



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0004856
(43) 공개일자 2019년01월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/005 (2006.01) A61K 41/00 (2006.01)
A61K 49/18 (2006.01) C01G 7/00 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07K 14/005 (2013.01)
A61K 41/0052 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0084793

(22) 출원일자 2017년07월04일
심사청구일자 2017년07월04일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

이지원

서울특별시 서초구 남부순환로309길 38, 5동 522호 (방배동, 서초중앙하이츠빌라)

권구철

서울특별시 영등포구 국회대로56길 4 골든힐 A동 401호

조은지

서울특별시 동대문구 무학로43길 18 27호 (용두동, 성은빌딩)

(74) 대리인

특허법인다나

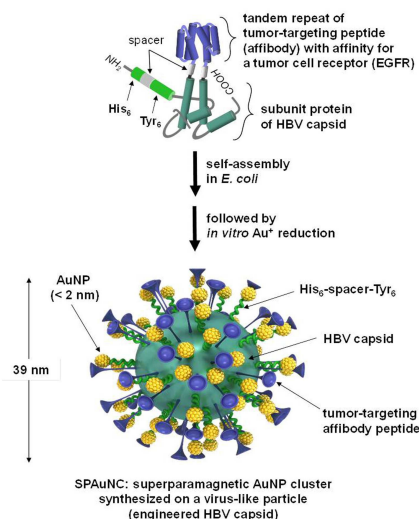
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 자기공명영상 및 자기온열 치료를 위한 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체

(57) 요약

본 발명은 자기공명영상 및 자기온열 치료를 위한 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체에 관한 것이다. 본 발명에 따르면 별도의 표면 안정화 과정이나 표적 지향성 부여 과정 없이도, 표적 지향성을 지니면서 단백질 나노입자의 표면에 고밀도의 초미세 금 나노입자가 균일하게 결합되어 있는, 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체를 제조할 수 있다. 이에 따라, 본 발명에 따른 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체는 기존의 금 나노입자에 비하여 우수한 생체 적합성을 보이고 표적 지향성이 우수하였을 뿐만 아니라, 초미세 금 나노입자의 초상자성 특성으로 인해 교류 자기장 내에서의 온도 증가능 및 T2-MRI 조영제로서의 기능성을 확인할 수 있었다. 따라서, 본 발명에 따른 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체는 자기온열 치료 및 자기공명영상 조영 분야의 핵심 기술로 이용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 49/1818 (2013.01)
A61K 49/1827 (2013.01)
C01G 7/00 (2013.01)
C07K 19/00 (2013.01)
B82Y 5/00 (2013.01)
C01P 2004/64 (2013.01)
C12N 2730/10111 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	R1522801
부처명	삼성전자 주식회사
연구관리전문기관	삼성전자 주식회사
연구사업명	삼성미래기술육성사업
연구과제명	단백질-금속 하이브리드 유도 다기능 나노소재
기 여 율	1/1
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2015.12.01 ~ 2016.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

재조합 B형 간염 바이러스 (HBV) 캡시드 단백질 나노입자 및 상기 단백질 나노입자 상에 형성되어 있는 초상자성 (superparamagnetic) 금 나노입자 클러스터를 포함하며,
상기 초상자성 금 나노입자의 크기는 1 nm 내지 4 nm인,
초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체.

청구항 2

제1항에 있어서,
재조합 B형 간염 바이러스 (HBV) 캡시드 단백질은 금 이온 흡착성 펩타이드를 포함하는 것인,
초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체.

청구항 3

제2항에 있어서,
상기 금 이온 흡착성 펩타이드는 재조합 HBV 캡시드 단백질의 N 말단에 도입되는 것인,
초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체.

청구항 4

제2항에 있어서,
상기 금 이온 흡착성 펩타이드는 복수 개의 히스티딘(H_n , $n \geq 2$)을 포함하는 아미노산 서열로 이루어지는 것인,
초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체.

청구항 5

제2항에 있어서,
재조합 B형 간염 바이러스 (HBV) 캡시드 단백질은 초상자성 유도 펩타이드를 추가로 포함하는 것인,
초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체.

청구항 6

제5항에 있어서,
상기 초상자성 유도 펩타이드는 복수 개의 타이로신(Y_n , $n \geq 2$), 쓰레오닌(T_n , $n \geq 2$), 세린(S_n , $n \geq 2$) 및 시스테인(C_n , $n \geq 2$)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 아미노산 서열로 이루어지는 것인,

초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 초상자성 금 나노입자는 클로로(트리메틸포스핀)금($\text{AuClP}(\text{CH}_3)_3$), 칼륨테트라클로로아우르산염(III)(KAuCl_4), 염화금산나트륨(NaAuCl_4), 염화금산(HAuCl_4), 브롬화금산나트륨(NaAuBr_4), 염화금(AuCl), 염화금(III)(AuCl_3) 및 브롬화금(AuBr_3)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 금 전구체로부터 형성되는 것인,

초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체.

청구항 8

제1항에 있어서,

제조합 B형 간염 바이러스(HBV) 캡시드 단백질은 표적 지향성 펩타이드를 추가로 포함하는 것인,

초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 표적 지향성 펩타이드는 제조합 HBV 캡시드 단백질의 스파이크 부위에 도입되는 것인,

초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 표적 지향성 펩타이드는 제조합 HBV 캡시드 단백질의 1-78번째 아미노산 서열 부분과 81-149번째 아미노산 서열 부분 사이에 위치하는 것인,

초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체.

청구항 11

제8항에 있어서,

상기 표적 지향성 펩타이드는 암세포에 대한 표적 지향성 펩타이드인 것인,

초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 암세포에 대한 표적 지향성 펩타이드는 EGFR (Epidermal growth factor receptor I), Integrin, Vimentin, IGF-IR (Insulin like growth factor-1 receptor), EDB (Human fibronectin extradomain B), IL-4 (interleukin-4), HER-2, 및 CD20으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 표적으로 하는 것인,

초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체.

청구항 13

제1항에 있어서,

제조합 B형 간염 바이러스 (HBV) 캡시드 단백질은 금 이온 흡착성 펩타이드와 초상자성 유도 펩타이드 사이에 링커 펩타이드를 추가로 포함하는 것인,

초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체.

청구항 14

금 이온 흡착성 펩타이드 및 초상자성 유도 펩타이드를 포함하는 제조합 B형 간염 바이러스 (HBV) 캡시드 단백질 나노입자에 금 전구체를 첨가하여 흡착시키는 단계; 및

제조합 B형 간염 바이러스 (HBV) 캡시드 단백질 나노입자에 흡착된 상기 금 전구체의 금 이온을 환원시켜 제조합 B형 간염 바이러스 (HBV) 캡시드 단백질 나노입자 상에 초상자성 금 나노입자를 형성하는 단계를 포함하며,

상기 초상자성 금 나노입자의 크기는 1 nm 내지 4 nm인 것인,

초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 제조방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 금 이온 흡착성 펩타이드는 복수 개의 히스티딘(H_n , $n \geq 2$)을 포함하는 아미노산 서열로 이루어지며,

상기 초상자성 유도 펩타이드는 복수 개의 타이로신(Y_n , $n \geq 2$), 쓰레오닌(T_n , $n \geq 2$), 세린(S_n , $n \geq 2$) 및 시스테인(C_n , $n \geq 2$)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 아미노산 서열로 이루어지는 것인,

초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 제조방법.

청구항 16

제14항에 있어서,

상기 금 전구체는 클로로(트리메틸포스핀)금($AuCIP(CH_3)_3$), 칼륨테트라클로로아우르산염(III)($KAuCl_4$), 염화금산 나트륨($NaAuCl_4$), 염화금산($HAuCl_4$), 브롬화금산나트륨($NaAuBr_4$), 염화금($AuCl$), 염화금(III)($AuCl_3$) 및 브롬화금($AuBr_3$)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 제조방법.

청구항 17

제14항에 있어서,

상기 환원은 상기 제조합 B형 간염 바이러스 (HBV) 캡시드 단백질 1 mg 당 0.005 내지 0.015 mol의 환원제를 첨가하여 반응시키는 것인,

초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 제조방법.

청구항 18

제17항에 있어서,
상기 반응은 2 내지 30분 동안 진행되는 것인,
초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 제조방법.

청구항 19

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는,
자기온열 치료용 의약 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서,
상기 조성물은 암 치료용인 것인,
자기온열 치료용 의약 조성물.

청구항 21

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는, 자기공명영상 (Magnetic resonance imaging; MRI)을 위한 조영제 조성물.

청구항 22

제21항에 있어서,
상기 조성물은 자기공명영상 T2 조영제인 것인, 조영제 조성물.

청구항 23

제21항에 있어서,
상기 조성물은 암 세포를 영상화하기 위한 것인, 조영제 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 자기공명영상 및 자기온열 치료를 위한 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 현대 의학의 발전에도 불구하고, 방사선 요법 또는 약물 기반의 요법을 필요로 하는 환자들은 비표적형 약물의 전신적 투여에 의한 세포 독성 및 그에 수반하는 부작용, 혹은 방사선 요법에 의한 정상세포의 변이 또는 사멸 등의 부작용을 겪게 된다. 또한, 해당 질병의 진단을 위해 영상 진단 기술을 이용할 경우, 기존 산화철 기반 조영제의 체내 축적으로 인한 정상 장기 손상 등의 부작용이 문제가 되고 있는 실정이다. 다만, 치료제 또는 조영제 등의 약물을 원하는 표적 조직에 특이적으로 전달할 수 있다면 정상세포 또는 정상조직에 대한 부작용 없이

질환을 진단하고 치료하는 것이 가능해질 수 있을 것이며, 이에 따라, 현재 부작용 없는 진단 및 치료를 위한 수단으로서 약물의 표적화를 위한 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

[0003] 약물의 표적화를 위해서는 주로 약물의 전달을 목적으로 하는 조직 또는 세포에 특이적인 항체나 펩타이드, 특정 리간드, 또는 고분자 등을 약물에 화학적 또는 물리적인 방법으로 결합시키는 방법을 사용하여 왔다. 그러나, 약물 고유의 물리화학적 특성으로 인해 항체, 펩타이드, 리간드 등을 결합시키는 것은 항상 용이하지는 않으며, 또한 화학적 또는 물리적 결합을 위한 결합제 또는 안정화제 등을 사용할 경우 약물의 약리적 특성이나 생체독성 등에 영향을 미치는 문제가 발생할 수 있다. 따라서 이러한 문제를 야기하지 않는 약물의 표적화 방법에 대한 기술적 요구는 계속되고 있는 실정이다.

[0004] 한편, 표적지향적으로 약물을 전달하여 표적 질환 (특히 암) 발병 세포를 사멸화시키는 방법들의 중의 하나로 나노미터 단위의 초미세 금 나노입자의 전달에 이은 자기온열 치료방법이 효과적인 치료수단이 될 수 있다. 해당 크기의 초미세 금 나노입자는 그 자체가 고유한 초상자성을 갖기 때문에 자기공명영상의 조영제로서의 기능 또한 수행할 수 있다. 금 나노입자는 수십 나노미터 크기에서, 표면 전자의 양자화에 의해서 고유의 광학적 또는 자기적 특성을 나타내며, 이러한 기능성을 기반으로 하여 단전자 소자, 화학물질 센서, 바이오 센서, 약물전달 및 촉매 등의 분야에 다양하게 활용될 가능성이 있다.

[0005] 그러나, 초미세 금 나노입자를 합성하기 위해 화학 환원반응과 같은 종래의 방법을 사용할 때에는, 일반적으로 금속 화합물, 용매, 환원제 또는 안정화제를 필요로 한다. 이러한 화학 첨가제는 독성을 야기할 수 있으며, 이는 금 나노입자를 의약 분야에서 활용하는데 주된 한계점으로 제시되고 있다.

[0006] 또한, 안정적인 금 나노입자를 제조하기 위해서는 금 나노입자의 표면 개질이 반드시 필요하다. 표면 개질을 하지 않는 경우, pH에 변화를 주거나 고농도로 농축할 때, 구조적 불안정성으로 인해 응축현상이 일어나 입자의 크기와 형태가 변형되는 경우가 발생하기 때문이다. 뿐만 아니라, 질병 진단 및 치료에 이용을 하는 경우, 앞서 설명한 약물의 표적화를 위해 금 나노입자의 표면에 항체 또는 표적형 펩타이드를 화학적 결합을 이용하여 노출시켜야 하는데, 이때 금 나노입자의 표면에 불규칙적으로 해당 물질이 결합하므로 이를 고밀도로 균일하게 표출시키는데 한계가 있다.

[0007] 일반적으로 금 나노입자의 합성 과정에서는 소듐 시트르산염과 같은 금 이온의 응결핵 역할을 하는 물질이 사용되는데, 티로신(tyrosine)과 같이 pH 7.0 이상에서 금 이온이 환원될 수 있는 표준 환원 전위를 제공하는 아미노산을 포함하는 펩타이드를 이용하면, 금 이온이 환원되어 펩타이드 표면에 금 나노입자를 합성할 수 있음이 보고된 바 있다 (한국공개특허 제2012-0052501호). 그러나, 상기 한국공개특허 제2012-0052501호에서 보고하고 있는 기술은 공지의 금 친화성 단백질 또는 금 이온 흡착성 펩타이드와 금 전구체를 반응시켜 상기 단백질 또는 펩타이드 주변에 금 나노입자를 응집시키는 정도에 불과하여 금 나노입자의 형상이나 크기 제어가 어려울 뿐만 아니라, 표적 지향성을 부여하기 위해서는 추가적인 화학적 결합을 필요로 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기와 같은 종래의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 본 발명자들은, 재조합 HBV 캡시드 단백질 나노입자 상에 초상자성 초미세 금 나노입자를 형성함으로써, 본 발명의 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체를 제조하였다. 이와 더불어, 상기 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 표적 지향성 자기온열 치료 및 자기공명영상을 위한 조영 효과를 확인하고, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

[0009] 이에, 본 발명의 목적은 자기장에 의한 우수한 온도 증가능 및 자기공명영상을 위한 조영 효과를 지닌, 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체를 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 자기온열 치료를 위한, 상기 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 의약적 용도를 제공하는데 있다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 자기공명영상 조영을 위한, 상기 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 의약적 용도를 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 재조합 B형 간염 바이러스 (HBV) 캡시드 단백질 나노입자 및 상기 단백질 나노입자 상에 형성되어 있는 초상자성 (superparamagnetic) 금 나노입자 클러스터를 포함하며, 상기 초상자성 금 나노입자의 크기는 1 nm 내지 4 nm인 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체를 제공한다.
- [0013] 본 발명의 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체는, 초미세 (1 nm 내지 4 nm) 크기의 금 나노입자로부터 비롯한 초상자성 (Superparamagnetic)을 지닌다는 점에서 본 발명의 기술적 의의가 있다. 본 발명에서 사용되는 용어, "초상자성"은 외부 자기장이 없는 경우 열에너지에 의해 나노입자의 자기적 모멘트가 랜덤화되어 자기적 특성이 관찰되지 않는 반면, 외부 자기장이 가해지는 경우 나노입자의 자기적 모멘트가 일정한 방향으로 배열되어 강한 자기적 특성을 나타내는 것을 일컫는다. 특히, 초상자성 나노입자는 외부 자기장이 없는 경우, 나노입자가 상호작용이 거의 없어 안정한 콜로이드 상태를 유지할 수 있으므로 바이오/의료 분야, 특히, 자기온열 치료, 자기공명영상화 기술 등에 확장 적용할 수 있다.
- [0014] 현재 바이오/의료 분야에 적용되고 있는 초상자성 나노입자로서, 산화철 나노입자가 개발되고 있으나, 산화철 기반 유래 물질의 체내 축적으로 인한 정상 장기 손상 등의 부작용들이 보고되고 있는 실정이다. 반면, 본 발명의 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체 내에 포함된 초미세 크기 (1 nm 내지 4 nm)의 금 나노입자는, 투여 후 빠른 시간 내 체외로 배출될 수 있어 우수한 생체 적합성 또는 안정성을 지닌다는 점에서 본 발명의 다른 기술적 의의가 있다.
- [0015] 본 발명에서, 재조합 B형 간염 바이러스 (HBV) 캡시드 단백질 나노입자는, 180개 또는 240개의 캡시드 단량체가 자가조립되어 형성한 구형 단백질 나노입자 또는 이러한 단백질 나노입자를 이루고 있는 각각의 캡시드 단량체를 지칭하는 것일 수 있다. 각각의 캡시드 단백질은 금 이온 흡착성 펩타이드 등을 포함하는 융합 단백질의 형태로 발현된 뒤 자가조립되어 나노입자를 형성하게 되므로, 매우 균일한 입도 분포를 보이는 입자를 재현성 있게 대량 생산할 수 있다. 뿐만 아니라, 생체 내에서 사용된 후 분해될 수 있는 생체 친화성 물질이기 때문에 나노입자의 잔존으로 인한 독성문제가 없다. 또한, 본 발명의 재조합 B형 간염 바이러스 (HBV) 캡시드 단백질은 화학적 방법이 아닌, 유전공학적 방법으로 금 이온 흡착성 펩타이드, 초상자성 유도 펩타이드, 표적 지향성 펩타이드 등을 단백질 나노입자에 부여하게 되므로, 이들의 표면 표출빈도 및 위치를 원하는 대로 제어할 수 있고, 생물학적 활성의 변성을 최소화시킬 수 있다는 장점이 있다.
- [0016] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 재조합 HBV 캡시드 단백질은, 금 이온 흡착성 펩타이드를 포함한다.
- [0017] 금 이온 흡착성 펩타이드는 금 전구체의 형태로 제공된 금 이온을 흡착하는 특성을 갖는다. 금 이온 흡착성 펩타이드는 금 이온 흡착 특성을 갖는 것이면 어떠한 서열이든 관계없이 사용될 수 있다. 한 구체예에서, 상기 금 이온 흡착성 펩타이드는 복수 개의 히스티딘(H_n , $n \geq 2$)을 포함하는 아미노산 서열로 이루어지는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 한 구체예에서, 금 이온 흡착성 펩타이드는 재조합 HBV 캡시드 단백질의 N 말단에 도입될 수 있다. 재조합 HBV 캡시드 단백질의 N 말단에 도입되게 되면 단백질 나노입자 표면으로의 표출이나 금 나노입자의 크기 제어 측면에서 유리할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 상기 금 이온 흡착성 펩타이드로서 헥사히스티딘을 HBV 캡시드 단백질의 N-말단에 발현시켜 재조합 HBV 캡시드 단백질 나노입자의 표면 상에 금 이온 흡착성 펩타이드를 고집적으로도 표출시켰다.
- [0018] 본 발명의 한 구체예에서, 재조합 B형 간염 바이러스 (HBV) 캡시드 단백질은 초상자성 유도 펩타이드를 추가로 포함할 수 있다. 초상자성 유도 펩타이드는 금 나노입자에 초상자성을 유도할 수 있도록 charge transfer 가 가능한 서열이면 어떠한 것이든 관계없이 사용될 수 있다. 한 구체예에서, 초상자성 유도 펩타이드는 복수 개의 타이로신(Y_n , $n \geq 2$), 트레오닌(T_n , $n \geq 2$), 세린(S_n , $n \geq 2$) 및 시스테인(C_n , $n \geq 2$)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 아미노산 서열로 이루어지는 것일 수 있다. 추가적으로, 전술한 n의 상한은, 예컨대 50개 내지 3개일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 일 실시예에서는 상기 초상자성 유도 펩타이드로서 헥사타이로신을 사용하여 charge transfer 를 통해 금 나노입자에 초상자성을 유도하였다.
- [0019] 본 발명에 있어서, 재조합 B형 간염 바이러스 (HBV) 캡시드 단백질 나노입자 상에 형성되는 초상자성 금 나노입자는 금 전구체로부터 형성될 수 있다. 상기 초상자성 금 나노입자는 금 이온성 흡착성 펩타이드에 흡착되어 있는 금 전구체의 금 이온을 환원시킴으로써 합성된다. 상기 금 전구체는 클로로(트리메틸포스핀)금($AuCIP(CH_3)_3$), 칼륨테트라클로로아우르산염(III)($KAuCl_4$), 염화금산나트륨($NaAuCl_4$), 염화금산($HAuCl_4$), 브롬화금산나트륨($NaAuBr_4$), 염화금($AuCl$), 염화금(III)($AuCl_3$) 또는 브롬화금($AuBr_3$) 등과 같은 공지의 금 전구체들이

적용될 수 있다.

- [0020] 상기 금 전구체와 재조합 자가조립성 단백질 나노입자와의 반응은 환원제의 추가에 의해 반응이 개시된다. 단백질 자체는 구조적 안정성이 크므로 환원제의 강력한 환원력이 제공되지 않으면 금 이온을 넣더라도 금 입자 형성이 어렵기 때문이다. 비록 환원제를 사용하긴 하나, 화학적 금 나노입자의 제조방법과 비교할 때 본 발명은 고온의 조건이 아닌 상온 조건에서 반응을 진행시킬 수 있고, 만들어진 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체가 추가적 표면 처리 없이도 매우 높은 구조적 안정성을 갖는다.
- [0021] 또한, 상기 반응에서, 환원제의 종류와 양, 및 반응 시간에 단백질 나노입자 표면에 형성된 금 나노입자의 크기를 조절할 수 있다는 장점을 갖는다. 이러한 특성을 이용하여, 초상자성을 갖는 초미세 금 나노입자를 형성할 수 있다. 구체적으로, 재조합 B형 간염 바이러스 (HBV) 캡시드 단백질 나노입자 상에 형성되는 초미세 금 나노입자의 크기는 예를 들어, 1 nm 내지 4 nm일 수 있다. 본 발명의 한 구체예에서는, HBV 캡시드 단백질 나노입자 1 mg 당 0.01 내지 0.1 mol의 환원제 NaBH_4 를 첨가하고 이들을 15분간 반응시킴으로써, 1.4 nm 크기의 초미세 금 나노입자를 형성하였다. 초미세 금 나노입자의 표면 금 원자로부터 타이로신의 산소 원자와 포스핀 포스포러스(phosphine phosphorus)로 전자 이동(charge transfer)가 일어나면 초미세 금 나노입자의 초상자성 특성이 발현되게 된다.
- [0022] 본 발명의 한 구체예에서, 재조합 B형 간염 바이러스 (HBV) 캡시드 단백질은 표적 지향성 펩타이드를 추가로 포함할 수 있다.
- [0024] 상기 표적 지향성 펩타이드는, 암세포나 염증세포와 같이 치료나 진단이 요구되는 생체 내 목적 부위로 본 발명에 따른 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체가 이동할 수 있도록, 암세포나 염증세포 등의 세포 표면에 결합할 수 있는 펩타이드를 의미한다.
- [0025] 본 발명의 목적상, 상기 표적 지향성 펩타이드는 재조합 자가조립성 단백질 나노입자의 표면에 표출되도록 도입될 수 있다. 본 발명의 한 구체예에서, 상기 표적 지향성 펩타이드는 재조합 HBV 캡시드 단백질의 스파이크 부위에 도입될 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 표적 지향성 펩타이드는 재조합 HBV 캡시드 단백질의 1-78번째 아미노산 서열 부분과 81-149번째 아미노산 서열 부분 사이에 도입될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는, 표적 지향성 펩타이드를 재조합 HBV 캡시드 단백질의 스파이크 부위에 도입함으로써, 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체가 특이적인 타겟팅이 가능함을 보여준다.
- [0026] 또한, 표적 지향성 펩타이드는 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체가 그 목적상 적합하게 사용될 수 있도록 원하는 조직 또는 세포에 타겟팅할 수 있는 것이면 어떠한 것이든 가능하다. 본 발명의 한 구체예에서, 상기 표적 지향성 펩타이드는 암세포에 대한 표적 지향성 펩타이드일 수 있다. 예를 들어, 상기 암세포에 대한 표적 지향성 펩타이드는 EGFR (Epidermal growth factor receptor), Integrin, Vimentin, IGF-IR (Insuline like growth factor-1 receptor), EDB (Human fibronectin extradomain B), IL-4 (interleukin-4), HER-2, 및 CD20으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나를 표적으로 하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 일 실시예에서는, 인간 유방암세포에서 특이성을 갖는 EGFR을 표적으로 하는 표적 지향성 펩타이드를 사용하였으나, 본 발명의 표적 지향성 펩타이드가 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 재조합 HBV 캡시드 단백질은 금 이온 흡착성 펩타이드와 초상자성 유도 펩타이드 사이에 링커 펩타이드를 추가로 포함할 수 있다. 링커 펩타이드는 다수의 글라이신을 포함하는 반응성이 없는 펩타이드로서 핵사 히스티틴 펩타이드와 초상자성 유도 펩타이드 사이의 공간을 적절한 크기로 확보하여 금 입자가 충분히 성장할 수 있으면서 동시에 금 이온이 과도하게 환원될 수 있는 가능성을 차단시킬 수 있으며, 구조적 안정성을 제공해 준다.
- [0028] 본 발명의 다른 구체예에서는, 상기 재조합 HBV 캡시드 단백질은 상기 링커 펩타이드와 초상자성 유도 펩타이드 사이에 또 다른 링커 펩타이드를 추가로 포함할 수 있다. 상기 링커 펩타이드는 초상자성 유도 펩타이드와 기존 링커 펩타이드 간의 적절한 공간을 확보해 줄 수 있는 길이를 가질 수 있다. 따라서, 링커 펩타이드의 길이는 초상자성 유도 펩타이드와 기존 링커 펩타이드의 종류 및 크기에 따라 달라질 수 있을 것이다. 예를 들어, 링커 펩타이드는 5 내지 20개, 예컨대, 5 내지 15개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드일 수 있다.
- [0029] 본 발명의 또 다른 구체예에서는, 분리 정제의 용이성을 위해, 한 구체예에서, 상기 재조합 HBV 캡시드 단백질은 FLAG(DYKDDDK) 태그, GST 태그와 같은 분리정제를 위한 펩타이드를 추가로 포함할 수 있다.

- [0030] 본 발명은 또한 금 이온 흡착성 펩타이드 및 초상자성 유도 펩타이드를 포함하는 제조합 B형 간염 바이러스 (HBV) 캡시드 단백질 나노입자에 금 전구체를 첨가하여 흡착시키는 단계; 및
- [0031] 제조합 B형 간염 바이러스 (HBV) 캡시드 단백질 나노입자에 흡착된 상기 금 전구체의 금 이온을 환원시켜 제조합 B형 간염 바이러스 (HBV) 캡시드 단백질 나노입자 상에 초상자성 금 나노입자를 형성하는 단계를 포함하며,
- [0032] 상기 초상자성 금 나노입자의 크기는 1 nm 내지 4 nm인 것인,
- [0033] 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 제조방법을 제공한다.
- [0034] 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 금 이온의 환원은 상기 제조합 B형 간염 바이러스 (HBV) 캡시드 단백질 1mg 당 0.005 내지 0.015 mol의 환원제를 첨가하여 반응을 시킬 수 있으며, 반응시간은 2 내지 30분, 예를 들어, 5 내지 20분 동안 진행될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 환원제로서 NaBH_4 를 사용하였으나, 금 이온의 환원제로 공지된 환원제라면 제한없이 사용할 수 있다.
- [0035] 한편, 본 발명의 일 실시예에는, 상기 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 특이적인 표적 지향성과 함께, 교류 자기장 내에서의 현저한 온도 증가 및 우수한 자기공명영상을 위한 T2 조영 효과를 보여주었다.
- [0036] 이에, 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 자기온열 치료를 위한 상기 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 의약적 용도; 상기 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체, 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는, 자기온열 치료용 의약 조성물; 및 상기 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체를 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 자기온열 치료방법을 제공한다.
- [0037] 본 발명에 따른 자기온열 치료를 위한 상기 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 의약적 용도 등은, 전술한 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체에서 기술한 바 있는 기술적 구성을 이용하기 때문에 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재 생략한다.
- [0038] 본 발명에서 사용되는 용어, "자기온열 치료"는 외부 자기장의 인가에 의해 발생한 열을 이용하여 병변 부위를 치료하는 기술로서, 특히 42℃ 이상의 온도에서 사멸하는 암세포를 타겟 치료하는데 주로 적용되고 있다. 상기 자기온열 치료에 적용될 수 있는 나노입자의 필수 조건으로, 1) 외부 자기장에 의해 치료학적으로 유효한 열을 발생시킬 수 있어야 하고, 2) 상기 나노입자들은 체내 축적되지 않고 분해 또는 배출되어야 하며, 3) 특이적인 병변 부위로의 전달을 통해 정상 조직의 손상을 최소화하여야 한다. 이러한 관점에서, 본 발명에서 조성물은 1) 우수한 초상자성 특성으로 인해, 교류 자기장 내에서 암세포를 사멸시킬 수 있는 정도의 열을 발생시킬 수 있고, 2) 초미세 크기의 금 나노입자는 소변을 통해 신속하게 방출될 수 있으며, 3) 제조합 HBV 캡시드 단백질의 구조적 특성으로 인해 표적 지향성 펩타이드를 효과적으로 표출시킬 수 있었는바, 자기온열 치료의 효과를 극대화시킴에 기여한다.
- [0039] 또한, 후술된 바와 같이, 본 발명의 조성물은 자기공명영상을 위한 조영제로서도 활용될 수 있는바, 단순히 치료 효과를 제공하는 것에 그치지 않고, 상기 자기온열 치료 효과의 실시간 모니터링을 가능하게 한다는 점에서 본 발명의 또 다른 기술적 의의가 있다.
- [0040] 본 발명에 따른 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 발열을 위해 가해지는 교류 자기장 조건과 관련하여, 진동수는 예를 들어, 300 kHz 내지 450 kHz, 또는 330 내지 390 kHz일 수 있고, 전력량은 예를 들어, 5 kW 내지 15 kW, 또는 8 내지 12 kW일 수 있으며, 처리 시간은 예를 들어, 5분 내지 20분, 또는 5분 내지 15분일 수 있으나, 질병의 특성 또는 중증도 등을 반영하여 적의 변경될 수 있다.
- [0041] 또한, 본 발명에 따른 자기온열 치료는 세포 수준의 치료에 비제한적으로 사용될 수 있으며, 상기 치료 대상 세포는 전술한 표적 지향성 펩타이드에 따라 변경된다. 한 구체예에서, 본 발명은 암 세포의 표적 치료, 즉 암 치료용으로 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0042] 또한, 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 자기공명영상의 조영을 위한 상기 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 의약적 용도; 상기 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체, 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는, 자기공명영상 (Magnetic resonance imaging; MRI)을 위한 조영제 조성물; 및 상기 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체를 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 자기공명영상화 방법을 제공한다.

- [0043] 본 발명에 따른 자기공명영상의 조영을 위한 상기 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 의약적 용도 등은, 전술한 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체에서 기술한 바 있는 기술적 구성을 이용하기 때문에 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.
- [0044] 본 발명에서 사용되는 용어, "자기공명영상 (MRI, Magnetic Resonance Imaging)"은 자기장 안에서 수소 원자의 스핀이 이완되는 현상을 이용해 신체의 해부학적, 생리학적, 생화학적 영상을 얻는 방법으로, 현재 살아있는 사람이나 동물의 신체기관을 비침습적이며 실시간 영상화할 수 있는 기술이다.
- [0045] 본 발명에서 사용되는 용어 "조영제"는 상기자기공명영상의 대조도를 증가하기 위한 외부물질을 의미하며, 이들은 일반적으로 초상자성 혹은 상자성의 특성을 지니고 있다. 구체적으로, 상기 조영제는 신체부위의 영상신호보다 상대적으로 높은 대조를 나타내는 positive 조영제 (T1 조영제), 신체부위의 영상신호보다 상대적으로 낮은 대조를 나타내는 negative 조영제 (T2 조영제)로 분류되며, 전자의 경우는 상자성 나노입자, 후자의 경우는 초상자성 나노입자가 사용되고 있다. 따라서, 본 발명에 따른 조성물은 자기공명영상 T2 조영제로 활용될 수 있다.
- [0046] 본 발명에 따른 자기공명영상화 방법은 상기 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체를 사용한 것 이외, 당업계에서 알려진 기술들을 채용하여 실시할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 4.7-T의 교류 자기장 세기를 갖는 자기공명영상 촬영 장비를 이용해 T2 MRI 촬영을 실시하였으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0047] 또한, 본 발명에 따른 자기공명영상화는 세포 수준의 이미지화에 비제한적으로 사용될 수 있으며, 상기 대상 세포는 전술한 표적 지향성 펩타이드에 따라 변경된다. 한 구체예에서, 본 발명은 암 세포의 이미지화, 즉 암 조직 모니터링용으로 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0049] 한편, 본 발명에 따른 자기온열 치료용 의약 조성물 또는 조영제 조성물에서 사용되는 약제학적으로 허용되는 담체는 의약 분야에서 통상 사용되는 담체 및 비히클을 포함한다.
- [0050] 상기 약제학적으로 허용되는 담체로는 이들로 한정되는 것은 아니지만, 이온 교환, 알루미늄, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질, 완충 물질, 물, 염 또는 전해질, 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌 글리콜 및 양모지 등이 포함된다. 본 발명의 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0051] 본 발명의 한 구체예로서, 본 발명에 따른 조성물은 비경구 투여를 위한 수용성 용액으로 제조할 수 있다. 예를 들어, 한스 용액(Hank's 용액), 링거 용액(Ringer's 용액) 또는 물리적으로 완충된 염수와 같은 완충용액을 사용할 수 있다. 수용성 주입 현탁액은 소듐 카르복시메틸셀룰로즈, 솔비톨 또는 텍스트란과 같이 현탁액의 점도를 증가시킬 수 있는 기질을 첨가할 수 있다.
- [0052] 본 발명의 바람직한 조성물은 멸균 주사용 수성 또는 유성 현탁액으로서 멸균 주사용 제제의 형태일 수 있다. 이러한 현탁액은 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁화제를 사용하여 본 분야에 공지된 기술에 따라 제형화될 수 있다. 멸균 주사용 제제는 또한 무독성의 비경구적으로 허용되는 회석제 또는 용매 중의 멸균 주사 용액 또는 현탁액일 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 오일을 사용할 수 있다.

발명의 효과

- [0053] 본 발명에 따르면 별도의 표면 안정화 과정이나 표적 지향성 부여 과정 없이도, 표적 지향성을 지니면서 단백질 나노입자의 표면에 고밀도의 초미세 금 나노입자가 균일하게 결합되어 있는, 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체를 제조할 수 있다. 본 발명에 따른 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체는 기존의 금 나노입자에 비하여 우수한 생체 적합성을 보이고, 표적 지향성이 우수할 뿐만 아니라 초미세 금 나노입자의 초상자성 특성으로 인해 교류 자기장 내에서의 온도 증가능 및 T2-MRI 조영제로서의 기능성을 갖는다. 따라서, 본 발명에 따른 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체는 자기온열 치료 및 자기

공명영상 의조영 분야의 핵심 기술로 이용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0054]

도 1은 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체 (SPAuNC)의 제조과정 및 구조에 대한 모식도이다.

도 2는 재조합 B형 간염 바이러스 (HBV) 캡시드 단백질 제조를 위한 발현 벡터에 대한 모식도이다.

도 3은 초미세 (SPAuNC) 또는 미세 (DAuNC) 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 (A) TEM 이미지, (B) 동적 광 산란 분석 (DLS; Dynamic Light Scattering) 결과, (C) 에너지-분산 X-레이 스펙트럼 (EDX; Energy-dispersive X-ray spectroscopy)를 확인한 결과이다.

도 4는 초미세 (SPAuNC) 또는 미세 (DAuNC) 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 단백질 나노입자 양과 표면 금 나노입자 양 사이의 상관관계를 확인한 결과이다 (붉은 실선: 초미세 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체, 푸른 실선: 미세 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체).

도 5는 초미세 (SPAuNC) 또는 미세 (DAuNC) 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체, 초상자성 산화철 나노입자, 금 나노입자 (5, 20, 40 nm), 및 HBV 캡시드 나노입자의 교류 자기장 처리 시간에 따른 온도 증가를 확인한 결과이다.

도 6은 초미세 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체 (SPAuNC) 에 대한 EPR spectrum 결과이다.

도 7은 SQUID를 통해 측정된 (A,B) 초미세 (SPAuNC) 또는 (B) 미세 (DAuNC) 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 온도에 따른 자화도 곡선이다.

도 8은 (A) Chloro(trimethyl phosphine) gold (I)와 초미세 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체 (SPAuNC) 표면의 금 나노입자 내 금 원자의 4f 오비탈에 대한 XPS 측정 결과, (B) chloro(trimethyl phosphine) gold (I)와 초미세 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체 (SPAuNC) 표면 금 나노입자 내 인 원자의 2p 오비탈에 대한 XPS 측정 결과, (C) HBV 캡시드 나노입자와 초미세 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체 (SPAuNC) 표면의 핵사타이로신 내 산소 원자의 1s 오비탈에 대한 XPS 측정 결과이다.

도 9는 초미세 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체 (SPAuNC) 표면에서 금 이온이 환원되는 과정 및 초상자성을 획득하는 과정을 간략하게 나타낸 모식도이다.

도 10은 EGFR이 과발현된 유방암 세포주 (MDA-MB-468 cell line)에 대하여, EGFR 표적형 펩타이드 유무에 따른 초미세 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체 (SPAuNC) 의 표적 지향능 변화 및 초상자성 산화철 나노입자와의 표적 지향능 비교 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 (A) EGFR이 과발현된 유방암 세포주 (MDA-MB-468 cell line)에 교류 자기장을 처리하지 않고 초미세 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체 (SPAuNC)를 농도별로 주입한 후, 시간의 경과에 따른 cell viability 분석을 실시하여 안전성을 검증한 결과, 및 (B) EGFR이 과발현된 유방암 세포주 (MDA-MB-468 cell line)에 초미세 (SPAuNC) 또는 미세 (DAuNC) 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체와 HBV 캡시드 나노입자를 주입한 후 교류 자기장을 처리하고 시간에 따른 cell viability 분석한 결과이다.

도 12는 (A) 초미세 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체 (SPAuNC) 의 T1 또는 T2 조영체로서의 효능을 검증한 결과, 및 (B) 초미세 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 농도에 따른 T2 조영효과를 분석한 결과이다.

도 13은 EGFR이 과발현된 유방암 세포 (MDA-MB-468 cell line)가 피하에 이식된 동물 모델에 대하여, (A) 투여된 초미세 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체 (SPAuNC) 의 생체 내 분포를 시간의 경과에 따라 근적외선 형광 이미지를 통해 확인한 결과, 및 (B) EGFR 표적형 펩타이드 유무에 따른 암 발생 부위에서 측정되는 형광량을 시간의 경과에 따라 정량화한 결과이다.

도 14는 EGFR이 과발현된 유방암 세포 (MDA-MB-468 cell line)가 간에 이식된 동물모델에 대하여, (A) 투여된 초미세 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체 (SPAuNC) 의 장기별 (간, 폐, 비장, 신장, 심장) 분포를 시간의 경과에 따라 근적외선 형광 이미지를 통해 확인한 결과, 및 (B) 간 정상 조직과 암 조직 내 초미세 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 분포를 공초점 면역형광 이미지를 통해 확인한 결과이다.

도 15는 EGFR이 과발현된 유방암 세포 (MDA-MB-468 cell line)가 피하에 이식된 동물 모델에 대하여, 1) 초미세

금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체 (SPAuNC) 를 투여하고 교류 자기장을 처리해 준 경우와 2) 물질 처리 없이 교류 자기장만 처리해 준 경우, (A) 암의 크기 변화를 시간의 경과에 따라 확인한 결과, 및 (B) 암 크기 및 체중의 변화를 시간의 경과에 따라 정량화한 결과이다 (a: 초미세 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체 (SPAuNC) 를 투여하고 교류 자기장을 처리해 준 경우, b: 물질 처리 없이 교류 자기장만 처리해 준 경우).

도 16은 EGFR이 과발현된 유방암 세포 (MDA-MB-468 cell line)가 간에 이식된 동물 모델에 대하여, 초미세 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체 (SPAuNC) 를 투여하고 교류 자기장을 처리해 준 경우, (A) 간을 적출해 치료 효과를 확인한 결과, 및 (B) 치료 후, 전체 간 조직에 대한 H&E 염색을 실시하여 정상 간 조직 손상 여부 및 치료 효과를 확인한 결과이다.

도 17은 EGFR이 과발현된 유방암 세포 (MDA-MB-468 cell line)가 피하에 이식된 동물 모델에 대하여, 초미세 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체 (SPAuNC) 를 투여하고 교류 자기장을 처리한 후, 정상 장기 (간, 폐, 심장, 비장, 이자, 신장)에 대한 H&E 염색을 실시하여 이들의 손상 여부를 확인한 결과이다.

도 18은 EGFR이 과발현된 유방암 세포 (MDA-MB-468 cell line)가 피하에 이식된 동물 모델에 대하여, 초미세 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체 (SPAuNC) 를 투여하고 교류 자기장을 처리한 후, 시간의 경과에 따라 자기공명영상을 촬영한 이미지이다.

도 19는 (A) EGFR이 과발현된 유방암 세포 (MDA-MB-468 cell line)가 간에 이식된 동물 모델, 및 (B) 상기 동물 모델에 대하여, 초미세 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체 (SPAuNC) 를 투여하고 교류 자기장을 처리한 후, 시간의 경과에 따라 자기공명영상을 촬영한 이미지이다.

도 20은 초미세 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체 (SPAuNC) 와 20 nm 금 나노입자에 대한 소변 내 금 나노입자의 정량을 실시하여, 상기 금 나노입자의 체외 배출 여부를 비교한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0055] 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.

[실시예 1] HBV 캡시드-유래 키메라 나노입자의 생합성을 위한 발현 벡터 제조

[0058] 하기 표 1에 기재된 프라이머 1-5와 프라이머 6을 사용하여 HBV 캡시드 단백질의 유전자 서열 (NCBI Nucleotide accession number: AF286594 서열 중 1901-2452 서열, 서열번호 1)을 주형으로 extension PCR 후에, HBV 코어 단백질(HBVcAg) 유전자로부터 유래한 N-NdeI-H6(hexahistidine)-LP(linker peptides)-Y6(hexatyrosine)-HBVcAg(1-78)-XhoI-C (서열번호 2) 및 N-BamHI-HBVcAg(81-149)-C/aI-C (서열번호 3)의 합성을 코드하는 두 유전자 클론을 얻었다. 또 EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor 1)로 HBVcAg의 P79A80를 대체하기 위하여, 5'-XhoI-EGFR affibody-BamHI-3' (서열번호 4)를 PCR을 이용하여 제조하였다. 플라스미드 pT7-7에 상기 유전자 클론의 일련의 라이게이션을 통하여, N-H6-LP-Y6-HBVcAg(1-78)-EGFR affibody-HBVcAg(81-149)-C (서열번호 5)의 합성을 코딩하는 플라스미드 발현 벡터 pT7-LP-Y6-EGFR affibody-HBcAg 를 구축하였다 (도 2). 제작된 모든 플라스미드 발현 벡터는 아가로스 젤- 정제 후 완전한 DNA 시퀀싱을 통해 서열을 확인하였다.

[0059] HBV 캡시드 유래 키메라 나노입자의 제조와 관련된 프라이머 서열과 주형에 대한 정보 및 이에 대한 좀 더 상세한 기재는 아래와 같다 (표 1).

[0060] 1) 첫 번째 부분은 HBV 캡시드 단백질의 유전자 서열 (NCBI Nucleotide accession number: AF286594 서열 중 1901-2452 서열, 서열번호 1)을 주형으로 하여 제한 효소 NdeI이 포함되어 있는 프라이머 서열부분 1부터 프라이머 서열부분 5까지를 XhoI을 포함하고 있는 프라이머 6 서열과 함께 extesion PCR을 진행하였다. 그 결과 5'-NdeI-H6-LP-Y6-HBV 캡시드 단백질(아미노산 서열 1-78)-XhoI-3' (서열번호 2)으로 이루어진 PCR 산물을 확보하였다.

[0061] 2) 두 번째 부분은 HBV 캡시드 단백질의 유전자 서열을 주형으로 하여 제한 효소 BamHI이 포함되어 있는 프라이

머 서열부분 7과 *ClaI*를 포함하고 있는 프라이머 서열 8를 이용하여 PCR을 진행하였다. 그 결과, 5'-BamHI-HBV 캡시드 단백질(아미노산 서열 81-149)-*ClaI*-3' (서열번호 3)으로 이루어진 PCR 산물을 확보하였다.

3) 세 번째 부분은 EGFR 염기서열을 주형으로 하여 *XhoI*을 포함하고 있는 프라이머 서열 9, BamHI을 포함하는 프라이머 서열 10을 이용하여 PCR을 수행하였다. 5'-*XhoI*-EGFR affibody-BamHI-3' (서열번호 4)의 제작을 위해 서 프라이머 서열 9와 10을 이용하였다.

이렇게 만들어진 PCR 산물을 순차적으로 pT7-7 벡터에 삽입하여 HBV 캡시드 유래 금 이온의 환원을 유도할 수 있는(hexatyrosine)작용기와 인간 유방암 세포에 특이적으로 결합력을 갖는 EGFR affibody를 합성할 수 있는 발현 벡터를 구성하였다 (도 2, (A)).

4) EGFR affibody의 암세포에 대한 결합력을 비교하기 위하여 프라이머 서열부분 1부터 프라이머 서열부분 5까지를 *ClaI*을 포함하고 있는 프라이머 서열 8과 함께 extesion PCR을 진행하고, 이렇게 만들어진 PCR 산물을 pT7-7 벡터에 삽입하여 HBV 캡시드 유래 금이온의 흡착을 유도할 수 있는(hexatyrosine)작용기를 갖는 발현 벡터를 구성하여, EGFR affibody에 대한 대조군으로 사용하였다 (도 2, (B)).

[표 1]

프라이머 1 (서열번호 6)	5' NdeI-H6-LP-Y6-HBcAg1 (1)	CATATG CATCACCATCACCATCAC ATGGCGTCTAGTCTGCGT
프라이머 2 (서열번호 7)	5' NdeI-H6-LP-Y6-HBcAg1 (2)	ATGGCGTCTAGTCTGCGTCAGATTCTGGATTCTCAGAAAATGGAATGGCG
프라이머 3 (서열번호 8)	5' NdeI-H6-LP-Y6-HBcAg1 (3)	CAGAAAATGGAATGGCGTTCTAATGCG GGTGGCTCTGGTGGCGGAAGTGGG
프라이머 4 (서열번호 9)	5' NdeI-H6-LP-Y6-HBcAg1 (4)	GGTGGCGGAAGTGGGGGAGGCACTGGAGGTGGCGGCGGTGGG TACTATTAC
프라이머 5 (서열번호 10)	5' NdeI-H6-LP-Y6-HBcAg1 (5)	GGCGGTGGG TACTATTACTATTACTAT GACATTGACCCGTATAAAGAA
프라이머 6 (서열번호 11)	3' <i>XhoI</i> -HBcAg78	CTCGAG GTCTTCCAAATTACTTCCCA
프라이머 7 (서열번호 12)	5' BamHI-HBcAg81	GGATCC TCCAGGGAATTAGTAGTCAGC
프라이머 8 (서열번호 13)	3' <i>ClaI</i> -HBcAg149	ATCGAT TTAACAACAGTAGTTCCGGAAGTGT
프라이머 9 (서열번호 14)	5' <i>XhoI</i> -EGFR	CTCGAG GTGGATAACAAATTTAACAAA
프라이머 10 (서열번호 15)	3' BamHI-EGFR	GGATCC TTTCGGCGCCTGCGCATCGTTTTCGCTTC

[실시예 2] HBV 캡시드-유래 키메라 나노입자의 생합성

대장균 균주 BL21(DE3)[F-ompThsdSB(rB-mB-)]를 상기 제조된 발현 벡터로 각각 형질 전환하고, 앰피실린-저항성 형질 전환체를 선택하였다. 형질 전환된 대장균을 50 mL의 Luria-Bertani (LB) 배지(100 mg L⁻¹ 앰피실린 함유)를 함유하는 플라스크(250 mL Erlenmeyer flasks, 37 °C, 150 rpm)에서 배양하였다. 배지 탁도(O.D 600)가 약 0.4-0.5에 도달할 때, IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) (1.0 mM)을 첨가하여 재조합 유전자의 발현을 유도하였다. 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 현탁하고, 초음파 파쇄기 (Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT, USA)를 이용하여 이를 파쇄하였다. 파쇄한 후 13,000 rpm으로 10분간 원심분리한 뒤 상등액과 불용성 응집체를 분리하였다. 분리된 상등액을 이용하여 실시예 3에 따라 정제를 진행하였다.

[실시예 3] HBV 캡시드-유래 키메라 나노입자의 정제

위와 같이 발현된 재조합 단백질 중 자가 조립된 EGFR 단백질 융합 단백질 나노입자를 정제하기 위하여 3단계의 정제 과정을 거쳐 진행하였다. 먼저 1) 재조합 단백질에 융합 발현된 히스티딘과 니켈의 결합을 이용한 Ni²⁺-NTA affinity 크로마토그래피를 진행한 후, 2) 재조합 단백질의 자가 조립을 효율을 향상 시키기 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 자가 조립된 단백질 나노입자만을 분리하기 위하여 sucrose gradient ultracentrifugation을 진행하였다. 각 단계별 상세한 기제는 아래와 같다.

[0073] 1) Ni²⁺-NTA affinity 크로마토그래피

[0074] 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 Ni²⁺-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).

[0076] 2) 자가 조립 촉진을 위한 버퍼 변경 및 농축

[0077] Ni²⁺-NTA affinity 크로마토그래피를 거쳐 용출된 3mL의 재조합 단백질을 Ultracentrifugal filter (Amicon Ultra 100K, Millipore, Billerica, MA) 에 담아 5,000 g로 10분간 원심 분리한 후 column 상부를 자가조립용 버퍼 (500mM NaCl .50mM Tris-HCl pH 7.0)로 가득 채운 후 column 위에 500 μ l 의 용액이 남을 때까지 5,000 g 로 원심 분리를 진행하였다. 이를 3회 반복한 후 최종 부피를 1ml로 맞춘 후 아래 단계를 진행하였다.

[0079] 3) Sucrose gradient 초고속 원심 분리

[0080] 자가조립용 버퍼에 sucrose를 농도별로 각각 첨가하여 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%의 sucrose를 포함하는 용액을 각각 준비한 후 초고속 원심 분리용 튜브 (ultraclear 13.2ml tube, Beckman) 에 각 농도별 (60~20%) sucrose 용액을 농도가 높은 용액부터 2 ml씩 담았다. 마지막으로 10% sucrose 용액을 0.5 ml 담은 후 상기 준비된 자가조립용 버퍼에 존재하는 재조합 단백질 용액을 1ml 채운 후 24,000rpm으로 16시간 동안 4° C 로 초고속 원심 분리를 시행하였다 (Ultracentrifuge L-90k, Beckman). 원심 분리 후 조심스럽게 pipette을 이용하여 위 층 (10~40% sucrose solution 부분)을 없애주고 50~60% sucrose solution 부분을 2) 에 명시된 바와 같이 ultracentrifugal filter와 자가 조립용 버퍼를 이용하여 재조합 단백질의 버퍼를 교체해 주었다.

[0082] [실시예 4] 제조된 HBV 캡시드-유래 키메라 나노입자의 표면에 금이온의 환원

[0083] 실시예 3을 통해서 얻어진 HBV 캡시드-유래 키메라 나노입자의 N-말단에는 금 이온이 환원 될 수 있는 헥사 타이로신(hexatyrosine)이 결합되어 있다. pH 7.0의 재조합 단백질 버퍼에 담겨져 있는 HBV 캡시드-유래 키메라 나노입자에 AuClP(CH₃)₃(Chloro(trimethylphosphine)gold(I))를 첨가하고, 16시간 반응시킨 뒤에 13,000rpm으로 10분간 4° C 로 원심 분리를 시행하였다. 그 상등액을 분리하여, 단백질 나노입자 1 mg 당 0.01 mol의 환원제 NaBH₄를 첨가하여 15분간 반응시킨 결과, 표면에 약 1.4 nm 가량의 크기를 갖는 초미세 금 나노입자가 균일하게 합성된 초미세 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체 (SPAUNC) (도 3, (A)의 왼쪽)가 형성되었고, 단백질 나노입자 1 mg 당 0.02 mol 의 환원제 NaBH₄를 첨가하여 50분간 반응시키면 표면에 약 4.5 nm 가량의 크기를 갖는 미세 금 나노입자가 균일하게 합성된 미세 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체 (DAUNC) (도 3, (A)의 오른쪽)를 얻을 수 있었다 (한편, 하기 본 명세서에서, SPAUNC는 초미세 또는 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체, DauNC는 미세 또는 상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체를 지칭함).

[0085] [실시예 5] 제조된 HBV 캡시드-유래 키메라 나노입자의 구조 분석

[0086] 전술한 바와 같이, 정제된 초미세 및 미세 금-단백질 나노입자 융합체의 구조 분석을 위하여 투과전자현미경 (TEM)을 이용하여 이들을 촬영하였다. 우선, 염색하지 않은 정제된 단백질 샘플을 탄소 코팅된 구리 전자 현미경 그리드(grid)를 올린 후, 자연 건조하였다. 상기 융합체들의 염색된 이미지를 얻기 위해, 자연 건조된 샘플을 포함하는 전자 현미경 그리드를 2% (w/v) 수성 우라닐 아세테이트 용액과 함께 10분 동안 실온에서 인큐베이션

하고, 증류수로 3-4회 세척하였다. 초미세 및 미세 금-단백질 나노입자 융합체의 이미지를 Philips Technai 120 kV 전자 현미경을 이용하여 관찰한 결과, 우선, 표면에 약 1.4 nm 가량의 크기를 갖는 초미세 금 나노입자가 균일하게 라스베리 형태의 클러스터를 형성함을 TEM 이미지를 통해 알 수 있었고 (도 3, (A)의 왼쪽), DLS 분석을 통해, 초미세 금 나노입자 (1.4 ± 0.2 nm)로 이루어진 초미세 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체 (SPAUNC)(38.7 ± 3.4 nm)를 확인할 수 있었다 (도 3, (B)의 왼쪽). 이 밖에도, 표면에 약 4.5 nm 가량의 크기를 갖는 미세 금 나노입자가 균일하게 클러스터를 형성함을 TEM 이미지를 통해 알 수 있었고 (도 3, (A)의 왼쪽), DLS 분석을 통해, 미세 금 나노입자 (4.5 ± 0.9 nm)로 이루어진 미세 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체 (DAUNC)(41.6 ± 3.31 nm)를 확인할 수 있었다(도 3, (B)의 오른쪽). 또한, 초미세 및 미세 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체에 대한 EDX(Energy-dispersive X-ray spectroscopy)를 실시하였고, 그 결과, 상기 초미세 및 미세 금-단백질 나노입자 융합체 표면에 결합한 금속이 금이라는 것을 확인할 수 있었다. (도 3, (C)).

[0088] [실시예 6] 초미세 및 미세 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 단백질 나노입자 양과 표면 금 나노입자 양 사이의 상관관계 구축

[0089] 단백질 나노입자인 HBV 캡시드와 표면에 합성된 금 나노입자 양 사이의 상관관계를 구축하기 위하여, SPAUNC 및 DAUNC에서, 단백질 나노입자의 다양한 농도에 따른 표면에 합성된 금의 양을 ICP-MS를 통해 정량 분석하고, 이에 대한 상관관계를 도식화하였다 (도 4). 아울러, 상기 그래프 결과를 바탕으로 하여 각 금-단백질 나노입자 융합체에 대해 단백질 나노입자의 양과 표면 금 나노입자의 양 사이의 관계식을 하기와 같이 정립하였다 .

[0090] [식 1] 초미세 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 관계식

[0091] $Y(\text{mg})=0.01 \times X(\text{mg})$ ($R^2=0.95$)

[0093] [식 2] 미세 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 관계식

[0094] $Y(\text{mg})=0.052 \times X(\text{mg})$ ($R^2=0.98$)

[0095] (상기 식 1 및 2에서, Y는 금 나노입자의 질량, X는 단백질 나노입자의 질량임.)

[0097] [실시예 7] 초미세 또는 미세 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 자기장 내에서의 온도 증가 추이 분석을 통한 자기온열 치료효능 검증 - in vitro

[0098] 상기 제조된 SPAUNC 및 DAUNC에 대한 자기온열 치료로의 적용 가능성을 확인하고자, 교류 자기장 내에서의 온도 증가능을 확인하였다. 전술한 식 1 또는 식 2를 바탕으로 금 나노입자 2 μg 을 기준으로 상기 융합체를 100 μl 의 PBS에 섞어준 후, 360 kHz, 10 kW 세기의 교류 자기장을 처리한 뒤, 시간에 따른 온도 변화를 측정하였다. 또한, 상기 결과를 동량의 5, 20, 40 nm 크기로 이루어진 시판 금 나노입자, 자기온열 효과가 우수하다고 알려진 초상자성 산화철 나노입자, 및 단백질 나노입자인 HBV 캡시드의 온도 증가능과 비교하였다. 그 결과, DAUNC 및 시판 금 나노입자, HBV 캡시드 단백질 나노입자에서는 뚜렷한 온도 증가 양상이 보이지 않았다. 반면, SPAUNC를 포함하는 용액의 경우, 온도가 급격하게 증가하여 10분 이내에 44 $^{\circ}\text{C}$ 까지 이르렀는데, 초상자성 산화철 나노입자와 유사한 수준의 온도 증가능을 보였다. (도 5), 이는 암세포가 피사될 수 있는 온도 이상으로 상승한 것으로서, 본 발명에 따른 초미세 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 우수한 자기온열 효과를 확인하였다.

[0099]

[0100] [실시예 8] 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 자기적 및 물리적 특성 검증

[0101] 우수한 온도 증가능을 나타낸 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체에 대한 물리적 및 자기적 특성을 확인하기 위하여 다음과 같은 측정 기법을 이용하였다.

[0103] 1) 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 자기적 특성을 확인하기 위하여 EPR(Electron

Paramagnetic Resonance) Spectrum 및 superconducting quantum interference device (SQUID) magnetometer 분석을 실시하였다. 각 물질은 분석을 위해, 초미세 또는 미세 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체를 -80 °C에서 3시간 동안 사전 동결시킨 후, 동결 건조기를 이용하여 완전 동결 건조시켰다. EPR의 분석을 위하여 동결 건조가 완료된 초미세 또는 미세 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체 시료를 EPR spectrometer에 주입한 후, 각 물질에 대한 자기적 특성을 분석하였다.

[0104] 우선, EPR 분석 결과, SPAuNC의 EPR 스펙트럼에서는 약 1700G, 3200G 및 2000 내지 4500G에서 EPR 신호가 관찰된 반면, DAuNC에서는 특이적인 EPR 신호가 관찰되지 않았다 (도 6). 구체적으로, 1700G에서의 신호는, SPAuNC의 Au 원자에서, 짝이 없는 전자의 triplet spin state를 의미한다. 3200G에서의 날카롭고 강한 신호와 2000G 내지 4500G에서의 넓은 신호는 분리/국부화 (localized) 및 이동/비국부화된 (delocalized) 스핀의 존재를 암시한다. 따라서, SPAuNC의 자성은 SPAuNC 표면 상, 금 원자의 d- 밴드에서, 국부화된 스핀과 비국부화된 스핀 사이의 상호 작용에 의해 유도됨을 알 수 있었다.

[0105] 한편, SQUID 분석에서는, SPAuNC의 전형적인 초상자성 거동이 4K 및 300K에서 명확하게 관찰되었던 반면 (도 7, (A)), DAuNC에서는 전형적인 상자성 특성이 관찰되었다 (도 7(C)). SPAuNC에서 AuNPs의 자화도는 300 k의 10 kOe에서 4.7 emu/g Au [또는 0.16 μ_B (자기 모멘트) / Au 원자]에 이르렀으며 (도 7 (B)), 이러한 결과는 300 K의 10 kOe에서, 상업용 초상자성 표준 [1.6 emu/g Gd ((Magnevist[®], 바이엘 헬스 케어, 레버쿠젠, 독일) 및 2.4 emu/g SPION (Resovist[®], Schering AG, Berlin-Wedding, 독일)]에 비해서도 2배 이상 높은 수준의 값을 가지는 것이었다.

[0107] 2) XPS(X-ray photoelectron spectroscopy)를 이용해 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체, 금 이온 소스인 chloro(trimethyl phosphine)gold (I), HBV 캡시드 단백질 나노입자의 결합 에너지 변화를 측정함으로써, 단백질 나노입자의 표면에 존재하며, 금 나노입자가 환원되는 과정에 중요한 역할을 한다고 알려진 원소들의 결합 에너지 변화를 측정하였다. 해당 원소의 결합에너지 변화를 기반으로 단백질 나노입자 표면에서 금 나노입자가 환원되는 과정 중, 전하 전달체 역할을 하는 원자를 유추하였다. XPS 측정 샘플을 만들기 위해 금-단백질 나노입자 융합체, 금 이온소스인 chloro(trimethyl phosphine)gold (I), HBV 캡시드 단백질 나노입자 수용액을 각각 실리콘 웨이퍼 표면에 드랍 코팅한 후, 진공 챔버에 건조하였다. 이후, 분석 장비를 통해 분석된 피크는 XPS 소프트웨어를 통해 피팅하며, 이를 기반으로 최종적인 각 원소의 결합에너지 변화를 측정하였다.

[0108] SPAuNC의 Au 결합 에너지와 관련하여, 83.7 eV 및 87.4 eV의 피크는 벌크한 금 원자 (각각 Au 4f_{7/2}와 Au 4f_{5/2})의 피크와 일치하였는바, 82.9 eV 및 86.6 eV의 피크는 SPAuNC에서 표면 Au 원자의 비점유/고갈 d-밴드 상태를 보여주었다 (도 8, 상단). 또한, SPAuNC (132.7 eV)와 Chloro(trimethyl phosphine) gold (I) / (CH₃)₃PAuCl (131.7 eV)의 포스핀 포스포러스의 P 결합 에너지의 차이는, SPAuNC의 Au 원자 표면에서 포스핀 포스포러스 방향으로 전하의 이동이 있었음을 나타내었다 (도 8, 중간). 한편, SPAuNC에서는, 0 1s의 4 개의 피크는 다음과 같이 확인되었다: 1) 티로신의 방향족 C-OH (533.6eV), 2) 세린의 지방족 C-OH (532.9eV), 3) COO- (531.3eV) 및 4) O=글루타민의 CN (532.0eV). 특히, HBV 캡시드와 비교하여, SPAuNC에서는 새로운 0 1s 피크 (536. 2 eV)가 관찰되었으며, 이는 (CH₃)₃PAu⁺와 배위 결합을 통해 결합된 His₆ 부근에 존재하는 산소 즉, Tyr₆의 측쇄 산소라고 추정할 수 있다. 즉, 반응하지 않은 티로신의 방향족 C-OH의 O 결합 에너지 (533.6eV)와 비교하여, Tyr₆의 금과 화학 흡착된 산소의 증가된 결합 에너지 (536.2eV)는, 표면 Au 원자로부터 Tyr₆의 근접한 측쇄 산소 원자로 전하 이동이 진행되었음을 나타낸다 (도 8의 하단).

[0109] 상기의 결과들을 종합해 보면, 우선, 포스핀-금 이온 [(CH₃)₃PAu⁺]은 (CH₃)₃PAu⁺와 His₆ 사이의 배위 결합을 통해 조작된 HBV 캡시드에 화학흡착된다. 이후, 화학흡착된 (CH₃)₃PAu⁺ AuNPs는 최적의 환원 조건 하 (NaBH₄)에서 2nm 미만의 크기로 형성된다. 이후, 초미세의 AuNP는 포스핀 포스포러스에 화학적으로 결합하고, Tyr₆의 근접 측쇄 산소에 화학흡착된다. 이후, 전하 이동은 AuNP의 표면 Au 원자로부터 포스핀 포스포러스와 티로신의 산소 방향으로 진행되어, 비어있는 d 상태의 발생, Au 표면 원자의 d- 밴드에서의 국부적인 스핀과 비국부적인 스핀간의 상호 작용을 일으킨다. 이러한 일련의 과정을 통해, 본 발명의 SPAuNC는 궁극적으로 초상자성 특징을 지니게된

다 (도 9).

[0111] **[실시에 9] 제조된 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 암세포 표적 지향능 검증 - in vitro**

[0112] EGFR 표적형 펩타이드를 포함하는 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 EGFR 과발현 암세포에 대한 표적 지향능을 검증하기 위하여 EGFR이 과발현된다고 알려진 인간 유방암 세포주 (MDA MB-468 cell line)를 이용하여 표적 지향능 검증 실험을 진행하였다. 구체적으로, 각각의 35파이 cell culture plate에 인간 유방암 세포를 성장시키고, 실시예 1에서 얻은 EGFR affibody 유무에 따른 두 종류의 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체 (EGFR 표적형 펩타이드가 없는 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체, 및 EGFR 표적형 펩타이드를 포함하는 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체)의 N-말단과 상용화된 자기온열 치료제인 초상자성 산화철 나노입자 (SPION)의 표면에 Cy5.5 ($\lambda_{ex} = 675 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 694 \text{ nm}$)를 표지하였다. 이후, 1시간 동안 인간 유방암 세포에 물질을 처리하여 세포 내로의 입자 흡수 실험을 실시하였다. 그 결과, EGFR 표적형 펩타이드를 포함하는 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체를 처리한 세포주에서만 Cy5.5에 의한 형광이 관찰되었다. 즉, 인간 유방암 세포주의 상기 융합체에 대한 흡수 (uptake)는 EGFR 표적 펩타이드와 EGFR 펩타이드간 특이적 상호작용에 의해 현저하게 향상되었으며, 이러한 EGFR-매개-엔도사이토시스를 통해 세포 표적능을 높일 수 있음을 알 수 있었다 (도 10). 또한, 종래의 기술적 이론을 토대로 형광 세포 이미지를 분석하여 SPAuNC의 세포 내 국부화 (intracellular localization)를 확인할 수 있었다: 즉, 반점 형광 패턴은 전형적으로 엔도솜 구획 내 형광 분자가 존재함을 의미하는 반면, 번져있거나/확산된 형광 신호는 세포질 내의 신호를 나타내는바, 본 발명의 SPAuNC는 세포질 내 존재함을 확인할 수 있었다.

[0114] **[실시에 10] 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 암세포 자기온열 치료효능 및 안전성 검증 - in vitro**

[0115] 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체를 흡수한 EGFR 과발현 유방암 세포에 대하여, 1) 교류 자기장을 처리하지 않은 경우, 상기 물질 자체가 세포에 미치는 독성, 또는 2) 교류 자기장을 처리한 후 자기온열 효과에 의해 암세포를 사멸시키는 효과를 확인하고자 하였다. 교류 자기장을 처리하기 전, 상기 물질 자체의 독성을 확인하기 위해, 우선, 96 well plate에 well 하나당 5,000개의 EGFR 과발현 유방암 세포인 MDA-MB-468 세포주를 배양하였다. 이후, 다양한 농도 (단백질 기준 0, 50, 150, 300 μg)의 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체를 24 시간 동안 처리한 뒤, CCK-8 키트를 이용해 각 경우에 대한 유방암 세포의 cell viability를 측정하였다. 그 결과, 교류 자기장을 처리하지 않은 경우, 과량의 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체가 투여되었음에도 불구하고, MDA-MB-468 세포의 80% 이상이 생존하고 있을 정도로, 세포 특이적 독성이 나타나지 않는 것을 확인하였다 (도 11, (A)).

[0116] 또한, 초미세 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체를 흡수한 암세포에 교류 자기장 (36 kHz, 10 kW, 30min)을 처리한 경우, 대조군인 HBV 캡시드 단백질 나노입자 및 미세 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체에 비해 우수한 자기온열 치료효과를 보였으며, 다량의 암세포가 괴사됨을 확인할 수 있었다 (도 11, (B)). 상기의 결과들로부터, 실시예 7에서 검증한 PBS 상에서의 온도 증가능을 바탕으로 하여, 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체는 암세포의 자기온열 치료에 이용할 수 있음을 검증하였다.

[0118] **[실시에 11] 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 자기공명영상 조영제로서의 기능 검증 - in vitro**

[0119] 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체 표면의 금 나노입자의 초상자성을 이용하여, 자기공명영상 조영제로 활용할 수 있는지를 확인하고자, 해당 물질에 대한 T1 및 T2 조영제로서의 기능성을 검증하였다. 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체에 대해 4.7-T의 세기를 갖는 MRI 장비를 활용하여 in vitro 조건에서 농도에 따른 T1 및 T2 relaxivity를 측정하였다. 실험 진행 과정에서 T1 relaxation time 측정은 다음과 같은 조건에서 진행되었다: TR = 100-5000 ms, TE = 8.25 ms, FOV = 60 x 40 mm, matrix = 192 x 128, and slice thickness = 1.0 mm. 한편, T2 relaxation time 측정은 다음과 같은 조건 하에서 진행되었다: TR = 2000 ms, TE = 6.5-208 ms, FOV = 60 x 40 mm, matrix = 192 x 128, and slice thickness = 0.8 mm. 일

반적으로 r_1 에 대한 r_2 의 비율이 높을수록 조영제는 T2 강조 영상에 더 적합하다고 알려져 있다. 본 발명의 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 경우, r_2/r_1 의 비율은 6.8로서 매우 높게 관찰되었고, 현재 상용화 중인 Resovist®의 결과 (6.2)와도 견줄 만한 정도의 값을 나타내었는바, 높아 T2 조영제로서 활용 가능성이 높음을 확인하였다 (도 12, (A)). 또한, 상기 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 농도에 따른 T2 MRI 조영 효과를 확인하고자 하였으며, 본 실험은 상기 T2 relaxation time을 측정하기 위한 조건과 동일하게 실시하였다. 그 결과, 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 농도, 즉 표면의 초미세 금 나노입자의 농도가 증가함에 따라 T2 조영효과가 이에 비례하여 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (도 12, (B)).

[0121] [실시예 12] 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 체내 표적 기능 검증 - in vivo

[0122] 세포 단위에서 효능이 검증된 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체에 대하여, 체내 표적 지향능을 검증하였다. EGFR이 과발현된다고 알려져 있는 유방암 세포 (MDA-MB-468)가 피하 또는 간에 이식된 동물 모델(BALb/c nude mouse)을 대상으로, 시간의 경과에 따른 체내 나노입자 융합체의 분포를 확인하였다. 본 실험을 위해 동물(BALb/c nude mouse)의 피하에 3×10^7 개의 EGFR 과발현 유방암 세포를 주입함으로써, 피하에 EGFR이 과발현된 암이 형성된 동물 모델을 확립하였다. 이후, 실시예 1에서 얻은 EGFR affibody 유무에 따른 두 종류의 초미세 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체 (EGFR 표적형 펩타이드가 없는 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체 및 EGFR 표적형 펩타이드를 포함하는 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체)의 N-말단에 Cy5.5 ($\lambda_{ex} = 675 \text{ nm}$ / $\lambda_{em} = 694 \text{ nm}$)를 표지한 뒤, 초미세 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자를 표면 금 나노입자 양 기준으로 $0.5 \mu\text{g}$ 정맥 주사하였다. 이후, 형광이미지 분석을 통해 시간에 따라 체내 형광량을 분석하여 각 입자의 시간별 체내 분포를 측정하였다. 그 결과, 본 발명에 따른 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체가 효과적으로 EGFR이 과발현된 암세포에 전달됨을 in vivo 상에서 검증하였다 (도 13, (A) 및 (B)).

[0123] 또한, EGFR이 과발현된 유방암 세포가 간에 이식된, 동물모델 (BAL B/C nude mouse)을 대상으로, 체내 표적 지향능을 검증하였다. EGFR이 과발현된 유방암 세포가 간에 이식된, 동물 모델을 만들기 위하여 마우스(BAL B/C nude mouse)를 개복하여 간 좌엽에 3×10^7 개의 EGFR 과발현 유방암 세포를 주사하였다. 제조된 해당 동물 모델에 대하여, 상기과 마찬가지로, EGFR affibody 유무에 따른 두 종류의 초미세 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 암세포 전달능을 비교하였다. 그 결과, 본 발명에 따른 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체는 암세포가 이식된 간 조직에 보다 특이적으로 전달됨을 확인하였다 (도 14, (A)). 더불어, 적출한 간을 조직 고정액 (4 (v/v) % formaldehyde)에 고정시킨 후, 상기 고정된 조직을 파라핀에 포매시키고 이를 $5 \mu\text{m}$ 두께로 절편화하였다. 이후, 상기 조직절편을 면역형광 염색하여 공초점 현미경을 통해 조직 변화를 관찰하였다. 그 결과, 본 발명에 따른 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체는 간 조직 내에서도 정상 세포가 아닌, EGFR이 과발현된 암세포에 전달됨을 확인하였다 (도 14, (B)).

[0125] [실시예 13] 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 체내 자기온열 치료효능 검증 - in vivo

[0126] 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 체내 자기온열 치료효과를 검증하기 위하여, 우선, EGFR이 과발현된다고 알려져 있는 유방암 세포주 (MDA-MB-468)가 피하에 이식된, 동물 모델(BALb/c nude mouse)을 대상으로 실험을 진행하였다. 실시예 12에서 확립된, 피하에 암세포가 이식된 동물 모델에 대하여, 1) 표면 금 나노입자 양 기준으로 $1.5 \mu\text{g}$ 에 해당하는 SPAuNC를 정맥 주사로 투여한 후 9시간 뒤 교류 자기장(360 kHz, 10 kW, 10 min)을 처리한 경우와 2) SPAuNC의 투여없이 교류 자기장만을 적용한 경우, 시간의 경과에 따른 암의 크기 변화를 관찰 및 비교하였다. 이와 함께, 상기 동물 모델의 체중과 암의 크기를 정량화하였고, 암의 크기는 (장경)²×(단경)×0.5 (mm³)의 식을 통해 산출되었다.

[0127] 그 결과, 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체를 투여한 뒤 교류 자기장을 처리한 경우, 암이 완전히 치료 또는 제거되었으며, 이를 통해 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 자기온열에 의한 암 치료 효과를 확인하였다. 반면, 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 투여없이 교류 자기장만 처리한 경우, 치료 효과는 전혀 관찰되지 않았고, 지속적으로 암의 크기가 증가하는 것을 볼 수 있었다. 따라서, 피하에 이식된 암에 대한 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 자

기온열 치료효과를 in vivo 상에서 검증하였다 (도 15 (A) 및 (B)).

[0128] 또한, 실시예 12에서 확립된, 간에 암세포가 이식된 동물 모델에 대하여, 1) 표면 금 나노입자 양 기준으로 1.5 μg 에 해당하는 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체를 정맥주사로 투여한 후 3시간 뒤 교류 자기장을 적용한 경우와 2) 교류 자기장만을 적용한 경우 (negative control), 이들에 대한 자기온열 치료 효과를 확인하였다. 그 결과, 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체를 처리한 경우에서만 암세포 사멸 효과가 관찰되었다 (도 16, (A) 및 (B)). 따라서, 심부 조직의 암에 대한 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 자기온열 치료효과를 in vivo 상에서 검증하였다.

[0129] 추가적으로, 상기 자기온열에 의한 암 치료가 암 이외의 정상 장기 조직에 미치는 영향을 확인하고자 다양한 조직을 대상으로 H&E staining을 실시하였다. 상기 초미세 금-단백질 나노입자를 주입하여 치료를 진행한지 1일, 7일, 18일 경과한 후, 1) 상기 초미세 금-단백질 나노입자를 주입하고 자기장을 처리한 그룹과 2) 자기장만 처리한 그룹을 대상으로, 심장, 간, 폐, 비장, 신장, 이자를 적출하였고, 이들을 조직 고정액(4 (v/v) % formaldehyde)에 고정시켰다. 상기 고정된 조직을 파라핀블록에 포매키고 이를 5 μm 두께로 절편화한 뒤, hematoxylin & eosin (H&E)로 염색하여 현미경을 통해 각 조직을 확인하였다. 그 결과, 초미세 금-단백질 나노입자를 주입하고 교류 자기장을 처리해 준 경우, 자기장만 처리한 그룹과 마찬가지로 정상 장기 조직에 전혀 손상이 없음을 확인하였다 (도 17).

[0131] **[실시예 14] 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 체내 자기공명영상 조영제로서의 효능 검증 - in vivo**

[0132] 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 체내 자기공명영상의 조영제로서의 효능을 검증하기 위해, 상기 실시예 12에서 확립된, EGFR이 과발현된 유방암 세포주 (MDA-MB-468)가 피하에 이식된, 동물 모델 (BALB/c nude mouse)을 대상으로 실험을 진행하였다. 피하에 암세포가 이식된 동물 모델에 대해서 표면 금 나노입자 양 기준으로 1.5 μg 에 해당하는 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체를 정맥주사로 투여한 후, 4.7-T의 교류 자기장 세기를 갖는 자기공명영상 촬영 장비를 이용해 T2 MRI 촬영을 진행하였다. 이때, 마우스는 산소와 1%의 isofluorane의 혼합 가스를 이용하여 호흡마취 하였으며, 체온 유지를 위해 동물 전용 베드 상에서 실험을 진행하였다. T2 자기공명영상의 촬영은 다음과 같은 조건에서 진행되었다: TR = 3500 ms, TE = 32.118 ms, FOV = 35 x 35 mm, matrix = 256 x 256, and slice thickness = 1.0 mm, NEX = 2, flip angle = 180 °. 피하에 암이 이식된 동물 모델에 대해 자기공명영상 촬영을 진행한 결과, 시간에 따라 피하의 EGFR 과발현 암 이식 부위가 확연히 조영되어 주변보다 어둡게 관찰되었으며 이를 바탕으로 체내에서 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 T2-MRI 조영제로서의 효능을 검증하였다 (도 18).

[0133] 상기 실시예 13에서 확립된, EGFR이 과발현된 유방암 세포주 (MDA-MB-468)를 간에 이식하여 제조된 심부 조직 암 동물모델 (BAL B/C nude mouse) 및 대조군인 정상 쥐에 각각 표면 금 나노입자 양 기준으로 1.5 μg 에 해당하는 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체와 PBS를 정맥주사한 후, 4.7-T의 교류 자기장 세기를 갖는 자기공명영상 촬영 장비를 이용해 T2 MRI 촬영을 진행하였다. 이때, 마우스는 산소와 1%의 isofluorane의 혼합 가스를 이용하여 호흡마취 하였으며, 체온 유지를 위해 동물 전용 베드 상에서 실험을 진행하였다. T2 자기공명영상의 촬영은 다음과 같은 조건에서 진행되었다: TR = 3500 ms, TE = 32.118 ms, FOV = 35 x 35 mm, matrix = 256 x 256, and slice thickness = 1.0 mm, NEX = 2, flip angle = 180 °. 대조군 정상 마우스와 심부 조직 암 동물모델의 시간의 경과에 따른 자기공명영상을 비교한 결과, 심부 조직 암 동물모델에서만 암 부위의 T2 조영 효과를 뚜렷히 확인할 수 있었다 (도 19). 따라서, 피하 암 뿐만 아니라 심부 조직 암에 대한 자기공명영상 기반 진단에 있어서, 본 발명에 따른 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체가 T2-MRI 조영제로 활용될 수 있음을 검증하였다.

[0135] **[실시예 15] 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체 표면 금 나노입자의 체내 축적 여부 확인 - in vivo**

[0136] 암이 이식되지 않은 정상 동물(C57BL/6 mouse)에 40 nm 금 나노입자와 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체를 금 나노입자 질량 기준으로 300 μg 씩 정맥주사로 마우스에 투여한 후, 시간에 따른 각 장기 에 축적된 금의 잔류량을 ICP-MS를 통해 분석하였다. 투여한지 1, 4, 7, 10, 14, 21, 28, 35, 42일 후, 각 그룹의 동물에 대해 간, 이자, 신장, 심장 및 대퇴골을 적출하여 조직 고정액 (4 (v/v) % formaldehyde)에 고정시

킨 후, 이를 60 ℃에서 하루간 건조시켰다. 이후 건조된 장기를 30 %의 과산화수소 수용액에 1일 동안 보관한 후, 질산과 황산이 1:3의 비율로 섞인 왕수를 이용해 장기 내의 금을 완전히 용해시켰다. 이후, 각 샘플을 염산으로 1/10로 희석하여 0.45 mm의 테플론 필터로 걸러내었다. 최종적으로 ICP-MS를 이용하여 걸러진 용액 내의 금의 양을 정량적으로 분석하였다.

[0137] 그 결과, 하기 표 2에 나타낸 바와 같이, 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 경우, 초기 금 투여량의 약 21%가 1일 만에 간에 축적되었으나, 6주 만에 1% 미만으로 감소하는 것을 확인하였다. 금 나노입자 (40 nm)의 경우, 1일 만에 초기 금 투여량의 약 38%가 간에 축적되었고 6주가 지난 후에도 약 19%가 계속 간에 잔류하고 있는 것이 관찰되었다 (심장 및 대퇴골에서는 유의적인 양의 금 나노입자가 검출되지 않음). 즉, 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 경우, 간 내 금 잔류량이 급속히 감소함과 동시에 신장에서 다량의 금이 검출되었는데, 간에 축적되어 있던 금 나노입자가 신장을 거쳐 소변을 통해 체외로 배출되고 있음을 유추해 볼 수 있었다.

[0138] [표 2]

Time (day)	Au contents $\mu\text{g}(\text{Au})$ of % of the given dose ¹					
	Liver		Spleen		Kidney	
	초미세 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체	Synthetic AuNP (40 nm)	초미세 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체	Synthetic AuNP (40 nm)	초미세 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체	Synthetic AuNP (40 nm)
1	63.9/21.3	112.6/37.5	0.6/0.2	0.5/0.02	6.4/2.1	ND ²
4	39.2/13.1	72.9/24.3	0.5/0.2	0.5/0.2	6.9/2.3	ND
7	29.2/9.7	66.3/22.1	0.4/0.1	0.6/0.2	6.0/2.0	0.4/0.1
10	24.5/8.2	61.7/20.6	0.3/0.1	0.6/0.2	4.0/1.3	0.3/0.1
14	21.1/7.0	60.5/20.2	0.2/0.1	0.6/0.2	2.7/0.9	0.2/0.1
21	12.9/4.3	59.7/19.9	0.1/0.03	0.5/0.2	2.2/0.7	0.1/0.03
28	8.4/2.8	58.2/19.4	0.1/0.03	0.3/0.1	1.4/0.5	ND
35	3.6/1.2	58.2/19.4	0.1/0.03	0.2/0.1	0.5/0.2	ND
42	2.6/0.9	55.9/18.6	0.1/0.03	0.2/0.1	0.3/0.1	ND

1. Amount of initial dose is 300.0 $\mu\text{g Au}$ (12.0 $\mu\text{g Au/g mouse}$)

2. Not detected (limit of detection of Au in ICP: 20 ppb)

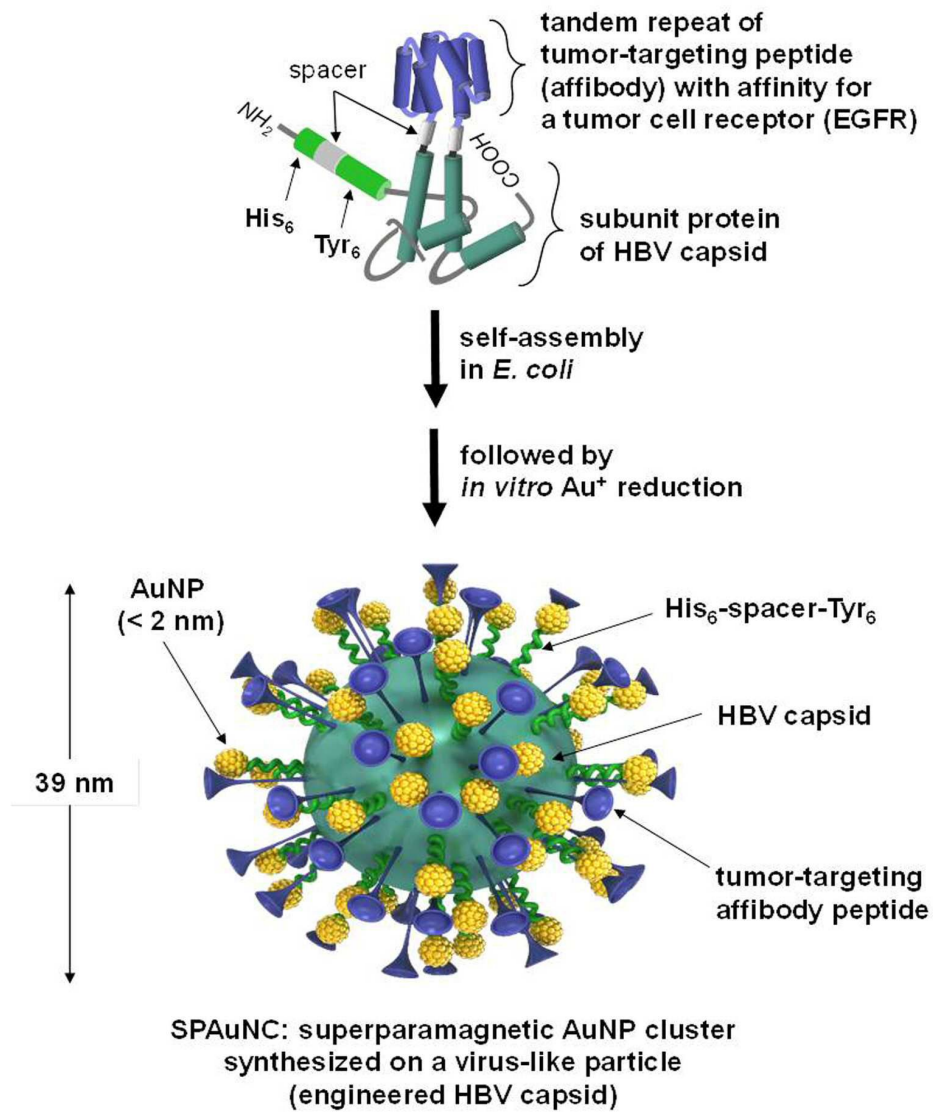
[0139]

[0140] 상기의 실험결과를 보다 구체적으로 확인하기 위해, 20 nm의 금 나노입자 42.6 μg 과 표면 금 나노입자 양 기준으로 42.6 μg 에 해당하는 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체를 정맥주사 하고 3일, 7일, 14일, 21일이 경과한 시점에 6시간 동안 매 30분마다 각 그룹 쥐의 소변을 채취하였다. 채취된 소변을 요일별/그룹별로 분류한 뒤, 전체 부피를 1 ml에 맞춰 희석시켰다. 이후, 희석된 소변을 30 % 과산화수소 수용액에 1일 동안 보관한 후, 질산과 황산이 1:3의 비율로 섞인 왕수를 천천히 가하며 소변 내의 금을 완전히 용해시켰다. 이후, 각 샘플을 염산으로 1/10로 희석하여 0.45 mm의 테플론 필터로 걸러내었다. 최종적으로 ICP-MS를 이용하여 걸러진 용액 내의 금의 양을 정량 분석하였다. 그 결과, 20 nm 금 나노입자에 비해 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체는 빠른 시간 내에 체외로 배출되는 것을 확인하였으며, 이는 적출된 장기에서의 금 잔류량 분석 결과와 일치하였다. 따라서, 상기의 실험 결과들은 초상자성 금 나노입자 클러스터-단백질 나노입자 융합체의 체내 축적으로 인한 독성/부작용 유발 가능성이 매우 낮음을 보여준다 (도 20).

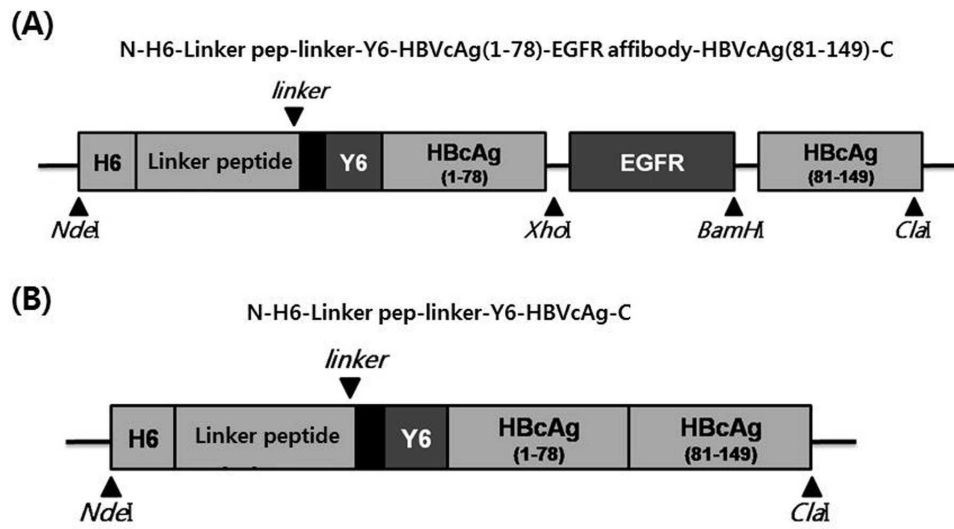
[0142] 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

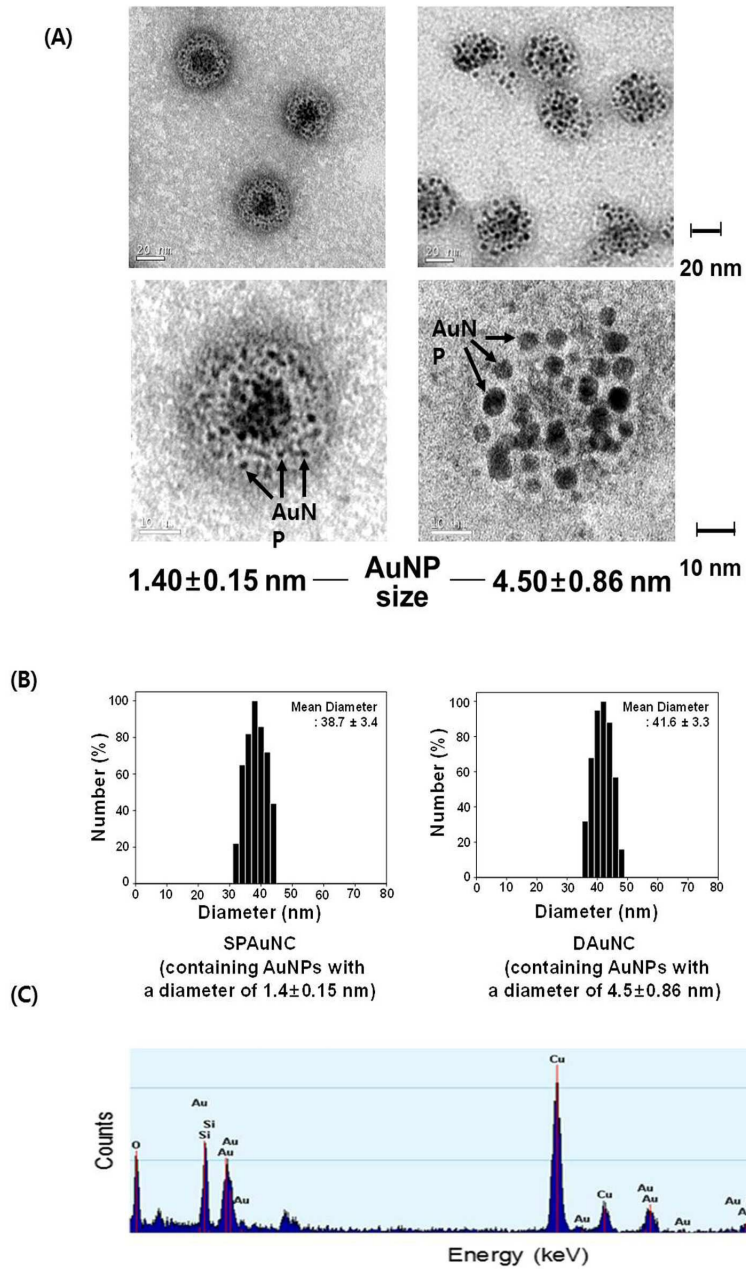
도면1



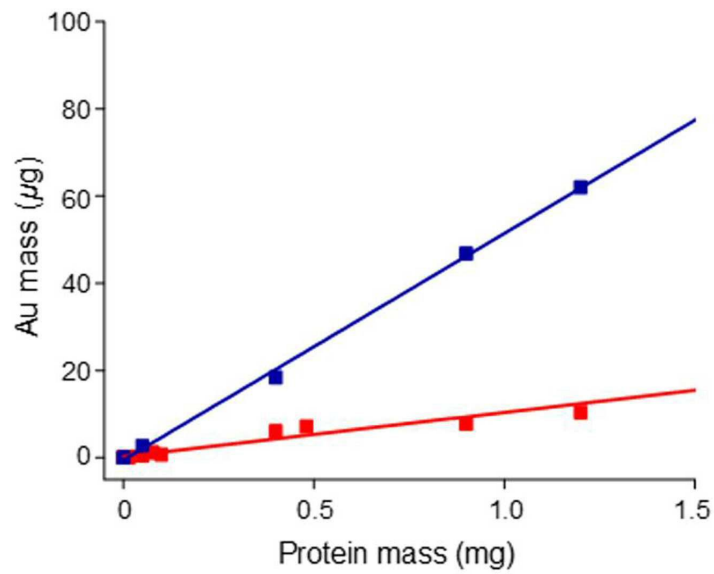
도면2



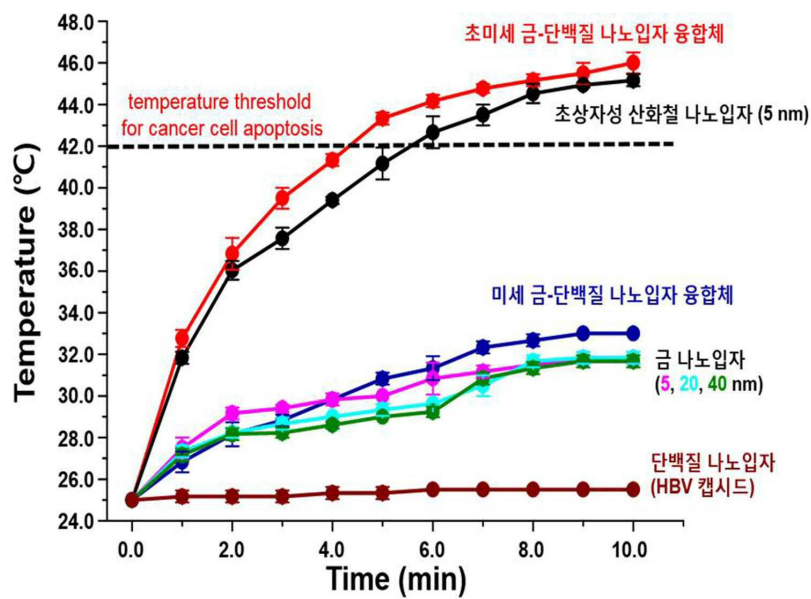
도면3



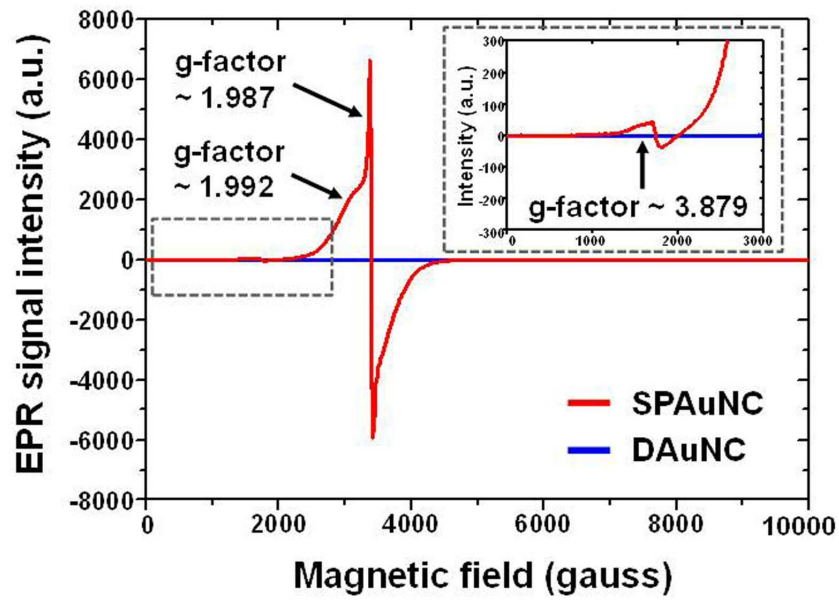
도면4



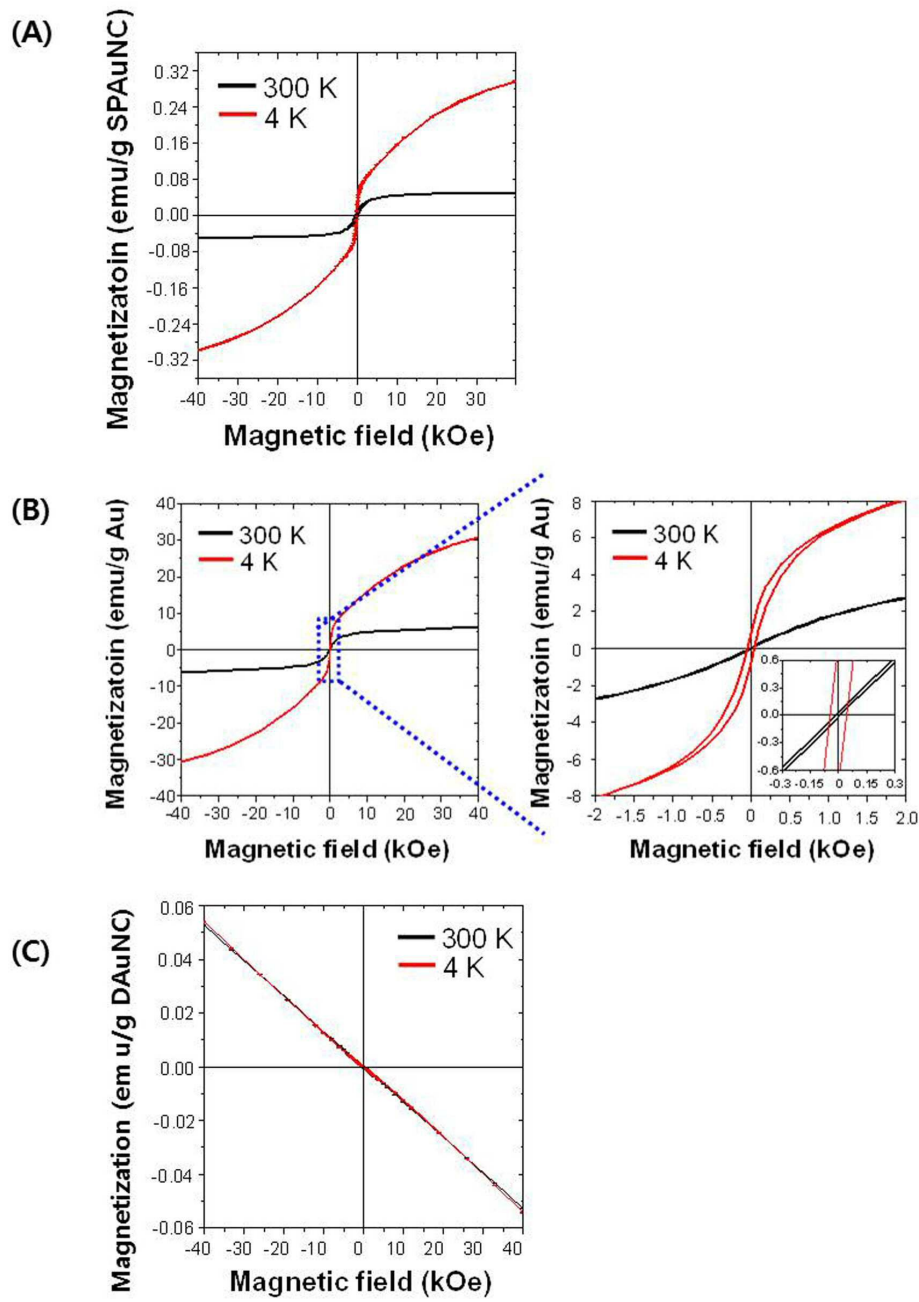
도면5



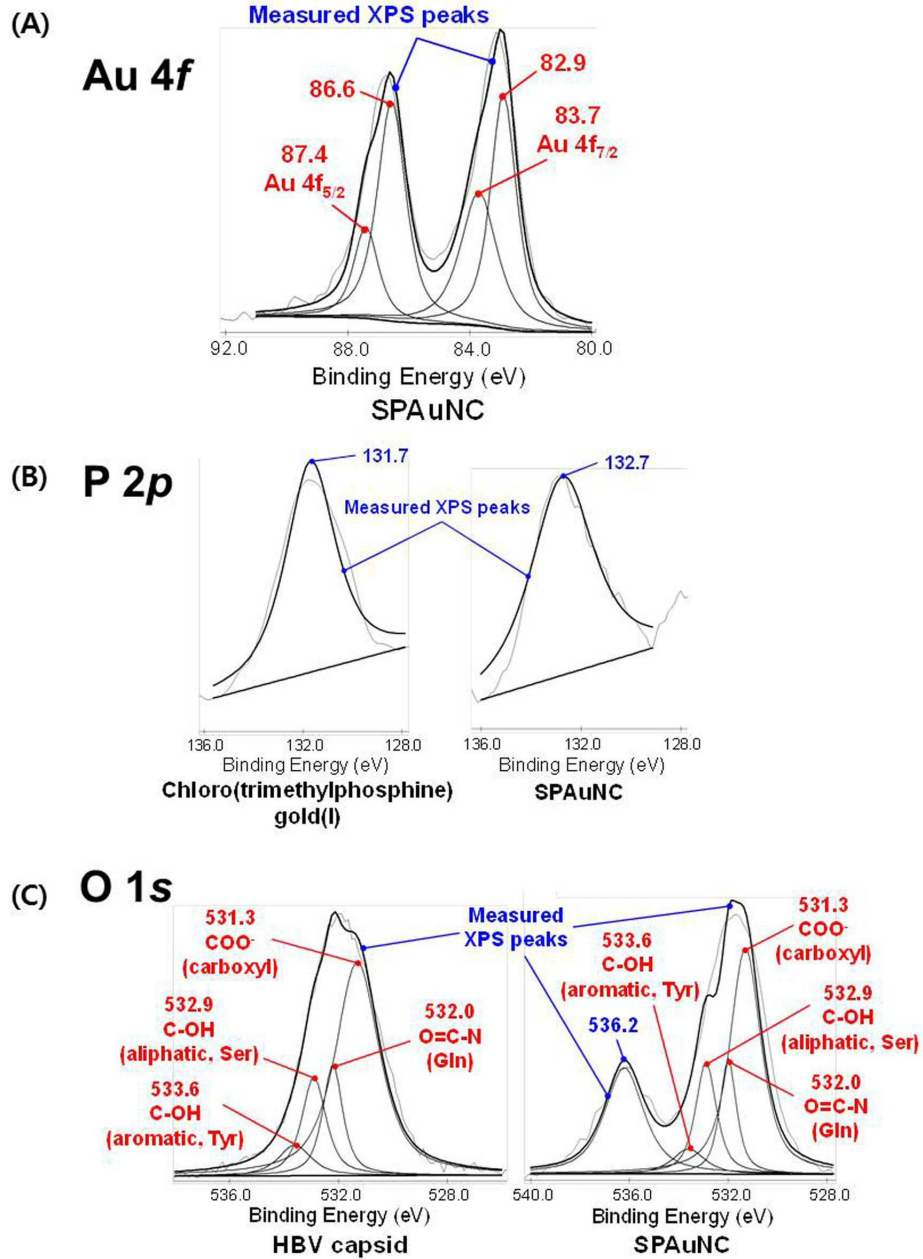
도면6



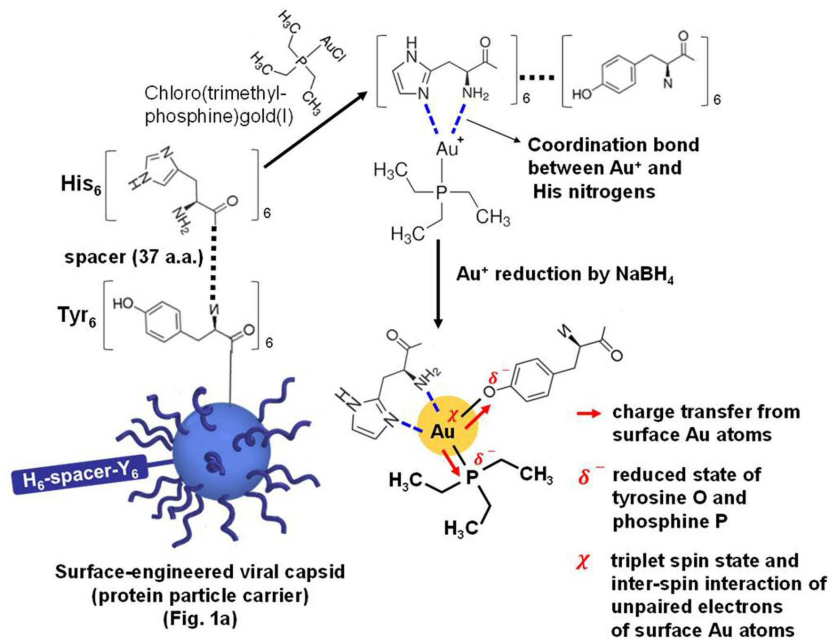
도면7



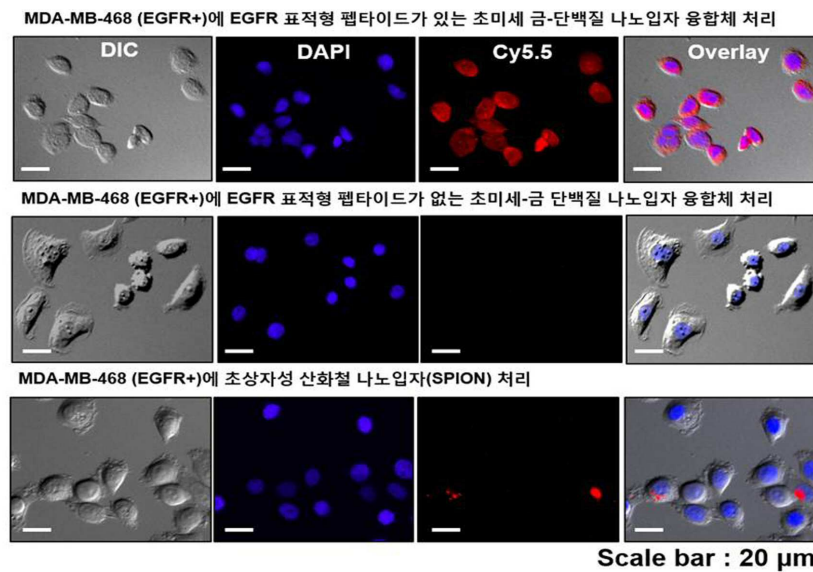
도면8



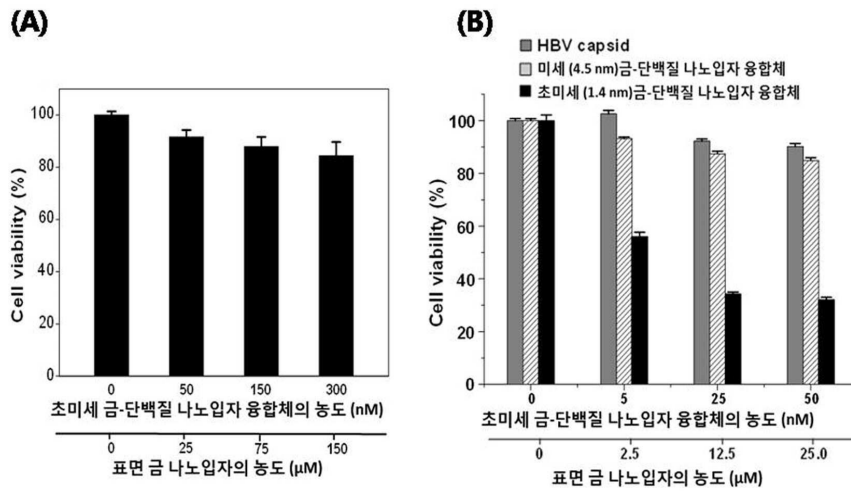
도면9



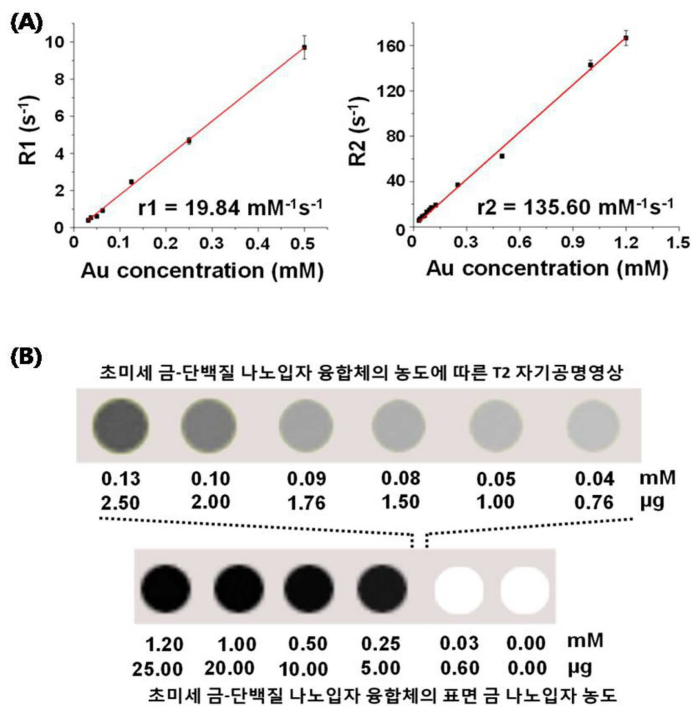
도면10



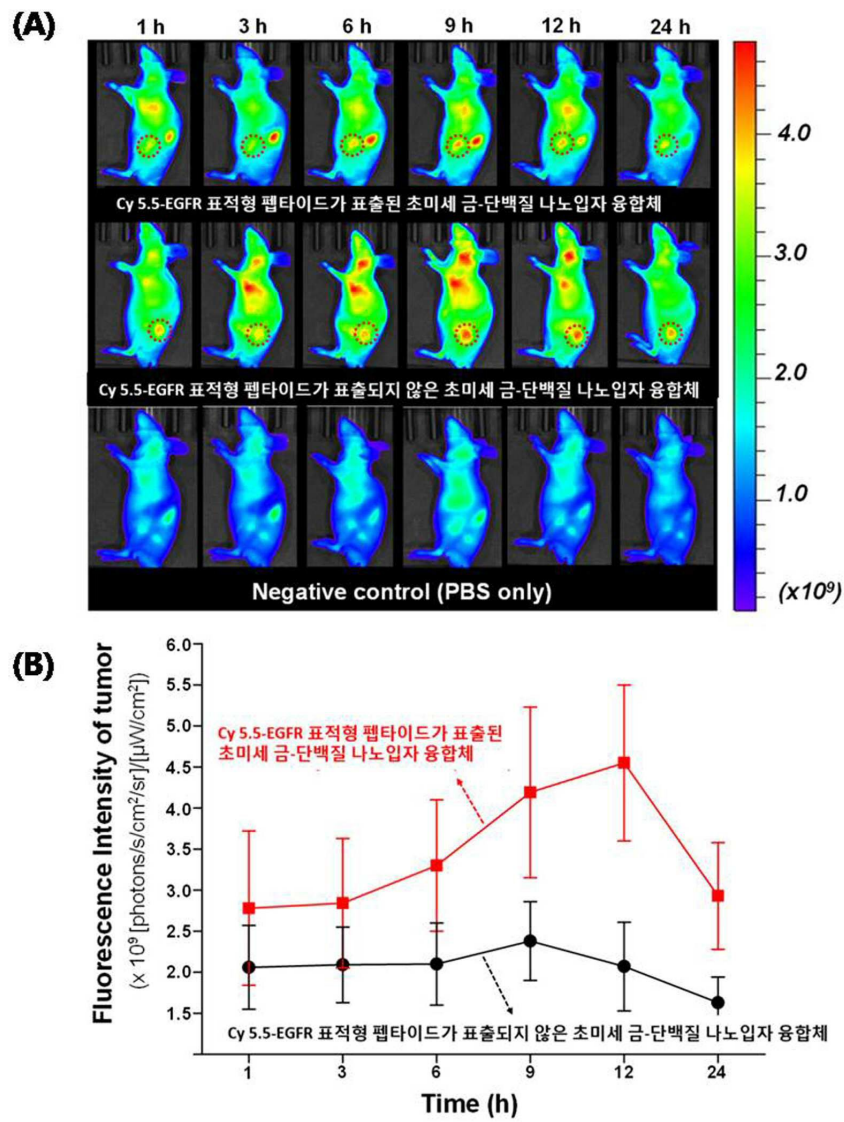
도면11



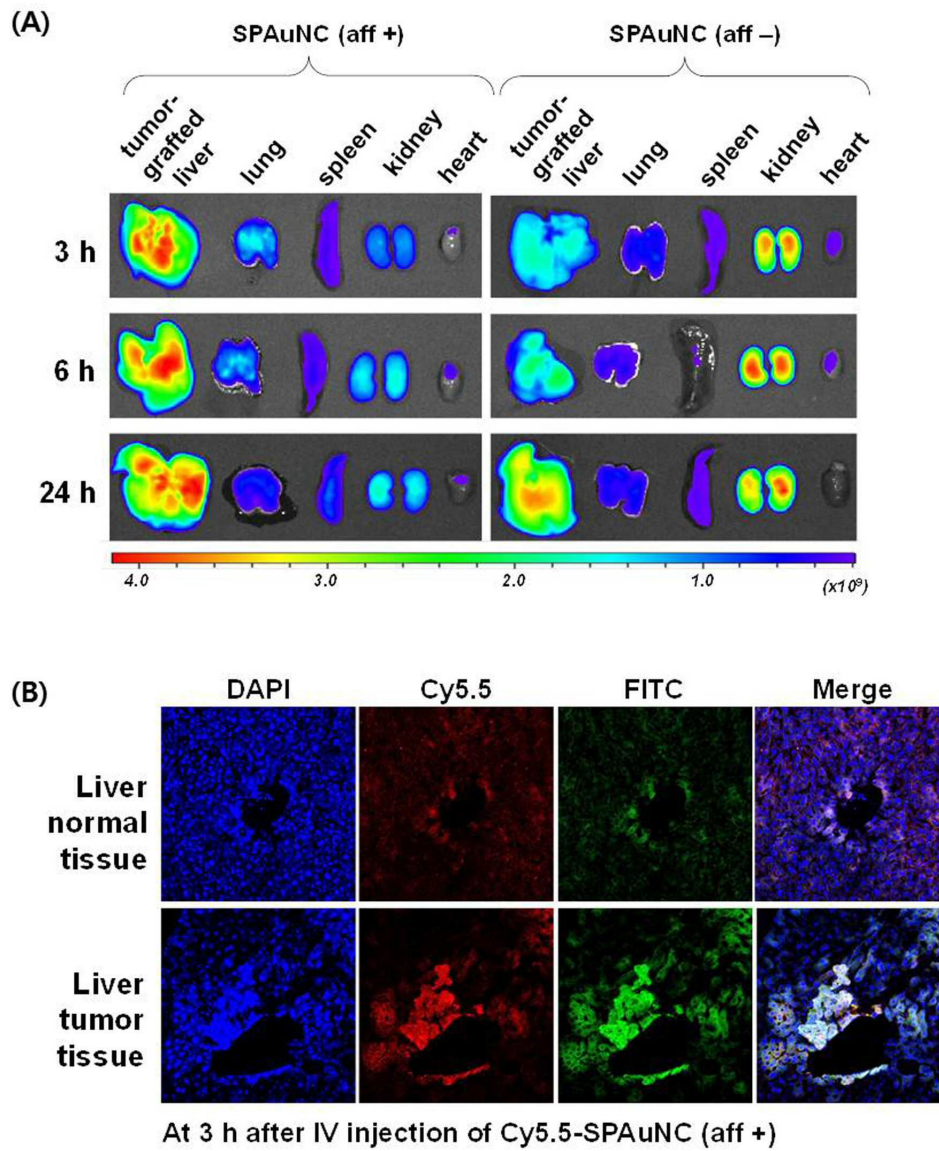
도면12



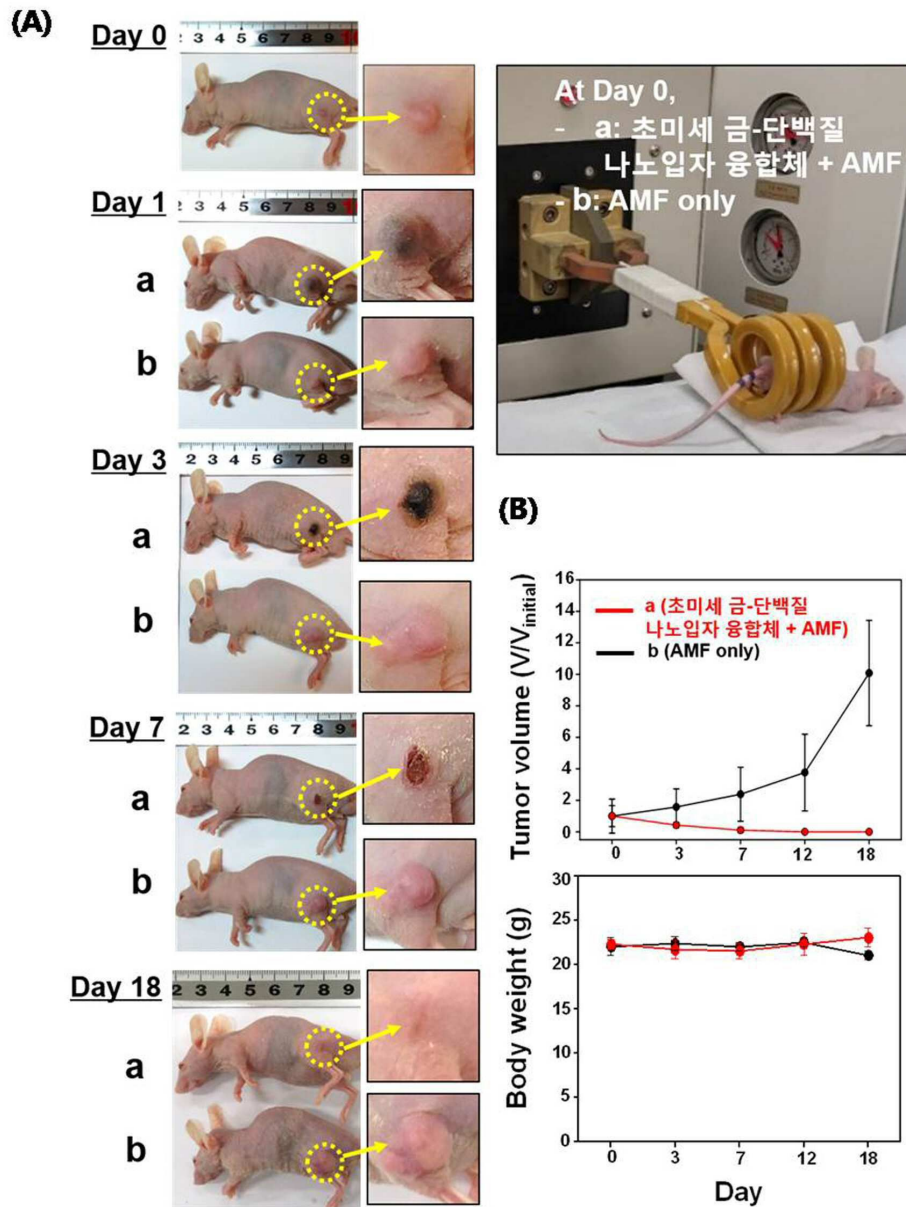
도면13



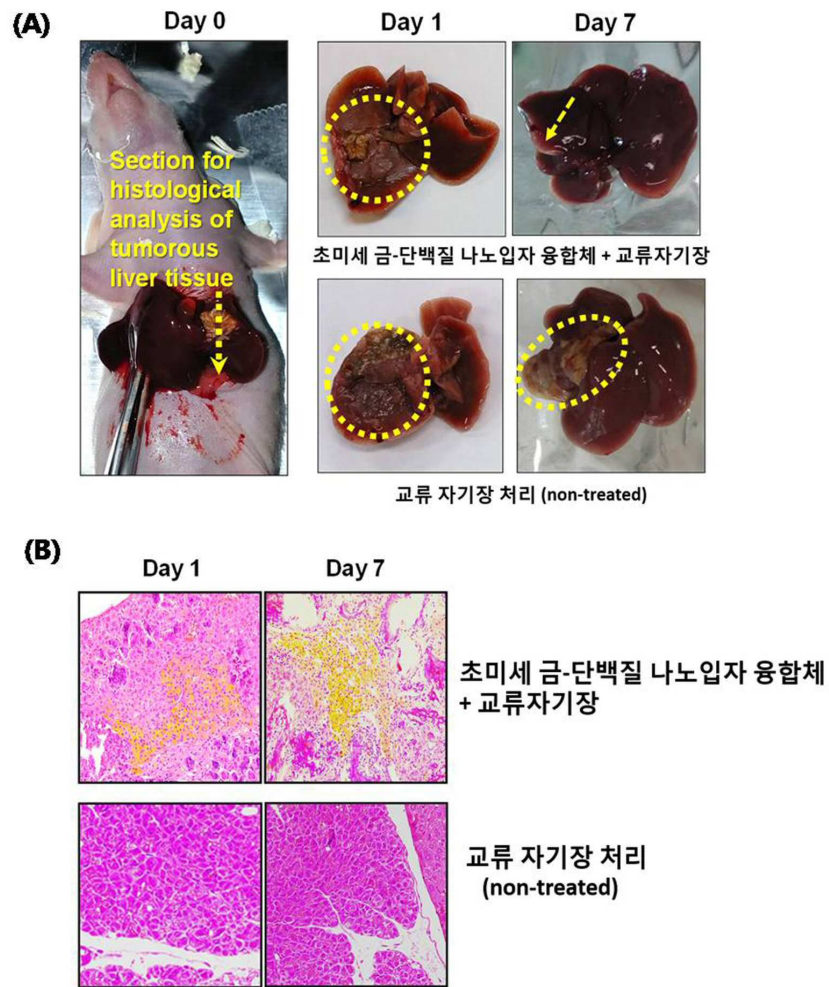
도면14



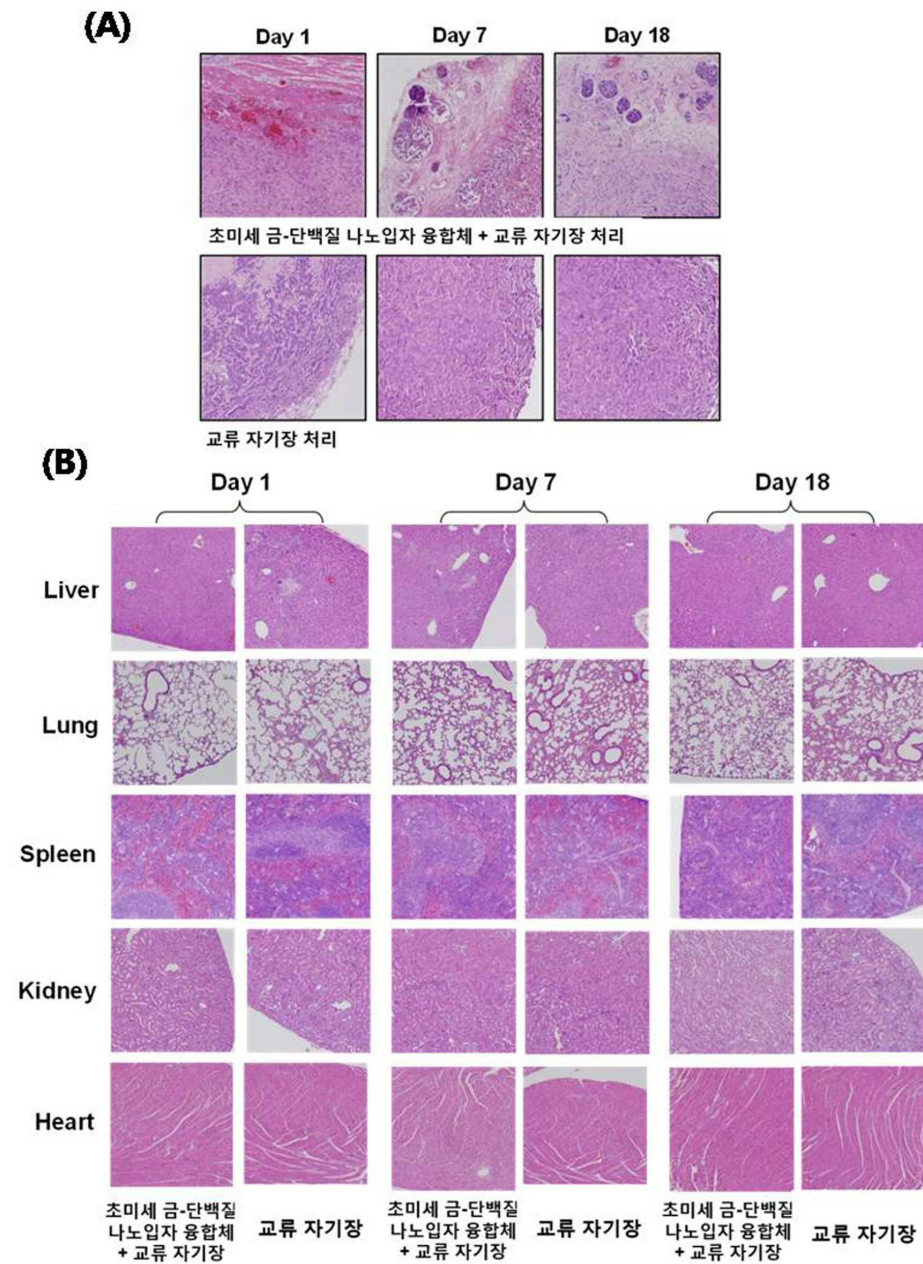
도면15



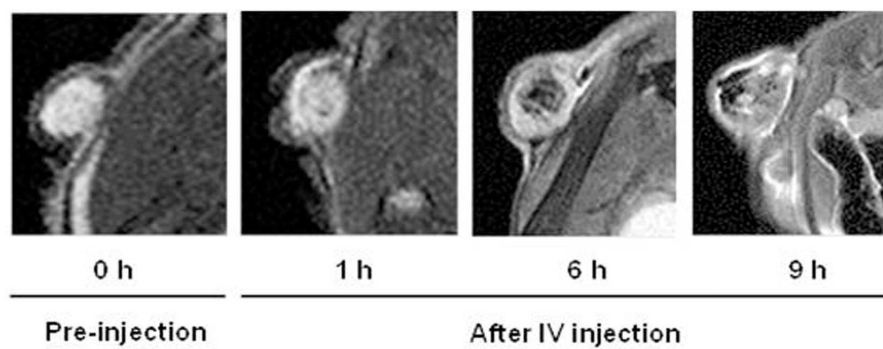
도면16



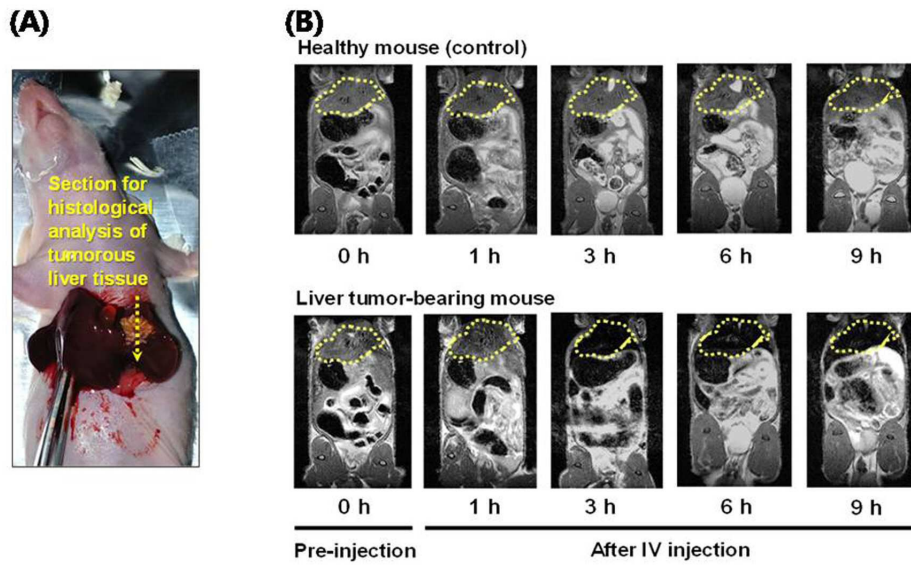
도면17



도면18

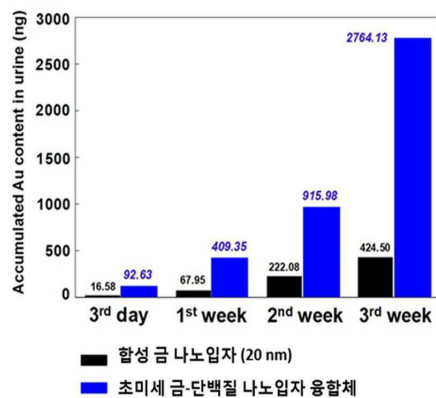


도면19



도면20

Renal Clearance: 초미세 금-단백질 나노입자 융합체 vs. 합성 금 나노입자 (20 nm)



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Superparamagnetic gold nanoparticle cluster- protein nanoparticle hybrid for MRI and magnetic hyperthermia
- <130> P17U13C0787
- <160> 15
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 552
- <212> DNA
- <213> Hepatitis B virus

<400> 1

atggacattg acccgtataa agaatttggg gcttctgtgg agttactctc tttttgcct	60
tctgacttct ttccttctat tcgagatctc ctcgacaccg cctctgctct gtatcgggag	120
gccttagagt ctccggaaca ttgttcacct caccatacag cactcaggca agctattctg	180
tgttggggtg agttgatgaa tctggccacc tgggtgggaa gtaatttggg agaccagca	240
tccagggaat tagtagtcag ctatgtcaac gttaatatgg gcctaaaaat cagacaacta	300
ttgtggtttc acatttctg tcttactttt ggaagagaaa ctgttcttga gtatttgggtg	360
tcttttggag tgtggattcg cactcctccc gcttacagac caccaaatgc ccctatctta	420
tcaacacttc cggaaactac tgttgtaga cgccgaggca ggtcccctag aagaagaact	480
ccctcgctc gcagacgaag gtctcaatca ccgcgtcgca gaagatctca atctcgggaa	540
tctcaatgtt ag	552

<210> 2

<211> 423

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> N-NdeI-H6-LP-Y6-HBVcAg(1-78)-XhoI-C

<400> 2

catatgcac accatcacca tcacatggcg tctagtctgc gtcagattct ggattctcag	60
aaaatggaat ggcgttctaa tgcgggtggc tctggtggcg gaagtggggg aggcactgga	120
ggtggcagcg gcggtgggta ctattactat tactatgaca ttgaccgta taaagaattt	180
ggagcttctg tggagtact ctcttttttg ccttctgact tcttctctc tattcgagat	240
ctctcgaca ccgcctctgc tctgtatcgg gaggccttag agtctccgga acattgttca	300
cctcaccata cagcactcag gcaagctatt ctgtgttggg gtgagttgat gaatctggcc	360
acctgggtgg gaagtaattt ggaagacggt ggcggaggga gtgggggggg cggctactctc	420
gag	423

<210> 3

<211> 249

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> N-BamHI-HBVcAg(81-149)-ClaI -C

<400> 3

ggatccggtg gcggagggtc tgggggaggc ggttccaggg aattagtagt cagctatgtc	60
---	----

aacgttaata tgggcctaaa aatcagacaa ctattgtggt ttcacatttc ctgtcttact 120

tttgggaagag aaactgttct tgagtatttg gtgtcttttg gagtgtggat acgcactcct 180

cccgttaca gaccacaaaa tgcccctatc ttatcaacac ttccggaac tactgttgtt 240

taaatcgat 249

<210> 4

<211> 366

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5'-XhoI-EGFR affibody-BamHI-3'

<400> 4

ctcgaggtgg ataacaaatt taacaaagaa atgtgggcgg cgtgggaaga aattcgtaac 60

ctgccgaacc tgaacggctg gcagatgacc gcgtttattg cgagcctggt ggatgatccg 120

agccagagcg cgaacctgct ggcggaagcg aaaaaactga acgatgcgca ggcgccgaaa 180

gaattcgtgg ataacaaatt taacaaagaa atgtgggcgg cgtgggaaga aattcgtaac 240

ctgccgaacc tgaacggctg gcagatgacc gcgtttattg cgagcctggt ggatgatccg 300

agccagagcg cgaacctgct ggcggaagcg aaaaaactga acgatgcgca ggcgccgaaa 360

ggatcc 366

<210> 5

<211> 1026

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> N-H6-LP-Y6-HBVcAg(1-78)-EGFR affibody-HBVcAg(81-149)-C

<400> 5

catatgcac accatcacca tcacatggcg tctagtctgc gtcagattct ggattctcag 60

aaaatggaat ggcgttctaa tgcgggtggc tctggtggcg gaagtggggg aggcactgga 120

ggtggcagcg gcggtgggta ctattactat tactatgaca ttgaccgta taaagaattt 180

ggagcttctg tggagtact ctcttttttg cttctgact tctttcttc tattcgagat 240

ctcctcgaca ccgcctctgc tctgtatcgg gaggccttag agtctccgga acattgttca 300

cctcaccata cagcactcag gcaagctatt ctgtgttggg gtgagttgat gaatctggcc 360

acctgggtgg gaagtaattt ggaagacggt ggcgagggga gtgggggggg cggtactctc 420

gaggtggata acaaatttaa caagaaatg tgggcggcgt gggaagaaat tcgtaacctg 480

ccgaacctga acggctggca gatgaccgcg ttatttcga gcctgggtgga tgatccgagc 540
cagagcgca acctgctggc ggaagcgaaa aaactgaacg atgcgcaggc gccgaaagaa 600
ttcgtggata acaaatttaa caaagaaatg tggcgcggt gggaagaaat tcgtaacctg 660
ccgaacctga acggctggca gatgaccgcg ttatttcga gcctgggtgga tgatccgagc 720
cagagcgca acctgctggc ggaagcgaaa aaactgaacg atgcgcaggc gccgaaagga 780
tccggtggcg gaggtctgg gggaggcgt tccagggaat tagtagtcag ctatgtcaac 840

gttaatatgg gcctaaaaat cagacaacta ttgtggttc acatttcctg tcttactttt 900
ggaagagaaa ctgttcttga gtatttggtg tcttttgag tgtggatacg cactcctccc 960
gettacagac caccaaagtc ccctatctta tcaacacttc cggaaactac tgttggttaa 1020
atcgat 1026

<210> 6
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer 1
<400> 6
catatgcac accatcacca tcacatggcg tctagtctgc gt 42
<210> 7

<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer 2
<400> 7
atggcgtcta gtctgcgtca gattctggat tctcagaaaa tggaatggcg 50
<210> 8
<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer 3
<400> 8
cagaaaatgg aatggcgttc taatcgggt ggtctcgtg gcggaagtgg g 51
<210> 9
<211> 51

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer 4
 <400> 9
 ggtggcggaa gtgggggagg cactggaggt ggcggcgggtg ggtactatta c 51

<210> 10
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer 5
 <400> 10
 ggcgggtgggt actattacta ttactatgac attgaccgt ataaagaa 48

<210> 11
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer 6
 <400> 11
 ctcgaggtct tccaaattac ttcca 26

<210> 12
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer 7
 <400> 12
 ggatcctcca gggaattagt agtcagc 27

<210> 13
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer 8
 <400> 13
 atcgatttaa acaacagtag ttccggaag tgt 33

<210> 14
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer 9
 <400> 14
 ctcgaggtgg ataacaaatt taacaaa 27
 <210> 15
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer 10
 <400> 15
 ggatcctttc ggcgcctgcg catcgttcag ttttttcgct tc 42