(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년04월25일
(11) 등록번호 10-2799910
(24) 등록일자 2025년04월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 41/00 (2020.01) *A61K 33/24* (2019.01)
A61K 45/06 (2006.01) *A61N 5/10* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 41/0038 (2013.01)
A61K 33/24 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2020-7003481
(22) 출원일자(국제) 2018년07월04일
심사청구일자 2021년07월02일
(85) 번역문제출일자 2020년02월05일
(65) 공개번호 10-2020-0026290
(43) 공개일자 2020년03월10일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2018/068099
(87) 국제공개번호 WO 2019/008040
국제공개일자 2019년01월10일
(30) 우선권주장
17305869.4 2017년07월05일
유럽특허청(EPO)(EP)
(56) 선행기술조사문헌
JP2008516984 A*
JP2016505061 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
엔에이취 테라퓩스
프랑스 메일랑 38240 슈망 뒤 비유 셴 타막 29
위니베르시테 끌로드 베르나르 리옹 I
프랑스 빌뢰르반 에프-69100, 불바르 뒤 11 노바브르 1918 43
(뒷면에 계속)
(72) 발명자
럭스, 프랑수아
프랑스 리옹 69003 쿠르 라파예트 272
티르망, 올리비에
프랑스 폰텐 생-마르탱 69270 뤼 데 푸르 305
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

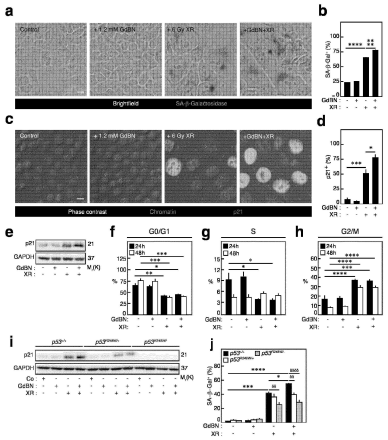
전체 청구항 수 : 총 14 항 심사관 : 이소영

(54) 발명의 명칭 **종양 치료 방법**

(57) 요 약

본 발명은 종양을 치료하는 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 종양 치료를 위한 이온화 방사선과 함께 나노입자의 신규한 용도를 제공하며, 여기서 나노입자의 병용 효과는 종양 세포의 노화 및/또는 카니발리즘을 유도한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 45/06 (2013.01)
A61N 5/10 (2018.08)
A61P 35/00 (2018.01)
A61N 2005/1098 (2013.01)
(73) 특허권자
상뜨르 나쇼날 드 라 러쉐르쉬 샹띠피끄
프랑스 75794 파리 세덱스 16 뤼 미셸-앙즈 3
인쎄름 (엥스띠뛰 나씨오날 드 라 쌍떼 에 드 라 호쉐르슈 메디깔)
프랑스공화국, 에프-75013 빠리, 뤼 드 똘비악 101
인스티튜트 구스타브 루시
프랑스, 94800 빌레쥬프, 뤼 까밀레 데스뮬린스, 39

(72) 발명자
페르페티니, 장-룩
프랑스 모 77100 에비뉴 갈리에니 15
도이치, 에릭
프랑스 파리 75011 블러바드 보마르셰 76
로, 프레더릭
프랑스 빌르뇌브 르 루아 94290 에비뉴 두 마레샬 드 튀렌 15
알로슈, 아와테프
프랑스 브리 쉬르 마른 94360 9 뤼 두 2 디셈버 1870

명 세 서

청구범위

청구항 1

종양의 치료를 필요로 하는 대상체에서 종양의 치료에 사용하기 위한, 활성 물질로써 나노입자를 포함하는 약학적 조성물로,

상기 나노입자는 40 보다 큰 원자 Z 번호를 가진 원소인 가돌리늄(Gd)을 포함하고, 10 nm 미만의 평균 수력학적 직경을 가지며,

상기 대상체는 저반응 환자의 비-종양 조직에서 또는 종양 조직에서 측정된 대조군 값과 동일하거나 보다 높은 NOX5 및/또는 ROCK1 발현 또는 활성을 가지는 종양으로 고통받는 대상체 중에서 선택되고, 및

상기 약학적 조성물은 상기 종양을 유효한 선량의 이온화 방사선에 노출시키기 전에 상기 대상체에 투여되고, 이온화 방사선 및 나노입자의 병용 효과는 조사된 종양 세포에 노화 및/또는 세포 카나발리즘(cellular cannibalism)을 유도하는 것인 약학적 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 각 나노입자는

· 폴리오가노실록산,

· 상기 폴리오가노실록산에 공유 결합된 킬레이트, 및

· 상기 킬레이트에 의해 착물화된 가돌리늄

을 포함하는 약학적 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 킬레이트는 DOTA, DTPA, EDTA, EGTA, BAPTA, NOTA, DOTAGA,,DTPABA, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 약학적 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 종양은 적어도 3Gy, 3Gy 내지 9Gy, 또는 5 내지 7Gy의 1회(fraction) 당 이온화 방사선의 선량에 노출되는 약학적 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

이온화 방사선에 종양의 노출 전, 또는 동시에 또는 후에 NOX5 및/또는 ROCK1 활성의 인핸서 또는 조절제가 투여되는 약학적 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

이온화 방사선 및 나노입자의 병용 효과는 종양 세포에 대한 NOX5 활성에 의해 매개되는 면역 반응을 유도하는 것은 약학적 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

이온화 방사선에 종양의 노출 전, 또는 동시에, 또는 후에 면역치료제가 투여되는 약학적 조성물.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 면역치료제는 면역 체크포인트 억제제인 약학적 조성물.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

상기 치료될 종양은 아폽토시스를 유도하는 화학요법 치료에 내성이 있는 것으로 나타난 종양 중에서 선택되는 약학적 조성물.

청구항 10

제 1 항에 있어서,

조사된 세포의 세포 카니발리즘(cellular cannibalism)에 의해 인접한 비-조사된 세포가 추가로 사멸되는 약학적 조성물.

청구항 11

제 1 항에 있어서,

종양 세포 내의 노화 세포의 수는, 나노입자 없이 이온화 방사선에 동일하게 노출되어 유도된 노화 세포의 수와 비교하여, 상기 치료 후에 적어도 10%, 20%, 30%, 40% 또는 적어도 50% 만큼 증가되는 약학적 조성물.

청구항 12

제 1 항에 있어서,

세포 카니발리즘은, 나노입자 없이 이온화 방사선에 동일하게 노출되어 관찰되는 세포 카니발리즘과 비교하여, 적어도 10%, 20%, 30%, 40% 또는 적어도 50% 만큼 향상되는 약학적 조성물.

청구항 13

제 1 항에 있어서,

이온화 방사선에 노출된 종양의 부피는 치료될 종양의 총 부피 보다 더 작은 약학적 조성물.

청구항 14

제 1 항에 있어서,

이온화 방사선 및 나노입자의 병용 효과는 이온화 방사선에 노출된 영역의 외부에 위치한 종양의 치료를 추가로 가능하게 하는 약학적 조성물.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 종양을 치료하는 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 종양 치료를 위한 이온화 방사선과 함께 나노입자의 신규한 용도를 제공하며, 여기서 나노입자의 병용 효과는 종양 세포의 노화 및/또는 카니발리즘(cannibalism)을 유도한다.

배 경 기 술

[0002] 방사선 치료 (방사선 요법이라고도 함)는 가장 많이 사용되는 항-종양 전략 중 하나이다. 모든 암 환자의 절반 이상이 이온화 방사선 (IR) 단독으로, 또는 수술 또는 화학 요법과 함께 치료된다.[1] 의학 물리학에서 실현된 최근의 진보 (저/고 에너지 방사선의 개발, 모노-, 하이포- 또는 하이퍼-플랙셔네이션(fractionation)스케줄의 구현 및 사용된 선량률의 다양화)와 혁신적인 의료 기술(예, 3D-양성 방사선 치료 (3D-CRT), 강도 조절 방사선 치료 (IMRT), 정위 방사선 수술 (SRS) 및 기능적 영상)의 개발은 건강한 조직을 둘러싼 상태에서 종양에 효율적인 방사선 선량을 더 잘 전달하는데 기여하며, 이는 방사선 요법의 가장 일반적인 부작용이다.[2] (방사성 동위원소 표지 또는 금속 나노입자와 같은) 나노메데신의 몇 가지 적용은 종양 부위로 방사선 선량을 보다 잘 전달하기 위해 영상화 또는 조영제로서 나노 물질을 사용하여 이러한 치료 지수를 개선하도록 및/또는 방사선민감제로서 종양에서의 선량 강하를 강화시키고 방사선 관련 부작용을 감소시키도록 개발되었다.[3, 4, 5, 6, 7] 임의의 조직에 의해 흡수되는 방사선 선량은 물질의 상대 원자번호의 제곱(Z^2)과 관련이 있다는 것을 고려하면 (여기서 Z는 원자번호)[8], 고-Z 원자(예, 금 또는 가돌리늄)를 함유한 나노입자는 방사선 요법을 향상시킬 수 있는 가능성에 대해 광범위하게 조사되었다. 이온화 방사선 노출 하에서 중금속 기반 나노입자는 종양으로의 총 선량률 강하를 강화하고 반응성 산소종(ROS)의 생성을 유도하며 많은 종양(예를 들어 흑색종, 교모세포종, 유방암 및 폐암종 포함)에서 세포 손상을 유발하는 광자 및 오거(Auger) 전자를 생성한다.[9, 10, 11] 몇몇 전임상 동물 모델이 종양 성장을 감소시키기 위해 중금속 기반 나노입자와 이온화 방사선과의 병용 능력을 밝혀냈음에도 불구하고, 여전히 이온화 방사선과 함께 항-암 치료에서 나노입자의 사용을 개선할 필요가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0003] 본원에서, 본 발명자들은 비-세포-자율적 메카니즘을 통한 세포 노화 및 사멸 모두를 유도하기 위해 이온화 방

사선과 함께 고-Z 원소 함유 나노입자, 특히 가돌리늄-기반 나노입자 (GdBN)의 병용 능력을 탐구하였다. 본 발명자들은 GdBN의 존재 하에 암 세포의 조사가 조사된 암 세포의 노화 능력을 향상시킨다는 것을 밝혀냈다. 동시에, 조사된 암 세포는 또한 카니발리즘 활성을 나타내며, 조사된 그리고 비-조사된 인접 암 세포 둘 다의 생세포 침지 후 제거함을 관찰하였다. 그들은 GdBN의 존재 하에서 암 세포의 조사에 의해 유발되는 생물학적 효과에 관여하는 신호 전달 경로를 추가로 해독하였고, GdBN의 존재 하에 조사한 후, 암 세포의 증식이 노화 및 세포 카니발리즘 유도에 의해 손상될 수 있으며, 상기 유도는 NOX5 및 ROCK1 활성에 의해 매개된다고 밝혔다. 이러한 연구 결과는 나노입자와 이온화 방사선을 병용한 최적화된 항-암 치료에 대한 새로운 해안을 제시하였다.

과제의 해결 수단

[0004] 본 개시 내용의 제 1 양태는 이를 필요로 하는 대상체에서 종양을 치료하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은

[0005] a. 유효한 양의 나노입자 현탁액을 이를 필요로 하는 대상체의 종양에 투여하되, 상기 나노 입자는 40 보다 크고, 바람직하게 50 보다 큰 원자 Z 번호를 가지고, 10 nm 미만, 바람직하게 5 nm 미만, 예를 들어 1 내지 5 nm의 평균 수력학적 직경을 갖는 원소를 포함하는 단계, 및

[0006] b. 나노입자를 포함하는 상기 종양을 유효한 선량의 이온화 방사선에 노출시키되, 여기서 이온화 방사선 및 나노입자의 병용 효과는 조사된 종양 세포에 노화 및/또는 세포 카나발리즘(cellular cannibalism)을 유도하는 단계를 포함한다.

[0007] 특정 구현예에서, 상기 종양은 적어도 3Gy, 예를 들어 3Gy 내지 9Gy, 또는 5 내지 7Gy의 1회(fraction) 당 이온화 방사선의 선량에 노출된다. 이전 구현예의 보다 구체적인 구현예에서, 이온화 방사선의 총 선량은 10회 이하로 나누어, 예를 들어 3 내지 8주 연속으로 투여된다.

[0008] 하나의 특정 구현예에서, 상기 방법은 치료 단계 전에 종양에서 NOX5 및/또는 ROCK1 발현 수준 또는 활성을 결정하는 단계를 추가로 포함한다. 일반적으로, 치료될 대상체는 NOX5 및/또는 ROCK1 활성 또는 발현 수준이 대조군 값 보다 크거나 적어도 동일한 종양을 갖는 대상체 중에서 선택된다.

[0009] 특정 구현예에서, 상기 방법은 종양에서 NOX5 및/또는 ROCK1 활성을 증가시키기 위해 이온화 방사선에 노출 전, 또는 동시에, 또는 후에 NOX5 및/또는 ROCK1 활성의 인핸서 또는 조절제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0010] 바람직한 구현예에서, 이온화 방사선 및 나노 입자의 병용 효과는 종양 세포에 대한 NOX5 활성에 의해 매개되는 면역 반응을 유도한다.

[0011] 특정 구현예에서, 이온화 방사선 및 나노입자의 병용 효과에 의해 유도된 면역 반응에 추가 또는 상승 작용으로 종양 세포에 대한 면역 반응을 추가로 향상시키기 위해, 상기 방법은 면역치료제를 이온화 방사선 노출 단계 전 또는 동시에, 또는 후에 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일반적으로, 상기 면역치료제는 PD1/PDL1 억제제, CTLA4 억제제와 같은 면역 체크포인트 억제제 중에서 선택될 수 있다.

[0012] 특정 구현예에서, 치료될 대상체는 아폽토시스를 유도하는 화학요법 치료에 종양 내성을 갖는 대상체들 중에서 선택된다.

[0013] 특정 구현예에서, 상기 방법은 종양 세포에 노화 유도제를 투여하는 단계를 추가로 포함하며, 이는 이온화 방사선 및 나노입자의 병용 효과에 의해 유도된 노화에 추가 또는 상승 작용을 일으키는 종양 세포에서의 노화를 추가로 향상시킨다. 일반적으로, 치사량의 화학 요법제는 노화 유도제로서 투여될 수 있다.

[0014] 상기 치료 방법에서, 비-조사된 세포는 인접 조사된 세포의 세포 카니발리즘에 의해 추가로 사멸될 수 있다.

[0015] 특정 구현예에서, 나노입자 없이 이온화 방사선에 대한 동일한 노출에 의해 유도된 노화와 비교하여 노화는 적어도 10%, 20%, 30%, 40% 또는 적어도 50%만큼 향상된다.

[0016] 유사하게, 특정 구현예에서, 나노입자 없이 이온화 방사선에 대한 동일한 노출에 의해 유도되는 세포 카니발리즘과 비교하여, 세포 카니발리즘은 적어도 10%, 20%, 30%, 40% 또는 적어도 50%만큼 향상된다.

[0017] 특정 구현예에서, 이온화 방사선에 노출된 종양 부피는 치료될 종양의 총 부피 보다 작으며, 예를 들어 적어도 10%(부피), 또는 적어도 20%(부피), 또는 적어도 30%(부피), 또는 적어도 40%(부피) 또는 적어도 50%(부피) 더 작다.

[0018] 상기 방법은 이온화 방사선에 노출된 영역의 외부에 위치한 종양의 치료를 추가로 가능하게 할 수 있다.

[0019] 바람직한 구현예에서, 상기 이온화 방사선은 X-선 또는 γ-선 방사선이다.

[0020] 바람직한 구현예에서, 상기 나노입자는 고-Z 원소로서 희토류 금속, 바람직하게 가돌리늄을 포함한다. 예를 들어, 조사 시 종양에서 고-Z 원소 (예를 들어 가돌리늄) 농도는 0.1 내지 10 μg 고-Z 원소.g^{-1} 일 수 있다.

[0021] 추가의 바람직한 구현예에서, 상기 나노입자는 고-Z 원소의 킬레이트, 예를 들어 희토류 원소의 킬레이트를 포함한다.

[0022] 일반적으로, 상기 나노입자는

[0023] • 폴리오가노실록산,

[0024] • 상기 폴리오가노실록산에 공유 결합된 킬레이트,

[0025] • 상기 킬레이트에 의해 착물화된 고-Z 원소, 예를 들어 희토류 원소.

[0026] 이전 구현예에서, 상기 킬레이트는 유리하게 DOTA, DTPA, DTPABA, DOTAGA로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 예를 들어 희토류 원소의 킬레이트는 가돌리늄의 킬레이트, 바람직하게 DOTAGA 킬레이트 Gd^{3+}이다. 더 구체적으로, 나노입자 당 고-Z 원소 (예를 들어 희토류 원소)의 비, 예를 들어 나노입자 당 가돌리늄의 비는 3 내지 100, 바람직하게는 5 내지 20일 수 있다.

[0027] 특정 구현예에서, 상기 나노입자는 정맥 내로 투여될 수 있다. 예를 들어, 15mg/kg 내지 100mg/kg의 나노입자의 단일 용량이 대상체에 정맥 내 주사될 수 있다.

[0028] 특정 구현예에서, 나노입자는 0.1 mg/l 내지 1 g/l, 바람직하게 0.1 내지 100 mg/l의 농도로 종양의 조사된 영역에 존재한다.

[0029] 본 발명의 다른 양태는 종양 세포의 노화 및/또는 세포 칸니발리즘 및/또는 이를 필요로 하는 대상체에서 상기 종양 세포에 대한 면역 반응을 유도하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은

[0030] a. 유효한 양의 나노입자 현탁액을 이를 필요로 하는 대상체의 종양에 투여하되, 상기 나노입자는 원자 번호 Z가 50 보다 높고 평균 직경이 10nm 미만, 바람직하게는 5nm 미만인 원소를 포함하는 단계,

[0031] b. 나노입자를 포함하는 상기 종양을 유효한 선량의 이온화 방사선에 노출시키는 단계,

[0032] c. 이온화 방사선 및 나노입자의 병용 효과는 조사된 종양 세포에 노화 및/또는 세포 카니발리즘을 유도하고/하거나 상기 종양 세포에 대한 면역 반응을 유도하는 것을 포함한다.

[0033] 본 발명의 다른 양태는 상기 정의된 치료 방법에 사용하기 위한 나노입자의 현탁액에 관한 것이다.

[0034] 특히, 본 발명은 이를 필요로 하는 대상체에서 종양을 치료하는 방법에 사용하기위한 나노입자의 현탁액에 관한 것으로, 상기 방법은

[0035] a. 유효한 양의 나노입자 현탁액을 이를 필요로 하는 대상체의 종양에 투여하되, 상기 나노입자는 40 보다 크고, 바람직하게 50 보다 큰 원자 Z 번호를 가지고, 10 nm 미만, 바람직하게 5 nm 미만, 예를 들어 1 내지 5 nm의 평균 수력학적 직경을 갖는 원소를 포함하는 단계, 및

[0036] b. 나노입자를 포함하는 상기 종양을 유효한 선량의 이온화 방사선에 노출시키되, 여기서 이온화 방사선 및 나노 입자의 병용 효과는 조사된 종양 세포에 노화 및/또는 세포 카나발리즘(cellular cannibalism)을 유도하는 단계

[0037] 를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0038] **도 1** 가돌리늄 기반 나노입자(GdBN)는 암 세포를 이온화 방사선 유발 노화에 민감하게 만든다. (a, b) 1.2 mM 가돌리늄-기반 나노입자의 존재 (또는 부재) 하에 6 Gray X-선(XR)으로(GdBN+XR) HCT116 세포를 조사한 후 관찰된 SA-β-Gal 활성의 현미경 사진 및 빈도를 48시간 처리 후 나타낸다 (스케일 바=10 μm) (n=3). (c, d) p21의 형광 현미경 사진 및 빈도를 또한 나타낸다 (스케일 바=10 μm) (n=3). (e) 24시간 처리 후 p21 발현의 면역블롯 검출을 나타낸다. GAPDH는 로딩 대조군으로 사용된다. 면역블롯은 3회의 독립적인 실험을 대표한다. (f-h) 1.2 mM GdBN의 존재 (또는 부재) 하에 6 Gray X-ρ α ψ σ (XR)로 조사된 HCT116 세포의 세포주기 분포는 24시

간 또는 48시간의 배양 후에 분석되었다. 세포주기 분석의 정량적 데이터를 나타낸다 (평균 ± SEM, n = 3).(i) 1.2mM 가돌리늄-기반 나노입자의 존재 (또는 부재) 하에 6 Gray X-선(XR)으로 조사되고 24시간 후에 분석된 $p53^{+/+}$, $p53^{R248W/+}$ 및 $p53^{R248W/-}$ HCT116 세포 상에서 p21 발현의 면역블롯 검출. GAPDH는 로딩 대조군으로 사용된다. 면역블롯은 3회의 독립적인 실험을 대표한다. (j) 1.2 mM 가돌리늄-기반 나노입자의 존재 (또는 부재) 하에 6 Gray X-선 (XR)으로(GdBN + XR) $p53^{+/+}$, $p53^{R248W/+}$ 및 $p53^{R248W/-}$ HCT116 세포를 조사한 후 검출된 SA-β-Gal 활성의 빈도. SA-β-Gal 활성의 측정은 조사 48시간 후에 수행되었다 (평균 ± SEM, n = 3). 통계적 유의성이 표시된다. *는 p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 및 **** p <0.0001을 나타낸다.

도 2 공초점 형광 현미경에 의한 GdBN+XR-유도된 비-세포 자율 사멸 양상의 검출. (a) 인간 결장암종 HCT116 세포를 XR 또는 GdBN+XR로 처리한 후 세포 카니발리즘을 검출하기 위해 사용된 실험 절차. (b, c) 표시된 농도의 가돌리늄계 나노입자 (GdBN)의 존재 (또는 부재) 하에 상이한 용량의 X-ραψσ로 조사된 (적색) CMTMR-표지된 HCT116 세포와 비-처리된 (녹색) CMFDA-표지된 HCT116 세포의 24시간 공동-배양 후 공초점 형광 현미경으로 검출된 카니발 세포의 현미경 사진 및 빈도. 카니발 세포의 대표적인 공초점 이미지는 (b)에 표시된다 (스케일 바 = 10 μm). 카니발 세포의 빈도는 (c)에 있다 (평균 ± SEM, n = 3). (d) 1.2 mM GdBN의 존재 (또는 부재) 하에 6 Gray X-선 (XR) 또는 6 Gray γ-선 (γR)로 조사된 (적색) CMTMR-표지된 HCT116 세포와 비-처리된 (녹색) CMFDA-표지된 HCT116 세포의 24시간 공동-배양 후 공초점 형광 현미경에 의해 검출된 카니발 세포의 빈도를 나타낸다. (e) R(G), R(R), G(R) 또는 G(G)를 나타내는 카니발 세포의 빈도를 결정하고 나타내었다 (평균 ± SEM, n = 3). (f-j) 인간 결장암종 HCT116 세포는 비-처리된 (대조군) (f), 1.2mM GdBN으로 처리된 (g), 6 Gray X-선 (XR)로 조사된 (h), 1.2 mM GdBN의 존재 하에 6 Gray X-선 (XR)로 조사된 상태로 두고, 아폽토시스 및 괴사 관련 파라미터의 평가를 위해 DiOC6 (3)와 프로피듐 아이오다이드 (PI)와 24시간 후 염색하였다. 대표적인 도트 플롯은 (f-i)에, 정량 데이터는 (j)에 나타낸다. (평균 ± SEM, n = 3). 통계적 유의성이 표시된다. *는 p <0.05, ***는 p <0.001 및 ****는 p <0.0001을 나타낸다.

도 3 ROCK1의 활성화는 XR- 및 GdBN+XR-매개 세포 카니발리즘에 필요하다. (a) 1.2mM GdBN의 존재 (또는 부재) 하에 6 Gray X-선 (XR)으로 인간 결장암종 HCT116 세포를 조사한 후 검출된 카스파제-3 (CASP3a)의 단백질 분해 절단의 대표적인 면역블롯을 나타낸다. 면역블롯은 처리 24시간 후 수행되었다. GAPDH를 로딩 대조군으로 사용하였다 (n=3). (b) 1.2mM GdBN의 존재 (또는 부재) 하에 6 Gray X-선 (XR)으로 조사되고 처리 24시간 후에 배양된 인간 결장암종 HCT116 세포의 MLC2 또는 $MLC2S19^{*}$의 대표적인 면역블롯, 24시간 동안 30 μM의 Y27632와 함께 나타낸다. GAPDH를 로딩 대조군으로 사용하였다 (n=3). (c) 카니발 세포의 백분율은 30 hM의 Y27632 또는 100 μM의 Z-VAD-fmk의 부재 또는 존재 하에 대조군, XR- 또는 GdBN+XR-처리된 HCT116 세포의 24시간-동종 배양 후 공초점 현미경에 의해 측정되었다 (n = 3). (d) 표적 HCT116 세포를 갖는 ROCK1 고갈된, 대조, XR- 또는 GdBN+XR-처리된 HCT116 세포 (및 대조 세포)의 24시간 이종 배양 후 검출된 카니발 세포의 백분율 (평균 ± SEM, n = 3) (e) ROCK1에 대해 고갈되거나 그렇지 않은 표적 HCT116 세포를 갖는 대조군, XR- 또는 GdBN+XR-처리된 HCT116 세포의 24-시간 이종 배양 후 검출된 카니발 세포의 백분율 (평균 ± SEM, n = 3). (f) 대조군, XR- 및 GdBN+XR- 처리된 HCT116 세포에서 48-시간 ROCK1 고갈의 대표적인 면역 블롯이 도시되어 있다. GAPDH를 로딩 대조군 (n = 3)으로 사용하였다. 통계적 유의성이 표시된다. *는 p <0.05, **는 p <0.01, ***는 p <0.001 및 **** 또는 δδδδ는 p <0.0001을 나타낸다.

도 4 결합된 GdBN+XR 처리 후 관찰된 카니발 세포에서의 포식된 세포 분해 및 노화 검출. (a-c) 100 μM의 Z-VAD-fmk의 존재 (또는 부재)에서 대조군, XR- 또는 GdBN+XR-처리된 HCT116 세포의 48-시간 동형 배양 후, 단일 세포 및 카니발 세포에서 검출된 표적 세포 분해 (a, d), p21 발현 (b, e) 및 SA-β-Gal+ 활성 (a, c, f 및 g)의 대표적인 현미경 사진 및 프리퀀시를 보여준다. 공동 배양 전에, 처리된 세포를 (적색) CMTMR 프로브로 표지하였다. 화살표는 카니발 세포 (c)에서 표적 세포 분해 (a), p21 발현 및 SA-β-Gal 활성을 나타낸다 (스케일 바 = 10 μm). (d-g)의 프리퀀시는 평균±SEM (n = 3)으로 표시된다. 통계적 유의성이 표시된다. *는 p <0.05, ** 또는 δδ는 p <0.01, ***는 p <0.001 및 ****는 p <0.0001을 나타난다. 도 4g에서, δδ는 XR 처리된 카니발 세포와 GdBN+XR-처리된 카니발 세포 사이의 통계적 유의성을 나타낸다.

도 5 GdBN+XR-유발 노화 및 세포 카니발리즘은 NADPH 옥시다제 5 (NOX5)-의존적 ROS 생성이 필요하다. (a) 1.2mM GdBN이 존재 (또는 부재)에서 6Gy의 X-ραψσ로 조사된 HCT116 세포와의 처리되지 않은 HCT116 세포의 24시간 공동-배양 후 ROS 생성을 나타내는 단일 세포 및 카니발 세포의 대표적인 현미경 사진 및 프리퀀시를 보여준다. 형광 현미경을 사용하여 비-형광 H2DCFDA 프로브를 녹색 형광 DCF+프로브로 변환하는 것을 검출함으로써 ROS 생성이 (a)에서와 같이 밝혀졌다 (스케일 바=10 μm). DCF+염색을 나타내는 단일 세포 및 카니발 세포의

프리퀀시는 (b) (평균±SEM, n=3)에 있다. (c) 1.2 mM GdBN, 6 Gy XR 또는 GdBN+XR로 HCT116 세포를 처리한 후 검출된 p21 발현에 대한 10 μM의 MnTBAP 및 100 μM의 NAC의 영향은 면역블롯을 사용하여 판단하였다. 3회 독립적인 실험의 대표적인 면역블롯이 도시되어 있다. GAPDH는 로딩 대조군으로 사용된다. (d) 특정 siRNA 풀의 48시간-트랜스펙션 후 NOX5 녹다운 검증. 3회 독립적인 실험의 대표적인 면역블롯이 도시되어 있다. GAPDH는 로딩 대조군으로 사용된다. (e-h) 1.2mM GdBN이 존재 (또는 부재)에서 6Gy의 X-ραψσ로 조사된 (또는 그렇지 않은) HCT116 세포와 처리되지 않은 HCT116 세포의 24시간 또는 48시간 공동-배양 후 검출된 ROS 생성 (e), p21 발현 (f), SA-β-Gal 활성 (g) 및 세포 카니발리즘 (h)에 대한 NOX5 감소의 영향을 형광 현미경 또는 명시야 현미경에 의해 측정하였다. ROS 생성 (DCF+), p21 발현, SA-β-Gal+활성 및 카니발리스틱 활성을 나타내는 단일 세포 및/또는 카니발 세포의 프리퀀시를 보여준다 (평균±SEM, n=3). (i) 1.2 mM GdBN의 존재 (또는 부재)에서 6Gy의 X-ραψσ로 조사된 (또는 그렇지 않은) $p53^{+/+}$, $p53^{R248W/+}$ 또는 $p53^{R248W/-}$ HCT116 세포와의 처리되지 않은 HCT116 세포의 24시간 공동-배양 후 검출된 세포 카니발리즘에 대한 p53 불활성화의 영향이 형광 현미경에 의해 결정되었다. 단일 세포 및/또는 카니발 세포의 프리퀀시가 도시되어 있다 (평균±SEM, n=3). 통계적 유의성이 표시된다. *는 p <0.05, **는 p <0.01, ***는 p <0.001 및 ****는 p <0.0001을 나타낸다.

도 6은 이온화 방사선 및 GdBN+XR 처리에 의해 매개되는 종양 억제에 대한 NOX5 불활성화의 영향. (a) shControl 및 shNOX5 HCT116 세포에서 검출된 NOX5 mRNA의 상대적 발현. (b, c) 1.2 mM의 GdBN, 6 Gy X-선 (XR) 또는 1.2 mM의 GdBN 및 6 Gy X-선 (GdBN+XR)으로 처리되거나 처리되지 않은 shControl HCT116 세포 (b) 및 shNOX5 HCT116 세포 (c)의 종양 성장을 측정하고 보여주었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 본 발명은 이를 필요로 하는 대상체에서 종양을 치료하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은

[0040] a. 유효한 양의 나노입자 현탁액을 이를 필요로 하는 대상체의 종양에 투여하는 단계; (상기 나노입자는 40 보다 크고, 바람직하게 50 보다 큰 원자 Z 번호를 가지고, 10 nm 미만, 바람직하게 5 nm 미만, 예를 들어 1 내지 5 nm의 평균 수력학적 직경을 갖는 원소를 포함함), 및

[0041] b. 나노입자를 포함하는 상기 종양을 유효한 선량의 이온화 방사선에 노출시키는 단계

[0042] 를 포함한다.

[0043] 본원에 사용된 바와 같이, "치료하다" 또는 "치료"라는 용어는 임상 결과를 포함하여 유익하거나 바람직한 결과를 얻기 위한 접근법이다. 유익하거나 바람직한 결과는 하나 이상의 증상 또는 상태의 완화 또는 개선, 질병 정도 축소, 질병 상태의 안정화 (즉, 악화되지 않음), 질병의 확산 방지, 질병 진행의 지연 또는 둔화, 질병의 역전, 질병 상태의 개선 또는 완화 및 차도 (부분 또는 전체)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 특히, 종양의 치료와 관련하여, 용어 "치료"는 종양의 성장 억제 또는 종양 크기의 감소를 지칭할 수 있다.

[0044] *본 발명에 따른 방법에 사용된 나노입자*

[0045] 본 발명은 종양 세포에 대한 노화 및/또는 세포 카니발리즘 및/또는 면역 반응을 유도하기 위해 이온화 방사선과 특정 나노입자의 병용 효과로 본 발명자들에 의해 입증된 놀라운 이점을 보여준다.

[0046] 본 발명의 방법의 유리한 효과는 특히 나노입자의 2가지 바람직한 특징과 관련된다:

[0047] 이들은 방사선민감제 역할을 하는 고-Z 원소, 예를 들어 원자 Z 수가 40 보다 크고, 예를 들어 50 보다 큰 원소를 포함한다.

[0048] 특정 구현예에서, 상기 고-Z 원소는 중금속, 보다 바람직하게 Au, Ag, Pt, Pd, Sn, Ta, Zr, Tb, Tm, Ce, Dy, Er, Eu, La, Nd, Pr, Lu, Yb, Bi, Hf, Ho, Pm, Sm, In 및 Gd 및 이들의 혼합물 중에서 선택된다.

[0049] 이들은 바람직하게 매우 작은 평균 수력학적 직경을 갖는다. 평균 직경이 예를 들어 1 내지 10 nm, 더욱 더 바람직하게는 1 내지 5 nm 또는 예를 들어 1 내지 5 nm, 일반적으로 약 3 nm인 나노입자는 종양에서 이들 나노입자의 우수한 분포를 허용하고, 빠른 신장 배출 (및 따라서 낮은 독성)가 유리하게 선택될 것이다.

[0050] 나노입자의 크기 분포는 예를 들어 PCS (Photon Correlation Spectroscopy)에 기초한 말베른 제타사이저 나노-S 입자 크기 측정기와 같은 상업적 입자크기 측정기를 사용하여 측정된다. 이 분포는 평균 수력학적 직경을 특징으로 한다.

[0051] 본 발명의 목적 상, "평균 수력학적 직경" 또는 "평균 직경"이라는 용어는 입자 직경의 조화평균(harmonic

mean)을 의미하는 것으로 의도된다. 이 매개 변수를 측정하는 방법은 표준 ISO 13321 : 1996에도 설명되어 있다.

[0052] 바람직한 구현예에서, 나노입자는 고-Z 원소 외에 생체 적합성 코팅을 추가로 포함한다. 이러한 생체 적합성에 적합한 제제는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리에틸렌 옥사이드, 폴리아크릴아미드, 바이오폴리머, 다당류 또는 폴리실록산과 같은 생체 적합성 중합체를 제한 없이 포함한다.

[0053] 나노입자는 예를 들어 영상 유도 방사선 요법에서 영상화제 또는 조영제로 유리하게 사용될 수 있다. 용어 "조영제"는 인접 또는 비-병리학적 구조와 관련하여 특정 해부학적 구조(예, 특정 조직 또는 기관) 또는 병리학적 해부학적 구조(예, 종양)를 시각화할 수 있게 하는 조영을 인위적으로 증가시키기 위해 의료 영상에 사용되는 임의의 제품 또는 조성물을 의미하는 것으로 의도된다. "영상화제"라는 용어는 인접 또는 비-병리학적 구조와 관련하여 특정 해부학적 구조(예, 특정 조직 또는 기관) 또는 병리학적 해부학적 구조(예, 종양)를 시각화할 수 있게 하는 신호를 생성하기 위해 의료 영상에 사용되는 임의의 제품 또는 조성물을 의미하는 것으로 의도된다. 조영제 또는 영상화제의 작동 원리는 사용되는 영상 기술에 따라 다르다.

[0054] 유리하게, 본 발명의 치료 방법에서 나노입자의 사용을 병용하는 것이 가능할 것이며, 그리고 MRI에 의한 인비보 검출을 위해, 예를 들어 본 발명에 개시된 치료적 처리의 모니터링을 가능하게 한다.

[0055] 바람직하게, 단지 적어도 50 중량%의 가돌리늄(Gd), 디스프로슘(Dy), 루테튬(Lu), 비스무트(Bi) 또는 홀름(Ho), 또는 이들의 혼합물을 포함하는 란타나이드 , 예를 들어 적어도 50 중량%의 가돌리늄이 나노입자에서 고-Z 원소로 선택될 것이다.

[0056] 하나의 변형에 따르면, 란타나이드를 함유하는 부분이 그 주변에, 가돌리늄과 같은 MRI 신호를 유발하는 란타나이드 및 이의 중앙부에 적어도 하나의 고-Z 원소(예, Bi)를 함유하는 나노입자가 사용될 것이다. 따라서 매우 큰 원자 번호를 갖는 방사선-흡수 고-Z 금속은 나노 입자의 코어의 중심에 위치될 수 있다.

[0057] 하나의 특정 구현예에서, 본 발명에 따라 사용될 수 있는 나노입자는 이들이 T1 MRI 영상을 위한 하나 이상의 조영제, 및 다음 영상 기술 중 하나에 적합한 하나 이상의 다른 영상화제 또는 조영제를 포함하는 것을 특징으로 한다:

[0058] -PET 또는 SPECT 신티그래프

[0059] -가시 범위 또는 근적외선 범위의 형광

[0060] -X-선 컴퓨터 단층 촬영(tomodensitometry)

[0061] 바람직하게, 나노입자는 입자 당 50 내지 5000 $mM^{-1}.s^{-1}$ (37 ℃ 및 1.4 T에서)의 이완성 r1 및/또는 적어도 5%의 예를 들어 5% 내지 50%의 Gd 중량비를 갖도록 선택된다.

[0062] 하나의 특정 구현예에서, 수력학적 직경이 매우 작은, 예를 들어 1 내지 10 nm, 바람직하게 1 내지 5 nm인 상기 나노입자는 고-Z 원소의 킬레이트, 예를 들어 희토류 원소의 킬레이트, 보다 바람직하게 가돌리늄 또는 비스무트의 킬레이트를 포함하는 나노입자이다.

[0063] 바람직하게는 이전 구현예와 조합될 수 있는 특정 구현예에서, 상기 나노입자는

[0064] · 폴리오가노실록산,

[0065] · 상기 폴리오가노실록산에 공유 결합된 킬레이트,

[0066] · 상기 킬레이트에 의해 착물화된 고-Z 원소.

[0067] 특정 구현예에서, 바람직하게 이전 구현예와 조합될 수 있고, 상기 킬레이트는 DOTA, DTPA, EDTA, EGTA, BAPTA, NOTA, DOTAGA, 및 DTPABA, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된다.

[0068] 특정 구현예에서, 바람직하게 이전 구현예와 조합될 수 있고, 희토류 원소의 킬레이트는 가돌리늄 및/또는 비스무트의 킬레이트, 바람직하게 DTPA 또는 DOTAGA 킬레이팅 Gd^{3+} 및/또는 Bi이다.

[0069] 구체적이고 바람직한 구현예에서, 나노입자 당 고-Z 원소의 비, 예를 들어 희토류 원소의 비, 예를 들어 나노입자 당 가돌리늄 (선택적으로 DOTAGA로 킬레이트됨)은 3 내지 100, 바람직하게 5 내지 20, 일반적으로 약 10이다.

[0070] 신티그래피로 이미징하는 경우, 나노입자는 신티그라피에 사용될 수 있는 방사성 동위 원소를 추가로 포함할 수 있으며, 바람직하게는 In, Tc, Ga, Cu, Zr, Y 또는 Lu, 예를 들어 ^{111}In, ^{99m}Tc, ^{67}Ga, ^{68}Ga, ^{64}Cu, ^{89}Zr, ^{90}Y 또는 ^{177}Lu의 방사성 동위 원소로 이루어진 군에서 선택된다.

[0071] 근적외선 범위의 형광의 경우, 나노입자는 Nd, Yb 또는 Er 중 선택된 란타나이드를 추가로 포함할 수 있다.

[0072] 가시광선 범위의 형광의 경우, 나노입자는 Eu 또는 Tb로부터 선택된 란타나이드를 추가로 포함할 수 있다.

[0073] 근적외선 범위의 형광의 경우, 나노입자는 시아닌 5.5, 시아닌 7, 알렉사 680, 알렉사 700, 알렉사 750, 알렉사 790, 보디피로부터 선택된 유기 형광 단을 추가로 포함할 수 있다.

[0074] 특정 구현예에서, 하이브리드 나노입자는 코어-쉘 타입이다. 희토류 산화물 및 임의로 작용화된 폴리오가노실록산 매트릭스로 이루어진 코어를 기반으로 하는 코어-쉘 유형의 나노입자가 공지되어 있다 (특히 WO 2005/088314, WO 2009/053644 참조).

[0075] 나노입자는 특정 조직에 대한 나노입자의 표적화를 허용하는 분자로 기능화 될 수 있다. 상기 작용제는 공유 결합에 의해 또는 비공유 결합에 의해, 예를 들어 캡슐화 또는 친수성/소수성 상호 작용에 의해 또는 킬레이트제를 사용하여 나노입자에 결합될 수 있다.

[0076] 하나의 특정 구현예에서, 다음을 포함하는 하이브리드 나노입자가 사용된다:

[0077] - 선택적으로 도핑 양이온 D^{m+}와 관련된 희토류 양이온 M^{n+}, (n은 2 내지 4 사이의 정수이고, 임의로 부분적으로 금속 산화물 및/또는 옥시하이드록사이드 형태이며, m은 2 내지 6 사이의 정수이고, D는 바람직하게 M 이외의 희토류 금속이며,) 악티나이드 및/또는 전이원소를 포함하는 폴리오가노실록산(POS) 매트릭스;

[0078] - 공유 결합 -Si-C-를 통해 POS에 공유 결합된 킬레이트,

[0079] - M^{n+} 양이온 및, 적절한 경우 킬레이트에 의해 착물화된 D^{m+} 양이온;

[0080] 적절한 경우, 나노입자의 표적화를 위한 표적화 분자로서, 상기 표적화 분자는 POS 또는 킬레이트에 그래프팅된다.

[0081] 코어-쉘 타입의 구조의 경우, POS 매트릭스는 금속 양이온계 코어를 둘러싸는 표면층을 형성한다. 이의 두께는 0.5 내지 10 nm의 범위일 수 있으며, 총 부피의 25% 내지 75%를 나타낼 수 있다.

[0082] POS 매트릭스는 외부 매체 (특히, 가수 분해에 대한 보호)와 관련하여 코어를 보호하는 역할을 하며 조영제 (예, 발광)의 특성을 최적화한다. 또한 킬레이트제와 표적 분자의 그래프팅을 통해 나노입자의 기능화를 가능하게 한다.

[0083] 유리하게, 킬레이트는 다음 생성물로부터 선택된다:

[0084] - 폴리아미노 폴리카복실산 및 이의 유도체의 그룹 생성물, 그리고 더욱 바람직하게 DOTA, DTPA, EDTA, EGTA, BAPTA, NOTA, DOTAGA, DTPABA 및 이들의 혼합물을 포함하는 하위 그룹;

[0085] - 포르피린, 클로린, 1,10-페난트롤린, 비피리딘, 테르피리딘, 사이클람, 트리 아자사이클로노난, 이들의 유도체 및 이들의 혼합물을 포함하는 그룹의 생성물; 및 이들의 혼합물.

[0086] M이 란타나이드, 예를 들어 Gd인 경우, 킬레이트는 란타나이드-착물화 특성을 갖는 것, 특히 착물화 상수 log (KC1)가 15 보다 큰 것, 우선적으로 20 보다 큰 것에서 유리하게 선택된다.

[0087] 란타나이드-착물 킬레이트제의 바람직한 예로서, 디에틸렌트리아민펜타아세트산 (DTPA), 1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,4,7,10-테트라아세트산 (DOTA) 또는 1,4,7-트리아자시클로노난-1,4,7-트리아세트산 (NOTA) 또는 이의 유도체 및 1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-1,글루타르산 무수물-4,7,10-트리아세트산 (DOTAGA)의 단위를 포함하는 것들이 언급될 수 있다.

[0088] 또한, 적용 의도에 따라, 나노입자는 선택적으로 또 다른 희토류 또는 악티나이드 금속 양이온, 예를 들어 란타나이드, 또는 적어도 하나는 Eu 및 Tb로부터 선택된 심지어 2개의 상이한 란타나이드로 도핑된다.

[0089] *"코어가 없는" 초미세 나노입자*

[0090] 특히 매우 작은 크기 및 강성 구조로 인해 보다 특히 바람직한 하나의 구현예에서, 본 발명에 따라 사용될 수

있는 나노입자는 다음 단계를 포함하는 하향식 합성 경로에 의해 수득된다:

[0091] - 금속 (M) 산화물 코어를 얻는 단계, 여기서 M은 희토류, 악티나이드 및 전이 원소의 그룹으로부터 선택된 고-Z 원소이고,

[0092] - 예를 들어 졸 겔 공정을 통해 M 옥사이드 코어 주위에 폴리실록산 쉘을 첨가하는 단계,

[0093] - 킬레이트제를 POS 쉘에 그라프팅하여, 킬레이트제가 -Si-C- 공유 결합에 의해 상기 POS 쉘에 결합되어 코어-쉘 전구체 나노입자를 수득하는 단계; 및

[0094] -코어-쉘 전구체 나노입자를 수용액에서 정제 및 전달하는 단계, 여기서 그래프팅제는 단계 d에서 금속 (M) 옥사이드 코어를 용해시키고 양이온성 형태 (M)을 착물화시켜 생성된 하이브리드 나노입자의 평균 수력학적 직경을 10 nm 미만, 바람직하게 5nm 미만, 예를 들어 1 내지 5nm의 평균 직경으로 감소시키기에 충분한 양으로 존재한다.

[0095] 상기 기술된 방식에 따라 수득된 이러한 나노입자는 적어도 하나의 코팅에 의해 캡슐화된 금속 산화물의 코어를 포함하지 않는다. 이러한 나노입자의 합성에 대한 자세한 내용은 다음 섹션에서 설명한다. 이러한 하향식 합성 방법은 일반적으로 1 내지 5 nm의 관찰된 크기를 초래한다. 이어서 사용된 용어는 초미세 나노입자이다. 이들 "초미세" 또는 "코어가 없는" 나노입자는 임의로 표적 분자, 특히 하기 단락에 기재된 바와 같이 폐 조직을 표적화하는 분자에 그래프팅된다.

[0096] 이들 초미세 나노입자의 다른 특징은 물체의 강성 및 주입 후 입자의 전체적인 기하학적 구조를 유지하는 것이다. 이러한 강력한 3차원 강성은 폴리실록산 매트릭스에 의해 제공되며, 대부분의 실리콘은 산소 브릿지에 의해 3개 또는 4개의 다른 실리콘 원자에 결합된다. 이러한 강성과 작은 크기의 조합은 시판 화합물 (예, Gd-DOTA 기반 착물)과 비교할 때 중간 주파수 (20 ~ 60MHz) 뿐만 아니라 차세대 하이-필드 MRI에 존재하는 100MHz 이상의 주파수에 대해 이러한 나노입자의 이완성을 증가킬 수 있다.

[0097] 바람직하게, 본 발명에 따른 방법에 사용하기 위한 나노입자는 20 MHz의 주파수에 대해 (M^{n+} 이온의) 5 $mM^{-1}.s^{-1}$ (37 ℃에서), 바람직하게 (M^{n+} 이온의) 10 $mM^{-1}.s^{-1}$(37 ℃에서) 보다 큰 Mn^{+} 이온 당 이완율 r1을 갖는다. 예를 들어, 이들은 나노입자 당 50 내지 5000 $mM^{-1}.s^{-1}$의 이완율 r1을 갖는다. 더 바람직하게, 이들 나노입자는 60 MHz에서 M^{n+} 이온 당 이완율 r1을 가지며, 이는 20 MHz에서 M^{n+} 이온 당 이완율 r1 보다 크거나 같다. 여기서 고려되는 이완율 r1은 M^{n+} (예, 가돌리늄) 이온 당 이완율이다. r1은 다음 식으로부터 추출된다: 1/T1 = [1/T1]물 + r1[M^{n+}].

[0098] 이러한 초미세 나노입자에 대한 자세한 내용은 이들을 합성하는 방법 및 이의 용도는 참고로 포함된 특허 출원 WO 2011/135101에 기재되어 있다.

[0099] *본 발명에 따라 사용하기 위한 나노입자의 바람직한 구현예를 얻는 방법*

[0100] 일반적으로, 당업자는 본 발명에 따라 사용되는 나노입자를 쉽게 생성할 수있을 것이다. 보다 구체적으로, 다음의 요소가 주목될 수 있다:

[0101] 란타나이드 옥사이드 또는 옥시하이드록사이드의 코어를 기초로 하는 코어-쉘 타입의 나노입자의 경우, 예를 들어 P. Perriat et al., J. Coll. Int. Sci, 2004, 273, 191; O. Tillement et al., J. Am. Chem. Soc., 2007, 129, 5076 and P. Perriat et al., J. Phys. Chem. C, 2009, 113, 4038.에 기술되어 있듯이, 용매로서 알코올을 사용하는 생산 공정이 사용될 것이다.

[0102] POS 매트릭스의 경우, Stoeber (Stoeber, W; J. Colloid Interf Sci 1968, 26, 62)에 의해 시작된 것들로부터 유도된 몇 가지 기술이 사용될 수 있다. 루이스 등의 문헌(Louis et al., 2005, Chemistry of Materials, 17, 1673-1682) 또는 국제 출원 WO 2005/088314에 기재된 바와 같이 코팅에 사용된 공정이 또한 사용할 수도 있다.

[0103] 실제로, 초미세 나노입자의 합성은 예를 들어 Mignot et al Chem. Eur. J. 2013, 19, 6122-6136에 기술된다: 일반적으로 코어/쉘 유형의 전구체 나노입자는 (변성 폴리올 경로를 통해) 란타나이드 옥사이드 코어 및 (졸/겔을 통해) 폴리실록산 쉘로 형성되고; 이 물체는 예를 들어 약 10 nm (바람직하게는 5 나노미터)의 수력학적 직경을 갖는다. 따라서, 매우 작은 크기 (10 nm 미만으로 조절 가능)의 란타나이드 옥사이드 코어는 다음 공개문헌에 기재된 방법 중 하나에 의해 알코올에서 제조될 수 있다: P. Perriat et al., J. Coll. Int. Sci, 2004,

273, 191; O. Tillement et al., J. Am. Chem. Soc., 2007, 129, 5076 and P. Perriat et al., J. Phys. Chem. C, 2009, 113, 4038. 이들 코어는 예를 들어 다음 공개문헌에 기재된 프로토콜에 따라 폴리실록산 층으로 코팅될 수 있다: C. Louis et al., Chem. Mat., 2005, 17, 1673 and O. Tillement et al., J. Am. Chem. Soc., 2007, 129, 5076.

[0104] 의도된 금속 양이온에 특이적인 킬레이트제 (예를 들어 Gd^{3+}에 대한 DOTAGA)를 폴리실록산의 표면에 그래프팅하고; 층 내부에 이의 일부를 삽입하는 것도 가능하지만, 폴리실록산의 형성 제어는 복잡하고 단순한 외부 그래프팅은 이러한 매우 작은 크기에서 충분한 비율의 그래프팅을 제공한다.

[0105] 나노입자는 적절한 크기의 기공을 포함하는 막 상에서 투석 또는 접선 여과 방법에 의해 합성 잔류물로부터 분리된다.

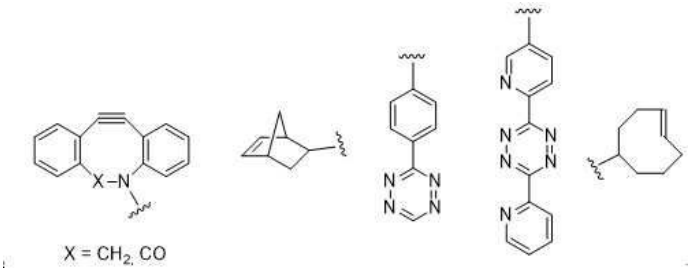
[0106] 코어는 용해에 의해 (예를 들어 pH를 변경하거나 착물 분자를 용액에 도입함으로써) 파괴된다. 이러한 코어의 파괴는 (느리게 부식 또는 붕괴의 메커니즘에 따라) 폴리실록산 층의 산란을 가능하게 하고, 이는 복잡한 형태를 갖는 폴리실록산 물체를 최종적으로 얻을 수 있게 하며, 이의 특성 치수는 폴리실록산 층의 두께의 크기, 즉 지금까지 생성된 물체 보다 훨씬 작다.

[0107] 코어를 제거함으로써, 직경 약 5 나노미터의 입자 크기에서 약 3 나노미터의 크기로 감소하는 것이 가능하다. 또한, 이러한 작업은 표면에 M(예, 가돌리늄)만을 포함하는 동일한 크기의 이론적 폴리실록산 나노입자와 비교하여 nm3 당 M(예, 가돌리늄)의 수를 증가시킬 수 있다. 나노입자 크기에 대한 M의 수는 EDX에 의해 측정된 M/Si 원자 비에 의해 평가될 수 있다.

[0108] 표적 분자는 예를 들어 Montalbetti, C.A.G.N, Falque B. Tetrahedron 2005, 61, 10827-10852에 기술된 바와 같이, 나노입자의 유기 성분 상에 펩타이드 결합에 의한 커플링을 사용하여 이들 나노입자에 그래프팅될 수 있다.

[0109] "클릭 케미스트리", Jewett, J.C.; Bertozzi, C.R. Chem. Soc. Rev. 2010, 39, 1272-1279를 사용하는 커플링 방법을 사용할 수도 있다.

[0110] -N3, -CN 또는 -C≡CH, 또는 다음 그룹 중 하나:

[0111] 

[0112] 하나의 특정 구현예에서, 본 발명에 따른 나노입자는 산 기능을 갖는 킬레이트제, 예를 들어 DOTA 또는 DOTAGA를 포함한다. 나노입자의 산 기능은 적절한 양의 표적 분자의 존재 하에 예를 들어 EDC/NHS (1-에틸-3-(3-디메틸 아미노 프로필) 카르 보디이미드/N-히드로석신이미드)를 사용하여 활성화된다. 그런 다음, 그래프트된 나노입자는 예를 들어 접선 여과에 의해 정제된다.

[0113] *치료 대상체*

[0114] 본 발명에 따른 방법은 환자의 종양, 예를 들어 인간 환자의 종양을 치료하기 위한 것이다.

[0115] 본원에서 사용되는 용어 "환자" 및 "대상체"는 동물계의 임의의 구성원, 바람직하게 포유 동물, 또는 인간을 지칭하며, 예를 들어 종양을 갖는 대상체를 포함한다.

[0116] 특정 구현예에서, 치료 방법은 악성 고형 종양, 특히 뇌종양 (일차 및 이차, 교모세포종), 골반 악성 종양 (자궁경부, 전립선, 항문 직장 및 대장 암), 간암 (일차 및 이차), 두경부암, 폐암, 식도암, 유방암, 췌장암의 치료에 관한 것이다.

[0117] 본 발명자들은 나노입자 및 이온화 방사선의 병용 효과에 의한 세포 카니발리즘 및/또는 노화의 유리한 유도가 NOX5 및/또는 ROCK1 활성에 의해 매개됨을 확인하였다. 실제로, 시험된 암 세포주에서 인비트로 NOX5 및/또는 ROCK1 활성을 억제할 때, 세포 카니발리즘 및/또는 노화의 유도는 관찰되지 않았다.

[0118] 따라서, 이러한 치료를 필요로 하는 환자는 NOX5의 발현 수준 및/또는 ROCK1 활성이 높은 종양을 가진 환자 중에서 유리하게 선택될 수 있다. 이들 환자는 치료 될 상기 종양 세포에 대해 노화 및/또는 세포 카니발리즘을 유도하기 위해, 나노입자 및 이온화 방사선을 병용한 치료에 대해 좋은 반응자인 것으로 예상된다.

[0119] 본원에 사용된 용어 "NOX5"는 NADPH 옥시다제 5, 바람직하게 인간 NOX5를 지칭하며, 이는 과산화물을 생성한다. Nox5는 c-abl과 상호 작용하고 수퍼옥사이드 생성은 c-abl의 인산화를 초래하는 반면, c-abl 키나제 활성의 억제는 Nox5 수퍼 옥사이드 생성을 억제한다. NOX5는 UniProtKB에서 참조 Q96PH1에 의해 식별된 단백질 서열을 갖는다.

[0120] 본원에 사용된 용어 "ROCK1"은 Rho의 GTP-결합 형태에 결합될 때 활성화되는 단백질 세린/트레오닌 키나제인 Rho-관련 코일-코일 함유 단백질 키나제 1을 지칭한다. ROCK1은 UniProtKB에서 참조 Q13464로 식별된 단백질 서열을 갖는다.

[0121] "NOX5 또는 ROCK1 발현 수준 또는 활성"을 언급할 때, 본원에서는 유전자의 발현 수준 (예컨대 mRNA 발현) 및/또는 상응하는 단백질 발현 및/또는 상응하는 단백질 활성 (효소 활성)을 지칭한다.

[0122] 따라서, 하나의 바람직한 구현예에서, 치료 방법은 NOX5 및/또는 ROCK1 발현 수준 또는 활성을 결정하는 단계를 포함한다. 환자는 예를 들어 환자의 종양에서 NOX5 및/또는 ROCK1 발현 수준 또는 활성이 대조군 값과 실질적으로 동일하거나 그보다 높을 때 본 발명의 치료에 대해 좋은 반응자인것으로 예상된다.

[0123] 본원에 사용된 바와 같이, 더 높은 발현 수준 또는 활성은 대조군 값과 비교하여 이러한 발현 수준 또는 활성의 통계적으로 유의미한 증가, 바람직하게 대조군 값의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50% 증가를 의미한다.

[0124] 본원에 사용된 용어 "좋은 반응자"는, 예를 들어 대조군 값에 상응하는 NOX5 및/또는 ROCK1의 발현 수준 또는 활성을 갖는 환자와 비교하여 환자가 치료에 대한 더 나은 반응의 이점을 얻을 수 있음을 의미한다.

[0125] 따라서, 본 발명의 방법은 (a) 상기 환자의 종양으로부터 수득된 생검 또는 종양 세포에서 예측되는 바이오마커로서 NOX5 및/또는 ROCK1의 발현을 측정하는 단계, 및 (b) 상기 획득된 발현 값을 상응하는 대조군 값과 비교하는 단계를 포함한다.

[0126] 상기 대조군 값은 예를 들어, 반응 환자 및/또는 저-반응 환자의 상응하는 종양에서 NOX5의 정규화된 (상대적인) 평균 값 및/또는 ROCK1 발현의 평균 값일 수 있다.

[0127] 상기 대조군 값은 또한 정량 방법 및 본 발명의 방법에 사용될 예측 바이오 마커에 따라 일상적인 실험에 의해 측정될 수 있다.

[0128] 예를 들어, 상기 대조군 값은 저-반응 환자에 대해 관찰된 발현 수준 값에 상응하고, 발현 수준 값이 대조군 값보다 통계적으로 높을 때 환자는 반응자인 것으로 예측된다.

[0129] 대안적으로, 상기 대조군 값은 반응자 환자에 대해 관찰된 발현 수준 값에 상응하고, 발현 수준 값이 대조군 값 (임계 값)과 통계적으로 상이하지 않거나 더 높은 경우, 환자가 반응자일 것으로 예측된다.

[0130] 또한 대안적으로, 상기 대조군 값은 환자의 비-종양 조직에서 관찰된 NOX5의 정규화된 (상대적인) 평균 값 및/또는 ROCK1 발현의 평균 값에 해당한다.

[0131] 비교 단계는 수동으로 수행하거나 컴퓨터로 지원받을 수 있다.

[0132] 예측 바이오마커 NOX5 및/또는 ROCK1의 발현은 대상체 종양의 생물학적 샘플에서 그러한 예측 바이오마커의 유전자 또는 단백질 발현을 결정함으로써 정량화할 수 있다. 상기 정량화는 (예를 들어, 바이오마커의 양을 알려진 양의 바이오마커를 갖는 대조군과 비교하고 그 대조군과 비교하여 "더 높은" 또는 "더 낮은" 양을 검출함으로써) 최소한 알려진 대조군 양에 대한 특정 양을 결정하기 위해 상대적이거나 더 정밀할 수 있다.

[0133] 용어 "핵산" 및 "폴리뉴클레오타이드"는 상호교환적으로 사용되며 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 또는 이의 유사체 중 임의의 길이의 뉴클레오타이드의 중합체 형태를 지칭한다. 폴리뉴클레오타이드는 임의의 3차원 구조를 가질 수 있고 임의의 기능을 수행할 수 있다. 다음은 폴리뉴클레오타이드의 비-제한적인 예이다: 유전자 또는 유전자 단편, 엑손, 메신저 RNA (mRNA), cDNA, 임의의 서열의 단리된 DNA, 임의의 서열의 단리된 RNA, 핵산 프로브 및 프라이머. 폴리뉴클레오타이드는 메틸화된 뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드 유사체와 같은 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 존재하는 경우, 뉴클레오타이드 구조물에 대한 변형은 중

합체의 조립 전 또는 후에 부여될 수 있다. 뉴클레오타이드의 서열은 비-뉴클레오타이드 성분에 의해 중단될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 예를 들어 표지 성분과의 접합에 의해 중합 후에 추가로 변형될 수 있다. 이 용어는 또한 이중 가닥 및 단일 가닥 분자 모두를 지칭한다. 달리 특정되거나 요구되지 않는 한, 폴리뉴클레오타이드인 본 발명의 임의의 구현예는 이중-가닥 형태 및 이중-가닥 형태를 구성하는 것으로 알려지거나 예측된 2개의 상보적인 단일-가닥 형태 모두를 포함한다.

[0134] "유전자"는 특정 폴리펩타이드 또는 단백질을 전사 및 번역한 후 인코딩할 수 있는 적어도 하나 이상의 오픈 리딩 프레임(ORF)을 함유하는 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다. 폴리뉴클레오타이드 서열은 이들이 관련된 유전자의 더 큰 단편 또는 전장 코딩 서열을 확인하는데 사용될 수 있다. 더 큰 단편 서열을 분리하는 방법은 당업자에게 공지되어 있다. "유전자 발현", "유전자 생성물" 또는 "발현"은 모두 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 유전자가 전사되고 번역될 때 생성되는 핵산 또는 아미노산 (예를 들어, 펩타이드 또는 폴리펩타이드), 바이오마커의 cDNA 또는 RNA 서열, 바이오마커의 유전자 발현, 바이오마커 단백질 발현, 바이오마커 mRNA 발현; 바이오마커 단백질의 기능적 효과, 바이오마커 유전자의 기능적 효과, cDNA 또는 mRNA, 단백질, cDNA, 유전자 또는 mRNA 활성을 지칭한다.

[0135] 특정 구현예에서, "발현 수준", "유전자 발현", "유전자 생성물" 또는 "발현"은 mRNA 발현, cDNA 발현, 단백질 전사 및 단백질 발현을 나타낸다.

[0136] 용어 "폴리펩타이드"는 용어 "단백질"과 상호 교환적으로 사용되며, 가장 넓은 의미에서 2개 이상의 서브유닛 아미노산의 화합물을 지칭한다. 서브유닛은 펩타이드 결합에 의해 연결될 수 있다.

[0137] 이러한 정량 방법은 예를 들어, 실시간 정량적 PCR을 수행할 뿐만 아니라 DNA 마이크로어레이를 이용함으로써, 대안적으로 상기 예측 바이오마커, 즉 상기 예측 바이오마커의 증폭된 mRNA에 해당하는 cDNA와 특이적으로 혼성화하는 핵산이 정의된 위치에서 결합된 기질,의 상응하는 유전자 발현 수준의 검출 및 정량화를 포함할 수 있다.

[0138] 일반적으로, 특정 구현예에서, 환자의 생물학적 샘플로부터 수득된 전사된 폴리뉴클레오타이드(mRNA)의 혼합물은 역전사 및 정량적 증폭된다. 상기 cDNA 또는 mRNA는 인비트로 기술로 DNA 마이크로어레이 또는 노던 블롯에 대한 엄격한 하이브리드화에 의해 검출될 수 있다.

[0139] 어떤 경우든, 이러한 검출 및 정량 분석의 일반적인 원리는 적절한 조건에서 예측 바이오마커 및 프로브가 상호작용하고 결합하기에 충분한 시간 동안 예측 바이오마커 및 프로브를 함유할 수 있는 샘플 또는 반응 혼합물을 제조하고 따라서 반응 혼합물에서 검출(및 정량화)될 수 있는 복합체를 형성하는 것을 포함한다.

[0140] 바이오마커의 이러한 검출 및/또는 정량 분석은 다양한 방식으로 수행될 수있다. 특정 분석법 및 이의 성분에 대한 적절한 조건은 당업자에게 잘 알려져 있을 것이다.

[0141] 특정 구현예에서, 예측 바이오마커 mRNA의 수준은 당업계에 알려진 방법을 사용하여 생물학적 샘플에서 인비트로 형식에 의해 모두 결정될 수 있다.

[0142] 특정 방법은 PCR, RT-PCR, RT-qPCR 또는 노던 블롯을 제한 없이 포함한다.

[0143] 또한, 바이오마커의 발현 수준은 하나 이상의 예측 바이오마커의 단백질 발현 또는 단백질 생성물을 검사함으로써 결정될 수 있다. 단백질 수준을 결정하는 것은 환자로부터 얻은 샘플에서 바이오마커의 폴리펩타이드를 선택적으로 인식하고 이에 결합하는 항체 사이에서 발생하는 임의의 면역특이적 결합 양을 측정하는 단계 및 이를 대조군 샘플에서 적어도 하나의 바이오마커의 면역특이적 결합 양과 비교하는 단계를 포함한다. 바이오마커의 단백질 발현량은 대조군 발현과 비교할 때 증가하거나 감소할 수 있다.

[0144] 다양한 면역 분석법을 포함하여 이러한 생물학적 샘플에서 단백질 발현 수준을 검출하기 위한 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있다. 여기에는 방사성 면역 분석, ELISA (효소 관련 면역 흡착 분석), "샌드위치" 면역 분석, 면역 방사 분석, 현장 면역 분석 (예, 콜로이드 금, 효소 또는 방사성 동위원소 표지 사용), 웨스턴 블롯 분석, 면역 침전 분석, 면역 형광 분석, 유세포 분석, 면역 조직 화학, 공초점 현미경, 효소 분석, 표면 플라즈몬 공명 및 PAGE-SDS를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. NOX5 또는 ROCK1 엘리사 키트는 시판되고 있다.

[0145] 또는, NOX1의 효소 활성 및/또는 ROCK1 활성은 적절한 효소 분석을 사용하여 예측 바이오마커로서 측정될 수 있다. rock1 키나제 분석은 예를 들어 PROMEGA (ADP-GloTM 키나제 분석)에서 이용 가능하다.

[0146] *치료될 대상체에 나노입자 투여*

[0147] 본 발명의 방법은 유효한 양의 나노입자 현탁액을 대상체의 종양에 투여하는 단계를 포함한다.

[0148] 나노입자는 국소 (종양 내(IT), 동맥 내(IA)), 피하, 정맥 내(IV), 진피 내, 기도(흡입)), 복막 내, 근육 내, 척추강 내, 안 내 또는 구강 경로를 사용하여 대상체에 투여될 수 있다. 특정 구현예에서, 나노입자는 정맥 내로 투여되고, 나노입자는 수동 표적, 예를 들어 향상된 투과성 및 보유 효과에 의해 종양을 표적화하는 것이 유리하다.

[0149] 필요한 경우, 나노입자의 반복 주사 또는 투여가 수행될 수 있다.

[0150] 하나의 구현예에서, 나노입자는 종양에 조사할 때, 종양에서 고-Z 원소 (예, 가돌리늄) 농도가 0.1 내지 10μg/고-Z 원소 g^{-1}이 되도록 환자에게 투여된다.

[0151] 특정 구현예에서,단일 용량 15 mg/kg 내지 100 mg/kg의 나노입자 (예, 가돌리늄 킬레이트를 갖는 코어리스 초미세 나노입자)는 대상체에 정맥 내 주사된다.

[0152] 특정 구현예에서, 나노입자는 환자의 종양에 투여되어, 나노입자가 0.1 mg/l 내지 1g/l, 바람직하게 0.1 내지 100 mg/l의 농도로 종양의 조사된 영역에 존재한다.

[0153] 노화 및/또는 세포 카니발리즘의 유도 효과는 NOX5 및/또는 ROCK1 활성에 의해 매개되므로, NOX5 및/또는 ROCK1 활성의 인핸서 또는 조절제를 환자에게 추가로 투여하는 것이 유리할 수 있다.

[0154] 따라서, 치료 방법의 특정 구현예에서, 치료 방법은 NOX5 및/또는 ROCK1 활성의 인핸서 또는 조절제를 이온화 방사선에 노출되기 전 또는 동시에 또는 노출 단계 후에 투여하는 단계를 추가로 포함한다 .

[0155] 본원에 사용된 NOX5 및/또는 ROCK1 활성의 인핸서는 예를 들어 환자의 종양 조직에서 인비보 NOX5 및/또는 ROCK1 활성을 증가시킬 수 있는 화합물 또는 약물 또는 화합물 또는 약물의 조합을 지칭한다. 이러한 인핸서는 NOX5의 산화효소 활성 또는 ROCK1의 키나제 활성의 직접적인 활성화제 또는 예를 들어 NOX5 또는 ROCK1 각각의 신호 전달 경로의 하향에서 작용하는 간접적인 인핸서일 수 있다.

[0156] NOX5의 이러한 인핸서의 예는 시플라틴, 칼슘 유입, 포볼 미리스테이트 아세테이트, 안지오텐신 II 및 엔도텔린-1을 포함한다.

[0157] 본원에 사용된 바와 같이, NOX5 및/또는 ROCK1 활성의 조절제는, 예를 들어, 환자의 종양 조직에서 인비보 NOX5 및/또는 ROCK1 활성을 증가, 감소 또는 제거할 수 있는 화합물 또는 약물 또는 화합물 또는 약물의 조합을 지칭한다. 이러한 조절제는 NOX5의 산화 효소 활성 또는 ROCK1의 키나제 활성의 직접적인 활성화제 또는 억제제 또는 예를 들어 각각 NOX5 또는 ROCK1의 신호 전달 경로의 하향에서 작용하는 간접적인 인핸서 또는 억제제일 수 있다.

[0158] 본 발명자들은 병용 효과 또는 이온화 방사선 및 나노입자가 종양 세포에 대해 NOX5 활성에 의해 매개되는 면역 반응을 유도할 수 있음을 추가로 발견하였다. 이러한 반응은 조사된 종양의 세포 또는 환자 내의 다른 종양 세포에 관한 것일 수 있다.

[0159] 그러므로 예를 들어 치료 방법을 면역치료적인 치료와 조합함으로써 이러한 면역 반응을 증가시키는 것이 유리할 수 있다. 따라서, 특정 구현예에서, 본 발명의 방법은 이온화 방사선에 노출 전, 또는 동시에, 또는 노출 단계 후에 면역치료제를 투여하여 이온화 방사선 및 나노입자의 병용 효과에 의해 유도된 면역 반응에 추가 또는 시너지로 면역 반응을 추가로 강화시키는 단계를 추가로 포함한다. 일반적으로, 상기 면역 치료 약물은 면역 체크포인트 억제제 중에서 선택된다. 면역 체크 포인트 억제제는 예를 들어 Parldoll DM Nat Rev Cancer 12(2012):252-264 및 Herrera FG et al CA Cancer J Clin. 67(2017):65-85. doi: 10.3322/caac.21358에 기술되어 있다. 이들은 예를 들어 PD1/PDL1 억제제, CTLA4 억제제, 보다 구체적으로, 항-PD1 또는 항-PDL1 항체 및/또는 항-CTLA4 항체를 포함한다.

[0160] 본 발명자들의 주요 발견 중 하나는 나노입자와 이온화 방사선의 병용 효과가 아폽토시스와 관련이 없는 메카니즘 (비-세포 자율 세포 사멸 메커니즘)에 의해 종양의 세포사멸을 유도한다는 것이다. 따라서, 본 발명의 치료 방법은 종양 세포의 아폽토시스를 유도하는 통상적인 화학치료 요법에 내성이 있는 것으로 나타난 종양의 치료에 더욱 특히 적합할 수 있다. 이러한 통상적인 화학 치료 요법은 특히 시스플라티늄 및 유도체, 5-우라실, 탁산 및 EGFr 억제제를 포함한다.

[0161] 본 발명의 치료 방법은 노화 유도제를 투여하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 노화 유도제는 유리하게

는 이온화 방사선 및 나노 입자의 병용 효과에 의해 유도된 노화에 추가 또는 시너지 효과를 유리하게 강화시킬 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 노화 유도제는 제한없이 노화를 유도하는 것으로 알려진 화학 요법제 중에서 선택된다:

[0162] 액티노마이신, 올-트란스 레티노익산, 아자시티딘, 아자티오프린, 블레오마이신, 보르테조밉, 카르보플라틴, 카페시타빈, 시스플라틴, 클로람부실, 사이클로포스파마이드, 사이타라빈, 다우노루비신, 도세탁셀, 독시플루리딘, 독소루비신, 에피루비신, 에포틸론, 에토포사이드, 플루오로우라실, 젬시타빈, 하이드록시우레알, 다루비신, 임마티닙, 이리노테칸, 메클로레타민, 머캅토푸린, 메톡트렉세이트, 마이톡산트론, 옥살리플라틴, 파클리탁셀, 페메트렉세드, 페니포사이드, 피오구아닌, 토포테칸, 발루비신, 베무라페닙, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신.

[0163] *종양을 이온화 방사선에 노출*

[0164] 본원에 기재된 나노입자는 방사선 치료가 고전적 치료이거나 가장 적절한 치료이거나 지시될 수 있는 종양을 치료하는데 사용될 것이다.

[0165] 방사선 치료 또는 방사선 요법은 악성 세포를 제어하기 위해 암 치료의 일환으로 방사선-즉,이온화 방사선-의 의학적 용도이다. 이는 완화 치료 또는 치료적 처치로 사용된다. 방사선 요법은 다양한 유형의 암 치료를 위한 중요한 표준 요법으로 받아들여 지고 있다.

[0166] 본원에 사용된 용어 "방사선 요법"은 이온화 방사선에 상응하는 방사선 조사로 종양성 질환의 치료에 사용된다. 이온화 방사선은 이의 유전 물질을 손상시켜 치료 대상 영역 (표적 조직)의 세포를 손상시키거나 파괴하는 에너지를 축적하여 이들 세포가 계속 성장할 수 없게 한다.

[0167] 특정 구현예에서, 본 발명의 방법은 나노입자를 포함하는 종양을 유효한 선량의 이온화 방사선에 노출시키는 단계를 포함하고, 여기서 상기 이온화 방사선은 광자, 예를 들어 X-선이다. 그들이 보유한 에너지의 양에 따라, 광선은 몸 표면이나 더 깊은 곳에서 암 세포를 파괴하는데 사용될 수 있다. X-선 빔의 에너지가 높을수록 X-선이 대상 조직으로 더 깊게 들어갈 수 있다. 선형 가속기 및 베타트론은 점점 더 큰 에너지의 X-선을 생성한다. 암 부위에 방사선(예, X-선)을 집중시키기 위해 기계를 사용하는 것을 외부 빔 방사선 요법이라고 한다.

[0168] 본 발명에 따른 치료 방법의 대안적인 구현예에서, 감마선을 사용한다. 감마선은 특정 원소(라듐, 우라늄 및 코발트 60 등)가 분해 또는 붕괴될 때 방사선을 방출함에 따라 자연적으로 생성된다. 이온화 방사선은 일반적으로 (예컨대 코발트 60 소스) 2keV 내지 25000 keV, 특히 2 keV 내지 6000 keV (즉, 6 MeV) 또는 2 keV 내지 1500 keV이다.

[0169] 방사선 치료 분야의 당업자는 질병의 성질 및 환자의 체질에 따라 적절한 투여과 적용 일정을 결정하는 방법을 알고 있다. 특히, 당업자는 선량 제한 독성 (DLT)을 평가하는 방법과 그에 따라 최대 허용 선량(MTD)을 결정하는 방법을 알고 있다.

[0170] 광자 방사선 요법에 사용되는 방사선의 양은 그레이(Gy)로 측정되며, 치료되는 암의 종류와 단계에 따라 달라진다. 치료 사례의 경우, 고형 상피 종양의 일반적인 선량은 60 ~ 80 Gy이다. 환자가 화학 요법을 받고 있는지, 환자의 동반이완, 수술 전 또는 후에 방사선 요법이 시행되는지, 수술 성공 정도를 포함하여 선량을 선택할 때 방사선 종양 학자들은 많은 다른 요인들을 고려한다.

[0171] 총 선량은 일반적으로 분할된다 (시간에 따라 분배됨). 모든 질병/해부학적 위치/질병 단계 환자 설정/연령에 대해 양과 일정(이온화 방사선, 분할 선량, 분할 전달 스키마, 총 선량 단독 또는 다른 항암제와의 병용 등의 계획 및 전달)이 정의되며, 특정 상황에 대한 치료 표준을 구성한다.

[0172] 성인의 일반적인 통상적인 분할 일정은 예를 들어 5 내지 8주 연속, 일주일에 5일, 하루에 1.8 내지 2 Gy일 수 있다.

[0173] 고 선량의 이온화 방사선으로 수득된 본 방법에 따른 나노입자 및 이온화 방사선의 병용 효과를 고려하면, 하나의 특정 구현예에서, 환자의 종양에 노출된 이온화 방사선의 선량은 유리하게 저분할된다. 예를 들어, 최소 3Gy, 예를 들어 3Gy 내지 9Gy, 또는 5 내지 7Gy의 분할당 선량은 환자의 종양에 노출되고 방사선 총 선량은 몇몇 분할(일반적으로, 반드시 10회 이하로 나눌 필요는 없음)으로 전달된다.

[0174] 본 발명자들은 나노입자 및 방사선 요법의 병용 치료는 특히 세포 노화, 세포 카니발리즘 및/또는 이러한 세포에 대한 면역 반응의 유도를 통해 조사되지 않은 종양 세포에도 영향을 미칠 수 있음을 밝혀냈다.

[0175] 유리한 효과에 따르면, 치료는 일반적으로 나노입자의 존재 없이 이온화 방사선에 대한 동일한 노출에 의해 유도된 노화와 비교하여, 적어도 10%, 20%, 30%, 40% 또는 적어도 50% 만큼 향상시킬 수 있다.

[0176] 유리한 효과에 따르면, 따라서 치료는 일반적으로 나노입자의 존재 없이 이온화 방사선에 대한 동일한 노출에 의해 유도된 세포 카니발리즘과 비교하여 적어도 10%, 20%, 30%, 40% 또는 적어도 50% 만큼 향상시킬 수 있다.

[0177] 그러므로, 하나의 구현예에서, 이온화 방사선에 노출된 종양 부피는 치료할 총 부피 보다 작으며, 예를 들어 부피가 적어도 10%, 20%, 30%, 40% 또는 적어도 50% 더 작다.

[0178] 또한, 특정 구현예에서, 방법은 이온화 방사선에 노출된 영역의 외부에 위치한 종양의 치료를 가능하게 한다.

[0179] 나노입자는 치료할 종양을 가진 대상체에 방사선 치료의 첫 번째 방사선 투여 전, 예를 들어 5분, 15분, 30분, 45분, 1시간, 2시간, 4시간, 6시간, 12시간, 24시간,에 투여될 수 있다.

[0180] 본 발명의 방법의 다른 양태 및 장점은 하기 실시예에서 명백해질 것이며, 이 실시예들은 단지 예시 목적으로 제공된다.

[0181] **실시예**

[0182] *재료 및 방법*

[0183] *세포, 시약 및 가돌리늄 기반 나노입자*

[0184] 대장암종($p53^{+/+}$, $p53^{R248W/+}$ 및 $p53^{R248/-}$) HCT116 세포를 10% 열-불활성화 태아 소 혈청 (Hycultec GmbH), 2mM L-글루타민 및 100 IU/mL 페니실린-스트렙토마이신 (Life technology)이 보충된 McCoy's 5A 배지 (Life Technology)에서 유지되었다. 인간 대장암종 돌연변이 HCT116 $p53^{R248W/-}$, $p53^{R248W/+}$ 및 HCT116 $p53^{+/+}$는 Dr. Christophe Bourdon에서 입수하였다. 벤질옥시카르복실-Val-Ala-Asp (OMe) 플루오로메틸케톤 (Z-VAD-fmk)을 Bachem에서 입수하였다. ROCK1 억제제 (Y27632) 및 N-아세틸시스테인 (NAC)은 시그마(Sigma)에서, 망간(III)-테트라키스(4-벤조익산)포르피린 (MnTBAP)은 머크 케미칼(Merck chemicals)에서 입수하였다. 가돌리늄-기반 나노입자 (GdBN)는 NH TherAguix에서 입수하였다.

[0185] *RNA-매개 간섭*

[0186] ROCK1에 특이적인 작은 간섭 RNA (siRNA) (siRNA-1 ROCK1 : 5 'GCC GCC GGG ACC CAA CUA U 3'; siRNA-2 ROCK1 : 5 'GGA AUC CAG UUG AAU ACA A 3') 및 대조 siRNA (siRNA-1 Co.:5 'GCC GGU AUG CCG GUU AAG U 3')를 시그마에서 입수하였다.

[0187] 스마트풀(SMARTpool) siGENOME NOX5 siRNA (siRNA NOX5) (D-010195-05)는 4개의 siRNA (siRNA-1: 5 'GGA GCA AGG UGU UCC AGA A 3'; siRNA-2: 5 'CUA UAG ACC UGG UGA CUA C 3'; siRNA-3: 5'GCU UAU GGG CUA CGU GGU A 3 '및 siRNA-4: 5'CCU UCU UUG CAG AGC GAU U 3 ')을 포함한다. 대조군 siGENOME 비-타겟팅 siRNA (siRNA-2 Co.로 표시됨)는 4개의 온-타겟과 비-타겟팅 siRNA의 풀(pool) (D-001206-13-05)이다. 스마트풀 siGENOME NOX5 siRNA 및 siGENOME 비-타겟팅 siRNA 풀 #1은 Dharmacon에서 구입하였다. RNA 간섭의 경우, siRNAs 트랜스펙션 48시간 전에 HCT116 세포를 (6-웰 플레이트에서 $5.0x10^5$ 세포/2 mL/웰) 씨딩하였다. 이어서, 제조사의 지시에 따라 리포펙타민 RNAi max (#13778150, Life technologies)를 사용하여 세포를 10 nM siRNA로 트랜스펙션하고 후속 실험 전 37 ℃에서 24시간 동안 인큐베이션하였다.

[0188] *조사*

[0189] HCT116 세포를 6-웰 플레이트에 씨딩하고 표시된 농도의 GdBN과 함께 1시간 동안 37 ℃에서 인큐베이션하였다. 이어서, 세포에 X-선 조사기 (1Gy/분, 200 keV, 15mA, 2mm 구리 두께, X-RAD 320, 정밀 X-선) 또는 감마선 조사기 (IBL-637, Cs137, 1Gy/분, 감마 CIS-BioInternational, IBA, Saclay, France)를 조사하였다. 후속 실험을 위해 조사 후 지정된 시점에 세포를 수거하였다.

[0190] *면역 형광 및 유세포 분석*

[0191] 세포 카니발리즘은 이전에 기재된 바와 같이 결정되었다[13]. 간단히 말해서, 처리된 세포를 10 μM의 5-(앤-6)-(((4-클로로메틸)벤조일)아미노)테트라메틸로다민(Cell Tracker Orange CMTMR, Invitrogen)로 염색하고, 미처리된 세포는 10 μM의 5-클로로메틸플루오레세인 디아세테이트 (Cell tracker Green CMFDA, Invitrogen)로 염

색하였다. 이어서, ROCK의 약리학적 억제제, Y27632 (30μM, TOCRIS) 또는 팬-카스파제 억제제, zVAD-fmk (100 μM, Calbiochem)의 존재에서 세포를 지정된 시간 동안 공-배양한다. 단일 및 카니발 세포에 대한 시클린-의존성 키나제 억제제 p21의 특정 아세포 염색의 경우, 세포를 4% 파라포름알데히드/포스페이트-완충 식염수(PBS)에 10분 동안 고정시키고, PBS에서 0,3% 트리톤 X-100 (시그마)에 투과시키고 1시간 동안 5% FCS-PBS와 인큐베이션하였다. 인간 p21에 대한 토끼 항체 (Cell Signaling Technology, #2947)를 1 mg/ml BSA를 함유하는 PBS에서 면역 검출에 사용하고 Invitrogen의 Alexa 488 플루오로 크롬에 접합된 염소 항-토끼 IgG로 밝혀졌다. 세포를 Hoechst 33342 (Invitrogen)로 대조 염색하고 Zeiss LSM510의 형광 공초점 현미경 또는 63x 대물 렌즈를 사용하는 LEICA DMi8의 형광 현미경으로 분석하였다. 유세포 분석에 의한 세포 사멸의 유도를 검출하기 위해, 세포를 40 nM에서 3,3'-디헥실록사카르보시아닌, DIOC6 (3) 및 2 μg/mL에서 프로피듐 아이오다이드 (Invitrogen, Molecular probes, OR, USA)로 37 ℃ 및 5% CO_2에서 30분 동안 염색하였다.

[0192] 구아바 EasyCyte (Millipore EMD)에 대해 세포 질소 측정을 수행하고, Incyte 소프트웨어 (Millipore)를 사용하여 데이터를 분석하였다. 세포 주기 분포는 전술한 바와 같이[14] 10 μg/ml의 Hoechst 33342 (Invitrogen)로 평가하였다. 세포 형광은 LSR IITM 유세포 분석기 (Becton-Dickinson)를 사용하여 정량화되었다. 형광 히스토그램은 Kaluza 소프트웨어 버전 1.5로 분석되었다.

[0193] *노화 관련 β-갈락토시다제 검출*

[0194] 표시된 시간에, 세포를 앞서 기술된 바와 같이 노화 β-갈락토시다제 염색 키트 (세포 신호 기술)를 사용하여 고정하고 염색하였다.

[0195] *면역 블로팅*

[0196] 총 세포 용해물을 프로테아제 및 포스파타제 억제제 칵테일(EDTA-free inhibitors, Roche-diagnostics, Meylan, France)이 보충된 용해 완충액(0,1% NP40 ; 200 mM HEPES ; 100 mM KCl ; 1 mM EDTA ; 1% 글리세롤 최종 농도)에서 제조하였다. 브래드 포드 분석법 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)을 사용하여 단백질 추출물을 정량하였다. 단백질 추출물 (20-40 μg)을 4-12% NuPAGE 비스-트리스 겔 (Invitrogen) 상에서 투여하고 4 ℃에서 니트로셀룰로오스 막으로 옮겼다. 블로킹 후, 제조사의 지침에 따라 막을 1차 항체로 4 ℃에서 밤새 인큐베이션하였다: $p21^{WAF1/CIP1}$ (Cell signaling #2947); NOX-5 (Abcam #191010) ; 절단된 카스파제-3 (Cell signaling #9664) ; MLC2S19* (Cell signaling #3671) 또는 MLC2 (Cell signaling #8505). 서양 고추냉이 퍼옥시다제-접합된 염소 항-마우스 또는 항-토끼 (Southern Biotechnology) 항체를 1시간 동안 인큐베이션하고 직접 화학발광 이미지 스캐닝 (G:BOX Syngene)을 사용하여 강화된 화학발광 프라임 검출 (Amersham, GE-Healthcare)로 밝혀졌다. GAPDH (#MAB374, EMD Millipore)를 로딩 대조군으로 사용하였다.

[0197] *ROS 생성 탐지*

[0198] 커버 유리 접시 (World Precision Instruments) 상에 세포를 씨딩하였다. 세포 내 ROS 수준을 제조사의 지시사항 (Invitrogen)에 따라 형광 프로브 (2,7-dichlorohydro-fluorescein diacetate (H2DCFDA)를 사용하여 평가하였다. 세포를 Hoechst 33342 (Invitrogen)로 대조 염색하고 형광 현미경 (63x 대물렌즈를 사용한 Leica DMi8)으로 분석하였다.

[0199] *RNA 간섭*

[0200] NOX5 침묵된 HCT116 클론은 GIPZ 렌티 바이러스 벡터에서 발현된 NOX5 유전자에 대해 3개의 특정 작은 헤어핀 RNA (shRNA) 풀을 사용하여 수행하였다. NOX5에 특이적인 shRNA (sh1NOX5 (clone ID, V3LHS 353964: 5' CTTGGACACCTTCGATCCA3' ; sh2NOX5 (clone ID, V2LHS 136069): 5' TAGAACACCTCAAAGTGGC3' ; sh3NOX5 (clone ID, V2LHS 136068): 5' ACAAAGTTCACAGTGTGAG3') 및 대조 shRNA (shControl: 5' GCCGGUAUGCCGGUUAAGU3')는 Dharmacon에서 구입하였다. 비-침묵 GIPZ 대조군 렌티바이러스 벡터 (clone ID: RHS4346, Dharmacon)를 사용하여 대조군 클론을 수행하였다.

[0201] *정량적 실시간 RT-PCR*

[0202] NOX5 mRNA의 검출을 위해, 본 발명자들은 NOX 5 유전자 (Hs00225846_m1) 및 GAPDH (Hs02758991_g1) (정규화용)에 대해 사전 설계된 응용 바이오시스템 프로브를 사용하였다. 이 프로브는 응용 바이오시스템에서 얻은 사전 제작된 TaqMan 유전자 발현 믹스에 포함되었다. 결과를 사이클 임계법 (CT)으로 분석하고 각 샘플을 내인성 GAPDH mRNA의 양으로 정규화하였다.

[0203] *면역 결핍 마우스의 종양 성장*

[0204] NOX5에 대해 고갈된 (shNOX5) 또는 그렇지 않은 (shControl)인 인간 대장 HCT116 세포를 37 ℃에서 1시간 동안 1.2mM의 GdBN으로 전처리하고 1회 단일 선량의 6Gy X-선 (XR)으로 조사하였다. 이어서, 2.5 10^6 shControl 또는 shNOX5 HCT116 세포를 6주령 스위스 누드 마우스 (Charles River Laboratories)에 이식하고, 시간-의존적인 방식으로 종양 성장을 모니터링하였다. 실험은 랜덤화되지 않았으며 EU 지침 63/2010에 따라 수행되었고 Gustave Roussy Cancer Campus (CEEA IRCIV/IGR n° 26)의 윤리위원회의 승인을 받았다.

[0205] *통계 분석*

[0206] 표본 크기를 미리 파악하기 위해 통계적 방법을 사용하지 않았다. 통계적 유의성은 일원 분산 분석 테스트(one-way ANOVA test)를 사용하여 결정되었다. 통계적으로 유의한 값은 도면 범례에 보고된다. 모든 실험은 적어도 세 번 독립적으로 수행되었다. 데이터는 평균 ± SEM으로 표시된다. 통계 분석을 수행하기 위해 그래프 패드 프리즘 버전 6.0b (그래프 패드 소프트웨어)가 사용되었다.

[0207] *결과*

[0208] *가돌리늄 기반 나노입자와 이온화 방사선의 병용은 세포 노화를 유도한다*

[0209] 앞서 보고한 바와 같이[13,14,] 암 세포는 세포 노화에 동시에 유도될 수 있는 뚜렷한 치사 양상(NCAD 또는 CAD 사멸 포함)을 통해 이온화 방사선 후 제거된다. 가돌리늄 기반 나노입자의 존재 하에 암 세포의 조사의 생물학적 효과를 결정하기 위해, 먼저 암 세포의 노화를 유도하는 이 치료의 능력을 분석하였다. 따라서, 인간 대장 HCT116 세포를 1시간 동안 1.2 mM의 가돌리늄계 나노입자 (GdBN)로 전처리한 후, 1회 단일 선량의 6 Gy X-선 (XR)으로 조사하였다. 2일 후, 세포질 노화-관련된 β-갈락토시다제 (SA-β-Gal) 활성, 사이클린-의존성 키나제 억제제 단백질 p21의 발현 및 처리된 HCT116 세포의 세포 주기 진행을 분석하였다. 대조군과 비교하여, XR로 HCT116 세포를 처리한 후 SA-β-Gal^+ 세포의 주파수가 유의하게 증가하는 것을 발견하였고, 또한 GdBN+XR의 조합이 XR로 처리한 후 검출된 SA-β-Gal^+ 세포의 수를 크게 증가시킨다는 사실에 특히 주의를 기울였다 (도 1a 및 1b). 형광 현미경 (도 1c 및 1d) 및 웨스턴 블롯 (도 1e)에 의해 p21의 증가된 발현을 검출함으로써 확인된 이들 결과는 가돌리늄-함유 입자와 이온화 방사선의 병용이 암 세포를 XR 후 노화 유도에 민감하게 한다는 것을 입증한다. 동시에, 우리는 또한 6 Gy 단독으로 또는 1.2 mM GdBN과 함께 조사되고 24시간 및 48시간 동안 배양된 HCT116 세포의 세포주기 분포를 유세포 분석법을 사용하여 분석하였다. 대조군 HCT116 세포와 비교하여, XR 단독으로 또는 GdBN+XR로 처리된 HCT116 세포의 G2/M 상의 유의미한 축적이 24시간 후에 검출되었지만 48시간의 배양 후에는 검출되지 않았다 (도 1f-1h). 이러한 결과는 XR과 GdBN의 결합 후 검출된 p21 발현의 현저한 증가와 일치한다 (도 1d 및 1e). 전사인자 p53이 p21 발현의 제어, 세포 노화 유도 동안 연장된 G2 정지(arrest)를 통해 야기될 수 있음을 고려하면[15,16], 야생형 ($p53^{+/+}$), p53에 대해 돌연변이 또는 전사적으로 불활성화된 ($p53^{R248W/+}$ 또는 $p53^{R248W/-}$) HCT116 세포에 6Gy 단독 또는 1.2mM GdBN과의 조합으로 조사하고 48시간 후 p21 발현 및 SA-β-Gal 활성에 대해 분석하였다. 예상대로, 본 발명자들은 p21 발현 (도 1f) 및 SA-β-Gal 활성 (도 1g)이 XR 및 GdBN+XR 처리 후 유의하게 감소하였으며, 이는 p53의 전사 활성이 XR- 또는 XR+GdBN-유도된 세포 노화에 필요함을 나타내는 것을 관찰하였다. 종합하면, 이들 결과는 가돌리늄-함유 나노입자의 존재 하에 암 세포의 조사가 세포 노화의 유도를 통해 조사된 암 세포의 제거를 선호한다는 것을 입증한다.

[0210] *가돌리늄 기반 나노입자는 조사된 암 세포의 세포 카니발리즘에 유리하다*

[0211] 암세포의 GdBN과 XR의 병용 치료에 의해 유발되는 치사 과정을 추가로 식별하기 위해, 우리는 세포 자율적 및 비-세포 자율적 사멸을 유도하는 이러한 처치능을 결정하였다. 이와 관련하여 앞에서 설명한 것처럼[13,14], 우리는 먼저 5-(앤드-6)-(((4-클로로메틸)벤조일)아미노)테트라메틸로다민(CMTMR, red) 형광 바이탈 프로브 표지된 처리되지 않은 HCT116 세포와 5-클로로메틸플루오레세인 디아세테이트 (CMFDA, 녹색) 형광 바이탈 프로브로 표지된 동종 HCT116 세포 사이의 공동-배양을 수행하고, 표시된 농도의 GdBN의 존재 (또는 부재)에서 다양한 선량으로 조사하였다. 공동-배양 24시간 후, CMFDA$^+$ 세포 및 CMTMR$^+$ 세포의 세포 운명이 세포 포식(engulfment)을 위해 분석되었다. 공초점 분석은 비처리된 CMFDA$^+$ HCT116 세포 (도 2b)와 조사된 (XR) 또는 GdBN+XR-처리된 CMTMR+HCT116 세포의 공동-배양 동안 세포 포식이 검출됨을 보여주었다. 이 과정은 선량에 따라 발생했으며 (도 2c) 암 세포에 γ-방사선을 조사한 경우에도 관찰된다 (도 2d). 세포 포식에 관여하는 생물학적 메커니즘을 추

가로 특성화하기 위해, 우리는 세포 침습 또는 세포 카니발리즘 메커니즘을 유도하는 이러한 치료의 능력을 조사하였다. 형광 현미경을 사용하여, 우리는 조사된 (XR) 및 GdBN+XR-처리된 $CMTMR^{+}$ HCT116 세포는 그들이 받은 치료와는 독립적으로 인접 ($CMFDA^{+}$ 또는 $CMTMR^{+}$) HCT116 세포를 내재화하였음을 관찰하였다 (도 2e). 우리는 조사된 세포와 비교하여 GdBN+XR-처리된 세포의 카니발리즘 활성의 현저한 증가를 관찰하여, GdBN과 XR의 암 세포 병용 치료가 조사된 세포의 카니발리즘 활성을 나타내는 능력을 증가시킨다는 것을 밝혔다. 이러한 실험과 병행하여, 우리는 동시에 다른 CAD 양상 (예, 아폽토시스 및 괴사)을 겪는 조사된 세포의 능력도 평가하였다. 처리된 세포의 미토콘드리아 막 및 원형질막의 투과성을 (유동 세포 측정법에 의한 3,3'-디헥실록사카르보시아닌 아이오다이드 및 프로피듐 아이오다이드 (DiOC6(3)/IP) 염색의 동시 검출을 통해) 분석함으로써, 우리는 XR 또는 GdBN+XR 처리에 반응하여 검출된 세포 카니발리즘이 아폽토시스 또는 괴사의 유의적인 유도가 없는 상태에서 유도되었음을 관찰하였다 (도 2f-2j). 전체적으로, 이들 결과는 가돌리늄-함유 나노입자로 암 세포를 처리한 후 조사된 세포의 세포 카니발리즘 작용을 높일 수 있다는 사실을 강조한다.

[0212] *ROdB1 키나아제의 활성화는 GdBN+XR 처리 후 검출된 살아있는 세포 포식에 필요하다*

[0213] 상술한 세포 카니발리즘에 관련된 분자 메커니즘을 정확하게 하기 위해, 이어서 우리는 인접 암 세포의 살아있는 세포 포식과 관련된 신호 경로를 연구하였다. 우리는 먼저 (XR 또는 GdBN+XR 처리 후 카스파제-3의 전-세포사멸적 분해가 없는 것으로 확인된 바와 같이(도 3a)) XR 또는 GdBN+XR 처리 후 관찰된 세포 포식이 세포사멸 유도 없이 발생하였고, 팬-카스파제 억제제인 Z-VAD-fmk에 의해 억제되지 않았으며(도 3c), 이는 이 과정이 죽어가는 세포의 세포사멸적 흡수와 무관하며 살아있는 암세포의 내재화를 가능하게 한다는 것을 나타냄을 밝혀냈다. 게다가, 우리는 (세린 19 (MLC2S19*)에서 미오신 경쇄 2의 인산화에 의해 밝혀진 바와 같이) GdBN, XR을 사용한 HCT116 세포의 처리, 또는 GdBN와 XR의 병용 치료가 키나제 ROCK1을 활성화시키는 것을 보여주었다 (도 3b). 우리는 GdBN의 존재 또는 부재 시 암 세포의 조사 후 MLC2S19*의 유의하게 증가된 인산화를 관찰하였으며 (도 3c), 이는 ROCK1의 활성화는 GdBN+XR 처리 후 검출된 인접 암 세포의 포식에 필요할 수 있음을 나타낸다. XR- 또는 GdBN+XR-매개 세포 포식 동안 ROCK-1 의존성 신호 전달 경로의 기여를 결정하기 위해, 이어서 1.2 mM GdBN의 존재 (또는 부재)에서 6 Gy로 조사된 HCT116 세포의 공동-배양에 ROCK1의 약리학적 억제제 (Y27632)를 첨가하고 공동-배양 24시간 후 세포 칸나발리즘의 프리퀀시를 측정하였다. 우리는 (도 3b에 제시된 바와 같이) Y27632에 의한 ROCK1의 약리학적 억제가 6 Gy 조사 단독 후 및 1.2 mM GdBN의 존재 하에 HCT116 세포의 조사 후 검출된 세포 카니발리즘을 억제한 것을 관찰하였으며(도 3c), 이는 ROCK1의 생물학적 활성이 XR 또는 GdBN+XR 처리 후 검출된 세포 카니발리즘에 필요하다는 것을 밝혀냈다. 그런 다음 포식된 (표적) 세포 또는 포식된 (카니발) 세포에 대한 두 개의 특정 작은 간섭 RNA (siRNA)로 ROCK1을 고갈시킴으로써 GdBN+XR-유도 세포 카니발리즘에 키나제 ROCK1의 기여를 더 잘 정의하였다. 우리는 두 상호 작용 세포에 대한 ROCK1의 고갈은 XR 또는 GdBN+XR 처리 후 검출된 세포 카니발리즘의 프리퀀시를 감소시킴을 관찰하였으며(도 3d 및 3e), 이는 키나제 ROCK1이 GdBN+XR-매개 세포 카니발리즘의 유도 동안 포식된 표적 세포 및 포식된 카니발 세포 둘 다에서 중심적인 역할을 한다는 것을 나타낸다.

[0214] *포식된 세포의 분해는 카니발 세포의 노화와 양의(positively) 상관 관계가 있다*

[0215] XR 또는 GdBN+XR 처리 후 검출된 포식된 세포 및 카니발 세포 둘 다의 운명을 결정하기 위해, 본 발명자들은 1.2mM GdBN의 존재 (또는 부재)에서 6Gy로 조사 된 HCT116 세포의 24시간 공동 배양 후 관찰된 포식된 HCT116 세포의 핵에서의 염색질 축합 및 핵 분열의 존재를 형광 현미경을 통해 검출하였다.단독 조사 후 또는 GdBN의 존재 하에서 암 세포의 조사 후에 검출된 모든 포식된 세포는 표적 세포 분해의 징후를 나타내는 것으로 관찰되었다 (도 4a 및 4d). 흥미롭게도, 우리는 팬-카스파제(pan-caspase) 억제제 억제제인 Z-VAD-fmk가 표적 세포 분해를 억제하지 못했음을 입증하였으며(도 4d), 이는 카스파제의 활성화가 X-선 방사선 또는 GdBN과의 병용에 의해 유발되는 세포 카니발리즘의 실시에 필요하지 않음을 나타낸다. 게다가, 우리는 또한 XR- 또는 GdBN+XR-유도 카니발 세포는 p21 발현 (도 4b 및 4e) 및 $SA\text{-}\beta\text{-}Gal^{+}$ 활성 (도 4c 및 4f)의 증가를 나타내었고, 이는 XR- 또는 GdBN+XR 처리 후, 카니발 세포가 노화를 겪을 수 있거나, 대안적으로 단일 노화 세포가 인접 세포를 내재화할 수 있음을 나타낸다.

[0216] *GdBN+XR 매개 노화 및 세포 카니발리즘은 NADPH 옥시다제 5 (NOX5) 의존적 ROS 생성에 의해 제어된다*

[0217] 활성산소종 (ROS) 생성이 이온화 방사선 후 노화 유도와 관련된 주요 세포 스트레스 중 하나임을 고려하여[17], 우리는 XR 및 GdBN+XR 처리 후 ROS 생성을 분석하였다. 형광 현미경으로 비-형광 염료 2,7-디클로로하이드로 플루오레세인 디아세테이트 (H2DCFDA)를 형광 2,7-디클로로하이드로플루오레세인(DCF)으로 변환하는 것을 검출함으

로써, XR 또는 GdBN+XR 처리 후 얻은 단일 세포 및 카니발 세포가 ROS를 생성능을 측정하였다. 우리는 이러한 처치가 단일 및 카니발 세포 모두에서 ROS의 생성을 유도한다는 것을 관찰하였다 (도 5a 및 5b). 또한, 우리는 ROS 생성을 둔화하는 것으로 알려진[18] 산화방지제 N-아세틸시스테인 (NAC) 및 수퍼옥사이드 디스무타제(SOD) 모방 Mn(III) 테트라키스(4-벤조익산) (MnTBAP)는 XR 단독 또는 GdBN+XR 조합으로 HCT116 세포를 처리한 후 검출된 세포 노화 (p21 발현의 검출에 의해 밝혀짐 (도 5c))를 감소시킴을 밝혔다. 이러한 결과는 ROS 생성이 XR 및 GdBN+XR 처리와 관련된 노화 및 세포 카니발리즘의 유도에 중요한 역할을 한다는 것을 입증하였다. ROS 생성의 주요 세포 내 공급원인 NADPH 산화효소(NOX)가 이러한 과정을 조절할 수 있는지 여부를 판단하기 위해[19, 20], 본 발명자들은 조사된 인간 1차 섬유아세포[21]의 사멸에 관여한 NADPH 옥시다제인 NADPH 옥시다제 5 (NOX5)가 ROS의 생성에 참여할 수 있는지를 결정하였다. 따라서, 본 발명자들은 XR 또는 GdBN+XR로 HCT116 세포를 처리한 후 검출된 ROS 생성, p21 발현, SA-β-갈락토시다제 활성 및 세포 칸나발리즘에 대한 NOX5 고갈의 영향을 평가하였다 (도 5a-5h). 우리는 특정 작은 간섭 RNA와 NOX5의 고갈이 ROS 생성(도 5d 및 도 5e)을 차단시키고, p21 발현 (도 5f) 및 SA-β-Gal+ 활성(도 5g)을 감소시키며 XR 및 GdBN+XR 처리 후 검출된 세포 칸나발리즘을 손상(도 5h)시켰음을 입증하였다.

[0218] *NADPH 산화효소 5 (NOX5) 불활성화는 XR 및 GdBN+XR 처리에 의해 유발되는 종양 억제를 강화한다*

[0219] NOX5 불활성화가 종양 성장에 미치는 영향을 설명하기 위해, 짧은 헤어핀 RNA(도 6a)를 사용하여 RNA 간섭을 통해 고갈 (shNOX5)되거나 그렇지 않은 (shControl) 인간 대장 HCT116 세포를 37 ℃에서 1시간 동안 1.2mM의 GdBN으로 전처리하고, 이어서, 1회 단일 선량의 6 Gy X-선(XR)으로 조사하였다. Balb/c 누드 마우스에 종양 세포를 피하 주사하고 종양 성장을 평가하였다. 우리는 이온화 방사선이 GdBN-처리된 또는 대조군 마우스와 비교하여 암 세포 이식 후 종양의 성장을 억제하고, 가돌리늄계 입자와 이온화 방사선 (GdBN + XR)의 병용이 XR의 종양 성장 정지 능력을 높인다는 것을 확인하였다 (도 6b). 우리는 또한 NOX5의 불활성화가 NOX5에 대해 고갈된 대조군, GdBN-처리된, XR-처리된 또는 GdBN+XR-처리된 HCT116 세포의 이식 후 수득된 종양의 성장을 강하게 저해한다는 것을 관찰하였다 (도 6c). 이러한 결과는 NOX5가 종양 이식 또는 GdBN 단독으로의 치료 및 XR 단독 또는 GdBN + XR의 종양 억제 활성에 의해 유발되는 세포 스트레스로부터 암 세포를 보호한다는 것을 나타낸다. 종합하면, 이들 결과는 NOX5 불활성화와 GdBN+XR의 병용이 방사선 요법의 효율을 강하게 향상시킨다는 것을 입증한다.

[0220] ***References***

[0221] 1. Schaue D, McBride WH. Opportunities and challenges of radiotherapy for treating cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2015, **12**(9): 527-540.

[0222] 2. Beasley M, Driver D, Dobbs HJ. Complications of radiotherapy: improving the therapeutic index. *Cancer Imaging* 2005, **5**: 78-84.

[0223] 3. Hainfeld JF, O'Connor MJ, Dilmanian FA, Slatkin DN, Adams DJ, Smilowitz HM. Micro-CT enables microlocalisation and quantification of Her2-targeted gold nanoparticles within tumour regions. *Br J Radiol* 2011, **84**(1002): 526-533.

[0224] 4. Dorsey JF, Sun L, Joh DY, Witztum A, Kao GD, Alonso-Basanta M, *et al.* Gold nanoparticles in radiation research: potential applications for imaging and radiosensitization. *Transl Cancer Res* 2013, **2**(4): 280-291.

[0225] 5. Taupin F, Flaender M, Delorme R, Brochard T, Mayol JF, Arnaud J, *et al.* Gadolinium nanoparticles and contrast agent as radiation sensitizers. *Phys Med Biol* 2015, **60**(11): 4449-4464.

[0226] 6. McQuaid HN, Muir MF, Taggart LE, McMahon SJ, Coulter JA, Hyland WB, *et al.* Imaging and radiation effects of gold nanoparticles in tumour cells. *Sci Rep* 2016, **6**: 19442.

[0227] 7. Zhu J, Zhao L, Cheng Y, Xiong Z, Tang Y, Shen M, *et al.* Radionuclide (131)I-labeled multifunctional dendrimers for targeted SPECT imaging and radiotherapy of tumors. *Nanoscale* 2015, **7**(43): 18169-18178.

[0228] 8. Mi Y, Shao Z, Vang J, Kaidar-Person O, Wang AZ. Application of nanotechnology to cancer radiotherapy. *Cancer Nanotechnol* 2016, **7**(1): 11.

[0229] 9. Le Duc G, Miladi I, Alric C, Mowat P, Brauer-Krisch E, Bouchet A, *et al.* Toward an image-guided

microbeam radiation therapy using gadolinium-based nanoparticles. *ACS Nano* 2011, **5**(12): 9566-9574.

[0230] 10. Dufort S, Bianchi A, Henry M, Lux F, Le Duc G, Josserand V, *et al.* Nebulized gadolinium-based nanoparticles: a theranostic approach for lung tumor imaging and radiosensitization. *Small* 2015, **11**(2): 215-221.

[0231] 11. Hainfeld JF, Slatkin DN, Smilowitz HM. The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. *Phys Med Biol* 2004, **49**(18): N309-315.

[0232] 12. Eriksson D, Stigbrand T. Radiation-induced cell death mechanisms. *Tumour Biol* 2010, **31**(4): 363-372.

[0233] 13. Raza SQ, Martins I, Voisin L, Dakhli H, Paoletti A, Law F, *et al.* Entescence, a senescence program initiated by cellular cannibalism

[0234] 14. Martins I, Raza SQ, Voisin L, Dakhli H, Allouch A, Law F, *et al.* Anticancer chemotherapy and radiotherapy trigger both non-cell-autonomous and cell-autonomous deaths

[0235] 15. Gire V, Dulic V. Senescence from G2 arrest, revisited. *Cell Cycle* 2015, **14**(3): 297-304.

[0236] 16. Baus F, Gire V, Fisher D, Piette J, Dulic V. Permanent cell cycle exit in G2 phase after DNA damage in normal human fibroblasts. *EMBO J* 2003, **22**(15): 3992-4002.

[0237] 17. Lu T, Finkel T. Free radicals and senescence. *Exp Cell Res* 2008, **314**(9): 1918-1922.

[0238] 18. Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci* 2003, **60**(1): 6-20.

[0239] 19. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 2004, **4**(3): 181-189.

[0240] 20. Drummond GR, Selemidis S, Griendling KK, Sobey CG. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 2011, **10**(6): 453-471.

[0241] 21. Weyemi U, Redon CE, Aziz T, Choudhuri R, Maeda D, Parekh PR, *et al.* Inactivation of NADPH oxidases NOX4 and NOX5 protects human primary fibroblasts from ionizing radiation-induced DNA damage. *Radiat Res* 2015, **183**(3): 262-270.

[0242] 22. Gmeiner WH, Ghosh S. Nanotechnology for cancer treatment. *Nanotechnol Rev* 2015, **3**(2): 111-122.

[0243] 23. Kobayashi K, Usami N, Porcel E, Lacombe S, Le Sech C. Enhancement of radiation effect by heavy elements. *Mutat Res* 2010, **704**(1-3): 123-131.

[0244] 24. Collado M, Blasco MA, Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* 2007, **130**(2): 223-233.

[0245] 25. Xue W, Zender L, Miething C, Dickins RA, Hernando E, Krizhanovsky V, *et al.* Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 2007, **445**(7128): 656-660.

[0246] 26. Ventura A, Kirsch DG, McLaughlin ME, Tuveson DA, Grimm J, Lintault L, *et al.* Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature* 2007, **445**(7128): 661-665.

[0247] 27. Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin HK, Dotan ZA, Niki M, *et al.* Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* 2005, **436**(7051): 725-730.

[0248] 28. Stein GH, Drullinger LF, Soulard A, Dulic V. Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1999, **19**(3): 2109-2117.

[0249] 29. Futreal PA, Barrett JC. Failure of senescent cells to phosphorylate the RB protein. *Oncogene* 1991, **6**(7): 1109-1113.

[0250] 30. Lundberg AS, Hahn WC, Gupta P, Weinberg RA. Genes involved in senescence and immortalization. *Curr Opin Cell Biol* 2000, **12**(6): 705-709.

[0251] 31. Ewald JA, Desotelle JA, Wilding G, Jarrard DF. Therapy-induced senescence in cancer. *J Natl Cancer Inst* 2010, **102**(20): 1536-1546.

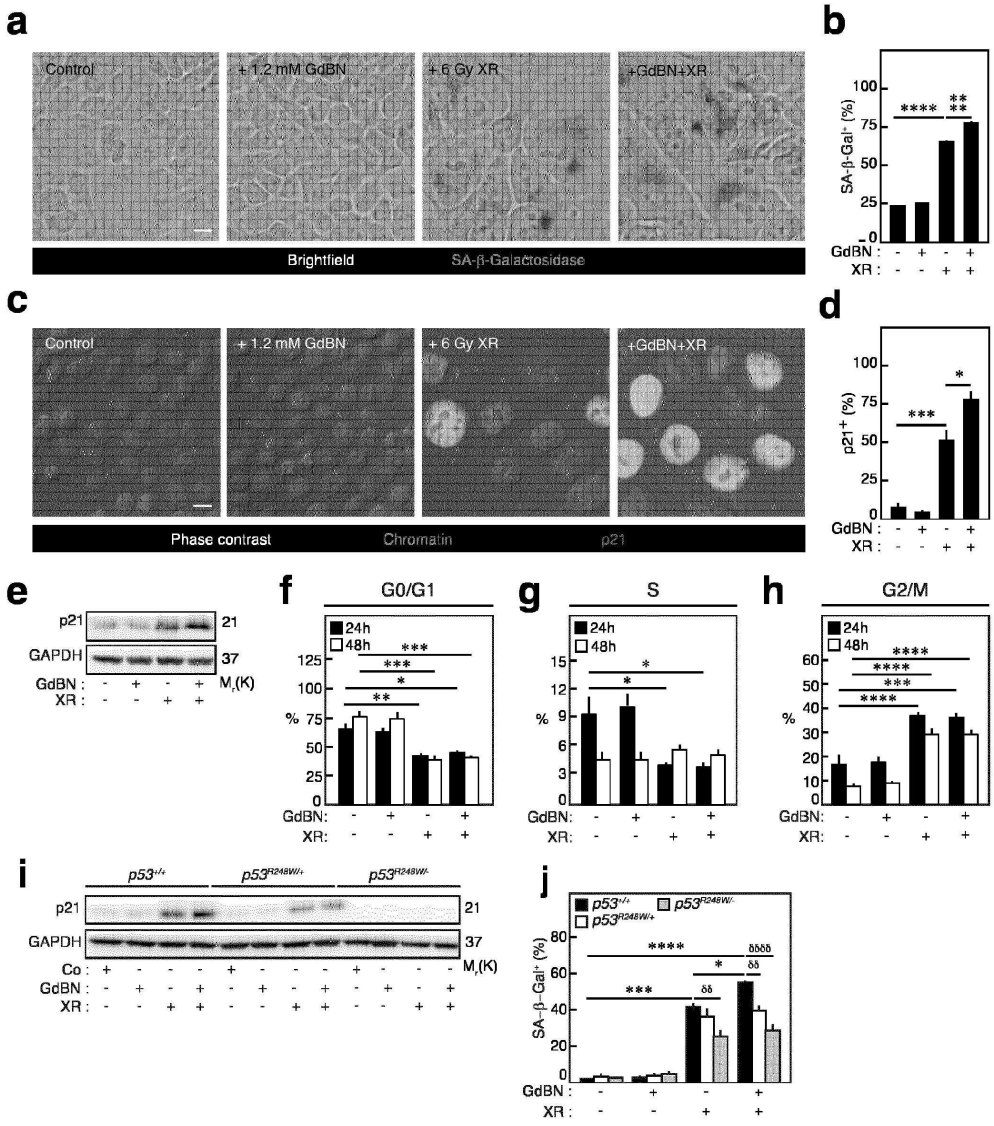
[0252] 32. Mikkelsen RB, Wardman P. Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene* 2003, **22**(37): 5734-5754.

[0253] 33. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007, **87**(1): 245-313.

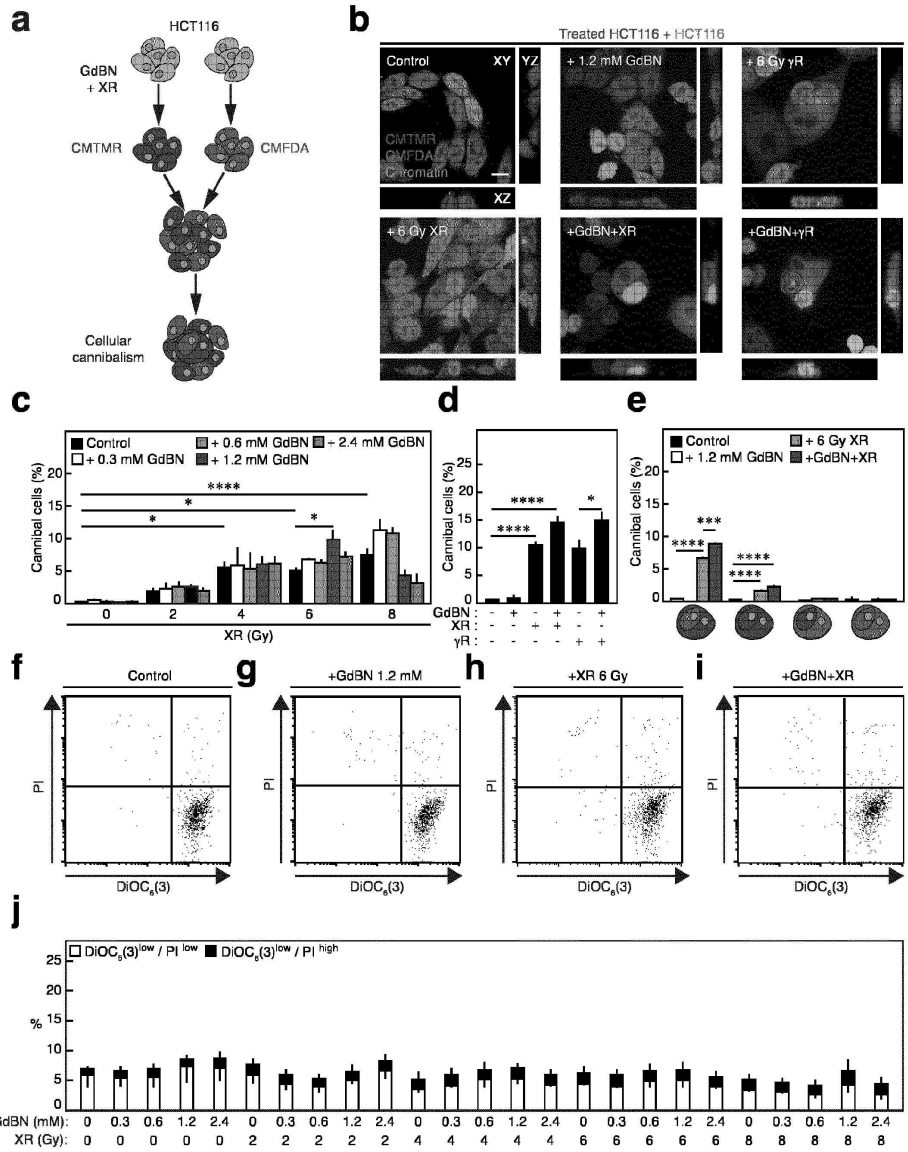
[0254] 34. Coppe JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol* 2010, **5**: 99-118.

도면

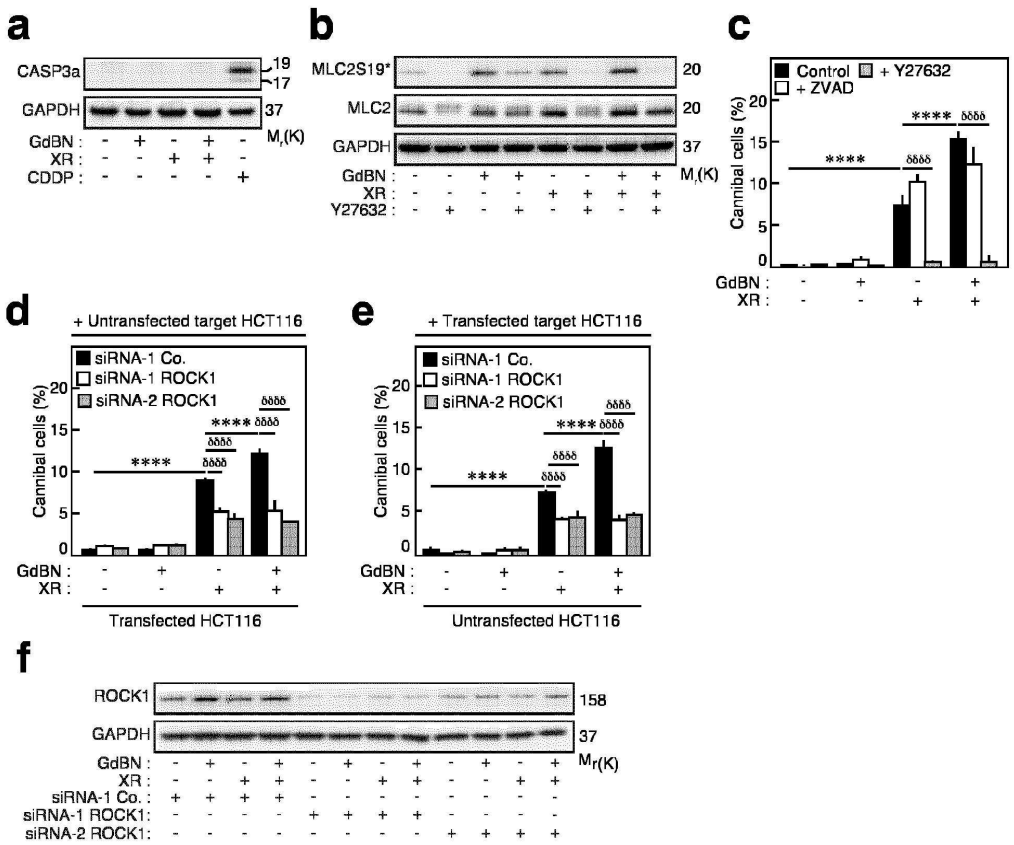
도면1



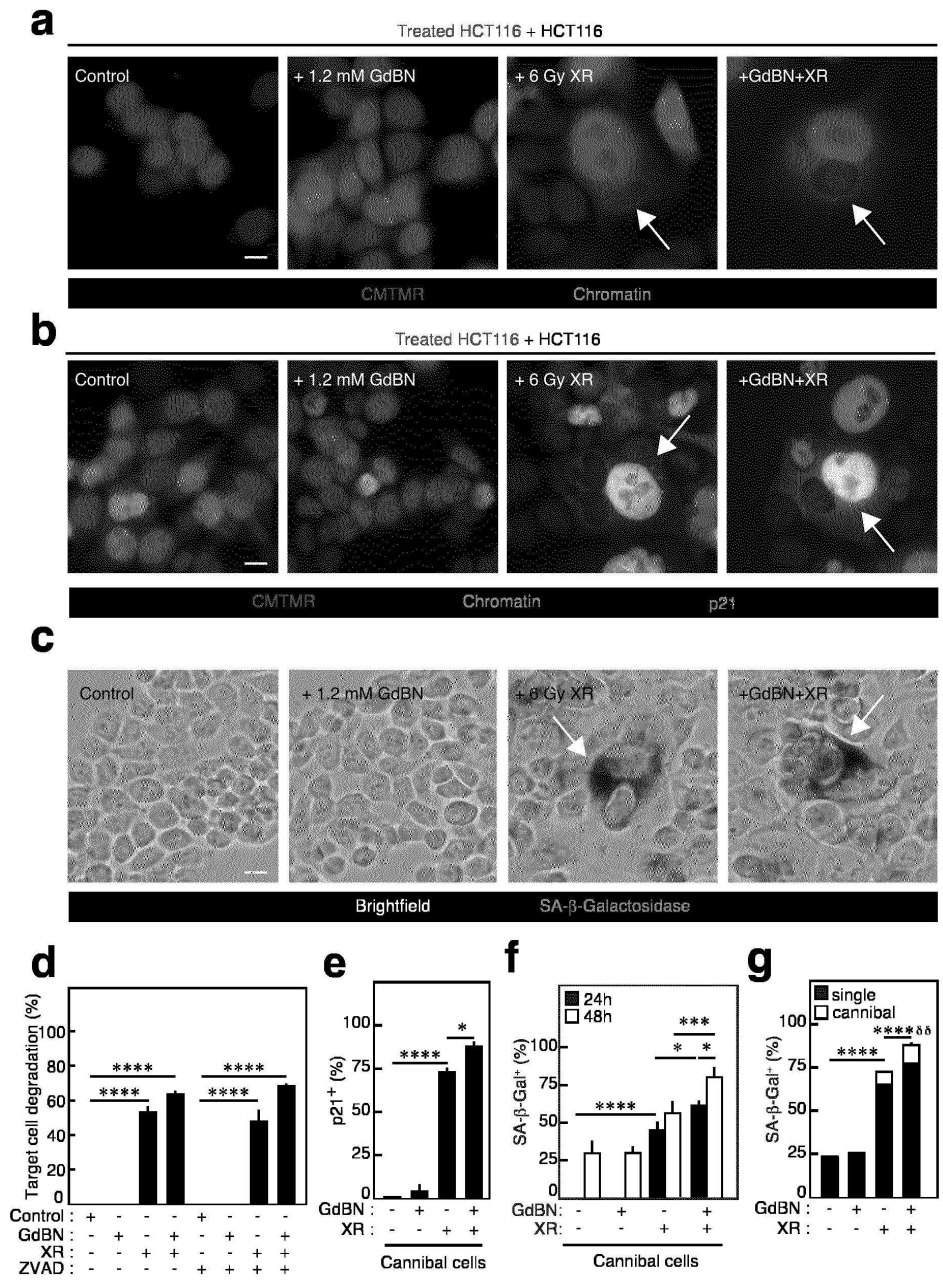
도면2


a
HCT116
GdBN + XR
CMTMR
CMFDA
Cellular cannibalism
b
Treated HCT116 + HCT116
Control
XY
YZ
XZ
CMTMR
CMFDA
Chromatin
+ 1.2 mM GdBN
+ 6 Gy γR
+ 6 Gy XR
+GdBN+XR
+GdBN+γR
c
d
e
Control
+ 0.3 mM GdBN
+ 0.6 mM GdBN
+ 1.2 mM GdBN
+ 2.4 mM GdBN
Cannibal cells (%)
XR (Gy)
GdBN :
XR :
γR :
+ 6 Gy XR
+GdBN+XR
f
g
h
i
Control
+GdBN 1.2 mM
+XR 6 Gy
+GdBN+XR
PI
DiOC6(3)
j
DiOC5(3)low / PI low
DiOC5(3)low / PI high
%
GdBN (mM):
XR (Gy):

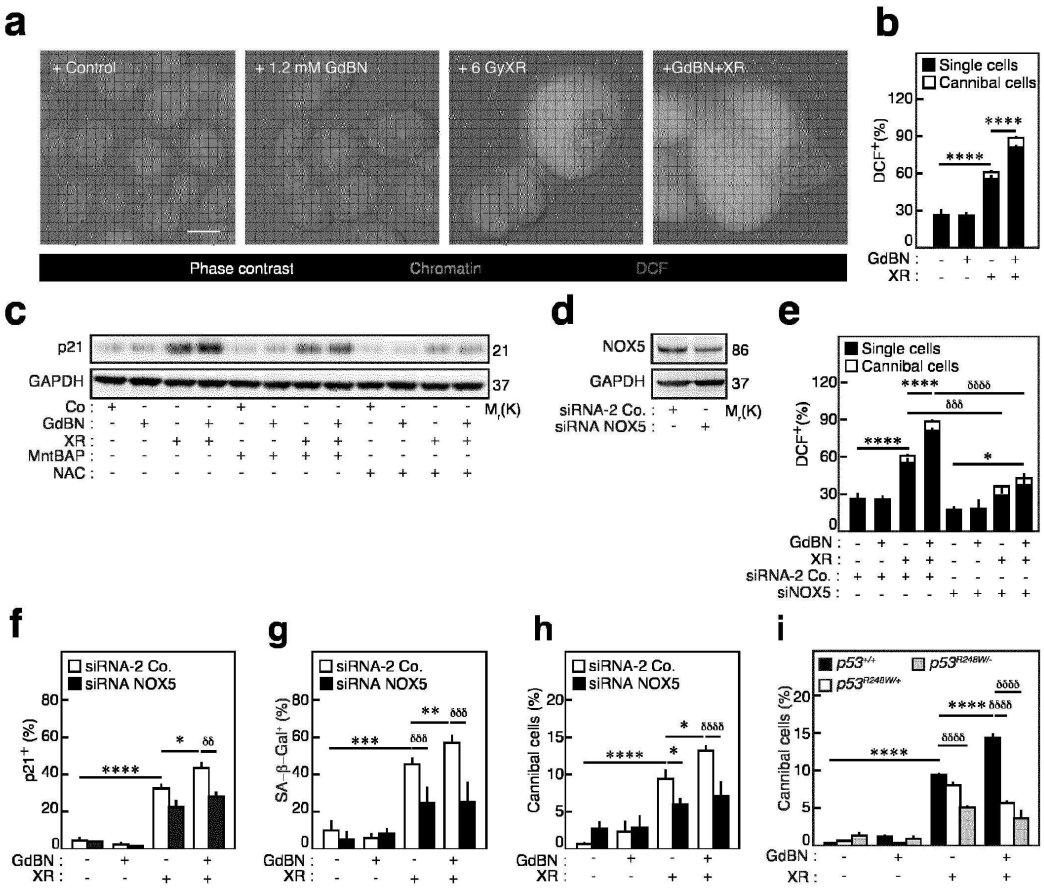
도면3


a
CASP3a
19
17
GAPDH
37
M,(K)
GdBN :
XR :
CDDP :
b
MLC2S19*
MLC2
GAPDH
20
20
37
M,(K)
GdBN :
XR :
Y27632 :
c
Control
+ Y27632
+ ZVAD
Cannibal cells (%)
****
δδδδ
GdBN :
XR :
d
+ Untransfected target HCT116
siRNA-1 Co.
siRNA-1 ROCK1
siRNA-2 ROCK1
Cannibal cells (%)
Transfected HCT116
e
+ Transfected target HCT116
Untransfected HCT116
f
ROCK1
GAPDH
158
37
Mr(K)
siRNA-1 Co. :
siRNA-1 ROCK1:
siRNA-2 ROCK1:

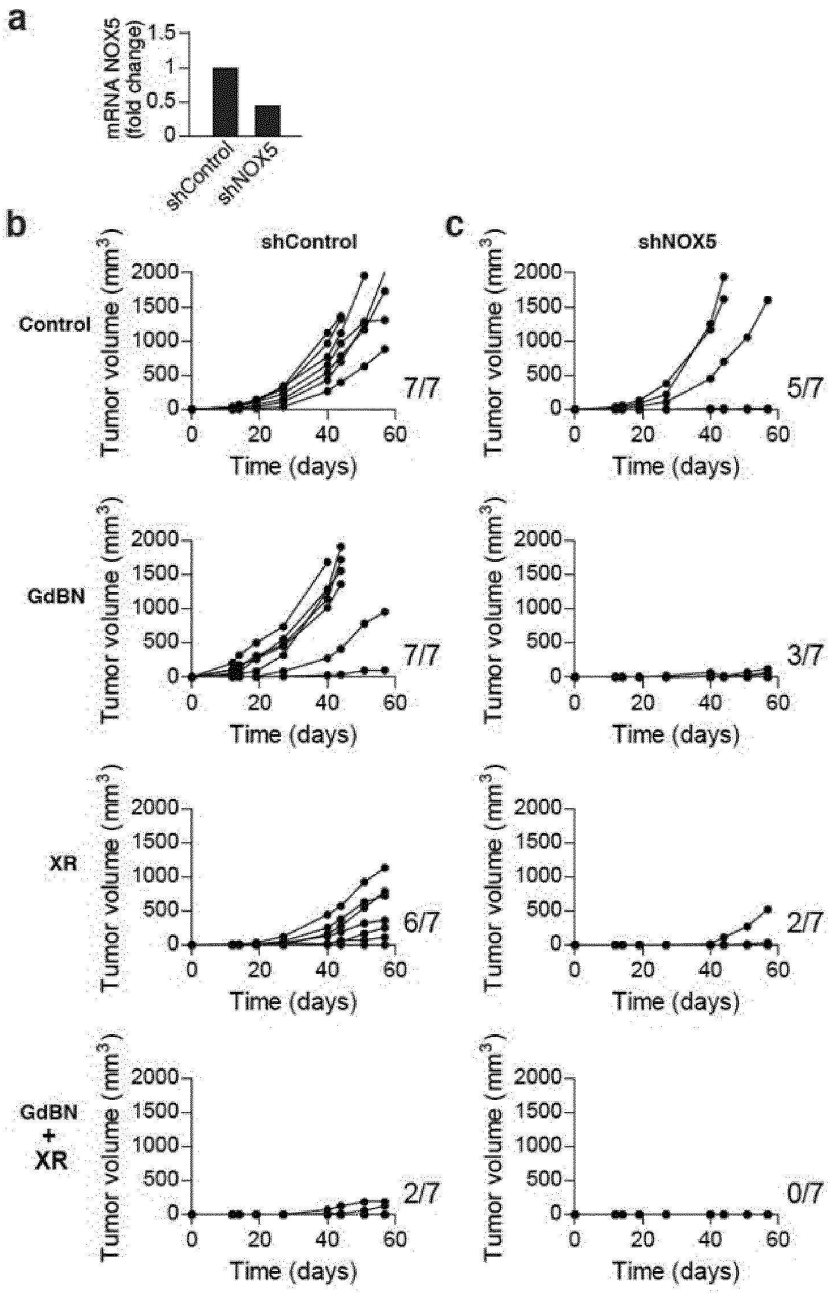
도면4


a
Treated HCT116 + HCT116
Control
+ 1.2 mM GdBN
+ 6 Gy XR
+GdBN+XR
CMTMR
Chromatin
b
Treated HCT116 + HCT116
Control
+ 1.2 mM GdBN
+ 6 Gy XR
+GdBN+XR
CMTMR
Chromatin
p21
c
Control
+ 1.2 mM GdBN
+ 6 Gy XR
+GdBN+XR
Brightfield
SA-β-Galactosidase
d
Target cell degradation (%)
Control :
GdBN :
XR :
ZVAD :
e
p21+ (%)
GdBN :
XR :
Cannibal cells
f
24h
48h
SA-β-Gal+ (%)
GdBN:
XR:
Cannibal cells
g
single
cannibal
SA-β-Gal+ (%)
GdBN :
XR :

도면5


a
+ Control
+ 1.2 mM GdBN
+ 6 GyXR
+GdBN+XR
Phase contrast
Chromatin
DCF
b
Single cells
Cannibal cells
DCF+(%)
GdBN :
XR :
c
p21
GAPDH
Co :
GdBN :
XR :
MntBAP :
NAC :
d
NOX5
GAPDH
siRNA-2 Co. :
siRNA NOX5 :
e
Single cells
Cannibal cells
DCF+(%)
GdBN :
XR :
siRNA-2 Co. :
siNOX5 :
f
siRNA-2 Co.
siRNA NOX5
p21+ (%)
g
SA-β-Gal+ (%)
h
Cannibal cells (%)
i
Cannibal cells (%)

도면6



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> NH THERAGUIX,

NH THERAGUIX

<120> METHODS FOR TREATING TUMORS

<130> EP2018/068099

<160> 11

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

gccgccggga cccaacuau 19

<210> 2

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

ggaauccagu ugaauacaa 19

<210> 3

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

gccgguaugc cgguuaagu 19

<210> 4

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

ggagcaaggu guuccagaa 19

<210> 5

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

cuauagaccu ggugacuac 19

<210> 6

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

gcuuaugggc uacguggua 19

<210> 7

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

ccuucuuugc agagcgauu 19

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

cttggacacc ttcgatcca 19

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

tagaacacct caaagtggc 19

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

acaaagttca cagtgtgag 19

<210> 11

<211> 19

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

gccgguaugc cgguuaagu 19