



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년01월19일
(11) 등록번호 10-1820513
(24) 등록일자 2018년01월15일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/51 (2006.01) A61K 31/704 (2006.01)
A61K 47/24 (2017.01) A61K 47/42 (2017.01)
A61K 9/127 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
A61K 9/5115 (2013.01)
A61K 31/704 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2016-0135580</p> <p>(22) 출원일자 2016년10월19일
심사청구일자 2016년10월19일</p> <p>(30) 우선권주장
1020160101057 2016년08월09일 대한민국(KR)</p> <p>(56) 선행기술조사문헌
KR1020070088391 A</p> | <p>(73) 특허권자
서울대학교 산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)</p> <p>(72) 발명자
오유경
서울특별시 강남구 압구정로 321
김미경
서울특별시 관악구 신림로29길 8
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
이원희</p> |
|--|---|

전체 청구항 수 : 총 8 항

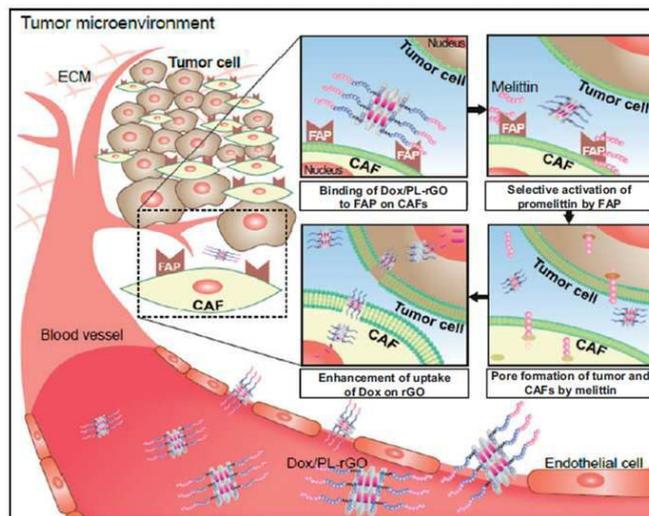
심사관 : 박제현

(54) 발명의 명칭 **종양 미세환경 감응형 프로펩타이드 지질 유도체 및 나노구조체를 포함하는 나노복합체 및 그 용도**

(57) 요약

본원은 하나 이상의 종양미세환경 감응형 펩타이드 지질 접합체; 및 나노구조체를 포함하는 약물전달용 나노복합체 및 이를 포함하는 항암 약물전달체를 개시한다. 본원에 따른 나노복합체는 종양미세환경에서 과발현되는 단백질에 의해 특이적으로 절단되는 펩타이드가 미세막공을 형성하여, 종양 세포 특이적으로 항암제를 효율적으로 전달할 수 있다. 따라서 본원의 약물전달체는 세포독성이 있는 약물을 선택적으로 활성화시키고, 그럼으로써 정상 조직에 대한 세포독성 약물의 부작용을 감소시킬 수 있다는 장점을 가진다.

대표도 - 도1c



(52) CPC특허분류

A61K 47/24 (2013.01)

A61K 47/42 (2013.01)

A61K 9/127 (2013.01)

A61K 9/5169 (2013.01)

(72) 발명자

김진영

경기도 시흥시 상직길 9

손유나

경기도 성남시 분당구 판교원로286번길 3

박주연

서울특별시 관악구 관악로12길 86

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016900323

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 도약연구지원사업(도전)

연구과제명 중앙미세환경 특이적 의약 표적전달 활성화 기술

기여율 1/1

주관기관 서울대학교 산학협력단

연구기간 2016.05.01 ~ 2017.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

하나 이상의 중양미세환경 감응형 펩타이드 지질 접합체; 및

항암제를 탑재하기 위한 나노구조체를 포함하는 항암제 전달용 나노복합체로,

상기 중양미세환경 감응형 펩타이드 지질 접합체는, 서열번호 1 또는 서열번호 2의, 중양미세환경 감응형 지질 펩타이드 및 미세막공 펩타이드를 N-말단에서 C-말단의 순서대로 포함하는 프로펩타이드; 및 상기 프로펩타이드의 N-말단에 친수성 고분자를 통해 연결된 양친매성(amphiphilic) 제1 인지질을 포함하며,

상기 나노구조체는 환원형 그래핀옥사이드(reduced graphene oxide), 그래핀옥사이드(graphene oxide), 또는 그래핀(graphene)인 나노시트이거나, 제2 인지질을 포함하여 형성되는 리포솜 또는 고형지질 나노입자인 구형구조체이며,

상기 친수성 고분자는 폴리에틸렌글리콜, 폴리아크릴산, 폴리비닐 알콜, 폴리하이드록시에틸 메타크릴레이트, 또는 히알루론산이며,

상기 지질 접합체의 양친매성 인지질을 통해 상기 펩타이드 지질 접합체와 연결된 것인, 항암제 전달용 나노복합체.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 양친매성 제1 인지질은포스파티딜 콜린, 포스파티딜 에탄올아민, 포스파티딜 이노시톨, 및 포스파티딜 세린으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 것인, 항암제 전달용 나노복합체.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 상기 양친매성 제1인지질은 DSPE(1,2-다이스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민)인 것인, 항암제 전달용 나노복합체.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 친수성 고분자는 평균 분자량은 500 내지 7000 Da의 폴리에틸렌글리콜인, 항암제 전달용 나노복합체.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 펩타이드 지질 접합체 대 상기 나노구조체는 20:1 내지 2:1의 중량비로 포함되는 것인, 항암제 전달용 나노복합체.

청구항 8

제 1 항 내지 제3항, 제6항 및 제 7 항 중 어느 한 항에 따른 나노복합체 및 항암제를 포함하는 항암용 조성물로, 상기 항암제는 상기 나노복합체의 나노구조체에 탑재되는 것인, 항암용 조성물.

청구항 9

제 8 항에 있어서,

상기 나노복합체 대 항암제는 1:1 내지 5:1의 중량비로 탑재되는 것인, 항암용 조성물.

청구항 10

제 8 항에 있어서,

상기 항암제는 사이클로포스파마이드(cyclophosphamide), 독소루비신(doxorubicin), 에토포시드(etoposide), 에토포시드 포스페이트(etoposide phosphate), 테니포시드(teniposide), 카미노마이신(carminomycin), 다우노루비신(daunorubicin), 아미노프테린(aminopterin), 메쏘트리세이트(methotrexate), 메쏘프테린(methopterin), 디클로로메쏘트리세이트(dichloromethotrexate), 마이토마이신 씨(mitomycin C), 파클리탁셀(paclitaxel), 택솔(Taxol), 에포틸론(epothilone), 포르피로마이신(porfiromycin), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 6-메르캅토평린(6-mercaptopurine), 겐시타빈(gemcitabine), 시토신 아라비노사이드(cytosine arabinoside), 포도필로톡신(podophyllotoxin), 멜팔란(melphalan), 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine), 레우로시딘(leurosidine), 빈데신(vindesine), 레우로신(leurosine), 에스트라무스틴(estramustine), 시스플라틴(cisplatin), 카르보플라틴(carboplatin), 블레오마이신(bleomycin), 타목시펜(tamoxifen), 이포스파미드(ifosfamide), 헥사메틸 멜라민(hexamethyl melamine), 티오테파(thiotepa), 시타라빈(cytarabin), 이다트리세이트(idatrexate), 트리메트리세이트(trimetrexate), 다카르바진(dacarbazine), 엘-아스파라기나제(L-asparaginase), 캄프토테신(camptothecin), 시피티-11(CPT-11), 이리노테칸(irinotecan), 토포테칸(topotecan), 아라-씨(Ara-C), 비칼루타미드(bicalutamide), 플루타미드(flutamide), 루프로리드(leuprolide), 부설펜(busulphan), 인터페론류(interferons), 또는 인터루킨류(interleukins) 중 하나 이상인, 항암용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본원은 종양 미세환경-활성형 프로펩타이드 지질 유도체 및 나노구조체를 포함하는 나노복합체 및 이를 약물전달체로 사용하는 기술에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 암의 치료방법은 크게 외과적 수술을 통한 종양의 제거와 항암제를 이용하여 암세포를 사멸시키는 화학요법으로 나누어진다. 특히 후자의 경우, 정상적 세포의 사멸로 인한 부작용으로 인해, 종양과 관련된 세포만을 특이적으로 사멸시키는 기술의 개발이 필요한 실정이다.

[0004] 이를 위해 최근 이용되는 것이 종양 미세환경의 특이점을 이용하는 것이다. 종양은 암 세포뿐 아니라 이와 관련된 기질 세포, 섬유아세포, 면역, 염증 매개 세포, 및 혈관내피세포 등 다양한 일반 세포들로 구성되어 있다. 또한, 빠르게 증식하는 암 세포들에 의해서 저산소 및 산성상태에 노출되어 있으며 암 세포들의 전이 및 침윤과 관련된 다양한 효소들을 발현 및 분비한다. 따라서 종양 미세환경은 신규 항암제 개발의 표적으로 연구되거나,

기존 항암제의 저항성 연구에도 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 종양 연구에 있어 종양 미세환경의 중요성이 부각되고 있다. 특히, 세포 수준에서는 항암 효과가 우수한 표적 항암제가 실제 임상에서는 부분적 반응을 보이며 내성을 획득하는 현상 또한, 종양 미세환경과 관련 있는, 종양 세포 자체 보다는 종양 미세환경의 특정 세포를 공격하여 항암효과를 기대하는 새로운 개념의 항암제를 개발하고자 하는 노력이 있다.

[0005] 미국 공개공보 제2014-0255300호는 고행암에 사용되는 fibroblast activation protein (FAP)-활성화 프로테아좀 저해제에 관한 것으로 FAP에 의해 활성화되는 프로트릭인 프로테아좀 저해제를 개시하고 있다.

[0006] 미국 공개특허공보 제2008-0280781호는 막투과성을 증진시키는 방법 및 조성물에 관한 것으로 멜리틴과 항균 펩타이드의 융합단백질을 개시한다.

[0007] 저분자 약물들의 투과도, 안정성 등을 개선하기 위하여 생체내에서 대사되어 활성화되는 프로트릭 연구는 많이 보고되고 있다. 하지만 정상 조직에서는 활성화 되지 않은 상태로 혈류를 순환하다가 종양 조직에 도달하여 종양 미세환경에 존재하는 세포 표면 단백질에 의하여 활성화 된 이후에 종양 세포내로 약물을 선택적으로 전달하는 프로-약물전달체 연구는 미진한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본원은 종양 미세환경에 존재하는 세포 표면 단백질에 의하여 활성화되고 이후에 종양 세포내로 특이적으로 약물을 선택적으로 전달할 수 있는 기술을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 한 양태에서 본원은 하나 이상의 종양미세환경 감응형 펩타이드 지질 접합체; 및 나노구조체를 포함하는 약물전달용 나노복합체를 제공하며, 상기 종양미세환경 감응형 펩타이드 지질 접합체는, 서열번호 1 또는 서열번호 2의, 종양미세환경 감응형 기질 펩타이드 및 미세막공 펩타이드를 N-말단에서 C-말단의 순서대로 포함하는 프로펩타이드; 및 상기 프로펩타이드의 N-말단에 친수성고분자를 통해 연결된 양친매성(amphiphilic) 지질을 포함하며, 상기 나노구조체는 상기 지질 접합체의 양친매성 지질을 통해 상기 펩타이드 지질 접합체와 연결되는 것을 특징으로 한다.

[0012] 본원에서 친수성 고분자는 프로펩타이드와 나노구조체 사이에 존재하여 포르펩타이드와 나노구조체 표면간의 소수성 상호작용을 방지하며, 혈액에 존재할 경우, 혈액내 다른 단백질이 나노구조체 표면에 흡착하는 것을 방지할 수 있어, 혈액내 체류 시간이 증가되며, 그 결과 종양 조직에 투과되는 증대된다. 따라서 이러한 목적을 달성하는 예를 들면 폴리에틸렌글리콜, 폴리아크릴산, 폴리비닐 알콜, 폴리에틸렌 옥사이드, 폴리하이드록시에틸 메타크릴레이트, 또는 히알루론산과 같은 다양한 친수성 고분자 물질이 본원에 사용될 수 있으나, 이로 제한하는 것은 아니다. 본원에 따른 일 구현예에서 특히 친수성 고분자로는 평균 분자량 500 내지 7000 Da의 폴리에틸렌글리콜이 사용되며, 상기과 같은 우수한 효과를 달성하였다.

[0013] 본원에서 양친매성 지질은 리포솜 표면 하전 전하와 프로펩타이드 자체 하전 전하의 상호작용을 방지할 수 있어 보다 안정적이고 효율적 약물의 전달이 가능한 우수한 나노복합체의 형성이 가능하다. 따라서 이러한 목적을 달성하는 DSPE (1,2-다이스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민), 포스파티딜 콜린, 포스파티딜 에탄올아민, 포스파티딜 이노시톨, 및 포스파티딜 세린을 포함하는 양친매성 지질이 사용될 수 있으나, 이로 제한하는 것은 아니다. 본원에 따른 일 구현예에서는 특히 양친매성 지질로서 DSPE (1,2-다이스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민)를 사용되며, 상기과 같은 우수한 효과를 달성하였다.

[0014] 일 구현예에서 나노구조체로는 평면 또는 구형의 나노구조체가 사용될 수 있으며, 예를 들면 나노시트(sheet), 또는 구형구조체로 소포체의 일종인 리포솜 또는 고행지질 나노입자가 사용될 수 있다.

[0015] 본원에 따른 나노복합체에서 약물은 나노구조체에 탑재되어 암세포 특이적 약물 전달을 가능하게 하며, 이를 위해 프로펩타이드 지질접합체는 나노구조체에 탑재된다. 본원에 따른 나노복합체에서 프로펩타이드 지질 접합체 대 상기 나노구조체는 20:1 내지 2:1의 중량비로 포함될 수 있으며, 특히 2:1의 중량비로 사용되어 우수한 탑재 효율이 될 수 있다.

[0016] 다른 양태에서 본원은 또한 본원에 따른 나노복합체를 포함하는 항암제 전달용 조성물을 제공하며, 약물은 상기 복합체의 나노구조체에 탑재된다.

[0017] 또 다른 양태에서 본원은 인비트로 또는 동물에서 암세포에 본원에 따른 약물 전달용 나노복합체 및 항암제를 처리하는 단계를 포함하며, 상기 나노복합체에 포함된 프로펩타이드는 상기 암세포에서 발현되는 효소에 의해 절단되고, 상기 효소는 FAP (fibroblast activating protein)인, 인비트로에서 암세포 특이적으로 항암제를 전달하는 방법을 제공한다. 본원에 따른 방법은 ex vivo용 암세포 사멸, 각종 연구를 위한 연구 툴로서 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0019] 본원은 하나 이상의 종양미세환경 감응형 펩타이드 지질 접합체; 및 나노구조체를 포함하는 약물전달용 나노복합체 및 이를 포함하는 항암 약물전달체를 개시한다. 본원에 따른 나노복합체는 종양미세환경에서 과발현되는 단백질에 의해 특이적으로 절단되어 활성화되는 펩타이드가 미세막공을 형성하여, 종양 세포 특이적으로 항암제를 효율적으로 전달할 수 있다.

[0020] 따라서, 본원에 따른 나노복합체는 종양 미세환경내에 존재하는 각종 암 세포에 대한 약물 전달 효율을 증가시켜 암 세포로의 약물의 효과를 증가시킬 수 있고 비선택적 약물 전달로 인한 세포독성을 감소시키므로, 정상조직에 대한 약물의 부작용을 감소시켜 약물의 전신 투여에 의한 부작용을 완화시킬 수 있다.

[0021] 아울러 항암제를 단독으로 사용할 때 나타나는 암세포에 의한 항암제 분해효과를 억제할 수 있어, 암세포의 항암제에 대한 감수성을 증가시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 본원의 일 구현예에 따른 독소루비신이 탑재된 프로멜리틴 지질 유도체-환원된 그래핀 옥사이드(Dox/PL-rGO) 나노시트 및 상기 물질의 작용기전을 도식적으로 나타낸 것이다. 도 1a는 FAP(fibroblast activation protein)-절단가능한 서열을 함유하는 프로멜리틴 지질 유도체 PL을 rGO 나노시트위에 고정시키고 얻어진 PL-rGO에 추가로 Dox를 탑재하여 제조한 Dox/PL-rGO를 도식적으로 나타낸 것이다. 도 1b는 본원의 일 구현예에 따른 종양 미세환경-활성형 프로펩타이드 지질 유도체 수식형 항암 약물 탑재 나노구조체에 대한 모식도를 나타낸다. 도 1c는 Dox/PL-rGO의 예측되는 작용기전의 모식도이다. CAF(종양-관련 섬유아세포)에서 과발현된 FAP에 의해 PL-rGO의 프로멜리틴 부분이 활성화되면 멜리틴이 방출된다. 주위 종양 세포 및 종양 미세환경의 세포로 멜리틴이 확산되면 막에서 기공 형성이 촉진되어, Dox-탑재된 rGO 나노시트의 세포내 유입을 증가시켜 항암 효능이 증가된다. CAFs = 종양-관련 섬유아세포(cancer-associated fibroblasts); Dox = 독소루비신; FAP = 섬유아세포 활성 단백질(fibroblast activation protein); PL = 프로멜리틴 지질 유도체(promelittin lipid derivative); rGO = 환원된 그래핀 옥사이드(reduced graphene oxide).

도 2는 독소루비신이 탑재된 프로멜리틴 지질 유도체-환원된 그래핀 옥사이드(Dox/PL-rGO) 나노시트의 특징을 규명한 것이다. 도 2a는 rGO, PL-rGO, 및 Dox/PL-rGO 나노시트의 크기를 동적광산란법(dynamic light scattering)으로 측정하였다. 예러바는 95% 신뢰구간(CIs)을 나타낸다. 도 2b는 rGO, PL-rGO, 및 Dox/PL-rGO 나노시트에 대한 제타 포텐셜 수치를 ELS-8000 instrument를 사용하여 22° 각도에서 레이저 Doppler 극소전기영동으로 측정하였다(*P< .05; †P< .01). 예러바는 95% 신뢰구간(CIs)을 나타낸다. Student-Newman-Keuls post hoc test와 함께 이원 분산 분석(Two-sided analysis of variance)을 이용하여 통계 분석을 하였다. 도 2c는 rGO 또는 PL-rGO 나노시트로의 Dox 흡착을 다양한 시점에서 유세포분석기로 분석하였다. D) rGO 나노시트로의 흡착에 대해 Dox를 담금질(quenching)함으로써 rGO 또는 PL-rGO로의 Dox 탑재 효율을 측정하였다. 예러바는 95% 신뢰구간(CIs)을 나타낸다. Dox = 독소루비신; PL = 프로멜리틴 지질 유도체; rGO = 환원된 그래핀 옥사이드.

도 3은 FAP 발현 및 mRBC 세포의 용혈을 나타낸 것이다. HT29 세포(3a) 및 CAF (3b)를 항-FAP 항체로 염색하였다. 유세포분석기로 형광-양성 세포를 측정하였다. 프로멜리틴 지질 유도체(PL)(3c) 및 PL-환원 그래핀 옥사이드(rGO)(3e)를 MMP9 또는 FAP로 처리하였다. HT29 세포 단독 또는 CAF와 공배양한 것에 PL(3d) 또는 PL-rGO(3f)를 처리하였다. 마우스 RBC에 대한 PL(3c 및 3d) 및 PL-rGO(3e 및 f)의 용혈 활성을 용혈분석법으로 정량하였다(n =3; *P<0.001). 예러바는 95% 신뢰구간을 나타낸다. Student-Newman-Keuls post hoc test와 더불어 양방 분산분석(Two sided analysis of variance)을 사용하여 통계 분석을 하였다. CAFs = 종양-관련 섬유아세포(cancer-associated fibroblasts); FAP = 섬유아세포 활성 단백질(fibroblast activation protein); IgG = 임뮤노글로불린 G; MMP9 = 매트릭스 메탈로펩티다아제(matrix metallopeptidase) 9.

도 4는 프로멜리틴 지질 유도체(PL)-환원된 그래핀 옥사이드(rGO) 나노시트가 FAP-양성, FAP-음성, 및 FAP 낙다

운 세포로 들어가는 것을 나타낸 것이다. 도 4a는 HT29 세포를 비처리 상태로 두거나 또는 형광 지질 염료로 표지된 rGO 또는 PL-rGO로 처리한 것이다. 도 4b는 공배양된 FAP 낙다운 CAF 및 HT29 세포를 비처리 상태로 두거나 형광 지질 염료로 표지된 rGO 또는 PL-rGO로 처리한 것이다. 도 4c는 공배양된 CAF 및 HT29 세포를 비처리 상태로 두거나 형광 지질 염료로 표지된 rGO 또는 PL-rGO로 처리한 것이다. 1시간 동안 배양한 후, 세포 형광을 공초점 현미경으로 관찰하였다. 스케일 바 = 20 μ m. PL = 프로멜리틴 지질 유도체; rGO = 환원된 그래핀 옥사이드.

도 5는 프로멜리틴 지질 유도체(PL)-환원된 그래핀 옥사이드(rGO) 나노시트로 전달된 독소루비신(Dox)의 인 비트로 항암 효능을 나타낸 것이다. 도 5a는 HT29 세포 단독 또는 FAP 낙다운 CAF 또는 FAP-양성 CAF를 Dox, PL, Dox + PL/rGO, Dox/rGO, PL-rGO, Dox + PL-rGO, 또는 Dox/PL-rGO로 3시간 동안 처리한 것이다. 비처리 세포를 대조군으로 사용하였다. 추가 24시간 더 배양한 후, 세포 카운팅 키트-8 분석기로 세포 생존력을 측정하였다. 예러 바는 95% 신뢰구간을 나타낸다(*P < 0.01; †P < .001). Student-Newman-Keuls post hoc test와 더불어 양방 분산분석(Two sided analysis of variance)을 사용하여 통계 분석을 하였다. 라이브(live) HT29 세포(도 5b), HT29 세포와 공배양한 FAP-낙다운 CAF(5c), 또는 HT29 세포와 공배양한 FAP-양성 CAF(5d)를 칼세인-AM으로 염색하여 형광 현미경으로 분석하였다. 스케일 바 = 250 μ m. CAF = 종양-관련 섬유아세포(cancer-associated fibroblast); Dox = 독소루비신; FAP = 섬유아세포 활성화 단백질(fibroblast activation protein); PL = 프로멜리틴 지질 유도체(promelittin lipid derivative); rGO = 환원된 그래핀 옥사이드(reduced graphene oxide).

도 6은 프로멜리틴 지질 유도체(PL)-환원된 그래핀 옥사이드(rGO) 나노시트의 생체 분포 및 종양 조직 침투를 나타낸 것이다. HT29 종양-함유 마우스(그룹당 5)에게 DSPE-PEG5000-Cy5.5 지질-표지된 rGO 또는 PL-rGO를 정맥 주사하였다. 도 6a는 24시간 후, 다양한 rGO 나노시트의 인 비보 분포를 분자 이미징 시스템을 사용하여 가시화한 것이다. 도 6b는 인비보 이미징 시스템을 사용하여 약물투여후(postdose) 72시간일때 비처리 그룹에 상대적인 종양 부위의 총 광자 수(photon count)를 정량한 것이다(*P < 0.01; †P < 0.001). 예러바는 95% 신뢰구간을 나타낸다. Student-Newman-Keuls post hoc test와 더불어 양방 분산분석(Two sided analysis of variance)을 사용하여 통계 분석을 하였다. 약물투여 후 1일째에 DSPE-PEG5000-Cy5.5 지질-표지된 rGO (6c) 또는 PL-rGO (6d)의 종양 투과 깊이를 eXplore Optix 시스템 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. Y-축은 종양 조직의 바닥(제로 수치)에서부터의 Z-축 깊이(mm)를 나타낸다. PL = 프로멜리틴 지질 유도체; rGO = 환원된 그래핀 옥사이드.

도 7은 독소루비신이 탑재된 프로멜리틴 지질 유도체-환원된 그래핀 옥사이드(Dox/PL-rGO) 나노시트의 인 비보 항암 효능 및 면역형광 염색을 나타낸 것이다. HT29 종양-함유 마우스(그룹당 5)에게 Dox (1mg/kg), PL (10mg/kg), Dox/rGO (1mg/kg Dox, 5mg/kg rGO), PL-rGO (10mg/kg PL, 5mg/kg rGO), 또는 Dox/PL-rGO (1mg/kg Dox, 10mg/kg PL, 5mg/kg rGO)를 이틀마다 총 세번 정맥 투여하였다. 도 7 a는 각 그룹당 종양 부피를 측정하였다(*P < .001). 예러 바는 95% 신뢰구간을 나타낸다. Student-Newman-Keuls post hoc test와 더불어 양방 분산 분석(Two sided analysis of variance)을 사용하여 통계 분석을 하였다. 종양 접종 24일 후에 항-CD133(7c) 및 항-FAP 항체를 사용하여 종양조직을 면역형광 염색하였다. (7e) 융합된 이미지. 스케일 바 = 250 μ m. Dox = 독소루비신; FAP = 섬유아세포 활성화 단백질; PL = 프로멜리틴 지질 유도체; rGO = 환원된 그래핀 옥사이드.

도 8은 본원의 일 실시예 따른, rGO 나노시트에 PL을 탑재한 PL-rGO 나노시트를 나타낸 것이다. rGO 나노시트에 PL 탑재 효능을 PL 및 rGO의 다양한 중량비에서 측정하였다(***P < 0.001). 예러 바는 95% 신뢰구간을 나타낸다. Student-Newman-Keuls post hoc test와 더불어 양방 분산분석(Two sided analysis of variance)을 사용하여 통계 분석을 하였다. PL = 프로멜리틴 지질 유도체; rGO = 환원된 그래핀 옥사이드; CI = 신뢰구간; ANOVA = 분산분석.

도 9는 인비트로에서 타겟 FAP 발현 감소를 분석한 것이다. CAF 세포를 siGFP 또는 siFAP로 트랜스펙션하였다. 트랜스펙션 후 48시간에, 세포의 FAP mRNA 및 단백질 레벨을 (9a) qRT-PCR(***P < 0.001) 및 (9b)웨스턴 블랏팅으로 분석하였다. β -액틴을 로딩 대조군으로 사용하였다. 예러 바는 95% 신뢰구간을 나타낸다. Student-Newman-Keuls post hoc test와 더불어 양방 분산분석(Two sided analysis of variance)을 사용하여 통계 분석을 하였다. FAP = 섬유아세포 활성화 단백질; CAFs = 종양-관련 섬유아세포; qRT-PCR = 정량적 실시간 PCR; CI = 신뢰구간; ANOVA = 분산분석.

도 10은 정상 섬유아세포에서의 Dox 및 Dox/PL-rGO의 서로 다른 세포독성을 나타낸 것이다. 정상 섬유아세포에

서로 다른 농도의 Dox를 처리하였다. 3시간 동안 배양한 후, CCK-8 분석법을 사용하여 세포생존력을 측정하였다 (n=3; ** P < 0.01 and *** P < 0.001). 예러 바는 95% 신뢰구간을 나타낸다. Student-Newman-Keuls post hoc test와 더불어 양방 분산분석(Two sided analysis of variance)을 사용하여 통계 분석을 하였다. Dox = 독소루비신; PL = 프로멜리틴 지질 유도체; rGO = 환원된 그래핀 옥사이드; CCK-8 = 세포 카운팅 키트-8; CI = 신뢰구간; ANOVA = 분산분석.

도 11은 본원의 일 실시예 따른 Dox/PL-rGO 나노시트의 단독 또는 반복 투여 후의 생화학적 파라미터를 나타낸 것이다. Dox/PL-rGO 나노시트를 마우스에게 단독(11a 및 b) 또는 반복(11c 및 d) 투여한 후, 혈청을 모아 BUN(11a,c) 및 크레아티닌(11b, d) 수치 측정을 하였다. 단일 투여를 하기 위하여 Dox/PL-rGO를, 1 mg/kg Dox 및 10 mg/kg PL를 탑재한 5 mg/kg rGO, 또는 2 mg/kg Dox and 20 mg/kg PL를 탑재한 10 mg/kg rGO의 두 가지 서로 다른 용량으로 투여하였다. 반복 투여를 하기 위하여 1 mg/kg Dox 및 10 mg/kg PL를 탑재한 5 mg/kg rGO 용량의 Dox/PL-rGO를 2일마다 통 3회 투여하였다. 예러 바는 95% 신뢰구간을 나타낸다. Dox = 독소루비신; PL = 프로멜리틴 지질 유도체; rGO = 환원된 그래핀 옥사이드; CI = 신뢰구간.

도 12는 프로멜리틴 지질 유도체 및 독소루비신을 함유하는 음이온성 리포솜에 의한 암세포 사멸 효능을 MTT 염색법을 사용하여 사람의 대장암 세포주인 HT29 또는 HT29와 종양-관련 섬유아세포가 같이 존재하는 공배양 세포주에서 확인한 결과이다.

도 13은 프로부포린 지질 유도체의 단백질 분해효소에 따른 선택적 세포막 미세막공 형성능을 hemolysis 분석방법을 사용하여 확인한 결과이다.

도 14는 프로부포린 지질 유도체 및 독소루비신을 함유하는 환원형 산화그래핀 나노시트에 의한 암세포 사멸 효능을 MTT 염색법을 사용하여 사람의 대장암 세포주인 HT29 또는 HT29와 종양-관련 섬유아세포가 같이 존재하는 공배양 세포주에서 확인한 결과이다.

도 15는 프로부포린 지질 유도체 및 독소루비신을 함유하는 음이온성 리포솜에 의한 암세포 사멸 효능을 MTT 염색법을 사용하여 사람의 대장암 세포주인 HT29 또는 HT29와 종양-관련 섬유아세포가 같이 존재하는 공배양 세포주에서 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 본 발명은 종양 미세환경에 존재하는 종양-관련 섬유아세포에 있는 섬유아세포 활성 단백질에 의해서 선택적으로 활성화되는 프로펩타이드 지질 유도체 및 항암 약물을 탑재한 나노구조체의 복합체를 통해 항암제를 종양 조직 및 세포로 효율적으로 전달할 수 있다는 발견에 근거한 것이다.

[0025] 따라서 한 양태에서 본원은 하나 이상의 종양미세환경 감응형 펩타이드의 지질 접합체; 및 나노구조체를 포함하는 약물전달용 나노복합체로, 상기 종양미세환경 감응형 펩타이드의 지질 접합체는, 서열번호 1 또는 서열번호 2의, 종양미세환경 감응형 기질 펩타이드 및 미세막공 펩타이드를 N-말단에서 C-말단의 순서대로 포함하는 프로펩타이드; 및 상기 프로펩타이드의 N-말단에 친수성고분자를 통해 연결된 양친매성 (amphiphilic) 지질을 포함하며, 상기 나노구조체는 상기 지질 접합체의 양친매성 지질을 통해 상기 접합체와 연결된 것인, 약물 전달용 나노복합체에 관한 것이다.

[0026] 본원에 따른 ‘프로펩타이드’는 기질펩타이드로부터 분리된 유리(free) 상태에서 세포에 미세막공을 형성하는 미세막공 펩타이드 부분과 종양미세환경 감응형 기질펩타이드로 구성되어 있다. 종양 미세환경에서는 정상세포에서와는 달리 종양-연관 섬유아세포(Cancer-Associated Fibroblast; CAF) 표면에 섬유아세포 활성 단백질 (Fibroblast Activation Protein; FAP)가 과발현되어 있는데, 이러한 과발현된 FAP에 의해 상기 프로펩타이드 중 종양미세환경 감응형 기질펩타이드가 절단되고, 미세막공 펩타이드가 유리된다. 상기 미세막공 펩타이드는 약 12-50개 정도의 아미노산으로 이루어져 있으며, 전하를 가진 부분과 소수성 부분을 가지는 구조적 특징을 가지는데, 상기와 같이 유리된 미세막공 펩타이드가 암세포의 막에 축적되면 펩타이드의 소수성 부분이 지질과 결합함으로써 세포막을 관통하는 미세막공을 형성하게 된다.

[0027] 본원의 일 실시예에서 상기 프로펩타이드는 서열번호 1의 서열을 가지는 펩타이드인 프로멜리틴, 또는 서열번호 2의 서열을 가지는 펩타이드인 프로부포린이다. 프로멜리틴의 서열은 ‘EPEAEADAEAGPAGIGAVLKVLTGLPALISWIKRKRQQ’ (서열번호 1)이고, 프로부포린의 서열은 ‘EPEAEADAEAGPARAGLQFPVGRLLRRLRRLLR’ (서열번호 2)이다. 상기 서열에서 밑줄친 부분이 종양미세환경 감응형, 즉 종양세포에서 발현되는 특정 단백질에 의해 잘리는 기질 펩타이드로서, FAP에 의해 절단되는 서열이다. 서열

번호 1 중 밑줄이 없는 부분이 펠리틴이고, 서열번호 2 중 밑줄이 없는 부분이 부포린이다.

- [0028] 본원에서 FAP의해 절단되어 소수성 특징을 갖는 N 말단이 노출되도록 프로펩타이드는 기질펩타이드 및 미세막공이 N-말단에서 C-말단의 순서대로 연결되는 것이 중요하다.
- [0029] 본원에서 ‘링커’ 는 상기 프로펩타이드의 N-말단과 양친매성(amphiphilic) 지질을 연결한다. 링커는 프로펩타이드 N-말단에 연결되는 것이 중요하다. 이렇게 연결된 경우에만 펠리틴 또는 부포린이 유리(free) 되어 중앙 미세환경 내에서 작용이 가능하다. C-말단에 연결을 하면 프로펩타이드의 기질 서열이 FAP에 의해서 잘 린 후에도 펠리틴이 나노복합체에 연결되어 있고, 이 경우는 세포막의 미세막공 형성능이 없는 것으로 나타났다.
- [0030] 본원에서 링커로는 친수성 고분자가 사용된다. 친수성 고분자는 상술한 바와 같이 프로펩타이드와 나노구조체 사이에 존재하여 프로펩타이드와 나노구조체 표면간의 소수성 상호작용을 방지하며, 혈액에 존재할 경우, 혈액 내 다른 단백질이 나노구조체 표면에 흡착하는 것을 방지할 수 있어, 혈액내 체류 시간이 증가되며, 그 결과 중앙 조직에 투과되는 증대된다.
- [0031] 따라서 이러한 목적을 달성하는 예를 들면 폴리에틸렌글리콜, 폴리아크릴산, 폴리비닐 알콜, 폴리에틸렌 옥사이드, 폴리하이드록시에틸 메타크릴레이트, 또는 히알루론산과 같은 다양한 친수성 고분자 물질이 본원에 사용될 수 있으나, 이로 제한하는 것은 아니다.
- [0032] 본원의 일 실시예에서 상기 링커는 친수성 고분자로 PEG(polyethylene glycol)로서, 평균 분자량 약 500 내지 7,000 Da의 것이 사용된다. 상기 PEG는 프로펩타이드와 양친매성 지질을 연결해주는 링커의 역할을 할 뿐만 아니라, 생체 내에 투여되었을 때 생체 내 체류시간 및 안정성을 증강시키는 역할에 특히 유리하다.
- [0033] 본원에서 양친매성 지질은 리포좀 표면 하전 전하와 프로펩타이드 자체 하전 전하의 상호작용을 방지할 수 있어 보다 안정적이고 효율적 약물의 전달이 가능한 우수한 나노복합체의 형성이 가능하다. 또한 양친매성 지질은 인지질로서, 인산기가 있는 머리부분은 친수성, 지방산이 있는 꼬리 부분은 소수성을 나타내는 특징이 있는데, 이러한 소수성으로 인해 나노구조체와의 복합체 형성이 가능하다. 따라서 이러한 목적을 달성하는 DSPE (1,2-다이스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민), 포스파티딜 콜린, 포스파티딜 에탄올아민, 포스파티딜 이노시톨, 및 포스파티딜 세린를 포함하는 양친매성 지질이 사용될 수 있으나, 이로 제한하는 것은 아니다.
- [0034] 본원에 따른 일 구현예에서는 특히 양친매성 지질로서 DSPE (1,2-다이스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민)를 사용되며, 상술한 목적에 특히 유리하다.
- [0035] 본원에서 프로펩타이드 지질접합체 또는 프로펩타이드의 지질접합체는 상술한 바와 같이, 프로펩타이드에 링커를 통해 그 N-말단에 양친매성 지질이 결합된 것이다.
- [0036] 본원에 따른 프로펩타이드 지질접합체는 나노구조체와 복합체를 형성한다. 이로 제한하는 것은 아니나 본원에 따른 프로펩타이드 지질접합체와 나노구조체는 비공유결합, 예를 들면 인지질 부분이 소수성 상호작용을 통해 나노구조체와 복합체를 형성한다.
- [0037] 본원에 따른 복합체에 포함된 나노구조체는 본원에 따른 프로펩타이드 지질접합체와 후술하는 나노구조체에 탑재되는 항암약물의 담체(carrier)로 사용된다.
- [0038] 따라서 상기 목적을 달성하는 다양한 나노구조체가 본원에 사용될 수 있으며, 예를 들면 나노시트 또는 구형구조체가 사용될 수 있다.
- [0039] 본원에서 사용된 용어 ‘나노구조체’ 란 나노스케일 즉 분자수준의 크기 및 마이크로미터 크기 사이의 크기를 갖는 시트(필름), 구형 또는 관형 등의 구조체를 칭하며, 정의는 예를 들면 Royal Society and the Royal Academy of Engineering July 2004에 기재된 정의를 참조할 수 있다.
- [0040] 본원에 따른 일 구현예에서는 나노구조체로서 나노시트가 채용된다. 나노시트는 1차원(one dimension)으로 두께로 표시되며, 본원에 따른 나노시트는 0.1 내지 100nm이나, 본원에 따른 효과를 달성하는 한 이로 제한하는 것은 아니다. 본원에 따른 나노시트는 이와 복합체를 형성한 프로펩타이드 지질접합체와의 복합체 형성 및 탑재된 약물의 방출에 유리한 시트형 화학적 구조를 가진다.
- [0041] 이러한 나노시트 구조를 갖는 나노구조체는 당업계의 공지된 방법으로 제조될 수 있으며, 이를 구성하는 물질은 예를 들면 환원형 그래핀옥사이드(reduced graphene oxide), 그래핀 옥사이드(graphene oxide), 또는 그래핀(graphene)을 포함한다. 일 구현예에서는 특히 환원된 그래핀 옥사이드(reduced graphene oxide; rGO)을 사용하여 형성될 수 있다. 상기 rGO는 표면적이 높으므로 지방산 사슬 및 방향족 약물을 흡수할 수 있다. 또한 프로

펩타이드 지질접합체의 인지질 부분은 소수성 상호작용을 통해 rGO 나노시트에 결합된다.

- [0042] 다른 구현예에서 본원에 따른 복합체를 형성하는 나노구조체는 구형구조체로리포솜 또는 고행지질 나노입자를 포함한다.
- [0043] 본원에서 ‘리포솜’은 인지질 분자로 제조된 지질이중층 구조를 갖는 소포체이다. 인지질은 지질분자내 포스페이트 에스테르를 포함하는 화합물로 친수성 머리와 소수성의 두 개의 꼬리 구조를 갖으며, 직경은 약 50nm에서 10 μm이나, 이로 제한하는 것은 아니다.
- [0044] 본원에 사용되는 리포솜은 음이온성, 양이온성, 및 중성 리포솜 일 수 있으며, 양이온성 리포솜의 제조를 위해서는 양하전 지질 및 중성 지질을, 중성 리포솜의 제조를 위해서는 중성 지질을, 음이온성 리포솜의 제조를 위해서는 음하전 지질 및 중성 지질이 사용될 수 있으며, 당업자라면 공지된 인지질 중에서 본원의 목적 및 효과를 고려하여 적절한 것으로 선택할 수 있을 것이다. 양하전 인지질의 예는 다음과 같다: 1,2-디미리스토일-3-트리메틸암모늄프로판 (1,2-dimyristoyl-3-trimethylammonium-propane), 1,2-디팔미토일-3-트리메틸암모늄프로판 (1,2-dipalmitoyl-3-trimethylammoniumpropane), 1,2-디스테로일-3-트리메틸암모늄프로판 (1,2-distearoyl-3-trimethylammonium-propane), 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄프로판 (1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propene), 1,2-디미리스토일-3-디메틸암모늄-프로판 (1,2-dimyristoyl-3-dimethylammonium-propane), 1,2-디팔미토일-3-디메틸암모늄-프로판 (1,2-dipalmitoyl-3-dimethylammonium-propane), 1,2-스테아로일-3-디메틸암모늄-프로판 (1,2-distearoyl-3-dimethylammonium-propane), 1,2-디올레오일-3-디메틸암모늄-프로판 (1,2-dioleoyl-3-dimethylammoniumpropane), 3β-[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)카바모일]콜레스테롤 (3β-[N-(N',N'-dimethylaminoethane)carbamoyl] cholesterol; DC-Chol), 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드 (dimethyldioctadecylammonium bromide). 중성 지질의 예는 다음과 같다:
- [0045] L-a-포스파티딜콜린 (L-a-phosphatidylcholine), 1,2-프로피오노일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (1,2-propionoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-부타노일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (1,2-butanoyl-snglycero-3-phosphocholine), 1,2-펜타노일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (1,2-pentanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-카프로일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (1,2-caproyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-헵타노일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (1,2-heptanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-카프리로일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (1,2-capryloyl-sn-glycero-3-phosphocholine), 1,2-노나노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-nonanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine). 음하전 지질의 예는 다음과 같다: L-a-포스파티딜글리세롤 (L-a-phosphatidylglycerol), 1,2-디카프로일-sn-글리세로-3-포스포글리세롤 (1,2-dicaproyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol), 1,2-디옥타노일-sn-글리세로-3-포스포글리세롤(1,2-dioctanoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol), 1,2-디카프릴-sn-글리세로-3-포스포글리세롤 (1,2-dicapryl-sn-glycero-3-phosphoglycerol), 1,2-디라우로일-sn-글리세로-3-포스포글리세롤 (1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포글리세롤 (1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol), 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포글리세롤 (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol), 1,2-디파이타노일-sn-글리세로-3-포스포글리세롤 (1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol).
- [0046] 본원에 따른 나노복합체에 포함된 인지질로서 프로펩타이드에 접합되는 인지질과 나노구조체로서 리포솜의 성분은 동일 또는 상이한 것이 사용될 수 있다. 다만 프로펩타이드에 접합되는 인지질은 리포솜 표면 하전 전하와 프로펩타이드 자체 하전 전하의 상호작용을 방지할 수 있도록 폴리에틸렌 글리콜을 함유하는 인지질 예를 들면, 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0047] 다른 구현예에서는 고행지질 나노입자(Solid lipid nanoparticle)가 사용될 수 있다. 고행지질 나노입자는 용점이 높아서 상온에서 고체인 지질로, 계면활성제, 보조계면활성제(co-surfactant)로 형성될 수 있다. 고행지질 나노입자는 특히 물에 잘 녹지 않는 항암제를 이의 내부에 봉입하여 사용할 수 있다. 따라서 본원에 따른 프로펩타이드 지질 접합체를 고행지질 나노입자 제조시에 추가하면, 상술한 리포솜과 유사한 방식으로 그 표면에 펩타이드를 탑재할 수 있다. 고행지질 나노입자의 종류, 구성성분, 제조방법 및 이를 이용한 항암제 탑재는 최성업 등, 한국약제학회, <약제학회지> 33권4호 (2003), pp.319-322; 또는 S. M. Cho, et al, J. Am. Oil. Chem., 84, 859 (2007)에 기재된 것을 참조할 수 있다.
- [0049] 본원에 따른 복합체에 포함된 프로펩타이드 지질접합체 대 나노구조체는 100:1 내지 0.1:1의 중량비, 바람직하게는 20:1 내지 1:1의 중량비로 존재한다. 특히 본원의 일 실시예에서 프로펩타이드 지질접합체 대 나노구조체의 중량비는 2:1이다. 상기 중량비에서 프로펩타이드 지질 접합체가 나노시트에 탑재 효율이 우수한 것으로 나타났다.

- [0050] 또다른 양태에서 본원은 상술한 프로펩타이드 지질유도체 및 나노구조체의 복합체 및 항암제를 포함하는 항암 약물전달체 또는 항암 약물 전달용 조성물에 관한 것이다.
- [0051] 본원에 따른 약물 전달체에서, 약물은 도 1a 및 도 1b에 도식적으로 표시된 바와 같이, 나노시트 또는 리포솜과 같은 나노구조체에 탑재되어 있다. 나노구조체에 탑재로 인해서 본원에 따른 나노복합체가 약물전달에 사용될 때 암 조직에 약물의 축적이 향상된다. 아울러 나노복합체에 포함된 나노구조체에 약물을 탑재하는 경우, 종양 조직 내 혈관에서 상피 세포 사이의 간극이 정상 조직의 혈관 상피 세포의 간극보다 넓어서 나노구조체가 정상 조직 대비하여 종양 조직으로 축적되는 경향이 높아지므로, 항암제의 종양 조직 분포도를 상대적으로 증가시킨다. 하지만 나노 전달체의 경우, 종양 조직에만 축적되는 것이 아니라 간, 폐, 비장 등의 정상 조직으로도 분포하므로, 본원에 따른 나노복합체와 같이 종양 세포 내부에서 항암제의 활성을 선택적으로 증강하는 것은 부작용 감소 측면에서 매우 중요하다.
- [0052] 본원에 따른 약물 전달체에 포함된 프로펩타이드는 종양 세포 특이적으로 발현되는 효소에 의해 절단되어, 미세 막공 펩타이드가 유리되고, 이에 의해 세포에 구멍이 형성되고, 나노구조체에 탑재한 항암제가 암세포에만 특이적으로 전달된다.
- [0053] 본원에 따른 약물 전달체가 사용되는 항암제는 암세포에 대한 세포독성을 나타내며, 본원에 따른 나노구조체에 탑재될 수 있는 것이면, 특별히 제한되는 것은 아니며, 예를 들면 사이클로포스파마이드(cyclophosphamide), 독소루비신 (doxorubicin), 에토포시드(etoposide), 에토포시드 포스페이트(etoposide phosphate), 테니포시드 (teniposide), 카미노마이신(carminomycin), 다우노루비신(daunorubicin), 아미노프테린(aminopterin), 메소트리세이트(methotrexate), 메소프테린(methopterin), 디클로로메소트리세이트(dichloromethotrexate), 마이토마이신 C(mitomycin C), 탁셀류(taxanes)인 파클리탁셀(paclitaxel) 또는 택솔(Taxol), 에포틸론(epothilone), 포르피로마이신(porphiromycin), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 6-메르캅토프린(6-mercaptopurine), 겐시타빈(gencitabine), 시토신 아라비노사이드(cytosine arabinoside), 포도필로톡신 또는 그 유도체 (podophyllotoxin or podophyllotoxin derivatives)인 멜팔란(melphalan), 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine), 레우로시딘(leurosidine), 빈데신(vindesine), 레우로신(leurosine), 에스트라무스틴(estramustine), 시스플라틴(cisplatin), 카르보플라틴(carboplatin), 블레오마이신(bleomycin), 타목시펜(tamoxifen), 이포스파미드(ifosfamide), 헥사메틸 멜라민(hexamethyl melamine), 티오테파(thiotepa), 시타라빈(cytarabine), 이다트리세이트(idatrexate), 트리메트리세이트(trimetrexate), 다카르바진(dacarbazine), 엘-아스파라기나제(L-asparaginase), 캄프토테신(camptothecin), 시피티-11(CPT-11), 이리노테칸(irinotecan), 토포테칸(topotecan), 아라-씨(Ara-C), 비칼루타미드(bicalutamide), 플루타미드(flutamide), 루프롤리드(leuprolide), 피리도벤조인돌 유도체(pyridobenzoindole derivatives), 부설펜(busulphan), 인터페론류(interferons), 또는 인터루킨류(interleukins) 중 하나 이상이다. 본원의 일 구현예에서 상기 항암제는 독소루비신이다.
- [0054] 본원에 따른 약물 전달체에 포함되는 항암제는 항암제의 종류, 나노구조체의 구체적 화학적 및 물리학적 특징에 따라 상이할 수 있으며, 예를 들면 항암제 : 나노 50:1 내지 1:1의 중량비, 특히 10:1 내지 2:1의 중량비로 탑재된다. 일 구현예에서는 독소루비신이 사용되며, 이는 1:1 내지 5:1의 중량비로 포함되며, 5:1을 넘는 경우 항암제의 분산이 어렵다.
- [0055] 본원의 일 실시예에서 상기 약물 전달체는 독소루비신/프로멜리틴 또는 프로부포린 지질접합체-환원된 그래핀 옥사이드(Dox/PL-rGO, Dox/PB-rGO)로서, 상기 프로멜리틴 또는 프로부포린 지질접합체는 프로멜리틴-PEG(폴리에틸렌글리콜)2000-다이스테아로일포스파티딜에탄올아민, 또는 프로부포린-PEG(폴리에틸렌글리콜)2000-다이스테아로일포스파티딜에탄올아민이다.
- [0056] 본원의 다른 실시예에서 상기 약물 전달체는 독소루비신/프로멜리틴 또는 프로부포린 지질접합체-리포솜으로서, 상기 프로멜리틴 또는 프로부포린 지질접합체는 프로멜리틴-PEG(폴리에틸렌글리콜)2000-다이스테아로일포스파티딜에탄올아민, 또는 프로부포린-PEG(폴리에틸렌글리콜)2000-다이스테아로일포스파티딜에탄올아민이다.
- [0057] 본원의 약물 전달체는 프로펩타이드로 수식되고 약물을 탑재한 나노구조체로 구성되어 있다. 따라서 상기한 바와 같이 종양 미세환경에 노출되면, 1차적으로 프로펩타이드의 기질 서열이 종양 미세환경 내에 존재하는 종양-관련 섬유아세포 표면에 과발현되어 있는 섬유아세포 활성 단백질(fibroblast activation protein; FAP)에 의하여 절단이 이루어지고, 절단이 이루어지면 나노구조체에서 멜리틴 또는 부포린 활성형 펩타이드가 떨어져 나오게 되며, 종양 미세환경에서 활성화된 형태의 멜리틴 또는 부포린 펩타이드는 암세포를 공격하여 미세막공을 형성하게 된다. 암세포에서 미세막공이 형성되면 약물을 탑재하고 있던 나노구조체가 보다 효율적으로 세포 안으로

더 잘 들어가게 되고, 그 후 약물에 의하여 암세포 성장이 억제하게 된다.

[0058] 본원의 약물전달체와는 달리 프로펩타이드로 수식되지 않은 약물담재 나노구조체의 경우, 미세막공을 형성할 수 있는 멜리틴 또는 부포린 펩타이드가 없기 때문에 세포내로의 약물 담재 나노구조체의 전달(delivery) 효율이 떨어지게 된다. 이는 세포 내로 나노구조체가 들어갈 수 있는 동력(driving force)이 없기 때문이다.

[0060] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위해서 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 본 발명이 하기의 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0062] **실시예**

[0063] **실시예 1. Dox/PL-rGO 나노시트 복합체의 설계, 제조 및 특징 규명**

[0064] **1-1. rGO 나노시트의 제조**

[0065] GO 나노시트를 환원시켜 rGO 나노시트를 합성하였다. 균질하게 분산된 GO 나노시트 2ml 용액을 기존 방법(Miao W, Shim G, Kang CM, et al. Cholesteryl hyaluronic acid-coated, reduced graphene oxide nanosheets for anti-cancer drug delivery. Biomaterials. 2013; 34(37):96389647)에 따라 제조하였다. 그래파이트 파우더 (0.5g, Sigma-Aldrich, USA)를 차가운 황산(H₂SO₄, 23ml)과 섞은 후, 용액을 얼음 위에서 섞어주며 과망가니즈 산칼륨(KMnO₄, 3g)과 질산나트륨(NaNO₃, 0.5g)을 서서히 적가하고, 용액을 35℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 후, 증류수(46ml)를 넣어주고 90℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응물을 염화수소 용액(5% HCl)으로 3회 원심 분리하여 불순물을 제거하고 증류수로 세척하였다. 세척된 산물(200mg)을 증류수(40ml)에 분산시킨 후 2시간 동안 초음파(400 W) 처리를 해주어 나노시트를 수득하였으며, 1600x g에서 10분간 원심 분리하여 나노시트 형태로 탈착되지 않은 산화그래핀을 제거하였다. 산화그래핀 나노시트를 만든 후, 환원반응을 진행하였다. 상기 산화그래핀 나노시트(2ml, 5mg/ml)를 8ml의 증류수, 0.5ml의 암모니아수(28 wt% ; Junsei Chemical, Tokyo, Japan), 및 5 μ l의 하이드라진 모노하이드레이트(64% in water; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)와 혼합하였다. 상기 혼합물을 80℃에서 10분간 수조에서 교반하였다. 실온으로 식힌 후, 3중 증류수(TDW)로 상기 혼합물을 투석(MWCO 100K; Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA, USA) 하여 과잉의 하이드라진 및 암모니아를 제거하였다. 그 결과 얻은 TDW에 분산된 rGO 나노시트를 사용할때까지 4℃에서 보관하였다.

[0066] **1-2. rGO 나노시트의 크기 및 제타 포텐셜 측정**

[0067] 다양한 크기의 rGO 나노시트를 동적 광산란(dynamic light scattering)을 사용하여 측정하였다. 제타 포텐셜 수치는 22° 각도에서 ELS-8000 instrument (Photal, Osaka, Japan)를 사용하여 레이저 Doppler 마이크로전기영동으로 측정하였다.

[0068] **1-3. 프로멜리틴-인지질 접합체(PL)의 합성**

[0069] 프로멜리틴 펩타이드는 기존에 알려진 바와 같이(LeBeau AM, Brennen WN, Aggarwal S, Denmeade SR. Targeting the cancer stroma with a fibroblast activation protein-activated promelittin protoxin. 135 Mol Cancer Ther. 2009;8(5):13781386) 멜리틴 및 FAP-절단 서열로 이루어져 있다. 프로멜리틴의 서열은 아세틸화-EPEAEADAEAGPAGIGAVLKVLTGLPALISWIKRKRQQ (FAP-절단가능한 서열은 이탤릭체로 나타내었다)이다. 우선 2 μ mole의 프로멜리틴 및 20 μ mole의 3-(N-숙신이미딜옥시글루타릴)아미노프로필, 폴리에틸렌글리콜-카바밀 다이스테아로일포스파티딜에타놀아민(NHS-PEG₂₀₀₀-DSPE; NOF Co. Ltd., Tokyo, Japan)를 다이메틸 설피록사이드(Sigma-Aldrich)에 녹인 후 22 μ mole의 N,N-다이이소프로필에틸아민(Sigma-Aldrich)와 혼합하고 실온에서 24시간 교반하여 프로멜리틴-태그된 지질을 합성하였다. 상기 혼합물을 TDW로 48시간 동안 투석(MWCO 5,000 Da; Spectrum Laboratories Inc.)하여 프로멜리틴-접합된 PEG₂₀₀₀-DSPE (promelittin-PEG₂₀₀₀-DSPE)에서 접합되지 않은 프로멜리틴 펩타이드를 제거하였다. 최종 화합물을 감압 동결건조하여 사용 전까지 20℃에서 보관하였다. 합성된 프로멜리틴-PEG₂₀₀₀-DSPE를 PL이라고 표시하며, MALDI-TOF mass spectrometry로 특징을 분석하였다.

[0070] **1-4. 형광지질의 제조**

[0071] 또한, 시아닌5.5 형광과 지질을 합성함으로써 형광 지질을 제조하였다. 폴리에틸렌 글리콜 사슬 분자량이 5000인 1,2-다이스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[아미노(폴리에틸렌 글리콜)-5000](DSPE-PEG₅₀₀₀-NH₂, NOF Corporation, Japan) 4.5mg을 탄화수소나트륨 완충용액(0.1 M, pH8.3)에 녹인 후, 1.0mg의 시아닌5.5 NHS 에스테르(Lumiprobe, USA)를 첨가하여 4시간 동안 암실에서 교반하였다. 지질에 결합하지 않은 시아닌5.5은 세

파텍스 G15 컬럼(Sephadex G15 colume, GE Healthcare)을 사용하여 제거하였다.

[0072] 1-5. PL-rGO 나노시트 복합체의 제조 및 Dox 탑재

[0073] PL : rGO의 중량비가 2:1이 되도록 3차 증류수(TDW)에 있는 rGO 나노시트(1mg/ml)를 동일 부피의 PL 용액(2mg/ml)와 혼합시켜 rGO 나노시트의 표면을 PL로 코팅하였다. 또한 플레인(plain) rGO 또는 PL-rGO 나노시트 위에 Dox를 탑재하였다. 1mL의 Dox용액(0.1mg/mL; Sigma-Aldrich)을 TDW에 있는 1mL의 rGO 또는 PL-rGO 나노시트에 각각 첨가하여 실온에서 10분간 배양하여 Dox-탑재된 rGO(Dox/rGO) 및 Dox-탑재된 PL-rGO(Dox/PL-rGO)를 제조하였다. 그 후 PD-10 탈염 컬럼(GE Healthcare, Piscataway, NJ)을 사용하여 탑재되지 않은 유리(free) Dox를 제거하였다.

[0074] 1-6. 탑재 효능 측정

[0075] rGO 나노시트에 탑재되는 PL의 범위를 인 분석법으로 결정하였다. PL-코팅된 rGO(PL-rGO) 나노시트를 1시간 동안 180°C에서 400 μ l의 5M H₂SO₄와 함께 다이제스트시켰다. 용액을 식힌 후, 100 μ l의 30% H₂O₂를 첨가하여 상기 혼합물을 30분동안 180°C로 다시 가열하였다. 그 후 상기 용액을 실온으로 식히고 4.6ml의 0.2% 암모늄 몰리브데이트(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 및 100ml의 15% 아스코르브산(Sigma-Aldrich)를 첨가하여 10분 동안 90°C로 가열하였다. UV microplate reader (Gemini XS; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 830nm에서 흡광도를 측정하여 인산염 복합화합물의 양을 결정하였다. 기지 농도의 인 표준용액(Sigma-Aldrich)를 사용하여 검정선을 만들었다.

[0076] rGO에 탑재됨으로 인해 소거되는 Dox 형광 강도의 감소를 측정함으로써 rGO 나노시트에 탑재된 Dox 효율 및 비율을 계산하였다. 형광 마이크로플레이트 리더(Gemini XS)를 사용하여 485nm에서 엑사이팅시켜 590nm에서 분출되는 형광을 측정하여 Dox 형광 강도를 결정하였다.

[0077] 상기와 같은 rGO의 표면을 PL로 코팅하여 Dox를 탑재한 것을 도 1A에 나타내었다. Dox/PL-rGO의 가능한 작용 메카니즘은 도 1B에 나타내었다. Dox/PL-rGO 나노시트의 프로멜리틴 부분에는 FAP 프로테아제에 의해 활성화되는 FAP-절단가능 펩타이드 서열이 있는데, 이는 종양 미세환경에서 CAF에서 과발현되며, 기공-형성 펩타이드인 멜리틴을 방출한다. 종양 미세환경의 세포 및 종양 세포에서 확산된 멜리틴에 의해 기공이 형성되어 Dox/PL-rGO의 세포내로의 유입을 증가시키고 항암 활성을 증가시킬 수 있다. rGO 나노시트 위에 PL을 고정시키고 이어 Dox를 탑재한 것은 rGO 나노시트의 평균 크기에 통계적으로 유의한 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(PL-rGO: mean = 94.6nm, 95% CI = 93.3 to 95.9nm, P = .80; Dox/PL-rGO: mean = 91.2nm, 95% CI = 88.7 to 93.8nm, P = .25) (도 2A). 반면 제타 포텐셜 수치는 PL 코팅 표면 위에서는 감소하였지만(mean = 9.4 mV, 95% CI = 5.6 to 13.2 mV, P = .001), PL-rGO 나노시트 위의 양이온성 Dox 탑재 후에는 증가하였다(mean = 18.5 mV, 95% CI = 16.3 to 20.7 mV, P = .02) (도 2B).

[0078] rGo 위의 PL의 탑재 효능은 인산염 분석법으로 측정하였다(Niu G, Cogburn B, Hughes J. Preparation and characterization of doxorubicin liposomes. *Methods Mol Biol.* 2010;624:211219). PL 대 rGO 중량비가 20:1에서 2:1로 감소할수록 rGO 위의 PL 탑재 효능이 통계적으로 상당히 증가하였다(P < 0.001)(도 8). 2:1(mean = 95.3%, 95% CI = 92.5% to 98.1%) 및 1:1(mean = 94.5%, 95% CI = 92.8% to 96.3%) 비율사이에는 rGO위의 PL 탑재 효능은 통계적으로 유의한 차이점(P = 0.65)이 없었다. 따라서 본원에서 추가 실험을 위해 PL-rGO 무게비로 2:1을 선택하였다.

[0079] rGO 또는 PL-rGO 나노시트에의 Dox 흡수(Dox:rGO 무게비 5:1)는 1분 내에 완료되었다(도 2C). rGO 나노시트로의 삽입된 Dox 형광 강도는 물리적 혼합 후 60초에서 상기의 원래 강도가 13% 감소하였다. 유사하게, PL-rGO 나노시트로 삽입된 Dox 형광 강도는 물리적 혼합 후 60초에서 상기의 원래 강도의 2%가 재빨리 감소하였다. Dox:rGO 무게비 5:1로 10분간 rGo 또는 PL-rGO로 Dox를 탑재시킬 때, Dox 탑재 효능의 평균치는 각각 96.3%(95% CI = 95.6% to 97.0%) 및 97.5% (95% CI = 96.2% to 98.4%)이었다(도 2D).

[0080] 상기 rGo는 표면적이 높아 지방산 사슬 및 방향족 약물을 흡수할 수 있어, 탑재 효능이 높다. 프로멜리틴은 폐길화된 인지질에 접합하기 때문에, PL의 인지질 부분은 소수성 상호작용을 통해 rGO 나노시트에 소수성 상호작용을 통한 결합력을 가지게 된다.

[0082] 실시예 2. 프로멜리틴 펩타이드 지질 유도체 및 독소루비신이 함유된 음이온성 리포솜의 제조 및 효능 평가

[0083] 2-1. 프로멜리틴 펩타이드 지질 유도체 및 독소루비신이 함유된 음이온성 리포솜의 제조

[0084] 실시예 1에서 합성한 프로멜리틴 지질 유도체, 중성 지질인 L- α -포스파티딜콜린(Avanti Polar Lipid Inc., USA, 이하 'PC'라 함), 음전하 지질인 L- α -포스파티딜글리세롤(Avanti Polar Lipid Inc., USA, 이하 'PG'라 함) 및 콜레스테롤(cholesterol, Sigma, USA)를 각각 0.2:2:2:2 μ mole씩 취하여 1ml의 클로로포름(chloroform)에 녹인 후, 파이렉스 10ml 유리 격막 바이알에 넣어 혼합한 후 질소 환경에서 모든 클로로포름이 증발될 때까지 낮은 속도로 회전 증발시켜 지질 박막 필름으로 제조하였다. 지질 다층형 소구체(multilamella vesicle)를 제조하기 위하여 이 박막필름에 인산완충용액 1ml을 첨가하고 바이알을 37°C로 하여 밀봉 후 3분간 교반(vortexing)하였다. 균일한 크기를 만들기 위해 이를 입자 균질화 제조기 (extruder, Northern Lipid Inc., Canada)를 사용하여 0.2 μ m 폴리카보네이트 막을 3번 통과시켜 제조하였다. 여기에 양전하로 하전된 독소루비신(doxorubicin, Sigma, USA) 0.1mg/ml을 혼합하여 음이온성 리포솜 표면에 정전기적으로 결합시킨 다음, 리포솜에 함유되지 않고 남아있는 독소루비신은 세파텍스 G15 컬럼(GE Healthcare, UK)을 사용하여 제거하였다. 얻어진 프로멜리틴 지질 유도체 및 독소루비신 함유 음이온성 리포솜은 사용하기 전까지 4°C에서 보관하였다.

[0085] **2-2. 프로멜리틴 지질 유도체 및 독소루비신 함유 음이온성 리포솜의 항암 효능 평가: MTT 분석**

[0086] 본 발명의 프로멜리틴 지질 유도체 및 독소루비신 함유 음이온성 리포솜의 표적세포 내 항암제 전달 효율 평가를 위하여 하기와 같은 과정으로 실험을 수행하였다. 사람 대장암 세포주인 HT29 또는 HT29 세포주와 종양-관련 섬유아세포가 같이 존재하는 공배양 세포를 실험 전날 24웰 플레이트에 웰 당 3×10^4 또는 9×10^4 개씩 분주(seeding)하였다. 독소루비신 함유 음이온성 리포솜과 프로멜리틴 지질 유도체 및 독소루비신 함유 음이온성 리포솜을 각각의 세포에 처리한 후, 37°C의 CO₂ 배양기에서 3시간 동안 배양하였다. 배지를 제거하고 인산완충용액으로 3번 세척한 세포를 37°C의 CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐 테트라졸륨 브로마이드 (MTT, Sigma, USA)를 배지의 10% 되도록 가하고, 2시간 더 배양한 다음 상층액을 제거하고 0.04 N 염산 이소프로판올 용액을 첨가한 후에 엘라이저 리더 (ELISA reader, Sunrise-Basic TECAN, Mannedorf, Switzerland)를 이용하여 570nm에서 그 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 아무것도 처리하지 않은 세포가 사용되었다.

[0087] 도 12에 나타난 바와 같이 상기의 독소루비신을 함유한 음이온성 리포솜들의 항암 효능을 평가한 결과, 공배양 세포주에서, 독소루비신 함유 음이온성 리포솜 처리군과 비교하여, 프로멜리틴 지질 유도체 및 독소루비신 함유 음이온성 리포솜 처리군이 더 증강된 암세포 사멸효과를 나타냈다. 상기 결과는 프로멜리틴 지질 유도체에 존재하는 섬유아세포 활성 단백질 기질 펩타이드 서열이 공배양 세포주에 존재하는 종양-관련 섬유아세포의 섬유아세포 활성 단백질 효소에 의해서 특이적으로 절단되고 그 결과 비활성의 프로멜리틴을 활성형의 멜리틴으로 전환시킴으로써 섬유아세포 활성 단백질을 세포 표면에 발현하는 종양-관련 섬유아세포가 같이 존재하는 공배양 세포주에 보다 효과적으로 독소루비신이 암세포내로 전달되어 증강된 항암 효능을 나타낸다.

[0089] **실시예 3. Dox/프로부포린-rGO 나노시트 복합체의 설계, 제조 및 효능 분석**

[0090] **3-1. 프로부포린 펩타이드와 폴리에틸렌글리콜 지질의 아마이드 결합을 통한 프로부포린 지질 유도체의 합성**

[0091] 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드 (20 μ mole, ChinaPeptide Corporation, Shanghai, China)와 폴리에틸렌 글리콜 사슬의 분자량이 2000인 3-(N-숙신이미딜옥시글루타릴) 아미노프로필, 폴리에틸렌글리콜-카바미르 다이스테아로일포스파티딜-에탄올아민(NHS-PEG₂₀₀₀-DSPE; NOF Co. Ltd., Tokyo, Japan) 20 μ mole을 실시예 1과 동일한 방법으로 반응시켜 프로부포린 펩타이드와 지질이 결합된 프로부포린 지질 유도체를 얻었다. 지질에 결합되지 않은 프로부포린은 증류수 상에서 48시간 동안 다이알리시스(MWCO 5 000 Da, Spectrum Laboratories Inc.)를 통해 제거하였다. 반응 여부는 말다-토프 질량 분석기(MALDI-TOF mass spectrometry; Merck & Co., Inc. USA)로 확인하였다.

[0092] **3-2. 단백질 분해효소에 따른 프로부포린 지질 유도체의 세포막 미세막공 형성능 평가: 용혈 분석**

[0093] 마우스 적혈구 세포(2×10^4 cells/ml)에 프로부포린 지질 유도체 10 μ g과 1 μ g의 매트릭스 메탈로펩티다제9(R&D Systems Inc.) 또는 섬유아세포 활성 단백질(R&D Systems Inc.)을 첨가한 후 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후, 1000 x g에서 10분간 원심 분리하여 얻어진 상층액을 96웰 플레이트에 옮겼다. 단백질 분해효소에 의해서 선택적으로 활성화된 프로부포린 지질 유도체는 마우스 적혈구 세포막에 미세막공을 형성할 수 있으며, 이로써 용혈된 마우스 적혈구 세포로부터 방출된 헤모글로빈(hemoglobin)의 흡광도를 540nm 파장에서 흡광 측정기 (Sunrise-Basic TECAN, Mannedorf, Switzerland)를 사용해 분석하였다. 대조군으로는 아무것도 처리하지 않고

원심분리하여 얻어진 마우스 적혈구 세포의 상층액이 사용되었다.

[0094] 도 13은 상기의 프로부포린 지질 유도체의 단백질 분해효소에 따른 세포막 미세막공 형성능을 평가한 결과로, 메트릭스 메탈로펩티다아제9를 처리한 프로부포린 지질 유도체는 세포막 미세막공 형성을 하지 못한 반면, 섬유아세포 활성 단백질을 처리한 프로부포린 지질 유도체는 세포막 미세막공 형성을 증강시켰음을 보여준다. 이러한 도 13의 세포막 미세막공 형성능 결과로부터, 프로부포린 지질 유도체에 존재하는 섬유아세포 활성 단백질 기질 펩타이드 서열이 섬유아세포 활성 단백질 효소에 의해서 특이적으로 절단되어 비활성의 프로부포린을 활성형의 부포린으로 전환시킴으로써 세포막 미세막공 형성능을 증강시켰음을 나타낸다.

[0095] **3-3. 프로부포린 지질 유도체 및 독소루비신이 함유된 환원형 산화그래핀 나노시트의 제조**

[0096] 실시예 1에서 제조한 환원형 산화그래핀 나노시트(1mg/ml)에 실시예 3-1에서 합성한 프로부포린 지질 유도체(2mg/ml)와 독소루비신(0.1mg/ml, doxorubicin, Sigma, USA)을 첨가한 후, 상온에서 10분간 반응시켰다. 환원형 산화그래핀 나노시트에 함유되지 않고 남아있는 독소루비신은 세파텍스 G15 컬럼(GE Healthcare, UK)을 사용하여 제거하였다. 얻어진 프로부포린 지질 유도체 및 독소루비신 함유 환원형 산화그래핀 나노시트는 사용하기 전까지 4℃에서 보관하였다.

[0097] **3-4. 프로부포린 지질 유도체 및 독소루비신 함유 환원형 산화그래핀 나노시트의 항암 효능 평가: MTT 분석**

[0098] 본 발명의 프로부포린 지질 유도체 및 독소루비신 함유 환원형 산화그래핀 나노시트의 표적세포 내로의 항암제 전달 효율 평가를 위하여 하기와 같은 과정으로 실험을 수행하였다. 사람 대장암 세포주인 HT29 또는 HT29 세포주와 종양-관련 섬유아세포가 같이 존재하는 공배양 세포를 실험 전날 24웰 플레이트에 웰 당 3×10^4 또는 9×10^4 개씩 분주(seeding)하였다. 독소루비신 함유 환원형 산화그래핀 나노시트, 및 프로부포린 지질 유도체 및 독소루비신 함유 환원형 산화그래핀 나노시트 각각을 상기 각각의 세포에 처리한 후, 37℃의 CO₂ 배양기에서 3시간 동안 배양하였다. 배지를 제거하고 인산완충용액으로 3번 세척한 세포를 37℃의 CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐 테트라졸륨 브로마이드 (MTT, Sigma, USA)를 배지의 10% 되도록 가하고, 2시간 더 배양한 다음 상층액을 제거하고 0.04 N 염산 이소프로판올 용액을 첨가한 후에 엘라이저 리더 (ELISA reader, Sunrise-Basic TECAN, Mannedorf, Switzerland)를 이용하여 570nm에서 그 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 아무것도 처리하지 않은 세포가 사용되었다.

[0099] 도 14는 상기의 독소루비신을 함유한 환원형 산화그래핀 나노시트들의 항암 효능을 평가한 결과로 공배양 세포주에서, 독소루비신 함유 환원형 산화그래핀 나노시트 처리군과 비교하여, 프로부포린 지질 유도체 및 독소루비신 함유 환원형 산화그래핀 나노시트 처리군이 더 증강된 암세포 사멸효과를 나타낸다는 것을 보여준다. 상기 결과는 프로부포린 지질 유도체에 존재하는 섬유아세포 활성 단백질 기질 펩타이드 서열이 공배양 세포주에 존재하는 종양-관련 섬유아세포의 섬유아세포 활성 단백질 효소에 의해서 특이적으로 절단되고 그 결과 비활성의 프로부포린을 활성형의 부포린으로 전환시킴으로써 섬유아세포 활성 단백질을 세포 표면에 발현하는 종양-관련 섬유아세포가 같이 존재하는 공배양 세포주에 보다 효과적으로 독소루비신을 암세포내로 전달하여 증강된 항암 효능을 나타내는 것을 의미한다.

[0101] **실시예 4. 프로부포린 지질 유도체 및 독소루비신이 함유된 음이온성 리포솜의 제조 및 효능 평가**

[0102] **4-1. 프로부포린 지질 유도체 및 독소루비신이 함유된 음이온성 리포솜의 제조**

[0103] 실시예 3에서 합성한 프로부포린 지질 유도체, PC, PG, 콜레스테롤을 각각 0.2:2:2:2 μ mole씩 취하여 1ml의 클로로포름에 녹인 후 파이렉스 10ml 유리 격막 바이알에 넣어 혼합한 후, 실시예 5와 동일한 방법으로 프로부포린 지질 유도체가 수식화된 음이온성 리포솜을 제조하였다. 여기에 실시예 5와 동일한 방법으로 독소루비신이 함유된 프로부포린 지질 유도체 수식형 음이온성 리포솜을 제조하였다. 리포솜에 함유되지 않고 남아있는 독소루비신은 세파텍스 G15 컬럼(GE Healthcare, UK)을 사용하여 제거하였다. 얻어진 프로부포린 지질 유도체 및 독소루비신 함유 음이온성 리포솜은 사용하기 전까지 4℃에서 보관하였다.

[0104] **4-2. 프로부포린 지질 유도체 및 독소루비신 함유 음이온성 리포솜의 항암 효능 평가: MTT 분석**

[0105] 본 발명의 프로부포린 지질 유도체 및 독소루비신 함유 음이온성 리포솜의 표적세포 내로의 항암제 전달 효율 평가를 위하여 하기와 같은 과정으로 실험을 수행하였다. 사람 대장암 세포주인 HT29 또는 HT29 세포주와 종양-관련 섬유아세포가 같이 존재하는 공배양 세포를 실험 전날 24웰 플레이트에 웰 당 3×10^4 또는 9×10^4 개씩 분주 (seeding)하였다. 독소루비신 함유 음이온성 리포솜과 프로부포린 지질 유도체 및 독소루비신 함유 음이온성 리

포즘을 각각의 세포에 처리한 후, 37°C의 CO₂ 배양기에서 3시간 동안 배양하였다. 배지를 제거하고 인산완충용액으로 3번 세척한 세포를 37°C의 CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐 테트라졸륨 브로마이드 (MTT, Sigma, USA)를 배지의 10% 되도록 가하고, 2시간 더 배양한 다음 상층액을 제거하고 0.04 N 염산 이소프로판올 용액을 첨가한 후에 엘라이저 리더 (ELISA reader, Sunrise-Basic TECAN, Mannedorf, Switzerland)를 이용하여 570nm에서 그 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 아무것도 처리하지 않은 세포가 사용되었다.

[0106] 도 15는 상기의 독소루비신을 함유한 음이온성 리포좀들의 항암 효능을 평가한 결과로 공배양 세포주에서, 독소루비신 함유 음이온성 리포좀 처리군보다 프로부포린 지질 유도체 및 독소루비신 함유 음이온성 리포좀 처리군이 더 증강된 암세포 사멸효과를 나타낸다는 것을 보여준다. 상기 결과는 프로부포린 지질 유도체에 존재하는 섬유아세포 활성 단백질 기질 펩타이드 서열이 공배양 세포주에 존재하는 종양-관련 섬유아세포의 섬유아세포 활성 단백질 효소에 의해서 특이적으로 절단되어 비활성의 프로부포린을 활성형의 부포린으로 전환시킴으로써 섬유아세포 활성 단백질을 세포 표면에 발현하는 종양-관련 섬유아세포가 같이 존재하는 공배양 세포주에 보다 효과적으로 독소루비신을 암세포내로 전달하여 증강된 항암 효능을 나타내는 것을 의미한다.

[0108] 실시예 5. PL-rGo 나노시트 복합체에 의한 FAP 발현-의존적 용혈 활성

[0109] 5-1. 정상 섬유아세포 및 CAF의 분리

[0110] 기존 방법(Castello-Cros R, Cukierman E. Stromagenesis during tumorigenesis: characterization of tumor-associated fibroblasts and stroma-derived 3D matrices. *Methods Mol Biol.* 2009;522:275305; Wang H, Wu Q, Liu Z, et al. Downregulation of FAP suppresses cell proliferation and metastasis through PTEN/PI3K/AKT and Ras-ERK signaling in oral squamous cell carcinoma. *Cell Death Dis.* 2014;5:e1155)을 약간 변형시켜 CAF 및 정상 섬유아세포를 분리하였다. 구체적으로 HT29-종양 함유 마우스(접종 14일 후)의 대장암 조직에서 CAF를 분리하였고, 누드 마우스의 폐 조직에서 정상 섬유아세포를 분리하였다. 인산염 완충식염수(PBS)로 세척한 후, 상기 조직을 기계로 갈아 작은 조각으로 한 후, 100유닛/ml 페니실린 플러스 100µg/ml 스트렙토마이신(GenDepot Inc., Barker, TX, USA), 1mg/ml 콜라게나아제 타입 I(Sigma-Aldrich) 및 1mg/ml 히알루로니다아제(Sigma-Aldrich)가 첨가된 무혈청-DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Welgene Inc., Daegu, Republic of Korea)에서 37°C, 1시간 동안 다이제스트시켰다. CAF 및 정상 섬유아세포를 90 x g에서 3분간 분별 원심분리하였다. CAF 또는 정상 섬유아세포를 함유하는 상층액을 800 x g에서 10분간 원심분리시켜, 15% 우태아 혈청(FBS; GenDepot), 100 유닛/ml 페니실린, 및 100µg/ml 스트렙토마이신이 첨가된 DMEM에 재서스펜션시켜 배양하였다. 분리된 CAF 및 정상 섬유아세포를 7일간 배양한 후 실험에 사용하였다.

[0111] 5-2. CAF 및 HT29 세포의 공배양

[0112] ATCC(American Type Culture Collection; Manassas, VA, USA)로부터 HT29 인간 대장선암 세포주를 얻었다. 10% FBS, 100 유닛/ml의 페니실린, 및 100µg/ml의 스트렙토마이신이 첨가된 DMEM에서 상기 세포를 배양하였다. 우선 24-웰 플레이트(SPL Life Sciences, Pochon, Republic of Korea)에 6×10⁴ 세포/웰 농도로 CAF를 씨딩하고 그 후 24시간 동안 ~80% 콘플루언스까지 배양한 후, 2:1의 CAF : HT29 세포비로 상기 미리 배양된 CAF 위에 HT29 세포를 씨딩함으로써, 소간섭 RNA (siRNA) targeting FAP (siFAP) 존재 또는 무존재하의 CAF를 HT29 세포와 함께 공배양하였다.

[0113] 5-3. FAP 발현 분석

[0114] 상기와 같이 분리된 CAF 및 HT29세포 표면에서의 FAP 발현은 유세포분석기로 측정하였다. 하베스트한 후, 2% 소혈청 알부민(BSA; USB Corp., Cleveland, OH, USA)을 함유하는 차가운 인산염 완충식염수(PBS)에서 4°C, 1시간 동안 배양함으로써 상기 세포를 블락하였다. 그 후 상기 세포를 PBS로 세척한 후 래빗 항-FAP 1차 항체(Abcam, Cambridge, UK) 존재하에서 4°C, 1시간 동안 우선 배양한 후, 차가운 PBS에 1:10으로 희석하고나서, 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC)-접합된 항-래빗 2차 항체(Biolegend, San Diego, CA, USA) 존재하에서 배양하고 1:10으로 희석하였다. BD FACS Calibur system equipped with Cell Quest Pro software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 사용하여 단일클론 형광 항체를 탐지함으로써 FAP-발현 세포를 확인하였다.

[0115] 5-4. 용혈 분석법

[0116] HT29 (1×10⁶ cells), 분리된 CAFs (1×10⁶ cells), 또는 CAF와 공배양된 HT29 (총 2×10⁶ cells)를 10µg의 PL,

1 μ g의 정제된 FAP (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN), 및 정제된 매트릭스 메탈로프로테이나제(MMP9; R&D Systems Inc.)와 함께 마우스 적혈구(mRBC) 존재하에서 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 체로 용혈 대조군으로 PBS에만 서스펜션된 mRBC를 사용하였고, 1% 트리톤 X-100(USB Corp., Cleveland, OH)에 존재하는 mRBC는 100% 용혈 대조군으로 사용하였다. 1000 \times g에서 10분간 원심분리한 후, 용해되지 않은 mRBC를 함유하는 상층액을 3차례 투명하고 바닥이 평편한 96-웰 폴리스티렌 플레이트(SPL Life Sciences)로 옮겼다. Molecular Devices Spectra Max Plus automatic plate reader를 사용하여 540nm에서 샘플의 흡광도를 측정하여 용혈 정도를 측정하였다.

[0117] FAP 발현 레벨이 HT29 세포(도 3A) 및 CAF 사이에 서로 달랐다(도 3B). 유세포 분석결과, CAF의 90.3%가 FAP 발현에 양성인 반면, HT29 세포의 5.1%만이 FAP-양성이었다(도 3A). PL 또는 PL-rGO의 프로펠리틴 부분이 외인성 FAP 또는 CAF에 발현된 FAP에 의해 기공-형성 펠리틴으로 선택적으로 절단될 수 있는지 시험하기 위하여, 상기와 같이 마우스 적혈구 용혈분석법을 수행하였다. FAP 처리 후에 PL(도 3C) 및 PL-rGO(도 3E)에 의해 mRBC가 용해되었지만, 매트릭스 메탈로프로테이나제(MMP)-9와 같이 처리한 후에는 그렇지 않았다. 특히, PL ($P < 0.001$) (도 3D) 및 PL-rGO ($P < 0.001$) (도 3F)에 의한 mRBC 용해가 CAF 및 HT29 세포의 공배양 시스템에서는 관찰되었지만, HT29 세포 단독에서는 그렇지 않았다. 이는 FAP 특이적 PL의 활성화를 나타낸다.

[0119] **실시예 6. FAP-양성 CAF 존재하에서 PL-rGO 나노시트 복합체의 세포내로의 전달 효능 분석**

[0120] **6-1. FAP-특이적 siRNA를 이용한 CAF의 낙다운**

[0121] FAP-특이적 siRNA(siFAP) 및 GFP-특이적 siRNA(siGFP)는 Bioneer Corporation (Daejeon, Republic of Korea)에서 공급받았다. 트랜스펙션에 사용된 siRNA의 서열은 하기와 같다 : siFAP, 5' -GGA AAG AAA GGU GCC AAU AdTdT-3' (sense) and 5' -UAU UGG CAC CUU UCU UUC CdTdT-3' (antisense); siGFP, 5' -GGC UAC GUC CAG GAG CGC ACC dTdT-3' (sense) and 5' -GGU GCG CUC CUG GAC GUA GCC dTdT-3' (antisense). 분리된 CAF(4×10^5 세포/웰)를 10-cm 플레이트(SPL Life Sciences) 위에 씨딩하였다. 24시간 후, 매뉴얼에 따라 Lipofectamine 2000 (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 세포를 siRNA 존재하에서 트랜스펙션시켰다. 1ml의 Opti-MEM (Gibco BRL; Grand Island, NY, USA)에서 siRNA(50nmol/l)를 15 μ l의 리포펙타민 2000과 혼합하였다. 상기 혼합물을 실온에서 20분간 배양하여 상기 세포에 첨가하였다. 그 후 상기 세포를 48시간 동안 배양하여 실험에 사용하였다.

[0122] **6-2. FAP 낙다운 평가를 위한 정량적 실시간 PCR**

[0123] 정량적 실시간 PCR(qRT-PCR)을 이용하여 mRNA 레벨에서 FAP 낙다운을 평가하였다. TRIzol 시약(Invitrogen)을 사용하여, siFAP 또는 siGFP 존재하에 처리된 CAF 플러스 HT29에서 총 RNA를 추출하여 RT PreMix (Intron Biotechnology Inc., Seoul, Republic of Korea)를 사용하여 cDNA로 역전사시켰다. 상기 혼합물을 42°C에서 60분 동안 그리고 70°C에서 5분간 배양하였다. Triplicate cDNA 샘플을 qRT-PCR로 증폭시켰다. FAP에 대한 프라이머는 5' -GTA TTT GGA GTT GCC ACC TCT G-3' (sense) 및 5' -GAA GGG CGT AAG ACA ATG CAC-3' (antisense)이다. LightCycler 2.0 instrument (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and FastStart DNA Master PLUS SYBR Green reagents (Roche Diagnostics)를 사용하여 20- μ l 유리모세관에서 qRT-PCR을 수행하였다. 증폭 조건은 95°C에서 10분간 초기 변성단계, 95°C에서 30s, 55°C에서 20s, 및 72°C에서 20s의 40사이클이었다. FAP mRNA 발현 레벨을 하우스키핑 유전자, 글리세알데하이드-3-포스페이트 데히드로게나아제의 것으로 노말라이즈하였다.

[0124] **6-3. 웨스턴 블랏 분석**

[0125] siFAP에 의한 FAP 단백질 발현 싸일런스를 웨스턴블랏으로 평가하였다. siFAP 존재하에 트랜스펙션된 CAF 플러스 HT29를, 프로테아제 저해제 혼합물(Roche Diagnostics)이 첨가된 0.1ml의 용해버퍼(20 mM Tris-HCL pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 75 mM NaCl)에 서스펜션시켰다. 재서스펜션된 세포를 얼음상에서 20분 동안 배양하여 12,000 x g에서 15분동안 원심분리하여 분류하였다. 상기 세포 용해물을 BCA 단백질 분석 키트(Thermo Scientific; Pittsburgh, PA, USA)를 매뉴얼에 따라 사용하여 정량하였다. 샘플 내 단백질을 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동(SDSOPAGE)로 8% 겔상에 리졸브한 후 폴리비닐리덴 다이플루오라이드 막(Hybond-ECL; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)위에 옮겼다. FAP에 특이적이 항체(1:1000; Abcam, Cambridge, UK) 및 β -액틴(1:1000; Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA, USA)을 사용하여 웨스턴 블랏으로 막을 분석하였다. 면역반응성 단백질을 ECL(enhanced chemiluminescence) 시약(Amersham Biosciences)을 사용하여 가시화시켜 LAS-4000 image analyzer (Fujifilm, Tokyo, Japan)로 탐지하였다.

[0126] **6-4. PL-rGO 나노시트 복합체에 의해 전달된 Dox의 세포내 유입**

[0127] 형광 지질 염료로 표지된 다양한 rGO 나노시트의 세포내 유입을 공초점 현미경을 사용하여 시험하였다. HT29 세포 단독, 또는 siFAP 처리 또는 무처리된 CAF 플러스 HT29 세포를 24웰 플레이트에 9×10^4 세포/웰 농도로 씨딩하였다. 공초점 현미경으로 분석하기 위하여, 실시예 1-3에서 제조한 Cy5.5-접합된 다이스테아로일-포스파티딜 에탄올아민 폴리에틸렌 글리콜-2000(DSPE-PEG5000-Cy5.5) 지질로 표지된 PL-rGO 또는 rGO로 세포를 처리하였다. 1시간동안 배양한 후, 세포를 세척하여 PBS내 4% 파라포름알데히드로 15분간 고정시켜, 4,6-다이아미디노-2-페닐인돌 다이히드로클로라이드(DAPI)로 염색시켰다. 공초점 레이저-스캐닝 현미경(LSM 5 Exciter; Carl Zeiss, Inc.)을 사용하여 Cy5.5 형광을 탐지하였다.

[0128] 상기와 같이, PL-rGO의 세포내 유입이 증가되는 것을 입증하기 위하여 우선 siFAP의 트랜스펙션에 의한 FAP 녹다운 CAF를 설계하였다(Verma SC, Agarwal P, Krishnan MY. Primary mouse lung fibroblasts help macrophages to tackle Mycobacterium tuberculosis more efficiently and differentiate into myofibroblasts up on bacterial stimulation. Tuberculosis. 2016; 97:172180). CAF 세포에 siFAP을 처리하면 대조군 레벨에 비해 FAP의 mRNA 레벨이 감소하는 것으로 나타났다(mean = 30.9%, 95% CI = 27.1% to 34.8%, $P < .001$)(도 9의 A). 웨스턴 블랏에서도 FAP 단백질 발현이 감소된 것으로 나타났다(도 9의 B). 반대로, siGFP(대조군)을 CAF에 처리하면 FAP mRNA 단백질이 감소되지 않았다. CAF 또는 HT29 세포의 단독 배양에서, PL-rGO 나노시트의 세포내 유입은 FAP-양성 CAF에서는 선택적으로 증가하였지만 FAP-음성 HT29 세포(도 4A) 또는 FAP 녹다운 CAF(도 4B)에서는 그렇지 않았고, 상기에서 형광 염료-표지된 PL-rGO의 유입은 형광 염료-표지된 rGO 나노시트의 유입과 다르지 않았다. 반대로, 형광 염료-표지된 PL-rGO의 세포내 유입은, FAP-양성 CAF와 같이 공배양된 HT29 세포에서의 형광 염료-표지된 rGO 유입보다 더 컸다. 상기의 결과는, PL-rGO의 PL이 FAP에 의해서 특이적으로 절단되어 종양 미세환경에 존재하는 암 세포로 특이적으로 약물을 탑재한 rGO가 전달되는 것을 나타낸다.

[0130] **실시예 7. Dox/PL-rGO 나노시트 복합체의 인비트로 항암 효능**

[0131] 세포 생존력 분석법을 사용하여 실시예 1의 Dox/PL-rGO 나노시트 복합체의 인비트로 항암 효능을 측정하였다. 구체적으로 siFAP (9×10^4 cells/well)로 처리 또는 비처리된 HT29 세포 (3×10^4 cells/well) 또는 HT29 세포 플러스 CAF를 24-웰 플레이트 위에 씨딩하고 다음날 12.5 μ g/mL rGO 및 1 μ M Dox 농도의 Dox/PL-rGO 또는 PL-rGO로 처리하였다. Dox-함유 배양 배지를 제거한 후, rGO 또는 PL-rGO(rGO 농도, 12.5 μ g/mL)를 상기 세포에 첨가하였다. 3시간 동안 배양한 후, 배양 배지를 새것으로 교체하고 세포를 24시간 동안 두었다. Cell Counting Kit-8 (CCK-8; Dojindo, Tokyo, Japan) 또는 live cellstaining assay (LIVE/DEAD Viability Assay; Molecular Probes, Eugene, OR)를 제조자의 방법대로 사용하여 세포 생존력을 측정하였다.

[0132] 결과는 도 5에 기재되어 있다. 도 5는 상기와 같은 실험을 통해, PL-rGO의 유입이 증가되면 인비트로에서 Dox-탑재된 PL-rGO의 효능이 증가되는지 시험한 것이다. Dox/PL-rGO의 항암 활성이 CAF/HT29 세포 공배양 시스템에서 증가하였지만 FAP-음성 HT29 세포에서는 그렇지 않았는데(도 5A), 항암 활성은 시험한 모든 그룹 사이에서 통계적으로 유의하게 다르지 않았다(Dox: mean = 90.5%, 95% CI = 88.2% to 92.8%, $P = .91$; PL: mean = 93.8%, 95% CI = 93.1% to 94.5%, $P = .81$; Dox + rGO: mean = 91.5%, 95% CI = 90.3% to 92.6%, $P = .98$; Dox/rGO: mean = 93.9%, 95% CI = 91.3% to 96.6%, $P = .85$; PL-rGO: mean = 91.3%, 95% CI = 90.5% to 92.1%, $P = .92$; Dox + PLrGO: mean = 89.7%, 95% CI = 84.8% to 94.6%, $P = .86$). Dox/PL-rGO의 항암 활성은 siFAP을 트랜스펙션한 FAP 녹다운 CAF/HT29 세포 및 HT29 세포에서보다 CAF/HT29 세포에서 각각 1.5배 및 2.7배 더 높았다. CAF/HT29 공배양에서 유리 Dox(mean = 80.1%, 95% CI = 78.9% to 81.3%) 및 Dox/rGO(mean = 68.9%, 95% CI = 66.0% to 71.8%)와 비교하여 세포-킬링 효과는 Dox/PL-rGO(mean = 33.3%, 95% CI = 32.4% to 34.3%)가 3.4- 및 2.1배 더 높게 나타났다. 게다가, CAF/HT29 세포배양에서 Dox 플러스 PL-rGO를 순차적으로 처리한 것과 비교하여 Dox/PL-rGO가 항암 효과가 통계적으로 상당히 더 컸다($P < 0.001$)(도 5A). 생/사 형광 분석 시스템에서도 유사한 결과가 나타났는데, Dox/PL-rGO가 선택적으로 공배양된 CAF 및 HT29 세포에서 주목할만한 세포-킬링 효과가 나타난(도 5D) 반면, HT29세포 단독(도 5B) 또는 FAP 녹다운 CAF/HT29 세포(도 5C)에서는 그렇지 않은 것으로 나타났다.

[0133] 상기의 결과는 Dox/PL-rGO의 인비트로 항암 효능이 종양 조직에서만 특이적으로 관찰된다고 알려진, FAP을 발현하고 있는 CAF (정상 조직의 fibroblast는 FAP을 발현하지 않으며 종양 조직의 fibroblast 즉 CAF만 FAP을 발현함) 존재하는 공배양 시스템 상에서만 특이적으로 나타내는 것으로, 암세포 특이적 약물 전달 효능을 나타내

는 것이다.

- [0135] **실시예 8. 정상 섬유아세포에서의 유리(free) Dox 및 Dox/PL-rGO 나노시트 복합체의 세포독성 분석**
- [0136] 실시예 1의 Dox/PL-rGO의 인비트로 독성을 세포 생존 분석법을 사용하여 평가하였다. 정상 섬유아세포를 24-웰 플레이트에 6×10^4 세포/웰의 농도로 씨딩한 후, 다음날 다른 농도의 Dox 단독 또는 Dox/PL-rGO로 처리하였다. 3 시간 후, 배양 배지를 새것으로 교체하고 24시간 동안 세포를 동일하게 유지시켰다. 제조자(Dojindo Molecular Technologies, Inc.) 매뉴얼의 프로토콜에 따른 CCK-8 분석법을 통해 세포생존력을 측정하였다. CCK-8 분석법을 하기 위하여 20 μ l의 CCK-8(수용성 테트라졸리움 염) 용액을 각 웰에 첨가하여 30분간 배양한 후, 마이크로플레이트 리더(Sunrise-Basic; TECAN, Mannedorf, Switzerland)를 사용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0137] 상기와 같이, 유리 Dox 및 Dox/PL-rGO의 차별적 세포독성을 정상 섬유아세포에서 조사한 결과 유리 Dox는 정상 섬유아세포에서 농도-의존적 세포독성 효과를 나타냈다(도 10). 반대로, Dox/PL-rGO 나노시트는 대조군 세포와 비교하여 정상 섬유아세포에서 통계적으로 유의하게 세포독성을 유도하지 않았다(1 μ M Dox on PL-rGO: mean = 91.5%, 95% CI = 88.8% to 94.2%, P = .08; 5 μ M Dox on PL-rGO: mean = 91.8%, 95% CI = 89.8% to 93.8%, P = .06; 10 μ M Dox on PL-rGO: mean = 90.2%, 95% CI = 85.6% to 94.8%, P = .05). 정상 섬유 아세포를 10 μ M 유리 Dox로 처리하면 대조군 세포와 비교하여 세포 생존력이 감소하였다(mean = 67.0%, 95% CI = 60.7% to 73.3%, P < .001).
- [0138] 상기의 결과는 FAP을 발현하지 않는 정상 섬유아세포에서는 Dox/PL-rGO가 인비트로 독성을 나타내지 않음을 보여주고 있다. 이는 종양 미세환경 내의 CAF 표면에서만 발현되어지는 FAP에 의해서만 Dox/PL-rGO가 활성화 되어진 후 약물의 효능을 나타낼 수 있어, 부작용을 최소화할 수 있음을 나타내는 것이다.
- [0140] **실시예 9. 인비보 분자 이미징을 통한 실시예 1의 PL-rGO 나노시트 복합체의 인 비보 종양조직 축적 및 침투 확인**
- [0141] 5주령 암컷 Balb/c 및 흥선제거 누드마우스(Orient Bio Inc., Seongnam, Kyonggi-do, Republic of Korea)를 사용하여, 종양조직내로의 DSPE-PEG₅₀₀₀-Cy5.5-labeled rGO 또는 PL-rGO 나노시트 복합체의 인비보 분포 및 침투를 분자 이미징으로 측정하였다. 모든 동물실험은 서울대학교 동물실험 윤리위원회의 실험동물 관리와 사용에 대한 지침에 따라 관리되고 사용되었다(approved animal experimental protocol number SNU-130129-3-1).
- [0142] 구체적으로 마우스 등(dorsal) 오른쪽 측면 피하에 5×10^6 HT29 세포를 주입하였다. 종양이 자라난 후, DSPE-PEG₅₀₀₀-Cy5.5-labeled rGO (5mg/kg rGO) 또는 PL-rGO 나노시트(10mg/kg PL, 5mg/kg rGO)를 마우스에게 정맥주사하였다. 이어 eXplore Optix system (Advanced Research Technologies Inc., Montreal, Canada)을 이용하여 인비보 분포 및 종양 침투를 평가하였다. rGO 또는 PL-rGO 나노시트의 침투 깊이를 측정하기 위하여, 기록된 데이터를 수반된 소프트웨어를 사용하여 3D 이미지로 재구성하였다. 670-nm pulsed-laser diode를 사용하여 Cy5.5를 엑사이트시켰다. fast photomultiplier tube (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) and a time-correlated single-photon counting system (Becker and Hickl GmbH, Berlin, Germany)를 사용하여 장파장 형광 배출을 측정하였다.
- [0143] 결과는 도 6에 있다. 상기와 같이 인비보 투여 후의 DSPE-PEG₅₀₀₀-Cy5.5 지질-표지된 rGO 및 PL-rGO의 종양 분포를 측정하였다. 24시간 post-dose에서(도 6A). 종양 부위에의 형광 축적은 rGO로 처리한 마우스보다 PL-rGO로 처리한 마우스에서 더 컸다. 종양 조직에서 형광 PL-rGO의 형광 강도는 주입 후 72시간동안 더 크게 유지되었다(도 6B). 상기 후자 시점에서의 광자수 측정에서 DSPE-PEG₅₀₀₀-Cy5.5-표지된 PL-rGO 나노시트의 종양 유지(retention)(mean = 12.3×10^3 photon counts, 95% CI = 9.3 to 15.3×10^3 photon counts)은 DSPE-PEG₅₀₀₀-Cy5.5-표지된 rGO 나노시트(mean = 4.0×10^3 photon counts, 95% CI = 3.2 to 4.8×10^3 photon counts)보다 3배 더 높았다(도 6B). 추가로 DSPE-PEG₅₀₀₀-Cy5.5 지질-표지된 rGO 및 PL-rGO의 인비보 종양 침투를 eXplore Optix imaging with 3D analysis를 사용하여 측정하였다. 1일 포스트도즈에서, DSPE-PEG₅₀₀₀-Cy5.5 지질-표지된 rGO (도 6C) 또는 DSPE-PEG₅₀₀₀-Cy5.5 지질-표지된 PL-rGO(도 6D)로 처리한 종양 조직의 밑바닥에서부터 1mm 간격으로 총 8개의 Z-스택 영상을 획득하였다. 총 영상에 대한 형광 Cy5.5-양성 z-스택 영상의 비율은, DSPE-PEG₅₀₀₀-Cy5.5 지질-표지된 rGO (mean = 0.5, 95% CI = 0.3 to 0.6)과 비교하여 DSPE-PEG₅₀₀₀-Cy5.5 지질-표지된

PL-rGO (mean = 0.9, 95% CI = 0.7 to 1.0)가 더 높았다.

[0144] 상기의 결과는, 인비보 모델에서 PL-rGO가 정상 조직보다 암 조직에 보다 많이 축적되고, 종양 조직내에서 활성화 형태로 변환된 멜리틴의 막공 형성 효과에 의하여 종양 조직내 침투 효과 또한 증강시킬 수 있음을 나타낸다.

[0146] **실시예 10. 실시예 1의 Dox/PL-rGO 나노시트 복합체의 인비보 항종양 효능**

[0147] 본 실시예에서는 CAF에서 발현되는 FAP에 의한 PL-rGO의 선택적 활성화 실험을 위해 대장암 이종이식 모델을 사용하였다. 구체적으로 HT29 tumorbearing mice를 사용하여 Dox/PL-rGO의 인비트로 항암 효능을 평가하였다. 5-주령 암컷 흥선제거 누드 마우스에게 등(dorsal) 오른쪽 측면 피하에 5×10^6 HT29 세포를 주입하였다. 종양 부피가 120mm³가 되었을 때, Dox (1mg/kg), PL (10mg/kg), Dox/rGO (1mg/kg Dox, rGO 5mg/kg), PL-rGO (10mg/kg PL, 5mg/kg rGO), 또는 Dox/PL-rGO (1mg/kg Dox, 10mg/kg PL, 5mg/kg rGO)를 2일마다 총 3번 마우스에게 정맥 주사하였다. 종양 접종 후 24일에 종양 조직을 10% 포르말린에 고정시켜 면역형광염색을 위한 파라핀 블록에 포매시켰다. 항-FAP 또는 항-CD133 항체 존재하에 면역염색한 종양 조직 섹션(4μm thick)으로 항암 효과를 측정하였다. Dox/PL-rGO의 인비보 항종양 효능을 HT29 종양 이종이식 모델에서와 같이 측정하였다.

[0148] 결과는 도 7에 기재되어 있다. 종양 접종 후 24일에, 유리 Dox (mean = 697.0mm³, 95% CI = 646.9 to 747.1mm³), 유리 PL (mean = 565.0mm³, 95% CI = 550.5 to 579.6mm³), Dox/rGO (mean = 637.6mm³, 95% CI = 619.5 to 655.7mm³), 또는 PL-rGO (mean = 464.4mm³, 95% CI = 433.0 to 495.8mm³)로 처리한 것과 비교하여 Dox/PL-rGO (mean = 200.6mm³, 95% CI = 148.7 to 252.5mm³)로 처리한 마우스에서 종양 부피가 통계적으로 유의하게 더 작았다(도 7A). 상기 결과와 일치하게도, 24일의 종양 무게가 Dox/PL-rGO로 처리한 마우스가 가장 적었다(도 7B). Dox/PL-rGO 의한 종양 무게 성장의 저해(mean = 155.0mg, 95% CI = 99.0 to 211.0mg)는 유리 Dox (mean = 685.0mg, 95% CI = 661.0 to 709.0mg) 및 Dox/rGO (mean = 555.2mg, 95% CI = 483.2 to 627.2mg)에 의한 것보다 각각 4.4- 및 3.6배 더 높았다. 면역 형광 염색에서, 항-CD133-양성 HT29(도 7C) 및 항-FAP-양성 CAF(도 7D) 세포 집단이 Dox/PL-rGO로 처리한 마우스의 종양 조직에서 가장 낮았다.

[0149] 상기 결과는 FAP를 발현하는 다양한 암에서 조직에 축적된 Dox/PL-rGO가 FAP 프로티아제 의해서 활성화된 후 약물을 암 세포로 효율적으로 전달한 결과, 종양의 성장이 저해됨을 보여주고 있다.

[0151] **실시예 11. 실시예 1의 Dox/PL-rGO 나노시트 복합체의 인비보 독성**

[0152] 서로 다른 용량의 Dox/PL-rGO를 5-주령 암컷 Balb/C 마우스 (Daehan Biolink; Seungnam, Republic of Korea)에게 정맥주사하였다. 급성 독성 시험을 하기 위하여, 마우스(각 그룹당 n = 5마리)에게 Dox/PL-rGO(rGO dose, 5 or 10 mg/kg)를 단일 투여하였다. 반복 투여 후의 독성은 각 마우스(각 그룹당 n = 5마리)에서 Dox/PL-rGO (rGO dose, 5mg/kg)를 2일마다 총 3번 정맥투여하여 시험하였다. Dox/PL-rGO 투여 24시간 후에 수집한 혈액 샘플을 사용하여 혈액학적 생화학적 파라미터를 분석하였다. 생화학적 분석을 하기 위하여, 혈액을 1,000 x g에서 20분간 원심분리하여 혈청을 모아 BUN(blood urea nitrogen) 및 크레아티닌을 분석할때까지 20℃에서 저장하였다. 하기와 같은 혈액학적 파라미터를 분석하였다 : 백혈구 (WBC) 수; 적혈구 (RBC) 수; 헤모글로빈 (Hb); 헤마토크리트 (Hct); 평균 적혈구 용적(MCV); 평균 혈구 혈색소 (MCH); 평균 혈구 혈색소 농도 (MCHC); 및 혈소판, 림프구, 단핵구, 호산구 및 호염구 수. 상기 분석은 Neodin VET Diagnostics Institute (Seoul, Republic of Korea)에서 수행하였다. 상기와 같이, Dox/PL-rGO 나노시트의 인비보 독성을 1회 주입 또는 3회 반복 주입 후에 측정하였다.

[0153] 결과는 도 11에 기재되어 있다. 비처리된 그룹과 비교하여, Dox/PL-rGO (1mg/kg Dox, 10mg/kg PL, 5mg/kg rGO) 주입 후 혈액요소질소(single administration: P = .65; repeated administrations: P = .72)(도 11A 및 C) 또는 크레아티닌(single administrations: P = .10; repeated administrations: P = .90)(도 11B 및 D)에 대해 통계적으로 유의한 변경이 없었고, 모든 혈액학적 파라미터가 정상범위내였다.

[0154] [표 1] Dox/PL-rGO 단일 투여 후의 혈액학적 파라미터

Parameters (units)	WBC (10 ⁹ /μL)	RBC (10 ¹² /μL)	Hb (g/dL)	HCT (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Platelet (10 ⁹ /μL)	Lymphocyte (%)	Monocyte (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)
Normal ranges	1.8-10.7	6.36-9.42	11.0-15.1	35.1-45.4	45.4-60.3	14.12-19.3	30.2-34.2	592-2972	55.8-91.6	0.0-7.5	0.0-3.9	0.0-2.0
Untreated	4.75 ± 1.52	7.40 ± 0.35	13.44 ± 0.67	38.04 ± 2.20	51.47 ± 1.21	18.19 ± 1.38	33.77 ± 1.04	513.60 ± 134.45	84.53 ± 4.37	2.68 ± 0.39	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Dox/PL-rGO (5 mg/kg rGO)	5.18 ± 0.84	8.14 ± 0.80	14.08 ± 1.44	42.54 ± 4.48	52.22 ± 0.96	17.30 ± 0.66	33.14 ± 1.67	379.83 ± 82.55	82.34 ± 2.76	4.43 ± 0.35	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Dox/rGO (10 mg/kg rGO)	8.16 ± 6.32	8.35 ± 0.50	14.35 ± 0.88	43.30 ± 3.08	51.72 ± 1.42	17.15 ± 0.45	33.17 ± 0.90	413.00 ± 48.09	82.68 ± 3.37	6.56 ± 4.95	3.52 ± 4.06	0.28 ± 0.33

[0155]

[0156]

* Dox = 독소루비신; PL = 프로멜리틴 지질 유도체; rGO = 환원된 그래핀 옥사이드; WBC = 백혈구; RBC = 적혈구; Hb = 헤모글로빈; HCT = 헤마토크릿; MCV = 평균 적혈구 용적; MCH = 평균 혈구 혈색소; MCHC = mean 평균 혈구 혈색소 농도.

[0157]

[표 2] Dox/PL-rGO 반복 투여 후의 혈액학적 파라미터

Parameters (units)	WBC (10 ⁹ /μL)	RBC (10 ¹² /μL)	Hb (g/dL)	HCT (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Platelet (10 ⁹ /μL)	Lymphocyte (%)	Monocyte (%)	Eosinophil (%)	Basophil (%)
Normal ranges	1.8-10.7	6.36-9.42	11.0-15.1	35.1-45.4	45.4-60.3	14.12-19.3	30.2-34.2	592-2972	55.8-91.6	0.0-7.5	0.0-3.9	0.0-2.0
Untreated	4.75 ± 1.52	7.40 ± 0.35	13.44 ± 0.67	38.04 ± 2.20	51.47 ± 1.21	18.19 ± 1.38	33.77 ± 1.04	513.60 ± 134.45	84.53 ± 4.37	2.68 ± 0.39	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Dox/PL-rGO (5mg/kg rGO)	4.64 ± 0.74	8.32 ± 0.32	14.01 ± 0.72	44.23 ± 1.99	53.18 ± 1.05	16.85 ± 0.32	31.68 ± 0.58	510.60 ± 138.61	81.00 ± 3.48	3.89 ± 0.68	1.49 ± 3.32	0.17 ± 0.38

[0158]

[0159]

* Dox = 독소루비신; PL = 프로멜리틴 지질 유도체; rGO = 환원된 그래핀 옥사이드; WBC = 백혈구; RBC = 적혈구; Hb = 헤모글로빈; HCT = 헤마토크릿; MCV = 평균 적혈구 용적; MCH = 평균 혈구 혈색소; MCHC = mean 평균 혈구 혈색소 농도.

[0160]

상기 결과는 단일 또는 반복 주사된 PL-rGO가 인비보 독성이 없음을 보여주는 것으로서, 종양이 존재하는 종양 미세환경에 Dox/PL-rGO가 도달하기 전까지는 안정성이 높은 상태로 유지될 수 있음을 의미한다.

[0162]

통계

[0163]

Student-Newman-Keuls post hoc test와 함께 ANOVA(Two-sided analysis of variance)를 이용하여 실험 데이터를 통계적으로 평가하였다. 0.05 이하의 P가 통계적으로 유의한 것으로 처리하였다. 도면에 기재된 모든 에러바는 95% 신뢰구간(CIs)을 나타낸다. SPSS software (version 23; Chicago, IL)를 사용하여 모든 통계 분석을 수행하였다.

[0164]

본 발명에서는, PL-rGO, PB-rGO, PL-리포솜, 및 PB-리포솜 나노복합체가 종양 미세환경에서 CAF에서 발현되는 FAP에 의해 활성화되어 항암제를 암세포로 특이적으로 전달하여 항종양 효능을 증강시킬 수 있다는 것을 입증하였다. FAP-절단가능한 펩타이드 서열을 함유하는 PL 또는 PB은, FAP 처리 후에 RBC 용혈 또는 용해작용을 일으키지만 MMP 처리 후에는 그렇지 않은 것으로 나타나 암세포에서 발현되는 FAP에만 특이적으로 반응을 하였다. 또한, HT29 세포 단독이 아닌, CAF와 함께 공배양된 HT29 세포에서, Dox/rGO와 비교하여 Dox/PL-rGO의 항종양 효과가 증가되었다.

[0165]

본 발명의 PL-rGO, PB-rGO, PL-리포솜, 및 PB-리포솜의 나노복합체는, 종양미세환경에서 세포독성이 있는 약물을 선택적으로 활성화시키고, 그럼으로써 정상 조직에 대한 세포독성 약물의 부작용을 감소시킬 수 있다는 장점이 있다. 종양미세환경은 최근 약물-대사 효소를 발현하여 종양세포를 화학적으로 보호(chemoprotection)한다고 보고되고 있다. 급성 골수성 백혈병(myeloid leukemia)에서, 종양 미세환경에서 레티노이드-대사 효소인 p450(CYP)-26의 발현으로 인해 올트랜스레티노산(all-trans retinoic acid)의 활성을 감소시키고 급성 골수성 백혈병 세포를 보호하는 것으로 나타났다. 인간 골수 유래 스트로마 세포에서 CYP3A4가 발현되면 다양한 골수종 및 백혈병 세포의 보르테조밐(bortezomib) 및 에토포시드(etoposide)에 대한 감수성을 감소시키는 것으로 나타났다. 유리 Dox와 비교하여 Dox/PL-rGO, Dox/PL-리포솜의 Dox는, 효소 접근성이 낮아지기 때문에 CYP에 대한 감수성이 적은 것으로 생각된다. 따라서 종양미세환경에서의 PL-rGO상의 Dox의 대사가 감소되면 종양세포의 약물 감수성은 증가될 수 있다. 게다가, PL-rGO 상에 Dox 및 CYP 저해제를 이중 탑재하면 Dox에 대한 종양 세포의 감수성을 추가로 증가시키는 것이 가능하다.

[0167]

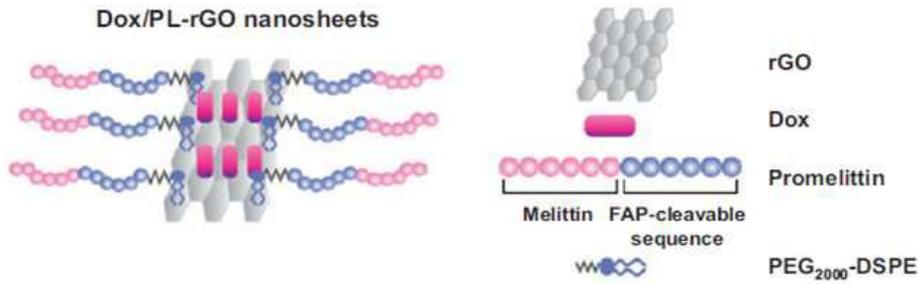
이상에서 본원의 예시적인 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본원의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본원의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본원의 권리범위에 속하는 것이다.

[0169]

본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.

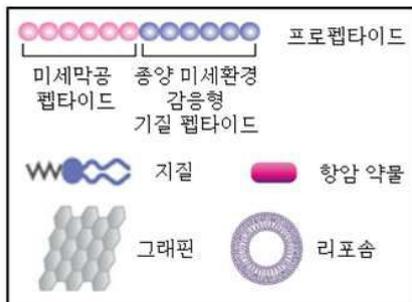
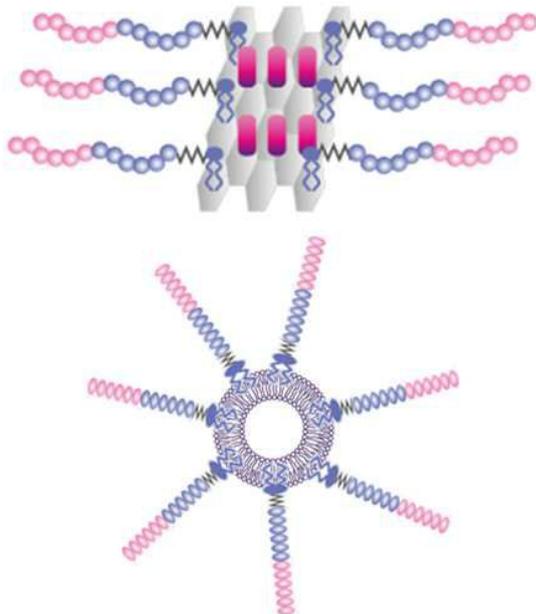
도면

도면1a

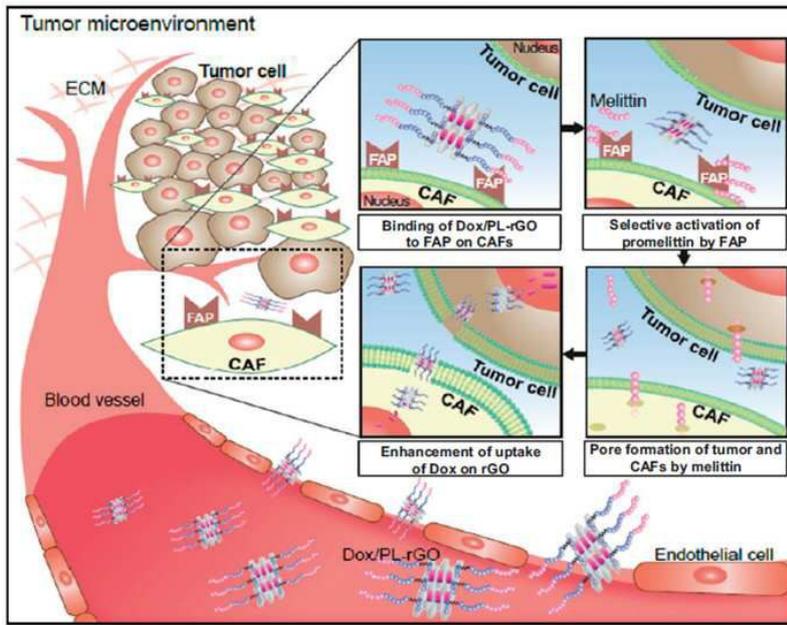


도면1b

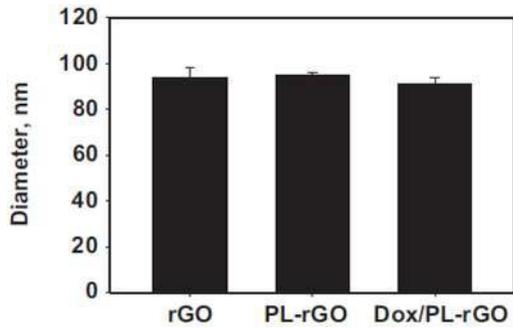
종양 미세환경-활성형 프로펩타이드 지질 유도체 수식형 약물 탑재 나노입자



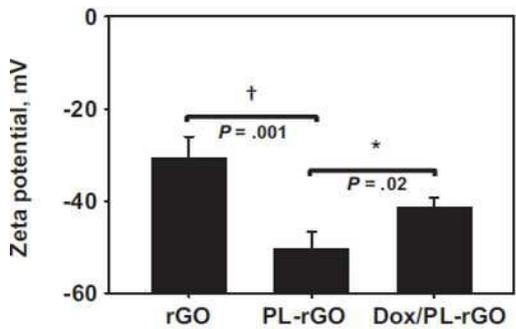
도면1c



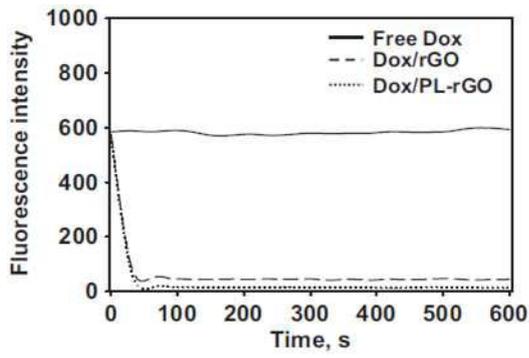
도면2a



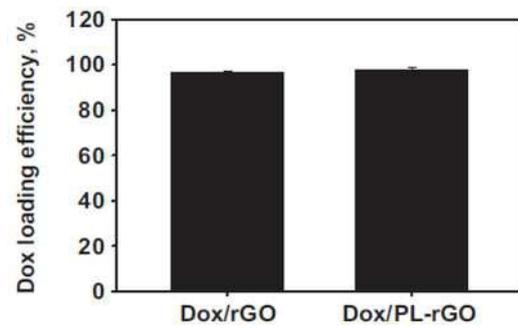
도면2b



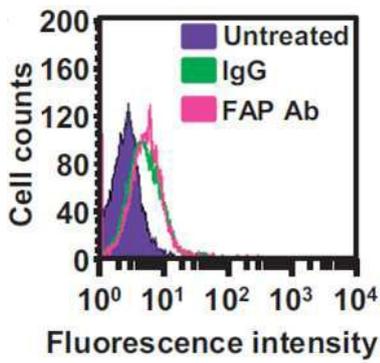
도면2c



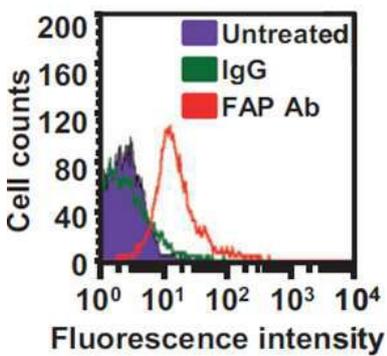
도면2d



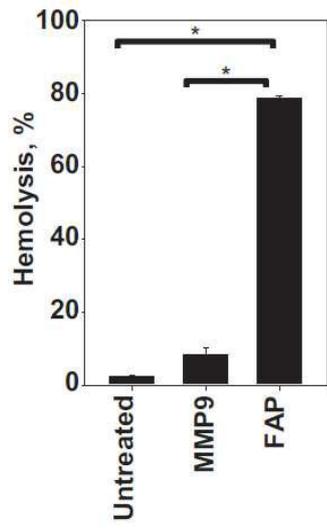
도면3a



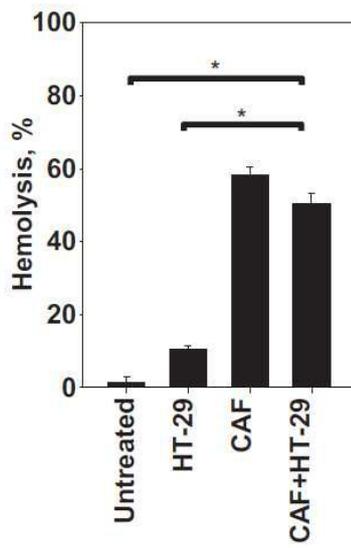
도면3b



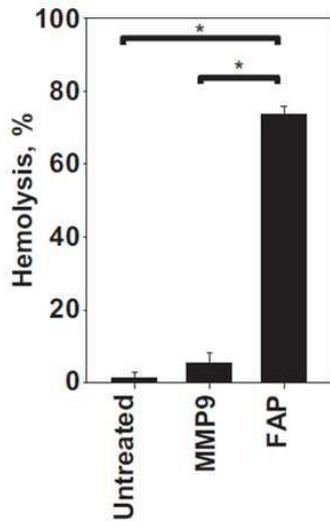
도면3c



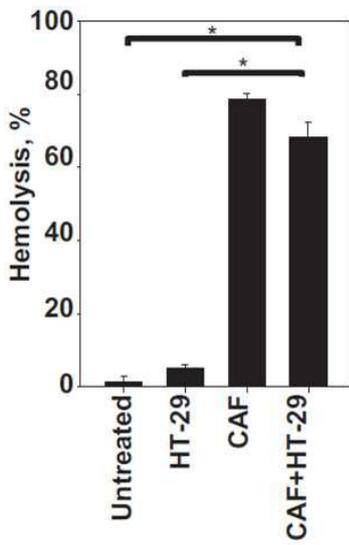
도면3d



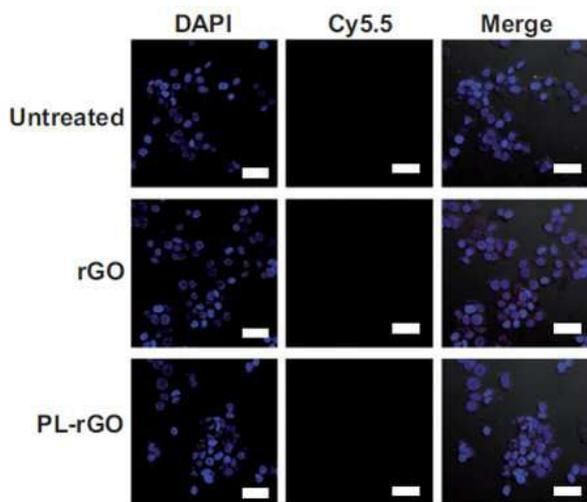
도면3e



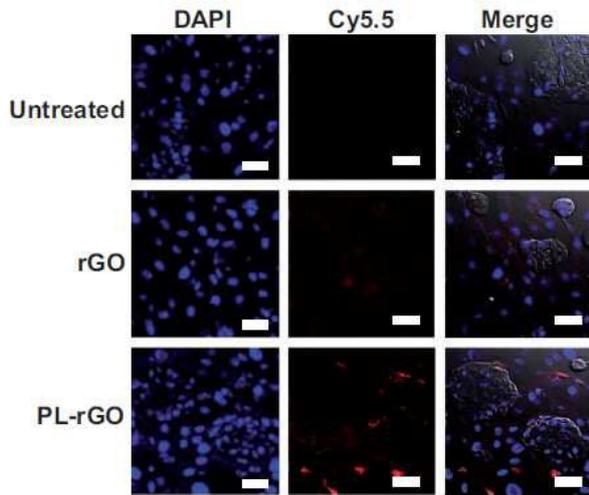
도면3f



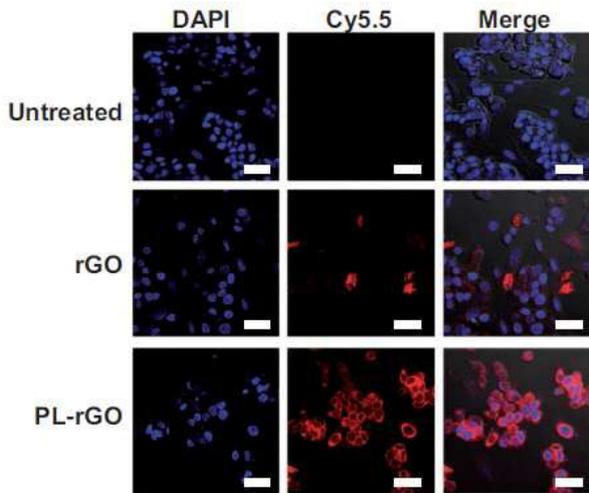
도면4a



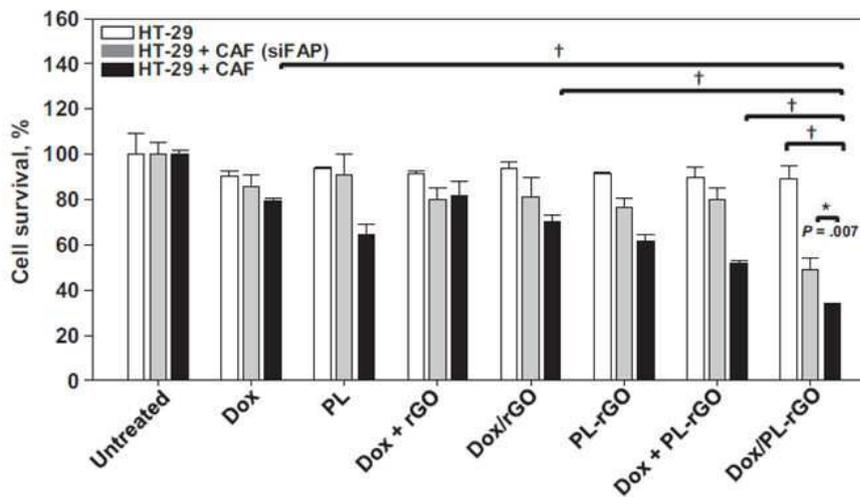
도면4b



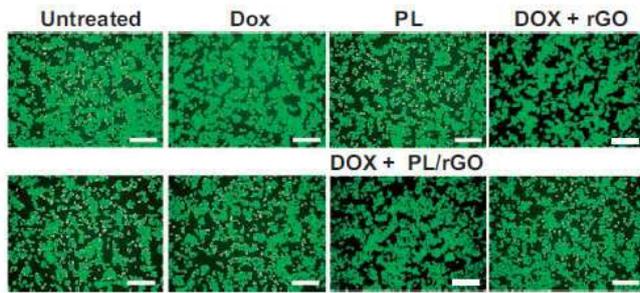
도면4c



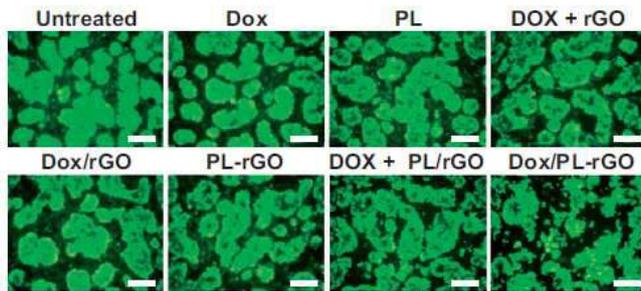
도면5a



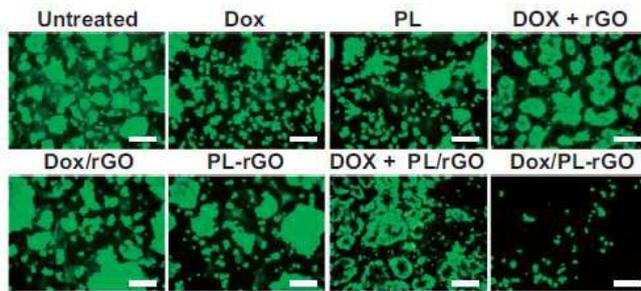
도면5b



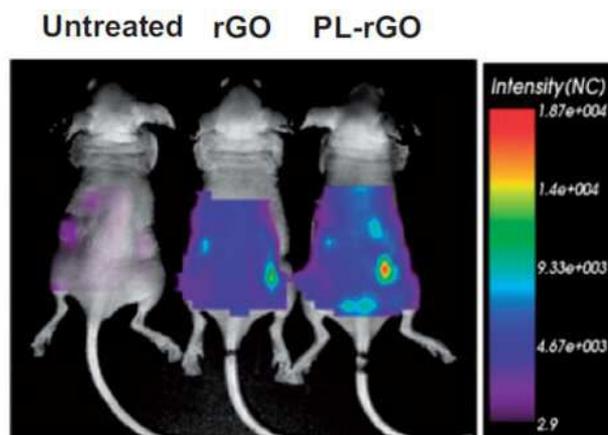
도면5c



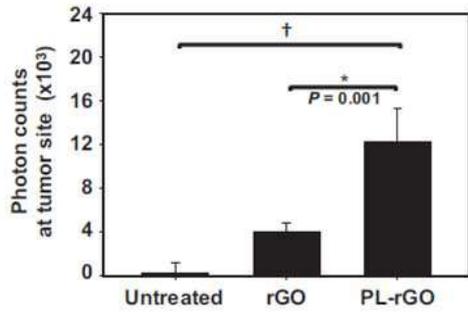
도면5d



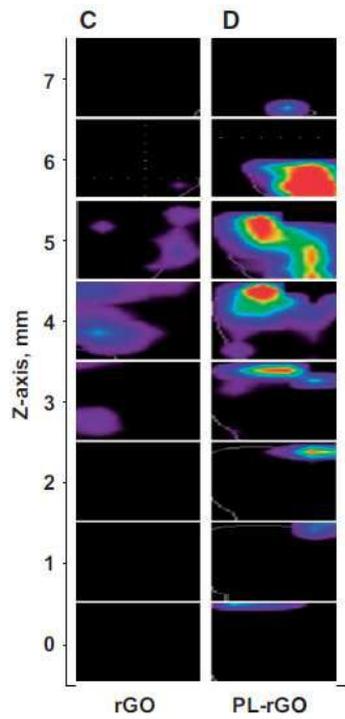
도면6a



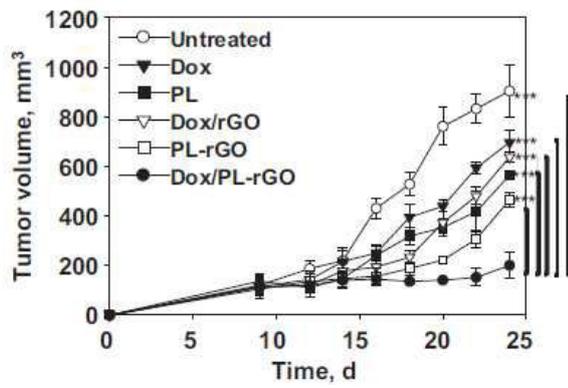
도면6b



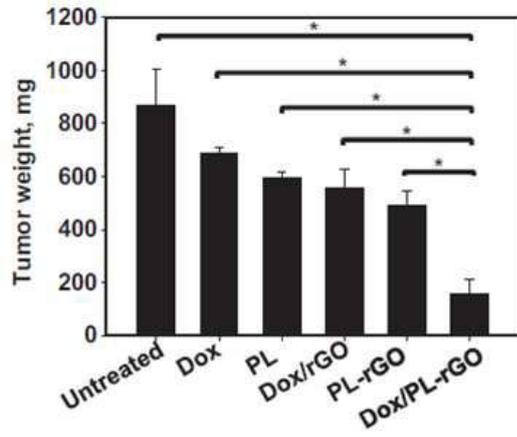
도면6c



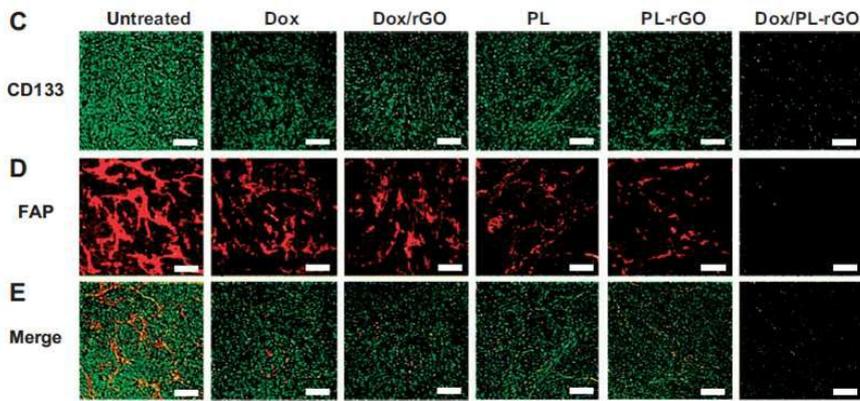
도면7a



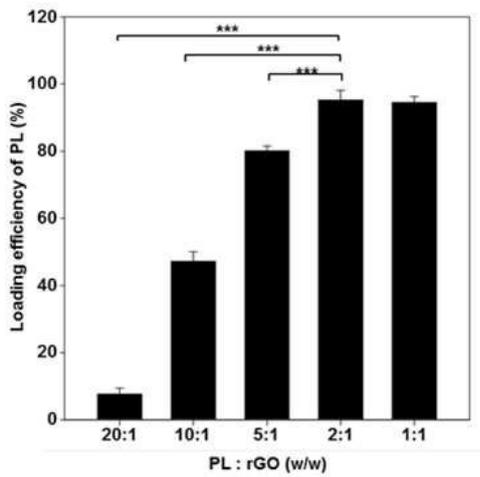
도면7b



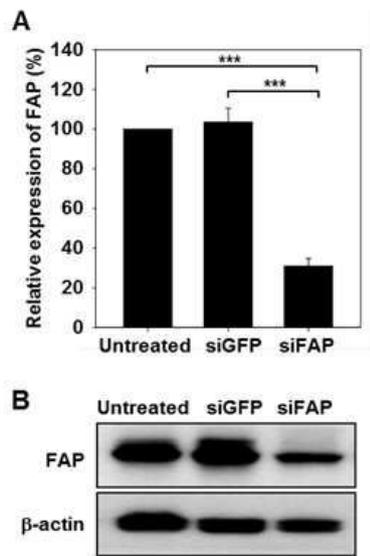
도면7c



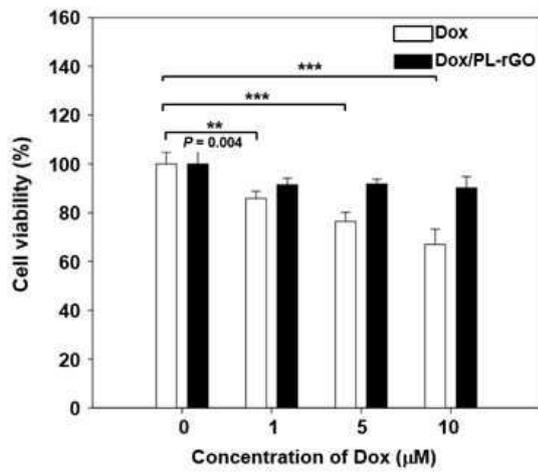
도면8



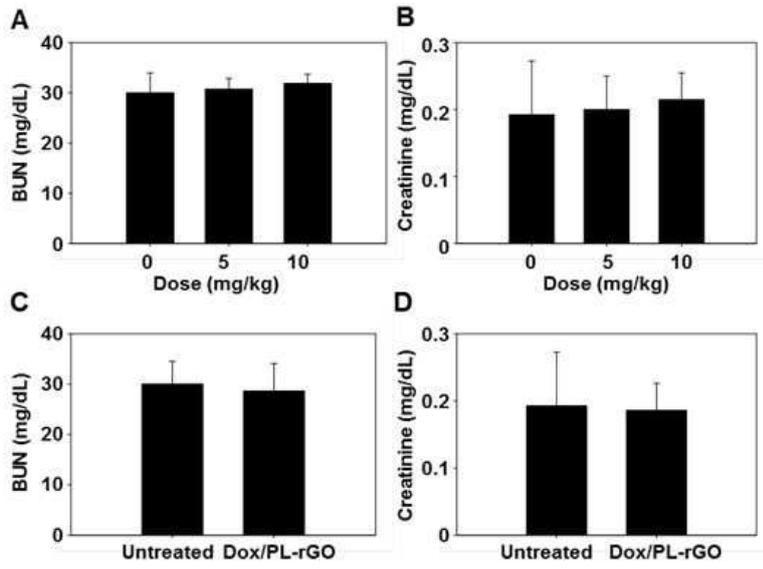
도면9



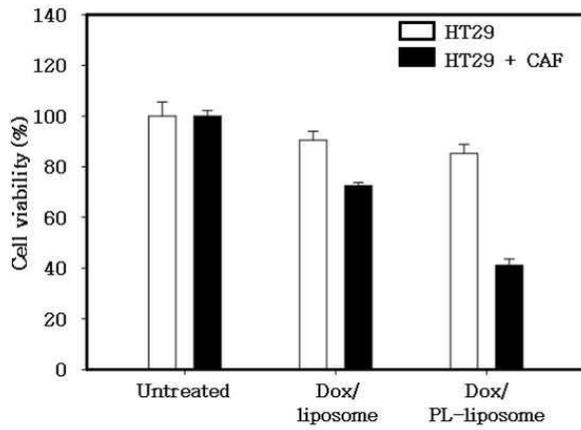
도면10



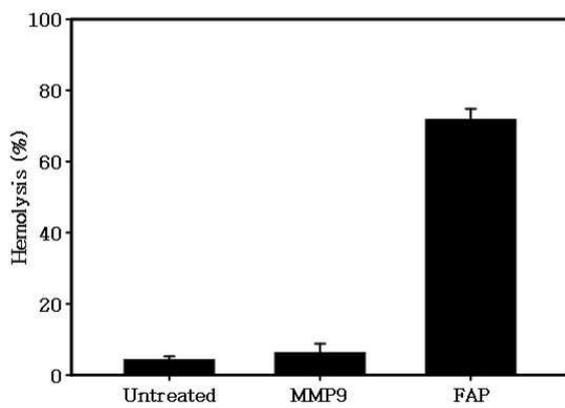
도면11



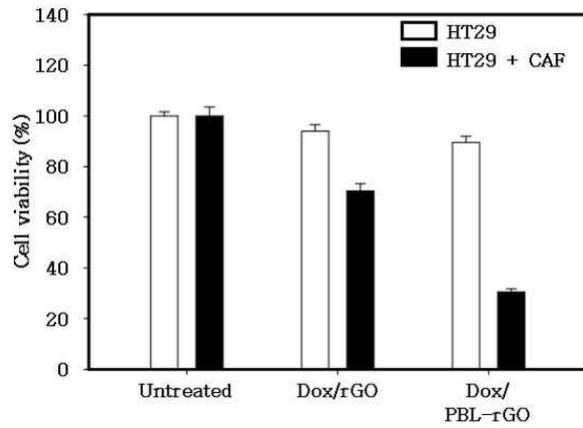
도면12



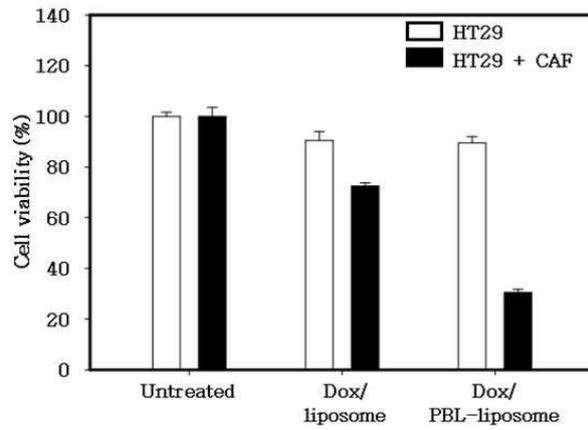
도면13



도면14



도면15



서열목록

- <110> Seoul National University R&DB Foundation
- <120> Nano complex of Tumor microenvironment-activated propeptide lipid derivatives and nanostructures and its use for drug delivery
- <130> DP201608021P
- <150> KR 2016/0101057
- <151> 2016-08-09
- <160> 2
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 39
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Promelittin

<400> 1

Glu Pro Glu Ala Glu Ala Asp Ala Glu Ala Gly Pro Ala Gly Ile Gly

1 5 10 15

Ala Val Leu Lys Val Leu Thr Thr Gly Leu Pro Ala Leu Ile Ser Trp

20 25 30

Ile Lys Arg Lys Arg Gln Gln

35

<210> 2

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Probuforin

<400> 2

Glu Pro Glu Ala Glu Ala Asp Ala Glu Ala Gly Pro Ala Arg Ala Gly

1 5 10 15

Leu Gln Phe Pro Val Gly Arg Leu Leu Arg Arg Leu Leu Arg Arg Leu

20 25 30

Leu Arg