(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2023 년 1 월 19 일 (19.01.2023)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2023/287009 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 41/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2022/007276

(22) 국제출원일: 2022 년 5 월 23 일 (23.05.2022)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2021-0092805 2021 년 7 월 15 일 (15.07.2021) KR

(71) 출원인: 인천대학교 산학협력단 (**INCHEON NATIONAL UNIVERSITY RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION**) [KR/KR]; 22012 인천광역시 연수구 아카데미로 119, Incheon (KR).

(72) 발명자: 심민석 (**SHIM, Min Suk**); 21982 인천광역시 연수구 송도과학로27번길 15, 103동 1304호, Incheon (KR). 이원종 (**RHEE, Won Jong**); 34049 대전광역시 유성구 엑스포로 448, 102동 202호, Daejeon (KR).

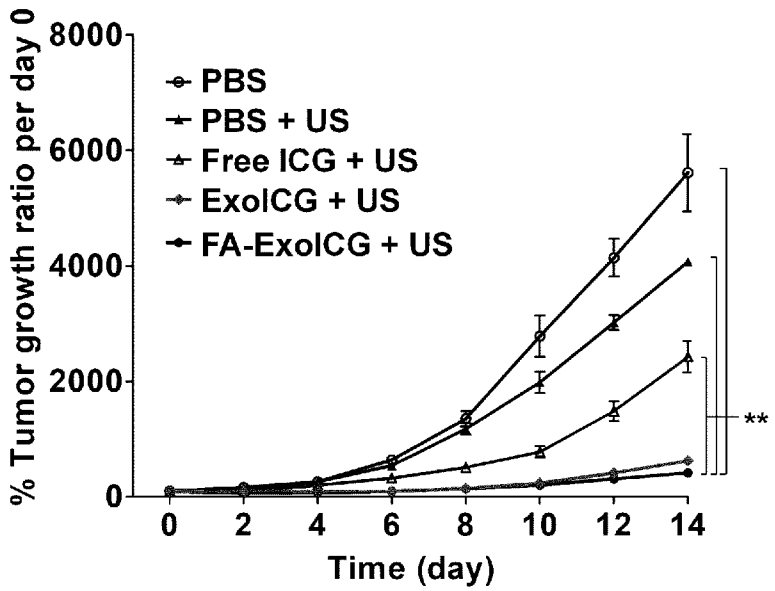
(74) 대리인: 특허법인 무한 (**MUHANN PATENT & LAW FIRM**); 06144 서울특별시 강남구 언주로 560, 8층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI

(54) **Title:** SONOSENSITIZER-LOADED, TUMOR-TARGETING EXOSOMES AND PREPARATION METHOD THEREFOR

(54) **발명의 명칭:** 초음파 감작제가 탑재된 종양 표적화 엑소좀 및 이의 제조방법



(57) **Abstract:** The present invention relates to ICG-loaded, folic acid-conjugated exosomes with improved tumor targeting ability, and a preparation method therefor. The exosomes according to the present invention are accumulated specifically on tumor cells, cause no toxicity in vivo by themselves, and can effectively act on tumors that are located at too deep a portion to be treated by photodynamic therapy, and as such, can be used as a non-invasive or least-invasive therapy for various solid tumors.

(57) **요약서:** 본 발명은 ICG 가 탑재되고 엽산이 접합되어 종양 표적능이 향상되어 있는 엑소좀 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 엑소좀은 종양 세포 특이적으로 축적되고, 엑소좀 자체로 인한 생체 내 독성을 유발하지 않으며, 심부에 위치하여 광역학 요법으로 치료 불가능한 종양에 효과적으로 작용할 수 있는바, 다양한 고형종양 치료에 비-침습성 또는 침습성이 최소화된 치료 방법으로 활용될 수 있다.

WO 2023/287009 A1

[다음 쪽 계속]

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

규칙 4.17에 의한 선언서:

— 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 초음파 감작제가 탑재된 종양 표적화 엑소좀 및 이의 제조방법

기술분야

[1] 본 발명은 초음파 감작제가 탑재된 종양 표적화 엑소좀 및 그 제조방법에 관한 것으로, 더 상세하게는 포르피린계(phorphyrins) 화합물, 프탈로시아닌계(phtalocyanine) 화합물, 로다민(rhodamine)계 화합물, 나프탈로시아닌계(naphthalocyanines) 화합물, 보디피계 (BODIPY) 화합물 및 인도시아닌 그린으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 초음파 감작제가 탑재되고 종양 표적화 물질이 접합되어 종양 표적능이 향상되어 있는 엑소좀 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 활성 산소종 (ROS)은 살아있는 유기체의 세포 대사 반응의 부산물이며 세포 신호 및 항상성에 관여한다. ROS를 통하여 암 세포를 사멸할 수 있음이 밝혀지면서, 세포 내 ROS를 조절하는 새로운 항암 요법이 대두되고 있다. 광역학 요법 (PDT)은 광조사 하에서 감광제에 의해 생성된 외인성 ROS를 사용하는 최소 침습 치료 방법이다. PDT는 전신 독성이 낮고, 종양을 선택적으로 파괴할 수 있음에도 불구하고, 빛이 조직 내 침투할 수 있는 깊이의 제한으로, 이를 임상 적용하는데 한계가 있다. 따라서, 심부 조직에서 ROS를 생성할 수 있는 새로운 치료 시스템에 대한 관심이 집중되고 있는데, 초음파역학 치료 (sonodynamic therapy, SDT)는 초음파 (US) 노출시 초음파 감작제에서 생성된 ROS를 활용하기 때문에 암 치료에서 PDT의 잠재적인 대안으로 큰 주목을 받고 있다. 초음파는 더 깊은 조직까지 침투할 수 있어, SDT는 PDT로 효과적으로 치료할 수 없는 심부 종양 치료에 적용될 수 있는 장점이 있다. 또한 SDT는 초음파가 특정 종양 부위에 정밀한 초점을 맞출 수 있기 때문에 주변 정상 세포에 대한 손상을 최소화하며 암세포를 선택적으로 파괴할 수 있는 장점이 있다.

[3] SDT의 치료 효과는 초음파 감작제의 효과에 의존적이기 때문에, SDT를 성공하기 위해서는 안전하고 효율적인 초음파 감작제의 개발이 특히 중요하다. 대부분의 유기 초음파 감작제는 소수성이므로 생리 환경에서 응집이 발생하기 쉽다. 또한 약동학적 특성이 좋지 않고 암 특이성이 낮다. 초음파 감작제의 이러한 한계를 극복하기 위하여 최근 나노전달체(nano carrier)가 개발되었다(Maeda, H. et al., J. Controlled Release 2000, 65, 271-284). 나노전달체는 난용성 초음파 감작제의 세포 내 전달을 크게 개선시킬 수 있으며 향상된 투과성 및 유지 (enhanced permeability and retention, EPR) 효과를 통해 종양 영역에 초음파 감작제를 우선적으로 수송할 수 있다. 그러나 일부 합성 나노전달체는 예상치 못한 독성과 면역원성을 유도할 수 있어, 초음파 감작제를

캡슐화하는 안전하고 생체 적합성인 나노전달체를 개발하는 것이 SDT의 임상 적용을 위해 매우 중요하다.

[4] 세포에서 생성된 나노 크기 (30-150 nm) 막 소포인 엑소좀이 최근 다목적 생체 적합성 나노 운반체로 등장하였는데, 엑소좀은 내인성 기원이므로, 뛰어난 생체 적합성과 긴 혈액 순환 반감기를 가지며, 면역원성이 거의 없다. 따라서 엑소좀은 다양한 소수성 및 친수성 약물을 효율적으로 운반할 수 있는 임상적으로 이용 가능한 약물 운반체로 간주되어 왔으며, 또한 엑소좀은 EPR 효과를 통해 종양에 선택적 축적될 수 있다는 장점을 갖는다(Antimisiaris, S. et al., Pharmaceutics, 2018, 10, 218).

[5] 본 발명자들은 효과적인 SDT를 위하여 초음파 감작제를 암세포 특이적으로 전달할 수 있는 방법을 발명하고자 예의 노력한 결과, 식약청에서 승인된 생체 적합성 근적외선 (NIR) 흡수제인 인도시아닌 그린 (ICG)을 초음파 감작제로 선정하여, 종양 표적화 능력을 증가시키기 위하여 엽산 (folic acid)이 추가로 장착된 엑소좀에 인도시아닌 그린을 탑재시킨 초음파 감작제 운반체를 간단한 방법으로 제조할 수 있었으며, 이와 같이 제조된 인도시아닌 그린이 탑재된 엑소좀은 수용액 상에서의 안정성 저하, 짧은 혈액 순환 시간, 암 표적성 부재 등 인도시아닌 그린의 본질적인 단점을 극복하며, SDT에 효과적으로 적용할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[6] 본 발명의 목적은 정상 조직 및 세포에 대한 부작용은 최소화하며, 생체친화적이며, 약물을 종양 부위에 선택적으로 전달하기 위한 신규한 초음파역학 치료용 나노전달체 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[7] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 초음파 감작제가 탑재되어 있는 종양 치료용 엑소좀을 제공한다.

[8] 본 발명에 있어서, 상기 초음파 감작제는 포르피린계(phorphyrins) 화합물, 프탈로시아닌계(phtalocyanine) 화합물, 로다민(rhodamine)계 화합물, 나프탈로시아닌계(naphthalocyanines) 화합물, 보디피계 (BODIPY) 화합물 및 인도시아닌 그린으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있다.

[9] 본 발명에 있어서, 상기 엑소좀은 종양 표적화 물질이 접합되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.

[10] 본 발명에 있어서, 상기 종양 표적화 물질은 엽산, 항체, 종양 표적 펩티이드, 압타머, 코발라민, 비타민 A, 비타민 C, 또는 비타민 B1로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[11] 본 발명에 있어서, 상기 엑소좀은 초음파 처리로 항종양 활성을 나타내는 것을

특징으로 할 수 있다.

[12] 본 발명은 또한, 상기 엑소좀을 유효성분으로 포함하는, 종양 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[13] 본 발명에 있어서, 상기 종양은 골발생 육종, 연조직 육종, 유방암, 폐암, 뇌암, 방광암, 갑상선암, 전립선암, 결장암, 직장암, 췌장암, 위암, 간암, 자궁암, 신장암, 자궁경부암, 피부암, 식도암 및 난소암; 호지킨 림프종, 비-호지킨, 신경교세포종, 흑색종, 골수종, 윌름스 종양, 급성 림프아구성 백혈병, 급성 골수아세포 백혈병, 별아교세포종, 신경아교종 및 망막모세포종으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[14] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 초음파 조사 전에 투여되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[15] 본 발명에 있어서, 상기 초음파는 0.1 내지 15 MHz 주파수, 0.01 내지 1.0 W/cm^2 강도로 30초 내지 300초 동안 조사하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[16] 본 발명에 있어서, 상기 초음파는 조성물 투여 후 4 내지 24시간에 조사되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[17] 본 발명에 있어서, 상기 초음파는

[18] (i) ICG에 의한 ROS 생성; 및/또는

[19] (ii) 엑소좀에서의 ICG 방출을 촉진하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[20] 본 발명은 또한, 1 내지 5% (v/v) DMSO를 포함하는 PBS에서 엑소좀과 불수용성 초음파 감작제를 혼합하여 인큐베이션 시키는 단계를 포함하는, 불수용성 초음파 감작제가 탑재되어 있는 엑소좀의 제조방법을 제공한다.

[21] 본 발명에 있어서, 상기 제조방법은 1 x 10^{10} 내지 1 x 10^{12}개의 엑소좀과 0.01 내지 1.0 mg의 불수용성 초음파 감작제를 혼합하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[22] 본 발명에 있어서, 상기 엑소좀은 불수용성 초음파 감작제와 혼합 전 또는 혼합 후, 종양 표적화 물질을 접합시키는 것을 특징으로 할 수 있다.

발명의 효과

[23] 본 발명에 따른 인도시아닌 그린이 탑재된 엑소좀은 종양 세포 특이적으로 축적되고 세포 내로 흡수되어 부작용을 최소화하면서도 심부에 위치하여 광역학 요법으로 접근 불가능한 종양에 효과적으로 작용하며, 엑소좀 자체로 인한 생체 내 독성을 유발하지 않으며, 유방암을 비롯한 다양한 고형종양 치료에 비-침습성 또는 침습성이 최소화된 치료 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[24] 도 1은 FA-접합되고 인도시아닌 그린-탑재된 엑소좀(FA-ExoICG)의 제조 및 초음파 역학 치료의 개략도이다. FA-ExoICG는 EPR 효과를 통해 종양에 선택적으로 축적되고, 엽산 수용체 매개 세포 내 이입을 통해 유방암 세포를 과발현하는 엽산 수용체로 효율적으로 내재화된다. FA-ExoICG는 초음파에 반응하여 세포 독성 ROS를 생성하여 세포 사멸을 유도한다.

[25] 도 2A는 블랭크 엑소좀, free ICG, FA, FA-엑소좀 및 FA-ExoICG 용액의 흡광도 스펙트럼를 나타낸다. 도 2B는 블랭크 엑소좀 및 FA-ExoICG의 TEM 이미지를 나타낸다. 스케일 바는 50nm. 도 2C는 다양한 엑소좀 샘플로부터 엑소좀 마커인 CD63 및 CD81의 웨스턴 블롯을 나타낸다. 도 2D는 10일 동안 4 ℃에서 PBS에서 인큐베이션 한 후 free ICG, ExoICG 및 FA-ExoICG의 형광 강도 변화를 나타낸다. 통계적 유의성은 ICG 그룹과 관련하여 결정되었다. 도 2E는 다른 인큐베이션 시간에서 초음파 조사 (1 분)의 부재 또는 존재 하에서 ExoICG 및 FA-ExoICG로부터의 ICG 방출 프로파일을 나타낸다. ExoICG 및 FA-ExoICG의 ICG 방출은 초음파에 노출되었을 때 촉진되었다.

[26] 도 3A는 4 시간 동안 free ICG, ExoICG 및 FA-ExoICG로 처리된 hDFB 및 MCF-7 세포에서 ICG의 상대적 세포 내 흡수(uptake)를 나타낸다. 도 3B는 무세포 시스템에서 free ICG, ExoICG 및 FA-ExoICG로부터 ROS 생성을 정량화한 것이다. 도 3C는 초음파 방사선 조사 전후 free ICG, ExoICG 및 FA-ExoICG로 처리된 MCF-7 세포의 세포 내 ROS 수준을 나타낸다. 도 3D는 초음파 조사 (60 및 70 초 동안 0.3 W/cm^2) 전후에 free ICG, ExoICG 및 FA-ExoICG로 처리된 MCF-7 세포의 세포 생존률을 나타낸다. 도 3E는 초음파 조사 하에 다양한 샘플로 처리한 hDFB 및 MCF-7 세포의 세포 생존률을 나타낸다. 도 3F는 다른 농도의 블랭크 엑소좀과 함께 배양된 MCF-7 세포의 세포 생존률을 나타낸다. 도 3G는 free ICG, ExoICG 및 FA-ExoICG로 처리된 MCF-7 세포의 세포사멸 비율을 나타낸 결과이다.

[27] 도 4A는 MCF-7 종양 이종 이식 마우스에 free ICG, ExoICG, 및 FA-ExoICG의 i.v. 주입 후 다른 시간 간격에서 생체 내 실시간 생체 분포 이미지를 나타낸다. free ICG 주입 마우스에서 검출된 형광 신호가 다른 마우스에 비해 현저히 낮게 나타나, ExoICG 또는 FA-ExoICG 처리 마우스와 비교하여 ICG 처리 마우스 (왼쪽 이미지)의 형광 이미지에서 컬러 스케일 막대의 최대값이 12.5 배 감소했다. 도 4B는 free ICG, ExoICG 및 FA-ExoICG의 투여 후 24 시간에 각 기관의 생체 외 영상을 나타낸다. 도 4C는 단일 i.v. ExoICG 및 FA-ExoICG 주입된 종양 이종 이식 마우스의 혈장에서 ICG 함량의 농도-시간 프로파일을 나타낸다. 도 4D는 ExoICG 및 FA-ExoICG의 단일 i.v. 주입 이후 종양 이종 이식 마우스의 전체 기관에서 ICG의 기관 분포를 나타낸다. 주입 후 24 시간에 ICG의 장기 분포는 주입된 용량의 백분율 (% ID/g)로 표시되었다. 데이터는 평균 ± SD (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, $n = 4$)로 표현되었다.

[28] 도 5A는 MCF-7 종양 이종 이식 마우스의 정규화된 종양 성장 비율을 시간 함수로 나타낸 것이다. 마우스를 각 샘플의 주입 후 4 시간에 3 분 동안 초음파 (0.5 W/cm^2)에 노출시켰다. 도 5B는 각 샘플의 정맥 내 주입 및 주입 후 4 시간에 3 분 동안 초음파 처리 14 일 후 종양의 대표적인 이미지를 나타낸다. 도 5C는 시간에 따른 마우스 체중 변화를 나타낸 것이다. 마우스는 각 샘플의 주입 후 4 시간에 3 분 동안 초음파 처리되었다. 도 5D는 초음파 조사 하에 다양한 샘플을

주입한 14 일 후 마우스 주요 장기 슬라이드의 H & E 염색을 나타낸다. 스케일 바는 200 μm를 나타낸다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[29] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법 및 이하에 기술하는 실험 방법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[30]

[31] 항암제 전달의 주요 과제 중 하나는 정상 조직 및 세포에 대한 부작용은 최소화하며, 치료 약물을 종양 부위에 선택적으로 전달하는 것이다. 이러한 과제 해결을 위하여 고분자 나노입자, 리포좀, 세포막 코팅된 나노입자, 미셀 등 다양한 유형의 합성 나노전달체가 개발되었다. 이러한 나노전달체는 EPR 효과를 통해 치료용 물질들을 종양 영역으로 운반할 수 있음이 입증되었다. 그러나 합성 나노전달체는 고유한 독성 및 망상 내피 시스템 (reticuloendothelial system, RES)에 의한 제거 등의 문제점으로 인하여 임상 적용에 한계가 있었다.

[32] 합성 나노전달체와 달리 세포 유래 나노입자의 일종인 엑소좀은 생체 적합성이 높고, 장기간 혈액 순환이 가능하다는 장점이 있다. 따라서 본 발명에서는 종양에 초음파 감작제를 효율적이고 선택적으로 전달하기 위하여, 나노전달체로 엑소좀을 활용하고자 하였으며, 치료 요법제로 인도시아닌 그린(ICG)을 나노 초음파 감작제로 엑소좀에 탑재되었다. 엑소좀으로 인도시아닌 그린을 캡슐화하는 경우 수용액에서의 응집과 분해 및 암 특이성 부족을 포함하여 인도시아닌 그린의 고유한 단점을 해결할 수 있었다.

[33] 본 발명에서 엑소좀은 인도시아닌 그린의 수성 안정성과 세포 흡수(uptake)를 크게 향상시켜 초음파 조사에서 ROS 생성을 향상시켰다. 특히, 엑소좀의 FA 접합은 인도시아닌 그린의 유방암 세포로의 세포 내재화를 더욱 촉진시켰다. 그 결과, FA-ExoICG는 비 암성 hDFB 세포보다 MCF-7 유방암 세포에 더 많은 초음파 독성을 나타내어 암 표적화된 초음파 역학적 효과를 입증할 수 있었다. 더욱이, 엑소좀에 탑재함으로써 인도시아닌 그린의 약동학적 특성과 종양 표적화된 축적이 개선되었다. 인도시아닌 그린이 탑재된 엑소좀은 free ICG보다 마우스의 종양 성장을 더 집중적으로 억제할 수 있었는데, 구체적으로, FA-ExoICG로 처리된 마우스는 인도시아닌 그린의 종양 국소화(localization)를 향상시켜, 현저한 종양 성장 억제 효과를 발휘하였다. 또한 FA-ExoICG는 전신 독성을 나타내지 않아 부작용도 없는 것으로 확인되었는데, 이로써 FA 접합되고 인도시아닌 그린이 탑재된 엑소좀이 암 표적 SDT에서 안전하고 효과적인 나노 초음파 감작제로 이용 가능하고, 임상 적용에 상당한 잠재력을 가지고 있음을 입증할 수 있었다.

[34]

[35] 따라서, 본 발명은 일 관점에서 초음파 감작제가 탑재되어 있는 종양 치료용 엑소좀에 관한 것이다.

[36] 본 발명에 있어서, 상기 초음파 감작제는 포르피린계(phorphyrins) 화합물, 프탈로시아닌계(phtalocyanine) 화합물, 로다민(rhodamine)계 화합물, 나프탈로시아닌계(naphthalocyanines) 화합물, 보디피계 (BODIPY) 화합물 및 인도시아닌 그린으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 상기 초음파 감작제는 바람직하게는 인도시아닌 그린이다.

[37] 본 발명에 있어서, 상기 엑소좀은 종양 표적화 물질이 접합되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.

[38] 본 발명에 있어서, 상기 종양 표적화 물질은 엽산, 항체, 종양 표적 펩티이드, 압타머, 코발라민, 비타민 A, 비타민 C, 또는 비타민 B1로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 상기 종양 표적화 물질은 바람직하게는 엽산이다.

[39] 본 발명에 있어서, 상기 엑소좀은 초음파 처리로 항종양 활성을 나타내는 것을 특징으로 할 수 있다. 일 양태로서, 상기 엑소좀은 초음파 처리에 의해 세포 독성 ROS를 발생시켜 항종양 효과를 발휘한다.

[40]

[41] 다른 관점에서, 본 발명은 상기 엑소좀을 유효성분으로 포함하는, 종양 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[42] 본 발명에 있어서, 상기 종양은 양성종양과 악성종양(암)을 모두 포함한다.

[43] 본 발명에 있어서, 상기 종양은 골발생 육종, 연조직 육종, 유방암, 폐암, 뇌암, 방광암, 갑상선암, 전립선암, 결장암, 직장암, 췌장암, 위암, 간암, 자궁암, 신장암, 자궁경부암, 피부암, 식도암 및 난소암; 호지킨 림프종, 비-호지킨, 신경교세포종, 흑색종, 골수종, 윌름스 종양, 급성 림프아구성 백혈병, 급성 골수아세포 백혈병, 별아교세포종, 신경아교종 및 망막모세포종으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[44] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 초음파 조사 전에 투여되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[45] 본 발명에 있어서, 상기 초음파는 0.1 내지 15 MHz 주파수, 0.01 내지 1.0 W/cm^2 강도로 30초 내지 300초 동안 조사하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[46] 본 발명에 있어서, 상기 초음파는 상기 조성물 투여 후 4 내지 24시간에 조사되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

[47] 본 발명에 있어서, 상기 초음파는

[48] (i) ICG에 의한 ROS 생성; 및/또는

[49] (ii) 엑소좀에서의 ICG 방출을 촉진하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[50]

[51] 본 발명에서는 또한, 안전하고 효율적인 초음파 종양 치료를 위해 활성 암 표적화 인도시아닌 그린이 탑재된 엑소좀을 성공적으로 개발함과 동시에, 인도시아닌 그린 탑재 효율이 높은 엑소좀은 간단한 배양 방법을 제조할 수 있음을 확인하였다.

[52] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, 1 내지 5% (v/v) DMSO를 포함하는 PBS에서 엑소좀과 불수용성 초음파 감작제를 혼합하여 인큐베이션 시키는 단계를 포함하는, 불수용성 초음파 감작제가 탑재되어 있는 엑소좀의 제조방법에 관한 것이다.

[53] 본 발명에 있어서, 상기 제조방법은 1×10^{10} 내지 1×10^{12}개의 엑소좀과 0.01 내지 1.0 mg의 불수용성 초음파 감작제를 혼합하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[54] 본 발명에 있어서, 암 표적화를 향상시키기 위하여, 상기 엑소좀은 불수용성 초음파 감작제와 혼합 전 또는 혼합 후, 종양 표적화 물질을 접합시키는 것을 특징으로 할 수 있다.

[55] 본 발명에 있어서, 상기 불수용성 초음파 감작제는 포르피린계(phorphyrins) 화합물, 프탈로시아닌계(phtalocyanine) 화합물, 로다민(rhodamine)계 화합물, 나프탈로시아닌계(naphthalocyanines) 화합물, 보디피계 (BODIPY) 화합물 및 인도시아닌 그린으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 불수용성 초음파 감작제일 수 있으며, 바람직하게는 인도시아닌 그린일 수 있다.

[56]

[57] 일 양태로서, 인도시아닌 그린은 DMSO의 존재하에 PBS에서 FA-엑소좀과 인도시아닌 그린을 혼합함으로써 엑소좀에 효율적으로 탑재될 수 있는데, DMSO는 인도시아닌 그린의 용해도와 지질막을 통한 투과성을 증가시키며, 인도시아닌 그린이 엑소좀에 탑재되는 효율을 증가시켰는데, 이 경우, DMSO의 농도가 1% 미만인 경우에는 탑재 효율이 현저히 낮게 나타나고, 5% 초과에서는 DMSO로 인한 막 파괴로 인해 엑소좀이 실질적으로 손실되어, 인도시아닌 그린의 탑재 효율은 2 내지 5% (v/v) DMSO를 포함하는 PBS에서 우수하였다. 인도시아닌 그린 캡슐화를 위해서는 PBS에서 약 4% DMSO를 사용하는 것이 가장 바람직하다.

[58]

[59] 최근 연구에서는 질병 또는 암 관련 경로에 관련된 분자는 HEK-293T 세포의 엑소좀에서 증가되지 않으며, 동물 연구에서 독성 및 면역 반응이 일반적으로 경미하다는 것이 입증된 바, 엑소좀은 인간 배아 신장 HEK-293T 세포를 배양하여 분리되는 것이 바람직하나, 이에 제한되지는 않는다. 그러나, 우유와 식물을 포함한 다른 엑소좀 공급원의 사용도 약물 전달을 위한 대체 수단으로 고려될 수 있음은 본 기술 분야의 통상의 기술자에게 자명할 것이다.

[60] 본 발명의 용어 "배양"이란, 세포 혹은 미생물을 적당히 인공적으로 조절한

환경조건에서 생육시키는 방법을 의미한다.

[61] 본 발명에 있어서, 상기 배양은 소태아혈청이 포함되지 아니한 배지로 교체하고 2 내 지 5일간 배양한 후 엑소좀을 분리하는 것이 바람직하다.

[62] 본 발명에 있어서, 상기 형질전환체를 배양하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다.

[63] 상기 배지는 동물세포 배양 시 사용되는 공지된 배지를 의미하고, 시판중인 무혈청 배지(serum free media), 무단백 배지(protein free media) 및 화학 정의 배지(chemically defined media) 등의 그룹 중에서 선택될 수 있다.

[64] 상기 무혈청 배지는 동물 세포를 배양하는데 사용되는 소혈청 성분이 제거된 배지로 SFM4CHO(HyClone), EXCell(JHR Bioscience) 등이 바람직하고, 인슐린형 성장인자 I(Insulin like growth factor I, IGF-I), 에탄올 아민(Ethanolamine), 페릭 클로라이드(Ferric chloride), 및 포스파티딜콜린(Phosphatidyl choline) 등이 첨가될 수 있으나 이에 한정하지 않는다.

[65] 상기 무단백 배지는 소혈청 성분이 제거된 무혈청 배지에서 동물 유래 단백질, 특히, 분자량 10kDa 이상인 고분 자 단백질이 제거된 동물세포 배양 배지로써, ProCHO(Lonza) 및 PF-CHO(HyClone) 등이 선택될 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.

[66] 상기 화학 정의 배지는 동물 유래의 성분이 없고, 배지를 구성하는 모든 구성 성분이 공지된 화학적 구조를 가진 동물 세포 배양용 배지로써, CDM4CHO(HyClone), PowerCHO2CD(Lonza), 및 CD-optiCHO(Life Technologies) 등 이 선택될 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.

[67] 또 다른 관점에서, 본원에 기재된 엑소좀은 초음파 역학 치료의 방법 및, 동시에, 생체내 이미지형성의 방법(예를 들면 진단 영상의 방법)에도 사용될 수 있다. 이와 같은 방법에서, 이미지형성은 관심 표적 부위에서 엑소좀 탑재물의 침착 및/또는 축적을 모니터링하는데 사용될 수 있다.

[68] 본원에 기재된 방법 중의 어느 것에서 사용하기 위해, 상기 엑소좀은 일반적으로 적어도 1종의 약제학적으로 허용가능한 부형제와 함께 약제학적 조성물로 제공될 수 있다. 이러한 조성물은 본 발명의 추가의 측면을 형성한다

[69] 본 발명에 따라 사용하기 위한 약제학적 조성물은 당해 분야에서 잘 알려진 기술을 사용하여 제형화될 수 있다. 투여 경로는 의도한 용도에 따라 좌우될 것이다. 전형적으로, 이들은 전신으로 투여될 것이며 따라서 비경구 투여, 예를 들면 진피내, 피하, 복강내 또는 정맥내 주사에 의한 투여에 적합한 형태로 제공될 수 있다. 적합한 약제학적 형태는 엑소좀을 하나 이상의 캐리어 또는 부형제와 함께 함유하는 현탁액 및 용액을 포함한다. 적합한 캐리어는 염수, 멸균수, 포스페이트 완충 식염수 및 이들의 혼합물을 포함한다.

[70] 조성물은 다른 제제 예컨대 유화제, 현탁화제, 분산제, 가용화제, 안정제, 완충제, 보존제, 등을 추가로 포함할 수 있다. 조성물은 종래의 멸균 기술에 의해 멸균될 수 있다.

[71] 엑소좀을 함유하는 용액은, 예를 들면 제제 예컨대 점도 조절제, 유화제, 가용화제, 등의 첨가에 의해 안정화될 수 있다.

[72] 바람직하게는, 본 발명에서 사용하기 위한 조성물은 물 또는 염수 용액, 예를 들면 포스페이트-완충 식염수 중의 수성 현탁액의 형태로 사용될 것이다. 엑소좀은 사용현장에서 재구성을 위해, 예를 들면 물, 염수 또는 PBS에서의 재구성을 위해 동결건조된 분말의 형태로 공급될 수 있다.

[73] 본원에 기재된 방법은 상기 엑소좀을 함유하는 치료적 유효량의 조성물의 투여를 포함한다. 이후 엑소좀을 신체의 원하는 부분 또는 표적체 부분에 분포되도록 한다. 일단 신체에 투여되면, 표적체 부분에서 원하는 치료 효과를 달성하는 빈도 및 강도로 초음파에 노출시킨다. 인도시아닌 그린이 탑재된 엑소좀에 대하여, 전형적인 활성화 절차가 첨부된 도 1에 개략적으로 나타내어져 있다. 인도시아닌 그린이 탑재된 엑소좀은 초음파에 의해 먼저 파열되고, 이후 원하는 표적 조직(예를 들면 종양)에 침투할 수 있는 초음파 감작제(SS)를 방출하는 2-단계 공정으로 치료가 진행될 수 있다. 표적 세포 내의 초음파 감작제의 후속적인 초음파-활성화는 다양한 세포 성분, 예컨대 단백질, 지질, 아미노산 및 뉴클레오타이드를 산화시키고 이로써 표적 세포를 파괴할 수 있는 단일항 산소의 생산을 초래한다. 초음파 감작제의 활성화는 전형적으로, 전달 이후 즉, 엑소좀이 인도시아닌 그린을 방출하면서 일어날 수 있으나, 엑소좀의 전달 및 초음파감작제의 활성화는 동시에 일어날 수 있을 것이다.

[74] 본원에 기재된 조성물의 효과적인 용량은 엑소좀의 성질, 투여 방식, 치료될 병태, 환자 등에 의존적일 것이며 이에 따라 조정될 수 있다.

[75] 사용될 수 있는 초음파의 빈도 및 강도는 표적 부위에서 엑소좀에 탑재된 인도시아닌 그린의 활성화를 유도하기 위한 필요에 기반하여 선택될 수 있으며, 초음파 주파수는 전형적으로 의료용 초음파에 사용되는 0.1 내지 15 MHz, 바람직하게는 0.1 내지 3 MHz 범위일 것이다. 초음파의 강도 (즉 전력 밀도)는 약 0.01 W/cm^2 내지 약 10 W/cm^2, 바람직하게는 약 0.1 내지 약 1 W/cm^{2}의 범위일 수 있다. 치료 시간은 전형적으로 10초 내지 600초, 바람직하게는 30초 내지 300초의 범위일 것이고 이것은 선택된 강도에 의존적일 것이며, 즉 낮은 초음파 강도의 경우 치료 시간은 장기적일 것이고 더 높은 초음파 강도의 경우 치료 시간은 더 낮을 것이다. 초음파는 연속 또는 펄스 방식으로 적용될 수 있고 집중적이거나 주상 빔으로서 전달될 수 있다.

[76] 음향 에너지 (예를 들면 초음파)를 생산할 수 있는 임의의 공급원이 본원에 기재된 방법에서 사용될 수 있다. 공급원은 에너지를 표적 부위에 지시할 수 있어야 하며, 예를 들면, 탐침 또는 에너지를 상기 표적 조직으로 지시할 수 있는 디바이스를 포함할 수 있다.

[77]

[78] <u>실시예</u>

[79] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는

오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[80]

[81]

[82] **실시예 1. 실험방법**

[83] **1-1. 재료**

[84] 인도시아닌 그린은 TCI (Tokyo, Japan)에서 구입하였다. FA, DCF-DA, 디시클로헥실카르 보디이미드(DCC) 및 NHS는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. PD MiniTrap G-25 탈염 컬럼은 Cytiva (Marlborough, MA, USA)에서 구입하였다. Slide-A-Lyzer Mini 투석 장치는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 공급받았다. Sonicator 740 (Mettler Electronics Corp., Anaheim, CA, USA)이 초음파 처리에 사용되었다. Minimum essential medium/Earle's balanced salt solution (MEM / EBSS) 및 FBS는 HyClone (Cytiva)에서 구입하였다. 수컷 CAnN.Cg-Foxn1 nu/Crl 마우스는 ORIENT (경기도, 한국)에서 공급받았다.

[85]

[86] **1-2. 엑소좀 분리**

[87] ExoQuick-TC (System Biosciences, Palo Alto, USA)를 사용하여 인간 배아 신장 HEK-293T 세포에서 엑소좀을 생산하였다. 간략히 서술하면, 세포는 엑소좀 생산을 위해 엑소좀-프리 FBS의 존재하에 3 일 동안 배양되었다. 이후, 원심 분리 (3000g, 15 분)에 의해 배양 배지를 세포 잔해로부터 정제하였다. ExoQuick-TC 용액을 상청액에 첨가하고 혼합물을 밤새 유지하였다. 혼합물을 1500g에서 30 분 동안 원심 분리하고 상청액을 제거하였다. 세척 단계 후, 엑소좀을 포함하는 펠렛을 PBS (pH 7.4)에서 재구성하였다. 최종 산물은 이후 사용을 위해 -80 ℃에서 보관하였다. 분리된 엑소좀의 농도와 크기는 NTA를 사용하여 분석하였다.

[88]

[89] **1-3. 웨스턴 블롯 분석**

[90] 엑소좀은 세포 용해 완충액을 사용하여 파괴되었고, 단백질 양은 BCA 단백질 분석 (Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 측정되었다. SDS-PAGE 겔의 단백질을 폴리비닐리덴플루오라이드 막으로 트랜스퍼하였다. 엑소좀에서 CD63 (MBL Life Science, Nagoya, Japan) 및 CD81 (Abcam, Cambridge, UK)을 검출하는 항체를 사용하여 검출하였다. 면역 반응 밴드는 ECL Prime Western Blotting 검출 시약 (Cytiva)을 사용하여 관찰되었다. 이미지는 ChemiDoc XRS 시스템 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 획득되었다.

[91]

[92] **1-4. ExoICG 및 FA ExoICG의 준비 및 특성 분석**

[93] 인도시아닌 그린(ICG) 및 엽산(FA)의 스톡 용액은 DMSO (ICG의 경우 20mg/mL, FA의 경우 100mg/mL)에서 준비되었다. ExoICG는 4% (v/v) DMSO를 포함하는 PBS에서 5 x 10^{11} 엑소좀과 0.2 mg의 인도시아닌 그린을 혼합하고 어두운 곳 (4 ℃)에서 2 시간 동안 배양하여 제작되었다. 이후 PD MiniTrap G-25 탈염 컬럼을 사용하여 미탑재된 인도시아닌 그린을 제거하였다.

[94] 엑소좀의 표면을 아민 반응성 NHS 에스테르 활성화된 FA로 개질하여 FA-ExoICG를 제조하였다. NHS 에스테르 활성화는 이전에 보고된 방법으로 합성되었다(Lee, R. J. et al. Biochim. Biophys. Acta, Biomembr. 1995, 1233, 134-144). 요약하면, FA (0.20g, 0.45mmol) 및 DCC (0.18g, 0.9mmol)를 트리에틸아민 (50.60mg, 0.5mmol)의 존재하에 DMSO (8mL)에서 혼합하였다. 혼합물 용액을 실온 (RT)의 암실에서 교반 하에 1 시간 동안 유지하였다. NHS (0.11g, 0.9mmol)를 첨가한 후, 혼합물을 밤새 어두운 실온에서 교반한 다음 여과하여 불용성 부산물인 디시클로헥실우레아를 제거하였다. 생성된 여액을 디에틸에테르를 사용하여 침전시켰다. 그 후, 조 생성물을 테트라하이드로퓨란(tetrahydrofuran)으로 세척하여 NHS 에스테르-활성화된 FA(NHS ester-activated FA)를 수득하였다.

[95] NHS 에스테르-활성화된 FA를 PBS (1 mg/mL)를 함유하는 1% (v/v) DMSO에 용해시키고 4 ℃에서 2 x 10^{12} 엑소좀과 혼합하였다. 혼합물을 밤새 교반하여 FA-엑소좀을 수득하였다. 이어서 샘플을 PD G-25 탈염 컬럼을 사용하여 정제하여 염 및 free FA를 압출시켰다. FA-ExoICG를 수득하기 위해, FA-엑소좀 (5 x 10^{11} 엑소좀)을 PBS를 포함하는 4% (v/v) DMSO에 0.2mg의 인도시아닌 그린과 혼합하고 어두운 곳에서 2 시간 (4 ℃) 교반하였다. PD G-25 탈염 컬럼을 사용하여 샘플을 정제하고 추가 사용을 위해 4 ℃에서 보관하였다. 엑소좀에 대한 FA의 접합 효율은 UV-vis 흡수에 의해 정량화되었다. FA-엑소좀은 DMSO에 용해되었고, FA 농도는 290 nm에서 정량화되었다 (Infinite M200 Pro, Tecan, Grodig, Austria). DMSO의 free FA 용액의 표준 곡선을 사용하여 엑소좀에 있는 FA의 몰 수를 계산하였다. 단일 엑소좀의 FA 수는 NTA로 측정한 FA-ExoICG의 엑소좀 수를 기준으로 결정되었다. FA-엑소좀 및 인도시아닌 그린-탑재된 엑소좀의 크기는 25 ℃에서 NTA에 의해 결정되었다. 다양한 엑소좀 샘플의 형태는 TEM (Talos F200X, FEI, Hillsboro, OR, USA)에 의해 관찰되었다. free ICG, ExoICG 및 FA-ExoICG의 흡광도 스펙트럼은 분광 광도계 (Infinite M200 Pro)를 사용하여 획득하였다. 인도시아닌 그린이 엑소좀에 캡슐화되는 효율은 UV-vis 흡수를 사용하여 측정하고 다음과 같이 결정하였다: (적재된 인도시아닌 그린의 양) / (초기 추가된 인도시아닌 그린의 양) × 100 %.

[96]

[97] **1-5. ExoICG 및 FA ExoICG의 콜로이드 안정성 평가**

[98] 생물학적 배지에서 FA-ExoICG의 콜로이드 안정성을 평가하기 위해 37 ℃에서 어둠 속에서 PBS에 분산시켰다. 샘플은 동적 광산란 분석 (Nano-ZS, Malvern,

Worcestershire, UK)에 의해 크기를 측정하기 위해 배양 후 0, 1 일, 2 일 및 3 일 후에 수득되었다.

[99]

[100] **1-6. ExoICG 및 FA-ExoICG에서 인도시아닌 그린의 수성 안정성 평가**

[101] ExoICG 및 FA-ExoICG의 인도시아닌 그린이 장기간에 걸쳐 수용액에서 안정적인지 조사하기 위해 PBS의 free ICG, ExoICG 및 FA-ExoICG (20 μg/mL ICG)를 4 ℃의 일반 조명 조건에서 최대 10일 동안 유지하였다. 미리 정해진 간격 동안 인큐베이션 한 후 인도시아닌 그린의 형광을 기록하였다 (λex= 780 nm; λem= 835 nm).

[102]

[103]

[104] **1-7. *In Vitro* 약물 방출 분석**

[105] ExoICG 및 FA-ExoICG에서 인도시아닌 그린의 방출 프로파일은 투석 방법을 사용하여 평가되었다. PBS 중 100ml의 ExoICG (30μg/mL ICG, 5.34×10^{10} 엑소좀/mL) 및 FA-ExoICG (30μg/mL ICG, 5.65×10^{10} 엑소좀/mL)를 Slide-A-Lyzer Mini 투석 장치(MW 컷오프 = 20,000 Da)에 탑재하고, 장치를 어두운 곳에서 교반하면서 37 ℃로 유지하였다. 샘플에서 인도시아닌 그린의 방출 프로파일은 이전에 보고된 것과 동일한 방식으로 정량화되었다. 샘플에서 방출된 인도시아닌 그린의 양은 780 nm에서의 흡광도를 기준으로 정량화되었다. 인도시아닌 그린이 탑재된 엑소좀에서 초음파에 의해 촉진된 인도시아닌 그린 방출을 평가하기 위하여 ExoIC 및 FA-ExoICG를 60초 동안 초음파 (1MHz, 0.3 W/cm^2)로 처리한 다음 어둠 속에서 37 ℃로 유지하였다. 2, 4, 8 및 24 시간 후 ExoICG 및 FA-ExoICG에서 방출된 ICG의 양을 UV-vis 분광법으로 정량화하였다.

[106]

[107] **1-8. 세포 배양**

[108] MCF-7 세포는 10% FBS와 1% 항생제를 포함하는 MEM/EBSS에서 배양되었다. hDFB 세포는 10% FBS 및 1% 항생제가 보충된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, HyClone, Cytiva)에서 유지되었다.

[109]

[110] **1-9. Free ICG, ExoICG, 및 FA-ExoICG의 세포 흡수 분석**

[111] MCF-7 및 hDFB 세포를 24 웰 플레이트 (1×10^5 세포/웰)로 배양하였다. 세포를 free ICG, ExoICG (40 μg/mL ICG, 7.13×10^{10} 엑소좀/mL) 또는 FA-ExoICG (40 μg/mL ICG, 7.51×10^{10} 엑소좀/mL)와 함께 인큐베이션하고 4 시간 동안 인큐베이션하였다. FA 경쟁 실험을 위해, MCF-7 및 hDFB 세포는 Free ICG, ExoICG 및 FA-ExoICG의 처리 전에 40 분 동안 Free FA (5mM)와 함께 사전 인큐베이션되었다. 세포로의 인도시아닌 그린 흡수는 유세포 분석기 (CytoFLEX, Beckman Coulter, Brea, CA, USA)를 사용하여 처리된 세포의 형광

강도에 의해 결정되었다. FA-ExoICG가 간세포보다 암세포를 더 효율적으로 표적화하는지 조사하기 위해 ExoICG 및 FA ExoICG의 세포 흡수를 MCF-7 및 AML12 마우스 간세포를 사용하여 정량화하였다. MCF-7 및 AML12 세포를 24 웰 플레이트 (1×10^5 세포/웰)에 접종하였다. 세포를 1 일 동안 배양한 후 ExoICG (40μg/mL ICG, 7.13 x 10^{10} 엑소좀/mL) 및 FA-ExoICG (40μg/mL ICG, 7.51 x 10^{10} 엑소좀/mL)로 4 시간 동안 처리하였다. 세포의 트립신 처리 후, 세포에 의한 인도시아닌 그린 흡수는 유세포 분석기 (CytoFLEX)를 사용하여 결정되었다.

[112]

[113] **1-10. 초음파 처리시 Free ICG, ExoICG 및 FA-ExoICG에 의한 ROS 생성**

[114] 초음파 처리 전후에 무세포 시스템에서 인도시아닌 그린이 탑재된 엑소좀에 의한 ROS 생성은 DCF를 사용하여 정량화되었다. DCF는 KOH(0.1mM)를 DCF-DA에 첨가하여 얻었다. 요약하면, Free ICG 용액과 DI water에 ExoICG (30 μg/mL ICG, 5.34 x 10^{10} 엑소좀/mL) 및 FA ExoICG (30 μg/mL ICG, 5.65 x 10^{10} 엑소좀/mL)의 현탁액을 10μM DCF 용액과 함께 처리하였다. 이후 샘플을 미세 원심 분리기 튜브로 옮기고 1MHz 초음파 2 분을 0.3 W/cm^2로 적용하였다. 어둠 속에서 추가로 1 시간 동안 인큐베이션 한 후, UV-vis 분광 광도계 (Infinite M200 Pro, λex= 495 nm, λem = 529nm) 를 사용하여 액체의 형광 신호를 기반으로 ROS 생성을 평가하였다.

[115] 인도시아닌 그린 함유 엑소좀 처리 후 세포 내 ROS 수준은 DCF-DA를 사용하여 정량화되었다. DCF-DA는 ROS 감지 형광 염료이므로 DCF-DA 처리된 세포의 녹색 형광 강도는 세포의 세포 내 ROS 수준에 해당한다. MCF-7 및 hDFB 세포를 12 웰 플레이트 (3 x 10^5 세포/웰)에 넣고 1일 동안 배양하였다. 이후 세포를 PBS로 세척하고 DCF-DA 용액 (10μM)과 함께 30 분 동안 배양하였다. 이어서 세포를 PBS로 세척하고 Free ICG, ExoICG (40 μg/mL ICG, 7.13 x 10^{10} 엑소좀/mL) 또는 FA-ExoICG (40 μg/mL ICG, 7.51 x 10^{10} 엑소좀/mL)로 4시간 동안 처리하였다. 이후, 1 mL의 MEM을 사용하여 세포를 분리하고 두 그룹으로 분리하였다. 한 그룹은 대조군으로 사용되었고 다른 그룹은 1 분 동안 1MHz (0.3 W/cm^2) 초음파에 노출되었다. 30분의 인큐베이션 후, 세포의 녹색 형광을 유세포 분석으로 정량화하였다.

[116]

[117] **1-11. *In Vitro* Sonotoxicity 평가**

[118] 인도시아닌 그린이 탑재된 엑소좀의 초음파 역학 효과를 조사하기 위하여, 초음파의 존재 또는 부재하에 다양한 샘플로 처리된 MCF-7 세포의 생존력을 표준 MTT 분석을 사용하여 측정하였다. MCF-7 및 hDFB 세포를 96-웰 플레이트 (1 x 10^4 세포/웰)에 접종하였다. 세포를 24 시간 동안 배양한 후, Free ICG (20μg/mL), ExoICG (20μg/mL ICG, 3.56×10^{10} 엑소좀/mL) 및 FA-ExoICG (20μg/mL ICG, 3.76×10^{10} 엑소좀/mL)를 세포에 첨가하였다. 처리 4 시간 후에 웰의 배지를 배양 배지로 교체하였다. 이후, 세포를 60초 또는 70초 동안 0.3

W/cm^2에서 1MHz 초음파에 노출시킨 다음 48 시간 동안 배양하였다. 세포 생존력을 결정하기 위해 기존의 MTT 분석을 수행하였다.

[119]

[120] **1-12. Annexin V-FITC/Propidium Iodide (PI) 염색을 이용한 세포사멸 분석**

[121] MCF-7 및 hDFB 세포를 12-웰 플레이트 (2×10^5 세포/웰)에 접종하였다. 세포를 1 일 동안 배양한 후, Free ICG, ExoICG (40 μg/mL ICG, 7.13×10^{10} 엑소좀/mL) 또는 FA-ExoICG (40 μg/mL ICG, 7.51×10^{10} 엑소좀/mL)를 각 웰에 첨가하고, 4 시간 인큐베이션 하였다. 이후 세포를 트립신 처리하고 PBS (0.5 mL)에 분산시켰다. 세포 현탁액을 0.6 mL 마이크로 원심 분리 튜브로 옮기고 0.3 W/cm^2에서 1 분 동안 초음파로 처리하였다. 초음파 처리 후, 세포를 10% FBS가 보충된 배양 배지에 현탁시켰다. 이후 즉시 12-웰 플레이트에 다시 분주되었고 2 시간 동안 더 인큐베이션 되었다. 제조업체의 프로토콜 (BD Biosciences, Heidelberg, Germany)에 따라 분리하고 Annexin V-FITC 및 PI로 염색하였다. 세포 사멸 세포의 백분율은 유세포 분석 (CytoFLEX)에 의해 정량화되었다. Annexin V-양성 세포는 초기 및 후기 세포 사멸 세포로 결정되었다.

[122]

[123] **1-13. *In Vivo* 실험을 위한 MCF-7 종양 이종 이식 마우스의 제조**

[124] 종양 이종 이식 마우스를 확립하기 위해, 100 μL의 PBS에 현탁된 MCF-7 세포 (1×10^6 세포)를 BALB/c 누드 마우스 (4 주령)의 등 부위에 피하 주사하였다. 종양 부피가 약 100 mm3에 도달하면 마우스를 n = 4로 각 처리 그룹으로 무작위로 분류하였다.

[125]

[126] **1-14. *In vivo* 생체 분포 연구**

[127] Free ICG, ExoICG, FA-ExoICG의 실시간 생체 분포 영상을 100 μL의 free ICG, ExoICG (1.0 mg ICG/kg, 1.78×10^{11} 엑소좀/kg) 또는 FA-ExoICG (1.0 mg ICG/kg, 1.87×10^{11} 엑소좀/kg)를 MCF-7 종양 이종 이식 마우스로 (n = 4) 정맥 주사하여 획득하였다. 마우스를 투여 24 시간 후 안락사시키고 장기를 수확하였다. Ami HT 이미징 시스템 (Spectral Instruments Imaging, Tucson, AZ, USA)을 사용하여 주사 후 24 시간 이내에 미리 정해진 시간에 인도시아닌 그린 형광 강도 (745-830nm)를 측정하여 전신 및 주요 장기 형광 이미지를 획득하고 분석하였다. 획득된 이미지는 Aura Imaging 2.20 소프트웨어 (Spectra Instruments Imaging)를 사용하여 분석하였다.

[128]

[129] **1-15. *In Vivo* 약동학 연구**

[130] Free ICG (1.0mg ICG/kg), ExoICG (1.0mg ICG/kg, 1.78×10^{11} 엑소좀/kg) 및 FA ExoICG (1.0mg ICG/kg, 1.87×10^{11} 엑소좀/kg)를 꼬리 정맥 주사로 MCF-7 종양 이종 이식 마우스 (n = 4)에 투여하였다. 혈액 샘플 (30 μL)은 투여 후 2, 10, 30, 60, 120, 240, 480 및 1440 분에 복재 정맥(saphenous vein)에서 수득하여 0.5 mL

헤파린화 된 폴리에틸렌 튜브에 보관하였다. 혈액 샘플에서 원심 분리 (4 ℃에서 10 분 동안 2000g)하여 혈장 샘플을 수집하였다. 투여 후 24 시간에 종양과 주요 기관 (뇌, 심장, 간, 폐, 비장 및 신장)을 채취하고 무게를 잰 후 균질화하였다. 혈장 및 조직 샘플은 탠덤 질량 분석을 이용한 액체 크로마토그래피 (LC-MS/MS) 분석을 위해 -80 ℃에서 유지되었다. 혈장 농도 (ng/mL)는 LC-MS / MS를 사용하여 정량화되었다.

[131]

[132] **1-16. 초음파 방사선 조사에 따른 FA-ExoICG의 *In Vivo* 항암 활성**

[133] 종양 이종 이식 마우스는 꼬리 정맥을 통해 다음을 i.v. 주입하고 초음파로 조사하였다 (n = 4) : (i) PBS; (ii) PBS + 초음파 (0.5 W/cm^2); (iii) free ICG (1.0 mg ICG/kg) + 초음파; (iv) ExoICG (1.0 mg ICG/kg) + 초음파; 및 (v) FA-ExoICG (1.0 mg ICG/kg) + 초음파. ExoICG 및 FA-ExoICG 샘플의 엑소좀 농도는 각각 1.78 x 10^{11} 엑소좀/mL 및 1.87 x 10^{11} 엑소좀/mL이었다. 초음파 노출 (1 MHz, 0.5W/cm^2)은 주사 후 4 시간 또는 24 시간에 3 분 동안 종양 부위에서 수행되었다. 종양 크기는 격일로 측정되었으며 다음과 같이 결정되었다: 종양 부피 = (종양 길이) × (종양 폭)^2 / 2. 샘플의 생물학적 안전성을 평가하기 위해 각 마우스의 체중도 격일로 측정되었다. 14 일 동안 각 샘플의 정맥 주사와 초음파 방사선 조사 후 종양, 심장, 간, 폐, 신장 및 비장을 채취하였다. 모든 조직을 H & E로 염색하여 조직학 결과를 관찰하였다.

[134]

[135] **1-17. 통계분석**

[136] 모든 실험은 달리 명시되지 않는 한 3회 수행되었다. 데이터는 평균 ± 표준 편차 (SD) 값으로 표현하였다. 실험 그룹 간의 통계적 유의성을 평가하기 위하여 One-way ANOVA가 사용되었다. 통계적 유의성은 다음과 같이 표시되었다: *p <0.05; **p <0.01.

[137]

[138] **<u>실시예 2. 인도시아닌 그린 탑재 엑소좀의 설계, 준비 및 특성 분석</u>**

[139] 본 발명에서는 분자 프로파일이 잘 알려진 HEK-293T 세포 유래 엑소좀을 사용하였으며, HEK-293T 세포 유래 엑소좀의 암 특이성을 향상시키기 위하여 FA를 엑소좀 표면에 결합하였다. 이를 위하여 엑소좀 (2.0 × 10^{12})을 1% (v/v) 디메틸설폭사이드 (DMSO)/인산염 완충 식염수 (PBS)에서 1mg/mL N 하이드록시숙신이미드 (NHS) 에스테르 활성화된 FA와 혼합하고 4 ℃에서 밤새 교반하였다. 이어서, PD G-25 탈염 컬럼을 사용하여 FA-접합된 엑소좀(FA-엑소좀)을 정제하였다. 인도시아닌 그린은 DMSO의 존재하에 PBS에서 FA-엑소좀과 인도시아닌 그린을 혼합함으로써 엑소좀에 효율적으로 탑재되도록 하였다. DMSO는 인도시아닌 그린의 용해도와 지질막을 통한 투과성을 증가시키는데 사용되었다. DMSO 농도가 4% (v/v) 보다 높으면 DMSO로 인한 막 파괴로 인해 엑소좀이 실질적으로 손실되기 때문에

인도시아닌 그린 캡슐화를 위해 PBS에서 최대 농도 4% (v/v) DMSO를 사용하였다 (표 1).

[140]

[141] [표1]

Solvent composition (v/v)	Percentage of remained exosomes (%)
1% DMSO/99% PBS	85.6±7.1
2% DMSO/98% PBS	84.2±2.3
3% DMSO/97% PBS	83.2±5.3
4% DMSO/96% PBS	85.2±8.4
5% DMSO/95% PBS	68.2±6.5
6% DMSO/94% PBS	40.2±5.0
7% DMSO/93% PBS	36.0±3.1

[142]

[143] 엑소좀에서 FA-접합 및 인도시아닌 그린 캡슐화를 확인하기 위하여 자외선-가시 광선 (UV-vis) 분광 분석을 수행하였다. 블랭크 엑소좀, free FA, free ICG, FA-엑소좀 및 FA-ExoICG의 UV-vis 흡수 스펙트럼은 도 2A에 도시된 바와 같다. FA-ExoICG의 흡수 스펙트럼은 각각 엽산 및 인도시아닌 그린을 나타내는 ~290 및 ~790nm에서 특징적인 피크를 보여주어, 엽산 및 인도시아닌 그린이 FA-엑소좀에 성공적으로 통합되었음을 확인할 수 있었다. 엑소좀에 대한 FA의 접합 비율은 290 nm에서 FA의 특징적인 UV 흡광도를 정량화하여 17.3%로 결정되었다. 엑소좀에 대한 FA의 밀도는 5.2×10^5 FA/엑소좀이었다. ExoICG 및 FA-ExoICG에서 인도시아닌 그린의 캡슐화 효율은 각각 64.9 및 60.7 %였다. ExoICG 및 FA-ExoICG에 대한 인도시아닌 그린의 탑재 용량은 각각 5.69×10^{-10} 및 5.32×10^{-10} μg/엑소좀이었다.

[144] 블랭크 및 변형된 엑소좀의 유체 역학적 크기 및 표면 전하는 나노 입자 추적 분석 (NTA) (Nanosight NS300, Malvern, 영국 Worcestershire) 및 제타 전위 분석 (Nano-ZS Zetasizer, Malvern)에 의해 각각 결정되었다. 블랭크 엑소좀, FA-엑소좀, ExoICG 및 FA-ExoICG의 유체 역학적 크기는 각각 108.5 ± 2.5, 115.7 ± 1.1, 136.0 ± 3.0 및 149.8 ± 3.4 nm였다 (표 2).

[145]

[146]

【표 2】

samples	size (nm)	zeta potential (mV)
blank exosome	108.5 ± 2.5	−24.8 ± 2.0
FA-Exosome	115.7 ± 1.1	−21.4 ± 0.3
ExoICG	136.0 ± 3.0	−28.5 ± 1.0
FA-ExoICG	149.8 ± 3.4	−25.3 ± 3.2

[147]

[148] 나노 크기의 직경을 가진 엑소좀은 강화된 세포 흡수 및 약동학이라는 추가 이점을 가질 수 있다. FA-엑소좀의 크기는 블랭크 엑소좀의 크기와 유사했으며, 이로써 FA 변형이 엑소좀 파괴 또는 응집을 유도하지 않음을 알 수 있었다. 엑소좀은 인도시아닌 그린이 탑재된 후 약간 더 커졌다. 대부분의 인도시아닌 그린은 엑소좀의 내부로 캡슐화되지만 인도시아닌 그린의 일부는 인도시아닌 그린의 친유성 특성으로 인해 엑소좀의 지질 이중층 내에 내장되어 엑소좀 크기가 증가될 수 있다. 제타 전위 분석 결과, 모든 엑소좀 기반 샘플이 -21.4 ~ -28.5mV 범위의 음의 표면 전하를 갖는 것으로 나타났다 (표 2 참조). 표면 개질된 엑소좀의 유체 역학적 직경 및 표면 전하에 대한 이러한 최소 변경으로 엑소좀의 고유한 특성이 유지됨을 알 수 있었다. 블랭크 엑소좀과 FA-ExoICG의 형태를 투과 전자 현미경 (TEM)으로 관찰한 결과, 블랭크 엑소좀과 FA-ExoICG는 모두 직경이 40 ~ 60nm 인 구형 입자임을 확인하였다 (도 2B).

[149] 엑소좀 마커 단백질인 CD81 및 CD63의 발현을 웨스턴 블롯팅으로 분석하여 표면 변형 및 인도시아닌 그린 탑재 과정이 엑소좀의 단백질 함량에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, 도 2C에서 볼 수 있듯이, CD81 및 CD63을 나타내는 명백한 밴드가 FA-엑소좀, ExoICG, FA-ExoICG 및 블랭크 엑소좀에서 관찰되었다. 이와 같은 결과는 표면 변형 및 인도시아닌 그린 탑재 과정에 의해 엑소좀의 원래 단백질 함량을 크게 변화하지 않음을 보여준다.

[150]

[151] **실시예 3. 인도시아닌 그린 탑재 엑소좀의 높은 콜로이드 안정성**

[152] 생체 내에서 성공적으로 작용하려면 생물학적 유체의 약물 운반체가 높은 콜로이드 안정성을 가져야 한다. PBS에 현탁된 ExoICG 및 FA ExoICG는 37 ℃에서 배양되었으며, 염분 생리학적 조건에서 콜로이드 안정성을 조사하기 위하여 다양한 기간에 걸쳐 크기를 측정하였다.

[153] 그 결과, ExoICG와 FA-ExoICG는 PBS에서 최대 72 시간 이내에는 크기 변화가 크게 나타나지 않는 것으로 나타났다. 이는 높은 염 농도에 대한 인도시아닌 그린 탑재 엑소좀의 높은 콜로이드 안정성을 보여주는 것으로, 인도시아닌 그린이 장착된 엑소좀은 높은 콜로이드 안정성과 나노 크기로 인하여 혈류의 순환 시간을 연장시키고 EPR 효과를 통해 종양 축적을 증가시켜 효율적인 생체

내 암 표적 SDT를 유도할 수 있음을 알 수 있었다.

[154]

[155] **실시예 4. 엑소좀으로의 캡슐화에 의한 인도시아닌 그린의 장기 수성 안정성**

[156] 인도시아닌 그린은 수용액에서 분해되어 흡수 및 형광이 동시에 감소된다. 엑소좀이 인도시아닌 그린의 장기 수성 안정성을 제공할 수 있는지 조사하기 위하여 10 일 동안 4 ℃PBS에서 배양하면서 free ICG, ExoICG 및 FA-ExoICG의 형광 강도를 모니터링하였다. 도 2D는 배양 10 일 후 ExoICG의 초기 형광 신호의 83%가 남아 있음을 나타낸다. FA-ExoICG는 ExoICG와 거의 동일한 형광 강도 변화를 보였으며, 이는 엑소좀의 FA 변형이 엑소좀의 장기 수성 안정성에 영향을 미치지 않음을 나타낸다. 반면, free ICG 용액의 형광 신호는 10 일 배양 후 초기 값의 47 %로 크게 감소하여 ($p < 0.01$) 인도시아닌 그린의 낮은 수성 안정성을 확인할 수 있었다. 상기와 같은 결과로부터, 엑소좀이 수용액에서 인도시아닌 그린의 안정성을 개선했음을 알 수 있었다.

[157]

[158] **실시예 5. 인도시아닌 그린 탑재 엑소좀에 의한 초음파 감응성 인도시아닌 그린 방출**

[159] 37 ℃PBS (pH 7.4)에서 인큐베이션하기 전 ExoICG 및 FA-ExoICG를 초음파로 조사하고 (1 분, 0.3 W/cm^2), 초음파 감응성 인도시아닌 그린 방출을 평가하였다. 초음파 조사가 없을 때 ExoICG 및 FA-ExoICG에서 방출된 인도시아닌 그린의 양은 크게 다르지 않았다(도 2E). 초음파 조사가 없는 상태에서 ExoICG 및 FA-ExoICG는 24 시간 이내에 각각 14.2 및 14.6% 누적 인도시아닌 그린을 방출하였다. 초음파로 조사했을 때 엑소좀에서 훨씬 더 많은 인도시아닌 그린이 방출되었다 ($p < 0.01$). ExoICG와 FA-ExoICG는 초음파 조사 후 24 시간 배양 후 각각 31.7 %와 32.9 %의 인도시아닌 그린을 방출했다.

[160] 이와 같은 결과로부터 초음파가 인도시아닌 그린에서 ROS 생성을 촉발할 뿐만 아니라 표적 종양 조직에서 인도시아닌 그린의 방출을 위한 외부 자극 역할도 한다는 것을 알 수 있었다. 본 발명에서는 초음파 조사에 의해 엑소좀 막의 불안정화가 유도되고, 이로써 엑소좀에서 인도시아닌 그린이 방출되며, 따라서 엑소좀을 효과적인 초음파 반응 약물 운반체로 사용할 수 있음을 확인하였다.

[161] 증가된 초음파 조사 시간이 FA-ExoICG에서 인도시아닌 그린 방출을 촉진하는지 여부를 조사하기 위하여, 상이한 초음파 조사 시간에 따른 인도시아닌 그린 방출 속도를 정량화 한 결과, 초음파 조사 시간이 증가함에 따라 FA-ExoICG에서 더 많은 인도시아닌 그린이 방출되는 것으로 확인되었다. 예를 들어, FA-ExoICG는 초음파를 70초 조사한 경우 24 시간 이내에 인도시아닌 그린의 45.0 %가 방출되었다. 이와 같이 엑소좀에서 방출되는 인도시아닌 그린이 증가함으로써 보다 효율적인 SDT를 발휘할 수 있음을 알 수 있었다.

[162]

[163] **실시예 6. FA-ExoICG의 암 표적 세포 흡수**

[164] 동등한 인도시아닌 그린 농도를 갖는 free ICG, ExoICG 및 FA-ExoICG를 엽산 수용체 과발현 MCF-7 세포와 함께 인큐베이션하여 FA 접합이 유방암 세포에 의한 인도시아닌 그린 탑재된 엑소좀의 세포 내재화를 촉진하는지 조사하였다. 인간 진피 섬유 아세포 (hDFB)가 엽산 수용체 음성 대조군으로 채택되었다.

[165] 그 결과, 도 3A에 나타난 바와 같이, FA-ExoICG는 FA가 없는 ExoICG 보다 MCF-7 세포를 과잉 생산하는 엽산 수용체에 의해 더 효과적으로 흡수되었다. 또한, MCF-7 세포에 의한 FA-ExoICG의 세포 흡수는 hDFB 세포에 의한 FA-ExoICG의 세포 흡수보다 우수한 것으로 나타났다. 이와 같은 결과로부터 FA-ExoICG의 암 선택적 세포 내재화를 확인할 수 있었다.

[166] FA-ExoICG의 수용체-매개 세포 내 이입에서 FA의 효과를 조사하기 위하여, ExoICG 또는 FA-ExoICG 처리 전 MCF-7 및 hDFB 세포를 free FA와 함께 사전 배양 한 FA 경쟁 결합 연구를 수행하였다. free FA로 전 배양시, 세포의 엽산 수용체는 FA-ExoICG 처리 전에 과량의 FA로 초기에 차단된다.

[167] 상기 실험 결과, 도 3A에 나타난 바와 같이, free FA의 전 배양은 MCF-7 세포에 의한 FA-ExoICG의 세포 내재화를 감소시켰다. 대조적으로, MCF-7 세포에 의한 FA-free ExoICG의 세포 내재화는 FA와의 전배양에 의해 크게 영향을 받지 않았다. 이와 같은 결과로부터 MCF-7 세포에 의한 FA-ExoICG의 상승된 흡수가 엽산 수용체 매개 세포 내 이입과 인과적 관련이 있음을 알 수 있었다.

[168]

[169] **실시예 7. 인도시아닌 그린 탑재 엑소좀에 의한 향상된 음역학적 효과**

[170] SDT의 효능은 초음파 노출에 의해 ROS를 생성하는 초음파 감작제의 기능에 따라 달라진다. free ICG 용액과 ExoICG 및 FA-ExoICG 현탁액을 초음파 (0.3 W/cm^2, 2 분)에 노출하여 인도시아닌 그린이 탑재된 엑소좀이 인도시아닌 그린의 음역학적 효과를 향상시키는지 여부를 조사하였다. ExoICG 및 FA-ExoICG의 인도시아닌 그린이 초음파 노출에서 ROS를 생성하는지 조사하기 위해 무세포 시스템에서 free ICG, ExoICG 및 FA-ExoICG의 상대적 ROS 생산을 초음파 조사 전후에 측정하였다(도 3B).

[171] 초음파 조사 결과, free ICG, ExoICG 및 FA-ExoICG의 ROS 생성이 크게 증가되었다. 특히 ExoICG와 FA-ExoICG 모두 free ICG보다 ROS 생성 능력이 더 강하게 나타났다. 이와 같은 결과는 엑소좀 캡슐화로 인해 수용액에서 인도시아닌 그린의 안정성이 향상되기 때문일 수 있다(도 2D). 상기 결과로부터, 인도시아닌 그린이 탑재된 엑소좀은 인도시아닌 그린에 비해 SDT에 대해 효과적이고 안정적인 나노 초음파 감작제임을 알 수 있었다.

[172] 세포 내 ROS 생성과 초음파 방사선 조사 하에서 초음파 감작제에 의한 산화 스트레스가 세포 내 소기관 기능 장애와 세포 사멸을 유발하는 것으로 알려져 있는바, MCF-7 및 hDFB 세포에 초음파 자극 하에 free ICG, ExoICG 및 FA-ExoICG를 처리 한 후 ROS의 세포 내 수준을 ROS 민감성 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) 염료를 사용하여 평가하였다. 염료

처리된 세포에서 더 강한 형광 신호는 더 높은 수준의 ROS 생산을 나타낸다.

[173] 그 결과, 도 3C에 도시된 바와 같이, 인도시아닌 그린이 탑재된 엑소좀을 사용한 치료는 초음파 처리에 관계없이 free ICG를 사용한 치료에 비해 더 높은 세포 내 ROS 수준을 나타내었다. 이 결과는 MCF-7 세포에 의한 인도시아닌 그린의 세포 내재화가 증가했기 때문일 수 있다. 특히, 초음파에 노출된 상태에서 free ICG, ExoICG 또는 FA-ExoICG로 처리된 세포는 초음파에 노출되지 않은 세포에 비해 세포 내 ROS 수준에서 극적인 증가를 나타내었다 (도 3C). 이 결과는 초음파가 인도시아닌 그린이 탑재된 엑소좀에서 ROS 생성을 트리거함을 보여준다. 초음파 조사에서 FA-ExoICG로 처리된 세포는 가장 높은 세포 내 ROS 수준을 나타내었는데, 이는 FA 접합으로 인해 세포 흡수가 촉진된 결과로 해석된다. FA-ExoICG와 함께 배양된 MCF-7 세포는 초음파 처리에 관계없이 hDFB 세포에 비해 더 높은 세포 내 ROS 수준을 나타냄을 확인할 수 있었다. 이 결과는 hDFB 세포보다 FA-ExoICG가 MCF-7 세포로 세포 흡수가 더 잘 일어난 결과로, 이와 같은 결과로부터 FA-ExoICG가 효과적인 암 표적 나노 초음파 감작제일 수 있음을 보여준다.

[174]

[175] **실시예 8. FA-ExoICG를 사용한 *In Vitro* 암 표적 SDT**

[176] 엽산 수용체-음성 hDFB 및 엽산 수용체-양성 MCF-7 세포에 대한 인도시아닌 그린-탑재된 엑소좀의 시험관 내 초음파 독성을 표준 MTT 분석을 사용하여 조사하였다. 세포를 20 μg/mL free ICG, ExoICG (20 μg/mL ICG, 3.56 x 10^{10} 엑소좀/mL) 및 FA-ExoICG (20 μg/mL ICG, 3.76 x 10^{10} 엑소좀/mL)로 처리한 다음, 60 초 또는 70 초 동안 초음파 방사선 조사하였다. 더 오랜 시간 초음파 방사선을 조사하면 세포 독성을 유발할 수 있기 때문에 세포는 최대 70 초 동안 초음파로 조사되었다.

[177] 그 결과, MCF-7 및 hDFB 세포의 88% 이상이 70 초의 초음파 조사에서 생존력을 유지하여 초음파 조사에 의해서는 MCF-7 및 hDFB 세포 모두에서 최소의 세포 독성을 나타내었다(도 3D, 3E). 한편, ExoICG와 함께 배양된 MCF-7 세포의 생존력은 free ICG로 처리된 것과 비교하여 유의하게 감소하였다(도 3D). 이는 엑소좀에 의해 인도시아닌 그린의 세포 내 흡수가 증가되어 세포 독성이 증가된 것으로 해석된다. 세포에 초음파 방사선을 조사한 후 ExoICG 또는 FA-ExoICG를 처리하였을 때, 세포 독성이 현저히 증가되었다. 구체적으로, FA-ExoICG로 처리한 후 MCF-7 세포의 생존율은 66.9%에서 60초의 초음파 조사 후 44.1%로 감소하였고 (도 3D), 70초의 초음파 조사 후 FA-ExoICG로 처리된 세포의 생존력은 더 현저하게 감소하였다. 특히 MCF-7 세포에 대한 FA-ExoICG의 초음파 독성(sonotoxicity)은 초음파 방사선 조사 여부와 관계없이 ExoICG보다 유의하게 더 크게 나타났다. 이와 같은 결과는 FA-ExoICG의 암 특이성 때문일 수 있다. MCF-7 및 hDFB 세포에 대한 free ICG, ExoICG 및 FA-ExoICG의 초음파 독성을 비교해 본 결과, FA-ExoICG는 hDFB 세포보다

MCF-7 세포에 훨씬 더 초음파 독성을 나타낸 반면, free ICG와 ExoICG는 두 세포 유형에 대해 유사한 수준의 초음파 독성을 나타내었다. 이와 같은 결과로부터 FA-ExoICG의 암 특이적 초음파 독성(sonotoxicity)을 확인할 수 있었다.

[178] 세포 내 ROS 생성 평가(도 3C)와 함께 세포 독성 평가로부터 인도시아닌 그린 탑재된 엑소좀이 효과적인 나노 초음파 감작제임을 확인할 수 있었다. MCF-7 및 hDFB 세포에 대한 블랭크 엑소좀 (즉, 인도시아닌 그린이 없는 엑소좀)의 세포 독성을 분석하여 엑소좀 자체의 독성을 평가하였다. 블랭크 엑소좀은 MCF-7 및 hDFB 세포 모두에 대해 2.0×10^{11} 엑소좀/mL 농도까지 유의한 독성 (> 90 % 생존율)을 나타내지 않아, 엑소좀이 저독성 담체임을 확인하였다 (도 3F). 시험관 내 초음파 독성 연구에 사용된 엑소좀 농도는 ExoICG 및 FA-ExoICG에서 각각 20 μg/mL의 인도시아닌 그린 농도를 탑재하기 위해 대략 3.8×10^{10} 엑소좀/mL를 사용하였으며, 3.8×10^{10} 엑소좀/mL 농도의 블랭크 엑소좀은 세포 독성이 거의 나타나지 않았다 (도 3F).

[179] 따라서, ExoICG와 FA-ExoICG의 초음파 독성은 엑소좀에 의한 것이 아니라, 엑소좀이 포함하고 있는 인도시아닌 그린 때문임을 확인할 수 있었다. 약물 운반체의 고유한 독성은 임상적 사용에 큰 장애가 된다는 점을 감안할 때, 블랭크 엑소좀의 낮은 독성으로부터 엑소좀 기반 나노 초음파 감작제를 SDT에 안전하게 임상 적용할 수 있음을 알 수 있었다.

[180]

[181] 추가적으로, free ICG, ExoICG 및 FA-ExoICG로 처리한 MCF-7 세포의 세포 사멸 정도를 초음파 방사선 조사 전후에 평가하여 초음파가 ExoICG 및 FA-ExoICG의 초음파 독성을 유발하는지 여부를 조사하였다. 초음파 조사 하에서 ExoICG 또는 FA-ExoICG로 처리된 세포에서는 초기 및 후기 세포 사멸 집단이 극적으로 증가하였다 (각각 34.09 및 57.65 %) (도 3G). 초음파 방사선 조사 하에서 특히 FA-ExoICG 처리는 ExoICG보다 더 높은 수준의 세포 사멸을 유도하였다 (도 3D).

[182] hDFB 세포에 대해서도 초음파 조사 전후 FA-ExoICG 처리에 의한 세포 사멸 정도를 조사하였다. 초음파 처리 후 FA-ExoICG 처리한 경우 31.80 %의 세포 사멸을 유도하여, 동일한 조건에서 MCF-7 세포에서 세포 사멸이 유도되는 것과 비교하여 상당히 낮은 수준으로 나타났다. 초음파 방사선 조사 후 FA-ExoICG로 처리할 때, hDFB 세포보다 MCF-7 세포에서 더 높은 세포사멸을 유도하는 것은 MCF-7 세포에서 hDFB 세포에 비해 세포 내 ROS 농도가 더 높기 때문인 것으로 판단된다.

[183]

[184] **실시예 9. FA-ExoICG의 효과적인 종양 내 축적**

[185] ~ 100 nm 엑소좀과 같은 나노 스케일 약물 운반체는 EPR 효과를 통해 고형 종양에서 혈관 투과성과 림프 배출이 억제되기 때문에, 선택적 축적이 가능하다. 이하에서는 MCF-7 종양 이종 이식 마우스에서 FA-ExoICG의 형태로 종양

영역에 전달된 인도시아닌 그린의 축적이 강화되어 있음을 생체 내 NIR 형광 이미징을 통해 확인하였다.

[186] free ICG, ExoICG 및 FA-ExoICG를 마우스 정맥 내 투여한 후, 0-24 시간에 마우스 체내에서의 free ICG, ExoICG 및 FA-ExoICG의 생체 분포를 생체 내 이미징 시스템 (IVIS)을 사용하여 인도시아닌 그린의 NIR 형광 신호를 통해 검출하였다. 모든 마우스 그룹은 정맥 주사 (i.v.) 1 분 후, 몸 전체에서 형광 신호를 검출하였다(도 4A). 주사 후 24 시간까지 ExoICG 및 FA-ExoICG의 형광이 종양에서 검출된 반면, free ICG의 형광은 24 시간 이내에 종양에서 거의 사라졌다(도 4A). 이와 같은 결과로부터, 인도시아닌 그린 탑재된 엑소좀이 EPR 효과를 통해 인도시아닌 그린을 종양에 효과적으로 전달할 수 있음을 확인할 수 있었으며, 특히, ExoICG 투여된 경우에 비해 FA-ExoICG 투여된 마우스의 종양에서 더 높은 형광 강도를 나타내어, FA-ExoICG의 우수한 암 특이성을 확인할 수 있었다. 한편, 주사 후 24 시간에 채취한 종양 및 주요 장기의 생체 외 영상에서도 FA-ExoICG 처리 및 ExoICG 처리 마우스에서의 인도시아닌 그린 종양 내 축적이 free ICG를 처리한 마우스에 비해 상당히 증가되는 것으로 확인되었다(도 4B). 상기와 같은 결과로부터, 인도시아닌 그린 탑재된 엑소좀은 비침습성 NIR 형광 이미징에 적합하고, 생체 내 SDT와 동시에, 각 치료 단계를 가이드하고 모니터링 할 수 있음을 알 수 있었다.

[187] 엑소좀의 종양 내 축적 과정을 확인하기 위하여, free ICG-, ExoICG- 및 FA-ExoICG 처리된 마우스에서 시간에 따른 종양 코어 영역의 형광 강도 대 종양 주위 조직 영역 (C/P)의 비율을 계산해 본 결과, 모든 그룹에서 주사 후 4 시간에 가장 높은 C/P 비율이 관찰되었고, 주사 후 8 시간까지 점진적으로 감소하는 것으로 나타났다. 따라서, 생체 내에서 가장 효과적인 인도시아닌 그린 매개 SDT를 달성하기 위한 연구로, 상기 각 샘플을 주사한 후 4시간이 지난 시점에서 초음파를 조사하였다.

[188] 투여 24 시간 후 C / P 비율이 증가한 이유는 투여 후 8 시간보다 투여 후 24 시간에 혈액 및 종양 주변 피부에 남아있는 ICG의 양이 급격히 감소[즉, 종양 주위 조직 영역 (P)의 ICG 농도가 크게 감소]했기 때문이다.

[189]

[190] **실시예 10. 인도시아닌 그린- 탑재된 엑소좀의 생체 내 약동학 및 생체 분포**

[191] free ICG 및 인도시아닌 그린 캡슐화된 엑소좀의 생체 내 약동학적 특성 및 생체 분포를 MCF-7 종양 이종 이식 마우스 모델을 사용하여 평가하였다. ExoICG 및 FA-ExoICG (1.0 mg ICG/kg)를 정맥 투여한 후 혈액 내 인도시아닌 그린 농도의 시간적 변화를 관찰하였다.

[192] 그 결과는 도 4C와 같으며, 곡선에서 파생된 약동학적 매개 변수는 표 3에 요약된 바와 같다. ExoICG 및 FA-ExoICG 그룹의 혈액 내 인도시아닌 그린 농도는 유사한 양상을 보였지만, FA-ExoICG 그룹의 초기 인도시아닌 그린 농도 (C_0)는 주입된 용량 (ID)/mL의 23.56 ± 5.21 %로 계산되었다. 이는 ExoICG

그룹보다 약 2배 더 높은 값인데, 이는 FA-ExoICG가 조직에서 ExoICG 그룹의 급속한 축적과는 대조적으로 초기에 혈액에 국한되어 있음을 나타낸다. 또한, FA-ExoICG 그룹에서 24 시간 동안 곡선 아래 면적 (AUC)은 ExoICG 그룹보다 1.6 배 더 높게 나타났다(표 3). FA-ExoICG의 소실기 반감기 [$t_{1/2}$ (z)]는 ExoICG 그룹보다 낮았다. ExoICG와 비교하여 종양 표적화 FA-ExoICG는 다른 조직보다 종양 조직에 더 빠르게 접근하고 흡수할 수 있는바, FA-ExoICG는 ExoICG에 비해 혈액 내 농도가 낮아 혈액 순환의 반감기가 상대적으로 짧을 수 있다. free ICG 그룹의 경우 C_0, 소실기 반감기 및 AUC는 각각 2.49 ± 0.73 % ID/mL, 2.43 ± 0.59 시간 및 0.69 ± 0.27 % ID·h /mL로 나타났다. free ICG 그룹의 경우 24 시간 동안 AUC는 ExoICG 그룹의 경우보다 약 5 배 낮게 나타나 (표 3), ExoICG가 free ICG보다 더 오래 혈액 순환을 유지함을 알 수 있었다. 상기와 같은 결과로부터, 엑소좀은 면역 체계에 의한 제거를 회피할 수 있고 혈액 순환이 연장되어, 인도시아닌 그린이 탑재된 엑소좀은 장기간의 혈액 순환이 통해 나노 초음파 감작제로 임상적 사용이 가능함을 알 수 있었다.

[193]

[194]

【표 3】

samples	C_0 (% ID/mL)	$t_{1/2}$ (z) (h)	AUC (% ID·h/mL)
ExoICG	12.56 ± 2.07	20.63 ± 7.05	2.12 ± 0.18
FA-ExoICG	23.56 ± 5.21	10.94 ± 2.91	3.43 ± 0.41

[195]

[196] ExoICG 및 FA-ExoICG를 종양 이종 이식 마우스에 단일 정맥 투여한 후 전체 기관에서의 인도시아닌 그린 분포를 조사하였다. 종양의 인도시아닌 그린 양은 주사 후 24 시간에 ExoICG 처리된 마우스에서 2.2 % ID/g, FA-ExoICG 처리된 마우스에서 8.2 % ID/g로 측정되어, FA-ExoICG가 ExoICG보다 더 효과적으로 종양을 표적으로 할 수 있음을 확인하였다(도 4D). 유사하게, IVIS를 사용하여 얻은 *ex vivo* 생체 분포 결과에서도 ExoICG 처리 마우스보다 FA ExoICG 처리 마우스의 폐 및 간에서 인도시아닌 그린의 흡수가 더 높게 나타났다 (도 4B). FA-ExoICG는 투여 후 24 시간에 간에서 가장 높은 인도시아닌 그린 국소화를 나타내었다 (도 4D).

[197]

[198] **실시예 11. FA-ExoICG에 의한 효율적인 생체 내 초음파역학 암치료 효과**

[199] 인도시아닌 그린이 탑재된 엑소좀의 생체 내 초음파역학 치료 효과(synodynamic effect)를 MCF-7 종양 이종 이식 마우스 모델을 사용하여 평가하고자, 고형 종양 (~ 100 mm^3)이 형성된 마우스 모델에 각 샘플 (PBS, free ICG, ExoICG 및 FA ExoICG)을 정맥 내로 투여하였다. 투여 후 4 시간 또는 24

시간에 3 분 동안 종양 영역에 초음파 조사 (0.5 W/cm^2)하고, 추가 주사 또는 초음파 방사선 조사없이 14일 동안 종양의 부피 변화를 측정하였다.

[200] 그 결과, 초음파 조사 14 일 후, ExoICG 또는 FA-ExoICG가 투여된 마우스는 free ICG가 투여된 마우스에 비해 종양 성장을 더 효과적으로 억제하였으며, FA-ExoICG 처리군이 다른 그룹에 비해 종양 성장 억제 효과가 특히 우수하였다 (도 5A). 종양 이미지를 촬영한 결과에서도 FA-ExoICG 처리된 마우스에서 14일째 가장 작은 종양 크기가 확인되어(도 5B), FA-ExoICG는 종양에 효과적으로 축적됨으로써 우수한 초음파 역학 치료 효과가 발휘됨을 알 수 있었다. 한편, 모든 처리군에서 14 일 동안 체중 변화는 관찰되지 않아, 치료에 부작용이 없음을 알 수 있었다(도 5C). 초음파 조사하며 FA-ExoICG로 투여한 그룹의 종양에서 핵 수축 영역과 단편화가 뚜렷하게 관찰되었고(도 5D), FA-ExoICG 투여 14일 후, 마우스의 주요 기관을 절편화하여 H & E 염색한 결과, 각 기관은 무시할 정도의 병리학적 변화를 나타내어 FA-ExoICG의 높은 생체 내 안전성을 확인할 수 있었다(도 5D).

[201] 나노 운반체는 만성적인 부작용을 예방하기 위하여 바람직한 시간 내에 신체에서 완전히 배설되어야 한다는 것이 잘 알려져 있다. 간과 비장의 대식세포가 주로 운반체로 사용되는 외래 엑소좀의 제거에 기여한다고 알려져 있는데, ICG가 탑재된 엑소좀은 투여 24 시간 후 간으로 상당히 축적된 결과를 보여주는바, 간 청소 경로를 통해 신체에서 제거될 것으로 예상된다. FA-ExoICG 처리된 마우스의 종양의 ICG 형광 강도는 주사 이후 시간에 관계없이 ExoICG로 처리된 것보다 더 높았다. 특히, FA-ExoICG로 처리된 종양의 ICG 양과 ExoICG로 처리된 종양의 ICG 양의 비율은 투여 후 4 시간보다 투여 후 24 시간에 더 높게 나타났다. 따라서, ExoICG와 비교하여 종양에서 상대적으로 증가된 FA-ExoICG 양이 SDT 효능의 향상으로 이어질 수 있는지 조사하기 위하여 주사 24 시간 후 종양을 분석하였다.

[202] 그 결과, 종양 성장은 free ICG로 처리된 마우스와 비교하여 ExoICG- 및 FA-ExoICG 처리된 마우스 모두에서 현저하게 억제되었다. 특히, FA-ExoICG 처리된 마우스는 14 일 동안 종양 부피의 증가가 현저히 적었으며 이는 주사 후 4 시간에서 초음파 조사를 사용한 종양 성장 억제 결과와 유사한 양상이었다 (도 5A). 특히, 투여 4시간 후 초음파 조사한 것과 비교하여, 투여 24시간 후 초음파 조사하는 경우 FA-ExoICG의 상대적인 종양 성장 억제 효과가 ExoICG의 종양 성장 억제 효과에 비해 현저하게 증가하였다(도 5A).

[203] 한편, 모든 마우스는 14 일 동안 체중에서 유의한 변화를 나타내지 않아 치료 부작용이 없음을 확인하였다. 또한, H & E 염색 이미지로도 ExoICG 처리군에 비해 FA-ExoICG 처리군에서 종양 조직이 더 효과적으로 파괴됨을 확인하였. 한편, ExoICG 및 FA-ExoICG 투여된 마우스의 주요 기관에서의 병리학적 변화는 거의 무시할 수 있는 수준에 불과하여, ICG 탑재된 엑소좀이 안전한 나노 초음파 감작제임을 확인하였다.

[204]

[205] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

청구범위

[청구항 1] 초음파 감작제가 탑재되어 있는 종양 치료용 엑소좀.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 초음파 감작제는 포르피린계(phorphyrins) 화합물, 프탈로시아닌계(phtalocyanine) 화합물, 로다민(rhodamine)계 화합물, 나프탈로시아닌계(naphthalocyanines) 화합물, 보디피계 (BODIPY) 화합물 및 인도시아닌 그린으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 엑소좀.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 엑소좀은 종양 표적화 물질이 접합되어 있는 것을 특징으로 하는, 엑소좀.

[청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 종양 표적화 물질은 엽산, 항체, 종양 표적 펩티이드, 압타머, 코발라민, 비타민 A, 비타민 C, 또는 비타민 B1로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 엑소좀.

[청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 엑소좀은 초음파 처리로 항종양 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는, 엑소좀.

[청구항 6] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 엑소좀을 유효성분으로 포함하는, 종양 치료용 약학적 조성물.

[청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 종양은 골발생 육종, 연조직 육종, 유방암, 폐암, 뇌암, 방광암, 갑상선암, 전립선암, 결장암, 직장암, 췌장암, 위암, 간암, 자궁암, 신장암, 자궁경부암, 피부암, 식도암 및 난소암; 호지킨 림프종, 비-호지킨, 신경교세포종, 흑색종, 골수종, 윌름스 종양, 급성 림프아구성 백혈병, 급성 골수아세포 백혈병, 별아교세포종, 신경아교종 및 망막모세포종으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 8] 제6항에 있어서, 상기 조성물은 초음파 조사 전에 투여되는 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 초음파는 0.1 내지 15 MHz 주파수, 0.01 내지 1.0 W/cm^2 강도로 30초 내지 300초 동안 조사하는 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 10] 제6항에 있어서, 상기 초음파는 상기 조성물 투여 후 4 내지 24시간에 조사되는 것을 특징으로 하는 조성물.

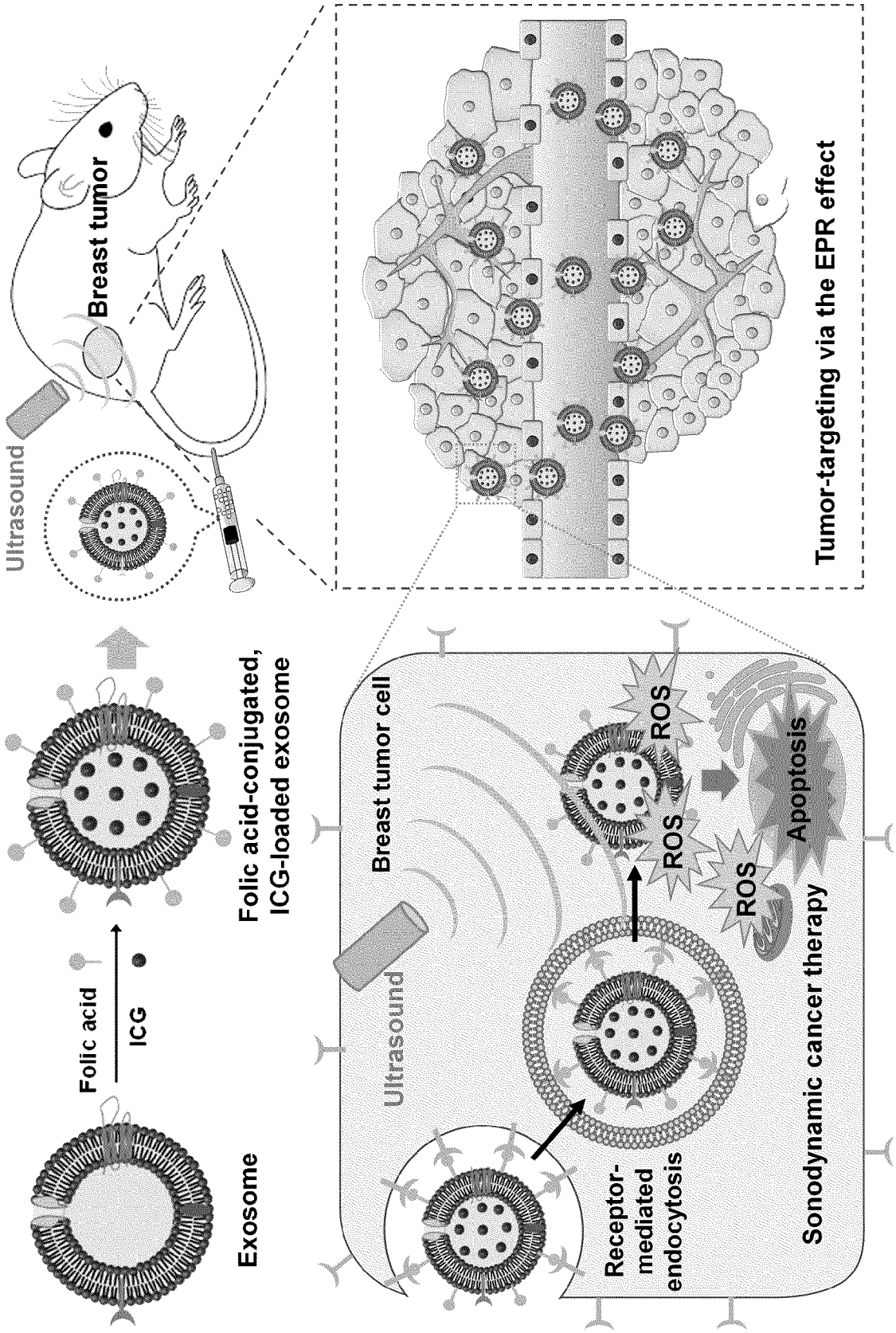
[청구항 11] 제8항에 있어서, 상기 초음파는
(i) ICG에 의한 ROS 생성; 및/또는
(ii) 엑소좀에서의 ICG 방출을 촉진하는 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 12] 1 내지 5% (v/v) DMSO를 포함하는 PBS에서 엑소좀과 불수용성 초음파 감작제를 혼합하여 인큐베이션 시키는 단계를 포함하는, 불수용성 초음파 감작제가 탑재되어 있는 엑소좀의 제조방법.

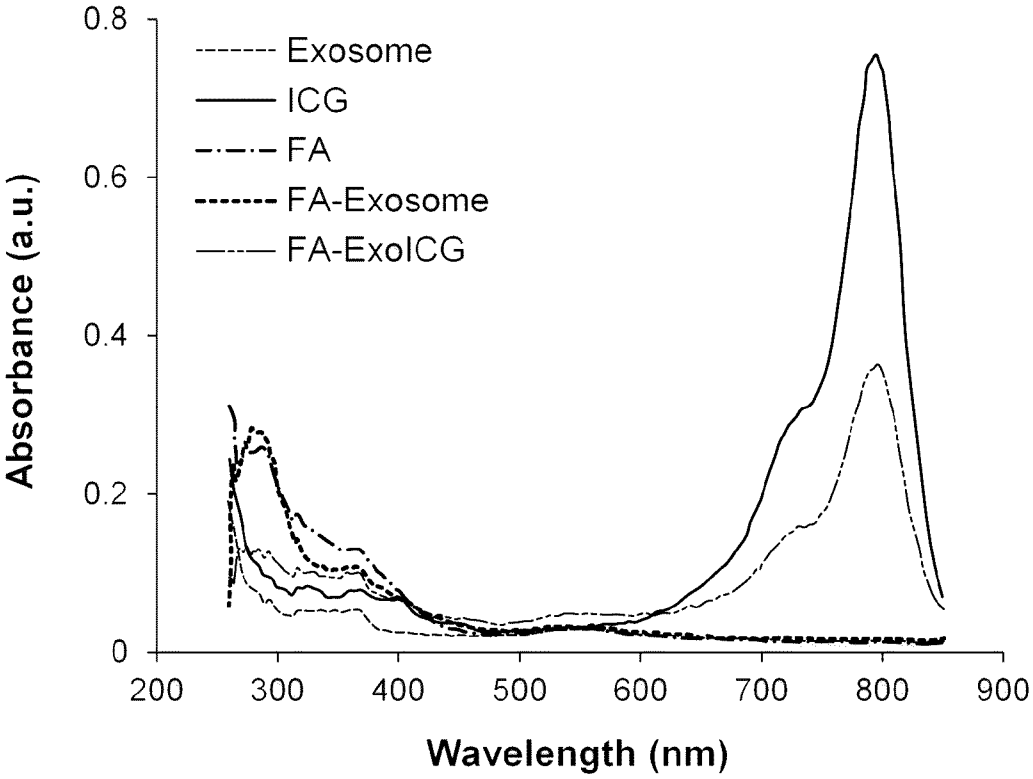
[청구항 13] 제12항에 있어서, 1×10^{10} 내지 1×10^{12}개의 엑소좀과 0.01 내지 1.0 mg의 불수용성 초음파 감작제를 혼합하는 것을 특징으로 하는, 제조방법.

[청구항 14] 제12항에 있어서, 상기 엑소좀은 불수용성 초음파 감작제와 혼합 전 또는 혼합 후, 종양 표적화 물질을 접합시키는 것을 특징으로 하는, 제조방법.

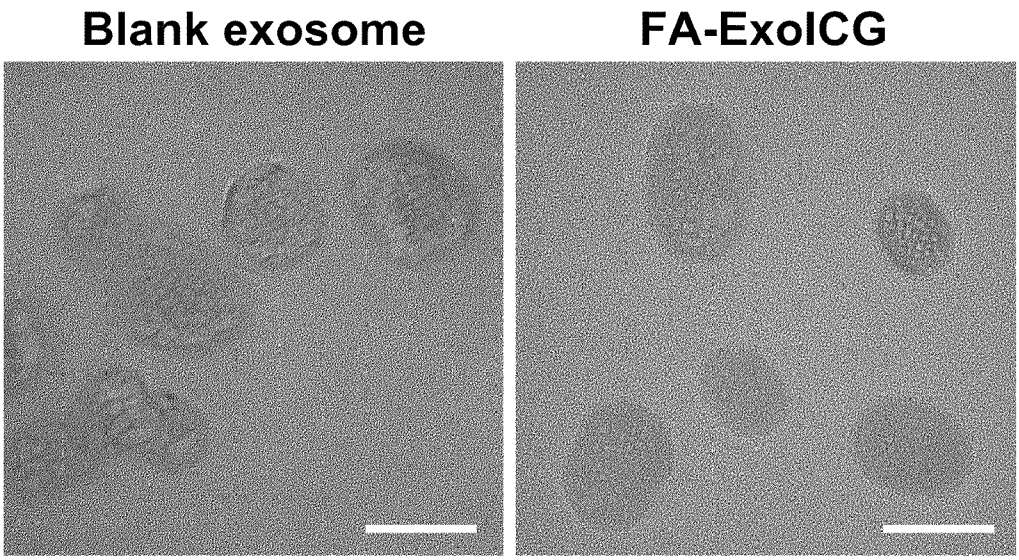
[도1]


Breast tumor
Ultrasound
Tumor-targeting via the EPR effect
Folic acid
ICG
Exosome
Folic acid-conjugated, ICG-loaded exosome
Breast tumor cell
Ultrasound
ROS
ROS
ROS
Apoptosis
Receptor-mediated endocytosis
Sonodynamic cancer therapy

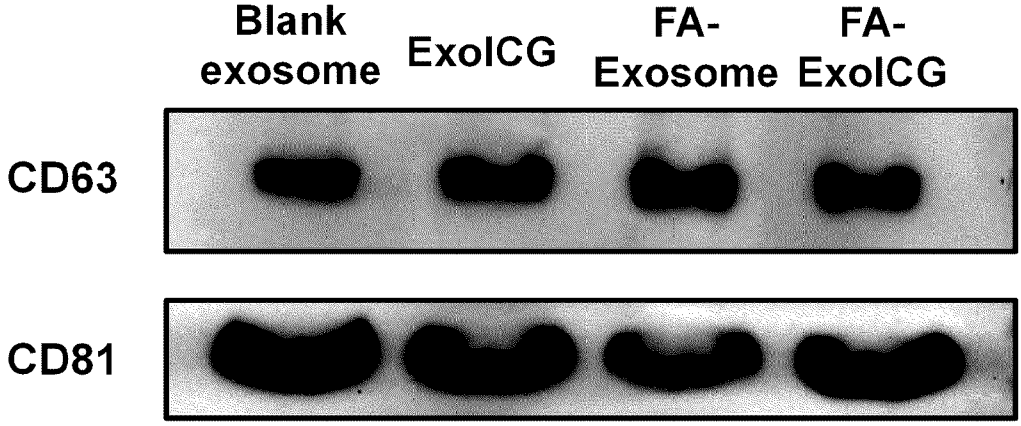
[도2a]


Exosome
ICG
FA
FA-Exosome
FA-ExoICG
Absorbance (a.u.)
0.8
0.6
0.4
0.2
0
200
300
400
500
600
700
800
900
Wavelength (nm)

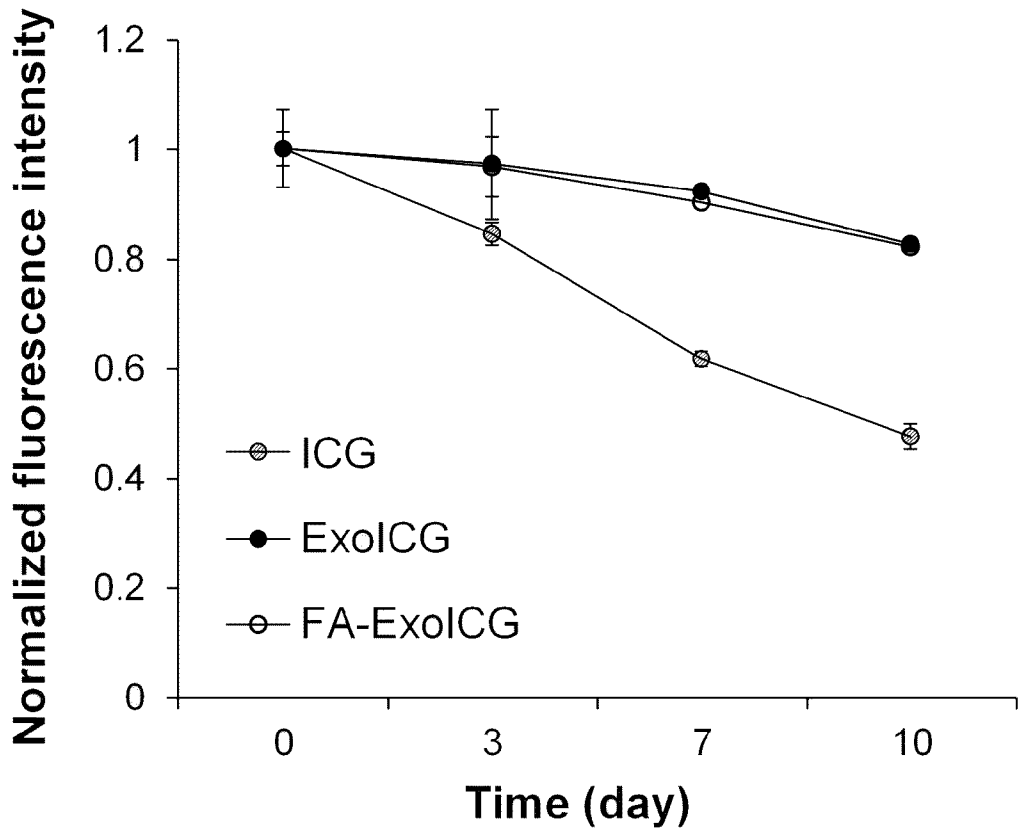
[도2b]


Blank exosome
FA-ExoICG

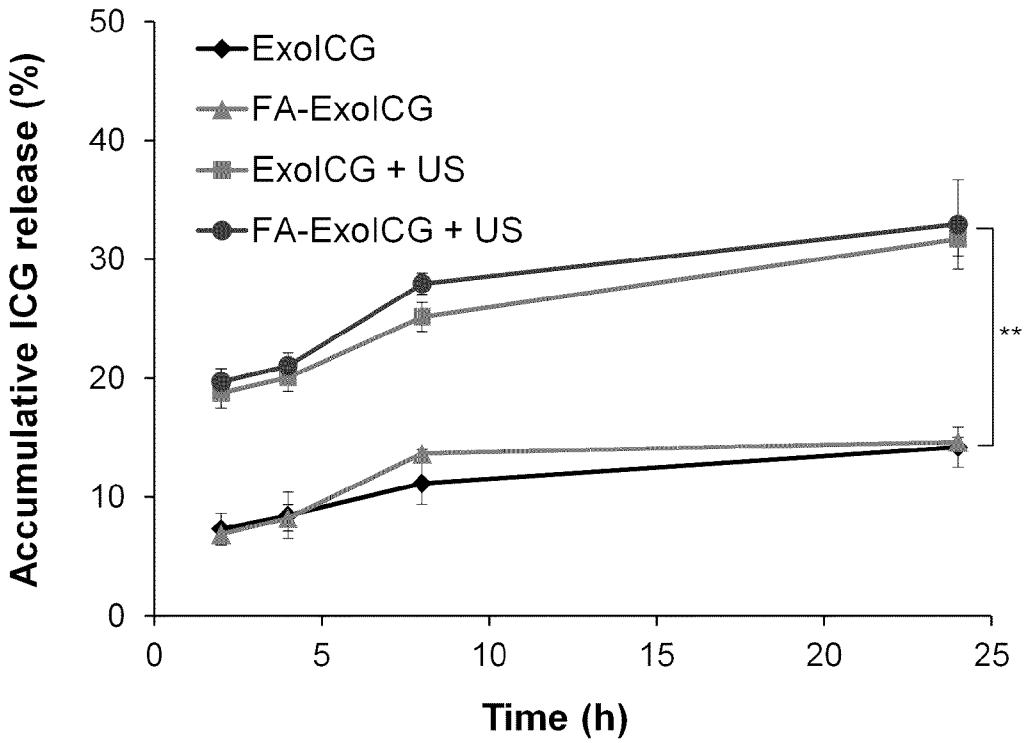
[도2c]


Blank exosome
ExoICG
FA-Exosome
FA-ExoICG
CD63
CD81

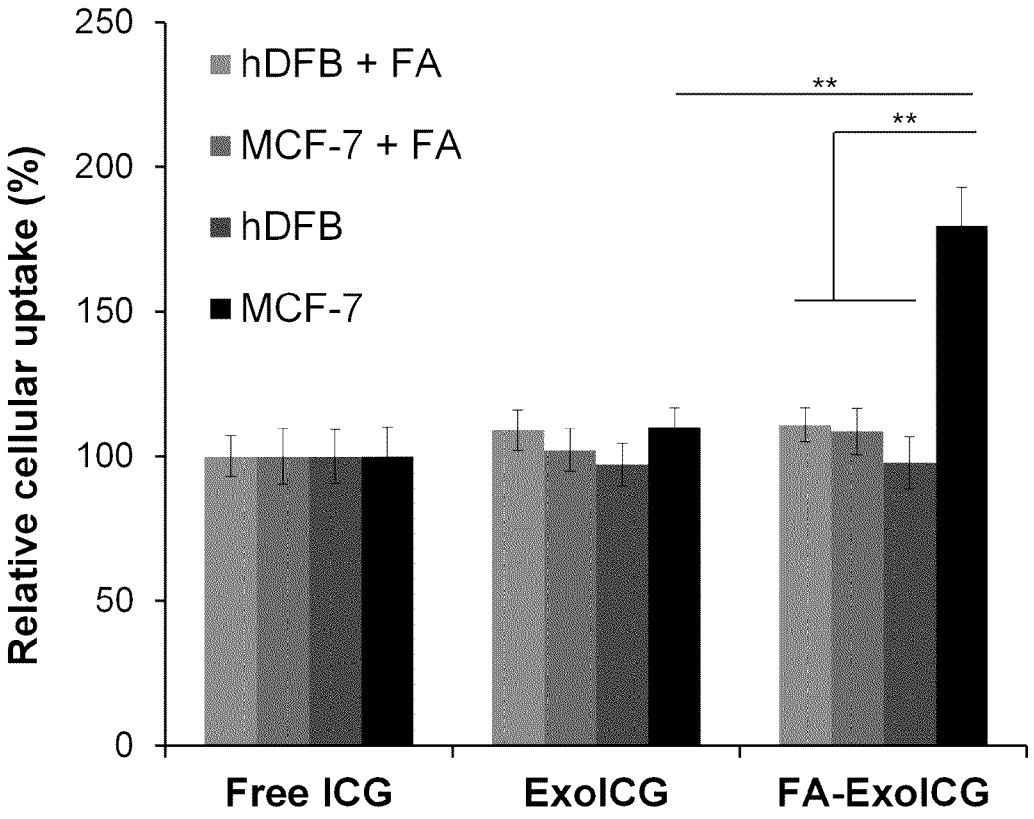
[도2d]


Normalized fluorescence intensity
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
ICG
ExoICG
FA-ExoICG
0
3
7
10
Time (day)

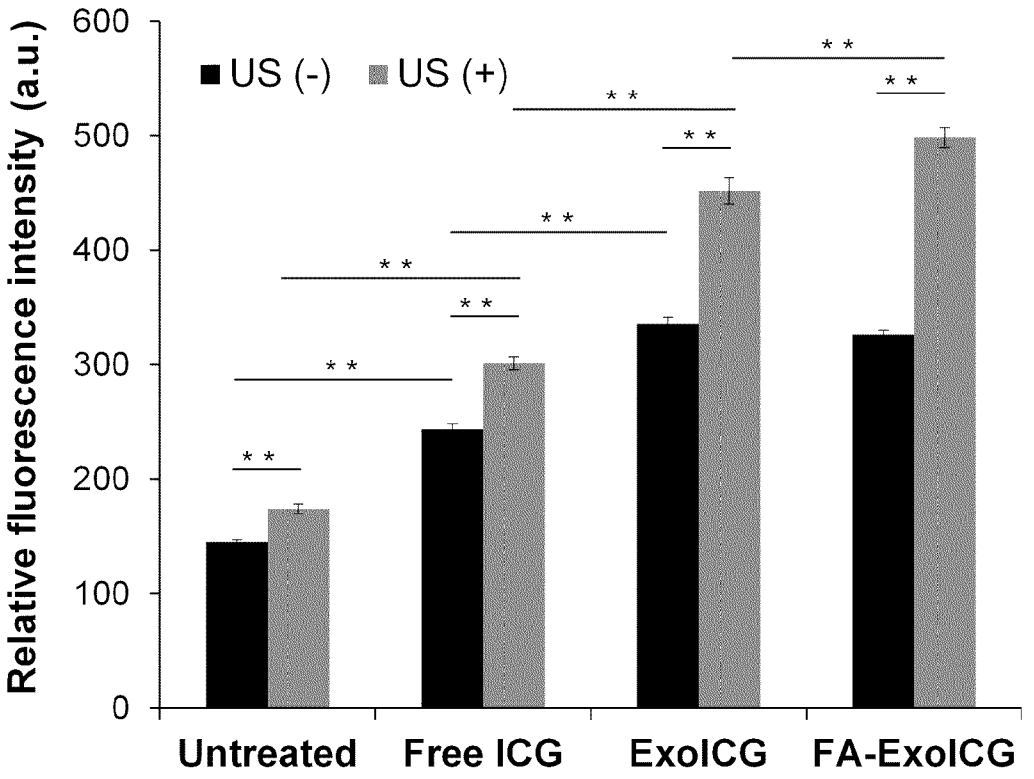
[도2e]


Accumulative ICG release (%)
50
40
30
20
10
0
ExoICG
FA-ExoICG
ExoICG + US
FA-ExoICG + US
**
0
5
10
15
20
25
Time (h)

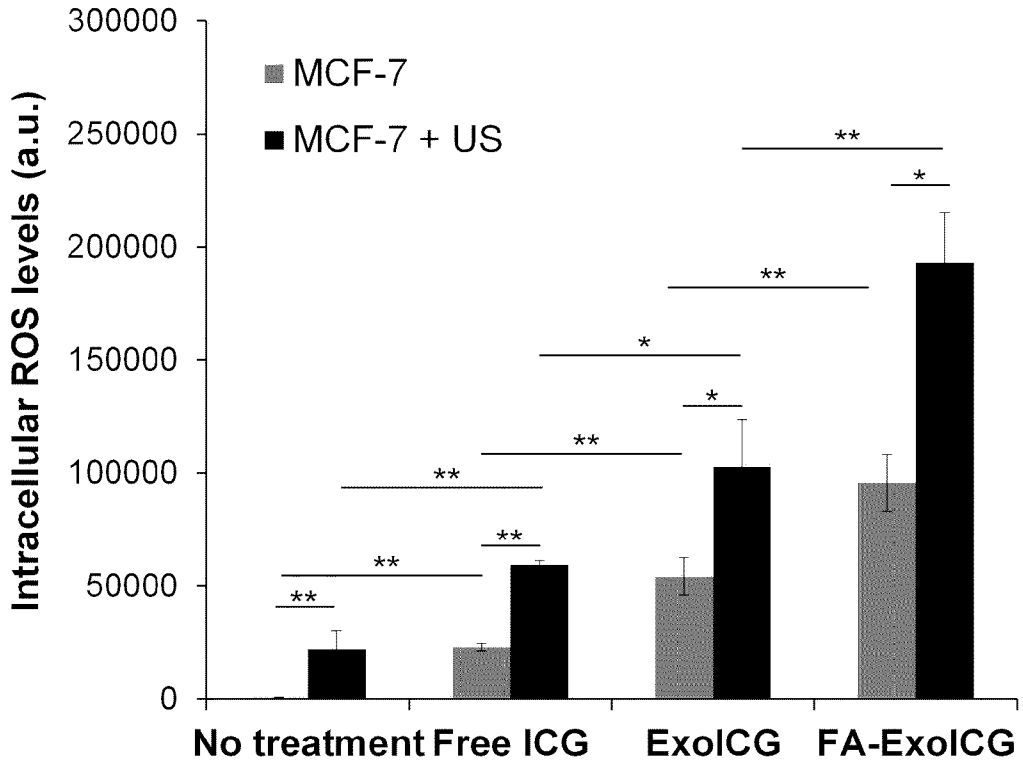
[도3a]


250
200
150
100
50
0
Relative cellular uptake (%)
hDFB + FA
MCF-7 + FA
hDFB
MCF-7
**
**
Free ICG
ExoICG
FA-ExoICG

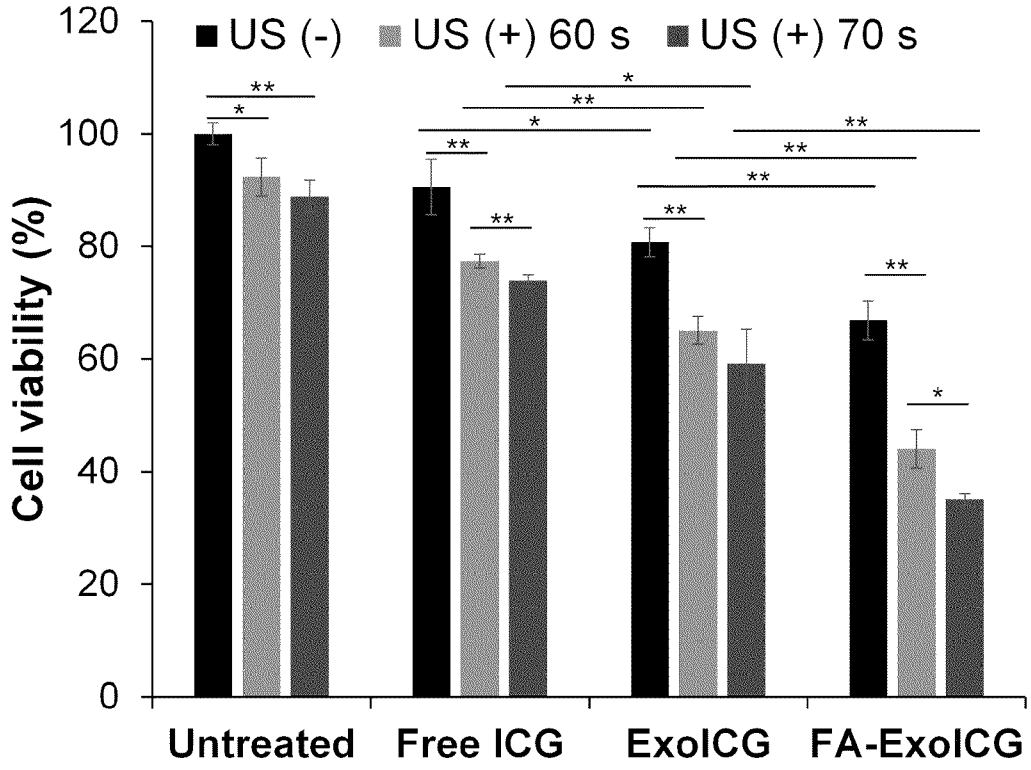
[도3b]


600
500
400
300
200
100
0
Relative fluorescence intensity (a.u.)
US (-)
US (+)
* *
Untreated
Free ICG
ExoICG
FA-ExoICG

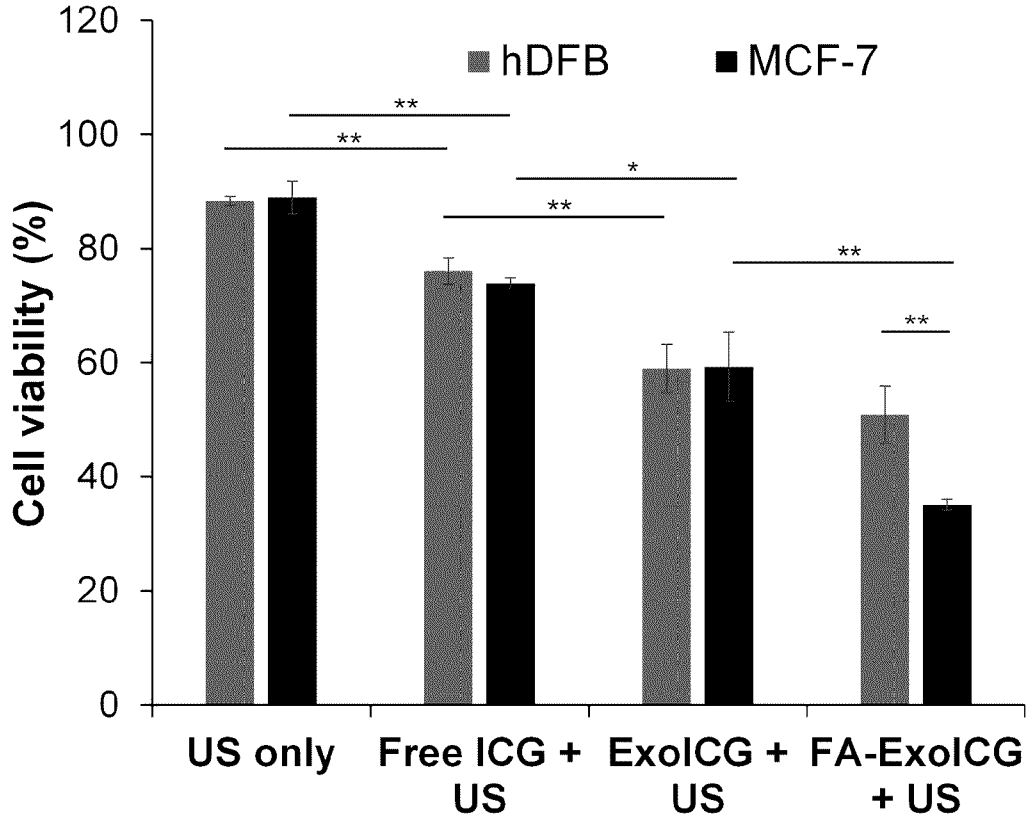
[도3c]


300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
Intracellular ROS levels (a.u.)
MCF-7
MCF-7 + US
No treatment
Free ICG
ExoICG
FA-ExoICG

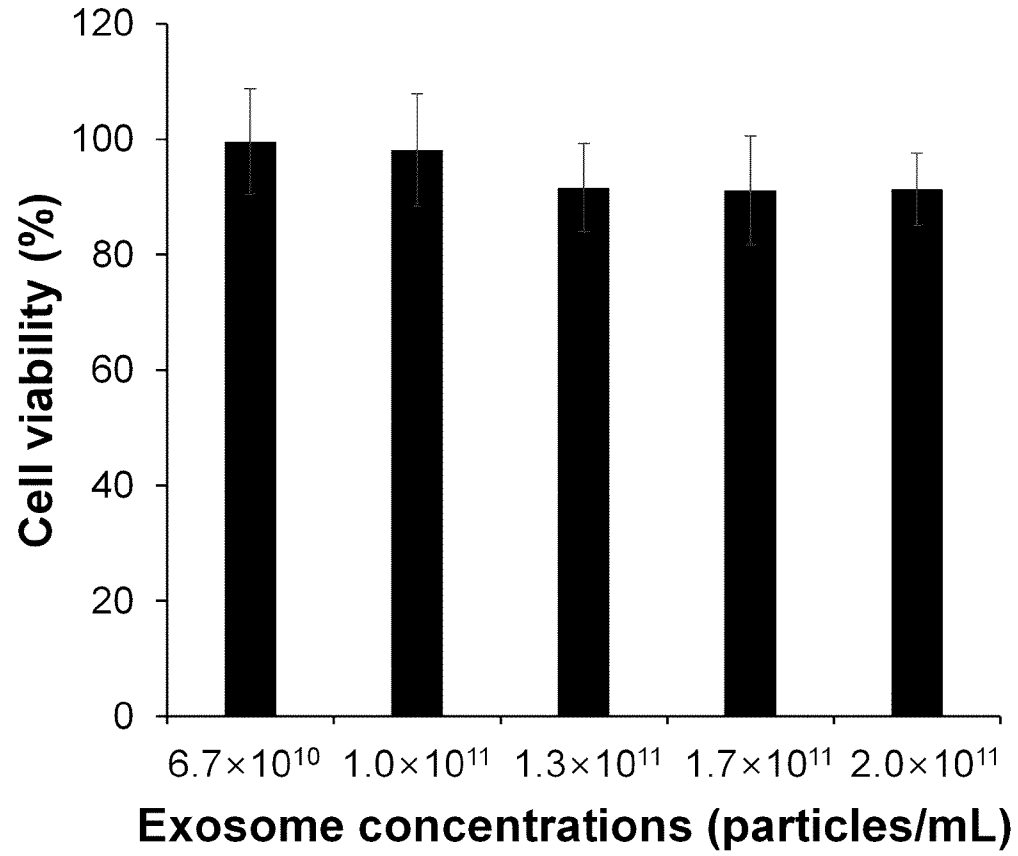
[도3d]


120
100
80
60
40
20
0
Cell viability (%)
US (-)
US (+) 60 s
US (+) 70 s
Untreated
Free ICG
ExoICG
FA-ExoICG

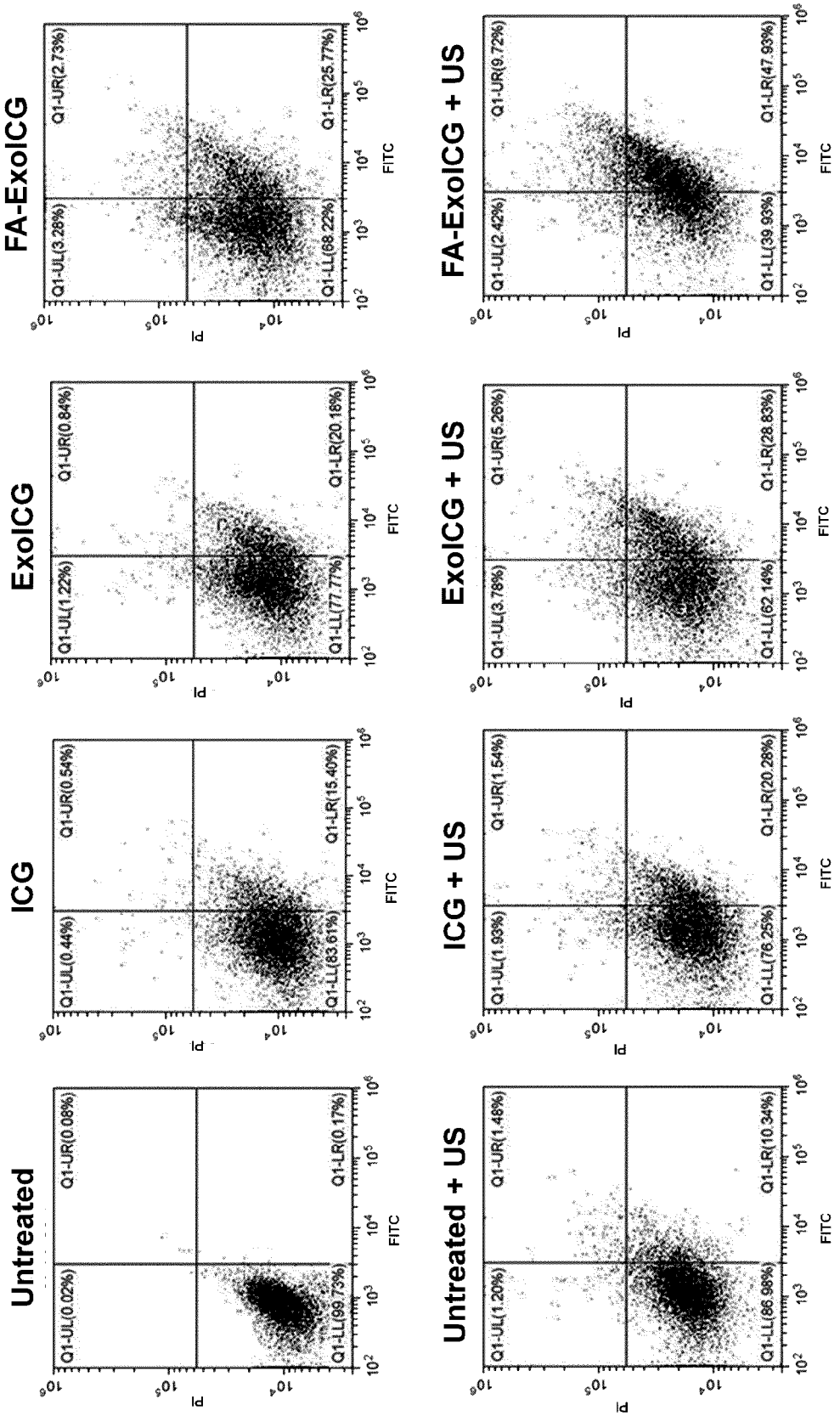
[도3e]


120
100
80
60
40
20
0
Cell viability (%)
hDFB
MCF-7
**
**
*
**
**
**
US only
Free ICG + US
ExoICG + US
FA-ExoICG + US

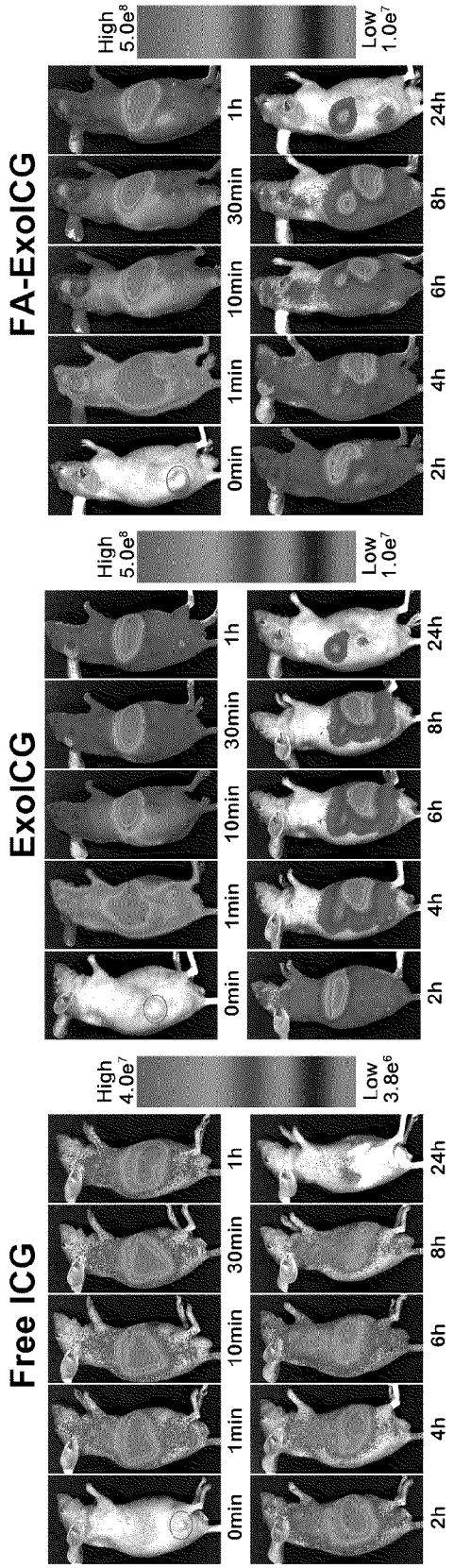
[도3f]


120
100
80
60
40
20
0
Cell viability (%)
6.7×10^10
1.0×10^11
1.3×10^11
1.7×10^11
2.0×10^11
Exosome concentrations (particles/mL)

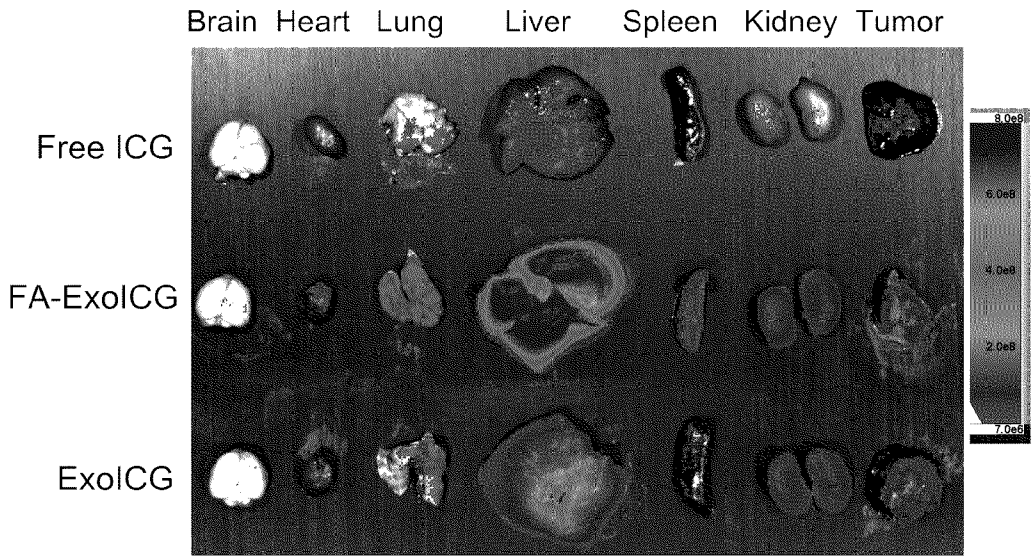
[도3g]


Untreated
Q1-UL(0.02%)
Q1-UR(0.08%)
Q1-LL(99.73%)
Q1-LR(0.17%)
ICG
Q1-UL(0.44%)
Q1-UR(0.54%)
Q1-LL(83.61%)
Q1-LR(15.40%)
ExoICG
Q1-UL(1.22%)
Q1-UR(0.84%)
Q1-LL(77.77%)
Q1-LR(20.18%)
FA-ExoICG
Q1-UL(3.28%)
Q1-UR(2.73%)
Q1-LL(68.22%)
Q1-LR(25.77%)
Untreated + US
Q1-UL(1.20%)
Q1-UR(1.48%)
Q1-LL(86.98%)
Q1-LR(10.34%)
ICG + US
Q1-UL(1.93%)
Q1-UR(1.54%)
Q1-LL(76.25%)
Q1-LR(20.28%)
ExoICG + US
Q1-UL(3.78%)
Q1-UR(5.26%)
Q1-LL(62.14%)
Q1-LR(28.83%)
FA-ExoICG + US
Q1-UL(2.42%)
Q1-UR(9.72%)
Q1-LL(39.93%)
Q1-LR(47.93%)
PI
FITC

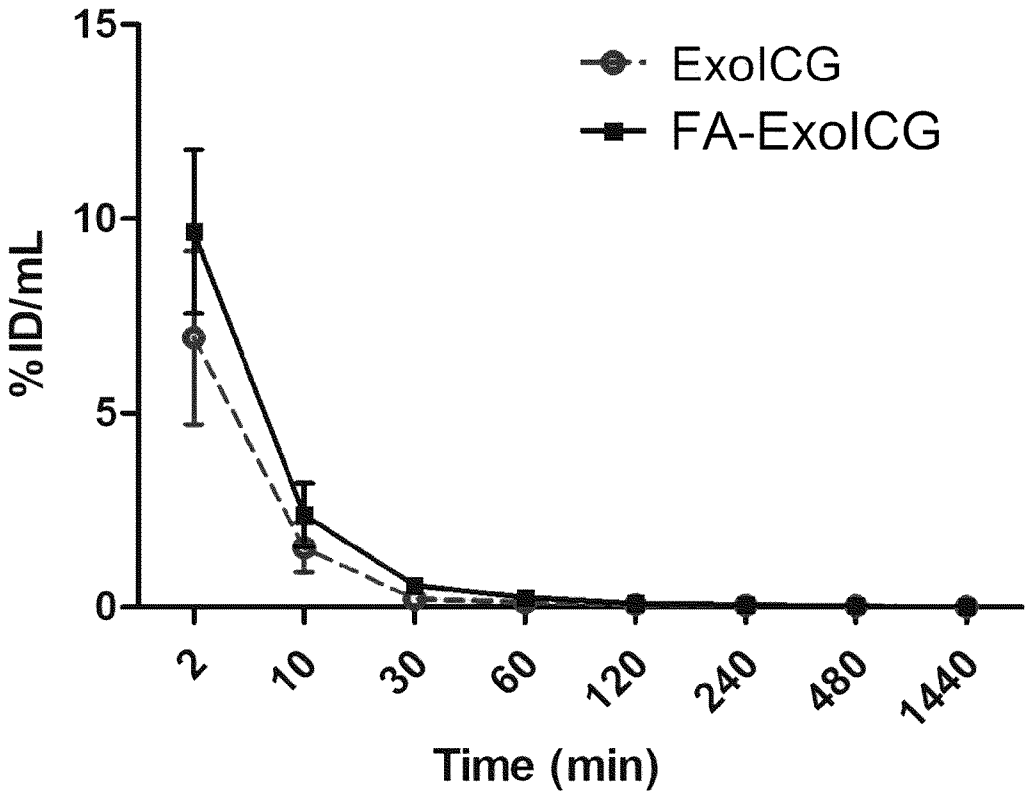
[도4a]


Free ICG
High 4.0e7
Low 3.8e6
ExoICG
High 5.0e8
Low 1.0e7
FA-ExoICG
High 5.0e8
Low 1.0e7
0min
1min
10min
30min
1h
2h
4h
6h
8h
24h

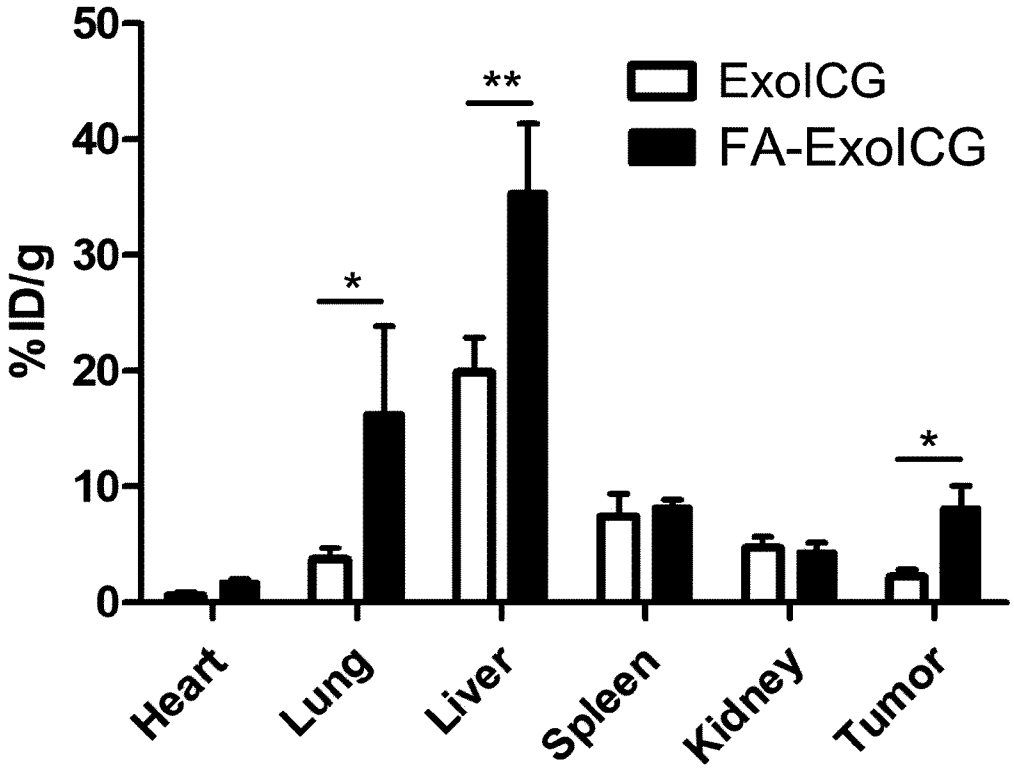
[도4b]


Brain Heart Lung Liver Spleen Kidney Tumor
Free ICG
FA-ExoICG
ExoICG
8.0e8
6.0e8
4.0e8
2.0e8
7.0e6

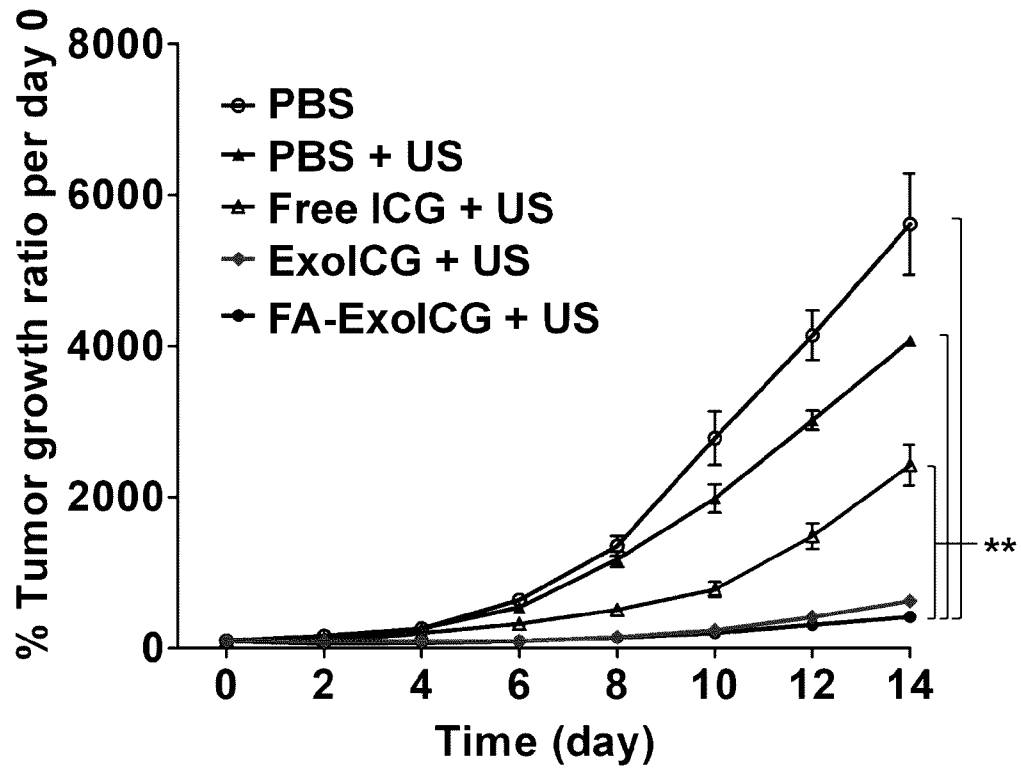
[도4c]


15
10
5
0
%ID/mL
ExoICG
FA-ExoICG
2
10
30
60
120
240
480
1440
Time (min)

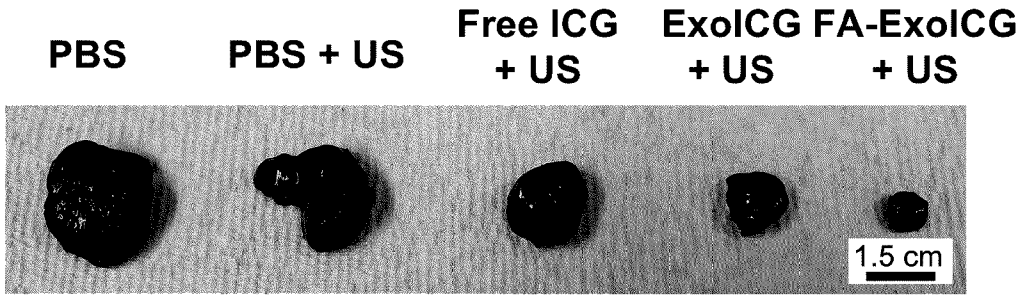
[도4d]


50
40
30
20
10
0
%ID/g
**
*
*
ExoICG
FA-ExoICG
Heart
Lung
Liver
Spleen
Kidney
Tumor

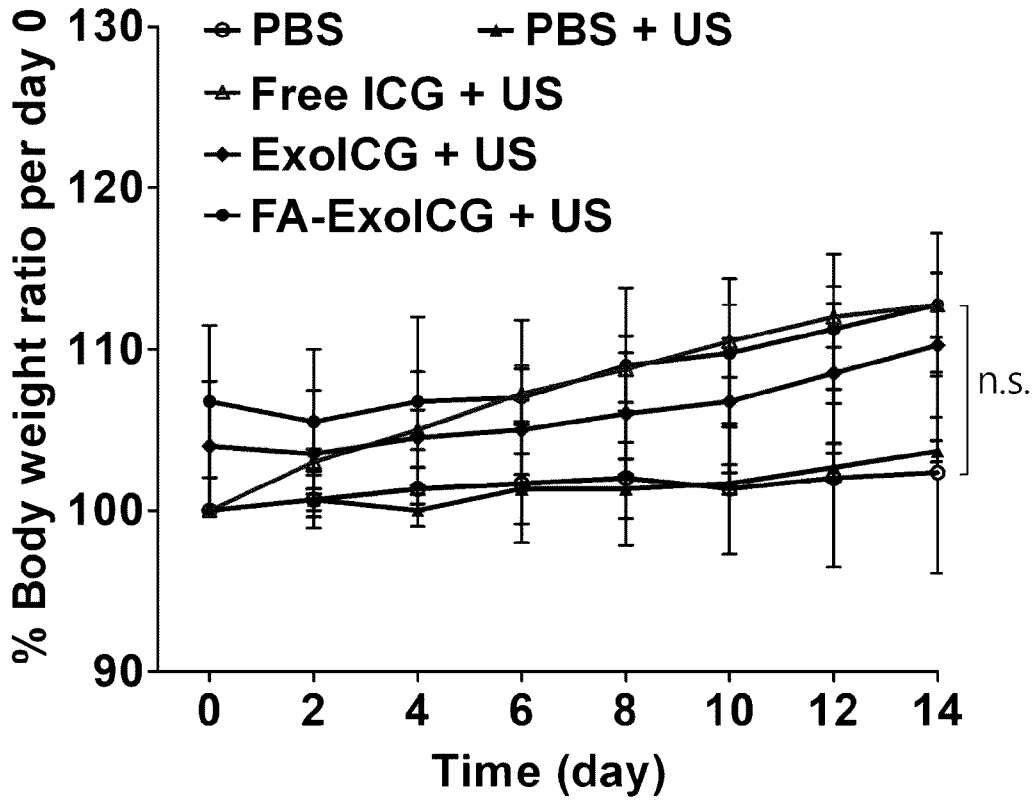
[도5a]


% Tumor growth ratio per day 0
8000
6000
4000
2000
0
PBS
PBS + US
Free ICG + US
ExoICG + US
FA-ExoICG + US
**
0
2
4
6
8
10
12
14
Time (day)

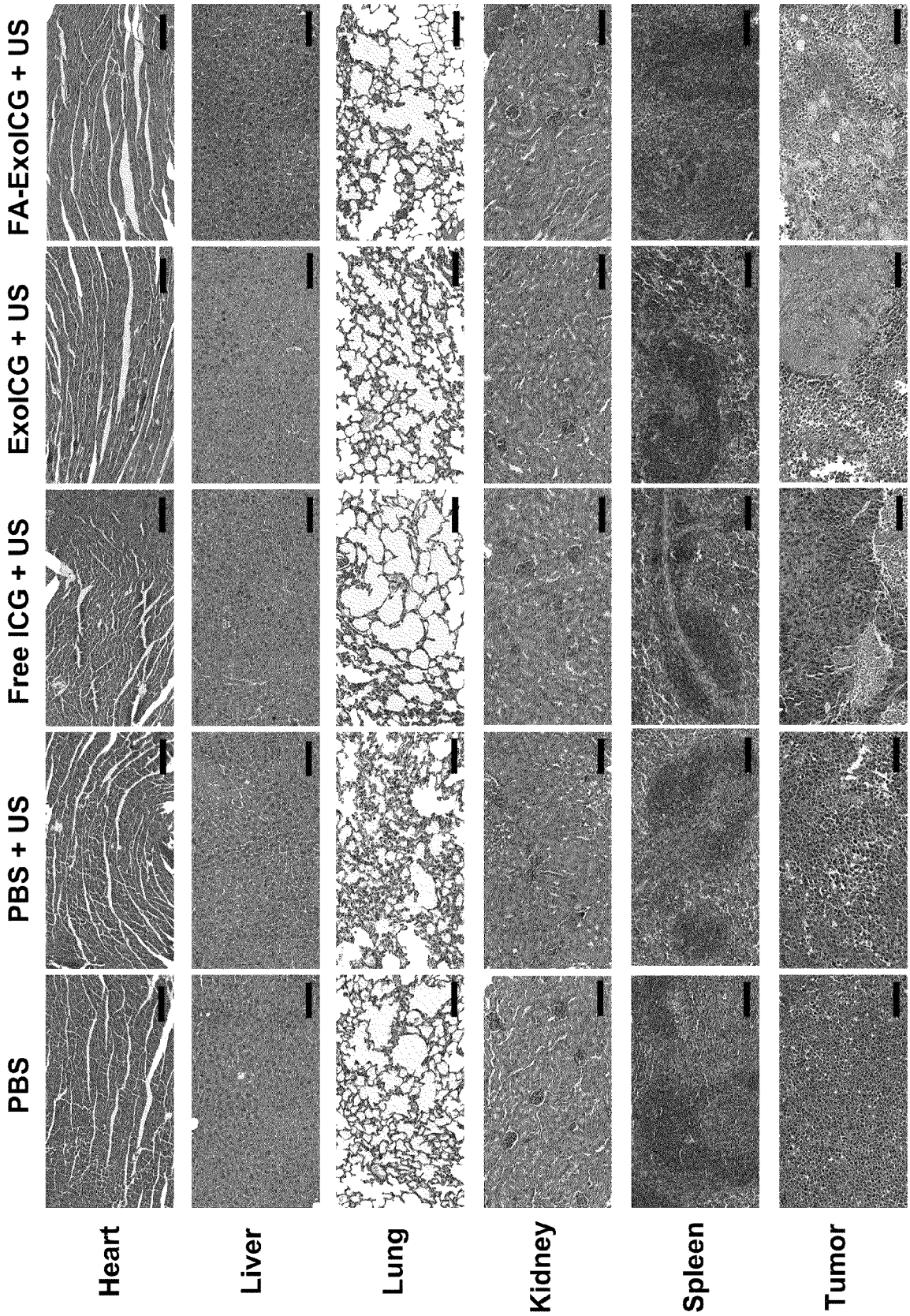
[도5b]


PBS
PBS + US
Free ICG + US
ExoICG + US
FA-ExoICG + US
1.5 cm

[도5c]


PBS
PBS + US
Free ICG + US
ExoICG + US
FA-ExoICG + US
% Body weight ratio per day 0
130
120
110
100
90
0
2
4
6
8
10
12
14
Time (day)
n.s.

[도5d]


PBS
PBS + US
Free ICG + US
ExoICG + US
FA-ExoICG + US
Heart
Liver
Lung
Kidney
Spleen
Tumor

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2022/007276

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 41/00(2006.01)i; **A61P 35/00**(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 41/00(2006.01); A61K 49/00(2006.01); A61K 49/18(2006.01); A61K 9/107(2006.01); A61K 9/127(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 초음파역학 치료(sonodynamic therapy, SDT), 엑소좀(exosome), 초음파(ultrasound), 감작제(sensitizer), 인도시아닌 그린(indocyanine green, ICG), 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LIU, Y. et al. Focused ultrasound-augmented targeting delivery of nanosonosensitizers from homogenous exosomes for enhanced sonodynamic cancer therapy. Theranostics. 09 July 2019 (publication date), vol. 9, no. 18, pp. 5261-5281. See abstract; pages 5262-5278; and figures 2, 4, 9A and 9B.	1,2,5-11
Y		3,4,12-14
Y	KR 10-2021-0057116 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN) 20 May 2021 (2021-05-20) See claims 1, 8, 11 and 22; and paragraphs [0054]-[0168].	3,4,12-14
A	EP 0979104 B1 (AMERSHAM HEALTH AS) 15 September 2004 (2004-09-15) See claim 1; and paragraphs [0040] and [0044].	1-14
A	KR 10-2016-0135424 A (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY et al.) 28 November 2016 (2016-11-28) See claim 1.	1-14

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
29 August 2022	**29 August 2022**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-1706282 B1 (KONKUK UNIVERSITY INDUSTRIAL COOPERATION CORP) 15 February 2017 (2017-02-15) See claim 1.	1-14
X	CAO, T. G. N. et al. Safe and Targeted Sonodynamic Cancer Therapy Using Biocompatible Exosome-Based Nanosonosensitizers. ACS Applied Materials & Interfaces. 25 May 2021 (publication date), vol. 13 , pp. 25575-25588. See abstract; pages 25575-25586; and figures 1-5. (This document is a document declaring exceptions to lack of novelty by the applicant.)	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2022/007276

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2021-0057116 A	20 May 2021	AU 2019-337699 A1	13 May 2021
		AU 2019-337699 A1	19 March 2020
		CA 3112787 A1	19 March 2020
		CN 113015482 A	22 June 2021
		EP 3849404 A1	21 July 2021
		JP 2022-500439 A	04 January 2022
		US 2020-101176 A1	02 April 2020
		WO 2020-056333 A1	19 March 2020
EP 0979104 B1	15 September 2004	AT 275971 T	15 October 2004
		DE 69826263 T2	27 October 2005
		EP 0979104 A1	16 February 2000
		JP 4503103 B2	14 July 2010
		US 16498945 B1	24 December 2002
KR 10-2016-0135424 A	28 November 2016	KR 10-1686145 B1	13 December 2016
		WO 2016-186429 A1	24 November 2016
KR 10-1706282 B1	15 February 2017	None	

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2022/007276

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 41/00(2006.01)i; **A61P 35/00**(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 41/00(2006.01); A61K 49/00(2006.01); A61K 49/18(2006.01); A61K 9/107(2006.01); A61K 9/127(2006.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 초음파역학 치료(sonodynamic therapy, SDT), 엑소좀(exosome), 초음파(ultrasound), 감작제(sensitizer), 인도시아닌 그린(indocyanine green, ICG), 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X Y	LIU, Y. 등, Focused ultrasound-augmented targeting delivery of nanosonosensitizers from homogenous exosomes for enhanced sonodynamic cancer therapy, Theranostics, 2019년 7월 9일(공개일), 9권, 18호, 페이지 5261-5281 요약; 페이지 5262-5278; 및 그림 2, 4, 9A, 9B	1,2,5-11 3,4,12-14
Y	KR 10-2021-0057116 A (더 리젠츠 오브 더 유니버시티 오브 미시간) 2021.05.20 청구항 1, 8, 11, 22; 및 단락 [0054]-[0168]	3,4,12-14
A	EP 0979104 B1 (AMERSHAM HEALTH AS) 2004.09.15 청구항 1; 및 단락 [0040], [0044]	1-14
A	KR 10-2016-0135424 A (한국과학기술원 등) 2016.11.28 청구항 1	1-14
A	KR 10-1706282 B1 (건국대학교 산학협력단) 2017.02.15 청구항 1	1-14

☑ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☑ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌
"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌
"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌
"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2022년08월29일(29.08.2022)	**2022년08월29일(29.08.2022)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관
대한민국 특허청 **(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)**	**허주형**
팩스 번호 **+82-42-481-8578**	전화번호 **+82-42-481-5373**

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2019년 7월)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	CAO, T. G. N. 등, Safe and Targeted Sonodynamic Cancer Therapy Using Biocompatible Exosome-Based Nanosonosensitizers, ACS Applied Materials & Interfaces, 2021년 5월 25일(공개일), 13권, 페이지 25575-25588 요약; 페이지 25575-25586; 및 그림 1-5 (본 문헌은 출원인에 의해 '신규성 상실의 예외'가 선언된 문헌임.)	1-14

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2022/007276

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2021-0057116 A	2021/05/20	AU 2019-337699 A1	2021/05/13
		AU 2019-337699 A1	2020/03/19
		CA 3112787 A1	2020/03/19
		CN 113015482 A	2021/06/22
		EP 3849404 A1	2021/07/21
		JP 2022-500439 A	2022/01/04
		US 2020-101176 A1	2020/04/02
		WO 2020-056333 A1	2020/03/19
EP 0979104 B1	2004/09/15	AT 275971 T	2004/10/15
		DE 69826263 T2	2005/10/27
		EP 0979104 A1	2000/02/16
		JP 4503103 B2	2010/07/14
		US 16498945 B1	2002/12/24
KR 10-2016-0135424 A	2016/11/28	KR 10-1686145 B1	2016/12/13
		WO 2016-186429 A1	2016/11/24
KR 10-1706282 B1	2017/02/15	없음	