

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2010-0098838 (43) 공개일자 2010년09월10일
(51) Int. Cl. A61K 9/14 (2006.01) A61K 38/43 (2006.01) A61K 38/08 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01) (21) 출원번호 10-2009-0017516 (22) 출원일자 2009년03월02일 심사청구일자 2009년03월02일	(71) 출원인 경희대학교 산학협력단 경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제 캠퍼스내 (72) 발명자 김영록 경기도 용인시 기흥구 보라동 민속마을 쌍용아파트 106-1602 김한나 경기도 수원시 장안구 율전동 173-3번지 201호 이진 충청남도 논산시 연무읍 안심리 1동 9-7번지 (74) 대리인 특허법인태동	

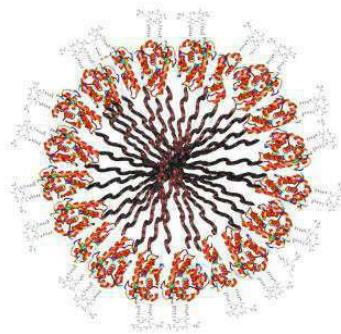
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 효소합성에 의한 표적지향형 입자의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 특정 세포에 선택적으로 결합하는 조형제 및 약물전달용 입자의 제조방법에 관한 것으로, 특정 리간드와 융합된 PHA 합성효소를 통해 합성된 생분해성, 생체호환성 PHA는 이를 합성한 PHA 합성효소와 블록공중합체를 형성하고, 이들이 가지는 양친매성 특성에 따라 자기조립 과정을 통해 나노입자를 만들게 되며, 이는 암세포 등의 신체 특정 세포에 선택적으로 결합하는 표적능이 부여된 나노입자를 간단하게 제작하는 방법으로 조형제 및 약물전달용 나노입자를 제조하는데 적용할 수 있다.

대표도 - 도2d



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호

부처명 지식경제부

연구관리전문기관

연구사업명 지식경제부 지역혁신센터 사업

연구과제명 피부생명공학센터

기여율

주관기관 경희대학교

연구기간 2008년 07월 01일 ~ 2009년 6월 30일

특허청구의 범위

청구항 1

세포에 특이적으로 결합하는 펩타이드 또는 단백질을 N-말단 또는 C-말단에 융합시킨 폴리히드록시알카노에이트 합성효소(polyhydroxyalkanoate synthase; PHA synthase)를 3-히드록시알카노일 CoA(3-hydroxyalkanoyl CoA)를 함유하는 기질 용액에 첨가하여 반응시킴으로써 제조되는 것을 특징으로 하는 세포에 특이적으로 결합하는 약물전달용 입자의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 폴리히드록시알카노에이트 합성효소(polyhydroxyalkanoate synthase; PHA synthase)는, 폴리히드록시부티레이트 합성효소(polyhydroxybutyrate synthase; PHB synthase)이고,

상기 3-히드록시알카노일 CoA(3-hydroxyalkanoyl CoA)는, 3-히드록시부티릴 CoA(3-hydroxybutyryl CoA)인 것을 특징으로 하는 세포에 특이적으로 결합하는 약물전달용 입자의 제조방법

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 세포는,

암세포인 것을 특징으로 하는 세포에 특이적으로 결합하는 약물전달용 입자의 제조방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

암세포에 특이적으로 결합하는 펩타이드 또는 단백질은,

암세포에 특이적으로 결합하는 활성 부위로 RGD(Arg-Gly-Asp)의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, 암세포에 특이적으로 결합하는 활성 부위로 NGR(Asn-Gly-Arg)의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, VEGI(vascular endothelial growth inhibitor), 트롬보스포딘스(Thrombospondins), 안지오스타틴(Angiostatin), 엔도스타틴(Endostatin), 바소스타틴(Vasostatin) 중 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 세포에 특이적으로 결합하는 약물전달용 입자의 제조방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

암세포에 특이적으로 결합하는 활성 부위로 RGD(Arg-Gly-Asp)의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는,

서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 RGD4C인 것을 특징으로 하는 세포에 특이적으로 결합하는 약물전달용 입자의 제조방법.

청구항 6

제3항에 있어서,

기질 용액은,

암 치료용 물질을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 세포에 특이적으로 결합하는 약물전달용 입자의 제조방법

청구항 7

제1항에 있어서,

세포에 특이적으로 결합하는 펩타이드 또는 단백질을 N-말단 또는 C-말단에 융합시킨 폴리히드록시알카노에이트 합성효소(polyhydroxyalkanoate synthase; PHA synthase)는,

세포에 특이적으로 결합하는 펩타이드의 핵산서열 또는 단백질을 암호화하는 유전자를 폴리히드록시알카노에이트 합성효소를 암호화하는 유전자의 5'-말단 또는 3'-말단에 융합시킨 후, 발현시킴으로써 제조되는 것을 특징으로 하는 세포에 특이적으로 결합하는 약물전달용 입자의 제조방법

청구항 8

제1항의 방법에 의해 제조된 약물전달용 입자

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 암세포 등의 특정 세포에 선택적으로 결합하여 약물 전달 및 치료의 목적으로 사용할 수 있는 입자의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 약물전달시스템(drug delivery system, DDS)은 약리학적으로 활성을 갖는 물질을 다양한 물리화학적 기술을 이용하여 최적의 효력을 발휘하도록 세포, 조직, 장기 및 기관으로의 전달을 제어하는 일련의 기술로 정의된다.

[0003] 약물전달시스템 기술의 적용 대상 물질은 소분자 합성화합물을 비롯하여 펩타이드, 단백질, 항체, 치료용 DNA, siRNA, 바이러스 및 세포 등의 거대분자 화합물인데, 주로 항암 연구에 많이 활용되고 있으며, 최근에는 유기 또는 무기화합물의 세포 또는 조직으로의 전달을 통한 분자생물학적 기초연구에까지 응용이 확대되고 있다.

[0004] 약물전달시스템에서 전달체로는 폴리에틸렌글리콜(polyethyleneglycol, PEG), 폴리락타이드(poly lactide, PLA), 폴리락티드코글리콜리드 (polylactidecoglycolide, PLAG), 폴리에틸렌옥사이드(polyethylene oxide PEO) 등이 많이 사용되는데, 이들은 단핵구와 대식세포에 의한 면역반응을 일으키지 않기 때문에 장기간 약효를 지속하게 하는 방법으로써 각광받고 있다. 예를 들어, 폴리에틸렌옥사이드(PEO)와 결합한 폴리카프로락톤(poly-ε-caprolactone, PCL) 이용하여 타목시펜(Tamoxifen)을 유방암 세포에 성공적으로 표적화한 연구와 PEO-PCL를 이용하여 탁솔(Taxol)과 세리미드(cerimide)를 접합시켜 난소암에 효과적으로 표적화한 보고가 있다.

[0005] 또한, 고분자 나노 물질로 마이셀, 리포솜과 같은 나노 전달체를 생성하여 생체 내에서 농도 차이에 의한 확산과 생체 내에서 고분자의 분해에 따른 약물 방출로 약물이 체내에 지속적으로 전달되게 하는 방식에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다. 대표적으로, 독실(Doxil)은 리포솜과 PEG을 이용하여 비수용성 약물의 용해도를 높이고 천천히 방출되도록 만든 주사제 항암제이며, AIDS 관련 카포시 육종(AIDS-related Kaposi sarcoma)에 처음으로 사용되었고, 현재 난소암과 다양한 골수종에 사용되고 있다. 이는 독소루비신(doxorubicin) 보다 체내에서 순환되는 반감기가 100배 정도 길며, 임상적으로는 독소루비신(doxorubicin)이 가지고 있는 심장 독성을 줄여주는 장점을 가지고 있다.

[0006] 한편, 나노전달체를 원하는 부위에만 이동시켜 생체의 다른 부위에 대한 부작용을 최소화하고, 그 효율

성을 극대화하기 위해서는 나노 입자의 크기, 나노 입자의 표면의 특성 등을 고려하여 적절하게 변형, 조절하여 이용하는 것이 중요한데, 암 세포에 대한 표적화가 많이 연구되어 있으며, EPR(enhanced permeability and retention effect) 효과에 의한 수동적 약물 전달과 특정 물질을 표적으로 하여 약물을 전달하는 능동적 약물 전달이 있다.

[0007] 암조직을 표적화하기 위한 표적물질로는 펩타이드, 단백질 항체 등이 있는데, 표적화된 나노 입자가 암 세포에 축적되고, 약물의 흡수를 증진시킨다는 결과가 보고된 바 있다.

[0008] 이상에서 살펴본 바와 같이, 나노 입자는 작은 사이즈로 인한 뛰어난 흡수성과 용해성, 그리고 이동성으로 말미암아 약물 전달체로 응용 가능성이 아주 높으며, 암세포와 결합하는 특정 리간드나 수용체(receptor)와 결합하는 물질을 나노 입자 표면에 도입하여 표적 기능을 부여할 수도 있다.

[0009] 또한, 특정한 환경에서 장착된 물질이나 성분 등을 전달할 수 있는 감응성 스마트 전달체로의 개발도 가능하며, 이 경우 적은 양으로도 높은 효과를 낼 수 있는 장점이 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0010] 이에 본 발명은 암세포 등의 특정 세포에 선택적으로 결합하는 특정 리간드를 도입한 입자를 제작하여 약물 전달 및 치료의 수단을 제공하는데 그 목적이 있다.

과제 해결수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 세포에 특이적으로 결합하는 펩타이드 또는 단백질을 N-말단 또는 C-말단에 융합시킨 폴리히드록시알카노에이트 합성효소(polyhydroxyalkanoate synthase; PHA synthase)를 3-히드록시알카노일 CoA(3-hydroxyalkanoyl CoA)를 함유하는 기질 용액에 첨가하여 반응시킴으로써 제조되는 것을 특징으로 하는 세포에 특이적으로 결합하는 약물전달용 입자의 제조방법 및 이 방법에 의해 제조된 약물전달용 입자를 제공한다(도 2a~2d 참조).

[0012] 본 발명에서 제조되는 약물전달용 입자에 있어 기본 골격(back bone)을 형성하는 구조체는 PHA(Polyhydroxyalkanoate)인데, 이 물질은 3-히드록시부티릴 CoA(3-hydroxyalkanoyl CoA)를 기질로 하고, 폴리히드록시부티레이트 합성효소(polyhydroxyalkanoate synthase; PHA synthase)를 첨가하여 반응시킴으로써 제조된다.

[0013] PHA는 미생물이 탄소원과 에너지원으로 세포질 내에 축적하는 물질로서 플라스틱과 비슷한 물성을 가지고 있다. 물성은 합성에 사용된 모노머(monomer)의 사이드 체인(side chain) 길이에 따라 결정되고, 사이드 체인의 길이가 길수록 부드러운 물성을 나타낸다. 이 물질의 가장 중요한 특성은 플라스틱과 같은 물성을 보이면서도 자연계에 존재하는 효소에 의하여 완전히 분해되는 특성인데, 그로 말미암아 친환경물질로 주목받고 있으며, 우리 몸속에서 특별한 거부반응을 일으키지 않는 생체호환성이 있다. 이러한 생분해성 및 생체 호환성 특성으로 인해 PHA는 의학계에서 많은 관심을 받고 있다.

[0014] PHA의 일 예로는 PHB(Polyhydroxybutyrate)가 있는데, 이 물질은 PHA 중 가장 많이 연구되고 있는 물질이다. PHB는 랄스토니아 유트로푸스(*Ralstonia eutrophus*) 또는 바실러스 메가테리움(*Bacillus megaterium*)과 같은 미생물에 의해 생산되며, 영양적 스트레스 조건에서 생성된다. PHB는 현재 많이 합성되는 미생물 분해성 중합체 PLA(Poly Lactic Acid)와 PLGA(Poly lactide-co-glycolide)보다 구조가 간단하지만, 훨씬 더 낮은 속도로 분해되며, 이러한 생분해적 특성 때문에 약물 전달체로서 훌륭한 역할을 할 수 있다.

[0015] 또한, PHB의 분해산물인 R-3-히드록시부티레이트(R-3-hydroxybutyrate)는 고등동물의 체내에서 흔히 발견되는 대사중간산물이며, 혈액 내에 0.3~1.3Mm 정도로 존재하며, 세포막에도 존재하는 물질로 알려져 있는데, 이로 말미암아 그 전구체인 PHB의 안전성은 이미 증명되었다고 볼 수 있다.

[0016] 본 발명에서 사용되는 폴리히드록시부티레이트 합성효소는 PHB를 합성하는 효소로서, 기질 특이성을 가지고 있고, 기질만 있으면 다른 요소 없이 PHB를 합성하는 특징이 있다. 도 1은 PHB 합성효소가 3-히드록시부티릴 CoA로부터 PHB를 합성하는 반응을 보여준다.

[0017] 본 발명에서는 세포와 결합할 수 있는 리간드로 세포에 특이적으로 결합하는 펩타이드 또는 단백질을 사용하는데, 이 리간드는 폴리히드록시알카노에이트 합성효소의 N-말단 또는 C-말단에 융합된다.

- [0018] 한편, 본 발명에서 세포는 일 예로 암세포일 수 있는데, 본 발명에서 암세포에 특이적으로 결합하는 펩타이드 또는 단백질을, 일 예로 암세포에 특이적으로 결합하는 활성 부위로 RGD(Arg-Gly-Asp)의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, 암세포에 특이적으로 결합하는 활성 부위로 NGR(Asn-Gly-Arg)의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드, VEGI(vascular endothelial growth inhibitor), 트롬보스포딘스(Thrombospondins), 안지오스타틴(Angiostatin), 엔도스타틴(Endostatin), 바소스타틴(Vasostatin) 중 선택되는 어느 하나인 것일 수 있다.
- [0019] 암세포에 특이적으로 결합하는 활성 부위로 RGD(Arg-Gly-Asp)의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 또는 암세포에 특이적으로 결합하는 활성 부위로 NGR(Asn-Gly-Arg)의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 암세포에 특이적으로 결합하는 활성 부위의 아미노산 서열이 RGD(Arg-Gly-Asp) 또는 NGR(Asn-Gly-Arg)인 펩타이드로서, 각 아미노산의 N-말단 또는 C-말단에는 다른 아미노산이 추가적으로 연결되어 구성될 수 있다.
- [0020] 암세포에 특이적으로 결합하는 활성 부위로 RGD(Arg-Gly-Asp)의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 'RGD 모티프(motif) 펩타이드'로 불리기도 하며, 암세포에 특이적으로 결합하는 활성 부위로 NGR(Asn-Gly-Arg)의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 'NGR 모티프(motif) 펩타이드'로 불리기도 한다.
- [0021] RGD 모티프 펩타이드는 암세포의 신생혈관생성(tumor angiogenesis), 렌탈 신생혈관생성(renal angiogenesis), 골다공증 억제제로서 유망하여 약물 전달 시스템에서 유용하게 사용되고 있는데[Holig, P., Bach, M., Volkel, T., Nahde, T., Hoffmann, S., Muller, R., Kontermann, R. Protein Engineering. 2004, 17(5)], 신생혈관생성에서 종양으로부터 과발현되는 단백질인 인테그린(integrin)과 특이적으로 결합한다.
- [0022] 인테그린은 α -서브유닛(140-180Kd)과 β -서브유닛(약 95Kd)으로 구성된 헤테로다이머(heterodimer)이며, 25종의 인테그린이 알려져 있다.
- [0023] RGD 펩타이드는 인테그린에 결합하는 이차 구조를 가지고 있으나, RGD 주변의 아미노산 구조에 따라 인테그린에 대한 결합력 차이를 보인다. RGD 핵산서열의 배열은 선형(linear) 형태와 환형(cyclic) 형태가 있으며, 이 중 환형 형태인 RGD4C(서열번호 1에 기재된 아미노산 서열)는 두 개의 이황화 결합(disulfide bonds)에 의해 RGD가 중앙에 위치하여 구조적으로 안정한 형태를 가진다. 또한, RGD4는 인테그린 $\alpha v \beta 3$ 와 강한 친화력을 가지고 있어 사용에 있어 여타의 RGD 펩타이드보다 바람직하다.
- [0024] 한편, 본 발명의 암세포를 대상으로 하는 약물전달용 입자의 제조방법에 있어서, 기질 용액은 암 치료용 물질을 추가적으로 포함하는 것이 좋은데, 기질 용액에 암 치료용 물질이 포함됨으로써, 입자가 제조되면서 암 치료용 물질이 본 발명의 약물전달용 입자의 내부에 포집될 수 있다. 암 치료용 물질로는 소수성 성질을 보유하고 있는 것이라면, 특성의 것에 국한되지 않고 사용될 수 있다.
- [0025] 한편, 본 발명의 약물전달용 입자의 제조방법에 있어서, 세포에 특이적으로 결합하는 펩타이드 또는 단백질을 N-말단 또는 C-말단에 융합시킨 폴리히드록시알카노에이트 합성효소는, 세포에 특이적으로 결합하는 펩타이드의 핵산서열 또는 단백질을 암호화하는 유전자를 폴리히드록시알카노에이트 합성효소를 암호화하는 유전자의 5'-말단 또는 3'-말단에 융합시킨 후, 발현시킴으로써 제조되는 것이 좋다.
- [0026] 세포에 특이적으로 결합하는 펩타이드의 핵산서열 또는 단백질을 암호화하는 유전자를 폴리히드록시알카노에이트 합성효소를 암호화하는 유전자의 5'-말단 또는 3'-말단에 융합시키는 방법은, 하기 실시예에서 수행된 것처럼, PCR을 통한 클로닝 및 라이게이션 등의 공지의 유전공학적 방법을 이용하면 용이하게 수행될 수 있기 때문에, 이에 관한 구체적인 설명은 생략하기로 한다.
- [0027] 또한, 세포에 특이적으로 결합하는 펩타이드의 핵산서열 또는 단백질을 암호화하는 유전자가 5'-말단 또는 3'-말단에 융합된 상기 제조한 폴리히드록시알카노에이트 합성효소의 '발현'은, 하기 실시예에서 수행된 것처럼, 공지의 벡터 및 공지의 호스트(일 예로서, 대장균)를 이용하여 용이하게 수행될 수 있기 때문에, 이에 관한 구체적인 설명은 생략하기로 한다.

효 과

- [0028] 본 발명은 생체 호환성 물질인 PHA를 기본 골격(back bone)으로 하고, 암세포와 같은 특정 세포에 특이적으로

결합하는 펩타이드 또는 단백질을 단백질 공학을 통해 PHA 합성효소에 융합한 후, PHA 입자의 표면에 리간드로 도입함으로써, 암세포와 같은 특정세포에 대한 표적능이 부여된 나노 수준의 약물전달용 입자를 제조할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예를 통해 더욱 상세히 설명하지만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 이와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

실시예 1: RGD4C 펩타이드가 융합된 PHB 합성효소를 이용하여 본 발명의 PHB 나노 입자의 제조

본 실시예에서는 RGD4C 펩타이드를 나노 입자 표면에 부착시키는 방법이 아닌, 단백질 공학을 통해 PHB 합성효소와 RGD4C 펩타이드를 융합하여 PHB 합성효소를 제조한 후, PHB입자 표면에 RGD4C 리간드가 결합된 나노 입자를 제작하고자 하였다.

PHB 합성효소와 RGD4C 융합 PHB 합성효소의 발현을 위해 사용된 벡터의 모식도는 도 3a~3c에 나타내었고, 해당 벡터의 제조 및 PHB 합성효소 또는 PGD4C 융합 PHB 합성효소의 발현은 하기에서 상세히 설명하고자 한다.

1) PHB 합성효소 및 N-말단 또는 C-말단에 RGD4C 시퀀스가 융합된 PHB 합성효소의 제조

① PHB 합성효소가 클로닝된 pET 15b 벡터 및 그로부터 PHB 합성효소의 제조

PHB 합성효소 유전자(*phb C*)를 랄스토니아 유트로푸스(*Ralstonia eutrophus*)로부터 PCR을 통해 증폭시켜 pET 15b 벡터(NOVAGEN, Darmstadt, Germany)에 클로닝하여, PHB 합성효소 유전자가 삽입된 pET 15b 벡터를 제조하였다(도 3a).

이때, PHB 합성효소 유전자의 5'과 3' 끝부분에 *Nde* I 사이트와 *Xho* I 사이트가 생성되도록 하기 위하여, PCR 수행시 정방향 프라이머는 "5'-GAC AAG CAT ATG ATC GAG AAT CCA ATC"를 사용하였고, 역방향 프라이머는 "5'-CCG CTC GAG TGC CTT GGC TTT GAC GTA T"를 사용하였다.

그 후, PHB 합성효소 유전자가 삽입된 pET 15b 벡터로 이 콜라이(*E.coli*) BL21를 형질전환시킨 후, 발현시키고, Ni-NTA 아가로오스 비드(agarose bead)를 이용하여 정제함으로써, PHB 합성효소를 분리하였다.

② C-말단에 RGD4C가 위치한 벡터 및 그로부터 C-말단에 RGD4C 핵산 서열이 융합된 PHB 합성효소의 제조

C-말단에 RGD4C가 위치한 벡터를 제조하고자 하였는데, RGD4C 서열은 뉴클레오타이드 합성을 통해서, 5'방향에 *Xho* I 사이트, 3'방향에 *Bam*HI 사이트를 붙여줌으로써, PHB 합성효소가 삽입되어 있는 pET 15b 벡터에 삽입될 수 있도록 하였다(5'-TC GAG GCG TGC GAT TGC CGT GGC GAT TGC TTC TGC GGC TGA G, 5'-GA TCC TCA GCC GCA GAA GCA ATC GCC ACG GCA ATC GCA CGC C).

이 후, PHB 합성효소 유전자가 삽입된 pET 15b 벡터와 인서트인 RGD4C 시퀀스를 라이게이션시킨 후, 라이게이션된 벡터로 이 콜라이(*E.coli*) DH5 α 컴피턴트 셀(competent cell)을 형질전환한 후, LB액체 배지(ampicillin 100 µg/ml)에서 16시간 동안 배양하였다. 그 후, 'Plasmid Miniprep Kit'를 이용하여 C-말단에 RGD4C가 위치한 벡터를 배양된 균주로부터 분리하였다(도 3b).

이 후, 분리한 벡터로 이 콜라이(*E.coli*) BL21를 형질전환한 후, 발현시키고, Ni-NTA 아가로오스 비드(agarose bead)를 이용하여 정제함으로써, C-말단에 RGD4C 펩타이드가 융합된 PHB 합성효소를 분리하였다.

③ N-말단에 RGD4C가 위치한 벡터 및 그로부터 N-말단에 RGD4C 핵산 서열이 융합된 PHB 합성효소의 제조

N-말단에 RGD4C가 위치한 벡터를 다음과 같이 제조하였다. RGD4C 서열은 뉴클레오타이드 합성을 통해서 5'방향에 *Nde* I 사이트, 3'방향에 *Xho* I 사이트를 갖도록 제작하였다(5'-G GAA TTC CAT ATG GCG TG C GAT TGC CGT GGC GAT TGC TTC TGC GGC CTC GAG CGG, 5'-CCG CTC GAG GCC GCA GAA GCA ATC GCC ACG GCA ATC GCA CGC CAT ATG GAA TTC C).

이 후, PHB 합성효소 유전자가 삽입된 pET 19b 벡터(도 3c)와 인서트인 RGD4C 시퀀스를 라이게이션시킨

후, 이 라이게이션 된 벡터로 이 콜라이(*E.coli*) DH5 α 컴피턴트 셀(competent cell)을 형질전환시키고, LB액체 배지(ampicillin 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에서 16시간 동안 배양하였다. 그 후 'Plasmid Miniprep Kit'를 이용하여 N-말단에 RGD4C가 위치한 벡터를 배양된 균주로부터 분리하였다(도 3d).

[0046] 이 후, 분리한 벡터로 이 콜라이(*E.coli* BL21)를 형질전환한 후, 발현시키고, Ni-NTA 아가로오스 비드(agarose bead)를 이용하여 정제함으로써, N-말단에 RGD4C 펩타이드가 융합된 PHB 합성효소를 분리하였다.

[0047] 2) PHB 합성효소 및 RGD4C 펩타이드가 N-말단 또는 C-말단에 융합된 PHB 합성효소를 이용하여 PHB 나노 입자의 제조

[0048] PHB 합성효소 및 RGD4C 펩타이드가 N-말단 또는 C-말단에 융합된 PHB 합성효소를 이용하여 하기의 방법에 의해 PHB 나노 입자 또는 PHB 입자 표면에 RGD4C 리간드를 가진 나노 입자를 제작하였다.

[0049] 시험관 내(*in vitro*) PHB 합성을 위해서 20 mM 포타슘 포스페이트 버퍼(potassium phosphate buffer, pH 7.0), 200 mM NaCl, 5 mM의 3HB-CoA, 4.8 μM 의 PHB 합성효소 또는 RGD4C 펩타이드가 N-말단에 융합된 PHB 합성효소 또는 RGD4C 펩타이드가 C-말단에 융합된 PHB 합성효소를 포함한 용액을 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 도 4에 기재된 각각의 시간 동안 반응시켰다. 이때, 나노입자에 약리성분과 같은 외래물질의 충전(loading) 가능 여부를 확인하기 위해 상기 나노입자 합성 반응액에 나일레드(Nile Red)를 최종농도 0.5mg/mL 로 첨가하였고, 첨가된 나일 레드 는 소수성 특성으로 인해 나노입자의 내부에 충전됨을 형광현미경으로 확인할 수 있었다.

[0050] 한편, 상기 반응 후, N-말단 또는 C-말단에 RGD4C 펩타이드가 융합된 PHB 합성효소에 의한 3-히드록시부티릴 CoA(3-hydroxybutyryl CoA)의 중합이 기존의 PHB 합성효소의 중합과 효소 역가에서 차이가 있는지 여부를 살펴보기 위해, 반응 후, 방출된 티올(thiol)기의 양을 측정하였다(Ellman's assay).

[0051] 엘만스 어세이(Ellman's assay)는 다음과 같이 수행하였다. 5 mM 소듐 아세테이트 버퍼(sodium acetate buffer, pH 4.7), 50 mM NaCl, 0.5 mM EDTA가 혼합된 380 μL 에 각각의 반응 시간에 따라 중합반응시킨 용액을 10 μL 씩 분주하였다. 그 후 40 mM 소듐 포스페이트 버퍼(pH 7.6), 2 mM EDTA, 100 mM 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB)가 혼합된 690 μL 를 각각 첨가한 후 실온에서 2분 동안 반응시켰다. 용액의 흡광도는 스펙트로포토미터(spectrophotometer)를 이용하여 412 nm에서 측정하였다.

[0052] 도 4는 PHB 합성효소와 N-말단에 RGD4C 펩타이드가 융합된 PHB 합성효소, C-말단에 RGD4C 펩타이드가 융합된 PHB 합성효소의 동일한 농도(4.8 μM)에서 3-히드록시부티릴 CoA를 기질로 하는 중합반응을 통해 방출된 티올(thiol)기를 시간에 따라 나타내었다. 비교 결과, 각각의 활성은 큰 차이가 없음을 확인할 수 있었으며, 이는 RGD4C가 PHB 합성효소에 결합이 되더라도 효소활성에는 영향을 끼치지 않는 사실을 의미한다.

[0053] 또한, AFM(Atomic Force Microscope)을 이용하여 각각의 나노입자 형태를 살펴보았는데, 형태학상으로 큰 차이가 없음을 확인할 수 있었다(도 5a~5c). 도 5a~5c는 제조된 PHB 입자의 AFM 사진인데, 도 5a는 PHB 합성효소에 의해 형성된 PHB 나노입자, 도 5b는 C-말단에 RGD4C 펩타이드가 융합된 PHB 합성효소가 형성한 PHB 나노입자, 도 5c는 N-말단에 RGD4C 펩타이드가 융합된 PHB 합성효소가 형성한 PHB 나노입자이다.

[0054] 실험예 1: 상기 실시예 1에서 제조한 본 발명의 RGD4C 펩타이드가 융합된 PHB 나노 입자의 암세포에 대한 결합능 조사

[0055] 본 실험예 1에서는 상기에서 제조된 RGD4C 펩타이드가 융합된 PHB 나노입자가 인테그린 $\alpha\text{v}\beta 3$ 을 과발현하는 MDA-MB231 유방암 세포주에 결합하는지 여부를 확인하고자 하였다.

[0056] 상기 실시예 1에서 제작된 RGD4C 펩타이드가 융합된 나노 입자 합성반응용액으로부터 버퍼와 남아 있는 나일 레드(Nile red)를 제거하기 위해 13000rpm으로 2분 동안 원심분리하였고, 상층액을 제거한 후, 하기의 유방암 세포의 배양액인 RPMI 1640을 첨가하였으며, 13000rpm에서 2분 동안 원심분리를 통해, 세척하였다(총 10회).

[0057] 그 후, RPMI 1640 배양액을 30 μL 첨가하여 10배 농축시킨 후, 울트라-소니피케이션(ultra-sonication, 130 W) 3회(1s) 와 배스 소닉(bath sonic, DH.WUC.A02H, 60Hz, 대과학, Seoul, Korea)을 10분간 시행함으로써 하기에서 사용할 시료를 준비하였다.

- [0058] 한편, 본 실험예 1에서 사용된 MDA-MB 231 유방암 세포주는 한국 세포주은행으로부터 분양받았다. 세포의 배양액은 RPMI 1640에 10% 페탈 보바인 시럼(fetal bovine serum), 페니실린(penicillin, 100 unit/ml)을 첨가하여 준비하였다.
- [0059] 세포주는 상기의 세포 배양액을 사용하여, 37℃, % 습도, 5% CO₂의 배양기에서 배양하였다. 통상적으로 3~4일 간격으로 계대 배양을 실시하였으며, 본 실험에서는 분양받은 후 8계대의 세포를 사용하였다.
- [0060] 상기에서 준비한 시료의 유방암 세포주에 대한 결합능 실험을 위해, 10% FBS가 포함되어 있지 않은 RPMI 1640 배양액으로 96-웰 플레이트에 웰 당 $5.1 \times 10^4 / 100 \mu\text{l}$ 세포를 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후, 배양액을 제거하고, DPBS 100 μl 로 2회 세척하였다.
- [0061] 그 후, 상기에서 준비된 시료를 분주하고 30분 동안 배양한 다음, DPBS 100 μl 로 1회 세척한 후, 형광 현미경으로 관찰하였다.
- [0062] 도 6은 현미경 관찰 결과를 보여준다. 도 6의 A), B)는 아무것도 처리하지 않은 대조군 세포이고, C), D)는 PHB 입자로 처리된 세포이며, E), F)는 RGD4C 펩타이드를 C-말단에 융합한 PHB 입자로 처리한 세포이고, G), H)는 RGD4C 펩타이드를 N-말단에 융합한 PHB 입자로 처리한 세포의 모습이다.
- [0063] 대조군 세포의 모습에 비해 RGD4C 펩타이드가 융합된 PHB 입자 처리한 세포의 모습이 붉은빛으로 염색된 모습을 볼 수 있었다. 이는 입자 제작시 충전(charging)한 나일 레드(Nile red)에 의해 세포가 염색이 된 것을 보여주는 것이다.
- [0064] RGD4C 펩타이드가 융합되지 않은 PHB 입자로 처리했을 경우(도 6의 C), D)) 처리한 세포가 붉은색으로 염색이 되지 않는 것으로 보아, PHB 입자의 표적세포에 대한 비특이적인 결합반응은 일어나지 않았음을 확인 하였다.
- [0065] 이상의 결과로부터 RGD4C 리간드가 융합된 PHB 합성효소를 이용하여 제작한 나노입자가 암세포에 우수한 특이적 결합력을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

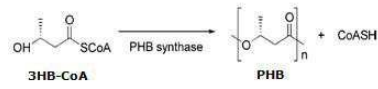
도면의 간단한 설명

- [0066] 도 1은 정제된 PHB 합성효소(PHB synthase)와 기질인 3-히드록시부티릴 CoA(3-hydroxybutyryl CoA)로부터 PHB가 합성되는 과정을 보여준다.
- [0067] 도 2a는 RGD4C(ACDCRGDCFCG)의 화학식을 보여주고, 도 2b는 정제된 융합단백질(RGD4C가 융합된 PHB 합성효소)을 모식도로 보여주며, 도 2c는 다이머(dimer) 형태의 융합 단백질에 의한 3-히드록시부티릴 CoA(3-hydroxybutyryl CoA)의 중합반응(polymerization)으로 형성된 양친성 블록공중합체를 보여주고, 도 2d는 중합이 일어난 후, 자기조립(self-assembling) 과정에 의해 형성된 본 발명의 RGD4C가 융합된 PHB 나노 입자를 보여준다.
- [0068] 도 3a~3d는 RGD4C가 융합된 PHB 합성효소의 발현을 위해 사용한 벡터의 구조를 보여주는데, 3a는 pET 15b 벡터에 클로닝된 PHB 합성효소 유전자를 보여주고, 3b는 pET 15b 벡터에 클로닝된 PHB 합성효소 유전자 및 그 C-말단에 결합한 RGD4C를 보여주고, 3c는 pET 19b 벡터에 클로닝된 PHB 합성효소 유전자를 보여주고, 3d는 pET 19b 벡터에 클로닝된 PHB 합성효소 유전자 및 그 N-말단에 결합한 RGD4C를 보여준다.
- [0069] 도 4는 PHB 합성효소에 의한 3-히드록시부티릴 CoA(3-hydroxybutyryl CoA)의 중합반응을 통해 방출된 티올(thiol)기를 시간에 따라 측정된 결과를 보여준다. 흡광도 값은 PHB의 중합반응의 활성을 나타낸다.
- [0070] 도 5는 제조된 PHB 나노 입자의 AFM 사진이다. 도 5a는 PHB 합성효소가 형성한 PHB 나노 입자, 도 5b는 PHB 합성효소의 C-말단에 결합된 RGD4C가 형성한 PHB 나노 입자, 도 5c는 PHB 합성효소의 N-말단에 결합된 RGD4C가 형성한 PHB 나노 입자이다.
- [0071] 도 6은 MDA-MB231 유방암 세포주에 본 발명의 나노 입자를 처리한 후, 형광현미경으로 관찰한 이미지이다. A)는 아무것도 처리하지 않은 대조군 세포의 이미지(bright filed), B)는 아무것도 처리하지 않은 대조군 세포의 형광이미지, C)는 나일 레드(Nile red)로 충전된 PHB 나노 입자를 처리한 세포의 이미지(bright filed), D)는 나일 레드(Nile red)로 충전된 PHB 나노 입자를 처리한 세포의 형광이미지, E)는 나일 레드(Nile red)로 충전된 RGD4C가 융합된 PHB(C-말단) 나노 입자를 처리한 세포의 이미지(bright filed), F)는 나일 레드(Nile red)로 충전된 RGD4C가 융합된 PHB(C-말단) 나노 입자를 처리한 세포의 형광이미지, G)는 나일 레드(Nile red)

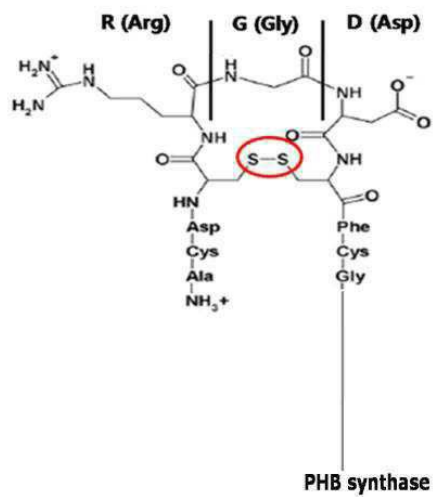
로 충전된 RGD4C가 융합된 PHB(N-말단) 나노 입자를 처리한 세포의 이미지(bright filed), H)는 나일 레드(Nile red)로 충전된 RGD4C가 융합된 PHB(N-말단) 나노 입자를 처리한 세포의 형광이미지이다. scale bar = 20 μm 이다.

도면

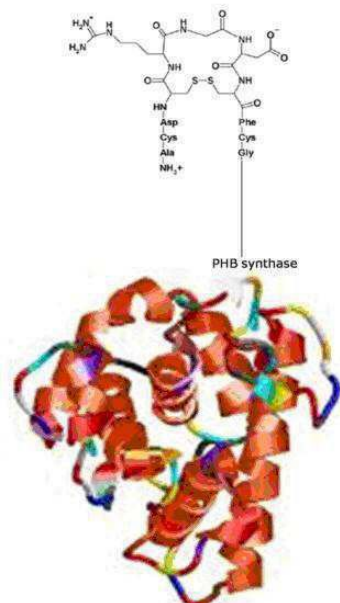
도면1



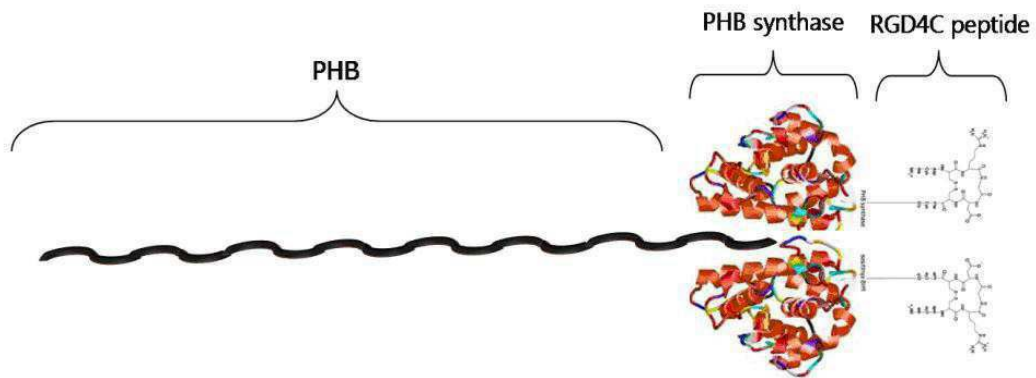
도면2a



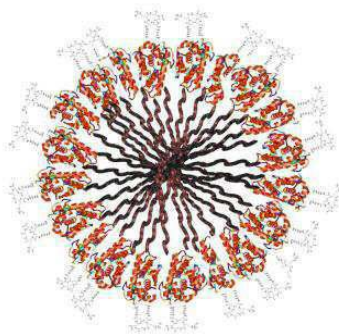
도면2b



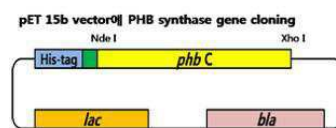
도면2c



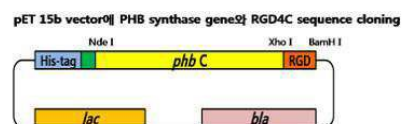
도면2d



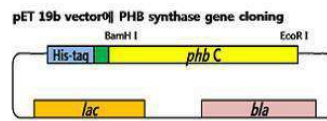
도면3a



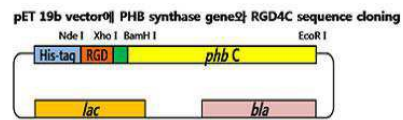
도면3b



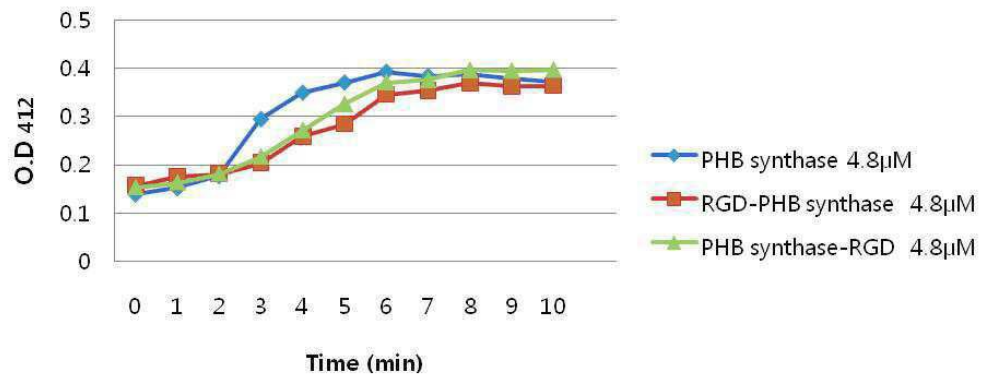
도면3c



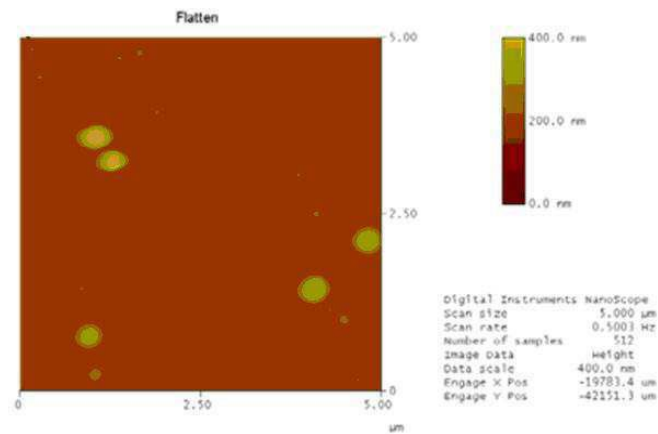
도면3d



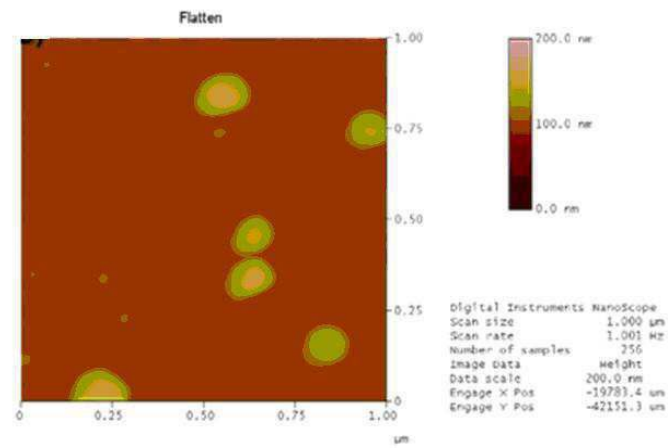
도면4



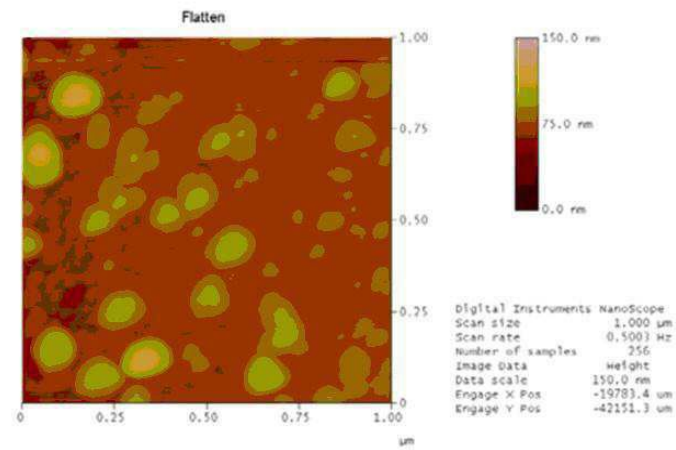
도면5a



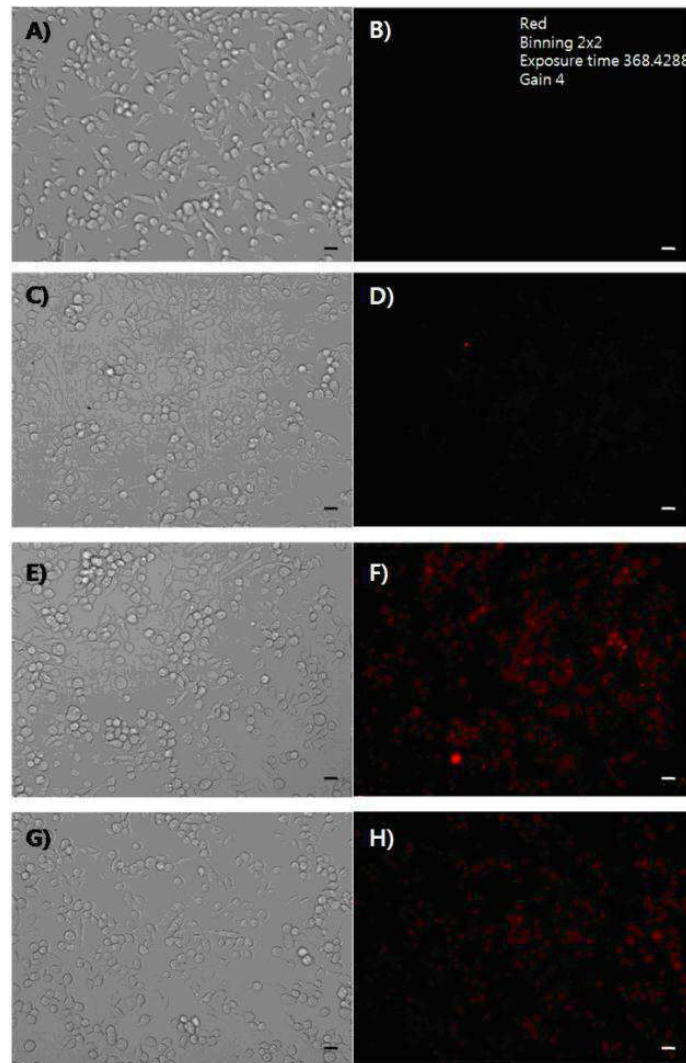
도면5b



도면5c



도면6



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> Method for production of particle for drug delivery system with affinity to cancer cell

- <160> 1

- <170> Kopatent In 1.71

- <210> 1
- <211> 11
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence

<220>

<223> RGD4C peptide with a binding affinity to integrin

<400> 1

Ala Cys Asp Cys Arg Gly Asp Cys Phe Cys Gly

1

5

10