(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0011849
(43) 공개일자 2009년02월02일

(51) Int. Cl.[9]
C12Q 1/68 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0075831
(22) 출원일자 2007년07월27일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내
(72) 발명자
김상태
서울특별시 광진구 자양동 227-7 더샵 스타시티 C동3601호
최진호
서울 강서구 등촌동 I-Park 114-1901

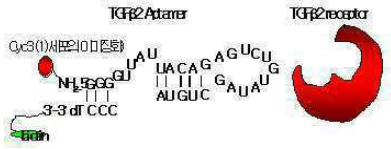
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 티지에프-베타2 리간드 유전자에 대한 압타머 및 이를포함한 항암 조성물

(57) 요 약

본 발명은 TGF-β2리간드유전자에 의한 aptamer-결합형 나노담체, 이를 포함하는 함암 조성물 및 이를 사용하여 암을 치료하거나 진단하는 방법이 기술되어 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	10022899-2006-22
부처명	산업자원부
연구사업명	핵심기술개발사업
연구과제명	약물전달 system의 vector로서 비유기계 다공성 물질의최적화
주관기관	이화여자대학교 산학협력단
연구기간	2006년 06년 01일 ~ 2007년 05월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

TGFRβ2의 액손 2와 5번사이를 표적으로 암세포 수용체 염기서열상의 압타머

청구항 2

TGFRβ2의 액손 2와 5번사이의 염기서열로 구성한 압타머와 MTX-LDH와의 생물결합구조

청구항 3

TGFRβ2의 액손 2와 5번사이의 염기서열로 구성한 압타머와 MTX-LDH의 구조로부터 항암제 효능 및 이미징 조영제로써 암진단 시약

청구항 4

TGFRβ2압타머와 MTX-LDH의 구조로부터 항암제 효과를 지닌 약제학적 조성물

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 TGFR-β2리간드유전자에 의한 aptamer-결합형 나노담체, 이를 포함하는 함암 조성물 및 이를 사용하여 암을 치료하거나 진단하는 방법에 관한 것이다.

<2> 형질전환 성장인자 (TGF: transforming growth factor)은 세종류가 있는데 이런 인자들은 정상적으로 세포분열을 조절하고 종양 상피세포경우 CDC Kinase 카이네즈(cyclin-dependent kinases)의 유도성 저해제로 (A.M. Grau, L. Zhang and W. Wang et al., Induction of p21waf1 expression and growth inhibition by transforming growth factor β involves the tumor suppressor gene DPC4 in human pancreatic adenocarcinoma cells, Cancer Res 57 (1997), p. 3929, G.J. Hannon and D. Beach, p15INK4B is a potential effector of TGF-β-induced cell cycle arrest, Nature 371 (1994), p. 257)으로 작용한다라고 알려져 있다. TGFβ는 TGFβ receptors를 조절하여 발생과정에도 관여한다라고 보고되어졌다 (L.P. Sanford, I. Ormsby and A.C. Gittenberger-de Groot et al. TGFβ2 knockout mice have multiple developmental defects that are nonoverlapping with other TGFβ knockout phenotypes, Development 124 (1997), p. 2659). 그리고 또한 대장암 경우 TGFβ1이 과발현되어져 있다 (E. Friedman, L.I. Gold and D. Klimstra et al., High levels of transforming growth factor β 1 correlate with disease progression in human colon cancer, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 4 (1995), p. 549). TGFβ1는 정상 대장 상피세포는 발현이 되어 있지 않지만 대장암 경우 활발하게 특수한 상태로 발현되어 있다. 위암은 TGFβ1발현이 종양 발생시기에 관련되고 나쁜 예후와 독립적으로 예후인자로 구성한다(D. Park II, H.J. Son and S.Y. Song et al., Role of TGF-β 1 and TGF-β type II receptor in gastric cancer, Korean J Intern Med 17 (2002), p. 160). 또한 폐쇄성 폐질환인 만성 폐쇄성 폐질환(Chronic obstructive pulmonary disease: COPD)은 T세포의 증가로 폐상피의 염증이 유발되는데 이것은 transforming growth factor (TGF)-/TGF receptor (TGFR)과 관련되어 세포사멸이 억제된다.(Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 285: L492-L499, 2003)

<3> TGFβ2 (transforming growth factor beta 2)는 25 Kda 크기의 단일이합체로 세포증식, 분화, 그리고 세포외 메트리스 생성에 관여한다. TGFβ는 세포수준에서 영아나 성인경우에 여러 가지 기능 측면으로 볼때 많은 영향을 주는 커다란 그룹의 하나인데 (J. Massague, TGF-β signal transduction, Annu Rev Biochem 67 (1998), p. 753), 인간의 경우 TGFβ그룹은 세종류의 TGFβ1, TGFβ2, 그리고 TGFβ3가 있다. 종양이나 정상 위 점막상피세포에서 발현되지만 위암에서 더 강하게 통계적으로 발현되어있다. 따라서 TGFβ2발현은 초기암보다는 말기암의 진단에 더 높다. 하지만 위암 후기에 관련되는지는 많은 연구가 진행중이다. TGFβ3는 TGFβ1나 TGFβ2와 다르게 존재한다. TGFβ3는 정상이나 종양이나 다 발현되어 있다. 그러므로 TGFβ3는 암의 종양 진행시기와 단계와

는 아무런 차이가 없다.

<4> 근래의 연구 자료에 따르면 TGFβ의 이성체는 세포증식을 유도하고 인간의 여러 암세포들에서 과발현되는 것이 확인되었고 여러 종류의 암환자 조직에서 위의 단백질들이 과발현하는 것을 확인함으로써 이를 인식하는 암세포의 세포막 수용체인 TGFR가 과발현되어 세포증식을 촉진하는 단백질로 암과의 밀접한 연관성이 있음을 확인되어졌다. (Prognostic relevance of TGF-beta1 and PAI-1 in cervical cancer. Int J Cancer. 2004 Dec 20;112(6):1020-8.). 여기서 본 발명자는 TGFβ1와 TGFβ2가 암세포나 조직에서 정상세포보다 더 많은 양이 발현되는 것을 착안하여 TGFβ2의 리간드를 활용한 항체성 aptamer를 활용하여 암진단과 표적 지향성 치료제 미사일 요법에 적용하였다. 따라서 암치료를 위한 새로운 신약개발의 목표로써 TGFR-β2에 대한 리간드에 대한 연구가 활발히 연구중에 있다.

<5> 최근 암을 치료하는 전략들이 다양하면서 암세포에서만 약물이 도달하게 하여 암세포의 성장을 억제하여 암환자의 생존율을 증가 시키고자 하는 기초 연구들이 수행하고 있다. 그러나 이러한 기존의 화학요법이 항암제의 전신투여에 대한 부작용을 수반한다. 이러한 항암치료 연구과정에서 암세포나 암조직내의 세포에 암치료를 위한 항체성 유전자를 선택적으로 표적지향성을 나타 내도록 항원-항체반응과정을 유도하려는 새로운 미사일 유도 치료방법에 대한 필요성이 대두되어 왔다.

배 경 기 술

<6> 압타머(Aptamer)는 저분자의 올리고뉴클레오타이드로 표적분자에 아주 밀접하고 특이하게 선택적으로 결합한다. 그래서 종양학에서는 진단과 치료면에서 아주 흥미로운 물질이다. 일반적으로 단백질성인 항체는 높은 친화력과, 특수성, 표적의 광범위성에서 우수하나 생체내 긴 혈류잔류로 이미징 능력 감소를 나타내고 표적조직의 고흡수율의 장점은 있으나 오랜 잔류로 종종 혈액독성의 한계를 보인다. 부가적으로 항체는 표적조직에 불완전한 침투성을 보인다. 따라서 새로운 표적물질과 임상 포르토콜이 요구된다. 예를 들면 더 작은 항체 절편이나 펩타이드 뿐만 아니라 항체 원시표적 전략이 그렇다 (Boerman OC, Kranenborg MH, Oosterwijk E, et al. Pretargeting of renal cell carcinoma: improved tumor targeting with a bivalent chelate. Cancer Res. 1999;59:44004405). 따라서 aptamer가 암조직에 특이적 표적을 위하여 임상 시도가 현재 진행중에 있다. 올리고뉴클레오타이드 리간드인 aptamer는 항체와 같은 전형적인 단백질 표적 분자에서 특이성과 친화력으로 비교가 된다. Aptamer는 분자량이 8-15 kDa인데 펩타이드(1-5kDa) (Wu AM, Chen W, Raubitschek A, et al. Tumor localization of anti-CEA single-chain Fvs: improved targeting by non-covalent dimers. Immunotechnology. 1996;2:2136)(Lister-James J, Moyer BR, Dean T. Small peptides radiolabeled with 99mTc. Q J Nucl Med. 1996;40:221233) 와 항체(150 kDa)의 분자량면에서 중간크기이고 단일사슬의 변이절편 항체 (scFve, 25 kDa)보다 더 작다. 다가음이온인 aptamer은 scFve와 아주 다른데 합성분자인 aptamer는 쉽게 구조와 활성을 나타내는 부위 특이 변성을 지지한다. 그래서 폴리에틸렌글리콜(PEG)폴리머와 생물결합, 진단 그리고 치료제에 연결하여 사용될수 있다. 또한 aptamer 약동력학적으로 변형할수 있다 (Watson SR, Chang YF, O'Connell D, Weigand L, Ringquist S, Parma DH. Anti-L-selectin aptamers: binding characteristics, pharmacokinetic parameters, and activity against an intravascular target in vivo. Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 2000;10:6375). 그러므로 현재까지 가장 진보된 연구 결과물은 혈관내피세포 성장인자 aptamer (VEGF-aptamer) (Ruckman J, Green LS, Beeson J, et al. 2'-fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF165): inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain. J Biol Chem. 1998;273:2055620567)와 pegaptanib sodium(Macugen, Pfizer and Eyetech), macular 퇴행성 치료에 적요되고 있다 ((Eyetech Study Group. Anti-vascular endothelial growth factor therapy for sufoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration: phase II study results. Ophthalmology. 2003;110:979986). 효과적으로 분자성 표적물질인 화합물을 전달하기 위해서는 병리조직에 상당한 수준으로 축적되어야 하고 병리조직과 정상조직간의 축적 비율이 큰 범위차가 되어야 한다. 표적물질로써 생체내 이미징이 성공하기 위해서는 대사의 기관이나 혈액내 오랫동안 잔류하지 않아야 한다. aptamer의 성질이나 다가 음이온, 그리고 크기가 혈액투명도, 조직 유입량을 신속히 유도하고 간, 신장의 잔류량을 최소화하고 이미징과 방사능 치료을 위한 잠재적으로 효과적인 특성을 가져야 한다 (Guhlke S, Famulok M, Biersack HJ. Aptamares: a novel class of radiopharmaceutical with diagnostic and therapeutic potential. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2003;30:14411443, Cerchia L, Hamm J, Libri D, Tavitian B, de Franciscis V. Nucleic acid aptamers in cancer medicine. FEBS Lett. 2002;528:1216). 초기에는 생체내 이미징화을 위한 aptamer 적합성을 이룬 연구가 보고하였는데 생체분포 특성에서 명확하게 고안 연구되었다. 인간암 xenograft

model에서 암세포에 과발현된 tenascin-C같은 단백질을 대상으로 높은 친화성이 있는 선택적인 aptamer성질을 선택하였다 (Hicke BJ, Marion C, Chang YF, et al. Tenascin-c aptamers are generated using tumor cells and purified protein. J Biol Chem. 2001;276:4864448654). tenascin-C은 혈관신생이나, 배아 발생, 상처치유, 암성장의 조직 재구성에 새롭게 재구성하게 하는 hexameric 세포외 큰 메트리스단백질이다. 동맥경화의 염증에 과발현되며 골수암에서는 약 1 μmol/L이 측정된다 (Lightner VA, Slemp CA, Erickson HP. Localization and quantitation of hexabrachion (tenascin) in skin, embryonic brain, tumors, and plasma. Ann N Y Acad Sci. 1990;580:260275). 현재까지 알려진 tenascin-C이 과발현된 암은 폐암, 유방암, 전립선암, 대장암, 임파선종양, sarcoma, 뇌암, 피부암등이다 (Lastoria S, Castelli L, Vergara E, et al. Human gliomas radioimmunoimaging with 131-I BC-2 murine IgG: preliminary report. J Nucl Med Allied Sci. 1990;34:173176,Paganelli G, Magnani P, Zito F, et al. Pre-targeted immunodetection in glioma patients: tumour localization and single-photon emission tomography imaging of [99mTc]PNAO-biotin. Eur J Nucl Med. 1994;21:314321). 현재까지 국내에서 aptamer로 사용하여 특허출원 또는 등록된 사례는 혈청단백질에 특이적으로 결합하는 단일가닥핵산 압타머를 이용하여 진단목적에 사용될수 있음이 보고되었다 (KR 2007-0061970 A 20070615). 그리고 식중독균에 특이적으로 결합하는 단일가닥핵산 압타머를 사용하여 식품오염에 적용한 사례가 보고되었고 (KR 2007-0054485 A 20070529), 이뮤노글로불린 E에 대한 핵산 리간드 및 아토피성 질환치료제로서의 적용한 사례도 보고되었으며 (KR 2007-0044813 A 20070430), 인간 ＩＬ－１２ 사이토카인 족에 대한 앱타머 및 자가면역 질환 치료제로 사용될수 있음을 보고하였다 (KR 2007-0031877 A 20070320). ＭＣＰ－1 결합 펩타이드 앱타머에 대한 결과 (KR 2007-0015715 A 20070206), 압타머를 이용한 탄소 나노튜브 트랜지스터 바이오센서 및 이것을 이용한 타겟물질 검출 방법에 대하여 적용될 수 잇음이 보고되었고(KR 2007-0000667 A 20070103), ＴＣＦ－1의 베타 카테닌과 상호작용하는 부위에 대한ＲＮＡ 앱타머가 사용될 수 있다고 보고하였고(KR 2006-0081860 A 20060713), 눈의 혈관신생성 질환을 치료하는 방법(KR 2005-0044372 A 20050512), 상동적으로 결합되거나 신규 복합체에 존재하는 핵산 또는 핵산 동족체의 서열을 함유하는 아프타머(KR 2004-0035878 A 20040429), 지혈 조인자로서 ＲＮＡ를 포함하는 약제(KR 2004-0014307 A 20040214), 분자상 인식을 판별 시그날로 변환시키는 시그날링 압타머 (KR 2002-0089339 A 20021129)처럼 질병의 진단과 치료목적으로 사용한 사례가 보고된 예가 있으며 국외에서는 인간 암의 치료와 진단, 탐지를 위한 압타머개발에 관하여 (US 20070160526 A1 20070712), 올리고뉴클레오타이드 모방형 압타머 (US 20060246123 A1 20061102), rho-gef 그룹에서의 단백질 저해제을 목적하는 압타머(US 20060210973 A1 20060921), 단백질구조결정과 응용에 있어 압타머 에피토퍼나 불연속 항체의 지도화(US 20060205089 A1 20060914), 인간형 IL-12사이토카인의 자가면역질환 치료에 압타머사용(US 20060193821 A1 20060831), 투과막의 GPCR에서의 이가 결합분자에 적용한 압타머(G protein-coupled receptors)의 (US 20060147987 A1 20060706), 병원체나 바이러스 단백질에 특이적으로 결합하는데 고집적 탐색방법에 적용한 압타머(US 20060121489 A1 20060608), 보체관련 질환의 치료에 압타머로 치료하는 방법(US 20060105980 A1 20060518), 치료용 올리고뉴클레오타이드에 대한 압타머 (US 20060105975 A1 20060518), 고정화 핵산 압타머에 대하여 (US 20060068407 A1 20060330)된 사례에서처럼 의학적, 약학적, 공학측면에서 선택적으로 변형된 올리고뉴클레오타이드의 사용이 확대되고 의학이나 약학적인 측면만 국한되는 것이 아니라 반도체, 환경, 산업측면에 사용범위가 증가되는 장점을 갖는다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<7> 이러한 aptamer의 도입은 암진단과 치료를 위한 유전자를 선택적으로 설계함으로 암세포에서만 특정 단백질의 발현에 대하여 항체 대신 올리고뉴클레오타이드를 사용함으로 항체 분야에서 사용되는 결합 리간드의 당과 단백질의 서열-특이적 변형 또는 단백질 구조에 이용되는 것보다 aptamer의 유효농도가 낮으며 증진된 안전성을 갖고, 다른 일반적인 안티센스나 리보좀 같은 폴리뉴클레오타이드에 비해 짧은 길이를 갖는 등의 장점을 갖는다. 또한 암세포의 항원인 표면 단백질에 대해 용이하게 결합하고 변형된 단백질 구조에 대해서도 아직 정밀하게 aptamer의 서열을 변형시킴으로 즉시 반응할 수 있는데 이와 같은 항체성 aptamer의 적용은 나노공학이나 분자생물학적, 세포생물학적인 역할에 대한 연구에 중요한 수단이 될 수 있다. 또한 암세포에서의 TGFR-β2를 표적으로한 암진단과 암치료에 중요한 역할을 담당할수 있다.

과제 해결수단

<8> 이에 본 발명자는 TGFR-β2를 탐지하거나 암세포 표면 항원에 결합하도록 설계된 aptamer 및 이를 HeLa 세포주

와 TGFR-β2에 대한 리간드인 TGFβ2와 함께 생물결합시킨 항암제가 탑재한 나노입자는 HeLa 세포주에 내포화시켜 TGFR-β2수용체에서 항암제만 탑재한 나노입자보다 더 많이 암세포 증식 억제를 확인하여 본 발명을 완성하였다.

<9> 본 발명의 목적은 TGFβ2리간드의 유전자와 생물결합성 나노항암제에 대한 초정밀 표적 지향성 aptamer를 제공하는데 있다.

<10> 본 발명의 다른 목적은 상기 초정밀 표적 지향성 aptamer를 포함하는 항암 조성물을 제공하는데 있다.

<11> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 초정밀 표적 지향성 aptamer와 생물결합성 항암제가 담지한 나노담체를 투여하여 암을 치료하거나 진단하는 방법을 제공하는데 있다.

<12>

<13> 하나의 형태로써 본 발명의 TGFβ2리간드 유전자 aptamer와 생물결합성으로 연결된 항암제 담지 나노담체에 관한 것이다.

<14> 본 발명에 있어 용어 “aptamer"란 특정염기로 구성되어져서 항체성질을 가지면서 면역반응을 전혀 나타내지 않고 세포내 효소분해작용을 가지지 않고 암세포 표면에만 과발현되거나 존재하는 TGFR-β2의 리간드기능을 갖도록 항원-항체반응을 유도한 단일가닥 또는 이중가닥 염기를 의미한다.

<15> 압타머는 특정 염기끼리 짝을 이루는 이중가닥부분이 완전히 쌍을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(상보적이지 않는 염기쌍), 벌지(일방가닥에 대응하는 염기가 빈 곳)등에 의하여 쌍을 이루어 지지 않는 부분이 포함될 수 있다. 염기쌍을 이루는 염기의 길이는 TGFR-β2의 활성 및 발현으로부터 결합 친화력이 증가되도록 10 내지 50염기, 바람직하게는 15 내지 35염기이다. 압타머말단 구조는 표적 수용체에 대하여 친화성을 좌우하도록 평활(blunt)말단 또는 돌출(overhang)말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3‘ 말단 돌출한 구조와 5’ 말단 방향쪽이 돌출한 구조 모두 가능하다. 돌출하는 염기수는 한정되지 않는다. 예를 들면 염기 수는 1 내지 8 염기, 바림직하게는 2 내지 7염기일 수 있다. 또한 점착 말단 구조는 3‘ 말단 돌출한 구조에 형광 염료인 FITC (fluorescein 5'-isothiocyanate) 내지 cyc5같은 green 형광염료와 5’ 말단 방향쪽에는 biotin결합된 구조 모두 가능하다. 돌출하는 구조는 한정되지 않는다. 압타머 말단구조는 양측 모두 염료가 부착될 필요는 없고 염기의 일방 부위가 링커염기에 의하여 접속된 스템 루프형 구조 내지 갈고리구조일수도 있다. 링커의 길이는 스템 부분의 쌍을 이루는데 지장이 없는 길이면 특별히 한정되지 않는다.

<16> 압타머를 제조하고 세포 또는 동물로 도입하는 방법의 결정은 실험의 목적 및 표적 수용체의 세포 생물학적 기능에 따라 달라질 수 있다.

<17> TGFRβ2유전자에 대한 모든 압타머가 생리학적 및 분자생물학적으로 중요한 효과를 갖는 단백질발현에 항원-항체반응을 유도하는 것은 아니다. 본 발명자는 상기한 압타머를 인간 자궁경부암 세포주인 HeLa 세포주와 MTX-LDH/aptamer에 도입한 결과 TGFRβ2단백질수준에서 나노벡터가 세포막에 더 많이 접촉되면서 세포내로 유입되고 세포사멸을 유도함을 확인하였다.

<18> 따라서, 하나의 구체적 양상에서 본 발명은 단일가닥 내지 이중가닥의 TGFRβ2압타머가 생물결합된 MTX-LDH/aptamer를 제공한다.

<19> 또 다른 구체적 양상에서, 본 발명은 양쪽 말단에 기능기로 FITC (fluorescein 5'-isothiocyanate) 내지 cyc5 같은 green 형광염료와 5’ 말단 방향쪽에는 biotin결합된 구조의 TGFRβ2압타머가 생물결합된 MTX-LDH/aptamer를 제공한다.

<20> 또 다른 구체적 양상에서 본 발명은 양 말단에 부분적으로 루프나 단일가닥으로 된 TGFRβ2압타머가 생물결합된 MTX-LDH/aptamer를 제공한다.

<21> 또 다른 구체적 양태에서, 본 발명은 상기한 압타머를 포함하는 항암 조성물 및 이를 투여하거나 생체내 조영하여 암을 치료하는 방법에 관한 것이다.

<22> 본 발명의 조성물에서 “항암”이란 TGFRβ2압타머에 의해 발병할 수 있는 모든 암에 대한 치료 또는 예방효과를 일컫으며 이러한 암은 유방암, 식도암, 폐암, 뇌암, 대장암, 등이 있다.

<23> 본 발명의 약제학적 조성물은 상기한 TGFRβ2압타머가 생물결합된 MTX-LDH/aptamer를 각각 단독으로 사용하거나 2종이상의 압타머 내지 항암제가 탑재된 나노담체를 혼합하여 사용될 수도 있다.

<24> 또한 본 발명의 약제학적 조성물은 암환자의 암세포의 증식을 저해시키는 추가의 물질을 포함할수도 있으며 또 다른 수용체의 압타머를 결합시켜 암세포를 정확히 표적인자로 설정하여 세포내로 유입을 촉진시키는 제제 예를 들어 리포좀(미국특허 제 4,897,355호, 제 4,235,871호, 제 4,673,567호)을 이용하거나 콜레스테롤, 콜레이트 및 데옥시콜산을 비롯한 다수의 스테롤류중 1종의 친유성 담체와 함께 배합할수도 있다.

<25> 본 발명의 약제학적 조성물은 생리학적으로 허용되는 담체와 함계 투여할수도 있으며 경구 투여시에는 결합제, 활탁제, 붕해제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료등을 사용할 수도 있으며 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조할수도 있다. 예를 들어 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릴시르, 세스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할수 있으며 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 이외의 본 발명 약제학적 조성물은 각종 제형의 형태로 통용되는 기법에 따라 제조할 수 있다.

<26> 본 발명의 약제학적 조성물에 함유되는 TGFRβ2압타머가 생물결합된 MTX-LDH/ 의 유효 투여량의 범위는 성별, 중증도, 연령, 투여방법, 표적 세포, 발현수준등 다양한 요인에 따라 달라질 수 있으며 당 분야의 전문가들에 의해 용이하게 결정될수 있다. 하나의 예시로서 약 0.01 μg 내지 약 1,000 μg/kg의 범위일 수 있다.

<27> 본 발명의 약제학적 조성물은 경구적으로 또는 정맥내 피하, 비강내 또는 복강내 등에 비경구적으로 사람과 동물에게 투여된다. 비경구적 투여는 피하주사, 근육내 주사 및 정맥주사와 같은 주사법 및 점적법을 포함한다.

효 과

<28> 본 발명의 TGFRβ2압타머가 결합된 LDH-MTX/aptamer에 대하여 압타머 염기서열은 특정암이나 TGFRβ2가 과발현된 암세포에서만 항암제가 탑재된 나노담체에 의해 암세포에 전달되고 세포증식을 억제되는 기작에 대한 전반적인 이해및 이를 응용한 암진단시약, 암치료제 개발등에 유용하게 이용될수 있을 것으로 기대된다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<29> 이하 본 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

<30> 실시예 1: TGFRβ2의 유전자 염기서열(genebank, LOC534421)

<31> 도 1은 TGFRβ2유전자 서열에서 압타머표적되는 염기서열을 나타낸 것이다. TGFRβ2는 액손 2와 액손 5사이의 일부분으로 표적되어 있다. 상기한 압타머는 제노텍으로부터 주문 제작하였다.

<32> 실험예 1. 자궁암 세포주에 TGFRβ2압타머로 생물결합된 LDH-MTX/aptamer처리하여 세포사멸가. 실험 내용

<33> 금속 이중층 수산화물을 구성하고 있는 금속 이온종은 기존의 전형적인 금속에서 일부 전이 금속으로 치환함에 따라, 용해성을 가질 수 있는 무기 vector를 얻을 수 있었다. 금속 이중층 수산화물의 합성시 합성조건 인 농도, 합성 온도, 수열 합성 조건을 변형하여 입형을 조절하는 데 성공하였고 이를 통해 150 nm정도의 입형 또한 넓은 판상에서 타원구형에 이르기까지 다양하게 변형 시킨 나노담체 입자를 합성하였다. 특히 입자표면에 특정암에 대한 표적리간드를 디자인하기 위해 TGFR2 (tumor growth factor receptor β2)에 대한 리간드를 대상으로 TGFRβ2에 대한 항체성 aptamer를 합성하였다. 이 aptamer는 5'-에 cyc3 (red형광)을 결합시키고 3 '-에 biotin을 부착시켜 총 올리고뉴클레오타이드가 56 mer 정도로 해서 합성하여 나노담체의 표면에 미리 흡착시킨 streptoavidin과 친화결합에 의해 매우 친밀도가 높게 반응하였다. 그래서 특정 암세포인 Hela 경우 5% 태아송아지 혈청, 페니실린 100 unit/ml 및 스트렙토마이신 100 μl/ml을 함유하는 DMEM 배양배지(Gibco/BRL, Grand Island NY)에서37도의 온도와 5% 이산화탄소 조건하에서 배양하였다. 이러한 HeLa 세포주를 0.5 내지 $1X10^4/cm^2$ 세포수로 6-웰 플레이트 또는 60 mm 배양접시로 옮기고 36시간동안 배양하였다. 상기 세포들을 PBS용액으로 두 번 세척한 후 TGFRβ2가 과발현되어 있어 TGFβ2리간드가 결합된 LDH-MTX/aptamer를 세포에 처리하였다.

<34> 나. 실험결과

<35> 암 특이적으로 세포막 표면에 분포하게 되고 또한 clathrin이 공통적으로 분포하는 곳에 많이 존재하게 하는 것이 중요하다. 따라서 LDH-MTX/aptamer가 세포질내로 많은 부분이 내재화하도록 합성하여 디자인하였다. 그리고 리간드가 잘 적용되기 위해서는 우선 특정암이나 암세포 특이적으로 존재하는 수용체에 대하여 알려진 것이

PSA(prostate specific antigen)로 그 외에는 항체를 대신할 수 있는 aptamer가 전무하다. 그러나 본 연구자는 최근에 알려진 TGFRβ2를 활용하여 자궁경부암세포주인 HeLa 세포주에서 EPR효과와 더불어 암 특이 표적지향성를 유도하였다. 즉 나노입자 사이즈가 150 nm이고 표면이 양전하를 띠며 암 특이적으로 표적 지향성을 띤 리간드를 합성하기 위한 조건을 최적화하였다. (도 1, 도 2) 또한 세포내로 유입되기 위해서는 처음으로 세포막의 수용체에 처음으로 접촉하게 된다. 상기 세포주에 처리하여 세포관찰을 한 결과 세포내로 유입된 나노담체와 압타머가 내재화됨을 적색형광으로 강하게 나타 내었다. 또한 세포사멸은 시간이 경과함에 따라 강하게 증가하였고

<36> 세포사멸시기에 출현되는 세포사멸 바디도 많이 출현되었다. (도 3)

<37> 실험예 2. 자궁암 세포주에 항체성 TGFRβ2압타머결합 LDH-MTX/aptamer처리하여 실시간

<38> 세포사멸을 추적

<39> 가. 실험 내용

<40> 특정 암세포인 Hela 경우 5% 태아송아지 혈청, 페니실린 100 unit/ml 및 스트렙토마이신 100 μl/ml을 함유하는 DMEM 배양배지(Gibco/BRL, Grand Island NY)에서37도의 온도와 5% 이산화탄소 조건하에서 배양하였다. 이러한 HeLa 세포주를 0.5 내지 $1X10^4/cm^2$ 세포수로 25 mm 배양접시로 옮기고 36시간동안 배양하였다. 상기 세포들을 PBS용액으로 두 번 세척한 후 TGFRβ2압타머가 결합된 LDH-MTX/aptamer 5 μg/ml 농도로 세포에 처리하여 LSM510 칼짜이즈 CONFOCAL(공초점 형광현미경)으로 3시간동안 실시간으로 관찰하였다.

<41> 나. 실험 결과

<42> 상기 HeLa세포을 TGFRβ2압타머가 결합된 LDH-MTX/aptamer 5 μg/ml 농도로 세포에 처리하여 LSM510 칼짜이즈 CONFOCAL(공초점 형광현미경)으로 3시간동안 실시간으로 관찰하였는데 세포내로 유입되는 칼슘이온이 시간이 경과하면 할수록 순신간에 농도가 증가하다가 급격히 감소하였다. 또란 시간이 경과하면서 세포막 부근에 존재하는 적색형광이 보이는 LDH-MTX/aptamer가 부착된 세포수가 증가하고 시간이 경과함에 따라 세포사멸의 징후인 세포사 바디가 여러 군데에서 늘어나는 것을 알 수 있었고 세포증식이 억제되었으며, 세포모양이 배양접시 바닥에서 떨어지거나 둥근모양으로 세포사멸을 나타내는 양상을 나타내었다. 또한 이런 양상은 세포나 조직에서의 LDH-MTX/aptamer으로부터 약물분포나 이미징같은 조영을 나타낼 수 있음이 사료된다(도 3,도 4).

<43> 상기의 방법으로 측정된 결과를 도 4에서 나타내었다.

도면의 간단한 설명

<44> 도 1은 TGFRβ2에 대한 항체성 aptamer가 리간드로써 수용체에 결합하기 위한 화학적 구조

<45> 도 2은 나노혼성체 표면의 TGFRβ2리간드 작용모식도

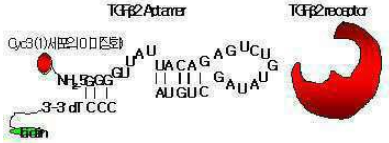
<46> 도 3은 자궁경부암세포주인 Hela에서의 LDH-MTX/aptamer (red) 세포내 분포양상

<47> 도 4은 LDH-MTX/aptamer가 HeLa 세포막 표면에 결합하는 양상을 time lapse confocal

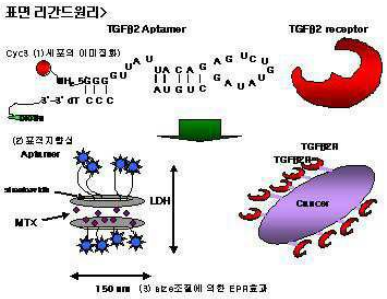
<48> 형광사진

도면

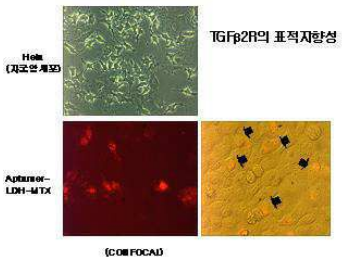
도면1



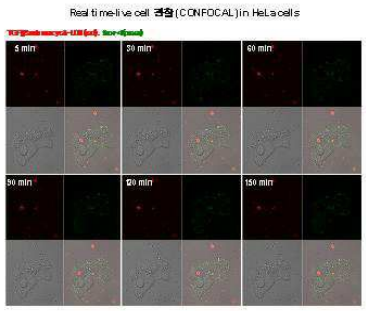
도면2


표면 리간드원리>
TGFβ2 Aptamer
TGFβ2 receptor
Cyc3 (1)세포의 이미질화)
3'-3' dT CCC
(2)표적지향성
Aptamer
LDH
MTX
TGFβ2R
Cancer
150 nm (3) size조절에 의한 EPR효과

도면3


TGFβ2R의 표적지향성
Hela
(자로인세포)
Aptamer-
LDH-MTX
(CONFOCAL)

도면4


Real time-live cell 관찰(CONFOCAL) in HeLa cells
5 min
30 min
60 min
90 min
120 min
150 min