

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0133792 (43) 공개일자 2016년11월23일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) G01N 33/573 (2006.01) C08G 61/00 (2006.01) C12N 5/09 (2010.01) C12N 9/48 (2006.01) G01N 21/64 (2006.01) G01R 33/465 (2006.01)	(71) 출원인 충남대학교산학협력단 대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)	(72) 발명자 이택승 대전광역시 유성구 배울2로 78, 611동 2001호 (관평동, 대덕테크노밸리6단지아파트) 김대근 대전광역시 유성구 궁동로2번길 9-5, 301호
(52) CPC특허분류 G01N 33/573 (2013.01) C08G 61/00 (2013.01)	(74) 대리인 김홍균	
(21) 출원번호 10-2015-0066770		
(22) 출원일자 2015년05월13일 심사청구일자 2015년05월13일		

전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **형광 공액화 고분자 나노입자 및 이와 자성나노입자를 포함하는 센서**

(57) 요약

본 발명은 공액화 화합물을 포함하는 고분자 나노입자 및 이와 자성나노입자를 이용하여 화학센서 및 바이오센서에 관한 것으로, 보다 상세하게는 특정 폴리펩타이드가 감싸여진 고분자 나노입자 및 이와 카복시기가 도입되어 음전하를 띄는 자성나노입자를 포함하는 센서에 관한 것이며, 상기 고분자 나노입자와 자성나노입자의 정전기적 상호작용을 바탕으로 안정한 나노하이브리드를 형성하며, 이를 화학센서 및 바이오센서로 이용하는 방법에 관한 것이다.

또한, 본 발명은 화학센서 및 바이오센서용 고분자 나노입자와 자성나노입자 복합체 및 이를 이용한 단백질 분해 효소의 선택적인 형광 및 자기 이완시간에 의한 이중검출방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

C12N 5/0693 (2013.01)

C12N 9/48 (2013.01)

G01N 21/64 (2013.01)

G01R 33/465 (2013.01)

C08G 2261/94 (2013.01)

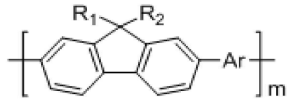
명세서

청구범위

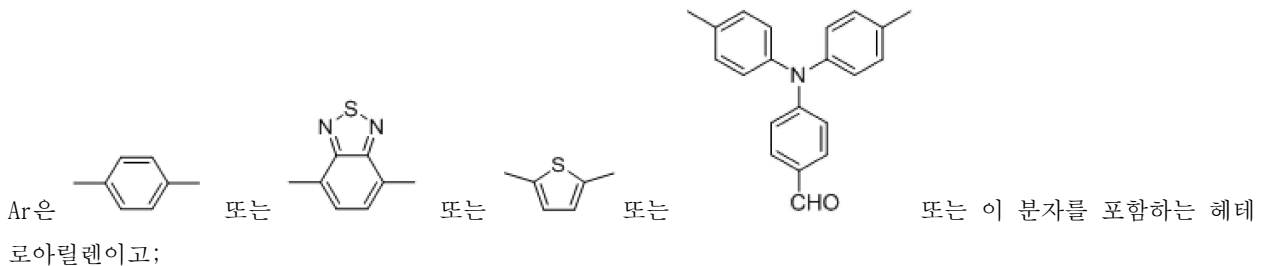
청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 공액화 화합물 및 화학식 2로 표시되는 공액화 화합물을 포함하는 고분자 나노입자.

[화학식 1]



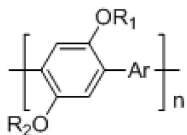
(상기 화학식 1에서,



R₁ 및 R₂는 서로 독립적인 직쇄 또는 분지쇄의 C1 내지 C8의 알킬기이고;

m은 2 내지 199의 정수이다.)

[화학식 2]



(상기 화학식 2에서, R₁, R₂ 및 Ar은 상기 화학식 1에서의 정의와 동일하고, n은 2 내지 199의 정수이다.)

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 고분자 나노입자 표면에 양전하를 갖는 폴리펩타이드가 추가로 도입된 고분자 나노입자.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 양전하를 갖는 폴리펩타이드는 폴리아르기닌 또는 폴리라이신인 것을 특징으로 하는 고분자 나노입자.

청구항 4

제2항 또는 제3항에 기재된 고분자 나노입자와 양전하를 갖는 자성나노입자와 음전하를 갖는 자성나노입자의 정전기적 상호 인력에 의하여 나노하이브리드화되며,

단백질 분해효소에 의하여 상기 고분자 나노입자 표면의 폴리펩타이드가 분해됨에 따라 고분자 나노입자와 상기 자성나노입자의 정전기적 반발력이 형성되어, 고분자 나노입자의 형광이 증가되고, 자성나노입자의 황이완시간이 증가되는 것을 이용한 센서.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 단백질 분해효소는 트립신 또는 카텡신인 것을 특징으로 하는 센서.

청구항 6

제 4항에 있어서,

상기 센서는 형광광도계 및 자기공명장치를 이용한 효소단백질의 선택적 검출용인 것을 특징으로 하는 센서.

청구항 7

제 4항에 있어서,

상기 센서는 특정 세포 내의 효소단백질에 의해서 세포를 감지하는 것을 특징으로 하는 센서.

청구항 8

제 7항에 있어서,

상기 세포는 Hela 세포 또는 MCF-7 세포인 암세포인 것을 특징으로 하는 센서.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 공액화 화합물을 포함하는 고분자 나노입자 및 이와 자성나노입자를 이용하여 화학센서 및 바이오센서에 관한 것으로, 보다 상세하게는 특정 폴리펩타이드가 감싸여진 고분자 나노입자 및 이와 카복시기가 도입되어 음전하를 띄는 자성나노입자를 포함하는 센서에 관한 것이며, 상기 고분자 나노입자와 자성나노입자의 정전기적 상호작용을 바탕으로 화학센서 및 바이오센서로 이용하는 방법에 관한 것이다.

[0002] 또한, 본 발명은 화학센서 및 바이오센서용 고분자 나노입자와 자성나노입자 복합체 및 이를 이용한 단백질 분해효소의 선택적인 형광 및 자기 이완시간에 의한 이중검출방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 현대 사회의 현대인들은 많은 질병에 직간접적으로 노출되어 있다. 그로 인하여 다양한 질병을 신속 정확하게 분석할 필요가 있다. 이러한 분석에는 특정 질병에 선택적으로 감지할 수 있는 물질을 이용한 바이오센서 물질들이 사용되며, 센서의 일반적인 감지 신호는 전기, 저항, 전위차 등의 전기적 성질이나 색채, 형광 등의 광학적 성질을 이용한다. 이중에서 색의 변화 및 형광의 변화는 육안으로 쉽게 판별이 가능하므로 특별한 장비가 없어도 측정이 용이한 방법 중의 하나이다. 특히, 색채 및 형광의 변화를 나타내는 센서로는 공액화 고분자가 일반적으로 사용되어지는 추세이다.

[0004] 분석 화학에 있어 유기 공액화 고분자의 사용은 정성적인 측면과 정량적인 측면에서 발전을 가져왔다. 그 이유는 공액화 고분자의 기본적인 특성인 전도성, 산화-환원 전위차, 흡수 또는 발광 스펙트럼이 환경의 변화에 따라 민감하게 변화하기 때문이다. 특히 분자 혹은 이온인식기능기를 지니는 공액화 고분자가 표적 물질을 인식하여 위의 특성 변화를 가져오면 센서로서 응용이 가능하다. 다양한 센서 응용 중에서도 색변이 유도체 화합물들을 감지 및 패턴링 구현 등에 사용하는 연구가 진행 되고 있다. 최근 화학 및 바이오 분야의 응용에서 형광 색변이 및 전기화학적, 또는 광 응답과 자기적 특성의 변화를 통한 화학종을 인식할 수 있는 분자센서들에 대하여 많은 관심이 이루어지고 있는 가운데, 기존의 형광 응답 신호의 변화나 자성 특성의 변화를 이용한 센서재료는 감지물질 응답특성에 있어서 뛰어난 응답특성을 보인다는 장점을 토대로 형광 유도체나 자성나노입자 화합물들이 많이 연구 되고 있다(A. P. De silva, H. Q. N. Gunaratne, T. Gunnlaugsson, A. J. M. Huxley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher, T. E. Rice, Chem. Rev., 97, 1515, 1997; D. Esteban-Gomez, L. Fabbrizzi, M. Licchelli, J. Org. Chem., 70, 5717, 2005).

[0005] 공액화 고분자 화합물을 이용하여 제조한 고분자 나노입자는 나노크기의 특성을 이용하여 감지시약, 바이오센서, 광전자 장치 물질들과 같은 분야에서 응용된다. 이러한 고분자 나노입자는 공액화 고분자를 설계 합성하고, 고분자 나노입자 표면처리를 통하여 요구분야에 맞게 사용할 수 있다. 고분자 나노입자는 제조하기 쉽고, 특성 조작이 간단하고, 독성도 양자점에 비교하여 현저히 떨어지므로, 인체에 적용하기 적합하다. 뿐만

아니라 고분자 나노입자는 높은 형광 양자수율을 가지며, 크기조절이 용이하여 많은 응용분야에 사용된다.(J. Pecher, S. mecking, Chem. Rev. 110, 6260-6279, 2010; D. Tuncel, H. V. Demir, Nanoscale, 2, 484-494, 2010; S. N. Clifton, D. A. Beattie, A. Mierczynska-Vasilev, R. G. Acres, A. C. Morgan, T. W. Kee, Langmuir, 26, 17785-17789, 2010; C. Wu, Y. Jin, T. Schneider, D. R. Burnham, P. B. Smith, D. T. Chiu, Angew. Chem. Int. Ed. 49, 9436-9440, 2010)

[0006] 자성나노입자는 자기공명영상(MRI, Magnetic Resonance Image) 촬영 시 조영제로 이용되며, 크기나 그 형태에 따른 자기 특성의 변화를 이용한 표적물질로 사용 되는 등 다양한 응용을 할 수 있는 장점이 있다. 또한 실리카를 자성나노입자 표면에 코팅함으로써 생체 적합성을 향상시킬 수 있으며, 표면처리를 통한 기능단을 도입할 수 있기 때문에 다양한 바이오 기술 분야에 큰 잠재력을 가지고 있다. 이러한 자성나노입자에는 다양한 종류의 금속산화물이 이용되며, 보편적으로 산화철(Fe_3O_4)을 입자화 시켜서 이용한다. 이러한 자성나노입자에 형광 물질을 복합시켜 다양한 바이오센서로 이용되어 왔다. 하지만 이러한 자성나노입자는 형광 물질을 소광시키는 에너지 반개 역할을 하기 때문에 형광 물질과 복합화하기에 큰 어려움이 있다. 따라서 이러한 자성나노물질의 표면을 실리카로 코팅하고 여러 형광기능단을 도입하여 바이오센서로서 이용하는 연구가 진행되고 있다.

[0007] 트립신은 분자량이 약 24,000 Da인 단백질 분해효소의 하나로서. 췌장액 중에 함유되며 염기성 아미노산을 많이 함유하는 폴리펩타이드의 분해에 작용한다. 췌장에서 분비될 때는 불활성의 트립신 전구체인 트립시노겐이지만, 장의 엔테로키나아제 및 트립신 자체의 작용으로 인해 활성 트립신으로 전환되며, 단백질의 소화에 있어서 펩신과 함께 가장 중요한 효소이다. 위에서 펩신에 의하여 가수분해된 펩타이드는 소장에서 키모트립신과 트립신에 의하여 더 가수분해되어 작은 펩타이드 파편이 된다. 또 트립신은 펩타이드 사슬을 끊는 엔도펩티다아제의 하나로 특이성이 높고, 아르기닌 또는 라이신의 펩타이드의 카르복시기쪽을 가수분해한다고 알려져 있다.(Q. Zhu, R. Zhan, B. Liu, Macromol. Rapid. Commun. 31, 1060-1064, 2010; L. An, L. Liu, S. Wang, Biomacromolecules, 10, 454-457, 2009; J. H. Wosnick, C. M. Mello, T. M. Swager, J. Am. Chem. Soc. 127, 3400-3405, 2005; X. Gu, G. Yang, G. Zhang, D. Zhang, D. Zhu, ACS Appl. Mater. Interfaces, 3, 1175-1179, 2011)

[0008] 카텝신(cathepsin)은 리소솜에 국재하는 산성의 단백질가수분해효소의 총칭이다. 기질 특이성 등에 의한 알파벳 순서로 분류하고 있다. 이들은 최적 pH 저해제에 대한 반응성, 기질 특이성 및 분자량 등에 의해서 분류되고, 카텝신 A, B, C, D, H, L 등과 같이 알파벳을 붙인 명칭으로 불리고 있다. 카텝신 A는 현재 리소솜카복시펩타이드 A(lysosomal carboxypeptidase A)라고 부르며 펩티드 사슬의 C말단에서 순차 아미노산을 유리하는 작용을 갖는다. 카텝신 B는 종래 카텝신 B1이라고 불리고 있는 시스테인 분해효소(cysteine protease)이고, 펩타이드내부 가수분해효소(endopeptidase, 펩타이드 사슬 내부의 펩타이드결합에 작용하여 이것을 단편화한다) 작용과 dipeptidylcarboxypeptidase(펩티드 사슬의 C말단에서 순차 dipeptide를 유리한다) 작용을 더불어 가지고 있다. 분자량은 약 25,000으로 최적 pH 5-6이다. 종래 카텝신 B2라고 불리던 것이 현재는 리소솜카복시펩타이드 B(lysosomal carboxypeptidase B)라고 불리고 있다. 카텝신 C는 dipeptidylaminopeptidase I이라고도 부르며 펩타이드 사슬의 N말단에서 다이펩타이드(dipeptide)를 순차 유리시킨다. 카텝신 D는 아스파르트산(aspartic acid)으로 분류되는 펩타이드내부가수분해효소로, 분자량 30,000~40,000으로 변성 헤모글로빈을 최적 pH 3~4에서 가수분해한다. 카텝신 H는 펩타이드내부가수분해 작용과 아미노펩타이다제(펩티드 사슬의 N말단에서 순차 아미노산을 유리한다) 작용을 더불어 갖는 분자량 약 28,000의 시스테인 분해효소이다. 카텝신 L은 분자량 약 25,000의 시스테인 분해효소로 강력한 펩타이드내부가수분해 작용을 갖고 있다. 이들의 카텝신은 생체 내에서는 협동적으로 단백질의 대사에 기여하고 있다고 생각되고 있다.(T. Nomura, N. Katunuma, J. Med. Invest. 52, 19, 2005; T. Yamashima, NEUROLOGY 105, 123, 2013; S. Z. Raptis, S. D. Shapiro, P. M. Simmons, A. M. Cheng, C. T. Pham, Immunity 22, 679691, 2005; E. Im, A. Kazlauskas, Exp. Eye Res. 84, 383388, 2007)

[0009] 상기와 같은 단백질 분해효소의 분해 특성을 바탕으로 색변화에 의한 컬러센서로 효소를 감지하려는 노력은 저분자와 고분자 물질에 의하여 많이 시도되었다. 이들은 용액 상태에서 형광색이 변하거나 눈에 보이는 색의 변화를 유도하는 것으로 알려져 있다. 이러한 효소의 감지는 수용액에서 행해져야 하기 때문에 센서 화합물은 반드시 수용성이어야 하는 구조적인 제한이 있었고, 그렇기 때문에 센서분자 설계 단계에서부터 수용성 기능단을 도입해야 하는 등의 어려움이 있었다.

[0010] 또한 형광색 또는 색의 변화만을 이용한 방법은 상황에 따라 제한적이며 효율이 떨어질 수 있기 때문에 다양한 감지 방법을 갖는 센서시스템의 개발이 필요하다. 색의 변화만을 이용한 방법은 눈으로 감지 할 수 있다는 장점이 있지만, 생체내에서 색변화를 관찰하기 어렵기 때문에 효소 감지나 바이오센서로의 응용에 제한이 있으며,

형광의 경우에도 변화를 확인하기 위해서는 빛을 통하여 여기시켜 주어야 하는데, 생체내에서의 변화를 관찰하기 위해서는 투과가 가능하도록 적외선 영역대에서의 여기 파장이 필요 하는 등의 제한이 있다. 그렇기 때문에 상황에 따라 복합적으로 대응시킬 수 있는 이중검출 시스템이 필요하다. 이러한 이중검출 시스템에 현재 생체내에서의 검사를 진행 할 수 있는 자기공명영상법을 이용하게 되면 생체내에서의 효소반응 등을 감지 할 수 있으며, 생체 밖에서는 형광색의 변화를 통하여 간단하고 효율이 높은 감지를 병행할 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 효소 단백질이 분해할 수 있는 특정 폴리펩타이드가 도입된 공액화 고분자 나노입자 및 이와 자성나노입자를 포함하는 센서를 제공하는 것을 목적으로 한다.

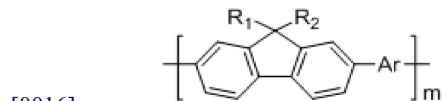
[0012] 또한, 상기 고분자 나노입자를 제조하고, 표적 효소 단백질에 의하여 폴리펩타이드가 분해됨으로 인하여 고분자 나노입자와 자성나노입자간의 정전기적 상호작용이 형성되어, 고분자 나노입자의 형광 변화 및 자성나노입자의 이완시간의 변화의 이중 감지 시스템을 통해 효소 단백질을 검출하는 방법을 제공하는 것도 목적으로 한다.

[0013] 아울러, 본 발명은 특정 효소만을 선택적으로 인지하여 형광강도의 변화 및 자성나노입자의 횡이완시간(T_2 , Transverse relaxation time)의 변화로서 이중 감지 신호를 나타내는 화학센서 및 바이오센서로의 응용이 가능한 방법을 제공하는 것도 목적으로 한다.

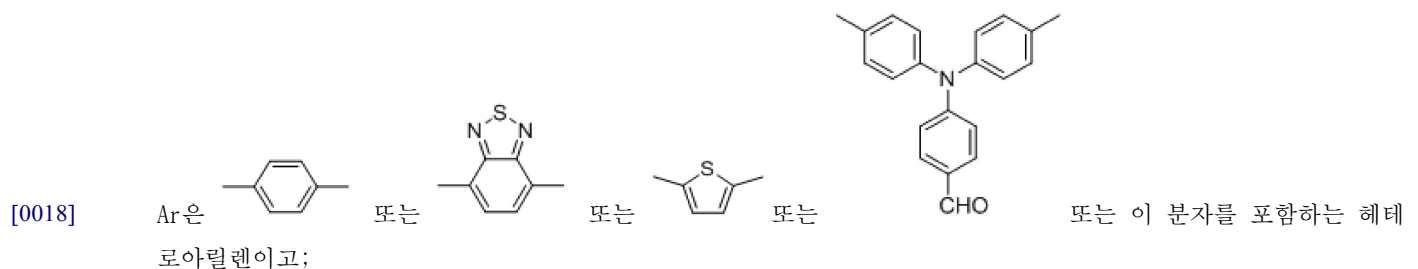
과제의 해결 수단

[0014] 전술한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 공액화 화합물 및 화학식 2로 표시되는 공액화 화합물을 포함하는 고분자 나노입자를 제공한다.

[0015] [화학식 1]



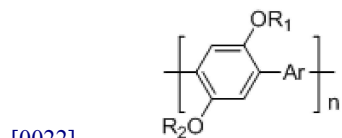
[0017] (상기 화학식 1에서,



[0019] R_1 및 R_2 는 서로 독립적인 직쇄 또는 분지쇄의 C1 내지 C8의 알킬기이고;

[0020] m은 2 내지 199의 정수이다.)

[0021] [화학식 2]



[0023] (상기 화학식 2에서, R_1 , R_2 및 Ar은 상기 화학식 1에서의 정의와 동일하고, n은 2 내지 199의 정수이다.)

[0024] 이때, 상기 고분자 나노입자 표면에 양전하를 갖는 폴리펩타이드가 추가로 도입된 것을 특징으로 한다.

[0025] 또한, 상기 양전하를 갖는 폴리펩타이드는 폴리아르기닌 또는 폴리라이신인 것이 바람직하다.

[0026] 아울러, 본 발명은 제2항 또는 제3항에 기재된 고분자 나노입자와 양전하를 갖는 자성나노입자와 음전하를 갖는 자성나노입자의 정전기적 상호 인력에 의하여 나노하이브리드화되며, 단백질 분해효소에 의하여 상기 고분자 나노입자 표면의 폴리펩타이드가 분해됨에 따라 고분자 나노입자와 상기 자성나노입자의 정전기적 반발력이 형성되어, 고분자 나노입자의 형광이 증가되고, 자성나노입자의 형이완시간이 증가되는 것을 이용한 센서도 제공한다.

[0027] 이때, 상기 센서는 형광광도계 및 자기공명장치를 이용한 효소단백질의 선택적 검출용인 것을 특징으로 한다.

[0028] 또한, 상기 센서는 특정 세포 내의 효소단백질에 의해서 세포를 감지하는 것을 특징으로 하며, 상기 세포는 HeLa 세포 또는 MCF-7 세포인 암세포인 것이 바람직하다.

발명의 효과

[0029] 이상과 같이 본 발명에 따른 표면에 표적 효소 단백질에 의하여 분해되는 특정 폴리펩타이드가 도입된 공액화 고분자 나노입자와 자성나노입자의 복합체는 수용액상에서 특정 바이오물질에 대한 인지물질로 사용할 수 있어, 화학센서 및 바이오센서로 응용이 가능하고, 따라서 진단, 의학연구, 임상실험, 화학분석 등에 널리 사용될 수 있다. 이렇게 형성된 공액화 고분자 나노입자와 자성나노입자 복합체는 두 가지 감지 신호체계를 갖고 있어 이중감지가 가능하게 된다.

[0030] 즉, 공액화 고분자 나노입자가 갖는 형광 변화와 산화철로 제조된 자성나노입자의 형이완시간의 변화를 통한 이중감지가 가능하여, 상황에 적합한 감지신호를 선택하여 사용할 수 있다. 수용액상에서는 민감도가 높고, 감지가 간편한 형광 신호를 바탕으로 효소 단백질을 감지 할 수 있으며, 생체내 실험을 할 경우 자성나노입자의 형이완시간의 변화를 관찰함으로써 효소 단백질 감지 및 효소 반응 추적에 사용 할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 본 발명은 공액화 화합물을 포함하는 고분자 나노입자 및 이와 자성나노입자를 이용하여 화학센서 및 바이오센서에 관한 것으로, 보다 상세하게는 특정 폴리펩타이드가 감싸여진 고분자 나노입자 및 이와 카복시기의 영향으로 음전하를 띄는 자성나노입자를 포함하는 센서에 관한 것이며, 상기 고분자 나노입자와 자성나노입자의 정전기적 상호작용을 바탕으로 화학센서 및 바이오센서로 이용하는 방법에 관한 것이다.

[0032] 상기 고분자 나노입자는 표면의 자유전자에 의하여 물 안에서 음전하를 띄지만, 분자내 다수의 아민을 가진 폴리아르기닌 또는 폴리라이신의 도입으로 고분자 나노입자의 표면을 양전하화시키고, 음전하를 갖는 자성나노입자와의 상호 인력을 이용하여 공액화 고분자 표면에 자성나노입자가 둘러싸여 있는 나노 하이브리드 물질을 구성하였다.

[0033] 또한, 본 발명은 화학센서 및 바이오센서용 고분자 나노입자와 자성나노입자의 복합체 제조 및 이를 이용한 효소 단백질의 선택적인 이중검출방법에 관한 것이다.

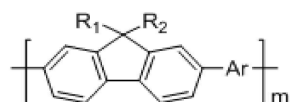
[0034] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0035] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 공액화 화합물 및 화학식 2로 표시되는 공액화 화합물을 포함하는 고분자 나노입자를 제공한다.

[0036] 상기 공액화 화합물은 알킬기를 이용하여 유기용매에 대한 용해성을 부여하고 주쇄의 반복단위에 따라 형광색이 다른 특징을 갖고 있다.

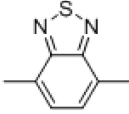
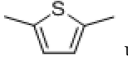
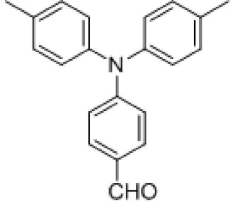
[0037] 본 발명에서 제안하는 공액화 화합물은 상기 화학식 1 및 화학식 2로 표시되지만, 형광을 갖는 모든 공액화 고분자를 사용할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0038] [화학식 1]



[0039]

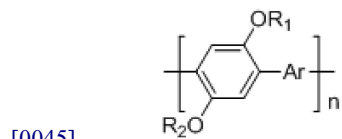
[0040] (상기 화학식 1에서,

[0041] Ar은  또는  또는  또는  또는 이 분자를 포함하는 헤테로아릴렌이고;

[0042] R₁ 및 R₂는 서로 독립적인 직쇄 또는 분지쇄의 C1 내지 C8의 알킬기이고;

[0043] m은 2 내지 199의 정수이다.)

[0044] [화학식 2]



[0046] (상기 화학식 2에서, R₁, R₂ 및 Ar은 상기 화학식 1에서의 정의와 동일하고, n은 2 내지 199의 정수이다.)

[0047] 상기 R₁ 및 R₂의 알킬기는 서로 독립적으로 메틸, 에틸, i-프로필, n-프로필, i-부틸, n-부틸, t-부틸, n-펜틸, i-펜틸 및 n-헥실로 이루어진 군으로부터 선택되어지며, 상기 Ar은 페닐렌, 벤조싸이아다리아졸, 비스싸이에닐 벤조싸이아다리아졸 및 비스페닐아미노벤즈알데하이드로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0048] 본 발명에 따른 화학식 1과 화학식 2의 공액화 고분자 화합물의 분자량은 원칙적으로 제한이 없으나, 수평균 분자량(Mn)으로 3,000 내지 100,000이 바람직하고, 그 용도에 요구되는 특성에 따라 그 범위를 적절히 조절하여 사용할 수 있다.

[0049] 본 발명에서 사용한 화학식 1 공액화 고분자는 본 발명자에 의하여 출원된 고분자이나(대한민국 특허 출원 번호 10-2010-0003084), 이에 한정하는 것은 아니다.

[0050] 또한, 화학식 2의 공액화 고분자는 일반적으로 제조되어지는 고분자로서, 본 발명이 고분자의 화학 구조에 구애 받지 않는다는 것을 보여주는 예이다.

[0051] 본 발명에서는 효소 단백질을 보다 쉽고 빠르게 검출하기 위하여 화학식 1과 2의 공액화 고분자 화합물로 고분자 나노입자를 제조하게 되면, 수용성을 부여하기 위하여 추가적인 기능단의 도입 없이 수분산 상태로 만들 수 있기 때문에 바이오분자의 감지가 쉽게 가능한 장점을 가지고 있다.

[0052] 또한, 본 발명은 상기 공액화 화합물을 이용하여 고분자 나노입자를 제조한 후, 상기 고분자 나노입자의 표면에 특정 효소 단백질에 의해 분해되는 폴리펩타이드를 정전기적 인력을 이용하여 도입한 고분자 나노입자를 제공한다.

[0053] 여기서, 상기 폴리펩타이드는 폴리아르기닌 또는 폴리라이신인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0054] 트립신에 의해 분해되는 폴리아르기닌은 본 발명에 따른 화학식 1과 2의 공액화 고분자로 제조한 고분자 나노입자 표면에 정전기적 인력에 의하여 도입된다. 이러한 고분자 나노입자는 표면에 도입된 폴리아르기닌의 영향으로 양전하를 띄게 된다.

[0055] 또한, 카텝신에 의해 분해되는 폴리라이신은 본 발명에 따른 화학식 1과 2의 공액화 고분자로 제조한 고분자 나노입자 표면에 정전기적 인력에 의하여 도입된다. 이러한 고분자 나노입자는 표면에 도입된 폴리라이신의 영향으로 양전하를 띄게 된다.

- [0056] 아울러, 본 발명은 상기 고분자 나노입자 표면에 양전하를 갖는 폴리펩타이드가 추가로 도입된 고분자 나노입자와 음전하를 갖는 자성나노입자를 포함하는 센서를 제공한다.
- [0057] 상기 자성나노입자는 형이완시간의 변화를 관찰하고자 Fe_3O_4 를 이용하였고, 이 자성나노입자의 표면은 카복시기로 처리 되어있기 때문에 고분자 나노입자와 다르게 음전하를 띤다. 이 두 나노입자를 물 안에서 혼합하면 서로 다른 전하로 인하여 상호 인력이 생겨 나노 하이브리드화를 이룬다.
- [0058] 이때, 상기 센서는 수용액 상에서 분산되어 있는 공액화 고분자 나노입자의 표면의 폴리펩타이드는 양전하를 갖고 있고, 자성나노입자는 음전하를 갖고 있어 정전기적 상호작용으로 인하여 회합이 일어나고, 이로 인하여 공액화 고분자 나노입자의 형광이 자성나노입자로 전이되어 형광이 감소되지만, 특정 효소의 첨가에 의해 공액화 고분자 나노입자를 감싸고 있는 폴리아르기닌 또는 폴리라이신은 분해되어, 음전하를 갖는 공액화 고분자 나노입자와 음전하를 갖는 자성나노입자의 상호 반발력이 일어나고, 이로 인해서 형광이 증가하며, 자성나노입자의 형이완시간 또한 증가하는 것을 특징으로 한다.
- [0059] 또한, 특정 폴리펩타이드를 분해할 수 있는 특정 효소 단백질을 사용할 수 있으므로 검출대상도 트립신과 카텝신으로 제한되는 것은 아니다.
- [0060] 상기 센서에 대해 보다 구체적으로 설명하면 하기와 같다.
- [0061] 상기 두 나노입자, 즉 고분자 나노입자와 자성나노입자를 물 안에서 혼합하면 서로 다른 전하로 인하여 상호 인력이 생겨 나노 하이브리드화를 이룬다. 이 복합체에 일정농도의 트립신을 넣게 되면, 트립신의 효소 작용에 의해 고분자 나노입자 표면의 폴리아르기닌은 분해되며, 고분자 나노입자와 자성나노입자간의 표면 전하 차가 발생하여 정전기적 상호작용에 의하여 회합이 일어난다. 이에 따라 고분자 나노입자에서 자성나노입자로 에너지 전이에 의해 고분자 나노입자 자체의 형광은 감소하게 된다.
- [0062] 또한, 고분자 나노입자와 자성나노입자의 회합에 의하여 전체 입자 크기가 커지게 되고 이로 인하여 자성나노입자의 형이완시간도 감소하게 된다. 이러한 이중변화 즉, 형광의 감소 및 형이완시간의 감소를 통해 트립신을 감지 할 수 있다.
- [0063] 또한, 카텝신에 의해 분해되는 폴리라이신은 본 발명에 따른 화학식 1과 2의 공액화 고분자로 제조한 고분자 나노입자 표면에 정전기적 인력에 의하여 도입된다. 이러한 고분자 나노입자는 표면에 도입된 폴리라이신의 영향으로 양전하를 띄게 된다.
- [0064] 또한, 자성나노입자는 형이완시간의 변화를 관찰하고자 Fe_3O_4 를 이용하였고 이 자성나노입자의 표면은 카복시기로 처리 되어있기 때문에 고분자 나노입자와 다르게 음전하를 띤다.
- [0065] 상기 두 나노입자, 즉 고분자 나노입자와 자성나노입자를 물 안에서 혼합하면 서로 다른 전하로 인하여 상호 인력이 생겨 나노 하이브리드화를 이룬다. 이 복합체에 일정농도의 카텝신을 넣게 되면 카텝신의 효소 작용에 의해 고분자 나노입자 표면의 폴리라이신은 분해되며, 고분자 나노입자와 자성나노입자간의 표면 전하 차가 발생하여 정전기적 반발력에 의하여 하이브리드의 분해가 일어난다. 이에 따라, 고분자 나노입자에서 자성나노입자로의 에너지 전이가 사라져 고분자 나노입자 자체 형광이 증가하게 된다. 또한, 고분자 나노입자와 자성나노입자의 회합에 의하여 전체 입자 크기가 커지게되고, 이로 인하여 자성나노입자의 감소된 형이완시간은 카텝신의 처리에 의해 전체 입자 크기는 작아지게 되고, 이에 따라 형이완시간은 증가하게 된다. 이러한 이중변화 즉, 형광의 증가 및 형이완시간의 증가를 통해 카텝신을 감지 할 수 있다. 또한, 세포 내에서 이 신호의 변화를 감지할 수 있기 때문에, 카텝신이 과발현되는 암세포를 감지하는 바이오 분야에서 센서 및 이미징으로 활용할 수 있다.
- [0066] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 예시적인 목적일 뿐 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0067] **[제조예] 공액화 고분자 화합물의 제조**
- [0068] **[제조예 1] 주쇄에 플루오렌을 갖는 공액화 고분자 화합물** (화학식 1, $\text{R}_1=\text{R}_2=-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, $\text{Ar}=4-(\text{비}$

스페닐아미노)벤즈알데하이드)의 제조

[0069] 4-(비스(4-브로모페닐)아미노)벤즈알데하이드 0.215 g (0.5 mmol)과 9,9-다이옥틸플루오렌2,7-다이보로닉엑시드 비스(1,3-프로페인다이올)에스터 0.335 g (0.6 mmol)과 그리고 테트라키스(트리페닐포스핀)팔라듐 촉매 0.047 g (0.04 mmol)을 습기가 제거된 8 mL의 톨루엔과 4 mL의 2M K₂CO₃의 혼합용액에 용해시키고, 90℃에서 40시간동안 환류하였다. 반응 후, 상온으로 냉각하고 메탄올에 부어 석출시킨 다음 석출물을 여과하였다. 여과하여 얻어진 석출물은 수평균 분자량이 10,000이상인 공액화 고분자 화합물을 얻었다.

[0070] ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ=9.8(1H, 알데하이드기), 7.7~6.6(18H, 방향족), 4.2~3.7(4H, 알킬기), 3.7~3.3(12H, 알킬기), 3.0~2.6(8H, 알킬기), 2.1~1.7(4H, 알킬기), 1.6~1.0(6H, 알킬기) ppm

[제조에 2] 주쇄에 페닐렌을 갖는 공액화 고분자 화합물 (화합식 2, R₁=R₂=-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃, Ar=4-(비스페닐아미노)벤즈알데하이드)의 제조

[0072] 4-(비스(4-브로모페닐)아미노)벤즈알데하이드 0.215 g (0.5 mmol)과 2,5-비스(옥틸록시)벤젠-1,4-다이보로닉엑시드 비스(1,3-프로페인다이올)에스터 0.347 g (0.6 mmol)과 그리고 테트라키스(트리페닐포스핀)팔라듐 촉매 0.047 g (0.04 mmol)을 습기가 제거된 8 mL의 톨루엔과 4 mL의 2M K₂CO₃의 혼합용액에 용해시키고, 90℃에서 40시간동안 환류하였다. 반응 후, 상온으로 냉각하고 메탄올에 부어 석출시킨 다음 석출물을 여과하였다. 여과하여 얻어진 석출물은 수평균 분자량이 10,000이상인 공액화 고분자 화합물을 얻었다.

[0073] ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ=9.8(1H, 알데하이드기), 7.6~6.8(14H, 방향족), 4.2~3.8(4H, 알킬기), 3.6~3.3(12H, 알킬기), 3.0~2.8(8H, 알킬기), 2.1~1.7(4H, 알킬기), 1.6~1.2(6H, 알킬기) ppm

[제조에 3] 공액화 고분자 화합물을 이용한 고분자 나노입자의 제조

[0075] 상기 제조에 1 및 2에서 제조한 공액화 고분자 화합물을 THF를 이용하여 1 mg/mL의 농도로 1 mL를 만든 후, 초음파 분해욕에서 12 mL의 3차 증류수가 담긴 비커에 빠르게 주사기로 주입하여 재침전에 의해 구형의 고분자 나노입자를 제조하였다. 초기에 첨가된 1 mL의 THF는 질소를 이용하여 증발시키고, 0.45 m 크기의 기공을 갖는 주사기 필터를 이용하여 크게 형성된 회합체를 제거하였다. 상기 방법을 통하여 제조된 고분자 나노입자를 전자현미경으로 분석한 결과, 농도에 따라 약 50-80 nm의 크기를 갖는 것을 확인하였다. 또한, 제타전위를 측정하여 -20 ~ -30 mV 사이의 음전하를 띄는 것을 확인하였다.

[제조에 4] 공액화 고분자 화합물로 만든 고분자 나노입자의 표면에 폴리아르기닌의 도입

[0077] 상기 제조에 3에서 제조한 공액화 고분자 나노입자의 표면에 폴리아르기닌을 도입하기 위하여, 초음파 분해욕에 있는 고분자 나노입자 수분산액 12 mL에 폴리아르기닌(1 mg/mL)의 1 mL를 주입한 후, 1 시간동안 초음파 분해욕에서 방치하였다. 이렇게 표면처리 된 고분자 나노입자는 0.45 m 크기의 기공을 갖는 주사기 필터를 이용하여 큰 회합체를 제거하였다. 상기의 방법을 통하여 표면처리가 된 고분자 나노입자의 제타전위를 측정한 결과, 5 ~ 20 mV 사이의 양전하를 띄는 것을 확인할 수 있다.

[제조에 5] 공액화 고분자 화합물로 만든 고분자 나노입자의 표면에 폴리라이신의 도입

[0079] 상기 제조에 3에서 제조한 공액화 고분자 나노입자의 표면에 폴리라이신을 도입하기 위하여, 초음파 분해욕에 있는 고분자 나노입자 수분산액 12 mL에 폴리라이신(1 mg/mL)의 1 mL를 주입한 후, 1 시간동안 초음파 분해욕에서 방치하였다. 이렇게 표면처리 된 고분자 나노입자는 0.45 m 크기의 기공을 갖는 주사기 필터를 이용하여 큰 회합체를 제거하였다. 상기의 방법을 통하여 표면처리가 된 고분자 나노입자의 제타전위를 측정한 결과, 5 ~ 25 mV 사이의 양전하를 띄는 것을 확인하였다.

- [0080] [제조예 6] 폴리아르기닌이 도입된 고분자 나노입자와 음전하를 갖는 자성나노입자의 나노하이브리드 제조
- [0081] 제조예 4에 의하여 제조한 폴리아르기닌이 표면에 도입된 공액화 고분자 나노입자 수분산액 2 mL를 초음파 분해 욕에 위치하고, 자성나노입자 수분산액 1 mL를 한시간에 걸쳐 천천히 첨가 한다. 폴리아르기닌이 도입된 공액화 고분자 나노입자는 표면의 전하가 양전하를 갖고 자성나노입자는 음전하를 갖기 때문에 두 물질간의 정전기적 상호 인력으로 인하여 나노하이브리드가 잘 형성된다.
- [0082] [제조예 7] 폴리라이신이 도입된 고분자 나노입자와 음전하를 갖는 자성나노입자의 나노하이브리드 제조
- [0083] 제조예 5에 의하여 제조한 폴리라이신이 표면에 도입된 공액화 고분자 나노입자 수분산액 2 mL를 초음파 분해 욕에 위치하고, 자성나노입자 수분산액 1 mL를 한시간에 걸쳐 천천히 첨가 한다. 폴리아르기닌이 도입된 공액화 고분자 나노입자는 표면의 전하가 양전하를 갖고 자성나노입자는 음전하를 갖기 때문에 두 물질간의 정전기적 상호 인력으로 인하여 나노하이브리드가 잘 형성된다.
- [0084] [실시예 1] 폴리아르기닌이 표면에 도입된 공액화 고분자 나노입자와 음전하를 갖는 자성나노입자 나노하이브리드의 트립신 센서로의 성능 평가
- [0085] 제조예 6에 의하여 제조한 폴리아르기닌이 도입된 공액화 고분자 나노입자와 음전하를 갖는 자성나노입자의 수분산액에, 트립신을 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 총 6가지 농도가 다른 용액을 만들어 60분 동안 노출시킨 후, 형광광도계를 이용하여 형광의 변화를 측정하였다.
- [0086] 형광광도계에 의한 형광을 측정한 결과, 트립신의 농도를 0 $\mu\text{g/mL}$ 에서 60 $\mu\text{g/mL}$ 으로 증가시킬수록 공액화 고분자 나노입자의 형광이 490 nm에서 589 % 증가하는 것을 확인하였다.
- [0087] 또한, 트립신이 60 $\mu\text{g/mL}$ 노출된 제조예 5의 나노하이브리드를 자기공명장치를 이용하여 횡이완시간(T_2 , transverse relaxation time)을 측정한 결과, 트립신의 유무에 따라, 횡이완시간이 28.98 $\text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$ 에서 56.34 $\text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$ 로 194 % 증가하는 것을 확인하였다.
- [0088] [실시예 2] 폴리라이신이 표면에 도입된 공액화 고분자 나노입자와 음전하를 갖는 자성나노입자 나노하이브리드의 카텝신 센서로의 성능 평가
- [0089] 제조예 7에 의하여 제조한 폴리라이신이 도입된 공액화 고분자 나노입자와 음전하를 갖는 수분산액에, 카텝신을 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 총 6가지 농도가 다른 용액을 만들어 60분 동안 노출시킨 후, 형광광도계를 이용하여 형광의 변화를 측정하였다.
- [0090] 형광광도계에 의한 형광을 측정한 결과, 트립신의 농도를 0 $\mu\text{g/mL}$ 에서 60 $\mu\text{g/mL}$ 으로 증가시킬수록 공액화 고분자 나노입자의 형광이 490 nm에서 795 % 증가 하는 것을 확인하였다.
- [0091] 또한, 카텝신이 60 $\mu\text{g/mL}$ 노출된 제조예 7의 수분산액의 자기공명장치를 이용하여 횡이완시간(T_2 , transverse relaxation time)을 측정한 결과, 카텝신의 유무에 따라, 횡이완시간이 26.32 $\text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$ 에서 59.48 $\text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$ 로 226 % 증가 하는 것을 확인하였다.
- [0092] [실시예 3] 폴리라이신이 표면에 도입된 공액화 고분자 나노입자와 자성나노입자 나노하이브리드의 HeLa 세포내에서 카텝신 센서 성능 평가
- [0093] 상기 제조예 7에서 제조한 나노하이브리드 20 μL 를 HeLa 세포에 37℃ 에서 같이 배양시킨 후, 1, 2, 그리고 4시간이 경과하고 세포내 형광 사진을 통해 감지하였다.
- [0094] 형광 사진을 통하여 확인한 결과, 나노하이브리드가 세포내의 카텝신과 반응에 의해 세포질 내에서 형광을 내는 것을 확인하였으며, 카텝신과 반응에 따라, 횡이완시간이 증가 하는 것을 확인하였다.

- [0095] **[실시예 4] 폴리라이신이 표면에 도입된 공액화 고분자 나노입자와 자성나노입자 나노하이브리드의 MCF-7 세포 내에서 카텡신 센서 성능 평가**
- [0096] 상기 제조예 7에서 제조한 나노하이브리드 20 μL 를 MCF-7 세포에 37°C 에서 같이 배양시킨 후, 1, 2, 그리고 4 시간이 경과하고 세포내 형광 사진을 통해 감지하였다.
- [0097] 형광 사진을 통하여 확인한 결과, 나노하이브리드가 세포내의 카텡신과 반응에 의해 세포질 내에서 형광을 내는 것을 확인하였으며, 카텡신과 반응에 따라, 형이완시간이 증가 하는 것을 확인하였다.
- [0098] **[비교예 1] 트립신 대비 다른 분해 효소에 대한 감지 성능 평가**
- [0099] 제조예 6에 의하여 제조한 폴리아르기닌이 도입된 공액화 고분자 나노입자와 자성나노입자 나노하이브리드 수분산액에, 일반 단백질인 보빈 세럼 알부민과 다른 종류의 효소 단백질인 펩신, 글루코즈 옥시데이즈, 트롬빈과 라이소자임을 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 넣은 후, 60분 동안 노출시킨 후, 형광광도계를 이용하여 형광의 변화를 측정하였다.
- [0100] 형광광도계에 의한 형광을 측정한 결과, 상기의 모든 효소 및 단백질을 첨가하였을 때 490 nm에서의 형광이 거의 변화가 없다.
- [0101] 또한 펩신, 글루코즈 옥시데이즈, 트롬빈과 라이소자임이 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 노출된 제조예 6의 수분산액의 자기공명장치를 이용하여 형이완시간을 측정한 결과, 상기의 모든 효소 및 단백질의 유무에 따라, 형이완시간의 변화가 없다.
- [0102] 이상의 결과로 보아 제조된 폴리아르기닌이 도입된 공액화 고분자 나노입자와 자성나노입자 나노하이브리드는 트립신의 존재와 농도에 따라 형광강도의 변화가 나타나고, 자성나노입자의 크기 변화에 의한 형이완시간의 변화를 나타내는 이중감지를 통하여 트립신에 대하여 선택적인 화학/바이오센서로 이용될 수 있음을 확인할 수 있다.
- [0103] **[비교예 2] 카텡신 대비 다른 분해 효소에 대한 감지 성능 평가**
- [0104] 제조예 7에 의하여 제조한 폴리라이신이 도입된 공액화 고분자 나노입자와 자성나노입자 나노하이브리드의 수분산액에, 일반 단백질인 보빈 세럼 알부민과 다른 종류의 효소 단백질인 펩신, 글루코즈 옥시데이즈, 트롬빈과 라이소자임을 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 넣은 후, 60분 동안 노출시킨 후, 형광광도계를 이용하여 형광의 변화를 측정하였다.
- [0105] 형광광도계에 의한 형광을 측정한 결과, 상기의 모든 효소 및 단백질을 첨가하였을 때 490 nm에서의 형광이 거의 변화가 없다.
- [0106] 또한 펩신, 글루코즈 옥시데이즈, 트롬빈과 라이소자임이 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 노출된 제조예 7의 수분산액의 자기공명장치를 이용하여 형이완시간을 측정한 결과, 상기의 모든 효소 및 단백질의 유무에 따라, 형이완시간의 변화가 없다.
- [0107] 이상의 결과로 보아 제조된 폴리라이신이 도입된 공액화 고분자 나노입자와 양전하를 갖는 자성나노입자 복합체는 카텡신의 존재와 농도에 따라 형광강도의 변화가 나타나고, 자성나노입자의 크기 변화에 의한 형이완시간의 변화를 나타내는 이중감지를 통하여 카텡신에 대하여 선택적인 화학/바이오센서로 이용될 수 있음을 확인할 수 있다.
- [0108] **[비교예 3] 폴리라이신이 표면에 도입된 공액화 고분자 나노입자와 자성나노입자 나노하이브리드의 HeLa 세포 내에서 억제제가 배양된 상태에서 성능 평가**
- [0109] HeLa 세포에 37°C 에서 카텡신 억제제를 1시간동안 배양시킨 후, 상기 제조예 7에서 제조한 나노하이브리드 20 μL 를 이 HeLa 세포에 37°C 에서 같이 배양시킨 후, 1, 2, 그리고 4시간이 경과하고 세포내 형광 사진을 통해 감지하였다.
- [0110] 형광 사진을 통하여 확인한 결과, 나노하이브리드가 세포내의 억제제에 의해 카텡신과 반응하지 못해 세포질 내

에서 형광이 나지 않는 것을 확인하였다.