(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017 년 9 월 14 일 (14.09.2017)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2017/155172 A1

(51) 국제특허분류:
G01N 33/58 (2006.01) *G01N 33/92* (2006.01)
G01N 33/72 (2006.01) *G01N 21/64* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2016/009440

(22) 국제출원일: 2016 년 8 월 25 일 (25.08.2016)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2016-0029331 2016 년 3 월 11 일 (11.03.2016) KR

(71) 출원인: **경북대학교 산학협력단 (KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION)** [KR/KR]; 41566 대구시 북구 대학로 80 (산격동, 경북대학교), Daegu (KR).

(72) 발명자: **박수영 (PARK, Soo Young)**; 42101 대구시 수성구 동대구로 250, 101 동 1503 호 (범어동, 태왕유성하이빌아파트), Daegu (KR). **부이티트랑 (BUI, Thi Trang)**; 41556 대구시 북구 대학로 80, 공대 9 호관 219 호 (산격동), Daegu (KR).

(74) 대리인: **김성현 (KIM, Sung-Hyun)**; 47504 부산시 연제구 중앙대로 1255, 7 층(거제동) 아너스특허법률사무소, Busan (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

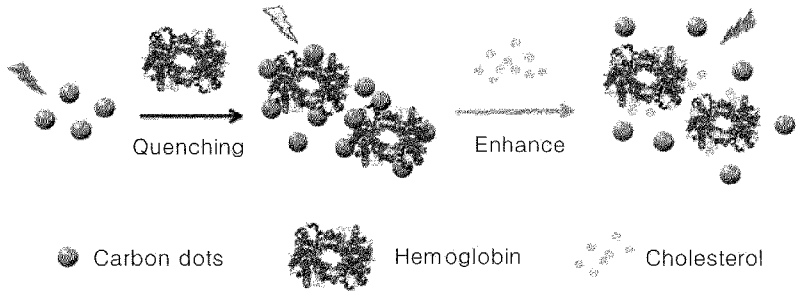
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

(54) **Title**: CARBON DOT-HEMOGLOBIN COMPOSITE FOR CHOLESTEROL DETECTION

(54) **발명의 명칭** : 콜레스테롤 검출용 탄소 점-헤모글로빈 복합체



(57) **Abstract**: The present invention relates to a carbon dot-hemoglobin composite for cholesterol detection. Specifically, according to the present invention, disclosed is a carbon dot-hemoglobin composite for cholesterol detection, the composite comprising: carbon dots; and hemoglobin chelate-bound to surfaces of the carbon dots, wherein the fluorescence of the carbon dots is quenched through the conjugation with the hemoglobin, and the fluorescence of the carbon dots is enhanced by the reaction with cholesterol, thereby detecting cholesterol.

(57) **요약서**: 본 발명은 콜레스테롤 검출용 탄소 점-헤모글로빈 복합체에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명에 따르면 탄소점(carbon dot) 및 상기 탄소 점 표면에 킬레이트 결합된 헤모글로빈을 포함하고, 상기 헤모글로빈의 결합으로 상기 탄소점의 형광이 소멸(quenching)되고, 콜레스테롤과 반응하여 상기 탄소 점의 형광이 복구(enhance)되어 콜레스테롤을 검출하는 것을 특징으로 하는, 콜레스테롤 검출용 탄소 점-헤모글로빈 복합체가 개시된다.

WO 2017/155172 A1

명세서

발명의 명칭: 콜레스테롤 검출용 탄소 점-헤모글로빈 복합체

기술분야

[1] 본 발명은 콜레스테롤 검출용 탄소 점-헤모글로빈 복합체에 관한 것이다.

배경기술

[2] 콜레스테롤(Cho)은 간에서 만들어지는 지방질이고, 몸 전체에 분배되어져 있다. 이것은 스테로이드 호르몬, 비타민 D, 담즙의 전구체이고, 세포막의 중요한 구성성분으로서 인간의 신체에서, 콜레스테롤의 평형 특성은 중요하다. 콜레스테롤의 양이 적정 수준을 초과하게 되면, 혈관에 손상을 입힌다. 이는 심혈관계 질환으로 이끌 수 있다. 콜레스테롤을 탐지하기 위한 분석 방법들은 전기화학적 방법, 박막 크로마토그래피, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)가 있다. 그러나 이러한 방법들은 복잡한 절차, 느린 반응 시간, 낮은 선택성, 특이성(specifictiy)과 같은 단점들을 가지고 있다. 그리고 콜레스테롤 센서의 대부분은 콜레스테롤 산화제를 사용한다. 이는 비싸고, 변성이 쉽다는 단점이 있다.

[3] 한편, 헤모글로빈(Hb or Hgb)은 신체 내부 곳곳에 산소를 운반하는 적혈구에서 중요한 단백질이다. 이는 거친 구모양이고, 5.5nm의 지름을 가지며, 분자량이 68,000이고 4개의 폴리펩티드 쇄를 함유한다. 각각의 쇄는 Fe^{2+}이온에 킬레이팅된 테트라피롤 환으로 이루어진 4개의 헴 그룹(Heme prosthetic group)에 결합된다.

[4] 또 한편, 탄소 점(Carbon dot)은 높은 형광 세기를 가지고, 10nm 이하의 사이즈를 가진 탄소 나노 물질로, 가장자리와 표면에 화학적 그룹을 가지고 있어 친수성을 띠고 있기 때문에 고분자, 단백질 등의 물질과 쉽게 결합하는 특성이 있고, 생체 적합성, 쉬운 합성방법, 무독성, 환경 친화성을 가진다. 따라서 이러한 특성을 이용하여 바이오센서, 약물방출(drug delivery)에 이용되고 있다.

[5] 특히 탄소 점은 그 표면구조와 기능 때문에 "off-on" 형광성을 가질 수 있다. 즉, 공역계 시스템을 포함하는 bio-compound와 금속이온이 반데르발스 결합 및 킬레이션을 통해 탄소 점의 표면에 흡수되면 형광성이 소멸(quenching)되어 형광이 "off"되고, 분석 물질과 금속 이온 사이에 결합이 형성되면 형광이 재복구(enhance)되는 것이다. 관련하여, Zeng et al.은 DNA가 형광의 탄소 점과 메틸렌 블루 용액을 퀀칭(quenching)시킨 후에 결정될 수 있다고 보고 한 바 있다. 그러나 탄소 점과 헤모글로빈을 사용하여 "off-on" 형광성을 기반으로 한 콜레스테롤 탐지에 대해서는 보고된 바 없다.

[6] 이에 본 발명자들은 탄소 점 형광의 quenching-enhance 접근법을 통하여 탄소 점과 헤모글로빈에 의해 콜레스테롤을 탐지할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[7] 따라서 본 발명은 콜레스테롤 검출용 탄소 점-헤모글로빈 복합체를 제공하는 것을 기술적 해결과제로 한다.

[8] 또한 본 발명은 상기 콜레스테롤 검출용 탄소 점-헤모글로빈 복합체를 포함하는 콜레스테롤 검출용 조성물을 제공하는 것을 다른 해결과제로 한다.

[9] 또한 본 발명은 콜레스테롤 검출용 탄소 점-헤모글로빈 복합체를 포함하는 광학 콜레스테롤 센서를 제공하는 것을 또다른 해결과제로 한다.

과제 해결 수단

[10] 상기 과제를 해결하기 위하여 본 발명은,

[11] 탄소 점(carbon dot) 및 상기 탄소 점 표면에 킬레이트 결합된 헤모글로빈을 포함하고,

[12] 상기 헤모글로빈의 결합으로 상기 탄소 점의 형광이 소멸(quenching)되고, 콜레스테롤과 반응하여 상기 탄소 점의 형광이 복구(enhance)되어 콜레스테롤을 검출하는 것을 특징으로 하는,

[13] 콜레스테롤 검출용 탄소 점-헤모글로빈 복합체를 제공한다.

[14] 또한 상기 다른 과제를 해결하기 위한 본 발명은,

[15] 상기 탄소 점-헤모글로빈 복합체를 포함하는 콜레스테롤 검출용 조성물을 제공한다.

[16] 또한 상기 또다른 과제를 해결하기 위한 본 발명은,

[17] 상기 탄소 점-헤모글로빈 복합체를 포함하는 광학 콜레스테롤 센서를 제공한다.

발명의 효과

[18] 상기 본 발명의 탄소 점-헤모글로빈 복합체는 콜레스테롤에 대한 높은 선택성과 높은 검출 민감도 및 빠른 반응시간을 나타낼 수 있어 콜레스테롤을 검출할 수 있는 효과가 있다. 또한 본 발명에 따르면 간단하면서도 경제적으로 콜레스테롤을 검출할 수 있는 바이오센서를 제공할 수 있으며, 특히 의학적 응용이 가능한 바이오센서를 제공할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[19] 도 1은 본 발명에 따른 콜레스테롤 검출용 탄소 점-헤모글로빈 복합체의 형광원리를 모식화하여 나타낸 것이다.

[20] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 탄소 점의 DLS(dynamic light scattering) 결과를 나타낸 것이다.

[21] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 탄소 점의 분석결과를 나타낸 것으로 도 3a는 FT-IR 스펙트럼, 도 3b는 탄소 점의 흡수, 여기-방출에 대한 UV-vis 스펙트럼, 도 3c 및 도 3d는 탄소 점의 광발광분광법에 따른 분석결과를 나타낸 것이다.

[22] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 탄소 점과, 다른 금속 이온(Cu^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}) 또는 바이오 컴파운드(Hb, Lys, Glu, Vit.C, Urea)에 대한 결합선택성을 나타낸 것이다(단, F0와 F는 각각의 물질을 첨가하기 전, 후의 탄소점의 형광 세기임)

[23] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 (a) 탄소 점(CDs)의 광발광분광법에 따른 분석결과를 나타낸 것이고, (b) 자외선 하에서 각각 a: CDs, b: CDs와 Hb, c: CDs/Hb을 포함하는 콜레스테롤 용액을 나타낸 것이며, (c) 같은 농도에서 콜레스테롤과 서로 다른 생체분자들(우레아, 글루코스, 갈락토스 및 L-아스코빅)의 CDs/Hb의 선택성을 나타낸 것이다(단, F0와 F는 각각의 물질을 첨가하기 전, 후의 CDs/Hb의 형광 세기임).

[24] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른, 헤모글로빈의 농도에 따른 탄소 점의 상대적 형광 세기를 나타낸 것이다(단, F0는 헤모글로빈 첨가 전 탄소 점 용액의 형광 세기, F는 헤모글로빈 첨가 후 탄소 점 용액의 형광 세기임)

[25] 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 CDs/Hb 시스템의 형광 세기에 있어서 반응시간의 영향을 나타낸 것이다.

[26] 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 CDs/Hb/Cho 시스템의 반응 시간에 따른 형광 세기를 나타낸 것이다.

[27] 도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 CDs/Hb/Cho 시스템의 pH에 따른 형광 효과를 나타낸 것이다(단, F0는 콜레스테롤 첨가 전 CDs/Hb 용액의 형광 세기, F는 콜레스테롤 첨가 후 CDs/Hb 용액의 형광 세기임).

[28] 도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 콜레스테롤 탐지 특성을 나타낸 것으로, 도 10a는 서로 다른 농도의 콜레스테롤 하에서 CDs/Hb 용액의 PL 스펙트럼을, 도 10b는 CDs/Hb/Cho 용액의 형광세기를 나타낸 것이다(단, F0는 콜레스테롤 첨가 전 CDs/Hb 용액의 세기, F는 콜레스테롤 첨가 후 CDs/Hb 용액의 세기임).

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[29] 이하 본 발명을 상세히 설명하기로 한다.

[30] 본 발명은 일 양태로서, 탄소 점(carbon dot) 및 상기 탄소 점 표면에 킬레이트 결합된 헤모글로빈을 포함하고, 상기 헤모글로빈의 결합으로 상기 탄소 점의 형광이 소멸(quenching)되고, 콜레스테롤과 반응하여 상기 탄소 점의 형광이 복구(enhance)되어 콜레스테롤을 검출하는 것을 특징으로 하는 탄소 점-헤모글로빈 복합체에 관한 것이다.

[31] 이와 같이 본 발명은 탄소 점 형광의 "quenching-enhance"(off-on)를 통하여 탄소 점과 헤모글로빈에 의해 콜레스테롤을 검출하게 된다. 구체적으로 탄소 점 형광의 "quenching"은 탄소 점 용액에 헤모글로빈이 존재함으로써 형성되고, 탄소 점의 형광은 소멸(off)하며, "enhance"는 여기에 콜레스테롤을 첨가하면서 형성되고, 탄소 점(CDs)의 형광을 복구하게 된다(on).

[32] 이 때, 상기 형광의 소멸 과정에서 헤모글로빈(Hb)은 0~14 μM까지 검출될 수

있고, 상기 형광의 복구 과정에서 56~800μM의 콜레스테롤을 검출할 수 있다.

[33] 또한 상기 탄소 점의 형광이 복구됨에 따른 콜레스테롤 검출 시간은 1~5분으로, 본 발명의 실시예에 따르면 탄소 점-헤모글로빈 복합체의 형광 발광 균형이 1분 30초인 것으로 나타났다.

[34] 이와 같이 본 발명의 탄소 점-헤모글로빈 복합체는 콜레스테롤에 대한 높은 선택성과 높은 검출 민감도, 빠른 반응시간을 나타내는 바, 다른 양태로서 본 발명은 상기 탄소 점-헤모글로빈 복합체를 포함하는 콜레스테롤 검출용 조성물에 관한 것이다.

[35] 또한 상기 본 발명의 탄소 점-헤모글로빈 복합체는 형광의 소멸 및 복구를 이용하여 콜레스테롤을 검출할 수 있는 바, 또다른 양태로서 본 발명은 상기 탄소 점-헤모글로빈 복합체를 포함하는 광학 콜레스테롤 센서에 관한 것이다.

[36]

[37] 이하, 본 발명을 실시예를 들어 상세히 설명하나 본 발명이 이하의 실시예에 한정되는 것은 아니다.

발명의 실시를 위한 형태

[38] **<실시예>**

[39] **탄소 점 준비**

[40] 탄소 점은 기존의 보고된 방법(*Shoujun Zhu et al.,* Highly Photoluminescent Carbon Dots for Multicolor Patterning, Sensors, and Bioimaging, Angewandte Chemie International Edition, Volume 52, Issue 14, pages 3953-3957, April 2, 2013.)으로 제조하였다. 구체적으로, 0.4g 시트르산(Citric acid, CA)과 270μl 에틸렌디아민(Ethylene diamine, EDA)을 증류수(Deionized water) 80ml에 용해시키고, 이후 이 용액을 오토클레이브에 넣은 다음 4시간 동안 200℃의 열을 가해주어 hydrothermal carbonization 반응으로 탄소 점 합성반응을 진행하였다. 이 반응 후, 반응기는 물에 의해 자연스럽게 실온까지 냉각되고, 갈색-붉은색을 가지면서 투명한 반응생성물을 얻었다. 다음으로 투석을 이용하여 최종적으로 탄소 점(Carbon dots, CDs)을 얻었다. 최종적으로 얻어진 CDs 용액의 농도는 대략 6.13mg/ml 이다.

[41] **헤모글로빈 탐지**

[42] 상기 얻어진 CDs 용액을 증류수에 희석 시켜 0.02mg/ml의 농도로 만들었다. 그리고 나서 헤모글로빈을 탐지하기 위하여, 헤모글로빈을 농도 별로 CDs 용액에 첨가하였다(50μL, 0.02 mg/ml).

[43] 그 후, 형광 세기를 형광 분광광도계(fluorescence spectrophotometer)를 이용하여 380nm의 여기 상태에서 측정하였다.

[44] 또한 헤모글로빈 탐지의 선택성은 같은 농도인 8μM의 다른 금속 이온과 바이오 컴파운드의 첨가를 통해 실험되었다.

[45] **콜레스테롤 탐지**

[46] 어세이(assay)에 상기에서 제조된 CDs 용액(0.02mg/ml)의 50μL를 헤모글로빈(10μM) 용액 3mL에 첨가시켰다. 그리고 나서, 콜레스테롤 농도 별로 헤모글로빈 용액에 첨가시켰다. 형광 세기는 헤모글로빈 탐지 시험과 동일 조건에서 기록하였다.

[47] 또한 콜레스테롤 탐지의 선택성에 대해 조사하기 위해서, 우레아, 글루코스, 갈락토스, L-아스코빅 및 콜레스테롤을 헤모글로빈 용액에 첨가하였다.

[48] 상기 모든 시험은 적어도 세 번씩 반복했고, 실온에서 진행하였다.

[49] 또한, 사람의 혈청을 이용한 시험을 위하여, 혈액은 큰 분자와 단백질을 제거하기 위해서 20분간 5000 rpm으로 원심 분리하여 이용되었다.

[50] **결과**

[51] **1. 탄소 점(CDs)의 구조적, 광학적 특징**

[52] 탄소 점의 크기와 형태를 관찰하기 위해 동적 광산란법(Dynamic light scattering; DLS)을 이용하였다.

[53] 도 2는 DLS의 결과를 나타낸 것으로, 탄소 점의 크기는 약 1.5-2nm라는 것을 알 수 있다.

[54] 화학적인 구조의 확인을 위하여, 퓨리에 변환 적외분광법(Fourier transform infrared; FT-IR)을 사용하였다. 도 3a는 FT-IR 결과를 나타낸 것으로 이를 참고하면 2935-2868cm^{-1}에서의 흡수 피크는 CH의 antisym과 symstretching을 나타내고, 679cm^{-1} 피크는 CH의 굽힘 운동(bending out-of-plane deformation)을 나타내며, 1637cm^{-1} 피크는 C=C, C=O 신축 운동을 나타내는 진동 밴드이다. 또한 C-N과 N-H 신축운동은 각각 1262cm^{-1}, 3296-3386cm^{-1}에서 피크를 나타내었고, 이는 탄소 점(CDs)의 표면에 아민기가 도핑(doping)되었음을 의미한다.

[55] 또한 탄소 점(CDs)은 크기가 작고, 표면에 다관능 그룹(multifunction group)을 가지고 있기 때문에, 컨쥬게이트 화합물과 높은 적합성을 가지며, 다양한 친수성 용매와 높은 용해성을 가진다. 이러한 탄소 점(CDs)의 화학적 구조와 형광발광을 확인하기 위하여, 자외선 및 가시광선 분광분석법(UV/vis spectroscopy)과 광발광분광법(photoluminescence spectroscopy)을 이용하여 분석하였다.

[56] 구체적으로 도 3b는 UV/vis 스펙트럼을 나타낸 것으로 이를 참고하면, 탄소 점 용액은 일반 백색광에서는 투명하나 365nm의 자외선 영역에서는 파란색을 나타내며, 210nm, 340nm에서 center peak를 보이고, 250nm에서 shoulder peak를 보인다. 이 때, 210nm와 250nm의 피크는 방향족 C=C 결합의 n-π^*와 π^*-π^* 전이에 탄소 점의 광발광분광법에 따른 분석결과에 의해 나타난다. 또한 340nm부근에서의 넓은 피크는 탄소 점 표면에 있는 작용기의 n-π^* 전이에 의해 나타난다(C=O, C=N 결합).

[57] 또한 도 3c 및 도 3d는 탄소 점의 광발광분광법에 따른 분석결과를 나타낸 것으로 이를 참고하면, 탄소 점의 작은 크기와 작용기를 기반으로 하여, 다른 여기 파장에 대해 파란색에서 노랑-초록까지 넓은 컬러 밴드(color band)를 나타내었다. 이로부터 탄소 점이 multi-color라고 불리며 세포 라벨링, 바이오

이미징 등에 이용될 수 있음을 분명히 확인할 수 있다.

[58] 또한 도 4는 탄소 점과 다른 금속 이온(Cu^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}) 또는 바이오 컴파운드(Hb, Lys, Glu, Vit.C, Urea)에 대한 선택성을 나타낸 것으로, 탄소 점은 다른 금속이온이나 바이오 컴파운드에 있어서 헤모글로빈과의 결합에 대한 높은 선택성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

[59]

[60] **2. 탄소 점(CDs)과 헤모글로빈(Hb)의 복합체(CDs/Hb)의 발광 특징**

[61] 또한 탄소 점(CDs)과 헤모글로빈(Hb)의 복합체의 "quenching-enhance" 형광 발광 메커니즘과, 상기 복합체를 기반으로 한 콜레스테롤 탐지를 확인하고 그 결과를 도 5 내지 도 10에 나타내었다.

[62] 구체적으로, 도 5는 (a) 탄소 점(CDs)의 광발광분광법에 따른 분석결과를 나타낸 것이고, (b) 자외선 하에서 각각 a: CDs, b: CDs와 Hb, c: CDs/Hb을 포함하는 콜레스테롤 용액을 나타낸 것이며, (c) 같은 농도에서 콜레스테롤과 서로 다른 생체분자들(우레아, 글루코스, 갈락토스 및 L-아스코빅)의 CDs/Hb의 선택성을 나타낸 것이다.

[63] 도 5(a),(b)를 참고하면 다른 조건(CDs, CDs 와 Hb, CDs/Hb 및 콜레스테롤(Cho))에 따라 바뀌는 형광발광을 보여주고 있다. 구체적으로, CDs와 CDs/Cho는 거의 유사하게 높은 형광발광을 나타내었고, Hb/Cho는 거의 형광을 나타내지 않았다. 또한 CDs/Hb에 비하여 CDs/Hb/Cho가 보다 강한 형광발광을 나타내었는 바, CDs/Hb 복합체에 콜레스테롤을 첨가한 후에, 형광세기가 증가했다는 것을 확인할 수 있었다. 보다 구체적으로, 헤모글로빈(Hb)이 6μM 존재할 때, 원래의 CDs 용액(CDs/Cho)보다 CDs/Hb 복합체가 약 25% 수준으로 형광세기가 감소하였으나, 콜레스테롤과 결합한 CDs/Hb/Cho의 경우에는 CDs/Hb 복합체 형광세기에 비하여 2배 가까이 향상된 형광세기를 나타내었고, 이는 원래의 CDs 용액보다는 50%정도의 감소한 형광세기이다.

[64] 또한 도 5(c)를 참고하면, 같은 농도에서 콜레스테롤과 서로 다른 생체분자들(우레아, 글루코스, 갈락토스 및 L-아스코빅)에 있어서 CDs/Hb는 특히 콜레스테롤에 현저하게 높은 선택성을 나타냄을 확인할 수 있다.

[65] 이러한 결과로부터 도 1에 나타낸 바와 같이, 탄소 점의 형광은 탄소 점과 헤모글로빈이 복합체를 형성함에 따라, 탄소 점의 형광이 소멸(quenching)되고, 상기 복합체는 다시 콜레스테롤과 결합하면서 형광이 복구(enhancing)되는 것을 분명히 확인할 수 있다. 즉, 콜레스테롤은 -OH기와 알킬 체인을 모두 가지고 있는 양친매성물질이고, 이러한 콜레스테롤은 헤모글로빈 헴 그룹의 철과 상호작용을 하며, 헤모글로빈의 폴리펩타이드 체인은 소수성 상호작용을 통하여 표면으로 소수성 부분을 흡수하게 되는 바, CDs/Hb 복합체에 있어서 헤모글로빈은 콜레스테롤과 결합하게 되고 이를 통해 탄소 점의 형광성을 복구하게 되는 것이다.

[66] 또한 이와 같이 도 5에 있어서 CDs/Hb 복합체에 콜레스테롤을 첨가한 후 탄소

점의 형광 세기가 증가한 다른 이유는, CDs/Hb 복합체는 탄소 점의 방향족 고리와 헤모글로빈의 헴 그룹 사이에 π-π stacking(반데르발스 힘)을 형성하는 바, 헤모글로빈과 콜레스테롤의 복합체가 헤모글로빈과 탄소 점의 복합체보다 열역학적으로 안정하기 때문이다. 즉, 소수성 상호작용의 에너지는 약 40 kJ/mol이고, 반데르발스 작용의 에너지는 0.4~4.0 kJ/mol로서 소수성 상호작용의 에너지가 반데르발스 작용보다 10배 더 높으므로, 콜레스테롤과 헤모글로빈 사이의 결합으로 탄소 점과 헤모글로빈 복합체로부터 탄소 점을 자유롭게 방출하여 탄소 점의 형광성을 복구할 수 있게 되는 것이다.

[67]

[68] **3. 탄소 점(CDs)과 헤모글로빈(Hb)의 복합체(CDs/Hb)의 콜레스테롤 탐지**

[69] 도 6은 서로 다른 농도의 헤모글로빈을 동일한 농도의 탄소 점 용액에 용해시킨 후, 헤모글로빈의 농도에 따른 탄소 점의 상대적 형광 세기를 나타낸 것이다. 이를 참고하면, 탄소 점 용액의 농도가 0.002mg/mL를 기준으로, 헤모글로빈의 농도가 6μM일 때 형광 발광 세기가 거의 소멸되는 것으로 확인되었다.

[70] 또한 도 7은 상기 도 6의 결과를 바탕으로, 상기 농도가 0.002mg/mL인 탄소 점 용액에, 각기 다른 농도의 헤모글로빈(2 μM, 12 μM)을 첨가한 후, 탄소 점의 반응시간을 측정하여 나타낸 것이다. 이를 참고하면, CDs/Hb 복합체의 형광 발광 균형이 1분 30초에 도달하는 것을 확인할 수 있는 바, 이로부터 탐지 시간은 1분 30초임을 증명할 수 있다.

[71] 또한 도 8은 CDs/Hb/Cho 시스템의 반응 시간에 따른 형광 세기를 나타낸 것으로, 이를 참고하면 상기 도 6과 마찬가지로 CDs/Hb/Cho 시스템의 형광 발광 균형이 1분 30초에 도달하는 것을 확인할 수 있는 바, 이로부터 콜레스테롤 탐지 시간은 1분 30초임을 확인할 수 있다.

[72] 또한 도 9는, CDs/Hb/Cho 시스템의 pH에 따른 형광 효과를 나타낸 것으로, 증류수의 pH인 pH 6.2~7.8 범위에서의 효과를 나타내었다. 이를 참고하면, 형광의 복구 과정에 있어서 pH 6.4-7.0 사이에 변화가 미미하다는 것을 알 수 있는 바, 증류수를 바이오 센싱 시스템을 위한 매체로 사용할 수 있음을 확인하였다.

[73] 또한 도 10은 상기 도 6 내지 도 9의 결과를 기초로 한 콜레스테롤 탐지 특성을 나타낸 것이다.

[74] 구체적으로 도 10a는 서로 다른 농도의 콜레스테롤을 CDs/Hb 용액에 용해하였을 때, 파장에 따른 PL 스펙트럼을 나타낸 것으로 이를 참고하면, 콜레스테롤의 농도가 증가됨에 따라 형광 세기가 점차 회복되는 것을 확인할 수 있었다.

[75] 또한 도 10b는 CDs/Hb/Cho 용액의 형광세기를 회복 인자인 F/F0로 나타낸 것이다. F와 F0는 450nm에서 콜레스테롤의 유무에 따른 CDs/Hb의 형광세기로, 형광회복인자 F/F0의 로그값은 다음과 같다.

[76]

$$Log(\frac{F}{F0})=1.95\times 10^{-4}X+0.0115$$

[77] X는 콜레스테롤 탐지 농도로서 R=0.990에서 0에서 800 μM의 범위이고, 탐지 한계(Limit of Detection)은 56 μM으로 측정되었다. 구체적으로 측정된 x 값은 각각 0, 20.6, 103.2, 206.4, 309.6, 412.8, 619.2, 722.4, 825.6 μM으로, Y축의 형광세기의 결과를 통해, X값을 측정하였고, 이를 통해, 콜레스테롤 탐지의 선형 범위는 0 ~ 800 μM으로 확인되었다. 이 때, 상기 R은 선형성을 의미하는 것으로, 도 10b에서 원점이 직선에서 벗어난 정도를 의미하며 편차가 작을수록 R의 값은 1에 가까워지는 바, R=0.990으로 확인되었음은 편차가 작음을 의미하는 것이다. 이러한 콜레스테롤 탐지 범위는, 종래 콜레스테롤 센서의 탐지 범위 및 탐지 한계와 비교하여 매우 낮은 값으로서, 본 발명의 CDs/Hb 복합체가 콜레스테롤 검출 센서로서 매우 높은 민감도를 가짐을 확인할 수 있었다.

[78]

[79] 상기 실시예의 결과로부터 본 발명의 탄소 점-헤모글로빈 복합체는 콜레스테롤에 대한 높은 선택성과 높은 검출 민감도, 빠른 반응시간, 간단하면서도 경제적인 바이오센서로서 적용가능한 것을 확인할 수 있었고, 성공적으로 인체 세럼에서 콜레스테롤을 탐지할 수 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 본 발명은 광학적 콜레스테롤 센서의 연구를 비롯, 탄소 점의 응용에 기여할 수 있고, 세포 라벨링, 바이오 이미징, 및 프린팅에도 적용가능할 수 있을 것으로 판단된다.

[80]

[81] 본 발명은 상기 실시예들에 한정되는 것이 아니라 다양한 형태로 제조될 수 있으며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해하여야 한다.

청구범위

[청구항 1] 탄소 점(carbon dot) 및 상기 탄소 점 표면에 킬레이트 결합된 헤모글로빈을 포함하고,
상기 헤모글로빈의 결합으로 상기 탄소 점의 형광이 소멸(quenching)되고, 콜레스테롤과 반응하여 상기 탄소 점의 형광이 복구(enhance)되어 콜레스테롤을 검출하는 것을 특징으로 하는,
콜레스테롤 검출용 탄소 점-헤모글로빈 복합체.

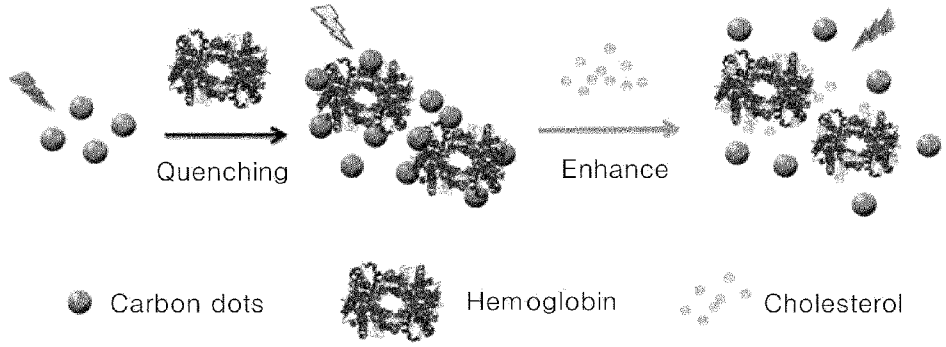
[청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 복합체는 56~800μM의 콜레스테롤을 검출하는 것을 특징으로 하는, 콜레스테롤 검출용 탄소 점-헤모글로빈 복합체.

[청구항 3] 제 1 항에 있어서,
상기 탄소 점의 형광이 복구됨에 따른 콜레스테롤 검출 시간은 1~5분인 것을 특징으로 하는, 콜레스테롤 검출용 탄소 점-헤모글로빈 복합체.

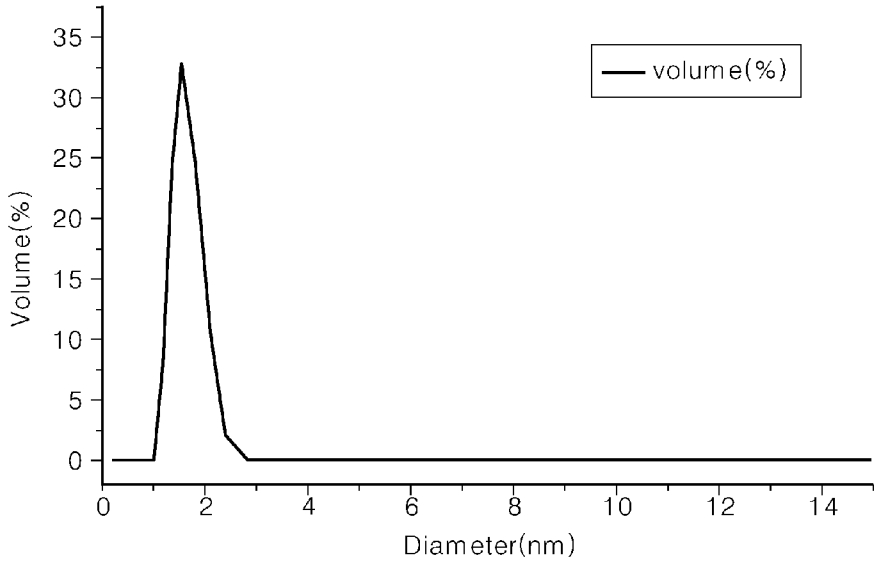
[청구항 4] 제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 따른 탄소 점-헤모글로빈 복합체를 포함하는 콜레스테롤 검출용 조성물.

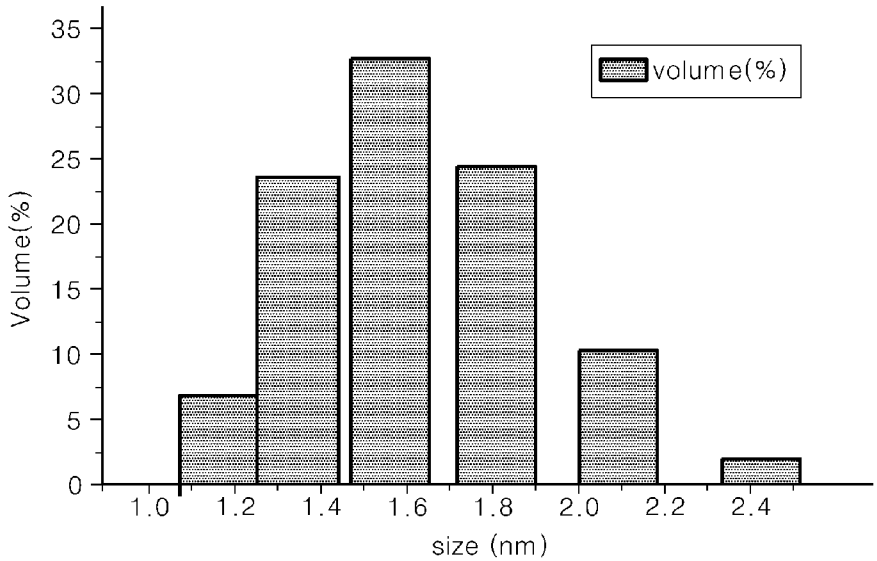
[청구항 5] 제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 따른 탄소 점-헤모글로빈 복합체를 포함하는 광학 콜레스테롤 센서.

[도1]

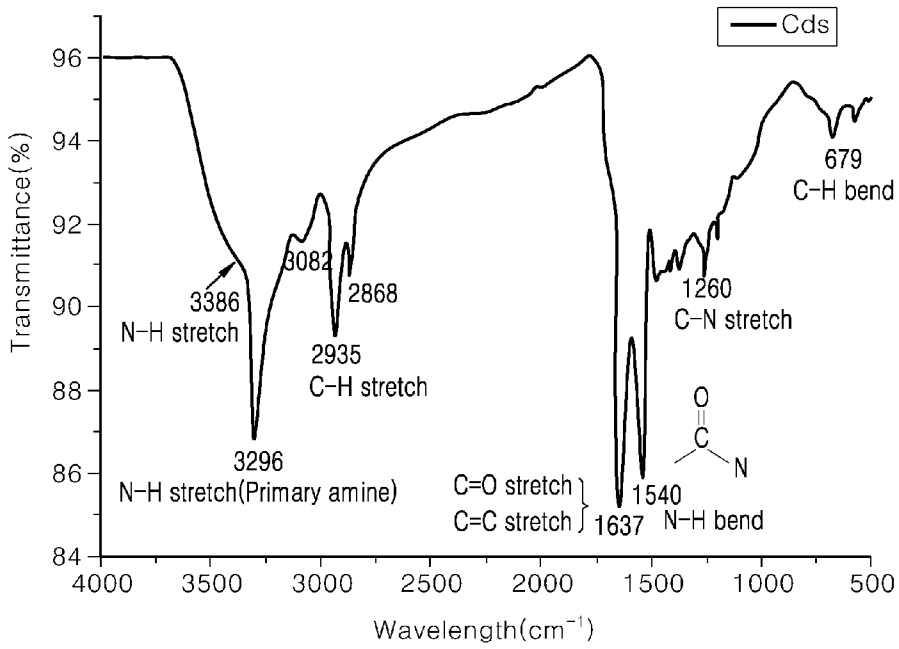

Quenching
Enhance
Carbon dots
Hemoglobin
Cholesterol

[도2]

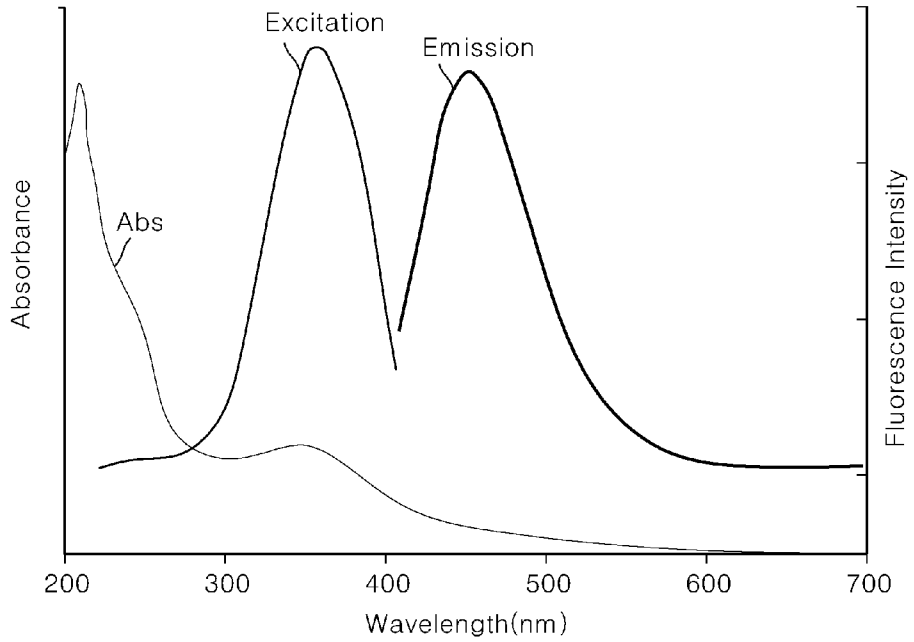

volume(%)
Volume(%)
Diameter(nm)
0
5
10
15
20
25
30
35
0
2
4
6
8
10
12
14


volume(%)
Volume(%)
size (nm)
0
5
10
15
20
25
30
35
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
2.2
2.4

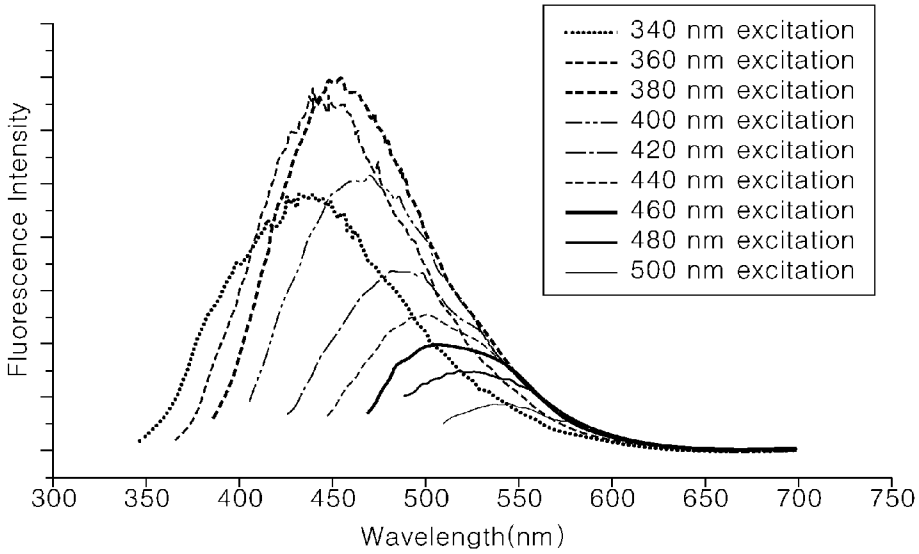
[도3a]


Cds
Transmittance(%)
96
94
92
90
88
86
84
3386
N-H stretch
3296
N-H stretch(Primary amine)
3082
2935
2868
C-H stretch
C=O stretch
C=C stretch
1637
1540
N-H bend
1260
C-N stretch
679
C-H bend
O
C
N
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
Wavelength(cm-1)

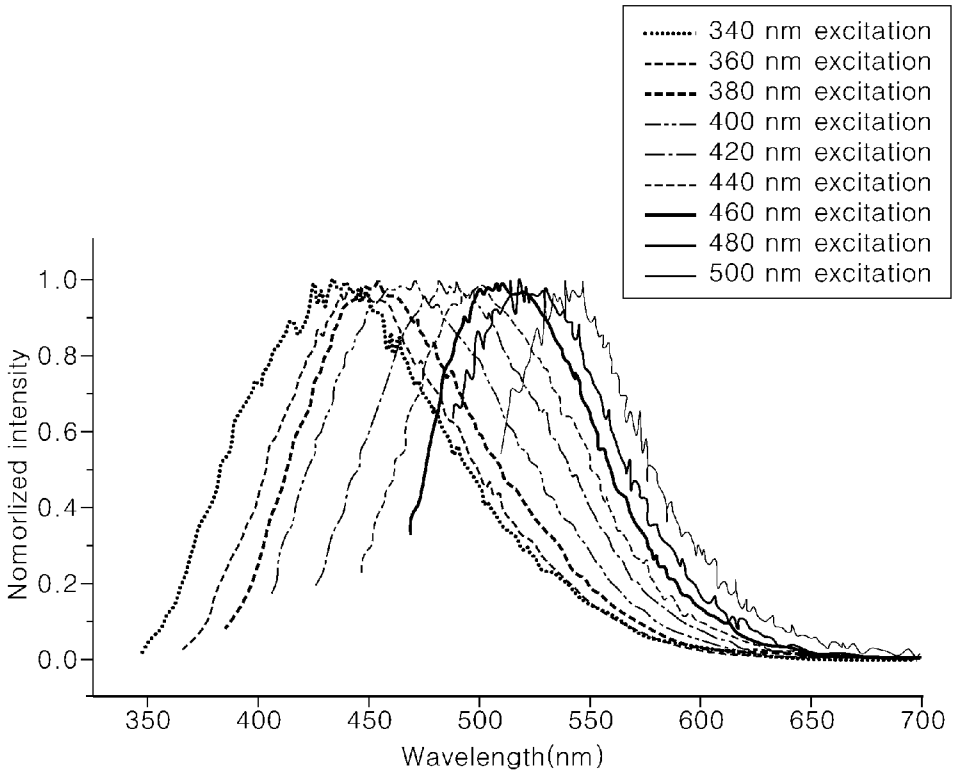
[도3b]


Excitation
Emission
Abs
Absorbance
Fluorescence Intensity
200
300
400
500
600
700
Wavelength(nm)

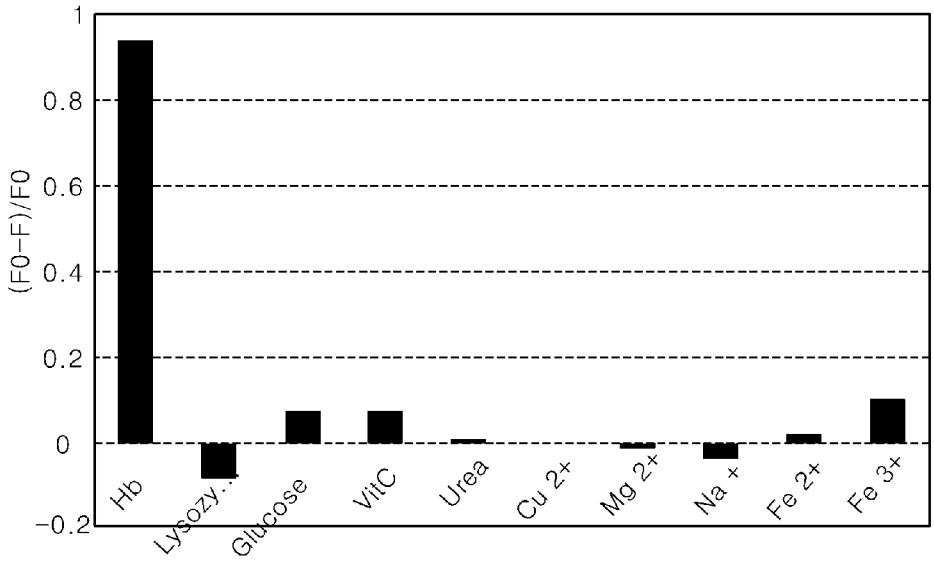
[도3c]


340 nm excitation
360 nm excitation
380 nm excitation
400 nm excitation
420 nm excitation
440 nm excitation
460 nm excitation
480 nm excitation
500 nm excitation
Fluorescence Intensity
300
350
400
450
500
550
600
650
700
750
Wavelength(nm)

[도3d]

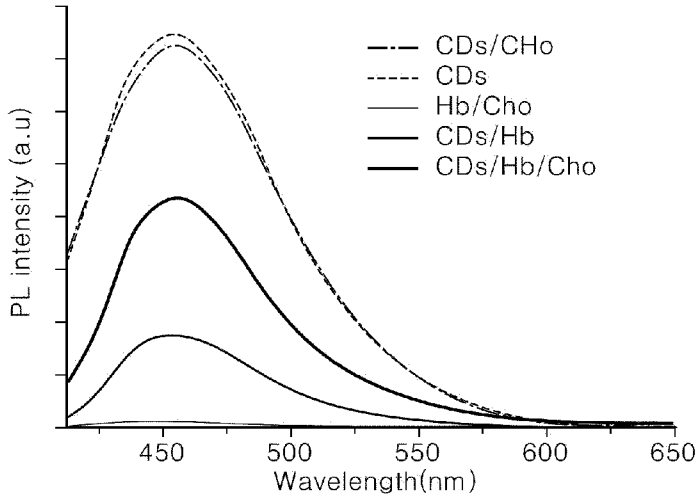

340 nm excitation
360 nm excitation
380 nm excitation
400 nm excitation
420 nm excitation
440 nm excitation
460 nm excitation
480 nm excitation
500 nm excitation
Nomorlized intensity
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
350
400
450
500
550
600
650
700
Wavelength(nm)

[도4]

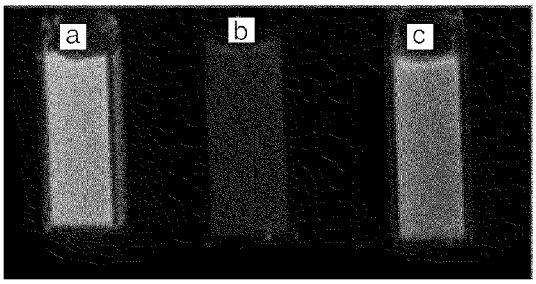

1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
-0.2
(F0-F)/F0
Hb
Lysozy..
Glucose
VitC
Urea
Cu 2+
Mg 2+
Na +
Fe 2+
Fe 3+

[도5]

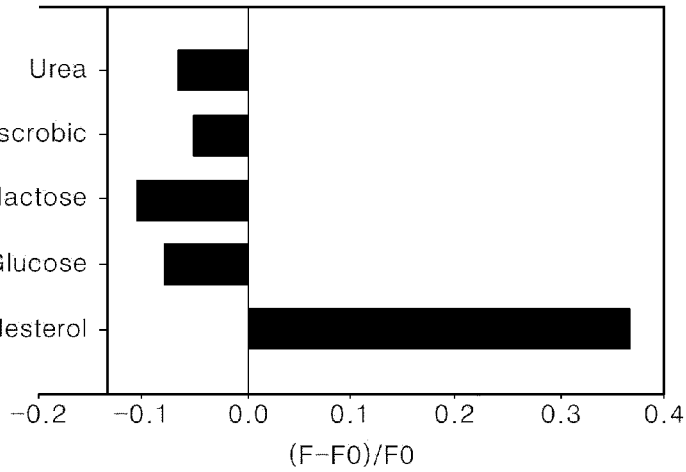
(a)


CDs/CHo
CDs
Hb/Cho
CDs/Hb
CDs/Hb/Cho
PL intensity (a.u)
450
500
550
600
650
Wavelength(nm)

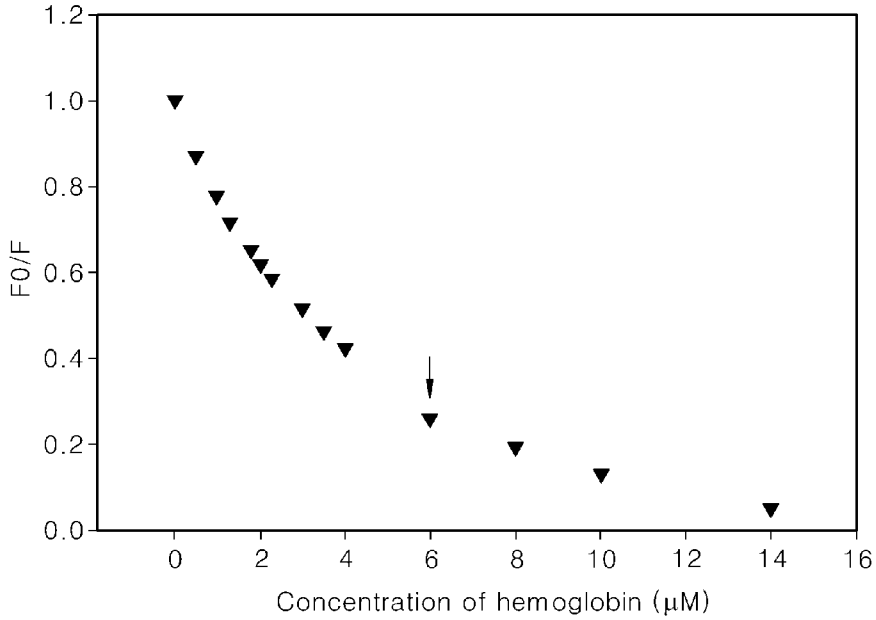
(b)


a
b
c

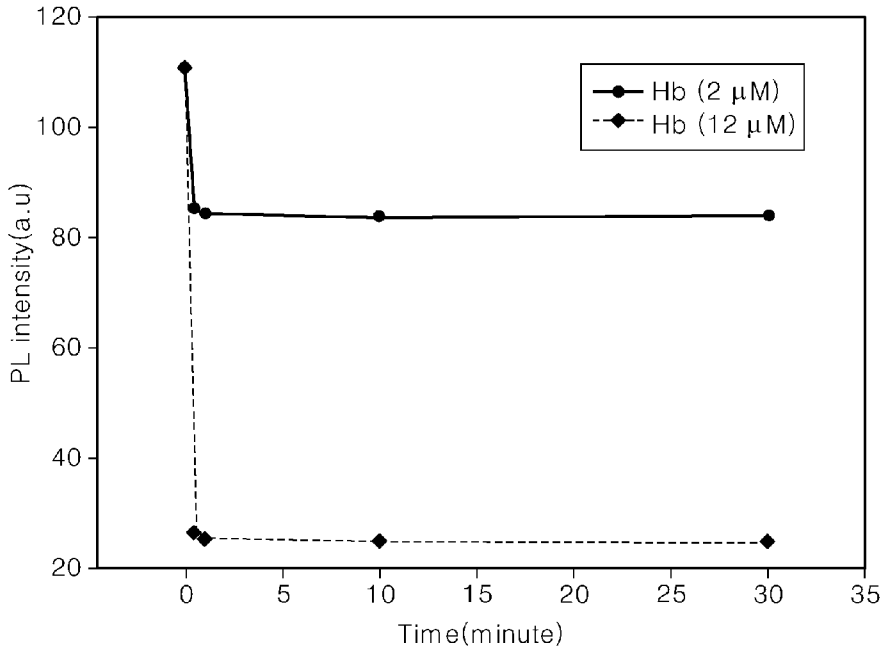
(c)


Urea
L-ascrobic
Galactose
Glucose
Cholesterol
-0.2
-0.1
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
(F-F0)/F0

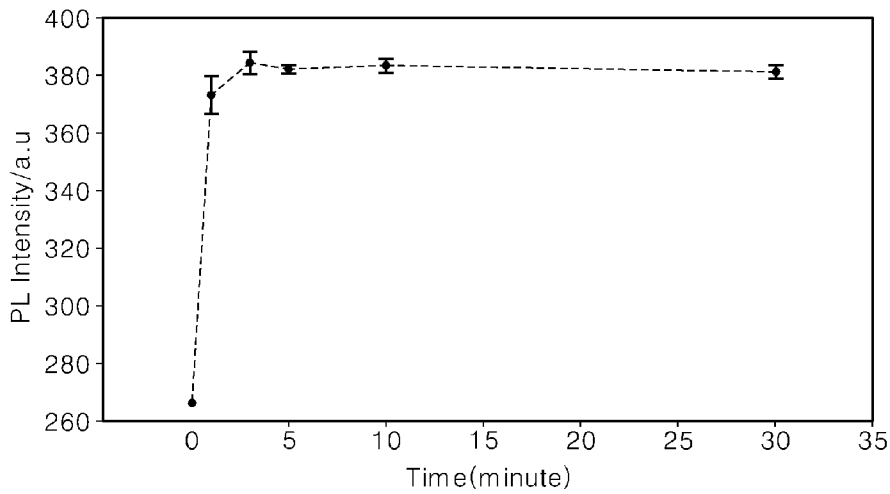
[도6]


F0/F
Concentration of hemoglobin (μM)

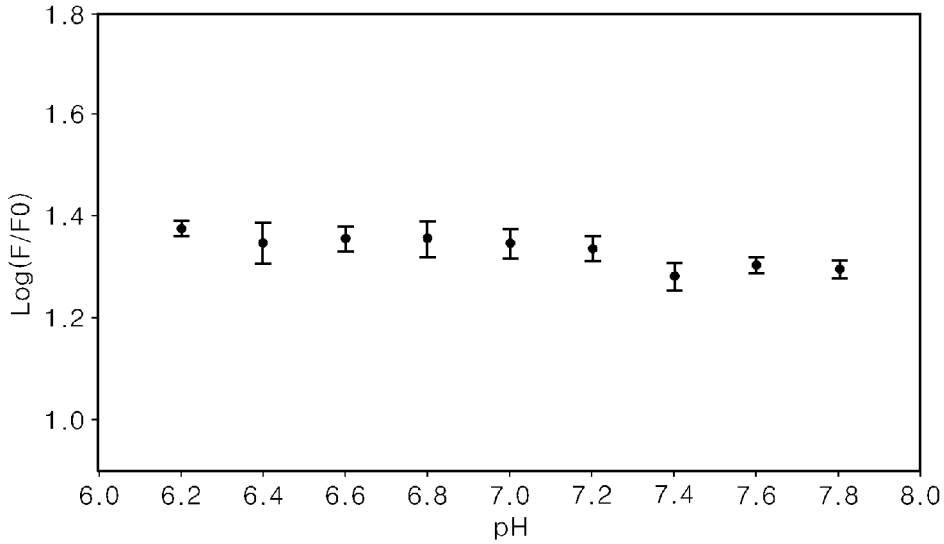
[도7]


Hb (2 μM)
Hb (12 μM)
PL intensity(a.u)
Time(minute)

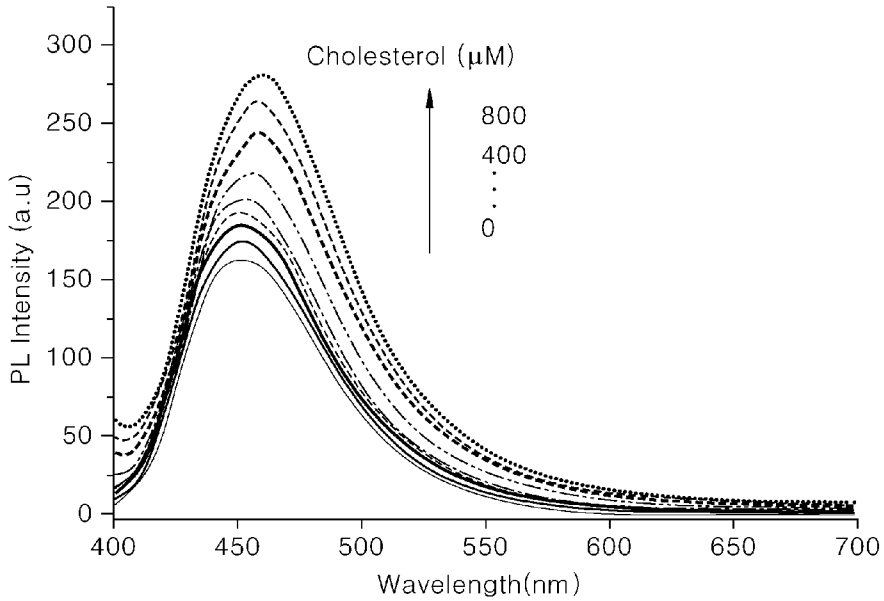
[도8]


PL Intensity/a.u
Time(minute)

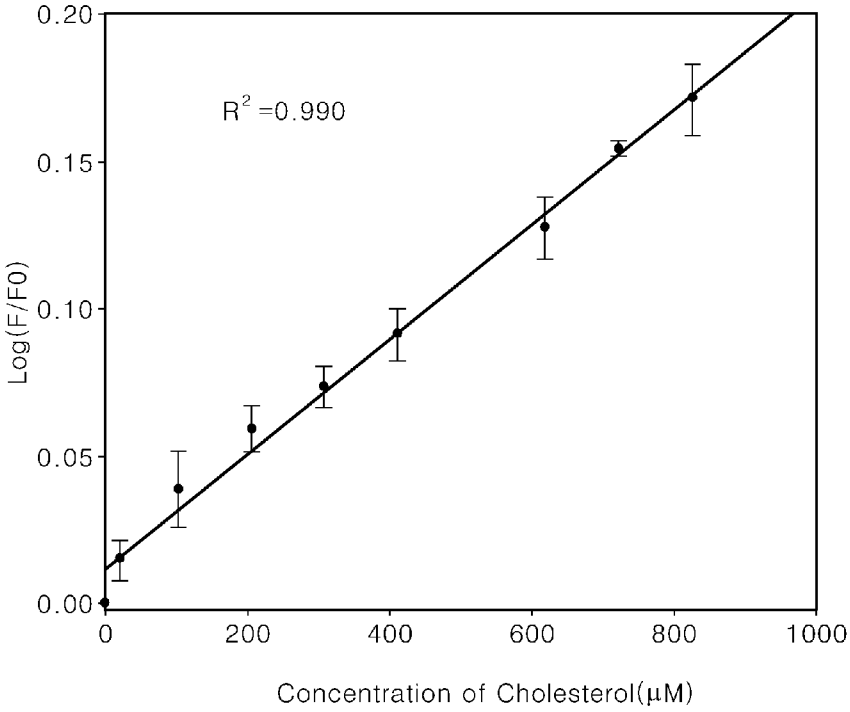
[도9]


1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
Log(F/F0)
6.0
6.2
6.4
6.6
6.8
7.0
7.2
7.4
7.6
7.8
8.0
pH

[도10a]


300
250
200
150
100
50
0
PL Intensity (a.u)
Cholesterol (μM)
800
400
0
400
450
500
550
600
650
700
Wavelength(nm)

[도10b]


0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
Log(F/F0)
R2 =0.990
0
200
400
600
800
1000
Concentration of Cholesterol(μM)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2016/009440

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/58(2006.01)i, G01N 33/72(2006.01)i, G01N 33/92(2006.01)i, G01N 21/64(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 33/58; C07J 43/00; G01N 21/76; G01N 21/64; G01N 33/566; C12Q 1/26; C09K 11/06; G01N 33/92; C12Q 1/28; G01N 33/72

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: cholesterol, carbon dot, hemoglobin, phosphor

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BUI, Thi Trang et al., "A Fluorescent Biosensor for the Detection of Hemoglobin by Using Carbon Dots", The Polymer Society of Korea, Abstracts Presented at 2015 Autumn Meeting, October 2015, page 102 See page 102, abstract.	1-5
A	HE, Xuewen et al., "One-step Instant Synthesis of Protein-conjugated Quantum Dots at Room Temperature", Scientific Reports, 02 October 2013, vol. 3, p. 2825 See abstract; figure 1; disscussion section.	1-5
A	SZEBENI, Janos et al., "Interaction of Hemoglobin Derivatives with Liposomes. Membrane Cholesterol Protects against the Changes of Hemoglobin", Biochemistry, 1988, vol. 27, pages 6425-6434 See abstract; page 6427 left column second paragraph-right column second paragraph; page 643, right column, first and second paragraphs; figures 1 and 3.	1-5
A	HU, De-Hong et al.,"Study on the Interation between CsSe Quantum Dots and Hemoglobin", Spectrochimica Acta Part A, 2008, vol. 69, pages 830-834 See the entire document.	1-5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
09 DECEMBER 2016 (09.12.2016)	**09 DECEMBER 2016 (09.12.2016)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2016/009440

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SOUZA, Tamera T. L. et al., "Use of Hemoglobin as Alternative to Peroxidases in Cholesterol Amperometric Biosensors", Sensors and Actuators B, 2013, vol. 178, pages 101-106 See the entire document.	1-5
A	BERGERON, Raymond J. et al., "Cholestarine and Ergostatetraene as in Vivo and in Vitro Membrane and Lipoprotein Probes", Journal of Lipid Research, 1982, vol. 23, 391-404 See abstract; results.	1-5
A	MILAN, Nikolic et al., "Cholesterols Bound to Hemoglobin in Normal Human Erythro cytes: a New Form of Cholesterol in Circulation?", Clinical Biochemistry, 2004, vol. 37, pages 22-26 See the entire document.	1-5
A	HUANG, Shan et al., "A Carbon Dots Based Fluorescent Probe for Selective and Sensitive Detection of Hemoglobin", Sensors and Actuators B: Chemical, 2015, vol. 221, pages 1215-1222 See the entire document.	1-5
A	BARATI, Ali et al., "Hemoglobin Detection Using Carbon Dots as a Fluorescence Probe", Bio-sensors and Bioelectronics, 2015, vol. 71, pages 470-475. See the entire document.	1-5
PX	BUI, Thi Trang et al., "A Carbon Dot-hemoglobin Complex-based Biosensor for Cholesterol Detection", Green Chemistry, 03 May 2016, vol. 18, pages 4245-4253 See abstract.	1-5
PX	KIM, Sung Wook et al., "A Fluorescent Biosensor for the Detection of Hemoglobin by Using Carbon Dots", The Korean Society of Industrial and Engineering Chemistry 2016 Spring Conference, 02 May 2016, vol. 20, no. 1, poster See abstract.	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2016/009440

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
NONE			

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2016/009440

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 33/58(2006.01)i, G01N 33/72(2006.01)i, G01N 33/92(2006.01)i, G01N 21/64(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
G01N 33/58; C07J 43/00; G01N 21/76; G01N 21/64; G01N 33/566; C12Q 1/26; C09K 11/06; G01N 33/92; C12Q 1/28; G01N 33/72

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 콜레스테롤, 탄소 점, 헤보글로빈, 형광

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	부이 티 트랑 등, 'A fluorescent biosensor for the detection of hemoglobin by using carbon dots`, 한국고분자학회, 2015년도 추계학술대회 연구논문 초록집, 2015.10., 102 페이지 102 페이지, 요약문 참조.	1-5
A	HE, XUEWEN 등, 'One-step instant synthesis of protein-conjugated quantum dots at room temperature', Scientific Reports, 2013.10.02., 3권, p.2825 요약; 도 1; Disscussion 섹션 참조.	1-5
A	SZEBENI, JANOS 등, 'Interaction of hemoglobin derivatives with liposomes. Membrane cholesterol protects against the changes of hemoglobin', Biochemistry, 1988, 27권, 6425-6434 페이지 요약; 6427 페이지의 왼쪽 컬럼 두 번째 문단 - 오른쪽 컬럼 두 번째 문단; 643 페이지, 오른쪽 컬럼, 첫 번째 및 두 번째 문단; 도 1 및 3 참조.	1-5
A	HU, DE-HONG 등, 'Study on the interation between CsSe quantum dots and hemoglobin', Spectrochimica Acta Part A, 2008, 69권, 830-834 페이지 문서 전체 참조.	1-5

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2016년 12월 09일 (09.12.2016)	2016년 12월 09일 (09.12.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
허주형
전화번호 +82-42-481-8150

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2016/009440

C(계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	SOUZA, TAMERA T. L. 등, 'Use of hemoglobin as alternative to peroxidases in cholesterol amperometric biosensors', Sensors and Actuators B, 2013, 178권, 101-106 페이지 문서 전체 참조.	1-5
A	BERGERON, RAYMOND J. 등, 'Cholestarine and ergostatetraene as in vivo and in vitro membrane and lipoprotein probes', Journal of Lipid Research, 1982, 23권, 391-404 Abstract; Results 참조.	1-5
A	NIKOLIC MILAN 등, 'Cholesterols bound to hemoglobin in normal human erythro cytes: a new form of cholesterol in circulation?', Clinical Biochemistry, 2004, 37권, 22-26 페이지 문서 전체 참조.	1-5
A	HUANG, SHAN 등, 'A carbon dots based fluorescent probe for selective and sensitive detection of hemoglobin`, Sensors and Actuators B: Chemical, 2015, 221권, 1215-1222 페이지 문서 전체 참조.	1-5
A	BARATI, ALI 등, 'Hemoglobin detection using carbon dots as a fluorescence probe', Bio- sensors and Bioelectronics, 2015, 71권, 470-475 페이지. 문서 전체 참조.	1-5
PX	BUI, THI TRANG 등, `A carbon dot-hemoglobin complex-based biosensor for cholesterol detection`, Green Chemistry, 2016.05.03., 18권, 4245-4253 페이지 요약 참조.	1-5
PX	김성욱 등, `A fluorescent biosensor for the detection of hemoglobin by using carbon dots`, 한국공업화학회 2016 춘계 학술대회, 2016.05.02, 20권, 1호, 포스터 요약문 참조.	1-5

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2016/009440

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일

없음