(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020 년 8 월 20 일 (20.08.2020)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2020/165883 A2

(51) 국제특허분류:
C07K 7/06 (2006.01) *C07K 14/47* (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01) *C12P 3/00* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/IB2020/051518

(22) 국제출원일: 2020 년 2 월 24 일 (24.02.2020)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2019-0017806 2019 년 2 월 15 일 (15.02.2019) KR
10-2020-0016933 2020 년 2 월 12 일 (12.02.2020) KR

(71) 출원인: 고려대학교 세종산학협력단 (**KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION, SEJONG CAMPUS**) [KR/KR]; 30019 세종시 조치원읍 세종로 2511, Sejong-si (KR).

(72) 발명자: 백승필 (**PACK, Seung Pil**); 06213 서울시 강남구 테헤란로52길 16 테헤란IPARK 105동 1505호, Seoul (KR). 기미란 (**KI, Mi Ran**); 30021 세종시 조치원읍 충현로 159 욱일아파트 113동 701호, Sejong-si (KR). 웡엔티콰미 (**NGUYEN, Thi Khoa My**); 30019 세종시 조치원읍 세종로 2511, 제1과학기술대학 9동 610호, Sejong-si (KR).

(74) 대리인: 특허법인 다해 (**DAHAI INTERNATIONAL PATENT & LAW FIRM**); 06156 서울시 강남구 삼성로 531 고운빌딩 3층, Seoul (KR).

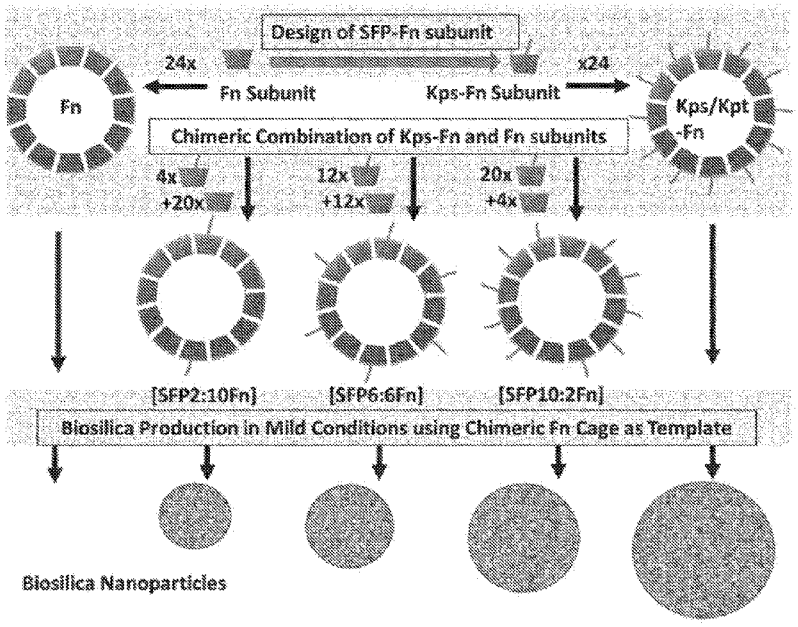
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ,

WO 2020/165883 A2

(54) **Title:** NOVEL PEPTIDE FOR SILICA SYNTHESIS AND METHOD FOR SYNTHESIZING SILICA PARTICLES USING SAME

(54) **발명의 명칭:** 신규의 실리카 합성 펩타이드 및 이를 이용한 실리카 입자 합성방법

[도5]



(57) **Abstract:** The present invention relates to a peptide for silica synthesis and a method for synthesizing silica particles using same. The present invention provides a novel peptide for silica synthesis in which 24 subunits of ferritin are assembled into a globular ferritin protein, wherein, by using the properties of this structure in which the structure disassembles at acidic pH and, when the pH is adjusted back to neutral, the 24 subunits of the ferritin protein reassemble, ferritin (Kps-Fn/Kpt-Fn) having a silica-forming peptide fused at the N-terminus thereof and ferritin (Fn) not containing same are mixed at a certain ratio to adjust the density of a biosilica-forming peptide, and thus the size of silica nanoparticles can be controlled. According to the present invention, size-adjustable biosilica nanoparticles can be prepared in a monodispersed form by controlling the concentration of glycerol, and thus a method for producing novel biosilica

[다음 쪽 계속]

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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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).

규칙 4.17에 의한 선언서:

— 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

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

— 하나 또는 그 이상의 우선권주장과 관련된 우선권 회복 신청에 관한 정보와 함께 (규칙 26의2.3 및 48.2(b)(vii))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

— 흑백; 출원 시의 국제출원에 색상 또는 회색 톤이 포함되어 있으며 PATENTSCOPE에서 다운로드 가능

particles that can be applied to the design of various biohybrid nanomaterials can be provided.

(57) 요약서: 본 발명은 실리카 합성 펩타이드 및 이를 이용한 실리카 입자 합성방법에 관한 것이다. 본 발명에서는 페리틴의 각 서브유닛 24개가 모여 구형의 페리틴 단백질을 형성하고 이 구조가 산에서는 해체되었다가 pH를 다시 중성으로 맞추면 페리틴 단백질의 24개 서브유닛이 다시 모이는 성질을 이용하여 페리틴 아미노말단에 실리카 형성 펩타이드가 융합된 페리틴과 (Kps-Fn/Kpt-Fn)과 그렇지 않은 페리틴 (Fn)을 일정 비율로 섞어 바이오 실리카 형성 펩타이드 밀도를 조절함으로써 실리카 나노 입자의 크기를 제어할 수 있는 신규한 실리카 합성 펩타이드를 제공한다. 본 발명에 따르면, 크기 조절이 가능한 바이오 실리카 나노입자를, 글리세롤의 농도 조절을 통해 단분산 형태로 제조할 수 있는바, 다양한 바이오 하이브리드 나노 물질의 디자인에 적용할 수 있는 새로운 바이오 실리카 입자의 생성 방법을 제공할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 신규의 실리카 합성 펩타이드 및 이를 이용한 실리카 입자 합성방법

기술분야

[1] 본 발명은 신규의 실리카 합성 펩타이드 및 이를 이용한 실리카 합성 방법 등에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 산업화 이후 한정된 육상 가용자원의 소비 급증에 따른 육상 자원 소재의 고갈로 인한 새로운 유용자원 개발이 국가적 미래를 위한 중요 이슈가 되고 있다. 따라서 미국, 유럽, 일본 등의 선진국들은 신규 원천 소재 개발 및 확보에 국가 역량을 집중시키고 있다. 여기에 더하여 환경오염으로 인한 지구 온난화 및 기후 변화 등은 인류의 생존을 위협하는 요인으로 작용하고 있어 경제 성장과 환경 보호를 동시에 추구하는 새로운 패러다임이 대두되고 있다.

[4] 환경 친화적인 생물학적 생산방법을 통해 신소재를 생산하는 방법은 원천 기술의 확보뿐 아니라 친환경 산업으로 인한 국가적인 저탄소 녹색성장의 견인차 역할을 할 기술로 기대된다. 특히, 실리카는 특정 화학종들과 공유 결합이 가능하기 때문에 새로운 하이브리드 소재 (유기-무기 복합체) 합성에 중요하고, 또한, 생체 적합한 소재로서 각 개별 소재의 단점을 보완할 수 있는 우수한 특성을 가지고 있다. 현재 실리카의 공업적 생산 공정은 고온, 강산 또는 강염기 조건이 요구되고 환경적으로 유해한 부산물 생성의 문제점이 있다.

[5] 그러나 상온 상압에서 실리카를 형성할 수 있는 효소 및 펩타이드가 발견됨으로써 생물학적 생산방법을 통한 바이오실리카 복합 소재 개발에 대한 관심이 증대되고 있다.

[6] 한편, 페리틴은 생체 내 주요 철 저장 단백질로서 포유류에서 세균류에 이르기까지 다양한 생명체에 존재한다. 페리틴 분자는 18~22 kDa의 단량체 24개가 결합된 약 450 kDa 분자량을 지닌 구형의 거대분자이면서 단백질 내부 공간이 비어 있는 코어셸 (core shell) 형태를 띠고 있다. 이러한 구조적 특징은 다양한 분야에 응용될 수 있는데, 예를 들어 페리틴의 내부 공간을 이용해 다양한 금속 이온, 동위 원소, 약물 전달 소재를 운반할 수 있으며 페리틴 각 단량체의 N-말단 부분에 특정 기능의 리간드를 연결하여 표적 지향적인 영상 진단 및 약물 전달체를 제조할 수 있다. 또한 페리틴 자체의 구조적 특성을 이용, 주형으로 사용하여 규칙적인 나노 구조체를 만들 수 있다.

[7] 전술한 기술적 배경하에서 본 발명자들은 입자의 크기를 조절할 수 있는 바이오 실리카 입자 제조 기술에 대해 연구하던 중, 신규 실리카 형성 펩타이드를 개발하고, 상기 실리카 형성 펩타이드와 페리틴이 융합된 단백질을

이용할 경우 실리카 나노 입자의 크기를 효과적으로 제어할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[8]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[9] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 실리카를 합성할 수 있는 신규 펩타이드 및 이를 이용하여 단분산 입자로 생성되며, 크기 조절이 가능한 바이오 실리카 입자를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[10] 또한, 본 발명에서는 상기 펩타이드에 의해 제조된 실리카 기반 복합체의 전자, 화학, 약학 등의 다양한 산업 분야에서의 용도를 제공하는 것이다.

[11] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

[12]

과제 해결 수단

[13] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여, 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 신규의 실리카 합성 펩타이드(silica forming peptide: SFP)를 제공한다.

[14] 또한, 본 발명은 상기 신규의 실리카 합성 펩타이드와 실리카 전구체를 포함하는 실리카 합성용 조성물을 제공한다.

[15] 또한, 본 발명은 상기 신규의 실리카 합성 펩타이드와 실리카 전구체를 반응시키는 단계를 포함하는 실리카 합성 방법을 제공하며, 상기 반응은 상온 및/또는 상압 조건하에서 수행될 수 있고, pH 5-8 조건 하에서 수행될 수 있다.

[16] 또한, 본 발명은 상기 신규의 실리카 합성 펩타이드와 페리틴(ferritin) 또는 바이러스 캡시드 단백질이 결합된 융합 단백질을 제공한다.

[17] 또한, 본 발명은 상기 융합 단백질과 실리카 전구체를 포함하는 실리카 파티클 합성용 조성물을 제공하며, 상기 실리카 파티클은 상기 페리틴 또는 바이러스 캡시드 단백질에 의해 형성된 코어쉘 구조체 표면에 실리카가 코팅된 구조를 가질 수 있다.

[18] 또한, 본 발명은 (1) 상기 융합 단백질을 산성 조건하에서 단량체로 분해하는 단계; (2) 약염기 조건하에서 상기 단량체의 페리틴 또는 바이러스 캡시드 서브유닛(subunit)의 결합을 유도하여 코어-쉘 구조체를 제조하는 단계; 및 (3) 상기 구조체와 실리카 전구체를 반응시키는 단계;를 포함하는 실리카 파티클 제조방법을 제공한다.

[19] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 (1) 단계는 융합 단백질과 페리틴 단백질을 혼합하여 수행될 수 있으며, 그 혼합 비율은 1:1~5일 수 있다. 상기 혼합 비율은 최종 산물인 실리카 파티클의 입자 크기에 영향을 미치며, 제조하고자 하는

실리카 파티클의 크기가 큰 경우 융합 단백질의 비율을 높이고, 그 크기가 작은 경우 페리틴 단백질의 비율을 높인다.

[20] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 (1) 단계는 pH 2~3 조건 하에서 수행될 수 있으며, 바람직하게는 pH 2 수용액 하에서 수행될 수 있다.

[21] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 (2) 단계는 pH 7~9 조건 하에서 수행될 수 있으며, 바람직하게는 pH 8 수용액 하에서 수행될 수 있다.

[22] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 (3) 단계는 글리세롤이 포함된 용액 내에서 수행될 수 있으며, 바람직하게는 50% 글리세롤이 포함된 용액 내에서 수행될 수 있다.

[23] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 실리카 파티클을 제공한다.

[24] 한편, 본 발명의 실리카 파티클은 내부에 약물을 담지하여 약물 전달체로 이용될 수 있으며, 상기 약물의 담지는 상기 (2) 단계에서 코어-쉘 구조체의 제조시 약물과 융합 단백질의 단량체가 혼합된 용액의 pH를 염기로 조절하여 코어-쉘 구조체를 제조함으로써 수행될 수 있다.

[25] 또한, 본 발명의 실리카 파티클은 그 표면에 약물을 로딩하여 약물 전달체로 이용될 수 있다. 상기 약물의 로딩은 상기 (3) 단계 이후에 제조된 실리카 파티클과 약물을 반응시켜 실리카 파티클의 표면과 약물의 결합을 유도함으로써 수행될 수 있다.

[26] 한편, 본 발명의 실리카 파티클은 내부와 표면에 각각 독립적으로 약물을 로딩하여 이중 약물 전달 시스템으로 이용될 수 있고, 상기 파티클 표면에 결합된 약물과 내부에 담지된 약물의 방출 패턴과 로딩되는 약물을 고려하여 표면과 내부에 각각 로딩되는 약물은 서로 동일하거나 상이할 수 있다.

[27] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 약물은 화합물, 펩타이드, 단백질, 이미징 제제(imaging agent), 유전자 구성물(gene construct), 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[28] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 실리카 전구체는 테트라에틸 오르토실리케이트, 테트라메틸 오르토실리케이트, 메틸 트리에톡시실란, 에틸 트리에톡시실란, 페닐 트리 에톡시실란, 디메틸 디메톡시 실란, 디메틸 디에톡시실란, 에틸 트리에톡시실란, 트리 메틸에톡시실란, 트리아미노프로필트리에톡시실란, 티타니아 테트라이소프로폭사이드, 티타니움옥시셀페이트, 티타니움비스암모니움락테이토디하이드록사이드, 티타니움 디이소프로폭사이드 비스아세틸아세토네이트 및 테트라에틸 게르마늄으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.

[29] 또한, 본 발명은 (가) 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 Kps 유전자 또는 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 Kpt 유전자와 페리틴(ferritin) 또는 바이러스 캡시드 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터를 제조하는 단계; (나) 상기 발현 벡터를 숙주 세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계; 및 (다) 상기 형질전환체를 배양하는 단계;를 포함하는 실리카 형성 펩타이드와

페리틴의 융합 단백질 제조 방법을 제공한다.

[30] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 방법은 (다) 단계 이후에 상기 형질전환체를 파쇄하고, 원심분리를 통해 형질전환체의 파편을 제거하여 획득된 가용성 분획물을 니켈 수지와 혼합하여 니켈 수지에 결합된 융합 단백질을 수득하는 정제 단계를 추가로 포함하여 고순도의 융합 단백질을 제공할 수 있다.

[31]

발명의 효과

[32] 본 발명에서는 페리틴의 각 서브유닛 24개가 모여 구형의 페리틴 단백질을 형성하고 이 구조가 산에서는 해체되었다가 pH를 다시 중성으로 맞추면 페리틴 단백질의 24개 서브유닛이 다시 모이는 성질을 이용하여 페리틴 아미노말단에 실리카 형성 펩타이드가 융합된 페리틴과 (Kps-Fn/Kpt-Fn)과 그렇지 않은 페리틴 (Fn)을 일정 비율로 섞어 바이오 실리카 형성 펩타이드 밀도를 조절함으로써 실리카 나노 입자의 크기를 제어할 수 있는 신규한 실리카 합성 펩타이드를 제공한다.

[33] 본 발명에 따르면, 크기 조절이 가능한 바이오 실리카 나노입자를, 글리세롤의 농도 조절을 통해 단분산 형태로 제조할 수 있는바, 다양한 바이오 하이브리드 나노 물질의 디자인에 적용할 수 있는 새로운 바이오 실리카 입자의 생성 방법을 제공할 수 있다.

[34]

도면의 간단한 설명

[35] 도 1은 pH에 따른 실리카 형성 펩타이드(R5, Kps, Kpt)의 실리카 침전 활성을 비교 확인한 도면이다.

[36] 도 2는 니켈 수지에 대한 펩타이드의 흡착 등온선이다[(A) 6×His. (B) Kps. (C) Kpt].

[37] 도 3은 SFP-Fn 단백질의 구조 비교 도면으로, (A)는 Native-PAGE 결과이고, (B)는 SFP-Fn 융합 단백질의 TEM 이미지이다.

[38] 도 4는 SFP, Fn, 및 SFP-Fn 융합 단백질의 실리카 형성능을 비교 확인한 도면이다.

[39] 도 5는 페리틴 기반의 실리카 파티클(NPs) 제어 방법의 모식도 이다.

[40] 도 6은 주형으로 키메라 Fn을 사용하여 50% 글리세롤의 존재하에 졸-겔 공정으로부터 유도된 실리카 입자에 대해 200개 이상의 입자의 통계 분석을 통해 얻어진 입자 크기 히스토그램 결과를 나타낸 것이다.

[41] 도 7은 실리카 형성 반응 시 50% 글리세롤 첨가 유무에 따른, 형성된 실리카 입자의 형태를 비교한 이미지이다(a: SiO_2/Kps-Fn, b: SiO_2/Kpt-Fn, c: SiO_2/Kps-Fn, 50% 글리세롤 첨가, d: SiO_2/Kpt-Fn, 50% 글리세롤 첨가). 스케일바: 500nm.

[42] 도 8은 실리카 입자에 결합한 DNA 양을 비교한 것으로, a는 아가로즈겔 (0.7 %) 전기영동을 통해 각 실리카 입자에 흡착되었던 DNA를 용출시켜 그 양을 비교한

대표도이며(레인1 : SiO_2/Kps-Fn, 레인 2: SiO_2/Kpt-Fn, 레인 3: SiO_2/Kps1:5, 레인 4: SiO_2/Kpt1:5, 레인 5: 상업용 SiO_2 (170nm), 레인 6: 상업용 SiO_2 (310nm), 레인 7: 유리 DNA (500ng)), b는 실리카 입자로부터 용출된 DNA의 양을 ImageJ 소프트웨어로 측정하여 정량화한 결과를 나타낸다(*P <0.01, SiO_2/Kps1:5 대 SiO_2 /Kps-Fn. **P <0.01, SiO_2/Kpt1:5 대 SiO_2/Kpt-Fn. #P <0.001, SiO_2/Kps1:5 대 상업용 실리카. ##P <0.001, SiO_2/Kpt1:5 대 상업용 실리카).

[43] 도 9는 Kps6:6 Fn 및 SiO_2/Kps6:6Fn에 담지된 Dox의 방출 패턴을 pH에 따라확인한 도면이다.

[44] 도 10은 Kpt6:6(Dox)의 표면에 고정된 mRFP와 Dox의 시간의 흐름에 따른 방출 패턴을 확인한 도면이다.

[45]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[46] 본 발명자들은 새로운 실리카 합성 펩타이드의 개발과 이를 이용한 바이오 실리카의 다양한 이용방법에 대해 예의 연구하여 본 발명을 완성하였다.

[47] 본 발명자들은 새로운 실리카 합성 펩타이드를 발굴하기 위하여 Kps 서열 (KPSHHHHHTGAN; US20060172282A1; DOI: https://doi.org/10.1166/jnn.2002.074)을 기초로 단백질 데이터베이스 Blast 검색에 의해 Kpt 펩타이드를 선별 하였고, Kps와 Kpt 펩타이드를 R5 펩타이드를 reference로 하여 실리카 합성 능력을 확인한 결과, Kps 및 Kpt 모두 상온, 상압, pH 5 내지 8 조건 하에서 활발하게 실리카를 합성할 수 있음을 확인하였다. 해양 미생물 Ruegeria pomeroyi DSS-3 (이전 Silicibacter pomeroyi)의 막 단백질 (NCBI RefSeq : WP_011046633.1)에 존재하는 서열 (KPTHHHHHHDG)로 이루어진 Kpt 펩타이드는 pH 5, 6, 및 8 조건 하에서 R5 및 Kps보다 우수한 실리카 형성능을 나타내었다(실시예 1-1).

[48] Kps 및 Kpt 펩타이드는 단독으로도 사용될 수 있지만 효소나 기능성 단백질과 융합을 통해 단백질에 실리카 형성능력을 부여할 수 있다. 그러나 재조합 단백질의 발현을 위해 multi-tag의 융합은 단백질 구조 및 발현에 영향을 줄 수 있어 단일 결합 tag이 다기성을 갖는다면 더 가치 및 유용성이 증가하게 된다. Kps 및 Kpt는 서열 중 히스티딘 잔기 6개가 반복 서열로 존재하기 때문에 정제를 위한 니켈수지에 결합 가능할 것으로 예상되었고 이를 확인한 결과, Kps 및 Kpt 모두 니켈 수지에 대해 높은 친화력을 가짐을 알 수 있었다(실시예 1-2).

[49] 한편, 페리틴의 각 단량체는 24개가 모여 구형의 페리틴 단백질을 형성하고 이 구조가 산에서는 해체되었다가 pH를 다시 중성으로 맞추면 페리틴 단백질의 24개 단량체가 다시 모여 코어-쉘 구조체를 형성하는 성질을 갖는다.

[50] 이에, 본 발명자들은 상기 Kps 또는 Kpt에 코어-쉘 구조체를 형성하는 페리틴 단백질을 결합한 융합 단백질(SFP-Fn)을 제조하고 이를 니켈 수지를 이용하여 정제한 후 상기 융합단백질은 산성 조건하에서 단량체로 분해하고 다시 중성

또는 염기성 조건하에서 결합을 유도하여 획득된 구조체의 형태를 관찰한 결과, Kps 및 Kpt는 결합된 페리틴 단백질의 기능에 영향을 미치지 않고 니켈 수지를 이용한 정제에 친화성 태그로 효과적으로 기능함을 확인할 수 있었다(실시예 2).

[51] 본 발명에서 상기 SFP-Fn를 이용하여 제조된 구조체는 키메라 페리틴이라고 할 수 있으며, 상기 코어-쉘 구조체와 키메라 페리틴은 혼용될 수 있다.

[52] 또한, 본 발명자들은 상기 융합 단백질의 코어-쉘 구조체와 실리카 전구체를 혼합하여 실리카 파티클을 제조하였으며, 상기 실리카 파티클은 상기 융합 단백질로 이루어진 구조체의 표면에 실리카가 코팅된 구조로서, 실리카 파티클의 크기는 융합단백질에 결합된 SFP의 실리카 형성능에 영향을 받음을 확인하였다. 이에 상기 페리틴에 의한 코어-쉘 구조체 표면에 위치한 SFP의 수와 성능에 따라 실리카 파티클의 크기를 조절할 수 있을 것으로 예상하고, Kps-Fn/Kpt-Fn 및 Fn 서브유닛의 비율을 달리하여 키메라 페리틴을 제작하고 실리카 파티클을 제조하여 실리카 파티클의 크기를 효과적으로 조절할 수 있음을 확인하였다(실시예 3-1). 한편, 본 명세서에서 Kps-Fn/Kpt-Fn 및 Fn 을 혼합하여 제작한 키메라 페리틴은 그 혼합 비율에 따라 구분하여 명명한다. 예를들어 Kps-Fn와 Fn을 1대 5의 몰비로 섞은 후 재구성하여 얻은 키메라 페리틴은 Kps1:5로 명명하고 Kpt-Fn와 Fn을 1대 5의 몰비로 섞은 후 재구성하여 얻은 키메라 페리틴은 Kpt1:5로 명명하였다.

[53] 또한, 본 발명자들은 제조된 실리카 파티클은 서로 뭉치는 현상이 확인되었으나, 이는 실리카 전구체와 반응시 50% 글리세롤을 첨가하여 방지할 수 있음을 확인하였다(실시예 3-2).

[54] Kps-Fn은 Kpt-Fn보다 크기가 큰 실리카 나노 파티클을 형성하고, 보다 작은 실리카 파티클을 형성하는 Kpt-Fn은 표면적이 넓은 바이오 실리카를 제조할 수 있음을 알 수 있다. 이에, 본 발명자들은 Kps-Fn, Kpt-Fn 및 키메라 Fn을 주형으로 제조된 실리카 나노입자에 DNA 흡착능을 확인한 결과 동량의 바이오 실리카에서 크기가 작을 수록 DNA 흡착능이 우수함을 확인하였고, 본 발명의 신규한 SFP로 제조된 실리카 파티클은 시판되는 실리카 파티클 보다 우수한 DNA 흡착능을 나타내었다(실시예 5).

[55] 또한, 본 발명자들은 상기 코어-쉘 구조체 내부에 약물을 담지하여 실리카 파티클을 제조함으로써 약물 전달체로 제공할 수 있음을 확인하기 위하여, 상기 융합단백질의 코어-쉘 구조체 형성시 약물을 혼합하여 쉘 구조 내부에 약물을 담지하고 실리카 파티클을 제조하였다. 약물을 담지한 실리카 파티클은 산성 조건하에서 빠르게 약물을 방출하였고, 중성 부근의 pH에서 서서히 약물을 방출함을 확인할 수 있었다(실시예6).

[56] 또한, 본 발명자들은 상기 코어-쉘 구조체 내부와 실리카 코팅 막에 약물을 각각 담지하여 2중 약물 전달체로 제공할 수 있음을 확인하기 위하여, 상기 융합단백질의 코어-쉘 구조체 형성시 약물을 혼합하여 쉘 구조 내부에 약물을 담지하고 실리카 파티클을 형성하는 과정에 다른 약물을 첨가하여 페리틴 코어

주위에 실리카가 침전되면서 주위에 존재하는 약물을 함께 실리카에 고정화시켜 약물이 담지된 실리카 파티클을 제조하였다. 페리틴 내부 코어와 외부 실리카 셀에 약물을 담지한 이중 약물전달시스템은 외부 약물이 내부 약물에 비해 빠르게 방출됨을 확인할 수 있었다 (실시예 7).

[57]

[58] 본 발명의 약물 전달체는 약제학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있으며, 상기 약물 전달체의 실리카 복합체는 코어-셸 구조로 내부에 약제학적 활성성분을 내포할 수도 있다.

[59] 상기 약제학적으로 허용 가능한 담체는 의약 분야에서 통상 사용되는 담체 및 비히클을 포함하며, 구체적으로 이온 교환 수지, 알루미나, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질(예, 사람 혈청 알부민), 완충 물질(예, 각종 인산염, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 포화 식물성 지방산의 부분적인 글리세라이드 혼합 물), 물, 염 또는 전해질(예, 프로타민 설페이트, 인산수소이나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨 및 아연 염), 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌 글리콜 또는 양모지 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[60] 또한, 본 발명의 약물전달체는 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 유화제, 현탁제, 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[61] 본 발명의 구체적인 실시예에서 "벡터 (vector)"는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물이라면 이에 제한되는 것은 아니다. 따라서, 벡터는 플라스미드, 파지 입자, 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환되면, 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이고, 본 발명의 구체적인 실시예에서 이용하고 있는 형태이므로, 본 발명의 명세서에서 "플라스미드 (plasmid)" 및 "벡터 (vector)"는 때로 상호 교환적으로 사용된다. 그러나, 본 발명은 당업계에 알려진 또는 알려지게 되는 바와 동등한 기능을 갖는 벡터의 다른 형태를 포함한다.

[62] 또한, 본 명세서에 "재조합 발현 벡터"는 통상 이종의 DNA의 단편이 삽입된 재조합 캐리어 (recombinant carrier)로서 일반적으로 이중 가닥의 DNA의 단편을 의미한다. 여기서, 이종 DNA는 숙주 세포에서 천연적으로 발견되지 않는 DNA인 이형 DNA를 의미한다. 발현 벡터는 일단 숙주 세포내에 있으면 숙주 염색체 DNA와 무관하 게 복제할 수 있으며 벡터의 수 개의 카피 및 그의 삽입된 (이종) DNA가 생성될 수 있다.

[63] 상기 벡터는 클로닝되는 유전자와 작동가능하게 연결된(operatively linked) 프로모터를 포함할 수 있으며, 본 명세서에서 "프로모터"는 형질주입하고자 하는 유전자의 발현을 촉진시키는 것으로서 상기 프로모터에는 전사에 필요한

기본인자(Basal element)뿐만 아니라, 발현의 촉진 및 조절에 사용될 수 있는 인핸서(enhancer)가 더 포함될 수 있다.

[64] 또한, 본 명세서에서 "형질전환" 또는 "형질주입"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체 외 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제가능하게 되는 것을 의미한다. 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 이용 한 교반, 아그로박테리아 매개된 형질전환, PEG, 덱스트란 설페이트, 리포펙타민 등이 포함되나 이로 제한되지 않는다.

[65] 또한, 숙주에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 목적에 가장 적합한 숙주세포를 선택하여 사용할 수 있다. 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.

[66]

[67] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 이하 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[68]

발명의 실시를 위한 형태

[69] **[실험 방법]**

[70] **1.실리카 형성 펩타이드(Silica forming peptide: SFP)**

[71] 1-1. SFP의 준비

[72] 실험에 이용된 SFP는 하기 표 1과 같다. Kpt는 Kps 서열을 기초로 Blast 단백질 데이터베이스 검색을 통해 선별하였다.

[73] [표1]

No.	SFP	Amino acid sequence	Molecular weight (kDa)	Histidine residues	Hydroxyl-containing residues	pI
1	Kps	KPSHHHHHTGAN	1.36	5	2	9.71
2	Kpt	KPTHHHHHHDG	1.34	6	1	7.98
3	R5	SSKKSGSYSGSK GSK	1.47	0	7	10.87

[74] 1-2. SFP의 실리카 형성능 확인

[75] 탈-이온수에 SFP (R5, Kps, Kpt)를 각각 10 mg / mL의 농도로 제조하고, 1M의 TMOS(Tetramethyl orthosilicate)를 반응 10분전에 HCl을 최종 농도 1mM이 되도록 첨가하여 실리카 전구체 silicic acid을 제조하였다. 실리카 침전을 위해 80 μL의 실리카 침전 반응용 완충제 (아세테이트 완충제 pH 5.0 및 칼륨 포스페이트 완충제 pH 6, 7 또는 8.0)에 가수 분해된 1 M의 TMOS 10 μL 및 SFP 10 μL를 첨가한 후 혼합물을 실온에서 5 분 동안 교반하여 반응시켰다. 침전된 실리카 입자를 원심 분리로 분리 한 다음 탈 이온수로 3 회 세척 하였다. pH에 따른 펩타이드의 실리카 형성능은 몰리브덴블루법을 이용한 실리카 정량법으로 정량하였다.

[76]

[77] 1-3. 니켈 수지에 대한 SFP의 친화성 확인

[78] PBS에 녹인 10 mg/mL의 펩타이드와 100 μL를 니켈수지를 30분간 상온에서 교반하여 혼합하고 원심분리하여 (14000×g, 5분) 니켈수지와 결합되지 않은 펩타이드를 회수하였다. 상청액 샘플 중 펩티드의 양을 Pierce Quantitative Fluorometric Peptide assay (Thermo Fisher Scientific, IL, USA)를 이용하여 측정하고, 하기 Langmuir 흡착 등온선 식 1에 따라 흡착 용량(q)과 K_d 값을 계산하였다.

[79] [식 1]

[80] $q = (q_{max} \times C_{eq}) / (K_d + C_{eq})$

[81]

[82] **2.Fn 단백질 및 SFP-Fn 융합 단백질의 제조**

[83] 2-1. 발현 벡터 및 형질전환체 제조

[84] 인간의 중쇄 페리틴 (human Ferritin heavy chain: Fn) 유전자는 pUC57-Fn OPT (GenScript USA Inc.)를 주형으로 PCR을 수행하여 준비하였다. PCR 수행을 위한 정방향/역방향 프라이머의 구체적인 정보는 하기 표 2와 같다. 이어서, 상기 PCR 산물로 확보된 Fn 유전자를 pET-42b 벡터에 삽입하여 pET-Fn 플라스미드를

제조하고 대장균 시스템 (BL21(DE3))에 도입하여 형질전환체를 제작하였다.

[85] [표2]

No.	Primer	Sequence
4	F-Fn	CATATGACGACCGCGTCTACCTCTCAAGTG
5	R-Fn	CCACTGAGGCTGTTACTTAGCACTGAGCTC

[86] Kps-Fn 및 Kpt-Fn을 제조하기 위하여, pUC57-Fn OPT 플라스미드를 주형으로 하여 3 개의 Kps 또는 Kpt 서열을 Fn의 아미노 말단에 도입하기 위한 각 유전자에 대한 전방향 프라이머 3개 (F1, F2 및 F3-Kps 또는 -Kpt)를 제작하였다(표 3). F1과 R-Fn으로 첫 PCR을 수행 후 그 산물을 다시 주형으로 F2와 R-Fn으로 PCR을 수행하고 그 산물을 다시 주형으로 하여 마지막 F3와 R-Fn으로 PCR을 수행하여 Kps-Fn 및 Kpt-Fn 유전자를 얻은 후 T-벡터인 pGEM-T Easy vector (Promega Co., Madison, WI)에 서브 클로닝 하였다. 제한 효소 NdeI / XhoI으로 상기 서브 클로닝된 T- 벡터로부터 Kps-Fn 또는 Kpt-Fn 유전자 단편을 절단하고, 같은 제한 효소로 처리된 pET42b 벡터를 이용하여 pET-Kps-Fn, pET-Kpt-Fn을 발현 벡터를 제조하고 이를 대장균 BL21(DE3)에 도입하여 Kps-Fn 또는 Kpt-Fn 생산 균주를 제작하였다. 삽입된 모든 DNA 염기 서열은 자동화 된 DNA 시퀀싱 (Cosmo Genetech Co., Seoul)에 의해 확인하였다.

[87] [표3]

No.	Primer	Sequence
6	F1-Kps	ACTGGTGCTAACACGACCGCGTCTAC
7	F2-Kps	TCACCATCACC ATCACACTGGTGCTAAC
8	F3-Kps	CATATGAAGCCGTCTCACCATCACCATCAC
9	F1-Kpt	CATCATGATGGCAGTACGACCGCGTCTAC
10	F2-Kpt	CCCACCATCACCATCATCATGATGGCAGT
11	F3-Kpt	CATATGA AGCCGACCCACCATCACCATC

[88] 2-2. 단백질의 발현

[89] Fn, Kps-Fn 또는 Kpt-Fn 발현 벡터가 도입된 대장균 BL21 (DE3)을 카나마이신 (25㎍/㎖)이 포함된 LB 액체 배양액에 배양하여 37 ℃에서 균체 흡광도가 0.6~0.8 (600nm 흡광도) 정도에 이를 때까지 성장 시킨 후, 최종 농도가 0.1mM이되도록 IPTG를 첨가하였다. 이어서, Fn 발현 벡터가 도입된 균주는 20 ℃에서 밤새 배양하여 단백질 발현을 유도하고, Kps-Fn 또는 Kpt-Fn 발현 벡터가 도입된 균주는 37℃에서 4 시간 배양하여 Kps-Fn 또는 Kpt-Fn의 발현을 유도하였다. 다음으로 상기 각 균주를 원심분리로 회수 후 초음파 처리로 파쇄하고, 4℃에서 13000 rpm으로 30분간 원심분리하여 불용성 균체 파편을 제거한 후 가용성

분획만을 회수하였다. 상기 가용성 분획은 60℃에서 10 분간 처리하여 침전된 단백질들을 같은 조건으로 원심분리하여 최종 가용성 분획을 회수하였다.

[90]

[91] 2-3. 단백질의 정제

[92] - Fn 단백질의 정제: 황산 암모늄 침전, phenyl-sheparose column chromatography 및 Q-sepharose column chromatography 의해 정제하였다.

[93] - Kps-Fn 및 Kpt-Fn 단백질의 정제: 니켈수지를 이용하여 고순도로 정제하였다.

[94] - 최종적으로, 용출된 분획을 투석을 통해 50mM Tris-HCl, 300mM NaCl 및 1 % 수크로스 (pH 8.0)로 완충액을 교환하였다. 각 단백질 농도는 Bradford 분석 시약 (Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 측정하였다.

[95]

[96] **3. 키메라 페리틴 단백질의 제조**

[97] Fn과 Kps/Kpt-Fn 단백질을 다양한 몰 비율로 혼합한 혼합용액 (Kps-Fn 2mol대 Fn 10 mol 의 비율로 융합된 경우 Kps 2:10로 표현, 같은 방법으로 Kpt-Fn 2mol대 Fn 10 mol 의 비율로 융합된 경우 Kpt 2:10) 에 1M HCl을 첨가하여 pH를 2.0으로 조정하여 20분 동안 페리틴을 단량체로 분해하고 다시 1M NaOH를 첨가하여 pH를 8.0로 조절하여 24개 단량체 페리틴이 합체된 키메라 Fn 단백질을 재구성 하였다. HCl 및 NaOH의 첨가로 발생된 염은 4℃에서 완충용액(50mM Tris-HCl, 300mM NaCl, pH 8.0(TBS) 및 1 % 수크로즈로)으로 24 시간 동안 투석하여 제거하였다. 이어서, 투석 후 Amicon Ultra 100K 원심여과액 장치로 여과하여 단량체 및 막대형 올리고머를 제거하고, 크기 구배 크로마토 그라피를 이용하여 구형의 Fn 단백질만을 수득하였다. 상기 획득된 Fn 단백질은 이하 규화 반응의 주형으로 사용하였다. 모든 단백질은 사용 전에 4℃에서 단백질 안정성을 유지하기 위해 1 % 수크로오스를 함유하는 TBS 완충액에 저장하였다.

[98]

[99] **4. 페리틴 단백질을 템플릿으로 하는 실리카 파티클**

[100] 4-1. 페리틴 기반의 실리카 파티클의 제조

[101] 1M의 TMOS(Tetramethyl orthosilicate)를 반응 10분전에 HCl을 최종 농도 1mM이 되도록 첨가하여 규산을 제조 하였다. 다양한 농도의 글리세롤 (0 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %)을 함유하는 인산 칼륨 완충액 (pH 8.0)에 40㎍/ ml 페리틴 단백질 및 10mM 규산을 첨가한 혼합물을 실온에서 2 시간 동안 진탕 반응시키고, 원심 분리에 의해 실리카로 캡슐화된 Fn 입자를 수득하고, 증류수로 수회 세척하였다.

[102]

[103] 4-2. 실리카 파티클의 정량

[104] 실리카 캡슐화된 Fn 입자를 1M NaOH에 용해시키고 95 ℃에서 5 분 동안 인큐베이션 하였다. 희석 된 시료 총 20 μL를 1 M HCl 20 μL와 증류수 10 μL가 들어있는 96- 웰 플레이트의 각 웰에 첨가하여 pH 값을 중화시켰다. 후속

단계에서, 2 % 암모늄 몰리브데이트 테트라 하이드레이트, 5 % 옥살산 및 100 mM 아스 코르빈산을 각각 50 ㎕씩 순차적으로 첨가 하였다. 마지막으로 200 ㎕ 용액의 흡광도를 파장 700 nm에서 측정하였다. 메타 규산 나트륨 비수화물의 용액을 Si 표준 곡선을 생성하기 위해 사용하였다.

[105]

[106] 4-3. 실리카 파티클의 표면 특성

[107] 실리카 침전물을 증류수로 세척하고, 에탄올로 희석하고, 실리카 웨이퍼 상에 스퍼터 코팅 하였다. 스캐닝 전자 현미경 (SEM) 이미지는 2 kV의 가속 전압으로 Hitachi S-900에서 촬영되었다. 샘플은 이온 스퍼터 시스템 (Hitachi E-1030)을 사용하여 아르곤 대기에서 SEM 관찰 직전에 백금으로 코팅되었다.

[108] 또한, 실리카 파티클의 다공성 및 표면적 측정을 위하여, Kps-Fn, Kps 2:10, Kpt-Fn, Kpt 2:10에 의해 형성된 100 mg의 실리카 파티클에 대한 BET analysis를 수행하였다. 질소 흡착 등온선은 ASAP 2020 (Micromeritics, GA, USA)을 사용하여 77K에서 측정되었다. 제조된 샘플의 비 표면적은 Brunauer-Emmett-Teller (BET) 방정식을 사용하여 질소 흡착 데이터에 의해 결정되었다.

[109]

[110] 4-4. 실리카 파티클의 DNA 흡착 및 용출

[111] DNA (최종 농도 60 ng/㎕)와 실리카 입자 (최종 농도 100 nM)를 섞은 후 혼합물을 실온에서 2 시간 동안 진탕 반응 시키고 실리카 입자를 원심 분리에 의해 결합 완충액으로부터 제거 하였다. DNA 용출을 위해 실리카 입자에 20㎕의 정제수를 첨가 한 다음, 진탕 조건 (200rpm)하에 30 분 동안 배양 하였다. 원심 분리 후, 실리카 입자를 연속적으로 세척하여 전체 흡착 된 DNA를 용리시켰다. 물에서의 DNA 농도는 겔 전기 영동에서 염색된 DNA 밴드의 세기를 ImageJ 프로그램으로 정량화하여 결정되었다.

[112]

[113] 4-5. 약물이 담지된 페리틴 기반의 실리카 파티클의 제조 및 약물 방출 확인

[114] Kps-Fn 과 Fn 을 6:6 비율로 섞은 1 mL 반응계에 1 N HCl을 넣어 pH를 2로 맞춘 후 20분간 반응시키고, 1mg/mL 농도의 독소루비신(doxorubicin: Dox)을 100μL 첨가하여 5분간 반응 시킨 후 1 N NaOH를 첨가하여 반응용액의 pH를 8로 조절하여 하룻동안 냉장 챔버에서 교반 반응시켰다. 원심분리를 통해 침전물을 제거 후, 상청액을 투석막에 넣고 페리틴 내부에 담지 되지 않은 Dox를 제거하였다. Dox를 담지한 페리틴 샘플 (Kps6:6(Dox)) 에 최종 농도가 40% 되도록 glycerol을 첨가하고 최종 TMOS 농도는 100 mM 조건에서 2시간 동안 실리카 형성 반응을 시킨 후 형성된 실리카를 침전시켜 최종 산물 (SiO_2 /Kps6:6(Dox)) 을 회수하였다. 실리카 반응을 수행하지 않은 독소 담지 카베라 페리틴 Kps6:6(Dox) 과 실리카로 캡슐화 된 SiO_2/Kps6:6(Dox) 로부터 방출된 Dox양을 비교하였다.

[115] 각 1mL 샘플은 투석막 (10K MWCO, Pierce)에 넣은 후 투석막은 10 mL 의 완충액 (인산-시트레이트 완충액, pH5.5 와 pH7.4)이 들어있는 50 mL 튜브에 넣은 후 37℃의 항온에서 150 rpm으로 진탕 반응시켰다. 상기 Dox 방출량 확인 시마다 투석막 밖의 완충액을 회수하고 새 완충액으로 교환하였다. 샘플로부터 방출된 Dox 농도는 상응하는 완충 용액에서의 Dox표준 곡선과 비교하여 형광 마이크로 플레이트 판독기 (λ485 / λInfinite F200 NanoQuant; TECAN)를 사용하여 결정되었다. 각 시점에 검출된 Dox 양은 시간에 따른 누적양으로 계산하였다.

[116]

[117] 4-6. 이중 약물 전달 시스템

[118] 이중 약물 전달 시스템의 적용가능성을 확인 하기 위해, mRFP 단백질을 모델 분자로 사용 하였다. 미리 제조 된 Kpt6:6 (Dox) 용액을 mRFP 및 20 mM의 가수 분해 된 TMOS를 함유하는 50 mM 인산 나트륨 완충액에 첨가 하였다 [mRFP 대 Kpt6:6 (Dox)의 몰비는 10 대 1에서 1 대 1 까지]. 24 시간 동안 교반하여 mRFP를 Kpt6:6 (Dox)의 규화 된 쉘에 포획 하였다 (SiO_2(mRFP)/Kpt6:6(Dox)). 미 반응 mRFP 및 TMOS는 Amicon Ultra-0.5 장치 (YM100)를 사용하여 제조사의 지시에 따라 PBS (pH 7.4)로 5 번에 걸쳐 한외 여과에 의해 제거되었다.

[119] SiO_2(mRFP)/Kpt6:6(Dox)로부터의 mRFP 및 Dox의 방출 프로파일은 8 일 동안 매일 14,000 × g에서 원심 분리하여 수득 하였다. 침전물을 1 mL의 PBS에 재 분산시켰다. 상청액 중의 mRFP 또는 Dox의 양은 형광 마이크로 플레이트 리더 (Infinite F200 NanoQuant; TECAN)를 사용하여 각각 λ590 / λem 635 nm 및 λex 485 / λ535 nm에서 모니터링되었다. 완충액 중의 mRFP 및 Dox의 농도는 각 분자에 대한 표준 곡선에 따라 결정되었다. 가시 광선으로 상등액으로 방출 된 Dox 양을 측정 할 때는 UV / visible microplate reader (Infinite M200 NanoQuant; TECAN)를 사용하여 550 nm에서 모니터링하였다. 샘플로부터 방출된 Dox 농도는 상응하는 완충 용액에서의 Dox표준 곡선과 비교하여 형광 마이크로 플레이트 판독기 (λ485 / λ를 사용하여 결정되었다. 각 시점에 검출된 Dox 양은 시간에 따른 누적양으로 계산하였다.

[120]

[121] **[실험 결과]**

[122] **실시예 1. 실리카 형성 펩타이드의 특성 확인**

[123] 1-1. 3종 SFP의 pH에 따른 실리카 형성능 비교 확인

[124] 상기 표 1에 3종 SFP (R5, Kps, Kpt) 각각을 실리카 전구체(TMOS)와 혼합한 용액의 pH를 달리하여 각 펩타이드의 실리카 형성능을 확인한 결과, 3종 펩타이드 모두 pH 7 및 8에서 높은 실리카 침전을 나타냈다. R5 펩타이드는 Kps 및 Kpt와 비교하여 pH 7.0에서 가장 높은 활성을 나타냈다. 그러나, pH 6.0에서 거의 실리카를 침전 시키지 못하였고, pH 5.0에서 완전히 활성이 없었다. Kpt 펩타이드는 pH 5, 6 및 8에서 R5 및 Kps보다 더 큰 실리카 형성 능력을 나타냈다(도 1).

[125]

[126] 1-2. 니켈 수지의 SFP 흡착 용량 및 친화력 확인

[127] 히스티딘은 히스티딘 이미다졸 고리상의 전자 공여체 그룹과 수지에 고정화 된 전이 금속 (니켈 또는 코발트) 사이의 배위 결합을 형성함으로써 메트릭스 상에 고정된 금속이온과 강한 상호 작용을 나타낸다. Kps, Kpt, 및 6×His 펩타이드의 니켈 수지에 대한 결합능의 능력을 조사하였다.

[128] Langmuir 등온선을 사용한 Ni- 수지에 대한 펩타이드 흡착 파라미터 비교 결과를 하기 표 4에 나타내었고, 그 등온선은 도 2와 같다.

[129] [표4]

Peptide	Dissociation coefficient K_d (μM)	Maximum adsorption capacity q_{max} (μmoles/g)
6xHis	52.36	2238
Kps	125.5	1640
Kpt	55.91	1522

[130] 중성 pH에서 6×His 펩타이드는 Kps 및 Kpt 펩타이드와 비교하여 니켈 수지에서 최고 흡착 용량 (2238 μmoles/g)을 나타내었다. Kps는 5 개의 히스티딘 잔기를 함유하지만 6개의 히스티딘 잔기를 갖는 Kpt 보다는 약간 높은 흡착 용량 값을 나타내었다. Kps의 q_{max}는 Kpt보다 약간 높았지만, 친화력을 나타내는 K_d 값은 125.5 μM로 55.91μM의 Kpt보다 2배 이상 높아 Kpt의 니켈수지에 대한 친화력이 Kps보다 더 높은 것으로 나타났다. 6xHis 펩타이드 K_d 값은 52.36μM로 Kpt 펩타이드가 6xHis 와 니켈 수지에 대한 유사한 친화력을 보여주었다.

[131]

[132] **실시예 2. 페리틴 기반의 실리카 파티클 형성 확인**

[133] 페리틴의 아미노말단에 도입된 SFP는 페리틴 구조 표면에 노출된 형태로 대장균에서 발현되었다. R5-Fn은 황산암모늄으로 침전 시킨 후 소수성 수지인 페닐 세파로오스 수지로 정제 후 다시 이온교환 수지인 SP-세파로오스 수지를 이용하여 정제하고, Kps-Fn 과 Kpt-Fn 은 니켈수지를 이용한 정제 단계를 추가하여 고순도의 융합 단백질을 획득할 수 있었다.

[134] 단백질을 정제 후 Native-PAGE를 통해 형성된 페리틴이 24개의 서브유닛이 모인 480 KDa의 이상의 단백질을 형성하는 것을 확인하였으나 R5-Fn 은 그러한 페리틴 구조를 형성하지 못한 것으로 나타났다 (도 3A). 즉, R5 서열이 휴먼 페리틴의 자가조립을 방해 하는 것으로 보인다. Kps와 Kpt는 R5에 비해 아미노산 서열이 짧으며, 실리카를 형성할 수 있고, 또한 정제도 용이하게 때문에 R5에 비해 융합 단백질 제작에 유용함을 보였다. Fn, Kps-Fn, Kpt-Fn 의 TEM 이미지 (도 3B) 또한 융합 단백질과 페리틴 구조가 동일함을 나타내어 Kpt, Kps 펩타이드가 페리틴 구조 형성에 영향을 주지 않음을 확인하였다.

[135]

[136] **실시예 3. 페리틴 기반의 실리카 파티클 입자 크기 및 분산 정도 조절**

[137] 3-1. Fn과 SFP-Fn의 비율에 따른 크기 조절

[138] Kps-Fn 이 Kpt-Fn 에 비해 실리카 형성능력이 높은 것과 형성된 실리카 파티클 크기도 큰 것을 확인하였다(도 4). 이를 통해 실리카 형성능력과 실리카 파티클 크기에 비례관계가 존재할 것으로 가정하고 SFP가 융합되지 않은 페리틴은 실리카 형성능이 없고, 페리틴 표면에 SFP 밀도를 달리하여 실리카 형성능을 조절함으로써 실리카 파티클의 사이즈 조절이 가능할 것으로 가정하여, 도 5의 모식도와 같이 SFP 밀도에 따른 실리카 파티클 사이즈 조절 전략을 수립하였다.

[139] 구체적으로, Kps-Fn/Kpt-Fn 및 Fn 서브 유니트의 비율을 5:1 (10:2), 1:1 (6:6), 및 1:5 (2:10) 로 각 각 변경함으로써 크기가 다른 바이오 실리카 입자 (100 ~ 500 nm)를 얻을 수 있었다 (표 5, 도 6).

[140] [표5]

Ratio of Kps/Kpt-Fn to Fn	6:0 (12:0)	5:1(10:2)	3:3(6:6)	1:5(2:10)
Peptides No./proteincage*	24	20	12	4
SiO_2/Kps chimera (nm)	513	290	250	150
SiO_2/Kpt chimera (nm)	350	150	100	72

[141] *이론적으로 Fn 키메라 케이지의 표면에 존재하는 펩타이드의 수

[142]

[143] 3-2. 반응계의 글리세롤 농도에 따른 분산 정도 조절

[144] Kps-Fn 또는 Kpt-Fn에 의해 형성된 실리카 입자들은 서로 뭉쳐있는 형태이나 실리카 형성 반응 시 50% 글리세롤을 첨가하여 반응 시 뭉침 현상을 방지하고 분산된 실리카 입자를 얻을 수 있었다(도 7).

[145]

[146] **실시예 4. 페리틴 기반의 실리카 파티클의 표면 분석**

[147] 실리카 파티클의 다공성과 표면적을 측정한 결과는 표 6에 나타내었다. 질소 흡착 등온선 분석은 SiO_2/Kps-Fn 및 SiO_2/Kps2:10의 표면적이 각각 403.18 및 492.09 m^2/g임을 보여 주었다. SiO_2/Kps2:10의 평균 기공 크기는 3.02 nm이며, 이는 SiO_2/Kps-Fn의 평균 기공 크기 (약 2.65 nm)보다 컸다. 더 작은 크기의 바이오 실리카 나노파티클은 더 큰 표면적을 가짐을 확인하였고 이러한 특징으로 인해 생체분자들이 결합 시 더 큰 부착 표면을 제공할 수 있을 것이다. SiO_2/Kpt-Fn 및 SiO_2/Kpt2:10 의 표면적은 각각 468.38 및 537.68 m^2/g 으로 SiO_2 /Kps-Fn 및 SiO_2/Kps2:10 에 비해 표면적이 더 큰 것으로 나타났다. SiO_2/Kpt2:10 의 평균 기공 크기는 2.90 nm이며, SiO_2/Kpt-Fn의 평균 기공 크기는 약 2.74 nm보다 약가 증가하였다. 표면적이 넓은 Kpt-Fn 이 Kps-Fn 에 비해 높은 DNA 결합력을 나타낸 것으로 판단된다. 비교를 위해 시판하는 비다공성 310

nm크기의 실리카 파티클에 대한 비교 분석결과 표면적은 2.30 m^2/g, 평균 기공크기는 69 nm로 나타났으며, 비다공성 입자이므로 입자 사이의 공극으로 판단된다.

[148] [표6]

Sample	S_{BET} (m^2/g)	Pore size (nm)
SiO_2 (310 nm)	2.30	69.32
SiO_2/Kps-Fn	403.18	2.65
SiO_2/Kps2:10	492.09	3.02
SiO_2/Kpt-Fn	468.38	2.74
SiO_2/Kpt2:10	537.68	2.90

[149] **실시예 5. 페리틴 기반의 실리카 파티클의 DNA 흡착 및 용출 확인**

[150] Kps-Fn, Kpt-Fn 및 키메라 Fn을 주형으로 사용하여 합성된 실리카 나노 입자뿐만 아니라 Bangs Laboratories Inc (Indiana, USA)의 직경 170nm (수성 현탁액) 및 310nm (건식 실리카)의 판매되고 있는 실리카 입자를 이용하여 고농도 칼륨하에서 700 bp 크기의 DNA에 대한 흡착력을 비교하였다. 그 결과, 키메라 템플릿상의 Kps 또는 Kpt의 표면 밀도가 낮으면 더 작은 크기의 바이오 실리카 입자를 만들 수 있으며 크기가 작을수록 표면적이 증가함으로 DNA 흡착성능 비교를 통해 표면적 증가의 이점을 확인하였다 (도 8). 본 발명에서 개발된 바이오 실리카 입자는 시판되는 실리카 입자보다 우수한 DNA 흡착 성능을 보였다.

[151]

[152] **실시예 6. 약물이 담지된 페리틴 기반의 실리카 파티클의 약물 방출**

[153] pH 5.5에서는 Dox 방출량이 증가하였고 실리카 코팅에 의한 차이는 없었다. 이는 페리틴 내부에 담지된 약물의 방출이 산에 의해 촉진되며 실리카 코팅은 pH에 의한 약물 방출을 방해하지 않음을 의미한다.

[154] pH 7.4에서는 Dox 방출량이 감소하였고, 또한 실리카 코팅에 의해 방출 속도가 보다 감소됨을 확인하였다. 이는 확산에 의해서만 약물 방출이 조절되기 때문에 실리카 코팅에 의해 확산속도가 느려지는 것으로 판단된다. 그러나 시간이 지나면서 약물 방출속도가 서서히 증가하는데, 이는 실리카가 분해되어 실리카 코팅에 의한 약물 방출 저해가 감소되기 때문인 것임을 알 수 있다(도 9).

[155]

[156] **실시예 7. 이중 약물 전달 시스템 기반의 실리카 파티클의 약물 방출**

[157] SiO_2/Kps6:6(Dox) 제조와 동일한 방법으로 제조된 Kpt6:6(Dox)의 표면에 mRFP 분자의 in situ 고정에 의해 이중 약물 전달 시스템을 시연하였다. 카고 분자 모델로서 모노머 RFP (mRFP)를 사용하고 Kpt6:6(Dox)에 의해 형성된 실리카와 함께 침전시켰다.

[158] 37 ℃에서 PBS (pH 7.4)에서 SiO_2 (mRFP) / Kpt6:6(Dox) 로부터의 Dox 및 mRFP의 시험 관내 방출 프로파일은 특정 시간 동안 방출된 약물의 양을 원심 분리 후 상등액을 취하여 각 각 λex 485 / λ535 nm 및 λ590 / λ635 nm 에서 측정되었다. SiO_2(mRFP)/Kpt6:6 (Dox)에서 방출 된 mRFP의 양은 1 일에 27 % 정도, 2 일 후 50 %, 4 일 후 75 %이고 그 이후 서서히 방출되었다(도 10). Dox 방출률은 mRFP보다 약 2 배 느리게 나타났다. 내부에 코어가 있는 페리틴 실리카 파티클은, 위의 두 가지 결과에 기초하여, 두 종류의 분자가 다른 구획에 적재되고 다른 속도로 방출 될 수 있는 이중 약물전달체로 사용될 수 있다.

[159]

[160] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

청구범위

[청구항 1] 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 펩타이드와 실리카 전구체를 포함하는, 실리카 합성용 조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 실리카 전구체는 테트라에틸 오르토실리케이트, 테트라메틸 오르토실리케이트, 메틸 트리에톡시실란, 에틸 트리에톡시실란, 페닐 트리에톡시실란, 디메틸 디메톡시실란, 디메틸 디에톡시실란, 트리메틸에톡시실란, 트라아미노프로필트리에톡시실란, 티타니아 테트라이소프로폭사이드, 티타니움옥시셀페이트, 티타니움비스암모니움락테이토디하이드록사이드, 티타니움 디이소프로폭사이드 비스아세틸아세토네이트 및 테트라에틸 게르마늄으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 실리카 합성용 조성물.

[청구항 3] 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 펩타이드와 실리카 전구체를 반응시키는 단계를 포함하는 실리카 합성 방법.

[청구항 4] 제3항에 있어서,
상기 반응은 상온 및 상압의 조건에서 pH 5-8의 수용액 하에서 수행되는 것을 특징으로 하는, 실리카 합성 방법.

[청구항 5] 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드; 및 페리틴(ferritin) 및 바이러스 캡시드 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 하나이상을 포함하는 융합 단백질.

[청구항 6] 제5항의 융합 단백질 및 실리카 전구체를 포함하는 실리카 파티클 합성용 조성물.

[청구항 7] (1) 제5항의 융합 단백질을 산성 조건에서 단량체로 분해하는 단계;
(2) 상기 단량체를 약염기 조건에서 코어-쉘 구조체로 결합시키는 단계; 및
(3) 상기 구조체에 실리카 전구체를 혼합하여 반응시키는 단계;를 포함하는 실리카 파티클 제조 방법.

[청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 (1) 단계는 융합 단백질과 페리틴 단백질을 혼합하여 수행되는 것을 특징으로 하는, 실리카 파티클 제조 방법.

[청구항 9] 제8항에 있어서,
상기 융합 단백질과 페리틴 단백질은 1:1~5의 비율로 혼합되는 것을 특징으로 하는, 실리카 파티클 제조 방법.

[청구항 10] 제7항에 있어서,
상기 (1) 단계는 pH 2~3 조건 하에서 수행되는 것을 특징으로 하는, 실리카 파티클 제조 방법.

[청구항 11] 제7항에 있어서,
상기 (2) 단계는 pH 7~9 조건 하에서 수행되는 것을 특징으로 하는, 실리카 파티클 제조 방법.

[청구항 12] 제7항에 있어서,
상기 (2) 단계는 하기의 (a) 내지 (c) 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 실리카 파티클 제조 방법:
(a) 상기 단량체와 약물을 혼합하는 단계;
(b) 약염기 조건에서 상기 단량체를 코어-쉘 구조체로 결합시켜 약물이 담지된 구조체를 제조하는 단계; 및
(c) 구조체 내부에 담지되지 않은 약물과 구조체를 형성하지 않은 단량체를 제거하여 약물이 담지된 구조체를 분리하는 단계.

[청구항 13] 제7항에 있어서,
상가 (3) 단계는 글리세롤이 포함된 용액 내에서 수행되는 것을 특징으로 하는, 실리카 파티클 제조 방법.

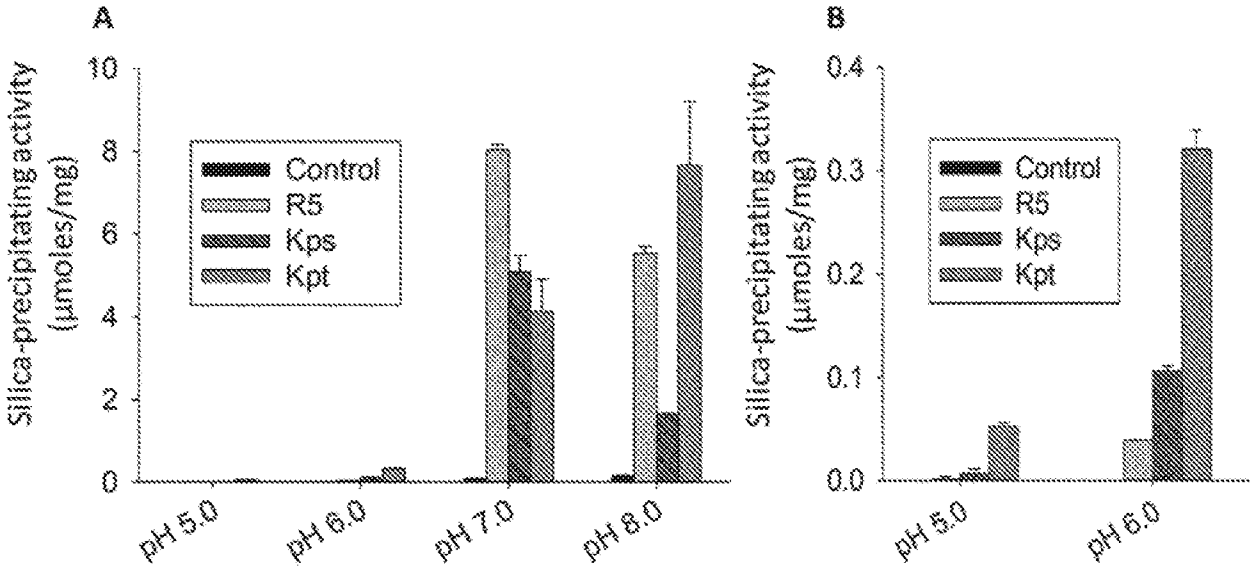
[청구항 14] 제7항에 있어서,
상기 방법은 (3) 단계 이후에 제조된 실리카 파티클을 약물에 담지하여 파티클 표면에 약물을 결합시키는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 실리카 파티클 제조 방법.

[청구항 15] 제7항 내지 제15항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 실리카 파티클.

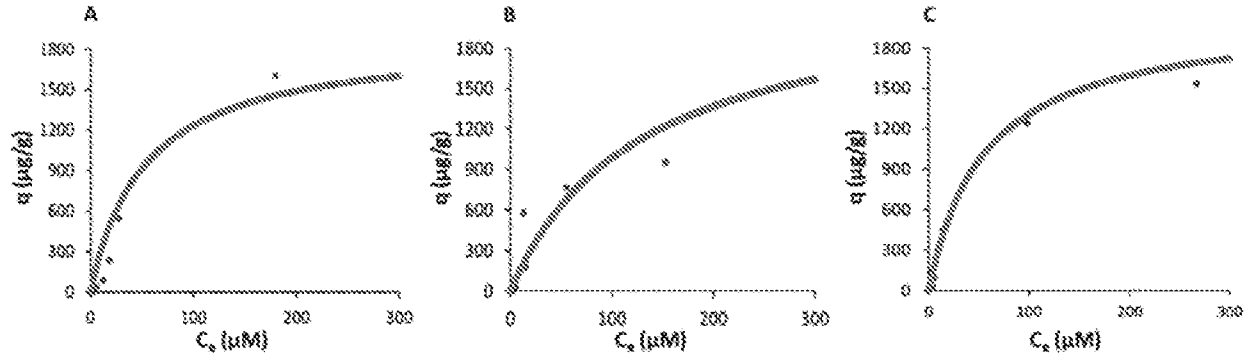
[청구항 16] (가) 서열번호 12의 염기서열로 이루어진 Kps 유전자 또는 서열번호 13의 염기서열로 이루어진 Kpt 유전자와 페리틴(ferritin)을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터를 제조하는 단계;
(나) 상기 발현 벡터를 숙주 세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계; 및
(다) 상기 형질전환체를 배양하는 단계;를 포함하는 실리카 형성 펩타이드와 페리틴의 융합 단백질 제조 방법.

[청구항 17] 제16항에 있어서,
상기 방법은 (다) 단계 이후에 상기 형질전환체를 파쇄하고, 원심분리를 통해 형질전환체의 파편을 제거하여 획득된 가용성 분획물을 니켈 수지와 혼합하여 니켈 수지에 결합된 융합 단백질을 수득하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 융합 단백질 제조 방법.

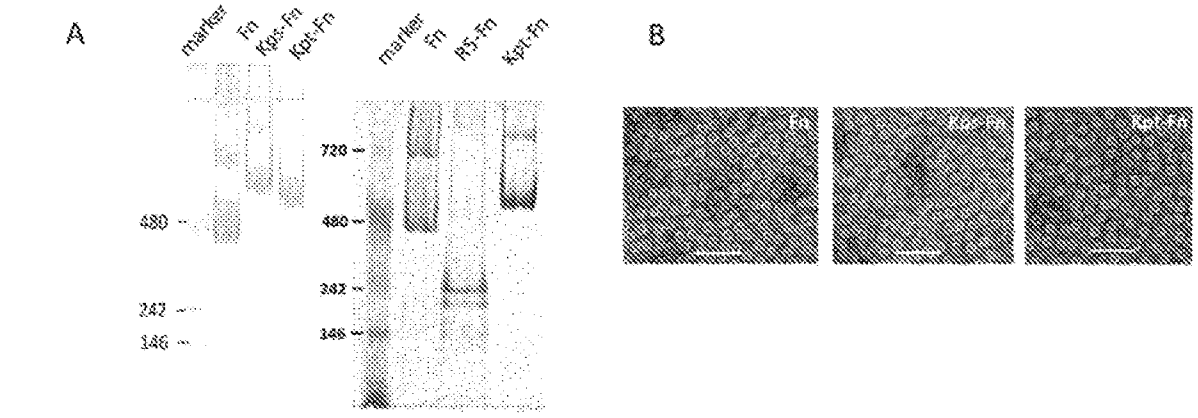
[도1]


A
Silica-precipitating activity (μmoles/mg)
10
8
6
4
2
0
Control
R5
Kps
Kpt
pH 5.0
pH 6.0
pH 7.0
pH 8.0
B
Silica-precipitating activity (μmoles/mg)
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
Control
R5
Kps
Kpt
pH 5.0
pH 6.0

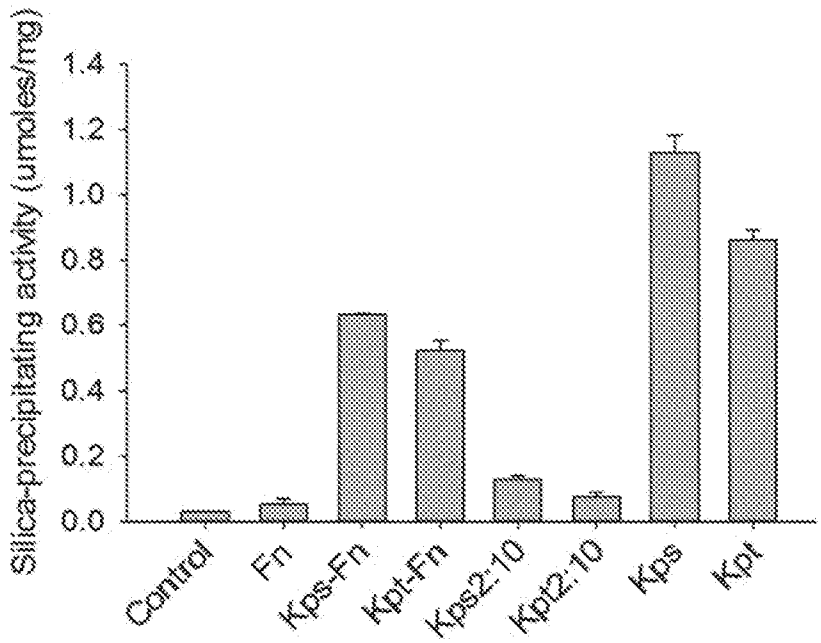
[도2]


A
B
C
q (μg/g)
1800
1500
1200
900
600
300
0
0
100
200
300
Ce (μM)

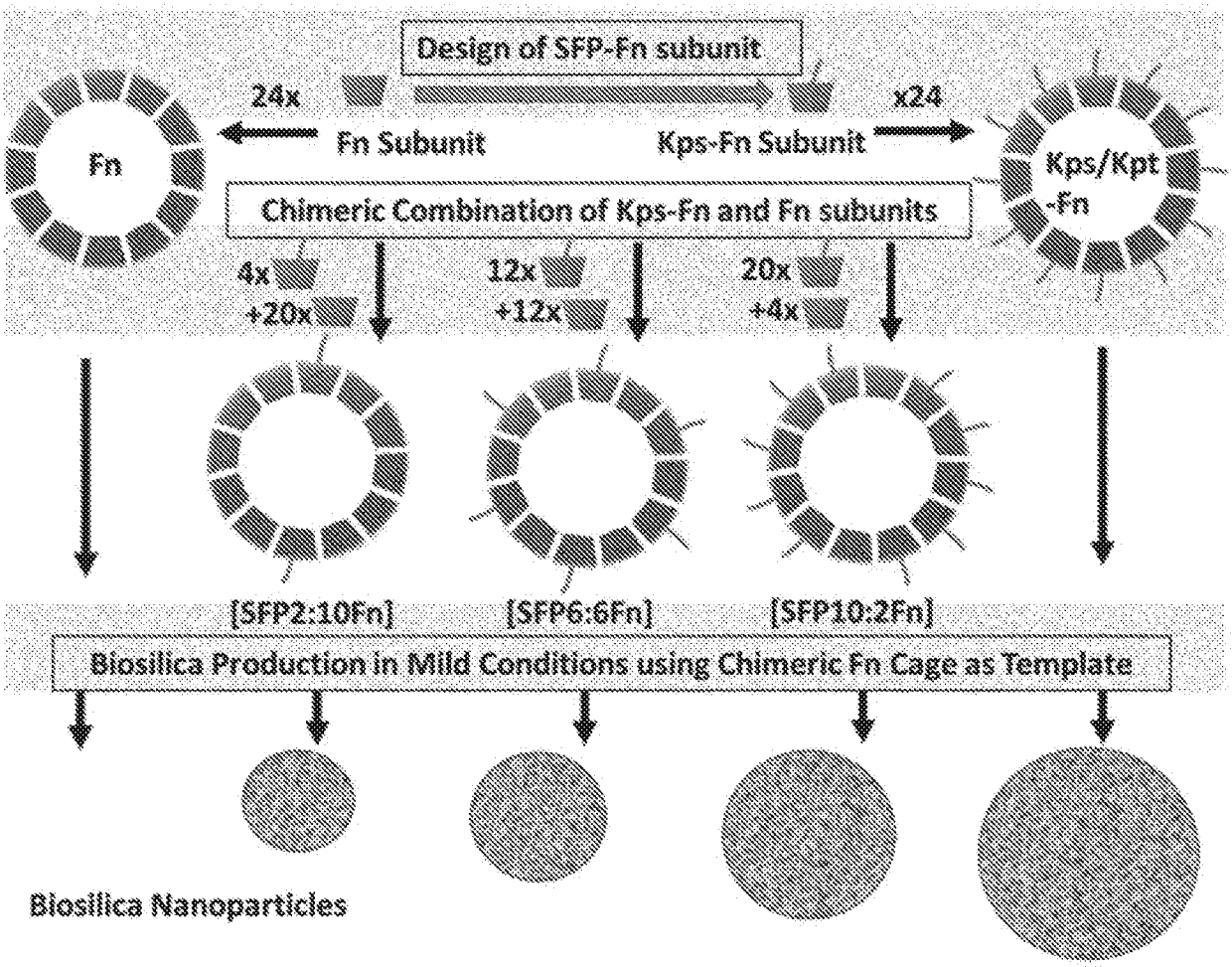
[도3]


A
marker
Fn
Kps-Fn
Kpt-Fn
marker
Fn
R5-Fn
Kpt-Fn
720
480
242
146
B
Fn
Kps-Fn
Kpt-Fn

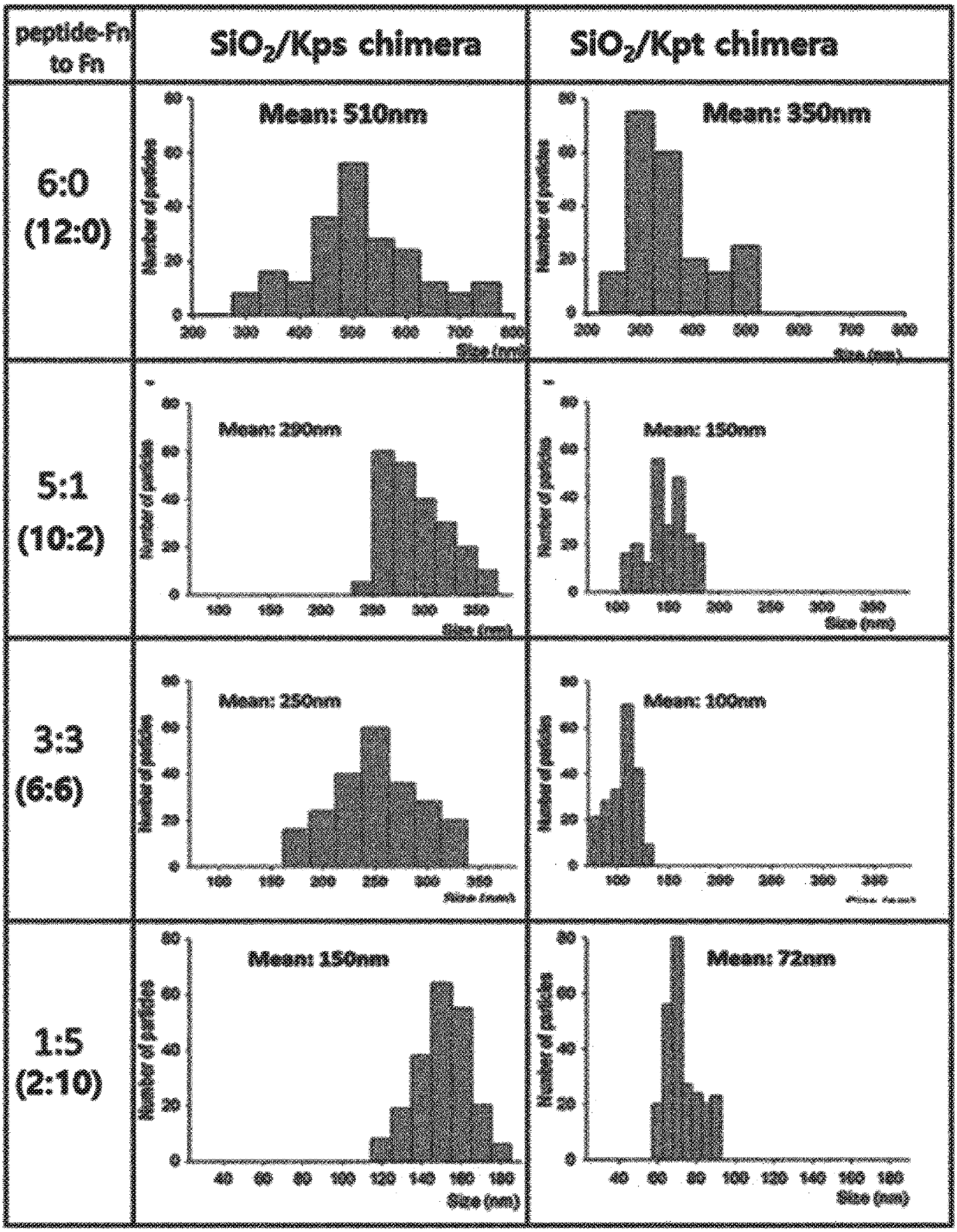
[도4]


Silica-precipitating activity (umoles/mg)
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Control
Fn
Kps-Fn
Kpt-Fn
Kps2:10
Kpt2:10
Kps
Kpt

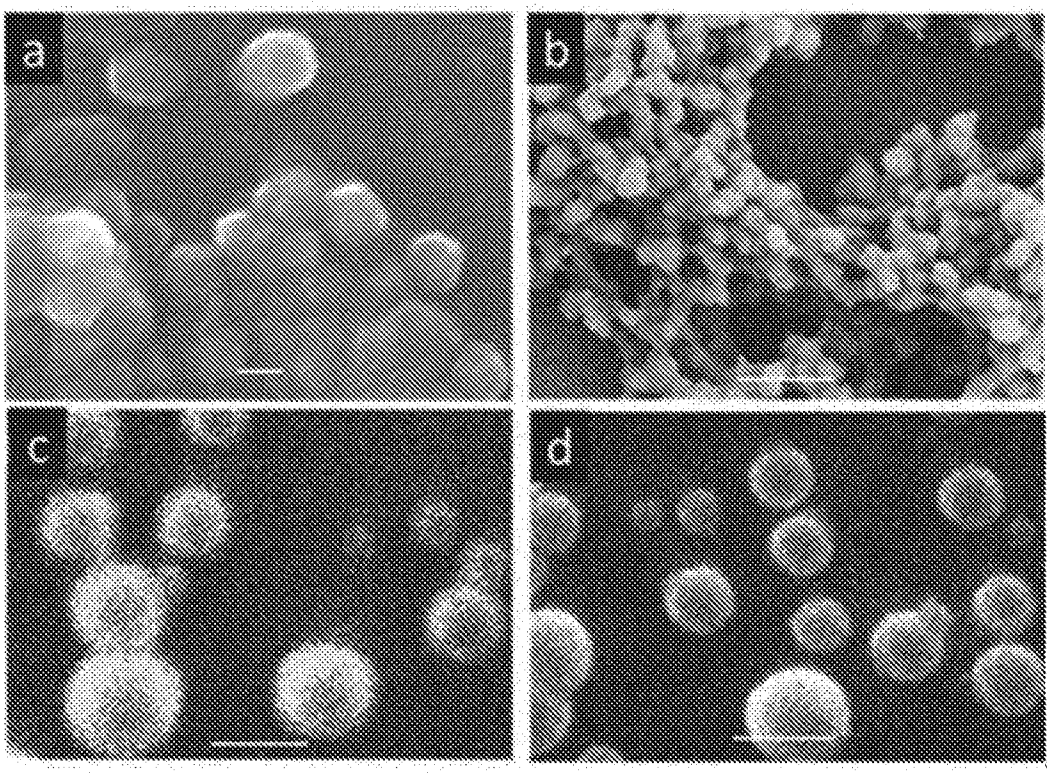
[도5]


Design of SFP-Fn subunit
24x
Fn Subunit
Kps-Fn Subunit
x24
Fn
Kps/Kpt
-Fn
Chimeric Combination of Kps-Fn and Fn subunits
4x
+20x
12x
+12x
20x
+4x
[SFP2:10Fn]
[SFP6:6Fn]
[SFP10:2Fn]
Biosilica Production in Mild Conditions using Chimeric Fn Cage as Template
Biosilica Nanoparticles

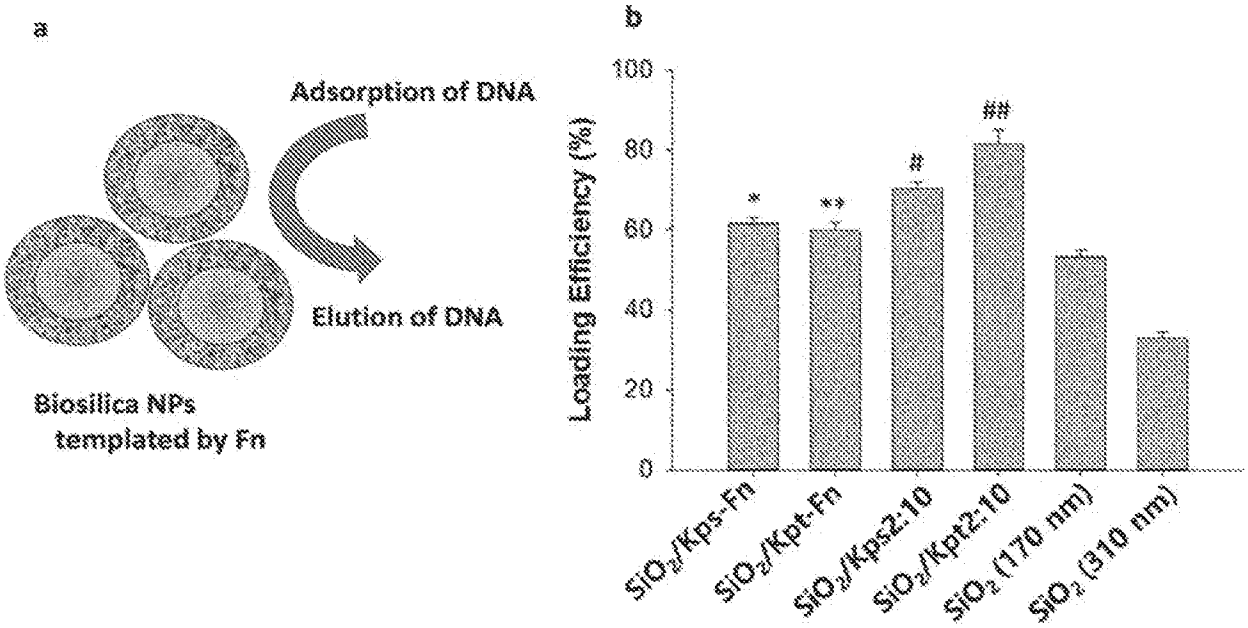
[도6]


peptide-Fn to Fn
SiO2/Kps chimera
SiO2/Kpt chimera
6:0 (12:0)
Mean: 510nm
Mean: 350nm
5:1 (10:2)
Mean: 200nm
Mean: 150nm
3:3 (6:6)
Mean: 250nm
Mean: 100nm
1:5 (2:10)
Mean: 150nm
Mean: 72nm
Number of particles
Size (nm)

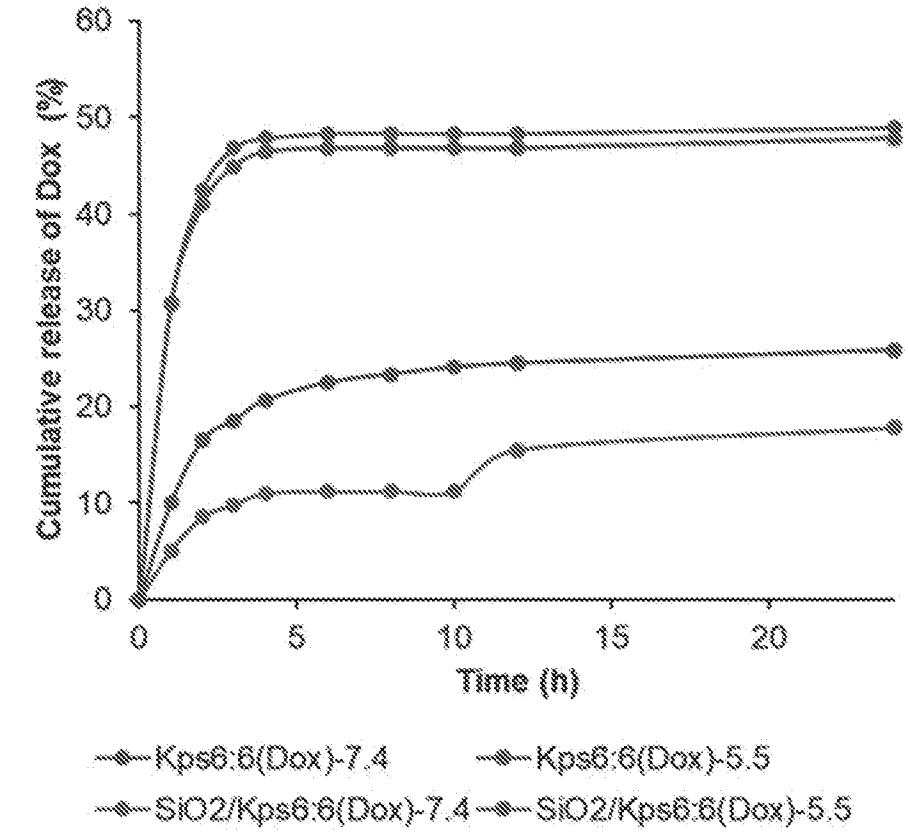
[도7]


a
b
c
d

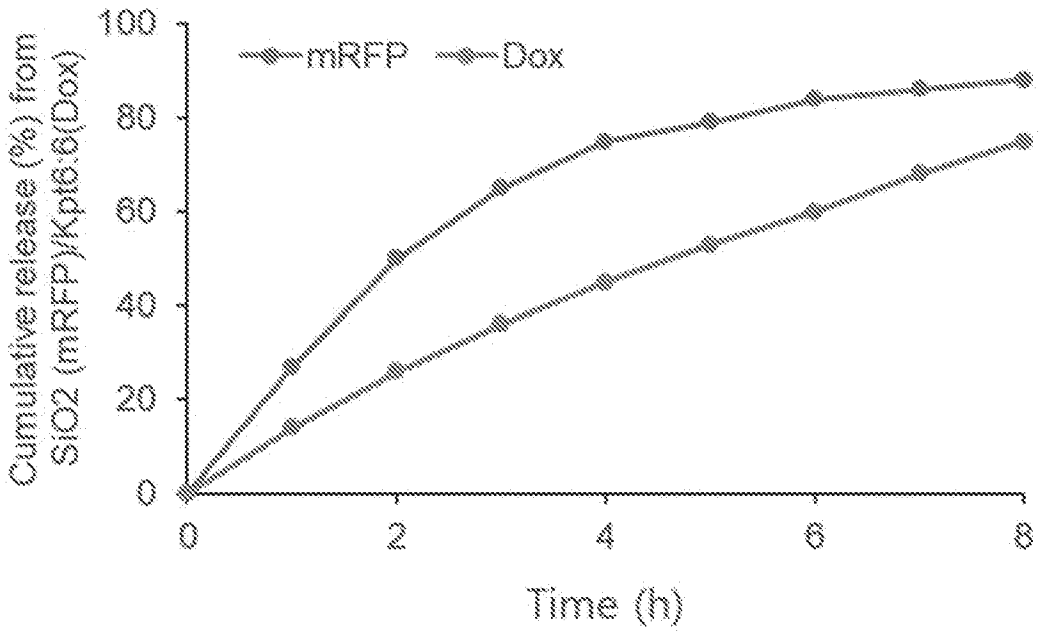
[도8]


a
Adsorption of DNA
Elution of DNA
Biosilica NPs
templated by Fn
b
Loading Efficiency (%)
100
80
60
40
20
0
*
**
#
##
SiO2/Kps-Fn
SiO2/Kpt-Fn
SiO2/Kps2:10
SiO2/Kpt2:10
SiO2 (170 nm)
SiO2 (310 nm)

[도9]


Cumulative release of Dox (%)
60
50
40
30
20
10
0
0
5
10
15
20
Time (h)
Kps6:6(Dox)-7.4
Kps6:6(Dox)-5.5
SiO2/Kps6:6(Dox)-7.4
SiO2/Kps6:6(Dox)-5.5

[도10]


Cumulative release (%) from SiO2 (mRFP)/Kpt6:6(Dox)
100
80
60
40
20
0
mRFP
Dox
0
2
4
6
8
Time (h)