



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년01월02일

(11) 등록번호 10-2619863

(24) 등록일자 2023년12월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 47/69 (2017.01) A61K 31/704 (2006.01)

A61K 47/68 (2017.01) A61K 49/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 47/6929 (2017.08)

A61K 31/704 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0066841

(22) 출원일자 2021년05월25일

심사청구일자 2021년05월25일

(65) 공개번호 10-2022-0159528

(43) 공개일자 2022년12월05일

(56) 선행기술조사문헌

Biotech, 9(7), p.1-15, 2019.

Journal of Controlled Release, 296(28),

150-161, 2019.

KR101977532 B1

(73) 특허권자

연세대학교 원주산학협력단

강원도 원주시 흥업면 연세대길 1

(72) 발명자

박용석

강원도 원주시 시청로 264

최문정

강원도 원주시 흥업면 연세대길 1

(74) 대리인

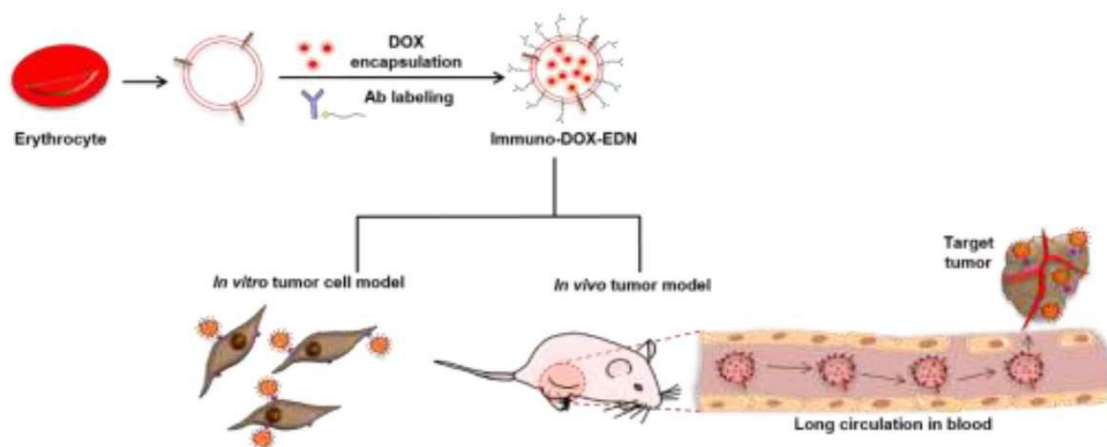
김보정

전체 청구항 수 : 총 18 항

심사관 : 이재정

(54) 발명의 명칭 **종양 표적 적혈구 막 유래 나노입자, 이의 용도 및 이의 제조방법****(57) 요약**

본 발명은 종양 표적 적혈구 막 유래 나노입자, 이의 용도 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 구체적으로, 양자점이 포획되고, 치료제가 캡슐화되며 표면에 종양 표적 항체가 부착된 적혈구 막(erythrocytes membrane) 유래 나노입자는 기존 약물전달체들에 비해 생체 적합성이 우수하고, 리포솜 등과 비교하여 면역세포 회피성이 우수하며, 종양 표적능 등이 개선되어 분자영상진단 및 항암치료에 동시에 사용될 수 있는 테라노스틱스(Theranostics) 시스템으로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1

(52) CPC특허분류

A61K 47/6849 (2017.08)
A61K 47/6851 (2017.08)
A61K 47/6855 (2017.08)
A61K 49/005 (2013.01)
A61K 49/0058 (2013.01)
A61K 49/0067 (2013.01)
A61K 49/0093 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A61K 2123/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711118083
과제번호	2020R1F1A1069625
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	면역, 화학 병용치료를 위한 종양표적 적혈구막 나노입자 테라노시스 시스템 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교(미래캠퍼스)
연구기간	2020.06.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345323350
과제번호	LINCPLUS-2020-29
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	산학연협력고도화지원(R&D)
연구과제명	사회맞춤형산학협력선도대학(LINC+)육성(0.5)
기 여 율	1/2
과제수행기관명	연세대학교(원주)
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

- 1) 이중층(bilayer)으로 이루어진, 적혈구 유래 CD47 양성 나노입자;
 - 2) 상기 나노입자 이중층에 삽입된 양자점;
 - 3) 상기 나노입자 표면에 부착된 종양 표적 항체; 및
 - 4) 상기 나노입자에 캡슐화된 항암제를 포함하는 종양 표적항체-양자점-항암제-적혈구 유래 나노입자 복합체로서,
- 상기 항암제는 상기 종양 표적 항체가 특이적으로 결합하는 암세포에 대한 항암활성을 갖고,
- 상기 복합체는 상기 종양 표적 항체에 의해 암세포에 특이적으로 결합하는, 종양 표적항체-양자점-항암제-적혈구 유래 나노입자 복합체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 적혈구는 적혈구 막(erythrocytes membrane)인 것을 특징으로 하는 종양 표적항체-양자점-항암제-적혈구 유래 나노입자 복합체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 CD47 양성 나노입자는 대식세포의 식균작용을 회피하는 것을 특징으로 하는 종양 표적항체-양자점-항암제-적혈구 유래 나노입자 복합체.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 표적 항체는 표피 성장 인자 수용체 (Epidermal growth factor receptor)에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 종양 표적항체-양자점-항암제-적혈구 유래 나노입자 복합체.

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 암세포는 유방암, 두경부암, 전립선암, 폐암, 비호지킨 림프종, 신경아교종 및 육종 종양 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 종양 표적항체-양자점-항암제-적혈구 유래 나노입자 복합체.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 암세포는 삼중음성유방암 세포인 것을 특징으로 하는 종양 표적항체-양자점-항암제-적혈구 유래 나노입자 복합체.

청구항 8

삭제

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 항암제는 독소루비신(Doxorubicin)인 것을 특징으로 하는 종양 표적항체-양자점-항암제-적혈구 유래 나노입자 복합체.

청구항 10

제1항의 종양 표적항체-양자점-항암제-적혈구 유래 나노입자 복합체를 포함하는 약물 전달체.

청구항 11

제1항의 종양 표적항체-양자점-항암제-적혈구 유래 나노입자 복합체를 포함하는 생체 진단 이미징 시스템.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 시스템은 세포 내 형광을 측정하는 것을 특징으로 하는 생체 진단 이미징 시스템.

청구항 13

제1항의 종양 표적항체-양자점-항암제-적혈구 유래 나노입자 복합체를 포함하는 암 치료 및 진단용 테라노스틱스(Theranostics) 조성물.

청구항 14

제13항의 암은 유방암, 두경부암, 전립선암, 폐암, 비호지킨 림프종, 신경아교종 및 육종 종양으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 암 치료 및 진단용 테라노스틱스 조성물.

청구항 15

1) 적혈구 막에 초음파를 처리하여 이중층(bilayer)으로 이루어진, 적혈구 유래 CD47 양성 나노입자를 제조하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 적혈구 유래 나노입자의 이중층에 양자점을 포획하는 단계;

3) 상기 단계 2)의 양자점이 포획된 나노입자에 종양 표적 항체를 부착하는 단계; 및

4) 상기 단계 3)의 종양 표적 항체가 부착된 나노입자에 항암제 처리한 후, 42 내지 54시간 배양하여 상기 항암제를 캡슐화하는 단계를 포함하는 종양 표적항체-양자점-항암제-적혈구 유래 나노입자 복합체를 제조하는 방법으로서,

상기 항암제는 상기 종양 표적 항체가 특이적으로 결합하는 암세포에 대한 항암활성을 갖고,

상기 복합체는 상기 종양 표적 항체에 의해 암세포에 특이적으로 결합하는 방법.

청구항 16

제 15항에 있어서, 상기 1)의 CD47 양성 나노입자는 말레이미드 모이어티(maleimide moieties)가 나노입자 표면

에 노출된 것을 특징으로 하는 종양 표적항체-양자점-항암제-적혈구 유래 나노입자 복합체.

청구항 17

제 15항에 있어서, 상기 단계 3)의 표적항체는 티올화된 항체를 나노입자에 부착하는 것을 특징으로 하는 표적항체-양자점-항암제-적혈구 유래 나노입자 복합체.

청구항 18

제15항에 있어서, 상기 단계 4)의 항암제는 나노입자에 첨가한 후, 42 내지 54시간 배양하는 것을 특징으로 하는 표적항체-양자점-항암제-적혈구 유래 나노입자 복합체.

청구항 19

제15항에 있어서, 상기 단계 4)의 항암제는 나노입자에 첨가한 후, 46 내지 50시간 배양하는 것을 특징으로 하는 표적항체-양자점-항암제-적혈구 유래 나노입자 복합체.

청구항 20

제15항에 있어서, 상기 단계 4)의 항암제는 인산염 구배(phosphate gradient)에 의해 나노입자로 캡슐화되는 것을 특징으로 하는 표적항체-양자점-항암제-적혈구 유래 나노입자 복합체를 제조하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 종양 표적 적혈구 막(erythrocytes membrane) 유래 나노입자, 이의 용도 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 구체적으로 양자점(quantum dots, Q-dots)이 포획되고, 치료제가 캡슐화되며 표면에 종양 표적 항체가 부착된 적혈구 막 유래 나노입자 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

[0002]

배경 기술

[0003] 유방암은 전이도와 주변조직으로의 침윤도가 매우 높으며 유전적으로 매우 복잡하고 다양한 특성을 가지기 때문에 여러 형태로 나타난다. 따라서 이러한 유방암에 대해서는 조기 진단과 적절한 표적 치료가 필수적이다. 하지만 현재 유방암의 조기 진단을 위해 진행되는 영상 진단은 비-특이 반응이 크고 조직검사는 침습적이어서 이를 대신할 수 있는 진단 방법이 필요하다.

[0005] 최근 연구 분야 및 임상 분야에서 살아있는 세포의 실시간 이미징에 대한 관심이 증가하면서, 크게 형광 이미징(fluorescence imaging, FI)과 생물발광 이미징(bioluminescence imaging, BLI)으로 분류되는 광학 이미징이 분자 이미징 기술로서 급속도로 떠오르고 있다.

[0006] FI는 단파장 또는 고에너지 광선에 의해 여기되면 가시광선으로 방출하는 형광물질을 이용하는 기술이다. 그러나, FI는 관심 있는 물질의 형광 신호 이외에 다른 신호를 감지하는 문제점이 있다. 뿐만 아니라, 상대적으로 단파장의 광선이 조직 깊숙한 곳까지 침투하는 것이 쉽지 않다. 그럼에도 불구하고, FI는 핵 이미징에 비해 생체 내 이미징을 위해 보다 안전하고, 다양한 표지 및 다채널 형광 이미징이 가능하며, 표적 질환을 반복적으로 추적함으로써 진단 분석에 이용할 수 있다는 장점이 있다. 이러한 장점으로 인해 FI는 빠르고, 재현이 가능하며 정량적인 진단을 가능하게 하기 위해 개발되고 있다.

[0008] 또한, 지난 몇 년 동안, 생물학적 이미징에서 형광 반도체 나노결정인 양자점(quantum dots, Q-dots)을 이용하기 위한 많은 노력이 있었다. 생체적합성 형광단(biocompatible fluorophore)으로서 양자점을 임상에 적용하는 것이 널리 시도되어 왔다. 양자점은 일반적으로 사용되는 유기 염료에 비해 장기간 안정성, 넓은 여기 스펙트

럼과 좁은 방출 스펙트럼, 및 형광의 높은 양자 수율과 같은 독특한 광학 특성을 가지고 있다. 그러나 혈액 순환을 통해 양자점을 전달하는 경우 전달효율이 낮아 체내 깊숙한 위치의 조직에서 방출되는 형광은 거의 검출되지 않는다는 문제점이 있다. 그러므로, 형광 양자점은 전달체(delivery system)를 통해 표적 조직으로 전달되어야 한다.

[0010] 한편 테라노스틱스(Theranostics)는 특정 부위에 치료제를 전달하고, 질환을 진단하며 질환의 경과를 추적할 수 있는 나노의학(nanomedicine)으로 정의된다. 최근, 테라노스틱스를 암 진단 및 치료에 적용하는 분야에서 학제간 연구가 폭발적으로 진행되고 있다. 그러나 이들의 약물전달체는 신체의 면역 체계에 쉽게 노출되어 혈액 순환 시간이 매우 짧고, 특정 종양만을 표적 하여 약물을 전달하지 못하고 정상 조직에도 영향을 미쳐 여러 부작용을 일으키는 것으로 알려져 있다. 이러한 점을 보완하기 위해 생체적합성과 안정성이 높은 약물 전달체 개발에 대한 요구가 증대되고 있다.

[0012] 이에, 본 발명자들은 삼중음성유방암의 효과적인 조기 진단과 치료를 동시에 수행하기 위해 생체적합성이 높은 적혈구 막을 활용하여 종양 표적 적혈구 유래 테라노스틱스 나노입자 개발에 노력한 결과, 양자점이 포획되고, 치료제가 캡슐화되며 표면에 종양 표적 항체가 부착된 적혈구 막 유래 나노입자를 제조하였고, 상기 나노입자 복합체가 기존 약물전달체들에 비해 생체 적합성, 면역세포 회피성, 종양 표적능 등이 개선되어 분자영상진단과 항암치료 물질로서 유용하게 사용될 수 있음을 밝힘으로써, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0014] (비특허문헌 0001) Bio-Inspired and Smart Nanoparticles for Triple Negative Breast Cancer Microenvironment, Mahsa Keihan Shokoo et al. Pharmaceutics, 2021 Feb 22

(비특허문헌 0002) Theranostic nanomedicine for cancer, Baran Sumer et al. Nanomedicine (Lond), 2008 Apr;3(2) 137-40

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 본 발명의 목적은 양자점이 포획되고, 치료제가 캡슐화되며 표면에 종양 표적 항체가 부착된 적혈구 막 유래 나노입자 및 이의 제조방법을 제공하기 위한 것이다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 나노입자 복합체를 포함하는 약물전달체, 생체 진단 이미징 시스템, 또는 암 치료 및 진단용 테라노스틱스(Theranostics) 조성물을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

[0018] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

[0019] 1) 이중층(bilayer)으로 이루어진, 적혈구 유래 CD47 양성 나노입자;

[0020] 2) 상기 나노입자 이중층에 삽입된 양자점;

[0021] 3) 상기 나노입자 표면에 부착된 종양 표적 항체; 및

[0022] 4) 상기 나노입자에 캡슐화된 항암제를 포함하는 종양 표적항체-양자점-항암제-적혈구 유래 나노입자 복합체를 제공한다.

[0023] 또한, 본 발명은 본 발명의 종양 표적항체-양자점-항암제-적혈구 유래 나노입자 복합체를 포함하는 약물 전달체를 제공한다.

[0024] 또한, 본 발명은 본 발명의 종양 표적항체-양자점-항암제-적혈구 유래 나노입자 복합체를 포함하는 생체 진단 이미징 시스템을 제공한다.

[0025] 또한, 본 발명은 본 발명의 종양 표적항체-양자점-항암제-적혈구 유래 나노입자 복합체를 포함하는 암 치료 및

진단용 테라노스틱스(Theranostics) 조성물을 제공한다.

- [0026] 아울러, 본 발명은
- [0027] 1) 적혈구 막에 초음파를 처리하여 이중층(bilayer)으로 이루어진, 적혈구 유래 CD47 양성 나노입자를 제조하는 단계;
- [0028] 2) 상기 단계 1)의 적혈구 유래 나노입자의 이중층에 양자점을 포획하는 단계;
- [0029] 3) 상기 단계 2)의 양자점이 포획된 나노입자에 종양 표적 항체를 부착하는 단계;
- [0030] 4) 상기 단계 3)의 종양 표적 항체가 부착된 나노입자에 항암제 처리한 후, 42 내지 54시간 배양하여 상기 항암제를 캡슐화하는 단계를 포함하는 종양 표적항체-양자점-항암제-적혈구 유래 나노입자 복합체를 제조하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0032] 본 발명은 양자점이 포획되고, 치료제가 캡슐화되며 표면에 종양 표적 항체가 부착된 적혈구 막(erythrocytes membrane) 유래 나노입자에 관한 것으로, 상기 나노입자 복합체는 기존 약물전달체들에 비해 생체 적합성이 우수하고, 리포좀 등과 비교하여 면역세포 회피성이 우수하며, 종양 표적능 등이 개선되어, 분자영상진단 및 항암 치료에 동시에 사용될 수 있는 테라노스틱스(Theranostics) 시스템으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0034] 도 1은 종양 표적 적혈구 막 유래 나노입자를 제조하는 모식도를 나타낸 도이다.
- 도 2a는 본 발명의 나노입자 복합체를 제조하기 위해 티올화 된 항체(항-EGFR(Epidermal growth factor receptor) 항체)를 적혈구 막 유래 나노입자(EDNs)에 접합하는 항-EGFR 항체가 부착된 EDNs(iEDNs)을 제조하는 과정을 나타낸 도이다.
- 도 2b는 항암 약물 독소루비신(DOX)이 EDNs에 캡슐화하는 과정을 나타낸 도이다.
- 도 3은 iEDNs 및 비-접합 유리(free) 항체의 CL-4B 컬럼 분획 분포 결과를 나타낸 도이다.
- 도 4는 EDNs 내 DOX 캡슐화 조건을 다양한 배양 시간에서 확인한 도이다.
- 도 5는 EDNs 입자 크기를 나타낸 도이다.
- 도 6은 EDNs-DOX 및 iEDNs-DOX의 TEM 이미지를 나타낸 도이다.
- 도 7은 혈청 단백질 존재시 EDNs의 안정성을 확인한 도이다.
- 도 8은 EDNs의 단백질 프로파일을 나타낸 도이다.
- 도 9는 적혈구 막(erythrocytes ghost) 및 EDNs에서 CD47의 발현을 확인한 도이다.
- 도 10은 EDNs-DOX 및 iEDNs-DOX에서 DOX의 누적 방출량을 확인한 도이다.
- 도 11은 FACS 분석을 통한 EDNs의 항-식세포(phagocytic) 능력을 확인한 도이다.
- 도 12는 EDNs 및 트립신 처리된 EDNs의 항-식세포 능력을 공초점 현미경으로 확인한 도이다.
- 도 13은 EDNs의 시험관 내(In vitro) 세포 독성을 확인한 도이다.
- 도 14는 MDA-MB-231 및 MDA-MB-453 세포에서 EGFR 발현을 확인한 도이다.
- 도 15는 iEDNs의 EGFR 특이적 세포 결합을 확인한 도이다.
- 도 16은 EDNs-DOX 또는 iEDNs-DOX로 처리된 종양 세포(MDA-MB-231 및 MDA-MB-453)의 형광 현미경 사진을 나타낸 도이다.
- 도 17은 EDNs-DOX 및 iEDNs-DOX의 시험관 내(In vitro) 세포 독성을 나타낸 도이다.
- 도 18은 EDNs-QD(양자점)의 제조과정 및 특성을 나타낸 도이다.
- 도 19는 iEDNs-QD의 생체 내 및 생체 외 생체 분포 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 20은 EDNs 및 iEDNs의 혈액 순환 시간을 확인한 도이다.

도 21은 iEDNs-DOX의 생체 내 항암 치료 효능을 확인한 도이다.

도 22는 iEDNs-DOX에 의한 이중 이식된 종양 세포의 *in situ* apoptosis 결과를 나타낸 도이다.

도 23은 iEDNs-DOX를 주사 한 종양 보유 마우스의 체중 변화를 나타낸 도이다.

도 24는 iEDNs-DOX가 주입된 마우스의 주요 내부 장기의 조직 병리학적 검사 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0037] 본 발명은 1) 이중층(bilayer)으로 이루어진, 적혈구 유래 CD47 양성 나노입자;

[0038] 2) 상기 나노입자 이중층에 삽입된 양자점;

[0039] 3) 상기 나노입자 표면에 부착된 종양 표적 항체; 및

[0040] 4) 상기 나노입자에 캡슐화된 항암제를 포함하는 종양 표적항체-양자점-항암제-적혈구 유래 나노입자 복합체를 제공한다.

[0041] 본 발명에서, 상기 1) 적혈구는 적혈구 막(erythrocytes membrane)인 것이 바람직하고, 또한, 본 발명의 적혈구 막 유래 나노입자 및 본 발명의 복합체는 CD47 양성으로 항-식세포(phagocytic) 능력을 유지되어야 하며, 항-세포 능력이 떨어질 경우 면역세포에 대한 회피성이 낮아져 테라노스틱스(Theranostics) 시스템에 사용될 수 없으므로, 본 발명의 적혈구 막 유래 나노입자 및 본 발명의 복합체 CD47 양성이어야 한다.

[0042] 또한, 상기 2)의 상기 "양자점(Quantum dot, QD)"은 형광성 반도체 결정으로서, 나노미터 크기를 지닌다. 또한, 상기 양자점은 광안정성(photostability), 좁은 방출 밴드(narrow emission band) 또는 넓은 여기 스펙트럼(broad excitationspectrum) 등의 형광적 특성을 지닌다. 상기와 같은 특성을 지니는 양자점은 그의 물리적 크기에 의하여 결정된 파장에서 넓은 스펙트럼 범위 및 형광에 걸쳐 빛을 흡수하고, 정확하며 좁은 스펙트럼에서 빛을 방출하기 때문에, 빛을 효과적으로 흡수하면서 고도로 안정화된 형광 방출을 가져올 수 있다.

[0043] 또한, 상기 3)의 종양 표적 항체는 표피 성장 인자 수용체(Epidermal growth factor receptor; EGFR)에 특이적으로 결합하는 항체로서, EGFR를 과발현하는 세포에 특이적으로 결합하는 것일 수 있고, 보다 구체적으로 EGFR를 과발현하는 암세포일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0044] 또한, 상기 4)의 상기 항암제는 종양 표적 항체가 특이적으로 결합하는 암세포에 대한 항암활성을 가지는 것이 바람직하고, 독소루비신(Doxorubicin)을 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 표적 항체가 결합하는 암세포에 대한 치료 활성을 가지는 항암제는 모두 사용할 수 있으며, 상기 독소루비신은 일례로 기재한 것일 뿐, 본 발명이 상기 특정 항암제로 한정하는 것은 아니다.

[0045] 또한, 상기 4)의 복합체는 종양 표적 항체로 인해 암세포에 특이적으로 결합하여 항암 활성을 가지며, 상기 암세포는 EGFR를 과발현하는 유방암, 두경부암, 전립선암, 폐암, 비호지킨 림프종, 신경아교종 및 육종 종양 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하며, 삼중음성유방암 세포인 것이 가장 바람직하다.

[0046]

[0047] 또한, 본 발명은 종양 표적항체-양자점-항암제-적혈구 유래 나노입자 복합체는 하기 제조방법으로 제조하는 것이 바람직하다:

[0048] 1) 적혈구 막에 초음파를 처리하여 이중층(bilayer)으로 이루어진, 적혈구 유래 CD47 양성 나노입자를 제조하는 단계;

[0049] 2) 상기 단계 1)의 적혈구 유래 나노입자의 이중층에 양자점을 포획하는 단계;

[0050] 3) 상기 단계 2)의 양자점이 포획된 나노입자에 종양 표적 항체를 부착하는 단계;

[0051] 4) 상기 단계 3)의 종양 표적 항체가 부착된 나노입자에 항암제 처리한 후, 42 내지 54시간 배양하여 상기 항암제를 캡슐화하는 단계를 포함하는 종양 표적항체-양자점-항암제-적혈구 유래 나노입자 복합체를 제조하는 방법.

[0052] 본 발명의 상기 단계 1)의 CD47 양성 나노입자는 말레이미드 모이어티(maleimide moieties)가 소수성 이중층으

로 이루어진 나노입자 표면에 노출된 것이 바람직하고, 단계 3)의 표적항체는 티올화된 항체이므로 상기 말레이미드 모이어티에 티올화된 종양 표적 항체가 결합된다.

- [0053] 또한, 상기 단계 4)의 항암제는 인산염 구배(phosphate gradient)에 의해 나노입자로 캡슐화되며, 상기 항암제는 나노입자에 첨가한 후, 42 내지 54시간, 바람직하게는 46 내지 50시간, 가장 바람직하게는 48시간 배양되어야 하며, 상기 범위를 벗어날 경우, 항암제가 나노입자 내로 캡슐화되는 되는 양이 현저히 낮아지므로 항암제를 첨가 후, 반드시 42 내지 54시간, 바람직하게는 46 내지 50시간 배양하여야 한다. 아울러, 상기 항암제가 본 발명의 복합체 내 유의적인 양으로 캡슐화되지 않으면 항암 효과를 나타낼 수 없으므로, 암 치료 및 진단용 테라노스틱스로 사용될 수 없다.
- [0054] 또한, 상기 종양 표적항체-양자점-항암제-적혈구 유래 나노입자 복합체는 140 nm 내지 180 nm의 직경을 가지는 것일 수 있다. 또한, 상기 복합체는 균일한 입도분포를 나타내며, 특징적인 입자의 크기 때문에 혈관이 매우 약하며 느슨한 구조를 갖는 암, 염증 등의 부위의 조직에 쉽게 혈관 내로 통과할 수 있다.
- [0055] 또한, 상기 종양 표적항체-양자점-항암제-적혈구 유래 나노입자 복합체의 제타 전위(zeta potential) 값이 -12 mV 내지 -15 mV로서, 음의 값을 가지므로, 서로 응집이 발생하지 않는다.
- [0057] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 양자점이 포획되고, 치료제가 캡슐화되며 표면에 종양 표적 항체가 부착된 적혈구 막 유래 나노입자를 제조하였다(도 1 내지 도 3 참조).
- [0058] 또한, 본 발명의 사용된 치료제의 적혈구 막 유래 나노입자 내 캡슐화 조건을 확인하기 위해, 독소루비신(DOX)을 적혈구 막 유래 나노입자(EDNs)에 첨가한 후 다양한 배양 시간에서 배양한 결과, 독소루비신을 첨가하고 48시간 배양할 때, 가장 효율적으로 독소루비신이 캡슐화되는 것을 확인하였다(도 4 참조).
- [0059] 또한, 본 발명의 나노입자의 물리·화학적 특성을 확인한 결과 구형 및 이중층 모양으로, 이를 도 5, 도 6 및 표 1에 나타내었다(도 5, 도 6 및 표 1 참조).
- [0060] 또한, EDNs의 혈청 안정성을 확인한 결과, 혈청 단백질과의 응집에 의한 입자 크기의 유의한 변화를 나타내지 않음을 확인하였다(도 7 참조).
- [0061] 또한, EDNs의 단백질 프로파일(profiles)을 확인한 결과 적혈구 막에 있는 CD47은 EDNs으로 변환된 후에도 보존되어 있음을 확인하였다(도 8 및 도 9 참조).
- [0062] 또한, EDNs 및 독소루비신 복합체(EDNs-DOX)에서 항암제인 독소루비신(DOX)의 방출 효과를 확인한 결과, 본 발명의 적혈구 막으로 제조된 나노 입자는 DOX 분자를 효율적으로 포획하고 약물을 안정적으로 운반할 수 있음을 확인하였다(도 10 참조).
- [0063] 또한, EDNs의 항-식세포(phagocytic) 능력을 확인한 결과, 양이온성 리포솜인 DMKE-Chol(0,0'-dimyristylN-lysyl glutamate/cholesterol) 및 CD47 차단 EDNs(CD47 blocking)과 비교하여 유의적인 항-식세포 능력을 나타냄을 확인하였다(도 11 및 도 12 참조).
- [0064] 또한, EDNs의 내재적 세포 독성을 확인한 결과, EDNs 자체는 높은 농도에서도 내재적 세포 독성이 없는 것을 확인하였다(도 13 참조).
- [0065] 또한, 종양 표적 항체인 EGFR 억제제가 결합된 EDNs(iEDN)의 표적 세포 특이적 결합 효과를 확인한 결과, EGFR-양성 유방암 세포주에 강력하게 결합하는 것을 확인하였다(도 14 및 도 15 참조).
- [0066] 또한, iEDNs 및 독소루비신 복합체의 EGFR 특이적 약물 전달 효과를 확인한 결과, EGFR-표적화 항체와 결합된 EDNs이 비표적 세포보다 표적 세포에 약물을 보다 효율적으로 전달할 수 있으며, 유리(free) DOX 처리 세포보다 동일한 시점에서 더 많은 양의 DOX를 표적 세포로 전달할 수 있음을 확인하였다(도 16 참조).
- [0067] 또한, iEDNs 및 독소루비신 복합체의 시험 관내 세포 독성을 확인한 결과, 적혈구 막과 제형화 된 DOX(EDNs-DOX 및 iEDNs-DOX)는 MDA-MB-231 세포에서 높은 세포 독성을 나타내고, 특히 iEDNs-DOX는 표적 종양 세포에서 특이적 치료 효능을 가지고 있음을 확인하였다(도 17 참조).
- [0068] 또한, 종양 이종 이식 마우스에서 양자점이 포획된 iEDNs-QD의 *in vivo* 생체 분포를 확인한 결과, 종양 특이적 iEDNs은 종양을 표적으로 더 효과적인 전달 능력을 가지고 있음을 확인하였다(도 18 내지 도 20 참조).
- [0069] 또한, iEDNs-DOX의 투여에 의한 생체 내 종양 성장 억제 효과를 확인한 결과, iEDNs-DOX는 EDNs-DOX보다 우수한 종양 성장 억제 효과를 나타냄을 확인하였다(도 21 참조).

- [0070] 또한, iEDNs-DOX로 처리된 마우스에서 종양 세포의 *in situ* apoptosis를 확인한 결과, iEDNs-DOX는 종양세포 특이적인 apoptosis를 나타냄을 확인하였다(도 22 참조).
- [0071] 아울러, iEDNs-DOX의 생체 내 독성을 확인한 결과, 모든 실험 그룹에서 마우스의 체중은 실험군 처리동안 크게 변하지 않았고, 체중 감소로 인한 심각한 물리적 및 임상 적 손상을 나타내지 않음을 확인하였다(도 23 참조).
- [0072] 따라서, 본 발명의 종양 표적항체-양자점-항암제-적혈구 유래 나노입자 복합체는 기존 약물전달체들에 비해 생체 적합성이 우수하고, 리포좀 등과 비교하여 면역세포 회피성이 우수하며, 종양 표적능 등이 개선되어, 분자영상진단 및 항암치료에 사용될 수 있는 약물전달체 및 상체 진단 이미징 시스템용으로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0074] 아울러, 본 발명은 본 발명의 종양 표적항체-양자점-항암제-적혈구 유래 나노입자 복합체를 포함하는 암 치료 및 진단용 테라노스틱스(Theranostics) 조성물을 제공한다.
- [0075] 구체적으로, 본 발명의 종양 표적항체-양자점-항암제-적혈구 유래 나노입자 복합체는 기존 약물전달체들에 비해 생체 적합성이 우수하고, 리포좀 등과 비교하여 면역세포 회피성이 우수하며, 종양 표적능 등이 개선되어, 분자영상진단 및 항암치료에 사용될 수 있는 약물전달체 및 상체 진단 이미징 시스템용으로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0077] 본 발명의 조성물은 "약제학적으로 이용가능한 담체"를 포함할 수 있으며 약제학적으로 이용가능한 담체는 당업자에게 잘 알려진 여러 가지 인자에 따라 제조될 수 있는데, 예를 들면 본 발명의 복합체로 치료하고자 하는 질환 및 질병 또는 상태; 치료받을 개체, 나이, 크기 및 일반적인 상태; 조성물을 투여하는데 이용되는 경로, 예를 들어 비강, 구강, 안구, 국소, 경피 및 근육 등의 요인을 고려해야 하나, 이에 제한되지는 않는다. 일반적으로 경구 투여 경로 이외의 생리활성물질 투여에 이용되는 약제학적으로 이용가능한 담체에는 D5W, 텍스트로즈 및 생리학 적 염을 용적의 5% 이내로 포함하는 수용액을 포함한다. 또한 약제학적으로 이용가능한 담체에는 보존제 및 항산화제와 같은 활성 성분들의 안정성을 보장시킬 수 있는 추가 성분들을 포함할 수 있다.
- [0079] 본 발명의 약제학적 조성물의 투여 경로는 적합한 모든 투여 경로가 이용될 수 있다. 또한, 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 의도하는 치료에 유효한 용량으로 투여된다. 특정의 의학적 질환을 치료하거나 또는 이의 진행을 억제시키는데 요구되는 치료학적 유효량은 의학 분야에 공지된 예비임상 연구 및 임상 연구를 이용하여 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 본 발명에서 상기 사용된 용어, "치료학적 유효량"은 임상의 또는 연구자가 목적하는, 특정 조직, 시스템, 및 동물 또는 인간의 생물학적 또는 의학적 반응을 유발시키는 활성 성분의 양을 말한다.
- [0081] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의하여 상세히 설명한다.
- [0082] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0084] <실시예 1> 시료의 준비
- [0085] DSPE-mPEG₂₀₀₀(1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000]), DSPE-PEG₂₀₀₀-mal(1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide(polyethylene glycol)2000])은 Avanti Polar Lipid, Inc. (Alabaster, USA)에서 구입하였다. 또한 항-EGFR 항체(Ab) (cetuximab, Erbitux[®])는 Merck(Darmstadt, Germany)에서 구입하였고, 양자점(Qquantum dots)은 ZEUS(화성시, 한국)에서 구입하였다.
- [0086] PD-10 컬럼 및 세파로스 CL-4B는 Amersham Bioscience(Uppsala, Sweden)에서 구입하였고, Amicon Ultra-4 30K MWCO는 Amicon(Beverly, Sweden)에서 구입하였다.
- [0087] 세포 생존력 측정을 위한 세포 계수 키트-8(CCK-8)은 Dojindo Laboratories (Kumamoto, Japan)에서 구입하였고, 독소루비신 염산염(Doxorubicin hydrochloride)은 Merck(Darmstadt, Germany)에서 구입하였다.
- [0088] 아울러, VyrantTM DiO 세포 라벨링 솔루션은 Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)에서 구입하였다.
- [0090] <실시예 2> 세포주 및 세포 배양
- [0091] 인간 유방 선암종(Human breast adenocarcinoma) MDA-MB-231(HTB-26TM), 인간 유방 전이성 암종(human breast

metastatic carcinoma) MDA-MB-453(HTB-131™) 및 마우스 대식세포 Raw 264.7 세포는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, USA)에서 구입하였다.

[0092] MDA-MB-231 및 MDA-MB-453 세포는 10% 소태아 혈청(FBS, WELGENE), 100 IU/mL 페니실린 및 100 µg/mL 스트렙토 마이신(Gibco™, Waltham, USA)이 보충된 Leibovitz의 L-15 배지(Leibovitz's L-15)(대한민국 경상시 웰진)에서 37℃에서 CO₂가 없는 상태에서 유지시켰다. 또한, RAW 264.7 세포는 10% 소태아 혈청(FBS, WELGENE), 100IU/mL 페니실린 및 100 µg/mL 스트렙토마이신(Gibco™)이 보충된 Dulbecco의 변형된 Eagle 배지(DMEM, WELGENE)에서 37℃, 95% 공기 및 5% CO₂ 상태에서 유지시켰다.

[0094] <실시예 3> 동물모델의 준비

[0095] 종양 이종이식(tumor-xenograft) 마우스 모델을 준비하기 위하여 6주령 암컷 BALB/c 누드 마우스를 나라 바이오텍(서울)에서 구입하였다. 모든 동물실험은 원주 연세대학교 동물 관리위원회(IACUC)(YWC1-201706-011-03)의 승인을 받아 학교 지침 및 규정에 따라 수행하였다.

[0097] <실시예 4> 종양 표적 적혈구 막 유래 나노입자(tumor-targeted nanoparticles using erythrocyte membranes)의 제조

[0098] 도 1의 모식도와 같이 종양 표적 적혈구 막 유래 나노입자를 제조하였으며, 구체적인 제조방법은 하기 실시예 <4-1> 내지 <4-4>, 및 <실시예 5>에 제조방법으로 제조하였다.

[0100] <4-1> 적혈구 막(erythrocytes membrane)의 준비

[0101] 8주된 ICR 마우스[Hsd:ICR(CD-1[®])]에서 K2EDTA(Becton, Dickinson and Company, NJ, USA)가 적용된 마이크로컨테이너 튜브로 약 1 mL의 전혈을 채취하고 4℃에서 15분간 500 × g로 원심분리하였다. 그런 다음 전혈에서 혈청과 버피 코트(buffy coat)를 제거하였다. 농축 적혈구(Packed red blood cells)는 용혈(hemolysis)을 위한 저장성(hypotonic) 용액에 처리되기 전에 4℃에서 1mL의 1X 인산 완충 식염수(PBS)로 3 회 세척하였다.

[0102] 세척된 적혈구는 1 mL의 0.25 × PBS에 현탁시킨 후, 헤모글로빈이 제거될 때까지 4℃에서 15 분 동안 14,000 rpm으로 원심 분리 하였다. 원심 분리 후 튜브 바닥에 적혈구(RBC) 막(RBC ghost)인 흰색 펠렛을 수득하였다.

[0104] <4-2> 적혈구 유래 나노입자(erythrocyte-derived nanoparticles; EDNs)의 제조

[0105] 상기 <4-1>에서 준비한 적혈구 막(1 mg 단백질을 37 kHz의 주파수 및 60 W의 전력으로 초음파 분산기(bath sonicator)(Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Germany)를 사용하여 유리관에서 10분 간격으로 각각 15분 동안 3 회 초음파 처리하였다. 또한, 적혈구 막의 수화(hydration)에 사용된 완충액은 독소루비신 캡슐화 조건을 위해 2 mL 300 mM 인산 암모늄 완충액을 사용하였다.

[0107] <4-3> 말레이미드-지질(maleimide-lipid) 결합 EDNs의 제조

[0108] DSPE-PEG₂₀₀₀-mal 지질(1 mg)을 N₂ 가스 하에서 건조시키고 1 시간 동안 증발시켰다. 증발 후, 지질 필름을 2 mL의 HEPES-EDTA 완충액으로 수화시켰다. DSPE-PEG2000-mal-lipid를 적혈구 유래 나노 입자에 삽입하기 위해 지질 용액을 1 mg의 적혈구 막 용액에 첨가한 다음 얼음에서 10분 간격으로 각각 15분 동안 3회 초음파 처리하여 말레이미드-지질이 결합된 EDNs(EDNs-Mal)을 제조하였다.

[0110] <4-4> 면역-EDNs(iEDNs)의 제조

[0111] 반응성 티올기를 갖는 항체를 제조하기 위하여, 1 mg의 세툽시맙(cetuximab)을 1 mL의 HEPES-EDTA 완충액(25 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 7.4)에서 2 mg의 Traut 시약(Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)과 실온에서 1 시간 동안 반응시켜 티올화시켰다. 그럼 다음, 탈기된(degassed) HEPES 완충액(25mM HEPES, 140mM NaCl, pH 7.4)은 PD-10 desalting column(GE Healthcare, Chicago, IL, USA)에 통과시켜 미반응 Traut 시약을 제거하였다.

[0112] 그런 다음, 300 µg의 티올화된 항체를 상기 <4-3>에서 제조한 EDNs-Mal과 결합시키기 위해 4℃에서 밤새 배양한 후, 세툽시맙과 EDNs의 접합체를 HEPES 완충액 (pH 7.4)을 이용하여 세파로스 CL-4B 컬럼에서 겔 여과 크로마토그래피를 사용하여 정제했습니다.

[0113] EDNs에 대한 항체 접합은 6% 나트륨 도데실 설페이트-폴리 아크릴 아마이드 겔(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel) 전기영동(SDS-PAGE)겔의 Coomassie Brilliant Blue 염색을 통해 확인하였고, 항체 삽입

효율은 Fusion Solo Chemidoc(Vilber Lourmat, Eberhardzell, Germany)로 염색된 밴드의 밀도를 측정하여 확인하였다.

[0115] <실시예 5> iEDNs 내 독소루비신(Doxorubicin; DOX) 캡슐화

[0116] 독소루비신을 상기 <실시예 4>에서 제조한 iEDNs 내 캡슐화하기 위하여, 5 mg/mL의 독소루비신 염산염 용액(Sigma Aldrich, Missouri, USA)을 37℃에서 48 시간 동안 iEDN(1 : 8 중량비)에 첨가후, 배양하였다.

[0117] 그런 다음, 유리 DOX(free DOX)는 HEPES 버퍼에서 PD-10을 사용하여 겔 여과에 의해 제거시켰다.

[0118] 독소루비신이 캡슐화된 iEDNs(iEDNs-DOX)(3-6th)은 3500 × g에서 10 분 동안 30K Amicon 튜브(Millipore, Darmstadt, Germany)를 사용하여 정제하였다. 그런 다음 Infinite 200 Pro NanoQuant(TECAN Group Ltd., Mannedorf, Switzerland)를 사용하여 480 nm에서의 흡광도를 측정하여 iEDN의 캡슐화 효율을 분석하였다.

[0119] 한편, 비교실험을 위해, 상기 실시예 <4-3>에서 제조한 EDNs-Mal을 위하여, 상기 동일한 방법으로 독소루비신을 캡슐화하여 EDNs-DOX를 제조하였다.

[0121] <실시예 6> iEDNs-DOX의 크기 및 표면 전하 측정

[0122] 상기 <실시예 4> 및 <실시예 5>에서 제조한 EDNs, iEDNs, EDNs-DOX 및 iEDNs-DOX의 크기와 표면 전하는 Zetasizer Nano-ZS90(Malvern Instrument Ltd., Malvern, UK)을 사용하여 DLS(dynamic light scattering)으로 3 회 측정하였다. 또한, GraphPad Prism 소프트웨어(GraphPad Software, Inc., CA, USA)로 통계적으로 분석하였다.

[0124] <실시예 7> TEM(Transmission electron microscopy) 분석

[0125] 상기 <실시예 4> 및 <실시예 5>에서 제조한 EDNs, iEDNs, EDNs-DOX 및 iEDNs-DOX의 형태는 투과 전자 현미경(TEM)(JEM-2100F, JEOL Ltd., Tokyo, Japan)으로 확인하였다.

[0126] 구체적으로, 입자(300 μg의 단백질)를 포함하는 용액은 15분 동안 탄소로 코팅된 카보닐-코팅 400 메쉬 구리 그리드에 로드하였다.

[0127] 음성 염색을 위해 10 μL의 2 % 우라닐 아세테이트를 10분 동안 그리드에 놓은 다음, 제거하고 실온에서 10분 동안 건조시켰다. TEM 이미지는 80 kV의 가속 전압에서 촬영하였다.

[0129] <실시예 8> EDNs의 혈청 안정성 분석

[0130] EDNs을 500 μL FBS 용액에 넣고 37℃에서 21일 동안 배양하였다. 그런 다음, 입자의 크기는 Zetasizer Nano-ZS90을 사용하여 3회 동안 다양한 시점(0, 1, 3, 7, 14, 21 일)에서 측정하였다.

[0132] <실시예 9> 적혈구 막과 EDNs의 단백질 프로파일링

[0133] 단백질 프로파일을 조사하기 위해, 적혈구 막과 EDNs의 용액을 6% 아크릴아미드 겔(acrylamide gel)에서 SDS-PAGE하였다(각각 30 μg 단백질).

[0134] 실험 후, 겔을 실온에서 30 분 동안 Coomassie Brilliant Blue (EZ-Gel Staining Solution, DoGenBio)로 염색시켰다. 또한, D.W.로 3 회 세탁 후, 단백질 밴드는 Fusion Solo Chemidoc (Vilber Lourmat)를 사용하여 확인하였다.

[0136] <실시예 10> 웨스턴 블랏팅 분석

[0137] 적혈구 막과 EDNs의 CD47 단백질 발현 수준을 확인하기 위해 웨스턴 블랏팅 분석을 수행하였다. 또한 MDA-MB-231 및 MDA-MB-453 세포의 CD47 발현 수준을 웨스턴 블랏팅 분석으로 평가하였다.

[0138] 구체적으로, 세포를 6-웰 플레이트(웰당 2×10^5 개 세포)에서 배양하고 프로테아제 억제제 각테일(Thermo Scientific)과 함께 RIPA 완충액(Thermo Scientific, Waltham, USA)을 사용하여 용해시켰다. 수확한 세포 용해물을 1.5 mL 튜브로 옮긴 다음 14,000 rpm에서 10 분 동안 4℃에서 원심 분리하였다. 상층액은 1.5 mL 튜브로 이동시켰다. 총 단백질 농도는 Bradford 분석 (Bio-rad, Hercules, USA)으로 측정하였다.

[0139] 단백질 용액(32 μL)과 5X reducing dye(8 μL)의 혼합물을 90℃에서 5분간 가열하였다. 추출된 단백질(30 μg)을 120 볼트에서 1시간 30분 동안 10 % SDS-PAGE 실행한 다음 1 시간 동안 350 mA에서 니트로 셀룰로오스 멤브레인(막)(Pall Corp., Port Washington, USA)으로 옮겼다. 멤브레인은 실온에서 1 시간 동안 3 % skim

milk(BD, Franklin Lakes, USA)를 포함하는 TBST(0.1 % Tween 20을 포함한 Tris- 완충 식염수)로 차단시켰다. 항-EGFR rabbit 항체(Cell Signaling Technology, Danvers, USA) 또는 항-mouse CD47 항체(Invitrogen, Carlsbad, USA)를 1 : 1000 희석한 다음, 상기 멤브레인과 배양한 다음, 3%의 skim milk를 함유하는 TBST에 1:3000 희석한 항-GAPDH mouse 항체(Millipore, Darmstadt, Germany)와 함께 4℃에서 밤새 배양하였다. TBST로 3회 세척 후, 3%의 skim milk를 함유하는 TBST에서 상기 멤브레인을 horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit 항체 또는 goat anti-rat 항체의 1:5000 희석액으로 처리하고, horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse 항체의 1:3000 희석액을 처리하였다.

[0140] 상기 멤브레인을 TBST로 3회 세척하고 SuperSignal® West Pico(Thermo Scientific)로 처리하였다. 면역 반응 밴드는 Fusion Solo Chemidoc (Vilber Lourmat)를 사용하여 확인하였다.

[0142] <실시예 11> iEDNs-DOX로부터의 독소루비신 방출 분석

[0143] EDNs-DOX 및 iEDNs-DOX로부터의 독소루비신의 누적 방출은 48 시간 동안 3.5kDa DiaEasy™ Dialyzer (MWC, Biovision Inc., Mipitas, USA)를 사용한 투석 방법(dialysis method)으로 측정하였다.

[0144] 구체적으로, 500 µg의 유리(free) DOX, 100 µg의 EDNs-DOX 및 100 µg의 iEDNs-DOX를 투석 튜브에 첨가하고 1L의 HEPES 완충액 (25mM, pH 7.4)에서 10 × g에서 일정하게 교반하면서 투석하였다. 잔여 DOX의 양은 480 nm 파장에서 Infinite 200 Pro NanoQuant(TECAN)로 측정하였다.

[0146] <실시예 12> 세포 독성 분석

[0147] EDNs의 세포 독성을 확인하기 위하여, MDA-MB-232 및 MDA-MB-453 세포를 96- 웰 플레이트(웰당 10 % FBS 함유 L-15 배지 200 µL에서 웰당 1×10^4 세포)에 접종하고 24시간 동안 배양하였다. 그럼 다음, 상기 세포에 100 µL의 무혈청 배양 배지에서 다양한 농도의 EDNs(0, 50, 100, 250, 500 µg/mL의 EDNs 단백질 농도)을 처리한 다음 37℃에서 24 시간 동안 배양하였다.

[0148] 유리(free) DOX, EDNs-DOX 및 iEDNs-DOX의 세포 독성을 확인하기 위해, MDA-MB-231 및 MDA-MB-453 세포에 상기 동일한 방법으로 접종하였다. 48 시간 배양 후, 상기 세포에 100 µL의 무혈청 배지에서 다양한 농도의 유리(free) DOX, EDNs-DOX 및 iEDNs-DOX (100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 및 0.0001 µM DOX)를 처리한 후, 37℃에서 48 시간 동안 배양하였다.

[0149] 배양 후 모든 세포를 배양배지로 1회 세척하고 10 µL의 Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 용액 (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)으로 처리 한 후 37℃에서 4 시간 동안 배양 하였다. 그럼 다음, Infinite 200 Pro NanoQuant (TECAN)를 사용하여 450nm 파장에서 웰을 분석하였다. 유리 DOX, EDNs-DOX 및 iEDNs-DOX의 IC₅₀ (최대 억제 농도의 절반) 값은 GraphPad Prism 소프트웨어(GraphPad Software, Inc., San Diego, USA)를 사용하여 확인하였다.

[0151] <실시예 13> 시험관 내에서 EDNs의 대식세포 세포 내 흡수 확인

[0152] EDNs의 면역 회피 능력(immune escape ability)을 평가하기 위해, Raw 264.7 세포에 의한 흡수를 FACS Calibur 유세포 분석기(BD, Franklin Lakes, USA) 및 공초점 레이저 스캐닝 현미경(LSM 510; Zeiss, Heidenheim, Germany)으로 분석하였다.

[0153] 구체적으로, Raw 세포를 6-웰 플레이트에 웰당 2×10^5 세포 밀도로 접종하고 12 시간 동안 배양 하였다. EDNs, CD47-차단 EDNs, 트립신-EDTA 처리 EDNs(TS-EDNs) 및 0,0'-디미리스틸-N-리실 글루타메이트/콜레스테롤 (0,0'-dimyristyl-N-lysyl glutamate/cholesterol, DMKE-Chol, 양성 대조군)과 같은 준비된 모든 입자는 5 µL의 Vybrant™ Multicolor Cell-Labeling kit(Invitrogen, Eugene, USA)으로 제조업체의 프로토콜에 따라 37℃에서 15분 동안 형광 표지시켰다. 그럼 다음 4℃에서 1 시간 동안 100 µg의 형광 EDNs, CD47-차단 EDNs, TS-EDNs 및 10 µg DMKE-Chol으로 처리된 세포를 FACS Calibur 유세포 분석기(Becton Dickinson)로 분석하였다. 또한, 공 초점 레이저 주사 현미경을 사용하여 37℃에서 1 시간 동안 세포를 관찰하였다.

[0155] <실시예 14> 시험관 내에서 iEDNs-DOX의 표적 세포 결합 및 세포 내 흡수 확인

[0156] <14-1> 유세포 분석

[0157] 표적세포로 표적 약물 전달을 확인하기 위하여, 100 µg의 EDNs과 iEDNs를 6-웰 플레이트에 접종된 MDA-MB-231(EGFR +) 및 MDA-MB-453(EGFR-) 세포에 처리한 후 24시간 배양하였다. 상기 세포는 L-15로 2회 세척한 후,

트립신-EDTA 용액 (pH 7.4)을 처리한 다음 세포 현탁액 배지를 3 분 동안 200 x g에서 원심 분리 하였다. 세포 펠렛을 5 mL 폴리스티렌 둥근 바닥 튜브(Corning, New York, USA)내 배양 배지 현탁시켰다. Alexa fluoro 488(Invitrogen, Eugene, USA)를 항-EGFR 항체와 4℃에서 10 분 동안 계속 교반하면서 라벨링했습니다. 세포에 대한 iEDNs의 결합은 FACS Calibur 유세포 분석기(Becton Dickinson)로 분석하였다.

[0159] <14-2> 공초점 현미경 분석

[0160] iEDNs-DOX의 세포 내 흡수를 확인하기 위해, 상기 <실시예 5>에서 제조한 iEDNs-DOX 100 μ g을 세포에 처리한 후 37℃에서 1, 4, 8, 12, 24 시간 동안 무혈청 배지에서 배양하였다. 처리 후 모든 세포를 PBS(pH 7.4, cold)로 2 회 세척하고, 2 % 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 4℃에서 10 분간 어두운 곳에서 고정시켰다. 또한, PBS로 3 회 세척한 후, 세포를 4',6-diamidino-2-phenylindole DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole) 용액(Vector lab, Burlingame, USA)으로 10 분 동안 어둠 속에서 염색한 다음 슬라이드에 고정시킨 후, 공초점 레이저 스캐닝 현미경(LSM 510; Zeiss)을 사용하여 관찰하였다.

[0162] <실시예 15> 생체 내(*in vivo*) 종양모델의 준비

[0163] 생체 내 종양모델을 준비하기 위해, 6주령 암컷 BALB/c 누드 마우스에 4 번 유방지방조직(4th mammary fat pad)에 200 μ L의 MDA-MB-231 세포(1×10^7)를 Matrigel(Corning, New York, USA)(1:1 volume ratio)과 혼합하여 피하주사하였다.

[0164] 캘리퍼스(calipers)로 종양 크기를 측정한 후, 다음 식을 이용하여 종양 부피를 확인하였다(종양 부피 = $\pi/6 \times \text{길이} \times \text{폭} \times \text{높이}$).

[0166] <실시예 16> EDNs 및 iEDNs의 생체 내 분포 확인

[0167] <16-1> 양자점(QD)이 포획된 EDN(EDNs-QD)의 제조

[0168] EDNs-QD의 제조를 위해, DSPE-mPEG2000 및 QD는 350:1의 물비로 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2 : 1)에 혼합하였다. 지질과 QD의 혼합물을 N_2 가스 흐름 하에서 증발시키고 진공 건조를 1 시간 동안 진행시켜 지질막(lipid film)을 형성시킨 후, 80-85℃에서 2 시간 동안 배양한 다음 HEPES 완충액(HEPES 25mM, NaCl 140mM, pH 7.5; 1mg 지질/mL)으로 수화하였다. QD 응집체는 100 nm 폴리 카보네이트 멤브레인 필터 (polycarbonate membrane filter, Whatman Inc., Piscataway, USA)를 통해 여과하여 제거하였다. 준비된 QD-micelles을 1 mg의 적혈구 막(erythrocyte ghost)과 혼합 한 후 투명해질 때까지 4℃에서 초음파 처리 하였다.

[0170] <16-2> 생체 내 분포 확인

[0171] 상기 <실시예 15>의 마우스의 종양 부피가 약 200 mm^3 에 도달하면 마우스의 꼬리정맥을 통해 준비된 EDNs 또는 iEDNs(150 μ g 단백질 / 마우스)을 주입하였다.

[0172] 마우스 전신의 형광 이미지는 주사 후 4, 24 및 48 시간에 FOBI *in vivo* 이미징 시스템(CELLGENTEK, 대전, 한국)으로 분석하였다. 전신 형광 이미지를 촬영 한 후 모든 마우스를 즉시 희생시키고 종양 조직을 포함한 주요 장기를 마우스에서 절개하였다. 모든 기관의 형광 강도는 FOBI 이미징 시스템을 사용하여 확인하였다.

[0173] 또한, 혈액 순환 시간을 분석하기 위해 EDTA 튜브를 사용하여 모든 마우스에서 혈액을 수집하고, QD의 흡광도는 Infinite 200 Pro NanoQuant(TECAN Group Ltd)를 통해 760 nm 파장에서 측정하였다.

[0175] <실시예 17> iEDNs-DOX에 의한 생체 내 종양 성장 억제 효과 확인

[0176] iEDNs-DOX의 항암 치료 효능을 평가하기 위해, 식염수, 유리 DOX, EDNs-DOX 또는 iEDNs-DOX를 MDA-MB-231가 이식된 마우스에 3 회 정맥 주사($n = 5$, 4mg DOX/kg) 한 후, 32 일 동안 종양 성장을 관찰했습니다. 마우스의 종양 부피와 체중은 32 일 동안 주 3 회 측정하였다. 종양 부피가 약 1,000 mm^3 에 도달하면 모든 마우스를 희생시키고 종양의 최종 크기를 측정하였다.

[0178] <실시예 18> TUNEL(terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick and labeling) 분석

[0179] 약물을 처리한 후 종양을 절개한 다음, 포르말린에 고정하고, 탈수하고, 파라핀에 포매하고, 5 μ m 절편을 제조하였다.

[0180] 절편에서 세포 사멸 세포의 존재 및 국소화는 제조업체의 지시에 따라 *in situ* 세포 사멸 검출 키트(Abcam,

Cambridge, UK)로 diaminobenzidine (DAB) 염색을 사용하여 TUNEL 분석을 사용하여 평가하였다. 총 핵(nuclei) 중 TUNEL 양성 핵 비율은 각 조직에 대해 4 개의 필드를 조사하여 계산하였다.

[0182] <실시예 19> 조직학적 분석

[0183] 주요 장기를 4% 포르말린에 24시간 동안 고정하고 DW 70%에서 100%까지 에탄올을 사용하여 탈수하였다. 고정된 조직을 파라핀에 포매하고, 마이크로톰(microtome)으로 절편하였다. 상기 조직 절편에서 파라핀 제거하고 H&E(hematoxylin and eosin) 시약으로 염색하였다. 염색된 조직을 광학 현미경으로 관찰하였다.

[0185] <실시예 20> 통계 분석

[0186] 데이터는 평균 \pm 표준 편차 (S.D.)로 표시되었습니다. Prism 8(GraphPad Software, Inc.)을 사용하여 양방향 ANOVA 및 t-test로 통계 분석을 수행하였다. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ 대 대조군 또는 실험군 간.

[0188] <실험예 1> iEDNs-DOX의 준비 및 특성

[0189] 도 2의 모식도에서와 같이, EDNs에 항-EGFR 항체 접합 및 항암 약물 독소루비신 캡슐화하는 과정을 나타내었다.

[0190] 구체적으로, 항-EGFR 항체에 Traut's 시약을 처리하여 1차 아민을 티올 그룹으로 전환하였다. 그런 다음 DSPE-PEG₂₀₀₀-mal를 적혈구 막과 혼합하고 ice 하에서 인산 암모늄 완충액에서 초음파 처리하여 말레이미드 모이어티를 노출하는 EDNs(EDNs-Mal)을 제조하였다. 티올화 된 항체를 EDNs-Mal에 첨가하여 4°C에서 밤새 직접 접합시켰다(도 2a). 유리(free) 항체(비 접합 항체)는 크기 배제 크로마토그래피로 분리하였고, 항체 접합 후, iEDNs의 추가 완충액을 HEPES 완충액으로 변경하였고, 이는 PD-10 크기 배제 크로마토그래피의 인산염 구배 방법을 위한 것이다.

[0191] 또한, DOX는 상기 <실시예5>에 나타낸 바와 같이 인산염 구배에 의해 iEDNs 내부로 이동한다(도 2B). 또한, CL-4B 컬럼을 통해 모든 분획의 단백질 흡광도 피크는 iEDNs과 유리 항체간에 차이를 나타내었고(도 3A), SDS-PAGE 결과 레인 6에 유리 항체가 없음을 확인하였다(도 3B). 한편, DOX를 로딩한 후, 캡슐화되지 않은 DOX는 크기 배제 크로마토 그래피로 제거하였다.

[0193] <실험예 2> 인산염 구배(phosphate gradient)에 의한 독소루비신 캡슐화

[0194] 수화된(hydrated) Ab-EDN은 인산염 구배의 차이를 위해 300mM 인산 암모늄 완충액을 대체하기 위해 25 mM HEPES 완충액(추가 완충액)으로 안정화된 PD-10 컬럼에 통과시켰다.

[0195] DOX를 EDNs 용액(1 : 8, DOX와 EDNs의 중량비)에 첨가한 다음 37°C에서 24, 48, 72 또는 96 시간 동안 배양했습니다. 캡슐화되지 않은 DOX는 PD-10 컬럼을 통해 제거하였다.

[0196] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, DOX 농도를 측정된 결과, DOX는 48 시간 동안 배양했을 때 약 38.5 % EDNs에 가장 효율적으로 로드되는 것을 확인하였다(도 4).

[0198] <실험예 3> iEDNs-DOX의 물리 화학적 특성 확인

[0199] EDNs, iEDNs, EDNs-DOX 및 iEDNs-DOX의 크기 분포는 입자 분석기로 측정하였으며, 도 5에 나타낸 바와 같이 평균 크기는 각각 144.6 nm, 171.2 nm, 146.5 nm 및 168.3 nm임을 확인하였다.

[0200] 또한, 도 5B에 나타낸 바와 같이, EDNs의 크기는 항체 접합에 의해 약 30 nm 정도 약간 증가했지만 DOX 캡슐화는 입자 크기에 영향을 미치지 않음을 확인하였다.

[0201] 모든 제조된 적혈구 유래 나노 입자의 크기와 표면 전하는 표 1에 나타내었고, EDNs, iEDNs, EDNs-DOX 및 iEDNs-DOX의 제타 전위는 각각 -12.9mV, -12.5mV, -14.5mV 및 -13.9mV임을 확인하였다.

표 1

	입자크기(nm)	다분산지수(PDI)	제타 전위(mV)	DOX 캡슐화 효율(%)
EDNs	144.6 \pm 8.5	0.154 \pm 0.01	-12.9 \pm 1.2	-
iEDNs	171.2 \pm 11.6	0.170 \pm 0.1	-12.5 \pm 0.8	-
EDNs-DOX	146.5 \pm 11.4	0.298 \pm 0.1	-14.5 \pm 1.3	37.8 \pm 1.5
iEDNs-DOX	168.3 \pm 15.3	0.247 \pm 0.1	-13.9 \pm 0.7	35.2 \pm 2.6

[0204] 따라서, 항체 접합 및 DOX 캡슐화 과정은 적혈구 원형질막과 유사한 EDNs의 표면 전하에 영향을 미치지 않음을

확인하였고, 또한, TEM 이미지 분석(도 6)을 통해 EDNs, iEDNs, EDNs-DOX 및 iEDNs-DOX은 직경이 약 140 nm 인 구형 및 이중층 모양으로, 항체 접합에 의한 EDN 크기의 약간 증가를 보여 주지만 DOX 캡슐화에 의한 변화는 없는 것을 확인하였다.

[0206] <실험예 4> EDNs의 혈청 안정성 확인

[0207] 일반적으로 입자의 안정성이 떨어질수록 주입 후 혈청 단백질과의 응집으로 인해 쉽게 면역계에 노출되고 제거 되는 것으로 알려져 있다. 이에, EDNs의 생물학적 안정성을 확인하기 위해, 50% FBS의 부재 또는 존재하에 HEPES 버퍼에서 EDNs 크기를 DLS 분석기로 21 일 동안 관찰하였다.

[0208] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이 EDNs의 크기는 두 가지 조건(FBS 없음 및 50% FBS)에서 크게 차이하지 않았고, 50% FBS 조건에서도 EDNs은 혈청 단백질과의 응집에 의한 입자 크기의 유의한 변화를 나타내지 않음을 확인 하였다(도 7).

[0210] <실험예 5> EDNs의 단백질 프로파일(profiles) 확인

[0211] 나노입자로 변환 된 후, EDNs의 막 단백질 프로파일에 변화가 있는지 확인하기 위해, SDS-PAGE를 통해 EDN 및 적혈구 막의 단백질 프로파일링을 수행하였다.

[0212] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이 EDNs을 준비하기 위한 처리된 초음파, 이렇게 생성된 나노 입자는 적혈구 막 의 단백질 프로파일에 영향이 없는 것을 확인하였다(도 8). 따라서, 적혈구 막에 존재하는 주요 단백질이 EDNs 에 보존됨을 확인하였다.

[0213] 아울러, 식세포 회피 활성화와 관련된 CD47의 발현 변화를 웨스턴 블랏팅을 통해 확인한 결과, 적혈구 막에 있는 CD47은 EDNs으로 변환된 후에도 보존되어 있음을 확인하였다(도 8 및 도 9).

[0215] <실험예 6> iEDNs-DOX에서 DOX의 방출 효과 확인

[0216] EDNs 및 iEDNs로 부터 독소루비신 방출 효과를 확인하기 위해, 유리(free) DOX, EDNs-DOX 및 iEDNs-DOX를 투석 백(dialysis bag) 내 HEPES 완충액에서 37℃에서 48 시간 동안 배양한 후, 방출된 DOX는 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24 및 48 시간에 정량화 하였다.

[0217] 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이 유리 DOX는 투석백에서 단시간에 쉽게 방출되었으나(4 시간 내에 62.5 %), EDN 및 iEDNs의 DOX는 vesicles 내 안정적으로 남아 있었고(각각, 4 시간 내에 7 % 및 3.5 % 방출), EDN 및 iEDNs는 48시간 후, DOX를 각각 39.6% 및 44.9% 보존하는 것을 확인하였다(도 10).

[0218] 따라서, 본 발명의 적혈구 막으로 제조된 나노 입자는 DOX 분자를 효율적으로 포획하고 약물을 안정적으로 운반 할 수 있음을 확인하였다.

[0219]

[0220] <실험예 7> 대식세포 세포 내 흡수 분석

[0221] EDNs의 항-식세포(phagocytic) 능력은 murine 대식세포를 사용하여 확인하였다.

[0222] 구체적으로, EDNs, 양이온성 리포좀인 DMKE-Chol(0,0'-dimyristylN-lysyl glutamate/cholesterol), CD47 차단 EDNs(CD47 blocking) 및 트립신-EDTA 처리 EDNs(TS-EDNs)을 마우스 대식세포 RAW264.7 세포와 함께 배양하였다. 37℃에서 1 시간 배양 후, PBS로 세포를 세척하여 세포 표면에 부착된 나노 입자를 제거한 후 FACS로 분석 한 후 공초점 레이저 스캐닝 현미경(CLSM)으로 영상을 촬영 하였다.

[0223] 그 결과, 도 11에 나타난 바와 같이 FACS 분석에 따르면 EDN 처리된 세포는 평균 형광 강도(MFI)가 11.82 % 증가를 나타내었고, 동일한 세포이지만 CD47 차단된 EDNs은 25.40% MFI 증가를 나타냄을 확인하였다(도 11). 한편, TS-EDNs과 DMKE-Chol 처리된 EDN은 대식세포와 강한 상호 작용을 보였고, MFI는 각각 62.92 % 및 65 % 증가됨을 확인하였다. 즉, EDNs은 Raw 264.7 세포에 거의 흡수되지 않았으나, CD47이 억제된 CD47 차단 EDNs 및 TS-EDNs은 Raw 264.7 세포에 의해 더 많은 양의 입자가 흡수됨을 확인하였다.

[0224] 또한, EDNs 및 TS-EDNs은 1 시간 동안 37℃에서 Raw 264.7 세포에 처리한 후, 입자의 세포 내 흡수 패턴을 평가 하기 위해 공초점 현미경 분석을 진행하였다.

[0225] 그 결과, 도 12에 나타난 바와 같이 Raw 264.7 세포의 세포질에서 약간의 EDNs이 보였지만, TS-EDNs은 대식세포 의 세포질에 고도로 국재화 되어 있음을 확인하였다(도 12). 따라서, TS-EDNs은 CD47이 기능하지 않고 식균 작

용에 의해 세포 내부에 존재하는 것을 확인하였고, CD47이 식균 작용을 피하는 데 중요한 역할을 한다는 것을 확인하였다.

[0227] <실험예 8> EDNs의 내재적 세포 독성 확인

[0228] EDNs 자체의 내재적 세포 독성을 확인하기 위하여, 두 개의 다른 유방 종양 세포(MDA-MB-231 및 MDA-MB-453)에 다양한 양의 EDNs(EDN 단백질 0, 50, 100, 250 및 500 μ g)를 처리하고 CCK-8 분석을 수행하였다.

[0229] 그 결과, 도 13에 나타난 바와 같이, 타겟 세포인 MDA-MB-231은 EDNs의 농도에 따라 각각 100 %, 98.6 %, 97.8 % 및 100 %, 100 %의 세포 생존율을 나타내었다. 아울러, 비 표적 세포인 MDA-MB-453에서도 EDN 농도에 따라 각각 100 %, 99.9 %, 96.2 %, 100 % 및 100 %의 세포 생존율을 나타냈습니다.

[0230] 따라서, EDN은 높은 농도에서도 암세포주 모두에서 독성을 나타내지 않음을 확인하였다.

[0232] <실험예 9> iEDNs의 특이적 표적 세포 결합 효과 확인

[0233] MDA-MB-231 및 MDA-MB-453 유방암 세포주는 각각 EGFR-양성 및 EGFR-음성 시험관내 암 세포 모델로 사용된다.

[0234] 표적 종양 세포 특이적 결합을 분석하기 전, 상기 각 세포주에서 EGFR 발현 수준을 웨스턴 블롯팅으로 확인하였다.

[0235] 그 결과 도 14에 나타난 바와 같이 MDA-MB-231 세포는 EGFR의 높은 발현을 보였지만 MDA-MB-453 세포는 EGFR 발현을 보이지 않음을 확인하였다(도 14).

[0237] 한편, Alexa 488-표지된 항-EGFR 항체-접합 EDNs(iEDNs)을 MDA-MB-231 및 MDA-MB-453 세포로 처리한 다음 이들의 상호 작용을 유세포 분석으로 분석하였다.

[0238] 그 결과, 도 15에 나타난 바와 같이 MDA-MB-231 세포는 MDA-MB-453 세포(3.89 %)보다 MFI의 더 강한 이동(53.36 %)을 나타냈으며, 이는 종양 표적 리간드를 사용함으로써 iEDNs은 MDA-MB-453 세포보다 MDA-MB-231 세포와 더 강력하게 결합할 수 있음을 확인하였다(도 15).

[0240] <실험예 10> iEDNs-DOX의 시험관내 EGFR 특이적 약물 전달 효과 확인

[0241] iEDNs의 시간에 따른 종양 특이적 약물 전달 및 세포에서의 분포를 평가하기 위해, MDA-MB-231 및 MDA-MB-453 세포에 본 발명에서 제조한 다양한 DOX 제형(유리 DOX, EDNs-DOX 및 iEDNs-DOX)을 처리하였다. 또한 이들의 세포 흡수는 공초점 현미경으로 분석하였다.

[0242] 구체적으로, 모든 세포는 6-웰 배양 접시에서 커버 슬립(cover slip)에 배양 하였다. 그림 다음 유리 DOX, EDNs-DOX 및 iEDNs-DOX를 MDA-MB-231 및 MDA-MB-453에 각각 처리한 다음 공초점 현미경으로 1-24 시간 동안 분석하였다.

[0243] 그 결과, 도 16에 나타난 바와 같이 유리 DOX는 1 시간 동안 배양되었을 때 상기 두 세포주의 세포질과 원형질 막에 국지화(localization) 되었고, 4 시간 배양시 약물이 두 세포주 모두의 핵으로 확산됨을 확인하였다. 다만, 배양 12 시간 후에는 약물 신호가 발견되지 않았고, 흥미롭게도 유리 DOX가 처리된 세포의 DAPI 염색 핵이 점점 작아지고 있음을 확인하였다.

[0244] 또한, 유리 DOX 결과뿐만 아니라 EDNs-DOX로 처리된 MDA-MB-231 및 MDA-MB-453 세포도 유사한 결과를 나타냈다. 4 시간 배양에서 DOX는 두 세포의 세포질에서 검출되었다. 일부 DOX 신호는 8 시간 배양에서 핵에서 나타났으며, MDA-MB-231 및 MDA-MB-453 세포주 사이에는 차이가 없음을 확인하였다.

[0245] 그러나, iEDNs-DOX의 경우 MDA-MB-453 세포는 모든 시점에서 DOX 신호가 나타나지 않았으나, MDA-MB-231은 iEDNs-DOX에 대한 반응성이 free DOX보다 높음을 확인하였다. 구체적으로 iEDNs-DOX로 처리된 세포는 4 시간 배양에서 가장 높은 DOX 신호를 보임을 확인하였다.

[0246] 따라서, EGFR-표적화 항체와 결합된 EDNs이 비표적 세포보다 표적 세포에 약물을 보다 효율적으로 전달할 수 있으며, 유리 DOX 처리 세포보다 동일한 시점에서 더 많은 양의 DOX를 표적 세포로 전달할 수 있음을 확인하였다(도 16).

[0248] <실험예 11> iEDNs-DOX의 시험 관내 세포 독성 확인

[0249] iEDNs-DOX의 세포 독성을 확인하기 위해, MDA-MB-231 및 MDA-MB-453 세포에 다양한 농도의 유리 DOX, EDNs-DOX 및 iEDNs-DOX를 처리하였다. 이렇게 처리된 세포의 생존력은 CCK-8 분석법으로 분석하였고, 각각 IC₅₀ 값을 비

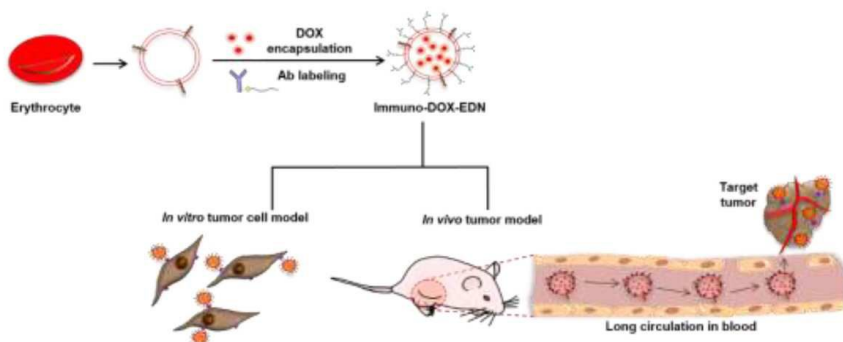
교하였다.

- [0250] 그 결과, 도 17에 나타난 바와 같이 유리 DOX, EDNs-DOX 및 iEDNs-DOX의 IC₅₀ 값은 MDA-MB-231 세포에서 각각 $0.02 \pm 0.01 \mu\text{M}$, $0.18 \pm 0.17 \mu\text{M}$ 및 $0.10 \pm 0.02 \mu\text{M}$ 임을 확인하였고, DA-MB-453 세포에서는 $0.12 \pm 0.05 \mu\text{M}$, $0.48 \pm 0.06 \mu\text{M}$ 및 $0.71 \pm 0.41 \mu\text{M}$ 임을 확인하였다.
- [0251] 따라서, 적혈구 막(EDNs-DOX 및 iEDNs-DOX)과 제형화 된 DOX는 MDA-MB-231 세포에서 높은 세포 독성을 나타내고, 특히 iEDNs-DOX는 표적 종양 세포에서 특이적 치료 효능을 가지고 있음을 확인하였다(도 17).
- [0253] <실험예 12> 종양 이종 이식 마우스에서 iEDNs-QD의 *in vivo* 생체 분포 확인
- [0254] 테라노시스(theranosis)을 위한 iEDNs의 적합성을 확인하기 위하여, 도 18A에 나타난 바와 같이 바이오 이미징(EDNs-QD)을 위해 양자점을 EDNs의 이중층에 채용하고, 종양 특이적 항체를 EDNs-QD에 접합하였다. 또한, 상기 제조된 EDNs-QD의 크기는 zeta-sizer를 통해 확인하였고, 직경이 약 140 nm임을 확인하였다(도 18B). 또한, TEM 분석을 통해 QD가 원형 나노 입자의 이중층(흰색 화살표)에 존재함을 확인하였다(도 18C).
- [0255] 또한, MDA-MB-231-이종 이식 된 마우스에서 입자의 *in vivo* 생체 분포 패턴을 확인하기 위해, 동일한 양의 EDNs-QD 또는 iEDNs-QD를 정맥 내 주사하였고, 실시간 생체 내 이미지 및 생체 외 이미지를 이미징 시스템으로 촬영하였다.
- [0256] 그 결과, 도 19A에 나타난 바와 같이 생체 내 이미징에 따르면 EDNs-QD 및 iEDNs-QD의 형광 신호가 마우스 몸 전체에 퍼져있었으며, iEDNs-QD는 EDNs-QD에 비해 주사 후 4 시간에 종양 이종 이식편의 위치에서 상대적으로 더 강한 형광을 나타냄을 확인하였다.
- [0257] 한편, 도 19B에 나타난 바와 같이 전신 형광 이미징 후, 주요 장기의 생체 외 형광 이미지는 시간이 경과함에 따라 일부 장기의 형광 강도가 변경되었음을 확인하였다(도 19B). 일반적으로 iEDNs-QD로 처리한 마우스는 종양 조직에서 상대적으로 더 강한 형광이 나타났고, 이를 통해 iEDNs의 종양 내 축적이 동일한 시점에 EDNs의 축적보다 높았음을 확인하였다. 게다가, iEDNs-QD의 종양 축적은 시간이 경과함에 따라 증가하여 주사 후 24 시간에 가장 높은 형광 신호와 통계적으로 의미있는 차이를 나타냄을 확인하였다(도 19C).
- [0258] 또한, EDNs-QD의 간 흡수는 주사 후 4 시간에서 가장 높았으며 시간에 따라 감소하였으나(도 19B), iEDNs-QD의 간 흡수는 종양 축적과 같이 시간이 지남에 따라 증가하였다. 또한, 주입된 형광의 약 30 %가 48 시간 동안 유지됨을 확인하였다.
- [0259] 또한, 도 20에 나타난 바와 같이 각 시점에서 마우스에서 추출한 혈액에서 QD의 형광은 4 시간에 형광 신호가 약 60 % 감소하였고, 48 시간에 iEDNs-QD로 처리된 마우스의 QD 신호는 EDNs-QD로 처리된 마우스보다 혈액에서 더 유의하게 존재하는 것을 확인하였다.
- [0260] 아울러, iEDNs-DOX를 상기 동일한 방법을 이용하여 QD를 접합하였을 때도, 상기 상기 도 18 내지 도 20과 동일한 효과를 나타냄을 확인하였다.
- [0261] 따라서, 종양 특이적 iEDNs은 종양을 표적으로 더 효과적인 전달 능력을 가지고 있음을 확인하였다.
- [0263] <실험예 13> iEDNs-DOX의 투여에 의한 생체 내 종양 성장 억제 효과 확인
- [0264] iEDNs-DOX의 생체 내 항암 치료 효능을 확인하기 위해, MDA-MB-231-이종 이식 된 마우스에 유리 DOX, EDNs-DOX 및 iEDNs-DOX를 정맥 주사하고 대조군은 식염수를 주입했습니다. 모든 실험 그룹에서 종양 성장을 32 일 동안 측정하였다.
- [0265] 도 21A에 나타난 바와 같이 적혈구 막에 제형화 된 DOX로 처리된 마우스는 유리 DOX를 처리한 마우스보다 우수한 종양 성장 억제 효과를 나타내었다. 특히 iEDNs-DOX는 EDNs-DOX보다 우수한 종양 성장 억제 효과를 나타냄을 확인하였다(도 21A).
- [0266] 또한, iEDNs-DOX를 주사 한 마우스의 평균 종양 부피는 32 일에 200 mm^3 미만임을 확인하였다. 모든 동물모델은 실험 마지막 날, 종양을 절제하고 무게를 측정하였다.
- [0267] 도 21B에 나타난 바와 같이 식염수, 유리 DOX, EDNs-DOX 및 iEDNs-DOX로 처리된 마우스의 절제된 종양의 무게는 각각 $0.426 \pm 0.10 \text{ g}$, $0.222 \pm 0.02 \text{ g}$, $0.15 \pm 0.03 \text{ g}$ 및 $0.062 \pm 0.02 \text{ g}$ 이었고(그림 21B), 종양의 전체적인 모습도 동일한 결과를 보임함을 확인하였다(도 21C).

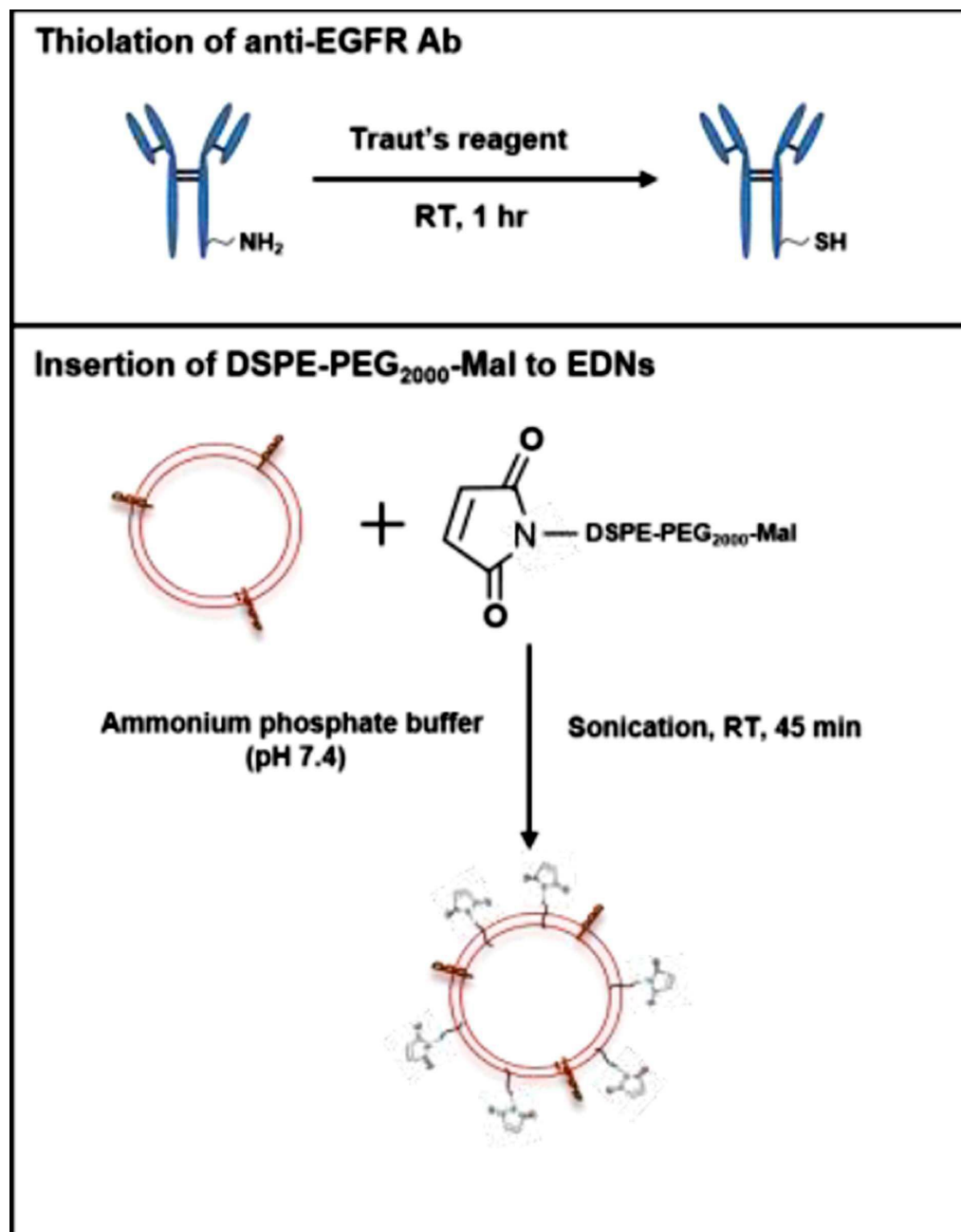
- [0268] 이러한 결과를 통해 종양 표적화 EDNs(iEDNs)이 유리 약물 또는 비 표적화 EDN에 비해 더 효율적인 치료 전달 시스템을 확인하였다.
- [0270] <실험예 14> iEDNs-DOX로 처리된 마우스에서 종양 세포의 *in situ* apoptosis 확인
- [0271] 식염수, 유리 DOX, EDNs-DOX 및 iEDNs-DOX가 주입된 마우스로부터 절개된 종양은 세포 apoptosis 평가를 위한 TUNEL 분석에 사용하였다. 파라핀-고정 종양 절편은 TUNEL 및 헤마톡실린 및 에오신으로 염색하였다.
- [0272] 도 22A에 나타난 바와 같이 식염수, 유리 DOX, EDNs-DOX 및 iEDNs-DOX가 주입된 마우스 종양에서 TUNEL 양성 세포의 수를 카운팅한 결과 8.25 ± 2.62 , 14.5 ± 5.50 , 77.25 ± 28.74 및 148 ± 14.07 임을 확인하였다. 즉, 식염수와 유리 DOX로 처리한 조직 절편은 TUNEL 양성 세포가 적었으나, EDNs-DOX 또는 iEDNs-DOX로 처리된 마우스 그룹에서 많은 수의 세포가 종양에서 세포 사멸을 보임을 확인하였다. 특히, iEDNs-DOX를 처리한 마우스는 EDNs-DOX를 처리 한 마우스에 비해 TUNEL 양성 세포 수가 유의적으로 많은 것을 확인하였다(도 22A).
- [0273] 또한, 도 22B에 나타난 바와 같이, 헤마톡실린 및 에오신으로 염색을 통해 식염수 처리 군과 유리 DOX 처리군의 종양 조직은 핵 다형성 및 신생 혈관 형성을 갖는 방추형 세포의 배열을 나타내었다. 즉, 종양 조직의 공격적인 측면을 나타냄을 확인하였다.
- [0274] 반면에, 본 발명의 iEDNs-DOX 처리 군은 다른 군에 비해 종양 세포의 괴사 면적(분홍색 영역)이 상대적으로 큰 것을 확인하였다.
- [0276] <실험예 15> iEDNs-DOX의 생체 내 독성 확인
- [0277] DOX을 포함하는 EDN의 의 생체 내 독성을 확인하기 위해, 유리 DOX, EDNs-DOX, iEDNs-DOX를 정맥 주사 한 마우스의 체중을 매주 3 회 측정했습니다.
- [0278] 그 결과, 도 23에 나타난 바와 같이 모든 실험 그룹에서 마우스의 체중은 실험군 처리동안 크게 변하지 않았고, 체중 감소로 인한 심각한 물리적 및 임상적 손상을 나타내지 않음을 확인하였다(도 23).
- [0279] 또한, EDNs-DOX의 다양한 제형으로 처리 한 후, 조직 병리학 적 효과를 밝히기 위해, 마우스에 주사 후 32 일째에 희생시켰고, 마우스로부터 주요 기관 (간, 심장, 폐, 비장 및 신장)을 절제하고 H & E로 염색하였다.
- [0280] 그 결과, 도 24에 나타난 바와 같이 검사 된 모든 장기는 식염수 처리된 대조군과 비교하여 명백한 병리학 적 이상을 보이지 않음을 확인하였다.
- [0281] 따라서, DOX를 포함하는 EDN 제형은 임상적 안전성을 나타냄을 확인하였다.

도면

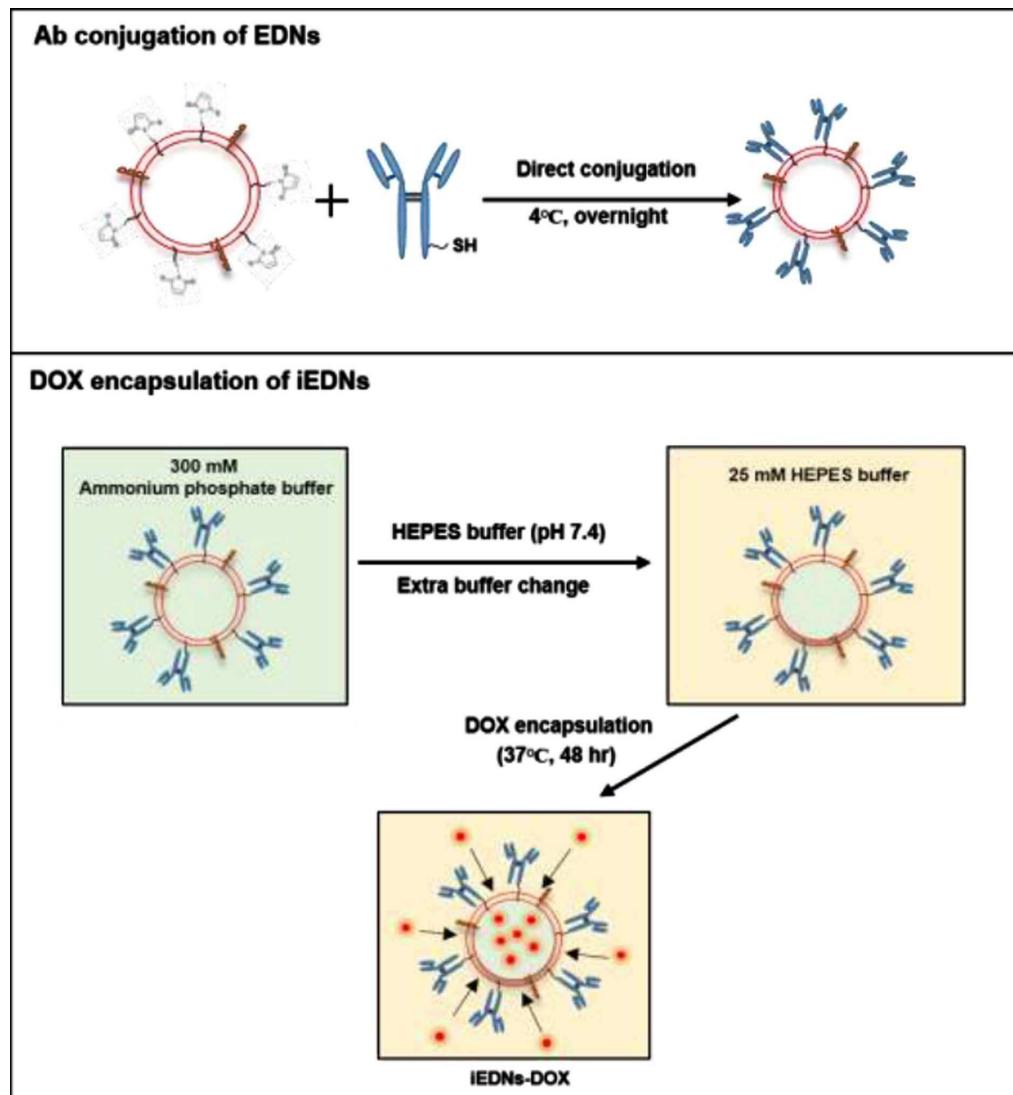
도면1



도면2a

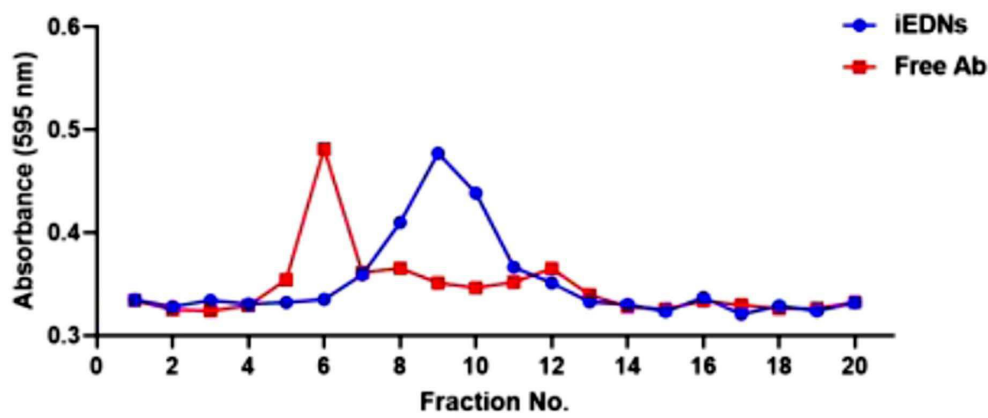


도면2b

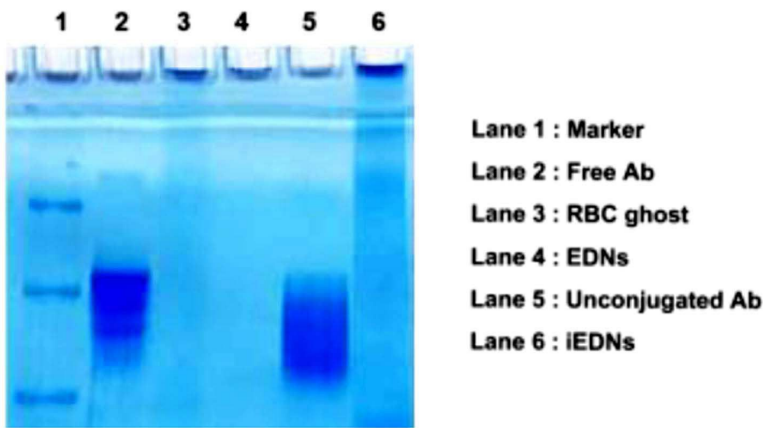


도면3

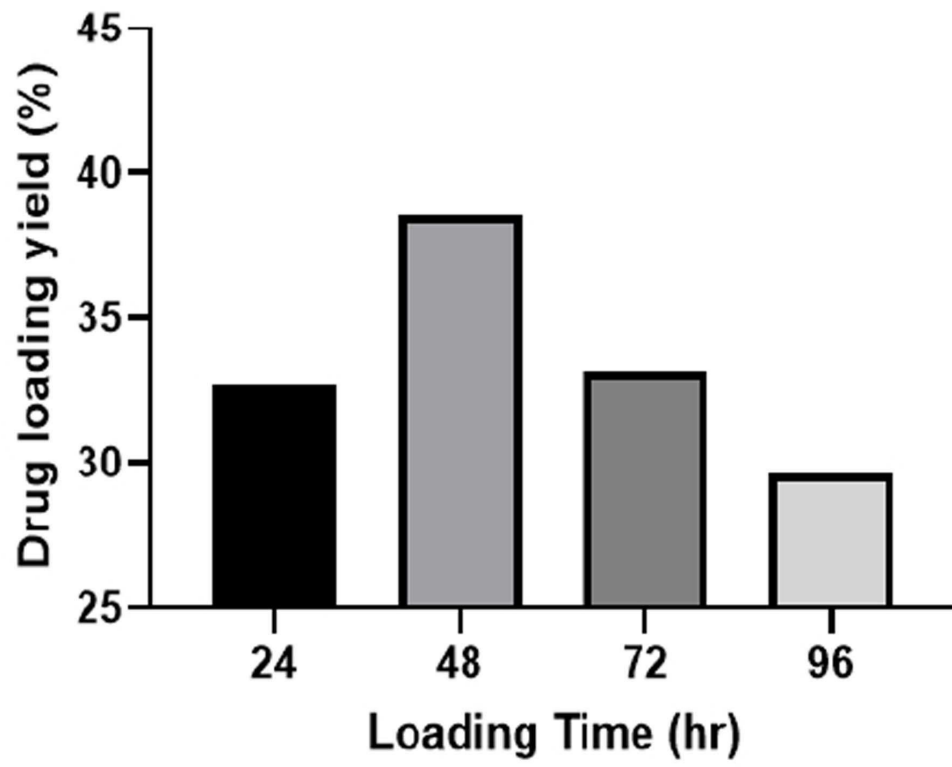
(A)



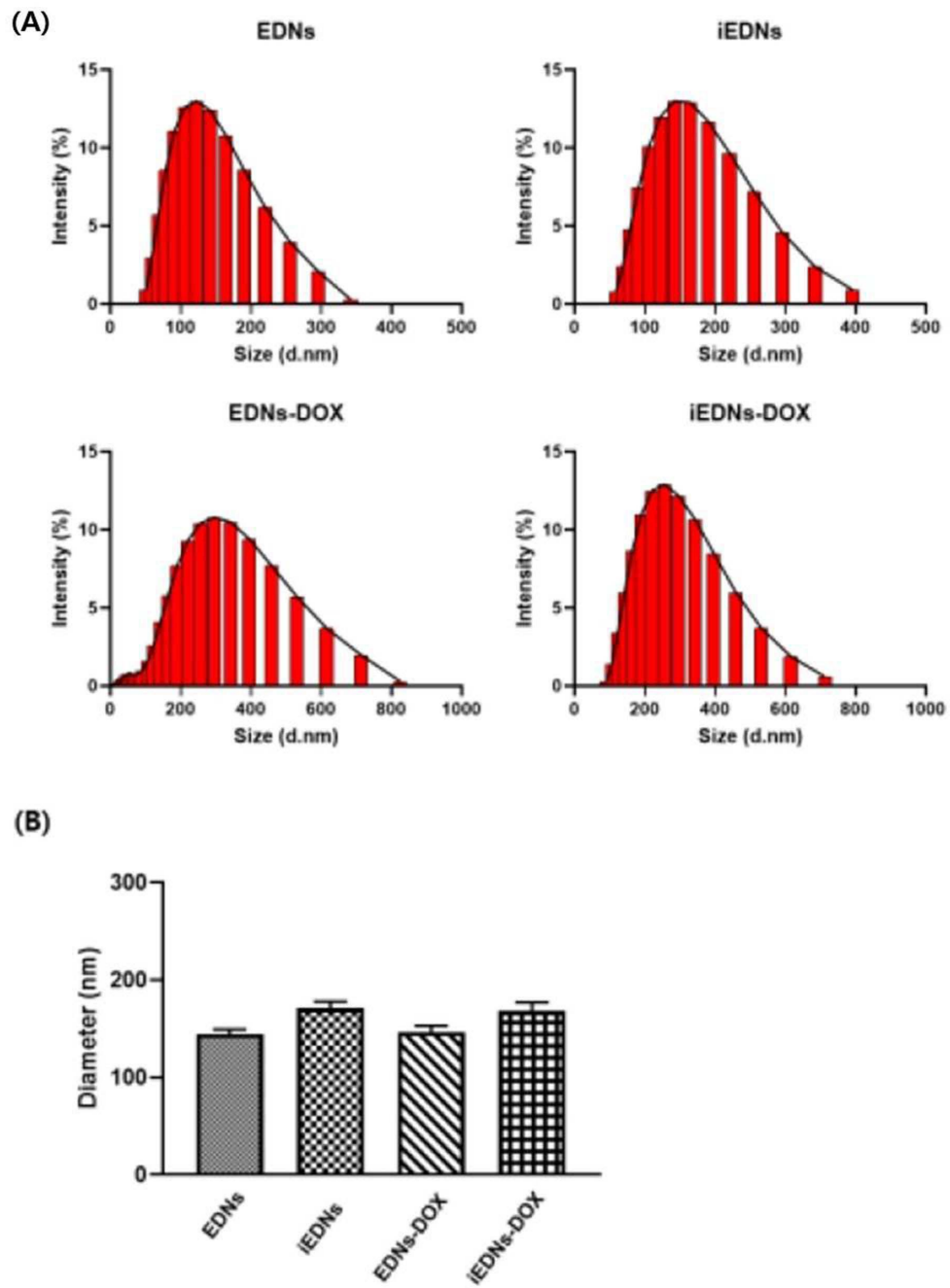
(B)



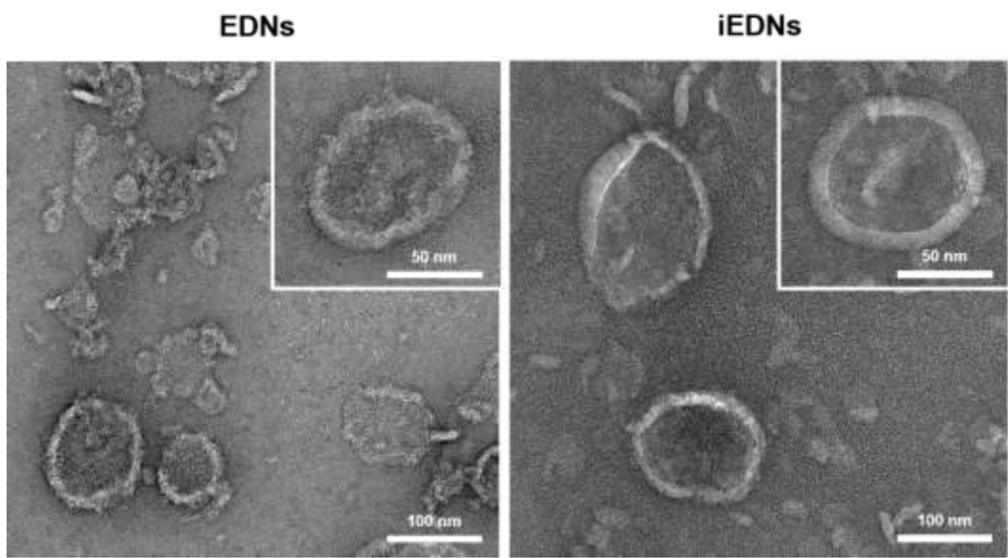
도면4



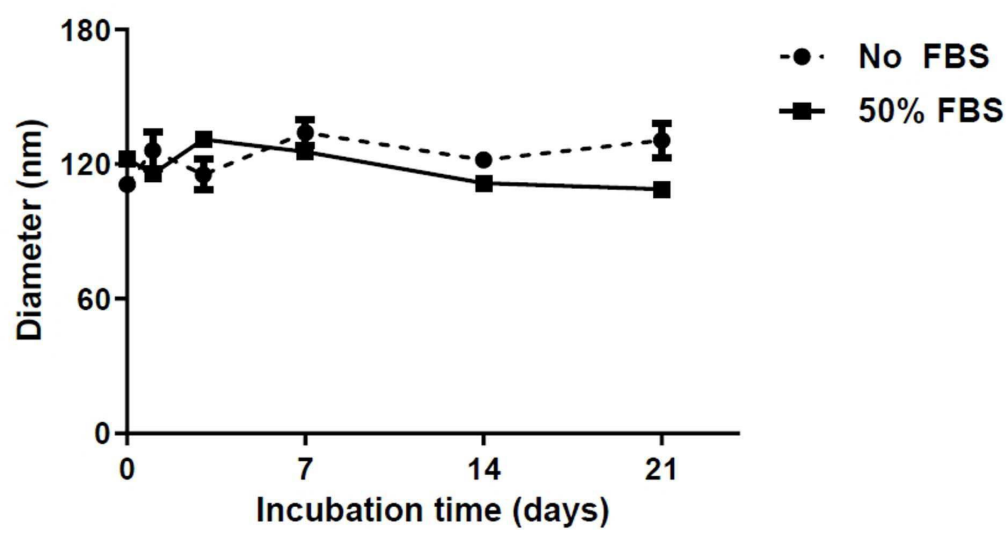
도면5



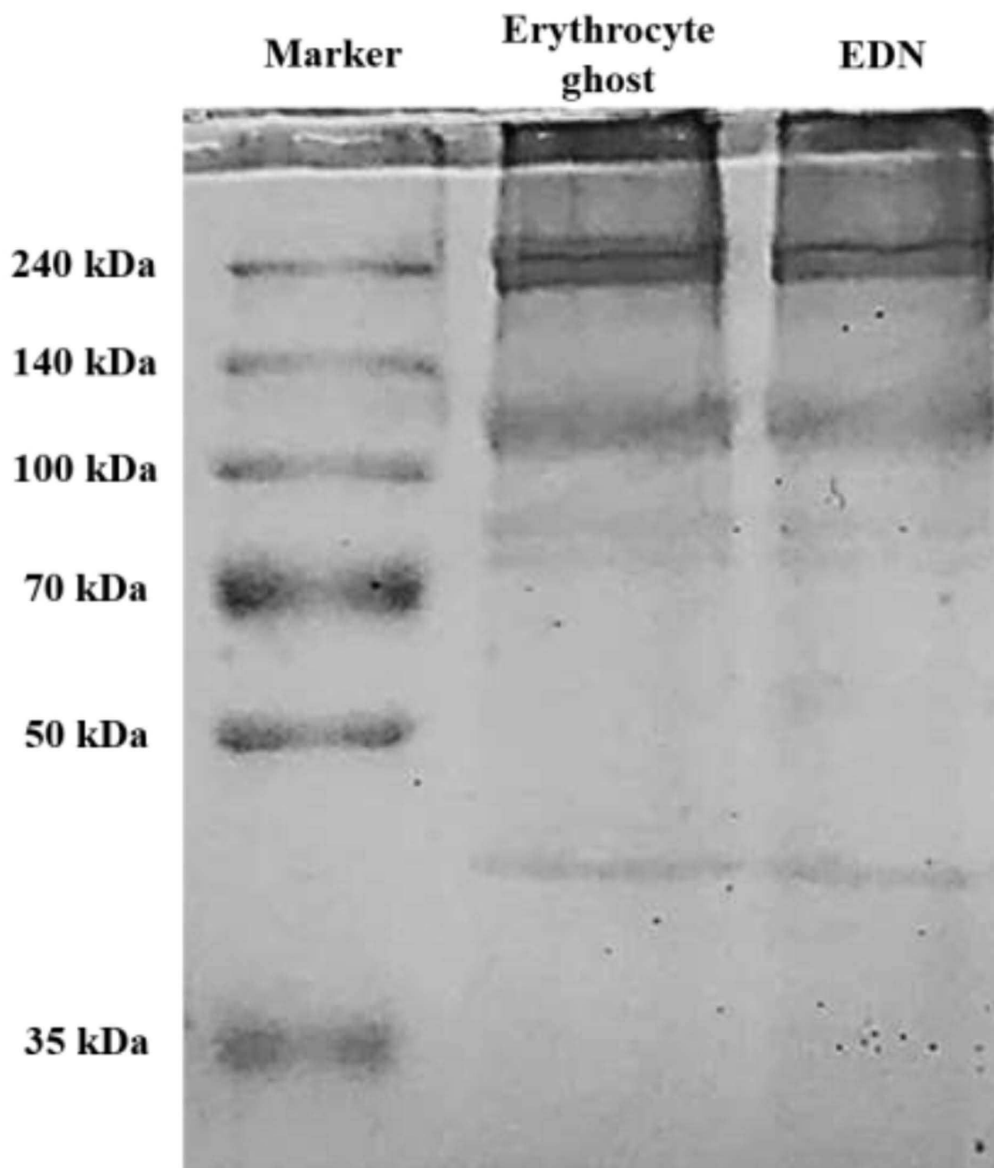
도면6



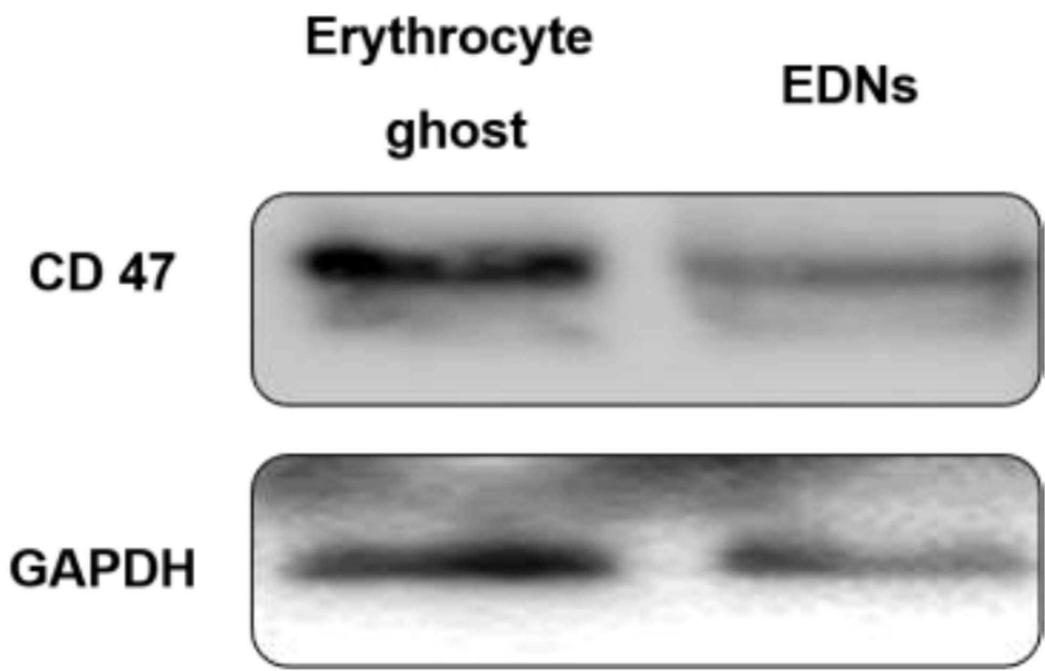
도면7



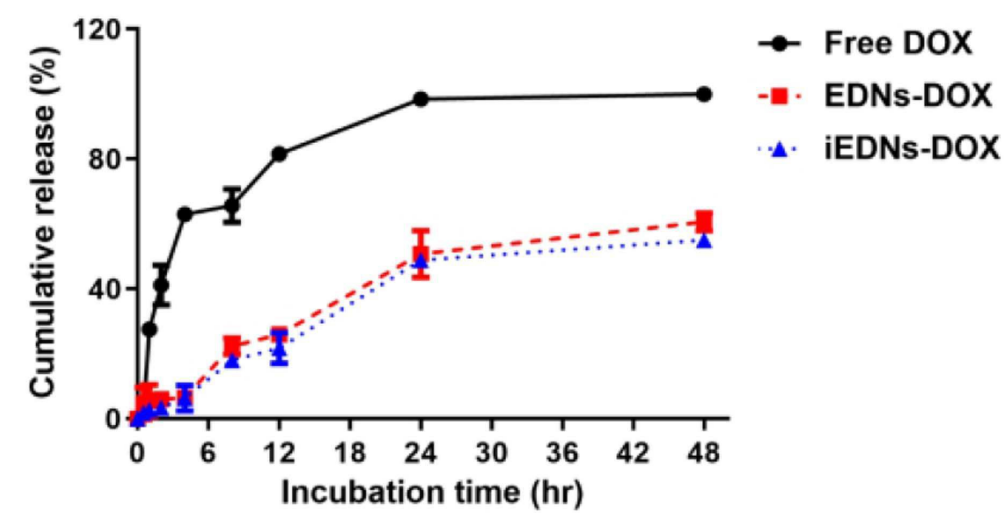
도면8



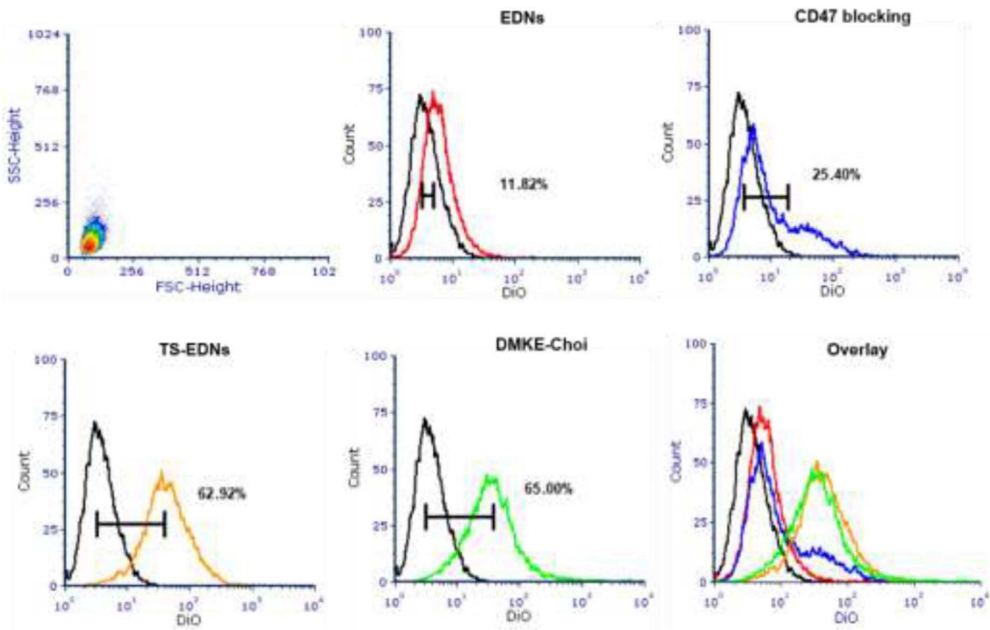
도면9



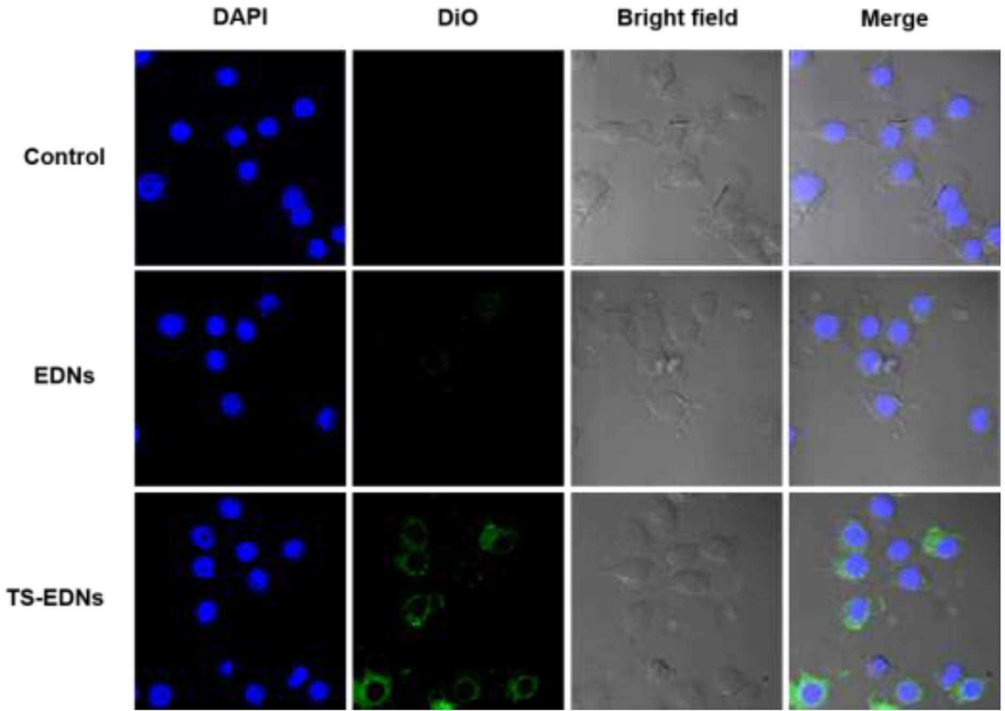
도면10



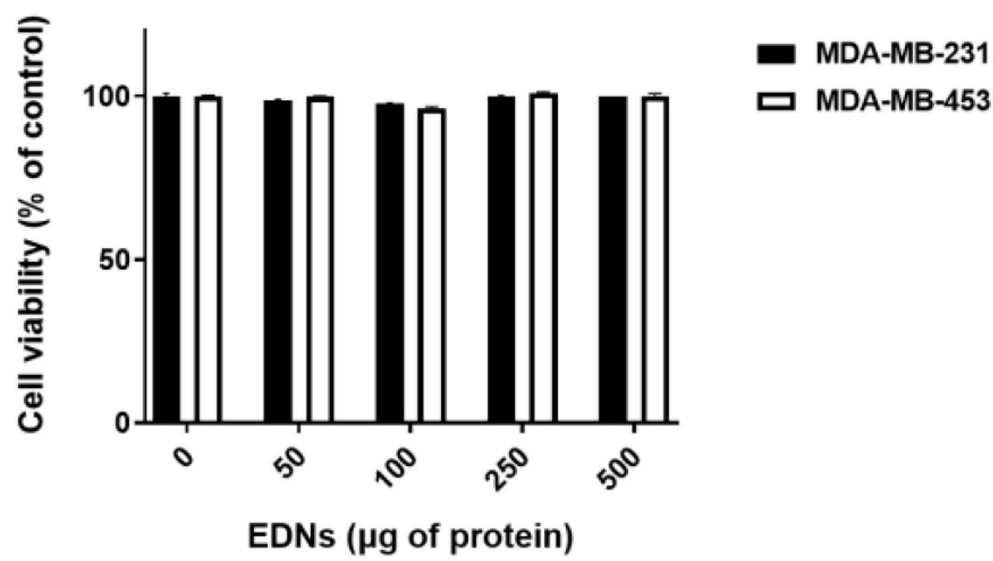
도면11



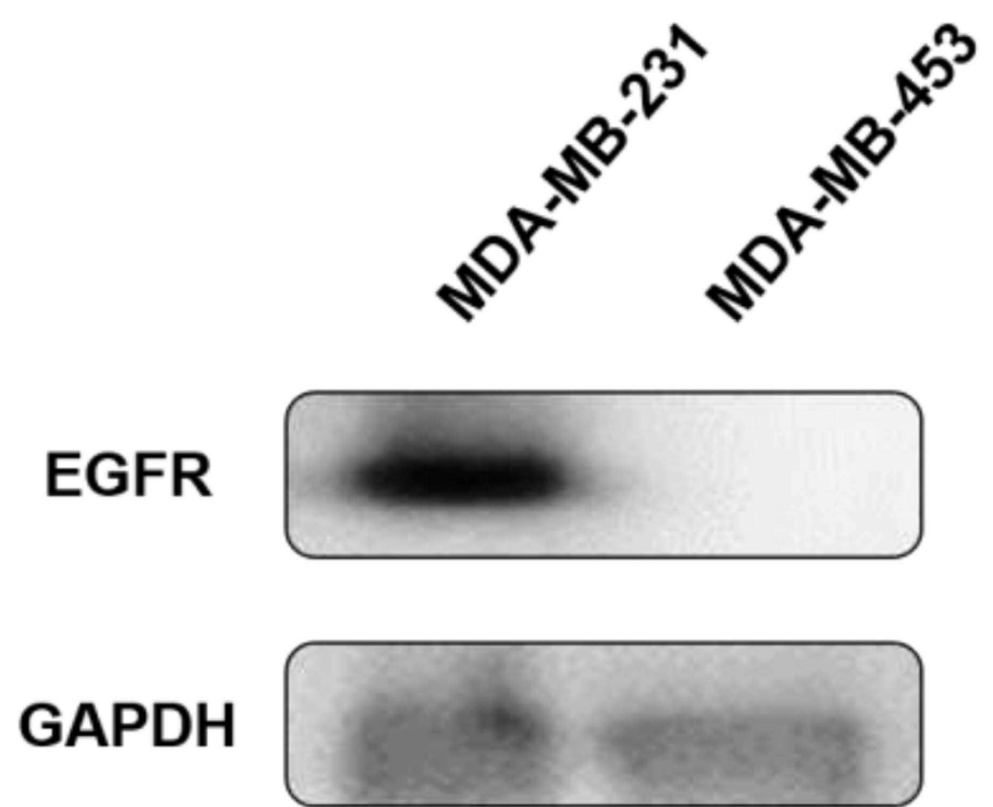
도면12



도면13

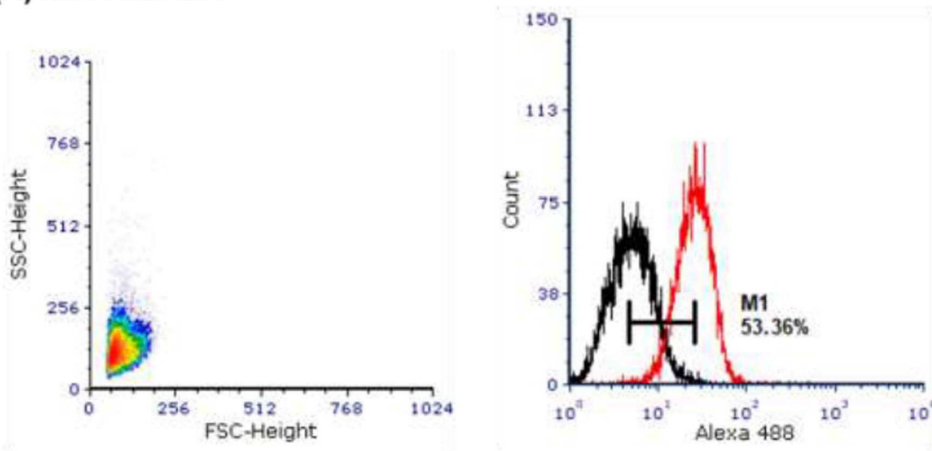


도면14

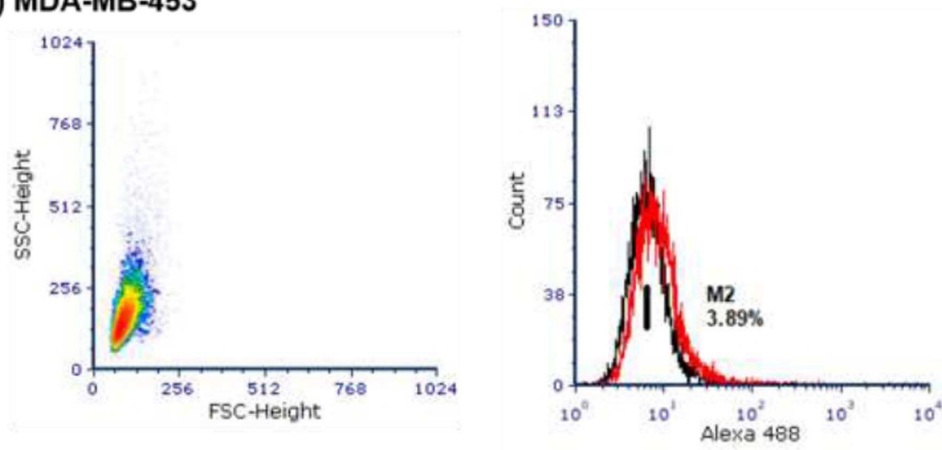


도면15

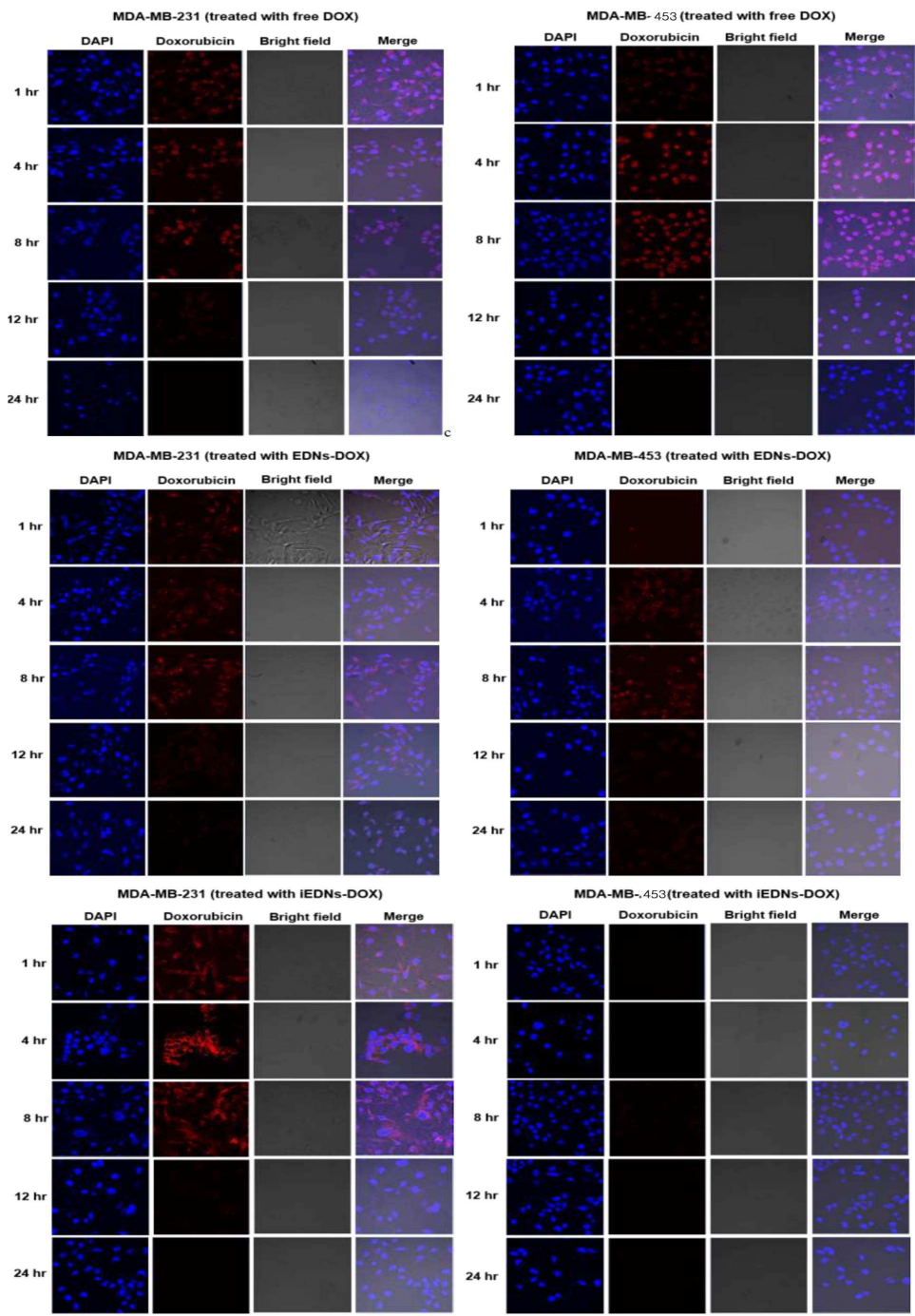
(A) MDA-MB-231



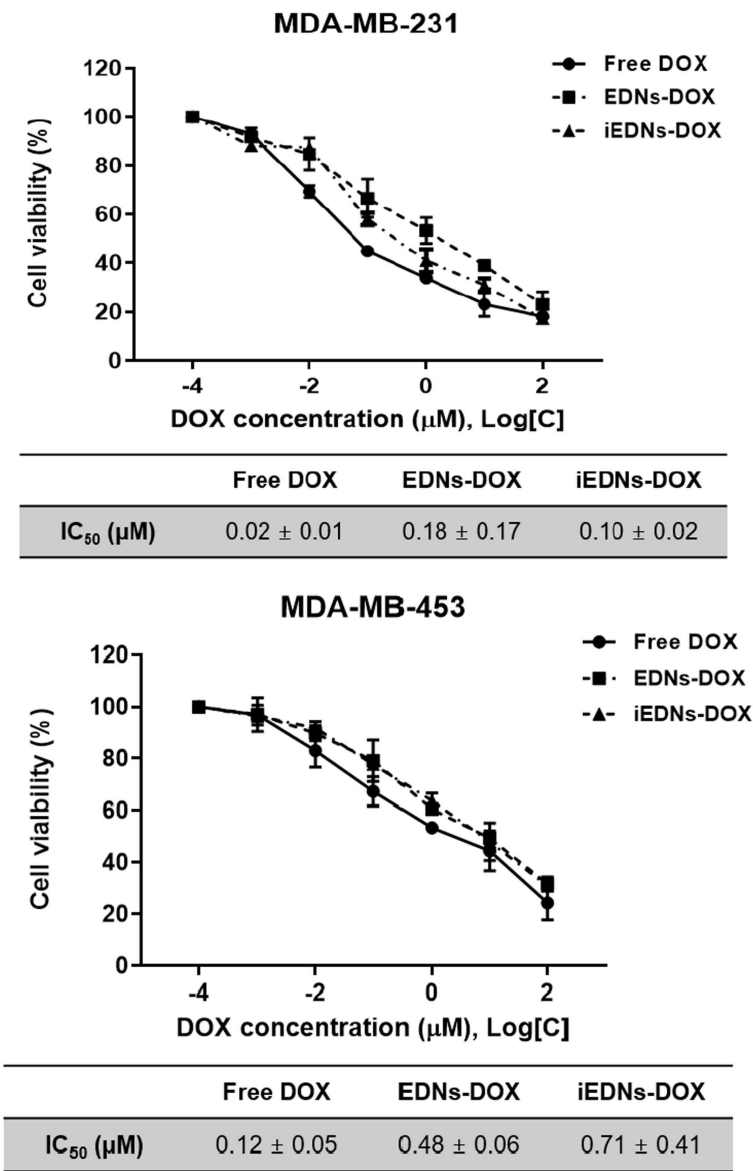
(B) MDA-MB-453



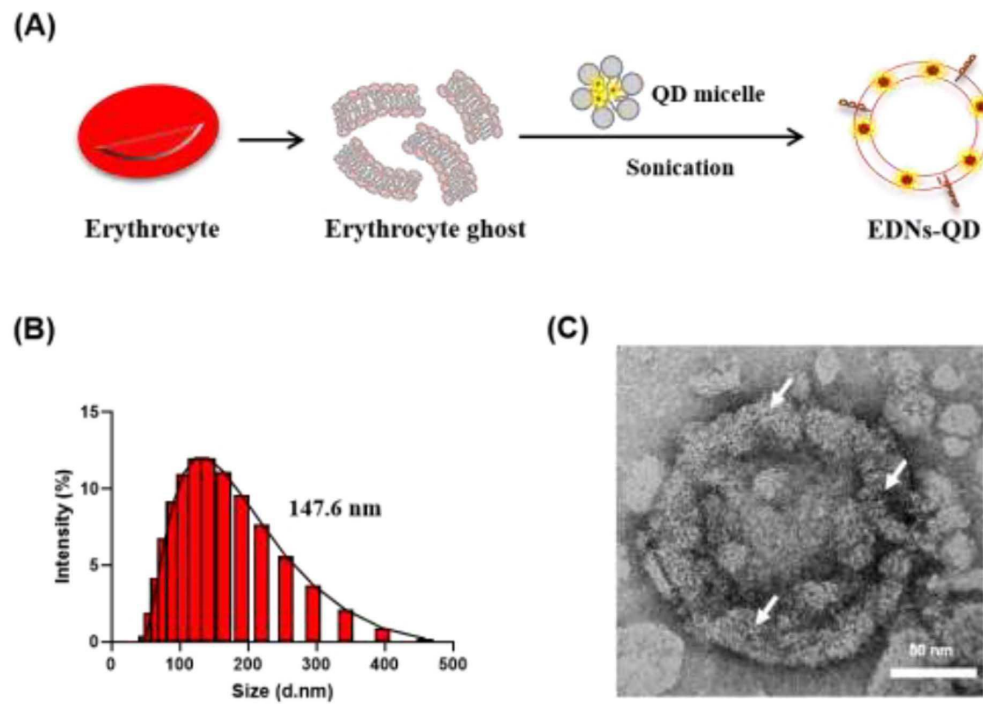
도면16



도면17

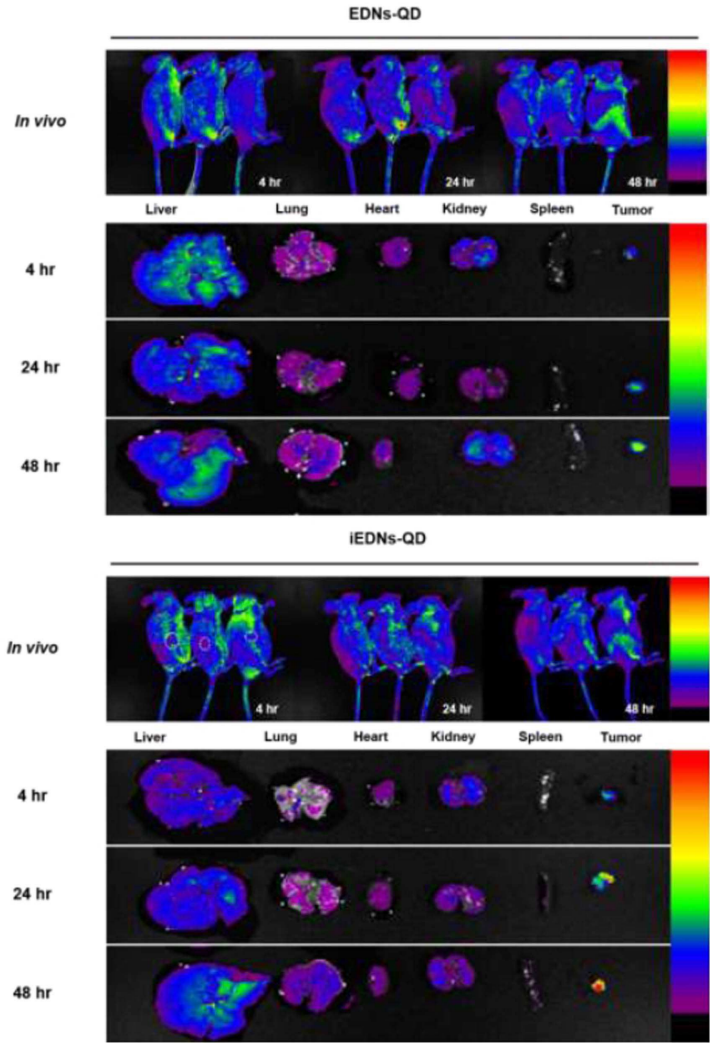


도면18



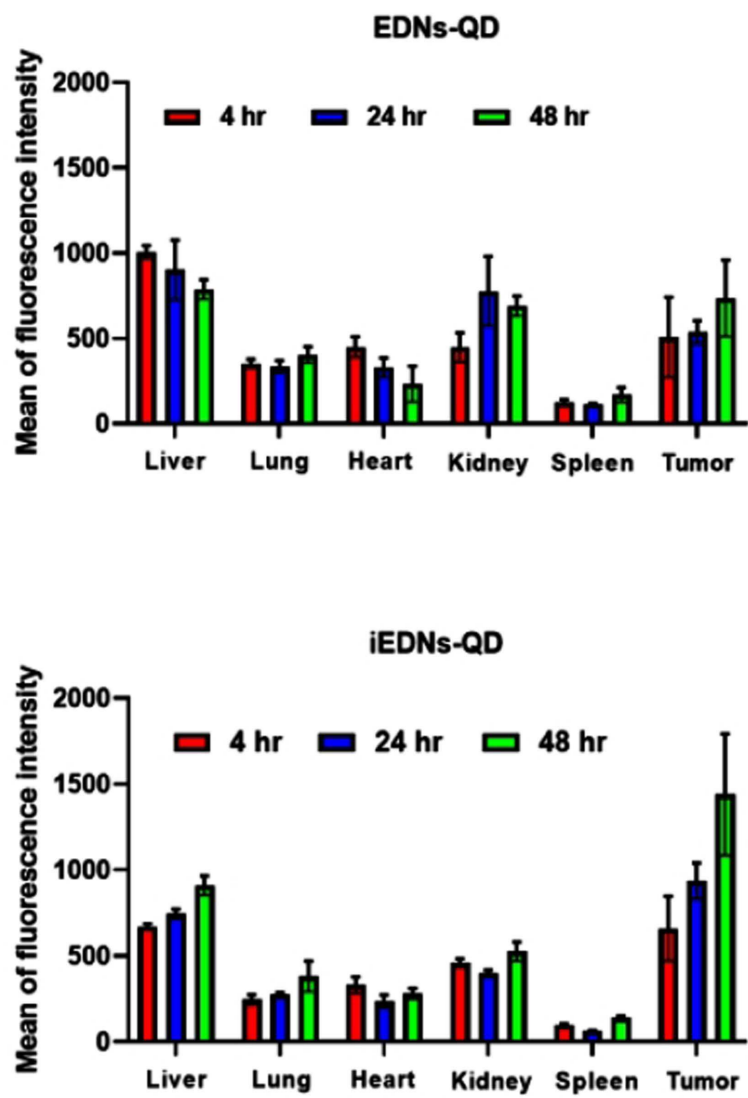
도면19a

(A)



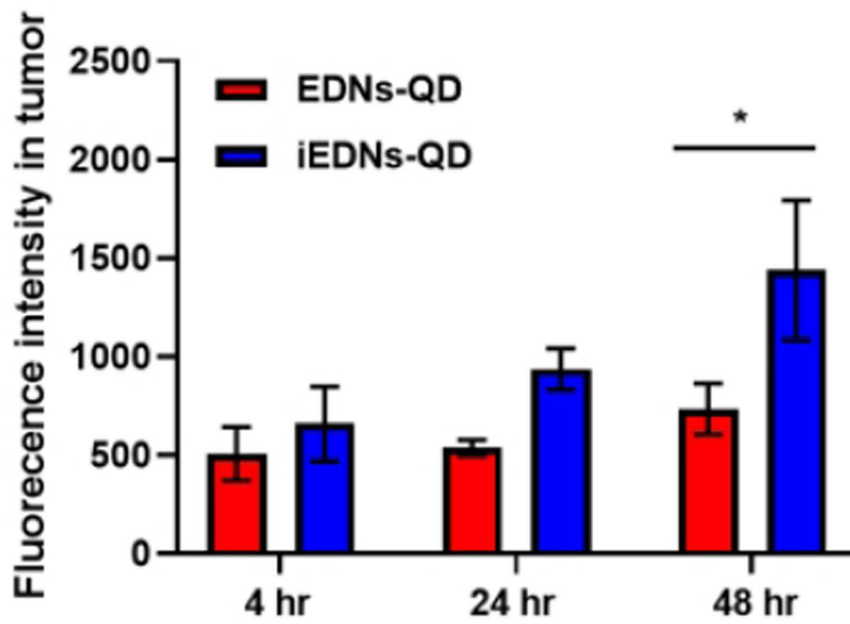
도면19b

(B)

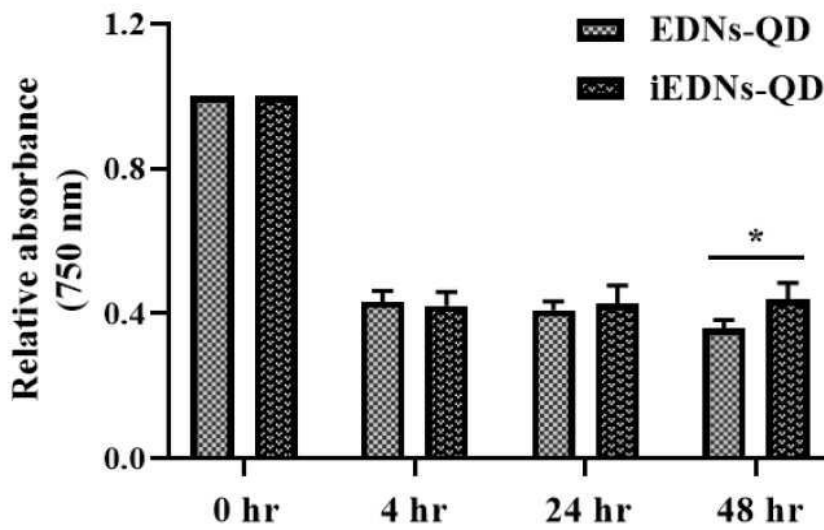


도면19c

(C)

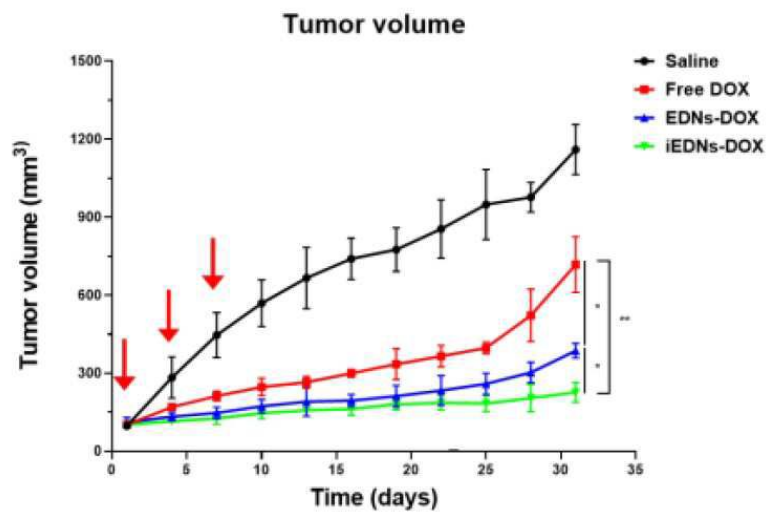


도면20



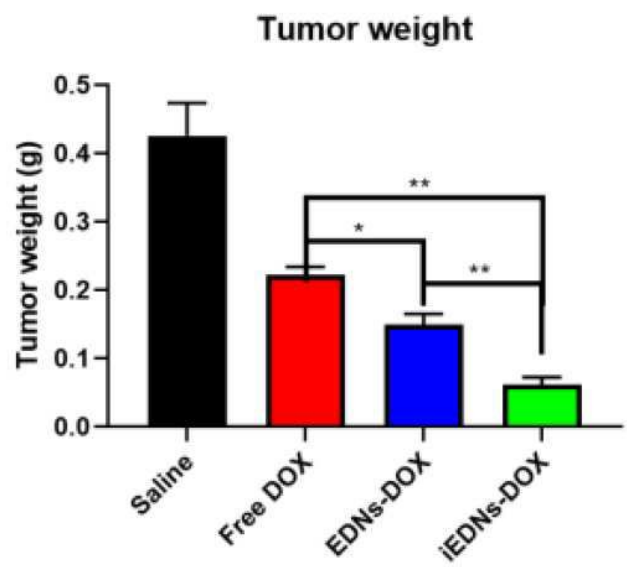
도면21a

(A)

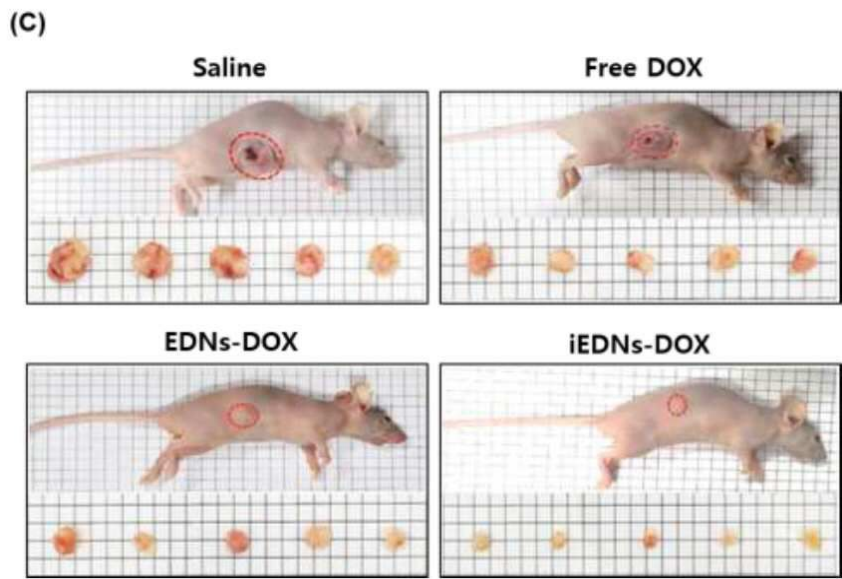


도면21b

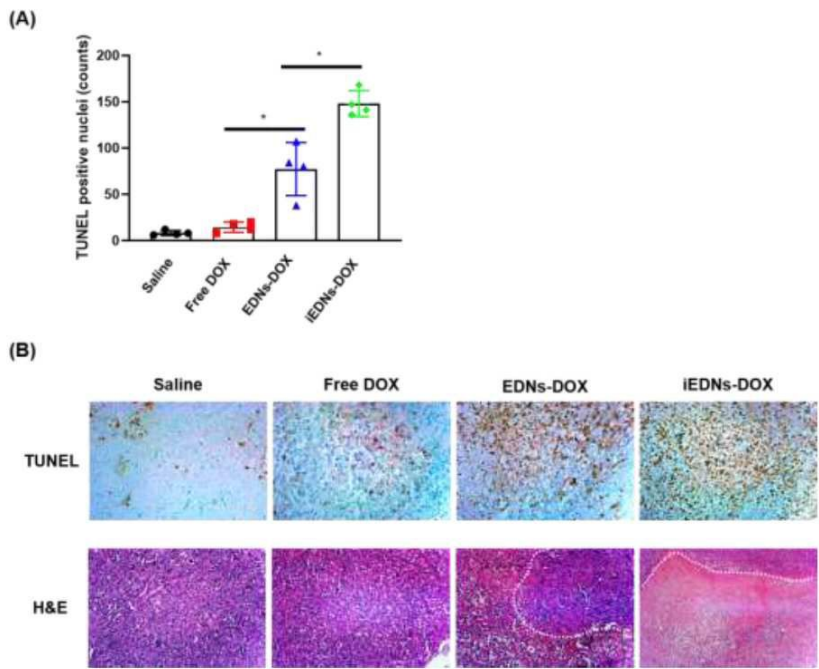
(B)



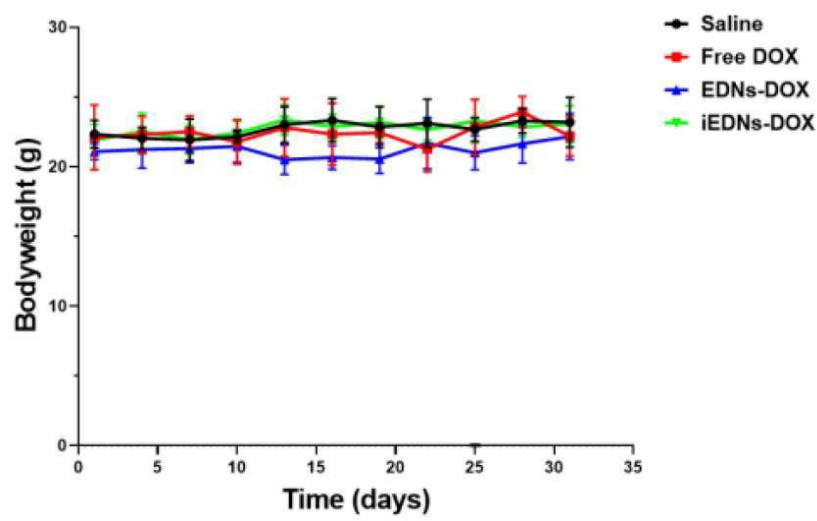
도면21c



도면22



도면23



도면24

