

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0056105 (43) 공개일자 2014년05월09일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>G01N 33/68</i> (2006.01) <i>G01N 33/58</i> (2006.01) <i>C07K 19/00</i> (2006.01)		(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(21) 출원번호	10-2013-0131026	(72) 발명자
(22) 출원일자	2013년10월31일	이지원
심사청구일자	2013년10월31일	서울 광진구 아차산로70길 62, 301동 204호 (광장동, 광장현대3단지아파트)
(30) 우선권주장		안금영
1020120122548	2012년10월31일 대한민국(KR)	경기 안산시 상록구 양지편3길 2, 202호 (이동)
		권구철
		서울 성북구 안암로 145, 제2공학관 251호 (안암동5가, 고려대학교이과대학)
		(74) 대리인
		특허법인다나

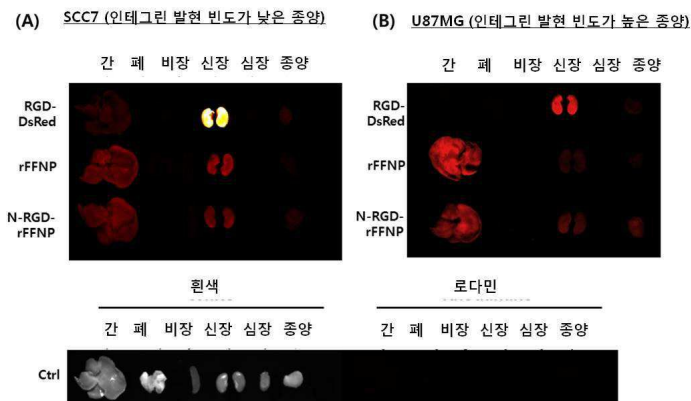
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **인 비보 이미징을 위한 재조합 형광 단백질 나노입자**

(57) 요약

본 발명은 높은 형광강도를 가지는 동시에 생체 적합성 및 안정성이 뛰어난 재조합 형광 단백질 나노입자 및 상기 재조합 형광 단백질 나노입자의 인 비보 이미징을 위한 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따른 형광 단백질 나노입자는 형광단백질 단량체에 비하여 현저히 증폭된 형광 강도를 보이며, 체온에 상응하는 온도에서 형광단백질의 구조적 변성을 방지하여 형광단백질의 구조적, 기능적 안정성을 향상시킬 수 있다. 또한 표적 지향성 펩타이드가 표면 발현된 형광 단백질 나노입자는 표적 특이적으로 타겟팅이 가능하며, 증폭된 형광 강도를 통해 생체 진단 이미징이 가능하므로, 타겟팅과 이미징이 동시에 가능한 생체 진단에 적합한 신소재를 제공한다.

대표도 - 도12



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

표면에 형광물질 및 표적 지향성 펩타이드를 표출하는 형광 단백질 나노입자.

청구항 2

제1항에 있어서,

자기조립성 단백질은 B형 간염 바이러스 코어 단백질, 페리틴 중쇄 단백질(Ferritin Heavy chain), 써모플라즈마 에시도필럼(*Thermoplasma acidophilum*) 유래의 프로테아좀(tPTS) 또는 대장균 유래의 DNA 결합 단백질(eDPS)을 포함하는 형광 단백질 나노입자.

청구항 3

제1항에 있어서,

형광물질은 형광단백질, 플루오레세인(fluorescein), 보디피(BODIPY), ATTO Dyes, 로다민(Rhodamine), 헵타메틴(Heptamethine), DyLight Fluor, 알렉사(Alexa), 시아닌(Cyanine) 및 알로피코시아닌(allopicocyanine)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 형광 단백질 나노입자.

청구항 4

제1항에 있어서, 형광 단백질 나노입자는

B형 간염 바이러스 코어 단백질의 1-78번째 아미노산 서열 부분과 상기 코어 단백질의 81-149번째 아미노산 서열 부분 사이에 증강된 녹색형광단백질(enhanced green fluorescent protein) 또는 적색형광단백질(DsRed)이 위치하고, 상기 형광단백질의 N-말단 부분은 헥사 히스티딘과 링커 펩타이드가, C-말단 부분은 링커 펩타이드가 결합되어 있고, 상기 표적 지향성 펩타이드는 B형 간염 바이러스 코어 단백질의 N-말단 또는 C-말단에는 결합되어 있는 키메릭 단백질로 이루어진 것인, 형광 단백질 나노입자.

청구항 5

제1항에 있어서,

형광 단백질 나노입자는 페리틴 중쇄 단백질의 양 말단에 링커 펩타이드에 의해 표적 지향성 펩타이드와 형광단백질이 각각 결합되어 있는 키메릭 단백질로부터 제조된 것인 형광 단백질 나노입자.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서,

링커 펩타이드는 SEQ ID NO: 35 내지 39에 기재된 아미노산 서열 중 어느 하나로 표시되는 형광 단백질 나노입자.

청구항 7

제1항에 있어서,

형광 단백질 나노입자는 B형 간염 바이러스 코어 단백질, 페리틴 중쇄 단백질, 써모플라즈름 애시도필룸 (*Thermoplasma acidophilum*) 유래의 프로테아좀(tPTS) 또는 대장균 유래의 DNA 결합 단백질(eDPS)을 포함하는 자기조립성 단백질의 일 말단에 표적 지향성 펩타이드가 결합된 키메라 단백질로부터 자기조립된 단백질 나노입자에 형광물질을 표면 결합시켜 제조된 것인, 형광 단백질 나노입자.

청구항 8

제1항에 있어서,

표적 지향성 펩타이드는 RGD 펩타이드, 소마토스타틴(somatostatins), 어피바디(affibody), 수용체 길항근(receptor antagonist), 봄베신(bombesin), 콜레시스토키닌(cholecystokinin) 또는 가스트린 유사체(gastrin analog)를 포함하는 형광 단백질 나노입자.

청구항 9

제1항에 따른 형광 단백질 나노입자; 및

약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 표적 지향형 조영제 조성물.

청구항 10

제1항에 따른 형광 단백질 나노입자; 및

약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 동시 진단 또는 치료용 조영제 조성물.

청구항 11

제1항에 따른 형광 단백질 나노입자; 및

진단 프로브를 포함하고, 상기 진단 프로브는 영상 관독을 위한 표지 물질인 다중 진단 프로브.

청구항 12

자기조립성 단백질에 형광물질이 결합된 10 내지 50 nm 크기의 형광 단백질 나노입자; 및

약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하고,

상기 형광 단백질 나노입자는 B형 간염 바이러스 코어 단백질, 페리틴 중쇄 단백질(Ferritin Heavy chain), 써모플라즈름 애시도필룸(*Thermoplasma acidophilum*) 유래의 프로테아좀(tPTS) 또는 대장균 유래의 DNA 결합 단백질(eDPS)을 포함하는 자기조립성 단백질로부터 자기조립된 단백질 나노입자에 형광물질을 표면 결합시켜 제조된 것인, 생체 이미징용 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서,

생체 이미징용 조성물은 감시림프절(Sentinel lymph node) 이미징용인 생체 이미징용 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 높은 형광강도를 가지는 동시에 생체 적합성 및 안정성이 뛰어난 제조합 형광 단백질 나노입자 및 상기 제조합 형광 단백질 나노입자의 인 비보 이미징을 위한 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 고령화 사회로 접어들면서 질병 예방 및 조기 검진의 중요성이 대두됨에 따라 질병 조기 진단 시스템의 개발이 중요시되고 있다. 혈청 및 체액을 이용한 진단 시스템에서 나아가 체내에 직접 적용하여 조직 및 기관 내 질환 발병 유무를 판단하기 위한 생체 진단 시스템의 개발이 활발히 진행되고 있다. 특히 나노 크기의 무기, 유기 소재는 독특한 구조적 특성을 기반으로 생체 진단 소재로 개발하기 위한 노력이 지속되고 있으며, 특히 형광을 띠는 나노소재는 높은 민감도와 편의성으로 인해 각광받고 있다.

[0003] 생체 이미징 소재는 높은 형광 신호를 보이고, 생체 적합성이 뛰어나야 하며, 특정 조직 및 질환 특이적으로 타겟팅이 가능해야 한다. 최근 광학적 생체 이미징 소재의 기능성 향상을 위하여 1) 이미징 소재의 형광 강도 증폭 기술, 2) 생체 적합성 나노 소재 개발을 위한 표면 처리 기술 및 생체 적합성 소재 발굴, 3) 조직, 질환 특이적 타겟팅 모티프 표출 이미징 소재 개발이 활발히 진행 중이다.

[0004] 현재 잘 알려진 화학적 형광 물질(organic dye)인 Cy3, Cy5, 그 외 FITC 등은 단백질 및 DNA의 형광 수식 기법이 널리 알려지면서 생체 진단 소재로 개발하기 위한 노력이 계속 되어왔으나 낮은 구조적 안정성과, 낮은 광안정성(photostability)으로 인해 효용성이 떨어질 뿐 아니라, 형광 신호 증폭 기술의 부재로 낮은 민감도를 나타내는 단점이 있다.

[0005] 최근 퀀텀닷(Quantum dot)이 높은 안정성과 형광 강도로 각광받고 있지만 중금속을 기반으로 제조되기 때문에 생체 적합성 문제나 독성문제가 해결되어야 할 과제로 남아있으며 제조 단가가 높고 생산 및 수식화에 복잡한 공정이 요구된다.

[0006] 반면 형광 검출 신호 물질로 널리 사용되고 있는 형광 단백질은 구조적 안정성, 높은 양자 효율, 높은 형광 밝기 등을 가지며, 대장균을 통해 쉽게 생산이 가능하고, 생체 유래의 단백질 기반의 소재이므로 이를 생체 진단에 활용하기 위한 다양한 연구가 수행되고 있다. 하지만 생체 내에서의 안정성 및 검출 가능한 수준의 형광 강도를 충족시키지는 못하는 실정이며, 이러한 제한 점을 극복하고 효용성을 증대시킬 수 있는 형광 단백질 기반의 새로운 기능성 소재 개발이 필요한 실정이다.

[0007] 또한, 나노 크기의 무기입자, 고분자기반의 구조체에 화학 공정을 거쳐 화학적 형광 물질을 고정한 소재를 이미징 소재로 개발하기 위한 시도가 활발히 진행되고 있으나, 이들이 독성으로 인한 안전성 문제는 끊임없는 이슈가 되고 있다.

[0008] 재현성 있는 생체 이미징 결과를 얻기 위해서는 입자의 입도 분포 및 표면 성질이 일정해야 하는데, 기존 생체 이미징에 적용하고자 연구 개발되고 있는 무기 입자, 자성입자, 고분자 소재 기반의 나노입자는 재현성 있는 균일한 입자의 제조가 어려울 뿐 아니라, 형광 물질을 추가로 화학적 반응을 통해 표면 고정화 내지는 입자 내 캡슐화(encapsulation) 과정을 거쳐야 하는 단점이 있다. 특히 생체 이미징 소재가 최종 질환 조직까지 도달하기 위해서는, 생체 내에서 면역 세포에 의해 제거되지 않아야 하고, 신장을 통해 빠져가 나가는 신장 클리어런스(renal clearance)를 극복해야 한다. 신장 클리어런스는 30 nm 이하 입자의 경우 주로 일어난다고 알려져 있으므로 30 nm 이상의 입자를 제조하는 기술 연구가 진행되고 있으나 화학적 반응을 통해 제조되는 입자는 균일한 크기로 재현성 있게 제조하는데 한계가 있다. 또한 기존 연구되고 있는 무기소재 기반의 이미징 소재는 면역 세포에 의해 빠르게 외부 물질로 인식되어 대부분이 간에 축적되는 현상을 보이며, 이를 방지하려면 표면 개질을 추가로 수행해야 하는 단점이 있다.

[0009] 또한 생체에 적용 가능한 나노입자를 개발하고 그 응용 범위를 확대하기 위하여 다양한 크기와 형태의 나노소재 개발이 활발히 진행되고 있다. 기존 무기 나노입자의 생체 분포 및 입자의 특성을 응용한 특정 장기 및 질환의 이미징 기술이 다수 보고된 바 있으나, 아직까지 단백질 나노입자 기반의 이미징 소재 개발은 단백질 나노입자를 생체에 적용하는데 있어서 정보가 충분하지 않아 그 응용에 한계가 있는 실정이다. 즉, 기존 무기 나노입자를 대체할 수 있는 생체 유래의 단백질 나노입자 라이브러리를 확보하고, 이의 적절한 생체 적용을 위해서는 다양한 크기와 형태의 단백질 나노입자에 대한 인 비보 연구가 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) 대한민국 특허 제10-877187호 (2008.12.26)
(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허 제2011-0090347호 (2011.08.10)

비특허문헌

- [0011] (비특허문헌 0001) Peter A. Kratz et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol. 96, pp. 1915-1920, 1999.03.02

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 본 발명의 목적은 형광 강도 증폭, 생체 안정성이 향상된 생체 진단용 신소재로서 형광 단백질 나노입자 및 이의 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 표면에 형광물질 및 표적 지향성 펩타이드를 표출하는 형광 단백질 나노입자를 제공한다.
- [0014] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 형광 단백질 나노입자; 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 표적 지향형 조영제 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 형광 단백질 나노입자; 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 동시 진단 또는 치료용 조영제 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 형광 단백질 나노입자; 및 진단 프로브를 포함하고, 상기 진단 프로브는 영상 관독을 위한 표지 물질인 다중 진단 프로브를 제공한다.
- [0017] 본 발명은 또한 자기조립성 단백질에 형광물질이 결합된 10 내지 50 nm 크기의 형광 단백질 나노입자; 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하고, 상기 형광 단백질 나노입자는 B형 간염 바이러스 코어 단백질, 페리틴 중쇄 단백질(Ferritin Heavy chain), 써모플라즈름 애시도필룸(*Thermoplasma acidophilum*) 유래의 프로테아솜(tPTS) 또는 대장균 유래의 DNA 결합 단백질(eDPS)을 포함하는 자기조립성 단백질로부터 자기조립된 단백질 나노입자에 형광물질을 표면 결합시켜 제조된 것인, 생체 이미징용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0018] 본 발명에 따른 형광 단백질 나노입자는 형광 단백질 단량체에 비하여 현저히 증폭된 형광 강도를 보이며, 체온에 상응하는 온도에서 형광 단백질의 구조적 변성을 방지하여 형광단백질의 구조적, 기능적 안정성을 향상시킬 수 있다. 또한 표적 지향성 펩타이드가 표면 발현된 형광 단백질 나노입자는 표적 특이적으로 타겟팅이 가능하며, 증폭된 형광강도를 통해 생체 진단 이미징이 가능하므로, 타겟팅과 이미징이 동시에 가능한 생체 진단에 적합한 신소재를 제공한다.
- [0019] 표적 지향성 펩타이드를 표출하지 않으나, 일정 크기와 구조의 특성을 갖는 형광 단백질 나노입자는 감시림프절 이미징에 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020]

도 1은 녹색(eGFP), 적색(DsRed) 형광단백질을 융합한 캡시드 단백질 나노입자 제조를 위한 발현 벡터의 모식도를 나타낸 것이다((A) gFCNP(w/o linker), (A) rFCNP(w/o linker), (C) gFCNP(w/ linker), (D) rFCNP(w/ linker)).

도 2는 형광단백질이 표면 표출된 구형의 단백질 나노입자의 모식도를 나타낸 것이다((A) gFCNP (w/ linker), (B) rFCNP (w/ linker)).

도 3은 대장균에서 발현 후 분리 정제한 HBV 캡시드 유래 키메라 형광 나노입자의 구조를 보여주는 TEM 사진도이다((A) gFCNP (w/ linker), (B) rFCNP (w/ linker)).

도 4는 형광단백질 단량체(eGFP, DsRed)와 링커를 삽입하지 않은 형광 단백질 나노입자[gFFNP, gFCNP(w/o linker), rFFNP, rFCNP(w/o linker)], 링커를 삽입한 형광 단백질 나노입자[gFFNP, gFCNP(w/ linker), rFFNP, rFCNP(w/ linker)]의 형광 세기를 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 PBS에 존재하는 형광단백질 단량체[eGFP(○), DsRed(▽)], 링커를 삽입한 형광 단백질 나노입자[gFCNP(w/ linker)(●), rFCNP(w/ linker)(▼)]의 보관 시간에 따른 형광 세기를 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 30%, 50% 혈청에 존재하는 형광단백질 단량체, 링커를 삽입한 형광 단백질 나노입자의 보관 시간에 따른 형광 세기를 비교한 결과를 나타낸 것이다((A) 적색형광단백질 단량체와 적색형광단백질 융합 나노입자 [30% 혈청 내 rFCNP (●), 30% 혈청 내 DsRed (○), 50% 혈청 내 rFCNP (▼), 50% 혈청 내 DsRed (▽)], (B) 녹색형광단백질 단량체와 녹색형광단백질 융합 나노입자 [30% 혈청 내 gFCNP (●), 30% 혈청 내 eGFP (○), 50% 혈청 내 gFCNP (▼), 50% 혈청 내 eGFP (▽)]).

도 7은 반복된 광원 노출에 대한 광안정성을 비교한 결과를 나타낸 것이다([gFCNP(●), FAM (▽), eGFP (○), Qdot655(▲), rFCNP (■), DsRed(□)]).

도 8은 동물 모델의 복부에 피하 주사한 형광단백질 단량체와 형광 단백질 나노입자의 생체 안정성을 비교한 결과를 나타낸 것이다((DsRed: 형광단백질 단량체, rFFNP: 페리틴 기반 적색형광단백질 나노입자, rFCNP: 캡시드 기반 적색형광단백질 나노입자)).

도 9는 생체진단용 표적 지향적 펩타이드(RGD)를 표출하는 본 발명에 따른 형광 단백질 나노입자 제조를 위한 발현 벡터의 모식도를 나타낸 것이다((A) RGD-rFFNP, (B) RGD-rFCNP).

도 10은 생체진단용 표적 지향성 펩타이드(RGD)를 표출하는 본 발명에 따른 형광 단백질 나노입자(RGD-rFFNP)와 형광 단백질 나노입자(rFFNP)의 암세포(U87MG) 업테이크 효율을 비교한 실험 결과이다.

도 11은 U87MG 암세포를 이식한 동물 모델에 rFFNP와 RGD-rFFNP를 각각 정맥 주사한 후 암 타겟팅 효율을 인 비보 이미징을 통해 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 12는 생체 진단용 표적 지향적 펩타이드(RGD)를 표출하는 본 발명에 따른 형광 단백질 나노입자를 적용한 동물 실험 후 조직별 형광 세기 비교 결과를 나타낸 것이다((A) SCC7 종양 모델, (B) U87MG 종양 모델).

도 13은 본 발명에 따른 eDPS 및 tPTS 기반 형광 단백질 나노입자와 RGD 표출 형광 단백질 나노입자의 제작을 위한 발현 벡터 모식도(A)와 각 나노입자의 크기와 형태를 보여주는 DLS 결과와 TEM 사진도(B)이다.

도 14는 본 발명에 따른 eDPS, RGD-eDPS, tPTS, RGD-tPTS 형광 단백질 나노입자를 이용한 인 비보 암 타겟팅 결과(A)와 암에 나타나는 형광 세기 측정을 통해 암 타겟팅 효율을 비교해서 보여주는 그래프(B) 이다.

도 15는 감시림프절 이미징에 적용한 본 발명에 따른 4개의 형광 단백질 나노입자의 크기와 구조를 보여주는 TEM 사진도(A)와 각 입자의 형광세기(B)를 나타낸 것이다.

도 16은 본 발명에 따른 4개의 형광 단백질 나노입자를 이용한 감시림프절 이미징 결과이다((A) eDPS, (B) tPTS, (C) FTN-h, (D) HBVcAg).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.
- [0022] 본 발명은 표면에 형광물질 및 표적 지향성 펩타이드를 표출하는 형광 단백질 나노입자에 관한 것이다.
- [0023] 본 발명의 형광 단백질 나노입자는 나노미터의 크기의 직경을 가지는 구형의 단백질 입자로서 자기조립성 단백질에 의한 자기조립에 의해 입자를 이루고 있어 매우 균일한 입도 분포를 보이는 입자를 재현성 있게 제조할 수 있을 뿐 아니라, 생체 내에서 사용된 후 분해될 수 있는 생체친화성 물질이기 때문에 생체 이미징 후의 나노입자의 잔존으로 인한 독성의 문제가 없다. 특히 인간 유래의 자기조립성 단백질을 사용할 경우 생체 이미징에 사용 시 안전성과 독성에 전혀 문제가 없고, 면역세포에 의한 제거 또한 타 무기 소재 입자에 비해 현저히 낮은 편이다.
- [0024] 따라서, 본 발명의 형광 단백질 나노입자는 생체 적용이 가능하고 입자에 따른 표적 타겟팅 효과가 우수하여 진단 조직 또는 질환에 적합한 것을 특징으로 한다.
- [0025] 본 발명의 형광 단백질 나노입자는 한 구체예에 따르면 형광단백질, 자기조립성 단백질, 및 표적 지향성 펩타이드가 융합된 단량체가 자가조립되어 하나의 구형 형광 단백질 나노입자를 이룰 수 있다. 다른 구체예에 따르면, 자기조립성 단백질에 표적 지향성 펩타이드가 결합된 키메라 단백질로부터 단백질 나노입자가 제조되고 형광물질로 표면 수식시켜 형광 단백질 나노입자를 제조할 수도 있다.
- [0026] 본 명세서에서, 용어 "자기조립성 단백질"은 단백질, 단백질의 서브유닛 또는 펩타이드가 수 개가 모였을 때 이들이 스스로 조직적인 구조 또는 패턴을 형성하며 집합체를 형성하는 단백질, 단백질의 서브유닛 또는 펩타이드를 의미한다. 이러한 자기조립성 단백질은 별도의 조작 없이도 단백질의 나노입자 형성을 가능하게 하므로 본 발명에 따른 단백질 나노입자의 제조를 위해 유리하게 사용할 수 있다.
- [0027] 상기 자기조립성 단백질은 외래 단백질과 융합할 수 있고, 상기 외래 단백질은 목적에 따라 자기조립 시 내부 또는 외부에 위치시킬 수 있다. 본 발명은 단백질 나노입자를 타겟 물질의 탐지 목적으로 사용하므로 외래 단백질로 형광단백질과 표적 지향성 펩타이드를 사용할 수 있고, 상기 형광단백질과 표적 지향성 펩타이드는 자기조립성 단백질의 자기조립 시 외부에 위치하도록 조절된다. 만일 형광단백질이 자기조립성 단백질의 자기조립시 내부에 위치하도록 발현되면 형광 강도의 저하를 야기하게 된다. 그러므로, 형광단백질과 표적 지향성 펩타이드가 융합단백질의 외부에 위치할 수 있도록 융합 파트너로서 사용되게 되는 자기조립성 단백질의 종류나 융합되는 부위, 또는 단백질의 융합이나 발현의 방법 등을 적절히 선택하는 것이 바람직하다.
- [0028] 이러한, 자기조립성 단백질로, B형 간염 바이러스 코어 단백질(이하, 'HBV'라 함)을 사용할 수 있다.
- [0029] HBV 코어 단백질은 180-240개의 단량체가 자가조립되어 하나의 구형 단백질 나노입자를 이루며, 유전자 재조합 기술을 이용하여 대장균에서 대량 생산이 가능하다. 특히 스파이크 부위에 외래 단백질을 융합 발현할 경우 외래 단백질이 단백질 나노입자의 표면에 표출되는 특징이 있다.
- [0030] 상기 HBV 코어 단백질은 구조상 스파이크에 해당하는 79-80번째 아미노산 서열 사이, N-말단 또는 C-말단에 외래 단백질을 융합 발현할 경우, 발현된 외래 단백질이 단백질 나노입자의 바깥 표면에 표출될 수 있다. 다만, 이러한 외래 단백질의 표면 표출은 HBV 코어 단백질의 3차 구조를 형성하는데 영향을 줄 수 있으므로 상기 3차 구조를 형성할 수 있는 범위에서 외래 단백질을 채택할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 일 구체예에 따르면, HBV 코어 단백질의 1-78번째 아미노산 서열 부분과 상기 코어 단백질의 81-149번째 아미노산 서열 부분 사이에 증강된 녹색형광단백질(enhanced green fluorescent protein) 또는 적색형광단백질(DsRed)을 위치시키고, 상기 형광단백질의 N-말단 부분은 헥사 히스티딘과 링커 펩타이드를, C-말단 부분은 링커 펩타이드를 결합시키며, HBV 코어 단백질의 N-말단 또는 C-말단에는 표적 지향성 펩타이드를 결합시킨 키메라 단백질을 제조할 수 있다. 1개의 키메라 단백질 즉 단량체 180-240개가 자가조립되어 표면에 형광단백질과 표적 지향성 펩타이드를 표출하는 형광 단백질 나노입자를 형성할 수 있다.
- [0032] 또는, 자기조립성 단백질의 아미노 말단과 카르복실 말단이 표면으로 표출되는 특징을 이용하여 형광 단백질 나노입자를 제조할 수도 있다. 예컨대, HBV 코어 단백질의 N-말단 또는 C-말단에 표적 지향성 펩타이드가 결합된 키메라 단백질로부터 자기조립된 단백질 나노입자에 화학적 공정을 통해 형광물질을 표면 결합시켜 형광 단백질 나노입자를 형성할 수 있다.
- [0033] 상기 자기조립성 단백질로, 인간 유래의 자기조립성 단백질을 사용할 수 있다. 상기 인간 유래의 자기조립성 단

백질 또는 이를 포함하는 단백질 나노입자는 인간화된 자기조립성 단백질 또는 인간화된 단백질 나노입자를 또한 포함하는 것으로 간주된다. 예컨대, 상기 자기조립성 단백질은 페리틴일 수 있다. 페리틴은 중쇄와 경쇄로 구성된 24개의 동일한 단백질 서브유닛으로 구성되며, 자기조립성을 갖고 있어 생체 내에서 구형의 속이 빈 셸 구조(hollow shell)를 형성한다. 한 구체예에서, 상기 자기조립성 단백질은 페리틴 중쇄 단백질(Ferritin Heavy Chain: 이하 'FTN-H'이라고도 함)일 수 있다.

[0034] 본 발명의 일 구체예에 따르면, FTN-H은 양 말단에 링커 펩타이드에 의해 표적 지향성 펩타이드와 형광단백질이 각각 결합될 수 있다. 보다 구체적으로, 표적 지향성 펩타이드는 FTN-H의 N-말단에, 형광단백질은 C-말단에 융합될 수 있다. FTN-H과 융합되는 표적 지향성 펩타이드와 형광단백질은 단백질 나노입자의 표면에 표출됨으로써 강한 형광 강도를 제공하여 표적 물질의 탐지시 매우 유용하게 활용될 수 있다.

[0035] 또는, 자기조립성 단백질의 아미노 말단과 카르복실 말단이 표면으로 표출되는 특징을 이용하여 형광 단백질 나노입자를 제조할 수도 있다. FTN-H의 N-말단 또는 C-말단에 표적 지향성 펩타이드가 결합된 키메릭 단백질로부터 자기조립된 단백질 나노입자에 화학적 공정을 통해 형광물질을 표면 결합시켜 형광 단백질 나노입자를 형성할 수 있다.

[0036] 상기 자기조립성 단백질로, 써모플라즈름 애시도필룸(*Thermoplasma acidophilum*) 유래의 프로테아솜(이하, 'tPTS'라 함)을 사용할 수 있다. 상기 tPTS는 서열이 다른 14개의 알파 단백질과 14개의 베타 단백질이 자기조립에 의해 약 원기둥 형태의 단백질 나노입자를 이루며, 유전자 재조합 기술을 이용하여 대장균에서 발현이 가능하다. 이 단백질 나노입자는 매우 높은 열안정성을 보일 뿐 아니라, 알파 단백질의 아미노 말단과 카르복실 말단, 베타 단백질의 카르복실 말단이 외부로 표출되어 있어 각 부분에 외래 단백질을 융합발현할 경우 외래 단백질이 단백질 나노입자의 표면에 표출되는 특징이 있다.

[0037] 이에 제한되는 것은 아니나, tPTS는 일 말단에 표적 지향성 펩타이드가 결합될 수 있다. 표적 지향성 펩타이드를 표면에 표출하는 단백질 나노입자로 자기조립된 후 화학적 공정을 통해 형광물질을 표면에 결합시킴으로써 형광 단백질 나노입자가 제조되는 것이다.

[0038] 상기 자기조립성 단백질로, 대장균 유래의 DNA 결합 단백질(이하 'eDPS'라 함)을 사용할 수 있다. eDPS는 12개의 동일한 단량체의 자기조립에 의해 8-10 nm의 구형 단백질 나노입자를 이룬다. 유전자 재조합 기술을 이용하여 대장균에서 대량 발현이 가능하며, 이의 아미노 말단과 카르복실 말단이 표면으로 표출되어 있어 외래 단백질의 표출을 위한 융합 발현이 가능하다.

[0039] 이에 제한되는 것은 아니나, eDPS는 일 말단에 표적 지향성 펩타이드가 결합될 수 있다. 표적 지향성 펩타이드를 표면에 표출하는 단백질 나노입자로 자기조립된 후 화학적 공정을 통해 형광물질을 표면에 결합시킴으로써 형광 단백질 나노입자가 제조되는 것이다.

[0040] 상기 자기조립성 단백질은 형광단백질 또는 표적 지향성 펩타이드와 링커 펩타이드를 통해 융합될 수 있다.

[0041] 상기 링커 펩타이드는 자기조립성 단백질과 외래 단백질 간의 간격을 만들어 주는데, 자기조립성 단백질과 형광 단백질 사이에 링커 펩타이드를 연결할 경우, 일반적으로 형광물질들이 1 내지 10 nm 이내로 서로 위치할 형광의 퀀칭 현상이 나타나는 것으로 알려져 있고, 링커 펩타이드는 형광단백질 간의 공간을 넓혀줌으로써 이러한 형광 퀀칭을 억제하고 형광의 강도를 증가시키는 효과를 제공할 수 있다. 따라서, 링커 펩타이드는 형광단백질 간의 적절한 공간을 확보해 줄 수 있는 길이를 가질 수 있다. 예컨대, 링커 펩타이드의 길이는 형광단백질의 종류 및 크기에 따라 달라질 수 있을 것이다. 예를 들어 링커 펩타이드는 5 내지 20개, 예컨대, 5 내지 15개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드일 수 있다.

[0042] 본 발명의 한 구체예에서, 링커 펩타이드는 글라이신을 포함하는 것일 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 본 발명의 링커 펩타이드는 예를 들어, SEQ ID NO: 35 내지 39에 기재된 아미노산 서열 중 어느 하나로 표시될 수 있다.

[0043] 또한, 본 발명의 형광 단백질 나노입자는 자기조립성 단백질에 형광단백질을 연결하는 대신 형광물질을 표면 고정시켜 사용할 수 있다. 상술한 자기조립성 단백질은 모두 아미노산의 작용기가 표면에 표출되어 있으므로, 유전자 재조합 기술에 의한 외래 단백질의 표면 표출뿐 아니라 화학적 반응을 통한 기능성 소재의 표면 고정화가 가능하다. 따라서, 자기조립성 단백질의 자기조립 후 화학적 공정을 통해 형광물질을 표면에 고정할 수 있다.

[0044] 이러한 형광물질로, 플루오레신(fluorescein), 보디피(BODIPY), ATTO Dyes, 로다민(Rhodamine), 헵타메틴(Heptamethine), DyLight Fluor, 알렉사(Alexa), 시아닌(Cyanine) 또는 알로피코시아닌(allopicocyanine) 등을

사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

- [0045] 또한, 본 발명의 형광 단백질 나노입자에 사용할 수 있는 형광단백질은 녹색형광단백질(GFP), 변형된 녹색형광 단백질(modified green fluorescent protein), 증강된 녹색형광단백질(enhanced green fluorescent protein; EGFP), 적색형광단백질(RFP, DSRed), 증강된 적색형광단백질(ERFP), 청색형광단백질(BFP), 증강된 청색형광단백질(EBFP), 황색형광단백질(YFP), 증강된 황색형광단백질(EYFP), 남색형광단백질(CFP), 증강된 남색형광단백질(ECFP) 등을 사용할 수 있다. 보다 구체적으로는, 증강된 녹색형광단백질 또는 적색형광단백질일 수 있다.
- [0046] 한편, 본 명세서에서, 용어 "표적 지향성 펩타이드"는 본 발명에 따른 형광 단백질 나노입자에 표적 지향성을 부여할 수 있는 펩타이드를 의미한다. 생체 이미징 소재 개발에 있어서, 표적 특이적으로 타겟팅을 가능하게 하기 위하여 표적 지향성 펩타이드를 나노입자의 표면에 고정하는 기술이 활발히 연구되고 있다. 하지만 기존 무기, 고분자 기반 나노입자의 경우 화학적 결합을 통해 형광물질을 표면 수식화하므로, 동시에 표적 지향성 펩타이드를 표면에 수식화하는데 어려움이 있으며 형광물질과 표적 지향성 펩타이드의 표출 빈도를 조절하는데 어려움이 있다. 반면 본 발명에서는 유전공학적 기법을 이용하여 추가 화학적 공정 없이 표적 지향성 펩타이드와 형광단백질을 동시에 표출하는 단백질 나노입자를 제조하거나, 표적 지향성 펩타이드를 표출하는 단백질 나노입자의 표면 아민기와 형광물질의 결합을 통해 형광 단백질 나노입자를 제조할 수 있으며, 표적 지향성 펩타이드의 표면 표출 빈도 및 표출 위치를 조절할 수 있는 장점이 있다.
- [0047] 본 발명에 따른 표적 지향성 펩타이드는 형광 단백질 나노입자의 표면에 표출되어 있다. 따라서, 인 비보 이미징에 적용시 본 발명에 따른 형광 단백질 나노입자를 특정 타겟 부위에 전달해 주는 역할을 충실히 수행한다.
- [0048] 본 발명에 있어서, 형광단백질, 자기조립성 단백질 및 표적 지향성 펩타이드가 융합된 단백질; 또는 자기조립성 단백질과 표적 지향성 펩타이드가 융합된 단백질은 하나의 발현 벡터를 통해 발현된다.
- [0049] 따라서, 표적 지향성 펩타이드는 상기 발현 벡터에 쉽게 삽입 가능하면서, 본 발명에 따른 형광 단백질 나노입자의 형광 강도 및 나노입자의 구조에 영향을 미치지 않는 것이라면 펩타이드 서열의 길이와 관계없이 어떠한 것이든 사용할 수 있다. 특히 특정 질환 조직 및 세포에서 특이적으로 과발현되는 수용체에 실제 호르몬과 유사하게 대신 결합하여 신호 전달을 억제한다고 알려진 다수 펩타이드 형태의 수용체 길항근(receptor antagonist); 소마토스타틴(somatostatin), 어피바디(affibody), 봄베신(bombesin), 콜레시스토키닌(cholecystokinin) 또는 가스트린 유사체(gastrin analog) 등의 펩타이드 호르몬 등으로 대체 가능하다.
- [0050] 본 발명의 일 구체예에서, 표적 지향성 펩타이드는 RGD(Arginine-Glycine-Aspartic acid) 펩타이드일 수 있다. 암세포는 정상 세포에 비해 빠른 성장을 위해서 주변에 새로운 혈관 생성을 촉진하기 위한 수용체를 표출하고 있다고 알려져 있다. 특히 인테그린(integrin) $\alpha\beta3$ 수용체는 혈관생성(angiogenesis)에 결정적인 역할을 한다고 알려져 있으며 기존 연구를 통해 RGD(Arginine-Glycine-Aspartic acid) 서열을 가지는 특정 펩타이드와 결합한다고 알려져 있다. 이에 본 발명에서는 암세포 특이적 타겟팅을 목적으로 RGD 서열을 표면 표출하는 형광 단백질 나노입자를 제조하여 암특이적 타겟팅과 이미징이 동시에 가능하도록 하였다.
- [0051] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 본 발명의 표적 지향성 펩타이드가 표출된 형광 단백질 나노입자는 암세포에 특이적으로 업테이크되며, 인 비보 이미징에 적용하기 위해, 인테그린 수용체 발현 빈도가 높은 U87MG 암세포를 누드 마우스에 주사하여 암을 신장시킨 동물 모델에서 2시간 이후에도 암에서 형광이 측정되었다. 또한 상대적으로 인테그린 수용체 발현 빈도가 낮은 SCC7 암세포, 인테그린 수용체 발현 빈도가 높은 U87MG 암세포를 각각 준비하여 누드 마우스에 주사하여 암을 신장시킨 동물 모델에 형광 단백질 나노입자 및 형광단백질 단량체를 정맥 주사한 후 각 조직에 남아있는 형광을 측정한 결과, SCC7, U87MG 암 모델 모두 형광 단백질 단량체는 RGD 펩타이드가 있음에도 신장을 통해 체내에서 제거되나, 본 발명에 따른 표적 지향성 펩타이드가 표출된 형광 단백질 나노입자는 상대적으로 간에 주로 축적됨을 확인하였다. 이는 단백질 나노입자 기반의 형광 나노입자는 단량체에 비해 구조적 안정성이 향상되고, 체내 순환률이 향상됨을 보여주며, 형광단백질 단량체에 비해 인 비보 이미징에 적합한 소재임을 보여준다. 또한 암세포 특이적 펩타이드를 표출하는 형광 단백질 나노입자는 암세포에 특이적으로 타겟팅이 가능하며, 동시에 높은 형광 세기를 통해 이미징이 가능함을 보여준다.
- [0052] 상술한 바와 같이, 본 발명에 따른 표적 지향성 펩타이드가 표출된 형광 단백질 나노입자는 높은 형광강도, 우수한 생체 안정성, 다양한 표면 수식화를 토대로 표적 타겟팅과 이미징이 가능하며, 그 효용성이 검증되었다.
- [0053] 따라서, 본 발명은 또한 본 발명에 따른 형광 단백질 나노입자; 및
- [0054] 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 표적 지향형 조영제 조성물을 제공한다.

- [0055] 본 발명의 형광 단백질 나노입자는 표적 지향성 펩타이드가 결합되어 있어 특정 세포나 조직에서 표적 지향이 가능하므로 자기공명 및 광학영상장치를 등을 통해 표적 부위의 이미징이 가능한 조영제로 사용할 수 있다.
- [0056] 상기 약제학적으로 허용가능한 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 혼합물), 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. 또한, 본 발명의 조영제 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 유화제, 현탁제, 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0057] 한 양태로서, 본 발명에 따른 조영제 조성물은 비경구 투여를 위한 수용성 용액으로 제조할 수 있으며, 바람직하게는 한스 용액(Hank's solution), 링거 용액(Ringer's solution) 또는 물리적으로 완충된 염수와 같은 완충 용액을 사용할 수 있다. 수용성 주입(injection) 현탁액은 소듐 카르복시메틸셀룰로즈, 솔비톨 또는 텍스트란과 같이 현탁액의 점도를 증가시킬 수 있는 기질을 첨가할 수 있다.
- [0058] 본 발명의 조영제 조성물의 다른 바람직한 양태는 멸균 주사용 수성 또는 유성 현탁액의 멸균 주사용 제제의 형태일 수 있다. 이러한 현탁액은 적합한 분산제 또는 습윤제(예를 들면 트윈 80) 및 현탁화제를 사용하여 본 분야에 공지된 기술에 따라 제형화할 수 있다.
- [0059] 또한, 상기 멸균 주사용 제제는 무독성의 비경구적으로 허용되는 희석제 또는 용매 중의 멸균 주사 용액 또는 현탁액(예를 들면 1,3-부탄디올 중의 용액)일 수 있다. 사용될 수 있는 비히클 및 용매로는 만니톨, 물, 링거 용액 및 등장성 염화나트륨 용액이 있다. 또한, 멸균 비휘발성 오일이 통상적으로 용매 또는 현탁화 매질로서 사용된다. 이러한 목적을 위해 합성 모노 또는 디글리세라이드를 포함하여 자극성이 적은 비휘발성 오일은 그 어느 것도 사용할 수 있다.
- [0060] 본 발명의 조영제 조성물은 진단 대상에서 분리한 조직 또는 세포에 투여하여 형광 단백질 나노입자가 발산하는 신호를 감지하여 영상을 획득하는데 이용될 수 있다. 상기 형광 단백질 나노입자에 의해 발산되는 신호를 감지하기 위해서는 자기공명영상장치(MRI)와 광학 이미징의 이용이 바람직하다.
- [0061] 자기공명영상장치는 강력한 자기장 속에 생체를 넣고 특정 주파수의 전파를 조사하여 생체조직에 있는 수소 등의 원자핵에 에너지를 흡수시켜 에너지가 높은 상태로 만든 후, 상기 전파를 중단하여 상기 수소 등의 원자핵 에너지가 방출되게 하고 이 에너지를 신호로 변환하여 컴퓨터로 처리하여 영상화한 장치이다. 자기 또는 전파는 골에 방해받지 않기 때문에 단단한 골 주위 또는 뇌나 골수의 종양에 대하여 종단, 횡단, 임의의 각도에서 선명한 입체적인 단층상을 얻을 수 있다. 특히 상기 자기공명영상장치는 T2 스핀-스핀 이완 자기공명영상장치인 것이 바람직하다.
- [0062] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 형광 단백질 나노입자; 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 동시 진단 또는 치료용 조영제 조성물에 관한 것이다.
- [0063] 본 발명의 형광 단백질 나노입자는 약제학적 활성성분과 물리 화학적으로 결합하여 표적 지향성 펩타이드가 타겟팅하는 세포 또는 조직에서 형광을 나타낼 수 있어 자기공명 및 광학영상장치 등을 통해 생체 분자의 분리, 진단 또는 치료 등의 나노 프로브 및 약물 또는 유전자 전달체(delivery vehicle)등에 이용할 수 있다.
- [0064] 상기 형광 단백질 나노입자를 이용한 생체 진단의 한 대표적인 예로서 분자 자기공명영상 진단 또는 자기 이완 센서(magnetic relaxation sensor)를 들 수 있다. 형광 단백질 나노입자는 그 크기가 커짐에 따라 더 큰 T2 조영효과를 나타내는데, 이러한 성질을 이용하면 생체 분자를 검출하는 센서로 사용될 수 있다. 즉, 특정한 생체 분자가 형광 단백질 나노입자의 영감을 유도하게 되면 이에 의해 T2 자기 공명 영상 효과가 증대된다. 이러한 차이를 이용하여 생체 분자를 검출한다.
- [0065] 또한, 본 발명의 형광 단백질 나노입자는 종양과 관련된 다양한 질병, 예를 들어 편평상피세포암, 자궁암, 자궁경부암, 전립선암, 두경부암, 췌장암, 뇌종양, 유방암, 간암, 피부암, 식도암, 고환암, 신장암, 대장암, 직장암, 위암, 신장암, 방광암, 난소암, 담관암, 담낭암을 진단 및/또는 치료하는데 이용될 수 있다. 또한, 류마티스 관절염, 골관절염과 같은 염증성 질환과, 치매, 뇌졸중 등을 포함하는 난치성 질환에서 영상화하는 방법

에 이용될 수 있다. 보다 구체적으로 설명하면, 종양 세포는 정상 세포에서는 거의 또는 전혀 생산되지 않는 특정 물질을 발현 및/또는 분비하는데 이들을 일반적으로 "종양 마커(tumor marker)"라고 명명한다. 그러한 종양 마커와 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 상기 형광 단백질 나노입자에 결합시켜 만든 형광 단백질 나노입자는 종양 진단에 유용하게 이용될 수 있다. 당업계에는 다양한 종양 마커뿐만 아니라 이들과 특이적으로 결합할 수 있는 물질이 공지되어 있다. 본 발명에서는 표적 지향성 펩타이드로 종양 마커와 특이적으로 결합할 수 있는 펩타이드를 사용함으로써 종양 진단에 이용될 수 있다.

[0066] 상기 종양 마커는 작용 기작에 따라 리간드, 항원, 수용체, 및 이들을 코딩하는 핵산으로 분류할 수 있다. 종양 마커가 "리간드"인 경우에는 상기 리간드와 특이적으로 결합하는 수용체 또는 항체를 표적 지향성 펩타이드로 사용할 수 있고, 수용체의 예로는 시냅토타그민의 C2(synaptotagmin의 C2)와 포스파티딜세린, 아넥신 V(annexin V)와 포스파티딜세린, 인테그린(integrin)과 이의 수용체, VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor)와 이의 수용체, 안지오포이에틴(angiopoietin)과 Tie2 수용체, 소마토스타틴(somatostatin)과 이의 수용체, 바소인테스티널 펩타이드(vasointestinal peptide)와 이의 수용체 등이 있지만 이에 제한되는 것은 아니다.

[0067] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 형광 단백질 나노입자; 및 진단 프로브를 포함하고, 상기 진단 프로브는 영상 관독을 위한 표지 물질인 다중 진단 프로브에 관한 것이다.

[0068] 상기 진단 프로브는 T1 자기공명 영상 진단 프로브, 광학 진단 프로브, CT 진단 프로브, 또는 방사선 동위원소 등을 사용할 수 있다.

[0069] 상기 다중 진단 프로브는 예를 들면, 단백질 나노입자에 T1 자기공명 영상 진단 프로브를 결합시키면 T2 자기공명영상 및 T1 자기공명영상 진단을 동시에 진행할 수 있고, 광학 진단 프로브를 결합시키면 자기공명 영상과 광학 이미징을 동시에 할 수 있으며, CT 진단 프로브를 결합시키면 자기공명영상과 CT 진단을 동시에 할 수 있다. 또한 방사선 동위원소와 결합시키면 자기공명영상과 PET, SPECT 진단을 동시에 할 수 있다.

[0070] 상기 T1 자기공명 영상 진단 프로브로는 Gd 화합물, 또는 Mn 화합물 등을 포함하며, 광학 진단 프로브로는 유기 형광 염료(dye), 양자점, 또는 염료 표지(dye labelled) 무기 지지체(예 SiO_2 , Al_2O_3)를 포함하며, CT 진단 프로브로는 I(요오드) 화합물, 또는 금 나노 입자를 포함하고, 방사선 동위원소로는 In, Tc, 또는 F 등을 포함한다.

[0071] 본 발명은 또한 자기조립성 단백질에 형광물질이 결합된 10 내지 50 nm 크기의 형광 단백질 나노입자; 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하고, 상기 형광 단백질 나노입자는 B형 간염 바이러스 코어 단백질, 페리틴 중쇄 단백질(Ferritin Heavy chain), 써모플라즈름 애시도필름(*Thermoplasma acidophilum*) 유래의 프로테아좀(tPTS) 또는 대장균 유래의 DNA 결합 단백질(eDPS)을 포함하는 자기조립성 단백질로부터 자기조립된 단백질 나노입자에 형광물질을 표면 결합시켜 제조된 것인, 생체 이미징용 조성물에 관한 것이다.

[0072] 표적 지향성 펩타이드를 표면 표출하지 않은 본 발명의 형광 단백질 나노입자는 그 자체의 크기와 구조의 특성만으로 특정 조직이나 질환을 타겟팅할 수 있다. 예컨대, 형광 단백질 나노입자를 이용하여 감시림프절(Sentinel lymphnode) 이미징에 적용할 수 있다.

[0073] 감시림프절 생검은 유방암이나 흑색종 등의 암의 전이 여부를 판단하는데 널리 사용되는 방법이다. 감시림프절은 고형암에서 가장 가까운 림프절을 지칭하는 용어로, 감시림프절을 적출하여 그 안에 암세포의 유무를 확인함으로써 암세포의 전이 여부를 진단한다. 이때 정확한 감시림프절을 찾아내는 것이 매우 중요한데, 림프절은 주변 조직, 특히 지방과 육안으로 구분하기 어려울 뿐 아니라, 특히 여러 림프절이 림프관을 따라 존재하므로 종양에서 가장 가까이 존재하는 감시 림프절을 구분하는데 어려움이 있다. 기존에 감시림프절을 찾는 데 사용되는 이소설파블루(Isosulfan blue)는 일부 환자에서 과민성 쇼크를 유발한다고 알려져 있으며 실제 감시림프절에 머무르는 시간이 짧고 다음 림프절로 쉽게 이동하는 단점이 있다. 반면 방사성 물질 테크네튬(Technetium(Tc) 99m-labeled colloid)은 시료를 주사한 부위에서 림프절로 이동하는데 오랜 시간이 소요되는 단점이 있다.

[0074] 본 발명에서는 감시림프절 이미징에 적절하다고 알려진 10 내지 50 nm 크기의 형광 단백질 나노입자를 이용하여 감시림프절 이미징에 적용하였으며 그 효용성을 검증하였다.

[0075] 그 결과, 크기가 다른 4개의 형광 단백질 나노입자, eDPS, tPTS, FTN-h, HBVcAg 나노입자를 동물 모델의 앞발에

주사하였을 때 주사한 부위로부터 가장 가까운 림프절에 형광 단백질 나노입자가 축적되는 것을 확인하였다. 주사한 즉시 감시림프절에서 표지 신호가 특정될 뿐 아니라 1시간 이상으로 표지 신호가 유지되며 다른 림프절로 확산되지 않는 것을 통해, 형광 단백질 나노입자가 감시림프절을 타겟팅하는데 매우 효과적임을 검증하였다. 특히, tPTS 나노입자의 경우 다른 입자에 비해 가장 높은 감시림프절 타겟팅 효율을 보였으며, 이는 표적 지향성 펩타이드가 없이도 단백질 나노입자 고유의 크기나 구조적 특성이 특정 조직을 타겟팅하여 이미징하는 소재로 활용될 수 있음을 보여준다.

[0076] 따라서, 표적 지향성 펩타이드를 표출하지 않으나 일정 크기나 구조적 특성을 갖는 단백질 나노입자는 감시림프절 인 비보 이미징에 적합한 소재일 수 있다.

[0077] 상기 형광 단백질 나노입자는 입자 크기가 10 내지 50 nm가 되도록 자기조립성 단백질을 자기조립한 후 형광물질로 표면 수식하여 제조한 것일 수 있다.

[0078] 상기 자기조립성 단백질로, B형 간염 바이러스 코어 단백질, 페리틴 중쇄 단백질(Ferritin Heavy chain), 썬모플라즈마 애시도필룸(*Thermoplasma acidophilum*) 유래의 프로테아좀(tPTS) 또는 대장균 유래의 DNA 결합 단백질(eDPS) 등을 사용할 수 있다.

[0079] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0080] <실시예 1> HBV 캡시드 유래 키메라 형광 나노입자의 제조

[0081] (HBV 캡시드 유래 키메라 형광 나노입자의 생합성을 위한 발현 벡터 제조)

[0082] 하기 표 1에 기재된 프라이머를 사용한 PCR 후에, HBV 코어 단백질(HBVcAg) 유전자로부터 유래한 N-NdeI-HBVcAg(1-78)-XhoI-C 및 N-BamHI-HBVcAg(81-149)-HindIII-C의 합성을 코딩하는 두 유전자 클론을 얻었다. 또한, 형광단백질(enhanced green fluorescent protein; eGFP 또는 red fluorescent protein; DsRed)로 HBVcAg의 P79A80를 대체하기 위하여, 4가지의 다른 클론, 5' -XhoI-hexahistidine-EGFP-BamHI-3' , 5' -XhoI-hexahistidine-DsRed-BamHI-3' 와 링커 펩타이드(G3SG3TG3SG3)가 삽입된 5' -XhoI-hexahistidine-linker-eGFP-linker-BamHI-3' 와 5' -XhoI-hexahistidine-linker-DsRed-linker-BamHI-3' 를 PCR 또는 extension PCR을 이용하여 제조하였다. 플라스미드 pT7-7에 상기 유전자 클론의 일련의 라이게이션을 통하여, A) N-HBVcAg(1-78)-His6-eGFP-HBVcAg(81-149)-C, B) N-HBVcAg(1-78)-His6-DsRed-HBVcAg(81-149)-C, C) N-HBVcAg(1-78)-His6-linker-eGFP-linker-HBVcAg(81-149)-C 및 D) N-HBVcAg(1-78)-His6-linker-DsRed-linker-HBVcAg(81-149)-C의 합성을 코딩하는 4개의 플라스미드 발현 벡터 pT7-형광단백질-HBVcAg를 구축하였다(도 1). 제작된 모든 플라스미드 발현 벡터는 젤-정제 후 완전한 DNA 시퀀싱을 통해 서열을 확인하였다.

[0083] HBV 캡시드 유래 키메라 나노입자의 제조와 관련된 프라이머 서열(표 1)과 주형에 대한 정보 및 이에 대한 좀 더 상세한 기재는 아래와 같다.

표 1

서열 번호	명칭	클론 명칭	5'-3'방향
SEQ ID No. 1	프라이머1	5' NdeI-HBVcAg1	CATATGGACATTGACCGTATAAAGA
SEQ ID NO. 2	프라이머2	3' XhoI-HBVcAg78	CTCGAGGTCTTCCAAATTACTTCCCA
SEQ ID NO. 3	프라이머3	5' BamHI-HBVcAg81	GGATCCTCCAGGAATTAGTAGTCAGC
SEQ ID NO. 4	프라이머4	3' HindIII-HBVcAg149	AAGCTTTTAAACAACAGTAGTTCCGGAAGTGT
SEQ ID NO. 5	프라이머5	5' XhoI-H6-eGFP	CTCGAGCATCACCATCACCATCACGTGAGCAAGGGCGAG

SEQ ID NO. 6	프라이머6	3' BamHI-eGFP	GGATCCCTGTACAGCTCGTCCATGCC
SEQ ID NO. 7	프라이머7	5' XhoI-H6-DsRed	CTCGAGCATCACCATCACCATCACGACAACACCGAGGAC
SEQ ID NO. 8	프라이머8	3' BamHI-DsRed	GGATCCCTGGGAGCCGGAGTGGCG
SEQ ID NO. 9	프라이머9	5' linkerN-eGFP	GGCTCTGGTGGCGGAAGTGGGGGTGGCGTGAGCAAGGGCGAG
SEQ ID NO. 10	프라이머10	3' linkerC-eGFP	AGAGCCACCCCACTTCCGCCACCCTGTACAGCTCGTCCAT
SEQ ID NO. 11	프라이머11	5' linkerN-DsRed	GGCTCTGGTGGCGGAAGTGGGGGTGGCGACAACACCGAGGAC
SEQ ID NO. 12	프라이머12	3' linkerC-DsRed	AGAGCCACCCCACTTCCGCCACCCTGGGAGCCGGAGTGGCG
SEQ ID NO. 13	프라이머13	5' XhoI-Hs-linkerN1	GGTGGCGGAAGTGGGGGTGGCTCTGGTGGCGGAAGT
SEQ ID NO. 14	프라이머14	5' XhoI-Hs-linkerN2	CTCGAGCATCACCATCACCATCACGGTGGCGGAAGTGGG
SEQ ID NO. 15	프라이머15	3' BamHI-linkerC	GGATCCGCCACCCCACTTCCGCCACCAGAGCCACCCCACT
SEQ ID NO. 16	프라이머16	5' NRGD-F-1	GAGGCGGTTCGGGCGGAGGTTCTGGTGGCGGAACACCGCGTCCACC
SEQ ID NO. 17	프라이머17	3' HindIII H6 DsRed	AAGCTTGTGATGGTGTGAGATGCTGGGAGCCGGAGTGG
SEQ ID NO. 18	프라이머18	5' NRGD-C-1	GAGGCGGTTCGGGCGGAGGTTCTGGTGGCGGAGACATTGACCCGTATAA
SEQ ID NO. 19	프라이머19	5' NdeI NRGD	CATATGGGACGTGGTGTAGCGGCGGAGGGTCTGGAGGCGGTTCGGCG

- [0085] 1) 첫 번째 부분은 HBV 코어 단백질의 유전자 서열(NCBI Nucleotide accession number: AF286594 서열 중 1901-2452 서열)을 주형으로 하여 제한 효소 *NdeI*이 포함되어 있는 프라이머 1과 *XhoI*을 포함하고 있는 프라이머 2를 이용하여 PCR을 진행하였다. 그 결과 5' '-NdeI-HBV 코어 단백질(아미노산 서열 1-78)-XhoI-3' 으로 이루어진 PCR 산물을 확보하였다.
- [0086] 2) 두 번째 부분은 HBV 코어 단백질의 유전자 서열을 주형으로 하여 제한 효소 *BamHI*이 포함되어 있는 프라이머 3과 *HindIII*를 포함하고 있는 프라이머 4를 이용하여 PCR 을 진행하였다. 그 결과 5' '-BamHI-HBV 코어 단백질(아미노산 서열 81-149)-HindIII-3' 으로 이루어진 PCR 산물을 확보하였다.
- [0087] 3) 세 번째 부분은 eGFP(또는 DsRed)의 염기서열을 주형으로 하여(NCBI Nucleotide accession number of eGFP: AJ566337, NCBI Nucleotide accession number of DsRed: EU827527) *XhoI*과 hexahistidine을 포함하고 있는 프라이머 5(또는 프라이머 7), *BamHI*을 포함하는 프라이머 6(또는 프라이머 8)을 이용하여 PCR을 수행하였다. 5' -XhoI-His6-eGFP-BamHI-3' 제작을 위해서 프라이머 5와 6을 이용하였으며, 5' -XhoI-His6-DsRed-BamHI-3' 제작을 위해서 프라이머 7과 8을 이용하였다.
- [0088] 4) 네 번째 부분은 eGFP(또는 DsRed)의 염기서열을 주형으로 하여 링커서열(아미노산 서열 G3SG3TG3SG3)을 포함하고 있는 프라이머 9 및 10 (eGFP) 또는 프라이머 11 및 12 (DsRed)을 이용하여 PCR을 수행한 후, 합성된 PCR 산물을 다시 주형으로 하여 프라이머 13 및 15를 이용하여 확장 PCR을 수행하였다. 합성된 PCR 산물을 주형으로 다시 프라이머 14 및 15를 이용하여 이차 확장 PCR을 수행하였으며, 그 결과 5' '-XhoI-His6-linker(G3SG3TG3SG3)-eGFP-linker(G3SG3TG3SG3)-BamHI-3', 5' '-XhoI-His6-linker(G3SG3TG3SG3)-DsRed-linker(G3SG3TG3SG3)-BamHI-3'으로 이루어진 PCR 산물을 확보하였다.
- [0089] 이렇게 만들어진 6개의 PCR 산물을 순차적으로 pT7-7 벡터에 삽입하여 HBV 캡시드 유래 키메라 형광 나노입자를 합성할 수 있는 발현 벡터를 구성하였다. 또한, 형광 단백질 나노입자의 형광 강도 개선을 위하여 형광단백질과 코어 단백질 사이에 링커를 삽입한 발현벡터를 제조하였다(도 1).
- [0090] 본 발명에서 구축한 발현 벡터를 통해 제조하고자 하는 형광 단백질 나노입자의 모식도는 도 2와 같다.

- [0091] (HBV 캡시드 유래 키메라형 형광 나노입자의 생합성 및 분리정제)
- [0092] 대장균 균주 BL21(DE3)[F-ompThsdSB(rB-mB-)]를 상기 제조된 발현 벡터로 각각 형질전환하고, 앰피실린-저항성 형질전환체를 선택하였다. 형질전환된 대장균을 50 mL의 Luria-Bertani(LB) 배지(100 mg L-앰피실린 함유)를 함유하는 플라스크(250 mL Erlenmeyer flasks, 37 °C, 150 rpm)에서 배양하였다. 배지 탁도(OD_{600})가 약 0.6-0.7에 도달할 때, IPTG(Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) (0.7 mM)를 첨가하여 재조합 유전자의 발현을 유도하였다.
- [0093] 20 °C에서 16~18 시간 배양 후, 배양한 대장균을 4,500 rpm으로 10분간 원심 분리하여 균체 침전물을 회수한 후 5 mL의 파쇄 용액(10 mM Tris-HCl 완충액, pH 7.5, 10 mM EDTA)에 현탁하여 초음파 파쇄기(Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT, USA)를 이용하여 파쇄하였다. 파쇄한 후 13,000 rpm으로 10분간 원심분리한 뒤 상등액과 불용성 응집체를 분리하였다.
- [0094] 분리된 상등액에 대해 자가조립된 형광단백질이 용합된 단백질 나노입자를 정제하기 위하여 3단계의 정제 과정을 거쳐 진행하였다.
- [0095] 먼저 1) 재조합 단백질에 용합 발현된 히스티딘과 니켈의 결합을 이용한 Ni^{2+} -NTA 친화성 크로마토그래피(Ni^{2+} -NTA affinity chromatography)를 진행한 후, 2) 재조합 단백질의 자가조립 효율을 향상시키기 위하여 Ultracentrifugal filter (Amicon Ultra 100K, Millipore, Billerica, MA)를 이용하여 재조합 단백질이 포함된 수용액을 조성이 다른 자가조립용 버퍼(500mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 7.0)로 변경해 줌과 동시에 재조합 단백질을 농축하였으며, 3) 마지막으로 자가조립된 단백질 나노입자만을 분리하기 위하여 수크로스 구배 초고속 원심분리(sucrose gradient ultracentrifugation)를 진행하였다. 각 단계별 상세한 기제는 아래와 같다.
- [0096] 1) Ni^{2+} -NTA 친화성 크로마토그래피
- [0097] 재조합 단백질을 정제하기 위하여 상기 명시된 동일한 방법으로 배양된 대장균을 회수하여 그 세포 펠렛을 5 mL 라이시스 버퍼(pH 8.0, 50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole)에 재부유하고 초음파 파쇄기를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 세포액을 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 그 상등액만 분리한 후 각 재조합 단백질을 Ni^{2+} -NTA 컬럼(Qiagen, Hilden, Germany)을 사용하여 각각 분리하였다(세척 버퍼: pH 8.0, 50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, 80 mM imidazole / 용출 버퍼: pH 8.0, 50 mM sodium phosphate, 300mM NaCl, 200 mM imidazole).
- [0098] 2) 자가조립 촉진을 위한 버퍼 변경 및 농축
- [0099] Ni^{2+} -NTA 친화성 크로마토그래피를 거쳐 용출된 3 mL의 재조합 단백질을 Ultracentrifugal filter(Amicon Ultra 100K, Millipore, Billerica, MA)에 담아 5,000 g로 10분간 원심분리한 후 컬럼 상부를 자가조립용 버퍼(500 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.0)로 가득 채운 후 컬럼 위에 500 μ L의 용액이 남을 때까지 5,000 g로 원심분리를 진행하였다. 이를 3회 반복한 후 최종 부피를 1 mL로 맞춘 후 아래 단계를 진행하였다.
- [0100] 3) 수크로스 구배 초고속 원심 분리
- [0101] 자가조립용 버퍼에 수크로스를 농도별로 각각 첨가하여 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%의 수크로스를 포함하는 용액을 각각 준비한 후 초고속 원심 분리용 튜브(ultraclear 13.2 mL tube, Beckman)에 각 농도별(60~20%) 수크로스 용액을 농도가 높은 용액부터 2 mL씩 담았다. 마지막으로 10% 수크로스 용액을 0.5 mL 담은 후 상기 준비된 자가조립용 버퍼에 존재하는 재조합 단백질 용액을 1 mL 채운 후 24,000 rpm으로 12시간 동안 20 °C로 초고속 원심분리를 시행하였다(Ultracentrifuge L-90k, Beckman). 원심분리 후 조심스럽게 피펫을 이용하여 위 층(10~30% 수크로스 용액 부분)을 없애주고 40~60% 수크로스 용액 부분을 2)에 명시된 바와 같이 ultracentrifugal filter와 자가조립용 버퍼를 이용하여 재조합 단백질의 버퍼를 교체해 주었다.
- [0102] (HBV 캡시드 유래 키메라형 형광 나노입자의 구조 분석)
- [0103] 상기 과정을 거친 후 정제된 재조합 단백질 나노입자의 구조 분석을 위하여 투과전자현미경(TEM)으로 재조합 단

백질 나노입자를 촬영하였다. 먼저 염색하지 않은 정제한 단백질 샘플을 탄소 코팅된 구리 전자 현미경 그리드(grids)에 올린 후 자연 건조하였다. 단백질 나노입자의 염색된 이미지를 얻기 위해, 자연 건조된 샘플을 포함하는 전자 현미경 그리드를 2%(w/v) 수성 우라닐 아세테이트 용액과 함께 10분 동안 실온에서 인큐베이션하고, 증류수로 3-4회 세척하였다.

[0104] 단백질 나노입자 이미지를 Philips Technai 120 kV 전자 현미경을 이용하여 관찰한 결과 형광단백질이 표면 표출된 30 내지 35 nm의 구형 나노입자가 형성된 것을 확인하였으며 그 결과는 도 3과 같다.

[0105] <실험예 1> HBV 캡시드 유래 키메릭 형광 나노입자와 페리틴 유래 키메릭 형광 나노입자의 형광 측정

[0106] 상기 실시예 1에서 제조한 4개의 HBV 캡시드 유래 키메릭 형광 나노입자:

[0107] gFCNP(w/o linker) : N-HBVcAg(1-78)-His6-eGFP-HBVcAg(81-149)-C,

[0108] rFCNP(w/o linker) : N-HBVcAg(1-78)-His6-DsRed-HBVcAg(81-149)-C,

[0109] gFCNP(w/ linker): N-HBVcAg(1-78)-His6-linker-eGFP-linker-HBVcAg(81-149)-C, 및

[0110] rFCNP(w/ linker) : N-HBVcAg(1-78)-His6-linker-DsRed-linker-HBVcAg(81-149)-C

[0111] 기존에 본 발명자가 출원한 출원번호 US13/487,921, KR2011-0128615에서 제조한 4개의 페리틴 유래 키메릭 형광 나노입자:

[0112] gFFNP(w/o linker) : N-Ferritin-eGFP-H6-C,

[0113] rFFNP(w/o linker) : N-Ferritin-DsRed-H6-C,

[0114] gFFNP(w/ linker) : N-Ferritin-linker-eGFP-H6-C, 및

[0115] rFFNP(w/ linker) : N-Ferritin-linker-DsRed-H6-C

[0116] 의 형광 세기를 측정 및 나노입자당 형광 세기를 비교하기 위하여 eGFP 단량체, DsRed 단량체, 페리틴 유래 키메릭 형광 나노입자, 캡시드 유래 키메릭 형광 나노입자를 각각 준비하여 블랙 96-웰 플레이트(black 96-well plate(Nunc, Roskilde, Denmark))에 1 pmole(단백질 나노입자 기준) 씩 담아 형광을 측정하였다. eGFP 단량체 및 eGFP 융합 단백질 나노입자의 형광 측정은 $\lambda_{ex} = 485 \text{ nm} / \lambda_{em} = 535 \text{ nm}$ 로, DsRed 단량체 및 DsRed 융합 단백질 나노입자의 형광 측정은 $\lambda_{ex} = 550 \text{ nm} / \lambda_{em} = 590 \text{ nm}$ 에서 GENios (Tecan, Austria)을 이용하여 각각 3번씩 측정하였다.

[0117] 도 4에 나타난 바와 같이, 단량체나 페리틴 융합 형광단백질에 비해 HBVcAg 캡시드 융합 형광단백질이 단백질 나노입자당 표출된 형광단백질의 수의 증대로 인해 높은 형광 세기를 나타낸 것을 확인하였다. 또한 링커가 삽입된 경우 형광 세기가 증가하였는데, 이는 링커를 삽입함으로써 단백질 나노입자 표면에 고밀도로 표출된 형광단백질 간의 퀸칭(quenching) 현상이 해소되었기 때문이다. 링커를 삽입하지 않았을 때에도 형광단백질 단량체에 비해 현저히 증폭된 형광강도를 보이는 것을 확인하였으며, 링커를 삽입함으로써 최적의 형광 단백질 나노입자를 제조하였다.

[0118] <실험예 2> 인 비트로에서 HBV 캡시드 유래 키메릭 형광 나노입자의 안정성 검증

[0119] 상기 실시예 1에서 제조한 형광 단백질 나노입자(gFCNP, rFCNP w/ linker)의 구조적, 기능적 안정성 유지 여부를 확인하기 위하여 eGFP, DsRed 단량체와 비교 실험을 진행하였다. eGFP, DsRed, gFCNP, rFCNP를 각각 1 nM을 최종 부피가 100 μl 이 되도록 PBS에 준비하여 37 °C에서 30분 간격으로 3.5시간 동안 형광 강도를 측정, 비교하였다.

[0120] 또한 동일한 형광단백질을 5 nM이 되도록 30%, 50%의 인간 혈청(Cat. No. H4522, Sigma-Aldrich) 100 μl 에 혼합하여 30분 간격으로 상기 실험예 1의 방법대로 형광 세기 변화를 측정하였다.

[0121] 도 5에 나타난 바와 같이, 형광단백질 단량체는 3.5시간 이후 초기 형광값의 20% 이하로 형광 세기가 감소했지만, 형광 단백질 나노입자의 경우 시간이 지나도 초기 형광값의 80% 이상이 유지되는 것을 확인하였다.

[0122] 또한, 도 6에 나타난 바와 같이, 형광단백질 단량체는 혈청에 혼합 후 1시간 이내에 초기 형광의 절반 이하로

형광 세기가 감소하였으나, 형광 단백질 나노입자는 5시간 동안 60% 이상의 형광 세기를 유지하는 것을 확인하였다.

[0123] 이는 형광단백질 단량체의 경우 혈청 내에서 안정성이 낮으므로 생체 진단에 적용하기에 제약이 있으나 형광단백질을 단백질 나노입자에 융합 발현할 경우, 안정성이 향상되어 생체 진단에 적용 가능함을 보여준다.

[0124] 또한 형광물질을 생체 진단에 이용하는데 제한점인 광원 노출에 대한 광안정성(photostability)을 비교하였다. 형광단백질이나 형광염료 등은 반복된 광원에 노출될 경우 광퇴색(photobleaching)에 의해 형광기능을 소실하는 단점이 있다. 형광물질을 생체 진단에 활용할 경우 시간별로, 조직별로 반복해서 형광 신호를 검출하므로 광원 노출에 대한 안정성이 보장되어야만 생체 진단에 적용가능하다.

[0125] 생명공학분야에서 널리 사용되고 있는 형광 물질인 FAM과 광퇴색에 대해 안정성이 뛰어나다고 알려져 있는 퀀텀닷(FAM, Genotech, Quantum dot(Qdot655/CdSe, invitrogen)을 대조군으로 하여 형광단백질 단량체와 형광 단백질 나노입자의 초기 형광 세기를 45,000 RFU (Relative fluorescence unit)가 되도록 조정 후 각 시료를 10 μ l 씩 슬라이드 글라스 위에 떨어뜨린 다음, 15분간 30초 간격으로 형광 현미경 (Olympus BX51)으로 관측하여 형광 변화를 비교하였다.

[0126] 그 결과 FAM을 비롯하여 형광단백질 단량체의 경우 광원에 노출되는 횟수가 증가할수록 형광 강도가 급격히 감소하지만, 형광 단백질 나노입자의 경우 퀀텀닷과 유사하게 형광 세기가 유지되는 것을 확인하였다(도 7).

[0127] 이는 형광단백질의 아미노 말단과 카르복실 말단이 단백질 나노입자(capsid)의 스파이크 부위에 융합됨으로써 형광단백질의 베타-배럴(beta-barrel) 구조가 온전히 유지되기 때문에 형광단백질의 형광단(fluorophore)이 광원에 노출되는 것을 방지하기 때문이다.

[0128] <실험예 3> 페리틴 유래 키메릭 형광 나노입자, HBV 캡시드 유래 키메릭 형광 나노입자의 생체 안정성 검증

[0129] 형광 단백질 나노입자를 생체 진단에 적용하기 위해서는 혈청 내에서 구조적, 기능적으로 안정성을 유지해야 한다. 이를 확인하기 위하여 형광단백질 단량체와 형광 단백질 나노입자를 30%, 50% 혈청에 희석한 후 시간별로 형광 세기의 변화를 비교하였다. 이를 위해, 형광단백질 단량체와 형광 단백질 나노입자를 초기 형광 세기가 40,000 RFU가 되도록 조정하여 20 μ l를 각각 BALB/cSlc-nude mice(female, 4wnfud, JAPAN SLC, Inc) 3 마리의 복부에 피하주사한 후 6시간 동안 피하에 남아 있는 물질의 형광 세기를 비교하였다. 복부 형광 이미지는 KODAK 12 bit CCD camera를 이용해 얻었으며 Excitation은 523-635 nm, Emission은 560-675 nm 형광 필터를 사용하였으며 최종적으로 550 nm/590nm에서 이미지를 촬영하였다.

[0130] 도 8에 나타난 바와 같이, 형광단백질 단량체는 주사 후 1.5 시간 이후 모두 형광을 소실한 반면 형광 단백질 나노입자는 6 시간 이후에도 형광을 나타내는 것을 확인하였다.

[0131] 이는 위에서 확인한 바와 같이 형광 단백질 나노입자는 단량체에 비해 온도, 생체 조건, 광원에 대한 구조적 안정성 유지가 가능하기 때문이다. 이는 형광 단백질 나노입자의 생체 이미징 또는 약물 전달 소재로 적합함을 입증하는 자료이다.

[0132] <실시예 2> 생체 진단용 표적 지향성 펩타이드 표출 형광 단백질 나노입자의 제조

[0133] 형광 단백질 나노입자의 인 비보 표적 타겟팅이 가능한지 검증하기 위하여 암세포 표면의 인테그린(integrin)과 특이적으로 결합한다고 알려진 RGD 펩타이드를 표출하는 형광 단백질 나노입자를 제조하였다.

[0134] 아미노 말단에 표적 지향성 펩타이드(GR_{GD}SG3SG3SG3SG)를 포함하는 형광 단백질 나노입자를 제조하기 위하여 클론번호 US13/487,921에 기재된 클론 6을 주형으로 프라이머 서열 16 및 17을 이용하여 PCR을 시행하고 합성된 PCR 산물을 주형으로 프라이머 서열 19, 17을 이용하여 확장 PCR을 수행하였다. 마찬가지로 실시예 1에서 제조한 N-HBVcAg(1-78)-His6-linker-DsRed-linker-HBVcAg(81-149)-C를 주형으로 프라이머 18, 4를 이용하여 PCR을 시행 후 합성된 PCR 산물을 주형으로 다시 프라이머 19, 4를 이용하여 확장 PCT를 수행하였다.

[0135] 그 결과 5 '-NdeI-GR_{GD}SG3SG3SG3SG-FTH-linker-DsRed-H6-HindIII-3' 과 5 '-NdeI-GR_{GD}SG3SG3SG3SG-HBVcAg(1-79)-linker-DsRed-linker-HBVcAg(81-149)-HindIII-3' 로 이루어진 PCR 산물을 확보하였으며 이를 pT7-7 벡터에 삽입하여 도 9와 같이 페리틴 기반 적색 형광 나노입자의 아미노 말단, 캡시드 기반 적색 형광 나노입자의 아미

노 말단에 RGD 펩타이드를 표출하는 나노입자 제조를 위한 발현 벡터를 제조하였다. 이를 실시예 1에 명시한 대로 발현, 정제하여 인 비보 이미징에 적용하기 위한 형광 단백질 나노입자를 확보하였다.

[0136] <실험예 4> 표적 지향성 펩타이드 표출 형광 단백질 나노입자를 이용한 생체 진단 가능성 검증

[0137] 실시예 2에서 제조한 표적 지향성 펩타이드(RGD)를 표출하는 형광 단백질 나노입자가 실제 인 비보 이미징에 적합한지 검증하기 위하여 RGD가 결합한다고 알려진 인테그린 표출 암 세포를 선정하여 암 모델을 준비하였다.

[0138] 먼저 암세포에 표적 지향성 펩타이드 융합 형광단백질이 선택적으로 업테이크 되는지 확인하기 위하여 6-웰 플레이트에 인테그린 발현 빈도가 높은 U87MG 암세포를 한 웰당 1×10^5 개를 부착시킨 후 각 1 μ M의 rFFNP, RGD-rFFNP를 37 $^{\circ}$ C, CO₂ 인큐베이터에서 1시간 동안 반응시킨 후 형광현미경을 이용하여 세포내 형광을 검정하였다. 인 비보 이미징을 위해서는 U87MG 암세포를 이식한 암모델에 각 형광 단백질 나노입자를 정맥 주사하여 IVIS 이미징 분석장비를 이용하여 형광 필터 550 nm/590nm 를 이용하여 암 부위의 형광을 측정하였다.

[0139] 도 10에 나타난 바와 같이, RGD가 융합발현된 형광 단백질 나노입자가 암세포로 업테이크 된 것을 확인하였다. 이는 RGD 펩타이드가 형광 단백질 나노입자의 표면에 효과적으로 표출되어 암세포에 특이적으로 업테이크 되는 것을 도운 것으로 생각된다.

[0140] 이후 실제 인 비보 이미징에 적용하기 위하여 인테그린 수용체 발현 빈도가 높은 U87MG 암세포를 각각 준비하여 누드 마우스에 주사 후 암을 신장 시킨 동물 모델에 형광 단백질 나노입자를 정맥 주사하였다.

[0141] 먼저 RGD가 융합된 적색형광단백질 단량체(RGD-rFFNP), RGD가 없는 페리틴 기반 적색 형광 나노입자, RGD가 융합발현된 페리틴 기반 적색 형광 나노입자(rFFNP)를 동일한 형광값을 보이도록 농도를 맞춰 정맥 주사 후 암에서의 형광단백질의 축적량을 비교하였다.

[0142] 도 11에 나타난 바와 같이, 2시간 이후에도 RGD-rFFNP에서 암에서 형광이 측정되었고, RGD가 없는 rFFNP 또한 초기 시간에 암에서 형광이 측정되나 RGD-rFFNP에 비해 낮은 형광 세기를 보이는 것을 확인하였다.

[0143] 또한 형광 재조합 단백질의 체내 분포를 분석하기 위하여 인테그린 수용체 발현 빈도가 낮다고 알려진 SCC7 암세포와 인테그린 수용체 발현 빈도가 높다고 알려진 U87MG 암세포를 준비하여 누드 마우스에 이식한 후 종양이 5-8 mm 크기가 되도록 성장시킨 후 RGD-DsRed, rFFNP, RGD-rFFNP를 동일한 형광값을 보이도록 준비하여 정맥 주사한 후 24 시간 후에 조직을 절개하여 12-bit CCD 카메라로 조직의 형광 세기를 비교하였다.

[0144] 도 12에 나타난 바와 같이, SCC7, U87MG 암 모델 모두 형광단백질 단량체는 RGD 펩타이드가 있음에도 신장을 통해 체내에서 제거되는 것을 확인하였으며, 페리틴 기반 형광 나노입자는 상대적으로 간에 주로 축적됨을 확인하였다. 이는 단백질 나노입자 기반의 형광 나노입자는 단량체에 비해 구조적 안정성이 향상되고, 체내 순환물이 향상됨을 보여주며, 형광단백질 단량체에 비해 인 비보 이미징에 적합한 소재임을 보여준다. 또한 페리틴 기반 형광 나노입자에 RGD를 융합발현 한 경우 RGD 펩타이드가 표출되지 않은 형광 나노입자에 비해 암세포에 축적되는 비율이 높아짐을 확인하였다. 이는 암세포 특이적 펩타이드를 표출한 형광 단백질 나노입자가 암세포를 특이적으로 타겟팅하며, 동시에 높은 형광 세기를 통해 이미징이 가능함을 보여준다.

[0145] <실시예 3> eDPS 및 tPTS 기반 표적 지향성 펩타이드 표출 형광 나노입자의 제조

[0146] (eDPS 및 tPTS 기반 형광 단백질 나노입자의 생합성을 위한 발현 벡터의 제조)

[0147] 표적 지향성 펩타이드를 융합 발현하지 않은 크기와 형태가 다른 형광 단백질 나노입자를 제작하여 암 타겟팅이 가능한지, 가능하다면 효율이 어떻게 달라지는지 비교하였다. 또한 상기 단백질 나노입자에 표적 펩타이드를 융합 발현할 경우 암 타겟팅 효율이 향상되는지를 검증하기 위한 실험을 진행하였다.

[0148] 이를 위해 크기와 형태가 다른 eDPS와 tPTS 나노입자를 생산하기 위한 발현 벡터를 제작하였다. 구체적으로 설명하면, 하기 표 2에 기재된 프라이머를 사용한 PCR 후에, 대장균 유전자로부터 유래한 N-NdeI-His6-eDPS-HindIII-C 및 N-NdeI-RGD-eDPS-His6-HindIII-C의 합성을 코딩하는 두 유전자 클론을 얻었다. 써모필라쿰 애시도필룸(*Thermoplasma acidophilum*) 유전자로부터 유래한 N-NdeI-tPTS α -HindIII-C, NdeI-tPTS α -RGD-HindIII-C 및 N-NdeI-tPTS β -His6-HindIII-C의 합성을 코딩하는 세 개의 유전자 클론을 얻었다. 플라스미드 pT7-7에 상기 유전자 클론의 라이게이션을 통하여, N-eDPS-His6-C, N-RGD-eDPS-His6 -C, N-tPTS β -His6-C 합성을 코딩하는 3

개의 플라스미드 발현 벡터를 구축하였다. 또한 pET28a에 상기 유전자 클론의 라이게이션을 통하여 N-tPTS α -C, N-tPTS α -RGD-C 합성을 코딩하는 3개의 플라스미드 발현 벡터를 구축하였다(도 13A). 제작된 모든 플라스미드 발현 벡터는 젤-중제 후 완전한 DNA 시퀀싱을 통해 서열을 확인하였다. 상기 단백질 나노입자의 제조와 관련된 프라이머 서열(표 2)과 주형에 대한 정보 및 이에 대한 좀 더 상세한 기재는 아래와 같다.

표 2

서열 번호	명칭	클론 명칭	5'-3- 방향
SEQ ID NO. 20	프라이머20	5' NdeI-His6-eDPS	CAT ATG cac cat cac cat cac cat AGT ACC GCT AAA TTA GTT A
SEQ ID NO. 21	프라이머21	3' HindIII-eDPS	AAG CTT TTA TTC GAT GTT AGA CTC
SEQ ID NO. 22	프라이머22	5' NdeI-eDPS	CAT ATG AGT ACC GCT AAA TTA GTT A
SEQ ID NO. 23	프라이머23	5' NdeI-RGD-eDPS	Cat atg TGC GAT TGC CGT GGT GAT TGC TTC TGC ctc gag AGTACCGCTAAATTAGTTA
SEQ ID NO. 24	프라이머24	3' HindIII-eDPS-His6	AAG CTT TTA GTG ATG GTG ATG GTG ATG TTC GAT GTT AGA CTC GAT AAAC
SEQ ID NO. 25	프라이머25	3' NdeI-tPTS α	CAT atg caa cag g gc cag atg gct
SEQ ID NO. 26	프라이머26	3' HindIII- tPTS α	AAG CTTA GAG GAA TTT TTT AAC TTC CTC CTG
SEQ ID NO. 27	프라이머27	3' HindIII- tPTS α -RGD-1	C ACG TCC GCA ATC GCA act Tcc acc gcc GAG GAA TTT TTT AAC TTC C
SEQ ID NO. 28	프라이머28	3' HindIII- tPTS α -RGD-2	Aag ctt a GCA GAA GCA ATC ACC ACG TCC GCA ATC GCA
SEQ ID NO. 29	프라이머29	5' NdeI- tPTS β	CAT ATG gcc gcg gtt ggt att aca ctg aaagacg
SEQ ID NO. 30	프라이머30	3' HindIII- tPTS β -His6	AAG CTTA ATG GTG ATG GTG ATG GTG cag aat taa tcc gag ctt c

(eDPS 및 tPTS 기반 표적 지향성 펩타이드 표출 형광 단백질 나노입자의 생합성, 정제 및 형광입자 제조)

eDPS, RGD-eDPS, tPTS 및 RGD-tPTS 나노입자의 생합성은 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 수행하였다. 다만 tPTS와 RGD-tPTS 나노입자는 알파단백질과 베타 단백질을 대장균에서 동시에 발현하기 위하여 상기에서 제작한 pT7 N-tPTS β -His6-C와 pET28a N-tPTS α -C(또는 pET28a N-tPTS α -RGD-C)를 형질전환하여 암피실린과 카나마이신을 모두 포함하는 배지에서 배양하였다. 각 단백질 나노입자의 정제는 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 수행하였다. 수크로스 원심분리 후 정제한 단백질 나노입자의 버퍼를 ultracentrifugal filter를 이용하여 0.1 M 소듐 바이카보네이트(pH 8.5)로 바꾼 후 단백질 나노입자 몰 농도의 4배에 해당하는 형광다이 Cy5.5를 섞어주고 상온에서 12시간 교반하여 반응한 후 다시 한 번 수크로스 초고속 원심분리를 통해 free-Cy5.5와 Cy5.5가 결합된 단백질 나노입자를 분리하였다. 최종 제작된 형광 단백질 나노입자의 크기와 구조를 TEM을 통해 확인하였다.

도 13B에 나타난 바와 같이, 각 형광 단백질 나노입자는 대략 9-18 nm 정도의 크기를 나타내었다.

<실험예 5> eDPS 및 tPTS 기반 표적 지향성 펩타이드 표출 형광 단백질 나노입자를 이용한 생체 진단 가능성 검증

1 μ M의 eDPS, RGD-eDPS, tPTS 및 RGD-tPTS 기반 형광 단백질 나노입자를 실험예 4와 같이 준비한 U87MG 암세포 이식 동물 모델에 정맥 주사하여 eXplore Optix System (Near-infrared fluorescence(NIRF) emission(600e700 nm)을 이용하여 시간별로 형광을 측정하였다. 또한 암에서 나타나는 형광 세기를 time-correlated single photon counting system을 이용하여 정량화한 후 그래프로 나타내어 암 타겟팅 효율을 비교하였다.

도 14A에 나타난 바와 같이, eDPS 나노입자는 간에 주로 축적되는 반면 tPTS 나노입자는 장에서 주로 관측되었으며 eDPS 나노입자 보다 tPTS 나노입자가 암 표적 펩타이드가 없음에도 암에 타겟팅이 더 잘 되는 것을 확인하였다.

[0156] 또한 eDPS, tPTS 모두 단백질 나노입자 표면에 암 표적 펩타이드가 표출되었을 때 암 타겟팅 효율이 향상됨을 확인하였다(도 14B). 이는 단백질이라는 동일한 소재로 이루어진 단백질 나노입자라 할지라도 그 크기와 형태에 따라 생체 적용시 체내 분포뿐 아니라 특정 조직에 대한 타겟팅 효율이 달라짐을 보여준다.

[0157] <실시예 4> 구조와 형태가 다른 형광 단백질 나노입자를 이용한 감시림프절 이미징

[0158] 크기와 형태가 다른 형광단백질 나노입자를 제조하여 기존 감시림프절(Sentinel lymphnode) 이미징에 적용하였다.

[0159] 이를 위해, 상기 실시예 3에서 제작한 eDPS와 tPTS 형광 단백질 나노입자와, 추가로 FTN-h, HBVcAg 기반 형광 단백질 나노입자를 제작하였다. 하기 표 3에 기재된 프라이머를 사용한 PCR 후에 N-NdeI-His6-FTN-h-HindIII-C 및 N-NdeI-His6-HBVcAg-HindIII-C의 합성을 코드하는 두 유전자 클론을 얻었다. 플라스미드 pT7-7에 상기 유전자 클론의 라이게이션을 통하여, N-His6-FTN-h-C, N-His6-HBVcAg-C 2개의 플라스미드 발현 벡터를 구축하였다. 또한 FTN-h, HBVcAg 기반 형광 단백질 나노입자를 제작하는 방법은 상기 실시예 3과 같다. 최종적으로 정제, 제작한 형광 단백질 나노입자의 형광량을 비교하여 동일한 형광 세기를 보이는 농도를 설정하고 tPTS 형광단백질 나노입자 1 μ M의 형광 세기와 동일한 형광 세기를 보이는 농도를 준비하여 정상 누드 마우스의 앞발에 20 μ l씩 피하주사하였다. 10분 간격으로 KODAK imaging station(12-bit-CCD camera) 을 이용하여 형광을 측정하였다.

표 3

서열 번호	명칭	클론 명칭	5'-3' 방향
SEQ ID NO. 31	프라이머31	5' NdeI-His6-FTN-h	CAT ATG cac cat cac cat cac cat ACGACCGCGTCCACCTCGCAGGTG
SEQ ID NO. 32	프라이머32	3' HindIII-FTN-h	aag ctt tca gct ttc att atc act gtc
SEQ ID NO. 33	프라이머22	5' NdeI-His6-HBVcAg	CAT ATG cac cat cac cat cac cat GAC ATT GAC CCG TAT AAA GAA
SEQ ID NO. 34	프라이머23	3' HindIII-HBVcAg	AAG CTT TTA AAC AAC AGT AGT TTC

[0161] 도 15에 나타난 바와 같이, 크기가 다른 4개의 형광단백질 나노입자를 제조하였으며, 이를 동물 모델의 앞발에 주사하였을 때 주사한 부위로부터 가장 가까운 림프절에 형광 단백질 나노입자가 축적되는 것을 확인하였다. 주사한 즉시 감시림프절에서 표지 신호가 특정될 뿐 아니라 1시간 이상으로 표지 신호가 유지되며 다른 림프절로 확산되지 않는 것을 통해, 형광 단백질 나노입자가 감시림프절을 타겟팅하는데 매우 효과적임을 검증하였다(도 16).

[0162] 특히, tPTS 나노입자의 경우 다른 나노입자에 비해 주사한 가장 높은 감시림프절 타겟팅 효율을 보였으며, 이는 표적 지향성 펩타이드가 없이도 단백질 나노입자 고유의 크기나 구조적 특성이 특정 조직을 타겟팅하여 이미징 하는 소재로 활용될 수 있음을 보여준다.

도면

도면1

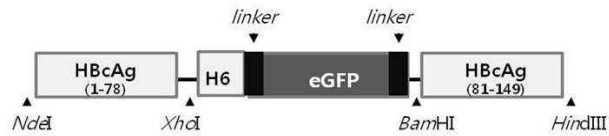
(A) N-HBVcAg(1-78)-H6-eGFP-HBVcAg(81-149)- C



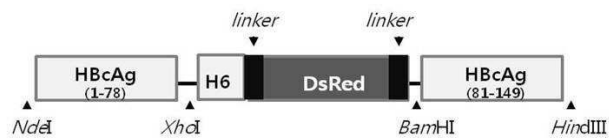
(B) N-HBVcAg(1-78)-H6-DsRed-HBVcAg(81-149)- C



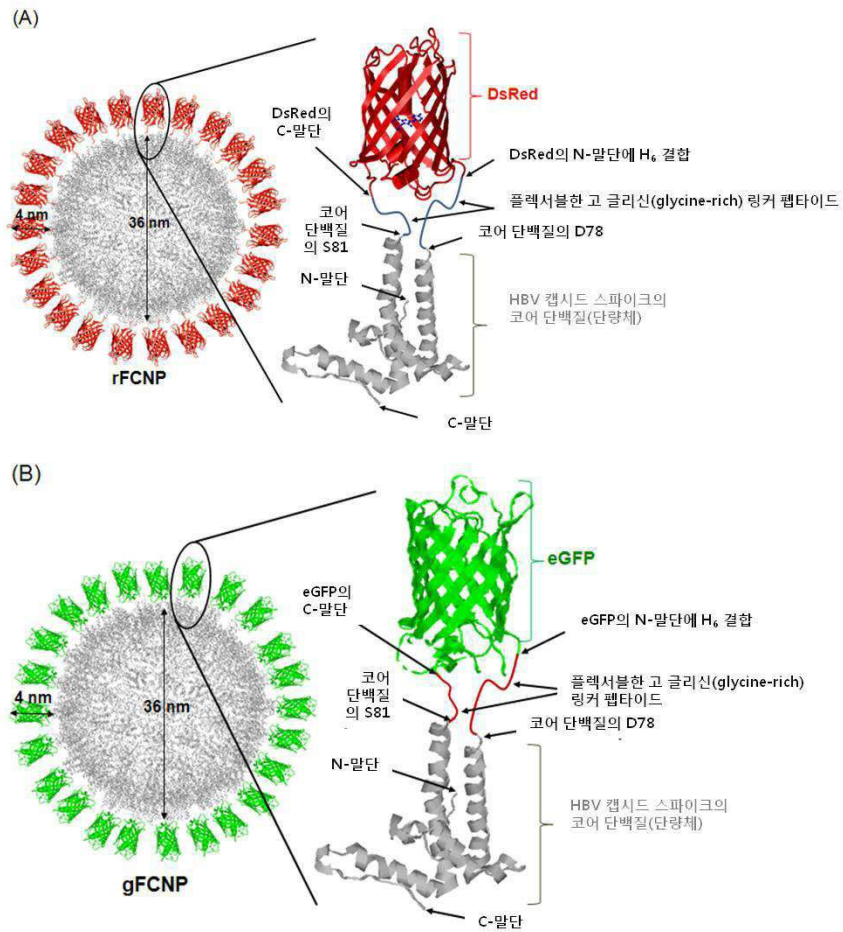
(C) N-HBVcAg(1-78)-H6-linker-eGFP-linker-HBVcAg(81-149)-C



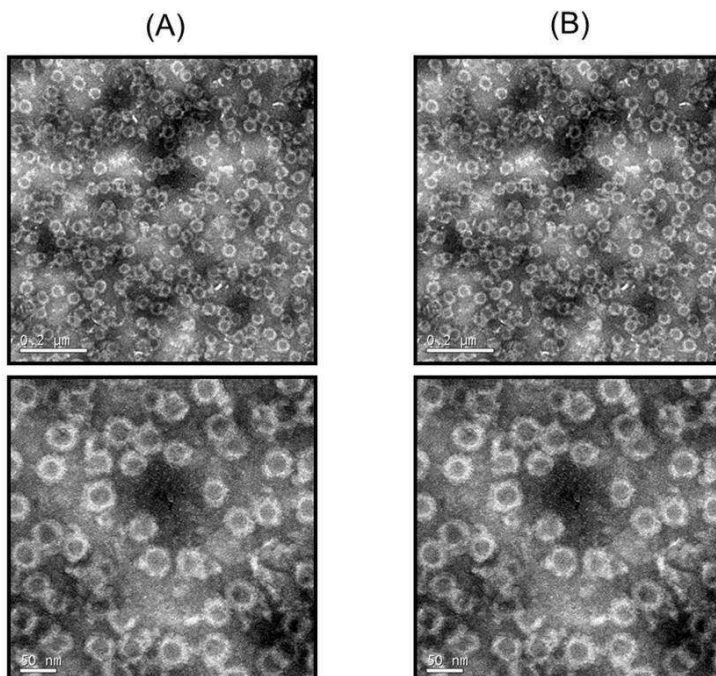
(D) N-HBVcAg(1-78)-H6-linker-DsRed-linker-HBVcAg(81-149)-C



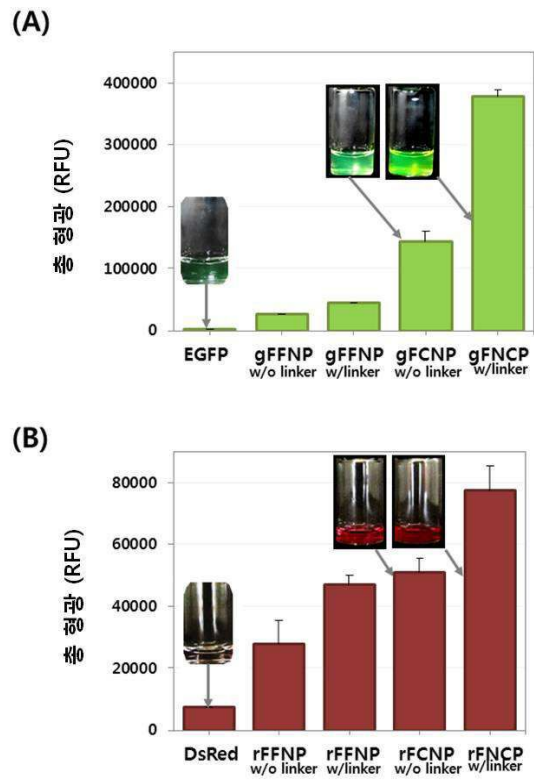
도면2



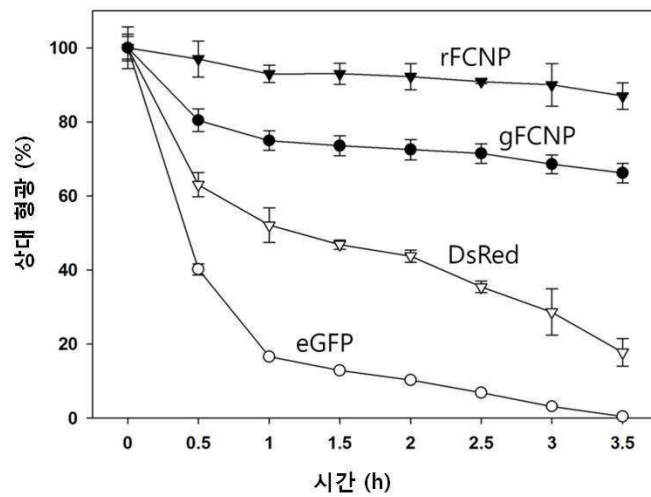
도면3



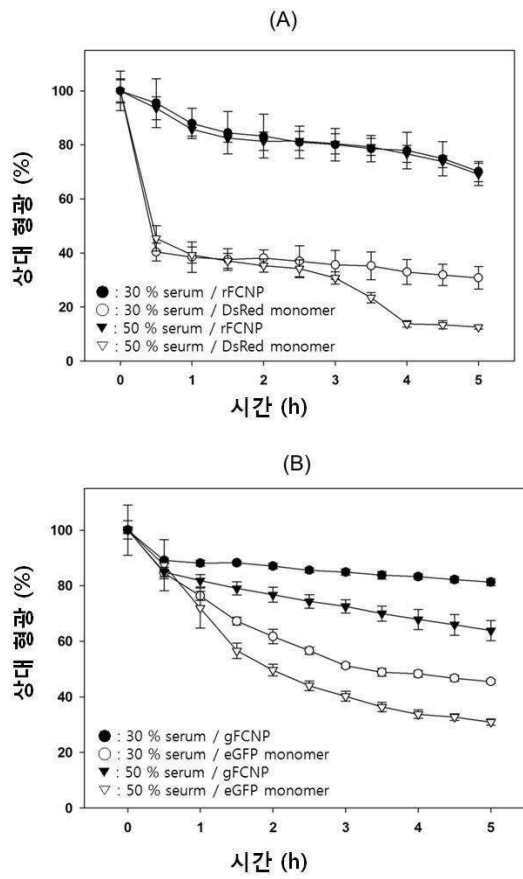
도면4



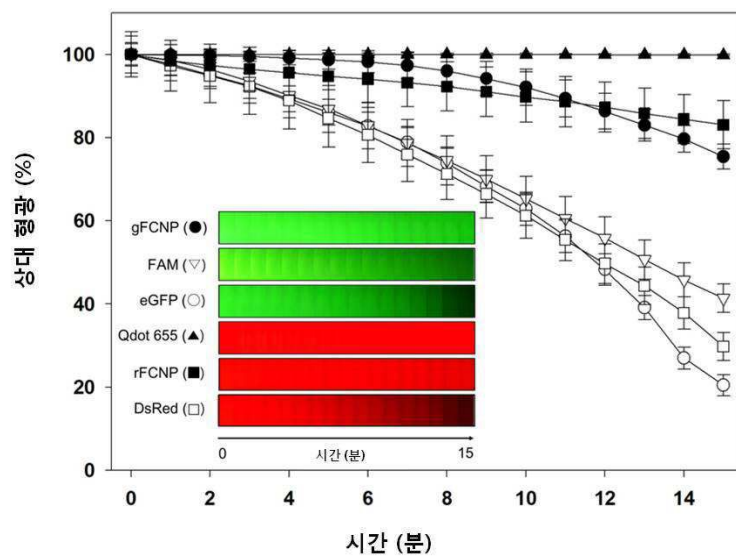
도면5



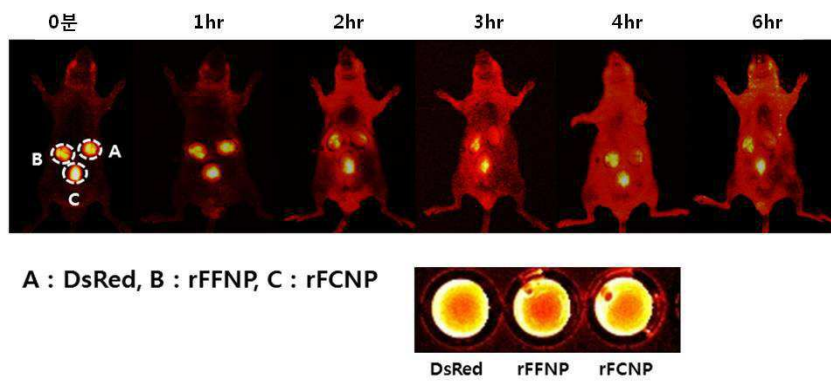
도면6



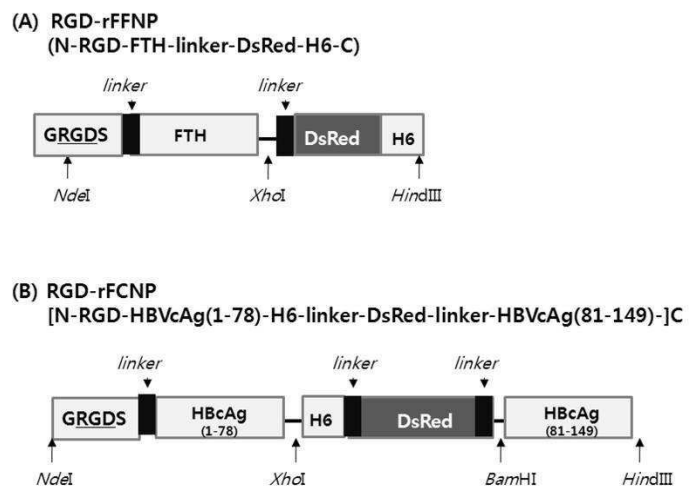
도면7



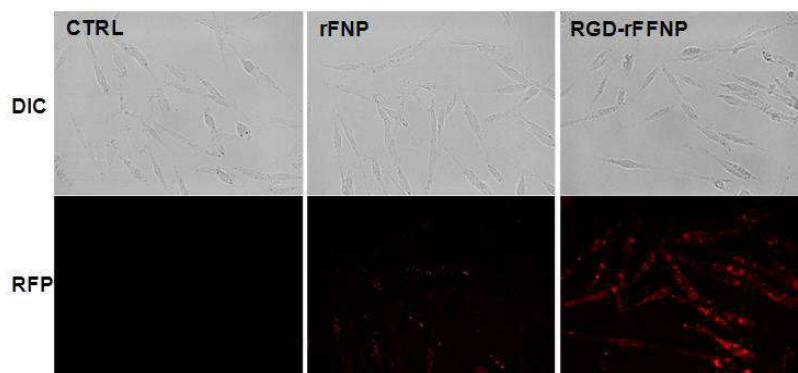
도면8



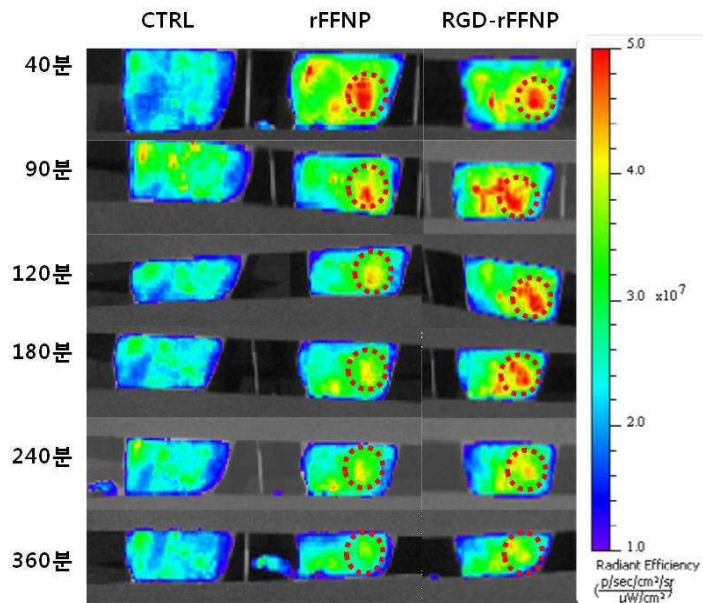
도면9



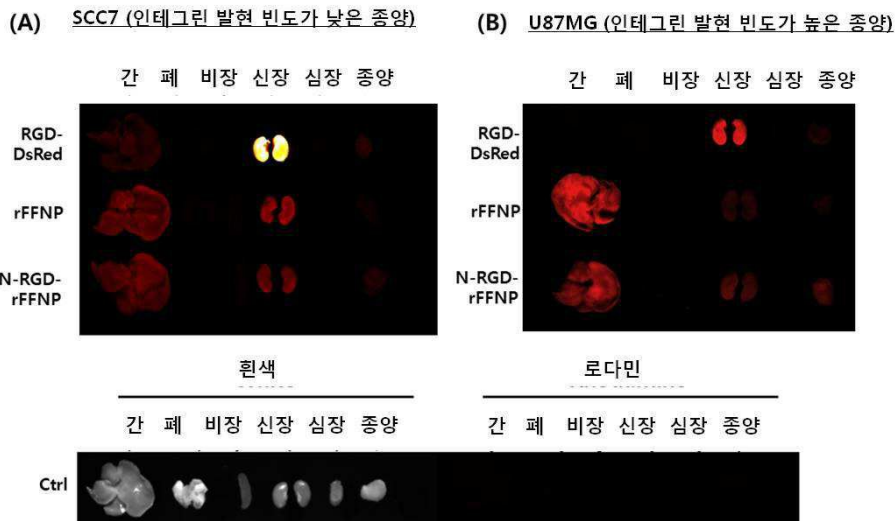
도면10



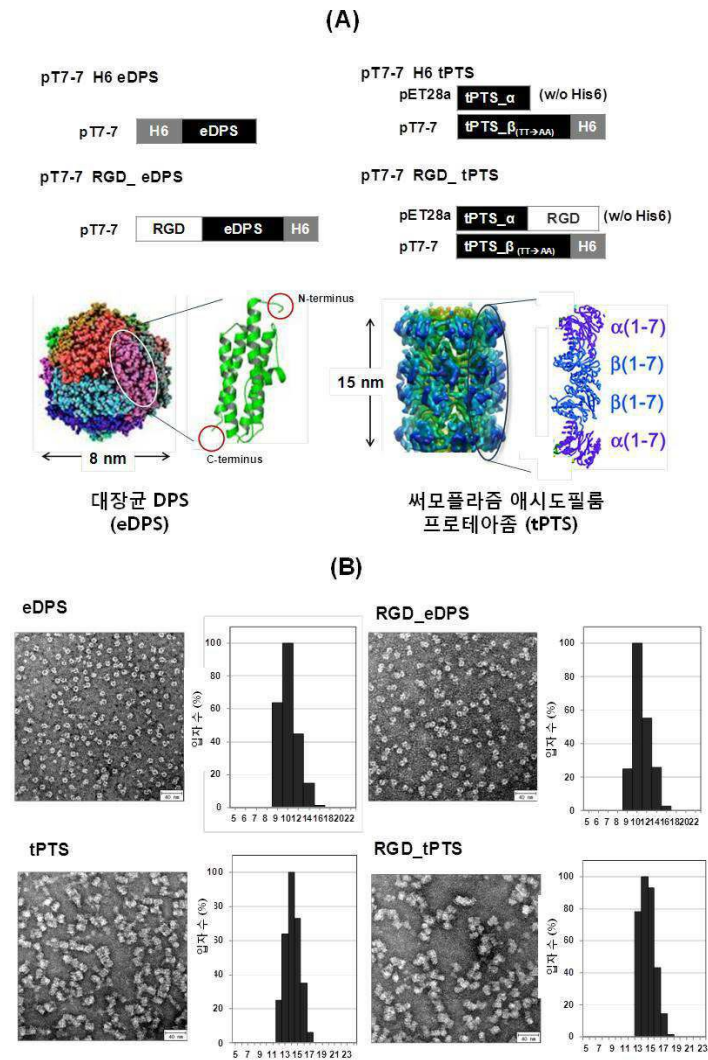
도면11



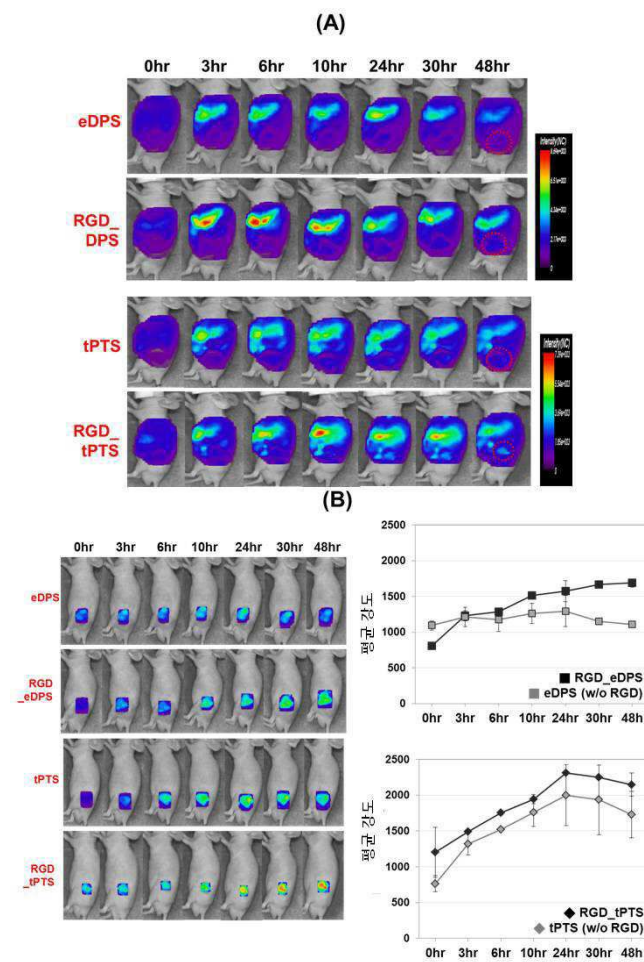
도면12



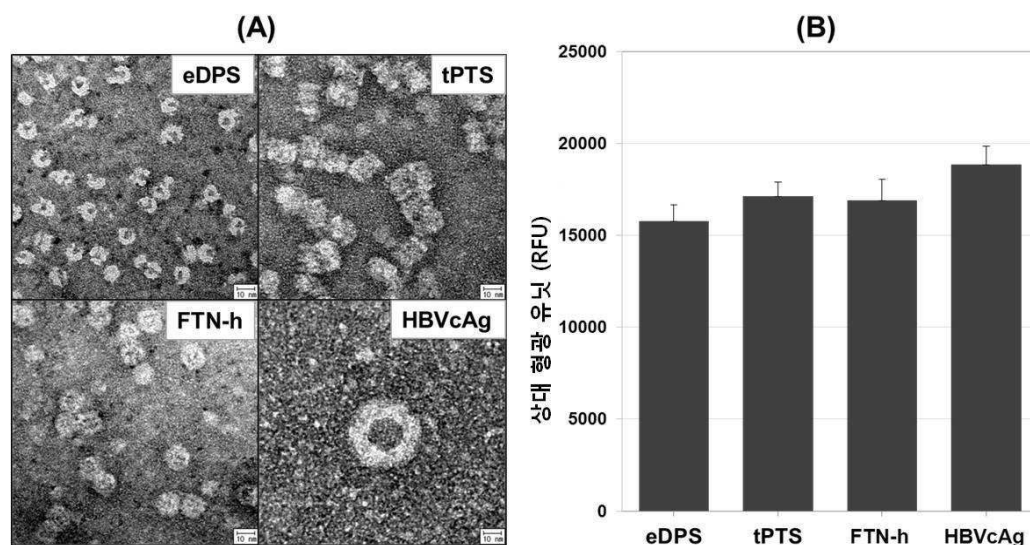
도면13



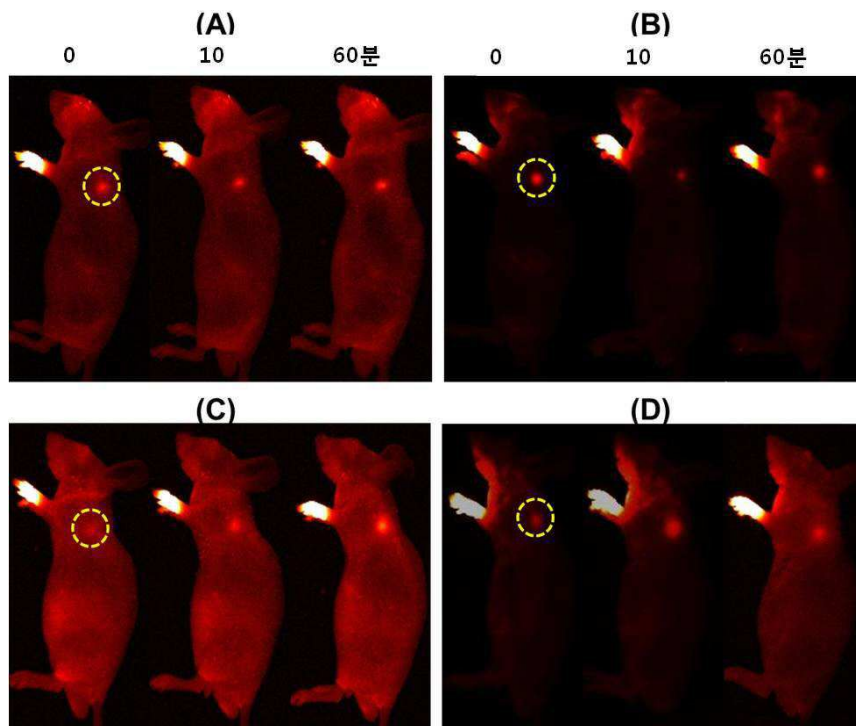
도면14



도면15



도면16



서열 목록

<110> Korea University Industrial & Academic Collaboration Foundation

<120> Fluorescent protein nanoparticles for in vivo imaging

<130> P120919

<150> KR 2012-122548

<151> 2012-10-31

<160> 39

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer No. 1

<400> 1

catatggaca ttgacccgta taaaga

26

<210> 2

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer No. 2

<400> 2

ctcgaggtct tccaaattac ttccca 26

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer No. 3

<400> 3

ggatcctcca gggaattagt agtcagc 27

<210> 4

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer No. 4

<400> 4

aagcttttaa acaacagtag ttccggaag tgt 33

<210>

> 5

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer No. 5

<400> 5

ctcgagcatc accatcacca tcacgtgagc aagggcgag 39

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer No. 6

<400> 6

ggatcccttg tacagctcgt ccatgcc 27

<210> 7

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer No. 7

<400> 7

ctcgagcatc accatcacca tcacgacaac accgaggac

39

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer No. 8

<400> 8

ggatccctgg gagccggagt ggcg

24

<210> 9

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer No. 9

<400> 9

ggctctggtg gcggaagtgg gggtagcgatg agcaagggcg ag

42

<210> 10

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer No. 10

<400> 10

agagccaccc ccacttcgc cacccttgta cagctcgtcc at

42

<210> 11

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer No. 11

<400> 11

ggctctggtg gcggaagtgg gggtagcgac aacaccgagg ac

42

<210> 12

<211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer No. 12
 <400> 12
 agagccaccc ccacttccgc caccctggga gccggagtgg cg 42
 <210> 13
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer No. 13
 <400> 13
 ggtggcggaa gtgggggtgg ctctggtggc ggaagt 36
 <210> 14
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer No. 14
 <400> 14
 ctgagcatc accatcacca tcacgtggc ggaagtggg 39
 <210> 15
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer No. 15
 <400> 15
 ggatccgcca cccccacttc cgccaccaga gccaccccca ct 42
 <210> 16
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer No. 16
 <400> 16

gaggcgggttc gggcggaggt tctggtggcg gaacgaccgc gtccacc 47

<210> 17
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer No. 17
 <400> 17

aagcttgtga tggatgatga gatgctggga gccggagtgg 40

<210> 18
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer No. 18
 <400> 18

gaggcgggttc gggcggaggt tctggtggcg gagacattga cccgtataa 49

<210> 19
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer No. 19
 <400> 19

catatgggac gtggtgatag cggcggaggg tctggaggcg gttcgggcg 49

<210> 20
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer No. 20
 <400> 20

catatgcacc atcaccatca ccatagtacc gctaaattag tta 43

<210> 21
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Primer No. 21

<400> 21

aagcttttat tcgatgttag actc 24

<210> 22

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer No. 22

<400> 22

catatgagta ccgctaaatt agtta 25

<210> 23

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer No. 23

<400> 23

catatgtgcg attgcctgg tgattgcttc tgcctcgaga gtaccgctaa attagtta 58

<210> 24

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer No. 24

<400> 24

aagcttttag tgatggtgat ggtgatgttc gatgttagac tcgataaac 49

<210> 25

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer No. 25

<400> 25

catatgcaac agggccagat ggct 24

<210> 26

<211> 31

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer No. 26
 <400> 26
 aagcttagag gaatttttta acttcctcct g 31
 <210> 27
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer No. 27
 <400> 27
 cagtcgcga atcgcaactt ccaccgcga ggaatttttt aacttcc 47
 <210> 28
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer No. 28
 <400> 28
 aagcttagca gaagcaatca ccacgtccgc aatcgca 37
 <210> 29
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer No. 29
 <400> 29
 catatggccg cggttggtat tacactgaaa gacg 34
 <210> 30
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer No. 30
 <400> 30
 aagcttaatg gtgatggtga tggcgcagaa ttaatccgag cttc 44
 <210> 31

<211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer No. 31
 <400> 31
 catatgcacc atcaccatca ccatacgacc gcgtccacct cgcaggtg 48

<210> 32
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer No. 32
 <400> 32
 aagctttcag ctttcattat cactgtc 27

<210> 33
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer No. 33
 <400> 33
 catatgcacc atcaccatca ccatgacatt gaccctata aagaa 45

<210> 34
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer No. 34
 <400> 34
 aagcttttaa acaacagtag tttc 24

<210> 35
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Linker peptide 1
 <400> 35

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

1 5 10 15

<210> 36

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker peptide 2

<400> 36

Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 37

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker peptide 3

<400> 37

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

1 5 10 15

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker peptide 4

<400> 38

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr

1 5 10

<210> 39

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker peptide 5

<400> 39

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10