

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 9월 14일 (14.09.2017)



(10) 국제공개번호
WO 2017/155293 A2

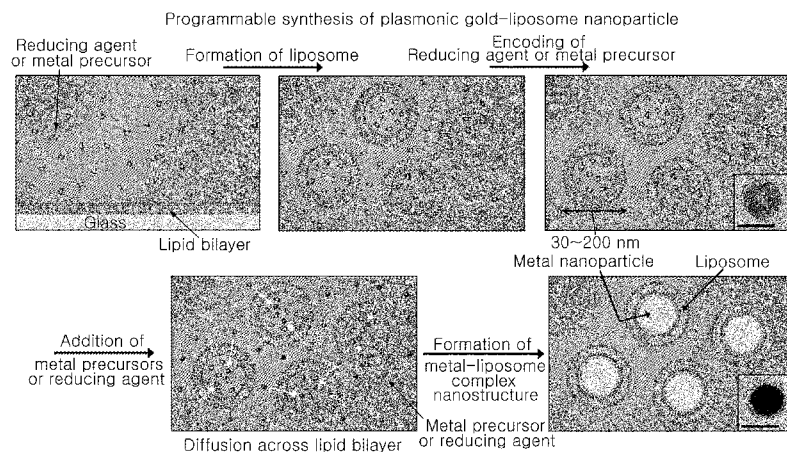
- (51) 국제특허분류:
A61K 49/18 (2006.01) A61L 27/50 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01) A61L 31/02 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01) A61L 31/14 (2006.01)
A61L 27/04 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/002485
- (22) 국제출원일: 2017년 3월 8일 (08.03.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2016-0027791 2016년 3월 8일 (08.03.2016) KR
- (71) 출원인: 서강대학교산학협력단 (SOGANG UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION) [KR/KR]; 04107 서울시 마포구 백범로 35, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 강태욱 (KANG, Taewook); 04086 서울시 마포구 창전로 45, 103 동 1502 호, Seoul (KR). 이진호 (LEE, Jin Ho); 07340 서울시 영등포구 국제금융로 7길 20, 3 동 717 호, Seoul (KR). 신용희 (SHIN, Yong Hee); 04110 서울시 마포구 백범로 10길 29, 304 호, Seoul (KR). 황금래 (WHANG, Keum Rai); 07751 서울시 강서구 강서로 20길 25, 403 호, Seoul (KR).

- (74) 대리인: 최우성 (CHOI, Woo-sung); 03151 서울시 종로구 종로 5길 58 석탄회관빌딩 10층, Seoul (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, DJ, 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, KH, KN, KP, KW, 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).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING METAL-LIPOSOME COMPLEX STRUCTURE USING PROGRAMMING TECHNIQUE, AND METAL-LIPOSOME COMPLEX STRUCTURE PRODUCED THEREBY

(54) 발명의 명칭 : 프로그래밍기법을 이용한 금속-리포솜 복합 구조체 제조 방법 및 이에 따라 제조된 금속-리포솜 복합 구조체



(57) Abstract: A metal-liposome complex structure in which a liposome forms the outer skeleton of a metal particle can be produced in the following manner: a liposome in which a reducing agent or a metal precursor is carried in advance is prepared, the metal precursor or the reducing agent is provided to the outside of the liposome to be diffused into the liposome, and a metal particle is selectively synthesized inside the liposome. Accordingly, a metal-liposome complex structure having a uniform size and a uniform shape can be produced with high yield.

(57) 요약서: 환원제나 금속 전구체가 내부에 미리 담지된 리포솜을 제조한 후 리포솜 외부에 금속 전구체 또는 환원제를 제공하여 리포솜 내부로 확산시킨 후, 리포솜 내부에서 선택적으로 금속 입자를 합성하여 리포솜이 금속 입자의 외부 골격을 이루는 금속-리포솜 복합 구조체를 제조한다. 이에 따라 크기와 형태가 일정한 금속-리포솜 복합 구조체를 높은 수율로 제조할 수 있다.

WO 2017/155293 A2

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

명세서

발명의 명칭: 프로그래밍기법을 이용한 금속-리포좀 복합 구조체 제조 방법 및 이에 따라 제조된 금속-리포좀 복합 구조체 기술분야

- [1] 본 명세서는 프로그래밍기법을 이용한 금속-리포좀 복합 구조체 제조 방법 및 이에 따라 제조된 금속-리포좀 복합 구조체에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 금속 나노 구조체는 외부에서 입사되는 특정한 파장의 빛과 상호 작용하여, 이를 집광시킴으로써 금속 나노 구조체 주변의 전자기장을 증폭시키는 효과를 지닌다. 이러한 전자기장 증폭 효과를 이용하여 촉매제, 분자 탐지, 태양에너지 집광 장치와 같이 다양한 분야에서 응용되고 있고, 특히 생체의학 분야의 경우 이러한 금속 나노 구조체를 이용한 생체 내 이미징, 모니터링 및 치료 기술의 개발이 다방면으로 이루어지고 있다.
- [3] 그러나 종래 제작되어온 금속 나노 구조체의 경우 생체 내 적용에 있어 고농도의 전해질이나 무수히 많은 생체분자들이 존재하는 생체 내와 같은 복잡한 환경에서 안정성이 떨어져 처음 제조된 상태로 존재하는 것이 쉽지 않으며, 이에 따라 본래 기능을 유지하기 힘들었다.
- [4] 또한, 세포 내로의 전달효율이 크게 떨어져, 대상 세포의 이미징이나 세포 내 분자반응을 모니터링 하는데 어려움이 있었다.
- [5] 이러한 문제점을 해결하기 위하여, 금속 나노 구조체 외부에 리포좀과 같은 물질을 결합시킨 복합 구조체를 형성하는 기술이 보고되고 있다.
- [6] 그러나, 본 발명자들의 연구 결과에 따르면, 기존 보고된 기술들의 경우 미리 제조된 금속 나노입자에 리포좀을 결합시키는 방법을 이용하는데, 이에 따라 복합 구조체의 제조가 무작위로 이루어지며 재현성 및 수율이 크게 떨어진다. 아울러, 제조된 복합 구조체의 크기와 형태도 균일하지 않아 응용이 매우 제한적이라는 문제가 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명의 예시적인 구현예들에서는, 일측면에서, 크기와 형태가 일정한 금속-리포좀 복합 구조체를 높은 수율로 제조할 수 있는 금속-리포좀 복합 구조체 제조 방법 및 이에 따라 제조된 금속-리포좀 복합 구조체를 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

- [8] 본 발명의 예시적인 구현예들에서는, 환원제 또는 금속 전구체가 미리 담지된 프로그래밍된 리포좀을 형성하는 단계; 프로그래밍된 리포좀 외부에 금속 전구체 또는 환원제를 제공하여 금속 전구체 또는 환원제가 프로그래밍된

리포좀 내부로 확산하도록 하는 단계; 및 프로그래밍된 리포좀 내부로 확산된 금속 전구체 또는 환원제와 프로그래밍된 리포좀 내부에 담지되어 있던 환원제 또는 금속 전구체로부터 프로그래밍된 리포좀 내부에서 금속 입자를 합성하여 리포좀이 금속 입자의 외부 골격을 이루는 금속-리포좀 복합 구조체를 제조하는 단계;를 포함하는 금속-리포좀 복합 구조체 제조 방법을 제공한다.

- [9] 예시적인 일 구현예에서, 상기 제조 방법은, 리포좀 내에 담지되는 물질에 유기 분자를 더 포함할 수 있다. 또한, 외부 환경으로부터 전달되는 물질에 유기 분자가 더 포함될 수 있다.
- [10] 예시적인 일 구현예에서, 상기 프로그래밍된 리포좀 형성 단계는, 환원제 또는 금속 전구체가 미리 담지된 프로그래밍된 리포좀을 형성한 후, 크기 또는 형태 중 하나 이상이 조절되도록 프로그래밍된 리포좀을 분리한다.
- [11] 예시적인 일 구현예에서, 상기 프로그래밍된 리포좀 형성 단계는, 환원제 또는 금속 전구체가 포함된 용액 속에서 지질 막으로부터 리포좀을 형성하여 환원제 또는 금속 전구체가 리포좀 내부에 담지된 프로그래밍된 리포좀을 형성하는 단계; 및 상기 프로그래밍된 리포좀을 포함하는 용액으로부터 상기 프로그래밍된 리포좀의 크기 또는 형태 중 하나 이상을 조절하도록 프로그래밍된 리포좀을 분리 및 여과하는 단계;를 포함할 수 있다.
- [12] 예시적인 일 구현예에서, 리포좀을 형성하는 지질은 중성, 음전하성, 양전하성을 포함할 수 있다. 또한, 골격을 형성하는 탄소의 수가 10 - 30 개까지 인 것을 포함할 수 있다.
- [13] 예시적인 일 구현예에서, 리포좀의 크기는 $10\mu\text{m}$ 이하로 예컨대 30 nm 내지 100 nm이거나, 100nm 초과 $10\mu\text{m}$ 이하일 수 있다.
- [14] 예시적인 일 구현예에서, 리포좀 형태는 구형, 막대형, 번들형을 포함할 수 있다.
- [15] 예시적인 일 구현예에서, 금속 전구체는 예컨대 Ag, Au, Cu, Pt, Al, Fe, Co, Ni, Ru, Rh 및 Pd로 구성된 금속들의 전구체일 수 있다.
- [16] 예시적인 일 구현예에서, 환원제는 유기 환원제 또는 무기 환원제일 수 있으며, 예컨대 시트르산나트륨(Sodium citrate), 하이드록시아민(Hydroxyamine), 아스코르브산(Ascorbic acid), 보로하이드라이드 나트륨(Sodium borohydride)을 포함할 수 있다.
- [17] 예시적인 일 구현예에서, 상기 유기 분자는 DNA, RNA, 형광물질, 라만분자, 핵산, 단백질로 이루어지는 그룹에서 선택되는 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [18] 본 발명의 예시적인 구현예들에서는, 또한, 금속-리포좀 복합 구조체로서, 리포좀이 외부 골격을 이루고 내부에 금속 입자 및 환원제가 존재하는 것을 특징으로 하는 금속-리포좀 복합 구조체를 제공한다.

발명의 효과

- [19] 본 발명의 예시적인 구현예들에 따르면, 금속 입자를 미리 제조하고 표면에 리포좀을 결합시키는 방식이 아닌, 환원제나 금속 전구체가 내부에 미리 담지된

리포좀 화학반응기를 제조한 후 리포좀 내부에서만 선택적으로 금속 입자를 합성함으로써 크기와 형태가 일정한 금속-리포좀 복합 구조체를 종래와 달리 현저히 높은 수율로 제조할 수 있다.

- [20] 이와 같이 제조된 금속-리포좀 복합 구조체는 금속 입자 제조와 동시에 리포좀이 금속 입자의 외부골격을 형성하는 것으로서, 리포좀 내부에 금속 입자와 금속 전구체의 환원에 사용된 환원제가 동시에 존재하며, 고농도의 전해질이나 무수히 많은 생체분자들이 존재하는 생체 내와 같은 복잡한 환경에서도 높은 안정성과 향상된 세포 내 전달 효율을 제공할 수 있다. 이러한 금속-리포좀 복합 구조체는 생체의학 및 촉매, 에너지 분야 등 다양한 분야에 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [21] 도 1은 본 발명의 일 구현예에 있어서, 금속-리포좀 복합 구조체의 제조 과정을 나타내는 개략도이다.
- [22] 도 2a 내지 2d는 본 발명의 일 실시예에서 있어서, 환원제 또는 금속 전구체가 담지된 리포좀의 투과전자현미경 그림이다.
- [23] 도 3a 내지 3d는 본 발명의 일 실시예에서 있어서, 리포좀 내부에서만 선택적으로 금속 나노 입자가 합성되어 형성된 금속-리포좀 복합 나노 구조체의 투과전자현미경 사진이다.
- [24] 도 4는 본 발명의 일 실시예에서 있어서, 생체 내와 유사한 복잡한 환경에서 제조된 금속(금)-리포좀 복합 구조체의 안정성을 나타내는 그래프이다.
- [25] 도 4a는 다양한 용액조건에서 기존 보고된 구형 금 나노입자(GNP)와 막대형 금 나노입자(GNR)와 본 발명의 실시예에서 제조된 금-리포좀 복합 구조체(GLN)의 안정성을 비교한 결과이고, 도 4b는 다양한 용액조건에서 제조된 금-리포좀 복합 구조체의 안정성을 시간에 따라 보여주는 결과이다.
- [26] 도 5a 내지 5d는 본 발명의 일 실시예에서 있어서, 제조된 금속(금)-리포좀 복합 구조체의 세포로의 전달효율을 나타내는 것으로서, 산란세기를 측정하여 세포(도 5a) 내로 전달된 구조체의 양을 기존 금 나노 입자의 경우(도 5d)와 대비하여 정성적으로 보여주는 이미지(도 5b)와 정량적으로 보여주는 그래프(도 5d)이다.
- [27] 도 6은 본 발명의 일 실시예에서 있어서, 제조된 금속(금)-리포좀 복합 구조체를 세포에 적용하여 세포 내 분자 탐지 및 이미징하는 응용기술을 보여준다. 도 6a 및 6b는 제작된 금-리포좀 복합 구조체를 세포(도 6a) 내로 전달하고 세포 내 존재하는 특정 분자들의 라만신호를 얻은 결과(도 6b)이다. 도 6c 및 6d는 획득한 세포 내 분자(도 6c)의 라만신호를 기반으로 하여 세포를 이미징한 결과(도 6d)이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [28] 본 명세서에서 프로그래밍 기법이란 리포좀 형성 시 리포좀 내에 환원제 또는

- 금속 전구체 및/또는 유기 분자 등의 물질을 미리 담지시키는 기법을 의미한다.
- [29] 본 명세서에서 나노 입자 또는 나노 구조체의 나노란 당해 기술 분야의 통상적인 정의로 사용되는 것으로서, 예컨대 1000nm 미만의 크기를 의미할 수 있다. 본 명세서의 금속-리포좀 복합 구조체가 특히 생체 내(in vivo)에서 사용되는 경우에는 해당 금속-리포좀 복합 구조체의 사이즈는 생체 내 사용에 적합하도록 100nm 이하의 크기로 사용될 수 있다.
- [30] 이하, 본 발명의 예시적인 구현예들을 상세히 설명한다.
- [31] 종래 금속 리포좀 복합 구조체의 경우 금속 입자를 미리 제조하고 표면에 리포좀을 결합시키는 방법을 사용해 왔다. 이러한 종래 방법에 의하는 경우에는 금속 입자가 리포좀의 외벽에 붙거나, 리포좀의 지질 막 사이에 금속 입자가 존재하는 경우가 많아 금속 입자를 리포좀 내부에 담지하는 형태를 얻는 것 자체가 매우 어렵다. 또한, 금속 입자가 리포좀의 지질 막 사이에 위치하게 되면 복합체의 손상을 야기하기 쉽다. 또한, 제조된 복합체의 경우 크기와 형태도 모두 제 각각이어서 실제 활용에는 제약이 크다.
- [32] 이에 반하여, 본 발명자들은 프로그래밍 기법을 이용하여 금속-리포좀 복합 구조체를 제조하는 혁신적인 접근법을 제공한다.
- [33] 앞서 정의하였듯이, 프로그래밍 기법이란 리포좀에 미리 환원제 혹은 금속 전구체를 담지하는 기법을 말한다. 화학반응기로서 환원제 또는 금속 전구체가 내부에 미리 담지된 즉 프로그래밍 된 리포좀, 특히 일정한 크기나 형태의 리포좀을 형성하고, 해당 리포좀의 외부 환경에 금속 전구체 또는 환원제를 제공하면, 외부 환경에 존재하는 금속 전구체 또는 환원제가 리포좀 내부로 확산된다. 이러한 확산현상을 통하여 리포좀 내부에서만 선택적으로 금속 전구체의 환원반응이 일어나도록 조절함으로써 금속 나노 입자가 합성됨과 동시에 리포좀이 해당 금속 나노 입자의 외부 골격이 되는 금속-리포좀 복합 구조체를 제조할 수 있다. 이에 따르면, 종래의 방법과 달리, 미리 프로그래밍 기법을 통한 리포좀에 금속 전구체 또는 환원제를 담지한 후 확산 반응을 통하여 내부에서 금속 입자를 형성하는 것이므로 금속-리포좀 복합 구조체의 수율이 종래의 방법과 대비하여 현저히 높게 될 뿐만 아니라, 금속이 리포좀의 지질막 사이나 리포좀 외벽에 붙는 형태가 아니라 리포좀 내부에 안정적으로 존재할 수 있어 복합체의 손상이 방지될 수 있으며, 금속-리포좀 복합체의 크기와 형태가 균일하게 얻어질 수 있다.
- [34] 아울러 프로그래밍 된 리포좀을 형성 시 다양한 유기분자도 같이 담지되도록 하는 이점이 있다.
- [35] 도 1은 본 발명의 일 구현예에 있어서, 금속-리포좀 복합 구조체의 제조 과정을 나타내는 개략도이다.
- [36] 도 1에 도시된 바와 같이, 예컨대 환원제(reducing agent) 또는 금속 전구체(metal precursor), 유기 분자가 포함된 용액 중의 유리 기판에 지질 이중층(lipid bilayer)을 형성하고, 지질 막의 수화를 통해 리포좀을 형성한다. 이에 따라,

리포좀 형성 시 환원제(reducing agent) 또는 금속 전구체(metal precursor)와 유기 분자가 리포좀 막 내에 담지될 수 있다(이를 프로그래밍으로 지칭한다).

- [37] 비제한적인 예시에서, 리포좀을 형성하는 지질은 중성, 음전하성, 양전하성을 포함한다. 또한, 골격을 형성하는 탄소의 수가 10 - 30 개까지 인 것을 포함할 수 있다.
- [38] 비제한적인 예시에서, 금속 전구체는 예컨대 Ag, Au, Cu, Pt, Al, Fe, Co, Ni, Ru, Rh 및 Pd로 구성된 금속들의 전구체일 수 있다. 이러한 전구체는 제한되지 않지만, 예컨대 HAuCl_4 , $\text{Au}(\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2)_3$, AgNO_3 , H_2PtCl_6 , H_2PtCl_4 , K_2PtCl_6 , K_2PtCl_4 , $\text{Pt}(\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2)_2$, K_2PdCl_4 등에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [39] 비제한적인 예시에서, 환원제는 유기 환원제 또는 무기 환원제를 사용할 수 있다. 무기 환원제의 경우 환원력은 높지만 유기 분자 변형 가능성이 있으므로 유기 환원제를 사용하는 것이 바람직하다.
- [40] 비제한적인 예시에서, 환원제는 시트르산나트륨(Sodium citrate), 하이드록시아민(Hydroxyamine), 아스코르브산(Ascorbic acid), 보로하이드라이드 나트륨(Sodium borohydride)을 포함할 수 있다.
- [41] 비제한적인 예시에서, 상기 유기 분자는 DNA, RNA, 형광물질, 라만분자, 핵산, 단백질로 이루어지는 그룹에서 선택되는 하나 이상의 유기 분자를 포함할 수 있다.
- [42] 한편, 전술한 바와 같이 환원제 또는 금속 전구체와 유기분자가 담지된 즉 프로그래밍 된 리포좀을 원심 분리를 이용하여 분리하도록 하며, 여과과정을 통해 일정한 크기나 형태를 가지도록 조절할 수 있다. 비제한적인 예시에서, 상기와 같이 얻어진 리포좀은 예컨대 $10\mu\text{m}$ 이하, 또는 30nm 내지 100nm 또는 100nm 초과 $10\mu\text{m}$ 이하의 범위 내의 크기일 수 있다. 생체 내(in vivo)에서 사용되는 경우에는 100nm 이하의 것이 적합하다. 한편, 생체 외(in vitro)에서의 사용을 목적으로 하는 경우에는 마이크로 사이즈의 것을 사용할 수 있다.
- [43] 마찬가지로, 리포좀 내의 금속 입자의 사이즈는 생체 내에서 사용되는 경우에는 예컨대 $20\sim 100\text{nm}$ 일 수 있고, 생체 외에서 사용되는 경우에는 마이크로 사이즈일 수 있다.
- [44] 비제한적인 예시에서, 리포좀 형태는 구형, 막대형, 번들형을 포함할 수 있다.
- [45] 이상의 과정을 통해 환원제 또는 금속 전구체와 유기분자가 내부에 담지된 즉 프로그래밍 된 일정한 크기의 리포좀이 포함된 용액을 선택적으로 확보할 수 있다.
- [46] 이어서, 상기 환원제 또는 금속 전구체와 유기분자가 내부에 담지된 프로그래밍된 리포좀이 포함된 용액에, 금속 전구체 또는 환원제를 추가로 도입한다. 이 과정을 통해 상기 프로그래밍된 리포좀 외부환경에 금속 전구체 혹은 환원제가 존재하게 되며, 이에 따라 추가 도입된 금속 전구체 또는 환원제는 확산과정을 통해 프로그래밍된 리포좀 내부로 전달된다.
- [47] 프로그래밍된 리포좀 내부로 확산된 금속 전구체 또는 환원제는 리포좀 내부에

미리 담지되어 있는 환원제 또는 금속 전구체와의 상호 작용을 통해 환원반응을 일으키게 된다. 이러한 환원반응을 통하여 금속 입자가 합성된다.

[48] 이러한 과정을 통해 리포좀 내부에서만 선택적으로 금속 입자의 합성반응이 진행될 수 있으며, 그 결과 금속 나노 입자의 합성과 동시에 리포좀이 금속 나노 입자의 외부 골격을 이루는 금속-리포좀 복합 구조체를 제조할 수 있다.

[49] 이에 따라 얻어진 금속-리포좀 복합 구조체는 전술한 제조 방법으로 제조됨에 따라 구조적으로 다음과 같은 특이점을 가진다. 즉, 얻어진 금속-리포좀 복합 구조체는 리포좀이 외부 골격을 이루고 내부에 금속 입자 및 환원제가 존재하게 된다. 종래 제조 방법에 의하는 경우, 환원제를 사용하지 않기 때문에 리포좀 내부에 환원제가 존재할 수 없다. 반면, 본 발명의 예시적인 구현예들에 의하면, 외부 골격을 이루는 리포좀 내부에 금속 입자와 동시에 해당 금속 전구체를 환원하기 위하여 사용된 환원제가 함께 존재하는 구조적 특이점을 가진다.

[50] 이와 같이, 본 발명의 구현예들의 종래의 방법 즉 미리 제조된 금속 나노입자 표면에 리포좀을 결합시키는 방식이 아닌, 프로그래밍 기법 즉, 환원제 혹은 금속 전구체가 담지된 리포좀을 이용하여 내부에서 금속 입자가 합성되면서 또한 리포좀이 외부골격을 이루는 방식이므로, 금속-리포좀 복합 구조체를 일정한 크기와 형태로 조절이 가능하며, 종래 방법과 대비하여 현저히 높은 수율로 크기와 형태가 일정한 금속-리포좀 복합 구조체를 제조할 수 있다.

[51] 또한, 본 발명의 구현예들에 따른 금속-리포좀 복합 구조체는 금속 나노 입자가 제조되면서 또한 리포좀이 금속 입자 및 환원제의 외부골격을 형성하여 고농도의 전해질이나 무수히 많은 생체분자들이 존재하는 생체 내와 같은 복잡한 환경에서 높은 안정성과 향상된 세포 내 전달 효율을 제공할 수 있다.

[52] 이에 따라, 해당 금속-리포좀 복합 구조체는 분자 탐지 및 광열효과를 이용하여, 세포 및 분자 수준에서의 실시간 모니터링, 이미징 및 맞춤 치료 등의 생체의학 분야나 그 외 촉매, 에너지 분야 등에서 광범위하게 활용될 수 있다.

[53] 이하, 본 발명의 예시적인 구현예들에 따른 구체적인 실시예를 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 본 발명이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니며 첨부된 특허청구범위 내에서 다양한 형태의 실시예들이 구현될 수 있고, 단지 하기 실시예는 본 발명의 개시가 완전하도록 함과 동시에 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 실시를 용이하게 하고자 하는 것이 이해될 것이다.

[54] 실시예

[55] <환원제 또는 금속 전구체와 유기분자가 담지(프로그래밍)된 일정한 크기의 리포좀을 형성>

[56] 지질 (예: 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DSPC))을 클로로폼(chloroform)에 녹인 후, 회전 증발기(rotary evaporator)를 이용하여 클로로폼(chloroform)을 완전하게 증발시켜 지질 박막을 형성하였다. 환원제 (예: 300 mM trisodium citrate dehydrate)를 증류수에 용해 시킨 후, 이를 지질박막에 첨가하였다. 이어서, 온도를 55-60°C (인지질의 임계 온도)를 유지하면서 지질을

녹인 후 초음파 처리(sonication) 및 다양한 크기의 필터(30nm, 50nm, 100nm, 200nm)를 가진 압출기 (Extruder)를 통하여 환원제가 담지된 일정한 크기의 리포솜을 제조하였다.

- [57] 원심분리를 통해 가라앉은 펠렛(pellet)을 제외한 나머지를 제거하였으며, 증류수를 통한 반복적인 세척 및 원심 분리를 통해 환원제가 담지된 리포솜을 선택적으로 확보하였다.
- [58] 도 2a 내지 2d는 본 발명의 일 실시예에서 있어서, 환원제가 담지된 리포솜의 투과전자현미경 그림이다. 도 2a, 2b, 2c, 2d는 각각 30, 50, 100, 200 nm의 일정한 크기를 가지는 리포솜을 보여준다.
- [59] <형성된 리포솜의 외부 환경에 금속 전구체 또는 환원제를 도입>
- [60] 금속 전구체 (예: $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, tetrachloroauric acid trihydrate)를 증류수에 용해한 후 pH를 조절하여 금속 전구체의 이온화 상태를 조절하였다. 이온화 상태가 조절된 금속 전구체 용액과 환원제가 담지된 리포솜을 상온에서 혼합하여 반응시키면 특정한 pH에서만 존재하는 중성화 상태의 금속 전구체는 인지질막을 파괴하지 않고 통과하여 리포솜 내부로 전달된다. 이때의 확산은 mm 초 내에 이루어진다. 참고로, 리포솜 내부의 소금 농도와 외부의 소금 농도의 차이에 의한 삼투압 효과에 의해 금속 전구체는 좀 더 효과적으로 리포솜 내부로 전달될 수 있다.
- [61] 도 3a 내지 3d는 본 발명의 일 실시예에서 있어서, 리포솜 내부에서만 선택적으로 금속 나노입자가 합성되어 형성된 금속-리포솜 복합 나노구조체의 투과전자현미경 사진이다.
- [62] 투과전자현미경 그림을 통해 금속 나노입자 주변을 따라 리포솜이 외부골격을 형성하고 있는 것을 확인할 수 있다. 도 3a, 3b, 3c, 3d는 각각 30, 50, 100, 200 nm의 일정한 크기를 가지는 금속-리포솜 복합 구조체를 보여준다.
- [63] <리포솜 내부에서 환원반응을 통해 선택적으로 금속 입자 합성>
- [64] 리포솜 내부로 전달된 금속 전구체(또는 금속 전구체를 미리 담지시킨 경우는 환원제)는 리포솜 내부에만 담지된 환원제(또는 금속 전구체)와 선택적으로 반응한다. 100nm 크기의 리포솜을 기준으로, 리포솜 내부로 전달된 금속 전구체는 2시간이 경과하면 인지질막의 손상없이 리포솜 내부에서 금속 입자를 형성하게 된다. 12시간이 경과하면 반응시키면 리포솜 내부가 금속 입자로 완전히 채워지게 되면서 자연적으로 리포솜이 외부골격을 이루는 금속-리포솜 복합 구조체를 형성하게 된다.
- [65] 도 4a 및 4b는 본 발명의 일 실시예에서 있어서, 생체 내와 유사한 복잡한 환경에서 제작된 금속(금)-리포솜 복합 구조체의 안정성을 나타내는 그래프이다.
- [66] 구체적으로, 도 4a는 다양한 용액조건에서 기존 보고된 구형 금 나노입자(GNP)와 막대형 금 나노입자(GNR)와 본 발명의 실시예에서 제조된 금-리포솜 복합 구조체(GLN)의 안정성을 비교한 결과로, 본 발명의 실시예에서

제조된 금-리포좀 복합 구조체의 경우 기존 보고된 금 나노 입자와 비교하여 여러 환경에서 높은 안정성을 보여주는 것을 확인할 수 있다.

- [67] 도 4b는 다양한 용액조건에서 제조된 금-리포좀 복합 구조체의 안정성을 시간에 따라 보여주는 결과로 한달 이후로도 변함없이 안정성을 유지하는 것을 확인할 수 있다.
- [68] 도 5a 내지 5d는 본 발명의 일 실시예에서 있어서, 제조된 금속(금)-리포좀 복합 구조체의 세포로의 전달효율을 나타낸다.
- [69] 구체적으로, 도 5a는 세포(U87-MG cell; control) 자체의 이미지이고, 도 5c는 기존의 금 나노 입자(GNP)의 경우 세포 내로 전달된 구조체의 양을 정성적으로 보여주는 이미지이며, 도 5b는 금-리포좀 복합 구조체(GLN)의 경우 세포 내로 전달된 구조체의 양을 정성적으로 보여주는 이미지이다. 도 5d는 각각 산란세기를 측정하여 세포 내로 전달된 구조체의 양을 정량적으로 보여주는 그래프이다.
- [70] 기존 보고된 구형 금속 나노입자에 비하여 금속-리포좀 복합 구조체가 높은 세포 내 전달효율을 가지는 것을 보여준다.
- [71] 도 6은 본 발명의 일 실시예에서 있어서, 제조된 금속(금)-리포좀 복합 구조체를 세포에 적용하여 세포 내 분자 탐지 및 이미징하는 응용기술을 보여준다.
- [72] 구체적으로, 도 6a 및 6b는 제조된 금-리포좀 복합 구조체(GLN)를 세포(도 6a) 내로 전달하고 세포 내 존재하는 특정 분자들의 라만신호를 얻은 결과(도 6b)이다. 도 6b에는 기존의 구형 금 나노 입자(GNS)를 이용하여 얻은 라만 신호도 함께 표시되어 있다. 도 6c 및 6d는 금-리포좀 복합 구조체(GLN)의 경우에 획득한 세포 내 분자(도 6c)의 라만신호를 기반으로 하여 세포를 이미징한 결과(도 6d)이다.
- [73] 이 결과로부터 알 수 있듯이, 본 발명의 예시적인 구현예들에 따른 금속-리포좀 복합 구조체는 외부골격을 형성하는 리포좀이 보호막의 역할을 수행하여 높은 농도의 전해질이나 무수히 많은 생체분자가 존재하는 생체 내와 같은 복잡한 환경에서도 높은 안정성을 가진다. 아울러, 이를 통해 크기와 형태를 일정하게 유지하여 본래의 기능을 원활하게 수행할 수 있다.

산업상 이용가능성

- [74] 프로그래밍기법을 이용한 금속-리포좀 복합 구조체 제조 방법 및 이에 따라 제조된 금속-리포좀 복합 구조체가 개시된다. 이러한 금속-리포좀 복합 구조체는 생체의학 및 촉매, 에너지 분야 등 다양한 분야에 활용될 수 있다.

청구범위

- [청구항 1] 환원제 또는 금속 전구체가 미리 담지된 프로그래밍된 리포좀을 형성하는 단계;
프로그래밍된 리포좀 외부에 금속 전구체 또는 환원제를 제공하여 금속 전구체 또는 환원제가 리포좀 내부로 확산되도록 하는 단계; 및
프로그래밍된 리포좀 내부로 확산된 금속 전구체 또는 환원제와 프로그래밍된 리포좀 내부에 담지되어 있던 환원제 또는 금속 전구체로부터 프로그래밍된 리포좀 내부에서 금속 입자를 합성하여 리포좀이 금속 입자의 외부 골격을 이루는 금속-리포좀 복합 구조체를 제조하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 프로그래밍 기법을 이용한 금속-리포좀 복합 구조체 제조 방법.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 제조 방법은, 리포좀 내에 미리 담지되는 물질이 유기 분자를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 금속-리포좀 복합 구조체 제조 방법.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서,
상기 제조 방법은, 외부로부터 프로그래밍된 리포좀 내부로 확산되는 물질이 유기 분자를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 금속-리포좀 복합 구조체 제조 방법.
- [청구항 4] 제 1 항에 있어서,
상기 프로그래밍된 리포좀 형성 단계에서는, 환원제 또는 금속 전구체가 미리 담지된 프로그래밍된 리포좀을 형성한 후, 크기 또는 형태 중 하나 이상이 조절되도록 프로그래밍된 리포좀을 분리하는 것을 특징으로 하는 금속-리포좀 복합 구조체 제조 방법.
- [청구항 5] 제 1 항에 있어서,
상기 프로그래밍된 리포좀 형성 단계는, 환원제 또는 금속 전구체가 포함된 용액에서 지질 막으로부터 리포좀을 형성하여 환원제 또는 금속 전구체가 리포좀 내부에 담지된 프로그래밍된 리포좀을 형성하는 단계; 및
프로그래밍된 리포좀의 크기 또는 형태 중 하나 이상을 조절하도록 프로그래밍된 리포좀을 분리 및 여과하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 프로그래밍 기법을 이용한 금속-리포좀 복합 구조체 제조 방법.
- [청구항 6] 제 5 항에 있어서,
리포좀을 형성하는 지질은 중성, 음전하성 또는 양전하성을 포함하는 것을 특징으로 하는 프로그래밍 기법을 이용한 금속-리포좀 복합 구조체 제조 방법.
- [청구항 7] 제 5 항에 있어서,

리포좀을 형성하는 지질은 골격을 형성하는 탄소의 수가 10 - 30 개인 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 프로그래밍 기법을 이용한 금속-리포좀 복합 구조체 제조 방법.

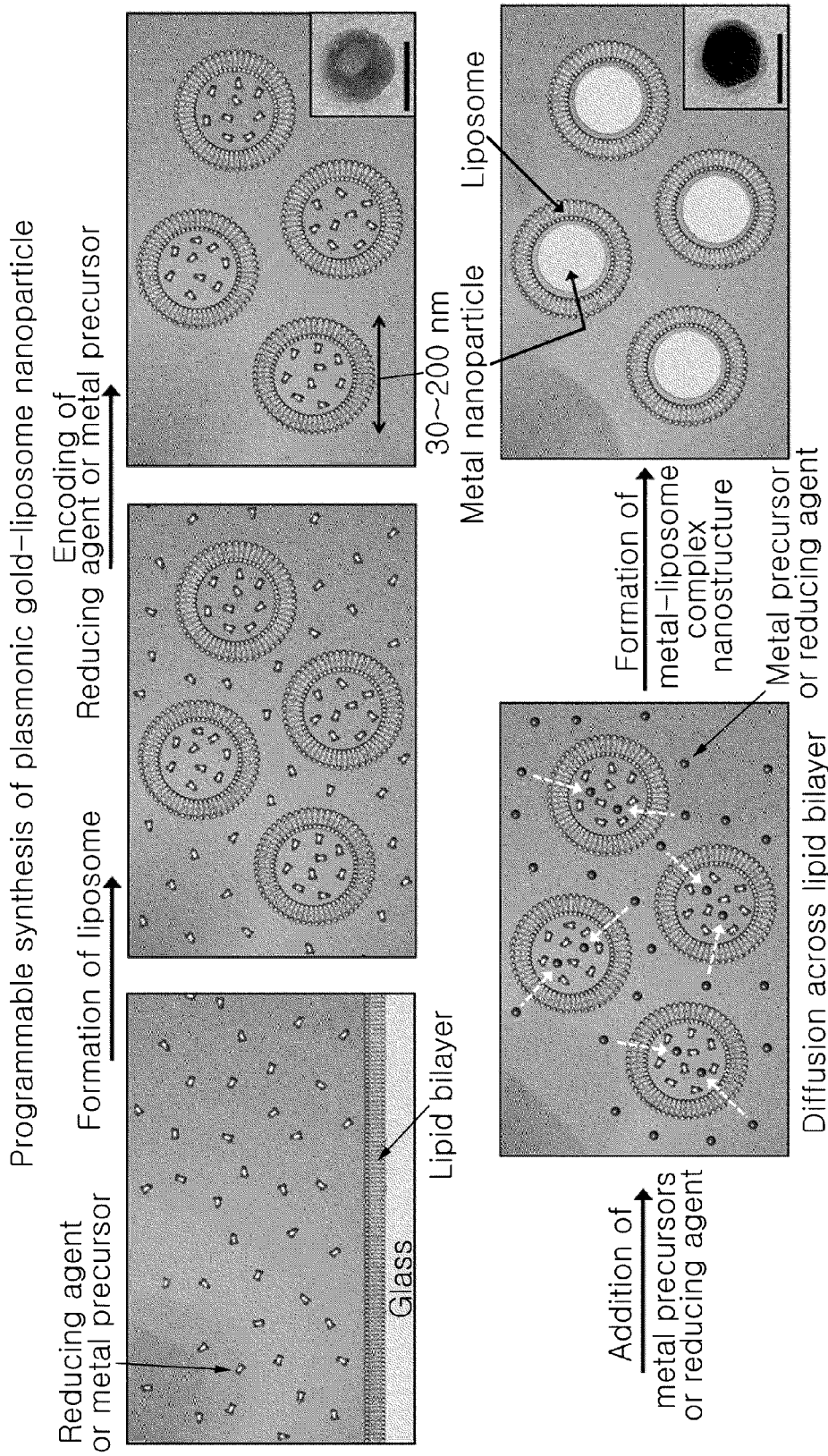
- [청구항 8] 제 1 항에 있어서,
금속 전구체는 Ag, Au, Cu, Pt, Al, Fe, Co, Ni, Ru, Rh 및 Pd로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상의 금속의 전구체인 것을 특징으로 하는 프로그래밍 기법을 이용한 금속-리포좀 복합 구조체 제조 방법.
- [청구항 9] 제 1 항에 있어서,
환원제는 유기 환원제 또는 무기 환원제인 것을 특징으로 하는 프로그래밍 기법을 이용한 금속-리포좀 복합 구조체 제조 방법.
- [청구항 10] 제 1 항에 있어서,
환원제는 시트르산나트륨(Sodium citrate),
하이드록시아민(Hydroxylamine), 아스코르브산(Ascorbic acid),
보로하이드라이드 나트륨(Sodium borohydride)으로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 프로그래밍 기법을 이용한 금속-리포좀 복합 구조체 제조 방법.
- [청구항 11] 제 2 항 또는 제 3 항에 있어서,
유기분자는 DNA, RNA, 형광물질, 라만분자, 핵산, 단백질로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상의 유기분자인 것을 특징으로 하는 프로그래밍 기법을 이용한 금속-리포좀 복합 구조체 제조 방법.
- [청구항 12] 금속-리포좀 복합 구조체로서,
리포좀이 외부 골격을 이루고 내부에 금속 입자 및 환원제가 존재하는 것을 특징으로 하는 금속-리포좀 복합 구조체.
- [청구항 13] 제 12 항에 있어서,
상기 금속-리포좀 복합 구조체는 유기 분자를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 금속-리포좀 복합 구조체.
- [청구항 14] 제 13 항에 있어서,
상기 유기분자는 DNA, RNA, 형광물질, 라만분자, 핵산, 단백질로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상의 유기분자인 것을 특징으로 하는 금속-리포좀 복합 구조체.
- [청구항 15] 제 12 항에 있어서,
리포좀의 크기가 30nm 내지 100 nm 또는 100nm 초과 10 μ m 이하인 것을 특징으로 하는 금속-리포좀 복합 구조체.
- [청구항 16] 제 12 항에 있어서,
상기 금속-리포좀 복합 구조체는 생체 내(in vivo)에서 사용되는 것이고,
리포좀의 크기가 30nm 내지 100nm인 것을 특징으로 하는 금속-리포좀 복합 구조체.
- [청구항 17] 제 12 항에 있어서,

리포좀의 형태는 구형, 막대형 및 변들형으로 이루어진 그룹에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 금속-리포좀 복합 구조체.

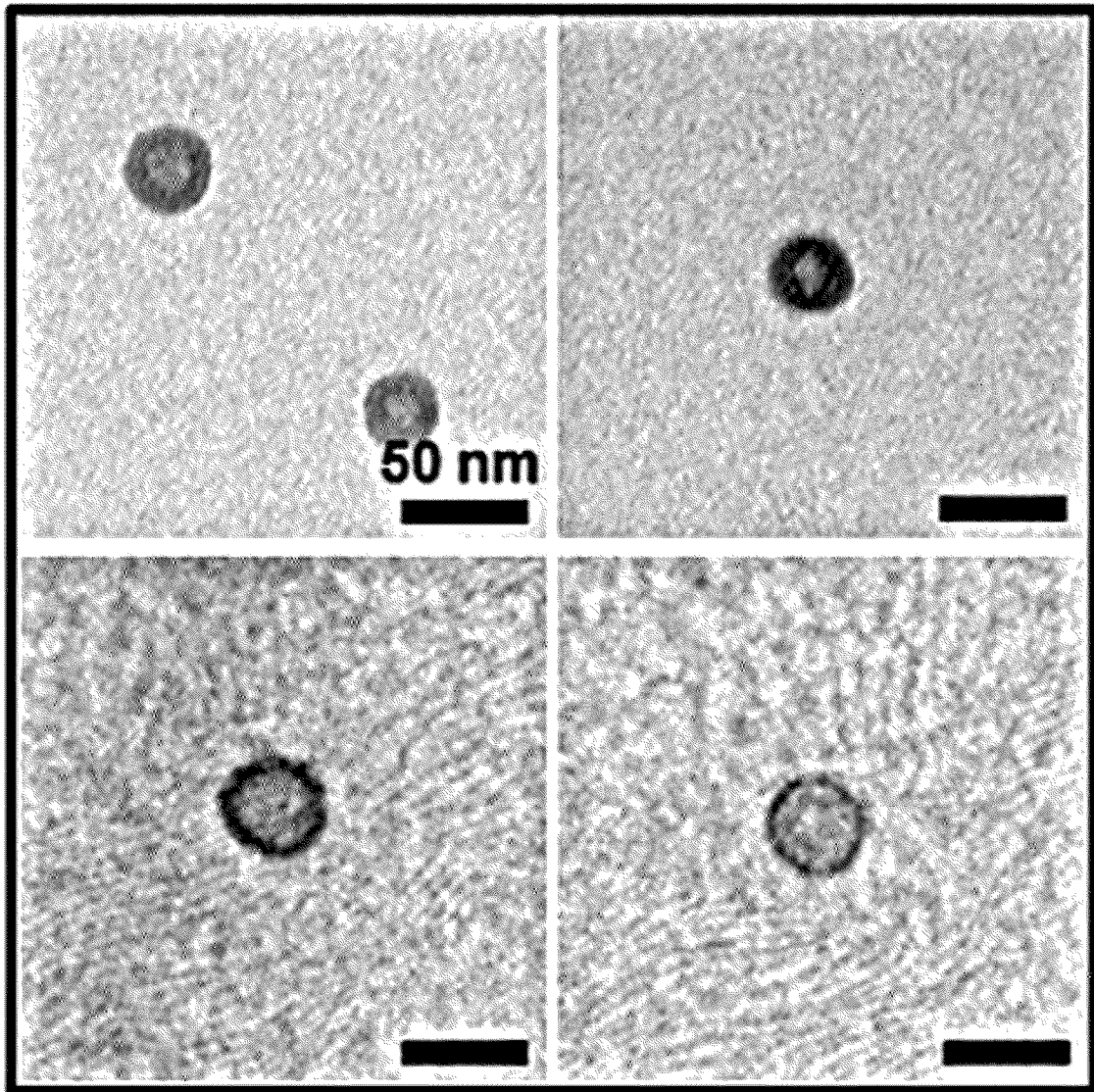
[청구항 18] 제 12 항에 있어서,
상기 환원제는 유기 환원제 또는 무기 환원제인 것을 특징으로 하는
금속-리포좀 복합 구조체.

[청구항 19] 제 12 항에 있어서,
상기 환원제는 시트르산나트륨(Sodium citrate),
하이드록시아민(Hydroxylamine), 아스코르브산(Ascorbic acid),
보로하이드라이드 나트륨(Sodium borohydride)으로 이루어진 그룹에서
선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 금속-리포좀 복합 구조체.

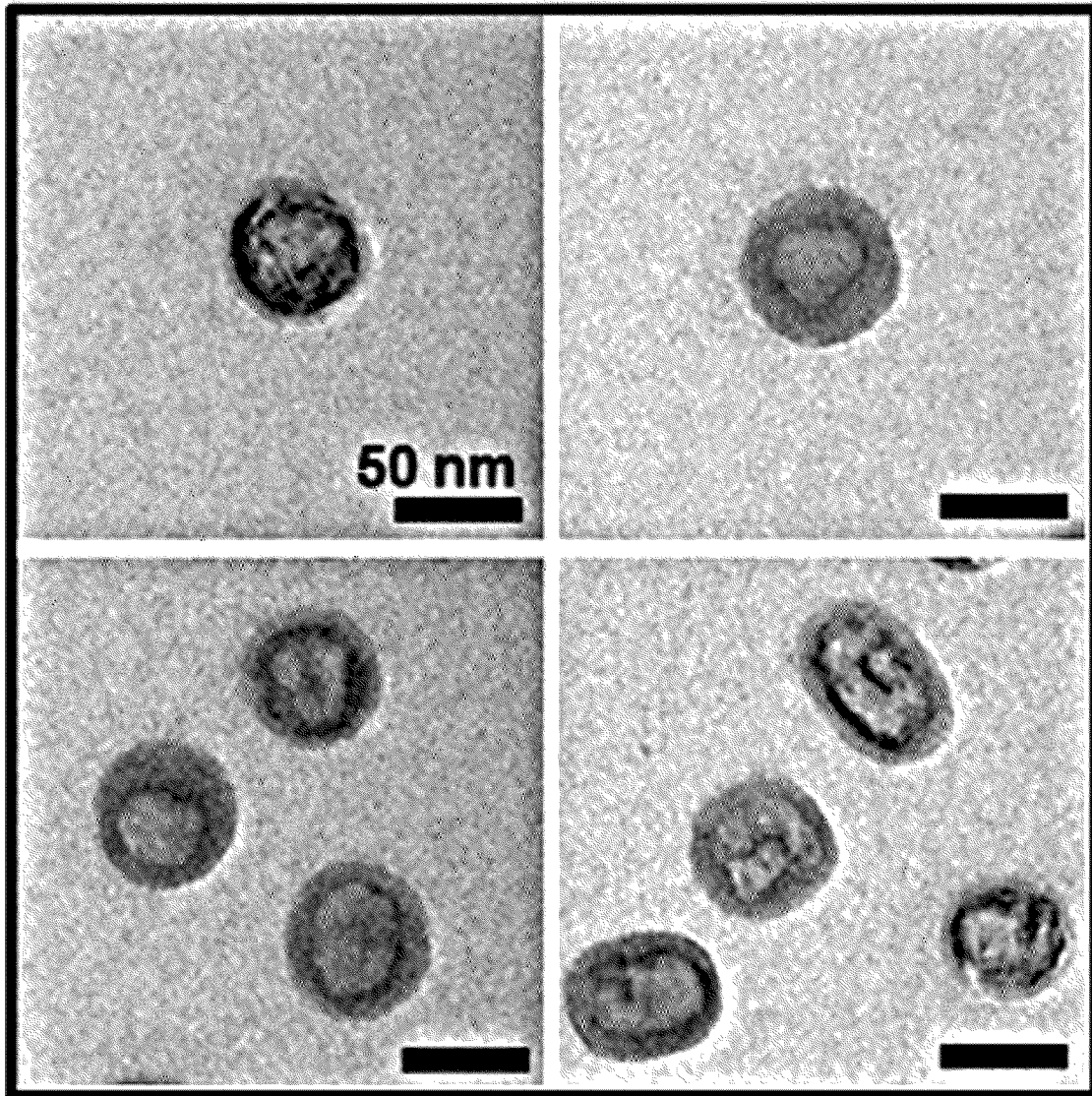
[Figure 1]



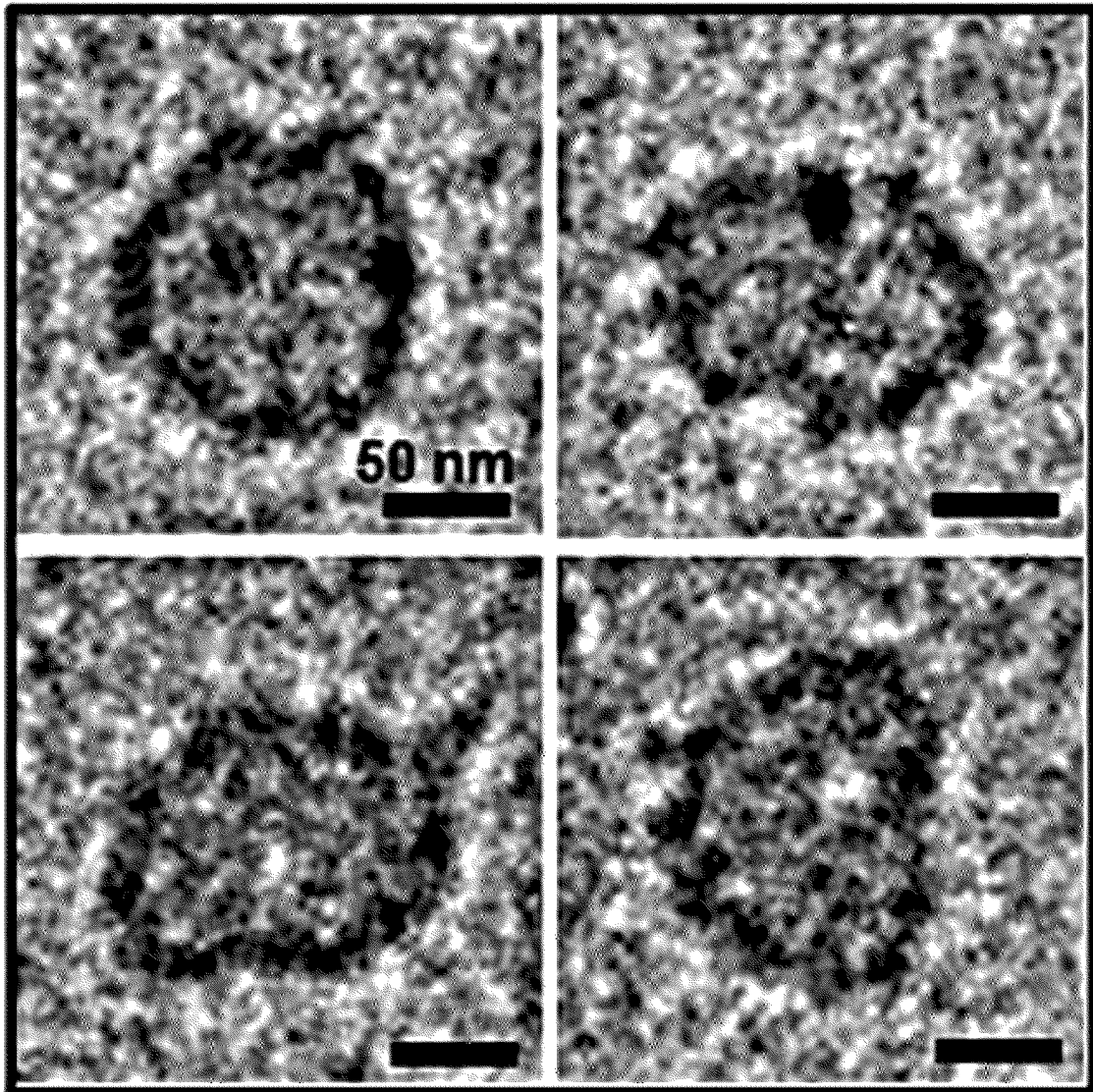
[도2a]



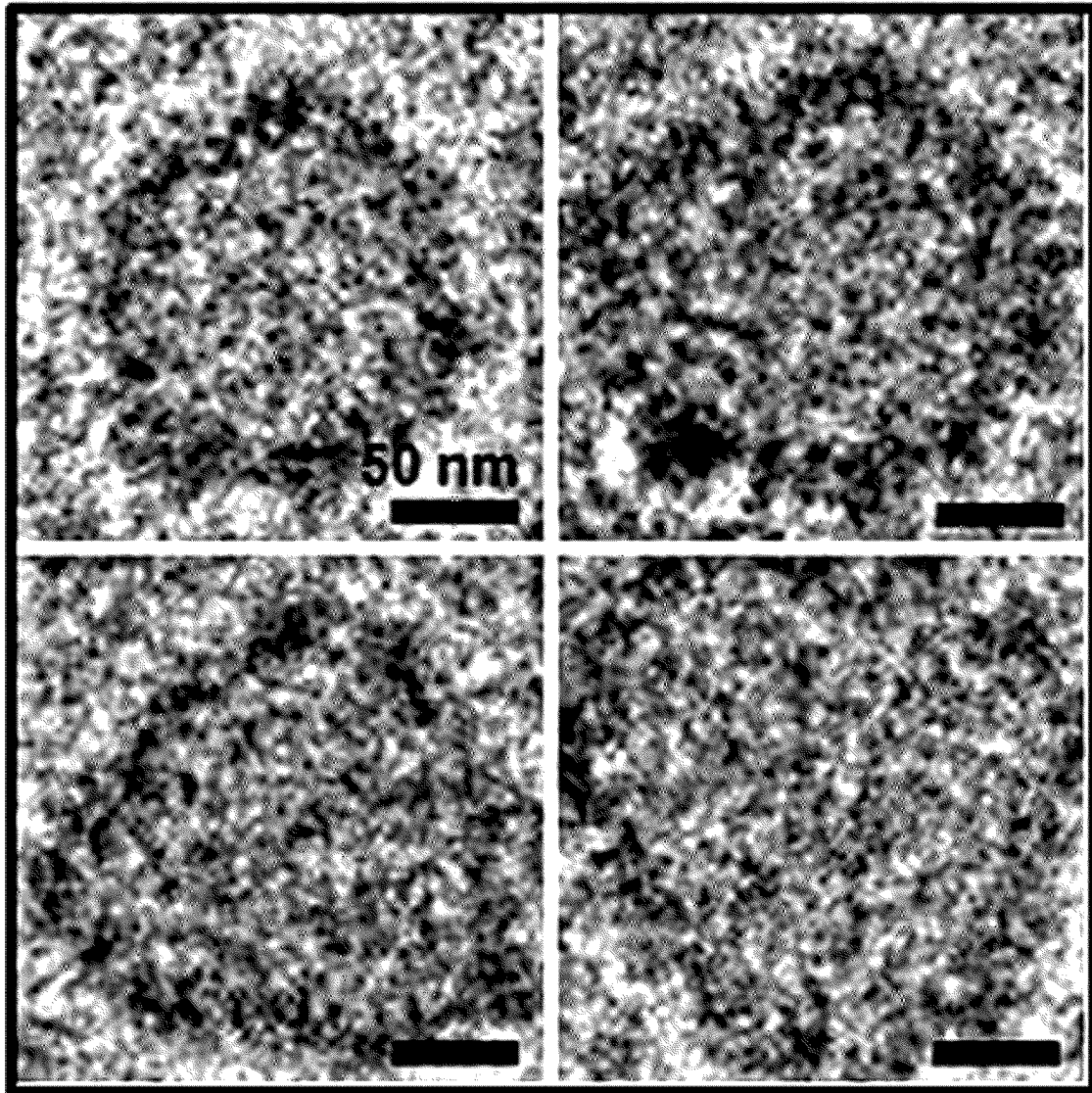
[도2b]



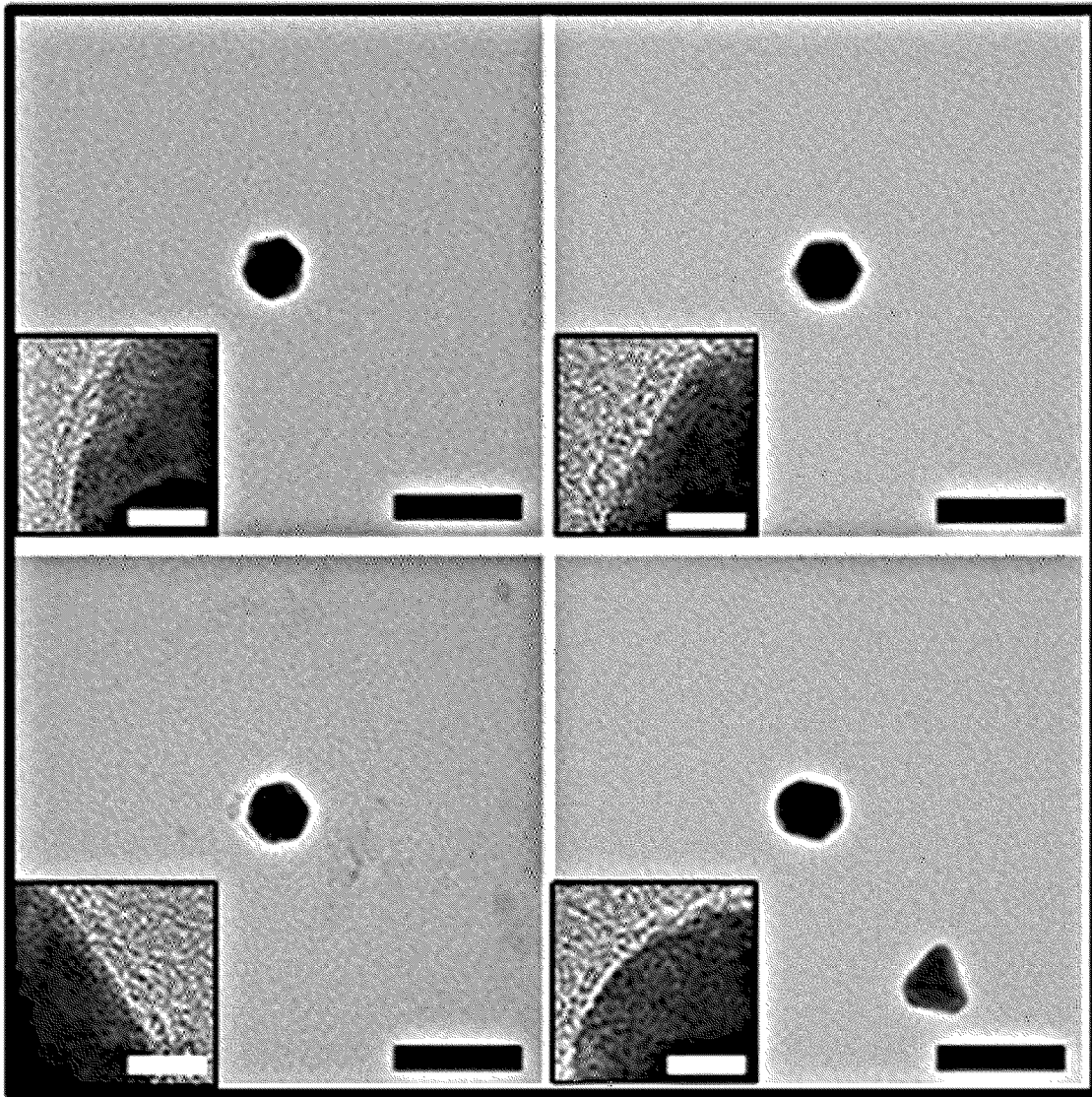
[도2c]



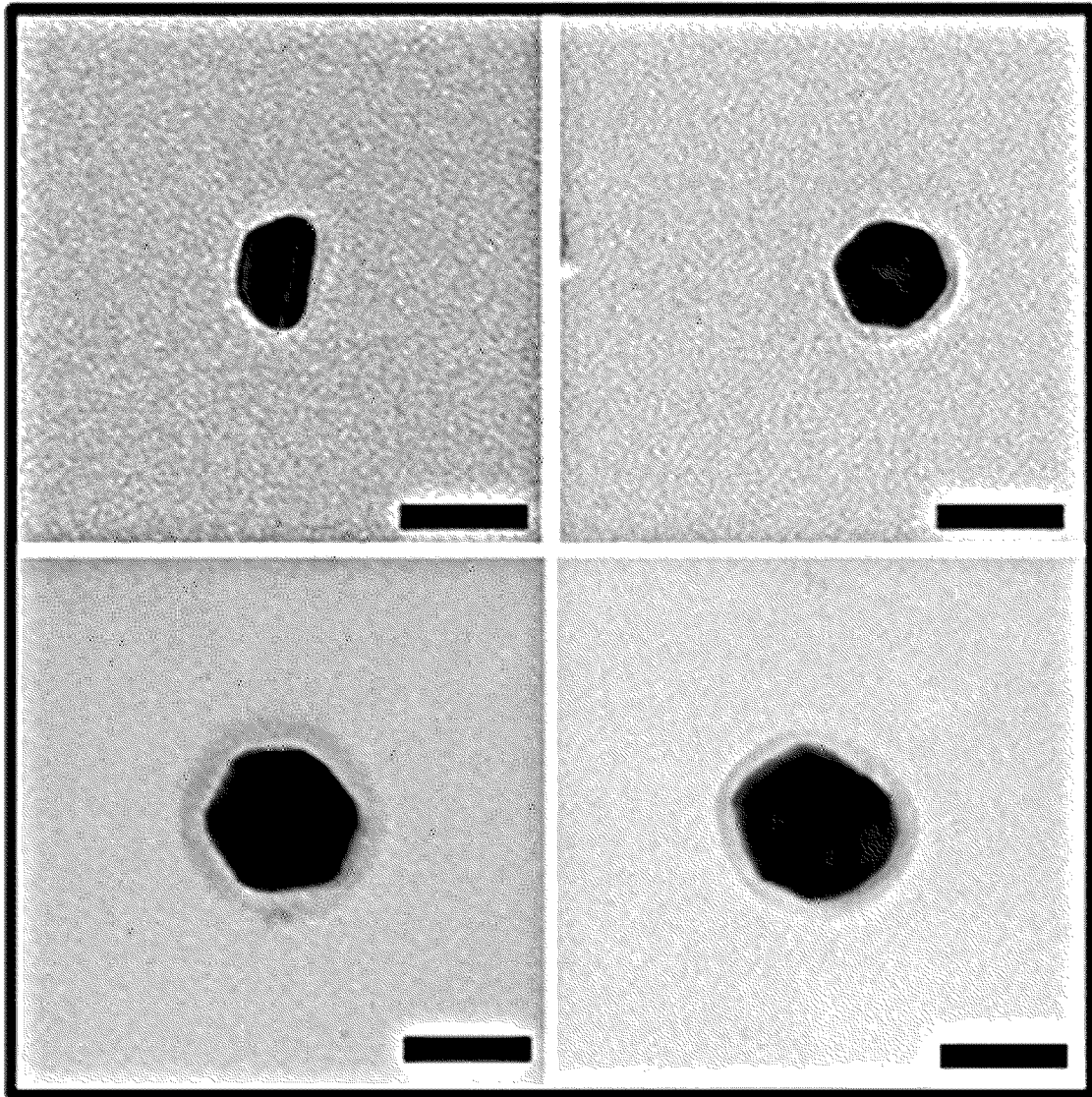
[도2d]



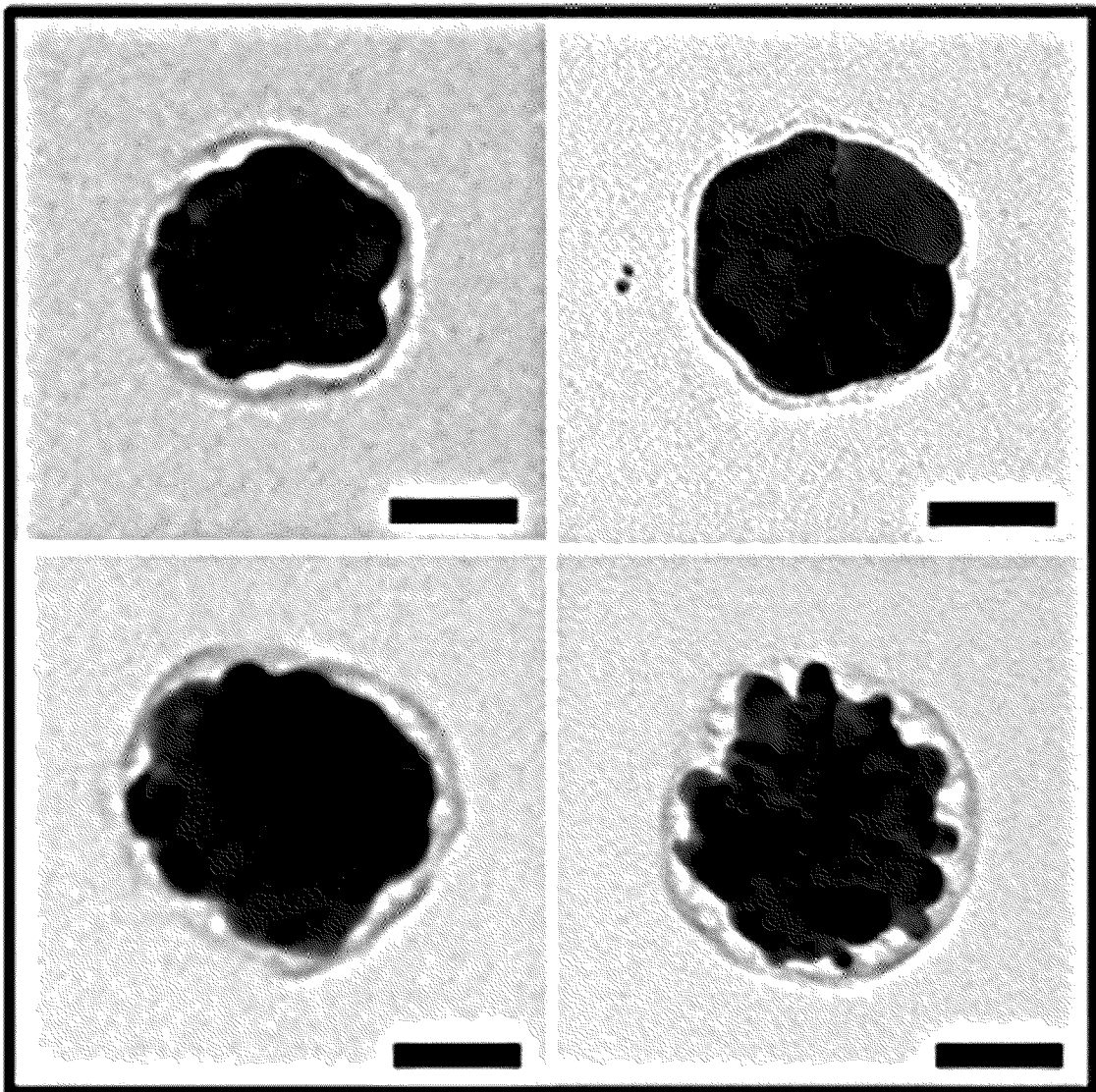
[도3a]



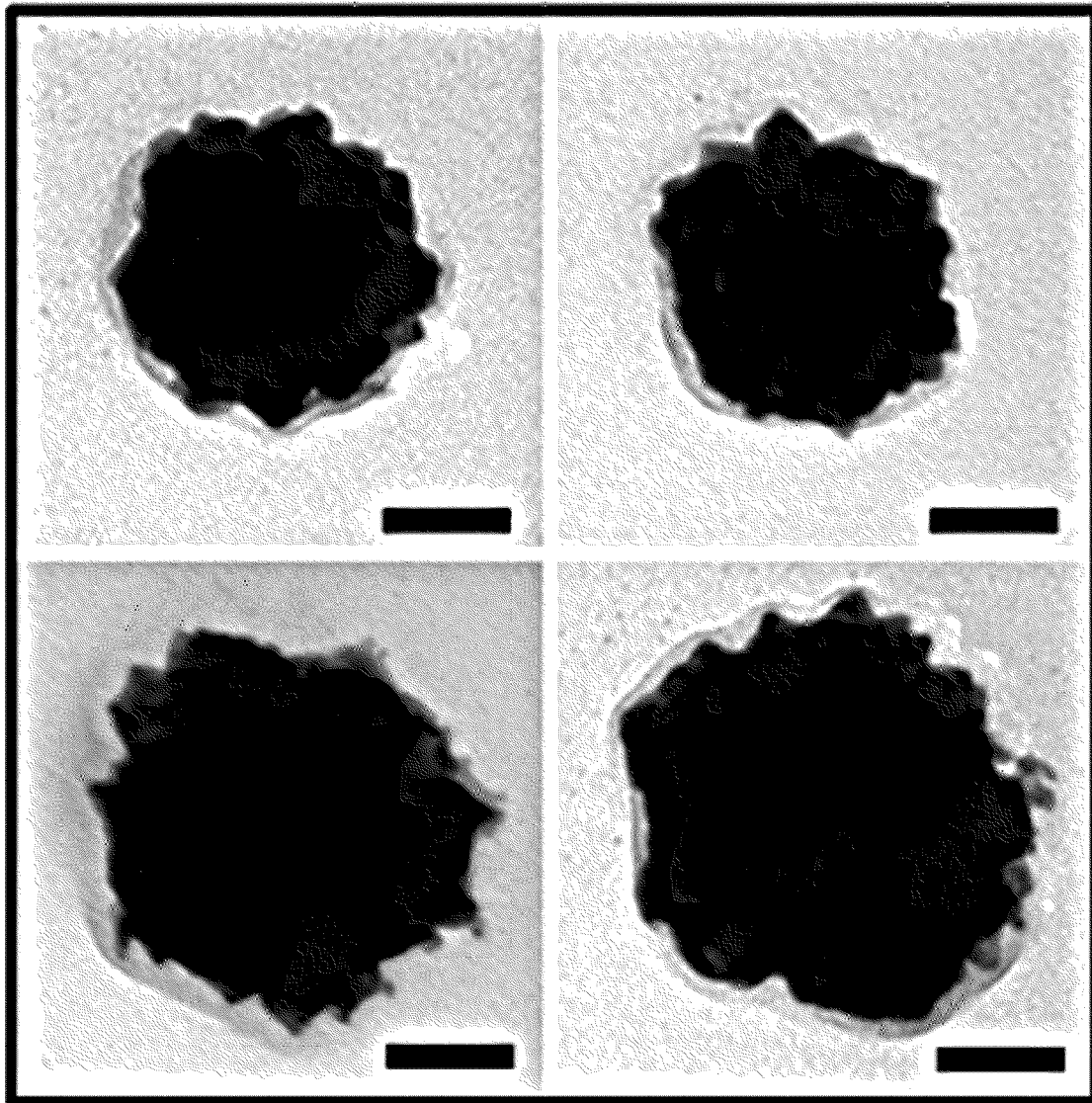
[도3b]



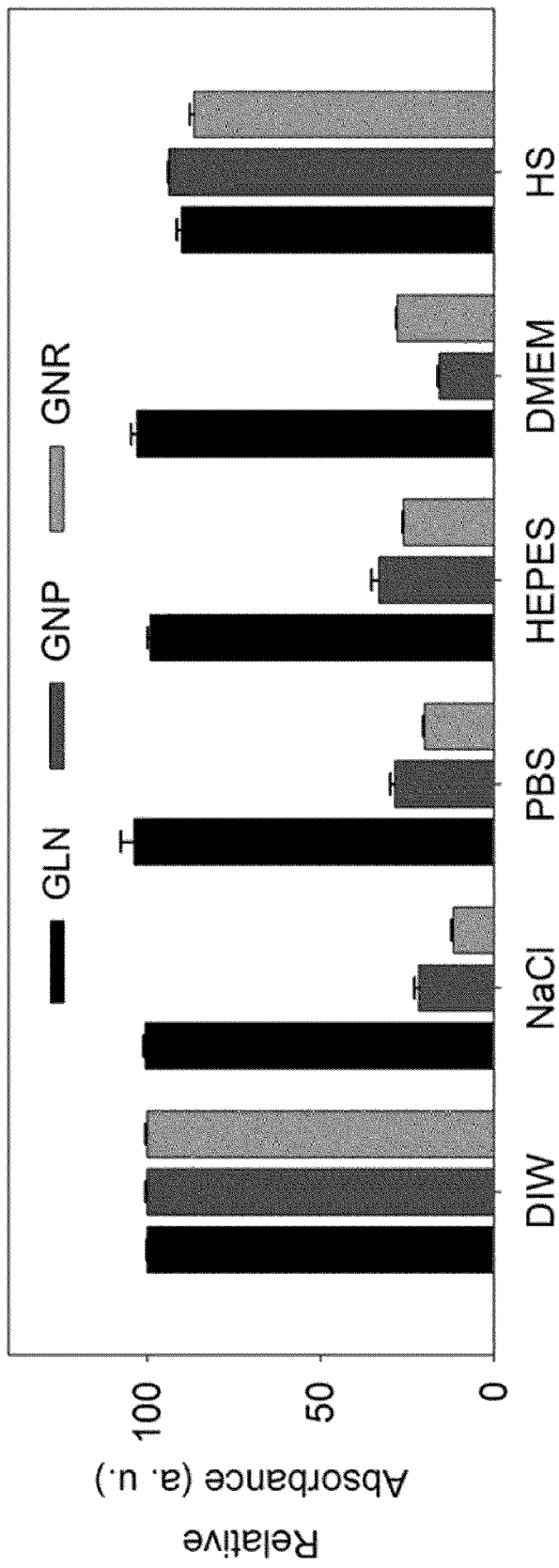
[도3c]



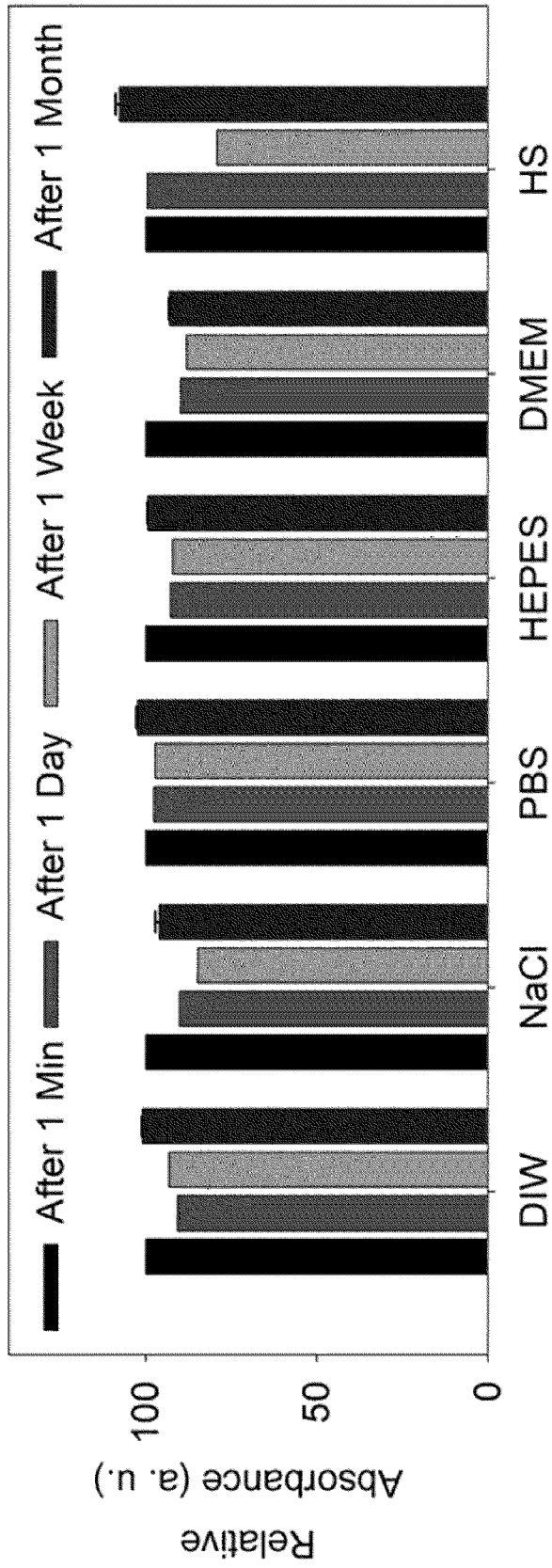
[도3d]



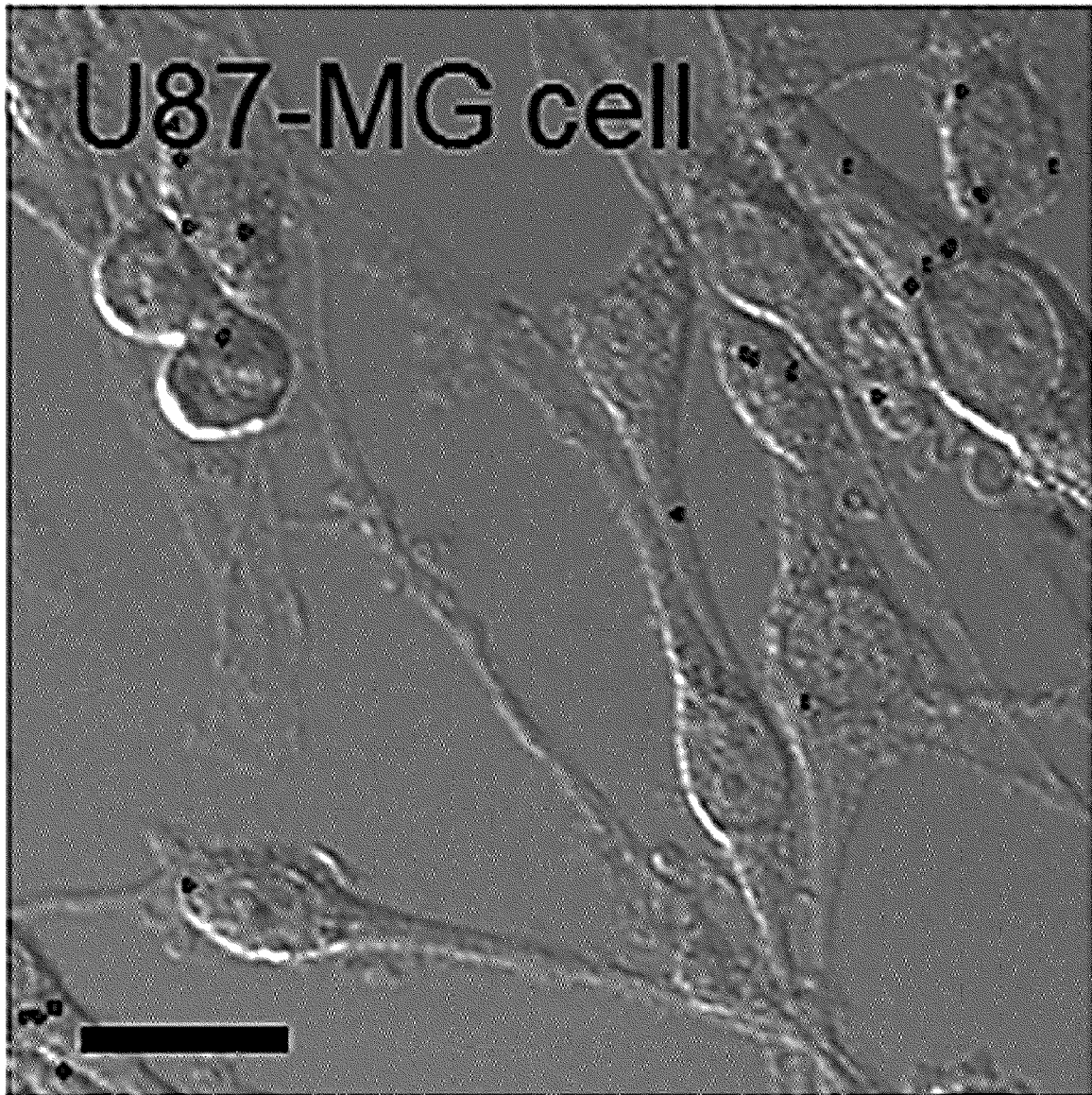
[도4a]



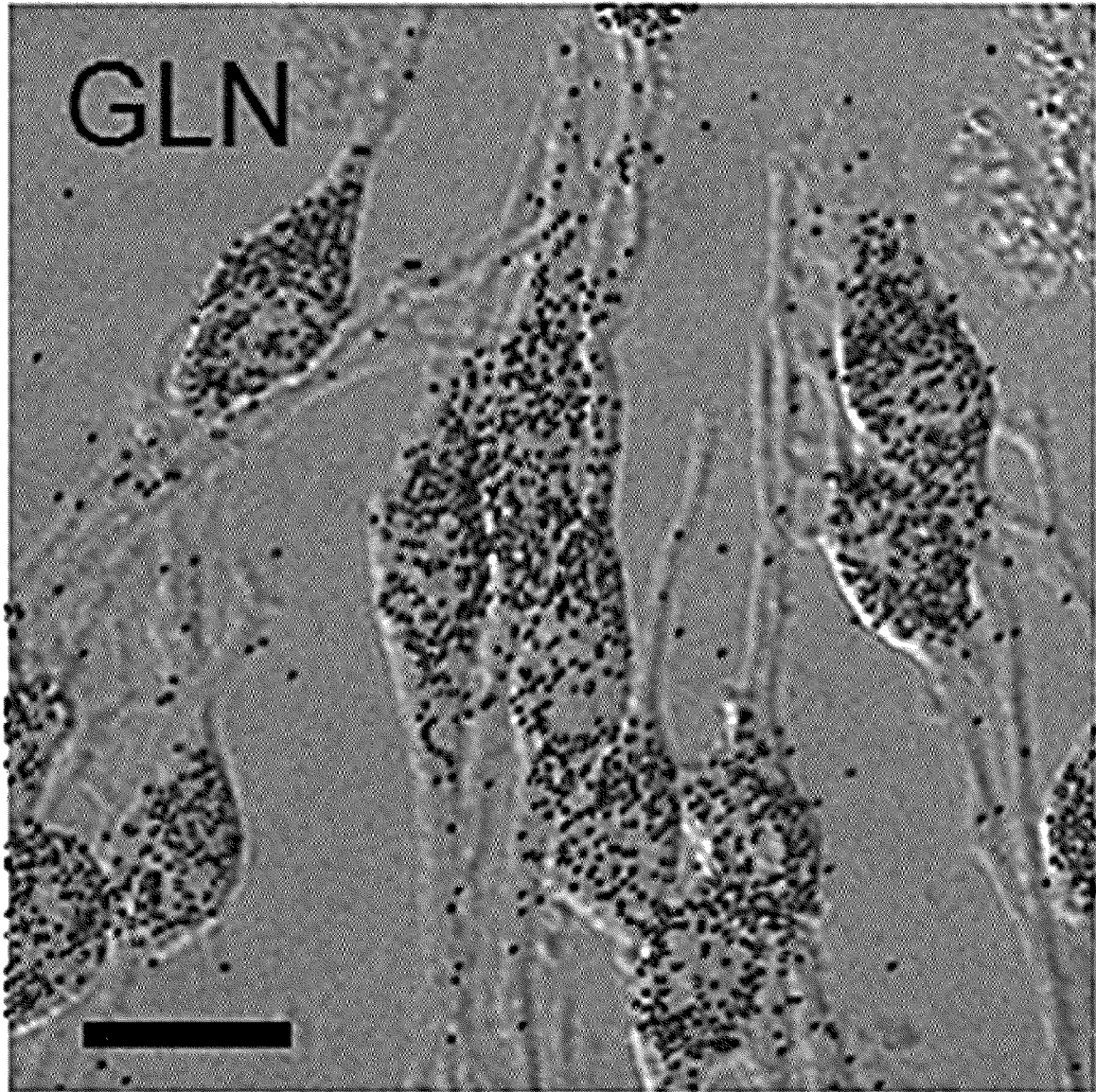
[도4b]



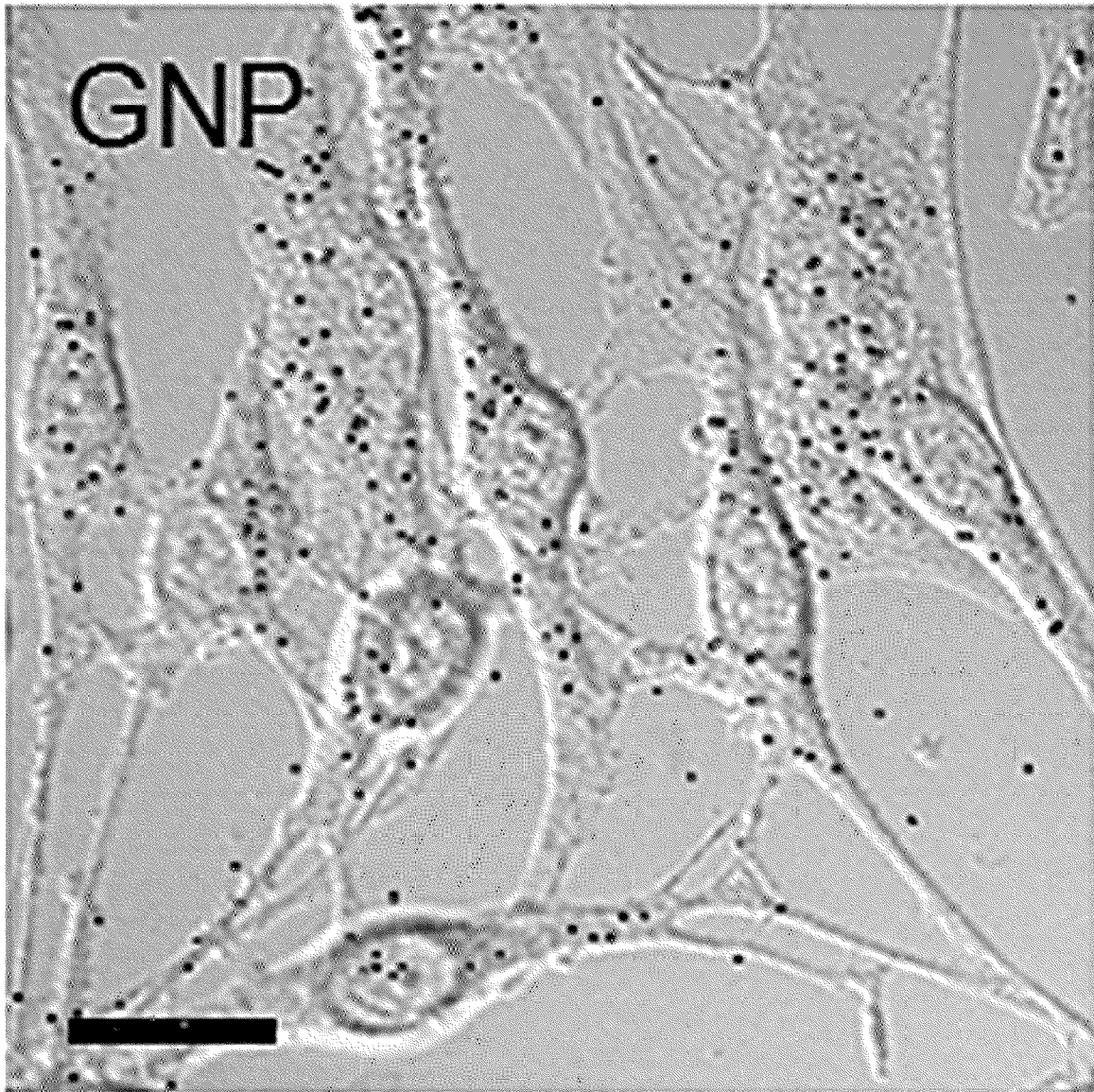
[도5a]



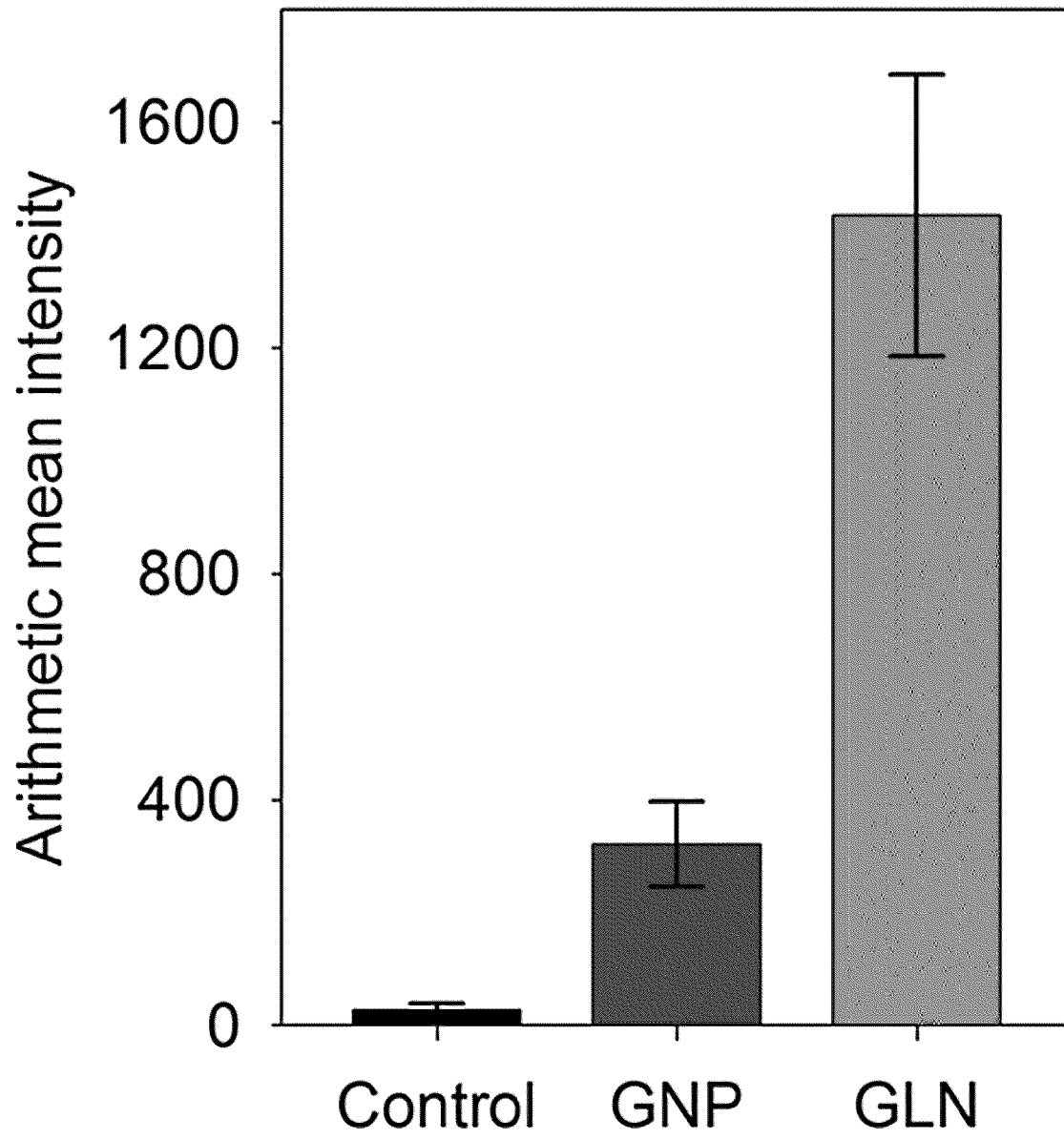
[도5b]



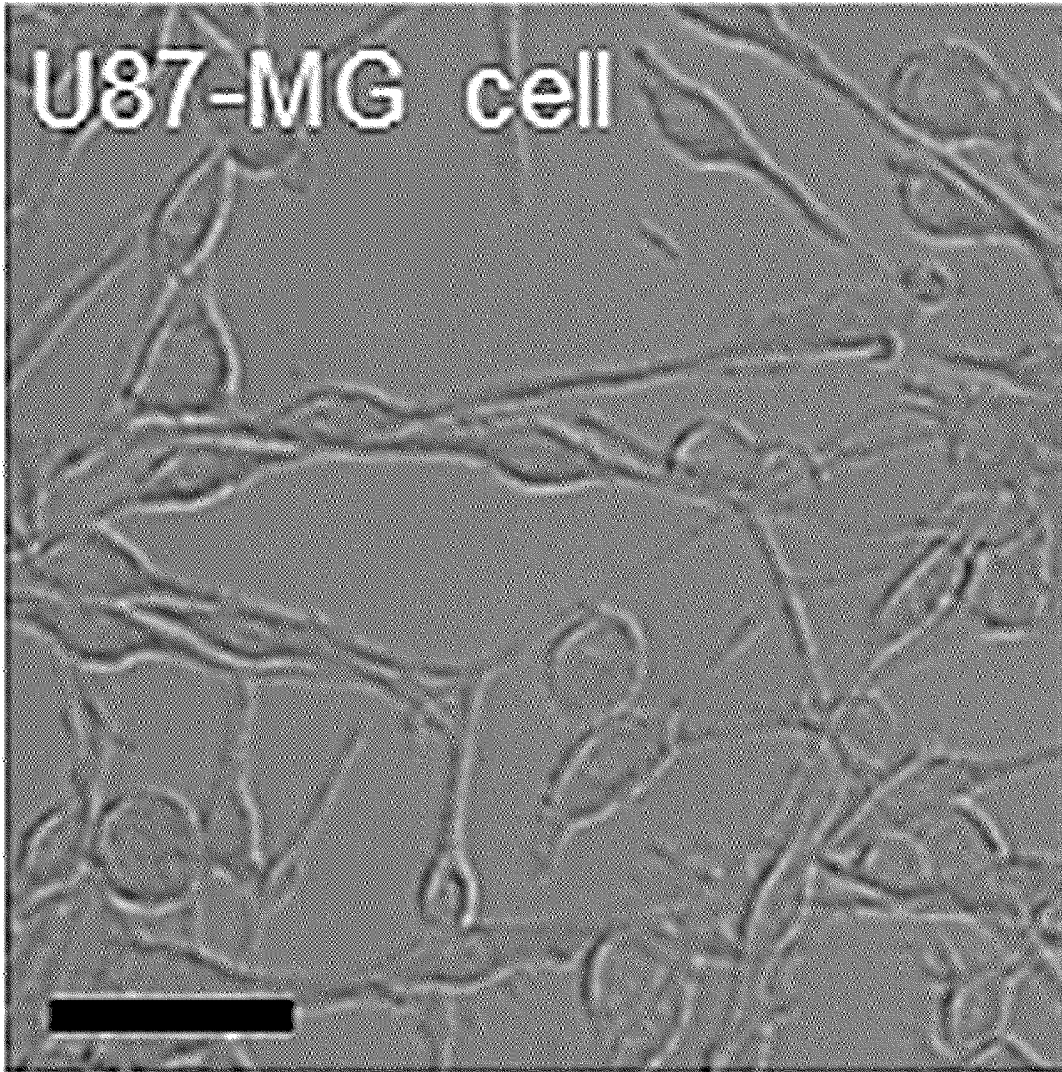
[도5c]



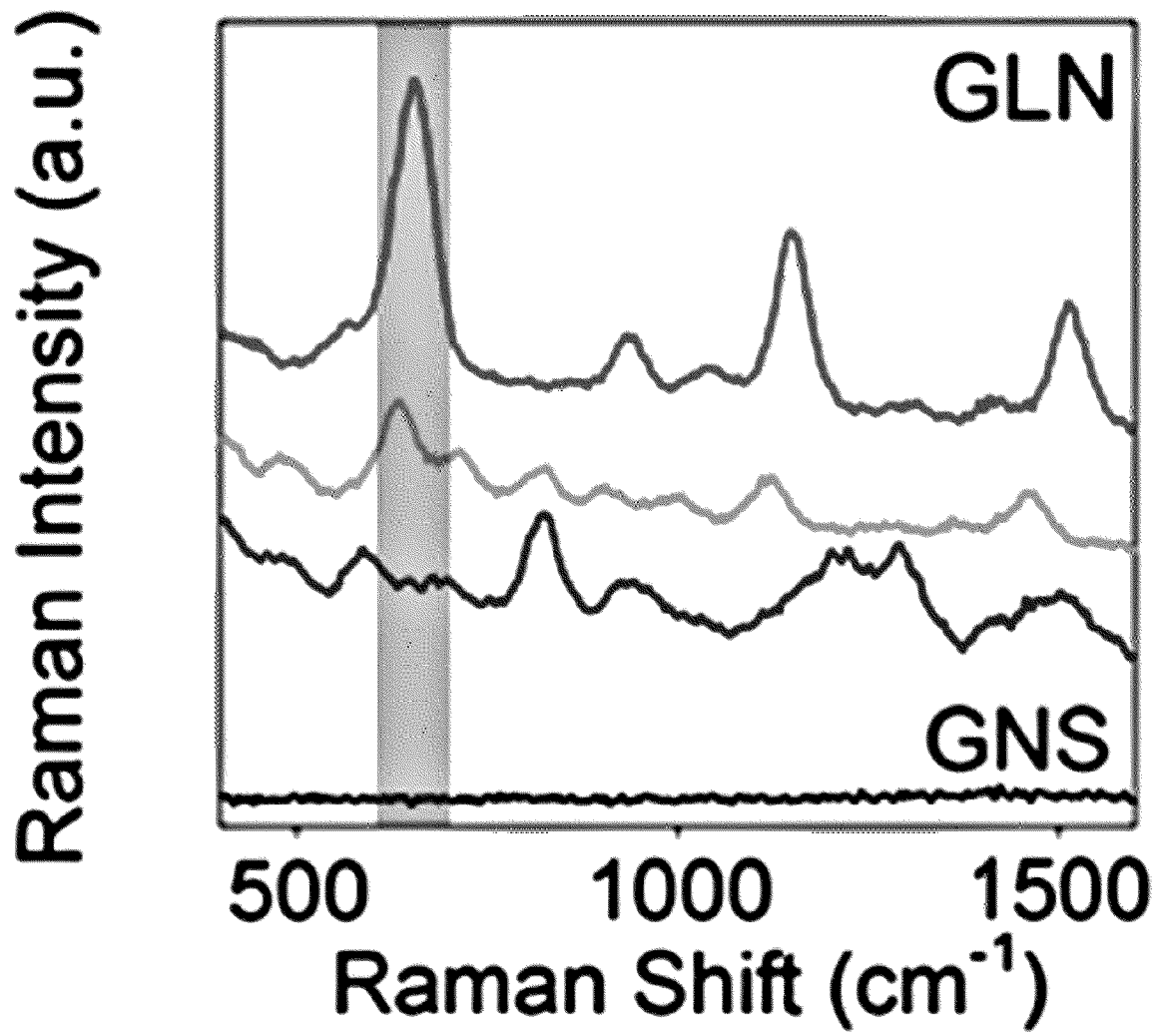
[도5d]



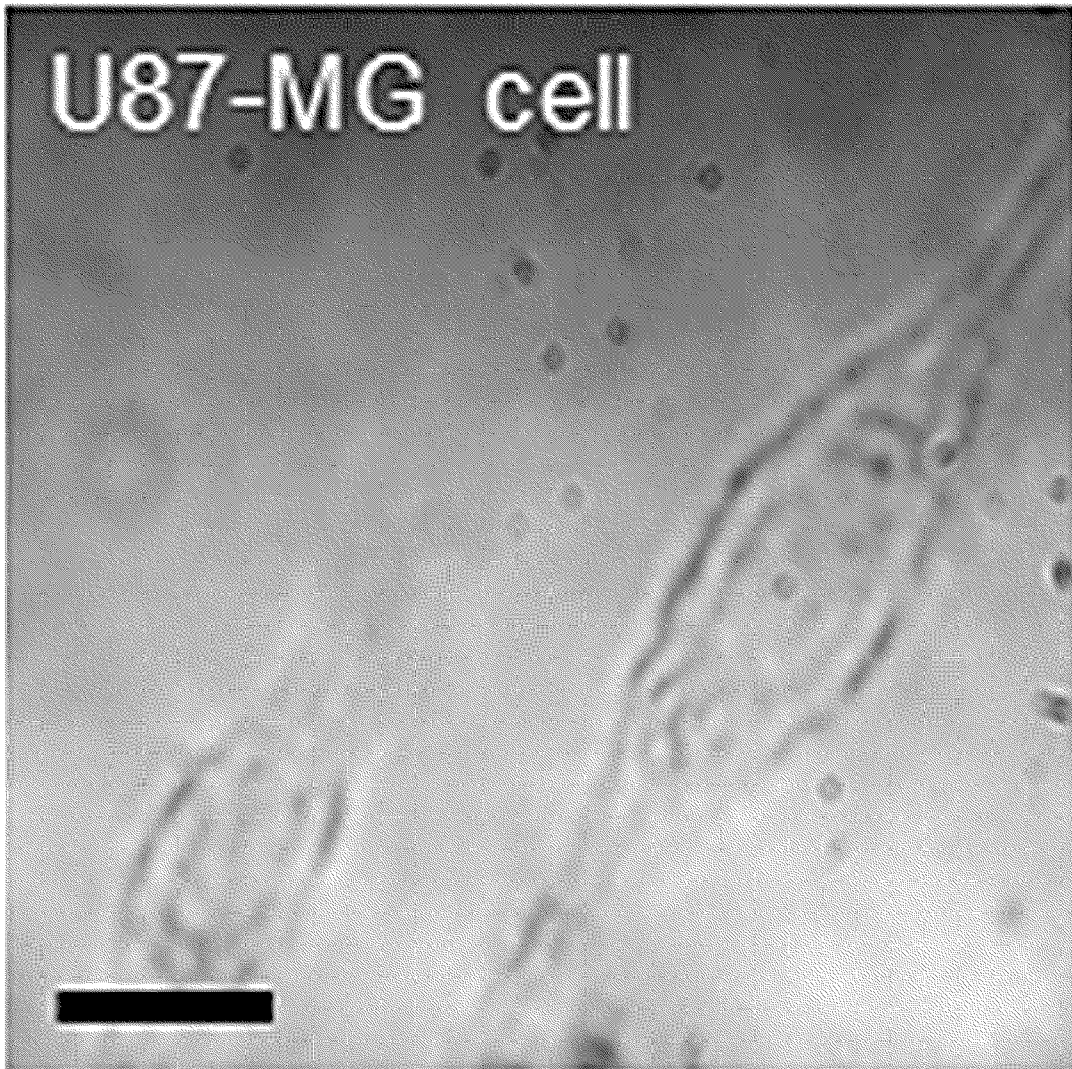
[도6a]



[도6b]



[도6c]



[도6d]

Raman Intensity (10^3)
1.00 2.00

