

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 9월 21일 (21.09.2017)



(10) 국제공개번호
WO 2017/159911 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 5/00 (2006.01) C12N 9/02 (2006.01)
C12N 5/0797 (2010.01) C07K 19/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/003208
- (22) 국제출원일: 2016년 3월 29일 (29.03.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2016-0032252 2016년 3월 17일 (17.03.2016) KR
- (71) 출원인: 서강대학교 산학협력단 (SOGANG UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION) [KR/KR]; 04107 서울시 마포구 백범로 35 서강대학교 데이아르관 306호, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 최정우 (CHOI, Jeong Woo); 04385 서울시 용산구 서빙고로 35 용산 시티파크 103-603, Seoul (KR). 김상욱 (KIM, Sang Uk); 05236 서울시 강동구 고덕로 131 강동 롯데캐슬퍼스트아파트 128동 2704호, Seoul (KR). 윤진호 (YOON, Jin Ho); 06608 서울시 서초구 서운로 221 래미안서초스위트아파트 102동 2105호, Seoul (KR). 모하마드나아이 모센 (MOHAMMADNIAEI, Mohsen); 04107 서울시 마포구 백범로 35, 서강대학교 공자가 국제학사 B965호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 양부현 (YANG, Boo Hyun); 08793 서울시 관악구 남부순환로 1922, 청동빌딩 301호, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

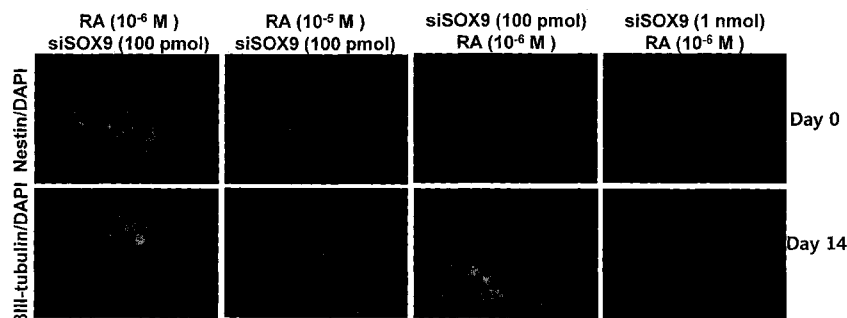
공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: BIOMOLETRON FOR REGULATION STEM CELL DIFFERENTIATION

(54) 발명의 명칭 : 줄기세포 분화 제어를 위한 바이오펜트론

Fig. 12a



(57) Abstract: The present invention provides a bioelectronic device for regulating stem cell differentiation, a method for differentiating stem cells using the same, and a method for manufacturing the bioelectronic device. According to the present invention, it is possible to effectively control the differentiation of stem cells at a single-cell level, and to simultaneously perform a free radical inhibition function.

(57) 요약서: 본 발명은 줄기세포 분화 조절용 생물전자소자, 이를 이용한 줄기세포 분화 방법 및 상기 생물전자소자의 제조방법을 제공한다. 본 발명에 따르면, 단일 세포 수준에서 효과적으로 줄기세포의 분화를 제어할 수 있으며, 자유 라디칼 억제 기능을 동시에 수행할 수 있다.

WO 2017/159911 A1

【명세서】

【발명의 명칭】

줄기세포 분화 제어를 위한 바이오몰레트론

5 【기술 분야】

본 특허출원은 2016년 03월 17일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제 10-2016-0032252 호에 대하여 우선권을 주장하며, 상기 특허출원의 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

본 발명은 신경줄기세포 분화 제어를 위한 바이오몰레트론에 관한 것으로, 보다 상세하게는 바이오(재조합 단백질)/유기(금속 이온이 결합된 DNA염기쌍)/무기 물질(나노입자 복합체)로 구성된 바이오몰레트론 장치이다.

【배경 기술】

세포 제어 기술은 세포 기반의 바이오센서, 약물 스크리닝, 줄기세포 분화 등 다양한 연구 분야에 필수적인 차세대 기술로써 큰 주목을 받고 있다. 특히, 줄기세포 치료제, 재생의학(regenerative medicine) 분야의 연구 수행에 있어, 세포 수준의 선택적 분화 제어는 필수적인 기술이다.

신경줄기세포의 분화를 조절하기 위해 다양한 기술들이 개발되어 왔지만 세포 수준의 분화 조절은 한계점을 보이고 있다. 전기적 자극 기반 분화 유도 기술은 전압에 의한 세포 손상 및 과도한 자유 라디칼(free radical) 생성으로 세포를 사멸시킬 수 있고 분화 유도 인자(differentiation inducing factor, DIF) 기반 유도 기술은 벌크(Bulk) 상태의 세포 기반으로, 세포에 효율적인 DIF 전달 한계를 가지고 있고, 세포 배양 환경 기반 유도 기술은 선택적인 방향으로 분화 유도 한계를 가지고 있다. 또한, 줄기세포 분화 과정 중에서 발생하는 자유 라디칼은 분화 안정성에 큰 영향을 주기 때문에, 효율적인 분화 조절을 위해서는 직접적인 제어가 필요하다. 따라서, 세포 수준에서 효과적으로 신경줄기세포의 분화를 제어할 수 있는 새로운 접근법이 필요하다.

본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그

전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

[선행기술문헌]

5 [비특허문헌]

(비특허문헌 1) K. -A. Chang, et al., PLoS ONE, 6, e18738 (2011)

(비특허문헌 2) Y. -J. Huang, et al., Small, 8, 2869 (2012)

(비특허문헌 3) J. T. Robinson, et al., Nature Nanotechnology, 7, 180 (2012)

10 (비특허문헌 4) C. Liu, et al., Nano Letters, 13, 2989 (2013)

(비특허문헌 5) O. Yanes, et al., Nature chemical biology, 6, 411 (2010)

(비특허문헌 6) K. Wang, et al., Cell death and disease, 4, e537 (2013)

15 (비특허문헌 7) Y. Yan, et al., Cell, 138, 1209 (2009)

【발명의 내용】

【해결하려는 과제】

20 본 발명자들은 단일세포 수준의 세포의 분화를 정교하게 조절할 수 있는 생물전자소자(bioelectronics)를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 세포 막에 통합되어 세포 분화 유도 인자를 방출하여 세포의 분화를 촉진하는 생체분자(산화환원능을 갖는 재조합 단백질), 유기물(금속 이온이 결합된 이중가닥 DNA) 및 무기물(나노입자 복합체)로 구성된 신규한 개념의
25 바이오몰레트론(biomoletron)을 개발하고, 이의 세포 분화 조절능 및 자유 라디칼 억제능을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

따라서, 본 발명의 목적은 세포 분화 조절용 생물전자소자를 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 세포 분화 촉진 방법을 제공하는 데 있다.

30 본 발명의 또 다른 목적은 세포 분화 조절용 생물전자소자의 제조방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

5 【과제의 해결 수단】

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음을 구성요소를 포함하는 줄기세포 분화 조절용 생물전자소자(bioelectronics)를 제공한다:

(a) 산화환원능(redox potential)을 갖는 단백질;

10 (b) 상기 산화환원능을 갖는 단백질의 N-말단에 결합된 제1단일가닥 DNA;

(c) 상기 제1단일가닥 DNA에 상보적으로 혼성화(hybridization)하여 이중가닥 DNA를 형성하는 제2단일가닥 DNA;

(d) 상기 제2단일가닥 DNA의 말단에 직접적으로 결합된 나노입자;

15 (e) 상기 나노입자에 결합된 (i) 세포막 투과성 펩티드 및 (ii) 분화 유도 인자.

본 발명자들은 단일세포 수준의 세포의 분화를 정교하게 조절할 수 있는 생물전자소자(bioelectronics)를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 세포 막에 통합되어 세포의 분화 유도 인자를 방출하여 세포의 분화를
20 촉진하는 생체분자(산화환원능을 갖는 단백질), 유기물(금속 이온이 결합된 이중가닥 DNA) 및 무기물(나노입자 복합체)로 구성된 신규한 개념의 바이오몰레트론(biomoletron)을 개발하고, 이의 세포 분화 조절능 및 자유 라디칼 억제능을 확인하였다.

25 본 발명의 줄기세포 분화 조절용 생물전자소자는 다양한 줄기세포에 적용이 가능하다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 줄기세포는 전능성 줄기세포(totipotent stem cell), 만능성 줄기세포(pluripotent stem cell), 다능성 줄기세포(multipotent stem cell) 또는 단분화성
30 줄기세포(unipotent stem cell)이다.

본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 다능성 줄기세포는 신경

줄기세포(neural stem cell), 조혈 줄기세포(hematopoietic stem cell) 또는 간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell)이다.

본 발명의 특정 구현예에 따르면, 본 발명의 줄기세포는 신경 줄기세포이다.

5 본 명세서에서 용어, “줄기세포”는 조직을 구성하는 각 세포로 분화(differentiation)되기 전 단계의 미분화 세포들을 총칭하며, 특정 분화 자극(환경)에 의해 특정 세포로 분화할 수 있는 능력을 가지고 있다. 줄기세포는 세포분열이 정지된 분화된 세포와는 달리 세포분열에 의해 자신과 동일한 세포를 생산(self-renewal)할 수 있고, 분화 자극이
10 가해지면 특정 세포로 분화되고 이러한 분화는 다른 환경 또는 다른 분화 자극에 의해 다양한 세포로도 분화될 수 있는, 분화의 유연성(plasticity)을 가지고 있는 것이 특징이다.

 본 명세서에서 용어, “생물전자소자”는 생체 기능의 다양성을
15 응용하여 1개의 생물분자가 전자소자의 요소로서 기능을 갖도록 생물분자를 설계하여 조합하고 분자 배선을 하여, 이들 분자를 접합시킨 장치이다. 상기 생물전자소자는 반도체의 물리적 한계를 극복하고자 고안된 장치이다. 분자 단위의 극미세구조에서부터 소자를 설계, 조립 및 제작하고자 하는 나노기술로 다양한 이점을 갖는다. 생물분자를 이용한 분자전자소자는
20 종래의 포토리소그래피(Photolithography) 기술을 이용하여 실리콘에 배선을 하던 기존의 반도체소자와 비교하여 첫째, 크기가 수십 Å ~ 수 nm 단위인 생물 분자를 이용하면 집적화 밀도가 기존 실리콘 칩의 천만배 이상 향상될 수 있으므로 이러한 집적화는 더욱 좁은 공간에 더욱 많은 정보를 저장할 수 있고, 열발생이 매우 적기 때문에 고밀도의 집적이 가능하다.
25 둘째, 생물 분자의 자기 조립 및 배향성에 의해 극미소의 가공이 가능하며 제작비용이 절감된다. 셋째, 신경계에서 사용되는 병렬 방식의 신호 처리가 가능하다. 넷째, 분자 간에 정보 전달을 수행함으로써 정보 전달의 속도를 향상시키고 정보 교환시의 오차를 줄일 수 있으며, 전자에 의한 정보 전달 이외에 광을 정보 전달 수단으로 응용하여 속도를 향상시킬 수 있다.

30

 본 발명의 줄기세포 분화 조절용 생물전자소자를 구성요소 별로

상세히 설명한다.

(a) 산화환원능을 갖는 단백질

본 발명의 생물전자소자를 구성하는 산화환원능을 갖는 단백질은 당업계에 공지된 산화환원능을 갖는 어떠한 단백질도 가능하다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 산화환원능을 갖는 단백질은 아주린, 헤모글로빈, 미오글로빈, 헤메리트린, 혈색소, 시토크롬, 철-황단백질, 루브레독신, 플라스토시아닌, 페리틴, 셀룰로프라스민, 탄산탈수 효소, 비타민 B12-종속 효소, 니트로게나아제, 슈퍼옥사이드 디스뮤타제, 엽록소-포함 단백질, 칼모듈린, 글루코스-6-포스파타제, 헥소키나아제, DNA 폴리머라아제, 바나빈, 아르기나아제, 카탈라아제, 수소화 효소, 철반응요소결합단백질, 아코니타제, 우레아제, 시토크롬 산화 효소, 라케이스, 알코올 탈수소 효소, 카르복시펩티다아제, 아미노펩티다아제, β -아밀로이드단백질, 질산 환원 효소, 글루타티온과산화효소, 메탈로티오네인 또는 포스파타아제인이다.

본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 산화환원능을 갖는 단백질은 아주린이다.

본 발명자는 상기 아주린이 기관 상에서 자기-조립하도록 시스테인 잔기를 도입하였다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 산화환원능을 갖는 단백질은 시스테인 잔기가 도입되어 기관에 직접 고정화된다.

본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 산화환원능을 갖는 단백질은 시스테인 잔기 2 내지 10개가 도입되어 기관에 직접 고정화된다.

본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 산화환원능을 갖는 단백질은 시스테인 잔기가 2 내지 5개가 도입되어 기관에 직접 고정화된다.

하기 실시예에서 입증된 바와 같이, 상기 산화환원능을 갖는 단백질은 시스테인 잔기가 3개 도입되어 기관에 직접 안정하게 고정화된다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 기관은 금속, 금속 옥사이드, 유리, 세라믹, 석영, 실리콘, 반도체, Si/SiO₂ 웨이퍼, 게르마늄, 갈륨 아르세나이드, 카본, 탄소나노튜브, 폴리머, 세파로스 또는 아가로스는이다.

본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 기관은 금속 기관이고, 본

발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 기판은 금(Au) 기판이다.

본 발명의 생물전자소자가 전기적으로 작동되는 경우, 본 발명의 생물전자소자는 전기적 장치는 기판을 포함한다. 이 기판은 상술한 바와 같으며, 하기의 실시예에서는 전기적으로 대전되는 금 표면 코팅된 기판이다. 상기 기판 상에 산화환원-활성층(redox-active layer)이 이루어진다. 본 발명에서는 산화환원 활성층으로서, 시스테인 도입되어 기판 상에 자기-조립된 산화환원능을 갖는 단백질이 이용된다. 상기 산화환원능을 갖는 단백질에 의해 일정한 전자적 상태, 예컨대 산화상태 또는 환원상태에 놓이게 된다.

본 발명자는 상기 산화환원능을 갖는 단백질에 부위-특이적 돌연변이(site-directed mutagenesis)를 유도하여 시스테인 잔기를 도입하였다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 산화환원능을 갖는 단백질은 서열목록 제2서열의 아미노산 서열을 포함한다.

본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 산화환원능을 갖는 단백질은 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

하기 실시예에서 입증된 바와 같이, 상기 산화환원능을 갖는 단백질의 13번째 아미노산인 메치오닌이 시스테인으로(Met13Cys), 92번째 아미노산인 라이신이 시스테인으로(Lys92Cys), 39번째 아미노산인 류신이 시스테인으로(Leu39Cys) 치환되어 치환된 시스테인의 잔기를 통해 기판 상에 직접 고정화된다.

도입된 시스테인 잔기는 티올기를 통하여 기판, 바람직하게는 금속 기판, 보다 바람직하게는 금(Au) 기판 상에 우수한 배향성(orientation)으로 안정된 단일막을 형성하도록 한다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 재조합 단백질에 도입된 시스테인 잔기의 수는 2-10개이다. 만일, 도입된 시스테인 잔기의 수가 2개 미만, 즉 1개인 경우에는 앵커링(anchoring) 부위로서의 시스테인 잔기의 기능의 크게 감소한다. 만일, 시스테인 잔기의 수가 10개를 초과하는 경우에는 도입된 시스테인 사이에 다이설파이드 결합을 형성하여 재조합 단백질을 정제하기 어려울 뿐만 아니라, 앵커링(anchoring) 부위로서의 시스테인 잔기의 기능의 크게 감소한다.

도입된 시스테인의 티올기를 통한 단백질의 고정화는 본 명세서에서 직접 고정화 방법(direct immobilization)으로 표현되어 있다. 본 명세서에서, 용어 “직접 고정화”는 다른 링커의 도움 없이 단백질 내에 있는 분자를 통하여 단백질이 직접 기판에 고정화되는 것을 의미한다.

5 이러한 직접 고정화를 통하여, 전자 전달 과정의 불필요한 저항층을 줄일 수 있다는 이점이 있으며 고정화능 또한 주어진 조건에서 최대화할 수 있는 장점이 있다.

단백질을 기판에 고정화 하는 기술로서, 현재 가장 많이 이용되는 것은 링커를 이용하는 것이다. 그러나, 이 방법은 (i) 지나치게 많은
10 공정을 필요로 하고, (ii) 낮은 고정화율을 나타내며, (iii) 링커층의 차단효과(insulating effect)를 초래한다는 단점이 있다.

본 발명의 직접 고정화 방법을 이용하는 경우에는 이러한 종래기술의 문제점을 해결할 수 있다.

본 발명의 생물전자소자를 구성하는 산화환원능을 갖는 단백질은
15 금속 이온을 포함하는 금속 단백질이다.

본 발명에 이용되는 금속단백질의 금속 이온은 마그네슘, 바나듐, 망간, 철, 니켈, 구리, 아연, 몰리브덴, 코발트, 갈륨, 비스무트, 골드, 알루미늄, 백금, 크로뮴, 은, 안티몬, 탈륨, 카드뮴, 수은, 납, 칼슘 또는 셀레늄이다.

20 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 산화환원능을 갖는 단백질은 구리 이온을 포함한다.

본 발명의 생물전자소자를 구성하는 산화환원능을 갖는 단백질은 세포 막의 수용체 단백질에 결합능을 갖는 리간드를 추가적으로 포함한다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 산화환원능을 갖는 단백질은 C-
25 말단에 세포 막의 수용체 단백질에 결합능을 갖는 리간드를 추가적으로 포함한다.

본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 세포 막의 수용체 단백질에 결합능을 갖는 리간드는 RGD(Arg-Gly-Asp), RGDS(Arg-Gly-Asp-Ser), RGDC(Arg-Gly-Asp-Cys), RGDV(Arg-Gly-Asp-Val), RGES(Arg-Gly-Glu-Ser),
30 RGDSPASSKP(Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Ala-Ser-Ser-Lys-Pro), GRGDS(Gly-Arg-Gly-Asp-Ser), GRADSP(Gly-Arg-Ala-Asp-Ser-Pro), KGDS(Lys-Gly-Asp-Ser),

GRGDSP(Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro), GRGDTP(Gly-Arg-Gly-Asp-Thr-Pro),
 GRGES(Gly-Arg-Gly-Glu-Ser), GRGDSPC(Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Cys),
 GRGESP(Gly-Arg-Gly-Glu-Ser-Pro), SDGR(Ser-Asp-Gly-Arg), YRGDS(Tyr-Arg-
 Gly-Asp-Ser), GQQHHLGGAKQAGDV (Gly-Gln-Gln-His-His-Leu-Gly-Gly-Ala-
 5 Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val), GPR(Gly-Pro-Arg), GHK(Gly-His-Lys),
 YIGSR(Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg), PDSGR(Pro-Asp-Ser-Gly-Arg), CDPGYIGSR(Cys-
 Asp-Pro-Gly-Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg), LCFR(Leu-Cys-Phe-Arg), EIL(Glu-Ile-
 Leu), EILDV(Glu-Ile-Leu-Asp-Val), EILDVPST(Glu-Ile-Leu-Asp-Val-Pro-Ser-
 Thr), EILEVPST(Glu-Ile-Leu-Glu-Val-Pro-Ser-Thr), LDV(Leu-Asp-Val) 및
 10 LDVPS(Leu-Asp-Val-Pro-Ser)로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나의
 리간드이다.

본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 세포 막의 수용체 단백질에
 결합능을 갖는 리간드는 RGD, RGDS, RGDC, RGDV, RGES 또는 RGDSPASSKP이다.

본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 세포 막의 수용체 단백질에
 15 결합능을 갖는 리간드는 RGD이다.

본 발명의 생물전자소자는 산화환원능을 갖는 단백질의 C-말단에
 RGD가 도입되어 세포 막에 결합된다.

본 발명의 생물전자소자는 줄기세포 분화 조절 기능과 함께, 자유
 라디칼 제거능을 갖는다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 산화환원능을 갖는 단백질은
 20 자유 라디칼 제거능을 갖는다.

하기 실시예에서 입증된 바와 같이, 상기 산화환원능을 갖는
 단백질은 활성산소 중 하나인 과산화수소를 제거하는 기능을 갖는다.

줄기세포 분화 과정 중에서 발생하는 자유 라디칼은 분화 안정성에
 25 큰 영향을 주기 때문에, 효율적인 분화 조절을 위해서는 직접적인 제어가
 필요하다. 본 발명의 생물전자소자는 줄기세포의 분화를 조절하는데 있어
 자유 라디칼을 제거하여 분화 안정성을 높일 수 있다.

(b) 제1단일가닥 DNA

본 발명의 줄기세포 분화 조절용 생물전자소자는 상기 산화환원능을
 30 갖는 단백질의 N-말단에 결합된 제1단일가닥 DNA를 포함한다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 제1단일가닥 DNA는 10-100 bp 길이를 갖는다.

본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 제1단일가닥 DNA는 10-80 bp, 10-60 bp, 10-50 bp, 20-50 bp 또는 30-50 bp 길이를 갖는다.

5 본 명세서에서 용어, “단일가닥 DNA”는 자연의 또는 변형된 모노머 또는 연쇄(linkages)의 선형 올리고머를 의미하며, 디옥시리보뉴클레오타이드를 포함하고 타깃 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있으며, 자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성되는 것이다. 본 발명의 단일가닥 DNA는 자연(naturally occurring)
10 dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 뉴클레오타이드 유사체 또는 유도체를 포함할 수 있다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 제1단일가닥 DNA는 서열목록 제3서열의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

상기 제1단일가닥 DNA는 상기 산화환원능을 갖는 단백질의 N-말단과
15 링커를 통해 간접적으로 결합된다.

본 발명의 상기 링커는 단백질과 DNA를 결합할 수 있는 당업계의 어떠한 링커를 포함한다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 링커는 SMCC(Sulfosuccinimidyl-4-(Nmaleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate),
20 포름알데하이드(formaldehyde), EDC(1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride, BASED(bis[beta-(4-azidosalicylamido)ethyl]disulfide) 또는 BMH(bis-maleimidohexane)이다.

본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 링커는 SMCC이다.

본 발명의 상기 혼성체는 다음의 다양한 방법으로 제조될 수 있다:

25 (i) 산화환원능을 갖는 단백질의 아미노기를 링커(예컨대, sulfo-SMCC)와 반응하여 아마이드 결합을 형성하고 티올-변형 ssDNA(설프히드릴-함유 생체분자)를 첨가하여 재조합 아주린-링커의 말레이미드기와 반응시켜 티올에스터 결합을 형성하여 재조합 아주린-ssDNA 혼성체를 제조한다.

(ii) 티올-변형 ssDNA(설프히드릴-함유 생체분자)를 링커와 반응한다.
30 산화환원능을 갖는 단백질을 티올-변형 ssDNA-링커에 첨가하여 아민 결합을 형성하여 산화환원능을 갖는 단백질-ssDNA 혼성체를 제조한다.

(iii) 아민-변형 ssDNA를 링커와 반응하여 아마이드 결합을 형성한다. 아주린 분자의 시스테인 잔기를 환원시키기 위해 DTT를 처리하여 산화환원능을 갖는 단백질을 제조한다. 상기 산화환원능을 갖는 단백질을 아민-변형 ssDNA-링커와 반응하여 티오에스터 본드를 형성하여 산화환원능을 갖는 단백질-ssDNA 혼성체를 제조한다.

(iv) 산화환원능을 갖는 단백질 분자의 시스테인 잔기를 환원시키기 위해 DTT를 처리한다. 산화환원능을 갖는 단백질을 링커와 반응시켜 티오에스터 결합을 형성한다. 아민-변형 ssDNA를 첨가하여 산화환원능을 갖는 단백질-ssDNA 혼성체를 제조한다.

하기 실시예에서 입증된 바와 같이, 본 발명의 제1단일가닥 DNA는 상기 (ii)방법을 통해 산화환원능을 갖는 단백질에 간접적으로 결합된다.

(c) 제2단일가닥 DNA

상기 제1단일가닥 DNA에 상보적으로 혼성화하여 이중가닥 DNA를 형성하는 제2단일가닥 DNA이다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 제2단일가닥 DNA는 10-100 bp 길이를 갖는다.

본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 제2단일가닥 DNA는 10-80 bp, 10-60 bp, 10-50 bp, 20-50 bp 또는 30-50 bp 길이를 갖는다.

상기 제2단일가닥 DNA는 제1가닥 DNA와 부분적으로 상보적인 서열을 갖는다.

본 명세서에서 용어, “상보적”은 소정의 어닐링(annealing) 조건 또는 엄격조건 하에서 제2단일가닥 DNA가 제1단일가닥 DNA에 선택적으로 혼성화 할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하며, “실질적으로 상보적(substantially complementary)” 및 “완전히 상보적(perfectly complementary)”인 것을 모두 포괄하는 의미를 가지며, 바람직하게는 완전히 상보적인 것을 의미한다.

상기 제2단일가닥 DNA는 제1단일가닥 DNA와 미스매치(mismatch) 염기쌍을 포함한다.

본 명세서에서 용어, “미스매치”는 원래 쌍을 이루어야 할 염기가 다른 염기와 쌍을 이루는 것을 의미한다. 예컨대, 시토신과 구아닌의

염기쌍이 아닌 구아닌과 구아닌의 염기쌍은 미스매치 염기쌍이다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 미스-매치 염기쌍은 1-10개이다.

본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 미스-매치 염기쌍은 1-8, 1-6 또는 2-6 개이다.

5 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 제2단일가닥 DNA는 서열목록 제4서열의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

상기 제2단일가닥 DNA는 제1단일가닥 DNA와 혼성화된다.

본 명세서에서 사용되는 용어 “혼성화(hybridization)”는 상보적인 단일 가닥 핵산들이 이중-가닥 핵산을 형성하는 것을 의미한다. 혼성화는 2
10 개의 핵산 가닥 간의 상보성이 완전할 경우(perfect match) 일어나거나 또는 일부 미스매치(mismatch) 염기가 존재하여도 일어날 수 있다. 혼성화에 필요한 상보성의 정도는 혼성화 조건에 따라 달라질 수 있으며, 특히 온도에 의하여 조절될 수 있다.

상기 제1단일가닥 DNA와 제2단일가닥 DNA가 혼성화된 이중가닥 DNA의
15 미스매치 염기쌍 사이에 메탈이온을 추가적으로 포함할 수 있다.

상기 메탈이온은 DNA의 전도성을 증가시키기 위하여 도입된다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 메탈이온은 양전하를 띠는(positively charged) 메탈이온이다. 예컨대, 은(Ag^+) 이온, 수은(Hg^{2+}) 이온 등이 가능하다.

20 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 메탈이온은 은(Ag) 이온이다.

상기 제2단일가닥 DNA는 말단에 도입된 티올기(thiol group)를 통하여 직접적으로 상기 나노입자에 결합된다.

(d) 나노입자

25 상기 제2단일가닥 DNA의 말단에 직접적으로 결합된 나노입자이다.

상기 나노입자는 제2단일가닥 DNA의 말단에 도입된 티올기를 통하여 직접 결합된다.

본 발명의 생물전자소자를 구성하는 나노입자는 어떠한 나노입자도 가능하다.

30 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 나노입자는 금속 나노입자, 금속 산화물 나노입자 또는 합금 나노입자 및 반도체 나노입자이다.

본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 나노입자는 금속 나노입자이다.

본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 나노입자는 금(Au) 나노입자이다.

- 5 상기 나노입자의 크기는 세포 내로 흡수(uptake)될 수 있는 어떠한 사이즈도 가능하다[M. K. Hossain, et al., Biosensors and Bioelectronics, 71, 300 (2015)].

본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 나노입자는 1 내지 20 nm 크기이다.

- 10 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 나노입자는 1 내지 15 nm 크기이다.

본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 나노입자는 1 내지 10 nm 크기이다.

15 (e) 세포막 투과성 펩티드 및 분화 유도 인자

상기 나노입자에 세포막 투과성 펩티드 및 분화 유도 인자가 결합된다.

- 본 명세서에서 용어, “세포막 투과성 펩티드”는 세포막을 투과하여 세포내로 들어갈 수 있는 펩티드로, 세포에 독성을 가하지 않고, 에너지를
20 사용하지 않으며, 특정한 세포막의 수용체를 거치지 않고 세포내로 효과적으로 흡수된다. 대개 세포막 투과성 펩티드는 10-30개의 짧은 아미노산으로 구성되며, 대부분 염기성의 아미노산을 많이 포함하고 있고, 일부는 양쪽성 알파사슬 구조를 나타낸다.

- 상기 세포막 투과성 펩티드는 공지된 어떠한 세포막 투과능을 갖는
25 펩티드도 가능하다. 예컨대, 상기 세포막 투과성 펩티드는 Tat, 안테나페디아(antennapedia, penetratin), 트랜스포탄(transportan), VP22, Hph-1, R11(R9), 펩티드 기반 신호서열(signal sequence based peptide) 또는 양친매성 펩티드(amphipathic peptide)이며 이에 한정되지 않는다.

- 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 세포막 투과성 펩티드는
30 Tat이다.

상기 세포막 투과성 펩티드를 나노입자에 직접 고정화하기 위해

시스테인을 도입한다. 상기 도입된 시스테인의 티올기를 통해 세포막 투과성 펩티드가 나노입자 표면에 결합된다.

상기 분화 유도 인자는 나노입자의 표면에 도입된 링커, Cucibit [8] Uril (CB) 및 펩티드를 통해 간접적으로 결합된다.

5 상기 링커, Cucibit [8] Uril (CB) 및 펩티드는 자기-조립 방법으로 복합체를 형성한다[Feng Tian et al., Langmuir, 27, 4, (2011)].

상기 링커는 양쪽에 티올기를 갖는 링커이다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 링커는 5,5'-bis(mercaptomethyl)-2,2'-bipyridine, 1,2-ethanedithiol, 1,3-
10 propanedithiol, 1,4-butanedithiol, 2,3-butanedithiol, 1,5-pentanedithiol, 1,6-hexanedithiol, 1,8-octanedithiol, 1,9-nonanedithiol, tetra(ethylene glycol) dithiol, hexa(ethylene glycol) dithiol 또는 2,2'-(ethylenedioxy)diethanethiol이다.

상기 펩티드는 링커와 분화 유도 인자를 연결하며, 전위 인가시 분화
15 유도 인자와 함께 방출(release)된다.

상기 펩티드는 1번째 내지 3번째 아미노산 서열이 WGG(Trp-Gly-Gly)인 어떠한 펩티드도 가능하다. 예컨대, TrpGlyGlyXaa, TrpGlyGlyXaaXaa, TrpGlyGlyXaaXaaXaa 등이다. 상기 Xaa는 임의(any) 아미노산을 의미한다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 펩티드는 WGG(Trp-Gly-Gly)
20 펩티드이다.

상기 펩티드는 분화 유도 인자와 간접적으로 결합하기 위해, 추가 작용기가 도입될 수 있다.

하기 실시예에서 입증된 바와 같이, 상기 레티노산(retinoic acid)은 WGG 펩티드의 N-말단에 직접 결합하고, siSOX9는 WGG 펩티드의 N-말단에
25 도입된 시스테인의 티올기와 siSOX9에 도입된 말레이미드(maleimide)기와 결합한다.

본 발명에서 나노입자에 간접적으로 결합되는 분화 유도 인자는 당업계에 공지된 줄기세포의 분화에 이용되는 어떠한 분화 유도 인자도 가능하다. 예컨대, 상기 분화 유도 인자는 siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임(ribozyme), DNAzyme, PNA(peptide nucleic acids), 안티센스
30 올리고뉴클레오타이드, 펩티드, 항체 및 앵타머이며, 이에 한정되지 않는다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 분화 유도 인자는 레티노산, siSOX9, BDNF(brain-derived neurotrophic factor), GDNF(glial cell-derived neurotrophic factor), 발프로익산(valproic acid), CNTF(ciliary neurotrophic factor), PDGF(platelet-derived growth factor), SHH(sonic hedgehog), IGF-1(insulin-like growth factor 1), FGF-4(fibroblast growth factor 4), BMP-2(bone morphogenetic protein 2) 및 dibutyril-cAMP로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 분화 유도 인자이다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 분화 유도 인자는 레티노산 및 siSOX9이다.

본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 siSOX9는 서열목록 제5서열 및 제6서열의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

하기 실시예에서 입증된 바와 같이, 본 발명의 생물전자소자에 -0.5 V의 전위를 인가하면 나노입자 표면에 간접적으로 결합된 RA와 siSOX9 안티센스 또는 siSOX9 센스가 방출된다. 상기 RA 및 siSOX9는 5,5'-bis(mercaptomethyl)-2,2'-bipyridine, Cucibit [8] Uril (CB), WGG(Trp-Gly-Gly)펩티드, 이 세 물질이 연결되어 있다가 전위를 인가하면 두 가지 분화유도물질 붙어 있는 WGG(Trp-Gly-Gly)펩티드만 방출된다.

본 발명의 생물전자소자는 줄기세포 내로 흡수되며 전위 인가에 따라 분화 유도 인자를 방출하여 줄기세포의 분화를 유도한다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 생물전자소자는 상기 재조합 아주린의 C-말단에 도입된 세포 막의 수용체 단백질에 결합능을 갖는 리간드에 의해 세포 막에 통합(integration)된다.

본 발명은 전기화학적 방법으로 인가(applying) 전압을 조절, 고정된 단백질의 산화와 환원 상태를 변화시키는 것이 가능한 정보 저장 디바이스에 관한 것이다. 단백질 박막이 형성된 기판은 전해질 용액, 예컨대 HEPES 전해질 안에 배치된다. 기판은 작업 전극으로 포텐티오스택에 연결되어 작동하고 전해질 안에 기준 전극 (예컨대, Ag/AgCl)과 상대 전극 (예컨대, Pt)가 삽입된다. 기준 전극은 포텐티오스택이 전압을 스위칭하는 경우 작업 전극의 전위 변화를 읽어내는 기준이 된다. 카운터 전극은 포텐티오스택의 전위 조절에 의해 전자가 흐르게 되는 통로다. 이와 같은 3 전극 시스템은 전기화학에서 가장 많이 구성하는 시스템 중의 하나인

것으로 알려져 있다. 상기 간단한 전기화학 시스템에서 순환전류전압법을 통해 간단한 전압-전류 곡선을 얻는다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 생물전자소자를
5 줄기세포에 접촉하는 단계를 포함하는 줄기세포의 분화 조절 방법을 제공한다.

하기 실시예에서 입증된 바와 같이, 상기 생물전자소자가 고정화된 세포 배양 기기(예컨대, 챔버)에 줄기세포를 배양하고 전위를 인가하여 분화를 조절한다.

10 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 전위는 -4.0 내지 -0.1 V 이다.
본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 전위는 -3.0 내지 -0.1 V 이다.

본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 전위는 -2.0 내지 -0.1 V 이다.

15 하기 실시예에서 입증된 바와 같이 상기 생물전자소자가 고정화된 세포 배양 기기에 일정시간 전위를 인가한다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 전위 인가 시간은 10 내지 1000초이다.

본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 전위 인가 시간은 10 내지
20 800초, 10 내지 600초, 10 내지 400초, 10 내지 300초 또는 50 내지 300초이다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 줄기세포 분화 조절용 생물전자소자의 제조방법을 제공한다.

25 본 발명의 줄기세포의 분화 조절 방법 및 줄기세포 분화 조절용 생물전자소자의 제조방법은 상기 생물전자소자를 이용하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

30 【발명의 효과】

본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

(a) 본 발명은 줄기세포 분화 조절용 생물전자소자, 이를 이용한 줄기세포 분화 방법 및 상기 생물전자소자의 제조방법을 제공한다.

(b) 본 발명은 단일 세포 수준에서 효과적으로 줄기세포의 분화를 제어할 수 있는 생물전자소자를 제공한다.

5 (c) 본 발명의 생물전자소자는 줄기세포의 분화 제어뿐 아니라 자유 라디칼 억제 기능을 동시에 수행할 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

10 도 1은 세 개의 시스테인 및 C 말단에 RGD-도입된 아주린의 설계 모식도를 나타낸다.

도 2는 바이오폐트론의 아랫부분(세 개의 시스테인 및 C 말단에 RGD-도입된 Azurin-ssDNA 이중층)의 제작 과정 모식도를 나타낸다.

도 3은 줄기세포 분화 조절용 바이오폐트론의 제작 과정 모식도를 나타낸다.

15 도 4는 전도도 확인을 위한 Au/아주린/메탈 이온 매개-염기쌍의 제작 과정 모식도를 나타낸다.

도 5a 및 5b는 바이오폐트론 윗부분(생체물질 기능화된 나노입자-csDNA 결합체)의 제작과정 모식도를 나타낸다.

20 도 6a는 전기영동을 이용하여 재조합 아주린의 발현 확인한 결과를 나타낸다. 도 6b는 상기 재조합 아주린의 과산화수소 제거능을 확인한 결과를 나타낸다.

도 7a는 순환전류전압법을 이용하여 Au/아주린/메탈 이온 매개-염기쌍의 전도도를 확인한 결과를 나타낸다. 도 7b는 상기 Au/아주린/메탈 이온 매개-염기쌍의 메탈이온 수의 증가에 따라 전도도 증가를 보여준다.

25 도 8은 순환전류전압법과 형광현미경을 이용하여 전기적 방출 기능을 나타낸다. 도 8a는 전기적 방출 전후의 순환전류전압법 그래프이고 도 8b는 전기적 방출 전후의 형광 이미지를 보여준다.

도 9는 흐름형 표면 플라스몬 공명(flow surface plasmon resonance, flow SPR)을 이용한 바이오폐트론의 표면을 나타낸다.

30 도 10은 바이오폐트론의 전기 방출시스템 기능 확인한 결과이다. 도 10a는 전위 인가 전(e)과 -0.5 V (f) 및 -1.0 V (g)전위 인가후의 표면

플라스몬 공명을 이용한 바이오몰레트론의 표면 조사 확인한 결과를 나타낸다. 도 10b는 -0.5 V 전위 인가시 전류측정법을 이용한 그래프이고, 도 10c는 -1.0 V 전위 인가시 전류측정법을 이용한 그래프를 보여준다.

도 11은 바이오몰레트론의 세포막 부분 투과를 세 가지 순차적인 실험방법으로 확인한 결과를 나타낸다. 도 11a는 공초점 현미경을 이용한 세포막 근처에 바이오몰레트론이 제작되었음을 확인한 형광 이미지이고, 도 11b는 “세포막 투과 못함”의 경우를 제외시키는 형광 이미지이며, 도 11c는 “세포막 전체 투과함”의 경우를 제외시키는 형광 이미지이다.

도 12는 바이오몰레트론 기반 신경줄기세포 분화 확인한 결과를 나타낸다. 도 12a는 면역염색법을 이용하여 신경줄기세포의 분화를 확인한 결과이고, 도 12b는 상기 분화를 검출정량 PCR을 이용하여 확인한 결과를 보여준다.

15 【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

20

실시예

실험 재료 및 방법

실험재료

Azu W, Azu Cys1, Azu Cys2, Azu Cys3, Azu RGD 프라이머 쌍은 Integrated DNA Technologies(미국)에서 구매하였다. 모든 화학제품(과산화수소(H_2O_2), 황산(H_2SO_4), 수산화암모늄(NH_4OH), 질산은($AgNO_3$))은 Sigma Aldrich(미국)으로부터 구매하였고 PDMS(Polydimethylsiloxane)는 코닝(미국)에서 구매하였다. 이소프로필알코올, 무수알코올, 증류수 및 인산은 시약등급(reagent grade)으로 사용하였고 알루미늄 호일은 Alpha(대한민국)에서 구매하였다. 모든 수용액은 밀리-Q 시스템(Millipore, 미국)을 사용하여 정제한 물($18\text{ M}\Omega\text{cm}$)로 제조하였다.

설폰-SMCC(Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate) 및 DTT(Dithiothreitol)는 Thermo Scientific Pierce(미국)에서 구매하였다. 에틸아세테이트, PBS(phosphate buffered saline)(pH 7.4, 10 mM)는 Sigma Aldrich(미국)로부터 구매하였다.

5

슈도모나스 애루지노사 아주린의 유전적 조작

슈도모나스 애루지노사(*pseudomonas aeruginosa*)로부터 지노믹 DNA를 지노믹 DNA 정제 키트(QIAZEN, 미국)를 사용하여 분리하였다. 다음과 같이 정방향 프라이머는 Nde I 제한효소 사이트를 포함하며, 역방향

10 프라이머는 BamH I 제한효소 사이트를 포함하도록 디자인하였다.

Azu W F: 5'-CATATGCTACGTAACTCGCTGCCGTA-3'

Azu W R: 5'-GAATTCACCTCAGGGTCAGGGTGCCCT-3'

슈도모나스 애루지노사의 지노믹 DNA로부터 블루 쿠퍼 단백질 아주린을 코딩하는 유전자(서열목록 제7서열)와 디자인된 프라이머를

15 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 이용하여 증폭하였다. PCR 반응산물은 DNA 정제 키트(QIAZEN, 미국)를 이용하여 정제한 후, Nde I 및 BamH I (New England Biolabs, 영국)의 두 제한효소로 분해하였다. 분해된 DNA 프래그먼트를 미리 Nde I 및 BamH I 제한효소 처리한 pET-21a(+) 벡터(노바젠, 독일)에 라이게이션 키트(다카라, 일본)을

20 이용하여 라이게이션 하였다. 얻어진 아주린 유전자를 포함하고 있는 플라스미드와 부위특이적 돌연변이 유도되게 디자인된 Azu Cys1 F, Azu Cys2 F, Azu Cys3 F, Azu RGD F 및 Azu Cys1 R, Azu Cys2 R, Azu Cys3 R, Azu RGD R 프라이머를 QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis 키트(Agilent Technologies, 미국)를 사용하여, ATG에서 TGC로,

25 AAG에서 TGC로, CTG에서 TGC로 Met13Cys(M13C), Lys92Cys(K92C), Leu39Cys(L39C)이 되게 치환하였고 C 말단에는 RGD 아미노산을 삽입하였다. 부위특이적 돌연변이를 이용하여 아주린 유전자의 돌연변이 하였다(도 1). 변이된 유전자 서열은 시퀀싱을 통하여 재확인하였다.

서브클로닝을 위해 이스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*) DH5α를

30 사용하였다. 본 발명에서 아주린 유전자의 부위특이적 돌연변이를 이용하기 위하여 아주린 단백질의 프라이머를 표 1 과 같이 설계하였다.

【표 1】

프라이머명	정방향 서열	역방향 서열
Azu Cys1	5- CATCCAGGGTAACGACCAGTGCCAGTTC AACACCAATGCCA-3	5- TGGCATTGGTGTGAACTGGCACTGGTCGT TACCCTGGATG-3
Azu Cys2	5- GCTGATCGGCTCGGGCGAGTGCGACTCG GTGACCTTCGACG-3	5- CGTCGAAGGTCACCGAGTCGCACTCGCCCG AGCCGATCAGC-3
Azu Cys3	5- CCTGTCCCACCCCGGCAACTGCCCCAAG AACGTCATGGGCC-3	5- GGCCCATGACGTTCTTCGGGCAGTTGCCGG GGTGGGACAGG-3
Azu RGD	5- GCGCTGATGAAGGGCACCCTGACCCTGA AGCGCGGGGATTGAGGATCCGGTGCTA ACAAAGCCCGAAA-3	5- TTTCGGGCTTTGTTAGCAGCCGGATCCTCA ATCCCCGCGCTTCAGGGTCAGGGTGCCCTT CATCAGCGC-3

재조합 아주린 치환체의 발현 및 정제

- 변형된 아주린 유전자를 포함하는 플라스미드를 E.coli BL21(DE3)에
- 5 형질전환 하였다. 형질전환주를 50 mg/ml 앰피실린을 포함하는 LB 배지(0.5 % 효모 추출물, 1.0 % 트립토판 및 1.0 % NaCl) 1 L 가 든 셰이킹 플라스크에서 37℃로 OD 0.6 까지 배양하였다. IPTG(isopropyl β-D-thiogalactopyranoside)를 최종 농도 0.839 mM 이 되게 첨가하여 발현을 유도하였다. 형질전환된 세포를 37℃에서 16 시간 동안 추가적으로
- 10 배양하였다. 5000 g 로 4℃, 15 분 동안 원심분리하여 세포를 수확하였다. 세포 페이스트를 수크로오스 버퍼(20% 수크로오스, 0.3 M Tris-HCl, pH 8.1 및 1 mM EDTA)에 부유하고, 삼투압 충격(0.5 mM MgCl₂)을 주었다. pH 를 3.0 까지 감소시켜 오염 단백질을 주변 세포질로부터 침전하여 아주린이 포함된 상층액을 수득하였다. 세 개의 시스테인 및 C 말단에 RGD-도입된
- 15 아포-아주린 분획(일루션 pH= 5.2 및 5.4)을 pH 4.0-6.0 의 농도구획(50 mM 초산나트륨)을 갖는 CM 셀룰로오즈 이온-교환 컬럼으로 분리하였다. 변형된 아주린 단백질 내에 구리 이온을 넣어주기 위하여 0.5 M CuSO₄ 를 첨가한다. 세 개의 시스테인 및 C 말단에 RGD-도입된 아주린 단백질을 MWCO 5k 아미콘

울트라 센트리퓨갈 필터(Amicon Ultra centrifugal filter, Millipore, USA)를 이용하여 분리해내었다.

설포-SMCC 태깅된 ssDNA 제조 및 정제

5 세 개의 시스테인 및 C 말단에 RGD-도입된 Azurin-SMCC-DNA 혼성체를 제조하기 위해 재조합 아주린 및 ssDNA(single strand DNA) 사이의 설포-SMCC 을 통한 결합에 적합하도록 단일 가닥 DNA 의 5' 말단에 티올기를 변형하였다. ssDNA 는 Bioneer(대한민국)로부터 공급되었고 다음과 같이 설계되었다(도 2).

10 ssDNA: 5'-CGCGCGCCGCTTTAGAGCGCGCGGATTCTGCATATAT A-3'

티올-변형 ssDNA(설포히드릴-함유 생체분자)를 설포-SMCC 와 반응하였다.

보다 상세하게는, PBS 완충액(pH 7.4)에 희석된 5 μ M 티올-변형 ssDNA(40 mer) 1 ml을 준비하였다. 티올-변형 ssDNA 활성화를 위해, 티올-
15 변형 ssDNA 에 1.0 N DTT 100 μ l를 실온에서 15 분 동안 처리하여 추가적으로 환원시켜 자유 설포히드릴기를 얻었다. 다음, DNA 용액에 1 ml 에틸아세테이트를 첨가하여 포화된 DTT 를 제거하였다. 환원된 티올-변형 ssDNA 를 탈염 컬럼(PD-10)을 이용하여 혼성용 완충액(10 mM PBS, 138 mM NaCl, 및 2.7 mM KCl, pH 7.4)에 옮겼다. 자유 SH-DNA 를 제조하는 동안,
20 3 차 증류수 100 μ l에 설포-SMCC 를 0.5 mg을 넣고 50°C의 워터배스에 10 분동안 반응시켜 5 μ M 설포-SMCC 100 μ l을 제조하였다. 5 μ M 자유 SH-DNA 1 ml과 5 μ M 설포-SMCC 100 μ l을 컨쥬게이션하기 위해 4 시간 동안 4 도의 냉장고에서 셰이킹하였다. 다음, 설포-SMCC 태깅된 ssDNA 를 정제하고 한외거르기(MWCO 3k Amicon Ultra centrifugal filter, Millipore,
25 미국)를 통해 비반응물을 제거하였다.

바이오몰레트론의 아랫부분(세 개의 시스테인 및 C 말단에 RGD-도입된 Azurin-ssDNA 이중층)의 제조(Part I)

30 5 mm $\times$ 15 mm로 절단된 Au 기판(Au(100 nm)/Cr(5 nm)/SiO₂/Si 웨이퍼)을 나노종합팹센터(대한민국)에서 구매하였다. 바이오몰레트론의 작동 전극을 제조하기 위해, 금(Au) 작동 전극을 Si/SiO₂ 기판 상에

대량으로 제조하였다. 제조된 Au 전극을 피란하(piranha) 용액(30 부피% H_2O_2 및 70 부피% H_2SO_4)으로 70°C에서 3 분 동안 세척하였다. 금 전극을 세척한 후, 에탄올 및 탈이온수로 반복세척하고 질소 스트림 하에 건조하였다. 준비한 0.1 mg/ml 세 개의 시스테인 및 C 말단에 RGD 도입된

아주린 수용액의 20 μ l를 시스테인 잔기를 통해 금 표면에 직접 고정화하기

위해 금 표면에 4 시간 동안 정치하였다. 4 시간 후에 3 차 증류수로 세척하고 질소 스트림 하에 건조하였다. 재조합 아주린 고정된 금 기판을 5 μ M 설폰-SMCC 태깅된 ssDNA 20 μ l 용액에 2 시간 동안 침지하였다. 재조합 아주린/ssDNA 이중층을 제조하기 위해, 재조합 아주린의 아민기와 설폰-SMCC 태깅된 ssDNA 의 설폰기의 공유결합을 이용하였다. 이러한 과정은 25°C의 습도 챔버에서 진행하였다. 2 시간 후에, 금 표면 상에 고정된 재조합 아주린/ssDNA 이중층이 형성되었다. 비반응된 설폰-SMCC 태깅된 ssDNA 를 제거하기 위해, 탈이온수로 세척하고 질소 가스 하에 건조하였다(도 3).

바이오폐트론 윗부분(생체물질 기능화된 나노입자-csDNA 결합체)의 제조 및 정제(Part II)

12 mm $\times$ 35 mm로 절단된 Au 기판(Au(10 nm)/Cr(2 nm)/글래스 웨이퍼)을 G-mek(대한민국)에서 구매하였다. 생체물질 기능화된 나노입자-csDNA 결합체를 만들기 위해 금속기판에 결합하기 위해 5' 말단에 티올 변형된 ssDNA 2(single strand DNA 2)와 5 나노미터 금 나노입자에 결합하기 위해 5' 말단에 티올 변형된 csDNA 2(complementary strand DNA 2)는 Bioneer(대한민국)에서 구매하였고 프라이머 시퀀스는 다음과 같이 설계하였다.

ssDNA 2: 5'-ATAAAAAAACGCGGGGGTTCCGCG-3'

csDNA 2: 5'-GCGCCCCCAAGGCGCAAAAATAAAA-3'

5 나노미터 금 나노입자는 BBI 인터내셔널(영국)에서 5,5' - Bis(mercaptomethyl)-2,2-bipyridine, Cucibit [8] Uril (CB), NHS(N-Hydroxysuccinimide), EDC(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydro chloride), PBS(phosphate buffered saline)(pH 7.4, 10 mM)는 시그마 알드리치 사(미국)에서 구매하였다. 세포막을 투과하기 위한 세포

투과성 펩티드(CPP, cell penetrating peptide)와 생체물질 기능화된 나노입자 혼성체를 만들기 위한 펩티드(펩티드 1(C-t NH₂ 기), 펩티드 2(C-t Cys))를 펩트론(대한민국)에서 합성하였고 다음과 같이 설계되었다.

CPP(CTAT): CGRKKRRQRRRPQ

5 펩티드 1(C-t NH₂): TGG-NH₂

펩티드 2(C-t Cys): WGGC

신경줄기세포 분화유도물질인 RA(retinoic acid)는 시그마 알드리치사(미국)에서 siRNA 의 한 종류인 siSOX9 는 5' 말단에 말레이미드기를 변형하여 Bioneer(대한민국)에서 합성하였다. siSOX9 는
10 다음과 같이 설계되었다.

siSOX9 안티센스: 5'-Maleimide-AACGAGAGCGAGAAGAGACCC-3'

siSOX9 센스: 5'-Maleimide-GGGUCUCUUCUCGUCUCGUU-3'

바이오몰레트론의 아랫부분(세 개의 시스테인 및 C 말단에 RGD- 도입된 Azurin-ssDNA 이중층)과 상보적인 csDNA(complementary strand
15 DNA)는 Bioneer(대한민국)에서 구매하였고 다음과 같이 설계되었다.

csDNA: 5'-TATATATGCAGAAATCCCCCCCCCTCTAAAGCGGCGCGCG-3'

바이오몰레트론 윗부분(생체물질 기능화된 나노입자-csDNA 결합체)을 만들기 위해 명빈 뉴클레아제(mungbean nuclease)은 New England Biolabs(미국)에서 구매하였다.

20 바이오몰레트론의 윗부분(생체물질 기능화된 나노입자-csDNA 결합체)을 제조하기 위해, 먼저 에펜도르프 튜브 1 에서는 펩티드 1, RA, EDC/NHS 를 에펜도르프 튜브 2 에서는 펩티드 2, 5' 말단에 말레이미드 변형된 siSOX9 Antisense, siSOX9 Sense 를 4 도의 냉장고 안의 셰이킹 인큐베이터에서 4 시간 동안 반응시켜 놓는다. 12 mm x 35 mm 로 dicing 된
25 Au 기판을 염기 피란하(piranha) 용액(15 부피% H₂O₂, 15 부피% NH₄OH 및 70 부피% H₂O)으로 70℃에서 3 분 동안 세척하였다. 금 전극을 세척한 후, 에탄올 및 탈이온수로 반복세척하고 질소 스트림 하에 건조하여 60 x 15 mm 의 페트리 디시에 넣는다. 금속기판에 직접 고정화하기 위해 10mM PBS(pH 7.4) 3 ml 와 5'말단에 티올 변형된 5 μM ssDNA 2 100 μl를 혼합하여
30 2 시간 동안 정치하였다. 2 시간 후에 3 차 증류수로 세척하고 질소 스트림 하에 건조하여 60 x 15 mm 의 페트리 디시에 넣는다. 그에 상보적인 결합을

위해, 10mM PBS(pH 7.4) 3 ml 와 5 μ M csDNA 2 100 μ l를 혼합하여 1 시간 동안 침지하였다. 1 시간 후에 3 차 증류수로 세척하고 질소 스트림 하에 건조하여 60 x 15 mm 의 페트리 디시에 넣는다. 금 기판 위에 고정된 5'말단에 티올 변형된 csDNA 2 와 5 나노미터 금 나노입자에 결합하기 위해,

5 10mM PBS(pH 7.4) 3 ml 와 5 nm 크기의 금 나노입자를 2 시간 동안 고정화하였다. 2 시간 후에 3 차 증류수로 세척하고 질소 스트림 하에 건조하여 60 x 15 mm 의 페트리 디시에 넣는다. 생체물질 기능화된 나노입자-dsDNA 혼성체 1 을 만들기 위해, 금 나노입자-dsDNA 혼성체 위에

10 10mM PBS(pH 7.4) 3 ml 와 5,5' -Bis(mercaptomethyl)-2,2-bipyridine 와 CPP(CTAT)를 물 비가 2:1 이 되게 혼합하여 2 시간 동안 정치하였다. 2 시간 후에 3 차 증류수로 세척하고 질소 스트림 하에 건조하여 60 x 15 mm 의 페트리 디시에 넣는다. 생체물질 기능화된 나노입자-dsDNA 혼성체 2 를

15 제조하기 위해, 10mM PBS(pH 7.4) 3 ml 와 반응시켜 놓은 에펜도르프 튜브 1, 튜브 2 와 Cucibit [8] Uri1 (CB)을 물 비가 1:1:2 이 되게 혼합하여 2 시간 동안 정치하였다. 2 시간 후에 3 차 증류수로 세척하고 질소 스트림 하에 건조하여 60 x 15 mm 의 페트리 디시에 넣는다. 생체물질 기능화된

나노입자-dsDNA 혼성체 3 를 제조하기 위해, 10 mM PBS(pH 7.4) 3 ml와 명빈 뉴클레아제 반응 완충액에 녹인 명빈 뉴클레아제 10 unit 을 37 도의 인큐베이터에서 1 시간 동안 진행하였다. 1 시간 후에, 페트리 디시 안에

20 있는 용액을 에펜도르프 튜브에 수집한다. 수집한 용액에서 생체물질 기능화된 나노입자-dsDNA 혼성체 3 만을 정제하기 위해서 1 차로는 응집되어 있는 생체물질 기능화된 나노입자-dsDNA 혼성체 3 을 제거하기 위해 0.2 μ m 의 실린지 필터를 사용한다. 2 차로는 한외거르기(MWCO 50k Amicon

25 Ultra centrifugal filter, Millipore, 미국)를 통해 비반응물을 제거하였다. 한외거르기 후 분리된 생체물질 기능화된 나노입자-dsDNA 혼성체 3 를 바이오몰레트론의 아랫부분(세 개의 시스테인 및 C 말단에 RGD-도입된 Azurin-ssDNA 이중층)과 상보적인 티올 변형된 5 μ M csDNA 20 μ l와 반응시켰다. 생체물질 기능화된 나노입자-csDNA 결합체를 정제하기 위해서

30 한외거르기(MWCO 50k Amicon Ultra centrifugal filter, Millipore, 미국)를 통해 비반응물을 제거하였다(도 3).

바이오몰레트론의 제조(Part III, IV 및 V)

바이오몰레트론(Part III)을 제작하기 위해, 바이오몰레트론의 아랫부분(세 개의 시스테인 및 C 말단에 RGD-도입된 Azurin-ssDNA 이중층)이 만들어진 기판의 ssDNA 와 바이오몰레트론 윗부분(생체물질
5 기능화된 나노입자-csDNA 결합체)의 csDNA 가 상보적인 것을 이용하여 바이오몰레트론 윗부분(생체물질 기능화된 나노입자-csDNA 결합체) 20 μ l를 1 시간을 정치하였다. 1 시간 후에 3 차 증류수로 세척하고 질소 스트림 하에 건조하였다. 바이오몰레트론(Part V)을 제작하기 위해, 10 mM AgNO₃ 10 μ l 용액을 1 시간 동안 침지하였다. 바이오몰레트론의 DNA 염기쌍 부분에
10 금속이온이 도입되면 금 기판으로부터 생체물질 기능화된 나노입자로의 전자 이동 효율이 높아진다.

1 시간 후에 3 차 증류수로 세척하고 질소 스트림 하에 건조하였다(도 3).

전류측정법을 이용한 과산화수소수의 검출

파란하 용액 처리한 5 mm $\times$ 15 mm의 Au 기판(Au(100 nm)/Cr(5 nm)/SiO₂/Si 웨이퍼)에 0.1 mg/ml 세 개의 시스테인 및 C 말단에 RGD 도입된 아주린 수용액의 20 μ l를 직접 고정화하여 작업전극으로 이용하였다. 다양한 과산화수소 농도에 따라 제작된 작업전극을 이용하여
20 전류측정법(amperometric measurement)을 수행하였다. 전류측정법은 각각 작업전극으로서 Au/아주린 기질, 상대 전극으로서 플래티늄 및 기준전극으로서 Ag/AgCl/KCl_{sat} 을 사용하는 3-전극 시스템으로 수행하였다. 5 ml의 10 mM PBS(pH 7.4)에 100 μ M 과산화수소를 20 μ l씩 연속 첨가하고 전위를 0 V 로 설정하여 전류-시간 곡선을 기록하였다. 전류를 측정하는
25 동안 600 rpm 의 마그네틱 교반으로 대류 이동시켰다. 실험에서 첨가된 버퍼 용액은 고순도 질소로 제거되었다. 실험에는 일반 전기화학 소프트웨어를 갖춘 CHI 660A 일정전위기(potentiostat)가 사용되었다.

Au/아주린/메탈 이온 매개-염기쌍의 전도도 확인을 위한
30 순환전류전압법(cyclic voltammetry) 실험

준비한 7 μM 세 개의 시스테인 및 C 말단에 RGD 도입된 아주린 수용액의 20 μl 를 시스테인 잔기를 통해 피란하 용액에 처리된 5 mm $\times$ 15 mm의 Au 기판(Au(100 nm)/Cr(5 nm)/SiO₂/Si 웨이퍼) 표면에 직접 고정화하기 위해 금 표면에 4 시간 동안 정치하였다. 4 시간 후에 3 차 증류수로 세척하고 질소 스트림 하에 건조하였다. 그 후에 재조합 아주린 고정된 금 기판을 5 μM 설폰-SMCC 태깅된 ssDNA 20 μl 용액에 2 시간 동안 침지하였다. 2 시간 후에 3 차 증류수로 세척하고 질소 스트림 하에 건조하였다. 그 후에 Au/아주린/ssDNA 의 ssDNA 와 상보적인 csDNA 20 μl 를 1 시간을 정치하였다. 1 시간 후에 3 차 증류수로 세척하고 질소 스트림 하에 건조하였다. Au/아주린/메탈 이온 매개-염기쌍을 제작하기 위해, 10 mM AgNO₃ 10 μl 용액을 1 시간 동안 침지하였다. 1 시간 후에 3 차 증류수로 세척하고 질소 스트림 하에 건조하였다. 제작된 칩을 작업 전극으로 사용하였다. 본 시스템은 작업 전극, 상대 전극 및 기준 전극으로 구성된 종래의 3 전극 시스템이다. Pt 상대 전극 및 Ag/AgCl 기준 전극은 BAS(미국)으로부터 구매하였다. 전기화학적 실험은 CHI660A 전기화학 워크스테이션(CH 인스트루먼트, 미국)으로 수행하였다. 모든 전기화학적 실험은 10 mM PBS(pH 7.4)버퍼 용액에서 수행하였다(도 4).

전기적 방출 기능 확인을 위한 전기화학적인 실험 및 형광현미경

전기화학적인 실험 및 형광현미경 분석을 위해, 펩티드(펩티드 3, 펩티드 4(C-t FITC))를 펩트론(대한민국)에서 합성하였고 다음과 같이 설계되었다.

펩티드 3: WGG

펩티드 4(C-t FITC): WGG-FITC

피란하 용액에 처리한 5 mm x 15 mm 의 Au 기판(Au(100 nm)/Cr(5 nm)/SiO₂/Si 웨이퍼)에 티올기가 달린 화학물질 복합체를 3 시간동안 고정화하였다. 화학물질복합체는 5,5' -Bis(mercaptomethyl)-2,2' -bipyridine, Cucibit [8] Uril (CB), 펩티드 3 으로 구성되며 자가조립방법으로 만들어졌다. 3 시간 후에 3 차 증류수로 세척하고 질소 스트림 하에 건조하였다. 제작된 칩을 작업 전극으로 사용하였다. 제작된 작업전극을 이용하여 전류측정법(amperometric measurement)과

순환전류전압법(cyclic voltammetry)을 수행하였다. 본 시스템은 작업 전극, 상대 전극 및 기준 전극으로 구성된 종래의 3 전극 시스템이다. Pt 상대 전극 및 Ag/AgCl 기준 전극은 BAS(미국)으로부터 구매하였다. 전기화학적 실험은 CHI660A 전기화학 워크스테이션(CH 인스트루먼트, 미국)으로 수행하였다. 모든 전기화학적 실험은 10 mM PBS(pH 7.4)버퍼 용액에서 수행하였다. 형광현미경 분석을 위해 피란하 용액에 처리한 5 mm x 15 mm의 Au 기판(Au(100 nm)/Cr(5 nm)/SiO₂/Si 웨이퍼)에 티올기가 달린 화학물질 복합체를 3 시간동안 고정화하였다. 화학물질복합체는 5,5' - Bis(mercaptomethyl)-2,2' -bipyridine, Cucibit [8] Uril (CB), 펩티드 4 로 구성되며 자가조립방법으로 만들어졌다. 3 시간 후에 3 차 증류수로 세척하고 질소 스트림 하에 건조하였다. 제작된 샘플은 형광현미경(Nikon Eclipse Ti-U, 미국)으로 확인하였다.

흐름형 표면 플라스몬 공명(flow surface plasmon resonance, flow SPR)을 이용한 바이오몰레트론의 표면 조사

바이오필름을 조사하기 위해, 표면 플라스몬 공명 기기(Reichert SR7500DC Dual Channel System, 미국)를 사용하였고 데이터 분석 소프트웨어는 Scrubber2(Reichert, 미국)를 사용하였다. 12.5 mm x 12.5 mm 크기의 금 기판(Au(50 nm)/Cr(1 nm)/글래스 슬라이드(0.95 mm))을 Reichert(미국)에서 구매하였고, 금과 프리즘 사이에 공기 및 방울을 감소시키기 위해 오일을 처리하였다. 흐름형 표면 플라스몬 공명의 자세한 실험 조건들은 아래의 표 2 와 같다.

【표 2】

Order	Sample	Concentration	Flow rate	Association time (sample injection)	Dissociation time (buffer loading)
① Ligand	Recombinant Azurin with RGD	10 ug	20 ul/min	6 min	4 min 30 sec
② Ligand	Recombinant Azurin with RGD	15 ug	20 ul/min	6 min	25 min
③ Analyte 1	ssDNA	5 uM	30 ul/min	5 min	5 min
④ Analyte 2	ssDNA-Functional GNP complex	5 uM	30 ul/min	4 min	3 min
⑤ Analyte 2	ssDNA-Functional GNP complex	5 uM	30 ul/min	4min 20sec	4 min 30 sec
⑥ Analyte 3	Metal Ion (Ag ⁺)	5 uM	30 ul/min	5 min	5 min

전류측정법(amperometric measurement)과 표면 플라스몬 공명(surface plasmon resonance, SPR)을 이용한 바이오몰레트론의 방출시스템 확인

5 준비한 7 μ M 세 개의 시스테인 및 C 말단에 RGD 도입된 아주린 수용액의 40 μ l를 시스테인 잔기를 통해 피란하 용액에 처리된 12.5 mm x 12.5 mm 크기의 금 기판(Au(50 nm)/Cr(1 nm)/글래스 슬라이드(0.95 mm)) 표면에 직접 고정화하기 위해 금 표면에 4 시간 동안 정치하였다. 4 시간 후에 3 차 증류수로 세척하고 질소 스트림 하에 건조하였다. 그 후에 재조합

10 아주린 고정된 금 기판을 5 μ M 설폰-SMCC 태깅된 ssDNA 40 μ l 용액에 2 시간 동안 침지하였다. 2 시간 후에 3 차 증류수로 세척하고 질소 스트림 하에 건조하였다. 바이오몰레트론(Part III)을 제작하기 위해, 바이오몰레트론의 아랫부분(세 개의 시스테인 및 C 말단에 RGD-도입된 Azurin-ssDNA 이중층)이 만들어진 기판의 ssDNA 와 바이오몰레트론

15 윗부분(생체물질 기능화된 나노입자-csDNA 결합체)의 csDNA 가 상보적인 것을 이용하여 바이오몰레트론 윗부분(생체물질 기능화된 나노입자-csDNA 결합체) 40 μ l를 1 시간을 정치하였다. 1 시간 후에 3 차 증류수로 세척하고 질소 스트림 하에 건조하였다. 바이오몰레트론(Part V)을 제작하기 위해, 10 mM AgNO₃ 20 μ l 용액을 1 시간 동안 침지하였다. 1 시간 후에 3 차

20 증류수로 세척하고 질소 스트림 하에 건조하였다. 제작된 칩을 작업 전극으로 사용하였다. 제작된 작업전극을 이용하여 전류측정법(amperometric measurement)을 수행하였다. 모든 전기화학적 실험은 10 mM PBS(pH 7.4)버퍼 용액에서 수행하였다.

25 바이오몰레트론의 방출시스템 확인을 위해, 표면 플라스몬 공명 기기(Reichert SR7500DC Dual Channel System, 미국)를 사용하였고 데이터 분석 소프트웨어는 Scrubber2(Reichert, 미국)를 사용하였다. 12.5 mm x 12.5 mm 크기의 금 기판(Au(50 nm)/Cr(1 nm)/글래스 슬라이드(0.95 mm))을 Reichert(미국)에서 구매하였고, 금과 프리즘 사이에 공기 및 방울을 감소시키기 위해 오일을 처리하였다.

30

신경줄기세포를 위한 바이오몰레트론이 고정화된 작업전극의 제작

본 발명에서는 작업전극(Au), 상대전극(Pt) 및 표준전극(Ag/AgCl)으로 구성된 일반적인 3-전극 전기화학 시스템을 도입하였다. 12 mm x 35 mm 로 dicing 된 Au 기판(Au(10 nm)/Cr(2 nm)/글래스 웨이퍼)을 G-mek(대한민국)에서 구매하였다. 이러한

5 기질(substrate)은 전극 상의 세포가 광학 현미경으로 잘 관찰될 수 있는 반-투명(semi-transparent) 상태이다. 상기 전극을 알코올 및 증류수에서 5 분간 소니케이션하여 세척하였다. 12 mm x 35 mm 로 dicing 된 Au 기판을 염기 피란하(piranha) 용액(15 부피% H₂O₂, 15 부피% NH₄OH 및 70 부피% H₂O)으로 70℃에서 3 분 동안 세척하였다. 금 전극을 세척한 후, 에탄올 및

10 탈이온수로 반복세척하고 질소 스트림 하에 건조하여 90 x 15 mm 의 패트리 디시에 넣는다. 전기화학적 측정을 위해, 플라스틱 챔버(Lab-Tek®, Thermo fisher scientific, 미국)를 PDMS(Polydi methylsiloxane)를 사용한 금 작동 전극에 고정하여 대략 10 mm × 20 mm 의 노출영역을 갖는 10 mm × 20 mm × 5 mm(너비×길이×높이)의 세포 칩 챔버를 제작하였다. 준비한 7 μM

15 세 개의 시스테인 및 C 말단에 RGD 도입된 아주린 수용액의 120 μl를 시스테인 잔기를 통해 제작된 세포 칩 챔버 Au 기판 표면에 직접 고정화하기 위해 금 표면에 4 시간 동안 정치하였다. 4 시간 후에 10 mM PBS(pH 7.4)버퍼로 두 번 세척하고 파스퇴르 파이펫으로 석션하였다. 그 후에 재조합 아주린 고정된 세포 칩 챔버 Au 기판을 5 μM 설폰-SMCC

20 태깅된 ssDNA 120 μl 용액에 2 시간 동안 침지하였다. 2 시간 후에 10 mM PBS(pH 7.4)버퍼로 두 번 세척하고 파스퇴르 파이펫으로 석션하였다. 바이오몰레트론의 아랫부분(세 개의 시스테인 및 C 말단에 RGD-도입된 Azurin-ssDNA 이중층)이 만들어진 세포 칩 챔버 Au 기판의 ssDNA 와 바이오몰레트론 윗부분(생체물질 기능화된 나노입자-csDNA 결합체)의

25 csDNA 가 상보적인 것을 이용하여 바이오몰레트론 윗부분(생체물질 기능화된 나노입자-csDNA 결합체) 120 μl를 1 시간을 정치하였다. 1 시간 후에 10 mM PBS(pH 7.4)버퍼로 두 번 세척하고 파스퇴르 파이펫으로 석션하였다. 제작된 세포 칩 챔버 Au 기판에 바이오몰레트론을 제작하기 위해, 10 mM AgNO₃ 60 μl 용액을 1 시간 동안 침지하였다. 1 시간 후에 10 mM PBS(pH

30 7.4)버퍼로 두 번 세척하고 파스퇴르 파이펫으로 석션하였다.

바이오몰레트론이 고정화 된 작업전극에서의 신경줄기세포 배양 및 분화

바이오몰레트론이 고정화 된 세포 칩 챔버 Au 기판을 작업전극으로 사용하였다. NE4C 세포는 ATCC(Rockville, 미국)에서 구매하였다. 세포 배양을 위해 열 불활성화된 10 % FBS(Fetal Bovine Serum, Gibco, 미국) 및 1% 페니실린(Gibco, 미국)을 포함하는 MEM 알파 배지(Gibco, 미국)를 사용하였다. 세포는 37℃의 습한 5% CO₂ 조건에서 배양되었다. 신경줄기세포 분화를 위해 제작된 작업전극에 전류측정법(amperometric measurement)을 이용하여 -0.5 V 전위를 200 초간 인가하였다. 배지는 3 일간 유지시킨다. 그 이후 배지는 2 일 간격으로 교체하였다. 세포의 수는 트립판블루 염색하여 혈구계수기로 결정하였다.

면역염색법을 통한 바이오몰레트론 기초로 한 신경줄기세포 분화 확인

세포는 4% 포름알데히드로 20 분간 고정된 후, 0.1% 트리톤 X-100 을 이용해 투과(permeabilization)하였다. 3% 소혈청 알부민(bovine serum albumin, BSA)을 포함하는 D-PBS 를 이용하여 블로킹(blocking)한 후, 지시된 1 차 항체를 이용해 반응시켰다. 세포는 세척 후, Cy2-(Jackson ImmunoResearch Laboratories) 또는 Alexa594-(Life Techonologies) 결합된 2 차 항체를 이용해 반응시킨다. 핵은 DAPI 를 이용하여 염색하였다. 이미지는 형광현미경(Nikon Eclipse Ti-U, 미국)을 이용하여 분석되었으며, 사용된 1 차 항체는 Nestin, β III-tubulin(Abcam, 미국)을 사용하였다.

RNA 추출 및 RT-qPCR(quantitative reverse transcription polymerase chain reaction)을 통한 바이오몰레트론 기초로 한 신경줄기세포 분화 확인

RNA 는 RNA 추출 키트(QIAGEN, 미국)를 이용해 얻은 후, RevertAid First Strand cDNA 합성 키트(Thermo Scientific, 미국)를 이용해 제공하는 방법에 따라 cDNA(complementary DNA)로 합성되었다.

RT-qPCR 은 Takara PCR thermal cycler (Takara, 일본) 장비에서 수행되었으며, 본 발명에서 사용된 유전자 특이적 프라이머는 표 3 에 명시되었다.

【표 3】

유전자	정방향 서열	역방향 서열
Oct 4	5-GAGGCTACAGGGACACCTTTC-3	5-GTGCCAAAGTGGGGACCT-3
NANOG	5-AAATTGGTGATGAAGATGTATTTCG-3	5-GCAAAACAGAGCCAAAAACG-3
SOX2	5-TTCACATGTCCCAGCACTACCAGA-3	5-TCACATGTGTGAGAGGGGCAGTGTGC-3
PAX6	5-TGTCCAACGGATGTGTGAGT-3	5-TTTCCCAAGCAAAGATGGAC-3
Ngn2	5-ACATCTGGAGCCGCGTAG-3	5-CAGCAGCATCAGTACCTCCTCt-3
Math2	5-CGACACTCAGCCTGAAAAGAt-3	5-CAAACTTTCTGCACATCTGGG-3
ACTB	5-GTCCTCTCCCAAGTCCACAC-3	5-GGGAGACCAAAAGCCTTCAT-3

5

실험결과

RGD 펩티드 서열이 도입된 재조합 아주린 발현 및 *H2O2* consumption 기능 확인

도 6 은 재조합 아주린 전기영동 및 과산화수소 제거 기능을 보여준다. 세포 표면의 자리하고 있는 Integrin 과 직접고정화를 위해 RGD 펩티드가 변형된 유전자를 삽입하여 재조합 아주린을 생산하였고 전기영동을 이용하여 확인하였다. 재조합되어 RGD 펩티드가 도입된 아주린이 활성산소 중의 하나인 과산화수소를 제거하는 기능을 전류측정기법을 이용하여 확인하였다.

15

Au/아주린/메탈 이온 매개-염기쌍의 전도도 기능 확인

도 7 은 삽입되는 메탈이온 수의 증가에 따라 전도도 증가를 보여준다. 세포 표면의 자리하고 있는 ssDNA 와 csDNA 의 상보적 결합시 생성되는 DNA 이중가닥 사이의 미스-매칭되는 시퀀스 부분에 삽입되어 들어갈 수 있는 특이적인 메탈이온의 결합을 이용한 메탈 DNA 의 제작 및 삽입되는 메탈이온 수의 증가에 따라 전도도 증가를 전기화학적 방법을 이용하여 확인하였다.

20

전기적 방출 기능 확인

도 8 은 순환전류전압법과 형광현미경을 이용하여 전기적 방출 기능 확인하였다. 전류측정법을 이용하여 작업전극에 전위를 -0.5 V 를 200 초 동안 인가하도록 설정하고 인가 전후의 곡선을 확인한 결과 변화가 되는 것을 보아 펩티드 3 가 떨어져 나간 것을 확인 하였다. 형광현미경을 통하여 펩티드 4 가 떨어져 나간 것을 보아 전기적 방출 기능 확인을 확인하였다.

흐름형 표면 플라스몬 공명(flow surface plasmon resonance, flow SPR)을 이용한 바이오몰레트론의 표면 조사 확인

도 9 는 흐름형 표면 플라스몬 공명 데이터 및 실험조건에 대한 표를 보여준다. 데이터를 보아 바이오몰레트론의 나노박막구조가 잘 형성되었음을 확인하였다. 상기 나노박막구조는 바이오몰레트론의 다층(multi-layered) 구조를 의미한다. (1 층) 금 기판 (2 층) 아주린 단백질 (3 층) 설폰-SMCC 태깅된 ssDNA (4 층) 바이오몰레트론 윗부분(생체물질 기능화된 나노입자-csDNA 결합체) (5 층) AgNO_3 .

나노박막구조의 층이 증가함에 따라 RU 값이 증가됨이 보여진다. 바이오몰레트론 나노박막구조가 잘 형성되었음을 확인하였다.

바이오몰레트론의 전기 방출시스템 기능 확인

도 10 은 바이오몰레트론의 전기 방출시스템 기능 확인을 위한 표면 플라스몬 공명 데이터를 보여준다. 제작된 세 개의 시스템인 및 C 말단 RGD 펩티드 서열이 도입된 바이오몰레트론 나노박막구조의 전기적 방출 시스템 기능을 확인하기 위해 전류측정기법을 도입하여 측정하였다. 바이오몰레트론 나노박막구조에 -0.5 V 와 -1 V 의 전압을 인가하여 세포 분화를 위한 기능성 복합체의 전기적 방출시스템을 SPR 을 이용하여 확인하였다. -0.5 V 와 -1 V 의 전압을 가한 이후에는 SPR 각이 전압을 인가하기 전과 비교하여 줄어드는 것을 통하여 새롭게 제작된 RGD 펩티드 서열이 도입된 바이오몰레트론의 세포 분화를 위한 기능성 복합체의 전기적 방출시스템이 잘 작동함을 확인하였다.

바이오몰레트론의 세포막 부분 투과 확인

도 11 은 바이오몰레트론의 세포막 부분 투과를 순차적인 실험방법으로 확인하는 것을 보여준다. 도 11a 의 공초점 현미경 데이터를 보면 세포막 근처에 바이오몰레트론이 제작되었음을 알 수 있고 3 가지
 5 경우(세포막 투과 못함, 세포막 전체 투과함, 세포막을 부분적으로 투과함)가 가능할 것임을 알 수 있다. 도 11b 의 형광 현미경 데이터를 보면 FITC 가 세포안으로 들어가기 때문에 “세포막 투과 못함”의 경우는 제외된다. 도 11c 의 공초점 현미경 데이터를 보면 세포표면(Integrin)에만
 10 바이오몰레트론의 일부인 단백질(RGD auzrin)이 붙어 있기 때문에 “세포막 전체 투과함”의 경우는 제외된다. 최종적으로 우리가 목표로 한 세포막을 부분적으로 투과하는 “세포막을 부분적으로 투과함”의 경우만 가능함을 알 수 있다.

바이오몰레트론 기초로 한 신경줄기세포 분화 확인

도 12 은 면역염색법과 검출정량 PCR 을 이용하여 바이오몰레트론 기초로 한 신경줄기세포 분화를 확인한 결과이다. 도 12a 는 RA 와 siSOX9 의
 15 농도에 따른 줄기세포 분화마커인 β III-tubulin 이 면역염색법을 이용하여 확인되었다. 바이오몰레트론을 기초로 한 줄기세포 분화를 검출정량 PCR 을 이용하여 확인(도 12b)하였고 배양 14 일 이후, 줄기세포 분화마커인 pax6,
 20 Ngn2, Math2 의 밴드가 확인됨으로 분화가 잘 되었음을 확인하였다.

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은
 25 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

다음은 구성요소를 포함하는 줄기세포 분화 조절용 생물전자소자(bioelectronics):

- 5 (a) 산화환원능(redox potential)을 갖는 단백질;
- (b) 상기 산화환원능을 갖는 단백질의 N-말단에 결합된 제 1 단일가닥 DNA;
- (c) 상기 제 1 단일가닥 DNA에 상보적으로 혼성화(hybridization)하여 이중가닥 DNA를 형성하는 제 2 단일가닥 DNA;
- 10 (d) 상기 제 2 단일가닥 DNA의 말단에 직접적으로 결합된 나노입자;
- (e) 상기 나노입자에 결합된 (i) 세포막 투과성 펩티드 및 (ii) 분화 유도 인자.

【청구항 2】

- 15 제 1 항에 있어서, 상기 산화환원능을 갖는 단백질은 아주린, 헤모글로빈, 미오글로빈, 헤메리트린, 혈색소, 시토크롬, 철-황단백질, 루브레독신, 플라스토시아닌, 페리틴, 셀룰로프라스민, 탄산 탈수 효소, 비타민 B12-종속 효소, 니트로게나아제, 슈퍼옥사이드 디스뮤타제, 엽록소-포함 단백질, 칼모둘린, 글루코스-6-포스파타제, 헥소키나아제, DNA
- 20 폴리머라아제, 바나빈, 아르기나아제, 카탈라아제, 수소화 효소, 철반응요소결합단백질, 아코니타제, 우레아제, 시토크롬 산화 효소, 라케이스, 알코올 탈수소 효소, 카르복시펩티다아제, 아미노펩티다아제, β -아밀로이드단백질, 질산 환원 효소, 글루타티온과산화효소, 메탈로티오네인 또는 포스파타아제인인 것을 특징으로 하는 생물전자소자.

25

【청구항 3】

제 1 항에 있어서, 상기 산화환원능을 갖는 단백질은 시스테인 잔기가 도입되어 기판에 직접 고정화 되는 것을 특징으로 하는 생물전자소자.

30

【청구항 4】

제 1 항에 있어서, 상기 산화환원능을 갖는 단백질은 서열목록 제 2 서열의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 생물전자소자.

【청구항 5】

5 제 1 항에 있어서, 상기 산화환원능을 갖는 단백질은 C-말단에 세포 막의 수용체 단백질에 결합능을 갖는 리간드를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 생물전자소자.

【청구항 6】

10 제 5 항에 있어서, 상기 세포 막의 수용체 단백질에 결합능을 갖는 리간드는 RGD(Arg-Gly-Asp), RGDS(Arg-Gly-Asp-Ser), RGDC(Arg-Gly-Asp-Cys), RGDV(Arg-Gly-Asp-Val), RGES(Arg-Gly-Glu-Ser), RGDSPASSKP(Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Ala-Ser-Ser-Lys-Pro), GRGDS(Gly-Arg-Gly-Asp-Ser), GRADSP(Gly-Arg-Ala-Asp-Ser-Pro), KGDS(Lys-Gly-Asp-Ser), GRGDSP(Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro), GRGDTP(Gly-Arg-Gly-Asp-Thr-Pro), GRGES(Gly-Arg-Gly-Glu-Ser), GRGDSPC(Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Cys), GRGES(P(Gly-Arg-Gly-Glu-Ser-Pro), SDGR(Ser-Asp-Gly-Arg), YRGDS(Tyr-Arg-Gly-Asp-Ser), GQQHHLGGAKQAGDV (Gly-Gln-Gln-His-His-Leu-Gly-Gly-Ala-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val), GPR(Gly-Pro-Arg), GHK(Gly-His-Lys), YIGSR(Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg), PDSGR(Pro-Asp-Ser-Gly-Arg), CDPGYIGSR(Cys-Asp-Pro-Gly-Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg), LCFR(Leu-Cys-Phe-Arg), EIL(Glu-Ile-Leu), EILDV(Glu-Ile-Leu-Asp-Val), EILDVPST(Glu-Ile-Leu-Asp-Val-Pro-Ser-Thr), EILEVPST(Glu-Ile-Leu-Glu-Val-Pro-Ser-Thr), LDV(Leu-Asp-Val) 및 LDVPS(Leu-Asp-Val-Pro-Ser)로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 리간드인 것을
20
25 특징으로 하는 생물전자소자.

【청구항 7】

제 1 항에 있어서, 상기 산화환원능을 갖는 단백질은 자유 라디칼 제거능을 갖는 것을 특징으로 하는 생물전자소자.

【청구항 8】

제 1 항에 있어서, 상기 제 1 단일가닥 DNA 는 상기 산화환원능을 갖는 단백질의 N-말단과 링커를 통해 간접적으로 결합된 것을 특징으로 하는 생물전자소자.

5 **【청구항 9】**

제 1 항에 있어서, 상기 제 2 단일가닥 DNA 는 말단에 도입된 티올기(thiol group)를 통하여 직접적으로 상기 나노입자에 결합된 것을 특징으로 하는 생물전자소자.

10 **【청구항 10】**

제 1 항에 있어서, 상기 이중가닥 DNA 는 미스매치(mismatch) 염기쌍 사이에 메탈이온을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 생물전자소자.

【청구항 11】

15 제 1 항에 있어서, 상기 세포막 투과성 펩티드는 상기 나노입자의 표면에 도입된 링커를 통해 간접적으로 결합된 것을 특징으로 하는 생물전자소자.

【청구항 12】

20 제 1 항에 있어서, 상기 분화 유도 인자는 상기 나노입자의 표면에 도입된 펩티드를 통해 간접적으로 결합된 것을 특징으로 하는 생물전자소자.

【청구항 13】

25 제 1 항에 있어서, 상기 분화 유도 인자는 전위 인가에 의해 나노입자로부터 방출(release)되는 것을 특징으로 하는 생물전자소자.

【청구항 14】

30 제 1 항에 있어서, 상기 분화 유도 인자는 siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임(ribozyme), DNzyme, PNA(peptide nucleic acids), 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 펩티드, 항체 및 앵타머로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 인자인 것을 특징으로 하는 생물전자소자.

【청구항 15】

제 1 항에 있어서, 상기 생물전자소자는 상기 재조합 아주린의 C-말단에 도입된 세포 막의 수용체 단백질에 결합능을 갖는 리간드에 의해
5 세포 막에 통합(integration)되는 것을 특징으로 하는 생물전자소자.

【청구항 16】

제 1 항 내지 제 15 항 중 어느 한 항의 생물전자소자를 줄기세포에
접촉하는 단계를 포함하는 줄기세포 분화 조절 방법.

10

【청구항 17】

다음의 단계를 포함하는 줄기세포 분화 조절용 생물전자소자의
제조방법:

(a) 기관 상에 산화환원능을 갖는 단백질을 자기-조립(self-
15 assembly)하는 단계;

(b) 상기 산화환원능을 갖는 단백질의 N-말단에 제 1 단일가닥 DNA 를
결합시키는 단계;

(c) 상기 제 1 단일가닥 DNA 에 제 2 단일가닥 DNA 를
혼성화(hybridization)하여 이중가닥 DNA 를 형성시키는 단계;

20 (d) 상기 제 2 단일가닥 DNA 의 말단에 나노입자를 결합시키는 단계;

(e) 상기 나노입자의 표면에 (i) 세포막 투과성 펩티드 및 (ii)
분화 유도 인자를 결합시키는 단계.

【청구항 18】

25 제 17 항에 있어서, 상기 단계 (a)의 산화환원능을 갖는 단백질은
아주린, 헤모글로빈, 미오글로빈, 헤메리트린, 혈색소, 시토크롬, 철-
황단백질, 루브레독신, 플라스토시아닌, 페리틴, 셀룰로프라스민, 탄산
탈수 효소, 비타민 B12-종속 효소, 니트로게나아제, 슈퍼옥사이드
디스무타제, 엽록소-포함 단백질, 칼모둘린, 글루코스-6-포스파타제,
30 헥소키나아제, DNA 폴리머라아제, 바나빈, 아르기나아제, 카탈라아제,
수소화 효소, 철반응요소결합단백질, 아코니타제, 우레아제, 시토크롬 산화

효소, 라케이스, 알코올 탈수소 효소, 카르복시펩티다아제, 아미노펩티다아제, β -아밀로이드단백질, 질산 환원 효소, 글루타티온과산화효소, 메탈로티오네인 또는 포스파타아제인인 것을 특징으로 하는 방법.

5

【청구항 19】

제 17 항에 있어서, 상기 단계 (a)의 산화환원능을 갖는 단백질은 시스템인 잔기가 도입되어 기관에 직접 고정화 되는 것을 특징으로 하는 방법.

10

【청구항 20】

제 17 항에 있어서, 상기 단계 (a)의 산화환원능을 갖는 단백질은 서열목록 제 2 서열의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

15

【청구항 21】

제 17 항에 있어서, 상기 단계 (a)의 산화환원능을 갖는 단백질은 C-말단에 세포 막의 수용체 단백질에 결합능을 갖는 리간드를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

20

【청구항 22】

제 21 항에 있어서, 상기 세포 막의 수용체 단백질에 결합능을 갖는 리간드는 RGD(Arg-Gly-Asp), RGDS(Arg-Gly-Asp-Ser), RGDC(Arg-Gly-Asp-Cys), RGDV(Arg-Gly-Asp-Val), RGES(Arg-Gly-Glu-Ser), RGDSPASSKP(Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Ala-Ser-Ser-Lys-Pro), GRGDS(Gly-Arg-Gly-Asp-Ser), GRADSP(Gly-Arg-Ala-Asp-Ser-Pro), KGDS(Lys-Gly-Asp-Ser), GRGDSP(Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro), GRGDTP(Gly-Arg-Gly-Asp-Thr-Pro), RGDSPC(Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Cys), GRGES(Gly-Arg-Gly-Glu-Ser-Pro), SDGR(Ser-Asp-Gly-Arg), YRGDS(Tyr-Arg-Gly-Asp-Ser), GQQHHLGGAKQAGDV (Gly-Gln-Gln-His-His-Leu-Gly-Gly-Ala-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val), GPR(Gly-Pro-Arg), GHK(Gly-His-Lys), YIGSR(Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg), PDSGR(Pro-Asp-Ser-Gly-Arg), CDPGYIGSR(Cys-Asp-Pro-Gly-Tyr-Ile-

25

30

Gly-Ser-Arg), LCFR(Leu-Cys-Phe-Arg), EIL(Glu-Ile-Leu), EILDV(Glu-Ile-Leu-Asp-Val), EILDVPST(Glu-Ile-Leu-Asp-Val-Pro-Ser-Thr), EILEVPST(Glu-Ile-Leu-Glu-Val-Pro-Ser-Thr), LDV(Leu-Asp-Val) 및 LDVPS(Leu-Asp-Val-Pro-Ser)로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 리간드인 것을
 5 특징으로 하는 방법.

【청구항 23】

제 17 항에 있어서, 상기 단계 (a)의 산화환원능을 갖는 단백질은 자유 라디칼 제거능을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 24】

제 17 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 제 1 단일가닥 DNA 는 상기 재조합 아주린의 N-말단과 링커를 통해 간접적으로 결합된 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 25】

제 17 항에 있어서, 상기 단계 (c)의 제 2 단일가닥 DNA 는 말단에 도입된 티올기(thiol group)를 통하여 직접적으로 상기 나노입자에 결합된 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 26】

제 17 항에 있어서, 상기 단계 (e)의 세포막 투과성 펩티드는 상기 나노입자의 표면에 도입된 링커를 통해 간접적으로 결합되는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 27】

제 17 항에 있어서, 상기 단계 (e)의 분화 유도 인자는 상기 나노입자의 표면에 도입된 펩티드를 통해 간접적으로 결합되는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 28】

제 17 항에 있어서, 상기 단계 (e)의 분화 유도 인자는 전위 인가에 의해 나노입자로부터 방출(release)되는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 29】

- 5 제 17 항에 있어서, 상기 단계 (e)의 분화 유도 인자는 siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임(ribozyme), DNAzyme, PNA(peptide nucleic acids), 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 펩티드, 항체 및 앵타머로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 인자인 것을 특징으로 하는 방법.

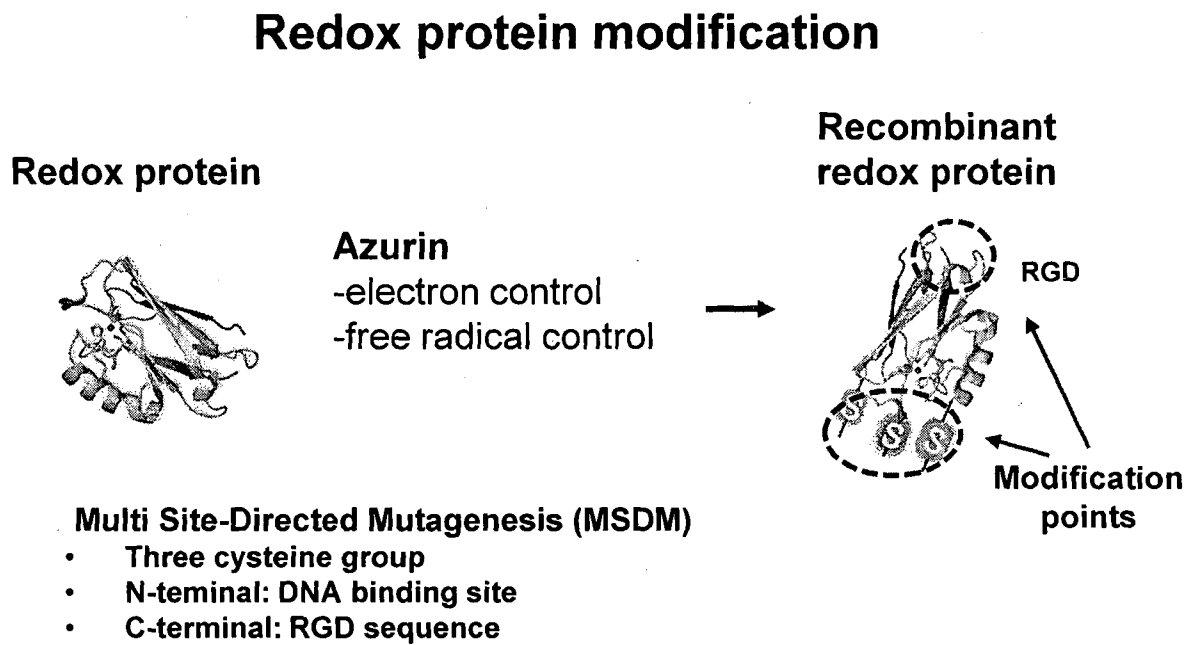
10 【청구항 30】

제 17 항에 있어서, 상기 단계 (e) 이후에 상기 단계 (c)의 이중가닥 DNA 의 미스매치(mismatch) 염기쌍 사이에 메탈이온을 도입하는 단계 (f)를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

15 【청구항 31】

제 17 항에 있어서, 상기 생물전자소자는 상기 재조합 아주린의 C-말단에 도입된 세포 막의 수용체 단백질에 결합능을 갖는 리간드에 의해 세포 막에 통합(integration)되는 것을 특징으로 하는 방법.

1/19

Fig. 1

2/19

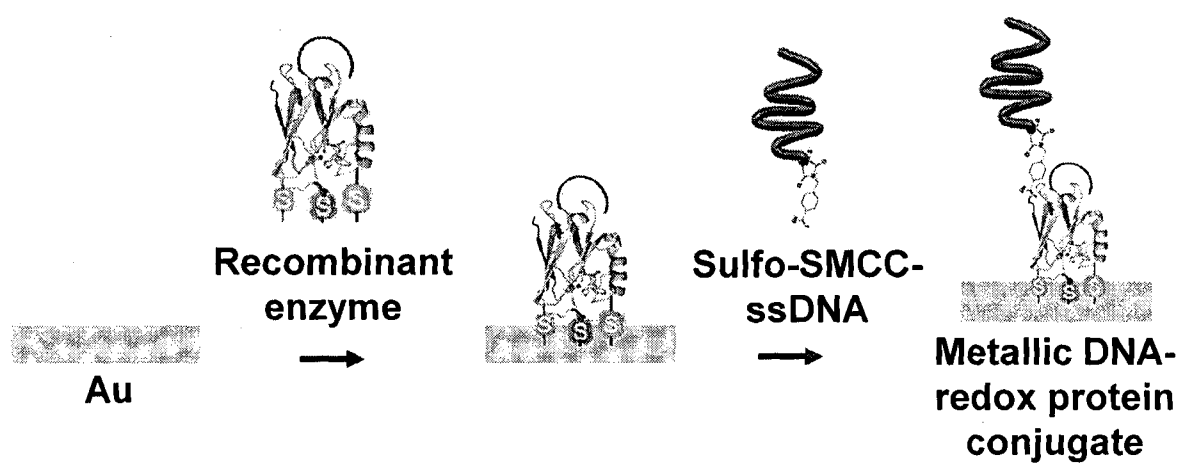
Fig. 2**DNA-Redox protein conjugation**

Fig. 3

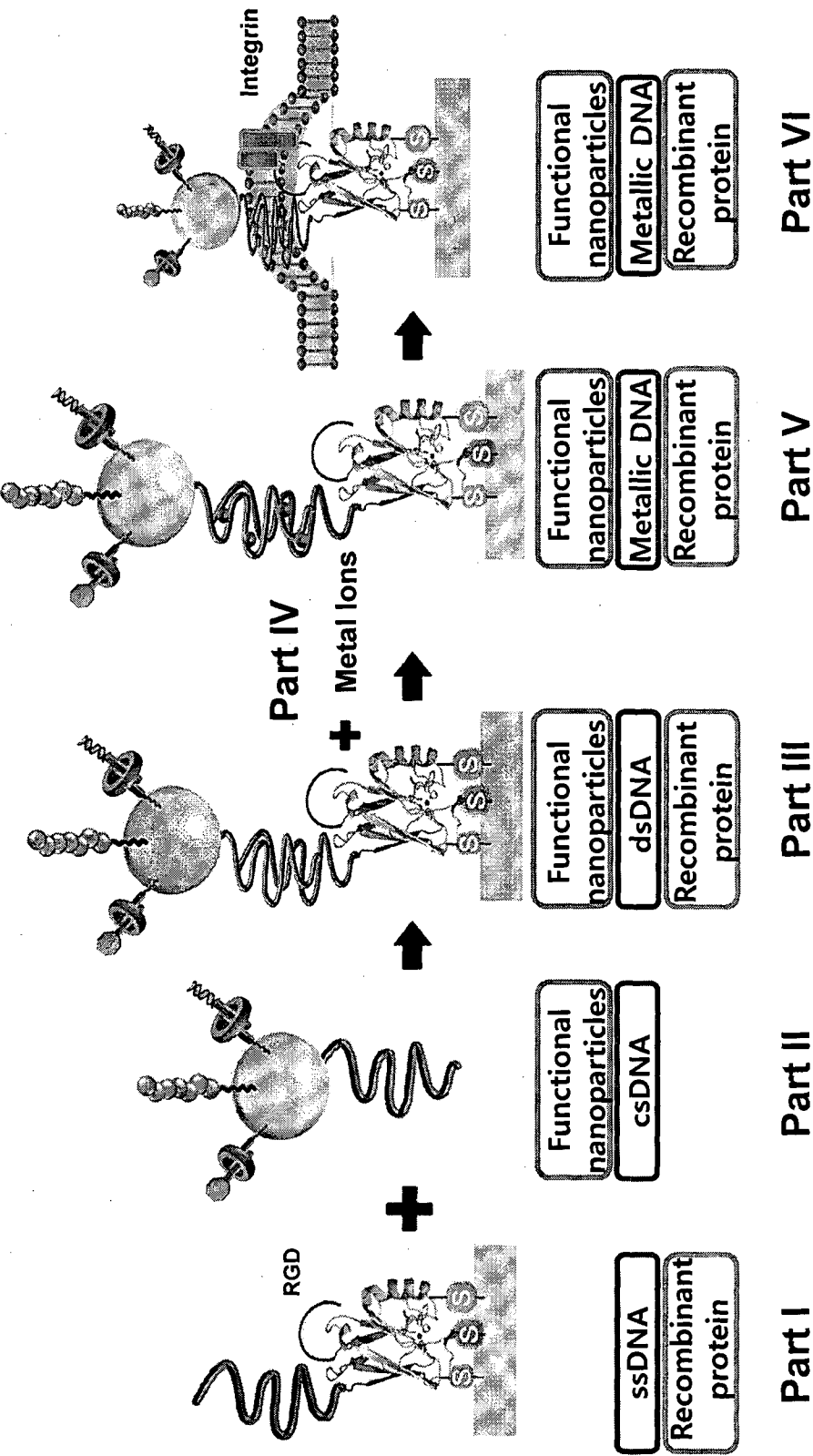


Fig. 4

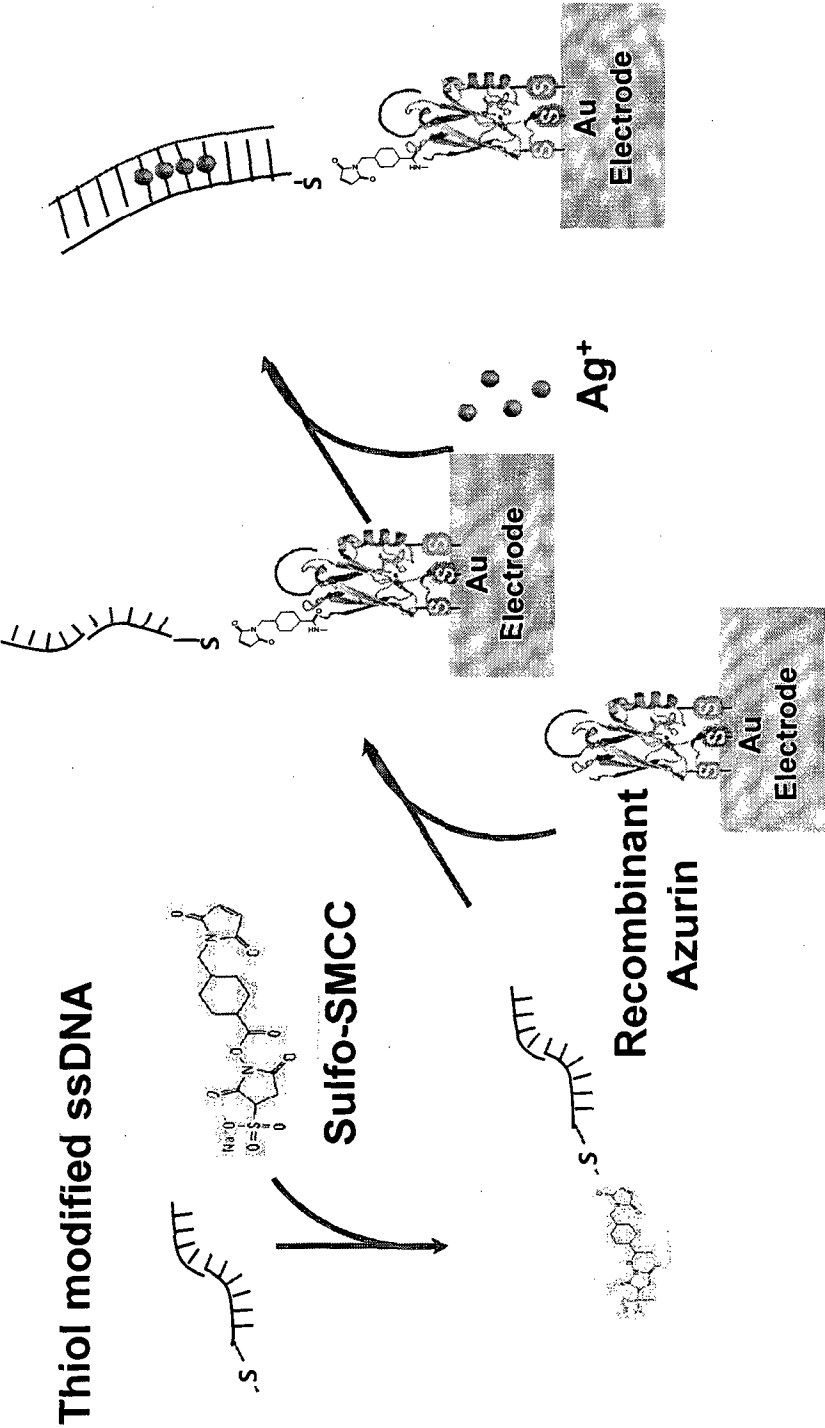
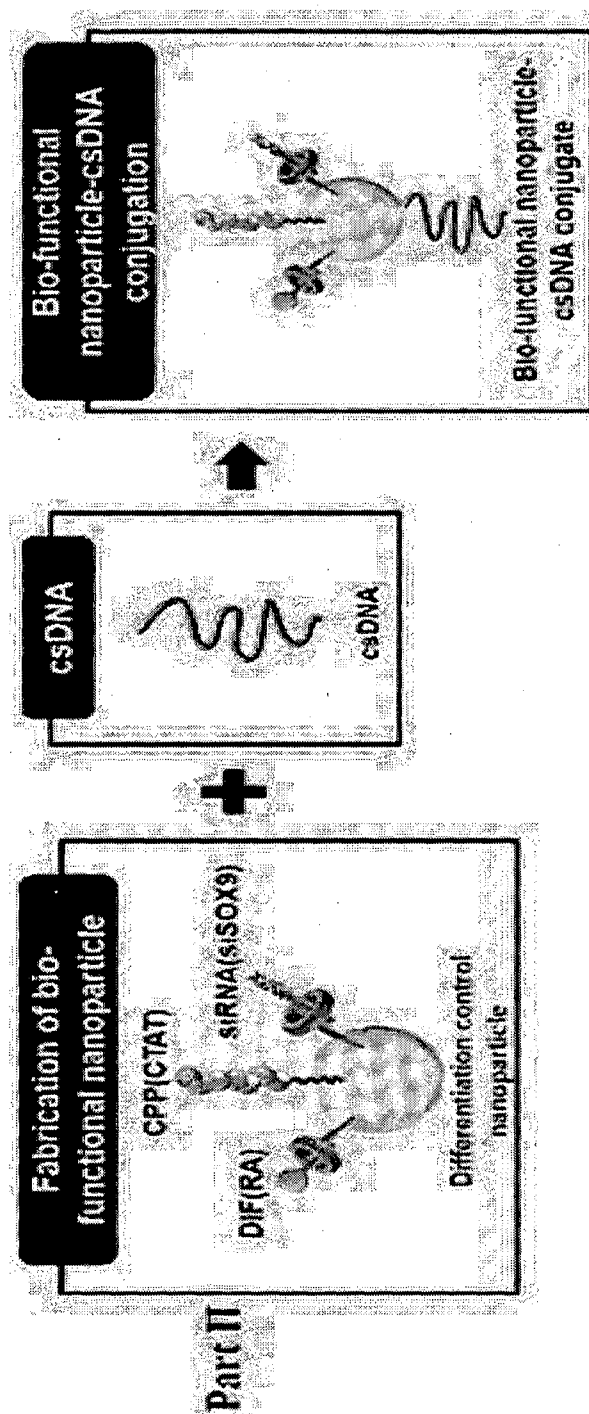
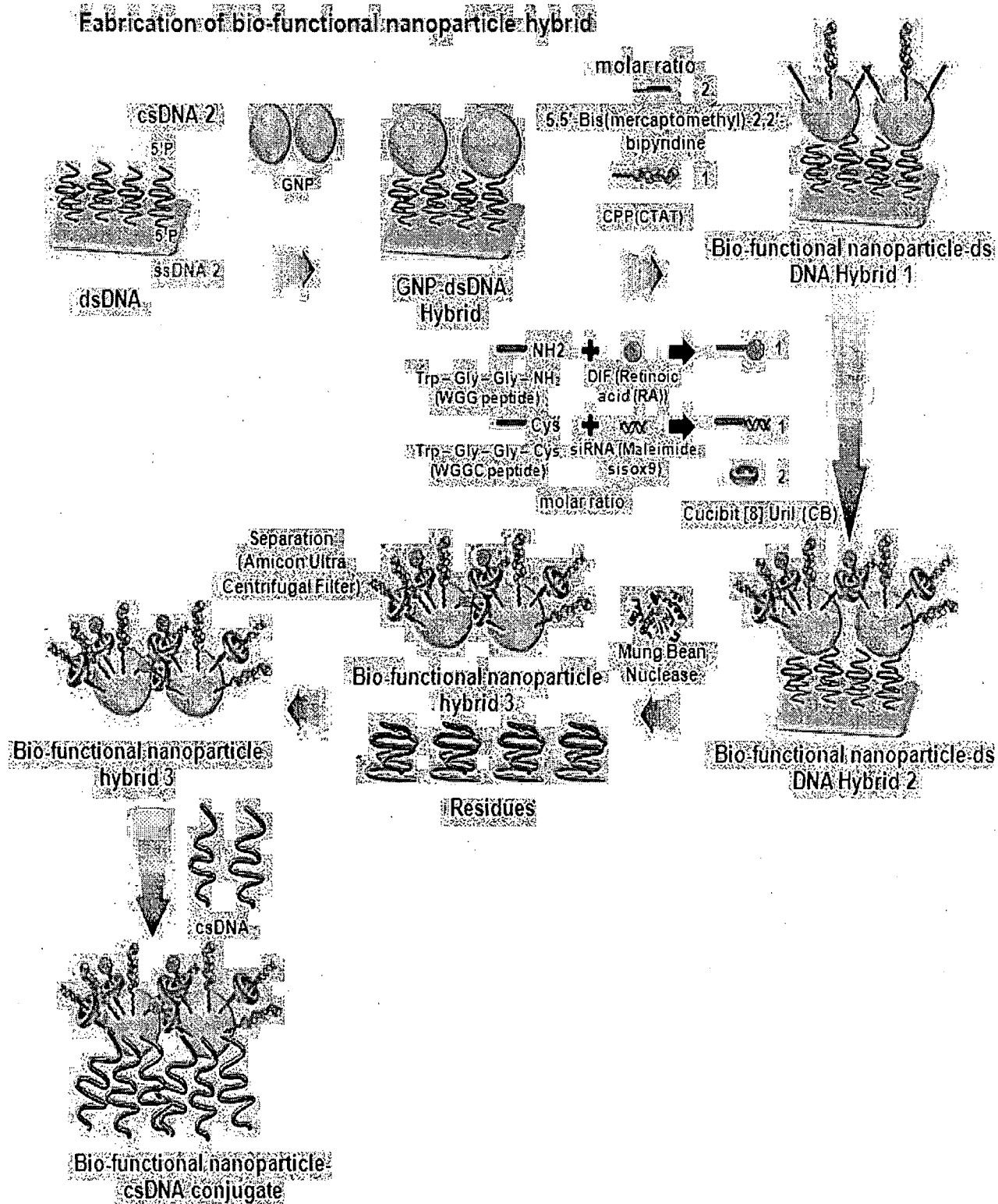


Fig. 5a

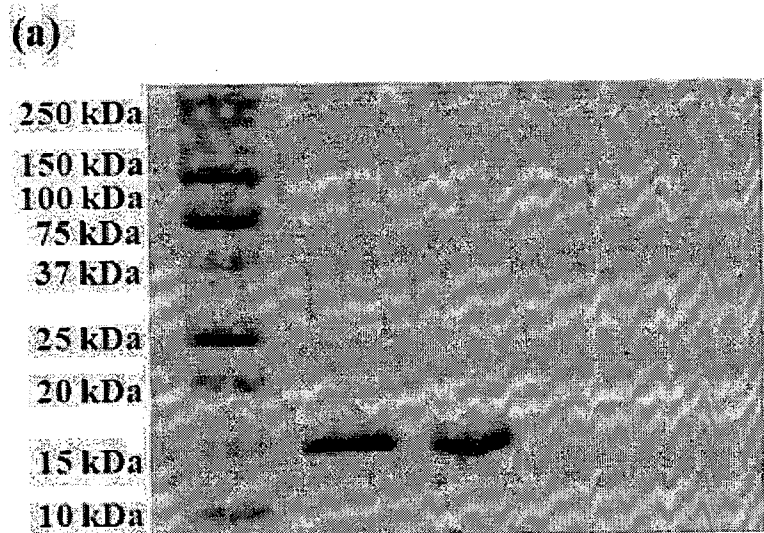
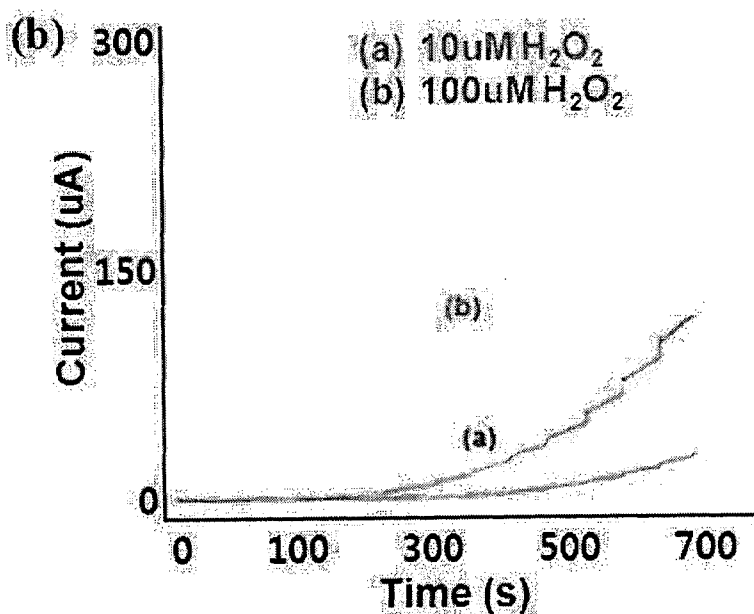


6/19

Fig. 5b

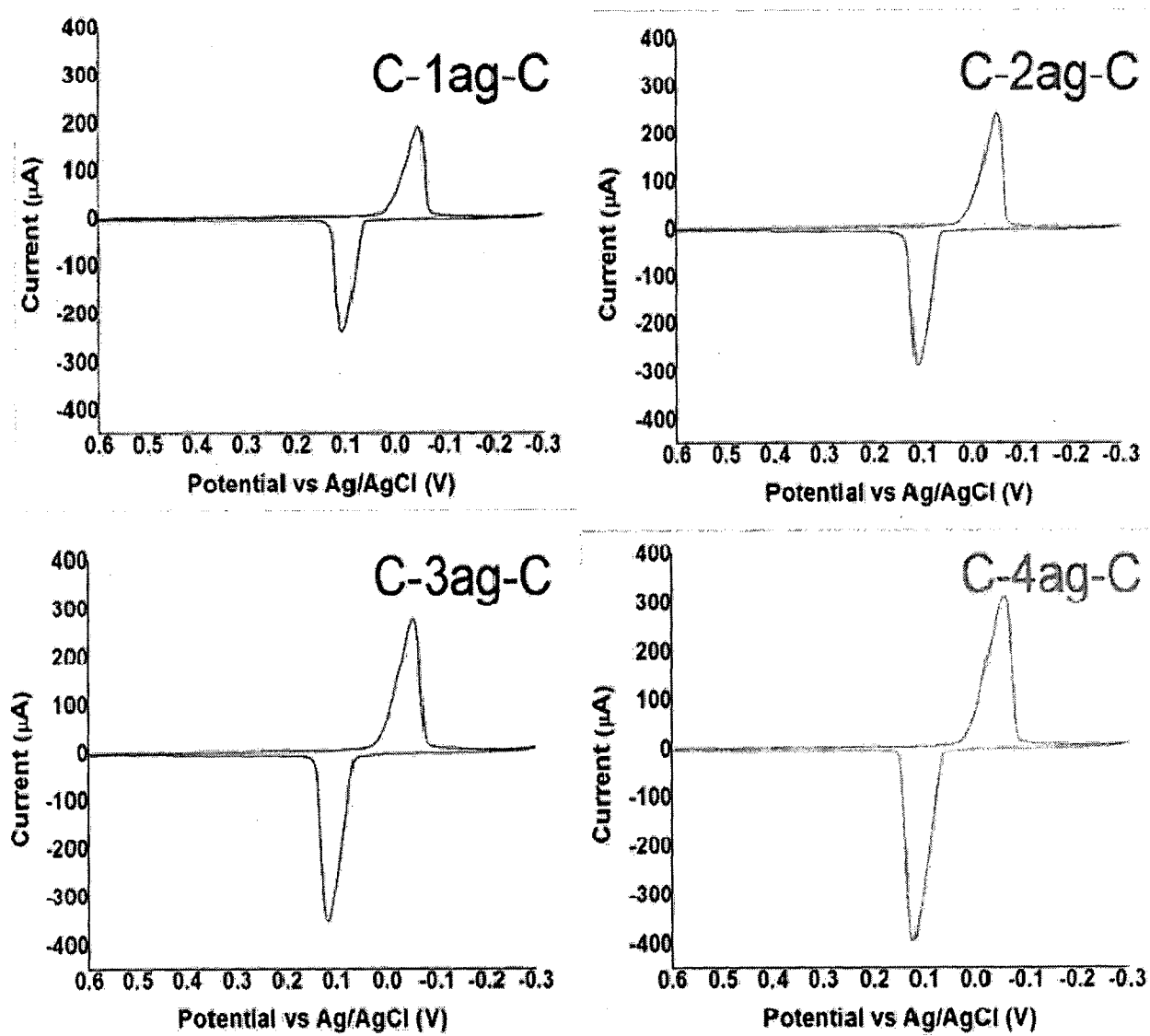


7/19

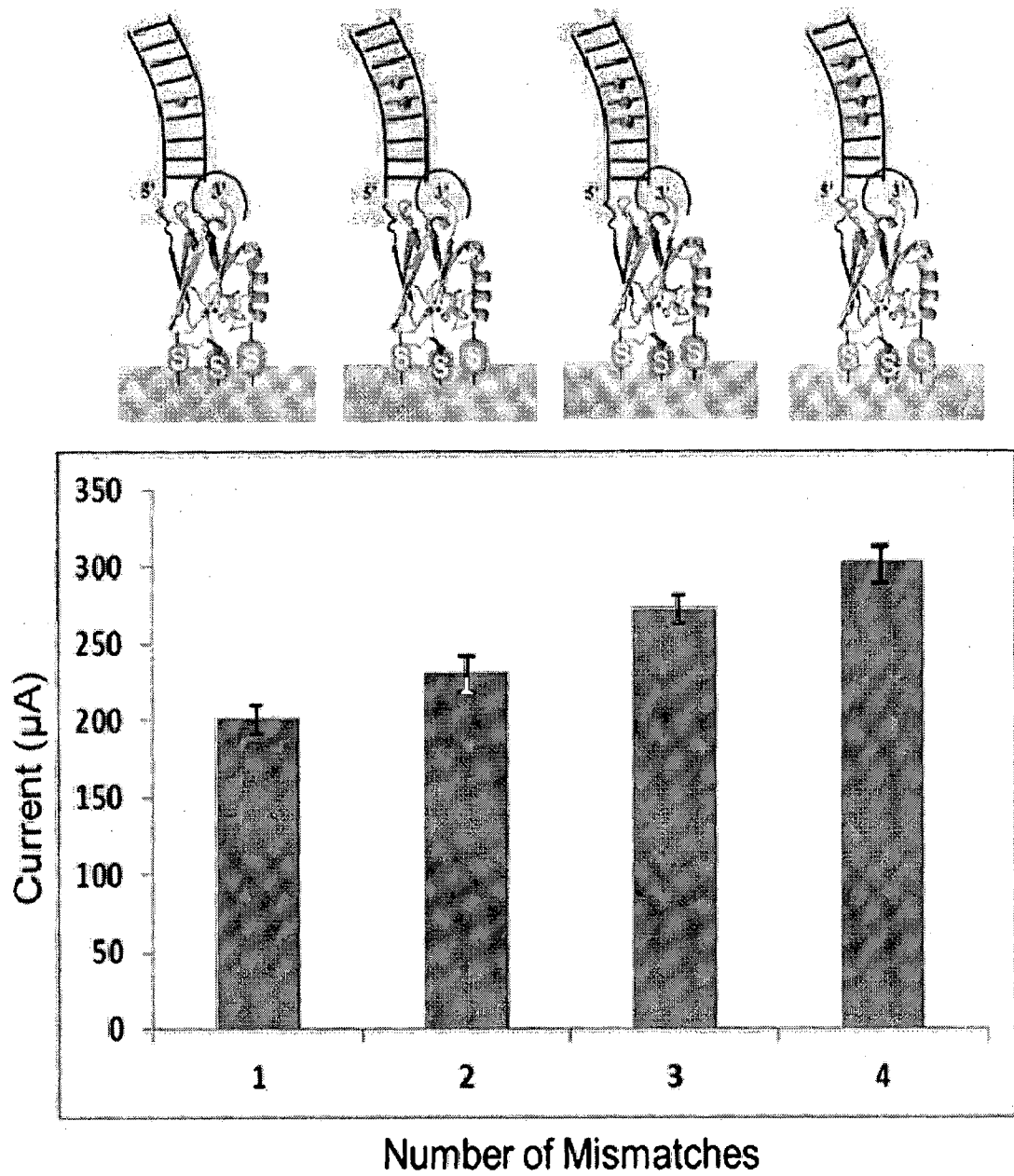
Fig. 6a**PAGE Lanes:****(1) Protein Marker****(2) pET21-sukim-3D-Azurin-Cys-Ct-RGD 75 type****(3) pET21-sukim-3D-Azurin-Cys-Ct-RGD 69 type****(4) pET21-sukim-3D-Azurin-Cys-Ct-RGD 41 type****(5) pET21-sukim-3D-Azurin-Cys-Ct-RGD 35 type****Fig. 6b**

8/19

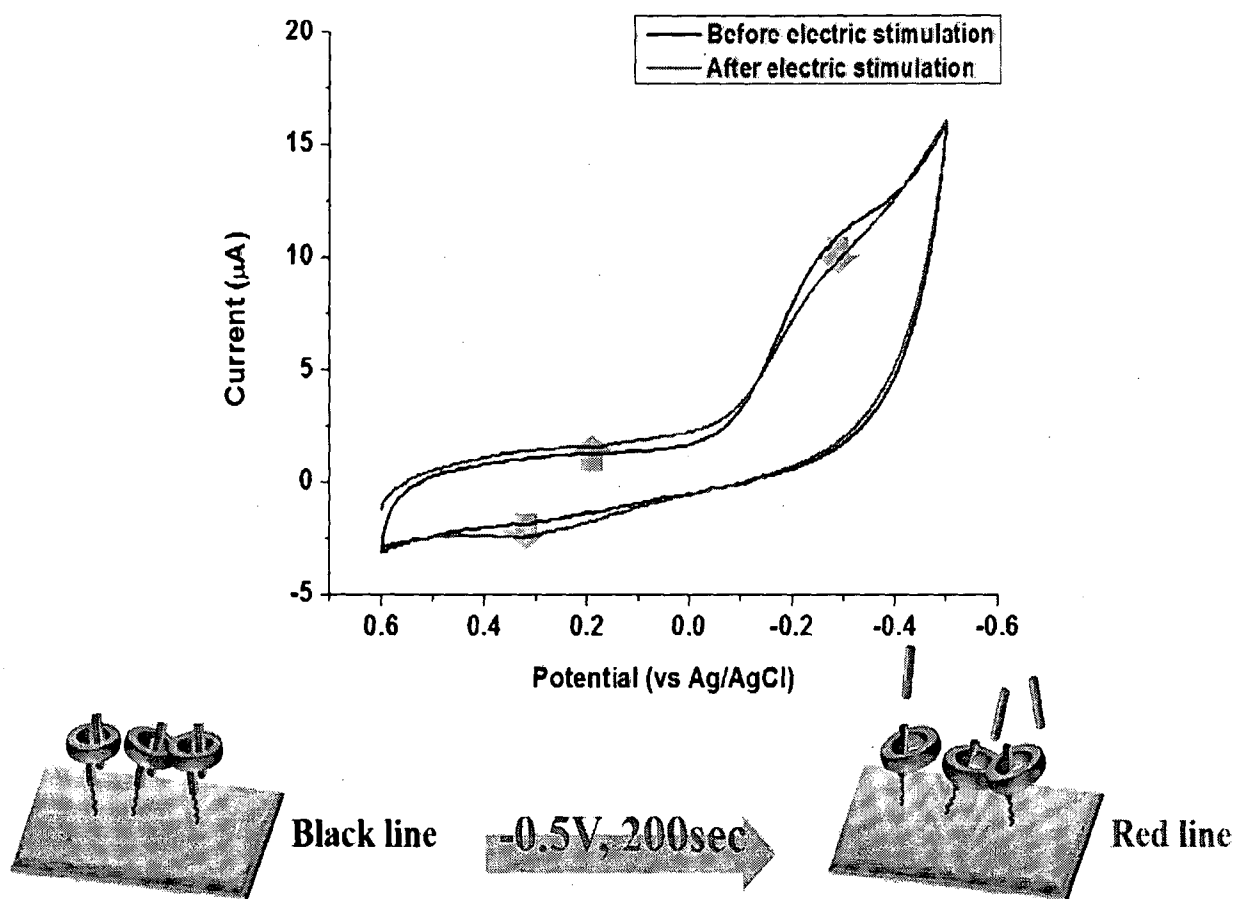
Fig. 7a



9/19

Fig. 7b

10/19

Fig. 8a

11/19

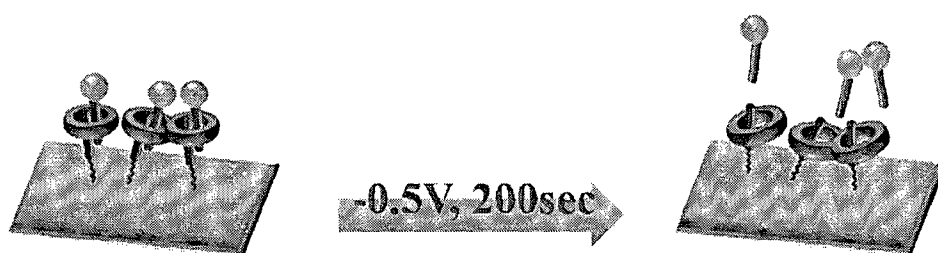
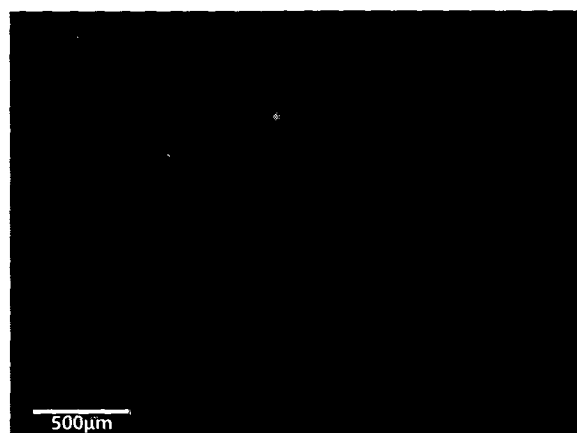
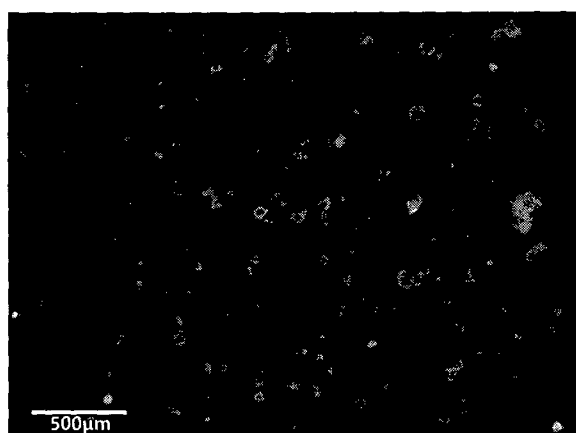
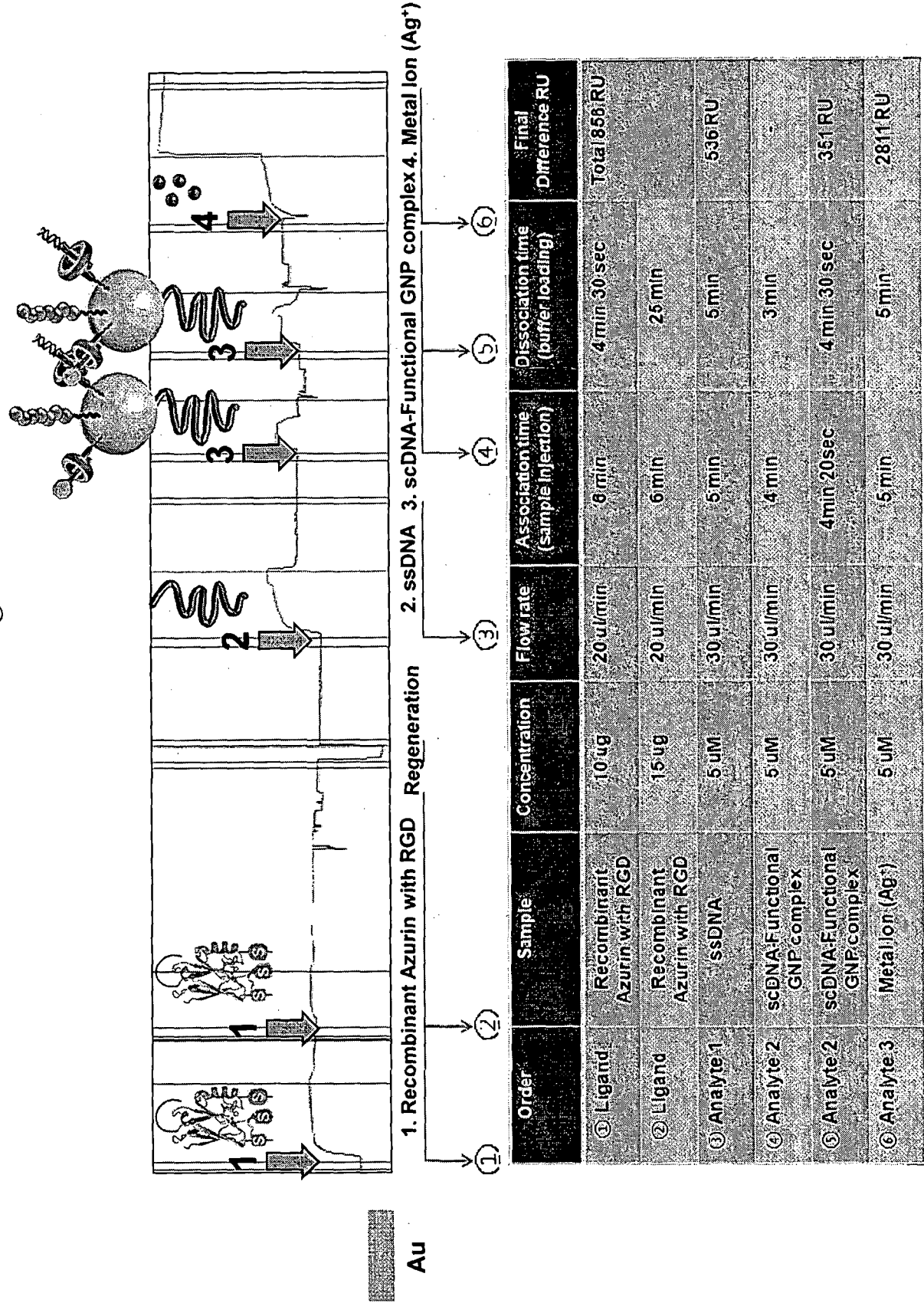
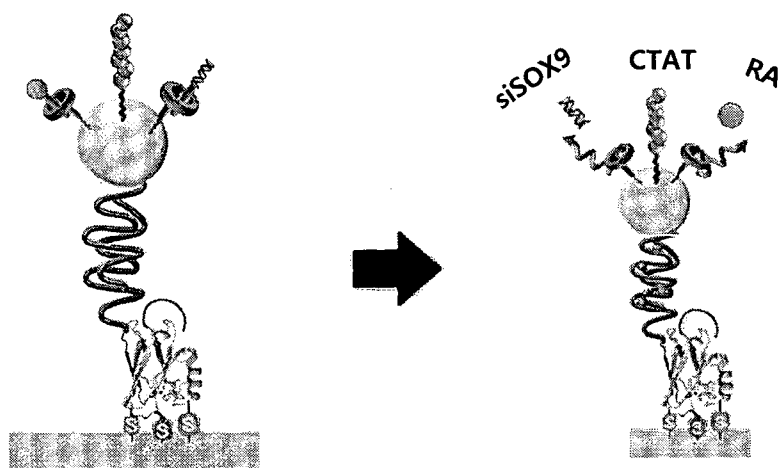
Fig. 8b

Fig. 9

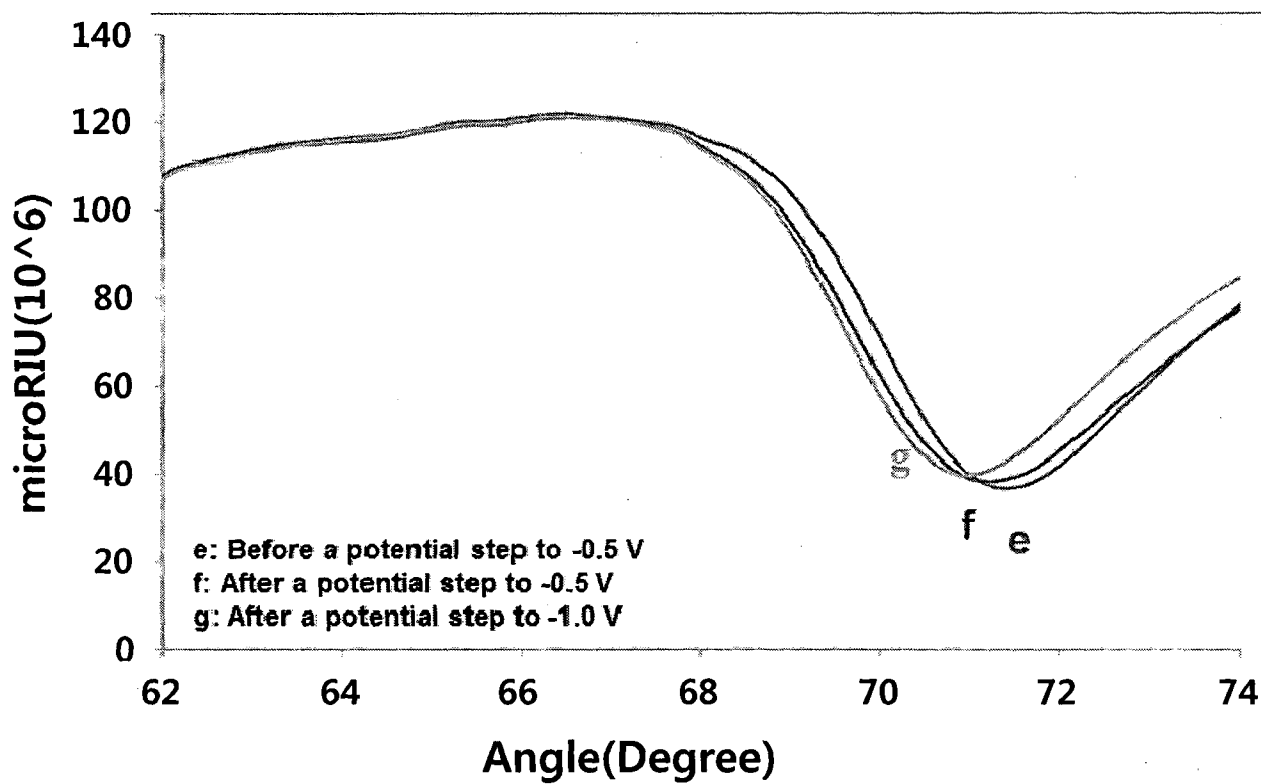


13/19

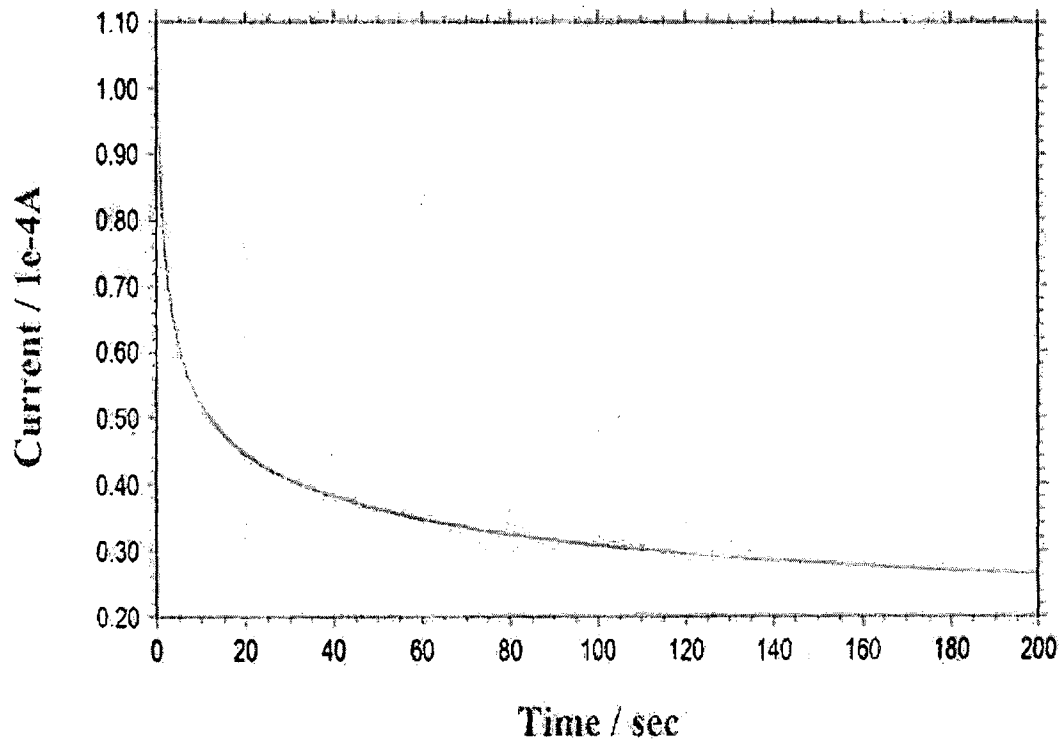
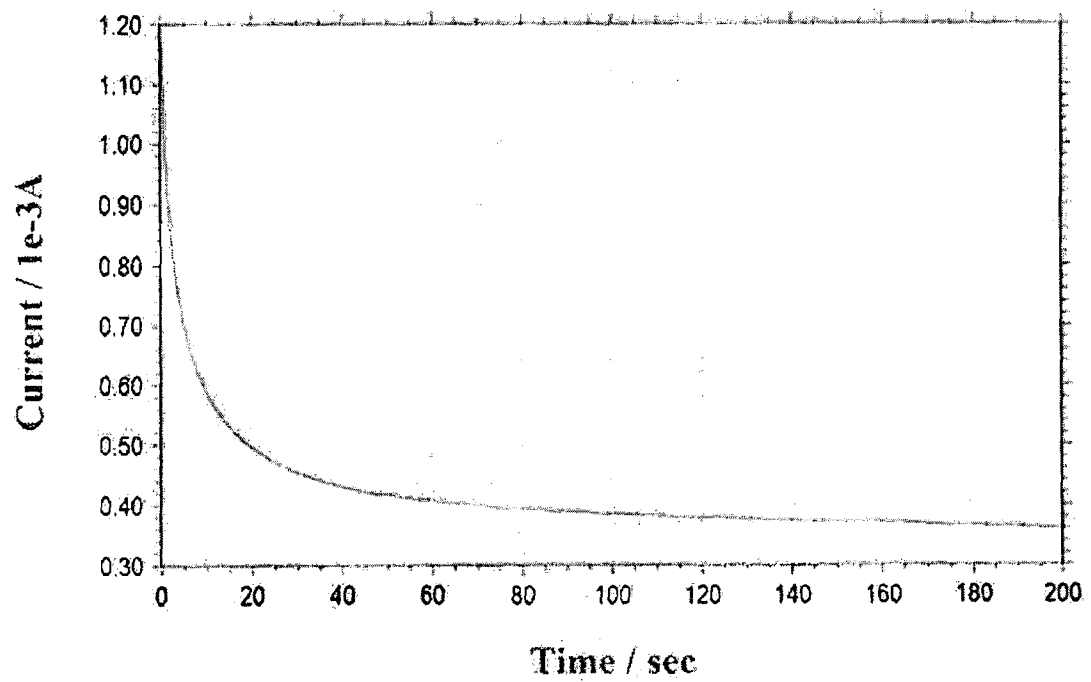
Fig. 10a

Before a potential step to
-0.5 V

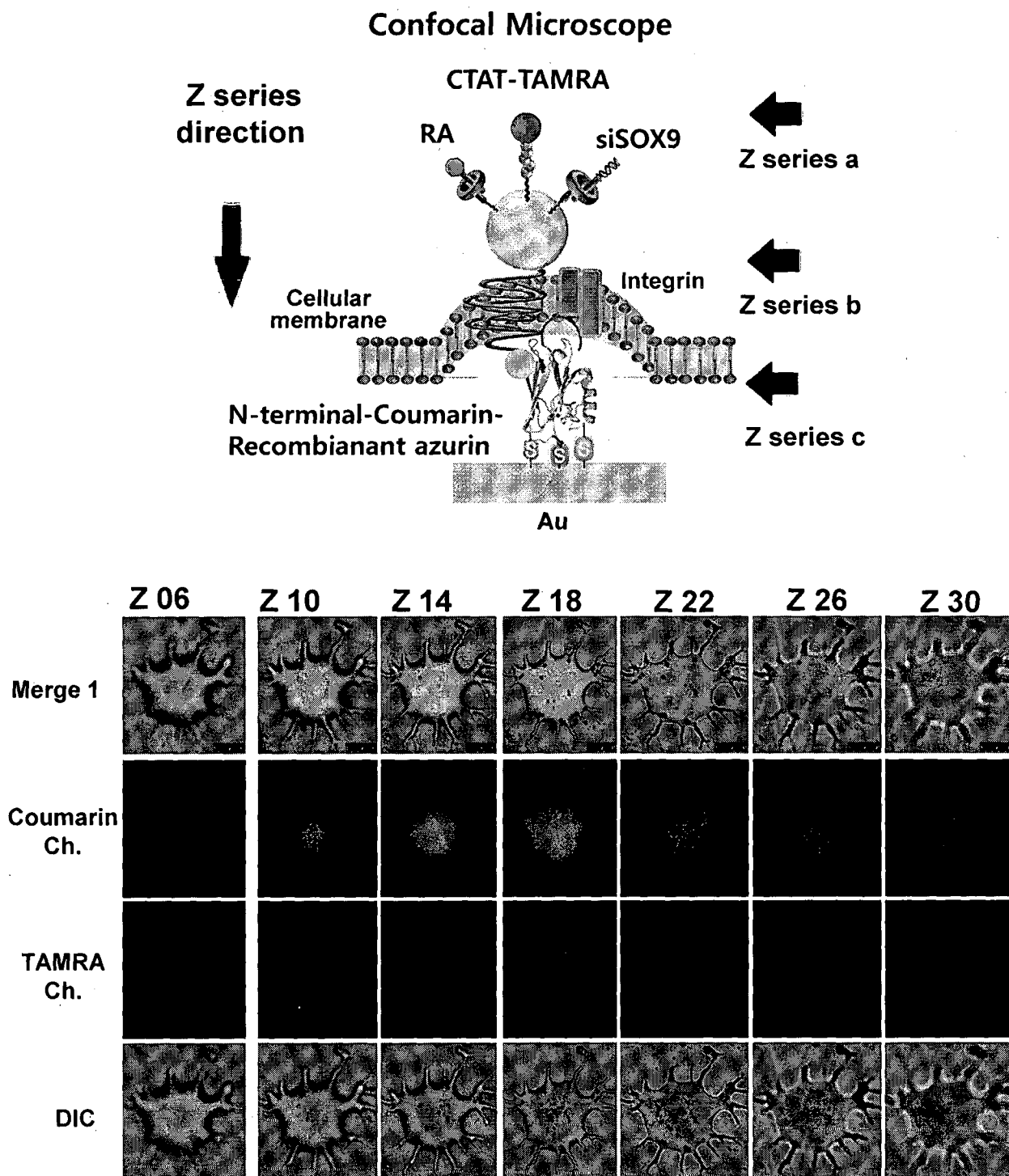
After a potential step to
-0.5 V (f), -1.0 V (g)



14/19

Fig. 10b**Fig. 10c**

15/19

Fig. 11a

16/19

Fig. 11b

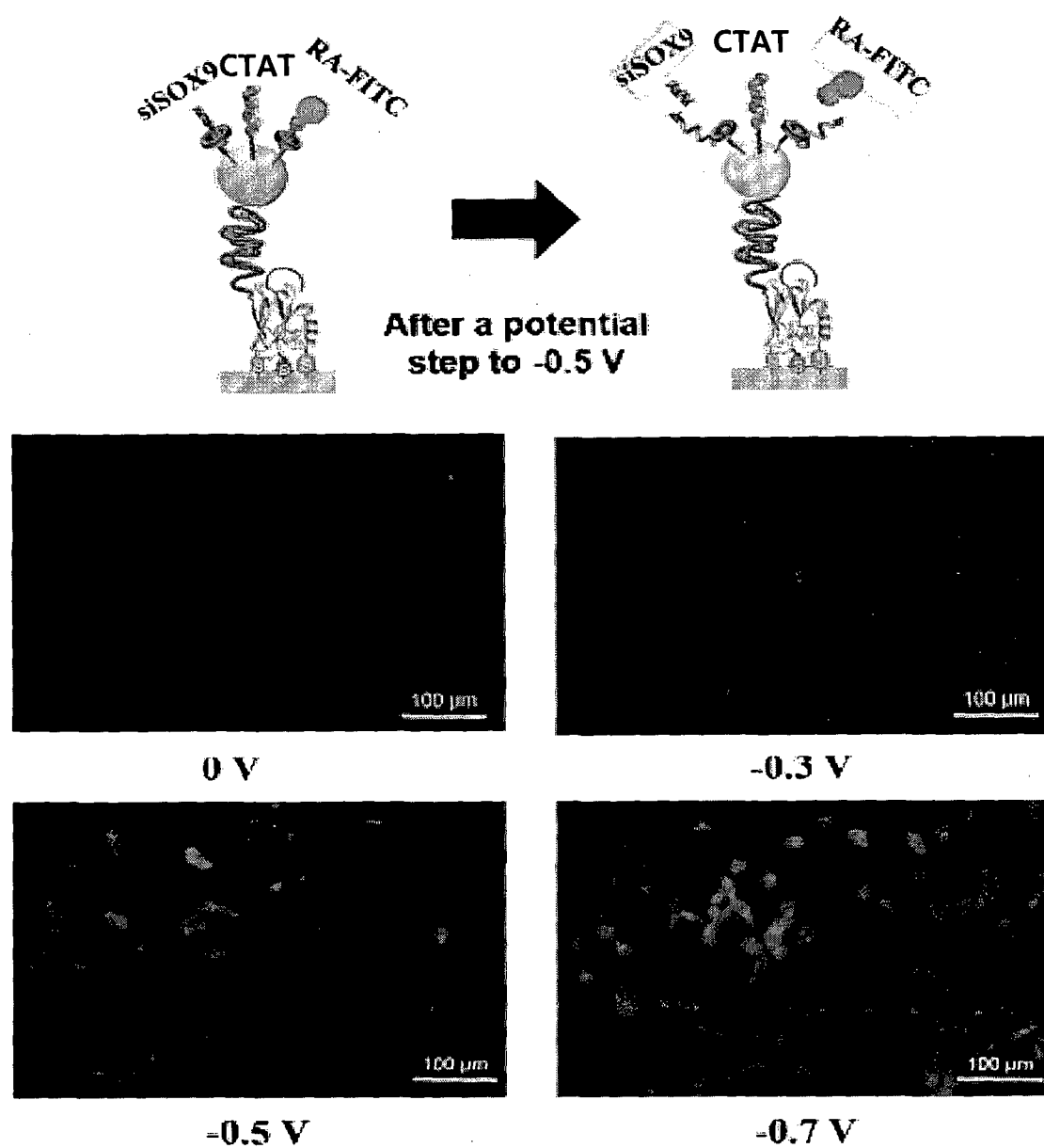


Fig. 11c

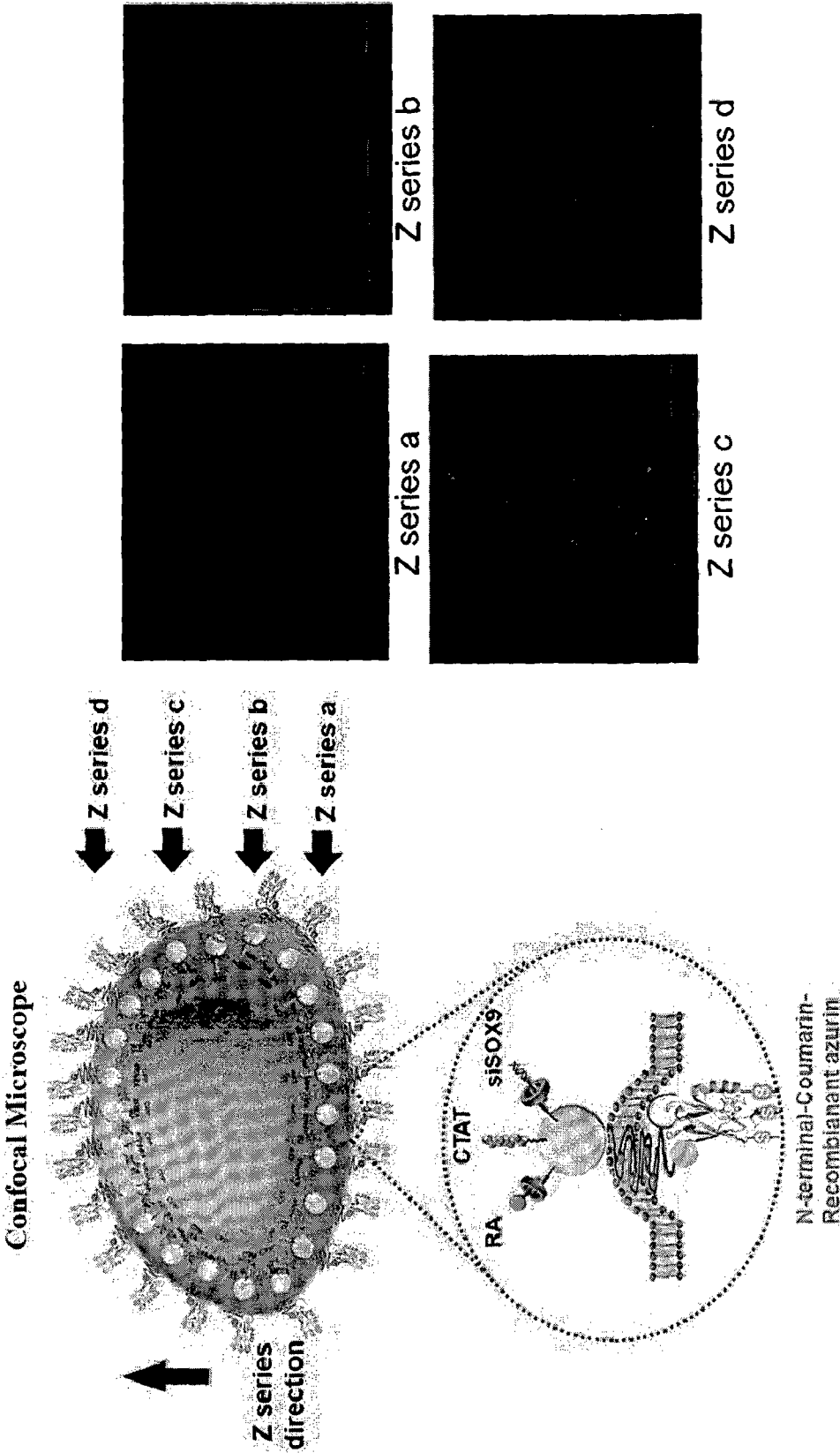
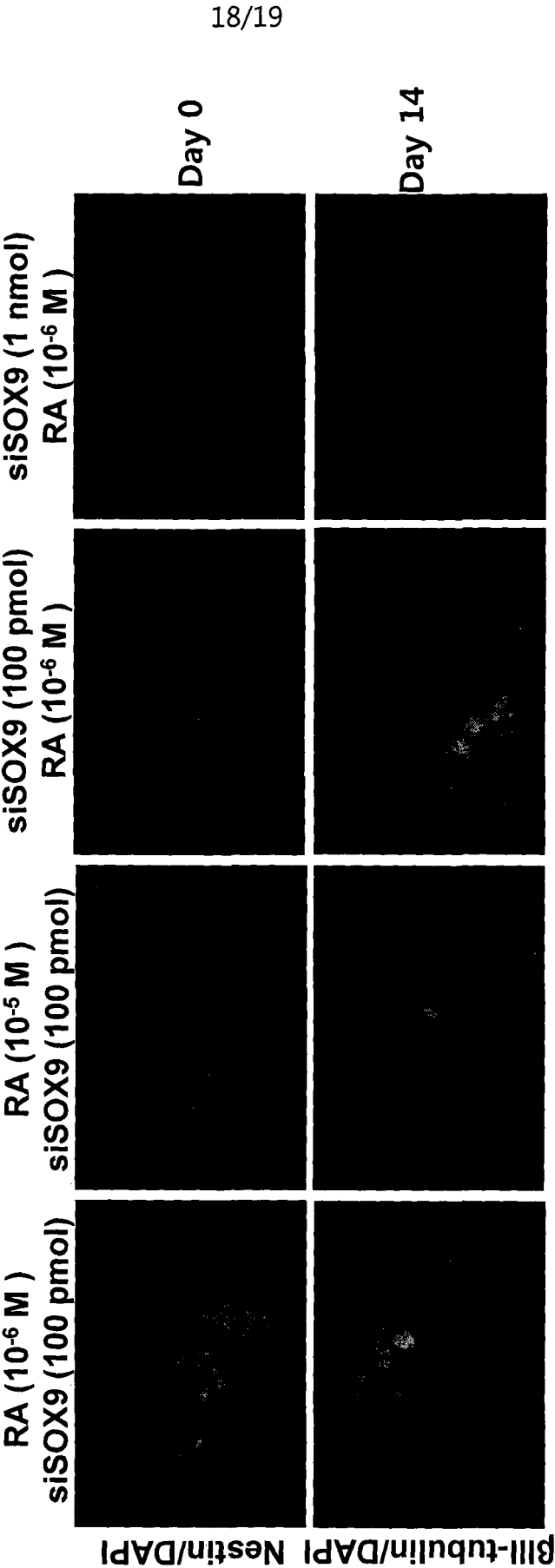
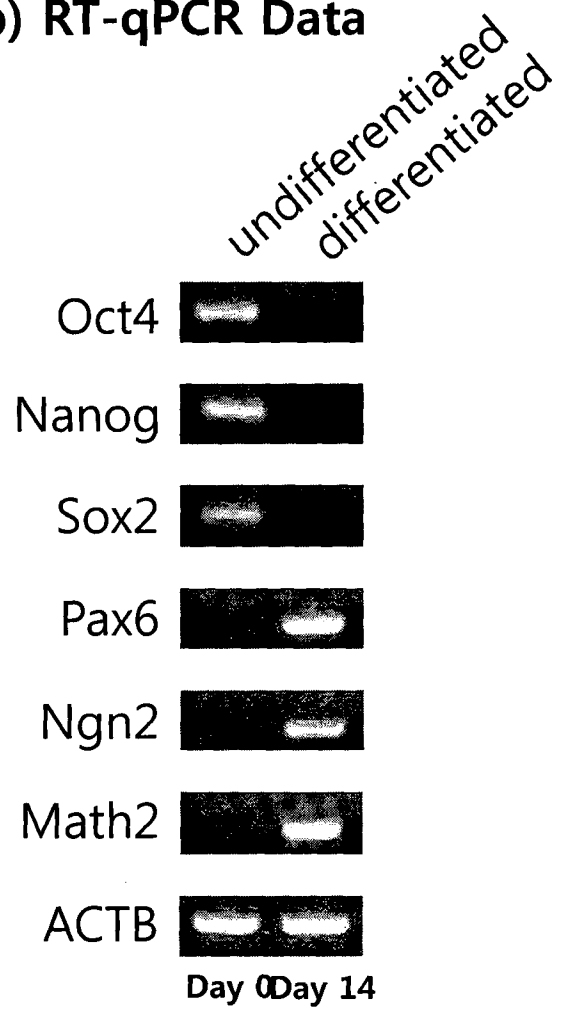


Fig. 12a



19/19

Fig. 12b**(b) RT-qPCR Data**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/003208**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER***C12N 5/00(2006.01)i, C12N 5/0797(2010.01)i, C12N 9/02(2006.01)i, C07K 19/00(2006.01)i*

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 5/00; C07K 19/00; A61K 39/39; G11C 11/54; C07K 2/00; C12Q 1/68; G01N 33/68; C12N 5/0797; C12N 9/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: bioelectronic element, biomoletron, redox capacity, DNA, nanoparticle

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2015-0003617 A (SOGANG UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION) 09 January 2015 See claims 1, 8, 12 and 20-22.	1-31
A	KR 10-2009-0034239 A (SNU R&DB FOUNDATION) 07 April 2009 See claim 1.	1-31
A	YAGATI, Ajay Kumar et al., "STM and Cyclic Voltammetric Investigation of Recombinant azurin-gold Nanoparticle Hybrids", Bioelectrochemistry, [E-pub.] 27 July 2011, vol. 83, pages 8-14 See abstract.	1-31
A	KR 10-2013-0068936 A (SOGANG UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION) 26 June 2013 See abstract.	1-31
A	US 2009-0123467 A1 (BEDI, Atul et al.) 14 May 2009 See claims 1 and 8.	1-31



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 DECEMBER 2016 (15.12.2016)

Date of mailing of the international search report

16 DECEMBER 2016 (16.12.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/003208

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2015-0003617 A	09/01/2015	KR 10-2016-0094914 A US 2015-0005479 A1	10/08/2016 01/01/2015
KR 10-2009-0034239 A	07/04/2009	WO 2009-045062 A1	09/04/2009
KR 10-2013-0068936 A	26/06/2013	KR 10-1360407 B1 US 2013-0157335 A1	11/02/2014 20/06/2013
US 2009-0123467 A1	14/05/2009	AU 2008-283802 A1 CA 2695385 A1 CN 102317303 A EP 2178896 A1 GB 2464887 A JP 2010-535248 A KR 10-2010-0063048 A MX 2010001194 A RU 2010107199 A TR 201000668 T1 WO 2009-018500 A1 WO 2009-018500 A8	05/02/2009 05/02/2009 11/01/2012 28/04/2010 05/05/2010 18/11/2010 10/06/2010 30/07/2010 10/09/2011 21/06/2010 05/02/2009 11/03/2010

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 5/00(2006.01)i, C12N 5/0797(2010.01)i, C12N 9/02(2006.01)i, C07K 19/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 5/00; C07K 19/00; A61K 39/39; G11C 11/54; C07K 2/00; C12Q 1/68; G01N 33/68; C12N 5/0797; C12N 9/02

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 생물전자소자, 바이오펠레트론, 산화환원능, DNA, 나노입자

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2015-0003617 A (서강대학교산학협력단) 2015.01.09 청구항 1, 8, 12 및 20-22 참조.	1-31
A	KR 10-2009-0034239 A (재단법인서울대학교산학협력재단) 2009.04.07 청구항 1 참조.	1-31
A	YAGATI, AJAY KUMAR 등, 'STM and cyclic voltammetric investigation of recombinant azurin-gold nanoparticle hybrids', Bioelectrochemistry, [전자공개] 2011.07.27, 83권, 페이지 8-14 초록 참조.	1-31
A	KR 10-2013-0068936 A (서강대학교산학협력단) 2013.06.26 요약 참조.	1-31
A	US 2009-0123467 A1 (BEDI, ATUL 등) 2009.05.14 청구항 1 및 8 참조.	1-31

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2016년 12월 15일 (15.12.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 12월 16일 (16.12.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

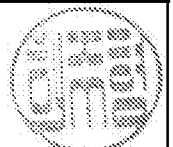
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2015-0003617 A	2015/01/09	KR 10-2016-0094914 A US 2015-0005479 A1	2016/08/10 2015/01/01
KR 10-2009-0034239 A	2009/04/07	WO 2009-045062 A1	2009/04/09
KR 10-2013-0068936 A	2013/06/26	KR 10-1360407 B1 US 2013-0157335 A1	2014/02/11 2013/06/20
US 2009-0123467 A1	2009/05/14	AU 2008-283802 A1 CA 2695385 A1 CN 102317303 A EP 2178896 A1 GB 2464887 A JP 2010-535248 A KR 10-2010-0063048 A MX 2010001194 A RU 2010107199 A TR 201000668 T1 WO 2009-018500 A1 WO 2009-018500 A8	2009/02/05 2009/02/05 2012/01/11 2010/04/28 2010/05/05 2010/11/18 2010/06/10 2010/07/30 2011/09/10 2010/06/21 2009/02/05 2010/03/11