(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0061093
(43) 공개일자 2025년05월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/08 (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 7/08 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0145042
(22) 출원일자 2023년10월26일
심사청구일자 2023년10월26일

(71) 출원인
동국대학교 산학협력단
서울특별시 중구 필동로1길 30, 동국대학교 내(필동3가)
인하대학교 산학협력단
인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)
(72) 발명자
최민재
서울특별시 용산구 효창원로 17 (산천동, 리버힐삼성아파트) 105동 801호
김교범
서울특별시 서초구 고무래로10길 34 (반포동, 일신반포빌라트) 901호
정우진
경기도 고양시 덕양구 소만로 19 (행신동, 소만마을6단지아파트) 610동 1001호
(74) 대리인
특허법인한얼

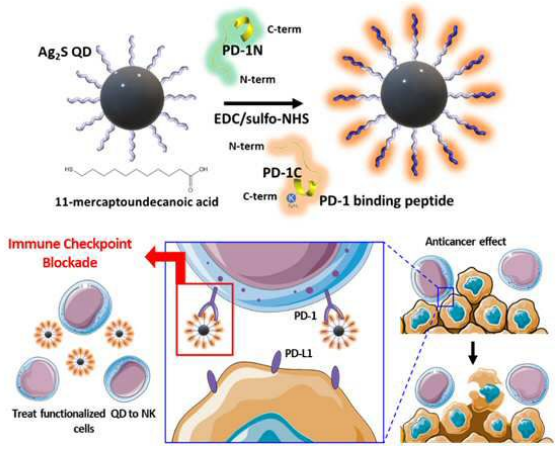
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **PD-1 결합 펩타이드로 표면개질된 양자점 및 이를 이용한 자연살해세포의 항암효과 향상**

(57) 요 약

본 발명은 PD-1 결합 펩타이드로 표면개질된 양자점 및 이를 이용한 자연살해세포의 항암효과 향상에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 47/02 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711184071
과제번호	2021R1A4A3024237
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원
연구과제명	유무기 생체소재를 활용한 표면개질 기반 항암치료용 면역세포전환 연구실
기 여 율	1/1
과제수행기관명	동국대학교
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

Ag_2S 양자점과 PD-1 결합 펩타이드가 연결된 구조를 갖는 나노입자.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 나노입자는 PD-1 결합 펩타이드가 Ag_2S 양자점에 표면 개질된 것인, 나노입자.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 PD-1 결합 펩타이드는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 서열을 포함하는 것인, 나노입자.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 PD-1 결합 펩타이드는 N-말단 또는 C-말단이 Ag_2S 양자점과 연결된 구조를 갖는 것인, 나노입자.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 PD-1 결합 펩타이드는 C-말단이 Ag2S 양자점과 연결된 구조를 갖는 것인, 나노입자.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 PD-1 결합 펩타이드는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것인, 나노입자.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 나노입자 및 적어도 하나의 약학적으로 허용가능한 담체, 염, 희석제 또는 이들의 조합을 포함하는 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 나노입자를 포함하는, 암질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 암질환은 유방암, 전립선암, 갑상선암, 위암, 대장암, 폐암, 간암, 췌장암, 고환암, 구강암, 기저세포암, 뇌종양, 담낭암, 담도암, 후두암, 망막세포종, 바터팽대부암, 방광암, 복막암, 부신암, 비소세포폐암, 설암, 소세포폐암, 소장암, 수막종, 식도암, 신우요관암, 신장암, 악성골종양, 악성연부조직종양, 악성핌프종, 악성흑색종, 안종양, 요도암, 위암, 육종, 인두암, 자궁경부암, 자궁내막암, 자궁육종, 전이성뇌종양, 직장암, 질암, 척수종양, 침샘암, 편도암, 편평상피세포암, 혈액암, 항문암, 두경부암, 다형성교모세포종, 결장

직장암, HPV-관련 암, 질암, 외음부암, 음경암, 다발성 골수종, 난소암, 림프종, 요로상피암, 및 현미세부수체 불안정형 고형 종양으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 암질환 예방 또는 암질환 치료용 약학적 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 나노입자를 포함하는, NK 세포 활성화용 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 나노입자를 포함하는, 약물 모니터링용 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 나노입자를 포함하는, 암 치료 모니터링용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 PD-1 결합 펩타이드로 표면개질된 양자점 및 이를 이용한 자연살해세포의 항암효과 향상에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 암 세포가 면역 세포의 공격을 회피하는 주요 기작 중 하나는 면역 체크포인트 단백질을 매개로 조절되는 표면 단백질 간 상호작용이다. 면역 체크포인트 단백질이 면역 세포 표면에서 종양 세포와 상호작용함으로써 다양한 면역 세포 활동이 억제되어 면역 세포의 암 세포의 인식능력이 감소하고 이펙터 기능 (effector function)을 억제해 면역반응이 감소할 수 있다. 면역 체크포인트 차단(Immune checkpoint blockade, ICB)치료는 암 세포의 이러한 면역 회피 기작을 방해하기 위해 면역 체크포인트 단백질을 차단하는 치료이다. 면역 체크포인트 차단 치료를 통해 면역 세포가 암 세포를 더 효과적으로 인식하고 제거할 수 있게 한다.

[0004] ICB 치료에서 대표적인 두 가지 유형의 단백질은 PD-1 (programmed cell death protein-1)과 CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4)로, 면역 시스템을 억제하는 역할을 한다. 항체 또는 펩타이드를 이용하여 면역 세포 표면의 PD-1과 CTLA-4을 차단하는 치료는 암 세포의 면역 회피 기작과 면역세포 활성 억제를 방지할 수 있다. 특히 PD-1은 CTLA-4보다 T 세포, B 세포 및 자연살해 (NK) 세포와 같은 다양한 유형의 면역 세포에서 발현되므로, PD-1을 표적으로 하는 ICB 치료법의 효과 범위가 CTLA-4보다 더 넓을 수 있다. 또한 CTLA-4은 사이토카인 분비 증가와 같은 다양한 신호전달 경로를 활성화시키는 초기 단계의 면역 세포 활동을 억제하는 반면, PD-1은 면역 세포가 퍼포린 (perforin) 및 그랜자임 (granzyme)을 매개로 표적 암세포의 사멸을 일으키는 이펙터 기능의 억제 역할을 한다. PD-1을 표적으로 하는 ICB 치료는 세포 기반의 암 면역치료에서 더욱 효과적이고 직접적인 면역반응 강화로 이어질 수 있다.

[0005] 이에 본 발명자들은 황화은(Ag_2S) 양자점과 PD-1 결합 펩타이드가 연결된 구조를 갖는 나노입자를 개발하고 이를 NK 세포에 처리함으로써 NK 세포의 PD-1을 차단하여 암세포의 인식과 항암 효과를 보존함과 동시에 암 세포에 대한 향상된 효능 및 나노입자 매개 적외선 이미징 및 세포 추적 잠재력을 입증하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 Ag_2S 양자점과 PD-1 결합 펩타이드가 연결된 구조를 갖는 나노입자를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 나노입자를 포함하는 암질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 나노입자를 포함하는 NK 세포 활성화용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 나노입자를 포함하는 약물 모니터링용 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 나노입자를 포함하는 암 치료 모니터링용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0014] 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 발명에 기재된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.

[0015] 또한, 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

[0017] 본 발명의 하나의 양태는 Ag_2S 양자점과 PD-1 결합 펩타이드가 연결된 구조를 갖는 나노입자이다.

[0018] 하나의 구체예에서 상기 나노입자는 PD-1 결합 펩타이드가 Ag_2S 양자점에 표면 개질된 것일 수 있다.

[0019] "양자점(quantum dot)" 은 본원에서 용어 "QD"로도 지칭되며, 무기물로 된 발광 반도체 소자의 일종이다. 양자점은 황화은(Ag_2S), 황화카드뮴(CdS), 카드뮴 셀렌(CdSe) 또는 타이타니아(TiO_2) 등의 상이한 밴드갭을 갖는 이종 물질의 접합체로, 그 크기는 약 5 내지 15 nm 정도로 양자점의 작은 크기는 약물이나 분자 전달 시 높은 운반 능력과 효율적인 전달이 가능하도록 한다. 또한, 크기에 따라 특정한 광학적 특성을 나타내며 안정적인 광발광 특성을 가지고 있어 수용액 상태에서 세포 이미징 및 추적에 적용될 수 있다. 양자점에 펩타이드를 결합하는 방식을 통해 대상 면역세포의 표면에 결합되면 생체 내 이미징 및 암세포 조직에서 광열요법으로의 응용 가능성도 존재한다. 또한, 본 발명의 황화은(Ag_2S) 기반 양자점은 기존의 PbS나 CdSe와 같은 중금속 기반 양자점에 비해 상대적으로 낮은 독성을 나타낸다.

[0020] 본 발명에서 용어 "PD-1"은 통상의 의미에 따라 사용되고, 세포 사멸 단백질 1(cell death protein 1)로 프로그램된 단백질을 지칭한다. 이는, T 세포, NK 세포 또는 B 세포와 같은 면역 세포 상의 체크포인트 단백질로, 상기 면역 세포가 신체의 다른 세포를 공격하는 것을 방해하는 역할을 하는 일종의 "오프 스위치"로서 기능한다. 이는 일부 정상(및 암) 세포의 단백질인 PD-L1에 부착될 때에 수행된다.

[0021] PD-1이 PD-L1에 결합하면, 기본적으로 면역 세포에 다른 세포를 그대로 두도록 지시한다. 일부 암세포에는 대량의 PD-L1이 있고, 이는 면역 공격을 회피하는 역할을 한다. PD-1과 PD-L1 간의 반응은 암세포에 의한 면역 회피를 나타낼 수 있다. 따라서 PD-1 결합 펩타이드에 의해 PD-1 매개 반응을 억제함으로써 면역 세포가 암 세포를 더 효과적으로 인식하고 제거하도록 할 수 있다.

[0022] PD-1 뉴클레오티드 및 아미노산 서열은 당업계에 공지되어 있다. 예시적인 인간 PD-1 아미노산 서열은 GenBank 기탁번호 GI:167857792로 제시된다.

[0023] 하나의 구체예에서 상기 PD-1 결합 펩타이드는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 서열을 포함하는 것일 수 있다.

[0024] 전술한 구체예 중 어느 하나의 구체예에서 상기 PD-1 결합 펩타이드는 N-말단 또는 C-말단이 Ag_2S 양자점과 연

결된 배향을 가질 수 있다.

[0025] 전술한 구체예 중 어느 하나의 구체예에서 상기 PD-1 결합 펩타이드는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0026] 전술한 구체예 중 어느 하나의 구체예에서 상기 PD-1 결합 펩타이드는 C-말단이 Ag_2S 양자점과 연결된 배향을 가질 수 있다.

[0027] 본 발명자들은 펩타이드로 표면 기능화 된 황화은 (Ag_2S) 양자점이 세포 표면의 PD-1 단백질을 효과적으로 억제하고, 이를 통해 암세포 표면에 존재하는 PD-L1과의 상호작용을 막는 혁신적인 ICB 치료 전략이 될 수 있을 것으로 판단하고, PD-1 결합 펩타이드로 표면 개질된 황화은 양자점을 제조하였으며, 제조된 펩타이드-양자점 결합 나노입자로 표면 개질된 NK 세포의 암 세포 인식 및 이에 따른 살해 효능 개선, 그리고 펩타이드-양자점 결합 나노입자 매개 적외선 이미징 및 세포 추적 잠재력을 실시예에서 입증하였다.

[0028] 전술한 구체예 중 어느 하나의 구체예에서 상기 PD-1 결합 펩타이드는 당업계 공지된 방법을 통해 양자점 표면에 결합한 형태로 제조될 수 있다. 펩타이드를 양자점 표면에 결합시키는 방법의 예시로는 바이오틴-스트렙타비딘 (SA) 결합, 메탈-티올 결합 반응, EDC 또는 DCC를 이용한 결합 반응 등이 공지되어 있다.

[0029] 일 예로, 수용액 상에 분산가능한 물성을 갖도록 제조된 황화은 양자점 표면의 리간드를 MPA 또는 MUA 등으로 치환시킴으로써 표면에 카르복실기(COOH)를 갖도록 하여, 펩타이드의 아민기와 결합시키거나 링커를 통해 펩타이드와 결합시키는 방법을 이용할 수 있다.

[0030] 본 발명의 일 구현예에서는 11-mercaptoundecanoic acid (MUA) 리간드로 표면이 치환된 황화은 양자점을 제조하였고, 표면의 카르복실기와 펩타이드의 아민기를 EDC/sulfo-NHS를 이용하여 결합시킴으로써 사용하였다.

[0031] 본 발명에서 용어 "자연 살해 세포" 및 "NK 세포"는 통상의 의미에 따라 사용되고, 선천성 면역계에 관여하는 세포독성 림프구의 일종을 지칭한다. NK 세포가 하는 역할은 일반적으로 척추동물의 적응 면역 반응에서 세포독성 T 세포의 역할과 유사하다. NK 세포는 바이러스에 감염된 세포에 신속하게 반응하고, 감염 후 약 3일에서 작용하고, 종양 형성에 반응할 수 있다. 일반적으로, 면역 세포는, 감염된 세포 표면에 존재하는 주요 조직 적합성 복합체(MHC)를 검출하여, 사이토카인 방출을 유발하고, 용해 또는 아폽토시스를 유발한다. NK 세포는 일반적으로 항체 및 MHC의 부재하에 스트레스를 받은 세포를 인식하는 능력을 갖고 있으므로, 훨씬 더 빠른 면역 반응을 가능하게 한다.

[0032] 본 발명의 일 구현예에서는 H-GNWDYNSQRAQLYNQ-NH2 (PD-1N 펩타이드: 서열번호 1) 및 Ac-GNWDYNSQRAQLYNQK-NH2 (PD-1C 펩타이드: 서열번호 2)의 2종류의 PD-1 결합 펩타이드를 각각 N말단, C말단의 아민기와 QD 표면의 카르복실기와 결합시켜 QD-PD-1N 및 QD-PD-1C를 제작하였고, 상기 QD-PD-1N 및 QD-PD-1C이 유리 펩타이드에 비해 NK 세포의 항암 활성을 증진시키는 효과가 우수한 점을 확인하였으며, 특히 QD-PD-1C의 효과가 우수함을 확인하였다.

[0034] 본 발명의 다른 하나의 양태는 Ag_2S 양자점과 PD-1 결합 펩타이드가 연결된 구조를 갖는 나노입자; 및 적어도 하나의 약학적으로 허용가능한 담체, 염, 희석제 또는 이들의 조합을 포함하는 조성물이다.

[0035] 본 발명의 다른 하나의 양태는 Ag_2S 양자점과 PD-1 결합 펩타이드가 연결된 구조를 갖는 나노입자를 포함하는 암질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물이다.

[0036] 상기 나노입자에 대해서는 전술한 바와 같다.

[0037] 하나의 구체예에서, 상기 암질환은 PD-L1의 과발현으로 특징지어지는 암일 수 있다. 다른 하나의 구체예에서 상기 암질환은, 유방암, 전립선암, 갑상선암, 위암, 대장암, 폐암, 간암, 췌장암, 고환암, 구강암, 기저세포암, 뇌종양, 담낭암, 담도암, 후두암, 망막세포종, 바터팽대부암, 방광암, 복막암, 부신암, 비소세포폐암, 설암, 소세포폐암, 소장암, 수막종, 식도암, 신우요관암, 신장암, 악성골종양, 악성연부조직종양, 악성림프종, 악성흑색종, 안종양, 요도암, 위암, 육종, 인두암, 자궁경부암, 자궁내막암, 자궁육종, 전이성뇌종양, 직장암, 질암, 척수종양, 침샘암, 편도암, 편평상피세포암, 혈액암, 항문암, 두경부암, 다형성교모세포종, 결장직장암, HPV-관련암, 질암, 외음부암, 음경암, 다발성 골수종, 난소암, 림프종, 요로상피암, 및 현미세부수체 불안정형 고형 종양으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다. 구체적인 일 예로서, 상기 암질환은 유방암

일 수 있다.

[0038] 전술한 구체예 중 어느 하나의 구체예에서, 본 발명의 약학적 조성물은 본 발명에서 제공하는 나노입자가 표면에 결합된 NK 세포를 유효성분으로 포함할 수 있다.

[0039] 전술한 구체예 중 어느 하나의 구체예에서, 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다.

[0041] 본 발명의 다른 하나의 양태는 Ag2S 양자점과 PD-1 결합 펩타이드가 연결된 구조를 갖는 나노입자를 포함하는 NK 세포 활성화용 조성물이다.

[0042] 상기 조성물에 의해 NK 세포의 면역 세포 활성화, 종양 세포 증식 억제, 혈관 신생 억제능 및/또는 항암 효능이 증진될 수 있다.

[0043] 본 발명의 일 구현예에서는 본 발명에서 제공하는 나노입자에 의해 NK 세포의 IFN-γ 및 TNF-α 분비량이 증가하였으며, 표면 단백질 중 다른 활성화 마커를 방해하지 않고 PD-1이 특이적으로 차단된 것을 확인하였으므로, 본 발명의 나노입자를 포함하는 조성물은 NK 세포의 활성화 및 효능 증진에 유용하게 사용될 수 있다.

[0045] 본 발명의 나노입자는 근적외선 영역의 파장에서 발광의 여기와 방출이 가능한 양자점과 펩타이드가 연결된 구조를 가지는바, 세포 이미징 및 추적에 사용될 수 있다.

[0046] 이에 따른 본 발명의 다른 하나의 양태는 Ag_2S 양자점과 PD-1 결합 펩타이드가 연결된 구조를 갖는 나노입자를 포함하는 약물 모니터링용 조성물이다.

[0047] 본 발명의 다른 하나의 양태는 Ag_2S 양자점과 PD-1 결합 펩타이드가 연결된 구조를 갖는 나노입자를 포함하는 암 치료 모니터링용 조성물이다.

[0048] 상기 나노입자 및 암에 대해서는 전술한 바와 같다.

발명의 효과

[0050] 본 발명에 따르면, 본 발명의 펩타이드-양자점 결합 나노입자는 수용액 상에 분산 가능한 물성을 가지며, 근적외선 조사를 통한 발광이 가능해 생체 이미징 및 세포 추적효과를 가지는 양자점 나노입자 및 자연살해세포 표면 단백질을 표적으로 하는 펩타이드를 포함하므로, 생체 이미징 및 자연살해세포 표면 단백질 저해를 통한 항암효과 개선의 조합에 이용 가능하다. 따라서 본 발명의 펩타이드-양자점 결합 나노입자는 근적외선 영역에서 발광효율을 가지는 황화은 양자점 나노입자와 효과적인 자연살해세포 항암기능 향상을 통해 암 질환 치료를 유도할 수 있는 자연살해세포 표면 단백질 표적 펩타이드가 결합된 자연살해세포 항암기능성 향상 제제로서 다양한 암 세포의 치료에 폭넓게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0052] 도 1은 본 발명의 펩타이드-양자점 결합 나노입자의 합성 방법과 작용 기작을 도식화한 도이다.

도 2는 황화은 양자점의 투과전자현미경 (Transmission Electron Microscope)로 관찰하고 그 크기 분포를 나타낸 도이다.

도 3은 황화은 양자점의 세포 독성 평가 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 펩타이드-양자점 결합 나노입자의 결합을 확인하기 위한 퓨리에변환적외선분광기(Fourier Transform Infrared Spectroscopy) 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 펩타이드-양자점 결합 나노입자 제작 시 펩타이드의 결합 효율을 나타낸 도이다.

도 6는 같은 서열의 펩타이드를 서로 다른 방향으로 양자점에 결합했을 때 펩타이드-양자점 결합 나노입자의 자

연살해세포 항암기능 향상효과를 비교한 도이다. 양자점(QD)와 펩타이드-양자점 결합 나노입자 (QD-PD-1N, QD-PD-1C)의 농도는 양자점의 농도를 기준으로 5 μM이며, 펩타이드 (PD-1N, PD-1C)의 농도는 결합 효율을 고려하여 50 μM으로 처리되었다.

도 7은 펩타이드-양자점 결합 나노입자의 자연살해세포 항암기능 향상효과를 서로 다른 두 가지 서로 다른 암세포에 대해 확인하여 나타낸 도이다.

도 8은 펩타이드-양자점 결합 나노입자로 처리된 자연살해세포의 활성을 확인하기 위해 두 가지 사이토카인(IFN-γ, TNF-α)의 방출을 확인하여 나타낸 도이다.

도 9는 펩타이드-양자점 결합 나노입자 처리 후 자연살해세포 표면의 표적 단백질 PD-1과 비표적 단백질 FasL을 정량하여 나타낸 도이다.

도 10은 펩타이드-양자점 결합 나노입자의 발광효과를 활용한 자연살해세포 이미징을 나타낸 도이다.

도 11은 펩타이드-양자점 결합 나노입자의 세포 면적 대비 발광 면적을 나타낸 도이다.

도 12는 펩타이드가 PEG에 의해 양자점과 결합한 형태로 제조된 나노입자를 NK 세포에 처리하여 NK 세포의 PD-1 차단 수준을 PD-1항체를 이용해 확인한 결과를 도 12A에, 암세포에 대한 세포 독성을 비교한 결과를 도 12B에 나타낸 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0053] 이하 본 발명을 실시예 및 실험예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[0055] **실시예 1. Ag_2S QD의 제작 및 특성 확인**

[0056] 황화은 양자점은 하기 방법으로 제조하였다.

[0057] 먼저 silver nitrate(AgNO3) 를 oleylamine과 oleic acid와 혼합한 뒤 140도 질소 환경 안에서 가열하였다. 그 뒤 sulfur 파우더를 octylamine에 녹인 용액을 위의 용액에 빠르게 주입함으로써 반응을 시키고 상온까지 식힌 뒤 정제를 통해 황화은 양자점을 분리하였다.

[0058] 합성한 황화은 양자점 용액을 MUA 수용액과 섞은 뒤 상온에서 하루 교반을 시켜 표면의 리간드가 MUA로 치환된 황화은 수용액을 수득하였다.

[0059] Ag_2S QD(quantum dot)의 크기 분포를 확인하기 위해 TEM 분석을 수행하였다. TEM 분석의 경우 1회 세척 후 시료를 cyclohexene에 분산시켰다. QD의 크기 분포는 Image J 소프트웨어 (National Institutes of Health, USA)를 이용하여 TEM 측정 후 무작위 입자 70개의 크기를 분석하여 측정하였다.

[0060] Ag_2S QD의 평균 크기는 10.572nm로 측정되었다(도 2). 이와 같이 작은 크기의 QD는 개선된 비표면적을 제시함으로써 더 많은 펩타이드와 접합할 수 있다는 이점을 갖는다.

[0061] QD의 독성을 확인하기 위해 세포 생존율 분석을 수행하였다. NK 세포를 100μL 의 배지가 포함된 96웰 라운드 바텀 플레이트 (SPL, 한국) 에 당 20,000 개 세포의 밀도로 시드하였다. 다양한 농도의 QD를 각 실험군에 100 μL 의 양으로 첨가하고 플레이트를 5% CO_2, 37℃ 조건에서 20시간동안 인큐베이션하였다. 20시간 후 각 실험군에 WST-1 용액 (DoGenBio, Korea) 을 20 μL 씩 첨가 하고 가볍게 흔들어 준 후, 5% CO_2, 37℃ 조건에서 4시간 추가 인큐베이션하여 총 24시간 인큐베이션하였다. 배양된 플레이트를 원심분리 원심분리(400xg, 5분)한 후 상층액을 새로운 96웰 플랫 바텀 플레이트 (SPL, Korea) 로 옮겼다. SpectraMax iD3(Molecular Devices, USA)를 사용하여 450 nm에서 상층액의 흡광도를 측정하였다. QD의 흡광도를 고려하여, 각 농도별 450nm에서의 QD의 흡광도 값을 제거하였다.

[0062] 일반적으로 중금속 기반 QD는 세포 독성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 그러나 Ag_2S QD의 세포 독성은 다른 QD에 비해 상대적으로 약한 것으로 알려져 있다. 펩타이드 전달을 위한 플랫폼으로 사용된 Ag_2S QD의 NK 세포에 대한 세포독성을 다양한 농도에서 측정한 결과 세포독성이 관찰되지 않는 것이 확인되었다 (도 3).

[0063] 이를 통해 Ag_2S QD는 세포독성을 나타내지 않으면서 수 나노미터 크기의 큰 표면적을 가지므로 펩타이드 결합 ICB 치료 플랫폼으로 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0065] **실시예 2. 펩타이드-양자점 결합 나노입자 제작 및 접합 효율성과 특성 규명**

[0066] **실시예 2-1. 펩타이드-양자점 결합 나노입자 제작**

[0067] 11-mercaptoundecanoic acid (MUA) 리간드로 QD를 pH 6.5의 MES 완충액 (bio-solution, Korea) 에 분산시킨 후, N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) (Sigma-Aldrich, USA) 및 N-Hydroxysulfosuccinimide sodium salt (sulfo-NHS) (Sigma-Aldrich, USA)를 QD 분산 용액에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 400RPM으로 6시간 동안 교반하면서 반응시켰다. QD의 카르복실산 활성화를 위한 반응 시간 이후, 혼합물을 13,000 RPM에서 30분 동안 원심분리하여 QD를 침강시켰다. 상층액을 제거하여 과량의 EDC와 sulfo-NHS를 제거하고 QD를 정제하였다. 다음으로 QD를 증류수에 분산시킨 후 PD-1 결합 펩타이드 : QD의 몰비율이 20:1이 되도록 펩타이드를 용액에 첨가하였다. 펩타이드 서열은 H-GNWDYNSQRAQLYNQ-NH2 (PD-1N 펩타이드: 서열번호 1) 및 Ac-GNWDYNSQRAQLYNQK-NH2 (PD-1C 펩타이드: 서열번호 2) 두 가지 종류를 사용하였다. 혼합물을 24시간 동안 반응시켜 QD와 펩타이드를 접합시킨 다음, 13,000 RPM에서 30분간 원심분리하여 PD-1 결합 펩타이드로 표면개질된 양자점 (이하 QD-PD-1)을 침강시켰다. 결합되지 않은 펩타이드를 제거하기 위해 상층액을 제거하고 QD-PD-1 은 증류수에 분산되었다.

[0068] **실시예 2-2. 펩타이드-양자점 결합 나노입자의 특성 확인**

[0069] 실시예 2-1에서 제조한 QD-PD-1을 증류수에 분산시켜 냉동고에서 24시간 동안 냉동한 후, 동결건조하여 분말 형태의 QD-PD-1을 수득하였다. QD-PD-1의 분말 형태는 Spectrum Two FT-IR Spectrometer (PerkinElmer, USA)를 이용하여 500 cm^{-1} 내지 4000 cm^{-1} 범위에서 밴드 변화를 분석하였다.

[0070] **실시예 2-3. 펩타이드-양자점 결합 나노입자의 접합 효율성 및 특성 확인 결과**

[0071] QD 표면의 리간드는 말단에 카르복실기를 가지며 MUA로 변형되었다. PD-1 결합 펩타이드는 말단에 아민기를 갖는다. QD 리간드 말단의 카르복실기와 PD-1 결합 펩타이드 말단의 아민기를 EDC/sulfo-NHS를 이용하여 접합시켰다. 아민기의 방향이 서로 다른 2종의 펩타이드를 사용하였다. 아민기가 N-말단에 위치하는지 C-말단에 위치하는지에 따라, 펩타이드의 이름은 PD-1N 또는 PD-1C로 명명되었다. 사용된 펩타이드 서열을 고려하면, 펩타이드는 어느 정도의 알파-헬릭스 구조를 가질 것으로 예측되었다. 펩타이드가 서로 다른 방향으로 QD 표면에 결합되어 있기 때문에 QD 입자의 가장 바깥층에 위치한 펩타이드의 구조가 달라진다. QD 표면에 결합하는 효율은 접합 방향에 따라 달라질 수 있으므로, 합성 후 상층액에 잔류하는 펩타이드의 농도를 측정하여 결합 효율을 정량화하였다.

[0072] 펩타이드의 결합 효율은 PD-1N 펩타이드의 경우 68%, PD-1C 펩타이드의 경우 72%로 큰 차이를 나타내지 않았다 (도 5). 이는 QD 표면의 MUA 리간드가 일종의 스페이서 역할을 하여 펩타이드가 QD에 결합할 때 구조적 차이로 인해 발생할 수 있는 입체 장애를 방지하기 때문인 것으로 여겨진다.

[0073] QD와 펩타이드 간 접합의 특성화는 FT-IR 분석을 통해 수행하였다(도 4). Ag_2S QD는 리간드의 C-H로 인한 밴드와 말단의 카르복실기로 인한 밴드를 나타내었다. 두 가지 유형의 펩타이드 모두 C-H로 인한 밴드, 서열 사이의 아미드 결합으로 인한 밴드, N-H로 인한 밴드를 나타내었다. 또한 QD와 펩타이드가 결합된 QD-PD-1N 및 QD-PD-1C는 펩타이드의 아미드 및 N-H로 인한 밴드를 나타내었다. 분석을 통해 2종의 펩타이드 모두 QD 표면에 성공적으로 결합된 것을 확인하였다.

[0075] **실시예 3. 펩타이드-양자점 결합 나노입자 처리된 NK 세포의 항암 효과 증대**

[0076] **실시예 3-1. 실험 방법**

[0077] calcein-AM (Thermo Fisher Scientific, USA) 방출을 측정함으로써 기능화된 QD에 의한 항암 효과를 확인하였다.

[0078] 제조된 QD-PD-1을 NK 세포에 5 μM 농도로 NK 세포에 첨가하고 30분간 배양하였다. 유리 펩타이드는 접합 효율

을 고려하여 QD-PD-1 군과 동일한 몰로 처리하였으며, PD-1 결합 항체인 Nivolumab (selleckchem, USA) 은 QD-PD-1 군의 QD 농도와 동일한 몰로 처리하였다. MCF-7 세포는 Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) (corning, USA) 용액의 15 μM calcein-AM을 이용하여 30분간 염색하였다. 염색 후 세포를 400 xg 에서 5분간 원심분리하여 세포수를 측정하였다. MCF-7 세포(또는 MDA-MB-231 세포)(5,000 cells) 및 NK 92mi 세포 (50,000 cells)를 E:T 비율 10:1로 라운드 바텀 플레이트에서 5% CO_2, 37℃ 조건으로 6시간 동안 공배양하였다. 인큐베이션 5시간 30분 후에 5% triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA) 용액을 첨가하여 최대 방출군의 암세포를 모두 사멸시켰다. 6시간의 공배양 후 플레이트를 400 xg 에서 5분간 원심분리한 후, 상층 액을 96웰 플랫 바텀 플레이트에 옮겨 SpectraMax iD3 를 이용하여 형광 세기(자극(excitation) 490 nm, 방출(emission) 530 nm)를 측정하였다. 세포 용해(%)는 아래 공식을 사용하여 계산하였다:

[0079] (실험적 방출(Experimental release) - 자연 방출(Spontaneous release)) / (최대 방출(Maximum release) - 자연 방출(Spontaneous release)) * 100 (%)

[0080] **실시예 3-2. 실험 결과**

[0081] 펩타이드-양자점 결합 나노입자로 처리된 NK 세포의 향상된 항암 효과를 조사하기 위해, MCF-7 유방암 세포와 함께 배양된 QD-PD-1를 NK 세포에 처리하였다. 6시간 공배양 후 NK 세포의 암세포 사멸능을 평가하였다.

[0082] 처리되지 않은 NK 세포와 유리 PD-1N 펩타이드 또는 PD-1C 펩타이드로 처리된 세포 사이에는 통계적으로 유의미한 차이가 없음이 확인되었으며 (도 6) 이는 항체에 비해 유리 펩타이드의 친화력이 낮기 때문에 시간이 지남에 따라 표적 단백질에서 해리될 수 있기 때문으로 여겨진다. 그러나 각 펩타이드가 QD 표면에 접합된 경우, 대조 NK 세포군이나 유리 펩타이드를 처리한 군에 비해 항암 효과가 증가한 것으로 확인되었다 (도 6). 이는 다수의 펩타이드가 QD 표면에 결합함으로써 결합 부위 수가 증가하고 표적 단백질에 대한 친화도가 증가하여 펩타이드-나노입자 접합체가 표적 단백질에 지속적으로 결합하는 데 기인한다. 또한, QD 표면에 수많은 펩타이드가 존재함으로써 분리 이후에도 표적 단백질과의 접촉 및 재결합 기회가 증가하므로 PD-1을 효과적으로 차단할 수 있다. 특히 PD-1C로 기능화된 QD-PD-1C 군의 경우 QD-PD-1N에 비해서도 더 높은 항암 효능 증진 효과를 나타냈다. 이는 PD-1N와 PD-1C의 결합 부위 차이에 따른 것일 수 있으며, QD-PD-1C는 PD-1C의 선형 부분이 외부에 위치하므로 표적 단백질과의 결합 측면에서 약간 더 나은 효과를 가지는 것으로 추측된다.

[0083] PD-1C로 기능화된 QD가 PD-1N에 비해 항암 효능 향상 효과가 우수한 것을 확인한 상기 실험 결과를 바탕으로 하여 2가지 유방암 세포주 MCF-7 및 MDA-MB-231 에 대한 항암 효능 평가를 수행하였다.

[0084] 펩타이드-양자점 결합 나노입자로 처리된 NK 세포는 MCF-7 또는 MDA-MB-231 유방암 세포주와 공배양되었다. MCF-7 및 MDA-MB-231 세포는 모두 높은 수준의 PD-L1을 발현하는 것으로 알려져 있는 세포주이다. 실험 결과, 두 세포주 모두 무처리 NK 세포에 비해 QD-PD-1C를 사용한 경우 NK 세포의 항암 효능이 유의하게 증가하였다(도 7). 특히 MCF-7 세포의 경우, 동일한 농도의 항체를 처리한 그룹에 비해 QD-PD-1C 그룹이 더 높은 수준의 항암 효능 향상을 나타내었다. 이는 QD 표면에 존재하는 다중 펩타이드가 유리 펩타이드보다 표적 단백질에 효과적으로 결합하며, 결합을 더 효과적으로 유지하는 것을 시사한다.

[0085] 결과적으로 PD-1C 펩타이드로 표면이 개질된 양자점이 ICB 치료에서 항체 유사 또는 더 높은 효능을 제공할 수 있음을 확인하였다.

[0087] **실시예 4. 펩타이드-양자점 결합 나노입자에 의한 NK 세포의 사이토카인 분비능 확인**

[0088] 펩타이드-양자점 결합 나노입자에 의한 NK 세포 활성을 확인하기 위해 NK 세포의 활성을 대표하는 사이토카인인 IFN-γ 및 TNF-α에 대한 ELISA 분석을 수행하였다.

[0089] NK 세포에서 분비되는 TNF-α는 암 생장을 억제할 수 있으며, NK 세포의 IFN-γ 생산을 증가시킬 수 있다. IFN-γ는 NK 세포에서 분비되는 항암 효과에 영향을 미치는 사이토카인으로서, T 및 B 세포와 같은 다른 면역 세포의 활성화를 유도할 수 있을 뿐만 아니라, 종양 세포의 증식 또는 혈관 신생을 억제하는 효과를 가진다.

[0090] 상기 실시예에서 제작된 QD-PD-1를 NK 92mi 세포에 다양한 농도로 첨가하고 30분간 인큐베이션하였다. MCF-7 세포와 NK 세포는 96웰 라운드 바텀 플레이트에서 10:1의 E:T 비율로 5% CO_2, 37℃ 조건으로 6시간 동안 공배양하였다. 인큐베이션 후, 혼합물을 400 xg 에서 5분간 원심분리하고 상층액을 1.5 mL EP 튜브 (SPL, Korea) 로 옮겼다. 상청액은 추가 사용 전까지 -80° C에서 보관되었다. NK 세포로부터의 사이토카인 방출은 효소 결합 면역

흡착 분석(ELISA) 키트(PeproTech, USA)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 IFN-γ 및 TNF-α 에 대해 정량화하였다.

[0091] IFN-γ 및 TNF-α 방출 프로파일을 분석한 결과(도 8), 유리 펩타이드 그룹에 비해 펩타이드로 QD-PD-1 그룹에서 더 많은 IFN-γ가 방출되었으며, 특히 QD-PD-1C 그룹에서 일반 NK 세포군에 비해 더 많은 IFN-γ가 방출되었다. TNF-α의 경우에도 일반 NK 세포군에 비해 QD-PD-1 그룹에서 사이토카인 방출이 통계적으로 유의하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0092] 또한 각각의 유리 펩타이드와 펩타이드로 기능화된 QD 군을 비교해 보면, 두 펩타이드 모두 QD 표면에 접합되었을 때 NK 세포의 사이토카인 방출을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다. 이는 QD 표면에 펩타이드 접합체를 전달하는 것이 유리 펩타이드를 전달하는 것보다 NK 세포 활성화를 강화하는 데 더 효과적이라는 것을 증명한다. QD 표면에 결합된 펩타이드는 다가성(multivalency)으로 인해 NK 세포 표면의 PD-1 단백질에 대해 더 높은 친화력을 가지므로 표적 단백질 부위에 더 오래 머무를 수 있다. 따라서, 펩타이드-양자점 결합 나노입자를 NK 세포에 전달하는 것이 NK 세포 활성화를 위한 보다 더 효율적인 전략으로 여겨진다.

[0094] **실시예 5. 펩타이드-양자점 결합 나노입자의 타겟 PD-1 차단 효율 및 비특이적 결합 검증**

[0095] PD-1 단백질은 억제 수용체 역할을 하는 NK 세포의 표면 단백질로, 암세포 표면의 PD-1 단백질과 PD-L1 단백질의 결합은 NK 세포와 면역세포의 활동을 억제하여 암세포를 죽이는 것을 방지하는 역할을 한다. 이 메커니즘은 일반적으로 암세포가 면역 반응을 회피하기 위해 이용된다. NK 세포에 전달된 QD는 PD-1 단백질을 표적으로 하는 펩타이드로 기능화되므로, QD는 NK 세포 표면의 PD-1을 차단할 수 있다.

[0096] FasL 단백질은 NK세포의 활성화 수용체 중 하나로. 암세포 표면의 Fas 와 결합하여 암세포의 세포사멸을 유도하는 단백질이다. NK 세포 표면에 존재하는 FasL과 같은 다양한 활성화 수용체 단백질이 전달된 QD에 의해 비특이적으로 차단된다면, 암세포에 대한 NK 세포의 항암 효과가 감소될 수 있으므로, 다른 리간드와의 비특이적 결합으로 인한 간섭을 최소화하는 것이 중요하다.

[0097] 펩타이드-양자점 결합 나노입자는 NK 세포의 표면 PD-1을 표적으로 삼고 암세포 표면에서 PD-1과 PD-L1의 결합을 억제함으로써 NK 세포의 항암 효과를 강화한다. 앞선 실시예에서 QD-PD-1C가 QD-PD-1N보다 우수한 항암 효과를 나타내는 것을 확인하였는바 QD-PD-1C의 표적화 성능과 다른 단백질과의 비특이적 결합의 잠재적 간섭을 평가하기 위해 QD-PD-1C로 처리된 NK 세포의 표면 단백질 PD-1 및 FasL 의 정량 분석을 수행하였다.

[0098] 96웰 플레이트에 50,000 NK cells/50 μL를 첨가하고, 원하는 QD 농도를 고려하여 50 μL 의 QD 분산 용액을 추가하고 37℃ 에서 30분간 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 400 xg 에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 100 μL 의 세포 배양 배지에 세포를 재현탁(resuspend) 하고 APC 접합된 PD-1 항체 (Invitrogen, USA)를 2 μg/mL 농도로 첨가하였다. 25℃에서 30분간 항체와 인큐베이션한 후, 400 xg 에서 5분 동안 원심분리를 수행 하고 세척 과정을 3회 반복하였다. 최종 세척 이후, 세포를 100 μL의 DPBS에 재현탁하고 유세포 분석으로 형광 강도를 분석하였다. APC 접합된 FasL 항체 (BD bioscience, USA) 에도 동일한 방법을 사용하여, MCF-7 유방암 세포주와 NK 세포를 6시간 동안 공배양한 세포 화합물에 대해서도 FasL 정량을 수행하였다.

[0099] PD-1 차단 효과와 NK 세포에 대한 QD-PD-1의 비특이적 결합 존재를 조사하기 위해 PD-1 결합 항체와 FasL 결합 항체를 사용한 NK 세포의 표면 단백질 분석을 다음 2가지 시점에 수행하였다: NK 세포에 QD 처리 후 30분이 경과한 뒤, 그리고 암세포와 공배양이 완료된 6시간 뒤(도 9).

[0100] QD 처리 30분 후 NK 세포의 표면 PD-1을 분석한 결과, QD-PD-1C 처리군에서 표면 PD-1이 가장 크게 감소한 것으로 나타났다. 유리 펩타이드는 더 높은 농도로 처리되었음에도 불구하고, 항체에 비해 더 낮은 표면 PD-1 결합 효율을 나타냈다. 그러나 QD-PD-1C는 QD와 동일한 농도에서 항체에 비해 더 높은 PD-1 단백질 차단 효율을 나타내었다. 표적 유방암 세포주(MCF-7) 과 공배양한 후 표면 단백질을 정량화한 결과 QD-PD-1C 그룹이 유리 펩타이드 그룹보다 더 나은 PD-1 차단 효율을 나타내었다. 단백질을 QD에 접합시킴으로써 다가성으로 인해 결합 능력 및 친화성이 증가하였고, 이에 따라 항체에 비해 PD-1 차단 효율이 증가하였는바, 궁극적으로 QD 표면에 존재하는 수많은 펩타이드는 항체에 비해 더 나은 PD-1 차단 효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다. QD 처리 30분 후 표적 유방암 세포주(MCF-7)와 공배양한 후, NK 세포의 표면 FasL 을 정량화한 결과 QD-PD-1C 가 NK 그룹, 유리 펩타이드 그룹 및 항체 그룹과 유사한 수준의 표면 FasL을 나타내는 것을 확인하였다. 이는 QD-PD-1이 표적 단백질 이외의 표면 단백질에는 비특이적으로 결합하지 않는 것을 나타낸다.

[0101] 결론적으로, PD-1C 펩타이드로 표면이 개질된 양자점은 표적 단백질인 PD-1에 특이적으로 결합하여 차단함으로써 동일한 농도의 항체에 비해 더 높은 수준의 차단 효율을 제공한다.

[0103] **실시예 6. 펩타이드-양자점 결합 나노입자가 처리된 NK 세포에 대한 인비트로(in vitro) IR-이미징(imaging)**

[0104] Ag_2S QD의 독특한 형광 방출을 이용한 근적외선 영역에서의 NK 세포 이미징이 수행되었다. QD-PD-1N 보다 QD-PD-1C 에서 NK 세포 항암 기능성 강화가 더 우수한 것으로 관찰된 앞선 실시예 결과를 기반으로 PD-1C 펩타이드에 대한 이미징을 수행하였다(도 10 및 도 11).

[0105] 96웰 플랫 바텀 플레이트에 20,000 cells/50 μL의 NK 세포를 첨가하였다. 200 μM 농도의 QD 분산 용액을 50 μL 가하여 목적하는 100 μM의 QD 농도를 얻고 37℃에서 30분간 인큐베이션하였다. 400 xg 에서 5분간 원심분리하고 상청액을 제거하였다. DBPS 10 μL 을 첨가한 후, QD는 결합 세포(bound cell)와 재결합(recombine) 되었다. 생성된 용액 10 μL 을 슬라이드 글라스에 놓고 커버 슬립으로 덮었다. 950nm Longpass 필터를 사용하여 QD-PD-1 처리된 NK 세포의 형광 이미지를 수득하였다. 레이저 사용 그룹은 QD의 형광을 확인하기 위해 808 nm 레이저를 조사하였다.

[0106] NK 세포의 자가형광 및 QD의 비특이적 결합 또는 작은 크기로 인한 NK 세포에 의한 세포 내 이입의 잠재적 영향을 확인하기 위해, 처리되지 않은 NK 세포 및 네이키드(naked) QD만으로 이미징을 수행하였다. 세포에 결합된 QD로부터 충분한 형광 강도를 확인하기 위해 QD 또는 QD-PD-1C 를 NK 세포에 100 μM 농도로 처리하였다. QD로 처리된 NK 세포는 30분간 인큐베이션되었고 세포만을 수집하여 살아있는 세포 상태로 이미징하였다.

[0107] 가시광선 영역에서 모든 그룹에서의 NK 세포 이미지를 확인하였다. 그러나 IR 영역에서의 방출을 분석한 결과, 미처리 NK 세포군과 QD만이 처리된 NK 세포군은 세포 이미지가 확인되지 않았다. 이와 대조적으로, QD-PD-1로 처리된 NK 세포군은 IR 영역에서 세포 표면에 결합된 QD로부터의 방출이 확인되었다. 이를 통해, 모든 세포 이미지가 IR 영역에서 관찰되는 것은 아니며, 충분한 양의 QD가 세포 표면에 결합되는 경우에만 이미지 측정이 가능함을 확인하였다.

[0108] 생물학적 조직에서 발생하는 상당한 흡수와 자가형광으로 인해 기존 광학 이미징 기술은 현재 침투 깊이와 가능한 해상도에 한계가 있다. 그러나 본원에서 펩타이드 전달 플랫폼으로 사용된 Ag_2S QD는 1100-1200 nm 범위에서 효율적으로 형광을 나타내며, 808nm 레이저에서 빛을 방출하였다. 이 영역은 NIR 영역에 속하므로 피부 침투뿐만 아니라 심부 조직에서도 측정이 가능하도록 한다. 또한, QD-PD-1C 그룹에서 NK 세포의 IR 영역에서의 확인은 QD-PD-1C가 NK 세포 표면에 성공적으로 결합했음을 나타낸다.

[0109] NK 세포 표면의 PD-1과 FasL 정량을 통해 PD-1 결합 펩타이드로 표면개질된 양자점이 가 비특이적 결합 없이 PD-1을 차단하는 것을 확인하였다. 이는 QD-PD-1C가 NK 세포 표면의 활성화 마커를 방해하지 않고 NK 세포 표면의 PD-1에 결합할 수 있음을 시사한다.

[0110] 이를 통해, 본원에서 발굴한 기능화된 QD는 NK 세포의 항암 기능성을 강화하고, 추적 플랫폼으로서의 기능 역시 수행할 수 있음을 알 수 있다.

[0112] **실시예 7. PEG spacer를 포함하는 펩타이드-양자점 결합 나노입자 처리된 NK 세포의 항암 활성 확인**

[0113] 실시예 1에 기재된 바와 같이 11-MUA로 리간드가 치환된 Ag_2S를 수득하였고 실시예 2-1과 마찬가지 방법으로 EDC/NHS를 이용하여 PEG를 연결시켰다. 연결된 PEG는 마찬가지로 EDC/NHS process를 통해 PD-1C 및 PD-1N 펩타이드와 연결시켰다. 결합 효율은 약 47~72% 범위로 나타났다.

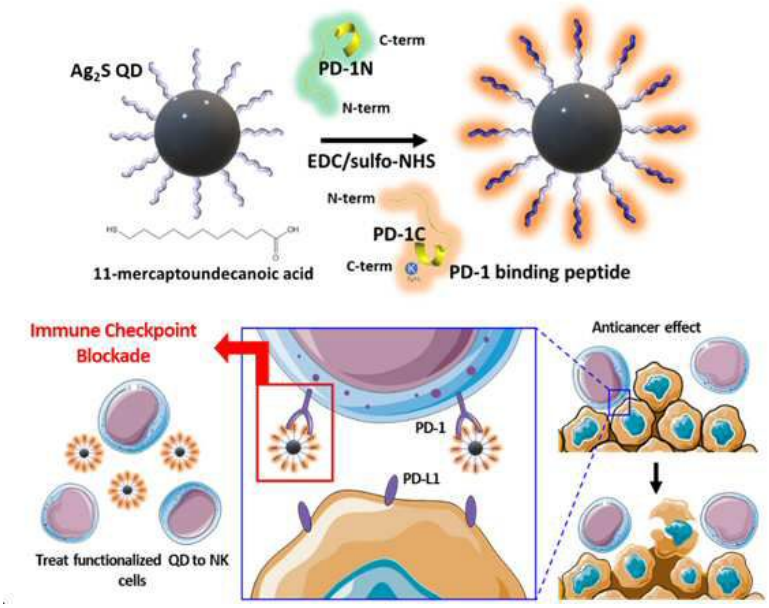
[0114] 제조된 QD-PD-1을 NK 세포에 처리하고 30분 뒤 MCF-7 암세포와 추가 6시간 공배양을 수행하여 NK 세포의 PD-1 차단 수준을 PD-1항체를 이용해 확인한 결과를 도 12A에, 암세포에 대한 세포 독성을 비교한 결과를 도 12B에 나타내었다.

[0115] 실험 결과 PD-1C 및 PD-1N 펩타이드를 처리한 경우에 비해 QD-PD-1을 처리한 경우 NK 세포의 PD-1 수용체가 충분히 차단된 것을 확인하였으며, 표적 암세포에 대한 항암 효과 역시 우수하게 나타났다.

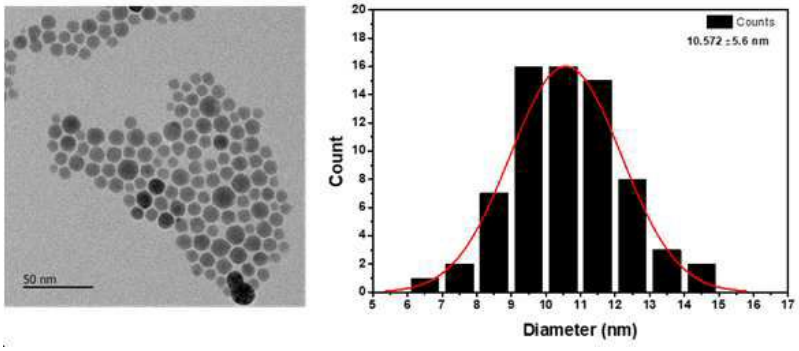
[0117] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

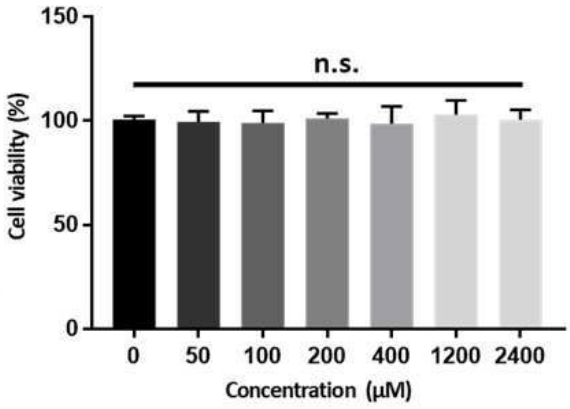
도면1



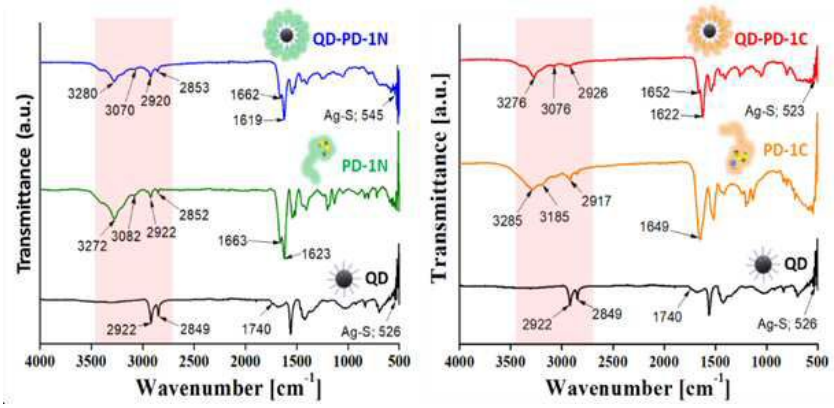
도면2



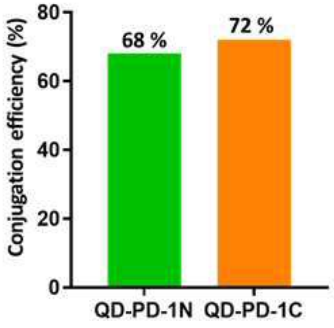
도면3


n.s.
Cell viability (%)
150
100
50
0
0
50
100
200
400
1200
2400
Concentration (μM)

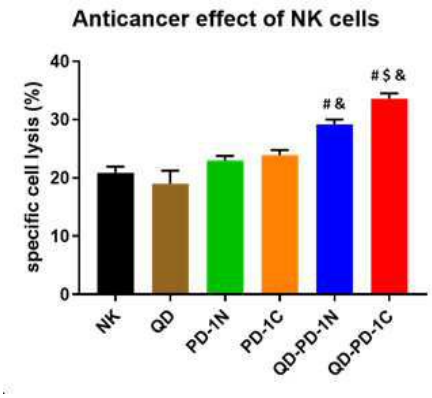
도면4


QD-PD-1N
3280
3070
2920
2853
1662
1619
Ag-S; 545
PD-1N
3272
3082
2922
2852
1663
1623
QD
2922
2849
1740
Ag-S; 526
Transmittance (a.u.)
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
Wavenumber [cm-1]
QD-PD-1C
3276
3076
2926
1652
1622
Ag-S; 523
PD-1C
3285
3185
2917
1649
QD
2922
2849
1740
Ag-S; 526
Transmittance [a.u.]
Wavenumber [cm-1]

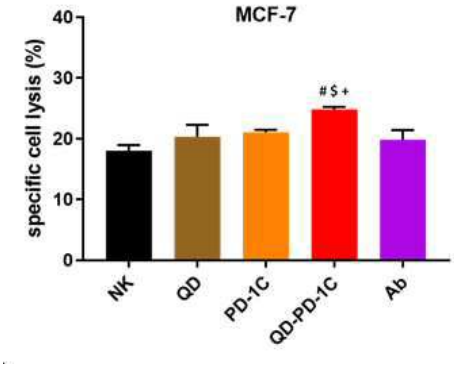
도면5


Conjugation efficiency (%)
80
60
40
20
0
68 %
72 %
QD-PD-1N
QD-PD-1C

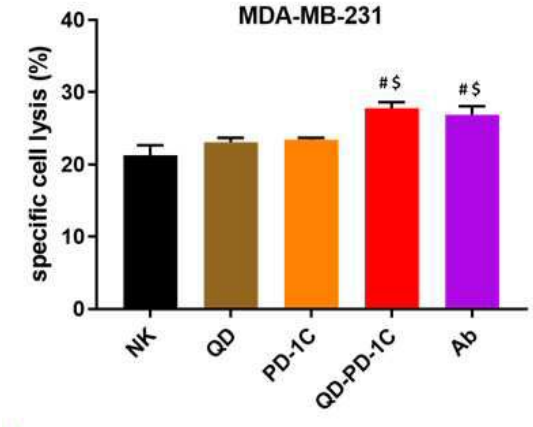
도면6



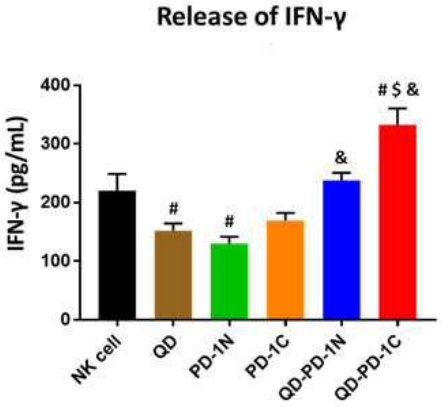
도면7a



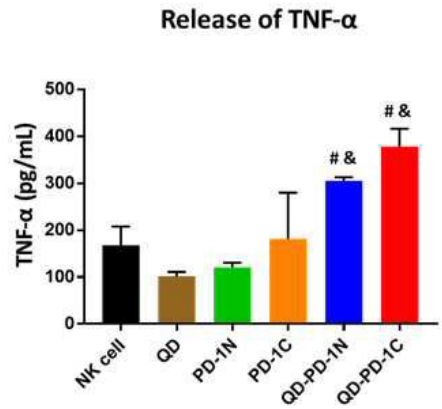
도면7b



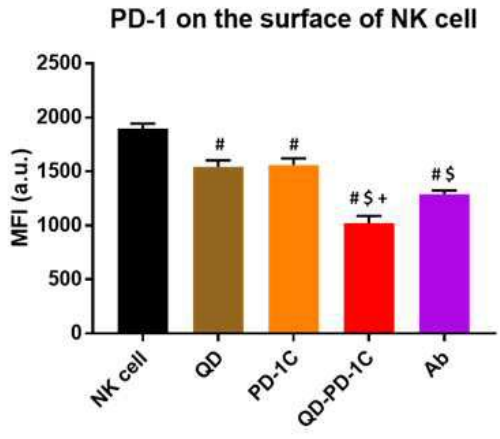
도면8a



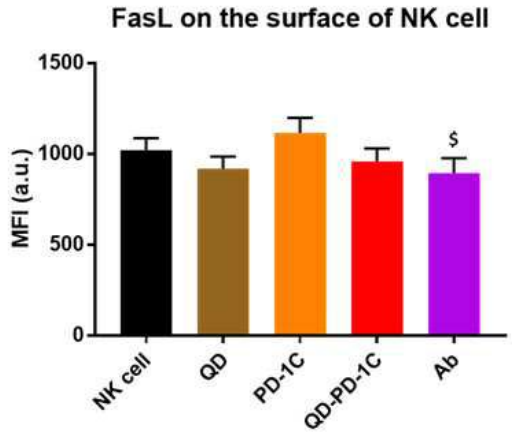
도면8b



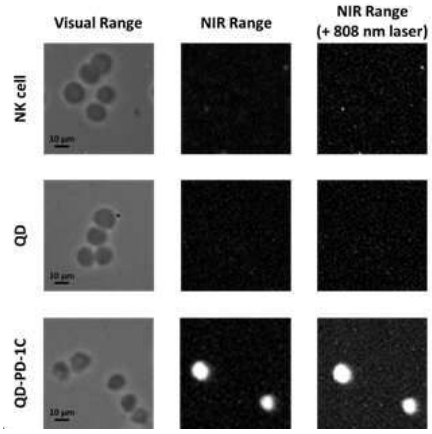
도면9a



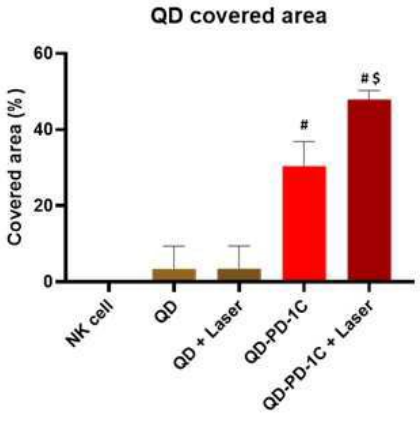
도면9b



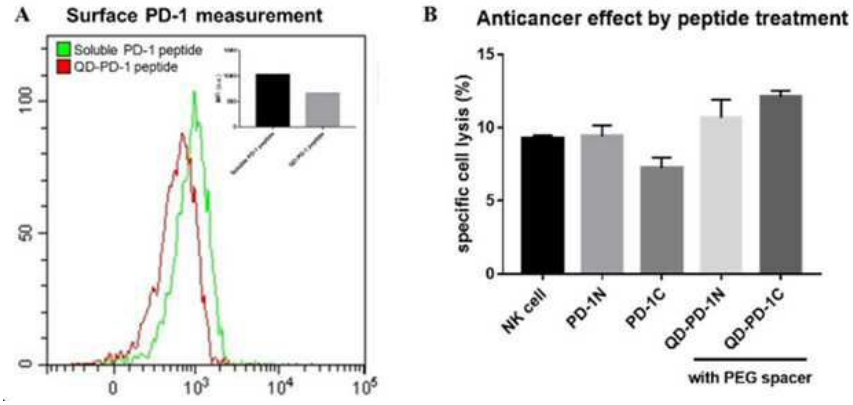
도면10



도면11



도면12


A
Surface PD-1 measurement
Soluble PD-1 peptide
QD-PD-1 peptide
100
50
0
0
10^3
10^4
10^5
B
Anticancer effect by peptide treatment
specific cell lysis (%)
15
10
5
0
NK cell
PD-1N
PD-1C
QD-PD-1N
QD-PD-1C
with PEG spacer

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.