



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0128213
(43) 공개일자 2016년11월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 21/552 (2014.01) G01N 21/47 (2006.01)
G01N 21/55 (2014.01) G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 21/554 (2013.01)
G01N 21/47 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0044107
(22) 출원일자 2016년04월11일
심사청구일자 2016년04월11일
(30) 우선권주장
1020150059720 2015년04월28일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
심상준
서울특별시 강남구 선릉로 221 301 - 803(도곡동, 도곡렉슬아파트)
송소진
서울특별시 서초구 현릉로8길 58 103동 603호(내곡동, 서초더샵포레스타)
(74) 대리인
정은열

전체 청구항 수 : 총 10 항

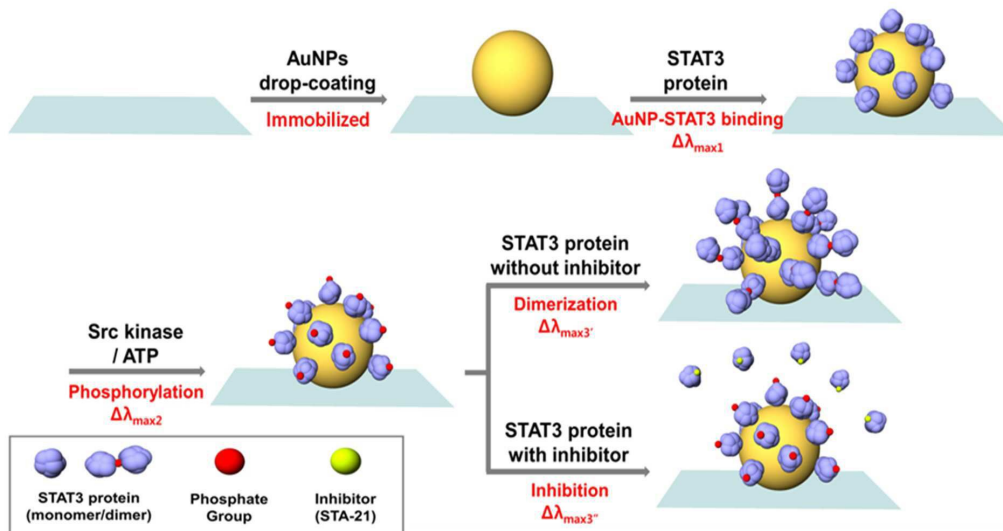
(54) 발명의 명칭 국소 표면 플라즈몬 공명 현상을 이용한 항암 후보약물의 탐색방법

(57) 요약

본 발명은 항암 후보약물의 탐색방법에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로는, 기관 상에 금 나노입자를 고정하는 단계; 상기 기관 상의 금 나노입자에 암 발생 및 전이에 관여하는 단백질을 결합시킨 후 스펙트럼을 분석하여 기준 데이터를 얻는 단계; 상기 기관 상의 금 나노입자에 암 발생 및 전이에 관여하는 단백질을 결합시킨 후, 상기 단백질의 활성을 저해하는 후보물질을 가해준 후 스펙트럼을 분석하여 비교 데이터를 얻는 단계; 및 상기 기준 데이터와 상기 비교 데이터를 분석함으로써 상기 후보물질이 상기 단백질의 활성에 대한 저해물질인지를 판독하는 단계를 포함하는 항암 후보약물의 탐색방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 암 발생 및 전이에 관여하는 소정 단백질에 대한 활성 저해 후보물질을 정확하고 간편하게 탐색해낼 수 있다.

대표도 - 도3a



(52) CPC특허분류

G01N 33/5008 (2013.01)

G01N 33/68 (2013.01)

G01N 2021/556 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2013R1A2A1A01015644
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	도약연구지원사업 (도전)
연구과제명	생물공정의 실시간 고속 모니터링을 위한 나노 플라즈몬 검지 플랫폼 기술 개발
기 여 율	60/100
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2015.06.01 ~ 2016.05.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2014M1A8A1049278
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	(재)한국이산화탄소포집및처리연구개발센터
연구사업명	거대과학연구개발사업(Korea CCS 2020사업)
연구과제명	생물학적 이산화탄소 고속전환 유기 자원화 기술
기 여 율	30/100
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2015.06.01 ~ 2016.05.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2015048709
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	이공학분야지원사업
연구과제명	진단/치료용 고분자 소재 연구센터
기 여 율	10/100
주관기관	성균관대학교 산학협력단
연구기간	2015.09.01 ~ 2016.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

기관 상에 금 나노입자를 고정하는 단계;

상기 기관 상의 금 나노입자에 암 발생 및 전이에 관여하는 단백질을 결합시킨 후 스펙트럼을 분석하여 기준 데이터를 얻는 단계;

상기 기관 상의 금 나노입자에 암 발생 및 전이에 관여하는 단백질을 결합시킨 후, 상기 단백질의 활성을 저해하는 후보물질을 가해준 후 스펙트럼을 분석하여 비교 데이터를 얻는 단계; 및

상기 기준 데이터와 상기 비교 데이터를 분석함으로써 상기 후보물질이 상기 단백질의 활성화에 대한 저해물질인지를 판독하는 단계

를 포함하는 항암 후보약물의 탐색방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 암 발생 및 전이에 관여하는 단백질은 면역신호전달에 관여하는 단백질인 것을 특징으로 하는 항암 후보약물의 탐색방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 암 발생 및 전이에 관여하는 단백질은 STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b 및 STAT6로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질인 것을 특징으로 하는 항암 후보약물의 탐색방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 암 발생 및 전이에 관여하는 단백질은 STAT3 단백질인 것을 특징으로 하는 항암 후보약물의 탐색방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 스펙트럼 분석은 상기 금 나노입자들에 대한 Rayleigh 광산란 스펙트럼을 암계 미세스펙트로스코피에 의해서 측정함으로써 수행되는 것을 특징으로 하는 항암 후보약물의 탐색방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 스펙트럼 분석은 국소 표면 플라즈몬 공명 현상 (Localized Surface Plasmon Resonance, LSPR)에 따른 $\Delta \lambda_{\max}$ 시프트값을 측정함으로써 수행되는 것을 특징으로 하는 항암 후보약물의 탐색방법.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 단백질의 활성을 저해하는 후보물질을 가해줌으로써, 상기 STAT3 단백질의 인산화, 다이머화 및 상기 기관 상의 금 나노입자와의 결합 양상이 달라지는 것을 특징으로 하는 항암 후보약물의 탐색방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 금 나노입자는 아민-개질된 구형의 금 나노입자인 것을 특징으로 하는 항암 후보약물의 탐색방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 아민-개질된 구형의 금 나노입자는 2-아미노에탄티올의 존재 하에서 수성 HAuCl_4 용액의 소듐 보로하이드라이드 환원을 통해서 제조되는 것을 특징으로 하는 항암 후보약물의 탐색방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 기관 상에 상기 아민-개질된 구형의 금 나노입자를 고정하는 단계는, 상기 아민-개질된 구형의 금 나노입자의 용액을 글루타르알데히드가 코팅된 커버슬립 슬라이드 상에 적가함으로써 수행되는 것을 특징으로 하는 항암 후보약물의 탐색방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항암 후보약물의 탐색방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 국소 표면 플라즈몬 공명 (Localized Surface Plasmon Resonance: LSPR) 방법은 복잡한 사전 정제 및 표지화 공정 없이 정량적으로 반응을 감지할 수 있기 때문에, 표면에 고정된 생체분자 사이의 상호작용에 관한 많은 연구에서 다양하게 사용되어 오고 있다. LSPR 방법은 금속 나노입자와 같이 국소적인 표면이 존재하는 재료에 다양한 파장을 갖는 빛을 조사하면 벌크 금속과는 달리 금속 나노입자 표면에 분극이 발생하게 되고 전기장의 강도를 증대하는 특이한 성질을 보인다. 이러한 LSPR 방법의 광학적 특성은 나노입자 근처에서 발생하는 유전율 (굴절율) 변화에 민감하게 응답하므로, 이러한 유전율 (굴절율) 변화를 이용하여 생체분자 사이의 흡착을 검출할 수 있게 된다.

[0003] 한편, STAT3 단백질은 인간의 세포에서 여러 유전자의 전사에 관여하는 전사조절 인자이다. 정상적인 경우, 외부로부터 사이토카인이나 성장 인자들에 의한 신호전달에 반응하여, 세포질에 존재하던 STAT3는 핵 안으로 이동하여 세포의 발달, 분화, 성장, 생존, 신생혈관 합성 그리고 면역기능 등을 위한 유전자들을 조절한다. 또한, STAT3 단백질은 다양한 경로를 통하여 지속적으로 활성화됨으로써 종양 형성을 촉진할 수도 있는 것으로 알려져 있으며, 암 발생과 전이에 있어서의 STAT3 단백질의 기능에 대한 연구들에서 STAT3 단백질이 과잉 활성화되어 있고, 암 신생혈관 형성, 전이와도 밀접한 관련이 있는 것으로 규명되고 있다. 이외에도, STAT3는 암의 성장, 항-세포자살, 침윤 종양 미세환경에서의 항암제 내성, 면역회피 등을 포함하여 종양의 개시, 발달, 진행에 중심적인 역할을 하는 것으로 알려져 있고, 지속적인 STAT3의 활성화는 넓은 범위에서의 인간 종양과 밀접한 관계가 있다 따라서, STAT3는 종양을 예방하고 치료하기 위한 새로운 타겟으로 대두되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 따라서, 본 발명에서는, 금 나노입자를 기반으로 한 나노플라즈모닉 바이오센서를 사용하여 STAT3 신호전달 경로를 구현하는 플랫폼을 구축함으로써, 구축된 플랫폼을 STAT3 인산화 및 다이머화를 저해하는 저해제를 탐색하는 플랫폼으로 활용하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0005] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위해서,

[0006] 기관 상에 금 나노입자를 고정하는 단계;

[0007] 상기 기관 상의 금 나노입자에 암 발생 및 전이에 관여하는 단백질을 결합시킨 후 스펙트럼을 분석하여 기준 데이터를 얻는 단계;

[0008] 상기 기관 상의 금 나노입자에 암 발생 및 전이에 관여하는 단백질을 결합시킨 후, 상기 단백질의 활성을 저해하는 후보물질들을 가해준 후 스펙트럼을 분석하여 비교 데이터를 얻는 단계; 및

[0009] 상기 기준 데이터와 상기 비교 데이터를 분석함으로써 상기 후보물질이 상기 단백질의 활성화에 대한 저해물질인지를 판독하는 단계

[0010] 를 포함하는 항암 후보물질의 탐색방법을 제공한다.

[0011] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 암 발생 및 전이에 관여하는 단백질은 면역신호전달에 관여하는 단백질일

수 있다.

- [0012] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 암 발생 및 전이에 관여하는 단백질은 STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b 및 STAT6로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질일 수 있다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 상기 암 발생 및 전이에 관여하는 단백질은 STAT3 단백질일 수 있다.
- [0014] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 스펙트럼 분석은 상기 금 나노입자들에 대한 Rayleigh 광산란 스펙트럼을 암계 미세스펙트로스코피에 의해서 측정함으로써 수행될 수 있다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 상기 스펙트럼 분석은 국소 표면 플라즈몬 공명 현상 (Localized Surface Plasmon Resonance, LSPR)에 따른 $\Delta \lambda_{\max}$ 시프트값을 측정함으로써 수행될 수 있다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 상기 단백질의 활성을 저해하는 후보물질을 가해줌으로써, 상기 STAT3 단백질의 인산화, 다이머화 및 상기 기관 상의 금 나노입자와의 결합 양상이 달라질 수 있다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 상기 금 나노입자는 아민-개질된 구형의 금 나노입자일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 상기 아민-개질된 구형의 금 나노입자는 2-아미노에탄티올의 존재 하에서 수성 HAuCl_4 용액의 소듐 보로하이드라이드 환원을 통해서 제조될 수 있다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 상기 기관 상에 상기 아민-개질된 구형의 금 나노입자를 고정하는 단계는, 상기 아민-개질된 구형의 금 나노입자의 용액을 글루타르알데히드가 코팅된 커버슬립 슬라이드 상에 적가함으로써 수행될 수 있다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명에 따르면, 암 발생 및 전이에 관여하는 소정 단백질에 대한 활성 저해 후보물질을 정확하고 간편하게 탐색해낼 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 금 나노입자의 합성을 설명한 것으로서,
- 도 1a는 아민-개질된 금 나노입자의 합성 개요에 관한 도면이고,
- 도 1b는 ~50 nm의 구형 금 나노입자 (AuNPs)에 대한 HRTEM 영상 (좌측) 및 HRSEM 영상 (우측)을 도시한 것이며,
- 도 1c는 아민-개질된 금 나노입자들에 대한 암계 영상을 1000 X로 관찰한 도면이고,
- 도 1d는 STAT3 신호전달 경로를 확인하기 위해서 사용된 UVVis 흡수 스펙트럼이며 (도면에서, 점선 박스 내의 화살표들은, 각각 AuNPs (흑색, 534 nm), STAT3 단백질-AuNPs (청색, 541.5 nm) 및 STAT3 단백질-AuNPs의 다이머화 (적색, 543.5 nm)의 흡수 피크들을 나타낸 것이다),
- 도 1e는 단일 AuNP-STAT3 단백질 결합 단계에서, 다양한 농도들에서의 LSPR 시프트를 도시한 도면이다.
- 도 2는 본 발명에 있어서, 아민-개질된 금 나노입자들이 글루타르알데히드 코팅된 커버슬립 슬라이드에 고정되고, 이어서 STAT3 단백질과 접합되는 과정을 개략적으로 설명한 도면이다.
- 도 3은 단일 나노플라스믹 바이오센서의 제작 과정을 개략적으로 설명한 도면으로서,
- 도 3a는 STAT3 신호전달 경로를 추적하고, STAT3 단백질의 억제를 추적하는 실험적 과정을 개략적으로 도시한 도면이고,
- 도 3b는 암계 현미경을 사용한 시스템 셋업을 개략적으로 도시한 도면이다.
- 도 4는 STAT3 신호전달 경로 및 나노센서 표면에서의 STAT3 다이머화를 분석한 도면으로서,
- 도 4a는 STAT3 다이머화 단계에 있어서, 다양한 STAT3 단백질의 농도에서의 LSPR 시프트를 도시한 도면이고,
- 도 4b는 STAT3 다이머화의 억제에 있어서, 다양한 억제제 (STA-21) 농도에서의 LSPR 시프트를 도시한 도면이며,
- 도 4c는 제조한 STAT3 단백질 및 실제 샘플을 사용한 경우에, 인산화, 다이머화 및 STAT3 다이머화의 억제를 포

합하는 STAT3 신호전달 경로에서 나노플라즈믹 (LSPR $\lambda_{\max}$) 시프트들을 도시한 도면이다 (삽입도면: 제조합 STAT3 단백질을 사용한 경우, 인산화 및 다이머화에 따른 STAT3 신호전달 경로의 대표 Rayleigh 광산란 스펙트럼).

도 5는 생화학적 분석 결과를 도시한 도면으로서,

도 5a는 STAT3 단백질의 천연 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (Native PAGE) 결과를 도시한 도면이고,

도 5b는 MCF-7 세포 용해물 중 STAT3 단백질의 농도를 측정된 결과를 도시한 도면으로서, STA-21로 미처리한 MCF-7으로부터 추출한 STAT3 단백질 (좌측 컬럼) 및 STA-21로 처리한 MCF-7으로부터 추출한 STAT3 단백질 (우측 컬럼)에 대한 결과를 도시한 도면이다.

도 6은 STAT3 단백질의 인산화 및 다이머화에 대한 비특이적 결합 분석 결과를 도시한 도면이다.

도 7은 제조합 STAT3 단백질을 사용한 경우에, 인산화, 다이머화 및 STAT3 인산화 억제제를 포함하는 STAT3 신호전달 경로에서 나노플라즈믹 (LSPR $\lambda_{\max}$) 시프트들을 도시한 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다.
- [0023] 본 발명에서는, 금 나노입자를 기반으로 한 나노플라즈모닉 바이오센서를 이용해서 암 발생 및 전이에 핵심적인 역할을 담당하는 단백질의 신호전달 경로를 구현하였으며, 상기 단백질에 대한 기존에 알려진 억제물질을 사용하여 성공적인 신호전달 경로 구현 여부를 확인하였다. 더 나아가, 이와 같이 구현된 플랫폼을 사용하여 상기 단백질에 대한 다수의 억제 후보물질로부터 항암 후보약물 대상이 되는 물질을 성공적으로 탐색해 내었다.
- [0024] 따라서, 본 발명에서는,
- [0025] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위해서,
- [0026] 기관 상에 금 나노입자를 고정하는 단계;
- [0027] 상기 기관 상의 금 나노입자에 암 발생 및 전이에 관여하는 단백질을 결합시킨 후 스펙트럼을 분석하여 기준 데이터를 얻는 단계;
- [0028] 상기 기관 상의 금 나노입자에 암 발생 및 전이에 관여하는 단백질을 결합시킨 후, 상기 단백질의 활성을 저해하는 후보물질을 가해준 후 스펙트럼을 분석하여 비교 데이터를 얻는 단계; 및
- [0029] 상기 기준 데이터와 상기 비교 데이터를 분석함으로써 상기 후보물질이 상기 단백질의 활성에 대한 저해물질인지를 판독하는 단계
- [0030] 를 포함하는 항암 후보약물의 탐색방법을 제공한다.
- [0031] 따라서, 본 발명에서는 금 나노입자가 고정된 기관을 사용하여 나노바이오센서를 제작하고, 특정 후보물질이 존재하지 않는 경우 상기 나노바이오센서와 분석 대상이 되는 단백질과의 결합, 또한 특정 후보물질이 존재하는 경우 상기 나노바이오센서와 분석 대상이 되는 단백질과의 결합 양상을 스펙트럼을 사용하여 분석함으로써, 결론적으로 상기 후보물질이 상기 분석 대상이 되는 단백질의 활성을 저해하는 물질인지 여부를 판독하게 되는 것이다.
- [0032] 본 발명에 따른 방법에서는 기관 상에 금 나노입자를 고정하는 단계를 수행함으로써 분석대상이 되는 암 발생 및 전이에 관여하는 단백질을 고정시킬 나노센서를 제작하게 된다. 이때, 상기 금 나노입자는 아민-개질된 구형의 금 나노입자 (AuNPs)이며, 이는, 예를 들어, 2-아미노에탄티올의 존재 하에서 수성 H₂AuCl₄ 용액의 소듐 보로하이드라이드 환원을 통해서 제조될 수 있다. 또한, 이와 같이 제조된 AuNPs 용액을 커버슬립 슬라이드 등에 서서히 적가함으로써, 나노센서인 금 나노입자가 코팅된 기관을 제조할 수 있게 되는 바, 예를 들어, 상기 아민-개질된 구형의 금 나노입자의 용액을 글루타르알데히드가 코팅된 커버슬립 슬라이드 상에 적가함으로써 제조할 수 있게 된다.
- [0033] 다음으로는, 항암 후보약물의 타겟이 될 단백질을 상기 기관 상의 금 나노입자에 결합시키고 스펙트럼 분석을 수행하여 기준 데이터를 얻게 된다. 한편, 하기 실시예에서는 상기 타겟이 될 암 발생 및 전이에 관여하는 단백질로서, STAT3 단백질만을 예로 들어 설명하였지만, 금 나노입자에의 부착 및 광조사에 이은 스펙트럼 분석이

가능한 단백질이라면 본 발명에 따른 방법에 적용이 가능하다. 예를 들어, 이에 제한되는 것은 아니지만, 본 발명에 따른 방법이 적용가능한 타겟 단백질들로서는, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b 및 STAT6로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질을 고려해 볼 수 있다. 한편, 후보약물을 첨가해주지 않은 상태에서 얻어진 데이터는 기준 데이터로서 후속 단계에서 후보약물을 첨가해준 다음 얻어지는 비교 데이터와의 상호 비교를 위한 것이다.

[0034] 이어서, 상기 기관 상의 금 나노입자에 암 발생 및 전이에 관여하는 단백질을 결합시킨 후, 상기 단백질의 활성을 저해하는 후보물질을 가해준 후 스펙트럼을 분석하여 비교 데이터를 얻게 되고, 상기 기준 데이터와 상기 비교 데이터와의 상호 비교를 통해서 상기 후보물질이 타겟 단백질에 대한 항암 작용을 갖는지 분석할 수 있게 되는 것이다.

[0035] 상기 스펙트럼 분석은, 상기 금 나노입자들에 대한 Rayleigh 광산란 스펙트럼을 암계 미세스펙트로스코피에 의해서 측정함으로써 수행될 수 있으며, 특히 국소 표면 플라즈몬 공명 현상 (Localized Surface Plasmon Resonance, LSPR)에 따른 $\Delta \lambda_{\max}$ 시프트값을 측정함으로써 수행될 수 있다.

[0036] 예를 들어, 상기 암발생 및 전이에 관여하는 단백질이 STAT3 단백질인 경우, 이러한 STAT3 단백질은 그 인산화 여부 및 다이머화 여부에 따라서 상기 기관 상의 금 나노입자와의 결합 양상이 달라지게 되고, 이는 LSPR $\Delta \lambda_{\max}$ 수치의 변화를 초래하게 된다.

[0037] 본 발명에 따른 항암 후보약물의 탐색 방법은 그 민감도가 매우 우수하고, 형광 화합물과 같은 별도의 표지물질을 필요로 하지 않는다. 또한, 소정 후보 물질이 첨가되는 경우의 LSPR $\Delta \lambda_{\max}$ 시프트 수치를 간단히 측정함으로써, 해당 후보 물질이 상기 암 발생 및 전이에 관여하는 단백질에 미치는 영향을 분석할 수 있게 된다. 따라서, 본 발명에 따른 방법은, 항암 후보 물질을 정확하고 효과적으로 약물 스크리닝할 수 있는 강력한 수단이 될 수 있다.

[0038] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 하되, 하기 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

[0039] 1. 재료 및 방법

[0040] 1.1 재료

[0041] N-히드록시숙신이미드 (NHS), N-에틸-N-(다이에틸아미노프로필)카르보다이이미드 (EDC), 2-아미노에탄올, 소듐 보로하이드라이드, 금 (III) 클로라이드 트리하이드레이트 (99.0%), 글루타르알데히드 용액, 다이메틸 설펝사이드 (DMSO), STAT3 인간 재조합체, STAT1 인간 재조합체, 쿠마시 브릴리언트 블루 G 용액 및 ColorBurstTM 전기영동 마커는 Sigma Aldrich (Korea)로부터 구입하였다. 활성 인간 Src 전장 단백질, STAT3 (pY705) ELISA 키트는 Abcam으로부터 구입하였다. ATP 용액 (100 mM)은 Thermo ScientificTM으로부터 구입하였다. STA21은 Santa Cruz Biotechnology로부터 구입하였다. 정제된 BSA 100 X는 New England Biolabs로부터 구입하였다. 뉴클레아제가 존재하지 않는 물은 Promega Corporation으로부터 구입하였다. 커버 슬립 슬라이드 (22×40×0.1mm)는 Deckglaser (Germany)로부터 구입하였다. 모든 화학 용액의 제조에는 초순수 (18.2 mΩcm⁻¹)를 사용하였다.

[0042] 1.2 금 나노입자의 합성

[0043] 종래 문헌 (Y. Jv, B. Li and R. Cao, Chem. Commun., 2010, 46, 80178019)에 서술된 바에 따라서, 2-아미노에탄티올의 존재 하에서 수성 H₂AuCl₄ 용액의 소듐 보로하이드라이드 환원을 통해서 아민-개질된 구형의 금 나노입자 (AuNPs)를 합성하였다. 유리 바이알을 왕수 (aqua regia) (3:1 HNO₃/HCl)로 세척하고, 초순수 (18.2 mΩcm⁻¹)로 린스하였다. 다음으로, 20 mL의 0.36 mM H₂AuCl₄ 및 42.5 μL의 213 mM 2-아미노에탄티올을 혼합하고, 실온에서 격렬하게 교반하였다. 20 분 경과 후에, 1.05 μL의 8 mM 소듐보로하이드라이드를 첨가하고 16 시간 동안 격렬하게 교반하였다. 현탁액을 0.22 μm의 필터를 사용하여 여과함으로써, 응집된 입자들을 제거하였다. 금 용액의 UV-vis 흡수 스펙트럼을 lifescience UV-Vis spectrophotometer (DUR730, Beckman)를 사용하여 기록하였다. 합성된 금 나노입자들의 크기 및 모폴로지를 고해상도 투과 전자 현미경 (HRTEM, JEOL JEM-3011 operated at 300 kV)을 사용하여 관찰하였다.

[0044] 1.3 단일 나노플라즈믹 바이오센서 (nanoplasmic biosensor)의 제작

[0045] 10 μL 의 희석 아민-개질된 AuNP 용액을 적가함으로써, 개별적인 아민-개질된 AuNPs로서, $\sim 50\text{ nm}$ AuNPs를 글루타르알데히드 코팅된 커버슬립 슬라이드 ($22 \times 40 \times 0.1\text{ mm}$) 상에 고정하였다 (도 2 참조). 상기 유리 슬라이드를 RC30HV 폐쇄조 영상화 챔버 (Warner Instruments, USA)에 탑재함으로써, 흡착물 및 반응물 첨가 이후의 AuNPs를 가시화하였다. 이어서, 상기 영상화 챔버 (Warner Instruments, USA)를 암계 현미경 (Eclipse TE2000U, Nikon, Japan)의 고정기 상에 삽입하고, 주사기 펌프 (Harvard Apparatus)에 연결함으로써 유체 흐름을 $100\text{ }\mu\text{L min}^{-1}$ 로 세팅하였다.

[0046] 다음으로, STAT3의 인산화 및 다이머화는 하기와 같이 수행하였다. 첫 번째 단계로서, $\sim 50\text{ nm}$ AuNPs를 커버슬립 슬라이드 상에 고정시킨 이후에, 결합되지 않은 모든 AuNPs 및 오염물질들을 제거하고, 뉴클레아제가 존재하지 않는 물을 1시간 동안 주입함으로써 아민-개질된 AuNPs의 표면을 세척하였다. 두 번째 단계로서, STAT3 단백질이 AuNPs에 접합된 이후에, STAT3 단백질을 함유한 ($10\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) $300\text{ }\mu\text{L}$ 의 STAT3 용액 (50 mM TrisHCl buffer 중 $10\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, pH 7.4, 150 mM NaCl 및 25% 글리세롤을 함유)을 고정된 AuNPs 내로 주입하고 밤새도록 배양하였다. 세 번째 단계인 키나아제 반응에서는, $300\text{ }\mu\text{L}$ 의 Src 키나아제 (1 ng mL^{-1}) 및 ATP 용액 ($200\text{ }\mu\text{M}$)을 영상화 챔버 내로 주입하고, 2 시간 동안 배양하였다. 네 번째 단계인 STAT3 다이머화 반응에서는, STAT3 단백질을 함유한 ($10\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) TrisHCl buffer (pH 7.4), Src 키나아제 (1 ng mL^{-1}) 및 ATP 용액 ($200\text{ }\mu\text{M}$)을 영상화 챔버 내로 주입하고 8 시간 동안 배양하였다. STAT3 단백질의 인산화 억제 효과를 분석하기 위해서, 상기 세 번째 단계를, STAT3 단백질 인산화 소분자 억제제인 S3I-201 ($1\text{ }\mu\text{M}$)의 존재 하에서 수행하였다 (도 7). 또한, STAT3 단백질의 다이머화 반응 억제 효과를 분석하기 위해서, 상기 네 번째 단계를, STAT3 단백질 다이머 형성에 대한 소분자 억제제인 STA21 ($1\text{ }\mu\text{M}$)의 존재 하에서 수행하였다 (도 3a).

[0047] 다이머화 및 다이머화의 억제에 있어서, 재조합 STAT3 단백질 대신에, Michigan Cancer Foundation7 (MCF7) 세포들로부터 추출된 인산화된 STAT3 단백질 ($10\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$)을 사용하여 바이오센서의 성능 분석을 수행하였다.

[0048] 나노센서 표면에 비특이적으로 결합하는 것을 확인하기 위해서, 서로 독립적인 3개의 대조 실험군들을 사용하였다. 대조군 1에서는, 두 번째 단계에서 재조합 STAT3 단백질 대신에 BSA를 사용하였다. 대조군 2에서는, 세 번째 단계에서 ATP를 사용하지 않았다. 대조군 3에서는, 인산화된 STAT3 대신에, 인산화된 STAT1 (STAT1 단백질 ($10\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$), Src 키나아제 ($2\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) 및 ATP 용액 ($200\text{ }\mu\text{M}$)을 함유하는 TrisHCl buffer (pH 7.4)) 및 ATP 용액 ($200\text{ }\mu\text{M}$)을 사용하였다.

[0049] STAT3 단백질 접합, STAT3 인산화, 다이머화 또는 STAT3 다이머화의 억제에 따른 단일 아민-개질된 AuNP의 LSPR 스펙트럼 변화를 기록하였다. λ_{max} 를 결정하기 위해서, OriginPro 8 소프트웨어를 사용하여 Lorentzian 알고리즘을 실험 스펙트럼에 적용하였다. 파장 시프트 ($\Delta\lambda_{\text{max}}$)는 하기 식을 사용하여 계산하였다: $\lambda_{\text{max}}(\text{반응 이후}) - \lambda_{\text{max}}(\text{반응 이전})$.

[0050] 1.4 생화학적 분석

[0051] 1.4.1 네이티브 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (PAGE)

[0052] STAT3 다이머화 및 그 억제는, 6% 천연 겔 상에서, 표준 프로토콜을 사용하여 (Y. Jv, B. Li and R. Cao, Chem. Commun., 2010, 46, 80178019), 천연 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의해서 확인하였다. 다이머화된 샘플들과 다이머화가 억제된 샘플들을 10 Vcm^{-1} 의 전압이 인가된 6% 천연 겔에 로딩하였다.

[0053] 1.4.2 효소-결합 면역흡착 분석법 (ELISA)

[0054] MCF-7 세포 용해물 중에서 STAT3 단백질의 농도를 측정하기 위해서, 각각의 웰 중에서 $50\text{ }\mu\text{L}$ 의 MCF-7 샘플들 또는 표준들 및 항체 각테일을, 실온에서 1 시간 동안 서서히 교반해주며 배양하였다. 이어서, 용액을 폐기하고, 웰들을 buffer로 3회 세척하였다. $100\text{ }\mu\text{L}$ 분획의 TMB 일-단계 기질 시약을 각각의 웰에 첨가하고, 암조건, 플레이트 교반기 상에서, 400 rpm 으로 15 분 동안 배양하였다. 최종적으로, 각각의 웰에 $100\text{ }\mu\text{L}$ 의 정지 용액을 첨가하고, 즉시 450 nm 에서의 흡광도를 측정하였다 (Shimadzu UV3600 UV-vis-NIR).

[0055] 1.5 세포 배양

- [0056] 인간 유방암 세포종인 MCF7 세포들은, 10% (v/v) 우태아 혈청 (FBS, Thermo Scientific, USA) 및 3% 페니실린/스트렙토마이신 (Thermo Scientific, USA)을 함유하는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Thermo Scientific, USA) 중에서, 37° C, 5% CO₂를 함유하는 가습 대기 조건으로 배양하였다. 세포들의 접종원은 혈구계수기 (hematocytometer)를 사용하여 생명 유지 염료인 trypanblue로 측정하였다. 또한, STAT3 신호전달 경로를 차단하기 위한 샘플 제조를 위해서, MCF7 세포들을 STA21 (STAT3 다이머화 억제제)로 처리하고, 24 시간 동안 배양하였다. 이어서, 프로테아제 억제제를 함유하는 차가운 RIPA 용해 버퍼 중에서 용해시킨 다음, 실험에 투입하였다.
- [0057] 2. 결과 및 검토
- [0058] 2.1 센서 제작
- [0059] 센서 제작을 위해서, 아민-개질된 AuNPs (~50 nm)를 합성하였으며 (도 1a), HRTEM 영상 (도 1b), 암계 영상 (도 1c) 및 UV-VIS 스펙트로스코피 (도 1d)에 의해서 분석하였다. 본 발명에 있어서, 상기 아민-개질된 AuNPs는 2-아미노에탄티올을 사용하여 합성하였는 바, 이는 환원제 및 안정화제로서 잘 알려진 화합물이며, 이는 또한 STAT3 단백질 접합을 위한 가교제로서 사용되기도 한다. 2-아미노에탄티올의 티올기 (SH)는 AuNPs의 표면에 결합하였으며, 그 아미노기 (NH₂)는 표면에 노출된 채로 남아 있었다. 아민-개질된 AuNPs는 공유결합에 의해서 글루타르알데히드 코팅된 커버슬립 슬라이드 상에 고정되었다 (도 2). AuNPs가 커버슬립 슬라이드 상에 고정된 후에, STAT3 단백질의 인산화 및 다이머화를 조사하였는 바, 이는 단일 AuNPs의 표면에 의해서 발생된다. 본 실시예에서는 암계 영상을 사용하여 ~50 nm AuNPs를 선택하였으며 (도 1c), 동일한 입자를 각 단계별로 모니터링하였다. 도 1c에 도시된 바와 같이, 전 과정 이후에, 아민-개질된 AuNPs는 고정화되었으며, 커버슬립 슬라이드 상에서 동일한 위치를 유지하였다. 또한, 본 실시예에서는 카르복실기가 NHS/EDC에 의해서 활성화된 STAT3 단백질 모노머를 첨가하였다. 상기 STAT3의 활성화된 카르복실기 (CO₂)는 AuNPs의 아미노기 (NH₂)와 공유결합하였다 (도 2).
- [0060] 도 1d는 아민-개질된 AuNPs에 대한 STAT3 신호전달 경로의 UVVIS 스펙트럼을 도시한 것이다. AuNPs에 특이적인 플라즈몬 공명 특성으로 인해서, 아민-개질된 AuNPs와 비교할 때의 표면 플라즈몬 밴드의 댐핑 (damping)은 7.5 nm 및 9.5 nm만큼 적색편이하는 것으로 관찰되었고, 이는 각각 STAT3 단백질 모노머와의 결합 및 STAT3 단백질의 다이머화에 해당되는 것이다. 이러한 결과는 아민-개질된 AuNPs가 STAT3 모노머와 결합되고, 성공적으로 인산화 및 STAT3의 다이머화를 유도한다는 것을 의미한다.
- [0061] 이어서, 단일 아민-개질된 AuNP의 표면에 결합하기 위한 STAT3 모노머의 최적 농도를 결정하였다. 본 실시예에서는 STAT3 모노머의 농도 범위를 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 내지 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 로 변화시켰다. 도 1e에 도시된 바와 같이, 재조합 STAT3 모노머의 농도에 기초한 LSPR 최대값의 적색 편이는 (LSPR $\Delta\lambda_{\text{max}}$) 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 로부터 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 까지 증가하였으며, 그 이상 증가하지는 않았다. 따라서, 본 실시예에서는 최적 STAT3 모노머의 농도를 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 로 선택하였으며, 이는 STAT3의 인산화 및 다이머화를 추적하기에 적당한데, 이는 단일 AuNPs 상의 모든 아미노기들이 재조합 STAT3 모노머에 의해서 결합된 것이기 때문이다.
- [0062] 2.2 STAT3 단백질의 인산화 및 다이머화 분석
- [0063] 도 3a에 도시된 바와 같이, 단일 아민-개질된 AuNP의 표면은 먼저 분자량 90 kDa을 갖고, SRC homology 2 (SH2) 도메인 및 타이로신 인산화 잔기 (Y705)를 갖는 STAT3 단백질 모노머들 (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$)과 결합된다. 이어서, 상기 STAT3 모노머들은 Src 키나아제 (1 ng mL⁻¹) 및 아데노신 트리포스페이트 (ATP) 용액 (200 μM)에 의해서 특정 타이로신 잔기 (Y705)에 인산화된다. 다음으로, 인산화된 상기 STAT3 단백질들은 STAT3 모노머들 사이의 포스포타이로신 (pY705)SH2 도메인 상호작용을 통해서 호모-다이머들을 형성하게 된다. STAT3의 인산화 및 다이머화는 암계 마이크로스펙트로스코피를 사용하여 Rayleigh 광산란 스펙트럼에 의해서 분석하였다 (도 3b). 측정 단계의 개시 시점에서, 배경의 스펙트럼은 개별 AuNP 근방 영역에서 제로로 정규화하였다.
- [0064] 도 4a는 다이머화 단계에서의 LSPR 시프트를 보여주는 것이며, 이는 STAT3 단백질의 농도에 따라서 증가하였다. 본 실시예에서는 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 내지 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 의 다양한 농도의 STAT3 단백질에 대해서 조사하였다. STAT3 단백질의 농도가 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 인 경우, 다이머화 단계에 대한 LSPR $\Delta\lambda_{\text{max}}$ 의 적색 편이는 9.00 nm였다. 따라서, 다이

머화 단계에서 STAT3 단백질의 최적 농도는 $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ 로 결정되었다.

[0065] 도 4c 및 삽입 도면에 도시된 바와 같이 (제조합 STAT3 단백질), STAT3의 인산화 및 다이머화를 분석한 결과, STAT3 모노머의 단일 아민-개질된 AuNP에 대한 생접합, 인산화 및 STAT3 단백질의 다이머화 각각에 대해서 14.79 nm, 3.46 nm 및 9.00 nm의 LSPR 최대 파장 적색 편이가 관찰되었다 (LSPR $\Delta \lambda_{\text{max}}$). 이러한 현저한 LSPR 피크 시프트는 단일 AuNP 표면에 대한 STAT3의 인산화 및 다이머화의 결합 발생을 나타내는 것이며, 이로 인해 AuNP에 대한 굴절률이 변화가 유도되는 것이다.

[0066] 2.3 나노센서 표면에서 STAT3 다이머화의 억제

[0067] STAT3 신호전달 경로를 성공적으로 추적한 이후에, 본 발명에서는 나노센서를 사용하여 STAT3 다이머화의 억제를 모니터링하고자 하였다. STAT3 다이머화의 억제는 억제제인 STA21 ($1 \mu\text{M}$)의 존재 하에서 수행하였다. STA21은 STAT3 단백질에 대한 선택적 소분자 억제제이다. STA21은 STAT3 단백질의 SH2 도메인에 결합하고, STAT3 다이머화, DNA 결합 및 핵 이동을 억제한다 (K. Miyoshi, M. Takaishi, K. Nakajima, M. Ikeda, T. Kanda, M. Tarutani, T. Liyama, N. Asao, J. Digiovanni and S. Sano, J. Invest. Dermatol., 2011, 131, 108-117). 따라서, STA-21은 STAT3가 인산화되는 인간 유방암 세포주에서 세포사멸을 유도한다.

[0068] STAT3 다이머화의 억제를 확인하기 위해서, 다양한 범위의 STA21 (10^{-1} nM 내지 10^4 nM)을 가해주었다. 도 4b는 STA-21의 농도에 따라서 LSPR $\Delta \lambda_{\text{max}}$ 수치가 8.96 nm로부터 2.65 nm로 감소한 것을 보여준다. STA-21의 농도가 증가함에 따라서 표면 상의 STAT3 다이머 형태들의 밀도가 감소하였으며, 이는 STA-21의 최적 농도가 10^3 nM라는 것을 의미하는 바, 이는 100%의 STAT3 다이머화가 STA-21에 의해서 억제되었기 때문이다.

[0069] 억제 효과를 확인하기 위해서, 다이머화 억제 분석에서의 LSPR $\Delta \lambda_{\text{max}}$ 의 적색 편이를 억제가 없는 경우의 수치와 비교하였다. 도 4c는 (제조합 STAT3 단백질) 다이머화 단계에서 STA-21이 부존재하는 경우와 존재하는 경우 각각에 LSPR $\Delta \lambda_{\text{max}}$ 의 적색 편이가 9.00 nm 및 2.65 nm로 측정된 것을 보여준다. 나노센서 표면 상의 STAT3 단백질들도 세포 수용체들과 유사한 패턴으로 작용할 것인 바, 소분자 활성화에 의해서 상호작용이 영향을 받게 된다.

[0070] 또한, 단백질 결합 분석에 대한 통상적 방법인 Native PAGE를 사용하여 STAT3의 다이머화 및 억제를 측정하였다. 그 결과 (도 5a), 167 kDa STAT3 다이머 (레인 3), STA-21 억제제에 기인한 90 kDa 모노머 (레인 4) 및 대조군으로서 90 kDa 모노머 (레인 2)가 관찰되었다. 다이머 형성은 포스포타이로신 (pY705) 및 인산화된 STAT3 단백질 모노머의 SH2 도메인 사이의 상호 작용으로 볼 수 있다.

[0071] 2.4 실제 샘플을 사용한 나노센서 표면 상에서의 STAT3 다이머화 및 STAT3 다이머화의 억제

[0072] 본 발명에 따른 시스템이 실제 샘플에도 적용가능한지 확인하기 위해서, 본 실시예에서는 제조합 STAT3 단백질을 대신에, 잘 알려진 인간 유방암 세포주인 Michigan Cancer Foundation7 (MCF7)으로부터 추출된 STAT3 단백질을 사용하였다. 단일 금 나노입자 상의 아미노기들은 인산화된 제조합 STAT3와 이미 접합된 것이었으며, MCF-7 세포로부터의 인산화된 STAT3와 다이머를 형성하였다. 따라서, 인산화된 STAT3 (MCF-7)은 STAT3 다이머화에 영향을 미치지, STAT3 다이머는 분석에 영향을 미치지 않았다.

[0073] MCF-7 세포로부터의 인산화된 STAT3 단백질의 농도를 ELISA (도 5b)에 의해서 측정하였으며, 농도 $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ 로 정량하였는 바, 이는 제조합 STAT3 단백질의 농도와 동일한 것이었다. STAT3의 다이머화를 확인하기 위해서, 다이머화 단계를 STA-21을 처리하지 않은 MCF-7 세포로 수행하였다. 또한, 억제 효과를 확인하기 위해서, 다이머화 억제 분석을 STA-21을 처리한 MCF-7 세포로 수행하였다. 억제제가 처리된 STAT3 단백질의 SH2 도메인은 STAT3 다이머를 형성하지 않았다.

[0074] 도 4c에 도시된 바와 같이 (MCF-7으로부터의 STAT3), 다이머화 단계에 대한 LSPR $\Delta \lambda_{\text{max}}$ 의 적색 편이는 각각 10.00 nm (STA21 부존재) 및 3.34 nm (STA21 존재)로 측정되었다. 실제 샘플의 LSPR $\Delta \lambda_{\text{max}}$ 는 제조합 STAT3 (9.00 nm)를 사용한 경우에 비해서 1 nm 더 높은 값이었으며, 이는 STAT-1과의 헤테로다이머화 및 다른 비특이적 결합에 의해서 생성된 것일 수 있다. 더 나아가, STA21의 활성화는 세포 추출물에 존재하는 다른 다이머화 분자들의 억제에도 사용될 수 있는 바, 이는 나노센서 표면에서 STAT3 다이머화가 더 높은 밀도로 발생하는 것을 야기할 수 있다. 그러나, 실제 샘플 (3.34 nm)과 제조합 STAT3 단백질 (2.65 nm) 사이의 LSPR $\Delta \lambda_{\text{max}}$ 차이는

0.69 nm이다. 이는 그다지 유의미한 값으로 볼 수 없는 바, 표준 편차보다도 작은 값이기 때문이다.

[0075] 2.5 비특이적 결합 분석

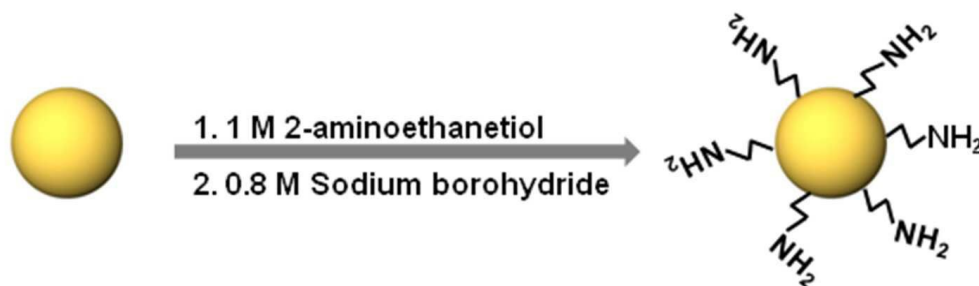
[0076] 각 경우들에서 비특이적 결합을 조심스럽게 고려하여 인공 산물에 의한 노이즈 신호들을 제거하였다. 단백질 센서에 대한 일반적 차단 물질인 우혈청 알부민 (BSA, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$)을 먼저 사용하여, 순수한 나노센서를 제조하기 위해서 아민-개질된 AuNP 상의 비특이적 부위들을 차단하였다 (도 6, 대조군 1의 흑색 컬럼).

[0077] 일부 연구들에 따르면, 비인산화된 STAT3 또한 다이머화 및 전사 촉진에 가능한 것으로 알려져 있는 바 (J. Yang, X. Liao, M. K. Agarwal, L. Barnes, P. E. Auron and G. R. Stark, Genes Dev., 2007, 21, 1396-1408), 비인산화된 STAT3 모노머 조건 하에서 STAT3의 다이머화를 측정하였다. 그 결과, LSPR $\Delta\lambda_{\text{max}}$ 의 적색 편이는 1.53 nm (도 6, 대조군 2의 청색 컬럼)로 측정되었고, 이는 비인산화된 STAT3는 본 실험 조건 하에서는 다이머를 형성하지 않는다는 것을 의미한다.

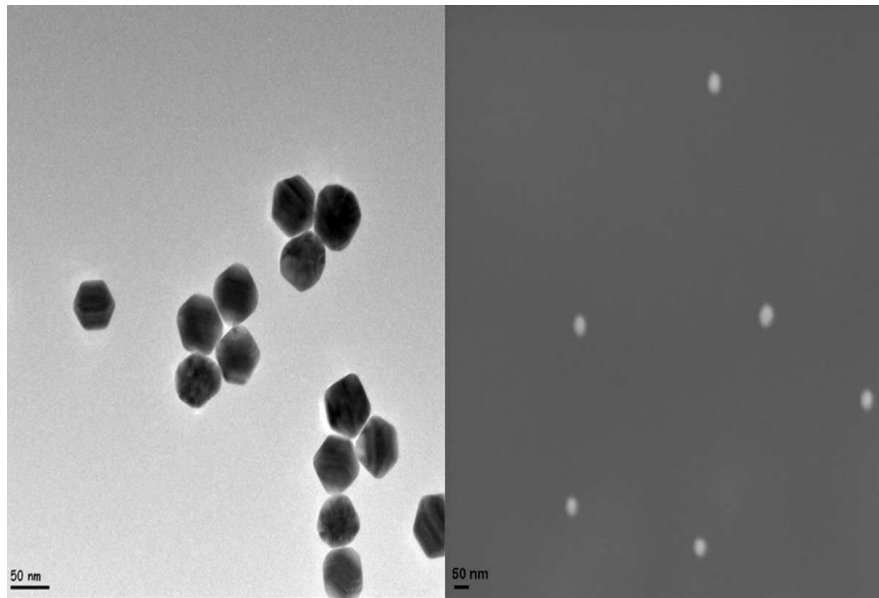
[0078] 또한, STAT3 단백질은, 예를 들어 STAT1 단백질과 같은 다른 STAT 패밀리 단백질들과 헤테로다이머를 형성하는 것으로 알려져 있는 바, STAT3 단백질이 다른 STAT 패밀리 단백질들과 헤테로다이머를 형성하는 것이 문제될 수 있다. 따라서, 다이머화를 위해서 재조합 STAT3 단백질 대신에 재조합 STAT1 단백질 ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$)을 투입하였다. 도 6에 도시된 바와 같이 (대조군 3의 적색 컬럼), LSPR 최대 파장은 1.63 nm 만큼 약간 시프트되었다. 이러한 약간의 시프트는 표면 센서 상에서 STAT3:STAT1 헤테로-다이머화가 이루어지지 않기 때문이며, 이는 STAT3:STAT1 헤테로다이머가 STAT3 호모다이머에 비해서 더 낮은 결합 친화도를 갖기 때문이다. 따라서, 헤테로다이머화에 기인하는 비특이적 결합은 무시할만한 수준으로서, 본 발명에 따른 시스템이 인 비트로에서 다이머-복합체들의 형성 및 다이머-복합체 형성 저해 효과를 확인하는 데에 있어서 적합한 것임을 알 수 있다.

도면

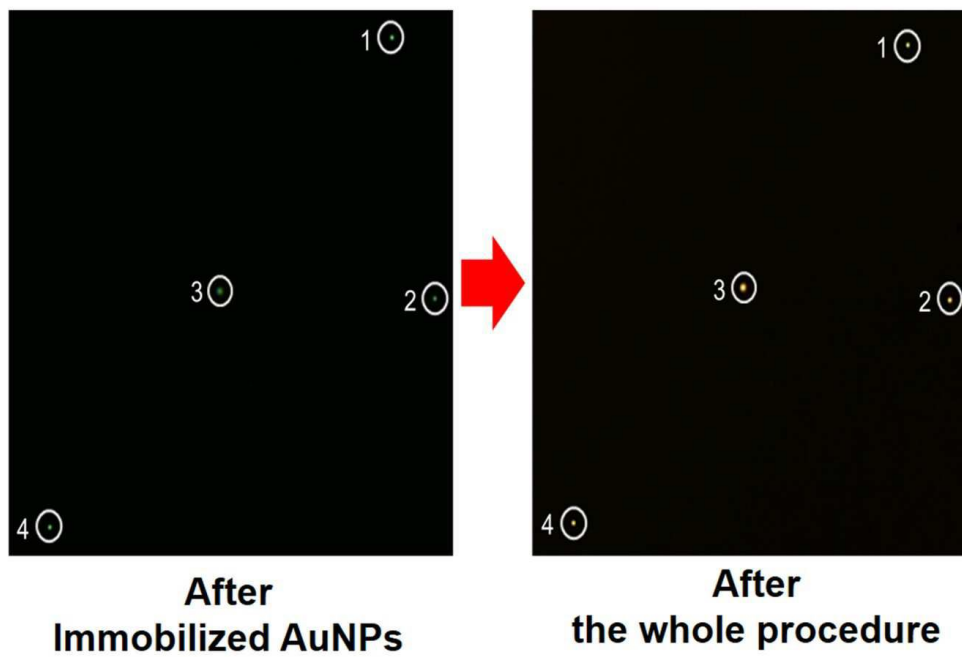
도면1a



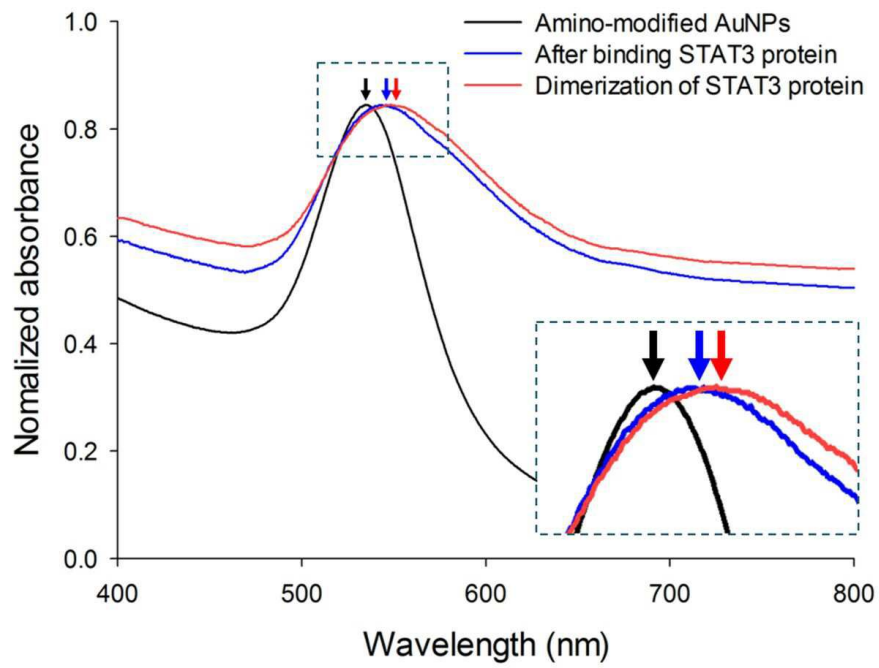
도면1b



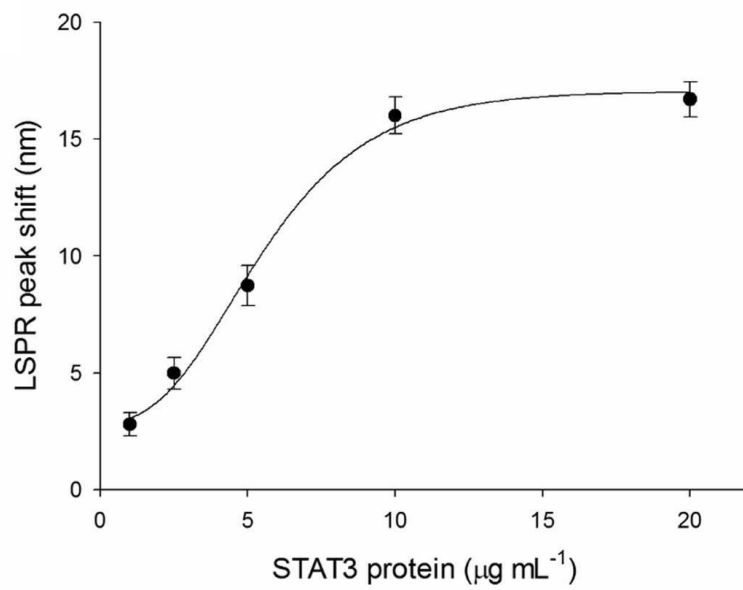
도면1c



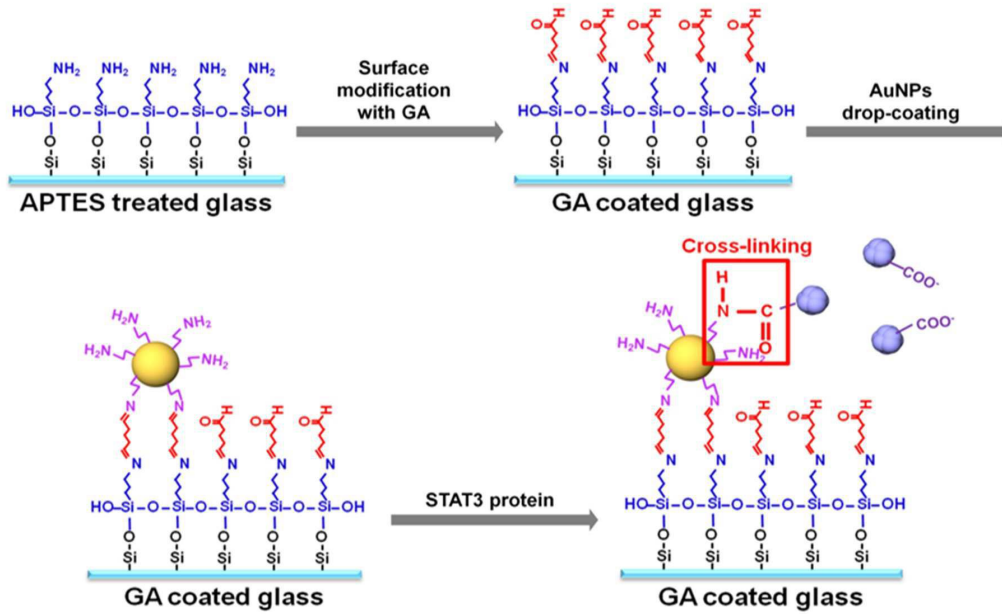
도면1d



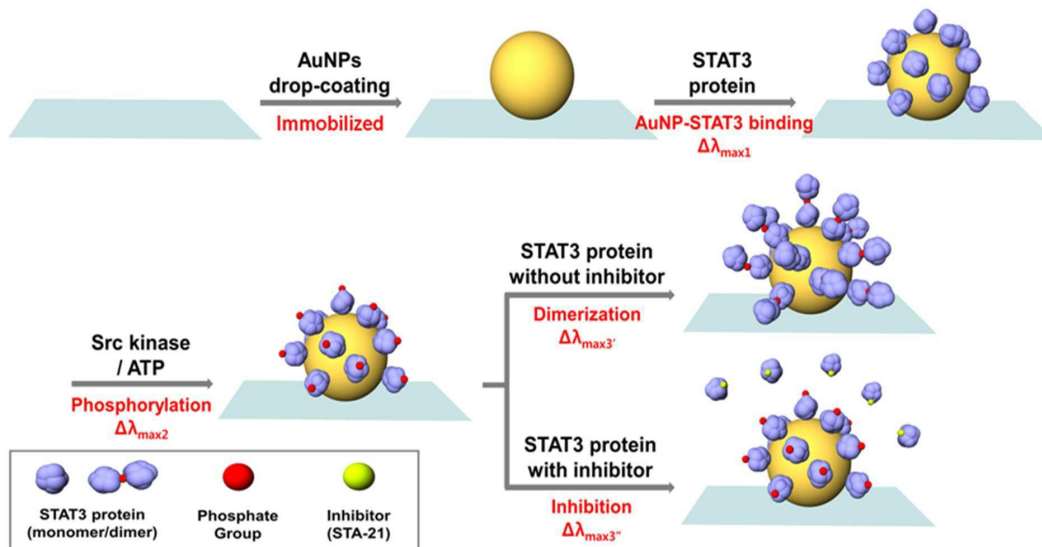
도면1e



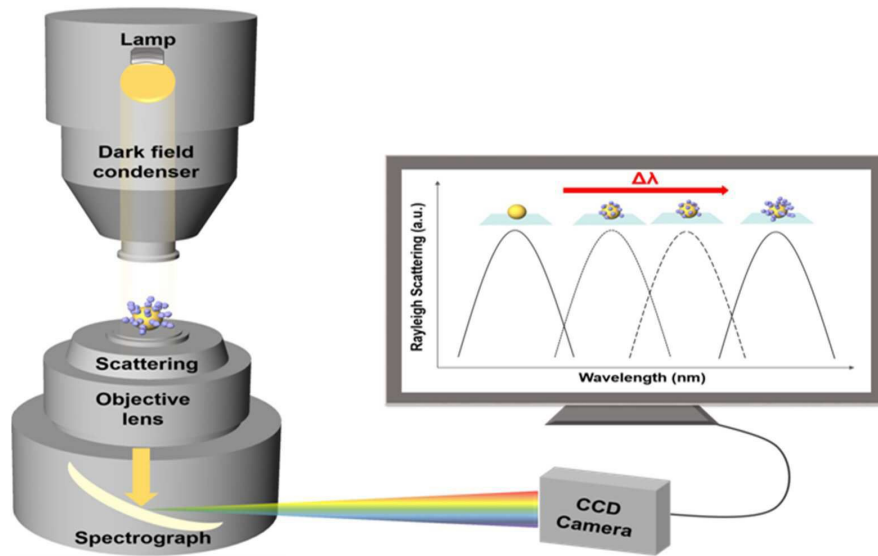
도면2



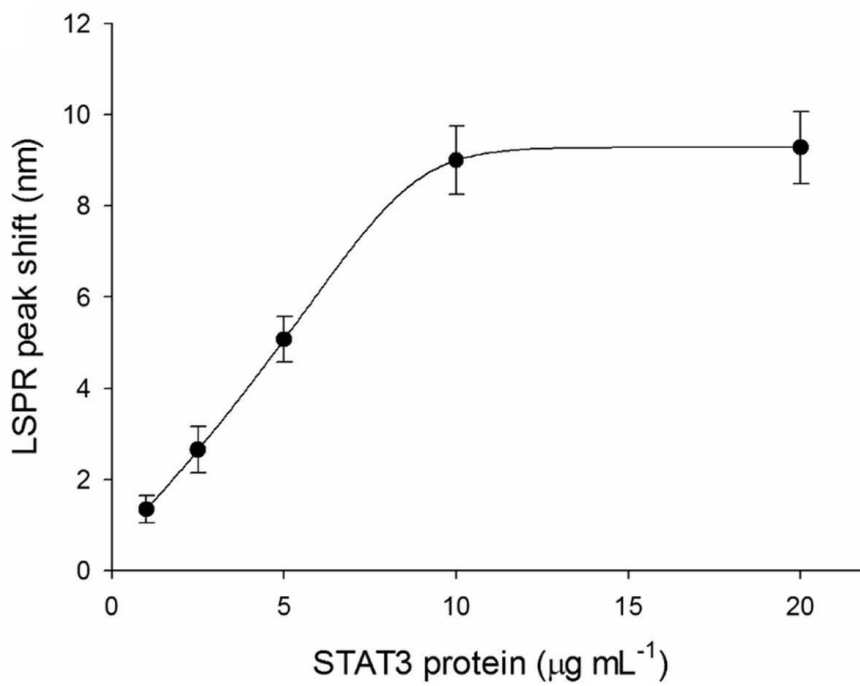
도면3a



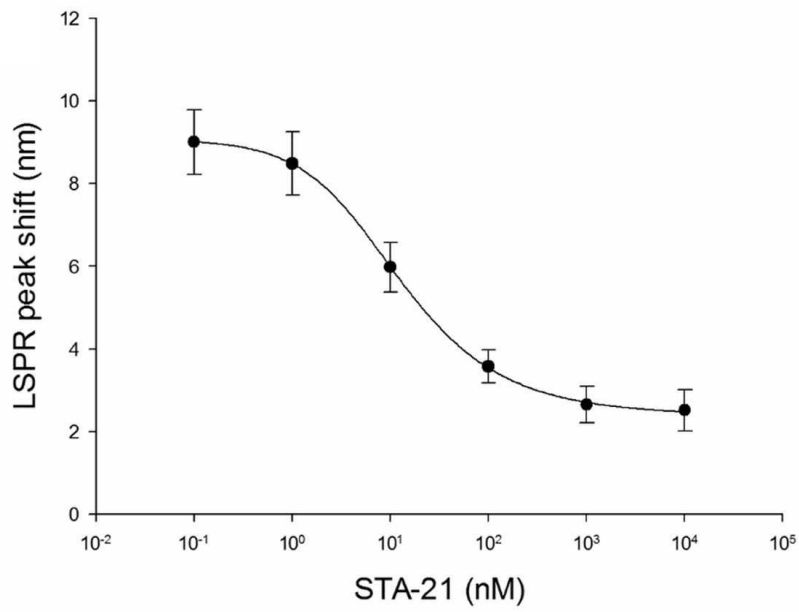
도면3b



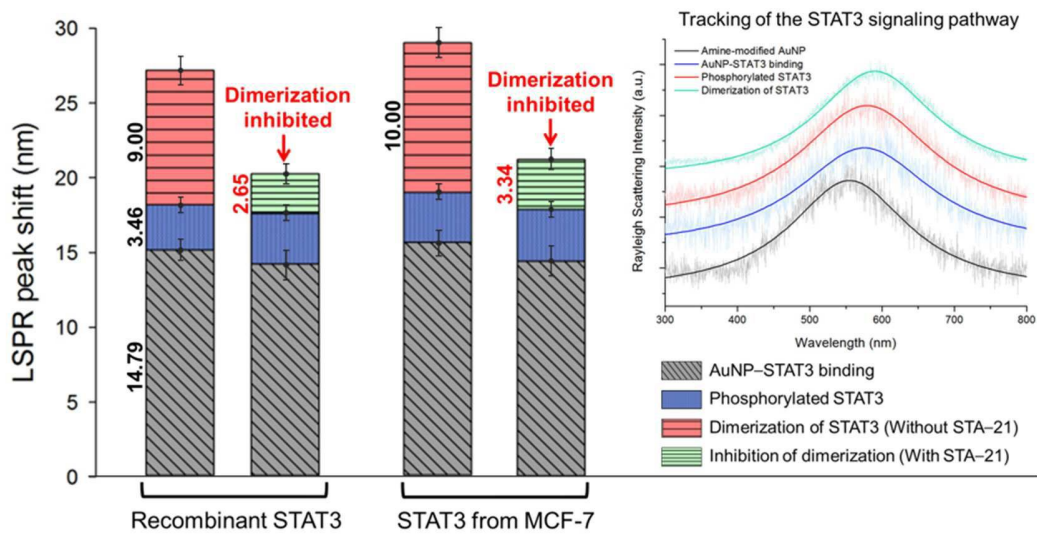
도면4a



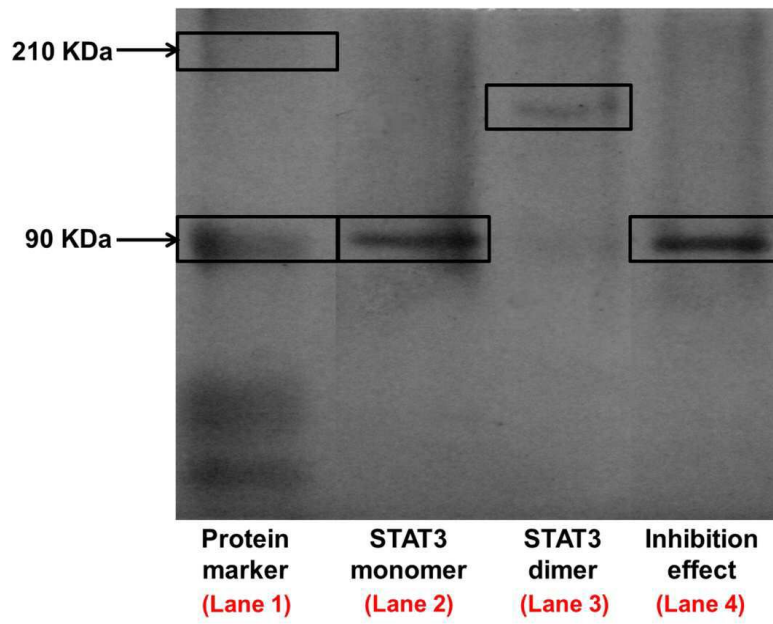
도면4b



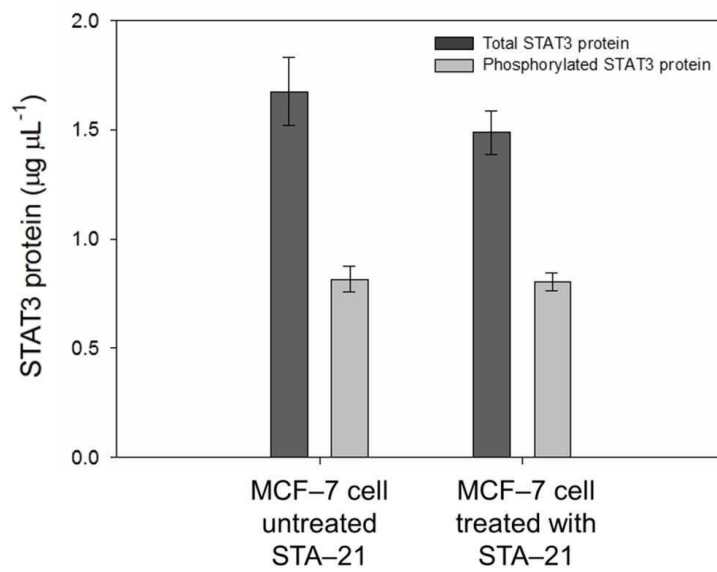
도면4c



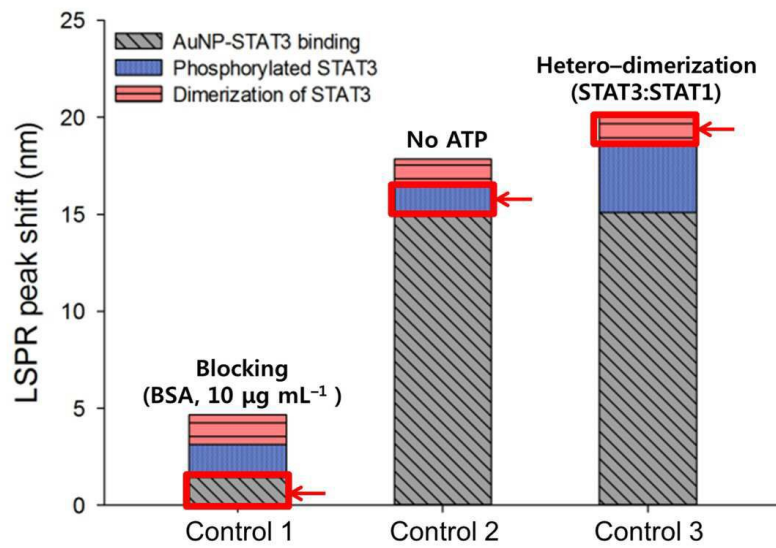
도면5a



도면5b



도면6



도면7

