



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0027346
(43) 공개일자 2019년03월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/00 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01) A61K 47/42 (2017.01)
A61K 47/52 (2017.01) A61K 47/64 (2017.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/0092 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0106693

(22) 출원일자 2018년09월06일

심사청구일자 없음

(30) 우선권주장

1020170113965 2017년09월06일 대한민국(KR)

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

서울대학교산학협력단

서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

(72) 발명자

김영근

서울특별시 강남구 압구정동 528 한양아파트 72-1109

조현아

대전광역시 서구 월평중로24번길 18, 대정하우스 402호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인다나

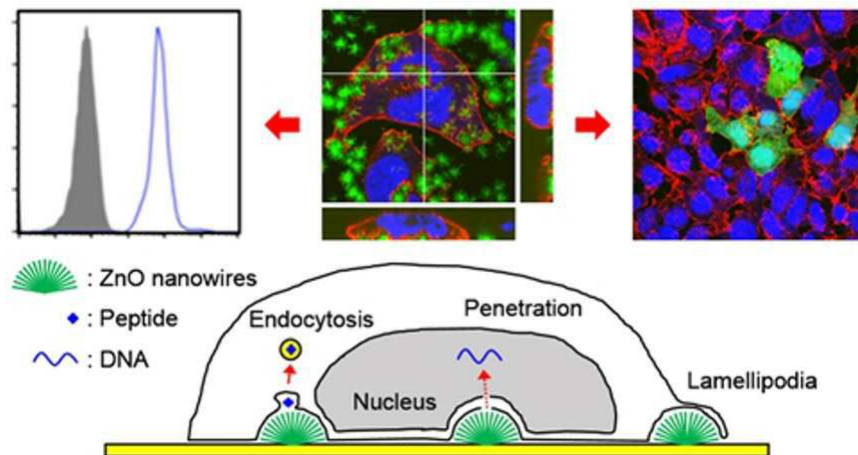
전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 나노선 다발을 이용한 생체분자 전달

(57) 요약

본 발명은 생체분자 전달용 소자에 관한 것으로, 보다 구체적으로 생체분자를 포함하는 산화아연 나노선 구조체를 이용한 고효율 유전자 전달용 소자에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 47/02 (2013.01)

A61K 47/42 (2013.01)

A61K 47/52 (2017.08)

A61K 47/64 (2017.08)

A61K 48/00 (2013.01)

(72) 발명자

함우승

서울특별시 강남구 남부순환로365길 39, 5층

박범철

대전광역시 유성구 봉명동 유성자이아파트 102동
3901호

조남혁

서울특별시 중랑구 면목2동 한신아파트 8-810

이재원

서울특별시 종로구 북촌로 7길 11-6(가회동) 201
호

프라산트

서울특별시 종로구 성균관로 2, 102호(명륜3가)

명세서

청구범위

청구항 1

산화아연 나노입자(nanoparticle) 코어(core); 및

상기 코어를 중심으로 수직형(vertical shape) 또는 방사형(radial shape)으로 성장되어 있는 산화아연 나노선을 포함하는 산화아연 나노선 구조체를 포함하며,

상기 산화아연 나노선 구조체의 표면에는 산화아연 특이결합 단백질이 결합되어 있는 산화아연 나노선 복합체.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

산화아연 나노입자 코어의 평균 직경은 1 nm 내지 1 μ m 인 산화아연 나노선 복합체.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

산화아연 나노선의 길이는 5 nm 내지 50 μ m이고, 직경은 5 nm 내지 500 nm인 산화아연 나노선 복합체.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

산화아연 나노선 구조체는 지지체 상에 형성되며,

상기 산화아연 나노선 구조체의 코어가 상기 지지체와 접촉하는 산화아연 나노선 복합체.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

지지체는 무기(inorganic) 또는 유기(organic) 형태의 유리 기판, 실리콘 기판, 고분자 기판 또는 무기(inorganic) 또는 유기(organic) 형태의 섬유(파이버, fiber)인 산화아연 나노선 복합체.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

섬유는 폴리락틱산(poly lactic acide, PLA), 폴리락틱글리콜산(poly lactic glycol acid, PLGA), 폴리하이드록시 부티레이트(PHB), 폴리우레탄(PU) 및 폴리카보네이트(PC)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 산화아연 나노선 복합체.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

산화아연 특이결합 단백질은 산화아연 나노선에 비공유결합을 통해 결합되어 있는 산화아연 나노선 복합체.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

산화아연 특이결합 단백질은 산화아연 특이결합 펩타이드 서열인 산화아연 나노선 복합체.

청구항 9

제 8 항에 있어서,

산화아연 특이결합 펩타이드 서열에 화학적 또는 유전공학적으로 융합(fusion) 또는 접합(conjugation)된 유기물 또는 무기물이 결합되는 산화아연 나노선 복합체.

청구항 10

제 8 항에 있어서,

산화아연 특이결합 펩타이드 서열의 C-말단에 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC)가 결합되는 산화아연 나노선 복합체.

청구항 11

제 1 항에 있어서,

산화아연 나노선 복합체에 약물이 추가로 도입되어 있는 산화아연 나노선 복합체.

청구항 12

제 11 항에 있어서,

약물은 단백질, DNA, RNA, 의약 화합물, 조영 물질 및 항원으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 산화아연 나노선 복합체.

청구항 13

제 1 항에 있어서,

약물 전달용 조성물, 조영제 조성물 또는 백신 조성물로 사용되는 산화아연 나노선 복합체.

청구항 14

산화아연 나노입자 코어에 상기 코어를 중심으로 산화아연 나노선을 수직형(vertical shape) 또는 방사형(radial shape)으로 성장시켜 산화아연 나노선 구조체를 제조하는 단계;

상기 성장된 산화아연 나노선에 산화아연 특이결합 단백질을 결합시키는 단계를 포함하는 산화아연 나노선 복합체의 제조 방법.

청구항 15

제 14 항에 있어서,

산화아연 나노선 구조체를 제조하는 단계는 지지체 상에 산화아연 나노입자 코어를 형성하는 단계; 및

상기 지지체 상에 형성된 산화아연 나노입자 코어를 중심으로 산화아연 나노선을 수직형(vertical shape) 또는 방사형(radial shape)으로 성장시키는 단계를 포함하는 산화아연 나노선 복합체의 제조 방법.

청구항 16

제 15 항에 있어서,

지지체 상에 산화아연 나노입자 코어를 형성하는 단계는

산화아연 나노입자를 포함하는 용액을 지지체에 적하(drop)한 후 건조시켜 제조하는 산화아연 나노선 복합체의 제조 방법.

청구항 17

제 15 항에 있어서,

지지체 상에 산화아연 나노입자 코어를 형성하는 단계는

산화아연 나노입자 및 생분해성 고분자를 포함하는 용액을 전기방사(electrospinning)하여 제조하는 산화아연 나노선 복합체의 제조 방법.

청구항 18

제 16 항 또는 제 17 항에 있어서,

산화아연 나노입자를 포함하는 용액 또는 산화아연 나노입자 및 생분해성 고분자를 포함하는 용액의 용매는 에탄올, 메탄올, DMF 또는 THF인 산화아연 나노선 복합체의 제조 방법.

청구항 19

제 15 항에 있어서,

산화아연 나노선을 수직형(vertical shape) 또는 방사형(radial shape)으로 성장시키는 단계는

산화아연 나노입자 코어가 형성된 지지체를 아연 전구체 용액에 담지시키고 70 내지 100℃에서 반응시키는 것인 산화아연 나노선 복합체의 제조 방법.

청구항 20

제 19 항에 있어서,

아연 전구체는 질산 아연 6수화물(zinc nitrate hexahydrate)인 산화아연 나노선 복합체의 제조 방법.

청구항 21

제 19 항에 있어서,

아연 전구체 용액은 폴리에틸렌이민(PEI) 및 염화 암모늄(NH_4Cl)을 추가로 포함하는 산화아연 나노선 복합체의

제조 방법.

청구항 22

제 11 항에 있어서,

산화아연 특이결합 단백질에 약물을 결합시키는 단계를 추가로 포함하는 산화아연 나노선 복합체의 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 생체분자 전달용 소자에 관한 것으로, 보다 구체적으로 생체분자를 포함하는 산화아연 나노선 구조체를 이용한 고효율 생체분자 전달용 소자에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 단백질 및 유전자를 전달하기 위한 방법으로는, 세포를 DNA 용액과 혼합한 후 직류고전압을 인가하여 전달하는 방식인 전기천공법(electroporation), 아데노바이러스, 레트로바이러스 등의 바이러스 벡터를 이용하여 전달하는 방식인 바이러스성 유전자 전달법, 및 리포펙타민 등의 약물을 이용하여 전달하는 방식인 비바이러스성 유전자 전달법이 이용되고 있다.

[0004] 한편, 산화아연 및 산화철과 같은 금속산화물 나노구조는 생체 친화적이고 표면에 생체분자를 도입하기 쉽기 때문에, 단백질 및 유전자를 세포 및 조직 내에 전달하는 소재로 제시되고 있다. 특히, 1 nm ~ 1000 nm 크기를 갖는 나노 구조는 매우 작은 크기를 갖기 때문에, 세포에 손상을 입히지 않고 단백질 및 유전자를 전달할 수 있다. 이러한 생체적합성 금속산화물 나노소재들은 면역계 조절 효과가 있기 때문에 유전질환 및 암에 대한 백신 개발을 위한 아쥬반트(adjuvant) 또는 전달체(carrier) 시스템으로도 사용될 수 있다(비특허문헌 1).

[0005] 산화아연 및 산화철의 응용성을 확대하기 위해서 금속산화물에 결합 가능한 펩타이드 서열 개발에 대한 연구가 활발히 이루어 졌다. 특히, 산화철-산화아연 코어-셸 나노입자 또는 산화아연 나노입자들에 비공유결합 방식으로 강한 힘으로 선택적 결합할 수 있는 펩타이드들이 보고된 바 있다.

[0006] 생체분자가 표면에 개질되어 있는 나노구조를 이용하여 세포 내에 전달하기 위해서는 세포와 나노구조의 경계에서 발생하는 현상을 이해하는 것이 중요하다. 세포와 나노구조 표면의 접촉 변화는 생체분자 전달에 매우 큰 영향을 줄 수 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) 1. L. Nie et al., Small 2, 621-625(2006)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 생체분자 등의 약물을 효율적으로 전달할 수 있는 산화아연 나노선 구조체로 이루어진 소자를 제공하는 것을 목적으로 한다. 본 발명에서는 수직형(vertical) 또는 방사형(radial)의 나노선 다발로 구성된 구조체와 산화아연 특이결합 단백질을 이용하여, 생체분자 또는 약물이 도입되어 있는 나노선 표면을 이용하여 세포 내에 생체분자 또는 약물을 효율적으로 전달 가능한 소자를 제공할 수 있다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명은 산화아연 나노입자(nanoparticle) 코어(core); 및
- [0012] 상기 코어를 중심으로 수직형(vertical) 또는 방사형(radial shape)으로 성장되어 있는 산화아연 나노선을 포함하는 산화아연 나노선 구조체를 포함하며,
- [0013] 상기 산화아연 나노선 구조체의 표면에는 산화아연 특이결합 단백질이 결합되어 있는 산화아연 나노선 복합체를 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 산화아연 나노입자 코어에 상기 코어를 중심으로 산화아연 나노선을 수직형(vertical) 또는 방사형(radial shape)으로 성장시켜 산화아연 나노선 구조체를 제조하는 단계;
- [0016] 상기 성장된 산화아연 나노선에 산화아연 특이결합 단백질을 결합시키는 단계를 포함하는 산화아연 나노선 복합체의 제조 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0018] 본 발명에 따른 산화아연 나노선 복합체는 산화아연 나노입자 코어를 중심으로 수직형(vertical) 또는 방사형(radial shape)으로 성장되어 있는 산화아연 나노선을 포함하는 산화아연 나노선 구조체를 포함하며, 산화아연 특이 결합 단백질을 이용하여 산화아연 나노선에 약물이 도입되어 있다.
- [0019] 본 발명에서는 수직형 또는 방사형 구조의 나노선, 특히, 평면에 대한 수직방향으로부터 평면 방향으로 기울어져 있는 나노선 다발의 구조를 가지는 방사형 산화아연 나노선 복합체를 제공할 수 있다. 이를 통해, 산화아연 나노선 복합체가 약물 전달용으로 사용될 경우 높은 생체분자 전달 효율을 제공할 수 있다.
- [0020] 본 발명에 따른 산화아연 나노선 복합체는 약물 전달 뿐 아니라 세포성장, 세포치료, 생체분자 검지 등을 포함하는 바이오메디컬 분야, 화학 분자 검지 등을 포함하는 환경 분야에 적용할 수 있다. 또한, 값싼 금속산화물 소재와 간단한 공정을 제공할 수 있으므로, 제조 비용 절감이 예상된다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 본 발명의 실시예 1에 따른 방사형 산화아연(ZnO) 나노선 복합체를 이용한 단백질 및 유전자를 포함하는 생체분자 전달을 간략히 나타내는 개념도, 및 세포 내에 전달된 생체분자에 의해서 녹색 형광이 검출된 형광현미경 사진을 나타낸다.
- 도 2는 본 발명의 실시예 1에 따른 방사형 ZnO 나노선 구조체의 제조 시에 시드(seed)로서 사용되는 ZnO 나노입자의 투과전자 현미경(TEM) 사진이다. 상기 ZnO 나노입자는 에탄올 용액에서 평균입경이 7 nm를 나타낸다.
- 도 3은 ZnO 나노선 구조체의 형태학적 및 미세 구조 분석 결과를 나타낸 것으로, 제조예 1-2에서 제조된 수직형 ZnO 나노선 구조체 및 제조예 1-1에서 제조된 방사형 ZnO 나노선 구조체에 대한 투과전자 현미경(TEM) 및 주사전자 현미경(SEM) 사진을 나타낸다.
- 구체적으로, 수직형 ZnO 나노선 구조체의 윗면(3a) 및 옆면(3b), 방사형 ZnO 나노선 구조체의 윗면(3c) 및 옆면(3d)은 주사전자 현미경 사진이며, ZnO의 결정성은 투과전자 현미경을 이용하여 분석하였다(3e-g). ZnO 나노선은 [0002] 방향으로 성장하고 높은 결정성을 갖는다.
- 도 4는 제조예 1-2에서 제조된 수직형 ZnO 나노선 구조체 및 제조예 1-1에서 제조된 방사형 ZnO 나노선 구조체에 대한 세포 독성 실험 결과로, 수직형 및 방사형 ZnO 나노선 위에서 성장한 HEK293 세포의 형상에 관련된 주사전자현미경(SEM) 및 형광현미경 사진이다.
- (A) HEK293 세포는 수직형 또는 방사형 나노선 구조체에서 성장하며, 이들의 성장은 최대 96 시간 동안 모니터링되었다(B 및 C). 세포 배양 후 지정된 시간에 annexin V 및 7-AAD로 염색 후, 세포 사멸 및 괴사를 유세포 분석법으로 평가 하였다.

도 5는 제조에 1-2에서 제조된 수직형 ZnO 나노선 구조체 및 제조에 1-1에서 제조된 방사형 ZnO 나노선 구조체에서 성장한 세포의 형태를 나타내는 도면이다.

(A) 세포 배양 24 시간 후 유리기관(CNT(대조군), glass coverslips), 수직형 나노선 구조체, 및 방사형 나노선 구조체에서 성장한 HEK293 세포의 SEM 이미지를 나타낸다(B 및 C). 나노선에서 성장한 세포는 TO-PRO-3 및 Alexa Fluor594-Phalloidin 접합체로 염색되어 세포핵(파란색) 및 액틴 세포골격(빨간색)을 각각 관찰하였다. 방사형 나노선 구조체에서 성장한 세포의 확대된 이미지는 변형된 핵과, 접촉 모서리(C, 흰색 화살촉)에서 ZnO 나노선 클러스터를 둘러싸고 있는 액틴 세포골격, 라멜라포뎬의 뚜렷한 정렬을 보여준다.

(D) 세포는 ZBP-FITC(녹색)로 코팅된 나노선에서 성장하였고, 세포핵 및 액틴 세포골격은 TO-PRO-3 및 Phalloidin으로 염색하였다. 세포 및 ZnO 나노선 구조체의 형광 이미지는 z 스택의 공초점 스캐닝으로 평가되었으며, 직교 뷰(orthogonal views)(yz 및 xz)는 오른쪽 및 아래 패널에 흰색 막대, 10 μ m로, 표시된다.

도 6은 제조에 1-2에서 제조된 수직형 ZnO 나노선 구조체 및 제조에 1-1에서 제조된 방사형 ZnO 나노선 구조체에서 수직되어있는 유전자의 세포 내 함입 효율 결과를 나타낸다(***, $p < 0.001$).

(A 및 B) HEK293 세포를 지시된 시간 동안 37°C에서 ZBP-FITC로 코팅된 ZnO 나노선 구조체에서 배양하고 유세포 분석법으로 분석하였다. 살아있는 세포를 산점도(scatter plot)에 따라 게이팅하고, 세포의 형광 강도(fluorescence intensities)를 평가하였다(A).

(C 및 D) 4°C 또는 37°C에서 30 분 동안 ZBP-FITC로 코팅된 ZnO 나노선 구조체에서 배양된 세포의 유세포 분석 결과를 나타낸다. ZBP-FITC 코팅이 없는 나노선 구조체에서 배양된 세포는 회색 막대 그래프로 표시되었으며, ZBP-FITC로 코팅된 세포는 파란색(방사형 나노선 구조체) 또는 빨간색(수직형 나노선 구조체) 막대 그래프로 표시되었다.

수직형 나노선 구조체를 이용할 때 보다 방사형 나노선 구조체를 이용하여 단백질을 전달할 때, 보다 높은 효율로 녹색형광이 발현되는 결과를 보였다.

도 7은 DNA 코팅된 클러스터 ZnO 나노선 구조체의 세포 내 전달을 나타낸다($p < 0.001$).

(A) GFP 발현 카세트를 코딩하는 DNA로 감염된(transfected) HEK293 세포의 형광 이미지이다. 세포를 선형 DNA로 코팅한 방사형 나노선 구조체에서 48 시간 동안 배양한 다음, 핵(파란색)과 액틴 세포골격(빨간색)을 시각화하기 위해 TO-PRO-3 및 Phalloidin으로 염색하였다(DIC: 미분 간섭 관찰(differential interference contrast), 백색 막대: 10 μ m).

(B) 나노선 구조체를 사용하여 형질주입 효율(Transfection efficiencies)을 배양 후 48 시간에 유세포 분석법으로 평가 하였다. GFP 양성 세포 백분위는 제시된 실험군(experimental groups)에서 비교하였다.

도 8은 제조에 1-2에서 제조된 수직형 ZnO 나노선 구조체 및 제조에 1-1에서 제조된 방사형 ZnO 나노선 구조체의 XRD 패턴을 나타낸다. 그래프의 아래 부분에는 부르자이트(wurtzite) ZnO(JCPDS No. 36-1451)의 특성 피크가 표시된다.

도 9는 ZBP-FITC로 코팅된 ZnO 나노선 구조체를 나타낸다.

(A) 수직형 ZnO 나노선 구조체 및 방사형 ZnO 나노선 구조체는 지시된 농도의 FITC로 결합된 ZnO-결합 펩타이드(ZBP)와 37°C에서 1 시간 동안 배양되었다. ZBP-FITC로 코팅된 ZnO 나노선 구조체의 형광 세기를 측정함으로써 ZBP-FITC의 상대적인 결합(relative binding)을 평가하였다.

(B) ZBP-FITC로 코팅된 ZnO 나노선 구조체의 대표 이미지이다(DIC: 미분 간섭 관찰(differential interferencecontrast), 백색 막대: 10 μ m).

도 10은 ZBP-스트렙타아비딘 및 비오틴-라벨화(labeled) DNA의 복합체 형성을 나타낸다.

(A) ZnO 나노선 구조체(파란색)에 ZBP(보라색)-스트렙타아비딘(녹색) 및 비오틴(빨간색)-라벨화 DNA(오렌지색)의 복합체 형성 방법의 모식도이다.

(B) ZnO 나노선 구조체에 ZBP-스트렙타아비딘의 키네틱 결합(Kinetic binding)을 나타낸다. 유리기관 상에 클러스터된 ZnO 나노선을 지정된 시간 동안 37°C에서 300 μ g 정제된 ZBP-스트렙타아비딘과 배양하고 결합된 단백질을 BCA 단백질 분석 키트로 평가하였다.

(C 및 D) ZBP-스트랩트아비딘과 비오틴화 DNA의 복합체 형성을 확인하기 위하여, 전기영동 이동성 변화분석(electrophoretic mobility shift assay)를 수행하였다. 지시된 양의 ZBP-스트랩트아비딘 단백질을 GFP 발현 카세트에 인코딩하는 비오틴화 DNA와 배양하고, 생성된 복합체를 아가로오스 겔 전기영동 한 후 UV 광하에서 가시화하였다(C). ZBP-스트랩트아비딘에 대한 비오틴화 DNA의 상대적인 결합은 3 회의 실험으로부터 제시되었다(오차 막대, $\pm$ SD).

도 11은 제조예 2-1에서 제조된 ZnO 나노선 구조체로, (A)는 PLA 섬유 SEM 이미지(왼쪽 위) 및 ZnO 나노선 구조체의 이미지(왼쪽 아래, 오른쪽 그림)이다.

(B)는 ZnO 나노선 구조체의 XRD 패턴으로, PLA 섬유의 패턴(파란색), ZnO 나노선 구조체의 패턴(빨간색)을 나타낸다. ZnO 피크 위치는 패턴(B) 하단에 검은색 수직선으로 표시되어 있다.

도 12는 제조예 2-1에서 제조된 ZnO 나노선 구조체의 세포독성 효과를 확인한 실험 결과를 나타낸다.

(A) 대조군(CNT)과 250 μ g PLA 섬유(PLLA) 및 ZnO 나노선 구조체(PLLA-ZnO) 그룹에서 DC2.4 세포가 잘 성장하였음을 확인하였다. 상기 실험은 24시간 동안 관찰된 결과를 나타낸다.

(B 및 C) 세포 사멸(apoptosis) 및 세포 괴사(necrosis)를 annexin V 와 7-AAD 염색을 한 후 유세포 분석법으로 확인한 결과를 나타낸다. 세포 사멸 및 괴사는 도면의 왼쪽 아래 표시된 것처럼 구분될 수 있다. (C)는 유세포 분석기로 나온 퍼센트 결과를 시간에 따른 변화량으로 나타낸 그래프이다.

도 13은 산화아연 특이결합 펩타이드와 ZnO 나노선 구조체의 결합을 확인한 결과를 나타낸다.

(A) 형광 현미경 이미지로, FITC로 표지된 ZBP(ZBP-FITC) 및 ZnO 나노선 구조체를 배양한 후 그 결합 정도를 확인하였다.

(B) ZBP-FITC의 양에 따라 결합하는 양이 증가함을 확인하였고, 일정 농도 이상에서는 결합되는 양이 포화(saturation)되는 것을 확인하였다.

(C) 겔 전기영동 결과로, PLA 섬유(PLLA)나 ZnO 나노선 구조체에 CEA 항원이 얼마나 결합하는지를 나타낸다. 또한, (D)는 (C) 에서 결합한 양을 정량화한 그래프이다.

도 14는 산화아연 특이결합 펩타이드와 결합한 ZnO 나노선 구조체의 세포내 섭취와 수지상세포에 대한 자극효과를 확인한 결과를 나타낸다.

(A) DC2.4 세포를 ZBP-FITC가 결합된 ZnO 나노선 구조체와 37°C에서 배양하였고, 유세포 분석법으로 복합체를 섭취한 세포들을 분석하였다. 대표적 위의 그림은 flow cytometric data를, 아래의 그림은 배양시간에 따른 FITC⁺ 세포의 변화를 나타낸다.

(B) DC2.4 세포를 구조체와 함께 37°C에서 18시간 동안 배양하고 염증성 사이토카인을 측정된 그래프이다(n = 4).

(C) DC2.4 세포를 복합체와 함께 배양한 후, DC2.4 세포의 표현형 변화를 나타낸 그래프이다. DC2.4세포의 활성화 마커인 CD40, CD86의 항상을 확인하였다(n = 4).

도 15. (A) 복합체로 면역한 한 마우스에서 형성된 CEA 항원 특이적(CEA-specific)이고, IFN- γ -positive이며, CD4, CD8 T세포가 향상됨을 나타낸 그래프이다. 위의 그림은 유세포 분석법의 대표 dot plot이고, 아래 그림은 위에서 분석된 T 세포 퍼센트를 나타낸 그래프이다. X축에는 면역한 복합체의 종류와 CNT(대조군)를 기재되고, CEA(+/-)는 항원인 CEA를 처리한 것과 하지 않은 것을 나타낸다.

(B) 산화아연 나노선 복합체(CEA 항원 결합)로 면역한 마우스의 세포독성효과 실험 결과를 나타낸다. CEA 항원을 발현하는 MC38 종양세포(MC38/CEA)와 면역한 마우스에서 유래한 비장 세포를 함께 배양했을 때 얼마나 많은 세포가 lysis 되는지를 나타낸다.

(C) MC38/CEA 종양 세포를 주입한 마우스에서의 종양 부피(그룹당 5 마리를 실험하였음)를 나타낸다. 마우스는 종양세포를 주입한 후, 7, 14, 21일 총 3번 면역하였다. 아래 사진은 30일째 ZnO 나노선 구조체-CEA 그룹(PLLA-ZnO/CEA)의 마우스에서 떼어낸 종양 이미지이다.

도 16은 종양 접종 후 24일 제에, (A) 비장에서의 조절-면역세포(CD45⁺), CD4⁺ T 세포, CD8⁺ T 세포, 조절 T 세포(Treg, CD4⁺/FoxP3⁺) 상대적 비율을 나타낸 그래프이고, (B) 종양 조직 내에서의 해당 세포들의 상대적 비

을 나타낸 그래프이다.

도 17은 ZnO 나노선 구조체의 준비 단계 및 대표 이미지를 나타낸다.

도 18은 ZnO 나노선 구조체로 자극한 후, DC2.4 세포의 표현형 변화(DC2.4세포의 활성화 마커인 MHCII와 CD80)를 나타낸 그래프이다.

도 19는 중앙 접종 후 24일째, 비장에서의 조혈-면역세포(CD45+), CD4+ T 세포, CD8+ T 세포, 조절 T 세포(Treg, CD4+/FoxP3+)의 퍼센트를 나타낸 유세포 분석 이미지를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 본 발명은 산화아연 나노입자(nanoparticle) 코어(core); 및
- [0024] 상기 코어를 중심으로 수직형(vertical shape) 또는 방사형(radial shape)으로 성장되어 있는 산화아연 나노선을 포함하는 산화아연 나노선 구조체를 포함하며,
- [0025] 상기 산화아연 나노선 구조체의 표면에는 산화아연 특이결합 단백질이 결합되어 있는 산화아연 나노선 복합체에 관한 것이다.
- [0027] 이하, 본 발명의 산화아연 나노선 복합체를 보다 상세하게 설명한다.
- [0028] 본 발명에 따른 산화아연 나노선 복합체는 산화아연 나노선 구조체의 표면에 산화아연 특이결합 단백질이 결합된 구조를 가지며, 상기 산화아연 나노선 구조체는 산화아연 나노입자 코어에 산화아연 나노선이 상기 코어를 중심으로 수직형(vertical shape) 또는 방사형(radial shape)으로 성장되어 있는 구조를 가진다.
- [0029] 상기 나노선이 수직형(vertical shape)으로 성장되어 있는 구조를 가질 경우 나노선 구조체를 수직형 산화아연 나노선 구조체라 표현할 수 있으며, 방사형(radial shape)으로 성장되어 있는 구조를 가질 경우 방사형 산화아연 나노선 구조체라 표현할 수 있다. 본 발명의 실시예 1에서는 수직형 산화아연 나노선 구조체를 VFW로 방사형 산화아연 나노선 구조체를 FNW로 표현하였다. 또한, 실시예 2에서는 PLLA-ZnO로 표현하였다. 또한, 산화아연 나노선 복합체의 경우 상기 산화아연 나노선 구조체에 결합된 화합물의 종류에 따라 화합물이 결합된(또는 코팅된) 산화아연 나노선 구조체 또는 산화아연 나노선 구조체/화합물로 표현할 수 있다.
- [0030] 본 발명에 따른 산화아연 나노선 복합체는 산화아연 나노선 구조체를 통해 단백질 등의 약물을 생체 내 또는 세포 내로 전달하는 역할을 수행하며, 또한 산화아연 나노선의 본연의 특성으로 인해 광학 이미지를 가능하게 한다.
- [0031] 산화아연 나노선 구조체에서 산화아연 나노입자 코어의 평균직경은 특별히 제한되지 않으며, 1 nm 내지 1 μ m, 1 내지 100 nm 또는 1 내지 50 nm일 수 있다. 상기 평균입경 범위에서 목적하는 산화아연 나노선 복합체를 제조할 수 있으며, 산화아연 나노선의 성장이 가능하다.
- [0032] 상기 산화아연 나노입자 코어에는 산화아연 나노선이 형성된다. 구체적으로, 하나의 산화아연 나노입자 코어에는 복수의 산화아연 나노선이 형성된다. 복수의 나노선을 나노선 다발이라 표현할 수 있다. 본 발명의 구조체는 나노선이 수직 방향으로 성장된 구조를 가질 수 있다. 또한, 방사형 구조, 즉 평면에 대한 수직방향에서부터 평면방향으로 기울어져 형성되어 있는 나노선 다발의 구조를 가지는 산화아연 나노선 복합체를 제공하여 약물의 전달 효율을 향상시킬 수 있다.
- [0033] 하나의 산화아연 나노선의 길이는 5 nm 내지 50 μ m, 또는 500 내지 2500 nm일 수 있으며, 직경은 5 nm 내지 500 nm, 또는 100 내지 200 nm일 수 있다. 이때, 길이는 코어에서 나노선이 성장하는 방향에서의 길이를 의미하며, 직경은 상기 성장하는 방향과 수직하는 방향에서의 길이를 의미한다. 또한, 산화아연 나노선의 단면, 구체적으로 성장하는 방향과 수직의 방향의 단면의 모양은 특별히 제한되지 않으며, 원형 또는 다각형의 모양을 가질 수 있다.
- [0034] 본 발명에서 산화아연 나노선 구조체는 지지체 상에 형성될 수 있다. 이때, 상기 지지체는 산화아연 나노선 구조체의 코어와 접촉된다.
- [0035] 상기 코어가 지지체에 접촉하는 경우, 나노선은 지지체가 존재하지 않는 공간에 형성될 수 있으며, 또한 지지체의 종류에 따라 나노선이 지지체 내부를 파고들어 형성될 수도 있다.

- [0036] 이러한 지지체의 종류는 산화아연 나노입자 코어가 접촉할 수 있다면 특별히 제한되지 않으며, 무기(inorganic) 또는 유기(organic) 형태의 유리 기관, 실리콘 기관, 고분자 기관 또는 무기(inorganic) 또는 유기(organic) 형태의 섬유(파이버, fiber)일 수 있다.
- [0037] 상기 섬유는 폴리락틱산(poly lactic acid, PLA), 폴리락틱글리콜산(poly lactic glycol acid, PLGA), 폴리하이드록시 부티레이트(PHB), 폴리우레탄(PU) 및 폴리카보네이트(PC)로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다. 본 발명의 실시예에서는 지지체로 유리기관(glass coverslip), PLA를 사용하였다. 상기 지지체의 형상은 특별히 제한되지 않으며, 필름, 원기둥 등의 형상을 가질 수 있다.
- [0038] 본 발명에 따른 산화아연 나노선 복합체는 상기 산화아연 나노선 구조체의 나노선에 산화아연 특이결합 단백질이 결합된 구조를 가진다. 상기 산화아연 특이결합 단백질은 산화아연 나노선에 비공유결합을 통해 결합될 수 있다.
- [0039] 상기 산화아연 특이결합 단백질은 산화아연 특이결합 펩타이드 서열일 수 있다. 본 발명에서는 산화아연과 결합될 수 있는 펩타이드 서열을 제한없이 사용할 수 있다.
- [0040] 상기 산화아연 특이결합 펩타이드 서열의 C-말단 또는 N-말단에는 화학적 또는 유전공학적으로 융합(fusion) 또는 접합(conjugation)된 유기물 또는 무기물이 결합될 수 있다. 또한, C-말단 또는 N-말단, 구체적으로 C-말단에는 플루오레세인 이소티오시아네이트(Fluorescein isothiocyanate, FITC)가 결합될 수 있다. 상기 FITC를 결합시키는 경우 형광 강도 측정을 통한 펩타이드의 정량이 가능하다.
- [0041] 본 발명에 따른 산화아연 나노선 복합체에는 약물이 추가로 도입될 수 있다. 이러한 약물은 생체분자이거나, 또는 구체적으로 단백질, DNA, RNA, 의약 화합물, 조영 물질 및 항원으로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다.
- [0042] 본 발명에 따른 산화아연 나노선 복합체는 다양한 용도로 사용될 수 있으며, 예를 들어, 약물 전달용 조성물, 조영제 조성물 또는 백신 조성물 등으로 사용될 수 있다.
- [0043] 일 구체예에서, 본 발명은 산화아연 나노선 복합체를 약물전달체로 포함하는 약물 전달용 조성물을 제공한다. 본 발명의 복합체는 단백질, DNA, RNA, 세포, 의약 화합물, 조영 물질 등의 약물과 결합하여 이들 약물을 생체 내 또는 세포 내로 전달해 주는 약물전달체로서 기능할 수 있다. 이러한 약물은 상기 복합체와 물리적 또는 화학적으로 결합될 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 복합체와 결합되는 약물 외에도 추가의 약물을 더 포함할 수 있으며, 제제화를 위해 일반적으로 이용되는 여러가지 부형제를 포함할 수 있다.
- [0044] 일 구체예에서, 본 발명은 산화아연 나노선 복합체에 항원이 결합된 백신 조성물을 제공한다. 산화아연 특이결합 펩타이드는 항원이 산화아연 나노선에 결합하는 것을 가능하게 하여 산화아연 나노선을 약물전달체로하여 항원을 생체 내 또는 세포 내로 도입하는 것을 용이하게 해 준다. 생체 내 또는 세포 내로 도입된 항원은 상기 항원에 대한 세포성 또는 체액성 면역반응을 야기하여 인체의 면역 시스템을 통해 상기 항원에 의해 매개되는 질환을 치료 또는 예방하게 된다. 이러한 항원의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 인위적으로 면역반응을 일으켜 질병을 예방 또는 치료하기 위해 사용되는 항원이라면 어떠한 것이든 본 발명의 백신 조성물의 제조를 위해 사용할 수 있다. 일 예로, 상기 항원은 종양 항원일 수 있으며, 이 경우 이러한 백신 조성물은 암의 치료 또는 예방을 위해 사용될 수 있다. 다른 예로, 약물로 ScaA 항원을 사용할 경우, 우수한 효능을 갖는 찌찌가무시 백신 조성물을 제공할 수 있으며, 본 발명의 실시예 2에서는 CEA 항원을 사용하여 종양 억제용 백신 조성물을 제공할 수 있다.
- [0045] 또한, 일 구체예에서, 본 발명은 산화아연 나노선 복합체를 포함하는 조영제를 제공한다. 산화아연 나노선 복합체는 산화아연 나노선 그 자체로 광학적 조영이 가능한 특성을 갖고 있기 때문에 조영제(imaging agent)로서 작용할 수 있다.
- [0046] 예를 들어, 산화아연 나노선 복합체에는 표적 지향성 리간드가 결합되어 있을 수 있다. 이 경우 조영제의 표적 지향성이 향상되게 된다. 다른 예로, 산화아연 특이결합 단백질은 항원이 추가로 결합될 수 있다. 산화아연 특이결합 단백질에 항원 결합될 경우 상기 항원을 발현하는 표적세포에 본 발명의 복합체가 도입되어 면역반응을 유도할 수 있을 뿐만 아니라 복합체가 갖고 있는 조영 효과로 인해 표적세포의 조영이 가능해지게 된다. 이러한 항원의 종류는 특별히 제한되지 않는다. 구체예에서, 상기 항원은 종양 항원일 수 있으며, 이 경우 상기 조영제는 암의 면역 치료와 동시에 조영을 가능하게 한다.

- [0048] 또한, 본 발명은 전술한 산화아연 나노선 복합체의 제조 방법에 관한 것이다.
- [0049] 상기 산화아연 나노선 복합체의 제조 방법은 산화아연 나노입자 코어에 상기 코어를 중심으로 산화아연 나노선을 수직형(vertical shape) 또는 방사형(radial shape)으로 성장시켜 산화아연 나노선 구조체를 제조하는 단계; 및
- [0050] 상기 성장된 산화아연 나노선의 말단에 산화아연 특이결합 단백질을 결합시키는 단계를 포함한다.
- [0051] 본 발명에서 산화아연 나노선 구조체를 제조하는 단계는 (a) 지지체 상에 산화아연 나노입자 코어를 형성하는 단계; 및
- [0052] (b) 상기 지지체 상에 형성된 산화아연 나노입자 코어를 중심으로 산화아연 나노선을 수직형(vertical shape) 또는 방사형(radial shape)으로 성장시키는 단계를 포함할 수 있다.
- [0053] 산화아연 나노입자는 당업계의 일반적인 제조 방법에 따라 제조할 수 있다.
- [0054] 상기 단계 (a)는 지지체의 종류에 따라 제조 방법이 달라질 수 있다.
- [0055] 예를 들어, 지지체로 유리기판을 사용하는 경우 상기 단계 (a)에서는 산화아연 나노입자를 포함하는 용액을 지지체에 적하(drop)한 후 건조시켜 산화아연 나노선 구조체를 제조할 수 있다.
- [0056] 또한, 지지체로 섬유를 사용하는 경우 상기 단계 (a)에서는 산화아연 나노입자 및 고분자를 포함하는 용액을 전기방사(electrospinning)하여 산화아연 나노선 구조체를 제조할 수 있다. 상기 고분자로는 전술한 섬유를 사용할 수 있다. 이때, 전기방사는 당업계의 일반적인 방법에 따라 수행할 수 있으며, 상기 전기방사에 의해 지지체의 내부 및/또는 표면에 산화아연 나노입자가 형성된다.
- [0057] 상기 단계 (a)에서 산화아연 나노입자를 포함하는 용액 또는 산화아연 나노입자 및 생분해성 고분자를 포함하는 용액의 용매는 에탄올, 메탄올, DMF(dimethylformamide) 또는 THF(tetrahydrofuran)일 수 있다.
- [0058] 또한, 단계 (b)의 산화아연 나노선을 수직형 또는 방사형으로 성장시키는 단계에서는, 단계 (a)에서 제조된 산화아연 나노입자 코어가 형성된 지지체를 아연 전구체 용액에 담지시키고 70 내지 100℃ 또는 90 내지 95℃에서 반응시켜 제조할 수 있다.
- [0059] 상기 산화아연 나노선은 수열합성법(hydrothermal synthesis)을 통해 형성될 수 있으며, 지지체에서 노출된 나노입자 코어에서 복수의 나노선이 성장되어 나노선 구조체가 형성될 수 있다.
- [0060] 상기 아연 전구체는 아연 이온을 공급해줄 수 있는 화합물이면 특별히 제한되지 않으며, 질산 아연 6수화물(zinc nitrate hexahydrate)을 사용할 수 있다. 상기 아연 전구체 용액은 폴리에틸렌이민(PEI) 및 염화 암모늄(NH₄Cl)을 추가로 포함할 수 있다. PEI 및 염화 암모늄은 산화아연 나노선의 길이를 증가시키고 직경을 줄이기 위해 사용할 수 있다.
- [0061] 본 발명에서 산화아연 나노선의 말단에 산화아연 특이결합 단백질의 결합은 당업계의 일반적인 방법에 따라 수행할 수 있다.
- [0062] 일 구체예에서, 산화아연 특이결합 단백질은 산화아연에 대한 친화성으로 인해 상기 단백질과 산화아연 나노선 구조체를 단순히 배양하는 것만으로 간단히 복합체를 형성할 수 있다.
- [0063] 본 발명에 따른 제조 방법은 산화아연 특이결합 단백질에 약물을 결합시키는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 상기 단계 역시 당업계의 일반적인 방법에 따라 수행할 수 있다.
- [0065] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.
- [0067] 실시예 1. 유리기판(glass coverslip) 상에 형성된 ZnO 나노선 구조체를 이용한 생체분자 전달

- [0068] **제조예 1-1-1. 방사형 ZnO 나노선 구조체 제조**
- [0069] **(1) ZnO 나노입자 합성**
- [0070] 50 mM의 $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 및 12 mM 세틸트리메틸암모늄 브로마이드 (CTAB)가 들어있는 에탄올 용액과 0.1 M NaOH가 들어있는 에탄올 용액을 동일 부피로 혼합하여 혼합 용액을 제조하고, 50℃에서 2 시간 동안 반응시켰다.
- [0071] 혼합 용액에 합성된 산화아연 나노입자를 초음파처리기에서 1 시간 동안 교반시킨 후, 원심분리기로 세척작업을 수회 진행하여 부산물들을 제거하고, 산화아연 나노입자를 제조하였다.
- [0072] 상기 제조된 산화아연 나노입자를 에탄올에 분산시켰다.
- [0074] **(2) 방사형 ZnO 나노선 구조체 제조**
- [0075] (1)에서 제조된 약 7 nm의 입경을 가지는 ZnO 나노입자를 에탄올에 첨가하여 농도를 0.01 내지 1 mg/ml로 맞추고, 세척된 유리기판(glass coverslip) 위에 떨어뜨린 후 대기 중 또는 진공 조건에서 건조하여 에탄올을 증발시켰다.
- [0076] 10 mM 질산 아연 6수화물(zinc nitrate hexahydrate, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 10 mM 헥사메틸렌테트라민(HMTA, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_4$), 2 mM 폴리에틸렌이민(PEI), 6 mM 염화 암모늄(NH_4Cl)을 초순수에 용해시킨 후 혼합하였다. 상기 혼합 용액을 90 내지 95℃까지 가열시킨 후, 준비된 ZnO 나노입자가 증착된 유리기판을 상기 혼합용액 속에 담갔다.
- [0077] 2 시간 반응시킨 후 가열을 멈추고 유리기판을 빼낸 후에 초순수를 이용하여 부산물들을 세척하였다.
- [0079] **제조예 1-2-1. 수직형 ZnO 나노선 구조체 제조**
- [0080] 유리기판 위에 DC 마그네트론 스퍼터링 시스템을 이용하여 산화아연(ZnO)을 100 nm 두께로 부착하였다.
- [0081] 10 mM 질산 아연 6수화물(zinc nitrate hexahydrate, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 10 mM 헥사메틸렌테트라민(HMTA, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_4$), 2 mM 폴리에틸렌이민(PEI), 6 mM 염화 암모늄(NH_4Cl)을 초순수에 용해시킨 후 혼합하였다. 상기 혼합용액을 90 내지 95℃까지 가열시킨 후, 준비된 ZnO 나노입자가 부착된 유리기판을 상기 혼합용액 속에 담갔다.
- [0082] 2 시간 반응시킨 후 가열을 멈추고 유리기판을 빼낸 후에 초순수를 이용하여 부산물들을 세척하였다.
- [0084] **제조예 1-1-2. 방사형 ZnO 나노선 구조체에 ZBP-FITC 결합(나노선 표면에 단백질 표면 개질)**
- [0085] 산화아연에 특이적으로 강하게 결합하고 RPHRKGGDARPHRKGGDARPHRKGGDA 서열을 가지는 단백질(이하, ZBP)의 카르복실기 말단에 플루오레신 이소티오시아네이트(FITC, fluorescein isothiocyanate, Peptron, Korea)를 결합시킨 후, 제조예 1-1-1에서 제조된 ZnO 나노선 구조체와 37℃의 초순수에서 1시간 동안 교반시켰다.
- [0086] ZBP-FITC로 코팅된 ZnO 나노선 구조체를 PBS를 이용하여 3회 세척하여 결합하지 않은 남은 부산물을 제거하였다.
- [0087] ZBP-FITC의 상대적인 결합은 Infinite[®] M200 PRO(Taken, Switzerland)를 사용하여 형광 강도(fluorescence intensity)를 측정하여 평가하거나 세포 배양에 사용하였다.
- [0089] **제조예 1-2-2. 수직형 ZnO 나노선 구조체에 ZBP-FITC 결합**
- [0090] 방사형 ZnO 나노선 구조체 대신 수직형 ZnO 나노선 구조체를 사용한 것을 제외하고는 제조예 1-1-2와 동일한 방법으로 ZBP-FITC로 코팅된 ZnO 나노선 구조체를 제조하였다.
- [0092] **제조예 1-1-3. 방사형 ZnO 나노선 구조체에 ZBP-스트렙타아비딘 결합(나노선 표면에 유전자 수식)**

- [0093] GFP 발현 카세트(GFP expression cassette)를 코딩하는 리포터 DNA를 PCR 프라이머 세트(forward primer: 5'-biotinylated atagtaatcaattacggggtcattag-3', reverse primer: 5'-tgaaaaaatgctttattgtgaaatt-3') 및 pEGFP-N1 벡터(Clontech)를 주형으로 사용하여 증폭시켰다.
- [0094] ZnO 나노선 구조체 및 비오틴화(biotinylated) DNA 복합체(complex)를 제조하기 위하여, 제조합 ZBP-스트렙타아비딘 단백질(recombinant ZBP-streptavidin protein)을 생산하였다. 먼저 스트렙타아비딘을 인코딩하는 DNA를 프라이머 세트(forward primer: 5'-gaattcagctgaagctggtatcacc-3', reverse primer: 5'-ctcgaggtgatgggaagcagcgga-3', EcoRI, and XhoI sites underlined) 및 pET21a-Streptavidin-Alive plasmid17(Addgene)을 주형으로 사용하여 증폭시켰다. 스트렙타아비딘을 인코딩하는 DNA를 DNA 제한(DNA restriction)한 후 ZBP-인코딩 서열(5'-cgcccgcatcgcaaaggcggcgatgcgcgccgcatcgcaaaggcggcgatgcgcg-3')을 함유하는 pET28a 벡터에 연결시켰다. ZBP- 스트렙타아비딘 단백질(pET28a/ZBP-스트렙타아비딘)을 인코딩하는 제조합 플라스미드를 E.coli BL21(DE3) 균주(RBC biosciences, Taiwan)에 도입 하였다. ZBP-스트렙타아비딘 단백질은 0.1 mM 이소프로필 β-D-티오갈락토시드(IPTG; Duchefa Biochemie, Netherlands)를 16℃에서 16시간 동안 사용하여 제조합 E. coli에서 유도하고 Ni-NTA 수지(Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 정제하였다.
- [0095] 제조예 1-1에서 제조된 나노선 구조체를 37℃에서 지시된 시간 동안 ZBP-스트렙타아비딘 제조합 단백질 300 μg 과 함께 배양하였다. 상등액 중 결합되지 않은 단백질의 양을 BCA 단백질 분석 키트(Sigma-Aldrich)로 측정하였다. 결합된 단백질의 양은 적용된 단백질의 총량으로부터 결합되지 않은 단백질의 양을 차감하여 결정하였다.
- [0097] **제조예 1-2-3. 수직형 ZnO 나노선 구조체에 ZBP-스트렙타아비딘 결합**
- [0098] 방사형 ZnO 나노선 구조체 대신 수직형 ZnO 나노선 구조체를 사용한 것을 제외하고는 제조예 1-1-3와 동일한 방법으로 ZBP-스트렙타아비딘을 결합시켰다.
- [0100] 이하, 도면에서는 제조예 1-1에서 제조된 방사형 ZnO 나노선 구조체를 FNW로, 제조예 1-2에서 제조된 수직형 ZnO 나노선 구조체를 VNW로 표현하였다.
- [0102] **실험예 1-1. 세포 생존 및 독성 분석**
- [0103] **(1) 방법**
- [0104] 인간 배아 신장(HEK, Human embryonic kidney) 293 세포를 37℃ 및 5% CO₂의 존재하에서 10 % heat-inactivated fetal bovine serum(FBS) (Welgene), 100 U ml⁻¹ 페니실린 및 100 μg/ml 스트렙토마이신(Gibco BRL)이 보충된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) (Welgene, Korea)에 유지하였다. ZnO 나노선으로 코팅된 유리기판에서 성장한 HEK293 세포의 생존력을 트립판 블루 스테이닝(trypan blue staining) 및 세포 사멸 분석(apoptosis assay)으로 96시간까지 조사하였다. 트립신 처리법(trypsinization)으로 유리기판에서 세포를 수집하고, 살아있는 세포를 트립판 블루 스테이닝 후 계수하였다.
- [0105] 세포 사멸(Cellular apoptosis)과 괴사(necrosis)는 유세포 분석기(flow cytometer) (LSR II, BD Biosciences)를 사용하여 annexin V-Alexa Fluor 568(eBioscience)과 7-aminoactinomycin D(7-AAD, Thermo Fisher Scientific)로 스테이닝한 후 평가하였다.
- [0107] **(2) 결과**
- [0108] 제조예 1-1 및 제조예 1-2에서 제조된 ZnO 나노선 구조체의 세포 독성을 평가하기 위하여, HEK293 세포를 수직형 또는 방사형 나노선 구조체에서 성장시키고 살아있는 세포수를 일반 유리기판에서 성장시킨 세포 수와 비교하여 그 결과를 도 4에 나타내었다.
- [0109] 살아있는 세포 수는 유도기(lag phase)인 12 시간 후 모든 배양물에서 서서히 증가하였다. HEK293 세포는 일반 유리기판보다 약간 낮은 성장률임에도 불구하고 수직형 또는 방사형 나노선으로 코팅된 유리기판에 복제할 수

있음을 확인하였다(도 4A).

- [0110] 유도기(lag phase)동안 잠재적인 독성을 평가하기 위하여, 세포 괴사(cellular necrosis)와 사멸(apoptosis)을 조사하였다(도 4B 및 C). 아포프토시스 세포 사멸(apoptotic cell death)은 수직형 또는 방사형 나노선 구조체에서 배양 후 1 시간 내에 조기 발견되어 ZnO 나노선과의 직접 접촉시 세포 사멸이 빠르게 유도된다고 판단되었다. 세포 사멸은 배양 후 6 시간까지 점진적으로 증가하고 이후 감소하였다. 일반 유리기관에 접촉된 세포에서도 사멸 유도가 관찰되었지만, 수직형 또는 방사형 나노선과 관계없이 ZnO 나노선 구조체 자체는 일반 유리기관 표면보다 세포 아포프토시스 세포 사멸을 유의하게 향상시켰다. 방사형 나노선 구조체에서의 세포는 수직형 나노선 구조체(~ 26%) 또는 일반 유리기관(~ 30%)의 세포와 비교했을 때, 초기 노출(~ 3 시간) 동안 세포 사멸의 비율이 상대적으로 높았다(~ 40%). 후기 사멸 세포는 모든 실험 세트(experiment sets)에서 배양 6 시간 후 7-아미노엑틴마이신 D(7-AAD) 및 아넥신 V이 모두 양성이었다. 수직형 및 방사형 나노선 구조체에서 배양된 세포는 나노선이 없는 유리기관(~ 14%)의 세포보다 후기 사멸 표현형(late apoptotic phenotype)이 유의하게 더 높은 비율(33-35%)을 보였다. 흥미롭게도, 괴사 세포는 배양 후 3 시간까지 거의 검출되지 않았지만, 배양 6 시간 후 모든 실험 세트에서 일시적으로 3-6%의 세포 피크를 나타내었다. 이는 아넥신 V 염색이 없는 7-AAD의 막 침투(membrane penetration)에 의해 측정된 직접 괴사 손상이 세포 사멸을 일으키는 것을 나타낸다.
- [0111] 괴사 표현형(necrotic phenotypes)은 일반 유리기관도 같은 시간 키네틱(time kinetics)과 유사한 괴사의 정도를 유발하기 때문에, ZnO 나노선 구조체가 특별하지 않을 수 있다. 또한 세포가 활발하게 성장할 때 24 시간 및 48 시간 사이에 세포 괴사가 2 차적으로 증가하여, 물리적 손상이 세포의 작은 부분(small fraction) (<10%)에서 세포 괴사를 유발한다는 사실도 주목할 만하다. 다시 말하면, 일반 유리기관도 유사한 시간 키네틱(time kinetics)과 유사한 괴사의 정도를 유발하기 때문에, 괴사의 작은 비율은 ZnO 나노선 구조체와는 무관한 것으로 판단된다. 세포 사멸이 기하 급수적인(exponential) 성장 단계에서 점진적으로 감소하는 것을 고려하면, 괴사 표현형의 두번째 상승은 세포 막의 물리적 손상을 반영하는 반면, 세포는 유도기 이후의 새로운 배양 환경에서 빠르게 성장하기 시작한다.
- [0112] 종합하면, 세포 사멸의 정도는 괴사가 아니지만, 배양 초기 단계에서 일반 유리기관보다 ZnO 나노선이 형성된 유리기관에 배양된 세포에서 더 높게 나타났다. 세포 사멸은 ZnO 나노선 구조체의 배양 초기 단계(~ 6 시간) 동안 빠르게 유도되고 점차적으로 감소하기 때문에, 세포 적응(cellular adaptation)은 ZnO 나노선 접촉에 의해 나타나는 사멸 스트레스를 극복하는 데 잠재적으로 도움이 되며, 세포는 외부 기질(the foreign substrate)에 복제를 시작한다.
- [0114] **실험예 1-2. 전자 현미경(Electron microscopy) 분석**
- [0115] **(1) 방법**
- [0116] 나노선 구조체의 형태 및 구조는 전계방사형 주사전자 현미경(FE-SEM, field emission scanning electron microscope, S-4300, 히타치, 일본), 투과전자 현미경(TEM, transmission electron microscope, JEM-2100F, JEOL) 및 고해상도 투과전자 현미경(HRTEM, high-resolution transmission electron microscopy) 및 X-선 회절(XRD, D / MAX-2500 V / PC, Rigaku, Japan)을 사용하여 측정하였다. 나노선 상에 성장된 세포는 SEM으로 측정하였다.
- [0117] 인산-완충 식염수(PBS)로 세척한 후, 글루타르알데하이드(glutaraldehyde) 및 소듐 카코딜레이트(sodium cacodylate) 용액(Karnovsky Fixate)으로 2 시간 동안 세포를 고정하였다.
- [0118] 샘플을 0.1M 소듐 카코딜레이트 중의 1% 사산화오스뮴(osmium tetroxide) 용액으로 2 시간 동안 행구고, 점차 증가하는 에탄올의 농도로 연속적으로 탈수하며, 헥사메틸다이실라잔(hexamethyldisilazane)으로 임계점까지 건조시킨 다음, 백금/팔라듐 막으로 스퍼터-코팅을 하였다.
- [0119] 주사전자 현미경(Hitachi S4700, Hitachi, Japan)을 사용하여 15kV 가속 전압(accelerating voltage)으로 샘플을 검사하였다.
- [0121] **(2) 결과**
- [0122] 제조예 1-1 및 제조예 1-2에서 각각 제조된 방사형 나노선 구조체 및 수직 나노선 구조체의 형태학적 특징을 도

3A-D에 나타내었다. ZnO 나노선의 직경은 100 내지 200 nm이며, 길이는 0.5 내지 2.5 μm 였다.

[0123] 수직형 및 방사형 나노선 구조체의 X선 회절(XRD) 패턴은 육각형 부르자이트 구조(hexagonal wurtzite structure)를 가지는 ZnO의 피크 특성을 확인할 수 있다(도 8). 수직형 및 방사형 나노선 구조체의 미세구조적 특징은 도 3E-G에 나타내었다. 개별 ZnO 나노선의 제한시야 전자 회절(SAED, selected area electron diffraction) 패턴은 명확한 반점을 나타내고, 나노선이 단결정 부르자이트(wurtzite) 구조를 가지는 것을 확인하였다(도 3F).

[0124] 스폿은 (1010) 및 (0002) 평면으로 인덱싱할 수 있는데, 여기서 d 간격은 (1010) 평면 ($d_{(1010)}$)에 대해 0.161nm 디고, (0002) 평면 ($d_{(0002)}$)에 대해 0.257 nm이다. 또한, SAED 패턴은 ZnO 나노선이 [0002] 방향을 따라 합성되었음을 나타낸다.

[0125] 도 3G의 고해상도 투과전자 현미경(HRTEM) 이미지에서의 격자 프린지(lattice fringes)는 구분되며, HRTEM의 프린지 간격으로부터 측정된 (0002) 평면의 d 간격 ($d_{(0002)}$)은 0.252 nm이다. 이러한 결과는 XRD 및 SAED 각각으로부터 유도된 0.260 nm 및 0.257 nm의 $d_{(0002)}$ 와 잘 매치된다.

[0127] 실험예 1-3. 공초점 현미경(Confocal microscopy) 및 유세포 분석(flow cytometry)

[0128] (1) 방법

[0129] 제조예 1-1 및 제조예 1-2에서 제조된 방사형 나노선 구조체를 100 μM ZBP-FITC와 37°C에서 1 시간 동안 배양하고, 결합하지 않은 펩타이드를 제거하기 위해 PBS를 이용하여 3회 세척하였다. 이어서, HEK293 세포를 씨딩하고 지시된 시간 동안 37°C에서 배양하였다.

[0130] 세포를 실온에서 20분 동안 4% 파라포름알데히드에 고정시키고, PBS 내의 0.2% Triton X100(Sigma-Aldrich)을 사용하여 15 분동안 투과화하였다(permeabilized). 세포핵(Cellular nuclei) 및 액틴 세포 골격(actin cytoskeletons)은 각각 TO-PRO-3(Molecular Probes) 및 Alexa Fluor594-Phalloidin conjugate(Molecular Probes)로 염색하였다. 염색된 세포를 PBS로 3회 세척하고 Olympus FV1000 레이저 공초점 현미경(Olympus, Japan)을 이용하여 관찰하고 Fluoview software(Olympus)를 이용하여 분석하였다.

[0131] ZBP-FITC 또는 GFP 발현(expression)의 세포 흡수(cellular uptake)는 유세포 분석기(LSR II, BD Biosciences)를 이용하여 유리기판으로부터 세포를 수집한 후 조사하였다.

[0133] (2) 결과

[0134] 수직형 또는 방사형 나노선 구조체에서 성장한 세포를 도 5에 나타내었다.

[0135] 주사전자 현미경 결과는 배양 24 시간 후 제조예의 나노선에서 제조된 세포의 표면 형태가 일반 유리기판에서 성장한 세포의 표면 형태와 유사 함을 나타낸다(도 5A). 배양 48 시간 후, 수직형 또는 방사형 나노선 구조체 상의 세포는 일반 유리기판에 있는 세포만큼 효율적으로 복제할 수 있으며, 전체 표면 영역을 점진적으로 덮을 수 있다(도 5B). 그러나, 세포 액틴 및 핵이 염색되었을 때, 방사형 나노선 구조체에서 성장한 세포는 일반 유리기판 및 수직형 나노선 구조체에서 성장한 세포와 비교하여 액틴 세포골격 및 핵의 뚜렷한 배열과 형태를 나타내었다(그림 3B와 C).

[0136] 변형된 핵은 여러 개의 방사형 나노선 클러스터(clusters)를 커버하는 세포에서 종종 발견되었다. 액틴 세포골격은 방사형 나노선 클러스터를 둘러싸고 접촉 가장자리에서 라멜리포뎀(lamellipodia)을 형성한다(도 5C). 세포 및 나노선 사이의 접촉 영역에서의 구조를 보다 자세하게 관찰하기 위하여, FITC.2와 결합된 ZnO-결합 펩타이드(ZBP)를 사용 하였다. 1 시간 동안 배양한 후 수직형 또는 방사형 나노선 구조체에 대한 ZBP-FITC의 결합을 ZBP-FITC의 적정 농도에서 측정하고, ZBP-FITC의 결합을 형광 강도 및 형광 현미경으로 측정 하였다(도 9). 이어서, 세포를 ZBP-FITC로 코팅된 수직형 또는 방사형 나노선 구조체에서 24 시간 동안 배양하고, 공초점 현미경으로 관찰 하였다. 공초점 스캐닝 이미지의 3D reconstitution은 방사형 나노선에서 성장한 세포 구조의 총 조 직이 일반 유리기판에서 성장한 세포와 유사한 반면, 수직형 나노선은 접촉 가장자리에서 액틴 세포골격과 라멜 리포뎀(lamellipodia)을 형성하는 것을 보여준다. 방사형 나노선 구조체에서 성장한 세포의 핵 변형이 주로 나 노선 클러스터의 공간적 제약에 기인한다는 것도 주목할 만하다.

- [0138] ZBP-FITC로 코팅된 나노선 구조체 세포 표면의 밀접한 접촉을 관찰하였다. 이에 따라, ZnO 나노선 구조체에 코팅된 펩타이드의 세포 내 전달을 평가하였다.
- [0139] 도 6A 및 B에 나타난 바와 같이, ZBP-FITC로 코팅된 나노선 구조체에서 37℃에서 30 분 동안 배양한 후 수집된 모든 살아있는 세포는 FITC 신호에 양성하였고, 형광 강도(fluorescence intensities)는 신호 강도의 약간의 변동에도 불구하고 포화되었다. 이러한 결과는 나노선에 코팅된 펩타이드 분자가 효율적이고 신속하게 세포 내로 전달됨을 나타낸다. 펩타이드의 빠른 포화는 또한 세포가 세포 접촉 후 ZnO 나노선 구조체의 팁에 코팅된 펩타이드 분자를 잠재적으로 흡수한다는 것으로 생각된다. 이전에는, 직경이 300 nm 이하이고 1 μ m 간격으로 배열된 SiO₂ 나노 필터에서 세포막은 세포를 천공하는 나노필터 없이 나노필터의 전체를 감싸는 것으로 나타났다. 다른 한편으로, 세포는 크고, 밀접하게 간격을 둔 나노필터의 배열 위에 있다. 본 발명의 ZnO 나노선 구조체는 나노선이 200 nm 미만의 직경을 가지지만, 밀도가 높기 때문에, 세포는 수직형 나노선에 있거나 라멜리포뎀(lamellipodia) 형성을 통해 방사형 나노선의 개별 클러스터를 감싼다. 따라서, 세포막은 주로 ZnO 나노선의 팁(tips)에 접촉하고(도 5D), 나노선의 팁을 코팅하는 펩타이드를 빠르게 흡수할 수 있다.
- [0140] 펩타이드 전달에 관여하는 세포 기작을 연구하기 위하여, 펩타이드로 코팅된 나노선 구조체를 4℃에서 30 분 동안 세포와 함께 배양하고, FITC-표지 펩타이드의 세포 흡수를 유세포 분석기로 측정 하였다.
- [0141] 도 6C에서 볼 수 있듯이, 세포가 수직형 및 방사형 나노선 구조체와 4℃에서 배양될 때, 펩타이드의 세포 내 전달은 현저하게 감소되고, 이는 엔도사이토시스(endocytosis)와 같은 활성 세포 과정이 나노선 상의 펩타이드의 세포 내 섭취(intracellular uptake)에 중요한 역할을 할 수 있음을 나타낸다. 그럼에도 불구하고, FITC 신호에 대해서는 세포의 일정 부분이 여전히 양성이어서, 세포 내로 펩타이드가 직접 침투할 수 있음을 시사한다. 세포가 수직형 나노선 구조체(25%)보다 방사형 나노선 구조체(60%)에서 4℃에서 배양될 때, 더 효율적인 세포내 전달이 일관되게 관찰되었다(도 6C 및 D). 이러한 결과는 방사형 나노선 구조체가 초기 접촉 기간(early contact period) 동안 보다 효과적인 물리적 침투를 중재한다는 것을 나타낸다. 시간 프레임 동안 ZnO 나노선 구조체 모두에서 세포 피사가 없는 배양 초기 단계(~ 3시간) 동안 방사형 나노선 구조가 수직형 나노선 구조체 보다 세포 사멸을 더 유도한다는 것을 고려하면(도 4C), 불균일하게 분포된 방사형 나노선 구조체에 의해 가해진 물리적 압력은 더 세포 사멸 적이지만 세포막에 피사 손상을 일으키기에는 불충분하다. 또한, 방사형 나노선에 접촉 동안 인력에 의해 세포에 부과된 압력은 4℃에서 펩타이드의 더 나은 세포 내 접근을 허용할 수 있다(도 6C 및 D).
- [0143] **실험예 1-4. 전기영동 이동성 변화분석**
- [0144] **(1) 방법**
- [0145] ZBP-스트렙트아비딘 및 비오틴화 DNA(biotinylated DNA)의 복합체 형성을 확인하기 위하여, 전기영동 이동성 변화분석(electrophoretic mobility shift assay)을 수행하였다.
- [0146] 20 μ g의 비오틴화 DNA를 지시된 양의 ZBP-스트렙트아비딘과 실온에서 1 시간 동안 배양하였다. 생성된 ZBP-스트렙트아비딘/비오틴화-DNA 복합체를 1% 아가로오스 겔에 로딩하고, 브롬화 에티듐의 존재하에서 전기영동한 후 UV 광에서 가시화하였다.
- [0148] **실험예 1-5. ZnO 나노선 다발을 이용한 유전자 전달**
- [0149] **(1) 방법**
- [0150] 유리기판을 24-웰 세포 배양 플레이트에 옮기고, 70% 에탄올로 세척하고, UV하에서 1 시간 동안 멸균시켰다. GFP(20 μ g)를 인코딩한 비오틴화 DNA가 결합된 정제된 ZBP-스트렙트아비딘 단백질(80 μ g)을 유리기판을 포함하는 웰에 추가하고, 37℃에서 1 시간 동안 배양하였다.
- [0151] 결합되지 않은 복합체를 PBS로 세척하여 제거하고, HEK293 세포(5 x 10⁴ 세포/웰)를 플레이트하였다. 세포에서 GFP 발현은 공초점 현미경 및 유세포 분석법(flow cytometry)을 사용하여 분석하였다.

[0153] (2) 결과

[0154] 4℃에서 방사형 나노선 구조체에 결합된 펩타이드의 강력한 세포내 전달은 다른 생체 고분자인 DNA의 전달을 평가하도록 자극하였다. DNA 분자를 ZnO 나노선에 연결하기 위하여, 녹색 형광 단백질(GFP)의 발현 카세트를 인코딩하는 ZBP-fused streptavidin 및 비오틴화 DNA를 이용하였다(도 10). ZBP-스트렙타비딘과 비오틴화 DNA로 코팅된 방사형 나노선 구조체에 배양된 HEK293 세포의 프랙션(fraction)(~ 8%)은 배양 후 48 시간에 GFP를 발현하는 반면, GFP 발현은 방사형 나노선 구조체 단독 또는 방사형 나노선 구조체와 자유 비오틴화 DNA를 가지는 방사형 나노선 구조체를 배양한 세포에서는 간신히 관찰되었다(도 7). 방사형 나노선 복합체인 ZBP-스트렙타비딘 및 비오틴화 DNA를 배양한 세포에서 GFP의 발현은 전혀 검출되지 않았다. 이러한 결과는 방사형 나노선 구조체가 포유류 세포에서 DNA 분자의 세포내 전달 및 발현을 매개 할 수 있음을 나타내며, 간접적으로 DNA의 세포핵으로의 침투를 확인할 수 있다.

[0156] 이전에는, 탄성 세포막(elastic cell membrane) 침투의 두 가지 메커니즘이 제안되었다: 세포가 나노선의 층 상에 랜드(land)되는 "impaling penetration" 및 세포가 기질(substrate)에 퍼지면서 접착력을 발생시키는 "adhesion-mediated penetration".

[0157] 배양 초기 단계(~ 30분) 동안 4℃에서 수직형 또는 방사형 나노선 구조체에 관련 펩타이드의 세포내 전달의 효능의 차이는 짧은 배양 기간 동안 4℃에서 기질상의 세포 확산이 제한되기 때문에 침투 정도에 기인할 수 있다(도 6C 및 D). 세포막과 ZnO 나노선 복합체 사이의 접촉은 잠재적으로 나노선의 팁에서 시작하여 나노선이 기울어 지거나 수직인 경우 비대칭 탄성 변형(asymmetric elastic strain)이 이후 접촉에 영향을 줄 수 있다. 방사형 나노선 복합체에서 방사형의 또는 기울어진 나노선(angled nanowires)이 세포막과 비대칭으로 접촉하고, 이어서 비어있는 지지체(substrate)에 세포가 확산되면 세포막과 액틴 세포골격이 더 잘 침투 할 수 있다.

[0158] 일시적인 침투는 나노선 구조체에 세포를 씨당한 직후에 일어날 수 있고, 표면 장력에 의해 유도된 지질 이중층 드리프트(lipid bilayer drift)에 의해 계속된다. 방사형 나노선 복합체에 의한 원형질막(plasma membrane)의 강화된 완전 침투는 연관된 DNA의 검출 가능한 유전자 발현에 의해 뒷받침된다(도 7). 진핵 세포(eukaryotic cells)에서 발현되기 위해서는, 발현 카세트를 인코딩하는 DNA가 원형질막을 통과한 후 핵으로 전달되어야 한다. 리소좀(lysosomes)으로 전달된 흡수된 분자(endocytosed molecules)가 저하되므로, 전달된 DNA에서 GFP 발현은 세포의 분획(~ 8%)에서 방사형 나노선 구조체에 의해 핵으로 세포막의 직접 침투를 보여준다. 방사형 나노선에 의한 세포 침투는 초기 접촉 단계에서 세포-지지체(substrate) 접촉 장력에 의해 더욱 강화 될 수 있으며, 이는 세포막이 유리기관 상에 확산되어 방사형 나노선(접착 모델) 쪽으로 변형되게 한다. 거대한 DNA 분자의 세포내 전달을 매개하기에 충분한 원형질막의 완전한 침투는 초기 세포 확산 동안 "텐트-접착 메커니즘(tent-adhesion mechanism)"에 의해 ZnO 나노선의 위에서 일어날 수 있다. 장기간에 걸쳐 중공 나노선에 세포를 씨당한 후 30분 이내에 세포 침투가 빠르게 발생하고, 오랜 기간 안정기(plateau)가 나타나는 것으로 나타났다. 세포가 나노선을 흡수하면, 세포는 스트레스를 유발하지 않으므로 멤브레인 장애를 피할 수 있다.

[0160] 실시예 2. PLA 섬유 상에 형성된 방사형 ZnO 나노선 구조체를 이용한 생체분자 전달

[0161] 제조예 2-1. PLA 섬유 상에 형성된 방사형 ZnO 나노선 구조체 제조

[0162] (1) ZnO 나노입자 합성

[0163] PLA 중합체 및 ZnO 나노입자의 용액을 전기 방사 전에 제조하였다. 알칼리성 용액-기반의 방법으로 헥사데실트리메틸암모늄 브로마이드(Hexadecyltrimethylammonium bromide, CTAB)가 캡핑된(capped) 5 nm ZnO 나노입자를 합성하였다.

[0165] (2) 방사형 ZnO 나노선 구조체 제조

[0166] PLA(15 w/v%) 중합체를 자기 교반(magnetic stirring)하면서 수 시간 동안 클로로포름에 용해시켰다. 10 mg/ml ZnO 나노입자를 포함하는 에탄올 용액을 준비된 PLA 용액에 첨가하고 볼텍스 믹서(vortex mixer) 및 초음파로 혼합하였다. 혼합된 용액을 0.5 mm 직경의 21-게이지 금속 니들 팁이 장착된 10 mL 시린지(syringe)에 넣었다.

니들과 컬렉터(collector) 사이의 거리는 10 cm로 조절하였다. PLA 섬유-ZnO 나노입자 용액을 10 kV의 전압에서 전기 방사법(electrospinning)으로 수집하였다.

[0167] ZnO 나노선 구조체는 ZnO 결정이 PLA 섬유에 내장된 ZnO 나노입자로부터 성장되는 열수 방법(hydrothermal method)을 통해 합성되었다. 10 mM 질산 아연 6수화물(zinc nitrate hexahydrate, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 및 10 mM 헥사메틸렌테트라민(HMTA, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_4$)을 탈이온수에 용해시켜 PLA 섬유상에 ZnO선을 합성하였다.

[0168] 본 발명의 도면에서는 PLA를 PLLA로 표현하였다.

[0170] (3) 방사형 ZnO 나노선 구조체의 기계적 단편화(Mechanical fragmentation)

[0171] 구조체를 기계적으로 단편화하기 위하여, 10 mg PLA 또는 PLA-ZnO 막을 디메틸 설폭시드(DMSO)에 30 분동안 분산시키고, 18G, 23G 및 26G 바늘을 가지는 주사기를 사용하여 10 회 연속 통과시켰다. 단편화된 구조체를 포함하는 용액을 80% 수크로오스 용액에 넣고, ZnO 나노선 구조체를 밀도 구배 원심 분리(density gradient centrifugation) ($3,515 \times g$, 30분)로 PLA 섬유로부터 분리하였다. 하부 층에서 수집된 구조체를 수집하고, 70 μm 세포 스트레이너(cell strainer)(Sigma Aldrich)를 사용하여 추가로 여과하였다. 최종 단편화된 ZnO 나노선 구조체를 인산 완충 식염수(PBS)로 세척하였다.

[0172] 단편화된 복합체의 크기 분포를 현미경으로 수동 측정하였다. ZnO 나노선 구조체의 단편화 및 분리 절차는 도 17에 요약되어있다.

[0174] 제조예 2-2. ZBP 펩타이드의 결합 및 ZBP-CEA 항원

[0175] 산화아연에 특이적으로 강하게 결합하고 RPHRKGGDARPHRKGGDARPHRKGGDA 서열을 가지는 단백질의 카르복실기 말단에 플루오레신 이소티오시아네이트(FITC, fluorescein isothiocyanate, Pepton, Korea)를 결합시킨 후, 제조예 2-1에서 제조된 ZnO 나노선과 37°C의 초순수에서 1시간 동안 교반시켰다.

[0176] ZBP-FITC로 코팅된 ZnO 나노선을 PBS를 이용하여 3회 세척하여 결합하지 않은 남은 부산물을 제거하였다.

[0177] ZBP-FITC의 상대적인 결합은 Infinite[®] M200 PRO(Taken, Switzerland)를 사용하여 형광 강도(fluorescence intensity)를 측정하여 평가하거나 세포 배양에 사용하였다.

[0179] 또한, ZBP-CEA 결합 분석을 위하여, 정제된 3x ZBP-CEA 단백질을 ZnO 나노선 구조체와 실온에서 1 시간 동안 배양하였다. 나노선 구조체 상에 결합된 단백질을 원심 분리로 수집하고, SDS-PAGE 후 쿠마시 블루 염색(Coomassie blue staining)으로 정량화하였다.

[0181] 실험예 2-1. ZnO 나노선 구조체의 특성

[0182] (1) 방법

[0183] ZnO 나노입자(NP) 및 제조예 2-1에서 제조된 ZnO 나노선 구조체의 형태와 미세구조는 15 kV의 가속 전압(accelerating voltage)에서 주사 전자 현미경(SEM, scanning electron microscopy, Hitachi, SU 70)을 사용하여 분석하였다.

[0184] 샘플의 결정 구조 및 결정 크기는 Cu K α radiation($\lambda=1.5406 \text{ \AA}$)을 가지는 분말 X-선 회절(XRD, PANalytical, X'Pert ProMPD)을 측정하여 결정되었다. 측정은 45 kV 및 40 mA 튜브 파워(tube power)에서 30° 내지 60°의 2θ 지오메트리(geometry)에서 수행되었다.

[0186] (2) 결과

[0187] 제조예 2-1에서 제조된 ZnO 나노선 구조체의 특징을 도 11에 나타내었다.

[0188] 주사전자 현미경(SEM) 사진에서 볼 수 있듯이, ZnO 나노선이 PLA 섬유에서 일정하게 자라난다. PLA 섬유의 직경

은 평균 1.25 μm 이고, 2시간 동안 수열합성법(hydrothermal reaction)을 하면, ZnO 나노선이 섬유에서 자라나 직경 $122.5 \pm 4 \text{ nm}$, 길이 $1,375 \pm 247 \text{ nm}$ 가 된다. ZnO 나노선은 용액에 퍼져 있는 ZnO 나노입자나 여러 물질의 바깥에 코팅된 ZnO 나노입자에서 성장한다. 그러나, ZnO 나노입자의 씨앗층(Seed layer)이 PLA 섬유 안쪽에 있어도, 기존에 알려진 ZnO 나노선과 비슷한 형태로 자라난다는 것은 흥미로운 사실이다. Zn^{2+} 와 OH^- 같이, 수용액에 녹아 있는 ZnO 전구체는 수열합성법 동안 PLA 섬유 안으로 확산될 수 있다. PLA 섬유 내부의 ZnO 나노입자가 씨앗 역할로써 사용되는데, 그 표면에서 ZnO 결정이 핵이 생성되고 성장하면서 방사형의 ZnO 나노선이 합성 가능하다. 더욱이, ZnO 나노선이 PLA 섬유 전체에 골고루 합성되는 것을 확인했고, 이것은 대량생산이 가능하다는 것을 의미한다.

[0189] 합성물의 결정 구조를 분석하기 위하여 XRD 패턴을 측정하였다. 도 11B의 회절 피크는 31.8° , 34.4° , 36.3° , 47.5° , 62.8° , 67.7° 에서 나타나고 이것은 각각 조밀육방격자구조를 갖는 ZnO 나노선의 (100), (002), (101), (102), (110) 면에 해당한다. ZnO 나노선이 ZnO 나노입자(NP)에서 성장하면서 ZnO 나노선의 회절 피크가 뾰족해진다. 마우스에 주입하기 위한 형태로 만들기 위해서, ZnO 나노선 구조체를 18G, 23G, 26G 주사기를 사용하여 물리적으로 조각을 낸 뒤, 밀도 구배 원심분리를 통하여 조각을 분리하였다(도 17). 상기 조각난 구조체의 사이즈 범위는 직경 1 내지 70 μm 이며 평균은 약 15 μm 이다.

[0191] 실험예 2-2. 세포 생존 및 독성 분석

[0192] (1) 방법

[0193] 마우스 수지상 세포주(mouse dendritic cell line) DC2.4, 16 143을 10% heat-inactivated fetal bovine serum(FBS) (Welgene), 100 U/ml 페니실린 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 스트렙토마이신(Gibco BRL)으로 보충된 Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI 1640) (Welgene, Korea)에서 37°C 에서 5% CO_2 존재하에서 유지시켰다. 표시된 복합체로 처리된 DC2.4 세포의 생존력을 트립판 블루 스테이닝(trypan blue staining) 및 세포사멸 분석(apoptosis assay)으로 24 시간까지 조사하였다. 세포를 트립신 처리에 의해 수집하고, 트립판 블루 염색 후 살아있는 세포 수를 계산하였다.

[0194] 세포 사멸(Cellular apoptosis)과 괴사(necrosis)는 유세포 분석기(flow cytometer) (LSR II, BD Biosciences)를 사용하여 annexin V-Alexa Fluor 568(eBioscience)과 7-aminoactinomycin D(7-AAD, Thermo Fisher Scientific)로 스테이닝한 후 평가하였다.

[0196] (2) 결과

[0197] 제조예 2-1에서 제조된 ZnO 나노선 구조체의 세포독성을 평가하기 위해서, DC2.4 세포에 나노구조체를 처리하여 배양 후 살아있는 세포수를 비교하였다(도 12). 6시간(lag phase) 이후부터 세포 수가 지속적으로 증가하였다. 이 결과는 ZnO 나노선 구조체 그룹의 세포 증가율이 다른 그룹에 비해 낮지만, DC2.4 세포가 ZnO 나노선 구조체 존재하에 문제없이 성장할 수 있음을 나타낸다. lag phase 동안의 잠재적인 독성을 평가하기 위해서, 세포 괴사(necrosis)와 세포사멸(apoptosis)의 정도를 확인하였다(도 12B 및 C). 세포 사멸은 12시간까지 점차적으로 증가하는데, 이것은 ZnO 나노선 구조체의 처리에 의해서 세포사멸이 유도된 것으로 분석된다. 그 후, 정상 범위로 감소한다. PLA 섬유를 처리한 그룹에서도 세포사멸이 관찰되지만, ZnO 나노선 구조체가 세포사멸을 좀 더 일으키는 이유가 되는 것으로 보인다. ZnO 나노선 구조체를 처리한 세포(4.1 ~ 5.3%)는 24시까지 PLA 섬유를 처리한 세포(4.1 ~ 5.5%)와 비슷한 정도를 보인다. 그러나, ZnO 나노선 구조체를 처리한 세포에서는 후기 세포사멸하는 세포(late apoptotic cells)는 12시간에 최고점(~ 25.5%)를 이루는 반면, PLA 섬유를 처리한 세포는 전 시간에 걸쳐 통계적으로 유의미하게 낮다(4.7 ~ 14.5%). 흥미롭게도, 모든 실험 그룹에서 세포괴사하는 세포는 거의 없는데(2.0% 미만), 이것은 PLA 섬유 또는 ZnO 나노선 구조체에 의해 수행된 세포에 대한 직접적인 물리적 손상은 무시할 수 있다는 것을 의미한다. ZnO 나노선 구조체에 야기된 세포사멸 양상은 실시예 1의 유리기판에서 실험했던 선행 연구결과와는 약간 달랐다. ZnO 나노선으로 코팅된 유리기판에서 자란 HEK293 세포는 초기 세포사멸 양상(early apoptotic phenotype)은 이른 시간(3시간)에 최고점에 도달(~40%)하고, 후기 세포사멸은 6시간 전에 최고점(~35%)에 이른다. 이것은 세포 유형의 차이(phagocytic dendritic cell vs. fibroblast)이거나 배양 플레이트(plastic culture plate vs. glass cover slip)때문으로 보인다. 그럼에도 불구하고, 두 가지 세포 타입 모두에서 세포사멸의 정도는 ZnO 나노선 때문에 세포괴사보다 조금 높다. ZnO 나노선에 의해 이른 시간에 세

포사멸이 야기되고 점차적으로 감소하기 때문에, 세포가 적응하여 세포사멸 스트레스를 극복하는 것으로 나타난다. 그 후, ZnO 나노선이 있는 상태로 세포는 증식을 시작한다.

[0199] 또한, ZnO 나노선 구조체를 항원 전달 시스템에 이용하기 위해, ZnO-결합 펩타이드(ZBP)를 사용했고, 결합 능력을 검증하였다(도 13). ZBP-FITC 와 ZnO 나노선 구조체는 농도별로 1시간 배양 후에 형광 세기를 측정하였다(도 13A 및 B). ZnO 나노선 구조체 250 μ g을 사용하였을 때, ZBP-FITC와 결합정도는 ~ 3.2 M에서 포화하였다. PLA 섬유에도 비특이적으로 펩티드가 결합할 수 있지만, ZnO 나노선 구조체의 약 1/3정도만 결합했음을 알 수 있다(도 13B).

[0200] 다음으로 항암면역치료를 위한 나노합성물의 응용을 위하여, 3X ZBP가 결합되어 있는 recombinant carcinoembryonic antigen(CEA) 항원 (ZBP-CEA)을 사용하였다. ZBP-CEA도 PLA 섬유보다 ZnO 나노선 구조체에 더 많이 결합하는 것을 알 수 있다(도 3C 및 D). 80 μ g의 항원을 한 시간 동안 함께 배양했을 때, 대략 22 μ g의 ZBP-CEA 단백질이 250 μ g의 ZnO 나노선 구조체에 결합하는 반면, 15 μ g의 ZBP-CEA이 같은 양의 PLA 섬유에 결합하는 것을 확인할 수 있다. ovalbumin 단백질의 비특이적 흡수에 관해서는 이미 보고된 적 있다. 그럼에도 불구하고, 본 발명의 결과는 ZBP와 결합된 종양-관련 단백질 항원이 unmodified PLA 섬유에서보다 ZnO 나노선 구조체에 좀 더 효과적으로 고정될 수 있음을 보여준다. 또한, 표면에 아무것도 없는 PLA 섬유보다, 표면에 있는 ZnO 나노선으로 인해 표면적이 더 커짐으로써 결합 능력이 향상될 수 있다.

[0202] 실험예 2-3. 사이토 카인 분석

[0203] (1) 방법

[0204] 배양물 상등액에서 분리된 사이토카인을 마우스 염증 키트(Mouse Inflammation Kit, BD Infoscience Kit) (BD Biosciences)를 사용하여 혈구 계산의 비드 어레이(cytometric bead array)로 분석 하였다.

[0205] DC2.4 자극 전에 배양 배지를 교체하고, 자극된 DC로부터 종양 괴사 인자-알파(tumor necrosis factor- α , TNF- α), IL-1 β , IL-6 및 IL-10의 생산을 배양 18 시간 후에 측정하였다.

[0207] (2) 결과

[0208] 방사형의 ZnO 나노선이 코팅된 물질이 진핵세포 안으로 항원을 전달하는 데 효과적이므로, 나노구조체-항원 복합체가 수지상세포 안으로 전달되는 효율을 관찰하였다.

[0209] 도 14A에서 확인 할 수 있듯이, ZBP-FITC로 코팅된 ZnO 나노선 구조체와 함께, 37 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 배양하면 대부분의 세포(>90%)가 FITC-positive이고, 그 이후에 FITC 신호가 포화된다. 반면에, DC2.4 세포는 같은 시간 약 35% 정도만 FITC를 띠고, 그 후 $\sim 10\%$ 까지 빠르게 감소한다. 이 결과들은 나노선으로 코팅된 펩타이드 분자는 효과적이고 빠르게 항원제시세포 (antigen-presenting cells) 안으로 전달된다는 것을 알 수 있다. 또한, 펩타이드가 빠르게 포화되는 것은 세포가 ZnO 나노선의 끝이 코팅된 펩타이드와 접촉 후 바로 섭취한다는 것을 암시한다.

[0210] ZnO 나노선 구조체로 DC2.4 세포에 자극을 준 후, 염증성 사이토카인의 분비를 측정하였다. TNF- α 를 제외하고, LPS를 처리한 양성 대조군보다는 일반적으로 낮지만, PLA 섬유를 처리한 세포와 처리하지 않은 세포를 비교해보면 나노선 구조체를 처리하면 상당히 높은 양의 IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α 의 염증성 사이토카인이 유도되는 것을 확인할 수 있다(도 14B). 그럼에도 불구하고, IL-1 β 를 제외하고 모든 사이토카인 레벨이 ZnO 나노선 구조체를 처리한 세포 그룹에서 훨씬 상승하였다. 이것은 수지상세포의 염증 반응에서 ZnO 나노선이 주요한 자극 요소임을 암시한다. DC2.4 세포의 활성화 마커인 CD40과 CD86이 ZnO 나노선 구조체로 자극한 후 유의미하게 증가했다(도 14C). 반면에, MHCII 과 CD80 은 아주 약간만 증가했고 통계적 유의성은 없었다(도 18). PLA 섬유를 처리했을 때는 어떤 마커도 통계적으로 유의미하게 증가하지 않았다. 이것은 ZnO 나노선이 세포의 활성화에 주요한 자극요소임을 암시한다. 종합해 보면, 이런 결과들은 ZnO 나노선 구조체는 ZnO 나노선 부분에 의해서, 항원 제시세포를 자극할 수 있고 염증반응을 유도할 수 있다고 분명하게 보여준다. ZnO 나노선 구조체에 의해 염증성 사이토카인이 많이 유도되고 수지상세포의 활성화할 수 있으므로, 상기 ZnO 나노선 구조체의 종양면역치료를 위한 면역보강제로서의 가능성을 검증하였다.

[0212] **실험예 2-4. 유세포 분석**

[0213] **(1) 방법**

[0214] PLA 및 ZnO 나노선 구조체를 ZBP-FITC와 실온에서 1 시간 동안 배양하고 PBS로 3회 세척하여 결합되지 않은 펩타이드를 제거 하였다. 이어서 제조된 복합체를 지시된 시간 동안 37℃에서 DC2.4로 배양하였다. ZBP-FITC의 세포 흡수(cellular uptake)는 유세포 분석기(LSR II, BD Biosciences)를 사용하여 세포를 수집한 후에 조사하였다. 세포 활성화를 분석하기 위하여, PLA 및 ZnO 나노선 구조체로 배양된 DC2.4 세포를 얼음으로 냉각시킨 FACS 완충액(1% 소 혈청 알부민[BSA] 및 1mM EDTA를 함유하는 PBS)로 세척하고, 10% 래트(rat) 혈청, 10% 햄스터(hamster) 혈청, 10 % 마우스(mouse) 혈청(Sigma) 및 10 μ g/ml 2.4G2 단클론 항체(monoclonal antibody) (BD Pharmingen)를 함유하는 울트라-블록 용액(ultra-block solution)으로 30 분 동안 얼음으로 차단하였다. DC 성숙(DC maturation)은 얼음 상에서 30분 동안 FITC-결합(conjugated) 항-I-Ab(BD Pharmingen), PE- 결합(conjugated) 항-CD40(BD Pharmingen), APC- 결합(conjugated) 항-CD80(eBioscience) 및 PE/Cy7- 결합(conjugated) 항-CD86(BioLegend)으로 염색한 후에 조사되었다. 세포를 유세포 분석기를 사용하여 분석하였다.

[0215] 면역화된 마우스의 비장(spleens)에서 수집된 림프구(Lymphocytes)를 24-웰의 바닥이 평평한 배양 플레이트(flat-bottomed culture plates) (5 X 10⁶ cells/well)에서 10% heat-inactivated FBS, 50 nM β -ME(Invitrogen), 100 units/ml penicillin streptomycin, 2 mM L-glutamine(Welgene), 및 20 μ g/ml 정제 CEA 단백질이 보충된 RPMI 1640 배지에서 16 시간 동안 배양하였다. 배양 후, GolgiPlug(BD Biosciences)를 6 시간 동안 첨가하였다. 림프구를 얼음으로 냉각시킨 FACS 완충액으로 3회 세척하였다. 세포를 얼음에서 30 분 동안 울트라-블록 용액(ultra-block solution)으로 차단하고 4℃에서 30 분 동안 BV-605-결합 CD4 및 Pe-cy7-결합 CD8 항체(BD Pharmingen)로 염색하였다. 표면 CD4 또는 CD8 염색 후, 세포를 얼음으로 냉각시킨 FACS 완충액으로 3 회 세척하고, 제조사의 지침(BD Biosciences)에 따라 Cytofix/Cytoperm 키트를 사용하여 세포 내 사이토 킨 염색(intracellular cytokine staining)을 수행 하였다.

[0216] 세포 내 인터페론(IFN)- γ 는 APC-결합 항-IFN- γ 항체(BD Pharmingen)를 사용하여 4℃에서 30 분 동안 염색하였다. PE- 결합 항-FoxP3 항체(eBioscience)를 사용하여 조절(regulatory) CD4 T 세포를 검출하였다. 염색된 세포를 FACS Canto II 유세포 분석기로 분석하였다. 유세포 분석 데이터는 FlowJo 소프트웨어(버전 8.8.6, FlowJo)에 의해 분석되었다.

[0218] **실험예 2-5. 세포 독성 T 림프구(CTL) 활성**

[0219] **(1) 방법**

[0220] 두번째 백신 접종 2 주 후, 면역화된 마우스로부터 비장 세포(splenocytes)를 수집하고, CTL 활성을 전술한 바와 같이 크리스탈 바이올렛 흡광도 측정법(crystal violet absorbance assay)을 사용하여 측정하였다.

[0221] CTL은 정제된 CEA 항원으로 16 시간 동안 비장 세포를 자극하고 24 시간 동안 타겟으로서 인간 CEA 항원을 발현하는 마우스 선암 세포주(mouse adenocarcinoma cell line)인 MC38/CEA 세포와 배양 함으로서 생성되었다. 세척 후, 타겟 세포를 크리스탈 바이올렛(PBS 중 4 mg/ml)으로 실온에서 30 분 동안 염색하였다. 이어서, 플레이트를 PBS로 세척하고 메탄올을 사용하여 세포를 용해시켰다. 표적 세포의 생존은 570 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다.

[0223] **실험예 2-6. 종양 성장(Tumor growth)**

[0224] **(1) 방법**

[0225] 동물 실험은 SNU IACUC(permission ID: SNU-090805-5)의 승인을 받아 수행되었다. 종양 보유 마우스는 관찰일에 종양이 2 cm³ 이상에 도달하면 희생시켰다.

[0226] 6 주된 C57BL/6 마우스(mice) (Orient Bio, Seoul, Korea)의 오른쪽 옆구리에 MC38/CEA 세포(1×10^5 세포/마우스)를 피하 주사하였다. 종양 세포 주사 7 일 후, 마우스를 테일 베이스(tail base)에서 지시된 복합체로 격

주로(weekly intervals) 3 회 면역화하였다. 5 마리의 마우스를 그룹으로 하였다. 종양은 디지털 캘리퍼스(TESA SHOP-CAL, Willrich Precision, Switzerland)로 측정하였다. 종양 부피(mm^3)는 $(A \times B^2)/2$ 로 계산하였다(A: 긴 직경, B: 짧은 직경). 종양 보유 쥐는 관찰일에 종양의 직경이 2cm 이상에 도달하면, CO₂로 희생시켰고, 종양 주입 후 생존 생쥐를 최대 30 일까지 관찰하였다.

[0228] 실험예 2-7. 종양 침윤성 백혈구의 분리

[0229] (1) 방법

[0230] 종양 조직을 마우스에서 무균적으로 얻고, 단편(fragments)으로 절단하고 PBS로 두 번 세척한 다음, 효소 콕테일(DNase 및 Collagenase IV, Sigma Aldrich)로 소화시켰다. 생성된 세포 현탁액을 나일론 메쉬 스크린(nylon mesh screens)에 여과시켜 세포 덩어리(cell clumps)를 제거하고, PBS로 3 회 세척하고, 얼음으로 냉각한 FACS 완충액에 재침전시켰다. 종양-유도 세포 혼합물을 FACS 분석에 사용하였다.

[0232] (2) 결과

[0233] C57BL/6 마우스에 ZnO 나노선 구조체(1 mg/mouse)을 100 μg ZBP-CEA과 섞어 면역하였고, CEA-특이적인 세포 면역을 분석하였다. 2주 후 2차 면역을 하였고, 세포매개 면역의 전형적인 특징인 IFN- γ 를 측정함으로써, 비장에서 T 세포 반응을 검증하였다(도 15A). 비장에서 IFN- γ 를 분비하는 CD4 나 CD8 T 세포가 ZnO 나노선 구조체를 면역한 그룹에서 상당히 증가했다. ZnO 나노선이 있어 항원-특이적인 T세포 반응을 약 70~100%까지 크게 향상했다는 것은 주목할 만 하다. 더욱이, ZBP-CEA를 결합한 나노선 구조체를 면역한 마우스에서 CEA 발현하는 종양 세포에 대한 세포 독성 반응이 상당히 유도되었다. 반면에 대조군 그룹에서는 통계적으로 유의미한 세포독성이 발견되지 않았다(도 15B). ZBP-CEA를 결합시킨 PLA 섬유를 면역한 마우스의 비장세포에서 종양세포에 대한 세포독성도 증가하긴 했다. 하지만 ZBP-CEA를 결합시킨 ZnO 나노선 구조체가 더 높았다.

[0235] 생체 내에서도 CEA-특이적인 면역 반응이 기능하는지 증명하기 위하여, 마우스에 MC38/CEA 세포를 접종한 후, 매주 1번씩, 총 3번 면역을 하였다. 도 15C에서 확인할 수 있듯이, ZBP-CEA를 결합시킨 ZnO 나노선 구조체를 면역한 그룹의 종양 성장이 다른 그룹에 비해서 상당히 저해되었다. ZBP-CEA와 결합시킨 PLA 섬유를 면역한 그룹에서도 CEA-특이적인 T 세포 반응이 상당히 증가한 것을 관찰했었지만, 종양의 성장을 억제하지는 못했다. 전신적인 면역억제 반응과 종양 내로 침투한 T 세포는 24일째에 비장과 종양을 분석함으로써 확인하였다(도 16). 종양이 있는 마우스는 T 세포가 전체적으로 감소하고 조절 T 세포가 점진적으로 증가함은 잘 알려진 사실이다. 또한 종양 속으로 침투한 CTL은 임상적인 결과와 관련 있다는 것은 잘 알려져 있다. 종양이 있는 마우스의 비장에서 CD4, CD8 T 세포의 급격한 감소를 관찰하였다. 각각 1%, 2% 미만으로 관찰되었다(도 16A 및 도 19). 정상 마우스에서 CD4와 CD8 T 세포는 일반적으로 각각 20%와 10%를 차지한다. 이것은 면역 여부와 관계없이, 종양이 있는 마우스는 전신적인 T 세포가 저해됨을 의미한다. 그럼에도 불구하고, ZBP-CEA를 결합한 ZnO 나노선 구조체를 면역한 마우스는 상당히 높은 비율의 CD4 T 세포와 상대적으로 낮은 조절 T 세포 비율을 유지했다. 게다가, 종양조직에서, CD45+ 면역세포와 조절 T 세포 비율은 비슷했지만 종양으로 침투하는 CD4, CD8 T 세포 비율이 상당히 높았다(도 16B). 이것은 종양미세환경에서 다른 그룹보다 더 나은 면역 조직을 갖고 있다는 것을 의미한다. 종합하면, ZnO 나노선을 PLA 섬유매트릭스 기반의 항암치료백신에 포함시키는 것은 항원-특이적인 T 세포 반응을 향상시킬 수 있고, T 세포가 종양 속으로 더 잘 침투하게 하며 그로 인해 종양의 성장을 더 잘 억제할 수 있다.

[0237] PLA 기반의 약물제조는 약물 전달 운반체로써, 다양한 적용을 위한 스캐폴드로써 엄청난 잠재력을 보여주었다. 이 유기 물질은 감염성 질병과 암의 백신 개발에 성공적으로 적용되었다. 그러나, 최근의 연구에서 비슷한 유기 물질인 poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) 입자 또한 자가면역반응의 치료를 위한 관련 펩티드에 대하여 면역관용 반응을 유도할 수 있다고 보고되었다. 면역관용효과는 scavenger receptor MARCO를 발현하는 대식세포에 의해 PLGA 미세입자가 섭취가 되어야 발생하며, 이 과정에서는 조절 T 세포 활성화와 T 세포의 불활성화, T 세포 에너지가 매개한다. 게다가, 활성이 없는 PLA 자체는 면역억제 효과를 가지거나 상처 회복과 foreign body reaction을 촉진할 수 있고 이로 인해 조직 조작을 위한 스캐폴드로 사용될 수 있다. 그러므로 유기 물질의 구

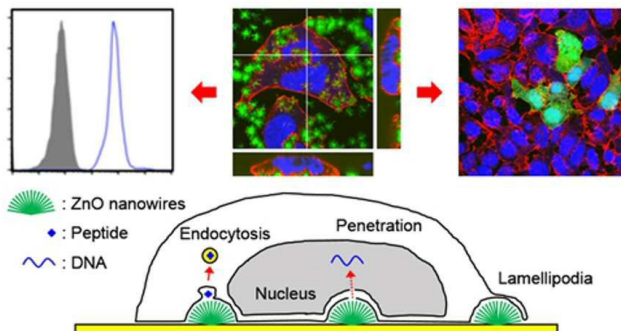
조와 구성을 변경하여 백신 운반체나 보조제로 사용하는 것은 매우 중요하다. Toll-like receptor (TLR) ligands 같은 면역-자극제를 종양 백신으로 사용하는 것은 적응면역을 자극하는데 유용한 방법의 하나다.

[0238]

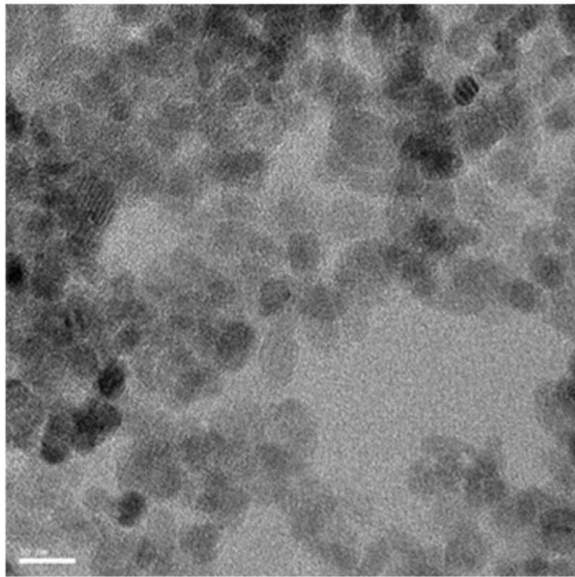
본 발명에서는 독특한 3차원 구조를 가진, PLA 마이크로섬유 위에 방사형으로 자란 ZnO 나노선을 합성하였다. 그리고, 이것을 치료용 암 백신에 적용하였다. 본 발명의 ZnO 나노선 구조체는 백신 보강제로써 하이브리드 나노복합체를 적용한 첫 번째 사례다. 본 발명에 따른 복합체는 매우 적은 세포독성을 띠면서도, 내재면역의 항원 제시세포를 효과적으로 자극하여 염증성 사이토카인과 활성화마크를 발현하게 한다(도 14). 이런 내재면역의 유도는 ZnO 나노선 구조체가 Toll-like receptors(TLR4 or TLR6)에 의해 직접적으로 인식되어 발생하거나, 세포의 zinc(아연) 항상성이 붕괴되어 세포내 ROS 생성을 통해 간접적으로 발생하는 것으로 보인다. 본 발명에서는 하이브리드 나노복합체가 성공적으로 종양 항원-특이적인 세포 면역을 유도할 수 있으며, 효과적인 세포내 전달과 내재면역의 자극을 통해서 종양의 성장을 상당히 억제할 수 있음을 확인하였다(도 15). ZnO 나노선 구조체와 생체 시스템의 상호작용은 다양한 기능을 함이 알려져 있고, 이런 이유로 인해 ZnO 나노선 구조체를 효과적인 항암제로 사용될 수 있을 것이다. ZnO 나노선과 조절 T 세포의 전신적 감소와 종양침투 T 세포의 증가(도 16)에 관한 메커니즘은 아직 더 많은 연구가 필요하지만, 본 발명의 결과는 무기금속 산화물과 유기물의 하이브리드 나노복합체를 의학적으로 적용할 수 있는 새로운 장을 열었다고 할 수 있다.

도면

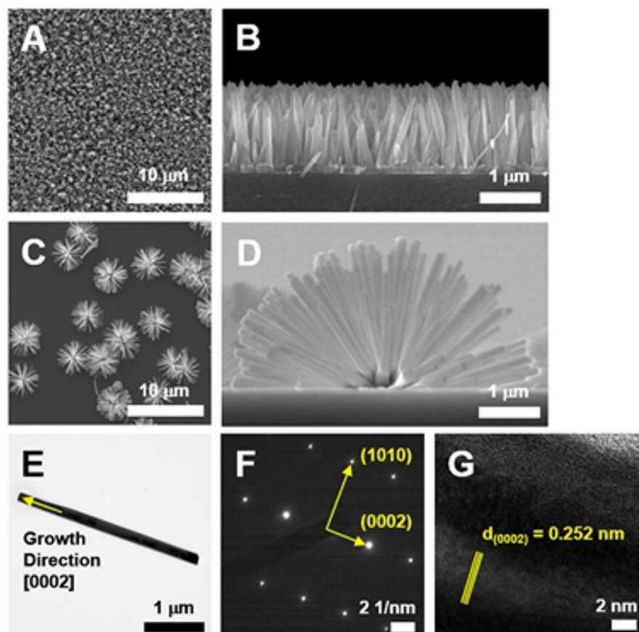
도면1



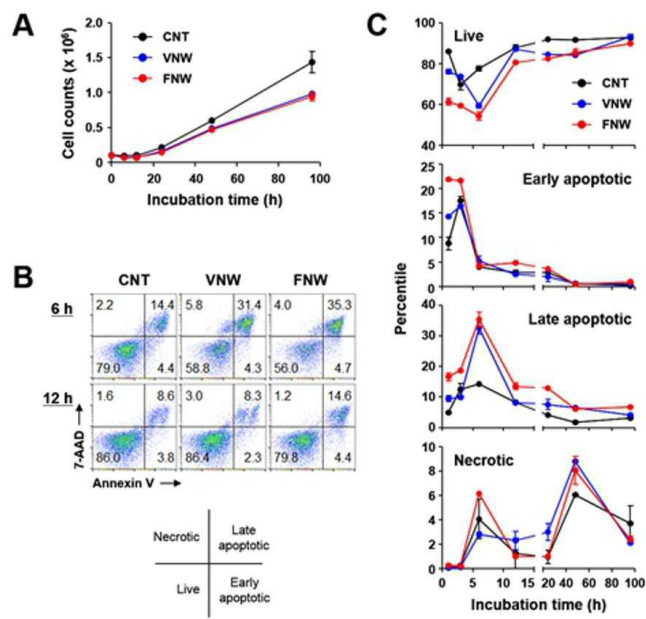
도면2



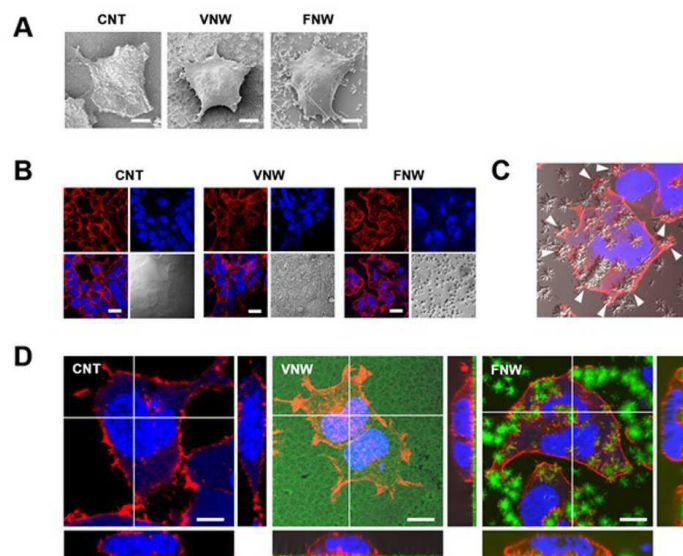
도면3



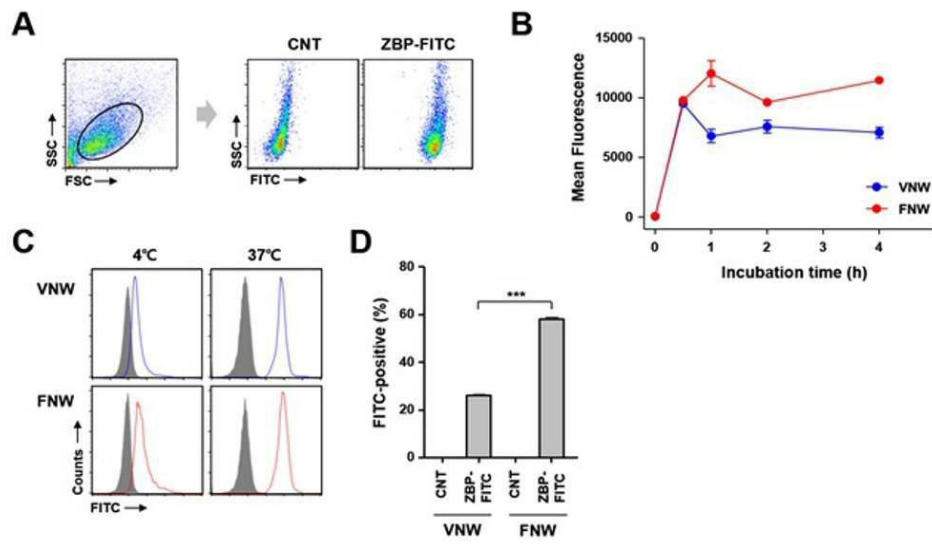
도면4



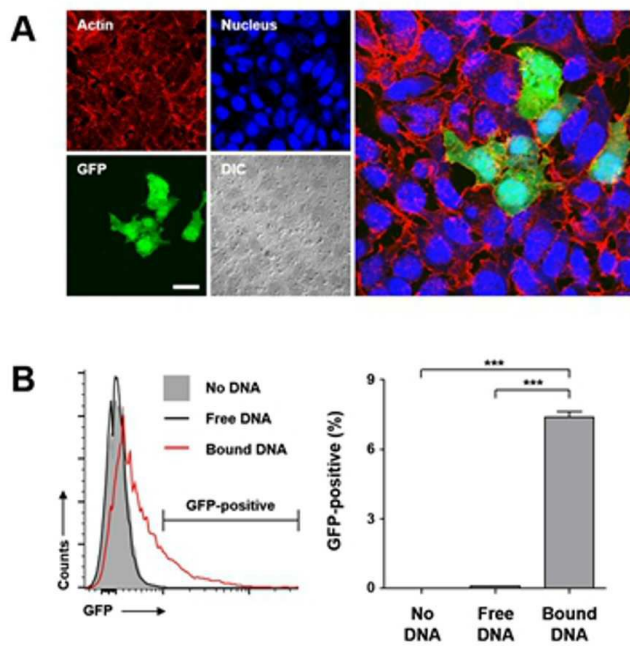
도면5



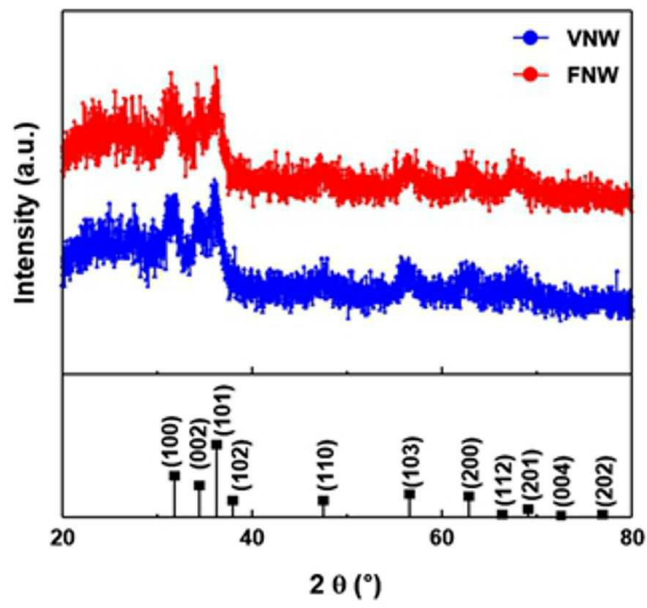
도면6



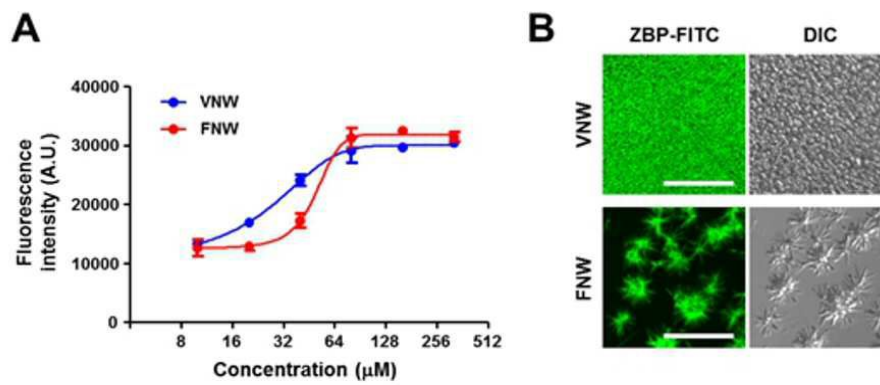
도면7



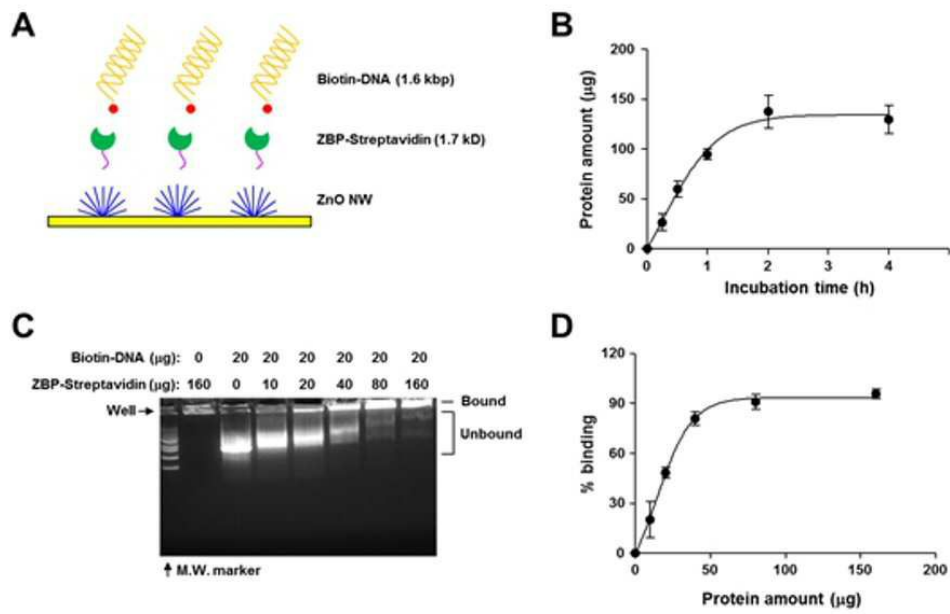
도면8



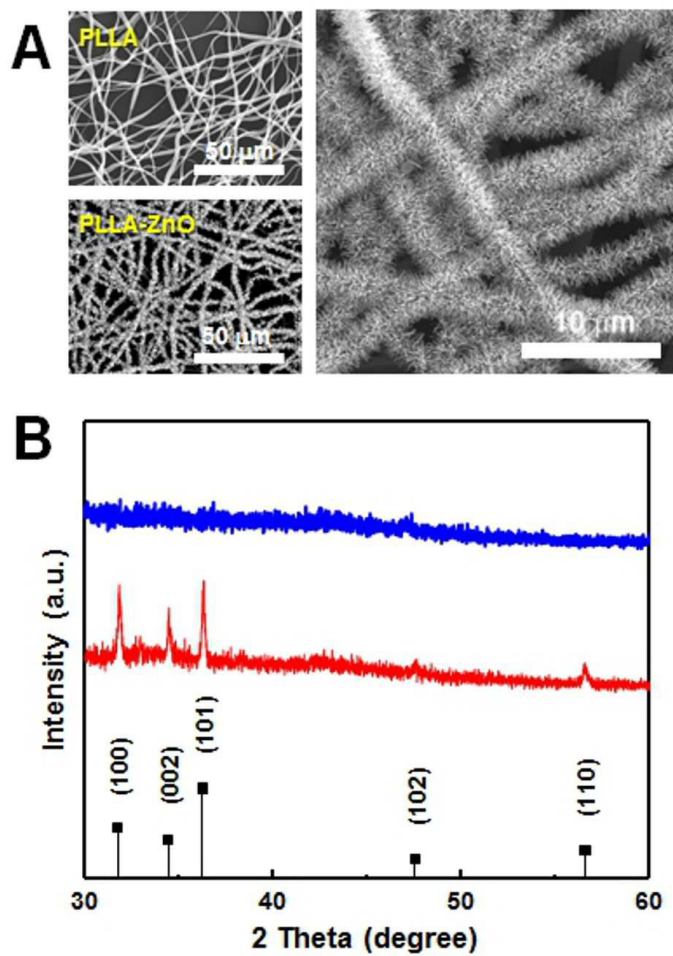
도면9



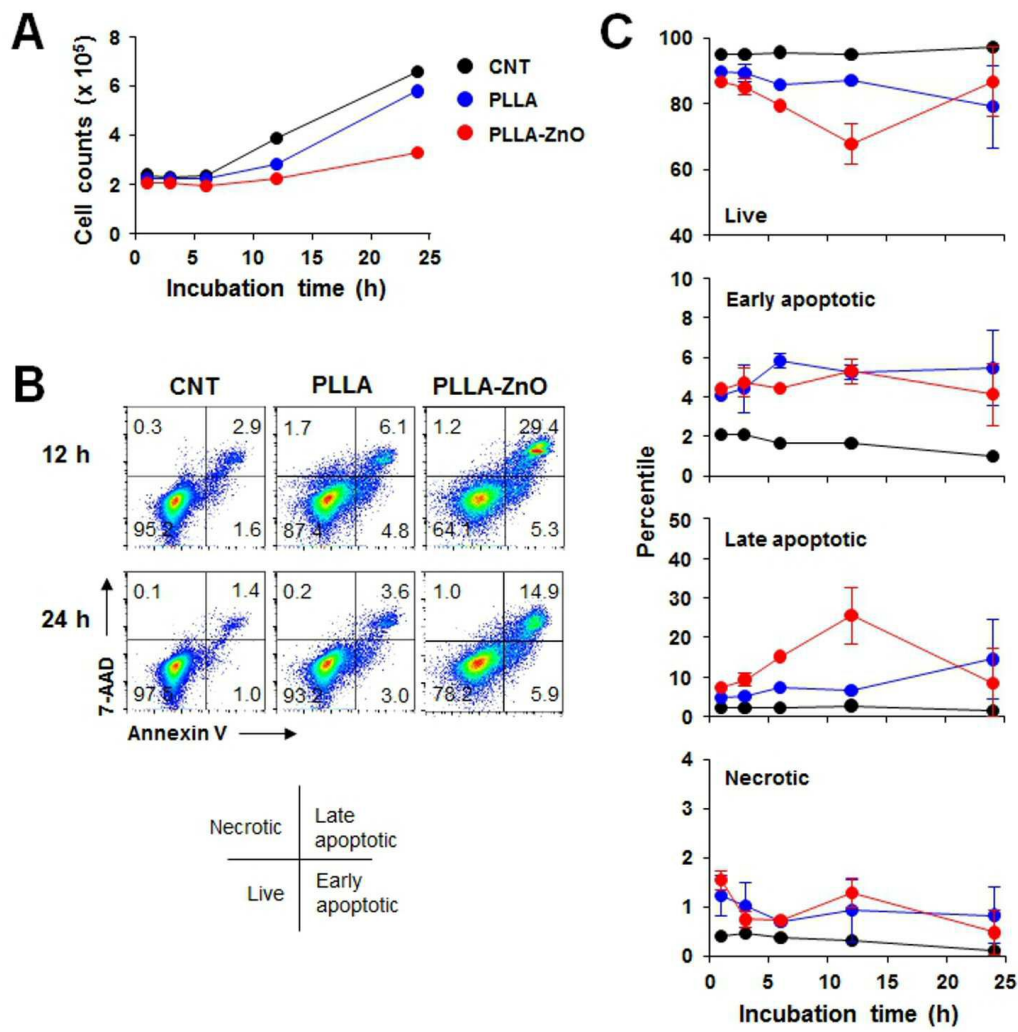
도면10



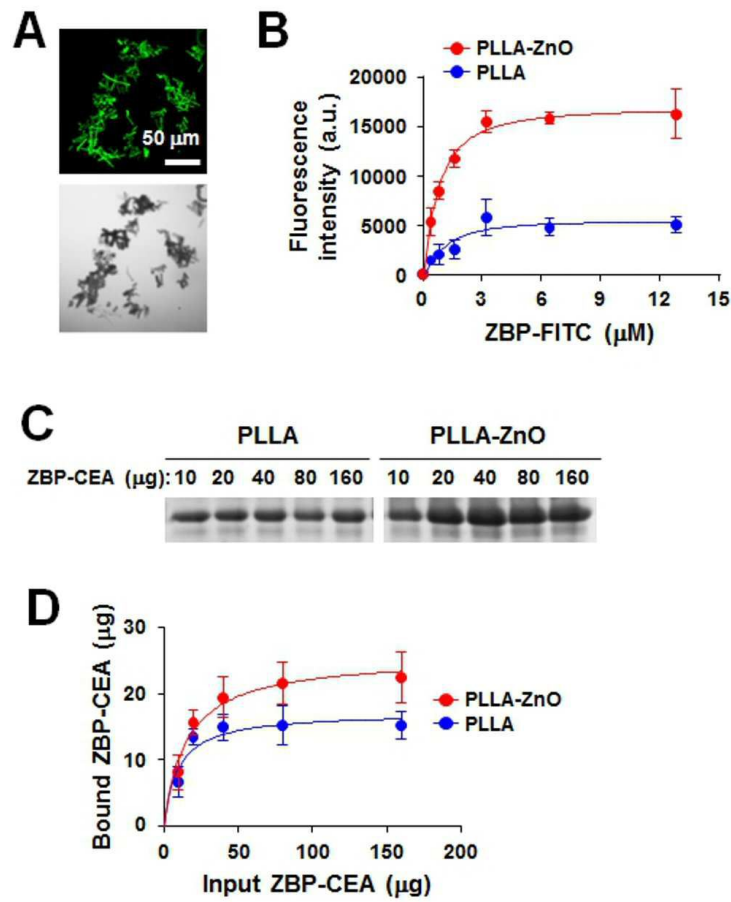
도면11



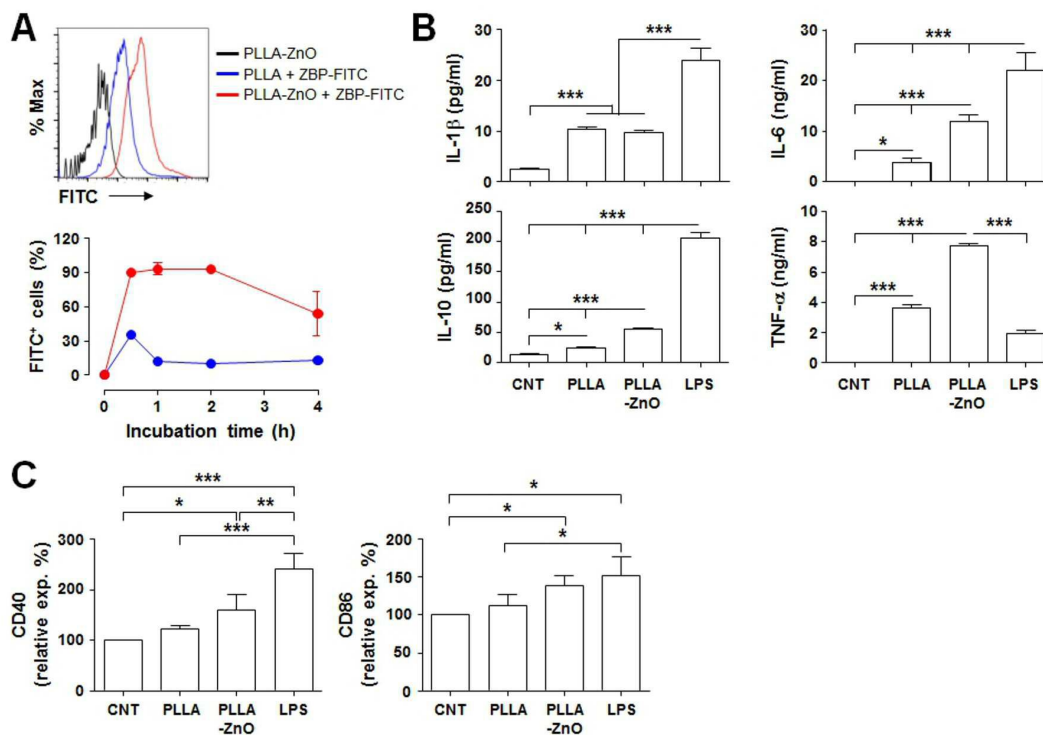
도면12



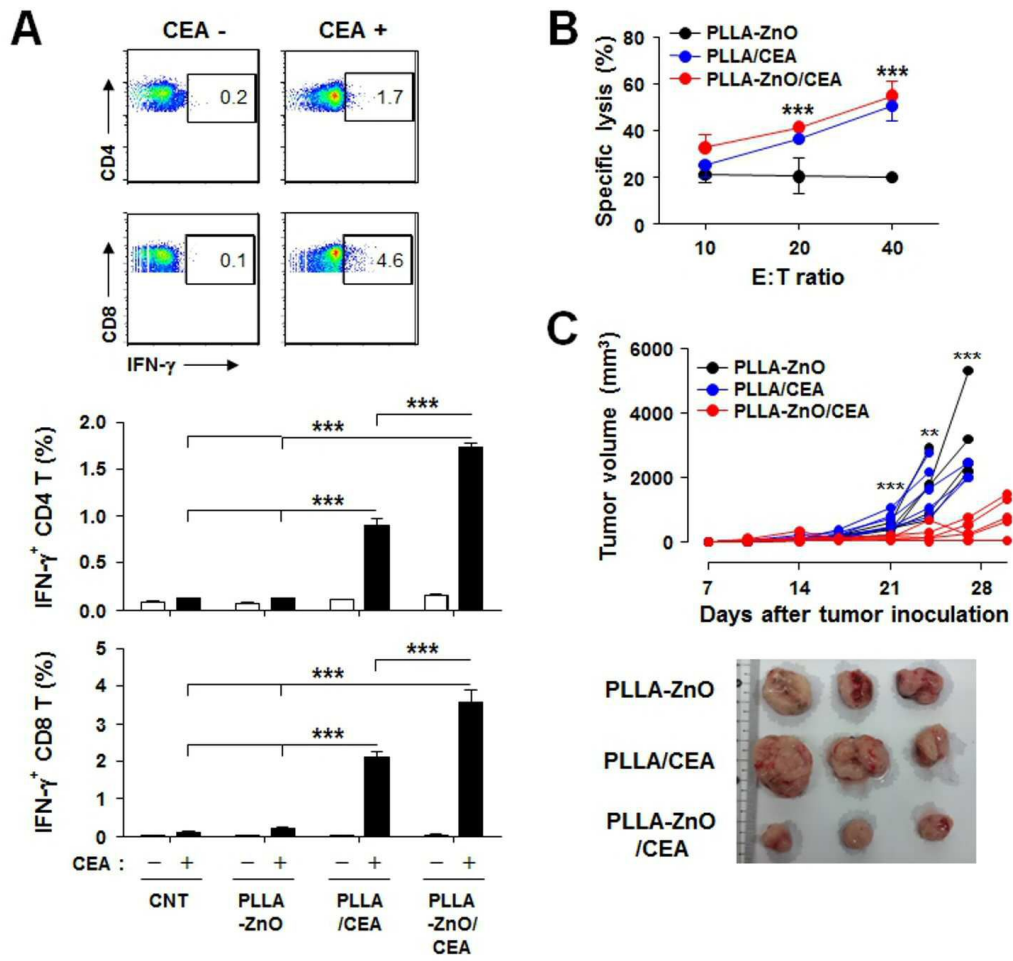
도면13



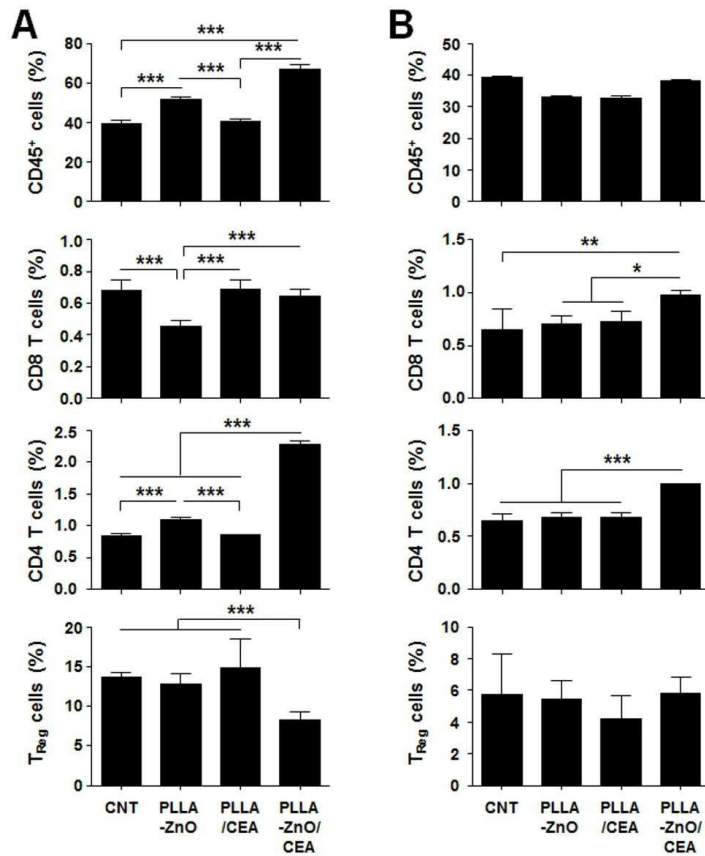
도면14



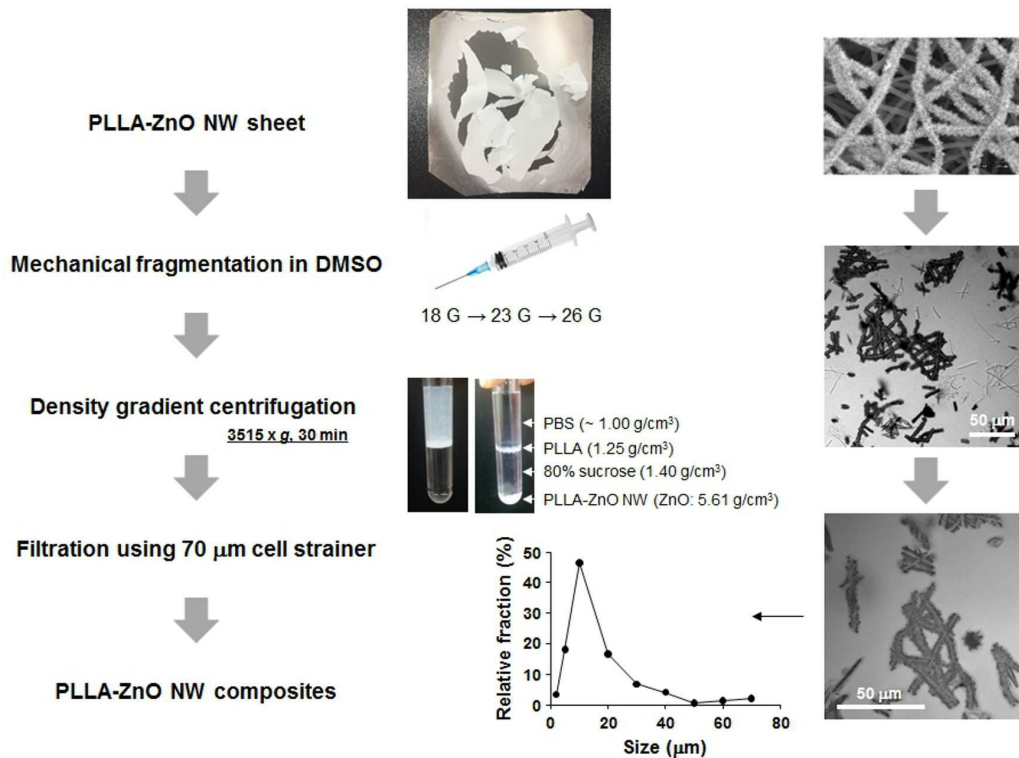
도면15



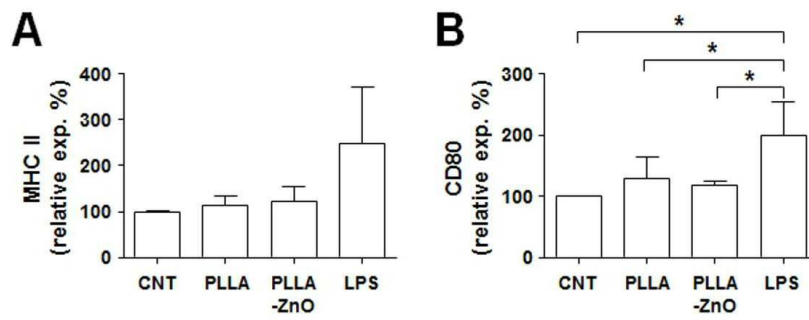
도면16



도면17



도면18



도면19

