(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0021509
(43) 공개일자 2022년02월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) *A61K 47/64* (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C12Q 1/25* (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
A61K 47/64 (2017.08)
(21) 출원번호 10-2020-0102142
(22) 출원일자 2020년08월14일
심사청구일자 2020년08월14일

(71) 출원인
한국과학기술연구원
서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
류주희
서울특별시 성북구 화랑로 14길 5
권익찬
서울특별시 성북구 화랑로 14길 5
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 16 항

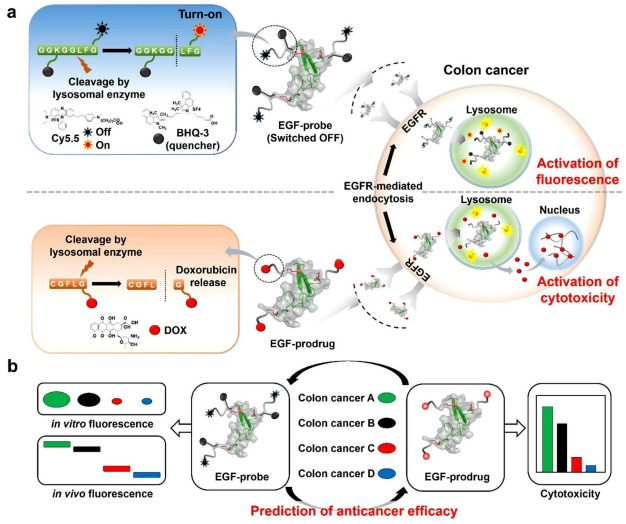
(54) 발명의 명칭 **약물 반응성 예측을 위한 대장암 진단 또는 검출용 조성물, 대장암 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 암세포 특이적 암 표적용 복합체에 관한 것으로, 본 발명에 따른 암 표적용 복합체는 EGF를 포함하고 있으나, EGFR 신호 전달 경로보다는 리소좀 활성에 영향을 받기 때문에, 종래 EGF 치료 기반의 진단용 조성물 및 치료용 조성물이 갖고 있던 단점을 극복하고 성공적으로 개인화되고, 향상된 암 치료, 예방 및 개선 효과를 제공할 수 있다.

본 발명에 따른 진단용 조성물은 대상체가 갖는 본 발명의 치료용 조성물의 항암 성능을 미리 예측할 수 있어, 안정적으로 항암 치료를 설계할 수 있다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
C12Q 1/25 (2013.01)
G01N 33/582 (2013.01)
G01N 2333/90 (2013.01)
G01N 2800/52 (2021.08)
(72) 발명자
김광명
서울특별시 성북구 화랑로 14길 5
김한영
서울특별시 성북구 화랑로 14길 5
김은선
서울특별시 강남구 선릉로 120, 11동 105호(대치동, 개포1,2차 우성아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711107129
과제번호	2020R1C1C1013146
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	신진연구
연구과제명	최적의 CpG 패턴과 신생항원을 포함한 DNA 나노구조체 기반의 개인 맞춤형 암 백신 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한국과학기술연구원
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 종양 세포 내에 존재하는 리소좀 효소에 의해 절단되는 펩타이드를 중심으로, 양측에 형광체와 소광체가 접합되어 있고,

상기 펩타이드의 C 말단에 EGF(epidermal growth factor)가 결합되어 있는 복합체를 포함하는 대장암 진단 또는 약효예측용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 펩타이드의 N-말단에 상기 형광체가 결합되고, 상기 펩타이드의 라이신 또는 아르기닌 아미노산 잔기의 입실론 아민기에 소광체가 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 대장암 진단 또는 약효예측용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 형광체는 플루오레세인(fluorescein), FITC(fluorescein isothiocyanate), 오레곤 그린(Oregon green), 텍사스 레드(Texas red), Cy2, Cy3, Cy3B, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, 인도카르보사이아닌(indocarbocyanine), 로다민(rhodamine), 옥사카르보사이아닌(oxacarbocyanine), 티아카르보사이아닌(thiacarbocyanine), 메로사이아닌(merocyanine), 피리딜록사졸(pyrodyloxazole), 니트로벤족사디아졸(nitrobenzoxadiazole), 벤족사디아졸(benzoxadiazol), 나일 레드(Nile red), 나일 오렌지(Nile orange), 아크리딘 옐로우(acridine yellow), 오마린(aumarine), 크리스탈 바이올렌(crystal violet), 및 말라카이트 그린(malachite green)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 대장암 진단 또는 약효예측용 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 소광체는 TAMRA(6-carboxytetramethyl-rhodamine), BHQ1(black hole quencher 1), BHQ2(black hole quencher 2), BHQ3(black hole quencher 3), NFQ (nonfluorescent quencher), 답실(dabcyl), Eclipse, DDQ(Deep Dark Quencher), 블랙베리 퀸처(Blackberry Quencher), 아이오와 블랙(Iowa black)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 대장암 진단 또는 약효예측용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 대장암은 표피성장인자 수용체(EGFR) 양성 대장암인 것을 특징으로 하는 대장암 진단 또는 약효예측용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 복합체는 대장암 세포로 침투하여, 대장암 세포의 리소좀 내에 존재하는 효소에 의해 절단되어 형광체와 소광체에 의한 소광작용이 해소되어 형광을 발생하는 것을 특징으로 하는 대장암 진단 또는 검출용 조성물.

청구항 7

서열번호 1로 표시되는 종양 세포 내에 존재하는 리소좀 효소에 의해 절단되는 펩타이드를 중심으로, 양측에 형광체와 소광체가 접합되어 있고,

상기 펩타이드의 C 말단에 EGF(epidermal growth factor)가 결합되어 있는 복합체를 포함하는 EGFR 양성 대장암

환자의 암 치료효과에 대한 예후 확인용 조성물.

청구항 8

암 환자로부터 분리된 시료에서, 제1항에 따른 대장암 진단 또는 검출용 조성물을 처리하고, 형광 세기를 측정하는 단계를 포함하는 표피성장인자 수용체(EGFR) 표적 약물에 대한 반응성을 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 형광 세기가 검출되면, 대상체는 EGFR 약물에 대하여 반응성을 갖는 것으로 판단하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

항암제를 투여받고 있는 대장암 환자로부터 분리된 시료에서, 제1항에 따른 대장암 진단 또는 약효예측용 조성물을 처리하고, 형광 세기를 측정하는 단계를 포함하는 상기 항암제의 치료효과를 검증하기 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 형광 세기가 검출되면, 상기 대장암 환자는 상기 항암제에 대하여 치료효과가 없는 것으로 판단하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

a) 서열번호 1로 표시되는 종양 세포 내에 존재하는 리소좀 효소에 의해 절단되는 펩타이드를 중심으로, 양측에 형광체와 소광체가 접합되어 있고, 상기 펩타이드의 C 말단에 EGF(epidermal growth factor)가 결합되어 있는 복합체; 및

b) 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 종양 세포 내에 존재하는 리소좀 효소에 의해 절단되는 펩타이드의 양 말단에 EGF(epidermal growth factor)와 항암제가 접합되어 있는 전구약물 복합체;를 포함하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 대장암은 EGFR 양성 대장암인 것을 특징으로 하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 14

제12항에 있어서,

상기 b) 전구약물 복합체에서 펩타이드와 EGF는 가교결합제에 의해 공유결합된 것을 특징으로 하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 가교결합제는, 단백질 A, 카르보디이미드, N-숙신이미딜-S-아세틸-티오아세테이트(SATA), N-숙신이미딜-3-(2-피리미딜디티오)프로피오네이트 (SPDP) 및 술포숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트(술포-SMCC)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 16

제12항에 있어서,

상기 항암제는 독소루비신(doxorubicin), 사이클로포스파아마이드(cyclophosphamide), 메클로레타민(mecholrethamine), 우라무스틴(uramustine), 멜파란(melphalan), 클로라부실(chlorambucil), 이포스파미드(ifosfamide), 벤다무스틴(bendamustine), 카르무스틴(carmustine), 로무스틴(lomustine), 스트렙토조신(streptozocin), 부설판(busulfan), 다카바진(dacarbazine), 테모졸로마이드(temozolomide), 티오테파(thiotepa), 알트레타민(altretamine), 듀오카르마이신(duocarmycin), 시스플라틴(cisplatin), 카르보플라틴(carboplatin), 네다플라틴(nedaplatin), 옥사리플라틴(oxaliplatin), 사트라플라틴(satraplatin), 트리플라틴 테트라나이트레이트(triplatin tetranitrate), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 6-머캅토퓨린(6-mercaptopurine), 카페시타빈(capecitabine), 클라드리빈(cladribine), 클로파라빈(clofarabine), 시스타르빈(cystarbine), 플록스유리딘(floxuridine), 플루다라빈(fludarabine), 겜시타빈(gemcitabine), 하이드록시우레아(hydroxyurea), 메토트렉세이트(methotrexate), 페메트렉세드(pemetrexed), 펜토스타틴(pentostatin), 티오구아닌(thioguanine), 캠토테신(camptothecin), 토포테칸(topotecan), 이리노테칸(irinotecan), 에토포사이드(etoposide), 테니포시드(teniposide), 미토산트론(mitoxantrone), 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 이자베필론(izabepilone), 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine), 빈데신(vindesine), 비노렐빈(vinorelbine), 에스트라머스틴(estramustine), 메이탄신(maytansine), DM1(mertansine, 메르탄신), DM4, 돌라스타틴(dolastatin), 아우리스타틴 E(auristatin E), 아우리스타틴 F(auristatin F), 모노메틸 아우리스타틴 E(monomethyl auristatin E), 모노메틸 아우리스타틴 F(monomethyl auristatin F) 및 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 약물반응성 예측을 위한 대장암 진단 또는 검출용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로 표피성장인자 수용체(EGFR) 양성 대장암세포에 침투할 수 있어, 표피성장인자 수용체(EGFR) 양성 대장암세포를 특이적으로 진단 또는 검출할 수 있고, 약물과의 결합을 통해 표피성장인자 수용체(EGFR) 양성 대장암을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있는 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 세계보건기구 산하 국제암연구소의 통계에 따르면, 우리나라의 대장암 발생률은 세계 1위로 나타났으며, 인구고령화 및 비만, 변화된 식습관 등으로 인해 한국인의 발병 암 중에 상위에 자리하고 있다. 대장암 치료를 위해 다양한 화학 치료제, 면역 치료제, 표적 치료제가 개발되었으며 그 중 표적 치료제의 경우 대장암세포를 특이적으로 표적하여 세포 성장억제나 사멸에 우수한 효과를 나타내는 것으로 알려져있다. 하지만 표적 치료제의 경우 환자의 유전적 특성에 따라 치료 반응성 매우 다르게 나타나는 문제점이 있다. 실제로, 세툭시맙(Cetuximab, 얼비툭스ᄅᆞ)과 같은 항-EGFR 약제는 대장암에 대한 효과적인 1순위 치료법으로 알려져 있지만 일부 환자만이 항-EGFR 치료제에 대해 반응성이 있다. 더욱이 항-EGFR 치료에는 상당한 비용이 들지만, 약물 반응성을 예측하기가 어려워서 임상에서 많은 환자들에게 항-EGFR 약제가 투여되지만, 실제 소수의 환자(20%)에게만 효과가 나타나는 것으로 알려져 있다. 더욱이 항-EGFR 치료에는 상당한 비용이 소요되나, 대부분의 환자는 낮은 약물 반응성을 예측하면서도 항-EGFR 치료를 시도해 볼 수 밖에 없는 실정이다.

[0003] 또한, 현재 항-EGFR 약제에 대한 반응성을 확인하기 위해서는 RAS mutation과 BRAF mutation과 같은 고비용의 추가 유전자 검사를 실기하고 있지만, 검사에 많은 시간이 소요되고 예측성공율이 50% 정도에 그치고 있다. 이처럼 환자의 종양을 진단하는 방법과 환자의 종양을 치료하는 방법이 상이함으로 인해 정확한 진단이 이루어진 후에도 효과적인 치료가 이루어지지 않고 있다. 따라서 치료 완치의 결과가 매우 낮다는 문제점이 있다.

[0004] 이러한 문제점을 해결하기 위하여, 최근에는 수많은 다국적 제약사들이 표적치료제 개발과 동시에 동반진단 제품을 개발하려는 노력이 계속되어오고 있다. 대표적으로 허셉틴은 유방암 등의 치료에 사용되는 표적 치료제로서 연간 70억불의 시장을 형성하고 있는데, 허셉틴의 치료 성공률을 높일 수 있도록 HercepTest™(DAKO) 와 같은 동반진단 제품을 함께 판매함으로써 허셉틴의 사용률을 크게 증가시켜 큰 성공을 거두었다. 이와 같이 항암 효능이 우수한 치료제 개발과 동시에, 신속하고 정확도가 높으며 합리적 비용으로 치료 반응성을 예측할 수 있는 기술의 수요가 꾸준히 증가하고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 특허문헌 1. 대한민국 등록특허공보 제10-1930399호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로, 항-EGFR 약물반응성을 갖는 암세포에 특이적으로 침투할 수 있는 대장암 예방 또는 치료용 조성물을 제공하고자 하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기와 같은 대장암 예방 또는 치료용 조성물의 약물반응성을 예측할 수 있는 약효예측용 조성물 및 이의 방법을 제공하고자 하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 상기 목적을 이루기 위하여, 서열번호 1로 표시되는 종양 세포 내에 존재하는 리소좀 효소에 의해 절단되는 펩타이드를 중심으로, 양측에 형광체와 소광체가 접합되어 있고, 상기 펩타이드의 C 말단에 EGF(epidermal growth factor)가 결합되어 있는 복합체를 포함하는 대장암 진단 또는 검출용 조성물을 제공한다.

[0009] 상기 펩타이드의 N-말단에 상기 형광체가 결합되고, 상기 펩타이드의 라이신 또는 아르기닌 아미노산 잔기의 입실론 아민기에 소광체가 결합되어 있는 것일 수 있다.

[0010] 상기 펩타이드에 항암제가 더 결합되어 있는 것일 수 있다.

[0011] 상기 형광체는 플루오레세인(fluorescein), FITC(fluorescein isothiocyanate), 오레곤 그린(Oregon green), 텍사스 레드(Texas red), Cy2, Cy3, Cy3B, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, 인도카르보사이아닌(indocarbocyanine), 로다민(rhodamine), 옥사카르보사이아닌(oxacarbocyanine), 티아카르보사이아닌(thiacarbocyanine), 메로사이아닌(merocyanine), 피리딜록사졸(pyrodyloxazole), 니트로벤족사디아졸(nitrobenzoxadiazole), 벤족사디아졸(benzoxadiazol), 나일 레드(Nile red), 나일 오렌지(Nile orange), 아크리딘 옐로우(acridine yellow), 오마린(aumarine), 크리스탈 바이올렌(crystal violet), 및 말라카이트 그린(malachite green)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0012] 상기 소광체는 TAMRA(6-carboxytetramethyl-rhodamine), BHQ1(black hole quencher 1), BHQ2(black hole quencher 2), BHQ3(black hole quencher 3), NFQ (nonfluorescent quencher), 답실(dabcyl), Eclipse, DDQ(Deep Dark Quencher), 블랙베리 퀸처(Blackberry Quencher), 아이오와 블랙(Iowa black)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0013] 상기 대장암은 표피성장인자 수용체(EGFR) 양성 대장암일 수 있다.

[0014] 상기 복합체는 대장암 세포로 침투하여, 대장암 세포의 리소좀 내에 존재하는 효소에 의해 절단되어 형광체와 소광체에 의한 소광작용이 해소되어 형광을 발생하는 것일 수 있다.

[0015] 상기 또 다른 목적을 이루기 위하여, 본 발명은 암 환자로부터 분리된 시료에서, 상기 대장암 진단 또는 검출용 조성물을 처리하고, 형광 세기를 측정하는 단계를 포함하는 표피성장인자 수용체(EGFR) 표적 약물에 대한 반응성을 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0016] 상기 형광 세기가 검출되면, 대상체는 항-EGFR 약물에 대하여 반응성을 갖는 것으로 판단할 수 있다.

[0017] 상기 또 다른 목적을 이루기 위하여, 본 발명은 항암제를 투여받고 있는 대장암 환자로부터 분리된 시료에서, 상기 대장암 진단 또는 검출용 조성물을 처리하고, 형광 세기를 측정하는 단계를 포함하는 상기 항암제의 치료효과를 검증하기 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0018] 상기 형광 세기가 검출되면, 상기 대장암 환자는 상기 항암제에 대하여 치료효과가 없는 것으로 판단할 수 있다.

[0019] 상기 또 다른 목적을 이루기 위하여, 본 발명은 a) 서열번호 1로 표시되는 종양 세포 내에 존재하는 리소좀 효소에 의해 절단되는 펩타이드를 중심으로, 양측에 형광체와 소광체가 접합되어 있고, 상기 펩타이드의 C 말단에 EGF(epidermal growth factor)가 결합되어 있는 복합체; 및

[0020] b) 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 종양 세포 내에 존재하는 리소좀 효소에 의해 절단되는 펩타이드의 양 말단에 EGF(epidermal growth factor)와 항암제가 접합되어 있는 전구약물 복합체;를 포함하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0021] 상기 대장암은 EGFR 양성 대장암일 수 있다.

[0022] 상기 b) 전구약물 복합체에서 펩타이드와 EGF의 사이에는 가교결합제에 의해 공유결합된 것일 수 있다.

[0023] 상기 가교결합제는, 단백질 A, 카르보디이미드, N-숙신이미딜-S-아세틸-티오아세테이트(SATA), N-숙신이미딜-3-(2-피리미딜디티오)프로피오네이트 (SPDP) 및 술포숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트(술포-SMCC)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0024] 상기 항암제는 독소루비신(doxorubicin), 사이클로포스파아마이드(cyclophosphamide), 메클로레타민(mecholrethamine), 우라무스틴(uramustine), 멜파란(melphalan), 클로라부실(chlorambucil), 이포스파미드(ifosfamide), 벤다무스틴(bendamustine), 카르무스틴(carmustine), 로무스틴(lomustine), 스트렙토조신(streptozocin), 부설판(busulfan), 다카바진(dacarbazine), 테모졸로마이드(temozolomide), 티오테파(thiotepa), 알트레타민(altretamine), 듀오카르마이신(duocarmycin), 시스플라틴(cisplatin), 카르보플라틴(carboplatin), 네다플라틴(nedaplatin), 옥사리플라틴(oxaliplatin), 사트라플라틴(satraplatin), 트리플라틴 테트라나이트레이트(triplatin tetranitrate), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 6-머캅토퓨린(6-mercaptopurine), 카페시타빈(capecitabine), 클라드리빈(cladribine), 클로파라빈(clofarabine), 시스타르빈(cystarbine), 플록스유리딘(floxuridine), 플루다라빈(fludarabine), 겜시타빈(gemcitabine), 하이드록시우레아(hydroxyurea), 메토트렉세이트(methotrexate), 페메트렉세드(pemetrexed), 펜토스타틴(pentostatin), 티오구아닌(thioguanine), 캠토테신(camptothecin), 토포테칸(topotecan), 이리노테칸(irinotecan), 에토포사이드(etoposide), 테니포시드(teniposide), 미토산트론(mitoxantrone), 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 이자베필론(izabepilone), 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine), 빈데신(vindesine), 비노렐빈(vinorelbine), 에스트라머스틴(estramustine), 메이탄신(maytansine), DM1(mertansine, 메르탄신), DM4, 돌라스타틴(dolastatin), 아우리스타틴 E(auristatin E), 아우리스타틴 F(auristatin F), 모노메틸 아우리스타틴 E(monomethyl auristatin E), 모노메틸 아우리스타틴 F(monomethyl auristatin F) 및 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

발명의 효과

[0025] 본 발명에 따른 복합체는 EGF를 포함하고 있으나, EGFR 신호 전달 경로보다는 리소좀 활성에 영향을 받기 때문에, 종래 EGF 치료 기반의 진단용 조성물, 예측용 조성물 및 치료용 조성물이 갖고 있던 단점을 극복하고 성공적으로 개인화되고, 향상된 암 치료, 예방 및 개선 효과를 제공할 수 있다.

[0026] 특히, 본 발명에 따른 진단용 조성물, 약물반응성 예측용 조성물은 대상체가 갖는 본 발명의 치료용 조성물의 항암 성능을 미리 예측할 수 있어, 안정적으로 항암 치료를 설계할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 본 발명에 따른 암 표적용 복합체와, 이를 기반으로 하는 암 진단용 조성물 및 암 치료용 조성물 구조와 기전을 개략적으로 도시한 도면이다.

도 2a는 제조예 2로부터 제조된 EGF-프로브의 합성과정을 개략적으로 도시한 것이다.

도 2b는 제조예 5로부터 제조된 EGF-전구약물의 합성과정을 개략적으로 도시한 것이다.

도 3은 HPLC 결과를 나타낸 그래프로, 도 3a는 EGF에 관한 HPLC 결과 그래프이다.

도 3b는 제조예 2의 C-프로브에 대한 HPLC 결과 그래프이다.

도 3c는 제조예 3의 EGF-프로브에 대한 HPLC 결과 그래프이다.

도 3d는 EGF와 EGF-프로브의 혼합물에 대한 HPLC 결과 그래프이다.

도 4는 HPLC 결과를 나타낸 그래프로, 도 4a는 EGF에 관한 HPLC 결과 그래프이다.

도 4b는 제조예 4의 C-전구약물에 대한 HPLC 결과 그래프이다.

도 4c는 제조예 5의 EGF-전구약물에 대한 HPLC 결과 그래프이다.

도 4d는 EGF와 EGF-전구약물의 혼합물에 대한 HPLC 결과 그래프이다.

도 5는 C-전구약물의 질량 스펙트럼이다.

도 6a는 EGF-프로브의 크기분포이다.

도 6b는 EGF-프로브의 형광 세기이다.

도 6c는 다양한 농도의 파파인 존재하에서 EGF-프로브의 농도별 광발광 양자효율(PLQY)이다.

도 6d는 EGF-전구약물의 크기분포이다.

도 6e는 EGF-전구약물, DOX, G-DOX, EGF에 대한 HPLC 크로마토그램이다.

도 6f는 다양한 농도의 파파인 존재하에서 EGF-전구약물의 HPLC 크로마토그램이다.

도 7a는 EGF-프로브를 4시간동안 처리한 후, HCT-15 결장 직장암 세포에서 리소좀(초록),과 EGF-프로브로부터 Cy5.5 형광(적색) 회복의 공동 국소화 여부를 관찰하기 위해, lysotracker green으로 리소좀을 염색한 후 촬영한 형광 세기 그래프(오른쪽)와 형광 이미지(왼쪽)이다. 바 = 50 μm.

도 7b는 HCT-15 세포에 EGF-프로브와 세툭시맙(EGFR 억제제) 또는 EGF-프로브와 BafA(리소좀 억제제)를 처리하였을 때, 이를 공초점 현미경으로 촬영한 사진이다.

도 7c는 HCT-15 세포에 EGF-프로브와 세툭시맙(EGFR 억제제) 또는 EGF-프로브와 BafA(리소좀 억제제)를 처리하였을 때, 이를 유세포 분석한 결과이다(DAPI는 핵, 바 = 50 ㎛).

도 7d는 EGF-Cy5.5, C-프로브 또는 EGF-프로브를 HCT-15-함유 마우스의 정맥 내에 투여한 후, 24 시간이 지났을 때, IVIS로 영상화한 이미지이다.

도 7e는 EGF-Cy5.5, C-프로브 또는 EGF-프로브를 HCT-15-함유 마우스의 정맥 내에 투여한 후, 24 시간이 지났을 때, 각종 장기에 대한 형광이미지이다.

도 7f는 EGF-Cy5.5, C-프로브 또는 EGF-프로브가 처리된 HCT-15-함유 마우스로부터 수집된 각종 장기의 형광세기를 정량적으로 나타낸 그래프(왼쪽)와 종양의 형광강도를 총 장기의 형광강도의 합으로 나누어 나타낸 그래프(오른쪽)이다.

도 7g는 GF-Cy5.5, C-프로브 또는 EGF-프로브를 투여한 마우스로부터 회수된 종양조직의 형광이미지이다. 바 = 50 μm.

도 8은 C-프로브 또는 EGF-프로브(10 μg/ml)를 2 시간 처리한 HCT-15 세포에 대한 공초점 현미경 이미지이다.

도 9a는 EGF-전구약물을 HCT-15 세포에 처리한 후, DOX(적색)를 시간별로 측정한 이미지이다.

도 9b는 EGF-전구약물(N은 핵, E는 EGFR 및 L은 리소좀이다)을 처리하고, 0.5 시간, 4 시간 및 24 시간에 DOX에 대한 세포위치를 분석하여 나타낸 그래프이다. 바 = 20 μm이다.

도 9c는 HCT-15 세포에 세툭시맙 또는 BafA와 함께 EGF-전구약물을 처리하고, 4 시간 및 24 시간이 지난다음, 형광현미경으로 촬영한 사진이다. 바 = 50 μm.

도 9d는 HCT-15 세포에 EGF-전구약물(0, 10 및 100 μM) 또는 BafA(0, 0.1 및 1 nM)을 다양한 농도로 처리하였을 때, 세포 독성을 측정하여 나타낸 그래프이다. n = 5, * P <0.05 및 *** P <0.001.

도 10은 HCT-15, HT29, LoVo 및 HCT-8 세포에서의 EGFR 발현 수준을 웨스턴 블롯으로 측정하여 나타낸 결과이다(n=3).

도 11a는 HCT-15, HT29, LoVo 및 HCT-8 세포에 EGF-프로브를 처리하고 4시간이 지난 후 촬영한 형광 이미지이다. 바 = 50 μm.

도 11b는 HCT-15, HT29, LoVo 및 HCT-8 세포에 다양한 농도의 EGF-프로브를 처리하고 얻은 세포용해물의 IVIS

형광이미지(상부)와 형광신호를 정량적으로 측정하여 나타낸 그래프(하부)이다. n=3, *** P<0.001.

도 11c는 HCT-15, HT29, LoVo 및 HCT-8 세포가 이식된 마우스의 생체 내에 EGF-프로브(5 mg/kg)를 투여하고, 마우스의 생체 내를 IVIS로 측정한 이미지이다.

도 11d는 HCT-15, HT29, LoVo 및 HCT-8 세포에 EGF-전구약물 및 유리 DOX를 처리하였을 때, 농도에 따른 세포 독성을 측정하여 나타낸 그래프이다(n=5).

도 11e는 HCT-15, HT29, LoVo 및 HCT-8 세포에 유리 DOX에 대한 EGF-전구약물의 IC_{50} 비를 나타낸 그래프이다.

도 12는 PBS(대조군), EGF, EGF-프로브 및 EGF-전구약물(50 ng/ml of EGF)를 HCT-15 세포에 20분동안 처리하고, 이로부터 EGFR과 ERK1/2의 인산화 여부를 측정한 것이다.

도 13a는 HCT-15, HT29, Lovo 및 HCT-8 세포에 EGFR 및 LAMP-1의 세포내 발현수준을 웨스턴 블롯으로 분석하여 나타낸 그래프이다.

도 13b는 lysotracker green으로 처리한 서로 다른 직장암세포를 유세포분석으로 분석한 결과 그래프이다.

도 13c는 HCT-15, HT29, Lovo 및 HCT-8 세포에 EGF-전구약물을 처리하고 4시간 후에 공초점 현미경으로 촬영한 이미지이다.

도 13d는 HCT-15, HT29, Lovo 및 HCT-8 세포에 EGF-전구약물을 처리하고 4시간이 지난 후, 형광 세기를 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 13f는 EGF-전구약물을 처리하고 24시간이 지난 HCT-15, HT29, Lovo 및 HCT-8 세포에 대한 형광 이미지이다.

도 14a는 DOX(5 mg/kg), C-전구약물(5 mg/kg of DOX) 또는 EGF-전구약물(5 mg/kg of DOX)를 투여하고 6시간이 지난 후, HCT-15 함유 마우스에 대한 IVIS 형광 이미지이다.

도 14b는 생체 외(ex vivo)에서, 정맥내 투여된 DOX, C-전구약물 또는 EGF-전구약물(Hsms 심장, Lu는 폐, Li는 간, SP는 비장, Ki는 신장, Tu는 종양)의 분포를 나타낸 형광 이미지이다.

도 14c는 장기의 형광세기를 정량적으로 측정하여 나타낸 그래프(좌측)와 모든 장기의 형광 세기의 합으로 나눈 종양의 형광 세기를 계산하여 나타낸 그래프(우측)이다.

도 14d는 DOX, C-전구약물 또는 EGF-전구약물이 투여된 마우스로부터 분리된 종양 조직에 대한 형광 사진이다. 바 = 50 ㎛.

도 14e는 HCT-8 또는 HCT-15 함유된 마우스에 DOX, C-전구약물, EGF-전구약물(1 mg/kg of DOX, 3일마다 6번)을 각각 주사한 후, 21 일 동안 종양크기를 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 14f는 PBS, DOX, C-전구약물 또는 EGF-전구약물을 처음 주사하고 24일 째인 HCT-8 또는 HCT-15 함유 마우스로부터 채취한 종양 조직을 H&E로 염색한 결과이다.

도 14h는 PBS, DOX, C-전구약물 또는 EGF-전구약물을 처음 주사하고 24일 째인 HCT-8 또는 HCT-15 함유 마우스로부터 채취한 종양 조직을 TUNEL로 염색한 결과이다. 바 = 1 ㎝.

도 15a는 EGF-전구약물(5 mg/kg of DOX)를 처리하고 6시간이 지난, HCT-8 또는 HCT-15 함유 마우스의 IVIS 형광 이미지이다.

도 15b는 생체 외에서, EGF-전구약물의 생체분포 및 정량적 형광세기를 측정하여 나타낸 형광 이미지와 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0029] 본 명세서에서 용어 "펩타이드"란 펩타이드 결합에 의해 아미노산 잔기들이 서로 결합되어 형성된 선형의 분자를 의미한다.

[0030] 참고로, 대표적인 아미노산과 각각의 약어는, 알라닌(Ala, A), 이소류신(Ile, I), 류신(Leu, L), 메티오닌(Met, M), 페닐알라닌(Phe, F), 프롤린(Pro, P), 트립토판(Trp, W), 발린(Val, V), 아스파라긴(Asn, N), 시스테인(Cys, C), 글루타민(Gln, Q), 글리신(Gly, G), 세린(Ser, S), 트레오닌(Thr, T), 티로신(Try, Y), 아스파르트

산(Asp, D), 글루탐산(Glu, E), 아르기닌(Arg, R), 히스티딘(His, H), 리신(Lys, K)과 같다.

[0031] 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 종양 세포 내에 존재하는 리소좀 효소에 의해 절단되는 펩타이드를 중심으로, 양측에 형광체와 소광체가 접합되어 있고, 상기 펩타이드의 C 말단에 EGF(epidermal growth factor)가 결합되어 있는 복합체를 포함하는 대장암 진단 또는 검출용 조성물에 관한 것이다.

[0032] 또한, 종래 대장암 세포를 타겟하기 위한 물질들은 생체 내에서 빨리 분해되거나, 제거되어 목적 부위까지 도달하기조차 어려웠으며, 대장암 세포를 만난다하더라도 대장암 세포에 특이적으로 전달되기 어려울 뿐만 아니라, 대장암 세포 내로 침투하기가 용이하지 않은 등의 다양한 문제점들이 존재했다. 최근 EGFR을 표적으로 하는 항암 전략을 사용한 예가 있으나, EGFR 표적 약물은 모든 암에 적용이 가능하지 않기 때문에 실상 다른 항암 전략과 병용 사용되어야 하며, EGFT 표적화된 약물은 개인마다 그 효과가 천차만별이기 때문에, 매우 불확실하다는 문제가 있다. 그럼에도 EGFR 표적 약물의 항암 효능을 예측하기 위한 플랫폼에 대한 연구는 전무하여, EGFR 표적 약물이 다양하게 개발되었음에도 사용되지 못하고 있다. 따라서 상술한 문제들을 해결하기 위하여 본 발명자들은 EGFR 기반의 대장암 세포만을 특이적으로 표지하며, 세포 내로 효과적으로 침투하되, 대장암 세포내에 존재하는 리소좀에 의해 분해되어 형광을 나타내므로, 정확하게 표적할 수 있는 물질을 발명하고자 노력한 바, 완성하게 되었다.

[0033] 상기 대장암 진단 또는 검출용 조성물은, 대장암 세포로 침투하여, 리소좀 내에 존재하는 효소에 의해 절단되어 형광체와 소광체에 의한 소광작용이 해소되어 형광을 발생하는 것일 수 있다.

[0034] 본 발명의 복합체는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 구성된 펩타이드; 및 상기 펩타이드의 C 말단에 EGF(epidermal growth factor)가 결합되어 있는 구조이다. 구체적으로 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 C 말단(카르복실기)에 NHS-EDC 반응을 통해 결합시킨 것일 수 있다.

[0035] EGF는 천연 EGF 리간드일 수 있고, 이는 EGFR-표적화 항체보다 더 많은 장점을 갖고 있는데, 구체적으로 53 잔기로 만들어진 6 kDa 단백질이며, 높은 결합 진화력을 갖고, 암세포에 더 깊숙이 침투할 수 있으며, 더 작은 분자량으로 생체 내에서 제거가 빠르게 이루어진다.

[0036] 상기 복합체를 포함하는 조성물이 표적화하는 대장암은 표피성장인자 수용체(EGFR) 양성 대장암일 수 있다.

[0037] 본 발명의 일 구현예에 따르면 상기 펩타이드를 중심으로, 상기 펩타이드 양측에 형광체와 소광체가 접합되어 있을 수 있다. 이 경우, 상기 대장암 진단 또는 검출용 조성물의 복합체는 평소에는 소광상태로, 거의 0에 가까운 형광 세기를 나타내다가, 암 세포 내에 존재하는 리소좀에 의해 분해되어 형광을 낼 수 있도록 설계되었기 때문에, 상기 단백질-형광 복합체는 암 세포 내부로 함입되어 침투될 경우, 암 세포 내에 존재하는 리소좀(lysosome)에 의해 효과적으로 분해됨으로써, 리소좀 활성도가 높은 암 세포에 대해 형광을 발현하는 것이다.

[0038] 즉, 상기 대장암 진단 또는 검출용 조성물이 생체 내 또는 생체 외에 처리되면, EGFR을 갖는 대장암 세포 즉, 표피성장인자 수용체(EGFR) 양성 대장암에 복합체가 특이적으로 결합하게 되고, EGFR에 바인딩하면, 세포 내로 반입되고, 반입된 상기 복합체는 세포 내에서 리소좀에 존재하는 효소에 의해 펩타이드가 절단되면서, 형광체가 소광체로부터 분리되어 형광성을 나타내게 된다. 따라서, 암세포가 존재하더라도 EGFR이 음성인 경우에는 형광을 발휘하지 못한다. 또한 암세포에 들어간다고 하더라도, 암세포에 존재하는 리소좀 효소(카텝신 B)가 존재하지 않으면 상기 복합체가 절단되지 않고 안정적으로 존재하기 때문에 형광을 나타내지 않는다(EGF는 세포의 리소좀 분해 등의 과정을 통해 분해되더라도, 형광체와 소광체는 펩타이드에 결합되어 있으므로, 상관없이 형광을 나타내지 않는다).

[0039] 이처럼, 상기 상기 대장암 진단 또는 검출용 조성물은 여러 안전장치를 가지고 있으므로 그만큼 정확한 암 세포 표적이 가능할 뿐만 아니라 동시에 EGFR 기반 항암제의 치료 효과를 예측할 수 있다.

[0040] 만약, 서열번호 1로 표시되는 펩타이드 없이 형광체-EGF-소광체 구조로만 구성되어 있을 경우, 세포 리소좀 내에서 '분해'되어 작동하기 때문에, 리소좀 활성에 대한 영향을 전혀 고려하지 않으므로, EGFR 기반 항암제의 치료효과를 정확하게 예측할 수 없다는 문제점이 있다.

[0041] 즉, 본 발명의 대장암 진단 또는 검출용 조성물은 생체적합성이 뛰어나 부작용이 적으며, 암 세포, 특히 EGFR을 갖는 암세포를 특이적으로 진단, 검출 또는 영상화할 수 있을 뿐만 아니라, 본 발명의 대장암 진단 또는 검출용 조성물은 EGFR 기반 항암제의 치료 효과를 예측하는데 효율적으로 사용할 수 있음을 다양한 실험예를 통해 확인하였다.

[0042] 또한, 상기 대장암 진단 또는 검출용 조성물은 생리학적 용액에 쉽게 용해되므로, 흡수가 용이하여 생체 이용률

이 뛰어나고, 안정성 및 암세포 특이성이 현저히 개선되었으므로, 표피성장인자 수용체(EGFR) 양성 대장암 세포의 진단, 검출 및 영상 이미징 및 치료에 매우 유용하다.

[0043] 상기 펩타이드는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 구성될 수 있다. 상기 펩타이드는 대장암 세포 내에서 리소좀 분해 효소들에 의해 잘리도록 펩타이드(GFLG)기반으로, C 말단에 하나 이상의 글리신과 라이신(lysine, K) 또는 아르기닌(Arginine, R) 아미노산 잔기가 결합되어 있는 펩타이드를 포함하는 것일 수 있다.

[0044] 상기 펩타이드의 N-말단에 상기 형광체가 결합되고, 상기 펩타이드(a)의 라이신 또는 아르기닌 아미노산 잔기의 입실론 아민기(ε-amino group; 측쇄 아민기)에 소광체가 결합될 수 있다.

[0045] 이는 당업자에게 잘 알려진 다양한 기술을 사용할 수 있다. 구체적으로 상기 펩타이드에 소광체 또는 형광체를 결합시키는 방법은 DMSO 상태에서 이루어졌으며, N-Methylmorpholine(NMM) 과 4-Dimethylaminopyridine(DMAP)을 촉매 하에 합성하였다. 합성과정은 형광체 도입, 보호 그룹(protecting group) 제거 및 소광체 도입 세 가지로 이루어지며, 각각의 과정은 고성능액체크로마토그래피(High-performance liquid chromatography, HPLC)로 확인 및 정제하였다. 상기 펩타이드에 아민기가 존재하고, 형광체 및 소광체에 N-하이드록시숙신이미드(NHS 형태) 작용기가 존재하는 경우, 상기 두 분자 간의 공유결합도 가능하다. 또는 상기 펩타이드에 COOH 기가 존재하고, 형광체 및 소광체에 아민기가 존재하는 경우에, 상기 두 잔기가 직접적으로 결합하는 것이 불가능하므로, 크로스링커(예컨대, 디사이클로헥실카보디이미드(DCC), 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)-카보디이미드, 하이드로클로라이드(EDAC))를 이용하여 두 개를 화학적으로 결합시키는 것이 가능하다.

[0046] 상기 형광체는 플루오레세인(fluorescein), FITC(fluorescein isothiocyanate), 오레곤 그린(Oregon green), 텍사스 레드(Texas red), Cy2, Cy3, Cy3B, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, 인도카르보사이아닌(indocarbocyanine), 로다민(rhodamine), 옥사카르보사이아닌(oxacarbocyanine), 티아카르보사이아닌(thiacarbocyanine), 메로사이아닌(merocyanine), 피리딜록사졸(pyrodyloxazole), 니트로벤족사디아졸(nitrobenzoxadiazole), 벤족사디아졸(benzoxadiazol), 나일 레드(Nile red), 나일 오렌지(Nile orange), 아크리딘 옐로우(acridine yellow), 오마린(aumarine), 크리스탈 바이올렌(crystal violet), 및 말라카이트 그린(malachite green)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있고, 바람직하게는 Cy5.5일 수 있다.

[0047] 상기 소광체는 TAMRA(6-carboxytetramethyl-rhodamine), BHQ1(black hole quencher 1), BHQ2(black hole quencher 2), BHQ3(black hole quencher 3), NFQ (nonfluorescent quencher), 답실(dabcyl), Eclipse, DDQ(Deep Dark Quencher), 블랙베리 퀀처(Blackberry Quencher), 아이오와 블랙(Iowa black)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 BHQ-3일 수 있다.

[0048] 상기 형광체와 소광체는 상술한 예로만 특별히 한정되지 않으나, 서열번호 1로 표시되는 펩타이드와 결합할 수 있는 능력을 지니면서, 형광체로서 형광성을 띄는 화합물, 소광체로서 형광체의 형광성을 억제할 수 있는 화합물이라면 특별히 이에 제한되지 않는다.

[0049] 상기 펩타이드와 EGF의 사이에는 가교결합제에 의해 공유결합된 것일 수 있다. 상기 가교결합제는 단백질 A, 카르보디이미드, N-숙신이미딜-S-아세틸-티오아세테이트(SATA), N-숙신이미딜-3-(2-피리미딜디티오)프로피오네이트 (SPDP) 및 술포숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트(술포-SMCC)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 수 있다.

[0050] 상기 대장암 진단 또는 검출용 조성물은 암 조직에서 과다 발현되는 EGFR과 반응하여, 세포 내로 함입되고, 세포 내에서 리소좀 분해효소에 의해 분해되어, 형광을 발광하게 된다. 이때, 상기 형광체는 근적외선 형광을 나타내는 시아닌 형광체인 Cy5.5이고, 근적외성 빛(650-900 ㎚)을 방출한다. 이에 소광체는 상기 형광체의 형광을 흡수하여 소광 효과를 극대화시킬 수 있는 BHQ3을 사용하였다. 상기 근적외성 형광체를 사용할 경우, 통상의 가시광선대 빛을 방출하는 형광분자에 비하여 더 심도가 깊은 곳의 표피성장인자 수용체(EGFR) 양성 대장암 세포를 영상화할 수 있기 때문에 인간과 같은 부피가 큰 동물의 생체 내 형광이미징에 적합하다.

[0051] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 펩타이드에 항암제가 결합되어 있을 수 있다.

[0052] 상기 항암제는 독소루비신(doxorubicin), 사이클로포스파아마이드(cyclophosphamide), 메클로레타민(mecholrethamine), 우라무스틴(uramustine), 멜파란(melphalan), 클로라부실(chlorambucil), 이포스파미드(ifosfamide), 벤다무스틴(bendamustine), 카르무스틴(carmustine), 로무스틴(lomustine), 스트렙토조신(streptozocin), 부설판(busulfan), 다카바진(dacarbazine), 테모졸로마이드(temozolomide), 티오테파(thiotepa), 알트레타민(altretamine), 듀오카르마이신(duocarmycin), 시스플라틴(cisplatin), 카르보플라틴

(carboplatin), 네다플라틴(nedaplatin), 옥사리플라틴(oxaliplatin), 사트라플라틴(satraplatin), 트리플라틴 테트라나이트레이트(triplatin tetranitrate), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 6-머캅토퓨린(6-mercaptopurine), 카페시타빈(capecitabine), 클라드리빈(cladribine), 클로파라빈(clofarabine), 시스타르빈(cystarbine), 플록스유리딘(floxuridine), 플루다라빈(fludarabine), 겜시타빈(gemcitabine), 하이드록시우레아(hydroxyurea), 메토트렉세이트(methotrexate), 페메트렉세드(pemetrexed), 펜토스타틴(pentostatin), 티오구아닌(thioguanine), 캠토테신(camptothecin), 토포테칸(topotecan), 이리노테칸(irinotecan), 에토포사이드(etoposide), 테니포시드(teniposide), 미토산트론(mitoxantrone), 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 이자베필론(izabepilone), 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine), 빈데신(vindesine), 비노렐빈(vinorelbine), 에스트라머스틴(estramustine), 메이탄신(maytansine), DM1(mertansine, 메르탄신), DM4, 돌라스타틴(dolastatin), 아우리스타틴 E(auristatin E), 아우리스타틴 F(auristatin F), 모노메틸 아우리스타틴 E(monomethyl auristatin E), 모노메틸 아우리스타틴 F(monomethyl auristatin F) 및 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 독소루비신(doxorubicin)일 수 있다.

[0053] 상기 항암제는 상기 펩타이드에 결합될 수 있는 것으로, 상기 항암제와 본 발명의 펩타이드의 연결은 당업계에 공지된 방법 예컨대, 공유결합, 가교 등을 통해 수행될 수 있다. 본 발명의 펩타이드는 필요하다면 그 활성이 소실되지 않는 범위에서 화학적으로 수식(modification) 될 수 있다.

[0054] 또한, 필요에 따라, 상기 제조된 복합체를 정제 또는 확인할 수 있는데, 이는 당업자에게 잘 알려진 다양한 기술을 사용할 수 있다.

[0055] 상기 복합체의 분자량은 18kDa 내지 21kDa일 수 있다. 상기 분자량을 초과할 경우, 응집현상이 발생하여 효과적으로 암세포를 형광 표지할 수 없으며, 미만일 경우 형광 정도가 낮아져 생체 내 영상화에 불리하다는 문제가 있다

[0056] 상기 진단은 치료제와 동시에 출시되거나, 병행 개발되어 해당 치료제의 투약여부 및 투여량을 결정하는 진단인 동반진단(companion diagnosis)을 포함하는 것일 수 있다.

[0057] 상기 조성물은 생체 내에 직접 투여될 수 있으므로, 약제학적으로 허용되는 담체를 더 포함할 수 있고, 상기 담체는 통상적으로 이용되는 것으로서, 탄수화물류 화합물(예: 락토스, 아밀로스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 셀룰로스 등), 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 염용액, 알코올, 아라비아 고무, 식물성 기름(예: 옥수수 기름, 목화 종자유, 두유, 올리브유, 코코넛유), 폴리에틸렌 글리콜, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences(19^{th} ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[0058] 상기 조성물은 경구 또는 비경구 투여될 수 있고, 상기 비경구 투여의 경우, 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입 및 보강 주입으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나이상의 경로를 통해 투여될 수 있다.

[0059] 상기 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면 조성물 기준으로는 0.0001 내지 100 mg/kg(체중)으로 투여될 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있거나 이틀 내지 한 달 간격으로 복수로 투여하는 것도 가능하다.

[0060] 본 발명의 다른 측면은 서열번호 1로 표시되는 종양 세포 내에 존재하는 리소좀 효소에 의해 절단되는 펩타이드를 중심으로, 양측에 형광체와 소광체가 접합되어 있고, 상기 펩타이드의 C 말단에 EGF(epidermal growth factor)가 결합되어 있는 복합체를 포함하는 EGFR 양성 대장암 환자의 암 치료효과에 대한 예후 확인용 조성물에 관한 것이다.

[0061] 상기 조성물은 항암제를 투여받은 대장암 환자, 특히 EGFR 양성 대장암 환자에 처리하여, 종양의 존재 여부를 모니터링함으로써, 항암치료 효과를 확인하거나, 미리 특정 약물에 대한 반응성을 예측하는데 사용될 수 있다. 이와 같은 방식의 진단을 일부에서는 동반진단(companion diagnosis)라고도 하며, 최근 개인 맞춤 치료와 관련

하여 매우 중요한 분야로 인식되고 있다.

[0062] 상기 조성물을 투여한 후, 형광 신호가 관찰되거나, 증가하는 경우 상기 항암제에 의한 치료효과가 음성인 것으로 판정할 수 있고, 형광 신호가 감소하거나, 관찰되지 않는 경우에는 상기 항암제에 의한 치료효과가 양성인 것으로 판정할 수 있다.

[0063] 본 발명의 또 다른 측면은 암 환자로부터 분리된 시료에서, 상기 대장암 진단 또는 검출용 조성물을 처리하고, 형광 세기를 측정하는 단계를 포함하는 표피성장인자 수용체(EGFR) 약물에 대한 반응성을 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0064] 본 발명에서 용어 "환자"는 임의의 인간 또는 비인간 동물을 포함한다. 용어 "비인간 동물"은 척추동물, 예컨대 비인간 영장류, 양, 개, 및 설치류, 예컨대 마우스, 래트 및 기니 피그일 수 있다. 상기 환자는 바람직하게 인간일 수 있다. 용어 "환자"는 본 명세서에서 "대상체" 및 "개체"와 상호교환적으로 사용 가능하다.

[0065] 상기 암 환자로부터 분리된 시료는 조직, 세포, 전혈, 혈액, 타액, 객담, 뇌척수액 및 뇨로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나이상 일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[0066] 상기 형광 세기가 검출되면, 대상체는 표피성장인자 수용체(EGFR) 표적 약물에 대하여 반응성이 유의하게 높아지는 반면, 반대로 형광 세기가 검출되지 않으면 약물 반응성이 유의하게 낮아지는 것을 확인하였는 바, 대상체 또는 대상체의 시료에 대장암 진단 또는 검출용 조성물을 처리하였을 때, 형광이 발현되는 경우에는, 대상체가 표피성장인자 수용체(EGFR) 표적 약물에 대하여 약효를 나타낼 것으로 예측할 수 있는 바, 약물반응성을 예측하여 개인 맞춤형 항암제를 제공하는데 활용할 수 있다.

[0067] 상기 암 환자가 EGFR 양성 대장암으로 판정될 경우, 표피성장인자 수용체(EGFR) 표적 약물의 처방을 결정하는데 중요한 정보를 제공할 수 있다.

[0068] 본 발명에서 '표피성장인자 수용체(EGFR) 표적 약물'은 EGFR과 결합하여 활성화를 막는 항암제라면 특별히 이에 제한되지 않으며, 구체적으로 세툭시맙(cetuximab), 베바시주맙(Bevacizumab), 파니튜뮤맙 (panitumumab) 및 트라스투주맙(Trastuzumab)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나이상일 수 있다.

[0069] 본 발명의 또 다른 측면은 항암제를 투여받고 있는 대장암 환자로부터 분리된 시료에서, 제1항에 따른 대장암 진단 또는 검출용 조성물을 처리하고, 형광 세기를 측정하는 단계를 포함하는 상기 항암제의 치료효과를 검증하기 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0070] 본 발명에서 용어 "환자"는 임의의 인간 또는 비인간 동물을 포함한다. 용어 "비인간 동물"은 척추동물, 예컨대 비인간 영장류, 양, 개, 및 설치류, 예컨대 마우스, 래트 및 기니 피그일 수 있다. 상기 환자는 바람직하게 인간일 수 있다. 용어 "환자"는 본 명세서에서 "대상체" 및 "개체"와 상호교환적으로 사용 가능하다.

[0071] 상기 대장암 환자로부터 분리된 시료는 조직, 세포, 전혈, 혈액, 타액, 객담, 뇌척수액 및 뇨로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나이상 일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[0072] 상기 대장암 환자는 표피성장인자 수용체(EGFR) 양성 대장암 환자일 수 있다.

[0073] 상기 형광 세기가 검출되면, 상기 대장암 환자는 상기 항암제에 대하여 치료효과가 없는 것으로 판단되고, 형광 세기가 검출되지 않거나 감소되면 상기 항암제에 대하여 치료효과 나타나, 종양이 감소되었음을 확인하여, 항암제 처리에 따른 예후 또는 치료효과를 판단하는데 중요한 정보를 제공할 수 있다.

[0074] 본 발명에서 '항암제'는 독소루비신(doxorubicin), 사이클로포스파아마이드(cyclophosphamide), 메클로레타민(mecholrethamine), 우라무스틴(uramustine), 멜파란(melphalan), 클로라부실(chlorambucil), 이포스파미드(ifosfamide), 벤다무스틴(bendamustine), 카르무스틴(carmustine), 로무스틴(lomustine), 스트렙토조신(streptozocin), 부설판(busulfan), 다카바진(dacarbazine), 테모졸로마이드(temozolomide), 티오테파(thiotepa), 알트레타민(altretamine), 듀오카르마이신(duocarmycin), 시스플라틴(cisplatin), 카르보플라틴(carboplatin), 네다플라틴(nedaplatin), 옥사리플라틴(oxaliplatin), 사트라플라틴(satraplatin), 트리플라틴 테트라나이트레이트(triplatin tetranitrate), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 6-머캅토퓨린(6-mercaptopurine), 카페시타빈(capecitabine), 클라드리빈(cladribine), 클로파라빈(clofarabine), 시스타르빈(cystarbine), 플록스유리딘(floxuridine), 플루다라빈(fludarabine), 겜시타빈(gemcitabine), 하이드록시우레아(hydroxyurea), 메토트렉세이트(methotrexate), 페메트렉세드(pemetrexed), 펜토스타틴(pentostatin), 티오구아닌(thioguanine), 캠토테신(camptothecin), 토포테칸(topotecan), 이리노테칸(irinotecan), 에토포사이드

(etoposide), 테니포시드(teniposide), 미토산트론(mitoxantrone), 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 이자베필론(izabepilone), 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine), 빈데신(vindesine), 비노렐빈(vinorelbine), 에스트라머스틴(estramustine), 메이탄신(maytansine), DM1(mertansine, 메르탄신), DM4, 돌라스타틴(dolastatin), 아우리스타틴 E(auristatin E), 아우리스타틴 F(auristatin F), 모노메틸 아우리스타틴 E(monomethyl auristatin E), 모노메틸 아우리스타틴 F(monomethyl auristatin F) 및 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0075] 본 발명의 또 다른 측면은, a) 서열번호 1로 표시되는 종양 세포 내에 존재하는 리소좀 효소에 의해 절단되는 펩타이드를 중심으로, 양측에 형광체와 소광체가 접합되어 있고, 상기 펩타이드의 C 말단에 EGF(epidermal growth factor)가 결합되어 있는 복합체; 및

[0076] b) 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 종양 세포 내에 존재하는 리소좀 효소에 의해 절단되는 펩타이드의 양 말단에 EGF(epidermal growth factor)와 항암제가 접합되어 있는 전구약물 복합체를 포함하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0077] 상기 a)의 복합체의 경우 앞서 구체적으로 설시하였으므로, 반복기재를 피하기 위해, 이하, 상기 구성에 대한 설명은 생략하기로 한다.

[0078] 상기 b) 전구약물 복합체는 대장암 세포로 침투하여, 리소좀 내에 존재하는 효소에 의해 절단되어 항암제가 방출되어 항암효과를 발생하는 것일 수 있다.

[0079] 상기 b) 전구약물 복합체는 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 구성된 펩타이드; 및 상기 펩타이드의 C 말단에 EGF(epidermal growth factor)가 결합되어 있고, 상기 펩타이드의 N 말단에 항암제가 결합되어 있는 구조이다.

[0080] 상기 b) 전구약물 복합체에서 상기 펩타이드와 EGF의 사이에는 가교결합제에 의해 공유결합된 것일 수 있고, 상기 가교결합제는, 단백질 A, 카르보디이미드, N-숙신이미딜-S-아세틸-티오아세테이트(SATA), N-숙신이미딜-3-(2-피리미딜디티오)프로피오네이트 (SPDP) 및 술포숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트(술포-SMCC)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다. 바람직하게 상기 펩타이드의 C 말단의 티올 작용기에 EGF를 SMCC linker를 통해 결합시킨 것일 수 있다.

[0081] 상기 항암제는 독소루비신(doxorubicin), 사이클로포스파아마이드(cyclophosphamide), 메클로레타민(mecholrethamine), 우라무스틴(uramustine), 멜파란(melphalan), 클로라부실(chlorambucil), 이포스파미드(ifosfamide), 벤다무스틴(bendamustine), 카르무스틴(carmustine), 로무스틴(lomustine), 스트렙토조신(streptozocin), 부설판(busulfan), 다카바진(dacarbazine), 테모졸로마이드(temozolomide), 티오테파(thiotepa), 알트레타민(altretamine), 듀오카르마이신(duocarmycin), 시스플라틴(cisplatin), 카르보플라틴(carboplatin), 네다플라틴(nedaplatin), 옥사리플라틴(oxaliplatin), 사트라플라틴(satraplatin), 트리플라틴 테트라나이트레이트(triplatin tetranitrate), 5-플루오로우라실(5-fluorouracil), 6-머캅토퓨린(6-mercaptopurine), 카페시타빈(capecitabine), 클라드리빈(cladribine), 클로파라빈(clofarabine), 시스타르빈(cystarbine), 플록스유리딘(floxuridine), 플루다라빈(fludarabine), 겜시타빈(gemcitabine), 하이드록시우레아(hydroxyurea), 메토트렉세이트(methotrexate), 페메트렉세드(pemetrexed), 펜토스타틴(pentostatin), 티오구아닌(thioguanine), 캠토테신(camptothecin), 토포테칸(topotecan), 이리노테칸(irinotecan), 에토포사이드(etoposide), 테니포시드(teniposide), 미토산트론(mitoxantrone), 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 이자베필론(izabepilone), 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine), 빈데신(vindesine), 비노렐빈(vinorelbine), 에스트라머스틴(estramustine), 메이탄신(maytansine), DM1(mertansine, 메르탄신), DM4, 돌라스타틴(dolastatin), 아우리스타틴 E(auristatin E), 아우리스타틴 F(auristatin F), 모노메틸 아우리스타틴 E(monomethyl auristatin E), 모노메틸 아우리스타틴 F(monomethyl auristatin F) 및 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0082] 본 발명의 조성물은 a) 복합체와 b) 전구약물 복합체를 순차적으로 혹은 동시에 처리함으로써, 형광신호를 통해 EGFR 표적 약물에 대하여 반응성을 나타낼 것으로 예측되는 대장암 환자에 효율적으로 처방할 수 있고, 약효를 실시간으로 측정하여 약물의 제어를 용이하게 행할 수 있다.

[0083] 상기 약학 조성물은 대장암 세포, 특히 EGFR을 갖는 대장암 세포에 대해서만 특이적으로 독성을 나타내므로, 정상조직에 대해서는 전혀 세포 독성을 유발하지 않는다는 점에서 매우 안정적이다.

[0084] 게다가 a) 복합체의 투여를 통해, b) 전구약물 복합체의 효과를 미리 또는 동시에 예측할 수 있으므로, 상승효

과 이상의 효과를 거둘 수 있다.

[0085] 즉, 약학 조성물은 생체 내 또는 생체 외에 처리되면, EGFR을 갖는 암 세포에 특이적으로 결합하게 되고, EGFR에 바인딩하면, 세포 내로 반입되고, 반입된 약학 조성물은 세포 내에서 리소좀에 존재하는 효소에 의해 펩타이드가 절단되면서, a) 복합체는 형광체와 소광체가 분리되고 b) 전구약물 복합체는 항암제가 분리되어 형광과 항암 활성을 나타내게 된다. 따라서, 암세포가 존재하더라도 EGFR이 음성인 경우에는 형광 신호가 관찰되지 않을 뿐더러 항암 효과가 발동되지 않는다. 또한 암세포에 들어간다고 하더라도, 암세포에 존재하는 리소좀 효소(카텝신 B)가 존재하지 않으면 약학 조성물로부터 항암제가 절단되지 않고 안정적으로 존재하기 때문에 세포 독성(항암 효과)을 나타내지 않는다(EGF는 세포의 리소좀 부해 등의 과정을 통해 분해된다하더라도, 항암제는 펩타이드에 결합되어 있으므로, 상관없이 세포독성을 나타내지 않는다).

[0086] 이처럼, 상기 약학 조성물은 여러 안전장치를 가지고 있으므로 그만큼 정확한 대장암 세포 표적이 가능할 뿐만 아니라 동시에 EGFR 기반 항암제의 치료 효과를 가질 수 있다.

[0087] 또한, 상기 약학 조성물은 용액상에서 자기조립을 통해 구형의 입자로 존재하나, 그 크기가 균일하고, 생체 내에서 안정적이므로, 정확한 약물용량으로 투여할 수 있다는 장점이 있다.

[0088] 상기 약학적 유효량은 "치료 유효량" 및 "예방 유효량"을 포함한다. 용어 "치료 유효량"은 약물 또는 치료제가 단독으로 또는 다른 치료제와 조합되어 사용되는 경우에, 질환 증상의 중증도 감소, 질환 증상이 없는 기간의 빈도 및 지속기간의 증가, 또는 질환 고통으로 인한 손상 또는 장애의 방지를 나타낼 수 있는 약물의 임의의 양을 의미한다. 용어 "예방 유효량"은 암 발생 위험이 있는 개체 또는 암 재발로 인해 고통받을 위험이 있는 개체에서 대장암의 발생 또는 재발을 억제하는 약물의 임의의 양을 의미한다. 유효량의 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소 등에 따라 결정될 수 있다.

[0089] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 다양한 방법 및 전달 시스템 중 임의의 것을 사용하여 조성물을 개체에게 물리적으로 도입하는 것을 지칭한다. 본 발명의 약학 조성물을 위한 투여 경로는 모든 투여 경로를 포함한다. 바람직하게는, 비경구 투여일 수 있으며, 예를 들어 정맥내, 근육내, 피하, 복강내, 척수 또는 다른 비경구 투여 경로, 예컨대 주사 또는 주입에 의한 투여 경로를 포함한다. 본 발명의 조성물을 위한 투여 횟수는 예를 들어 1회, 복수 회, 및/또는 하나 이상의 연장된 기간에 걸쳐 수행될 수 있다.

[0090] 본 발명의 약학 조성물은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 구체적으로 암을 갖는 개체의 질환 발병 정도에 따라 본 발명의 조성물을 0.0001 내지 100 mg/kg(체중)을 일일 1회 내지 수회 투여할 수 있다. 또한 그 투여량은 투여 경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이, 특히 환자가 갖는 암의 발병 정도 등에 따라 증감될 수 있다.

[0091] 또한 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여되거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있다. 다른 치료제와 병용하여 투여되는 경우, 본 발명의 조성물과 다른 치료제는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 상기 다른 치료제는 암 퇴행을 촉진하거나 또는 추가로 종양 성장을 방지하는 화합물, 단백질 등의 약물일 수 있으며, 또한 방사선 치료 등 약물 요법 이외의 기타 항암 요법을 모두 포함한다.

[0092] 또한, 본 발명은 대장암 진단 또는 검출용 조성물을 통해 EGFR 표적 약물에 대하여 반응성을 나타낼 것으로 예측된 대장암 환자에 상기 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 대장암 치료 또는 예방 방법을 제공할 수 있다.

[0093] 본 발명에 따른 대장암 치료 또는 예방 방법에서 각 용어는 특별히 언급하지 않는 한 상기 대장암 치료 또는 예방용 약학 조성물에서 상기한 바와 동일한 의미를 갖는다.

[0094] 상기 대장암 치료는 예를 들면 비치료 개체에 비해 종양 성장을 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 40% 이상, 약 60% 이상, 또는 약 80% 이상 억제할 수 있다.

[0095] 이하에서 실시예 등을 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 하며, 다만 이하에 실시예 등에 의해 본 발명의 범위와 내용이 축소되거나 제한되어 해석될 수 없다. 또한, 이하의 실시예를 포함한 본 발명의 개시 내용에 기초한다면, 구체적으로 실험 결과가 제시되지 않은 본 발명을 통상의 기술자가 용이하게 실시할 수 있음은 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속하는 것도 당연하다.

[0096] 또한 이하에서 제시되는 실험 결과는 상기 실시예 및 비교예의 대표적인 실험 결과만을 기재한 것이며, 아래에

서 명시적으로 제시하지 않은 본 발명의 여러 구현예의 각각의 효과는 해당 부분에서 구체적으로 기재하도록 한다.

[0097] **실험 재료**

[0098] DMSO(Dimethyl sulfoxide), DMF(dimethylformamide), DOX(doxorubicin hydrochloride), DIPEA(N,N-diisopropylethylamine), NHS(N-hydroxysuccinimide), EDC(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide), 파파인(papaya latex로부터 유래됨), EGF(human epidermal growth factor), Sulfo-SMCC(sulfosuccinimidyl-trans-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate), DMAP(4-(dimethylamino)pyridine), NMM(4-methylmorpholine), 아니솔(anisole), 트리플루오로아세트산(trifluoroacetic acid), 바필로마이신 A1(Bafilomycin A1) 및 disposable PD 10 desalting columns은 Sigma Aldrich(MO, USA)로부터 구입하였다. 시아신5.5(Cyanine5.5) NHS ester, 항-EGFR 항체, 및 항-β-액틴 항체는 Abcam(Cambridge, UK)으로부터 구입하였다. BHQ-3-숙신이미딜 에스테르(BHQ-3-succinimidly ester)는 Biosearch Technologies Inc.(Hoddesdon, UK)로부터 구입하였다. NH2-Gly-Phe-Leu-Gly-Gly-Lys (Boc)-Gly-Gly-COOH(NH2-GFLGGK(Boc)GG-COOH) 및 (Ac)Cys-Gly-Phe-Leu-Gly((Ac) CGFLG) 펩타이드 서열은 Peptron Co.(Daejeon, Republic of Korea)와 BeadTech Inc.(Gyeonggi-do, Republic of Korea)에 의뢰하여 합성하였다. Lysotracker green DND-26은 Invitrogen(CA, USA)로부터 구입하였다. DeadEndTM fluorescence TUNEL staining kit는 Promega(WI, USA)로부터 구입하였다. Anti-phospho-EGFR antibody, anti-ERK1/2 antibody, anti-phospho-ERK1/2 antibody, HRP-linked horse anti-mouse secondary antibody는 Cell Signaling Technology(MA, USA)로부터 구입하였다. HRP-linked goat anti-rabbit secondary antibody는 Agilent Technologies(CA, USA)로부터 구입하였다.

[0099] **통계분석.**

[0100] 본 발명에서 시험관내 및 생체 내 데이터는 정량적으로 평균 ± 표준 편차(SD)로 표시하였다. 시간에 따른 종양 크기는 평균에 대한 평균 ± 표준 오차(SEM)로 표시하였다. p-값은 GraphPad Prism 8 소프트웨어를 사용한 일원 또는 이원 분산 분석으로 계산하였다. $p<0.05$의 값은 통계적으로 유의 한 것으로 간주하였다.

[0101] **제조예 1. EGF-Cy5.5의 합성**

[0102] EGF-Cy5.5의 합성은 인간 EGF와 Cy5.5-NHS 에스테르를 1 ㎖ DMSO에 혼합하고, DMAP와 NMM을 첨가한 후, 상기 반응 혼합물을 37 ℃에서 2 시간동안 저어주었다. 이를 disposable PD10 desalting culumn으로 정제하였다. 정제된 EGF-Cy5.5를 PBS(phosphate-buffered saline)으로 4 ℃에서 사용전까지 저장해두었다.

[0103] **제조예 2. C-프로브의 합성**

[0104] 대조군 프로브(C-프로브)인 Cy5.5-GFLGGK(BHQ-3)GG-COOH의 합성을 위해, 상기 NH2-GFLGGK(Boc)GG-COOH 및 Cy5.5-BHS 에스테르는 2 ㎖ DMSO에 용해하였다. 여기에 NMM과 DMAP를 더한 후, 이를 37 ℃에서 2시간동안 저어주어 반응 혼합물을 제조하였다. 상기 반응 혼합물을 C18 컬럼이 구비된 분석용 역상 HPLC(1200 infinity series, Agilent Technologies) 정제하였다. 상기 청색 고체 생성물이 Cy5.5-GELGGK(Boc)GG-COOH이고, 이는 동결건조하여 얻었다. 혼합 용매(TFA(trifluoroacetic acid): 증류수(distilled water) : 아니솔 = 95: 2.5: 2.5)에 용해한 후, 혼합액을 C18 컬럼이 구비된 분석용 역상 HPLC(1200 infinity series, Agilent Technologies) 정제하였다. 결과 Cy5.5-GFLGGKGG-COOH을 얻었다.

[0105] 이후, Cy5.5-GFLGGKGG-COOH를 BHQ-3-숙신이미딜 에스테르와 혼합하고, 37 ℃에서 2 동안 교반하였다. 이를 역상-HPLC로 정제하여 C-프로브를 합성하였다.

[0106] **제조예 2. EGF-프로브의 합성**

[0107] EGF-프로브는 도 2a에 따라 합성하였다. 상기 NH2-GFLGGK(Boc)GG-COOH 및 Cy5.5-BHS 에스테르는 2 ㎖ DMSO에 용해하였다. 여기에 NMM과 DMAP를 더한 후, 이를 37 ℃에서 2시간동안 저어주어 반응 혼합물을 제조하였다. 상기 반응 혼합물을 C18 컬럼이 구비된 분석용 역상 HPLC(1200 infinity series, Agilent Technologies) 정제하였다. 상기 청색 고체 생성물이 Cy5.5-GELGGK(Boc)GG-COOH이고, 이는 동결건조하여 얻었다. 혼합 용매(TFA(trifluoroacetic acid): 증류수(distilled water) : 아니솔 = 95: 2.5: 2.5)에 용해한 후, 혼합액을 C18 컬럼이 구비된 분석용 역상 HPLC(1200 infinity series, Agilent Technologies) 정제하였다. 결과 Cy5.5-GFLGGKGG-COOH을 얻었다.

[0108] Cy5.5-GFLGGK(BHQ-3)GG-COOH의 합성을 위해, Cy5.5-GFLGGKGG-COOH를 BHQ-3-숙신이미딜 에스테르와 혼합하고,

37 ℃에서 2 동안 교반하였다. 이를 역상-HPLC로 정제하였다. 다음, EGF-프로브의 합성을 위해 EGF와 접합시켰다. 간단히, Cy5.5-GFLGGK(BHQ-3)GG-COOH, EDC 및 NHS를 PBS(pH 6.0)에 용해시키고, 1 시간 동안 교반하였다. EGF를 첨가한 후, 반응 혼합물을 37 ℃에서 6 시간 동안 추가로 교반하였다. 이어서, 혼합물을 disposable PD10 desalting culumn으로 정제 하였다. 수집된 EGF-프로브를 추가 사용을 위해 4 ℃에서 보관하였다.

[0109] **제조예 4. C-전구약물 합성**

[0110] (Ac)CGFLG, N-hydroxysuccinimide, 및 ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide DMSO에 용해하였다. 상기 반응 혼합물을 37 ℃에서 1 시간동안 교반하였다. DOX을 첨가한 후, DOX로부터 하이드로클로라이드(hydrochloride)를 제거하기 위하여 DIPEA를 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 37 ℃, 4 시간동안 교반하였다. 이를 분석용 역상-HPLC로 정제하여 (Ac)CGFLG-DOX의 C-전구약물을 합성하였다. 동결건조하여 보관하였다.

[0111] **제조예 5. EGF-전구약물 합성**

[0112] EGF-전구약물은 도 2b에 따라 합성하였다. SMCC(sulfosuccinimidyl-trans-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate)-결합한 EGF와 C-전구약물을 접합시켜 EGF-전구약물을 제조하였다. 구체적으로 다음과 같다.

[0113] 우선, (Ac)CGFLG, N-hydroxysuccinimide, 및 ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide DMSO에 용해하였다. 상기 반응 혼합물을 37 ℃에서 1 시간동안 교반하였다. DOX을 첨가한 후, DOX로부터 하이드로클로라이드(hydrochloride)를 제거하기 위하여 DIPEA를 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 37 ℃, 4 시간동안 교반하였다. 이를 분석용 역상-HPLC로 정제하여 (Ac)CGFLG-DOX의 C-전구약물을 합성하였다.

[0114] SMCC-EGF를 제조하기 이하여, EGF와 SMCC를 증류수에 용해한 후, 37 ℃에서 6시간동안 반응시켰다. 상기 반응물을 PD10 desalting column으로 정제하였다. 합성한 SMCC-EGF를 C-전구약물과 PBS(pH 8.0)에 혼합한 후, PD10 column을 사용하여 정제하였다. EGF-전구약물을 회수하고, 사용전까지 4 ℃에 보관하였다.

[0115] **실험예 1. EGF-전구약물, EGF-프로브의 특성 분석-1**

[0116] 제조예 3의 EGF-프로브와 제조예 5의 EGF-전구약물은 Cary 300 spectrophotometer(Agilent Technologies), Quantamaster 40 spectrofluorometer(Horiba Scientific, Kyoto, Japan), analytical reverse phase-HPLC equipped with a MAbPacTMRP(3.0 X100 mm) column 및 ISQTM EM single quadrupole mass spectrometer(Thermo Fisher Scientific, IL, USA)을 사용하여 분석하였다. 제조예 4의 C-전구약물인 GFLG-DOX(m/z : [M+H]+ calcd for C52H64N6O16S 1062.17, Found 1062.5)의 분자량을 측정하기 위해, 질량 분석기를 사용하였다. EGF, C-프로브(제조예 2), EGF-프로브(제조예 3), C-전구약물(제조예 4) 및 EGF-전구약물(제조예 5)은 분석용 역상(analytic reverse phase)-HPLC에 의해 특성을 분석하였고, 구체적인 조건은 다음과 같다; 0.1% TFA을 포함하는 0-100% 아세토니트릴 대(versus) 0.1% TFA를 포함하는 증류를 0.3 ㎖/min의 유속으로 22분에 걸쳐 수행하였다.

[0117] 도 3은 HPLC 결과를 나타낸 그래프로, 도 3a는 EGF에 관한 HPLC 결과 그래프이고, 도 3b는 제조예 2의 C-프로브에 대한 HPLC 결과 그래프이며, 도 3c는 제조예 3의 EGF-프로브에 대한 HPLC 결과 그래프이며, 도 3d는 EGF와 EGF-프로브의 혼합물에 대한 HPLC 결과 그래프이다. 상기 신호는 254 nm에서 측정하였다.

[0118] 도 3에 나타난 바와 같이, 제조예 3의 EGF-프로브와 제조예 5의 EGF-전구약물을 먼저 분석 역상-HPLC를 사용하여 분석하였다. EGF(9.95m), C-프로브(제조예 2)(11.53m), EGF-프로브(제조예 3)(12.07m)인 것으로 확인되었다. 이러한 결과를 통해 EGF와 C-프로브의 결합에 의해 EGF-프로브가 성공적으로 합성되었음을 확인하였다.

[0119] 도 4는 HPLC 결과를 나타낸 그래프로, 도 4a는 EGF에 관한 HPLC 결과 그래프이고, 도 4b는 제조예 4의 C-전구약물에 대한 HPLC 결과 그래프이며, 도 4c는 제조예 5의 EGF-전구약물에 대한 HPLC 결과 그래프이며, 도 4d는 EGF와 EGF-전구약물의 혼합물에 대한 HPLC 결과 그래프이다. 상기 신호는 254 nm에서 측정하였다.

[0120] 도 4에 나타난 바와 같이, EGF, C-전구약물(10.28m) 및 EGF-전구약물(11.31m)이 확인되었고, 이 역시 C-전구약물과 EGF가 성공적으로 결합을 형성함을 확인하였다.

[0121] 도 5는 C-전구약물의 질량 스펙트럼으로, 이에 따라 C-전구약물의 분자량을 확인하였다.

[0122] **실험예 2. EGF-전구약물, EGF-프로브의 특성 분석-2**

[0123] UV-가시광 흡수 스펙트럼은 spectrophotometer을 사용하여 얻었다. 발광방출 스펙트럼(Photoluminescence

emission spectra)은 spectrofluorometer을 통해 얻었다. 상대적인 광발광 양자효율(The relative photoluminescence quantum efficiency)(PLQY)은 PBS 하에서 DOX((Φ_F) of 0.04) 및 시아닌-5.5((Φ_F) of 0.23)를 사용하여 측정하였다. PBS 하에서 제조예 3의 EGF-프로브와 제조예 5의 EGF-전구약물의 크기 분포는 Zetasizer Nano ZS(Malvern Panalytical, Malvern, UK)를 사용하여 DLS(dynamic light scattering)를 분석하였다.

[0124] 제조예 3의 EGF-프로브와 제조예 5의 EGF-전구약물의 리소좀 효소-특이적 절단 기능을 평가하기 위하여, PBS 하에서 다양한 농도의 파파인 효소와 함께 37 ℃, 1시간동안 배양하였다. 분광계(Spectrophometer), 분광형광계(spectrofluorometer) 및 IVIS 형광 이미징(IVIS fluorescence imaging)(Lumina series Ⅲ, Perkin Elmer, MA, USA)을 사용하여 제조예 3의 EGF-프로브의 퀀칭 및 디퀀칭 능력을 측정하였다. 또한 분석용 역상-HPLC를 사용하여 제조예 5의 EGF-전구약물의 절단 프로파일을 수득하였다.

[0125] 도 6은 EGF-프로브와 EGF-전구약물의 특성을 분석한 결과로, 도 6a는 EGF-프로브의 크기분포이고, 도 6b는 EGF-프로브의 형광 세기이며, 도 6c는 다양한 농도의 파파인 존재하에서 EGF-프로브의 농도별 광발광 양자효율(PLQY)이며, 도 6d는 EGF-전구약물의 크기분포이며, 도 6e는 EGF-전구약물, DOX, G-DOX, EGF에 대한 HPLC 크로마토그램이며, 도 6f는 다양한 농도의 파파인 존재하에서 EGF-전구약물의 HPLC 크로마토그램이다.

[0126] 도 6a에 나타난 바와 같이, 동적광산란(DLS)에 의해 EGF-프로브의 크기 분포를 측정한 결과, EGF-프로브의 평균 유체 역학적 크기는 75.25 ± 17.09 nm인 것으로 확인되었다.

[0127] 도 6b 및 도 6c에서와 같이 EGF-프로브을 다양한 농도의 파파인과 함께 37 ℃에서 1 시간 동안 처리하였다. EGF-프로브의 정량적 형광측정 및 광발광 양자효율(PLQY)은 0.1 U/mL까지 증가된 신호 강도 및 PLQY를 갖는 것으로 확인되었다.

[0128] 도 6d에 나타난 바와 같이 EGF-전구약물의 평균 크기는 88.97 ± 10.62 nm인 것으로 확인되었다.

[0129] 도 6e 및 도 6f에 나타난 바와 같이 EGF-전구약물로부터 절단된 G-DOX의 HPLC 피크를 정의하기 위해, 우리는 EGF-전구약물, DOX, G-DOX 및 EGF의 HPLC 피크를 추가로 분석하였다. EGF-전구약물의 절단된 형태는 G-DOX임을 확인하였고, 파파인(1 U/mL)으로 1 시간 처리한 결과, EGF-전구약물은 G-DOX로 100% 절단됨을 확인하였다.

[0130] **실험예 3. 생체 외에서(in vitro), EGF-프로브의 세포 흡수성(uptake)과 형광 활성 평가**

[0131] HCT-15, HT-29, Lovo 및 HCT-8(Human colorectal adenocarcinoma cell lines)는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank)(Seoul, Republic of Korea)로부터 얻었고, 10% 태아소혈청(FBS; Fetal Bovine Serum)(GenDEPOT) 및 1% 항생체(Antibiotics)(streptomycin, 100U/mL penicillin)(GenDEPOT)을 포함하는 RPMI 1640 배지(GenDEPOT, TX, USA)에서 배양하였다.

[0132] 생체 외에서(in vitro)에서 형광이미지를 얻기 위해, HCT-15 세포(3×10^5 cells/dish)를 35 ㎜ 공초점 배양접시에 분주하고, 밤새 배양하였다. 다음날 세포에 제조예 3의 EGF-프로브(10 ㎍/㎖)를 처리하고, 4 시간동안 반응시켰다. 리소좀을 염색하기 위해서, EGF-프로브를 제거하기 전에 lysotracker green(1 μM)을 1 시간동안 처리하였다. 실험이 완료된 세포를 PBS로 3번 세척하고, 4% 파라포름알데히드로 고정한 후, TCS SP8 공초점 레이저 현미경(Leica, Wetzlar, Germany)으로 관찰하였다. Cy5.5와 lysotracker green의 형광 프로파일(Fluorescence profiles)은 LasX 소프트웨어로 얻었다. EGFR-기반의 엔도시토시스(endocytosis)와 EGF-프로브의 리소좀 특이적 형광 회복을 평가하기 위해, 세포는 세툭시맙(Cetuximab) 1 mg/mL 또는 Bafilomycin A1(BafA) 1 nM로 공처리(co-treated)하였다. 배양 4시간 후에, 세포 핵을 DAPI로 염색하고, 공초점 현미경으로 관찰하였다. 유세포 분석기는 Guava easyCyte HT 유세포 분석기(Millipore, MA, USA)를 사용하였고, 데이터는 FlowJo 소프트웨어로 분석하였다. 다양한 결장 직장암 세포에서의 형광 회수 효율을 비교하기 위해, HCT-15, HT29, Lovo 및 HCT-8 세포를 공초점 접시 또는 24-웰 플레이트에 분주하고 4 시간 동안 EGF-프로브로 처리하였다. 공초점 현미경을 사용하여 4 개의 상이한 암 세포의 형광 이미지를 획득하였다. 형광 강도의 정량화를 위해, 세포를 RIPA 완충제로 용해시키고, 그의 전체 세포 용 해물을 IVIS 형광 영상화를 위해 96-웰 블랙 플레이트로 옮겼다. 660 nm의 여기파장 710 nm 하에서 이미지를 획득하였다. 각 웰의 형광강도는 Living Image 소프트웨어를 사용하여 측정하였다.

[0133] **실험예 3. 생체 외에서(in vitro), EGF-전구약물의 형광 이미징 분석**

[0134] 제조예 5로부터 제조된 EGF-전구약물이 세포 내에서 어떻게 작용하는지 실시간으로 확인하기 위하여, HCT-15 세포를 10 μM EGF- 전구약물로 처리하고, 0.5 시간, 4 시간 및 24 시간이 지난 후, 각 세포를 공초점 현미경으로

분석하였다. EGF-전구약물을 함유하는 세포 배지를 제거하기 0.5 시간 전에 Lysotracker green을 첨가하였다. 즉, 전처리 0.5 시간에 관찰을 위해, EGF-전구약물 및 Lysotracker green을 HCT-15 세포에 동시에 처리하였다. 다른 시점에서, 세포를 세척하고 4% 파라포름알데히드로 고정시켰다. 다음으로, EGFR을 표지하기 위해 면역세포화학(immunocytochemistry)을 수행하였다. 고정된 세포를 1 시간 동안 1%(w/v) 소혈청알부민으로 차단한 다음, 실온에서 2 시간 동안 항-EGFR 항체와 함께 배양하였다. 집중세척한 후, Alexa Fluor 647이 접합된 염소 항-토끼 IgG 2 차 항체를 실온에서 1 시간 동안 적용하였다. 핵을 DAPI로 염색하고 공초점 현미경으로 세포를 관찰하였다. DOX의 세포 내 위치는 Image J 소프트웨어를 사용하여 정량적으로 분석하였다. EGFR 또는 리소좀 활성의 억제시 EGF-전구약물의 세포 내 활동을 평가하기 위해, HCT-15 세포를 각각 세툭시맙(1 mg / mL) 또는 BafA(1 nM)로 처리하였다. 4 시간 및 24 시간 후에 형광 이미지를 수득하였다. 다양한 결장 직장암 세포에서 EGF-전구약물의 리소좀 국소화를 비교하기 위해, HCT-15, HT29, Lovo 및 HCT-8 세포를 EGF-전구약물(10 μM) 및 Lysotracker(1 μM)으로 처리하고 4 시간이 흘린 뒤, 공초점 현미경으로 관찰하였다. 다음 HGF-15, HT29, Lovo 및 HCT-8 세포에서 EGF-전구약물로부터 절단된 DOX의 핵 전위는 EGF-전구약물을 처리하고 24 시간이 지난 후, 측정하였다.

[0135] 도 7은 생체내 및 생체외에서 자가-퀜칭된 EGF-프로브의 시간 또는 특이적 형광회복을 관찰한 것으로, 도 7a는 EGF-프로브를 4시간동안 처리한 후, HCT-15 결장 직장암 세포에서 리소좀(초록)과 EGF-프로브로부터 Cy5.5 형광(적색) 회복의 공동 국소화를 관찰한 것으로, 리소좀은 lysotracker green으로 염색하였다. Cy5.5, 리조솜의 형광 세기 프로필(오른쪽)은 공초점 현미경 이미지(왼쪽)에서 지시된 라인에서 결정되었다. 바 = 50 μm.

[0136] 구체적으로 EGF-프로브가 시험 관내에서 세포 내재화 및 형광 회복 기능을 갖는지를 평가하였다. 소광된(dark-quenched) EGF-프로브가 파파인을 첨가한 후, 신속하게 Cy5.5 형광을 회복할 수 있음을 확인하였고, 이어서 EGF-프로브가 세포 리소좀 내에서도 탈 소광할 수 있는지 여부를 조사하였다. 이를 위해 HCT-15 인간 결장 직장암 세포에 EGF-프로브를 처리하고, 4 시간 배양하였다. 동시에, Lysotracker green을 사용하여 리소좀을 염색하였다. 다음, 공초점 현미경으로 관찰하였다.

[0137] 도 7a에 나타난 바와 같이, EGF-프로브는 HCT-15 세포에서 강한 Cy5.5 형광을 나타내었다. 이러한 많은 형광신호는 리소좀 신호와 겹치는 것을 알 수 있다.

[0138] 도 7b는 HCT-15 세포에 EGF-프로브와 세툭시맙(EGFR 억제제) 또는 EGF-프로브와 BafA(리소좀 억제제)를 처리하였을 때, 이를 공초점 현미경으로 촬영한 사진이다(DAPI는 핵, 바 = 50 ㎛).

[0139] 도 7b에 나타난 바와 같이, Cy5.5와 리소좀 사이의 높은 수준의 공동-국소화는 형광세기 분석을 통해 확인되었다. EGF-프로브의 EGFR-매개 세포 흡수를 조사하고자, HCT-15 세포에 EGFR를 차단할 수 있는 항-EGFR 항체인 세툭시맙(0.5 mg/mL)을 처리하였다. 세툭시맙은 EGFR 리간드의 결합을 차단하여, EGF-기반 나노입자의 EGFR-매개 흡수를 평가하는데 사용된다.

[0140] 또한, EGF-프로브의 형광 탈소광(de-quenched)이 암 세포의 리소좀 활성에 의존하는지 여부를 확인하기 위하여, 세포에 10 nM의 바필로마이신 A1(BafA)과 vacuolar type H(+)-ATPase의 특이적 억제제를 동시처리하였다. BafA의 처리는 리소좀 내 pH를 증가시켜서 리소좀 분해를 억제할 수 있다. 몇몇 리소좀 효소는 산성 pH에서 최대 활성을 나타낼 수 있다. 가수 분해 효소 및 카텝신 B와 같은 리소좀 효소는 최적 pH 조건이 4.5 내지 5.5이며, 신경 pH 조건에서는 활성을 잃는 것으로 알려져 있다.

[0141] 도 7c는 HCT-15 세포에 EGF-프로브와 세툭시맙(EGFR 억제제) 또는 EGF-프로브와 BafA(리소좀 억제제)를 처리하였을 때, 이를 유세포 분석한 결과이다.

[0142] 도 7c에 나타난 바와 같이 공초점 현미경 이미지를 살펴보면 EGF-프로브와 함께 세툭시맙 또는 BafA를 공동처리하였을 때, Cy5.5 형광신호가 현저하게 감소되었다. 유세포 분석(Flow cytometric analysis) 결과에 따르면, 세툭시맙과 BafA를 처리한 군에서 형광이 크게 감소함을 알 수 있다.

[0143] 도 8은 C-프로브 또는 EGF-프로브(10 μg/ml)를 2 시간 처리한 HCT-15 세포에 대한 공초점 현미경 이미지이다.

[0144] 도 8에 나타난 바와 같이, EGF를 함유하지 않은 C-프로브와 비교하여, EGF-프로브는 HCT-15 세포에서 향상된 형광신호를 나타내었다. 이를 통해 EGF 리간드의 도입이 EGFR가 발현된 결장 직장암 세포 내로도 효과적으로 침투할 수 있음을 알 수 있다.

[0145] **실험예 4. EGF-프로브 및 EGF-전구약물의 형광 이미징 분석**

[0146] 살아있는 동물에 대한 모든 실험은 한국과학기술연구원(KIST)의 기관 동물관리 및 사용위원회(IACUC)의 관련 법

률 및 제도 지침에 따라 수행되었으며, IACUC에 의해 실험을 승인받았습니다(2019-092 승인).

[0147] HCT-15, HT29, Lovo 또는 HCT-8 종양을 갖는 마우스에서 정맥 내로 투여된 EGF-프로브의 생체 분포를 평가하였다. 가장 먼저 종양을 발생시키기 위해 6 주령 Balb/c- 누드 마우스(Nara-Biotec, Gyeonggi-do, Korea)를 준비하고, 여기에 상기 각 세포를 2 × 10^6 cell/마우스의 농도로 누드 마우스 우측 옆구리에 피하 접종하였다. 종양 부피가 ~ 150 mm^3에 도달하면, 마우스는 꼬리 정맥 주사에 의해 EGF-프로브(5 mg/kg)를 처리하였다. EGF-프로브를 투여한지 24 시간이 지나면, 마우스를 형광 IVIS 이미징 시스템으로 이미지화하였다. 종양 특이적 영상화를 위해 EGF-Cy5.5, C-프로브 및 EGF-프로브의 타당성을 비교하고자 하였고, HCT-15 종양 보유 마우스에 EGF-Cy5.5, C-프로브 또는 EGF-프로브를 정맥 내 주사하였다. 투여하고 24 시간이 지난 후, IVIS 형광 이미징 실험을 수행하였다. 주요 기관 및 종양을 수득하고 IVIS 영상 시스템으로 영상화하였다. 기관 및 종양에서의 형광 강도를 Living Image 2.50 소프트웨어로 분석하였다. 수집된 종양 조직을 OCT 화합물에 봉입하고, Cy5.5 형광의 관찰을 위해 냉동 절편화하였다. 종양 조직 섹션을 DAPI로 카운터-염색하고 공초점 현미경으로 시각화하였다.

[0148] 또한, DOX, C-전구약물 및 EGF-전구약물의 종양 표적화 능력을 비교하였다. 간략하게, DOX, C-전구약물 또는 EGF-전구약물을 HCT-15 종양 보유 마우스에 정맥 내 주사하고, 6 시간이 지난 후에 이미지화하였다. EGF-전구약물의 종양-특이적 축적을 확인하기 위하여, HCT-15- 및 HCT-8-보유 마우스를 사용하였고, 이는 앞서 언급한 바와 동일하게 수행하였다.

[0149] 도 7d는 EGF-Cy5.5, C-프로브 또는 EGF-프로브를 HCT-15-함유 마우스의 정맥 내에 투여한 후, 24 시간이 지났을 때, IVIS로 영상화한 이미지이다. 검은색 화살표는 HCT-15 종양세포를 나타난대. 이에 따르면, HCT-15-함유 마우스에 EGF-Cy5.5, C-프로브 또는 EGF-프로브(5 mg/kg)를 주사한 후, 24 시간이 지났을 때, 생체 내 형광을 영상화한 결과, EGF-Cy5.5는 종양부위에서 강한 형광 신호를 나타내지만, C-프로브 및 EGF-프로브와 비교하여 신체 전체에 비특이적 배경신호가 관찰되는 것을 확인하였다.

[0150] 도 7e는 EGF-Cy5.5, C-프로브 또는 EGF-프로브를 HCT-15-함유 마우스의 정맥 내에 투여한 후, 24 시간이 지났을 때, 각종 장기에 대한 형광이미지이다(H는 심장이고, Lu는 폐이며, Li는 간이며, SP는 비장이고, Ki는 신장, Tu는 종양이다). 도 7f는 EGF-Cy5.5, C-프로브 또는 EGF-프로브가 처리된 HCT-15-함유 마우스로부터 수집된 각종 장기의 형광세기를 정량적으로 나타낸 그래프(왼쪽)와 종양의 형광강도를 총 장기의 형광강도의 합으로 나누어 나타낸 그래프(오른쪽)이다. n은 그룹당 동물 3마리, ns는 유의성이 없음을 나타낸다. **P < 0.01 and ***P < 0.001.

[0151] 형광 스위칭 시스템과 EGF 리간드의 존재로 인해, EGF-프로브는 정확하고 분명하게 형광신호가 관찰되었고, 배경신호는 가장 낮은 것을 확인하였으므로, 종양-특이적 형광 신호를 나타내는 것으로 확인되었다. EGF-Cy5.5-, C-프로브 또는 EGF-프로브로 처리된 마우스로부터 수집된 주요 생체 장기의 형광신호를 관찰한 결과, EGF-프로브는 종양에서 EGF-Cy5.5에 필적하는 높은 형광 강도를 나타내지만, 폐, 간 및 비장 등 외부 장기에 대해서는 형광 신호가 거의 검출되지 낳았다. 종양-특이적 영상화를 위한 EGF-Cy5.5, C-프로브 또는 EGF-프로브의 능력을 확인하기 위해, 종양의 형광 강도를 모든 주요 기관의 형광 강도의 합으로 나누었다. EGF-프로브는 각각 EGF-Cy5.5 및 C-프로브에 비해 2.8 배 및 3.3 배 증가된 종양-특이 적 형광 강도 비율을 갖고 있는 것으로 확인되었다.

[0152] 도 7g는 GF-Cy5.5, C-프로브 또는 EGF-프로브를 투여한 마우스로부터 회수된 종양조직의 형광이미지이다. 바 = 50 μm.

[0153] 도 7g에 나타난 바와 같이, EGF-Cy5.5 및 EGF-프로브를 처리한 경우 명확하게 종양 조직이 관찰되는 반면, C-프로브는 EGF-Cy5.5 및 EGF-프로브보다 훨씬 형광신호가 낮게 잡히는 것을 확인할 수 있었다.

[0154] 상술한 실험결과를 종합하면, 암세포에 대한 EGF-프로브의 내재화가 EGFR에 의해 매개되며, 내재화된 EGF-프로브는 형광 탈소광이 리소좀 특히, 리소좀 효소에 의해 유도된다는 것을 확인하였다. EGF 리간드의 결합(conjugation)을 통해 종양 표적화 효율이 크게 향상되며, 이는 배경 신호를 현저히 감소시킴으로써 정확하고 특이적으로 종양세포를 이미징할 수 있다.

[0155] 도 9는 EGF-전구약물로부터 OXFR-매개 세포내 이입 및 DOX가 리소좀 특이적으로 절단되는지 확인하고자 하였다. 도 9a는 EGF-전구약물을 HCT-15 세포에 처리한 후, DOX(적색)를 시간별로 측정한 이미지이다. EGF-전구약물을 제거하기 전에 리소좀(녹색)을 30분동안 염색하였고, EGFR은 회색, 리소좀은 녹색, 핵은 파란색 화살표를 의미한다. 바 = 20 μm.

[0156] 도 9a에 나타난 바와 같이, EGF-전구약물은 EGF-프로브와 달리, 리소좀에서 소광한 후, 형광검출이 가능하고, EGF-전구약물는 DOX로 지속적으로 전환된다. EGFR가 발현되는 결장 직장암 세포에서 EGF-전구약물의 세포 내 운명을 결정하기 위해, EGF-전구약물과 세포 간 처리 후0.5 시간, 4 시간 및 24 시간에 HCT-15 세포의 공 초점 현미경 이미지를 획득하였다.

[0157] 도 9b는 EGF-전구약물(N은 핵, E는 EGFR 및 L은 리소좀이다)을 처리하고, 0.5 시간, 4 시간 및 24 시간에 DOX에 대한 세포위치를 분석하여 나타낸 그래프이다. 바 = 20 μm이다.

[0158] 도 9b에 나타난 바와 같이, EGF-전구약물을 처리하고, EGF-전구약물은 EGFR에 결합하는 능력이 있음을 분명히 확인하였다. 4시간이 지난 후에는 EGF-전구약물의 세포 내재화 및 리소좀 국소화를 확인할 수 있다. EGF-전구약물은 리소좀에 존재하는 리소좀 효소로 인해 DOX로 절단될 수 있고, 이에 따른 DOX의 형광신호는 시간이 경과함에 따라 세포핵에서 명확하게 관찰되었다.

[0159] 도 9c는 HCT-15 세포에 세툭시맙 또는 BafA와 함께 EGF-전구약물을 처리하고, 4 시간 및 24 시간이 지난다음, 형광현미경으로 촬영한 사진이다. 바 = 50 μm.

[0160] 앞서 실험을 통해 EGFR을 매개로 유도되는 세포내 이입, 리소좀 효소에 의해 유도되는 DOX 방출 등의 효과가 있음을 확인하였다.

[0161] 도 9c에 나타난 바와 같이, EGFR을 매개로 유도되는 세포내 이입, 리소좀 효소에 의해 유도되는 DOX 방출 등의 효과가 있음을 확인하였다. 세툭시맙 및 BafA를 각각 사용하여 EGFR 및 리소좀 활성을 억제하였을 때의 EGF-전구약물 매카니즘을 추가로 평가하고자 하였다.

[0162] EGF-프로브와 유사하게, EGFR의 차단은 EGF-전구약물의 흡수를 실질적으로 감소시켰다. BafA의 처리에 의한 리소좀 활성의 억제는 EGF-전구약물의 세포 흡수에 영향을 미치지 않았지만, DOX의 핵 전위는 크게 감소하였다.

[0163] **실험예 5. EGF-전구약물의 시험 관내 독성 시험**

[0164] 제조예 5의 EGF-전구약물이 갖는 세포 독성을 확인하고자 하였다. 또한 EGF-전구약물에 의해 BafA 감쇠와 세포 독성이 야기되는지도 조사하였다. 우선 HCT-15 세포를 5 × 10^3 cell/well의 밀도로 96-웰 플레이트에 분주하였다. 이어서, 세포를 0-100 μM의 EGF-전구약물과 0-1 μM과 함께 배양하였다. 48 시간 후, 세포 배지를 제거하고 세포계수키트-8(CCK-8)(Dojindo, Japan)을 37 ℃에서 1 시간 동안 처리하였다. VERSAmaxTM 마이크로플레이트 리더(Molecular Devices Corp., CA, USA)를 사용하여 450 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 각각의 실험 그룹(n = 5)에 대한 세포 생존율은 정상세포(대조군)(untreated cell)의 백분율로서 결정되었다. 4 개의 상이한 결장 직장암 세포주에서 EGF-전구약물 및 DOX의 세포 독성을 비교하기 위해, HCT-15, HT29, Lovo 및 HCT-8 세포를 0.001-50 μM의 EGF-전구약물 또는 DOX와 함께 37 ℃에서 48 시간 동안 배양하였다. 세포 배지를 제거하고 세포 생존력의 평가를 위해 CCK-8 분석을 수행 하였다.

[0165] 도 9d는 HCT-15 세포에 EGF-전구약물(0, 10 및 100 μM) 또는 BafA(0, 0.1 및 1 nM)을 다양한 농도로 처리하였을 때, 세포 독성을 측정하여 나타낸 그래프이다. n = 5, * P <0.05 및 *** P <0.001.

[0166] 도 9d에 나타난 바와 같이, EGF-전구약물은 BafA와 공동처리하면 세포 생존율이 농도별로 점차 증가함을 알 수 있다. 리소좀의 활성을 억제시키면 EGF-전구약물의 DOX 방출이 억제되고, EGF-전구약물의 암세포에 대한 독성을 상당히 약화시킬 수 있음을 알 수 있다.

[0167] **실험예 5. 웨스턴 블롯 분석**

[0168] 웨스턴 블롯 분석에 의해 AKT 및 ERK1/2의 인산화를 측정하였다. HCT-15 세포를 5 × 10^5 cell/sell의 밀도로 6-웰 플레이트에 분주하였다. 안정화 후, 세포를 동일한 농도의 EGF(50 ng/mL)에서 20 분 동안 EGF, EGF-프로브 또는 EGF-전구약물로 처리하였다. 세포를 PBS로 즉시 세척하고, 프로테아제/포스파타제 억제제 칵테일이 보충된 RIPA 완충제를 사용하여 총 세포 용해물을 수집 하였다. 얼음에서 1 시간 동안 배양한 후, 용해물을 14,000 g에서 20 분 동안 원심분리하였다. 원심분리 후, 상청액을 수집하고 단백질 농도의 측정을 위해 BCA 분석을 수행하였다. 단백질을 8%(w/v) SDS- 폴리아크릴아미드 겔에 로딩하였다. 80V에서 100 분의 전기영동 후, 단백질을 25-V에서 30 분 동안 트랜스-블롯(Trans-Blot)㉾ 터보 전달 시스템을 사용하여 니트로셀룰로오스 막(Bio-Rad, Ca, USA)으로 옮겼다. 이어서, 막을 2 시간 동안 5%(w/v) 탈지유를 사용하여 차단하고, 4 ℃에서 16 시간 동안 1 차 항체로 프로브하였다. 이어서, 블롯을 TBS-T로 집중적으로 세척한 후, HRP-연결된 염소 항-토끼 이차항체 또는 HRP-연결된 말 항-마우스 이차항체와 함께 실온에서 1 시간 동안 배양하였다. 포획된 단백질은 화학 발광 검출

시스템을 사용하여 측정하였고, iBright FL1000 이미징 시스템(Invitrogen, CA, USA)으로 관찰하였다.

[0169] 도 10은 HCT-15, HT29, LoVo 및 HCT-8 세포에서의 EGFR 발현 수준을 웨스턴 블롯으로 측정하여 나타낸 결과이다(n=3). 도 10에 나타난 바와 같이, HCT-15, HT29, LoVo 및 HCT-8 세포에서 EGFR 발현 수준을 측정한 결과, Lovo 세포에서 EGFR의 발현이 가장 높았고, HCT-15 및 HCT-8 세포는 EGFR 발현수준이 중간정도였으며, HT29 세포에서는 EGFR의 발현수준이 가장 낮은 수준이였다.

[0170] 도 11은 HCT-15, HT29, LoVo 및 HCT-8 세포에 EGF-프로브의 형광 회복과 EGF-전구약물의 세포독성 사이의 관련성을 확인하고자 한 것이다. 도 11a는 HCT-15, HT29, LoVo 및 HCT-8 세포에 EGF-프로브를 처리하고 4시간이 지난 후 촬영한 형광 이미지이다. 바 = 50 μm.

[0171] 도 11a에 나타난 바와 같이, HCT-15, HT29, LoVo 및 HCT-8 세포 중에서 EGFR의 발현수준이 가장 낮거나, 가장 높은 LoVo와 HCT-8 세포에서는 EGF-프로브가 희미하게 관찰되었고, 나머지 세포에서는 EGF-프로브가 뚜렷한 형광신호를 제공하였다.

[0172] 도 11b는 HCT-15, HT29, LoVo 및 HCT-8 세포에 다양한 농도의 EGF-프로브를 처리하고 얻은 세포용해물의 IVIS 형광이미지(상부)와 형광신호를 정량적으로 측정하여 나타낸 그래프(하부)이다. n=3, *** P<0.001.

[0173] 도 11b에 나타난 바와 같이, HCT-15, HT29, LoVo 및 HCT-8 세포의 총 세포용해물을 IVIS로 형광신호를 영상화하고, 형광세기를 측정하여 도시하였다. 살펴보면, HCT-15 및 HT29 세포는 강한 형광신호를 나타내었으나, Lovo 및 HCT-8 세포는 낮은 수준의 형광신호를 나타내었다. EGF-프로브의 세포 내재화가 EGFR에 의해 매개되기 때문에 EGF-프로브는 EGFR 발현 수준이 높은 세포에서 높을 것이라고 기대했으나, 실제로는 EGFR 발현 수준과 EGF-프로브의 형광신호 강도는 유의한 상관관계를 나타내지 않은 것으로 확인되었다.

[0174] 또한, EGF-프로브의 농도가 높아질수록 검출강도도 증가함을 알 수 있다. 즉, 모든 종양세포에 우수한 검출특성을 갖도록 하기 위해서는 EGF-프로브는 20 ㎍/ml 첨가되는 것이 가장 바람직한 농도이다.

[0175] 도 11c는 HCT-15, HT29, LoVo 및 HCT-8 세포가 이식된 마우스의 생체 내에 EGF-프로브(5 mg/kg)를 투여하고, 마우스의 생체 내를 IVIS로 측정한 이미지이다. 도 11c의 우측에 있는 그래프는 도 11c의 형광이미지로부터 형광세기를 Living image 소프트웨어를 사용하여 정량적으로 측정하여 나타낸 그래프이다. n= 그룹당 3마리, ** P<0.01 및 P<0.001.

[0176] 도 11c에 나타난 바와 같이, HCT-15, HT29, Lovo 또는 HCT-8 암 세포를 투여한 마우스에, EGF-프로브를 주사하고 24시간이 지난뒤 IVIS 형광 이미지촬영하였다. 그 결과 EGF-프로브는 마우스의 종양 부위에서 상당히 높은 형광강도를 나타내었고, 종양세포 외에 다른 부분에서는 거의 형광신호가 관찰되지 않음을 확인하였다.

[0177] 도 11d는 HCT-15, HT29, LoVo 및 HCT-8 세포에 EGF-전구약물 및 유리 DOX를 처리하였을 때, 농도에 따른 세포독성을 측정하여 나타낸 그래프이다(n=5). 도 11e는 HCT-15, HT29, LoVo 및 HCT-8 세포에 유리 DOX에 대한 EGF-전구약물의 IC_{50} 비를 나타낸 그래프이다.

[0178] 도 11d 및 도 11e에 나타난 바와 같이, HCT-15, HT29, LoVo 및 HCT-8 세포에 EGF-전구약물(0.1 내지 50 μM의 DOX) 또는 유리 DOX(0.01 내지 50 μM)로 처리하고 이들의 세포 생존율을 측정하였다. EGF-전구약물 및 DOX를 처리하는 농도가 높아질수록 세포독성이 증가함을 확인하였다. EGF-전구약물은 0.1 내지 5 μM의 농도 범위에서 유리 DOX보다 낮은 세포 독성을 나타내었다. 10 μM보다 높은 농도에서는 EGF-전구약물과 DOX는 유사한 세포독성을 나타내었다. EGF-전구약물은 IC_{50} 비가 HCT-15에서 가장 낮았고, HCT-8에서 가장 높음을 확인하였다.

[0179] 4종류의 암세포에서 EGF-프로브의 형광세기와 EGF-전구약물의 세포독성은 서로간 유의한 상관관계가 있음을 확인하였고, EGF-전구약물의 항암 효과의 예측을 위해 EGF-프로브의 타당성을 확인하고자 하였다.

[0180] EGF 리간드의 응용은 EGFR 신호 전달 경로의 활성화하여 암세포를 오히려 자극할 수 있다. 따라서 본 발명에서는 EGF-프로브 또는 EGF-전구약물이 EGFR 및 ERK1/2의 인산화를 유도하는지 여부를 확인하였다.

[0181] 도 12는 PBS(대조군), EGF, EGF-프로브 및 EGF-전구약물(50 ng/ml of EGF)를 HCT-15 세포에 20분동안 처리하고, 이로부터 EGFR과 ERK1/2의 인산화 여부를 측정하였다.

[0182] 도 12에 나타난 바와 같이, 양성 대조군인 EGF(50 ng/ml)와 비교하여, EGF-프로브 또는 EGF-전구약물(50 ng/mL의 EGF)을 처리한 HCT-15 세포에서는 EGFR 및 ERK1/2의 인산화가 증가하지 않았다. 이를 통해 EGF가 접합된 나노담체는 유리 EGF(free EGF)와 달리 EGFR의 활성화없이 대장암 세포로 침투할 수 있음을 알 수 있다.

[0183] **실험예 6. EGF-전구약물의 생체 내 항종양 효과 분석**

[0184] HCT-15 세포 및 HCT-8 세포를 마우스 당 2 x 10^6 세포에서 Balb/c- 누드 마우스에 피하 접종하였다. 종양 부피가 150-200 mm^3에 도달하면, 마우스를 4 개의 그룹으로 무작위로 할당하였다; PBS 주사(대조군), 유리 DOX, C-전구약물 및 EGF-전구약물로 4개의 그룹을 제조하였다. DOX, C-전구약물 및 EGF-전구약물은 DOX를 기준으로 1 mg/kg의 용량으로 주사하였다. 꼬리 정맥 주사는 3 일마다 총 6 회 투여하였다. 항 종양 효과는 HCT-15 또는 HCT-8을 투여한 마우스를 희생하여, 종양조직의 부피를 측정함으로써 평가하였다. 0.53 ㅅ 길이 ㅅ 폭^{2}의 계산으로 매일 또는 2 일마다 종양조직의 부피를 측정하였다. 21 일까지 종양의 성장을 모니터링하였고, 마우스를 희생시킨 다음, HCT-15 또는 HCT-8 종양 조직을 수집하였다. 해부된 종양을 촬영하고, 4% 파라포름알데히드를 처리하여 고정하였다 파라핀에 봉입한 후, 종양조직을 10 μm 두께로 절단하여 절편을 제조하였다. 이어서, 상기 절편을 조직적 또는 병리학적 확인을 위해 사용하였다. 시각화하기 위해 H&E 염색을 수행하였고, 암세포의 세포사멸을 확인하기 위하여, DeadENDTM TUNEL 시스템(Promega, WI, USA)을 사용하여 TUNEL 분석을 수행하였다. BX51 광학 현미경(Olympus, Tokyo, Japan) 및 TCS SP8 공초점 레이저 현미경을 사용하여, H&E 염색과 TUNEL 염색 종양 조직을 관찰하였다.

[0185] 종양세포에서 EGF-프로브의 형광 회복과 EGF-전구약물의 세포 독성사이의 긍정적인 관련성을 살펴보고자 하였다. 앞서 실험을 통해 EGFR의 세포 발현 수준과 EGF-프로브 및 EGF-전구약물은 유의한 상관관계가 없었으므로, HCT-15, HT29, Lovo, HCT-8 세포에서 리소좀 활성 수준을 분석하고자 하였다.

[0186] 도 13은 생체 외(In vitro)에서, 다양한 직장암세포(colorectal cancer cells)에 대한 EGF-전구약물의 매커니즘을 분석하고자 하였다. 도 13a는 HCT-15, HT29, Lovo 및 HCT-8 세포에 EGFR 및 LAMP-1의 세포내 발현수준을 웨스턴 블롯으로 분석하여 나타낸 그래프이다.

[0187] 도 13a에 나타난 바와 같이, 다양한 직장암세포(colorectal cancer cells)에 lysotracker green을 1 시간 동안 처리하고, 유세포 분석을 수행한 결과, HCT-15 및 HT29 세포에서는 lysotracker green의 명확한 히스토그램 이동이 관찰되었으나, Lovo와 HCT-8 세포에서는 유의하지 않은 히스토그램 이동이 관찰되었다.

[0188] 도 13b는 lysotracker green으로 처리한 서로 다른 직장암세포를 유세포분석으로 분석한 결과 그래프이다. 대조군으로 아무것도 처리하지 않은 세포를 사용하였다.

[0189] 도 13b에 나타난 바와 같이, lysotracker green으로 염색된 세포의 수는 HCT-15 및 HT29 세포가 Lovo 및 HCT-8 세포보다 유의적으로 더 높음을 확인하였다.

[0190] 도 13c는 HCT-15, HT29, Lovo 및 HCT-8 세포에 EGF-전구약물을 처리하고 4시간 후에 공초점 현미경으로 촬영한 이미지로, 이는 HCT-15, HT29, Lovo 및 HCT-8 세포에서 EGF-전구약물의 리소좀 국소화 정도를 평가한 것이다. 바 = 10 ㎛. 4 시간 동안 EGF-전구약물로 암 세포를 배양하고 lysotracker green으로 염색한 다음, 공초점 현미경 이미지로 분석하였다.

[0191] 도 13c에 나타난 바와 같이, HCT-15 및 HT29 세포 내에 리소좀과 DOX가 공동-국소화되어 있음을 확인하였다.

[0192] 도 13d는 HCT-15, HT29, Lovo 및 HCT-8 세포에 EGF-전구약물을 처리하고 4시간이 지난 후, 형광 세기를 측정하여 나타낸 그래프로, DOX(적색), 리소좀(초록)에서의 공동-국소화 효율성을 확인하였다. DOX와 리소좀의 형광 세기를 측정한 그래프는 공초점 이미지에서 얻은 것이다. 도 13e는 DOX, 리소좀의 형광강도 사이 관련성을 측정하여 나타낸 그래프로, 빨간색 점선은 선형 회귀선이 적합함을 의미한다. n = 8, #P < 0.05 versus HCT-15, §P < 0.05 versus HT-29.

[0193] 도 13d 및 도 13e에 나타난 바와 같이, HCT-15 및 HT29 세포에서는 높은 수준의 공동-국소화가 나타났으나, Lovo 및 HCT-8 세포에서는 유의하지 않은 공동-국소화가 나타남을 확인하였다. 또한 HCT-15 및 HT29 세포에서 DOX와 리소좀 사이에 강한 선형적 공간상관성(linear spatial correlation)을 나타내었으나, Lovo 및 HCT-8 세포에서는 유의하게 더 나쁜 상관성을 나타내는 것으로 확인되었다. EGF-전구약물의 리소좀 국소화, EGF-전구약물로부터 DOX의 분리는 DOX를 세포 핵으로 이동시키기 위한 필수적인 요소이다.

[0194] 도 13f는 EGF-전구약물을 처리하고 24시간이 지난 HCT-15, HT29, Lovo 및 HCT-8 세포에 대한 형광 이미지로, DOX의 직접적인 국소화를 볼 수 있다. 바 = 50 ㎛. 도 13g는 DAPI(세포 핵)과 함께 DOX 공동-국소화의 비율을 정량적으로 나타낸 그래프이다. n = 5, #P < 0.05 versus HCT-15, §P < 0.05 versus HT-29.

[0195] 도 13f에 나타난 바와 같이, , 본 발명의 EGF-전구약물를 처리하고 24시간이 지난 후, 세포 핵에 축적되는 DOX

의 양을 관찰하였다. 공초점 현미경 이미지는 HCT-15와 HT29의 세포 핵내에서 다량 국소화된 DOX의 형광신호를 확인하였다. 이는 DAPI(핵)과 함께 공동-국소화된 DOX의 정량적 분석에 의해 확인되었는데, 구체적으로 HCT-15 및 HT29에서 91 내지 100%의 공동-국소화가 이루어졌음을 확인할 수 있다. 대조적으로, Lovo 및 HCT-8 세포에서는 세포 핵 내에 DOX 축적이 현저히 감소하였으며, 이는 이들 세포에서 EGF-전구약물의 세포독성이 낮은 원인이라 여겨진다.

[0196] 자기 소광 프로브와 EGF 리간드의 결합에 의해 종양-표적화 능력이 향상됨으로써, EGF 리간드의 도입에 의해 종양 특이적 전구약물의 생체 내 축적도 향상되는지 확인하고자 하였다.

[0197] 도 14는 생체 내에서 EGF-전구약물의 항암 효과와 종양표적화 능력을 평가한 것으로, 도 14a는 DOX(5 mg/kg), C-전구약물(5 mg/kg of DOX) 또는 EGF-전구약물(5 mg/kg of DOX)를 투여하고 6시간이 지난 후, HCT-15 함유 마우스에 대한 IVIS 형광 이미지이다.

[0198] 도 14a에 따르면, C-전구약물 또는 EGF-전구약물(5 mg/kg 용량의 DOX)을 HCT-15 함유 마우스에 정맥으로 투여하고, 6 시간이 지난 후, IVIS 형광 이미지를 획득하였다. 그 결과 EGF-전구약물을 주사한 마우스의 종양 부위에서 가장 강한 형광신호가 관찰됨을 알 수 있다.

[0199] 도 14b는 생체 외(ex vivo)에서, 정맥내 투여된 DOX, C-전구약물 또는 EGF-전구약물(Hsms 심장, Lu는 폐, Li는 간, SP는 비장, Ki는 신장, Tu는 종양)의 분포를 나타낸 형광 이미지이다. 투여하고 24시간 후에 측정하였다.

[0200] 도 14b에 나타난 바와 같이, 생체 외(ex vivo)에서, DOX, C-전구약물 및 EGF-전구약물의 분포를 통해, C-전구약물에 비해 EGF-전구약물이 유의적으로 현저하게 종양조직에 특이적으로 축적되었음을 명백히 확인하였다.

[0201] DOX만을 단독으로 투여한 경우, 종양 조직외에 폐, 간 및 신장에도 현저히 많은 양이 축적되어 있음을 확인하였다. 이에 반해 EGF-전구약물은 종양 조직에 가장 많이 축적되었으며, 나머지 장기에는 비교적 적은 양이 적용되었음을 알 수 있다.

[0202] 도 14c는 장기의 형광세기를 정량적으로 측정하여 나타낸 그래프(좌측)와 모든 장기의 형광 세기의 합으로 나눈 종양의 형광 세기를 계산하여 나타낸 그래프(우측)이다. 각 그룹당 동물의 수는 3마리, *P<0.05, **P<0.01.

[0203] 도 14c에 나타난 바와 같이, EGF-전구약물을 주사한 경우, 종양 특이적 축적이 가장 정확하고 효율적으로 이루어졌음을 확인하였다.

[0204] 도 14d는 DOX, C-전구약물 또는 EGF-전구약물이 투여된 마우스로부터 분리된 종양 조직에 대한 형광 사진이다. 바 = 50 ㎛.

[0205] 도 14d에 나타난 바와 같이, 종양 조직에 대한 조직학적 분석결과, EGF-전구약물이 상당량 종양 조직내에 축적되었음을 알 수 있다.

[0206] 도 14e는 HCT-8 또는 HCT-15 함유된 마우스에 DOX, C-전구약물, EGF-전구약물(1 mg/kg of DOX, 3일마다 6번)을 각각 주사한 후, 21 일 동안 종양크기를 측정하여 나타낸 그래프이다. 대조군은 PBS를 주사한 것을 사용하였다. 각 그룹당 동물의 수는 4마리이다. *P<0.05, **P<0.01.

[0207] 도 14e에 나타난 바와 같이, HCT-8- 또는 HCT-15-함유 마우스에 DOX, C-전구약물 또는 EGF-전구약물을 주사하였다. 이때 DOX, C-전구약물 또는 EGF-전구약물은 3 일마다 6 회 투여하였고, 21 일 동안 종양의 크기를 모니터링한 결과, DOX, C-전구약물 또는 EGF-전구약물을 투여한 후에는 HCT-8-함유 마우스에서 종양의 크기가 유의하게 억제되지 않았다. 그러나, HCT-15-함유 마우스에서 EGF-전구약물을 투여한 경우 대조군, DOX 및 C-전구약물에 비해서는 종양 크기, 종양 성장을 현저히 억제하였음을 확인하였다.

[0208] 도 14f는 PBS, DOX, C-전구약물 또는 EGF-전구약물을 처음 주사하고 24일 째인 HCT-8 또는 HCT-15 함유 마우스로부터 채취한 종양 조직이고, 도 14g는 PBS, DOX, C-전구약물 또는 EGF-전구약물을 처음 주사하고 24일 째인 HCT-8 또는 HCT-15 함유 마우스로부터 채취한 종양 조직을 H&E로 염색한 결과이며, 도 14h는 PBS, DOX, C-전구약물 또는 EGF-전구약물을 처음 주사하고 24일 째인 HCT-8 또는 HCT-15 함유 마우스로부터 채취한 종양 조직을 TUNEL로 염색한 결과이다. 바 = 1 ㎝.

[0209] 도 14f에 나타난 바와 같이, EGF-전구약물은 HCT-15 종양에 대해 매우 우수한 항 종양 효능을 갖는 것으로 확인되었다.

[0210] 도 14g 및 도 14h에 나타난 바와 같이, EGF-전구약물이 투여된 HCT-15 함유 마우스의 종양 조직에서 심각한 세

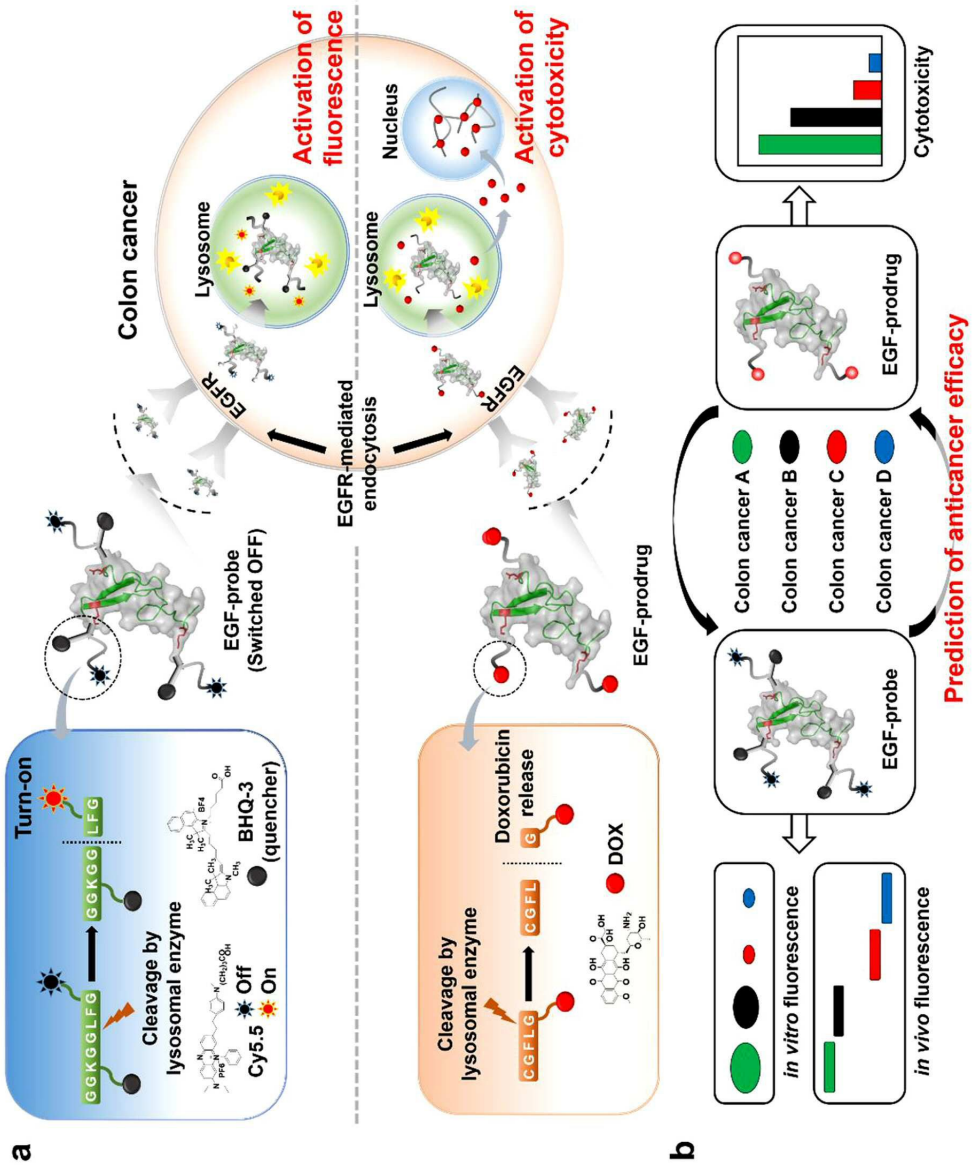
포 사멸이 관찰되고 있음을 알 수 있다.

[0211] 도 15는 생체 내에서, HCT-8 또는 HCT-15 함유 마우스내에서의 EGF-전구약물의 종양 표적화 능력을 분석하고자 한 것으로, 도 15a는 EGF-전구약물(5 mg/kg of DOX)를 처리하고 6시간이 지난, HCT-8 또는 HCT-15 함유 마우스의 IVIS 형광 이미지이고, 도 15b는 생체 외에서, EGF-전구약물의 생체분포 및 정량적 형광세기를 측정하여 나타낸 형광 이미지와 그래프이다. 각 그룹당 동물의 수는 3마리이다. ns는 유의한 의미가 없음을 의미한다.

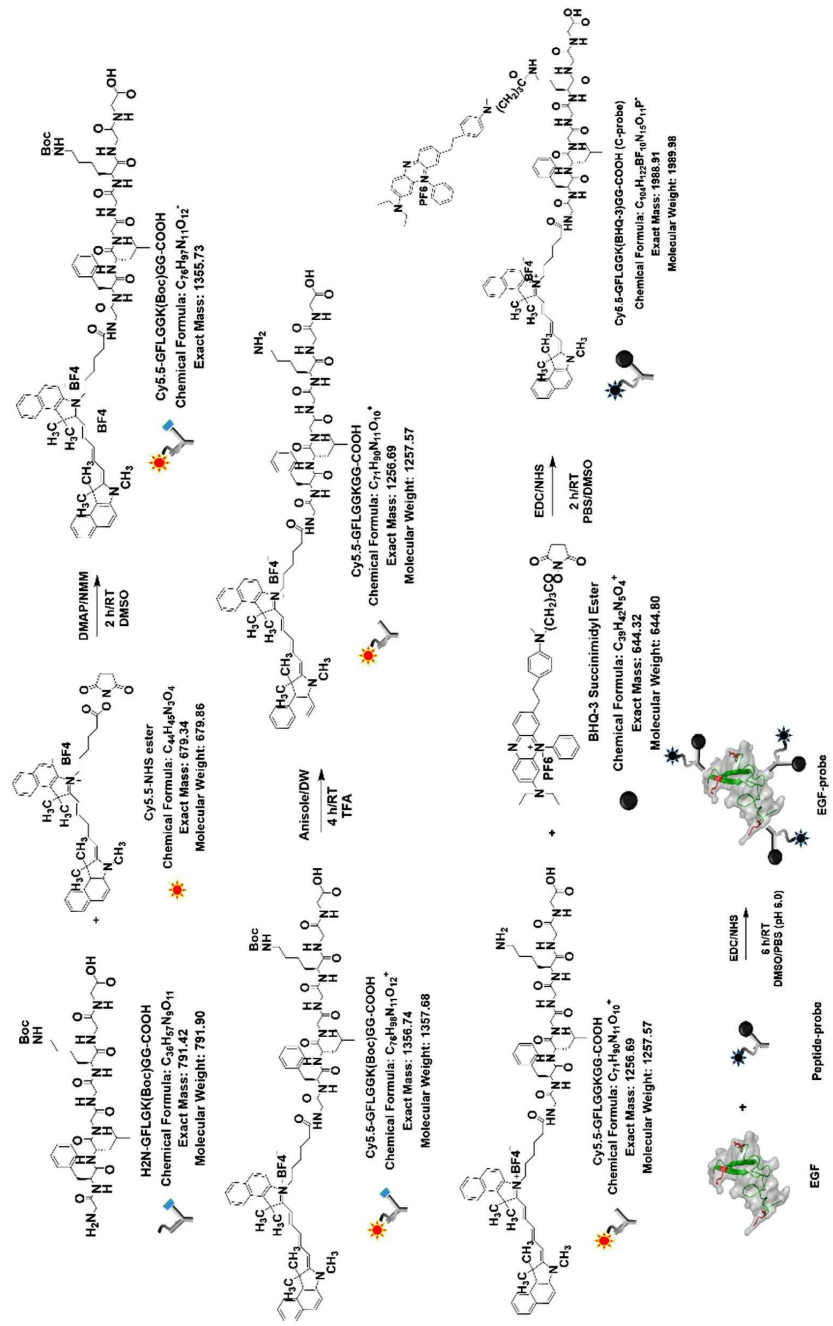
[0212] 도 15에 나타난 바와 같이, 평가 전에, HCT-15 또는 HCT-8 함유 마우스의 종양에 축적된 EGF-전구약물의 양은 유의한 차이가 없음을 확인하였다.

도면

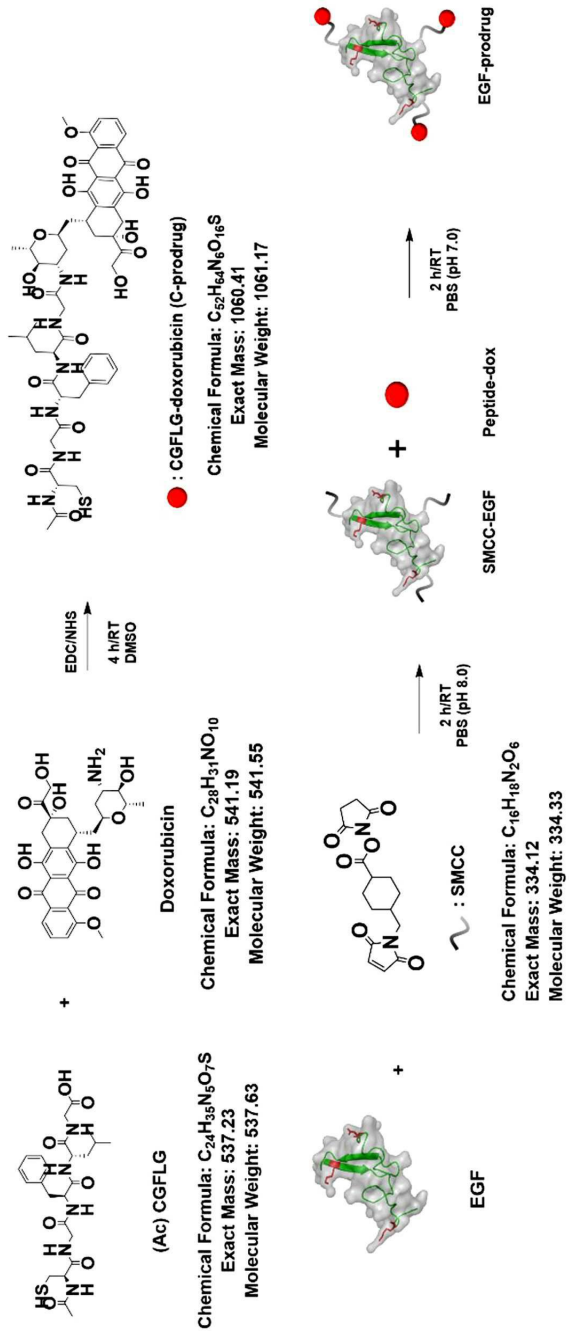
도면1



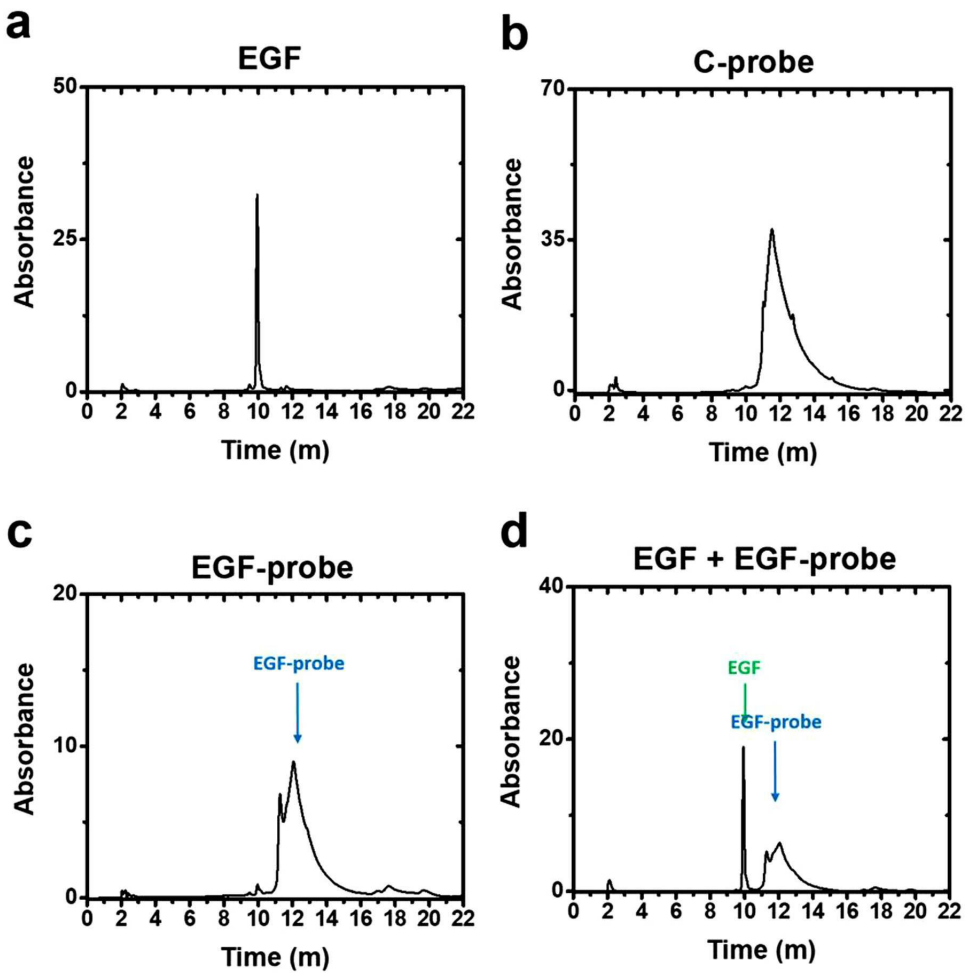
도면2a


H2N-GFLGK(Boc)GG-COOH
Chemical Formula: C38H57N9O11
Exact Mass: 791.42
Molecular Weight: 791.90
DMAP/NMM
2 h/RT
DMSO
Cy5.5-NHS ester
Chemical Formula: C44H48N3O4
Exact Mass: 679.34
Molecular Weight: 679.86
Cy5.5-GFLGGK(Boc)GG-COOH
Chemical Formula: C78H97N11O12+
Exact Mass: 1355.73
Anisole/DW
4 h/RT
TFA
Cy5.5-GFLGGK(Boc)GG-COOH
Chemical Formula: C78H98N11O12+
Exact Mass: 1356.74
Molecular Weight: 1357.68
Cy5.5-GFLGGKGG-COOH
Chemical Formula: C71H90N11O10+
Exact Mass: 1256.69
Molecular Weight: 1257.57
EDC/NHS
6 h/RT
DMSO/PBS (pH 6.0)
EGF
Peptide-probe
EGF-probe
BHQ-3 Succinimidyl Ester
Chemical Formula: C28H42N5O4+
Exact Mass: 644.32
Molecular Weight: 644.80
EDC/NHS
2 h/RT
PBS/DMSO
Cy5.5-GFLGGK(BHQ-3)GG-COOH (C-probe)
Chemical Formula: C99H132BF10N10O17P2+
Exact Mass: 1958.91
Molecular Weight: 1959.98

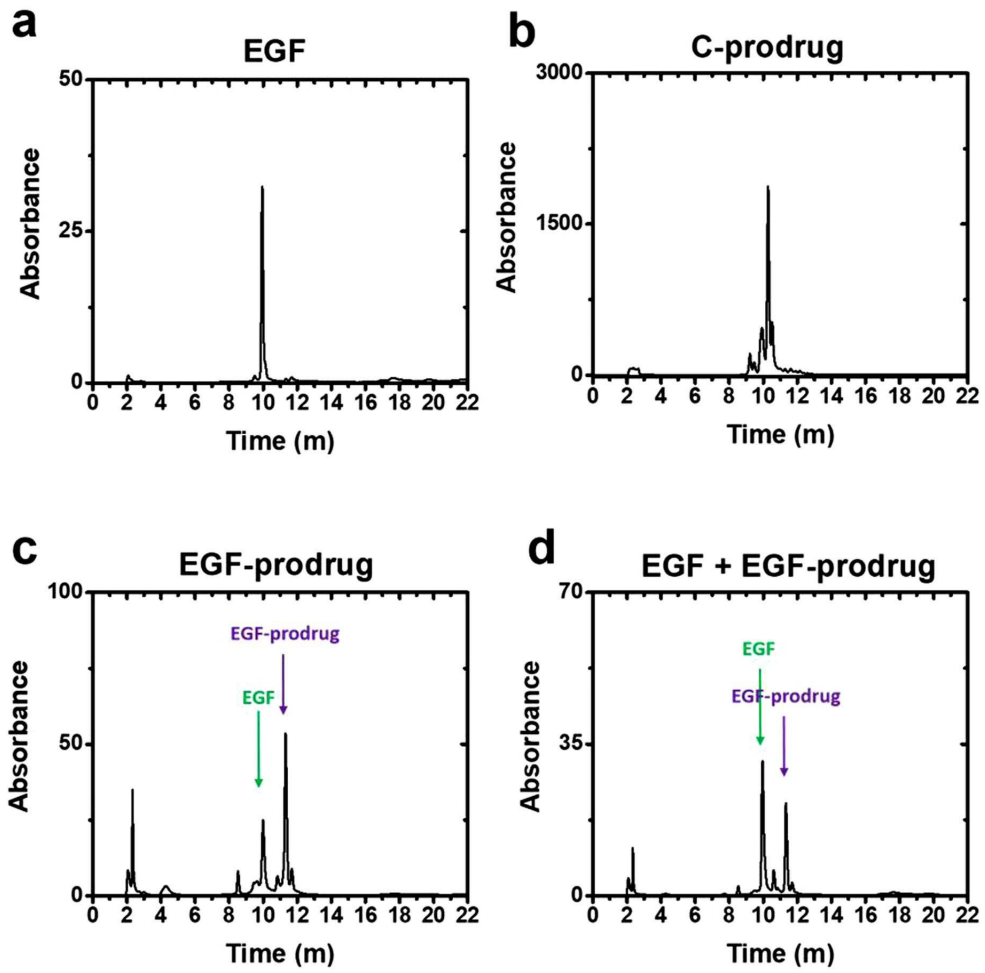
도면2b


(Ac) CGFLG
Chemical Formula: C24H35N5O7S
Exact Mass: 537.23
Molecular Weight: 537.63
Doxorubicin
Chemical Formula: C28H31NO10
Exact Mass: 541.19
Molecular Weight: 541.55
EDC/NHS
4 h/RT
DMSO
: CGFLG-doxorubicin (C-prodrug)
Chemical Formula: C52H64N6O16S
Exact Mass: 1060.41
Molecular Weight: 1061.17
EGF
: SMCC
2 h/RT
PBS (pH 8.0)
Chemical Formula: C16H18N2O6
Exact Mass: 334.12
Molecular Weight: 334.33
SMCC-EGF
Peptide-dox
2 h/RT
PBS (pH 7.0)
EGF-prodrug

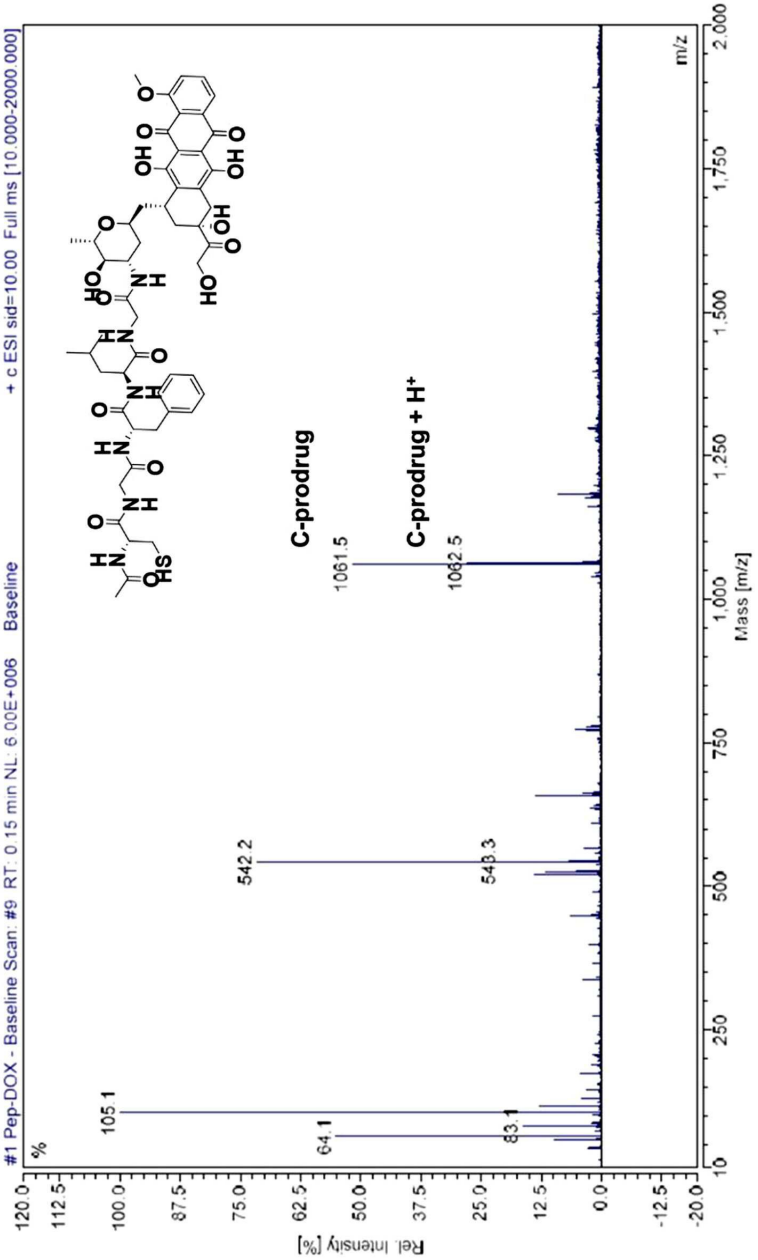
도면3


a
EGF
Absorbance
Time (m)
b
C-probe
Absorbance
Time (m)
c
EGF-probe
EGF-probe
Absorbance
Time (m)
d
EGF + EGF-probe
EGF
EGF-probe
Absorbance
Time (m)

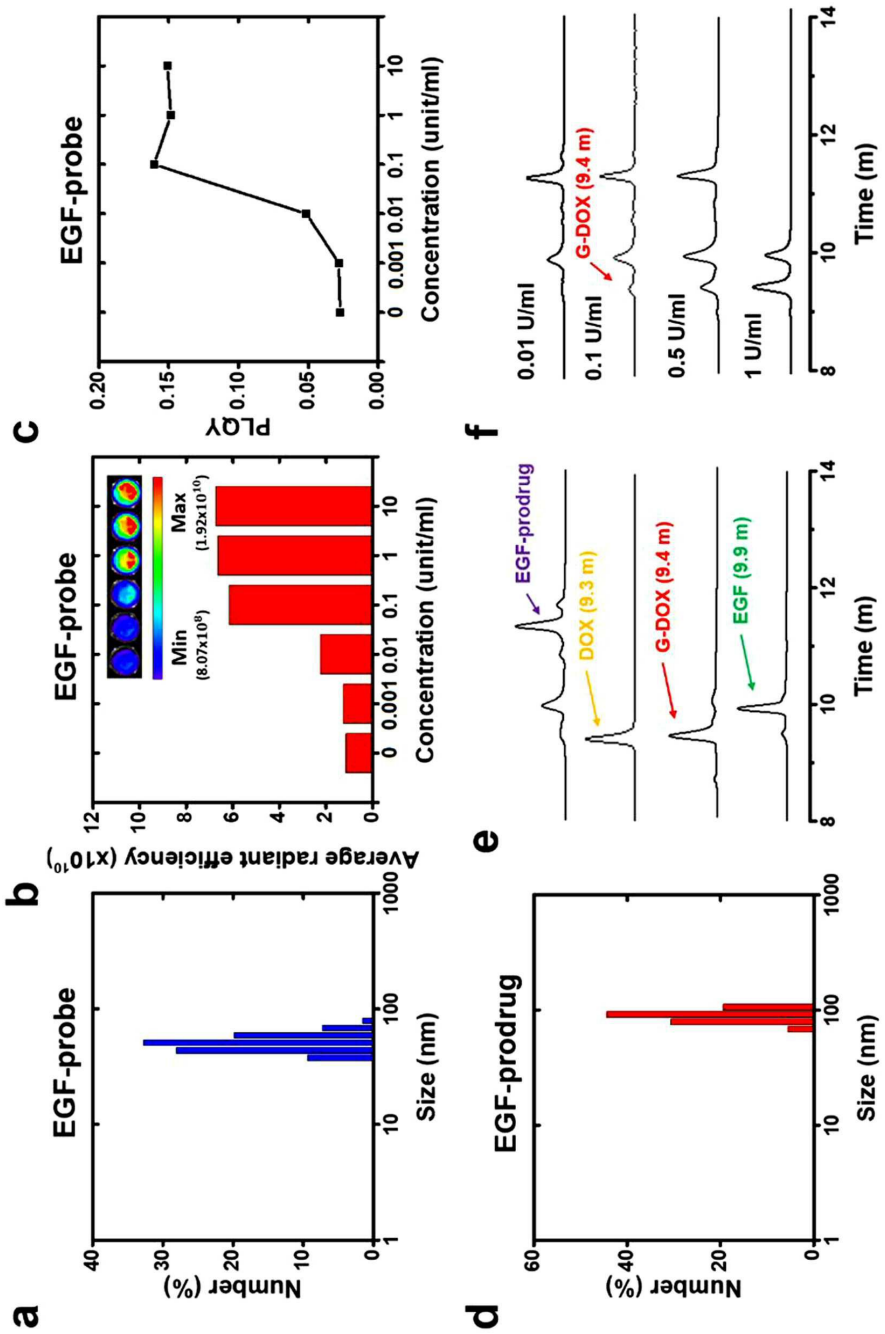
도면4


a
EGF
Absorbance
Time (m)
b
C-prodrug
Absorbance
Time (m)
c
EGF-prodrug
EGF-prodrug
EGF
Absorbance
Time (m)
d
EGF + EGF-prodrug
EGF
EGF-prodrug
Absorbance
Time (m)

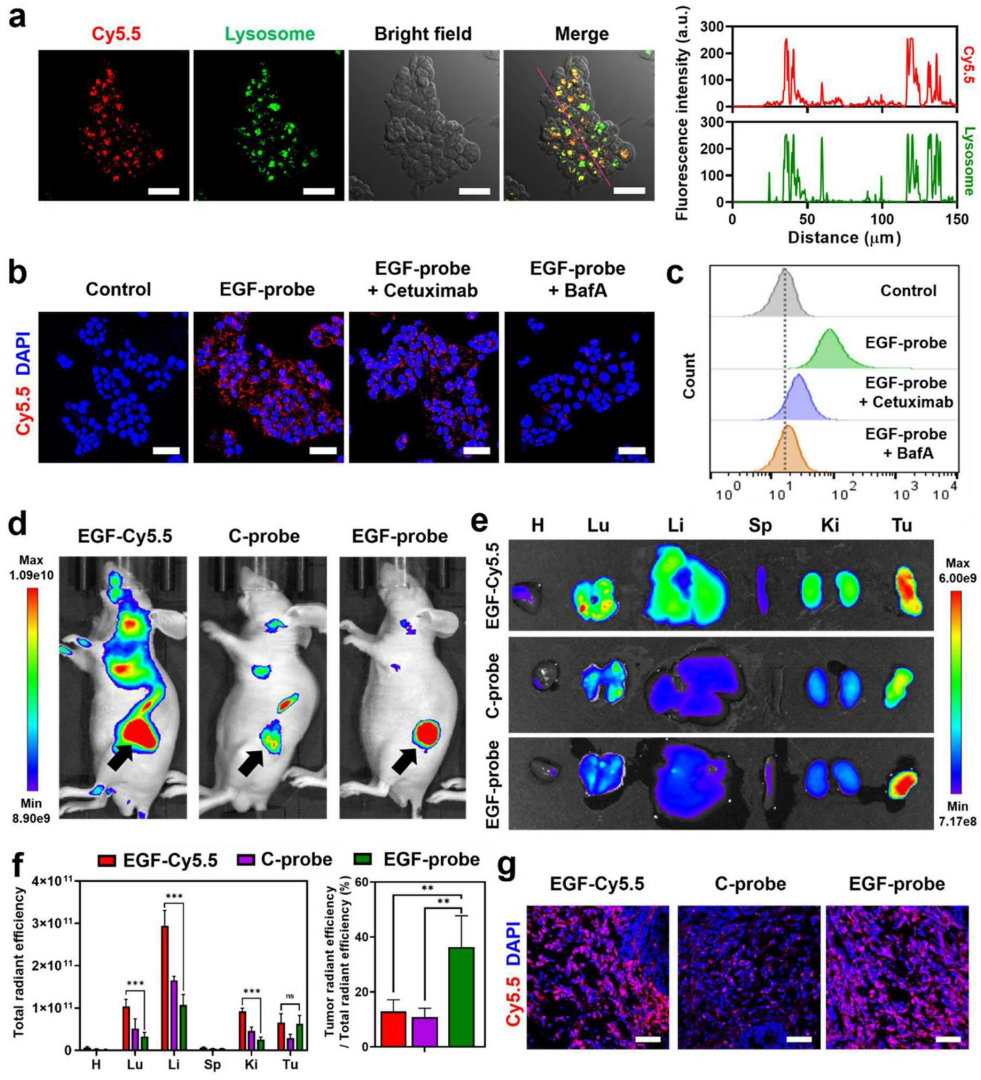
도면5


#1 Pep-DOX - Baseline Scan: #9 RT: 0.15 min NL: 6.00E+006 Baseline + c ESI sid=10.00 Full ms [10.000-2000.000]
%
105.1
64.1
83.1
542.2
548.3
1061.5
1062.5
C-prodrug
C-prodrug + H+
Rel. Intensity [%]
Mass [m/z]
m/z

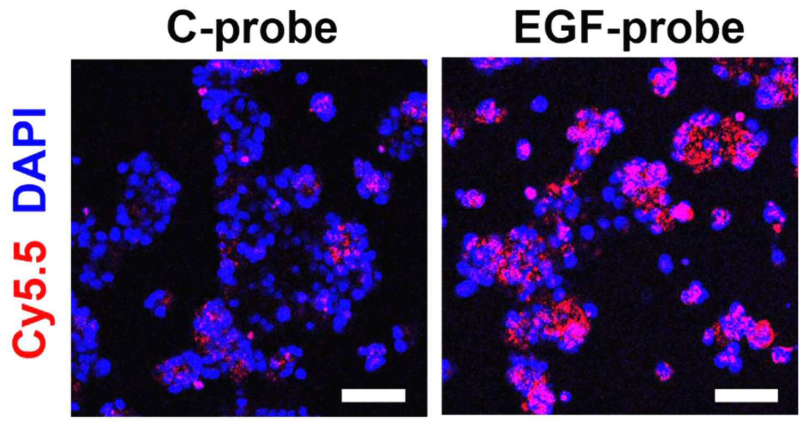
도면6


a
EGF-probe
Number (%)
Size (nm)
b
EGF-probe
Max
(1.92x10^10)
Min
(8.07x10^8)
Average radiant efficiency (x10^10)
Concentration (unit/ml)
c
EGF-probe
PLQY
Concentration (unit/ml)
d
EGF-prodrug
Number (%)
Size (nm)
e
EGF-prodrug
DOX (9.3 m)
G-DOX (9.4 m)
EGF (9.9 m)
Time (m)
f
0.01 U/ml
0.1 U/ml
G-DOX (9.4 m)
0.5 U/ml
1 U/ml
Time (m)

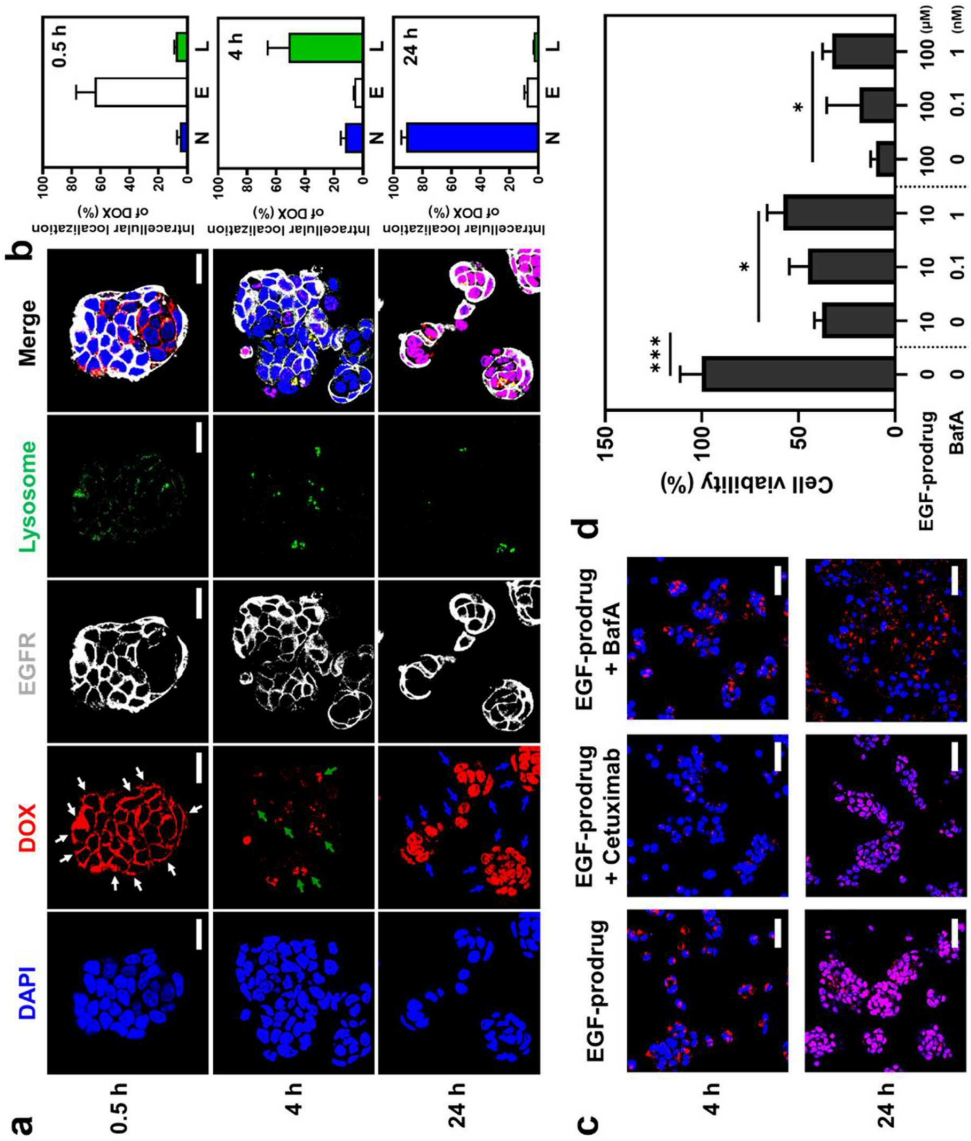
도면7


a
Cy5.5
Lysosome
Bright field
Merge
Fluorescence intensity (a.u.)
Distance (μm)
b
Control
EGF-probe
EGF-probe + Cetuximab
EGF-probe + BafA
Cy5.5 DAPI
c
Count
d
EGF-Cy5.5
C-probe
EGF-probe
Max 1.09e10
Min 8.90e9
e
H
Lu
Li
Sp
Ki
Tu
Max 6.00e9
Min 7.17e8
f
Total radiant efficiency
Tumor radiant efficiency / Total radiant efficiency (%)
g
Cy5.5 DAPI

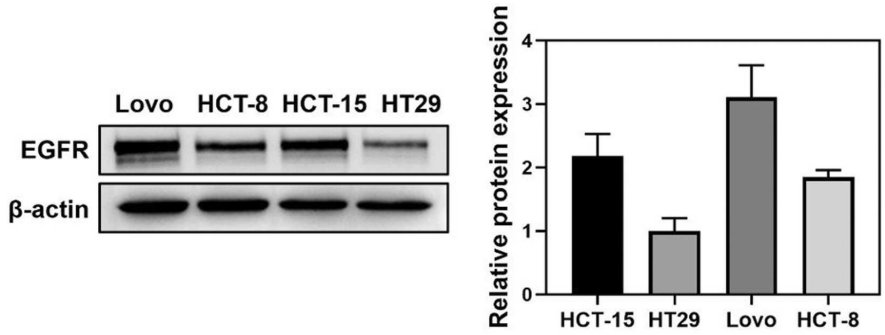
도면8


C-probe
EGF-probe
Cy5.5 DAPI

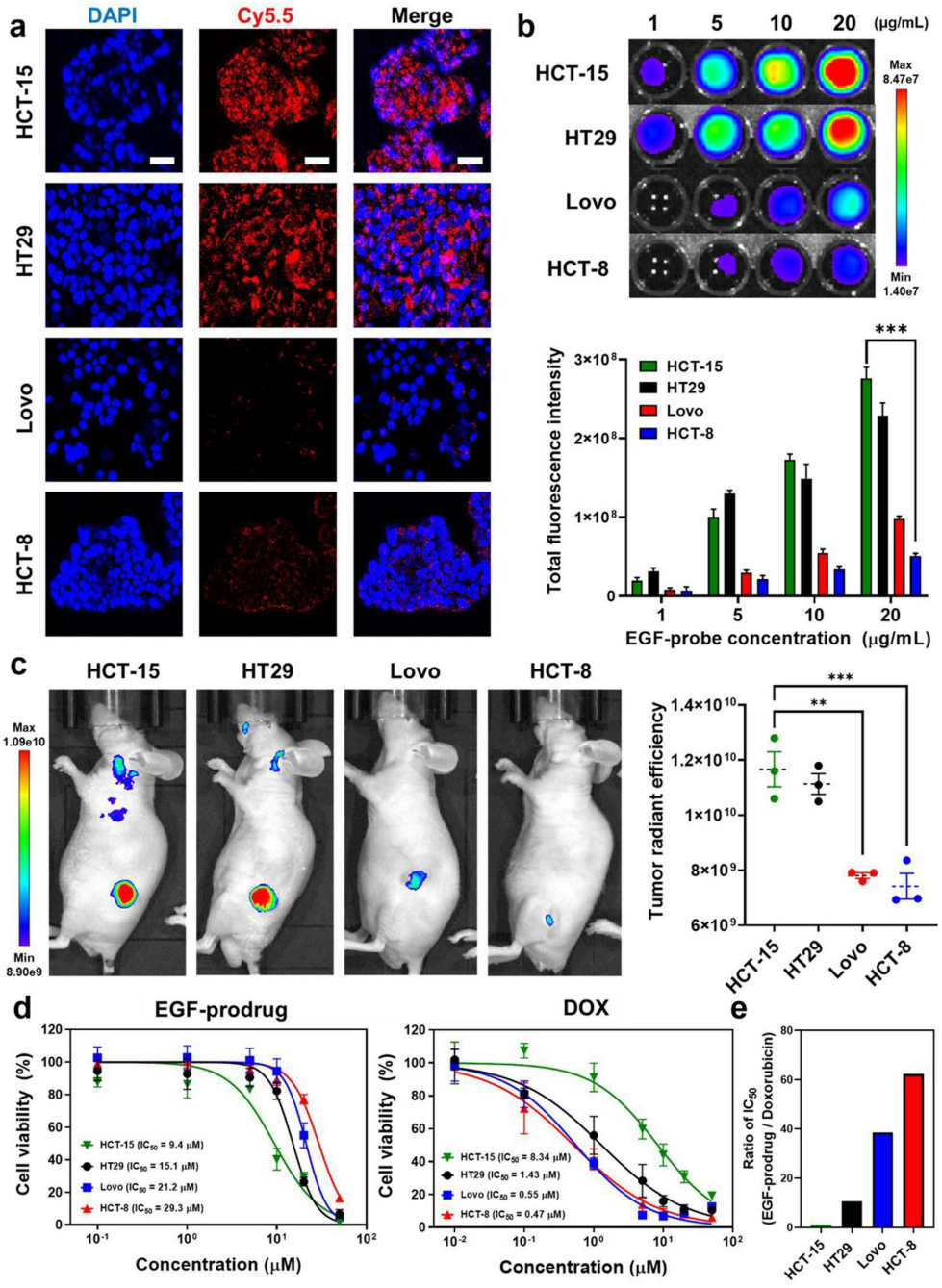
도면9


a
0.5 h
4 h
24 h
DAPI
DOX
EGFR
Lysosome
Merge
b
0.5 h
4 h
24 h
N
E
L
Intracellular localization of DOX (%)
c
EGF-prodrug
EGF-prodrug + Cetuximab
EGF-prodrug + BafA
4 h
24 h
d
Cell viability (%)
EGF-prodrug
BafA
(μM)
(nM)
***
*
*

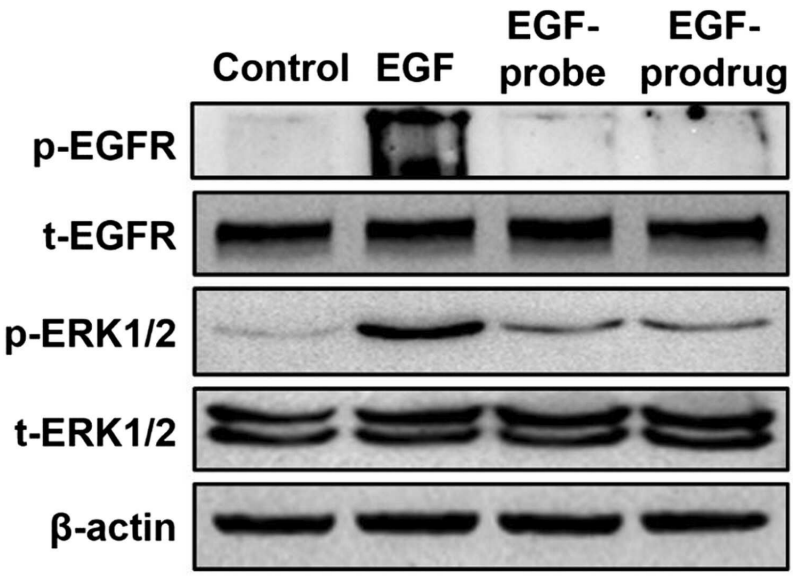
도면10


Lovo
HCT-8
HCT-15
HT29
EGFR
β-actin
Relative protein expression
HCT-15
HT29
Lovo
HCT-8

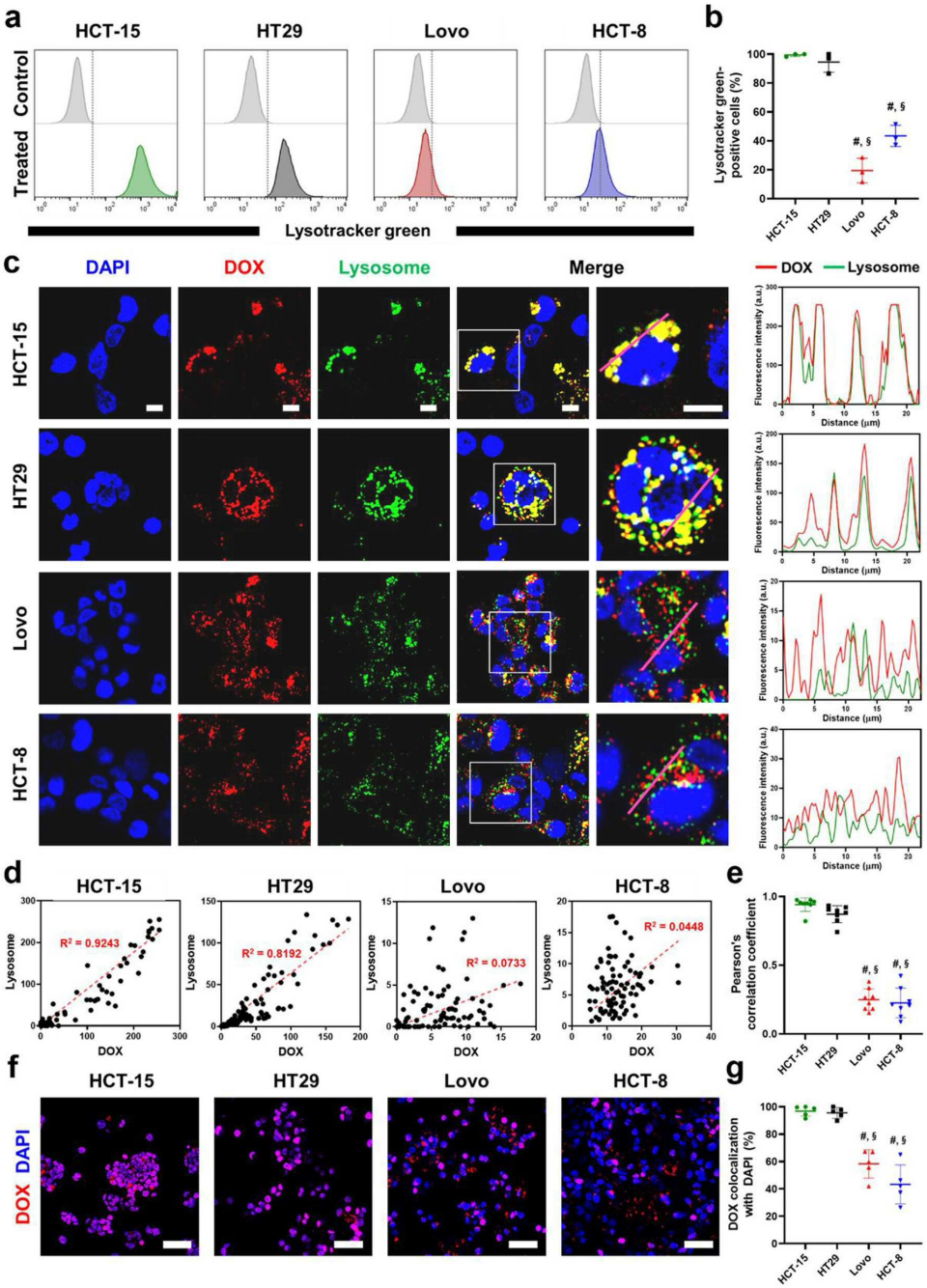
도면11


a
DAPI
Cy5.5
Merge
HCT-15
HT29
Lovo
HCT-8
b
1
5
10
20
(μg/mL)
HCT-15
HT29
Lovo
HCT-8
Max
8.47e7
Min
1.40e7
***
Total fluorescence intensity
3×10^8
2×10^8
1×10^8
0
HCT-15
HT29
Lovo
HCT-8
1
5
10
20
EGF-probe concentration (μg/mL)
c
HCT-15
HT29
Lovo
HCT-8
Max
1.09e10
Min
8.90e9
***
**
Tumor radiant efficiency
1.4×10^10
1.2×10^10
1×10^10
8×10^9
6×10^9
HCT-15
HT29
Lovo
HCT-8
d
EGF-prodrug
Cell viability (%)
HCT-15 (IC50 = 9.4 μM)
HT29 (IC50 = 15.1 μM)
Lovo (IC50 = 21.2 μM)
HCT-8 (IC50 = 29.3 μM)
Concentration (μM)
DOX
Cell viability (%)
HCT-15 (IC50 = 8.34 μM)
HT29 (IC50 = 1.43 μM)
Lovo (IC50 = 0.55 μM)
HCT-8 (IC50 = 0.47 μM)
Concentration (μM)
e
Ratio of IC50
(EGF-prodrug / Doxorubicin)
HCT-15
HT29
Lovo
HCT-8

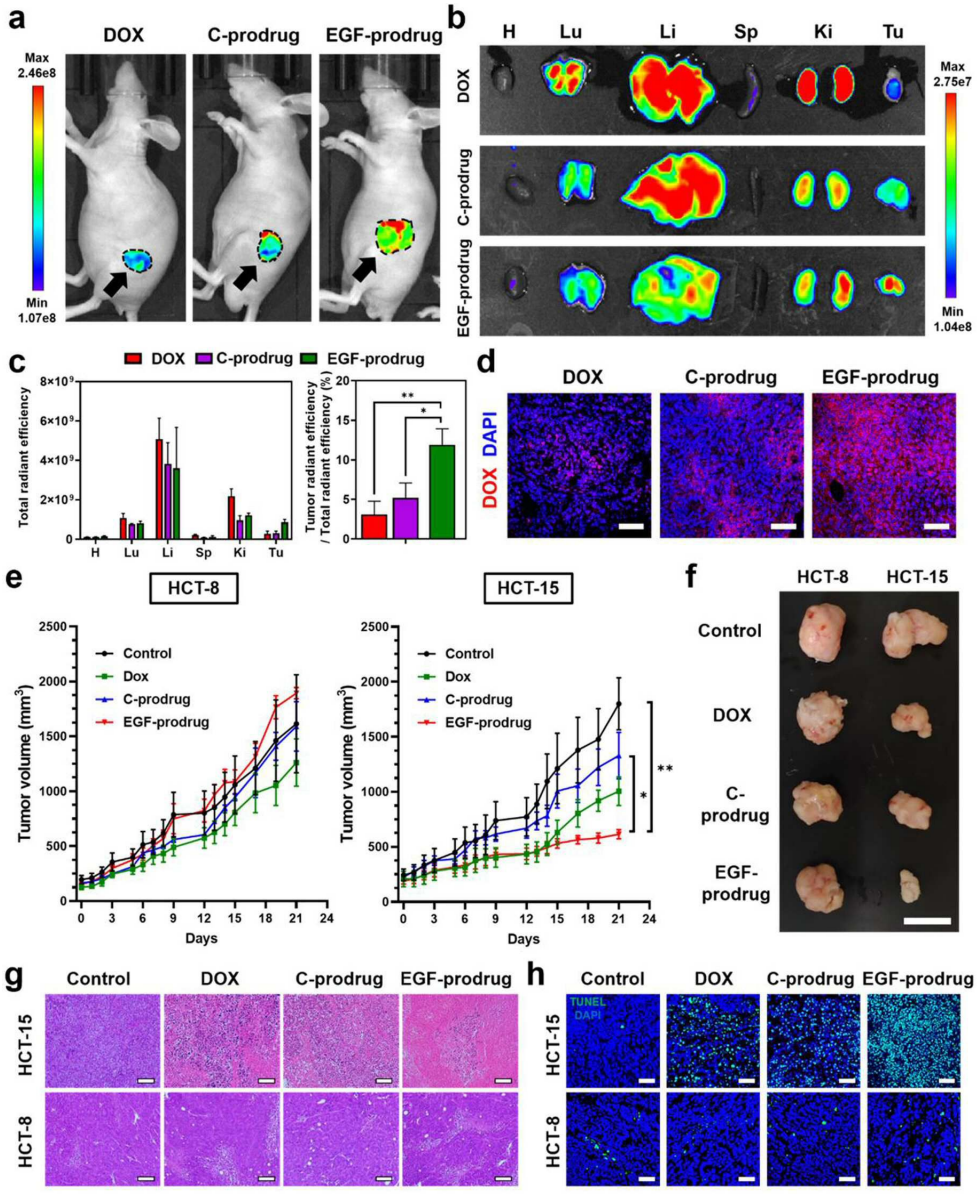
도면12


Control
EGF
EGF-probe
EGF-prodrug
p-EGFR
t-EGFR
p-ERK1/2
t-ERK1/2
β-actin

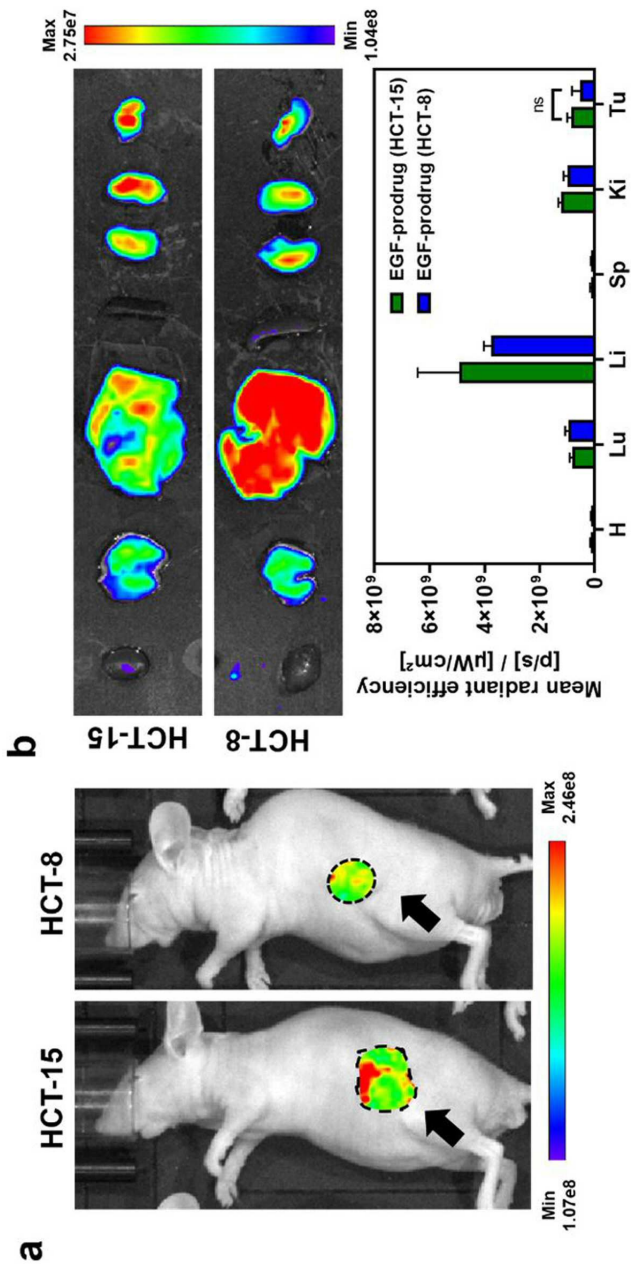
도면13


a
HCT-15
HT29
Lovo
HCT-8
Control
Treated
Lysotracker green
b
Lysotracker green-positive cells (%)
#, §
c
DAPI
DOX
Lysosome
Merge
HCT-15
HT29
Lovo
HCT-8
DOX
Lysosome
Fluorescence intensity (a.u.)
Distance (μm)
d
HCT-15
HT29
Lovo
HCT-8
R² = 0.9243
R² = 0.8192
R² = 0.0733
R² = 0.0448
Lysosome
DOX
e
Pearson's correlation coefficient
f
DOX DAPI
g
DOX colocalization with DAPI (%)

도면14


a
DOX
C-prodrug
EGF-prodrug
Max
2.46e8
Min
1.07e8
b
H
Lu
Li
Sp
Ki
Tu
DOX
C-prodrug
EGF-prodrug
Max
2.75e7
Min
1.04e8
c
DOX
C-prodrug
EGF-prodrug
Total radiant efficiency
Tumor radiant efficiency / Total radiant efficiency (%)
d
DOX
C-prodrug
EGF-prodrug
DOX DAPI
e
HCT-8
HCT-15
Control
Dox
C-prodrug
EGF-prodrug
Tumor volume (mm3)
Days
f
HCT-8
HCT-15
Control
DOX
C-prodrug
EGF-prodrug
g
Control
DOX
C-prodrug
EGF-prodrug
HCT-15
HCT-8
h
Control
DOX
C-prodrug
EGF-prodrug
TUNEL
DAPI
HCT-15
HCT-8

도면15



서 열 목 록

<110> Korea University Research and Business Foundation

KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

<120> composition for diagnosing or detecting colorectal cancer for predicting drug responsiveness, composition for preventing or treating colorectal cancer

<130> HPC9361

<160> 2

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial peptide

<400> 1

Gly Phe Leu Gly Gly Lys Gly Gly

1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial peptide

<400> 2

Cys Gly Phe Leu Gly

1 5