OP로 분석한 라인 스캔(line scan) 분석 결과를 나타내는 그래프이다.

- [0073] 상기 도 5 및 도 6을 참고하면, 상기 PTFE 내의 거의 규칙적으로 이격된 마이크로그루브들은 상기 폴리머 기판 표면으로 옮겨졌음을 확인할 수 있다.
- [0075] **[실험예 2: 금 나노 구조체의 물성 측정]**
- [0076] 상기 제조예 1에서 제조된 금 나노 구조체(GNR)를 주사 투과 전자 현미경(STEM, scanning transmission electron microscope) 및 주사 전자 현미경(SEM, scanning electron microscope)로 관찰하였고, 그 결과를 도 7에 나타내었다.
- [0077] 상기 도 7의 (가)는 CGNR의 STEM 명시야 및 암시야로 측정한 결과이고, 도 7의 (나)는 CGNR의 SEM으로 측정한 결과이고, 도 7의 (다)는 DGNR의 STEM 명시야 및 암시야로 측정한 결과이고, 도 7의 (라)는 DGNR의 SEM으로 측정한 결과이다. 상기 도 7에서, 상기 "DGNR"은 상기 제조예 1에서 제조된 도파민으로 코팅된 금 나노 로드를 나타내고, 상기 "CGNR"은 CTAB(hexadecyltrimethylammonium)로 코팅된 금 나노 로드를 나타낸다.
- [0078] 상기 금 나노 로드 형성 시 나노 로드 형태 안정성을 주기 위해 가장 중요한 물질이 상기 CTAB(hexadecyltrimethylammonium) 계면활성제이나 상기 계면활성제 자체로는 다른 재료와 결합할 수 있는 리간드(ligand)가 없다.
- [0079] 상기 도 7을 참고하면, 상기 CTAB을 도파민 코팅으로 바꾼 DGNR의 경우 STEM 모드 중 명시야(brightfield image) 관측시 DGNR 주변에 10 nm 정도 두께의 도파민이 코팅된 이미지가 관찰되었다. 반면, CGNR의 경우 명시야 이미지에서 도파민 코팅이 관찰되지 않았다.
- [0080] 또한, 암시야 관찰은 물질의 구성에 대한 정보를 반영하는데, 상기 CGNR과 DGNR이 별다른 차이가 없는 것으로 보아 금 나노 로드와 도파민으로 코팅되는 것에 의해 물성이 변하지 않았으며, 금 나노 로드의 모양을 변화시키지 않았음을 확인하였다.
- [0081] 또한, 상기 SEM은 도체만 이미징이 잘 되는데, 상기 CGNR의 경우 뚜렷한 금 나노 로드의 이미지가 관찰되는 반면, 상기 DGNR의 경우 비전도성 도파민 코팅에 의해 차징(charging)이 일어나서 불분명한 이미지가 관찰됨을 확인하였다.
- [0082] 또한, 상기 제조예 1에서 제조된 금 나노 구조체의 물성을 측정하였고, 그 결과를 도 8 내지 도 12에 나타내었다.
- [0083] 상기 도 8은 상기 CGNR과 DGNR의 흡광 결과를 나타내는 그래프이다.
- [0084] 상기 도 8을 참고하면, 상기 CGNR과 DGNR 흡광 결과 관측시 장측에 해당하는 800 nm 영역대의 그래프가 약 36 nm 정도 블루-시프트(blue-shift)되었으며, 이를 통해 도파민이 코팅되었음을 확인할 수 있다.
- [0085] 상기 도 9는 상기 CGNR과 DGNR의 DLS(Dynamic light scattering) 분석 결과를 나타내는 그래프이다.
- [0086] 상기 도 9를 참고하면, 상기 DLS 관측시 콜로이드 크기(colloid size)가 DGNR이 증가하였음을 알 수 있다. 이것 역시 도파민 코팅에 기인한 결과이다.
- [0087] 상기 도 10은 상기 CGNR과 DGNR의 FT-IR(Fourier transform) 분석 결과를 나타내는 그래프이다.
- [0088] 상기 도 10을 참고하면, 상기 CGNR과 DGNR을 각각 동결 건조를 하여 파우더 형태로 만든 뒤 FT-IR(Fourier transform) 분광을 관찰한 결과, 상기 CGNR은 CTAB의 밴드(band)만 관찰되었으며, 상기 DGNR은 도파민 밴드가 관찰되었다.
- [0089] 상기 도 11과 도 12는 각각 상기 CGNR과 DGNR의 XPS(X-ray photoelectron spectroscopy) 분석 결과를 나타내는 그래프이다.
- [0090] 상기 도 11 및 도 12를 참고하면, 표면의 질소 결합의 작용기 비율로부터 표면내 화학 결합을 알 수 있다. 상기 CGNR의 경우 대부분 CTAB에 기인한 $-NH_4^+$ 결합이 관찰되며, 상기 DGNR의 경우 금 나노 로드 표면에 도파민 염산염이 산화되어 인돌 구조로 변하여 $-NH-$ 작용기가 25 % 정도로 증가한 것을 알 수 있다.
- [0092] **[실험예 3: 기판의 코팅성 측정]**
- [0093] 상기 제조예 1에서 제조된 마이크로그루브 패턴이 형성된 PDMS("P"(Patterned substrate)로 표시됨)와 마이크로

그루브 패턴이 형성되지 않은 평평한 PDMS("B"(bare substrate)로 표시됨)에 각각 CGNR, DGNR을 드롭 코팅(drop coating) 방식으로 고정화한 후, 코팅성을 육안으로 확인하였고, 그 결과를 도 13에 나타내었다.

- [0094] 상기 도 13를 참고하면, 상기 B에 CGNR이 코팅된 경우 코팅 바깥 테두리에 금박이 관찰되는데 이는 건조된 콜로이드(drying colloid)의 커피 링 효과(coffee ring effect)에 의하여 테두리 쪽으로 콜로이드가 쏠린 현상이다.
- [0095] 상기 P에 CGNR 코팅시 B에 코팅된 경우보다 커피 링 효과가 줄어들었으며 코팅 면적도 더 넓어졌다. 이는 마이크로그루브 패턴에 의해 콜로이드 모션(colloid motion)이 조절되어 커피 링 효과가 억제되었음을 보여주는 결과이다.
- [0096] 상기 DGNR의 경우 상기 B, P에 코팅시 커피 링 효과가 관찰되지 않았으며 매우 균일하게 같은 금 나노 로드 현탁액(suspension) 색깔로 코팅이 되었음을 확인할 수 있다. 이는 도파민의 접착 특성(adhesive property)에 의해 기관에 화학적으로 공유 결합을 이루어 용매 증발 시 콜로이드 모션이 조절되어 균일하게 코팅된 결과이다.
- [0097] 이후 탈이온수(DI water)를 이용하여 세게 흔들어서 세척을 진행한 뒤 기관 표면의 금 나노 로드 코팅층을 관측하였는데, 상기 CGNR 코팅들의 경우 금박의 박리가 일어나며 매우 불균일한 코팅을 이루었음을 육안으로도 관측이 가능하였다. 반면, 상기 DGNR 코팅의 경우 매우 안정한 코팅층을 유지함을 확인하였다.
- [0098] 또한, 상기 CGNR/B, CGNR/P, DGNR/B 및 DGNR/P 각각에 대하여 흡광계수(Extinction coefficient) 및 파장(Wavelength)을 측정하였고, 그 결과를 도 14에 나타내었다.
- [0099] 상기 도 14를 참고하면, 상기 CGNR/B의 경우 금 나노 로드의 LSPR 흡광 그래프와 모양이 다르며 1 차원적인 선형 그래프만 관찰되는 것으로 보아, 상기 금 나노 로드가 매우 응집(aggregation)되었음을 확인하였다.
- [0100] 상기 CGNR/P의 경우 금 나노 로드의 LSPR 흡광 그래프와 같이 2 개의 봉우리가 있는 그래프 개형으로 변화하였으며, 이는 마이크로그루브 패턴에 의해 금 나노 로드 코팅시 금 나노 로드의 콜로이드 모션(colloidal motion)이 억제되었음을 확인하였다.
- [0101] 상기 DGNR/B의 경우 금 나노 로드의 흡광 그래프와 유사해졌으며, 상기 DGNR/P의 경우 표준 편차가 더 작으며, 분해능(400 nm 내지 1100 nm) 이내로 장축, 단축에 해당하는 흡광 피크(peak)가 존재하므로 상기 DGNR/P가 센서로써 의미가 있음을 알 수 있다.
- [0102] 또한, DGNR 농축액(stock solution)의 농도를 1X로 하여 1/2씩 희석을 진행하여 상기 기관에 코팅을 하였고, 이들 각각에 대하여 흡광계수(Extinction coefficient) 및 파장(Wavelength)을 측정하였고, 그 결과를 도 15 및 도 16에 나타내었다.
- [0103] 상기 도 15를 참고하면, 상기 DGNR 코팅액의 농도에 따라 DGNR의 LSPR 그래프 개형이 바뀌는 것을 알 수 있다.
- [0104] 즉, DGNR의 농도가 희석될 수록 단축(520 nm) 영역의 밴드의 강도(intensity)가 커지며 단축, 장축 간의 거리가 멀어지게 되는데, 이는 LSPR 분광 분해능을 초과하게 되므로 센서로써 의미를 상실하게 됨을 의미한다.
- [0105] 단축에 해당하는 강도(Transverse-LSPR; T-LSPR)와 장축에 해당하는 강도(Longitudinal-LSPR; L-LSPR)의 비율 $I(L-LSPR)/I(T-LSPR)$ 을 센서 선택의 기준 항목으로 삼았다.
- [0106] 상기 DGNR 현탁액의 흡광 결과(도 8)에서는 3.3이었는데, 이 수치와 가까울수록 기관에서 상기 DGNR이 현탁액처럼 분산 상태가 좋을 것이라 예상하여, 상기 DGNR 0.5X를 센서로 사용하였다.
- [0108] **[실험예 4: LSPR 분광 결과]**
- [0109] 상기 실험예 3에서 DGNR 농축액(stock solution)의 농도가 0.5X인 경우에 대하여, Anti-HER2 압타머의 고정화 농도를 변화시키면서 국소표면 플라즈몬 공명(localized surface plasmon resonance; LSPR) 분광을 측정한 결과를 도 17에 나타내었다.
- [0110] 상기 도 17을 참고하면, 170 μ M 농도의 Anti-HER2 압타머를 압타머 현탁액의 전체 부피가 30 μ L가 되게끔 고정화하였을 때, Anti-HER2 압타머의 고정화 농도가 진해질수록 L-LSPR 피크(peak)가 블루 시프트(blue-shifting)되는 것을 확인하였다. 또한, 농도에 따른 블루 시프트 정도의 경향성 확인시 Anti-HER2 압타머의 최고 농도에서 포화(saturation)됨을 알 수 있다.
- [0111] 또한, 상기 마이크로그루브 패턴을 포함하는 기관에 DGNR만 고정화한 경우(PLaS), 상기 마이크로그루브 패턴을 포함하는 기관에 Anti-HER2 압타머를 결합시킨 DGNR을 고정화한 경우(+ HER2 aptamer), 및 DGNR 표면에 있는 도

파민의 마이클 첨가 반응 사이트(Michael addition site)를 2-머캅토에탄올을 이용하여 종결(termination)시킨 경우(+ Mercapto EtOH termination) 각각에 대하여, 국소표면 플라즈몬 공명(localized surface plasmon resonance; LSPR) 분광, 및 라만(Raman) 분광을 측정하였고, 그 결과를 도 18에 나타내었다.

[0112] 상기 도 18의 (가)를 참고하면, 상기 DGNR 표면에 있는 도파민의 마이클 첨가 반응 사이트(Michael addition site)를 2-머캅토에탄올을 이용하여 종결(termination)시키면 L-LSPR이 다시 이동함을 알 수 있다.

[0113] 또한, 상기 도 18의 (나)를 통하여, 해당 3 가지 물질들(PLaS, PLaS + HER2 aptamer, PLaS + Mercapto EtOH termination)이 상기 기관 표면에 고정화되었는지를 라만(Raman) 분광을 이용하여 검증하였고, 그 결과 모두 상기 기관 표면에 잘 고정화되었음을 확인하였다.

[0115] **[실험예 5: 표적 분자 검지 능력 평가]**

[0116] ECD-HER2 단백질을 각 농도별로 PBS(Phosphate buffered saline)에 분주한 뒤 실시간(real-time)으로 L-LSPR의 이동을 관찰하였고, 그 결과를 도 19에 나타내었다.

[0117] 상기 도 19의 (가)를 참고하면, 비선택적 단백질인 알부민(bovine serum albumin, BSA)의 경우 L-LSPR 이동이 일어나지 않음을 확인할 수 있다.

[0118] 반면, ECD-HER2 단백질이 있는 경우에는 ECD-HER2 단백질이 Anti-HER2 압타머와 결합하여 시간 경과시 농도에 따라 L-LSPR이 이동하였으며 포화 상태에 도달하였다.

[0119] 상기 도 19의 (나)는 유체 역학 모델 중 다니엘 벤-아브라함(Daniel Ben-Avraham)이 정립한 정지한 유체(statistic fluid)에서의 응고 모델(coagulation model)의 일반해(general solution) 결과이며, 이는 리얼 타임 바인딩 키네틱(Real time binding kinetic) 실험의 L-LSPR과 같은 결과이다.

[0120] 상기 도 19의 (나)를 참고하면, ECD-HER2 단백질의 선택성이 우수하며, 검지 한계(limit of detection, LOD)는 4 ng/mL 내지 5 ng/mL임을 알 수 있다. 이는 임상 검출 농도가 15 ng/mL 임을 감안하면 충분히 임상에서 사용 가능한 센서임을 나타낸다.

[0121] 또한, 임상에서 사용 가능한 센서로써 의미가 있는지를 확인하기 위하여, 실제 혈액과 같은 성분의 혈장에서도 검지가 가능한지 여부를 확인하는 실험을 진행하였고, 그 결과를 도 20에 나타내었다.

[0122] 이때, 쥐(Rat)에서 혈액을 뽑아 적혈구를 응고시킨 뒤 혈장을 얻어서 ECD HER2 단백질 농도를 맞추어 실험을 진행하였다. 또한, 보통의 압타머는 혈액 내 존재하는 효소들에 의해 변형이 쉽게 일어나기 때문에, 이 실험에서 사용한 압타머는 혈액 내 존재하는 효소들에 의한 변형에 저항성이 있도록 압타머의 염기서열 중 피리미딘 구조를 변형시킨 변형 핵산 압타머를 사용하였다.

[0123] 도 20을 참고하면, ECD HER2 단백질을 포함하는 세럼(serum)의 경우(30 ng/mL), 혈액 내에는 무수한 단백질이 많아서 초반 30 분까지는 L-LSPR 피크의 이동이 매우 불안정하게 움직이나 60 분 이후 압타머와 단백질 결합이 이루어져 포화 상태에 이르렀다.

[0124] 반면, ECD HER2 단백질이 없는 세럼(serum)의 경우(0 ng/mL), 표준 편차가 2 nm 정도에서 진동(oscillation)하였으며 변화가 없었다.

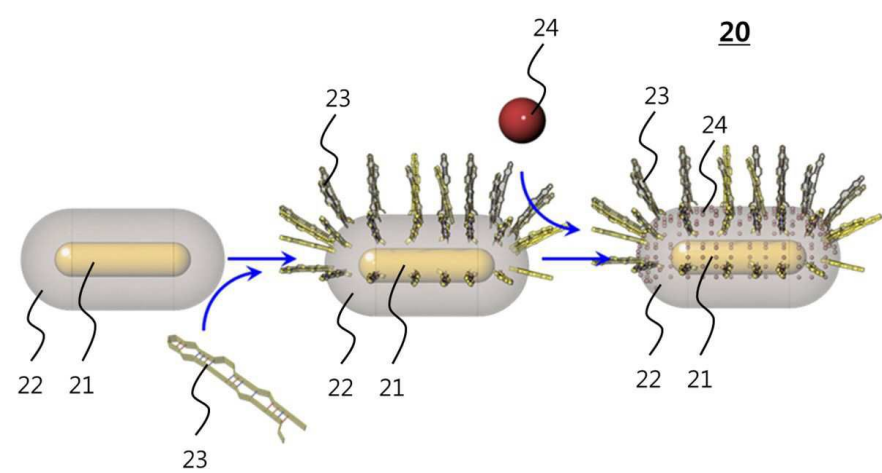
[0126] 이상에서 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본 발명의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본 발명의 권리범위에 속하는 것이다.

부호의 설명

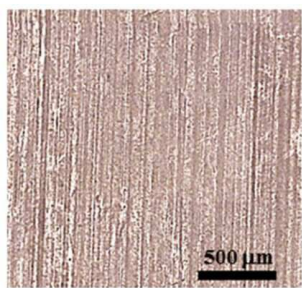
- [0127] 20: 금속 나노 구조체
21: 금속 나노 입자
22: 코팅층
23: 압타머
24: 캡핑제

도면

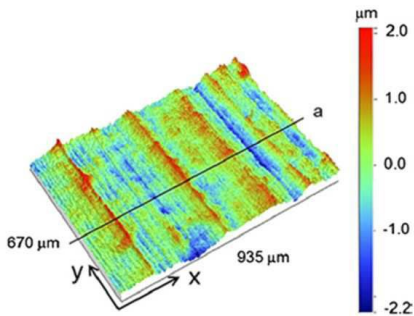
도면1



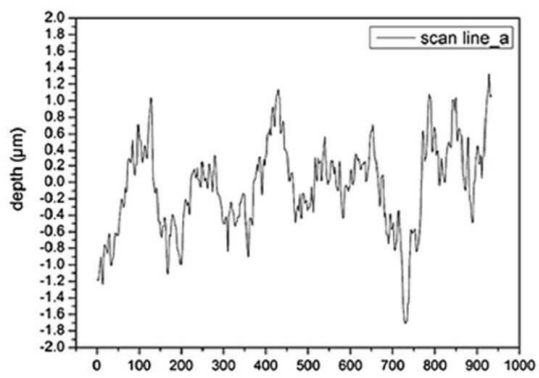
도면2



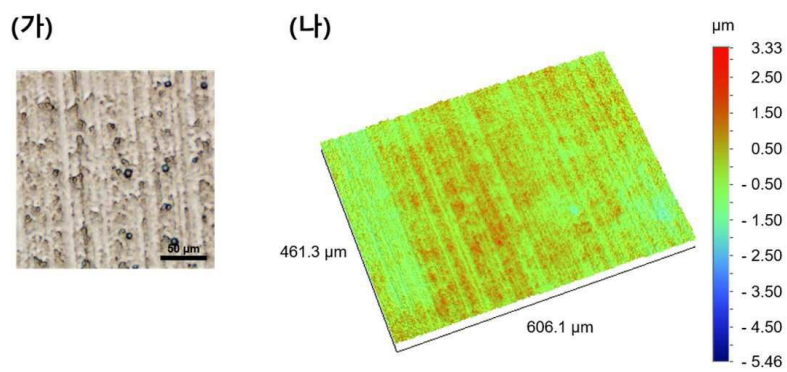
도면3



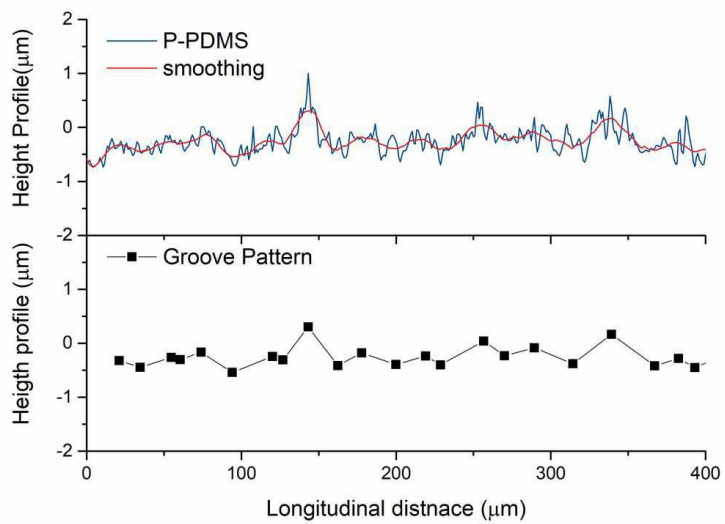
도면4



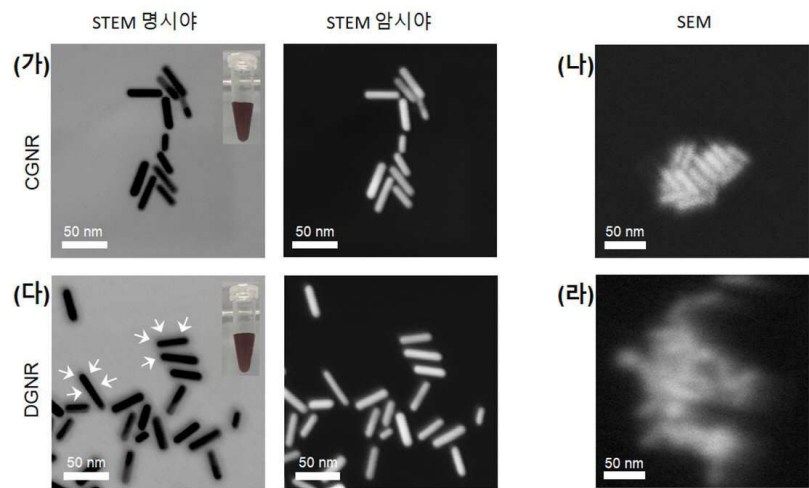
도면5



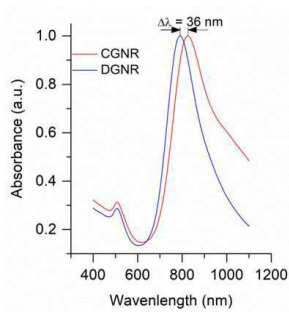
도면6



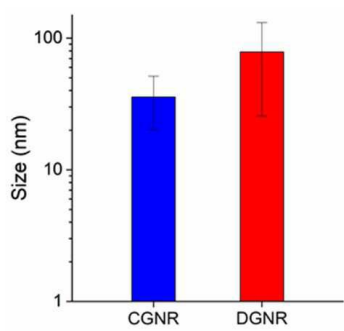
도면7



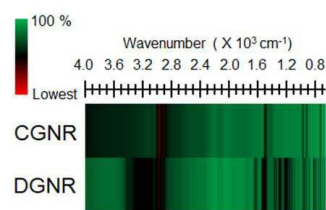
도면8



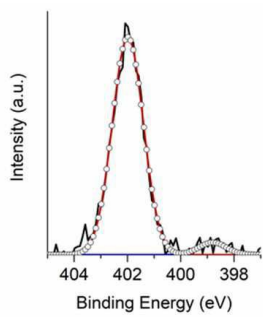
도면9



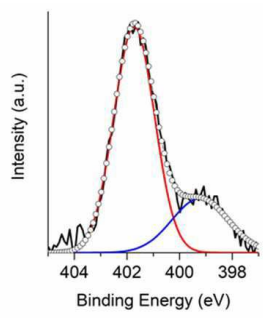
도면10



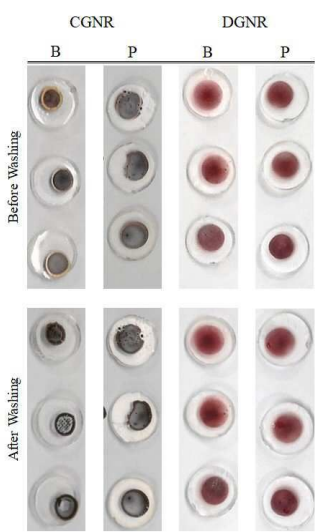
도면11



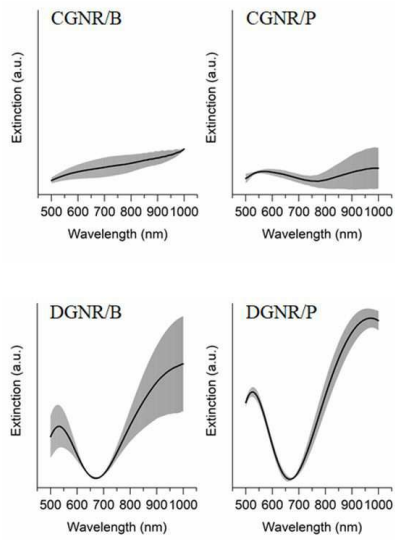
도면12



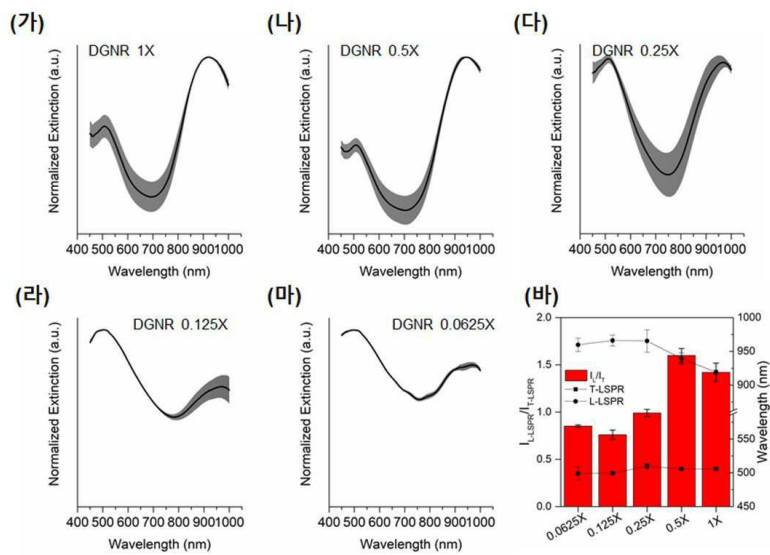
도면13



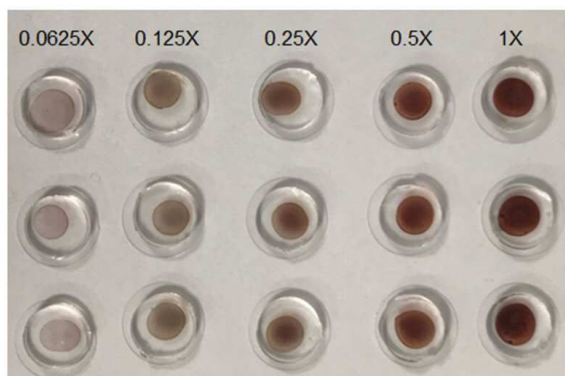
도면14



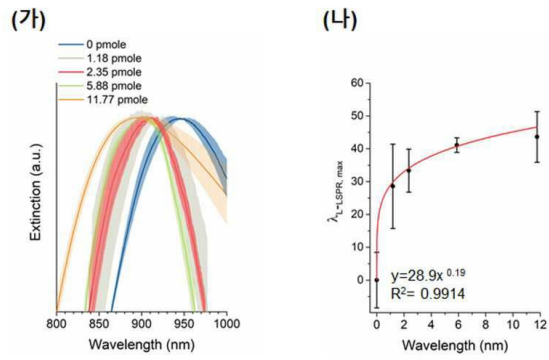
도면15



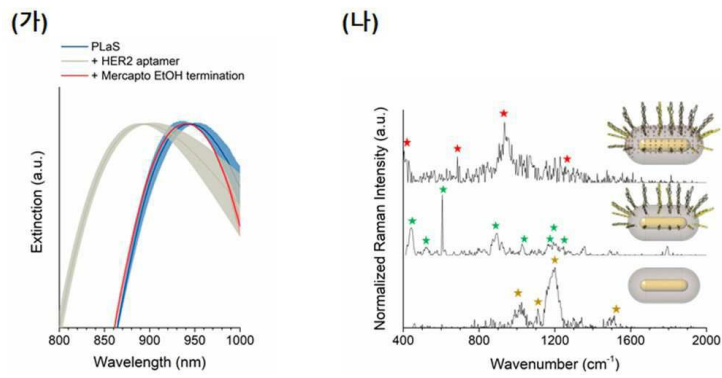
도면16



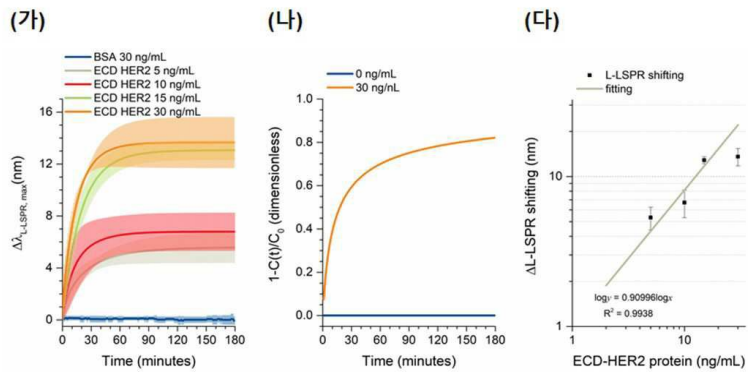
도면17



도면18



도면19



도면20

