creative commons
COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

공학석사학위논문

약물전달을 위한 30Kc19α 단백질 나노입자 생산

Production of 30Kc19α protein nanoparticle for drug delivery

2016년 2월

서울대학교 대학원
공과대학 협동과정 바이오엔지니어링 전공
우 연 화

약물전달을 위한 30Kc19α 단백질 나노입자 생산

Production of 30Kc19α protein nanoparticle for drug delivery

지도교수 박 태 현

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함

2015년 12월

서울대학교 대학원

공과대학 협동과정 바이오엔지니어링 전공

우 연 화

우연화의 석사학위논문을 인준함

2015년 12월

위 원 장	김 병 기	(인)
부위원장	박 태 현	(인)
위 원	한 지 숙	(인)

요약 (국문초록)

누에 체액에 존재하는 30 kDa 크기의 단백질 중 30Kc19 단백질은 가장 많은 양을 차지하고 있다. 선행연구에서 30Kc19 단백질은 세포 내로 투과하여 세포 내 효소를 안정화시킨다는 것이 밝혀졌다. 이러한 단백질의 특성을 약물 전달에 활용하기 위하여, 안정적으로 만들어지는 인간혈청알부민 (HSA) 나노입자에 충진되었을 때, 세포 투과성과 효소 안정화 효과를 나타내는 연구가 수행되었다. 또한, N-terminal에 α-helix 부분과 C-terminal에 β-sheet 부분을 갖는 30Kc19 단백질의 α-helix (30Kc19α) 부분만을 재조합 단백질로 정제하였을 때, 세포투과성을 담당하는 CPP (cell-penetrating peptide) 가 존재한다는 것과, 세포 내 및 외부에서 효소 안정화 기능을 보고하였다.

그리하여 본 연구에서는 30Kc19α 단백질만으로 나노입자를 만들어 약물전달을 위한 도구로 사용될 수 있음을 확인하고자 하였다. 먼저, 탈용매화 방법으로 만들어진 30Kc19α 단백질 나노입자는 1 mg/ml 농도와 pH 10인 환경에서 200 nm 지름을 갖는 안정적인 구형의 형태로 합성되었으며, 세포내에서 거의 독성을 유발하지 않는 것을 보였다. 효소 안정화 기능을 확인하기 위하여, 모델 효소인, β-galactosidase가 충진되었을 시, 공초점 레이저 현미경으로, 세포 투과성을 관찰할 수 있었으며, 30Kc19α 단백질 나노입자로부터 방출된 β-galactosidase의 안정성을 유

지시켜주었으며, β-galactosidase는 *in vitro* 상에서 나노입자로부터 서방형 방출양상 (controlled-release)으로 방출되는 것을 확인하였다. HDF 세포내 β-galactosidase 활성은 엑스 갈 (X-gal) 염색법으로 확인할 수 있었다. 또한 단백질 나노입자에 충진된 β-galactosidase는 서방형 방출양상으로 나노입자로부터 방출되었다.

이상의 결과들에서, 30Kc19α 단백질 나노입자는 다양한 세포내로 단백질 기반 약물의 효과적이고 안정적인 운반체로 사용될 수 있는 것으로 기대된다.

주요어 : Protein nanoparticle, 30Kc19α, drug delivery, soluble expression, cell-penetrating property, enzyme-stabilizing property, recombinant protein production

학번 : 2014 - 21550

목차

요약 ---- i
목차 ---- iii
그림목차 ---- v
표목차 ---- vi
1. 서론 ---- 1
1.1. 누에 체액과 누에 체액 단백질에 대한 선행 연구 ---- 1
1.1.1. 누에 체액 ---- 1
1.1.2. 30K 단백질의 특성 ---- 2
1.1.3. 30Kc19α 단백질의 특성 ---- 3
1.2. 약물 전달체 ---- 4
1.2.1. 약물 전달 시스템에서 나노입자의 역할 ---- 4
1.2.2. 30Kc19-HSA 나노입자의 특성 ---- 4
1.3 약물 전달 시스템에서 30Kc19α 단백질 나노입자의 기능 ---- 5
2. 실험 재료 및 방법 ---- 7
2.1. pET-23a/*30Kc19a* ---- 7
2.2. 30Kc19α 단백질 발현 및 정제 ---- 9
2.3. 탈용매화 방법 ---- 11
2.4. 전기영동광산란광도계로 지름, 다분산지수, 제타포텐셜 측정 13
2.5. 주사전자현미경으로 30Kc19α 단백질 나노입자의 형태 관찰 14
2.6. Live cell imaging ---- 15
2.7. CCK-8 assay를 통한 HDF 세포 내 독성 검사 ---- 16
2.8. β-galactosidase의 specific activity 측정 ---- 17
2.9. Alexa Fluor® 488-labeled β-galactosidase의 형광강도 측정 18
2.10. X-gal 염색법 ---- 19
3. 결과 및 고찰 ---- 20
3.1. 재조합 단백질의 발현 및 농도 확인 ---- 20

3.2. pH가 30Kc19α 단백질 나노입자의 지름, 다분산 지수, 및 제타 포텐셜에 미치는 영향 ---- 23
3.3. 단백질 농도가 30Kc19α 단백질 나노입자의 지름, 다분산 지수, 및 제타 포텐셜에 미치는 영향 ---- 26
3.4. 30Kc19α 단백질 나노입자의 세포 내 독성 확인 ---- 29
3.5. 30Kc19α 단백질 나노입자의 형태 확인 ---- 31
3.6. β-galactosidase 충진된 30Kc19α 단백질 나노입자의 형태 확인 ---- 33
3.7. β-galactosidase 충진된 30Kc19α 단백질 나노입자의 세포 투과성 ---- 35
3.8. 30Kc19α 단백질 나노입자의 효소 안정화 특성 확인 ---- 37
3.9. 30Kc19α 단백질 나노입자로 부터의 β-galactosidase의 서방형 방출 양상 ---- 39
3.10. HDF 세포의 β-galactosidase activity 측정 ---- 41
4. 결론 ---- 43
5. 참고문헌 ---- 45
Abstract ---- 52

그림 목차

Figure 1. 30Kc19α 단백질 나노입자를 사용한 효소 운반 ---- 6
Figure 2. pET-23a/*30Kc19α* 벡터의 구조 ---- 8
Figure 3. 탈용매화 방법으로 30Kc19α 단백질 나노입자 생산 ---- 12
Figure 4. SDS-PAGE를 이용한 재조합 30Kc19α단백질의 크기 및 발현 확인 ---- 21
Figure 5. Western blot을 통한 30Kc19α 단백질 확인 ---- 21
Figure 6. pH 환경이 30Kc19α 단백질 나노입자의 지름과 다분산 지수에 미치는 영향 ---- 24
Figure 7. pH 환경이 30Kc19α 단백질 나노입자의 제타 포텐셜에 미치는 영향 ---- 25
Figure 8. 30Kc19α 단백질 농도가 나노입자의 지름과 다분산 지수에 미치는 영향 ---- 27
Figure 9. 30Kc19α 단백질 농도가 나노입자의 제타 포텐셜에 미치는 영향 ---- 28
Figure 10. 30Kc19α 단백질 나노입자가 Human Dermal Fibroblasts에 대한 독성검사 ---- 30
Figure 11. 30Kc19α 단백질 나노입자의 FESEM 이미지 ---- 32
Figure 12. β-galactosidase 충진된 30Kc19α 단백질 나노입자의 FESEM 이미지 ---- 34
Figure 13. 공초점 레이저 현미경을 통한 HDF 세포에서의 β-galactosidase 충진된 30Kc19α 단백질 나노입자의 세포 투과성 ---- 36
Figure 14. 30Kc19α 단백질 나노입자로부터 시간대별 방출된 β-galactosidase의 specific activity ---- 38
Figure 15. β-galactosidase가 충진된 30Kc19α 단백질 나노입자의 *in vitro* release profile ---- 40
Figure 16. X-gal 염색법을 통한 HDF 세포의 β-galactosidase activity ---- 42

표 목차

Table 1. BCA 분석을 이용하여 측정한 재조합 단백질의 농도 -----22

1. 서론

1.1. 누에 체액과 누에 체액 단백질에 대한 선행 연구

1.1.1. 누에 체액

30 kDa 크기를 갖는 30K 단백질들은 *Bombyx mori*의 학명을 갖는 누에의 체액에 존재하며, 다양한 생물학적 기능들이 본 연구실에서 보고되었다. 누에체액은 곤충 세포의 배지로 기존에 이용되었던 고가의 FBS (fetal bovine serum)와 유사한 효능을 보여, 이의 대체물질로 선행 연구가 되어왔다 [1]. 누에 체액이 곤충 세포-베큘로바이러스 (baculovirus) 시스템의 배지에 첨가되었을 때, 베큘로바이러스에서 유도된 에이파토시스 (apoptosis)를 억제하는 것을 보였으며 [2], 숙주 세포의 생존률을 향상시키는 것을 볼 수 있었다 [3]. 또한, 누에 체액은 화학 유도제에서 유도된 세포의 에이파토시스를 억제하는 것을 나타냈다 [4]. 곤충 세포와 마찬가지로, 누에 체액이 동물세포의 배지에 첨가되었을 때 숙주 세포의 에이파토시스를 억제하고 [5,6], 세포의 생존율과 생산성을 증가시키는 것을 보였으며, 화학물질 [6]이나 백신 바이러스 [5]에 의한 에이파토시스를 억제하는 것을 확인하였다.

1.1.2. 30K 단백질의 특성

에이파토시스 억제 효과를 갖는 단백질들을 누에 체액으로부터 분리 및 정제를 하였고, 그 결과 이 단백질들은 30 kDa의 비슷한 크기를 갖는 단백질 군이라고 밝혀졌다 [7]. 이 단백질 군은 분자량뿐만 아니라 유사한 아미노산서열을 갖는 5개의 하위 단백질들 (30Kc6, 30Kc12, 30K19, 30Kc21, 30Kc23)로 구성되어있다 [8,9].

그 중 30Kc6 단백질을 CHO (Chinese hamster ovary) cell에서 발현시켰을 때 에이파토시스 억제효과를 보였으며 [10], 재조합 단백질의 생산성을 향상시키는 것을 보았다 [11,12,13,14]. 30Kc19 단백질은 가장 많은 부분을 차지하는 하위 단백질로서, 곤충세포에 처리했을 때 에이파토시스 억제효과를 보였으며 [15], EPO (erythropoietin)을 생산하는 CHO cell에 30Kc19을 재조합 단백질 형태로 첨가해주거나 [9], 함께 발현시켰을 때 [16,17] EPO의 생산량을 향상시켰다. 또한, 30Kc19 단백질을 효소에 처리하였을 때, BSA (bovine serum albumin)와 비슷한 효소 안정화 특성을 보였다 [18]. 또한 이 단백질은 cell-penetrating peptide (CPP)를 포함하고 있어, *in vitro* 시스템에서 세포 투과성을, 그리고 *in vivo* 시스템에서 조직 투과성을 보임을 확인하였다 [19].

1.1.3. 30Kc19α 단백질의 특성

30Kc19 단백질은 N-terminal 도메인에 6개의 alpha-helix들과, C-terminal 도메인에 12개의 β-sheet 들로 구성되어 있음이 보고됐다 [20]. 30Kc19 단백질의 특성중 하나인 세포투과성은 alpha-helix 구조에 존재하는 세포 투과 단백질 (cell-penetrating protein)인, Pep-c19의 역할로 밝혀졌다 [21]. 또한, 본 연구실에서는 이 단백질의 α-helix 부분(30Kc19α)은 soluble하게 정제되었고, β-sheet 부분은 insoluble하게 정제 되는 것을 밝혔다. 또한 30Kc19α 단백질은 세포 투과성과 extracellular과 intracellular 시스템에서의 단백질 안정화 특성을 갖는다는 것을 확인하였다.

1.2. 약물 전달체

1.2.1. 약물 전달 시스템에서 나노입자의 역할

유기나노입자를 사용한 약물 전달에 관한 연구들에 따르면, 유기나노입자는 환경 친화적으로 분해되며, 독성이 적고, 운반하는 약물이 조절된 방출 (controlled-release)을 하여 약물 주입 횟수를 줄여주는 가능성을 보였다. 또한, 단백질 기반 약물이 나노입자에 충진되어 encapsulation 되었을 때 안정적인 구조가 유지됨을 보였다. 나노입자 외에도 마이셀 (micelles), 중합 나노젤 (polymeric nanogel), 중합 나노입자 (polymeric nanoparticles), 등이 생물 의학 연구에서 응용되고 있다 [22,23,24].

1.2.2. 30Kc19-HSA 나노입자의 특성

선행 연구에서, 누에 체액에서 유래한 30Kc19 단백질의 대표적인 특성인 세포 투과성과 단백질 안정성을 약물전달에 응용하기 위하여, 30Kc19 단백질이 안정적으로 만들어지는 인간혈정알부민 (human serum albumin) 나노입자에 충진되었다. 두 단백질 양이 1 대 1 비율로 섞여서 탈용매화 방법으로 만들어졌을 때, 인간혈정알부민 나노입자에 비해 향상된 세포투과성과 단백질 안정화 특성을 보였다 [22].

1.3. 약물 전달 시스템에서 30Kc19α 단백질 나노입자의 기능

본 연구에서는, 30Kc19 단백질 중 soluble하게 생산되고 세포투과성과 단백질 안정화 특성을 갖는 30Kc19 α-helix 단백질만을 생산 및 정제를 하고 단백질의 pH환경과 농도가 최적화된 탈용매화 방법으로 단백질 나노입자를 만들어 세포투과성과 단백질 안정화 특성을 확인하여 서방형 방출 양상 (controlled-release)을 보이는 다양한 약물의 전달체로서 사용될 수 있음을 확인하고자 하였다 (Figure 2).

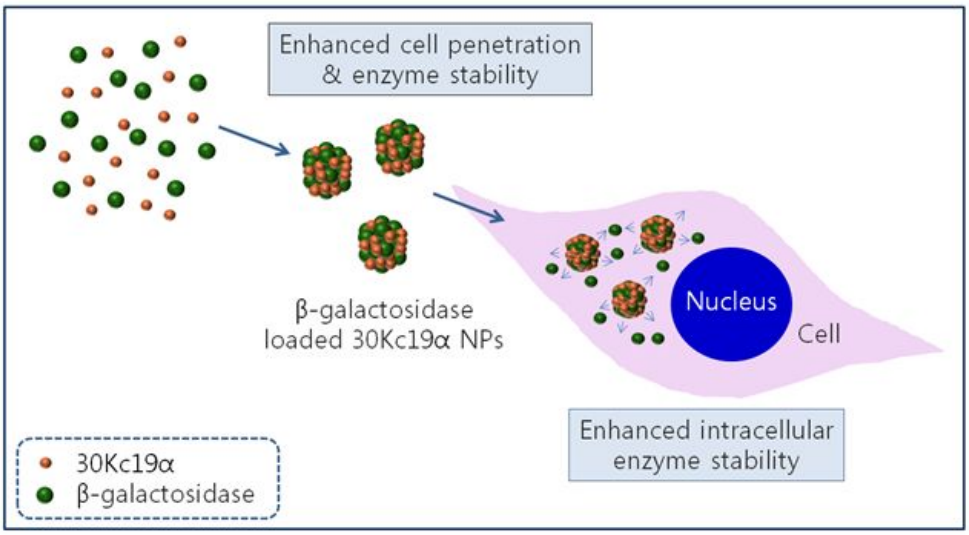


Figure 1. 30Kc19α 단백질 나노입자를 사용한 효소 운반

2. 실험 재료 및 방법

2.1. pET-23a/*30Kc19a*

선행연구에서 사용된 발현용 pET-23a/*30Kc19a* plasmid는, pET-23a/GFP-30Kc19 [19]로부터 얻은 30Kc19 유전자를, forward primer는 *EcoR*I 제한 효소 절단위치가 추가된 5'-GAA TCC GCA GAT TCC GAC GTC-3'를 사용하여, reverse primer는 5'-CTC GAG GTT TTT CGG CGA AGA TAA-3'으로 *Xho*I 제한효소 절단위치를 추가하여, 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction)으로 *30Kc19a*를 증폭시킨 후, pET-23a (Novagen, Madison, WI, USA)에 삽입하여 완성되었다. pET-23a plasmid에서 발현된 각 단백질들은 N 말단에 T7 tag와 C 말단에 정제과정을 위한 6-Histidine tag가 존재한다 (Figure 3).

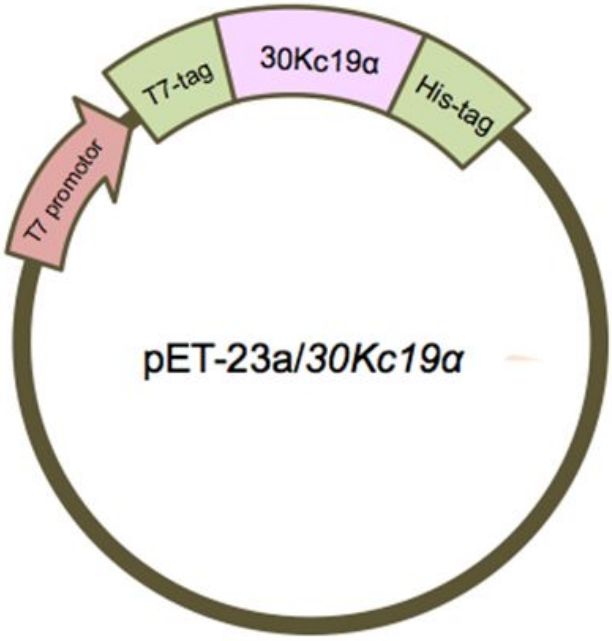


Figure 2. pET-23a/*30Kc19a* 벡터의 구조

2.2. 30Kc19α 단백질 발현 및 정제

재조합 30Kc19α 단백질을 생산하기 위하여 선행연구에서 사용된 plasmid는 *E. coli* (*Escherichia coli)* BL21 strain (Novagen)에 형질전환 (transformation)되었다. 형질전환 된 *E. coli*를 50 μg/ml Ampicilin이 첨가된 LB broth 배지 (10 g/L NaCl, 10 g/L trypton, 5 g/L yeast extract) 에서 37°C, 200 rpm의 조건으로 배양하였다. 흡광도 (OD_{600})가 0.7 일 때 1 mM isopropyl-B－D-thiogalactopyranoside (IPTG)로 30Kc19α 단백질 발현을 유도하였고, 27°C에서 4 시간 동안 추가적으로 배양하였다.

배양 후 원심분리 (4°C, 7000 rpm, 20 분)를 통해 *E. coli*를 수집하였다. 상등액을 제거한 후, 세포 침전물 (cell pellet)을 binding buffer (20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0)를 첨가하여 재부유 (resuspension) 시킨 후 얼음물에 담긴 상태에서 초음파 파쇄 (Amplification 23%, 10분) 하였다. 그런 후, 이를 원심분리 (4°C, 12000 rpm, 30분)한 후 상등액을 수거하여 0.2 μm 막 필터 (membrane filter)로 여과시켰다. 그런 후, AKTA FPLC (fast protein liquid chromatography; GE Healthcare, Sweden)를 사용하여 His-tag affinitiy chromatography로 정제과정을 수행하였다. His-Trap HP column (GE Healthcare, Uppsala, Sweden)의 column 내부가 평형상태가 되도록 만

들기 위해서 binding buffer를 20 ml 흘려주고, 상등액을 흘려주어 단백질을 column의 Ni^{2+}-bead에 부착시킨다. 이후, washing buffer (20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 50 mM imidazole, pH 8.0)를 column에 흘려주어 비특이적으로 부착된 단백질들을 제거한 후, elution buffer (20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 350 mM imidazole, pH 8.0)를 흘려주어 원하는 단백질을 용출하였다. 마지막으로, HiTrap Desalting column (GE Healthcare, Uppsala, Sweden)에 미리 20 mM Tris-HCl (pH 8) 용액을 흘려주어 column 내부를 평형상태로 만들고, 앞서 얻은 단백질을 1 ml씩 흘려주며 salt를 제거함과 동시에 buffer를 교체해주었다. 이렇게 정제한 단백질은 -80°C deep freezer에서 보관하였으며, 사용 시 4°C 상에서 천천히 녹여 사용하였다.

15% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 와 Coomassie brilliant blue 염색을 수행하여 정제된 단백질의 크기를 확인하였다. 그리고 Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA)를 이용하여 단백질의 정량 분석을 수행하였다.

2.3. 탈용매화 방법을 이용한 30Kc19α 단백질 나노입자 생산

30Kc19α 단백질 나노입자들은 탈용매화 방법으로 만들어졌다 [25]. 400 μl Tris-HCl buffer (pH 10.0) 용액 내에 30Kc19α 단백질 (1 mg/ml)과 40 μg β-galactosidase (Sigma Aldrich)는 상온에서 달걀 모양의 교반자 (stirring egg bar)를 사용하여 자기 교반기에 의해 섞였다 (1000 rpm). 이에 탈용매 물질인 에탄올 (2 ml) 을 한 방울씩 흘려주어 만들어진 나노입자를 가교화 (crosslinking) 시키기 위하여 10% 글루탈알다하이드 (Sigma Aldrich)를 넣고 얼음이 있는 차가운 조건에서 1시간동안 초음파로 파쇄 하였다. 가교화된 나노입자는 원심분리 (4°C, 12,000 rpm, 20분)를 통해 상등액을 제거한 후 침전한 나노입자를 PBS 버퍼로 재부유 시켰다. 만들어진 나노입자를 원심분리하고 재부유하는 과정을 세 번 더 수행하여 나노입자를 washing 시켰다.

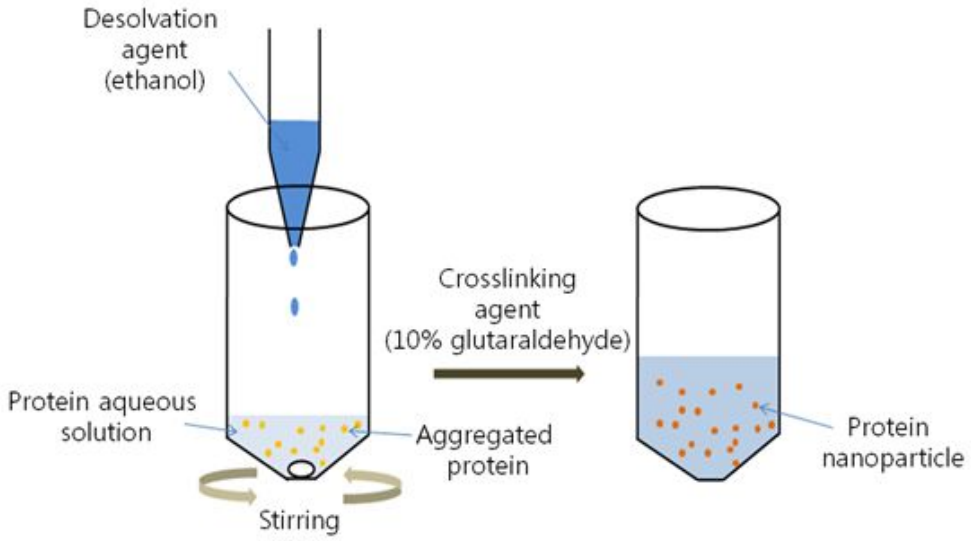


Figure 3. 탈용매화 방법으로 30Kc19α 단백질 나노입자 생산

2.4. 전기영동광산란광도계로 30Kc19α 단백질 나노입자의 지름, 다분산 지수, 및 제타포텐셜 측정

탈용매화 방법으로 만들진 후 PBS 버퍼에 담겨져 있는 1 mg/ml 농도의 30Kc19α 단백질 나노입자는 1/10으로 희석된 후, 제조 회사의 지시에 따라 전기영동광산란광도계 (electrophoretic light scattering (ELS) spectrophotometer; ELS-8000, Otsuka, Tokyo, Japan)를 사용하여서 입자의 지름, 다분산 지수 (polydispersity index), 및 제타 포텐셜 (zeta potential) 을 측정하였다.

2.5. 주사전자현미경으로 30Kc19α 단백질 나노입자의 형태 관찰

앞서 만들어진 30Kc19α 단백질 나노입자를 원심분리 후 탈이온수로 재부유시켰다. 나노입자가 있는 용액의 한 방울을 12 mm circular coverslip에 떨어뜨린 후, -80°C deep freezer에서 얼렸다 (overnight). 이후, 얼려진 나노입자를 동결건조기 (Hanil, Seoul, Korea)로 동결건조 시킨 후, 백금 코팅 (sputter coating using platinum)을 하여 주사전자현미경 (field emission scanning electron microscopy, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 나노입자의 형태를 관찰(2.0 kV acceleration voltage, 50,000x magnification) 하였다.

2.6. Live cell imaging

30Kc19α 단백질 나노입자가 세포막을 투과하여 세포 내에 위치하는지 확인하기 위해 공초점 레이저 현미경 (confocal laser scanning microscope, CLSM; EZ-C1, Nikon, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다. 1차 인체 피부아세포 (Human Dermal Fibroblast, HDF)를 8-well chamber plate에서 키워 밤새 세포 배양기 (37°C, 5% CO_2)에서 배양되었다. β-galactosidase에 Alexa Fluor® 488 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 형광을 부착시키기 위하여, 2 mg/ml 농도의 β-galactosidase, Alexa Fluor® 488, sodium bicarbonate buffer (pH 8.3)을 혼합하여 20분간 상온에서 rocking 시켜주었다. Vivaspin® 500 ultrafiltration spin column (Sartorius Stedim Biotech, Germany)에 옮긴 후 β-galactosidase과 결합하지 않은 형광물질이 없어질 때까지 원심분리 (4°C, 12,000 rpm, 30분)를 반복하고 dPBS로 washing 한 후, 탈용매화 방법으로 30Kc19α 단백질 나노입자에 충진되었다. β-galactosidase가 충진된 200 μg/ml 30Kc19α 단백질 나노입자를 세포들에 처리한 후 24시간 동안 세포 배양기 (37°C, 5% CO_2)에서 배양하였다. 나노입자가 처리된 세포들을 PBS 버퍼로 세 번 washing 한 후, 2 μg/ml Hoechst 33342 (Sigma, USA)를 15분간 처리하여 핵을 염색했다. 다시 PBS 버퍼로 washing 후에, 공초점 레이저 현미경을 이용하여 나노입자가 세포 내에 위치하는지 확인하

였다.

2.7. CCK-8 assay를 통한 30Kc19α 단백질 나노입자의 세포 내 독성 검사

Cell Counting Kit-8 (Dojindo Laboratories, Japan)을 이용하여 30Kc19α 단백질 나노입자의 세포 내 독성 검사를 수행하였다. 96-well plate (Thermo Scientific, USA)에 HDF 세포를 seed culture 한 후, 30Kc19α 단백질 나노입자를 10 μg/ml, 50 μg/ml, 100 μg/ml, 200 μg/ml, 400 μg/ml 농도에 맞게 넣고 37°C, 5% CO_2의 조건에서 24시간 배양하였다. WST-8 (water-soluble tetrazolium-8) 용액을 10 μl씩 각 well에 넣고 2시간 동안 배양을 하였다. 이후 분광광도계 (spectrophotometer)를 사용하여 450 nm 파장에서 발색 정도를 측정했다.

2.8. β-galactosidase의 specific activity 측정

나노입자로부터 방출된 β-galactosidase의 activity를 측정하기 위해서 β-galactosidase가 충진된 1mg/ml 30Kc19α 단백질 나노입자를 37°C, 200 rpm 조건에서 각각 24시간 또는 96시간 동안 shaking incubation 시켰다. 원심분리 (12,000 rpm, 20분)를 통해 나노입자로부터 방출된 β-galactosidase가 있는 상등액을분리하고 β-galactosidase assay kit (Invitrogen)를 이용하여 제조 회사의 지시에 따라 다음과같이 수행하였다. 앞서 얻은 상등액 5 μl 을 50 μl cleavage buffer (60 mM Na2HPO4·7H2O, 40 mM NaH2PO4·H2O, 10mM KCl, 1 mM MgSO4·7H2O, pH7)와 17 μl 4 mg/ml o-nitrophenol-β-D-galactoside (Sigma-Aldrich) 용액에 첨가 된후, 37°C 조건에서 30분동안 incubation 되었다. Incubation동안 노란색이 발색했으며, 125 μl stop buffer (1M Na2Co3) 를 각 well 에 첨가해주고, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader (Thermo LabSystems, Milford, MA, USA)을 사용하여 405 nm 에서 absorbance를 측정하였다.

2.9. Alexa Fluor® 488-labeled β-galactosidase의 형광강도 측정

Alexa Fluor® 488 형광이 레이블링된 β-galactosidase가 충진된 30Kc19α 단백질 나노입자를 37℃, 200 rpm 조건에서 shaking incubation 시켰다. 30Kc19α 단백질 나노입자에서 방출되는 β-galactosidase의 형광강도를 fluorometer를 사용하여 측정하여 시간대별 방출양상 프로파일을 (release-profile) 확인할 수 있었다.

2.10. X-gal 염색법

β-galactosidase가 충진된 30Kc19α 단백질 나노입자가 처리된 HDF 세포들에서부터 β-galactosidase activity를 측정하기 위해 X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-$_D$-galactopyranoside, Sigma-Aldrich) 염색법을 사용했다. 96-well plate (Thermo Scientific, USA)에 HDF 세포를 seed culture 한 후, 10% FBS, 1% PS를 포함한 DMEM에 있는 나노입자를 400 μg/ml 농도에 맞게 넣고 37°C, 5% CO_2의 조건에서 24시간 배양하였다. 이후 PBS 버퍼로 세포를 두 번 washing 하고 4% paraformaldehyde in PBS로 15분 동안 세포를 고정시켰다. 고정된 세포는 0.5 mg/ml X-gal in PBS containing 5mM $K_4Fe(CN)_6$, 5mM $K_3Fe(CN)_6$, and 2mM $MgCl_2$ 와 밤새 37°C 조건에서 배양하였다. Fluorescence microscope (Olympus IX71, Tokyo, Japna)를 사용하여서 세포들의 bright-field 이미지들을 얻었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 재조합 단백질의 발현 및 농도 확인

E. coli 에서 생산된 재조합 30Kc19α 단백질의 C 말단에는 6-Histidine tag를, 그리고 N 말단에는 T7 tag가 있는 구조를 가진다 (Figure 3). FPLC를 이용하여 soluble하게 정제된 30Kc19α 단백질을 15% SDS-PAGE로 분리한 후, Coomassie brilliant blue 염색 방법으로 시각화 되었다. 13 kDa 위치에서 형성된 30Kc19α 단백질 band를 관찰하였다 (Figure 5). His-tag antibody를 1st antibody로 사용하여 웨스턴 블롯으로 단백질을 확인할 수 있었다 (Figure 6). 정제된 단백질의 정량값은 Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, USA)를 이용하여 계산하였다 [Table 1].

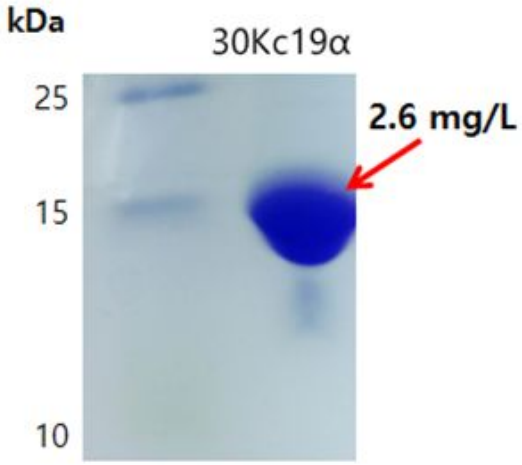


Figure 4. SDS-PAGE를 이용한 재조합 30Kc19α단백질의 크기 및 발현 확인

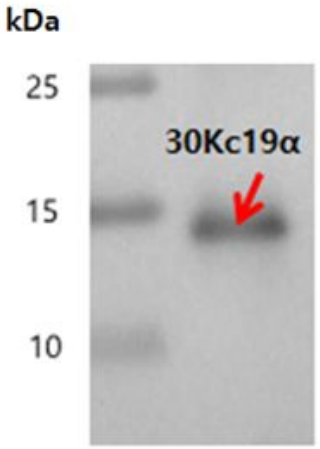


Figure 5. Western blot을 통한 30Kc19α 단백질 확인

(1st Antibody: His-tag Ab)

Table 1. BCA 분석을 이용하여 측정한 재조합단백질의 농도

	30Kc19α
Concentration (mg/ml)	3.2
Yield (mg/L)	2.6

3.2. pH가 30Kc19α 단백질 나노입자의 지름, 다분산 지수, 및 제타 포텐셜에 미치는 영향

탈용매화 방법으로 30Kc19α 단백질 나노입자를 만들 때, 탈용매 물질인 에탄올을 단백질 용액 (1 mg/ml)에 한 방울씩 첨가하기 전에, 20 mM Tris-HCl 버퍼의 pH가 7, 8, 9, 10이 되도록 각각 맞춰주어 pH에 따른 지름, 다분산 지수, 및 제타 포텐셜을 전기영동광산란광도계로 측정하였다 [26,27,28].

단백질 용액의 pH 값이 증가할수록 30Kc19α 단백질 나노입자의 지름은 감소하여 pH가 10일 때 200 nm 였다 (Figure 7). 분자량의 분포를 나타내는 다분산 지수 (polydispersity index)는 단백질 용액의 pH 값이 증가할수록 감소하였으며 pH가 10일 때 0.2 미만의 낮은 다분산 지수를 측정하였다. 이는 단백질 용액의 pH가 10일 때, 나노입자의 크기가 균일하게 만들어 지는 것을 확인하였다 (Figure 7).

액체에 부유하고 있는 콜로이드 입자의 표면전기적 특성인 전위를 나타내는 제타 포텐셜 (zeta potential) 값은 0으로 가까울수록 입자가 응집하거나 침전되는 것을 보인다. 단백질 용액의 pH와 상관없이 음성인 제타 포텔셜 값 (mV)을 가지는 30Kc19α 단백질 나노입자는 액체 중에 고르게 분산해 있음을 확인하였다 (Figure 8).

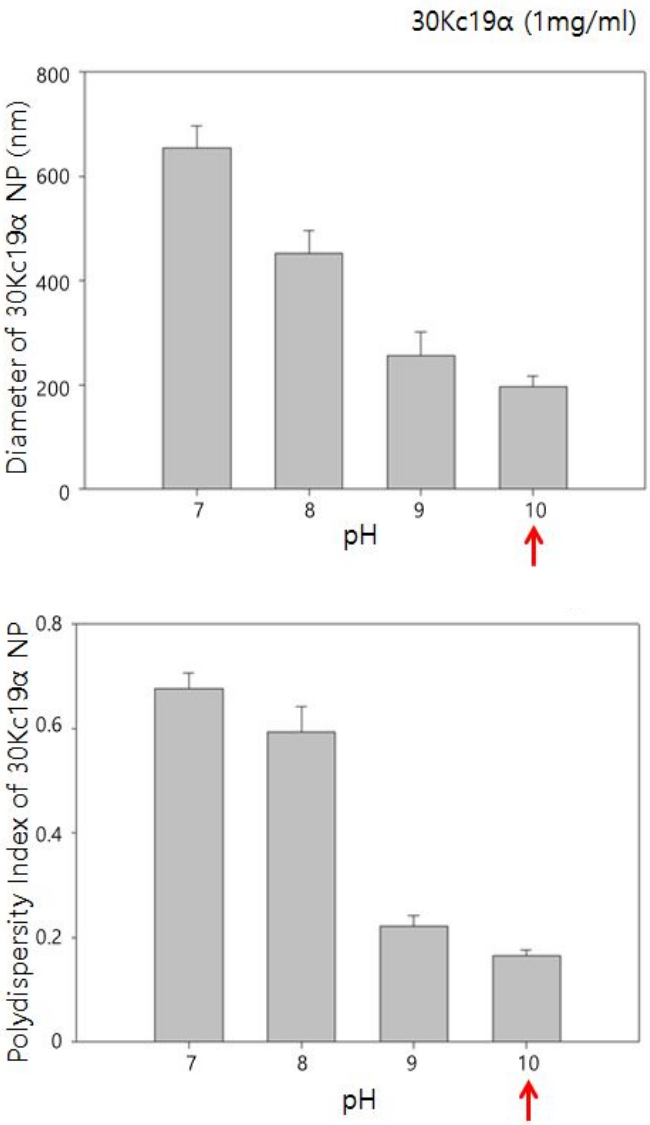


Figure 6. pH 환경이 30Kc19α 단백질 나노입자의 지름과 다분산 지수에 미치는 영향

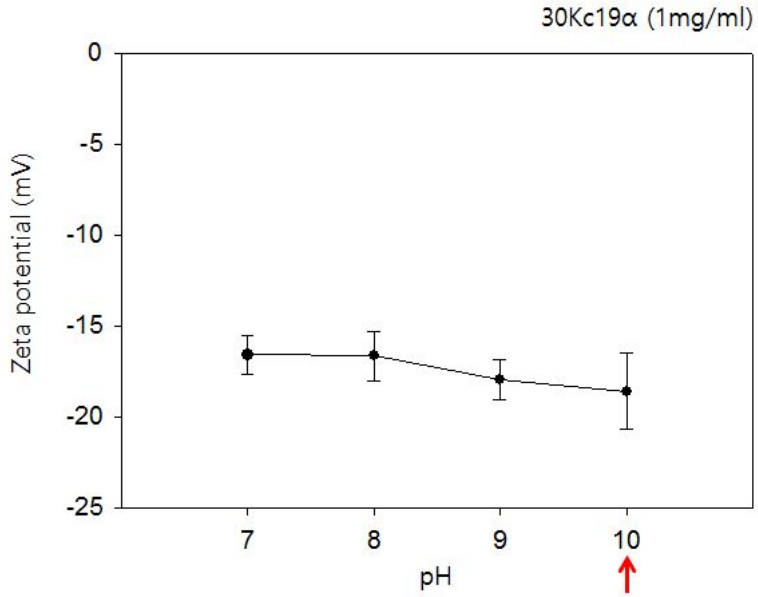


Figure 7. pH 환경이 30Kc19α 단백질 나노입자의 제타 포텐셜에 미치는 영향

3.3. 단백질 농도가 30Kc19α 단백질 나노입자의 지름, 다분산 지수, 및 제타 포텐셜에 미치는 영향

탈용매화 방법으로 30Kc19α 단백질 나노입자를 만들 때, 탈용매 물질인 에탄올을 단백질 용액에 한 방울씩 첨가하기 전에, 20mM Tris-HCl 버퍼 (pH10) 안에 있는 30Kc19α 단백질의 농도가 30Kc19α 단백질 나노입자의 지름, 다분산 지수, 및 제타 포텐셜에 미치는 영향을 전기영동광산란광도계로 측정하였다.

30Kc19α 단백질의 농도가 증가할수록 30Kc19α 단백질 나노입자의 지름은 증가하였고, 농도가 1 mg/ml 과 1.5 mg/ml 일 때 나노입자의 다분산 지수 (polydispersity index)는 0.2 미만 이었다 (Figure 9).

단백질의 농도와 상관없이 음성인 제타 포텔셜 값 (mV)을 가지는 30Kc19α 단백질 나노입자는 액체 중에 고르게 분산해 있음을 확인하였다 (Figure 10).

이는 20mM Tris-HCl 버퍼 (pH10)에서 단백질의 농도가 1 mg/ml 일 때, 나노입자의 크기가 최적화 되어 탈용매화 방법으로 균일하게 만들어지고 용액에 고르게 분산되어 있음을 확인하였다.

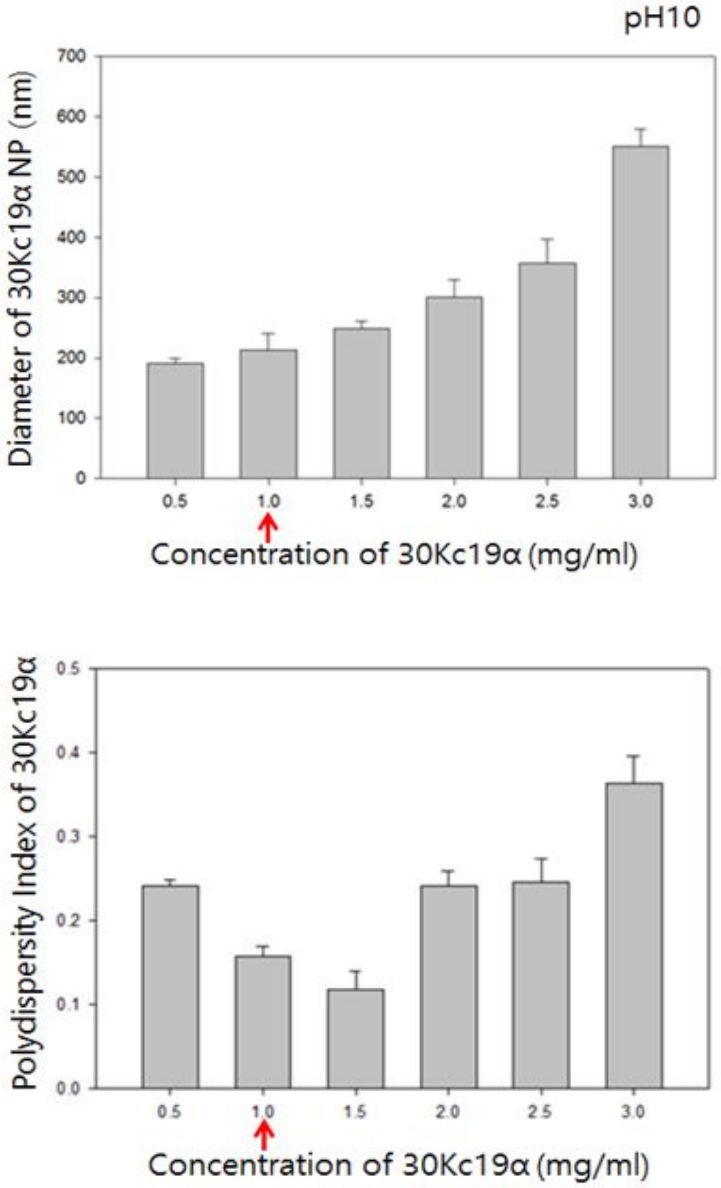


Figure 8. 30Kc19α 단백질 농도가 나노입자의 지름과 다분산 지수에 미치는 영향

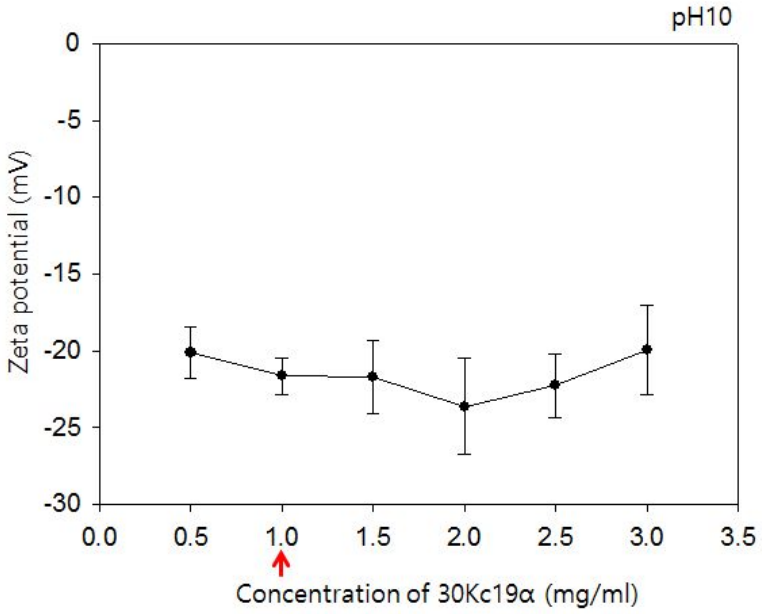


Figure 9. 30Kc19α 단백질 농도가 나노입자의 제타 포텐셜에 미치는 영향

3.4. 30Kc19α 단백질 나노입자의 세포 내 독성 확인

30Kc19α 단백질 나노입자가 HDF 세포 내에서 독성을 나타내는지 확인하였다. 다른 농도로 30Kc19α 단백질 나노입자를 세포에 처리하고 24시간 배양한 후 CCK-8 assay를 사용하여 흡광도를 측정해 세포의 활성도를 확인하였다. 30Kc19α 단백질 나노입자를 처리한 세포가 나노입자를 처리하지 않은 대조군 세포와 비슷한 생존률을 나타내는 것을 확인하였다 (Figure 11). 그러므로 30Kc19α 단백질 나노입자는 세포 내에서 독성을 거의 유발하지 않으므로 세포내 운반체로 이용될 수 있는 가능성을 보였다.

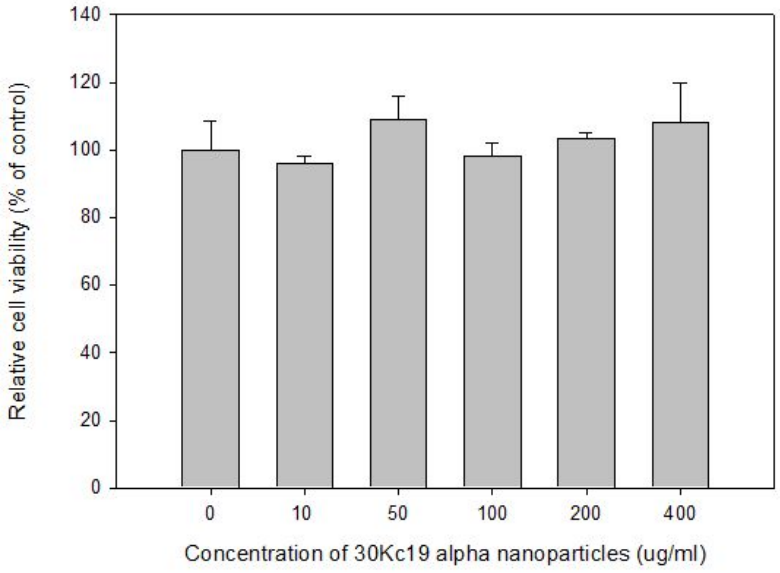


Figure 10. 30Kc19α 단백질 나노입자가 Human Dermal Fibroblasts에 대한 독성검사

3.5. 30Kc19α 단백질 나노입자의 형태 측정

탈용매화 방법으로 30Kc19α 단백질 나노입자를 만들 때, 탈용매 물질인 에탄올을 단백질 용액 (1 mg/ml)에 한 방울씩 첨가하기 전에, 20 mM Tris-HCl 버퍼의 pH가 7, 8, 9, 10이 되도록 각각 맞춰주어 pH에 따른 30Kc19α 단백질 나노입자의 형태 (morphology)를 주사전자현미경 (field emission scanning electron microscopy)을 사용하여 측정하였다. 단백질 용액의 pH가 증가할수록 나노입자의 형태는 안정적인 구형을 나타내는 것을 FESEM 이미지로 확인할 수 있었다. 30Kc19α 단백질 나노입자는 pH가 10인 단백질 용액 (1 mg/ml)에서 탈용매화 방법으로 구형을 띠고 200 nm 지름을 갖도록 만들어짐을 확인 할 수 있었다.

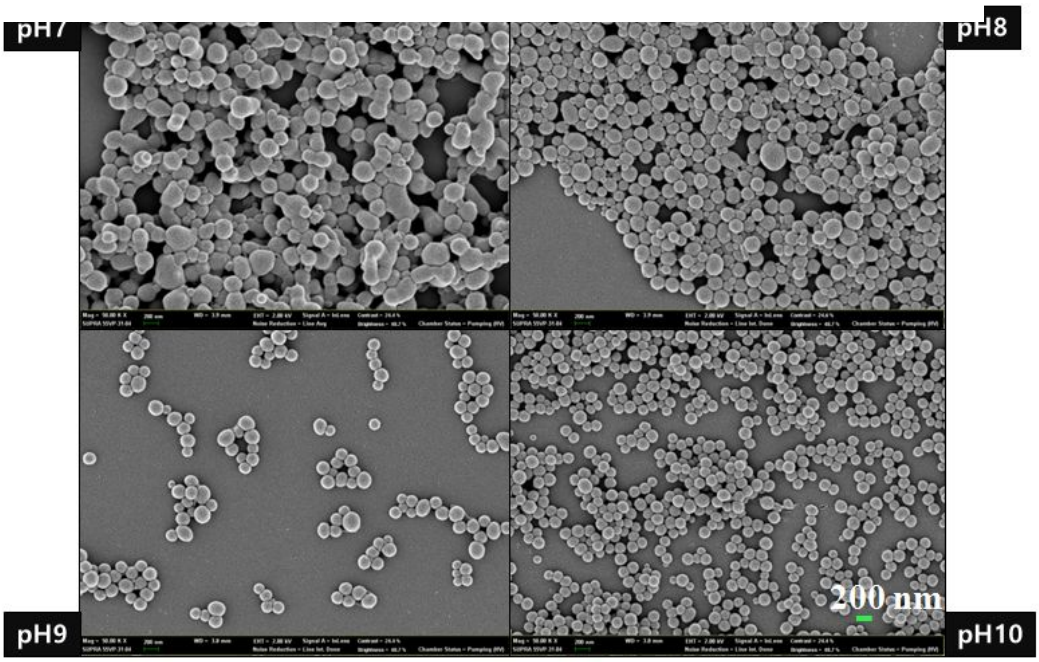


Figure 11. 30Kc19α 단백질 나노입자의 FESEM 이미지

3.6. β-galactosidase 충진된 30Kc19α 단백질 나노입자의 형태 확인

탈용매화 방법으로 만들어진 β-galactosidase 충진된 30Kc19α 단백질 나노입자의 형태 (morphology)를 주사전자현미경 (field emission scanning electron microscopy)을 사용하여 측정하였다. β-galactosidase가 충진되지 않은 대조군인 30Kc19α 단백질 나노입자에 비해 β-galactosidase 충진된 30Kc19α 단백질 나노입자는 일정하지는 않지만 구형의 형태를 나타내었다.

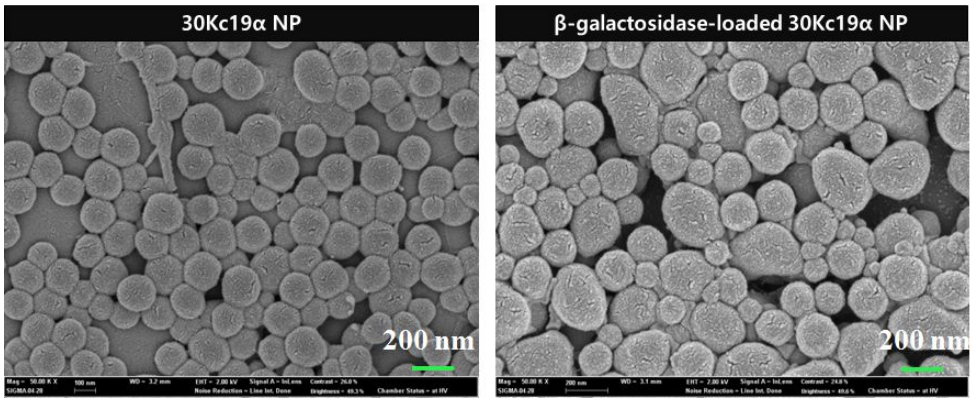


Figure 12. β-galactosidase 충진된 30Kc19α 단백질 나노입자의 FESEM 이미지

3.7. β-galactosidase 충진된 30Kc19α 단백질 나노입자의 세포 투과성

HDF 세포에서의 β-galactosidase 충진된 30Kc19α 단백질 나노입자의 세포 투과성을 lilve cell imaging 방법으로 공초점 레이저 현미경을 이용하여 관찰하였다. Alexa Fluor® 488 형광이 labeling된 β-galactosidase가 충진된 200 μg/ml 30Kc19α 단백질 나노입자를 HDF 세포에 처리한 후 24시간 동안 세포 배양기 (37°C, 5% CO_2)에서 배양하였다. 배지에 나노입자를 첨가하지 않은 대조군의 HDF 세포 내부에서는 형광이 관찰되지 않았지만, β-galactosidase 충진된 30Kc19α 단백질 나노입자를 첨가한 세포에서는 세포 내부에서 형광을 관찰하였다 (Figure 14). 이것을 통해 β-galactosidase가 충진된 30Kc19α 단백질 나노입자가 세포 투과성을 가진다는 것을 확인할 수 있었다.

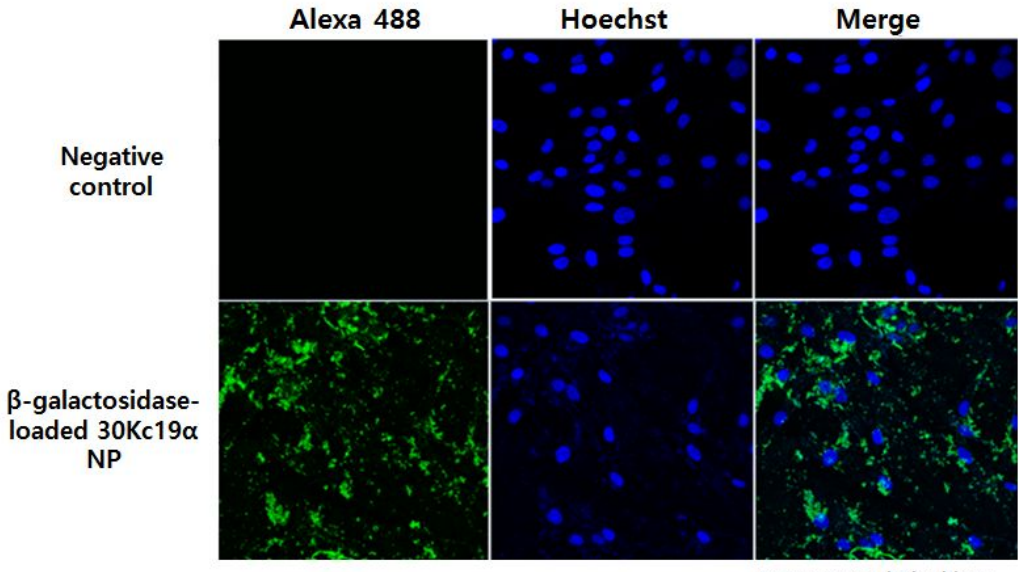


Figure 13. 공초점 레이저 현미경을 통한 HDF 세포에서의 β-galactosidase 충진된 30Kc19α 단백질 나노입자의 세포 투과성

3.8. 30Kc19α 단백질 나노입자의 효소 안정화 특성 확인

30Kc19α 단백질 나노입자에서 각각 24시간 또는 96시간 동안 흘러나온 β-galactosidase는 유사한 활성을 갖고 있음을 β-galactosidase 어세이 키트를 사용하여 측정하였다. 30Kc19α 단백질 나노입자로부터 방출된 β-galactosidase의 안정성은 유지되었음을 확인하였다.

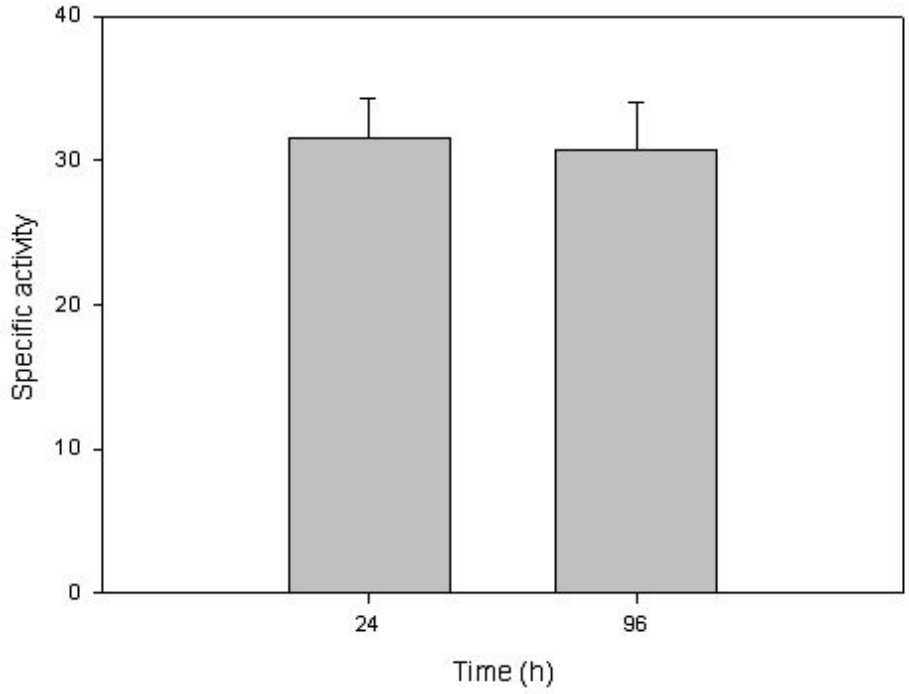


Figure 14. 30Kc19α 단백질 나노입자로부터 시간대별 방출된 β-galactosidase의 specific activity

3.9. 30Kc19α 단백질 나노입자로 부터의 β-galactosidase의 서방형 방출 양상

β-galactosidase가 충진된 30Kc19α 단백질 나노입자의 β-galactosidase는 *in vitro* 상에서 서방형 방출 양상 (controlled-release)으로 나노입자로부터 방출되는 것을 β-galactosidase activity를 측정하여 확인할 수 있었다. 이를 통해 30Kc19α 단백질 나노입자는 천천히 약물을 방출할 수 있는 운반체로 사용될 수 있음을 확인하였다 (Figure 16).

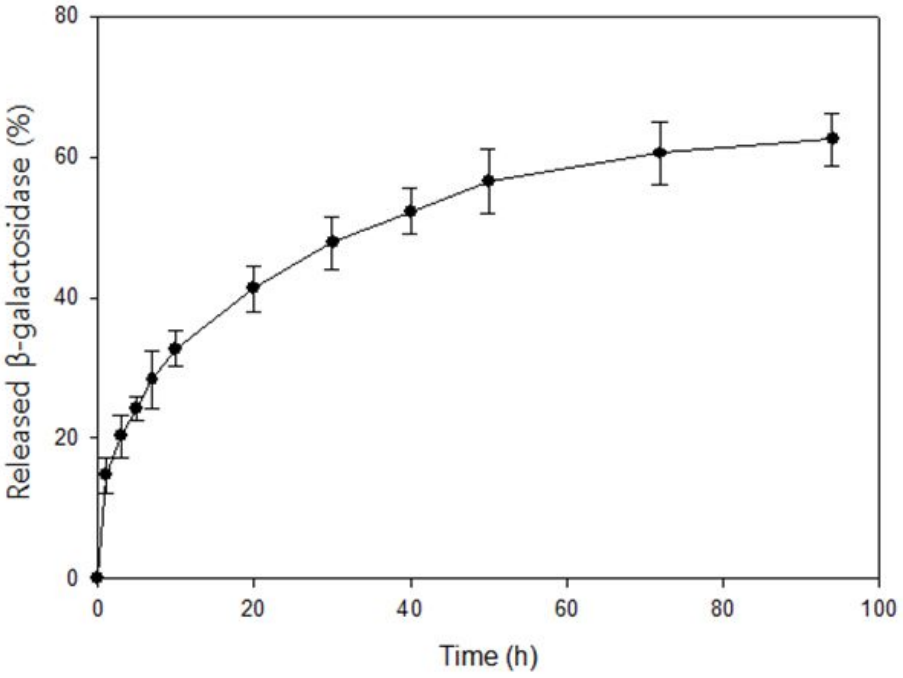


Figure 15. β-galactosidase가 충진된 30Kc19α 단백질 나노입자의 *in vitro* release profile

3.10. HDF 세포의 β-galactosidase activity 측정

X-gal 염색법을 사용하여 HDF 세포에서의 β-galactosidase activity를 측정하였다. 배지에 30Kc19α 단백질 나노입자를 첨가하지 않은 대조군의 HDF 세포 내부에서는 푸른빛이 관찰되지 않았지만, β-galactosidase가 충진된 30Kc19α 단백질 나노입자를 첨가한 세포에서는 세포 내부에서 푸른빛을 관찰하였다 (Figure 15). 이것을 통해 β-galactosidase 충진된 30Kc19α 단백질 나노입자가 세포 투과성을 가지고 나노입자에서 세포내부로 흘러나온 β-galactosidase는 활성을 갖는다는 것을 확인할 수 있었다.

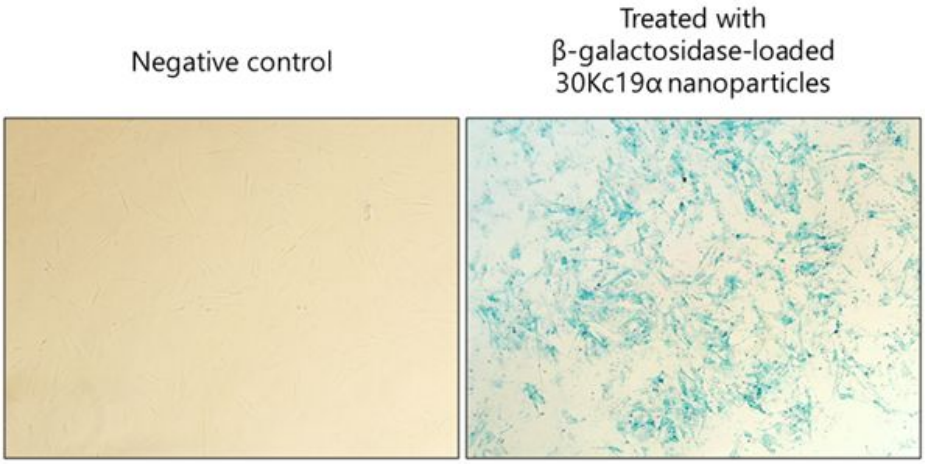


Figure 16. X-gal 염색법을 통한 HDF 세포의 β-galactosidase activity

4. 결론

본 연구에서는 대표적인 30Kc19 단백질의 특성인 세포 투과성과 단백질 안정성을 가진 30Kc19 α-helix (30Kc19α)단백질만을 30Kc19 β-sheet로부터 분리하여, *E. coli*에서 soluble form으로 발현 및 정제를 하고, 탈용매화 방법으로 30Kc19α 단백질 나노입자로 만들어 특성을 확인하였다.

30Kc19α 단백질 나노입자를 만들 때 탈용매 물질을 첨가해 주기 전의 단백질 용액의 pH와 단백질 농도가 나노입자의 지름, 다분산 지수, 및 제타포텐셜에 영향을 미치는 것을 확인하였다. 30Kc19α 단백질의 농도가 1 mg/ml 이고 pH가 10인 용액에서 30Kc19α 단백질 나노입자의 지름은 최적화된 200 nm로 균일한 크기로 만들어지는 것을 측정하였다. 음성 값의 제타 포텐셜은 음성 surface charge를 갖는 나노입자가 용액에 고르게 부유하고 있음을 나타냈다. 30Kc19α 단백질 나노입자는 일정한 구형의 형태와 안정적인 분산을 보였다. 또한, 30Kc19α 단백질 나노입자는 HDF 세포 내에서 독성을 유발하지 않았다.

세포 투과성을 확인하기 위하여 β-galactosidase 충진된 30Kc19α 단백질 나노입자를 HDF 세포 배양 배지에 처리한 결과, 나노입자가 세포 내 투과성을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 각각 24시간 또는 96시간 동안 30Kc19α 단백질 나노입자에서 흘러나온 β-galactosidase는 유사한 specific activity를 갖고있음을 확인하였다. 그리고 *in vitro* 상에서 β

-galactosidase는 나노입자로부터 서서히 방출되는 서방형 방출 양상을 보이는 것을 관찰하였다. X-gal 염색법을 통하여 HDF 세포내에서 나노입자에서 방출된 β-galactosidase의 활성을 관찰할 수 있었다.

나노입자는 나노메디신으로서 다양하게 활용될 수 있는 포텐셜을 가지고 있다. 나노입자의 표면에 functional group을 conjugation 시켜주어 암세포와 같이 특정 세포에 대한 타겟팅 능력도 가질 수가 있다 [30.31,32,33]. 또한 난백 알부민, 소혈청알부민, 및 사람 혈청 알부민을 이용하여 단백질 기반의 나노입자를 만들었다 [29]. 그리고 사람 혈청 알부민 나노입자는 doxorubicin과 같은 항암제 운반체로 사용될 수 있음을 보였다 [28]. 또한 본 연구실에서 30Kc19-HSA 단백질 나노입자는 세포내 전달성과 안정성 및 controlled-release를 하여 단백질 기반 치료제와 같은 약물 전달에 적용 될 수 있음을 보고하였다 [22].

본 연구에서는 세포투과성을 담당하는 PTD (protein transduction domain)을 포함하고 단백질 안정화 특성을 갖고 있는 30Kc19 α-helix 단백질만으로 탈용매화 방법으로 나노입자를 성공적으로 합성하였다. 이상의 결과들로부터 30Kc19α 단백질 나노입자는 다양한 세포내로 단백질 기반 약물의 효과적이고 안정적인 운반체로서 항암치료, 및 효소대체치료와 같은 분야로도 응용될 수 있음을 기대할 수 있다.

5. 참고문헌

[1] S.H. Ha, S.E. Kim, and T.H. Park, Silkworm hemolymph as a substitute for fetal bovine serum in insect cell culture. Biotechnology Techniques, 1996. 10(6) : p. 401-406.

[2] W.J. Rhee, E.J. Kim, and T.H. Park, Silkworm hemolymph inhibits baculovirus-induced insect cell apoptosis. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000. 271(1) : p. 186-190.

[3] W.J. Rhee, E.J. Kim, and T.H. Park, Kinetic effect of silkworm hemolymph on the delayed host cell death in an insect cell-baculovirus system. Biotechnology Progress, 1999. 15(6) : p. 1028-1032.

[4] W.J. Rhee, E.J. Kim, and T.H. Park, Silkworm hemolymph as a potent inhibitor of apoptosis in Sf9 cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002. 295(4) : p. 779-783.

[5] S.S. Choi, W.J. Rhee, and T.H. Park, Inhibition of human cell apoptosis by silkworm hemolymph. Biotechnology Progress, 2002. 18(4) : p. 874-878.

[6] S.S. Choi, W.J. Rhee, and T.H. Park, Beneficial effect of silkworm hemolymph on a CHO cell system : Inhibition of apoptosis and increase of EPO production. Biotechnology and Bioengineering,

2005. 91(7) : p. 793-800.

[7] E.J. Kim, W.J. Rhee, and T.H. Park, Isolation and characterization of an apoptosis-inhibiting component from the hemolymph of *Bombyx mori*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001. 285(2) : p. 224-228.

[8] N. Sakai, S. Moil, S. Izumi, K. Haino-Fukushima, T. Ogura, H. Maekawa, and S. Tomino, Structures and expression of mRNAs coding for major plasma proteins of *Bombyx mori*. Biochemica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression, 1988. 949(2) : p. 224-232.

[9] S. Izumi, J. Fujie, S. Yamada, and S. Tomino, Molecular properties and biosynthesis of major plasma proteins in *Bombyx mori*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure, 1981. 670(2) : p. 222-229.

[10] E.J. Kim, H.J. Park, and T.H. Park, Inhibition of apoptosis by recombinant 30K protein originating from silkworm hemolymph. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003. 308(3) : p. 523-528.

[11] S.S. Cho, W.J. Rhee, E.J. Kim, and T.H. Park, Enhancement of recombinant protein production in Chinese hamster ovary cells

through anti-apoptosis engineering using *30Kc6* gene. Biotechnology and Bioengineering, 2006. 95(3) : p. 459-467.

[12] T.Y. Koo, J.H. Park, H.H. Park, and T.H. Park, Beneficial effect of *30Kc6* gene expression on production of recombinant interferon-β in serum-free suspension culture of CHO cells. Process Biochemistry, 2009. 44(2) : p. 146-153.

[13] Z. Wang, J.H. Park, H.H. Park, W. Tan, and T.H. Park, Enhancement of therapeutic monoclonal antibody production in CHO cells using *30Kc6* gene. Process Biochemistry, 2010. 45(12) : p. 1852-1856.

[14] Z. Wang, X. Ma, L. Zhao, L. Fan, W.J. Rhee, and T.H. Park, Understanding the mechanistic roles of 30Kc6 gene in apoptosis and specific productivity in antibody-producing Chinese hamster ovary cells. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012. 94(5) : p. 1243-1253.

[15] W.J. Rhee, E.H. Lee, and T.H. Park, Expression of *Bombyx mori* 30Kc19 protein in *Escherichia coli* and its anti-apoptotic effect in Sf9 cell. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2009. 14(5) : p. 645-650.

[16] J.H. Park, Z. Wang, H.J. Jeong, H.H. Park, B.G. Kim, W.S.

Tan, S.S. Choi, and T.H. Park, Enhancement of recombinant human EPO production and glycosylation in serum-free suspension culture of CHO cells through expression and supplementation of 30Kc19. Applied Microbiology and Biotechnology. 2012. 96(3) : 671-683.

[17] Z. Wang, J.H. Park, H.H. Park, W. Tan, and T.H. Park, Enhancement of recombinant human EPO production and sialylation in chinese hamster ovary cells through *Bombyx mori 30Kc19* gene expression. Biotechnology and Bioengineering, 2011. 108(7) : p. 1634-1642.

[18] J.H., Park, H.H. Park, S.S. Choi, and T.H. Park, Stabilization of enzymes by the recombinant 30Kc19 protein. Process Biochemistry, 2012. 47(1) : p.164-169.

[19] J.H., Park, J.H. Lee, H.H. Park, W.J. Rhee, S.S. Choi, and T.H. Park, A protein delivery system using 30Kc19 cell-penetrating protein originating from silkworm. Biomaterials, 2012. 33(35) : p. 9127-9134.

[20] J.P. Yang, X.X. Ma, Y.X., He, W.F. Li, Y, Kang, R. Bao, Y. Chen, and C.Z. Zhou, Crystal structure of the 30K protein from the silkworm *Bombyx mori* reveals a new member of the β-trefoil superfamily. Journal of Strucutral Biology, 2011. 175(1) : p. 97-103.

[21] H.H. Park, Y. Sohn, J.W. Yeo, J.H. Park, H.J. Lee, J. Ryu, W.J. Rhee, and T.H. Park, Identification and characterization of a novel cell-penetrating peptide of 30Kc19 protein derived from *Bombyx mori*. Process Biochemistry, 2014. 49(9) : p. 1516-1526.

[22] H.J. Lee, H.H. Park, J.A. Kim, J.H. Park, J. Ryu, J. Choi, J. Lee, W.J. Rhee, and T.H. Park, Enzyme delivery using the 30Kc19 protein and human serum albumin nanoparticles. Biomaterials, 2014. 35(5) : p. 1696-1704.

[23] O.P. Rubino, R. Kowalsky, and J. Swarbrick, Albumin microphores as a drug delivery system: relation among turbidity ratio, degree of cross-linking, and drug release. Pharmaceutical Research, 1993. 10(7) : p. 1056-1065.

[24] M. Zhao, A. Biswas, B. Hu, K.I. Joo, P. Wang, Z. Gu, and Y. Tang, Redox-responsive nanocapsules for intracellular protein delivery. Biomaterials, 2011. 32(22) : p. 5223-5230.

[25] C. Weber, C. Coester, J. Kreuter, and K. Langer, Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles. International Journal of Pharmaceutics, 2000. 194(1) : p. 91-102.

[26] K. Langer, M.G. Anhorn, I. Steinhauser, S. Dreis, D. Celebi, N. Schrickel, S. Faust, and V. Vogel, Human serum albumin (HSA)

nanoparticles: Reproducibility of preparation process and kinetics of enzymatic degradation. International Journal of Pharmaceutics, 2000. 347(1) : p. 109-117.

[27] K. Langer, S. Balthasar, V. Vogel, N. Dinauer, H. von Briesen, and D. Schubert, Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles. International Journal of Pharmaceutics, 2000. 257(1) : p. 169-180.

[28] S. Dreis, F. Rothweiler, M. Michaelis, J. Cinatl Jr., J. Kreuter, and K. Langer, Preparation, characterisation and maintenance of drug efficacy of doxorubicin-loaded human serum albumin (HSA) nanoparticles. International Journal of Pharmaceutics, 2007. 341(1) : p. 207-214.

[29] A.O. Elzoghby, W.M. Samy, and N.A. Elgindy, Journal of Controlled Release, 2012. 157(2) : p. 168-182.

[30] H.K. Sajja, M.P. East, H. Mao, A.Y. Wang, S. Nie, and L. Yang, Development of multifunctional nanoparticles for targeted drug deliviery and non-invasive imaging of therapeutic effect. Current Drug Discovery Technologies, 2009. 6(1) : p. 43-51.

[31] J.D. Byrne, T. Betancourt, L. and Brannon-Peppas, Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics.

Advanced Drug Delivery Reviews, 2008. 60(15) : p. 1615-1626.

[32] F. Danhier, O. Feron, and V. Preat, To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. Journal of Controlled Release, 2010. 148(2) : p. 135-146.

[33] L. Agemy, D. Friedmann-Morvinski, V.R. Kotamraju, L. Roth, K.N. Sugahara, O.M. Girard, R.F. Mattrey, I.M. Verma, and E. Ruoslahti, Targeted nanoparticle enhanced proapoptotic peptide as potential therapy for glioblastoma. Proceddings of the National Academy of Sciences, 2011. 108(42) : p. 17450-17455.

Abstract

Production of 30Kc19α protein nanoparticle for drug delivery

Yeon Hwa Woo

Interdisciplinary program for bioengineering

The Graduate School

Seoul National University

Nanoparticles are an emerging strategy for drug delivery. In previous studies, application of a recombinant 30Kc19 protein to human serum albumin (HSA) nanoparticles improved cellular uptake and stability of a nanoparticle cargo enzyme. Therefore, similar drug delivery potential could be achieved with nanoparticles prepared only with α-helix domain of the 30Kc19 protein (30Kc19α) without the addition of HSA. Desolvation method was employed to prepare 30Kc19α nanoparticles. Several parameters of the preparation process were evaluated; the pH of the 30Kc19α solution and the protein concentration were shown to be the crucial factors determining the nanoparticle size. 30Kc19α protein concentration of 1 mg/ml at pH 10

solution produced the optimal nanoparticle size between 180-230 nm. 30Kc19α nanoparticles showed to intracellularly deliver β-galactosidase in confocal microscopic images. SEM images showed that 30Kc19α nanoparticles were uniformly spherical in shape. The 30Kc19α nanoparticles had negligible toxicity to cells. Moreover, 30Kc19α nanoparticles provided enzyme stability to its cargo enzyme so that specific activity of the enzyme could be maintained. Release profile showed that β-galactosidase was released from the 30Kc19α nanoparticles in a controlled-release manner. These results demonstrate that 30Kc19α nanoparticles could be applied in delivering drugs to various cells.

Keywords : Protein nanoparticle, 30Kc19α, drug delivery, soluble expression, cell-penetrating property, enzyme-stabilizing property, recombinant protein production

Student Number : 2014 - 21550