

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0068607

(43) 공개일자 2024년05월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/51 (2006.01) A61K 31/704 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01) A61K 31/711 (2006.01)
A61K 47/46 (2017.01) A61P 35/00 (2006.01)
C12N 5/04 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/5176 (2013.01)
A61K 31/704 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2024-0058386(분할)

(22) 출원일자 2024년05월02일

심사청구일자 2024년05월02일

(62) 원출원 특허 10-2020-0166660

원출원일자 2020년12월02일

심사청구일자 2020년12월02일

(71) 출원인

인천대학교 산학협력단

인천광역시 연수구 갯벌로 27, 인천대학교 이노베이션센터(송도동)

(72) 발명자

이원중

대전광역시 유성구 엑스포로 448, 102동 202호

유계영

경기도 양주시 백석읍 꿈나무로 39-8, 403호

강수진

경기도 안산시 상록구 안산천서로4길 14, 402호

(74) 대리인

차준용

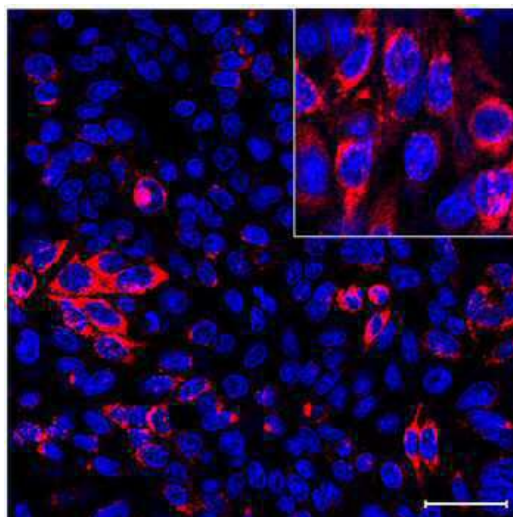
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 식물 유래 세포막 소포체를 포함하는 약물 전달체

(57) 요약

본 발명은 식물 유래 세포막 소포체에 핵산, 화학합성물질 등의 약물을 탑재하여 새로운 나노 약물 전달체로 활용하는 기술에 관한 것으로, 구체적으로는 식물 유래 세포막 소포체에 핵산, 화학합성물질 등의 다양한 약물을 탑재하여, 인간 세포에 처리하였을 경우, 효율적으로 탑재 약물을 전달할 수 있는 식물 유래 세포막 소포체를 포함하는 약물 전달체에 관한 것으로, 본 발명에 따른 식물 유래 세포막 소포체는 저비용으로 대량 생산이 용이하고, 본 발명에서 사용된 콩과와 배추속 식물들은 전세계적으로 흔히 볼 수 있는 식물임을 고려하면, 현재 많이 사용되는 인간 세포 배양 유래 세포막 소포체를 훌륭하게 대체할 수 있는 신규 소재로서 의약, 화장품, 기능성 식품 등으로 높은 가치를 갖고 있다.

대표도 - 도12



(52) CPC특허분류

A61K 31/7105 (2013.01)

A61K 31/711 (2013.01)

A61K 47/46 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C12N 5/04 (2013.01)

C12N 2509/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

인간 세포로 전달하기 위한 miRNA를 탑재하고 있는 양배추 유래 세포막 소포체를 포함하고,
상기 양배추 유래 세포막 소포체는 크기 배제 크로마토그래피를 이용하여 양배추 조직으로부터 분리되고,
상기 양배추 유래 세포막 소포체는 인간 세포 유래 세포막 소포체보다 약물 탑재량이 높은 것을 특징으로 하는,
약물 전달체.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 인간 세포로 전달하기 위한 miRNA를 탑재하고 있는 양배추 유래 세포막 소포체는 구(Sphere) 형상인 것을
특징으로 하는, 약물 전달체.

청구항 3

제1항에 있어서,
상기 양배추 유래 세포막 소포체에 탑재된 miRNA는 전체 함량 대비 16% 이상의 함량이 인간 세포 내에 전달되는
것을 특징으로 하는, 약물 전달체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 식물 유래 세포막 소포체를 포함하는 약물 전달체에 관한 것으로, 구체적으로는 식물 유래 세포막 소포체에 핵산, 화학합성물 등의 다양한 약물을 탑재하여, 인간 세포에 처리하였을 경우, 효율적으로 탑재 약물을 전달할 수 있는 식물 유래 세포막 소포체를 포함하는 약물 전달체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 세포막 소포체는 다양한 크기를 가지며, 특히 이중 크기가 가장 작은 엑소좀(exosome)은 50~150 nm의 작은 세포막성 수포이다. 세포막 소포체는 인간과 동물, 곤충, 식물, 미생물 세포에서 분비된다. 특히 이들은 세포가 갖고 있는 단백질, 핵산, 지질, 탄수화물 등 특정 분자들을 포함하고 있으며, 지질 이중층으로 둘러싸여 있어 이들 분자들을 안정적으로 보호하면서, 분비 후 다른 세포로 이들을 전달할 수 있는 특징이 있다. 생체 내 혈액, 소변, 침 등과 같은 체액에서 고농도로 발견되는 세포막 소포체는 이런 특징으로 인해 새로운 생물학적 소재로서 가능성을 갖고 있다.

[0003] 최근 인간을 포함한 세포 유래 세포막 소포체를 활용하여 약물 전달체로 개발하는 연구가 활발히 이뤄지고 있다. 배양을 통해 생산된 세포막 소포체에 핵산, 펩타이드, 화학합성물을 탑재한 후에, 이를 생체 내로 전달하여 치료하는 목적으로 다양한 연구가 진행된다. 하지만, 세포 배양을 통해 생산된 세포막 소포체는 큰 이슈들이 존재하는데, 예를 들면, 인체에 적용하기 위해서는 상당량의 세포막 소포체가 필요한데, 이를 위해서는 대규모 배양이 필요하다. 따라서 비용적, 기술적, 장비적인 측면에서 매우 불리한 면이 존재한다. 또한, 세포 배양을 위해서는 소태아혈청(FBS) 등의 동물 유래 물질들을 사용해야 하며, 이 역시 의약품 등의 개발 측면에서 큰 문제가 되기 때문에 사용이 어렵다. 따라서, 이러한 문제들을 해결하기 위해서는 세포막 소포체를 대량으로 얻을 수 있는 새로운 소스(source)가 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제10-2017-0037380호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기의 과제를 해결하기 위한 것으로서, 식물 유래 세포막 소포체를 포함하는 약물 전달체에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기한 기술적 과제를 달성하고자, 본 발명은 인간 세포로 전달하기 위한 약물을 탑재하고 있는 식물 유래 세포막 소포체를 포함하는 약물 전달체를 제공한다.

[0007] 상기 식물 유래 세포막 소포체는 1) 저 비용으로 대량 생산이 용이하며, 2) 천연물질로 부작용 이슈가 매우 적으며, 3) 정맥 투여는 물론 경구투여를 통해 대장 등에도 약물을 전달하는 것이 가능하여 의약품 및 건강기능식품의 새로운 패러다임 선도할 수 있으며, 4) 약리성분을 탑재하여 여러 장기로 전달할 수 있는 효율적인 약물 전달체로 적용이 가능하고, 5) 핵산, 단백질, 펩타이드, 화학합성물 등의 다양한 약물을 탑재할 수 있는 가능성이 있다.

[0008] 이에, 상기 식물 유래 세포막 소포체가 다양한 약물 탑재 능력이 있으며, 이를 인간의 세포로 효율적으로 전달할 수 있음을 규명하고자 본 기술을 발명하였다.

[0009] 본 기술 개발을 위해서 콩과 식물과 배추속 식물(양배추, 적채)을 사용하였다.

[0010] 상기 콩과 식물 (*Fabaceae*)은 서리태 (*Glycine max* Merr) 등을 포함하는 것으로 본 발명에서는 콩과 식물 중에서도 검은콩 (서리태) 유래 세포막 소포체 (Blex)를 이용하여 실험을 진행하였다.

[0011] 상기 배추속 식물 (*Brassica oleracea*)은 양배추, 적채(적양배추), 브로콜리, 콜리플라워, 콜라비, 콜라드, 브르셀 스프라우트 등을 포함하는 것으로 본 발명에서는 배추속 식물 중에서도 양배추 유래 세포막 소포체 (Cabex)와 적채 유래 세포막 소포체 (Rabex)를 이용하여 실험을 진행하였다.

[0012] 또한, 본 발명에서는 크기 배제 크로마토그래피 (Size Exclusion Chromatography, SEC)를 이용하여 식물 조직으로부터 세포막 소포체를 고순도, 고품질로 분리 및 정제 하였다. 또한, 이렇게 분리된 콩과 식물 및 배추속 식물 유래 세포막 소포체 등을 사용하여 핵산 및 화학합성물 등의 다양한 약물 전달체로서의 활용 가능성을 규명하였다.

[0013] 상기 약물은 핵산 약물(miRNA) 및 DNA 약물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 독소루비신 (Doxorubicin)을 포함하는 항암을 위한 화학합성물질일 수 있다.

[0014] 상기 식물은 콩과 식물 및 배추속 식물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 한다.

[0015] 상기 인간 세포로 전달하기 위한 약물을 탑재하고 있는 식물 유래 세포막 소포체는 구(Sphere) 형상일 수 있다.

[0016] 상기 식물 유래 세포막 소포체에 탑재된 약물 탑재량은 상기 약물을 탑재한 인간 세포 유래 세포막 소포체에 탑재된 약물 탑재량 이상일 수 있다.

[0017] 상기 인간 세포는 인간 대장암 세포, 인간 자궁경부암 세포, 인간 폐암 세포, 인간 유방암 세포 및 인간 전립선암 세포 중 어느 하나 이상일 수 있다.

[0018] 상기 식물 유래 세포막 소포체에 탑재된 약물은 전체 함량 대비 16% 이상의 함량이 인간 세포 내에 전달될 수 있다.

[0019] 본 발명의 다른 실시형태는 상기 식물 유래 세포막 소포체를 포함하는 약물 전달체를 포함하는 의약품, 화장품 및 기능성 식품을 제공한다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명의 식물 유래 세포막 소포체를 포함하는 약물 전달체는 식물 유래 세포막 소포체에 핵산, 화학합성물 등의 다양한 약물을 탑재하여, 인간 세포에 처리하였을 경우, 효율적으로 탑재 약물을 전달할 수 있다.
- [0021] 또한, 본 발명에 따른 식물 유래 세포막 소포체는 저비용으로 대량 생산이 용이하고, 본 발명에서 사용된 콩과와 배추속 식물들은 전세계적으로 흔히 볼 수 있는 식물임을 고려하면, 현재 많이 사용되는 인간 세포 배양 유래 세포막 소포체를 훌륭하게 대체할 수 있는 신규 소재로서 의약, 화장품, 기능성 식품 등으로 높은 가치를 갖고 있다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 콩과 식물 유래 세포막 소포체 크기 분포도 및 정제도에 관한 그래프이다.
- 도 2는 배추속 식물 유래 세포막 소포체 크기 분포도 및 정제도에 관한 그래프이다.
- 도 3은 콩과 식물 유래 세포막 소포체의 miRNA 탑재 유무에 따른 크기 및 모양을 나타내는 도면이다.
- 도 4는 대장암 세포에서 콩과 식물 유래 세포막 소포체의 용량에 따른 증식 확인을 나타내는 그래프이다.
- 도 5는 콩과 식물 유래 세포막 소포체(Blex)와 miRNA가 탑재된 콩과 식물 유래 세포막 소포체를 처리한 세포에서의 miRNA 양을 비교한 그래프이다.
- 도 6은 miRNA가 탑재된 콩과 식물 유래 세포막 소포체(Blex)의 항암 효과를 나타내는 그래프이다.
- 도 7은 miRNA가 탑재된 콩과 식물 유래 세포막 소포체(Blex)에 의한 대장암 세포에서의 암 관련 유전자(A: c-Myc, B: IGF-1R) 발현 억제 결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 8은 정상적인 세포막 소포체(A)와 miR-184가 탑재된 세포막 소포체(B)의 miRNA 전달 유무에 따른 크기를 나타내는 그래프이다.
- 도 9는 배추속 식물 유래 세포막 소포체(Cabex)의 miRNA 탑재 유무에 따른 모양 및 제타 전위(zeta potential)를 측정한 결과를 나타내는 도면이다.
- 도 10은 배추속 식물 유래 세포막 소포체(Cabex)와 miRNA가 탑재된 배추속 식물 유래 세포막 소포체를 처리한 대장암 세포에서의 miRNA양 분석 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 11은 배추속 식물 유래 세포막 소포체(Cabex)와 인간 세포 유래 세포막 소포체(HEK293T EV)에서의 miRNA 탑재량 비교 결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 12는 DNA 약물이 탑재된 배추속 식물 유래 세포막 소포체에 의한 인간 세포로의 약물 전달 확인 실험(공초점 레이저 주사 현미경을 통해 확인한 결과)를 나타내는 도면이다, 파란색: 핵, 빨간색: DNA 약물.
- 도 13은 배추속 식물 유래 세포막 소포체의 Doxorubicin 탑재 유무에 따른 크기 분석을 나타내는 그래프이다.
- 도 14는 Doxorubicin이 탑재된 배추속 식물 유래 세포막 소포체(Rabex)에 의한 대장암 세포에서의 항암 효과 결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 15는 Doxorubicin이 탑재된 배추속 식물 유래 세포막 소포체와 인간 세포 유래 세포막 소포체의 Doxorubicin 농도 비교 그래프이다.
- 도 16은 콩과 식물 유래 세포막 소포체의 Doxorubicin 탑재 유무에 따른 크기 분석을 나타내는 그래프이다.
- 도 17은 탑재되지 않은 Doxorubicin을 분리하기 위해 PD column을 이용하여 분리 후 탑재된 콩과 식물 유래 세포막 소포체의 Doxorubicin 농도 비교 그래프이다.
- 도 18은 Doxorubicin이 탑재된 콩과 식물 유래 세포막 소포체에 의한 대장암 세포에서의 항암 효과 결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 19는 Doxorubicin이 탑재된 콩과 식물 유래 세포막 소포체에 의한 인간 자궁경부암 세포, 인간 폐암 세포, 인간 유방암 세포, 인간 전립선암 세포에서의 항암 효과 결과를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 이하, 실시예 및 실험예를 통해 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐 어떠한 의미로든 본 발명의 범위가 이들 예로 한정되는 것은 아니다.

[0025] 실험 방법 및 결과

[0027] 1.1. 식물 유래 세포박 소포체 분리 및 정제 방법

[0028] 세포박 소포체를 얻기 위해 널리 사용되는 고분자 침전법이나 초고속 원심분리방법의 경우, 세포박 소포체 이외의 식물 유래 불순물들이 많이 나올 수 있으며, 따라서 세포박 소포체가 아닌 이들 불순물들의 효과를 보게 되는 경우가 많다.

[0029] 또한, 세포박 소포체가 가혹한 원심 분리 조건에 따라 과쇄되는 경우도 있다.

[0030] 따라서, 본 발명에서는 식물 유래 세포박 소포체를 제외한 다른 물질들을 제외하여 식물 유래 세포박 소포체만의 효과를 확인하기 위하여 크기 배제 크로마토그래피를 이용한 고순도 세포박 소포체 분리 과정을 진행하였다.

[0031] Amicon Ultra®-15 10kDa Centrifugal filter (Merck Millipore, Cat. No: UFC901024)에 착즙 용액 13 mL를 넣어 준 후 원심분리 (5,000 x g, 3 h, 4℃)를 진행한 후 얻어진 상층액 500 µL를 시린지 필터 0.2 µm를 진행하여 Eppendorf tube 1.5 mL (SPL, Cat.No : 50015)에 옮긴다.

[0032] 실험 클램프 스탠드에 qEVoriginal/70 nm(Izon science, Cat.No: SP1)을 클램프에 고정된 후 qEV original column 내에 있던 저장 용액을 중력으로 제거한 후 1X PBS(pH 7.4) 용액을 이용하여 중력으로 10 mL equilibration을 진행한다. 다음으로 이전 단계에서 filter가 된 착즙 용액을 qEV original column에 주입하고 용액이 모두 크기 배제 크로마토그래피 비드로 내려가면 PBS 용액을 넣어준다.

[0033] 이때 크기 배제 크로마토그래피가 받는 중력의 힘을 일정하게 유지하기 위하여 PBS 용액이 column내에서 2 mL가 초과하지 않도록 주의하며 용액을 첨가한다. 중력에 의해 내려가는 용액을 하나의 Eppendorf tube 1.5 mL에 500 µL씩 담으며 하나의 fraction으로 칭한다. 따라서 결과적으로 총 33개의 fraction을 얻는다.

[0035] 1.2. 식물 유래 세포박 소포체 크기 분포도 및 농도와 수율

[0036] 도 1은 콩과 식물 유래 세포박 소포체 크기 분포도 및 정제도에 관한 그래프이고, 도 2는 배추속 식물 유래 세포박 소포체 크기 분포도 및 정제도에 관한 그래프이다.

[0037] 콩과 식물 유래 세포박 소포체의 농도와 순도를 결정하기 위하여 나노입자추적분석(Nanoparticle tracking analyzer, NTA)과 단백질 정량화의 BCA (Bicinchoninic acid) assay를 이용한다. 우선 분리한 세포박 소포체의 fraction의 tube를 각각 PBS로 1:100의 dilution을 진행한 후 나노 입자 추적 분석 장치를 이용하여 세포박 소포체의 농도와 크기 분포도를 측정 한다. 다음으로 크기 배제 크로마토그래피를 진행한 fraction의 단백질 농도를 확인하기 위하여 BCA assay를 이용하여 단백질의 농도를 정량화 한다. 다음으로 단백질의 농도 희석을 두가지로 측정하게 되며 처음으로 희석 없이 해당 용액을 바로 찍는 과정과 PBS : 세포박 소포체를 9 : 1의 비율로 희석을 진행하여 단백질 정량화를 진행하고 이후 기준이 되는 Bovine serum albumin를 이용하여 표준 곡선을 만들고 단백질의 양을 확인한다.

[0039] 2. 콩과 식물 유래 세포박 소포체에 핵산 약물(miRNA) 탑재

[0040] 콩과 식물 유래 세포박 소포체에 핵산 약물을 탑재할 수 있음과 탑재된 핵산 약물이 인간 세포로 전달되어 기능을 발휘할 수 있음을 규명하는 실험을 진행하였다. 핵산 약물의 대표적인 miRNA (마이크로알앤에이)를 사용하였다. 콩과 식물 유래 세포박 소포체에 miR-184를 탑재하기 위해 Lipofectamine RNAiMAX를 사용하여 실험을 진행하였다. 12 µL of Lipofectamine RNAiMAX Reagent를 먼저 150 µL Opti-MEM에 희석한 후, 10 µL (200 pmol) miRNA mimics를 150 µL Opti-MEM에 넣었다. 이후 miRNA mimics과 Lipofectamine RNAiMAX 용액을 1:1 비율로 섞고 상온에서 5분 동안 반응시킨다. 콩과 식물 유래 세포박 소포체는 1.7 mL Opti-MEM에 1×10^{11} particles/mL이 되도록 희석하고, miRNA-lipid 복합체를 섞어 37 °C 에서 6시간 동안 반응시킨다. 탑재되지 않

은 miRNA를 제거하기 위해, Amicon Ultra® 100kDa Centrifugal filter를 이용하였다.

[0041] 본 발명에서는 콩과 식물 유래 세포막 소포체에 핵산 약물을 탑재하기 위해 Lipofectamine RNAiMAX를 사용하였으나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니며, Electroporation 방법 등을 사용하여 수행될 수도 있다.

[0043] 2.1. 콩과 식물 유래 세포막 소포체의 특징 확인

[0044] miRNA 탑재 여부에 따른 콩과 식물 유래 세포막 소포체의 특징 및 변화를 확인하기 위해 나노 입자 추적 분석기를 이용하여 크기를 분석하였다. 도 3의 A, B, C에서 보듯이 miRNA가 탑재되지 않은 경우에는 151.5 nm, miRNA가 탑재된 경우에는 138.8 nm의 크기를 보였고 3번 반복을 진행하여 확인하였을 때 크기 차이가 없는 것을 확인하였다.

[0045] 도 3의 D, E에서 TEM을 이용하여 콩과 식물 유래 세포막 소포체의 miRNA 탑재 유무에 따른 모양을 확인한 결과, 큰 변화가 없음을 확인하였다.

[0047] 2.2. 대장암 세포에서 콩과 식물 유래 세포막 소포체의 영향 분석

[0048] 콩과 식물 유래 세포막 소포체에 탑재된 miR-184의 항암 효과를 확인하기에 앞서, 콩과 식물 유래 세포막 소포체가 암 세포 증식에 미치는지를 확인할 필요가 있다. 콩과 식물 유래 세포막 소포체가 대장암 세포의 증식에 미치는 영향을 확인하기 위해서, 96-well cell culture plate에 10% FBS과 1% 페니실린과 스트렙토마이신이 첨가된 DMEM을 사용하여 대장암 세포 (SW480)를 1×10^4 cell/cm²으로 세포를 접종하였다. 24시간 이후에 대조군 세포와 실험군 세포의 배지를 제거 후 PBS로 세척해주었다. 이때, 실험군 세포에는 10^9 , 10^{10} , 5×10^{10} particles/mL 농도로 콩과 식물 유래 세포막 소포체를 넣어 배양하였으며, 대조군 세포에는 콩과 식물 유래 세포막 소포체 첨가 없이 일반 배양 배지를 이용하여 배양하였다. 세포의 증식률은 WST-1을 통해 분석하였다. 도 4에서 보듯이 콩과 식물 유래 세포막 소포체는 그 자체로는 항암 효과를 가지지 않는 것으로 확인되었다. 따라서 약물 전달체로 쓰이기 적합하다.

[0050] 2.3. 콩과 식물 유래 세포막 소포체에 탑재된 miR-184의 확인 및 인간 대장암 세포로의 miRNA 약물 전달 확인

[0051] 여기서는 콩과 식물 유래 세포막 소포체에 어느 정도의 miRNA 약물이 탑재되었는지, 또한 이들 세포막 소포체를 인간 세포에 처리하였을 경우, 과연 이들 miRNA가 세포로 전달되는 지를 확인하였다. 이를 위해 먼저, 콩과 식물 유래 세포막 소포체에 탑재된 miRNA 양을 확인하기 위하여 qRT-PCR을 통해 발현 정도를 확인하였다 (도 5). miRNA가 탑재되지 않은 콩과 식물 유래 세포막 소포체에 비해 miRNA가 탑재된 콩과 식물 세포막 소포체에서 1,711,580배 높은 miRNA 양을 확인하였다. miRNA를 탑재한 콩과 식물 세포막 소포체를 대장암 세포에 처리한 후 세포에서의 miRNA 양을 분석해 보았을 때, 272,467배 높은 miRNA양이 증가함을 확인할 수 있었다. 즉, 상기 식물 유래 세포막 소포체에 탑재된 약물은 전체 함량 대비 16% 이상의 함량이 인간 세포 내에 전달되는 것을 특징으로 한다. 따라서 콩과 식물 유래 세포막 소포체를 약물 전달체로 사용할 수 있으며, 이를 대장암 세포에 처리 시 고농도의 miRNA 약물이 세포 내로 전달이 되는 것을 확인하였다.

[0053] 2.4. miRNA가 탑재된 콩과 식물 유래 세포막 소포체의 대장암 세포에서의 항암 효과

[0054] 콩과 식물 세포막 소포체에 miRNA를 전달하여 항암 효과를 확인하는 실험을 진행하였다. 이 실험에서 사용된 miRNA 중 miRNA-NC는 사람의 유전자 서열과 상보성이 없는 서열이며 대조군으로 이용하기 위해 선정되었다. miR-184는 여러 논문에서 대장암 세포를 억제한다는 결과가 존재하여 이 실험에서는 콩과 식물 유래 세포막 소포체에 miR-NC, miR-184를 전달하여 실험을 진행하였다.

[0055] miRNA가 전달된 콩과 식물 유래 세포막 소포체의 암 억제 효과를 확인하기 위하여 SW480 세포를 1×10^4 cell/cm²으로 96-well cell culture plate에 접종하였다. 24시간 이후에 대조군 세포와 실험군 세포의 배지를 제거 후 PBS로 세척해주었다. 이때, 실험군 세포에는 miR-184가 탑재된 콩과 식물 유래 세포막 소포체를 넣어 배양하였으며, 대조군 세포에는 miRNA-NC가 탑재된 콩과 식물 유래 세포막 소포체를 넣어 배양하였다. 이후 세

포는 0, 48, 72, 96 시간 배양하였으며 증식률은 WST-1을 통해 분석하였다. 모든 값은 평균±표준 편차(*p<0.1 및 ***p<0.001; n = 3)로 표시된다.

[0056] 세포의 증식 정도는 miR-184가 탑재된 콩과 식물 유래 세포막 소포체의 경우 96시간 후 58.4 %까지 감소하였다. 이 결과를 통해 miR-184가 탑재된 콩과 식물 유래 세포막 소포체는 대장암 세포의 증식을 매우 효과적으로 억제할 수 있음을 확인하였다 (도 6).

[0058] 2.5. miRNA가 탑재된 콩과 식물 유래 세포막 소포체의 대장암 세포에서의 암 세포 증식 관련 mRNA 발현 조절

[0059] miR-184는 세포의 증식, 세포 자멸, 분화 그리고 종양 발생 과정 중에 관여하는 miRNA이다. 한편, c-Myc은 암 발생 유전자이며 전사 인자를 암호화하는 유전자를 감소시키며, IGF-1R은 암의 생성, 진행, 전이에 관여한다. miR-184는 암세포에서 c-Myc와 IGF-1R mRNA의 분해를 유도하거나 번역 후 과정을 조절할 수 있다. 따라서, 세포막 소포체를 이용하여 암세포에 miR-184를 고농도로 전달하며, 세포막 소포체 내 miR-184가 암세포내에서 이들 암 관련 유전자의 mRNA에 결합하여 발현을 억제할 수 있다. 이를 확인하기 위해 세포 내 각 유전자의 발현을 qRT-PCR로 확인하였다. 도 7에서 c-Myc의 발현량은 miR-184가 탑재된 콩과 식물 유래 세포막 소포체가 처리된 대장암에서 62.54 %로 감소하였고, IGF-1R의 발현량은 miR-184가 탑재된 콩과 식물 유래 세포막 소포체가 처리된 세포에서 67.3 %로 감소하였다. 이를 통해 miR-184가 전달된 콩과 식물 유래 세포막 소포체가 c-Myc의 전사를 대장암 세포에서 효과적으로 억제하고, IGF-1R의 발현을 조절하여 항암 효과를 나타냄을 확인하였다.

[0061] 3. 배추속 식물 유래 세포막 소포체의 약물 전달체로서의 기능 규명

[0062] 여기서는 콩과 식물이외에 타 식물 유래 세포막 소포체에도 이런 핵산 약물 탑재 및 인간 세포로의 전달이 가능한지를 확인하였다. 이를 위해 배추속 식물로부터 세포막 소포체를 분리하였으며, 여기에 miRNA 약물을 동일한 방법으로 탑재하였다. 먼저 miRNA 탑재 여부에 따른 배추속 식물 유래 세포막 소포체의 성질이 바뀌는 지를 확인하기 위해 나노 입자 추적 분석기를 이용하여 크기를 분석하였다. 도 8의 A, B에서 보듯이 miRNA가 전달되지 않은 경우와 miRNA가 전달된 경우 크기 차이가 없는 것을 확인하였다.

[0063] 도 9의 A에서 TEM을 이용하여 배추속 식물 유래 세포막 소포체의 miRNA 탑재 유무에 따른 모양을 확인한 결과, 모든 경우에 세포막 소포체가 구 모양을 나타내고 있는 것을 확인할 수 있다. 또한, 제타 전위 (zeta potential)를 측정한 결과 두 실험군 사이에 변화가 없는 것을 확인하였다 (도 9의 B).

[0065] 3.1. miRNA가 탑재된 배추속 식물 유래 세포막 소포체 처리 시 세포에서의 miRNA 발현

[0066] 배추속 식물의 대표인 양배추 유래 세포막 소포체에 탑재된 miRNA 양을 확인하기 위하여 qRT-PCR을 통해 탑재 정도를 확인하였다 (도 10). miRNA가 탑재되지 않은 배추속 식물 유래 세포막 소포체에 비해 miRNA가 탑재된 배추속 식물 세포막 소포체에서 667,000배 높은 miRNA 양을 확인하였다.

[0067] 또한, 이렇게 탑재된 miRNA가 배추속 식물 세포막 소포체에 의해 대장암 세포에 효율적으로 전달되는 지를 확인하였다. miRNA를 탑재한 배추속 식물 세포막 소포체를 대장암 세포에 처리한 후 세포에서의 miRNA 양을 분석해 보니, 244,617배 높은 miRNA 전달량을 확인할 수 있었다. 따라서 배추속 식물 유래 세포막 소포체를 약물 전달체로 사용할 수 있으며, 이를 대장암 세포에 처리 시 세포 내로 매우 효율적으로 전달이 되는 것을 확인하였다. 모든 값은 평균±표준 편차(*p<0.1; n = 3)로 표시된다.

[0069] 3.2. 배추속 식물 유래 세포막 소포체와 인간 세포 유래 세포막 소포체의 miRNA 탑재량 비교

[0070] 배추속 식물 유래 세포막 소포체와 인간 세포 유래 세포막 소포체에 탑재된 miRNA 양을 확인하기 위하여 qRT-PCR을 통해 발현 정도를 확인하였다 (도 11). 이 실험에서 사용된 세포막 소포체는 식물 유래 세포막 소포체의 경우 배추속 식물을 사용하였고, 인간 세포 유래 세포막 소포체의 경우에는 인간 배아 신장 세포 (HEK293T)를 사용하여 얻었다.

[0071] 배추속 식물 유래 세포막 소포체와 인간 세포 유래 세포막 소포체에 miR-184를 탑재하기 위해 Lipofectamine RNAiMAX를 사용하여 실험을 진행하였다. 12 μ L Lipofectamine RNAiMAX Reagent를 먼저 150 μ L Opti-MEM에

회석한 후, 10 μ L (200 pmol) miR-184를 150 μ L Opti-MEM에 넣었다. 이후 miR-184와 Lipofectamine RNAiMax 용액을 1:1 비율로 섞고 상온에서 5분 동안 반응시킨다. 배추속 식물 유래 세포막 소포체와 인간 세포 유래 세포막 소포체는 1.7 mL Opti-MEM에 1×10^{11} particles/mL이 되도록 희석하고, miRNA-lipid 복합체를 섞어 37 $^{\circ}$ C에서 6시간 동안 반응시킨다. 탑재되지 않은 miR-184를 제거하기 위해, miRNA가 로딩된 배추속 식물 유래 세포막 소포체와 인간 세포 유래 세포막 소포체를 Amicon Ultra $^{\circ}$ 100kDa Centrifugal filter를 이용하여 제거한다.

[0072] 배추속 식물 유래 세포막 소포체와 인간 세포 유래 세포막 소포체에 전달된 miRNA 양을 확인하기 위하여 qRT-PCR을 통해 발현 정도를 확인하였다. miRNA를 전달하지 않은 배추속 식물 유래 세포막 소포체에 비해 miRNA가 전달된 배추속 식물 세포막 소포체에서 667,000배 높은 miRNA 발현량을 확인하였고, miRNA가 전달된 인간 세포 유래 세포막 소포체에서 297,000배 높은 miRNA 발현량을 확인하였다. 따라서, 그림 12를 통해 배추속 식물 유래 세포막 소포체의 miRNA 탑재량이 인간 세포 유래 세포막 소포체와 동일 또는 그 이상이 됨을 확인할 수 있었다.

[0074] 4. 배추속 식물 유래 세포막 소포체에 DNA 핵산 약물체 탑재

[0075] 배추속 식물 유래 세포막 소포체에 miRNA뿐만 아니라 최근 많이 사용되고 있는 다양한 핵산 약물이 탑재됨을 규명하기 위해, 배추속 식물 유래 세포막 소포체에 DNA 약물을 탑재하여 탑재 여부를 공초점 레이저 주사 현미경을 통해 확인하였다. 앞선 실험에서 miRNA의 탑재가 가능한 것을 통해 동일한 조건으로 DNA 탑재 실험을 진행하였다. DNA 약물 탑재 여부를 확인을 위해 Cy3 형광 다이가 결합된 DNA (5' Cy3-GCGCGCAACATCAGTCTGATAAGCTACGCGC 3')를 사용하였다. 이후, DNA가 탑재된 배추속 식물 유래 세포막 소포체를 세포에 6시간 동안 처리해준 후 PBS로 씻어준 후 Hoechst33342를 통해 핵을 염색 하였다. 도 12에서 파란색이 세포의 핵을 나타내고, 붉은색 부분이 세포막 소포체에 의해 세포로 전달된 DNA이다. 이 결과를 통해 miRNA 뿐만 아니라 DNA 약물 역시 세포막 소포체를 통해 세포에 효율적으로 전달됨을 확인하였다.

[0077] 5. 배추속 식물 유래 세포막 소포체에 화학합성 약물 탑재

[0078] 앞선 결과에서는 식물 유래 세포막 소포체에 핵산 기반의 약물이 효과적으로 탑재되며, 이들 세포막 소포체가 이들 핵산 약물을 인간의 세포에 전달함을 규명하였다. 여기서는 핵산이 아닌 화학합성물 기반의 약물들 역시 식물 유래 세포막 소포체에 고농도로 탑재되며, 이들 약물이 인간의 세포로도 효율적으로 전달될 수 있음을 규명하기 위한 실험을 진행하였다. 이를 위해 대표적인 화학합성 약물인 doxorubicin (독소루비신, Dox)을 화학합성 약물로 사용하였다. Doxorubicin은 항암 치료에 많이 사용하는 약물이다.

[0079] Doxorubicin을 탑재하기 위해 배추속 식물 유래 세포막 소포체에 Doxorubicin을 섞어 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 동안 반응시킨다. 탑재되지 않은 Doxorubicin을 제거하기 위해, Doxorubicin이 탑재된 배추속 식물 유래 세포막 소포체를 Amicon Ultra $^{\circ}$ 100kDa Centrifugal filter를 이용하여 미 탑재된 Doxorubicin을 제거한다.

[0081] 5.1. Doxorubicin이 탑재된 배추속 식물 유래 세포막 소포체의 특성 분석

[0082] Doxorubicin 탑재 여부에 따른 배추속 식물 유래 세포막 소포체의 특성 변화 여부를 확인하기 위해 나노 입자 추적 분석기를 이용하여 크기를 분석하였다. 도 13의 A, B 에서 Doxorubicin이 전달되지 않은 배추속 식물 (적채) 유래 세포막 소포체의 경우에는 126.9 nm, Doxorubicin이 전달된 경우에는 117.2 nm의 크기였고 3회 반복을 진행하여 확인하였을 때 크기 차이가 없는 것을 확인하였다. 이를 통해 Doxorubicin의 탑재에 의해 세포막 소포체의 크기 변화가 없음을 확인하였다.

[0084] 5.2. Doxorubicin이 탑재된 배추속 식물 유래 세포막 소포체의 암세포에서의 항암 효과

[0085] 배추속 식물 유래 세포막 소포체에 doxorubicin 등의 화학합성물질을 탑재하여 항암 효과를 확인하는 실험을 진행하였다. Doxorubicin이 전달된 배추속 식물 유래 세포막 소포체 (도 14에서 Rabex라고 표현)의 암 억제 효과를 확인하기 위하여 대장암 세포인 SW480 세포를 1×10^4 cell/cm ^{2} 으로 96-well cell culture plate에 접종하였다. 24시간 이후에 대조군 세포와 실험군 세포의 배지를 제거 후 PBS로 세척해 주었다. 이때, 대조군 세포에는

Doxorubicin이 탑재되지 않은 배추속 식물 유래 세포막 소포체를 넣어 배양하였으며, 실험군 세포에는 Doxorubicin이 탑재된 배추속 식물 유래 세포막 소포체를 넣어 배양하였다. 이후 세포는 0, 96 시간 배양하였으며 증식률은 WST-1을 통해 분석하였다. 모든 값은 평균±표준 편차 (***p<0.001; n = 3)으로 표시된다.

[0086] 세포의 생존율은 Doxorubicin이 탑재된 배추속 식물 유래 세포막 소포체의 경우 96시간 후 32.4 %까지 감소하였다. 이 결과를 통해 Doxorubicin이 배추속 식물 유래 세포막 소포체에 효율적으로 탑재되었으며, 대장암 세포에 고농도의 약물이 전달되어 대장암 세포의 자멸을 촉진할 수 있음을 확인하였다.

[0088] 5.3. 배추속 식물 유래 세포막 소포체와 인간 세포 유래 세포막 소포체에서의 Doxorubicin 탑재 정도 비교

[0089] 식물 유래 세포막 소포체의 화학합성 약물의 탑재 능력을 인간 세포 유래 세포막 소포체와 비교하는 실험을 진행하였다. 이를 위해 배추속 식물 유래 세포막 소포체에 Doxorubicin 등의 약물 탑재 정도와 인간 세포 유래 세포막 소포체에 Doxorubicin의 탑재 정도를 비교하는 실험을 진행하였다. 인간 세포 유래 세포막 소포체의 경우에는 인간 배아 신장 세포 (HEK293T)를 사용하여 얻었다.

[0090] Doxorubicin을 탑재하기 위해 배추속 식물 유래 세포막 소포체와 인간 세포 유래 세포막 소포체에 Doxorubicin을 섞어 37 °C 에서 4시간 동안 반응시킨다. 세포막 소포체에 탑재되지 않은 Doxorubicin은 Amicon Ultra® 100kDa Centrifugal filter를 이용하여 제거한다. 탑재된 Doxorubicin의 양은 형광 측정(Ex:480, Em:595)을 이용하여 진행하였다. 도 15에서 보듯이 배추속 식물 유래 세포막 소포체에 탑재된 Doxorubicin의 양이 인간 세포 유래 세포막 소포체에 탑재된 양에 비해 다소 높음을 확인할 수 있다. 이를 통해 식물 유래 세포막 소포체가 인간 세포 유래 세포막 소포체와 마찬가지로 매우 효율적으로 화학합성 약물을 탑재할 수 있으며, 이를 인간 세포로 전달하여 항암 약효를 보임을 규명하였다. 결과적으로는 이를 통해 식물 유래 세포막 소포체가 새로운 약물 탑재 및 전달체로서 개발될 수 있음을 규명하였다.

[0092] 6. 콩과 식물 유래 세포막 소포체에 화학합성 약물 탑재

[0093] 앞선 결과에서는 배추속 식물 유래 세포막 소포체에 핵산 기반의 약물이 효과적으로 탑재되며, 이들 세포막 소포체가 이들 핵산 약물을 인간의 세포에 전달함을 규명하였다. 여기서는 다른 식물 유래 세포막 소포체 역시 약물 탑재 기능이 있으며, 고농도로 약물을 탑재할 수 있음을 규명하기 위한 실험을 진행하였다. 또한, 한외 여과 방법 이외에도 추가적으로 다른 방법으로 탑재되지 않은 화학 합성 약물을 분리할 수 있으며, 이들 약물이 여러 종류의 인간의 세포로도 효율적으로 전달될 수 있음을 규명하기 위한 실험을 진행하였다.

[0094] Doxorubicin을 탑재하기 위해 콩과 식물 유래 세포막 소포체에 Doxorubicin을 섞어 37 °C에서 4시간 동안 반응시킨다. 탑재되지 않은 Doxorubicin을 제거하기 위해, 앞선 배추속 식물 유래 세포막 소포체와는 다르게 Doxorubicin이 탑재된 콩과 식물 유래 세포막 소포체를 PD MiniTrap desalting column을 이용하여 미 탑재된 Doxorubicin을 제거한다.

[0096] 6.1. Doxorubicin이 탑재된 콩과 식물 유래 세포막 소포체의 특성 분석

[0097] Doxorubicin 탑재 여부에 따른 콩과 식물 유래 세포막 소포체의 특성 변화 여부를 확인하기 위해 나노 입자 추적 분석기를 이용하여 크기를 분석하였다. 도 16의 A, B에서 Doxorubicin이 전달되지 않은 콩과 식물 유래 세포막 소포체의 경우에는 126.4 nm, Doxorubicin이 전달된 경우에는 132.6 nm 의 크기로 이를 통해 Doxorubicin의 탑재에 의해 세포막 소포체의 크기 변화가 없음을 확인하였다.

[0100] *6.2. Doxorubicin이 탑재된 콩과 식물 유래 세포막 소포체의 탑재 농도 확인

[0101] 한외여과 방법과 더불어 다른 분리 방법으로도 탑재되지 않은 화학합성물질이 분리되는 것을 확인하기 위하여 PD MiniTrap desalting column을 이용하여 미 탑재된 Doxorubicin을 제거하였다. 이를 위해 화학합성물질 자체, 콩과 식물 유래 세포막 소포체, 콩과 식물 유래 세포막 소포체에 Doxorubicin 등의 약물 탑재 정도를 column을 통해 분리 후 비교하는 실험을 진행하였다.

[0102] Doxorubicin을 탑재하기 위해 콩과 식물 유래 세포막 소포체에 Doxorubicin을 섞어 37 °C에서 4시간 동안 반응시킨다. 세포막 소포체에 탑재되지 않은 PD MiniTrap desalting column을 중력 방법을 이용하여 제거한다. 탑재된 Doxorubicin의 양은 형광 측정(Ex:480, Em:595)을 이용하여 진행하였다. 도 17에서 보듯이 콩과 식물 유래 세포막 소포체에 탑재된 Doxorubicin의 양이 0.04 μM 탑재된 것을 확인하였다. 이에 반해 화학합성물질 자체를 분리한 경우와 콩과 식물 유래 세포막 소포체를 분리한 후 Doxorubicin의 양을 확인한 경우 형광 값이 나오지 않는 것을 통해 분리가 잘 되었음을 확인하였다. 이를 통해 한외여과 방법뿐만 아니라 다른 여러 방법을 통해서도 탑재되지 않은 화학합성물질을 분리할 수 있음을 확인하였다.

[0104] 6.3. Doxorubicin이 탑재된 콩과 식물 유래 세포막 소포체의 암세포에서의 항암 효과

[0105] 콩과 식물 유래 세포막 소포체에 Doxorubicin 등의 화학합성물질을 탑재하여 항암 효과를 확인하는 실험을 진행하였다. Doxorubicin이 전달된 콩과 식물 유래 세포막 소포체 (도 1에서 Blex라고 표현함)의 암 억제 효과를 확인하기 위하여 대장암 세포인 SW480 세포를 1×10^4 cell/cm²으로 96-well cell culture plate에 접종하였다. 24시간 이후에 대조군 세포와 실험군 세포의 배지를 제거 후 PBS로 세척해 주었다. 이 때, 대조군 세포에는 Doxorubicin이 탑재되지 않은 콩과 식물 유래 세포막 소포체를 넣어 배양하였으며, 실험군 세포에는 Doxorubicin이 탑재된 콩과 식물 유래 세포막 소포체를 넣어 배양하였다. 이 후 세포는 0, 48, 72, 96 시간 배양하였으며 증식률은 WST-1을 통해 분석하였다. 모든 값은 평균 $\pm$ 표준편차 (***p < 0.001; n=3)으로 표시된다.

[0106] 도 18에서 보듯이 세포의 생존율은 Doxorubicin이 탑재된 콩과 식물 유래 세포막 소포체의 경우 96시간 후 41.7%까지 감소하였다. 이 결과를 통해 Doxorubicin이 콩과 식물 유래 세포막 소포체에 효율적으로 탑재되었으며, 대장암 세포에 고농도의 약물이 전달되어 대장암 세포의 자멸을 촉진할 수 있음을 확인하였다.

[0108] 6.4. Doxorubicin이 탑재된 콩과 식물 유래 세포막 소포체의 다양한 인간 암세포에서의 항암 효과

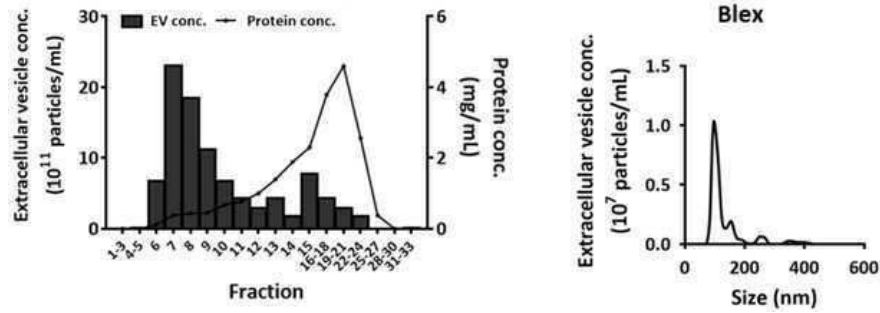
[0109] 콩과 식물 유래 세포막 소포체에 Doxorubicin 등의 화학합성물질을 탑재하여 항암 효과를 인간 대장암 세포뿐만 아니라 여러 인간 암세포에서 확인하는 실험을 진행하였다. Doxorubicin이 전달된 콩과 식물 유래 세포막 소포체의 암 억제 효과를 확인하기 위하여 자궁경부암 세포 (HeLa), 인간 폐암 세포 (A549), 인간 유방암 세포 (MCF-7) 및 인간 전립선암 세포 (PC-3)를 1×10^4 cell/cm²으로 96-well cell culture plate에 접종하였다. 24시간 이후에 대조군 세포와 실험군 세포의 배지를 제거 후 PBS로 세척해 주었다. 이 때, 대조군 세포에는 Doxorubicin이 탑재되지 않은 콩과 식물 유래 세포막 소포체를 넣어 배양하였으며, 실험군 세포에는 Doxorubicin이 탑재된 콩과 식물 유래 세포막 소포체를 넣어 배양하였다. 이 후 세포는 0, 48, 72, 96 시간 배양하였으며, 증식률은 WST-1을 통해 분석하였다. 모든 값은 평균 $\pm$ 표준편차 (***p < 0.001; n=3)으로 표시된다.

[0110] 도 19에서 보듯이 Doxorubicin이 탑재된 콩과 식물 유래 세포막 소포체의 96시간 후 세포 생존율은 자궁 경부암 세포의 경우 14.9%, 폐암 세포의 경우 66.5%, 유방암 세포의 경우 45.9% 및 전립선암 세포의 경우 70.2%까지 감소하였다. 이 결과를 통해 Doxorubicin이 콩과 식물 유래 세포막 소포체에 효율적으로 탑재되었으며, 대장암 세포뿐만 아니라 다른 암세포에도 고농도의 약물이 전달되어 세포의 자멸을 촉진할 수 있음을 확인하였다.

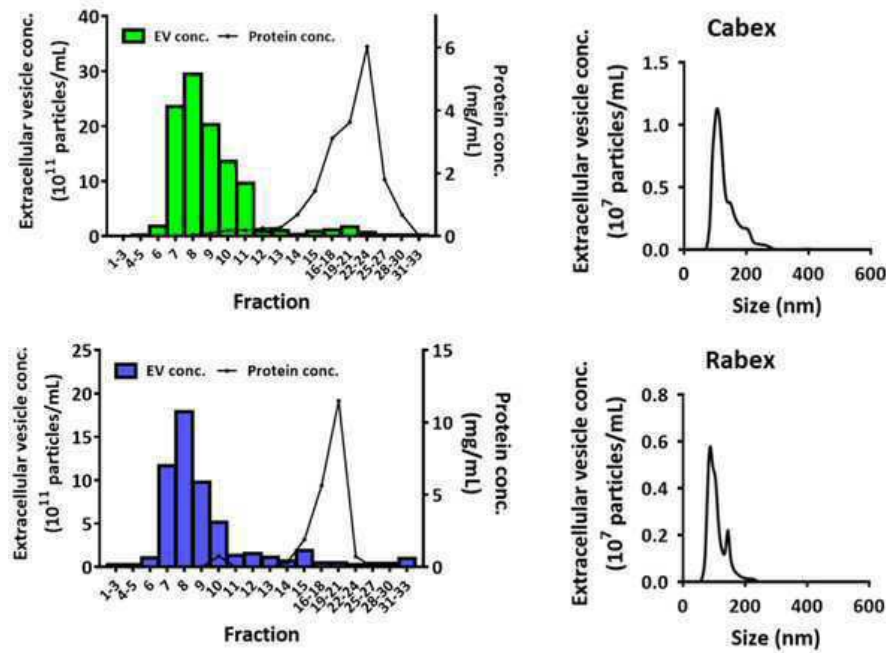
[0112] 이상에서 설명한 본 발명은, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위내에서 여러 가지 치환, 변형이 가능하므로 전술한 실시예에 한정되는 것은 아니다.

도면

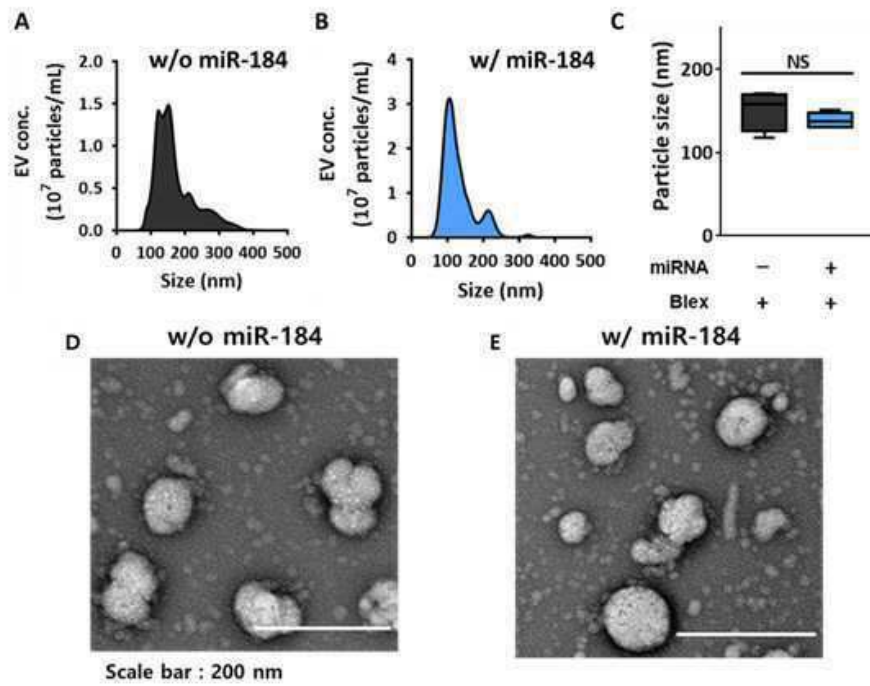
도면1



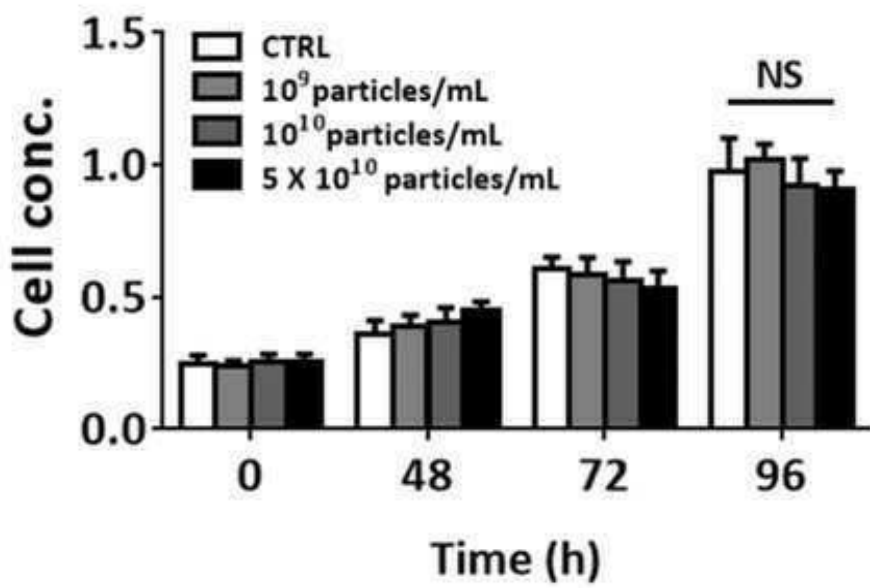
도면2



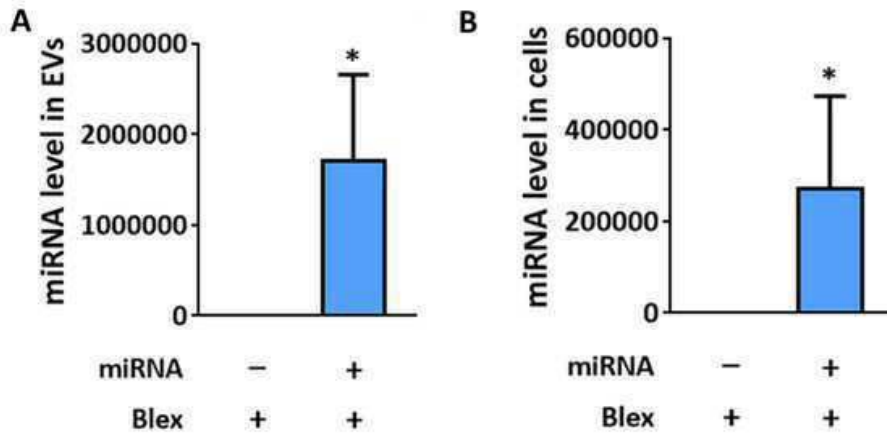
도면3



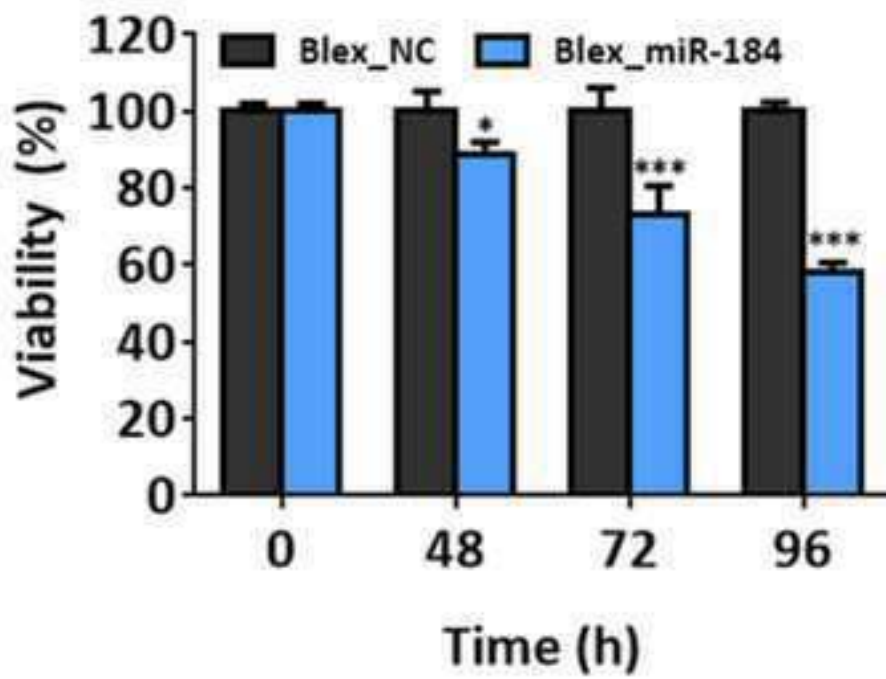
도면4



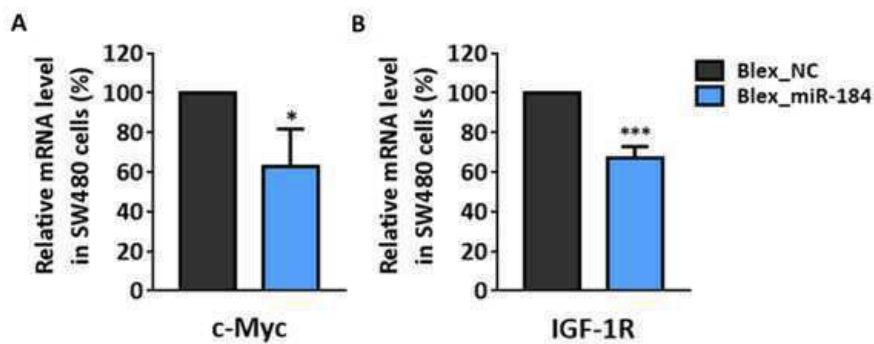
도면5



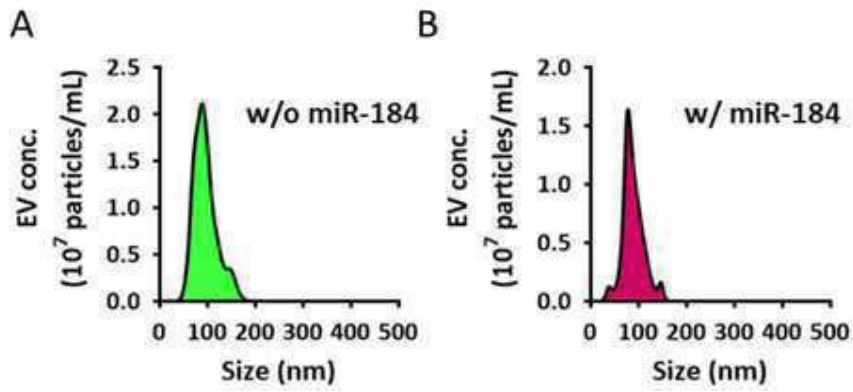
도면6



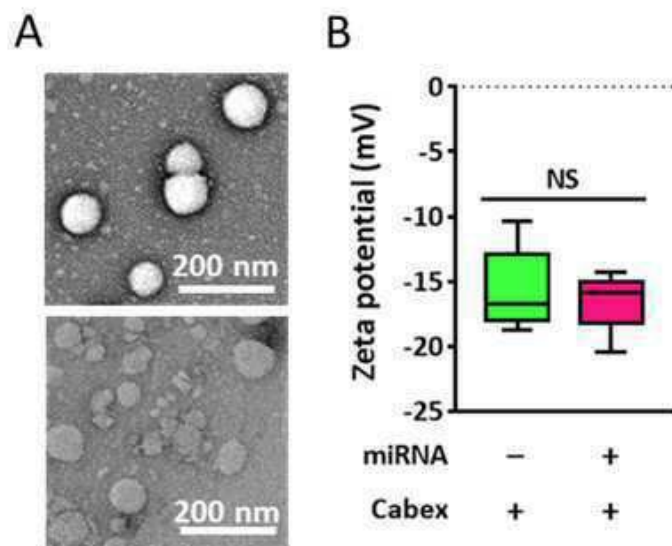
도면7



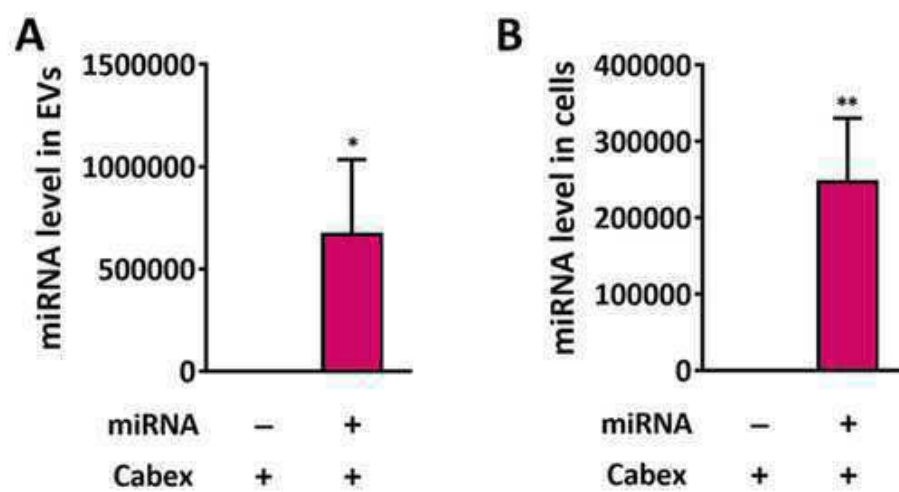
도면8



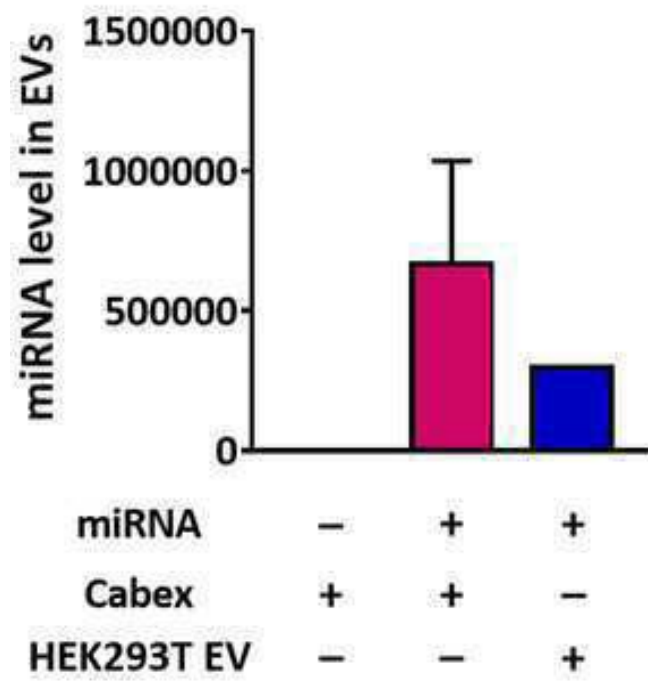
도면9



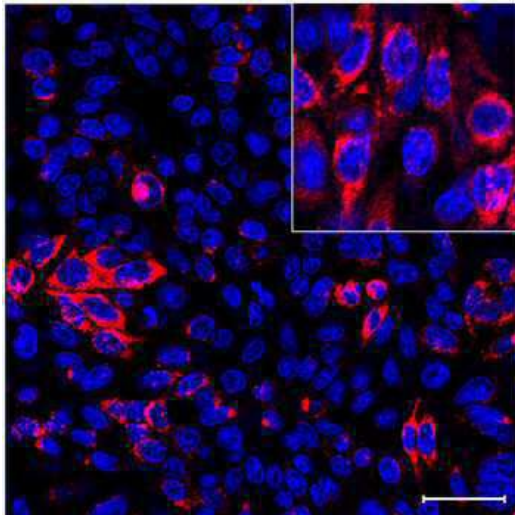
도면10



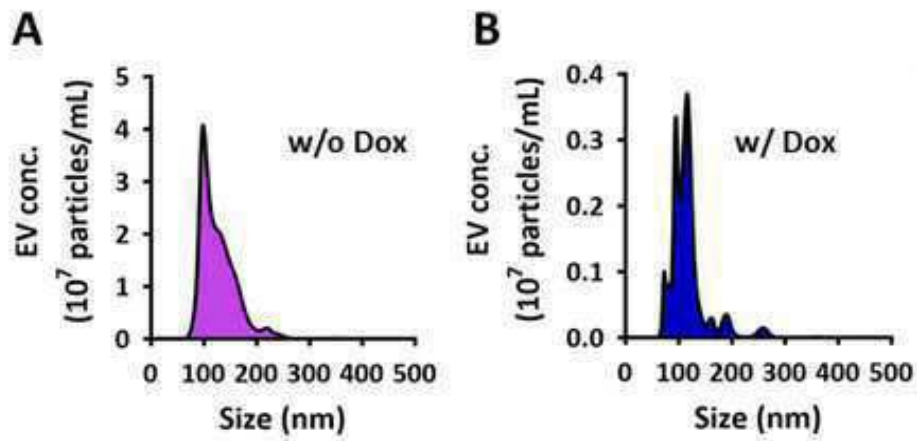
도면11



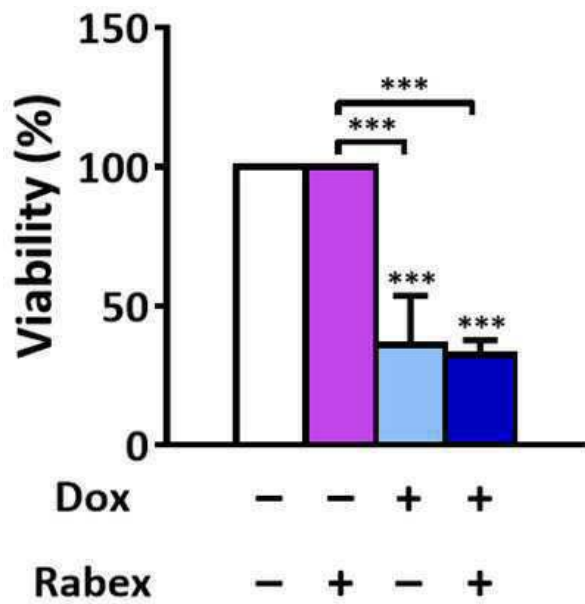
도면12



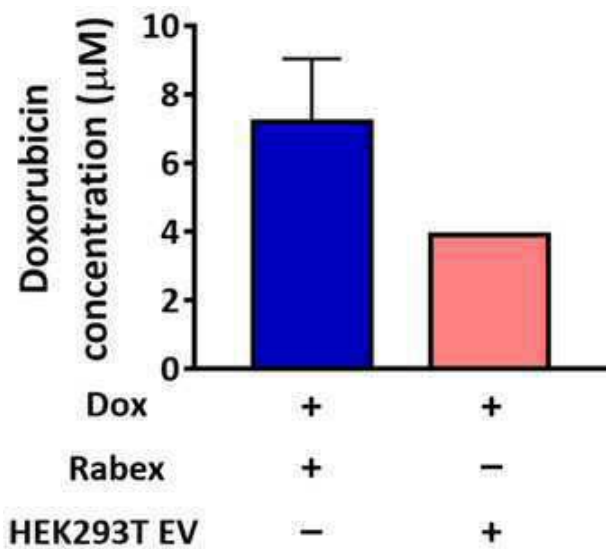
도면13



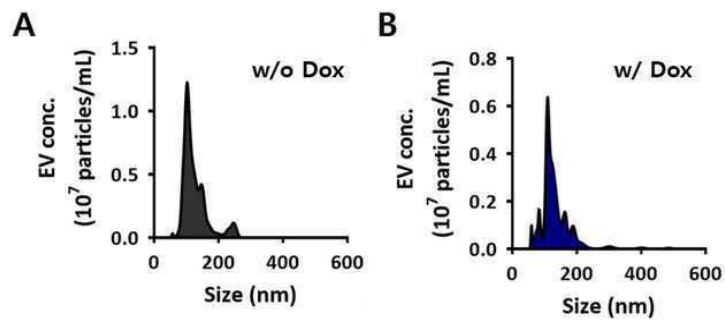
도면14



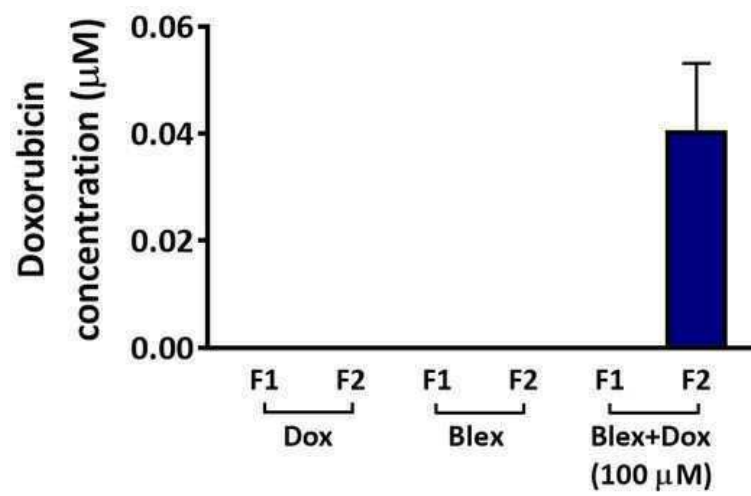
도면15



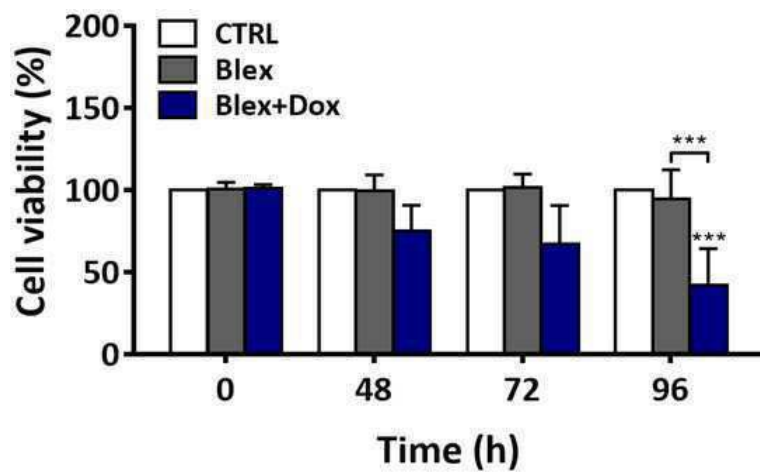
도면16



도면17



도면18



도면19

