

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2010년 3월 4일 (04.03.2010)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2010/024609 A2

- (51) 국제특허분류:
C12Q 1/37 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2009/004794
- (22) 국제출원일: 2009년 8월 27일 (27.08.2009)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2008-0085497 2008년 8월 29일 (29.08.2008) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 한국과학기술연구원 (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 서울특별시 성북구 하월곡동 39-1 번지, 136-791 Seoul (KR). 재단법인 아산사회복지재단 (THE ASAN FOUNDATION) [KR/KR]; 서울특별시 송파구 풍납 2동 388-1 번지, 138-878 Seoul (KR). (주)퓨처캡 (FUTURECHEM CO., LTD.) [KR/KR]; 인천광역시 남구 용현동 253 번지 인하대학교화학과내, 402-020 Incheon (KR).
- (72) 발명자: 권
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 권익찬 (KWON, Ick-Chan) [KR/KR]; 서울특별시 노원구 중계동 신안아파

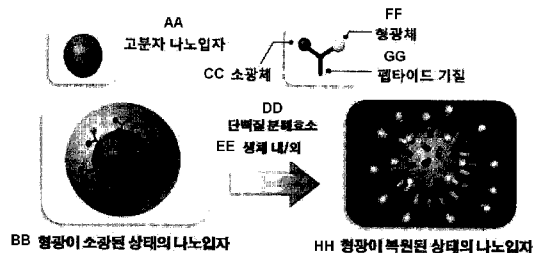
트 101-306 호, 139-922 Seoul (KR). 최귀원 (CHOI, Kui-Won) [KR/KR]; 서울특별시 동대문구 회기동 신현대아파트 1-504 호, 130-792 Seoul (KR). 김광명 (KIM, Kwang-Meyung) [KR/KR]; 서울특별시 구로구 개봉 2 동 현대아파트 121-2201 호, 152-755 Seoul (KR). 윤인찬 (YOUN, In-Chan) [KR/KR]; 서울특별시 광진구 노유동 829 번지 한강 현대아파트 102-1301 호, 143-764 Seoul (KR). 이슬기 (LEE, Seul-Ki) [KR/KR]; 서울특별시 강남구 논현동 86-12 번지, 135-818 Seoul (KR). 박경순 (PARK, Kyeong-Soon) [KR/KR]; 전라남도 담양군 금성면 대성 1 구 781-2 번지, 517-812 Junranam-Do (KR). 문대혁 (MOON, Dae-Hyuk) [KR/KR]; 서울특별시 송파구 문정 1 동 1 번지 문정 래미안아파트 119-1002 호, 138-201 Seoul (KR). 지대윤 (CHI, Dae-Yoon) [KR/KR]; 서울특별시 용산구 이촌동 407 번지 한가람아파트 215-804 호, 140-030 Seoul (KR). 이승진 (LEE, Seung-Jin) [KR/KR]; 서울특별시 강동구 상일동 고덕 주공아파트 718-206 호, 134-797 Seoul (KR). 명승재 (MYUNG, Seung-Jae) [KR/KR]; 서울특별시 강남구 도곡 2 동 527 번지 도곡테크아파트 405-1303 호, 135-506 Seoul (KR).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: NANOPARTICLE SENSOR FOR MEASURING PROTEASE ACTIVITY AND METHOD FOR MANUFACTURING THE SAME

(54) 발명의 명칭 : 단백질분해효소 활성 측정용 나노입자 센서 및 그 제조방법

[Fig. 1]



- AA ... Polymer nanoparticle
BB ... Nanoparticle of quenched fluorescence
CC ... Quencher
DD ... Protease
EE ... In vivo/in vitro
FF ... Fluorophore
GG ... Peptide substrate
HH ... Nanoparticle of recovered fluorescence

(57) Abstract: The present invention relates to a nanoparticle sensor for measuring protease activity for protease imaging and a method for manufacturing the same. More specifically, the present invention relates to a nanoparticle sensor for measuring protease activity in which a fluorophore- and quencher-conjugated peptide substrate is conjugated to a biocompatible polymer nanoparticle. The peptide substrate is specifically lysed by a protease. The sensor according to the present invention is capable of inhibiting emission of fluorescence with high extinctive activity of the quencher on a fluorescent material. But strong fluorescence is specifically emitted only if the peptide substrate is lysed by a specific protease. Therefore, the sensor is especially useful as a method for screening a novel drug such as a protease overexpression inhibitor, and early diagnosis of incurable diseases and various diseases such as autoimmune diseases including cancer, osteoarthritis, rheumatoid arthritis, and dementia.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



(74) **대리인: 박장원 (PARK, Jang-Won)**; 서울특별시 서울 강남구 논현동 200 번지 제우빌딩 5 층, 135-010 Seoul (KR).

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

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

공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

본 발명은 단백질분해효소의 영상화를 위한, 단백질분해효소 활성 측정용 나노입자 센서 및 그 제조방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 형광체 및 소광체가 결합된, 단백질분해효소에 의해 특이적으로 분해되는 펩타이드 기질이 생체 적합성 고분자 나노입자에 결합된 단백질분해효소 활성 측정용 나노입자 센서에 관한 것이다. 본 발명에 따른 센서는 소광체의 형광물질에 대한 높은 소광 능력으로 형광이 발광하지 않은 상태로 있다가 특정 단백질분해효소에 의하여 펩타이드 기질이 분해가 되어야만 강한 형광을 특이적으로 발광함으로써, 특히, 단백질분해효소 과다 발현 억제제와 같은 신약을 스크리닝하는 방법, 암, 골 관절염, 류마티스 관절염, 치매 등 자가면역질환과 같은 다양한 질병 및 난치병의 조기 진단에 유용하게 사용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 단백질분해효소 활성화 측정용 나노입자 센서 및 그 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 단백질분해효소의 영상화를 위한, 단백질분해효소 활성화 측정용 나노입자 센서 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 우리 몸속 세포는 대부분 단백질로 구성되어 있으며, 수많은 단백질분해효소들이 세포에 나쁜 영향을 끼칠 수도 있으므로, 대부분이 비활성상태로 생성되고, 특이적으로 활성화된다. 즉, 단백질분해효소는 비가역적인 펩타이드 결합의 가수분해를 통하여 단백질의 활성이나 운명을 조절한다. 예컨대 단백질들의 세포내부나 외부위치 지정 조절 또는 세포 표면으로부터의 분리, 다양한 성장인자 호르몬, 사이토카인, 효소 단백질분해효소의 활성화 또는 비활성화, 수용체의 작용제(agonist)의 길항제(antagonist)로의 전환 등이 있다.
- [3] 단백질 분해 효소는 넓은 범위에서 다양한 세포기능을 조절하는 역할을 하고, 이는 생리활성 물질의 분해를 통하여 이루어지기 때문에, 모든 생명체의 생명현상에 대한 단백질분해효소의 기능 및 역할은 매우 중요하다. 예를 들어, 특정 단백질분해효소의 결핍이나 부족 또는 과다발현은 중대한 결과를 초래하는데, 이는 암, 관절염, 퇴행성 신경질환, 심혈관계 및 자가 면역 염증질환 등으로 나타날 수 있다. 따라서 제약업계에서 보면 단백질분해효소와 그의 기질 단백질은 신약개발의 주요 표적이며 지대한 관심을 가지고 있는 실정이다.
- [4] 단백질분해효소의 다양한 역할과 최근 다양한 게놈 프로젝트의 완결에 기인하여 단백질분해효소의 세포 및 체내 역할 규명이 활발히 이루어지고 있으며 인간게놈 프로젝트에 따르면 인간의 유전자 중 약 500개 이상의 단백질분해효소 관련 유전자가 파악되었다. 최근 단백질분해효소는 암과 치매와 같은 다양한 인간 질병에 중추적인 역할을 하며 원인을 제공 하고 있음이 새로이 밝혀지고 있다. 예를 들어, 기질 금속단백분해효소(matrix metalloprotease, MMP)는 과거 세포 및 체내에서 세포외 기질(extracellular matrix)을 분해하는 인자로 인식되었지만, 다양한 연구를 통해 이들이 인테그린(integrin) 신호전달과 세포주위 기질(pericellular matrix)의 분해에 따른 세포 운동에 관련되어 있음이 밝혀졌다. 또한 MMP는 신규 혈관형성 현상, 암세포의 침윤, 전이 등 암 성장에 있어서 중요한 역할을 담당하고 있음이 밝혀져 있다. 또한 세포 사멸 (cell apoptosis)은 다양한 질환 발생 및 치유에 기반한 생물학적 과정에서 핵심적인 역할을 하며, 면역 체계 기능과 결합 세포를 제거하는데 중추적 역할을 한다. 세포 사멸이 제대로 작동하지 않거나 병원체에 의하여 손상되면, 그 결과는

치명적일 수 있으며, 암, 알츠하이머 병, 에이즈와 같은 다양한 난치성 질환으로 발전할 수 있다. 이에 MMP 및 세포 사멸에 중추적 역할을 하는 카스파제를 타겟으로 한 신약 개발이 선진국 거대 제약회사를 중심으로 다양하게 이루어지고 있다.

- [5] 새로운 기질 단백질들이 밝혀짐에 따라 앞으로 여러 가지 단백질 분해 효소군의 생리적 기능이 새롭게 조명될 것이며, 이에 따라 새로운 신약 표적 단백질들이 발굴될 것으로 기대되고 있다. 하지만, 특이적인 단백질분해효소의 활성 및 발현 양을 정량적으로 영상화하여 분석하거나, 생체 내에서 단백질분해효소 발현 정도를 비침습적으로 영상화하는 기법이 전무하여 관련 기술개발이 시급한 실정이다.
- [6] 현재 이용되고 있는 대표적인 단백질분해효소의 측정 방법은 2-D 젤과 다단계 액체 크로마토그래피 방법, 효소면역측정법(The Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ELISA) 또는 단백질분해효소에 특이적으로 분해되는 펩타이드 기질에 형광체를 결합하여 분광법(spectroscopy)으로 피크 이동(peak shift) 정도를 측정하는 방법 등이 있다. 그러나 이러한 방법들은 다단계의 측정 프로토콜이 필요하여 신약개발과 같이 많은 약물을 스크리닝하는데 이용하기에는 경제적 시간적으로 효율적이지 못하다. 또한, 위와 같은 방법은 특정 단백질분해효소의 발현을 체내에서 탐지하거나 발현 양을 정량적으로 분석하여 질병의 조기진단에 이용하기는 불가능하다.
- [7] 상기와 같은 단점을 해결하기 위하여 최근 분자영상기법을 이용하여 단백질분해효소를 측정하는 방법이 개발되었다.
- [8] 가장 대표적인 기술은 2001년 하버드 의과대학에서 개발된 단백질분해효소 영상화를 위한 고분자 센서이다. 상기의 센서는 단백질분해효소에 의해 분해가 가능한 형광체-펩타이드 기질-생체 적합성 고분자의 화학적 결합으로 이루어져 있다. 근적외선 형광체가 서로 가까운 거리 (수십 nm)에 있을 때 형광체의 발광(emission)과 여기 스펙트럼(excitation spectra)이 공유되어 FRET(fluorescence resonance energy transfer) 원리에 의하여 형광체의 형광은 소광된다. 이에 상기의 센서는 형광체-펩타이드가 고분자에 결합되어 있을 시에는 형광체-형광체의 물리적 결합으로 형광이 소광되어 있다가 단백질분해효소에 의하여 펩타이드가 분해되고 이에 형광체-형광체의 거리가 멀어지면 형광이 복원되어 단백질분해효소 발현정도를 영상화할 수 있다. 광학 영상기법에서 가장 중요한 것은 신호대노이즈(signal-to-noise (S/N)) 비율이다. 배경(Background)의 형광이 높으면 표적으로 하는 생체 분자 또는 조직에서의 영상 해상도(resolution)가 낮아질 수밖에 없다. 이에 형광체의 소광은 매우 중요하며 형광체가 소광상태에 있어 형광을 전혀 나타내지 않다가 원하는 생체 분자 또는 질환 부위에서 형광이 발광하면 높은 S/N 비율을 나타낼 수 있으며 결과적으로 선명한 영상을 얻을 수 있다. 상기 연구에서는 근적외선 형광체가 가까운 거리에 있을때 형광이 소광되는 자가소광원리 (self-quenching)를 이용하여 센서의 소광을 이루었다.

하지만 FRET에 기인한 자가소광은 형광체가 매우 가까운 거리에 있을 시 이루어지며 형광 소광율도 뛰어나지 못한 단점이 있다.

- [9] 이를 해결하고자 다양하게 사용되고 있는 것이 소광체 (quencher)이며, 다양한 소광체 중 완전 흡광체인 블랙홀 소광체(black hole quencher) 등은 다양한 흡수 파장을 가지고 있다. 일 예로, BHQ-1은 480 - 580 nm, BHQ-2는 550 - 650 nm, BHQ-3는 620 - 730 nm 파장대의 형광을 매우 효율적으로 흡수한다. 형광체-펩타이드 기질-소광체의 단일 분자는 단백질분해효소에 의해 펩타이드 기질이 분해되면 형광이 복원되어 단백질분해효소 양을 측정할 수 있으며, 형광체-형광체 결합의 자가소광보다 높은 형광 소광율을 나타낸다. 그러나, 형광체-펩타이드 기질-소광체는 펩타이드 고유 특성인 낮은 생체 내 안정성 및 세포 비 투과성으로 반응액 내에서의 단백질분해효소 양을 정량적으로 분석하는 시험관 내 키트(in vitro kit)에만 응용 될 수 있다. 또한 형광체-펩타이드 기질-소광체의 단일 분자는 생체 내에서만 영상화가 가능한 높은 형광 방출이 어렵기 때문에 생체 내에서의 단백질 발현을 실시간으로 측정하기에는 어려움이 있다.

발명의 상세한 설명

- [10] 해결하고자 하는 과제
- [11] 본 발명의 목적은 세포 및 체내의 조직에서 발현하는 단백질분해효소를 선택적으로 영상화하기 위한, 형광체, 단백질분해효소에 의해 특이적으로 분해되는 펩타이드 기질 및 상기 형광체의 발광을 흡수하는 소광체가 생체 적합성 고분자 나노입자에 결합된 단백질분해효소 활성 측정용 나노입자 센서 및 그 제조방법을 제공하는 것이다.
- [12] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 나노입자 센서를 이용하여 이를 유효성분으로 포함하는 암, 뇌졸중, 자가면역질환 진단용 조성물 또는 단백질분해효소의 정량분석용 조성물 등을 제공하는 것이다.
- [13] 과제 해결 수단
- [14] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은,
- [15] 형광체 및 소광체가 결합되고, 단백질분해효소에 의해 특이적으로 분해되는 펩타이드 기질에 생체 적합성 고분자 나노입자에 결합된 단백질분해효소 활성 측정용 나노입자 센서를 제공한다.
- [16] 상기 단백질분해효소 활성 측정용 나노입자 센서는 다음의 구조식 1을 가지는 것일 수 있다:
- [17] [구조식 1]
- [18]
- $$\begin{array}{c} \text{A} - \text{B} - \text{C} \\ | \\ \text{D} \end{array}$$
- [19] 여기서, 상기 A는 형광체이고, 상기 B는 상기 단백질분해효소에 의하여

특이적으로 분해되는 펩타이드 기질이며, 상기 C는 상기 형광체의 발광을 흡수하여 소광 효과를 나타낼 수 있는 소광체이고, 상기 D는 암 및 염증질환 부위에 특이적으로 축적가능한 생체적합성 고분자로 이루어진 나노입자.

- [20] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 펩타이드 기질의 C-터미널 말단의 카르복실산 또는 시스테인의 -SH기와 상기 생체적합성 고분자 나노입자가 결합되는 것일 수 있다.
- [21] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 펩타이드 기질은 상기 형광체 및 상기 소광체와 펩티드 결합된 것일 수 있다.
- [22] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 생체적합성 고분자 나노입자는, 키토산, 텍스트란, 히알루론산, 폴리아미노산 및 헤파린으로 이루어진 군에서 선택된 생체 적합성 고분자 및 담즙산, 지방산 및 콜레스테롤로 구성된 군에서 선택된 소수성 물질이 결합된 나노입자일 수 있다.
- [23] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 단백질분해효소는 기질 금속단백분해효소(matrix metalloproteinases; MMP), 트롬빈, FXIIIa(factor Xiiiia), 카스파제(caspase), 우로키나아제 플라스미노겐 활성화제(urokinase plasminogen activator, uPA), HIV 프로테아제, DPP-IV(dipeptidyl peptidase) 및 프로테아좀(proteasome)으로 이루어지는 군에서 선택되는 것일 수 있다.
- [24] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 형광체는 적색 또는 근적외선의 형광을 발광하는 형광체일 수 있고, 상기 형광체는 시아닌, 플루오레신, 테트라메틸로드아민, 알렉사, 보디피 및 이들의 유도체로 이루어지는 군에서 선택되는 것일 수 있다.
- [25] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 펩타이드는 단백질분해효소에 의해 특이적으로 분해되는 펩타이드 기질일 수 있다.
- [26] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 소광체는 형광을 소광시킬 수 있는 블랙홀 소광체(blackhole quencher), 블랙베리(blackberry quencher) 소광체 및 이들의 유도체로 이루어지는 군에서 선택될 수 있다.
- [27] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 단백질분해효소는 MMP이고, 상기 A는 Cy5.5이고, 상기 B는 MMP에 특이적 분해되는 펩타이드 기질이고, 상기 C는 BHQ-3이고, 상기 D는 키토산 나노입자일 수 있다.
- [28] 다른 측면에서, 본 발명은 상기 단백질분해효소 활성 측정용 나노입자 센서를 유효성분으로 함유하는, 상기 단백질분해효소의 과다발현을 억제하는 약물 또는 약물의 효능의 스크리닝을 위한 조성물을 제공한다.
- [29] 또 다른 측면에서, 본 발명은, 다음의 단계를 포함하는 상기 단백질분해효소 활성 측정용 나노입자 센서의 제조방법을 제공한다:
- [30] (a) 특정 단백질분해효소에 특이적인 펩타이드 기질에 근적외선 형광체를 반응시켜 결합하는 단계;
- [31] (b) 상기 펩타이드 기질에 소광체를 결합시키는 단계; 및
- [32] (c) 상기 형광체-펩타이드 기질-소광체에 고분자 나노입자를 결합시켜

단백질분해효소 활성 측정용 나노입자 센서를 제조하는 단계.

- [33] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 단백질분해효소 활성 측정용 나노입자를 유효성분으로 함유하는 편평상피세포암, 자궁암, 자궁경부암, 전립선암, 두경부암, 췌장암, 뇌종양, 유방암, 간암, 피부암, 식도암, 고환암, 신장암, 대장암, 직장암, 위암, 신장암, 방광암, 난소암, 담관암 및 담낭암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 암 진단용 조성물을 제공할 수 있다.
- [34] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 단백질분해효소 활성 측정용 나노입자를 유효성분으로 함유하는, 자가면역질환 진단용 조성물을 제공할 수 있다.
- [35] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 자가면역질환은 염증성 질환으로, 골관절염 또는 류마티스 관절염일 수 있다.
- [36] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 단백질분해효소 활성 측정용 나노입자 센서를 유효성분으로 함유하는, 세포 및 조직에서 발현되는 상기 단백질분해효소의 정량분석용 조성물을 제공한다.

[37] **효과**

- [38] 상술한 바와 같이, 본 발명에 따른 형광체, 단백질분해효소에 의해 특이적으로 분해되는 펩타이드 기질 및 상기 형광체의 발광을 흡수하는 소광체가 생체 적합성 고분자 나노입자에 결합된 단백질분해효소 활성 측정용 나노입자 센서는, 소광체의 형광물질에 대한 높은 소광 능력으로 형광이 발광하지 않은 상태로 있다가 특정 단백질분해효소에 의하여 펩타이드 기질이 분해가 되면 강한 형광을 특이적으로 발광함으로써, 특히, 단백질분해효소 과다 발현을 억제하는 억제제와 같은 신약을 스크리닝하는 방법, 암, 골 관절염, 류마티스 관절염, 치매 등 자가면역질환 등의 다양한 질병 및 난치병의 조기 진단에 유용하게 사용될 수 있다.

[39] **발명의 실시를 위한 구체적인 내용**

- [40] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 세포 및 체내에서 발현되는 단백질 분해 효소에 특이적으로 분해되는 임의의 펩타이드 기질에 형광체와 소광체를 결합하여 형광의 소광율을 극대화하고, 이를 생체 적합성, 세포 침투성 고분자 나노입자에 결합하여, 다양한 단백질분해효소에 특이적으로 반응하고, 표적으로 하는 특정 단백질분해효소에만 형광이 발생하도록 하는 단백질분해효소 활성 측정용 나노입자 센서에 관한 것이다.

- [41] 보다 구체적으로, 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 단백질분해효소 활성 측정용 나노입자 센서는 다음의 구조식 1을 가지고, 세포 또는 생체 조직 내에서 발현되는 단백질분해효소 활성 측정용 나노입자 센서일 수 있다:

- [42] [구조식 1]

- [43]
- $$\begin{array}{c} \text{A} - \text{B} - \text{C} \\ | \\ \text{D} \end{array}$$

- [44] 여기서, 상기 A는 형광체이고, 상기 B는 상기 단백질을 분해효소에 의하여 특이적으로 분해되는 펩타이드 기질이며, 상기 C는 상기 형광체의 발광을 흡수하여 소광 효과를 나타낼 수 있는 소광체이고, 상기 D는 암 및 염증 질환 부위에 특이적으로 축적가능한 생체적합성 고분자로 이루어진 나노입자이다.
- [45] 여기서, 일 구체예로, 상기 펩타이드 기질의 C 말단의 카르복실산 또는 시스테인의 -SH기와 나노입자가 결합될 수 있다.
- [46] 여기서, 상기 펩타이드 기질에 상기 형광체 및 상기 소광체는 상기 펩타이드 기질과 펩타이드 결합을 형성할 수 있는 모든 부위에 결합 가능하며, 일 예로, 아미노 말단, 라이신, 시스테인, 또는 카르복실산에 결합될 수 있다.
- [47] 상기 단백질을 분해효소는 기질 금속단백분해효소(matrix metalloproteinases; MMP), 트롬빈, FXIIIa(factor Xiiiia), 카스파제(caspase), 우로키나아제, 플라스미노겐 활성화제(urokinase plasminogen activator, uPA), HIV 프로테아제, DPP-IV(dipeptidyl peptidase) 또는 프로테아좀(proteasome) 등 일 수 있고,
- [48] 상기 펩타이드 기질(C)은 단백질을 분해효소에 의해 특이적으로 분해되는 펩타이드 기질로, 예컨대 MMP (matrix metalloprotenase), 트롬빈, 세포사멸시 활성화되는 카스파제(caspase), 프로테아좀(proteasome) 등의 표적이 되는 펩타이드일 수 있다. 특정 단백질을 분해효소에 따라 사용되는 상기 펩타이드 기질은 다르다.
- [49] 하기 표 1에서 다양한 단백질 분해 효소에 대한 펩타이드 기질 서열을 예시적으로 나타낸다. 그러나, 본 발명에 따른 나노입자 센서에 사용되는 펩타이드 기질이 이들 특정 서열의 펩타이드로 한정되는 것은 아니다.
- [50] 표 1

질환	단백질 분해효소	펩타이드 기질/ 분해되는 site
암 (Cancer)	MMP-2/9	PLG/LP
	MMP-7	VPLS/LTM
죽상동맥경화증(Atherosclerosis)	MMP-13	PLG/MRG
류마티즘(Rheumatoid)	Cathepsins B	K/K
	Cathepsins D	PICF/FRL
관절염(arthritis)	PSA	HSSLQ/
세포사멸(Apoptosis)	Capspase-1	WEHD/
	Capspase-3	DEV D/
고지혈증(Cardiovascular)	Thrombin	F(Pin)R/S
	Fijian	NQ/EQVS
당뇨병(Diabetes)	DPP-IV	GP/GP
HIV protease	HSV	GVSQNY/PIVG

- [51] 상기의 표 1과 같이, 다양한 질환에 중추적 역할을 하는 단백질분해효소가 이미 종래에 보고되어 있고, 이에 특이적으로 분해되는 펩타
- [52] 질환 중요 인자 단백질 분해효소 및 펩타이드 기질 이드 기질 또한 많이 보고되어 있다. 상기 표 1에 개시된 바와 같은 펩타이드 기질들 이외에도, 시그마-알드치리 회사 홈페이지에는 효소에 의해 다양하게 분해되는 펩타이드 기질이 개시되어 있다 (<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/TablePage/14573356> 참고) 다양하게 사용될 수 있고, 이를 이용하여 다양한 단백질분해효소를 검출할 수 있다.
- [53] 상기 형광체(A)는 가시광선 영역 또는 근적외선의 형광을 발광하는 형광체일 수 있고, 일 예로써, 플루오레신(fluorescein), 보디피(BODIPY), 테트라메틸로드아민(Tetramethylrhodamine), 알렉사(Alexa), 시아닌(Cyanine), 알로피코시아닌(allopicocyanine), 기타의 형광을 발생시키는 형광체 또는 이들의 유도체가 사용될 수 있다. 또한, 양자 수득량(quantum yield)이 높은 형광체를 사용하는 것이 바람직하다. 상기 형광체 중 특히 시아닌계, 알렉사계는 근적외선 빛을 방출 및 흡수하므로 세포, 혈액 및 생체 조직 등과 간섭 또는 흡수가 최소화되므로 더욱 바람직하다.
- [54] 상기 소광체(C)는 형광체가 결합된 펩타이드 기질에 화학적으로 결합된 소광체는 형광체가 발산하는 파장의 빛을 흡수하여 강한 소광효과(quenching effect)를 이룸으로써, 펩타이드가 특정 단백질분해효소에 의해 분해되지 않으면

형광이 발광되지 않으며, 이러한 소광효과는 형광체와 소광체의 거리가 수십 nm 이내에 있을 경우에 나타난다. 다시 말해, 특정 단백질분해효소와 반응하여 펩타이드 기질이 분해되면 펩타이드에 결합된 형광체와 소광체가 서로 분리되어 멀어지면서 소광효과가 없어지고, 이에 따라 형광체 고유의 형광을 발광하여 단백질분해효소의 정성 및 정량적 분석이 가능하게 된다.

- [55] 본 발명에서 소광체는, 형광체에서 나오는 빛의 파장을 흡수하여 소광효과를 최대화할 수 있는 소광체로, 형광체의 발광파장과 같거나 거의 유사한 파장대의 소광체를 사용하여야 소광효과를 극대화할 수 있기 때문에, 형광체의 발광 파장의 범위에 따라 사용되는 소광체의 종류가 달라진다.
- [56] 본 발명에 있어서 소광체는, 여기된(excited) 형광체의 에너지를 흡수하지만 형광 에너지를 밖으로 방출하지 않으므로 형광체의 형광을 소광시킬 수 있는 물질인 'dark quencher'로서, 상업적으로 널리 상용화되어 있는 블랙홀 소광체(black hole quenchers) (BHQ, WO01/86001, Biosearch Technologies, Inc. Novato, CA, USA), 블랙베리 소광체(blackberry quencher) (Berry & Associates Inc. Dexter, MI, USA) 등이 있다.
- [57] 상기 나노입자 (D)는 수용액 상태에서 50 내지 500nm의 균일한 크기를 가지는 키토산, 폴리(에틸렌이민)(poly(ethylene imine)), 폴리(아미노산)(poly(amino acid)) 등의 분자량 1,000 내지 1,000,000 Da의 생체 적합성 고분자에 소수성 화합물을 결합하여 이루어진 나노입자일 수 있다.
- [58] 본원에서 사용되는 "생체적합성"이란 용어는 생체 독성 반응, 염증 반응, 면역 반응, 발암성 등을 일으키지 않아 생체에 무독 무해하고 면역학적 거부 반응을 일으키지 않으면서 생체 조직이나 생체 시스템과 좋은 친화성으로 양립할 수 있는 능력을 말한다. 또한, 상기 생체 적합성 고분자로 키토산, 텍스트란, 히알루론산, 폴리아미노산, 헤파린 등이 있으며, 바람직하게는, 친수성 키토산일 수 있으며, 분자량 10^3 내지 10^6 인 모든 종류의 키토산, 특히, 생체적합성이 뛰어난 천연 고분자인 수용성 키토산(chitosan), 보다 바람직하게는 글리콜(glycol)기가 도입되어 수용성이 증대된 글리콜 키토산을 사용할 수 있다.
- [59] 상기 생체 적합성 고분자에 결합하는 소수성 물질로는, 담즙산, 지방산, 콜레스테롤 등이 있다.
- [60] 본 발명의 구체적인 일 예로써, 본 발명의 단백질분해효소 활성 측정용 나노입자 센서에서, 상기 펩타이드(B)는 암 및 염증질환 부위에서 과다 발현되는 다양한 분해효소에 특이적으로 분해되는 펩타이드 기질이고, 형광체 (A)는 상기 펩타이드의 아미노 말단에 결합되어 근적외선 형광을 나타내는 시아닌 형광체인 Cy5.5이며, 소광체 (C)는 상기 펩타이드의 라이신, 시스테인 등과 결합되어 상기 형광체의 형광을 흡수하여 소광효과를 극대화시킬 수 있는 BHQ-3(black hole quencher-3)일 수 있다. 또한, 나노입자 (D)는 상기 펩타이드 (B)의 C터미널 말단부분의 카르복실산 또는 시스테인의 -SH 부분과 화학적으로 결합하여 소강형태의 형광체 A-B-C를 암 및 염증 부위에 특이적으로 전달할 수

있는 전달체 역할을 할 수 있다.

- [61] 아울러, 이러한 상기 나노입자 센서는 고분자 나노입자를 기반으로 이루어져 있기 때문에, 세포 침투성을 가지고 있고, EPR(enhanced permeability retention) 효과에 의하여 생체 내 암 조직을 포함한 염증성 질환 부위에 특이적으로 축적 가능하므로, 세포 및 생체 내 질환 부위에서 특징적으로 발현되는 단백질분해효소의 발현정도를 비침습적으로 측정 및 영상화할 수 있다.
- [62] 또한, 본 발명에 따른 단백질분해효소의 영상화를 위한, 단백질분해효소 활성 측정용 나노입자 센서는, 특정 단백질분해효소에 특이적으로 분해되는 펩타이드 기질에 형광체와 소광체를 결합시키고, 이를 고분자 나노입자에 결합하여 제조할 수 있다.
- [63] 보다 구체적으로는, (a) 특정 단백질분해효소에 특이적인 펩타이드 기질에 근적외선 형광체를 반응시켜 결합하는 단계; (b) 상기 펩타이드 기질에 소광체를 결합시키는 단계; 및 (c) 상기 형광이 소광된 형광체-펩타이드 기질-소광체에 고분자 나노입자를 결합시켜 단백질분해효소 활성 측정용 나노입자 센서를 제조하는 단계를 포함하는 단백질분해효소의 영상화를 위한 고분자 나노입자 센서를 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [64] 상기 제조 방법에 있어서, 필요에 따라, 상기 방법으로 제조된 형광체-펩타이드-소광체-나노입자 센서를 정제 또는 확인하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [65] 일 구체예에서, 상기 펩타이드 기질은 적절하게 합성될 수 있고, 이러한 합성은 당업자에게 공지인 다양한 펩타이드 합성 방법, 예컨대, 고체상 합성법(solid phase synthesis)에 따른 에프목방법(Fmoc strategy)을 이용할 수 있다.
- [66] 또한, 상기 합성된 펩타이드 기질의 N 말단 또는 펩타이드 중간부분에 있는 보호기를 제거하고, 펩타이드의 말단 작용기와 결합할 수 있는 형광체 또는 그 유도체를 반응시켜 결합시키고, 펩타이드의 한쪽 말단에 형광체가 결합된 펩타이드 유도체의 나머지 말단에 있는 보호기를 제거하고, 이 말단 작용기와 결합할 수 있는 형광체 또는 그 유도체를 반응시켜 결합시킬 수 있다.
- [67] 또한, 상기 결합된 형광체-펩타이드 기질-소광체를 생체적합성 고분자 나노입자에 결합시키는 경우에 있어서, 상기 생체적합성 고분자는 친수성 생체고분자 및 소수성 물질을 이용하여 화학적으로 결합시킴으로써 수용액 상태에서 균일한 나노크기의 입자를 형성시켜 수득한다.
- [68] 상기 형광체 (A)와 소광체 (C)사이의 거리는 형광체와 소광체 사이에서 발생하는 소광효과를 최대화하여, 형광체의 형광이 최소화될 수 있도록 조절한다. 형광체와 소광체 사이의 거리를 수십 나노미터 이내로 유지시킴으로써 발생하는 소광효과에 의해서 형광체의 형광 세기가 최소가 되게 합성하는 것이 바람직하다. 또한, 상기 제조된 단백질분해효소 활성 검출용 나노입자 센서인 형광체-펩타이드-소광체-나노입자 유도체는, 형광체, 소광체, 및 펩타이드 기질을 쉽게 변경하고 제어 가능하기 때문에, 원하는 특정

단백질분해효소 센서 및 원하는 파장대의 다양한 센서를 쉽게 제어할 수 있으므로, 다양한 단백질분해효소에 대한 센서를 설계할 수 있다.

[69] 따라서, 단백질분해효소의 활성 및 억제를 영상화를 통하여 빠르게 스크리닝할 수 있으므로 약물 스크리닝에 응용할 수 있고, 세포 및 조직에 실시간 세포 영상화 및 비침습적 조직 영상화를 할 수 있게 되고, 구체적으로, 상기 나노입자 센서는 생체 내 특정 조직 또는 세포에 존재하는 단백질분해효소의 존재 유무, 활성, 및 활성 억제 등을 쉽게 판별해 낼 수 있어서 세포 영상, 특정 조직 영상, 약물전달체 등의 다양한 목적으로 사용될 수 있다.

[70] 또한, 상기 단백질분해효소 활성 측정용 나노입자 센서는 편평상피세포암, 자궁암, 자궁경부암, 전립선암, 두경부암, 췌장암, 뇌종양, 유방암, 간암, 피부암, 식도암, 고환암, 신장암, 대장암, 직장암, 위암, 신장암, 방광암, 난소암, 담관암, 담낭암 등을 포함하는 암 및 류마티스 관절염, 골관절염과 같은 염증성 질환에서의 단백질분해효소를 영상화하는 방법에 이용될 수 있으며, 일 구체예로써, 상기 단백질분해효소의 영상화를 위한 센서는 치매, 뇌졸중 등을 포함하는 난치성 질환에서의 단백질분해효소를 영상화하는 방법에 이용될 수 있다.

[71] 본 발명은, 일 예로써, 상기 단백질분해효소 활성 측정용 나노입자를 유효성분으로 함유하는 편평상피세포암, 자궁암, 자궁경부암, 전립선암, 두경부암, 췌장암, 뇌종양, 유방암, 간암, 피부암, 식도암, 고환암, 신장암, 대장암, 직장암, 위암, 신장암, 방광암, 난소암, 담관암 및 담낭암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 암 진단용 조성물, 또는 치매 또는 뇌졸중 진단용 조성물 또는 자가면역질환, 구체적으로 골관절염 또는 류마티스 관절염을 비롯한 염증성 질환 진단용 조성물에 관한 것이다.

[72] 또한, 본 발명에 따른 단백질분해효소 활성 측정용 나노입자 센서의 응용으로써, 상기 단백질분해효소 활성 측정용 나노입자 센서를 이용하여 이를 유효성분으로 함유하는, 세포 및 조직에서 발현되는 상기 단백질분해효소의 정량분석용 조성물 또는 상기 단백질분해효소의 과다발현을 억제하는 약물 또는 약물의 효능의 스크리닝을 위한 조성물일 수 있다.

[73] 아울러, 상기 조성물들은 생체 내(*invivo*) 및 생체 외(*invitro*) 모두 적용이 가능하여, 신약 개발에 필요한 고성능 스크리닝(*high-throughput screening*) 방법 및 조기 질병 진단 등의 다양한 용도로 사용이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[74] 도 1은 형광 소광상태에 있다가 단백질분해효소에 의하여 특이적으로 분해되면 강한 형광이 복원되어 영상화가 가능한 펩타이드, 근적외선 형광체, 소광체 및 고분자 나노입자로 이루어진 본 발명의 단백질분해효소 활성 측정 센서의 모식도이다.

[75] 도 2는 고분자 나노입자 기반의 단백질분해효소 활성 측정 센서가 염증 부위에

특이적으로 축적되어 질환 부위에서 과다발현되는 다양한 단백질분해효소에 의해 강한 형광이 복원되는 원리를 나타내는 모식도이다.

[76] 도 3은 형광체-펩타이드-소광체로 이루어진 P1의 합성 예를 나타낸것이다.

[77] 도 4(a)는 수용액 상태에서 균일한 나노입자를 이룰 수 있는 글라이콜 키토산-담즙산 유도체의 합성 모식도이다.

[78] 도 4(b)는 수용액 상태에서 글라이콜 키토산-담즙산 유도체가 균일한 나노입자를 이루고 있음을 나타내는 입자 크기 분포도 및 TEM 사진이다.

[79] 도 5(a)는 단백질분해효소 MMP-2의 농도가 증가함에 따라 PN1의 형광 발광 정도가 일정하게 증가하여 단백질분해효소를 정량적으로 분석 가능함을 보여주는 것이다.

[80] 도 5(b)는 형광 영상 장비를 통하여 단백질분해효소 MMP-2의 농도가 증가함에 따라 형광 발광 정도가 일정하게 증가하는 것을 보여주는 것이다.

[81] 도 6(a)는 암을 유도한 암 조직과 정상 조직에 단백질분해효소 센서인 PN1을 투여한 후 MMP-2 억제제 처리를 한 것과 MMP-2 억제제 처리를 하지 않은 동물 모델의 1,2시간 후에 얻은 각 암 조직 부위의 근적외선 이미지를 나타낸 것이다.

[82] 도 6(b)는 암을 유도한 암 조직과 정상 조직에 단백질분해효소 센서인 PN1을 투여한 후 MMP-2 억제제 처리를 한 것과 MMP-2 억제제 처리를 하지 않은 동물 모델에서의 암 조직 부위의 형광 세기를 수치적으로 나타낸 것이다.

[83] 도 7은 암을 유도한 암 조직과 정상 조직에 단백질분해효소 센서인 PN1을 투여한 후 MMP-2 억제제 처리를 한 것과 MMP-2 억제제 처리를 하지 않은 동물 모델에서의 암 조직을 절개하여 형광현미경으로 관찰한 사진이다.

[84] 도 8은 골관절염을 유도한 관절 부위와 정상 관절 부위에 단백질분해효소 센서인 PN3를 투여한 후 MMP-13 억제제 처리를 한 것과 MMP-13 억제제 처리를 하지 않은 동물 모델의 2시간 후에 얻은 각 암 조직 부위의 근적외선 이미지를 나타낸 것이다.

[85] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 예시일 뿐 본 발명의 범위가 이에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[86] 실시예 1. 형광체-펩타이드-소광체-나노입자 유도체 제조

[87] 1-1. 형광체-펩타이드-소광체 유도체의 제조

[88] 먼저, 형광체와 소광체가 결합된 펩타이드를 제조하기 위해, 펩타이드는 고체상 합성법(solid phase synthesis)을 따라 에프록 방법(Fmoc strategy)으로 제조하고, 상기 제조된 펩타이드 서열에 형광체와 소광체를 화학적으로 결합하였다.

[89] 형광체로는 Cy5.5 (ex/em, 670/690), TRITC (ex/em, 547/572), FITC (ex/em, 490/520)을 사용하였고, 각각의 Cy5.5, TRITC, FITC 형광체의 형광을 소광시킬 수 있는 소광체로는 BHQ-3 (abs. 620 nm - 730 nm), BHQ-2 (abs. 550 nm - 650 nm) 및 BHQ-1 (abs. 48- nm - 580 nm) (Biosearch Technologies Inc.)를 각각 사용하였다.

[90] 일 예로, MMP-2 에 선택적으로 분해되어 형광을 나타내는

형광체-펩타이드-소광체 합성 과정은 다음과 같았다 (도 3).

- [91] MMPs 단백질 효소에 선택적으로 분해되는 펩타이드 기질인 NH_2 -Gly-Pro-Leu-Gly-Val-Arg(Pbf)-Gly-Lys(Boc)-Gly-Gly-COOH을 에프목(Fmoc) 펩타이드 합성방법으로 제조하고, 펩타이드 기질 5 mg에 근적외선 형광체인 Cy5.5-HNS 에스터 8.5mg, N-메틸모르폴린 $8\mu\text{l}$, 4-디메틸아미노피리딘 0.3 mg을 $200\mu\text{l}$ 의 디메틸포름아미드에 녹인 후 12 시간 상온에서 반응시켰다. 반응이 종료된 용액을 차가운 에틸 에테르 4 ml로 침전시키고 원심분리하여 상등액은 제거한 후 차가운 에틸 에테르 2 ml로 다시 세척하였다. 표면의 에틸 에테르를 제거한 후 스피드 베큘(speed vacuum) 또는 진공 오븐(vacuum oven)으로 건조시켜 Cy5.5-Gly-Pro-Leu-Gly-Val-Arg(Pbf)-Gly-Lys(Boc)-Gly-Gly-COOH 전구체를 제조하였다.
- [92] 건조된 상기의 펩타이드 전구체의 보호기를 탈보호하기 위하여, 상기의 물질을 트리플로오로아세트산 1ml, 증류수 $25\mu\text{l}$, 아니솔(Anisole) $25\mu\text{l}$ 를 넣어서 1 시간 동안 상온에서 반응시켰다. 로터리 펌프(Rotary pump)를 이용하여 용액을 모두 제거한 후, 이를 HPLC 용리액(eluent) (0.1% TFA이 있는 식염수:0.1% TFA가 있는 아세토니트릴 =1:1) 1ml에 녹인 후, 필터 ($0.45\mu\text{m}$, 유기용매 사용 가능한 필터)하였다. HPLC 용리액(eluent) (0.1% TFA이 있는 식염수: 0.1% TFA이 있는 아세토니트릴 =1:1), 애질런트(Agilent) ZORBAX SB-C18 컬럼 (9.4 x 150 mm)을 이용하여, 0.1% TFA이 있는 5% 아세토니트릴, 0.1% TFA이 있는 95% 식염수로 HPLC를 안정화시켰다. 20분 동안 기울기 용리(gradient elution) (0분에 5%, 5분에 22%, 20분에 40% 아세토니트릴 (0.1% TFA이 있는) vs DW (0.1% TFA가 있는))을 통하여 물질을 분리시켰다. 이때, UV 220nm, FLD ex: 675nm em: 690nm에서 측정한 후 Cy5.5-Gly-Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Gly-Lys-Gly-Gly-COOH 물질을 분리하였다. 분리한 물질의 분자량을 매스(mass)를 사용하여 찍어 확인한 후 동결건조시켰다. 상기의 물질 2 mg에 BHQ3-NHS 에스터 (Biosearch Technologies Inc., 0.71 mg), NMM $1.5\mu\text{l}$, DMAP 0.2 mg를 $30\mu\text{l}$ DMSO에 녹여 상온에서 12시간 반응시켰다. HPLC 용리액 (0.1% TFA이 있는 식염수 : 0.1% TFA가 있는 아세토니트릴 =1:1), 애질런트(Agilent) ZORBAX SB-C18 컬럼(9.4 x 150 mm)을 이용하여, 0.1% TFA가 있는 5% 아세토니트릴, 0.1% TFA가 있는 95% 식염수로 HPLC를 안정화시켰다. 25분 동안 기울기 용리(gradient elution) (0분에 5%, 5분에 30%, 25분에 70% 아세토니트릴(0.1% TFA 있는)vs 0.1% TFA가 있는 식염수)을 통하여 물질을 분리시켰다. 이때, UV 220nm, FLD ex: 675nm em: 690nm에서 측정한 후 Cy5.5-Gly-Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Gly-Lys(BHQ3)-Gly-Gly-COOH 물질을 분리하였다. 분리한 물질의 분자량을 매스(mass)를 사용하여 찍어 확인한 후 동결건조 시켰다. 상기와 같이 형광체와 소광체가 결합된 Cy5.5-Gly-Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Gly-Lys(BHQ3)-Gly-Gly-COOH 물질을 P1이라 명명하였다. 상기 합성 과정에 따라 아래와 같은 서열을 가지는, 다양한 복합체를 합성하였다.

- [93] P1: Cy5.5-Gly-Pro-Leu-Gly-Val-Arg-Gly-Lys(BHQ3)-Gly-Gly-COOH
- [94] P2: Cy5.5-Gly-Val-Pro-Leu-Ser-Leu-Thr-Met-Gly-Lys(BHQ3)-Gly-Gly-COOH
- [95] P3: Cy5.5-Gly-Pro-Leu-Gly-Met-Arg-Gly-Leu-Gly-Lys(BHQ3)-Gly-Gly-COOH
- [96] **1-2. 고분자 나노입자 유도체의 제조**
- [97] EPR 효과에 의하여 암 및 염증 조직에 대한 선택성이 높고, 세포 침투성인 생체 적합성 고분자 나노입자를 제조하기 위해, 고분자로 생체 친화성 글라이콜 키토산 (분자량 250,000 Da)을 사용하였고, 소수성 물질로는 담즙산의 일종인 콜란산(cholanic acid)을 사용하였으며, 최종 합성된 물질은 글라이콜 키토산-담즙산(도 4)이었다.
- [98] 도 4(a)의 반응식에 나타난 과정에 따라, 글라이콜 키토산 500 mg을 60 ml 증류수에 녹인 후 90ml의 MeOH을 부어 희석시켰다. 상기의 용액에 MeOH에 녹인 콜란산, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카보디이미드 (EDC)와 N-히드록시 숙신이미드(NHS)를 첨가 한 후 상온에서 12시간 반응시켰다. 반응 종료 후 증류수/MeOH (1:3) 용액에서 24시간, 증류수/MeOH (1:1) 용액에서 24시간 및 증류수 용액에서 24시간 투석(dialysis) 한 후 동결건조시켰다. 그 결과, 도 4(b)에 나타난 바와 같이, 수용액 상태에서 250 nm의 크기를 가지는 고분자 나노입자가 제조되었다.
- [99] **1-3. 형광체-펩타이드-소광체-고분자 나노입자 유도체의 제조**
- [100] 상기 1-1에서 제조된 형광체-펩타이드-소광체를 고분자 나노입자에 화학적으로 결합시켜 최종 본 발명에 따른, 고분자 나노입자 기반 단백질분해효소 활성 측정용 나노입자 센서를 제조하였다.
- [101] 구체적으로, 상기 1-1에서 제조된 형광체-펩타이드-소광체 중 P1, P2 및 P3는 글라이콜 키토산 기반의 나노입자에 결합하였다.
- [102] 상기 1-2에서 합성된 글라이콜 키토산-담즙산 10 mg를 튜브에 담고 100 μ l DMSO로 녹인 후 14 ml PBS (pH 7.4) 에 첨가한 후 소니케이터를 이용하여 완전히 분산시켜 나노입자를 형성시켰다. 형광체-펩타이드-소광체 (P1, P2 또는 P3)를 100 μ l DMSO로 녹인 후 100 μ l PBS (pH 6.0)를 첨가한 후 EDC (1 mg) 및 Sulfo-NHS (1 mg)를 첨가하여 상온에서 15분 반응시켰다. 반응 종료 후 상기 용액을 글라이콜 키토산-담즙산 용액에 첨가한 후 상온에서 12 시간 반응시켰다. 반응 종료 후 증류수/MeOH (1:3) 용액에서 24 시간, 증류수/MeOH (1:1) 용액에서 24 시간 및 증류수 용액에서 24 시간 투석(dialysis)한 후 동결건조시켰다. 상기의 제조 방법에 의해 P1, P2 또는 P3 및 키토산-담즙산을 이용하여 제조된 나노입자를 PN1, PN2, PN3로 명명하였다.
- [103] **실험예 1. 본 발명에 따른 단백질분해효소 센서의 MMPs 특이적 분해에 의한 광학 특성 변화**
- [104] 실시예 1에서 제조된 MMPs 특이적 고분자 기반 센서의 단백질 분해 효소에 대한 선택 특이성을 관찰하였다. 각각의 센서들(PN1, PN2, PN3)을 각각 단백질 분해 효소가 첨가된 반응액에 첨가한 후 시간에 따라 복원되는 형광 (fluorescent

intensity, FI)을 측정하였다.

[105] 구체적으로, MMPs에 특이적으로 반응하여 형광이 복원되는 PN1, PN2, PN3 (각 10 $\mu\text{g/ml}$)를 활성화된 MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 또는 MMP-13 (1 $\mu\text{g/ml}$)에 첨가한 후 효소 분해반응에 의한 형광 발현을 관찰하였다. 각 MMPs를 활성화하기 위하여 MMPs를 p-아미노페닐 머큐릭산(p-aminophenyl mercuric acid)이 첨가된 TCNB 반응액 (0.1 M Tris, 5 mM 염화칼슘, 200 mM NaCl, 0.1% 브리즈(Brij))에 첨가하여 37°C에서 1 시간 동안 반응시켰고, 활성화된 MMPs를 각 96 웰에 200 μL 반응액 상에서 고분자 나노입자 기반 센서와 37°C에서 반응시킨 후 시간에 따른 형광 복원 정도를 형광분석기를 통하여 관찰하였다.

[106] PN1은 하기 표 2에 보는 바와 같이, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 및 MMP-13에 60분간 반응시 각각 9.7, 2.0, 1, 9.2 및 12.3배 형광이 복원되는 결과를 나타내었다. 그러므로, PN1은 MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13과 반응하여 상대적으로 높은 형광이 복원됨을 알 수 있었다.

[107] 표 2

단백질분해효소 활성 측정용 센서 PN1의 MMPs에 대한 형광 복원 특성

	단백질분해효소에 대한 형광 세기 (FI) 변화				
시간 (분)	MMP-2	MMP-3	MMP-7	MMP-9	MMP-13
0	378.6	307.4	278.5	350.5	664.6
10	952.3	284.9	288.3	680.3	1933
20	1715	362.6	287.2	1350	3933
30	2387	421.3	290.1	2010	5292
40	2916	506.4	294.2	2248	6512
50	3210	537.3	299.6	2846	7608
60	3658	629.5	302.1	3221	8182

[108] PN2는 아래 표 3에서 보는 바와 같이 MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 및 MMP-13에 60분간 반응시 각각 1.8, 3.6, 3.9, 1.3 및 4.8배 형광이 복원되는 결과를 나타내었다. 그러므로, PN2는 MMP-3, MMP-7, MMP-13과 반응하여 상대적으로 높은 형광이 복원됨을 알 수 있었다.

[109] 표 3

단백질분해효소 활성 측정용 센서 PN2의 MMPs에 대한 형광 복원 특성

	단백질분해효소에 대한 형광 세기 (FI) 변화				
시간 (분)	MMP-2	MMP-3	MMP-7	MMP-9	MMP-13
0	271.1	336.1	327.9	182	286.7
10	245	225.7	653	186.3	723.5
20	350	407.8	992.8	186	1063
30	280.2	842.8	1161	187.1	1231
40	334.8	946	1252	239.4	1350
50	426.1	1073	1310	233.3	1361
60	493.5	1229	1276	247.9	1373

[110] PN3은 아래 표 4에서 보는 바와 같이 MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 및 MMP-13에 60분간 반응시 각각 3.7, 2.4, 0.8, 1.3 및 4.3배 형광이 복원되는 결과를 나타내었다. 그러므로, PN3은 MMP-2, MMP-3, MMP-13과 반응하여 상대적으로 높은 형광이 복원됨을 알 수 있었다.

[111] 표 4

단백질분해효소 활성 측정용 센서 PN3의 MMPs에 대한 형광 복원 특성

	단백질분해효소에 대한 형광 세기 (FI) 변화				
시간 (분)	MMP-2	MMP-3	MMP-7	MMP-9	MMP-13
0	77.37	102.5	104.3	100.9	100.6
10	90.98	128.3	90.14	106.1	131.2
20	125.2	143.2	87.61	109.1	166.1
30	151.3	174.4	86.97	114.3	234.4
40	189.4	199.5	91.48	127.6	280.7
50	238.5	217.2	94.88	129.8	355.3
60	286.7	249.3	86.33	133.3	455.5

[112] 실험예 2. 본 발명에 따른 단백질분해효소 활성 측정용 센서의 단백질분해효소의 농도에 대한 형광 복원 및 영상화

[113] 실시예 1에서 제조된 센서들을 이용하여 단백질분해효소의 농도를 정량적으로 분석하였다. 구체적으로, 상기 실험예 1과 동일한 방법으로, PN1 센서에 농도가 각각 0, 0.55, 1, 3, 7, 14 nmol/L의 활성화된 MMP-2를 첨가하고, 37°C에서 60분간 반응시킨 후 형광 발광 정도를 형광분석기와 디지털 이미징 시스템(Kodak Image Station 4000MM)으로 관찰하였다.

- [114] 도 5(a)에 나타낸 바와 같이, PN1 센서의 형광 발광이 첨가된 MMP-2 효소의 농도에 따라 비례적으로 증가하므로 실험군의 발광도를 측정하는 것에 의해 검체 내의 특정 효소농도를 정량적으로 검출할 수 있음이 입증되었으며, 광학영상기기를 이용하여 영상화가 가능하였다 (도 5(b)).
- [115] **실험예 3. 본 발명에 따른 단백질분해효소 활성 측정용 센서를 이용한 암 질환 동물모델에서의 MMP 발현 및 암 조직 영상화**
- [116] 편평상피세포 암(SCC7)을 C3H/HeN 마우스에 피하 이식하여 암 질환 동물모델을 만들고, 암 조직 크기가 5mm 이상 되었을 때 PN1을 질환 동물에 정맥 투여하여 암 조직에서 발현되는 MMPs 영상화를 통한 암조직 영상화 가능성을 평가하였다.
- [117] 편평상피세포 암 (SCC7)은 다량의 MMP-2를 발현하는 암 세포로 알려져 있다. 정상 마우스와 암 질환 마우스에 PN1 (100 μ l, 100 μ g)를 투여하고, 또한 암 질환 마우스에 PN1과 MMP-2 발현 억제제 (inhibitor)를 동시에 투여한 세 가지의 동물 실험군을 나누어 진행하였다. 광학 영상화는 eXplore Optix™ system을 이용하였다.
- [118] 그 결과, 도 6(a)에서 보는 바와 같이, 암세포가 없는 정상 마우스(No treat)에 투여한 센서는 형광이 발광하지 않았지만, 암 세포를 함유한 마우스(PN1)에서는 강한 형광이 시간이 지남에 따라 밝게 발광함을 관찰할 수 있었다. 또한 MMP-2가 발현된 암 세포에서 나타난 강한 형광 복원은 MMP-2의 활성을 억제하는 MMP-2 억제제 투여시에는 나타나지 않았다 (PN1 + inhibitor). 도 6(b)와 같이 MMPs 활성 억제제를 투여시 형광 복원율이 2.2 배 낮게 관찰되므로, PN1은 생체 내 MMP-2가 과다 발현된 암 세포에 특이적으로 반응하여 강한 형광 발광을 나타낸 것이고, 이에 생체 내에서 발현되는 MMPs 발현 정도 및 이에 기인한 암 세포를 특이적으로 영상화할 수 있음을 증명하였다.
- [119] 또한, MMP-2를 과다 발현하는 암 조직에 MMP-2 억제제 투여 유무에 따른 PN1의 형광 복원 정도를 측정하였다. 정상 마우스와 암세포를 함유한 마우스에 상기 실험예와 동일한 방법으로 PN1을 정맥 투여한 후, MMP-2 억제제를 투여한 마우스와 투여하지 않은 마우스에서 암 조직을 절개하여 형광 현미경을 이용하여 암 세포에 특이적으로 발광된 형광을 관찰하였다. 도 7에서 보는 바와 같이, 정상 마우스에서는 형광이 복원되지 않은 반면, 암세포를 함유한 마우스의 암 조직에서는 강한 형광이 발현됨을 관찰할 수 있었다. 하지만, 상기 동물 실험결과와 같이 MMP-2 억제제를 처리한 암 조직(PN1 + inh)에서는 형광 복원이 억제되어 형광 발광이 매우 낮음을 관찰할 수 있었다.
- [120] **실험예 4. 본 발명에 따른 단백질분해효소 활성 측정용 센서를 이용한 골관절 질환 동물모델에서의 MMP 발현 및 골관절염 영상화**
- [121] 골관절염 및 류마티스 관절염과 같은 염증성 질환에서는 MMPs가 과다 발현되므로, MMPs를 마커로 이용하여 이의 영상화를 통한 관절염의 조기진단이 가능하다. 일반적으로, 골관절염 질환 부위에서는 MMP-13이 과다

발현되는 것으로 알려져 있어, 실시예 1에서 제조된 센서를 이용하여 골관절염 질환 동물 모델에서 MMP-13 영상화를 통한 골관절염 조기진단을 시도하였다.

- [122] Sprague-Dawley 쥐 (250~300 g)를 마취를 시킨 후, 오른쪽 무릎 관절을 돌출시키고, 힘줄을 잘라내어 골관절염 질환 동물모델을 만들었다. 6주에서 8주 이후에, 실시예 1에서 제조된 PN2 센서를 관절 조직에 투여하여 질환 부위에 발현된 MMP-13을 영상화하였다. 구체적으로, 정상 관절 조직과 골관절염 관절 조직에 PN2 (100 μ l, 100 μ g)를 투여하고, 디지털 이미징 시스템(Kodak Image Station 4000MM)을 사용하여 관찰하였다.
- [123] 도 8에 나타난 바와 같이, 정상 관절 조직(Normal)에 투여한 PN2는 형광이 발광하지 않았지만, MMP-13이 과다 발현되는 골 관절염 관절조직(OA)에서는 강한 형광이 발광함을 관찰할 수 있었다. 또한 MMP-13이 발현된 골관절염 부위에 나타난 강한 형광 복원은 MMP-13의 활성을 억제하는 MMP-13 억제제 투여시에는 나타나지 않았다(+inh). 따라서, PN3은 생체 내 MMP-13이 과다 발현된 골 관절염 질환 부위에서 강한 형광 발광을 나타내었고, 이에 생체 내에서 발현되는 MMPs 발현 정도 및 이에 기인한 염증성 질환을 특이적으로 영상화 할 수 있음을 알 수 있었다.

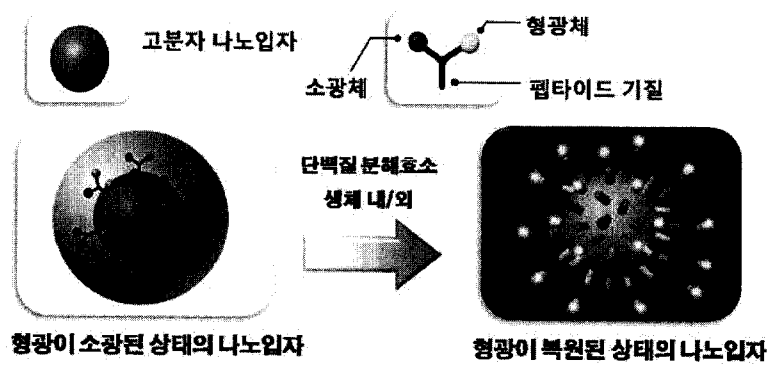
청구범위

- [청구항 1] 형광체 및 소광체가 결합되고, 단백질분해효소에 의해 특이적으로 분해되는 펩타이드 기질이 생체 적합성 고분자 나노입자에 결합된 단백질분해효소 활성 측정용 나노입자 센서.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 단백질분해효소 활성 측정용 나노입자 센서는 다음의 구조식 1을 가지는 것인 단백질분해효소 활성 측정용 나노입자 센서:
- [구조식 1]
- $$\begin{array}{c} \text{A} - \text{B} - \text{C} \\ | \\ \text{D} \end{array}$$
- 여기서, 상기 A는 형광체이고, 상기 B는 상기 단백질분해효소에 의하여 특이적으로 분해되는 펩타이드 기질이며, 상기 C는 상기 형광체의 발광을 흡수하여 소광 효과를 나타낼 수 있는 소광체이고, 상기 D는 암 및 염증 질환 부위에 특이적으로 축적가능한 생체적합성 고분자로 이루어진 나노입자.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 펩타이드 기질의 C-터미널 말단의 카르복실산 또는 시스테인의 -SH기와 상기 생체적합성 고분자 나노입자가 결합되는 것인 단백질분해효소 활성 측정용 나노입자 센서.
- [청구항 4] 제2항에 있어서, 상기 펩타이드 기질은 상기 형광체 및 상기 소광체와 펩티드 결합된 것인 단백질분해효소 활성 측정용 나노입자 센서.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 생체적합성 고분자 나노입자는, 키토산, 텍스트란, 히알루론산, 폴리아미노산 및 헤파린으로 이루어진 군에서 선택된 생체 적합성 고분자 및 담즙산, 지방산 및 콜레스테롤로 구성된 군에서 선택된 소수성 물질이 결합된 나노입자인 것인 단백질분해효소 활성 측정용 나노입자 센서.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 단백질분해효소는 기질 금속단백분해효소(matrix metalloproteinases; MMP), 트롬빈, FXIIIa(factor Xiii), 카스파제(caspase), 우로키나아제, 플라스미노겐 활성화제(urokinase plasminogen activator, uPA), HIV 프로테아제, DPP-IV(dipeptidyl peptidase) 및 프로테아좀(proteasome)으로 이루어지는 군에서 선택되는, 세포 또는 생체 조직 내에서 발현되는 단백질분해효소 활성 측정용 나노입자 센서.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 형광체는 적색 또는 근적외선의 형광을

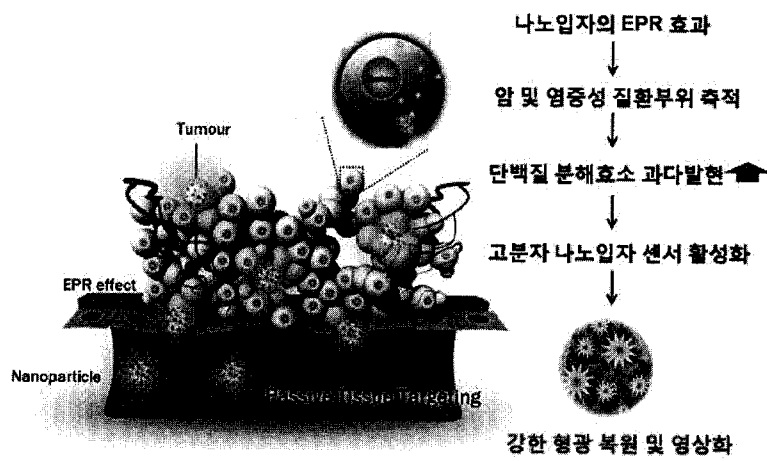
- 발광하는 형광체인 것인 단백질분해효소 활성 측정용 나노입자 센서.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 형광체는 시아닌, 플루오레신, 테트라메틸로드아민, 알렉사, 보디피 및 이들의 유도체로 이루어지는 군에서 선택되는 것인 단백질분해효소 활성 측정용 나노입자 센서.
- [청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 소광체는 형광을 소광시킬 수 있는 블랙홀 소광체(blackhole quencher), 블랙베리(blackberry quencher) 및 이들의 유도체로 이루어지는 군에서 선택되는 것인 단백질분해효소 활성 측정용 나노입자 센서.
- [청구항 10] 제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 단백질분해효소는 MMP이고, 상기 A는 Cy5.5이고, 상기 B는 MMP에 특이적 분해되는 펩타이드 기질이고, 상기 C는 BHQ-3이고, 상기 D는 키토산 나노입자인 것인 단백질분해효소 활성 측정용 나노입자 센서.
- [청구항 11] 다음의 단계를 포함하는 제1항에 따른 단백질분해효소 활성 측정용 나노입자 센서의 제조방법:
 (a) 특정 단백질분해효소에 특이적인 펩타이드 기질에 근적외선 형광체를 반응시켜 결합하는 단계;
 (b) 상기 펩타이드 기질에 소광체를 결합시키는 단계; 및
 (c) 상기 형광체-펩타이드 기질-소광체 복합체에 고분자 나노입자를 결합시켜 단백질분해효소 활성 측정용 나노입자 센서를 제조하는 단계.
- [청구항 12] 제1항에 따른 단백질분해효소 활성 측정용 나노입자 센서를 유효성분으로 함유하는 편평상피세포암, 자궁암, 자궁경부암, 전립선암, 두경부암, 췌장암, 뇌종양, 유방암, 간암, 피부암, 식도암, 고환암, 신장암, 대장암, 직장암, 위암, 신장암, 방광암, 난소암, 담관암 및 담낭암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 암 진단용 조성물.
- [청구항 13] 제1항에 따른 단백질분해효소 활성 측정용 나노입자를 유효성분으로 함유하는, 자가면역질환 진단용 조성물.
- [청구항 14] 제13항에 있어서, 상기 자가면역질환은 골관절염 또는 류마티스 관절염인 것인 자가면역질환 진단용 조성물.
- [청구항 15] 제1항에 따른 단백질분해효소 활성 측정용 나노입자 센서를 유효성분으로 함유하는, 세포 및 조직에서 발현되는 상기 단백질분해효소의 정량분석용 조성물.
- [청구항 16] 제1항에 따른 단백질분해효소 활성 측정용 나노입자 센서를 유효성분으로 함유하는, 상기 단백질분해효소의 과다발현을

억제하는 약물 또는 약물의 효능의 스크리닝을 위한 조성물.

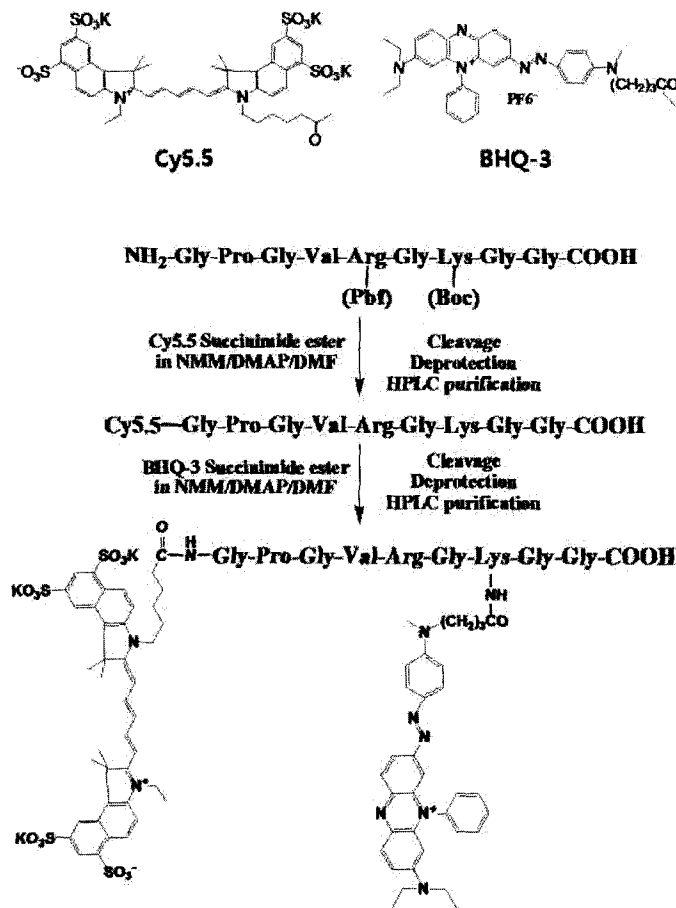
[Fig. 1]



[Fig. 2]

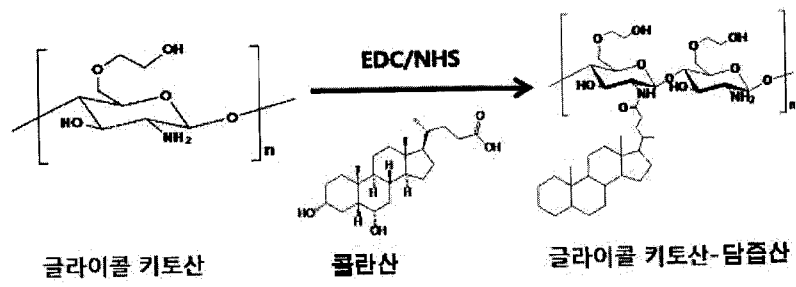


[Fig. 3]

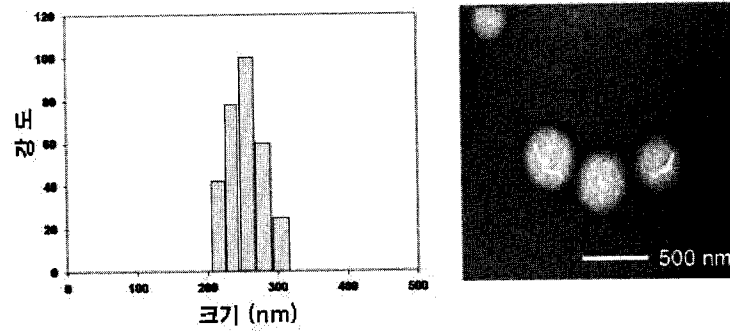


[Fig. 4]

[a]

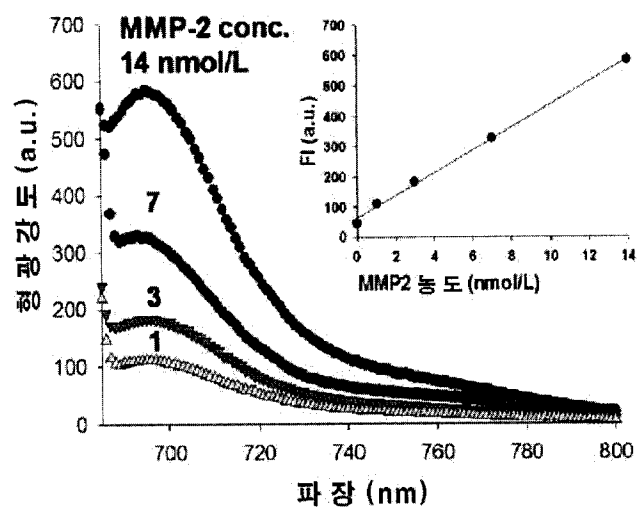


[b]

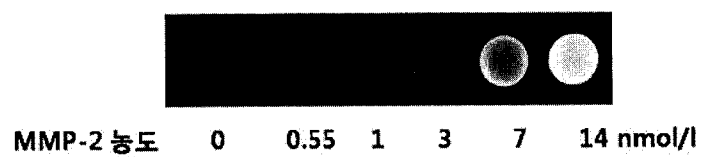


[Fig. 5]

[a]

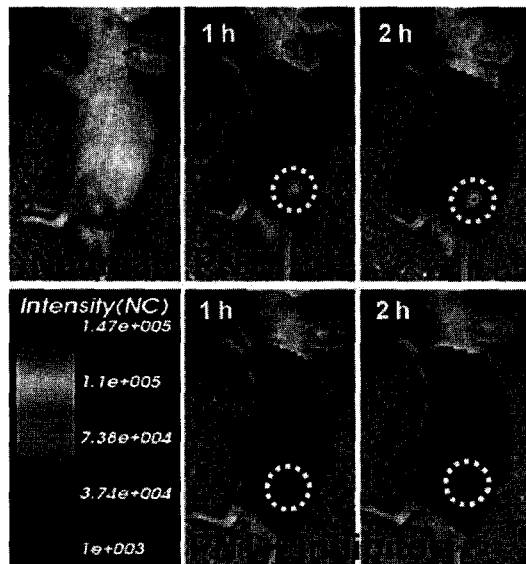


[b]

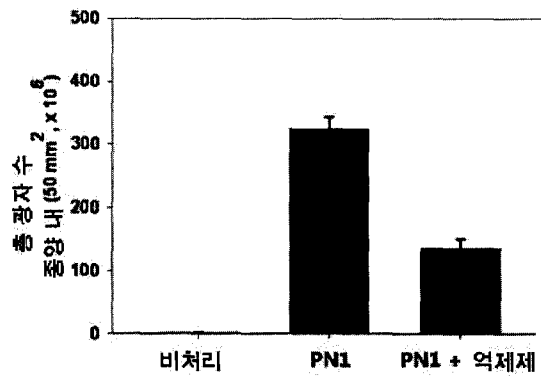


[Fig. 6]

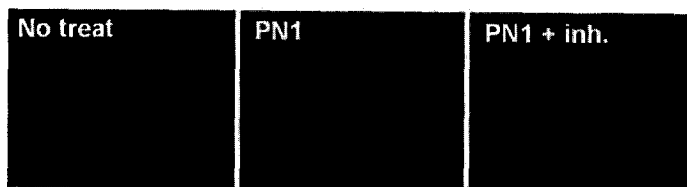
[a]



[b]



[Fig. 7]



[Fig. 8]

