



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년01월28일  
(11) 등록번호 10-2357588  
(24) 등록일자 2022년01월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 9/51 (2006.01) A61K 31/704 (2006.01)  
A61K 9/107 (2006.01) A61K 9/127 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
A61K 9/51 (2013.01)  
A61K 31/704 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2020-0028461  
(22) 출원일자 2020년03월06일  
심사청구일자 2020년03월06일  
(65) 공개번호 10-2021-0112875  
(43) 공개일자 2021년09월15일  
(56) 선행기술조사문헌  
Theranostics, 10(9), 2020.2.21.,  
pp.3849-3866\*  
Scientific Reports, 6, 2016, article number  
21933\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
연세대학교 원주산학협력단  
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1  
(72) 발명자  
박용석  
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1 미래관 219호  
유영명  
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1 미래관 219호  
최문정  
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1 미래관 219호  
(74) 대리인  
김보정

전체 청구항 수 : 총 4 항

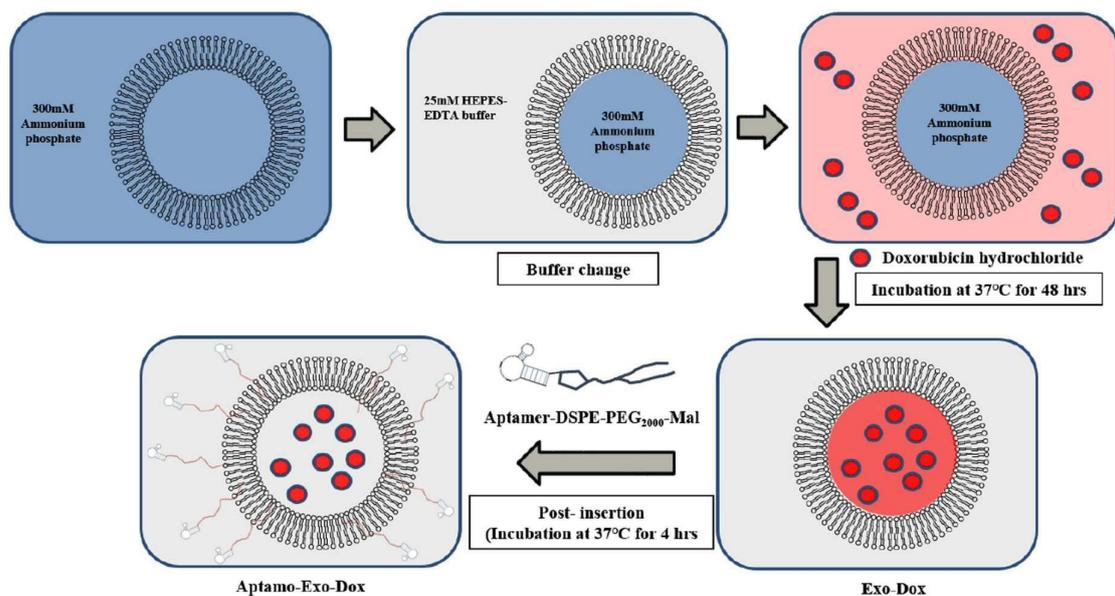
심사관 : 김강필

(54) 발명의 명칭 **약물이 포획되고 표면에 압타머가 부착된 엑소좀 및 이의 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 약물이 포획되고 표면에 압타머가 부착된 엑소좀, 이의 용도 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 세포에서 막 여과 방법 및 크로마토그래피법으로 분리하고 농도구배법을 이용하여 항종양 약물을 포획한 엑소좀과 EFG 수용체와 결합하는 항EGFR 압타머가 부착된 마이셀을 배양하여 제조한, 약물이 포획되고 표면에 압타머가 부착된 엑소좀 제조방법, 이의 용도 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

*A61K 9/1075* (2013.01)

*A61K 9/1271* (2013.01)

*A61P 35/00* (2018.01)

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

삭제

**청구항 2**

삭제

**청구항 3**

삭제

**청구항 4**

삭제

**청구항 5**

삭제

**청구항 6**

삭제

**청구항 7**

삭제

**청구항 8**

삭제

**청구항 9**

삭제

**청구항 10**

삭제

**청구항 11**

- 1) 세포배양액에서 엑소좀을 추출하는 단계;
- 2) 추출한 엑소좀 내부에 약물을 포획하는 단계;
- 3) 표면에 2 내지 4 몰 % 농도의 압타머가 부착된 마이셀을 제조하는 단계; 및
- 4) 단계 2)의 약물이 포획된 엑소좀과 단계 3)의 압타머가 부착된 마이셀을 같이 배양하는 단계;

를 포함하는 약물이 포획되고 표면에 압타머가 부착된 엑소좀의 제조방법으로서,

상기 단계 2)에서 엑소좀 내부를 인산암모늄 완충액으로 평형화한 후 컬럼에 통과시켜 엑소좀 외부의 완충액을 HEPES EDTA 완충액으로 교환시킨 후, 상기 내부 완충액은 인산암모늄이고 외부 완충액은 HEPES EDTA인 엑소좀과 포획하고자 하는 약물과 배양하여 약물을 포획하는 것인 제조방법.

**청구항 12**

제11항에 있어서,

상기 단계 1)의 엑소솜은 막 여과 방법 및 크로마토그래피법으로 분리된, 약물이 포획되고 표면에 압타머가 부착된 엑소솜의 제조방법.

**청구항 13**

삭제

**청구항 14**

삭제

**청구항 15**

제11항에 있어서,

상기 단계 3)의 마이셀은 항EGFR 압타머가 리포솜에 부착된 마이셀인, 약물이 포획되고 표면에 압타머가 부착된 엑소솜의 제조방법.

**청구항 16**

제15항에 있어서,

리포솜은 0,0'-디미리스틸-N-리실 글루타메이트(0,0'-Dimyristyl-N-lysyl glutamate, DMKE), 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌글리콜)2000](1,2-distearoylsnglycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)2000], DSPE-mPEG<sub>2000</sub>), 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-말레이미드(폴리에틸렌글리콜)2000](1,2-distearoyl-snglycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide(polyethylene glycol)2000], DSPE-PEG<sub>2000</sub>-MAL)를 포함하는 군에서 선택되는 하나 이상의 리포솜인, 약물이 포획되고 표면에 압타머가 부착된 엑소솜의 제조방법.

**청구항 17**

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 약물이 포획되고 표면에 압타머가 부착된 엑소솜 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 세포에서 분리한 엑소솜에 항종양 약물을 포획시킨 후 종양 표적화 능력을 제공하기 위해 항EGFR 압타머를 표면에 접합시킨 구조의 엑소솜 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0003] 암은 신체의 조직 또는 다른 부분에 접하여 퍼져나갈 수 있는 조절되지 않는 세포의 비정상적 성장에 의한 질환으로, 암세포가 함께 덩어리화되어 있는 고형종양을 형성하거나 백혈병에서와 같이 분산된 세포로서 존재할 수 있다. 정상세포는 성숙될 때까지 분화하고 이후 필요에 따라서 손상되거나 죽은 세포를 교체하나, 암세포는 끊임없이 분화하여 결국 인근 세포를 밀어내고 다른 부분으로 퍼지게 되어 악성으로 불린다. 악성 종양 세포는 혈류 또는 림프계를 통해 신체의 다른 부분으로 전이되며, 여기에서 증식하고 새로운 종양을 형성한다.

[0004] 암은 다양한 치료방법이 개발되었음에도 불구하고, 전 세계적으로 여전히 인간의 건강을 심각하게 위협하고 있다. 현재 주요 암 치료법으로는 외과적 수술, 방사선 치료, 호르몬 요법 및 화학 요법이 있으며, 그 중 화학 요

법은 하나 이상의 항암제를 사용하여 암을 직접 치료하거나 증상을 완화시키는 방법이다.

- [0005] 전통적인 화학 요법제는 암세포 분열 및 대사를 방해하거나, 핵산 또는 단백질의 생합성을 억제함으로써, 암세포에 대한 세포독성을 나타내게 된다. 그러나 이러한 화학 요법제는 항암제에 대하여 암세포가 저항성을 가지게 되는 문제 및 정상 세포 및 조직에 대해 독성을 나타내는 등 심각한 부작용을 초래하는 문제가 있다. 특히 기존 항암제로 사용되고 있는 물질은 암세포에 영향을 미치지만 정상세포에도 독성을 미침으로써 다양한 부작용을 초래하고 있는 경우가 많다. 따라서 정상세포에는 독성을 미치지 않고 암세포에만 선택적인 우수한 독성을 나타내며 항암 활성이 우수한 항암 치료제가 필요하다.
- [0007] 표피 성장 인자 수용체(epidermal growth factor receptor, EGFR)는 EGFR (ErbB-1), HER2/c-neu (ErbB-2), Her 3 (ErbB-3) 및 Her 4 (ErbB-4)를 포함한 티로신 키나제의 하위계열인 ErbB 계열 수용체의 특정 세포 표면 수용체로, 과발현시 중앙 활동을 촉진하여 인간의 악성 종양을 심화시킨다. EGFR 또는 계열 구성원의 돌연변이, 증폭 또는 조절불량은 모든 상피암의 약 30%와 관련이 있으며, EGFR 과발현 또는 과활성이 초래하는 돌연변이에는 폐암, 항문암 및 두경부암을 포함한 많은 상피암과 연관이 있다. 따라서, EGFR 과발현 암의 치료를 위해 EGFR 매개 신호 전달 경로를 차단하는 것은 합리적인 치료방법으로 간주되어진다.
- [0009] 한편, 엑소좀은 세포내에서 자연적으로 만들어지는 30 내지 200 nm 크기의 세포간 miRNA, mRNA, DNA 및 단백질을 전달하는 세포 외 소포(extracellular vesicles)로 면역반응을 피할 수 있고, 인체적합성이 뛰어나며, 약물 탑재기능, 특정 세포로의 표적전달효과, 혈액내 안정성 등의 장점으로 인해 약물 전달을 위한 유망한 나노 운반체로 여겨져왔다. 그러나, 통상적인 연속 원심분리 방법으로 엑소좀을 분리하는 경우 회수율이 낮고, 항온 배양, 전기투과 또는 초음파 처리와 같은 방법으로 엑소좀에 약물을 포획하는 경우 효율이 너무 낮아 이용하는데 어려움이 있다.
- [0011] 이에, 본 발명의 발명자들은 암세포 특이적 결합을 하는 엑소좀을 개발하기 위해 연구해온 결과, 막 여과 방법(Membrane filtration method) 및 크로마토그래피법을 이용하여 세포에서 엑소좀을 분리하고, 인산구배법(Phosphate gradient method)을 이용하여 엑소좀에 충분한 양의 약물을 포획하는 약물을 포획한 엑소좀을 제조할 수 있음을 확인하였다.
- [0012] 또한, 암에서 과발현 되는 EGFR 수용체와 결합하는 항EGFR 압타머가 부착된 마이셀과 배양하여 약물이 포획되고 표면에 압타머가 부착된 엑소좀을 제조할 수 있음을 확인하였다.

**선행기술문헌**

**비특허문헌**

- [0014] (비특허문헌 0001) Salomon, D.S., Brandt, R., Ciardiello, F., and Normanno, N. (1995). Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. Crit Rev Oncol Hematol 19, 183-232.
- (비특허문헌 0002) Yarden, Y., and Sliwkowski, M.X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. Nat Rev Mol Cell Biol 2, 127-137.Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2017) Cancer Statistics, 2017. CA Cancer J Clin 67: 7-30.
- (비특허문헌 0003) Klapper, L.N., Waterman, H., Sela, M., and Yarden, Y. (2000). Tumor-inhibitory antibodies to HER-2/ErbB-2 may act by recruiting c-Cbl and enhancing ubiquitination of HER-2. Cancer Res 60, 3384-3388.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0015] 기존 항암제는 암세포에 영향을 미치지만 정상세포에도 독성을 미쳐 탈모, 설사, 백혈구 감소증 등 다양한 부작용을 초래하는 경우가 많아 정상세포에는 독성을 미치지 않고 암세포 특이성 독성을 나타내는 항암 활성이 우수한 항암 치료제가 요구되고 있다.
- [0016] 따라서, 본 발명은 암세포 특이적으로 결합하고 항암 활성이 우수한, 약물이 포획되는 표면에 압타머가 부착된

엑소좀 및 이의 제조방법을 제공하기 위한 것이다.

**과제의 해결 수단**

[0018] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명의 발명자는 막 여과 방법 및 크로마토그래피법으로 세포에서 엑소좀을 분리하고 농도구배법의 일종인 인산구배법으로 상기 엑소좀에 항종양 약물을 포획한 후 항EGFR 압타머가 부착된 마이셀과 배양하여 항종양 약물이 포획되고 표면에 항EGFR 압타머가 부착된 엑소좀을 제조하였고, 상기 항종양 약물이 포획되고 표면에 항EGFR 압타머가 부착된 엑소좀이 EGFR이 과발현되는 암세포와 결합하여 포획된 항종양 약물에 의한 항암효과가 나타나는 것을 확인하였다.

**발명의 효과**

[0020] 본 발명의 항종양 약물이 포획되고 표면에 항EGFR 압타머가 부착된 엑소좀이 EGFR가 과발현되는 암세포와 특이적으로 결합하고 항종양 약물에 의한 항암효과가 나타나는 것을 확인하였는바, 상기 엑소좀을 이용하여 항암용 약제학적 조성물을 제조할 수 있다.

[0021]

**도면의 간단한 설명**

- [0022] 도 1은 막 여과 방법 및 크기배제 크로마토그래피법을 이용하여 분리된 엑소좀의 특징을 나타낸 도이다.
- (A) 분리된 엑소좀의 단백질 농도
  - (B) 분리된 엑소좀의 동적 광산란
  - (C) 분리된 엑소좀의 직경
- 도 2는 분리된 엑소좀 분획(16th)의 엑소좀 마커 단백질(CD9 및 Tsg101)을 전기영동으로 확인한 도이다.
- 도 3은 분리된 엑소좀의 크기 분포를 확인한 도이다.
- 도 4는 독소루비신이 포획되고 표면에 압타머가 부착된 엑소좀 제조방법을 나타낸 도이다.
- 도 5는 독소루비신 용량에 따른 엑소좀에 포획되는 독소루비신의 효율 및 엑소좀의 크기 변화를 나타낸 도이다.
- (A) 독소루비신 용량에 따른 엑소좀에 독소루비신 포획되는 효율
  - (B) 독소루비신 용량에 따른 엑소좀의 크기 변화
- 도 6은 독소루비신과 엑소좀의 배양시간에 따른 엑소좀에 포획되는 독소루비신 효율 및 엑소좀의 크기 변화를 나타낸 도이다.
- (A) 배양시간에 따른 엑소좀에 독소루비신이 포획되는 효율
  - (B) 배양시간에 따른 엑소좀의 크기 변화
- 도 7은 압타머와 DSPE-PEG<sub>2000</sub>-Mal이 결합하였음을 전기영동으로 확인한 도이다.
- 도 8은 엑소좀에 부착되는 다양한 몰 %의 압타머와 엑소좀을 배양한 결과를 전기영동으로 확인한 도이다.
- (A) 다양한 몰 %의 압타머와 엑소좀을 배양한 결과
  - (B) 10 % SDS와를 처리하고 압타머와 엑소좀을 배양한 결과
- 도 9는 독소루비신이 포획되고 표면에 항EGFR 압타머가 부착된 엑소좀(aptamo-Exo-Dox)의 혈청 안정성을 확인한 도이다.
- 도 10은 인간 상피암 세포주 A431 및 인간 유방암 세포주 MDA-MB-453 세포에서 EGF 수용체 발현 수준을 확인한 도이다.
- 도 11은 Cy3-labeled 압타머의 EGFR 특이적 결합을 확인한 도이다.
- (A) A431 세포에 Cy3-labeled 압타머 처리시 나타나는 히스토그램

(B) MDA-MB-453 세포에 Cy3-labeled aptamer의 처리시 나타나는 히스토그램

도 12는 Cy3-labeled aptamo-Exo-Dox의 EGFR 특이적 결합을 확인한 도이다.

(A) A431 세포에 다양한 몰 % (0.5, 1.5 및 3.5 몰 %) Cy3-labeled aptamo-Exo-Dox 처리시 나타나는 히스토그램

(B) MDA-MB-453 세포에 0.5 몰 % Cy3-labeled aptamo-Exo-Dox 처리시 나타나는 히스토그램

도 13a는 A431 세포에 Dox, Exo-Dox 및 aptamo Exo-Dox를 처리하였을 때 IC<sub>50</sub> 값을 확인한 도이다.

도 13b는 MDA-MB-453 세포에 Dox, Exo-Dox 및 aptamo Exo-Dox를 처리하였을 때 IC<sub>50</sub> 값을 확인한 도이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0023] 이하, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 실시형태를 들어 상세히 설명한다. 본 발명의 실시형태는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 더욱 완전하게 설명하기 위해서 제공되는 것이다. 따라서, 본 발명의 실시형태는 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 이하 설명하는 실시형태로 한정되는 것은 아니다.
- [0024] 본 발명의 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0025] 본 발명의 명세서 전체에서 사용되는 용어 "~(하는) 단계" 또는 "~의 단계"는 "~를 위한 단계"를 의미하지 않는다.
- [0027] 본 발명은 약물이 포획되고 표면에 aptamer가 부착된 엑소좀을 제공한다.
- [0029] 상기 엑소좀의 직경은 혈관 외 우출 및 체류 효과를 통해 종양 조직에 유출될 수 있는 200 nm 이하일 수 있고, 구체적으로 30 nm 내지 200 nm일 수 있으나 이로 한정되는 것은 아니다.
- [0030] 상기 엑소좀에 포획되는 약물은 항종양 약물일 수 있고, 상기 항종양 약물은 독소루비신(doxorubicin), 사이클로포스파마이드(cyclophosphamide), 메클로레타민(mecholrethamine), 우라무스틴(uramustine), 멜파란(melphalan), 클로라부실(chlorambucil), 이포스파미드(ifosfamide), 벤다무스틴(bendamustine), 카르무스틴(carmustine), 로무스틴(lomustine), 스트렙토조신(streptozocin), 부설판(busulfan), 다카바진(dacarbazine), 테모졸로마이드(temozolomide), 티오테파(thiotepa), 알트레타민(altretamine), 듀오카르마이신(duocarmycin), 시스플라틴(cisplatin), 카르보플라틴(carboplatin), 네다플라틴(nedaplatin), 옥사리플라틴(oxaliplatin), 사트라플라틴(satraplatin), 트리플라틴 테트라나이트레이트(triplatin tetranitrate), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 6-머캅토피린(6-mercaptopurine), 카페시타빈(capecitabine), 클라드리빈(cladribine), 클로파라빈(clofarabine), 시스타르빈(cystarbine), 플록스유리딘(floxuridine), 플루다라빈(fludarabine), 겐시타빈(gemcitabine), 하이드록시우레아(hydroxyurea), 메토트렉세이트(methotrexate), 페메트렉세드(pemetrexed), 펜토스타틴(pentostatin), 티오구아닌(thioguanine), 캄토테신(camptothecin), 토폠테칸(topotecan), 이리노테칸(irinotecan), 에토포사이드(etoposide), 테니포시드(teniposide), 미토산트론(mitoxantrone), 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 이자베필론(izabepilone), 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine), 빈데신(vindesine), 비노렐빈(vinorelbine), 에스트라머스틴(estramustine), 메이탄신(maytansine), DM1(mertansine, 메르탄신), DM4, 돌라스타틴(dolastatin), 아우리스타틴 E(auristatin E), 아우리스타틴 F(auristatin F), 모노메틸 아우리스타틴 E(monomethyl auristatin E), 모노메틸 아우리스타틴 F(monomethyl auristatin F) 및 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 항종양 약물일 수 있으나 이로 한정되는 것은 아니다.
- [0031] 상기 엑소좀에 포획되는 약학적으로 유효한 양의 약물은 10 내지 50 μg 일 수 있고, 구체적으로 10 내지 40 μg일 수 있고, 보다 구체적으로 10 내지 35 μg일 수 있으나 이로 한정되는 것은 아니다.
- [0032] 상기 aptamer는 항EGFR(epidermal growth factor receptor) aptamer 일 수 있고, 상기 항EGFR aptamer는 EGFR에 특이적으로 결합하는 표적리간드 일 수 있으며, 구체적으로 EGFR이 과발현하는 암과 특이적으로 결합하는 표적리간드 일 수 있다.
- [0033] 상기 EGFR이 과발현 하는 암은 폐암, 유방암, 전립선암, 장암, 췌장암, 위암, 간암, 혈액암, 뼈암, 피부암, 두경부암, 피부 또는 안구 흑색종, 자궁육종, 난소암, 직장암, 항문암, 대장암, 난관암, 자궁암, 자궁내막암, 자

궁경부암, 소장암, 내분비암, 갑상선암, 부갑상선암, 신장암, 연조직종양, 요도암, 기관지암, 골수종, 결장암, 항문암, 성상세포종, 백혈병, 림프종, 고환암, 육종, 혈관종, 식도암, 안암, 후두암, 경구암, 중피종, 구강암, 인후암, 방광암, 기저세포암, 편평세포암종, 구강편평세포암종, 대장직장암, 교모세포종 및 악성뇌교모종으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 암일 수 있으며, 구체적으로 폐암, 유방암, 전립선암, 췌장암, 위암, 간암, 피부암, 두경부암, 난소암, 대장암, 신장암, 식도암, 방광암 및 교모세포종으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 암일 수 있으나 이로 한정되는 것은 아니다.

- [0035] 또한, 본 발명은 약물이 포획되고 표면에 압타머가 부착된 엑소좀의 제조방법을 제공한다.
- [0036] 본 발명에서 상기 약물이 포획되고 표면에 압타머가 부착된 엑소좀은 하기의 단계들을 포함하는 방법에 의해 제조된다.
- [0037] 1) 세포배양액에서 엑소좀을 추출하는 단계;
- [0038] 2) 추출한 엑소좀 내부에 약물을 포획하는 단계;
- [0039] 3) 표면에 압타머가 부착된 마이셀을 제조하는 단계; 및
- [0040] 4) 단계 2)의 약물이 포획된 엑소좀과 단계 3)의 압타머가 부착된 마이셀을 같이 배양하는 단계.
- [0042] 본 발명에서 상기 단계 1)의 엑소좀을 추출하는 단계는 막 여과 방법 및/또는 크기배제 크로마토그래피 법으로 추출할 수 있다. 세포배양액을 원심분리하여 세포 및 세포 잔해물을 제거하고 막으로 여과시킨 후, 여과된 배양 상청액을 농축시키고 원심분리하여 큰 소포 및 단백질 응집체를 제거한 후, 상청액을 컬럼에 통과시켜 엑소좀을 추출할 수 있다.
- [0043] 상기 막 여과 방법에서 사용되는 막은 기공크기가 0.20 내지 0.30  $\mu\text{m}$ 인 셀룰로오스 막일 수 있고, 상기 상청액을 농축은 50 K MWCO의 막 여과 장치를 갖는 아미콘(Amicon) 필터를 이용할 수 있다.
- [0044] 상기 크기배제 크로마토그래피 법에서 상기 상청액을 통과시키는 컬럼은 300 mM 인산암모늄(ammonium phosphate) 완충액(pH 7.4)로 평형화된 CL-4B 필터일 수 있다.
- [0046] 본 발명에서 상기 단계 2)의 엑소좀 내부에 약물을 포획하는 단계는 농도구배법으로 할 수 있고, 구체적으로 농도구배법의 일종인 인산구배법으로 포획할 수 있으나 이로 한정되는 것은 아니다. 엑소좀 내부를 인산암모늄 완충액으로 평형화한 후 컬럼에 통과시켜 엑소좀 외부의 완충액을 HEPES EDTA 완충액으로 교환시킨 후, 상기 내부 완충액은 인산암모늄이고 외부 완충액은 HEPES EDTA인 엑소좀과 포획하고자 하는 약물과 배양하여 약물을 포획시킬 수 있다.
- [0047] 상기 인산구배법에서 사용되는 컬럼은 HEPES 완충액으로 평형화된 PD-10 컬럼일 수 있다.
- [0048] 상기 내부 인산암모늄 완충액과 약물의 몰비는 1:0.5 내지 1:2일 수 있고, 구체적으로 1: 0.5 내지 1:1.5일 수 있으나 이로 한정되는 것은 아니다.
- [0049] 상기 엑소좀 내부에 포획되는 약물의 농도 및 약물인 항종양 약물의 종류는 약물이 포획되고 표면에 압타머가 부착된 엑소좀에서의 설명과 동일한 바, 구체적인 설명은 상기 내용은 원용한다.
- [0050] 상기 엑소좀 내부에 포획될 수 있는 약물과 엑소좀을 배양하는 시간은 24시간 내지 72시간 동안 배양할 수 있으나 이로 한정되는 것은 아니고, 배양하는 온도는 25 내지 45  $^{\circ}\text{C}$ 로 진탕하면서 배양할 수 있다.
- [0052] 본 발명에서 상기 단계 3)의 표면에 압타머가 부착된 마이셀을 제조하는 단계는 리포솜에 압타머를 부착하여 마이셀을 제조할 수 있다. 압타머와 리포솜과 혼합한 후 교반하면서 배양할 수 있다.
- [0053] 상기 혼합은 클로로포름 및 메탄올의 1:3 내지 3:1의 혼합물에서 혼합할 수 있고, 구체적으로 1:2 내지 2:1의 혼합물에서 혼합할 수 있으나 이로 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 혼합한 후 교반하면서 하는 배양은 10 내지 30시간 동안 배양할 수 있고, 구체적으로 15 내지 25시간 동안 배양할 수 있다.
- [0054] 상기 압타머는 1 내지 5 몰 %의 농도인 압타머 일 수 있고, 구체적으로 2 내지 4 몰 %의 농도인 압타머 일 수 있으나 이로 한정되는 것은 아니다.
- [0055] 상기 리포솜은 0,0'-디미리스틸-N-리실 글루타메이트(0,0'-Dimyristyl-N-lysyl glutamate, DMKE), 1,2-디스테로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌글리콜)2000](1,2-distearoylsnglycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)2000], DSPE-mPEG<sub>2000</sub>), 1,2-디스테로일-sn-글리세로-

3-포스포에탄올아민-N-말레이미드(폴리에틸렌글리콜)2000](1,2-distearoyl-snglycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide(polyethylene glycol)2000], DSPE-PEG<sub>2000</sub>-MAL) 및 콜레스테롤을 포함하는 군에서 선택되는 하나 이상의 리포솜일 수 있으나 이로 한정되는 것은 아니다.

- [0057] 본 발명에 있어서, "예방"은 조성물의 투여로 발병을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 본 발명에 있어서, "개선" 또는 "치료"란 조성물의 투여로 상기 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0058] 본 발명에 있어서, "투여"는 임의의 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 제공하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 일반적인 모든 경로를 통하여 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 또한, 조성물은 활성물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 탑재된 형태로 투여될 수 있다.
- [0060] 또한, 본 발명은 약물이 포획되고 표면에 압타머가 부착된 엑소솜을 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0061] 또한, 본 발명은 약물이 포획되고 표면에 압타머가 부착된 엑소솜을 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 키트를 제공한다.
- [0062] 상기 약학적 조성물 및 치료용 키트에서의 약물, 압타머 및 엑소솜에 대해서는 상기 약물이 포획되고 표면에 압타머가 부착된 엑소솜에서의 설명과 동일한 바, 구체적인 설명은 상기 내용을 원용한다.
- [0063] 상기 엑소솜은 정제, 캡슐제, 주사제, 트로키제, 산제, 과립제, 액제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 좌제, 질정제, 및 환제로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 제형으로 제형화될 수 있으나 이로 한정되지 않으며, 필요에 따라 적절한 제형으로 제형화가 가능하다. 상기 엑소솜을 제제화할 경우, 보통 사용하는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조할 수 있다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환자, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되며, 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0065] 또한, 본 발명은 약물이 포획되고 표면에 압타머가 부착된 엑소솜을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 치료방법을 제공한다.
- [0066] 본 발명에 있어서, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 효리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 배합된 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0067] 구체적으로, 본 발명에 따른 화합물의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg 당 0.1 mg 내지 100 mg, 바람직하게는 0.5 mg 내지 10 mg을 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 질환의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0069] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 본 발명의 독소루비신이 포획되고 표면에 항EGFR 압타머가 부착된 엑소솜의 EGFR 발현 암에서 항암활성을 확인하기 위해 EGFR 과발현 인간 상피암 세포주 A431 및 EGFR 결핍 인간 유방암 세포주 MDA-MB-453 세포에 처리한 결과, A431 세포와는 특이적으로 결합하여 양으로 이동된 히스토그램이 나타나는 반면, MDA-MB-453 세포에서는 히스토그램의 유의한 변화가 나타나지 않음을 확인하였다(도 11

참조).

- [0070] 또한, 본 발명의 독소루비신, 독소루비신이 포획된 엑소솜, 독소루비신이 포획되고 표면에 항EGFR 압타머가 부착된 엑소솜을 인간 상피암 세포주 A431 및 인간 유방암 세포주 MDA-MB-453 세포에 처리하여 시험관 내 세포독성을 확인한 결과, 유의미한 IC<sub>50</sub> 차이값이 없음을 확인하여(도 13a 참조) 엑소솜으로 약물을 포획해도 약물의 효과를 감소시키지 않음을 확인하였다.
- [0072] 이하 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.
- [0073] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.
- [0075] <실시예 1> 시료의 준비
- [0076] <1-1> 시약
- [0077] DSPE-PEG2000-Mal(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide(polyethylene)2000])은 아반티 폴라 리피드사(Avanti Polar Lipid, Inc., Alabaster, AL, USA)에서 구입하였다. 독소루비신(Doxorubicin)은 시그마 알드리지(Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 3' 말단에서 설프히드릴 그룹(sulfhydryl group)으로 작용화된 항EGFR 압타머는 압타머 사이언스(Aptamer Science Inc., Pohang, Korea)에서 구입하였다. PD-10 컬럼은 GE 헬스케어(Piscataway, NJ, USA)에서 구입하였다. 3K, 30K, 50K 분자량 컷-오프(cut-off) 및 막 여과 장치를 갖는 아미콘(Amicon)필터는 밀리포어(Millipore, Billerica, Massachusetts, USA)에서 구입하였다.
- [0079] <1-2> 세포주
- [0080] 인간 상피암 세포주 A431 및 인간 유방암 세포주 MDA-MB-453은 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. 마우스 흑색종 세포주 B16BL6은 MD 앤더슨 암센터(MD Anderson Cancer Center, Houston, USA)의 Dr. I.J.Fidler에 의해 제공되었다.
- [0081] A431 세포 및 B16BL6 세포는 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C에서 10% 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS; Welgene Inc., Gyeongsan, Korea), 100 IU/mL 페니실린(penicillin; Gibco, Carlsbad, CA) 및 100 µg/mL 스트렙토마이신(streptomycin; Gibco)이 보충된 DMEM(Welgene Inc.) 및 MEM(Welgene Inc.)에서 배양하였다. MDA-MB-453 세포는 37 °C에서 10% FBS, 100 IU/mL 페니실린 및 100 µg/mL 스트렙토마이신이 보충된 레이보비츠(Leibovitz) L-15 배지(Welgene Inc.)에서 배양하였다.
- [0083] <실시예 2> 약물이 포획된 엑소솜 제조
- [0084] <2-1> 엑소솜 분리
- [0085] B16BL6 세포에서 막 여과 방법 및 크기배제 크로마토그래피 방법을 이용하여 엑소솜을 분리하였다.
- [0086] 구체적으로, B16BL6 세포의 세포밀집도가 세포배양배지의 80-90%에 도달했을 때 FBS가 있는 배양배지를 제거하고 인산완충식염수(phosphate buffer saline, PBS)로 3회 세척하여 FBS에서 엑소솜을 제거하였다. 세척 후 세포를 37 °C에서 48시간 동안 FBS 없는 MEM에서 배양하였다. 배양 상청액을 50 ml 튜브에 옮긴 후, 300 x g로 5분 동안 원심분리하고 4 °C에서 4000 x g로 30분동안 원심분리하여 세포 및 세포 잔해물을 제거하였다.
- [0087] 세포 및 세포 잔해물이 제거된 배양 상청액을 기공크기가 0.22 µm의 셀룰로오스 막으로 여과시키고, 여과된 배양 상청액 600 ml을 50 K MWCO의 막 여과 장치를 갖는 아미콘 필터를 이용하여 1 ml로 농축시켰다. 농축된 상청액을 다시 4 °C에서 14000 x g로 10분동안 원심분리하여 큰 소포 및 단백질 응집체를 제거하였다. 상기 단백질 응집체가 제거된 상청액을 52.2 ml의 베트볼륨(bed volume, BV)으로 CL-4B 컬럼에 통과시켜 엑소솜을 분리하였다. 상기 CL-4B 컬럼은 300 mM 인산암모늄 완충액(pH 7.4)로 평형화되고, 높이는 29 cm, 지름이 1.5 cm이다.
- [0089] 수집된 샘플의 단백질 농도를 확인한 결과, 2개의 피크가 나타남을 확인하였다(도 1의 (A)).
- [0090] 수집된 샘플의 동적 광산란(Dynamic light scattering, DLS)를 분석한 결과, 16 내지 20분에서 비교적 낮은 분산지수(polydispersity index, PDI)값(0.2 미만) 및 높은 평균 카운트 속도(mean count rates)를 확인하였다(도 1의 (B)).
- [0091] 수집된 샘플의 직경을 확인한 결과, 나노입자의 직경이 200 nm로 비교적 균일함을 확인하였다(도 1의 (C)).

- [0092] 정제된 엑소좀을 분석한 결과, 엑소좀 마커인 CD9 및 Tsg101에서 강한 밴드가 나타남을 확인하였고, B16BL6의 36번째 분획에서는 CD9이 없고 Tsg101이 미량 존재함을 확인하였다(도 2).
- [0093] 상기 결과를 통해 엑소좀이 CL-4B 컬럼을 이용한 크기 배제 크로마토그래피를 통해 성공적으로 분리되었음을 확인하였다.
- [0095] <2-2> 독소루비신 포획
- [0096] 인산구배법을 이용하여 실시예 <2-1>에서 추출한 엑소좀 내부로 독소루비신(Doxorubicin, Dox)을 포획하였다.
- [0097] 구체적으로, 인산암모늄 완충액(pH 7.4) 300 mM 에서 상기 엑소좀을 12시간 배양하여 인산 암모늄으로 엑소좀 내부를 평형화한 후 PD-10 컬럼을 통과시켜 엑소좀 외부의 인산암모늄 완충액을 HEPES EDTA(Hydroxyethyl piperazine Ethane Sulfonic acid, 하이드록시에틸피페라진에테인설포산; HEPES 25mM, NaCl 140mM, EDTA 2mM, pH 7.4) 완충액으로 교환하였다.
- [0098] Dox 농도에 따른 약물 포획 효율을 확인하기 위해, 외부 완충액이 교환된 500  $\mu$ l의 엑소좀을 진탕시키면서 37  $^{\circ}$ C에서 다양한 농도(10, 20, 30, 33 및 50  $\mu$ g)의 Dox와 배양하였다. 또한, 배양시간에 따른 약물 효율을 확인하기 위해 500  $\mu$ l 엑소좀을 37  $^{\circ}$ C에서 진탕시키면서 Dox와 다양한 시간(24, 48 및 72 시간) 동안 배양하였다.
- [0099] 배양 후 HEPES 완충액으로 평형화된 PD-10 컬럼에 통과시켜 남아있는 독소루비신을 제거하고 용출된 샘플의 독소루비신 농도를 495 nm의 흡광도에서 Infinite 200 Pro NanoQuant(TECAN Group Ltd., Mannedorf, Switzerland)를 사용하여 측정하였다. 독소루비신이 포획된 엑소좀을 Exo-Dox로 명명하였다.
- [0101] 그 결과, 엑소좀 내부의 인산암모늄 완충액과 독소루비신은 1:1.16의 몰비로 엑소좀에 포획되었고, Dox 농도 20  $\mu$ g에서 15.45%로 가장 우수하게 포획되었으며(도 5의 (A)), 24시간 후 10.1% 에서 72시간 후 25.02%로 약물 포획 효율이 증가함을 확인하였다(도 6의 (A)). 또한, Exo-Dox의 크기는 배양시간에 따라 약간 증가함을 확인하였다(도 6의 (B)).
- [0103] <2-3> 표면에 항EGFR 압타머가 부착된 마이셀 제조
- [0104] 이황화 결합(disulfide bonds)에 의해 가교되지 않도록 보호된 압타머를 환원시켜 리포좀 DSPE-PEG<sub>2000</sub>-Mal의 말레이미드(maleimide) 말단에 접합시켰다.
- [0105] 구체적으로, HEPES 완충액에서 20 mM 트리스(2-카복시에틸)포스핀(Tris-(2-carboxyethyl) phosphine, TCEP, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 100  $\mu$ M 항EGFR 압타머와 혼합하고 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 배양하여 환원된 압타머를 PD-10 컬럼을 통과시켜 잔여 TCEP로부터 정제시킨 후, 압타머와 클로로포름 및 메탄올의 혼합물(2:1, v/v)을 0.2:1의 몰비로 DSPE-PEG<sub>2000</sub>-Mal과 혼합하고 실온에서 18시간동안 교반하면서 배양하였다. 배양 후 HEPES 완충액을 첨가하고 100 K 아미콘 튜브에서 4000  $\times$  g로 10분 동안 3회 원심분리하여 반응되지 않은 압타머를 제거하였다.
- [0107] 트리스/붕산염/EDTA(Tris/borate/EDTA, TBE) 완충액의 1.5% 아가로스젤 상에서 전기영동을 진행한 후 브로민화 에티듐(ethidium bromide, EtBr) 염색 및 UV 조명으로 확인한 결과, 자유 압타머 위치보다 높은 위치의 압타머 지질 접합체 밴드를 확인하여 DSPE-PEG<sub>2000</sub>-Mal의 maleimide 말단에 압타머가 성공적으로 부착됨을 확인하였다(도 7).
- [0109] <2-4> 엑소좀 및 Exo-Dox을 DSPE-PEG<sub>2000</sub>-Mal에 접합된 항EGFR 압타머에 부착
- [0110] DSPE-PEG<sub>2000</sub>-Mal에 접합된 항EGFR 압타머를 엑소좀 및 Exo-Dox에 부착하였다.
- [0111] 구체적으로, DSPE-PEG<sub>2000</sub>-Mal에 접합된 항EGFR 압타머와 엑소좀 및 Exo-Dox를 교반하면서 37  $^{\circ}$ C에서 4시간 동안 배양하였다. 나노 입자 표면상의 표적화 리간드 양은 결합 친화성에 영향을 줄 수 있으므로, 상기 압타머의 농도에 따른 부착 정도를 확인하기 위해 다양한 농도(2, 3, 또는 4 몰 %)의 압타머를 이용하였다. DSPE-PEG<sub>2000</sub>-Mal에 접합된 항EGFR 압타머가 부착된 엑소좀을 aptamo-Exo, DSPE-PEG<sub>2000</sub>-Mal에 접합된 항EGFR 압타머가 부착된 Exo-Dox를 aptamo-Exo-Dox로 명명하였다.
- [0113] 1.5% 아가로스젤 상에서 aptamo-Exo 및 aptamo-Exo-Dox의 전기영동을 진행한 결과, 3 몰 %의 압타머는 엑소좀 및 Exo-Dox에 거의 부착되었지만 4 몰 %의 압타머는 특정량이 부착되지 않고 남아있음을 확인하였다(도 8의

(A)). 또한, 엑소좀 막에 압타머 접합체의 존재를 확인하기 위해 aptamo-Exo 및 aptamo-Exo-Dox에 10% SDS(sodium dodecyl sulfide)로 처리하고 용해시킨 후 전기영동을 진행한 결과, DSPE-PEG<sub>2000</sub>-Mal에 접합된 항 EGFR 압타머가 엑소좀에 부착되는 것을 확인하였다(도 8의 (B)).

[0115] <실험예 1> Exo-Dox 및 aptamo-Exo-Dox 물리화학적 특성 분석

[0116] 상기 <실시예 2>에서 제조한 Exo-Dox 및 aptamo-Exo-Dox의 입자크기 및 표면 전하를 확인하기 위해 Zetasizer Nano ZS90(말번인스트루먼트, Malvern Instruments Ltd. Malvern, UK)를 이용하여 동적광산란을 3회 반복하여 측정하였다 .

[0118] 그 결과, Exo-Dox의 직경은  $193.9 \pm 2.54$  nm이고 표면 전하는  $-9.39 \pm 0.64$  mV임을 확인하였다. aptamo-Exo-Dox의 직경은  $191.5 \pm 2.47$  nm이고 표면 전하는  $-8.11 \pm 0.70$  mV임을 확인하였다(표 1).

표 1

	Diameter	PDI	$\zeta$ -potential
Exosomes	$186.9 \pm 7.35$	$0.162 \pm 0.014$	$-8.19 \pm 0.905$
Exo-Dox	$193.9 \pm 2.54$	$0.164 \pm 0.004$	$-9.39 \pm 0.642$
Aptamo-Exo-Dox	$191.5 \pm 2.47$	$0.169 \pm 0.026$	$-8.11 \pm 0.702$

[0121] <실험예 2> aptamo-Exo-Dox의 혈청 안정성 실험

[0122] 상기 <실시예 2>에서 제조한 aptamo-Exo-Dox의 혈청의 존재 하에서 안정성을 확인하기 위해 aptamo-Exo-Dox 입자를 FBS(총 부피 0.5ml)에 첨가한 후 37℃에서 다양한 시간(0.5, 2, 6, 12, 24 및 48시간)동안 배양한 후, 입자분석기를 이용하여 입자크기의 변화를 3회 반복하여 측정하였다.

[0124] 그 결과, 50% 혈청의 존재하에서 aptamo-Exo-Dox의 유의한 크기변화가 확인되지 않아 혈청 및 혈액에서 안정함을 확인하였다(도 9).

[0126] <실험예 3> EGF 수용체 발현 확인

[0127] A431 및 MDA-MB-453 세포의 EGFR 발현 수준을 면역 블롯 분석을 통해 확인하였다.

[0128] 구체적으로, A431 및 MDA-MB-453 세포를 2 mL의 MEM, DMEM 또는 L-15 배지를 함유하는 6 웰 플레이트에 웰 당  $5 \times 10^5$  cells/well로 분주하고 2일동안 배양 후, 프로테아제 억제제(Thermo Scientific) 및 세포 용해 완충액(RIPA buffer, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) 200  $\mu$ l에 용해시켰다. 세포 용출액(cell lysates)을 1.5 mL tube에 넣은 후  $14,000 \times g$  에서 4 °C, 10분 동안 원심분리 하였다. 원심분리 후 상청액을 새로운 튜브에 옮긴 후 세포 용출액 및 엑소좀의 단백질 농도를 소 감마 글로불린(bovine gamma globulin, BGG) 표준 세트(Bio rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 확인하였다.

[0130] 그 결과, A431 세포에서 EGFR이 과발현되고 MDA-MB-453 세포에서 EGFR이 결핍되는 것을 확인하였다(도 10).

[0132] <실험예 4> 압타머 및 aptamo-Exo-Dox의 결합 친화도 분석

[0133] 제조된 압타머 및 aptamo-Exo-Dox의 EGF 수용체에 대한 결합 친화도를 유세포분석을 통해 확인하였다,

[0134] 구체적으로 A431 세포 및 MDA-MB-453 세포( $1 \times 10^5$  cells /1 mL)를 다양한 몰%(0.5, 1.5 및 3 몰%)의 20 nM 항EGFR 압타머 또는 항EGFR 압타머-DSPE-PEG<sub>2000</sub>-Mal가 부착된 엑소좀에 처리하고 4 °C, 30분동안 교반하였다. 상기 세포현탁액을 0.1%의 아자이드화 나트륨(sodiumazide) 및 1%의 소 혈청 알부민(bovine serum albumin, BSA)이 포함된 PBS(pH 7.4)로 2회 세척하였다.

[0135] 총 부피 800  $\mu$ L PBS에 포함된 각 샘플을 FACS Calibur 유세포 분석기(벡톤 디킨슨, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) 및 CellQuest 소프트웨어 (BD 바이오사이언스, BD Biosciences)로 분석 하였다.

[0137] 그 결과, EGFR 과발현 A431 세포에서 양으로 이동된 히스토그램이 나타나는 반면 EGFR 결핍 MDA-MB-453 세포에서는 나타나지 않음을 확인하여 제조된 압타머가 암세포에서 발현된 EGF 수용체에 강력하고 특이적인 결합 친화성이 있음을 확인하였다(도 11). 또한, 0.5 몰%의 항EGFR 압타머 또는 항EGFR 압타머-DSPE-PEG<sub>2000</sub>-Mal가 결합된 엑소좀에서 평균 형광강도(mean fluorescence intensities, MFIs)를 확인하여 압타머와 엑소좀의 결합이 포화됨

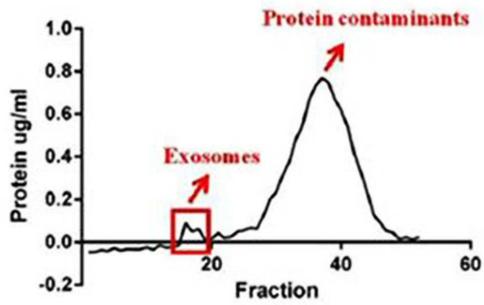
을 확인하였다(도 12).

- [0139] <실험예 5> aptamo-Exo-Dox의 *in vitro* 세포 독성 분석
- [0140] aptamo-Exo-Dox의 시험관내 세포독성을 확인하기 위해 셀 카운팅 키트(Cell Counting Kit-8, CCK-8; 도진도 실험실, Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)를 통해 분석하였다.
- [0141] 구체적으로, A431 및 MDA-MB-453 세포를 96 웰 플레이트에 웰 당  $1 \times 10^4$  cells/well로 분주하고 2일동안 배양한 후, 다양한 농도(0, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10  $\mu$ M)의 Dox, Exo-Dox 또는 aptamo-Exo-Dox를 처리하고 37  $^{\circ}$ C, 2일동안 10 % FBS를 함유하는 100  $\mu$ L DMEM에서 배양 하였다. 배양한 후 10  $\mu$ L의 세포 현탁액을 6 웰 플레이트의 덮개 유리에 분주하고 2일동안 배양하고 10  $\mu$ L의 CCK-8 용액으로 처리하고 A431 세포를 30분, MDA-MB-453 세포를 1시간 동안 배양하였다.
- [0142] 배양된 A431 및 MDA-MB-453 세포의 450 nm에서 흡광도를 Infinite 200 Pro NanoQuant(테칸, TECAN)로 측정하고 IC<sub>50</sub>를 GraphPad (프리즘 소프트웨어, Prism software, Inc., La Jolla, CA, USA)를 이용하여 계산하였다.
- [0144] 그 결과, A431 세포에 처리한 Dox, Exo-Dox 및 aptamo-Exo-Dox의 IC<sub>50</sub> 값이 각각  $2.62 \pm 1.08$ ,  $3.24 \pm 1.08$  및  $2.72 \pm 1.13$   $\mu$ M로 유의적 변화가 없음(도 13a)을 확인하였고, MDA-MB-453 세포에 처리한 Dox, Exo-Dox 및 aptamo-Exo-Dox의 IC<sub>50</sub> 값이 각각  $2.34 \pm 1.18$ ,  $6.48 \pm 1.16$  및  $4.86 \pm 1.17$   $\mu$ M로 유의적 변화가 없음(도 13b)을 확인하여, 엑소좀에 포획되거나 항EGFR 압타머와 결합에도 독소루비신의 항암 활성에는 영향을 주지 않음을 확인하였다.

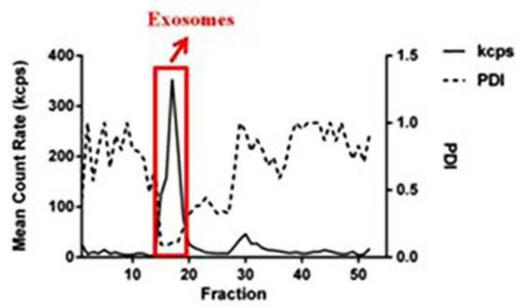
도면

도면1

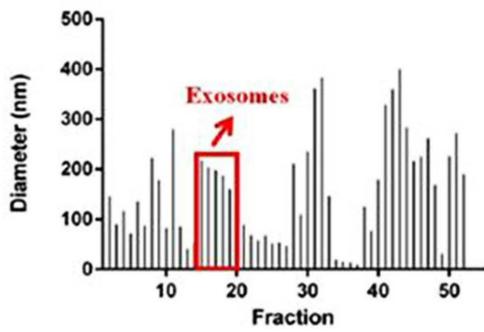
(A)



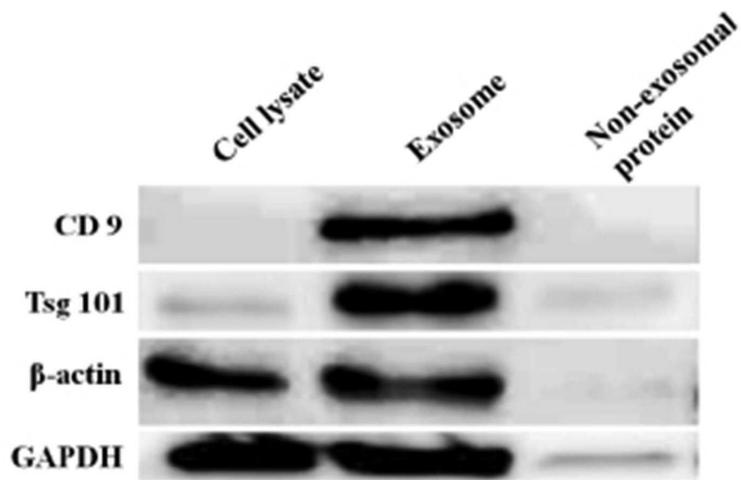
(B)



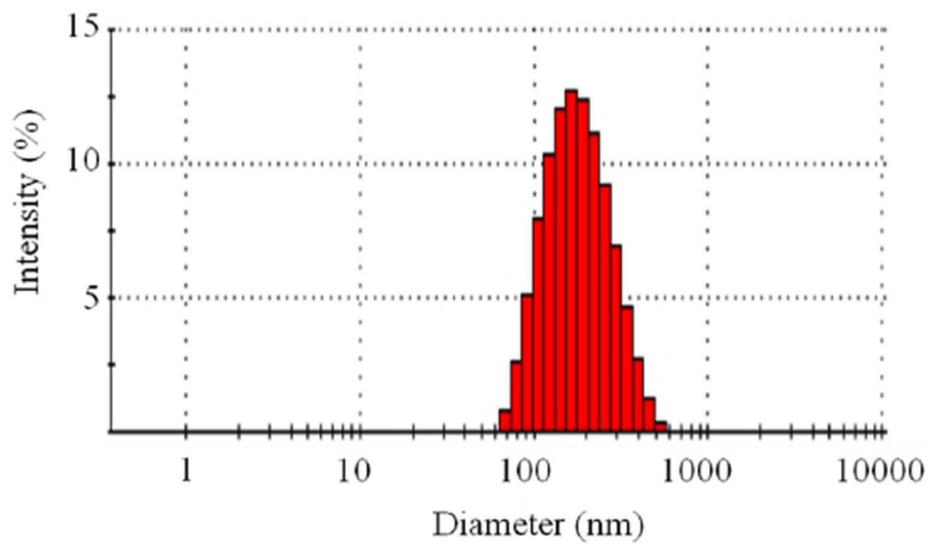
(C)



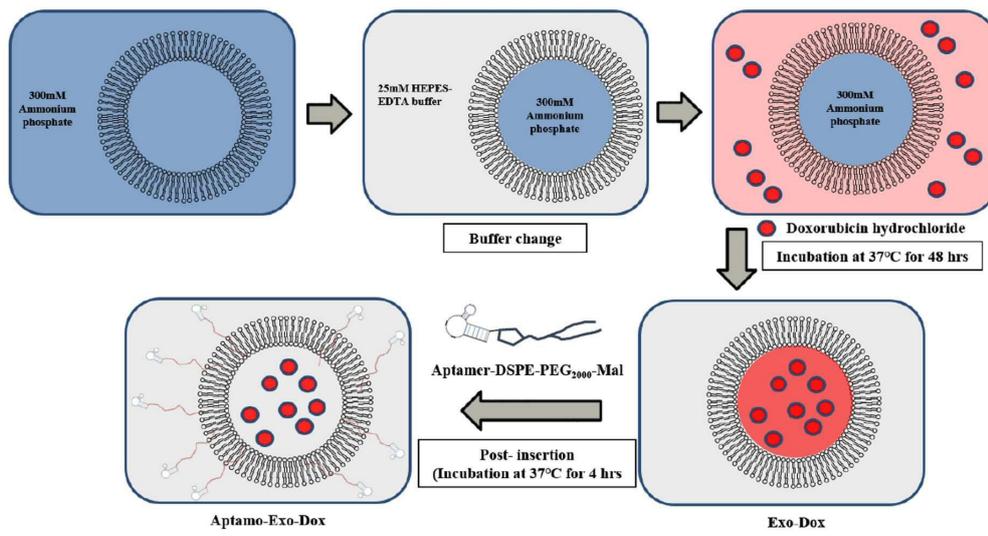
도면2



도면3

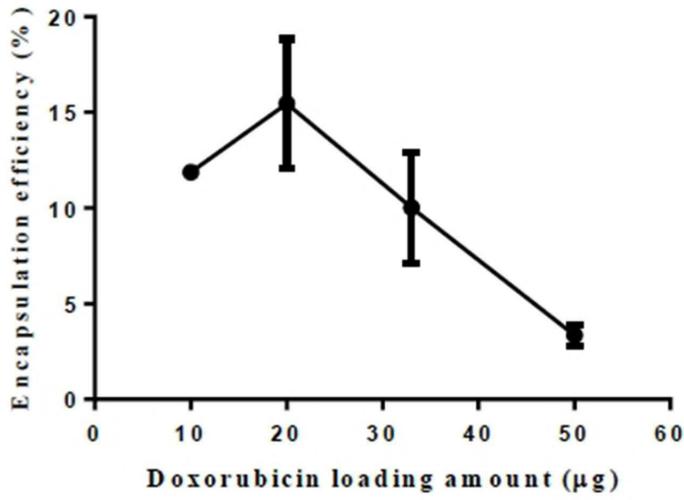


도면4

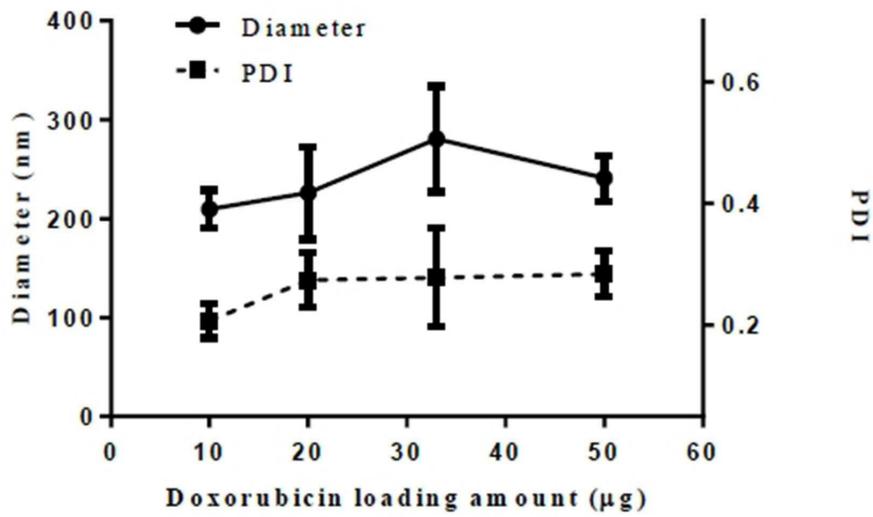


도면5

(A)

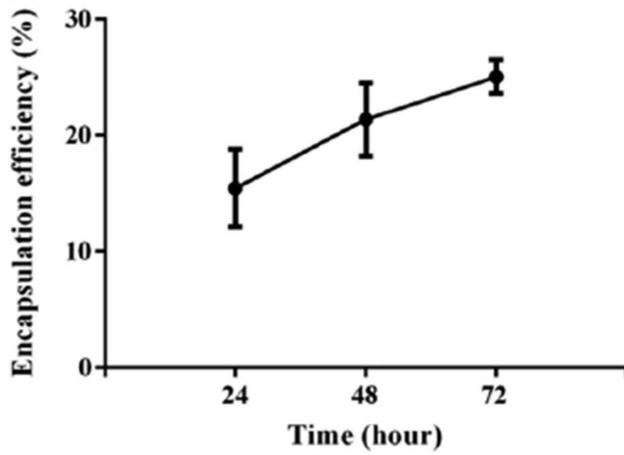


(B)

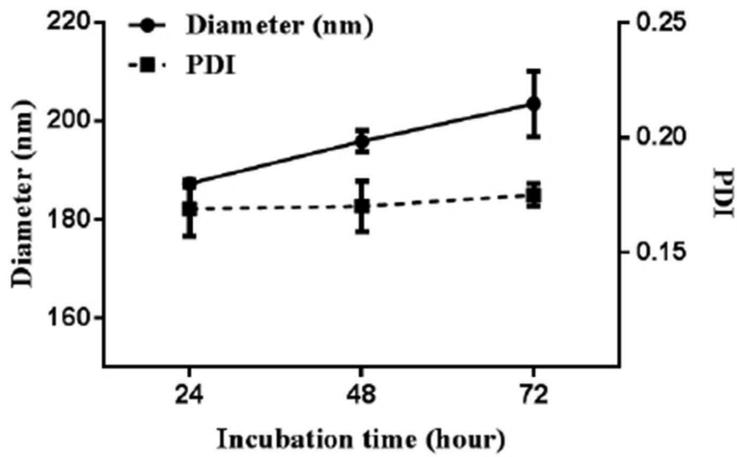


도면6

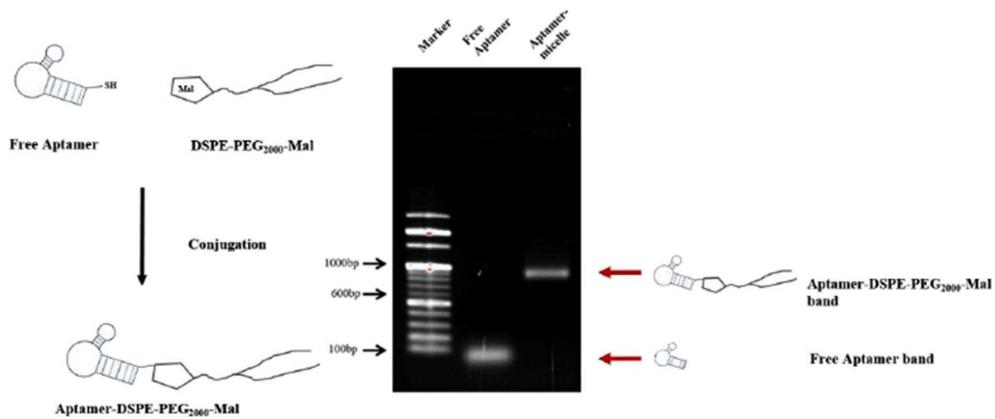
(A)



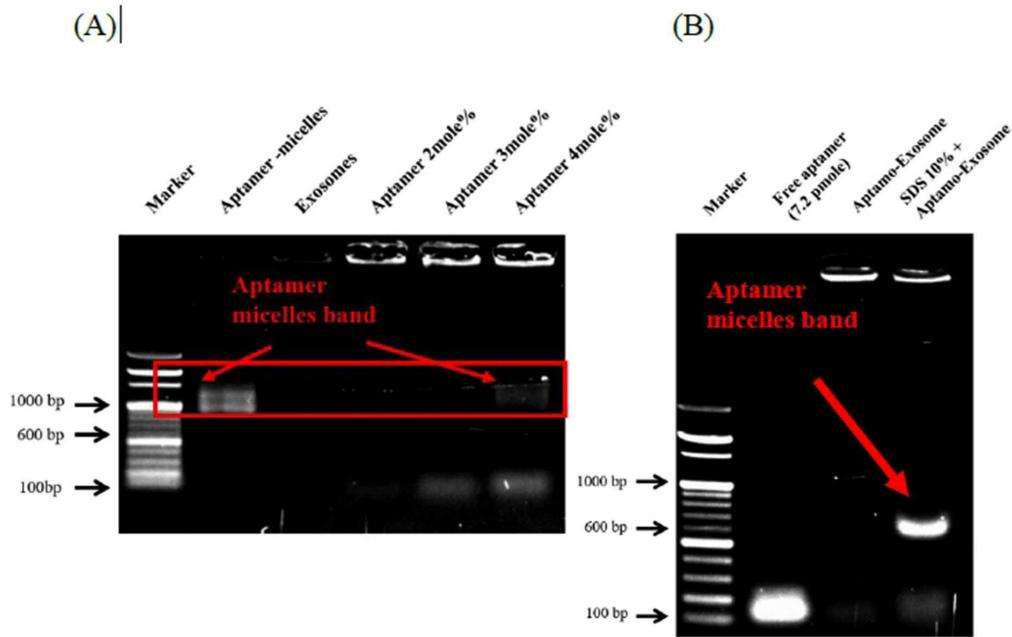
(B)



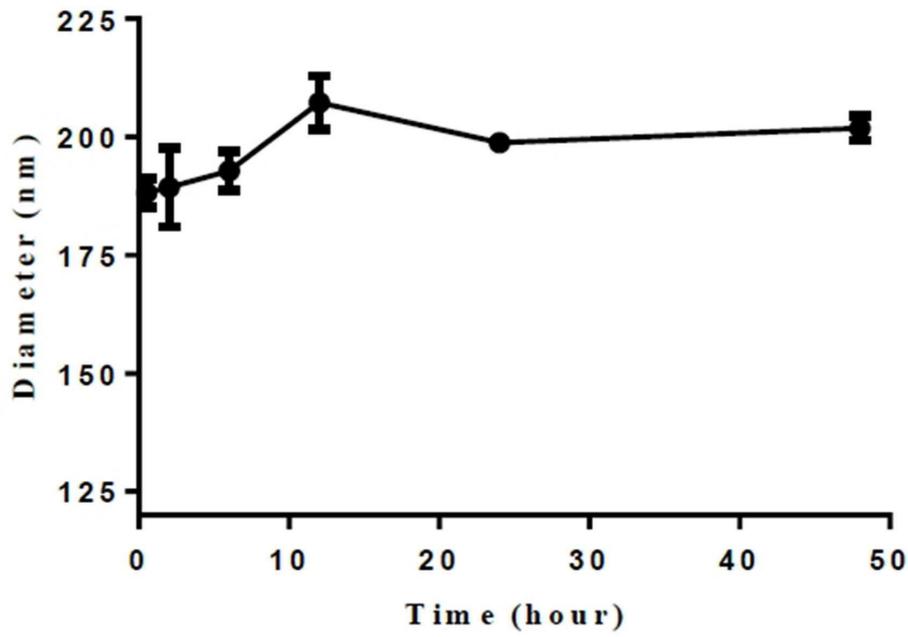
도면7



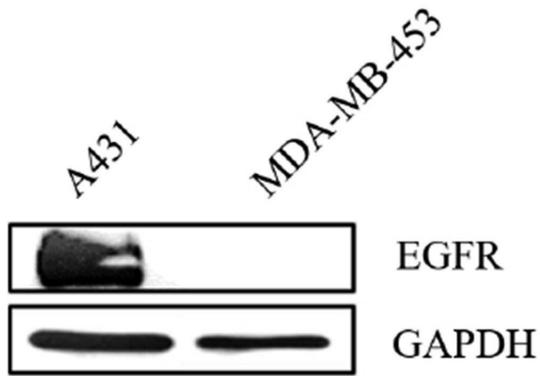
도면8



도면9

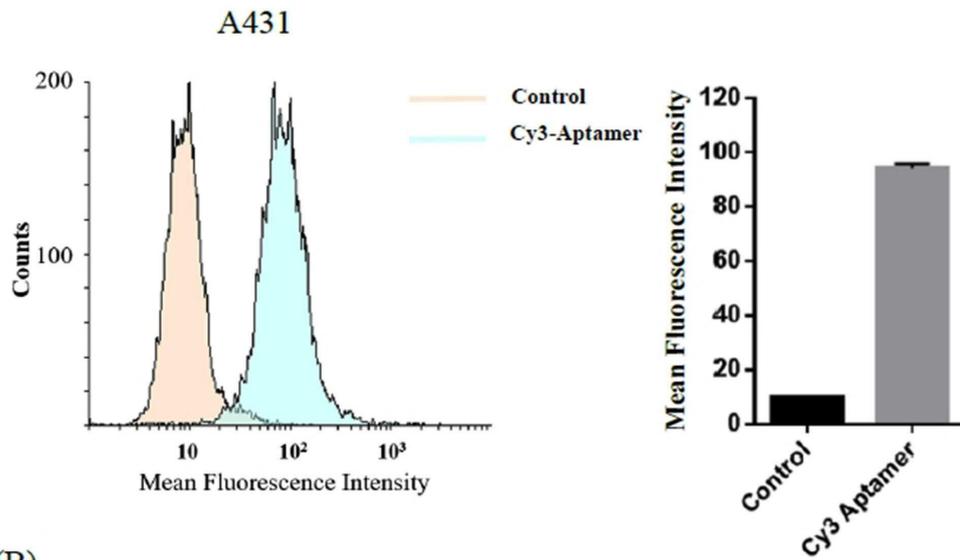


도면10

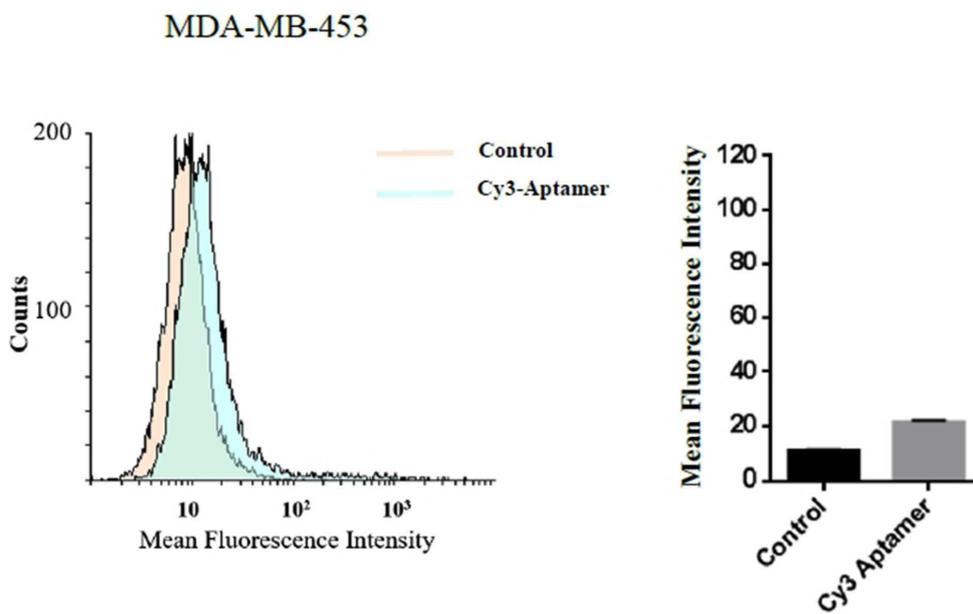


도면11

(A)

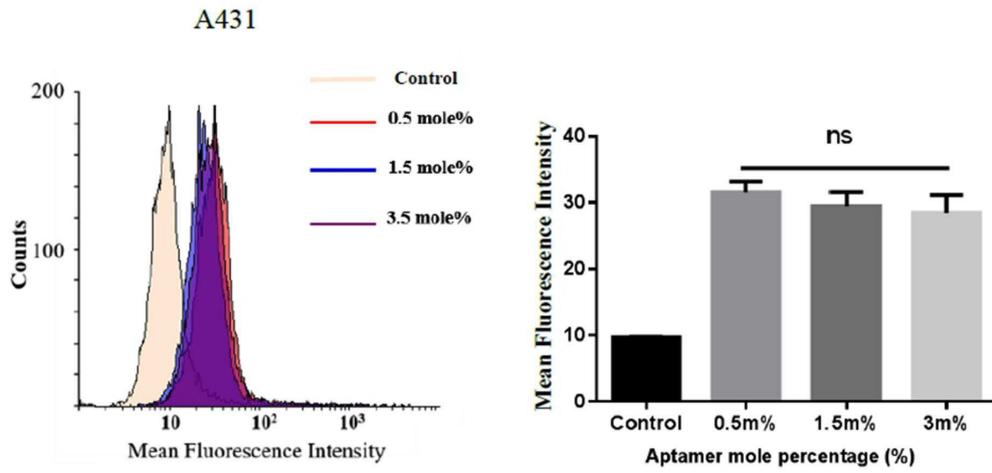


(B)

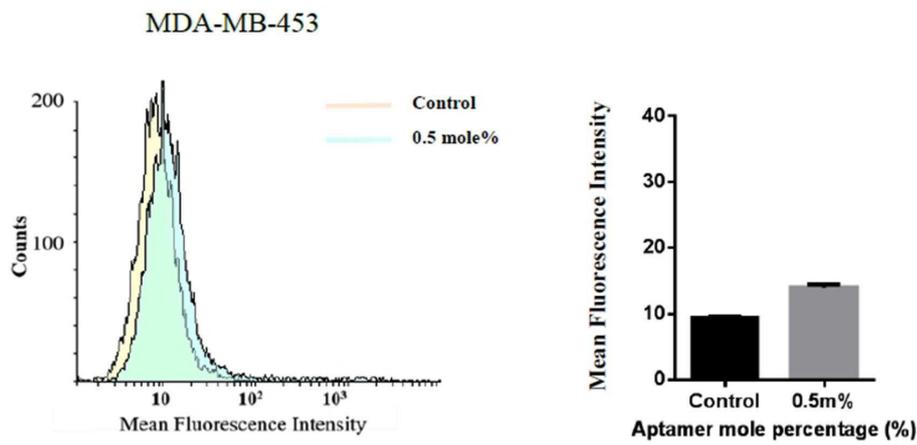


도면12

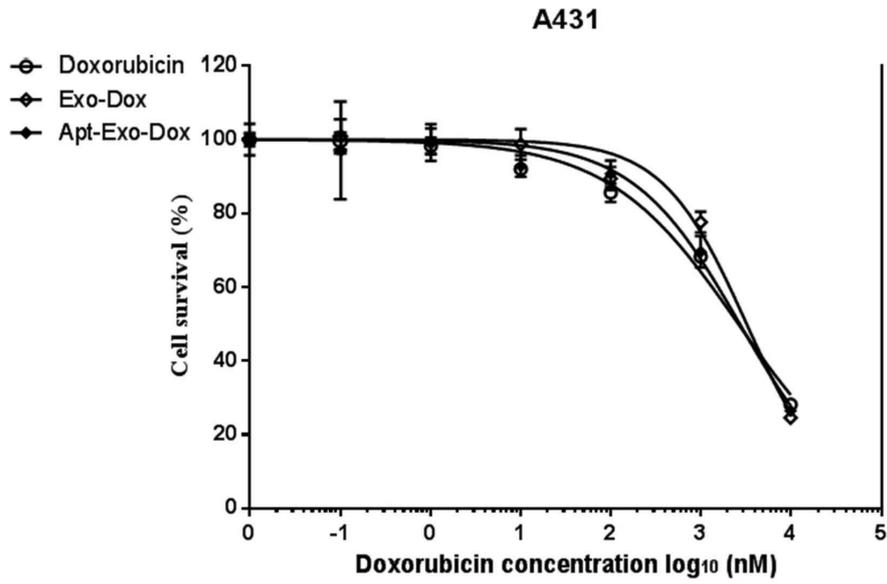
(A)



(B)

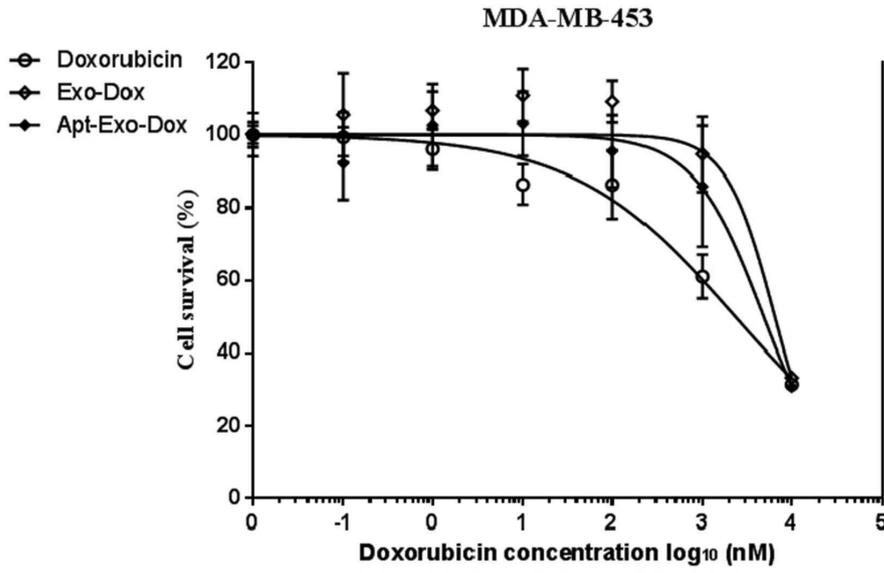


도면13a



	Dox	Exo-Dox	Apt-Exo-Dox
IC <sub>50</sub> (μM)	2.62 ± 1.08	3.24 ± 1.08	2.72 ± 1.13

도면13b



	Dox	Exo-Dox	Apt-Exo-Dox
IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	2.34 $\pm$ 1.18	6.48 $\pm$ 1.16	4.86 $\pm$ 1.17