



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0049724
(43) 공개일자 2011년05월12일

(51) Int. Cl.

C07K 14/47 (2006.01) C07K 17/14 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0108877

(22) 출원일자 2010년11월03일

심사청구일자 2010년11월03일

(30) 우선권주장

1020090105510 2009년11월03일 대한민국(KR)

(71) 출원인

서울대학교산학협력단

서울 관악구 신림동 산 56-1

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

조남혁

서울특별시 중랑구 면목2동 면목한신아파트 8-810

정택진

경기도 고양시 일산동구 마두1동 854-1 203호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인다나

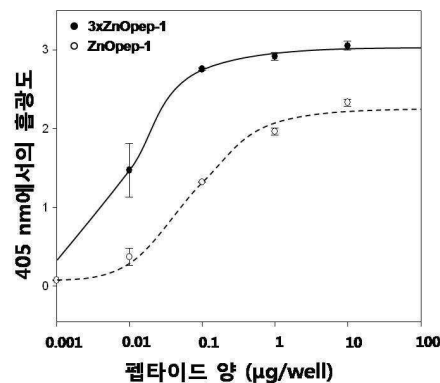
전체 청구항 수 : 총 38 항

(54) 산화아연-결합성 펩타이드를 포함하는 단백질과 산화아연 나노입자의 복합체 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 산화아연-결합성 펩타이드를 포함하는 단백질과 산화아연 나노입자의 복합체, 의약의 제조를 위한 약물전달체로서의 그의 용도, 상기 복합체를 포함하는 백신 조성물 및 조영제를 제공한다. 산화아연-결합성 펩타이드를 포함하는 단백질은 산화아연 나노입자의 생체 내 활용성을 현저히 개선시키므로, 상기 복합체는 의약의 생체 내 또는 세포 내 전달을 위한 약물전달체로서 사용할 수 있을 뿐만 아니라 생체 또는 세포의 이미징을 위해 사용할 수 있으며, 생물체제를 효과적으로 분리할 수 있는 분리제, 온열치료를 비롯한 치료제, MRI 조영제, 바이오센서에 응용 가능한 비드(bead)의 제조를 위한 용도를 추가로 제공한다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

성승용

서울특별시 강남구 대치동 우성아파트 7동 1302호

민지현

서울특별시 관악구 삼성동 1693 국제산장아파트
106동 1401호

우준화

서울특별시 성북구 안암동5가 1번지 고려대학교 외
국인교원기숙사 W445호

김영근

서울특별시 강남구 압구정2동 한양아파트 72동
1109호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0081506

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 미래유망파이오니어 사업

연구과제명 자성천이와 영속발광 특성을 갖는 복합기능 마그네틱-포토닉 나노결정을 활용한 바이오
메디컬 혁신기술 개발

기여율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2008.07.01 ~ 2014.02.28

특허청구의 범위

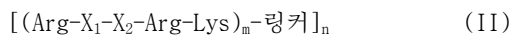
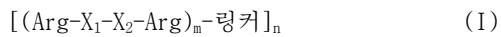
청구항 1

산화아연-결합성 펩타이드를 포함하는 단백질과 산화아연 나노입자의 복합체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 산화아연-결합성 펩타이드는 하기 식 (I) 또는 (II)의 구조를 갖는 것인 복합체:



상기 식에서,

X_1 은 Pro, Ala, Thr, Gln, 또는 Ile이고,

X_2 는 His, Ile, Asn, 또는 Arg이며,

m 은 1 내지 5의 정수이고,

n 은 1 내지 100의 정수이다.

청구항 3

제2항에 있어서,

X_1 은 Pro 또는 Thr이고,

X_2 는 His이며,

m 은 1 내지 5의 정수이고,

n 은 3 내지 50의 정수인 복합체.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 산화아연-결합성 펩타이드가 서열번호 1 내지 4 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드인 복합체.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 복합체에 추가로 단백질, DNA, RNA, 화합물 의약 및 조영 물질로 이루어진 군으로부터 선택되는 약물이 도입되어 있는 복합체.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 복합체의 표면에 표적 지향성 리간드가 결합되어 있는 것인 복합체.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 단백질은 산화아연-결합성 펩타이드와 항원을 포함하는 재조합 단백질인 복합체.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 항원은 종양 항원인 복합체.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 종양항원은 암종배아항원, 서바이빈, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-12, BAGE, GAGE, NY-ESO-1, 티로시나아제, TRP-1, TRP-2, gp100, MART-1, MC1R, Ig 이디오타입, CDK4, 카스파제-9, 베타-카테닌, CIA, BCR/ABL, 변이된 p21/ras, 변이된 p53, 프로테나아제 3, WT1, MUC-1, 정상 p53, Her2/neu, PAP, PSA, PSMA, G250, HPV E6/E7, EBV LMP2a, HCV, HHV-8, 알파-페토프로테인, 5T4, 옹코-트로포블라스트 및 글라이코프로테인으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 복합체.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 산화아연 나노입자는 코어-셸 구조를 갖는 것인 복합체.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 코어는 금속 물질(metal material), 자성 물질(magnetic material), 자성 합금(magnetic alloy) 또는 반도체 물질(semiconductor material)로 이루어져 있고, 셸은 산화아연으로 이루어진 것인 복합체.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 코어는 T1 또는 T2 조영물질로 이루어져 있고, 셸은 산화아연으로 이루어진 것인 복합체.

청구항 13

제10항에 있어서,

상기 코어는 산화철로 이루어져 있고, 셸은 산화아연으로 이루어진 것인 복합체.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 복합체를 약물전달체로서 포함하는 의약 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 의약 조성물은 단백질, DNA, RNA, 화합물 의약 및 조영 물질로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 약물을 포함하는 것인 의약 조성물.

청구항 16

약물을 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 복합체와 혼합하거나 상기 복합체에 결합시키는 것을 포함하는 약물과 상기 복합체를 포함하는 의약 조성물의 제조방법.

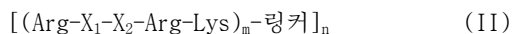
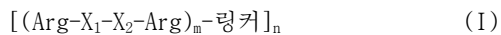
청구항 17

산화아연-결합성 펩타이드 및 항원을 포함하는 단백질 및 산화아연 나노입자의 복합체를 포함하는 백신 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 산화아연-결합성 펩타이드는 하기 식 (I) 또는 (II)의 구조를 갖는 것인 백신 조성물:



상기 식에서,

X₁은 Pro, Ala, Thr, Gln, 또는 Ile이고,

X₂는 His, Ile, Asn, 또는 Arg이며,

m은 1 내지 5의 정수이고,

n은 1 내지 100의 정수이다.

청구항 19

제17항에 있어서,

상기 항원은 종양 항원인 백신 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서,

상기 종양 항원은 암종배아항원, 서바이빈, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-12, BAGE, GAGE, NY-ESO-1, 티로시나아제, TRP-1, TRP-2, gp100, MART-1, MC1R, Ig 이디오타입, CDK4, 카스파제-9, 베타-카테닌, CIA, BCR/ABL, 변이된 p21/ras, 변이된 p53, 프로테나아제 3, WT1, MUC-1, 정상 p53, Her2/neu, PAP, PSA, PSMA, G250, HPV

E6/E7, EBV LMP2a, HCV, HHV-8, 알파-페토프로테인, 5T4, 옹코-트로포블라스트 및 글라이코프로테인으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 백신 조성물.

청구항 21

제17항에 있어서,
상기 백신 조성물은 암의 치료 또는 예방을 위한 것인 백신 조성물.

청구항 22

제17항에 있어서,
상기 백신 조성물은 추가로 면역세포를 포함하는 것인 백신 조성물.

청구항 23

제17항에 있어서,
상기 백신 조성물은 상기 복합체가 도입된 면역세포를 포함하는 것인 백신 조성물.

청구항 24

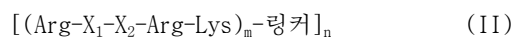
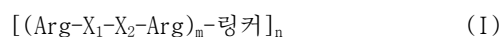
제22항 또는 제23항에 있어서,
상기 면역세포는 수지상세포, T 세포 또는 NK 세포인 백신 조성물.

청구항 25

산화아연-결합성 펩타이드를 포함하는 단백질 및 산화아연 나노입자의 복합체를 포함하는 조영제.

청구항 26

제25항에 있어서,
산화아연-결합성 펩타이드는 하기 식 (I) 또는 (II)의 구조를 갖는 것인 조영제:



상기 식에서,
 X_1 은 Pro, Ala, Thr, Gln, 또는 Ile이고,
 X_2 는 His, Ile, Asn, 또는 Arg이며,
 m 은 1 내지 5의 정수이고,
 n 은 1 내지 100의 정수이다.

청구항 27

제25항에 있어서,

상기 복합체의 표면에 표적 지향성 리간드가 결합되어 있는 것인 조영제.

청구항 28

제25항에 있어서,

상기 단백질은 상기 산화아연-결합성 펩타이드 및 항원을 포함하는 것인 조영제.

청구항 29

제28항에 있어서,

상기 항원은 종양 항원인 조영제.

청구항 30

제29항에 있어서,

상기 종양 항원은 암종배아항원, 서바이빈, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-12, BAGE, GAGE, NY-ESO-1, 티로시나아제, TRP-1, TRP-2, gp100, MART-1, MC1R, Ig 이디오타입, CDK4, 카스파제-9, 베타-카테닌, CIA, BCR/ABL, 변이된 p21/ras, 변이된 p53, 프로테아아제 3, WT1, MUC-1, 정상 p53, Her2/neu, PAP, PSA, PSMA, G250, HPV E6/E7, EBV LMP2a, HCV, HHV-8, 알파-페토프로테인, 5T4, 옹코-트로포블라스트 및 글라이코프로테인으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조영제.

청구항 31

제25항에 있어서,

상기 산화아연 나노입자는 코어-셸 구조를 갖는 것인 조영제.

청구항 32

제31항에 있어서,

상기 코어는 금속 물질(metal material), 자성 물질(magnetic material), 자성 합금(magnetic alloy) 또는 반도체 물질(semiconductor material)로 이루어져 있고, 셸은 산화아연으로 이루어진 것인 조영제.

청구항 33

제31항에 있어서,

상기 코어는 T1 또는 T2 조영물질로 이루어져 있고, 셸은 산화아연으로 이루어진 것인 조영제.

청구항 34

제31항에 있어서,

상기 코어는 산화철로 이루어져 있고, 셸은 산화아연으로 이루어진 것인 조영제.

청구항 35

제25항에 있어서,

상기 단백질은 상기 산화아연-결합성 펩타이드 및 항체를 포함하는 것인 조영제.

청구항 36

제35항에 있어서,

상기 항체는 종양 항원을 타겟으로 하는 것인 조영제.

청구항 37

제25항에 있어서,

상기 복합체에 단백질, DNA, RNA, 화합물 의약 및 조영 물질로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 약물이 물리적 또는 화학적으로 결합되어 있는 것인 조영제.

청구항 38

제37항에 있어서,

상기 조영 물질은 형광 물질, 방사성 동위원소 또는 양자점인 조영제.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 산화아연-결합성 펩타이드를 포함하는 단백질과 산화아연 나노입자의 복합체, 의약의 제조를 위한 약물전달체로서의 그의 용도, 상기 복합체를 포함하는 백신 조성물 및 조영제에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 나노 기술은 다양한 분야에서 응용되고 있으며, 특히 의료 분야와 생명공학 분야에서 가장 널리 이용되고 있다. 의료 분야에서는 나노 기술을 이용하여 진단과 치료의 혁명을 가능케 하는 빠르고 효과적인 염기서열 분석, 또는 인체 질병을 진단 및 예방할 수 있는 나노 감지 분석에 응용되고 있으며, 생명공학 분야에서는 유전자나 약물의 전달, 또는 나노 배열을 기반으로 한 분석기술 등에 활용되고 있다.

[0003] 현재, 여러 가지 소재들이 다양한 크기의 나노 입자를 제조하는데 사용되고 있으며, 이러한 나노입자들은 면역 치료, 자기공명영상(Magnetic Resonance Imaging, MRI) 진단, 약물 전달 체계 개발 등에 활용되고 있다.

[0004] 이 중 산화아연 나노입자는 그 전기적, 광학적 특성 때문에 요업분야, 전기 소재 분야, 센서, 의생물학 분야에 널리 사용되고 있다. 특히 최근에 와서는 산화아연과 유기물질을 이용한 나노구조체 합성을 통하여 생물학적 감지 장치 등을 개발하는데 폭넓게 활용되고 있으며, 인체 위해성이 낮기 때문에(식품 첨가물로서 미국 FDA의 사용 허가 물질) 식품, 의약품 산업 분야에서 연고, 색소, 식품 첨가물 등으로도 널리 사용되고 있다. 따라서 생체 적용 가능성이 매우 높은 소재로서 각광을 받고 있으며, 향후 다양한 의생명공학 분야에의 활용이 기대되고 있다.

[0005] 산화아연 나노입자를 의생명공학 분야에 활용하기 위해서는 단백질 등의 생체 고분자들과 결합시키는 과정이 필요하다. 그러나, 이 소재 자체가 다른 유기물질들과 강하게 결합하지 않는 특성 때문에 대부분의 경우에 있어서 산화아연 나노입자의 표면을 화학적으로 처리하는 제조 공정이 도입되고 있다.

[0006] 그러나, 이러한 산화아연 나노입자의 표면 처리 과정은 유기용매 또는 화학적 반응성이 높은 화합물들을 사용해

야 하기 때문에 인체에 직접 사용될 수 있는 나노입자 또는 구조체의 제조 및 활용에 제약이 되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 산화아연-결합성 펩타이드를 이용하여 산화아연 나노입자의 생체적합성을 개질하고 이를 의학의 제조를 위한 약물전달체로 활용하거나, 백신, 조영제, 생물제제를 효과적으로 분리할 수 있는 분리제, 온열치료를 비롯한 치료제, 바이오센서에 응용 가능한 비드 등의 제조에 사용하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명자들은 산화아연 나노입자를 화학적으로 개질하는 대신 산화아연-결합성 펩타이드를 도입하여 산화아연 나노입자의 생체이용성을 개선시킬 수 있을 것이라는 점에 착안하였다. 하기 실시예에서 확인할 수 있는 바와 같이, 산화아연-결합성 펩타이드를 산화아연 나노입자에 도입할 경우 산화아연 나노입자를 이용해 전달하고자 하는 중앙 항원의 결합력이 산화아연-결합성 펩타이드를 사용하지 않은 군에 비해 현저하게 높다. 따라서, 본 발명은 산화아연-결합성 펩타이드를 포함하는 단백질과 산화아연 나노입자의 복합체를 제공한다.

[0009] 본 발명에서 사용하고자 하는 산화아연-결합성 펩타이드는 일반적인 펩타이드들과 비교하여 산화아연 나노입자에 대한 친화력(affinity)가 우수한 펩타이드를 말한다. 하기 실시예에서 볼 수 있는 바와 같이, 산화아연-결합성 펩타이드를 사용하지 않는 경우 단백질 약물은 산화아연 나노입자와 거의 결합하지 않는다. 그러나, 산화아연-결합성 펩타이드를 사용하는 경우 단백질, DNA, RNA 등의 약물은 특별한 화학적 고정 방법을 사용하지 않더라도 산화아연 나노입자에 도입될 수 있게 된다.

[0010] 산화아연에 결합하는 펩타이드를 펩타이드 라이브러리 스크리닝을 통해 찾아내는 방법에 대해서는 기존에 보고되어 있으나(Kjaergaard et. al, 2000 App. Env. Microbiol. 66(1) 10-14; Thai et. al., 2004 Biotech. Bioengineering. 87(2) 129-137), 이들 논문에서는 대장균 표면에 펩타이드를 발현시켜 산화아연 필름에 결합된 대장균 수를 측정함으로써 산화아연과의 결합 여부를 간접적으로 확인하였을 뿐이고, 그 결합력에 대한 자세한 분석은 이루어지지 않았다. 또한, 이들 논문에서는 산화아연-결합성 펩타이드를 산화아연 나노입자에 도입하여 이를 약물전달체로 사용하거나, 백신, 또는 조영제 등으로 사용할 수 있음에 대해서는 전혀 개시하고 있지 않다.

[0011] 이에, 상기 선행기술에 개시된 펩타이드 라이브러리를 이용한 산화아연-결합성 펩타이드들의 아미노산 서열을 분석한 결과, 산화아연-결합성 펩타이드는 하기 식 (I) 또는 (II)의 구성을 갖는 것이 바람직하다는 사실을 알아냈다.

[0012] $[(\text{Arg-X}_1\text{-X}_2\text{-Arg})_m\text{-링커}]_n$ (I)

[0013] $[(\text{Arg-X}_1\text{-X}_2\text{-Arg-Lys})_m\text{-링커}]_n$ (II)

[0014] 상기 식에서,

[0015] X_1 은 Pro, Ala, Thr, Gln, 또는 Ile이고,

[0016] X_2 는 His, Ile, Asn, 또는 Arg이며,

[0017] m 은 1 내지 5의 정수이고,

[0018] n 은 1 내지 100의 정수이다.

[0019] 즉, Arg- X_1 - X_2 -Arg 또는 Arg- X_1 - X_2 -Arg-Lys 모티프를 공통적으로 포함하면서, 직렬반복(tandem repeat) 구조를 갖도록 하면 상기 산화아연-결합성 펩타이드의 산화아연에 대한 결합력이 증가하는 것으로 나타났다. 직렬반복 구조를 갖도록 하기 위해 상기 모티프들이 유동적으로 결합할 수 있는 링커를 포함시켰다. 이러한 링커로서 하기 실시예에서는 Gly-Gly-Asp-Ala를 사용하였으나, 모티프들 간의 결합에 유동성을 제공할 수 있는 형태라면 링커의 구성은 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 이러한 링커에는 Gly이 다수 포함되는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, Gly-Gly-Asp-Xaa-Ala(Xaa는 임의의 아미노산)의 형태 또한 링커로 사용가능하다. 상기 Xaa로

는 Ser이나 Val이 바람직할 것으로 예상된다. 하기 실시예에서 확인할 수 있는 바와 같이, 이러한 산화아연-결합성 펩타이드는 산화아연과의 결합성이 매우 우수하므로, 산화아연 나노입자의 생체 내 또는 세포 내 활용을 위한 산화아연 나노입자의 표면 개질을 위해 사용될 수 있다.

- [0020] 따라서, 본 발명은 하기 식 (I) 또는 (II)의 산화아연-결합성 펩타이드를 포함하는 단백질과 산화아연 나노입자의 복합체를 제공한다.
- [0021] $[(\text{Arg-X}_1\text{-X}_2\text{-Arg})_m\text{-링커}]_n$ (I)
- [0022] $[(\text{Arg-X}_1\text{-X}_2\text{-Arg-Lys})_m\text{-링커}]_n$ (II)
- [0023] 상기 식에서,
- [0024] X_1 은 Pro, Ala, Thr, Gln, 또는 Ile이고,
- [0025] X_2 는 His, Ile, Asn, 또는 Arg이며,
- [0026] m 은 1 내지 5의 정수이고,
- [0027] n 은 1 내지 100의 정수이다.
- [0028] 한 구체예에서, X_1 은 Pro 또는 Thr이고, X_2 는 His이며, m 은 1 내지 5의 정수이고, n 은 3 내지 50의 정수일 수 있다.
- [0029] 다른 구체예에서, 상기 산화아연-결합성 펩타이드는 서열번호 1 내지 4 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드일 수 있다.
- [0030] 서열번호 1: Arg Pro His Arg Lys Gly Gly Asp Ala
- [0031] 서열번호 2: Arg Thr His Arg Lys Gly Gly Asp Ala
- [0032] 서열번호 3: Arg Pro His Arg Lys Gly Gly Asp Ala Arg Pro His Arg Lys Gly Gly Asp Ala Arg Pro His Arg Lys Gly Gly Asp Ala
- [0033] 서열번호 4: Arg Thr His Arg Lys Gly Gly Asp Ala Arg Thr His Arg Lys Gly Gly Asp Ala Arg Thr His Arg Lys Gly Gly Asp Ala
- [0034] 본 발명에 있어서, 산화아연-결합성 펩타이드를 포함하는 단백질은 식 (I) 또는 (II)의 산화아연-결합성 펩타이드 그 자체일 수 있다. 이 경우, 산화아연-결합성 펩타이드를 포함하는 단백질과 산화아연 나노입자와의 복합체에 추가로 단백질, DNA, RNA, 화합물 의약, 조영 물질 등의 약물이 추가로 도입될 수 있다. 이러한 약물들은 예를 들어, 복합체와 물리적 또는 화학적으로 결합될 수 있으며, 이를 통해 생체 내 또는 세포 내로 이들 약물을 전달해 주는 역할을 하게 된다.
- [0035] 이 경우, 약물의 효과적인 전달을 위해 복합체 표면에는 표적 지향성 리간드가 결합될 수 있다. 본 발명의 복합체가 조직이나 세포에 도입될 수 있도록 표적화시키는 리간드를 의미한다. 이러한 표적 지향성 리간드로는 항체, 앵타머 뿐만 아니라, 세포 표면의 특정 수용체와 결합하는 것으로 알려져 있는 화합물 리간드 또한 유용하게 사용할 수 있다. 이러한 항체, 앵타머, 화합물 리간드의 구체적인 종류는 당업계에 잘 알려져 있다.
- [0036] 상기 복합체와 약물과의 물리적 또는 화학적 결합, 또는 상기 복합체와 표적 지향성 리간드와의 물리적 또는 화학적 결합은, 복합체 표면에 존재하는 단백질과 약물 또는 표적 지향성 리간드와의 결합을 통해 수행되며, 이는 당업계에 공지된 방법을 이용하여 쉽게 수행될 수 있다.
- [0037] 예를 들어, 복합체 표면의 단백질에 존재하는 기능기와 약물이나 표적 지향성 리간드 상에 존재하는 기능기 간의 공유결합을 통해 이루어질 수 있다. 이러한 기능기들은 단백질, 약물 또는 표적 지향성 리간드 상에 본래 존재하는 것일 수 있으나, 필요한 경우 상호결합가능한 기능기를 갖도록 개질할 수 있다. 단백질 상에 존재하는 기능기와 약물 또는 표적 지향성 리간드 상에 존재하는 기능기는 서로 결합을 형성할 수 있도록 공지의 기능기 결합예로부터 선택될 수 있다. 이러한 이러한 공지의 기능기 결합예 중 대표적인 예를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0038]

I	II	III
R-NH ₂	R'-COOH	R-NHCO-R'
R-SH	R'-SH	R-SS-R
R-OH	R'-(에폭시기)	R-OCH ₂ C(OH)CH ₂ -R'
RH-NH ₂	R'-(에폭시기)	R-NHCH ₂ C(OH)CH ₂ -R'
R-SH	R'-(에폭시기)	R-SCH ₂ C(OH)CH ₂ -R'
R-NH ₂	R'-COH	R-N=CH-R'
R-NH ₂	R'-NCO	R-NHCONH-R'
R-NH ₂	R'-NCS	R-NHCSNH-R'
R-SH	R'-COCH ₂	R'-COCH ₂ S-R
R-SH	R'-O(C=O)X	R-OCH ₂ (C=O)O-R'
R-(아지리딘기)	R'-SH	R-CH ₂ CH(NH ₂)CH ₂ S-R'
R-CH=CH ₂	R'-SH	R-CH ₂ CHS-R'
R-OH	R'-NCO	R'-NHCOO-R
R-SH	R'-COCH ₂ X	R-SCH ₂ CO-R'
R-NH ₂	R'-CON ₃	R-NHCO-R'
R-COOH	R'-COOH	R-(C=O)O(C=O)-R' + H ₂ O
R-SH	R'-X	R-S-R'
R-NH ₂	R'CH ₂ C(NH ²⁺)OCH ₃	R-NHC(NH ²⁺)CH ₂ -R'
R-OP(O ²⁻)OH	R'-NH ₂	R-OP(O ²⁻)-NH-R'
R-CONHNH ₂	R'-COH	R-CONHN=CH-R'
R-NH ₂	R'-SH	R-NHCO(CH ₂) ₂ SS-R'
I 또는 II: 단백질 상에 존재하는 기능기 또는 약물이나 리간드 상에 존재하는 기능기 III: I과 II의 반응에 따른 결합예 R 또는 R': 임의의 기능기		

[0039]

다르게는, 상기 산화아연-결합성 펩타이드를 포함하는 단백질은 산화아연-결합성 펩타이드 뿐만 아니라 제2의 펩타이드를 단백질 내에 포함하는 융합단백질일 수 있다. 이러한 융합단백질은 당업계에 공지된 통상의 재조합 단백질 제조 방법을 통해 용이하게 제조할 수 있다. 이 때 제2의 펩타이드는 산화아연-결합성 펩타이드의 N 말단 또는 C 말단에 위치할 수 있으며, 그 위치는 특별히 제한되지 않는다.

[0040]

예를 들어, 산화아연-결합성 펩타이드를 포함하는 단백질에 포함되는 제2의 펩타이드는 항원일 수 있다.

[0041]

즉, 한 구체예에서, 상기 단백질은 산화아연-결합성 펩타이드와 항원을 포함하는 재조합 단백질일 수 있다.

[0042]

산화아연-결합성 펩타이드와 항원을 포함하는 재조합 단백질과 산화아연 나노입자와의 복합체는 후술하는 바와 같이 매우 다양한 용도로 사용될 수 있다. 예를 들어, 산화아연-결합성 펩타이드와 항원을 포함하는 재조합 단백질과 산화아연 나노입자의 복합체는 면역 치료를 위한 백신 조성물의 제조를 위해 사용될 수 있다. 산화아연 나노입자는 항원이 포함된 재조합 단백질에 대한 담체 또는 약물 전달체로서 이용된다.

[0043]

한 구체예에서, 상기 항원은 종양 항원일 수 있다. 하기 실시예에서는 산화아연-결합성 펩타이드와 종양 항원을 포함하는 재조합 단백질과 산화아연 나노입자의 복합체를 수지상세포에 도입하고, 이러한 수지상세포를 백신으로 이용하여 암을 치료 또는 예방할 수 있을 보여준다.

[0044]

이러한 종양 항원의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 당업계에 공지되어 있는 종양 항원이라면 어떠한 것이든 사용가능하다. 암의 치료 또는 예방을 위해 사용될 수 있는 종양 항원의 대표적인 예는 암종배아항원, 서바이빈, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-12, BAGE, GAGE, NY-ESO-1, 티로시나아제, TRP-1, TRP-2, gp100, MART-1, MC1R, Ig 이디오타입, CDK4, 카스파제-9, 베타-카테닌, CIA, BCR/ABL, 변이된 p21/ras, 변이된 p53, 프로테아아제 3, WT1, MUC-1, 정상 p53, Her2/neu, PAP, PSA, PSMA, G250, HPV E6/E7, EBV LMP2a, HCV, HHV-8, 알파-페토프로테인, 5T4, 옹코-트로포블라스트 및 글라이코프로테인 등을 포함한다. 이러한 종양항원의 예

및 이들을 발현하는 암 세포에 대해서는 당업계에 잘 알려져 있다.

- [0045] 한편, 본 발명에서 사용되는 산화아연 나노입자는 그 전체가 산화아연으로 이루어진 산화아연 나노입자뿐만 아니라 그 외의 성분을 포함하는 산화아연 나노입자도 포함하는 것으로 정의한다.
- [0046] 한 구체예에서, 본 발명의 산화아연 나노입자는 산화아연만으로 이루어진 것일 수 있다. 이 경우, 본 발명의 복합체는 산화아연 나노입자를 통해 단백질 등의 약물을 생체 내 또는 세포 내로 전달하는 역할을 수행하며, 또한 산화아연 나노입자의 본연의 특성으로 인해 광학 이미징을 가능하게 한다.
- [0047] 한 구체예에서, 본 발명의 산화아연 나노입자는 산화아연에 의해 나노구조의 외부가 일부 또는 전부 둘러싸인 나노크기의 물질이 될 수 있다. 이러한 예로 덤벨(dumbbell) 모양, 나노선, 합금, 박막 등이 될 수 있다. 덤벨 모양에서는 한 쪽은 산화아연으로 일부/또는 전부가 구성되어 있을 수 있으며, 덤벨의 나머지 한 쪽은 자성, 금속, 고분자, 세라믹, 반도체 등으로 구성되어 있을 수 있다. 또, 합금은 금속, 세라믹, 반도체와 산화 아연의 합금으로 이루어질 수 있다. (예: FeO와 ZnO, Au와 ZnO), 또한 나노선의 경우 전기화학적 또는 습식 방법으로 만들어 질 수 있는데, ZnO 나노선, ZnO가 포함된 나노선 (예: Au ZnO 합금 나노선), ZnO가 코팅된 나노선이 될 수 있다. 또한, ZnO가 표면에 존재하는 박막이 될 수도 있으며, 사용처에 따라서 상기 구조가 복합적으로 구성된 구조 (예: 박막에 1차원 나노선이 돌출되어 있는 구조, 입자 표면에 나노입자, 나노선 등이 부착된 구조)도 포함될 수 있다.
- [0048] 다른 구체예에서, 상기 산화아연 나노입자는 코어-셸 구조를 갖는 것일 수 있다. 코어-셸 구조를 갖는 산화아연 나노입자에서, 셸은 본 발명의 단백질과의 결합을 위해 산화아연으로 이루어져 있으며, 코어에는 본 발명에 따른 복합체의 적용 목적에 따라 알맞은 물질을 선택하여 위치시킬 수 있다.
- [0049] 예를 들어, 한 구체예에서, 상기 코어는 금속 물질(metal material), 자성 물질(magnetic material), 자성 합금(magnetic alloy) 또는 반도체 물질(semiconductor material)로 이루어진 것일 수 있다. 상기 금속은 특별히 제한되지는 않으나, Pt, Pd, Ag, Cu 및 Au로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것이 바람직하다. 상기 자성 물질 역시 특별히 제한되지는 않으나, Co, Mn, Fe, Ni, Gd, Mo, MM'2O4, 및 MxOy (M 및 M'는 각각 독립적으로 Co, Fe, Ni, Mn, Zn, Gd, 또는 Cr을 나타내고, $0 < x \leq 3$, $0 < y \leq 5$)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것이 바람직하다. 또한 상기 자성 합금 역시 특별히 제한되지는 않으나 CoCu, CoPt, FePt, CoSm, NiFe, 및 NiFeCo로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것이 바람직하다. 또한, 반도체 물질로는 이에 제한되는 것은 아니나, CdSe, CdTe, ZnSe 등이 선택될 수 있다.
- [0050] 한 구체예에서, 상기 코어는 자성 물질로 이루어진 것일 수 있다. 이 경우 본 발명의 복합체를 이용하면 산화아연 나노입자 내부의 자성 물질로 인해 외부 자기장에 의한 생물체제(DNA, RNA, 세포 등)의 효과적인 분리, 약물 전달, 고효율 진단, 외부자기장에 의한 온열치료(Hyperthermia)를 비롯한 치료, 그리고 MRI 조영 등이 가능하다.
- [0051] 한 구체예에서, 상기 코어는 T1 또는 T2 조영물질로 이루어진 것일 수 있다. 이 경우 본 발명의 복합체는 산화아연 나노입자를 통해 단백질을 생체 내 또는 세포 내로 전달할 수 있을 뿐만 아니라 산화아연 내의 T1 또는 T2 조영물질로 인해 MRI 조영이 가능하며, 산화아연 나노입자 본연의 특성으로 인해 광학 이미징이 가능한 멀티모달 특성을 갖게 된다. 코어-셸 구조를 갖는 산화아연 나노입자에서 사용될 수 있는 T1 또는 T2 조영물질의 종류는 특별히 제한되지 않으며, T1 또는 T2 조영물질의 예는 당업계에 잘 알려져 있다(예컨대, 대한민국 공개특허 공보 10-2010-0023778호 참조).
- [0052] 한 구체예에서, 상기 코어는 산화철로 이루어진 것일 수 있다. 하기 실시예에서는, 코어가 T2 조영물질인 산화철로 이루어져 있고, 셸이 산화아연으로 이루어진 코어-셸 구조의 산화아연 나노입자를 제조하고, 이러한 산화아연 나노입자와, 산화아연-친화성 펩타이드와 종양 항원을 포함하는 단백질과의 복합체를 이용하여 암 세포를 조영하고, 암 세포를 사멸시킬 수 있음을 보여준다.
- [0053] 본 발명에 따른 산화아연 나노입자는 바람직하게는 고분자 계면활성제를 이용하여 제조된 것일 수 있다. 고분자 계면활성제 중 양친매성(amphiphilic) 계면활성제를 사용하면 산화아연 나노입자를 유기용매상에서 고온열분해법(Thermodecomposition)으로 제조할 수 있어서, 공침법(Co-precipitation) 등 다른 방법으로 제조한 나노입자에 비하여 결정성이 우수하고 균일한 크기를 갖는 산화아연 나노입자를 얻을 수 있으면서, 이와 동시에 양친매성 계면활성제를 사용하지 않고 유기용매상에서 제조한 나노입자에 비해 물에 대한 분산성이 상대적으로 우수한 장점을 제공한다. 이러한 양친매성 계면활성제로는 폴리(에틸렌 글리콜)-블록-폴리(폴리프로필렌 글리콜)-블록-폴리(에틸렌 글리콜)(PEG-PPG-PEG) 또는 폴리비닐피롤리돈(PVP)을 사용할 수 있다.

- [0054] 한편, 상기 산화아연-결합성 펩타이드를 포함하는 단백질과 산화아연 나노입자와의 복합체 형성에는 특별한 방법이 요구되지 않는다. 산화아연-결합성 펩타이드의 산화아연에 대한 친화성으로 인해 상기 단백질과 산화아연 나노입자를 단순히 인큐베이션하는 것만으로도 간단히 복합체를 형성할 수 있다.
- [0055] 본 발명은 또한 상기 산화아연-결합성 펩타이드를 포함하는 단백질과 산화아연 나노입자의 복합체를 약물전달체로서 포함하는 의약 조성물을 제공한다. 앞서 설명한 바와 같이, 본 발명의 복합체는 단백질, DNA, RNA, 세포, 화합물 의약, 조영 물질 등의 약물과 결합하여 이들 약물을 생체 내 또는 세포 내로 전달해 주는 약물전달체로서 기능할 수 있다. 이러한 약물은 상술한 바와 같이 상기 복합체와 물리적 또는 화학적으로 결합될 수 있으며, 이러한 약물 외에도 복합체에 표적 지향성을 부여하기 위한 표적 지향성 리간드가 추가로 결합될 수 있다. 또한, 본 발명의 의약 조성물은 복합체와 결합되는 약물 외에도 추가의 약물을 더 포함할 수 있으며, 의약의 제제화를 위해 일반적으로 이용되는 여러가지 부형제를 포함할 수 있다.
- [0056] 본 발명은 또한, 약물을, 상기 산화아연-결합성 펩타이드를 포함하는 단백질과 산화아연 나노입자의 복합체와 혼합하거나 상기 복합체에 결합시키는 것을 포함하는 약물과 상기 복합체를 포함하는 의약 조성물의 제조방법을 제공한다.
- [0057] 본 발명은 또한 산화아연-결합성 펩타이드 및 항원을 포함하는 단백질 및 산화아연 나노입자의 복합체를 포함하는 백신 조성물을 제공한다. 상술한 바와 같이, 산화아연-결합성 펩타이드 및 항원을 포함하는 단백질; 및 산화아연 나노입자와의 복합체는 백신 조성물의 제조를 위해 사용될 수 있다. 산화아연-결합성 펩타이드는 항원이 산화아연 나노입자에 결합하는 것을 가능하게 하여 산화아연 나노입자를 약물전달체로 하여 항원을 생체 내 또는 세포 내로 도입하는 것을 용이하게 해 준다. 생체 내 또는 세포 내로 도입된 항원은 상기 항원에 대한 세포성 또는 체액성 면역반응을 야기하여 인체의 면역 시스템을 통해 상기 항원에 의해 매개되는 질환을 치료 또는 예방하게 된다. 이러한 항원의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 인위적으로 면역반응을 일으켜 질병을 예방 또는 치료하기 위해 사용되는 항원이라면 어떠한 것이든 본 발명의 백신 조성물의 제조를 위해 사용할 수 있다. 한 구체예에서, 상기 항원은 종양 항원일 수 있으며, 이 경우 이러한 백신 조성물은 암의 치료 또는 예방을 위해 사용될 수 있다.
- [0058] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 백신 조성물은 추가로 면역세포를 포함하는 것일 수 있다. 본 발명에 있어서, 면역세포는 면역계를 담당하는 세포를 총칭하는 것으로, 구체적으로는 수지상세포, T세포, NK세포, B 세포 등을 포함한다. 한 구체예에서, 상기 면역세포는 수지상세포, T세포, NK 세포일 수 있다. 한편, 이러한 조성물에는 세포 외에도 세포를 안정하게 유지할 수 있는 완충액 등이 포함된다.
- [0059] 면역세포를 이용한 암의 면역 치료 방법에 대해서는 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 환자로부터 수지상세포를 회수한 후 수지상세포에 TAT 단백질과 종양항원의 융합 단백질을 도입하고, 이렇게 종양 항원을 수득한 수지상세포를 다시 체내로 주입하여 수지상세포로 하여금 면역반응을 유도하도록 하여 암 세포를 사멸시키는 방법이다. 종양 항원을 수지상세포로 도입하기 위해 TAT 융합 단백질을 이용하는 등의 기존의 방법은 절차가 복잡할 뿐만 아니라 배양의 시간이 많이 소요되었으며 이 때문에 수지상세포의 생존율의 저하, 생체 내 도입 후 효과의 저하 등이 문제되었다. 그러나, 본 발명의 산화아연-결합성 펩타이드 및 항원을 포함하는 단백질 및 산화아연 나노입자의 복합체를 면역세포에 도입하여 이를 백신 조성물에 사용하는 경우 간단한 방법으로 단시간 내에 면역세포를 포함하는 세포 치료제, 즉 백신을 제조할 수 있다. 뿐만 아니라 하기 실시예에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 복합체는 수지상세포의 생존율, 면역 효능 등에도 영향을 미치지 않으면서 종양 항원의 전달율이 매우 높아 효과적으로 암 세포를 사멸시킬 수 있는 것으로 나타났다. 따라서, 본 발명의 한 구체예에서, 상기 백신 조성물은 상기 복합체가 도입된 면역세포를 포함하는 것일 수 있다.
- [0060] 면역세포를 포함하는 암 면역 치료제 또는 백신 조성물의 조성, 투여 방법, 유효량 등 에 대해서는 당업계에 잘 알려져 있다.
- [0061] 본 발명은 또한, 상기 산화아연-결합성 펩타이드를 포함하는 단백질 및 산화아연 나노입자의 복합체를 포함하는 조영제를 제공한다.
- [0062] 상술한 산화아연-결합성 펩타이드를 포함하는 단백질 및 산화아연 나노입자의 복합체는 약물전달체 또는 백신의 역할을 수행할 수 있을 뿐만 아니라, 산화아연 나노입자는 그 자체로 광학적 조영이 가능한 특성을 갖고 있기 때문에 동시에 조영제(imaging agent)로서 작용할 수 있다.
- [0063] 한 구체예에서, 상기 산화아연-결합성 펩타이드를 포함하는 단백질 및 산화아연 나노입자의 복합체에는 표적 지향성 리간드가 결합되어 있을 수 있다. 이 경우 조영제의 표적 지향성이 향상되게 된다.

- [0064] 다른 구체예에서, 산화아연-결합성 펩타이드를 포함하는 단백질은 산화아연-결합성 펩타이드 및 항원을 포함하는 것일 수 있다. 앞서 설명한 바와 같이, 산화아연-결합성 펩타이드를 포함하는 단백질에 항원이 포함될 경우 상기 항원을 발현하는 표적세포에 본 발명의 복합체가 도입되어 면역반응을 유도할 수 있을 뿐만 아니라 복합체가 갖고 있는 조영 효과로 인해 표적세포의 조영이 가능해지게 된다. 이러한 항원의 종류는 특별히 제한되지 않는다. 한 구체예에서, 상기 항원은 종양 항원일 수 있으며, 이 경우 상기 조영제는 암의 면역 치료와 동시에 조영을 가능하게 해준다. 상기 종양 항원은 이에 제한되는 것은 아니나, 암종배아항원, 서바이빈, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-12, BAGE, GAGE, NY-ESO-1, 티로시나아제, TRP-1, TRP-2, gp100, MART-1, MC1R, Ig 이디오타입, CDK4, 카스파제-9, 베타-카테닌, CIA, BCR/ABL, 변이된 p21/ras, 변이된 p53, 프로테나아제 3, WT1, MUC-1, 정상 p53, Her2/neu, PAP, PSA, PSMA, G250, HPV E6/E7, EBV LMP2a, HCV, HHV-8, 알파-페토프로테인, 5T4, 웅코-트로포블라스트 및 글라이코프로테인으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.
- [0065] 상기 조영제에 포함되는 산화아연 나노입자의 구성은 앞서 설명한 바와 같다. 한 구체예에서, 상기 산화아연 나노입자는 코어-셸 구조를 갖는 것일 수 있다. 예를 들어, 금속 물질(metal material), 자성 물질(magnetic material), 자성 합금(magnetic alloy) 또는 반도체 물질(semiconductor material)로 이루어져 있고, 셸은 산화아연으로 이루어진 것일 수 있다. 상술한 바와 같이 산화아연 나노입자가 T1 또는 T2 조영물질로 이루어진 코어와 산화아연으로 이루어진 셸로 구성된 코어-셸 구조를 갖는 것일 경우, 본 발명의 조영제는 광학적 이미징 뿐만 아니라 자기공명 이미징을 가능하게 한다. 하기 실시예에서 확인할 수 있는 바와 같이, 산화철 코어와 산화아연 셸로 이루어진 산화아연 나노입자 및 산화아연-결합성 펩타이드와 암종배아항원을 포함하는 단백질과의 복합체를 포함하는 본 발명의 조영제는 암 세포의 사멸 동시에 주입한 수지상세포의 위치를 추적 진단할 수 있다. 자기공명 이미징을 위한 기존의 산화철 나노입자들은 수용액 상에서의 응집을 방지하기 위해 화학적 표면처리를 하거나, 수지상세포로 도입하기 위해 리포솜과 같은 세포 전달용 화합물들(transfection agents)을 이용하는 등 절차가 복잡할 뿐만 아니라 배양의 시간이 많이 소요되었으며 이 때문에 수지상세포의 생존율의 저하, 생체 내 도입 후 효과의 저하 등이 문제되었다. 그러나, 본 발명의 산화아연-결합성 펩타이드 및 항원을 포함하는 단백질 및 산화아연 나노입자의 복합체를 수지상세포에 도입하여 이를 백신 조성물에 사용하는 경우 간단한 방법으로 단시간 내에 수지상세포를 포함하는 세포 치료제, 즉 백신을 제조할 수 있고, 코어셸에 포함된 산화철 성분을 통해 자기공명 이미징을 가능하게 한다.
- [0066] 본 발명의 조영제에 있어서, 산화아연-결합성 펩타이드를 포함하는 단백질은 산화아연-결합성 펩타이드 외에 항체를 더 포함하는 것일 수 있다. 이 경우 항체는 조영제에 표적 지향성을 부여하는 역할을 수행하며, 만일 상기 항체가 치료용 항체인 경우 추가적으로 치료제의 역할을 수행하게 된다. 한 구체예에서, 이러한 항체는 종양 항원을 타겟으로 하는 것일 수 있다. 조영제에 표적 지향성을 부여하거나 종양항원을 타겟으로 하여 치료 효과를 나타내는 항체의 종류에 대해서는 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 암 치료용 항체로서 잘 알려져 있는 허셉틴의 Fc 말단에 산화아연-결합성 펩타이드가 존재하도록 허셉틴의 재조합 항체를 제조할 수 있다. 이러한 재조합 항체는 산화아연 나노입자에 매우 잘 결합될 수 있으며, 이렇게 형성된 복합체는 암의 치료 및 암 치료의 예후를 살필 수 있는 치료제와 조영제로서의 역할을 동시에 수행할 수 있다.
- [0067] 또한, 이러한 조영제 조성물에 있어서, 상기 복합체에는 단백질, DNA, RNA, 화합물 의약 및 조영 물질로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 약물이 물리적 또는 화학적으로 결합되어 있을 수 있다. 예를 들어, 상기 복합체에 치료용 약물이 결합되어 있는 경우 진단과 동시에 치료의 효과를 거둘 수 있으며, 만일 상기 복합체에 조영 물질이 추가적으로 결합되어 있는 경우, 다기능성 조영제로서 작용할 수 있다. 이러한 조영 물질로는 예를 들어 형광 물질, 방사성 동위원소 또는 양자점 등을 포함한다.
- [0068] 본 발명에 따른 조영제는 의약 분야에서 통상 사용되는 담체 및 비히클을 포함할 수 있다. 구체적으로 이온 교환 수지, 알루미늄, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질(예, 사람 혈청 알부민), 완충 물질(예, 각종 인산염, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 포화 식물성 지방산의 부분적인 글리세라이드 혼합물), 물, 염 또는 전해질(예, 프로타민 설페이트, 인산수소이나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨 및 아연 염), 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌 글리콜 또는 양모지 등을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 본 발명에 따른 조영제는 또한 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 유화제, 현탁제, 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0069] 한 구체예에서, 본 발명에 따른 조영제는 비경구 투여를 위한 수용성 용액으로 제조할 수 있으며, 바람직하게는 한스 용액(Hank's solution), 링거 용액(Ringer's solution) 또는 물리적으로 완충된 염수와 같은 완충 용액을 사용할 수 있다. 수용성 주입(injection) 현탁액은 소듐 카르복시메틸셀룰로즈, 솔비톨 또는 텍스트란과 같이

현탁액의 점도를 증가시킬 수 있는 기질을 첨가할 수 있다.

[0070] 본 발명의 조영제의 다른 바람직한 양태는 멸균 주사용 수성 또는 유성 현탁액의 멸균 주사용 제제의 형태일 수 있다. 이러한 현탁액은 적합한 분산제 또는 습윤제(예를 들면 트윈 80) 및 현탁화제를 사용하여 본 분야에 공지된 기술에 따라 제형화할 수 있다. 멸균 주사용 제제는 또한 무독성의 비경구적으로 허용되는 희석제 또는 용매 중의 멸균 주사 용액 또는 현탁액(예를 들면 1,3-부탄디올 중의 용액)일 수 있다. 사용될 수 있는 비휘발 및 용매로는 만니톨, 물, 링거 용액 및 등장성 염화나트륨 용액이 있다. 또한, 멸균 비휘발성 오일이 통상적으로 용매 또는 현탁화 매질로서 사용된다. 이러한 목적을 위해 합성 모노 또는 디글리세라이드를 포함하여 자극성이 적은 비휘발성 오일은 그 어느 것도 사용할 수 있다.

[0071] 상기 조영제를 생체에 투여하는 단계는 의학 분야에서 통상적으로 이용되는 경로를 통해 투여될 수 있으며, 비경구 투여가 바람직하고 예를 들어 정맥내, 복강내, 근육내, 피하 또는 국부 경로를 통하여 투여할 수 있다.

[0072] 한편, 본 발명의 산화아연-결합성 펩타이드를 포함하는 단백질 및 산화아연 나노입자의 복합체는 상술한 약물전달체, 백신, 또는 조영제의 제조를 위한 용도 외에 생물체제를 효과적으로 분리할 수 있는 분리제, 온열치료를 비롯한 치료제, MRI 조영제, 바이오센서에 응용 가능한 비드(bead)의 제조를 위한 용도를 추가로 제공한다. 예를 들어, 산화아연 나노입자가 갖고 있는 광학적 특성으로 인해 본 발명의 복합체를 FACS와 같은 광학 분리에 사용하여 유전자, 세포 등의 생물학적 물질의 분리에 이용할 수 있다. 다른 구체예에서, 본 발명의 산화아연-결합성 펩타이드를 포함하는 단백질 및 산화아연 나노입자의 복합체가 코어-셸 구조를 갖고 있고, 상기 코어가 자성물질로 이루어져 있으며 셸이 산화아연으로 이루어진 경우, 코어에 존재하는 자성물질로 인해 MACS와 같은 물질의 자성분리에의 응용이 가능하다. 또한, 본 발명은 산화아연-결합성 펩타이드를 포함하는 단백질 및 산화아연 나노입자의 복합체를 포함하는 온열치료용 조성물, 산화아연-결합성 펩타이드를 포함하는 단백질 및 산화아연 나노입자의 복합체를 비드로서 포함하는 바이오센서 등을 제공한다.

발명의 효과

[0073] 산화아연-결합성 펩타이드를 포함하는 단백질은 산화아연 나노입자의 생체 내 활용성을 현저히 개선시키므로, 상기 복합체는 의학의 생체 내 또는 세포 내 전달을 위한 약물전달체로서 사용할 수 있을 뿐만 아니라 생체 또는 세포의 이미징을 위해 사용할 수 있으며, 생물체제를 효과적으로 분리할 수 있는 분리제, 온열치료를 비롯한 치료제, MRI 조영제, 바이오센서에 응용 가능한 비드(bead)의 제조를 위한 용도를 추가로 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0074] 도 1은 Fe_3O_4 -ZnO 코어셸 나노입자의 TEM 분석, 구조, 성분 분석, 수용액에서의 분산, 광학특성, 및 자성 특성 분석 결과를 보여준다.

도 2는 본 발명의 ZnOpep-1과 $3\times\text{ZnOpep-1}$ 양을 측정된 405 nm에서의 흡광도 결과를 보여준다.

도 3은 본 발명의 ZnOpep-1, $3\times\text{ZnOpep-1}$ 및 $3\times\text{ZnOpep-2}$ 가 코어셸 나노입자와 결합한 양을 측정된 405 nm에서의 흡광도 결과를 보여준다.

도 4는 다양한 종류의 수용액 내에서의 산화아연 나노입자와 펩타이드 사이의 결합력을 보여준다.

도 5는 수용액 내에서 산화아연 나노입자와 산화아연 결합 펩타이드를 포함하는 CEA 종양항원의 재조합 단백질과 산화아연 나노입자의 결합력을 보여준다.

도 6a는 DAB-enhanced Prussian blue 염색을 통해 인큐베이션 시간에 따른 Fe_3O_4 나노입자와 Fe_3O_4 -ZnO 코어셸 나노입자의 세포내 운반 상태를 보여주며, 도 6b는 각각의 샘플에서 랜덤하게 선택된 100 개의 세포의 광학 강도를 측정된 결과를 보여준다.

도 7a는 수지상세포내로 도입된 코어셸 나노입자를 DAB-enhanced Prussian blue 염색을 통해 확인한 결과를 보여준다.

도 7b는 코어셸 나노입자의 광학적 특성을 이용하여 공초점 형광현미경으로 도입된 코어셸 나노입자를 확인한 결과를 보여준다.

도 7c는 수지상세포내로 도입된 코어셸 나노입자 결합 펩타이드를 공초점 형광현미경으로 관찰한 결과를 보여준다.

도 7d는 수지상세포 내로 산화아연 나노입자와 산화아연 결합 펩타이드를 포함하는 CEA 종양항원의 재조합 단백질과 산화아연 나노입자를 전달한 경우에 수지상세포 내에 존재하는 종양항원의 양을 FACS 분석한 결과이다.

도 8는 코어셸 나노입자의 로딩이 수지상세포의 세포생존율에 영향을 미치지 않음을 보여주는 그래프이다.

도 9은 코어셸 나노입자의 로딩이 수지상세포의 성숙에 영향을 미치지 않음을 보여주는 그래프이다.

도 10은 산화철 나노입자와 코어셸 나노입자로 표지된 수지상세포의 자기공명영상 분석에 의한 인 비트로 및 인 비보에서의 탐지 결과를 보여준다.

도 11는 산화철 나노입자로 표지된 수지상세포(○)와 코어셸 나노입자로 표지된 수지상세포(●)의 T2 이완 시간을 비교한 자기공명 분석 결과를 보여준다.

도 12는 산화아연 나노입자와 산화아연-결합성 펩타이드 아미노산 서열을 포함한 CEA 종양 항원 복합체로 표지된 수지상세포에 의해 유도된 항-종양 면역성을 평가한 결과를 보여준다.

도 13는 산화아연 나노입자와 산화아연-결합성 펩타이드 아미노산 서열을 포함한 CEA 종양 항원 복합체로 표지된 수지상세포에 의해 유도된 CEA-특이적 T 세포 반응의 유도 결과를 보여준다.

도 14는 산화아연 나노입자와 산화아연-결합성 펩타이드 아미노산 서열을 포함한 CEA 종양 항원 복합체로 표지된 수지상세포로 면역된 마우스의 종양 성장 및 생존을 분석한 결과를 보여준다(□: NP/3×ZBP-CEA, ■: NP/CEA, ▽: 3xZBP-CEA, ▼: CEA, ○: NP, ●: DC).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0075] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[실시예]

[0077] 실시예 1: Fe_3O_4 -ZnO 코어-셸 나노입자의 합성

[0078] Fe_3O_4 -ZnO 코어셸 나노입자(core-shell nanoparticles, CSNP)를 개량된 나노에멀전 방법에 의해 제조하였다.

[0079] Fe_3O_4 코어 합성을 위하여 0.5 mmol(0.1766 g)의 아이언(III) 아세틸아세토네이트($\text{Fe}(\text{acac})_3$, 99.9%, Aldrich)와 2.5 mmol(0.6468g)의 1,2-헥사데칸디올(1,2-hexdecandiol, $\text{C}_{14}\text{H}_{29}\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2(\text{OH})$, 90%, Aldrich)을 폴리(에틸렌 글리콜)-블록-폴리(폴리프로필렌 글리콜)-블록-폴리(에틸렌 글리콜)(PEG-PPG-PEG, Aldrich)(0.7529 g)와 함께 10 ml 내지 20 ml의 옥틸에테르($\text{C}_8\text{H}_{17}\text{OC}_8\text{H}_{17}$, 99%, Wako)에 용해하였다. 나노입자의 물리적, 화학적 특성 제어를 위하여 PEG-PPG-PEG 대신 폴리비닐피롤리돈(PVP)가 사용될 수 있으며, 용매에는 올레일아민(OAM, $\text{C}_9\text{H}_{18}=\text{C}_9\text{H}_{17}\text{NH}_2$, 70%), 올레산(OA, $\text{C}_9\text{H}_{18}=\text{C}_8\text{H}_{15}\text{COOH}$, 99%) 등이 사용될 수 있다.

[0080] 환원과정은 상기 혼합용액을 1시간 동안 80℃ 내지 130℃까지 천천히 가열하고, 그 온도에서 1시간 내지 2시간 동안 순환시켰다. 이후 15분 동안 260℃ 내지 300℃까지 빠르게 가열하였고, 260℃ 내지 300℃에서 1시간 내지 2시간 동안 순환시켰다. 혼합 용액을 실온까지 냉각시키면 자성체 코어 물질이 형성된다. 합성 과정은 아르곤과 같은 불활성 가스 분위기에서 진행할 수 있다. 상기 자성체 코어를 제조한 후 특별한 정제과정 없이 ZnO 코팅공정을 진행하였다. 이미 형성된 Fe_3O_4 코어에 0.25 mmol(0.0659 g)의 아연 아세틸아세토네이트(zinc acetylacetonate, $\text{Zn}(\text{acac})_2$), 0.3234 g(1.25 mmol)의 1,2-헥사데칸디올(1,2-hexdecandiol)이 용해된 옥틸에테르(octyl ether, 5 ml)를 첨가한 뒤, 가열수단과 자력교반기(Magnetic Stirring)를 사용하여 상기 반응혼합물을 80℃ 내지 130℃까지 온도를 올려 주고, 1시간 내지 2시간 동안 균일하게 혼합하였다. 이어서, 혼합용액을

가열하여 260℃ 내지 300℃ 사이에서 1시간 내지 2시간 정도 유지한 결과 ZnO 층이 Fe₃O₄위에 형성되었다. 반응 후 Fe₃O₄-ZnO 코어-셸 나노입자를 무수에탄올(anhydrous ethanol)를 첨가하고 원심분리 및 자성분리를 이용하여 세척하였다. 제조된 코어-셸 나노입자의 형태, 조성 및 나노 구조는 energy dispersive X-ray spectroscopy가 구비된 TEM(JEOL 2010F, Technai F20 (FEI Co.))으로 측정하였다. TEM 측정을 위한 샘플의 제조를 위해, 핵산 중에 분산된 나노입자와 물과 PBS에 분산된 펩타이드-나노입자 복합체는 각각 carbon-supported copper grids 상에 떨어뜨렸다. Fe₃O₄-ZnO NPs의 구조적 분석은 분말 x-선 회절 분석기(10C1 beamline, Pohang Accelerator Laboratory, South Korea)에 의해 수행되었다. 자성 특성은 vibrating sample magnetometer (Lakeshore 7300), Physical property measurement system (PPMS, Quantum Design)를 사용하여 측정되었다. 핵산 중에 분산된 나노입자와 물과 PBS에 분산된 펩타이드-나노입자 복합체의 광학특성은 각각 UV-Vis spectroscopy (Agilent 8453E) 및 spectrofluorophotometry (Shimadzu RF-5301PC)에 의해 분석되었다. 도 1은 Fe₃O₄-ZnO 나노입자의 TEM 분석, 수분산성, 자성특성 및 광학특성 분석 결과를 보여준다. 구체적으로, 도 1a는 Fe₃O₄-ZnO 나노입자의 구형 형태 및 균일한 크기 분포를 보여주는 TEM 결과이다(Scale bar: 100 nm). 도 1b는 코어-셸 나노입자의 구조적 모식도이다. 도 1c는 단일 코어셸 나노입자가 Fe와 Zn으로 이루어져 있음을 나타내는 TEM-EDX point-probe analysis 의 결과이다. 도 1d는 PBS 중에서의 갈색의 코어셸 나노입자의 균질한 분산을 보여주며, 도 1e는 자석에 의해 나노입자의 회수 후 깨끗하고 투명한 용액을 보여준다. 도 1f는 Fe₃O₄ 코어 부분(적색)과 Fe₃O₄-ZnO 코어셸 나노입자(청색)의 자성 이력 곡선을 보여준다. 도 1g는 펩타이드가 결합된 코어셸 나노입자의 UV 및 가시광 방출을 나타내는 광발광(Photoluminescence) 스펙트럼을 보여준다.

[0081] 실시예 2: ZnO-결합성 펩타이드의 설계 및 제조

[0082] ZnO-결합성 펩타이드(ZnO-binding peptide, ZBP)의 설계를 위해, 선행 연구들로부터 고-친화성 ZnO 결합 패턴의 서열들을 수집하였다. 고-친화성 결합 펩타이드들의 클러스터링을 통해 RXXR 또는 RXXRK 의 결합 모티프가 ZnO 결합에 중요한 역할을 수행함을 알아내고, RPHRK 또는 RTHRK를 하기 실시예에서 사용될 ZnO-결합성 펩타이드의 모티프로 선택하였다. 또한, 산화아연 나노입자와 ZnO-결합성 펩타이드 간의 결합력을 증가시키기 위해 산화아연-결합성 펩타이드의 제조시 ZnO 결합 모티프의 직렬 반복을 도입하고자 하였다. 주변 모티프들간의 유연성을 증가시킬 수 있는 유연성 링커로서 GGDA를 선택하고 이를 모티프들간에 도입하였다.

[0083] 산화아연-결합성 펩타이드의 산화아연 나노입자에 대한 결합성을 정량분석할 수 있도록, 산화아연-결합성 펩타이드를 바이오틴으로 표지하여 스트렙타비딘과의 결합성을 조사하는 방법을 사용하였다. 이를 위해 먼저 바이오틴이 표지된 산화아연-결합성 펩타이드와 스트렙타비딘 사이의 결합을 확인하고자 하였다. 펩타이드 합성기(PeptrEXTM, Pepton)를 이용하여 바이오틴으로 표지된 펩타이드로서, biotin-RPHRKGGDA(biotin-ZnOpep-1), biotin-RPHRKGGDARPHRKGGDARPHRKGGDA(biotin-3xZnOpep-1), biotin-RTHRKGGDA(biotin-ZnOpep-2) 및 biotin-RTHRKGGDARTHRKGGDARTHRKGGDA(biotin-3xZnOpep-2)를 합성한 후 멸균된 물에 1 mg/ml의 농도로 녹였다. TBS(Tris buffered saline)에 희석한 상기 펩타이드들을 각각 10 µg/well, 1 µg/well, 0.1 µg/well 및 0.01 µg/well씩 되도록 96 웰 플레이트(96 well plate)에 분주한 후 4℃에서 16시간 반응시켜 상기 플레이트에 코팅하였다. 그 후 각 웰에 차단용액(blocking solution: 5% Bovine serum albumin in TBS)를 넣어 상온에서 한 시간 동안 반응시킨 뒤, 0.05% Tween 20을 포함한 TBS를 사용하여 3회 세척하였다. 그 후 AP-스트렙타비딘 결합체(alkaline phosphatase-streptavidin conjugate)를 1:1,000으로 희석하여 상온에서 한 시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 다시 0.05% Tween 20을 포함한 TBS를 사용하여 잔류 AP-스트렙타비딘 결합체를 제거하였다. 그 후 pNPP 포스파타제(pNPP phosphatase) 기질을 첨가하여 20분 동안 상온에서 반응시킨 뒤 정지 버퍼를 넣어 반응을 멈춘 후, VICTOR(Perkinelmer사)를 사용하여 405 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과, 도 2에서 볼 수 있는 바와 같이 단일 산화아연-결합성 펩타이드 보다 3X 산화아연-결합성 펩타이드가 더 높은 흡광도를 보이며, 이는 코팅된 양에 의존적으로 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 이 결과는 산화아연-결합성 펩타이드의 바이오틴과 스트렙타비딘의 결합력을 이용하여 정량 분석이 가능하다는 것을 시사한다.

[0084] 실시예 3: 산화아연 나노입자와 산화아연-결합성 펩타이드 간의 결합력

[0085] 실시예 3에서는 실시예 2을 바탕으로 산화아연 나노입자와 산화아연-결합성 펩타이드 간의 결합력을 확인하고자 하였다. 실시예 1에서 얻은 산화아연 나노입자(에탄올 내에 보관)를 1.5 ml 튜브에 옮기고 마그네틱 스탠드에

20분 동안 정치시켜 코어-셸(core-shell) 산화아연 입자들을 분리하였다. 상기 산화아연 나노입자로부터 에탄올을 완전히 제거한 후 TBS를 첨가한 뒤, 초음파를 이용하여 나노입자들을 수용액에 분산시켰다. 100 μ g의 나노입자와 10 μ g, 1 μ g, 0.1 μ g, 0.01 μ g 및 0.001 μ g의 펩타이드를 TBS에 희석하여 혼합한 후 상온에서 한 시간 동안 회전하며 반응시켰다. 반응 후 원심분리기를 이용하여 (15,000 g, 2 min) 결합체를 침전시킨 후 마그네틱 스탠드에 15분간 정치시켜 나노입자-펩타이드 결합체를 분리하였다.

[0086] 동일한 방법으로 결합체를 TBS를 이용하여 6회 세척하였다. 1:1000으로 희석된 AP-스트렙타비딘 결합체(1.5 mg/ml)를 첨가하고 상온에서 한 시간 회전하며 반응시켰다. 반응이 끝난 후 다시 원심분리기를 이용하여 상기 AP-스트렙타비딘 결합체를 분리하고 마그네틱 스탠드에 15분간 정치시켜 용액을 제거한 뒤, TBS를 이용하여 6회 세척하였다. 그 후 pNPP 포스파타제 기질을 넣어 20분 동안 상온에서 반응시키고 정지 버퍼를 넣어 반응을 멈춘 후, VICTOR(Perkinelmer사)를 이용해 405 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과, 도 3에서 볼 수 있는 바와 같이, 산화아연 나노입자와 산화아연-결합성 펩타이드 사이의 결합이 산화아연-결합성 펩타이드의 농도에 의존적으로 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 단일 산화아연-결합성 펩타이드 보다 3X 산화아연-결합성 펩타이드가 산화아연 나노 입자와 더 잘 결합하는 것을 확인 할 수 있었다. 각각의 펩타이드의 결합은 100 μ g의 코어셸 나노입자에 대해 약 1 μ g 이하의 펩타이드(1xZBP에 대해 ~1nmol, 3xZBP에 대해 ~0.3nmol에 균등)가 사용될 때 포화되어, 1 μ g의 코어셸 나노입자 당 약 3 내지 10pmol의 펩타이드가 결합하는 것으로 나타났다.

[0087] 실시예 4: 다양한 수용액에서의 산화아연 나노입자와 산화아연-결합성 펩타이드 사이의 결합력

[0088] 실시예 4에서는 실시예 3으로부터 확인한 산화아연 나노입자와 산화아연-결합성 펩타이드 사이의 결합력을 다양한 수용액 조건에서도 결합이 가능한지 알아보기 위해 수행하였다. 실시예 1에서 얻은 산화아연 나노입자(에탄올 내에 보관)를 1.5ml 튜브에 옮기고 마그네틱 스탠드에 20분 동안 정치시켜 코어-셸(core-shell) 산화아연 입자들을 분리한 후 에탄올을 완전히 제거하였다. 분리된 나노입자들(100 μ g)을 TBS, RIPA 버퍼(1% Triton X-100, 0.1% 소듐 도데실설페이트, 0.5% 소듐 디옥시콜레이트, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl[pH 7.5], 2 mM EDTA), 또는 다양한 농도(6 M, 3 M, 1.5 M, 0.75 M, 0.375 M)의 요소가 첨가된 박테리아 용균버퍼(bacteria lysis buffer: 20 mM HEPES[pH 7.6], 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40)에 부유시킨 뒤, 0.1 μ g의 펩타이드 (3×ZnOpep-1)를 첨가하여 상온에서 한 시간 동안 회전하며 반응시켰다. 원심분리기를 이용하여 결합체를 떨어 뜨리고 마그네틱 스탠드에 15분 넣어 놓은 후 수용액을 제거한 뒤 TBS를 이용하여 6회 세척하였다. AP-스트렙타비딘 결합체를 넣고 상온에서 한 시간 회전하며 반응시켰다. 반응이 끝난 후 다시 원심분리기를 돌려 상기 결합체를 떨어뜨린 후 마그네틱 스탠드에 15분간 정치시키고 반응 용액을 제거한 뒤, TBS를 이용하여 6회 세척하였다. pNPP 포스파타제 기질을 넣고 20분 동안 상온에서 반응시킨 뒤, 반응 정지 버퍼를 넣고 405 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과, 도 4에서 볼 수 있는 바와 같이, TBS, RIPA, 그리고 다양한 농도의 요소가 첨가된 수용액 상에서도 산화아연 나노입자와 산화아연-결합성 펩타이드가 잘 결합되어 있는 것을 확인 할 수 있었다. 이는 산화아연 나노입자와 산화아연-결합성 펩타이드가 다양한 수용액 조건에서도 잘 결합한 다는 것을 의미한다.

[0089] 실시예 5: 암종배아항원과 산화아연-결합성 펩타이드와의 융합 단백질의 제조

[0090] Bae, M.Y., 등[Bae, M.Y., Cho, N.H. & Seong, S.Y. Protective anti-tumour immune responses by murine dendritic cells pulsed with recombinant Tat-carcinoembryonic antigen derived from Escherichia coli. *Clin. Exper. Immunol.* **157**, 128-138 (2009)]에 개시된 방법을 이용하여 *E. coli*로부터 아미노산 35 에서 332 (GenBank Accession no. M17303)에 상응하는 인간 암종배아항원(CEA)을 정제하였다. 재조합 ZBP-CEA 융합단백질의 제조를 위해, 3xZnOpep-1 (RPHRKGGDARPHRKGGDARPHRKGGDA)를 코딩하는 annealed double-stranded DNA (5'-CTA GCC GCC CGC ATC GCA AAG GCG GCG ATG CGC GCC CGC ATC GCA AAG GCG GCG ATG CGC GCC CGC ATC GCA AAG GCG GCG ATG CGG-3')를 *NheI* 및 *EcoRI* 위치의 절단 후(밑줄로 표시), 상기 Bae, M.Y., 등에 개시된 pET23a-CEA 플라스미드로 클로닝하였다. Bae, M.Y., 등에 개시된 방법에 따라 재조합 단백질을 생산하고 정제하였다. 같은 방법으로, ZnOpep-1, ZnOpep-2 및 3xZnOpep-2를 생산하였다. 정제된 단백질은 사용 전 엔도톡신 제거 컬럼(Pierce)으로 처리되었다. 정제된 재조합 단백질의 엔도톡신 오염은 QCI-1000 End-Point Chromagenic Endotoxin Detection Kit(Lonza)를 이용하여 조사하였다.

- [0091] **실시예 6: 산화아연 나노입자와 산화아연-결합성 펩타이드 아미노산 서열을 포함한 재조합 CEA 종양 항원의 결합력**
- [0092] 실시예 5에서는 산화아연 나노입자와 산화아연-결합성 펩타이드 아미노산 서열을 포함한 재조합 암종배아항원 (Carcino-Embryonic Antigen, CEA)의 결합력을 확인하였다. 서로 다른 농도의 산화아연 결합 펩타이드가 포함된 재조합 CEA 종양항원과 상기 산화아연-결합성 펩타이드가 포함되지 아니한 종양항원을 50 μ g의 산화아연 나노입자와 PBS(Phosphate-buffered saline)에서 1시간 동안 반응시키고, 반응이 끝난 후 다시 원심분리기를 이용하여 결합체를 떨어뜨린 후 마그네틱 스탠드에 15분간 정치시킨 후 용액을 제거한 뒤 PBS를 이용하여 6회 세척하였다. 수거된 산화아연 나노입자를 SDS-PAGE 샘플 버퍼에 넣어 100℃에서 10분간 반응시키고 SDS-PAGE를 실행한 뒤 쿠마시 블루 염색법(Coomassie blue staining)을 사용하여 산화아연 나노입자에 결합된 재조합 단백질의 양을 확인하였다. 그 결과, 도 5에서 볼 수 있는 바와 같이, 산화아연-결합성 펩타이드 아미노산 서열을 포함하지 않은 재조합 CEA 종양항원은 산화아연 나노입자와 매우 적은 양만 결합한 반면, 산화아연-결합성 펩타이드 아미노산 서열을 포함하는 재조합 CEA 종양항원은 산화아연 나노입자와 결합이 넣어준 펩타이드의 농도에 의존적으로 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 이는 산화아연 나노입자와 산화아연-결합성 펩타이드 아미노산 서열을 포함하는 재조합 종양항원 사이에도 결합이 가능하다는 것을 의미한다.
- [0093] **실시예 7: 수지상 세포에 로딩된 산화아연 나노입자와 산화아연-결합성 펩타이드 아미노산 서열을 포함한 CEA 종양 항원 복합체의 인 비트로 모니터링**
- [0094] Bae, M.Y., 등 에 기술된 방법을 이용하여 마우스세포로부터 수지상 세포를 제조하고 여기에 코어셀 나노입자를 로딩하였다. 미성숙 수지상세포를 코어셀 나노입자와 공배양하였다. 이는 성숙 수지상세포에 비해 미성숙 수지상세포가 포식작용이 활발하기 때문이다. 인큐베이션 시간과 ZnO 셀의 로딩 효율에 대한 효과를 평가하기 위해, 미성숙 수지상세포를 100 μ g/ml의 Fe_3O_4 NPs 또는 Fe_3O_4 -ZnO 코어셀 나노입자와 다양한 시간 조건으로 인큐베이션하였다. 도입된 나노입자는 DAB(diaminobenzidine)-enhanced Prussian blue 염색법에 의해 탐지되었으며, 광학 강도의 측정을 통해 정량 하였다. 도 6a는 DAB-enhanced Prussian blue 염색을 통해 인큐베이션 시간에 따른 Fe_3O_4 NPs와 Fe_3O_4 -ZnO 코어셀 나노입자의 세포내 운반 상태를 보여주며, 도 6b는 각각의 샘플에서 랜덤하게 선택된 100 개의 세포의 광학 강도를 측정한 결과를 보여준다. 도 6에서 볼 수 있는 바와 같이, 8시간 이전의 반응시간에서는 Fe_3O_4 -ZnO 코어셀 나노입자가 Fe_3O_4 NPs에 비해 훨씬 효율적으로 수지상세포에 의해 섭취되었으나, 인큐베이션 20시간 후에는 별다른 차이가 없었다. 이 결과는 ZnO 셀이 코어셀 나노입자의 세포내 운반을 촉진하며, 코어셀 나노입자를 이용할 경우, 수지상세포내로의 도입에 필요한 인큐베이션 시간을 줄여줄 수 있음을 제시한다.
- [0095] 도 7은 코어셀 나노입자의 광학적 특성을 이용한 수지상세포에 로딩된 항원의 인비트로 모니터링 결과를 보여준다. 도 7a는 DAB-enhanced Prussian blue 염색 후 가시화된 코어셀 나노입자가 로딩된 수지상세포와 코어셀 나노입자가 로딩되지 않은 수지상세포를 보여준다. 도 7a에서 볼 수 있는 바와 같이, 인큐베이션 1시간 후, 약 95% 이상의 수지상세포가 코어셀 나노입자로 표지된 것으로 나타났다. ZnO 나노입자가 수 시간 내에 포식성 세포와 비-포식성 세포에 의해 효율적으로 흡수된다는 것은 잘 알려져 있다. 정확한 메커니즘은 아직 알 수 없지만, 이 결과는 ZnO에 의한 Fe_3O_4 NPs의 표면 코팅이 세포성 흡수(uptake)를 촉진할 수 있음을 제시한다. 통상적인 초상자성 Fe_3O_4 입자들이 세포내 전달을 위해 프로타민 설페이트와 같은 트랜스펙션 촉진 화합물이나 긴 인큐베이션 시간(대개 16 내지 48시간)을 필요로 한다는 점을 고려할 때, 본 발명의 코어-셀 나노입자는 적은 인큐베이션 시간을 필요로 하고 트랜스펙션을 위한 시약이나 표면 개질을 필요로 하지 않는다는 점에서 큰 장점을 갖는다.
- [0096] ZnO의 광발광은 수지상세포 사이토졸 내로의 운반 후 레이저 스캐닝 공초점 현미경을 이용하여 조사하였다. 도 7b는 코어셀 나노입자가 로딩된 수지상 세포(하단) 또는 로딩되지 않은 수지상 세포(상단)을 공초점 현미경으로 관찰한 결과를 보여준다 (여기: 405nm, 발광: > 420nm). ToPro-3 염색시약으로 염색된 수지상세포의 핵은 청색으로 나타난다 (White bar: 10 μ m). 코어셀 나노입자-표지된 수지상세포는 405 nm의 파장에서 여기되었으며, 465 내지 679 nm의 넓은 발광 파장에서 높은 형광 강도를 보였다. 그러나, 피크 발광은 529 ~550 nm에서 관찰되었으며, 이는 통상적인 FACS 또는 공초점 현미경을 통해 쉽게 관찰될 수 있다 (미도시). 코어셀 나노입자는 사이토플라زم에 걸쳐 분산되어 있었고, 응집된 형태로 발견되었는데, 이는 포식작용에 의해 흡수되었음을 의미할 수 있다. 세포내 코어셀 나노입자 분포의 유사한 패턴이 비-식세포성 epithelium으로부터 유래된 HeLa 세포에서

도 나타났다 (테이터 미도시). 엔도솜성 또는 리소솜성 소포의 공염색은 응집된 코어셀 나노입자가 초기 엔도솜성 마커인 EEA1 또는 리소솜성 마커인 LAMP2와의 공존을 보여주며, 이는 응집된 나노입자들이 엔도사이토시스를 통해 내재화됨을 제시한다. 코어셀 나노입자가 사이토플라즘 및 세포내 수송 소포(intracellular trafficking vesicles) 내에서 탐지되는 것을 고려할 때, 그들은 파고사이토시스 또는 엔도사이토시스에 의해 내재화되는 것으로 여겨진다.

[0097] 우리는 또한 코어셀 나노입자 상에 고정된 폴리펩타이드들의 세포내 운반을 조사했다. 도 7c에서 볼 수 있는 바와 같이, 3×ZBP-결합된 코어셀 나노입자가 수지상세포의 사이토플라즘 내로 효율적으로 운반되었다. 일부 펩타이드-코어셀 나노입자 응집체들은 펩타이드가 결합되지 않은 코어셀 나노입자와 같이 엔도솜 또는 리소솜에 부분적으로 공존하기도 했다(White bar: 10 μm).

[0098] **실시예 8: 산화아연 나노입자와 산화아연-결합성 펩타이드 아미노산 서열을 포함한 CEA 종양 항원 복합체의 수지상세포 내 전달 효율**

[0099] 실시예 8에서는 산화아연 나노입자와 산화아연-결합성 펩타이드 아미노산 서열을 포함한 CEA 종양 항원 결합체의 수지상세포 내로 전달되는 효율을 알아보고자 하였다. 산화아연 나노입자와 산화아연-결합성 펩타이드 아미노산 서열을 포함한 CEA 종양항원 결합체의 수지상 세포내 전달 효율을 FACS 분석법을 사용하여 확인하였다. 마우스의 골수에서 분리된 미성숙 수지상세포(1×10^6 cells)를 CEA 종양항원과 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 세포 내로 전달된 종양항원의 양을 FACS로 분석하였다. 산화아연 나노입자(50 μg)와 CEA 종양항원(20 μg) 결합체를 PBS에서 1시간 동안 반응시켰다.

[0100] 대조군 및 실험군으로서 a) 산화아연 나노입자 처리군, b) CEA 종양항원 처리군, c) 산화아연-결합성 펩타이드를 포함하는 재조합 CEA 종양항원 처리군, d) 산화아연 나노입자와 CEA 종양항원을 함께 처리한 군, e) 산화아연 나노입자와 산화아연-결합성 펩타이드 아미노산 서열을 포함한 CEA 종양항원 결합체 처리군으로 나누어 분석한 결과, 도 7d에서 볼 수 있는 바와 같이, 산화아연 나노입자와 산화아연-결합성 펩타이드 아미노산 서열을 포함한 CEA 종양항원이 결합체를 형성할 수 있는 실험군에서만 수지상세포 내에서 CEA 종양항원이 세포 내로 전달되었음을 확인할 수 있었다 (코어셀 나노입자: 산화아연 코어셀 나노입자, CEA: 종양항원, 3Xzbp-CEA: 산화아연-결합성 펩타이드(3×ZnOpep-1)가 결합된 종양항원). 이는 향후 산화아연 나노입자를 이용하여 산화아연-결합성 펩타이드를 포함한 CEA 종양항원의 결합체를 수지상세포 내로 도입할 수 있는 전달체로 사용가능 하다는 것을 의미한다.

[0101] **실시예 9: 산화아연 나노입자와 산화아연-결합성 펩타이드 아미노산 서열을 포함한 CEA 종양 항원 복합체의 수지상세포 내 전달에 따른 수지상 세포의 생존율 및 성숙**

[0102] 코어셀 나노입자의 로딩이 수지상세포의 생존율 및 성숙에 미치는 영향에 대해 평가하였다. 도 8a는 100 μg/ml 코어셀 나노입자를 1 내지 7일 동안 수지상 세포와 인큐베이션하였을 때의 세포 생존율을 보여주며, 도 8b는 다양한 농도의 코어셀 나노입자 (12.5 - 400 μg/ml)를 3일 동안 수지상 세포와 인큐베이션하였을 때의 세포생존율을 보여준다. 도 8에서 볼 수 있는 바와 같이, 코어셀 나노입자의 로딩은 수지상세포의 세포생존율에 영향을 미치지 않는다. 도 9는 코어셀 나노입자의 로딩 전과 후의 수지상세포의 성숙 마커를 보여준다. 박테리아의 LPS(lipopolysaccharide)가 수지상세포의 성숙을 위해 사용되었다. 수지상세포 상의 성숙 마커 (MHC II, CD40, CD80, and CD86)의 표면 발현은 코어셀 나노입자 로딩에 의해 영향을 받지 않았다. 종합하면, 이들 결과는 코어셀 나노입자 로딩이 수지상세포의 세포생존율이나 성숙에 영향을 미치지 않음을 제시한다.

[0103] **실시예 10: 산화아연 나노입자와 산화아연-결합성 펩타이드 아미노산 서열을 포함한 CEA 종양 항원 복합체로 표지된 수지상세포의 자기공명 분석에 의한 인 비트로 및 인 비보에서의 탐지**

[0104] 나노입자를 이용한 인 비트로 또는 인 비보 자기공명영상 분석 실험에 있어서, 효과적인 세포 표지링을 위한 최적의 조건을 결정하는 것은 매우 중요하다. 이를 위해, 먼저 수지상 세포를 다양한 농도의 코어셀 나노입자 (0 - 160 μg/ml)와 인큐베이션하였다. 도 10a에서 볼 수 있는 바와 같이, 수지상세포의 인 비트로 자기공명 이미징 결과는 코어셀 나노입자의 농도가 증가함에 따라 T2 이완 시간이 점진적으로 감소하는 것으로 나타났으며 (이미지가 어두워짐), 100 μg/ml 미만에서 포화가 되는 것으로 나타났다. 최적의 인큐베이션 시간을 정하기 위

해, 40 $\mu\text{g/ml}$ 의 코어셀 나노입자의 존재하에서 0.5 내지 24시간 동안 수지상세포를 배양하였다. 도 10b에서 볼 수 있는 바와 같이, 수지상 세포는 1시간 내에 코어셀 나노입자로 포화되었으며, 이는 앞서 살펴본 바와 같이 코어셀 나노입자가 1시간 내에 수지상세포에 의해 효율적으로 흡수됨을 나타내며, 자기공명 이미징에 있어서 T2 이완 시간의 충분한 감소를 보여준다. 도 11에서 볼 수 있는 바와 같이, Fe_3O_4 -표지된 수지상세포(○)와 비교할 때, 최초 4시간 동안 코어셀 나노입자-표지된 수지상세포(●)의 자기공명영상 분석 결과는 T2 이완 시간에 있어서 보다 신속한 감소를 나타냈다. 이들 결과는 코어셀 나노입자가 비침습적 자기공명영상 분석을 이용한 인 비보에서의 수지상세포 이동 모니터링을 위해 적용될 수 있음을 나타낸다.

[0105] 자기공명영상 분석에 의한 수지상세포 수송의 인비트로 모니터링에 대한 코어셀 나노입자의 잠재적 용도를 검증하기 위해, 코어셀 나노입자가 표지된 수지상세포를 C57BL/6 마우스의 뒷 발바닥에 주사하였다. 주사된 발바닥으로부터 슬와림프절로 이동한 수지상세포를 T2-weighted multigradient echo 자기공명 sequence를 이용하여 관찰하였다. 도 10c에서 볼 수 있는 바와 같이, 주사 48시간 후, 왼쪽 림프절 내에서 코어셀 나노입자-표지된 세포의 존재를 나타내는 저신호강도 (hypointense)를 나타내는 영역이 관찰되었다 (빨간 화살표). 예상했던 바와 같이, ZnO NP로 표지된 수지상세포의 주사 부위에 상응하는 슬와림프절에서는 T2 감소가 관찰되지 않았다 (흰색 화살표).

[0106] 코어셀 나노입자로 표지된 수지상세포는 배출 림프절의 중심부에서 관찰되었으며, 이는 T2 감소가 림프관을 통해 수송된 코어셀 나노입자 보다는 코어셀 나노입자로 표지된 수지상세포에 의한 것임을 나타낸다. 유리 나노입자는 일반적으로 림프관을 통해 수송된 후 림프절의 subcapsular region에 위치한다. 절단된 림프절의 면역조직학적 분석은 자기공명영상 분석에 의해 관찰된 T2 감소가 T 세포 영역으로 이동한 코어셀 나노입자-표지 수지상세포에 의해 야기된 것임을 보여준다 (도 10d). DAB-enhanced Prussian blue 염색과 면역조직화학염색(anti-Thy1.2, 도 10d의 상단; anti-B220, 도 10d의 하단)의 결과를 조합해 보면, 코어셀 나노입자로 표지된 수지상세포는 대부분 B220+ B 세포 소포(follicle)가 아닌 Thy1.2+ T 세포 영역 내에 존재함을 알 수 있다. 대조적으로, 산화아연으로 레이블된 DCs를 주입한 림프절에서는 철 성분을 측정할 수 없었다.

[0107] **실시예 11: 산화아연 나노입자와 산화아연-결합성 펩타이드 아미노산 서열을 포함한 CEA 종양 항원 복합체로 표지된 수지상 세포에 의해 유도된 항-종양 면역**

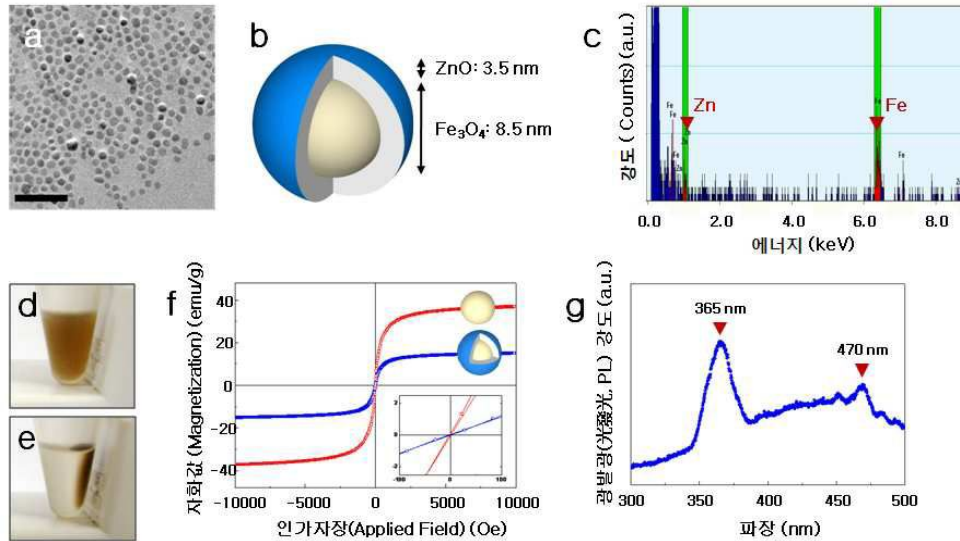
[0108] 산화아연 나노입자와 산화아연-결합성 펩타이드 아미노산 서열을 포함한 CEA 종양 항원 복합체로 표지된 수지상세포로 C57BL/6 마우스를 면역하고, CEA-특이적 세포성 면역을 분석하였다. 면역된 마우스의 비장으로부터 림프구를 얻고, 인 비트로에서 다양한 농도의 CEA로 재자극 하였다. 도 12a에서 볼 수 있는 바와 같이, 수지상세포 (코어셀 나노입자/3×ZBPCEA)로 면역화된 마우스의 림프구는 대조군의 림프구 보다 CEA에 대한 반응에 있어서 더 높은 투여량-의존적인 증식을 나타냈다. CEA 특이적인 세포독성 림프구가 전신적으로 생성되는지 여부를 조사하기 위해 면역화된 마우스로부터 얻은 비장세포(Splenocyte)를 분석하였다. 수지상세포(코어셀 나노입자/3×ZBP-CEA)로 면역화된 마우스로부터의 비장 세포를 이용할 때 CEA-발현 암세포(MC38/CEA)에 대한 현저한 세포독성 반응이 관찰된 반면, 대조군에서는 유의한 세포 독성이 관찰되지 않았다(도 12b, 우측 패널). CEA-음성 MC38 표적 세포에 대한 비장세포의 세포독성은 실험군 중 어떠한 것에서도 유의하게 나타나지 않았다 (도 12b, 좌측 패널). 이는 면역된 마우스에서 탐지된 반응이 종양 항원 CEA 특이적임을 제시한다. 우리는 그 다음으로 세포-매개 면역반응의 전형적인 표지 사이토카인인 $\text{IFN-}\gamma$ 를 생성하는 T 세포의 생성을 조사하였다. 비장세포에서 CEA-특이적 CD8^+ T 세포 면역 반응을 세포내 사이토카인 염색 및 CEA 항원의 존재 또는 부재하에서의 유세포분석을 통해 조사하였다. $\text{IFN-}\gamma$ -분비 CD8^+ T 세포의 빈도는 수지상세포(코어셀 나노입자/3×ZBP-CEA)로 면역화된 마우스로부터 얻은 CD8^+ T 세포에서만 오직 종양 항원으로서의 자극 후 대략 10배 정도 증가하였다. 대조적으로, 다른 대조군으로부터 얻은 CD8^+ T 세포는 면역 후 유의한 $\text{IFN-}\gamma$ 분비를 나타내지 않았다 (도 12c). 수지상세포 (코어셀 나노입자/3×ZBPCEA) 군은 다른 수지상세포 군에 비해 림프절에서 CEA-특이적인, $\text{IFN-}\gamma$ -생산 CD4^+ 또는 CD8^+ T 세포들을 생성하는데 있어서 보다 효과적이었다 (도 13). 이 결과는 수지상세포(코어셀 나노입자/3×ZBP-CEA)가 인 비보에서 CEA 특이적인 세포성 면역을 효과적으로 생성할 수 있음을 나타낸다.

[0109] C57BL/6 마우스의 옆구리에 MC38/CEA 세포를 주입하고, 수지상세포(코어셀 나노입자/3×ZBP-CEA) 면역에 따른 종양의 성장을 관찰하여 수지상세포(코어셀 나노입자/3×ZBP-CEA)의 항종양 면역성을 평가하였다. 종양 접종 후 7일 후, 마우스들을 일주일 간격을 두고 주 1회씩 수지상세포를 4회 면역하였다. 도 14a에서 볼 수 있는 바와 같이, 대조군과 비교하여 수지상세포(코어셀 나노입자/3×ZBP-CEA)가 주입된 마우스에서 종양 성장이 보다 억제되었다(□: NP/3×ZBP-CEA, ■: NP/CEA, ▽: 3xZBP-CEA, ▼: CEA, ○: NP, ●: DC). 또한, 도 14b에서 볼 수

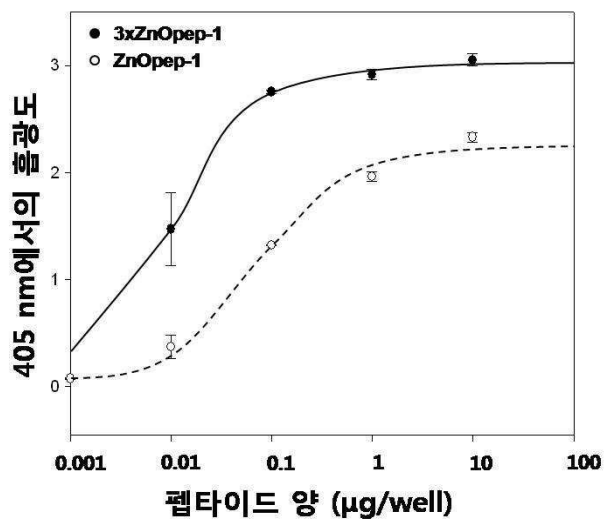
있는 바와 같이, 종양 접종 40일 후, 수지상세포(코어셀 나노입자/3×ZBP-CEA)로 처리된 5마리의 마우스가 모두 생존한 반면, 다른 모든 군의 마우스들은 죽었다. 수지상세포(코어셀 나노입자/3×ZBP-CEA)로 면역화된 마우스의 평균 생존기간은 대조군 마우스들에 비해 평균 10.5 ~ 19.5일 연장되었다. 이러한 결과는 수지상세포(코어셀 나노입자/3×ZBP-CEA)가 대조군에 비해 CEA-양성 종양에 대한 보다 강력한 보호 면역 반응을 유도함을 나타낸다.

도면

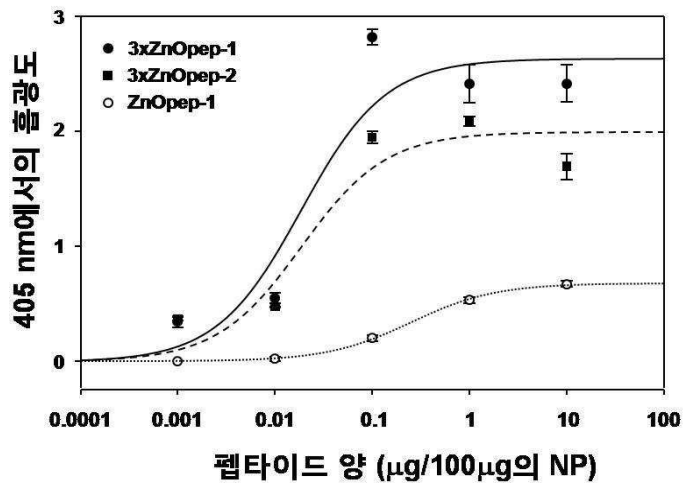
도면1



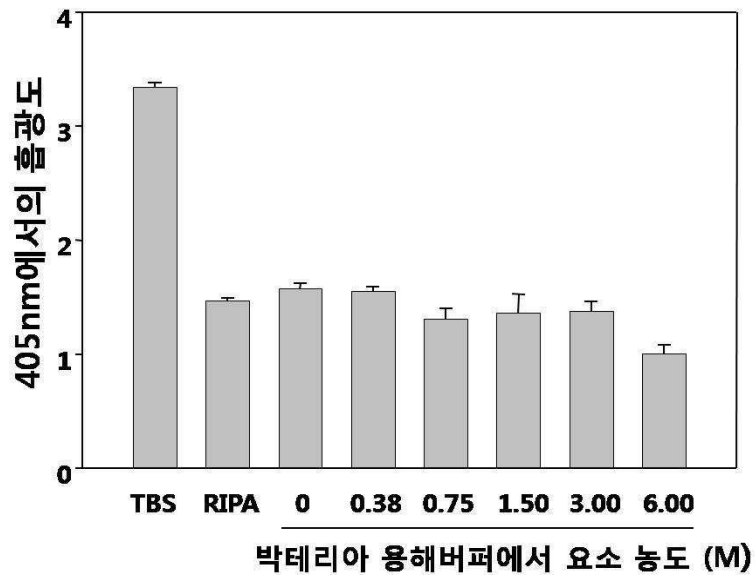
도면2



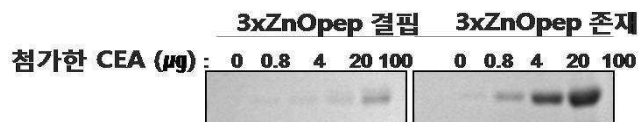
도면3



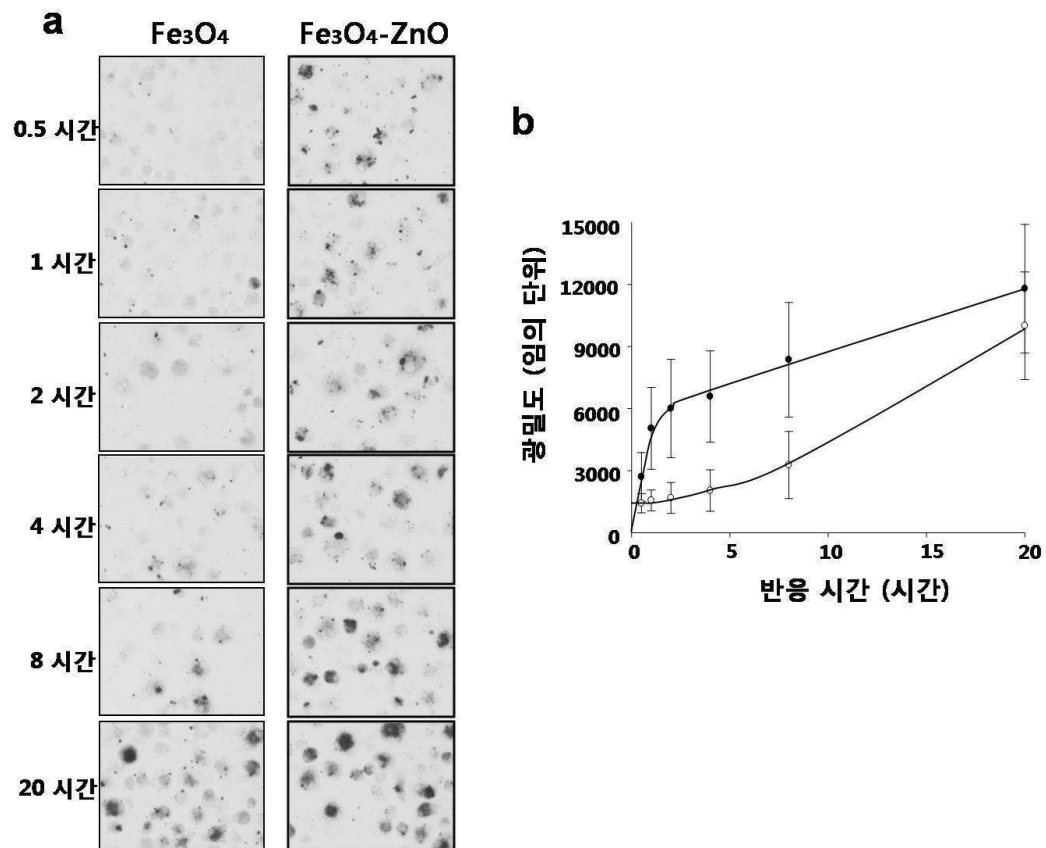
도면4



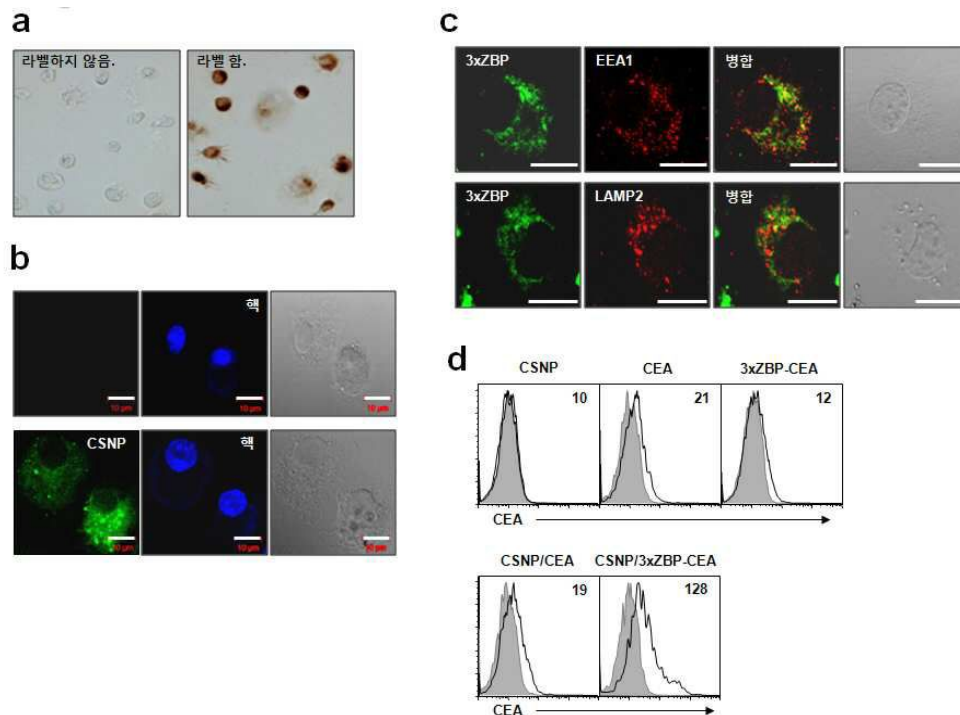
도면5



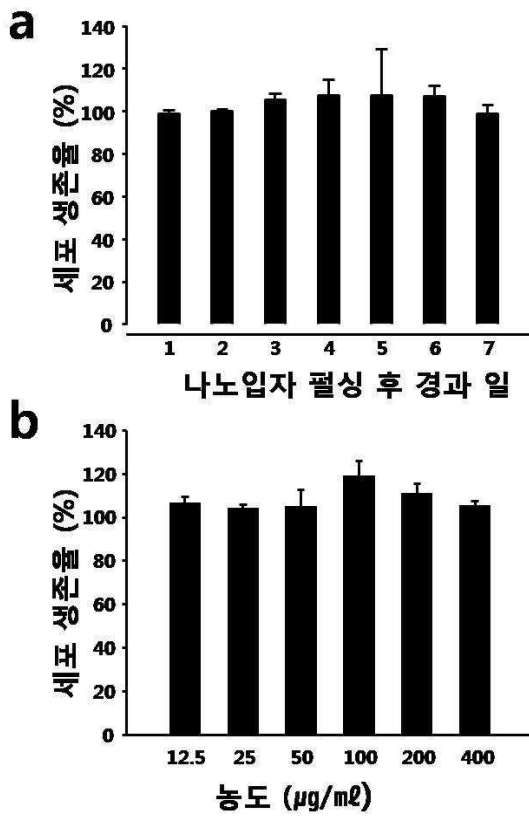
도면6



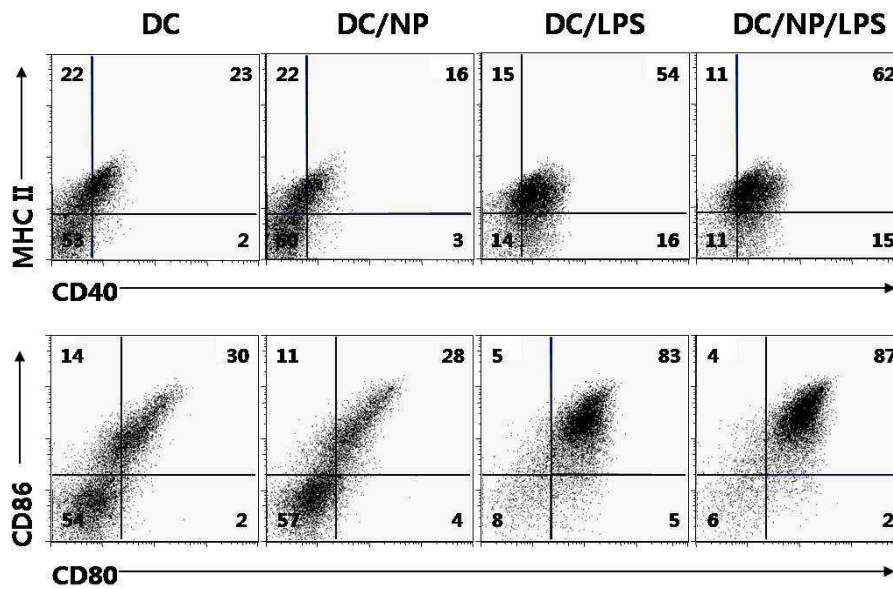
도면7



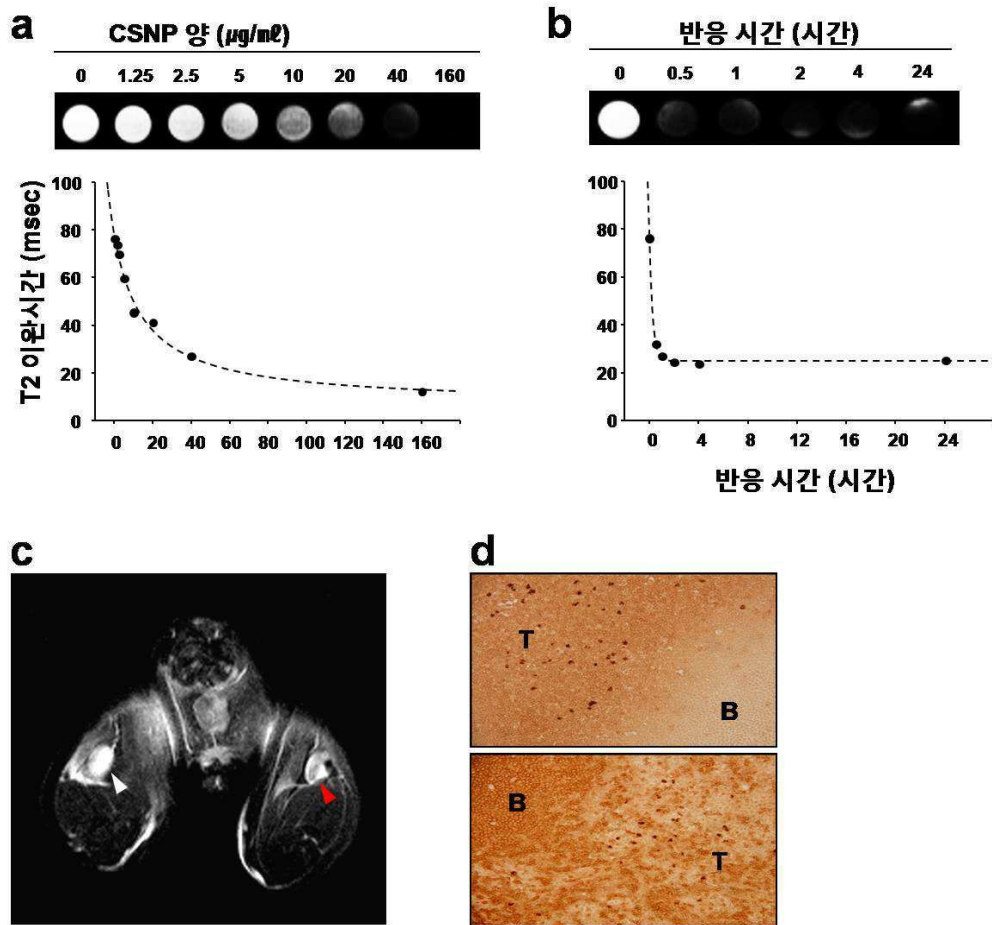
도면8



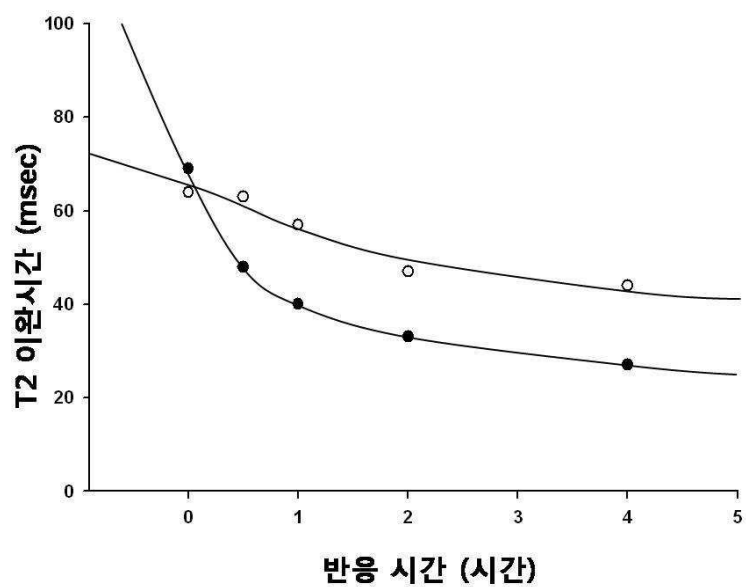
도면9



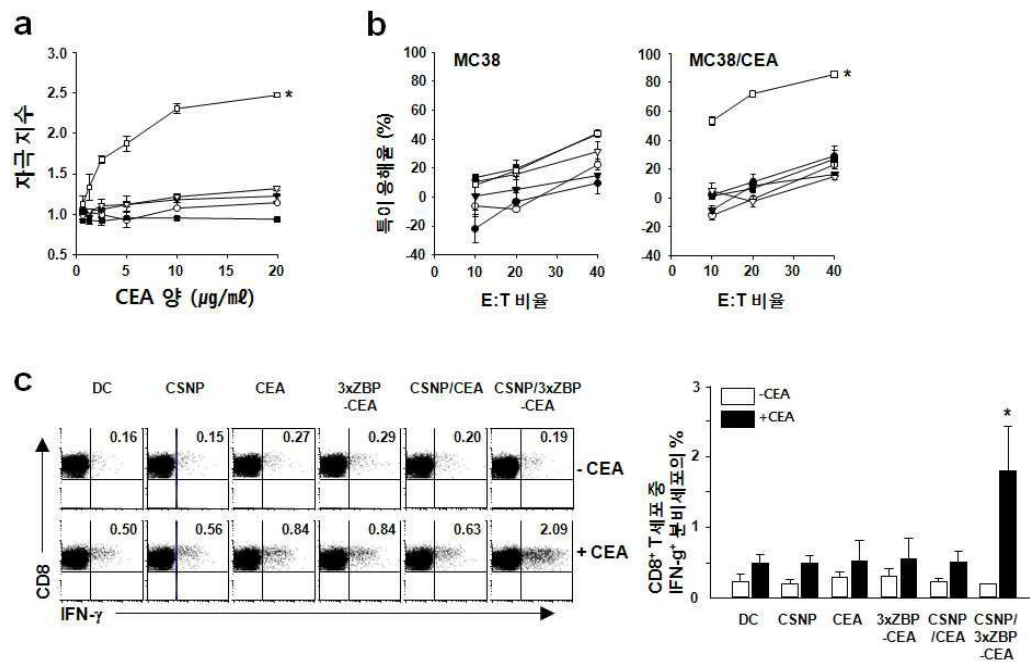
도면10



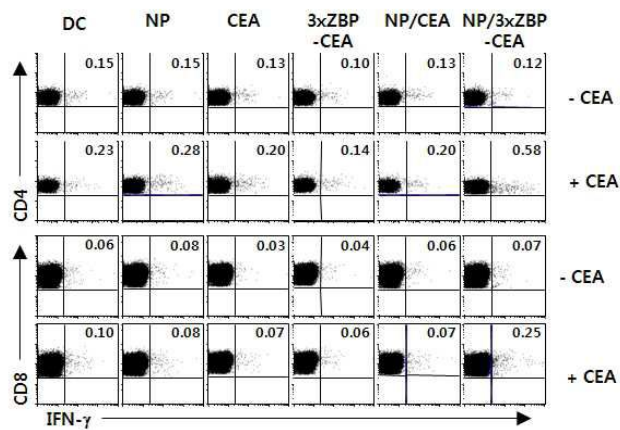
도면11



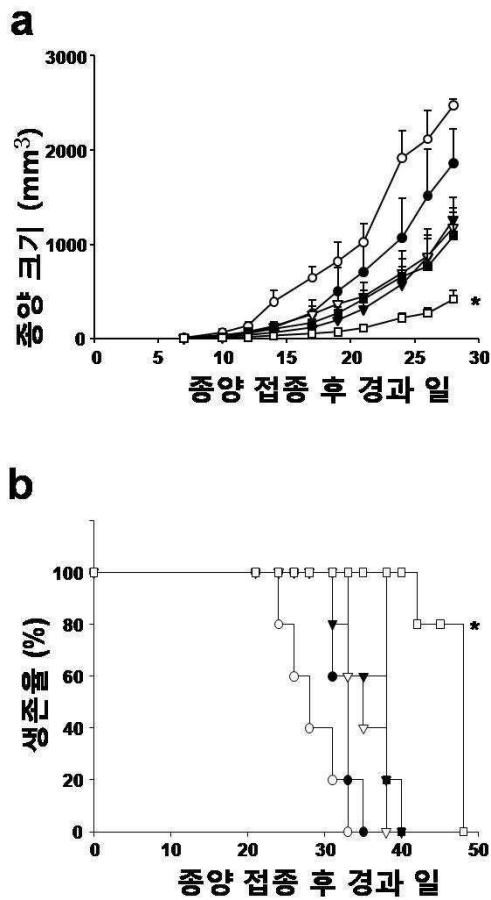
도면12



도면13



도면14



서열 목록

- <110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
SNU R&DB FOUNDATION
- <120> COMPLEX OF ZINC OXIDE NANOPARTICLE AND PROTEIN COMPRISING ZINC
OXIDE-BINDING PEPTIDE, AND USE THEREOF
- <130> P101351
- <150> KR10-2009-0105510
- <151> 2009-11-03
- <160> 4
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 9
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Synthetic peptide
- <400> 1

Arg Pro His Arg Lys Gly Gly Asp Ala

1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 2

Arg Thr His Arg Lys Gly Gly Asp Ala

1 5

<210> 3

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 3

Arg Pro His Arg Lys Gly Gly Asp Ala Arg Pro His Arg Lys Gly Gly

1 5 10 15

Asp Ala Arg Pro His Arg Lys Gly Gly Asp Ala

20 25

<210> 4

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 4

Arg Thr His Arg Lys Gly Gly Asp Ala Arg Thr His Arg Lys Gly Gly

1 5 10 15

Asp Ala Arg Thr His Arg Lys Gly Gly Asp Ala

20 25