



등록특허 10-2659839



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년04월22일
(11) 등록번호 10-2659839
(24) 등록일자 2024년04월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/51 (2006.01) A61K 31/704 (2006.01)
A61K 47/69 (2017.01) A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/5169 (2013.01)
A61K 31/704 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0066684
(22) 출원일자 2021년05월25일
심사청구일자 2021년05월25일
(65) 공개번호 10-2022-0158984
(43) 공개일자 2022년12월02일
(56) 선행기술조사문헌
Acta Pharmaceutica Sinica B, 11(8),
p.2096-2113, 2021.02.01.
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
연세대학교 원주산학협력단
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1
(72) 발명자
박용석
강원도 원주시 시청로 264
임찬수
강원도 원주시 연세대길 1
(74) 대리인
김보정

전체 청구항 수 : 총 12 항

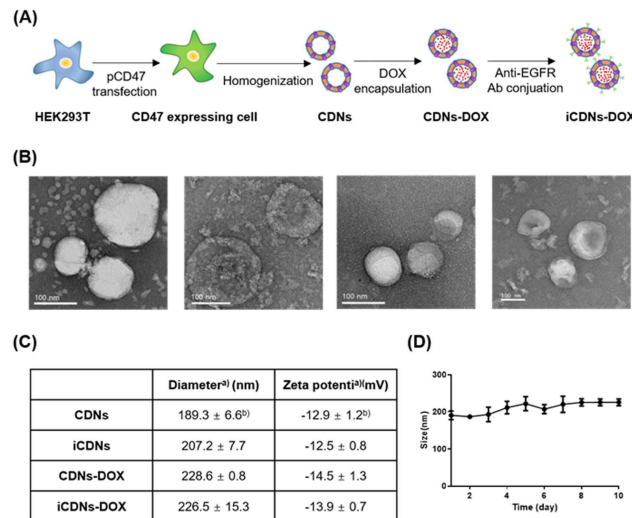
심사관 : 곽희찬

(54) 발명의 명칭 CD47 양성 세포막 유래 나노입자, 이의 용도 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 CD47 양성 세포막 유래 나노입자, 이의 용도 및 이의 제조방법에 관한 것으로, CD47을 과발현하도록 유전자 변형된 세포로부터 제조된 세포막 유래 나노입자에 치료제가 캡슐화되고 표면에 종양 표적 항체가 부착된 CD47 양성 세포막 유래 나노입자는 종양 표적능 등이 우수하고, 특히 탐식작용을 회피하여 혈액에서 생체 적합성 및 혈액순환시간을 향상시켜 특정 암세포를 표적하여 약물을 전달하는 약물 전달체 또는 암 치료용 복합체로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 47/6929 (2017.08)

A61K 9/5192 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020190037163 A*

International Journal of Nanomedicine, 12, p.2759-2767, 2017.

Biomaterials, 128, p.69-83, 2017.

KR1020120002942 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

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) CD47이 형질도입된 세포에서 분리된 세포막 유래 CD47 양성 나노입자;
- 2) 상기 나노입자 표면에 부착된 종양 표적 항체; 및
- 3) 상기 나노입자에 캡슐화된 항암제를 포함하는 대식세포의 식균작용을 회피하는 CD47양성-종양 표적항체-항암제-세포막 유래 나노입자 복합체로서,
상기 CD47 양성 나노입자는 나노입자 표면에 말레이미드 모이어티(maleimide moieties)가 노출된 나노입자이고,
상기 종양 표적 항체는 티올화된 종양 표적 항체이며,
상기 종양 표적 항체는 나노입자 표면의 말레이미드 모이어티에 부착되는 것인, 복합체.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 표적 항체는 표피 성장 인자 수용체(Epidermal growth factor receptor)에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 CD47양성-종양 표적항체-항암제-세포막 유래 나노입자 복합체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 복합체는 암세포에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 CD47양성-종양 표적항체-항암제-세포막 유래 나노입자 복합체.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 암세포는 유방암, 두경부암, 전립선암, 폐암, 비호지킨 림프종, 신경아교종 및 육종 종양 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 CD47양성-종양 표적항체-항암제-세포막 유래 나노입자 복합체.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 암세포는 삼중음성유방암 세포인 것을 특징으로 하는 CD47양성-종양 표적항체-항암제-세포막 유래 나노입자 복합체.

청구항 8

제1항이 있어서, 상기 항암제는 종양 표적 항체가 특이적으로 결합하는 암세포에 대한 항암활성을 갖는 것을 특징으로 하는 CD47양성-종양 표적항체-항암제-세포막 유래 나노입자 복합체.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 항암제는 독소루비신(Doxorubicin)인 것을 특징으로 하는 CD47양성-종양 표적항체-항암제-세포막 유래 나노입자 복합체.

청구항 10

제1항의 나노입자 복합체를 포함하는 약물 전달체.

청구항 11

- 1) CD47이 형질도입된 세포 유래 세포막의 표면에 말레이미드 모이어티(maleimide moieties)를 노출하여 말레이미드 모이어티가 나노입자 표면에 노출된 CD47 양성 나노입자를 제조하는 단계;
- 2) 상기 단계 1)의 CD47 양성 나노입자에 티올화된 종양 표적 항체를 처리하여 나노입자 표면에 노출된 말레이미드 모이어티에 종양 표적 항체를 부착하는 단계; 및
- 3) 상기 단계 2)의 종양 표적 항체가 부착된 나노입자에 항암제 처리한 후, 42 내지 54시간 배양하여 상기 항암제를 캡슐화하는 단계를 포함하는 CD47양성-종양 표적항체-항암제-세포막 유래 나노입자 복합체를 제조하는 방법.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 단계 3)의 항암제는 나노입자에 첨가한 후, 46 내지 50시간 배양하는 것을 특징으로 하는 CD47양성-종양 표적항체-항암제-세포막 유래 나노입자 복합체를 제조하는 방법.

청구항 15

제11항에 있어서, 상기 단계 3)의 나노입자 및 항암제는 100:5~10 몰비(molar ratio)로 혼합하는 것을 특징으로 하는 CD47양성-종양 표적항체-항암제-세포막 유래 나노입자 복합체를 제조하는 방법.

청구항 16

제11항에 있어서, 상기 단계 4)의 항암제는 인산염 구배(phosphate gradient)에 의해 나노입자로 캡슐화되는 것을 특징으로 하는 CD47양성-종양 표적항체-항암제-세포막 유래 나노입자 복합체를 제조하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 CD47 양성 세포막 유래 나노입자, 이의 용도 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 구체적으로 CD47을 발

현하도록 유전자 변형된 세포로부터 제조된 세포막 유래 나노입자에 치료제가 캡슐화되고 표면에 종양 표적 항체가 부착된 CD47 양성 세포막 유래 나노입자 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 최근, 질병 유전학에 대한 이해를 바탕으로 정밀 의학 개발에 많은 노력을 기울이고 있다. 표적 부위에 효과적인 치료제를 전달하기 위한 적절한 시스템은 정밀 의학의 전제 조건이다. 정확하고 효과적인 암 치료를 위해 다양한 유형의 전달 수단이 제안되고 테스트되고 있다.
- [0004] 그 중에서 고분자 나노입자, 리포솜 및 금속 나노입자와 같은 합성 나노입자는 임상 응용을 위해 광범위하게 연구되고 있다. 이러한 나노입자는 유리 약물(free drug) 투여와 관련된 약점, 즉 고유한 독성, 불충분한 치료 활성 및 종양 특이성의 결여를 보완할 수 있다. 반면에, 나노입자는 생체이물(xenobiotic) 특성으로 인해 체내 면역계에 의해 쉽게 인식되어 혈액 순환에서 빠르게 제거되어 약동학적 특성의 손실을 초래한다.
- [0006] 최근, 세포막에서 유래한 다양한 나노입자가 연구되고 있다. 세포 유래 나노입자(Cell-derived nanoparticles, CDNs)는 생체적합성이 있고, 제조방법, 구성성분 및 조건에 따라 면역체계를 회피할 수 있다. CDNs는 원래 세포의 막 단백질과 지질 성분을 가지고 있기 때문에 원래 세포막의 특성을 공유한다. 따라서, 적혈구 원형질막(plasma membrane)에서 유래한 CDNs는 장기간 순환계(circulatory system)에 머무르기 때문에 흥미로운 연구로 관심을 끌었다.
- [0008] 적혈구의 장기간 순환은 원형질막에서 CD47 발현과 관련이 있다. CD47은 면역글로불린(immunoglobulin) superfamily에 속하는 인테그린 결합 단백질(integrin-associated protein, IAP)이다. 또한, 대식세포에서 신호 조절 단백질 알파(Signal-regulatory protein alpha, SIRP α)의 리간드로 알려져 있으며 “don’t eat me” 신호 역할을 한다. CD47과 SIRP α 사이의 상호작용은 면역감시(immune surveillance)에서 벗어나게 한다. 또한, 종양세포 표면에 발현된 CD47은 종양 발생에 중요한 역할을 한다.
- [0010] 항암제와 그 전달 시스템이 암 치료에 효과적이기 위해서는 적어도 다음 두 가지 조건을 만족시켜야 한다. 첫째는, 투여 후 혈액 내 약물 손실을 최소화하면서 해부학적 또는 면역학적 장벽에도 불구하고 표적 종양 조직에 도달해야 한다. 일반적으로 나노입자 캐리어는 소위 침투보존(enhanced permeability and retention, EPR) 효과로 수동 표적(passive targeting)을 통해 종양 조직에 선택적으로 축적되는 것으로 알려져 있다. 두 번째는, 약물은 종양 조직을 선택적으로 표적화하고 정상 조직에 영향을 최소화해야 한다. 능동 표적(Active targeting)은 높은 종양 특이적 약물 축적 및 낮은 비정상 세포독성을 유도하기 위한 암 치료의 진보된 전략이다. 한편 능동 종양 표적은 특이적 표적 리간드를 나노입자의 표면에 결합시켜 수행된다.
- [0012] 표피 성장인자 수용체(epidermal growth factor receptor, EGFR)는 대장암, 뇌암, 폐암 및 유방암을 포함한 다양한 암에서 과발현되거나 상향 조절된다는 것과 관련된 증거들이 많다. 따라서, 항-EGFR 항체 치료제는 암에서 EGFR 유도 신호를 방해하기 위해 개발되었으며, 현재 임상 환경에서 활용되고 있다. 또한, 세툭시맙(cetuximab)과 같은 EGFR 항체는 EGFR을 과발현하는 암세포의 능동 표적(Active targeting)을 위한 암 표적 리간드로 광범위하게 이용되고 있다.
- [0014] 이에 본 발명자들은 기존 약물 전달 시스템 분야에서 다양한 합성 나노입자들은 임상적 적용시 생체 내에서 암 세포에 의해 빠르게 제거되는 한계를 보이고 있으므로, 암식작용을 피하는 것으로 알려진 “Don’t eat me” 신호 마커인 CD47을 세포막에서 과도한 양이 발현되도록 유전자 변형된 세포로부터 제조한 세포막 유래 나노입자에 치료제가 캡슐화되며 표면에 종양 표적 항체를 부착시킨 결과, 생체 적합성, 면역세포 회피성, 종양 표적능 등이 개선되어 항암치료 물질로서 유용하게 사용될 수 있음을 밝힘으로써, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0016] (비특허문헌 0001) Anti-EGFR lipid micellar nanoparticles co-encapsulating quantum dots and paclitaxel for tumor-targeted theranosis, Nanoscale 10(41) (2018) 19338-19350
- (비특허문헌 0002) Lipid-coated polymeric nanoparticles for cancer drug delivery, Biomater Sci 3(7) (2015) 923-36.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0017] 본 발명의 목적은 치료제가 캡슐화되며 표면에 종양 표적 항체가 부착된 CD47 양성 세포막 유래 나노입자 및 이의 제조방법을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

[0019] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

[0020] 1) 세포막 유래 CD47 양성 나노입자;

[0021] 2) 상기 나노입자 표면에 부착된 종양 표적 항체; 및

[0022] 3) 상기 나노입자에 캡슐화된 항암제를 포함하는 CD47양성-종양 표적항체-항암제-세포막 유래 나노입자 복합체를 제공한다.

[0023] 또한, 본 발명은 CD47양성-종양 표적항체-항암제-세포막 유래 나노입자 복합체를 포함하는 약물 전달체를 제공한다.

[0024] 아울러, 본 발명은

[0025] 1) CD47이 형질도입된 세포 유래 세포막에 초음파를 처리하여 CD47 양성 나노입자를 제조하는 단계;

[0026] 2) 상기 단계 1)의 CD47 양성 나노입자에 종양 표적 항체를 부착하는 단계; 및

[0027] 3) 상기 단계 2)의 종양 표적 항체가 부착된 나노입자에 항암제 처리한 후, 42 내지 54시간 배양하여 상기 항암제를 캡슐화하는 단계를 포함하는 CD47양성-종양 표적항체-항암제-세포막 유래 나노입자 복합체를 제조하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0029] 본 발명의 CD47을 과발현하도록 유전자 변형된 세포로부터 제조된 세포막 유래 나노입자에 치료제가 캡슐화되고 표면에 종양 표적 항체가 부착된 CD47 양성 세포막 유래 나노입자는 종양 표적능 등이 우수하고, 특히 탐식작용을 회피하여 혈액에서 생체 적합성 및 혈액순환시간을 향상시켜 특정 암세포를 표적하여 약물을 전달하는 약물 전달체 또는 암 치료용 복합체로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 CD47⁺iCDNs-DOX의 제조방법 및 특성을 나타낸 도이다:

(A) CD47⁺iCDNs-DOX 제조 과정 모식도;

(B) CDNs, CDNs-DOX, iCDNs 및 iCDNs-DOX의 전자현미경($\times 80K$) 이미지;

(C) 본 발명의 나노입자의 크기 및 표면전하; 및

(D) 나노 입자 크기를 10일 동안 모니터링한 결과.

도 2는 HEK293T 세포에 CD47을 형질감염시키는 모식도를 나타낸 도이다:

(A) CD47 암호화 플라스미드인 pCMV3-C-CD47GFPSpark의 구조; 및

(B) HEK293T 세포에 CD47을 형질감염시킨 후, 공초점 현미경($\times 200$)으로 관찰 결과.

도 3은 CDNs로의 독소루비신(DOX) 캡슐화의 효율성을 확인한 도이다:

(A) 분광광도법으로 DOX 탑재 효율 측정 결과; 및

(B) CDNs와 40 μg DOX를 다양한 시간동안 배양한 후, 탑재효율 결과.

도 4는 항-EGFR 항체와 CDNs의 결합을 gel filtration analysis(A) 및 SDS-PAGE(B)로 확인한 도이다.

도 5는 대식세포와 CDNs의 상호작용을 확인한 도이다:

- (A) 세포 표면에 CD47-GFP 융합 단백질의 발현을 공초점현미경(x800)으로 확인한 이미지;
- (B) 형질감염된 세포 용해물 및 CDNs의 Western blotting 결과;
- (C) RAW 264.7 세포에 DiD 표지된 CD47⁻CDNs 또는 CD47⁺CDNs로 1 또는 4시간 동안 처리한 다음 유세포 분석 결과; 및
- (D) 4시간 동안 CDNs과 함께 배양된 대식세포를 공초점 현미경(× 800)으로 확인한 이미지.

도 6은 MDA-MB-231 및 MDA-MB-453 세포에서 EGFR의 발현을 확인한 도이다.

도 7은 iCDNs의 EGFR-특이적 세포 결합 및 iCDNs-DOX의 종양 표적화 및 세포 독성을 확인한 도이다:

- (A) MDA-MB-231 및 MDA-MB-453 세포에 Alexa fluor 488-labeled iCDNs를 처리한 다음 FACS analysis을 수행한 결과;
- (B) MDA-MB-231 및 MDA-MB-453 세포에 iCDNs-DOX로 처리하고 DAPI로 염색한 후, 다양한 시점에서 공초점 현미경으로 확인한 이미지, PMT: photomultiplier tube; 및
- (C) 세포 생존력 결과.

도 8은 이중 이식 마우스에서 iCDNs의 생체 분포를 확인한 도이다:

- (A) 주요 장기의 형광 이미지;
- (B) 주요 기관의 상대적 형광 강도; 및
- (C) 및 (D) CDNs 및 iCDNs의 종양 대 간 비율(Tumor-to-liver ratios)

도 9는 CDNs-DOX에 의한 생체 내 종양 성장 억제를 확인한 도이다.

도 10은 CDNs-DOX로 처리된 마우스의 주요 기관의 조직 병리학 결과를 나타낸 도이다:

종양 사진의 검은색 점선은 피사 부위(밝은 분홍색).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0032] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0034] 본 발명은 1) 세포막 유래 CD47 양성 나노입자;
- [0035] 2) 상기 나노입자 표면에 부착된 종양 표적 항체; 및
- [0036] 3) 상기 나노입자에 캡슐화된 항암제를 포함하는 CD47양성-종양 표적항체-항암제-세포막 유래 나노입자 복합체를 제공한다.
- [0037] 상기 단계 1)의 세포막은 CD47이 형질도입된 세포에서 분리된 세포막으로, CD47이 과발현된 세포막으로 제조된 나노입자는 항-식세포(phagocytic) 능력이 우수하여 면역세포에 대한 회피성을 나타낸다.
- [0038] 또한, 상기 2)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.
- [0039] 또한, 상기 3)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.
- [0040] 또한, 상기 3)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.
- [0042] 또한, 본 발명은 CD47양성-종양 표적항체-항암제-세포막 유래 나노입자 복합체는 하기 제조방법으로 제조하는

것이 바람직하다:

- [0043] 1) CD47이 형질도입된 세포 유래 세포막에 초음파를 처리하여 CD47 양성 나노입자를 제조하는 단계;
- [0044] 2) 상기 단계 1)의 CD47 양성 나노입자에 종양 표적 항체를 부착하는 단계; 및
- [0045] 3) 상기 단계 2)의 종양 표적 항체가 부착된 나노입자에 항암제 처리한 후, 42 내지 54시간 배양하여 상기 항암제를 캡슐화하는 단계.
- [0046] 본 발명의 상기 단계 1)의 CD47 양성 나노입자는 말레이미드 모이어티(maleimide moieties)가 나노입자 표면에 노출된 것이 바람직하고, 단계 2)의 표적항체는 티올화된 항체이므로 상기 말레이미드 모이어티에 티올화된 종양 표적 항체가 결합된다.
- [0047] 또한, 상기 단계 3)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 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 치료용으로 사용될 수 없다.
- [0048] 또한, 상기 단계 3)의 나노입자 및 항암제는 100:5~10 몰비(molar ratio)로 혼합하는 것이 바람직하며, 상기 범위를 벗어날 경우, 나노입자의 탑재효율이 낮아 저 항암효과를 나타낼 수 없는 것이 당업자에게 자명한 사실이다.
- [0049] 또한, 일반적으로 막 소포(membranous vesicle)에 치료제를 캡슐화하면 약물 자체와 비교하여 세포 독성을 감소되나, 본 발명의 제조 조건을 이용할 경우, 탑재된 약물의 효과가 유지되므로, 본 발명의 조건 및 방법을 벗어날 경우, 유의적인 항암 효과를 나타내지 못한다.
- [0050] 또한, 상기 CD47양성-종양 표적항체-항암제-세포막 유래 나노입자 복합체는 2000 nm 이하 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.
- [0051] 또한, 상기 CD47양성-종양 표적항체-항암제-세포막 유래 나노입자 복합체의 제타 전위(zeta potential) 값이 -12 mV 내지 -15 mV로서, 음의 값을 가지므로, 서로 응집이 발생하지 않는다.
- [0053] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 CD47을 인코딩한 플라스미드를 HEK293T 세포에 형질 전환시키고 균질화 및 연속적인 원심 분리 과정을 사용하여 형질 전환된 세포로부터 CD47 양성 세포막 유래 나노입자(CD47⁺-CDNs)를 제조하였고, 제조된 세포막 유래 나노입자는 200 nm보다 작은 크기를 띠었고, 이는 투과 상승 및 저류 효과를 통해 종양에 수동 표적화하기에 적합한 크기임을 확인하였다(도 1 내지 도 3 참조).
- [0054] 또한, 본 발명자들은 CD47⁺-CDNs는 CDNs보다 RAW264.7 대식세포에 의해 적게 탐식되는 것을 확인하였고, 이 결과는 CD47⁺-CDNs이 대식세포에 의한 면역 반응을 피할 수 있으므로, 혈액에서 생체 적합성 및 혈액순환시간을 향상시킬 수 있음을 확인하였다(도 5 참조).
- [0055] 또한, 본 발명자들은 독소루비신(DOX)은 인산염 농도 구배(Phosphate gradient method)으로 CD47⁺-CDNs에 포획하였고 그 포획율은 약 20%임을 확인하였다(도 4 참조).
- [0056] 또한, 본 발명자들은 표피성장인자수용체(EGFR)가 과발현된 암세포에 선택적으로 결합하기 위해 종양을 표적할 수 있는 항 EGFR 항체를 CD47⁺-CDNs에 접합시킨 후, 유세포 분석 결과, 항 EGFR 항체가 접합된 CD47⁺-CDNs(immuno-CD47⁺-CDNs; CD47⁺-iCDNs)은 EGFR 양성 MDA-MB-231 세포에 선택적으로 결합할 수 있었지만, EGFR 음성 MDA-MB-453 세포에는 결합할 수 없는 것을 확인하였다(도 6 및 도 7 참조).
- [0057] 또한, 본 발명자들은 CD47⁺-iCDNs가 생체 내에서 CD47⁺-CDNs에 비해 종양 조직에 많이 축적되는 것을 종양이 이식된 쥐를 통해 확인하였다(도 8 참조).
- [0058] 아울러, 본 발명자들은 공초점 현미경으로 CD47⁺-iCDNs-DOX가 EGFR 과발현 종양 세포의 세포질 내에 특이적으로

내재화되는 것을 독소루비신 형광을 검출함으로써 확인하였다(도 9 및 도 10 참조).

- [0059] 따라서 본 발명의 항 EGFR 항체가 접합되어 있고 독소루비신을 포획한 CD47⁺-CDNs는 EGFR 과발현 암세포를 표적하여 약물을 전달하는 나노입자로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0061] 아울러, 본 발명은 본 발명의 CD47양성-종양 표적항체-항암제-세포막 유래 나노입자 복합체를 포함하는 약물 전달체를 제공한다.
- [0062] 구체적으로, 본 발명의 CD47을 과발현하도록 유전자 변형된 세포로부터 제조된 세포막 유래 나노입자에 치료제가 캡슐화되고 표면에 종양 표적 항체가 부착된 CD47 양성 세포막 유래 나노입자는 종양 표적능 등이 우수하고, 특히 탐식작용을 회피하여 혈액에서 생체 적합성 및 혈액순환시간을 향상시켜 특정 암세포를 표적하여 약물을 전달하는 약물전달체로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0064] 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.
- [0066] 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 당업자에게 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.
- [0068] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의하여 상세히 설명한다.
- [0069] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0071] <실시예 1> 시료의 준비
- [0072] DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimide(1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide(polyethylene glycol)2000])은 Avanti Polar Lipid, Inc.(Alabaster, USA)에서 구입하였다. DMKE(O,O-dimyrystyl-N-lysyl glutamate) 양이온 지질은 KOMA 바이오텍에서 구입하였다(서울, 대한민국). 마우스 CD47 ORF cDNA clone expression plasmid, C-GFPspark tag (pCD47-GFP)는 Sino Biological사에서 구입하였다(베이징, 중국). DOX는 Sigma-Aldrich에서 구입하였다(St. Louis, MO, USA). 항-EGFR 항체(cetuximab, Erbitux®)는 Merck KgaA에서 구입하였다(Darmstadt, Germany). Martigel은 Corning에서 구입하였다(New York, NY, USA).
- [0074] <실시예 2> 세포주 및 세포 배양
- [0075] HEK293T(인간 배아 신장; CRL-3216TM), 인간 유방 선암종(Human breast adenocarcinoma) MDA-MB-231(HTB-26TM), 인간 유방 전이성 암종(human breast metastatic carcinoma) MDA-MB-453(HTB-131TM) 및 Raw 264.7(murine 대식세포, TIB-71TM) 세포주는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, USA)에서 구입하였다.
- [0076] HEK293T 및 RAW 264.7 세포는 10% 소태아 혈청(FBS, Gibco, Carlsbad, CA, USA), 100 IU/mL 페니실린(Gibco) 및 100 µg/mL 스트렙토마이신(Gibco)이 보충된 Dulbecco의 변형된 Eagle 배지(DMEM, Gibco)에서 37°C, 95% 공기 및 5% CO₂ 상태에서 유지시켰다. MDA-MB-231 및 MDA-MB-453 세포는 10% 소태아 혈청, 100 IU/mL 페니실린 및 100 µg/mL 스트렙토마이신이 보충된 Leibovitz의 L-15 배지(Leibovitz's L-15)(Gibco)에서 37°C에서 CO₂가 없는 상태에서 유지시켰다.
- [0078] <실시예 3> 동물모델의 준비
- [0079] 본 발명의 모든 동물실험은 연세대학교 원주(YWCI-201805-006-01)의 Institutional Animal Care and Use

Committee(IACUC)의 승인을 받았으며, 학교 지침 및 규정에 따른 프로토콜에 따라 수행하였다.

[0081] <실시예 4> CD47⁺-세포 유래 나노입자(cell-derived nanoparticles; CDN)의 제조

[0082] <4-1> CD47⁺-CDNs의 제조

[0083] CD47을 암호화하는 플라스미드를 상기 <실시예 2>에서 배양한 인간 배아 신장(HEK293T) 세포로 형질감염시켰다.

[0084] 구체적으로, HEK293T는 60-mm 세포 배양 접시에서 융합(confluence) 정도가 80%될 때까지 배양하였고, 형질감염 전 pCD47-GFP 및 DMKE(1 : 3 중량비)를 30분 동안 Opti-MEM에서 혼합하였다. 그런 다음, 상기 세포에 혼합 형질감염 용액을 처리하고 48시간 동안 배양하였다.

[0085] 그런 다음, 원형질막을 추출하기 위해, pCD47로 형질감염된 상기 세포를 PBS(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에서 5 mM EDTA-4Na로 200 ×g에서 3분 동안 원심분리하고, 세포를 PBS로 세척하였다. 그런 다음, 상기 세포를 4℃에서 20 mM Tris-HCl, 3mM MgCl₂ 및 10mM NaCl을 포함하는 저장액 완충액(hypotonic solution buffer)에 현탁한 다음, Dounce homogenizer를 사용하여 균질화하였다. 4℃에서 10분 동안 5,000 ×g에서 원심분리한 후, 상층액을 수집하고 4℃에서 30분간 15,000 ×g로 다시 원심분리 하였다. 상층액을 버리고 펠릿을 PBS(pH 7.4)에 분산시켰다. 현탁된 펠릿을 얼음 위에서 VibraCell VC50(Sonics & Materials Inc., Danbury, CT, USA)을 사용하여 22% amplitude에서 20초 동안 3회 초음파 처리하였다.

[0086] CD47⁺-세포 유래 나노입자인 CD47⁺-CDNs는 추가 실험을 위해 4℃에서 보관되었다.

[0088] <4-2> DSPE-PEG2000-maleimide 결합 CD47⁺-CDNs

[0089] 항체 접합을 위하여, DSPE-PEG2000-maleimide(1mg)를 N₂ 가스 하에서 건조하고 1 mL의 완충액으로 수화하여 미셀(micelle) 용액을 제조하였다. 그런 다음, 상기 미셀 용액(4 nmol 지질)을 상기 <4-1>에서 제조한 CD47⁺-CDNs(1 μmol 지질)에 첨가한 다음 얼음 위에서 10초 동안 3회 초음파 처리하였다.

[0090] 최종적으로, 상기 방법으로 Mal-CD47⁺-CDNs(DSPE-PEG2000-maleimide-결합된 CD47⁺-CDNs)을 제조하였다.

[0092] <실시예 5> CDNs 내 독소루비신(Doxorubicin; DOX) 캡슐화

[0093] 독소루비신을 상기 <실시예 4>에서 제조한 CDNs 내 캡슐화하기 위하여, 인산염 구배(phosphate gradient)를 이용하였다.

[0094] 구체적으로, CDNs는 암모늄 인산염 버퍼(ammonium phosphate buffer; 300 mM, pH 7.4)에서 준비한 다음 PD-10 column(GE Healthcare, Chicago, IL, USA)을 통과하여 HEPES-EDTA buffer(25mM, 140mM NaCl, 2mM EDTA, pH 7.4)로 교환하였다. CDNs는 40 μg의 DOX의 존재 하에 37℃에서 다양한 기간 동안 배양하였고, 배양 후, PD-10 column을 통과하여 유리 DOX(free DOX)를 제거하였다. DOX의 캡슐화 효율은 480 nm에서 DOX의 흡광도를 측정하여 정량화하였다.

[0096] <실시예 6> 세툽시맵(cetuximab)이 결합된 CDNs-DOX의 제조

[0097] 반응성 티올기를 갖는 항체를 제조하기 위하여, 1 mg 세툽시맵을 HEPES-EDTA 버퍼(25mM HEPES, 140mM NaCl, 2mM EDTA, pH 7.4)에서 5 mg Traut 시약과 실온에서 1시간 동안 반응시켜 티올화시켰다. 그런 다음, PD-10 desalting column을 사용하여 미반응 Traut의 시약을 제거하였다.

[0098] 그런 다음, 상기 티올화된 항체를 0.2:1(항체: DSPE-PEG2000-maleimide) 몰비로 Mal-CD47⁺-CDNs-DOX에 첨가하고 혼합물을 4℃에서 16시간 동안 배양하였다. 비접합 항체는 HEPES-EDTA buffer(pH 7.4)에서 sepharose CL-4B column을 사용하여 제거시켰다. CDNs에 항체가 접합된 iCDNs는 SDS-PAGE에 의해 확인하였다.

[0100] <실시예 7> CDNs 특성 확인

[0101] CDNs의 크기 및 표면 전하는 동적 광산란 제타-사이저(dynamic light scattering zeta-sizer; Nano-ZS90, Malvern Instruments Ltd. Malvern, UK)를 사용하여 측정하였고, 측정은 3회 반복하였다.

[0102] 또한, CDNs의 형태는 투과 전자 현미경(transmission electron microscopy; TEM)(JEM-2100F, JEOL Ltd, Tokyo,

Japan)을 사용하여 관찰하였다.

- [0103] 구체적으로, CDNs 및 CDNs-DOX(1 nM)를 카르보닐(carbonyl) 코팅된 400 메쉬 구리 그리드에 로드하였다. 음성 염색을 위하여 10 μ L의 2 % 우라닐 아세테이트를 그리드에 10분 동안 놓고, 제거한 다음 실온에서 10분 동안 건조시킨 후, TEM 이미지 촬영하였다.
- [0105] <실시예 8> 웨스턴 블랏팅 분석
- [0106] MDA-MB-231 및 MDA-MB-453 세포의 EGFR 발현 수준을 웨스턴 블랏팅 분석으로 평가하였다. 세포를 6-웰 플레이트(웰당 2×10^5 개 세포)에 접종하고, 프로테아제 억제제(Thermo Scientific)와 함께 세포 용해 완충액(cell lysis buffer)(RIPA buffer, Thermo Scientific, MA, USA)을 사용하여 용해시켰다. 또한, 형질감염된 세포에서 CD47 발현을 분석하기 위하여, 세포 용해물 및 CDNs를 세포 용해 완충액에서 용해시켰다.
- [0107] 구체적으로, 용해물을 10% SDS-PAGE로 분리한 후, 니트로 셀룰로오스 멤브레인(nitrocellulose membranes)으로 옮겼다. 멤브레인은 skim milk를 포함하는 TBST로 차단시킨 후, 항-EGFR rabbit 항체(Cell Signaling Technology, Danvers, USA) 또는 항-mouse CD47 항체(Invitrogen, Carlsbad, USA)의 1 : 1,000 희석액과 함께 배양하였다. 세척 후, 상기 멤브레인을 horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit 항체 또는 goat anti-rat 항체(Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA)의 1:5000 희석으로 처리하고, 상기 멤브레인을 세척한 후, SuperSignal® West Pico(Thermo Scientific)을 처리하였다. 면역 반응 밴드는 Fusion Solo Chemidoc(Vilber Lourmat)를 사용하여 확인하였다.
- [0109] <실시예 9> 세포 독성 분석
- [0110] CDNs-DOX 및 iCDNs-DOX의 세포독성을 확인하기 위하여, MDA-MB-231 및 MDA-MB-453 세포를 96- 웰 플레이트(1×10^4 세포)에 접종하고 48시간 동안 배양하였다.
- [0111] 구체적으로, 상기 암세포에 100 μ L의 무혈청 배양 배지에서 다양한 농도의 CDNs-DOX 및 iCDNs-DOX(0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 및 100 μ M DOX/mL)을 처리한 다음 37°C에서 48 시간 동안 배양하였다. 그런 다음, 상기 세포에 37°C에서 2시간 동안 10 μ L의 Cell Counting Kit-8(CCK8) 용액(Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)을 처리하였다. Infinite 200 Pro NanoQuant (TECAN)를 사용하여 450nm 파장에서 웰을 분석하였고, IC₅₀(최대 억제 농도의 절반) 값은 GraphPad Prism 소프트웨어(GraphPad Software, Inc., San Diego, USA)를 사용하여 확인하였다.
- [0113] <실시예 10> 시험관 내에서 대식세포 흡수 확인
- [0114] Raw 264.7 세포에 의한 CDNs 및 CD47⁺-CDNs의 세포 내 흡수를 FACS Calibur 유세포 분석기(BD Biosciences, San Jose, CA, USA) 및 공초점 레이저 스캐닝 현미경(LSM 510; Zeiss, Heidenheim, Germany)으로 분석하였다.
- [0115] 구체적으로, Raw 세포를 6-웰 플레이트에 웰당 2×10^5 세포 밀도로 접종하고 12 시간 동안 배양 하였다. CDNs 및 CD47⁺-CDNs는 3 μ L의 Vybrant™ Multicolor Cell-Labeling kit(Molecular Probes, Eugene, OR, USA)으로 제조업체의 프로토콜에 따라 37°C에서 15분 동안 형광 표지시켰다. 그런 다음, 1 μ mol의 형광 CDNs 또는 CD47⁺-CDN으로 처리한 세포를 FACS Calibur 유세포 분석기(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 사용하여 다양한 시점에서 분석하였다. 동시에, 공초점 현미경(LSM 510; Zeiss, Heidenheim, Germany)으로 관찰하였다.
- [0117] <실시예 11> 시험관 내에서 iCDNs의 표적 세포 결합 확인
- [0118] <11-1> 유세포 분석
- [0119] MDA-MB-231 및 MDA-MB-453 세포를 6-웰 플레이트에 접종하고 48시간 동안 배양하였다. 배양 후, 세포를 L-15(pH 7.4)로 2회 세척하고, 트립신-EDTA 용액(pH 7.4)을 처리하였다. 세포 펠릿(1×10^5 세포) 5 mL 폴리스티렌 둥근 바닥 튜브(Corning, New York, NY, USA)의 L-15에 현탁시켰다. Alexa Fluor 488(Invitrogen) 표지된 항-EGFR 항체-접합 CD47⁺-CDNs를 세포(튜브 당 50 μ M)에 첨가하고 계속 교반하면서 4°C에서 1시간 동안 배양하였다. 세포에 대한 immuno-CD47⁺-CDNs의 결합은 FACS Calibur 유세포 분석기(Becton Dickinson)로 분석하였다.

- [0121] <12-2> 공초점 현미경 분석
- [0122] immuno-CD47⁺-CDNs-DOX(CD47⁺-iCDNs-DOX)의 세포 내 흡수를 확인하기 위하여, DOX를 포함하는 immuno-CD47⁺-CDNs를 세포(튜브 당 50 μ M)에 첨가한 다음 37℃에서 0.5, 1, 4 또는 24시간 동안 무 혈청 배지에서 배양하였다. 배양 후, 세포를 차가운 PBS(pH 7.4)로 2회 세척하고, 2% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 고정시켰다. 또한, 세포를 어둠 속에서 30분 동안 DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole) 용액(Vector Lab, Burlingame, CA, USA)으로 염색하고 슬라이드에 장착한 후, 공초점 현미경을 사용하여 슬라이드를 관찰하였다.
- [0124] <실시예 13> 생체 내(*in vivo*) 종양모델의 준비
- [0125] 생체 내 종양모델을 준비하기 위해, 6주령 암컷 BALB/c 누드 마우스(Orient Bio, Seongnam, Korea)의 유방지방 조직(mammary fat pad)에 200 μ L의 MDA-MB-231 세포(1×10^7)를 Matrigel(BD Biosciences)(1:1 volume ratio)과 혼합하여 피하주사하였다.
- [0126] 비니어 캘리퍼스(Vernier calipers)로 종양 크기를 측정한 후, 다음 식을 이용하여 종양 부피를 확인하였다(종양 부피 = (길이 \times 높이²)/2).
- [0128] <실시예 14> iCDNs의 생체 내 분포 확인
- [0129] 상기 <실시예 13>의 마우스의 종양 부피가 약 200 mm³에 도달하면 로다민 B(rhodamine B)가 표지된 CDNs, CD47⁺-CDNs 또는 immuno-CD47⁺-CDNs(10 mg lipid/kg)를 꼬리정맥을 통해 마우스에 주입하였다(n=3). 모든 마우스를 24 시간 후, 희생시키고 종양 조직을 포함한 주요 장기를 마우스에서 절개한 다음, Maestro 2 *in vivo* imaging system(Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA)을 사용하여 형광 강도를 측정하였다.
- [0131] <실시예 15> iCDNs-DOX에 의한 생체 내 종양 성장 억제 효과 확인
- [0132] iCDNs-DOX의 항암 효과에 대한 생체 내 평가를 위하여, <실시예 13>과 동일한 방법으로, 마우스에 MDA-MB-231 세포를 주입하고, 마우스 종양의 부피가 약 150 mm³에 도달하였을 때, 식염수, 유리 DOX, CD47⁺-CDNs-DOX, CD47⁺iCDNs-DOX 또는 CD47⁺iCDNs-DOX로 처리하였다. 처리는 2일 간격으로 3회 반복되었다(2.785 mg/kg DOX, n=4). 마우스의 종양 부피와 체중은 3일 간격으로 측정하였다.
- [0133] 모든 마우스를 주사 후 39 일에 희생시키고 간, 심장, 신장, 폐 및 종양을 수집하고, 10 % 포르말린 용액으로 고정하고, 파라핀에 포매하고, 조직학적 분석을 위해 절개하였다. 절편된 조직은 H&E로 염색하고 현미경으로 관찰하였다.
- [0135] <실험예 1> iCDNs의 제조
- [0136] 도 1A의 모식도에서와 같이, CDNs에 항-EGFR 항체 접합 및 항암 약물 독소루비신 캡슐화하는 과정을 나타내었다.
- [0137] 구체적으로, HEK293T 세포에 CD47을 코딩하는 플라스미드(pCMV3-C-CD47GFPSpark, 간단히 pCD47GFP)로 형질 감염시키고, 상기 형질 감염된 세포에서 CD47의 발현을 형광 현미경으로 확인하였다(도 2). 그런 다음, CD47을 발현하는 원형질막에 초음파 처리로 나노입자를 형성한 다음 DSPE-PEG2000-maleimide를 삽입하여 항체에 대한 커플링 모이어티(coupling moieties)를 제공하였다.
- [0138] 상기 나노입자 내 약물 캡슐화는 치료 약물용 나노 캐리어 개발에서 중요한 단계로, 본 발명에서는 DOX를 나노입자 내부와 외부에서 생성된 인산염 구배를 이용하여 CDNs에 효율적으로 캡슐화하였다(도 3).
- [0139] 구체적으로, CDNs와 DOX를 100:7의 지질:약물 몰비로 혼합한 다음, 실온에서 48시간 동안 배양했을 때, 구조적으로 안정한 CDNs 내부에 다량의 DOX를 캡슐화 할 수 있음을 확인하였다(19.6 % 로딩 효율).
- [0140] 아울러, 티올화 설테시맵 항체는 DOX를 함유하는 CDNs의 표면에 노출된 maleimide 말단에 접합되어 CD47⁺iCDNs-DOX를 형성하였다(도 4). 한편, 이하, 본 발명의 실험예에서 다르게 명시하지 않는 CDNs는 CD47⁺CDNs를 나타낸다.
- [0142] <실험예 2> CDNs의 물리 화학적 특성 확인

- [0143] TEM imaging(도 1B)에 나타난 바와 같이, 본 발명의 CDNs, iCDNs, CDNs-DOX 및 iCDNs-DOX는 안정적인 소포 나노구조(vesicular nanostructure)를 나타냄을 확인하였다. 본 발명에서는 간단한 초음파 처리로 준비된 CDNs는 직경이 200nm 이하로 균일하게 분산되었고, 약간 음전하임을 확인하였다(-12.5 ~ -14.5mV)(도 1C).
- [0144] 한편, DOX 캡슐화 및 항체 접합은 소포 구조의 완전성에 영향을 미치지 않음을 확인하였다. 구체적으로, iCDNs-DOX는 10일간 4℃에서 보관하는 동안 심각한 크기 변화를 나타내지 않음을 확인하였다(도 1D).
- [0146] <실험예 3> CDNs의 시험관내 대식세포 흡수 확인
- [0147] 공초점 현미경 분석을 통해, pCD47GFP로 형질감염된 HEK293T 세포는 CD47과 GFR의 융합 단백질이 원형질막에서 효율적으로 발현되었지만, 세포질에서는 발현하지 않음을 확인하였다(도 5A). 또한, 웨스턴블랏 분석을 통해 형질감염된 세포와 형질감염된 세포의 원형질막으로 만들어진 나노입자(CDNs)가 일시적으로 발현된 충분한 양의 CD47 단백질을 포함하고 있음을 확인하였다(도 5B).
- [0148] 대식세포 인식 측면에서 CD47⁻CDN 및 CD47⁺CDN을 비교하기 위해, 나노입자를 DiD 소수성 형광 염료(DiD hydrophobic fluorescence dye)로 표지한 다음 RAW 264.7 대식세포와 함께 배양하였다.
- [0149] 그 결과, 도 5C에 나타난 바와 같이 유세포 분석을 통해 CD47⁻CDNs가 CD47⁺CDNs보다 대식세포에 의해 더 쉽게 흡수된다는 것을 확인하였다(도 5C). 동일한 실험 조건 하에서, CD47⁺CDNs와 함께 배양된 대식세포는 CD47⁻CDNs와 함께 배양된 세포에 비해 더 작은 형광 이동 및 더 낮은 평균 형광 강도를 나타냈으며, 시간이 지남에 따라 대식세포와의 상호작용이 더 낮아지는 것을 확인하였다.
- [0150] 아울러, 도 5D에 나타난 바와 같이 대식세포의 CDNs 흡수를 공초점 현미경으로 시각화하였다(도 5D). 4시간 동안 CD47⁻CDNs와 함께 배양된 대식세포는 CD47⁺CDNs와 함께 배양된 것보다 더 광범위하고 강한 형광을 나타냈다.
- [0151] 따라서, 상기 실험을 통해 본 발명의 CD47⁺CDNs는 대식세포의 식균 작용을 유의적으로 회피하는 것을 확인하였다.
- [0153] <실험예 4> iCDNs-DOX의 시험관내 종양 표적 효과 확인
- [0154] 종양 표적화 CDNs인 항-EGFR immuno-CDNs(iCDNs) 제조를 위하여, DSPE-PEG2000-maleimide 및 DiD 형광 염료에 수화된 혼합물을 CDNs와 혼합한 후, 초음파 처리하였다. 또한, 항-EGFR 항체인 티올화 세특시맵(Thiolated cetuximab)을 CDNs 표면에 노출시킨 maleimide 말단에 직접 결합시켜 iCDNs를 제조하였다.
- [0155] iCDNs를 EGFR을 발현하는 표적 종양 MDA-MB-231 세포(도 6)에 처리하고, 이들의 상호작용을 cytometric 분석을 이용하여 확인하였다(도 7A)
- [0156] 그 결과, 도 7A에 나타난 바와 같이, 표적 리간드가 결합된 CDNs는 표적 MDA-MB-231 또는 대조군 MDA-MB-453 세포에 효과적으로 결합할 수 없었다. 그러나 본 발명의 iCDNs는 EGFR의 높은 발현을 나타내는 MDA-MB-231 세포에 대해 유의적으로 결합을 나타내었지만, MDA-MB-453 세포에는 그렇지 않음을 확인하였다.
- [0157] 따라서, 본 발명의 iCDNs가 EGFR 매개 상호작용을 통하여 표적 종양 세포를 특이적으로 인식할 수 있음을 확인하였다.
- [0159] <실험예 5> iCDNs의 종양 표적 약물 전달 효과 확인
- [0160] iCDNs의 종양 표적 약물 전달을 확인하기 위하여, DOX를 인산염 구배 방법을 이용하여 CDNs에 캡슐화하였다. 최적 조건 하에서, DOX 및 CDNs(1mM 지질 : 40 μg의 DOX)를 37℃에서 300 mM 암모늄 포스페이트의 존재 하에 4 시간 동안 외소낭 배지(extravesicular medium)에서 배양하여, 가장 많은 양의 DOX(약 20%)를 CDNs로 캡슐화하였고, CDNs의 구조적 무결성(structural integrity)은 이후 안정적으로 유지됨을 확인하였다. 또한, 티올화 세특시맵을 상기 동일한 방법으로 iCDNs-DOX 표면에 접합시켰다.
- [0161] 도 7B에 나타난 바와 같이 공초점 현미경 분석을 통해 iCDNs-DOX로 처리된 MDA-MB-231 세포는 동일한 실험 조건에서 MDA-MB-453 세포보다 강한 DOX 형광을 나타냄을 확인하였다. 이는 iCDNs-DOX가 비표적 MDA-MB-453 세포보다 표적 MDA-MB-231 세포의 세포질에 DOX를 더 효과적으로 전달할 수 있음을 나타낸다.
- [0162] 따라서, iCDNs-DOX의 세특시맵과 EGFR간의 상호작용을 통해 표적 세포에 DOX의 향상된 전달 효과를 나타냄을 확인하였다.

[0164] <실험예 6> iCDNs의 세포독성 확인

[0165] MDA-MB-231 및 MDA-MB-453 세포에 대한 iCDNs-DOX의 세포 독성을 확인하기 위하여, 유리 DOX 및 비표적 CDNs-DOX의 세포 독성과 비교하였다. 일반적으로 막 소포(membranous vesicle)에 치료제를 캡슐화하면 약물 자체와 비교하여 세포 독성을 감소시키는 경향을 나타냄이 알려져 있다(Anti-EGFR lipid micellar nanoparticles co-encapsulating quantum dots and paclitaxel for tumor-targeted theranosis, Nanoscale 10(41) (2018) 19338-19350). 따라서, 약물 전달을 위해 캡슐화하였더라도, 표적 세포에 타겟 약물에 유의적인 효과를 나타내야 한다.

[0166] 따라서, 본 발명의 iCDNs-DOX의 세포 독성을 CCK-8 분석을 통해 확인하였다.

[0167] 구체적으로, 도 7C에 나타난 바와 같이 iCDNs 또는 CDNs로의 캡슐화는 MDA-MB-453 세포에서 DOX의 세포 독성에 상당한 부정적 영향을 미침을 확인하였다(도 7C). MDA-MB-453 세포에서 유리 DOX의 IC₅₀은 0.32±0.1 μM, CDNs-DOX 및 iCDNs-DOX의 IC₅₀은 각각 3.92±1.46 μM 및 2.11±0.62 μM임을 확인하였다.

[0168] 반면에, MDA-MB-231 세포에서 유리 DOX, CDNs-DOX, iCDNs-DOX의 IC₅₀은 각각 4.05 ± 1.07 μM, 4.20 ± 0.95 μM 또는 3.77 ± 1.51 μM으로 본 발명의 캡슐화로 인한 영향이 없는 것을 확인하였다.

[0170] <실험예 7> 종양 이종 이식 마우스에서 iCDNs의 *in vivo* 생체 분포 확인

[0171] iCDNs의 생체 분포 패턴을 확인하기 위하여, 마우스에 MDA-MB-231 세포를 이종 이식한 다음, DiD 표지된 CDNs 또는 iCDNs를 정맥주사하였다. 종양 조직 및 주요 기관(예: 간, 폐, 심장, 신장, 비장 및 혈액)을 수집하고, 주사 후 10분, 1시간, 4시간, 24시간 및 48시간에 이미징 시스템으로 형광 이미지를 촬영하였다.

[0172] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이 iCDNs로 처리 된 마우스는 CDNs로 처리 된 마우스에 비해 오른쪽 유방 지방 패드의 종양 조직에서 상대적으로 더 강한 형광 신호를 보였고(도 8A), 모든 측정에서 iCDNs 처리시 강한 형광 반응을 나타내었다.

[0173] 또한, 생체 내 이미징 분석 후, 주요 장기(간, 폐, 신장, 비장 및 종양)를 마우스에서 절개한 후, 생체의 형광 이미지 확인하였다(도 8B).

[0174] 그 결과, 도 8B에 나타난 바와 같이 동일 처리시점에서 iCDNs 처리군은 CDNs 처리군보다 종양에서 더 강한 형광 신호를 나타냄을 확인하였다.

[0175] 또한 CDNs 처리군의 종양 형광 신호는 주사 후 10분에 낮았고 4시간 후에 가장 높았으며 신호가 점차 소멸되었으나, 본 발명의 iCDNs 그룹의 종양 형광 신호는 주입 후 10분에도 강했고 48시간 동안 높은 수준의 형광 강도를 유지됨을 확인하였다.

[0176] CDN과 iCDN의 종양 표적성을 비교하기 위하여 각 측정에서 종양 대 간 비율(tumor-to-liver ratio, TLR)을 계산하였다(도 8D).

[0177] 그 결과, 도 8D에 나타난 바와 같이 iCDNs 그룹의 TLR은 CDNs 그룹의 TLR보다 높았고, iCDNs의 개선된 TLR은 혈관 내 순환으로부터의 효율적인 혈관외유출(extravasation)과 효율적인 EGFR 매개 내포작용(endocytosis)으로 형성 타겟 세포를 인식할 수 있음을 확인하였다.

[0179] <실험예 8> iCDNs-DOX에 의한 생체내 종양 성장 억제

[0180] iCDNs-DOX의 항암 치료 효능을 평가하기 위하여, 도 9A에 나타난 바와 같이 MDA-MB-231 종양을 보유한 마우스에 CD47⁺iCDNs-DOX를 3일 간격으로 세 번 정맥 주사하고, 종양 성장을 39일 동안 확인하였다. 또한, 유리 DOX, CD47⁺CDNs-DOX 및 CD47⁺CDNs-DOX를 처리한 마우스의 종양 성장과 비교하였다.

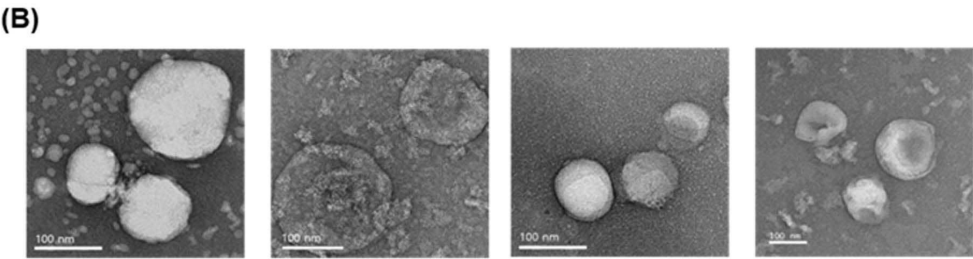
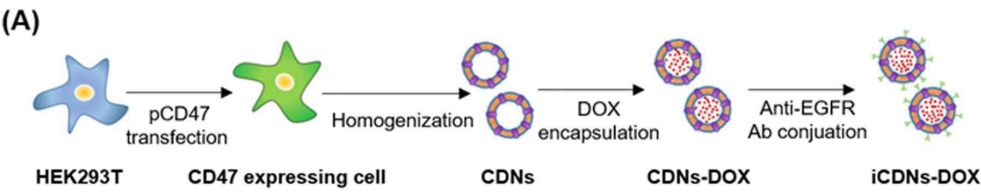
[0181] 그 결과 도 9B에 나타난 바와 같이, CD47⁺iCDNs-DOX는 치료군 중에서 종양 성장을 가장 효과적으로 억제하는 것을 확인하였다. 한편, 비-표적 CD47⁺CDNs-DOX가 유리 DOX 및 CD47⁺CDNs-DOX보다 더 강한 종양 성장 억제를 보였음에도 불구하고, 종양 표적 CD47⁺iCDNs-DOX는 가장 효과적으로 종양 성장을 억제시켰고, 마지막 날에 절제된 종양의 무게는 CD47⁺iCDNs-DOX가 현저한 종양 억제 효과를 나타냄을 확인하였다(도 9C 및 9D). 한편, 유리 DOX 처리 또는 CD47⁺CDNs-DOX 처리 마우스는 유사한 종양 무게(각각 0.613 ± 0.240 mg 및 0.593 ± 0.240 mg)를 나

타냄을 확인하였다.

- [0182] 결론적으로, $CD47^{+}$ iCDNs-DOX 처리된 마우스의 종양 무게는 비표적 $CD47^{+}$ CDNs-DOX 처리된 마우스보다 낮았고, 이러한 결과는 CDN 표면에 노출된 면역 세포-회피 $CD47$ 단백질과 종양 표적화 세특시맵 분자가 종양 세포의 세포질로 DOX의 세포 내 전달을 상승적으로 향상시켜, 암세포의 나노 캐리어 시스템의 항암 치료 효능을 높일 수 있음을 확인하였다.
- [0183] 한편, 도 9E에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 세포막 나노 캐리어 시스템 자체는 치료 중 심각한 생체 내 독성을 나타내지 않는다.
- [0184] 구체적으로, DOX를 포함하는 본 발명의 막 나노입자로 처리된 모든 마우스는 급성 체중 감소를 나타내지 않았고, 이러한 결과를 통해 본 발명의 막 나노 입자 시스템이 세포독성이 없어, 임상적으로 안정하게 사용될 수 있음을 확인하였다(도 9E).
- [0186] <실험예 9> $CD47^{+}$ iCDNs-DOX로 처리 된 마우스의 조직학적 분석
- [0187] 종양 성장 측정의 마지막 날 심장, 신장, 간, 폐, 종양 조직 등 주요 기관 및 조직을 절제하고, 조직학적 분석을 수행하였다.
- [0188] 유리 DOX는 고용량에서 심장 독성을 유발할 수 있다는 점이 잘 알려져 있으나, 식염수 처리된 대조군 마우스와 비교하여, 유리 DOX, $CD47^{-}$ CDNs-DOX, $CD47^{+}$ CDNs-DOX 및 $CD47^{+}$ iCDNs-DOX가 처리된 모든 마우스 그룹(DOX 처리량 2.8mg/kg)에서 심장 조직에 유의한 형태학적 변화가 나타나지 않았고, 간, 신장 및 폐의 절편된 조직에서도 유의적인 변화가 나타나지 않음을 확인하였다.
- [0189] 그러나, 종양조직에서는 $CD47^{-}$ CDNs-DOX, $CD47^{+}$ CDNs-DOX 또는 $CD47^{+}$ iCDNs-DOX로 처리된 마우스의 종양 조직에서 광범위한 괴사 영역이 관찰된 반면, 식염수 또는 유리 DOX 처리된 마우스는 조직 전체의 불규칙한 핵산 위치와 많은 혈관을 보이므로 종양의 전형적인 조직을 나타내었다.
- [0190] 따라서, 본 발명의 나노입자 표면에 노출된 종양 표적화 세특시맵 및 $CD47$ 분자는 표적 종양 조직의 성장 억제에 대해 상승적(또는 부가적)이고 유의적인 효과를 나타내므로, $CD47$ 및 항암 리간드를 노출하는 세포 유래 나노 캐리어가 표적 암 치료를 위한 새로운 약물 전달 시스템으로 사용될 수 있음을 확인하였다.

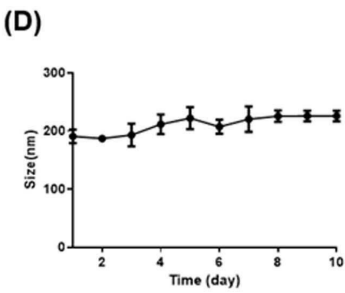
도면

도면1



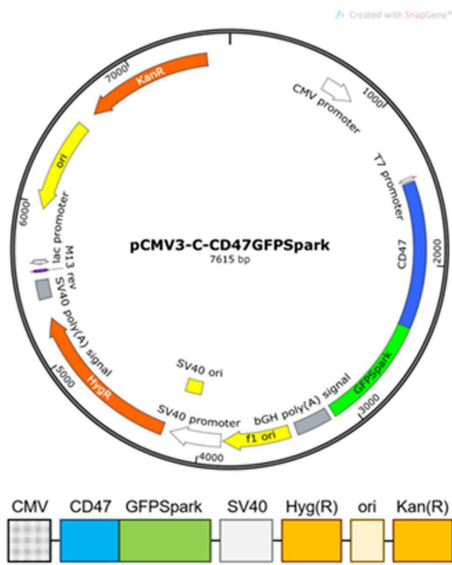
(C)

	Diameter ^{a)} (nm)	Zeta potenti ^{a)} (mV)
CDNs	189.3 ± 6.6 ^{b)}	-12.9 ± 1.2 ^{b)}
iCDNs	207.2 ± 7.7	-12.5 ± 0.8
CDNs-DOX	228.6 ± 0.8	-14.5 ± 1.3
iCDNs-DOX	226.5 ± 15.3	-13.9 ± 0.7

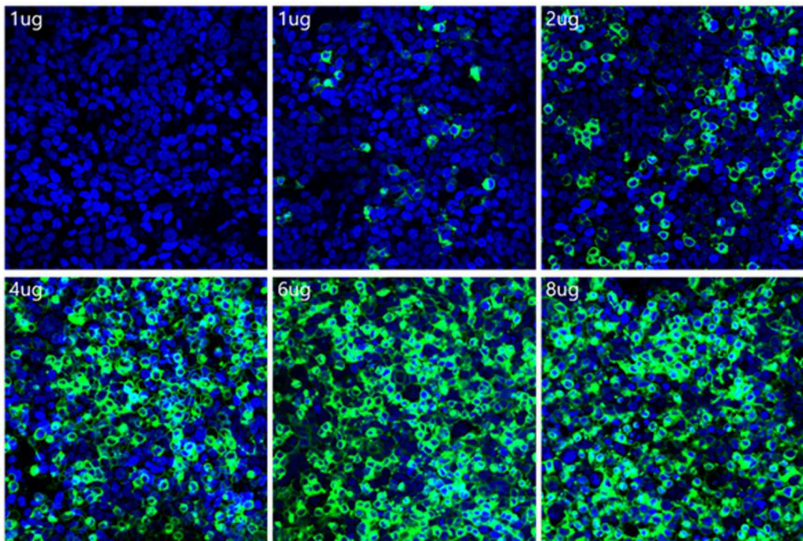


도면2

(A)

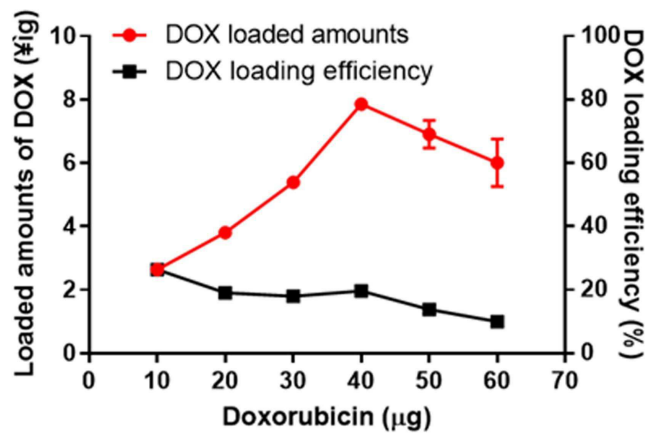


(B)

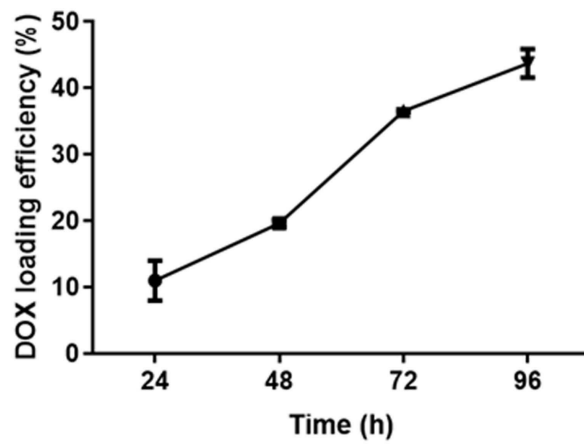


도면3

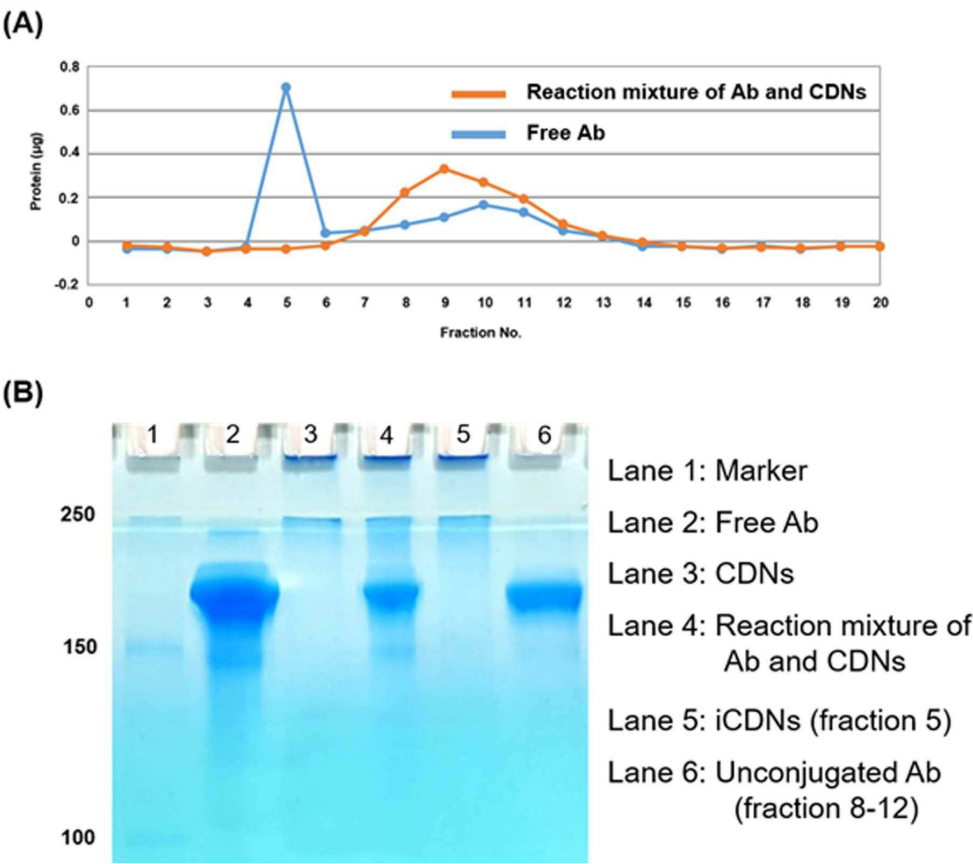
(A)



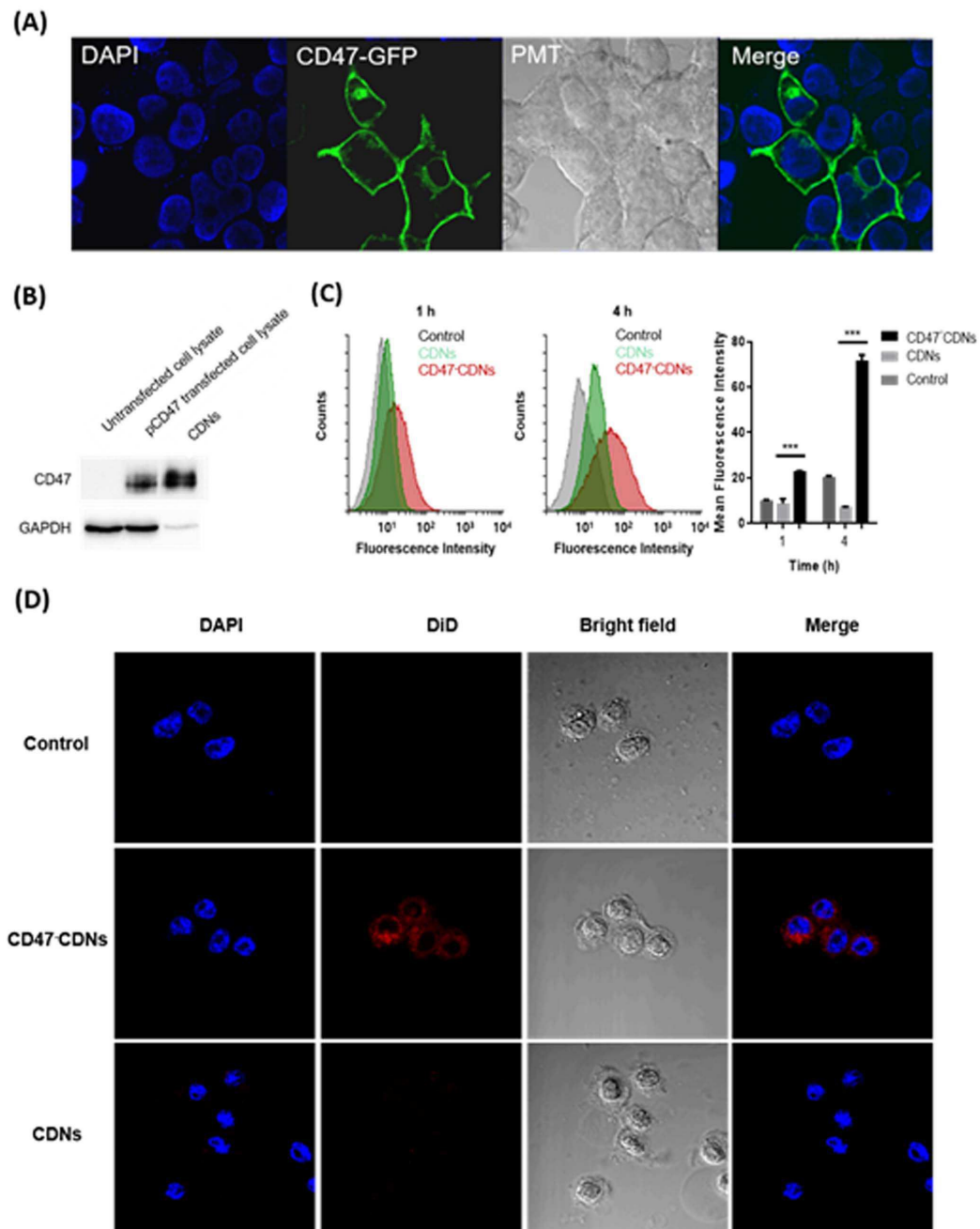
(B)



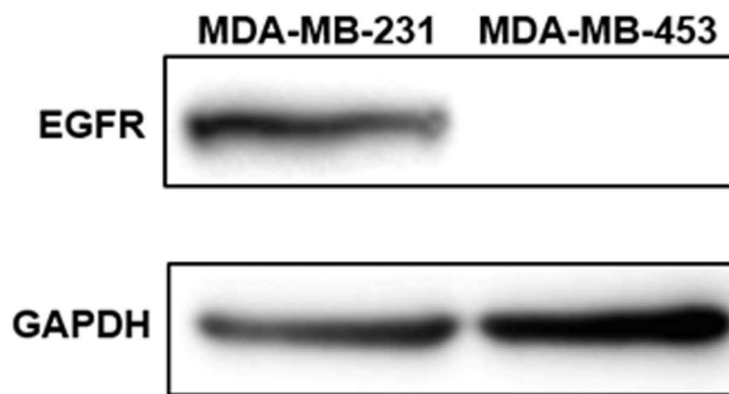
도면4



도면5

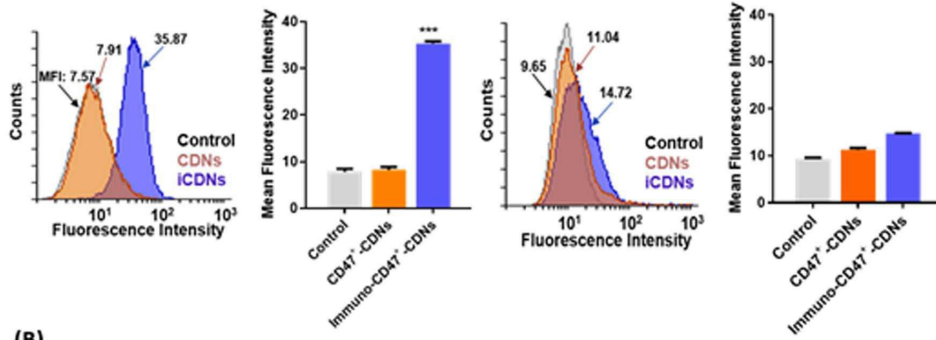


도면6

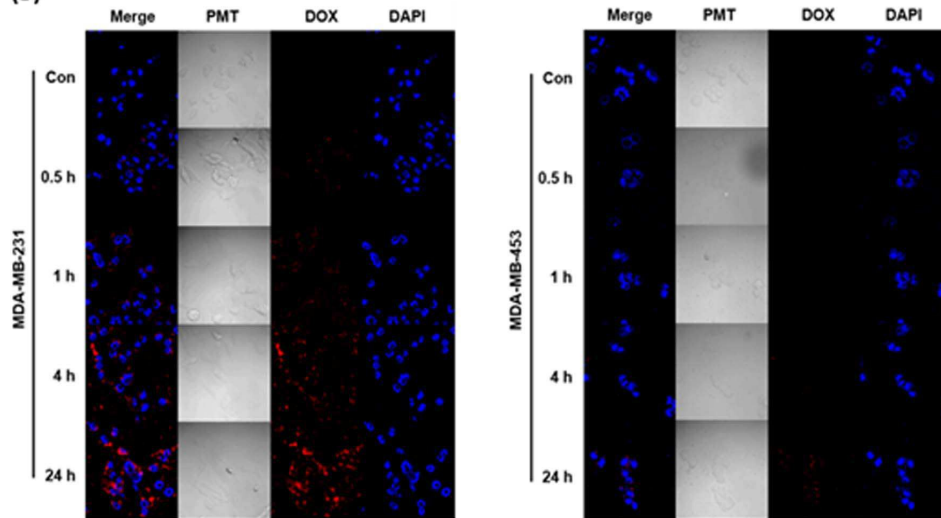


도면7

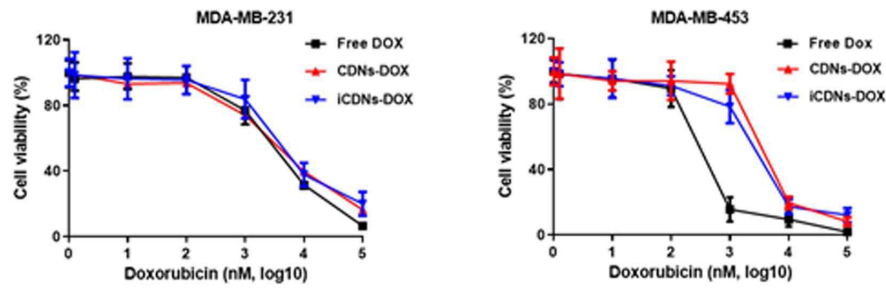
(A)



(B)



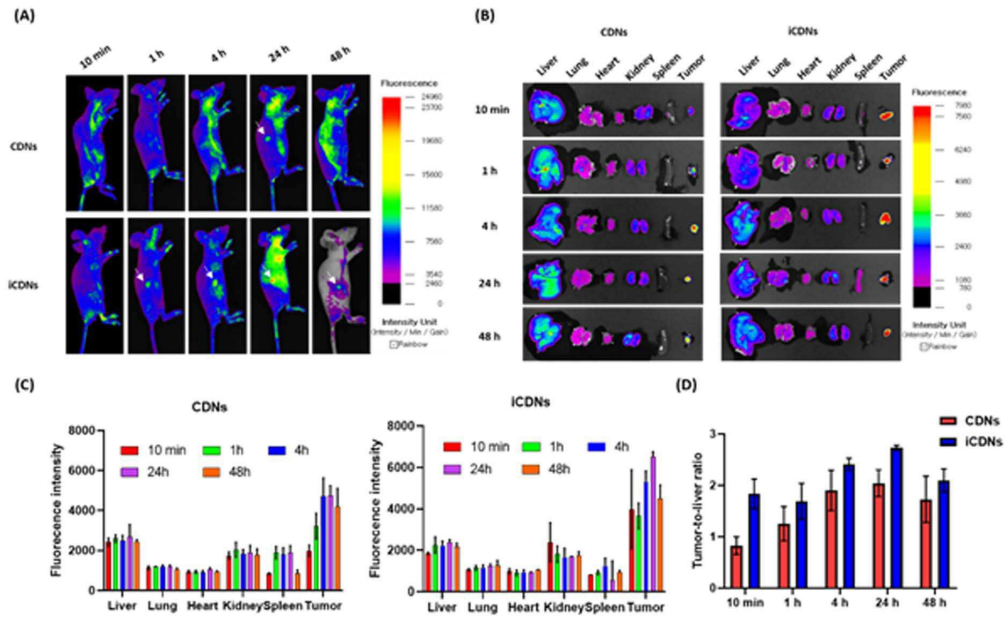
(C)



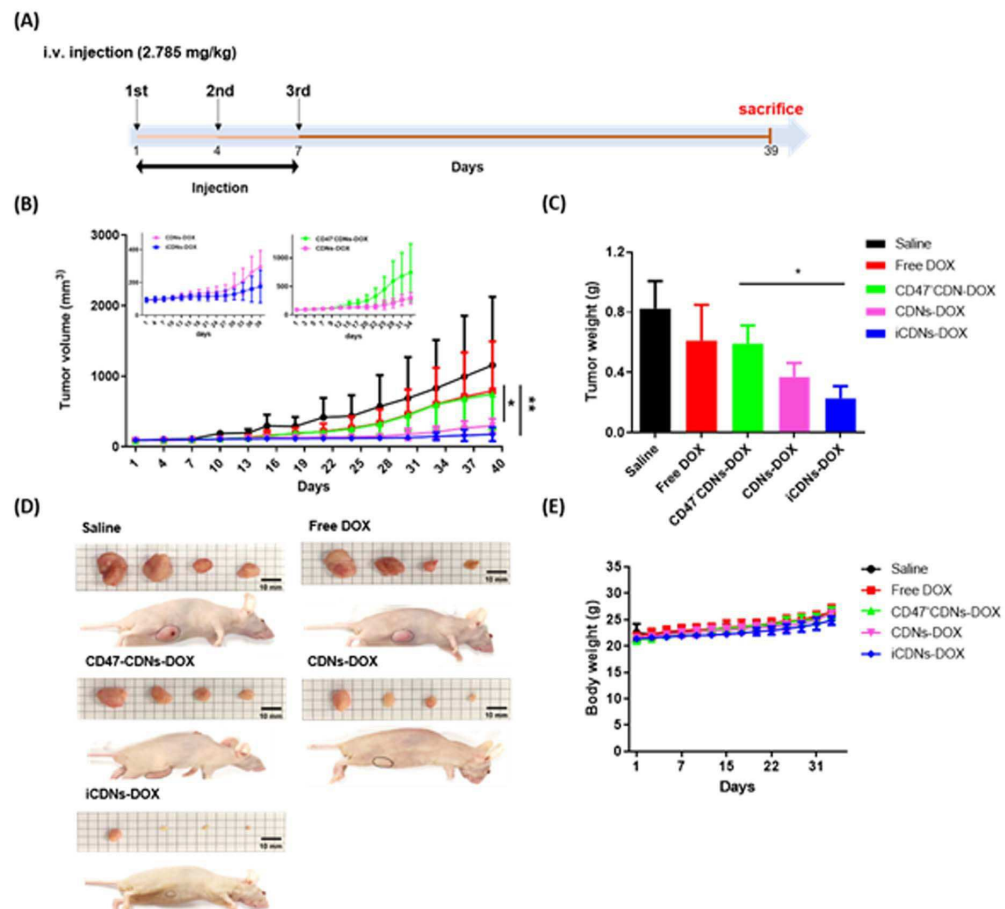
	Free DOX	CDNs-DOX	iCDNs-DOX
IC ₅₀ (μM)	4.05 ± 1.07	4.20 ± 0.95	3.77 ± 1.51

	Free DOX	CDNs-DOX	iCDNs-DOX
IC ₅₀ (μM)	0.32 ± 0.1	3.02 ± 1.46	2.11 ± 0.62

도면8



도면9



도면10

