(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0060452
(43) 공개일자 2014년05월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) *C07K 17/04* (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01) *B82Y 15/00* (2011.01)
(21) 출원번호 10-2013-0081190
(22) 출원일자 2013년07월10일
심사청구일자 2013년07월10일
(30) 우선권주장
1020120126843 2012년11월09일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
이지원
서울 광진구 아차산로70길 62, 301동 204호 (광장동, 광장현대3단지아파트)
이은정
서울특별시 성북구 종암동 삼성 래미안 세레니티 아파트 210동 102호
이종환
서울특별시 동대문구 용두동 191-5번지 가동 302호
(74) 대리인
특허법인다나

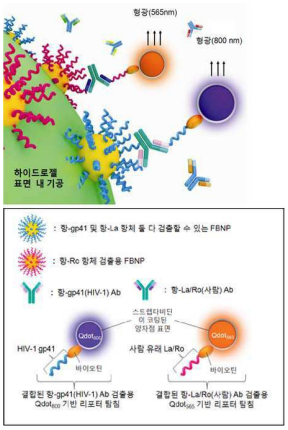
전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 **단백질 나노입자 융합 하이드로젤의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 단백질 나노입자 융합 하이드로젤의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 질환 마커 검출용 탐침을 표출하는 단백질 나노입자가 고정된 하이드로젤을 사용하여 질환 마커의 고감도/동시다중 검출이 가능하다.

대 표 도 - 도9



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2012008085
부처명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원_도약연구
연구과제명	의료기능 맞춤형 단백질 나노입자 기반 차세대 나노의료 혁신기술 개발
기 여 율	4/5
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2012.05.01 ~ 2013.04.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2010-0029409
부처명	교육과학기술부
연구사업명	선도연구센터육성(ERC)
연구과제명	실시간 체외검지용 기능성 소재연구
기 여 율	1/5
주관기관	성균관대학교 산학협력단
연구기간	2012.09.01 ~ 2013.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

질환 마커 검출용 탐침을 표출하는 단백질 나노입자가 고정된 하이드로젤을 포함하는 질환 마커 검출용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

단백질 나노입자는 자가조립 능력이 있는 단백질로부터 제조되고, 구형, 막대형 또는 선형 형태를 갖는 질환 마커 검출용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

자가조립 능력이 있는 단백질은 페리틴 중쇄(ferritin heavy chain), 사카로마이세스 세르비시애(*Saccharomyces cerevisiae*) 유래의 Sup35 단백질 또는 바이러스 캡시드 단백질을 포함하는 질환 마커 검출용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

질환 마커 검출용 탐침은 질환 마커와 결합할 수 있는 단백질 또는 펩타이드, 또는 항체인 질환 마커 검출용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

질환 마커와 결합할 수 있는 단백질 또는 펩타이드는 사람의 RO(SSA) 단백질 또는 사람의 La(SSA) 단백질을 포함하는 자가면역질환 자가항체에 특이적인 항원 단백질, 또는 HIV-1 gp41 펩타이드를 포함하는 바이러스 유래 항원 단백질을 포함하는 질환 마커 검출용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

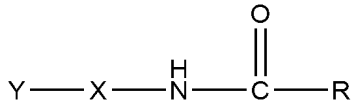
질환 마커 검출용 탐침을 표출하는 단백질 나노입자는 자가조립 능력이 있는 단백질 및 하나 이상의 질환 마커 검출용 탐침이 융합된 키메릭 단백질로부터 제조되는 질환 마커 검출용 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 질환 마커 검출용 탐침을 표출하는 단백질 나노입자가 고정된 하이드로젤은

하기 화학식 1로 표시되는 단백질 나노입자와 고분자 전구용액을 중합 반응시켜 제조하는 질환 마커 검출용 조성물:

[화학식 1]



상기 식에서,

X는 단백질 나노입자이고,

Y는 질환 마커 검출용 탐침이며,

R은 비닐기, 아크릴기, 또는 탄소수 1 내지 30의 알킬로 치환되거나 비치환된 아크릴기를 나타낸다.

청구항 8

제7항에 있어서,

고분자는 폴리아크릴산, 폴리아크릴아마이드, 폴리하이드록시에틸 메타크릴레이드, 폴리에틸렌글리콜, 폴리(N,N-에틸아미노에틸 메타크릴레이트), 히알루론산 및 키토산으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 질환 마커 검출용 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서,

고분자 전구용액은 고분자 100 중량부에 대하여 0.1 내지 0.2 중량부의 중합개시제를 더 포함하는 질환 마커 검출용 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

중합개시제는 암모늄 퍼설페이트, 테트라메틸에틸렌디아민, 리보플라빈, 리보플라빈-5'-포스페이트, 2-히드록시-2-메틸프로파논 및 2,2-디에톡시아세토페논으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 질환 마커 검출용 조성물.

청구항 11

제7항에 있어서,

중합은 화학적 중합법, UV 중합법 및 광화학적 중합법으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 질환 마커 검출용 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서,

질환 마커 및 질환 마커 검출용 탐침의 복합체를 탐지할 수 있는 리포터 탐침을 더 포함하는 질환 마커 검출용 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서,

리포터 탐침은 HRP(Horseradish Peroxidase) 또는 AP(Alkaline Phosphatase)를 포함하는 리포터 효소로 컨쥬게이트된 항 사람 IgG; HIV-1 gp41 펩타이드를 포함하는 바이러스 항원; 바이오틴이 결합된 HIV-1 gp41 펩타이드를 포함하는 바이오틴이 결합된 바이러스 항원; 또는 바이오틴이 결합된 사람의 La(SSA) 단백질 또는 Ro(SSA) 단백질을 포함하는 사람 자가항원 중 어느 하나인 질환 마커 검출용 조성물.

청구항 14

제12항에 있어서,

리포터 탐침은 형광물질로 표지된 것인 질환 마커 검출용 조성물.

청구항 15

질환 마커 검출용 탐침을 표출하는 단백질 나노입자가 고정된 하나 이상의 하이드로젤과 검출 대상 시료를 반응시키는 단계;

상기 단계로부터 얻은 반응물과 리포터 탐침을 반응시키는 단계; 및

질환 마커-질환 마커 검출용 탐침-리포터 탐침의 결합에 의한 시료의 흡광 변화 또는 형광 강도의 변화를 측정하여 하나 이상의 질환 마커를 검출하는 단계를 포함하는 질환 마커의 검출방법.

청구항 16

제15항에 있어서,

질환 마커 검출용 탐침을 표출하는 단백질 나노입자는 자가조립 능력이 있는 단백질 및 하나 이상의 질환 마커 검출용 탐침이 융합된 키메릭 단백질로부터 제조되는 질환 마커의 검출방법.

청구항 17

제16항에 있어서,

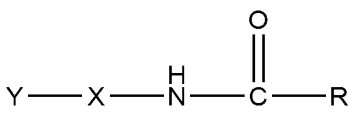
자가조립 능력이 있는 단백질은 페리틴 중쇄(ferritin heavy chain), 사카로마이세스 세르비시애(*Saccharomyces cerevisiae*) 유래의 Sup35 단백질 또는 바이러스 캡시드 단백질을 포함하는 질환 마커의 검출방법.

청구항 18

제15항에 있어서,

질환 마커 검출용 탐침을 표출하는 단백질 나노입자가 고정된 하이드로젤은 하기 화학식 1로 표시되는 단백질 나노입자와 고분자 전구용액을 중합 반응시켜 제조하는 질환 마커의 검출방법:

[화학식 1]



상기 식에서,

X는 단백질 나노입자이고,

Y는 질환 마커 검출용 탐침이며,

R은 비닐기, 아크릴기, 또는 탄소수 1 내지 30의 알킬로 치환되거나 비치환된 아크릴기를 나타낸다.

청구항 19

제18항에 있어서,

고분자는 폴리아크릴산, 폴리아크릴아마이드, 폴리하이드록시에틸 메타크릴레이드, 폴리에틸렌글리콜, 폴리(N,N-에틸아미노에틸 메타크릴레이트), 히알루론산 및 키토산으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 질환 마커의 검출방법.

청구항 20

제15항에 있어서,

질환 마커 검출용 탐침은 사람의 RO(SSA) 단백질 또는 사람의 La(SSA) 단백질을 포함하는 자가면역질환 자가항체에 특이적인 항원 단백질, 또는 HIV-1 gp41 펩타이드를 포함하는 바이러스 유래 항원 단백질을 포함하는 질환 마커의 검출방법.

청구항 21

제15항에 있어서,

리포터 탐침은 HRP(Horseradish Peroxidase) 또는 AP(Alkaline Phosphatase)를 포함하는 리포터 효소로 컨쥬게이트된 항 사람 IgG; HIV-1 gp41 펩타이드를 포함하는 바이러스 항원; 바이오틴이 결합된 HIV-1 gp41 펩타이드를 포함하는 바이오틴이 결합된 바이러스 항원; 또는 바이오틴이 결합된 사람의 La(SSA) 단백질 또는 Ro(SSA) 단백질을 포함하는 사람 자가항원 중 어느 하나인 질환 마커의 검출방법.

청구항 22

제15항에 있어서,

리포터 탐침은 형광물질로 표지된 것인 질환 마커의 검출방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 질환 마커 검출용 탐침을 표출하는 단백질 나노입자가 고정된 하이드로젤을 사용하여 질환 마커의 고감도/동시다중 검출이 가능한 단백질 나노입자 융합 하이드로젤의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 특정 단백질-단백질 상호 작용, 예를 들어, 항원-항체를 기반으로 하는 단백질 검출 기술에 있어서 중요한 요소는 단백질 탐침(probe)의 활성화 및 표적물질과의 특이적 결합 능력을 유지하는 것이다. 다양한 종류의 단백질 칩 고체 기판 표면에 단백질을 접착하는 기존의 방법은 단순 흡착/확산 또는 단백질의 일차 아민 그룹의 공유결합에 의한 고정화 또는 그것을 기반으로 한 방법이 많다. 그러나 단백질은 일반적으로 기판 표면 위에서 무작위적으로 접착되고, 단백질의 구조가 쉽게 변형되므로 단백질의 활성이 저해되며, 이로 인해 표면 물질과의 결합이 불가능해져 특이적 결합이 효율적이지 못한 큰 문제점이 있다. 또한 단순 흡착으로 기판 표면에 단백질 탐침

이 고정화 된 경우, 검출 과정 중 강도 높은 세척 조건으로 단백질 탐침이 씻겨 나가거나 기판 표면에 더 높은 친화력을 가지는 다른 분자로 전이될 수 있으며, 무엇보다도 단백질 칩 기판 표면에 고정화되는 단백질 탐침의 정량적 제어와 활성화 유지가 어렵다는 큰 문제점이 있다[Kusnezow, W. Hoheisel, J.D. *J. Mol. Recognit.* 16, 165-176 (2003); Park, J.S. *et al. Nat. Nanotechnol.* 4, 259-264 (2009); Kingsmore, S.F. *Nat Rev Drug Discov.* 5(4), 310-20 (2006); Ellington, A.A., Kullo, I.J., Bailey, K.R. & Klee, G.G. *Clin. Chem.* 56(2), 186-193 (2010)].

[0003] 인위적으로 합성되는 기존의 유무기 나노입자 (금속 나노입자)와는 달리, 단백질 나노입자는 생명체의 세포내에서 자가조립에 의해 합성되는 나노소재로서, 균일한 입도 분포 및 안정성을 확보하고 있음은 물론, 미생물 세포내에서도 손쉽게 경제적 대량생산이 가능한 소재이다. 또한 유전공학적 표면 개질을 통해 다양한 특성/기능을 가진 단백질 나노입자로 개발할 수 있으며, 특히 표면에 질환 마커 검출 펩타이드 또는 단백질(질환 마커 검출용 탐침)을 표출시켰을 때 일정한 배향성과 높은 직접도 및 구조적 안정성을 확보할 수 있다는 장점을 가지고 있어 고감도 진단시스템을 위한 탐침(probe) 소재로 활용되고 있다[Park, J.S. *et al. Nat. Nanotechnol.* 4, 259-264 (2009); Seo, H.S. *et al. Adv. Funct. Mater.* 20, 4055-4061 (2010); Lee, J.H. *et al. Adv. Funct. Mater.* 20, 2004-2009 (2010); Lee, S.H. *et al. The FASEB J.* 21, 1324-1334 (2007)].

[0004] 하이드로젤은 다공성의 3차원 구조체로 내부에 일정한 수분 함량 유지가 가능하므로 단백질 분석 및 활용 기술에 널리 사용되고 있다. 특히 일정한 결합 반응에 의해 중합체를 형성할 때 특정 잔기를 가진 물질과의 공유 결합이 가능하므로 기능성 물질의 고정화에도 널리 사용되고 있으며, 하이드로젤 내부에 효소와 같은 단백질을 고정하면 효소의 활성을 장기간 유지할 수 있다[Nolan, J.P. *TRENDS in Biotechnology.* 20, 9-12 (2002)]. 하지만 하이드로젤만을 효소 지지체로 사용하는 경우 하이드로젤이 수분에 의해 팽윤되면서 안에 있던 효소들이 확산되어 젤 밖으로 나가므로 시간이 지남에 따른 안정성이 급격히 떨어지는 한계가 있다[Basri, M. *et al. J. Appl. Polym. Sci.* 82, 1404-1409 (2001)]. 따라서 단백질 효소 또는 단백질 탐침을 수분이 있는 하이드로젤에 고정시키면서 활성을 장기간 유지하기 위한 기술이 필요하다.

[0005] 따라서, 본 발명에서는 난치성 질환 중 증상만으로는 임상적 진단이 어려운 쇼그렌 증후군과 후천성 면역 결핍 증후군을 모델 질환으로 선정하여, 단백질 나노입자 표면에 두 질환에 특이적인 검출용 탐침을 표출시킨 단백질 나노입자를 합성하고, 이를 3차원 다공성의 하이드로젤과 융합하여 표면적과 안정성이 극대화된 3차원의 진단 센서 시스템을 개발하여 고감도/동시다중검출이 가능한 실용적인 진단 시스템 구축하고자 하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 공개특허 제2010-0060931호

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) 1. Jason Colomb et al., Magnetic Resonance in Medicine 64:1792-1799 (2010)

(비특허문헌 0002) 2. Min Kyoon Shin et al. Adv. Mater. 2009, 21, 1712-1715

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 표면에 질환 마커 검출용 탐침을 표출시킨 단백질 나노입자를 사용하여 검출용 탐침의 고집적화 및 배향성 제어를 가능케 하고, 이를 3차원 다공성 하이드로젤에 고정시켜 진단 시스템의 부피 대비 표면적을 획기적으로 증가시킴과 동시에 검출용 탐침의 장기 활성 유지 및 정량 제어를 가능하여 효과적으로 질환 마커를 검출하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 질환 마커 검출용 탐침을 표출하는 단백질 나노입자가 고정된 하이드로젤을 포함하는 질환 마커 검출용 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명은 또한 질환 마커 검출용 탐침을 표출하는 단백질 나노입자가 고정된 하나 이상의 하이드로젤과 검출 대상 시료를 반응시키는 단계; 상기 단계로부터 얻은 반응물과 리포터 탐침을 반응시키는 단계; 및 질환 마커-질환 마커 검출용 탐침-리포터 탐침의 결합에 의한 시료의 흡광 변화 또는 형광 강도의 변화를 측정하여 하나 이상의 질환 마커를 검출하는 단계를 포함하는 질환 마커의 검출방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명은 단백질 나노입자와 3차원 하이드로젤의 융합을 모델 질환인 쇼그렌 증후군, AIDS 뿐만 아니라 다양한 질환의 진단에 범용적으로 적용할 수 있는 기반 기술을 제공하므로 조기진단을 통한 난치성 질환의 치료 및 예방에 큰 도움이 될 것으로 생각된다.

[0012] 또한, 본 발명의 단백질 나노입자 융합 하이드로젤은 고정화된 단백질 탐침의 활성을 안정적으로 장시간 유지시킬 수 있으므로 의료 현장에서 다양한 질병에 대해 고민감도로 검사할 수 있는 실용적인 진단 센서 개발에 적용할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 질환 마커 검출용 탐침으로, 쇼그렌 자가항체 검출용 탐침(La 또는 Ro) 또는 AIDS 표지인자 항체 검출용 탐침(gp41 펩타이드)가 표출된 구형의 단백질 나노입자 및 이의 발현 벡터 모식도이다.

도 2는 질환 마커 검출용 탐침이 표출된 구형 단백질 나노입자의 TEM 사진도로, (a)는 쇼그렌 자가항체 검출용 탐침인 Ro 단백질이 표출된 단백질 나노입자, (b)는 쇼그렌 자가항체 검출용 탐침인 La 단백질이 표출된 단백질 나노입자, (c)는 쇼그렌 자가항체 검출용 탐침인 La 단백질과 AIDS 표지인자 항체 검출용 탐침(gp41 펩타이드)이 표출된 단백질 나노입자이다.

도 3은 구형 단백질 나노입자 융합 하이드로젤의 제조 모식도(a), 제조된 단백질 나노입자-하이드로젤 복합체의 SEM 사진도(b) 및 하이드로젤에 고정된 단백질 나노입자 분포의 SEM 사진도(c)를 나타낸 것이다.

도 4는 2차원 기판 및 3차원 하이드로젤에 고정화된 형광 구형 단백질 나노입자의 모식도 및 시간별 형광 단백질 나노입자의 형광 세기 변화를 나타낸 것이다.

도 5는 AIDS와 쇼그렌 증후군 진단을 위한 구형 단백질 나노입자 융합 하이드로젤을 이용한 표적 항체 검출 시스템의 모식도이다.

도 6은 AIDS와 쇼그렌 증후군 진단을 위한 La 및 gp41 펩타이드가 동시에 표출된 구형 단백질 나노입자 융합 하이드로젤을 이용한 표적 항체 검출 시스템의 민감도 검증 결과를 나타낸 것으로, (a)는 La 자가 항체 검출 민감도 검증 결과, (b) 는 AIDS 표적 항체 검출 민감도 검증 결과이다.

도 7은 구형 단백질 나노입자 융합 하이드로젤의 쇼그렌 증후군 진단 시 민감도 검증 결과(a)와, 시중 판매되고 있는 ELISA 와 민감도 비교 실험 결과(b)를 나타낸 것이다.

도 8은 동시 다중 검출시스템에 적용하기 위해 선정된 양자점(quantum dot)들의 방출 파장 측정 결과(여기 파장: 350nm)를 나타낸 것이다.

도 9는 구형 단백질 나노입자 융합 하이드로젤을 이용한 AIDS와 쇼그렌 증후군의 동시 다중 검출 모식도이다.

도 10은 구형 단백질 나노입자 융합 하이드로젤을 이용한 AIDS와 쇼그렌 증후군의 동시 다중 검출 시 AIDS 및 쇼그렌 환자 샘플을 적용한 결과(a-f)를 나타낸 것이다.

도 11은 질환 마커 검출 탐침 [쇼그렌 자가항제 검출용 탐침 (La)] 이 표출된 단백질 나노로드 발현 벡터 모식도(a) 및 대장균 내 발현 결과(b)를 나타낸 것이다.

도 12는 질환 마커 검출 탐침이 표출된 단백질 나노로드의 조립 모식도 및 TEM 사진도이다.

도 13은 단백질 나노로드 융합 하이드로젤 제조 모식도 및 SEM 사진도이다.

도 14는 쇼그렌 증후군 진단을 위한 단백질 나노로드 융합 하이드로젤을 이용한 표적 항체 검출 시스템의 모식도이다.

도 15는 PBS 버퍼 내에서 쇼그렌 증후군 진단을 위한 단백질 나노로드 융합 하이드로젤을 이용한 표적 항체 검출 시스템의 민감도 검증 결과이다.

도 16은 사람 혈청에서 쇼그렌 증후군 진단을 위한 단백질 나노로드 융합 하이드로젤을 이용한 표적 항체 검출 시스템의 민감도 검증 결과이다.

도 17은 질환 마커 검출 탐침 [쇼그렌 자가항체 검출용 탐침 (La)]와 바이오틴이 동시에 표출된 단백질 나노로드의 발현 벡터 모식도 및 TEM 사진도이다.

도 18은 스트렙타비딘-바이오틴 결합 기반 단백질 나노로드 융합 하이드로젤을 이용한 표적 항체 검출 시스템의 모식도이다.

도 19는 PBS 버퍼 내에서 스트렙타비딘-바이오틴 결합 기반 단백질 나노로드 융합 하이드로젤을 이용한 표적 항체 검출 시스템의 민감도 검증 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.

[0015] 본 발명은 질환 마커 검출용 탐침을 표출하는 단백질 나노입자가 고정된 하이드로젤을 포함하는 질환 마커 검출용 조성물에 관한 것이다.

[0016] 본 명세서에서, 용어 "재조합 단백질(recombinant protein) 또는 융합 단백질(fusion protein)"은 하나의 단백질의 특정 부위, N-말단 또는 C-말단에 다른 단백질이 연결되거나 다른 아미노산 서열이 부가된 단백질을 의미한다.

[0017] 용어, "키메릭 단백질" 또는 "단백질 나노입자 탐침"은 최광의 의미로 사용된 것으로서 유전공학 또는 단백질공학 기술을 바탕으로 단백질 나노입자의 표면에 외래 생체 물질을 결합시킴으로써 다양한 기능성이 부여된 단백질 또는 단백질 나노입자를 의미한다. 비록 본 발명에서는 인간 유래의 페리틴 중쇄 또는 사카로마이세스 세르비시애(*Saccharomyces cerevisiae*) 유래의 Sup35 단백질이 질환 마커 검출용 탐침의 표면 표출을 위한 모델 스캐폴드(scaffold)로 사용되었지만, 자가조립 능력이 있는 단백질, 또는 다른 바이러스 캡시드 단백질, 또는 바이러스-유사 입자들도 질환 마커 검출용 탐침을 표출하는 키메릭 단백질 또는 단백질 나노입자 또는 단백질 나노입자 탐침의 생성에 사용될 수 있다. 상기 단백질 나노입자는 구형, 막대형(로드 형태), 선형 등의 형태를 가질 수 있고, 구형인 경우, 직경이 5 내지 100 nm인 것일 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다. 상기 막대형(또는 로드 형태) 단백질 나노입자는 "단백질 나노로드"와 혼용되어 사용할 수 있다.

[0018] 용어, "표출" 또는 "발현"은 단백질 나노입자의 표면, 예컨대, N-말단(또는 아미노 말단) 또는 C-말단(또는 카르복실 말단) 등에 외래 단백질을 제시할 때 사용하는 의미로, 자가조립 능력이 있는 단백질에 융합되어 함께 발현되면서 단백질 나노입자의 N-말단, 또는 C-말단 등에 외래 단백질이 표면 표출 또는 발현할 수 있다.

[0019] 용어, "발현 벡터"는 발현 벡터의 전사에 제공되는 추가단편에 작동가능하게 연결된 관심의 폴리펩티드를 암호화하는 단편으로 구성되는 선형 또는 원형의 DNA 분자이다. 그와 같은 추가단편은 프로모터 및 종료암호 서열을 포함한다. 발현 벡터는 하나 이상의 복제 개시점, 하나 이상의 선택마커, 폴리아데닐화 신호 등을 또한 포함한다. 발현 벡터는 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스 DNA로부터 유도되거나, 또는 둘 다의 요소를 함유한다.

[0020] 본 발명에 따른 3차원 구조를 이루는 하이드로젤과 단백질 나노 입자 탐침의 융합은 검출용 탐침의 고집적화 및 배향성 제어를 가능하게 하며, 진단 시스템의 부피 대비 표면적을 획기적으로 증가시킴과 동시에 검출용 탐침의 장기 활성 유지 및 정량 제어를 가능케 하는 기술이라 할 수 있다. 즉, 단백질 나노입자 융합 하이드로젤은 매우 균일한 다공성을 갖는 3차원 구조체이며, 뛰어난 수분 유지 능력이 있기 때문에 단백질 나노입자의 변성을 막아주어 장기간 활성 유지가 가능하게 하며, 또한 하이드로젤 내에 고정화된 단백질 나노입자의 고른 분산 및 정량 제어가 가능하다.

[0021] 일 구체예에 따르면, 이를 쇼그렌 증후군 및 후천성 면역 결핍 증후군 (AIDS) 질환 마커 검출에 적용한 결과,

기존 상용 진단시스템에 비해 월등히 향상된 민감도를 확인하였고, 또한 실제 쇼그렌 증후군과 AIDS 환자 혈액을 대상으로 실험한 결과, 높은 안정성과 민감도, 특이도를 가지고 두 질환의 질환 마커를 효과적으로 검출하였다.

[0022] 이러한 결과는 본 발명의 단백질 나노입자 융합 하이드로젤이 기존의 진단 시스템이 갖는 기술적 한계(낮은 민감도/특이도/재현성)를 극복함과 동시에 고감도/동시다중검출 나노바이오센서의 기반 플랫폼으로 응용이 가능하며, 또한 실제 환자 혈액 대상의 고감도 진단 시스템으로서 활용될 수 있음을 보여준다.

[0023] 본 발명에 따른 질환 마커 검출용 조성물에 있어서, 질환 마커는 쇼그렌 증후군의 항-La 자가항체 또는 항-Ro 자가항체 등의 사람 자가면역질환의 자가항체, 또는 HIV-1 항-gp41 항체 등의 바이러스 감염질환의 항 바이러스 항체일 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0024] 상기 질환 마커 검출용 탐침은 질환 마커의 종류에 따라 달라질 수 있어 특별히 제한하지는 않으며, 예를 들어, 질환 마커와 결합할 수 있는 단백질 또는 펩타이드, 또는 항체일 수 있다. 상기 질환 마커와 결합할 수 있는 단백질 또는 펩타이드는 사람 자가면역질환의 자가항체에 특이적인 항원 단백질, 예컨대, RO(SSA) 단백질, 사람의 La(SSA) 단백질 등, 또는 HIV-1 gp41 펩타이드 등의 바이러스 유래 항원 단백질 또는 펩타이드를 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다.

[0025] 상기 질환 마커 검출용 탐침을 표출하는 단백질 나노입자는 자가조립 능력이 있는 단백질 및 하나 이상의 질환 마커 검출용 탐침이 융합된 키메릭 단백질로부터 제조될 수 있다.

[0026] 상기 키메릭 단백질을 포함하는 발현 벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환시키고 항생제 마커를 이용하여 목적하는 형질전환체를 선별할 수 있다.

[0027] 상기에서 선별된 형질전환체를 통상의 배양방법에 따라 배양하여 정제함으로써 본 발명의 단백질 나노입자를 얻을 수 있다.

[0028] 상기 형질전환은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이런 방법에는 전기충격유전자전달법(electroporation), 원형질 융합, 인산 칼슘($CaPO_4$) 침전, 염화 칼슘($CaCl_2$) 침전, 실리콘 카바이드 섬유 이용한 교반, 아그로박테리아 매개된 형질전환, PEG, 덱스트란 설페이트, 리포펙타민 등이 포함되나 이로 제한되지 않는다.

[0029] 또한, 숙주세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 목적에 가장 적합한 숙주세포를 선택하여 사용하면 된다.

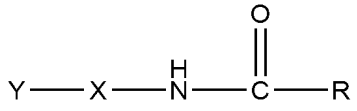
[0030] 숙주세포로는 대장균(*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 또는 스타필로코쿠스(*Staphylococcus*)와 같은 원핵 숙주 세포가 있으나 이로 제한되는 것은 아니다. 또한, 진균(예를 들어, 아스페르길러스(*Aspergillus*)), 효모(예를 들어, 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세르비시애(*Saccharomyces cerevisiae*), 쉬조사카로마세스(*Schizosaccharomyces*), 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*))등과 같은 하등 진핵 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 포유동물 등을 포함하는 고등 진핵생물 유래의 세포를 숙주세포로 사용할 수 있다.

[0031] 상기 단백질 나노입자 융합 하이드로젤은 단백질 나노입자가 공유결합을 통해 하이드로젤에 고정되어 있어 질환 마커 검출용 탐침의 유실을 개선할 수 있다.

[0032] 이러한 질환 마커 검출용 탐침을 표출하는 단백질 나노입자는 단백질 나노입자를 중합반응이 가능한 화학 구조로 개질시킨 후 하이드로젤 제조를 위한 고분자 전구체와 반응시켜 제조할 수 있다.

[0033] 보다 구체적으로, 하기 화학식 1로 표시되는 단백질 나노입자와 고분자 전구용액을 중합 반응시켜 제조할 수 있다:

[0034] [화학식 1]

[0035] 

[0036] 상기 식에서,

[0037] X는 단백질 나노입자이고,

[0038] Y는 질환 마커 검출용 탐침이며,

[0039] R은 비닐기, 아크릴기, 또는 탄소수 1 내지 30의 알킬로 치환되거나 비치환된 아크릴기를 나타낸다.

[0040] 본 발명의 화합물의 치환체 정의에 사용된 용어는 하기와 같다.

[0041] "알킬"은 다른 기재가 없는 한, 탄소수 1 내지 30의 직쇄 또는 분지쇄 또는 고리형의 포화 탄화수소를 가리킨다. C_{1-30} 알킬기의 예는 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 펜틸, 헥실, 헵틸, 옥틸, 노닐, 데실, 이소프로필, 이소부틸, sec-부틸 및 tert-부틸, 이소펜틸, 네오펜틸, 이소헥실, 이소헵틸, 이소옥틸, 이소노닐 및 이소데실이 포함되나, 이들에 제한되지 않는다. 또한 상기 알킬은 "시클로알킬"을 포함한다. 상기 시클로알킬은 다른 기재가 없는 한, 탄소수 3 내지 12의 비방향족, 포화 탄화 수소환으로서 단일환 및 융합환을 포함한다. C_{3-12} 시클로알킬의 대표적 예는 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸, 시클로헥실, 시클로헵틸 및 시클로옥틸이 포함되나, 이들에 제한되지 않는다.

[0042] 상기 화학식 1에서 치환기 R은 고분자와 중합 가능한 작용기를 의미하며, 단백질 나노입자의 말단 아민기가 상기 작용기로 치환되어 하이드로젤 제조를 위한 고분자 전구체와 반응하게 된다.

[0043] 따라서, 상기 치환기 R은 비닐기, 아크릴기, 또는 탄소수 1 내지 30의 알킬로 치환되거나 비치환된 아크릴기를 나타낼 수 있다. 보다 구체적으로, 비닐기, 아크릴기, 또는 탄소수 1 내지 6의 알킬로 치환되거나 비치환된 아크릴기를 나타낼 수 있다. 가장 구체적으로, 비닐기일 수 있다.

[0044] 일 구체예에 따르면, 단백질 나노입자 표면에 표출된 아민기가 N-석신이미딜아크릴레이트(N-succinimidylacrylate, NSA)와 반응하여 중합반응이 가능한 비닐기를 가진 단백질 나노입자가 준비되는데, 상기 화학식 1의 화합물은 이러한 표면 개질된 단백질 나노입자를 의미한다.

[0045] 상기 고분자는 폴리아크릴산, 폴리아크릴아마이드, 폴리하이드록시에틸 메타크릴레이드, 폴리에틸렌글리콜, 폴리(N,N-에틸아미노에틸 메타크릴레이트), 히알루론산 또는 키토산 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다.

[0046] 상기 고분자 전구용액은 고분자를 물, 또는 완충용액에 첨가하여 제조할 수 있다. 상기 완충용액으로 PBS 등을 사용할 수 있다.

[0047] 고분자 전구용액의 젤화 반응은 기본적으로 고분자 단량체 혼합물의 고분자 중합 과정으로서, 중합개시제의 화학적인 분해를 통해 반응을 진행하는 화학적 중합법과 UV 혹은 플라스마와 같은 광개시에 의해 반응을 진행하는 광화학적 중합법 등이 가능하다.

[0048] 고분자 전구용액은 고분자 100 중량부에 대하여 0.1 내지 0.2 중량부의 중합개시제를 더 포함할 수 있다.

[0049] 상기 중합개시제는 암모늄 퍼설페이트, 테트라메틸에틸렌디아민, 리보플라빈, 리보플라빈-5'-포스페이트, 2-히드록시-2-메틸프로파논 또는 2,2-디에톡시아세토페논 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다.

[0050] 본 발명의 질환 마커 검출용 조성물은 질환 마커와 질환 마커 검출용 탐침의 복합체와 결합할 수 있는 리포터 탐침을 더 포함할 수 있다.

[0051] 상기 리포터 탐침은 질환 마커와 질환 마커 검출용 탐침의 결합 형태를 탐지하기 위한 것으로, 예컨대, 질환 마커로 쇼그렌 증후군의 항-La 자가항체 또는 항-Ro 자가항체, 또는 HIV-1 항-gp41 항체를 대상으로 할 경우, 질환 마커 검출용 탐침은 La, Ro 또는 gp41 항원이 될 수 있다. 따라서, 리포터 탐침은 항원-항체 복합체를 탐지하는 것으로, 상기 복합체의 형성량을 비교하고, 이로부터 질병 마커의 존재 여부, 양, 존재 패턴을 판단할 수 있고, 궁극적으로 질환의 발병 여부를 진단할 수 있는 것이다.

[0052] 여기서, "항원-항체 복합체"란 단백질성 질환 마커와 이에 특이적인 항체 또는 항체의 결합물을 의미하고, 항원-항체 복합체의 형성량이나 형성 패턴은 통상 2차 항체에 연계된 검출 라벨(detection label)의 시그널의 크기 및 패턴을 검출함으로써 측정이 가능하다. 이러한 검출 라벨은 효소, 형광물질, 리간드, 발광물질, 미세입자, 레독스 분자, 방사선 동위원소 등을 예로 들 수 있으나, 반드시 이로 제한되는 것은 아니다. 검출 라벨로서 효소가 사용되는 경우 이용 가능한 효소에는 β-글루쿠로니다제, β-D-글루코시다제, β-D-갈락토시다제, 우레아제, 퍼옥시다아제 또는 알칼라인 포스파타아제, 아세틸콜린에스테라제, 글루코즈 옥시다제, 헥소키나제와 GDPase, RNase, 글루코즈 옥시다제, 루시페라제, 포스포프럭토키나제, 포스포에놀피루베이트 카복실라제, 아스파르테이트 아미노트랜스페라제, 포스페놀피루베이트 데카복실라제, β-라타마제 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다. 검출 라벨로서 형광물질이 사용되는 경우 형광단백질, Dylight 488 NHE-ester dye, VybrantTM DiI, VybrantTM DiO, 양자점(quantum dots) 나노입자, 플루오로세인, 로다민, 루시퍼 엘로우, B-파이토에리쓰린, 9-아크리딘이소티오시아네이트, 루시퍼 엘로우 VS, 4-아세트아미도-4'-이소티오-시아나토스틸벤-2,2'-다이설폰산, 7-다이에틸아미노-3-(4'-이소티오시아토페닐)-4-메틸쿠마린, 석시니미딜-파이렌부티레이트, 4-아세트아미도-4'-이소티오시아나토스틸벤-2,2'-다이설폰산 유도체, LC™-Red 640, LC™-Red 705, Cy5, Cy5.5, 리사민, 이소티오시아네이트, 에리쓰로신 이소티오시아네이트, 다이에틸렌트리아민 펜타아세테이트, 1-다이메틸아미노나프틸-5-설포네이트, 1-아닐리노-8-나프탈렌 설포네이트, 2-소티토우이디닐-6-나프탈렌 설포네이트, 3-페닐-7-이소시아나토쿠마린, 9-이소티오시아나토아크리딘트, 크리딘 오렌지 9-이(소티(2-벤족사조일릴)페닐)멜레이미드 사디아졸, 스틸벤, 파이렌, 이벤도체, 형광 물질을 포함한 실리카, Ⅱ/Ⅳ족 반도체 양자점, Ⅲ/Ⅴ족 반도체 양자점, Ⅳ족 반도체 양자점, 또는 이다성분 혼성 구조체를 포함할 수 있으며, 바람직하게는 상기 형광물질은 양자점(quantum dots) 나노입자, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, ICG(indocyanine green), Cypate, ITCC, NIR820, NIR2, IRDye78, IRDye80, IRDye82, Cresy Violet, Nile Blue, Oxazine 750, Rhodamine800, 란탄나이드 계열 및 Texas Red로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 사용할 수 있고, 상기 양자점(quantum dots) 나노입자인 경우에는 Ⅱ-Ⅵ 또는 Ⅲ-Ⅴ족 화합을 사용할 수 있다. 이 경우 상기 양자점 나노입자는 CdSe, CdSe/ZnS, CdTe/CdS, CdTe/CdTe, ZnSe/ZnS, ZnTe/ZnSe, PbSe,PbS InAs, InP, InGaP, InGaP/ZnS 및 HgTe로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 사용할 수 있다. 검출 라벨로서 리간드가 사용되는 경우 이용 가능한 리간드에는 바이오틴 유도체 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다. 검출 라벨로서 발광물질이 사용되는 경우 이용 가능한 발광물질에는 아크리디늄 에스테르, 루시페린, 루시퍼라아제 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다. 검출 라벨로서 미세입자가 사용되는 경우 이용 가능한 미세입자에는 콜로이드 금, 착색된 라텍스 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다. 검출 라벨로서 레독스 분자가 사용되는 경우 이용 가능한 레독스 분자에는 페로센, 루테늄 착화합물, 바이올로젠, 퀴논, Ti 이온, Cs 이온, 디이미드, 1,4-벤조퀴논, 하이드로퀴논, $K_4W(CN)_8$, $[Os(bpy)_3]^{2+}$, $[RU(bpy)_3]^{2+}$, $[MO(CN)_8]^{4-}$ 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다. 검출 라벨로서 방사성 동위원소가 사용되는 경우 이용 가능한 방사성동위원소에는 ^{3}H, ^{14}C, ^{32}P, ^{35}S, ^{36}Cl, ^{51}Cr, ^{57}Co, ^{58}Co, ^{59}Fe, ^{90}Y, ^{125}I, ^{131}I 또는 ^{186}Re 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다.

[0053] 상기 리포터 탐침으로, 예컨대, HRP(Horseradish Peroxidase) 또는 AP(Alkaline Phosphatase) 등의 리포터 효소로 컨쥬게이트된 항 사람 IgG; HIV-1 gp41 펩타이드 등의 바이러스 항원; 바이오틴이 결합된 HIV-1 gp41 펩타이드 등의 바이오틴이 결합된 바이러스 항원; 또는 바이오틴이 결합된 사람의 La(SSA) 단백질 또는 Ro(SSA) 단백질 등의 사람의 자가면역항원 중 어느 하나일 수 있으나, 질환 마커의 종류에 따라 달라질 수 있어 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0054] 본 발명은 또한 질환 마커 검출용 탐침을 표출하는 단백질 나노입자가 고정된 하나 이상의 하이드로젤과 검출 대상 시료를 반응시키는 단계; 상기 단계로부터 얻은 반응물과 리포터 탐침을 반응시키는 단계; 및 질환 마커-질환 마커 검출용 탐침-리포터 탐침의 결합에 의한 시료의 흡광 변화 또는 형광 강도의 변화를 측정하여 하나 이상의 질환 마커를 검출하는 단계를 포함하는 질환 마커의 검출방법에 관한 것이다.

[0055] 본 발명의 질환 마커 검출용 탐침을 표출하는 단백질 나노입자가 결합된 하이드로젤은 질환 마커와 반응하여 흡광 또는 형광 변화를 나타낼 수 있어 흡광도 또는 형광 강도의 측정을 통해 하나 이상의 질환 마커를 검출할 수 있다.

[0056] 단일 또는 다중 질환 마커를 검출하기 위해서는 질환 마커 검출용 탐침을 하나 이상 표출하는 단백질 나노입자가 고정된 하나의 하이드로젤을 사용하거나, 하나의 질환 마커 검출용 탐침을 표출하는 단백질 나노입자가 고정

된 하이드로젤을 하나 이상 사용하여 시료와 반응시킬 수 있다.

[0057] 상기 질환 마커는 예컨대 쇼그렌 증후군의 항-La 자가항체 또는 항-Ro 자가항체 등의 사람 자가면역질환의 자가항체, 또는 HIV-1 항-gp41 항체 등의 바이러스 감염질환의 항 바이러스 항체일 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0058] 상기 질환 마커 검출용 탐침은 질환 마커와 결합할 수 있는 단백질 또는 펩타이드, 또는 항체 등일 수 있다. 예컨대, 사람의 RO(SSA) 단백질, 사람의 La(SSA) 단백질 등의 사람 자가면역질환 자가항체에 특이적인 항원 단백질, 또는 HIV-1 gp41 펩타이드 등의 바이러스 유래 항원 단백질일 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0059] 상기 질환 마커 검출용 탐침을 표출하는 단백질 나노입자는 상술한 방법에 따라 제조할 수 있다. 예컨대, 페리틴 중쇄(ferritin heavy chain), 사카로마이세스 세르비시애(*Saccharomyces cerevisiae*) 유래의 Sup35 단백질 또는 바이러스 캡시드 단백질 중 어느 하나의 자가조립 능력이 있는 단백질과 하나 이상의 질환 마커 검출용 탐침이 융합된 키메릭 단백질로부터 제조될 수 있다. 이 경우 상기 질환 마커 및 질환 마커 검출용 탐침은 단백질 또는 펩타이드 형태일 수 있다.

[0060] 상기 질환 마커 검출용 탐침을 표출하는 단백질 나노입자가 고정된 하이드로젤은 단백질 나노입자와 고분자 전구용액을 중합 반응시켜 제조된 것일 수 있고, 고분자의 종류 및 중합 방법은 상술한 방법에 따라 제조할 수 있다.

[0061] 상기 검출 대상 시료는 피검체의 생물학적 시료를 사용할 수 있고, 예를 들어, 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 뇌척수액, 뇨 등일 수 있다.

[0062] 상기 리포터 탐침은 질환 마커와 질환 마커 검출용 탐침의 결합 형태를 탐지하기 위한 것이므로 상술한 종류를 사용할 수 있으나, 질환 마커와 결합할 수 있는 것이라면 특별히 제한하지는 않는다.

[0063] 상기 질환 마커가 항체인 경우, 질환 마커 검출용 탐침은 항원이 될 수 있고, 리포터 탐침은 상기 항원-항체 복합체를 탐지하는 것이며, 상기 복합체의 형성량, 패턴은 웨스턴 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선 면역분석(Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테를로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케트 (rocket) 면역 전기영동, 조직면역 염색, 면역 침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS, 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.

[0064] 상기 분석 방법들을 통하여, 정상인의 생물학적 시료에서의 항원-항체 복합체의 형성량과 쇼그렌 증후군 또는 AIDS가 의심되는 환자의 생물학적 시료에서의 항원-항체 복합체의 형성량을 비교할 수 있고, 이로부터 본 발명의 쇼그렌 증후군 또는 AIDS 진단용 단백질성 마커의 존재 여부와 그 양 및/또는 패턴을 판단할 수 있으며, 궁극적으로 쇼그렌 증후군 또는 AIDS이 의심되는 환자의 쇼그렌 증후군 또는 AIDS 발병 여부를 조기에 진단할 수 있게 된다.

[0065] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0066] <실시예 1> 구형 단백질 나노입자 융합 하이드로젤의 제조

[0067] (질환 마커 검출용 탐침이 표출된 구형 단백질 나노입자의 합성을 위한 발현 벡터 제조)

[0068] 본 발명자들은 발병 원인이 다르나 증상이 유사하게 나타난다고 알려진 쇼그렌 증후군과 후천성 면역 결핍증(AIDS)를 모델 질병으로 선정하였다. AIDS는 human immunodeficiency virus(HIV)에 의한 감염으로 발병되며 AIDS 환자의 혈청에는 HIV를 항원으로 인식하는 여러 표지인자 항체가 존재한다고 알려져 있다. 특히 HIV 타입 1의 gp41은 항체가 인식하는 면역우성 영역(immunodominant region)으로 대부분의 AIDS 환자가 항-gp41항체를 가지고 있다고 알려져 있으며 이 항원의 부분을 검출용 탐침으로 사용하여 진단시스템이 개발된 사례가 있다. HIV에 감염된 경우 대개 자가면역 질환 환자와 유사한 증상(reumatological manifestation)으로 발전하는 것으로 알려져 있으며, 특히 안구 건조 및 구강 건조 등 쇼그렌 증후군과 매우 유사한 증상을 보이는 DILS(sjogren-like syndrome; diffuse infiltrative lymphocytosis syndrome) 환자의 경우, 증상만으로는 임상학적 진단이

어려운 것으로 알려져 있다. 쇼그렌 증후군은 방치할 경우, 혈관염, 신장이나 폐의 침범 등 생명을 위협하는 전신적 합병증까지 나타날 수 있으며 바이러스 감염에 의한 AIDS는 고위험 전염성 질환으로 조기 진단 실패 시 질병의 확산이 우려되므로 두 질병은 반드시 초기에 구분하여 확진되어야 한다. DILS 환자 혈청에서 항-Ro및 항-La 자가항체의 부재는 DILS 와 SS 간의 가장 두드러진 차이점이다. 또한 항-Ro및 항-La 자가항체 검출은 SS의 임상 진단 중 하나에 사용되고 있다.

[0069] 이를 바탕으로 본 발명자들은 질환 마커 검출용 탐침으로 쇼그렌 자가항체 검출용 탐침 (La단백질 또는 Ro단백질) 또는 AIDS 표지인자 항체 검출용 탐침(gp41 펩타이드)를 선정하고, 단백질 나노입자 카르복실 말단에 쇼그렌 자가항제 검출용 탐침(La 단백질 또는 Ro 단백질) 또는 AIDS 표지인자 항체 검출용 탐침(gp41) 유전자를 중복으로 삽입하여 생산 벡터를 제작하고, 이를 대장균에서 발현하였다.

[0070] 이를 위해, NH_2-NdeI-헥사히스티딘-[사람 유래 페리틴 중쇄(서열번호 1)]-XhoI-COOH 및 NH_2-XhoI-[사람 유래의 La 단백질(서열번호 2)]-HindIII-COOH(또는 NH_2-XhoI-[사람 유래의 Ro 단백질(서열번호 3)]-HindIII-COOH 또는 NH_2-XhoI-[사람 유래의 La 단백질]-BamHI-COOH 및 NH_2-BamHI-[gp41 펩타이드]-[gp41 펩타이드]-HindIII-COOH)을 코딩하는 유전자 클론들을 적당한 프라이머를 이용하여 PCR 증폭하고, pT7-7의 NdeI-XhoI-BamHI-HindIII 클로닝 사이트에 라이게이션시켜 표면에 질환 마커 검출용 탐침(La 또는 Ro 또는 gp41)이 표출된 재조합 페리틴 단백질 나노입자의 합성을 코딩하는 발현 벡터 pT7-FTNH-La(또는 pT7-FTNH-Ro 또는 pT7-FTNH-La-gp41-gp41)를 제조하였다(도 1). 제작된 모든 플라즈미드 발현 벡터는 젤-정제 후 완전한 DNA 시퀀싱을 통해 서열을 확인하였다. 또한, gp41 펩타이드는 Nelson J.D. *et al*. *J. Virol*. 81, 4033-4043 (2007)에 기재된 서열을 사용하였다.

[0071] (바이오틴이 융합된 리포터 탐침의 생합성을 위한 발현 벡터 제조)

[0072] NH_2-NdeI-헥사히스티딘-[바이오틴 펩타이드(서열번호 4)]-[링커(G3SG3TG3SG3)]-[사람 유래의 La 단백질]-HindIII-COOH(또는 NH_2-NdeI-헥사히스티딘-[N-ePGK(대장균의 포스포글리세라이트 키나아제의 N-말단 도메인(N-terminal domain of *E. coli* phosphoglycerate kinase)]-[바이오틴 펩타이드]-[링커(G3SG3TG3SG3)]-[사람 유래의 Ro 단백질]-HindIII-COOH, 대장균에서 단독 발현 시 불용성으로 발현되는 Ro 단백질의 수용성 발현을 위해 본 발명자들이 개발한 융합 태그(fusion tag)인 N-ePGK(서열번호 5)를 융합하였음)을 코딩하는 유전자 클론들을 적당한 프라이머를 이용하여 PCR 증폭하고, pT7-7의 NdeI-HindIII 클로닝 사이트에 라이게이션시켜 바이오틴이 융합된 리포터 탐침(La 또는 Ro 또는 gp41)을 코딩하는 발현 벡터 pT7-biotin-La(또는 pT7-NePGK-biotin-Ro)를 제조하였다. 제작된 모든 플라즈미드 발현 벡터는 젤- 정제 후 완전한 DNA 시퀀싱을 통해 서열을 확인하였다.

[0073] (질환 마커 검출용 탐침이 표출된 단백질 나노입자 및 리포터 탐침의 생합성을 위한 형질전환체 제조 및 발현)

[0074] 하나한(Hanahan)이 기술한 방법(Hanahan D, *DNA Cloning* vol.1 109-135, IRS press 1985)에 의해 상기에서 제조된 벡터들을 대장균에 형질전환하였다.

[0075] 구체적으로 $CaCl_2$로 처리한 대장균 BL21(DE3)에 상기에서 제조된 벡터들을 열 충격 방법으로 형질전환시킨 후, 암피실린이 포함된 배지에서 배양하여 상기 발현벡터가 형질전환되어 암피실린 저항성을 나타내는 콜로니를 선별하였다. 상기 콜로니를 하룻밤 동안 LB 배지에서 배양한 종균 배양액의 일부를 100mg/mL 암피실린을 포함하는 LB 배지에 접종한 다음 37℃에서 130rpm으로 배양하였다. 배양액의 OD_{600}이 0.7~0.8에 이르렀을 때 IPTG를 첨가(0.5mM)하여 20℃로 옮겨 재조합 유전자의 발현을 유도하였다. IPTG 첨가 후 동일한 조건으로 16~18시간 더 배양하였다. 아미노 말단에 바이오틴 펩타이드가 융합된 리포터 탐침의 경우, IPTG 첨가 시 10㎍/mL의 바이오틴을 배양 배지에 첨가하여 배양하였다.

[0076] (질환 마커 검출용 탐침이 표출된 단백질 나노입자 및 리포터 탐침의 정제)

[0077] 재조합 단백질을 정제하기 위하여 상기에서 배양된 대장균을 회수하여 그 세포 펠렛을 5 mL 라이시스 버퍼[pH 8.0, 1mM PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride: serine proteinase inhibitor), 10% 글리세롤, 0.1% Triton X-100, 2mM $MgCl_2$, 50mM Tris-Cl, 0.1mg/mL 라이소자임]에 재부유시키고 상온에서 15~30 분간 교반 후 초음파 파쇄기를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 세포액을 13,000rpm에서 10분간 원심분리하여 그 상등액만 분리

한 후 각 재조합 단백질을 Ni^{2+}-NTA 컬럼(Qiagen, Hilden, Germany)을 사용하여 각각 분리하였다(세척 버퍼: pH 8.0, 50mM 소듐 포스페이트, 300mM NaCl, 80mM 이미다졸; 용출 버퍼: pH 8.0, 50mM 소듐 포스페이트, 300mM NaCl, 250mM 이미다졸). 용출 버퍼의 이미다졸을 제거하기 위하여 멤브레인 필터레이터(Amicon, 10K)를 이용하여 PBS로 버퍼를 교체해 주었다.

[0078] 도 2의 TEM 사진도를 통해 균일한 구형 나노입자를 이루는 것을 확인하였다.

[0079] (형광 물질이 표지된 리포터 탐침의 제조)

[0080] 상기 바이오틴이 융합된 리포터 탐침에 표지물질인 형광물질(Quantum dot)을 결합시켜 최종 형광 리포터 탐침을 제조하기 위해 스트렙타비딘(streptavidin)이 표면에 고정된 양자점과 상기 아미노 말단에 바이오틴이 융합된 리포터 탐침을 바이오틴-스트렙타비딘(biotin-streptavidin) 결합을 이용하여 결합시켜 주었다.

[0081] 아미노 말단에 바이오틴이 융합된 Ro 단백질 또는 La 단백질(0.05pmol)과 스트렙타비딘이 표면에 고정된 Quantum dot 565(5pmol)을 PBS 버퍼 내에서 2시간 동안 25℃에서 배양하여 결합시켜준 후, 양자점이 표지되지 않은 리포터 탐침은 스트렙타비딘 어피니티 크로마토그래피와 ultrafiltration(Amicon Ultra 100K)로 제거하여 주었다.

[0082] AIDS 검출을 위한 리포터 탐침(Biotin::gp41)은 펩타이드의 길이가 매우 짧기 때문에 펩타이드 합성을 통해 제조한 후, 상기 동일한 방법을 통하여 Quantum dot 800과 결합시켜 주었다.

[0083] (단백질 나노입자가 고정된 하이드로젤의 제조)

[0084] 상기에서 제조된 단백질 나노입자 10mg을 N-석신이미딜아크릴레이트(N-succinimidylacrylate, NSA) 0.01mg과 PBS 버퍼 내에서 1시간 동안 37℃에서 인큐베이션하여 결합시켜준 후, 결합되지 않은 NSA는 ultrafiltration (Amicon Ultra 100K)로 제거하여, 최종 중합반응이 가능한 화학 구조를 가진 단백질 나노입자를 제조하였다.

[0085] 문헌에 따르면, 폴리아크릴아마이드 기반 하이드로젤은 높은 안정성, 낮은 비특이적 결합, 낮은 형광 백그라운드(background)와 같은 장점이 있다.

[0086] 따라서, 상기 변형된 단백질 나노입자 30㎍과 0.9% 폴리아크릴아마이드(29:1 W/W 아크릴아마이드:비스-아크릴아마이드)를 0.125%w/v 암모늄 퍼설페이트(amonium persulphate, APS)와 0.125%w/v 테트라메틸에틸렌디아민(tetramethylethylenediamine, TEMED) 존재 하에 혼합하여 96 웰 플레이트 속에 50㎕씩 위치시킨 후, 25℃에서 16시간 동안 중합 반응을 진행하여 단백질 나노입자가 융합된 하이드로젤을 제조하였다(도 3a).

[0087] 그 결과 SEM 사진을 통해 단백질 나노입자 융합 하이드로젤이 매우 균일한 다공성의 3차원 구조를 가지는 것을 확인하였다(도 3b).

[0088] 또한, 기판에 고정된 검출용 탐침의 양은 검출시스템의 민감도를 결정하는 핵심 요소이므로 신뢰도 높은 진단 시스템을 구축하기 위해서는 밀도 높은 검출용 탐침을 균일하게 고정하는 기술이 요구된다. 일반적으로 기판의 2차원 표면에 검출용 탐침을 단순 흡착 고정화할 경우 실제 기판에 고정된 검출용 탐침의 양을 정량화하는데 어려움이 있으나 단백질 나노입자 융합 하이드로젤은 제조 시 단백질 나노입자의 양 조절이 가능하고, 하이드로젤에 융합되어 고정화되므로 기판에 존재하는 검출용 탐침의 정확한 정량 측정이 가능하다는 장점이 있다.

[0089] 따라서 단백질 나노입자가 하이드로젤에 고르게 분산되어 고정화 되어 있는지 확인하기 위하여 바이오틴이 표출된 단백질 나노입자 융합 하이드로젤에 금 나노입자(20 nm)가 결합된 항-바이오틴 항체와 반응 후 silver enhancement kit를 이용하여 금 나노입자를 증폭하였다.

[0090] SEM 촬영 시 하이드로젤 내 단백질 나노입자의 위치를 금 나노입자를 통해 명확하게 확인할 수 있다. 도 3c 와 같이 하이드로젤에 금 나노입자가 고르게 분산되어 있는 것을 확인하였으며 이는 단백질 나노입자가 하이드로젤 전체 면적에 고르게 분산되어 고정되어 있음을 보여준다.

[0091] 질환 진단 시스템 실용화를 위해서는 기판에 고정된 단백질 검출용 탐침의 장기 안정성 유지가 필수적이다. 일반적으로 2차원 평면에 고정된 단백질은 별도의 안정제 처리 없이는 공기에 노출되기 쉽고 수분 유지가 어려우므로 단백질의 장기 보존이 어렵다.

[0092] 본 발명자들이 구축한 단백질 나노입자 융합 하이드로젤의 단백질 보존 능력을 검증하기 위하여 녹색형광단백질(eGFP)과 단백질 나노입자를 융합 발현하여 단백질 고정용 기판으로 널리 사용되고 있는 폴리스틸렌(PS) 2차원 평면과 하이드로젤 기반의 3차원 구조체에 각각 고정하여 질소 충진 후 25℃에 보관하여 시간에 따른 형광세기 변화를 비교하였다.

[0093] 그 결과 폴리스틸렌 2차원 평면에 고정된 형광 나노입자는 하루 만에 초기 형광값의 30%까지 감소하였으나 하이드로젤에 융합 고정된 형광 나노입자의 경우 초기 형광값의 50%는 1개월 후에도 유지됨을 확인하였다. 이는 2차원 평면에 비해 하이드로젤이 뛰어난 수분 유지 능력을 가지고 있기 때문에 단백질의 변성을 최소화 시킨다고 생각되며, 앞으로 구축할 실용화 가능한 진단 시스템의 검출용 탐침 고정용 플랫폼으로써 하이드로젤이 매우 우수한 장점을 가지고 있음을 보여준다(도 4).

[0094] (단백질 나노입자가 고정화된 하이드로젤 융합소재의 민감도 조사)

[0095] 상기에서 제조된 단백질 나노입자 융합 하이드로젤 3차원 검출시스템의 효용성 및 우수성을 확인하고자 민감도 분석을 실행하였다. 민감도 분석은 항-gp41 및 항-La 항체를 사용하여 수행하였다. 도 5와 같이 각각의 단백질 나노입자 검출용 탐침이 융합되어 있는 하이드로젤에 시료(항-gp41 또는 항-La 항체 또는 환자 혈액 샘플)를 반응시킨 후 HRP가 결합되어 있는 2차 항체를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

[0096] 또한, 기본 상용화되고 있는 혈액 진단용 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 키트와 단백질 나노입자가 폴리스틸렌(PS) 2차원 평면에 고정화되어 있는 검출시스템과 비교 분석하였다.

[0097] 이를 위해, 상기에서 제조된 단백질 나노입자([FTNH-La-$(gp41)_2$])를 함유하고 있는 하이드로젤을 PBS 버퍼를 사용하여 세척한 후, 100㎕의 인간 혈청(쇼그렌 증후군 환자 또는 건강한 혈청) 또는 마우스 항-La 항체 또는 사람의 항-gp41 항체가 포함된 PBS 버퍼를 첨가하고, 상온에서 2시간 교반시켜 배양하였다. PBS 버퍼를 사용하여 세척 후, 100 ㎕의 "효소 컨쥬케이트 시약[HRP 효소로 컨쥬케이트 된 항 마우스 IgG 또는 gp41 펩타이드(ELISA 키트와의 비교를 위하여 같은 "효소 컨쥬게이트 시약"을 사용하였음)]을 각 웰에 첨가 후, 1시간 상온에서 교반시켜 배양한 후, PBS 버퍼로 세척하였다. 100 ㎕의 "TMB 시약(HRP 효소에 대한 기질을 함유)"을 각 웰 내에 첨가한 후, 15분 동안 상온에서 배양한 후, 효소 반응을 중지하기 위하여 100 ㎕의 1M 황산(sulphuric acid)을 각 웰에 첨가하고 30초간 혼합하고 450nm에서 마이크로플레이트 리더를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

[0098] 그 결과 2차원 평면의 ELISA 키트의 경우 항-La 항체와 항-gp41 항체농도 6.6nM의 LODs[검출 한계: IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry)의 정의에 따라 결정하였음]을 보였으나, 단백질 나노입자 융합 하이드로젤의 경우 항-La 항체농도 6.6pM, 항-gp41 항체농도 33pM의 LODs(limit of detection)를 보였다(도 6). 즉, 단백질 나노입자 융합 하이드로젤의 경우 2차원 평면의 ELISA 키트에 비해 100-200배 정도 향상된 민감도를 나타냈으며 이는 단백질 나노입자 융합 하이드로젤의 우수성을 보여준다.

[0099] 또한, 쇼그렌 증후군 환자 혈액 샘플을 기존 상용화 되어있는 혈액 진단용 ELISA 키트와 비교 실험한 결과, 총 30명의 환자 중 9명의 환자만이 ELISA 키트에서 항-La 항체가 검출, 30%의 민감도를 보인 반면 본 발명자들이 구축한 단백질 나노입자 융합 하이드로젤 검출 시스템에서는 26명의 환자에서 항-La 항체가 검출, 87%의 확연히 높은 민감도를 보였다(도 7). 이는 본 발명의 단백질 나노입자가 다공성 3차원 하이드로젤에 고정됨으로써 고체상(solid-phase) 환경보다 액상(fluid-phase) 환경에 더 비슷하여 시료의 변성 방지, 접근성을 용이하게 한다고 생각되며, 진단 시스템의 프로브 고정용 플랫폼으로써 하이드로젤이 매우 우수한 장점을 가지고 있음을 보여준다.

[0100] (단백질 나노입자가 고정화된 하이드로젤 융합소재를 이용한 동시다중 질환 검출)

[0101] 동시 다중 검출 시스템은 한 번의 분석을 통해서 다양한 질병을 동시에 진단할 수 있음은 물론, 시간과 비용 효율적이며, 소량의 혈액 샘플로도 질환을 진단할 수 있다는 장점이 있지만, 낮은 재현성과 비특이적 교차 반응과 같은 문제가 해결되어야 한다.

[0102] 본 발명자들은 최종적으로 2가지 질병에 대한 동시 다중 검출 시스템을 구축하기 위하여 상기 기술한 바와 같이 gp41 펩타이드와 La 단백질이 동시에 포함되어 있는 단백질 나노입자와 Ro 단백질이 포함되어 있는 단백질 나노입자를 혼합하여 하이드로젤을 제조하였으며 형광 물질 Quantum dot 800-스트렙타비딘에 바이오틴이 융합된 La

단백질 또는 Ro 단백질을 고정하고, Quantum dot 585-streptavidin에 바이오틴이 융합된 gp41 펩타이드를 고정하여 동시 검출을 위한 리포터 탐침으로 사용하였다(Quantum dot 800과 585의 여기 파장, 방출 파장은 상호 중첩되지 않기 때문에 동시 사용이 가능함, 도 8 참조). 도 9와 같이 실험을 진행하였으며 쇼그렌 증후군 환자 혈액 샘플과 HIV-1 양성 환자 혈액샘플을 그림과 같이 혼합하여 적용하였다.

[0103] 보다 구체적으로, 상기에서 제조된 단백질 나노입자[FTNH-La-$(gp41)_2$]와 [FTNH-Ro]를 각각 15㎍씩 함유하고 있는 하이드로젤을 PBS 버퍼를 사용하여 세척한 후, 쇼그렌 증후군 환자 혈청 샘플과 HIV-1 양성 환자 혈액 샘플을 도 10d-f와 같이 혼합한 혈청 혼합액을 100㎕ 첨가하고, 상온에서 2시간 교반시켜 배양하였다. PBS 버퍼를 사용하여 세척 후, 상기에서 제조된 형광 리포터 탐침 100㎕를 각 웰에 첨가 후, 1시간 상온에서 교반시켜 배양한 후, PBS 버퍼로 세척하였다. 그 후 여기 파장 350nm과 방출 파장 565nm 또는 800nm에서 마이크로플레이트 리더를 사용하여 형광세기를 측정하였다.

[0104] 도 10a-c에 나타난 바와 같이, 다양한 혼합 조건에서도 검출 신호가 각 환자의 혈액 샘플 농도에 비례하는 결과를 보였다. 이는 많은 양의 단백질 나노입자가 다공성 3차원 하이드로젤에 일정한 간격으로 균일하게 분포함으로써 비특이적 결합으로 인한 시그널 노이즈(signal noise)가 거의 없고, 각각의 항체가 정확하고 재현성 있게 검출됨을 보여준다.

[0105] <실시예 2> 단백질 나노로드가 고정된 하이드로젤의 제조

[0106] (질환 마커 검출용 탐침이 표출된 단백질 나노로드의 합성을 위한 발현 벡터 제조)

[0107] 자가조립에 의해 나노로드 형태를 이룬다고 알려진 사카로마이세스 세르비시애(*Saccharomyces cerevisiae*) 유래의 Sup35 단백질의 카르복실 말단에 쇼그렌 자가항체 검출용 탐침(La 단백질) 유전자를 삽입하여 생산 벡터를 제작하였으며(도11a), 이를 대장균에서 발현하여 수용성 형태의 Sup35-La 단백질 단량체를 제조하였다(도 11b).

[0108] NH_2-NdeI-헥사히스티딘-[사카로마이세스 세르비시애(*Saccharomyces cerevisiae*) 유래의 Sup35 단백질 1-61(서열번호 6)]-G4S-BamHI-COOH 및 NH_2-BamHI-[사람 유래의 La 단백질]-XhoI-COOH(또는 NH_2-BamHI-[사람 유래의 La 단백질]-[바이오틴 펩타이드]-XhoI-COOH)을 코딩하는 유전자 클론들을 적당한 프라이머를 이용하여 PCR 증폭하고, pT7-7과 pET 28a의 NdeI-BamHI-XhoI 클로닝 사이트에 라이게이션시켜 표면에 질환 마커 검출용 탐침이 표출된 재조합 sup 나노로드의 합성을 코딩하는 발현 벡터pET28a-Sup35-La (또는 pT7-Sup35-La-biotin)를 제조하였다.

[0109] 나노 로드의 조립(Assembly) 과정은 "T. R. Serio, A. G *et al., Science,* 2000, 289, 1317-1321." 문헌을 참조하여 실시하였다.

[0110] 도 12의 TEM 사진도를 보면, 대장균 내에서 단량체 형태로 발현된 Sup35-La 단백질을 in-vitro assembly 과정을 거쳐 나노로드 형태의 단백질 입자(SuPNP)로 제조하였으나, 수십 nm에서 크게는 1 ㎛까지 나노로드의 길이 제어가 불가능하였다(도 12a 및 b). 따라서 초음파 파쇄기를 이용한 분해(disassembly) 과정을 거쳐 10nm 크기의 Sup35-La 단백질 씨드(seed)를 제조한 후(도 12c 및 d), Sup35-La 단백질 단량체와 Sup35-La 단백질 씨드를 1:8의 비율로 혼합하여 최종 100 ~ 400 nm의 일정한 크기를 가진 나노로드 형태의 단백질 나노입자로 제조하였다(도 12e 및 f).

[0111] (단백질 나노로드가 고정된 하이드로젤의 제조)

[0112] 스트렙타비딘 10mg을 N-succinimidylacrylate(NSA) 0.01mg과 PBS 버퍼 내에서 1시간 동안 37℃에서 인큐베이션하여 결합시켜준 후, 결합되지 않은 NSA는 ultrafiltration(Amicon Ultra 100K)로 제거하여, 최종 중합반응이 가능한 화학 구조를 가진 스트렙타비딘을 제조하였다. 상기 스트렙타비딘 30㎍과 0.45% 폴리아크릴아마이드(29:1 W/W acryamide : bis-acrylamide)를 0.125 % w/v 암모늄 퍼설페이트(amonium persulphate, APS)와 0.125 % w/v 테트라메틸에틸렌디아민(tetramethylethylenediamine, TEMED) 존재 하에 혼합하여 96 웰 플레이트 속에 150㎕씩 위치시킨 후, 25℃에서 16시간 동안 중합 반응을 진행하여 스트렙타비딘이 융합된 하이드로젤을 제조하였다. 스트렙타비딘 하이드로젤에 10㎍의 Sup35-La-biotin 나노로드를 1시간 동안 인큐베이션하여 고정화시켜 주었다.

[0113] 도 13을 보면, SEM 사진을 통해 단백질 나노로드 융합 하이드로젤이 매우 균일한 다공성의 3차원 구조를 가지는

것을 확인하였다.

[0114] (단백질 나노로드가 고정화된 하이드로젤 융합소재의 민감도 조사)

[0115] 단백질 나노로드 융합 하이드로젤 3차원 검출시스템의 효용성 및 우수성을 확인하고자 민감도 분석을 실행하였다. 민감도 분석은 항-La 항체를 사용하여 수행하였다. 도 14와 같이 단백질 나노로드가 융합되어 있는 하이드로젤 또는 2D PS 평면에 시료(농도별 PBS 버퍼 내 항-La 항체 또는 사람 혈액 내 항-La 항체)를 반응시킨 후 HRP가 결합되어 있는 2차 항체를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 상대 흡광도는 측정된 실제 흡광도에서 음성 대조군(농도가 0인 경우)의 흡광도를 뺀 값이고, LOD_H 및 LOD_P는 각각 SuPNP-하이드로젤 및 2D PS 플레이트 기반 분석의 LOD를 나타낸다.

[0116] 도 15 및 16에 나타난 바와 같이, 2차원 평면에 고정화되어 있는 경우에 비해 100배 더 향상된 민감도를 보임을 확인할 수 있었다.

[0117] 하이드로젤에 단백질 나노로드를 공유결합이 아닌 바이오틴-스트렙타비딘 결합으로 고정화하고자 상기 sup35-La 단백질의 카르복실 말단에 바이오틴 펩타이드를 삽입하여 생산 벡터를 제작하였다. 이를 대장균에서 발현시킨 후, Sup35-La 단백질 단량체와 in-vitro assembly 과정을 거쳐 바이오틴과 La 단백질이 동시에 표출된 단백질 나노로드(bt-SuPNP)를 제조하였다(도 17).

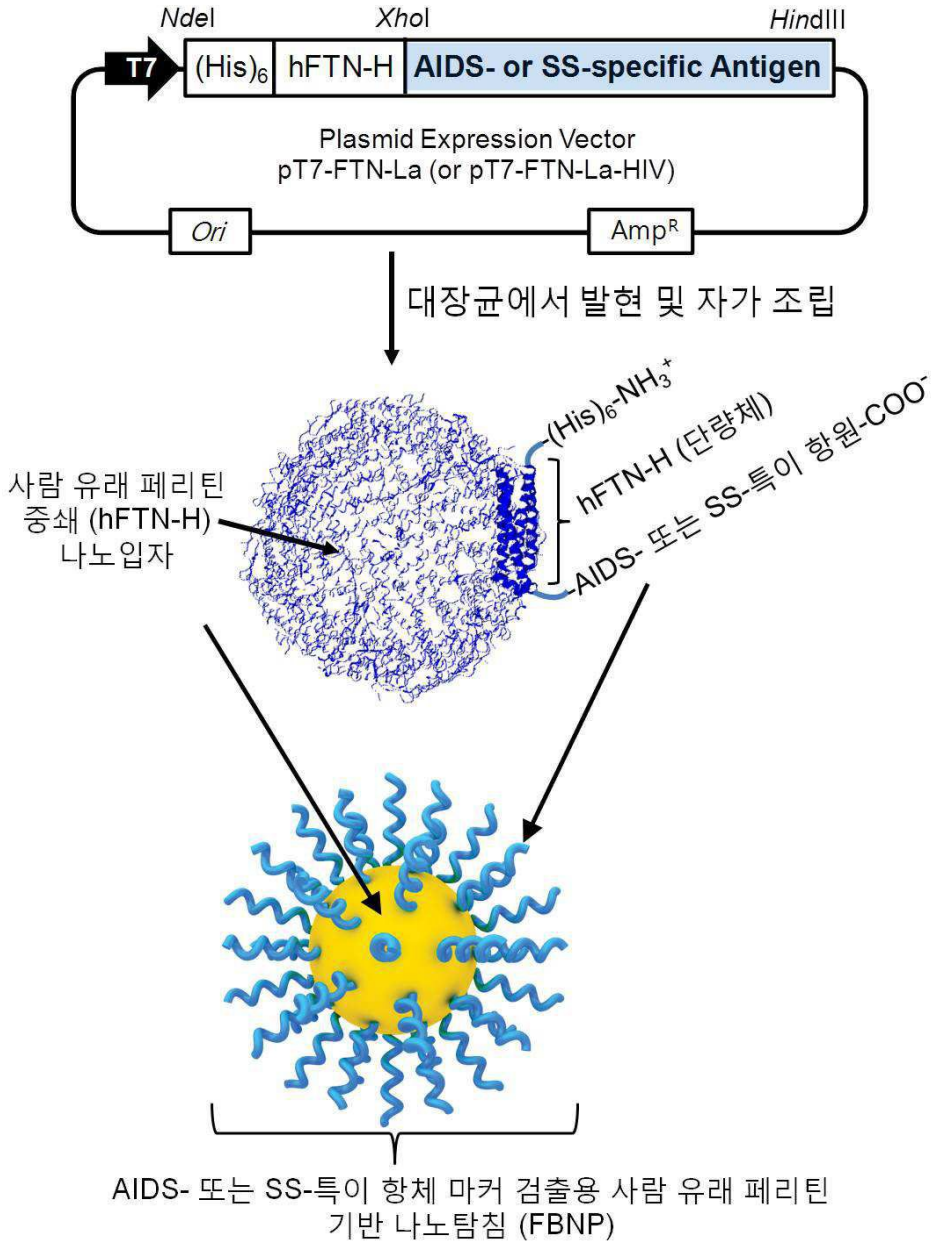
[0118] 상기 바이오틴과 La 단백질이 동시에 표출된 단백질 나노로드를 스트렙타비딘이 함유되어 있는 하이드로젤에 바이오틴-스트렙타비딘 결합을 이용하여 고정화시켜 주었다. 바이오틴-스트렙타비딘 결합 기반 단백질 나노로드 융합 하이드로젤 3차원 검출시스템의 효용성 및 우수성을 확인하고자 민감도 분석을 실행하였다. 민감도 분석은 항-La 항체를 사용하여 수행하였다. 도 18과 같이 단백질 나노로드(bt-SuPNP)가 융합되어 있는 하이드로젤에 시료(PBS 버퍼 내 항-La 항체 또는 사람 혈액 내 항-La 항체)를 반응시킨 후 HRP가 결합되어 있는 2차 항체를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

[0119] 단백질 나노로드가 폴리스틸렌(PS) 2차원 평면에 고정화되어 있는 검출시스템과 비교 분석한 결과, 2차원 평면에 고정화되어 있는 경우에 비해 100배 더 향상된 민감도를 보임을 확인할 수 있었다 (도 19).

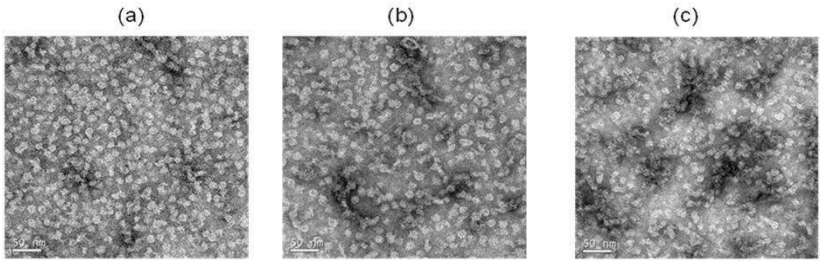
[0120] 상기 결과로부터 본 발명이 단백질 나노입자를 다공성 3차원 하이드로젤에 고정화시킴으로써 진단시스템의 기술적 성숙도를 향상시킴으로써 다른 질병의 진단에도 사용할 수 있는 기반 기술로 활용될 수 있음을 알 수 있었다.

도면

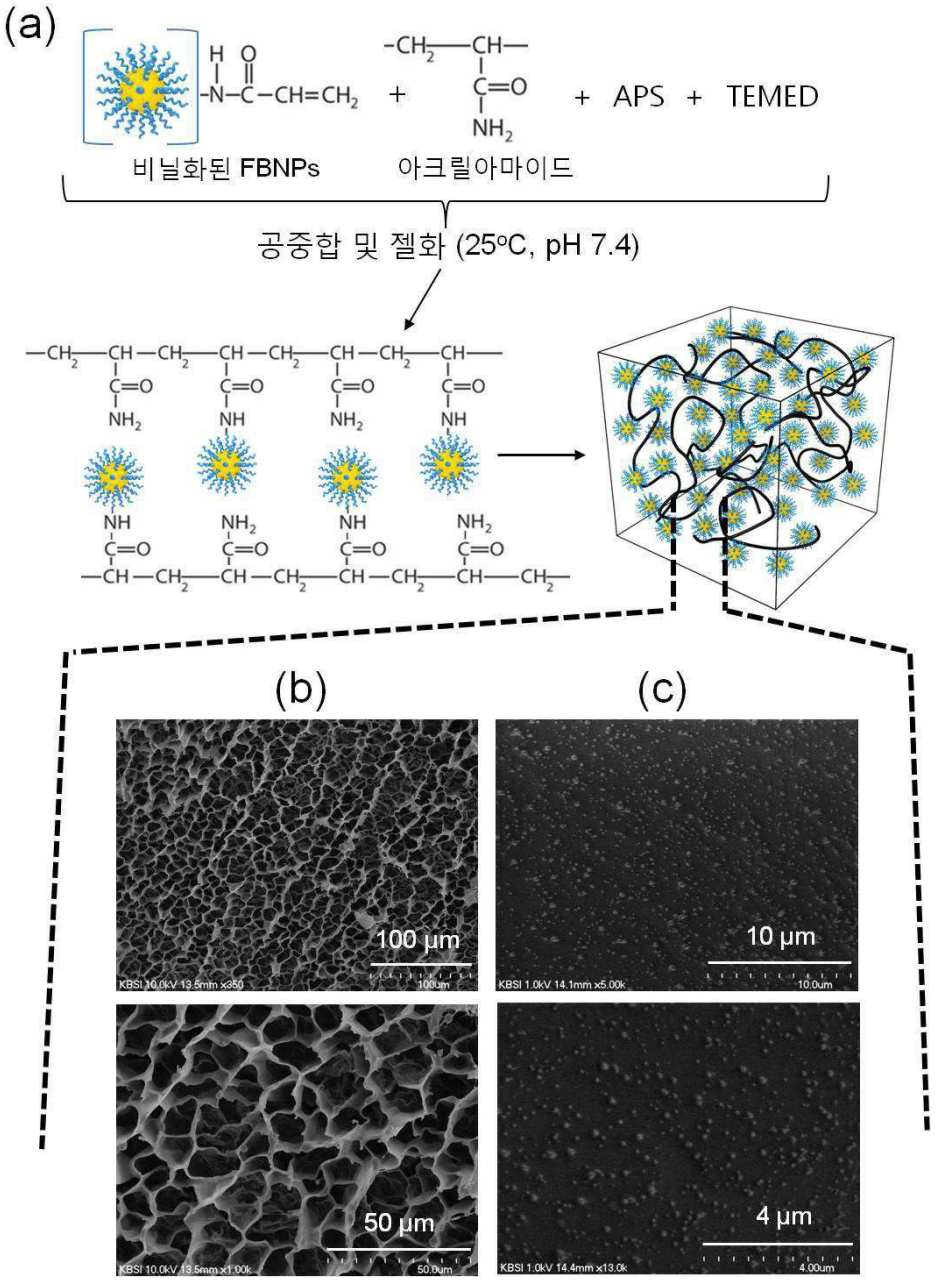
도면1


NdeI
XhoI
HindIII
T7
(His)6
hFTN-H
AIDS- or SS-specific Antigen
Plasmid Expression Vector
pT7-FTN-La (or pT7-FTN-La-HIV)
Ori
AmpR
대장균에서 발현 및 자가 조립
사람 유래 페리틴 중쇄 (hFTN-H) 나노입자
(His)6-NH3+
hFTN-H (단량체)
AIDS- 또는 SS-특이 항원-COO-
AIDS- 또는 SS-특이 항체 마커 검출용 사람 유래 페리틴 기반 나노탐침 (FBNP)

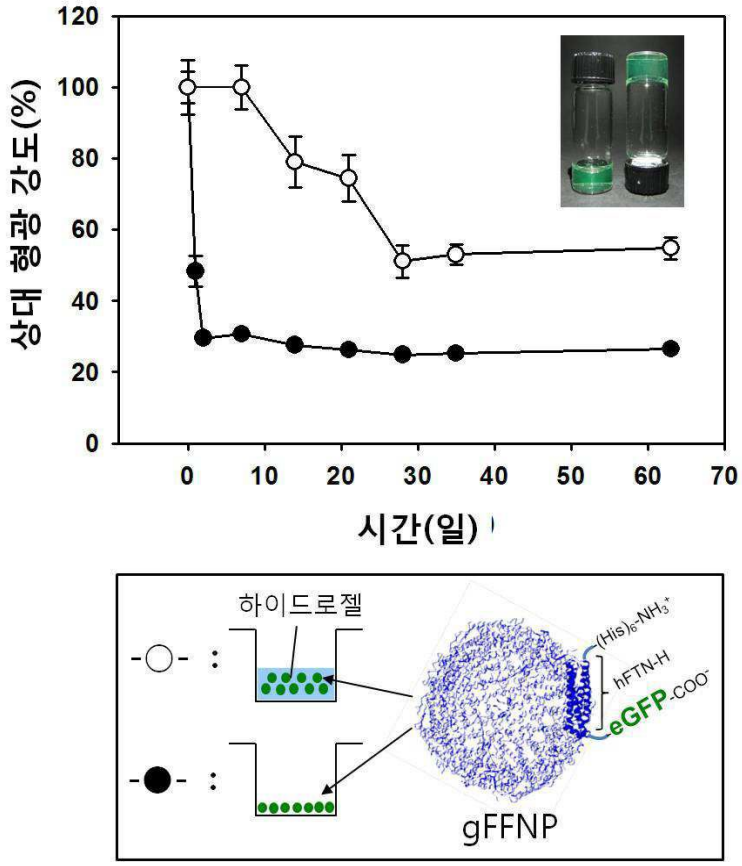
도면2


(a)
(b)
(c)

도면3

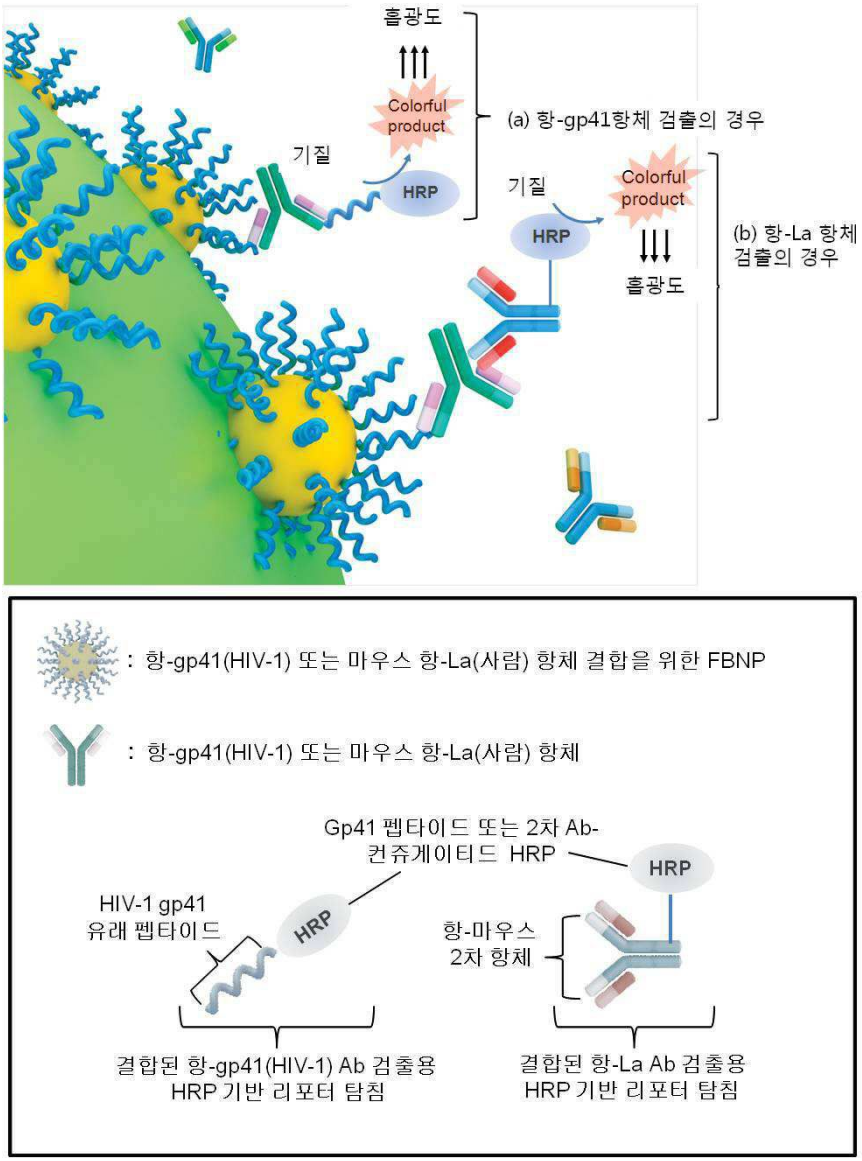

(a)
비닐화된 FBNPs
아크릴아마이드
APS
TEMED
공중합 및 젤화 (25°C, pH 7.4)
(b)
(c)
100 μm
10 μm
50 μm
4 μm

도면4

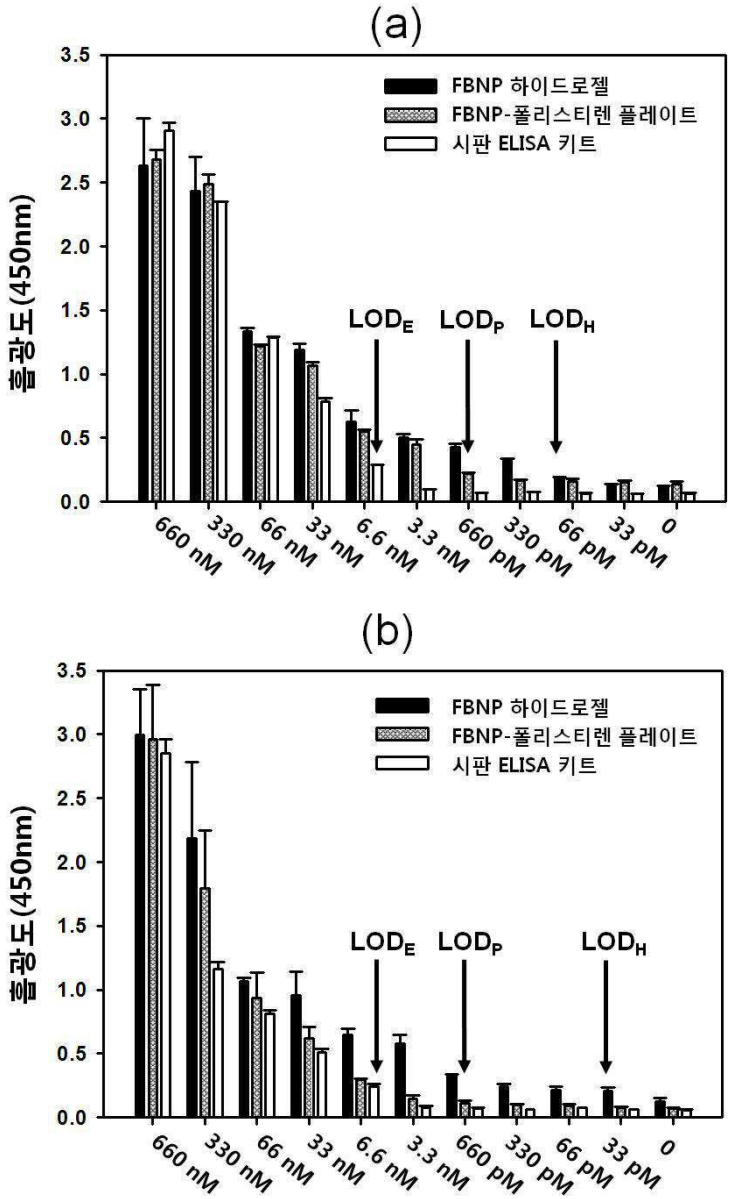

120
100
80
60
40
20
0
상대 형광 강도(%)
0
10
20
30
40
50
60
70
시간(일)

하이드로젤
-○- :
-●- :
(His)6-NH3+
hFTN-H
eGFP-COO-
gFFNP

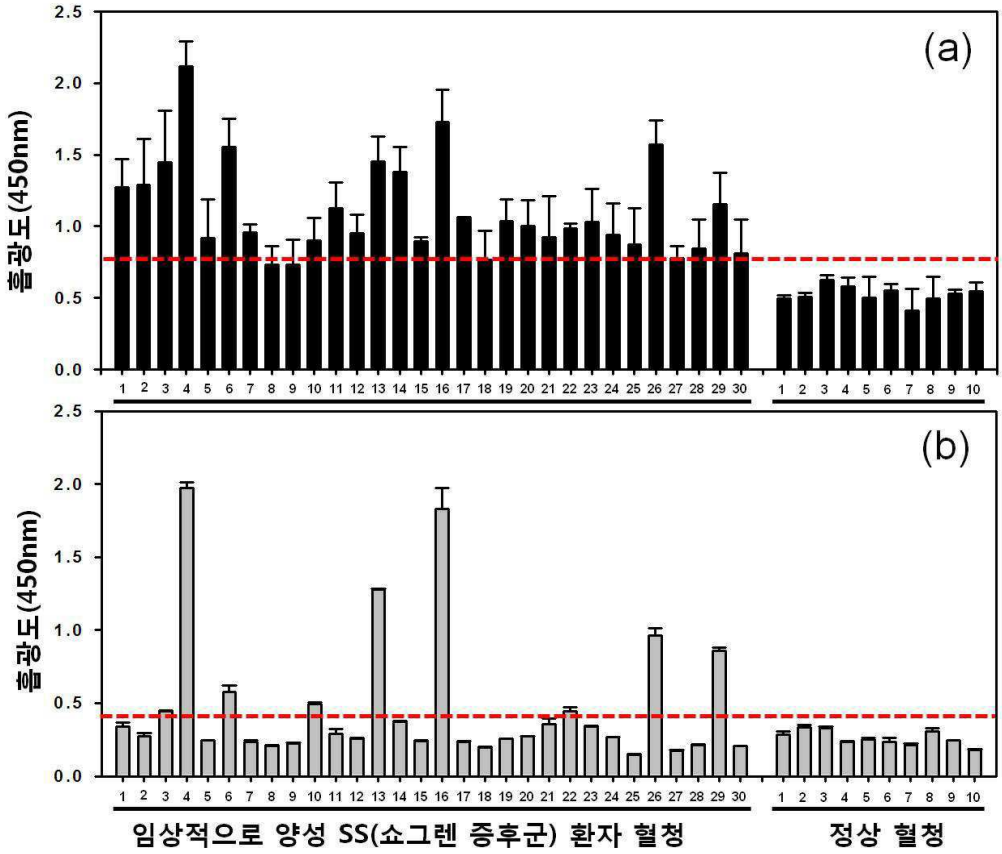
도면5


흡광도
Colorful product
(a) 항-gp41항체 검출의 경우
기질
HRP
기질
Colorful product
HRP
(b) 항-La 항체 검출의 경우
흡광도
: 항-gp41(HIV-1) 또는 마우스 항-La(사람) 항체 결합을 위한 FBNP
: 항-gp41(HIV-1) 또는 마우스 항-La(사람) 항체
Gp41 펩타이드 또는 2차 Ab-컨쥬게이티드 HRP
HRP
HIV-1 gp41 유래 펩타이드
HRP
항-마우스 2차 항체
결합된 항-gp41(HIV-1) Ab 검출용 HRP 기반 리포터 탐침
결합된 항-La Ab 검출용 HRP 기반 리포터 탐침

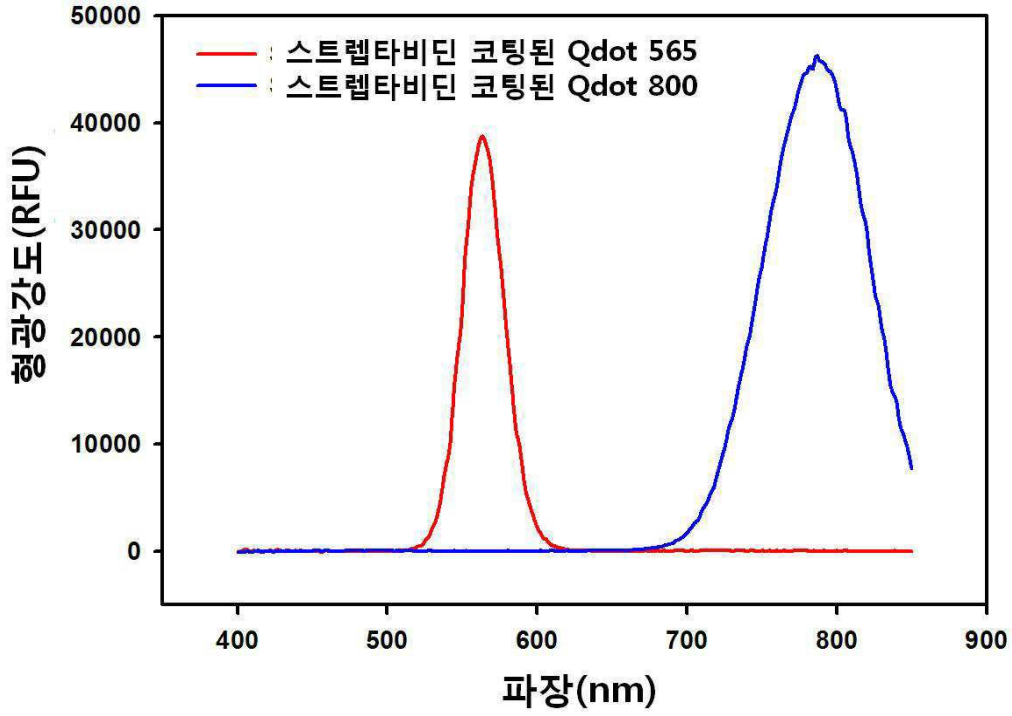
도면6


(a)
흡광도(450nm)
FBNP 하이드로젤
FBNP-폴리스티렌 플레이트
시판 ELISA 키트
LOD$_E$
LOD$_P$
LOD$_H$
660 nM
330 nM
66 nM
33 nM
6.6 nM
3.3 nM
660 pM
330 pM
66 pM
33 pM
0
(b)
흡광도(450nm)
FBNP 하이드로젤
FBNP-폴리스티렌 플레이트
시판 ELISA 키트
LOD$_E$
LOD$_P$
LOD$_H$
660 nM
330 nM
66 nM
33 nM
6.6 nM
3.3 nM
660 pM
330 pM
66 pM
33 pM
0

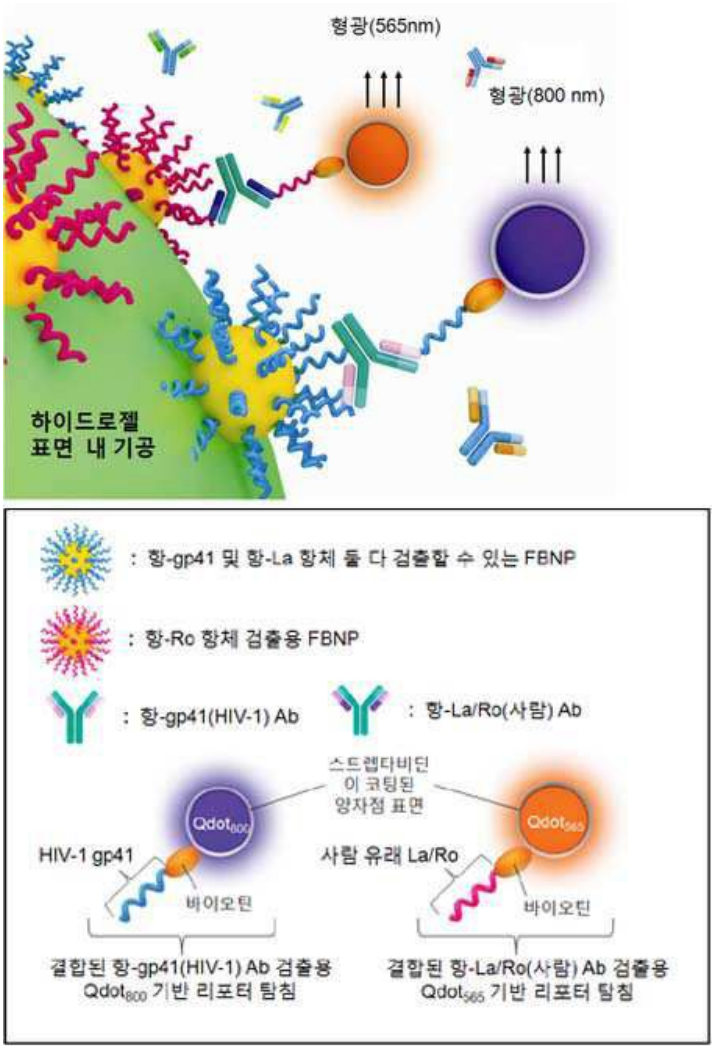
도면7


(a)
흡광도(450nm)
(b)
흡광도(450nm)
임상적으로 양성 SS(쇼그렌 증후군) 환자 혈청
정상 혈청

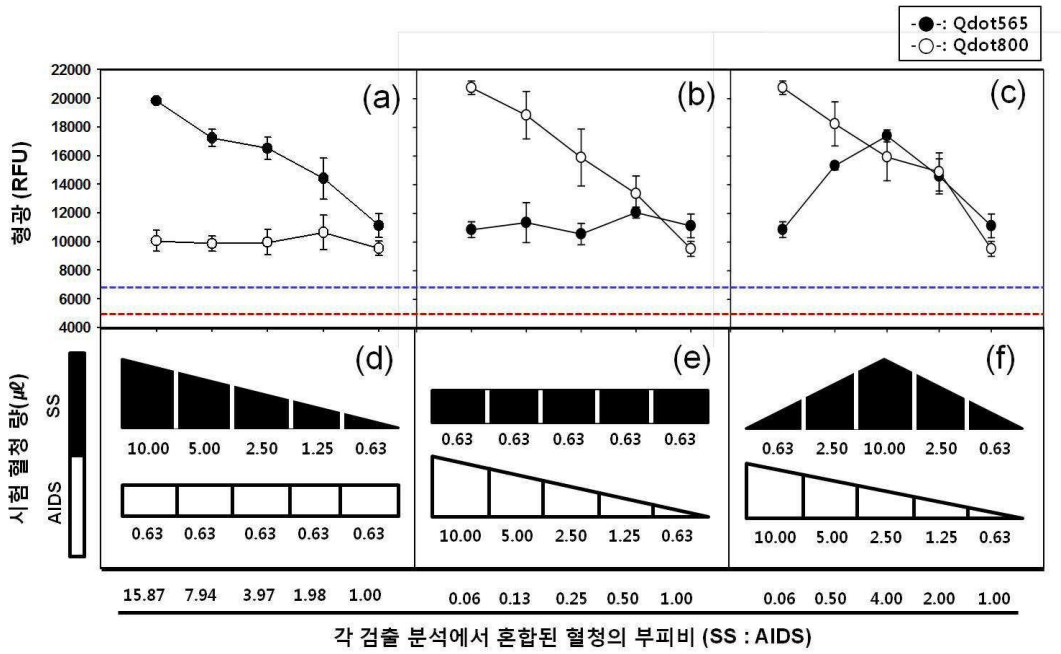
도면8


스트렙타비딘 코팅된 Qdot 565
스트렙타비딘 코팅된 Qdot 800
형광강도(RFU)
파장(nm)

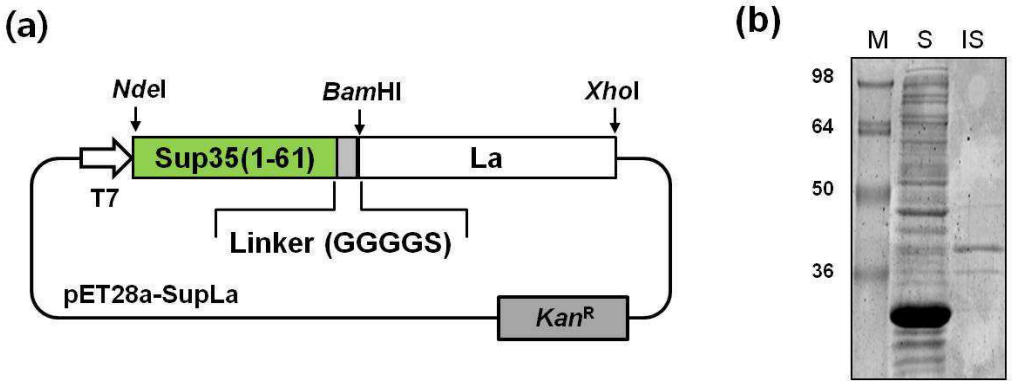
도면9


형광(565nm)
형광(800 nm)
하이드로젤
표면 내 기공
: 항-gp41 및 항-La 항체 둘 다 검출할 수 있는 FBNP
: 항-Ro 항체 검출용 FBNP
: 항-gp41(HIV-1) Ab
: 항-La/Ro(사람) Ab
스트렙타비딘
이 코팅된
양자점 표면
Qdot800
Qdot565
HIV-1 gp41
사람 유래 La/Ro
바이오틴
바이오틴
결합된 항-gp41(HIV-1) Ab 검출용
Qdot800 기반 리포터 탐침
결합된 항-La/Ro(사람) Ab 검출용
Qdot565 기반 리포터 탐침

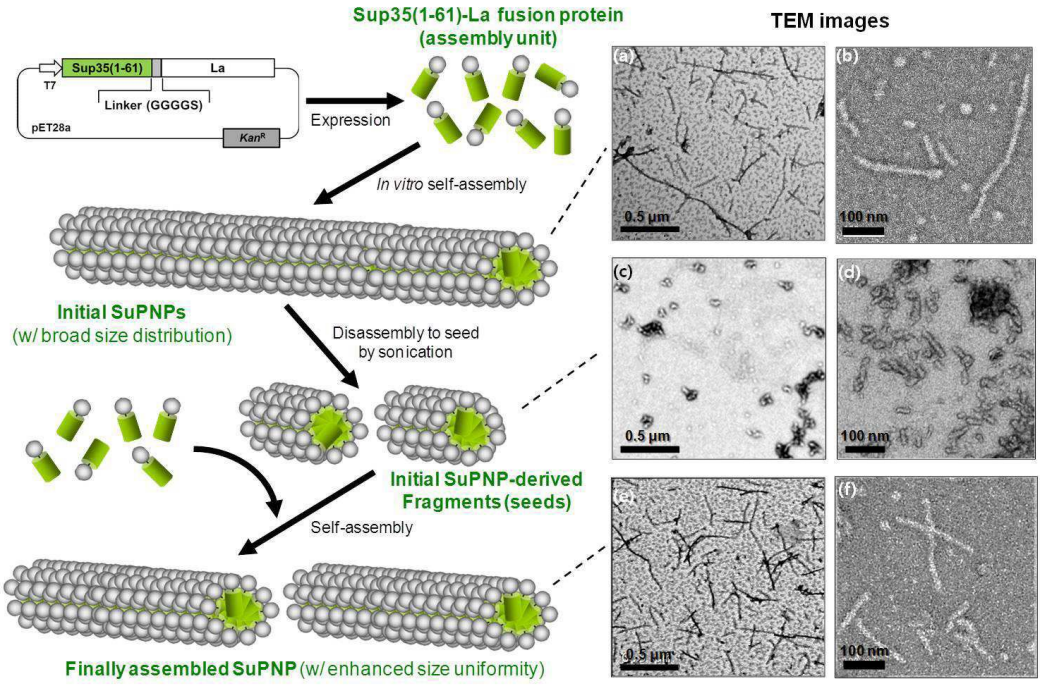
도면10


-●-: Qdot565
-○-: Qdot800
형광 (RFU)
22000
20000
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
(a)
(b)
(c)
(d)
(e)
(f)
시험 혈청 량(㎕)
SS
AIDS
10.00 5.00 2.50 1.25 0.63
0.63 0.63 0.63 0.63 0.63
0.63 0.63 0.63 0.63 0.63
10.00 5.00 2.50 1.25 0.63
0.63 2.50 10.00 2.50 0.63
10.00 5.00 2.50 1.25 0.63
15.87 7.94 3.97 1.98 1.00
0.06 0.13 0.25 0.50 1.00
0.06 0.50 4.00 2.00 1.00
각 검출 분석에서 혼합된 혈청의 부피비 (SS : AIDS)

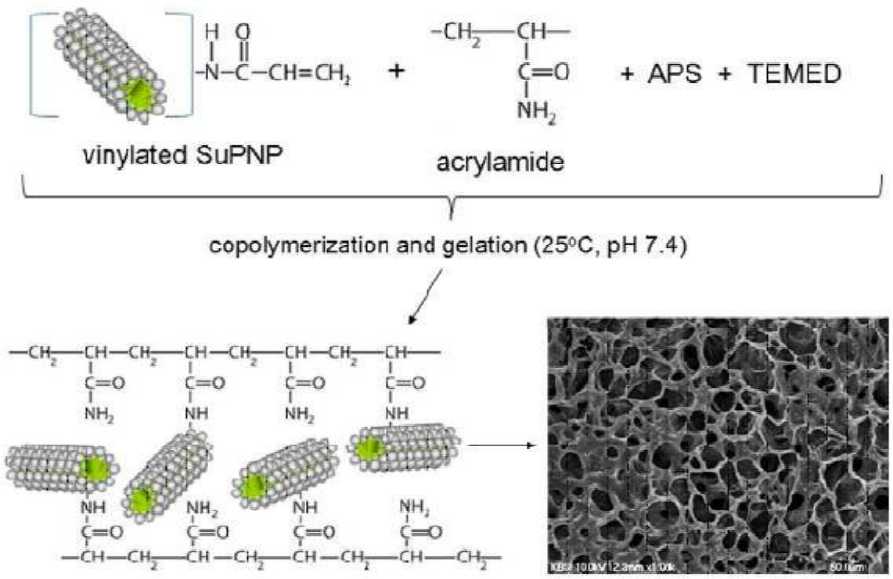
도면11


(a)
NdeI
BamHI
XhoI
Sup35(1-61)
La
T7
Linker (GGGGS)
pET28a-SupLa
KanR
(b)
M S IS
98
64
50
36

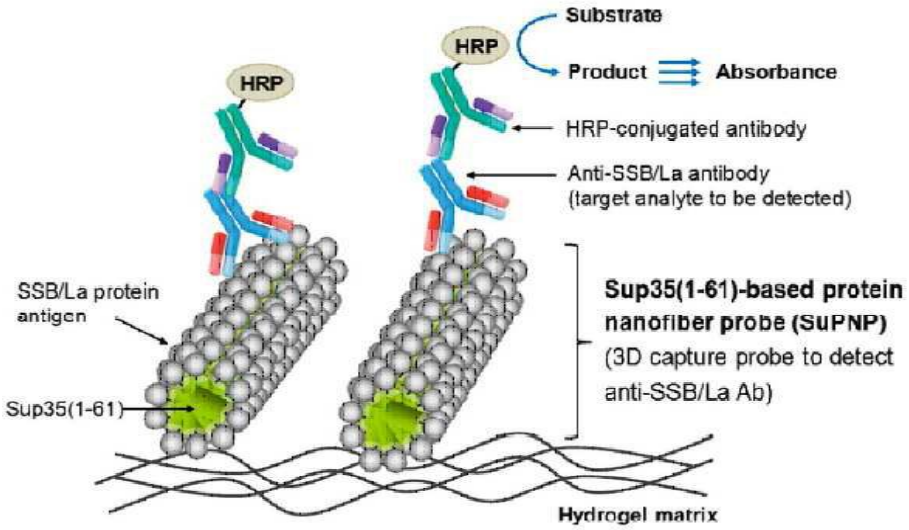
도면12


Sup35(1-61)-La fusion protein
(assembly unit)
TEM images
Sup35(1-61)
La
T7
Linker (GGGGS)
pET28a
Kan^R
Expression
In vitro self-assembly
Initial SuPNPs
(w/ broad size distribution)
Disassembly to seed
by sonication
Initial SuPNP-derived
Fragments (seeds)
Self-assembly
Finally assembled SuPNP (w/ enhanced size uniformity)
(a)
(b)
(c)
(d)
(e)
(f)
0.5 μm
100 nm

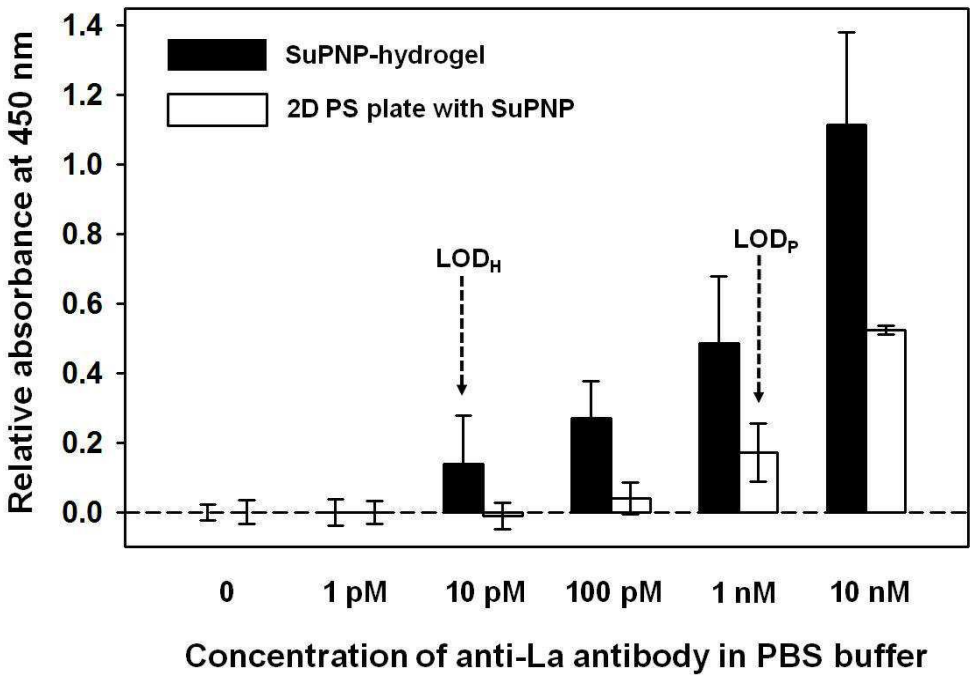
도면13


vinylated SuPNP
acrylamide
+ APS + TEMED
copolymerization and gelation (25°C, pH 7.4)

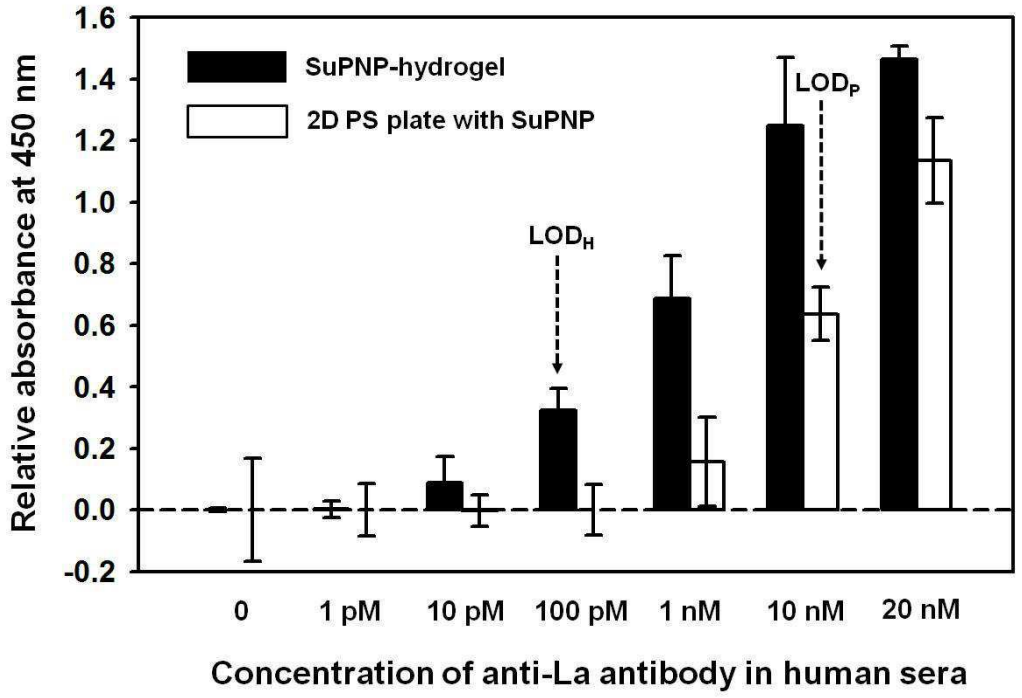
도면14


Substrate
HRP
Product
Absorbance
HRP
HRP-conjugated antibody
Anti-SSB/La antibody
(target analyte to be detected)
SSB/La protein
antigen
Sup35(1-61)
Sup35(1-61)-based protein
nanofiber probe (SuPNP)
(3D capture probe to detect
anti-SSB/La Ab)
Hydrogel matrix

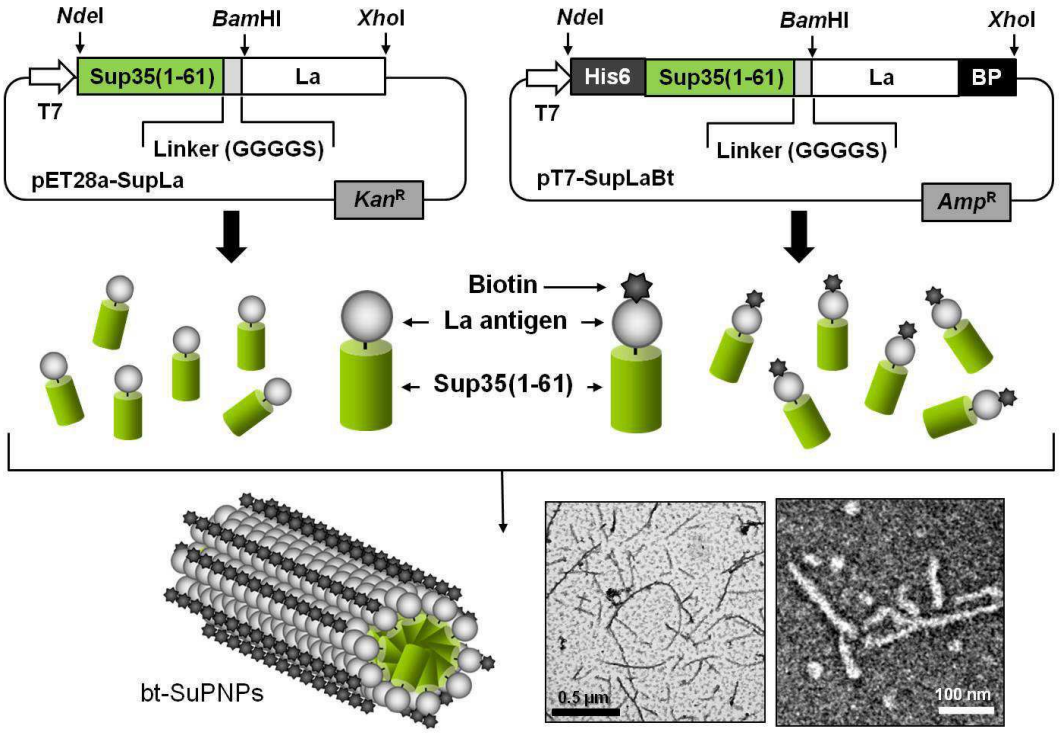
도면15


SuPNP-hydrogel
2D PS plate with SuPNP
Relative absorbance at 450 nm
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
LOD$_H$
LOD$_P$
0
1 pM
10 pM
100 pM
1 nM
10 nM
Concentration of anti-La antibody in PBS buffer

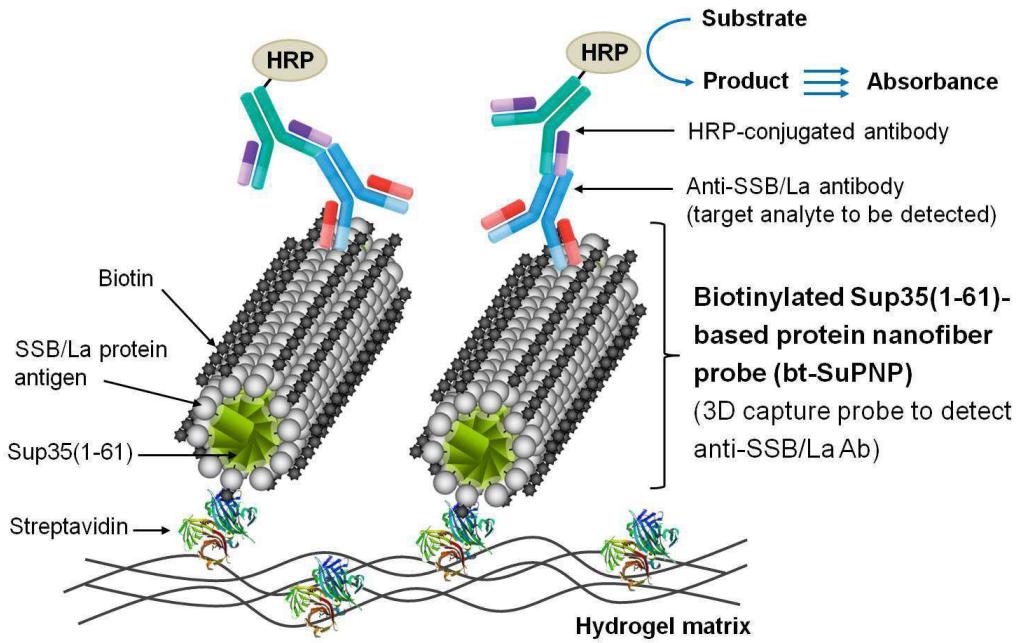
도면16


Relative absorbance at 450 nm
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
SuPNP-hydrogel
2D PS plate with SuPNP
LOD$_H$
LOD$_P$
0
1 pM
10 pM
100 pM
1 nM
10 nM
20 nM
Concentration of anti-La antibody in human sera

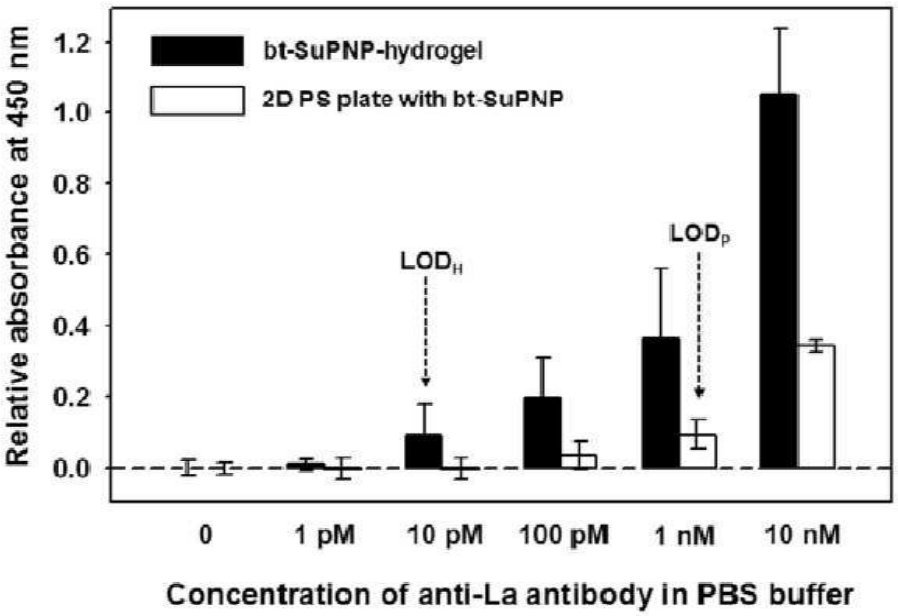
도면17


NdeI
BamHI
XhoI
Sup35(1-61)
La
T7
Linker (GGGGS)
pET28a-SupLa
Kan^R
His6
BP
pT7-SupLaBt
Amp^R
Biotin
La antigen
Sup35(1-61)
bt-SuPNPs
0.5 μm
100 nm

도면18



도면19



서 열 목 록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> Use of protein nanoparticle based hydrogel

<130> P130804

<150> 12/0126843

<151> 2012-11-09

<160> 6

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 175

<212> PRT

<213> Human ferritin heavy chain

<400> 1

Met Ser Ser Gln Ile Arg Gln Asn Tyr Ser Thr Asp Val Glu Ala Ala
1 5 10 15

Val Asn Ser Leu Val Asn Leu Tyr Leu Gln Ala Ser Tyr Thr Tyr Leu
20 25 30

Ser Leu Gly Phe Tyr Phe Asp Arg Asp Asp Val Ala Leu Glu Gly Val
35 40 45

Ser His Phe Phe Arg Glu Leu Ala Glu Glu Lys Arg Glu Gly Tyr Glu
50 55 60

Arg Leu Leu Lys Met Gln Asn Gln Arg Gly Gly Arg Ala Leu Phe Gln
65 70 75 80

Asp Ile Lys Lys Pro Ala Glu Asp Glu Trp Gly Lys Thr Pro Asp Ala
85 90 95

Met Lys Ala Ala Met Ala Leu Glu Lys Lys Leu Asn Gln Ala Leu Leu
100 105 110

Asp Leu His Ala Leu Gly Ser Ala Arg Thr Asp Pro His Leu Cys Asp
115 120 125

Phe Leu Glu Thr His Phe Leu Asp Glu Glu Val Lys Leu Ile Lys Lys
130 135 140

Met Gly Asp His Leu Thr Asn Leu His Arg Leu Gly Gly Pro Glu Ala
145 150 155 160

Gly Leu Gly Glu Tyr Leu Phe Glu Arg Leu Thr Leu Lys His Asp
165 170 175

<210> 2

<211> 408

<212> PRT

<213> Human La protein

<400> 2

Met Ala Glu Asn Gly Asp Asn Glu Lys Met Ala Ala Leu Glu Ala Lys
1 5 10 15

Ile Cys His Gln Ile Glu Tyr Tyr Phe Gly Asp Phe Asn Leu Pro Arg
20 25 30

Asp Lys Phe Leu Lys Glu Gln Ile Lys Leu Asp Glu Gly Trp Val Pro
35 40 45

Leu Glu Ile Met Ile Lys Phe Asn Arg Leu Asn Arg Leu Thr Thr Asp
50 55 60

Phe Asn Val Ile Val Glu Ala Leu Ser Lys Ser Lys Ala Glu Leu Met
65 70 75 80

Glu Ile Ser Glu Asp Lys Thr Lys Ile Arg Arg Ser Pro Ser Lys Pro
85 90 95

Leu Pro Glu Val Thr Asp Glu Tyr Lys Asn Asp Val Lys Asn Arg Ser
100 105 110

Val Tyr Ile Lys Gly Phe Pro Thr Asp Ala Thr Leu Asp Asp Ile Lys
115 120 125

Glu Trp Leu Glu Asp Lys Gly Gln Val Leu Asn Ile Gln Met Arg Arg
130 135 140

Thr Leu His Lys Ala Phe Lys Gly Ser Ile Phe Val Val Phe Asp Ser
145 150 155 160

Ile Glu Ser Ala Lys Lys Phe Val Glu Thr Pro Gly Gln Lys Tyr Lys
165 170 175

Glu Thr Asp Leu Leu Ile Leu Phe Lys Asp Asp Tyr Phe Ala Lys Lys
180 185 190

Asn Glu Glu Arg Lys Gln Asn Lys Val Glu Ala Lys Leu Arg Ala Lys
195 200 205

Gln Glu Gln Glu Ala Lys Gln Lys Leu Glu Glu Asp Ala Glu Met Lys
210 215 220

Ser Leu Glu Glu Lys Ile Gly Cys Leu Leu Lys Phe Ser Gly Asp Leu
225 230 235 240

Asp Asp Gln Thr Cys Arg Glu Asp Leu His Ile Leu Phe Ser Asn His

245 250 255

Gly Glu Ile Lys Trp Ile Asp Phe Val Arg Gly Ala Lys Glu Gly Ile

260 265 270

Ile Leu Phe Lys Glu Lys Ala Lys Glu Ala Leu Gly Lys Ala Lys Asp

275 280 285

Ala Asn Asn Gly Asn Leu Gln Leu Arg Asn Lys Glu Val Thr Trp Glu

290 295 300

Val Leu Glu Gly Glu Val Glu Lys Glu Ala Leu Lys Lys Ile Ile Glu

305 310 315 320

Asp Gln Gln Glu Ser Leu Asn Lys Trp Lys Ser Lys Gly Arg Arg Phe

325 330 335

Lys Gly Lys Gly Lys Gly Asn Lys Ala Ala Gln Pro Gly Ser Gly Lys

340 345 350

Gly Lys Val Gln Phe Gln Gly Lys Lys Thr Lys Phe Ala Ser Asp Asp

355 360 365

Glu His Asp Glu His Asp Glu Asn Gly Ala Thr Gly Pro Val Lys Arg

370 375 380

Ala Arg Glu Glu Thr Asp Lys Glu Glu Pro Ala Ser Lys Gln Gln Lys

385 390 395 400

Thr Glu Asn Gly Ala Gly Asp Gln

405

<210> 3

<211> 538

<212> PRT

<213> Human Ro protein

<400> 3

Met Glu Glu Ser Val Asn Gln Met Gln Pro Leu Asn Glu Lys Gln Ile

1 5 10 15

Ala Asn Ser Gln Asp Gly Tyr Val Trp Gln Val Thr Asp Met Asn Arg

20 25 30

Leu His Arg Phe Leu Cys Phe Gly Ser Glu Gly Gly Thr Tyr Tyr Ile

35 40 45

Lys Glu Gln Lys Leu Gly Leu Glu Asn Ala Glu Ala Leu Ile Arg Leu
50 55 60

Ile Glu Asp Gly Arg Gly Cys Glu Val Ile Gln Glu Ile Lys Ser Phe
65 70 75 80
Ser Gln Glu Gly Arg Thr Thr Lys Gln Glu Pro Met Leu Phe Ala Leu
85 90 95
Ala Ile Cys Ser Gln Cys Ser Asp Ile Ser Thr Lys Gln Ala Ala Phe
100 105 110
Lys Ala Val Ser Glu Val Cys Arg Ile Pro Thr His Leu Phe Thr Phe
115 120 125
Ile Gln Phe Lys Lys Asp Leu Lys Glu Ser Met Lys Cys Gly Met Trp

130 135 140
Gly Arg Ala Leu Arg Lys Ala Ile Ala Asp Trp Tyr Asn Glu Lys Gly
145 150 155 160
Gly Met Ala Leu Ala Leu Ala Val Thr Lys Tyr Lys Gln Arg Asn Gly
165 170 175
Trp Ser His Lys Asp Leu Leu Arg Leu Ser His Leu Lys Pro Ser Ser
180 185 190
Glu Gly Leu Ala Ile Val Thr Lys Tyr Ile Thr Lys Gly Trp Lys Glu
195 200 205

Val His Glu Leu Tyr Lys Glu Lys Ala Leu Ser Val Glu Thr Glu Lys
210 215 220
Leu Leu Lys Tyr Leu Glu Ala Val Glu Lys Val Lys Arg Thr Arg Asp
225 230 235 240
Glu Leu Glu Val Ile His Leu Ile Glu Glu His Arg Leu Val Arg Glu
245 250 255
His Leu Leu Thr Asn His Leu Lys Ser Lys Glu Val Trp Lys Ala Leu
260 265 270
Leu Gln Glu Met Pro Leu Thr Ala Leu Leu Arg Asn Leu Gly Lys Met

275 280 285
Thr Ala Asn Ser Val Leu Glu Pro Gly Asn Ser Glu Val Ser Leu Val

290 295 300

Cys Glu Lys Leu Cys Asn Glu Lys Leu Leu Lys Lys Ala Arg Ile His
305 310 315 320
Pro Phe His Ile Leu Ile Ala Leu Glu Thr Tyr Lys Thr Gly His Gly
325 330 335
Leu Arg Gly Lys Leu Lys Trp Arg Pro Asp Glu Glu Ile Leu Lys Ala
340 345 350

Leu Asp Ala Ala Phe Tyr Lys Thr Phe Lys Thr Val Glu Pro Thr Gly
355 360 365
Lys Arg Phe Leu Leu Ala Val Asp Val Ser Ala Ser Met Asn Gln Arg
370 375 380
Val Leu Gly Ser Ile Leu Asn Ala Ser Thr Val Ala Ala Ala Met Cys
385 390 395 400
Met Val Val Thr Arg Thr Glu Lys Asp Ser Tyr Val Val Ala Phe Ser
405 410 415
Asp Glu Met Val Pro Cys Pro Val Thr Thr Asp Met Thr Leu Gln Gln

420 425 430
Val Leu Met Ala Met Ser Gln Ile Pro Ala Gly Gly Thr Asp Cys Ser
435 440 445
Leu Pro Met Ile Trp Ala Gln Lys Thr Asn Thr Pro Ala Asp Val Phe
450 455 460
Ile Val Phe Thr Asp Asn Glu Thr Phe Ala Gly Gly Val His Pro Ala
465 470 475 480
Ile Ala Leu Arg Glu Tyr Arg Lys Lys Met Asp Ile Pro Ala Lys Leu
485 490 495

Ile Val Cys Gly Met Thr Ser Asn Gly Phe Thr Ile Ala Asp Pro Asp
500 505 510
Asp Arg Gly Met Leu Asp Met Cys Gly Phe Asp Thr Gly Ala Leu Asp
515 520 525
Val Ile Arg Asn Phe Thr Leu Asp Met Ile
530 535

<210> 4

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Biotin peptide

<400> 4

Ala Ser Ser Leu Arg Gln Ile Leu Asp Ser Gln Lys Met Glu Trp Arg
1 5 10 15

Ser Asn Ala Gly Gly Ser
20

<210> 5

<211> 196

<212> PRT

<213> N-terminal domain of E. coli phosphoglycerate kinase

<400> 5

Met Ser Val Ile Lys Met Thr Asp Leu Asp Leu Ala Gly Lys Arg Val
1 5 10 15

Phe Ile Arg Ala Asp Leu Asn Val Pro Val Lys Asp Gly Lys Val Thr
20 25 30

Ser Asp Ala Arg Ile Arg Ala Ser Leu Pro Thr Ile Glu Leu Ala Leu
35 40 45

Lys Gln Gly Ala Lys Val Met Val Thr Ser His Leu Gly Arg Pro Thr
50 55 60

Glu Gly Glu Tyr Asn Glu Glu Phe Ser Leu Leu Pro Val Val Asn Tyr
65 70 75 80

Leu Lys Asp Lys Leu Ser Asn Pro Val Arg Leu Val Lys Asp Tyr Leu
85 90 95

Asp Gly Val Asp Val Ala Glu Gly Glu Leu Val Val Leu Glu Asn Val
100 105 110

Arg Phe Asn Lys Gly Glu Lys Lys Asp Asp Glu Thr Leu Ser Lys Lys
115 120 125

Tyr Ala Ala Leu Cys Asp Val Phe Val Met Asp Ala Phe Gly Thr Ala
130 135 140

His Arg Ala Gln Ala Ser Thr His Gly Ile Gly Lys Phe Ala Asp Val
145 150 155 160
Ala Cys Ala Gly Pro Leu Leu Ala Ala Glu Leu Asp Ala Leu Gly Lys
165 170 175
Ala Gly Gly Glu Gly Lys Val Leu Pro Ala Val Ala Met Leu Glu Glu
180 185 190

Arg Ala Lys Lys
195

<210> 6
<211> 61
<212> PRT
<213> Sup35 protein from Saccharomyces cerevisiae
<400> 6

Met Ser Asp Ser Asn Gln Gly Asn Asn Gln Gln Asn Tyr Gln Gln Tyr
1 5 10 15
Ser Gln Asn Gly Asn Gln Gln Gln Gly Asn Asn Arg Tyr Gln Gly Tyr
20 25 30
Gln Ala Tyr Asn Ala Gln Ala Gln Pro Ala Gly Gly Tyr Tyr Gln Asn
35 40 45

Tyr Gln Gly Tyr Ser Gly Tyr Gln Gln Gly Gly Tyr Gln
50 55 60