



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0098542
(43) 공개일자 2019년08월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/005 (2006.01) A61K 49/00 (2006.01)
B82Y 5/00 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/005 (2013.01)
A61K 49/0045 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0018614
(22) 출원일자 2018년02월14일
심사청구일자 2018년02월14일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
이지원
서울특별시 서초구 남부순환로309길 38, 5동 522
호(방배동, 서초중앙하이츠빌라)
김성은
서울특별시 노원구 공릉동 591-19번지 상아빌라
302호
(74) 대리인
특허법인다나

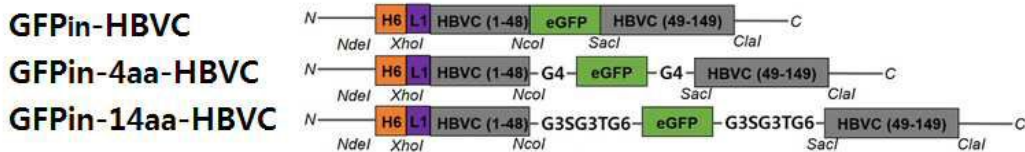
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 이중 형광 단백질 나노입자

(57) 요약

본 발명은 이중층 형광 단백질 나노입자에 관한 것으로, 내부 및 외부 표면에 형광 단백질이 융합되어 있고 외부 표면에는 표적 지향성 펩타이드를 표출함으로써 형광도와 광안정성이 우수한 형광 단백질 나노입자를 제공할 수 있다. 본 발명에 따른 형광 단백질 나노입자는 우수한 형광도와 광안정성으로부터 생체 이미징 용도로 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 49/0093 (2013.01)

B82Y 5/00 (2013.01)

C07K 2319/33 (2013.01)

C07K 2319/60 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

B형 간염 바이러스 코어 단백질의 내부 및 외부 표면(both inner and outersurface)에 형광 단백질이 융합되어 있고, 외부 표면(outer surface)에는 표적 지향성 펩타이드가 표출되어 있는 형광 단백질 나노입자.

청구항 2

제1항에 있어서,

형광 단백질 나노입자 내부의 형광 단백질은 B형 간염 바이러스 코어 단백질을 이루고 있는 단량체의 1-44번째 아미노산 서열 부분과 상기 단량체의 45-149번째 아미노산 서열 부분 사이; 상기 단량체의 1-45번째 아미노산 서열 부분과 상기 단량체의 46-149번째 아미노산 서열 부분 사이; 또는 상기 단량체의 1-48번째 아미노산 서열 부분과 상기 단량체의 49-149번째 아미노산 서열 부분 사이에 위치하고 있는 형광 단백질 나노입자.

청구항 3

제1항에 있어서,

형광 단백질 나노입자 외부 표면의 형광 단백질은 B형 간염 바이러스 코어 단백질의 N-말단에 결합되는 것인 형광 단백질 나노입자.

청구항 4

제1항에 있어서,

형광 단백질은 m카디널(mCardinal), 녹색형광단백질(GFP), 변형된 녹색형광단백질(modified green fluorescent protein), 증강된 녹색형광단백질(enhanced green fluorescent protein; eGFP), 적색형광단백질(RFP, DSRed), 증강된 적색형광단백질(eRFP), 청색형광단백질(BFP), 증강된 청색형광단백질(eBFP), 황색형광단백질(YFP), 증강된 황색형광단백질(eYFP), 남색형광단백질(CFP) 또는 증강된 남색형광단백질(eCFP) 중 어느 하나인, 형광 단백질 나노입자.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 형광 단백질의 N-말단 부분과 C-말단 부분은 링커 펩타이드가 결합되어 있는 것인, 형광 단백질 나노입자.

청구항 6

제1항에 있어서,

표적 지향성 펩타이드는 B형 간염 바이러스 코어 단백질을 이루는 단량체의 1-78번째 아미노산 서열 부분과 상기 단량체의 81-149번째 아미노산 서열 부분 사이에 결합되어 있는 키메라 단백질로 이루어진 것인, 형광 단백질 나노입자.

청구항 7

제1항에 있어서,

표적 지향성 펩타이드는 수용체 길항제(receptor antagonist); 또는 어피바디(affibody), RGD 펩타이드, 소마토스타틴(somatostatin), 봄베신(bombesin), 콜레시스토키닌(cholecystokinin) 및 가스트린 유사체(gastrin analog)로 이루어진 군에서 선택되는 펩타이드 호르몬인 형광 단백질 나노입자.

청구항 8

제1항에 있어서,

형광 단백질 나노입자는 자기조립성 단백질로부터 자가조립된 단백질 나노입자인 형광 단백질 나노입자.

청구항 9

제1항에 있어서,

형광 단백질 나노입자는 자기조립성 단백질의 일 말단에 표적 지향성 펩타이드가 결합된 키메라 단백질로부터 자기조립된 단백질 나노입자에 형광 단백질을 내부 및 외부에 융합시켜 제조된 것인, 형광 단백질 나노입자.

청구항 10

제1항에 따른 형광 단백질 나노입자; 및

약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 표적 지향형 조영제 조성물.

청구항 11

제1항에 따른 형광 단백질 나노입자; 및

약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 동시 진단 또는 치료용 조영제 조성물.

청구항 12

제1항에 따른 형광 단백질 나노입자; 및

진단 프로브를 포함하고,

상기 진단 프로브는 영상 판독을 위한 표지 물질인 다중 진단 프로브.

청구항 13

제1항에 따른 형광 단백질 나노입자; 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 생체 이미징용 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서,

생체 이미징용 조성물은 영상 유도 수술(Image-guidedsurgery) 이미징용인 생체 이미징용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 내부 및 외부 표면에 형광 단백질이 융합된 이중층의 형광 단백질 나노입자 및 상기 이중층 형광 단백질 나노입자의 생체 내 이미징을 위한 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 암 수술 치료 분야에서 실시간 이미지 안내 수술이 크게 주목을 받고 있다. 수술 중 이미징 기술에서 형광 조영제를 이용하여 특정 암 조직을 시각화할 수 있는 형광 기술은 일반적으로 비광학 기술, 예를 들면 자기 공명 이미징(magnetic resonance imaging), 컴퓨터 단층촬영(computed tomography), 양전자방출 단층촬영술(positron emission tomography) 보다 일반적으로 적절하고 나은 성능을 낸다.

[0003] 종래의 근적외선 파장의 형광 프로브, 퀀텀닷(CdSe, ZnS, 등) 및 합성 유기 염색물질(Cy5, Cy5.5, 등)은 생체 독성과 불필요한 화학적 특성, 예를 들면 알부민과 같은 혈청 단백질과의 비특이적 결합 등으로 인해 현재 수술 중 이미징 기술에 적용하기에 부족하다.

[0004] 위와 같은 문제를 해결하기 위해 리포좀 또는 속이 빈 실리카 구형 나노입자 안에 형광 프로브를 캡슐화하는 것이 하나의 해결책으로 제시되었지만, 상기의 경우 몸 속 장기간 축적에 의한 독성에 대한 문제에 대해서 충분히 안전하지 못하다.

- [0005] 이와 같은 문제점이 해결된, 어느 정도 안정적인 구조를 갖는 속이 빈 합성 나노입자는 물리, 화학적 합성이 용이하지만, 합성된 입자는 수 나노미터에서 수백 나노미터까지로 그 크기의 범위가 넓어 균일도가 떨어지며, 이에 따라 입자당 채워진 형광 물질의 개수의 변화가 일어나는 문제점이 있다.
- [0006] 게다가, 캡슐화된 형광입자의 방출은 대표적인 문제로 대두되고 있다. 그리고 지금까지 캡슐화된 형광입자의 공간적 분포를 정밀하게 컨트롤할 수 있는 방법이 제시된 적이 없으며, 형광입자의 공간 분포를 정밀하게 컨트롤할 수 없었기 때문에 캡슐화된 형광입자 간의 자가 형광 꺼짐 현상(self-quenching effect)을 해결하기 어려웠다. 또한, 친수성 형광 단백질은 각각의 단백질이 밀어내는 정전기적 상호 작용을 일으켜 작은 캡슐에 형광단백질을 고농도로 넣는 것이 어렵다.
- [0007] 본 발명자들은 위와 같은 기존의 캡슐화 방법의 한계를 극복할 수 있는 새로운 캡슐화 방법을 개발하였다. 본 발명은 생물학적 단백질 나노입자인 B형 간염 바이러스 입자(hepatitis B virus capsid, HBVC)를 균일한 사이즈와 구성물을 가진 속이 빈 나노 구조체로 활용하였다.
- [0008] HBVC 나노입자는 세포 안에서 세밀하게 조절된 자가 조립 과정을 통해 형성된다. 최근 화학적 결합 방법을 이용하여 형광 물질을 바이러스 유래 입자에 결합한 나노입자를 의료 이미징 분야에 적용된 보고들이 있지만, 같은 화학적 결합 방법을 쓸지라도 그 수율이 형광 물질의 구조에 따라 변할 수 있다고 보고되어 있다. 예를 들면, 동부 모자이크 바이러스(Cowpea mosaic virus, CPMV) 유래 단백질 나노입자에 화학적으로 A555(Alexa Fluor 555)와 A488(Alexa Fluor 488)이 각각 접합되었을 때, 그 결과 다른 입자당 형광물질 비율이 각각 70과 120을 보였다. 또한, 다른 기존 연구 개발에서도 화학적 결합방법을 사용하였을 경우, 300개의 소단위 구조를 가진 CPMV 입자가 입자당 결합 형광물질 200개로 제한되었음이 발표되었다.
- [0009] 한편, 최근에 강한 형광특성과 광안정성을 가지는 근적외선 형광 단백질(mCardinal)이 개발되었다. 이 형광 단백질은 깊은 조직 이미징에 적합한 광파장 범위(600-1000 nm)의 여기 스펙트럼을 가지고 있다. 현재 이 형광 단백질은 체외 이미징이나 이식형 체내 세포 이미징에만 적용되었으며, 체내 암 이미징에는 적용된 사례는 알려지지 않았다.
- [0010] 특허문헌 1에서는 표면에 표적 지향성 펩타이드와 형광 단백질을 융합하는 형광 단백질 나노입자를 개시하고 있다. 상기 형광 단백질 나노입자는 외부 표면에만 형광 입자를 표출한 경우이므로 형광도가 본 발명보다 낮고 광안정성도 내부보다 떨어지는 문제점이 있다.
- [0011] 이에, 종래 기술보다 형광도와 광안정성이 우수한 형광 단백질 나노입자의 개발이 요구되는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0012] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1599589호(2016.02.25.)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 본 발명의 목적은 형광강도 증폭 및 생체 안정성이 향상된 생체 진단용 신소재로서 이중층의 형광 단백질 나노입자 및 이의 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은,
- [0015] B형 간염 바이러스 코어 단백질의 내부 및 외부 표면(both inner and outersurface)에 형광 단백질이 융합되어 있고 외부 표면(outer surface)에는 표적 지향성 펩타이드가 표출되어 있는 형광 단백질 나노입자를 제공한다.
- [0016] 또한, 본 발명은,
- [0017] 본 발명에 따른 형광 단백질 나노입자; 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 표적 지향형 조영제 조성물을 제공한다.

- [0018] 또한, 본 발명은,
- [0019] 본 발명에 따른 형광 단백질 나노입자; 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 동시 진단 또는 치료용 조영제 조성물을 제공한다.
- [0020] 또한 본 발명은,
- [0021] 본 발명에 따른 형광 단백질 나노입자; 및 진단 프로브를 포함하고, 상기 진단 프로브는 영상 판독을 위한 표지 물질인 다중 진단 프로브를 제공한다.
- [0022] 또한, 본 발명은
- [0023] 본 발명에 따른 형광 단백질 나노입자; 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 생체 이미징용 조성물을 제공한다.
- [0025] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.
- [0027] 본 발명은 B형 간염 바이러스 코어 단백질의 내부 및 외부 표면(both inner and outer surface)에 형광 단백질이 융합되어 있고, 외부 표면(outer surface)에는 표적 지향성 펩타이드가 표출되어 있는 형광 단백질 나노입자에 관한 것이다.
- [0028] 본 발명의 형광 단백질 나노입자는 나노미터 크기의 직경을 가지는 구형의 단백질 입자로서, 자기조립성 단백질에 의한 자기조립에 의해 입자를 이루고 있어 매우 균일한 입도 분포를 보이는 입자를 재현성 있게 제조할 수 있을 뿐만 아니라, 생체 내에서 사용된 후 분해될 수 있는 생체친화성 물질이기 때문에 생체 이미징 후의 나노입자의 잔존으로 인한 독성의 문제가 없다.
- [0029] 따라서, 본 발명의 형광 단백질 나노입자는 생체 적용이 가능하고 입자에 따른 표적 타겟팅 효과가 우수하여 진단 조직 또는 질환에 적합한 것을 특징으로 한다.
- [0030] 한 구체예에 따르면, 본 발명의 형광 단백질 나노입자는 형광 단백질, B형 간염 바이러스 코어 단백질, 및 표적 지향성 펩타이드가 융합된 단량체가 자가조립되어 하나의 구형 형광 단백질 나노입자를 이룰 수 있다.
- [0031] 본 명세서에서, 용어 “자기조립성 단백질”은 단백질, 단백질의 서브유닛 또는 펩타이드가 수 개가 모였을 때 이들이 스스로 조직적인 구조 또는 패턴을 형성하여 집합체를 형성하는 단백질, 단백질의 서브유닛 또는 펩타이드를 의미한다. 이러한 자기조립성 단백질은 별도의 조작 없이도 단백질의 나노입자 형성을 가능하게 하므로 본 발명에 따른 단백질 나노입자의 제조를 위해 유리하게 사용할 수 있다.
- [0032] 상기 자기조립성 단백질은 외래 단백질과 융합할 수 있고, 상기 외래 단백질은 목적에 따라 자기조립시 내부 및/또는 외부에 위치시킬 수 있다. 본 발명은 단백질 나노입자를 표적 물질의 탐지 목적으로 사용하고 있으므로, 외래 단백질로 형광 단백질과 표적 지향성 펩타이드를 사용할 수 있고, 상기 형광 단백질은 자기조립성 단백질의 자기조립시 내부 및/또는 외부 표면에, 표적 지향성 펩타이드는 자기조립성 단백질의 자기조립시 외부 표면에 위치하도록 조절할 수 있다.
- [0033] 이러한 자기조립성 단백질로 B형 간염 바이러스 코어 단백질(이하, 'HBV 코어 단백질'이라 함)을 사용할 수 있다.
- [0034] HBV 코어 단백질은 180 내지 240개의 단량체가 자가조립되어 하나의 구형 단백질 나노입자를 형성하며, 유전자 재조합 기술을 이용하여 대장균으로부터 대량 생산이 가능하다.
- [0035] 본 발명에 따른 형광 단백질 나노입자는 HBV 코어 단백질의 내부 및 외부 표면에 형광 단백질이 융합되어 있고, 외부 표면(outer surface)에는 표적 지향성 펩타이드가 표출되어 있는 것을 포함한다.
- [0036] 본 발명에 있어서, 형광 단백질 나노입자의 “내부 표면(inner surface)” 및 “외부 표면(outer surface)”은 형광 단백질과 접하여 상기 형광 단백질이 융합될 수 있는 영역을 의미한다. 본 발명에 있어서, 상기 “외부 표면”에는 단백질 나노입자의 표적 지향성 펩타이드가 표출될 수 있다.
- [0037] 본 발명과 같이, 형광 단백질 나노입자의 내부 및 외부 표면에 형광 단백질이 융합되어 있는 경우, 기존의 단일 형광 단백질 나노입자(외부 표면에만 형광 단백질이 융합되어 있는 나노입자)에 비해 형광도가 향상되고 광안전

성이 우수한 단백질 나노입자를 제공할 수 있다.

- [0038] 상기 형광 단백질 나노입자는 HBV 코어 단백질을 이루고 있는 180 내지 240개의 단량체의 1-44번째 아미노산 서열 부분과 상기 단량체의 45-149번째 아미노산 서열 부분 사이; 상기 단량체의 1-45번째 아미노산 서열 부분과 상기 단량체의 46-149번째 아미노산 서열 부분 사이; 또는 상기 단량체의 1-48번째 아미노산 서열 부분과 상기 단량체의 49-149번째 아미노산 서열 부분 사이에 형광 단백질이 위치하고 있다. 형광 단백질이 B형 간염 바이러스 코어 단백질 단량체의 상기 위치에 위치함으로써, 상기 코어 단백질의 자가조립 시 형광 단백질이 내부와 외부 표면에 위치하도록 조절될 수 있다. 다만, 이러한 형광 단백질의 융합은 HBV 코어 단백질의 3차 구조를 형성하는데 영향을 줄 수 있으므로 상기 3차 구조를 형성할 수 있는 범위에서 형광 단백질을 채택할 수 있다.
- [0039] 본 발명의 일 구체예에 따르면, HBV 코어 단백질 단량체의 1-44번째 아미노산 서열 부분과 상기 단량체의 45-149번째 아미노산 서열 부분 사이; 상기 단량체의 1-45번째 아미노산 서열 부분과 상기 단량체의 46-149번째 아미노산 서열 부분 사이; 또는 상기 단량체의 1-48번째 아미노산 서열 부분과 상기 단량체의 49-149번째 아미노산 서열 부분 사이에 mCardinal; 증강된 녹색 형광 단백질(enhanced green fluorescent protein); 또는 적색 형광단백질(DsRed)을 위치시키고, HBV 코어 단백질의 N-말단 또는 C-말단에는 표적 지향성 펩타이드를 결합시킨 키메라 단백질을 제조할 수 있다. 1개의 키메라 단백질, 즉 단량체 180 내지 240개가 자가조립되어 내부 표면에 형광 단백질이 융합되어 있고 외부 표면에 형광 단백질이 융합되어 있으면서 표적 지향성 펩타이드가 표출되어 있는 형광 단백질 나노입자를 형성할 수 있다.
- [0040] 한 구체예에서, 상기 형광 단백질 나노입자의 외부 표면의 형광 단백질은 HBV 코어 단백질의 N-말단에 결합되는 것일 수 있다.
- [0041] 본 발명에 따르면 자기조립성 단백질의 아미노 말단과 카복실 말단이 표면으로 표출되는 특징을 이용하여 내부 표면에는 형광 단백질이 융합되어 있으면서도 외부 표면에 형광 단백질이 표출되어 있는 나노입자를 제조할 수 있다. 예컨대, 내부 표면에 형광 단백질이 융합되어 있으며 외부 표면에는 표적 지향성 펩타이드가 표출되어 있는 형광 단백질 나노입자에 화학적 공정을 통해 형광 단백질을 표면 결합시켜 형광 단백질 나노입자를 형성할 수 있다.
- [0042] 본 발명의 일 구체예에 따르면, HBV 코어 단백질 단량체의 1-44번째 아미노산 서열 부분과 상기 단량체의 45-149번째 아미노산 서열 부분 사이; 1-45번째 아미노산 서열 부분과 46-149번째 아미노산 서열 부분 사이; 또는 1-48번째 아미노산 서열 부분과 49-149번째 아미노산 서열 부분 사이에 mCardinal, 증강된 녹색 형광 단백질(enhanced-green fluorescence protein) 또는 적색 형광 단백질(DsRed)을 위치시키고, 상기 표적 지향성 펩타이드는 HBV 코어 단백질 단량체의 1-78번째 아미노산 서열 부분과 상기 단량체의 81-149번째 아미노산 서열 부분 사이에 결합시켜 키메라 단백질을 제조할 수 있다. 1개의 키메라 단백질 즉, 단량체 180 내지 240개가 자가조립되어 내부 및 외부 표면에 형광 단백질을 융합되어 있고 외부 표면에 표적 지향성 펩타이드가 표출되는 형광 단백질 나노입자를 형성할 수 있다.
- [0043] 일반적으로 형광 단백질들이 1 내지 10nm 이내에 서로 위치할 때 형광의 퀀칭(quenching) 현상이 나타나는 것으로 알려져 있다. 본 발명에 따른 형광 단백질 나노입자는 내부 및 외부 표면에 형광 단백질이 융합되어 있어 퀀칭 현상이 일어나지 않는 간격으로 형광 단백질이 위치할 수 있다. 이에, 본 발명에 따른 형광 단백질 나노입자는 링커 펩타이드 없이 B형 간염 바이러스 코어 단백질과 형광 단백질 및 표적 지향성 펩타이드를 결합시킴으로써 형광 단백질 간의 퀀칭 현상이 일어나지 않는 형광 단백질 나노입자를 형성할 수 있다. 다만, 본 발명의 형광 단백질 나노입자는 형광 단백질 간의 적절한 공간이 확보되는 선에서 링커 펩타이드를 포함할 수도 있다.
- [0044] 한 구체예에서, 상기 자기조립성 단백질은 형광 단백질 또는 표적 지향성 펩타이드와 링커 펩타이드를 통해 융합될 수 있다.
- [0045] 상기 링커 펩타이드는 형광 단백질 간의 적절한 공간을 확보해줄 수 있는 길이를 가질 수 있다. 예컨대, 링커 펩타이드는 1 내지 20개, 3 내지 17개, 4 내지 14개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드일 수 있다.
- [0046] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 링커 펩타이드는 글라이신을 포함하는 것일 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 본 발명의 링커 펩타이드는 예를 들어, SEQ ID NO: 21 및 22에 기재된 아미노산 서열 중 어느 하나로 표시될 수 있다.
- [0047] 또한, 본 발명의 형광 단백질 나노입자는 자기조립성 단백질의 내부 및 외부 표면에 형광 단백질이 융합되어 있으면서도 형광 물질을 표면에 고정시켜 사용할 수 있다. 자기조립성 단백질은 아미노산의 작용기가 표면에 표출되어 있으므로, 유전자 재조합 기술에 의한 외래 단백질의 표면 표출뿐만 아니라 화학적 반응을 통한 기능성 소

재의 표면 고정화가 가능하다. 따라서, 자기조립성 단백질의 자기조립 후 화학적 공정을 통해 형광 물질을 표면에 고정할 수 있다.

- [0048] 이러한 형광 물질로, 플루오레신(fluorescein), 보디피(BODDYPY), ATTO Dyes, 로다민(Rhodamine), 헵타메틴(Heptamethine), DyLight Fluor, 알렉사(Alexa), 시아닌(Cyanine) 또는 알로피코시아닌(allopicocyanine) 등을 사용할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0049] 또한, 본 발명의 형광 단백질 나노입자에 사용할 수 있는 형광 단백질은 mCardinal, 녹색 형광 단백질(GFP), 변형된 녹색 형광 단백질(modified green fluorescent protein), 증강된 녹색 형광 단백질(enhanced green fluorescent protein, eGFP), 적색 형광 단백질(RFP, DsRed), 증강된 적색 형광 단백질(eRFP), 청색 형광 단백질(BFP), 증강된 청색 형광 단백질(eBFP), 황색 형광 단백질(YFP), 증강된 황색 형광 단백질(eYFP), 남색 형광 단백질(CFP), 증강된 남색 형광 단백질(eCFP) 등을 사용할 수 있다.
- [0050] 한 구체예에서, 상기 형광 단백질은 mCardinal 또는 eGFP일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0051] 하기 실시예에서는, mCardinal 형광 단백질을 이용하여 HBV 코어 단백질 나노입자의 내부 표면과 외부 표면에 상기 형광 단백질을 유전학적으로 접합하였으며, 결과적으로 증강된 형광도와 광안정성을 가진 이중층 mCardinal HBVC 나노입자(mC-DL-HBVC)를 제조하였다.
- [0052] 본 발명자들은 이중층 형광 단백질 나노입자(mC-DL-HBVC)의 세세한 구조적, 광학적 특성을 발견하였고, 이의 체외 및 체내 암 세포 표적 이미징과 체내 분포 특성을 발견하였다. 이 결과들은 발명된 이중층 형광 단백질 나노입자(mC-DL-HBVC)가 체내 형광 암 이미징을 위한 조영제로서 큰 잠재력을 가지고 있음을 뒷받침할 수 있다.
- [0053] 한편, 본 발명에서, 용어 “표적 지향성 펩타이드”는 본 발명에 따른 형광 단백질 나노입자에 표적 지향성을 부여할 수 있는 펩타이드를 의미한다. 생체 이미징 소재 개발에 있어서, 표적 특이적으로 타겟팅을 가능하게 하기 위하여 표적 지향성 펩타이드를 나노입자의 표면에 고정하는 기술이 활발하게 연구되고 있다. 하지만 기존 무기, 고분자 기반 나노입자의 경우 화학적 결합을 통해 형광 물질을 표면 수식화 하므로, 동시에 표적 지향성 펩타이드를 표면에 수식화하는데 어려움이 있으며, 형광 물질과 표적 지향성 펩타이드의 표출 빈도를 조절하는데 어려움이 있다. 반면 본 발명에서는 유전공학적 기법을 이용하여 추가 화학적 공정 없이 표적 지향성 펩타이드를 표출하고 형광 단백질이 융합된 단백질 나노입자를 제조할 수 있으며, 표적 지향성 펩타이드의 표면 표출 빈도 및 표출 위치를 조절할 수 있는 장점이 있다.
- [0054] 본 발명에 따른 표적 지향성 펩타이드는 형광 단백질 나노입자의 표면에 표출되어 있다. 따라서, 인비보 이미징에 적용시 본 발명에 따른 형광 단백질 나노입자를 특정 타겟 부위에 전달해주는 역할을 충실히 수행한다.
- [0055] 본 발명에 있어서, 형광 단백질, 자기조립성 단백질 및 표적 지향성 펩타이드가 융합된 단백질; 또는 자기조립성 단백질과 표적 지향성 펩타이드가 융합된 단백질은 하나의 발현 벡터를 통해 발현된다.
- [0056] 따라서, 표적 지향성 펩타이드는 상기 발현 벡터에 쉽게 삽입 가능하면서, 본 발명에 따른 형광 단백질 나노입자의 형광 강도 및 나노입자의 구조에 영향을 미치지 않는 것이라면 펩타이드 서열의 길이와 관계없이 어떠한 것이든 사용할 수 있다. 특히 특정 질환 조직 및 세포에서 특이적으로 과발현되는 수용체에 실제 호르몬과 유사하게 대신 결합하여 신호 전달을 억제한다고 알려진 다수 펩타이드 형태의 수용체 길항제(receptor antagonist); 소마토스타틴(somatostatin), 어피바디(affibody), 봄베신(bombesin), 콜레시스토키닌(cholecystokinin) 또는 가스트린 유사체(gastrin analog) 등의 펩타이드 호르몬 등으로 대체 가능하다.
- [0057] 본 발명의 일 구체예에서, 표적 지향성 펩타이드는 어피바디(affibody)일 수 있다. 상기 어피바디는 매우 많은 수의 타겟 단백질에 특이적으로 결합되도록 조작가능한 작고 강건한 고친화성 단백질 분자를 의미한다. 이에 본 발명에서는 암 세포 특이적 타겟팅을 목적으로 어피바디를 표면 표출하는 형광 단백질 나노입자를 제조하여 암 특이적 타겟팅과 이미징이 동시에 가능하도록 하였다.
- [0058] 상술한 바와 같이, 본 발명에 따른 표적 지향성 펩타이드가 표출된 형광 단백질 나노입자는 높은 형광강도, 우수한 생체 안정성, 다양한 표면 수식화를 토대로 표적 타겟팅과 이미징이 가능하며, 그 효용성이 검증되었다.
- [0059] 이에, 본 발명은
- [0060] 본 발명에 따른 형광 단백질 나노입자; 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 표적 지향형 조영제 조성물을 제공한다.
- [0061] 본 발명의 형광 단백질 나노입자는 표적 지향성 펩타이드가 결합되어 있어 특정 세포나 조직에서 표적 지향이

가능하므로 자기공명 및 광학영상장치를 통해 표적 부위의 이미징이 가능한 조영제로 사용할 수 있다.

- [0062] 상기 약제학적으로 허용가능한 담체는 의약 분야에서 통상 사용되는 담체 및 비히클을 포함하며, 구체적으로 이온 교환 수지, 알루미늄, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질(예컨대, 사람 혈청 알부민), 완충 물질(예컨대 각종 인산염, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 포화 식물성 지방산의 부분적인 글리세라이드 혼합물), 물, 염 또는 전해질(예컨대 프로타민 설페이트, 인산수소이나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨 및 아연염), 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이드, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸 셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스 또는 양모지를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 또한, 본 발명의 조영제 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 유화제, 현탁제, 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0063] 한 양태로서, 본 발명에 따른 조영제 조성물은 비경구 투여를 위한 수용성 용액으로 제조할 수 있으며, 바람직하게는 한스 용액(Hank's solution), 링거 용액(Ringer's solution) 또는 물리적으로 완충된 염수와 같은 완충 용액을 사용할 수 있다. 수용성 주입(injection) 현탁액은 소듐 카르복시메틸셀룰로즈, 솔비톨 또는 텍스트란과 같이 현탁액의 점도를 증가시킬 수 있는 기질을 첨가할 수 있다.
- [0064] 본 발명의 조영제 조성물의 다른 바람직한 양태로는 멸균 주사용 수성 또는 유성 현탁액의 멸균 주사용 제제의 형태일 수 있다. 이러한 현탁액은 적합한 분산제 또는 습윤제(예를 들면, 트윈 80) 및 현탁화제를 사용하여 본 분야에 공지된 기술에 따라 제형화할 수 있다.
- [0065] 또한, 상기 멸균 주사용 제제는 무독성의 비경구적으로 허용되는 희석제 또는 용매 중의 멸균 주사 용액 또는 현탁액(예를 들면 1,3-부탄디올 중의 용액)일 수 있다. 사용될 수 있는 비히클 및 용매로는 만니톨, 물, 링거 용액 및 등장성 염화나트륨 용액이 있다. 또한, 멸균 비휘발성 오일이 통상적으로 용매 또는 현탁화 매질로서 사용된다. 이러한 목적을 위해 합성 모노 또는 디글리세라이드를 포함하여 자극성이 적은 비휘발성 오일은 그 어느 것도 사용할 수 있다.
- [0066] 본 발명의 조영제 조성물은 진단 대상에서 분리한 조직 또는 세포에 투여하여 형광 단백질 나노입자가 발산하는 신호를 감지하여 영상을 획득하는데 이용될 수 있다. 상기 형광 단백질 나노입자에 의해 발산되는 신호를 감지하기 위해서는 자기공명영상장치(MRI)와 광학 이미징의 이용이 바람직하다.
- [0067] 자기공명영상장치는 강력한 자기장 속에 생체를 넣고 특정 주파수의 전파를 조사하여 생체조직에 있는 수소 등의 원자핵에 에너지를 흡수시켜 에너지가 높은 상태로 만든 후, 상기 전파를 중단하여 상기 수소 등의 원자핵 에너지가 방출되게 하고 이 에너지를 신호로 변환하여 컴퓨터로 처리하여 영상화한 장치이다. 자기 또는 전파는 골에 방해받지 않기 때문에 단단한 골 주위 또는 뇌나 골수의 종양에 대하여 종단, 횡단, 임의의 각도에서 선명한 입체적인 단층상을 얻을 수 있다. 특히 상기 자기공명영상장치는 T2 스핀-스핀 이완 자기공명영상장치인 것이 바람직하다.
- [0069] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 형광 단백질 나노입자; 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 동시 진단 또는 치료용 조영제 조성물에 관한 것이다.
- [0070] 본 발명의 형광 단백질 나노입자는 약제학적 활성성분과 물리 화학적으로 결합하여 표적 지향성 펩타이드가 타겟팅하는 세포 또는 조직에서 형광을 나타낼 수 있어 자기공명 및 광학영상장치 등을 통해 생체 분자의 분리, 진단 또는 치료 등의 나노 프로브 및 약물 또는 유전자 전달체(delivery vehicle)등에 이용할 수 있다.
- [0071] 상기 형광 단백질 나노입자를 이용한 생체 진단의 한 대표적인 예로서 분자 자기공명영상 진단 또는 자기 이완 센서(magnetic relaxation sensor)를 들 수 있다. 형광 단백질 나노입자는 그 크기가 커짐에 따라 더 큰 T2 조영효과를 나타내는데, 이러한 성질을 이용하면 생체 분자를 검출하는 센서로 사용될 수 있다. 즉, 특정한 생체 분자가 형광 단백질 나노입자의 영감을 유도하게 되면 이에 의해 T2 자기 공명 영상 효과가 증대된다. 이러한 차이를 이용하여 생체 분자를 검출한다.
- [0072] 또한, 본 발명의 형광 단백질 나노입자는 종양과 관련된 다양한 질병, 예를 들어 편평상피세포암, 자궁암, 자궁경부암, 전립선암, 두경부암, 췌장암, 뇌종양, 유방암, 간암, 피부암, 식도암, 고환암, 신장암, 대장암, 직장암, 위암, 신장암, 방광암, 난소암, 담관암, 담낭암을 진단 및/또는 치료하는데 이용될 수 있다. 또한, 류마티스 관절염, 골관절염과 같은 염증성 질환과, 치매, 뇌졸중 등을 포함하는 난치성 질환에서 영상화하는 방법에 이용될 수 있다. 보다 구체적으로 설명하면, 종양 세포는 정상 세포에서는 거의 또는 전혀 생산되지 않는 특

정 물질을 발현 및/또는 분비하는데 이들을 일반적으로 "종양 마커(tumor marker)"라고 명명한다. 그러한 종양 마커와 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 상기 형광 단백질 나노입자에 결합시켜 만든 형광 단백질 나노입자는 종양 진단에 유용하게 이용될 수 있다. 당업계에는 다양한 종양 마커뿐만 아니라 이들과 특이적으로 결합할 수 있는 물질이 공지되어 있다. 본 발명에서는 표적 지향성 펩타이드로 종양 마커와 특이적으로 결합할 수 있는 펩타이드를 사용함으로써 종양 진단에 이용될 수 있다.

[0073] 상기 종양 마커는 작용 기작에 따라 리간드, 항원, 수용체, 및 이들을 코딩하는 핵산으로 분류할 수 있다. 종양 마커가 "리간드"인 경우에는 상기 리간드와 특이적으로 결합하는 수용체 또는 항체를 표적 지향성 펩타이드로 사용할 수 있고, 수용체의 예로는 시냅토타그민의 C2(synaptotagmin의 C2)와 포스파티딜세린, 아넥신 V(annexin V)와 포스파티딜세린, 인테그린(integrin)과 이의 수용체, VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor)와 이의 수용체, 안지오펀에틴(angiopoietin)과 Tie2 수용체, 소마토스타틴(somatostatin)과 이의 수용체, 바소인테스티날 펩타이드(vasointestinal peptide)와 이의 수용체 등이 있지만 이에 제한되는 것은 아니다.

[0075] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 형광 단백질 나노입자; 및 진단 프로브를 포함하고, 상기 진단 프로브는 영상 관독을 위한 표지 물질인 다중 진단 프로브에 관한 것이다.

[0076] 상기 진단 프로브는 T1 자기공명 영상 진단 프로브, 광학 진단 프로브, CT 진단 프로브, 또는 방사선 동위원소 등을 사용할 수 있다.

[0077] 상기 다중 진단 프로브는 예를 들면, 단백질 나노입자에 T1 자기공명 영상 진단 프로브를 결합시키면 T2 자기공명영상 및 T1 자기공명영상 진단을 동시에 진행할 수 있고, 광학 진단 프로브를 결합시키면 자기공명 영상과 광학 이미징을 동시에 할 수 있으며, CT 진단 프로브를 결합시키면 자기공명영상과 CT 진단을 동시에 할 수 있다.

[0078] 또한 방사선 동위원소와 결합시키면 자기공명영상과 PET, SPECT 진단을 동시에 할 수 있다.

[0079] 상기 T1 자기공명 영상 진단 프로브로는 Gd 화합물, 또는 Mn 화합물 등을 포함하며, 광학 진단 프로브로는 유기 형광 염료(dye), 양자점, 또는 염료 표지(dye labelled) 무기 지지체(예 SiO₂, Al₂O₃)를 포함하며, CT 진단 프로브로는 I(요오드) 화합물, 또는 금 나노 입자를 포함하고, 방사선 동위원소로는 In, Tc, 또는 F 등을 포함한다.

[0081] 본 발명은 또한 상기 형광 단백질 나노입자; 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 생체 이미징용 조성물에 관한 것이다.

[0082] 본 발명에 따르면, 상기 형광 단백질 나노입자는 영상 유도 수술(Image-guided surgery) 이미징에 적용할 수 있다.

[0083] 영상 유도 수술은 수술장에서 수술 도구의 위치를 추적하여 CT 또는 MR 등 환자의 진단 영상에 중첩하여 시각화함으로써 수술의 정확성과 안정성을 높일 수 있는 방법이다.

발명의 효과

[0084] 본 발명은 이중층 형광 단백질 나노입자에 관한 것으로, 내부 및 외부 표면에 형광 단백질이 융합되어 있고 외부 표면에는 표적 지향성 펩타이드가 표출되어 있음으로써 형광도와 광안정성이 우수한 형광 단백질 나노입자를 제공할 수 있다. 본 발명에 따른 형광 단백질 나노입자는 우수한 형광도와 광안정성으로부터 생체 이미징 용도로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0085] 도 1은 형광 단백질로 eGFP를 HBVC에 융합한 형광 단백질 나노입자를 제조하기 위한 발현 벡터의 모식도를 나타낸 것이다.

도 2는 형광 단백질로 mCardinal을 HBVC에 융합한 형광 단백질 나노입자를 제조하기 위한 발현 벡터의 모식도를 나타낸 것이다.

도 3은 유전적 캡슐화와 자기조립을 통한 암 이미징을 위한 이중층 형광 단백질 나노입자의 개발에 대한 전체적인 모식도를 나타낸 것이다. 도 3의 (a)는 기존 B형 간염 바이러스 유래 구형 단백질 입자에 암 표적 펩타이드

를 표면 고정화한 방법과 형광 단백질의 유전적 캡슐화를 위한 방법을 나타내며, (b)는 나노입자 내부의 링커 길이에 따른 형광 입자의 위치 조절과 이에 따른 형광도를 나타낸 것이다.

도 4는 도 3에 따라 순차적으로 제작된 단백질 나노입자(a, b, c, d, f)와 대조군으로 제작된 표면에만 형광 단백질을 가지고 있는 나노입자(e)를 관찰한 TEM 사진을 나타낸 것이다.

도 5는 형광 단백질 나노입자들의 형광 세기 비교(a, c), 구조를 고려한 형광도 계산 예측 결과 비교(b) 및 연속적 레이저 표출에 의한 시간에 따른 형광 단백질 나노입자의 광안정성 측정 결과(d)를 나타낸 것이다.

도 6의 (a)는 단독 형광 단백질과 이중층 형광 단백질 나노입자의 암 표적 인자 성능을 확인한 실험 결과로서, 체외 암세포 타겟팅을 관찰한 근적외선 형광이미지이며, (b)는 (a)의 형광 세기를 나타낸 것이다.

도 7의 (a)는 형광 단백질 나노입자의 암세포 타겟팅 이후 세포 내에서 형광도를 유지하는 정도를 실시간으로 관찰한 사진이며, (b)는 (a)의 형광 세기를 나타낸 것이다.

도 8의 (a)는 이중층 형광 단백질 나노입자가 암 세포 표적 인자가 있는 경우와 없는 경우를 쥐에 주입하여 실시간으로 나노입자의 체내 암세포 표적 성능을 나타낸 것이며, (b)는 (a)의 암 부위의 형광 세기를 시간에 따라 나타낸 그래프이다. (c)는 쥐에 주입한 후 24시간 동안 주요 5 장기(간, 허파, 이자, 신장, 심장)와 암 조직을 적출하여 형광 나노입자의 분포를 관찰한 근적외선 사진이다. (d)는 (c)의 사진에서 간 대비 암에 존재하는 형광 세기를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0086] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[실시예 1] 형광 단백질 나노입자의 제조

[0089] 1) 형광 단백질 나노입자의 제조를 위한 발현 벡터의 제조

[0090] 하기 표 1의 벡터 모식도에 따라 PCR을 수행하여 형광 단백질 나노입자(eGFP_{in}-linker0-HBVC, eGFP_{in}-linker4-HBVC, eGFP_{in}-linker14-HBVC, mC_{in}-HBVC-Affi, mC_{out}-HBVC-Affi, mC-DL-HBVC-Affi, mC-DL-HBVC)를 제작하였다(도 1 및 도 2). 제작된 모든 플라스미드 발현 벡터는 아가로스 겔에서 정제한 후, 완전한 DNA 시퀀싱을 통해 서열을 확인하였다.

[0091] 상기 과정을 통해 만들어진 PCR 산물을 순차적으로 플라스미드 pT7-7 벡터에 삽입하여 각각의 단백질 나노입자를 발현할 수 있는 발현 벡터를 구성하였다.

[0092] HBVC 유래 단백질 나노입자의 제조와 관련된 프라이머 서열과 각각의 단백질 나노입자의 발현용 벡터는 아래 표 1 및 2에 기재하였으며, 이에 대한 상세한 기재는 아래와 같다.

표 1

[0093]

서열번호	명칭	클론 명칭	5'-3' 방향
SEQ ID NO: 1	프라이머1	5' L1a-HBVC1	GGC TCT GGT GGC GGA AGT GGG GGA GGC ACT GGA GGT GGC GGC GGT GGG TAC TAT TAC TAT TAC TAT GAC ATT GAC
SEQ ID NO: 2	프라이머2	5' L1b-HBVC1	ATG GCG TCT AGT CTG CGT CAG ATT CTG GAT TCT CAG AAA ATG GAA TGG CGT TCT AAT GCG GGT GGC TCT GGT GGC
SEQ ID NO: 3	프라이머3	5' NdeI-H6-XhoI -L1-HBVC1	CAT ATG CAT CAC CAT CAC CAT CAC CTC GAG ATG GCG TCT AGT
SEQ ID NO: 4	프라이머4	3' NcoI-HBVC48	CCA TGG ACA ATG TTC CGG

SEQ ID NO: 5	프라이머5	5' <i>SacI</i> -HBVC49	GAG CTC TCA CCT CAC CAT
SEQ ID NO: 6	프라이머6	3' <i>ClaI</i> -HBVC149	ATC GAT TTA AAC AAC AGT AGT TTC
SEQ ID NO: 7	프라이머7	5' <i>NcoI</i> -eGFP	CCA TGG GTG AGC AAG GGC GAG
SEQ ID NO: 8	프라이머8	3' <i>SacI</i> -eGFP	GAG CTC CTT GTA CAG CTC GTC
SEQ ID NO: 9	프라이머9	5' <i>NcoI</i> -linker4-eGFP	CCA TGG GGT GGC GGT GGC GTG AGC AAG
SEQ ID NO: 10	프라이머10	3' <i>SacI</i> -linker4-eGFP	GAG CTC GCC ACC GCC ACC CTT GTA CAG
SEQ ID NO: 11	프라이머11	5' <i>NcoI</i> -linker14-eGFP	CCA TGG GGT GGC GGA AGT GGG GGA GGC ACT GGA GGT GGT GGC GGT GGC GTG AGC AAG
SEQ ID NO: 12	프라이머12	3' <i>SacI</i> -linker14-eGFP	GAG CTC GCC ACC TCC AGT GCC TCC CCC ACT TCC ACC GCC ACC GCC ACC CTT GTA CAG
SEQ ID NO: 13	프라이머13	5' <i>NcoI</i> -mC	CCA TGG CTT GTA CAG CTC GTC
SEQ ID NO: 14	프라이머14	3' <i>SacI</i> -mC	GAG CTC CTT GTA CAG CTC GTC
SEQ ID NO: 15	프라이머15	5' <i>NdeI</i> -H6-mC	CAT ATG CAT CAC CAT CAC CAT CAC ATG GTG AGC AAG GGC
SEQ ID NO: 16	프라이머16	3' <i>XhoI</i> -mC	CTC GAG CTT GTA CAG CTC GTC
SEQ ID NO: 17	프라이머17	3' <i>EcoRI</i> -HBVC63	GAA TTC AGT ACC GCC CCC CCC ACT CCC TCC GCC ACC GTC TTC CAA ATT
SEQ ID NO: 18	프라이머18	5' <i>BamHI</i> -HBVC64	GGA TCC GGT GGC GGA GGG TCT GGG GGA GGC GGT TCC AGG GAA TTA
SEQ ID NO: 19	프라이머19	5' <i>EcoRI</i> -L2-EA	GAA TTC GGT GGC GGA AGT GGG GGA GGC ACT GGA GGT GGC AGT GGC GGT GGG GTG GAT AAC
SEQ ID NO: 20	프라이머20	3' <i>BamHI</i> -L2-EA	GGA TCC CCC ACC GCC ACT GCC ACC TCC AGT GCC TCC CCC ACT TCC GCC ACC TTT CGG CGC

- [0095] 1) 첫 번째 부분은 HBV 코어 단백질의 유전자 서열(NCBI Nucleotideaccession number:[0085] AF286594 서열 중 1901-2452 서열)을 주형으로 프라이머 1과 프라이머 4번을 이용하여 Chain Reaction(CR)을 진행하였다. L1 5'에 서열의 2분의 1과 3'에 제한 효소 *NcoI* 을 포함한 5 '-L1(1/2)-HBV 코어 단백질(아미노산 서열 1-48)-*NcoI*-3'으로 이루어진 PCR 산물을 확보하였다. 이를 다시 주형으로, 프라이머 2와 프라이머 4번을 이용하여 CR을 진행하였고 L1 전체 서열을 5'에 부착한 후, 이를 다시 주형으로 프라이머 3과 프라이머 4를 이용하여 CR을 진행하였다. 그 결과, 5'에 제한 효소 *NdeI*, 6개 히스티딘, 제한 효소 *XhoI* 서열을 부착한 5 '-*NdeI*-h6-*XhoI*-L1-HBV 코어 단백질(아미노산 서열 1-48)-*NcoI*-3'을 확보하였다.
- [0096] 2) 두 번째 부분은 HBV 코어 단백질의 유전자 서열을 주형으로 하여 제한 효소 *SacI*이 포함되어 있는 프라이머 5와 *ClaI*를 포함하고 있는 프라이머 6를 이용하여 PCR을 진행하였다. 그 결과 5 '-*SacI*-HBV 코어 단백질(아미노산 서열 49-149)-*ClaI*-3'으로 이루어진 PCR 산물을 확보하였다.
- [0097] 3) 세 번째 부분은 eGFP의 염기서열을 주형으로 하여(NCBI Nucleotideaccession number of eGFP: AJ566337) *NcoI* 및 *SacI*을 각각 포함하고 있는 프라이머 7과 프라이머 8, *NcoI* 및 *G₄*를 포함하는 프라이머 9과 *SacI* 및 *G₄*를 포함하는 프라이머 10, *NcoI* 및 *G₃SG₃TG₆*를 포함하는 프라이머 11과 *SacI* 및 *G₃SG₃TG₆*를 포함하는 프라이머 12의 3쌍의 프라이머를 이용하여 각각 PCR을 수행하였다. 결과적으로 5'-*NcoI*-eGFP-*SacI*-3'과 5'-*NcoI*-*G₄*-eGFP-*G₄*-*SacI*-3'과 5'-*NcoI*-*G₃SG₃TG₆*-eGFP-*G₃SG₃TG₆*-*SacI*-3', 총 3개의 PCR 산물을 확보하였다.
- [0099] 1) 내지 3)의 과정을 통해서 만들어진 5개의 PCR 산물을 순차적으로 pT7-7 벡터에 삽입하여 HBV 캡시드 유래 키메라 eGFP 내부 형광 나노입자를 합성할 수 있는 발현 벡터를 구성하였다(도 1).

- [0101] 4) mCardinal(NCBI Nucleotideaccession number of mCardinal: KJ131552))의 염기서열을 주형으로 하여 제한 효소 *NcoI* 및 *SacI*을 각각 포함하고 있는 프라이머 13과 프라이머 14, 그리고 제한 효소 *NdeI* 및 여섯 개의 히스 티딘을 포함한 프라이머 15과, 제한 효소 *XhoI*을 포함한 프라이머 16을 이용하여 각각 PCR을 수행한 후, 5'-*NcoI*-mC-*SacI*-3'과 5'-*NdeI*-h6-mC-*XhoI*-3'의 PCR 산물을 확보하였다.
- [0102] 5) 도 1에서 사용한 HBV 코어 단백질 서열을 주형으로 하여, 프라이머 5와 *EcoRI*을 포함하는 프라이머 17, 그리고 *BamHI*을 포함하는 프라이머 18과 프라이머 6의 두 쌍을 이용하여 각각 PCR을 수행하였으며, 5'-*SacI*-HBVC(49-63)-*EcoRI*-3'과 5'-*BamHI*-HBVC(64-149)-*Clal*-3' 두 개의 PCR 산물을 확보하였다.
- [0103] 6) US20160074511에서 사용한 EGFR(epidermal growth factor receptor I)-binding affibody 염기 서열을 주형 으로 하여 제한 효소 *EcoRI* 및 G₃SG₃TG₃SG₃을 포함하는 프라이머 19와 제한 효소 *BamHI* 및 G₃SG₃TG₃SG₃을 포함하 는 프라이머 20과 PCR을 진행하여, 5'-*EcoRI*-L2-EA-L2-*BamHI*-3' PCR 산물을 확보하였다.
- [0105] 4) 내지 6)의 과정을 통해서 만들어진 5개의 PCR 산물과 도 1에서 이용되었던 5 '-*NdeI*-h6-*XhoI*-L1-HBV 코어 단 백질(아미노산 서열 1-48)-*NcoI*-3'을 순차적으로 pT7-7 벡터에 삽입하여 HBV 캡시드 유래 키메라 mCardinal 형 광 나노입자를 합성할 수 있는 발현 벡터를 구성하였다. 또한, 형광 단백질 나노입자의 암세포 표적 기능과 형 광 강도 개선을 위한 형광단백질 발현벡터를 제조하였다(도 2).
- [0106] 본 발명에서 구축한 형광 나노입자 발현 벡터는 표 2와 같다.

표 2

[0107]

형광 단백질 나노입자	발현 벡터	벡터 도식도
링커 펩타이드 14개 아미노산 이 연결된 eGFP가 캡슐화된 HBVC 단백질	pT7-eGFPin-linker14-HBVC	NH ₂ - <i>NdeI</i> -H ₆ -L1 (MASSLRQILDSQKMEWRNAGGSG ₃ SG ₃ TG ₆ Y ₆)- capsid subunit(1-48)-linker (n=14: G ₃ SG ₃ TG ₆)-eGFP-linker (n=14: G ₃ SG ₃ TG ₆)-capsid subunit(49-149)- <i>Clal</i> -COOH
링커 펩타이드 4개 아미노산 이 연결된 eGFP가 캡슐화된 HBVC 단백질	pT7-eGFPin-linker4-HBVC	NH ₂ - <i>NdeI</i> -H ₆ -L1-capsid subunit(1-48)-linker(n=4: G ₄)-eGFP-linker (n=4: G ₄)-capsid subunit(49-149)- <i>Clal</i> -COOH
링커 펩타이드 0개 아미노산 이 연결된 eGFP가 캡슐화된 HBVC 단백질	pT7-eGFPin-linker0-HBVC	NH ₂ - <i>NdeI</i> -H ₆ -L1-capsid subunit(1-48)-eGFP-capsid subunit(49-149)- <i>Clal</i> -COOH
표면에 affibody 펩타이드가 추가로 표출된 mCardinal가 캡슐화된 HBVC 단백질	pT7-mCin-HBVC-Affi	NH ₂ - <i>NdeI</i> -H ₆ -L1-capsid subunit(1-48)-mC-capsid subunit(49-78)-L2 (G ₃ SG ₃ TG ₃ SG ₃)-Affi [(EGFR-binding affibody peptide) ₂]-L2-capsid subunit(81-149)- <i>Clal</i> -COOH
표면에 affibody 펩타이드가 추가로 표출된 mCardinal가 표면에 부착된 HBVC 단백질	pT7-mCout-HBVC-Affi	NH ₂ - <i>NdeI</i> -H ₆ -mC-L1-capsid subunit(1-78)-L2-Affi-L2-capsid subunit(81-149)- <i>Clal</i> -COOH
표면에 affibody 펩타이드가 추가로 표출된 mCardinal가 표면과 내부에 캡슐화되어 이중층을 형성한 HBVC 단백질	pT7-mC-DL-HBVC-Affi	NH ₂ - <i>NdeI</i> -H ₆ -mC-L1-capsid subunit (1-48)-mC-capsid subunit(49-78)-L2-Affi [(EGFR-binding affibody peptide) ₂]-L2-capsid subunit(81-149)- <i>Clal</i> -COOH
mCardinal가 표면과 내부에 캡슐화되어 이중층을 형성한 HBVC 단백질	pT7-mC-DL-HBVC	NH ₂ - <i>NdeI</i> -H ₆ -mC-L1-capsid subunit(1-48)-mC-capsid subunit(49-149)- <i>Clal</i> -COOH

[0109] 2) 형광 단백질 나노입자의 생합성

[0110] HBVC의 자가조립을 통한 형광 단백질의 캡슐화를 위해서, 도 3의 모식도와 같은 유전적 조작을 체계적으로 수행하였다. HBVC 단량체는 형광 단백질(enhanced-green fluorescent protein; eGFP 또는 mCardinal; mC)과 유전적으로 연결되어 자가조립을 통해 *E. coli*의 세포질에서 단일(ML-) 또는 이중층(DL-FPNPs)의 형광 단백질 나노입자를 형성하였다. 이때 HBVC의 48번째 cysteine과 49번째 serine 아미노산 사이에 형광 단백질을 유전적으로 삽입하여 자가조립을 통해 내부층으로 형광 단백질이 융합되도록 하였다. 추가적으로, 형광 단백질을 HBVC 단량체의 N-말단에 유전적으로 삽입하여 기존의 단일 형광 단백질에 비해 향상된 형광도와 광안정성을 갖는 이중층 형광 단백질 나노입자를 제조하였다. 이때 형광 단백질로는 eGFP를 이용하였으며, 상기 eGFP와 HBVC 단량체를 이어주는 링커 펩타이드는 아미노산 개수가 n=0, 4, 14인 펩타이드를 이용하였다. 구조물 간의 입체 장애를 최소화하기 위해 유연한 Glycine이 많은 링커를 사용하였다.

[0111] 구체적으로, 대장균 균주 RosettaTM (DE3)를 상기 실시예 1에서 제조한 발현 벡터로 각각 형질 전환하고, 앰피실린-저항성 형질 전환체를 선택하였다. 형질 전환된 대장균을 50 mL의 Luria-Bertani(LB) 배지(100 mg L⁻¹ 앰피실린 함유)를 함유하는 플라스크(250 mL Erlenmeyer flasks, 37°C, 150 rpm)에서 배양하였다. 배지 탁도(O.D₆₀₀)가 약 0.6에 도달할 때, IPTG(Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)(1.0 mM)을 주입하여 재조합 유전자의 발현을 유도하였다.

[0112] 20°C에서 20시간 배양한 후, 배양한 대장균을 4,500 rpm으로 10분간 원심 분리하여 균체 침전물을 회수한 후 5 mL의 파쇄 용액(10 mM Tris-HCl 완충액, pH 7.5, 10 mM EDTA)에 현탁하여 초음파 파쇄기(Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT, USA)를 이용하여 파쇄하였다. 파쇄한 후 13,000 rpm으로 10분간 원심분리한 뒤 상등액과 불용성 응집체를 분리하였다. 분리된 상등액을 추후 실험에 이용하였다.

[0114] [실시예 2] 형광 단백질 나노입자의 정제

[0115] 상기 실시예 1에서 수득한 상등액에 대해 형광 단백질이 융합된 단백질 나노입자를 정제하기 위해 3단계의 정제 과정을 거쳐 진행하였다.

[0116] 먼저, 1) 재조합 단백질에 융합 발현된 히스티딘과 니켈의 결합을 이용한 Ni²⁺-NTA affinity 크로마토그래피를 진행한 후, 2) 자가조립된 구형 형광 단백질 나노입자만을 분리하기 위하여 수크로스 구배 초고속 원심분리(ultracentrifugation)를 진행하였다. 3) 수크로스 구배로부터 선별된 구형 형광 단백질을 버퍼 교환 과정을 통해 수크로스 용액을 제거하였다. 각 단계의 구체적인 과정은 다음과 같다.

[0117] 1) Ni²⁺-NTA affinity 크로마토그래피

[0118] 재조합 단백질을 정제하기 위하여 상기 명시된 동일한 방법으로 배양된 대장균을 회수하여 그 세포 펠렛(pellet)을 5 mL 라이시스(lysis) 버퍼(pH 8.0, 50 mM의 sodium phosphate, 300 mM의 NaCl, 20 mM의 imidazole)에 재부유하고 초음파 파쇄기를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 세포액을 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 그 상등액만 분리한 후 각 재조합 단백질을 Ni²⁺-NTA 컬럼(Qiagen, Hilden, Germany)을 사용하여 각각 분리하였다 (세척 버퍼: pH 8.0, 50 mM의 sodium phosphate, 300 mM의 NaCl, 80 mM의 imidazole / 용출 버퍼: pH 8.0, 50 mM의 sodium phosphate, 300mM의 NaCl, 200 mM의 imidazole).

[0119] 2) 수크로스 구배 초고속 원심분리

[0120] 자가조립용 버퍼인 PBS(2.7 mM의 KCl, 137 mM의 NaCl, 2 mM의 KH₂PO₄, 10mM의 Na₂HPO₄, pH 7.4) 버퍼에 수크로스를 농도별로 각각 첨가하여 40%, 35%, 30%, 25%, 20%의 수크로스를 포함하는 용액을 각각 준비한 후 초고속 원심 분리용 튜브(ultraclear 13.2ml tube, Beckman)에 각 농도별(45 내지 20%) 수크로스 용액을 농도가 높은 용액부터 2 mL씩 담은 다음, 준비된 자가조립용 버퍼에 존재하는 재조합 단백질 용액을 1 mL 채운 후 35,000 rpm으로 16시간 동안 4 °C로 초고속 원심 분리를 시행하였다(Ultracentrifuge L-90k, Beckman). 원심 분리 후 주사기를 이용하여 구형 형광 단백질 나노입자로 예측되는 층(40-50% 수크로스 용액 부분)을 수거하였다.

[0121] 3) 버퍼 교환을 통한 수크로스 용액 제거

[0122] 수거된 용액에서 수크로스를 제거하기 위해 초고속 원심분리 필터(ultracentrifugal filter; Amicon Ultra

100K, Millipore, Billerica, MA)와 PBS 버퍼를 이용하여 재조합 단백질의 버퍼를 교체해 주었다.

[실시예 3] 형광 단백질 입자의 조립 검증

상기 실시예 3에서 제작한 정제된 재조합 단백질 나노입자의 구조 분석을 위해 투과전자현미경(TEM)을 이용하여 재조합 단백질을 촬영하였다. 먼저, 염색되지 않은 정제한 단백질 샘플을 탄소가 코팅된 구리 전자 현미경 그리드(grid)에 올린 후 자연 건조하였다. 단백질 나노입자의 염색된 이미지를 얻기 위해, 자연 건조된 샘플을 포함하는 전자 현미경 그리드를 2%(w/v) 수성 우라닐 아세테이트 용액과 함께 2분동안 실온에서 인큐베이션하고, 증류수로 3-4회 세척하였다. 상기 단백질 나노입자의 이미지를 Philips Technai 120 kV 전자 현미경을 이용하여 관찰한 결과를 도 4에 나타내었다.

그 결과, 각각의 입자들이 구형 또는 원기둥 모양의 약 40nm 정도의 크기를 갖는 나노입자를 형성하는 것을 통해 자가조립이 잘 이루어졌음을 확인할 수 있었다.

[실시예 4] 형광 단백질 입자의 광안정성 검증

형광 단백질 나노입자의 광안정성을 확인하기 위해, pH 7.4인 버퍼 안에 들어있는 각각의 형광 단백질 입자와 컨트롤 mCardinal과 Cy5.5를 glass cover slip 위에 10 μ l 떨어뜨렸다. 계속 여기(continuous excitation; 590-650nm)를 10분동안 각 샘플들에 유지시키면서 각 샘플들의 형광을 60초에 한 번씩 Fluorescence Microscope(Olympus IX81, Tokyo, JP)를 이용하여 모니터링하였다. 형광 세기는 캡처된 형광 이미지들로부터 ImageJ software(National Institutes of Health, MD, USA)로 수량화하였다.

또한, 도 5c에서 형광 물질 중 mC-DL-HBVC는 가장 강한 형광도를 방출하는 것을 확인하였다. mC-DL-HBVC의 형광도가 mCout-HBVC와 mCin-HBVC로부터의 형광도의 합보다 대략 23% 높았다. 이는 240개의 단량체를 갖는 mC-DL-HBVC와 mCin-HBVC(T=4 symmetry)에 비해 mCout-HBVC(T=3 symmetry, 32nm)가 상대적으로 적은 수의 단량체(180개)를 갖기 때문이며, mC-DL-HBVC는 통상적으로 사용되는 유기 형광 물질인 Cy5.5의 형광 세기보다 같은 물 농도에서 약 24배 더 높았다.

도 5d에서, mC 단량체와 mCout-HBVC 나노입자는 광 노출 10분 이내에 70~80%의 초기 형광 세기를 잃었으나, mCin-HBVC 및 mC-DL-HBVC 나노입자는 10분 이상의 광 노출에도 60% 이상의 초기 형광 세기를 유지하였다. 측정된 모든 형광체들 중 Cy5.5가 가장 낮은 광 안정성을 보였다.

상기 결과를 통해 HBVC 단백질 나노입자는 캡슐화된 mCardinal을 광 퇴색(photobleaching)으로부터 효과적으로 보호하는 견고한 생물학적 케이지로 사용될 수 있음을 증명하였다.

[실시예 5] 형광 단백질 나노입자의 내부 링커 펩타이드 길이에 따른 형광 효율도(η) 검증

형광 단백질 나노입자의 내부에 존재하는 링커 펩타이드의 길이와 자가 꺼짐 현상(self-quenching)의 상관관계를 확인하기 위해, 형광 에너지 전달식(일반식)을 이용하여 형광 효율도(η)를 분석하였다.

[일반식]

$$\eta(r) = QY \left(\frac{r^6}{r^6 + R_0^6} \right) = QY(1 - E) = QY \left(\frac{F}{F_0} \right)$$

상기 일반식에서 QY는 양자 수율(=0.6 for eGFP); r은 두 형광체 사이의 거리; R₀는 효과적인 ?칭 반지름[= (N ϵ)^{1/6} R_F = 3.49, where N is effective number of fluorescence acceptors in the nearest neighbor (= 6 under the assumption that fluorophores inside eGFP_{in}-HBVC are closely packed through hexagonal arrangement on the internal spherical surface), ϵ 는 0에서 1 사이 값을 갖는 잃음 파라미터(= 0.03 분 발명에서 사용됨), 그리고 R_F는 Förster distance (= 4.65 nm for eGFP)]; E는 에너지 전송 효율; 그리고 F와 F₀는 eGFP_{in}-HBVC에 캡슐화된 eGFPs와 eGFP 단량체의 형광 세기를 나타낸다.

- [0139] 세 가지의 링커 펩타이드 길이($n=0, 4, 14$)와 두 가지의 다른 symmetries($T=3, 4$)의 구조를 고려하여 η 값을 예측할 수 있었다. 또한, 식 $\eta=QY(1-E)$ (상기 식에서 QY와 E는 각각 quantum yield 및 eGFP의 energy transfer efficiency로 정의된다)을 이용하여 실험적으로 유추된 η 와 비교하였다. eGFP_{in}-HBVC의 형광도(F)와 표준입자 eGFPs의 형광도(F_0)를 이용하여 $E=1-F/F_0$ 식에 대입하여 에너지 전달 효율을 구하였다.
- [0140] 도 5b에서, 예측된 η 값은 실험적으로 유추한 값과 일치하였으나, capsid symmetry를 고려하였을 때, 값에 큰 영향은 없었다. 결과적으로 링커의 길이가 실제로 자가 꺼짐 현상에 영향을 주는 주요 인자임을 확인하였다.
- [0142] [실시예 6] 제조된 형광 단백질 나노입자들을 이용한 NIR 이미지 분석
- [0143] 1) 생체외(*in vitro*) 암세포 이미지 분석
- [0144] 본 발명에 따른 형광 단백질 나노입자(mC-DL-HBVC)의 EGFR을 통한 세포 표적 성능을 mCardinal 단량체의 경우와 비교하여 생체의 암세포 이미지 분석을 통해 확인하였다.
- [0145] 36 시간 인큐베이션된 암세포 (1×10^4 cells/dish) 에 mC-DL-HBVC 에 affibody 펩타이드가 있는 입자(mC-DL-HBVC(affi+))와 없는 입자(mC-DL-HBVC(affi-))(2nM)와 mC 단량체(mC monomer)에 affibody 펩타이드가 있는 것(mC+)과 없는 것(-)(200nM)를 1시간 동안 처리하였다. 이후, PBS (pH 7.4) 용액으로 세척한 후, 4%의 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)와 0.1%의 글루타르알데하이드(glutaraldehyde)로 10분 동안 세포를 고정하고 4',6'-diamidino-2-phenylindole hydrochloride(DAPI)로 세포 핵을 염색하였다. 그리고 이와 같이 처리된 세포들을 공초점 레이저 주사 현미경(Confocal Laser Scanning Microscope; LSM 700, Carl-Zeiss, Jena, Germany)으로 형광 세포의 이미지를 관찰하였다. 형광 여기(Fluorescence excitation)와 방출(emission)은 각각 523-635nm와 560-675nm의 long pass filter를 사용하였다. 각각의 형광 이미지는 도 6에 나타내었으며, ImageJ software를 이용하여 분석하고 형광도를 정량화하였다.
- [0146] 도 6a 및 6b에서와 같이, EGFR affibody 펩타이드가 없는 경우, mC-DL-HBVC와 mC 단량체 모두 세포 내부로 들어가지는 못했다. 그러나, 표면에 affibody 펩타이드가 존재하는 경우 모두 세포 안으로 들어가는 것을 확인할 수 있다. 이는 표면의 affibody 펩타이드가 세포 유입 과정에서 효과적인 중간 매개체 역할을 하고 있는 것을 보여주며, 특히 mC-DL-HBVC는 mC 단량체보다 100배 낮은 농도에서 7배 높은 형광도를 보여주었다. 이는 본 발명의 형광 단백질 나노입자의 암 세포 표적 능력이 표적 펩타이드가 단일체로 존재할 때보다 현저하게 뛰어남을 나타낸다.
- [0148] 세포 내부에서의 형광 단백질 나노입자의 안정성을 측정하기 위해서 암 세포에 같은 농도의 mC-DL-HBVC(2nM), mC_{in}-HBVC(2nM), mC_{out}-HBVC(2nM)의 형광 단백질 나노입자를 3시간 동안 처리한 후, 세포 내부로 들어가지 않은 입자들을 씻어낸 다음, 새 배지를 넣어 24시간동안 37℃에서 추가로 배양하였다. 이후 특정 시간 간격(3, 6, 12 및 24시간)으로 공초점 레이저 현미경을 통해 세포의 형광도를 관찰하였다. 그 결과를 도 7a에 나타내었다.
- [0149] 도 7a는 세포 내부에서 점 모양의 형광 패턴을 보임으로써, mC-DL-HBVC, mC_{out}-HBVC 및 mC_{in}-HBVC 엔도솜(endosome) 또는 라이소솜(lysosome)에 위치하는 것을 보여준다.
- [0150] 도 7b를 보면, mC-DL-HBVC와 mC_{in}-HBVC의 형광 단백질 나노입자가 처리된 세포는 12시간 포인트에서 40% 이상의 초기 형광도를 유지하였지만, mC_{out}-HBVC 형광 단백질 나노입자를 처리한 세포는 12시간 이내에 90% 이상 처음 형광도를 잃는 것을 확인할 수 있다. mC_{out}-HBVC의 경우 세포 내에서 형광 세기가 빠르게 약해지는 반면, mC_{in}-HBVC는 가장 느리게 감소하는 양상을 보였다. 이는 낮은 pH에서 분해가 쉬운 mCardinal이 넓은 pH 범위에서 안정한 HBVC 나노입자 내부에서 효과적으로 보호되었음을 나타낸다.
- [0151] 2) 생체내(*in vivo*) 암세포 이미지 분석
- [0152] mC-DL-HBVCs에서 affibody peptides의 유무에 따라 (affi+)와 (affi-)로 나누었으며, 상기 나노입자들을 EGFR 과발현 암 세포를 갖는 쥐에 정맥 주사하여 mC-DL-HBVCs의 생체내 분포와 암으로의 전달 양상을 24시간동안 형광 이미징 장비로 관찰하였다($n=4$).
- [0153] 대조군으로는 상용화된 근적외선 합성 형광 물질인 Cy5.5가 부착된 affibody peptides가 표출된 HBVC(Cy5.5-

HBVC(affi+))를 화학적 연결 방법을 통해 준비하였다. 상기 실시예 3에서 제작한 3가지의 단백질 나노입자(DL-HBVC(affi+), DL-HBVC(affi)와 Cy5.5-HBVC(affi+))의 형광도를 맞춘 후 5주된 누드 마우스에 주입하여 암 세포에 생체내 조건에서의 암 표적 효율을 관찰하였다. 이때, 마우스에 주입하기 전에 mC-DL-HBVC(affi+), mC-DL-HBVC(affi-) 및 Cy5.5-HBVC(affi+)는 형광도가 모두 같도록 조정하였다.

[0154] 형광 물질 주입 전, 후에 따른 시간별 쥐의 몸체를 IVIS spectrum Imaging System(Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA)을 통해 관찰하였으며, 그 결과를 도 6에 나타내었다. 이때 사용된 DL-HBVC의 여기/방출 채널(excitation/emission channel)은 600nm/670nm이며, Cy5.5-HBVC(affi(+))의 여기/방출 채널은 660nm/710nm이었다. 상기 이미지 분석 및 형광도 정량화는 IVIS software를 통해 수행하였고, 형광 세기는 radiant efficiency (photons/s/cm²/sr per μ W/cm²)로 정규화하였다.

[0155] 형광 물질이 투입된 쥐의 시간에 따른 형광도 변화를 확인하기 위해 근적외선 형광 이미징을 관찰하였다. 또한, 쥐 내부의 형광 물질 분포도를 관찰하기 위해, 형광 이미징 실험에 사용된 쥐를 해부하여 5개의 주요 장기들(간, 허파, 이자, 신장, 심장)을 상기와 같은 기계로 *ex vivo* 근적외선 형광 촬영을 실시하였다. 해부된 장기와 암 조직은 PBS 버퍼로 씻겨진 후 4%의 포르말데하이드(formaldehyde)로 고정하여 형광 이미징 촬영을 실시하였다.

[0156] 그 결과, 도 8에서 보는 것과 같이, 도 8a에서 mC-DL-HBVC(affi+)의 경우가 높은 대비로 암 부위에 나타나면서 암으로 전달되었음을 확인하였다. 또한, 도 8b에서는 표적 지향성 펩타이드인 affibody가 mC-DL-HBVC의 암 표적 기능 및 전달을 증대시켰음을 보여주었다.

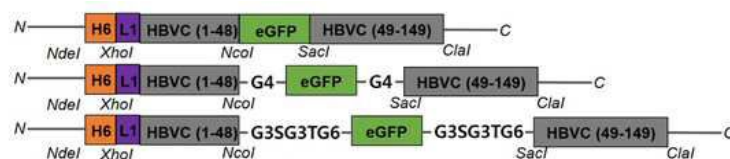
[0157] 또한, 도 8c에서 볼 수 있듯이, mC-DL-HBVC(affi+) 경우와 Cy5.5-HBVC(affi+) 경우를 비교했을 때, Cy5.5-HBVC(affi+)가 간에서 훨씬 많은 축적을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 도 8d에서는 Cy5.5-HBVC(affi+)가 암 대비 간 형광도 비율에서 가장 낮은 값을 보였다. 이는 Cy5.5가 친유성(lipophilicity)을 가지고 있고, 음전하를 띄어 간에 축적되는 경향이 크기 때문인 것으로 보인다(측정된 Cy5.5-HBVC(affi+)의 제타포텐셜 값은 -8.45mV이다).

[0158] 상기 실험을 통해, mC-DL-HBVC(affi+)는 단백질 기반 친수성 형광 나노입자로서 상용화된 유기 형광 물질인 Cy5.5보다 낮은 간 축적도를 보이며, 높은 형광도와 광안정성, 그리고 우수한 생체 내 암 이미징 성능을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 본 발명에 따른 형광 단백질 나노입자는 형광 물질의 좋은 광안정성과 긴 방출 파장을 요구하는 실시간 이미징 도움 수술 분야에 매우 적합한 물질로 사용될 수 있다.

도면

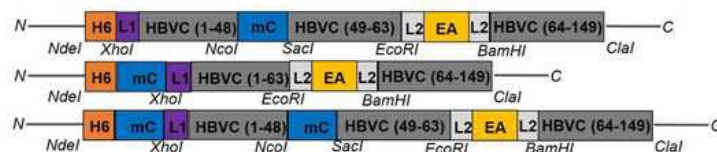
도면1

GFPin-HBVC
GFPin-4aa-HBVC
GFPin-14aa-HBVC

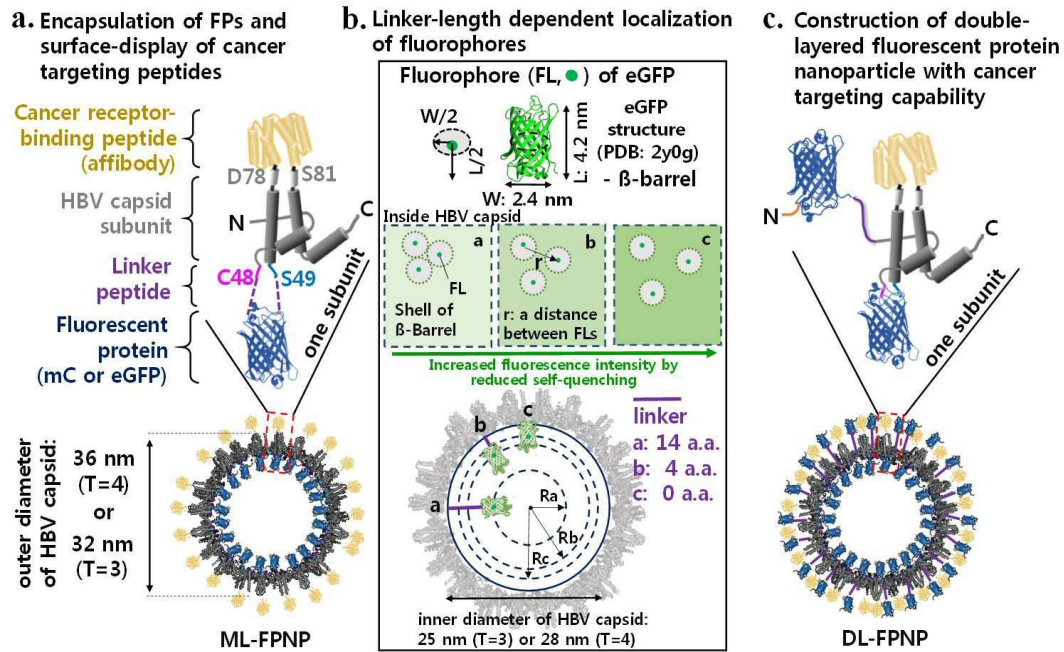


도면2

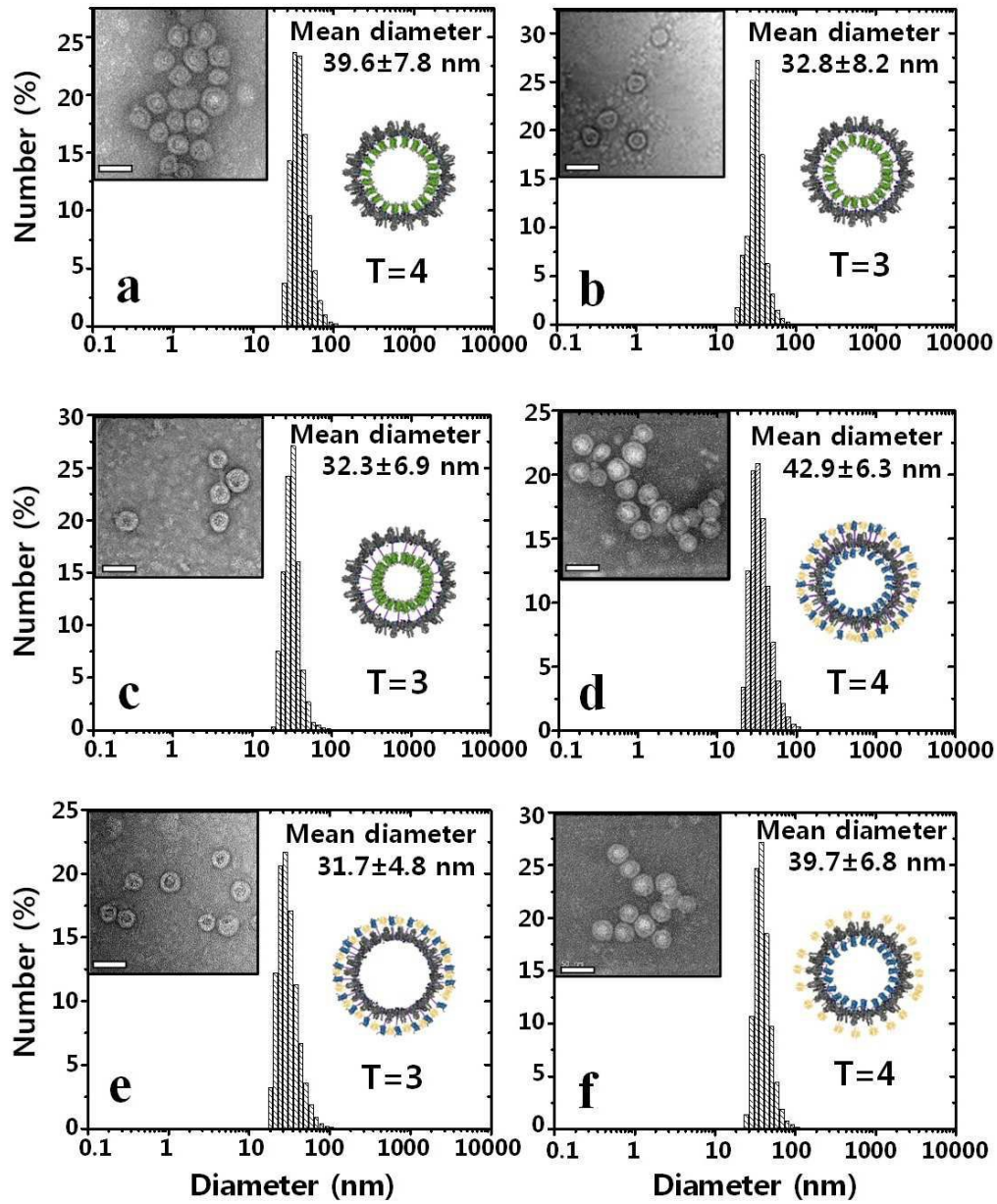
mCin-HBVC
mCout-HBVC
mC-DL-HBVC



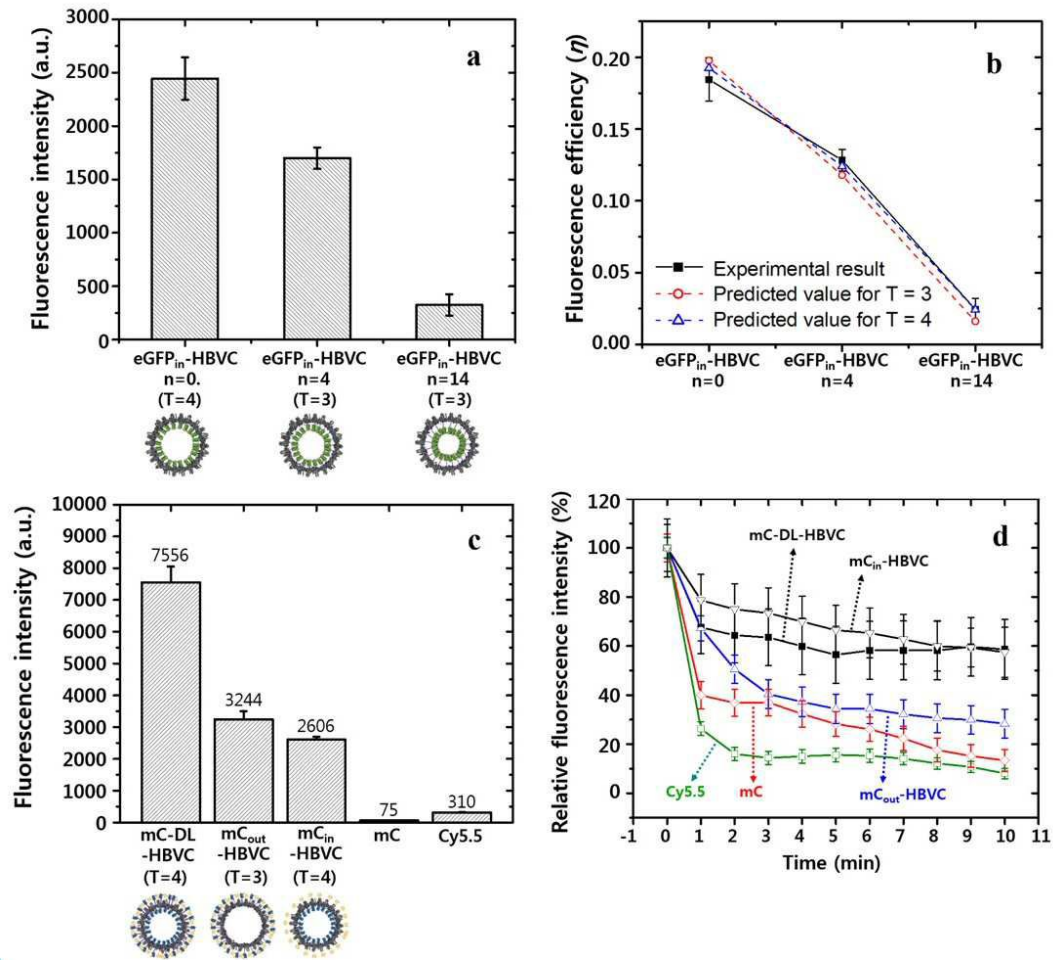
도면3



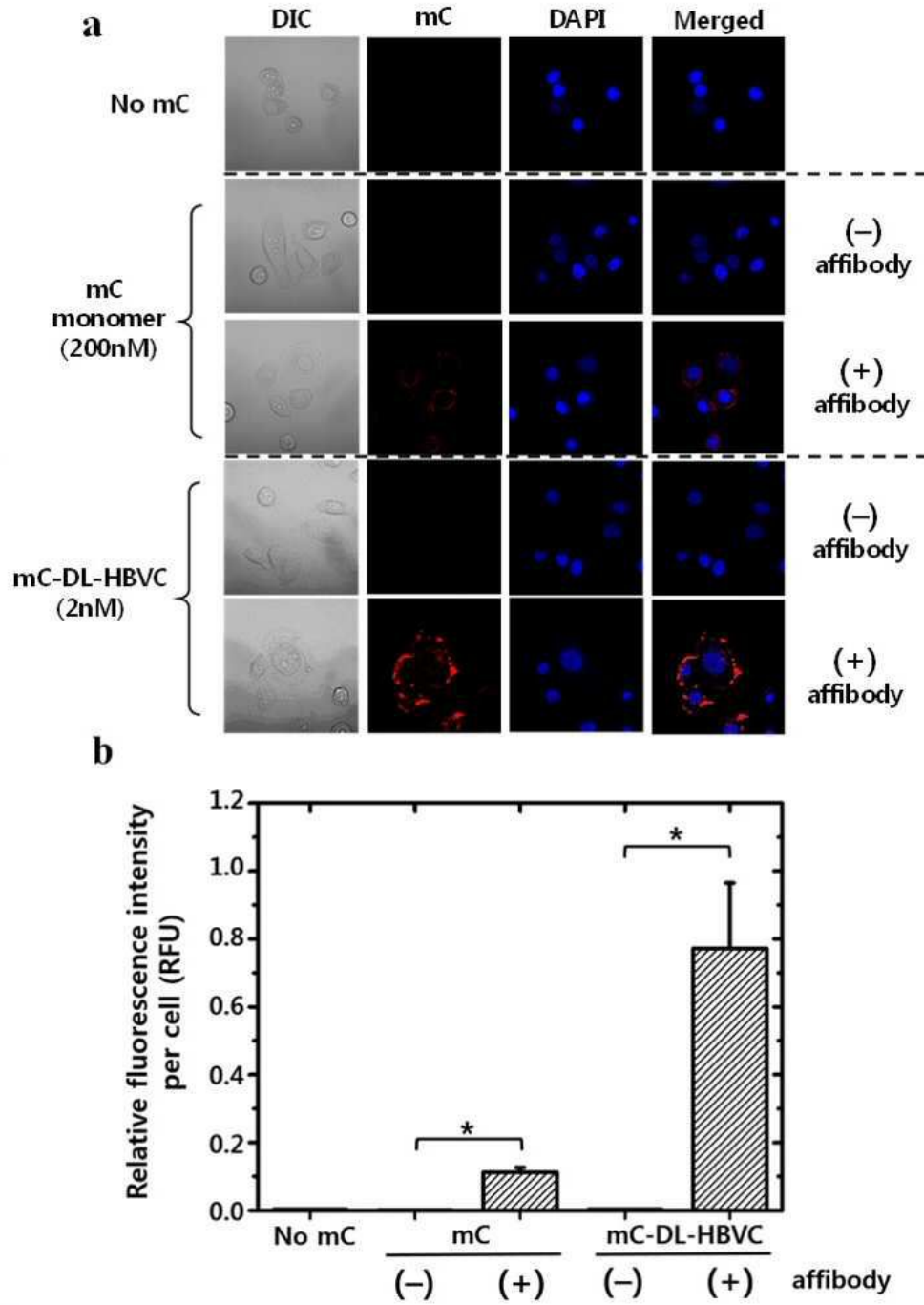
도면4



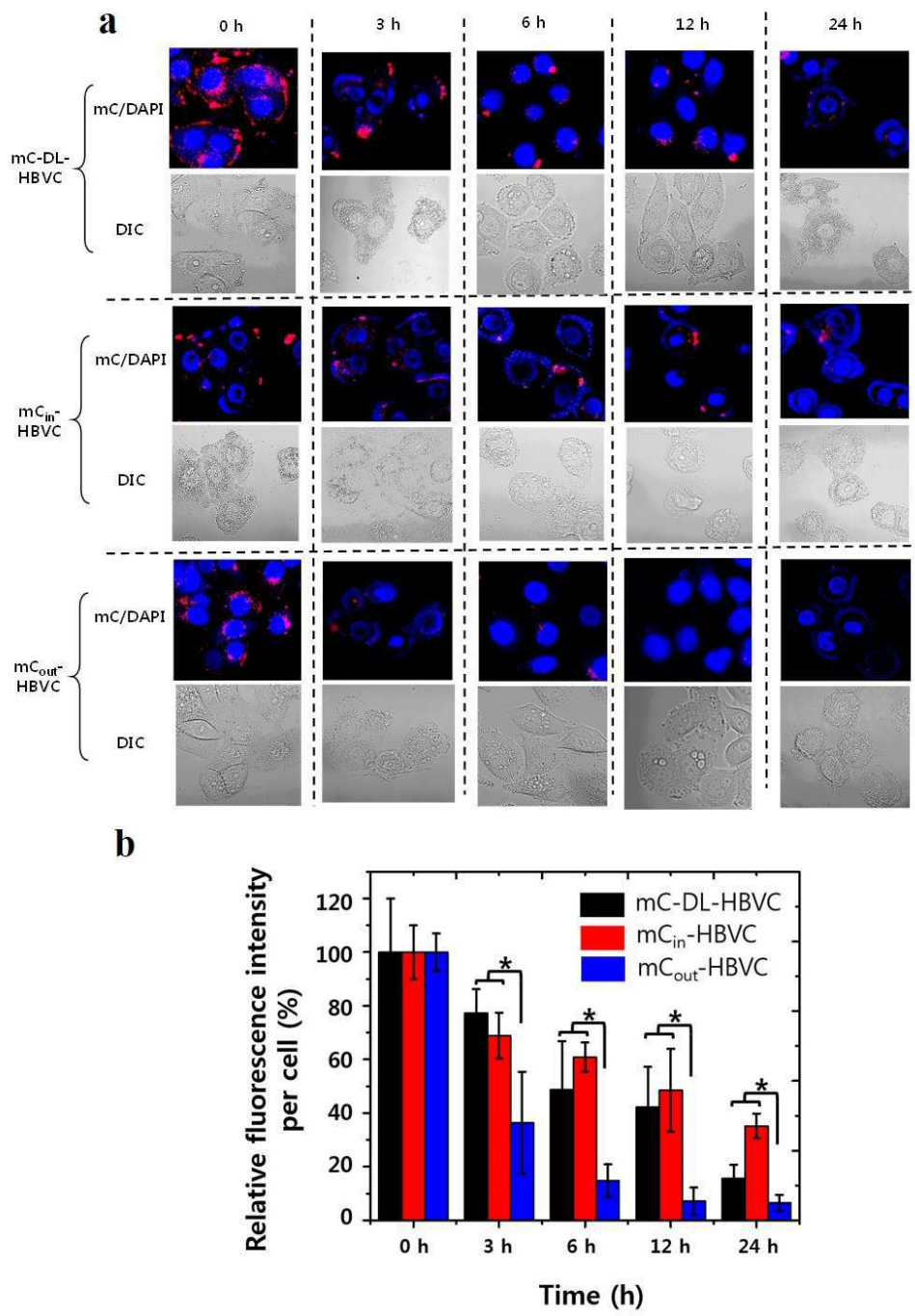
도면5



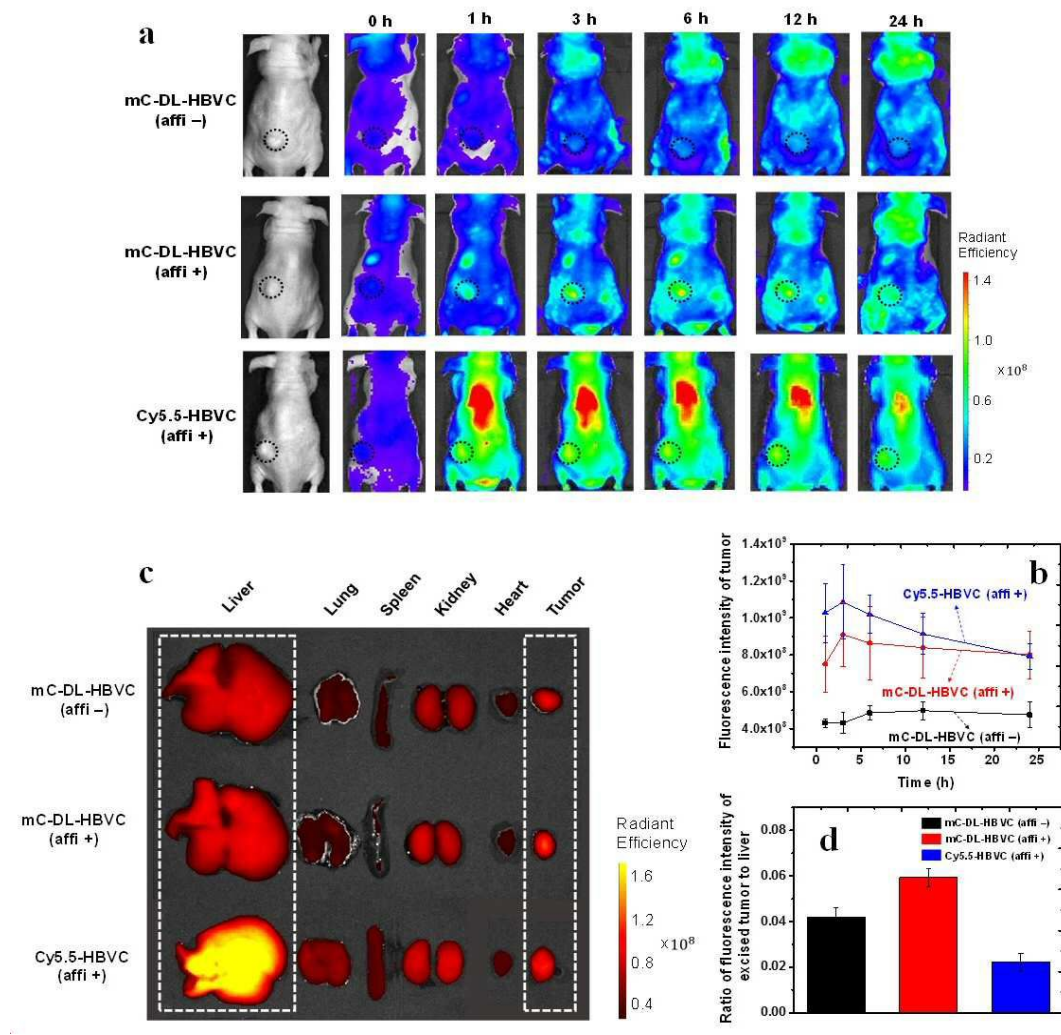
도면6



도면7



도면8



서열 목록

<110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION

<120> Double-layered fluorescent protein nanoparticles

<130> P17U13C0708

<160> 22

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer No. 1

<400> 1

ggctctggtg gcggaagtgg gggaggcact ggaggtggcg gcggtgggta ctattactat

60

tactatgaca ttgac

75

<210> 2
 <211> 75
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Primer No. 2
 <400> 2
 atggcgtcta gtctgcgtca gattctggat tctcagaaaa tggaatggcg ttctaatacg 60
 ggtggctctg gtggc 75

<210> 3
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Primer No. 3
 <400> 3
 catatgcatac accatcacca tcacctcgag atggcgtcta gt 42

<210> 4
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Primer No. 4
 <400> 4
 ccatggacaa tgttcgg 18

<210> 5
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Primer No. 5
 <400> 5
 gagctctcac ctacat 18

<210> 6
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Primer No. 6

<400> 6

atcgatttaa acaacagtag tttc

24

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer No. 7

<400> 7

ccatgggtga gcaaggcga g

21

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer No. 8

<400> 8

gagctccttg tacagctcgt c

21

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer No. 9

<400> 9

ccatggggtg gcggtggcgt gagcaag

27

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer No. 10

<400> 10

gagctcgcca ccgccacct tgtacag

27

<210> 11

<211> 57

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer No. 11
 <400> 11
 ccatggggtg gcggaagtgg gggaggcact ggaggtggtg gcggtggcgt gagcaag 57
 <210> 12
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer No. 12
 <400> 12
 gagctcgcca cctccagtgc cteccccaact tccaccgcca ccgccaccct tgtacag 57
 <210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer No. 13
 <400> 13
 ccatggcttg tacagtcgt c 21
 <210> 14
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer No. 14
 <400> 14
 gagtccttg tacagtcgt c 21
 <210> 15
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer No. 15
 <400> 15
 catatgcac accatcacca tcacatggtg agcaagggc 39
 <210> 16

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer No. 16
 <400> 16
 ctcgagcttg tacagctcgt c 21

<210> 17
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer No. 17
 <400> 17
 gaattcagta cgcggggggg cactccctcc gccaccgtct tccaaatt 48

<210> 18
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer No. 18
 <400> 18
 ggatccggtg gcggagggtc tgggggaggc ggttccaggg aatta 45

<210> 19
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer No. 19
 <400> 19
 gaattcgggtg gcggaagtgg gggaggcact ggaggtggca gtggcggtgg ggtggataac 60

60

<210> 20
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer No. 20

<400> 20
 ggatcccca cgcactgc cactccagt gcctcccca ctccgccac cttcggcgc 60
 60

<210> 21
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Linker peptide 1
 <400> 21

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5 10
 <210> 22
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Linker peptide 2
 <400> 22
 Gly Gly Gly Gly
 1