



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0090347
(43) 공개일자 2011년08월10일

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0010067

(22) 출원일자 2010년02월03일

심사청구일자 2010년02월03일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

박진승

인천광역시 강화군 강화읍 관청리 833-6

조문규

서울특별시 마포구 창전동 107-702

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

구현서

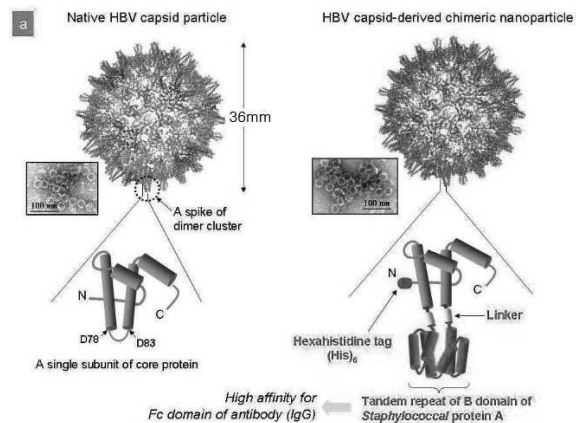
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 키메라 단백질, 그 제조방법 및 그 키메라 단백질이 고정화된 나노센서 및 그 응용

(57) 요약

본 발명은 스타필로코컬 프로틴 (*Staphylococcal protein*) A의 B 도메인(SPA_B)과 B형 간염 바이러스 (HBV)의 캡시드 단백질의 키메라 단백질 및 그 제조방법, HBV 유래 키메라 단백질이 고정화된 기질 및 나노센서 및 그 나노센서의 응용에 관한 발명이다.

대표도 - 도3a



(72) 발명자

이은정

경기도 고양시 일산동구 풍동 현대아이파크 506동
203호

김영근

서울특별시 강남구 압구정동 한양아파트 72-1109

이지원

서울특별시 광진구 광장동 현대아파트 301-204

특허청구의 범위

청구항 1

B형 간염 바이러스 캡시드 단백질에 스타필로코컬 프로틴 에이(Staphylococcal protein A)가 포함되어 있는 키메릭 단백질.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 키메릭 단백질은 스타필로코컬 프로틴 (*Staphylococcal protein*) A의 B 도메인(SPA_B)과 B형 간염 바이러스 (HBV)의 캡시드 단백질의 키메릭 단백질.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 키메릭 단백질은 B형 간염 바이러스 캡시드 단백질의 1-78번째 아미노산 서열 부분, 스타필로코컬 프로틴 에이(Staphylococcal protein A)가 포함되어 있는 부분, 및 캡시드 단백질의 81-149번째 아미노산 서열 부분을 포함하는 키메릭 단백질.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 단백질은 헥사 히스티딘 또는 바이오틴화된 펩타이드 서열을 더욱 포함하는 키메릭 단백질.

청구항 5

- B형 간염 바이러스 코어 단백질(HBVcAg) 유전자로부터 유래한 유전자 클론을 얻는 단계;
- 스타필로코커스 단백질 A(Staphylococcal protein A)의 B도메인(SPA_B)으로 HBVcAg의 부위를 대체하거나 HBVcAg의 부위에 삽입하기 위한 다른 클론을 제조하는 단계;
- 상기 제조된 유전자 클론의 일련의 라이게이션을 통하여 발현 벡터를 제조하는 단계; 및
- 상기 발현벡터를 숙주에 형질전환하여 키메릭 단백질의 유전자를 발현하는 단계를 포함하는 키메릭 단백질의 제조방법.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 제조방법은

- B형 간염 바이러스 코어 단백질(HBVcAg) 유전자로부터 유래하고, N-NdeI-hexahistidine-HBVcAg(1-78)-G4SG4T-XhoI-C 및 N-BamHI-G4SG4-HBVcAg(81-149)-HindIII-C 의 합성을 코딩하는 두 유전자 클론을 얻는 단계;
- 스타필로코커스 단백질 A(Staphylococcal protein A)의 B도메인(SPA_B)의 209-271 잔기의 탠덤 리피트로 HBVcAg의 P79A80를 대체하기 위하여, 두 다른 클론, N-XhoI-SPA_B-EcoRI-C 및 N-EcoRI-SPA_B-BamHI-C를 제조하는 단계;
- 상기 네 유전자 클론의 일련의 라이게이션을 통하여, N-His₆-HBVcAg(1-78)-SPA_B-SPA_B-HBVcAg(81-149)-C의 합성을 코딩하는 플라스미드 발현 벡터를 제조하는 단계; 및
- 상기 발현벡터를 숙주에 형질전환하여 키메릭 단백질의 유전자를 발현하는 것을 특징으로 하는 키메릭 단백질의 제조방법.

청구항 7

B형 간염 바이러스(HBV) 유래 키메릭 단백질이 고정화된 기질.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 HBV 유래 키메릭 단백질은 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 단백질인 것을 특징으로

하는 기질.

청구항 9

제 7항에 있어서, 상기 기질은 나노 센서에 사용되는 기질.

청구항 10

제 7항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 기질은 규소, 랭뮤어-보제트 필름, 관능화 유리, 게르마늄, 세라믹, 규소, 반도체 재료, 폴리테트라플루오르에틸렌(PTFE), 탄소, 폴리카르보네이트, 운모, 마일라, 폴리플루오르화 비닐리덴(PVDF), 플라스틱, 석영, 폴리스티렌, 갈륨 아세나이드, 금, 은, 금속, 금속 합금, 직물, 및 그 표면 상에 혼입된 아미노, 카르복실, 티올 또는 히드록실 관능기를 가질 수 있는 그의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 기질.

청구항 11

제 10항에 있어서, 상기 금속은 니켈 나노 구조를 포함하는 것을 특징으로 하는 기질.

청구항 12

제 7항 내지 제 9항 중 어느 한 항의 상기 기질에 고정된 키메릭 단백질에 항체, 효소, 단백질, 미생물, 핵산, 약물, 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 특이물질을 첨가하여 상기 키메릭 단백질의 표면과 반응시켜서 제조된 3 차원 나노구조 기반 나노센서.

청구항 13

제 12항의 3 차원 나노구조 기반 나노센서에 진단하려는 시료를 반응시키는 단계를 포함하는 질병 마커를 검출하는 방법.

청구항 14

제 13항에 있어서, 상기 시료는 혈액, 혈청, 뇨, 침, 객담, 또는 콧물인 것을 특징으로 하는 질병 마커를 검출하는 방법.

청구항 15

제 13항 또는 제 14항에 있어서, 상기 질병 마커는 트로포닌 I 또는 장독소(enterotoxin)인 것을 특징으로 하는 질병 마커를 검출하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 키메릭 단백질, 그 제조방법 및 그 키메릭 단백질이 고정화된 나노센서 및 그 응용에 관한 발명이다.

배경기술

[0002] 일반적으로, 캡시드로 둘러싸인 바이러스는 바이러스 핵산을 함유하도록 조립된 단백질 코트 또는 "캡시드"를 포함한다. 많은 바이러스들이 개별적으로 발현된 캡시드로부터 "자가-조립"될 수 있는 캡시드를 갖는데, 캡시드는 세포 내부에서 발현되어 VLP를 형성시키기도 하고 ("생체내 조립"), 세포 외부에서 발현되어 단리 및 정제되기도 한다 ("시험관내 조립"). 이상적으로, 캡시드가 표적 재조합 펩티드를 함유하도록 변형되어 재조합 바이러스 캡시드-펩티드 융합물을 생성한다. 이어서, 융합 펩티드는 세포 내에서 발현될 수 있으며, 이상적으로는 생체내에서 조립되어 재조합 바이러스 또는 바이러스-유사 입자를 형성시킬 수 있다.

[0003] 이러한 접근법이 충족되어 다양한 성공을 거두게 되었다 (예를 들면, 문헌 [C Marusic et al., J Virol. 75 (18):8434-39(Sep 2001) (재조합 바이러스 입자의 생체내 형성과 함께, 항원성 HIV 펩티드의 말단에 융합된 재조합 나선형 감자 바이

[0004] 러스 X 캡시드의 식물 내 발현]); [FR Brennan et al., Vaccine 17 (15-16): 1846-57 (09 Apr 1999) (재조합 바이러스 입자의 생체내 형성과 함께, 항원성 스타필로코쿠스 아우레우스(Staphylococcus aureus) 펩티드의 말

단에 융합된 재조합 20면체 동부 모자이크 바이러스 또는 나선형 감자 바이러스 X 캡시드의 식물 내 발현)] 참조).

[0005] 로모노소프(Lomonosoff) 및 존슨(Johnson)의 미국 특허 제5,874,087호는 식물 세포에서 재조합 식물 바이러스의 제조를 기술하는데, 바이러스 캡시드는 생물학적으로 활성인 펩티드, 예를 들어 호르몬, 성장 인자 또는 항원성 펩티드를 함유하도록 조작된 캡시드를 포함한다. 코모바이러스(Comovirus), 톰부스바이러스(Tombusvirus), 소베나오바이러스(Sobenaovirus) 및 네포바이러스(Nepovirus) 속(genus)으로부터 선택된 바이러스는 외인성 펩티드 코딩 서열을 함유하도록 조작되며, 바이러스의 전체 조작된 게놈이 발현되어 재조합 바이러스를 생성시킨다. 외인성 펩티드-코딩 서열은 하나 이상의 캡시드 표면 루프 모티프-코딩 서열 내에 삽입된다.

[0006] 비-항성 세포를 이용해서 특정 바이러스-유사 입자를 제조하기 위한 시도가 이루어져 왔다. 예를 들면, 바이러스-유사 입자의 생체내 형성과 함께, 헵타데카캡시드의 말단에 융합된 재조합 20면체 감자 잎 롤(roll) 바이러스 캡시드의 곤충 세포 내 발현을 기술하는 문헌 [JW Lamb et al., J Gen. Virol. 77 (Pt.7):1349-58 (Jul 1996)]을 참조한다. 특정 상황에서는, 비-항성 VLP가 바람직할 수 있다. 예를 들어, 비-항성 바이러스 캡시드는 바이러스-유사 입자로 조립되는 능력이 상실되지 않으면서 외래 펩티드를 삽입하는데 있어서 천연 바이러스 캡시드보다 더 적합할 수 있다. 별법으로, 비-항성 바이러스 캡시드에 대한 특성화 및 이해는 천연 항성 바이러스 유래의 캡시드에 대한 것보다 더 잘 되어 있다. 또한, 백신 생성과 같은 특정 용도에서는 특정 숙주 세포 발현 시스템에서의 항성 바이러스의 사용이 고려되지 않을 수 있다. 채프만(Chapman)등의 미국 특허 제6,232,099호에는 식물에서 막대형(rod-shaped) 바이러스를 사용해서 바이러스 캡시드 하위 단위에 연결된 외래 단백질을 제조하는 것에 대하여 기재되어 있다. 나선형 바이러스로 분류되기도 하는 막대형 바이러스, 예를 들어 감자 바이러스 X (PVX)는 바이러스의 게놈 내에 삽입된 대상 재조합 펩티드를 가짐으로써 재조합 바이러스 캡시드-펩티드 융합물을 생성시킨다. 이어서, 상기 재조합 바이러스를 사용해서 숙주 세포를 감염시키며, 바이러스는 숙주 세포 내에서 활발하게 복제되어 다른 세포를 추가로 감염시킨다. 결국, 재조합 바이러스 캡시드-펩티드 융합물을 식물 숙주 세포로부터 정제한다.

[0007] 한편 촉매에는 금속, 금속산화물, 고체산 등의 많은 종류가 있다. 또한 제조 방법도 크게 함침법 (지지체를 활성물질이 녹아있는 용액에 담근 후에 침전체를 가하거나 증발시켜 활성물질을 담지시킴), 이온교환법 (지지체를 활성물질이 녹아있는 용액과 접촉시켜 활성물질을 지지체에 교환시킴), 침전법 (용액상태 활성물질을 침전시켜 활성화과정을 거침) 등으로 나눌 수 있다. 이 중 본 발명은 금속촉매의 함침법 중에 특수한 방법으로 특히, 본 공정에서는 산화니켈 (NiO)은 촉매로서 활성이 없기 때문에 금속니켈이 촉매로 쓰인다. 또한 니켈은 산화니켈에 비해 나노를 이용하여, 원하는 모양과 크기로 만들기가 용이하기 때문에 니켈을 이용한 금속선, 금속막막, 금속결정 등이 촉매작용의 연구에 많이 이용되고 있다. 예를 들어, 니켈나노헤어 구조는 바이오분야 (BT)에의 응용성을 위해 생체기능성 (Biofunctionalization)을 부여할 수 있다. 특히 니켈나노선이 노출된 부분은 표면개질화 (surface modification)를 통하여, 바이오분자 (Biomolecules)-프로브 (Probe), 항체 (Antibody)-항원 (Antigen) 그리고 비오틴 (Biotin)-아비딘 (Avidin)의 결합력을 이용한 바이오센서에의 응용이 가능하다. 특히, 니켈은 아민 (amine)과 히스티딘 (histidine)의 선택적 결합이 가능하여 이에 대한 응용성을 더욱 고취시킨다. 또한 니켈의 자기적성질을 이용한 나노구조물의 움직임 제어를 하는 것 또한 가능하다. 하지만, AA0에서 완전히 분리된 니켈나노선을 이용하는 데에는 자기적 성질과 반데르발스 힘 때문에 뭉침 (Agglomeration)현상이 발생하여 나노선 개별적인 특성의 결과를 얻기가 힘들다.

[0008] 여기서, 본 발명의 니켈헤어나노구조는 그 높이가 균일하며, 나노를 내부에 있으므로 뭉침현상을 방지하며, 고밀도를 가짐으로 인해 화학적 검출에 있어서 매우 유용한 나노 소재이다. 따라서 이에 대한 연구를 위한 나노구조물의 합성방법이 요구된다.

[0009] 또한 퀴츠(quartz) 및 유리와 같은 투명한 물질에 대한 나노구조의 제조는 센서 시스템의 응용의 범위에서 활발하게 연구 중이다(P. Skladal, *Chem. Soc.* 2003, 14, 491; Z. Liu, M. D. Amiridis, *J. Phys. Chem. B* 2005, 109, 16866.). 특히 퀴츠 구조는 그들의 우수한 전기적 절연성과, 다른 전기 장치로부터 전자기적 방해가 없으며, 자외선 가시광선에 대한 우수한 투과성 및 우수한 화학적 안정성 그리고 높은 기계적 강도로 인하여 여러 광학 및 광전기적(optoelectrical) 응용에 이용되고 있다(A. Gopinath, S. V. Boriskina, N.-N. Feng, B. M. Reinhard, L. D. Negro, *Nano Lett.* 2008, 8, 2423; A. Dmitriev, C. Hagglund, S. Chen, H. Fredriksson, T. Pakizeh, M. Kall, D. S. Sutherland, *Nano Lett.* 2008, 8, 3893; T. Lohmuller, M. Helgert, M. Sundermann, R. Brunner, J. P. Spatz, *Nano Lett.* 2008, 8, 1429.).

[0010] 최근 수십년 동안, 플라즈마-관련 기술들이 연구 및 산업분야 모두에서 여러 물질들의 표면 가공 및 나노구조

물질의 생산에 채택되었다.

- [0011] 플라즈마-관련 기술들을 사용한 표면 가공은 두 타입으로 나눌 수 있다: 1) 표면의 화학적 조성의 변화를 야기하는 표면 변형(surface modification); 및 2) 하이엔드 물질 상에 나노미터-스케일 패턴을 제조하는 것을 가능하게 만드는 플라즈마에 의해 생성된 반응성 이온족을 사용한 선택적 드라이-식각(selective dry-etching). 반응성 이온 식각(reactive ion etching; RIE)으로 명명된 후자 기술은 실리콘-기반 기술에 심도있게 채택되었다. 비록 일반적으로 나노미터-스케일 패턴을 제조하는데 일반적으로 마스크(mask)가 사용되지만, RIE는 몇몇 연구에서 마스크없이 마이크로- 및 나노구조를 제조하는데 적용되었다. 그러나 그들은 집적회로를 제조할 때 깨끗한 앞면층제거(delayering)을 방해하는 "RIE grass"로 알려진 식각의 바람직하지 않은 아티팩트(artifact)를 이용한다(H. G. Craighead, R. E. Howard, J. E. Sweeney, D. M. Tennant, *J. Vac. Sci. Technol.* 1982, 20, 316; M. Gotza, B. Saint-Cricq, M. Dutoit, P. Jouneau, *Microelectron. Eng.* 1995, 27, 129; M. Gharghi, S. J. Sivothythaman, *Vac. Sci. Technol.* 2006, 24, 723; W. E. Vanderlinde, C. J. V. Benken, A. R. Crockett, *Proc. Soc. Photo. Opt. Instrum. Eng.* 1996, 2874).
- [0012] RIE grass는 실리콘 또는 실리콘 옥사이드 표면 상에 불소화 탄소와 같은 중합 복합체(polymerized complex) 또는 캐소드(cathode) 물질(통상적으로 알루미늄)의 재침적의 결과로 일어난다.(M. Gharghi, S. J. Sivothythaman, *Vac. Sci. Technol.* 2006, 24, 723) RIE grass 형성 단독으로 나노구조의 스페이싱을 조절하기가 어려워서 RIE grass 형성을 회피하면서 효과적으로 나노구조를 스페이싱하는 새로운 방법이 필요하다.
- [0013] 단백질 분석체를 검출하는 바이오센서 시스템에 식각된 퀴즈 플레이트의 적용은 나노구조체 퀴즈 플레이트의 표면 상에 프로브 항체의 고정화를 요하고 이것은 센서 시스템의 민감도를 결정하는 중요한 단계이다. 기존의 고정화 방법은 하기 원리 중 하나를 사용하여 수행된 표면에 항체를 직접 결합하는 기반한다: 1) 소수성 상호작용에 기반 물리적인 흡착, 2) 항체와 화학적으로 활성화된 고체 표면 사이의 공유 결합, 및 3) 표면 아비딘에 바이오틴화된 항체의 특정 결합을 포함하는 분자적 친화 상호작용.(F. Rusmini, Z. Zhong, J. Feijen, *Biomacromol.* 2007, 8, 1775; W. Kusnezow, J. D. Hoheisel, *J. Mol. Recognit.* 2003, 16, 165; Y. Jung, Y. Jeong, B. H. Chung, *Analyst* 2008, 133, 697) 물리적인 흡착 방법은 표면에 항체의 비특이적인 결합에 기인한 고정화된 항체의 랜덤/비조절 오리엔테이션을 야기한다. 항체의 항원-결합 도메인(활성화 부위)의 변성은 화학적으로 변형된 표면에 항체의 공유 결합 동안에 일어날 수 있다.(F. Rusmini, Z. Zhong, J. Feijen, *Biomacromol.* 2007, 8, 1775; W. Kusnezow, J. D. Hoheisel, *J. Mol. Recognit.* 2003, 16, 165) 또한 항체의 부위 특이적 바이오틴화가 거의 불가능하므로, 바이오틴 분자들은 항체 활성화 부위에 인접한 라이신 잔기에 결합할 수 있고 그것에 의해서 활성화 부위에 타겟 항원의 결합을 저해하며, 그 항체의 랜덤/비조절 오리엔테이션 문제는 해결되지 않고 있다. 이 바람직하지 않은 문제들은 바이오센서의 민감도 및 특이성을 현저하게 감소시킨다.(Y. Jung, Y. Jeong, B. H. Chung, *Analyst* 2008, 133, 697) 이 문제를 해결하는 방법은 항체의 Fc 도메인에만 결합하는 프로테인 G 또는 박테리아 프로테인 A와 같은 항체 결합 단백질을 사용하는 것이다. 이것은 프로브 항체를 화학적으로 변형하는 부가적인 단계가 수반되지 아니하여 항체의 원래 활성 부위를 유지할 수 있어서 항원의 아주 효과적이고 특이적 결합을 가능하게 한다.
- [0014] 본 발명의 일 실시예에서는 본 발명자들은 나노구조체 퀴즈 상에 잘 배열된 오리엔테이션을 가지고 프로브 항체를 밀집되게 고정화하기 위해서 바이오틴화된 펩타이드 및 Staphylococcal 프로테인 A 모두를 노출시키는 유전 공학적으로 조작된 B형 간염 바이러스(HBV) 캡시드의 용도를 제안한다.
- [0015] 한편 고위험성의 급성 심근 경색을 가지는 환자에서 트로포닌 I (단백질 마커)의 조기 검출(Adams, J.E. et al. *Circulation* 88, 101-106 (1993); Adams, J.E., Schechtman, K.B., Landt, Y., Ladenson, J.H. & Jaffe, A.S. *Clin. Chem.* 40, 1291-1295 (1994); Thygesen, K., Alpert, J.S. & White, H.D. *J. Am. Coll. Cardiol.* 50, 2173-2195 (2007); Morrow, D.A. et al. *Clin. Chem.* 53, 552-574 (2007); Gibler, W.B. et al. *Ann. Emerg. Med.* 46, 185-197 (2005))은 심장마비로부터 사망의 위험성을 감소시킬 수 있다(Antman, E.M. et al. *N. Engl. J. Med.* 335, 1342-1349 (1996); Wu, A.H.B. & Jaffe, A.S. *Am. Heart J.* 155, 208-214 (2008); Benamer, H. et al. *Am. Heart J.* 137, 815-820 (1999); Heeschen, C., van den Brand, M.J., Hamm, C.W. & Simoons, M.L. *Circulation* 100, 1509-1514 (1999); Wong, G.C. et al. *Circulation* 106, 202-207 (2002)).
- [0016] 대부분의 트로포닌 분석은 현재 통상적인 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay) 방법에 기초하고 나노- 및 피코-몰 범위의 검출 한계를 가진다(Rosi, N.L. & Mirkin, C.A. *Chem. Rev.* 105, 1547-1562 (2005))

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0017] 본 발명은 상기의 문제점을 해결하고 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 키메라 단백질을 제공하는 것이다.
- [0018] 본 발명의 다른 목적은 상기 키메라 단백질의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 키메라 단백질이 고정화된 기질을 제공하는 것이다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 기질에 고정화된 키메라 단백질에 특정물질이 고정화된 3차원 나노 구조 기반 초고감도 나노센서를 제공하는 것이다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 3차원 나노 구조 기반 초고감도 나노센서를 이용한 질병 마커를 검출하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0022] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 B형 간염 바이러스 캡시드 단백질의 일 부분에 스타필로코컬 프로틴 에이(Staphylococcal protein A)가 포함되어 있는 키메라 단백질을 제공한다.
- [0023] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 본 발명의 키메라 단백질은 스타필로코컬 프로틴 (Staphylococcal protein) A의 B 도메인(SPA_B)과 B형 간염 바이러스 (HBV)의 캡시드 단백질인 것이 바람직하고, 더욱 바람직하게 상기 단백질은 B형 간염 바이러스 캡시드 단백질의 1-78번째 아미노산 서열 부분, 스타필로코컬 프로틴 에이 (Staphylococcal protein A)가 포함되어 있는 부분, 및 캡시드 단백질의 81-149번째 아미노산 서열부분을 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0024] 또한 본 발명의 일 구체예에 있어서 상기 키메라 단백질은 헥사 히스티딘 또는 바이오틴화된 펩타이드 서열을 더욱 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0025] 또한 본 발명은 a) B형 간염 바이러스 코어 단백질(HBVcAg) 유전자로부터 유래한 유전자 클론을 얻는 단계;b) 스타필로코커스 단백질 A(Staphylococcal protein A)의 B도메인(SPA_B)으로 HBVcAg의 부위를 대체하거나 HBVcAg의 부위에 삽입하기 위한 다른 클론을 제조하는 단계; c) 상기 제조된 유전자 클론의 일련의 라이게이션을 통하여 발현 벡터를 제조하는 단계; 및 d) 상기 발현벡터를 숙주에 형질전환하여 키메라 단백질의 유전자를 발현하는 단계를 포함하는 키메라 단백질의 제조방법을 제공한다.
- [0026] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 본 발명의 제조방법은 a) B형 간염 바이러스 코어 단백질(HBVcAg) 유전자로부터 유래하고, N-NdeI-hexahistidine-HBVcAg(1-78)-G4SG4T-XhoI-C 및 N-BamHI-G4SG4-HBVcAg(81-149)-HindIII-C의 합성을 코딩하는 두 유전자 클론을 얻는 단계;b) 스타필로코커스 단백질 A(Staphylococcal protein A)의 B도메인(SPA_B)의 209-271 잔기의 탠덤 리피트로 HBVcAg의 P79A80를 대체하기 위하여, 두 다른 클론, N-XhoI-SPA_B-EcoRI-C 및 N-EcoRI-SPA_B-BamHI-C를 제조하는 단계; c) 상기 네 유전자 클론의 일련의 라이게이션을 통하여, N-His₆-HBVcAg(1-78)-SPA_B-SPA_B-HBVcAg(81-149)-C의 합성을 코딩하는 플라스미드 발현 벡터를 제조하는 단계; 및 d) 상기 발현벡터를 숙주에 형질전환하여 키메라 단백질의 유전자를 발현하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0027] 본 명세서에 사용된 '키메라 단백질' 또는 '키메라 나노입자'는 최광의 의미로 사용된 것으로서 유전공학 또는 단백질 공학 기술을 바탕으로 단백질 나노입자의 표면에 외래 생체 물질을 결합시킴으로써 다양한 기능이 부여된 단백질 또는 단백질 나노입자를 의미한다. 비록 본 발명의 HBV 캡시드가 SPA_B의 표면 디스플레이를 위한 모델 바이러스 스카폴드로 사용되었지만, 다른 바이러스 또는 바이러스-유사 입자들도 표면 SPA_B를 디스플레이하는 키메라 단백질 또는 키메라 나노입자의 생성에 사용될 수 있다.
- [0028] 따라서 본 발명은 상기 HBV 유래 키메라 단백질이 고정화된 기질을 제공한다.
- [0029] 본 발명에서 'HBV 유래 키메라 단백질'이란 최광의 의미로 사용된 것으로, HBV 유래 단백질에 외래 단백질을 결합시켜서 다양한 기능이 부여된 단백질 또는 단백질 나노입자를 의미한다.

- [0030] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 기질은 나노 센서에 사용되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0031] 본 명세서에 사용된 '기질'은 분자가 공유 결합 또는 비공유 결합으로 결합되는 미세제조된 고체 표면일 수 있고, 예를 들어 규소, 랭뮤어-보제트 필름, 관능화 유리, 게르마늄, 세라믹, 규소, 반도체 재료, PTFE, 탄소, 폴리카르보네이트, 운모, 마일라, 플라스틱, 석영, 폴리스티렌, 갈륨 아세나이드, 금, 은, 금속, 금속 합금, 직물, 및 그 표면 상에 혼입된 아미노, 카르복실, 티올 또는 히드록실과 같은 관능기를 가질 수 있는 그의 조합을 포함한다. 유사하게, 기질 표면은 크거나 또는 작을 수 있고, 반드시 균일해야 하지는 않지만 접촉 표면으로서 기능해야만 한다 (반드시 단층은 아님). 기질은 다공성, 평면성 또는 비평면성일 수 있다. 기질은 기질 자체 또는 유기 또는 무기 분자로 제조되고 유기 또는 무기 분자가 접촉할 수 있는 제2 층 (예를 들어, 기질 또는 접촉 표면을 갖는 생물학적 재료)일 수 있는 접촉 표면을 포함한다.
- [0032] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 금속 기질의 나노헤어 구조물은 a) 양극산화 알루미늄(AAO: Anodized Alumina Oxide) 나노틀을 합성하는 단계;b) 은(Ag)을 상기 양극산화 알루미늄 나노틀의 한쪽 면에 증착하는 단계;c) 니켈 이온을 포함하는 용액에 상기 양극산화 알루미늄 나노틀을 넣은 후, 상대전극 (counter electrode)을 백금 (Pt)으로 하여 니켈 나노선을 증착하는 단계;d) 상기 니켈 나노선을 화학적기계적연마 (CMP: Chemical Mechanical Polishing) 공정을 통하여 평탄화하는 단계; 및 e) 상기 양극산화 알루미늄 나노틀을 선택적으로 반응이온식각 (RIE: Reactive Ion Etching)하는 단계를 포함하는 방법에 의하여 제조되는 것이 바람직하고,
- [0033] 상기 나노헤어 구조물의 제조방법에 있어서 b)단계의 증착 두께는 250~350nm인 것이 바람직하며, 상기 c)단계의 니켈 이온을 포함하는 용액은 니켈 설페이트 및 니켈클로라이드 및 붕산(boric acid)의 혼합액인 것이 바람직하며, 상기 e)단계의 반응이온식각 공정은 BCl_3 가스를 사용하여 0.25 $\mu\text{m}/\text{분}$ 의 식각률(etching rate)로 10분 간 양극산화 알루미늄 나노틀을 식각하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0034] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 있어서, 상기 석영 나노 구조체는 쿼츠 웨이퍼를 폴리(메타클릴산 메틸)으로 코팅하고, O_2 및 CF_4 반응성이온식각(RIE)을 수행하여 제조되고 쿼츠 표면은 아비딘이 결합된 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0035] 본 명세서에 사용된 '쿼츠(석영) 나노 구조체'는 반응성 이온 식각(reactive ion etching) 과정을 통해 넓은 표면적을 갖도록 형성된 나노 기둥 형태의 쿼츠 구조체를 의미한다.
- [0036] 일반적으로 본 발명에서 '나노센서'는 기체나 액체와 같은 유체 내 특정 화합물, 분자 또는 DNA, Protein 등의 바이오표지물을 감지하거나 특정분자의 분압 및 농도를 측정함과 더불어 진공장비 및 진공챔버의 진공도를 측정하거나 기체 누설위치를 파악하는데 사용되는 장치를 의미한다.
- [0037] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 상기 기질에 고정된 키메릭 단백질에 항체, 효소, 단백질, 미생물, 핵산, 약물, 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 1종이상의 특이표지물을 첨가하여 키메릭 단백질의 표면과 반응시켜서 생성된 3 차원 나노구조 기반 나노센서를 제공한다.
- [0038] 본 발명에 사용된 '3차원 나노구조 기반 나노센서'란 용어는 3차원 단백질 나노입자 프로브 물질과 3차원 나노구조체의 결합을 통해서 질병 특이적 마커 단백질 등의 검출 능력을 극대화한 센서를 의미한다.
- [0039] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 3 차원 나노구조 기반 나노센서에 진단하려는 시료를 반응시키는 단계를 포함하는 질병 마커를 검출하는 방법을 제공한다.
- [0040] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 시료는 혈액, 혈청, 뇨, 침, 객담, 또는 콧물인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0041] 본 명세서에서 사용된 '바이오 마커'또는 '질병 마커'라는 용어는 일반적으로 분자, 즉 유전자(또는 상기 유전자를 암호화하는 핵산), 단백질, 탄수화물 구조물 또는 당지질로서, 포유동물 조직 또는 세포로부터 유래된 샘플에서의 또는 샘플상에서의 이의 발현을 당업계의 표준 방법으로 검출하여, 샘플을 채취한 피험체의 상태를 예측하거나 보여줄 수 있는 것이다. 질병 마커가 단백질인 경우, 발현의 조절 또는 변화에는 상이한 해독후 변형을 통한 조절이 포함된다. 질병 마커를 사용하여, 질병마커의 수준에 따라 상태의 개선 및 상태의 악화를 포함하는 질환 활성을 구별할 수 있다. 따라서, 한가지 양태에서, 본 발명에서 유용한 질병 마커는 트로포닌 I 또는 장독소(enterotoxin)인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니하며, 이들 질병 마커를 이용하여 환자의 반응을 측정하여 신속한 진단 또는 예후진단을 할 수 있다.

- [0042] 본 명세서에서 사용되는 "벡터"라는 용어는 이와 연결된 다른 핵산을 운반할 수 있는 핵산 분자를 말한다. 벡터의 한가지 종류로는 "플라스미드"가 있고, 이는 이 속에 추가적인 DNA 단편이 연결될 수 있는 원형의 이분쇄 DNA 루프(loop)를 말한다. 다른 종류의 벡터로는 바이러스 벡터가 있고, 이때 추가적인 DNA 단편이 바이러스 게놈 속으로 연결될 수 있다. 특정 벡터는 벡터가 도입되는 숙주 세포에서 자가 복제할 수 있다 (예: 세균의 복제오리진을 갖는 세균 벡터 및 에피솜 포유동물 벡터). 다른 벡터 (예: 비-에피솜 포유동물 벡터)는 숙주 세포 속으로 도입시 숙주 세포의 게놈 속으로 통합되어, 숙주 게놈과 함께 복제될 수 있다. 또한, 특정 벡터는 이와 작동 가능하게 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 벡터는 본원에서 "재조합 발현 벡터" (또는 간단하게, "발현 벡터")라고 한다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에서 유용한 발현 벡터는 종종 플라스미드의 형태이다. 플라스미드가 가장 통상적으로 사용되는 벡터의 형태이므로, 본 명세서에서 "플라스미드" 및 "벡터"는 상호교환가능하게 사용될 수 있다. 하지만, 본 발명은 동등한 기능을 하는 바이러스 벡터 (예: 복제 결함 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-관련 바이러스)와 같은 이러한 다른 형태의 발현 벡터를 포함한다.
- [0043] 본 명세서에서 사용되는 "재조합 숙주 세포" (또는 간단하게 "숙주 세포")라는 용어는 재조합 발현 벡터가 도입된 세포를 말한다. 이러한 용어는 특정 대상 세포 뿐만 아니라, 이러한 세포의 자손도 말한다는 것을 이해하여야 한다. 돌연변이 또는 환경적 영향으로 인해 다음 세대에서 특정한 변형이 일어날 수 있으므로, 이러한 자손은, 사실상 모 세포와 동일하지 않을 수 있지만, 본원에서 사용되는 "숙주 세포"라는 용어의 범위 내에 포함된다.
- [0044] 이하 본 발명을 설명한다.
- [0045] 본 발명의 실시예로 니켈나노헤어선 구조의 합성방법을 설명한다. 본 실시예 1의 전 과정은 도 1과 같다.
- [0046] 본 발명의 실시예 1은 양극산화 알루미늄 (AAO: Anodized Aluminium Oxide) 나노틀 (nanotemplate)내에서 1차원을 갖는 나노선의 합성에 이어, AAO 나노틀 위로 나노선이 노출된 구조를 갖는 Nano-hair 구조형성 방법에 관한 것으로서, 바이오분야에의 응용에 있어서 나노선을 촉매로 이용하여, 생체 외 (In vitro)적용이 가능한 바이오 나노촉매소재 개발에 그 목적이 있다.
- [0047] 본 실시예 1의 기술은 전기화학에 기반을 둔 기술로서, 반응물과 접촉해서 활성화에너지가 작은 반응을 만들어주는 즉, 반응속도를 증진시키는 촉매 (catalyst)를 저비용의 대량생산이 가능한 제조방법에 관한 것이다. 이는 전해도금법에 의해 생성된 양극산화 알루미늄 (AAO) 나노틀 (nanotemplate)내에 니켈 나노선을 합성한 후, 선택적 등방성 (selective isotropy) 반응이온식각 (RIE)을 통한 니켈 나노선의 노출을 통해 구현되어진다.
- [0048] 본 발명의 니켈나노구조의 제조과정은 나노선을 AAO 나노틀 내에 전기화학적 방법에 의해 합성한 후, 화학적 기계적 연마 (CMP: Chemical Mechanical Polishing)를 통해 AAO와 나노선의 높이를 일정하게 평탄화시킨다. 이렇게 만들어진 시료는 반응이온식각 (RIE: Reactive Ion Etching)장비를 이용한 식각공정을 통하여, AAO 나노틀을 선택적으로 식각처리한다. 위와같은 공정을 통하여 최종적인 AAO 나노틀 표면에 머리카락처럼 노출된 나노헤어선 구조 (Ni Nanohair structure)를 합성하게 된다. 이와 같이 구현된 나노헤어구조는 나노선끼리의 뭉침현상 없이, 매우 높은 밀도 (10^6 개/ cm^2)와 일정한 높이 (최대 60 μm)를 가지게 됨으로써, 나노뿐 아니라 바이오 및 환경분야에의 촉매로서의 응용성이 크게 도모된다.
- [0049] '화학적 기계적 연마'란 평탄화 공정에 통상적으로 사용되는 방법 중 하나로 작용 표면에 회전 연마 패드에 대하여 압착되고, "슬러리"로 알려진 연마 및/또는 화학적 반응 용액이 연마 패드 위로 투입된다. 압력의 기계적인 효과가 연마 패드를 통하여 적용되고, 슬러리의 투입으로부터 야기된 화학반응이 작용 표면으로부터 물질들을 선택적으로 제거하여 층을 좀 더 균일하게 만든다. 전형적으로는 고순도를 가지는 탈이온수가 연마 용액에 기초로 적용되고, 여기에 연마 효과를 가지는 입자 및/또는 화학적 첨가제가 첨가된다. 화학적 기계적 연마 및 슬러리 등에 대한 더 많은 정보는 미국 특허 제 6,914,001호 및 제 6,887,137호에 기재되어 있다.
- [0050] 본 발명의 명세서에 기재된 '트로포닌 I (Troponin I)'은 심근경색증 환자의 혈중에서 발견되는 단백질의 종류로서, 이의 존재가 검지될 시에는 심장에 이상이 있는 것으로 판단된다.
- [0051] 본 발명의 명세서에 기재된 '니켈 나노헤어구조 (Ni Nanohair Structure)'는 양극산화알루미늄(Anodized Aluminum Oxide, AAO) 나노틀 안에 니켈(Ni) 나노선을 합성한 후, 화학기계적평탄화(Chemical Mechanical Planarization, CMP)방법으로 나노선의 길이를 일정하게 만들고, AAO 나노틀을 반응성이온식각(Reactive ion etching, RIE) 공정을 이용하여 선택적으로 식각하여 나노선을 노출시킨 구조이며, 본 발명의 명세서에 기재된 'PVDF 멤브레인 (Poly(vinyl difluoride) membrane)'은 소수성(물과의 친화성이 없음)과 작은 기공을 가진 폴리머 멤브레인으로서 본 발명에서는 450 nm 크기의 기공을 가진 멤브레인을 사용하였으며, 이는 그 표면위에

나노입자가 쉽게 잘 붙는 성질을 가지고 있다.

- [0052] 본 발명의 명세서에 기재된 '생체 나노 프로브'는 표적 검지용 프로브가 단백질 나노입자에 집적화된 센서소재로 사용된다.
- [0053] 본 발명에서 본 발명자들은 항체와 니켈에 대한 이중 친화성을 가지게 고안된 바이러스 나노입자와 니켈 나노헤어를 포함하는 3차원 나노구조를 결합하여 통상의 ELISA 분석(Hirsch, L.R., Jackson, J.B., Lee, A., Halas, N.J. & West, J. *Anal. Chem.* **75**, 2377-2381 (2003); Nam, J.M., Park, S.J. & Mirkin, C.A. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 3820-3821 (2002); Niemeyer, C.M. & Ceyhan, B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **40**, 3685-3688 (2001); Chien, R.J. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 4984-4989 (2003); Wang, J., Polsky, R., Merkoci, A. & Turner, K.L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **43**, 2158-2161 (2004))을 사용한 경우보다 인간 혈청에서 $10^6 \sim 10^7$ 낮은 트로포닌 수준을 검출할 수 있다는 것을 보였다. 바이러스 나노입자는 트로포닌 마커의 최대 캡처를 위하여 항체의 배향성을 돕는다. 나노구조에 결합된 고밀도에서 항체에 트로포닌 마커의 더 큰 결합은 검출 민감도를 크게 증가시킨다. 니켈 나노헤어는 재생가능하고 건강하지 않은 혈청으로부터 건강한 혈청을 재생적으로 구분할 수 있다. 본 발명자들은 여러 다른 단백질 마커에 대한 유사한 높은 민감성 진단 분석을 형성하는 다른 바이러스 나노입자를 예상한다.
- [0054] 본 발명에서 본 발명자들은 면역글로불린 G의 Fc 도메인에 대한 특이적 친화성을 가지는 *Staphylococcal protein A*의 B 도메인(SPA_B)(Gouda, H. et al. *Biochemistry* **37**, 129-136 (1998); Deisenhofer, J. *Biochemistry* **20**, 2361-2370 (1981))에 고밀도를 나타내는 표면에서 hepatitis B 바이러스(HBV) 캡시드-유래 나노-스케일 입자(이하, 키메릭 나노입자라 함)를 합성하였다.
- [0055] B형 간염 바이러스는 HBV 표면 항원("HBsAg")을 함유하는 막 외피(envelope)에 의하여 둘러싸이고, HBV 코어 단백질("HBcAg"), 바이러스 폴리머라제 및 바이러스 DNA를 포함하는 내부 뉴클레오캡시드로 구성되며, 4개의 광범위하게 중복된 개방 해독 구조를 지니는 소형의 부분적 이분체 DNA 게놈을 함유하는 혈액-매개성 바이러스이다. 바이러스 외피는 3개의 다른, 그러나 관련된 긴(L), 중간(M) 및 짧은(S) 표면 항원 단백질을 함유한다. 이들은 공통의 카복시 말단 부분을 공유하나 다른 아미노 말단을 보유하며, 연속한 개방 해독 구조내의 다른 지점에서 개시 트리플렛을 다양하게 사용함으로써 생성된다.
- [0056] 긴 폴리펩티드(L 폴리펩티드)는 pre-S1, pre-S2 및 S 영역으로 구성된다. 완전한 해독 구조의 생성물로서, 이것의 아미노 말단에서 108 아미노산(또는 199, 바이러스 하위 유형에 따라 달라짐)의 pre-S1 도메인 및 이에 뒤따르는 55 아미노산의 pre-S2 도메인 및 226 아미노산의 짧은 폴리펩티드(S 폴리펩티드) 영역을 포함한다. 중간-길이 폴리펩티드(M 폴리펩티드)는 S 영역이 뒤따르는 아미노 말단에 pre-S2 도메인을 보유하는 반면, 가장 풍부한 형태의 S 폴리펩티드는 S 영역만으로 구성된다. pre-S 영역은 숙주 세포에의 부착 및 바이러스 조립 모두에서 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. S형은 바이러스에서 HBsAg의 M 및 L 형에 비하여 더 풍부하고, 글리코실화된 형 및 비글리코실화된 형으로 모두 발생한다[V. Bruss 및 D. Garem, "B형 간염 바이러스 조립시 외피 단백질의 역할", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, pp. 1059-63 (1991); V. Bruss 등, "B형 간염 바이러스 대형 외피 단백질의 경막 위상에서 해독후 변형", *EMBO J.*, 13, pp. 2273-79 (1994); A.R. Neurath 등, "B형 간염 바이러스에서 숙주 세포 수용체 결합 부위의 동정 및 화학적 합성", *Cell*, 46, pp. 429-36 (1986); K. Ueda et al., "B형 간염 바이러스의 3가지 외피 단백질: Dane 입자의 형성에 필요한 대형 S, 중형 S, 및 주요 S 단백질", *J. Virol.*, 65, pp. 3571-29 (1991)]. 외피의 내부 표면과 코어의 외부 표면 사이의 특이적 상호작용은 바이러스의 정확한 조립을 인도하고 생성된 입자를 안정화시키는 것 같다.
- [0057] HBV 코어 단백질은 대장균(*E. coli*)에서 효과적으로 발현될 수 있다[M. Pasek 등, "대장균에서 B형 간염 바이러스 유전자 및 이것의 발현", *Nature*, 282, pp. 575-79 (1979)]. 상기 단백질은 180(T=3) 또는 240(T=4) 서브유니트를 함유하는
- [0058] 2가지 크기의 정20면체 쉘(shell)내로 조립된다[R.A. Crowther et al., "전자현미경에 의하여 결정된 간염 B 바이러스 코어 입자의 3차 구조", *Cell*, 77, pp. 943-50 (1994)]. 서브유니트는 이량체로 집합되며, 각 이량체는 쉘의 표면상에 돌출하는 스파이크를 형성한다. 전자 냉현미경 및 이미지 프로세싱을 사용하여, 최근에 T=4 쉘의 맵이 6000개 이상의 개체 입자의 이미지로부터 7.4Å 해상도에서 제작되었다[B. Bottecher 등, "전자 냉현미경에 의하여 B형 간염 바이러스의 코어 단
- [0059] 백질의 접힘을 측정", *Nature*, 386, pp. 88-91 (1997)]. 이것은 폴리펩티드 사슬의 접힘이 이전에 해결된 바이러스 캡시드와는 매우 다르고, 대개 α-헬릭스라는 것을 보여주었다. 각 이량체 스파이크는 이량체의 각 단량체

로부터의 하나씩으로 된 긴 a-헬릭스 헤어핀 쌍에 의하여 형성되었다[Bottcher 등, (1997); J.F. Conway 등, "냉전자현미경에 의하여 B형 간염바이러스 캡시드에서 4-헬릭스 다발의 시각화", *Nature*, 386, pp. 91-94 (1997)]. 접힘 위에 아미노산 서열을 포개놓는 변호매김 계획[Bottcher 등, (1997)]은 스파이크의 끝에 아미노산 78-82 주위에 HBV 코어 단백질의 주요 면역우성 영역[J. safeld 등, "B형 간염 바이러스로부터 코어 항원 및 E 항원에 항원 결정기 및 기능성 도메인", *J.Virol.*, 63, pp. 798-800 (1989); M. Sallberg 등, "B형 간염 코어 항원에 대한 모노클론 항체를 위하여 선형 결합 부위의 특성화", *J. Med.Viol.* 33, pp. 248-52 (1991)]을 위치시켰다.

[0060]

한편, HBV 코어 단백질은 4 긴 알파-나선 번들로 구성되고(도 3a), 박테리아에서 발현 시, 바이러스의 천연 캡시드 구조(Bottcher, B., Wynne, S.A. & Crowther, R.A. *Nature* 386, 88-91 (1997); Crowther, R.A. et al. *Cell* 77, 943-950 (1994))와 매우 흡사한 코어 쉘 입자로 결합된다. 전자 저온 현미경 분석을 통하여, 브처 등은 149 잔기 이후가 트린케이트된 싱글 HBV 코어 단백질은 240 소단위체를 포함하는 코어 쉘 입자를 형성하고 전체 36 nm 직경을 가진다고 보고하였다(Bottcher, B., Wynne, S.A. & Crowther, R.A. *Nature* 386, 88-91 (1997)). 소단위체의 다이머 클러스터링은 쉘 입자의 표면 상에 스파이크를 형성하고, 그 면역성 에피토프는 돌기한 표면 스파이크에 위치한다(도 3a). 그 표면 노출된 스파이크 톱은 단일 코어 단백질의 D78에서 D83 잔기로 구성된 루프 부위에 해당된다. 본 발명자들은 루프 부위의 P79A80를 탠덤 리피트된 SPA_B 서열(NCBI nucleotide accession No. M18264 nucleotide sequence 625-813, 서열번호 11)로 대체하여, 결론적으로 고밀도를 가지는 합성된 키메릭 나노입자의 표면에 노출되게 하였다(도 3a). 키메릭 나노입자 합성에서, 본 발명자들은 키메릭 나노입자가 니켈에 대하여 강한 친화성을 가지게 트린케이트된 HBV 코어 단백질의 N-말단에 헥사히스티딘을 첨가하였다(도 3a). TEM 이미지 분석(도 3a)은 대장균에서 발현된 HBV 캡시드-유래 나노입자가 거의 자연적인 직경을 가지는 구형 나노입자로 결합되는 것을 나타낸다. 결론적으로, 그 키메릭 나노입자는 항체의 (IgG)의 Fc 도메인과 니켈에 이중 친화성을 가진다. 이들 바이러스 나노 입자들은 관심이 있는 생체분자를 검출 및/또는 정량하기 위하여 사용되는 그들의 여러 표면 펩타이드 및 단백질 상에 나타낼 수 있다.

[0061]

도 3b에 나타낸 바와 같이 3-차원 분석 시스템은 Ni 나노헤어 구조 또는 다공성(porous) 막과 키메릭 나노입자를 결합하고, 단백질 마커들을 특이적으로 결합하는 항체를 첨가하여 개발되었다. 본 발명에서 '나노헤어'란 일부 와이어들은 공기 중에 노출되고, 나머지는 서포팅 유기 또는 무기 템플레이트에 들어가 있는 나노와이어의 어레이를 의미한다(도 3b). 이 구조에서 나노와이어의 공기-노출된 부분이 매우 증가된 표면 대 부피 비를 가진다.

[0062]

항체들이 헥사히스티딘과 니켈 사이의 친화성 상호작용에 의하여 니켈 나노헤어 표면 상에 이미 부착된 키메릭 나노입자에 첨가될 때(도 3a), 항체(IgG)의 Fc 도메인이 특이적으로 키메릭 나노입자의 표면 SPA_B에 특이적으로 결합되고 따라서 IgG의 항원-특이적인 가변 도메인은 완전하게 단백질 마커에 접근할 수 있다. 결론적으로 도 3b에 나타난 바와 같이, 효과적인 3-차원 분석 시스템은 다음과 같은 우수한 효과를 가지게 개발되었다: (i) 항체의 조절된 배향성 및 단백질 캡처의 3차원 방법에 기인하여 허용된 항체에 대한 단백질 마커의 최대 접근성 및 (ii) 3차원 나노 헤어 표면에 대한 단백질 마커에 대한 항체의 크게 증가된 밀도 및 비율. 그 포착된 마커들은 2차 항체에 부착된 양자 점들에 의하여 방사된 광루미네선스를 센싱하여 검출되었다(도 3b).

[0063]

도 4a로부터, ELISA-기반 분석(실시에 참고)은 대략 0.1 nM보다 낮은 농도에서 트로포닌 I(PBS 버퍼 또는 건강한 혈청에서)을 검출하지 않았고, 각 트로포닌 I 농도에서 매우 높은 재생성 신호를 가졌다. 본 발명에서 개발된 키메릭 나노입자 + Ni 나노헤어 시스템을 사용하면, 그 민감도는 최근 보고된(Apple, F.S., Smith, S.W., Pearce, L.A., Ler, R. & Murakami, M.M. *Clin. Chem.* 54, 723-728 (2008)) 가장 높은 수준(0.25pM) 보다 대략 100,000-배 더 높은 민감도를 가지고, 현재의 ELISA 분석(Rosi, N.L. & Mirkin, C.A. *Chem. Rev.* 105, 1547-1562 (2005); Hirsch, L.R., Jackson, J.B., Lee, A., Halas, N.J. & West, J. *Anal. Chem.* 75, 2377-2381 (2003); Nam, J.M., Park, S.J. & Mirkin, C.A. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 3820-3821 (2002); Niemeyer, C.M. & Ceyhan, B. *Angew. Chem., Int. Ed.* 40, 3685-3688 (2001); Chien, R.J. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 4984-4989 (2003); Wang, J., Polsky, R., Merkoci, A. & Turner, K.L. *Angew. Chem., Int. Ed.* 43, 2158-2161 (2004))보다는 $10^6 \sim 10^7$ 더 민감한 낮은 10^{-18} 수준으로 크게 상승한다(도 4b). Ni 나노헤어의 세척된 표면에 키메릭 나노입자의 결합에서(즉 도 5a의 B 단계), 그 Ni 나노헤어 표면은 도 4b의 대조군의 결과에서 확인되는 것과 같이 광루미네선스의 가짜 신호를 야기하는 맨(bare) 니켈 표면에 Qdot-2차 항체의 특이적 결합을 저해하기에 충분한 양의 키메릭 나노입자로 도포되었다(도 8). 또 AMI 환자 혈청에서 트로포닌 I은 동일한 분석 시스템과 방법을 사용하여 성공적으로 검출할 수 있고, 트로포닌 I-없는 PBS 버퍼 및 건강한 혈청은 단지 무시

할 정도의 신호를 준다(도 4b).

[0064] 본 발명의 현저한 효과 중 하나는 동일한 Ni 나노헤어 구조를 다중 샘플에서 반복적으로 사용할 수 있다는 것이다. 세척과 행굼 과정을 통하여(즉 도 5a의 A 단계), 그 사용된 Ni 나노헤어는 재사용가능하여지고 다른 샘플분석에 재사용할 수 있다. 모든 세 분리된 Ni 나노헤어 구조들은 8 다른 샘플의 연속적인 분석에 성공적으로 사용되었다. 각 연속적인 분석은 테스트된 모든 샘플에 대한 재생적이고 일관된 신호를 보였다.

[0065] 평균 450 nm의 크기를 가진 PVDF 막은 키메릭 나노입자가 용이하게 고정되는 소수성 포어 표면을 가지는 적당한 나노구조체이고 따라서 또 다른 타입의 3차원 분석 시스템을 구축하는데 사용하였다. 도 6a에서 알 수 있는 바와 같이, 키메릭 나노입자에 부착된 항체들은 모든 농도에서 트로포닌 I을 가지는 PBS 버퍼와 건강한 혈청 모두에서 트로포닌 I을 재생적으로 검출할 수 있었다. 트로포닌 I의 10^{-18} 검출 한계도 Ni 나노헤어 기반 분석에 비견될만한 한도. 또 PVDF 표면에 직접 고정된 항체를 가지는 분석은 키메릭 나노입자들을 사용한 분석에 비하여 현저하게 낮은 민감도를 보였다(도 6b). 이것은 항체들의 배향성에 기인하는 것 같다; PVDF 표면에 직접 고정된 것들은 랜덤하고 트로포닌 I에 낮은 접근성을 가진다. 키메릭 나노입자에 고정된 항체의 배향성은 분석의 민감도에서 중요한 것으로 나타났다.

[0066] 본 발명자들은 AMI를 경험한 26 AMI 환자(표 1)의 임상 진단에서 PVDF-기반 시스템을 테스트하였고, 그 분석 결과를 ELISA-기반 분석과 비교하였다(도 7a의 a 및 b). ELISA-기반 분석에서(도 7a의 b), 세 (No. 4, 9, 및 18) AMI 환자 혈청은 양성으로 검출되지 않았고, 즉 흡광 신호가 임상 컷오프 값 이하였고(수평 점선으로 나타냄), 9명(No. 1, 2, 3, 5, 8, 11, 16, 17, 및 23) AMI 환자 혈청으로부터 온 신호들은 양성이었으나 임상 컷오프 바로 근처였지만, 키메릭 나노입자 + PVDF-기반 분석은 모든 26 AMI 환자 혈청에서 명확한 양성 신호를 나타냈고, 따라서 100% 임상 특이성을 나타내었다(도 7a). (상기 ELISA 분석결과는 제공업자들에 의하여 그 ELISA 키트의 임상 특이성이 87.5%로 정의되었기 때문에 놀라지 않았다) 또 PVDF 표면에 직접 고정된 항체들은 1000-배 희석된 AMI 환자 혈청을 진단하는데 실패한 반면에, 키메릭 나노입자 + PVDF-기반 분석은 그 희석된 환자 혈청에서 트로포닌I를 검출할 수 있었서(도 7b), 본 발명의 3차원 분석이 매우 적은 양의 환자 혈청에서도 AMI의 발병을 구분할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0067] HBV 캡시드-유래된 키메릭 나노입자 및 3-차원 나노구조체(Ni 나노헤어 및 PVDF 막)를 사용하여 본 발명자들은 트로포닌 I 또는 특정의 AMI 마커에 대한 매우 큰 민감성과 특이성을 가지는 분석 시스템을 개발하였다. 비록 본 발명의 HBV 캡시드가 SPA_B의 표면 디스플레이를 위한 모델 바이러스 스카폴드로 사용되었지만, 다른 바이러스 또는 바이러스-유사 입자들도 표면 SPA_B를 디스플레이하는 키메릭 나노입자의 생성에 사용될 수 있다. 아마도 단백질 캡처의 3차원 방법과 고밀도 고정화된 항체들의 조절된 배향성으로 인하여 그 분석 민감도 및 임상 특이성은 통상의 ELISA 분석에 비교하여 크게 증가된 것이다.

[0068] 또한 이하에서는 본 발명의 나노구조체 퀴즈를 이용한 3차원 나노구조 기반 질병 마커 검출용 나노센서에 대하여 설명한다.

[0069] 1. 나노구조체 퀴즈의 제조

[0070] 본 발명자들은 나노구조의 스페이싱을 효과적으로 조절할 수 있는 새로운 방법을 개발하였다. 제안된 새로운 방법은 두 단순한 RIE 처리단계로 구성된다: 1) PMMA [poly(methyl methacrylate)] 스핀-코팅된 퀴즈 샘플의 O₂ RIE, 그것은 도트-유사 중합체 패턴을 생성하고 2) 그 도트-유사 패턴의 상부에 선택적으로 RIE grass를 유도하고, 그 RIE grass가 없는 곳에서는 그 퀴즈를 식각하여서 기둥(pillar)-타입 구조를 형성하게 하는 CF₄ RIE .

[0071] 도 9는 (a) PMMA 스핀-코팅된 퀴즈 와이퍼를 1분 동안 O₂ RIE 후에 형성된 나노구조의 SEM 이미지를 나타낸다. 도트-유사 나노구조의 스페이싱은 O₂ RIE 시간에 따라서 증가하였다. (여러 O₂ RIE 후에 형성된 스페이싱 조절된 도트 패턴의 SEM이미지는 도 13 및 참고예 1 참조) O₂ RIE에 의하여 형성된 구조는 5분 동안 CF₄ RIE를 수행하고, 동일한 스페이싱을 가지나 더 넓은 직경을 가지는 기둥-유사 나노구조체가 형성되었다(도 13 참조). 도 9(b) ~ (f)는 CF₄ RIE 시간을 30초에서 4분으로 증가시킴에 따라서 기둥 유사 나노구조체의 직경 및 종횡비는 증가하지만 나노구조체 사이의 스페이싱은 변하지 않았다. 기둥 유사 나노구조체의 스페이싱 및 종횡비 각각 O₂ 및 CF₄ RIE 시간에 의존하였고, 바이오센서 응용에 적합한 것으로 나타난 1 분의 O₂ RIE 및 10 분의 CF₄ RIE를 선택하였다. XPS 분석은 제조 과정의 각 단계에서 샘플에 대하여 수행하였다(표 3) 산소 및 실리콘 양은 1 분의

O₂ RIE 후에 증가하였지만, 탄소 양은 대조군 샘플(bare quartz, 7.06%)에 비하여 여전히 매우 높았고 (33.63%), O₂ 플라즈마가 스핀-코딩된 PMMA 중합체 (S2)를 식각한 후 도트-유사 패턴(S3)로 남은 잔류 PMMA와 일치하였다. 차후 CF₄ RIE는 불소 양을 현저하게 상승하게 하였고(30.33%, S4) 탄소양을 약간 증가시켰다 (37.83%, S4). 에틸 아세테이트에 13시간 침지한 후, 불소와 탄소 레벨이 약간 감소하나 여전히 높게 유지되었다. 그 샘플을 잔류 수용성 중합체를 제거하기 위하여 PMMA 레진에 좋은 용매인 에틸 아세테이트에 침지하였지만 퀴즈 표면(S5)에 부착된 유기 층을 제거하는데 효과적이지 않았다. 에틸 아세테이트에 침지 및 건조 후, 가장 바깥 유기 층을 900 에서 1시간 동안 가열하고 일련의 클리닝 과정(piranha 용액으로 세척, DI 수로 세척, 질소가스로 불로잉)을 수행하여서 성공적으로 제거하였다. 이 과정 후, 기본적인 조성이 대조군 퀴즈 기질의 것과 거의 동일하게 복귀하였다(S6). 도 10은 900 에서 가열을 포함한 일련의 클리닝 과정 전후에 샘플의 나노구조체를 보여준다. 도 10 (a) 및 (d)는 CF₄ RIE 전에 나노구조체가 형성되지 않은 것을 나타낸다. 도 10 (e) 및 (f)는 2 분 CF₄ RIE 샘플에서 2.6 ± 0.4 에서 10분 CF₄ RIE 샘플에서 5.6 ± 0.6 으로 나노기둥에서 중회비가 증가한 것을 나타낸다. SEM 이미지와 XPS 분석으로부터, 높은 중회비 나노구조의 형성에 대하여 하기 기작이 제안될 수 있다: 1) PMMA 레진의 O₂ RIE이 퀴즈 표면 상에 나노미터-스케일 PMMA 도트-패턴을 생성하고; 2) 그 도트-유사 나노구조체가 CF₄RIE 동안에 C_xF_y 중합체의 성장과 침적을 위한 시드로 작용하고 화학적 건조-식각에 저항하는 셀프-마스크로 작용한다. CF₄ RIE 전 후에 SEM 이미지의 비교는 도트-유사 패턴의 간격이 기둥-유사 구조의 것과 유사하고 XPS 분석에서 관찰되는 그 조성 변화는 이것을 지지한다. 그 제안된 기작을 지지하는 부가적인 실험은 유기 층의 제거에 의하여 제공된다(도 10 (b), (c), (e) 및 (f)). 나노구조체의 상층 부위는 적용된 클리닝 과정에 따라 다르다: 에틸 아세테이트로만 클리닝한 샘플(도 10 (b) 및 (c))에 비하여, 에틸 아세테이트로 클리닝하고 일련의 클리닝 과정을 수행한 샘플의 나노구조체의 상층 부위는 덜 둥글고 얇은 구조가 관찰되었다(도 10 (e) 및 (f)). 이 결과는 패턴의 상부에 셀프-마스크링 유기 층은 PMMA와 같은 수용성 물질이 아니고 C_xF_y와 같은 불용성 물질이라는 것을 나타낸다. 이 3-차원 나노구조체는 2차원 평면 퀴즈 표면에 비하여 더 높은 표면적 부피 비율을 가졌고(10분 CF₄ RIE 샘플에 대하여 약 6배 높은), 그것은 본 발명에서 하기 나타낸 것과 같은 높은 민감도의 바이오분석에 대하여 매우 유용한 특징을 제공한다.

[0072] 2. 바이러스 나노입자와 결합된 나노구조체 퀴즈를 사용한 질병 마커의 민감한 검출

[0073] 본 발명에서, 본 발명자들은 나노구조체 퀴즈의 표면 상에 아비딘 분자들과 상호작용하는 HBV capsid-유도 및 바이오틴화된 나노입자(제조에 참고)를 사용하였다(도 11a, 11b). 바이러스 입자의 표면 발현된 (SPA_B)₂로 인하여, 그 나노구조체 퀴즈 표면은 조절된 오리엔테이션을 가지는 프로브 항체(즉 염소 항-LT-B IgG)에 의하여 뾰뾰하게 커버되어서 3차원 분석 시스템을 이룬다(도 11b). 도 11b에서 설명하는 바와 같이, 분석 시그널은 마우스 항-LT-B 단클론 항체에 특징적으로 결합하는 2차 항체와 결합된 Q-도트로부터 방출하는 광발광(형광)이다.

[0074] 본 발명자들은 넓은 농도 범위에서 LT-B를 검출하려 노력하였다(1.2 aM에서 1.2 μM) (도 12a). 나노구조체 퀴즈 기반 시스템의 분석 민감도는 플레인 퀴즈를 사용한 분석 시스템의 것보다 비교하였다. 나노구조체 퀴즈 기반 분석 시스템에서, 검출 한계는 12 aM의 LT-B로 감소하였지만, 플레인 퀴즈-기반 시스템은 그것의 농도가 12 fM보다 낮은 경우에는 LT-B를 검출할 수 없었다.

[0075] IUPAC 정의에 의하면, 플레인- 및 나노구조체 퀴즈-기반 분석 시스템의 검출 한계는 각각 12 fM 및 12 aM로 결정되었고(참고예 2 참조), 그것은 나노구조체 퀴즈의 훨씬 더 높은 민감도를 나타낸다.

[0076] 면역분석의 민감도는 직접적으로 하기 세 중요한 요소에 의하여 영향을 받는다: 1) 고정화된 프로브 항체의 1) 밀도 및 2) 오리엔테이션 그리고 3) 프로브 항체에 대한 분석 항원의 접근성. 더 큰 표면적대 부피의 비율을 가지는 나노구조체 퀴즈는 많은 양의 프로브 항체 및 조작된 바이러스 입자의 고정을 가능하게하는 것 같다. 프로브 항체의 증가된 표면 밀도 이외에, 고정화된 항체의 오리엔테이션은 항체의 Fc 도메인에 대한 선택적 친화도를 가지는 표면 조작된 바이러스 입자들을 사용하여 잘 조절되었다. 또한 퀴즈의 3차원 나노구조는 고정화된 항체들에 대한 매우 증가된 접근성을 가지는 LT-B 단백질 마커를 제공한다. 즉, 나노구조체 퀴즈는 LT-B 단백질 마커와 같은 큰 분석 분자의 방사 확산(radial diffusion)을 가능하게 하여서 센싱 부위(즉 고정화된 항체)에 대한 증가된 접근성을 가능하게하는 반면, 평면 퀴즈 및 ELISA와 같은 통상적인 2차원 분석에서는 단지 선형 확산만이 일어난다.

[0077] 도 12a에서 알 수 있는 바와 같이 형광 시그널의 비선형성은 퀴즈 도트 사이의 상호작용의 일반적인 현상인 셀

프-퀀칭을 일으키고, 그것은 퀀텀 도트의 분포가 높은 국소 밀도를 가지고 불균일하게 편극되었을 때 일어난다. 본 발명에서 개발된 분석 시스템에서, 그 프로브 항체는 바이러스 입자 표면의 프로테인 A 서열 및 항체의 Fc 도메인 사이에 특정한 상호작용을 통하여 바이러스 입자의 표면에 부착된다. 많은 항체들(이론적으로는 약 20개 항체 분자까지)이 36 nm 직경을 가지는 단일 바이러스 입자에 부착하고, 따라서 많은 퀀텀 도트들이 나노구조체 퀀츠의 고체 표면 상에 이미 고정된 바이러스 나노입자 주위에 뽁뽁하게 위치되어 있다.

[0078] 보고에 의하면, 퀀텀 도트의 퀀텀 수율은 셀프-퀀칭의 현상때문에 용액 상태에서 고체 상태로 진행할 때 크게 감소한다(H. Skaff, K. Sill, T. Emrick, *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 11322). 형광 방출에서 셀프-퀀칭-유도된 감소는 심지어 퀀텀 도트가 용액에서 높은 밀도로 존재할 때도 관찰된다.(D. M. Willard, L. L. Carillo, J. Jung, A. V. Orden, *Nano Lett.* 2001, 1, 469) 유사하게, 다중 형광단(fluorophores)으로 표지된 프로브 항체에서 형광 시그널은 그 항체에 부착된 형광단의 증가되는 수에 비 선형 형태로 증가한다.(J. R. Lakowicz, J. Malicka, S. D. Auria, I. Gryczynski, *Anal. Biochem.* 2003, 320, 13)

[0079] 중요한 대조군 실험이 도 12b에서 나타난 것과 같이 수행되었다. 네가티브 대조군 1 및 3 실험 모두는 매우 낮은 시그널의 광발광을 내었고(도 12a), 그것은 LT-B 없다면, 두 항-LT-B 항체들 사이에 비특이적인 상호작용은 무시해도 좋을 정도인 것을 나타내고(도 12b), Qdot-부착된 2차 항체의 비특이적인 결합에 의한 거짓신호가 없다는 것을 나타낸다. 퀀츠 표면의 아미데이션 및 바이오틴화가 없으면(즉 도 12b의 네가티브 대조군 실험 2 및 4) 무시해도 좋을 정도의 형광 시그널을 야기한다 (도 12a). 결론적으로 도 12의 결과는 본 발명에서 사용된 분석 시스템과 방법을 사용하면 비 특이적인 거짓 신호없이 믿을만하고 민감한 분석을 달성할 수 있다는 것을 보인다.

발명의 효과

[0080] 본 발명의 나노헤어선구조는 나노선끼리의 뭉침현상을 배제하여, 고효율수득물의 화학적 검출을 위한 공정방법으로써, 나노틀 내부에 생체기능성을 가진 나노선 재료를 합성하여 나노기술(NT)뿐 아니라 바이오기술(BT)분야에서의 응용성이 크며, 키메릭 나노입자 및 3-차원 나노구조체(Ni 나노헤어 및 PVDF 막)를 사용한 본 발명의 분석 시스템은 질병진단 마커의 검출용의 용도로 매우 큰 민감성과 특이성을 가지며, 본 발명에서는 트로포닌 I 또는 특정의 AMI 마커와 같은 단백질 마커에 대한 매우 큰 민감성과 특이성을 가진다는 것을 보였다.

[0081] 또한 넓은 면적의 퀀츠 표면에 높은-중형비 기둥-유사 나노구조체를 제조하는 제안된 방법은 패턴의 차원 특성을 조절하는 고가의 마스크링 과정이 필요하지 않는 단순하고 비용이 적게드는 기술에 기반한다. 따라서 그 기술은 앞선 연구 및 추가적인 응용을 위한 크기-조절된 나노패턴의 대량 생산에 널리 사용될 수 있다. 일 예로, 본 발명자들은 *E. coli* 엔테로톡신 마커를 검출하는 매우 민감한 바이오센서를 개발하였다. 나노구조체 퀀츠를 가지는 HBV 캡시드로부터 유래한 조작된 바이러스 입자들을 결합하여서, 본 발명자들은 3-차원 분석 시스템을 구축하였고, 심지어 attomolar 농도에서도 타겟 엔테로톡신 마커를 성공적으로 검출하였으며, 민감한 진단이 ETEC 감염의 아주 초기 단계에서 가능할 수 있다는 것을 제안한다. 우리의 분석 시스템은 ELISA와 같은 다른 분석 방법에 비하여 중요한 잇점을 가진다. 그것은 통상적인 분석 문제점을 해결한다, 즉 항체의 랜덤 오리엔테이션 문제를 해결하는 프로브 항체의 뽁뽁한 고정화가 3차원 표면 상에서 가능하다. 더 중요하게는 나노구조체 퀀츠는 프로브 항체에 대한 현저하게 증가된 접근성을 가지는 타겟 마커를 제공한다. 또한 이 분석 시스템은 활성 부위의 바람직하지 않은 변형때문에 항원 결합 활성을 현저하게 감소시킬 수 있는 프로브 항체의 화학적 변형을 수반하지 아니한다. 또한, 바이오틴화된 바이러스 입자를 사용한 항체 고정화 방법은 아민-노출된 표면을 채택하는 분석 시스템에 적용될 수 있다. 비록 박테리아 엔테로톡신이 개념 증명을 위하여 여기에서 분석되었지만 이 방법은 거의 모든 단백질 질환 마커의 검출에 적용될 수 있고 따라서 여러 질환 마커들의 초기 및 민감한 검출에서 큰 가능성을 가진다.

도면의 간단한 설명

[0082] 도 1은 본 발명의 일련적인 공정모식도로 나노헤어선구조의 제조방법을 나타낸다. :도1(a)는 양극산화알루미늄 나노틀의 합성, 도1(b)는 전자빔증착법에 의한 전도층 (Ag, 250-350 nm)의 증착, 도1(c)는 나노틀 내부에의 나노선의 합성, 도1(d)는 나노틀과 나노선의 평탄화공정, 도1(e)는 나노헤어선구조를 위한 나노틀의 선택적인 식각공정

도2는 본 발명의 실시예인 니켈나노헤어선 구조의 주사전자현미경 (FE-SEM: Field Emission-Scanning Electron Microscope) 사진을 나타낸다.:도2(a)와 (b)는 화학적기계연마 (CMP)공정에 의해 평탄화된 평면도, 도2(c)와 (d)는 화학적기계연마공정에 의해 평탄화된 단면도, 도2(e)와 (f)는 나노틀의 선택적 반응이온식각 (RIE)공정에

의한 니켈나노헤어선 구조의 단면도.

도 3은 바이러스 나노입자에 기반한 3차원 진단 분석방법을 나타낸다. a는 천연 B형 간염바이러스, (HBV) 캡시드 입자 및 대장균에서 합성된 키메릭 나노입자의 TEM 이미지 및 도식이며, 3b는 96-웰 마이크로플레이트에서 수행된 진단 시스템의 도식화 및 그 분석 원리이다, 요약하면, 그 질병 마커(이 경우에는 트로포닌 I)를 인지하는 항체들은 키메릭 나노입자에 결합하고 특정한 방법의 배향성을 가진다. 트로포닌 I이 항체에 결합하고, 검출은 양자 점과 컨쥬게이트된 2차 항체로 수행된다.

도 4는 트로포닌 I의 검출을 나타내는 그림이다. 4a는 통상의 ELISA 분석이 0.1 nM보다 낮은 농도에서는 트로포닌 I을 검출하지 못한다는 것을 보여주고, 4b는 키메릭 나노입자와 니켈 나노헤어를 사용한 분석은 PBS 및 인간 혈청 모두에서 10^{-18} (attomolar)의 민감도를 보여주는 것을 나타낸다. "대조군"은 충분한 양의 키메릭 나노입자 (PBS 버퍼 50에 30nM)로 도포된 Ni 나노헤어 표면에 단지 Qdot-2차 항체만을 첨가한 실험을 의미한다.

도 5는 세척가능하고 재생가능한 분석 시스템을 나타낸다. 5a는 검출을 위한 니켈 나노헤어의 세척과 재사용을 위한 4단계 프로토콜이다. 5b는 세 분리된 시스템을 사용한 8 다른 트로포닌 I (Tn) 샘플의 연속적인 분석이 우수한 재생성을 나타내는 것을 보여준다. A, B, C, D, 점선과 실선 및 PL₁/PL₂는 a에 것에 해당한다. 검은 직사각형은 전체 PL 증가를 나타낸다.

도 6은 PVDF 막에 대한 트로포닌 I 분석을 나타낸다. 6a는 PVDF 막에 고정된 키메릭 나노입자가 PBS 및 인간 혈청 모두에서 유사한 검출 민감도를 나타내는 것을 보여준다. 6b는 PVDF 막에 직접 고정된 항체는 키메릭 나노입자에 고정된 것에 비하여 현저하게 낮은 민감도를 보여준다.

도 7은 바이러스 키메릭 나노입자 기반 분석의 임상 특이성 및 민감도를 나타낸 그림이다. 16 건강한 사람과 26 AMI 환자로부터 유래한 혈청 분석에서, PVDF 막의 키메릭 나노입자를 사용한 경우에는 모든 환자의 트로포닌 I이 명확하게 검출되었고(7a의 a 참고). ELISA-기반 진단은 3 환자(4, 9, 18번)에서는 검출에 실패하였고, 9명은 진단 컷오프 신호(수평 점선)에 매우 근접한 모호한 신호를 나타냈다(7a의 b). 도 7b는 키메릭 나노입자에 부착된 항체에서는 1000X 배 희석된 샘플에서 트로포닌 I을 검출할 수 있었지만 PVDF에 직접 고정된 것에서는 검출할 수 없었다것을 보여준다. 74/M 및 75/F는 AMI 환자의 연령과 성별을 나타낸다.

도 8은 니켈 표면에 비특이적인 Qdot-2차 항체의 결합을 방해하는 맨(bare) 니켈 표면에 첨가된 HVB 캡시드-유래 키메릭 나노입자의 양을 결정하는 그림이다.

도 9는 CF₄ 플라즈마에 의한 건조 식각의 시간 의존성을 나타낸다. 도트 패턴은 1-분 O₂ RIE에 의하여 형성되고 (a) 0 s, (b) 30 s, (c) 1 분, (d) 2 분, (e) 3 분, 및 (f) 4 분 동안 CF₄ RIE를 수행하였다. SEM 이미지를 Hitachi S-4700 FE-SEM을 사용하여 얻었다.

도 10은 클리닝 과정 전후의 건조-식각된 도트 패턴의 SEM 이미지를 나타냄. (a) 1 분 O₂ RIE(CF₄ RIE 없는) 및 클리닝 과정없음, (b) 1 분 O₂ RIE 및 2 분 CF₄ RIE, 에틸 아세테이트 침지 및 클리닝 수반, (c) 1 분 O₂ RIE 및 10 분 CF₄ RIE, 에틸 아세테이트 침지 및 클리닝 수반. (d) 1 분 O₂ RIE(CF₄ RIE없는), 에틸 아세테이트 침지 및 클리닝 수반, (e) 1 분 O₂ RIE 및 2 분 CF₄ RIE, 에틸 아세테이트 침지 후 900℃에서 1시간 가열 및 클리닝 수반. (f) 1 분 O₂ RIE 및 10 분 CF₄ RIE, 에틸 아세테이트 침지 후 900℃에서 1시간 가열 및 클리닝 수반. SEM 이미지들을 JEOL JSM-6701F FE-SEM을 사용하여 얻었다.

도 11은 바이러스 나노입자와 결합된 나노구조체 퀴즈에 기반한 3차원 분석 시스템. (a) 대장균에서 합성된 B형 간염 바이러스 캡시드 입자로부터 유래한 바이오틴화된 바이러스 나노입자의 TEM 이미지와 도식적인 설명. (b) 질환-특이적인 단백질 마커(예를 들어 ETEC 엔테로톡신 LT-B)의 검출을 위하여 본 발명에서 사용된 3차원 분석 시스템 및 원리의 도식적인 설명. [B 형 간염 바이러스의 다이머 클러스터 스파이크 및 캡시드 입자의 구조는 Protein Data Bank (PDB no. : 1QGT)로부터 얻음].

도 12는 3차원 분석 시스템의 수행. (a) 도 4의 3차원 분석 시스템(solid bar) 또는 판 퀴즈-기반 분석 시스템(dashed bar)를 사용하여 수행된 LT-B 분석 및 네가티브 대조군 실험의 결과이다. ("네트 광발광"은 측정된 실질적인 광발광 신호로부터 맨 퀴즈 표면의 배경 광발광 신호를 빼주어서 얻은 값을 의미한다) (b) 네가티브 대조군 실험의 도식적인 설명.

도 13은 (a) 15 s, (b) 30 s, (c) 1 분 및 (d) 3 분의 O₂ 플라즈마 노출 시간 후에 형성된 셀프-마스킹 도트 패턴의 SEM 이미지를 나타낸다

도 14는 HBV 캡시드 유래 키메릭 나노입자를 합성할 수 있는 발현 벡터 제작과정 및 개열지도를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 예시의 목적으로 기재된 것으로, 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되지 아니한다.

실시예 1: 니켈나노헤어선 구조의 합성방법

- 니켈 나노선의 합성 -

도 1(a)과 같이 균일한 구멍 직경 (수 십 nm~ 수 백 nm)을 가진 양극산화 알루미늄 나노틀 (AAO: Anodized Alumina Oxide)을 합성한다. 그 후 도 1(b)와 같이 작업전극 (working electrode)으로써 은 (Ag)을 전자빔증착기로 250~350 nm 두께로 AAO의 한쪽 면에 증착한다. 그 후 Nickel Sulfate (NiSO₄·H₂O, 0.5M) + Nickel Chloride (NiCl₂·H₂O, 0.1M) + Boric acid (H₃BO₃, 0.1M) 용액에 도 1(c)과 같이 AAO를 넣은 후, 상대전극 (counter electrode)을 백금 (Pt)으로 하여 니켈 나노선을 증착한다. 여기서 Nickel Sulfate는 도금의 주성분이며, Nickel Chloride는 전기적 전도성 증가, Boric acid는 pH의 항상성을 위한 버퍼 (Buffer)용액으로 쓰인다.

- 니켈 나노선의 평탄화 -

그 후 도 1(c)와 같이 AAO내부에서 넘침 (overflow)이나 모자란 (underflow) 성장을 한 나노선의 높이를 AAO 나노틀과 동일시키기 위하여 화학적기계적연마 (CMP: Chemical Mechanical Polishing)공정을 통하여 대략 10 μm 정도 연마를 실시한다.

- 니켈 나노선의 AAO위로의 노출 -

이후 마지막 단계인, 니켈 나노선의 노출을 위하여 AAO 나노틀의 선택적인 반응이온식각 (RIE: Reactive Ion Etching)공정이 이루어진다. 이 공정은 BCl₃ (100%) gas를 사용하여 0.25 μm/분의 식각률(etching rate)로 10분 간 AAO를 식각한다. 이후 수세공정 (DI water: 초순수 물, Ethanol)을 마치면 표면이 깨끗한 니켈나노헤어선구조의 공정을 마무리하게 된다.

실시예 2: HBV 캡시드-유래 키메릭 나노입자의 생합성

하기 표 1에 기재된 프라이머를 사용한 어셈블리 PCR 후에, 본 발명자들은 HBV 코어 단백질(HBVcAg) 유전자로부터 유래하고, *Nde*I-hexahistidine-HBVcAg(1-78)-G4SG4T-*Xho*I-C 및 *N-Bam*HI-G4SG4-HBVcAg(81-149)-*Hind*III-C의 합성을 코드하는 두 유전자 클론을 얻었다. 또 SPA_B (209-271 잔기)의 탠덤 리피트로 HBVcAg의 P79A80를 대체하기 위하여, 두 다른 클론, *N-Xho*I-SPA_B-*Eco*RI-C 및 *N-Eco*RI-SPA_B-*Bam*HI-C를 제조하였다. 플라스미드 pT7-7에 상기 네 유전자 클론의 일련의 라이게이션을 통하여, 본 발명자들은 *N-His*₆-HBVcAg(1-78)-SPA_B-SPA_B-HBVcAg(81-149)-C의 합성을 코딩하는 플라스미드 발현 벡터 pT7-Chimera-HBV를 구축하였다. 젤-정제된 플라스미드 발현 벡터의 완전한 DNA 시퀀싱 후, *E. coli* 균주 BL21(DE3)[F⁻*ompT*hsdS_B(rB⁻mB⁻)]를 pT7-Chimera-HBV로 형질전환하고, 앰피실린-저항성 형질전환체를 선택하였다. 키메릭 나노입자의 유전자 발현, 정제 및 TEM 이미지 분석은 Ahn, J.Y. et al. *Nucl. Acids Res.* **33**, 3751-3762 (2005)에 기재된 것과 같은 방법으로 수행하였다.

HBV 캡시드 유래 키메릭 나노입자의 제조와 관련된 프라이머 서열과 주형에 대한 정보 및 이에 대한 좀 더 상세한 기재는 아래와 같다.

표 1

유전자명	프라이머	서열번호	염기서열
------	------	------	------

Hepatitis B virus capsid	N-terminus of HBV capsid (유전자 서열 1-234)	센스	서열번호 1	cat atg cat cac cat cac cat cac gac att gac ccg tat aaa gaa
		안티센스	서열번호 2	ccc act ccc tcc gcc acc gtc ttc caa att act tcc cac cca
		안티센스	서열번호 3	ctc gag agt acc gcc tcc ccc act ccc tcc gcc acc
	C-terminus of HBV capsid (유전자 서열 241-447)	센스	서열번호 4	gga tcc gga tcc ggt gcc gga ggg tct ggg gga gcc ggt
		센스	서열번호 5	ggc gga ggg tct ggg gga gcc ggt tcc agg gga tta gta gtc agc tat
		안티센스	서열번호 6	aag ctt tta aac aac agt agt ttc cgg aag
		Staphylococcal protein A의 B 도메인	센스	서열번호 7
안티센스	서열번호 8		gaa ttc gtc agc ttt tgg tgc ttg	
센스	서열번호 9		gaa ttc gca ccg aaa gct gat aac	
안티센스	서열번호 10		gga tcc gtc agc ttt tgg tgc ttg	

[0095] 표 1은 프라이머 서열을 나타내며, 볼드체는 제한효소 염기서열, 밑줄 : 링커(linker) 염기서열, *Italic* : 6개의 히스티딘 염기서열을 나타낸다.

[0096] HBV 캡시드 유래 키메릭 나노입자는 크게 캡시드 단백질의 1-78번째 아미노산 서열 부분, 스태필로코컬 프로틴 에이(Staphylococcal protein A)가 연속적으로 2개 포함되어 있는 부분, 그리고 캡시드 단백질의 81-149번째 아미노산 서열부분으로 나눌 수 있다.(캡시드 단백질의 1-78번째 서열은 : NCBI Nucleotide accession number: AF286594의 염기서열 : 1901-2134(서열번호 12) 및 아미노산 서열(서열번호 13), 캡시드 단백질의 81-149번째 염기서열은 AF286594의 염기서열 2141-2347(서열번호 14) 및 아미노산 서열은 서열번호 15 그리고 프로틴 에이의 서열은 NCBI nucleotide accession No. M18264, nucleotide sequence 625-813(서열번호 11), 및 아미노산 서열은 서열번호 16)

[0097] 첫 번째 부분은 HBV 캡시드 단백질의 유전자 서열 (NCBI Nucleotide accession number: AF286594 서열 중 1901-2452 서열)을 주형으로 하여 6개의 히스티딘이 포함되어 있는 프라이머 서열부분 1과 링커서열(아미노산 서열 GGGGSGGGT)을 포함하고 있는 프라이머 서열 2,3을 이용하여 확장 PCR(extension PCR)을 진행하였다. 우선 프라이머 서열 1과 2를 이용해서 PCR을 진행한 후, 합성된 PCR 산물을 주형으로 프라이머 서열 1과 3을 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 5-NdeI-HBV 캡시드 단백질(아미노산 서열 1-78)-링커서열(GGGGSGGGT)-XhoI-3' 으로 이루어진 PCR 산물을 확보하였다.

[0098] 두 번째 부분은 *Staphylococcus aureus*의 protein A(SPA) 염기서열 (NCBI Nucleotide accession number: M18264) 중 B 도메인 부분(SPA_B)을 주형으로 하여 프라이머 염기서열 7과 8, 그리고 9와 10을 이용하여 5-XhoI-SPA_B-EcoRI-3', 5'-EcoRI-SPA_B-BamHI-3을 형성하는 두 개의 protein A B도메인을 PCR 산물을 확보하였다.

[0099] 세 번째 부분은 HBV 캡시드 단백질의 유전자 서열을 주형으로 하여 링커서열(아미노산 서열 GGGGSGGGG)을 포함하고 있는 프라이머 서열 4, 5와 프라이머 서열 6을 이용하여 확장 PCR을 수행하였다. 먼저 프라이머 서열 5와 6을 이용해서 PCR을 수행한 후, 합성된 PCR 산물을 다시 주형으로 하여 프라이머 서열 4와 6을 이용해서 PCR을 수행하였다. 그 결과 5-BamHI-링커서열(GGGGSGGGG)-HBV 캡시드 단백질(아미노산 서열 81-149)-HindIII-3' 으로 이루어진 PCR 산물을 확보하였다.

[0100] 이렇게 만들어진 4개의 PCR 산물을 순차적으로 pT7-7 벡터에 삽입하여 HBV 캡시드 유래 키메릭 나노입자를 합성할 수 있는 발현 벡터를 구성하였다(도 14).

[0101] 실시예 3:바이러스 나노입자를 사용한 3-차원 진단 시스템의 구축

[0102] Ni 나노헤어-기반 시스템: 상기 실시예 1에 의하여 제조된 니켈 나노헤어 구조를 Costar 96 웰 플레이트(Cat. No. 3599, Corning, NY, USA) 속에 위치시켰다. 키메릭 나노입자를 고정화하기 전, 각 웰 내의 Ni 나노헤어를 0.3 M 황산을 사용하여 15분 동안 4회 세척하고, 증류수를 사용하여 10분 동안 6회 세척한 후 완전하게 건조하였다. 다음, 각각 420와 650 nm의 여기 및 방사를 가지는 마이크로플레이트 리더(GENios, Tecan, Austria)를 사용하여 Ni 나노헤어 구조로부터 배경 광루미네선스를 측정하였다. 실시예 2에서 제조된 38-nM 키메릭 나노입자를 가지는 50의 PBS 버퍼를 Ni 나노헤어 구조에 첨가하고, 50 mM Tris 버퍼(pH 7.4)로 세척한 후 30 분 동안 천천히 교반하였다. 래빗 항-트로포닌 다클론 항체(5 µg/ml, Cat. No. ab470003, Abcam, Cambridge, UK)를 포

함하고 있는 200 μ l의 PBS 버퍼를 Ni 나노헤어 상에 이미 고정된 키메릭 나노입자에 첨가한 뒤, 2 시간 동안 천천히 교반하여 키메릭 나노입자 표면에 항체를 고정화 하였다.

[0103] PVDF-기반 시스템: Costar 96 웰 플레이트 내에 PVDF 막(Immobilion-FL, IPFL 10100, Millipore, MA, U.S.A.)을 1 분 동안 메탄올에 미리 담가 놓고, 5-10분 동안 PBS 버퍼(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , pH 7.4)로 세척하였다. 그 PVDF 막이 완전하게 건조되기 전에, 실시예 2에서 정제된 키메릭 나노입자를 포함한 PBS 버퍼 10 μ l를 막의 정해진 지점에 떨어트렸다. 그 후에 그 막을 블러킹 용액(1% 탈지유)에서 1시간 동안 천천히 교반하고, 30분 동안 PBS 버퍼로 2회 세척하였다. 키메릭 단백질 나노입자가 고정화되어 있는 PVDF 막을 염소 항-트로포닌 I 다클론 항체(PBS 버퍼 내 20 μ g/ml; Cat. No. 70-XG82, Fitzgerald, MA, USA)가 포함되어 있는 200 μ l의 PBS 버퍼에서 2시간 동안 천천히 교반하여 키메릭 나노입자 표면에 항체를 고정화 하였다.

[0104] 실험예 1: 트로포닌 I의 검출 및 AMI 환자의 진단

[0105] 항-트로포닌 I 항체, 실시예 2에서 제조된 HBV 캡시드-유래 키메릭 나노입자, 및 실시예 1에서 제조된 Ni 나노헤어 구조(또는 PVDF 막)으로 구성된 3차원 진단 시스템에, 200 μ l의 인간 혈청(AMI 환자- 또는 건강한 혈청) 또는 트로포닌(인간 심장 트로포닌 I-T-C 복합체, Cat. No. 8T62, HyTest, Finland)이 포함된 PBS 버퍼를 첨가하고, 20 초간 교반하고 상온에서 1시간 배양하였다. PBS 버퍼를 사용하여 5분 세척 후, PBS 버퍼 내의 200 μ l의 마우스 항-트로포닌 I 단클론 항체(3.2 μ g/ml, Cat. No. 4T21, HyTest, Finland)를 첨가하고, 20초간 교반하고 상온에서 1시간 배양한 후 PBS 버퍼를 사용하여 5분 세척하였다. 200 μ l의 Qdot(CdSe)-2차 Ab 컨쥬게이트[1 nM, Qdot 655-염소 F(ab')₂ 항-마우스 IgG 컨쥬게이트, Cat. No. Q11021MP, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA]를 첨가하고, 20 초간 교반하고 상온에서 1 시간 배양하고 최종적으로 PBS 버퍼를 사용하여 10분 동안 세척하였다. 그 후 각각 420와 650 nm의 여기 및 방사를 가지는 마이크로플레이트 리더(GENios, Tecan, Austria)를 사용하여 광루미네선스를 측정하였다.

[0106] 본 발명에서 모든 ELISA 분석 실험은 인 비트로 진단용으로 개발된 통상적인 ELISA 트로포닌 에세이 키트 (Troponin I EIA, Cat. No. 25-TRIHU-E01, 96 wells, ALPCO Diagnostics, NH, USA)을 사용하여 수행되었다. 간단하게 요약하면 첨부된 키트 프로토콜에 따라, 1) 100 μ l의 인간 혈청(AMI 환자- 또는 건강한 혈청) 또는 트로포닌(인간 심장 트로포닌 I-T-C 복합체, Cat. No. 8T62, HyTest, Finland)이 포함된 PBS 버퍼를 제조업자가 제공한 96-웰 마이크로플레이트에 항체-코팅된 웰에 첨가하고; 2) 100 μ l의 "효소 컨쥬게이트 시약(HRP 효소로 컨쥬게이트된 항-트로포닌 I 항체를 함유한)을 각 웰에 첨가 후, 30초간 충분히 혼합한 후, 90분간 상온에서 배양한 후, 증류수로 5회 세척하였다; 3) 모든 잔류 물방울을 제거하기 위하여 흡수 패이더 상에 웰을 세게 두드린 후, 100 μ l의 "TMB 시약(HRP 효소에 대한 기질을 함유)"을 각 웰 내에 첨가한 후, 5초간 혼합하고, 20분 동안 상온에서 배양하였다; 4) 효소 반응을 중지하기 위하여 100 μ l의 "Stop 용액"을 각 웰에 첨가하고 30초간 혼합하고; 420nm에서 마이크로플레이트 리더(GENios, Tecan, Austria)를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

[0107] 트로포닌 I EIA는 87.5%의 임상적 특이성을 가지는 인간 심장-특이적 트로포닌 I의 정량적 측정값에 대한 신뢰성 높은 분석을 제공한다. 트로포닌 I EIA 프로토콜에서 기재된 방법은 트로포닌 I 분석에 대하여 엄격하게 따랐고, 그 분석방법은 다음과 같았다. AMI 및 건강한 혈청의 전체 리스트는 하기 표 2에 기재된다.

표 2

[0108]

AMI 환자 혈청			
No.	연령	성별	병원
1	74	M	강남 성심병원
2	75	F	
3	58	M	
4	68	M	
5	63	M	
6	80	M	
7	59	M	
8	68	M	
9	74	M	
10	77	F	
11	86	F	
12	85	F	

13	52	F	
14	43	M	
15	68	M	
16	59	F	
17	84	F	
18	58	M	
19	37	M	
20	42	M	고려대 의료원 [*: 체외 순환법으로 심장중 격 결손 수술로 인한 심근 손상 경험자]
21*	3	F	
22	91	M	
23	72	F	
24	79	F	
25	89	F	
26	57	M	
건강한 혈청			
No.	연령	성별	병원
1	34	M	고려대 의료원
2	24	M	
3	28	M	
4	25	F	
5	45	M	
6	24	M	
7	27	M	
8	24	F	
9	31	F	
10	25	M	
11	30	F	
12	24	M	
13	26	F	
14	48	M	
15	26	F	
16	29	M	

[0109] 실시예 4: 나노구조체 퀴츠의 제조:

[0110] 본 발명의 나노구조체 퀴츠를 제조하기 위하여, 퀴츠 웨이퍼(Buysemi, Seoul, Korea)를 piranha 용액(7:3 v/v 농축 황산: 35% 과산화수소)로 먼저 세척하고, 탈이온(DI)수로 행구고, 100℃에서 5분동안 건조하고 상온에서 냉각하였다. 그 후 PMMA[poly(methyl methacrylate)] A2, A8, A9 또는 A11 (Microchem, USA) 중 하나인 중합 레진을 4000 rpm에서, 25 sec 동안 퀴츠 표면 상에 스핀-코팅하고, 그 웨이퍼를 170℃에서, 30분 동안 포스트-베이크하였다. O₂ 및 CF₄ RIE를 250 W, 40 mTorr 및 40 sccm의 가스 유속에서 커스텀-메이드 RIE 시스템을 사용하여 수행하였다. 최종적으로, 퀴츠 표면들을 일련의 세척 과정에 의하여 세척하였다. 최외각층의 원자 조성 및 나노구조들을 각각 장 방출 주사 전자 현미경(FE-SEM; Hitachi S-4700, Japan) 및 x-레이 광전자 분광기(XPS; PHI 5800 ESCA system, Japan)를 사용하여 관찰하였다. 이 방법을 사용하여 제조된 기둥-유사 퀴츠 나노구조체는 높은 종횡비를 가지고 따라서 높은 표면적을 가진다.

표 3

	Cl s / %	Ol s / %	Fl s / %	Si2p / %
S1: Quartz control	7.06	62.78	0.19	29.97
S2: PMMA coating	73.13	26.87	0.00	0.00
S3: O2 1min	33.63	44.73	7.07	14.57
S4: CF4 10min	37.82	24.34	30.33	7.52
S5: EA soaking	35.52	26.70	27.51	10.27
S6: 900℃	9.75	63.04	0.16	27.05

[0111]

[0112]

상기 표 3은 나노구조체 제조에 대한 각 순차적인 단계에서 XPS결과를 나타낸 표이다.

[0113]

실시예 5: HBV 캡시드-유래 및 바이오틴화된 나노입자의 합성:

[0114]

본 발명자들은 HBV 코어 단백질 돌연변이체의 표면 루프에 Staphylococcal protein A [(SPA_B)₂]의 B 도메인의 탠덤 리피트를 삽입하여 HBV 캡시드 입자들(HBV 코어 단백질의 240 트런케이티된 돌연변이체로 구성[B. Bottcher, S. A. Wynne, R. A. Crowther, *Nature* 1997, 386, 88;R. A. Crowther, N. A. Kiselev, B. Bottcher, J. A. Berriman, G. P. Borisova, V. Ose P. Pumpens, *Cell* 1994, 77, 943])을 유전공학적으로 조작하여서 항체[immunoglobulin G (IgG)]를 (SPA_B)₂ 및 IgG의 Fc 도메인 사이의 특정한 상호작용을 통하여 각 바이러스 입자 주위에 결합하고 뽀뽀한 카펫을 형성할 수 있다(J. S. Park, M. K. Cho, E. J. Lee, K. Y. Ahn, K. E. Lee, J. H. Jung, Y. Cho, S. S. Han, Y. K. Kim, J. Lee, *Nat. Nanotechnol.* 2009, 4, 259). 본 발명에서 본 발명자들은 특정한 바이오틴화된 펩타이드를 첨가하여서 HBV 캡시드 입자를 더욱 변형, 즉 바이오틴화된 펩타이드 서열을 HBV 코어 단백질 돌연변이체의 N-말단 및 폴리히스티딘 태그 사이에 추가적으로 삽입하였다. 그 바이오틴화된 펩타이드 서열(MASSLRQILDSQKMEWRNAGGS; 서열번호 17)을 적당한 프라이머를 사용한 PCR 확장에 의하여 HBV 코어 단백질의 N-말단에 첨가하였다. 바이오틴화된 HBV 코어 단백질의 합성을 코딩하는 재조합 유전자 클론의 완전한 시퀀싱을 한 후, 플라스미드 벡터 pT7-7를 사용하여 발현 벡터를 구축하고, *E. coli* 균주 BL21(DE3)를 그 발현벡터로 형질전환하고 앰피실린-저항성 형질전환체를 최종적으로 선택하였다(J. S. Park, M. K. Cho, E. J. Lee, K. Y. Ahn, K. E. Lee, J. H. Jung, Y. Cho, S. S. Han, Y. K. Kim, J. Lee, *Nat. Nanotechnol.* 2009, 4, 259;J. Y. Ahn, H. Choi, Y. H. Kim, K. Y. Han, J. S. Park, S. S. Han, J. Lee, *Nucl. Acids Res.* 2005, 33, 3751). 재조합 유전자 발현을 유도하기 위하여, 1mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)를 바이오틴(10 μg/ml Sigma, USA)을 함유하는 배양 배지에 첨가하였다. 마지막으

로, 바이오틴화된 코어 단백질 돌연변이체의 셀프-어셈블된 나노입자 형성은 TEM 이미지 분석을 통하여 확인하였다(도 11a).

[0115] 실시예 6: 바이러스 나노입자와 결합된 나노구조체 퀴즈 상에 기반한 3차원 분석 시스템의 구축:

[0116] 프로브 항체의 고정화는 3-aminopropyldiethoxysilane (APS) (Gelest Inc, USA)의 용액(1 mM in toluene)에 1 시간 동안 침지하여서 나노구조체 퀴즈 표면의 아미네이션으로 시작된다. 그 다음 그 아민화된 표면은 바이오틴 3-sulfo-N-hydroxysuccinimide 에스테르 소듐 염(Sigma, USA) [2 mM dimethyl sulfoxide (DMSO) 및 phosphate buffered saline (PBS)의 혼합액]의 용액에 6시간 동안 그 아민화된 샘플을 침지하여서 바이오틴화하였다. 그 바이오틴화된 퀴즈 샘플을 DMSO/PBS 및 탈이온수로 행구고 상온에서 건조하였다. 퀴즈 표면에 아비딘 분자를 결합시키기 위해서 상온에서 3시간 동안 PBS에서 그 바이오틴 변형된 퀴즈를 아비딘(10 µg/ml, Sigma, USA)과 배양하였고, 15분 동안 PBS로 2회 세척한 후, 바이오틴화된 HBV 캡시드 입자(0.5 mg/ml)와 6시간 동안 10℃에서 배양하였다. 4℃에서 12시간 동안 5% 소 혈청 알부민(BSA, Thermo scientific, USA)에서 침지 후, 그 조작된 바이러스 입자-코팅된 퀴즈 표면을 PBS로 15분 동안 2회 세척하고, 3시간 동안 천천히 교반하면서 웰 당 400 µl 염소 항-LT-B 항체(20 µg/ml IgG in PBS 버퍼, Gene Tex, USA)로 배양하고, PBS로 15분 동안 2회 세척하였다.

[0117] 실험예 2:ETEC LT-B 마커의 분석:

[0118] PBS 버퍼로 희석된 500 µl의 LT-B 마커를 3-차원 분석 시스템에 첨가하고 1시간 동안 상온에서 교반하였다[본 발명에 사용된 LT-B 마커는 N-말단 융합 발현 파트너 및 E. coli SlyD로 구성된 재조합 융합 단백질 N-SlyD-LT-B-C이었다. (N-SlyD-LT-B-C의 합성은 Supporting Information에 잘 설명). LT-B-free PBS 버퍼로 반복되는 10 분 세척 단계 후, PBS 내에 500 µl의 마우스 항-LT-B 단클론 항체(10 µg/ml IgG, Abcam, UK)를 첨가하고 상온에서 1시간 교반하고 PBS 버퍼로 10분 동안 2회 세척하였다. 500 µl의 Qdot(CdSe)-2차 Ab 컨쥬게이트(1 nM, Invitrogen, CA)를 첨가하고 상온에서 1시간 교반하고 PBS 버퍼로 10분 동안 2회 세척하였다. 형광은 각각 여기 및 방출을 420 및 650 nm에서 마이크로플레이트 리더(GENios, Tecan, Austria)를 사용하여 측정하였다.

[0119] 참고예 1:(a) 15 s, (b) 30 s, (c) 1 분 및 (d) 3 분의 0₂ 플라즈마 노출 시간 후에 형성된 셀프-마스킹 도트 패턴의 SEM 이미지

[0120] 삽입된 도면은 도트 패턴을 5 분의 CF₄ 플라즈마 처리한 경우에 형성된 건조-식각 패턴을 보여준다. SEM 이미지는 Hitachi S-4700 FE-SEM를 사용하여 얻었다.

[0121] 참고예 2: limit of detection (LOD) 결정:

[0122] 본 발명에서 본 발명자들은 IUPAC 정의(IUPAC Compendium of Chemical Technology, 2nd ed., 1997)에 따라서 LOD를 결정하였다. 농도나 양으로 표시되는 "The limit of detection"은 주어진 분석 과정에 대하여 확실한 판정을 가지고 검출될 수 있는 가장 작은 값, X_L 으로부터 유래한다. X_L 값은 방정식, $X_L = X_{bi} + k S_{bi}$ 여기서 X_{bi} 는 브랭크 값의 평균, S_{bi} 는 브랭크 값의 표준 편차이고 k는 원하는 신뢰도에 따라 선택된 수치인자이다, 최근 논문(L. Soleymani, Z. Fang, E. H. Sargent, and S. O. Kelley, *Nat. Nanotechnol.* 2009, 4, 844;K. Dore, S. Dubus, H. A. Ho, I. Le vesque, M. Brunette, G. Corbeil, M. Boissinot, G. Boivin, M. G. Bergeron, D. Boudreau, M. Leclerc, *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 4240;A. Hucknall, D. H. Kim, S. Rangarajan, R. T. Hill, W. M. Reichert, A. Chilkoti *Adv. Mater.* 2009, 21, 1968;S. Majd, E. C. Yusko, A. D. MacBriar, J. Yang, M. Mayer, *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 16119)에 따르면, k 값은 3.0으로 선택된다. 3.0의 k값을 사용하여, 본 발명자들은 하기 표에서 나타난 것과 같이 분석 시스템의 LOD를 결정하였다. 플레인- 및 나노구조체 퀴즈 기반 분석 시스템의 검출 한계는 각각 12 fM 및 12 aM이었다.

표 4

[0123]

LT-B 마커 농도	Plane quartz	Nanostructured quartz
	fluorescence measure mean	fluorescence measure mean
1.2 µM	34317	43049
120 nM	27840	38257
120 pM	24651	32538
12 pM	22687	31282

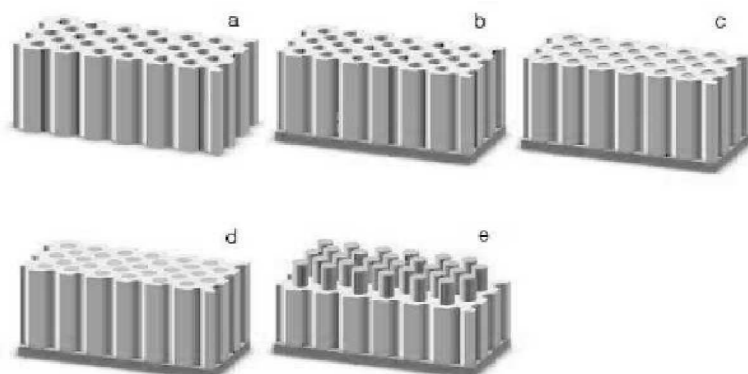
120 fM	19479	29812
12 fM	12019	27883
120 aM	8052	24246
12 aM	7656	19275
1.2 aM	7565	10063
negative control 1	6571	6818
negative control 2	6584	7800
negative control 3	7061	8108
negative control 4	6107	6595
blank signal average (X_{bi})	6538	7248
blank signal SD average (S_{bi})	880	1342
$X_{bi} + 3 \cdot S_{bi}$	9179	11274
limit of detection	12 fM	12 aM

[0124] 참고예 3:LT-B 마커(N-SlyD-LT-B-C)의 생합성:

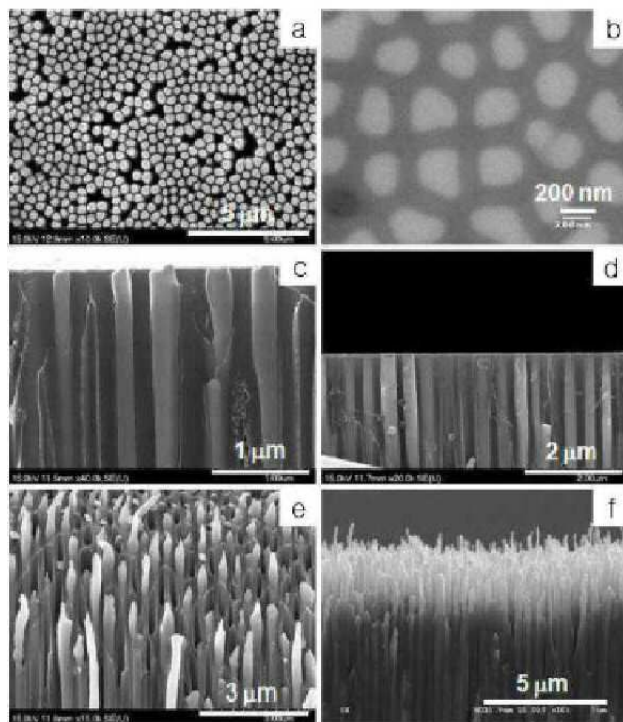
[0125] *E. coli* 열-민감 엔테로톡신(LT) 유전자는 한국 질병관리본부(Seoul, Korea)로부터 제공받았다. 적당한 PCR 프라이머(센스 프라이머 : **CTC GAG** GCT CCT CAG TCT ATT(서열번호 18), 안티센스 프라이머 : **AAG CTT** GTT TTC CAT ACT GAT(서열번호 19), 볼드체는 제한효소 서열임)를 사용하여 본 발명자들은 LT 엔테로톡신의 B 소단위체(LT-B)를 코딩하는 유전자를 증폭하였다. LT-B의 수용성 및 활성 형태를 생산하기 위해서, SlyD (즉 *E. coli* FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase) 유전자를 하기 제한 효소 부위를 가지는 LT-B 유전자의 5'말단에 융합하였다: 5'*Nde*I-SlyD-*Xho*I-LT-B-*Hind*III-3'. 플라스미드 pET28a (Novagen, Germany)로 그 유전자 클론의 라이게이션을 통하여, 본 발명자들은 *N*-His₆-SlyD-LT-B-C를 합성하는 발현벡터를 구축하였다. 발현벡터로 형질전환한 후, *E. coli* BL21(DE3)의 kanamycin-저항성 형질전환체를 선택하였다. 재조합 대장균을 50 mL의 Luria-Bertani (LB) 배지(100 mg L⁻¹ kanamycin 함유)를 함유하는 셰이크 플라스크(250-mL Erlenmeyer flasks, 37°C, 200 rpm)에서 배양하였다. 배지 탁도(OD_{600nm})가 약 0.6-0.7에 도달할 때, 그 재조합 유전자 발현을 IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) (1mM)를 첨가하여 유도하였다. 20°C에서 밤새 배양 후, 그 재조합 대장균 세포를 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 수확하였다. 그 세포 펠렛을 DNase I (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)를 함유한 5 mL 라이시스 버퍼(pH 8.0, 50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole)에 재부유하고 소니퍼(Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT, USA)를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 그 세포-free 상등액을 7,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 분리한 후 그 재조합 융합 단백질 SlyD::LT-B를 최종적으로 Ni²⁺-NTA 컬럼(Qiagen, Hilden, Germany)을 사용하여 분리하였다 (세척 버퍼: pH 8.0, 50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, 80 mM imidazole 용출 버퍼: pH 8.0, 50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, 200 mM imidazole).

도면

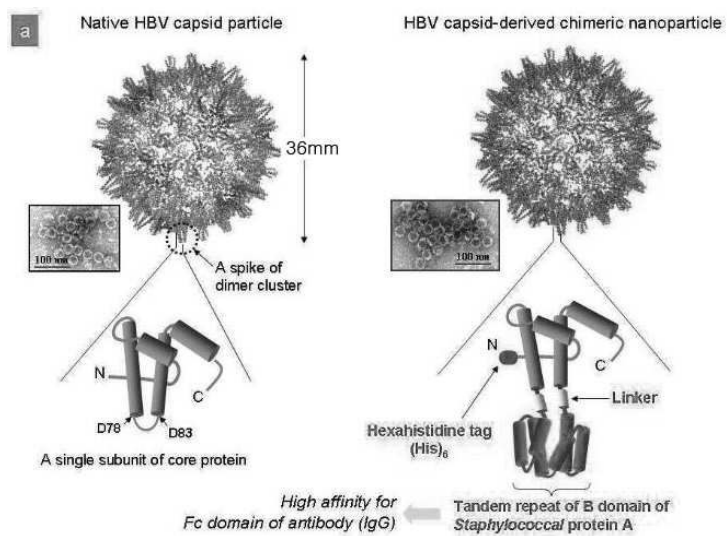
도면1



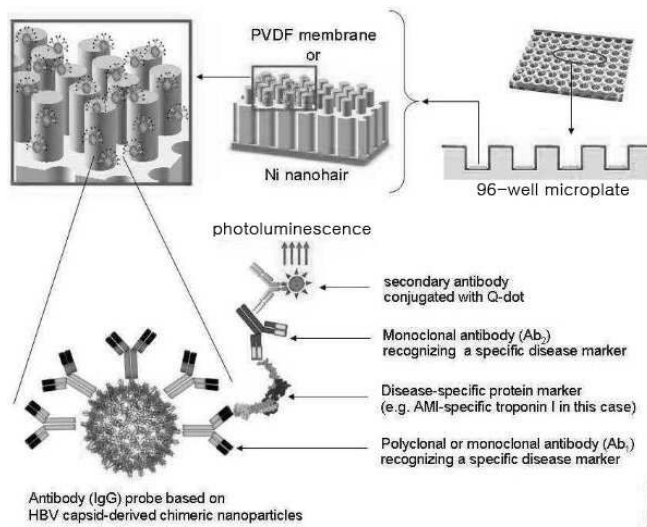
도면2



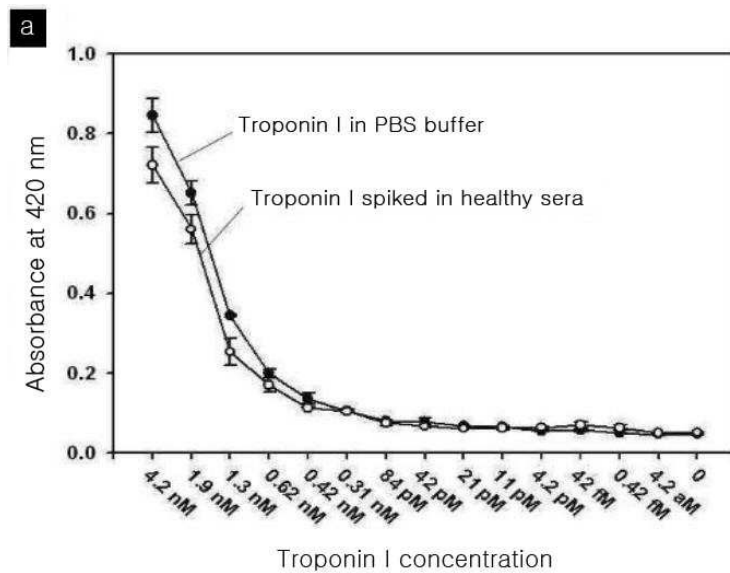
도면3a



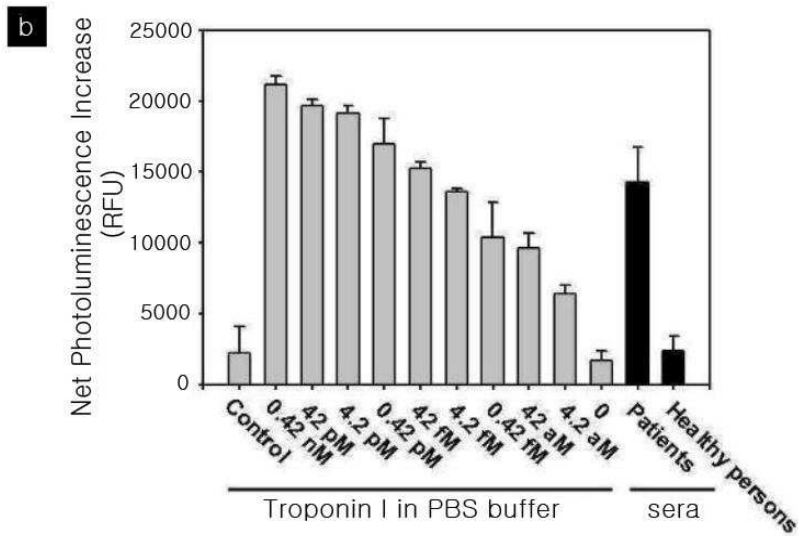
도면3b



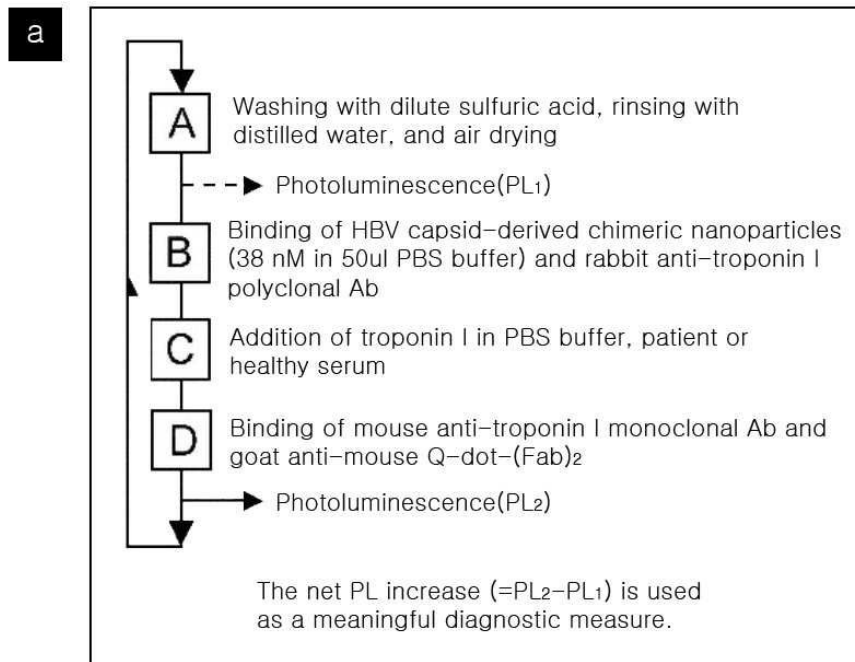
도면4a



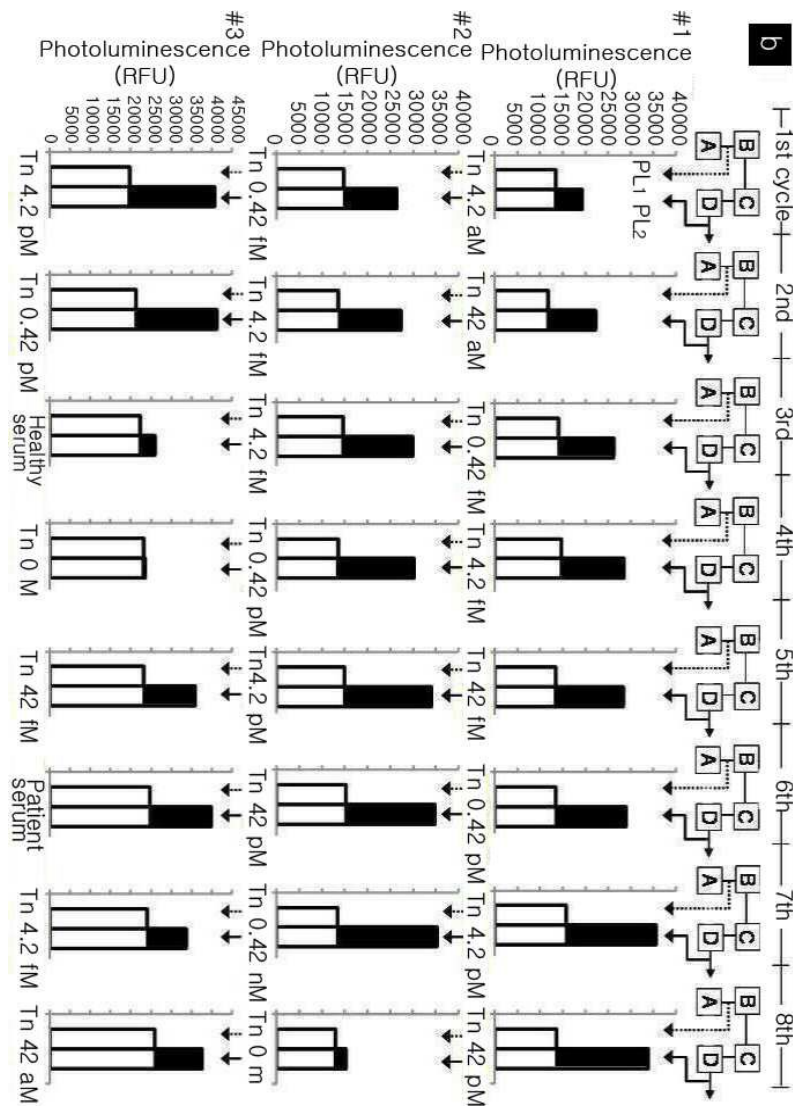
도면4b



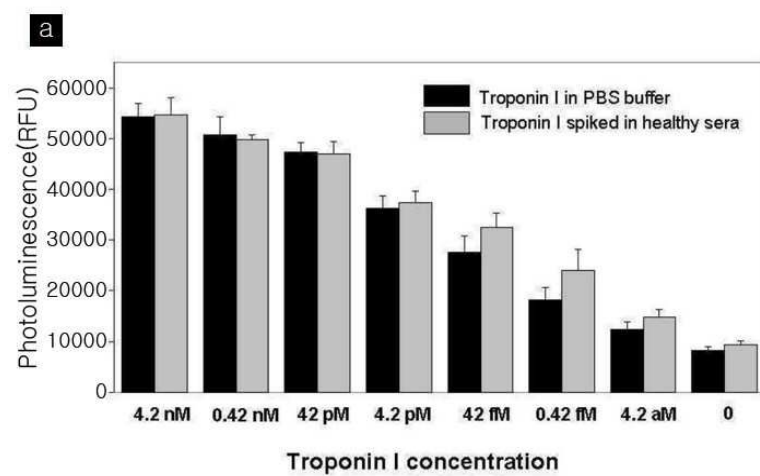
도면5a



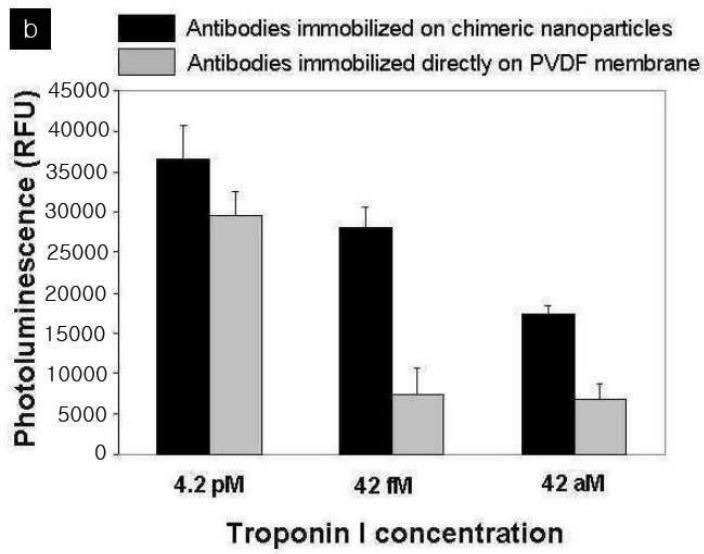
도면5b



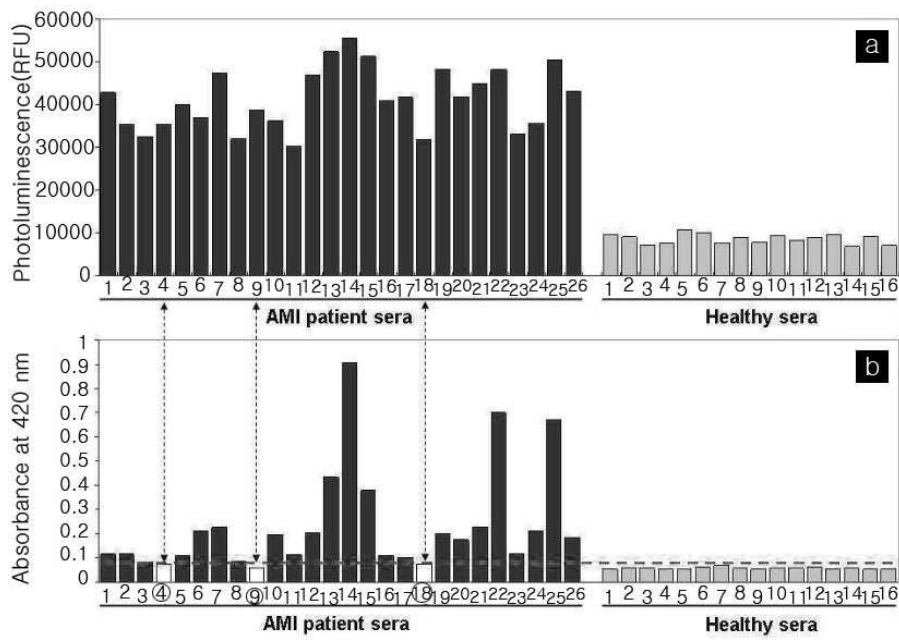
도면6a



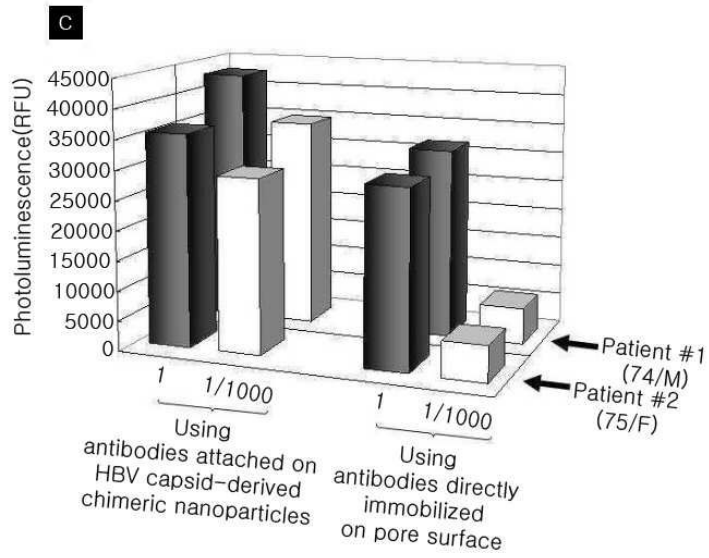
도면6b



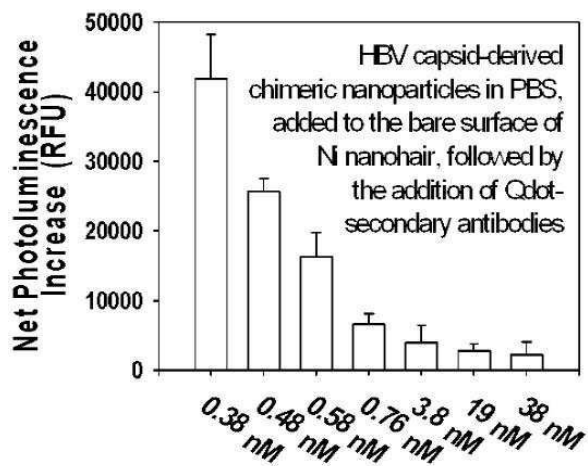
도면7a



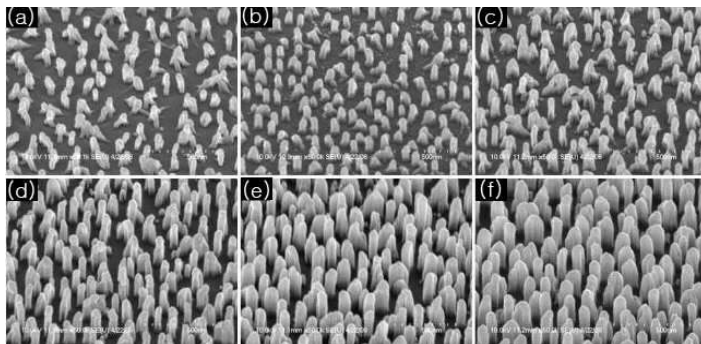
도면7b



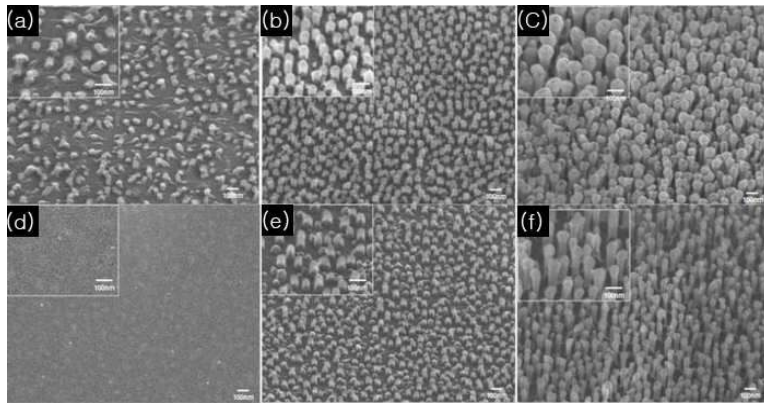
도면8



도면9



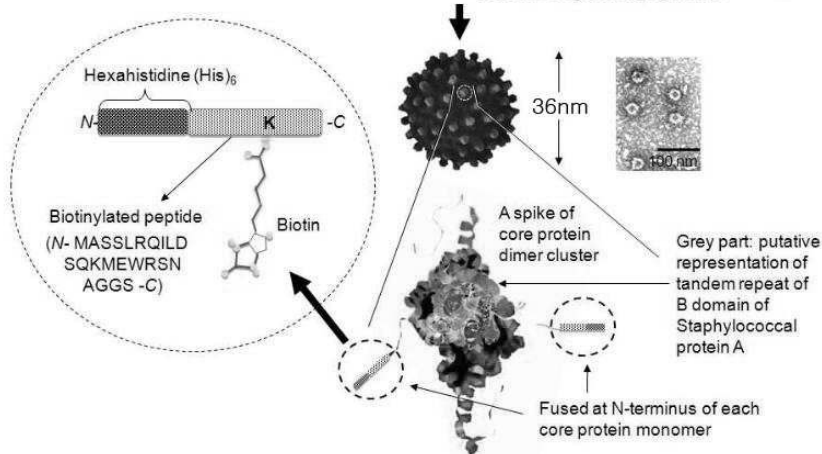
도면10



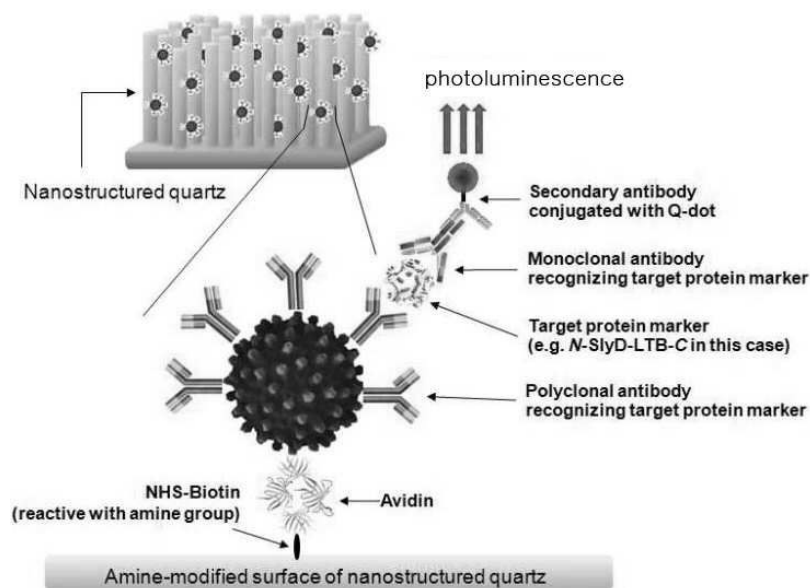
도면11a

HBV capsid-derived viral nanoparticles were genetically engineered, at the surface of which hexahistidine tags and tandem repeat of B domain of Staphylococcal protein A are densely displayed.

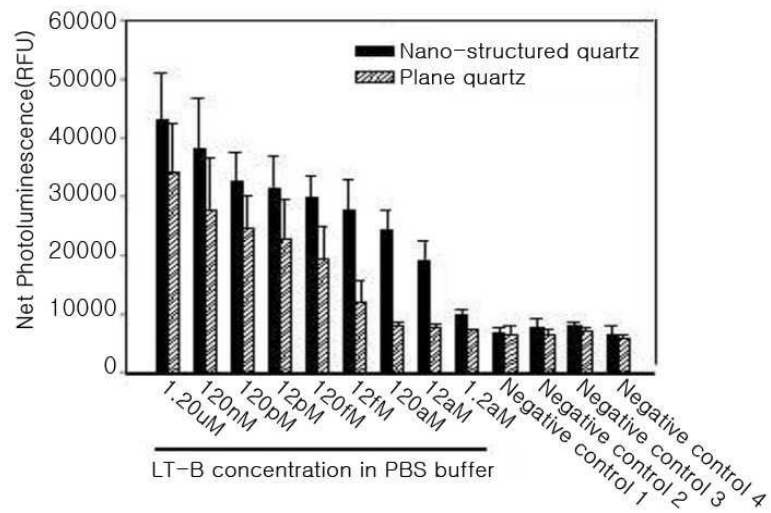
This engineered viral nanoparticle surface was further modified with biotinylated peptide.



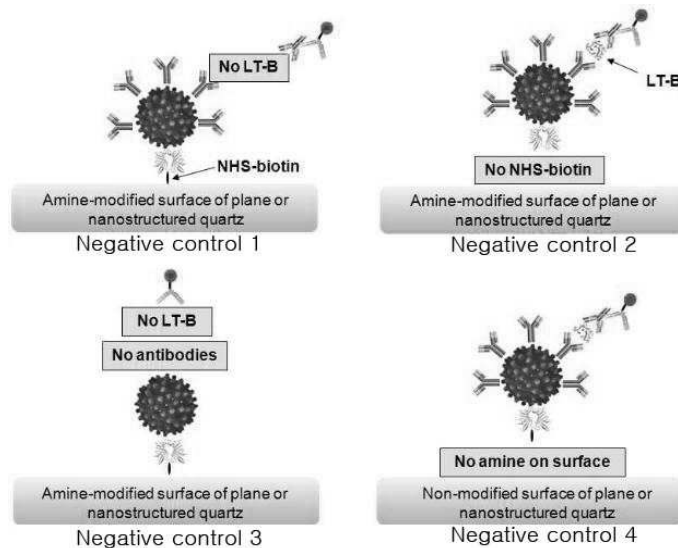
도면11b



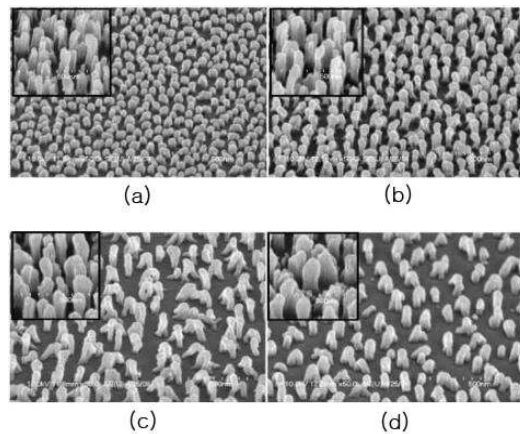
도면12a



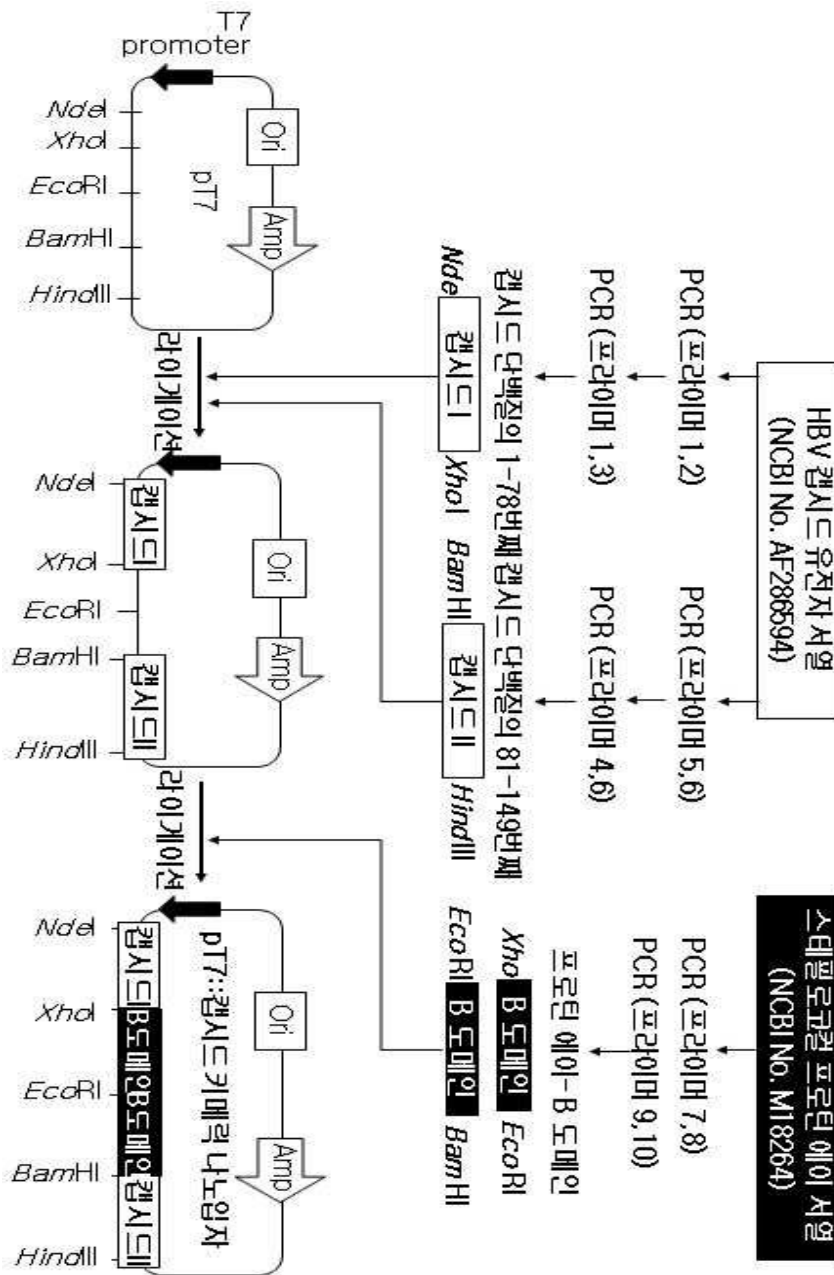
도면12b



도면13



도면14



서 열 목 록

- | | |
|-------|--|
| <110> | KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION |
| <120> | A Chimeric protein, A Preparation method thereof, A Nanosensor
fixed with the same and An application thereof |
| <150> | KR10-2009-0019355 |
| <151> | 2009-03-06 |
| <160> | 19 |
| <170> | KopatentIn 1.71 |
| <210> | 1 |

<211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 1
 catatgcatc accatcacca tcacgacatt gacccgtata aagaa 45
 <210> 2
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 2
 cccactccct ccgccaccgt cttccaaatt acttcccacc ca 42
 <210> 3
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 3
 ctcgagagta ccgcctcccc cactccctcc gccacc 36
 <210> 4
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 4
 ggatccggat ccggtggcgg agggctctggg ggaggcgg 39
 <210> 5
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 5

ggcggagggt ctgggggagg cggttccagg ggattagtag tcagctat	48
<210> 6	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 6	
aagcttttaa acaacagtag ttccggaag	30
<210> 7	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 7	
ctcaggcac cgaaagctga taac	24
<210> 8	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 8	
gaattcgtca gcttttggtg cttg	24
<210> 9	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 9	
gaattcgac cgaaagctga taac	24
<210> 10	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	

<400>	10	
ggatccgtca gcttttggtg cttg		24
<210>	11	
<211>	189	
<212>	DNA	
<213>	SPAB	
<400>	11	
gcaccgaaag ctgataacaa attcaacaaa gaacaacaaa atgctttcta tgaaatctta		60
catttaccta acttaaatga agaacaacgc aatggtttca tccaaagctt aaaagatgac		120
ccaagccaaa gcgctaacct tttagcagaa gctaaaaagc taaatgatgc acaagcacca		180
aaagctgac		189
<210>	12	
<211>	234	
<212>	DNA	
<213>	HBV capsid protein	
<400>	12	
atggacattg acccgataaa agaatttga gcttctgtgg agttactctc ttttttgctt		60
tctgacttct ttccttctat tcgagatctc ctcgacaccg cctctgctct gtatcgggag		120
gccttagagt ctccgaaca ttgttcacct caccatacag cactcaggca agctattctg		180
tgttggggtg agttgatgaa tctggccacc tgggtgggaa gtaatttga agac		234
<210>	13	
<211>	78	
<212>	PRT	
<213>	HBV capsid protein	
<400>	13	
Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Ser Val Glu Leu Leu		
1 5 10 15		
Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Ile Arg Asp Leu Leu Asp		
20 25 30		
Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys		
35 40 45		
Ser Pro His His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu		

50 55 60
 Leu Met Asn Leu Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp
 65 70 75
 <210> 14
 <211> 207
 <212> DNA
 <213> HBV capsid protein
 <400> 14
 tccaggggaat tagtagtcag ctatgtcaac gttaatatgg gcctaaaaat cagacaacta 60

 ttgtggtttc acatttcctg tcttactttt ggaagagaaa ctgttcttga gtatttggtg 120
 tcttttggag tgtggattcg cactcctccc gcttacagac caccaaatgc ccctatctta 180
 tcaacacttc cggaaactac tgttggtt 207
 <210> 15
 <211> 69
 <212> PRT
 <213> HBV capsid protein
 <400> 15
 Ser Arg Glu Leu Val Val Ser Tyr Val Asn Val Asn Met Gly Leu Lys
 1 5 10 15
 Ile Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg

 20 25 30
 Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr
 35 40 45
 Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro
 50 55 60
 Glu Thr Thr Val Val
 65
 <210> 16
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> Protein A
 <400> 16
 Ala Pro Lys Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe

1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly

20 25 30

Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu

35 40 45

Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ala Asp

50 55 60

<210> 17

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Biotinated peptide

<400> 17

Met Ala Ser Ser Leu Arg Gln Ile Leu Asp Ser Gln Lys Met Glu Trp

1 5 10 15

Arg Ser Asn Ala Gly Gly Ser

20

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 18

ctcgaggctc ctcagtctat t 21

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 19

aagcttggtt tccatactga t 21