



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0088806
(43) 공개일자 2013년08월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/76 (2006.01) A61K 47/42 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0011427
(22) 출원일자 2013년01월31일
심사청구일자 2013년01월31일
(30) 우선권주장
1020120010082 2012년01월31일 대한민국(KR)

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
전길자
서울시 영등포구 여의도동 광장아파트 9동 1002호
김태희
서울시 종로구 숭인동 종로센트레빌 105동 204호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
손민

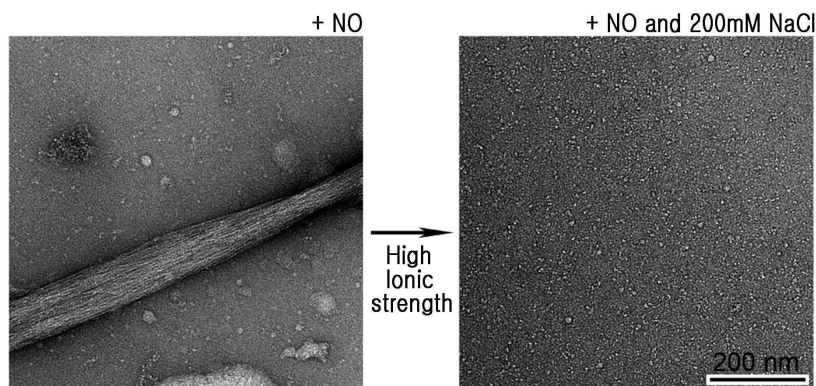
전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 발명의 명칭 일산화질소에 의해 형성되는 알부민 다량체 및 알부민 구조변형체

(57) 요약

본 발명은 NO(일산화질소, nitric oxide)를 함유하는 알부민 다량체, NO를 포함하는 알부민 구조변형체, 알부민 단량체 또는 알부민 다량체를 함유하는 NO 전달체, 알부민 단량체 또는 알부민 다량체를 함유하는 산소 전달체, 상기 알부민 구조변형체 또는 알부민 다량체를 함유하는 약물전달체, 일산화질소를 첨가하는 단계를 포함하는 단백질 구조변형체(structural deformer) 또는 다량체(multimer)의 제조방법 및 (a) 단백질 다량체를 포함하는 시료에 일산화질소를 첨가하여 단백질 다량체를 포함하는 시료를 제조하는 단계; 및 (b) 상기 단백질 다량체를 포함하는 시료에 염을 첨가하는 단계를 포함하는, 단백질로부터의 산소 방출을 조절하는 방법에 있어서, 상기 (a) 단계는 일산화질소를 첨가하여 단백질 다량체화에 의해 산소를 포집하는 단계이며, 상기 (b) 단계는 염의 첨가에 의해 산소를 포함하는 단백질 다량체의 올리고머화 또는 다량체화에 의해 산소를 방출하는 단계인 것인 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도7



(72) 발명자

김은남

경기도 안산시 일동 541-11 예가빌리지 202호

이영미

서울시 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교 종합
과학관 B동 461호

박선아

서울시 강남구 도곡1동 200-5 월드메르디앙 102동
501호

하예진

경기도 부천시 원미구 상2동 백송마을 2713동 150
2호

정현석

대전광역시 유성구 과학로 113번지 한국기초과학지
원연구원 전자현미경연구부

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011K000813

부처명 교육과학기술부

연구사업명 신기술융합형성장동력사업

연구과제명 단백질 기반의 산소전달기전 확립을 통한 저산소증 치료기술 개발

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2011.07.01 ~ 2012.06.30

특허청구의 범위

청구항 1

일산화질소(nitric oxide; NO)를 포함하는 알부민 다량체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 알부민 다량체는 알부민 1분자 당 0.01 내지 4 개의 NO를 함유하는 것인 알부민 다량체.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 알부민은 탄소수 18의 지방산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 추가로 포함하는 것인 알부민 다량체.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 알부민은 인간혈청알부민 또는 오브알부민인 것인 알부민 다량체.

청구항 5

일산화질소(nitric oxide; NO)를 함유하는 알부민 구조변형체.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 알부민 구조변형체는 알부민 1분자 당 0.01 내지 4개의 NO를 함유하는 것인 알부민 구조변형체.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 알부민은 인간혈청알부민 또는 오브알부민인 것인 알부민 구조변형체.

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 알부민 구조변형체는 NO와 결합하면 아미노산 서열 변화없이 3차원 구조가 변하는 것인 알부민 구조변형체.

청구항 9

알부민 단량체 또는 알부민 다량체를 함유하는 NO(nitric oxide) 전달체.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 알부민 단량체는 NO 결합시 NO가 결합되지 않은 알부민 단량체와 다르게 3차원 구조가 변형되거나 공유결합없이 다량체를 형성하는 것인 NO 전달체.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 알부민은 표적세포에 특이적으로 결합하는 리간드가 추가로 수식된 것인 NO 전달체.

청구항 12

제9항에 있어서,

상기 알부민은 천연 알부민; 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 기재된 알부민 다량체; 또는 제5항 내지 제8항 중 어느 한 항에 기재된 알부민 구조변형체인 것인 NO 전달체.

청구항 13

알부민 단량체 또는 알부민 다량체를 함유하는 산소 전달체.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 알부민 단량체는 NO 결합시 NO가 결합되지 않은 알부민 단량체와 다르게 3차원 구조가 변형되거나 공유결합없이 다량체를 형성하는 것인 산소 전달체.

청구항 15

제13항에 있어서,

상기 알부민은 표적세포에 특이적으로 결합하는 리간드가 추가로 수식된 것인 산소 전달체.

청구항 16

제13항에 있어서,

상기 알부민은 천연 알부민; 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 기재된 알부민 다량체; 또는 제5항 내지 제8항 중 어느 한 항에 기재된 알부민 구조변형체인 것인 산소 전달체.

청구항 17

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 기재된 알부민 다량체 또는 제5항 내지 제8항 중 어느 한 항에 기재된 알부민 구조변형체를 함유하는 약물전달체.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 약물전달체는 표적세포에 특이적으로 결합하는 리간드가 추가로 수식된 것인 약물전달체.

청구항 19

단백질 다량체를 포함하는 시료에 일산화질소(nitric oxide; NO)를 첨가하는 단계를 포함하는, 단백질 다량체(multimer) 또는 구조변형체(structural deformer)의 제조방법.

청구항 20

제19항에 있어서,

상기 일산화질소는 최종농도가 1 μ M 내지 600 μ M이 되도록 첨가되는 것인 제조방법.

청구항 21

제19항에 있어서,

상기 일산화질소의 첨가는 완충액에 불활성 가스를 주입하여 산소를 제거한 후 일산화질소 가스를 주입하여 제조한 일산화질소 용액을 첨가하여 수행되는 것인 방법.

청구항 22

제19항에 있어서,

상기 단백질 다량체는 염화나트륨 첨가에 의해 올리고머화 또는 단량체화될 수 있는 것인 제조방법.

청구항 23

제19항에 있어서,

상기 단백질은 탄소수 18의 지방산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 추가로 포함하는 것인 제조방법.

청구항 24

제19항에 있어서,

상기 단백질은 알부민(albumins), 글로불린(globulins), 피브리노겐(fibrinogen), 조절단백질(regulatory proteins) 및 응고인자(clotting factors)로 구성된 혈액단백질(blood proteins)으로부터 선택되는 것인 제조방법.

청구항 25

제19항에 있어서,

상기 단백질은 오브알부민 또는 인간혈청알부민인 것인 제조방법.

청구항 26

(a) 단백질 다량체를 포함하는 시료에 일산화질소(nitric oxide; NO)를 첨가하여 단백질 다량체를 포함하는 시료를 제조하는 단계; 및

(b) 상기 단백질 다량체를 포함하는 시료에 염을 첨가하는 단계를 포함하는, 단백질로부터의 산소 방출을 조절하는 방법에 있어서,

상기 (a) 단계는 일산화질소를 첨가하여 단백질 다량체화에 의해 산소를 포집하는 단계이며, 상기 (b) 단계는 염의 첨가에 의해 산소를 포함하는 단백질 다량체의 올리고머화 또는 단량체화에 의해 산소를 방출하는 단계인 것인 방법.

청구항 27

제26항에 있어서,

상기 염은 염화나트륨, 염화마그네슘, 염화암모늄, 염화칼륨, 아세트산나트륨, 탄산나트륨, 질산나트륨 및 황산마그네슘으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 NO(일산화질소, nitric oxide)를 함유하는 알부민 다량체, NO를 포함하는 알부민 구조변형체, 알부민 단량체 또는 알부민 다량체를 함유하는 NO 전달체, 알부민 단량체 또는 알부민 다량체를 함유하는 산소 전달체, 상기 알부민 구조변형체 또는 알부민 다량체를 함유하는 약물전달체, 일산화질소를 첨가하는 단계를 포함하는 단백질 구조변형체(structural deformer) 또는 다량체(multimer)의 제조방법 및 (a) 단백질 다량체를 포함하는 시료에 일산화질소를 첨가하여 단백질 다량체를 포함하는 시료를 제조하는 단계; 및 (b) 상기 단백질 다량체를 포함하는 시료에 염을 첨가하는 단계를 포함하는, 단백질로부터의 산소 방출을 조절하는 방법에 있어서, 상기 (a) 단계는 일산화질소를 첨가하여 단백질 다량체화에 의해 산소를 포집하는 단계이며, 상기 (b) 단계는 염의 첨가에 의해 산소를 포함하는 단백질 다량체의 올리고머화 또는 단량체화에 의해 산소를 방출하는 단계인 것인 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 알부민은 혈액에 매우 많이 존재하는 단백질로, 간에서 생성된다. 구조적으로 인간 혈청 알부민(human serum albumin; HSA)은 585개의 아미노산(66,438 Da)으로 이루어져 있으며, 17개의 이황 가교(disulfide bridge)와 하나의 자유 시스테인(Cys34)으로 구성되어 있다[Dugiaczyk, A. *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1998, 79: 71-75]. 또한 알부민은 혈장부피의 유지 및 회복시키는 역할, 물, 칼슘, 나트륨, 칼륨 등의 양이온, 지방산, 호르몬, 빌리루빈(bilirubin), 약물 등 다양한 리간드와 결합하여 혈액의 콜로이드 삼투압을 조절, 전달하는 역할 및 영양 불량시 아미노산 공급원으로서의 역할을 한다[Bar-Or, D. *et al.*, *Eur J. Biochem.*, 2001, 268: 42-47]. 특히 약물과 알부민의 결합은 약물의 약효 발현에 크게 관여한다. 한편, 순화한 HSA는 예를 들어 외과수술, 출혈성 쇼크 또는 화상 및 신증후군(nephrotic syndromes) 등 알부민 상실 및 알부민 합성 기능 장애에 의한 저알부민혈증의 치료에 사용된다. 알부민은 또한 보다 높은 진행 세포의 성장에 사용되는 매체의 보충 및 치료용 단백질 배합에 있어서 의약품 첨가제로 사용된다. 혈청 알부민의 또 다른 알려진 기능은 헤모글로빈과 유사하게 산소 분압에 따라 산소와 흡착하고 탈착하여 산소 캐리어로서의 작용이다. 따라서 비상시에 헤모글로빈을 대신하여 투여될 수 있다. 그러나 알부민 단량체는 크기 및 분자량이 작아 혈액을 통한 이동이 빨라

원하는 부위에 머무름이 어렵고, 특히 혈관손상부위에 목적물질을 전달하고자 하는 경우에는 혈관 내에 머무르지 못하고 혈관손상부위를 통해 확산되어 나갈 수 있다는 단점이 있다.

[0003] 한편 NO는 체내에서 혈관확장과 신호전달기능을 하는 것으로 알려져 있다. 혈중 산소 농도가 떨어지면 혈관 벽의 내피세포는 NO를 생산한다. NO는 주변의 근육세포에 작용하여 근육을 이완시키는 효소를 활성화시켜 혈관을 확장시키는 효과가 있다. 혈관이 확장되면 혈류량이 증가하고 조직에 산소가 원활하게 공급될 수 있다. 이후 NO는 몇 초 지나지 않아 분해된다. Stamler 교수 등은 현혈 후 저장해 놓은 혈액의 헤모글로빈이 NO 활성을 잃게 되면 산소전달능력이 저하되고 그 때 NO를 첨가하면 헤모글로빈과 결합한 NO 수준이 증가하여 산소전달능력이 향상된다는 것을 보고하였다[James, D. et al., PNAS, 2007, 104(43): 17058-17062].

[0004] 이에 본 발명자들은 인간혈청알부민 및 계란의 주요 단백질인 오브알부민에 의한 산소전달기전과 NO와의 관계를 예의 연구한 결과, NO에 의해 알부민의 구조가 변형되고 나아가 다량체를 형성하는 현상을 관찰하였으며, 상기 구조변형체 및 다량체가 산소를 포획하여 방출함을 확인하고 이에 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 하나의 목적은 NO(일산화질소, nitric oxide)를 함유하는 알부민 다량체를 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 NO를 포함하는 알부민 구조변형체를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 알부민 단량체 또는 알부민 다량체를 함유하는 NO 전달체를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 알부민 단량체 또는 알부민 다량체를 함유하는 산소 전달체를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 알부민 구조변형체 또는 알부민 다량체를 함유하는 약물전달체를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 일산화질소를 첨가하는 단계를 포함하는 단백질 구조변형체(structural deformer) 또는 다량체(multimer)의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 단백질 단량체를 포함하는 시료에 일산화질소를 첨가하여 단백질 다량체를 포함하는 시료를 제조하는 단계; 및 (b) 상기 단백질 다량체를 포함하는 시료에 염을 첨가하는 단계를 포함하는, 단백질로부터의 산소 방출을 조절하는 방법에 있어서, 상기 (a) 단계는 일산화질소를 첨가하여 단백질 다량체화에 의해 산소를 포집하는 단계이며, 상기 (b) 단계는 염의 첨가에 의해 산소를 포함하는 단백질 다량체의 올리고머화 또는 다량체화에 의해 산소를 방출하는 단계인 것인 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 NO(일산화질소, nitric oxide)를 함유하는 알부민 다량체를 제공한다.

[0013] 본 발명의 용어 "알부민"은 세포의 기본 물질을 구성하는 단백질의 하나로, 혈액 중에 매우 많이 존재하며, 간에서 생성된다. 자연상태에 존재하는 단순 단백질 중 가장 분자량이 적다. 혈액 중의 혈청 알부민은 혈장부피를 유지하고 회복시키는 기능이 있어서 과다 출혈에 따른 쇼크를 방지하고 수술 및 화상치료 등에 사용된다. 또한 헤모글로빈과 유사한 산소전달 능력을 갖는 것으로 알려져 있다. 인간혈청알부민, 난백알부민, 소혈청알부민 등을 제한없이 포함할 수 있으나, 바람직하게는 인간혈청알부민 또는 난백알부민의 주성분인 오브알부민일 수 있으며, 보다 바람직하게는 인간혈청알부민일 수 있다.

[0014] 본 발명의 용어 "알부민 다량체"는 2개 이상의 알부민 단량체로부터 형성되는 단백질 복합체를 의미하며, 바람직하게는 공유결합이 아닌 알부민 단량체 간의 상호작용에 의해 형성될 수 있다. 본 발명의 목적상, 상기 알부민 다량체는 이량체 또는 그 이상의 다량체를 제한없이 포함하나, 응집체는 포함하지 않으며, 바람직하게 백수십만개, 수십만개 또는 수만개의 알부민 단량체로 구성된 다량체일 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에 따르

면, 생성된 다량체의 형태를 TEM(transmission electron microscopy)으로 확인한 결과, NO 처리에 의해 생성된 알부민 다량체는 일반적인 단백질 응집체와는 달리 폭 50 내지 200 nm 및 길이 6 내지 10 μm 의 섬유형태를 갖는 것을 확인하였다. 단일 알부민 다량체가 약 $140 \times 40 \times 40 \text{ \AA}^3$ 의 크기를 갖는 것을 고려할 때, 상기 알부민 다량체는 적게는 수만 개 많게는 백수십만개의 알부민 다량체를 포함할 수 있음을 시사하는 것이다(실시예 5 및 도 7).

- [0015] 상기 알부민 다량체는 바람직하게 알부민 1분자 당 0.01 내지 4개, 보다 바람직하게는 0.1 내지 4개의 NO를 함유할 수 있다. 또한, 탄소수 18의 지방산을 추가로 포함할 수 있다. 상기 탄소수 18의 지방산에는 스테아르산(stearic acid; octadecanoic acid), 올레산(oleic acid), 리놀레산(linoleic acid) 및 리놀렌산(linolenic acid)이 있으며, 바람직하게는 올레산일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이외에도 천연알부민에 결합하는 것으로 알려진 탄소수 18의 지방산 이외의 지방산, 호르몬, DHA, EPA 등을 포함할 수 있다. 상기 NO를 포함하는 알부민 다량체를 형성하는 알부민은 인간혈청알부민, 난백알부민, 소혈청알부민 등을 제한없이 포함할 수 있으나, 바람직하게는 인간혈청알부민 또는 난백알부민의 주성분인 오브알부민일 수 있으며, 보다 바람직하게는 인간혈청알부민일 수 있다.
- [0016] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 NO를 포함하는 알부민 구조변형체를 제공한다.
- [0017] 본 발명의 용어 "알부민 구조변형체"는 천연형의 알부민으로부터 서열이나 분자량은 변하지 않고 3차원 입체구조만이 변화된 구조적 유도체를 의미한다.
- [0018] 상기 NO를 포함하는 알부민 구조변형체를 형성하는 알부민은 다량체와 동일하게 인간혈청알부민, 난백알부민, 소혈청알부민 등을 제한없이 포함할 수 있으나, 바람직하게는 인간혈청알부민 또는 난백알부민의 주성분인 오브알부민일 수 있으며, 보다 바람직하게는 인간혈청알부민일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 구체적인 실시예에 의하면, NO 처리로 유도된 알부민 다량체의 구조변형체는 알부민의 분자량 및 3차원 구조를 반영하는 천연-PAGE 겔에서는 천연형 알부민 다량체보다 빠르게 이동하여 낮은 분자량을 갖는 것처럼 보이지만, 3차원 구조는 배제하고 분자량에 의해서만 분리되는 SDS-PAGE에서는 동일한 분자량을 갖는 것으로 나타났다. 즉, NO에 의해 유도된 알부민 다량체의 구조변형체는 천연형의 알부민보다 겔 상에서 더 빠르게 이동할 수 있는 보다 컴팩트한 구조를 가지는 것으로 예상할 수 있다.
- [0020] 상기 알부민 다량체에 상술한 바와 같이 알부민 구조변형체 또한 알부민 1분자 당 0.01 내지 4개 보다 바람직하게는 0.1 내지 4개의 NO를 함유할 수 있다. 본 발명의 실시예에 의하면, 과량의 NO를 처리하였을 경우 구조변형체나 다량체가 아닌 응집체를 형성하는 결과를 나타내었다(실시예 3).
- [0021] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 알부민 다량체 또는 알부민 다량체를 함유하는 NO 전달체를 제공한다.
- [0022] NO(일산화질소; nitric acid)는 체내에서 혈관확장과 신호전달기능을 갖는 것으로 알려진 물질이다. 특히 혈중 산소 농도가 감소하거나 혈관 손상시 혈관 벽의 내피세포에서 생성되며 주변의 근육세포에 작용하여 근육을 이완시키는 효소를 활성화시킴으로 혈관을 확장시키는 효과를 갖는다. 상기 혈관 벽에서 생성된 NO는 기능을 수행한 후 수 초 내에 분해된다.
- [0023] 본 발명의 "NO 전달체"는 NO와 결합하여 특정 위치에서 NO를 방출할 수 있는 물질을 의미한다. 바람직하게는 혈류를 타고 이동하여 필요한 위치에서 NO를 방출할 수 있는 물질이다. 따라서 NO 결합체는 첫째로 NO와 가역적으로 결합하여 필요한 위치에서 방출할 수 있고, 둘째로는 혈류를 통해 이동할 수 있으며, 마지막으로 원하는 위치에 선택적으로 타겟팅 할 수 있는 물질인 것이 바람직하다. 알부민은 헤모글로빈과 유사하게 산소분압이 높은 곳에서 산소와 결합하여 혈관을 따라 이동하여 산소분압이 낮은 곳에서 산소를 방출하는 능력을 가진다는 것이 알려져 있다. 또한 본 발명에서는 NO로 유도된 알부민 구조변형체 및 다량체가 천연형 알부민 다량체의 기능은 유지하면서 NO와 비공유결합적 상호작용으로 결합되어있어 가역적인 구조변형에 의해 NO를 재방출할 수 있음을 확인하였다. 따라서 상기 NO를 포함하는 알부민 구조변형체 및 다량체 또는 천연형 알부민은 NO 전달체로 작용할 수 있다. 추가적으로 상기 NO 전달체에 표적세포 특이적으로 결합하는 리간드를 수식하여 조직 선택적 이동능력을 향상시킬 수 있다.

- [0024] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 알부민 단량체 또는 알부민 다량체를 함유하는 산소 전달체를 제공한다.
- [0025] 상기 본 발명의 알부민 단량체 또는 알부민 다량체가 산소 전달체로 작용하는 원리는 상기 NO 전달체와 동일하다. 상기 NO 전달체와 산소 전달체로 작용할 수 있는 알부민 단량체는 천연형의 단량체까지 포함한다.
- [0026] 본 발명의 구체적인 실시예에 의하면, NO를 처리하여 제조한 알부민 다량체는 추가적인 NO 기체 주입시 또는 고농도의 염용액 처리시 산소기체를 방출하는 것을 확인하였다. 이는 본 발명에 따른 알부민 다량체가 산소기체를 함유하고 있음을 시사하는 것으로, NO 기체 주입시에는 NO 기체에 의한 치환에 의해, 고농도의 염용액 처리시에는 다량체가 저분자화하면서 함유하고 있던 산소기체를 방출함을 확인하였다(실시예 4 및 6). 다시 말하면, 본 발명에 따른 알부민 다량체는 산소기체를 치환할 수 있는 다른 기체가 제공되거나 주위의 염농도에 따라서 산소기체를 방출할 수 있다. 이는 본 발명에 따른 알부민 다량체가 환경에 따라 함유하고 있는 산소기체를 방출할 수 있는 산소전달체로 작용할 수 있음을 시사한다.
- [0027] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 알부민 구조변형체 또는 알부민 다량체를 함유하는 약물전달체를 제공한다.
- [0028] 알부민의 공지된 또 다른 기능은 약물전달체로서의 기능이다. 상기 언급된 바와 같이 본 발명의 알부민 구조변형체 및 알부민 다량체는 알부민과 동일한 생체내 기능을 가지면서 선택적 이동능력이 향상된 단백질 복합체이다. 따라서, 상기 알부민 구조변형체 및 알부민 다량체는 약물전달체로 사용될 수 있다. 또한 표적세포에 특이적으로 결합하는 리간드를 추가적으로 수식하여 조직 선택적 이동성을 높일 수 있다.
- [0029] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 단백질 단량체를 포함하는 시료에 일산화질소를 첨가하는 단계를 포함하는 단백질 다량체(multimer) 또는 구조변형체(structural deformer)의 제조방법을 제공한다.
- [0030] 바람직하게 상기 일산화질소는 최종농도가 1 μM 내지 600 μM 이 되도록 첨가하여 제조할 수 있다. 보다 바람직하게 최종농도가 1 μM 내지 40 μM , 보다 더 바람직하게는 1 μM 내지 20 μM 이 되도록 처리할 수 있다. 그러나 이에 제한되는 것은 아니며, NO를 고농도로 처리하였을 때 단백질이 응집체를 형성할 수 있으며, 이때 NO의 농도는 단백질의 종류에 따라 다름을 고려하여 다량체가 형성되는 것이 확인되는 한 낮은 농도로 처리하는 것이 바람직하다.
- [0031] 상기 일산화질소의 첨가는 완충액에 불활성 가스를 주입하여 산소를 제거한 후 NO 가스를 주입하여 제조한 NO 용액을 첨가함으로써 달성될 수 있다. 바람직하게 상기 완충액은 PBS(phosphate buffered saline)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 불활성 가스는 아르곤 또는 헬륨 가스일 수 있으며, 바람직하게는 아르곤 가스일 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에 의하면, 알부민에 NO를 처리하기 위하여 NO 용액을 제조하여 사용하였으며, 상기 NO 용액은 완충액에 불활성 가스를 주입하여 산소를 제거한 후 NO 가스를 주입하여 NO 원액으로 제조하고 원하는 농도로 희석하여 사용하였다.
- [0032] 바람직하게는 상기 완충액으로는 0.1 M PBS를, 불활성 가스로는 아르곤 가스를 사용할 수 있다. 아르곤 가스 및 NO 가스는 용액에 직접 버블링하여 주입할 수 있고, NO 주입시간은 30분으로 하여 1.9 mM 농도의 NO 원액을 제조할 수 있다. 알부민 구조변형체 및 다량체를 제조하기 위하여 상기 NO 용액을 알부민 용액에 제시된 농도대로 혼합하였다. 상기한 방법으로 제조한 NO 용액을 1200 μM 과 1400 μM 이상의 농도로 동일한 부피의 오브알부민과 인간혈청알부민에 처리하였을 때, 즉 최종혼합물에서 NO의 농도가 600 μM 과 700 μM 이 되도록 처리하였을 때, 상기 단백질들의 응집이 관찰됨을 확인하였다. 응집이 아닌 다량체를 형성하기에 바람직한 NO의 농도는 오브알부민과 인간혈청알부민에 대해 각각 300 μM 과 1200 μM 이나 다량체를 형성하지 응집체를 형성하지 않는 한 이에 제한되지 않는다(실시예 3).
- [0033] 한편, 상기 NO를 처리하여 제조한 단백질 다량체는 염화나트륨 첨가에 의해 올리고머화 또는 단량체화될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 구체적인 실시예에 의하면, TEM으로 얻은 분자수준의 이미지로부터, NO 처리에 의해 형성된 섬유모양의 알부민 다량체가 500 mM의 NaCl로 처리하였을 때 저분자량의 올리고머 또는 단량체로 분해되는 것을 확인하였다(도 7).
- [0035] 또한, 본 발명에 따른 단백질은 탄소수 18의 지방산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 추가로 포함할 수

있다. 자연상태의 혈액 중에는 탄소수 18의 지방산이 존재하며, 상기 지방산은 인간혈청알부민 등의 혈액단백질과 결합하고 있는 것으로 알려져 있다. 이외에도 천연알부민에 결합하는 것으로 알려진 탄소수 18의 지방산 이외의 지방산, 호르몬, DHA, EPA 등을 포함할 수 있다.

[0036] 상기 단백질의 비제한적인 예는 알부민(albumins), 글로불린(globulins), 피브리노겐(fibrinogen), 조절단백질(regulatory proteins) 또는 응고인자(clotting factors) 등의 혈액단백질(blood proteins)일 수 있다. 보다 바람직하게 상기 단백질은 오브알부민 또는 인간혈청알부민일 수 있다.

[0037] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) 단백질 다량체를 포함하는 시료에 일산화질소를 첨가하여 단백질 다량체를 포함하는 시료를 제조하는 단계; 및 (b) 상기 단백질 다량체를 포함하는 시료에 염을 첨가하는 단계를 포함하는, 단백질로부터의 산소 방출을 조절하는 방법에 있어서, 상기 (a) 단계는 일산화질소를 첨가하여 단백질 다량체화에 의해 산소를 포집하는 단계이며, 상기 (b) 단계는 염의 첨가에 의해 산소를 포함하는 단백질 다량체의 올리고머화 또는 단량체화에 의해 산소를 방출하는 단계인 것인 방법을 제공한다.

[0038] 상기 단백질의 비제한적인 예는 알부민(albumins), 글로불린(globulins), 피브리노겐(fibrinogen), 조절단백질(regulatory proteins) 또는 응고인자(clotting factors) 등의 혈액단백질(blood proteins)일 수 있다. 보다 바람직하게 상기 단백질은 오브알부민 또는 인간혈청알부민일 수 있다.

[0039] 상기 염의 비제한적인 예는 염화나트륨, 염화마그네슘, 염화암모늄, 염화칼륨, 아세트산나트륨, 탄산나트륨, 질산나트륨, 황산마그네슘 등일 수 있다. 바람직하게 상기 염은 염화나트륨일 수 있다.

[0040] 본 발명에 따른 구체적인 실시예에 의하면, PBS 또는 알부민 다량체 용액에 NaCl을 첨가하여 용액의 이온세기가 증가할 경우 용액 중의 산소포화도가 감소하여 이온세기 증가에 따라 산소분압이 감소하는 것으로 나타났으나, 본 발명에 따른 알부민 다량체 용액의 경우 상기한 바와 같이 용액자체의 산소포화도는 이온세기에 비례하여 감소함에도 불구하고 용액 내의 산소분압이 증가하는 것을 확인하였다. 이는 알부민 다량체가 산소분자를 함유하고 있다가, 이온세기가 증가함에 따라 저분자화 되면서 이들 산소분자를 방출하여 발생하는 현상으로 해석될 수 있다. 또한 알부민 다량체를 제조하기 위한 일산화질소의 처리농도 및 알부민 다량체의 저분자화를 위한 NaCl 농도에 대해 각기 다른 산소분압 변화 양상을 보이는 것을 확인하였으므로, 본 발명에 따른 단백질로부터의 산소 방출을 조절하는 방법은 단백질 다량체화를 위해 첨가하는 일산화질소의 농도 및/또는 제조된 단백질 다량체의 저분자화를 위해 첨가되는 염화나트륨의 농도에 의해 달성될 수 있다.

발명의 효과

[0041] 혈장 및 계란의 주요 단백질인 알부민에 NO(일산화질소, nitric oxide)를 처리하여 제조된 알부민 다량체 구조 변형체 또는 알부민 다량체는 산소전달체 및 약물전달체로서 기존의 알부민의 기능은 유지하면서 혈액 중 이동 속도는 낮아지고 선택성은 높아져서 보다 개선된 전달체로 작용할 수 있으며, 목적세포에 특이적인 리간드를 추가로 표지하여 선택성이 보다 더 향상된 전달체로 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0042] 도 1은 NO에 의한 20% 오브알부민의 구조적 변화를 나타낸 도이다. 20% 오브알부민 용액을 제조하였고, NO 용액과 혼합하여 밤새도록 반응시켰다. 오브알부민은 8% Bis-Tris 젤로 분리하였다. (a)는 CBB로 염색한 오브알부민을 천연(native)-PAGE로 (b)는 SDS-PAGE로 분석한 결과이다. 레인 1; 분자량 마커, 레인 2; 오브알부민 대조군, 레인 3; 1 μ M NO 용액으로 처리한 오브알부민, 레인 4; 10 μ M NO 용액으로 처리한 오브알부민, 레인 5; 100 μ M NO 용액으로 처리한 오브알부민, 레인 6; 300 μ M NO 용액으로 처리한 오브알부민.

도 2는 인간혈청알부민의 다량체화에 대한 NO의 영향을 나타낸 도이다. SK 케미칼의 20% 알부민 용액을 NO 용액과 혼합하여 밤새도록 반응시켰다. 단백질은 8% Bis-Tris 젤로 분리하였다. (a) 및 (b)는 CBB(coomassie brilliant blue)로 염색한 결과이고, (c) 및 (d)는 니트로셀룰로스 막에 이동시켜 항-인간혈청알부민을 처리한 후 이차 HRP 결합 항체를 처리하여 웨스턴 블롯으로 검출한 결과이다. (a) 및 (c)는 천연(native)-PAGE로 (b) 및 (d)는 SDS-PAGE로 인간혈청알부민 단백질을 분석한 결과이다. 레인 1; 분자량 마커, 레인 2; 인간혈청알부민 대조군, 레인 3; 300 μ M NO 용액으로 처리한 인간혈청알부민, 레인 4; 600 μ M NO 용액으로 처리한 인간혈청알

부민, 레인 5; 1200 μM NO 용액으로 처리한 인간혈청알부민.

도 3은 인간혈청알부민의 단량체에 대한 NO의 영향을 나타낸 도이다. SK 케미칼의 20% 알부민 용액을 NO 용액과 혼합하여 밤새도록 반응시켰다. 단백질은 8% Bis-Tris 겔로 분리하였다. (a)는 천연-PAGE로, (b)는 SDS-PAGE로 인간혈청알부민을 분석하여 CBB로 염색한 결과이다. 레인 1; 분자량 마커, 레인 2; 인간혈청알부민, 10 μg , 대조군, 레인 3; 600 μM NO 용액으로 처리한 인간혈청알부민, 10 μg , 레인 5; 인간혈청알부민, 1 μg , 대조군, 레인 6; 600 μM NO 용액으로 처리한 인간혈청알부민, 1 μg .

도 4는 NO/O₂ 듀얼 마이크로센서 구조를 나타낸 도이다. 듀얼 마이크로센서에서 NO 및 O₂ 기체는 PTFE 기체 투과성 막 통과 후 WE1 및 WE2의 표면에서 전류측정에 의해 검출하였다.

도 5는 5% 오브알부민에서 산소측정 결과를 나타낸 도이다. 5% 오브알부민 용액은 0.1 mol/L PBS로 제조하였고, 동일한 부피의 PBS 및 600 μM NO 용액과 혼합하여 밤새도록 반응시켰다. 듀얼 센서에서 NO 및 O₂ 기체는 PTFE 기체 투과성 막 통과 후 WE1 및 WE2의 표면에서 전류측정에 의해 검출하였다. (a)는 오브알부민 용액 대조군, (b)는 NO 처리 오브알부민 용액에 대한 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

도 6은 인간혈청알부민에서 산소측정 결과를 나타낸 도이다. 시료는 PBS 완충액에 녹이고 동일한 부피의 600 μM NO 용액과 혼합하여 밤새도록 반응시켰다. 듀얼 센서에서 NO 및 O₂ 기체는 PTFE 기체 투과성 막 통과 후 WE1 및 WE2의 표면에서 전류측정에 의해 검출하였다. (a)는 인간혈청알부민 대조군, (b)는 NO 처리 인간혈청알부민에 대한 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

도 7은 NO 처리에 의해 생성된 다량체화된 상태 및 고농도의 NaCl 처리에 의해 단량체화된 상태의 인간혈청알부민을 나타내는 TEM 사진이다. 1 내지 37.5 μM NO 용액으로 처리하여 알부민의 다량체화를 유도할 수 있으며, 상기 알부민 다량체는 500 mM NaCl로 처리시 단량체로 완전히 분해될 수 있음을 나타낸다.

도 8은 대조군의 염처리에 따른 용액의 산소분압 변화를 나타낸 도이다. (a)는 음성대조군으로써 NO를 처리하지 않은 PBS에 NaCl을 가하면서 용액의 산소분압을 측정한 결과이다. (b)는 NO를 처리하지 않은 1 중량% 희석한 알부민 주사제 즉, 혈장유래 알부민 용액의 NaCl 처리에 따른 산소분압 변화를 나타낸 도이다.

도 9는 NO를 처리한 인간혈청알부민 용액의 염처리에 따른 산소분압 변화를 나타낸 도이다. 1 중량% 희석한 알부민 주사제 즉, 혈장유래 알부민 용액을 (a) 18.5 μM 및 (b) 37.5 μM 농도의 NO 용액으로 처리한 후 NaCl을 가하여 염농도를 높이면서 용액의 산소분압을 측정한 결과이다.

도 10은 NO를 처리한 재조합인간혈청알부민 용액의 염처리에 따른 산소분압 변화를 나타낸 도이다. 1 중량% 재조합인간혈청알부민 용액을 (a) 18.5 μM 및 (b) 37.5 μM 농도의 NO 용액으로 처리한 후 NaCl을 가하여 염농도를 높이면서 용액의 산소분압을 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0044] 실시예 1: 시약 및 재료

[0045] 오브알부민(ovalbumin)은 시그마로부터, 오브알부민 항체는 Santa Cruz biotechnology로부터 구입하였다. 인간혈청알부민(human serum albumin; HSA) 항체는 Cell Signaling Technology(Beverly, MA)로부터, Coomassie Brilliant Blue R250은 Amresco로부터, 의약품 등급의 인간혈청알부민은 SK 케미칼로부터 구입하여 사용하였다.

[0046] 실시예 2: NO(일산화질소, nitric oxide) 원액 용액의 준비

[0047] NO 원액 용액(stock solution)은 0.1 M PBS에 아르곤 가스를 주입하여 산소를 제거한 후 NO 가스를 30분간 버블링시켰다. 상기 방법으로 제조된 NO 원액 용액의 농도는 1.9 mM이며(Ahmed *et al.* 2001; Friedemann *et al.* 1996), NO 원액 용액은 사용할 때마다 새로 준비하였다.

- [0048] **실시예 3: 1D 폴리아크릴아미드 젤 전기영동(1-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis; 1D-PAGE)**
- [0049] NO에 의한 단백질의 구조변화를 확인하기 위하여 1D-PAGE를 이용하였다. 구체적으로 본 발명에서는 SDS(sodium dodecylsulfate)-PAGE 및 천연(native)-PAGE를 이용하였다. SDS-PAGE는 아미노산 측쇄끼리의 결합(이황결합 등)을 절단하여 단일사슬 형태로 만든 후 음이온성 계면활성제인 SDS를 처리하여 단백질의 전하를 균일하게 한 후 전압을 걸어 전하차에 의해 단백질을 분리하는 것이다. 반면, 천연-PAGE는 아미노산 측쇄의 결합을 유지하며, SDS도 처리하지 않으므로 단백질 고유의 상태를 볼 수 확인할 수 있다. 시그마로부터 구입한 오브알부민은 0.1 M PBS에 녹여 준비하였다. 동일한 양의 단백질을 SDS 또는 천연 시료 완충액과 섞었고, SDS 시료는 97℃에서 3 내지 5분간 가열하였다. 이후 8% Bis-Tis 젤을 이용하여 80 내지 120 V에서 전기영동하였다. 상기 전기영동한 1D-PAGE 젤은 쿠마시 브릴리언트 블루(Coomassie brilliant blue; CBB) 염색, 웨스턴 블롯 및 당단백질 염색을 각각 수행하여 확인하였다. 구체적인 실험방법은 하기와 같다.
- [0050] 첫째, CBB 염색은 Coomassie Brilliant Blue R-250 시약을 이용하는 염색방법으로 50 ng 이상의 단백질을 검출할 수 있다. Coomassie Brilliant Blue R-250 시약이 단백질의 아르기닌(arginine; Arg), 라이신(lysine; Lys) 또는 방향족 고리를 갖는 아미노산 잔기인 타이로신(tyrosine; Tyr), 트립토판(tryptophan; Try), 페닐알라닌(phenylalanine; Phe) 등과 결합하여 붉은 색이 푸르게 변하는 성질을 이용한다. 쿠마시는 6개의 페닐그룹과 2개의 황산기를 통해서 단백질과 소수성 상호작용 및 반데르발스 상호작용(van der Waals interaction)을 통해 결합한다. 이를 위하여 1D-PAGE 후 젤을 쿠마시 블루 R-250으로 30분간 염색하였다. 증류수로 세척한 후 메탄올과 아세트산이 섞인 탈염색 용액에서 바탕이 제거될 때까지 탈염색시켰다. 그 다음, LAS-3000(FUJIFILM)을 이용하여 염색된 단백질을 확인하였다.
- [0051] 두번째, 웨스턴 블롯은 여러 단백질을 전기영동으로 분리하고 분리된 단백질 밴드를 니트로셀룰로스 또는 나일론 막에 옮긴 후 단백질이 옮겨진 막에서 항원-항체 반응을 이용하여 특정 항체에 대한 항원을 찾아내는 방법이다. 이를 위하여 1D-PAGE 후 젤을 니트로셀룰로스 막으로 이동시켰다. 이동이 끝나면 선포색(ponceau) 염색으로 제대로 이동되었는지 확인하였고, 세척 완충액으로 씻은 후 5% 무지방 우유에 희석한 오브알부민 항체 또는 인간혈청알부민을 넣고 4℃에서 밤새 반응시켰다. 세척 완충액으로 10분간 3회 세척 후, 증가된 화학발광 용액을 막에 처리한 후 하이퍼필름에 감광시켜 단백질을 확인하였다.
- [0052] **3.1. NO 농도에 따른 오브알부민의 구조변화**
- [0053] 구입한 오브알부민에 1, 10, 100 및 300 μM 의 NO 용액을 처리한 후 1D-PAGE로 변화를 확인하였다(도 1). 그 결과, NO 농도가 증가할수록 오브알부민 단량체의 밴드는 아래로 떨어지고, 폴리머가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나, NO를 1200 μM 이상 과량으로 처리시에는 응집이 관찰되었다. 이로부터 NO는 1 내지 600 μM , 특히 300 μM 의 농도로 처리했을 때 안정적으로 반응하며 다량체를 생성하고 또한 오브알부민 단량체의 구조에도 영향을 주는 것을 확인하였다.
- [0054] **3.2. NO 농도에 따른 인간혈청알부민의 구조변화**
- [0055] 20% 인간혈청알부민에 300, 600 및 1200 μM 농도의 NO 용액을 처리한 후 1D-PAGE로 변화를 확인하였다(도 2). 그 결과, 처리한 NO의 농도가 증가할수록 인간혈청알부민 단량체의 밴드가 아래로 떨어지고 다량체가 증가하는 것을 CBB 염색 및 HSA-항체에 대한 웨스턴 블롯으로부터 확인할 수 있었다. 인간혈청알부민은 상기 3.1.에서 보인 오브알부민보다 높은 농도인 1400 μM 이상의 NO로 처리시 응집현상이 관찰되었다. 따라서, 오브알부민과 인간혈청알부민의 NO에 대한 반응민감성에 차이가 있음을 확인할 수 있었다. 인간혈청알부민에 1200 μM 의 NO를 처리시 천연젤에서 단백질의 양이 증가한 것처럼 보였으나, 희석하여 다시 분리한 결과 분자량 감소로 인한 것임을 확인할 수 있었다(도 3). 이로부터 의약품 등급의 인간혈청알부민은 300 내지 1200 μM 의 NO 처리시 특히 1200 μM 로 처리시 젤로 확인할 수 있는 안정적인 반응을 보이며 단량체의 구조변화에도 영향을 주는 것을 알 수 있었다.

- [0056] 상기와 같은 결과는 NO가 알부민, 특히 오브알부민 또는 인간혈청알부민의 3차원 구조변화를 수반할 수 있음을 시사하는 결과이다.
- [0057] **실시예 4: NO/O₂ 듀얼 마이크로센서 및 이를 이용한 단백질에 포획된 산소 측정**
- [0058] NO/O₂ 듀얼 마이크로센서는 시료 중의 NO와 O₂ 기체의 농도를 동시에 실시간으로 측정할 수 있는 기기이다. 이것은 유리를 썬 두 개의 백금 작업 전극과 은/염화은 기준 전극으로 구성되어 있다(도 4). 상기 전극들은 기체 투과성 막으로 싸여 있어서 다른 방해 이온 종들을 제외한 오직 기체분자만 선택적으로 막을 통과할 수 있다. 통과한 기체분자 중 작업 전극의 +0.75V에서는 NO가 산화되고 -0.4V에서는 O₂가 환원된다. 상기 산화, 환원 전류는 각각 NO와 O₂의 양에 비례하여 측정된다. 기지의 NO, O₂ 농도에서 산화/환원 전류를 측정하는 보정(calibration)을 거쳐 시료 중 미지 농도의 NO, O₂를 정량할 수 있다.
- [0059] 상기 NO/O₂ 듀얼 마이크로센서를 이용하여 오브알부민 및 인간혈청알부민의 포획된 산소를 측정하였다. 0.1 M PBS에 녹여 준비한 5% 오브알부민 및 5% 인간혈청알부민 시료에 각각 600 μM NO 용액을 동일한 부피로 가하여 4℃에서 12시간 반응시킨 후 NO 기체를 주입하며 전류 변화를 측정하였다.
- [0060] **4.1. 오브알부민에서의 산소 측정**
- [0061] 오브알부민의 산소를 측정하기 위하여 NO/O₂ 듀얼 마이크로센서를 이용하였다(도 5). 도 5에 나타난 바와 같이, 동일한 부피의 600 μM NO 용액으로 처리한 5% 오브알부민의 산소 바탕 수준이 대조 용액의 것과 비교하였을 때, 산소함량이 감소하였음을 확인할 수 있었고, NO 기체 주입시 산소가 방출되는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 오브알부민은 감소한 산소 바탕 수준만큼 산소를 포획할 수 있으며, NO에 의해 상기 포획한 산소를 방출시킴을 알 수 있었다.
- [0062] **4.2. 인간혈청알부민에서의 산소 측정**
- [0063] 인간혈청알부민에서 산소함량을 측정하기 위하여 NO/O₂ 듀얼 마이크로센서를 이용하였다(도 6). 상기 의약품 등급 인간혈청알부민은 인간 혈액으로부터 분리하여 제조한 것이다. 상기 인간혈청알부민에 동일한 부피의 600 μM NO 용액을 처리하고 산소 바탕 수준을 측정하였다. 상기 오브알부민과 유사하게 대조 용액에 비해 산소 바탕 수준이 감소하였고, NO 기체를 주입하자 산소가 방출되었다(도 6). 이로부터 의약품 등급의 인간혈청알부민 또한 감소한 산소 바탕 수준만큼 산소를 포획할 수 있으며, NO에 의해 포획한 산소를 방출할 수 있음을 확인하였다.
- [0064] **실시예 5: NO 처리에 의한 알부민의 다량체화 및 NaCl 처리에 의한 알부민 다량체의 저분자화**
- [0065] 상기 실시예 3에서 언급된 바와 같이 NO 처리시 알부민은 NO 농도에 따라 다량체화(multimerization)가 진행되지만 일정농도 이상의 고농도로 처리한 경우에는 응집(aggregation)이 수반됨을 확인하였다. 따라서, 본 발명에 따른 알부민 다량체는 응집에 의해 형성되는 응집체와는 다른 특성을 가짐을 확인하고자 하였다. 상기 응집은 일반적으로 단백질은 열이나 산처리에 의해 복수의 분자가 비가역적으로 형성되는 무정형의 단백질 복합체를 의미하는 것일 수 있으므로, TEM을 이용하여 단분자 수준에서 관찰하여 생성되는 다량체가 일정한 형태를 가지며, 가역적으로 단량체화될 수 있음을 확인하였다.
- [0066] 구체적으로, 음성염색(negative staining)을 위해 0.5% 인간혈청알부민을 20 mM Tris-HCl 및 37.5 μM NO(또는 PBS와 1 μM NO)를 포함하는 용액으로 10배 희석하였다. 높은 이온세기에서 분자상태를 가시화하기 위하여 단백질 원액을 상기 희석 완충액과 혼합한 후 500 mM NaCl을 첨가하였다. 대기 중에서 3분간 글로우 방전시킨(glow-discharged) 탄소코팅 그리드(carbon-coated grid) 상에 각 시료를 5 μl씩 가하고, 상기 그리드를 즉시 1% 우라닐 아세테이트(uranyl acetate)로 음성염색하였다. 120kV에서 작동하는 Technai G2 Spirit Twin TEM(FEI, USA)에서 그리드를 확인하고 4K×4K UltraScan 4000 CCD 카메라(Gatan, USA)로 이미지를 기록하였다.
- [0067] 그 결과를 도 7에 나타내었다. 도 7에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 방법으로 즉, 알부민에 NO 용액을 처

리하여 제조한 알부민 다량체는 일반적인 단백질의 응집에 의해 생성되는 응집체와 달리 길다란 섬유모양을 갖는 것을 확인하였으며, 그 크기는 폭이 50 내지 200 nm, 길이가 약 6 내지 10 μm 였다. 한편, 상기 섬유모양의 알부민 다량체는 고농도 예컨대 500 mM 농도의 NaCl을 처리하였을 때 저분자량의 올리고머(oligomer) 또는 단량체(monomer)로 분해되는 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명에 따른 방법에 의해 용액환경을 조절함으로써 알부민 다량체를 생성하거나 생성된 다량체를 단량체로 분해시키는 것이 가능함을 확인하였다.

[0068] 이어서, 830 nm 파장에서 작동하며 온도조절기를 구비한 Viscotech 802 DLS(Viscotech, U.K.)와 256-채널 멀티타우 상관기(256-channel multi tau correlator)를 이용하여 20℃에서 동적광산란(Dynamic Light Scattering) 측정을 수행하였다. NO를 처리한 단백질(알부민:NO의 결합비=10:1)을 포함하는 PBS 용액을 100, 200, 225, 250, 300, 400 또는 500 mM NaCl 및 50 mM Tris을 포함하는 pH 7.0의 용액으로 추가적으로 희석하였다. 상기 제조한 각각의 시료를 20 ml씩 마이크로셀에 주입하였다. 입자의 이동확산계수(translation diffusion coefficient)는 제조업자로부터 제공되는 Omnisize 3.0 소프트웨어를 이용하여 계산하였다. 용매의 굴절률 또는 점도 변화는 고려하지 않았다. 굴절률 및 점도값은 PBS에 대한 값을 사용하였다.

[0069] 상기 동적광산란 실험은 NO 처리에 의해 형성된 섬유모양의 알부민 다량체가 저분자량을 갖는 올리고머 또는 단량체로 분해되는 경향을 이해하기 위하여 수행하였다. 10 μM 알부민을 1 μM NO(pH 7.0)과 반응시킨 혼합물의 경우, 100 내지 200 mM NaCl 용액을 처리하였을 때, 약 10%의 고분자량을 갖는 다량체가 용액 내에 존재함을 확인하였다. 이들의 저분자량화 경향을 연구하기 위하여 이온세기를 점차적으로 증가시키면서 측정을 계속하였다. 그 결과 200 mM NaCl 용액에서 저분자화가 진행되며 250 mM 이상으로 이온 세기가 높아지면 고분자량의 다량체들이 저분자량을 갖는 올리고머 또는 단량체로 분해됨을 확인하였다. 특히 225 내지 250 mM 농도의 NaCl로 처리 시 저분자량화가 가속화되며 250 mM을 초과하는 농도에서는 완전히 분해됨을 확인하였다.

[0070] 상기 결과는 본 발명에 따른 알부민 다량체는 일반적인 단백질 응집체와는 달리 섬유모양의 일정한 형태를 가지며, 염농도를 조절하여 가역적으로 저분자화할 수 있는 물질임을 시사한다. 또한 상기 알부민 다량체는 처리하는 NO 농도 및/또는 NaCl 농도를 조절함으로써 다량체화 및/또는 저분자화 정도를 조절할 수 있음을 확인하였다.

[0071] 실시예 6: 알부민 다량체의 산소포집능

[0072] 본 발명의 제조방법에 따라 NO 처리에 의해 생성된 알부민 다량체의 특성변화를 확인하고 산소전달체로서의 활용가능성을 확인하기 위하여 상기 알부민 다량체의 산소포집능을 확인하였다.

[0073] 시료로는 인간혈청알부민 주사제(SK)를 0.3 M PBS(pH 7.4)를 이용하여 1 중량% 농도로 희석한 알부민 용액을 사용하였다. 상기 1 중량% 인간혈청알부민 용액과 상기 용액에 18.5 μM 또는 37.5 μM 농도로 처리하여 제조한 알부민 다량체 용액에 NaCl을 첨가하여 저분자화 시키면서 방출되는 산소의 양을 측정하였다. 상기 산소량의 측정은 실험실에서 자체 제작한 클락타입(Clark-type) 전류측정용 센서를 이용하여 수행하였으며, 실험에 앞서 산소가 제거된 PBS 용액에 산소로 포화된 PBS 용액을 첨가하면서 증가하는 산소량을 측정하여 보정곡선을 얻고 상기 보정곡선을 이용하여 인간혈청알부민 시료에 대해 측정된 전류값을 용존산소분압으로 환산하였다.

[0074] 음성대조군으로는 PBS 용액에 NaCl 농도가 50, 150, 300 및 500 mM이 되도록 NaCl 용액을 첨가하면서 측정된 용존산소분압을 이용하였다. 그 결과를 도 8(a)에 나타내었다. 도면상의 수직으로 표시된 화살표는 NaCl을 첨가한 시점을 나타내며, 좌로부터 각각 50, 150, 300 및 500 mM로 NaCl 농도를 계단식으로 증가시켰다. 용액에서 NaCl의 농도가 증가함에 따라 산소의 용해도가 감소하면서 용액 중의 산소분압이 감소하는 것을 확인하였다. 도 8(b)에는 NO를 처리하지 않은 1 중량% 인간혈청알부민 용액에 상기한 바와 동일하게 NaCl을 처리하면서 측정된 산소분압을 나타내었다. 상기 음성대조군에서와 마찬가지로 NaCl의 농도가 증가함에 따라 용존산소분압이 감소함을 확인하였다($\Delta pO_2 = -5.77 \text{ mmHg}$).

[0075] 한편, 1 중량% 인간혈청알부민 용액에 NO 용액을 각각 18.5 μM 또는 37.5 μM 농도로 처리하여 제조한 인간혈청알부민 다량체 용액에 상기한 바와 동일하게 NaCl을 처리하여 염농도를 증가시키면서 용존산소분압을 측정하였으며, 그 결과를 각각 도 9(a) 및 9(b)에 나타내었다. 도 9(a) 및 (b) 모두에서 상기 PBS 및 NO를 처리하지 않은 인간혈청알부민 용액에서와는 달리 NaCl의 농도가 증가할수록 산소용해도가 감소함에도 불구하고 측정되는 용존산소분압이 증가하는 것을 확인하였다. 또한 18.5 μM NO로 처리한 경우(도 9(a); $\Delta pO_2 = +4.1 \text{ mmHg}$)보다

37.5 μM NO로 처리한 경우(도 9(b); $\Delta pO_2=+11.9$ mmHg) 즉, 다량체화 정도가 높을수록 산소분압 증가도가 높은 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명에 따른 인간혈청알부민 다량체는 단량체(도 8(b); $\Delta pO_2=-5.77$ mmHg)에 비해 높은 산소포집능을 가지고 주변 염농도에 따라 저분자화하면서 보유한 산소를 효율적으로 방출하므로 산소전달체로 유용하게 활용될 수 있음을 확인하였다.

[0076] 또한 상기 혈장유래의 천연상태의 인간혈청알부민뿐만 아니라, 재조합 인간혈청알부민도 동일한 효과를 나타내는지 확인하기 위하여 1 중량%의 재조합 인간혈청알부민 용액을 시료로 이용하여 상기한 바와 동일한 방법으로 실험하였으며, 그 결과를 도 10에 나타내었다. 이에 따라, 재조합 인간혈청알부민 역시 NO를 처리하지 않은 경우에는 NaCl의 농도가 증가함에 따라 산소분압이 감소하는 반면, 18.5 μM (도 10(a); $\Delta pO_2=+26.8$ mmHg) 또는 37.5 μM (도 10(b); $\Delta pO_2=+26.2$ mmHg) 농도의 NO로 처리한 경우 혈장유래 인간혈청알부민에서와 동일하게 NaCl의 농도가 증가함에 따라 산소분압이 증가하는 것으로 나타났다. 상기 모든 실험은 2회 반복하여 수행하였으며, 이를 평균하여 하기 표 1에 요약하였다.

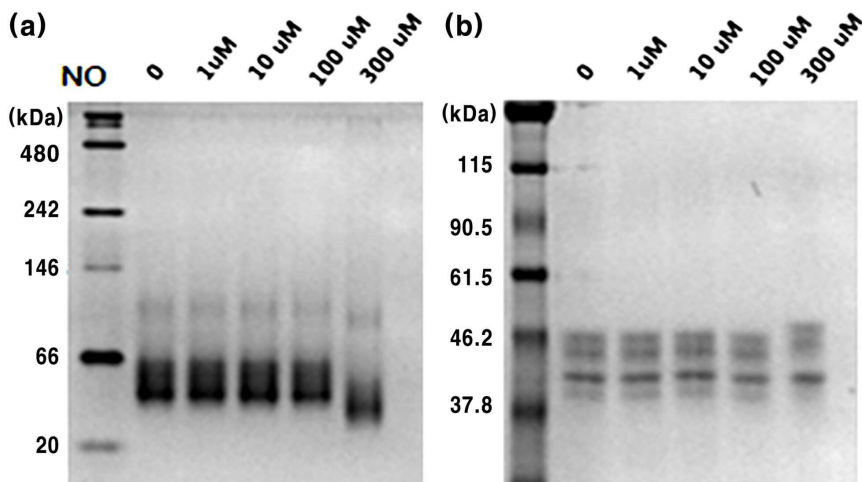
표 1

처리한 NO 용액 농도	용존산소분압 변화량(ΔpO_2 / mmHg)		
	PBS	1 중량% 혈장유래 HSA	1 중량% rHSA
0 μM	-18.39	-14.79	-6.41
18.5 μM	-9.7	4.1	15.35
37.5 μM	-10.1	6.2	8.85

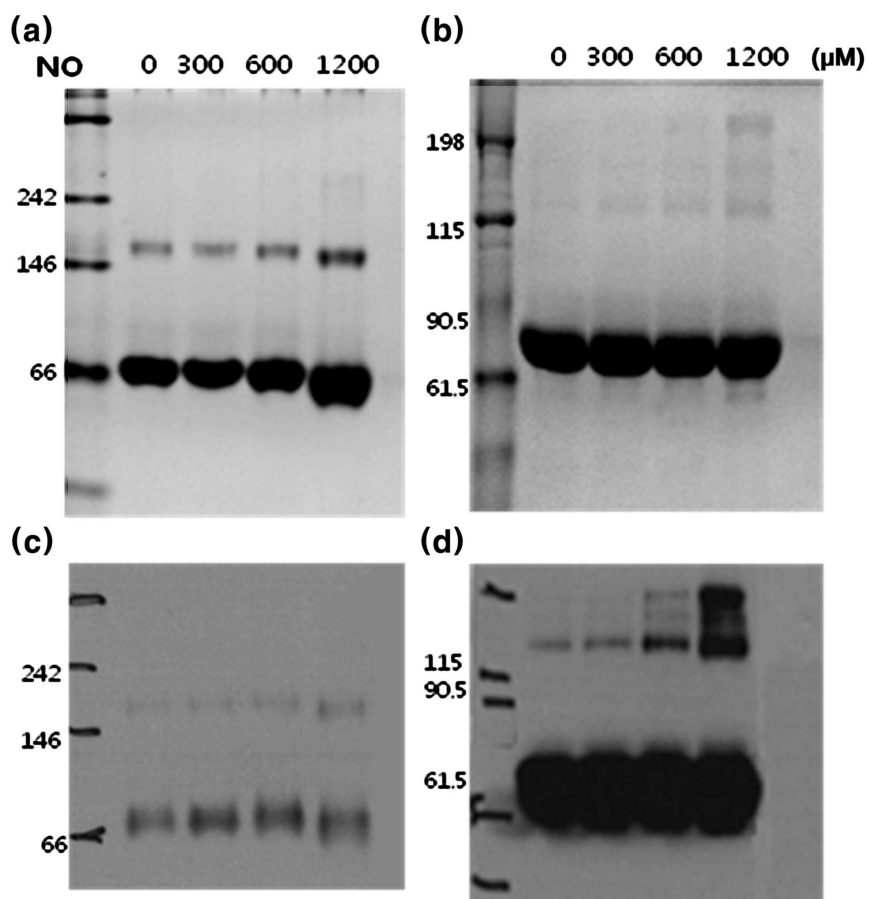
[0078] 상기 실시예 4 및 실시예 6에 나타난 결과를 종합하면, 본 발명에 따른 알부민 다량체는 산소를 함유하고 있으며, 주위환경변화에 따라 이를 방출할 수 있으므로, 산소전달체로 유용하게 사용될 수 있음을 시사한다. 구체적으로, NO 기체를 추가로 주입하는 경우 상기 NO 분자가 알부민 다량체에 함유된 산소분자를 치환하여 산소분자를 방출할 수 있으며, 고농도의 염용액을 처리하여 알부민 다량체를 저분자화함으로써 상기 다량체가 함유하고 있던 산소분자를 방출할 수 있음을 확인하였다.

도면

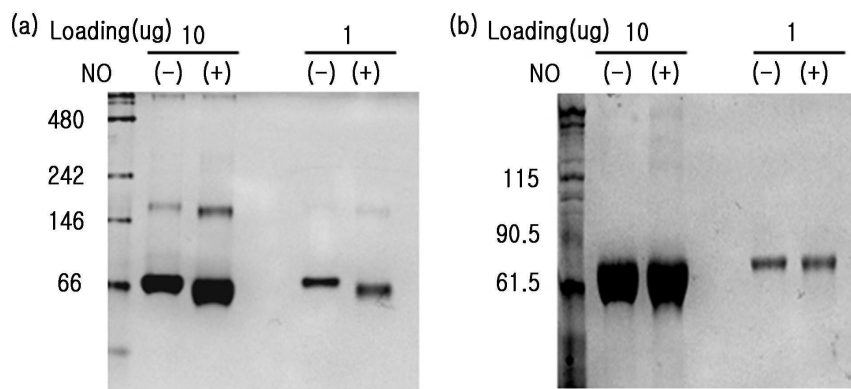
도면1



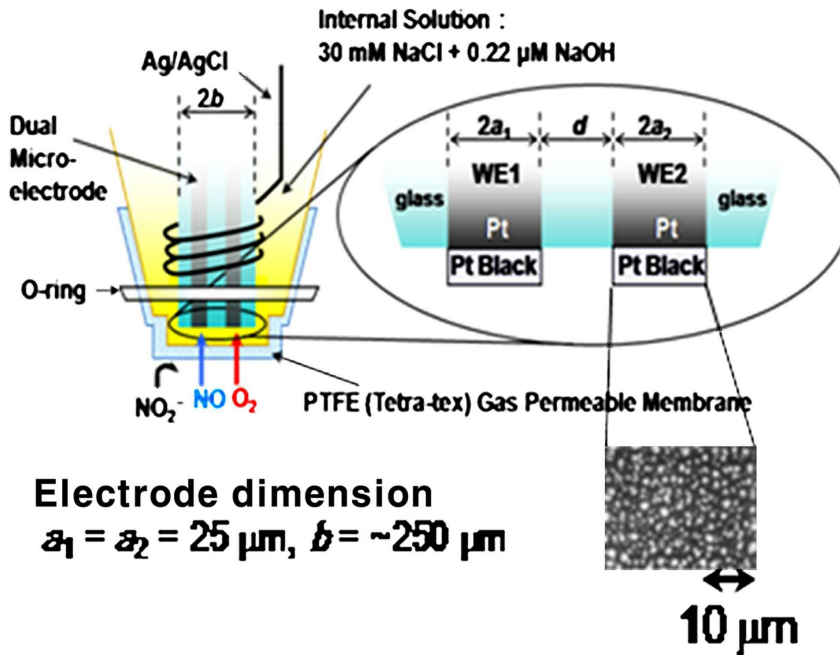
도면2



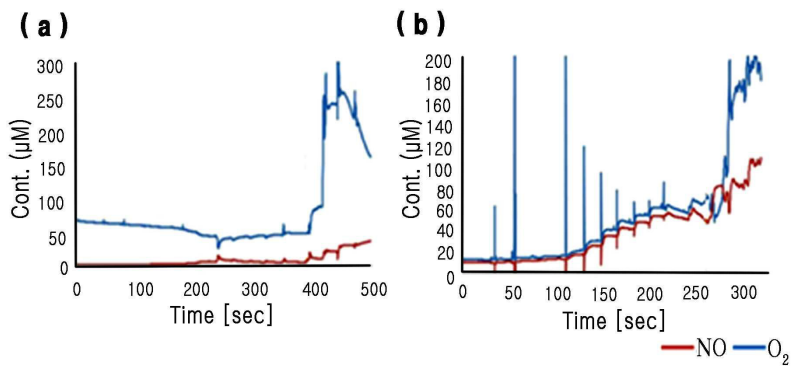
도면3



도면4

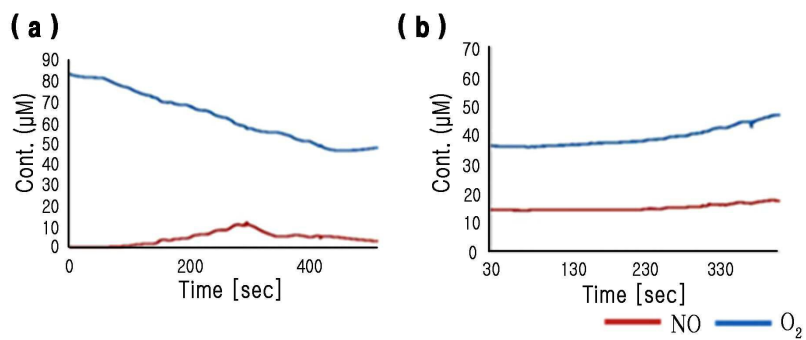


도면5



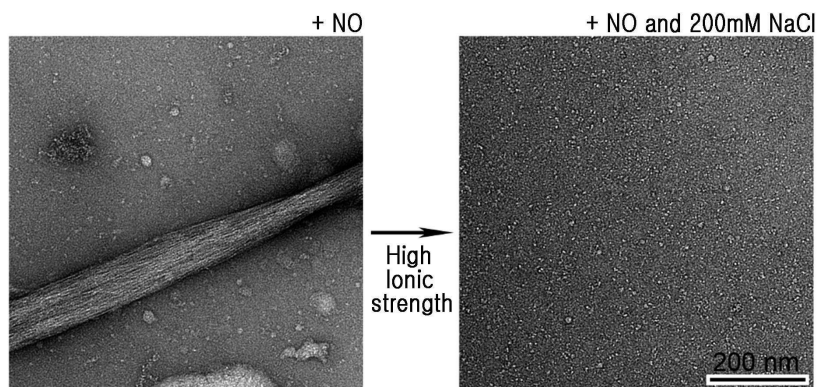
	산소방출량 (μM)	산소 Base Level (μM)	산소 Base Level 차이 (μM)
오브알부민	-16.5	62.8	50.46
NO 처리 오브알부민	57.2	12.34	

도면6



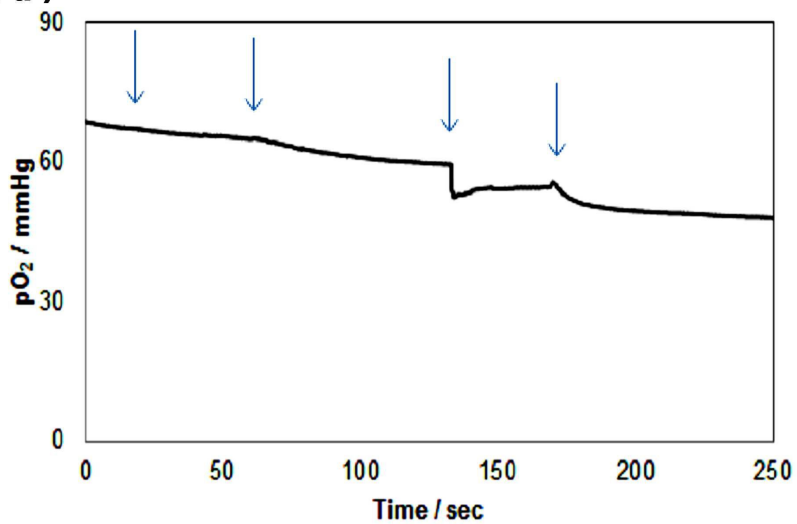
	산소방출량 (μM)	산소 Base Level (μM)	산소 Base Level 차이 (μM)
인간혈청알부민	-19.79	85	47
NO 처리 인간혈청알부민	12	38	

도면7

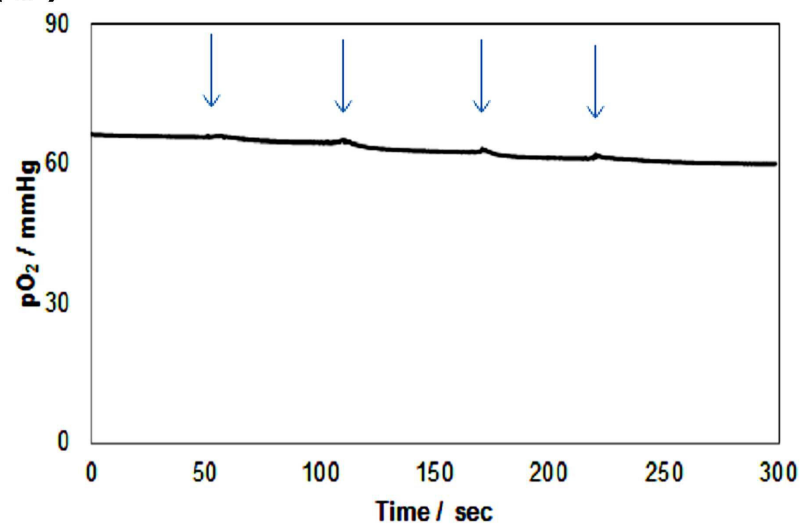


도면8

(a)

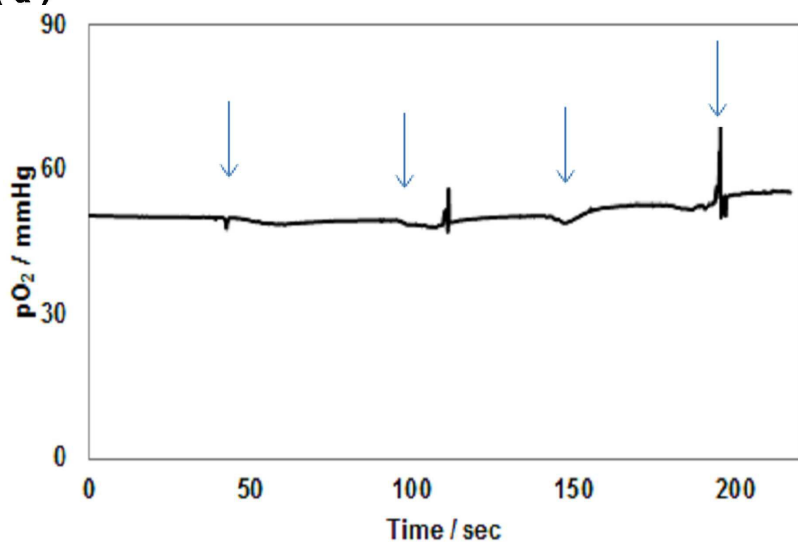


(b)

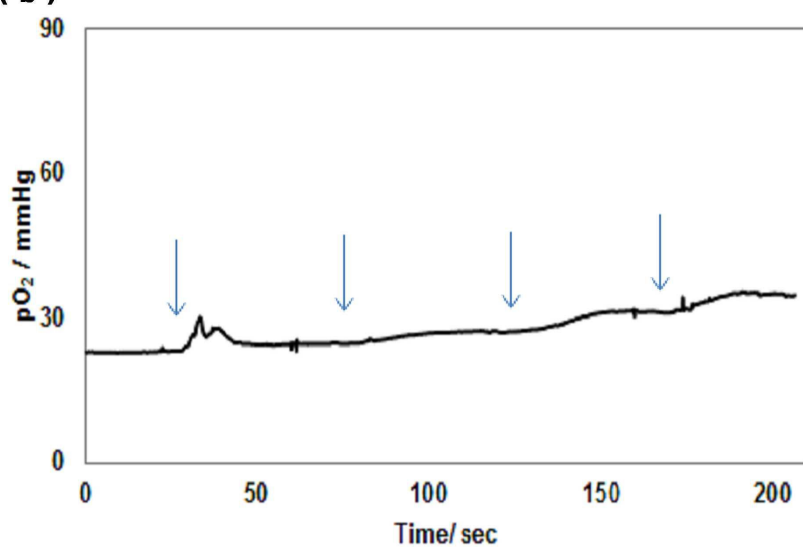


도면9

(a)

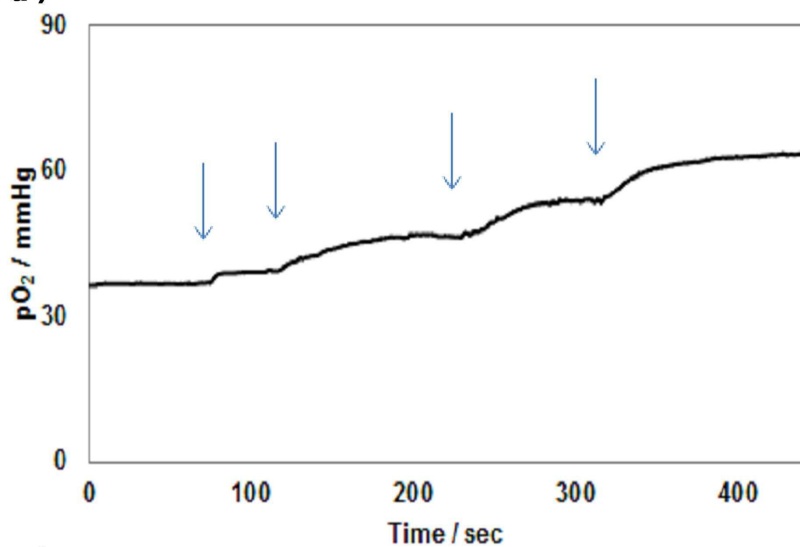


(b)



도면10

(a)



(b)

