



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년09월04일
(11) 등록번호 10-1774636
(24) 등록일자 2017년08월29일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) G01N 21/64 (2006.01)
G01N 31/22 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
G01N 33/6854 (2013.01)
G01N 21/64 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-0048661
(22) 출원일자 2015년04월06일
심사청구일자 2015년04월06일
(65) 공개번호 10-2016-0119654
(43) 공개일자 2016년10월14일
(56) 선행기술조사문헌
J. Am. Chem. Soc., 2007 May 30; 129(21): 6865.6871.*
Tetrahedron Letters 49 (2008) 3045.3048*
W002022573 A2*
W02002022573 A2*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
한국생명공학연구원
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
- (72) 발명자
정주연
대전광역시 유성구 과학로 125
임은경
대전광역시 유성구 과학로 125
국경혜
대전광역시 유성구 과학로 125
- (74) 대리인
안소영

전체 청구항 수 : 총 6 항

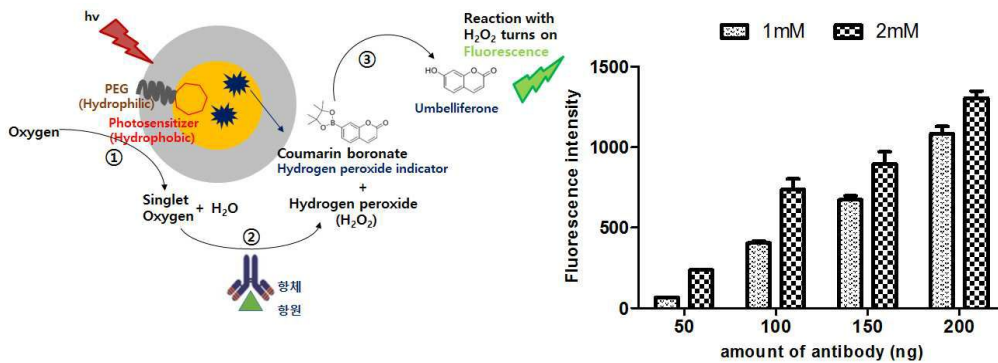
심사관 : 김도현

(54) 발명의 명칭 나노 프로브 기반 항체의 무표지 검출 방법

(57) 요약

본 발명은 쿠마린 보로네이트가 결합된 PEG-Chlorine e6를 포함하는 항체 검출용 나노프로브에 관한 것이다. 본 발명은 ELISA 등 기존의 방법과 달리 2차 항체나 별도의 효소를 사용하지 않아 보다 간단하고 편리한 검출이 가능하다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

G01N 31/22 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014060507
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 원천기술개발사업(글로벌프론티어)
 연구과제명 약물 저항성 바이오 유해물질 신속 검출을 위한 바이오 컨텐츠 설계 및 활용기술 개발
 기여율 50/100
 주관기관 한국생명공학연구원
 연구기간 2014.09.01 ~ 2015.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KGM1121521
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 국가과학기술연구회
 연구사업명 주요사업(2015-2018)
 연구과제명 나노바이오메디컬 융복합 기술개발사업
 기여율 35/100
 주관기관 한국생명공학연구원
 연구기간 2015.01.01 ~ 2015.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014003797
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 원천기술개발사업(미래유망)
 연구과제명 원자현미경 적용을 위한 바이오컨텐츠 발굴, 생산 및 활용기술 개발
 기여율 15/100
 주관기관 한국생명공학연구원
 연구기간 2014.03.01 ~ 2015.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

쿠마린 보로네이트가 결합된 PEG-Chlorine e6를 포함하는 항원-항체 반응 검출용 형광 나노프로브.

청구항 2

제1항의 나노프로브를 이용하여 항체를 검출하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 방법은 항체를 정량적으로 검출하는 것인 방법.

청구항 4

제1항의 나노프로브를 이용하여 항원을 검출하는 방법으로서, 상기 방법은 제1항의 나노프로브를 이용하여 항체를 검출함으로써 상기 항체에 결합된 항원을 검출하는 것인 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 방법은 항원을 정량적으로 검출하는 것인 방법.

청구항 6

제1항의 나노프로브를 포함하는 항원 또는 항체 검출용 키트.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 나노 프로브 기반 항체의 무표지 검출 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 항체 또는 항원을 정량/정성적으로 검출 하기 위한 방법에는 여러 가지가 있는데, 대표적으로 효소결합면역흡착 분석(ELISA)가 있다. ELISA에서는 시험관내에서 발색원이 되는 효소를 결합시킨 항체를 이용하여 항원을 검출한다. 그러나 ELISA에 사용되는 효소인 겨자무과산화수소(horseradish peroxidase), 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase) 등은 단가가 높고 TMB나 NADPH와 같은 기질을 첨가해야만 발색이 되어 과정이 복잡하다. 또한 민감도와 특이도를 높이기 위하여 2차 항체를 사용하는 경우가 많은데, 이 경우 항체의 종 특이성(species reactivity)을 확인하는 등 1차 항체와 2차 항체의 반응성을 확인해야 하는 번거로움이 있다.

[0003] 항체는 그 종류에 관계없이 산소(O₂)로부터 과산화수소(H₂O₂)를 생성하며, 이러한 항체의 능력은 비-면역글로불린 단백질들보다 훨씬 더 뛰어난 것으로 보고된 바 있다(Paul Wentworth Jr *et al.*). 이는 항체가 항원을 인식하고 파괴하는 작용과 관계가 있을 것이라고 추측되고 있다. 그러나 이를 이용하여 항체를 검출하는 기술에 대해서는 밝혀진 바 없다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0004] (비특허문헌 0001) Paul Wentworth Jr *et al.*, Antibody Catalysis of the Oxidation of Water, Science 293, 1806 (2001)

발명의 내용

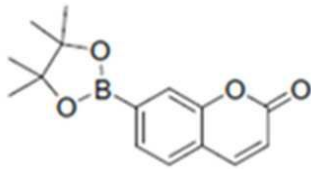
해결하려는 과제

- [0005] 본 발명은 쿠마린 보로네이트가 결합된 PEG-Chlorine e6 (클로린 e6)를 포함하는 항체 검출용 나노프로브에 관한 것이다.
- [0006] 본 발명은 상기 나노프로브를 이용하여 항체를 검출하는 방법에 관한 것이다.
- [0007] 본 발명은 상기 나노프로브를 이용하여 항원을 검출하는 방법에 관한 것이다.
- [0008] 본 발명은 상기 나노프로브를 포함하는 항원 또는 항체 검출용 키트에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

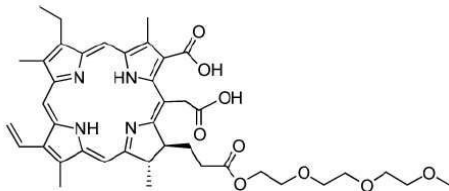
- [0009] 본 발명은 쿠마린 보로네이트가 결합된 PEG-Chlorine e6를 포함하는 항원-항체 반응 검출용 나노프로브를 제공한다.
- [0010] 상기 쿠마린 보로네이트는 본 발명의 나노프로브에서 H₂O₂ indicator로서 작용하며, 하기 화학식 1로 표시된다.

[0011] [화학식 1]

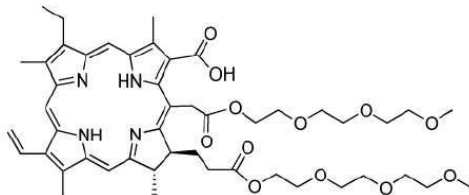


- [0012]
- [0013] 또한 상기 PEG-Chlorine e6는 본 발명의 나노프로브에서 photosensitizer로서 작용하며, 하기 화학식 2 내지 4 중 하나가 될 수 있다.

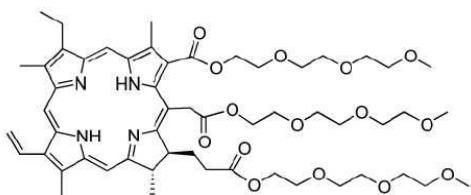
[0014] [화학식 2]



- [0015]
- [0016] [화학식 3]



- [0017]
- [0018] [화학식 4]



- [0019]
- [0020] PEG-Chlorine e6는 특정 파장의 빛에 의해 감작되는 특징이 있으며, 암세포의 광 치사(photokilling) 유도를 위

해 사용할 수 있다고 보고된 바 있다.

- [0021] 그러나 쿠마린과 PEG-Chlorine e6를 함께 사용한 예에 대해서는 알려진 바가 없으며, 이를 항체의 검출에 사용한 예에 대해서도 밝혀진 바 없다.
- [0022] 본 발명의 나노프로브에 특정 파장의 빛을 가하면 나노프로브 내의 PEG-Chlorine e6가 산소를 싱글렛 산소로 전환시키며, 상기 싱글렛 산소가 항체와 접촉하면 과산화수소가 발생한다. 생성된 과산화수소가 나노프로브 내의 쿠마린 보로네이트와 반응하면 쿠마린 보로네이트가 움벨리페론(umbelliferone) 구조로 변하여 형광을 나타낸다. 싱글렛 산소는 자연적으로는 미량으로만 존재하며, 상술한 바와 같이 항체의 과산화수소 발생 능력은 비-면역글로불린 단백질보다 현저히 높으므로, 본 발명의 나노프로브는 높은 민감도로 항체를 검출할 수 있다. 또한 ELISA 등 기존의 항체 정량/정성 검출방법은 다양한 시약을 필요로 하나, 본 발명의 나노프로브는 단일 프로브만으로 검출이 가능하여 간편하고 단순하다는 장점이 있다. ELISA에서 항체를 효소로 표지하는 것과 반대로, 본 발명은 항체의 무표지 검출(Label-free detection)을 할 수 있다.
- [0023] 또한 본 발명은 본 발명의 쿠마린 보로네이트가 결합된 PEG-Chlorine e6를 포함하는 나노프로브를 이용하여 항체를 검출하는 방법을 제공한다.
- [0024] 본 발명의 방법을 이용하여 시료 내 항체의 존재 여부를 확인할 수 있다. 뿐만 아니라 본 발명의 방법에서는 항체의 양이 많을수록 쿠마린 보로네이트에 의해 발생하는 형광 세기가 강해지므로 항체를 정량적으로 검출할 수 있다.
- [0025] 또한 본 발명은 본 발명의 쿠마린 보로네이트가 결합된 PEG-Chlorine e6를 포함하는 나노프로브를 이용하여 항원을 검출하는 방법을 제공한다. 구체적으로, 본 발명의 방법에서는 본 발명의 나노프로브를 이용하여 항체를 검출함으로써 항체에 대한 항원이 존재함을 확인할 수 있다. 예를 들어, 항원이 존재하는 웰에, 항체가 들어 있는 시료를 가한 뒤, 나노 프로브를 처리하면 발생하는 형광 신호에 의하여 항체가 항원과 결합을 하였음을 알 수 있고, 항체의 양이 많을수록 이에 대한 항원의 양이 많을 것으로 예상할 수 있기 때문에, 항원의 정량적 분석 역시 가능하다.
- [0026] 본 발명은 쿠마린 보로네이트가 결합된 PEG-Chlorine e6 (클로린 e6)를 포함하는 나노프로브를 포함하는 항원 또는 항체 검출용 키트를 제공한다. 본 발명의 키트는 그 외 검출에 필요한 물품을 더 포함할 수 있으며, 사용 지침(instruction)을 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [0027] 본 발명은 항원-항체 반응의 검출에 이용될 수 있다. 본 발명은 2차 항체나 별도의 효소를 사용하지 않아 보다 간단하고 편리한 검출이 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0028] 도 1은 합성된 PEG-Chlorine e6를 FT-IR로 확인한 도이다.
- 도 2는 본 발명의 나노프로브를 광학현미경을 이용하여 확인한 도이다.
- 도 3은 본 발명의 나노프로브가 흡광도를 나타내는 파장을 확인한 도이다.
- 도 4는 본 발명의 나노프로브에 자외선을 조사하고 배양한 후 시간 경과에 따른 산소 원자 발생 정도를 확인한 도이다.
- 도 5는 본 발명의 나노프로브에 항체를 접촉시키고 항체의 농도에 따른 형광 세기를 측정한 도이다.
- 도 6은 본 발명을 요약하는 것으로서, 본 발명의 나노프로브의 검출 모식도(좌측 도)와, 상기 도 5의 우측 도를 그대로 나타낸 것(우측 도)이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0030] 또한, 이하에서 언급된 시약 및 용매는 특별한 언급이 없는 한 시그마 알드리치(Sigma Aldrich)[®]로부터 구입한

것이다.

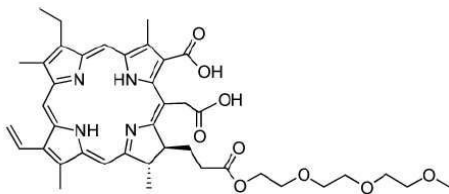
[0031] **실시예 1. 나노프로브의 제조**

[0032] **1-1. PEG-Chlorine e6의 합성**

[0033] 먼저 다음과 같이 PEG-Chlorine e6를 합성하였다. mPEG (분자량: 5000) (0.5 g), Chlorine e6 (88 mg), N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (41.27 mg), 4-Dimethylaminopyridine (DMAP) (24.43mg) 을 20 mL의 Dioxane 에 용해시킨 뒤, 12시간 이상 상온에서 교반하면서 반응시켰다. DCC를 커플링제(Coupling agent)로 작용하고 DMAP가 반응을 촉매하여 mPEG와 Chlorine e6를 결합시켰다. 증발기 (Evaporator) 를 이용해 용매를 증발시키고 합성된 물질을 투석막 (Dialysis membrane) (MWCO: 3500Da)에 넣어 일주일동안 투석시키면서, 반응 되지 않은 물질을 제거하였다. 일주일 뒤, 투석 막내 존재하는 용액을 동결건조 시켜 파우더 형태의 PEG-Chlorine e6를 얻었다. 합성된 PEG-Chlorine e6는 FT-IR로 합성 여부를 분석하였고, 1737 cm⁻¹에서 ester group을 확인 하였다 (도 1).

[0034] 상기 방법에 의해 합성된 PEG-Chlorine e6의 화학식은 다음과 같다.

[0035] [화학식 2]



[0036]

[0037] **1-2. 나노프로브의 제조**

[0038] 침전법(Precipitation)을 이용하여 나노프로브를 제조하였다.

[0039] 먼저 70mL 바이알에 상기 1-1에서 합성한 PEG-Chlorine e6 (25mg)을 탈이온수 (40 mL)에 넣고 1000rpm 이상으로 교반시키면서 아세톤 (2mL)에 용해시킨 쿠마린 보로네이트 (2mg) 를 첨가하였다. 24시간 이상 교반 후, 15000rpm에서 45분간 원심 분리한 뒤, 과량의 미반응물이 포함된 상층액은 버리고 침전물 (product)을 탈이온수 2mL 에 재 분산 시켰다.

[0040] 나노프로브를 SEM(scanning electron microscope)으로 확인하였다(도 2). 제조된 나노프로브의 크기는 100 - 150 nm 정도였다.

[0041] **실시예 2. 나노프로브의 특성 확인**

[0042] 상기 나노프로브에 파장을 변화시켜 가며 빛을 가하여 흡광도를 확인하였다.

[0043] 그 결과 본 발명의 나노프로브는 400 nm에서 강한 흡광을 확인 하였다 (도 3).

[0044] 또한 상기 나노프로브 농도별로 (각각 0, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 및 10 mM) 발생하는 singlet oxygen을 측정하였다. 이를 위하여 나노 프로브에 365 nm의 자외선(UV)을 10분간 조사 후 각각 다른 배양 시간 (4시간, 8시간, 및 밤새(overnight)) 경과 후, CK-8 키트(Dojindo Laboratories)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정함으로써 발생된 singlet oxygen을 측정하였다. 결과는 도 4에 나타내었다. 도 4에서 나노프로브의 농도가 높을수록, 배양 시간이 길수록 싱글렛 산소 (Singlet oxygen) 발생 정도가 높은 것을 확인 하였다.

[0045] **실시예 3. 나노프로브를 이용한 항체 검출**

[0046] 본 발명의 나노프로브의 효능을 평가하기 위하여, 일반적으로 사용되는 항체인 Purified Human IgG (Sigma-aldrich)를 이용하여 하기 실험을 수행하였다.

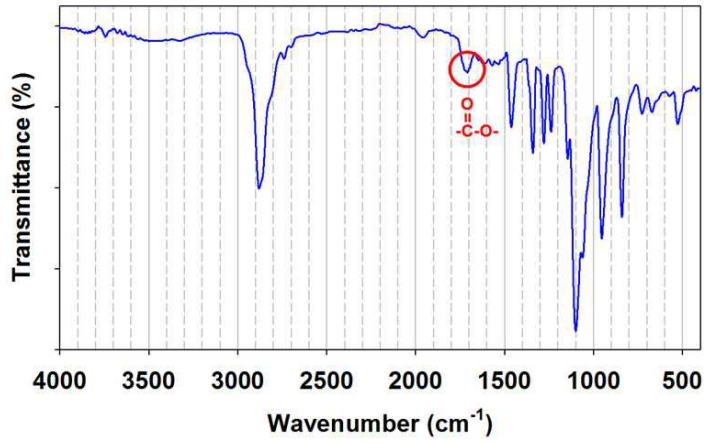
[0047] 96-well plate의 각 well(웰)에 상기 항체를 각각 0, 50, 100, 150, 및 200 ng 첨가하고, 본 발명의 나노프로브를 1 mM 또는 2mM 첨가하였다. 여기에 365 nm의 자외선을 10분간 조사한 후 λ_{ex} 는 470 nm, λ_{em} 는 520 nm에서 각각 형광 세기를 측정하였다(도 5. 도 5의 좌측 도는 실험을 통해 얻은 original 값을 나타낸 것이고, 우측 도는 항체가 0 ng일 때의 값을 제외시켜 보정한 그래프임).

[0048] 도 5에서 항체의 양이 증가함에 따라 본 발명의 나노프로브의 형광 세기도 강해짐을 알 수 있다. 이로부터 본

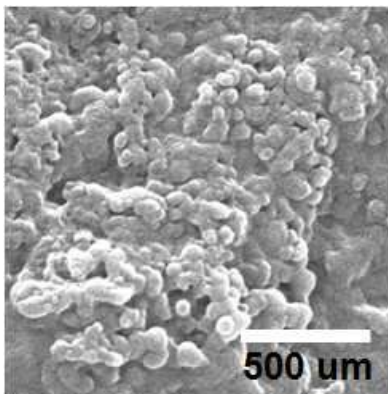
발명의 나노프로브가 항체를 정량적으로 검출할 수 있음을 알 수 있다.

도면

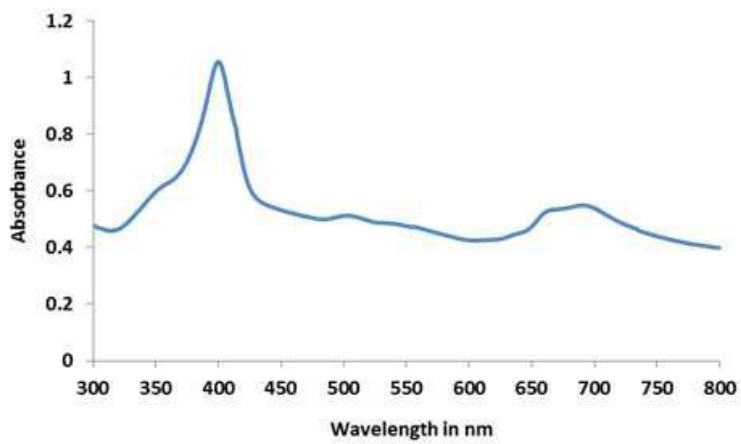
도면1



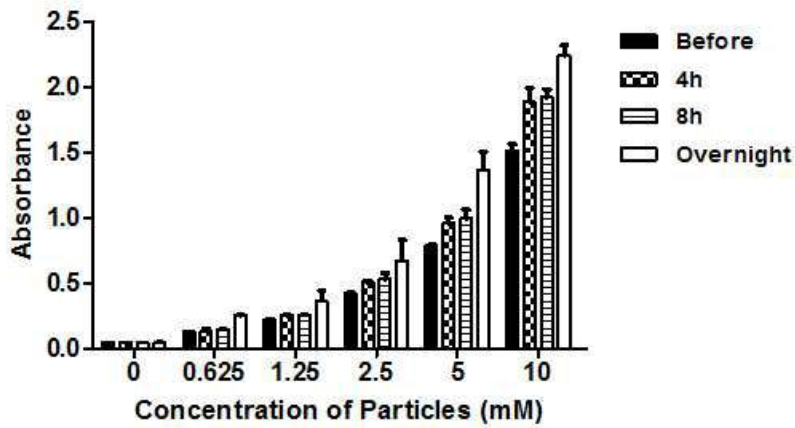
도면2



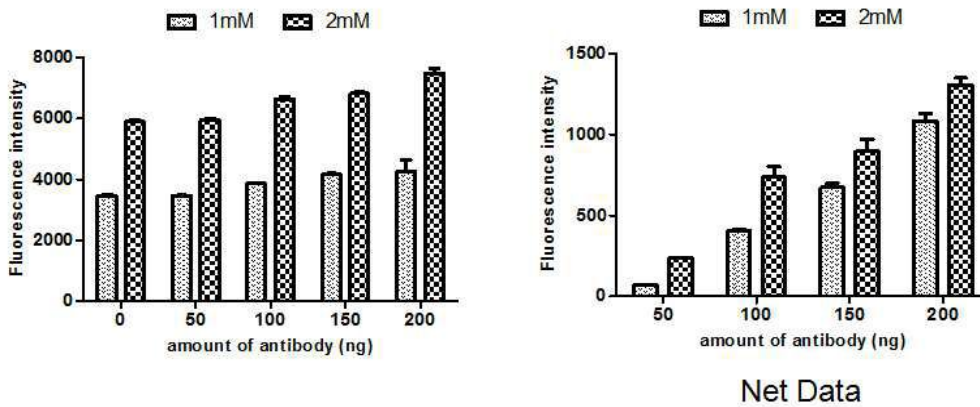
도면3



도면4



도면5



도면6

