



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0088598
(43) 공개일자 2016년07월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/543 (2006.01) G01N 21/47 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/54326 (2013.01)
G01N 21/47 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0007872
(22) 출원일자 2015년01월16일
심사청구일자 2015년10월05일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김영근
서울특별시 강남구 압구정로61길 37, 72동 1109호 (압구정동, 한양아파트)
이지성
서울특별시 성북구 보문로 34다길 25, 305호 (동선동3가)
함우승
서울특별시 강남구 남부순환로 365길 39, 5층 (도곡동)
(74) 대리인
특허법인충현

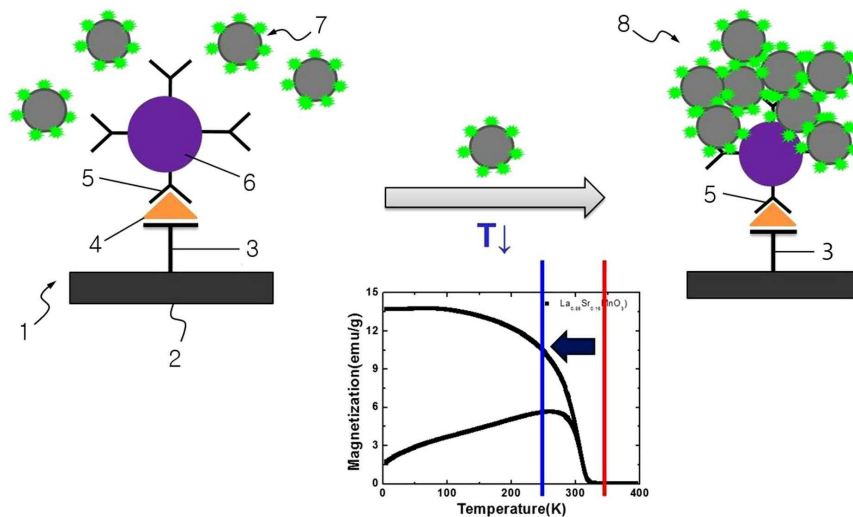
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 회토류 금속산화물 나노입자를 이용한 생체 물질 검지 시스템 및 이것을 이용한 검지 방법

(57) 요약

본 발명은 포집 항체가 기관에 고정된 검지 장치; 검지 항체가 부착된 강자성 나노입자; 및 형광물질이 부착된 회토류 금속산화물 나노입자를 포함하는 재사용가능한 생체 물질 검지 시스템에 관한 것으로서, 체온 부근에서 큐리온도를 갖는 회토류 금속산화물 나노입자를 이용하여 비특이적 결합 감소와 신호증폭을 동시에 만족하면서, 검지 이후 재사용이 가능한 생체 물질 검지 시스템을 제공할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/54346 (2013.01)

G01N 33/582 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014011889

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (이공)중견연구자지원_도약연구

연구과제명 금속 및 산화물 기반 차원융합 나노플랫폼 핵심기술 연구

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교

연구기간 2014.05.01 ~ 2015.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

포집 향체가 기관에 고정된 검지 장치; 검지 향체가 부착된 강자성 나노입자; 및 형광물질이 부착된 희토류 금속산화물 나노입자를 포함하고, 상기 희토류 금속산화물 나노입자는 자성권이 온도 제어가 가능한, 재사용가능한 생체 물질 검지 시스템.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 희토류 금속산화물 나노입자는 섭씨 30 내지 40도의 온도 범위에서 큐리온도를 갖는 것을 특징으로 하는 생체 물질 검지 시스템.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 시스템을 큐리 온도 이하로 냉각시키면, 상기 형광물질이 부착된 희토류 금속산화물 나노입자와 상기 검지 향체가 부착된 강자성 나노입자가 결합하여 집적체를 형성하는 것을 특징으로 하는 생체 물질 검지 시스템.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 시스템을 큐리 온도 이상으로 가열하면, 상기 형광물질이 부착된 희토류 금속산화물 나노입자와 상기 검지 향체가 부착된 강자성 나노입자가 분리되는 것을 특징으로 하는 생체 물질 검지 시스템.

청구항 5

재사용가능한 생체 물질의 검지 방법으로서,

- (i) 포집 향체가 기관에 고정된 검지 장치를 준비하는 단계;
- (ii) 분석하고자 하는 시료를 검지 장치에 투입하는 단계;
- (iii) 검지 향체가 부착된 강자성 나노입자를 투입하여 항원을 검지하는 단계;
- (iv) 자석을 이용하여 검지 장치 내의 강자성 나노입자를 자화시키는 단계;
- (v) 형광물질이 부착된 나노입자를 상기 검지 장치에 투입하는 단계;
- (vi) 검지 장치를 냉각하여 그 온도를 낮추는 단계;
- (vii) 형광물질이 부착된 나노입자가 검지 향체가 부착된 강자성 나노입자와 집적체를 형성하여 검지되는 단계를 포함하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 생체 물질을 검지한 후에 다시 온도를 높여서 나노입자를 재수집함으로써 재사용하는 것을 특징으로 하는 생체 물질 검지 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 생체 물질 검지 시스템에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 체온 부근에서 자성천이 온도 제어가 가능한 나노입자를 이용한 생체 물질 검지 시스템에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 현재 나노기술과 바이오 기술에서 면역검지방법은 비약적인 발전을 이루고 있다. 하지만 이러한 면역검지방법의 경우, 비특이적 결합을 줄임과 신호증폭을 통한 민감도 향상을 동시에 만족시키기는 어려운 것으로 평가되고 있다. 현재 생체체제의 검지기술은 효소면역측정법(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)을 기반으로 하고 있는데, 이 방법의 경우 생체체제의 검지를 위하여 항체를 ELISA 기관위에 고정시킨 후 항원과 결합시킨다. 이후 1차 항체를 항원과 결합시키고 1차 항체와 결합할 수 있는 2차 항체를 결합시킨다. 그 후 기질을 이용하여 형광신호를 얻음으로써 검지를 실행할 수 있다. 이러한 과정에서 항원-항체의 특이적 반응뿐만이 아닌 항체-항체 또는 1차 항체-기질 등의 비특이적 반응은 오진을 발생시킬 위험을 내포하고 있다.
- [0003] 한편 나노 자성체는 온열치료, 생체 물질과의 결합을 통한 자성분리 및 약물전달 등의 여러 가지 바이오 분야에 이용되고 있다. 이러한 분야 중에서 특히 자성나노입자를 이용하여 단백질 및 생체체제를 검지하는 기술에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 자성나노입자는 제조가 간단하며, 그 표면을 카르복실기(carboxylic group)나 아민기(amine group) 등으로 수식하기가 용이하여 생체분자를 표면에 부착하기 용이하다. 따라서 이러한 이유로 인하여, 고감도 진단분석 분야에서 그 적용이 무한한 가능성을 지니고 있다고 할 수 있다.
- [0004] 기존 선행발명으로서, 미국 특허출원 제2012-438049호는 금나노입자를 이용하여 측방유동검지(lateral flow assay) 방식으로 생체 물질을 검지하는 방법에 관하여 개시하고 있으나, 본 발명에서는 강자성(ferromagnetic)을 갖는 마그네타이드(Fe_3O_4) 나노입자와 형광체가 붙은 희토류 금속산화물 $\text{La}_{(1-x)}\text{Sr}_x\text{MnO}_3$ (이하 LSMO라 칭함) 나노입자를 이용하여 검지 시스템의 온도를 LSMO 입자의 큐리온도(Curie temperature) 이하로 낮춤으로써 LSMO 나노입자가 자성을 띄게 되어, 두 나노입자가 결합하여 검지신호를 증폭시키는 검지방법이다.
- [0005] 또한, 미국 특허출원 제2008-2055995호는 검출 표면과 분해물질을 위한 분석에서 검지 표면을 재사용할 수 있는 발명을 개시하고 있으나, 본 발명에서는 검지 표면의 재사용 보다는 형광체가 붙어있는 나노입자를 재사용 할 수 있다는 차이가 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0006] (특허문헌 0001) 미국 특허출원 제2012-438049호
(특허문헌 0002) 미국 특허출원 제2008-2055995호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 목적은 상온에서 큐리온도를 갖는 희토류 금속산화물 나노입자를 이용하여 비특이적 결합 감소와 신호증폭을 동시에 만족하면서, 검지 이후 재사용이 가능한 생체 물질 검지 시스템을 제공하고자 하는 것이다.
- [0008] 또한, 본 발명의 다른 목적은 기관에 고정된 포집 항체 및 강자성 나노입자가 구비된 검지 장치를 이용하여 목적하는 생체 물질을 검지하는 효율적인 검지 방법을 제공하고자 하는 것이다.

[0009] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 검지 후, 체온 부근에서 큐리온도를 갖는 희토류 금속산화물 나노입자를 채수 집하여 재사용가능한 생체 물질 검지 방법을 제공하고자 하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명의 대표적인 구체예에 따르면, 포집 항체가 기관에 고정된 검지 장치; 검지 항체가 부착된 강자성 나노입자; 및 형광물질이 부착된 희토류 금속산화물 나노입자를 포함하는 재사용가능한 생체 물질 검지 시스템을 제공한다.

[0011] 상기 희토류 금속산화물 나노입자는 자성천이 온도 제어가 가능하다.

[0012] 상기 희토류 금속산화물 나노입자는 섭씨 30 내지 40도의 온도 범위에서 큐리온도를 갖는다.

[0013] 상기 시스템을 큐리온도 이하로 냉각시키면, 형광물질이 부착된 희토류 금속산화물 나노입자와 상기 강자성 나노입자가 결합하여 집적체를 형성한다.

[0014] 상기 시스템을 큐리온도 이상으로 가열하면, 형광물질이 부착된 희토류 금속산화물 나노입자는 상기 강자성 나노입자로부터 분리된다.

[0015] 본 발명의 또 다른 구체예에 따르면, 재사용가능한 생체 물질의 검지 방법을 제공하며, 다음 단계를 포함한다:

[0016] (i) 포집 항체가 기관에 고정된 검지 장치를 준비하는 단계;

[0017] (ii) 분석하고자 하는 시료를 검지 장치에 투입하는 단계;

[0018] (iii) 표면에 검지 항체가 수식된 강자성 나노입자를 상기 검지 장치에 투입하는 단계;

[0019] (iv) 자석을 이용하여 검지 장치 내의 강자성 나노입자를 자화시키는 단계;

[0020] (v) 상온에서 형광물질이 부착된 희토류 금속산화물 나노입자를 검지 장치에 투입하는 단계;

[0021] (vi) 검지 장치를 냉각하여 그 온도를 낮추는 단계; 및

[0022] (vii) 형광물질이 부착된 희토류 금속산화물 나노입자가 상기 강자성 입자와 결합하여 집적체를 형성하여 검지 되는 단계.

[0023] 상기 생체 물질을 검지한 후에 다시 온도를 높임으로써 형광이 부착된 희토류 금속산화물 나노입자를 채수집함으로 상기 검지 장치를 재사용할 수 있다.

발명의 효과

[0024] 본 발명에 따른 생체 물질 검지 장치 및 이것을 이용한 검지 방법은 생체 물질의 자성검지, 자성분리 및 전달 등의 분야에서 신호증폭과 같은 강자성 특성이 요구되는 경우에만 그 특성을 활용할 수 있도록 온도를 사용하여 자성특성을 제어함으로써 기존의 항원-항체 검지 시스템에서 일어나는 비특이적 결합을 줄일 뿐 아니라, 형광신호를 급격히 증폭시킬 수 있어 민감도 및 특이성이 향상되는 효과를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 본 발명의 일 구체예에 따른 검지 시스템 및 이것의 검지 방법을 나타내는 모식도이다.

도 2는 형광현미경으로 희토류 금속산화물(LSMO) 나노입자의 강자성 입자 주위로의 응집을 관찰한 이미지이다.

도 3은 동적광산란법(dynamic light scattering)을 이용하여 수용액 내에 나노입자의 유체역학적 입도(hydrodynamic diameter)를 측정한 그래프이다.

도 4는 실제로 항원의 농도와 형광값 간의 관계를 나타낸 그래프이다.

도 5는 검지 및 가열 후 나타나는 형광값을 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명한다.

본 발명은 항체를 이용하여 표면을 수식한 강자성 나노입자와 항원간의 결합을 이용하여 강자성 입자를 바닥에 고정시킨 뒤, 형광이 표면에 수식되어 있고, 체온의 범위에서 큐리온도를 갖는 희토류 금속산화물 나노입자를 넣어 큐리온도 이하로 온도를 낮추어 이 나노입자가 자성을 뿜에 따라, 강자성 입자 주위로 뭉치는 효과를 이용하여 생체 물질을 검지하는 기술이며, 또한 검지 이후에 기판을 큐리온도 이상으로 가열함으로써 나노입자를 재채집하여 재사용이 가능한 기술에 관한 것이다.

본 발명의 일 구체예는, 포집 항체가 기판에 고정된 검지 장치; 검지 항체가 부착된 나노입자; 및 형광물질이 부착된 희토류 금속산화물 나노입자를 포함하는 재사용가능한 생체 물질 검지 시스템을 제공한다.

상기 희토류 금속산화물 나노입자는 자성천이 온도 제어가 가능하고,

상기 희토류 금속산화물 나노입자는 체온의 범위에서 큐리온도를 갖는다.

상기 희토류 금속산화물 나노입자는 그 표면이 검지 항체로 수식되어 있다.

상기 검지 시스템은 큐리 온도 이하로 냉각시키면 강자성 나노입자와 형광물질이 결합된 나노입자가 집적체를 형성하는 것을 특징으로 한다.

상기 검지 시스템은 큐리 온도 이상으로 가열하면 강자성 나노입자와 형광물질이 결합된 나노입자가 분리되는 것을 특징으로 한다.

상기 희토류 금속산화물 나노입자는 $\text{La}_{(1-x)}\text{Sr}_x\text{MnO}_3$, LaSrGdMnO_3 , Gd , LaCaMnO_3 , $\text{MnFeP}_{(1-x)}\text{As}_x$ 으로 구성된 체온 근처에서 큐리온도를 가지는 물질군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 한다.

상기 형광물질은 로다민 및 그의 유도체, 쿠마린 및 그의 유도체, 아크리딘 및 그의 유도체, 피렌 및 그의 유도체, 에리트로신 및 그의 유도체로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 한다.

상기에서 검지되는 생체 물질은 DNA, RNA 등 핵산들과 및 트로포닌(troponin), PSA(prostate specific antigen), CA 19-9 (pancreatic cancer antigen) 등의 단백질 마커 등이다.

포집 항체는 항원을 기판에 결합시키기 위하여 매개체로 사용되는 항체이며, 검지 항체는 상기 강자성 입자에 결합되어 직접적인 검지를 위해 사용되는 항체이다. 포집 항체와 검지 항체는 동일할 수도 있고 상이할 수도 있다.

도 1을 참조하여 본 발명에 따른 시스템을 설명한다. 본 발명에 따른 검지 장치(1)의 기판(2) 위에 포집 항체(3)가 고정되어 있다. 검지하고자 하는 생체 물질(4)이 포집 항체(3)와 결합하게 되면, 생체 물질을 인식하는 검지 항체(5)가 결합된 강자성 나노입자(6)와 결합하게 된다. 그리고, 큐리 온도 이하로 온도를 낮춰주게 되면, 형광물질이 결합된 희토류 금속산화물 나노입자(7)가 검지 항체가 결합된 강자성 나노입자(6) 주변으로 모여들어 집적체(8)를 이루게 된다.

또한, 본 발명의 다른 구체예는 재사용가능한 생체 물질의 검지 방법에 관한 것으로서, 다음 단계를 포함한다:

(i) 포집 항체가 기판에 고정된 검지 장치를 준비하는 단계;

(ii) 분석하고자 하는 시료를 검지 장치에 투입하는 단계;

(iii) 검지 항체가 부착된 강자성 나노입자를 투입하여 항원을 검지하는 단계;

- [0043] (iv) 자석을 이용하여 검지 장치 내의 강자성 나노입자를 자화시키는 단계;
- [0044] (v) 형광물질이 부착된 회토류 금속산화물 나노입자를 상기 검지 장치에 투입하는 단계;
- [0045] (vi) 검지 장치를 냉각하여 그 온도를 낮추는 단계;
- [0046] (vii) 형광물질이 부착된 회토류 금속산화물 나노입자가 검지 항체가 부착된 강자성 나노입자와 집적체를 형성하여 검지되는 단계를 포함하는 방법.
- [0047] 또한, 상기 생체 물질을 검지한 후에 다시 온도를 높임으로써 상기 검지 장치를 재사용할 수 있다.
- [0048] 상기 검지 항체는 입자 표면의 카르복실기와 항체의 아민기를 연결하기 위하여 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) 를 이용한 반응을 통하여 강자성 나노입자의 표면에 부착된다.
- [0049] 상기 (iv) 단계에서 자석은 자화도가 1000 Oe 내지 30000 Oe 인 것으로 상기 강자성 입자를 완전히 자화시켜 잔류자화를 가지는 상태를 만들 수 있는 것을 특징으로 한다. 강자성 입자를 충분히 자화도가 큰 자석으로 자화시켜 강자성 입자가 충분히 자화되어 자화값이 포화자화 값을 가지게 되고, 자석을 떼게 되면 강자성 입자는 잔류자화를 가지게 되어 마치 영구자석과 같은 상태가 되게 된다. 기판에 나노구조체와 함께 고정되어 있는 강자성 입자를 자화시키기 위해서는 기판 아래에 세기가 1000 Oe 내지 30000 Oe 인 전자석, 막대자석 등을 일정시간 접촉하였다 떼는 방법을 이용하여 기판 내 나노구조체의 강자성 입자를 자화시키는 것이 가능하다.
- [0050] 상기 (v) 단계에서 온도를 낮춰주게 되면, 자성나노입자는 강자성 입자에 끌려가게 되어, 집적체를 형성하게 되며, 형광의 세기가 매우 강하게 나타난다.
- [0051] 이하에서 실시예 등을 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 하며, 다만 이하에 실시예 등에 의해 본 발명의 범위와 내용이 축소되거나 제한되어 해석될 수 없다. 또한, 이하의 실시예를 포함한 본 발명의 개시 내용에 기초한다면, 구체적으로 실험 결과가 제시되지 않은 본 발명을 통상의 기술자가 용이하게 실시할 수 있음은 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속하는 것도 당연하다.
- [0052] 실시예 1: 항체가 수식된 강자성 입자의 제조
- [0053] 변형된 폴리올 법(modified polyol method)를 이용하여 란타넘 스트론튬 망가니즈 옥사이드($\text{La}_{(1-x)}\text{Sr}_x\text{MnO}_3$) 나노입자를 형성한다. 이에 란타넘 아세틸아세토네이트 (lanthanum acetyl acetonate, $\text{La}(\text{acac})_3$), 스트론튬 아세틸아세토네이트 (strontium acetylacetonate, $\text{Sr}(\text{acac})_2$), 망가니즈 아세틸아세토네이트 (manganese acetylacetonate)의 전구체를 넣고, 폴리에틸렌글리콜(PEG)-폴리프로필렌글리콜(PPG)-폴리에틸렌글리콜(PEG)의 블록 공중합체 또는 폴리에틸렌옥사이드(PEO)-폴리프로필렌옥사이드(PPG)-폴리에틸렌옥사이드(PEO)의 블록 공중합체를 계면활성제로 사용하며, 1,2-헥사디케인다이올 (1,2-hexadecanediol)을 환원제로 사용한다. 이 모두를 용매제인 옥틸-에테르(octyl-ether)에 넣고 300 에서 2시간 가량 환원의 과정을 거친다. 이후 환원된 물질이 섞인 용액을 실리콘 웨이퍼에 떨어뜨려 12시간동안 900에서 산소 분위기에서 열을 가하여 나노입자를 형성시킨다. 형성된 입자는 35 에서 큐리온도를 가진다. 이를 $\text{La}_{0.85}\text{Sr}_{0.15}\text{MnO}_3$ (LSMO) 입자라 칭한다.
- [0054] 이 후 강자성 입자와 상온에서 큐리온도를 가지는 입자를 이용하여 검지 시스템을 구축한다. 상온에서 큐리 온도를 가지는 입자에 폴리아크릴 산(polyacrylic acid)을 이용하여 표면을 수식하고 이후 이를 푸트레신(putrescine)을 이용하여 형광체(fluorescence dye)와 결합한다. 또한 강자성 입자의 표면에 항체를 수식한다.
- [0055] 실시예 2: 카디악 트로포닌 I의 검지
- [0056] 기판위에 고정되어 있는 항체위에 항원이 담긴 용액을 떨어뜨려 항원-항체 반응을 통하여 항체와 심근경색 항원인 카디악 트로포닌 I (cardiac troponin I)을 결합한다. 이후 표면에 항체가 수식된 강자성 입자를 떨어뜨려 항원-항체 반응을 유도하여 기판-항체-항원-항체-강자성 입자의 나노 구조체를 형성한다. 이후 표면에 형광체가

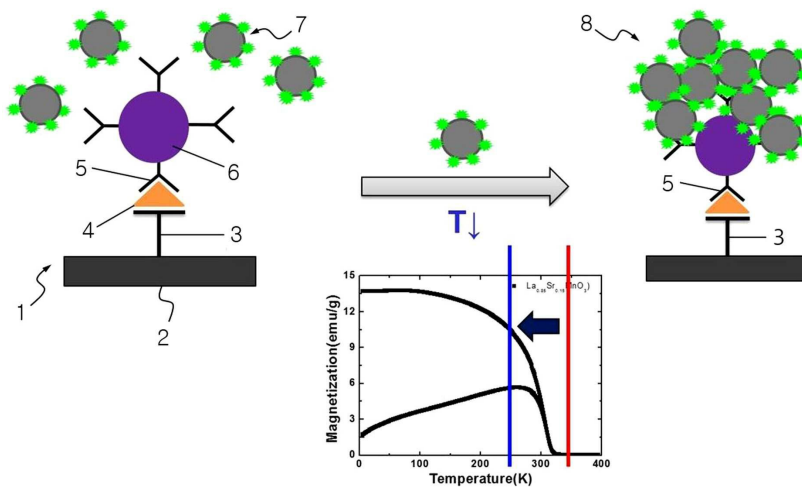
붙은 LSMO 나노입자를 떨어뜨린다. 상온에서 LSMO 나노입자는 자성을 띄지 않으므로 온도를 그 큐리온도 이하 (섭씨 35도)로 낮추어 강자성 입자 주위에 나노입자의 응집을 유도한다. 도 2은 형광현미경으로 LSMO 나노입자의 강자성 입자 주위로의 응집을 관찰한 것이다. 도 2에 나타난 빨간점의 경우와 같이, 40도에서 강자성입자와 상호작용을 하지 않으며 분산되어 있는 LSMO입자가 10도로 온도를 낮추었을 때, 도1의 오른쪽 그림과 같이 응집함을 알 수 있다. 도2에서는 동적광산란법(dynamic light scattering)을 이용하여 수용액 내에 나노입자의 유체 역학적 입도(hydrodynamic diameter)를 측정 한 것이다. 도 3에서와 같이 40도에서 분산되어 있는 LSMO와 Fe3O4 강자성 나노입자 (초록색)는 온도를 낮춤에 따라 검은 선과같이 수용액내의 입도가 증가함을 알 수 있다. 이를 통하여 10도에서 LSMO입자의 자성으로 인하여 강자성입자 주위에 응집하여 신호를 증폭하는 것이 가능함을 알 수 있다.

[0057] 실시예 3: 강자성 나노입자의 재채집

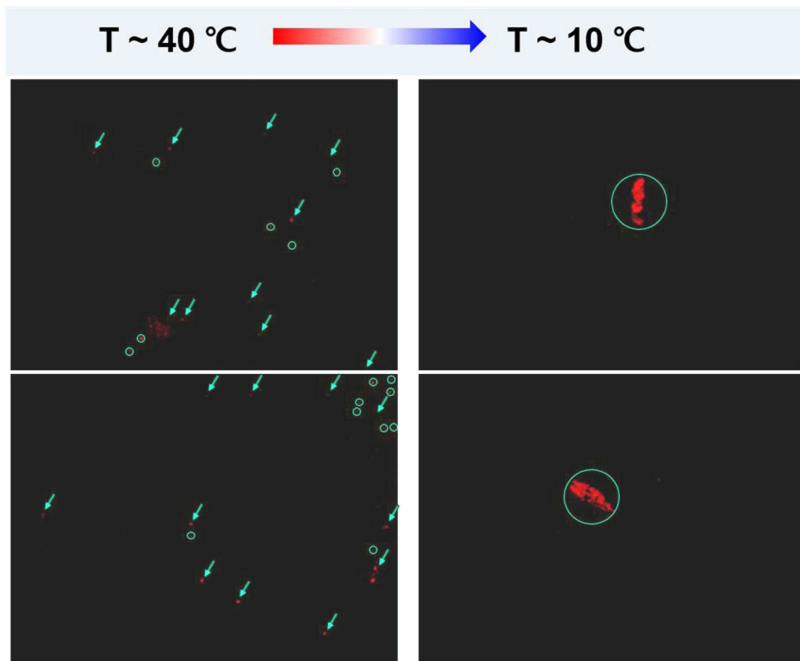
[0058] 도 4에서와 같이 실제로 항원의 농도와 형광값간의 관계를 통하여 직선의 관계를 얻을 수 있다. 농도를 실제로 아는 샘플(standard sample)을 이용하여 직선의 관계식을 그리고 추후 환자로부터 모르는 농도의 항원(빨간색 세모점)을 얻은 후 검지를 실행하여 얻어진 형광값을 직선의 관계식에 대입하여 역으로 항원의 농도를 역추적 할 수 있다. 이 시행은 0.1 ng/ml 혹은 그 이하에서 수십 ng/ml의 범위로 한정할 수 있다. 또한 도 5의 경우와 같이 검지 후, 기판을 나노입자의 큐리온도 이상으로 가열하였을 때, 나노입자는 자성을 잃고 강자성체에서 떨어져 나올 수 있으며, 가열 후 검은색 세모 점이 나타내는 바와 같이 기판은 형광값을 띄지 않는 것을 볼 수 있다. 따라서 떨어져 나온 형광체가 수식된 나노입자는 재채집이 가능하며 이에 추후 재사용이 가능하다는 경제적인점이 있다.

도면

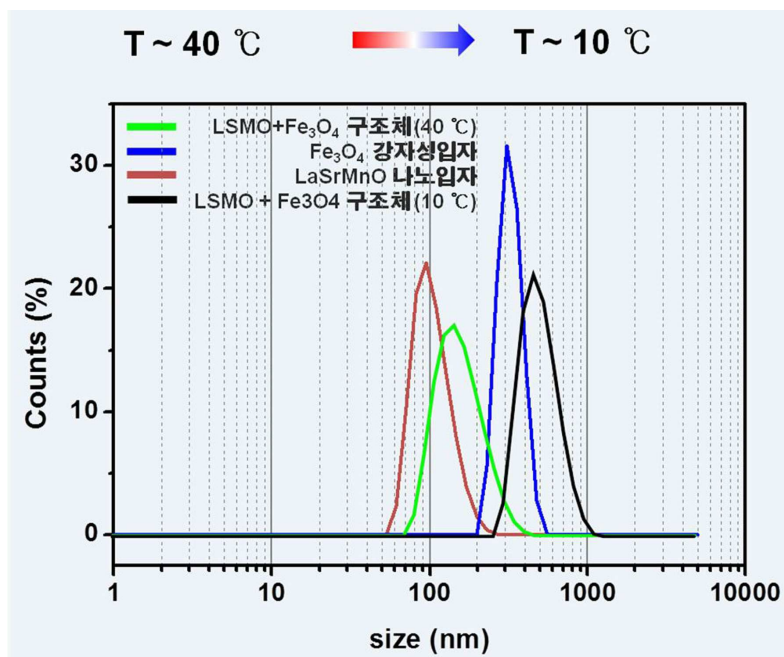
도면1



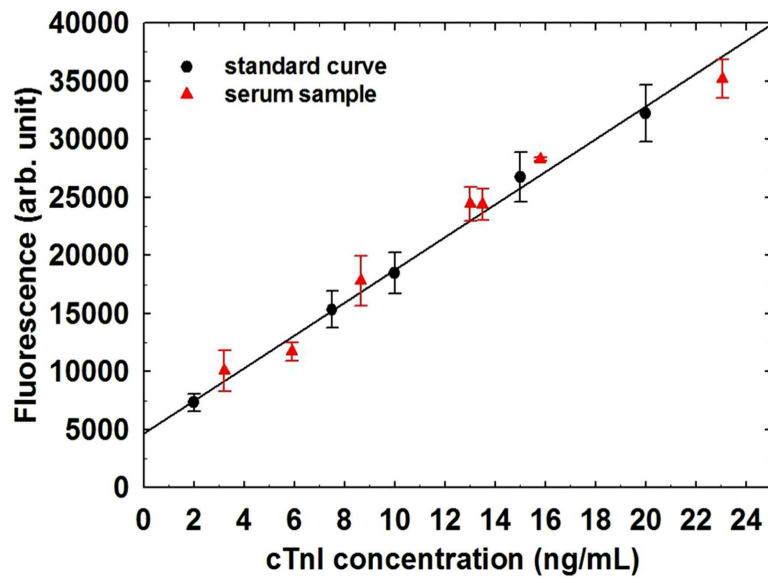
도면2



도면3



도면4



도면5

