



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0117249
 (43) 공개일자 2014년10월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 A61K 47/42 (2006.01) A61K 9/48 (2006.01)
 A61K 8/11 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2013-0121583
 (22) 출원일자 2013년10월11일
 심사청구일자 2013년10월11일
 (30) 우선권주장
 1020130031128 2013년03월22일 대한민국(KR)

(71) 출원인
부산대학교 산학협력단
 부산광역시 금정구 부산대학로63번길 2 (장전동, 부산대학교)
한국화학연구원
 대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)
가천대학교 산학협력단
 경기도 성남시 수정구 성남대로 1342 (복정동)
 (72) 발명자
백현중
 부산 금정구 금강로 503, 구서롯데캐슬골드 606동 404호 (구서동)
송재광
 대전 유성구 배울1로 35, 405동 1701호 (관평동, 쌍용스윗닷홈)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
손민

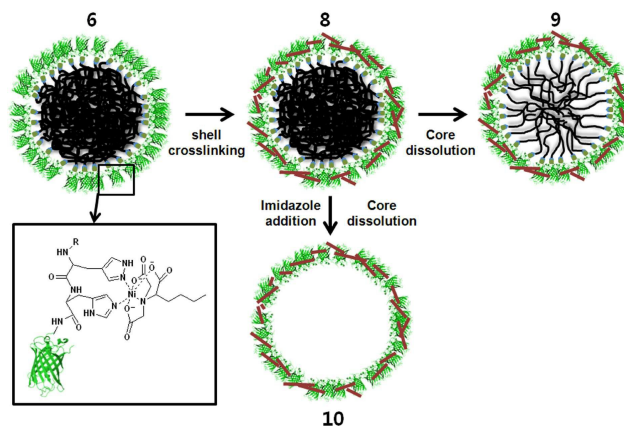
전체 청구항 수 : 총 33 항

(54) 발명의 명칭 **단백질 케이지의 제조방법 및 소수성 첨가제를 담지한 코어-셸 구조의 고분자-단백질 입자의 in-situ 제조방법**

(57) 요약

본 발명에 따른 단백질 케이지의 제조방법은 소수성 제1고분자와 친수성 제1작용기를 포함하는 양친성 고분자를 준비하는 제1단계; 상기 제1작용기에 결합하는 제2작용기를 구비한 친수성 단백질을 준비하는 제2단계; 상기 제1작용기와 제2작용기 간의 결합을 통해 양친성 고분자-단백질 하이브리드가 형성되고 친수성 용매 내에서 양친성 고분자의 자가조립에 의해 단백질 셸과양친성 고분자 코어를 포함하는 코어-셸 구조의 입자를 형성하는 제3단계; 및 상기 코어-셸 구조의 입자로부터 코어부분의 소수성 고분자를 일부 또는 전부 제거하는 제4단계를 포함한다.

대표도 - 도11



(72) 발명자
안성수
 서울 송파구 오금로17길 31, (방이동)
이채연
 충북 충주시 대림7길 11, (문화동)
정중화
 부산 해운대구 대천로67번길 15, 106동 401호 (좌
 동, 신성아파트)

모하메드 압둘 카디르
 부산시 금정구 장전동 산 30번지 부산대학교 제 7
 공학관 7106호
이태현
 부산 수영구 연수로330번길 12-6, (망미동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R33-2012-000-10035-0

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 세계수준의연구중심대학육성사업(WCU)

연구과제명 리빙 라디칼 중합을 이용한 염료감응 태양전지용 고분자 브러쉬 개발

기여율 1/4

주관기관 부산대학교

연구기간 2012.09.01 ~ 2013.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20120005995

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 미래기반기술개발사업

연구과제명 메타게놈 라이브러리로부터 유용 효소 발굴과 이용 기술 확립을 통한 효소 탐색 통합시스

템의 유효성 검증

기여율 1/4

주관기관 한국화학연구원

연구기간 2012.06.01 ~ 2013.07.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 SI-11 01

부처명 기획예산처

연구관리전문기관 한국화학연구원

연구사업명 정부출연 일반사업

연구과제명 화학산업용 바이오촉매 활용기술 기반구축

기여율 1/4

주관기관 한국화학연구원

연구기간 2011.01.01 ~ 2011.12.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345189159

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원

연구과제명 생분해·생친화적 나노패턴 마이크로 섬유·튜브 개발 및 피부, 혈관 조직 공학 응용

기여율 1/4

주관기관 가천대학교

연구기간 2012.09.01 ~ 2013.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

소수성 제1고분자와 친수성 제1작용기를 포함하는 양친성 고분자를 준비하는 제1단계;

상기 제1작용기에 결합하는 제2작용기를 구비한 친수성 단백질을 준비하는 제2단계;

상기 제1작용기와 제2작용기 간의 결합을 통해 양친성 고분자-단백질 하이브리드가 형성되고 친수성 용매 내에서 양친성 고분자의 자가조립에 의해 단백질 셸과 양친성 고분자 코어를 포함하는 코어-셸 구조의 입자를 형성하는 제3단계; 및

상기 코어-셸 구조의 입자로부터 코어부분의 소수성 고분자를 일부 또는 전부 제거하는 제4단계를 포함하는 단백질 케이지의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 단백질은 3차 구조를 유지하여 활성을 유지하는 것이 특징인 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 단백질 케이지는 1종 또는 2종 이상의 단백질을 포함하는 것인 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

제3단계에서 형성된 코어-셸 구조의 입자에 가교제를 첨가하여 셸을 형성하는 단백질 간의 결합을 형성하는 단계를 추가로 포함하는 단백질 케이지의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

제3단계에서 제1작용기를 포함하지 않는 제2소수성 고분자를 추가로 포함하는 것인 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 단백질 케이지에 첨가제가 담지된 것인 단백질 케이지의 제조방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 첨가제는 제3단계에 첨가되어 자기조립시 코어부분에 포함되거나, 제4단계에서 형성된 단백질 케이지에 주

입되는 것인 단백질 케이지의 제조방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 단백질 케이지의 크기는 20 nm 내지 5 μm 의 직경을 갖는 것인 단백질 케이지의 제조방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 제3단계의 코어-셸 구조의 입자는 구형, 타원형 또는 막대형인 것인 단백질 케이지의 제조방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 코어-셸 구조의 입자의 형태 또는 크기는 소수성 고분자의 종류, 분자량 또는 농도, 단백질의 종류, 분자량 또는 농도, 소수성 고분자와 단백질의 혼합비 또는 소수성 고분자와 단백질의 혼합속도를 조절함으로써 달성되는 것인 단백질 케이지의 제조방법.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 제1작용기와 제2작용기 간의 결합은 배위결합(coordinate bond), 공유결합(covalent bond), 금속결합(metallic bond), 수소결합(hydrogen bond), 이온 결합(ionic bond), 항원-항체 결합(antigen-antibody binding) 및 리간드-수용체 결합(ligand-receptor binding)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 단백질 케이지의 제조방법.

청구항 12

제1항에 있어서,

제4단계에서 상기 코어-셸 구조의 입자로부터 코어부분의 소수성 고분자 일부 또는 전부 제거는 (i) 상기 제1작용기와 제2작용기 간의 결합의 경쟁자 화합물을 도입시키거나, (ii) 양친성 고분자-단백질 하이브리드에서 고분자 부위를 가수분해시키는 화합물을 도입시키는 것에 의해 수행되는 것인 단백질 케이지의 제조방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 단백질 케이지.

청구항 14

제13항에 기재된 단백질 케이지; 및 그 내부에 봉입되거나 단백질 사이에 삽입되거나 표면에 결합된 약물을 포함하는 약물전달체.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 단백질 케이지를 구성하는 단백질은 자체가 타켓팅 가능한 단백질이거나, 타켓팅 가능한 다른 항원, 항체, 리간드 또는 수용체가 결합된 것인 약물전달체.

청구항 16

제13항에 기재된 단백질 케이지; 및 그 내부에 봉입되거나 단백질 사이에 삽입되거나 표면에 결합된 화장료를 포함하는 화장료 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 단백질 케이지를 구성하는 단백질은 자체가 피부투과성을 갖는 단백질이거나, 피부투과성 펩티드 또는 화합물이 결합된 것인 화장료 조성물.

청구항 18

제13항에 기재된 단백질 케이지; 및 그 내부에 봉입되거나 단백질 사이에 삽입되거나 표면에 결합된 조영제를 포함하는 영상화 조성물.

청구항 19

제13항에 기재된 단백질 케이지를 포함하는 인공 백신으로서,

상기 단백질 케이지를 형성하는 단백질 일부 또는 전부가 항원 단백질인 것인 인공 백신.

청구항 20

제13항에 기재된 단백질 케이지를 포함하는 바이오센서로서,

상기 단백질은 검출하고자 하는 물질에 작용하여 물리화학적 변화를 일으키거나 검출하고자 하는 물질에 의해 물리화학적 변화가 일어나는 효소, 항원, 항체, 리간드 및 수용체로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질을 포함하는 것인 바이오센서.

청구항 21

소수성 첨가제를 담지한 코어-셸 구조의 고분자-단백질 입자의 in-situ 제조방법으로서,

소수성 제1고분자와 친수성 제1작용기를 하나 이상 포함하는 양친성 고분자 및 소수성 첨가제를 유기용매에 포함하는 제1용액을 준비하는 제1단계;

물을 포함하는 친수성 용매에 3차 구조를 유지하면서 상기 제1작용기에 결합하는 제2작용기를 하나 구비한 친수성 단백질을 포함하는 제2용액을 준비하는 제2단계; 및

상기 제2용액에 제1용액을 혼합하는 제3단계를 포함하여,

친수성 용매 내에서 상기 제1작용기와 제2작용기 간의 결합을 통해 양친성 고분자-단백질 하이브리드를 형성하는 동시에 양친성 고분자의 자가조립에 의해, 3차 구조를 유지하는 단백질 셸과 양친성 고분자 및 소수성 첨가제

를 함유하는 코어를 포함하는 코어-셸 구조의 입자를 형성하는 것이 특징인 제조방법.

청구항 22

제21항에 있어서,

제2용액은 적어도 1종의 단백질이 제기능을 할 수 있는 생리적 조건(physiological conditions)에 해당하는 pH 범위 또는 온도 범위를 갖는 것인 제조방법.

청구항 23

제21항에 있어서,

상기 입자의 크기는 20 nm 내지 5 μ m의 평균 직경을 갖는 것인 제조방법.

청구항 24

제21항에 있어서,

상기 입자는 구형, 타원형 또는 막대형인 것인 제조방법.

청구항 25

제21항에 있어서,

상기 입자의 형태 또는 크기는 고분자의 종류, 분자량 또는 농도, 단백질의 종류, 분자량 또는 농도, 고분자와 단백질의 혼합비, 또는 고분자와 단백질의 혼합속도를 조절함으로써 달성되는 것인 제조방법.

청구항 26

제21항에 있어서,

상기 제1작용기와 제2작용기 간의 결합은 배위결합(coordinate bond), 공유결합(covalent bond), 금속결합(metallic bond), 수소결합(hydrogen bond), 이온 결합(ionic bond), 항원-항체 결합(antigen-antibody binding) 및 리간드-수용체 결합(ligand-receptor binding)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 제조방법.

청구항 27

제21항에 있어서,

상기 제1용액은 제1작용기를 포함하지 않는 제2고분자를 추가로 포함하는 것인 제조방법.

청구항 28

제21항 내지 제27항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조되고, 셸을 형성하는 개별 단백질은 3차 구조를 유지하면서, 소수성 첨가제를 담지한 코어-셸 구조의 고분자-단백질 입자.

청구항 29

제28항에 있어서,

상기 소수성 첨가제는 약물이고, 상기 입자는 약물전달체인 것이 특징인 고분자-단백질 입자.

청구항 30

제28항에 있어서,

상기 단백질은 자체가 목적 부위에 타겟팅 가능한 단백질이거나, 타겟팅 가능한 다른 항원, 항체, 리간드 또는 수용체가 결합된 것인 고분자-단백질 입자.

청구항 31

제28항에 있어서,

상기 소수성 첨가제는 화장료인 것이 특징인 고분자-단백질 입자.

청구항 32

제31항에 있어서,

상기 단백질은 자체가 피부투과성을 갖는 단백질이거나, 피부투과성 펩티드 또는 화합물이 결합된 것인 고분자-단백질 입자.

청구항 33

제28항에 있어서,

상기 소수성 첨가제는 조영제인 것이 특징인 영상화용 고분자-단백질 입자.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 단백질 케이지의 제조방법, 상기 방법으로 제조된 단백질 케이지, 소수성 첨가제를 담지한 코어-셸 구조의 고분자-단백질 입자의 in-situ 제조방법, 상기 제조방법에 의해 제조한 코어-셸 구조의 고분자-단백질 입자 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 약물전달시스템(Drug Delivery System; DDS)은 신약개발과 맞먹는 경제적 이익을 창출할 수 있으면서 성공 가능성이 높은 고부가가치 핵심기술로서, 약물투여를 효율적으로 하여 환자 치료의 질을 높이는 데 그 목적이 있다. 약물전달시스템의 핵심기술 중 하나인 약물 흡수 촉진 기술에 속하는 난용성 약물의 가용화 기술은 신약 물질의 개발비용을 줄일 수 있는 동시에 현재 출시되어 있는 의약품의 부가가치를 높일 수 있는 가장 합리적인 방법으로 여겨지고 있다.

[0003] 한편, 나노캡슐 기술은 목적하는 성분을 나노 크기의 캡슐에 봉입시킨 후 원하는 장소에서 원하는 속도로 방출시키는 기술이다. 캡슐 기술은 오랫동안 연구됐지만 캡슐 소재의 한계 및 캡슐 크기의 제한 때문에 기술 개발이 더디다가 최근 나노 기술과 접목된 나노 캡슐 개발을 통해 새롭게 각광받고 있다. 이러한 나노캡슐 기술은 캡슐 소재의 개발 공정과 내부에 봉입되는 물질의 종류에 따라 정밀, 의약, 화장품, 전자분야 등 다양한 분야로의 응용이 가능하다. 특히 의약, 화장품 등의 분야에서 나노 캡슐은 항암 표적치료, 약물 전달, 화장품의 경피 흡수, 화장 진찰 등에 이르게까지 다양하게 활용할 수 있는 잠재력을 가지고 있으나, 나노 캡슐을 만드는 과정이 복잡

하고 캡슐을 형성하기 위한 별도의 주형이 필요하다는 단점이 있었다.

[0004] 친화성 크로마토그래피는 분리하고자 하는 단백질과 특이적 상호작용을 가지는 리간드(ligands: chemicals, amine, amino acids, peptides, proteins)를 담체에 고정화시킴으로써 단백질과 리간드간의 친화성을 이용하는 단백질 분리방법이다. 생물시스템 내의 다양한 단백질로부터 목적 단백질의 특이성을 이용하는 선택적인 분리방법으로서 융합단백질 및 항체의 분리정제에 널리 이용되고 있다. 특히 IMAC(Immobilized-metal affinity chromatography, 고정상-금속 친화성 크로마토그래피)는 리간드와 Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} 등의 전이금속이 배위결합을 형성하고 있는 레진을 담체로 하여, 상기 금속에 친화성이 있는 단백질을 정제하는 방법으로, 상기 Ni^{2+} , Co^{2+} 등의 금속 이온은 히스티딘-태그에 특이한 높은 친화성을 가지는 것으로 보고되어 있고, 이러한 레진의 대표적인 예로 Ni-NTA를 들 수 있다. 니트릴로트리아세탄산(NTA)는 금속이온과 착화합물을 형성하는 메탈킬레이터로서, Ni-NTA는 히스티딘의 이미다졸링과 배위결합을 형성하게 된다.

[0005] 이에 본 발명자는 나노 캡슐화 방법을 연구하던 중, 단백질 정제에 이용되는 친화성 크로마토그래피에 착안하여, 별도의 주형 없이 직접적으로 단백질이 코팅되는 고분자 나노입자를 제조하였다. 이때, 상기 단백질 코팅 고분자 나노입자로부터 고분자를 일부 또는 전부 제거하여 단백질 케이지를 제조할 수 있음을 확인하였다. 또한, one-pot의 캡슐화 방법에 의하여 단백질이 코팅되는 고분자 나노입자 형성과 동시에 내부에 소수성 첨가제를 담지할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 신규한 단백질 케이지; 이의 제조방법; 소수성 첨가제를 담지한 코어-셸 구조의 고분자-단백질 입자의 in-situ 제조방법; 상기 방법으로 제조된 소수성 첨가제를 담지한 코어-셸 구조의 고분자-단백질 입자; 및 이를 이용한 약물전달체, 화장료 조성물, 영상화 조성물, 인공 백신 및 바이오센서를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명의 제1양태는 소수성 제1고분자와 친수성 제1작용기를 포함하는 양친성 고분자를 준비하는 제1단계; 상기 제1작용기에 결합하는 제2작용기를 구비한 친수성 단백질을 준비하는 제2단계; 상기 제1작용기와 제2작용기 간의 결합을 통해 양친성 고분자-단백질 하이브리드가 형성되고 친수성 용매 내에서 양친성 고분자의 자가조립에 의해 단백질 셸과 양친성 고분자 코어를 포함하는 코어-셸 구조의 입자를 형성하는 제3단계; 및 상기 코어-셸 구조의 입자로부터 코어부분의 소수성 고분자를 일부 또는 전부 제거하는 제4단계를 포함하는 단백질 케이지의 제조방법을 제공한다.

[0008] 본 발명의 제2양태는 제1양태의 방법에 의해 제조된 단백질 케이지를 제공한다.

[0009] 본 발명의 제3양태는 소수성 첨가제를 담지한 코어-셸 구조의 고분자-단백질 입자의 in-situ 제조방법으로서, 소수성 제1고분자와 친수성 제1작용기를 하나 이상 포함하는 양친성 고분자 및 소수성 첨가제를 유기용매에 포함하는 제1용액을 준비하는 제1단계; 물을 포함하는 친수성 용매에 3차 구조를 유지하면서 상기 제1작용기에 결합하는 제2작용기를 하나 구비한 친수성 단백질을 포함하는 제2용액을 준비하는 제2단계; 및 상기 제2용액에 제1용액을 혼합하는 제3단계를 포함하여, 친수성 용매 내에서 상기 제1작용기와 제2작용기 간의 결합을 통해 양친성 고분자-단백질 하이브리드를 형성하는 동시에 양친성 고분자의 자가조립에 의해, 3차 구조를 유지하는 단백질 셸과 양친성 고분자 및 소수성 첨가제를 함유하는 코어를 포함하는 코어-셸 구조의 입자를 형성하는 것이 특징인 제조방법을 제공한다.

[0010] 본 발명의 제4양태는 제1양태의 방법에 의해 제조되고, 셸을 형성하는 개별 단백질은 3차 구조를 유지하면서, 소수성 첨가제를 담지한 코어-셸 구조의 고분자-단백질 입자를 제공한다.

[0011] 본 발명의 제5양태는 제2양태에 기재된 단백질 케이지; 및 그 내부에 봉입되거나 단백질 사이에 삽입되거나 표면에 결합된 약물을 포함하는 약물전달체를 제공한다.

- [0012] 본 발명의 제6양태는 제2양태에 기재된 단백질 케이지; 및 그 내부에 봉입되거나 단백질 사이에 삽입되거나 표면에 결합된 화장료를 포함하는 화장료 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명의 제7양태는 제2양태에 기재된 단백질 케이지 및 그 내부에 봉입되거나 단백질 사이에 삽입되거나 표면에 결합된 조영제를 포함하는 영상화 조성물을 제공한다.
- [0014] 본 발명의 제8양태는 제2양태에 기재된 단백질 케이지를 포함하는 인공 백신으로서, 상기 단백질 케이지를 형성하는 단백질 일부 또는 전부가 항원 단백질인 것인 인공 백신을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 제9양태는 제2양태에 기재된 단백질 케이지를 포함하는 바이오센서로서, 상기 단백질은 2종 이상의 단백질을 포함하는 것인 바이오센서를 제공한다.
- [0016] 이하, 본 발명을 자세히 설명한다.
- [0017] 본 명세서에서 "단백질 케이지"는 2개 이상의 단백질 분자들이 모여 특정 구조물의 외부 표면을 형성하는 것으로, 단백질 셸과 혼용되어 사용될 수 있다.
- [0018] 또한, "단백질 케이지"에 대한 설명은, 본 발명의 제1양태에 따라 제조된 단백질 케이지 뿐만 아니라, 제3양태에서 제조된 소수성 첨가제를 담지한 코어-셸 구조의 고분자-단백질 입자 중 단백질 셸에 대해서도 적용될 수 있다.
- [0019] 단백질은 독특한 아미노산 서열을 가지며 이런 순서를 1차 구조라 하고 이것이 단백질의 구조와 기능을 결정한다. 아미노산의 상호작용을 통해 단백질 사슬은 특징적인 2차 구조를 이루며 어떤 경우는 3차 구조를 만들기도 한다. 2차 구조는 아미노산을 서로 연결하는 펩티드 결합의 각도에 의해 결정되며, 이런 결합각도는 한 아미노산의 질소원자와 다른 아미노산의 산소원자 사이에서 수소결합에 의해 만들어지는데 일반적으로 이런 수소결합은 나선형의 2차 구조를 형성한다. 3차 구조는 단백질 사슬이 구부러지고 접혀짐으로써 형성되며, 정도의 차이는 있지만 구형단백질(球形蛋白質)을 형성한다. 3차 구조는 아미노산의 곁사슬에 의해 결정된다. 곁사슬 중에는 너무 커서 단백질 사슬의 정상적인 2차 나선구조를 파괴하는 것이 있는데 이때는 꼬임이나 구부러짐이 생긴다. 또한 곁사슬이 서로 다른 전하(電荷)를 띠고 있으면 서로를 끌어당겨 이온결합을 형성하며 같은 전하를 띠고 있으면 서로 밀어낸다. 물에 녹지 않는 소수성(疏水性) 곁사슬은 단백질의 안쪽에 집합하고 물에 노출되는 바깥쪽 부분을 피하려 한다. 친수성(親水性) 곁사슬은 물분자와 쉽게 수소결합을 이루어 바깥쪽에 위치한다. 이황화물 다리는 공유결합의 일종으로 황(-S-)을 함유하는 아미노산인 2개의 시스테인 사이에 이루어진다. 이렇게 형성된 이황화물 다리(-S-S-)는 단백질 사슬의 고리모양구조를 안정화시킨다.
- [0020] 본 발명은 인공적으로 단백질 케이지를 제작하기 위해, 그리고, 소수성 첨가제를 담지한 코어-셸 구조의 고분자-단백질 입자를 one-pot in-situ 로 제조하기 위해, 자가조립에 의한 소수성 고분자-친수성 단백질 하이브리드 코어-셸 구조체 제작 원리를 활용하였다. 소수성 고분자-친수성 단백질 하이브리드 코어-셸 구조체로부터 고분자를 일부 또는 전부 제거할 수 있으며 이때 셸을 구성하는 단백질이 셸의 형태를 유지하는 것을 발견하였다. 또한 one-pot의 캡슐화방법에 의하여 단백질이 코팅되는 고분자 나노입자 형성과 동시에 소수성 고분자에 소수성 첨가제를 담지할 수 있음을 확인하였다. 나아가, 본 발명은 친수성 용매(예, 생리적 조건에 적절한 환경) 내에서 단백질이 3차 구조를 유지한 채 소수성 고분자와의 연결 및 자가조립을 통해 코어-셸 구조 중 단백질 셸을 형성할 수 있으면서, 소수성 첨가제를 동시에 코어 부분에 포집할 수 있다는 것을 발견하였다. 본 발명은 이에 기초한 것이다.
- [0021] 본 발명의 제1양태에 따른 단백질 케이지의 제조방법은, 소수성 제1고분자와 친수성 제1작용기를 포함하는 양친성 고분자를 준비하는 제1단계; 상기 제1작용기에 결합하는 제2작용기를 구비한 친수성 단백질을 준비하는 제2단계; 상기 제1작용기와 제2작용기 간의 결합을 통해 양친성 고분자-단백질 하이브리드가 형성되고 친수성 용매 내에서 양친성 고분자의 자가조립에 의해 단백질 셸과 양친성 고분자 코어를 포함하는 코어-셸 구조의 입자를 형성하는 제3단계; 및 상기 코어-셸 구조의 입자로부터 코어부분의 소수성 고분자를 일부 또는 전부 제거하는

제4단계를 포함한다.

- [0022] 또한, 본 발명의 제3양태에 따른 소수성 첨가제를 담지한 코어-셸 구조의 고분자-단백질 입자의 in-situ 제조방법은, 소수성 제1고분자와 친수성 제1작용기를 하나 이상 포함하는 양친성 고분자 및 소수성 첨가제를 유기용매에 포함하는 제1용액을 준비하는 제1단계; 물을 포함하는 친수성 용매에 3차 구조를 유지하면서 상기 제1작용기에 결합하는 제2작용기를 하나 구비한 친수성 단백질을 포함하는 제2용액을 준비하는 제2단계; 및 상기 제2용액에 제1용액을 혼합하는 제3단계를 포함한다.
- [0023] 본 발명에서 소수성 제1고분자는 친수성 제1작용기를 구비하여 양친성 고분자를 형성하고, 친수성 단백질은 상기 제1작용기에 결합하는 제2작용기를 구비하며, 상기 제1작용기와 제2작용기의 결합을 통해 소수성 제1고분자가 친수성 단백질과 연결되어 양친성 고분자-단백질 하이브리드를 형성하는 것이 특징이다(도 1a). 제1작용기는 친수성이어야, 소수성 제1고분자를 친수성 단백질이 있는 친수성 용매의 계면으로 유도할 수 있고, 친수성 용매 내 친수성 단백질의 제2작용기와 용이하게 결합할 수 있게 한다.
- [0024] 또한, 본 발명은 친수성 용매 내에서 상기 제1작용기와 제2작용기 간의 결합을 통해 양친성 고분자-단백질 하이브리드를 형성하는 동시에, 친수성 용매내에서 응집하고자 하는 소수성 제1고분자 부분을 보유한 양친성 고분자의 자가조립에 의해, 단백질 셸과 소수성 제1고분자를 함유하는 코어를 포함하는 코어-셸 구조의 입자를 형성하는 것이 특징이다(도 1b). 이때, 상기 단백질은 고유의 3차 구조를 유지할 수 있으므로 여전히 단백질 자체의 활성을 나타낼 수 있다.
- [0025] 잘 규정된 코어셸 구조를 합성하기 위해서는, 소수성 제1고분자와 친수성 제1작용기를 포함하는 양친성 고분자는 친수성 제1작용기를 하나 이상 포함할 수 있으나, 친수성 단백질은 제2작용기를 하나 구비하는 것이 바람직하다. 하나의 제2작용기가 단백질의 특정 부분에 한정되어 연결되어야 단백질 케이지 또는 단백질 셸에서 친수성 단백질의 배향을 원하는 대로 조절할 수 있기 때문이다.
- [0026] 특히, 단백질 케이지 또는 단백질 셸이 이를 구성하는 단백질의 고유 활성을 유지하기 위해서는 단백질 활성부위가 아닌 부분에, 바람직하게는 공간적으로 방해되지 않도록 상기 활성부위와 3차원적으로 이격된 부분에 제2작용기가 연결되는 것이 좋다. 예컨대, 활성부위가 말단에 없는 경우 N말단 또는 C말단에 제2작용기를 연결할 수 있다.
- [0027] 본 발명에 따른 제조방법을 이용하면, 동일 단백질뿐만 아니라, 상이한 단백질들도 코어-셸 구조 중 단백질 셸 부분 또는 단백질 케이지와 같은 하나의 구조체의 일정한 공간 내에 공존 및/또는 밀집시킬 수 있다. 따라서, 단백질 케이지 또는 단백질 셸을 구성하는 단백질은 1종일 수 있으나, 목적에 따라 2종 이상의 단백질을 함께 사용할 수 있다.
- [0028] 본 발명에 따라 자가조립에 의한 고분자-단백질 하이브리드 나노구조체(self-assembled polymer-protein hybrid nanostructures)를 구축하면, 나노구조체에 생물기능성(biofunctionalities)을 내장(built-in)시킬 수 있고, 다양한 형태의 구조물(morphological architectures)을 형성할 수 있다. 특히, 고분자-단백질 하이브리드 나노구조체의 형성시 크기와 형태를 조절할 수 있기 때문에, 약물, 치료제 또는 진단제 전달과 같은 다양한 생물학적인 분야 뿐만아니라 촉매용 나노반응기로서 적용 방안을 제공할 수 있다.
- [0029] 잠재적인 생물학적인 응용을 위하여 고분자-단백질 하이브리드 응집체의 크기를 조절하고 고분자-단백질 하이브리드 응집체의 in situ 제조방법에 대한 메커니즘을 이해하기 위하여 다양한 변수를 변화시키면서 일련의 실험을 수행하였다. 예컨대, 단백질로 His6-GFP 대신에 His-태그된 리파아제를 사용하거나, 분자량이 다른 Ni-NTA-PS를 사용하거나, 고분자 및/또는 단백질 용액의 농도를 변화시키거나, 고분자 용액의 첨가 속도를 조절하거나, 다양한 용매를 사용하거나, 투석에 의해 유기 용매를 제거하면서 유사한 실험을 수행하였다.
- [0030] 그 결과, 코어-셸 구조의 입자의 형태 또는 크기는 소수성 고분자의 종류/조성비, 분자량 또는 농도, 단백질의 종류/조성비, 분자량 또는 농도, 소수성 고분자와 단백질의 혼합비 또는 소수성 고분자와 단백질의 혼합속도를 조절함으로써 달성될 수 있다(표 1). 예컨대, 고분자와 단백질의 비율이 변화함에 따라 고분자와 단백질 간의 결합 형성 속도 및 자가조립에 의해 입자를 형성하는 속도가 변화하여 최종 생성되는 코어-셸 구조의 고분자-단백질 입자의 크기가 결정된다. 이때 각각의 단백질은 각 분자마다 제1작용기와 결합하는 제2작용기를 하나씩 구비하여 서로 경쟁적으로 결합한다. 따라서, 2종 이상의 단백질 사용시 이의 혼합 비율을 조절함으로써 단백질 셸을 구성하는 단백질의 조성비를 조절할 수 있다.

- [0031] 본 발명의 제조방법에 따라 형성되는 코어-셸 구조의 고분자-단백질 입자는 평균직경 20 nm 내지 5 μm 의 크기를 가질 수 있다. 또한 상기 입자는 구형, 타원형 또는 막대형으로 제조될 수 있으나, 그 형태는 이에 제한되지 않는다.
- [0032] 본 발명에 따라 단백질 케이스를 제조할 경우, 단순한 공정으로 잘 규정된 구조를 합성할 수 있게 되고, 단백질의 선택 및 도입에 있어서 그 제약이 적어 그 이용범위가 넓다.
- [0033] 또한, 본 발명에 따른 단백질 케이스 제조시 one-pot으로 단백질이 코팅된 입자 형성과 소수성 첨가제 담지를 동시에 수행될 수 있으므로, 공정이 매우 단순하고 간소하여 약물 또는 화장료 등의 전달체 등 다양한 분야에서 이를 효과적으로 도입할 수 있다. 또한, 단백질 케이스에 담지하고자 하는 물질과 사용되는 고분자의 종류를 선택함에 있어 그 제약이 적어 넓은 범위에서 물질을 선택하여 이용할 수 있다.
- [0034] 제1작용기, 제2작용기 또는 둘다는 고분자 및 단백질 각각에 직접 또는 링커를 통해 연결될 수 있다.
- [0035] 제1작용기와 제2작용기 간의 결합의 비제한적인 예로는, 배위결합(coordinate bond), 공유결합(covalent bond), 금속결합(metallic bond), 수소결합(hydrogen bond), 이온 결합(ionic bond), 항원-항체 결합(antigen-antibody binding) 및 리간드-수용체 결합(ligand-receptor binding) 등이 있다(도 1c). 제1작용기와 제2작용기 간의 결합은 특이적인 결합이 바람직하다.
- [0036] 제1작용기를 구비한 제1소수성 고분자의 일례로, IMAL(Immobilized-metal affinity ligand)이 말단에 결합된 고분자가, 상기 제1작용기에 결합하는 제2작용기를 구비한 친수성 단백질의 일례로, 상기 IMAL-친화성 태그가 부착되는 단백질이 있다. 이때, IMAL은 Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} 등의 전이금속을 포함하는 리간드로서, 바람직하게는 Ni^{2+} 을 포함한다. 바람직한 예로는, Ni-NTA(nitrilotriacetic acid), Ni-IDA(iminodiacetic acid), Ni-TED(tris(carboxymethyl)ethylene diamine) 등이 있다. 또한, 바람직하게는 상기 IMAL-친화성 태그는 사이드 체인에 금속이온과 친화성이 있는 이미다졸링을 가지고 있는 히스티딘 태그일 수 있다. 히스티딘 태그와 Ni-NTA 사이의 배위결합을 통해 고분자-단백질 하이브리드가 형성될 수 있다 (도 4b).
- [0037] 또는 역으로, IMAL-친화성 태그로서 히스티딘이 결합된 고분자와 IMAL이 결합된 단백질을 이용할 수 있다.
- [0038] 서로 결합가능한 제1작용기와 제2작용기의 다른 구체적인 예로는 NHS(N-하이드록시숙신이미딜 2-브로모-2-메틸 프로피오네이트)와의 공유결합 및 바이오틴과 아비딘 간의 리간드 수용체 결합 등이 있다. 상기 NHS 작용기는 일차아민과 공유결합을 형성할 수 있다. 따라서, NHS를 포함하는 고분자는 측쇄에 일차아민기를 포함하는 아르기닌, 라이신, 아스파리긴 또는 글루타민 등의 아미노산 잔기를 통해 공유결합을 형성할 수 있다. 또는 NHS 작용기를 갖도록 수식된 단백질은 일차아민기를 포함하는 고분자와 공유결합을 형성할 수 있다. 한편, 바이오틴과 아비딘 간의 리간드 수용체 결합은 바이오틴으로 수식된 고분자와 아비딘을 포함하는 단백질 또는 이의 역으로 수식된 고분자와 단백질 간에 형성될 수 있다. 또는, 상기 아비딘은 복수의 바이오틴 결합자리를 가지므로 바이오틴화된 고분자와 단백질이 아비딘을 매개로 결합하는 형태일 수 있다. 상기 아비딘은 아비딘, 스트렙타비딘, 탈당화 아비딘(deglycosylated avidin; NeutrAvidin)을 제한없이 포함한다.
- [0039] 친수성 용매 내에서 자가조립에 의해 마이셀과 같은 코어-셸 구조의 입자를 형성하기 위해, 제1고분자는 친수성 용매내에서 응집할 수 있을 정도로 소수성이면 되고, 단백질은 친수성 용매내에서 균일하게 분산 또는 용해될 수 있을 정도로 친수성이면 되고, 상기 제1고분자 및 단백질이 각각 서로 결합가능한 제1작용기와 제2작용기를 구비하는 한 본 발명에서 상기 제1고분자 및 단백질의 종류에는 제한이 없다.
- [0040] 제1고분자는 생체적합성 및/또는 생분해성 고분자인 것이 바람직하고, 상기 고분자는 폴리글리콜라이드(polyglycolide; PGA), 폴리락타이드(polylactide; PLA), 폴리메틸메타크릴레이트(polymethylmethacrylate; PMMA), 폴리스티렌(polystyrene), 폴리(메타)아크릴레이트(poly(metha)acrylate; PMA), 폴리카프로락톤(polycapropactone; PCL) 및 이들의 유도체 중에서 선택될 수 있다. 한편, 고분자를 형성하는 단량체의 비제한적인 예로는 스티렌(styrene), 아크릴레이트(acrylate), 락타이드(lactide), 히드록시부티르산(hydroxybutyric acid) 등이 있다.
- [0041] 본 발명에서 단백질은 아미노산만으로 이루어진 단순 단백질 뿐만아니라, 비(非)아미노산 보결분자단을 포함하는 복합단백질도 포함한다. 보결분자단에는 탄수화물, 지질(脂質), 핵산, 금속, 색소 등과 몇몇 비단백질 분자

와 이온 등이 속한다. 또한, 본 발명에서 단백질은 구조 단백질(예, 콜라겐, 케라틴 등), 생물학적 활성 단백질(효소, 호르몬, 물질수송단백질, 면역글로불린 등), 단백질 일부(예, 효소 활성부위, 결합부위, 기능부위 등 다양한 모티프)도 포함한다.

[0042] 또한, 단백질, 펩티드, 모티프, 융합단백질, 펩티도 유도체, PEG 등으로 개질된 단백질, 합성 단백질, 천연 단백질 등도 본 발명의 단백질 범주에 속한다. 단백질 내 소수성 잔기를 갖고 있더라도, 단백질 표면이 친수성을 띠고 친수성 용매에서 균일하게 분산될 수 있는 한 본 발명의 친수성 단백질 범주에 속한다. 특히, 친수성 단백질은 친수성 용매 내에서 3차 구조 또는 3차원 형태(conformation)를 유지하면서 친수성을 띠는 것이 바람직하다.

[0043] 상기 단백질의 비제한적인 예로는 인간성장호르몬, G-CSF(granulocyte colonystimulatingfactor), GM-CSF(granulocyte-macrophage colony-stimulatingfactor), 에리스로포이에틴(erythropoietin), 백신, 항체, 인슐린, 글루카곤, 칼시토닌(calcitonin), ACTH(adrenocorticotropic hormone), 소마토스테틴(somatostatin), 소마토트로핀(somatotropin), 소마토메딘(somatomedin), 부갑상선 호르몬, 갑상선 호르몬, 시상하부 분비물질, 프로락틴(prolactin), 엔돌핀, VEGF(vascular endothelial growth factor), 엔케팔린(enkephalin), 바소프레신(vasopressin), 신경성장촉진인자(nerve growth factor), 비자연발생적 아편양 물질(non-naturally occurring opioid), 인터페론, 아스파라기나아제(asparaginase), 알기나제(alginase), 슈퍼옥사이드 디스뮤타제(superoxide dismutase), 트립신(trypsin), 키모트립신(chymotrypsin), 펩신 등이 있다.

[0044] 친수성 용매는 양친성 고분자-단백질 하이브리드가 자가조립을 통해 코어-셸 구조를 형성할 수 있는 한 제한되지 않는다. 친수성 용매의 비제한적인 예로는, 물 또는 이의 혼합용매가 있다. 다만, 셸을 형성하는 단백질이 단백질 고유의 제거능을 발휘할 수 있는 상태에서 단백질 셸을 형성할 수 있도록, 단백질의 3차 구조, 예컨대 단백질 활성을 유지할 수 있는 용매인 것이 바람직하고, 생리적 조건(physiological conditions)에 해당하는 pH 범위 및/또는 온도 범위의 용매가 더바람직하고, pH 완충액(예, 포스페이트 완충용액)이 더더욱 바람직하다.

[0045] 유기용매는 소수성 제1고분자와 제1작용기를 포함하는 양친성 고분자를 용해 또는 분산시킬 수 있는 한 제한이 없다. 유기용매의 비제한적인 예로는 C1~C6 알코올, 아세톤, DMF(dimethylformamide), DMSO(dimethyl sulfoxide), THF(tetrahydrofuran) 등이 있다.

[0046] 상기 유기 용매는 코어-셸 입자 형성시 소수성 고분자와 함께 코어에 포집될 수 있다. 따라서, 소수성 첨가제가 유기용매에 용해 또는 분산되어 있으면 유기용매와 함께 코어에 포집될 수 있다.

[0047] 제1용액과 제2용액을 혼합하는 단일 단계의 반응으로 one-pot의 캡슐화방법에 의하여 단백질이 코팅되는(소수성) 고분자 나노입자 형성과 동시에 소수성 고분자에 소수성 첨가제를 담지할 수 있음을 확인한 것에 기초하여, 본 발명의 제3양태는 코어-셸 구조의 고분자-단백질 입자의 in-situ 제조방법에서, 소수성 제1고분자와 친수성 제1작용기를 포함하는 양친성 고분자를 유기용매에 포함하는 제1용액에, 코어 부분에 담지하고자 하는 소수성 첨가제를 추가 함유하는 것이 특징이다.

[0048] 또한, 본 발명의 제3양태에 따른 제조방법은 친수성 용액 내에서 자가조립에 의한 고분자-단백질 하이브리드 나노구조체를 one-pot in-situ로 제작할 수 있으므로, 상기 소수성 고분자의 종류, 분자량 또는 농도, 단백질의 종류, 분자량 또는 농도, 소수성 고분자와 단백질의 혼합비 또는 소수성 고분자와 단백질의 혼합속도를 조절함으로써 형성되는 입자의 형태 및/또는 크기를 조절할 수 있다. 따라서, 상기 본 발명에 따른 in-situ 제조방법에 의해 제조되는 소수성 첨가제를 담지한 코어-셸 구조의 고분자-단백질 입자도 형태 및/또는 크기를 조절 가능하다는 것이 또다른 특징이다.

[0049] 그 자체가 친수성이더라도 그 표면을 소수성으로 개질하면, 상기 소수성 첨가제로 사용할 수 있다.

[0050] 상기 소수성 첨가제는 약물일 수 있으며, 소수성 첨가제로서 약물을 담지한 입자는 약물전달체로 사용될 수 있다. 종래 소수성 약물은 난용성으로 투여가 어려웠다. 본 발명은 소수성 약물을 친수성 단백질로 코팅된 표면을 갖는 입자에 담지시킴으로써, 이러한 문제점을 해결할 수 있다. 특히, 본 발명의 제조방법은 소수성 약물을 고분자와 함께 유기용매에 용해시켜 준비하고 친수성 용매에 단백질을 녹인 용액과 혼합하는 단일 단계의 반응에 의해 수행되므로 빠르고 간편하게 소수성 약물을 담지한 코어-셸 구조의 고분자-단백질 입자 형태의 약물전달체를 제공할 수 있다.

- [0051] 상기 약물의 비제한적인 예로는 파클리탁셀, 메토틀렉세이트, 독소루비신, 5-플루오로우라실, 마이토마이신-C, 스티렌 말레산 네오카르지노스타틴, 시스플라틴, 카보플라틴, 카뮤스틴, 다카바진, 에토포사이드, 또는 다우노마이신 등의 항암제; 항바이러스제; 스테로이드계 소염제; 항생제; 항진균제; 비타민; 프로스타사이클린; 항대사제; 축동제; 아드레날린 길항제; 항경련제; 항불안제; 정온제; 항우울제; 마취제; 진통제; 동화성 스테로이드제; 면역 억제제 또는 면역 촉진제 등이 있다.
- [0052] 상기 소수성 첨가제는 화장료일 수 있다. 상기 "화장료"는 인체를 청결, 미화하여 매력을 더하고 용모를 밝게 변화시키거나 피부, 모발의 건강을 유지 또는 증진하기 위하여 인체에 사용되는 물질로서 인체에 대한 작용이 경미한 물질로 정의된다. 화장료의 비제한적인 예로는 피부연화제, 방부제, 향수 물질, 향여드름제, 항진균제, 산화방지제, 방취제, 지한제, 항비듬제, 탈색소제, 항지루성제, 염료, 선텐로션, UV 빛 흡수제, 효소, 방향 물질등을 들 수 있다.
- [0053] 마찬가지로, 소수성 첨가제는 조영제일 수 있다. 상기 "조영제"는 단순 영상 촬영시 확인이 불가능한 부위에 발생한 질병을 조기에 진단하여 치료할 수 있도록 선명한 영상을 제공하는 기능을 하는 물질로서, 자기공명영상(MRI)용 조영제, 컴퓨터단층촬영(CT)용 조영제, 양전자단층촬영(PET)용 조영제, 초음파 조영제, 형광 조영제 등이 사용될 수 있다. 조영제의 비제한적인 예로는 가돌리늄(Gd), 망간(Mn), 구리(Cu) 및 크롬(Cr)을 포함하는 전이금속 이온, 가도텐테이트 디메글루민(Gd-DTPA), 가도테레이트 메글루민(Gd-DOTA)을 포함하는 상기 전이금속 이온의 소수성 착화합물, 퍼플루오로카본(perfluorocarbon), 퍼플루오로프로판(perfluoropropan)을 포함하는 불소함유 화합물, 산화철계, 망간계, 구리계 및 크롬계 나노입자 및 상기 나노입자의 표면을 소수성 물질로 수식한 화합물 등의 상자성 또는 초상자성 물질인 자기공명영상(MRI)용 조영제; 요오드화 양귀비씨 기름 유래의 요오드화 소수성 물질 및 비스무스(Bi), 금(Au) 및 은(Ag)을 포함하는 금속원소로 구성된 나노입자 등의 컴퓨터단층촬영(CT)용 조영제; ^{99m}Tc, ¹²³I, ¹⁶⁶Ho, ¹¹¹In, ⁹⁰Y, ¹⁵³Sm, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ⁶⁸Ga 및 ¹⁷⁷Lu을 포함하는 방사선 동위원소 및 디에틸렌트리아민펜타아세테이트(DTPA)를 이용하여 제조한 상기 방사선 동위원소의 소수성 착화합물 등인 양전자단층촬영(PET)용 조영제; 퍼플루오로프로판(perfluoropropan), 퍼플루오로헥산(perfluorohexane), 설퍼헥사플루오라이드(sulfur hexafluoride), 퍼플루오로펜탄(perfluoropentane) 및 데카플루오로부탄(decapluorobutane) 등의 소수성 화합물인 초음파 조영제; 및 플루오로신(fluorescein), 로다민(rhodamine), 나일 레드(nile red), Cy-3 및 Cy-5 등의 형광 조영제가 있다.
- [0054] 제1작용기를 구비한 제1소수성 고분자에서 제1작용기의 일례로 Ni-NTA가 있으며, 도 4a에, Ni-NTA가 말단에 결합된 고분자의 합성 메커니즘을 개략적으로 도시한 반응도를 나타내었다(제조예 1). 한편, 도 4c에는 제1작용기와 제2작용기 간의 결합을 통해 양친성 고분자-단백질 하이브리드가 형성되고 친수성 용매 내에서 상기 하이브리드가 자가조립에 의해 소수성 첨가제를 담지한 코어-셸 구조의 입자를 형성하는 공정의 일례를 도시하였다.
- [0055] 도 4a 및 도 4c를 참고하면, NTA를 가진 R-X 형태의 개시제를 합성한 후, ATRP 리빙중합을 통해 Ni-NTA-고분자를 합성하고, 이를 히스티딘 태그가 부착된 단백질이 녹아있는 PBS 완충용액에 상기 Ni-NTA-고분자와 소수성 물질(nile red)을 DMF에 녹여 떨어뜨리게 되면, 단백질이 코팅된 고분자 입자가 형성됨과 동시에 코어에 소수성의 물질을 담지하게 된다. 이러한 작용은 고분자의 물에서의 응집과 동시에 Ni-NTA와 히스티딘 태그의 상호작용에 의해 발생한다.
- [0056] 본 발명의 일실시예에서는 소수성 첨가제로서 염색제인 나일 레드(nile red)를 사용하여 단백질 케이스 내부에 봉입여부 및 세포내로의 전달가능성도 확인하였다(도 9 및 도 10).
- [0057] 본 발명에 따라 코어-셸 구조의 고분자-단백질 입자 제조시 제1작용기를 포함하지 않는 제2소수성 고분자를 추가로 포함할 수 있다. 이를 위해 본 발명에 따른 코어-셸 구조의 고분자-단백질 입자의 제조에 사용되는 제1용액은 제1작용기를 포함하지 않는 제2고분자를 추가로 포함할 수 있다.
- [0058] 상기 제2소수성 고분자는 제1소수성 고분자와 함께 코어-셸 구조의 입자 중 코어부분에 위치할 수 있고 상기 입자의 크기를 조절할 수 있으면서, 제2소수성 고분자는 제1소수성 고분자 보다 양친성 고분자-단백질 하이브리드에 결합되어 있지 아니하거나 덜 결합되어 있어, 추후 용이하게 코어-셸 구조의 입자로부터 제거될 수 있다. 상기 제2소수성 고분자의 종류는 제1소수성 고분자와 동일 또는 상이할 수 있다. 예컨대, 단백질과 결합하는 제1작용기를 포함하지 않으며 상기 제1고분자의 소수성 부분만을 포함하는 제2고분자를 추가로 포함하여 코어-셸 구조의 고분자-단백질 입자를 제조함으로써 입자의 크기 및/또는 단일 입자 당 결합하는 단백질의 개수를 조절할

수 있다.

- [0059] 또한, 본 발명에 따른 제조방법은, 제3단계에서 형성된 코어-셸 구조의 입자에 가교제를 첨가하여 셸을 형성하는 단백질 간의 결합을 형성하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0060] 가교제를 더 포함할 경우 단백질간의 가교가 일어나게 되어 상기 코어-셸 입자가 더 안정해질 수 있어 단백질 셸에 의한 캡슐화가 더 용이하게 될 수 있다. 이러한 가교제로는 글루타르알데히드, NHS 에스터, EDC, 말레이미드, 피리딜 디설파이드, 하이드라지드, 및 알콕시 아민류 등을 사용할 수 있다.
- [0061] 본 발명의 제4양태는 단백질 케이스를 제조하기 위해, 상기 코어-셸 구조의 입자로부터 코어부분의 소수성 고분자를 일부 또는 전부 제거하는 제4단계를 더 포함하는 것이 특징이다.
- [0062] 상기 코어-셸 구조의 입자로부터 코어부분의 소수성 고분자 일부 또는 전부 제거는 (i) 상기 제1작용기와 제2작용기 간의 결합의 경쟁자 화합물을 도입시키거나, (ii) 양친성 고분자-단백질 하이브리드에서 고분자 부위를 가수분해시키는 화합물을 도입시키는 것에 의해 수행될 수 있다.
- [0063] 도 11은 본 발명의 일구체예에 따른 단백질 케이스의 제조를 도식화하여 나타낸 것으로, 히스티딘 태그가 부착된 단백질이 녹아있는 PBS 완충용액에, Ni-NTA가 말단에 결합된 고분자를 DMF에 녹여 떨어뜨리게 되면, 단백질이 코팅된 고분자 입자가 형성되고, 형성된 입자 표면의 단백질을 가교시킨 뒤에 이를 유기 용매에 녹임으로써 안쪽의 고분자를 입자 바깥으로 녹여내게 된다. 이때, Ni-NTA와 히스티딘 태그의 결합을 해리시키는 경우와 해리시키지 않는 경우의 차이가 나타나게 된다. 용액에 과량의 이미다졸을 첨가하여 반응시킴으로서, 상기 과량으로 첨가된 이미다졸이 IMAL-친화성 태그가 부착된 단백질과 경쟁적으로 IMAL에 결합하여 고분자와 단백질의 결합을 대체함으로써 상기 코어-셸 입자 중의 고분자만을 용출시킬 수 있다.
- [0064] 상기한 바와 같이, 양친성 고분자-단백질 하이브리드에서 고분자와 단백질이 비공유결합으로 연결되어 있는 경우 경쟁적으로 상기 결합을 대체할 수 있는 물질을 과량 첨가함으로써 손쉽게 그 결합을 해리시킬 수 있다. 따라서, 바람직하게는 단백질 셸을 가교시킨 뒤, 상기 경쟁시약을 이용하여 안쪽의 고분자를 분리시켜 제거함으로써 최종적으로 단백질 케이스를 합성할 수 있다.
- [0065] 한편, 양친성 고분자-단백질 하이브리드에서 고분자와 단백질이 공유결합으로 연결되어 있는 경우에는 고분자를 분해시킬 수 있는 시약, 용매 또는 이를 포함하는 용액을 이용하여 입자의 코어를 차지한 고분자를 녹여낼 수 있다.
- [0066] 본 발명에 따라 제조될 수 있는 단백질 케이스는 바람직하게는 20 nm 내지 5 μ m의 직경을 갖는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 본 발명에 따른 단백질 케이스는 구형, 타원형 또는 막대형일 수 있다.
- [0067] 본 발명의 제1양태 또는 제3양태의 방법에 의해 제조된 단백질 케이스/단백질 셸은 특이적 결합능, 촉매능 등 기능성 단백질의 나노구조체로서 역할을 수행할 수 있다. 예컨대, 케이스 구성 단백질의 선택에 따라 다양한 기능을 갖는 단백질 나노구조체를 제공할 수 있고(도 2), 더 나아가 담지되는 물질의 기능에 따라 유효 성분(생리 활성, 약물 등)의 전달체, 센서, 촉매제 등 다양한 용도로 활용할 수 있는 단백질 나노구조체를 제공할 수 있다(도 3).
- [0068] 본 발명에 따른 단백질 케이스는 난용성 약물과 같은 소수성 첨가제를 담지할 수 있는데, 상기 소수성 첨가제를 제3단계에 첨가하여 자기조립시 코어부분에 포함시키거나, 제4단계에서 형성된 단백질 케이스에 주입시키는 방법으로 가능하다. 제1양태에 따라 제조된 단백질 케이스에 첨가제를 주입할 때는 소수성에 한정하지 아니하고, 친수성 첨가제도 가능하다.
- [0069] 케이스 구성 단백질은 단일 또는 다중 단백질일 수 있으므로, 단일 또는 다중 기능 단백질의 케이스를 제공할 수 있다.
- [0070] 케이스 구성 단백질의 비제한적인 예로는, Sensor/Reporter protein (센서 단백질; 예, Green fluorescent protein), 효소(예, Lipase, Esterase, Horse radish peroxidase), 생체표적지향단백질(Recognition protein), 백신용 단백질(예, 항원, Hemagglutinin), 피부 작용성/투과성 펩티드 및 그 유도체일 수 있다.

- [0071] 따라서, 본 발명에 따른 단백질 케이지는 케이지 구성 단백질을 적절히 선택함으로써, Virus-Like Particle (VLP)를 넘어서는 백신(신속 대응성, 부작용 저감), 생체 표적 세포 지향성 조영제, 기능성 물질(약물, 피부 기능 물질, 헬스케어 화합물)의 단백질 전달체, 기능성 단백질의 표적 지향적 단백질 전달체 (다중 단백질 케이지의 경우)을 제공할 수 있다.
- [0072] 제1양태 또는 제3양태의 방법에 의해 제조된 단백질 케이지는, 그 내부에 봉입되거나 단백질 사이에 삽입되거나 표면에 결합된 약물을 포함하는 약물전달체; 그 내부에 봉입되거나 단백질 사이에 삽입되거나 표면에 결합된 화장료를 포함하는 화장료 조성물; 또는 그 내부에 봉입되거나 단백질 사이에 삽입되거나 표면에 결합된 조영제를 포함하는 영상화 조성물에 사용될 수 있다.
- [0073] 통상 약물은 특정한 질환에 대해 특이적인 예방 또는 치료 효과를 나타내는 물질로, 경우에 따라서는 표적 조직이 아닌 다른 정상세포에 대해서는 독성을 나타내는 경우도 있다. 따라서 이들 약물을 이를 필요로 하는 부위에 특이적으로 전달하는 것은 약물의 부작용을 최소화하고 예방 또는 치료 효과를 극대화하기 위한 중요한 요소이다. 따라서, 단백질 케이지/단백질 쉘을 구성하는 단백질은 자체가 타겟팅 가능한 단백질이거나, 타겟팅 가능한 항원, 항체, 리간드 또는 수용체가 결합된 것일 수 있고, 이 경우 그 내부에 포함된 약물을 원하는 부위에 타겟팅할 수 있다. 또한, 영상화 조성물로 사용시, 단백질 케이지/단백질 쉘을 구성하는 단백질도, 약물전달체와 마찬가지로 영상화하고자 하는 조직으로 특이적으로 이동할 수 있도록, 자체가 타겟팅 가능한 단백질이거나, 타겟팅 가능한 다른 항원, 항체, 리간드 또는 수용체가 결합된 것이 바람직하다.
- [0074] 한편, 화장료가 피부에 도포되었을 때 효과를 나타내기 위해서는 표피층을 투과하여 피부 내부로 전달될 수 있는 것이 바람직하다. 따라서, 화장료를 피부 내부로 효과적으로 전달하기 위하여 단백질 케이지/단백질 쉘을 구성하는 단백질은 자체가 피부투과성을 갖는 단백질이거나, 피부투과성 펩티드 또는 화합물이 결합된 것일 수 있다.
- [0075] 피부투과촉진에 사용될 수 있는 피부투과성 펩타이드의 예가 미국등록특허 제7,659,252호(본 발명의 명세서에 통합됨)에 기재되어 있다. 이러한 펩타이드는 우수한 피부투과도를 나타낼 뿐만 아니라 다른 약물의 경피전달용 담체로서도 사용될 수 있다.
- [0076] 제1양태 또는 제3양태의 방법에 의해 제조된 단백질 케이지는, 단백질 일부 또는 전부가 항원 단백질인 경우 인공 백신으로 사용될 수 있다. 개별 단백질 보다 본 발명에 따른 단백질 케이지는 크기가 훨씬 크므로, 백신으로서 면역력이 우수하다. 또한, 백신제작 기간을 단축시킬 수 있으며, 신속한 예방백신개발이 가능하고, 입자 크기 조절도 가능하며, 면역 부작용 유발 가능성을 낮출 수 있다.
- [0077] 본 발명에 따라 제조될 수 있는 인공 백신의 일례는 도 3에 개략적으로 도시되어 있다. 예컨대, 인플루엔자 표면 단백질로서 HA/NA 항원 단백질을 이용하여 본 발명에 따른 자기조립형 단백질 케이지를 제조하면 고효율 인플루엔자 예방백신을 제공할 수 있다.
- [0078] 또한, 제1양태 또는 제3양태의 방법에 의해 제조된 단백질 케이지는, 검출하고자 하는 물질에 작용하여 물리화학적 변화를 일으키거나 검출하고자 하는 물질에 의해 물리화학적 변화가 일어나는 효소, 항원, 항체, 리간드 또는 수용체 등의 단백질을 포함하도록 제조하여 바이오센서로 사용할 수 있다. 상기 단백질은 필요에 따라 2종 이상의 단백질을 사용할 수도 있다. 예컨대, 본 발명에 따른 단백질 케이지는 구형 지지체 상에 효소 등의 검출용 단백질이 고정된 형태의 센서를 제공할 수 있다. 나아가, 케이지의 내부에는 조효소나 반응에 추가적으로 요구되는 물질을 담지하여 케이지에서 상대적으로 높은 농도를 나타내도록 함으로써 국부적인 신호증강 효과를 나타낼 수 있다.
- [0079] 바이오센서의 예로서, 글루코스 효소 센서는 글루코스 산화효소가 글루코스를 글루탐산으로 전환할 때 산소를 소모하고 과산화수소를 발생시키는 현상에 기초한다. 따라서, 과산화수소가 2차적으로 산화됨으로써 발생하는 전하량의 증가, pH 변화 또는 산소량의 감소 등을 측정하는 방식으로 작동한다. 이와 같이 산소를 소모하고 부산물로 과산화수소를 발생시키는 반응은 글루코스 이외에도 갈락토즈 등 다양한 산화효소들에 의한 전형적인 반응이다(예컨대, 갈락토즈 산화효소, 락테이트 산화효소, 콜레스테롤 산화효소 등). 따라서, 기존의 바이오센서로서 활용되는 제품의 구성요소로서 효소를 용액 상에 부유시키거나 막 또는 지지체에 담지/고정시켜 사용하는

것과 같이, 본 발명에 따른 단백질 케이지로 제조하여 센서로서 활용할 수 있다. 전술한 바와 같이, 이와 같이 제조한 단백질 케이지는 하나의 입자에 수십 내지 수천개 또는 그 이상의 효소입자를 고정시킬 수 있으므로 극부적인 신호증강 효과를 나타낼 수 있으므로, 적은 양의 시료도 효과적으로 검출할 수 있다.

[0080] 이종 단백질을 포함하는 단백질 케이지를 센서로서 활용하는 예로는, 상기 산화효소 이외에 이로부터 발생하는 과산화수소를 이용하는 퍼옥시다제 효소를 추가로 포함하도록 제조하여 이용할 수 있다. 퍼옥시다제는 기질 화합물을 색깔이 있는 생성물로 변환시키므로, 이러한 색 변화를 측정함으로써 산화효소의 활성을 측정할 수 있다. 이때, 퍼옥시다제의 기질 화합물은 효율적인 검출을 위해 단백질 케이지 내부에 봉입시킬 수 있다.

[0081] 바람직하게, 상기 바이오센서는 추가로 검출기를 구비할 수 있다. 상기 검출기는 당업계에 공지된 전기화학적 신호 검출기, 광학적 검출기, pH 검출기, 기체 검출기 등을 제한없이 사용할 수 있다.

발명의 효과

[0082] 본 발명에 따른 단백질 케이지는, 코어를 형성하는 소수성 고분자의 제약이 적고, 제1작용기와 제2작용기 간의 결합을 통해 단백질 코팅 셸을 형성할 수 있어 다양한 코팅 단백질을 도입할 수 있다.

[0083] 또한, 별도의 주형없이도 one-pot으로, 제1작용기와 제2작용기 간의 결합을 통해 양친성 고분자-단백질 하이브리드가 형성되고 친수성 용매 내에서 상기 하이브리드가 자가조립에 의해 코어-셸 구조의 입자를 형성할 수 있으면서도, 코어-셸 구조의 입자로부터 코어부분의 소수성 고분자를 일부 또는 전부 제거하여 형성된 단백질 케이지 내부에 약리활성물질, 화장료, 조영제 등 다양한 첨가제를 담지시킬 수 있으므로, 화장품, 의약품, 식품, 헬스케어 등 매우 다양한 분야에 단백질 소자로서 활용될 수 있다.

[0084] 게다가, 제조공정이 매우 단순하고 간소하며, 쉽게 코어-셸 입자의 크기를 제어할 수 있어, 다양한 분야에서 이를 효과적으로 도입하여 제조할 수 있다.

[0085] 나아가, 본 발명에 따라 단백질 케이지를 제조할 경우, 단순한 공정으로 잘 규정된 구조를 합성할 수 있고, 단백질의 선택 및 도입에 있어서 그 제약이 적어 다양하게 이용가능하다.

도면의 간단한 설명

[0086] 도 1은 본 발명의 일 구체예에 따라, 서로 특이적으로 결합하는 작용기인 X 및 Y의 결합을 통한 고분자 및 단백질의 하이브리드 형성 (a), 상기 고분자-단백질 하이브리드의 자가조립 (b) 및 다양한 결합에 의한 고분자-단백질 하이브리드의 형성 (c)을 개략적으로 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명의 일구체예에 따라 제조될 수 있는 단백질 케이지의 모식도이다.

도 3은 본 발명의 일구체예에 따라 제조될 수 있는 인공 백신을 도시한 도이다.

도 4a는 제조예 1에 따라 Ni-NTA가 말단에 결합된 고분자의 합성 메커니즘을 나타낸 것이다.

도 4b는 본 발명의 일 구체예에 따라 말단에 Ni-NTA를 포함하는 고분자와 히스티딘으로 태그된 단백질 간의 배위결합을 개략적으로 나타낸 도이다.

도 4c는 본 발명의 일 구체예에 따라 나일 레드가 담지 된 단백질 코팅 고분자나노입자 형성을 도식으로 나타낸 것이다.

도5는 실시예 1에서 제조된 단백질 코팅 고분자나노입자의 TEM 분석결과(A, B)와 DLS 데이터(C)를 나타낸 것이다.

도6은 실시예 2에서 제조된 단백질 코팅 고분자 나노입자의 TEM 분석결과(위)와, DLS 데이터(아래)를 나타낸 것이다.

도 7은 실시예 3에서 제조된 고분자-단백질 입자의 크기 및 형태를 나타낸 도이다.

도 8은 실시예 4에서 제조된 고분자-단백질(효소) 입자의 크기 및 형태를 DLS 데이터 및 TEM 이미지로 나타낸 도이다.

도 9는 실시예 5에서 제조된 단백질 코팅 고분자나노입자의 발광 스펙트럼 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 실시예 5에서 제조된 단백질 코팅 고분자 나노입자의 세포실험에 따른 형광현미경 관찰 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 본 발명의 일구체예에 따른 단백질 케이지 합성 공정을 도식적으로 나타낸 것이다.

도 12는 실시예 6에서 제조된 고분자 입자가 형성된 용액에 가교제(glutaraldehyde)를 첨가한 후의 TEM 분석결과(위)와, DLS 데이터(오른쪽 아래)를 나타낸 것이다.

도 13은 상기 도 12에서 확인한, 가교된 구조에 THF를 첨가한 후의 TEM 사진 및 모식도를 나타낸 것이다.

도 14는 실시예 7에 따라 상기 도 13에서와 같이 안 쪽의 고분자를 녹여낼 때, 과량의 이미다졸을 첨가한 후의 TEM사진 및 모식도를 나타낸 것이다.

도 15는 실시예 8에 따라 물-DMF 용액(DMF 4 부피%)에서 Ni-NTA-PS와 His6-GFP로부터 제조한 고분자-단백질 입자의 크기 및 형태를 나타낸 도이다. (A)는 투석(24시간)에 의해 DMF를 제거한 후의 DLS 및 TEM 결과이고, (B)는 투석(24시간)에 의해 DMF를 제거와 과량의 이미다졸 용액(250 mM) 첨가 후 DLS 및 TEM 결과를 나타낸 도이다.

도 16은 실시예 8에 따라 고해상도 TEM 이미지(A 내지 C)와 형광 광학현미경 이미지(D)를 나타낸 도이다. (A) 및 (B)는 고분자-단백질 입자의 외부층을, (C)는 250 mM 이미다졸 용액 첨가 후 내부 고분자를 조절한 후 입자를 나타낸 이미지이다. (A)에서 입자 외부의 단백질 층을 명확히 확인할 수 있다. (B)에서 화살표는 외부 고분자 층을 나타낸다. 이미지는 같은 실험 조건하에서 수행한 다른 실험들로부터 채택하였다.

도 17은 본 발명에 따른 코어-셸 구조의 고분자-단백질 입자 제조방법에 있어서 사용한 고분자 농도에 따른 입자의 크기변화를 나타낸 도이다. 상기 실험은 pH 8.0에서 수행하였다.

도 18은 본 발명에 따른 코어-셸 구조의 고분자-단백질 입자 제조방법에 있어서 pH 변화에 따라 생성되는 입자의 크기 변화를 나타낸 도이다.

도 19는 DLS 및 TEM으로 측정된 0.1 ml DMF에 녹인 Ni-NTA-PS(Mn~4,900)의 사용량에 따른 입자의 직경 변화를 중첩시켜 나타낸 도이다.

도 20은 실시예 10에서 제조된, NHS 작용기와 히스티딘 태그의 공유결합에 의해 형성된 코어-셸폴리스티렌-GFP입자의 크기 및 형태를 나타낸 도이다. 좌측은 동적 광 산란(dynamic light scattering; DLS)으로 측정된 입자의 크기분포를, 우측은 TEM으로 관찰한 입자의 형태를 나타낸 도이다.

도 21은 실시예 10에서 제조된, NHS 작용기와 히스티딘 태그의 공유결합에 의해 형성된 코어-셸폴리스티렌-RFP입자의 크기 및 형태를 나타낸 도이다. 좌측은 동적 광 산란(dynamic light scattering; DLS)으로 측정된 입자의 크기분포를, 우측은 TEM으로 관찰한 입자의 형태를 나타낸 도이다.

도 22는 실시예 10에서 제조된, NHS 작용기와 히스티딘 태그의 공유결합에 의해 형성된 코어-셸폴리스티렌-YFP입자의 크기 및 형태를 나타낸 도이다. 좌측은 동적 광 산란(dynamic light scattering; DLS)으로 측정된 입자의 크기분포를, 우측은 TEM으로 관찰한 입자의 형태를 나타낸 도이다.

도 23은 실시예 10에서 제조된, NHS 작용기와 히스티딘 태그의 공유결합에 의해 형성된 코어-셸폴리스티렌-피브리노젠입자의 크기 및 형태를 나타낸 도이다. 좌측은 동적 광 산란(dynamic light scattering; DLS)으로 측정된 입자의 크기분포를, 우측은 TEM으로 관찰한 입자의 형태를 나타낸 도이다.

도 24는 ATRP(atom transfer radical polymerization)에 의한 tri-NTA가 말단에 결합된 폴리스티렌(tri-NTA-PS, 8')의 합성방법을 나타낸 도이다.

도 25는 p-tri-NTA 개시제(6')의 (A) ^1H NMR 및 (B) ^{13}C NMR 스펙트럼을 나타낸 도이다.

도 26은 p-tri-NTA 개시제(6')에 대한 (A) 겔 투과 크로마토그래피 및 (B) MALDI-TOF 질량분광 분석결과를 나타낸 도이다.

도 27은 p-tri-NTA 개시제(6')를 사용한 스티렌의 ATRP 결과를 나타낸 도이다. 시간에 따른 분자량(Mn)과 분산도(D; dispersity)를 tri-NTA-PS(7')에 대한 겔 투과 크로마토그래피와 함께 나타내었다. 초기 반응물의 농도

비는 [스티렌]₀:[개시제]₀:[CuCl]₀:[dNbpy]₀=100:1:10:20이며, 용매로는 50 부피%의 아니솔을 사용하여 115℃에서 수행하였다.

도 28은 (A) p-tri-NTA-PS(Mn, GPC = 6,400 g/mol, Đ = 1.15; 7') 및 (B) tri-NTA-PS(Mn, GPC = 5,400 g/mol, Đ = 1.17; 8')의 ¹H NMR(300 MHz) 스펙트럼을 나타낸 도이다.

도 29는 (A) p-tri-NTA-PS(Mn, GPC = 6,400 g/mol, Đ = 1.15; 7') 및 (B) tri-NTA-PS(Mn, GPC = 5,400 g/mol, Đ = 1.17; 8')의 ¹³C NMR(300 MHz) 스펙트럼을 나타낸 도이다.

도 30은 물/THF에서 tri-NTA-PS로부터 자가조립된 구형 입자의 DLS 데이터 및 TEM 이미지를 나타낸 도이다.

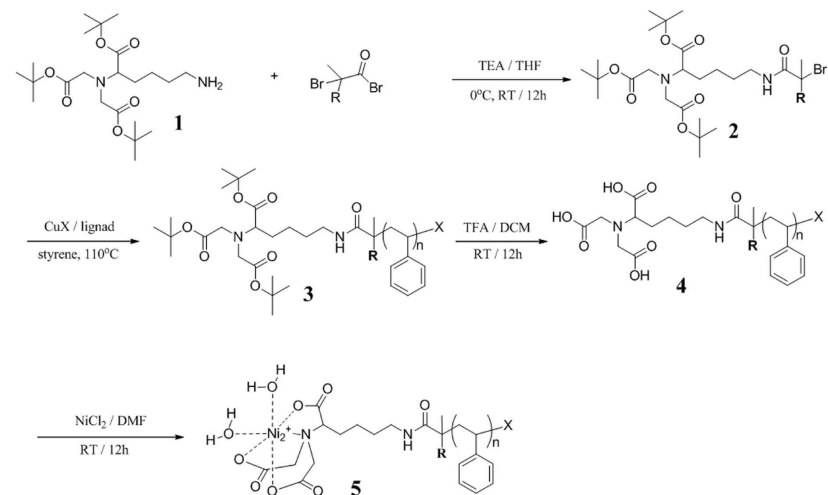
도 31은 실시예 13에 따라 물/DMF(DMF 4 vol%)에서 NTA-Ni/His 상호작용을 통해 니켈 착제화된 tri-NTA-PS(Ni-tri-NTA-PS)와 His6-GFP로부터 자가조립된 고분자-단백질 코어-셸하이브리드 입자의 DLS 데이터 및 TEM 이미지를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0087] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0088] <제조예1> Ni-NTA가 말단에 결합된 고분자의 제조

[0089] 도4(A)에 도시된 바와 같이 Ni-NTA가 말단에 결합된 고분자를 합성하였다.



[0090]

[0091] **1.1.NTA 개시제의 합성 (2)**

[0092] 2-브로모이소부티릴 브로마이드(2-Bromoisobutyryl bromide, 0.09 ml, 0.85 mmol)를 0℃에서 화합물 1(N-(5-Amino-1-carboxypentyl)iminodiacetic acid tTri-t-butyl ester, 342 mg, 0.77 mmol), 트리에틸아민(0.32 ml, 2.3 mmol) 및 THF(50 ml)가 들어있는 플라스크에 1시간 동안 천천히 주입하였다. 브롬산(acid bromide)의 주입이 완료된 후, 반응 혼합물을 상온에서 12시간 동안 반응시킨 다음, THF를 제거한 후, 반응 혼합물을 100 ml의 메틸렌 클로라이드(methylene chloride)에 녹이고 증류수(5 × 100 ml)를 사용하여 세척하였다. 컬럼 크로마토그래피법을 통하여 생성물을 정제하였다(헥산 : 에틸아세테이트 = 4 : 1). 생성물의 구조를 ¹H NMR을 통해 분석하였다.

[0093] ¹H NMR (300MHz, CDCl₃): δ 1.38(s, 18H), 1.40 (s, 9H), 1.49 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), 1.65 (m, 2H), 1.88 (s, 6H) 3.20 (t, 2H), 3.25 (t, 1H), 3.42 (dd, 4H).

[0094] **1.2. NTA로 관능화된 폴리스티렌의 제조 (3)**

[0095] 스티렌(1.00 ml, 8.82 mmol, 104 g/mol)과 아니솔(anisole, 1.00 ml)을 질소로 충전된 슈링크 플라스크에 넣고, 세 번의 얼림-펌프-해동 과정을 반복한 후, CuCl(36.4 mg, 0.368 mmol)과 dNbpy(300.8 mg, 0.736 mmol)을 플라스크에 넣고 얼림-펌프-해동 과정을 2회 더 실시하였다. 플라스크를 110°C의 오일 배스에 설치한 다음 NTA 개시제 2(106.5 mg, 0.184 mmol)를 반응 혼합물에 주입하였다. 중합이 끝난 후 화합물 3을 메탄올에 침전하여 수득하였다(Mn = 6500 g/mol).

[0096] **1.3. (3)의 보호그룹 제거 (4)**

[0097] 화합물 3(300 mg, 0.06 mmol)과 트리플루오로아세트산(trifluoroacetic acid, 0.14 ml, 1.86 mmol)을 20 ml의 메틸렌 클로라이드에 녹이고 상온에서 12시간 동안 반응시켰다. 용매를 제거한 후 화합물 4를 메탄올에 침전하여 수득하였다.

[0098] **1.4. 니켈의 착체화 (5)**

[0099] 화합물 4(100 mg, 0.02 mmol)를 50 ml의 DMF에 녹이고, 니켈 클로라이드(54.4 mg, 0.42 mmol)를 투입하고, 상온에서 12시간 동안 니켈의 착체화 반응을 수행하였다. 반응 혼합물을 메탄올에 침전하여 생성물 5를 수득하였다.

[0100] **<실시예1>배위결합에 의한 단백질 코팅 고분자 나노입자(6)의 제조 및 단백질 코팅 고분자 나노입자의 크기 결정**

[0101] 제조예 1에서 준비된 생성물 5(0.1 mg, 1.5×10^{-5} mmol)를 0.2 ml의 DMF에 녹인 용액을 상온에서 실린지 펌프(syringe pump)를 사용하여 0.02 ml/h의 속도로 His6-GFP(0.41 mg, 1.4×10^{-5} mmol)가 녹아있는 5 ml의 포스페이트 완충용액(10 mM, pH 7.5)에 적하하였다. 10시간의 투입 이후, 반응 혼합물을 1일 동안 교반시켰다.

[0102] **TEM 시료의 준비**

[0103] 탄소-코팅된 구리 그리드를 상기 실시예 1에서 제조한 단백질 코팅 고분자 나노입자를 포함하는 용액에 담귀 TEM 시료를 준비하였다. 여분의 용액은 여과지로 짚어내고 그리드를 6시간 동안 실온에서 건조시켰다. 시료는 염색하지 않았다.

[0104] **DLS 시료의 준비 및 측정**

[0105] 상기 실시예 1에서 제조한 단백질 코팅 고분자 나노입자에 대하여 660 nm에서 작동하는 레이저와 최적화된 직접 제작한 셋업을 이용하여 DLS 실험을 수행하였다. DLS 시료는 물-DMF(DMF 4 vol.%, pH 7.4)로 각 시료를 10 또는 20배 희석하여 준비하였다. 측정 전에 상기 시료를 구형 유리 큐벳에 장착하였다. 모든 측정은 25°C에서 90°에서 수행하였다. 각 측정은 5회 반복하여 합하였고 단회 측정 시간은 1분이었다. 획득한 하이브리드 입자의 크기를 수분포(number distribution)로 나타내었다.

[0106] 도 5는 실시예 1에 따른 단백질 코팅 고분자 나노입자의 형성여부를 확인하기 위한 TEM 분석결과(A, B)와 DLS 데이터(C)를 나타낸 것이다. (A) TEM 사진에 나타난 바와 같이 균일한 형태의 나노입자가 형성되었고, (B) 확대해서 보았을 때 입자의 안쪽과 바깥쪽의 균일한 형태의 입자가 형성되었고 입자 안 쪽과 바깥 쪽의 contrast가 다른 것을 확인할 수 있었다. 또한 DLS 데이터(C)를 통해 균일한 크기의 입자들이 좁은 분포를 가지며 존재하는 것으로 나타났다.

[0107] 한편, 고분자-단백질 하이브리드 응집체의 안정성은 생물분야에서 잠재적 활용을 위해 중요한 요소이다. Ni-NTA-PS(Mn ~ 21,800) 및 His6-GFP로부터 획득한 하이브리드 응집체의 안정성을 연구하기 위하여, 상기 고분자-단백질 하이브리드 콜로이드를 포함하는 용액을 지속적으로 교반하였고 한달까지 균일한 시간 간격으로 DLS 측정을 수행하였다. DLS 및 TEM 연구는 응집체들이 15일까지 안정함을 나타내었으며, 15일 이후 응집체는 상분리(침전)없이 분해되었다.

[0108] <실시예 2>

[0109] 도 6은 말단에 Ni-NTA가 결합된 폴리스티렌(0.1 mg, 1.5×10^{-5} mmol)과 나일 레드(nile red, 0.02 mg, 6.3×10^{-5} mmol)를 0.2 ml의 DMF에 녹인 후 히스티딘 태그를 가지고 있는 단백질인 His6-GFP(0.41 mg, 1.4×10^{-5} mmol)가 녹아 있는 PBS 완충용액 5 ml에 천천히 떨어뜨려 Ni-NTA가 결합된 폴리스티렌 입자가 균일하게 형성됨을 확인한 TEM 분석결과(위)와, DLS 데이터(아래)를 나타낸 것이다. TEM 사진에 나타난 바와 같이 폴리스티렌 입자가 균일한 크기로 형성되었고, 이 입자에 단백질이 결합되면서 안정화가 이루어짐을 확인할 수 있다. 또한 DLS 데이터를 통해 균일한 크기의 입자들이 존재하는 것으로 나타났다.

[0110] <실시예3>

[0111] 실시예 1과 달리 유기용매에 녹인 고분자의 양에 따라 변화하여 생성되는 응집체의 크기를 확인하였다 .

[0112] 0.25 mg의 Ni-NTA-PS(Mn ~21,800, 1.2×10^{-5} mmol)를 0.2 ml DMF에 용해시키고 상기 고분자 용액을 His6-GFP(27 kDa, 261 mg, 9.8×10^{-6} mmol)을 포함하는 5 ml 탈이온수에 0.02 ml/h 속도로 천천히 첨가하여 응집체를 제조하였다. 제조한 응집체의 형태 및 크기를 측정하여 도 7에 나타내었다. 상기 반응조건에서는 80 내지 140 nm 크기의 구형 응집체가 형성되었으며, DLS 데이터와 대표적인 TEM 이미지를 각각 도 7A 및 B에 나타내었다.

[0113] 도 7C는 DMF에 녹인 Ni-NTA-PS를 첨가하기 전 His6-GFP 수용액(pH 7.4) (1)과 DMF에 녹인 Ni-NTA-PS를 첨가하여 제조된 고분자-단백질 입자의 콜로이드 용액 (2)을 나타낸 디지털 사진이다. 고분자-단백질 하이브리드 콜로이드 용액은 응집체를 형성함으로써 His6-GFP 용액과 비교하여 덜 투명하게 되었다(도 7C).

[0114] His6-GFP 없이 실험을 수행하는 경우 동일한 실험 조건 하에서 반응을 수행하더라도 Ni-NTA-PS 자체는 불분명한 (ill-defined) 무정형의(amorphous) 커다란 응집체를 형성하는 한편,실린지 펌프를 이용하여 DMF에 녹인 니켈 착화된 NTA가 말단에 수식된 폴리스티렌(Ni-NTA-PS) 용액을 His6-GFP를 포함하는 수용액(pH 7.4)에 서서히 첨가하였을 때에는, 단백질과 고분자 간의 특이적인 상호작용으로 인해 구형의 응집체가 생성되는 것을 확인하였다.

[0115] <실시예 4> 효소가 코팅된 고분자 나노입자의 제조

[0116] 실시예 1에 기재된 것과 유사한 방법으로 효소가 코팅된 고분자 나노입자를 제조하였다.

[0117] 구체적으로, 0.05 ml DMF에 연속희석에 의해 니켈 착제화된 NTA가 말단에 수식된 폴리스티렌(Ni-NTA-PS, Mn ~ 21,800, 0.0625 mg, 3.0×10^{-6} mmol)을 준비하였다. 상기 고분자 용액을 실린지 펌프를 사용하여 유리 바이알에서 실온(22℃)에서 교반하면서 His-태그된 효소(His6-Lip21H, 37 kDa, 77.5 mg, 2.1×10^{-6} mmol)을 포함하는 1.25 ml 탈이온수에 0.02 ml/h 속도로 천천히 첨가하였다. 수 방울의 인산완충용액(phosphate buffer saline; PBS, 50 mM, pH ~7.4)을 첨가하여 수용성 효소 용액에 고분자 용액을 첨가하기 전에 pH를 7.4로 유지하였다. 고분자 용액 첨가를 완료한 후, 생성된 고분자-효소 하이브리드 용액을 계속 교반하면서 자가조립된 형태를 DLS와 TEM으로 분석하였다. 이어, His6-Lip83H(27 kDa)와의 콘주게이션을 위해 유사한 과정을 수행하였다.

[0118] 상기 제조한 효소가 코팅된 고분자 나노입자에 대한 DLS 및 TEM 분석 결과를 도 8에 나타내었다. (A)와 (B)는 각각 히스티딘태그된 효소로서 His6-Lip21H(37 kDa)와 His6-Lip83H(27 kDa)를 이용하여 제조한 입자에 대한 결과이다. 도 8에 나타난 바와 같이, His6-Lip21H(도 2A;37 kDa)가 코팅된 입자는 90 내지 150 nm 범위의 크기 분포를, His6-Lip83H(도 2B;27 kDa)가 코팅된 입자는 이보다 다소 낮은,70 내지 120 nm 범위의 크기 분포를 나타내었다.

- [0119] <실시예 5> 소수성 염색제가 담지된 단백질 코팅 고분자 나노입자 (6)
- [0120] 제조예 1에서 준비된 생성물 5(0.1 mg, 1.5×10^{-5} mmol)와 나일 레드(nile red, 0.02 mg, 6.3×10^{-5} mmol)를 0.2 ml의 DMF에 녹이고, 이 용액을 상온에서 실린지 펌프를 사용하여 0.02 ml/h의 속도로 His6-GFP(0.41 mg, 1.4×10^{-5} mmol)을 함유한 5 ml의 포스페이트 완충용액에 투입하였다. 10시간 투입 후, 반응 혼합물을 1일 동안 교반시키고, 피포화되지 않은 나일 레드를 200 nm 막 실린지 필터를 사용하여 제거하였다.
- [0121] 도 9 는 발광 스펙트럼(emission spectrum)을 측정한 결과를 나타낸 것으로, 나일 레드의 경우 담지가 되게 되면 그 파장영역대가 단파장대로 이동하는 특징이 있으므로 이를 확인하였다(도 9b). 필터를 통해 담지되지 않은 나일 레드를 제거하면 장파장 대 영역의 피크가 사라지는 것으로 나타났고, GFP는 상기 과정 중에 그 형광이 유지되는 것으로 나타났으며(도 9a), 필터 후에도 나일 레드가 존재한다는 것을 형광 현미경으로 확인할 수 있었다.
- [0122] 실시예 5에서 제조된 입자가 세포의 안쪽에 들어갈 수 있는지를 확인하기 위해 형광현미경으로 관찰하였다. 도 10에 도시된 바와 같이, 세포내 녹색 형광을 나타내는 GFP와 적색 형광을 나타내는 나일 레드 둘 다 존재함을 확인하였다.
- [0123] <실시예 6> 단백질 코팅 고분자 나노입자의 단백질 코팅 셀 가교 (8)
- [0124] 2.5%의 글루타르알데하이드(glutaraldehyde) 수용액 0.1 ml를 상온에서 실린지 펌프를 사용하여 실시예 1에 따라 제조된 용액에 30분 동안 주입하였다. 30분 이후, 소디엄보로하이드라이드(sodiumborohydride)를 사용하여 반응을 정지시켰다.
- [0125] 도 12는 코어-셸 구조의 고분자-단백질 입자가 형성된 용액에 가교제(glutaraldehyde)를 첨가한 후의 TEM 분석 결과(위)와, DLS 데이터(오른쪽 아래)를 나타낸 것이다. TEM 사진에 나타난 바와 같이 단백질들의 가교가 일어나게 되고 이를 통해 입자가 더욱 안정해 지게 되고, 이후 반응물과 완충용액 이온 등은 원심분리 필터를 통해 정제하여 입자만 물상에 존재하는 깨끗한 용액을 얻어내게 된다.
- [0126] <실시예 7> 단백질 나노케이지의 제조 (9)(10)
- [0127] 도 13은 상기 도 12에서 확인한, 가교된 구조에 THF를 첨가한 후의 TEM 사진 및 모식도를 나타낸 것으로(9), THF의 첨가에 의하여 상기 가교된 구조 안쪽에 응집되어있던 폴리스티렌이 입자 바깥쪽으로 녹아 나오게 되고, 이 때 단백질과 결합되어 있는 고분자는 여전히 구조 안 쪽에 남아 있게 되는 것이다.
- [0128] 과량의 이미다졸을 실시예 6에 따라 제조된 용액에 넣어 Ni-NTA와 히스티딘 태그사이의 상호작용을 해리시켰다. THF를 같은 부피로 넣어주고 1주일 동안 교반하여 중심이 비어있는 단백질 나노케이지를 안정화시켰다(10).
- [0129] 도 14는 상기 도 13에서와 같이 안 쪽의 고분자를 녹여낼 때, 과량의 이미다졸을 첨가한 후의 TEM사진 및 모식도를 나타낸 것으로(10), 상기 과량의 이미다졸을 첨가하게 되면 고분자와 단백질 간의 결합을 해리시키게 되고, 이로 인해 단백질 코팅된 셀에 결합되어 남아있던 잔여 고분자들이 모두 구조 밖으로 녹아 나오게 됨을 확인할 수 있었다.
- [0130] <실시예 8> 단백질 코팅된 고분자 입자 및 단백질 케이지의 안정성에 대한 용매의 효과
- [0131] 고분자-단백질 하이브리드 응집체의 자가조립에 대한 용매(DMF 및 THF)의 효과를 확인하였다. 각 용매에 녹인 Ni-NTA-PS(Mn = 21,800)을 His6-GFP를 포함하는 탈이온수(pH 7.4)에 첨가하였을 때, 물-DMF 시스템은 명확한 구형 응집체를 형성하는 한편, 물-THF는 불분명한 커다란 응집체를 형성하였다. 이는 THF에 대한 His6-GFP의 낮은 용해도에 기인하는 것으로 유추되었다.
- [0132] 고분자-단백질 하이브리드 응집체를 제조하기 위하여, 단백질을 포함하는 수용액(pH 7.4)에 고분자를 첨가하는 동안 Ni-NTA-PS에 적합한 용매인 4 vol.% DMF를 첨가하였다. 유기용매인 DMF는 구형 응집체의 코어에 존재할 수 있으며, 또한 상기 시스템에서 응집체의 외부에도 존재할 수 있다. 상기 코어 내의 DMF의 존재는 폴리스티렌을

팽창하게(swell) 할 수 있다. 따라서, 응집체에 대한 DMF의 효과를 관찰하기 위하여, 동력학적으로 포획된 응집체(폴리스티렌 코어는 이의 유리 전이 온도(glass transition temperature)보다 낮음)를 형성하고, 구형 응집체를 형성한 후 투석에 의해 상기 시스템으로부터 DMF를 제거하였다. TEM 측정 및 DLS 연구로부터 초기 응집체가 투석 후(24시간)에도 유지됨을 확인하였다(도 15A). 그러나, 시간이 지남에 따라 상분리에 의한 응집체의 침전이 발생하였다. 이는 DMF(4 vol.%)의 존재가 고분자-단백질 하이브리드 응집체의 수용액 상에서의 보존에 필수적임을 나타낸다. 또한, 고분자-단백질 응집체의 형태 변화를 확인하기 위하여, 과량의 이미다졸 수용액(250 mM)을 고분자-단백질 응집체의 투석 용액에 첨가하였다. TEM 측정 및 DLS 연구로부터 고분자-단백질 응집체의 크기가 감소함을 확인하였다(24시간; 도 15B). 이는 경쟁체인 리간드 이미다졸에 의한 히스-태그된 GFP의 치환에 기인하는 것으로 유추되었다. 이미다졸 첨가 후, 응집체는 불안정하고 시간이 지남에 따라 서로 모여 불명확하고 보다 큰 무정형의 응집체를 형성하였다.

[0133] 본 실험의 결과로부터 유추되는 고분자-단백질 하이브리드 응집체의 in situ 형성에 대한 가능한 메커니즘은 내부의 Ni-NTA-PS의 소수성 상호작용과 히스-태그된 GFP를 통한 하이브리드에 의해 증가된 안정성에 기인함을 확인하였다. DMF에 녹인 Ni-NTA-PS를 수용액에 첨가하였을 때, 폴리스티렌의 소수성으로 인해 응집하기 시작하였으며, 이와 같이 생성된 응집체는 표면에 친수성의 니켈 착제화된 NTA 부분을 포함하므로, 폴리스티렌 기재(matrix)는 코어에서 역마이셀을 구성할 수 있으며, 이는 수용액상에서 NTA-Ni-히스티딘 상호작용을 통해 친수성 히스-태그된 단백질에 의해 안정화될 수 있다.

[0134] <실시예 9> 단백질 코팅된 고분자입자의 크기 조절

[0135] 단백질 코팅된 고분자 입자의 크기를 조절하는 다양한 인자들의 효과를 확인하기 위하여, 단백질의 양에 대한 고분자 양의 비율, 반응 용액의 pH, 고분자의 분자량 및 고분자와 단백질의 사용량 등을 변화시키면서 생성되는 응집체의 크기를 확인하여 이들 변수가 응집체 크기 변화에 미치는 영향을 확인하였다.

[0136] **1. 고분자 농도의 효과**

[0137] 상기 실시예 1에 기재된 방법과 유사하게 단백질 코팅된 고분자 입자를 제조하되 사용한 단백질의 양에 대한 고분자 양의 비를 변화시키면서 생성되는 입자의 크기를 확인하였다.

[0138] 그 결과, 도 17에 나타난 바와 같이, 단백질에 대한 고분자의 사용량이 증가할수록 생성되는 응집체의 크기가 증가하는 것을 확인하였다.

[0139] **2. pH의 효과**

[0140] 상기 실시예 1에 기재된 방법과 유사하게 단백질 코팅된 고분자 입자를 제조하되 용액의 pH를 6.5 내지 8.5 범위 내에서 변화시키면서 제조하고, 생성되는 입자의 크기를 확인하였다.

[0141] 그 결과, 도 18에 나타난 바와 같이, 응집체 제조시 반응 용액의 pH가 증가할수록 생성되는 입자의 크기가 감소하는 것을 확인하였다.

[0142] **3. 고분자 분자량 및 고분자와 단백질 사용량의 효과**

[0143] 상기 실시예 1에 기재된 동일한 실험 방법으로 수행하되 분자량 21 800의 Ni-NTA-PS 대신 분자량 4 900의 Ni-NTA-PS를 이용하여 His6-GFP와 함께 응집체를 제조하고 DLS와 TEM 이미지로 형태 및 크기를 분석하여 도 19 및 표 1에 나타내었다. 또한, 표 1에는 사용한 고분자와 단백질의 양을 감소시키면서 제조한 입자의 크기를 함께 개시하였다.

[0144] 도 19 및 표 1에 나타난 바와 같이, 형성된 입자의 크기는 분자량이 큰 고분자를 동일한 농도로 사용하여 제조한 입자의 크기가 약 100 nm 내외 임을 감안할 때, 사용한 고분자의 분자량이 4,900으로 감소하였을 때 형성된 입자의 크기는 280 내지 350 nm로 눈에 띄게 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0145] 또한 표 1에 나타난 바와 같이, 사용한 고분자와 단백질의 농도를 동일한 비율로 감소시키면서 응집체를 형성하였을 때, 사용한 고분자 및 단백질의 양이 감소함에 따라 형성된 입자의 크기가 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

다.

표 1

Entry	^a Amount of polymer in 0.1 ml DMF[mg]	Amount of His6-GFP in 2.5 ml H ₂ O[μg]	Rate of addition of polymeric solution[ml/h]	^b Mean diameter of micellar aggregates (DLS)[nm]	^c Average size of micellar aggregates (TEM)[nm]
1	0.125	540	0.01	365±25.48	~350
2	0.0625	270	0.01	342±23.94	~330
3	0.03125	135	0.01	103±7.21	~100
4	0.003125	13.5	0.01	66±4.62	~50
5	0.001562	6.75	0.01	42±2.94	~50

a: prepared by stepwise dilution from a higher concentration.

b: mean diameter obtained from number distribution DLS measurements.

<제조예 2> NHS 작용기를 포함하는 고분자의 제조

스티렌(6.51 ml, 56.8 mmol)과 아니솔(3.5 ml)이 들어있는 반응용액을 얼림-펌프-해동 과정을 3회 반복 실시함으로써 산소를 제거하였다. 그 후 반응용기에 CuBr(54.3 mg, 0.379 mmol), bpy(118 mg, 0.757 mmol) 및 N-하이드록시숙신이미딜 2-브로모-2-메틸프로피오네이트(N-hydroxysuccinimidyl 2-bromo-2-methylpropionate; 100 mg, 0.379 mmol)를 넣고 펌프-N₂ 치환을 3회 반복하였다. 반응 용액을 110℃에서 10시간 동안 반응시켰다. THF로 반응 용액을 희석시키고 중성 알루미나 컬럼(neutral alumina column)을 사용하여 Cu 촉매를 제거하였다. Cu 촉매가 제거된 용액을 과량의 메탄올에 적하하여 NHS 작용기를 가진 폴리스티렌을 침전시켜 정제하였다(Mn: 12,000, PDI: 1.12).

<실시예10> 공유결합에 의한 단백질 코팅 고분자 나노입자 및 단백질 나노케이지의 제조

1. GFP가 코팅된 고분자 나노입자의 제조

NHS 작용기를 가진 폴리스티렌(0.26 mg, 2.2×10^{-5} mmol)을 0.4 ml의 DMF에 녹인 용액을 상온에서 실린지 펌프를 사용하여 0.04 ml/h의 속도로 His6-GFP(0.16 mg, 1.5×10^{-5} mmol) 이 녹아있는 PBS 완충액(10 ml, 50 mM, pH 8.0)에 적하하여 구조체를 제조하였다. 상기 제조한 구조체의 형태 및 크기를 동적 광 산란법(dynamic light scattering; DLS) 및 TEM으로 측정하여 도 20에 나타내었다.

1.1. GFP 코팅된 나노케이지의 제조

상기 실시예 10.1.에 의해 제조한 공유결합에 의해 GFP가 코팅된 고분자 나노입자로부터 고분자 코어를 제거하는 과정을 추가로 실시하여 GFP를 포함하는 단백질 나노케이지를 제조하였다. 구체적으로, 상기 GFP가 코팅된 고분자 나노입자에 2.5% 글루타알데하이드 수용액 1.0 ml을 30분 동안 주입하였다. 이후, 소듐보로하이드라이드를 가하여 반응을 정지시켰다. 상기 반응 혼합액에 5 ml의 THF를 주입하고 12시간 동안 교반하였다. 이후, THF를 제거하고 단백질과 결합하지 않은 고분자를 막 실린지 필터로 제거하였다.

2. RFP가 코팅된 고분자 나노입자의 제조

NHS 작용기를 가진 폴리스티렌(0.26 mg, 2.2×10^{-5} mmol)을 0.4 ml의 DMF에 녹인 용액을 상온에서 실린지 펌프를 사용하여 0.04 ml/h의 속도로 His6-RFP(0.16 mg, 1.5×10^{-5} mmol) 이 녹아있는 PBS 완충액(10 ml, 50 mM, pH 8.0)에 적하하여 구조체를 제조하였다. 상기 제조한 구조체의 형태 및 크기를 DLS 및 TEM으로 측정하여 도 21에

나타내었다.

[0158] **3. YFP가 코팅된 고분자 나노입자의 제조**

[0159] NHS 작용기를 가진 폴리스티렌(0.26 mg, 2.2×10^{-5} mmol)을 0.4 ml의 DMF에 녹인 용액을 상온에서 실린지 펌프를 사용하여 0.04 ml/h의 속도로 His6-YFP(0.17 mg, 1.5×10^{-5} mmol) 이 녹아있는 PBS 완충액(10 ml, 50 mM, pH 8.0)에 적하하여 구조체를 제조하였다. 상기 제조한 구조체의 형태 및 크기를 DLS 및 TEM으로 측정하여 도 22에 나타내었다.

[0160] **4. 피브리노젠이 코팅된 고분자 나노입자의 제조**

[0161] NHS 작용기를 가진 폴리스티렌(0.26 mg, 2.2×10^{-5} mmol)을 0.4 ml의 DMF에 녹인 용액을 상온에서 실린지 펌프를 사용하여 0.04 ml/h의 속도로 피브리노젠(fibrinogen; 2.0 mg, 1.5×10^{-5} mmol) 이 녹아있는 PBS 완충액(10 ml, 50 mM, pH 8.0)에 적하하여 구조체를 제조하였다. 상기 제조한 구조체의 형태 및 크기를 DLS 및 TEM으로 측정하여 도 23에 나타내었다.

[0162] **<제조예 3> 바이오틴 작용기를 포함하는 고분자의 제조**

[0163] **1. 바이오틴화 RAFT 시약의 합성**

[0164] 바이오틴(0.5 g, 2.0 mmol)과 카보닐디이미다졸(carbonyldiimidazole; 0.64 g, 4.0 mmol)을 DMF (20 ml)에 녹이고 상온에서 6시간 동안 반응시켰다. 반응 용액에 2-(2-아미노에톡시)에탄올(2-(2-aminoethoxy)ethanol; 0.63 ml, 6.0 mmol)을 추가적으로 투여하고 18시간 동안 교반하였다. 용매를 제거한 후, 바이오티닐 알코올(biotinyl alcohol)을 컬럼 크로마토그래피로 정제하였다(고정상: 실리카, 이동상: 1-부탄올/아세트산/물=80/10/10). 정제된 바이오티닐 알코올(0.35 g, 1.0 mmol)을 DMF에 녹이고 S-1-도데실-S'-(α, α' -디메틸- α'' -아세트산) 트리티오카보네이트(S-1-dodecyl-S'-(α, α' -dimethyl- α'' -acetic acid) trithiocarbonate; 0.37 g, 1.0 mmol), DCC(0.205 g, 1.0 mmol) 및 DMAP(0.015 g, 0.12 mmol)와 상온에서 48시간 동안 반응시켰다. 고체 침전물 여과 및 용매를 제거하고 바이오틴화 RAFT 시약을 컬럼 크로마토그래피로 정제하였다(고정상: 실리카, 이동상: 클로로포름/메탄올=70/30).

[0165] **2. 바이오틴으로 관능화된 폴리스티렌의 제조**

[0166] 산소가 제거된 아니솔(0.8 ml)에 스티렌(2 ml, 17.4 mmol), AIBN(1.43 mg, 0.01 mmol) 및 바이오틴화 RAFT 시약(59.1 mg, 0.08 mmol)을 넣고 65°C에서 131시간 동안 반응시켰다. 중합 후, 반응 혼합용액을 과량의 메탄올에 넣고 침전하여 바이오틴작용기를 가지는 폴리스티렌을 얻었다(Mn: 9,200, Mw: 11,100, PDI: 1.18).

[0167] **<실시에 11> 리간드-수용체 결합에 의한 단백질 코팅 고분자 나노입자 및 단백질 나노케이지의 제조**

[0168] 상기 제조예 3에 따라 제조한 바이오틴작용기를 가지는 폴리스티렌(0.2 mg, 2.2×10^{-5} mmol)을 0.4 ml의 DMF에 녹인 용액을 상온에서 실린지 펌프를 사용하여 0.04 ml/h의 속도로 스트렙타비딘(0.79 mg, 1.5×10^{-5} mmol) 이 녹아있는 PBS 완충액(10 ml, 50 mM, pH 8.0)에 적하하여 구조체를 제조하였다.

[0169] **<실시에 12> 상이한 2종 이상의 단백질을 포함하는 단백질 코팅 고분자 나노입자의 제조**

[0170] 상기 제조예 1에 따른 Ni-NTA-PS(0.1 mg, 1.5×10^{-5} mmol)를 0.2 ml의 DMF에 녹인 용액을 상온에서 실린지 펌프를 사용하여 0.02 ml/h의 속도로 His6-GFP(0.2 mg, 0.7×10^{-5} mmol) 및 His6-리파아제(0.3 mg, 0.7×10^{-5} mmol)를 녹인 PBS 완충액(5 ml, 50 mM, pH 7.4)에 적하하였다. 10시간의 투입 이후, 반응 혼합물을 1일 동안 교반

시켰다.

[0171] <제조예 4> tri-Ni-NTA가 말단에 결합된 고분자의 제조

[0172] 고분자 1분자 당 단백질과 결합할 수 있는 작용기를 3개 포함하는 고분자를 합성하기 위한 예로써, 3개의 니켈 착제화된 NTA가 말단에 결합된 폴리스티렌 고분자를 제조하였다. 상기 고분자의 제조방법은 도 24에 나타내었다.

[0173] 1. 보호된 tri-NTA 개시제의 합성 (6')

[0174] 화합물 1'의 합성

[0175] H-Lysine(Z)-OtBu · HCl(2 g, 5.360 mmol)을 DMF 50 ml에 녹인 현탁액에 tert-부틸 브로모아세테이트(7.84 ml, 50.361 mmol)와 N,N-디이소프로필에틸아민(DIPEA)(4.6 ml, 26.412 mmol)을 질소분위기 하에 첨가하였다. 반응 혼합물을 55°C에서 밤새도록 교반하였다. 휘발성 물질은 65°C에서 진공으로 증발시켰다. 슬러리 잔여물은 사이클로헥산:에틸아세테이트(3:1)로 추출하였다. 추출물은 농축하여 헥산:에틸아세테이트(4:1)를 이동상으로 하여 실리카겔 상에서 크로마토그래피로 분석하였다.

[0176] 수율: 2.8 g (H-Lysine(Z)-OtBu · HCl에 대해 92.5 %).

[0177] TLC: R_f = 0.38 (헥산:에틸아세테이트=4:1).

[0178] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3), δ (TMS, ppm): 1.42 (s, 18H), 1.45 (s, 9H), 1.53 (m, 4H), 1.62 (m, 2H), 3.20 (m, 2H), 3.31 (t, J = 7.2, 1H), 3.44 (dd, J = 16, 8.4, 4H), 5.08 (s, 2H), 7.34 (m, 5H).

[0179] 화합물 2'의 합성

[0180] 질소 분위기 하에 1'의 메탄올 용액(1.7 g/50 ml, 3.013 mmol)에 10 % Pd/C(150 mg)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온의 수소 분위기 하에서 9시간 동안 격렬히 교반하였다. 셀라이트(celite) 상에서 Pd/C를 여과하고, 여과물은 감압하에 증발시켰다.

[0181] 수율: 1.15 g (1'에 대해 88.7 %).

[0182] TLC: R_f = 0.5 (클로로포름:메탄올=6:1).

[0183] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3), δ (TMS, ppm): 1.44 (s, 18H), 1.45 (s, 9H), 1.63 (m, 6H), 2.87 (t, J = 7.2, 2H), 3.29 (t, J = 7.6, 1H), 3.44 (dd, J = 17.2, 9.2, 4H).

[0184] 화합물 3'의 합성

[0185] 1'의 클로로포름 용액(2 g/30 ml, 3.542 mmol)에 트리플루오로산(trifluoroacetic acid; TFA, 5.46 ml)과 트라이소프로필실란(triisopropylsilane; TIS, 0.3 ml)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 교반하고 TLC로 분석하였다. 3시간 후, 반응 혼합물에 7 ml 메탄올과 4 ml 물을 첨가하였다. 휘발성 물질을 감압하에 증발시켰다. 잔여물을 톨루엔과 함께 비등시켜 건조시키고(dried azeotropically with toluene) 무수 에틸에테르로 침전시켰다. 흰색 침전을 회수하여 고진공하에(under high vacuum) 건조시켰다.

[0186] 수율: 1.3 g (1'에 대해 92.6 %).

[0187] TLC: R_f = 0.06 (클로로포름:메탄올:물=65:25:4).

[0188] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3), δ (TMS, ppm): 1.48-1.53 (m, 4H), 1.66 (m, 1H), 1.78 (m, 1H), 3.15 (m, 2H),

3.45 (t, $J = 12.8$, 1H), 3.63 (dd, $J = 18, 9.6$, 4H), 5.08 (s, 2H), 7.36 (m, 5H).

[0189] 화합물 4'의 합성

[0190] NHS(400 mg, 3.484 mmol), DMAP(58 mg, 0.468 mmol) 및 DCC(985 mg, 4.772 mmol)를 20 ml 무수 DMF에 녹인 3'(400 mg, 0.952 mmol) 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하고, 10 ml 클로로포름에 녹인 2(1.49 g, 3.479 mmol)와 N,N-디이소프로필에틸아민(N,N-diisopropylethylamine; DIPEA, 0.63 ml, 3.479 mmol) 용액을 첨가하였다. 밤새도록 반응시킨 후, 휘발성 물질을 65°C 진공에서 증발시켰다. 잔여물을 헥산:에틸아세테이트(1:1)에 용해시키고, 용액을 여과하여 우레아 슬러리(urea slurry)를 제거하였다. 휘발성 물질은 물로 3회 추출하였다. 혼합한 추출물을 농축하여 클로로포름:메탄올(30:1)를 이동상으로 하여 실리카겔 상에서 크로마토그래피로 분석하였다.

[0191] 수율: 1.23 g (3'에 대해 74.6 %).

[0192] TLC: $R_f = 0.34$ (클로로포름:메탄올=30:1).

[0193] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3), δ (TMS, ppm): 1.44 (s, 54H), 1.46 (s, 27H), 1.53 (m, 16H), 1.63 (m, 8H), 3.20-3.31 (m, 12H), 3.44 (m, 16H), 5.08 (s, 2H), 7.34 (m, 5H).

[0194] 화합물 5'의 합성

[0195] 질소 분위기 하에서 4'의 메탄올 용액(1.0 g/40 ml, 0.612 mmol)에 10 % Pd/C(130 mg)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온의 수소 분위기 하에서 9시간 동안 격렬히 교반하였다. 셀라이트(celite) 상에서 Pd/C를 여과하고, 여과물은 감압하에 증발시켰다.

[0196] 수율: 0.8 g (4'에 대해 87.1 %).

[0197] TLC : $R_f = 0.48$ (클로로포름:메탄올=9:1).

[0198] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3), δ (TMS, ppm): 1.44 (s, 54H), 1.46 (s, 27H), 1.53 (m, 16H), 1.63 (m, 8H), 3.20-3.31 (m, 12H), 3.44 (m, 16H).

[0199] 화합물 6'의 합성

[0200] 전술한 방법으로 화합물 1', 2', 3', 4' 및 5'를 합성한 후, 0°C 질소 분위기 하에서 5의 건조 THF 용액(0.8 g/15 ml, 0.533 mmol)에 2-브로모 이소부틸릴 브로마이드(0.078 ml, 0.636 mmol)와 DIPEA(0.28 ml, 1.592 mmol)를 서서히 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새도록 교반하였다. 휘발성 물질은 50°C 진공에서 증발시켰다. 잔여물 슬러리를 디클로로메탄에 용해시키고 물로 3회 추출하였다. 혼합한 추출물을 농축하고 클로로포름:메탄올(30:1)를 이동상으로 하여 실리카겔 상에서 플래시 컬럼 크로마토그래피(flash column chromatography)로 정제하였다.

[0201] 수율: 0.63 g (5'에 대해 71.7 %).

[0202] TLC: $R_f = 0.26$ (클로로포름:메탄올=30:1).

[0203] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3), δ (TMS, ppm): 1.44 (s, 54H), 1.46 (s, 27H), 1.53 (m, 16H), 1.63 (m, 8H), 1.88 (s, 6H), 3.20-3.31 (m, 12H), 3.44 (m, 16H).

[0204] ^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (TMS, ppm): 23.30, 28.35, 28.43, 30.13, 32.63, 34.40, 39.50, 48.77, 53.97, 65.20, 77.23, 170.08, 172.50.

[0205] 전술한 바와 같이, 원자 전달 라디칼 중합반응(atom transfer radical polymerization; ATRP)에 의해 다결합가

(multivalent) NTA가 말단에 수식된 고분자를 합성하기 위하여, 먼저 적절히 보호된-트리-NTA 개시제(p-tri-NTA initiator, 6')를 준비하였다. 먼저, α-질소원자 상에 둘 이상의 tert-부틸 아세테이트기를 도입하여 H-Lys(Z)-OtBu·HCl을 1'으로 전환하였다. 1'으로부터 보호기의 선택적 제거는 하나의 아민기(2') 또는 3개의 카르복시기(3')를 포함하는 1세대 NTA 덴드론(dendron)을 제공하였다. 2'와 3'의 커플링으로 완전히 보호된 화합물 4'을 얻고 이로부터 촉매 수소화(catalytic hydrogenation)에 의해 아민기가 수식되고 tert-부틸로 보호된 덴드리머 5'을 얻었다.

[0206] 상기 5'을 2-브로모이소부틸릴 브로마이드와 반응시켜 이들 사이에 아마이드 결합을 형성함으로써 말단에 tert-부틸 보호된 NTA 모이어티와 활성화된 알킬 브로마이드를 포함하는 ATRP 개시제 6'를 준비하였다. 용해도를 향상시키고 부반응(예컨대, ATRP 리간드의 양성자 부가 반응)을 차단하기 위하여 tert-부틸 보호된 NTA-기반 아마이드 성 개시제를 고안하였다. 합성된 개시제(6')의 구조를 ¹H NMR 및 ¹³C NMR로 확인하였다(도 25). ¹H NMR에서 ~1.4 ppm에서의 피크와 ¹³C NMR에서 ~28 ppm에서의 피크를 tert-부틸 양성자로 지정할 수 있다. 6'의 분자량을 겔 투과 크로마토그래피(gel permeation chromatography; GPC)와 MALDI-TOF(matrix assisted laser desorption ionization-time of flight) 질량분광법으로 결정하였다(도 26). GPC에 의한 6'의 분자량은 1,650 g/mol, MALDI-TOF 분석에 의한 나트륨 부가된 p-tri-NTA 개시제의 질량 대 전하 비는 1,672.772이었다.

[0207] **2. tri-NTA로 관능화된 폴리스티렌의 제조 (8')**

[0208] 고분자로의 tri-NTA의 도입 (7')

[0209] 스티렌(1.0 ml)과 아니솔(1.0 ml)을 질소로 충전된 슈링크 플라스크에 넣고, 세 번의 얼림-펌프-해동 과정을 반복한 후, CuCl(17.5 mg)과 dNbpy(71.27 mg)을 플라스크에 넣고 얼림-펌프-해동 과정을 2회 더 실시하였다. 플라스크를 115°C의 오일 배스에 설치한 다음 p-트리-NTA 개시제 6'(140 mg, 85.2×10⁻³ mmol)을 첨가하고 10시간 동안 교반하였다. 시간 간격을 두고, 반응 혼합물 0.1 ml 분액을 취하여 GPC 분석을 위해 THF로 희석하였다. 메탄올로 침전시켜 보호된 tri-NTA가 결합된 고분자를 분리하였다.

[0210] 7'의 보호그룹 제거 (8')

[0211] 상기 수득한 보호된-트리-NTA-폴리스티렌(p-tri-NTA-PS) 7'(100 mg, 15.63×10⁻³ mmol)을 플라스크에서 6.0 ml의 CH₂Cl₂에 용해시켰다. 상기 플라스크에 트리플루오로아세트산(trifluoro acetic acid; TFA, 0.96 ml, 14.06 mmol)을 첨가하였다. TFA 첨가를 완료한 후, 반응 혼합물을 실온에서 24시간 동안 교반하였다. 최종적으로 메탄올로 침전시켜 탈보호된 트리-NTA-폴리스티렌(deprotected tri-NTA-polystyrene; tri-NTA-PS, 8')을 획득하였다.

[0212] 상기 제조예 4.1.에 따라 제조한 p-tri-NTA ATRP 개시제 (6')를 사용하여 115°C에서 용액상에서 스티렌의 중합 반응을 수행하였다(도 24). 아마이드 기반 개시제는 일반적으로 ATRP에서 개시 거동을 나타내므로, 할로젠 교환기법을 이용하여 중합반응을 수행하였다. 할로젠 교환반응에서, 상기 개시제와 함께 CuCl/dNbpy 촉매를 사용하였다. 이에 따라, 6'과 CuCl/dNbpy 촉매를 사용하여 ATRP에 의해 p-tri-NTA 폴리스티렌(p-tri-NTA-PS, 7')을 합성하였다.

[0213] 겔 투과 크로마토그래피 결과는 합성된 고분자의 분자량이 시간에 따라 증가함을 나타내었으며, 할로젠 교환기법을 사용함에도 불구하고 여분의 개시제의 존재로 인한 이중 피크가 나타났다(도 27). 그러나, 메탄올 침전에 의한 고분자 정제 후, 좁은 분산성을 갖는 대칭적인 하나의 용출 피크가 관찰되었다(Mn = 6400 및 'D = 1.15) (도 27).

[0214] 상기 합성된 tri-NTA가 결합된 폴리스티렌(7')에서 NTA 모이어티의 존재를 ¹H NMR(도 28A)과 ¹³C NMR(도 29A)로 확인하였다. 도 28에서 1.45 (a, (CH₃)₃-) 및 1.46 ppm (b, (CH₃)₃-)에서의 피크를 tert-부틸 양성자로 지정하였고, 2.8 (h, -CH₂-), 3.2 (d, -CH-), 3.45 (c, -CH₂-) 및 4.43 (m, -CH-Cl) ppm에서의 피크를 NTA 모이어티로 지정하였다. 이로부터 6'가 ATRP 개시제로서 성공적으로 사용되었음을 확인하였다. CH₂Cl₂에서 TFA로 7'의 tert-

부틸기를 제거함으로써 tri-NTA가 말단에 결합된 폴리스티렌(tri-NTA-PS, 8')을 제조하였다. 8'의 구조 또한 ¹H NMR(도 28B)과 ¹³C NMR(도 29B)으로 확인하였다.

[0215] 이와 같이 본 발명에서는 폴리스티렌의 α-체인 말단에서 3개의 NTA 모이어티를 도입하여 양친성의 선형-수지상 블록 공중합체(linear-dendritic block copolymer; 8')를 얻었다. 따라서, 본 발명자들은 수용액상에서 tri-NTA-PS(8')의 자가조립 거동을 연구해왔다. 실온에서 격렬히 교반하면서 유리 바이알 내에 THF에 용해시킨 tri-NTA-PS(8') 용액에 물을 서서히 첨가할 때, 자가조립된 입자가 형성되었다. TEM 및 DLS 측정을 통해 상기 입자는 구형이며, 균일하고 ~40 내지 60 nm의 직경을 갖는 것을 확인하였다(도 30). 이들 입자는 표면에 친수성 NTA 모이어티를 제공할 수 있으므로, 다양한 분야에 응용될 수 있다.

[0216] 3. tri-NTA-PS의 자가조립에 의한 고분자 입자의 제조

[0217] tri-NTA-PS(8, 2 mg, Mn (GPC) ~ 5,400)를 유리 바이알에서 1 ml의 건조 THF에 용해시켰다. 이후, 실온에서 격렬히 교반하면서 2 ml의 물을 서서히 첨가하였다. 물 첨가를 완료한 후, 반응 용액을 계속 교반하면서 TEM 및 DLS 측정을 통해 형태를 확인하였다.

[0218] **<실시예 13> 히스-태그된 단백질과 tri-NTA-PS의 결합에 의한 고분자-단백질 하이브리드 나노입자의 제조**

[0219] 니켈 착제화된 tri-NTA가 말단에 수식된 폴리스티렌(Ni-tri-NTA-PS, Mn ~24,500, 0.25 mg, 1.02×10⁻⁵ mmol)을 0.2 ml DMF에 용해시켰다. 상기 고분자 용액을 실린지 펌프를 사용하여 유리 바이알에서 실온(18℃)에서 교반하면서 His6-GFP(27 kDa, 207 μg, 7.7×10⁻⁶ mmol)를 포함하는 5 ml 탈이온수에 0.02 ml/h 속도로 천천히 첨가하였다. 수 방울의 PBS(50 mM, pH ~7.4)를 첨가하여 수용성 단백질 용액에 고분자 용액을 첨가하기 전에 pH를 7.4로 유지하였다. 고분자 용액 첨가를 완료한 후(10시간), 생성된 고분자-단백질 하이브리드 용액을 계속 교반하면서 자가조립된 형태를 DLS와 TEM으로 분석하였다.

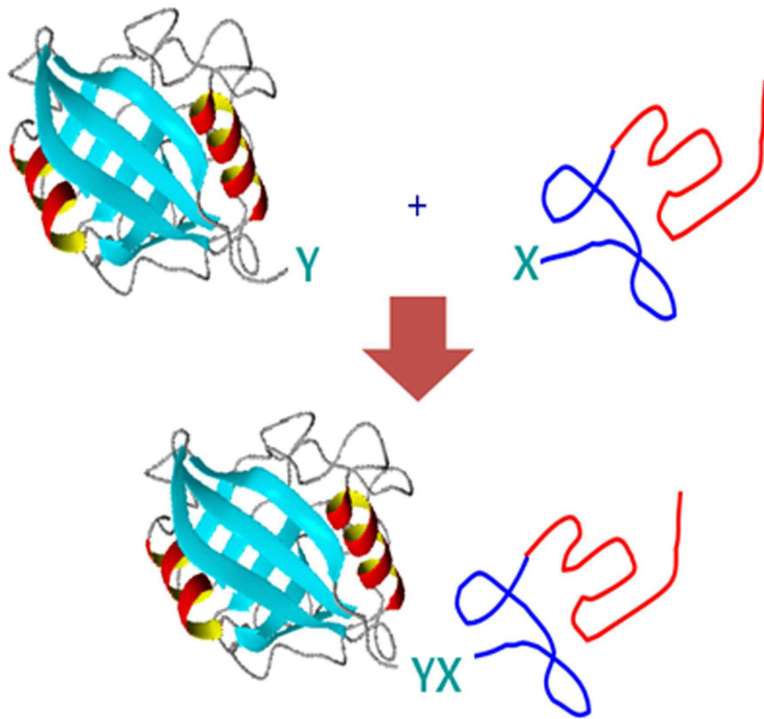
[0220] 진술한 단백질 코팅 고분자 나노입자의 제조방법에 따라, 니켈과 착제화한 후 물/DMF (DMF 4 vol%)에서 NTA-Ni/His 상호작용을 통해 His6-GFP와 콘쥬게이트된 tri-NTA-PS(8')의 자가조립된 형태를 연구하였다. 0.25 mg의 니켈 착제화된 tri-NTA-PS(Mn~24,500, 0.25 mg, 1.02×10⁻⁵ mmol)를 DMF(0.2 ml)에 용해시켜 제조한 고분자 용액에 His6-GFP(27 kDa, 207 μg, 7.7×10⁻⁶ mmol)을 포함하는 탈이온수(5 ml, pH 7.4)를 첨가하였을 때, 예상되는 바와 같이, ~90 내지 115 nm 크기의 구형 코어-셸 하이브리드 입자를 획득하였다. 상기 입자의 형태와 크기를 보여주는 DLS 데이터와 대표적인 TEM 이미지를 도 31에 나타내었다. 도 31의 TEM 이미지(우측)로부터 단백질 층으로 여겨지는 입자 외부의 층을 확인할 수 있었다. DLS 데이터 및 TEM 측정을 통해 물/DMF에서 이들 니켈 착제화된 트리-NTA-PS와 His6-GFP의 하이브리드 입자는 15일까지 안정하며 Ni-NTA-PS로부터 제조된 것과 매우 유사성을 나타내는 것을 확인하였다.

[0221] 결과적으로, 본 발명에서는 ATRP에 의한 tri-NTA-PS의 합성 및 물/DMF에서 His6-GFP와의 자가조립 뿐만 아니라 물/THF에서 고분자 자체의 자가조립을 확인하였다. 먼저, tert-부틸 보호된 NTA-기반 아마이드성 개시제를 제조하고 ¹H NMR, ¹³C NMR, GPC 및 MALDI-TOF 질량분광법으로 특성을 분석하였다. 폴리스티렌의 α-체인 말단으로부터 tert-부틸기를 제거하여 탈보호된 트리-NTA가 말단에 결합된 폴리스티렌(tri-NTA-PS)을 제조하였다. tri-NTA-PS는 이의 양친성으로 인해 자체로 자가조립하여 물/THF에서 ~40 내지 60 nm 직경의 구형 입자를 형성하는 한편, 니켈 착제화된 tri-NTA-PS는 His6-GFP와 NTA-Ni/His 상호작용을 통해 물/DMF에서 ~90 내지 115 nm 직경의 구형 코어-셸 하이브리드 입자를 형성하였다.

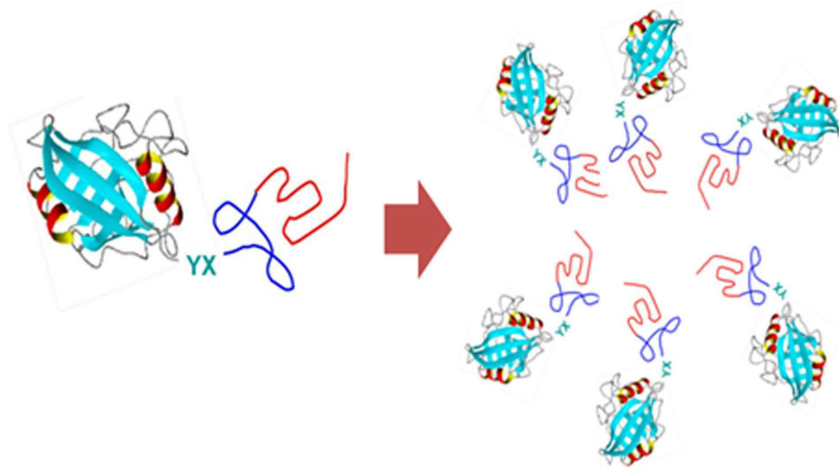
[0222] tri-NTA-PS는 3개의 NTA 모이어티를 포함하므로, 수지상이며 보다 양친성을 띠게 된다. 이는, 본 발명에 따른 고분자-단백질 하이브리드 입자 또는 단백질 케이지가 유사한 응용에 유용하게 사용될 수 있으며, 특히 고분자 자체의 다양한 자가조립된 형태의 생성, 나노입자, 염료 등의 소수성 첨가물의 봉입, 표적약물전달 및 단백질 정제에 활용될 수 있음을 나타내는 바이다.

도면

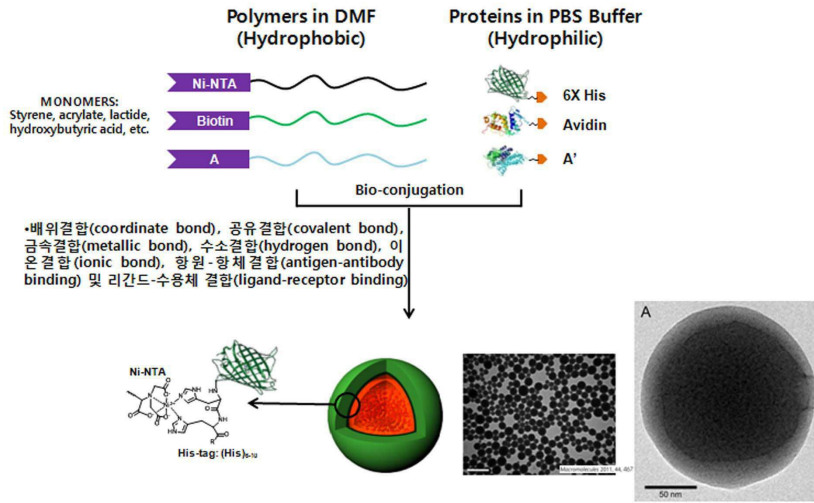
도면1a



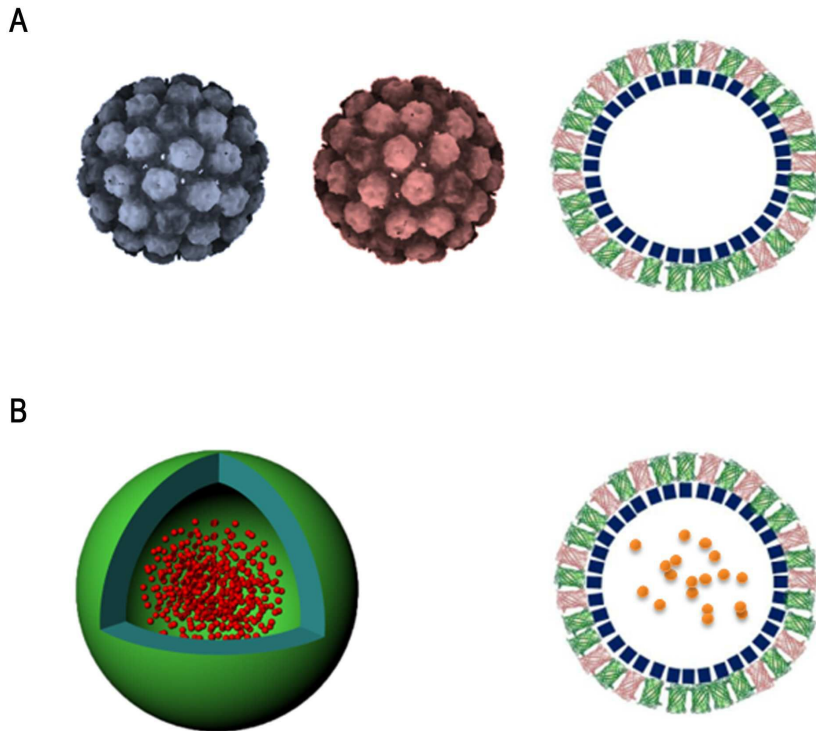
도면1b



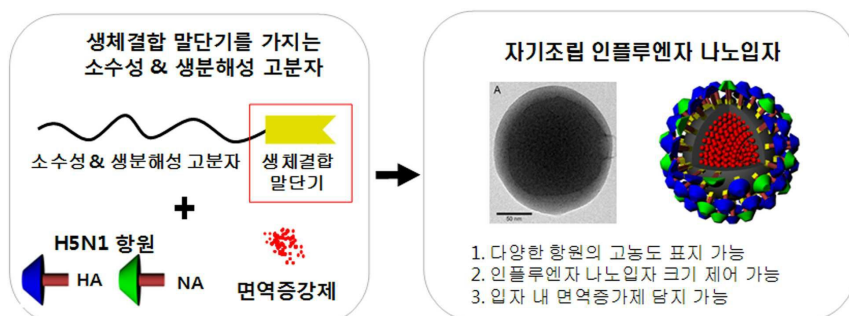
도면1c



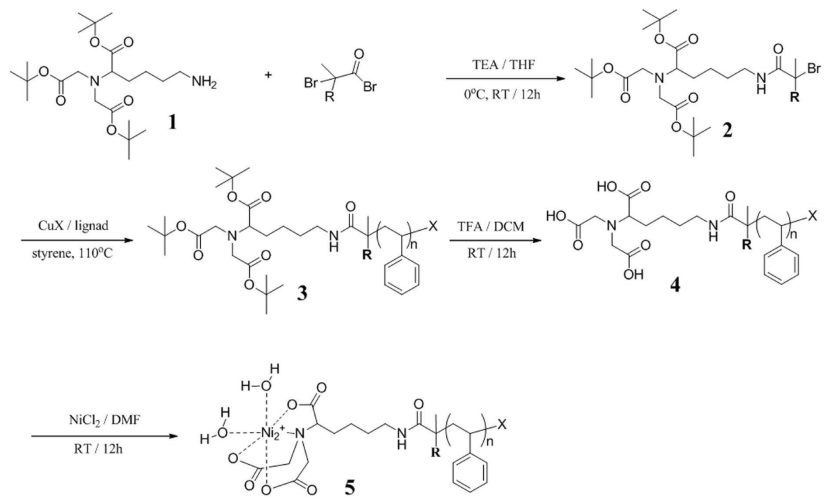
도면2



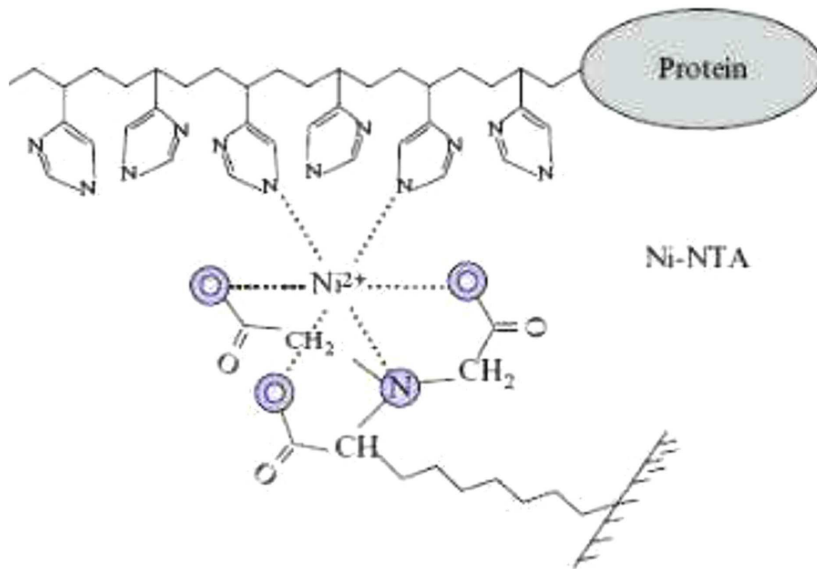
도면3



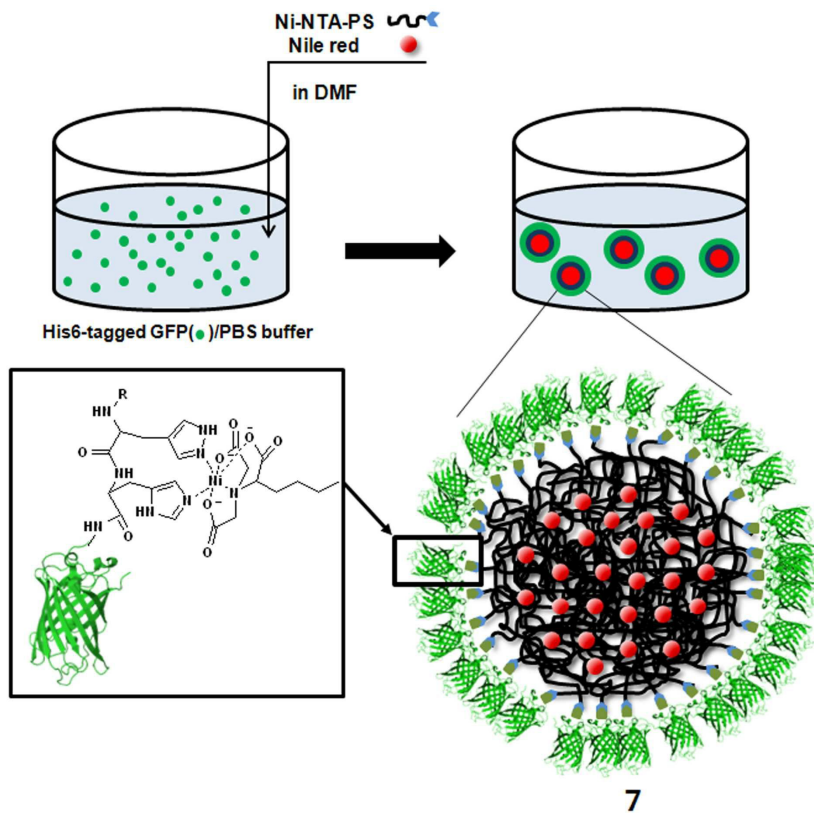
도면4a



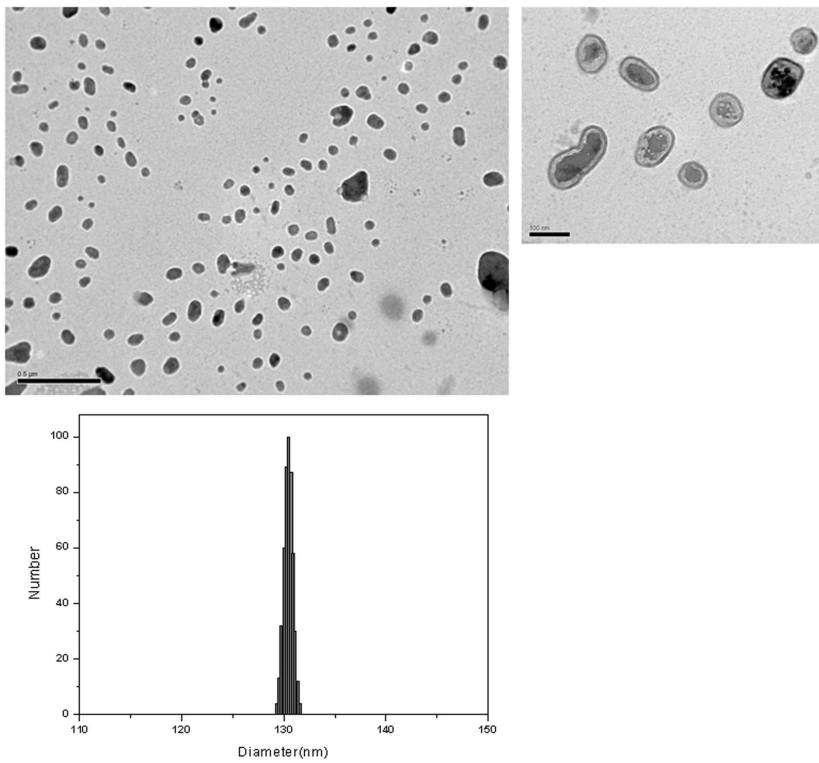
도면4b



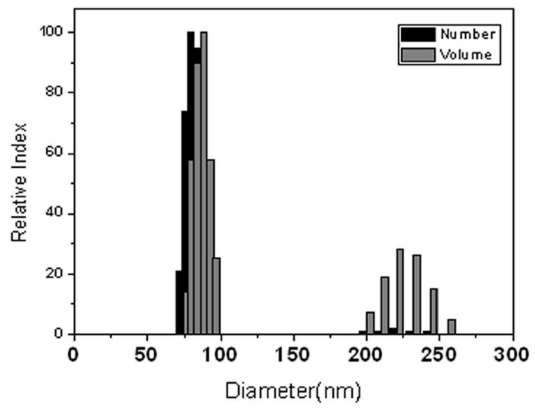
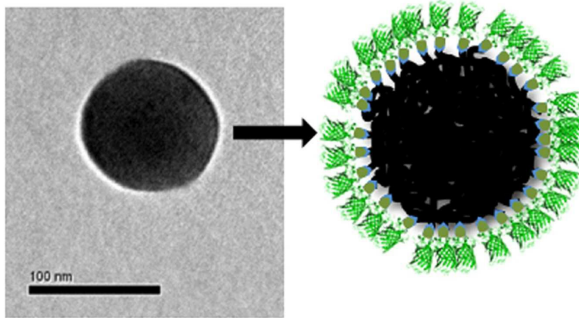
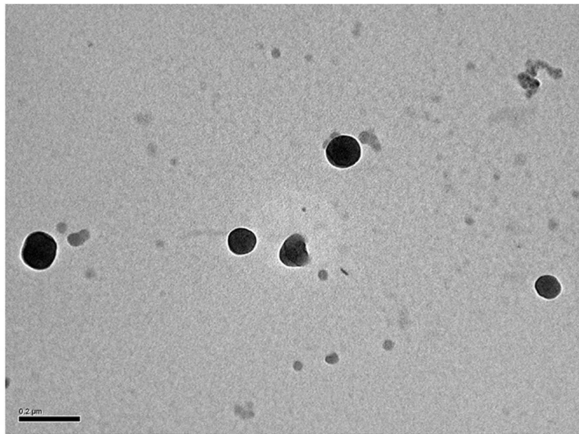
도면4c



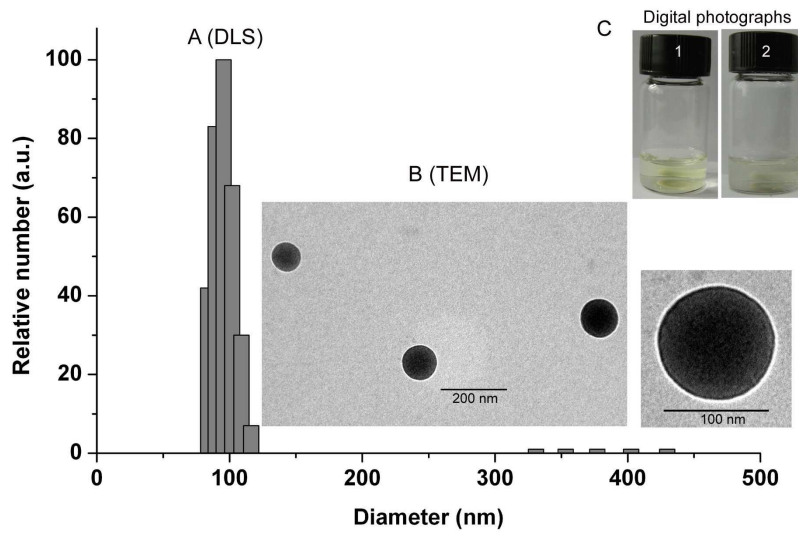
도면5



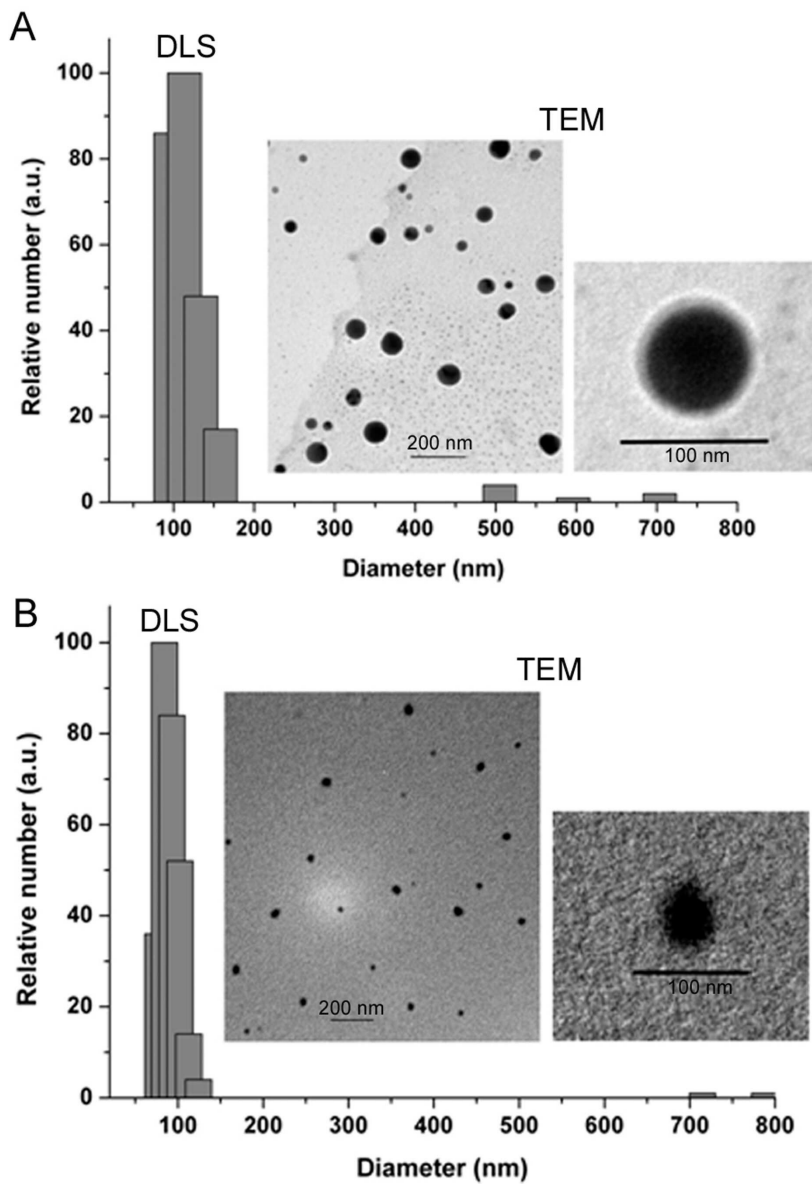
도면6



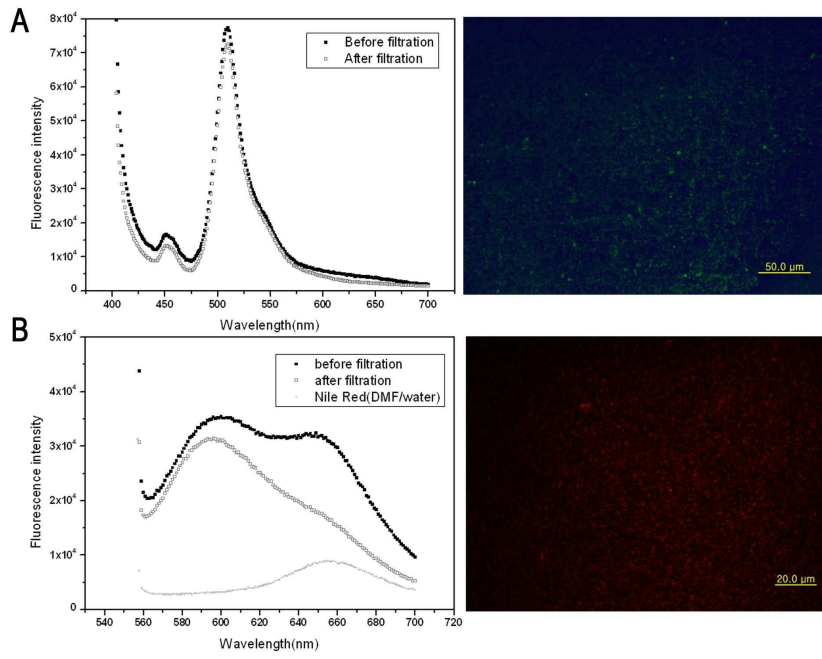
도면7



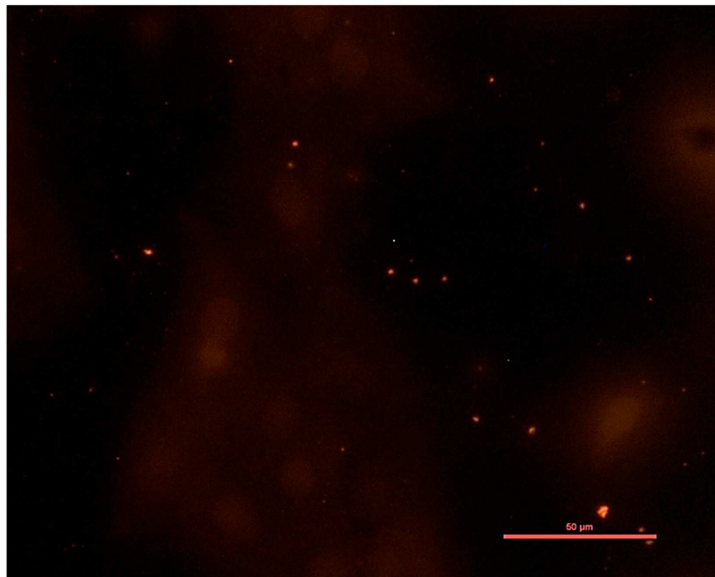
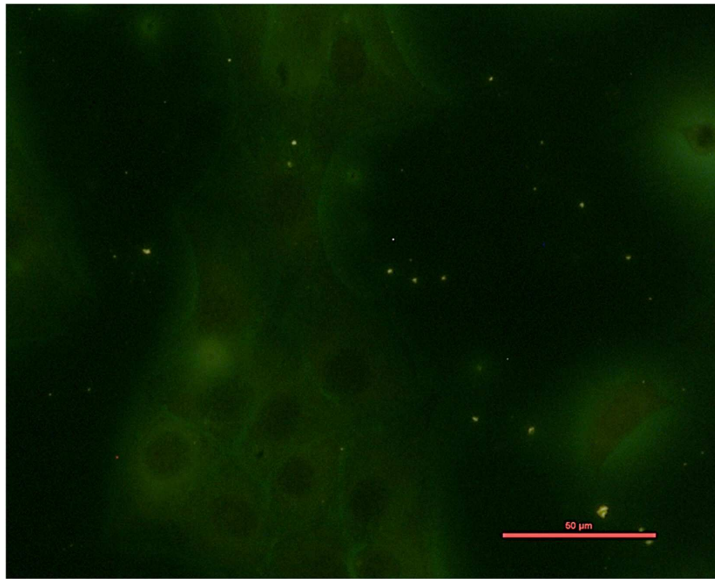
도면8



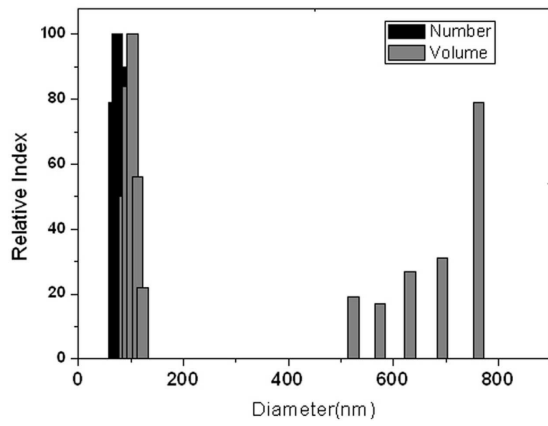
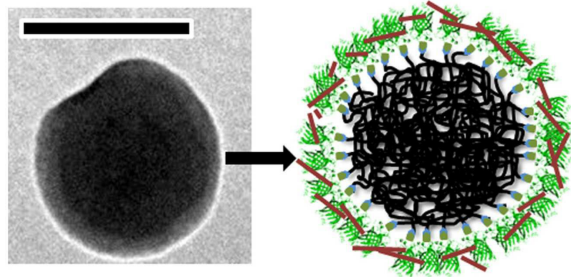
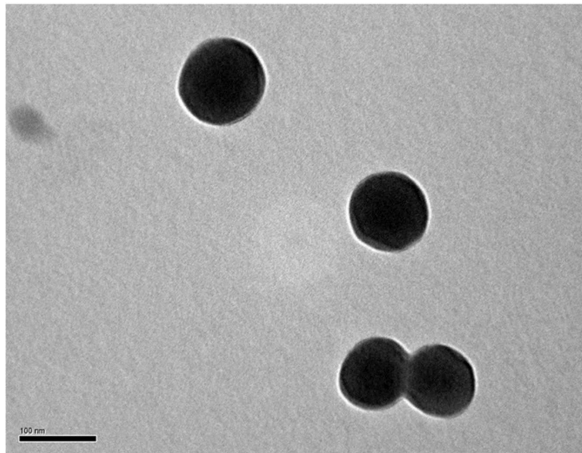
도면9



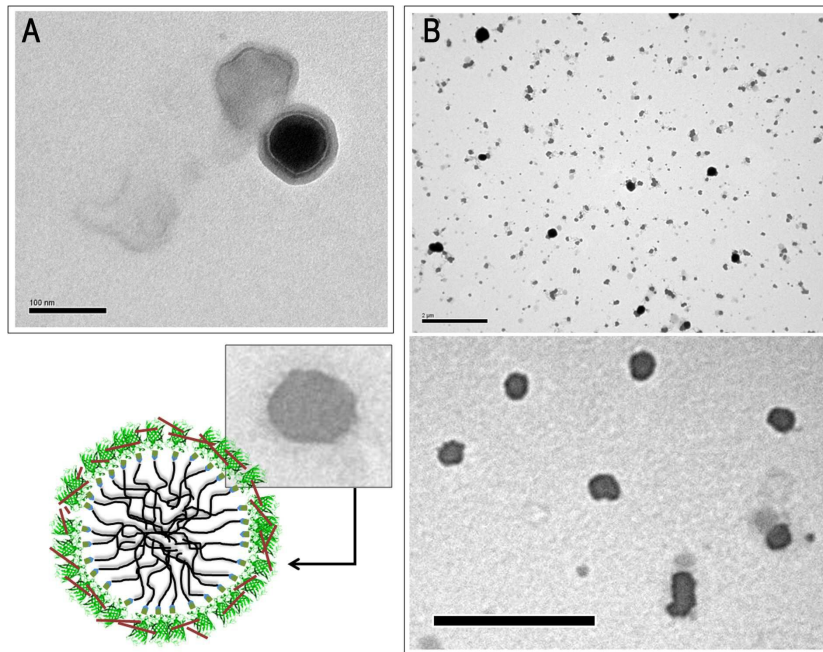
도면10



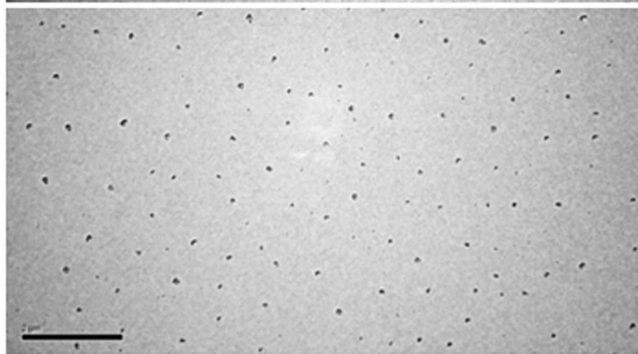
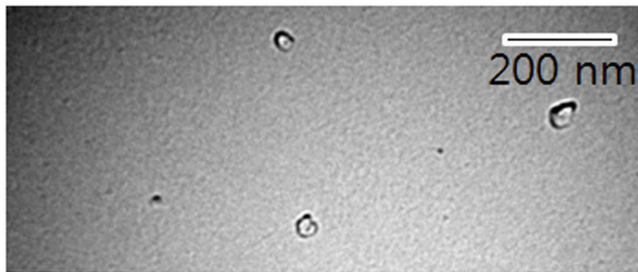
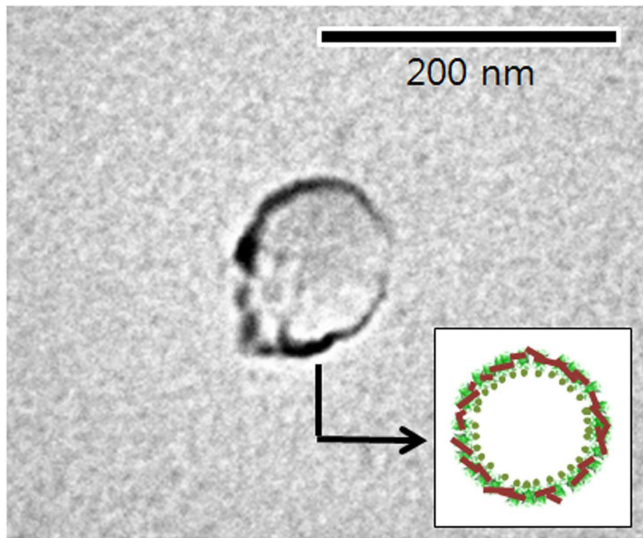
도면12



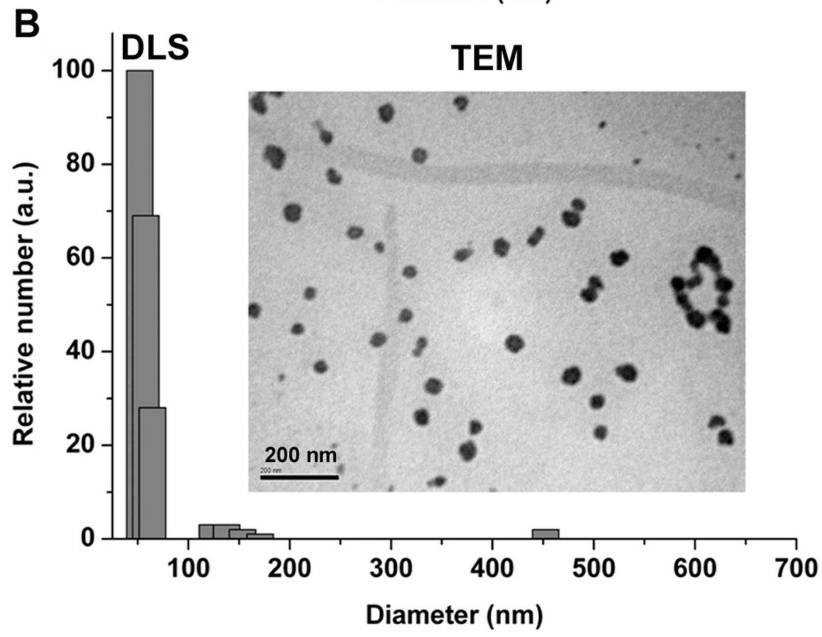
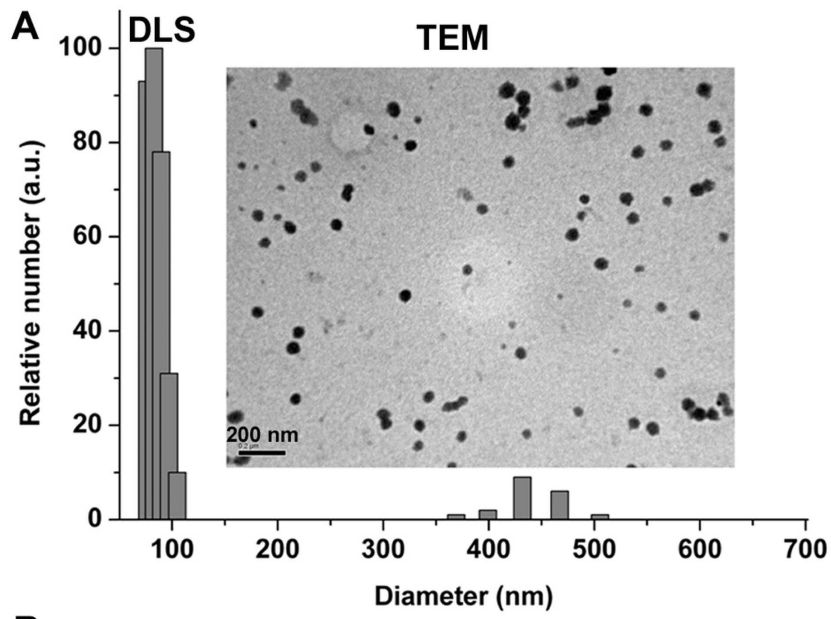
도면13



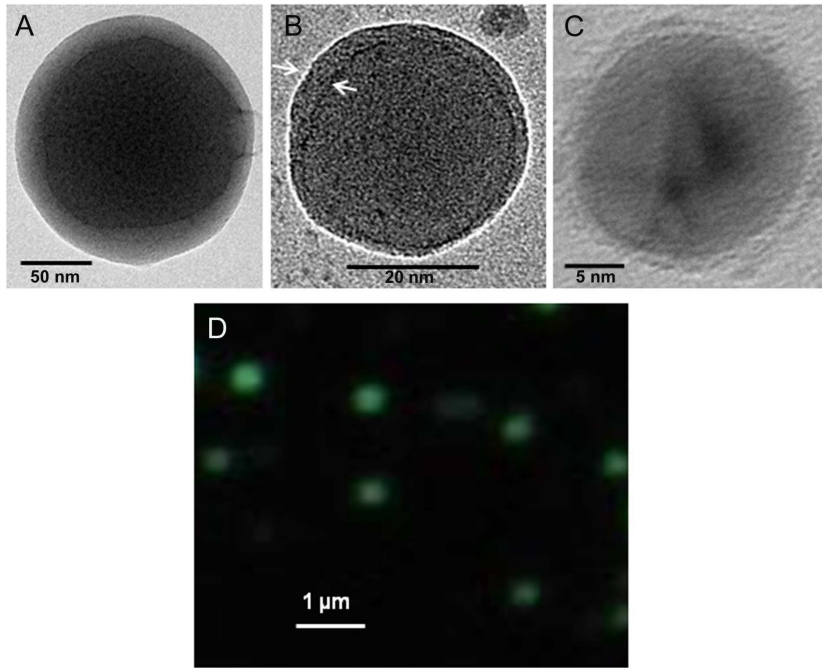
도면14



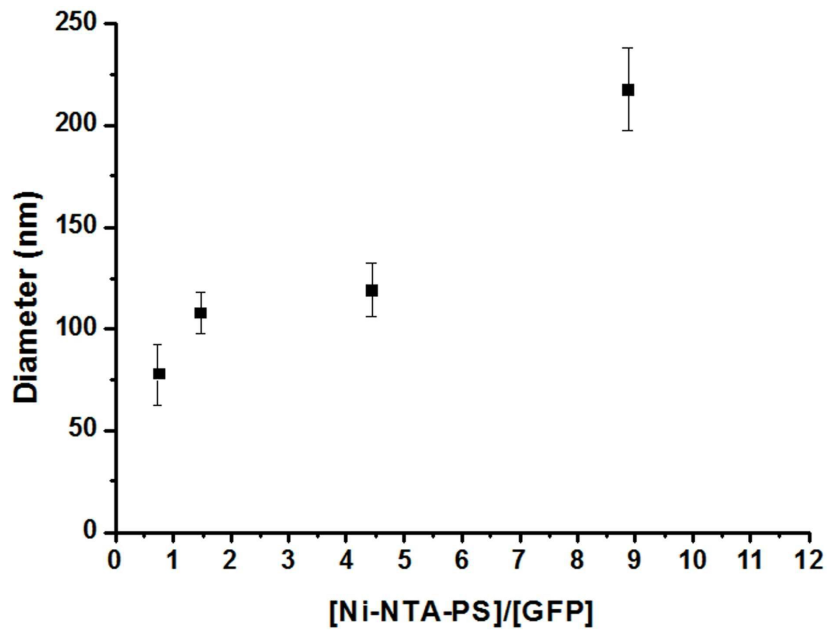
도면15



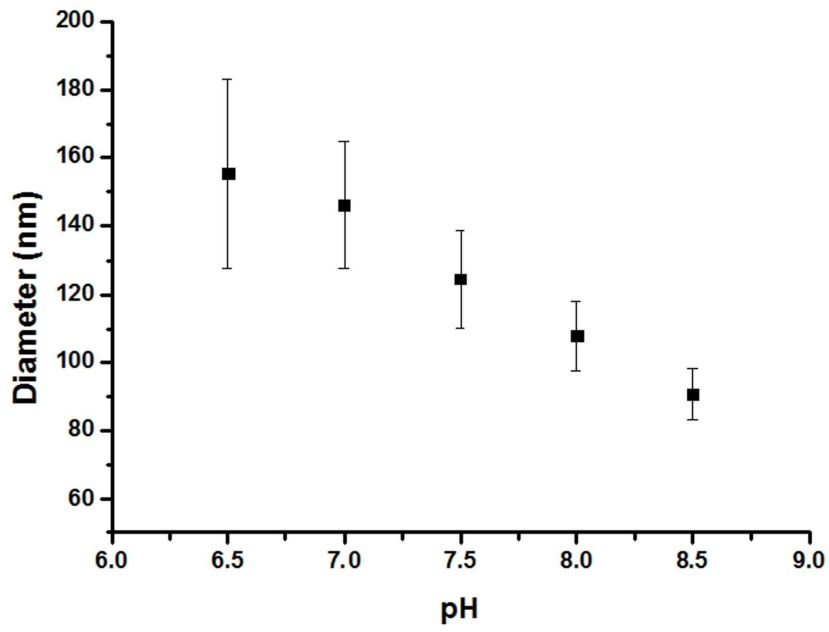
도면16



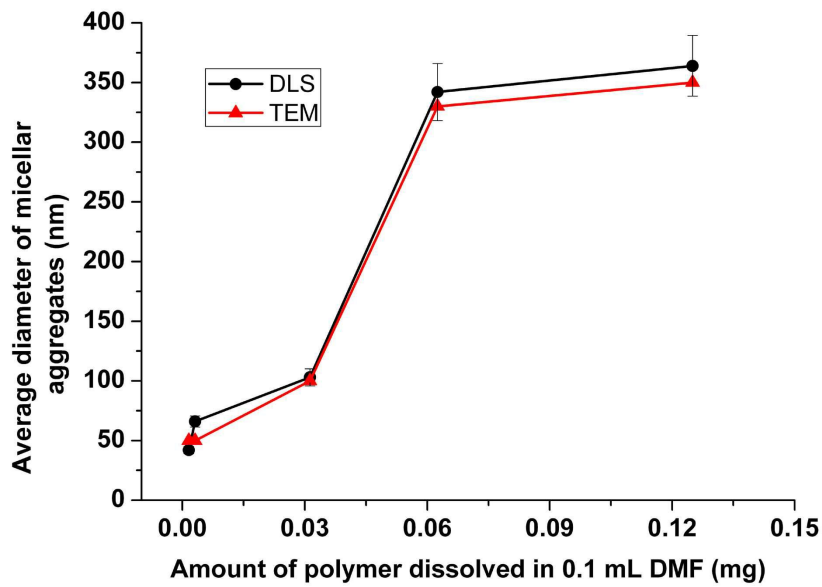
도면17



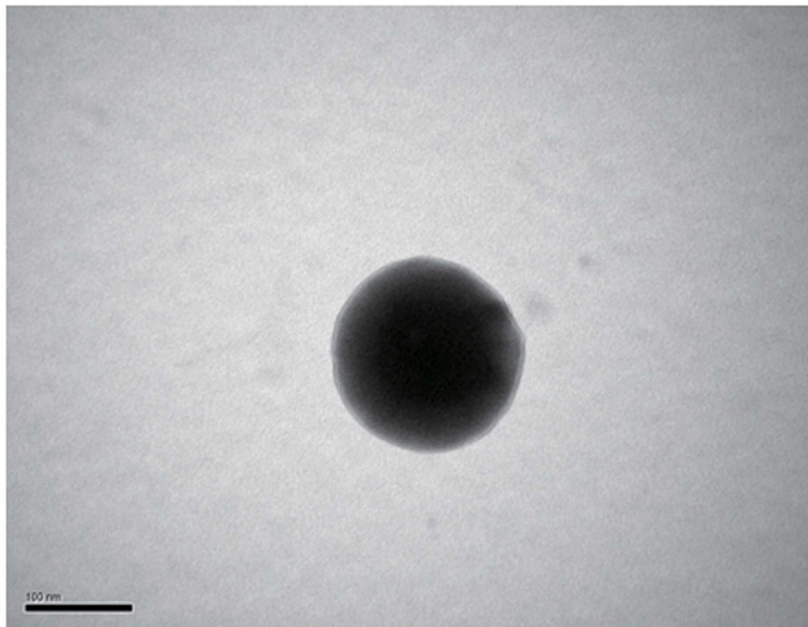
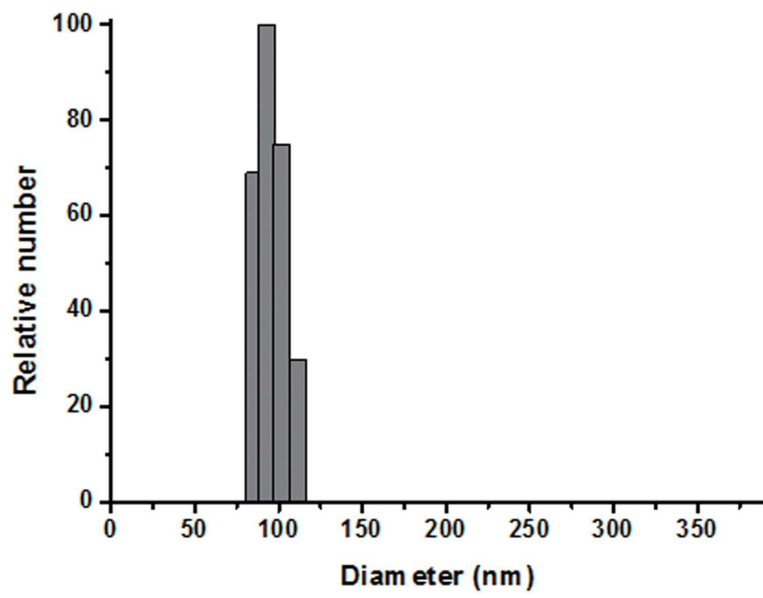
도면18



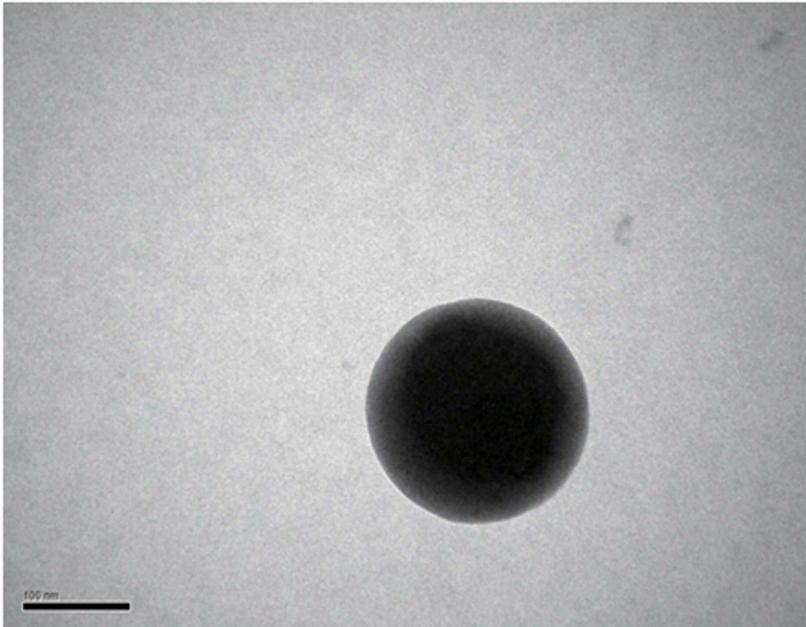
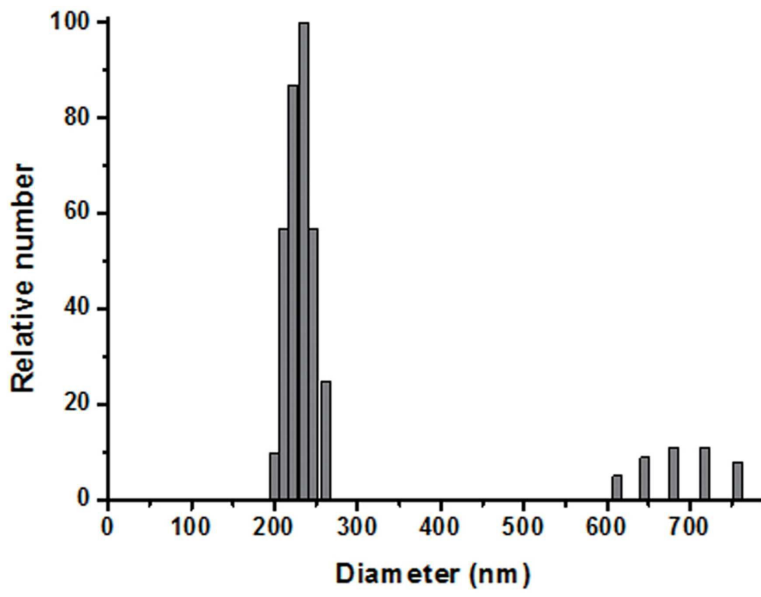
도면19



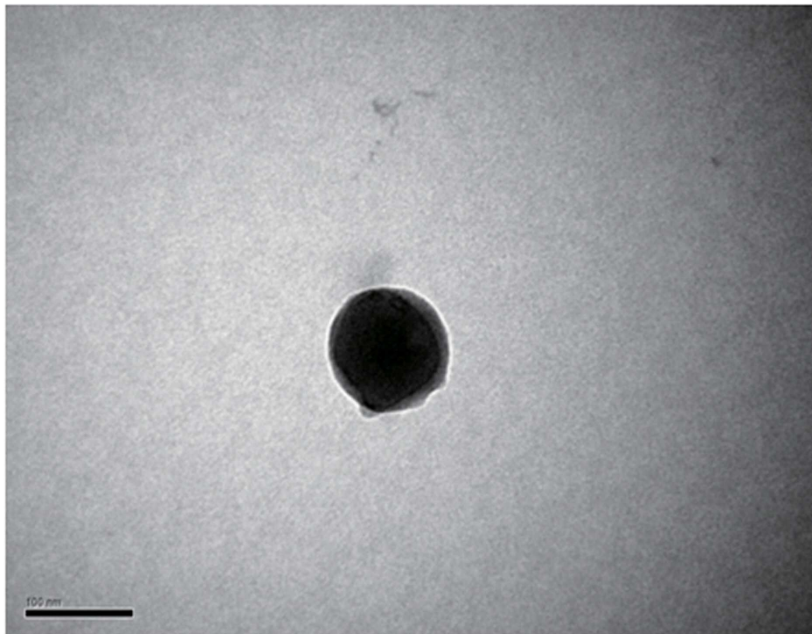
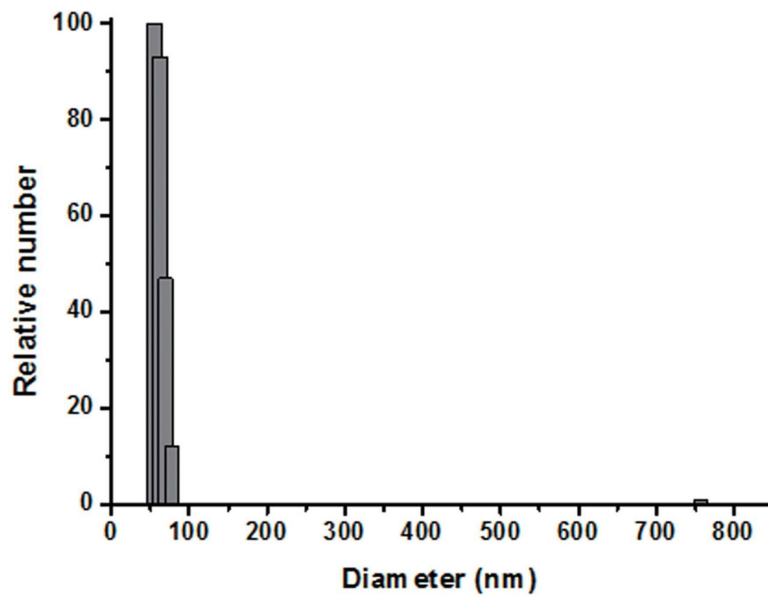
도면20



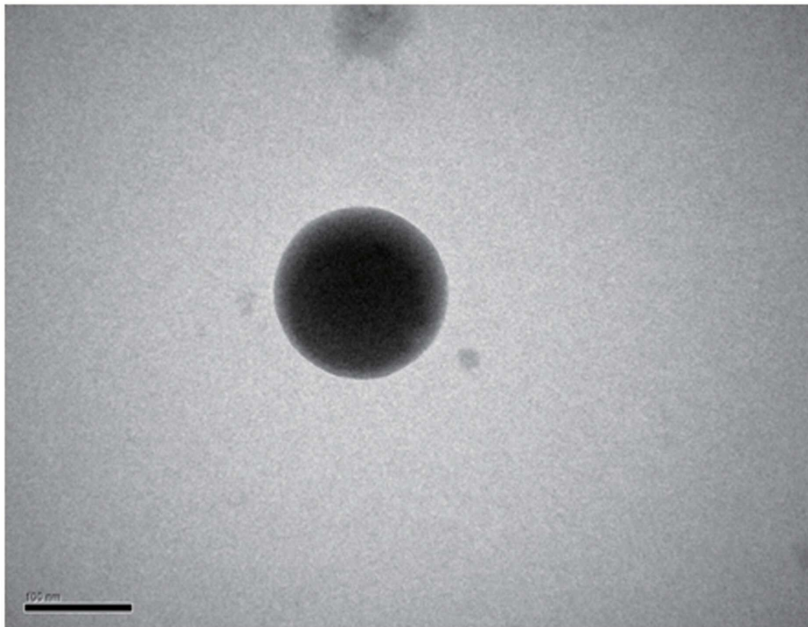
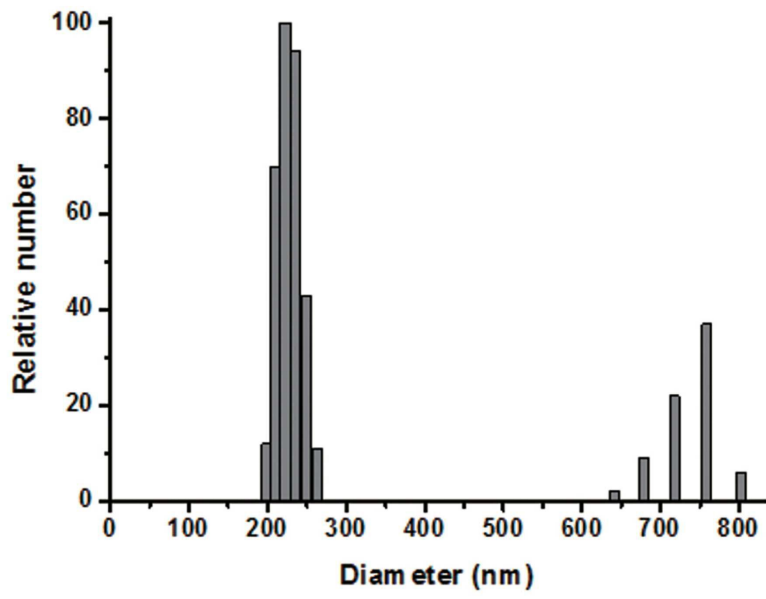
도면21



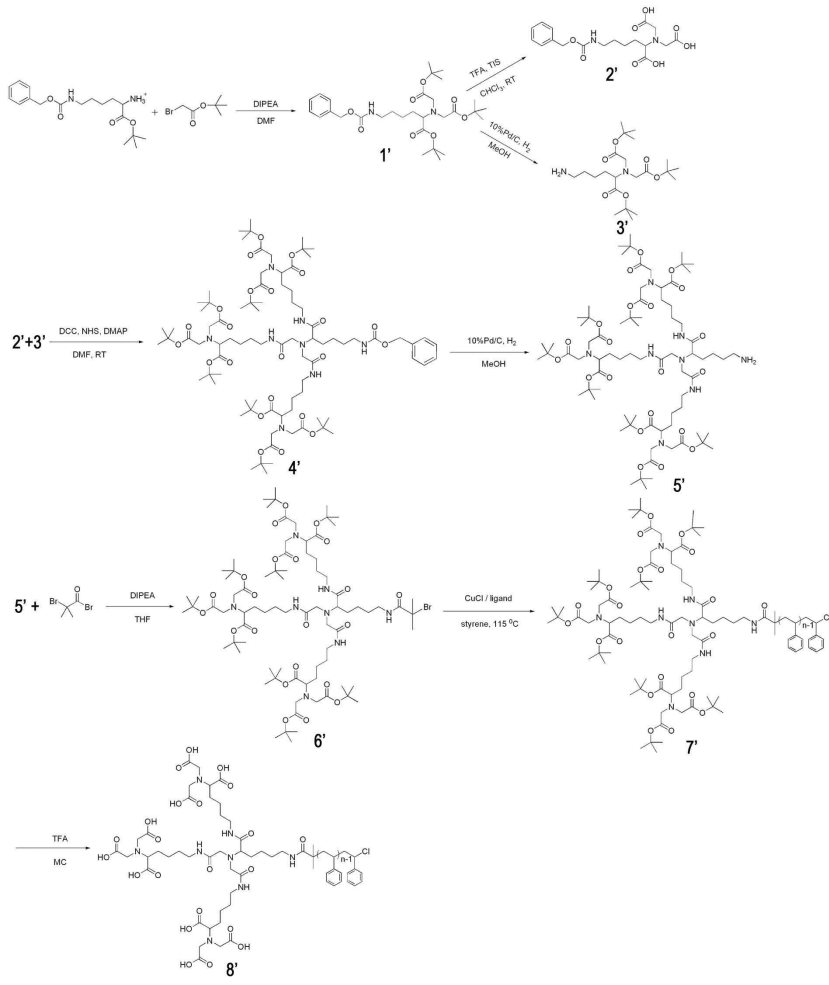
도면22



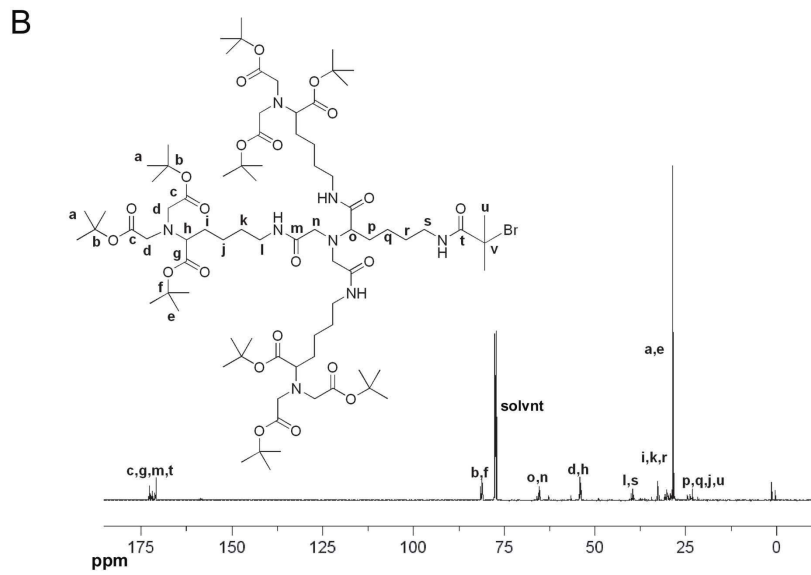
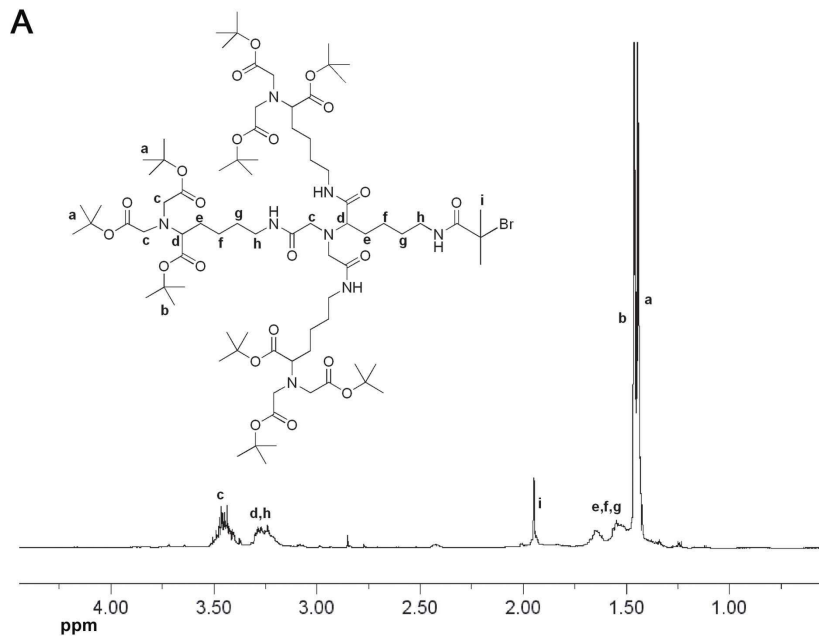
도면23



도면24

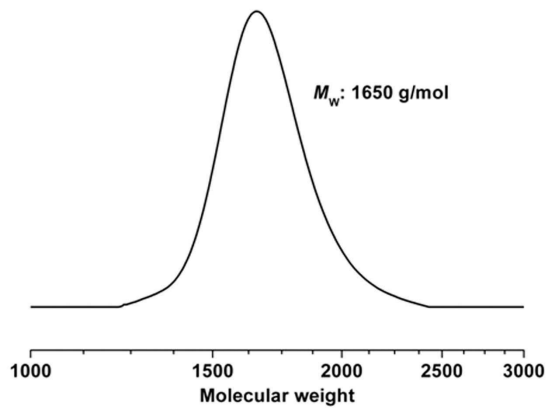


도면25

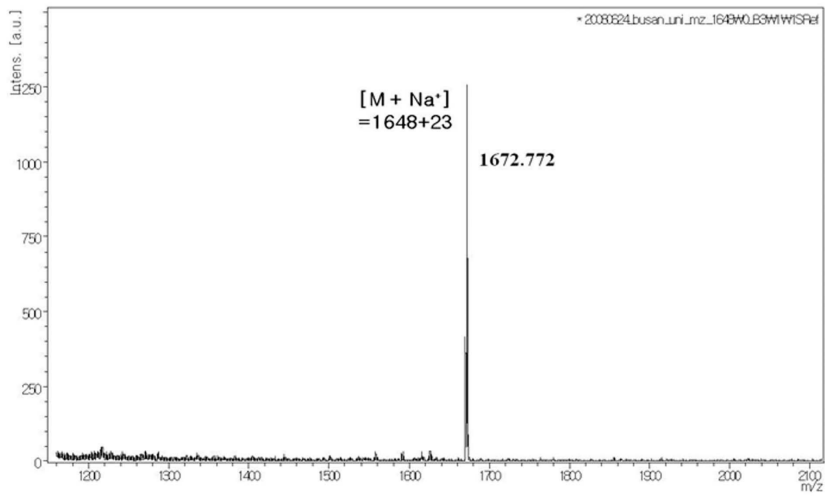


도면26

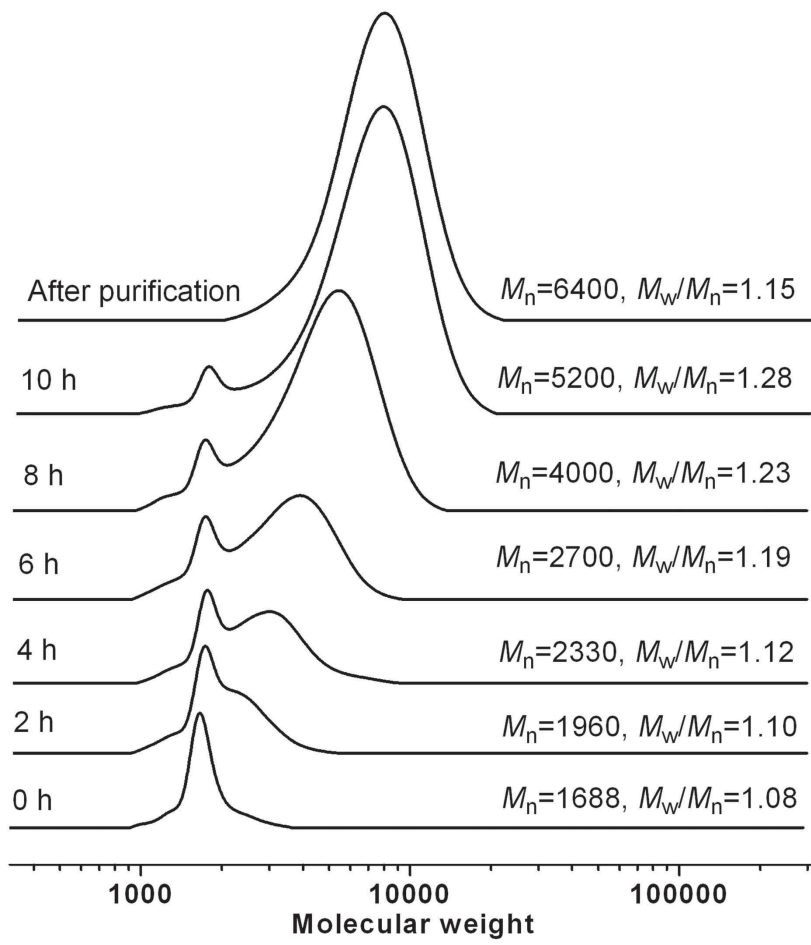
A



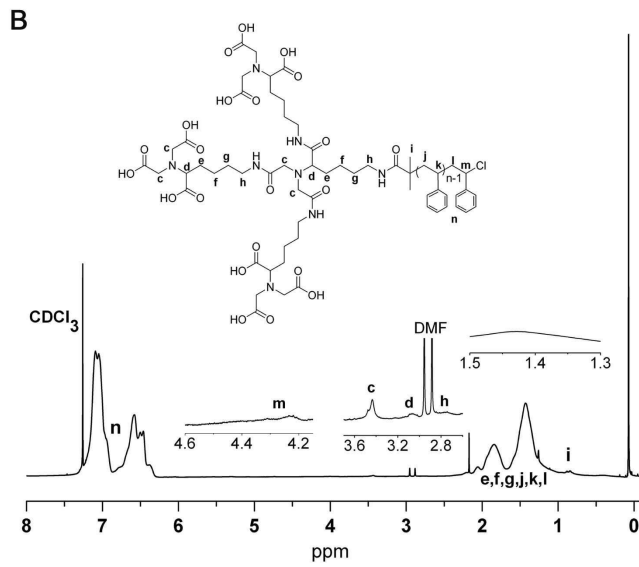
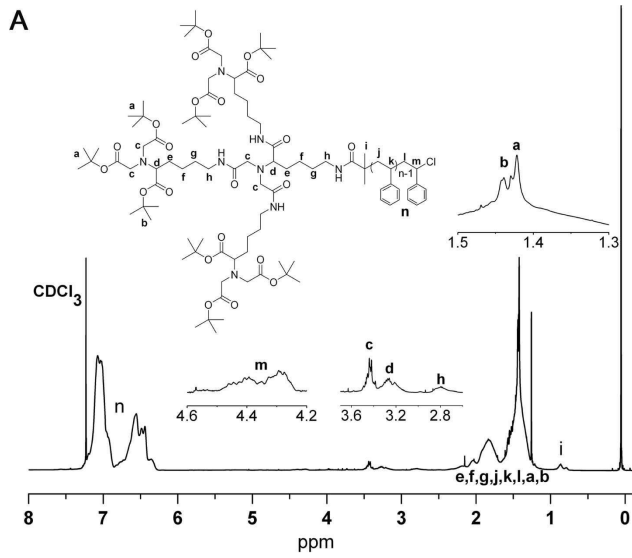
B



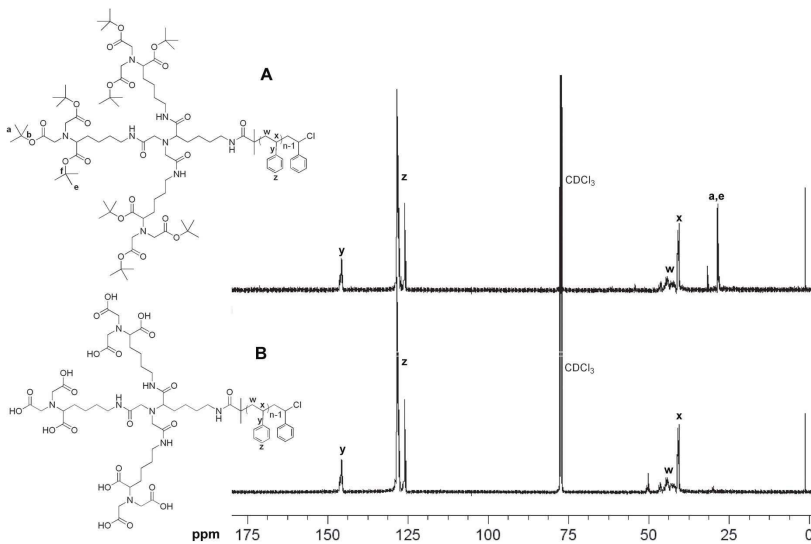
도면27



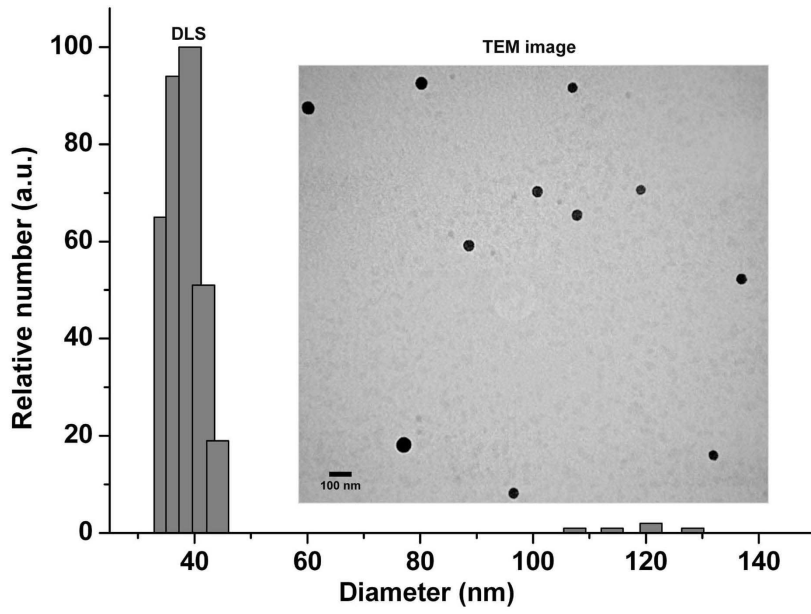
도면28



도면29



도면30



도면31

