



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0047482
(43) 공개일자 2020년05월07일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 9/51</i> (2006.01) <i>A61K 47/64</i> (2017.01)
 <i>A61K 47/69</i> (2017.01) <i>A61K 9/50</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A61K 9/5169</i> (2013.01)
 <i>A61K 47/64</i> (2017.08)</p> <p>(21) 출원번호 10-2020-0050354(분할)</p> <p>(22) 출원일자 2020년04월24일
 심사청구일자 2020년04월24일</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2018-0150083
 원출원일자 2018년11월28일
 심사청구일자 2018년11월28일</p> <p>(30) 우선권주장
 1020170159936 2017년11월28일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
 울산과학기술원
 울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50</p> <p>(72) 발명자
 유자형
 울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
 오준용
 울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
 리앤목특허법인</p> |
|---|---|

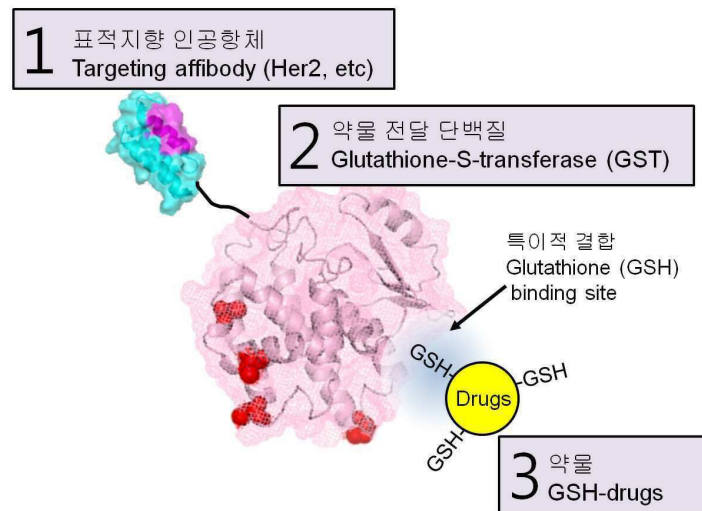
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 EGFR-GST-약물 복합체, 및 이를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

글루타치온-S-전이효소 및 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질을 포함하는 융합 단백질 및 이의 약물 전달체 및 약학적 조성물로서의 용도에 관한 것으로, 일 양상에 따른 융합 단백질 및 그를 포함하는 약물 전달체에 의하면, 생체 내 잔존 시간을 지속시킬 수 있을 뿐 아니라, 표적 세포로의 표적능이 향상되어 타겟으로 하는 세포로 효과적으로 전달될 수 있으므로, 표적 치료제로서 유용하게 사용될 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도15



(52) CPC특허분류

A61K 47/6929 (2017.08)

A61K 9/5052 (2013.01)

C07K 2319/23 (2013.01)

(72) 발명자

김한솔

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

김채규

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

강세병

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711050025

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관

연구사업명 개인기초연구(미래부)

연구과제명 세포 소기관 표적 자기조립을 통한 새로운 항암치료 연구

기 여 율 1/2

주관기관

연구기간 2017.03.01 ~ 2018.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711049114

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관

연구사업명 국제연구인력교류

연구과제명 초분자 자기조립 원리를 이용한 지능형 나노 메디신 시스템의 개발

기 여 율 1/2

주관기관

연구기간 2017.03.01 ~ 2017.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

하나의 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST) 분자;

EGFR(Epidermal growth factor receptor)에 결합능을 갖는 하나의 애피바디(affibody) 또는 다이아바디(diabody) 분자;

상기 글루타치온-S-전이효소와 상기 애피바디 또는 다이아바디를 연결하고, 프로테아제가 결합하지 않는 폴리펩티드인 링커; 및

상기 글루타치온-S-전이효소와 하나의 GSH(Glutathione) 분자에 의해 결합된 하나의 항암제 분자를 함유하는 약물 전달체.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 항암제는 나노파티클에 담지된 것인 약물 전달체.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 나노파티클은 다공성 실리카 나노파티클(mesoporous silica nanoparticle, MSN), 골드 나노파티클(gold nanoparticle), 마그네틱 나노파티클(magnetic nanoparticle), 핵산-금속유기 금속체 나노파티클(Nucleic acid-Metal Organic Framework nanoparticle) 및 중합체 나노파티클(polymer nanoparticle)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인 약물 전달체.

청구항 4

하나의 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST) 분자;

EGFR(Epidermal growth factor receptor)에 결합능을 갖는 하나의 애피바디(affibody) 또는 다이아바디(diabody) 분자;

상기 글루타치온-S-전이효소와 상기 애피바디 또는 다이아바디를 연결하고, 프로테아제가 결합하지 않는 폴리펩티드인 링커; 및

상기 글루타치온-S-전이효소와 하나의 GSH(Glutathione) 분자에 의해 연결된 하나의 항암제 분자를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 항암제는 나노파티클에 담지된 것인 약학적 조성물.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 나노파티클은 다공성 실리카 나노파티클(mesoporous silica nanoparticle, MSN), 골드 나노파티클(gold nanoparticle), 마그네틱 나노파티클(magnetic nanoparticle), 핵산-금속유기 금속체 나노파티클(Nucleic acid-Metal Organic Framework nanoparticle) 및 중합체 나노파티클(polymer nanoparticle)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 글루타치온-S-전이효소 및 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질을 포함하는 융합 단백질 및 이

의 약물 전달체 및 약학적 조성물로서의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 나노파티클은 생물학적 분포능이 우수하며 약물 방출 정도를 조절할 수 있어 영상화 장비나 표적 치료제 등의 분야에서 유용한 도구로 사용되고 있다. 통상적으로 나노파티클은 200 nm의 직경을 가질 때 종양 주위의 혈관 근처로 유출될 수 있으며, 종양 주위에서는 림프관이 형성되지 않아 압력이 낮기 때문에 유출된 나노파티클이 종양 조직 내에 계속 잔존할 수 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 과정은 EPR 효과(enhanced permeability and retention effect)라 하며, 이를 통해 약물 전달체의 투과성 및 잔존성이 개선될 수 있다.
- [0003] 현재 상업적으로 사용되는 나노파티클로서, Abraxane 및 Doxil을 대표적인 예로 들 수 있다. 그러나, 이들은 종양마다 혈관의 투과성이 각기 다양하며, 나노파티클을 정맥투여하였을 때 단핵식세포계(mononuclear phagocyte system, MPS)가 이를 제거하기 위해 간과 비장과 같은 세망내피계 조직(reticuloendothelial organ)에 빠르게 축적된다는 제한점을 가질 수 있다. 이로 인해, 나노파티클을 적용하는 표적 치료제는 치료 효과가 저감될 수 있으며, 나노파티클의 독성으로 인해 부작용을 나타낼 수 있다.
- [0004] 이러한 단점을 극복하기 위해서, 폴리에틸렌 글리콜화(poly(ethylene glycol) ylation, PEGylation)하여 나노파티클을 둘러싸는 방법이 개발되었다. 이러한 방법을 사용하였을 때, 생체 내 순환기에서 나노파티클이 순환될 수 있는 시간이 길어질 수 있다는 장점이 있으나, 반대로 표적 세포 내로 유입될 수 있는 가능성이 감소하고 비-특이적인 결합을 통해 표적 세포 이외의 세포를 표적할 수 있어 이 또한 치료 효율이 낮아질 수 있다.
- [0005] 나노파티클을 약물전달체로 사용함에 있어서, 약물 전달을 위한 표적능과 함께 EPR 효과를 증진시키기 위해, 나노파티클의 구조적인 변화를 유도하고자 하는 전략이 제시되고 있다. 구체적으로, 나노파티클의 표면에 암세포에서 과발현되는 수용체와 결합할 수 있는 항체, 단백질 또는 펩티드로 코팅하는 등의 구조적 변화를 유도하여 약물전달체의 표적능을 향상시키고자 하는 시도가 계속되었다(비특허문헌 1). 그러나, 이러한 방법을 통해서도 종양 표적 효율이 효과적으로 증가되지 않고, 오히려 MPS를 통한 체내 면역 반응을 통해 나노파티클이 보다 빠르게 제거될 수 있는 타겟 리간드를 제공하게 되어, 전체적인 종양 치료 효과 면에서 유의적인 치료 효과를 나타내지는 못한다는 한계가 있다(비특허문헌 2).
- [0006] 이론적으로는, 생리적 환경에 노출되었을 때, 엔트로피에 따르는 물분자의 배치, 파티클 표면의 전하의 보정(charge compensation)이나 소수성 부분이 노출되는 점 등이 복합적으로 작용하여 표면 에너지를 낮추는 방향으로 나노파티클의 표면은 자연적으로 다른 생물분자에 의해 둘러싸이게 된다. 이 때, 나노파티클의 표면의 표면에 다양한 생물분자들이 비-특이적으로 흡착되는데, 이러한 형태를 단백질 코로나(protein corona)라고 한다. 단백질 코로나는 다른 분자들에 둘러싸여 본연의 분자적 특징이 변화하고, 표적 세포 또는 기관으로의 표적능과 나노파티클이 나타내는 다양한 생물학적 기능이 차단된다(비특허문헌 3, 비특허문헌 4). 때문에, 나노파티클을 표적 치료제로서 임상 수준에서 적용할 수 있도록 단백질 코로나를 조절하고자 하는 연구가 계속 진행되고 있다(비특허문헌 5).
- [0007] 따라서, 나노파티클을 기반으로 하는 표적 치료제를 제조하는 과정에서, 나노파티클의 표면에 단백질 코로나를 먼저 형성하여 이를 조절하는 방법이 개발되었다(비특허문헌 6, 비특허문헌 7, 비특허문헌 9). 이를 위해, 단백질 코로나에 의해 표적능이 차단되는 것을 피하기 위해서, 나노파티클의 표면을 쌍성 이온(zwitterionic), PEG 및 탄수화물 잔기 등으로 변경하여 혈청 내 단백질과의 상호작용을 최소화하고자 하는 방법이 공지된 바 있다(비특허문헌 10, 비특허문헌 11, 비특허문헌 12, 비특허문헌 13). 이 외에도, 나노파티클을 dysopsonic 단백질로 전코팅하여 혈장 내의 원하는 단백질의 순환을 통해 단백질 코로나를 조절할 수 있다. 이에 따라, 단백질 코로나로 전코팅된 나노파티클은 콜로이드 상태의 안정성이 증가되어 MPS에 의해 제거되지 않고 혈액 내에서 순환 시간을 지속할 수 있는 효과를 가진다(비특허문헌 14, 비특허문헌 15, 비특허문헌 16, 비특허문헌 17). 그러나, 이러한 방법을 통하여도 표적으로의 타겟능이 제한될 수 있고, 전코팅에 사용되는 단백질과 나노파티클 간의 생물학적 상호작용을 통한 생물화학적 작용이 알려지지 않았다는 점에서 임상으로의 적용에서 제한을 가진다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0008] (비특허문헌 0001) Xu, X., Ho, W., Zhang, X., Bertrand, N. & Farokhzad, O. Trends Mol Med 21, 223-232, doi:10.1016/j.molmed.2015.01.001 (2015).

- (비특허문헌 0002) Monopoli, M. P., Aberg, C., Salvati, A. & Dawson, K. A. Nat Nanotechnol 7, 779-786, doi:10.1038/nnano.2012.207 (2012).
- (비특허문헌 0003) Salvati, A. et al. Nat Nanotechnol 8, 137-143, doi:10.1038/nnano.2012.237 (2013).
- (비특허문헌 0004) Tenzer, S. et al. Nat Nanotechnol 8, 772-781, doi:10.1038/nnano.2013.181 (2013).
- (비특허문헌 0005) Hadjidemetriou, M. et al. ACS Nano 9, 8142-8156, doi:10.1021/acsnano.5b03300 (2015).
- (비특허문헌 0006) Lazarovits, J., Chen, Y. Y., Sykes, E. A. & Chan, W. C. Chem Commun (Camb) 51, 2756-2767, doi:10.1039/c4cc07644c (2015).
- (비특허문헌 0007) Hamad-Schifferli, K. Nanomedicine (Lond) 10, 1663-1674, doi:10.2217/nnm.15.6 (2015).
- (비특허문헌 0008) Saha, K. et al. ACS Nano 10, 4421-4430, doi:10.1021/acsnano.6b00053 (2016).
- (비특허문헌 0009) Mizuhara, T. et al. Angew Chem Int Ed Engl 54, 6567-6570, doi:10.1002/anie.201411615 (2015).
- (비특허문헌 0010) Kang, B. et al. Angew Chem Int Ed Engl 54, 7436-7440, doi:10.1002/anie.201502398 (2015).
- (비특허문헌 0011) Dai, Q., Walkey, C. & Chan, W. C. Angew Chem Int Ed Engl 53, 5093-5096, doi:10.1002/anie.201309464 (2014).
- (비특허문헌 0012) Wan, S. et al. ACS Nano 9, 2157-2166, doi:10.1021/nn506060q (2015).
- (비특허문헌 0013) Mirshafiee, V., Kim, R., Park, S., Mahmoudi, M. & Kraft, M. L. Biomaterials 75, 295-304, doi:10.1016/j.biomaterials.2015.10.019 (2016).
- (비특허문헌 0014) Corbo, C. et al. ACS Nano, doi:10.1021/acsnano.7b00376 (2017).
- (비특허문헌 0015) Schottler, S. et al. Nat Nanotechnol 11, 372-377, doi:10.1038/nnano.2015.330 (2016).
- (비특허문헌 0016) Takeuchi, T. et al. Angew Chem Int Ed Engl, doi:10.1002/anie.201700647 (2017).

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 일 양상은 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST); 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질을 포함하는 융합 단백질을 제공하는 것이다.
- [0010] 다른 양상은 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST); 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질; 및 상기 글루타치온-S-전이효소와 결합된 약물을 포함하는 약물 전달체를 제공하는 것이다.
- [0011] 다른 양상은 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST); 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질; 및 상기 글루타치온-S-전이효소와 결합된 약물을 그를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 개체 내 약물을 전달하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 또 다른 양상은 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST); 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질; 및 상기 글루타치온-S-전이효소와 결합된 항암제를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0013] 또 다른 양상은 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST); 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질; 및 상기 글루타치온-S-전이효소와 결합된 항암제를 포함하는 조성물을 그를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

[0014] 또 다른 양상은 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST); 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질; 및 상기 글루타치온-S-전이효소와 결합된 항암제를 포함하는 조성물을 암 예방 또는 치료에 사용하기 위한 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 일 양상은 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST); 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질을 포함하는 융합 단백질을 제공한다.

[0016] 상기 융합 단백질은 글루타치온-S-전이효소와 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질을 연결하는 링커를 더 포함할 수 있다.

[0017] 본 명세서에서 용어 "표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질", "표적세포 인식능을 갖는 단백질", 또는 "표적 세포 또는 표적 단백질에 특이적으로 결합하는 단백질"은 세포의 수용체 또는 표적 단백질을 특이적으로 인식하는 또는 세포의 수용체 또는 표적 단백질에 특이적으로 결합하는 단백질을 의미할 수 있다. 구체적으로, 상기 세포의 수용체 또는 표적 단백질에 특이적으로 결합하는 단백질은 항체, 항원 결합 단편, 애피바디(affibody), 다이아바디(diabody) 및 앵타머(aptamer)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것일 수 있다.

[0018] 본 명세서에서 용어 "애피바디 분자(affibody molecule)"는 특정 타겟 단백질(수용체)에 결합할 수 있는, 항체 모사체를 의미할 수 있다. 일반적으로 애피바디 분자는 20 내지 150의 아미노산 잔기로 구성되며, 2 내지 10개의 알파 헬릭스로 구성된 것일 수 있다. 더욱 상세하게는 상기 애피바디 분자는 항-ErbB 애피바디 분자(ab31889), HER2-특이적 애피바디 분자(ZHER2:342), 항-EFGR 애피바디 분자(ZEGFR:2377) 등을 포함할 수 있다. 또한, 이에 한정되지 않고, 세포의 특정 수용체 또는 표적 단백질을 인식할 수 있는 애피바디 분자를 모두 포함한다. 상기 애피바디 분자가 인식할 수 있는 표적 수용체 또는 표적 단백질의 예는, 아밀로이드 베타 펩티드, 시누클레인(예를 들면, 알파-시누클레인), 아포리포프로테인(예를 들면, 아포리포프로테인 A1), 보체 인자(Complement factor)(예를 들면, C5), 탄산무수화효소(Carbonic anhydrase)(예를 들면, CAIX), 인터루킨-2 수용체 알파 사슬(IL2RA; CD25), 세포 표면의 CD 항원(예를 들면, CD28), 또는 c-Jun, Factor VIII, 프비르노젠, GP120, H-Ras, Her2, Her3, HPV16 E7, IAPP(Human islet amyloid polypeptide), 이뮤노글로불린 A(IgA), IgE, IgM, 인터루킨(예를 들면, IL-1, IL-6, IL-8, IL-17), 인슐린, 스태필로코커스 단백질 A 도메인(Staphylococcal protein A domain), Raf-1, LOV 도메인(Light-oxygen-voltage-sensing domain), 또는 RSV G 단백질일 수 있다. 상기 애피바디에 대한 정보는 Stefan Stahl et al., Affibody Molecules in Biotechnological and Medical Applications, Trends in Biotechnology, August 2017, Vol 35, No 8에 기재되어 있으며, 상기 문헌은 그 전체가 참조로서 본 명세서에서 포함된다.

[0019] 상기 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질은 수용체 타이로신 카이네이즈(Receptor tyrosine kinases: RTKs)에 특이적으로 결합하는 것일 수 있다. 더욱 구체적으로, 상기 수용체 타이로신 카이네이즈는 표피 성장인자 수용체, 인슐린 수용체, 혈소판 유래 성장인자 수용체, 혈관내피 성장인자 수용체, 섬유아세포 성장인자 수용체, 콜레시스토킨(Cholecystokinin: CCK) 수용체, 신경영양인자(Neurotrophic factor: NGF) 수용체, 간세포 성장인자(Hepatocyte growth factor: HGF) 수용체, 에프린(Ephrin: Eph) 수용체, 안지오프이에틴 수용체, 및 RYK(related to receptor tyrosine kinase) 수용체로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있다.

[0020] 일 구체예에 있어서, 상기 GST 및 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질은 링커를 통해 연결되어 있을 수 있다. 예를 들어, 상기 링커는, 1 내지 400개, 1 내지 200개, 또는 2 내지 200개의 임의의 아미노산으로 이루어진 폴리펩티드일 수 있다. 상기 펩티드 링커는 Gly, Asn 및 Ser 잔기를 포함할 수 있으며, Thr 및 Ala와 같은 중성 아미노산들도 포함될 수 있다. 펩티드 링커에 적합한 아미노산 서열은 당업계에 공지되어 있다. 또한 기능적 일부분 사이의 적절한 분리를 달성하기 위하여 또는 필수적인 내부-일부분(inter-moiety)의 상호작용을 유지하기 위한 링커의 최적화를 고려하여 카피 수 "n"을 조절할 수 있다. 해당 기술분야에서 다른 가요성 링커들이 알려져 있는데, 예를 들어 수용성을 향상시키기 위하여 극성 아미노산 잔기를 추가하는 것뿐만 아니라 유연성을 유지하기 위하여 T 및 A와 같은 아미노산 잔기를 추가한 G 및 S 링커가 있을 수 있다. 따라서 일 구체예에 있어서, 상기 링커는 G, S, 및/또는 T 잔기를 포함하는 유연성 링커일 수 있다. 상기 링커는 $(G_pS_s)_n$ 및 $(S_pG_s)_n$ 으로부터 선택되는 일반식을 가질 수 있고, 이 경우, 독립적으로, p는 1 내지 10의 정수이고, s = 0 내지 10의 0 또는 정수이고, p + s는 20 이하의 정수이고, 및 n은 1 내지 20의 정수이다. 더욱 구체적으로

로 링커의 예는 (GGGS)_n (서열번호 2), (SGGG)_n (서열번호 3), (SRSSG)_n (서열번호 4), (SGSSC)_n (서열번호 5), (GKSSGSGSESKS)_n (서열번호 6), (RPPPPC)_n (서열번호 7), (SSPPPPC)_n (서열번호 8), (GSTSGSGKSSEGGK)_n (서열번호 9), (GSTSGSGKSSEGGSTKG)_n (서열번호 10), (GSTSGSGKPGSGEGSTKG)_n (서열번호 11), 또는 (EGKSSGSGSESKSKEF)_n (서열번호 12)이고, 상기 n은 1 내지 20, 또는 1 내지 10의 정수이다.

[0021] 또 다른 양상은 상기 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0022] 용어 “폴리뉴클레오티드(polynucleotide)”는 단일가닥 또는 이중가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드의 중합체를 의미한다. RNA 게놈 서열, DNA(gDNA 및 cDNA) 및 이로부터 전사되는 RNA 서열을 포괄하며, 특별하게 다른 언급이 없는 한 자연의 폴리뉴클레오티드뿐만 아니라 당 또는 염기 부위가 변형된 그의 유사체(analogue)도 포함한다. 일 구체예에서, 상기 폴리뉴클레오티드는 단쇄 폴리뉴클레오티드이다.

[0023] 또 다른 양상은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다.

[0024] 본 명세서에서 사용되는 용어, “벡터”는 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동 가능하게 연결된 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 지칭한다. 일 실시예에 따른 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널, 및/또는 인핸서와 같은 발현 조절 요소를 포함할 수 있으며, 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한, 상기 벡터는, 숙주 세포 내에서 안정적으로 상기 융합 단백질을 발현시킬 수 있는, 발현용 벡터일 수 있다. 상기 발현용 벡터는 당업계에서 식물, 동물 또는 미생물에서 외래의 단백질을 발현하는 데 사용되는 통상의 것을 사용할 수 있다. 상기 재조합 벡터는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다. 예를 들어, 상기 벡터는 벡터를 함유 하는 숙주세포를 선택하기 위한 선택성 마커를 포함하고, 복제 가능한 벡터인 경우, 복제 기원을 포함할 수 있다. 또한, 벡터는 자가 복제하거나 숙주 DNA에 도입될 수 있으며, 상기 벡터는 플라스미드, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 레트로바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스, 및 배시니아 바이러스로 구성되는 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

[0025] 상기 벡터는 동물세포, 예를 들어, 포유동물 세포에서 작동가능한 프로모터를 포함한다. 일 실시예에 따라 적합한 프로모터는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 및 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터를 포함하며, 예컨대, CMV (Cytomegalovirus) 프로모터, U6 프로모터 및 H1 프로모터, MLV(Murine Leukemia Virus) LTR(Long terminal repeat) 프로모터, 아데노바이러스 초기 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, 배시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, HSV의 tk 프로모터, RSV 프로모터, EF1 알파 프로모터, 메탈로티오닌 프로모터, 베타-액틴 프로모터, 인간 IL-2 유전자의 프로모터, 인간 IFN 유전자의 프로모터, 인간 IL-4 유전자의 프로모터, 인간 림프톡신 유전자의 프로모터, 인간 GM-CSF 유전자의 프로모터, 인간 포스포글리세레이트 키나아제(PGK) 프로모터, 마우스 포스포글리세레이트 키나아제(PGK) 프로모터 및 셀바이빈 (Survivin) 프로모터를 포함할 수 있다.

[0026] 또한, 상기 벡터에서, 전술한 융합 단백질은 프로모터에 작동 가능하게 연결되어 있을 수 있다. 본 명세서에서 사용된 용어, “작동 가능하게 연결된”은 핵산 발현 조절 서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 번역을 조절하게 된다.

[0027] 또 다른 양상은 상기 융합 단백질, 폴리뉴클레오티드, 또는 벡터를 포함하는, 숙주 세포를 제공한다.

[0028] 상기 세포, 예를 들면, 진핵 세포는 효모, 곰팡이, 원생동물(protozoa), 식물, 고등 식물 및 곤충, 또는 양서류의 세포, 또는 CHO, HeLa, HEK293, 및 COS-1과 같은 포유 동물의 세포일 수 있고, 예를 들어, 당업계에서 일반적으로 사용되는, 배양된 세포 (인 비트로), 이식된 세포 (graft cell) 및 일차 세포 배양 (인 비트로 및 엑스 비보(ex vivo)), 및 인 비보 (in vivo) 세포, 및 또한 인간을 포함하는 포유동물의 세포 (mammalian cell)일 수 있다. 또한, 상기 유기체는 효모, 곰팡이, 원생동물, 식물, 고등 식물 및 곤충, 양서류, 또는 포유 동물일 수 있다. 또한, 상기 세포는 동물 세포 또는 식물세포일 수 있다.

[0029] 다른 양상은 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST); 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질; 및 상기 글루타치온-S-전이효소와 결합된 약물을 포함하는 약물 전달체를 제공한다.

[0030] 다른 양상은 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST); 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질; 및 상기 글루타치온-S-전이효소와 결합된 약물을 그를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함

하는 개체 내 약물을 전달하는 방법을 제공한다.

- [0031] 상기 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST) 및 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질을 포함하는 융합 단백질에 대해서는 상기한 바와 같다.
- [0032] 일 구체예에 있어서, 상기 글루타치온-S-전이효소와 약물의 결합은 GSH(Glutathione)에 의한 것일 수 있다. 즉, 상기 약물은 GSH(Glutathione)가 결합된 약물일 수 있다. 상기 GSH는 글루타치온-S-전이효소의 결합 부위로 작용하여 약물과 글루타치온-S-전이효소를 연결할 수 있다.
- [0033] 약물 전달체를 사용하여 개체 내로 전달할 수 있는 약학적 활성 성분의 종류는 항암제, 조영제(염료), 호르몬제, 항호르몬제, 비타민제, 칼슘제, 무기질 제제, 당류제, 유기산 제제, 단백질 아미노산 제제, 해독제, 효소 제제, 대사성 제제, 당뇨 병용제, 조직 부활 용약, 클로로필 제제, 색소제제, 종양 용약, 종양 치료제, 방사성 의약품, 조직 세포 진단제, 조직 세포 치료제, 항생 물질 제제, 항바이러스제, 복합항생물질제제, 화학요법제, 백신, 독소, 독소이드, 항독소, 랩토스피라헨, 혈액 제제, 생물학적 제제, 진통제, 면역원성 분자, 항히스타민제, 알레르기 용약, 비특이성 면역원 제제, 마취제, 각성제, 정신 신경 용제, 저분자 화합물, 핵산, 엠타머, 안티센스 핵산, 올리고뉴클레오타이드, 펩타이드, siRNA 및 마이크로 RNA 등을 포함할 수 있다.
- [0034] 또한, 상기 항암제는 캄토테신(camptothecin), 독소루비신(doxorubicin), 시스플라틴(cisplatin), 베라파밀(Verapamil), 플루오로우라실(fluorouracil), 옥살리플라틴(Oxaliplatin), 다우노루비신(Daunorubicin), 이리노테칸(irinotecan), 토폠테칸(topotecan), 파클리탁셀(paclitaxel), 카보플라틴(carboplatin), 겐시타빈(Gemcitabine), 메소트렉세이트(Methotrexalte), 도세탁셀(Docetaxel), 아시바이신, 아클라루비신, 아코다졸, 아크로나이신, 아도젤레신, 알라노신, 알테스루킨, 알로푸리놀 소듐, 알트레타민, 아미노글루테티미드, 아모나파이드, 암플리겐, 암사크린, 안드로겐스, 안구이딘, 아피디콜린 글리시네이트, 아사레이, 아스파라기나아제, 5-아자시딘, 아자티오프린, 바실러스 칼메테-구에린(BCG), 베이커스 안티폴, 베타-2-디옥시티오구아노신, 비스안트렌 HCl, 블레오마이신 설페이트, 불서판, 부티오닌 설페시민, BWA 773U82, BW 502U83/HCl, BW 7U85 메실레이트, 세라세미드, 카르베티머, 카르보플라틴, 카르무스틴, 클로람부실, 클로로퀴녹살린-설프오나미드, 클로로조토신, 크로모마이신 A3, 시스플라틴, 클라드리빈, 코르티코스테로이드, 코리나박테리움 파르부름, CPT-11, 크리스나톨, 사이클로사이티딘, 사이클로포스파미드, 사이타라빈, 사이템베나, 다비스 말리에이트, 데카르바진, 닥티노마이신, 다우노루바인 HCl, 디아자유리딘, 텍스라죽산, 디언하이드로갈락티톨, 디아지쿠온, 디브로모돌시톨, 디데민 B, 디에틸디티오카르바메이트, 디클라이코알데하이드, 다이하이드로-5-아자사이틴, 에치노마이신, 데다트렉세이트, 에텔포신, 에플롤니틴, 엘리웃스 용액, 엘사미트루신, 에피루비신, 에소루비신, 에스트라머스틴 포스페이트, 에스트로젠, 에타니다졸, 에티오포스, 에토포사이드, 파드라졸, 파자라빈, 펜테티나이드, 필그라스티م, 피나스테라이드, 플라본 아세트산, 플록스유리딘, 플루다라빈 포스페이트, 5-플루오로우라실, Fluosol™, 플루타미드, 갈륨 나이트레이트, 겐사이타빈, 고세레틴 아세테이트, 헤프셀팜, 핵사메틸렌 비스아세트아미드, 호모하링토닌, 하이드라진 설페이트, 4-하이드록시안드로스테네디온, 하이드로지우레아, 이다루비신 HCl, 이포스파미드, 인터페론 알파, 인터페론 베타, 인터페론 감마, 인터루킨-1 알파 및 베타, 인터루킨-3, 인터루킨-4, 인터루킨-6, 4-이포메아놀, 이프로플라틴, 이소트레티노인, 류코보린 칼슘, 류프로라이드 아세테이트, 레바미솔, 리포좀 다우노루비신, 리포좀 포집 독소루비신, 로머스틴, 로니다민, 마이탄신, 메클로레타민 하이드로클로라이드, 멜팔란, 메노가릴, 메르바론, 6-머캅토프린, 메스나, 바실러스 칼레테-구에린의 메탄올 추출물, 메토타렉세이트, N-메틸포름아미드, 미페프리스톤, 미토구아존, 마이토마이신-C, 미토탄, 미톡산트론 하이드로클로라이드, 모노사이트/마크로파아지 콜로니-자극 인자, 나빌론, 나폭시딘, 네오키르지노스타틴, 옥트레오타이드 아세테이트, 오르마플라틴, 옥살리플라틴, 파클리탁셀, 팔라, 펜토스타틴, 피페라진디온, 피포브로만, 피라루비신, 피리트렉심, 피록산트론 하이드로클로라이드, PIXY-321, 플리카마이신, 포르피머 소듐, 프레드니무스틴, 프로카르바진, 프로게스틴스, 파이라조푸린, 라죽산, 사르그라모스틴, 세무스틴, 스피로게르마늄, 스피로무스틴, 스트렙토나이트그린, 스트렙토조신, 솔로페너르, 수라민 소듐, 타목시펜, 탁소테레, 테가푸르, 테니포사이드, 테레프탈아미딘, 테록시론, 티오구아닌, 티오테파, 티미딘 인젝션, 티아조푸린, 토폠테칸, 토레미펜, 트레티노인, 트리플루오페라진 하이드로클로라이드, 트리플루리딘, 트리메트렉세이트, TNF(tumor necrosis factor), 우라실 머스타드, 빈블라스틴 설페이트, 빈크리스틴 설페이트, 빈데신, 비노렐빈, 빈줄리딘, Yoshi 864, 조루비신, 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 이들의 혼합물 등을 포함할 수 있다.
- [0035] 다른 구체예에 있어서, 상기 약물은 약물이 담지된 또는 약물을 담지할 수 있는 나노파티클일 수 있다. 나노파티클은 종래의 기술에 따라 약물 전달체로서 적용할 수 있는 나노파티클이라면 제한없이 적용될 수 있다. 구체적으로, 다공성 실리카 나노파티클(mesoporous silica nanoparticle, MSN), 골드 나노파티클(gold nanoparticle), 마그네틱 나노파티클(magnetic nanoparticle), 핵산-금속유기 금속체 나노파티클(Nucleic

acid-Metal Organic Framework nanoparticle) 및 중합체 나노파티클(polymer nanoparticle)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것일 수 있다. 또한, 상기 나노파티클의 GSH(Glutathione)이 결합된 것일 수 있다. 이에 의해, 상기 나노파티클은 GST를 포함하는 융합 단백질과 결합할 수 있다. 또한, 구체적으로, 상기 나노파티클은 화학 항암제를 담지할 수 있다.

- [0036] 이 때, 해당 화학 항암제가 사멸 유도하고자 하는 암 조직 세포에 대하여 특이적으로 인식하는 단백질이 상기 표적세포 인식능을 가지는 단백질로서 해석될 수 있다.
- [0037] 또 다른 양상은 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST); 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질; 및 상기 글루타치온-S-전이효소와 결합된 항암제를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0038] 또 다른 양상은 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST); 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질; 및 상기 글루타치온-S-전이효소와 결합된 항암제를 포함하는 조성물을 그를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [0039] 또 다른 양상은 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST); 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질; 및 상기 글루타치온-S-전이효소와 결합된 항암제를 포함하는 조성물을 암 예방 또는 치료에 사용하기 위한 용도를 제공한다.
- [0040] 상기 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST), 표적 세포 또는 표적 단백질 결합능을 갖는 단백질, 및 상기 글루타치온-S-전이효소와 결합된 항암제에 대해서는 상기한 바와 같다.
- [0041] 용어 "대상체", "개체" 및 "환자"는 척추동물, 바람직하게는 포유동물, 더욱 바람직하게는 인간을 지칭하기 위해 본원에서 상호교환가능하게 사용된다. 포유동물은 쥐과, 원숭이, 인간, 농장 동물, 스포츠 동물 및 애완동물을 포함하나 이들에 한정되지 않는다. 생체내에서 수득되거나 시험관내에서 배양된 생물학적 엔티티(entity)의 조직, 세포 및 그들의 자손도 또한 포함된다.
- [0042] 용어 "치료제" 또는 "약학적 조성물"은, 대상체로의 투여 시에 몇몇 유리한 효과를 부여하는 분자 또는 화합물을 지칭한다. 유리한 효과는 진단적 결정을 가능하게 하는 것; 질병, 증상, 장애 또는 병태의 개선; 질병, 증상, 장애 또는 질환의 발병의 감소 또는 예방; 및 일반적으로 질병, 증상, 장애 또는 병태의 대응을 포함한다.
- [0043] 본원에 사용되는 바와 같이, "치료" 또는 "치료하는" 또는 "완화하는" 또는 "개선하는"은 상호교환가능하게 사용된다. 이들 용어는 치료 이익 및/또는 예방 이익을 포함하나 이들에 한정되지 않는 유리한 또는 요망되는 결과를 수득하는 방법을 지칭한다. 치료 이익은 치료 하의 하나 이상의 질병, 질환 또는 증상의 임의의 치료적으로 유의미한 개선 또는 그에 대한 효과를 의미한다. 예방 이익에 있어서, 조성물은 특정 질병, 질환 또는 증상이 발생할 위험이 있는 대상체에게 또는 질병, 질환 또는 증상이 아직 나타나지 않을지라도, 질병의 하나 이상의 생리학적 증상을 보고하는 대상체에게 투여될 수 있다.
- [0044] 용어 "유효량" 또는 "치료적 유효량"은 유리한 또는 요망되는 결과를 야기하기에 충분한 작용제의 양을 지칭한다. 치료적 유효량은 치료되는 대상체 및 병태, 대상체의 체중 및 연령, 병태의 중증도, 투여 방식 등 중 하나 이상에 따라 달라질 수 있으며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 또한, 상기 용어는 본원에 기술된 영상화 방법 중 임의의 것에 의한 검출을 위한 이미지를 제공할 용량에 적용된다. 특정 용량은 선택된 특정 작용제, 뒤따르는 투여 요법, 그것이 다른 화합물과 병용하여 투여되는지 여부, 투여 시기, 영상화되는 조직 및 그것을 운반하는 신체 전달 시스템 중 하나 이상에 따라 달라질 수 있다.
- [0045] 상기 암은 폐암(예를 들면, 비소세포성 폐암), 췌장암, 위암, 간암, 대장암, 뇌암, 유방암, 갑상선암, 방광암, 식도암, 또는 자궁암일 수 있다. 또한, 상기 암은 항암제에 대한 내성(예를 들면, 다제 내성)을 갖는 위암, 유방암, 폐암, 간암, 식도암 및 전립선암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.
- [0046] 상기 약학적 조성물은 임상투여시 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다. 비경구 투여는 직장, 정맥, 복막, 근육, 동맥, 경피, 비강(Nasal), 흡입, 안구 및 피하와 같은 경구 이외의 투여경로를 통한 투여를 의미할 수 있다. 본 발명의 상기 약학적 조성물을 의약품으로 사용하는 경우, 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- [0047] 상기 약학적 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁

제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(Witepsol), 마크로골, 트윈(Tween) 61, 카카오지, 리우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

- [0048] 또한, 상기 약학적 조성물은 생리식염수 또는 유기용매와 같이 약제로 허용된 여러 전달체(Carrier)와 혼합하여 사용될 수 있고, 안정성이나 흡수성을 증가시키기 위하여 글루코스, 수크로스 또는 덱스트란과 같은 탄수화물, 아스코르브산(Ascorbic acid) 또는 글루타치온(Glutathione)과 같은 항산화제(Antioxidants), 킬레이트화제(Chelating agents), 저분자 단백질 또는 다른 안정화제(Stabilizers)들이 약제로 사용될 수 있다.
- [0049] 상기 약학적 조성물의 유효용량은 0.01 내지 100 mg/kg이고, 바람직하게는 0.1 내지 10 mg/kg 이며, 하루 1회 내지 3회 투여될 수 있다.
- [0050] 또 다른 양상은 하기의 구성을 포함하는, 단백질 코로나 외층(protein corona shield)을 가지는 나노파티클(protein corona shield nanoparticle, PCSN)을 제공한다:
- [0051] a) 약물을 담지할 수 있는 나노파티클; b) 나노파티클의 표면에 결합된, 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST) 포함 융합 단백질.
- [0052] 또한, 본 발명은 상기 나노파티클의 내부에 약물이 담지된, 단백질 코로나 외층을 가지는 나노파티클 약물 전달체를 제공한다.
- [0053] 또한, 본 발명은 하기 i) 내지 iii) 단계를 포함하는, 단백질 코로나 외층을 가지는 나노파티클 약물 전달체의 제조 방법을 제공한다:
- [0054] i) 나노파티클 표면에 링커(예를 들면, GSH)를 결합시키는 단계; ii) 상기 단계 i)에서 링커와 결합된 나노파티클의 내부 또는 표면에 약물을 담지시키는 단계; 및 iii) 상기 단계 ii)에서 약물을 담지한 나노파티클 표면에 GST 융합 단백질을 코팅하여 단백질 코로나 외층(PCSN)을 형성시키는 단계.
- [0055] 상기 단백질 코로나 외층(protein corona shield)을 가지는 나노파티클은 융합 단백질로 표면이 전-코팅된 단백질 코로나 외층을 먼저 생성하였기 때문에 체내 환경에서 혈청 단백질에 의해 둘러싸이는 코로나층이 형성되지 않아, 대식 세포에 의한 면역 반응을 회피할 수 있어 스텔스 효과(stealth effect)를 유의적으로 가질 수 있다. 따라서, 상기 단백질 코로나 외층을 가지는 나노파티클(PCSN)은 생체 내 잔존 시간을 지속시킬 수 있을 뿐 아니라, 표적 세포로의 표적능이 향상되어 타겟으로 하는 세포로 효과적으로 전달될 수 있으므로, 표적 치료제로서 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 효과

- [0056] 일 양상에 따른 융합 단백질 및 그를 포함하는 약물 전달체에 의하면, 생체 내 잔존 시간을 지속시킬 수 있을 뿐 아니라, 표적 세포로의 표적능이 향상되어 타겟으로 하는 세포로 효과적으로 전달될 수 있으므로, 표적 치료제로서 유용하게 사용될 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0057] 도 1은 본 발명에서 단백질 코로나 외층을 가지는 나노파티클(protein corona shield nanoparticle, PCSN)을 제조하기 위한 과정을 나타낸다:
- 도 1a는 생체 내에서 약물 전달체가 표적 세포에 대하여 유의적인 약물 전달능을 나타내지 못하는 한계를 극복하기 위한, 본 발명의 PCSN 제조 전략을 나타내는 모식도이며; 및 도 1b는 GST-Afb 융합 단백질로 코로나 외층이 형성된 PCSN의 제조 과정을 나타내는 모식도이다.
- 도 2는 단백질 코로나 외층을 가지는 나노파티클에 사용하기 위한 외층 융합 단백질의 발현 과정을 나타낸다:
- 도 2a 및 도 2b는 GST-HER2 및 GST-EGFR 융합 단백질을 발현한 후 정제하는 과정을 나타내며; 및 도 2c는 발현 및 정제한 융합 단백질의 분자량을 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 3은 GST-Afb 융합 단백질의 세포 독성 및 세포 표적능을 확인한 결과이다:
- 도 3a는 GST-Afb 융합 단백질이 Afb 표적 세포에 대하여 세포 생존율을 저하시키지 않음을 확인한 결과이고; 및 도 3b는 GST-Afb 융합 단백질이 Afb 표적 세포에 대하여 나타내는 세포 표적능을 확인한 결과이다.

도 4는 단백질 코로나 외층(PCN)을 가지는 약물 전달체의 제조한 결과이다:

도 4a는 PCSN 및 대조군의 표면 전하를 확인한 결과이며; 도 4b는 PCSN 및 MMSN의 표면에 분포하는 반응기를 확인하기 위한 FTIR 분석 결과이고; 도 4c는 제조된 PCSN 및 MMSN의 형태 관찰 결과이며; 및 도 4d는 HER2-PCSN의 저장 안정성을 나타내는 결과이다.

도 5는 PCSN 표면에 단백질 코로나를 형성하는 단백질 양을 확인한 결과이다:

도 5a는 55% 혈청 내에서 4 시간 동안 보관된 나노파티클의 표면으로부터 분리한 단백질을 SDS-PAGE로 분리한 결과이며; 및 도 5b는 상기 SDS-PAGE로 분리한 결과를 정량 분석한 결과이다.

도 6은 나노파티클 표면에 결합된 혈청 단백질에 대한 단백질체 분석 결과를 나타낸다:

도 6a는 MMSN, PMSN 및 PCSN 표면에 결합된 혈청 단백질을 결합 양상에 따라 총 3군으로 나눈 결과이며; 도 6b 내지 도 6d는 각각의 나노파티클 표면에 결합된 혈청 단백질을 분자량, 등전점 및 기능에 따라 분류한 결과이고; 및 도 6e는 기능에 따라 세분화한 단백질군의 결합 양상을 분류한 결과이다.

도 7은 PCSN의 종양 세포 표적능을 확인한 결과이다:

도 7a 및 도 7b는 CPT를 담지한 HER2-PCSN 및 EGFR-PCSN을 SK-BR3 세포 또는 MDA-MB-468 세포에 처리한 후의 세포 내 위치를 확인한 결과이며; 도 7c는 DiI을 담지한 HER2-PCSN 및 EGFR-PCSN을 Hek293T, SK-BR3 세포 또는 MDA-MB-468 세포에 처리한 후 유세포 분석기를 통해 분석한 결과를 나타낸다.

도 8은 PCSN으로부터 종양 세포 내로 약물을 전달하는 유입능을 평가한 결과이다:

도 8a는 CPT를 담지한 EGFR-PCSN을 MDA-MB-468 세포에 처리한 후의 세포 사진이고; 및 도 8b는 Hek297T 세포에 처리한 후의 세포 사진이다.

도 9는 표적 세포에 대한 PCSN의 세포 독성을 확인한 결과이다:

도 9a는 CPT를 담지한 HER2-PCSN을 SK-BR3 세포 또는 Hek297T 세포에 처리한 후의 세포 생존율을 나타내며; 및 도 9b는 CPT를 담지한 EGFR-PCSN을 MDA-MB-468 세포 또는 Hek297T 세포에 처리한 후의 세포 생존율을 나타낸다.

도 10은 독소루비신(DOX)을 담지한 PCSN의 세포 표적능 및 세포 독성 여부를 확인한 결과이다:

도 10a 및 도 10b는 DOX를 담지한 HER2-PCSN 또는 EGFR-PCSN을 SK-BR3 세포 또는 MDA-MB-468 세포에 처리한 후의 세포 사진이고; 및 도 10c 및 도 10d는 DOX를 담지한 HER2-PCSN 또는 EGFR-PCSN을 SK-BR3 세포 또는 MDA-MB-468 세포에 처리한 후의 세포 생존율을 나타낸다.

도 11은 GST-Afb 외층을 가지는 나노파티클이 대식 세포에 대하여 나타내는 스텔스 효과(stealth effect)에 대한 모식도이다:

도 11a는 PCSN이 혈청 내 단백질로부터 둘러싸이는 코로나층 형성을 차단하여 대식 세포의 면역 반응을 회피할 수 있음을 나타내는 모식도이며; 및 도 11b는 스텔스 효과의 여부를 확인하기 위해 PCSN을 55% 혈청 내에서 보관한 후 약물의 전달 과정을 확인하는 과정을 나타내는 모식도이다.

도 12는 PCSN에 대한 대식 세포의 포식 여부 및 대식 세포에 대한 세포 독성 여부를 확인한 결과이다:

도 12a 및 도 12b는 DiI을 담지한 EGFR-PCSN 및 HER2-PCSN을 MDA-MB-468 세포, SK-BR3 또는 Hek293T 세포에 처리하였을 때 시간의 흐름에 따른 세포 형광 관찰 사진이고; 도 12c는 DiI을 담지한 PMSN 또는 HER2-PCSN을 SK-BR3 세포에 처리하고 6 시간 후 관찰한 세포 형광 사진이며; 도 12d는 상기 관찰한 세포 형광 사진의 세포를 유세포 분석기로 분석한 결과이고; 및 도 12e는 CPT를 담지한 HER2-PCSN를 대식세포인 RAW 264.7 세포에 처리한 후의 세포 생존율을 확인한 결과이다.

도 13은 생체 내 환경에서 보관한 PCSN의 종양 세포 표적능을 확인한 결과이다:

도 13a는 DiI을 담지한 HER2-PCSN을 55% 혈청 내에서 4 시간 동안 보관한 후, Hek297T 세포 또는 SK-BR3 세포에 처리한 후의 세포 사진이고; 도 13b는 CPT를 담지한 EGFR-PCSN을 55% 혈청 내에서 보관한 후 MDA-MB-468 세포에 처리한 후의 세포 사진이며; 및 도 13c는 CPT를 담지한 HER2-PCSN을 55% 혈청 내에서 보관한 후 SK-BR3 세포 또는 Hek297T 세포에 처리하였을 때의 세포 생존율을 나타낸다.

도 14는 생체 내에서 PCSN의 항암 효과를 확인한 결과이다:

도 14a 및 도 14b는 암세포를 이종이식한 마우스에 CPT를 담지한 PCSN, PMSN 또는 HER2-PCSN을 투여한 후, 시간의 흐름에 따른 형광 표지를 확인한 결과이며; 및 도 14c 및 도 14d는 투여 24 시간 후에 마우스를 희생하여 수득한 장기에서 종양의 형광 표지 정도를 확인한 결과이다.

도 15는 일 구체예에 따른 융합 단백질 및 이에 결합된 약물의 구조를 도식화하여 나타낸 도면이다.

도 16은 일 구체예에 따른 융합 단백질에 캄토테신을 결합시키기 위한 과정을 나타낸 도면이다; 도 16a: CPT-PDS의 합성 과정, 도 16b: GSH-CPT의 합성 과정.

도 17은 CPT-PDS 및 GSH-CPT의 NMR 데이터를 나타낸 도면이다; 도 17a: CPT-PDS의 NMR 데이터, 도 17b: GSH-CPT의 NMR 데이터.

도 18은 일 구체예에 따른 융합 단백질에 염료를 결합시키기 위한 과정을 나타낸 도면이다.

도 19는 GSH 결합된 염료(GSH-FL)의 NMR 데이터를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0058] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0059] 실시예 1. 단백질 코로나 외층을 가지는 나노파티클에 사용하기 위한 외층 융합 단백질의 발현

[0060] <1-1> 애피바디(affibody) 및 글루타치온-S-전이효소(glutathione-S-transferase, GST) 융합 단백질의 제조

[0061] 본 발명에서는 약물 전달체로 사용하기 위한 나노파티클의 표면에 단백질 코로나의 외층을 형성시켜, 생체 내 환경에서도 안정성 및 표적능이 향상된 약물 전달체를 제조하고자 하였다. 이를 위해, 먼저 단백질 코로나 외층을 구성할 수 있는 융합 단백질(fusion protein)을 제조하였다. 융합 단백질은 암세포 표면의 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 애피바디(affibody, Afb)와 GST가 결합된 형태가 되도록 발현하였다.

[0062] 구체적으로, 본 발명에서는 Afb로서 HER2에 특이적으로 결합하는 HER2 Afb 및 EGFR에 특이적으로 결합하는 EGFR Afb를 사용하였다. 각각의 HER2 Afb 또는 EGFR Afb를 암호화하는 유전자의 말단에 추가 링커 도메인(서열번호 1: GGGLVPRGSGGGCGGGTGGGSGGG)을 암호화하는 유전자를 결합시킨 다음, pETduet 플라스미드에 삽입하였다. 또한, GST 과발현을 위해서 GST의 N-말단에 6×His 태그가 연결되도록 디자인한 GST 암호화 유전자를 상기 pETduet 플라스미드에 삽입하여, Afb와 GST가 링커로 연결된 융합 단백질(GST-Afb)의 과발현을 위한 플라스미드를 구축하였다. 구축된 플라스미드에서 PCR 및 DNA 서열분석을 통해 GST-Afb 암호화 서열이 정상적으로 삽입되었는지 확인하였다. 그런 다음, 구축된 플라스미드를 E. coli BL21(DE3) 균주에 삽입하여 배양한 다음, IPTG를 처리하고 30 °C에서 16 시간 동안 배양하여 GST-Afb의 과발현을 유도하였다. 과발현 유도된 E. coli 세포는 5000×g로 4 °C에서 10 분간 원심분리하여 침전된 세포를 수득하고, 인산염 완충용액(50 mM 인산 나트륨 및 100 mM 염화 나트륨, pH 6.5)에 세포를 현탁하였다. 세포 현탁액에 리소자임(lysozyme)을 처리하고 20 분간 실온에서 배양한 다음, 30 초 파쇄 및 1 분 간격으로 총 10 분가 초음파 파쇄하였다. 파쇄 후, 12000×g로 4°C에서 1 시간 동안 원심분리하여 상층액을 GST-Afb 포함 분획으로서 수득하였다. 상층액은 FPLC를 이용한 금속이온 친화 크로마토그래피(immobilized metal affinity chromatography; 1mL HisTrap FF 컬럼, GE HealthCare)로 정제하여 GST-Afb를 분리 하였다. 분리한 GST-Afb(GST-HER2 Afb 및 GST-EGFR Afb)는 PBS(pH 7.4)에서 밤새도록 투석하여 농축하였다. 농축한 GST-HER2 Afb 및 GST-EGFR Afb는, SDS-PAGE 분석 및 ESI-TOF MS(electrospray ionization time-of-light mass spectrometry) 분석을 통해 분리한 단백질의 순도 및 분자량을 분석하였다.

[0063] 그 결과, 도 2에서 나타난 바와 같이 GST-HER2 Afb 및 GST-EGFR Afb를 발현하고 이의 분자량을 확인하였다. 금속이온 친화 크로마토그래피로 분리한 분획층을 SDS 분석하였을 때 GST-HER2 Afb 및 GST-EGFR Afb를 각각 99.0% 이상의 순도로 정제할 수 있음을 확인하였으며(도 2a 및 도 2b), 이의 분자량 분석을 하였을 때 GST-HER2 Afb의 분자량은 약 36.3 kDa이고 GST-EGFR Afb의 분자량은 약 36.14 kDa임을 확인하였다(도 2c).

[0064] <1-2> GST-Afb 융합 단백질의 세포 독성 및 세포 표적능 확인

[0065] 본 발명에서 발현한 GST-Afb 융합 단백질을 약물 전달체에서 단백질 코로나 외층(protein corona shield, PCS)으로 적용할 수 있는지 확인하기 위해 세포 독성 및 세포내 흡수능을 확인하고자 하였다.

- [0066] 구체적으로, 먼저 GST-HER2 Afb를 대상으로 세포 독성 여부를 확인하기 위해 인간 유방암 세포주인 SK-BR-3 세포를 준비하였다. 준비한 SK-BR-3 세포는 DMEM 배지(11995065, Invitrogen, S.Korea)에서 배양하였다. 배지에는 10% 우태아혈청(FBS), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 스트렙토마이신 및 100 U/ml 페니실린을 첨가하였고, 배양 기간 중에는 배지를 매일 한번씩 교체하였다. 배양 환경은 37℃의 5% CO₂ 배양기로 유지하였다. 세포 접종 후 세포가 85% 포화도로 증식되면, 부착 배양된 세포를 분리하여 실험에 사용하였다. SK-BR-3 세포를 분리하여, 96 웰 플레이트(Thermo Scientific Inc. Korea)에 5×10^3 세포/웰의 농도로 각각의 세포를 접종하고 37℃의 5% CO₂ 배양기에 서 24 시간 동안 배양하였다. 그런 다음, 상기 실시예 <1-1>에서 수득한 GST-HER2 Afb를 0.3 μM 내지 10 μM 의 농도로 SK-BR-3 세포에 처리하고 24 시간 동안 추가 배양하였다. 배양 종료 후, 알라마르 블루 염색약(Alamar blue dye; DAL 2015, Invitrogen, Korea)을 사용하여 세포 생존율을 확인하였다. 세포 생존율을 확인하기 위해 형광 염료에 대한 여기 파장(excitation wavelength)을 565 nm로 설정하였으며 이에 따른 방출 파장(monitored emission)을 590 nm로 설정하여 형광 플레이트 리더기(Tecan Infinite Series, Germany)로 형광 분석하였다. 또한, GST-HER2 Afb 중 GST를 형광-5-말레이미드(fluorescein-5-maleimide, F5M)로 표지하여 세포 내로 흡수(cell uptake)된 GST-HER2 Afb의 위치를 확인하였다. 음성 대조군으로서는 정상 상피 세포주인 MCF-10A 세포를 사용하여 동일한 방법을 수행하여 세포 생존율 및 세포 내 흡수 정도를 확인하였다.
- [0067] 이와 함께, GST-Afb에서 GSH와 표적 수용체 간의 상호작용을 실시간으로 확인하기 위해 수정진동자저울(Quartz Crystal Microbalance, QCM) 및 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance, SPR) 분석을 수행하였다.
- [0068] 그 결과, 도 3에서 나타난 바와 같이 GST-HER2 Afb가 세포에 대하여는 독성을 나타내지 않으나, 암 세포 특이적으로 흡수될 수 있음을 확인하였다. GST-HER2 Afb를 SK-BR-3 세포 및 MCF-10A 세포에 처리하여 배양하였을 때 처리 농도와는 관계없이 세포 사멸 정도를 나타내지 않아 GST-Afb에 의해 세포 독성을 나타내지 않음을 확인한 반면(도 3a), GST-HER2 Afb는 유방암 세포주인 SK-BR-3 세포에만 결합하는 결합능을 나타내어 GST-Afb가 암세포 특이적인 표적능을 나타내는 것으로 확인하였다(도 3b). 이를 통해, 본 발명에서 단백질 코로나 외층으로 사용하기 위해 발현한 GST-Afb 융합 단백질은 정상 세포에 대하여 독성을 나타내지 않고 암 세포에 대한 표적능을 나타낼 수 있음을 확인하였다.
- [0069] **실시예 2. 단백질 코로나 외층(PCN)을 가지는 약물 전달체의 제조**
- [0070] **<2-1> 다공성 실리카 나노파티클 준비**
- [0071] 약물 전달체의 기본 구조로서, 다공성 실리카 나노파티클(mesoporous silica nanoparticle, MSN)을 준비하였다. MSN은 두 종류로 나누어, 직경 100 nm 이하의 MSN 및 직경 50 nm 이하의 MSN을 준비하였다.
- [0072] 먼저, 직경 100 nm 이하의 MSN을 준비하기 위해, 1.0 g의 세틸트리메틸암모늄브로마이드(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)를 0.015 M NaOH 용액 480 g에 녹인 후 80℃에서 교반하여 이를 용해시켰다. CTAB가 완전히 용해되면, 계면활성제로서 4.7 g의 TEOS를 가하고 2 시간 동안 800 rpm으로 추가 교반하였다. 교반된 교반액이 백색의 고체상을 나타내면 이를 진공 필터로 여과한 다음, 탈이온수(DI water)로 세척하고, 70℃의 공기중에서 건조시켜 건조물을 수득하였다. 수득한 건조물은 마노 절구(agate mortar)에서 균질화한 다음, 550℃에서 5 시간 동안 하소(calcine)하여 최종적으로 MSN을 수득하였다.
- [0073] 한편, 직경 50 nm 이하의 MSN을 준비하기 위해 1.53 g의 CTAB 및 0.3 g의 수산화테트라에틸암모늄 용액(Tetraethylammonium hydroxide, TEAH)을 100 g의 탈이온수에 가한 후, 80℃에서 1 시간 동안 교반하여 이를 용해시켰다. CTAB 및 TEAH가 완전히 용해되면, 14.45 g의 TEOS를 가하고 2 시간 동안 800 rpm으로 추가 교반하였다. 교반된 교반액이 백색의 고체상을 나타내면 이를 진공 필터로 여과한 다음, 탈이온수로 세척하고, 70℃의 공기중에서 건조시켜 건조물을 수득하였다. 수득한 건조물은 마노 절구(agate mortar)에서 균질화한 다음, 550℃에서 5 시간 동안 하소(calcine)하여 최종적으로 MSN을 수득하였다.
- [0074] **<2-2> PEG화된 MSN 제조**
- [0075] 나노파티클을 약물 전달체로 사용함에 있어서, 종래 기술에서는 MSN 표면을 PEG화하여 사용하고 있다. 이에, 본 발명에서는 대조군으로 사용하기 위해 MSN 표면을 PEG화한, PEG화된 MSN(PMSN)을 제조하였다.
- [0076] 구체적으로, 상기 실시예 <2-1>에서 제조한 MSN에 5 mg의 염료 또는 약물을 담지시킨 다음, 10 mg의 PEG-PDS 중합체를 포함하는 탈이온수 1 ml에 상기 MSN을 분산시키고 12 시간 동안 실온에서 교반하였다. 그런 다음, 중합체를 MSN 외층으로 가교결합 시키기 위해, PDS 군에 대하여 50 mol%의 최종 농도가 되도록, 실온에서 교반을 지속하면서 3 시간에 걸쳐 DTT를 첨가 및 가교결합 반응을 수행하였다. 3 시간의 교반이 종료되면, 약물을 담지한

채 PEG 중합체로 둘러싸인 MSN을 원심분리로 수득한 다음, pH 7.4 인산염 완충용액(10 mM) 및 탈이온수로 총 3 회 세척하였다. 세척 단계에서 상층액을 별도로 수득하여, 티올-이황화 교환 반응을 통한 중합체 가교결합 과정에서 방출되는 부산물(피리도치온, pyridothione) 및 이외의 제거된 약물의 포함 정도를 UV-분광 분석(UV-Visible spectra)을 통해 확인하였다.

[0077] <2-3> GST를 표면 결합시킨 나노파티클의 제조

[0078] 본 발명의 단백질 코로나 외층을 가지는 나노파티클을 제조하기 위한 과정으로서, 표면에 글루타치온(glutathione, GSH)을 티올-엔 클릭 화학반응(thiol-ene click chemistry)으로 결합시킨 나노파티클(GSH-modified particle, MMSN)을 제조하였다.

[0079] 구체적으로, 상기 실시예 <2-1>에서 제조한 MSN 100 mg 및 1 ml의 3-(트리메톡시실일)프로필 아크릴레이트(3-(trimethoxysilyl) propyl acrylate)를 18 ml 톨루엔에 혼합하였다. 혼합된 혼합액은 60 °C에서 24 시간 동안 교반하여 반응시켰다. 반응 후, 에탄올 및 탈이온수로 반응된 MSN을 세척한 다음, 16 ml의 DMF에 가하여 MSN을 준비하였다. 외층을 이루기 위한 GSH는 100 mg의 GSH를 2 ml의 탈이온수에 용해하여 준비하였다. 그런 다음, 상기 준비한 MSN 포함 용액 및 GSH 수용액을 혼합하고, 40 μl의 피리딘을 가하여 불택성하여 교반하였다. 교반 후, 혼합액은 실온에서 72 시간 동안 방치하여 반응을 유도하였다. 반응 종료 후, 나노파티클을 에탄올로 3 회 세척하고 실온에서 진공 건조하여, GSH가 표면에 결합된 나노파티클(MMSN)을 최종적으로 수득하였다.

[0080] <2-4> GST-Afb 단백질 코로나 외층을 가지는 나노파티클의 제조

[0081] 본 발명에서 약물 전달체로 사용하고자 하는, 단백질 코로나 외층을 가지는 나노파티클(protein corona shield nanoparticle, PCSN)을 제조하기 위해, 단백질 코로나 외층으로서 GST-Afb를 적용한 나노파티클을 제조하였다. MSN은 내부 및 표면에 화학 작용기를 통해 물질을 담지할 수 있는 전달체로서 사용되므로, 본 발명에서는 MSN 표면에 GSH를 결합하여 MMSN를 제조하고, 이에 GST를 통해 결합된 단백질 코로나 외층을 형성하여, 도 1b의 과정을 통해 PCSN을 제조하였다.

[0082] 구체적으로, 상기 실시예 <1-1>에서 정제 수득한 GST-HER2 Afb 또는 GST-EGFR Afb를 각각 1 mg 준비하여, 2 ml PBS(pH 7.4)에 용해한 단백질 용액을 준비하였다. 또한 상기 실시예 <2-3>에서 제조한 MMSN 1 mg을 3 ml PBS에 가하였다. 그런 다음, GST-Afb 단백질 용액을 4 °C에서 교반하면서, MMSN 용액을 천천히 가하여 혼합되도록 하였다. 두 용액을 완전히 혼합한 다음, 4 °C에서 1 시간 동안 추가로 교반하였다. 교반 후, 5000 rpm에서 원심분리하여 결합되지 않은 잔여 단백질을 제거한 다음 PBS로 세척하여, 최종적으로 PCSN을 수득하고 이를 5 ml PBS에 보관하였다.

[0083] 실시예 3. 단백질 코로나 외층(PCN)을 가지는 약물 전달체의 생리화학적 특징 확인

[0084] <3-1> 단백질 코로나 외층을 가지는 나노파티클(PCSN)의 표면 전하 확인

[0085] 본 발명에서 제조한 PCSN의 표면 전하를 확인하고자, 생리적 pH 환경에 분산된 나노파티클의 제타전위(zeta-potential)를 측정하여 약물 전달체의 표면 전하를 확인하였다. 이를 비교하기 위해, 상기 실시예 <1-1>에서 제조한 GST-Afb와 함께, 상기 [실시예 2]에서 제조한 약물 전달체인 MSN, PMSN, MMSN 및 PCSN의 표면 전하를 함께 확인하였다.

[0086] 그 결과, 도 4a에서 나타난 바와 같이 GST-Afb 단백질 코로나를 외층으로 가지지 않는 나노파티클에 비해, 본 발명의 PCSN의 표면 전하가 GST-Afb의 전하와 유사한 수준을 나타내는 것으로 확인하였다(도 4a). GST-HER2 Afb 및 GST-Afb EGFR은 생리적 pH 환경에서 표면 전하가 각각 약 -5.25 mV 및 -3.5 mV임을 확인하였다. 반면, MSN의 표면 전하는 -23 mV 이고, GST를 나노파티클 표면에 결합시킨 MMSN은 -40 mV의 표면 전하를 나타내는 것을 확인하였다.

[0087] 이에 비해, 단백질 코로나 외층(PCS)을 형성하여 둘러싼 PCSN은, HER2-PCSN 및 EGFR-PCSN이 각각 -5.3 mV 및 -3.24 mV의 표면 전하를 나타내어, 나노파티클 표면에 결합되지 않은 상태의 GST-Afb 용해 단백질과 유사한 수준의 표면 전하를 나타내는 것으로 확인하였다(도 4a).

[0088] <3-2> 나노파티클의 표면적 및 크기 변화 확인

[0089] 본 발명에서 제조한 나노파티클의 크기를 비교하고자 하였다.

[0090] 먼저, MSN 및 MMSN의 표면에 분포하는 반응기를 확인하기 위해, FTIR 분석을 수행하였다. MSN 표면에 GST를 화학결합을 통해 부착시킨 MMSN에 대하여 FIIR 분석한 결과, 도 4b에서 나타난 바와 같이, 약 1711 내지 1651 cm⁻¹

¹(symmetric vCOO⁻), 약 1409 cm⁻¹(asymmetric vCOO⁻) 및 1711 cm⁻¹(vC=O)에서 흡수 피크대를 나타내어, MMSN 표면에서 GSH의 -COOH기를 포함하고 있음을 확인하였다(도 4b). 또한, 약 2526 cm⁻¹에서는 흡수 피크를 나타내지 않아 GSH가 MSN 표면의 아크릴산 기(acrylate group)와 공결합을 통해 결합되어, 해당 피크에서 흡수 피크를 나타내지 않는 것으로 확인하였다(도 4b).

[0091] 또한, MSN 및 MMSN을 대상으로 표면적 및 포어 크기를 확인하였다. MSN은 평균 직경이 103±10 nm인 것을 사용하였다. 그 결과, 하기 [표 1]에서 나타난 바와 같은 표면적 및 포어 크기의 양상을 나타내는 것으로 확인하였으며, MSN과 MMSN을 비교하였을 때, 표면에 GST를 결합시킨 MMSN가 MSN보다 표면적 및 포어 부피가 감소하는 경향을 나타내는 것으로 확인하였다(표 1).

표 1

[0092] MSN 및 MMSN의 표면적 및 포어 크기 양상의 비교

시료명	표면적(m ² /g)	포어 부피(cm ³ /g)	포어 크기(nm)
MSN	1190	1.10	2.68
MMSN	540	0.50	2.04

[0093] 이와 함께, 동적광산란법(dynamic light scattering, DLS)을 수행하여 MMSN 및 PCSN의 유체역학적 반지름을 측정해, 나노파티클의 크기를 확인하였다. 그 결과, GST-Afb의 용합 단백질 없이 GSH 만을 결합시킨 MMSN의 반지름은 약 140±20 nm인 반면, PCSN은 나노파티클의 반지름은 HER2-PCSN 및 EGFR-PCSN이 각각 약 270±20 nm 및 약 265±31 nm인 것을 확인하여, 단백질 코로나 외층으로 둘러싸인 PCSN의 직경이 증가함을 확인하였다. 이는 TEM 영상 분석을 통하여서도 MMSN에 비해 PCSN의 표면에 단백질 층이 추가로 형성되어, 입자의 직경이 증가함을 확인하였다(도 4c). MMSN 표면에 GST-Afb를 결합시켜 PCSN을 제조하는 과정에서, MMSN 상에 단백질 코로나 외층을 형성하는 GST-Afb 용합 단백질의 수를 BSA 분석으로 확인하였다. 그 결과, HER2-PCSN 표면에 결합된 GST-HER2 Afb 단백질은 1162±41 개이며, EGFR-PCSN 표면에 결합된 GST-EGFR Afb 단백질은 819±30 개임을 확인하였다.

[0094] <3-3> PCSN의 저장 안정성 확인

[0095] 본 발명의 PCSN을 약물 전달체로서 사용하기 위해, 저장 안정성을 나타내어 장기간 보관하여도 응집을 나타내지 않고 나노파티클의 형태를 나타낼 수 있는지 확인하고자 하였다. 이를 위해, GST-Afb 용합 단백질 및 이를 PCS로 가지는 PCSN을 각각 PBS 완충용액에 가하고, 4℃에서 2 주간 보관한 후, 응집체 형성 여부를 확인하였다.

[0096] 그 결과, 도 4d에서 나타난 바와 같이 GST-Afb 용합 단백질 및 PCSN 모두 2주간 보관한 후에도 응집체가 형성되지 않고 구조적으로 온전한 상태를 유지하여, 일정한 크기가 지속되는 것을 확인하였다(도 4d).

[0097] 실시예 4. 나노파티클 표면에 생성되는 단백질 코로나 외층의 특징 확인

[0098] <4-1> PCSN 제조 과정에서 GST-Afb 최적 첨가 농도 확인

[0099] PCSN을 제조하는 과정에서 GST-Afb로 단백질 코로나 외층을 먼저 형성하도록 유도할 때, GST-Afb를 첨가하는 최적의 농도를 확인하고자 하였다.

[0100] 이에 따라, 상기 실시예 <2-4>의 과정으로 PCSN을 제조할 때, MMSN 1 mg 당 1, 5, 50, 150 또는 175 μg의 농도로 GST-HER2 Afb 또는 GST-EGFR Afb를 혼합하여 PCSN을 제조하였다. MMSN 및 GST-Afb의 혼합 반응을 유도하고 남은 잔여 단백질의 농도를 측정하여, PCSN 표면에서 PCS를 형성하기 위한 GST-Afb의 최적 첨가농도를 구하였다.

[0101] 그 결과, MMSN 상에 결합되는 GST-Afb 단백질의 수는 MMSN 1 mg 당 50 μg(1008 개 내지 1100 개)가 최적의 비율인 것으로 확인하였다. 이는 나노파티클의 표면에 최종적으로 PCS를 형성하는 단백질의 양이 초기 반응시의 단백질 농도에 따라 영향을 받는 것으로 확인하였다.

[0102] <4-2> 나노파티클 표면에 단백질 코로나를 형성하는 단백질량의 확인

[0103] PCSN 표면에 GST-Afb로 먼저 PCS를 형성하는 것을 통해, 생체 내 주입된 이후에 원하지 않는 단백질 코로나의 형성이 억제되는 효과를 확인하고자 하였다. 이를 위해, MMSN, PMSN 및 PCSN을 각각 55% 혈청 내에서 총 4 시간

동안 보관하였다. 보관 개시 후 1 시간, 2 시간 및 4 시간 후에 각각의 나노파티클을 수득하여 표면에 형성된 혈청 단백질 층을 나노파티클로부터 분리하였다. 분리한 단백질은 SDS-PAGE에 로딩하여 단백질 밴드를 확인하였다. 확인한 단백질 밴드는 밴드 강도(intensity)를 정량 분석하였다.

[0104] 그 결과, 도 5에서 나타난 바와 같이 MMSN 및 PMSN 표면에 결합된 혈청 단백질에 비해, PCSN 표면에 결합된 혈청 단백질의 수준이 현저히 감소하는 것을 확인하였다(도 5a 및 도 5b). 특히, MMSN 및 PMSN에서는 혈청 내 보관하는 시간이 지남에 따라 나노파티클 표면에 결합하는 혈청 내 단백질의 수준이 증가하는 반면, PCSN 표면에는 시간의 흐름과 관계없이 미량의 혈청 단백질만이 결합하는 것을 확인하였다.

[0105] <4-3> 나노파티클 표면에 결합된 혈청 단백질에 대한 단백질체 분석

[0106] PCSN 표면에는 MMSN 및 PMSN과는 달리 현저히 감소된 수준의 단백질층이 결합되는 것을 확인하였다. 이에, 각각의 나노파티클에 부착된 단백질의 종류를 확인하기 위해, 단백질체 수준에서 분석을 수행하였다.

[0107] 구체적으로, 상기 실시예 <4-2>에서 SDS-PAGE에 로딩하고 코마시에 블루(Coomassie blue)로 염색하여 확인한 단백질 밴드를, 인-젤 트립신 절단(in-gel tryptic digestion) 분석을 수행하여 연속적인 6 개의 부분으로 나누었다. 이를 통해 트립신 분해로 수득한 펩티드는 LC-MS/MS 분석하고, 나노 수준의 전자스프레이 이온 분석기(nanoelectrospray ion source)를 장착한 Orbitrap ELITE (Thermo, Bremen, Germany)에서 해당 펩티드의 분자량을 분석하였다. LC-MS/MS 중, 펩티드 혼합물을 분리하기 위해 수행한 HPLC 분석의 조건으로, HPLC 컬럼은 C18 역상 컬럼(500 mm × 75 μg ID)을 사용하였다. 이동상 용매로는 아세트오닐트릴 및 0.1% 포름산(formic acid)을 혼합하여 농도구배를 주면서 총 150 분간 분석하였고, 이동상의 유속은 분당 300 nL으로 유지하였다. 분리된 펩티드의 분자량을 분석하기 위한 MS/MS 분석의 조건은 다음과 같다. 초기 이온 스캔(precursor ion scan)의 MS 스펙트럼(m/z 350~1600)은 internal lock mass 조건으로 m/z 400에서 60,000의 resolution을 가지는 Orbitrap 기기로 수행하였다. 이 중 상위 20 개의 이온을 분리하여 CID(collisionally induced dissociation)을 통해 선형 이온 트랩으로 절편화하였다. LC-MS/MS 분석 결과는 Sequest(Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA; Version 1.4.1.14) 및 X! Tandem(The GPM, thegpm.org; version CYCLONE (2010.12.01.1)) 프로그램을 사용하여 분석하였다. 두 프로그램을 사용하여 분석한 단백질은 *Bos taurus* 단백질 서열 데이터베이스(8244 entries, UniProt (<http://www.uniprot.org/>))를 기반으로 서열을 조사하여 해당 단백질을 확인하였다. 확인한 단백질에 대한 분류는 Protein Prophet 알고리즘(Mueller, L. N., Brusniak, M.-Y., Mani, D. & Aebersold, R. *Journal of proteome research* 7, 51-61 (2008))을 기준으로 하여 분류하였고, NCBI의 GO terms를 사용하여 단백질 기능을 분석하였다.

[0108] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이 PMSN, MMSN 및 PCSN의 표면에 부착된 단백질은 총 183 개의 단백질이며, 이 중 상위 78 개의 단백질에 대하여 히트맵(heat map)으로 나타낼 수 있었다(도 6a). 각각의 단백질은 PMSN, MMSN 및 PCSN에 결합된 양상에 따라 총 3 군으로 나누었다. 제 1군에 속하는 혈청 단백질의 종류가 가장 많으며, 제 1군 단백질은 MMSN, PMSN 및 PCSN 순으로 결합된 단백질의 양이 감소하는 것으로 분류하였다. 또한, 제 2군 단백질은 MMSN 및 PMSN에서 유사한 수준으로 결합되는 것으로 분류하였으며, 제 3군 단백질은 MMSN, PMSN 및 PCSN의 모든 나노파티클에서 유사한 수준으로 결합된 것으로 분류하였다(도 6a). 이를 통해, PCSN의 표면에 GST-Afb 단백질로 둘러싼 PCS가 나노파티클을 보호하는 역할을 하여, MMSN 및 PMSN에 비해 혈청 단백질과의 결합을 차단하므로 PCSN에 결합된 혈청 단백질의 양이 감소하는 것을 확인하였다.

[0109] 다음으로, 결합된 단백질을 분자량 및 등전점에 따라 분류하였다. 그 결과, MMSN 및 PMSN에서는 단백질의 분자량에 따라 서로 유사한 양상으로 표면에 혈청 단백질이 결합됨을 나타내는 반면, PCSN에서는 다른 양상으로 단백질의 결합이 나타남을 확인하였다. 구체적으로, PCSN의 표면에는 100 kDa 이상의 분자량을 가지는 단백질보다 20 내지 80 kDa의, 분자량이 낮은 단백질이 결합되는 비율이 높은 것으로 확인하였다(도 6b). 등전점의 경우, PCSN의 표면에 pI가 약 7 내지 8을 나타내는 단백질이 결합되는 비율이 높은 것으로 확인하였다(도 6c).

[0110] 또한, 결합된 단백질의 기능에 따라 분류하였다. 혈청 단백질의 기능에 따라 분류군을 나누었을 때, 응고작용(coagulation) 또는 보체(complement)와 같이 면역 반응에 관여하는 단백질이 주로 결합되었으며, 이에 따라 총 4 군으로 나누었다(도 6d). 이를 MMSN, PMSN 및 PCSN에서 비교하였을 때, MMSN과 PMSN은 유사한 양상으로 단백질의 결합을 나타내어 응고작용에 관여하는 혈청 단백질 및 보체 단백질이 높은 비율로 결합되나, PCSN의 표면에는 급성기 반응(acute phase)에 관여하는 혈청 단백질과, 아포지질단백질(apolipoprotein)이 보다 높은 비율로 결합됨을 확인하였다(도 6d 및 도 6e).

[0111] 이를 통해, 본 발명의 PCSN에서는 GST-Afb 단백질이 나노파티클 표면을 둘러싼 코로나 외층을 먼저 형성하는 것

을 통해, 혈청 내에서 부착되는 단백질의 종류를 조절하고 단백질 수를 차단할 수 있어, 이를 통해 혈청 단백질에 의해 둘러싸이는 단백질 코로나의 형성을 억제함을 확인하였다. 이러한 기능을 통해, 본 발명의 PCSN이 생체 내 환경으로 주입되었을 때, 대식세포(macrophage)에 의해 식균작용으로 제거되지 않고, 종양 조직으로 이동하여 표적능이 향상될 수 있도록 함을 확인하였다.

[0112] **실시예 5. GST-Afb 외층을 가지는 나노파티클의 종양 세포 표적능 및 약물 전달능 확인**

[0113] **<5-1> PCSN의 종양 세포 표적능 확인**

[0114] PCSN는 나노파티클 표면에 GST-Afb 단백질로 코로나 외층을 형성하여 혈청 내 단백질의 결합이 차단되는 것을 확인하였으므로, GST-Afb 단백질이 표면에 결합됨에 따라 PCSN이 약물 전달체로서 특징을 유지하여 나타낼 수 있는지 확인하였다.

[0115] 구체적으로, 정상 대조군으로 사용하기 위한 인간 신장 배아줄기세포주인 HeK-293T 세포, HER2 Afb가 인식하는 수용체를 발현하는 유방암 세포주인 SK-BR-3 세포 및 EGFR Afb가 인식하는 수용체를 발현하는 유방암 세포주인 MDA-MB-468 세포를 각각 2 웰의 챔버 커버 글래스(Lab Tek II, Thermo Scientific)에 2×10^5 세포/웰의 밀도로 접종하였다. 접종 후 24 시간 동안 배양하고, 캠토테신(CPT)을 담지한 나노입자를, CPT의 최종 농도가 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 각각의 세포에 처리하였다. HER2-PCSN은 SK-BR-3 세포 및 HeK-293T 세포에 처리하였으며, EGFR-PCSN은 MDA-MB-468 세포 및 HeK-293T 세포에 처리하였다. CPT를 담지한 PCSN을 처리하였을 때, MSN에 FITC를 결합시켜 나노파티클을 처리한 세포에서 MSN의 위치를 녹색 파장으로 형광 관찰하였다. 세포를 염색하기 위해서는 살아있는 세포 내 리소좀(lysosome)을 염색하는 키트인 리소트래커 레드(Lysotracker red FM DND-99, Invitrogen)를 사용하였다. 각각의 세포에 PCSN을 처리한 후, 시간의 흐름에 따라 형광 현미경으로 세포 및 MSN의 위치를 관찰하였다.

[0116] 세포 내로 약물이 유입되는지 여부를 함께 확인하기 위해서, DiI을 담지한 나노파티클을 사용하였다. HeK293T 세포, SK-BR-3 세포 및 MDA-MB-468 세포를 1×10^6 세포/웰의 밀도로 6 웰 플레이트에 접종한 다음, 37°C 에서 24 시간 동안 세포를 배양하였다. 그런 다음, DiI을 담지한 나노파티클을 세포에 처리하고 배양하였다. 이 때 DiI의 최종 농도는 $0.20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되도록 처리하였다. 세포를 배양한 후, 각각의 세포에 트립신을 처리하여 세포를 수득한 다음, PBS로 세척 및 재현탁하여 이를 BD-FACS Caliber가 장착된 유세포 분석기에 주입시켜 세포 내의 DiI 염료의 발색 정도를 확인하였다. 이 때의 세포 내 리소좀은 리소트래커 그린(Lysotracker green FM DND-26, Invitrogen)을 사용하여 염색하였다. DiI 염료의 형광 발색을 확인하기 위해 최소 10,000 세포를 유세포분석기에 주입하여 분석하였으며, 수득한 결과는 FlowJo 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0117] 그 결과, 도 7에서 나타난 바와 같이 CPT 또는 DiI을 담지한 PCSN을 각각의 세포주에 처리한 후의 위치를 확인하였다. 먼저, CPT를 담지한 PCSN을 표적 암세포에 처리하였을 때, HER2-PCSN은 HER2 Afb가 표적으로 하는 종양 세포인 SK-BR3 세포의 표면을 유의적으로 인식할 수 있으며(도 7a), EGFR-PCSN은 EGFR Afb가 표적으로 하는 종양 세포인 MDA-MB 468 세포의 표면을 유의적으로 인식할 수 있음을 확인하였다(도 7d). 이를 정상 세포주인 HeK-293T 세포에 대한 결과와 비교하였을 때, HER2-PCSN 및 EGFR-PCSN 모두 HeK-293T 세포 표면에 결합하지 않아, 본 발명의 PCSN이 표적 암세포에 대하여 특이적인 표적능을 나타낼 수 있음을 확인하였다. 특히, PCSN을 세포에 처리하였을 때 위치를 확인하기 위해 GSH의 기능기에 FITC를 결합시켜 형광 현미경 분석하였을 때, 나노파티클은 암세포 내로 유입되지 않고 세포 표면에 잔존하여 있는 것을 확인할 수 있었다(도 7e).

[0118] **<5-2> PCSN으로부터 종양 세포 내로의 약물 유입능 평가**

[0119] PCSN이 표면에 결합된 애피바디가 표적하는 종양 세포에 특이적인 표적능을 나타낼 수 있음을 확인함에 따라, PCSN이 암세포를 표적한 이후 내부에 담지된 약물의 유입을 유의적으로 나타낼 수 있는지 확인하고자 하였다.

[0120] 구체적으로, EGFR-PCSN을 제조하기 전에 GST-EGFR Afb의 GSH 기에 FITC를 공유결합으로 결합시킨 다음, PCSN으로 제조하고 캠토테신(CPT)를 담지시켜 나노입자를 준비하였다. 그런 다음, MDA-MB-468 세포 또는 HeK-293T 세포를 각각 배양하고, 상기 준비한 나노입자를 CPT의 최종 농도가 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 각각의 세포에 처리하였다. 그런 다음 세포를 16 시간 동안 추가배양하면서, 시간의 흐름에 따라 형광 현미경으로 CPT 및 FITC의 위치를 관찰하였다.

[0121] 그 결과 도 8에서 나타난 바와 같이, 약물을 담지한 PCSN 첨가 초기에는 PCSN이 표적 세포 주변에 위치함과 동시에 약물(CPT) 또한 세포 주변에 위치하여 형광 신호가 중첩되는 반면, 시간의 흐름에 따라 약물은 세포 내로 유입되고, PCSN의 FITC 신호는 세포 주변에서 분해되는 것을 확인하였다(도 8a 및 도 8b). 이를 통해, 약물은

담지한 PCSN을 생체 내 환경으로 투여하였을 때, PCSN 내부에 담지된 약물이 방출되어 세포 내로 유입될 수 있고, PCSN은 분해되어 암 세포에 유의적으로 약물을 처리할 수 있는 것을 알 수 있다.

[0122] <5-3> 표적 세포에 대한 PCSN의 세포 독성 확인

[0123] PCSN이 표적 세포에 대하여 유의적인 표적능 및 세포 내부로의 약물 유입 효과를 나타내므로, 이를 통해 암세포의 사멸이 나타날 수 있는지 확인하였다.

[0124] 구체적으로, CPT를 담지한 HER2-PCSN 및 EGFR-PCSN을 각각 제조하고, CPT 농도를 기준으로 0.01, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5 및 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 HeK293T 세포, SK-BR-3 세포 및 MDA-MB-468 세포에 처리한 후, 세포를 배양하였다. 배양 종료 후, 알라마르 블루 염색약(alar blue dye; DAL 2015, Invitrogen, Korea)을 사용하여 세포 생존율을 확인하였다.

[0125] 그 결과, 도 9에서 나타난 바와 같이 HER2-PCSN 및 EGFR-PCSN 모두 각각의 표적하는 종양 세포에 대하여 약물 방출을 유의적으로 유도할 수 있으며, 이를 통해 PCSN 처리 농도가 증가함에 따라 종양 세포의 사멸 효과 또한 증가하는 것으로 확인하였다(도 9a 및 도 9b). 이에 반해, 정상 세포인 HeK293T 세포에 대하여는 PCSN 처리 농도가 증가하여도 세포 사멸을 나타내지 않는 것을 확인하여, 정상 세포에 대하여는 본 발명의 PCSN이 세포 독성을 나타내지 않아 안전한 약물 전달체로서 사용할 수 있을 것으로 확인하였다.

[0126] <5-4> 담지된 약물에 따른 PCSN의 세포 표적능 및 세포 독성 변화 여부 확인

[0127] 본 발명의 PCSN을 제조할 때, 염료인 DiI 또는 약물인 CPT를 담지한 PCSN이 세포 표적능 및 세포 독성을 유의적으로 나타낼 수 있음을 확인하여, CPT 약물을 독소루비신(doxorubicin, DOX)으로 변경하여 약물을 담지한 PCSN을 제조하였으며, 이에 따라 HER2-PCSN 및 EGFR-PCSN이 각각의 표적 세포에 대하여 나타내는 약물 전달 효과 및 세포 사멸 여부를 확인하였다.

[0128] 그 결과, 도 10에서 나타난 바와 같이 독소루비신을 담지한 PCSN 역시 표적 세포 특이적인 표적능을 나타내어, PCSN 처리 농도가 증가함에 따라 세포 사멸 효과가 증가하는 것으로 확인하였다(도 10a 내지 도 10d). 이에 따라, 나노파티클의 내부에서는 약물과의 특이적인 화학 작용을 요구하지 않기 때문에 원하는 약물 또는 염료로의 변경이 가능할 것으로 보이며, PCSN의 표면 구조로 인해 유의적인 약물 전달 효과를 나타낼 수 있는 것으로 확인하였다.

[0129] 실시예 6. GST-Afb 외충을 가지는 나노파티클이 대식 세포에 대하여 나타내는 스텔스 효과(stealth effect)의 확인

[0130] 실제 생물학적 환경에서 나노전달체를 표적 종양 조직으로 전달할 수 있도록 하려면, 나노파티클이 혈액 순환계에서 오래 유지되는 것이 필요하다. 그러나, 작용기가 결합된 나노파티클의 표면에 다른 단백질이 부착되는 것으로 인해 면역 체계 중 하나인 대식 세포(macrophage)에 의해 제거 대상이 될 수 있고, 유의적인 약물 전달효과를 나타내지 못한다는 한계가 있다. 이러한 약물 전달체로서 나노파티클을 사용하여 유의적인 약물 전달 효과를 나타내기 위해서는, 이러한 자가포식성 세포에 의한 면역 반응을 회피하여 극복하는 것이 필수적으로 수반되어야 하며, 이러한 효과를 스텔스 효과(stealth effect)라고 한다(도 11a).

[0131] <6-1> PCSN에 대한 대식 세포의 포식 여부 확인

[0132] 본 발명자들은 본 발명의 PCSN이 대식세포에 의한 포식작용을 회피하여 스텔스 효과를 나타낼 수 있는지 확인하고자 하였다(도 11b). PEG화된 나노파티클(PMSN)은 종래 기술에서 약물 전달체로서 사용되고 있지만, 대식 세포에 의해 포식되어 약물 전달 효과의 한계를 가지고 있는 것으로 알려져 있어, PMSN을 PCSN에 대한 대조군 나노파티클로서 사용하였다.

[0133] 구체적으로, DiI를 담지한 PMSN 또는 HER2-PCSN을 55% 우태아혈청(FBS)에 가하여 37°C에서 1 시간 동안 반응을 유도한 다음, 원심분리하여 나노파티클의 표면에 비부착된 단백질을 분리한 다음, PBS로 세척하여 나노파티클을 준비하였다. 그런 다음, 대식 세포인 RAW 264.7 세포를 1×10^6 세포/웰의 밀도로 6 웰 플레이트에 접종한 다음, 37°C에서 24 시간 동안 세포를 배양하였다. 배양 후, 준비한 나노파티클을 세포에 처리하고 6 시간 동안 추가로 배양하였다. 배양한 세포에는 DAPI를 처리하여 핵을 염색한 후, DAPI 및 DiI의 형광 발색을 형광 현미경으로 관찰하였다. 또한 RAW 264.7 세포에 트립신을 처리하여 세포를 수득한 다음, 유세포 분석기에 주입시켜 세포 내의 DiI 염료의 발색 정도를 확인하였다.

[0134] 그 결과 도 12에서 나타난 바와 같이, 나노파티클에 담지하지 않은 DiI 염료(free DiI)은 대식 세포 내에 포식

되어 세포 내에 DiI이 흡수되는 것을 확인하였다. 또한, PMSN을 처리한 경우에서도 세포 내로 흡수된 DiI의 형광 발색이 나타나는 것을 확인하였다. 이에 비해, PCSN의 경우에는 세포 내로 DiI이 흡수되지 않아 DiI의 발색을 나타내지 않는 것을 확인하였다(도 12a 내지 도 12d). 따라서, 본 발명의 PCSN에서 표면의 GST 융합 단백질이 외부 단백질을 효과적으로 차단할 수 있으며, 이에 따라 생체 내 환경에서도 면역 세포에 대하여 스텔스 효과를 나타내어 제거되지 않고 유지될 수 있음을 확인하였다.

[0135] <6-2> 대식 세포에 대한 PCSN의 세포 독성 확인

[0136] 본 발명의 PCSN이 대식 세포에 의해 면역 반응으로 제거되지 않음을 확인하였으므로, CPT를 담지하였을 때 대식 세포에 대하여 세포 사멸 효과를 나타내는지 여부를 확인하고자 하였다.

[0137] 구체적으로, CPT를 담지한 HER2-PCSN을 제조하고 55% FBS의 고농도 혈청 단백질 환경에서 1 시간 동안 보관하였다. 그런 다음, 보관한 HER2-PCSN을 수득 및 세척하여 CPT 농도를 기준으로 0.01, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 및 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 RAW 264.7 세포에 처리한 후, 48 시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후, 알라마르 블루 염색약을 사용하여 세포 생존율을 확인하였다. 세포 사멸 효과를 비교하기 위한 대조군으로, 나노파티클 내에 담지하지 않은 자유 CPT를 RAW 264.7 세포에 처리하고 세포 생존율을 확인하였다.

[0138] 그 결과, 도 12e에서 나타난 바와 같이 PCSN에 담지하지 않은 자유 CPT는 처리 농도가 증가함에 따라 RAW 264.7 세포 사멸 효과를 나타내는 반면, HER2-PCSN에 담지된 CPT는 대식 세포에서 분비되지 않으므로 대식 세포에 대하여 사멸 효과를 나타내지 않는 것으로 확인하였다(도 12e).

[0139] <6-3> 생체 내 환경에서 보관한 PCSN의 종양 세포 표적능 확인

[0140] 본 발명의 PCSN가 고농도 혈청 환경에서 보관한 이후에도 대식 세포에 의해 제거되지 않는 스텔스 효과를 나타내므로, 이와 동시에 생체 내 환경에서 암세포에 대하여 유의적인 표적능 및 세포 사멸능을 나타낼 수 있는지 확인하였다.

[0141] 구체적으로, DiI을 담지한 HER2-PCSN을 제조하고 55% FBS의 고농도 혈청 단백질 환경에서 1 시간 동안 보관하였다. 그런 다음, 보관한 HER2-PCSN을 수득 및 세척하여 Hek293T 세포 또는 SK-BR3 세포에 처리하고 4 시간 동안 추가로 배양하였다. 세포 배양 종료 후, 세포 내 리소솜을 리스트래커 그린(Lysotracker green FM DND-26, Invitrogen)을 사용하여 염색하고 형광 현미경으로 DiI 및 리소솜의 위치를 확인하였다. 또한, CPT를 담지한 HER2-PCSN을 위와 동일한 방법으로 SK-BR3 세포에 처리하여 배양한 다음, 리스트래커 레드(Lysotracker red FM DND-99, Invitrogen)로 리소솜을 염색하고 형광 현미경으로 CPT 및 리소솜의 위치를 확인하였다.

[0142] 세포 사멸 효과를 확인하기 위해서는, CPT를 담지한 HER2-PCSN을, CPT 농도를 기준으로 0.1, 1.0, 2.0, 3.0 및 5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 하여 Hek293T 세포 또는 SK-BR3 세포에 각각 처리한 후, 48 시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후, 알라마르 블루 염색약을 사용하여 세포 생존율을 확인하였다.

[0143] 그 결과, 도 13에서 나타난 바와 같이 HER2-PCSN 및 EGFR-PCSN 모두 생체 내 환경에서 보관한 이후에도 표적 암 세포에 대하여 유의적인 DiI 전달능 및 CPT 전달능을 나타내므로(도 13a 및 도 13b), 생체 내 환경에서도 본 발명의 PCSN는 혈청 단백질로 둘러싸이는 단백질 코로나층의 형성을 차단하여, 나노파티클이 생체 내 안정적이고 표적능을 가지는 약물 전달체로서 사용될 수 있음을 확인하였다. 뿐만 아니라, CPT를 담지한 PCSN는 표적 세포인 SK-BR3 세포에 대하여 특이적으로 세포 사멸 효과를 나타낼 수 있어, 약물 전달체로서 사용하였을 때 유의적인 항암 효과를 나타낼 수 있을 것으로 확인하였다(도 13c).

[0144] 실시예 7. 생체 내(*in vivo*)에서 PCSN의 항암 효과 확인

[0145] 본 발명에서 PCSN가 시험관 내 환경에서 표적의 종양 세포에 효과적으로 약물을 전달하여 암세포 특이적인 사멸 효과를 나타내며, 표면에 혈청 단백질로 코로나층이 생성되는 것을 차단하여 대식 세포에 대하여 면역 반응을 회피할 수 있는 스텔스 효과를 나타내는 것으로 확인하였다. 이에, 실제 생체 내에서 본 발명의 PCSN이 유의적인 종양 조직 표적능 및 약물 전달 효과를 나타낼 수 있는지 확인하기 위하여, 생체 내 환경에서 실험을 수행하였다.

[0146] 구체적으로, 구입한 마우스를 각각 5 마리 씩 총 4군으로 나누고, 사료 및 수분을 자유롭게 급여할 수 있는 환경에서 사육하였다. 사육한 마우스에 SK-BR3 세포를 이종이식하여 종양 마우스 모델을 제조하였다. 그런 다음, 생리식염수(saline), DiI을 담지한 MMSN, PMSN 및 HER2-PCSN을 준비하여, 총 4 군으로 나눈 각각의 마우스 모델군에 나노파티클을 1 mg/마우스 투여량(DiI 기준 3mg/kg)으로 정맥 주사 투여하였다. 나노파티클의 투여 후, 총 24 시간 동안 마우스를 사육하면서 생체 내 형광 영상분석(In-vivo fluorescence Imaging)으로 마우스 체내

에서 나노파티클의 위치를 확인하였다. 투여 이후 28 시간까지 생체 내 형광 영상분석한 후, 마우스를 희생하여 심장, 폐, 비장, 간, 신장 및 종양 조직을 적출하여 각각의 기관을 수득한 다음, 생체 외 형광 영상분석(Ex-vivo fluorescence Imaging)으로 투여한 나노파티클 내 Dil의 위치를 확인하였다.

[0147] 그 결과, 도 14에서 나타난 바와 같이 시간이 지남에 따라 HER2-PCSN 투여군에서 DiI의 흡수율이 높은 수준으로 나타나 24 시간 동안 약물이 종양 조직에서 잔존하는 반면, PCSN 투여군 및 PMSN 투여군에서는 투여 초기에 나타나는 DiI 형광 신호가 시간이 지남에 따라 점차 사라져 투여 24 시간 후에는 형광 신호를 나타내지 않는 것으로 확인하였다(도 14a 및 도 14b). 이를 통해, PCSN을 약물 전달체로 사용하였을 때 종양 조직으로 이동하는 이동능이 뛰어날 뿐 아니라 종래 사용되는 MMSN 및 PMSN에 비해 지속적인 체내 잔존능을 나타내어 PCSN가 약물 전달체로서 효과적임을 확인하였다. 각 마우스 군에서 종양 조직의 DiI 형광 강도를 비교하였을 때, PCSN 처리군에서 PMSN 및 MMSN 처리군보다 처리 초기부터 DiI의 형광 강도가 유의적으로 높은 수준으로 나타날 뿐 아니라, 생체 내 잔존 시간 또한 지속적으로 나타나는 것을 확인하였다(도 14b).

[0148] 또한, 사육 이후 마우스를 희생하여 장기를 적출하고 DiI의 위치를 확인하였을 때, MMSN 투여군에서 DiI의 형광 세기가 투여 28 시간 이후 대부분 사라졌으며, PMSN 투여군에서는 대부분의 DiI 형광 발색이 간 및 비장에서 나타나, 체내 면역 및 해독 과정에 의해 배출되는 것을 확인하였다(도 14c 및 도 14d). 이에 비해, PCSN 내부에 담지된 DiI 염료는 대부분이 동양 조직에서 잔존되어 나타남을 확인하였으며, 이러한 결과를 통해 PCSN에서 단백질 코로나층으로 둘러싸이는 과정이 차단되어, 안전하게 종양 조직으로 이동하며 지속적으로 약물 방출능을 나타낼 수 있는 것으로 확인하였다(도 14c 및 도 14d).

[0149] 실시예 8. 애피바디(affibody) 및 GST 융합 단백질을 이용한 저분자 화합물 약물 전달체의 제조

[0150] 본 실시예에서는 도 15에 나타난 바와 같이, 단백질 코로나 외층을 갖는 나노파티클 이외에, 저분자 화합물에 대해서도 애피바디 및 GST 융합 단백질을 이용하여 약물 전달체를 제조할 수 있는지 확인하였다.

[0151] 구체적으로, 저분자 화합물로는 캄토테신(Camptothecin)을 사용하였다. 상기 캄토테신에 GSH(glutathione)을 결합시키기 위하여, 도 16a에 나타낸 바와 같이, CPT-NC(4-ethyl-3,14-dioxo-3,4,12,14-tetrahydro-1H-pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-4-yl (4-nitrophenyl) carbonate) (90mg, 0.175 mmol)에 PA ((2-(pyridin-2-yl)disulfaneyl)ethan-1-ol,) 52.5mg, 0.18mmol), 및 DMAP (40.6mg, 0.333mmol) 을 Dichloromethane (DCM) 용액 중에 혼합하였다. 이후에 24시간 동안 실온에서 반응시켜 CPT-PSD (4-ethyl-3,14-dioxo-3,4,12,14-tetrahydro-1H-pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-4-yl (2-(pyridin-2-yl)disulfaneyl)ethyl carbonate)를 제조하였다. 반응한 CPT-PSD 혼합물은 dichloromethane : ethylacetate = 4:1 의 혼합용매를 실리카 겔럼에 통과시켜, CPT-PSD를 정제하였다. 이의 Mass 데이터를 도 17a에 나타내었다.

[0152] 이후에, 도 16b에 나타낸 바와 같이, CPT-PDS (10mg, 0.0178 mmol) 을 GSH ((glutathione), 5.47mg, 0.0178)와 함께 pH 7.4의 PBS 용액에 섞고 실온에서 24시간 침전법으로 GSH가 결합된 캄포테신을 제조하였다. 이의 Mass 데이터를 도 17b에 나타내었다.

[0153] 다음으로, 상기 제조한 GSH 결합된 캄토테신을 상기 실시예 1에서 제조한 GST-HER2 Afb에 탑재하기 위해, 과량의 GSH-CPT를 GST-HER2 (0.3 mg/ml)와 함께 4℃에서 30분 동안 반응시켰다. 이후에, PBS 에서 투석(dialysis) (24시간) 과정으로 과량의 GSH-CPT를 제거하였고, CPT가 탑재된 GST-HER2 Afb를 분리하였다.

[0154] 실시예 9. 애피바디(affibody) 및 GST 융합 단백질을 이용한 염료(dye) 전달체의 제조

[0155] 본 실시예에서는 염료에 대해서도 애피바디 및 GST 융합 단백질을 이용하여 약물 전달체를 제조할 수 있는지 확인하였다.

[0156] 구체적으로, 염료로는 FL-Mal(Fluorescein-Maleimide) (TCI chemicals)를 사용하였다. 상기 FL-Mal에 GSH를 결합시키기 위하여, 도 18a에 나타낸 바와 같이, FL-Mal (1-(4-(3,6-dihydroxy-9H-xanthen-9-yl)phenyl)-1H-pyrrole-2,5-dione)에, (10mg, 0.0178 mmol) 을 GSH ((glutathione), 5.47mg, 0.0178) pH 7.4 PBS 용액에 섞고 실온에서 24시간 반응후 침전법으로 분리하여 GSH-FL (N5-(1-((carboxymethyl)amino)-3-((1-(4-(3,6-dihydroxy-9H-xanthen-9-yl)phenyl)-2,5-dioxopyrrolidin-3-yl)thio)-1-oxopropan-2-yl)glutamine) (6.18mg, 46%)를 수득하였다.

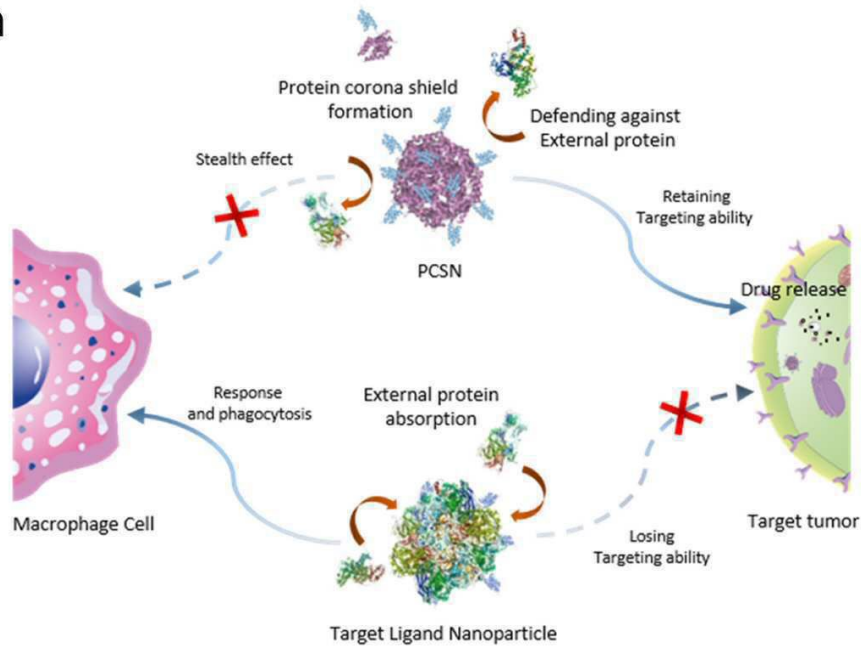
[0157] 이후에, GSH 결합된 FL 염료를 상기 실시예 1에서 제조한 GST-HER2 Afb에 탑재하기 위해, 과량의 GSH-FL (1mg)를 GST-HER2 Afb (0.3 mg/ml)와 함께 4 °C에서 30분 동안 반응시켰다. 이후에, PBS 에서 투석(dialysis) (24 시간) 과정으로 과량의 FITC-GSH를 제거하여, GSH-FL이 탑재된 GST를 분리하였다. UV lamp의 조사에 의한 형광

발광을 관측하여, GST에 GSH-FL이 탑재되어 있음을 확인할 수 있었다.

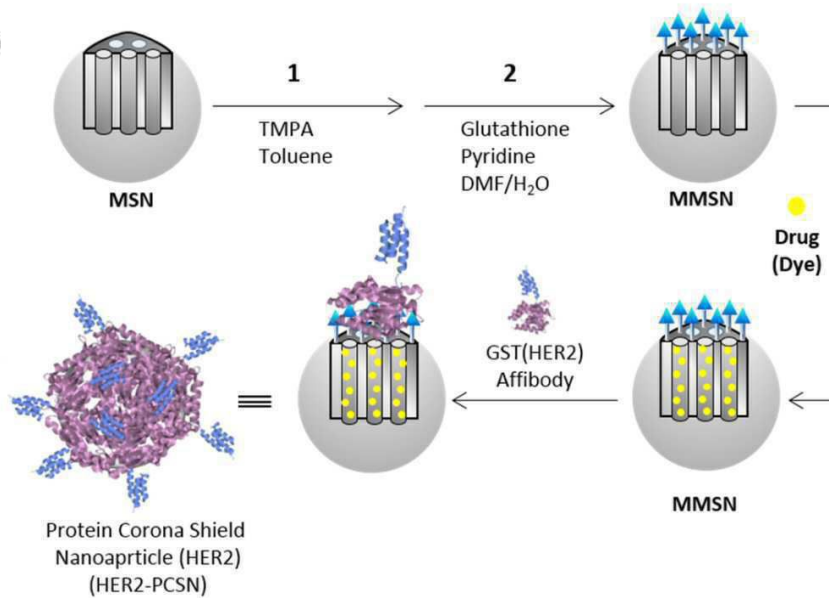
도면

도면1

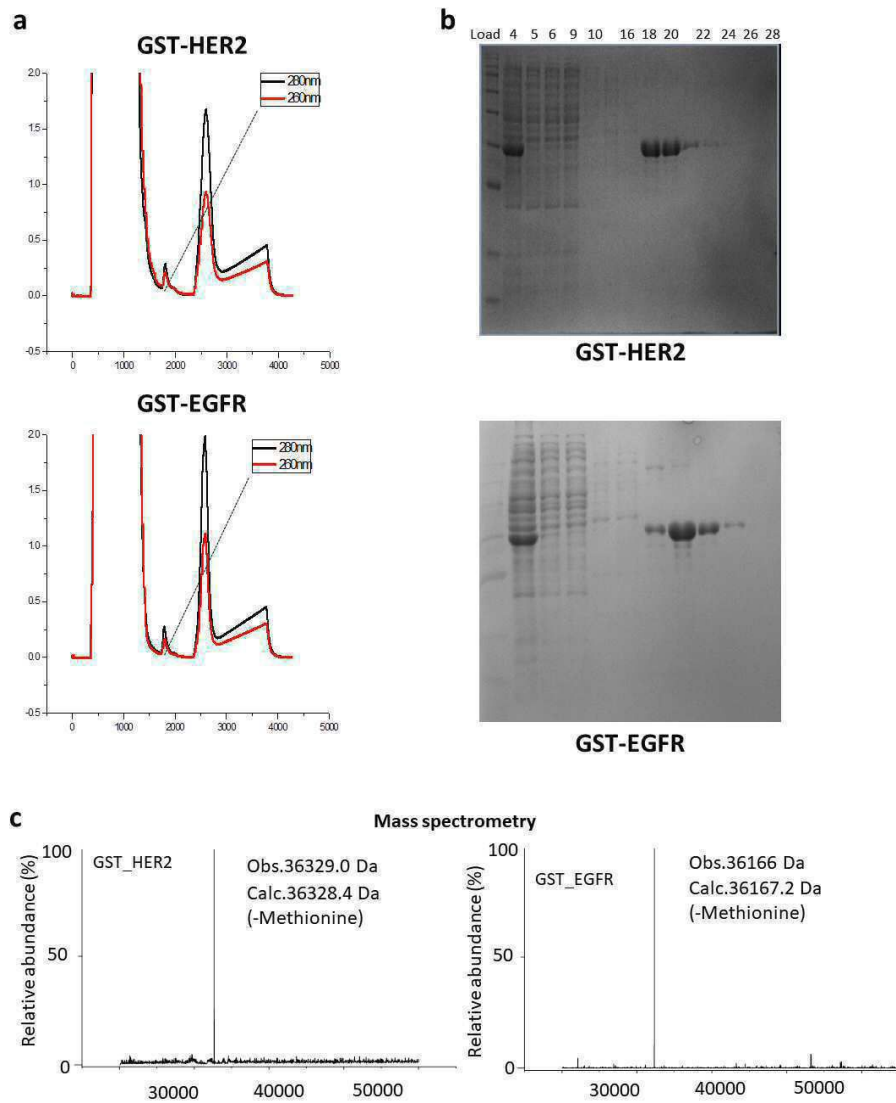
a



b

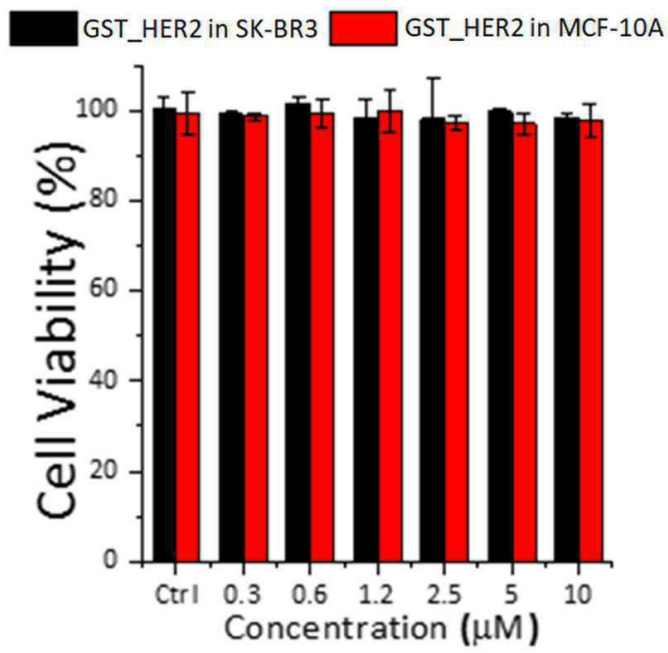


도면2

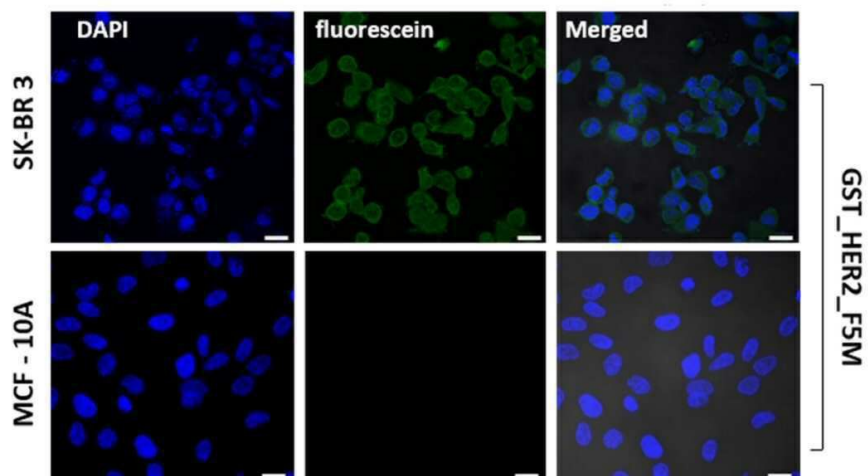


도면3

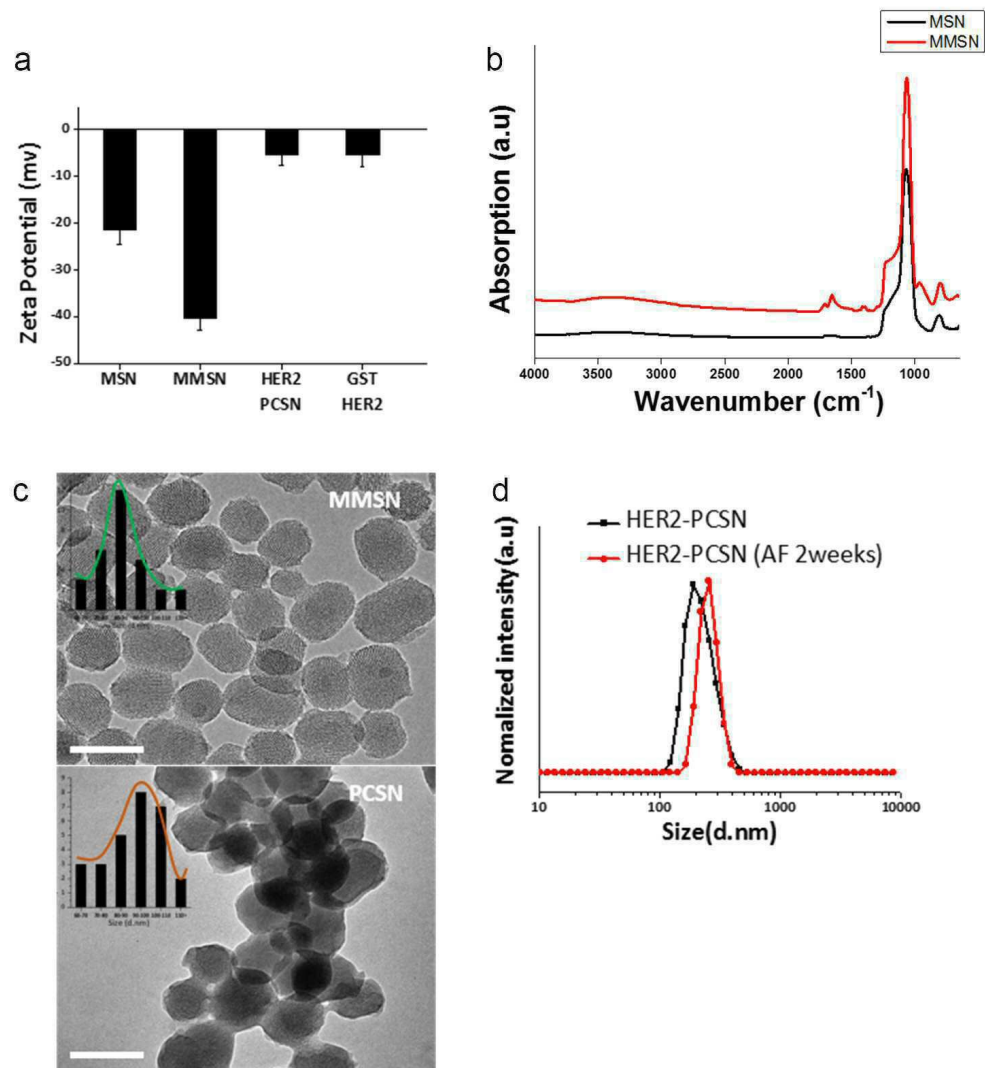
a



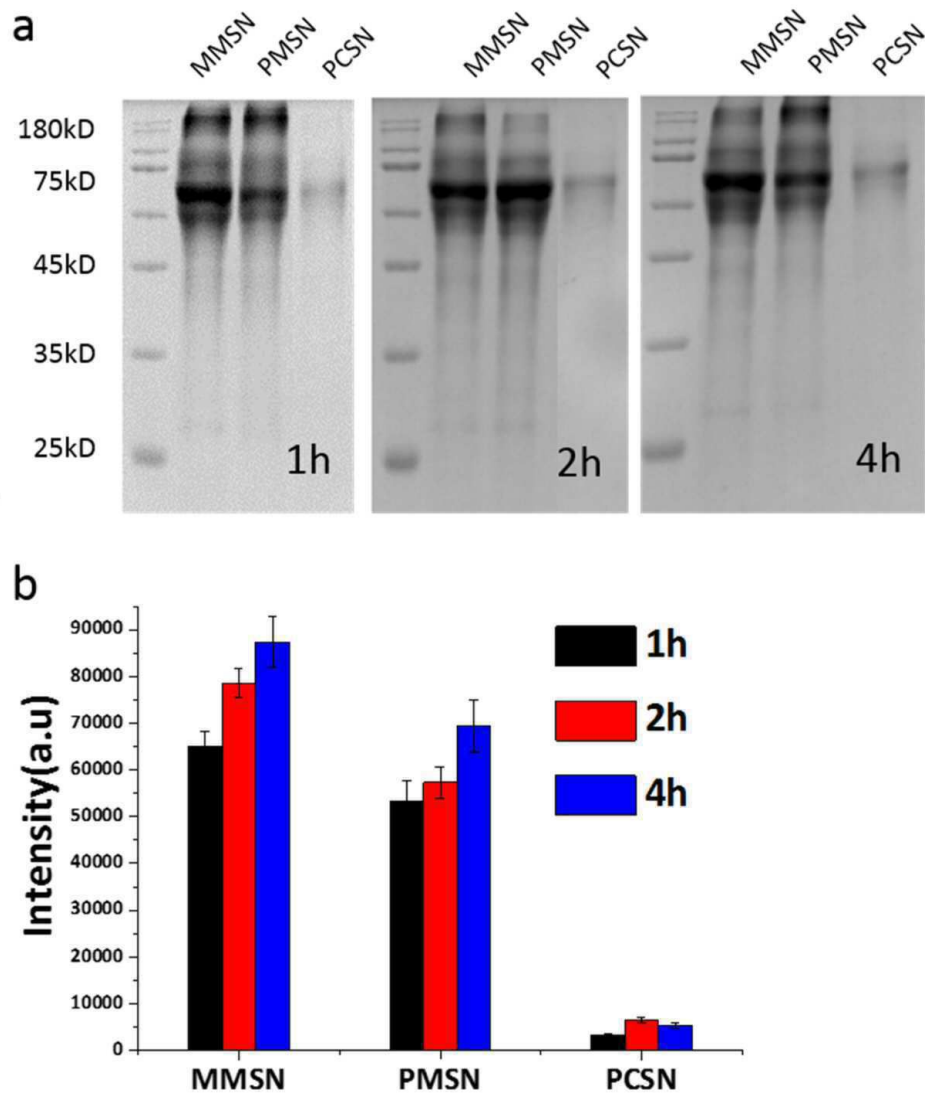
b



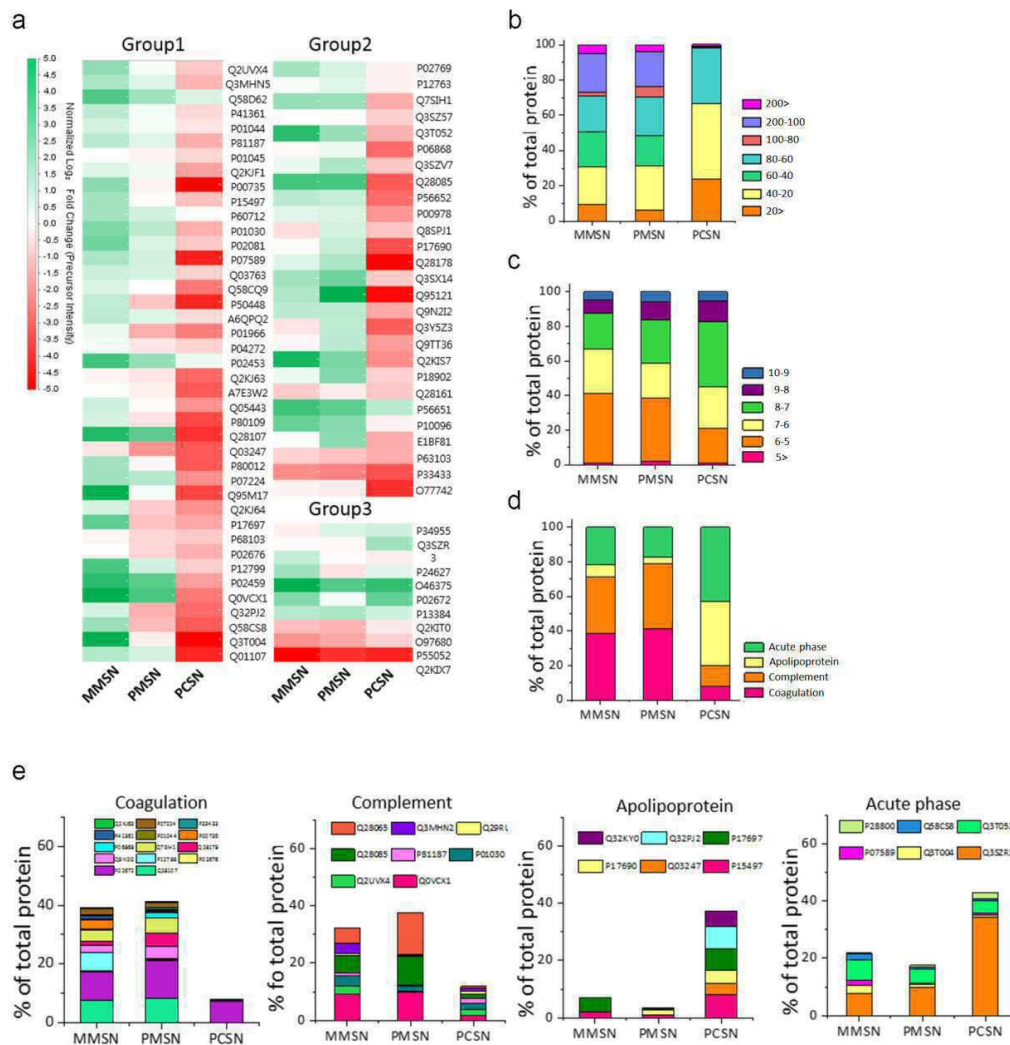
도면4



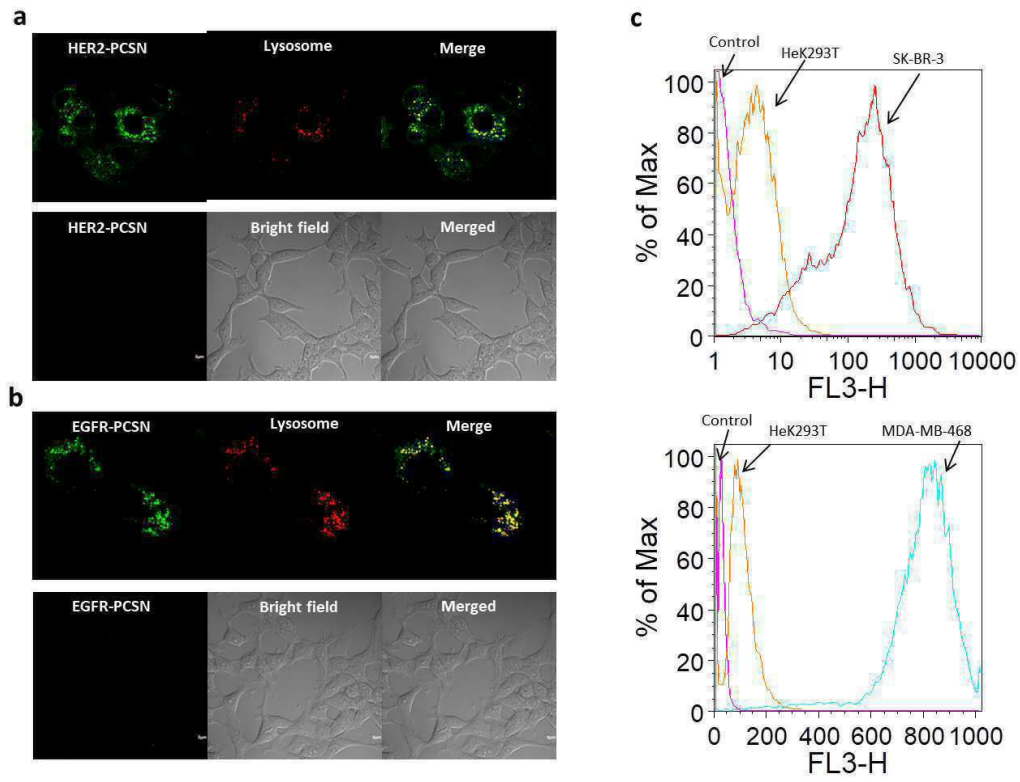
도면5



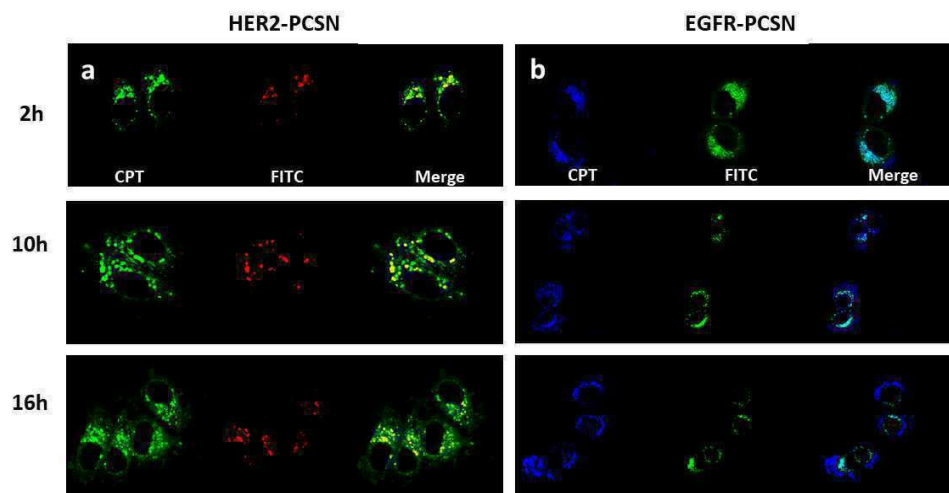
도면6



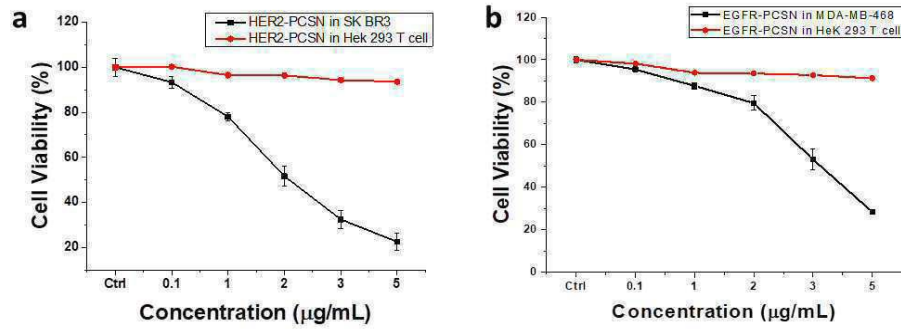
도면7



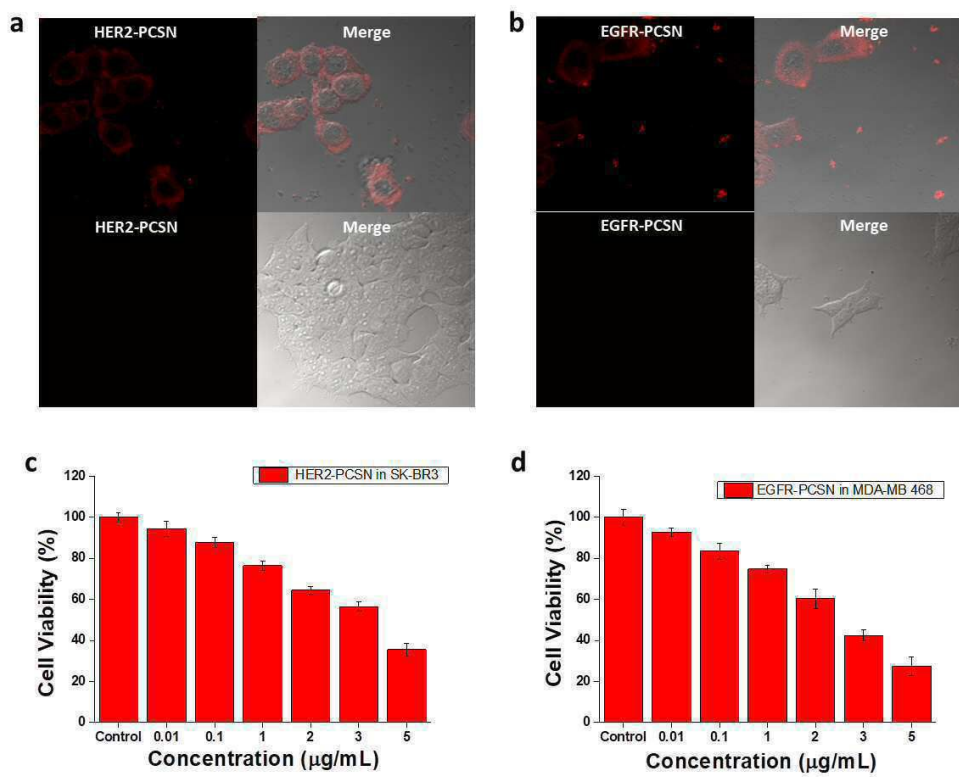
도면8



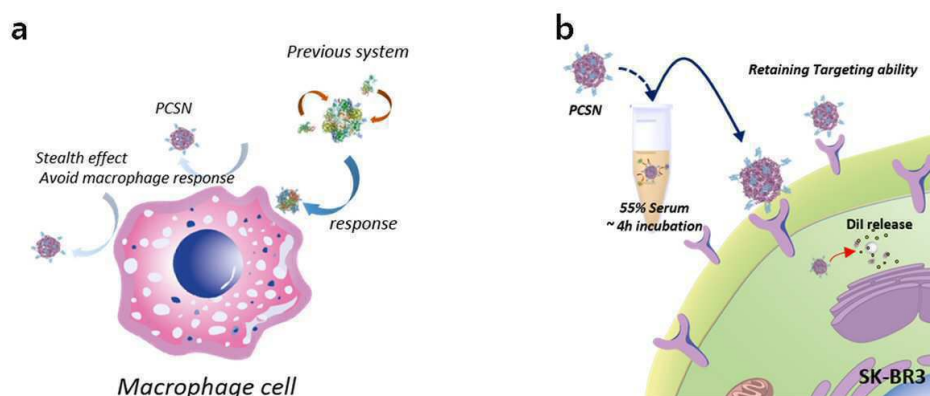
도면9



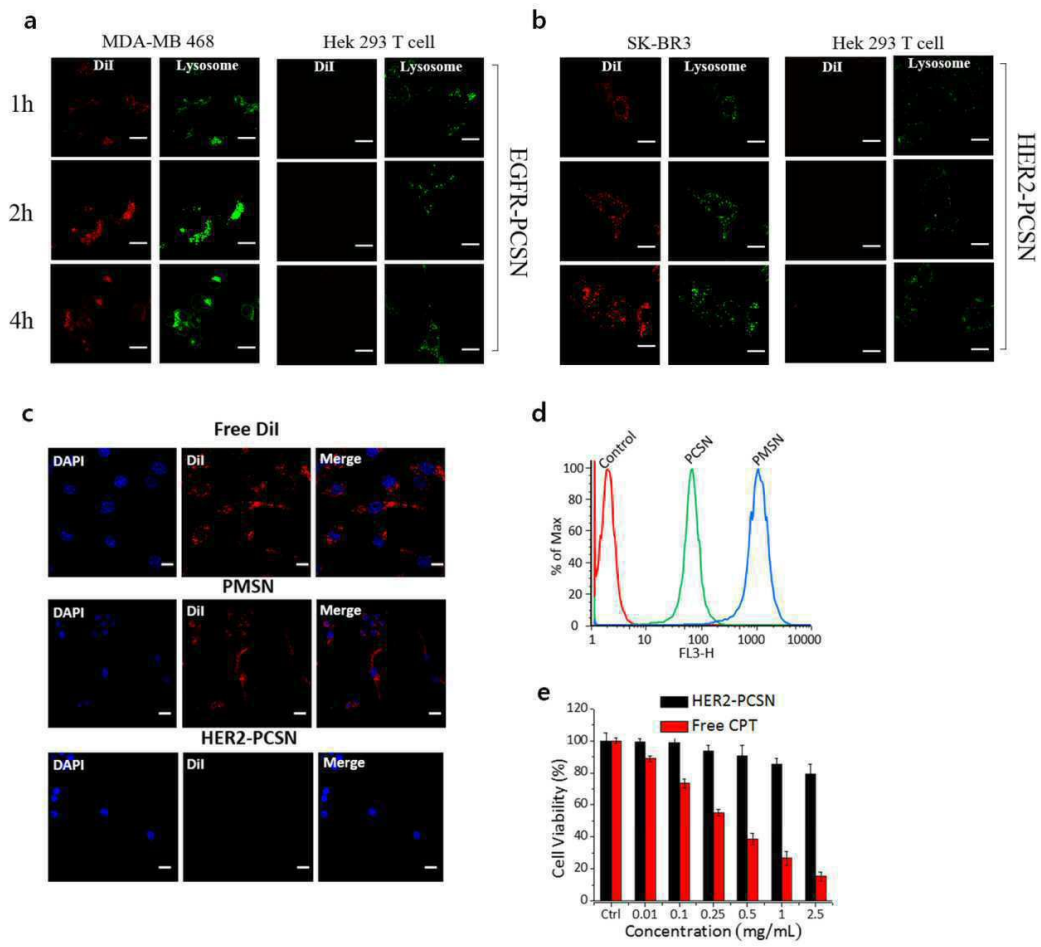
도면10



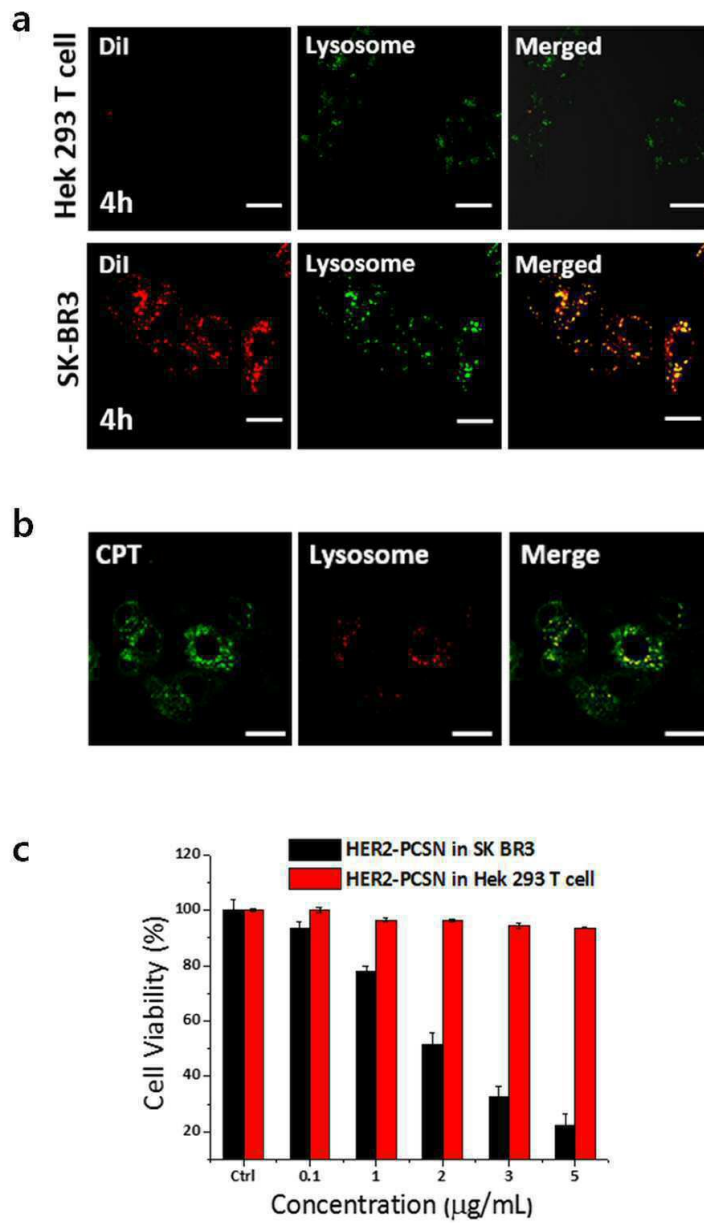
도면11



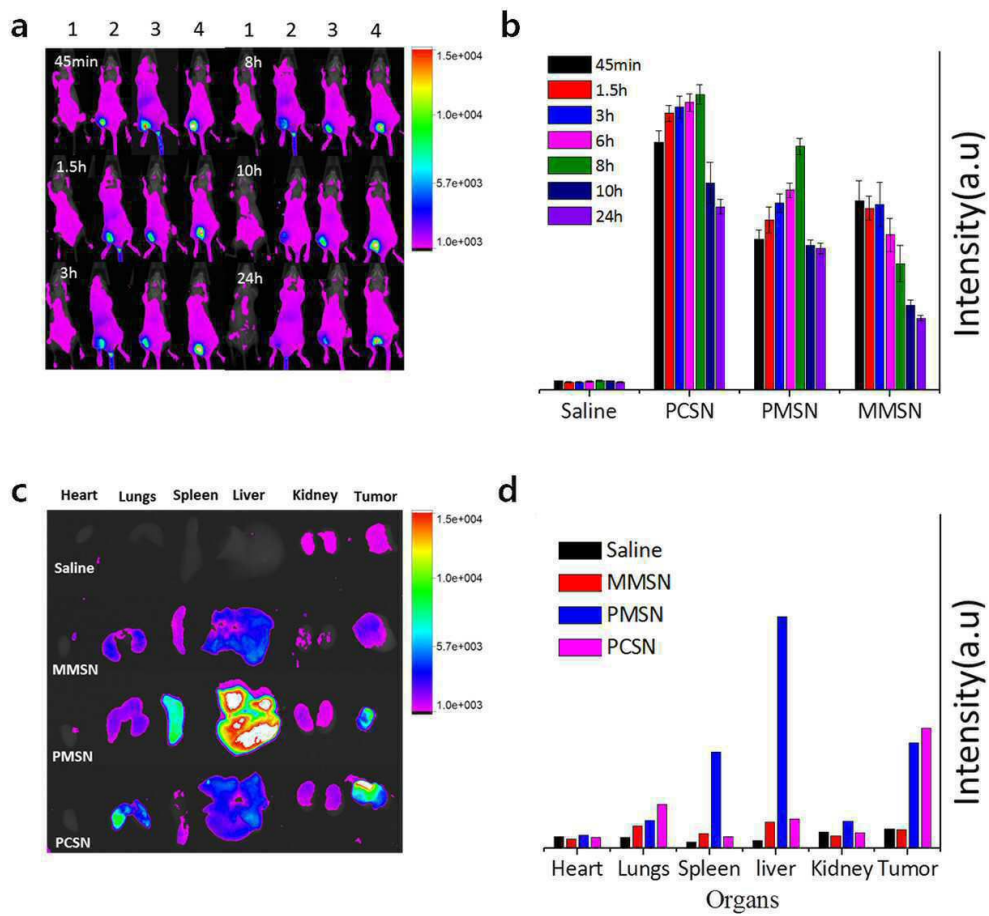
도면12



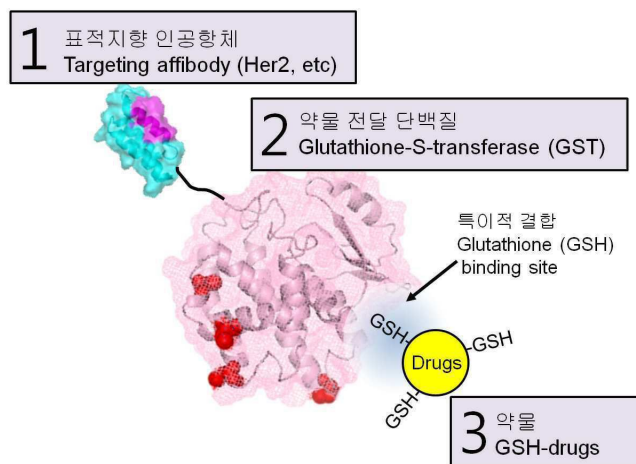
도면13



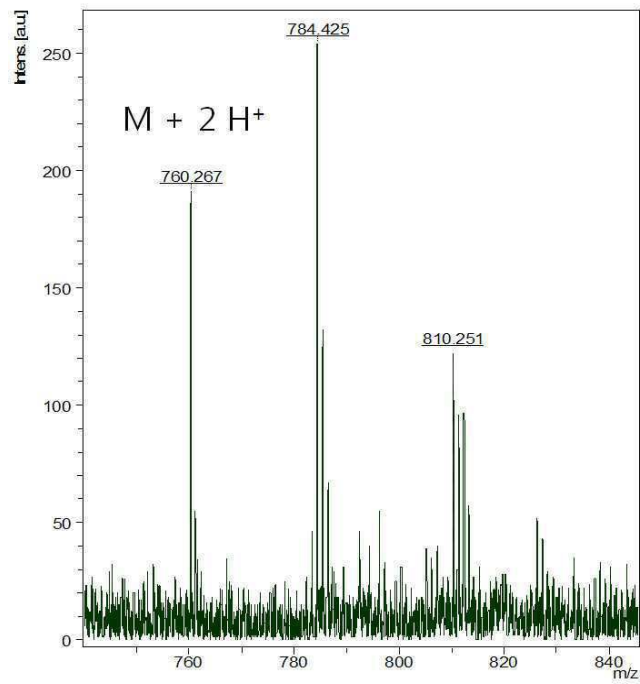
도면14



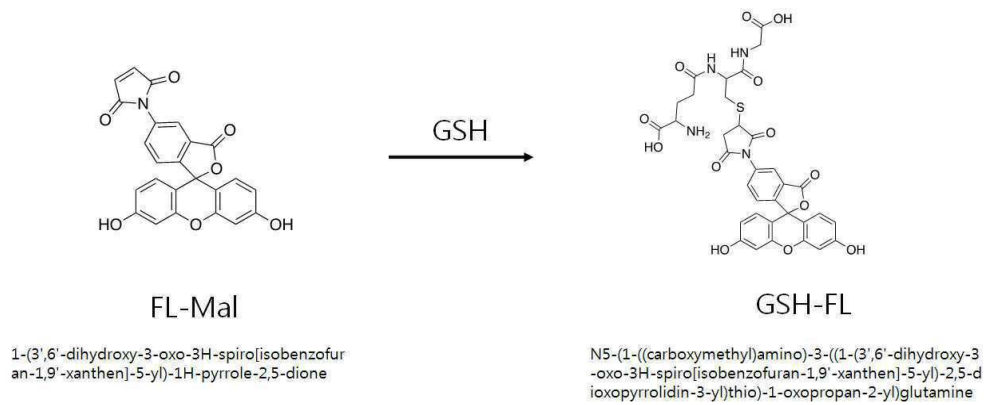
도면15



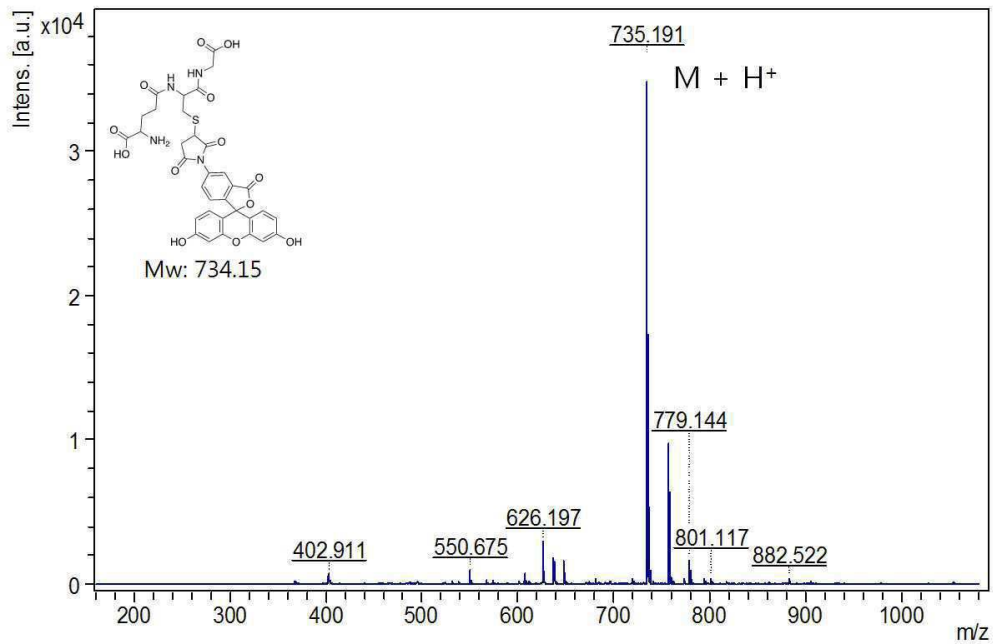
도면17b



도면18



도면19



서열 목록

- <110> ULSAN NATIONAL INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
- <120> Fusion protein comprising glutathione-S-transferase and protein binding to target cell or target protein and uses thereof
- <130> PN122479
- <150> KR 2017-0159936
- <151> 2017-11-28
- <160> 12
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 25
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Linker domain
- <400> 1

Gly Gly Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser Gly Gly Gly Cys Gly Gly Gly

1 5 10 15

Gly Thr Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

20 25

<210> 2

<211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Linker 1
 <400> 1

Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

<210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Linker 2
 <400> 2

Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5

<210> 4
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Linker 3
 <400> 3

Ser Arg Ser Ser Gly
 1 5

<210> 5
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Linker 4
 <400> 4

Ser Gly Ser Ser Cys
 1 5

<210> 6
 <211> 12
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker 5

<400> 5

Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser

1 5 10

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker 6

<400> 6

Arg Pro Pro Pro Pro Cys

1 5

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker 7

<400> 7

Ser Ser Pro Pro Pro Pro Cys

1 5

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker 8

<400> 8

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys Gly

1 5 10

<210> 10

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker 9

<400> 9

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Ser Gly Ser Thr

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 11

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker 10

<400> 10

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 12

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker 11

<400> 11

Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Glu Phe

1 5 10