



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년09월19일
(11) 등록번호 10-1657040
(24) 등록일자 2016년09월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 31/22 (2006.01) C07B 51/00 (2006.01)
C07C 15/38 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01) G01N 21/64 (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
G01N 31/22 (2013.01)
C07B 51/00 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-0074068
(22) 출원일자 2015년05월27일
심사청구일자 2015년05월27일
- (56) 선행기술조사문헌
New Journal of Chemistry, (2002), 26, pp 593-600.)*
Biomacromolecules 2012, 13, 2645-2654*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
한국기초과학지원연구원
대전광역시 유성구 과학로 169-148 (어은동)
- (72) 발명자
이은지
대전광역시 유성구 동서대로 725 (원신흥동, 어울림하트) 1210-2402
김인혜
전라북도 군산시 서래안2길 10 (중동)
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인 플러스

전체 청구항 수 : 총 7 항

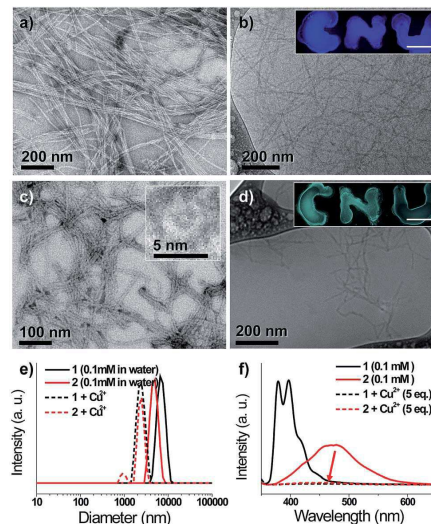
심사관 : 김도현

(54) 발명의 명칭 금속 이온 검출용 나노피브릴 복합체 및 그 제조방법

(57) 요약

본 발명은 나노피브릴 복합체 및 그 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 알킬 체인으로 구성되고 피렌-결합된 펩타이드; 및 상기 펩타이드에 결합되고 히스티딘-리치(histidine-rich) 펩타이드;를 포함하는 나노피브릴 복합체에 관한 것이다. 본 발명을 통한 나노피브릴 복합체는 은 이온을 포함한 다양한 종류의 금속 이온 검출에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07C 15/38 (2013.01)
C07K 19/00 (2013.01)
C07K 7/08 (2013.01)
G01N 21/64 (2013.01)
G01N 33/52 (2013.01)
C07C 2103/50 (2013.01)
C07K 2319/60 (2013.01)

김건희

세종특별자치시 나리1로 15 (한솔동,
첫마을아파트3단지) 303-702

(72) 발명자

김용재

전라북도 군산시 옥도면 어청도2길 1

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013R1A1A2061197
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 일반연구자/기본연구
연구과제명 공액고분자-바인더의 액상 자기조립 구조제어 기반 유무기 이중접합 1D 나노전선 제조
기 여 율 40/100
주관기관 충남대학교 산학협력단
연구기간 2013.11.01 ~ 2016.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013R1A6A9067028
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 연구기반구축사업
연구과제명 연구장비엔지니어양성사업
기 여 율 20/100
주관기관 충남대학교 산학협력단
연구기간 2014.08.01 ~ 2015.07.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 D35500
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국기초과학지원연구원
연구사업명 2015 산업화형
연구과제명 창의산업 육성을 위한 첨단광분석장비개발
기 여 율 40/100
주관기관 한국기초과학지원연구원
연구기간 2015.01.01 ~ 2015.12.31

공지예외적용 : 있음

명세서

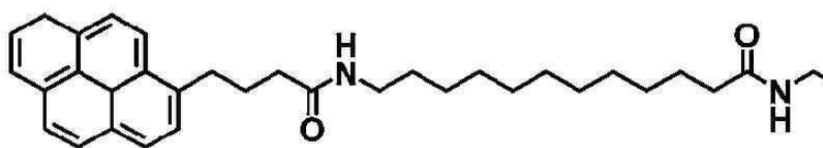
청구범위

청구항 1

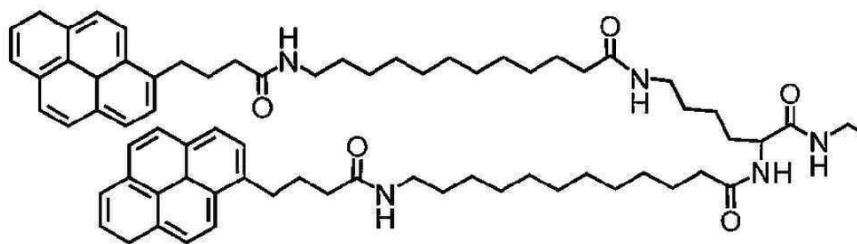
소수성의 선형(linear) 또는 가지형(branched) 알킬 체인으로 구성되고 피렌-결합된 펩타이드(pyrene-labeled peptide); 및 상기 펩타이드에 결합되고 친수성의 히스티딘-리치(histidine-rich) 펩타이드;를 포함하는 나노피브릴(nanofibril) 복합체에 있어서,

상기 피렌-결합된 펩타이드는 하기 화학식 I 또는 화학식 II의 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 나노피브릴 복합체.

[화학식 I]



[화학식 II]



청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 히스티딘-리치 펩타이드는 HGGGHGHGGGHG의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 복합체.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 피렌은 히스티딘-리치 펩타이드의 N-말단(N-terminal)과 연결된 것을 특징으로 하는 복합체.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 복합체는 금속과 결합하여 형광을 나타내는 것을 특징으로 하는 복합체.

청구항 5

삭제

청구항 6

피렌 부티르산(pyrene butyric acid)과 N-말단 히스티딘-리치 펩타이드를 선형 또는 가지형 도데카노익산(dodecanoic acid)으로 공유결합시키는 단계;를 포함하는 금속 이온 검출을 위한 제 1항의 나노피브릴 복합체의

제조방법.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 금속 이온은 Ag^+ , Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} 또는 Zn^{2+} 인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 8

제 6항 또는 제 7항에 있어서,

상기 제조방법은 피렌 표지된 펩타이드를 표준 Fmoc(9-fluorenylmethoxycarbonyl) 방법을 이용하여 합성한 후 정제하는 단계;를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 나노피브릴 복합체 및 그 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 알킬 체인으로 구성되고 피렌-결합된 펩타이드; 및 상기 펩타이드에 결합되고 히스티딘-리치(histidine-rich) 펩타이드;를 포함하는 나노피브릴 복합체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 양친매성 펩타이드(peptide amphiphiles, PAs)의 자기 조립(self-assembly)은 수용액 상에서 교질 입자(micelle), 배럴(barrel), 액포(vesicle), 나노피브릴(nanofibrils; NFs), 리본(ribbon), 튜브(tube)와 같은 다양한 나노 구조를 형성할 수 있도록 한다. 상기 펩타이드는 우수한 생분해성(biodegradability), 생적합성(biocompatibility) 및 생물활성(bioactivity)을 포함하는 특성으로 인해 매력적인 생체 재료로 인식되어 왔다. 양친매성 펩타이드의 자기 조립 특성의 이해를 통한 분자 단위의 조직적 나노 구조를 통해 조직 공학, 재생 의학, 표적 치료 전달 및 진단 등의 응용을 위한 신규 기능성 물질의 개발을 위한 새로운 기회를 제공하였다. 일 예로 양친매성 펩타이드 기반의 나노 구조 중, 1차원의 β -시트 리치(sheet rich) 양친매성 펩타이드의 원 섬유 조직은 신경병성 질환(neurodegenerative disease)에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한, 양친매성 펩타이드가 수용액 상에서 코어-셸(core-shell) 응집을 형성하는 고유 성향은 희망하는 화학 및 생물학적 활성을 나노 구조의 특정 지역에 쉽게 부여할 수 있도록 하는 장점이 있다. 그러나, 상기 나노피브릴은 생리학적 환경(physiological environment)에서 광반응을 보임으로 섬유 코어에서 분자의 적층을 변화시키기 때문에, 많은 연구가 이루어지지 못하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0003] 따라서, 본 발명에서는 펩타이드 빌딩 블록(building block)과 양친매성 펩타이드를 이용하여 생물학적으로 가치가 있는 금속 이온을 검출하기 위한 새로운 분자 시스템을 제공하고자 하였다.

과제의 해결 수단

[0004] 본 발명은 소수성의 선형(linear) 또는 가지형(branched) 알킬 체인으로 구성되고 피렌-결합된 펩타이드(pyrene-labeled peptide amphiphiles); 및 상기 펩타이드에 결합되고 친수성의 히스티딘-리치(histidine-rich) 펩타이드;를 포함하는 나노피브릴(nanofibril) 복합체에 관한 것이다.

[0005] 또한 본 발명은 피렌 부티르산(pyrene butyric acid)과 N-말단 히스티딘-리치 펩타이드를 선형 또는 가지형 도데카노익산(dodecanoic acid)으로 공유결합시키는 단계;를 포함하는 금속 이온 검출을 위한 나노피브릴 복합체의 제조방법에 관한 것이다.

[0006] 또한 본 발명은 상기 복합체를 포함하는 세포 이미징용 조성물에 관한 것이다.

[0007] 또한 본 발명은 상기 복합체와 결합된 금속 이온을 포함하는 항균용 조성물에 관한 것이다.

발명의 효과

[0008] 본 발명을 통한 나노피브릴 복합체는 은 이온을 포함한 다양한 종류의 금속 이온 검출에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 양친매성 펩타이드의 수용성 자기조립 나노 구조를 시각화한 것이다.

(a) NFs 1의 TEM 이미지, (b) NFs 1의 cryo-TEM 이미지, (c) NFs 2의 TEM 이미지, (d) NFs 2의 cryo-TEM 이미지, (e) 수력학 직경(hydrodynamic diameter) 및 (f) 물에서 NFs 0.1 mM로 수행된 Cu^{2+} 추가 전 후의 방출 스펙트럼.

도 2는 나노피브릴을 이용한 Cu^{2+} 의 센싱 결과이다.

(a) NFs 1의 깨끗한(unstained) TEM 이미지, (b) NFs 2의 깨끗한(unstained) TEM 이미지, (c) Cu^{2+} -나노피브릴 복합체의 MALDI-TOF 질량 스펙트럼, (d) Cu^{2+} 추가 전 후의 FTIR 스펙트럼, (e) Cu^{2+} 입자와 결합된 NFs 1의 TEM 이미지 및 (f) Cu^{2+} 입자와 결합된 NFs 2의 TEM 이미지.

도 3은 금속 이온에 대한 양친매성 펩타이드의 초분자 형광 나노프로브 행동 측정 결과이다.

(a) 금속 이온의 첨가에 따른 NFs 2의 형광 강도, (b) 396 nm에서 측정된 형광 강도 대비율($F_{\text{metal}}/F_{\text{metal free}}$), (c) 340 nm에서 측정된 여러 종류의 금속 이온 공존 하에 Cu^{2+} 이온의 형광 스펙트럼 및 (d) 은 나노 입자와 결합된 NFs의 TEM 이미지.

도 4는 세포이미징(cell-imaging) 결과이다.

(a) bright field, (b) 10 μM NFs 2와 HeLa 세포주 및 (c) 150 μM AgNO_3 및 NFs 2 존재 하의 HeLa 세포주.

도 5는 항균 활성(antimicrobial activity) 측정 결과이다.

(a) 10 $\mu\text{g/mL}$ Ag 나노 입자(NPs)-NFs 2에서 대장균의 성장 곡선, (b) 대장균 O157:H7의 배양액의 혼탁도 측정, (c) 마이크로칩을 이용한 GFP 발현 결과 및 (d) 10 $\mu\text{g/mL}$ Ag 은나노 입자-NFs 2에서 바실러스 서브틸리스의 성장 곡선.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 본 발명은 소수성의 선형(linear) 또는 가지형(branched) 알킬 체인으로 구성되고 피렌-결합된 펩타이드(pyrene-labeled peptide amphiphiles); 및 상기 펩타이드에 결합되고 친수성의 히스티딘-리치(histidine-rich) 펩타이드;를 포함하는 나노피브릴(nanofibril) 복합체에 관한 것이다.

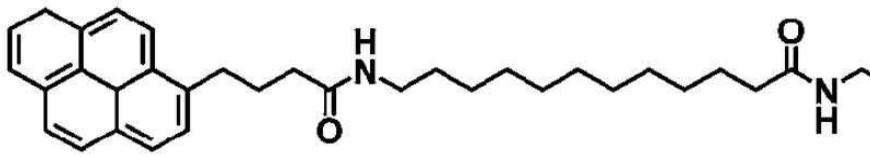
[0011] 본 발명에서 상기 히스티딘-리치 펩타이드는 제한되지는 않으나 히스티딘과 글리신으로 구성된 아미노산 서열을 가질 수 있다. 히스티딘-리치 펩타이드는 히스티딘 잔기(histidyl residue)에서 매우 효율적인 이미다졸-질소(imidazole-nitrogen) 제공 원자 때문에 단백질의 활성 사이트(active site)에 금속 이온을 결합하기 위한 분자 인식 스캐폴드(scaffold)로서 많은 주목을 받아왔다. 예를 들어 본 발명에서 상기 히스티딘-리치 펩타이드는 HGGGHGHHGGGHG (HG12)의 아미노산 서열일 수 있다. 상기 HG12 펩타이드는 미리 제조된 나노튜브에 고정화되어 Cu^{2+} 또는 Ni^{2+} 이온과 복합체를 형성함으로써, 환원제 하에서 금속 나노입자가 코팅된 나노튜브의 형성을 이끄는 역할을 수행한다.

[0012] 본 발명에서 상기 피렌은 제한되지는 않으나 히스티딘-리치 펩타이드의 N-말단(N-terminal)과 연결될 수 있다.

[0013] 본 발명에서 상기 복합체는 제한되지는 않으나 금속과 결합하여 형광을 나타낼 수 있다.

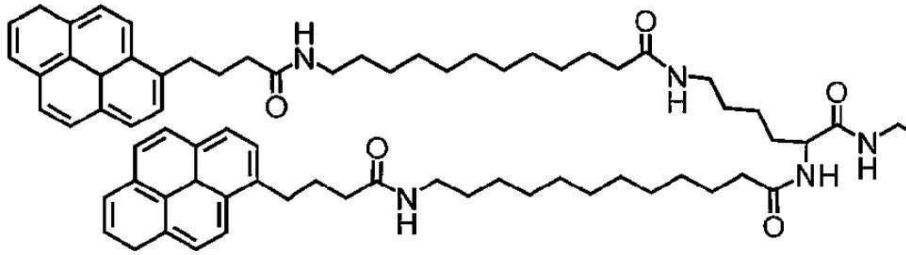
[0014] 본 발명에서 상기 피렌-결합된 펩타이드의 구조는 제한되지는 않으나 하기 와 같이 소수성의 선형 펩타이드와 피렌이 결합된 화학식 I 또는 소수성의 가지형 펩타이드와 피렌이 결합된 화학식 II의 구조를 갖을 수 있다.

[0015] [화학식 I]



[0016]

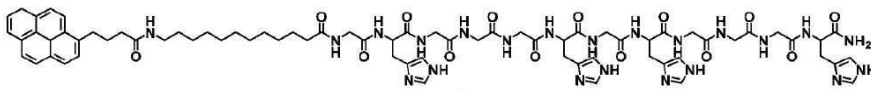
[0017] [화학식 II]



[0018]

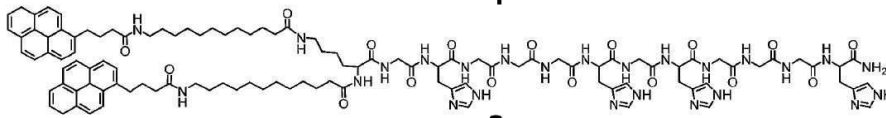
[0019] 본 발명에서 상기 복합체의 구조는 제한되지는 않으나, 예를 들어 하기 화학식 III 또는 화학식 IV의 형태를 가
을 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에서와 같이 화학식 IV의 가지형 구조를 갖는 것이 Ag^+ 와 같은 금속 이온과
의 결합을 통해 항균 활성을 나타내는 데 있어 보다 효율적이다.

[0020] [화학식 III]



[0021]

[0022] [화학식 IV]



[0023]

[0024] 또한 본 발명은 피렌 부티르산(pyrene butyric acid)과 N-말단 히스티딘-리치 펩타이드를 선형 또는 가지형 도
데카노익산(dodecanoic acid)으로 공유결합시키는 단계;를 포함하는 금속 이온 검출을 위한 나노피브릴 복합체
의 제조방법에 관한 것이다.

[0025] 본 발명에서 상기 금속 이온은 특별히 제한되지는 않으나 Ag^+ , Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} 또는
 Zn^{2+} 을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 Ag^+ 을 사용할 수 있다.

[0026] 본 발명에서 상기 제조방법은 제한되지는 않으나 피렌 표지된 펩타이드를 표준 Fmoc(9-
fluorenylmethoxycarbonyl) 방법을 이용하여 합성한 후 정제하는 단계;를 추가로 포함할 수 있다.

[0027] 또한 본 발명은 상기 복합체를 포함하는 세포 이미징용 조성물에 관한 것이다.

[0028] 또한 본 발명은 상기 복합체와 결합된 금속 이온을 포함하는 항균용 조성물에 관한 것이다.

[0029] 본 발명에서 상기 금속 이온은 특별히 제한되지는 않으나 Ag^+ , Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} 또는
 Zn^{2+} 을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 Ag^+ 을 사용할 수 있다.

[0030] 본 발명에서 상기 항균용 조성물은 제한되지는 않으나 그람-음성(Gram-negative) 또는 그람-양성(Gram-

positive) 균에 대한 항균 특성을 갖을 수 있다. 상기 그람-음성 또는 그람-양성 균은 해당 속성을 갖는 균이면 특별히 제한되지는 않으나, 예를 들어 본 발명의 일 실시예에서 사용된 바와 같이 그람-음성균은 대장균 (*Escherichia coli*) O157:H7을 상기 그람-양성균은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)를 대표적인 균으로 사용할 수 있다.

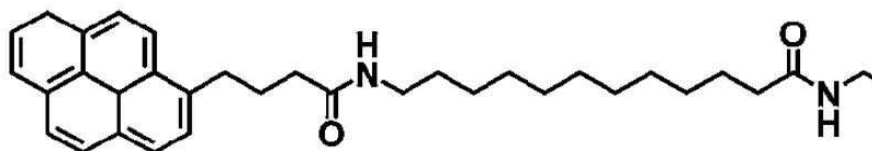
이하 본 발명을 실시예를 참조하여 상세히 설명한다. 그러나 이들은 본 발명을 보다 상세하게 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 권리범위가 하기의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[실시예 1] 양친매성 펩타이드의 합성 및 정제

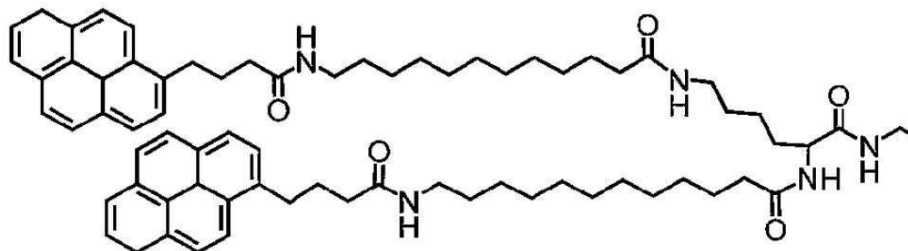
양친매성 펩타이드는 표준 Fmoc(9-fluorenylmethoxycarbonyl) 방법을 이용하여 Rink 아미드 MBHA 레진(100-200 mesh, Merck) 상에서 합성하여 사용하였다.

피렌 부티르산(pyrene butyric acid; Alfa Aesar)을 하기 화학식 I 및 화학식 II의 선형(linear) 또는 가지형(branched) 도데카노익산(dodecanoic acid)을 각각 이용하여 HGGGGHGGGGHG (HG12) 펩타이드의 N-말단에 공유결합 연결하여 화학식 III 및 화학식 IV의 화합물을 수득하였다.

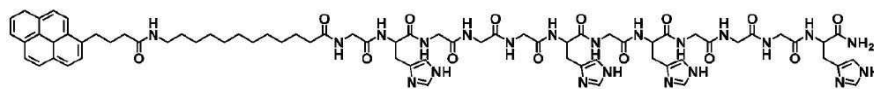
[화학식 I]



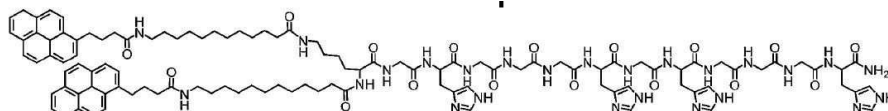
[화학식 II]



[화학식 III]



[화학식 IV]



양친매성 펩타이드 1 (PA 1) 합성

피렌 표지된 양친매성 펩타이드 1은 Rink 아미드 MBHA 레진상에서 CEM Focused MicrowaveTM Synthesis System(Discover)를 사용하여 통상적인 고체상 펩타이드 합성 절차를 이용하여 제조하였다. 상기 레진을 디클로

로메탄(dichloromethane, DCM; Daejung Chemicals)으로 세척한 후, 항온진탕배양기(shaking incubator)에 DMF(N,N-dimethylformamide; Fisher)와 DCM의 1:1 혼합 용액과 함께 넣고 30분 이상 방치하였다.

[0045] 이후, GHGGGHGHGGGH-Resin의 서열을 갖는 레진에서 펩타이드의 N-말단에 Fmoc-His(Trt)-OH (5 equiv.; Beadtech)와 Fmoc-Gly-OH (5 equiv.; Merck)의 혼합물을 연결시켰다. 양친매성 펩타이드 1은 Fmoc-12-아미노도데카노산(aminododecanoic acid)을 HG 12 펩티드와 1-피렌 부티르산에 직접 부착하는 방식으로 합성하였다.

[0046] 상기 과정을 거친 후 레진은 TFA(trifluoroacetic acid, 99%; Sigma-Aldrich) : 1,2-에탄디티올(1,2-ethanedithiol, 98%; Merck) : 티오아니솔(thioanisole)이 95:2,5:2.5의 비율로 혼합된 절단(cleavage) 용액으로 2 시간 이상 처리하고, 혼합 용액은 tert-부틸 메틸 에테르(butyl methyl ether)로 연마(triturate)하였다.

[0047] 양친매성 펩타이드 1은 C18 컬럼의 역상 HPLC으로 0.1% TFA의 물과 0.1% TFA의 아세토니트릴로 선형 경사(linear gradient)를 이용하여 정제하였다.

[0048] 양친매성 펩타이드 2 (PA 2) 합성

[0049] 피렌 표지된 양친매성 펩타이드 2는 Rink 아미드 MBHA 레진상에서 CEM Focused MicrowaveTM Synthesis System(Discover)를 사용하여 통상적인 고체상 펩타이드 합성 절차를 이용하여 제조하였다. 상기 레진을 디클로로메탄(dichloromethane, DCM; Daejung Chemicals)으로 세척한 후, 항온진탕배양기(shaking incubator)에 DMF(N,N-dimethylformamide; Fisher)와 DCM의 1:1 혼합 용액과 함께 넣고 30분 이상 방치하였다.

[0050] 이후, GHGGGHGHGGGH-Resin의 서열을 갖는 레진에서 펩타이드의 N-말단에 Fmoc-His(Trt)-OH (5 equiv.; Beadtech)와 Fmoc-Gly-OH (5 equiv.; Merck)의 혼합물을 연결시켰다. 양친매성 펩타이드 2를 가지형 알킬 체인으로 합성하기 위해 Fmoc-Lys(Fmoc)-OH(Sigma-Aldrich)를 GHGGGHGHGGGH-Resin에 연결하고 다시 Fmoc-12-아미노도데카노산(aminododecanoic acid)을 HG 12 펩티드와 1-피렌 부티르산에 직접 부착하는 방식으로 합성하였다.

[0051] 상기 과정을 거친 후 레진은 TFA(trifluoroacetic acid, 99%; Sigma-Aldrich) : 1,2-에탄디티올(1,2-ethanedithiol, 98%; Merck) : 티오아니솔(thioanisole)이 95:2,5:2.5의 비율로 혼합된 절단(cleavage) 용액으로 2 시간 이상 처리하고, 혼합 용액은 tert-부틸 메틸 에테르(butyl methyl ether)로 연마(triturate)하였다.

[0052] 양친매성 펩타이드 2는 C18 컬럼의 역상 HPLC으로 0.1% TFA의 물과 0.1% TFA의 아세토니트릴로 선형 경사(linear gradient)를 이용하여 정제하였다.

[0053] 수득된 산물을 정제하여 95% 이상의 순도를 갖는 양친매성 펩타이드를 각각 수득하였다. 정제된 펩타이드의 분자량은 MALDI-TOF(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight; Bruker Ultraflextreme) 질량분석법으로 측정하였다.

[0054] [실시예 2] 양친매성 펩타이드의 수용액 상 자기 조립 행동

[0055] 상기 정제한 양친매성 펩타이드에 대하여 수용액 상에서의 자기 조립 행동을 관찰하기 위해 TEM(JEM-0311 HR, 300 kV and JEM-1400, 120 kV)을 사용하여 측정하였다(도 1). 선형 알킬체인을 포함하는 상기 화학식 1의 양친매성 펩타이드 1의 응집체의 관찰을 통해 평균 9.5 nm 내외의 일정한 직경을 갖는 마이크로미터 단위 길이의 나노피브릴(NFs)을 밝혀냈다. 극저온 TEM(cryo-TEM; JEM-0311 HR ; 300 kV, 온도범위) 측정을 통하여 평균 직경 4.2 nm의 수용성 NFs의 존재를 확인할 수 있었다. 반면 2개의 가지로 구성된 알킬체인을 포함하는 상기 화학식 2의 양친매성 펩타이드 2의 응집체를 관찰한 결과, NFs의 평균 직경과 길이 모두 상기 선형 알킬체인을 포함하는 경우 대비 감소하였다. 수력학적 직경(hydrodynamic diameter, RH)는 각각 6.6 μm 및 4.9 μm 였다. 상기 양친매성 펩타이드 2의 NFs의 TEM 측정 직경은 8.2 내외로 양친매성 펩타이드 1 대비 감소한 반면, 극저온-TEM으로 측정한 직경은 5.7 nm로 오히려 증가하여 상반된 결과를 나타내었다.

[0056] 상기 예측할 수 없었던 소수성 코어(hydrophobic core)의 직경 증가 현상은 가지 형태의 도데카노익 말단의 도입에 따른 내부 분자 적층의 변화에 따른 새로운 현상인 것으로 해석할 수 있다. 선형 알킬 체인에서 가지형 알킬 체인으로의 변화를 통해 HG12 펩타이드 간 입체적 제약이 발생하며 이로 인한 피렌 그룹(pyrenyl group)과 펩타이드의 β -시트 구조 간 응집이 강화됨으로 인해, 결과적으로 나노피브릴(NFs)의 길이가 감소하는 결과를

초래하였다. 도 1(f)의 스펙트럼으로부터 선형 알킬-체인이 도입된 양친매성 펩타이드 1은 일반적인 맞물림 이중층 응집(interdigitated bilayer assembly) 구조를 나타낸 반면, 양친매성 펩타이드 2는 고유의 이중층 적층 배열 구조를 갖는 것을 확인할 수 있었다.

- [0057] [실시예 2] 나노피브릴을 이용한 Cu^{2+} 의 센싱
- [0058] 상기 실시예의 히스티딘-리치 펩타이드인 HG12 코팅된 나노피브릴(NFs)이 금속 이온을 인식하는 현상을 Cu^{2+} 을 이용하여 시험하였다.
- [0059] 상자성체(paramagnetic)의 Cu^{2+} 이온 첨가에 이어 중요한 소광 현상이 발생하는 동안 높은 가로세로의 비를 갖는 섬유 구조를 그대로 유지함을 확인하였다(도 1(f)). 특히, 양친매성 펩타이드 2의 λ_{max} 는 478 nm에서 455 nm으로 단파장이동(blue-shift)함으로써, 샌드위치와 같은 동적인 이량체(excimer)에서 부분적으로 중첩된 안정형 이량체로의 전환을 나타내는 것을 알 수 있었다. 이는 HG12 펩타이드가 Cu^{2+} 이온을 붙잡음으로써 피렌 그룹(pyrenyl groups) 간의 보다 가까운 분자 상호작용이 유도되었음을 뜻한다. 양친매성 펩타이드 1 및 2의 나노피브릴에 대하여 TEM 이미지를 측정한 결과, 스테이닝(staining)을 수행하지 않고도 질량대비에서 뚜렷한 향상이 있음을 확인하였다(도 2).
- [0060] Cu^{2+} 이온 존재 하의 NFs와의 연관성은 MALDI-TOF/TOF 질량측정법을 사용하여 수행하였다. 도 2 (c)에서 확인할 수 있는 바와 같이 Cu^{2+} 이온 결합 전후 m/z의 비율은 양친매성 펩타이드 1의 경우 1491.9에서 1553.8로, 양친매성 펩타이드 2의 경우 2089.0에서 2136.0으로 증가하였음을 확인할 수 있었다.
- [0061] 추가적으로 상기 Cu^{2+} 이온이 NFs와 결합하였음을 증명하기 위해 FTIR (Fourier transform infrared) 측정법을 사용하여 히스티딘 측쇄의 N-H와 C=C 결합의 진동을 측정함으로써 도 2 (d)와 같이 확인할 수 있었다. 상기 Cu^{2+} 이온의 첨가에 따라 N-H의 진동수 $\nu_{\text{N-H}}$ 는 3500에서 3490 cm^{-1} 으로 감소하였고, C=C의 진동수 $\nu_{\text{C=C}}$ 는 1494에서 1508 cm^{-1} 로 증가함으로써, 상기 Cu^{2+} 이온이 HG12의 히스티딘 잔기와 킬레이트화(chelation)되었음을 짐작할 수 있다. 또한 양친매성 펩타이드 1의 1543 cm^{-1} 의 아마이드 II(amide II) 밴드 피크가 크게 감소함으로써, HG12의 β -구조가 매우 불안정해졌음을 예측할 수 있었다.
- [0062] Cu^{2+} 이온과 결합된 NFs의 형성을 직접적으로 확인하는 것은 NaBH_4 를 첨가하여 금속 이온에 따른 환원을 통해 시각적으로 확인하는 방법을 사용하였다. 도 2 (e), (f)와 같이 상기 물질의 첨가를 통해 나노 결정의 형성을 확인할 수 있으며, 양친매성 펩타이드 1을 사용한 경우 11.9 nm 내외, 양친매성 펩타이드 2를 사용한 경우 21.6 nm 내외의 직경을 가짐을 알 수 있었다.
- [0063] [실시예 3] 금속 이온에 대한 양친매성 펩타이드의 초분자 형광 나노프로브 행동(supramolecular fluorescent nanoprobe behavior)
- [0064] 수용성 NFs의 금속 결합 친화도를 확인하기 위해, Ag^+ , Ca^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} 또는 Zn^{2+} 과 같은 다양한 종류의 금속 이온을 사용하여 친화도를 측정하였다.
- [0065] 물에서 양친매성 펩타이드의 임계교질농도(critical micellar concentration, CMC)는 형광 분광계(fluorescence spectrometer; Perkin Elmer LS-55)를 사용하여 측정하였고, 이를 이용하여 묽은 용액에서 금속 결합체로서 NFs의 능력을 측정하였다. 두 파장에서 방출 피크의 강도 비율(intensity ratio, I_{396}/I_{378})을 측정한 결과, 배지 극성에 매우 민감함을 알 수 있었다(도 3). 양친매성 펩타이드 1, 2의 임계교질농도를 측정한 결과 각각 7.5 μM 및 6.1 μM 을 나타내었으며, 이와 같은 낮은 측정값으로부터 본원발명의 양친매성 펩타이드는 묽은 용액에서 초분자 1차원 나노프로브(supramolecular 1D nanoprobe)로 사용할 수 있음을 알 수 있었다.
- [0066] 본 실시예에서 사용한 금속 이온 중 양친매성 펩타이드 1에 대해서는 Cu^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} 의 경우 금속 이온의 농도가 증가함에 따라 킬레이트화된 소광 현상이 일어났다.

- [0067] 특히 도 3(a)에서 알 수 있듯이, 물에서 7.6 μM 의 양친매성 펩타이드 2를 사용한 경우 은이온(Ag^+)의 첨가에 따라 형광이 비약적으로 증가함을 확인할 수 있었다. 또한 도 3(b)에서 알 수 있듯이, 은이온(Ag^+)은 가장 형광 방출을 크게 향상시킨 반면, Cu^{2+} 이온은 소광 효과를 가장 크게 일으켰음을 확인할 수 있다.
- [0068] Cu^{2+} 이온을 각각의 이온이 첨가되어 있는 실험군에 가한 결과 은이온(Ag^+)은 Cu^{2+} 이온이 양친매성 펩타이드 2와 결합하여 소광 효과를 일으키는 것을 간섭하며(도 3(c)), 양친매성 펩타이드 2에 AgNO_3 을 가하고 이후 NaBH_4 로 연속적으로 환원반응을 유도한 결과 도 3(d)의 TEM 결과에서와 같이 검은 대비로 나타난 구형의 응집물이 형성된 것을 알 수 있는데 이는 Ag 나노 입자임을 알 수 있었다.
- [0069] 상기 결과로부터 양친매성 펩타이드 2는 선택적으로 은이온(Ag^+)의 형광을 향상시킨 검출(light-up)이 가능한 것을 확인하였으며, 은 나노 입자가 융합된 하이브리드 NFs로의 전환 능력을 보유하고 있음을 새롭게 확인하였다.
- [0070] [실시예 4] 세포이미징(cell-imaging)
- [0071] HeLa 세포(epithelial cervical cancer cell line)는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)과 10% FBS(fetal bovine serum)이 포함된 배지에서 배양하였다. 모든 세포는 100 units/mL 페니실린(penicillin), 0.1 mg/mL 스트렙토마이신(streptomycin) 및 0.25 mg/mL 암포테리신 B(amphotericin B)가 혼합된 항생제-항진균 용액과 함께 공급되어 37 °C에서 표준 배양 조건인 5% CO_2 및 95% 습도에서 12 시간 동안 배양하였다. 불용성 AgCl 침전물의 생성을 방지하기 위하여 1.0 mM의 질산나트륨을 포함하는 pH 6.8의 HEPES(N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid)의 염소 이온을 포함하지 않는 버퍼를 사용하였다. 세포는 37 °C에서 HEPES에 10 μM 의 양친매성 펩타이드 2(PA 2)와 함께 먼저 1시간 동안 로딩하였다. 이후 1.0 mM 질산나트륨을 포함하는 pH 6.8의 20 mM HEPES 버퍼 용액으로 세 차례 세척하여 free PA 2를 제거하였다. 이후 세포를 150 μM 의 질산은을 포함하는 20 mM HEPES에서 30분간 더 배양하였다.
- [0072] 생체적합성 양친매성 펩타이드 기반 NFs의 형성을 통해 잠재적인 생물의학적 응용의 추구가 가능하게 되었다. 본 발명에서는 구체적인 데이터를 개시하지는 않았으나, 10 μM 의 NF를 사용하여 HeLa 세포에 대하여 표준 생존 실험을 실시한 결과 약 93%의 높은 세포 생존율을 나타내었다. 특히 상기 실시예들로부터 확인한 Ag^+ 이온을 이용한 NFs의 선택적인 형광 방출 향상 능력을 통해 양친매성 펩타이드를 세포이미징 분야에 활용할 수 있도록 하였다. Ag^+ 이온이 고정화된 나노프ibril은 하이브리드 NFs가 항균 효과를 유도하는 잠재적 능력을 가지고 있는지 조사할 수 있게끔 한다. 그러나, Ag^+ 이온에 비해 환원된 형태의 Ag의 경우 동물 세포에 있어 훨씬 적은 독성을 나타내기 때문에 NFs의 표면에 부착된 Ag^+ 이온의 형태로 환원하는 과정을 추가로 수행하였다.
- [0073] 온전한 HeLa 세포를 10 μM 의 양친매성 펩타이드 2에서 Ag^+ 이온 없이 1 시간 동안 37°C의 온도 하에서 배양한 후 염화나트륨(NaCl) 대신 질산나트륨(NaNO_3)을 포함한 20 mM의 HEPES 버퍼 용액(pH 6.8)로 세척하고, 형광을 나타내는지 여부를 관찰하였다(도 4(b)).
- [0074] 150 μM 의 AgNO_3 에서 1 시간 동안 37°C의 온도 하에서 배양한 결과 도 4(c)에서 확인할 수 있는 것과 같이 세포에 있어서 4.1배로 눈에 띄는 정도의 형광 증가 효과를 얻을 수 있었다. 이 결과로부터 양친매성 펩타이드 2는 세포를 투과할 수 있으며, 세포 내의 은이온(Ag^+)과의 상호작용을 통해 형광 신호를 나타냄을 알 수 있었다. 비록 양친매성 펩타이드 2는 'TAT', 아르기닌- 및 리신-리치 펩타이드(arginine- and lysine-rich peptide)와 같은 세포 투과 펩타이드를 포함하고 있지는 않으나, NFs의 외부에 결합된 HG12의 존재로 인하여 세포 투과를 가능하게 한다. 히스티딘을 포함하는 펩타이드는 정전기적 작용을 통해 세포막과 상호작용할 수 있으며, 약산성 조건에서 세포막을 투과할 수 있음이 알려져 있다.
- [0075] [실시예 5] 항균 활성(antimicrobial activity) 측정
- [0076] Ag 나노 입자-NFs의 항균 활성은 그람-음성 박테리아인 대장균 (*Escherichia coli*)157:H7과 그람-양성 박테리아

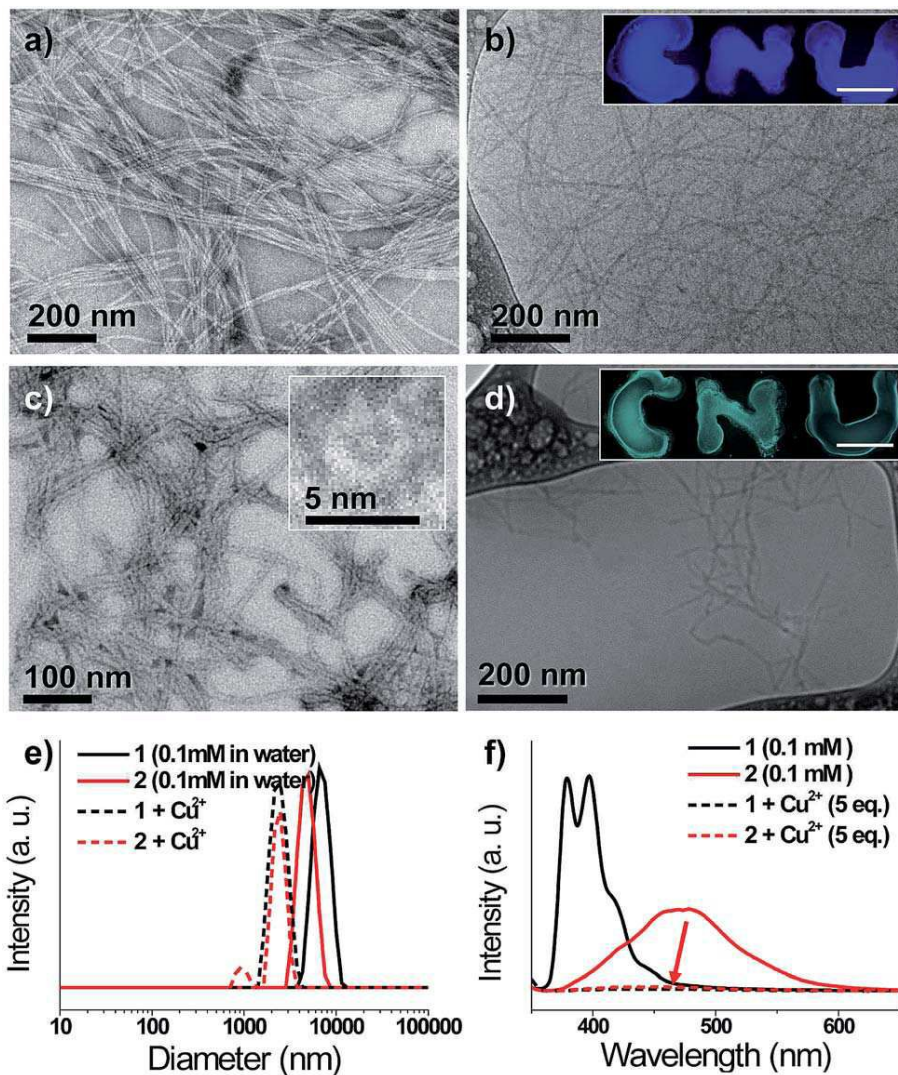
인 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)의 성장 저해 실험을 통해 조사하였다.

[0077] Ag 나노입자(AgNPs), NFs (양친매성 펩타이드 2) 및 Ag 나노입자가 도입된 NFs(AgNPs-NFs) (양친매성 펩타이드 2) 각각을 공기중에서 보관하고, LB(Luria-Broth) 배지에 10 ug/mL로 대장균 (*Escherichia coli*) 157:H7과 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)를 접종하여 배양한 후, 상기 실험균을 각각 미생물이 배양액에 주입하였다. 이후, 미생물의 성장 곡선은 600 nm에서 흡광도를 시간 별로 측정하여 도시하였다(도 5(a) 및 (d)). 도면으로부터 확인할 수 있는 바와 같이, 아무런 처리를 하지 않은 대조군에 비하여 AgNPs-NFs가 존재하는 경우, 상기 미생물의 성장을 크게 저해하는 것을 확인할 수 있다. 7일 경과 후 대장균에 대한 배양액의 혼탁도를 조사한 결과 도 5(b)와 같이 AgNPs-NFs가 존재하는 경우 투명한 상태의 배지로 남아 있음을 알 수 있다. 이로부터 상기 물질의 존재 하에서는 미생물이 거의 생존하지 않았다고 추측할 수 있다. 결과적으로 AgNPs는 NFs와의 연결을 통해 오랫동안 지속될 수 있는 항균력을 부여한 것을 확인하였다. 반면 AgNPs 또는 NFs 단독으로 처리한 실험균은 미생물의 성장을 결과적으로 저해하지는 못하였다.

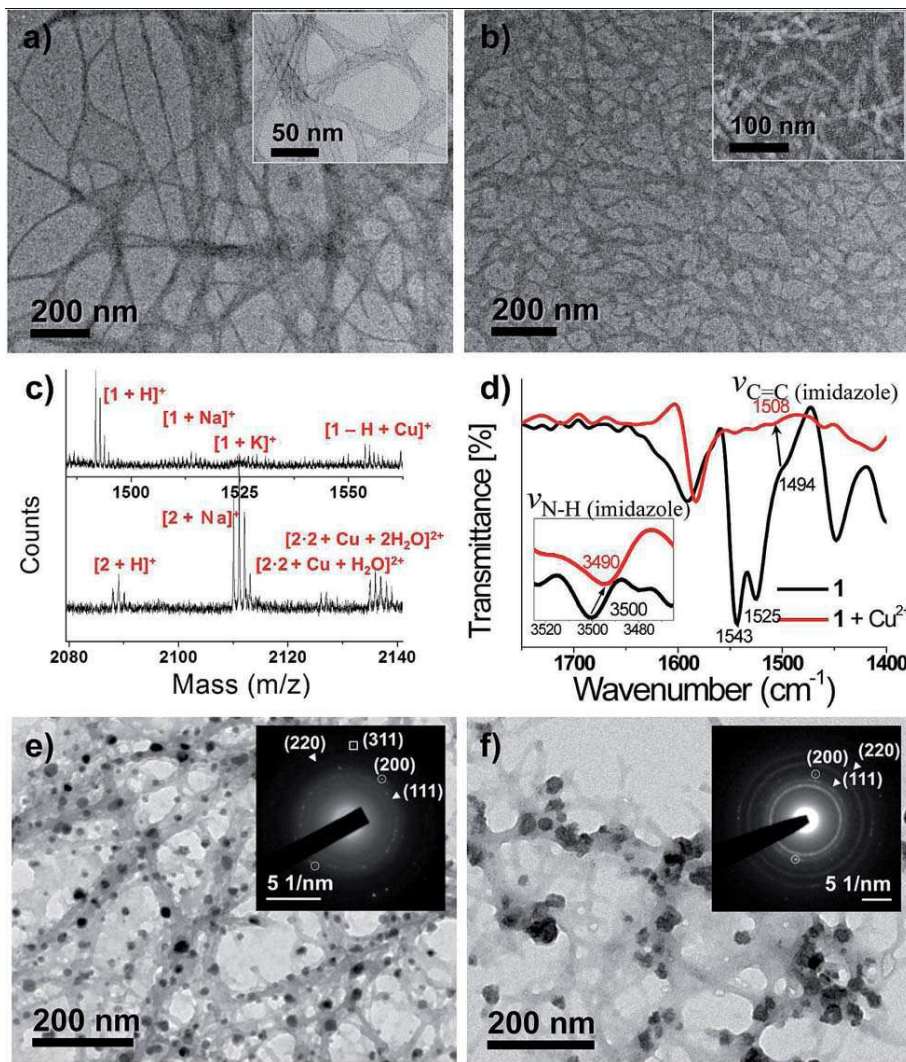
[0078] 도 5(c)는 상기 실험을 하나의 칩에 구현한 것으로 12 시간 경과 후 GFP(green fluorescence protein) 발현이 나타나기 시작하여, 24 시간 경과 후에는 AgNP-NF를 제외한 나머지 세 실험군에서 대장균이 성장하였음을 확인할 수 있었다. 이로부터 AgNPs-NFs는 그람-음성 박테리아인 대장균에서 AgNPs에 비해 매우 효율적인 항균 활성을 지니고 있음을 확인할 수 있으며, 이 결과는 상기 도 5 (a), (b)의 결과와 일치하는 것이다.

도면

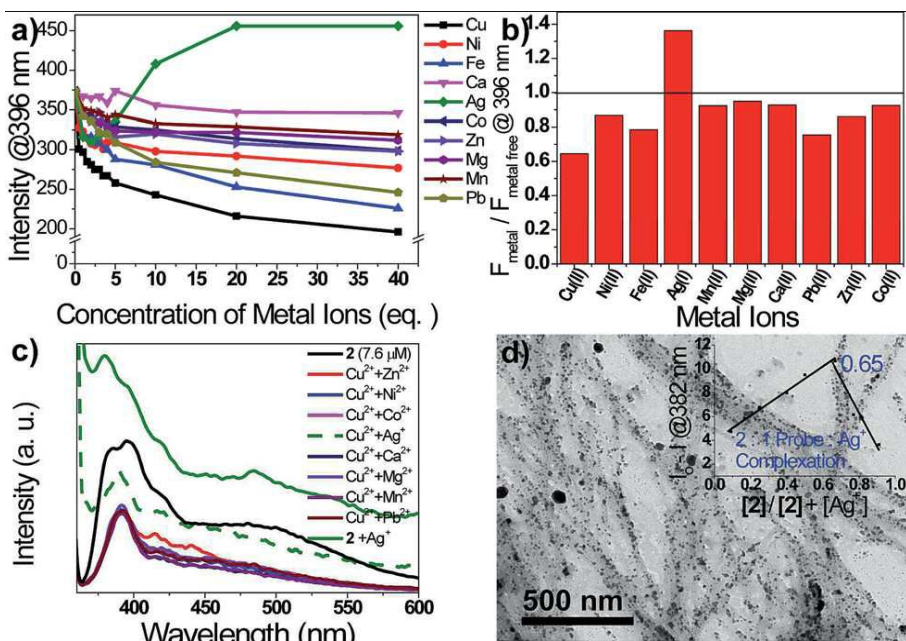
도면1



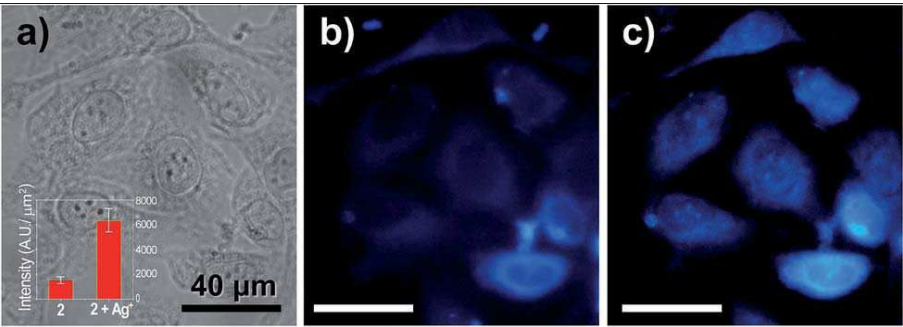
도면2



도면3



도면4



도면5

