



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년11월18일

(11) 등록번호 10-2730833

(24) 등록일자 2024년11월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/51 (2006.01) A61K 47/60 (2017.01)
A61K 47/69 (2017.01)

(52) CPC특허분류
A61K 9/5115 (2013.01)
A61K 47/60 (2017.08)

(21) 출원번호 10-2017-7037129

(22) 출원일자(국제) 2016년05월26일
심사청구일자 2021년05월21일

(85) 번역문제출일자 2017년12월22일

(65) 공개번호 10-2018-0012299

(43) 공개일자 2018년02월05일

(86) 국제출원번호 PCT/US2016/034351

(87) 국제공개번호 WO 2016/196201

국제공개일자 2016년12월08일

(30) 우선권주장

62/168,636 2015년05월29일 미국(US)

62/280,960 2016년01월20일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

US20130039848 A1*

EMMA LACHAIE et al., ANTICANCER RESEARCH,
2014, vol. 34, pp.6417-6422

Scott J. Dixon et al., Cell, vol. 149,
pp.1060-1072(2012.05.25.)

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

메모리얼 슬로안 케터링 캔서 센터

미국, 뉴욕 10065, 뉴욕, 요크 애비뉴 1275

코넬 유니버시티

미국 뉴욕 14850 이타카 스위트 310 파인 트리 로
드 395 옛 코넬 유니버시티(씨티엘) 센터 포 테크
놀로지 라이선싱

(72) 발명자

브래드버리, 미셸, 에스.

미국, 뉴욕 10065, 뉴욕, 요크 애비뉴 1275 메모
리얼 슬로안-케터링 캔서 센터 (내)

비즈너, 올리버

미국 14850 뉴욕 이타카 화이트 파크 로드 105

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 광장리앤코

전체 청구항 수 : 총 23 항

심사관 : 최홍석

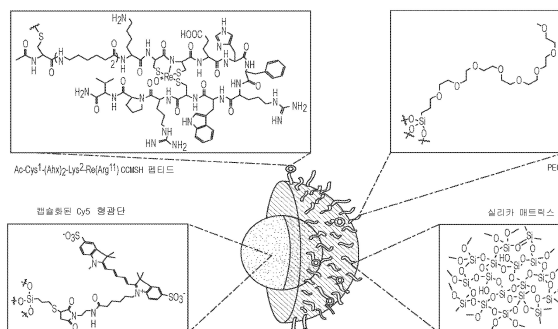
(54) 발명의 명칭 초소형 나노입자를 사용하여 페로토시스를 통해 영양분-결핍 암 세포의 세포 사멸을 유도하는
치료 방법

(57) 요약

나노입자 분해에 의한 페로토시스를 통해 세포 사멸을 유도하는 방법이 본원에 기술되어 있다. 또한, 본 기재내
용은 영양분-결핍된 환경과 조합하여 치료 경로에 걸쳐 고농도의 초소형 나노입자를 여러 번 투여하는 것을 기술
하고 있으며, 이에 의해 세포 대사 경로를 조절하여 페로토시스 메커니즘에 의한 세포 사멸을 유도한다. 페로토

(뒷면에 계속)

대표도



시스는 철, 반응성 산소 종, 및 세포 사멸 실행의 동시 모드를 포함한다.

(52) CPC특허분류

A61K 47/6923 (2017.08)

A61K 47/6929 (2017.08)

(72) 발명자

오버홀처, 미첼

미국, 뉴욕 10065, 뉴욕, 요크 애비뉴 1275 메모리
얼 슬로안-캐터링 캔서 센터 (내)

셰어, 호와르트

미국 07670 뉴저지 테나프리 하이우드 애비뉴 264

마, 카이

미국 14850 뉴욕 이타카 아파트먼트 엔2에이 노스
트립하머 로드 2250

명세서

청구범위

청구항 1

대상체의 종양의 치료를 위한 조성물로서,

종양 조직의 페로토시스를 유도하기 위해 $1\mu\text{M}$ 초과 농도로 투여된 실리카 나노입자로서, 조성물이 비처리 세포에 비해 종양 조직의 세포내 철 농도를 증가시키기 위해 투여되는 것을 특징으로 하는 실리카 나노입자를 포함하고,

이 때 실리카 나노입자의 평균 직경이 15nm 이하인,

조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 투여된 실리카 나노입자가 실리카를 포함하는 코어 및 코어를 적어도 일부분 둘러싸는 실리카 셸(shell)을 포함하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 투여된 실리카 나노입자에 약물이 부착되어 있지 않은 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 종양 조직이 아미노산 결핍된 조성물.

청구항 5

대상체의 종양의 조합 치료를 위한 조성물로서,

종양 조직의 페로토시스를 유도하기 위해 $1\mu\text{M}$ 초과 농도로 투여된 실리카 나노입자로서, 종양 조직은 호르몬이 결핍되어 있고, 조성물이 비처리 세포에 비해 종양 조직의 세포내 철 농도를 증가시키기 위해 투여되는 것을 특징으로 하는 실리카 나노입자를 포함하고,

이 때 실리카 나노입자의 평균 직경이 15nm 이하인,

조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 투여된 실리카 나노입자가 실리카를 포함하는 코어 및 코어를 적어도 일부분 둘러싸는 실리카 셸을 포함하는 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서, 투여된 실리카 나노입자에 약물이 부착되어 있지 않은 조성물.

청구항 8

제5항에 있어서, 종양 조직이 거세를 통해 호르몬 결핍된 조성물.

청구항 9

제5항에 있어서, 종양 조직이 아미노산 결핍된 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 종양 조직이 신장, 전립선, 흑색종, 췌장, 폐, 섬유육종, 유방, 뇌, 난소 및 결장 종양 조직의

로 구성된 군으로부터 선택되는 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 종양 조직이 종양 췌장 조직을 포함하고, 종양 췌장 조직이 BxPC3 세포를 포함하는 조성물.

청구항 12

제10항에 있어서, 종양 조직이 종양 폐 조직을 포함하고, 종양 폐 조직이 H1650 세포를 포함하는 조성물.

청구항 13

제1항에 있어서, 실리카 나노입자의 평균 직경이 10nm 이하인 조성물.

청구항 14

제1항에 있어서, 실리카 나노입자의 평균 직경이 5nm 내지 7nm인 조성물.

청구항 15

제1항에 있어서, 실리카 나노입자가 1 내지 20개의 표적화 모이어티를 포함하며, 표적 모이어티는 세포 상의 수용체에 결합하는 조성물.

청구항 16

제1항에 있어서, 실리카 나노입자가 1 내지 20개의 표적화 모이어티를 포함하고, 1 내지 20개의 표적화 모이어티가 알파-멜라닌세포-자극 호르몬(α MSH)을 포함하는 조성물.

청구항 17

제1항에 있어서, 실리카 나노입자가 표적화 모이어티를 포함하는 조성물.

청구항 18

제1항에 있어서, 실리카 나노입자가 치료 과정에 걸쳐 여러 번 투여되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 19

제1항에 있어서, 치료 과정에 걸쳐 3 또는 4일마다 투여되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 20

제1항에 있어서, 종양 조직이 영양분 결핍된 조직 또는 종양 조직을 포함하는 조성물.

청구항 21

제1항에 있어서, 증가된 세포내 철 농도는 8.32 ppb(parts per billion) 이상인 조성물.

청구항 22

제1항에 있어서, 증가된 세포내 철 농도는 144.7 ppb(parts per billion) 이상인 조성물.

청구항 23

제1항에 있어서, 증가된 세포내 철 농도는 2.58 μ M 이상인 조성물.

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2015년 5월 29일자로 출원된 미국 출원 일련 번호 62/168,636 및 2016년 1월 20일자로 출원된 미국 출원 일련 번호 62/280,960의 이익을 주장하며, 이들의 개시 내용은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다.

[0003] 정부 지원

[0004] 본 발명은 NIH (National Institutes of Health)/National Cancer에 의해 부여된 교부금 1U54 CA199081-01, R01GM111350 및 1R01CA161280-01A1에 의한 정부 지원으로 이루어졌다.

[0005] 발명의 분야

[0006] 본 발명은 일반적으로 분자-수준 상호작용(예를 들어, 세포/준세포 기능, 예를 들어, 세포 사멸)을 조절하기 위한 나노입자, 예를 들어, 초소형 나노입자의 용도에 관한 것이다. 특정 구체예에서, 본 발명은 초소형 나노입자(예를 들어, C 또는 C' dot)를 사용하여 페로토시스를 통해 영양분-결핍된 암 세포에서 세포 사멸을 선택적으로 유도하는 치료 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0007] 고도로 통합된 암-표적화된 나노의약의 설계 및 개발은 질병-특이적 표적화를 강화시키고 세포내 약리학적 표적에 대한 접근성을 향상시킬 것으로 기대된다. 그러나, 생물학적 시스템에서 나노의약의 운명을 이끌어내는 분자-수준의 상호작용(예를 들어, 세포/준세포 기능의 조절)에 대한 상세한 이해는 여전히 명확하지 않다. 예를 들어, 엔도사이토시스와 세포내 트래피킹(trafficking), 생리학적 및/또는 대사 경로 사이의 복잡한 상호작용 및 표적화된 나노입자가 이러한 복잡한 시스템을 움직이게 하는 방법은 항상성 조절에 중요할 수 있다. 게다가, 이러한 상호작용은 입자 프로브의 특성, 주변 생물학적 상태 및 질병 그 자체의 성질로 인해 다양할 수 있다. 더욱이, 특정 세포내 구획 내에서 입자 흡수 및 축적은 기능, 대사 및/또는 에너지 항상성을 변화시킬 수 있다. 예를 들어, 엔도사이토시스 및 세포내 트래피킹을 겪은 많은 입자-기반 프로브는 자가포식현상을 유도하고 리소좀 기능을 억제하는 것으로 나타났다. 그러나, 이러한 효과가 시간에 걸쳐 어떻게 세포 생존을 조절하는지는 여전히 불분명하다.

[0008] PET 방사성라벨로 미리 표면 적층된 초소형(예를 들어, 20nm 이하, 예를 들어, 15nm 이하, 예를 들어, 10nm 이하)의 직경을 가짐) FDA 승인 형광 유기-실리카 입자(C dot) 및 인테그린-표적화된 펩티드 사이클로-(Arg-Gly-Asp-Tyr)(cRGDY)는 인간에서 작동하는 분자 암 이미징제(imaging agent)로 밝혀졌다. 예를 들어, C dot는 벌크 신장 청소를 입증할 뿐만 아니라 작은 동물 및 더 큰 동물 및 인간 대상체 흑색종 모델에서 $\alpha v \beta 3$ 인테그린-발현 원발성 및/또는 전이성 병변 내에 우선적으로 축적되는 것으로 나타났다. C dot에 대한 상세한 내용은 미국 특허 번호 8298677 B2 “Fluorescent silica-based nanoparticles”, 미국 공개 번호 2013/0039848 A1 “Fluorescent silica-based nanoparticles”, 및 미국 공개 번호 US 2014/0248210 A1 “Multimodal silica-based nanoparticles”에 기술되어 있으며, 이의 내용은 그 전체가 참조로 본원에 통합된다. 더욱이, 14-머 펩티드 유사체, 알파-멜라닌세포 자극 호르몬(α -MSH)으로 추가로 표면-개질되고, 서브-10nm 범위로 하향 조절가능한 직경을 갖는 C' dot로서 언급된 초소형 폴리(에틸렌 글리콜)-코팅된(폐결화된) 근적외선(NIR) 형광 실리카 나노입자는 악성 흑색종 세포에서 발현된 멜라노코르틴-1 수용체(MC1-R)를 표적으로 하는 것으로 밝혀졌다. 그러나, 이들 입자가 어떻게 세포 기능 및 세포내 트래피킹을 조절할 수 있는지에 대해서는 여전히 알려지지 않았다.

[0009] 따라서, 농도 및 시간-기반 과정에서의 변화가 입자-기반 프로브의 내재화 후 운명에 어떻게 영향을 끼쳐 적용-특이적 나노의약(예를 들어, C 및 C' dot) 플랫폼의 설계를 개선하는지를 결정할 필요가 여전히 존재한다.

발명의 내용

[0010] 개요

[0011] 나노입자 섭취에 의한 페로토시스를 통해 세포 사멸을 유도하는 방법이 본원에 기술되어 있다. 또한, 본 기재 내용은 영양분-결핍된 환경과 조합되어 치료 과정에 걸쳐 다중 시점에서 고농도의 초소형(예를 들어, 20nm

이하, 예를 들어, 15nm 이하, 예를 들어, 10nm 이하의 직경을 가짐) 나노입자를 투여하고, 이에 의해 세포 대사 경로를 조절하여 메카니즘 페로토시스에 의한 세포 사멸을 유도하는 것을 기술한다. 페로토시스는 철, 반응성 산소 종, 및 세포 사멸 실행의 동시 모드를 포함한다.

- [0012] 특정 영양분-결핍된 환경에서 α -MSH-PEG-C' dot (또는 예를 들어, α -MSH-PEG-C' dot 대비 더 긴 기간을 요구하는 α -MSH 비함유 PEG-C' dot)로 세포를 처리하면 암 세포에서 심지어 약물의 존재 없이 페로토시스를 유도할 수 있음을 발견하였다. 종합적으로, 본원에 기술된 결과는 아미노산의 부재하에 배양되고 α -MSH-PEG-C' dot로 처리된 세포가 페로토시스에 의한 세포 사멸을 겪음을 나타냈다. 이와 관련하여 페로토시스는 웨이브형 방식으로 세포로부터 세포로 전파되는 것으로 관찰되었다. 이론에 얽매이지 않으면서, 이는 사멸-유도 시그널의 세포 대 세포 소통을 시사하였다.
- [0013] 한 양태에서, 본 발명은 축적을 위한 나노입자를 종양 조직 중의 충분한 고농도로 투여하여 페로토시스(예를 들어, 철-의존성 괴사 또는 반응성 산소 종-의존성 괴사를 포함하는 페로토시스성 세포 사멸)를 유도하는 것을 포함하는, 대상체 치료 방법에 관한 것이다.
- [0014] 특정 구체예에서, 나노입자는 초소형 나노입자(예를 들어, C dot, 예를 들어, C' dot)를 포함한다.
- [0015] 특정 구체예에서, 고농도는 $1\mu\text{M}$ 초과 예를 들어, $15\mu\text{M}$ 초과, 예를 들어, $60\mu\text{M}$ 초과이다. 특정 구체예에서, 고농도는 종양 조직에서 $0.18\mu\text{M}$ 내지 $1.8\mu\text{M}$ 의 범위 내의 국소 농도이다(예를 들어, 고농도는 종양 조직에서 적어도 $0.18\mu\text{M}$, 적어도 $0.3\mu\text{M}$, 적어도 $0.4\mu\text{M}$, 적어도 $0.5\mu\text{M}$, 또는 적어도 $0.6\mu\text{M}$ 의 국소 농도이고; 예를 들어, 나노입자는 실리카를 기반으로 하며, 예를 들어, 나노입자는 C dot 또는 C' dot이다).
- [0016] 특정 구체예에서, 종양 조직은 충분히 아미노산 (또는 대사적으로) 결핍되어 있다.
- [0017] 특정 구체예에서, 종양 조직은 페로토시스의 유도에 민감해진다.
- [0018] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체의 조합 치료 방법으로서, 종양 조직으로의 수송 (및/또는 종양 조직 내의 축적)을 위한 약물을 투여하고; (페로토시스를 유도하기 위해) 축적을 위한 나노입자를 종양 조직 중의 충분한 고농도로 투여하는 것을 포함하는 방법에 관한 것이다.
- [0019] 특정 구체예에서, 약물은 화학요법제(예를 들어, TAS-102)를 포함한다.
- [0020] 특정 구체예에서, 나노입자는 초소형 나노입자(예를 들어, C dot, 예를 들어, C' dot)를 포함한다.
- [0021] 특정 구체예에서, 고농도는 $1\mu\text{M}$ 초과 예를 들어, $15\mu\text{M}$ 초과, 예를 들어, $60\mu\text{M}$ 초과이다. 특정 구체예에서, 고농도는 종양 조직에서 $0.18\mu\text{M}$ 내지 $1.8\mu\text{M}$ 의 범위 내의 국소 농도이다(예를 들어, 고농도는 종양 조직에서 적어도 $0.18\mu\text{M}$, 적어도 $0.3\mu\text{M}$, 적어도 $0.4\mu\text{M}$, 적어도 $0.5\mu\text{M}$, 또는 적어도 $0.6\mu\text{M}$ 의 국소 농도이고; 예를 들어, 나노입자는 실리카를 기반으로 하며, 예를 들어, 나노입자는 C dot 또는 C' dot이다).
- [0022] 특정 구체예에서, 종양 조직은 충분히 아미노산 (또는 대사적으로) 결핍되어 있다. 특정 구체예에서, 종양 조직은 페로토시스의 유도에 민감해진다.
- [0023] 특정 구체예에서, 약물을 투여하고 나노입자를 투여하는 것은 약물 및 나노입자 둘 모두를 포함하는 조성물을 투여함으로써 달성된다.
- [0024] 특정 구체예에서, 조성물은 나노입자 약물 컨쥬게이트를 포함한다.
- [0025] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체의 조합 치료 방법으로서, 종양 조직(예를 들어, 전립선암 조직)에서 호르몬을 결핍시키고; 축적을 위한 나노입자를 종양 조직 중에 충분히 높게 투여하여 페로토시스를 유도하는 것을 포함하는 방법에 관한 것이다.
- [0026] 특정 구체예에서, 종양 조직은 거세(예를 들어, 화학적 거세)를 통해 호르몬 결핍된다.
- [0027] 특정 구체예에서, 나노입자는 초소형 나노입자(예를 들어, C dot, 예를 들어, C' dot)를 포함한다.
- [0028] 특정 구체예에서, 고농도는 $1\mu\text{M}$ 초과 예를 들어, $15\mu\text{M}$ 초과, 예를 들어, $60\mu\text{M}$ 초과이다. 특정 구체예에서, 고농도는 종양 조직에서 $0.18\mu\text{M}$ 내지 $1.8\mu\text{M}$ 의 범위 내의 국소 농도이다(예를 들어, 고농도는 종양 조직에서 적어도 $0.18\mu\text{M}$, 적어도 $0.3\mu\text{M}$, 적어도 $0.4\mu\text{M}$, 적어도 $0.5\mu\text{M}$, 또는 적어도 $0.6\mu\text{M}$ 의 국소 농도이고; 예를 들어, 나노입자는 실리카를 기반으로 하며, 예를 들어, 나노입자는 C dot 또는 C' dot이다).
- [0029] 특정 구체예에서, 종양 조직은 충분히 아미노산 (또는 대사적으로) 결핍되어 있다.

- [0030] 특정 구체예에서, 종양 조직은 페로토시스의 유도에 민감해진다.
- [0031] 특정 구체예에서, 종양 조직은 신장, 전립선, 흑색종, 췌장, 폐, 섬유육종, 유방, 뇌, 난소 및 결장 종양 조직으로 구성된 군으로부터 선택된다. 특정 구체예에서, 종양 췌장 조직은 BxPC3 세포를 포함한다. 특정 구체예에서, 종양 폐 조직은 H1650 세포를 포함한다.
- [0032] 특정 구체예에서, 나노입자는 15nm 이하의 평균 직경을 갖는다. 특정 구체예에서, 나노입자는 10nm 이하의 평균 직경을 갖는다. 특정 구체예에서, 나노입자는 약 5nm 내지 약 7nm(예를 들어, 약 6nm)의 평균 직경을 갖는다.
- [0033] 특정 구체예에서, 나노입자는 1 내지 20개의 표적화 모이어티를 포함하며, 여기서 표적화 모이어티는 종양 세포상의 수용체에 결합한다(예를 들어, 나노입자는 평균 직경이 15nm 이하, 예를 들어, 10nm 이하, 예를 들어, 약 5nm 내지 약 7nm, 예를 들어, 약 6nm이다). 특정 구체예에서, 1 내지 20개의 표적화 모이어티는 알파-멜라닌세포-자극 호르몬(α MSH)을 포함한다. 특정 구체예에서, 나노입자는 표적화 모이어티(예를 들어, α MSH)를 포함한다.
- [0034] 특정 구체예에서, 나노입자는 치료 과정에 걸쳐 여러 번 투여된다.
- [0035] 특정 구체예에서, 상기 방법은 치료 과정에 걸쳐 3 또는 4일마다 나노입자를 투여하는 것을 추가로 포함한다.
- [0036] 특정 구체예에서, 투여된 나노입자는 부착된 약물(예를 들어, 화학요법제)을 갖는다. 특정 구체예에서, 약물은 링커 모이어티를 통해 부착된다(예를 들어, 공유적으로 또는 비공유적으로 부착된다).
- [0037] 특정 구체예에서, 약물 전달은 투여된 나노입자의 천연 면역조절 특성과 조합되어(예를 들어, 나노입자는 α -MSH-PEG-C' dot를 포함하며, 예를 들어, α -MSH는 나노입자의 표면에 결합됨)(예를 들어, 나노입자는 유기-폴리머 코팅(예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜(PEG))을 포함함) 암 치료 및/또는 조직 수복 과정(예를 들어, 상처 치유)에서 C dot의 치료학적 잠재성을 증가시킨다.
- [0038] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체의 치료 방법에 사용하기 위한 나노입자(예를 들어, 초소형 나노입자 예를 들어, C dot, 예를 들어, C' dot)를 포함하는 조성물로서, 치료는 대상체의 종양 조직에 축적을 위한 조성물을 종양 조직 중의 충분한 고농도(예를 들어, 1 μ M 초과, 예를 들어, 15 μ M 초과, 예를 들어, 60 μ M 초과)로 전달하여(예를 들어, 고농도는 종양 조직에서 0.18 μ M 내지 1.8 μ M 범위 내의 국소 농도임)(예를 들어, 고농도는 종양 조직에서 적어도 0.18 μ M, 적어도 0.3 μ M, 적어도 0.4 μ M, 적어도 0.5 μ M, 또는 적어도 0.6 μ M의 국소 농도이며; 예를 들어, 나노입자는 실리카를 기반으로 하며, 예를 들어, 나노입자는 C dot 또는 C' dot임)(예를 들어, 종양 조직은 충분히 아미노산 (또는 대사적으로) 결핍되거나 다른 식으로 페로토시스 유도에 민감함) 페로토시스를 유도하는 것을 포함하는, 조성물에 관한 것이다.
- [0039] 또 다른 양태에서, 본 발명은 페로토시스를 유도하기 위해 종양 조직 중의 충분한 고농도(예를 들어, 1 μ M 초과, 예를 들어, 15 μ M 초과, 예를 들어, 60 μ M 초과)의 축적을 위한 나노입자(예를 들어, 초소형 나노입자 예를 들어, C dot, 예를 들어, C' dot)를 포함하는, 요법에 사용하기 위한 조성물에 관한 것이다(예를 들어, 고농도는 종양 조직에서 0.18 μ M 내지 1.8 μ M 범위 내의 국소 농도임)(예를 들어, 고농도는 종양 조직에서 적어도 0.18 μ M, 적어도 0.3 μ M, 적어도 0.4 μ M, 적어도 0.5 μ M, 또는 적어도 0.6 μ M의 국소 농도이며; 예를 들어, 나노입자는 실리카를 기반으로 하며, 예를 들어, 나노입자는 C dot 또는 C' dot임)(예를 들어, 종양 조직은 충분히 아미노산 (또는 대사적으로) 결핍되거나 다른 식으로 페로토시스 유도에 민감함).
- [0040] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체 치료 방법에 사용하기 위한, 약물(예를 들어, 화학요법제 예를 들어, TAS 102)을 포함하는 제1 조성물 및 나노입자(예를 들어, 초소형 나노입자 예를 들어, C dot 예를 들어, C' dot)를 포함하는 제2 조성물에 관한 것이며, 치료는 대상체의 종양 조직으로의 수송을 위한 (및/또는 조직 내의 축적을 위한) 제1 조성물을 전달하고; 대상체의 종양 조직에 축적을 위한 제2 조성물을 종양 조직 중의 충분한 고농도(예를 들어, 1 μ M 초과, 예를 들어, 15 μ M 초과, 예를 들어, 60 μ M 초과)로 전달하여(예를 들어, 고농도는 종양 조직에서 0.18 μ M 내지 1.8 μ M 범위 내의 국소 농도임)(예를 들어, 고농도는 종양 조직에서 적어도 0.18 μ M, 적어도 0.3 μ M, 적어도 0.4 μ M, 적어도 0.5 μ M, 또는 적어도 0.6 μ M의 국소 농도이며; 예를 들어, 나노입자는 실리카를 기반으로 하며, 예를 들어, 나노입자는 C dot 또는 C' dot임)(예를 들어, 종양 조직은 충분히 아미노산 (또는 대사적으로) 결핍되거나 다른 식으로 페로토시스 유도에 민감함) 페로토시스를 유도하는 것을 포함한다.
- [0041] 또 다른 양태에서, 본 발명은 요법에 사용하기 위한, 대상체의 종양 조직으로의 수송을 위한 (및/또는 조직 내의 축적을 위한) 약물(예를 들어, 임의의 화학요법제 예를 들어, TAS 102)을 포함하는 제1 조성물; 및 페로토시스를 유도하기 위해, 충분한 고농도(예를 들어, 1 μ M 초과, 예를 들어, 15 μ M 초과, 예를 들어, 60 μ M 초과)의

축적을 위한 나노입자(예를 들어, 초소형 나노입자 예를 들어, C dot, 예를 들어, C' dot)를 포함하는 제2 조성물에 관한 것이다(예를 들어, 고농도는 종양 조직에서 0.18 μ M 내지 1.8 μ M 범위 내의 국소 농도임)(예를 들어, 고농도는 종양 조직에서 적어도 0.18 μ M, 적어도 0.3 μ M, 적어도 0.4 μ M, 적어도 0.5 μ M, 또는 적어도 0.6 μ M의 국소 농도이며; 예를 들어, 나노입자는 실리카를 기반으로 하며, 예를 들어, 나노입자는 C dot 또는 C' dot임)(예를 들어, 종양 조직은 충분히 아미노산 (또는 대사적으로) 결핍되거나 다른 식으로 페로토시스 유도에 민감함).

[0042] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체의 치료 방법에 사용하기 위한 나노입자(예를 들어, 초소형 나노입자 예를 들어, C dot, 예를 들어, C' dot)를 포함하는 조성물로서, 치료는 대상체의 종양 조직(예를 들어, 전립선 조직)으로부터 호르몬을 결핍시키고(예를 들어, 거세(예를 들어, 화학적 거세)를 통해); 축적을 위한 조성물을 종양 조직 중의 충분한 고농도(예를 들어, 1 μ M 초과, 예를 들어, 15 μ M 초과, 예를 들어, 60 μ M 초과)로 대상체의 종양 조직에 전달하여(예를 들어, 고농도는 종양 조직에서 0.18 μ M 내지 1.8 μ M 범위 내의 국소 농도임)(예를 들어, 고농도는 종양 조직에서 적어도 0.18 μ M, 적어도 0.3 μ M, 적어도 0.4 μ M, 적어도 0.5 μ M, 또는 적어도 0.6 μ M의 국소 농도이며; 예를 들어, 나노입자는 실리카를 기반으로 하며, 예를 들어, 나노입자는 C dot 또는 C' dot임)(예를 들어, 종양 조직은 충분히 아미노산 (또는 대사적으로) 결핍되거나 다른 식으로 페로토시스 유도에 민감함) 페로토시스를 유도하는 것을 포함하는, 조성물에 관한 것이다.

[0043] 본 발명의 한 양태(예를 들어, 방법)를 포함하는 구체예의 요소는 본 발명의 다른 양태(예를 들어, 시스템)를 포함하는 구체예에 적용될 수 있으며, 그 반대일 수도 있다.

[0044] 정의

[0045] 본 발명의 개시가 더욱 용이하게 이해되도록 하기 위해, 특정 용어가 먼저 하기에서 정의된다. 하기 용어 및 다른 용어에 대한 추가 정의는 명세서 전체에 걸쳐 기재되어 있다.

[0046] 본 출원에서, "또는"의 사용은 달리 언급하지 않는 한 "및/또는"을 의미한다. 본 출원에서 사용되는 바와 같은 용어 "-을 포함하다" 및 이러한 용어의 변형, 예를 들어, "-을 포함하는" 및 "-을 포함하다"는 다른 부가물, 성분, 정수 또는 단계를 배제하고자 하는 것이 아니다. 본 출원에서 사용되는 바와 같은 용어 "약" 및 "대략"은 동등하게 사용된다. 약/대략을 갖거나 갖지 않는 본 출원에서 사용되는 임의의 숫자는 관련 분야의 당업자에 의해 인지되는 임의의 일반적인 변동을 포함하는 것을 의미한다. 특정 구체예에서, 용어 "대략" 또는 "약"은 문맥으로부터 달리 언급되거나 달리 명백하지 않는 한 언급된 참조 값의 어느 한 방향(초과 또는 미만)으로 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 또는 그 미만 내에 해당하는 값의 범위를 나타낸다(상기 수가 가능한 값의 100%를 초과하는 경우는 예외이다).

[0047] "투여": 용어 "투여"는 물질을 대상체로 도입시키는 것을 나타낸다. 일반적으로, 예를 들어, 비경구(예를 들어, 정맥내), 경구, 국소, 피하, 복막, 동맥내, 흡입, 질, 직장, 비, 뇌척수액으로의 도입, 또는 신체 구획으로의 점적주입을 포함하는 임의의 투여 경로가 이용될 수 있다. 특정 구체예에서, 투여는 경구 투여이다. 추가로 또는 대안적으로, 특정 구체예에서, 투여는 비경구 투여이다. 특정 구체예에서, 투여는 정맥내 투여이다.

[0048] "생체적합성": 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "생체적합성"은 생체내에서 실질적인 해로운 반응을 유발하지 않는 물질을 기재하기 위한 것이다. 특정 구체예에서, 물질은 세포에 대해 독성인 아닌 경우에 "생체적합성"이다. 특정 구체예에서, 물질은 시험관 내에서 이들의 세포로의 첨가가 20% 또는 그 미만의 세포 사멸을 발생시키고/시키거나, 생체내에서의 이들의 투여가 염증 또는 다른 유해 효과를 유도하지 않는 경우에 "생체적합성"이다. 특정 구체예에서, 물질은 생물분해성이다.

[0049] "생물분해성": 본원에서 사용되는 바와 같은 "생물분해성" 물질은 세포로 도입되는 경우 세포 기구(예를 들어, 효소적 분해)에 의해서나, 세포에 대한 유의한 독성 효과 없이 세포가 재사용하거나 배치할 수 있는 성분으로의 가수분해에 의해 분해되는 물질이다. 특정 구체예에서, 생물분해성 물질의 분해에 의해 생성된 성분은 생체내에서 염증 및/또는 다른 유해 효과를 유도하지 않는다. 특정 구체예에서, 생물분해성 물질은 효소적으로 분해된다. 대안적으로 또는 추가로, 특정 구체예에서, 생물분해성 물질은 가수분해에 의해 분해된다. 특정 구체예에서, 생물분해성 중합체 물질은 이들의 성분 중합체로 분해된다. 특정 구체예에서, 생물분해성 물질(예를 들어, 생물분해성 중합체 물질을 포함함)의 분해는 에스테르 결합의 가수분해를 포함한다. 특정 구체예에서, 물질(예를 들어, 생물분해성 중합체 물질을 포함함)의 분해는 우레탄 결합의 분해를 포함한다.

[0050] "암"(cancer): 본원에 사용된 바와 같은 용어 "암"은 악성 신생물 또는 종양을 지칭한다(Stedman 's Medical Dictionary, 25th ed.; Hensly ed.; Williams & Wilkins: Philadelphia, 1990). 예시적인 암은 비제한적으

로, 청각 신경종; 선암종; 부신 암; 항문 암; 혈관육종(예를 들어, 림프관 육종, 림프관 종양 육종, 혈관 육종); 맹장 암(appendix cancer); 양성 모노클로날 감마병증; 담도 암(biliary cancer)(예를 들어, 담도 암종); 방광암; 유방암(예를 들어, 유방의 선암종, 유방 유도 암종, 유방암(mammary cancer), 유방의 수질 암종); 뇌암(예를 들어, 뇌수막종, 교모세포종, 신경교종(예를 들어, 성상세포종, 희소돌기종), 수모세포종); 기관지 암; 유암종; 자궁 경부암(예를 들어, 자궁경부 선암종); 용모막암종; 척삭종; 두개인두종; 연결조직암; 상피암종; 뇌실막종; 내피육종(예를 들어, 카포시 육종, 다발성 특발성 출혈 육종); 자궁내막암(예를 들어, 자궁암, 자궁 육종); 식도암(예를 들어, 식도의 선암종, 바렛 선암종); 유잉 육종; 안암(예를 들어, 안구 내 흑색종, 망막 아세포종); 가족성 과다호산구증식증; 담낭암; 위암(예를 들어, 위 선암종); 위장관기질암(GIST); 배세포 암; 두경부암(예를 들어, 두경부 편평 세포 암종, 경구암(예를 들어, 경구 편평 세포 암종), 후두암(예를 들어, 후두암, 인두 암, 비 인두 암, 구강인두암)); 조혈 암(예컨대, 백혈병 예컨대, 급성 림프성 백혈병(ALL)(예를 들어, B 세포 ALL, T 세포 ALL), 급성 골수성 백혈병(AML)(예를 들어, B 세포 AML, T 세포 AML), 만성 골수성 백혈병(CML)(예를 들어, B 세포 CML, T 세포 CML), 및 만성 림프성 백혈병(CLL)(예를 들어, B 세포 CLL, T 세포 CLL)); 림프종 예컨대, 호지킨 림프종(HL)(예를 들어, B 세포 HL, T 세포 HL) 및 비호지킨 림프종(NHL)(예를 들어, B 세포 NHL 예컨대, 광범위 큰 세포 림프종(DLCL)(예를 들어, 광범위 큰 B세포 림프종), 소포 림프종, 만성림프성 백혈병/소림프구 림프종(CLL/SLL), 외투세포 림프종(MCL), 변연부 B세포 림프종(예를 들어, 점막연관 림프조직(MALT) 림프종, 결절 변연부 B세포 림프종, 지라 변연부 B세포 림프종), 원발성 세로칸 B세포 림프종, 버킷 림프종, 림프형질세포성 림프종(예를 들어, 발덴스트롬 마크로글로블린혈증), 털세포 백혈병(HCL), 면역모세포 큰 세포 림프종, 전구체 B 림프모구 림프종 및 원발성 중추 신경계(CNS) 림프종; 및 T 세포 NHL 예컨대, 전구체 B 림프모구 림프종/백혈병, 말초 T 세포 림프종(PTCL)(예를 들어, 피부 T 세포 림프종(CTCL)(예를 들어, 균상식육종, 세자리 증후군), 혈관면역모구 T 세포 림프종, 림프절외 자연 살해 T 세포 림프종, 장병증형 T 세포 림프종, 피하지방층염 유사 T 세포 림프종, 및 역형성 큰 세포 림프종); 상기 기술된 바와 같은 하나 이상의 백혈병/림프종의 혼합; 및 다발 골수종(MM), 중쇄병(예를 들어, 알파 사슬병, 감마사슬병, mu 쇄 병); 혈관모세포종; 후두인두 암; 염증성 근섬유모세포 종양; 면역세포성 아밀로이드증(immunocytic amyloidosis); 신장암(예를 들어, 콩팥모세포종 a.k.a. 빌립스 종양, 콩팥 세포 암종); 간 암(예를 들어, 간세포 암(HCC), 악성 간암); 폐암(예를 들어, 기관지원성 암종, 소세포 폐 암(SCLC), 비 소세포 폐 암(NSCLC), 폐의 선암종); 평활근육종(LMS); 비만세포종(예를 들어, 전신 비만세포종); 근육 암; 골수형성이상 증후군(MDS); 중피종; 골수증식 질환(MPD)(예를 들어, 진성적혈구 증가증(PV), 본태 혈소판증가증(ET), 원인불명골수화생(AMM) a.k.a. 골수섬유증(MF), 만성 특발성 골수섬유증, 만성 골수세포 백혈병(CML), 만성 호중구 백혈병(CNL), 과다호산구증후군(HES); 신경모세포종; 신경섬유종(예를 들어, 신경섬유종증(NF) 타입 1 또는 타입 2, 신경초종증(schwannomatosis)); 신경내분비암(예를 들어, 위장췌장 신경내분비 종양(GEP NET), 유암종); 골육종(예를 들어, 뼈 암); 난소암(예를 들어, 난선암종, 난소 배아 암종, 난소 선암종); 유두모양 선암종; 췌장암(예를 들어, 췌장 선암종, 췌장내 유두모양 점액 종양(IPMN), 섬 세포 종양); 음경 암(예를 들어, 음경 및 음낭의 페이젯병); 송과체종; 원시신경외배엽 종양(PNT); 혈장 세포 신생물; 신생물발달 증후군; 상피내 신생물; 전립선암(예를 들어, 전립선 선암종); 직장 암; 횡문근육종; 침샘암; 피부암(예를 들어, 편평세포암종(SCC), 각질가시세포종(KA), 흑색종, 기저 세포 암종(BCC)); 작은 창자 암(예를 들어, 충수 암); 연조직 육종(예를 들어, 악성 섬유조직 구종(MFH), 지방육종, 악성 말초 신경 초 종양(MPNST), 연골육종, 섬유육종, 점액육종); 피부기름샘 암종; 소장 암; 땀샘 암종; 윤활막종; 고환 암(예를 들어, 고환종, 고환 배아 암종); 갑상선암(예를 들어, 갑상선의 유두모양 암종, 유두모양 갑상선 암종(PTC), 수질성 갑상선 암); 요도암; 질암; 및 외음부암(예를 들어, 외음부의 페이젯병)을 포함한다.

[0051] "담체": 본원에서 사용되는 바와 같은 "담체"는 화합물과 함께 투여되는 희석제, 애췌버트, 부형제, 또는 비히클을 나타낸다. 상기 약학적 담체는 멸균 액체, 예를 들어, 물 및 오일, 예를 들어, 석유, 동물, 식물 또는 합성 기원의 오일, 예를 들어, 땅콩유, 대두유, 광유, 참기름 등일 수 있다. 물 또는 수용액 염수 용액 및 텍스트로스 및 글리세롤 수용액이 바람직하게는, 특히 주사 용액용 담체로 사용된다. 적합한 약학적 담체는 문헌 ["Remington's Pharmaceutical Sciences" by E. W. Martin]에 기재되어 있다.

[0052] "화학요법제": 본원에서 사용된 바와 같은, 용어 "화학요법제"(예를 들어, 항암 약물)는 하나 이상의 아포토시스 유도성(pro-apoptotic), 세포 증식 억제성 및/또는 세포독성제와 관련하여 이의 당업계에 이해되는 의미를 가지며, 예를 들어, 특히 바람직하지 않은 세포 증식과 관련된 하나 이상의 질병, 장애 또는 병태를 치료하는데 사용하기 위해 사용되고/거나 권장되는 제제를 포함한다. 많은 구체예에서, 화학 요법제는 암 치료에 유용하다. 일부 구체예에서, 화학요법제는 하나 이상의 알킬화제, 하나 이상의 안트라사이클린, 하나 이상의 세포골격 파괴제(예를 들어, 타산, 메이탄신 및 이의 유사체와 같은 미세소관 표적화제), 하나 이상의 에포틸론, 하나 이상

의 히스톤 데아세틸라제 억제제 HDAC), 하나 이상의 토포아이스오머라제 억제제(예를 들어, 토포아이스오머라제 I 및/또는 토포아이스오머라제 II의 억제제), 하나 이상의 키나제 억제제, 하나 이상의 뉴클레오타이드 유사체 또는 뉴클레오타이드 전구체 유사체, 하나 이상의 펩티드 항생제, 하나 이상의 백금-기반 제제, 하나 이상의 레티노이드, 하나 이상의 빈카 알칼로이드, 및/또는 하기 중 하나 이상의 하나 이상의 유사체(즉, 관련된 항-증식 활성을 공유함)일 수 있거나 이를 포함할 수 있다. 일부 특정 구체예에서, 화학요법제는 악티노마이신(Actinomycin), 모든-트랜스 레티노산, 아우리스타틴(Auristatin), 아자시티딘(Azacitidine), 아자티오프린(Azathioprine), 블레오마이신(Bleomycin), 보르테조미브(Bortezomib), 카르보플라틴(Carboplatin), 카페시타빈(Capecitabine), 시스플라틴(Cisplatin), 클로르암부실(Chlorambucil), 사이클로포스파미드(Cyclophosphamide), 쿠르쿠민, 시타라빈(Cytarabine), 다우노루비신(Daunorubicin), 도세탁셀(Docetaxel), 독시플루리딘(Doxifluridine), 독소루비신(Doxorubicin), 에피루비신(Epirubicin), 에포틸론(Epothilone), 에토포시드(Etoposide), 플루오로우라실(Fluorouracil), 겐시타빈(Gemcitabine), 하이드록시우레아(Hydroxyurea), 이다루비신(Idarubicin), 이마티닙(Imatinib), 이리노테칸(Irinotecan), 메이탄신(Maytansine) 및/또는 이들의 유사체(예를 들어, DM1) 메클로레타민(Mechlorethamine), 메르캅토푸린(Mercaptopurine), 메토트렉세이트(Methotrexate), 미톡산트론(Mitoxantrone), 메이탄시노이드(Maytansinoid), 옥살리플라틴(Oxaliplatin), 파클리탁셀(Paclitaxel), 페메트렉시드(Pemetrexed), 테니포시드(Teniposide), 티오구아닌(Tioguanine), 토포테칸(Topotecan), 발루비신(Valrubicin), 빈블라스틴(Vinblastine), 빈크리스틴(Vincristine), 빈데신(Vindesine), 비노렐빈(Vinorelbine) 및 이들의 조합물 중 하나 이상일 수 있거나 이를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 화학요법제는 항체-약물 컨쥬게이트와 관련하여 사용될 수 있다. 일부 구체예에서, 화학요법제는 hLL1-독소루비신, hRS7-SN-38, hMN-14-SN-38, hLL2-SN-38, hA20-SN-38, hPAM4-SN-38, hLL1-SN-38, hRS7-Pro-2-P-Dox, hMN-14-Pro-2-P-Dox, hLL2-Pro-2-P-Dox, hA20-Pro-2-P-Dox, hPAM4-Pro-2-P-Dox, hLL1-Pro-2-P-Dox, P4/D10-독소루비신, 겐투주맵 오조가미신(gemtuzumab ozogamicin), 브렌투시맵 베도틴(brentuximab vedotin), 트라스투주맵 엠탄신(trastuzumab emtansine), 이노투주맵 오조가미신(inotuzumab ozogamicin), 글렘바투모맵 베도틴(glembatumomab vedotin), SAR3419, SAR566658, BIIB015, BT062, SGN-75, SGN-CD19A, AMG-172, AMG-595, BAY-94-9343, ASG-5ME, ASG-22ME, ASG-16M8F, MDX-1203, MLN-0264, anti-PSMA ADC, RG-7450, RG-7458, RG-7593, RG-7596, RG-7598, RG-7599, RG-7600, RG-7636, ABT-414, IMGN-853, IMGN-529, 보르세투주맵 마포도틴(vorsetuzumab mafodotin), 및 로르보투주맵 메르탄신(lorvotuzumab mertansine)로 구성된 군으로부터 선택된 항체-약물 컨쥬게이트에서 발견된 것이다. 일부 구체예에서, 화학요법제는 파르네실-티오살리실산(FTS), 4-(4-클로로-2-메틸페녹시)-N-하이드록시부탄아미드(CMH), 에스트라디올(E2), 테트라메톡시스테틸렌(TMS), δ -토카트리엔올, 살리노마이신 또는 쿠르쿠민 중 하나 이상일 수 있거나 이를 포함할 수 있다.

[0053] "조합 요법": 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "조합 요법"은 대상체가 2개 이상의 치료 요법(예를 들어, 2개 이상의 치료제)에 동시에 노출되는 그러한 상황을 지칭한다. 일부 구체예에서, 2개 이상의 제제가 동시에 투여될 수 있으며; 일부 구체예에서, 이러한 제제가 순차적으로 투여될 수 있으며; 일부 구체예에서, 이러한 제제는 중첩 투여 요법으로 투여된다.

[0054] "펩티드" 또는 "폴리펩티드": 용어 "펩티드" 또는 "폴리펩티드"는 펩티드 결합에 의해 함께 연결된 적어도 2개(예를 들어, 적어도 3개)의 아미노산의 스트링(string)을 나타낸다. 특정 구체예에서, 폴리펩티드는 자연 발생 아미노산을 포함하고; 대안적으로 또는 추가로, 특정 구체예에서, 폴리펩티드는 하나 이상의 비-자연 아미노산(즉, 자연적으로 발생하지 않으나, 폴리펩티드 사슬로 혼입될 수 있는 화합물; 예를 들어, 기능성 이온 채널로 성공적으로 혼입된 비-자연 아미노산의 구조를 나타내는 <http://www.cco.caltech.edu/~dadgrp/Unnatstruct.gif> 참조)을 포함하고/하거나, 당 분야에 공지된 바와 같은 아미노산 유사체가 대안적으로 이용될 수 있다. 특정 구체예에서, 단백질 내의 아미노산 중 하나 이상은, 예를 들어, 화학적 존재물, 예를 들어, 탄수화물 기, 포스페이트 기, 파르네실 기, 이소파르네실 기, 지방산 기, 컨쥬게이션을 위한 링커의 첨가, 기능화, 또는 다른 변형 등에 의해 변형될 수 있다.

[0055] "방사성라벨": 본원에 사용된 바와 같은, "방사성라벨"은 적어도 하나의 원소의 방사성 동위원소를 포함하는 모이어티를 지칭한다. 예시적인 적합한 방사성라벨은 비제한적으로, 본원에 기술된 것들을 포함한다. 특정 구체예에서, 방사성라벨은 양전자 방출 단층촬영(PET)에서 사용된 것이다. 특정 구체예에서, 방사성라벨은 단일-양성자 방출 컴퓨터 단층촬영(SPECT)에 사용된 것이다. 특정 구체예에서, 방사성동위원소는 ^{99m}Tc , ^{111}In , ^{64}Cu , ^{67}Ga , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{67}Cu , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{149}Pm , ^{90}Y , ^{213}Bi , ^{103}Pd , ^{109}Pd , ^{159}Gd , ^{140}La , ^{198}Au , ^{199}Au , ^{169}Yb , ^{175}Yb , ^{165}Dy , ^{166}Dy , ^{67}Cu , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{89}Zr , ^{225}Ac , 및 ^{192}Ir 을

포함한다.

- [0056] "대상체": 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "대상체"는 인간 및 포유동물(예를 들어, 마우스, 래트, 돼지, 고양이, 개, 및 말)을 포함한다. 많은 구체예에서, 대상체는 포유동물, 특히 영장류, 특히 인간이다. 특정 구체예에서, 대상체는 가축, 예를 들어, 축우, 양, 염소, 소, 돼지, 등; 가금, 예를 들어, 닭, 오리, 거위, 칠면조, 등; 및 길들여진 동물, 특히 애완동물, 예를 들어, 개 및 고양이이다. 특정 구체예에서(예를 들어, 특히 연구 상황에서), 대상체 포유동물은, 예를 들어, 설치류(예를 들어, 마우스, 래트, 햄스터), 토끼, 영장류, 또는 돼지, 예를 들어, 순계교배 돼지, 등일 것이다.
- [0057] "실질적으로": 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "실질적으로"는 관심 특징 또는 특성의 전체 또는 거의 전체 범위 또는 정도의 정량적 상태를 지칭한다. 생물 분야의 당업자는 생물학적 또는 화학적 현상이 (완료될 수도 있지만) 거의 완료되지 않았고/거나 절대 결과를 완료 또는 달성하거나 피하도록 진행됨을 이해할 것이다. 따라서, 용어 "실질적으로"는 많은 생물학적 및 화학적 현상에 내재된 완료의 잠재적인 부족을 포착하기 위해 본원에 사용된다.
- [0058] "치료제": 본원에서 사용되는 구 "치료제"는 대상체에 투여되는 경우 치료적 효과를 갖고/갖거나 바람직한 생물학적 및/또는 약리학적 효과를 유발하는 임의의 제제를 나타낸다.
- [0059] "치료": 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "치료"(또는 "치료하다" 또는 "치료하는")는 특정 질병, 장애, 및/또는 질환의 하나 이상의 증상, 특징, 및/또는 원인을 부분적으로 또는 완전히 완화시키고/시키거나, 개선시키고/시키거나, 경감시키고/시키거나, 억제하고/하거나, 이들의 발병을 지연시키고/시키거나, 이들의 중증도를 감소시키고/시키거나, 이들의 발병률을 감소시키는 물질의 임의의 투여를 나타낸다. 상기 치료는 관련 질병, 장애, 및/또는 질환의 징후를 나타내지 않는 대상체 및/또는 질병, 장애, 및/또는 질환의 단지 초기 징후만 나타낸 대상체의 치료일 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 상기 치료는 관련 질병, 장애 및/또는 질환의 하나 이상의 확립된 징후를 나타내는 대상체의 치료일 수 있다. 특정 구체예에서, 치료는 관련 질병, 장애, 및/또는 질환으로 고통받는 것으로 진단된 대상체의 치료일 수 있다. 특정 구체예에서, 치료는 관련 질병, 장애, 및/또는 질환의 증가된 발생 위험과 통계적으로 관련된 하나 이상의 민감성 인자를 갖는 것으로 공지된 대상체의 치료일 수 있다.
- [0060] 도면은 제한이 아닌 설명의 목적으로 본원에 제시된다.

도면의 간단한 설명

- [0061] 본 발명의 개시의 상기 및 다른 목적, 양태, 특징 및 장점은 수반되는 도면과 함께 취해지는 하기 설명을 참조함으로써 더욱 명백해지고 더 잘 이해될 것이다:
- 도 1a-1k는 실리카-기반의 초소형 α -MSH-PEG-C' dot 입자가 아미노산-결핍 조건하에서 세포 사멸을 유도함을 보여준다.
- 도 1a는 예시적인 α -MSH-PEG-C' dot가 형광(예를 들어, Cy5 캡슐화된) 코어 및 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 코팅 및 알파-멜라닌세포-자극 호르몬(α MSH)-변형된 외층을 갖는 초소형의 6nm 직경의 실리카-기반 입자임을 보여준다.
- 도 1b는 α -MSH-PEG-C' dot가 세포에서 리소좀 네트워크에 위치함을 보여준다. LAMP1-GFP를 발현하는 M21 흑색종 세포를 24시간 동안 α -MSH-PEG-C' dot(15 μ M)로 처리하였다. 나노입자(Cy5 형광, 유사-착색 및 LAMP1-GFP) 사이의 코로컬라이제이션(colocalization)이 이미지에서 병합됨을 주목하라. 막대 = 10 μ m.
- 도 1c-1e는 α -MSH-PEG-C' dot가 영양분-풍부한 배지에서 잘 견디며, M21 세포는 지시된 α -MSH-PEG-C' dot 농도로 처리되고 40시간 동안 배양됨을 보여준다. 나노입자는 세포 생존(도 1d) 또는 세포 증식(도 1e)에 유의한 영향을 끼치지 않았다. 막대는 평균 $\pm$ 평균의 표준 오차를 나타낸다. n = 3 생물학적 실험으로서, 각각에 대한 5개의 독립적인 가시범위를 가짐. 각각의 실험 값에 있어서는 도 10a 및 10b 참조. 눈금 오차 막대는 S.D.를 가리킨다. 막대 = 10 μ m.
- 도 1f-1h는 나노입자-처리된 세포에서 자가포식현상 및 리소좀 기능이 교란되지 않음을 보여준다. 블롯은 리소좀 억제제 콘카나마이신 A(ConA, 100nM에서 1시간)의 존재(+) 및 부재(-)하에 비처리된 아미노산-결핍(AA-st) 세포 대비 24시간 동안 증가되는 용량의 α -MSH-PEG-C' dot로 처리된 세포에서 LC3-I 및 -II를 보여준다. LC3-II의 수준(도 1g)은 나노입자 처리에 의해 변형되지 않으며, 자가포식현상 전환의 척도인 ConA-유도성 LC3-II

축적(도 1h)은 처리된 세포와 대조군 세포 사이에 유사하다. SEM 막대는 평균 $\pm$ 표준 오차를 나타낸다. 각 그룹에 대해 N = 3. 각각의 실험 값에 있어서는 도 10c 및 10d 참조.

도 1i-1j는 나노입자 처리가 아미노산-비함유 배지 중 배양된 M21 세포의 세포 사멸을 유도함을 보여준다. 이미지는 AA-st 상태에서 생 대조군 세포 및 죽은 (Sytox 녹색-양성 나노입자-처리된 세포를 보여준다. 눈금 막대 = 10 μ m.

도 1i는 실시간 현미경에 의해 결정된 바와 같이(도 1J), 50시간 후 완전 배지(완전) 또는 AA-st 상태에서 Sytox 녹색-양성 세포 퍼센트를 보여준다. 막대는 평균 $\pm$ 표준 편차를 나타낸다. 각 그룹에 대해 N = 4. 각 반복실험은 하나의 생물학적 실험으로부터 비롯되며, 다섯 개의 독립된 가시범위로 정량화된다.

도 1k는 면역결핍(SCID/베이지) 마우스에서 이종이식을 발생시키기 전 72시간 동안 배양시 완전 배지에서 15 μ M α -MSH-PEG-C' dot로 처리된 M21 세포가 비처리된 세포(원형)에 비해 성장 억제(억삼각형)를 입증함을 보여준다. 도식은 (1) 배양물 중 입자-로딩 M21 흑색종 세포, (2) 마우스에 입자-로딩된 M21 세포를 주입하여 대조군 세포 대비 이종이식 종양 성장을 검정하는 것을 포함하는 작업 흐름을 보여준다. 데이터는 그룹 당 3개 종양으로부터 22일 성장에 걸친 평균 종양 부피를 보여준다. 막대는 평균 $\pm$ 표준 오차를 나타낸다. 입자-처리된 M21 세포는 연구 구간에 걸쳐 대조군 대비 통계적으로 유의한($p < 0.001$) 성장 억제를 보여주었다. P-값은 데이터의 중단 특성을 고려하기 위해 추정 방정식을 일반화시킴으로써 추정된 회귀 모델에서의 Walt 테스트로부터 비롯된다.

도 2a-2f는 α -MSH-PEG-C' dot 입자-유도된 세포 사멸이 아포토시스, 네크로토시스, 또는 오토시스가 아님을 보여준다.

도 2a는 아미노산의 부재하에 15 μ M α -MSH-PEG-C' dot와 배양된 MCF10A 인간 유방 상피 세포가 30시간 후 괴사 특징을 갖는 세포 사멸을 겪음을 보여준다. 삽도는 화살표로 표시된 죽어가는 세포를 보여준다. 형광 이미지는 죽은 세포 핵의 Sytox 녹색-라벨링을 보여준다. 막대 = 10 μ m.

도 2b-2f는 실시간 현미경에 의해 결정되는 바와 같이, 15 μ M α -MSH-PEG-C' dot의 존재 또는 부재하에 40시간 (MCF10A)(도 2b) 또는 45시간(MEF)(도 2c) 후 완전 배지 또는 아미노산 결핍된(AA-st) 상태에서 MCF10A 및 마우스 배아 섬유모세포(MEF) 배양물 중의 세포 사멸(Sytox 녹색 +)의 정량화를 보여준다. 막대는 평균 $\pm$ 표준 편차를 나타낸다. 그룹당 N = 5. 각 반복실험은 하나의 생물학적 실험으로부터 비롯되며, 다섯 개의 독립된 가시범위로 정량화된다.

도 2d-2f는 세포 사멸 검정(도 2b-2c에 도시된 검정과 유사)이 38시간 실시간 실험 후 정량화된 MCF10A에서 Bcl2 과발현에 의한 아포토시스 억제(도 2d), 또는 45시간 후 정량화된 MEF에서 Bax 및 Bak의 결실(도 2e), 또는 45시간 후 정량화된 MEF에서 *ripk3*의 결실에 의한 네크로토시스의 억제(도 2f), 또는 45시간 후 MEF에서 Atg5의 녹아웃에 의한 자가포식현상의 억제가 아미노산 결핍 및 15 μ M α -MSH-PEG-C' dot로의 처리에 의해 유도된 세포 사멸을 억제하지 않음을 나타낸다는 것을 보여준다. 막대는 평균 $\pm$ 표준 편차를 나타낸다. 그룹당 N = 5. 각 반복실험은 하나의 생물학적 실험으로부터 비롯되며, 다섯 개의 독립된 가시범위로 정량화된다.

도 3a-3g는 페로토시스가 α -MSH 입자-유도된 세포 사멸의 근본적인 메커니즘임을 보여준다.

도 3a-3c는 15 μ M α -MSH-PEG-C' dot 및 (도 3a) 40시간 후 1 μ M 페로스타틴-1(Fer-1), (도 3b) 38시간 후 100 μ M 테페록사민(DFO), 및 (도 3c) 40시간 후 50 μ M 부틸화된 하이드록시아니솔(BHA), 200 μ M 아스코르브산(AA), 100 μ M 트롤록스(Trolox), 10mM N-아세틸시스테인(NAC), 또는 5mM 글루타티온(GSH)의 존재 또는 부재하에서 완전 배지(완전) 또는 아미노산-결핍된(AA-st) 상태에서 배양된 MCF10A 세포에서 세포 사멸(Sytox 녹색 +)의 정량화를 보여준다. 막대는 평균 $\pm$ 표준 편차를 나타낸다. 그룹당 N = 5. 각 반복실험은 하나의 생물학적 실험으로부터 비롯되며, 다섯 개의 독립된 가시범위로 정량화된다.

도 3d 및 3e는 15 μ M α -MSH-PEG-C' dot를 갖는 아미노산-결핍된 상태에서 페로토시스를 겪는 MCF10A의 실시간 분석으로부터의 이미지를 보여준다. 사멸(Sytox 녹색 명료성)이 이미지의 왼쪽으로부터 오른쪽으로 세포에서 세포로 확산됨을 주목하라. 눈금 막대 = 10 μ m.

도 3f-3g는 15 μ M α -MSH-PEG-C' dot 및 아미노산 회수로 처리된 세포에서 사멸 전 지질 ROS 축적을 보여준다.

도 3f는 지질 ROS를 검출하는 C11-BODIPY의 존재하에 배양된 처리된 세포를 보여준다. C11-BODIPY의 형광 강도는 세포 사멸 전 수시간 증가함을 주목하라(각 이미지의 하단 이미지에서 나타난 세포 사멸 전 시간).

도 3g는 입자-처리되고 아미노산-결핍된 세포(점선), 또는 에라스틴-처리된 세포(흑색 선)에서 C11-BODIPY 형광의 정량화를 보여준다. 하나의 생물학적 실험으로부터 5개 세포 +/- 표준 편차 중 평균 강도를 나타낸다. 시간 0은 DIC 현미경에 의해 결정된 세포 사멸 시간을 나타낸다. C11-BODIPY 염색은 세포 사멸 전 3시간 내지 4시간 사이에 강도를 증가시킴을 주목하라.

도 4a-4g는 α -MSH-PEG-C' dot가 다양한 유형의 암 세포에서 세포 사멸을 유도할 수 있음을 보여준다.

도 4a-4f는 15 μ M α -MSH-PEG-C' dot의 존재 및 부재하에 완전 배지(완전) 또는 아미노산-비함유 배지(AA-st)에서 40시간 후 BxPC3 췌장 암종 세포(도 4a-4b), 45시간 후 H1650 폐 암종 세포(도 4c-4d), 및 65시간 후 HT1080 섬유육종 세포(도 4e-4f)에서 세포 사멸(Sytox 녹색 +)의 정량화를 보여준다. 막대는 평균 +/- 표준 편차를 나타낸다. 그룹당 N = 5. 각 반복실험은 하나의 생물학적 실험으로부터 비롯되며, 다섯 개의 독립된 가시범위로 정량화된다. 눈금 막대 = 10 μ m.

도 4g는 α -MSH-PEG-C' dot 나노입자-유도된 페로토시스에 대한 예시적인 모델을 보여준다. 아미노산 결핍 (I) 및 리소좀으로의 나노입자 섭취 (II) 둘 모두는 글루타티온의 고갈로 이어지며(도 7d-7e 참조), 이는 함께 반응성 산소 종(ROS)의 공지된 유도인자인 리소좀성 철에 의존적인 페로토시스 및 페로스타틴-1 및 리포록스스타틴-1에 의해 차단된 지질 과산화물을 유도하는데 기여한다.

도 5a-5k는 α -MSH-PEG-C' dot가 HT1080 및 786-O 이중이식 모델에서 종양 성장을 억제함을 보여준다.

도 5a, 도 5b 및 도 5k 각각은 α -MSH-PEG-C' dot-처리된(T; n = 5) 마우스 및 염수-처리된(C; n = 3) 마우스에서 786-O(도 5k) 및 HT1080(도 5b) 평균 종양 부피 측정의 그래프 요약을 보여주며; 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다. 3가지의 고용량 α -MSH-PEG-C' dot (또는 대조군 비허클) 치료제를 10일 기간에 걸쳐 i.v. 주입(a; 화살표)하였다. 일부(도 5a)로부터의 개별 HT-1080 종양 부피 측정은 도 5b에 도시된다. 대조군 종양 부피와 비교하여, 데이터는 입자 처리 후 종양 성장의 현저한 억제 및 부분 종양 퇴화를 보여준다(HT-1080: p<0.001; 786-OL P<0.01). P-값은 데이터의 중단 특성을 고려하기 위해 추정 방정식을 일반화시킴으로써 추정된 회귀 모델에서의 Walt 테스트로부터 비롯된다.

도 5c는 대표적인 HT1080 종양 이중이식의 대표적인 전신 Cy5 형광 이미징을 보여준다.

도 5d는 대표적인 대조군 및 처리된 종양으로부터의 H&E-염색된 조직 절편의 저전력 사진은 대조군 표본이 상응하는 처리된 것보다 크기가 불균형적으로 더 크다는 것을 드러냄을 보여준다.

도 5e-5h는 Mac-2로의 종양 절편의 면역조직화학적 염색이 저전력(도 5e) 및 고전력(도 5g) 사진에서 대조군 종양 절편(T)을 둘러싸는 흡어진 대식세포(화살표)를 보여주는 반면, Mac-2 염색된 처리된 절편의 상응하는 저전력(도 5f) 및 고전력(도 5h) 사진은 유사한 위치에서 종양을 에워싸는 다수의 Mac-2 양성 세포(박스, d, f; 화살표)를 보여줌을 나타낸다. 적은 수의 종양내 Mac-2 양성 세포가 또한 주목된다.

도 5i는 입자 처리제 단독(T; n = 3) 대비 조합된 억제제와 입자 처리제(T+L; n = 3)로 처리된 마우스에서 개별 HT1080 종양 부피 측정의 그래프 요약을 보여준다. 10일 기간에 걸친 3가지 고용량 α -MSH-PEG-C' dot 처리(i.p.-주입된 억제제 함유 및 비함유). 단독의 입자 처리에 비해, 조합된 억제제 및 입자 처리 후 종양 성장의 현저한 진행이 관찰된다(p<0.001).

도 5j는 대표적인 입자-노출된 종양이 리포록스스타틴-1로 추가로 처리되는 경우 불균형적인 더 큰 크기의 표본을 나타냄을 보여준다. 눈금 막대: 1mm(도 5d, 도 5e 및 도 5f); 50 μ m(도 5g, 도 5h); 1cm(도 5j).

도 6a-6c는 786-O 및 HT-1080 세포에서 나노입자-유도된 세포 사멸, 및 HT-1080 종양의 혈관형성을 보여준다. 50시간 후 SKOV3 난소 암종 세포(도 6a) 및 5일 후 HT1080 섬유육종 세포(도 6b)에서 세포 사멸(Sytox 녹색 +)의 정량화. 세포를 지시된 농도의 α -MSH-PEG-C' dot의 존재 또는 부재하에 완전 배지(완전) 또는 아미노산-비함유 배지(AA-st)에서 배양하였다. 막대는 평균 +/- 표준 편차를 나타낸다. 그룹당 N = 5.

도 6c-6e는 15 μ M α -MSH-PEG-C' dot의 존재 또는 부재하에 아미노산-결핍된 786-O 신장 암 세포에서 세포 사멸(Sytox 녹색 +)의 정량화를 보여준다. 막대는 평균 +/- 표준 편차를 나타낸다. 그룹당 N = 5. 각 반복실험은 하나의 생물학적 실험으로부터 비롯되며, 다섯 개의 독립된 가시범위로 정량화된다. 눈금 막대 = 10 μ m. 괴사 세포 사멸은 아포토시스 사멸(도 6e)과 비교하여 형태 및 신속한 Sytox 녹색 명확성(도 6d)에 의해 결정되었다.

도 7a-7k는 나노입자가 철 흡수 및 글루타티온 수준에 영향을 끼침을 보여준다.

도 7a-7c는 24시간 동안 완전 배지에서 15 μ M α -MSH-PEG-C' dot로 처리된 MCF10A 세포가 25 μ M HDCFDA를 사용

한 사이토졸 ROS(도 7b) 및 2 μ M C11-BODIPY(581/591)(도 7c)를 사용한 지질 과산화의 수준에 대한 유동 세포 측정기에 의해 검사됨을 보여준다. 도 7a는 입자-처리된 세포의 Cy5 형광(청색 집단)을 보여준다.

도 7d는 15 μ M α -MSH-PEG-C' dot 또는 400 μ M 부티오닌 설펝시민(BSO), γ -글루타미르시스테인 신세타제의 억제제, 글루타티온에 대한 속도-제한 효소의 존재 또는 부재하에 완전 배지(완전) 또는 아미노산-비함유 배지(AA-st)에서 24시간 동안 배양된 MCF10A 세포의 감소된 글루타티온(GSH) 수준의 정량화를 보여준다. 나노입자 처리 및 아미노산 결핍은 단독으로 그리고 조합되어 BSO로의 처리와 유사하게 글루타티온 수준을 감소시킴을 주목하라. 막대는 3개의 독립된 실험 중에서 평균 $\pm$ 평균의 표준 오차를 나타낸다. 개별 실험 값에 대해서는 도 12d 참조.

도 7e는 총 글루타티온 수준이 나노입자-처리된 세포에서 감소되며, 24시간 후 아미노산-결핍된 세포, 나노입자-처리된 세포(α MSH), 및 글루타티온 생성 BSO의 억제제로 처리된 세포에서 총 글루타티온의 상대적 수준을 보여준다.

도 7f는 40시간 및 68시간에서 15 μ M의 α -MSH-PEG-C' dot(백색 막대) 또는 α MSH 펩티드가 결합된 PEG-C' dot(회색 막대)의 존재하에 AA-st 상태에서 배양된 MCF10A 세포의 세포 사멸(Sytox 녹색 +)의 정량화를 보여준다. 막대는 평균 $\pm$ 표준 편차를 나타낸다. 그룹당 N = 5. 각 반복실험은 하나의 생물학적 실험으로부터 비롯되며, 다섯 개의 독립된 가지범위로 정량화된다.

도 7g는 α -MSH-PEG-C' dot가 철에 결합하고, 처리된 세포가 증가된 철 수준을 가짐을 보여준다. 데이터는 α MSH 나노입자 스톱 샘플 및 비처리된 세포(둘 모두 "대조군"임, 검출 한계 미만)로부터 결정된 철 농도, 배양 배지(NP+ 배지)로부터 정제된 α -MSH-PEG-C' dot 및 나노입자로 처리된 세포(NP+ 세포)를 보여준다. 철 농도 표준은 적색 데이터 지점으로서 도시된다. 모든 측정은 삼중으로 수행된 하나의 생물학적 실험으로부터의 평균이다. 원시 데이터는 표 1에 나타내었다.

도 7h는 페르리틴 중쇄 발현이 15 μ M α -MSH-PEG-C' dot로의 처리에 의해 또는 페릭 암모늄 시트레이트(FAC)로의 처리에 의해 아미노산-결핍된(AA-st) 세포에서 증가되며, DFO로의 처리에 의해 감소됨을 보여준다. 웨스턴 블롯은 지시된 시약으로의 처리 후 24시간에 액틴 로딩 대조군 대비 페르리틴 중쇄(FTH1) 발현을 보여준다.

도 7i는 철로의 세포 처리(FAC)가 아미노산-결핍(AA-st) 상태에서 α -MSH-PEG-C' dot-유도된 사멸을 모방하기에 충분함을 보여준다. 그래프는 지시된 바와 같이 처리된 세포에 있어서 세포 사멸(Sytox 녹색 +) 퍼센트의 정량화를 보여준다.

도 7j는 에라스티노로의 전처리가 나노입자-유도된 페로토시스에 대해 민감함을 보여준다. 그래프는 지시된 처리 후 18시간(백색 막대) 또는 24시간(회색 막대)에서 HT-1080 세포 사멸(Sytox 녹색 + 세포) 퍼센트를 보여준다. 4시간 동안 에라스티노로의 전처리는 '-' 또는 '+'로서 표시된다. 에라스티노-전처리는 이 자체로는 세포 사멸을 유도하지 않으나('비처리'), 전처리된 배양물('+')이 18 및 24시간에 더 많은 세포 사멸을 겪기 때문에 지속적인 에라스티노 처리('에라스티노') 및 α -MSH-PEG-C' dot(15 μ M)와 아미노산 결핍('AA-st + α MSH')의 조합 둘 모두에 대해 민감함을 주목하라. 막대는 평균 $\pm$ 표준 편차를 나타낸다. 그룹당 N = 5. 각 반복실험은 하나의 생물학적 실험으로부터 비롯되며, 다섯 개의 독립된 가지범위로 정량화된다.

도 7k는 GPX4 활성이 입자 처리에 의해 억제되지 않음을 보여준다. 데이터는 지시된 처리 후 수집된 세포 용해물로부터 GPX4의 특이적 활성을 보여준다. 데이터는 3개의 독립적인 생물학적 실험으로부터 비롯된다; 막대는 평균 $\pm$ 평균의 표준 오차를 나타낸다.

도 8a-8g는 아포토시스 및 네크로토시스-억제된 세포 및 리프록스타틴-1에 대한 대조 검정을 보여준다.

도 8a는 아미노산 비함유 배지에서 배양되고 100nM 콘카나마이신 A(ConA)로 처리된 MCF10A 세포가 세포 수포 및 단편화를 포함하는 아포토시스의 형태학적 특징을 갖는 세포 사멸을 겪음을 보여준다.

도 8b는 Bcl2 과발현 및 ConA로의 처리의 존재 또는 부재하에 완전 배지(완전) 또는 아미노산-결핍된(AA-st) 상태에서 배양된 MCF10A 세포 중 세포 사멸(Sytox 녹색 +)의 정량화를 보여준다. Bcl2가 AA-st 상태에서 ConA 처리에 의해 유도된 아포토시스를 억제함을 주목하라. 막대는 평균 $\pm$ 표준 편차를 나타낸다. 그룹당 N = 5. 각 반복실험은 하나의 생물학적 실험으로부터 비롯되며, 다섯 개의 독립된 가지범위로 정량화된다.

도 8c는 RIPK3의 녹아웃이 네크로토시스를 억제함을 보여준다. 그래프는 네크로토시스를 유도하기 위해 100ng/ml TNF α , 1 μ g/ml 사이클로헥시미드(CHX) 및 20 μ M zVAD의 조합물로 처리된 야생형(wt) 및 RIPK3-/- MEF의 세포 사멸(Sytox 녹색 +) 퍼센트를 보여준다. 30 μ M 네크로스타틴-1(Nec-1)인 네크로토시스 억제제로 처리

리된 wt 세포와 유사하게 RIPK3 $-/-$ MEF는 세포 사멸을 겪지않음을 주목하라. 막대는 평균 $\pm$ 표준 편차를 나타낸다. 그룹당 N = 5. 각 반복실험은 하나의 생물학적 실험으로부터 비롯되며, 다섯 개의 독립된 가시범위로 정량화된다.

도 8d는 50 μ g/ml 사이클로헥시미드로의 처리에 반응하여 아포토시스를 겪은 MCF10A가 세포 사멸의 비동기식 패턴을 나타냄을 보여준다. 왼쪽 이미지는 아포토시스를 겪은 세포의 실시간 현미경으로부터의 이미지를 보여준다 (브라이트 = Sytox 녹색). 오른쪽 이미지는 개별 세포 사멸 시점을 나타내기 위해 의사착색된(pseudocolored) 왼쪽 이미지로부터의 Sytox 녹색-양성 핵을 보여준다. 여기에서 세포 사멸의 일시적 패턴은 도 3d 및 3e 대비 비동기적이다. 모든 눈금 막대 = 10 μ m.

도 8e는 72시간 동안 15 μ M α -MSH-PEG-C' dot의 부재(왼쪽) 및 존재(오른쪽) 하에 완전 배지 중에 배양된 M21 세포를 보여준다(입자 형광은 청록색으로 표시됨).

도 8f는 완전 배지에서 입자 처리 72시간 후 3일 및 10일에 대조군 및 입자-처리된 세포에 대한 세포 사멸 (Sytox 녹색 + 세포) 퍼센트를 보여준다. 완전 배지 상태에서 입자 처리는 세포 생존력을 억제하지 않음을 주목하라. 막대는 평균 $\pm$ 표준 편차를 나타낸다. 그룹당 N = 5. 각 반복실험은 하나의 생물학적 실험으로부터 비롯되며, 다섯 개의 독립된 가시범위로 정량화된다.

도 8g는 리프록스스타틴-1 처리가 입자-유도된 세포 사멸을 억제함을 보여준다. 40시간 후 15 μ M α -MSH-PEG-C' dot 및 1 μ M 리프록스스타틴-1의 존재 또는 부재하에 아미노산-결핍된(AA-st) 상태에서 배양된 MCF10A 세포에서 세포 사멸(Sytox 녹색 +)의 정량화. 막대는 평균 $\pm$ 표준 편차를 나타낸다. 그룹당 N = 5. 각 반복실험은 하나의 생물학적 실험으로부터 비롯되며, 다섯 개의 독립된 가시범위로 정량화된다.

도 8h는 리프록시스타틴-1 처리가 에라스틴 처리에 의해 유도된 C11-BODIPY 염색을 억제함을 보여준다. 이미지는 대조군 세포가 도 3f-3g에서와 같이 세포 사멸을 겪은지 6시간 후 에라스틴(5 μ M)으로 처리된 C11-BODIPY-인큐베이션된 세포를 보여준다. 에라스틴+리프록스스타틴-1-처리된 세포에서 C11-BODIPY 염색의 부재를 주목하라.

도 9a-9c는 입자-처리된 종양의 이미지를 보여준다.

도 9a는 상이한 크기의 PEG-C' dot로 처리된 HT-1080 세포에서 세포 사멸 측정을 보여준다. α MSH 펩티드가 결합된 6nm 또는 10nm의 15 μ M PEG-C' dot의 부재 또는 존재하에 48시간 동안 완전 배지 또는 AA-st 상태에서 배양된 HT-1080 세포 사멸(Syto 녹색 +)의 정량화. 오차 막대는 S.D.를 나타낸다. 막대는 평균 $\pm$ -표준 편차를 나타낸다. 그룹당 N = 5.

도 9b는 HT-1080 종양이 잘 혈관발달됨을 보여준다. 이미지는 입자 주입 후 10일에 채취되고, 내피 마커 CD31에 대한 면역조직화학에 의해 염색된 대표적인 HT-1080 이종이식 표본을 보여준다. 전체 종양의 저배율(4x) 현미경 이미지(상단 이미지) 및 종양 부위의 고배율(40x) 이미지(하단 이미지). 종양 전체에 걸친 혈관의 존재를 주목하라. 눈금 막대 = 500 μ m(저전력); 50 μ m(고전력).

도 9c는 α -MSH-PEG-C' dot-처리된 786-O 종양이 다수의 보충된 대식세포를 보여줌을 나타낸다. Mac-2 염색된 처리된 절편의 저전력(상단 이미지) 및 고전력(하단 이미지) 사진은 유사한 위치(박스)에서 종양을 에워싸는 표시된 Mac-2 양성 세포를 보여준다.

도 10a-10j는 도 1c-1f 및 도 2a-2e로부터의 그래프에 대한 개별 데이터 지점을 보여준다.

도 10a는 도 1c의 세포 성장 그래프(왼쪽)로부터의 데이터가 도시됨을 보여준다. N = 3 생물학적 실험, 각 데이터 지점은 5개의 독립된 가시범위로부터의 평균을 나타낸다.

도 10b는 도 1c의 세포 증식 그래프(오른쪽)로부터의 데이터가 도시됨을 보여준다. N = 3 생물학적 실험, 각 데이터 지점은 5개의 독립된 가시범위로부터의 평균을 나타낸다.

도 10c는 개별 LC3-II/액틴 값이 도 1d에 도시됨(왼쪽 그래프)을 보여준다. N = 3 각 그룹에 대한 웨스턴 블롯. 15 μ m 상태가 0.79에서 플롯팅된 2개의 값을 가짐을 주목하라.

도 10d는 개별 LC3-II 전환 값이 도 1d에 도시됨(오른쪽 그래프)을 보여준다. N = 3 각 그룹에 대한 웨스턴 블롯.

도 10e는 도 1e의 세포 사멸 그래프로부터의 데이터가 도시됨을 보여준다. N = 4 생물학적 실험, 각 데이터 지점은 5개의 독립된 가시범위로부터의 평균을 나타낸다.

도 10f는 도 2b 왼쪽의 세포 사멸 그래프로부터의 데이터가 각 그룹에 있어서 $N = 5$ 에 대해 도시됨을 보여준다. 각 반복실험은 동일한 생물학적 실험의 독립된 가시범위이다.

도 10g는 도 2b 오른쪽의 세포 사멸 그래프로부터의 데이터가 각 그룹에 있어서 $N = 5$ 에 대해 도시됨을 보여준다. 각 반복실험은 동일한 생물학적 실험의 독립된 가시범위이다.

도 10h는 도 2c의 세포 사멸 그래프로부터의 데이터가 각 그룹에 있어서 $N = 5$ 에 대해 도시됨을 보여준다. 각 반복실험은 동일한 생물학적 실험의 독립된 가시범위이다.

도 10i는 도 2d의 세포 사멸 그래프로부터의 데이터가 각 그룹에 있어서 $N = 5$ 에 대해 도시됨을 보여준다. 각 반복실험은 동일한 생물학적 실험의 독립된 가시범위이다.

도 10j는 도 2e의 세포 사멸 그래프로부터의 데이터가 각 그룹에 있어서 $N = 5$ 에 대해 도시됨을 보여준다. 각 반복실험은 동일한 생물학적 실험의 독립된 가시범위이다.

도 11a-11i는 도 3a-3f, 4a-4c 및 8a-8g의 그래프에 대한 개별 데이터 지점을 보여준다.

도 11a는 도 3a의 세포 사멸 그래프로부터의 데이터가 도시됨을 보여준다. $N = 3$ 생물학적 실험, 각 데이터 지점은 5개의 독립된 가시범위로부터의 평균을 나타낸다.

도 11b는 도 3c의 세포 사멸 그래프로부터의 데이터가 도시됨을 보여준다. 각 그룹에 대해 $N = 5$. 각 반복실험은 동일한 생물학적 실험의 독립된 가시범위이다.

도 11c는 도 3b의 세포 사멸 그래프로부터의 데이터가 도시됨을 보여준다. $N = 3$ 생물학적 실험, 각 데이터 지점은 5개의 독립된 가시범위로부터의 평균을 나타낸다.

도 11d는 도 4a의 세포 사멸 그래프로부터의 데이터가 도시됨을 보여준다. 각 그룹에 대해 $N = 5$. 각 반복실험은 동일한 생물학적 실험의 독립된 가시범위이다.

도 11e는 도 4b의 세포 사멸 그래프로부터의 데이터가 도시됨을 보여준다. 각 그룹에 대해 $N = 5$. 각 반복실험은 동일한 생물학적 실험의 독립된 가시범위이다.

도 11f는 도 4c의 세포 사멸 그래프로부터의 데이터가 도시됨을 보여준다. $N = 3$ 생물학적 실험, 각 데이터 지점은 5개의 독립된 가시범위로부터의 평균을 나타낸다.

도 11g는 도 8b의 세포 사멸 그래프로부터의 데이터가 도시됨을 보여준다. 각 그룹에 대해 $N = 5$. 각 반복실험은 동일한 생물학적 실험의 독립된 가시범위이다.

도 11h는 도 8c의 세포 사멸 그래프로부터의 데이터가 도시됨을 보여준다. 각 그룹에 대해 $N = 5$. 각 반복실험은 동일한 생물학적 실험의 독립된 가시범위이다.

도 11i는 도 8f의 세포 사멸 그래프로부터의 데이터가 도시됨을 보여준다. 각 그룹에 대해 $N = 5$. 각 반복실험은 동일한 생물학적 실험의 독립된 가시범위이다.

도 12a-12e는 도 6b-6c 및 7b-7h의 그래프에 대한 개별 데이터 지점을 보여준다.

도 12a는 도 6b의 세포 사멸 그래프로부터의 데이터가 도시됨을 보여준다. 각 그룹에 대해 $N = 5$. 각 반복실험은 동일한 생물학적 실험의 독립된 가시범위이다.

도 12b는 도 7c의 세포 사멸 그래프로부터의 데이터가 도시됨을 보여준다. 각 그룹에 대해 $N = 5$. 각 반복실험은 동일한 생물학적 실험의 독립된 가시범위이다.

도 12c는 도 7f의 세포 사멸 그래프로부터의 데이터가 도시됨을 보여준다. 각 그룹에 대해 $N = 5$. 각 반복실험은 동일한 생물학적 실험의 독립된 가시범위이다.

도 12d는 도 7b(상단 그래프)의 글루타티온 정량화에 대한 데이터가 도시됨을 보여준다. $N = 3$ 독립된 생물학적 실험.

도 12e는 도 7g의 세포 사멸 그래프로부터의 데이터가 도시됨을 보여준다. 각 그룹에 대해 $N = 5$. 각 반복실험은 동일한 생물학적 실험의 독립된 가시범위이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0062] **상세한 설명**

[0063] 설명 전체에 걸쳐, 구성물이 특정 성분을 갖거나, 함유하거나, 포함하는 것으로 기재되거나, 방법이 특정 단계를 갖거나, 함유하거나, 포함하는 것으로 기재되는 경우, 언급된 성분으로 필수적으로 구성되거나, 언급된 성분으로 구성되는 본 발명의 구성물, 및 언급된 처리 단계로 필수적으로 구성되거나, 언급된 처리 단계로 구성되는 본 발명에 따른 방법이 추가로 존재하는 것으로 간주된다.

[0064] 단계의 순서 또는 특정 작용을 수행하기 위한 순서는 본 발명이 실시 가능한 한 중요하지 않음이 이해되어야 한다. 또한, 2개 이상의 단계 또는 작용이 동시에 수행될 수 있다.

[0065] 예를 들어, 배경 섹션에서의 임의의 간행물의 본원의 언급은 상기 간행물이 본원에 제시된 청구범위 중 임의의 청구범위에 대한 선행 기술로서의 역할을 함을 인정하는 것이 아니다. 배경 섹션은 명확성을 목적으로 제시되며, 임의의 청구범위와 관련된 선행 기술의 설명을 의미하지 않는다.

[0066] 본원에 기술된 다양한 구체예는 C 및 C' dot와 같은 초소형 FDA-IND 승인 나노입자를 사용한다. 본원에 기술된 다양한 구체예는 약물 전달 적용에 대한 이들의 적응을 입증하며, (1) 농도 및 시간(예를 들어, 수일 내지 수주일) 범위에 걸쳐 세포 및 이중이식 모델이 흑색종-표적화 C' dot(예를 들어, α -MSH-PEG-C' dot) 처리에 어떻게 반응하는지, 그리고, (2) 세포 경로가 입자 섭취에 의해 영향을 받는지의 여부를 검사하는 상세한 세포 생물학적 분석이 수행되었다.

[0067] α -MSH-PEG-C' dot로의 세포 처리와 아미노산 결핍의 조합이 어떻게 세포 사멸 프로그램 페로토시스를 유도하도록 협동작용하는지 본원에 기술되어 있다. 또한, 흑색종-표적화 펩티드에 맞춰진 서브-10nm 직경 형광(Cy5 염료-함유) 실리카 나노입자(예를 들어, C' dot)를 사용한 세포에 대한 농도- 및 시간-의존적 처리 효과를 본원에서 입증하였다. 본 기재내용은 고농도의 초소형 나노입자(예를 들어, 10nm 미만의 직경 예를 들어, C dot 또는 C' dot)가 철, 반응성 산소 종, 및 세포 사멸 수행의 동기적 모드를 포함하는 메카니즘 페로토시스에 의해 세포 사멸을 어떻게 유도하는지를 기술한다. 특정 구체예에서, 고농도는 대상체의 종양 조직에서 0.18 μ M 내지 1.8 μ M 범위 내의 국소 농도이다(여기에서 이러한 범위는 본원에 기술된 마우스 연구를 기반으로 하는 추정치이다). 특정 구체예에서, 고농도는 종양 조직에서 적어도 0.18 μ M, 적어도 0.3 μ M, 적어도 0.4 μ M, 적어도 0.5 μ M, 또는 적어도 0.6 μ M의 국소 농도이다; 여기에서 예를 들어, 나노입자는 실리카를 기반으로 하며, 예를 들어, 나노입자는 C dot 또는 C' dot이다. 특정 구체예에서, 국소 농도는 종양 유형 및/또는 대상체에 의존적이다.

[0068] 본 기재내용은 고농도의 이들 입자가 영양분-풍부 배지에서 배양된 비-암 및 암 세포 둘 모두에서 일반적으로 잘 견뎌를 기술한다. 입자 처리와 대사(예를 들어, 아미노산) 결핍의 조합이 높은 비율로 암 세포를 사멸하도록 협동작용하였다. 이론에 구속되지 않으면서, 섭취된 나노입자는 리소좀 네트워크로 국소화되나, 리소좀 기능을 억제하지 않으며, 나노입자-유도된 사멸은 자가포식현상 경로와 무관하게 발생한다.

[0069] 이들 효과가 생체내에서 영양분 결핍된 상태로 확장되는지의 여부를 결정하기 위해, 이중이식편을 입자-노출된 암 세포로부터 생성시키거나 입자 다중-투약 전략을 이용하여 정맥내로 처리하였다. 이를 위해, 농도-의존적인 지속적 성장 억제가 관찰되었으며, 부분적 종양 퇴행과 결부된 종양 성장 동력학의 억제가 발생하였다. 따라서, 이러한 데이터는 고농도 및 영양분 결핍 상태에서 사용된 초소형의 표면-작용기화된 실리카-기반 나노입자는 메카니즘 페로토시스에 의해 세포 사멸을 유도하였음을 입증하였다.

[0070] 특정 구체예에서, 나노입자는 실리카, 중합체(예를 들어, 폴리(락트-코-글리콜산)(PLGA)), 생물학적 체제(예를 들어, 단백질 담체), 및/또는 금속(예를 들어, 금, 철)을 포함한다. 특정 구체예에서, 나노입자는 참조로 본원에 통합된, 브래드베리(Bradbury) 등의 미국 공개 번호 2013/0039848 A1에 기술된 바와 같은 "C dot"이다.

[0071] 특정 구체예에서, 나노입자는 구형이다. 특정 구체예에서, 나노입자는 비-구형이다. 특정 구체예에서, 나노입자는 금속/반-금속/비-금속, 금속/반-금속/비-금속-산화물, -설파이드, -카르바이드, -니트라이드, 리포솜, 반도체, 및/또는 이들의 조합물로 구성된 균으로부터 선택된 물질이거나 이를 포함한다. 특정 구체예에서, 금속은 금, 은, 구리, 및/또는 이들의 조합물로 구성된 균으로부터 선택된다.

[0072] 나노입자는 실리카(SiO₂), 티타니아(TiO₂), 알루미나(Al₂O₃), 지르코니아(ZrO₂), 게르마니아(GeO₂), 탄탈륨 펜톡사이드(Ta₂O₅), NbO₂, 등을 포함하는 금속/반-금속/비-금속 산화물, 및/또는 금속/반-금속/비-금속 보라이드, 카르바이드, 설파이드 및 니트라이드를 포함하는 비-산화물 예컨대, 티타늄 및 이의 조합물(Ti, TiB₂, TiC, TiN, 등)을 포함할 수 있다.

- [0073] 나노입자는 하나 이상의 중합체 예를 들어, 미국 식품 의약국(FDA) 21 C.F.R. § 177.2600에 따라 인간 사용에 허용된 하나 이상의 중합체를 포함할 수 있으며, 비제한적으로, 폴리에스테르(예를 들어, 폴리락트산, 폴리(락트-코-글리콜산), 폴리카프로락톤, 폴리발레로락톤, 폴리(1,3-디옥산-2-온)); 폴리안하이드라이드(예를 들어, 폴리(세바스산 무수물)); 폴리에테르(예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜); 폴리우레탄; 폴리메타크릴레이트; 폴리아크릴레이트; 폴리시아노아크릴레이트; PEG와 폴리(에틸렌 옥사이드)(PEO)의 공중합체를 포함한다.
- [0074] 나노입자는 하나 이상의 분해가능한 중합체 예를 들어, 특정 폴리에스테르, 폴리안하이드라이드, 폴리오르토에스테르, 폴리포스파젠, 폴리포스포에스테르, 특정 폴리하이드록시산, 폴리프로필푸메레이트, 폴리카프로락톤, 폴리아미드, 폴리(아미노산), 폴리아세탈, 폴리에테르, 생물분해성 폴리시아노아크릴레이트, 생물분해성 폴리우레탄 및 폴리스카라이드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 사용될 수 있는 특정 생물분해성 중합체는 비제한적으로, 폴릴리신, 폴리(락트산)(PLA), 폴리(글리콜산)(PGA), 폴리(카프로락톤)(PCL), 폴리(락티드-코-글리콜리드)(PLG), 폴리(락티드-코-카프로락톤)(PLC), 및 폴리(글리콜리드-코-카프로락톤)(PGC)을 포함한다. 또 다른 예시적인 생물분해성 중합체는 폴리(베타-아미노 에스테르)이며, 이는 본 출원에 따라 사용하기에 적합할 수 있다.
- [0075] 특정 구체예에서, 나노입자는 하나 이상의 작용기를 가질 수 있거나 갖도록 변형될 수 있다. 이러한 작용기(나노입자의 표면 내 또는 표면 상)는 임의의 제제(예를 들어, 검출가능한 실체, 표적화 실체, 치료 실체, 또는 PEG)와의 회합에 사용될 수 있다. 표면 작용성을 도입하거나 변형시킴으로써 표면 전하를 변화시키는 것 이외에, 상이한 작용기의 도입은 링커(예를 들어, (절단성 또는 (생물-)분해성) 중합체 예컨대, 비제한적으로, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, PLGA, 등), 표적화/호밍 제제, 및/또는 이들의 조합물의 컨쥬게이션을 허용한다.
- [0076] 특정 구체예에서, 나노입자는 하나 이상의 표적화 리간드 (또는 모이어티)(예를 들어, 나노입자에 부착된) 예컨대, 비제한적으로, 소분자(예를 들어, 폴레이트, 염료, 등), 앵타머(예를 들어, A10, AS1411), 폴리스카라이드, 소 생분자(예를 들어, 폴산, 갈락토스, 비스포스포네이트, 바이오틴), 올리고뉴클레오타이드, 및/또는 단백질(예를 들어, (폴리)펩티드(예를 들어, αMSH, RGD, 옥트레오타이드, AP 펩티드, 상피 성장 인자, 클로로톡신, 트랜스페린, 등), 항체, 항체 단편, 단백질, 등)을 포함한다. 특정 구체예에서, 나노입자는 하나 이상의 조영제/이미징제(예를 들어, 형광 염료, (킬레이트화된) 방사성동위원소(SPECT, PET), MR-활성제, CT-제제), 및/또는 치료제(예를 들어, 소분자 약물, 치료학적 (폴리)펩티드, 치료학적 항체, (킬레이트화된) 방사성동위원소, 등)을 포함한다.
- [0077] 특정 구체예에서, PET(양전자 방출 단층촬영) 트레이서가 이미징제로서 사용된다. 특정 구체예에서, PET 트레이서는 ^{89}Zr , ^{64}Cu , [^{18}F] 플루오로데옥시글루코스를 포함한다. 특정 구체예에서, 나노입자는 이들 및/또는 기타 방사성라벨을 포함한다. 특정 구체예에서, 하나 이상의 표적화 리간드 (또는 모이어티)는 동일한 유형일 수 있거나 상이한 종일 수 있다.
- [0078] 특정 구체예에서, 나노입자는 하나 이상의 형광단을 포함한다. 형광단은 플루오로크롬, 플루오로크롬 소광제 분자, 임의의 유기 또는 무기 염료, 금속 킬레이트, 또는 프로테아제 활성화가능한 효소 기질을 포함하는 임의의 형광 효소 기질을 포함한다. 특정 구체예에서, 형광단은 장쇄 카르보필릭 시아닌을 포함한다. 기타 구체예에서, 형광단은 DiI, DiR, DiD, 및 기타 등등을 포함한다. 플루오로크롬은 원적외선, 및 근적외선 플루오로크롬(NIR F)을 포함한다. 플루오로크롬은 비제한적으로, 카르보시아닌 및 인도시아닌 플루오로크롬을 포함한다. 특정 구체예에서, 이미징제는 비제한적으로, Cy5.5, Cy5 및 Cy7 (GE Healthcare); AlexaFluor660, AlexaFluor680, AlexaFluor750, 및 AlexaFluor790 (Invitrogen); VivoTag680, VivoTag-S680, 및 VivoTag-S750 (VisEn Medical); Dy677, Dy682, Dy752 및 Dy780 (Dyomics); DyLight547, DyLight647 (Pierce); HiLyte Fluor 647, HiLyte Fluor 680, 및 HiLyte Fluor 750 (AnaSpec); IRDye 800CW, IRDye 800RS, 및 IRDye 700DX (Li-Cor); 및 ADS780WS, ADS830WS, 및 ADS832WS (American Dye Source) 및 Kodak X-SIGHT 650, Kodak X-SIGHT 691, Kodak X-SIGHT 751 (Carestream Health)을 포함하는 시중에서 입수가능한 플루오로크롬을 포함한다.
- [0079] 특정 구체예에서, 나노입자는 예를 들어, 암 조직/관심 세포를 표적화하기 위한 (예를 들어, 나노입자에 부착된) 하나 이상의 표적화 리간드를 포함한다.
- [0080] 처리될 수 있는 암은 예를 들어, 전립선암, 유방암, 고환암, 자궁경부암, 폐암, 대장암, 골암, 신경아교종, 교모세포종, 다발성 골수종, 육종, 소세포암종, 흑색종, 신장암, 간암, 두경부암, 식도암, 갑상선암, 림프종, 췌장(예를 들어, BxPC3), 폐(예를 들어, H1650), 및/또는 백혈병을 포함한다.

- [0081] 특정 구체예에서, 나노입자는 치료제 예를 들어, 약물(예를 들어, 화학요법 약물) 및/또는 치료학적 방사성동위원소를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같은 "치료제"는 대상체에 투여되는 경우 치료적 효과를 갖고/갖거나 바람직한 생물학적 및/또는 약리학적 효과를 유발하는 임의의 체제를 나타낸다.
- [0082] 특정 구체예에서, 예를 들어, 조합 요법이 사용되는 경우, 전형적인 치료학적 방법은 나노입자의 투여 및 하나 이상의 약물(예를 들어, 분리된 또는 나노입자에 컨주게이션된), 예를 들어, 하나 이상의 화학요법 약물 예컨대, 소라페닙, 파클리탁셀, 도세탁셀, MEK162, 에토포시드, 라파티닙, 닐로티닙, 크리조티닙, 플베스트란트, 베무라페닙, 벡소로텐, 및/또는 캄프토테신의 투여를 포함한다.
- [0083] 표면 화학, 코팅의 균일성(코팅이 존재하는 경우), 표면 전하, 조성물, 농도, 투여 빈도, 형상, 및/또는 나노입자 크기가 요망되는 치료학적 효과 예를 들어, 암 세포의 페로토시스를 유도하도록 조절될 수 있다.
- [0084] 특정 구체예에서, 나노입자 약물 컨주게이트(NDC)는 약물 전달 적용분야에 사용된다. NDC에 대한 상세한 내용은 예를 들어, 내용 그 전체가 본원에 참조로 통합된 국제 공개 WO 2015/183882 A1에 기술되어 있다.
- [0085] 실시예
- [0086] 본원에 기술된 바와 같은, MC1-R-표적화 C' dot를 사용하여 세포 흡수를 증진시켰다(도 1a). 24시간 동안 입자로 처리된 MC1-R 발현 인간 흑색종 세포(M21) 세포의 라이브 이미징은 α -MSH-PEG-C' dot와 리소솜의 코로컬리제이션을 나타냈다. 코로컬리제이션은 GFP-태깅된 리소솜-회합된 맴브레인 단백질 1(LAMP1)의 발현에 의해 가시화되어 섭취된 입자가 리소솜 또는 후기 엔도솜 네트워크에 존재함을 나타내었다(도 1b). $15\mu\text{M}$ 까지 증가하는 농도의 α -MSH-PEG-C' dot 입자로 처리된 M21 세포는 대조군 세포에서 관찰된 비율과 유사한 생존 및 증식 비율을 보였다(도 1c-1e). 이러한 결과는 세포가 고농도의 이러한 나노입자와의 인큐베이션을 잘 견뎌내임을 입증하였다. 다음으로 리소솜이 α -MSH-PEG-C' dot로 처리된 세포 내에서 적절하게 기능하는지를 시험하였다. 이를 결정하기 위해, 리소솜 분해를 위한 세포내 기질을 표적으로 하는 자가포식현상 경로를 시험하였다. 자가포식현상은 자가포식소체 막 상으로 지질화되고 자가포식소체와 리소솜의 융합 후 분해가 되는 자가포식 단백질 미세소관-결합 단백질 1 경쇄 3(LC3)의 기저 수준 및 전환율을 정량화함으로써 시험하였다. 자가포식소체-결합되고 지질화된 형태의 LC3(소위, LC3-II)의 축적은 웨스턴 블롯팅에 의한 사이토솔의 비-지질화된 형태(소위 LC3-I) 대비 리소솜을 통과하는 플럭스의 척도 또는 자가포식 도입의 척도로서 정량화되었다(도 1f-1h).
- [0087] 리소솜-의존적 방식으로 발생하는 LC3-II의 전환은 또한 리소솜 기능의 판독물로서 측정될 수 있다. 리소솜이 적절하게 기능하는 경우, 리소솜 액포형 H⁺-ATPase(V-ATPase)를 억제하는 리소솜 억제제 예컨대, 콘카나마이신 A(ConA)으로의 처리는 분해 결여로 인해 LC3-II의 축적으로 이어진다. 대조적으로, 리소솜이 기능장애가 있는 경우, ConA로의 처리는 LC3-II 수준을 변화시키지 못할 것이다. $0.15\mu\text{M}$ 에서 $15\mu\text{M}$ 까지 24시간 동안 α -MSH-PEG-C' dot의 농도를 증가시켜 처리한 세포는 대조군 세포와 비교하여 유사한 상대적 LC3-II 수준을 가지며, 이는 자가포식현상이 나노입자 처리에 의해 유도되지 않거나 교란되지 않음을 시사한다. pH를 증가함으로써 리소솜 기능을 억제하고 자가포식소체 분해를 차단하는 리소솜 억제제 ConA로의 세포 처리는 대조군 대비 입자-처리된 세포에서 LC3-II의 유사한 축적을 발생시키며, 이는 리소솜이 세포에 고농도의 α -MSH-PEG-C' dot를 로딩시킬 경우에도 적절하게 기능함을 입증한다(도 1f-1h).
- [0088] 다음으로, 나노입자를 영양분-결핍된 상태하에 배양된 세포에 투여하여 자가포식현상을 유도하였다. 아미노산 비함유 배지에서 배양된 세포를 α -MSH-PEG-C' dot로 처리하고, 실시간 이미징으로 시험하였다. 입자의 부재하에 M21 세포는 아미노산 결핍을 잘 견딜 수 있는 반면, 영양분-풍부 배지 중의 세포에는 전혀 영향을 끼치지 못하는 $15\mu\text{M}$ α -MSH-PEG-C' dot로의 아미노산 결핍된 세포의 처리는 높은 비율로 세포 사멸을 유도하였다. 세포 사멸은 파열된 혈장 막을 갖는 세포를 라벨링시키는 Sytox 녹색 즉, 막-불침투성 핵산 염료의 흡수에 의해 검출될 수 있다(도 1i-1j). 이는 α -MSH-PEG-C' dot가 일반적으로 내약성이 우수하지만, 영양분-결핍된 암 세포는 이러한 처리에 민감함을 입증한다. 이러한 발견이 생체내 종양 성장에 대한 영향력을 가질 수 있는지의 여부를 결정하기 위해, M21 흑색종 세포를 세포 생존력에 영향을 미치지 않는 영양분-풍부 상태하의 배양에서 α -MSH-PEG-C' dot와 인큐베이션하고(도 1c-1e 및 도 8e-8f), 이어서 입자-노출된 세포는 물론 입자-비노출된 세포를 플랭크 종양 이종이식편으로서 마우스에 주입하여 영양분 결핍 상태를 촉진하였다. α -MSH-PEG-C' dot로 로딩된 M21 흑색종 세포는 입자 비노출된 세포에 비해 통계학적으로 유의한 성장-억제($p<0.001$)를 입증하였다. 세포 주입 후 10일까지 입자-노출된 세포에서 측정 가능한 종양 성장이 발생하지 않았다. 이론에 얽매이지 않으면서, 이러한 발견은 고농도의 α -MSH-PEG-C' dot 처리가 배양에서 및 생체내에서 영양분 결핍 상태하에 세포 사멸을 유도할 수 있음을 시사하였다.

- [0089] 다음으로, 영양분-결핍된 상태 하에 α -MSH-PEG-C' dot로 처리된 세포가 어떠한 메카니즘으로 세포 사멸을 겪는지를 조사하였다. 이론에 얽매이지 않으면서, 죽어가는 세포의 형태학적 검사는 전형적으로 아포토시스 동안 관찰되는 세포 수포형성(blebbing) 및 단편화 없이 세포가 팽창되고 원형질 막이 파열되게 하는 괴사 형태를 시사하였다(도 2a 및 도 8a). 세포 사멸 메카니즘을 더욱 명확히 확인하기 위해, 2개의 비-종양 세포주 즉, MCF10A 인간 유방 상피 세포 및 마우스 배아 섬유모세포(MEF)를 사용하였으며, 또한 α -MSH-PEG-C' dot의 존재하에 아미노산 비함유 배지에서 배양할 경우 높은 비율로 사멸하는 것이 관찰되었다(도 2b-2c). 항-아포토틱 단백질 Bcl-2(MCF10A-Bcl2)(도 8b)의 과발현에 의한 또는 *Bax* 및 *Bak*의 유전자 결실(*Bax/Bak*-/- MEF)에 의한 아포토시스에 대해 내성을 띠는 세포는 대조군 세포의 비율과 유사한 비율로 세포 사멸을 겪었으며, 이는 α -MSH-PEG-C' dot-유도된 세포 사멸이 아포토시스에 의해 발생하지 않음을 시사한다(도 2d 및 도 2e).
- [0090] 다음으로, 세포 사멸이 RIPK3 키나제를 필요로 하는 프로그래밍된 형태의 괴사인 네크로토시스에 의해 발생하는지의 여부를 결정하였다. *Bax/Bak*-/- MEF와 유사하게, 네크로토시스에 대해 내성인(도 8c) *Ripk3*-/- 닥아웃 MEF 또한 대조군 대비 유사한 비율로 세포 사멸을 겪었다. 이론에 얽매이지 않으면서, 이러한 결과는 나노입자 처리가 네크로토시스를 유도하지 않음을 시사한다(도 2f).
- [0091] 다음으로, 자가포식현상을 위해 완전히 결핍된 자가포식현상-관련된 유전자 5 닥아웃 MEF(*Atg5* -/- MEF)를 아미노산의 부재하에 α -MSH-PEG-C' dot로 처리함으로써 오토시스로 불리는 자가포식현상 경로를 포함하는 최근 기술된 형태의 세포 사멸이 관련될 수 있는지의 여부를 결정하였다. *Atg5* -/- MEF는 대조군 세포와 유사한 비율로 세포 사멸을 겪었으며, 이는 α -MSH-PEG-C' dot-유도된 세포 사멸이 자가포식현상을 포함하지 않으며 오토시스가 아님을 입증한다(도 2f). 종합적으로, 이들 데이터는 α -MSH-PEG-C' dot 처리와 아미노산 결핍의 조합에 의해 유도된 세포 사멸이 아포토시스, 네크로토시스, 및 오토시스와 무관하게 발생함을 입증하였다.
- [0092] 다음으로, 철- 및 지질 반응성 산소 종(ROS)-의존성 과정을 통해 발생하는 최근에 기술된 세포 사멸 메카니즘인 페로토시스가 글루타티온 결핍에 의해 유도되고 α -MSH-PEG-C' dot-유도된 세포 사멸에 관련되는지의 여부를 결정하였다. 먼저, 지질 ROS의 스캐빈저인 페로토시스의 약리학적 억제제 페로스타틴-1 및 리프록스스타틴-1이 이러한 상황에서 세포 사멸을 차단할 수 있는지의 여부를 결정하였다. 페로스타틴-1 또는 리프록스스타틴-1 중 어느 하나로의 처리는 세포 생존력을 구제하였으며, 이는 세포 사멸을 나노입자의 부재하에 아미노산-결핍된 상태하에 발생하는 수준으로 감소시켰다(도 3a, 도 8g).
- [0093] 나노입자-유도된 세포 사멸은 또한, 부틸화된 하이드록시아니솔(BHA), 아스코르브산(Asc Acid) 및 트롤록스를 포함하는 기타 항산화제로의 처리에 의해, 또는 대안적으로, 글루타티온 또는 글루타티온의 전구체인 N-아세틸시스테인(NAC)의 첨가를 통한 글루타티온 풍부화에 의해 억제되었다(도 2b-2c). 나노입자-유도된 세포 사멸 동안 지질 ROS가 축적되는지를 시험하기 위해, 입자-노출된 세포를 지질 산화 표시인자 C11-BODIPY의 존재하에 이미징시켰다. 세포 사멸 전 증가된 염색은 리프록스스타틴-1-억제가능 방식으로 공지된 페로토시스-유도제 에라스틴으로의 처리에 반응하여 발생하는 것으로 관찰되었다(도 3f-g, 도 8h). 에라스틴 처리에 의해 유도된 세포 사멸과 마찬가지로, C11-BODIPY 염색에 의해 검출된 지질 ROS는 아미노산 비함유 상태하에 나노입자 처리에 의한 세포 사멸의 유도 수 시간 전에 축적되었다(도 3f-3g). 나노입자-유도된 사멸이 페로토시스의 요건인 철에 의존적인지의 여부를 추가로 시험하기 위해, 철 과부하를 처리하는데 사용되는 철 킬레이터인 데페록사민(DFO) 및 페로토시스를 차단하는 것으로 보고된 제제로 처리된 세포가 거의 완전하게 세포 사멸을 억제하였음을 확인하였다(도 3b). 이들 데이터는 α -MSH-PEG-C' dot 고농도로의 아미노산-결핍된 세포의 처리가 페로토시스를 유도함을 입증한다(도 3c). 특히, 이러한 상황에서 페로토시스는 또한, 다른 유형의 사멸 예컨대, 아포토시스를 겪은 세포에 대해 발견된 것(도 8d)과 달리 웨이브형 방식으로 세포에서 세포로 전파되는 것으로 관찰되었다(도 3d 및 3e). 이론에 얽매이지 않으면서, 이는 사멸-유도 시그널의 세포 대 세포 소통을 시사하였다.
- [0094] MCF10A 세포 및 MEF가 페로토시스에 의해 세포 사멸을 겪는다는 것을 결정한 후, 더 넓은 패널의 암 세포에서 아미노산 결핍 및 나노입자 처리에 의해 이러한 방식으로 세포 사멸이 유도될 수 있는지의 여부를 결정하였다. 예를 들어, MCF10A, MEF 및 M21 세포, BxPC3 췌장 암종 세포, H1650 폐 암종 세포, HT1080 섬유육종 세포, 및 786-0 신장 암종 세포 또한, 아미노산의 부재하에 α -MSH-PEG-C' dot로 처리할 경우 높은 비율의 괴사를 겪었다. 이러한 데이터는 세포 사멸이 여러가지 상이한 암 세포 유형에서 아미노산의 부재하에 나노입자에 의해 유도될 수 있음을 나타냈다(도 4a-4f, 도 6c-6e).
- [0095] 특히, HT-1080 세포는 10배 낮은 입자 농도에서 결핍 배지(도 6b) 및 완전 배지(도 4e-4f)에서 배양할 경우 나노입자 처리에 반응하여 괴사를 겪었으며, 이는 이들 세포가 이러한 유형의 세포 사멸에 특히 민감함을 시사한다.

- [0096] 이들 결과에 근거하여, 입자-유도된 처리 반응이 786-0 신장 암종 및 HT1080 섬유육종 이종이식 모델에서 발생할 수 있는지의 여부를 추가로 결정하였다. 다중-투약 전달 체계를 사용하여, 플랭크 786-0 또는 HT-1080 종양을 함유하는 면역억제된 마우스에서 표적화된 입자 프로브(n = 5) 또는 0.9% 염수액(n = 3) 중 어느 하나의 3가지의 고용량 정맥내(i.v.) 처리 후 10일 기간에 걸쳐 종양 성장을 평가하였다. 염수 비히클 주입 후 측정된 시간에 따라 신속하게 증가하는 종양 부피에 비해, 종양 성장의 통계학적으로 유의한 억제가 두 종양 유형 모두에 대하여 실험 구간에 걸쳐 다중-투약 입자 처리로 관찰되었으며(도 5a, 5b, 5i, 5k), HT-1080 이종이식편에 있어서는 더 컸다. 특히, 이는 초기 주입 후 4 내지 5일 구간 내에 모든 입자 처리된 HT-1080 종양에 있어서 50%를 초과하는 부분 종양 퇴화에 의해 달성되었다(예를 들어, 57%-78%의 부분 종양 퇴화 범위; 약 64%의 평균 부분 종양 퇴화를 가짐)(도 5b). 나머지 실험 구간에 걸쳐, 입자-처리된 종양 부피가 감소되었다. 예를 들어, 10일 실험 기간의 말기까지, 처리된 HT-1080 종양 부피는 대조군 부피에 비해 약 85%의 통계학적으로 유의한 감소를 보였으며(p<0.001), 처리된 786-0 종양 부피는 약 73%의 통계학적으로 유의한 감소를 보였다(p<0.01)(도 5a, 5b). HT1080 플랭크 이종이식편을 갖는 마우스에서 대표적인 전신 광학 이미징은 초기 αMSH-PEG-C' dot 주입 후 종양 배치 부위에서 강한 형광 시그널을 나타냈으며, 이는 정맥내 주입된 입자의 국소화를 시사한다(도 5c).
- [0097] 대표적인 대조군(n = 1) 및 처리된(n = 2) 종양(도 5d)으로부터의 대응하는 H&E-염색된 조직 절편은 밀도가 높은 세포성 및 침습성 신생물이 다초점 괴사를 나타냄을 드러냈다. 대조군 종양은 명백한 형태학적 차이 없이 처리된 종양 보다 평균적으로 현저하게 더 컸다. 대식세포 마커 Mac-2에 대한 면역조직화학적 염색은 저배율 및 고배율 둘 모두에서 대조군 종양 주변에서 관찰된 것과 비교하여 처리된 종양을 둘러싸는 다수의 보충된 대식세포를 나타냈다(도 5e-5h). 종양내 Mac-2 양성 세포는 모든 종양에서 유사하게 적은 수로 존재하였다.
- [0098] 나노입자 처리로부터 발생하는 종양 성장의 억제가 페로토시스와 관련될 수 있는지의 여부를 추가로 시험하기 위해, 종양-보유 마우스를 10일의 기간에 걸쳐 매일 복강내(i.p.) 투여량의 리프록스스타틴-1로 처리하여 입자-유도된 종양 수축에 대한 영향을 결정하였다. HT1080 이종이식 마우스(n = 3)에서, 후속적으로 투여된 3가지 고용량 입자 처리제 리프록스스타틴-1은 입자에 노출되지 않았던 종양에서 관찰된 것과 거의 동일한 수준으로 성장 억제를 현저하게 감소시켰다(도 5i). 리프록스스타틴-1로 처리된 입자-노출된 종양에서 평균 1일 성장은 입자 단독 처리에 있어서 -0.87mm^3 (95% CI: -1.06 내지 -0.69)와 비교하여 14.6mm^3 (95% CI: $10.1 - 18.9$)이었으며, 차는 15.3mm^3 (CI: 13.1 내지 17.6 ; p < 0.001)이다. 상응하는 입자-노출된 종양 표본은 매일 리프록스스타틴-1이 투여된 입자-처리된 종양 보다 평균적으로 현저히 더 작았다(도 5j).
- [0099] α-MSH-PEG-C' dot 및 아미노산 결핍으로의 세포의 조합 처리는 세포 사멸 프로그램 페로토시스를 유도하기 위해 협동작용을 하고, 고용량의 나노입자 전달은 종양 성장을 억제하며 종양 퇴화를 초래할 수 있으며; 이들 효과는 리프록스스타틴-1의 존재하에 역전될 수 있다. 예를 들어, 이와 관련하여 페로토시스 유도를 위한 영양분 결핍과 나노입자 처리의 조합된 요건은 생체내 종양 세포와 관련되는 반면, 정상 세포에는 덜 관련이 있다(예를 들어, 종양 조직은 대사 스트레스를 받는 것으로 알려져 있으며, 정상 조직 대비 영양분-제한되기 때문이다). 초소형의 표적화된 실리카 나노입자 자체는 또한, 표적화를 촉진하는 리간드로 변형되는 경우, 비-종양 조직에서보다 더욱 효율적으로 종양 조직에서 우선적으로 축적되는 것으로 밝혀졌다.
- [0100] 본원에 기술된 바와 같이, 정맥내 전달 후 HT1080 이종이식편 내의 나노입자의 축적은 종양 성장을 현저하게 억제하고 부분적 종양 퇴화를 유도하는 것으로 밝혀졌다. 리프록스스타틴-1의 추가적 첨가는 이러한 효과를 입자에 노출되지 않은 종양에서 관찰된 것과 거의 동일한 수준으로 역전시켰다. 이러한 발견은 선택된 암 유형에서 관찰된 영양분 결핍과 입자 처리 사이의 잠재적인 상승작용을 강조하며, 이론에 얽매이지 않으면서, 이는 이러한 대사 전략을 활용하여 페로토시스의 관련성이 치료학적 잠재력을 보유할 수 있음을 시사한다.
- [0101] 대조군 종양 주변의 대식세포의 수와 비교하여 입자-처리된 종양 주변의 대식세포의 수에 있어서 뚜렷한 증가의 유의성은 완전히 명확하지는 않지만, 세포 파편의 완전한 빨아들임에 의한 질병 보호 및 상처 수복에서 이들의 역할은 잘 확립된다. 높은 등급의 대식세포 소성이 종양 미세환경으로부터 국소 신호에 반응하여 발생할 수 있으며, 활성화시, 대식세포는 종양 수축과 관련된 이들의 기능 변화를 포함하는 조직 항상성을 유지하는데 필요한 여러가지 역할을 추정할 수 있음이 추가로 인식될 수 있다. 이러한 데이터는 예를 들어, 표면-부착된 세포독성제의 필요없이 암 이미징 및 검출을 위한 임상 실험에서 이미 분자-표적화된 C' dot에 대한 치료학적 적용을 제시한다.
- [0102] 특정 구체예에서, 본원에 기술된 나노입자는 페로토시스를 유도한다. 암을 표적으로 하기 위한 αMSH 펩티드로의 입자 표면-변형은 세포 내재화를 향상시킨다(데이터 미도시됨). αMSH로의 입자 표면 변형은 시험 세포주에

서 페로토시스에 필요하지 않는데, 더 늦은 속도이긴 하나 페로토시스의 유도가 α -MSH 표적화 리간드로 변형되지 않은 PEG-코팅된 C' dot로 발생하였기 때문이며, 이는 α -MSH-변형된 플랫폼에 비해 기본 입자의 더 느린 내재화를 반영할 수 있다(도 7f).

[0103] 따라서, 특정 구체예에서, 천연 실리카 입자 자체는 페로토시스-유도 활성을 갖는데, 탈양자화된 표면 실라놀기 및/또는 프랙탈 내부 구조가 이의 구조 내부에서 철 흡착 및/또는 혼입으로 이어질 수 있기 때문이다. 이중으로 탈이온화된 물 제조물과 비교하여, α -MSH-PEG-C' dot 나노입자의 철 로딩은 배양 배지와 인큐베이션되었음이 발견되었다(도 7g, 도 8a-8f). 증가되는 철 로딩은 페릭 옥사이드 용액과 인큐베이션할 경우 농도-의존적 방식으로 발생하였으며, 철-로딩 용량의 감소가 수반되었다(도 8a-8f). 또한, 비처리된 세포 대비 α -MSH-PEG-C' dot 나노입자-처리된 세포에 있어서 증가된 세포내 철 수준이 발견되었다(도 7g, 표 1). 또한, 입자-처리된 세포는 사이토졸 철에 결합하는 페리틴의 중쇄(FTH1)의 발현을 상향조절한다(도 7h). 또한, 페릭 암모늄 시트레이트(FAC)로의 처리에 의한 세포 내로의 철 로딩은 입자 처리를 모방하고 아미노산-결핍된 세포에서 페로토시스를 유도하는데 충분한 것으로 밝혀졌으며(도 7i), 이는 이들 실리카-기반 나노입자가 철을 세포 내로 로딩함으로써 페로토시스와 관계할 수 있음을 시사한다. 증가된 철 흡수는 생각되는 바로는, 증가된 ROS 생성으로 인해 글루타티온의 고갈로 이어질 수 있다. 글루타티온 수준이 입자-처리된 세포에서 억제되고(도 7d-7e), 시스틴 흡수를 차단함으로써 글루타티온 생성을 억제하는 에라스틴으로의 전처리는 세포를 입자-유도된 페로토시스에 예민하게 하는 것으로 밝혀졌으며, 이는 글루타티온 고갈이 입자-유도된 사멸에 대해 속도 조절함을 시사한다(도 7j).

[0104] 표 1은 마이크로파 플라즈마 원자 방출 분광법(MP-AES)에 의해 측정된 철 농도를 보여준다.

[0105] 표 1

표본	철-함유 용액 농도(정제 전)	† 측정된 철 농도 (ppb) +/- S.D. (정제 후)	C' dot 또는 세포 중 철 농도 (μM)	철-로딩 용량
C' dot, 희석된 완전 배지*	~6.5 μM	33.6 +/- 18.6	0.60	46.2%
C' dot, 희석된 AA-비함유 배지*	~6.5 μM	33.9 +/- 16.3	0.61	46.9%
C' dot, Fe ³⁺ -도핑된 용액	1.5 μM	8.32 +/- 12.9	0.15	50.0%
C' dot, Fe ³⁺ -도핑된 용액	15.0 μM	144.7 +/- 16.3	2.58	86.0%
C' dot, Fe ³⁺ -도핑된 용액	1.5 mM	522.6 +/- 32.6	9.33	3.1%
C' dot 단독	NA	BDL	BDL	NA
C' dot-노출된 HT1080 세포, AA-비함유 배지	~8.6 μM	37.6 +/- 7.8	0.67	~8.0%
HT1080 세포, AA-비함유	~8.6 μM	BDL	BDL	NA

[0106]

[0107] BDL, 검출 한계 미만; NA 해당 사항 없음

[0108] * 비희석된 완전 배지 및 AA-비함유 배지에 존재하는 철은 8.6 μM이다.

[0109] † 물 또는 인산염 완충제 용액에 재현탁됨

[0110] 종합적으로, 본원에 기술된 예시적인 데이터는 입자 처리에 의해 유도된 페로토시스가 세포 내로 철 흡수를 포함하여 페로토시스를 실행시키는 글루타티온의 억제 및 지질 ROS의 축적으로 이어지는 모델을 지지한다(도 4g). 지질 ROS는 지질 과산화에 대해 세포를 보호하며 페로토시스를 억제하는 글루타티온 퍼옥시다제 4(GPX4) 효소의 저하된 활성으로 인해 글루타티온-억제된 세포에서 축적될 수 있다. 입자 처리가 처리된 세포 용해물로부터 효소 검정에서 GPX4 활성을 억제하는 것으로 밝혀지지 않았다(도 7k). 마찬가지로, 입자 처리가 GPX4의 직접 억제 의한 지질 과산화로 이어지지 않는 모델은 발견되지 않았다.

[0111] 일부 암(예를 들어, HT1080, 786-0)은 또한 세포 사멸의 이러한 메커니즘에 특히 민감할 수 있으며, 이는 항-종양 효과를 달성하는데 필요한 미립자 농도의 임계를 낮출 수 있다. HT-1080 암 세포는 영양분 풍부 상태하에서도 α-MSH-PEG-C' dot-유도된 페로토시스를 겪으며(도 4e-4f), 이들 세포는 또한 10배 더 낮은 나노입자 농도로 아미노산-결핍 상태에서 사멸됨이 밝혀졌다(도 6b). HT-1080 종양은 잘 혈관발달되며(도 9b), 이는 영양분-풍부 상태에서도 입자-유도된 사멸에 대한 이들 암 세포의 민감성(도 4e-4f)이 정맥내 입자 전달 후 관찰된 강한 항-

종양 효과에 기여할 수 있음을 시사한다.

[0112] 본원에 사용된 나노입자의 농도는 시험관내 세포 사멸을 유도하거나(예를 들어, 15 μ M) 생체내 종양 성장 억제 및 퇴화를 억제하도록(예를 들어, 60 μ M) 선택되었으며, 단일-투약 이미징-기반 분석에 있어서 인간 대상체에서 현재 사용되는 것보다 적어도 네자릿수 높은 반면, 국소 농도는 조합 치료 요법인 다중-투약 전략의 일부로서 및/또는 표적 부위에서의 직접 카테터 주입에 의해 종양 부위에서 훨씬 더 높은 수준으로 유도될 수 있다. 이러한 투약 스케줄은 최대 종양-대-배경 비율을 산출하면서 표적을 벗어난 독성을 감소시키고 효율적인 신장 청소를 촉진하도록 설계될 수 있다. 특히, 종양 맥관구조의 누출은 종양 조직에서 전신 주입된 나노입자의 축적을 허용할 수 있으며, 또한 종양 내의 영양분 결핍에 기여한다. 이론에 얽매이지 않으면서, 이는 나노입자와 영양분 결핍의 상승작용이 생체내 종양 부위로 제한될 수 있음을 추가로 시사하였다. 또한, 상이한 종양 세포주가 페로토시스-유도 메커니즘에 대한 이들의 민감성에 있어서 상이할 수 있음이 밝혀졌다. 예를 들어, 난소 암 세포주인 SKOV3는 아미노산 결핍과 α -MSH-PEG-C' dot의 조합된 처리에 의해 세포 사멸에 대한 내성을 나타냈음이 밝혀졌다(도 6a). 이에 반해, HT1080 섬유육종 세포는 심지어 영양분-풍부 상태하에서도(도 4e-4f) 및 아미노산-결핍된 상태에서 10배 더 낮은 나노입자 농도(1.5 μ M)로 α -MSH-PEG-C' dot 나노입자-유도된 페로토시스를 겪었다(도 6b). 이러한 경우 HT1080 세포로의 표적화된 입자 흡수는 아마도 비-특이적 식균작용 경로를 통해 발생하였다. 페로토시스가 철-의존적 세포 사멸이기 때문에, 이론에 얽매이지 않으면서, 부분적으로 상이한 민감성은 세포에서 이용가능한 철의 양으로 인한 것일 수 있다. 예를 들어, 철은 세포 항상성에 필수 성분이지만, 또한 세포소기관을 손상시킬 수 있는 ROS를 생성할 수 있다. 세포는 흡수, 전달 또는 저장소로부터 불안정성 철 풀(LIP)로의 이동에 의해 철 유효성을 조절할 수 있으며, 이러한 과정 중 일부가 암에서 변형된다. 암유전자 c-myc 및 E1a는 페리틴 즉, 주요 사이토졸 철 저장 단백질의 수준을 감소시키며, 이는 저장소로부터 대사적으로 활성인 LIP로 철을 이동시킬 수 있으며, 페리틴의 억제는 DNA 합성을 활성화시킴으로써 Ras-의존성 증식을 자극할 수 있다. 페로토시스-유도 약물은 Ras-구동 종양 세포의 선택적 사멸을 제공하는 소분자의 스크린에서 초기에 발견되었다. 게다가, 상기 시험한 암 세포주 중에서, HT1080은 Ras 돌연변이가 내재된 유일한 세포주이다. 따라서, 돌연변이 Ras를 갖는 암 세포가 일반적으로 나노입자 처리에 더욱 민감한지의 여부를 결정할 것이다.

[0113] 일부 나노물질(예를 들어, 약 63nm(예를 들어, C' dot보다 한자릿수 큼)의 직경을 갖는 비코팅된 실리카 입자)은 세포에서 ROS를 유도하는 것으로 나타났다. 대조적으로, 서브-10nm 직경 α -MSH-PEG-C' dot로 24시간 동안 처리된 세포에서 사이토졸 또는 지질 ROS의 증가된 수준이 검출되지 않았다(도 7a-7c). 상기 기술된 바와 같이, 아미노산 결핍 및 나노입자 처리 둘 모두는 세포에서 글루타티온 수준을 저하시키며, 또한 부가적인 효과를 가짐이 밝혀졌다(도 7d-7e). 이론에 얽매이지 않으면서, 이러한 데이터는 이러한 상황에서의 세포 사멸이 시스템인 흡수를 제한함으로써 글루타티온 생성을 억제하는 페로토시스-유도제인 에라스틴과 유사하게 글루타티온 결핍에 의해 적어도 부분적으로 촉발될 수 있음을 시사하였다.

[0114] 본원에 사용된 나노입자는 생체내에서 암을 표적화하기 위한 α MSH 펩티드로 표면-변형되었다. 이러한 변형은 또한 세포 흡수를 증진시키는 것으로 나타났다(데이터 미제시됨). 이러한 입자 표면 변형은 페로토시스와 관련 있는 것으로 보이지 않는데, 왜냐하면 페로토시스 유도는 또한 α MSH 표적화 리간드로 변형되지 않은 PEG-코팅된 C' dot로도 관찰되었기 때문이다. 그러나, α MSH 변형 없이 PEG-코팅된 C' dot로 초래된 사멸은 MC1-R 발현 흑색종 세포에서 α -MSH-변형된 플랫폼인 것과 비교하여 기본 입자의 흡수의 감소된 비율로 인해 세포 집단 내에서 더 느린 반응속도로 발생하였다(도 7f). 다른 한편, 입자 크기는 아미노산 결핍 상태에서 페로토시스의 유도에서 중요한 역할을 행하는 것으로 밝혀졌다. 더 작은 직경(~6nm)의 폐길화된 C' dot에 노출되고 48시간 후 밝혀진 높은 백분율(예를 들어, 80%)의 Sytox 녹색 라벨링된 HT1080 세포에 비해, 더 큰 직경(~10nm)의 입자와의 인큐베이션 후 발견된 라벨링된 세포의 백분율은 약 25%로서 훨씬 낮아졌으며, 비처리된 세포 대비 단지 약간 증가된 것이다(도 9a-9c).

[0115] 생각되는 바로는, 일부 암의 민감성은 항-종양 효과를 발휘하는데 필요한 입자 농도를 낮출 수 있으면서, 또한 다중 고용량 처리를 잘 견딤이 밝혀졌다. 입자- 및 비히클-처리된 HT-1080- 및 786-O-보유 마우스로부터의 종양, 간, 신장 및 혈액 표본의 평가를 실험 실시예의 종료시 수행하였다. 대조군 동물 대비, 입자-처리된 마우스에서 적당하게 상승된 간접 및 총 빌리루빈 혈청 농도를 제외하고는, 완전한 혈구 카운트, 혈청 화학반응, 및 간과 신장 조직병리학에서 유의한 그룹 차이가 발견되지 않았다(표 2, 표 3). 그러나, 완전 혈구 카운트에 대한 용혈 결여 및 조직병리학 및 혈청 화학반응에 대한 간 손상의 부재를 고려할 때 어떠한 메커니즘도 이러한 발견에 기인하지 않았다. 따라서, 이러한 발견은 다중 고용량 α -MSH-PEG-C' dot 처리는 내성이 좋을 수 있음을 시사한다. 입자-처리된(뚜렛함) 및 비히클-처리된(경미함) 종양 표본 중 대식세포 염색 정도가 또한 요약되어 있다(표 4).

[0116] 표 2는 중앙-함유 마우스에서 대사 농도 프로파일, 신장 프로파일, 및 간 기능 프로파일을 보여준다.

[0117] 표 2

		HT1080 입자-노출된 암컷			HT1080 염수 비히클						786-O 입자-노출된 암 컷			786-O 염수 비히클 수컷		
					수컷											
대사 프로파일	Na (mEq/L)	151	149	153	156	156	152	152	156	152	157	157	154	155	QNS	QNS
	K (mEq/L)	8.1	9.2	8.2	9.6	9.3	10.7	9.1	8.2	8.5	8.5	8.8	10.1	8.8	ONS	ONS
	Cl (mEq/L)	111	111	111	108	109	109	117	113	112	114	115	113	110	ONS	ONS
	TCO ₂ (mEq/L)	26	24	26	13	23	21	18	23	23	14	11	10	18	ONS	15
	Ca (mg/dL)	10.5	10.2	10.2	10.3	10.3	9.7	10.5	10.4	10.3	9.7	10.0	10.4	10.1	6.4	9.2
	P (mg/dL)	9.2	9.0	8.6	9.1	10.0	9.1	9.5	8.6	7.6	9.4	9.0	10.8	9.9	8.5	10.0
신장	GLU (mg/dL)	179	184	192	108	153	149	216	164	215	142	208	224	210	149	160
	BUN (mg/dL)	12	18	19	29	28	30	19	21	23	16	17	16	24	19	21
	Crea (mg/dL)	0.2	0.2	0.24	0.12	0.12	0.03	0.20	0.23	0.21	0.10	0.11	0.13	0.18	ONS	ONS
간 기능	ALP (U/L)	29	37	58	67	71	45	73	56	48	106	95	120	71	60	55
	AST (U/L)	140	293	120	113	67	119	365	149	209	188	156	1100	68	214	43
	ALT (U/L)	15	94	30	24	18	25	158	57	71	87	66	509	34	144	21
	GGT (U/L)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	TBIL (mg/dL)	0.8*	0.8*	0.9*	0.2	0.3	0.4	0.3	0.2	0.3	0.8*	0.7*	0.9*	0.2	0.2	0.1

[0118]

DBIL (mg/dL)	0.1	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	0.0
IBIL (mg/dL)	0.7*	0.7*	0.8*	0.2	0.3	0.4	0.3	0.2	0.2	0.7*	0.6*	0.8*	0.1	0.2	0.1
TP (g/L)	4.9	4.9	5.1	5.3	5.2	5.3	5.3	5.3	5.3	4.9	5.1	5.4	5.0	5.6	5.3
ALB (g/L)	3.8	3.9	3.9	3.3	3.1	3.1	3.3	3.2	3.2	3.1	3.2	3.3	2.9	3.3	3.0
GLOB (g/dL)	1.9	2.0	2.0	2.0	2.1	2.2	2.0	2.1	2.1	1.8	1.9	2.1	2.1	2.3	2.3
CHOL (mg/dL)	86	83	88	82	98	104	99	108	118	72	71	88	99	67	90
TRIG (mg/dL)	94	74	96	89	159	127	84	88	85	95	94	94	89	151	92
CK (U/L)	442	506	325	50	122	255	616	300	358	63	117	458	100	53	36

[0119]

[0120]

Na, 나트륨; K, 칼륨; Cl, 클로라이드; TC0₂, 총 이산화탄소; Ca, 칼슘; P, 인; GLU, 글루코스; BUN, 혈액 요소 질소; Crea, 크레아티닌, ALP, 알칼리성 포스파타제; AST, 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제; ALT, 알라닌 아미노트랜스퍼라제; GGT, 감마-글루타밀 트랜스퍼라제; TBIL, 총 빌리루빈; DBIL, 직접 빌리루빈; IBIL, 간접 빌리루빈; TP, 총 단백질; ALB, 알부민; GLOB, 글로불린; CHOL, 콜레스테롤; TRIG, 트리글리세리드; CK, 크레아틴 키나제; *, 정상 값 대비 상승

[0121]

표 3은 중앙-보유 마우스에서 혈액학적 프로파일을 보여준다.

[0122] 표 3

	786-0 입자-노출된 암컷			786-0 염수 비히를 수컷		
RBC (M/ μ L)	9.87	9.79	10.50	9.53	9.30	9.13
HGB (g/dL)	15.3	15.0	16.5	14.4	14.2	14.0
HCT (%)	52.1	52.0	57.4	49.8	48.7	48.2
MCV (fL)	52.8	53.1	54.7	52.3	52.4	52.8
MCH (pg)	15.5	15.3	15.7	15.1	15.3	15.3
MCHC (g/dL)	29.4	28.8	28.7	28.9	29.2	29.0
RDW-SD (fL)	31.4	32.3	31.0	29.9	29.3	30.7
RDW-CV (%)	23.5	23.5	23.0	22.5	22.2	22.3
RET (K/ μ L)	436.3	470.9	573.3	487.9	444.5	454.7
RET (%)	4.42	4.81	5.46	5.12	4.78	4.98
PLT (K/ μ L)	908	650	682	365	294	985
PDW (fL)	7.0	7.0	7.1	7.8	8.2	6.6
MPV (fL)	6.2	6.1	6.5	6.7	6.9	6.1
WBC (K/ μ L)	2.25	1.93	2.21	3.22	2.73	3.75
NEUT (K/ μ L)	0.86	0.82	0.70	1.65	1.32	2.36
LYMPH (K/ μ L)	0.84	0.84	0.80	1.06	1.01	0.93
MONO (K/ μ L)	0.46	0.14	0.58	0.34	0.28	0.35
EO (K/ μ L)	0.09	0.13	0.12	0.16	0.10	0.10
BASO (K/ μ L)	0.00	0.00	0.01	0.01	0.02	0.01
NEUT (%)	38.3	42.5	31.7	51.2	48.3	62.9
LYMPH (%)	37.3	43.5	36.2	32.9	37.0	24.8
MONO (%)	20.4	7.3	26.2	10.6	10.3	9.3
EO (%)	4.0	6.7	5.4	5.0	3.7	2.7
BASO (%)	0.0	0.0	0.5	0.3	0.7	0.3

[0123]

[0124] RBC, 적혈구; HGB, 헤모글로빈 농도; HCT, 헤마토크리트; MCV, 평균 미립자 체적; MCH, 평균 미립자 헤모글로빈; MCHC, 평균 미립자 헤모글로빈 농도; ROW-SD 및 ROW-CV, 적혈구 분포 폭 표준 편차 및 분산 계수; RET, 망상 적혈구 상대 및 절대 계수; PLT, 혈소판 수; POW, 혈소판 분포 폭; MPV, 평균 혈소판 부피; WBC, 백혈구; 및 NEUT, 호중구, LYMPH, 림프구, MONO, 단핵구, EO, 호산구, BASO, 호염기구의 상대 및 절대 계수

[0125] 표 4는 중앙-보유 마우스에서 조직병리학적 프로파일을 보여준다.

[0126] 표 4

	HT1080 입자-노출된 암컷		HT1080 염수 비히클 암컷		786-0 입자-노출된 암컷		786-0 염수 비히클 수컷	
종양 H&E	HT1080과 의 SQ 종 양 일관성	H1080과 의 SQ 종 양 일관성	H1080과의 SQ 종양 일 관성	H1080과 의 SQ 종 양 일관성	786-0 과 의 SQ 종 양 일관성	786-0 과 의 SQ 종 양 일관성	786-0 과의 SQ 종양 일 관성	786-0 과의 SQ 종양 일 관성
종양 Mac2	뚜렷함	뚜렷함	경미함	경미함	뚜렷함	뚜렷함	ND	ND
간 H&E	N.	간염, 조직구 및 호중구성, 1, MFR; 골수외조 혈, 1.	N.	N.	N.	N.	N.	N.
신장 H&E	결절 관성 낭종, F, U.	N.	N.	N.	N.	N.	결절 관 성 괴사 및 재생, 1, MF, U.	N.

[0127]

[0128]

SQ, 피하; N, 정상; Mac2, 대식세포 면역조직화학적 마커; N: 정상, F: 초점, FE: 광범위 초점, MF: 다초점, MFR: 다초점 무작위, D: 확산, U: 일방적, 1: 최소, 2: 경미, 3: 보통, 4: 뚜렷함.

[0129]

C dot가 페로토시스에 기여하는 메카니즘은, 다른 종류의 나노물질이 이러한 형태의 세포 사멸을 유도하는데 유사한 효과를 가질 수 있는지의 여부 및 입자 구조, 조성, 또는 표면 화학적 특성에서 다른 제어된 변형이 페로토시스 유도를 변경시킬 수 있거나 심지어 폐기시킬 수 있는지의 여부를 확인하기 위해 결정될 수 있다. 어떠한 이론에도 얽매이지 않으면서, 세포 운명의 산화환원 조절인자는 물론 종양 퇴화 및 성장 억제제 매개인자로서 나노입자-유도된 페로토시스의 능력은, 이러한 메카니즘에 가장 감수성을 띠는 암에 민감한 암을 동기적으로 그리고 선택적으로 사멸시키도록 치료학적으로 이러한 과정을 활용할 수 있음을 시사한다.

[0130]

특정 구체예에서, 종양 혈관분포는 입자 전달, 영양분 및 산소 상태 및 치료 반응에 영향을 미친다. 특정 구체예에서, 다양한 임상전 종양 유형에 걸친 종양 혈관분포의 평가는 페로토시스에 의한 세포 사멸 유도에 적합한 모델의 개선된 스크리닝을 제공한다. 특정 구체예에서, 평가는 적합한 복합 처리 패러다임을 확인한다.

[0131]

특정 구체예에서, C' dot 특성(예를 들어, 구조, 조성, 또는 표면 화학반응)에서 제어된 변형은 페로토시스의 유도를 강화시키거나 폐지시킨다. 예를 들어, C' dot 크기는 아미노산-결핍 상태에서 관찰된 효과의 크기에 중요한 역할을 담당하는 것으로 밝혀졌다(도 9a). 더 작은 직경(~6nm)의 폐쇄화된 C' dot는 더 큰 직경(~10nm) C' dot에 대해 발견된 것(약 25%)과 비교하여 현저하게 더 높은 백분율의 Sytox 녹색 라벨링된 HT-1080 세포(약 80%)를 유도하였다.

[0132]

또한, 리프록스타틴-1에 대한 반응은 생체내에서 항-종양 메카니즘으로서 페로토시스에 대한 예를 제공하는 반면, 비제한적으로, 종양 미세환경의 조절, 입자-처리된 종양에 대한 뚜렷한 해당 대식세포 모집을 포함하는 다른 메카니즘이 원인이 될 수 있다(도 5g 및 5h, HT-1080; 도 9c, 786-0).

[0133]

특정 구체예에서, 조합 요법이 페로토틱 유도를 촉진하기 위해 대상체에 시행될 수 있다. 예를 들어, 약물(예를 들어, TAS-102)이 종양 세포에 투여될 수 있으며, 이어서 충분한 고농도의 나노입자가 페로토시스를 유도하기 위해 투여될 수 있다. TAS-102에 대한 상세한 사항은 그 내용이 본원에 참조로 통합된 문헌 [“Randomized Trial of TAS-102 for Refractory Metastatic Colorectal Cancer” by R. J. Mayer et al., NEJM, May 14, 2015]에서 찾아볼 수 있다. 또한, 종양은 호르몬 결핍(예를 들어, 거세)될 수 있으며, 종양에 투여된 충분한 고농도의 나노입자는 호르몬 또는 억제제 처리에 노출되지 않은 종양에 비해 페로토틱 세포 사멸 프로그램을 유도하고/거나 심지어 증강시킬 수 있다.

[0134]

임의의 특정 이론에 얽매이지 않으면서, 호르몬 거세 (및/또는 영양분 예를 들어, 아미노산 결핍)가 이웃에 있

는 입자를 내지화시키는 수용체를 과발현시킴으로써 세포를 보완하게 하는 것으로 상정된다. 특정 구체예에서, 페로토시스에 대한 철의 효과가 추가로 이용될 수 있다. 예를 들어, 대안적 구체예에서, 특정 세포 유형은 페로토시스의 유도를 위한 나노입자를 내재화시키기 위해 대사적으로 또는 호르몬적으로 결핍될 필요가 없을 수 있다.

[0135] 종양 미세환경 및 대식세포 소성/활성화의 나노입자 조절

[0136] 구별되는 대식세포 서브셋은 암에서 보호성 또는 병원성과 관련되었다. 고전적으로 활성화된 "염증유도성(proinflammatory)" M1 표현형 대식세포는 항-종양 면역에서 역할을 가져, 종양형성에서 보호 역할을 제공한다. 이들 대식세포는 종양-사멸 메커니즘을 활성화시키고, 종양 회합된 대식세포 및 골수-유래된 억제 세포의 억제 활성을 길항시킨다. M1 대식세포는 Toll-유사 수용체 리간드(예컨대, 리포폴리사카라이드) 및 인터페론- γ 에 의해 활성화되며, 이는 헬퍼 T 세포 서브타입 TH1 반응을 증폭시켜, 항종양 반응에서 양성 피드백 루프를 제공한다. 또한, M1 대식세포는 특히, 염증유도 사이토킨 및 유도성 니트릭-옥사이드 신타제를 발현한다. 대안적으로, 활성화된 "해소-촉진(pro-resolving)" 대식세포(M2 대식세포)는 항-염증 기능을 가져, 상처 치유를 조절한다. 또한, 이들은 적응성 종양-특이적 면역 반응을 억제하고, 종양 성장, 침윤, 전이, 스트로마 재구성 및 혈관신생을 촉진한다.

[0137] 종양-표적화 모이어티(예를 들어, 알파 멜라닌세포 자극 호르몬)의 존재 및 부재의 실리카 나노입자는 세포 사멸 프로그램(예를 들어, 페로토시스) 및 약물 요법을 평가하기 위한 동물 모델에서 계속 시험된다. 본원에 기술된 바와 같이, 소수의 Mac-2 양성 대식세포, 뮤린 대식세포 마커는 면역조직화학적 염색에 의해 대조군 종양을 둘러싸는 연조직에서 나타난 반면, 입자-처리된 종양은 저배율 및 고배율 둘 모두에서 동일한 위치에서 훨씬 더 많은 수의 Mac-2 양성 세포에 의해 외접되었다. 대조군 병변 주위의 것과 비교하여 입자-처리된 종양을 둘러싸는 대식세포의 수의 이러한 뚜렷한 증가는 세포 파면을 완전히 빨아들임으로써 질병 보호 및 상처 수복에서 역할을 갖는다. 대식세포는 종양 미세환경으로부터의 국소 신호에 반응하여 높은 정도의 소성(예를 들어, 별개의 안정한 소집단 보다는 다양한 활성화된 표현형을 나타냄)을 입증하는 것으로 공지되어 있음이 추가로 인식될 수 있으며, 종양 수축과 연관된 이들의 기능에서 이동을 포함하는 조직 항성성 유지에 요구되는 활성화시 다양한 역할을 추정할 수 있다.

[0138] 기술된 상기 결과는 물론 관련된 종양 성장 억제 및 수축은 초소형 실리카 나노입자 크기(예를 들어, 6nm)와 변화하는 순전하, 크기, 및 형태의 표면 기능을 조합시킨 이러한 하이브리드 무기-유기 플랫폼에 대해 완전히 예측되지 못하였다. 특정 구체예에서, 이들 결과가 단독의 페로토시스로 인한 것인지의 여부, 또는 종양 미세환경 내의 면역조절 및/또는 기타 활성화된 대사/비면역 과정이 역할을 담당하는지의 여부에 관한 메커니즘이 결정될 수 있다. 어떠한 이론에 얽매이지 않으면서, C dot 물리화학적 성질(예를 들어, 크기, 전하, 부착된 표면 화학적 모이어티)은 종양 미세환경으로부터 국소 신호에 반응하여 그러한 과정을 조절할 수 있다.

[0139] 특정 구체예에서, 단백질 코로나(예를 들어, IgG, 알부민, 등)는 전신 투여 후 입자 표면 주위를 형성하여 대식세포의 표현형 활성화(예를 들어, 염증-유도(M1) 및/또는 해소-촉진(M2))를 유도하는 것으로 결정된다. 특정 구체예에서, 혈액/혈장 표본, 젓과 종양 조직, 생체의 인간 종양 조직 표본에서 추출된 입자 사이에서 대식세포의 표현형 활성화 프로파일에서의 차이가 결정된다.

[0140] 특정 구체예에서, 입자의 존재에 대한 단핵구/대식세포 반응이 결정되고/거나 제어된다. 특정 구체예에서, 종양 파괴 특성을 달성하기 위해 종양 미세환경의 다른 성분의 반응이 결정되고/거나 제어된다. 특정 구체예에서, 치료학적 나노입자의 표면 화학반응이 단핵구/대식세포 반응에 영향을 미친다. 특정 구체예에서, 치료학적 나노입자의 표면 화학반응은 단핵구/대식세포 반응을 조절하도록 설계된다.

[0141] 특정 구체예에서, 천연 및/또는 표면-작용기화된 초소형 실리카 나노입자(예를 들어, C dot)는 대식세포(예를 들어, M1 대식세포)를 활성화시킨다. 특정 구체예에서, 높은 IL-12 수준이 존재하는데, IL-12가 TH1 세포에 의해 IFN γ 생성을 자극하기 때문이다(예를 들어, IL-10 수준이 낮아야 함). 특정 구체예에서, iNOS 발현 및 TNF α , GM-CSF, 및 LPS의 수준이 측정된다. 특정 구체예에서, 전사 인자(예를 들어, IRF-5, STAT-1)가 측정된다. 특정 구체예에서, M1 세포에 의해 분비된 사이토킨(예를 들어, IL-1, IL-6, IL-15, IL-18, 및 IL-23)이 측정된다. M1 대식세포는 다른 형태의 면역 세포를 끌어 당기고 면역 반응을 통합/조율하는 염증-유도 사이토킨 및 케모킨을 분비한다. M1 대식세포는 또한 높은 수준의 주요 조직적합성 복합체(MHC), 공동자극 분자, 및 Fc γ R을 발현한다.

[0142] 특정 구체예에서, M1 표현형에 연결된 유전자의 상향조절 및/또는 하향조절이 발생한다. 특정 구체예에서, 신호

전달 경로 및/또는 면역 이펙터 예컨대, p38MAPK, p44/p42 MAPK, JNK, CD40, CD80, CD86(예를 들어, 공동-자극 분자), 및 I-A/I-E 활성화 마커(예를 들어, B 세포 활성화)의 상향조절은 천연 및/또는 표면-작용기화된 초소형 실리카 나노입자에 의해 수행된다.

[0143] 특정 구체예에서, 대식세포 활성화는 TLR4(Toll-유사 수용체 4) 및 ROS 시그널링에 의존하여 세포를 사멸시킨다. 특정 구체예에서, 천연 및/또는 표면-작용기화된 초소형 실리카 나노입자에 노출될 경우 LPS-유도된 표현형(예를 들어, 발현 프로파일링)이 발생한다.

[0144] 특정 구체예에서, 대식세포 포도좀(예를 들어, 세포외 매트릭스 분해 형성 및 세포외 매트릭스 분해 활성화에 필요한 인자를 전달함으로써 이동 및 침윤을 가능하게 하는 액틴-풍부화된 세포 표면 구조)에 대한 C dot의 작용성 효과가 결정될 수 있다.

[0145] 특정 구체예에서, 암-관련 염증이 표면 작용기화된 C dot를 사용하여 환자에서 표적화될 수 있다.

[0146] 특정 구체예에서, '불량한' 및 '우수한' 염증 과정은 C dot 물리화학적 성질에 의해 변경되어 종양 발달 대신에 적응 면역을 촉진한다.

[0147] 특정 구체예에서, 약물 전달 (또는 기타 요법)은 C dot의 천연 면역조절 성질과 조합되어 암 치료 및/또는 조직 수복 과정(예를 들어, 상처 치유)에서 C dot의 치료학적 잠재력을 증가시킨다.

[0148] 특정 구체예에서, 이중-양식 입자 프로브를 사용한 용량 증대 연구는 EGFRmt+ 임상전 플랭크/뇌 이중양식 모델에서 게피티닙-NDC 및 PDGFB-유도된 글리오마스에서 다사티닙-NDC 둘 모두에 있어서 천연 약물에 비해 표적화된 치료학적 전달, 침투 및 최대 치료 반응에서의 개선을 조사하는데 이용된다; 이미징제는 조직학적으로 확인된다. 약물통태학적 연구가 또한, 예상치 못한 독성을 평가하고 입자 약량측정을 평가하기 위해 이들 체제를 사용하여 수행되었다. 별도의 마우스 집단에 약물 vs 입자 전달 및 분포를 추적하도록 이중-양상 입자 프로브로 주입하여 플랫폼의 안정성을 모니터링할 수 있다. 종양 부위에서 예상되는 증가된 유효 약물 농도는 이전에 관찰된 우선적 종양 보유 및 치료학적 투여 요건을 정량적으로 추정하는 능력을 기반으로 한다.

[0149] 세포 배양 및 작제물

[0150] MEF 및 HT1080 세포를 페니실린/스트렙토마이신(Corning, Corning, NY)과 10% 소 태아 혈청(FBS, Sigma, St. Louis, MO)으로 보충된 둘베코 개질된 이글 배지(DMEM)(MSKCC Media Preparation Facility)에서 배양하였다. MCF10A 세포를 5% 말 혈청(Atlanta Biologicals, Flowery Branch, GA), 20ng/ml EGF (Peprotech, Rocky Hill, NJ), 10 µg/ml 인슐린(Sigma), 0.5 µg/ml 하이드로코르티손(Sigma), 및 100ng/ml 콜레라 독소(Sigma)와 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 DMEM/F12(Gibco, Grand Island, NY)에서 배양하였다. M21, BxPC3, H1650 및 786-O 세포를 페니실린/스트렙토마이신과 10% FBS가 보충된 RPMI-1640(Gibco)에서 배양하였다. SKOV3 세포를 페니실린/스트렙토마이신과 10% FBS가 보충된 McCoy 5a 개질된 배지(Gibco)에서 배양하였다. 아미노산 비함유 배지를 4h 동안 열-불활성화된 FBS(MEF, HT1080, M21, BxPC3, H1650, 및 SKOV3 세포에 있어서) 또는 말 혈청(MCF10A 세포에 있어서)을 투석한 후, MWCO 3500 투석 튜빙(21-152-9; Fisherbrand, Pittsburgh, PA)에서 4°C에서 인산염-완충된 염수(PBS)에서 밤새 인큐베이션하고 아미노산 없이 제조된 기본 배지에 첨가함으로써 제조하였다. PRetro-Lamp1-GFP를 레트로바이러스 형질도입에 의해 M21 세포로 도입하고, 안정한 세포주를 푸로마이신(2 µg ml⁻¹)으로 선택하였다.

[0151] 시약

[0152] 지시된 농도의 다음 시약을 사용하였다: 콘카나마이신 A(ConA) (SIGMA) 100 nM; SYTOX 녹색 핵산 착색제 (S7020, Invitrogen, Carlsbad, CA) 5nM; 페로스타틴-1(Fer-1) (EMD Millipore, Billerica, MA) 1 µM; 리프록스스타틴-1(Selleckchem) 시험관내 및 생체내에서 각각 1 µM 및 125 mg/kg; 테퍼록사민(DFO) (Sigma) 100 µM; 부틸화된 하이드록시아니솔(BHA) (Sigma) 50 µM; 아스코르브산(Asc Acid) (Sigma) 200 µM; 트롤록스(Sigma) 100 µM; N-아세틸시스테인(NAC) (Sigma) 10mM; 글루타티온(GSH) (Sigma) 5mM; TNF α(Sigma) 100 ng/ml; 사이클로헥시미드(CHX)(Sigma) 네크롭토시스 및 아포토시스를 유도하기 위해 각각 1 µg/ml 및 50 µg/ml; zVAD(Sigma) 20 µM; 네크로스타틴-1(Sigma) 30 µM; 부티오닌 실폭시딘(BOS)(Sigma) 400 µM; 펠릭 암모늄 시트레이트(FAC)(Sigma, F5879) 400 µM; 에라스틴(Sigma), 5 µM, C11-BODIPY(581/591) 2 µM(Invitrogen). 생물학적 검증 시작시 시약을 배양물에 첨가하였으며, 단 ConA는 웨스턴 블롯을 위한 세포 용해 1시간 전에 첨가하였다.

[0153] 펩티드 합성

- [0154] 이중 아미노헥사노산(Ahx2) 지방족 링커 및 N-Ac-Cys를 갖는 펩티드 Re(Arg11)CCMSH를 표적으로 하는 변형된 멜라노코르틴-1 수용체를 표준 고체상 Fmoc 펩티드 화학반응을 사용하여 합성하였다. 레늄-고리화된 αMSH 펩티드 유사체인 Ac-Cys1-(Ahx)2-dLys2-Re[Cys-Cys-Glu-His-dPhe-Arg-Trp-Cys]-Arg-Pro-Val-NH2를 분석하고 LCQ FLEET Ion Trap Mass 분광기(Thermo Fisher Scientific)에 결합된 Beckman Coulter 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 시스템에서 정제하고, 동결건조에 의해 최종적으로 회수하였다.
- [0155] α-MSH-PEG-C' dot의 합성 및 특성 규명
- [0156] αMSH는 신경면역조절제이며, 이의 수용체인 MC1-R은 대식세포 상에 존재한다. 특정 구체예에서, αMSH 펩티드는 나노입자(예를 들어, C' dot)에 부착된다. 특정 구체예에서, α-MSH-PEG-C' dot는 조합 요법에 사용된다. 예를 들어, α-MSH-PEG-C' dot는 페로토시스를 유도하고, αMSH 펩티드를 통한 면역조절을 제공한다.
- [0157] 유기 염료 Cy5를 캡슐화시키는 상이한 크기의 형광 실리카 나노입자(C' dot)를 물에서 합성하였다. αMSH 펩티드를 이의 N-말단 아세틸화된 시스테인 티올을 통해 말레이미도-말단화된 실란-폴리에틸렌 글리콜(PEG)에 컨쥬게이션시켜 α-MSH-PEG를 형성하였다. 컨쥬게이션을 폐결화 단계에서 입자 표면에 부착시켜 αMSH 작용기화된 C' dot, 또는 α-MSH-PEG-C' dot를 생성시켰다. 합성된 입자 샘플을 물에서 투석하고 추가의 특성 규명 전에 겔 투과 크로마토그래피(GPC, Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, California)에 의해 정제하였다. 캡슐화된 및 천연 Cy5 염료에 대한 흡광 및 발광 스펙트럼 프로파일을 Varian Cary 5000 분광광도기(Varian, Palo Alto, CA) 및 형광 분광형광기(Photon Technology International, Inc, Birmington, NJ)를 사용하여 획득하였다. 자유 Cy5 염료에 대한 것과 같이 α-MSH-PEG-C' dot의 수력학적 반경, 밝기 및 농도는 고체-상태 633-nm 여기로 구성된 홈빌트 형광 상관 분광학(FCS) 설정을 사용하여 결정하였다.
- [0158] 웨스턴 블롯팅
- [0159] 세포를 빙냉 RIPA 완충제(pH 7.4에서 50mM Tris, 150mM NaCl, 2mM EDTA, 1% NP40, 0.1% SDS와 프로테아제 억제제 콕테일) 내로 스크래핑시키고 10분 동안 얼음 상에서 용해시켰다. 그 후, 용해물을 15,870g에서 20min 동안 4℃에서 원심분리하고, 단백질을 BCA 검정에 의해 정량화하였다(Pierce, Waltham, MA). 샘플을 15% 폴리아크릴아미드 SDS-PAGE 겔 상에서 분리하고 폴리비닐리돌루오라이드 막으로 전달하고, 이를 TBST 플러스 5% BSA로 차단하고, 일차 항체(항-LC3A/B(4108; Cell Signaling, Danvers, MA) 항-FTH1(3998; Cell Signaling), 및 항-액틴(A1978; Sigma))과 4℃에서 밤새 인큐베이션하고 차단 완충제로 희석하였다. 블롯을 2차 항체에 컨쥬게이션된 호스래디쉬 퍼옥시다제와 인큐베이션하고, 단백질을 증강된 화학발광 검출(Invitrogen)을 사용하여 검출하였다. ImageJ 소프트웨어(NIH)를 사용하여 덴시토메트리 분석을 수행하였다.
- [0160] 실시간 현미경
- [0161] 세포를 유리 바닥 디쉬(MatTek, Ashland, MA) 상에 플레이팅시켰다. 밤새 형광 및 차등간섭대비(DIC) 이미지를 Nikon TI-E 도립현미경, CoolSNAP HQ² CCD(전하-커플링된 디바이스) 카메라(Photometrics, Tucson, AZ)를 사용하여 지시된 시간 동안 30분 마다 획득하였다. 생-세포 인큐베이션 챔버는 세포를 37℃ 및 5% CO₂에서 유지하였다. NIS Elements 소프트웨어(Nikon, Melville, NY)를 사용하였다. 세포 생존, 사멸 및 증식을 포함하는 세포 운명을 수동으로 정량화하고 NIS Elements 소프트웨어 및 Imag J를 사용하여 처리하였다.
- [0162] 글루타티온 정량화
- [0163] 글루타티온 측정에 있어서, HT-1080 세포를 6cm 세포 배양 디쉬에 플레이팅시키고, 아미노산 비함유 DMEM + 10% 투석된 FBS에서 15 μM α-MSH-태깅된 나노입자와 인큐베이션하고, 예상 사멸 시간 약 2시간 전에 채취하였다. 대조군으로서, 세포를 3부의 완전 또는 아미노산 비함유 DMEM와 1부의 H₂O의 믹스, 또는 완전 배지 중의 100 μM BSO로 처리하였다. 세포를 냉 PBS로 3x로 세척하고, 50 μL 냉 용해 완충제에서 세포 스크래핑을 통해 채취하였다. BCA 검정을 사용하여 단백질 농도를 측정하고, 샘플 부피를 각각이 동일한 최종 단백질 농도를 갖도록 조절하였다. 총 글루타티온을 글루타티온 검정 키트(Glutathione Assay Kit)(Cayman Chemicals, 703002)를 사용하여 측정하고, 감소된 글루타티온을 제조업자의 설명서에 따른 QuantiChromTM 글루타티온 검정 키트(BioAssay Systems, DIGT-250)를 사용하여 측정하였다.
- [0164] 반응성 산소 종의 분석
- [0165] 세포를 24시간 동안 15 μM α-MSH-PEG-C' dot로 24시간 동안 처리하거나 처리하지 않은 후, H₂DCFDA(25 μM) 또

는 C11-BODIPY(581/591)(2 μ M)(둘 모두 Invitrogen) 중 어느 하나가 보충된 500 μ L 헵크스 평형 염용액(HBSS)(Gibco)에 재현탁시키고, 15분 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 그 후, 세포를 500 μ L의 새로운 HBSS에 재현탁시키고, 유동 세포계측기의 FL1 채널을 사용하여 분석하였다(MoFlo, Beckman Coulter). 데이터는 조건 당 최소 10,000개의 세포로부터 수집하였다.

[0166] 철 측정

[0167] C' dot의 철 로딩 용량 측정에 있어서, 50 μ L α -MSH-PEG-C' dot(60 μ M)를 철(Fe^{3+}) 농도 범위(2 μ M 내지 2mM, 표 1)에 걸쳐 제조된 150 μ L 철-함유 배지(8.6 μ M) 또는 150 μ L FeCl_3 용액중 어느 하나에 첨가하였다. 용액을 실온에서 48시간 동안 스피닝시킨 후(160rpm), PD-10 칼럼을 사용하여 C' dot로부터 유리 철을 분리하고 물에 용리시켰다. 세포 샘플을 원심분리 48시간 전에 배지 중에 입자의 존재 및 부재하에 인큐베이션하고, 펠렛팅시키고, 인산염 완충된 염수액에 재현탁시키기 전에 3회 세척하였다. 철 측정(십억분율, ppb)을 철-로딩 용량에 따라 Microwave Plasma - Atomic Emission Spectroscopy를 사용하여 결정하였다. 철 로딩 용량은 정제 전에 측정된 초기 철의 총량으로 나누고 100을 곱한, 정제된 입자에 노출된 C' dot (또는 셀)의 철 함량의 비율로 계산하였다. 모든 실험은 3중으로 수행하였다.

[0168] GPX4 활성 검정

[0169] GPX4 특이적 활성 검정을 로베리(Roveri)와 동료들에 따라 수행하였다. 간략하게는, 냉동 세포 펠렛을 100 μ L 용해 완충액(100mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 7.4, 1mM EDTA, 150mM KCl, 0.1% CHAPS, 3mM β -메르캅토에탄올 및 프로테아제 억제제 콕테일)에 재현탁시키고 50회 유봉 스트라이크로 균질화시켰다. 샘플을 15분 동안 얼음 상에서 인큐베이션시키고, 세포 파편을 원심분리(20000g 및 10min, 4°C)에 의해 제거하였다. 균질화된 세포로부터의 50 μ L의 상청액을 20 μ M 포스파티딜콜린 하이드로퍼옥사이드(PCOOH)의 존재하에 1mL의 검정 완충액(5mM EDTA, 0.1% Triton X, 3mM GSH, 200 μ M NADPH 및 0.6U/ml 글루타티온 환원효소를 함유하는 100 mM TrisHCl pH 7.8) 중에서 효소 활성을 측정하는데 사용하였다. GPX4 활성은 SpectraMax 플레이트 판독기(Molecular Device GmbH)에서 340nm에서의 흡광도 감소로 검출가능한 NADPH의 글루타티온 환원효소-의존성 소비에 의해 결정된다. 샘플 중의 단백질 함량은 비색분석 660nm Pierce Protein Assay 방법(Pierce, Waltham, MA)에 의해 결정하였다.

[0170] 동물 모델 및 종양 접종

[0171] 모든 동물 실험은 Memorial Slovak-Kettering 암 센터의 기관 동물 관리 및 사용 위원회의 승인을 받은 프로토콜에 따라 수행되었으며 동물 복지를 위한 NIH 지침을 따랐다. 인간 흑색종(M21) 이종이식편은 면역결핍 수컷 SCID/베이지(C.B-17/IcrHsd-Prkdc^{sci}dLyst^{bg-J}) 마우스(6-8 주령; Harlan Laboratories, South Easton, MA)의 털을 민 옆구리에서 발생시켰다. 인간 육종 HT1080 및 786-0 옆구리 이종이식편($\sim 2 \times 10^6$ 세포/100 μ L)을 정맥내 입자 주입을 위해 동일한 모델을 사용하여 추가로 생성하였다. 45-75mm³의 평균 초기 종양 부피를 모든 실험에 사용하였다.

[0172] 생체내 투여 전략 및 시험

[0173] 혈청 보충 배지에서 배양된 5백만 개의 M21 세포를 23-게이지 트로카 바늘을 사용하여 마우스의 오른쪽 옆구리에 피하 이식하여 입자 노출 후 2일에(n = 3) 또는 노출 없이(n = 3) 흑색종 이종이식편을 성립하였다. 후속 연구에서, 마우스를 10일 기간에 걸쳐 3회(즉, 0, 4, 7일) 투여된 고농도(60 μ M)의 i.v. 주입된 α -MSH-PEG-C' dot(n = 5마리 마우스; 200 μ L)에 대한 HT-1080 및 786-0 종양의 반응을 평가하기 위해 2개의 상이한 처리 군 중 하나에 할당하였다. 대조군 HT-1080 및 786-0 마우스(n = 3)에는 동일 시점에서 0.9% 염수 비히클을 투여하였다. 제3 치료 연구에서, HT-1080 마우스를 10일 기간에 걸친 리프록스타틴-1(n = 3마리 마우스, 125mg/kg)의 복강내 투여 후 또는 단독의 3가지 고농도 용량(60 μ M)의 i.v. 주입된 α -MSH-PEG-C' dot(n = 3마리 마우스; 200 μ L)에 대한 반응을 평가하기 위해 2 그룹 중 하나에 할당하였다. 종양 크기는 처리 구간에 걸쳐 캘리퍼를 사용하여 측정하였다. 모든 마우스는 종양 세포 접종 부위에서 촉진(palpation)으로 검사하고, 이환율 또는 사망률의 징후에 대한 종양 성장 연구의 종료까지 매일 관찰하였다. 종양 부피($V; 4/3 \cdot \pi \cdot d_1^2 \cdot d_2/8$)를 계산하는데 사용된 종양의 2개의 수직 직경($d_1 \leq d_2$)을 세포 주입 후 매일 캘리퍼로 측정하였다.

[0174] 형광 이미징

[0175] 이소플루란을 사용하여 동물을 마취시키고, 종양 부위에서 나노입자 형광을 확인하기 위해 전신 광학 형광 이미

징을 획득하였다. 마우스를 제조사의 권고에 따라 선택된, Cy5 형광(여기 650nm, 발광 680nm) 및 배경 형광(여기 465nm, 발광 600nm)에 대한 블록 및 필터를 갖는 IVIS 스펙트럼 광자-카운팅 장치 광학 이미징 시스템(Xenogen, Alameda, CA)을 사용하여 0.1 내지 1초 동안 스캐닝하였다. 마찬가지로 제조사의 지시에 따라 형광 배경도 감하였다. 형광 신호는 복사 효율($((\text{광자/s/cm}^2/\text{sr})/(\text{mW/cm}^2))$)로 보고되었다.

[0176] 병리조직학적 분석

[0177] 생체 내 이미징 연구를 종료한 직후, HT-1080 및 786-0 수컷 및 암컷 마우스를 CO₂ 흡입에 의해 안락사시키고, 대표적인 입자 노출된(n = 2) 및 대조군(n = 1) 종양뿐만 아니라 간 및 신장 표본을 부검시 절제하였다. 완전 혈액 카운트와 혈청 화학반응을 위해 혈액 표본을 추가로 얻었다. 절제된 종양, 간 및 신장을 24시간 동안 10% 중성 완충된 포르말린에 고정시키고, 알콜 및 자일렌으로 처리하고, 파라핀에 매립하고, 5마이크론 두께로 절편 화시키고, 헤마톡실린 및 에오신(H&E)으로 염색하였다. 추가 절편을 Mac-2(1차 항체 Cedarlane CL8942B를 pH 6.0 완충액에서 열 유도된 에피토프 회수 [HIER] 후 1:100의 농도로 적용), 마이엘로퍼옥시다제(Dako A0398, 1:1000, HIER pH 6.0), 절단된 카스파제-3(Cell Signaling Technology 9661, 1:250, HIER pH6.0) 및 Ki-67(Abcam ab16667, 1:100, HIER pH 9.0)에 대한 면역조직화학에 의해 염색하였다. Mac-2 염색은 아비딘-바이오티 검출 시스템(Vectastain ABC Elite Kit, Vector Laboratories, PK-6100)을 사용하여 수동으로 수행하였다. 다른 염색은 Bond Polymer Refine 검출 키트(Leica Biosystem DS9800)를 사용하여 Leica Bond RX 자동화 염색 기에서 수행하였다. 종양 절편 또한, 전술한 바와 같이 TUNEL 방법으로 염색하였다. 모든 슬라이드는 면허 소지 수의 병리학자에 의해 검사하였다.

[0178] 종양 혈관분포 평가

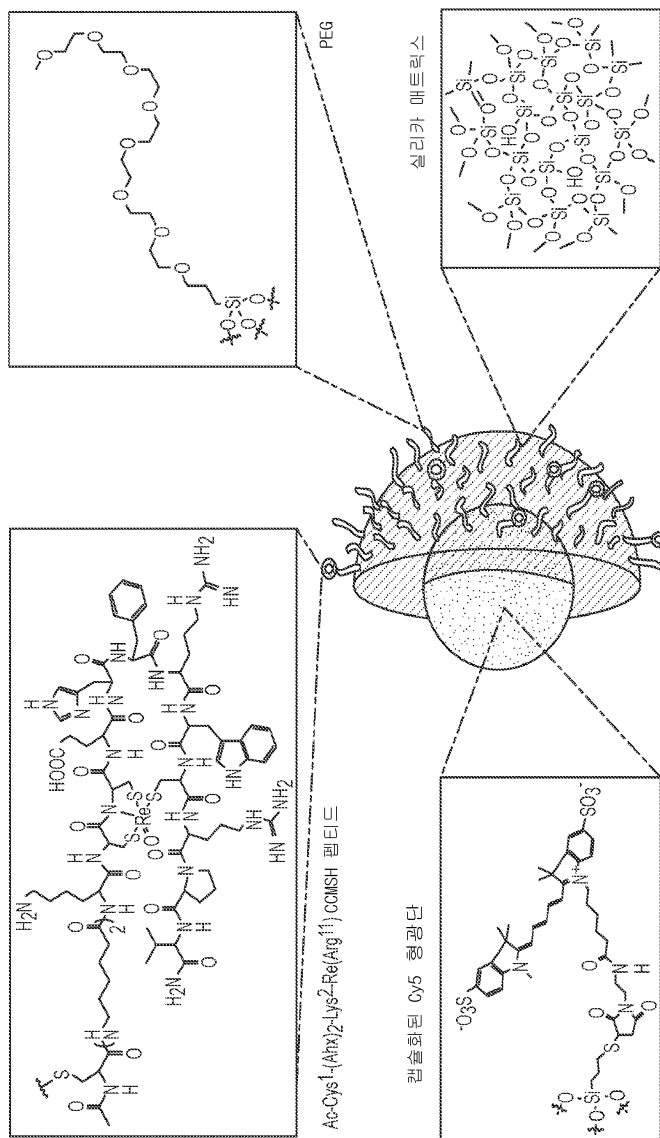
[0179] Leica Bond RX 자동화 염색 플랫폼(Leica Biosystems)에서 CD31에 대한 면역조직화학에 의해 HT-1080 종양을 염색하여 종양 혈관분포를 평가하였다. pH9.0에서 열-유도된 에피토프 회수 후, 1차 항체(랫 단일클론, 카탈 로그 # DIA-310; Dianova)를 1:250의 농도로 적용한 다음 중합체 검출 시스템(Novocastra Bond Polymer Refine Detection, Leica Biosystems)을 적용하였다.

[0180] 통계

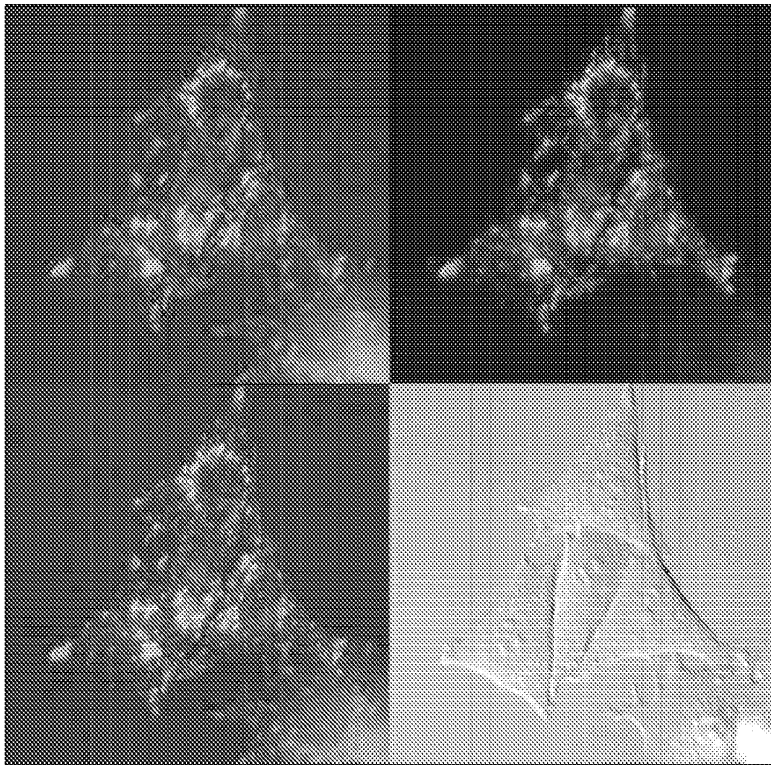
[0181] 부피-시간 프로파일은 일반화된 추정 방정식 접근법을 사용하여 계산된 강건한 표준 오차(robust standard error)를 사용하여 두 처리 그룹 간에 비교하였다. 페로토시스에 대한 약리학적 억제제인 리프록스스타틴-1의 존재 및 부재하에 입자-처리된 종양 성장 프로파일을 선형 모델을 사용하여 비교하였다. 데이터의 종단 측면은 일반화된 추정 방정식을 사용하여 고려되었다. 통계적 유의성은 P < 0.05로 지정되었다.

도면

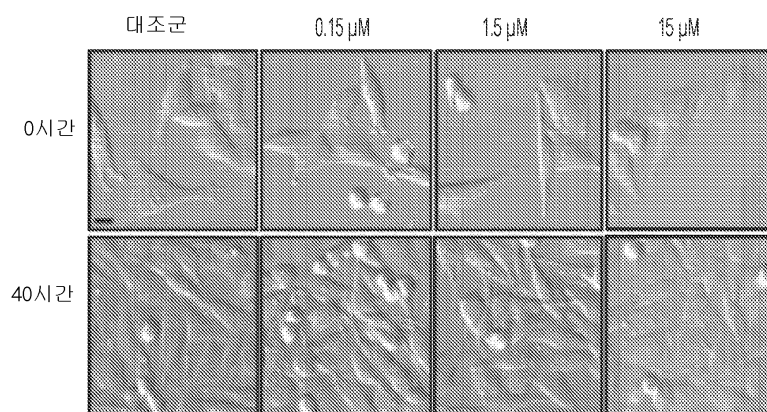
도면1a



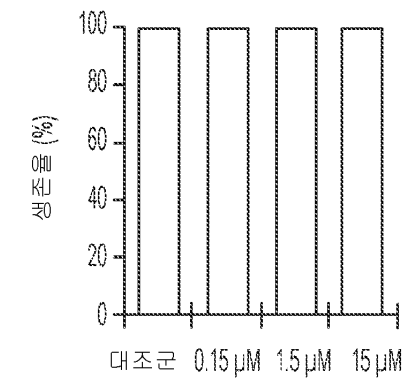
도면1b



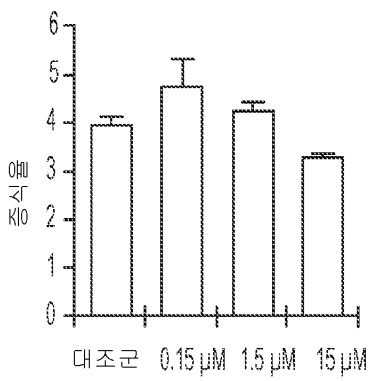
도면1c



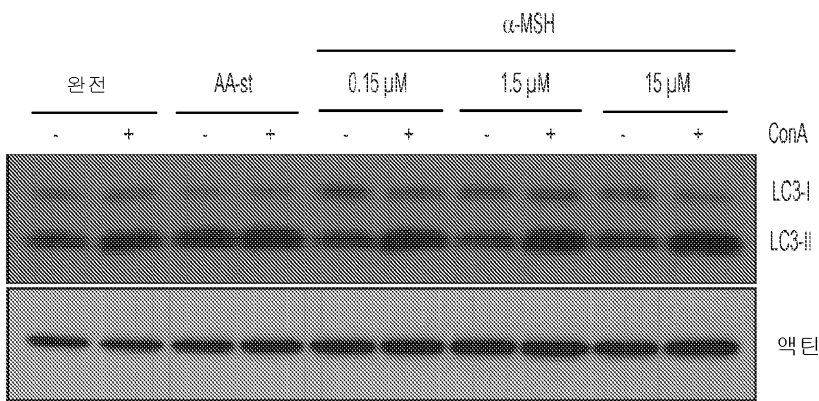
도면1d



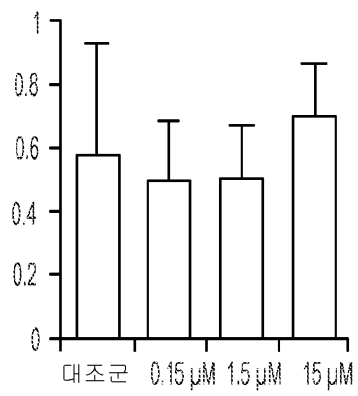
도면1e



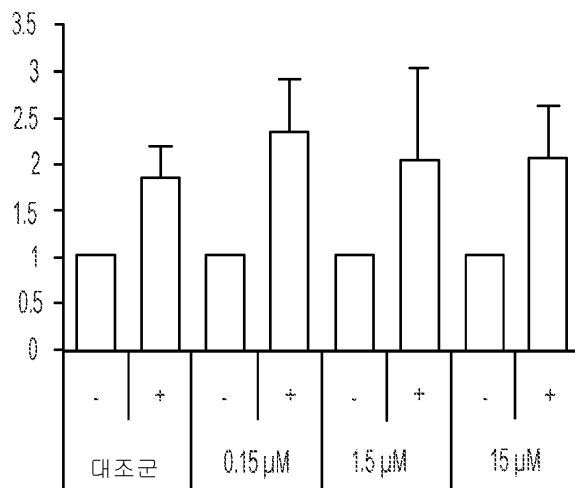
도면1f



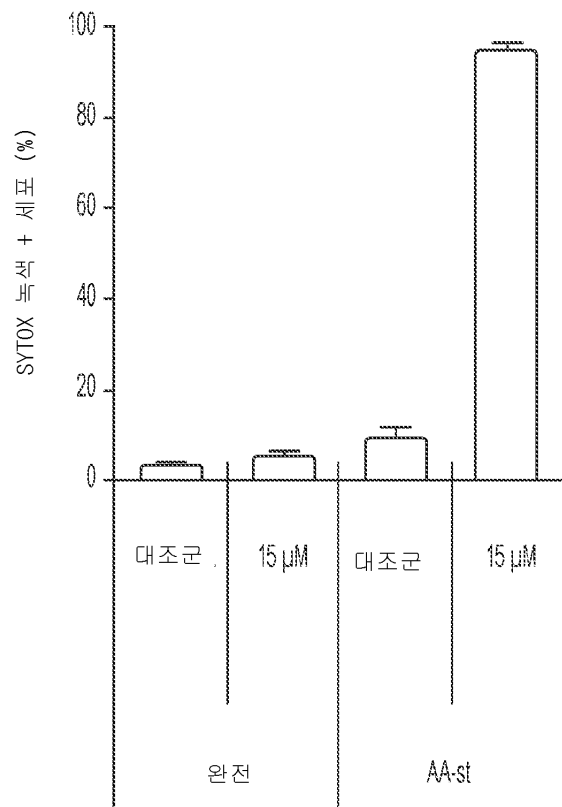
도면1g



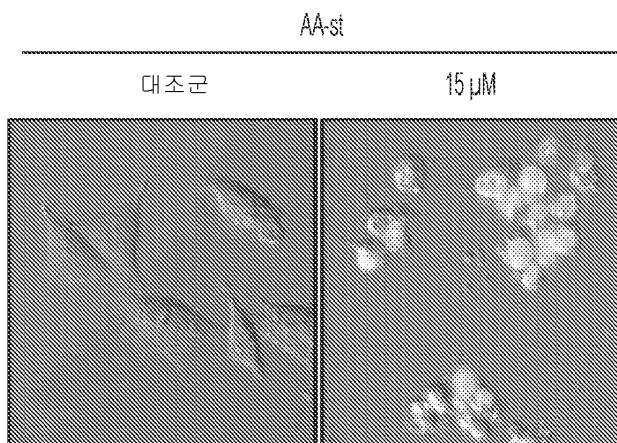
도면1h



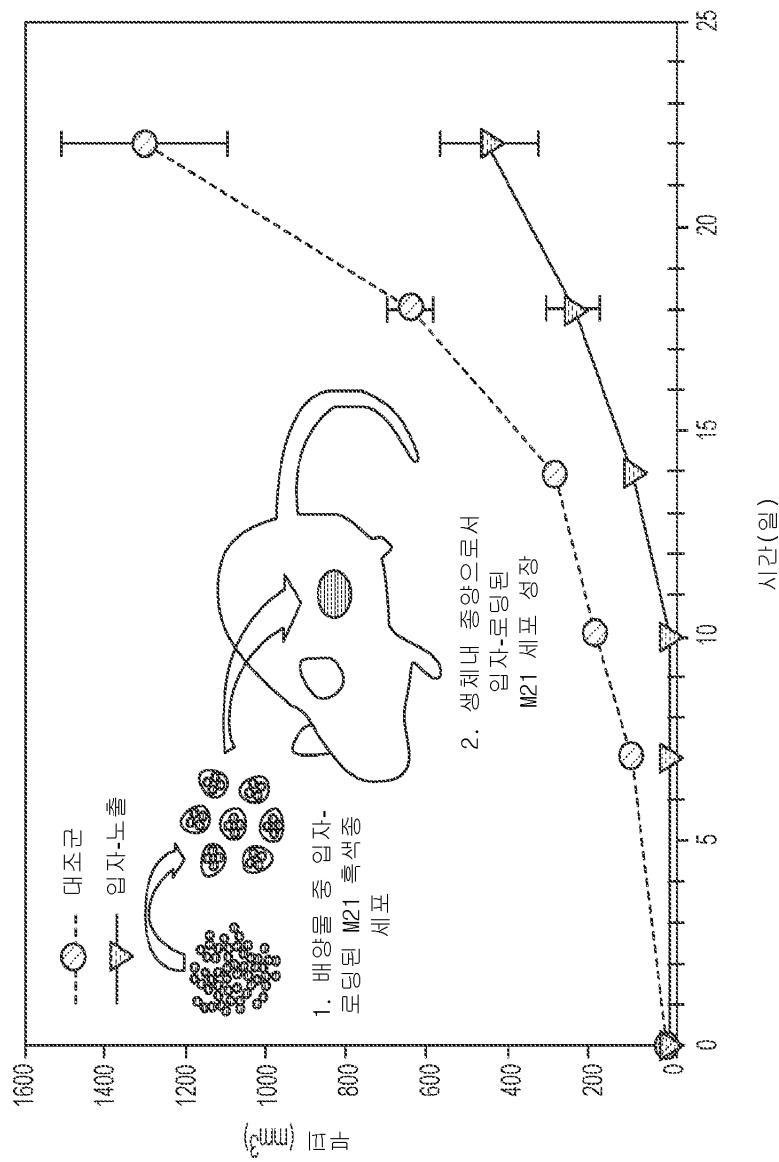
도면1i



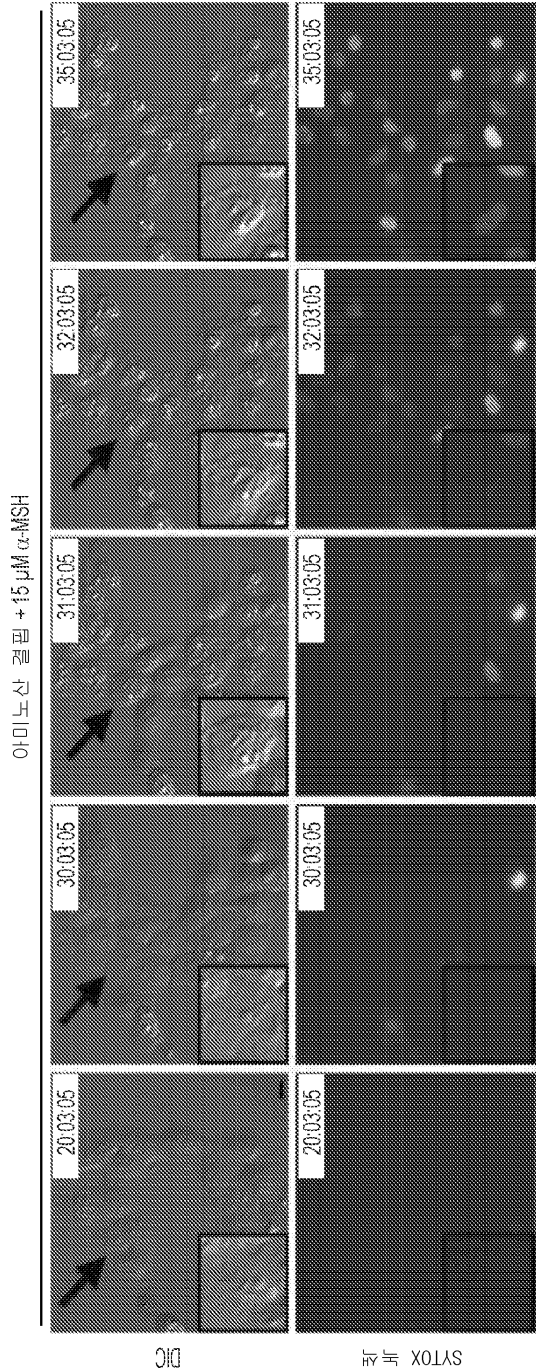
도면1j



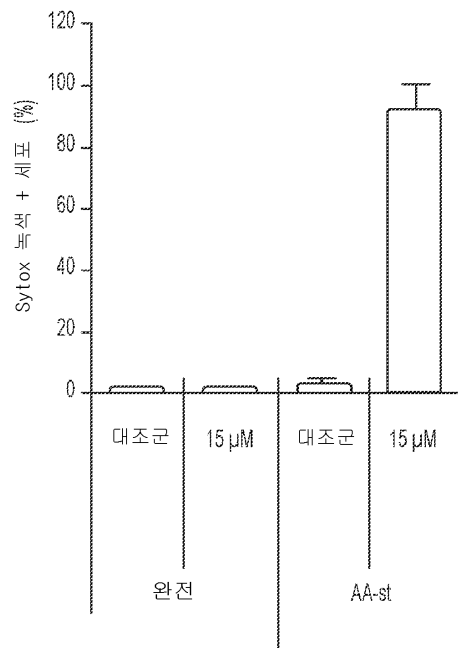
도면1k



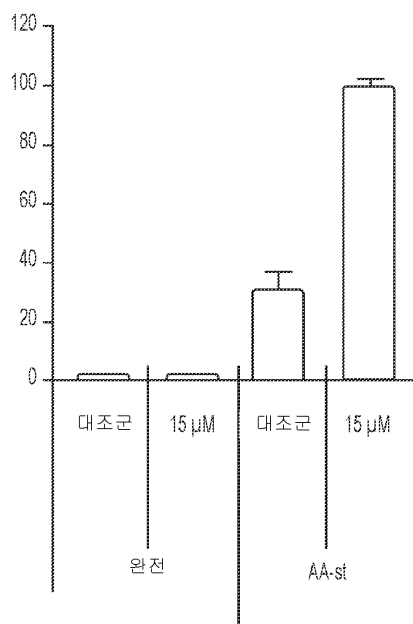
도면2a



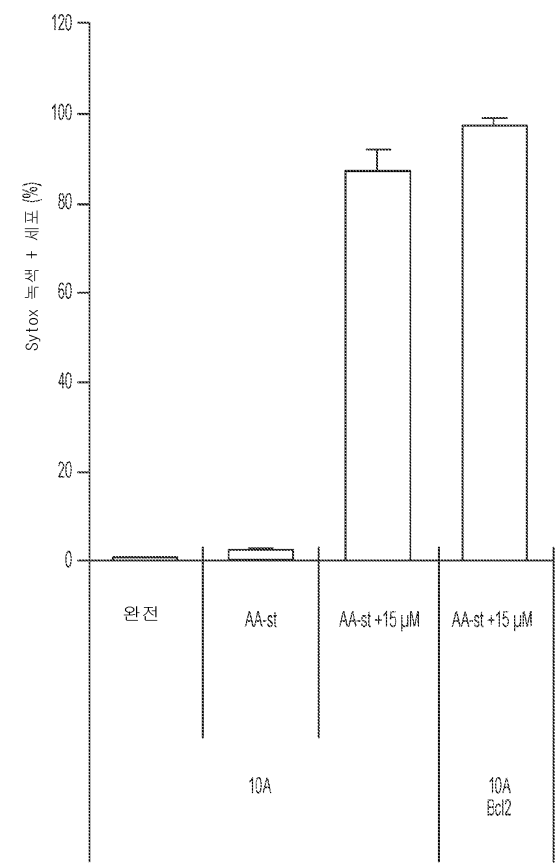
도면2b



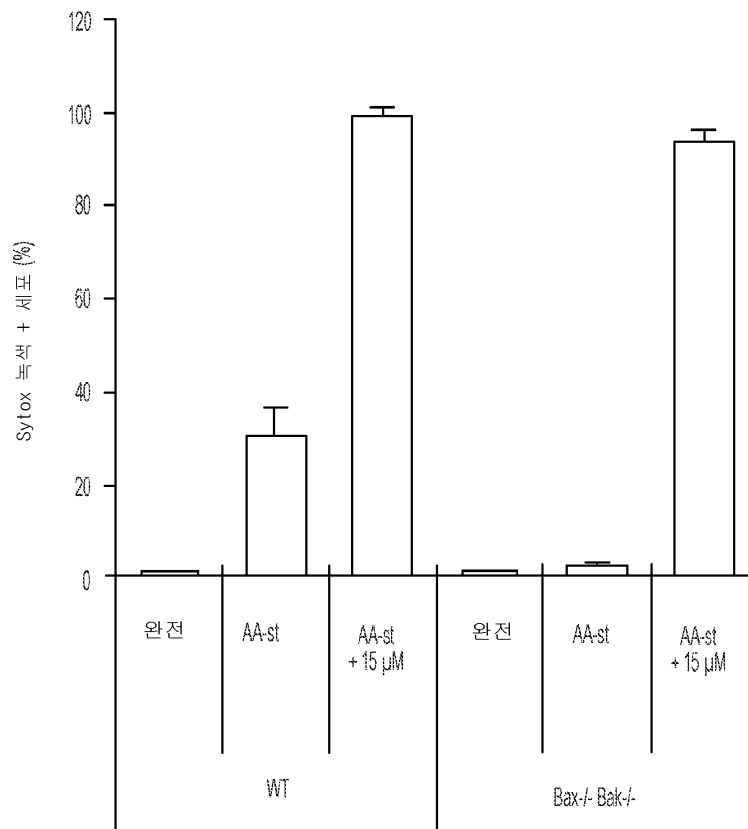
도면2c



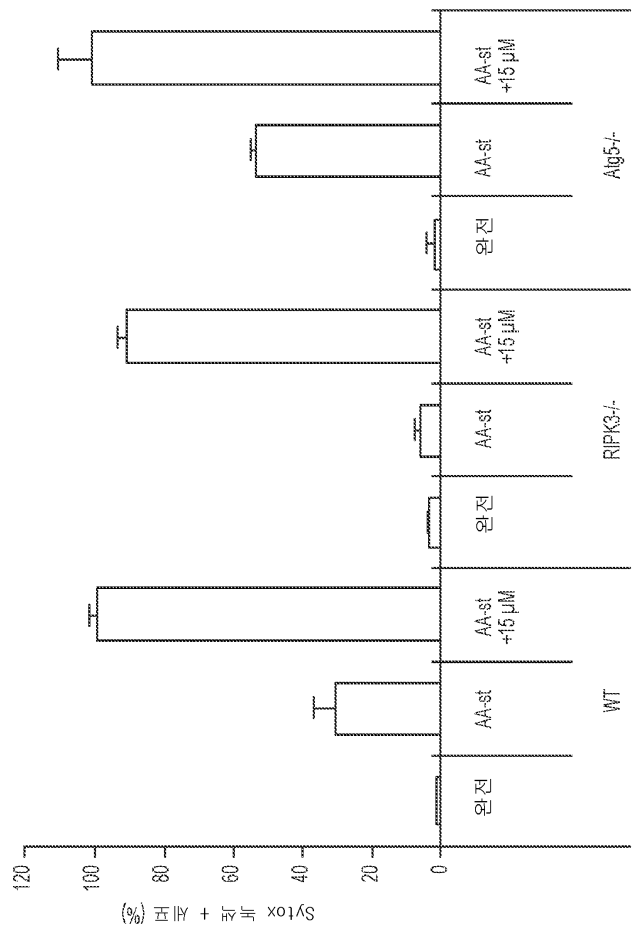
도면2d



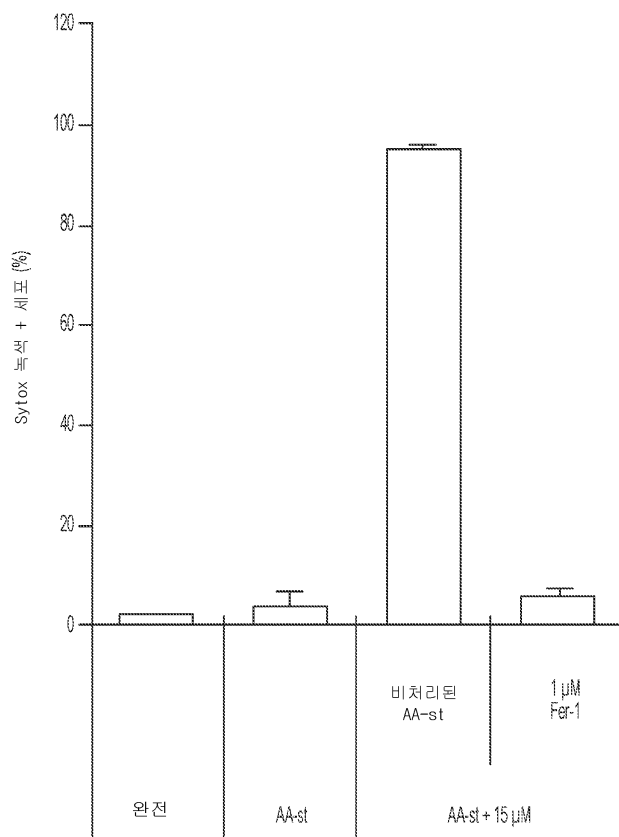
도면2e



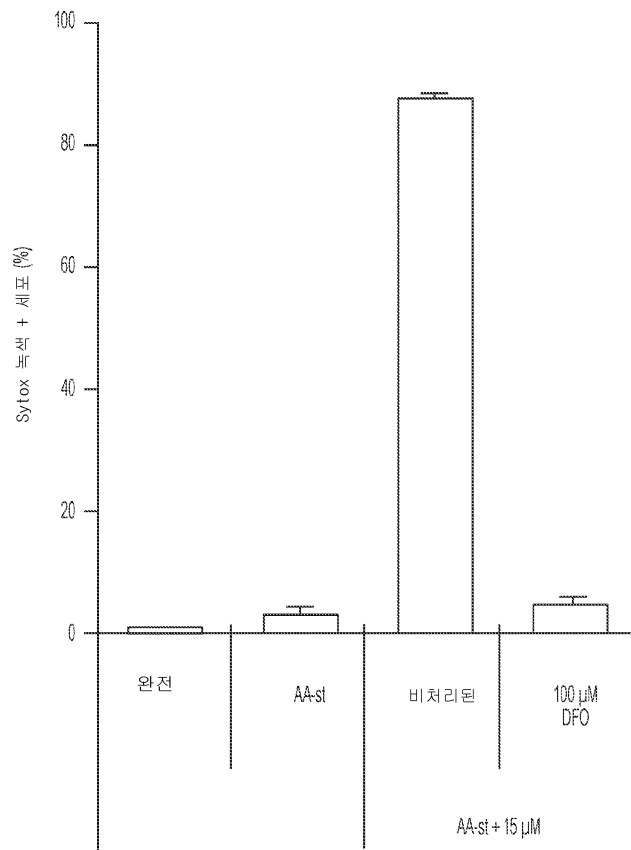
도면2f



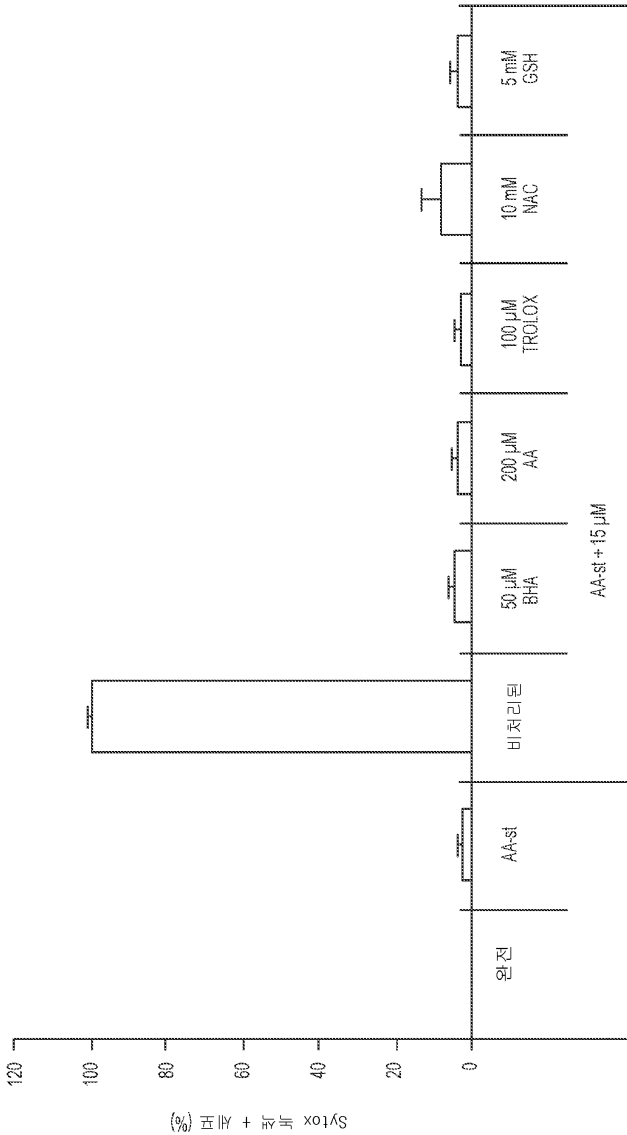
도면3a



도면3b

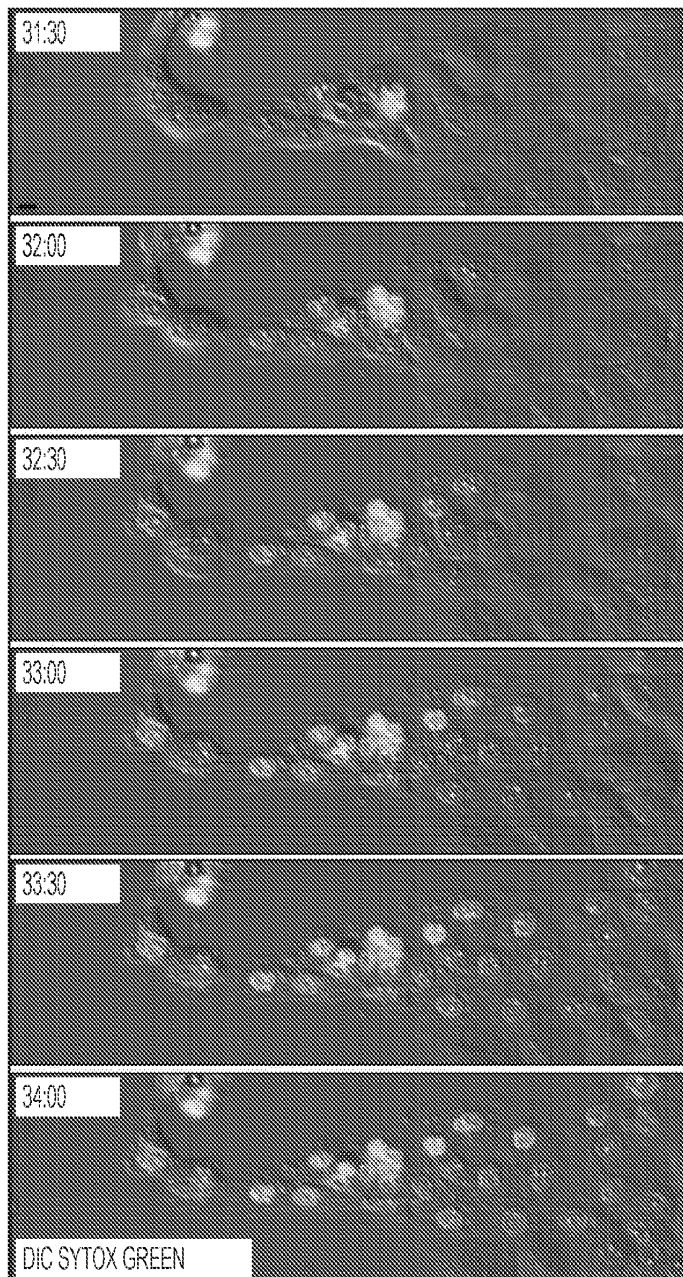


도면3c

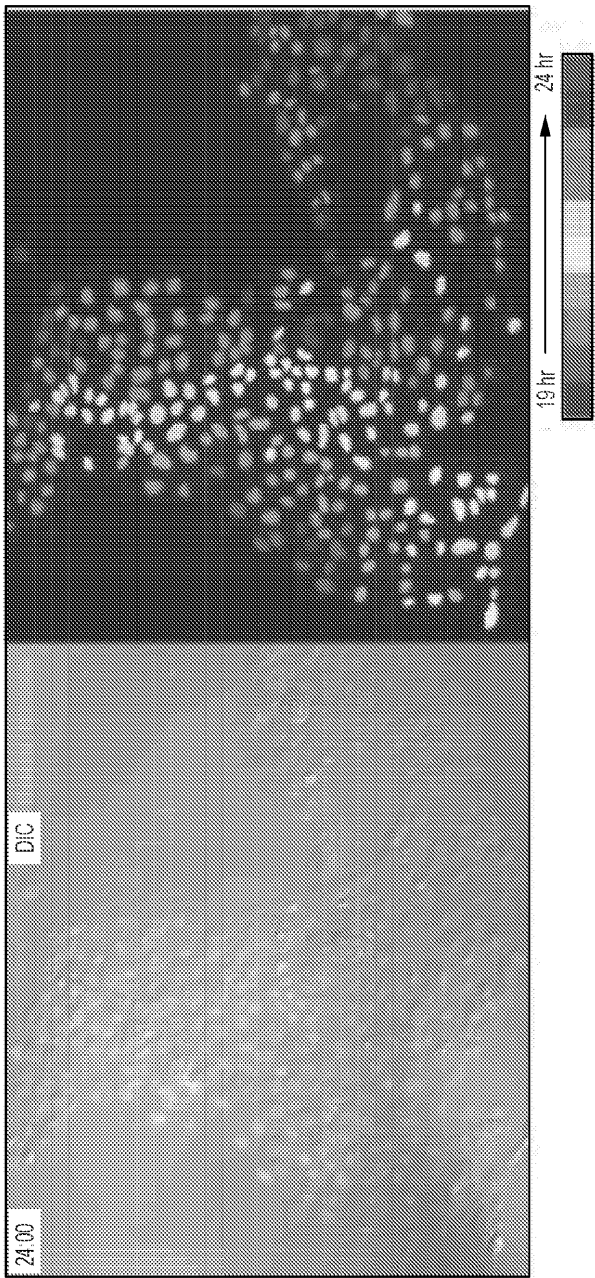


도면3d

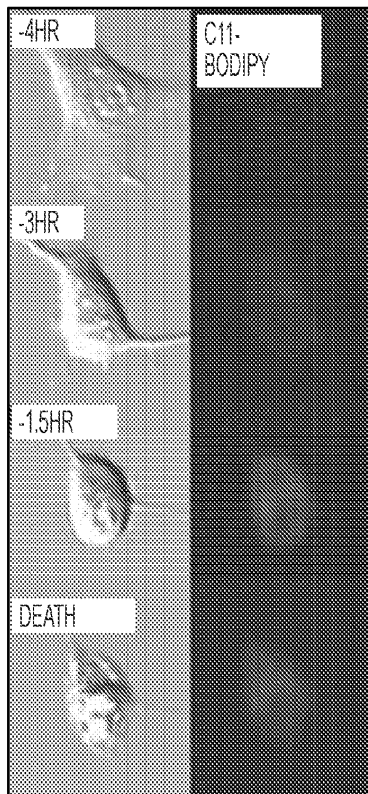
아미노산 결핍 + 15 μ M α -MSH



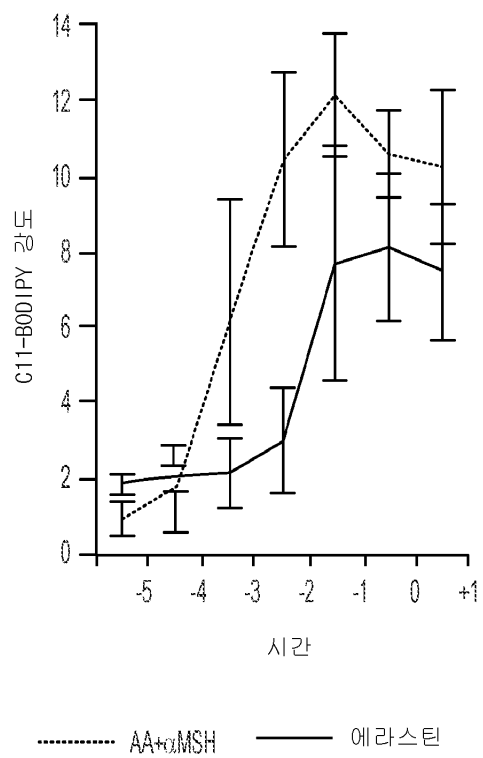
도면3e



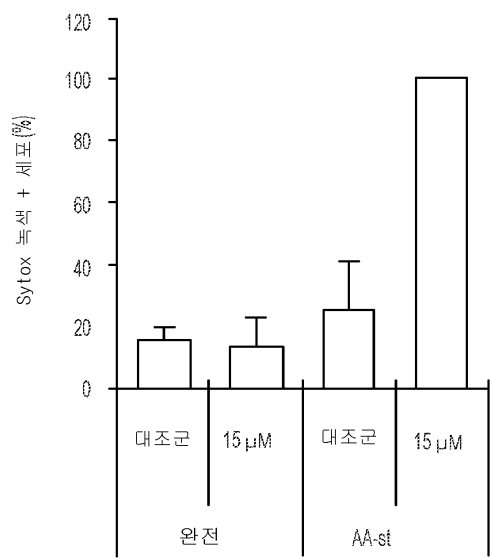
도면3f



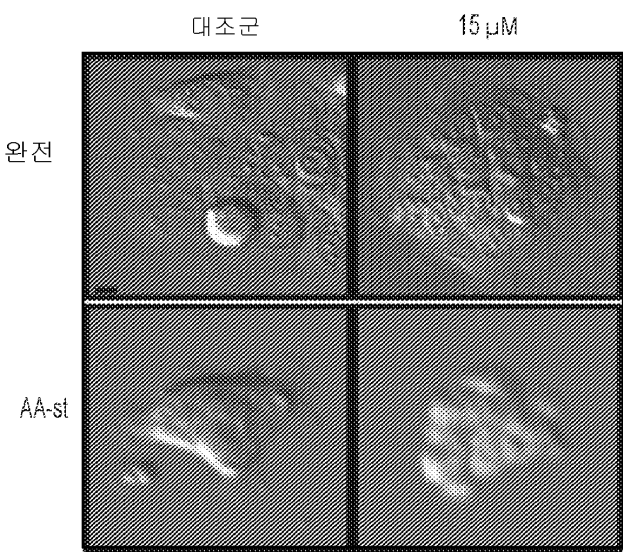
도면3g



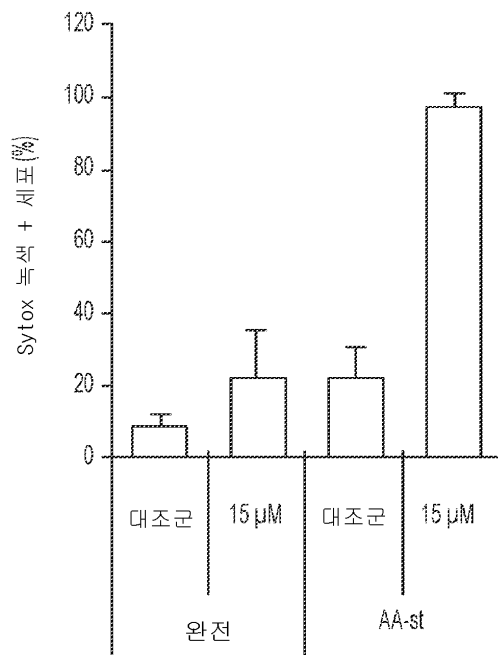
도면4a



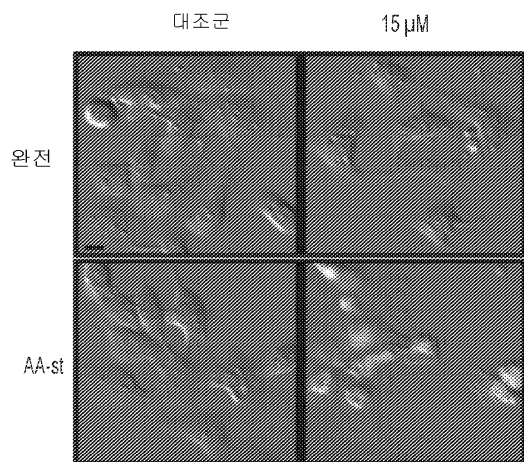
도면4b



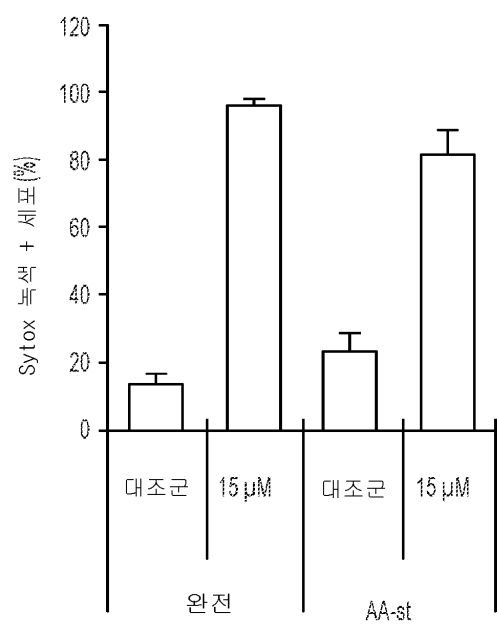
도면4c



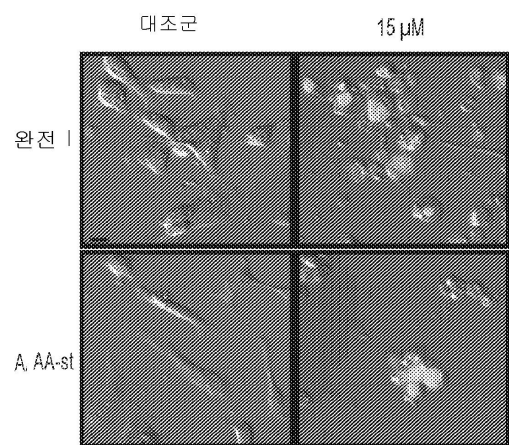
도면4d



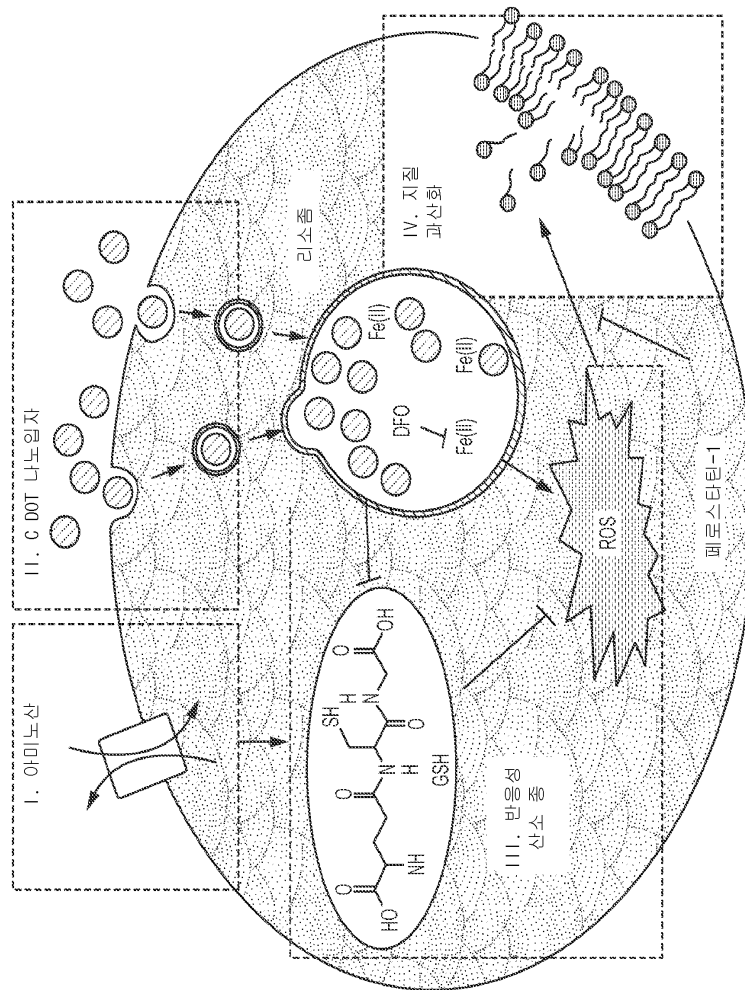
도면4e



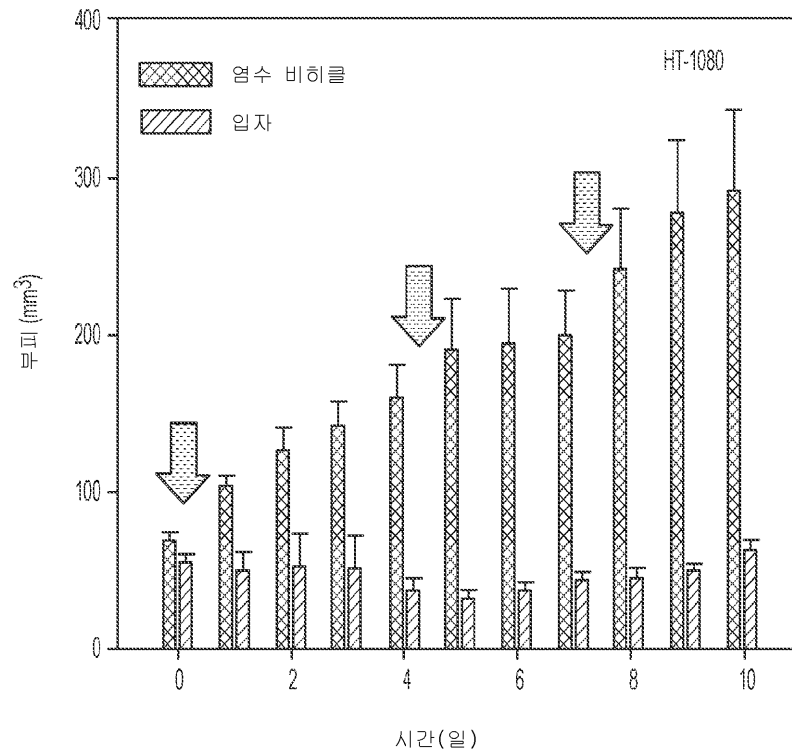
도면4f



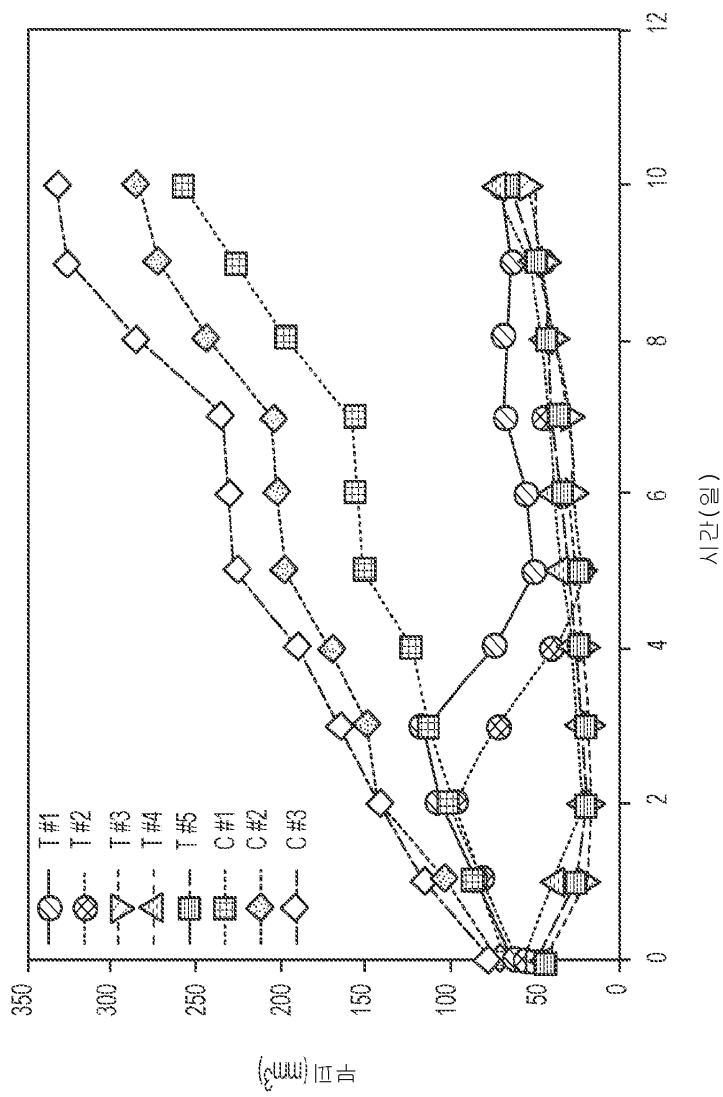
도면4g



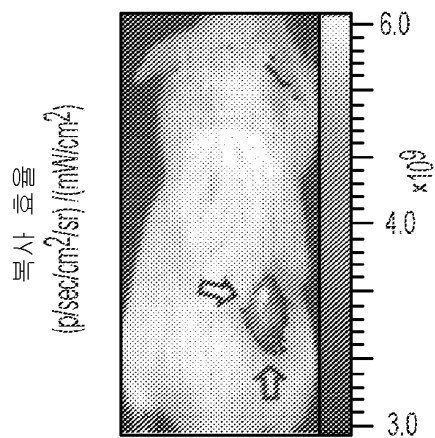
도면5a



도면5b



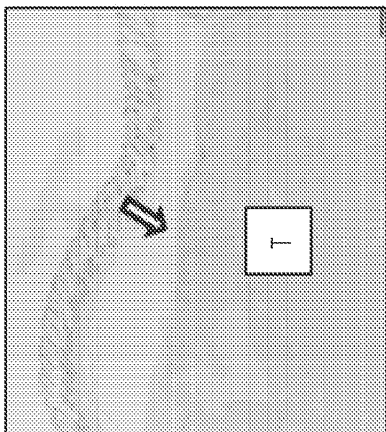
도면5c



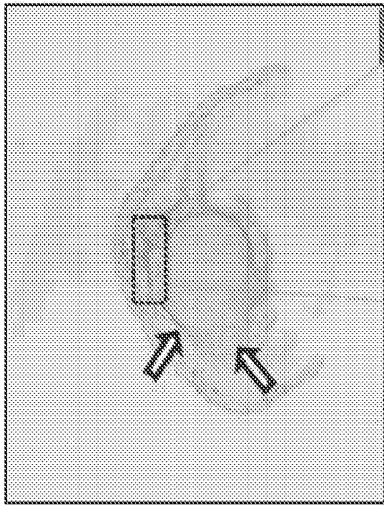
도면5d



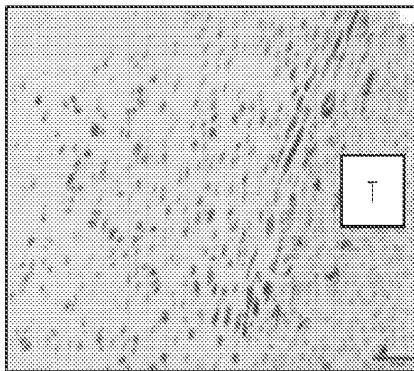
도면5e



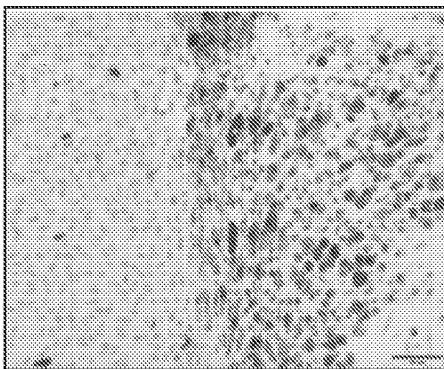
도면5f



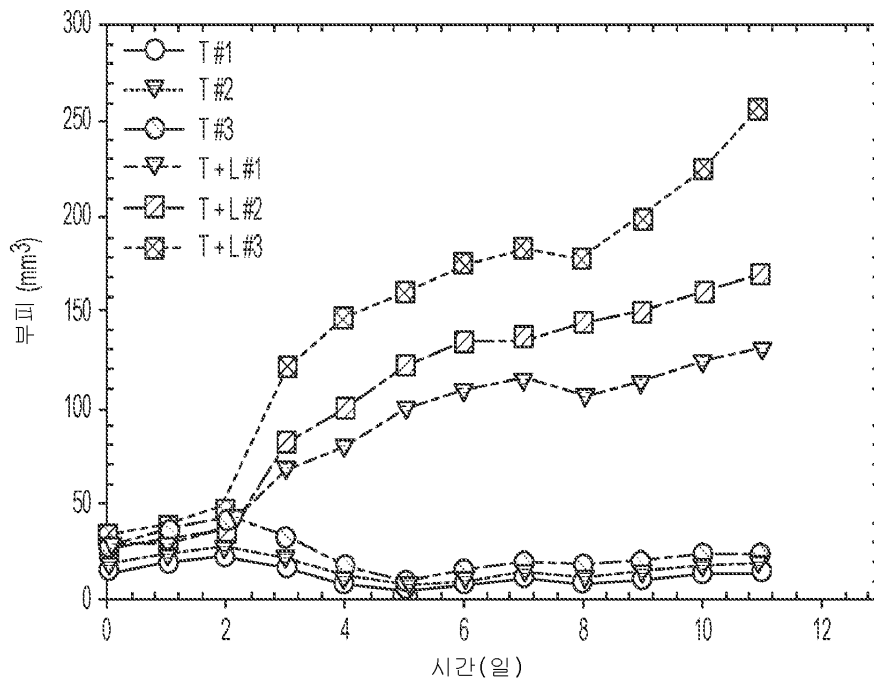
도면5g



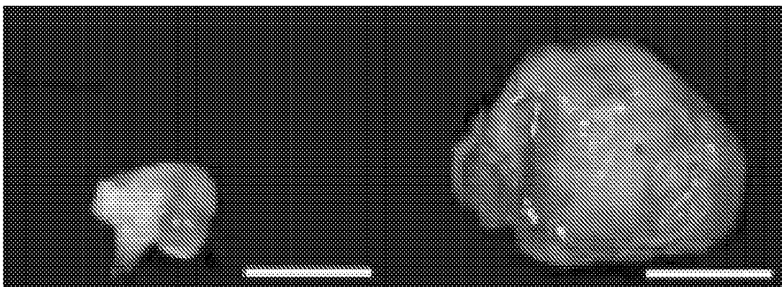
도면5h



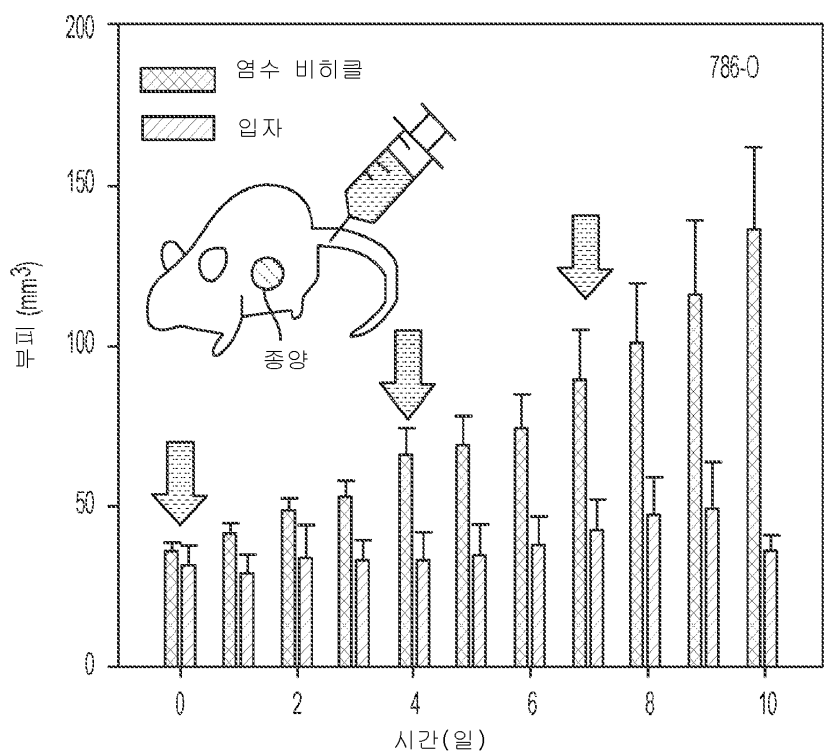
도면5i



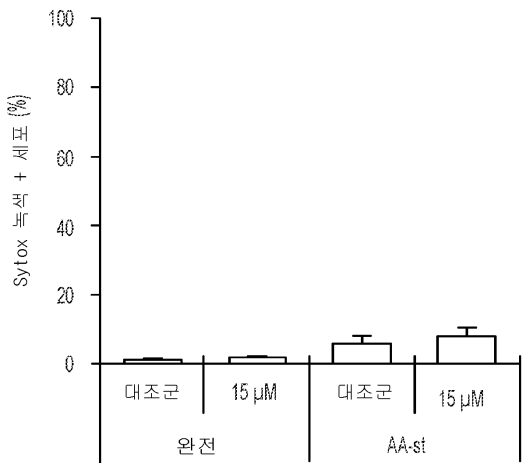
도면5j



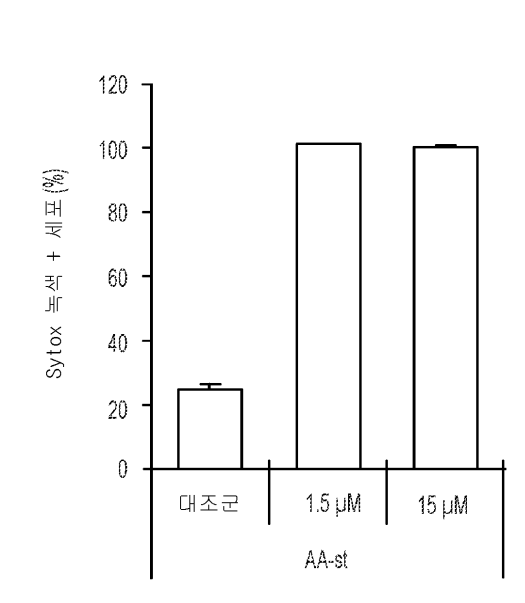
도면5k



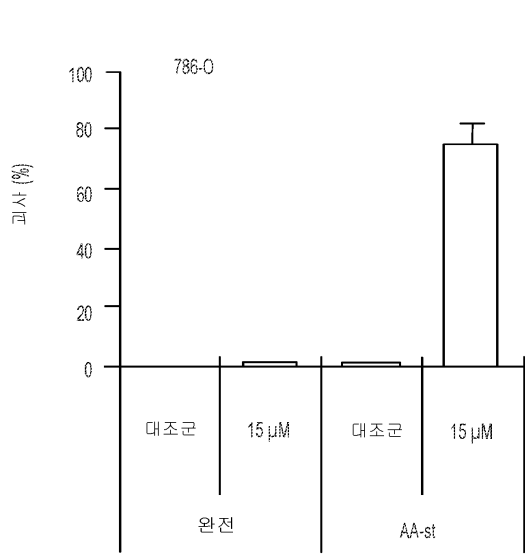
도면6a



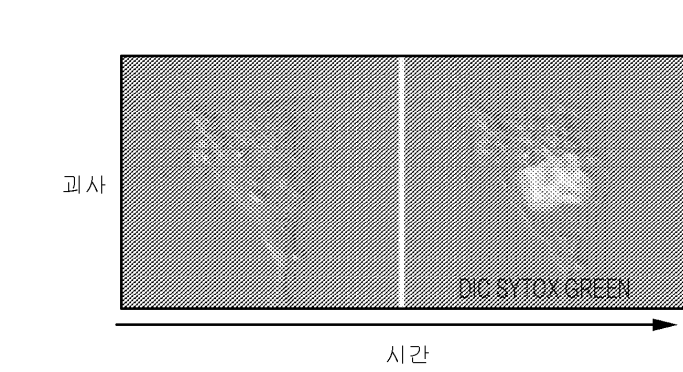
도면6b



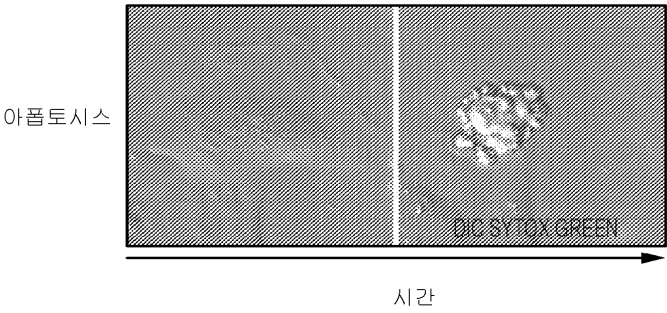
도면6c



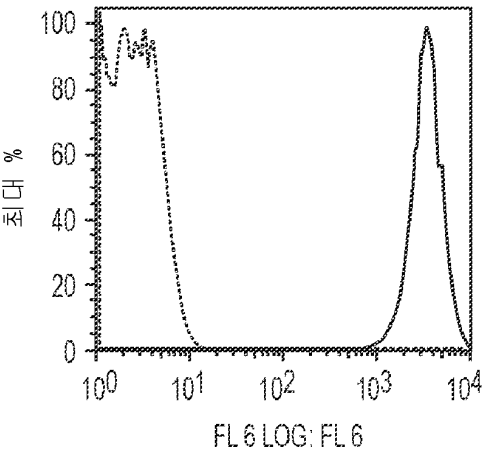
도면6d



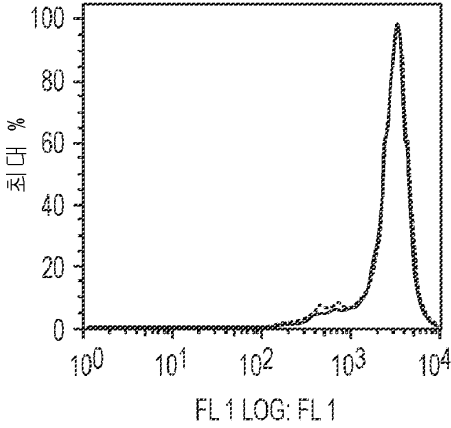
도면6e



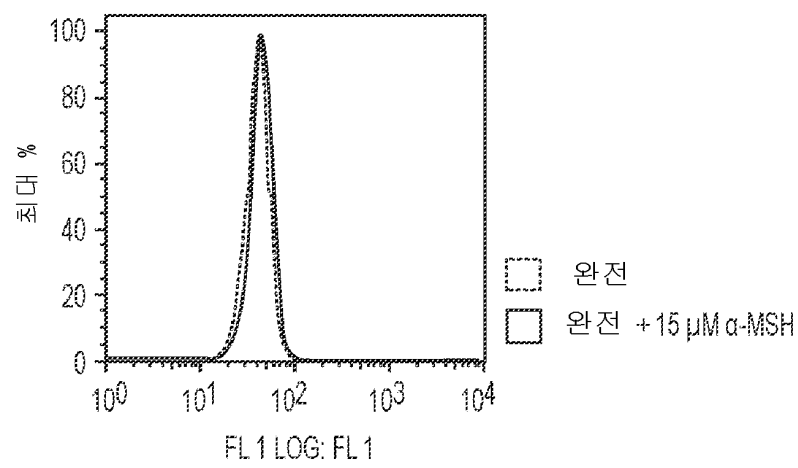
도면7a



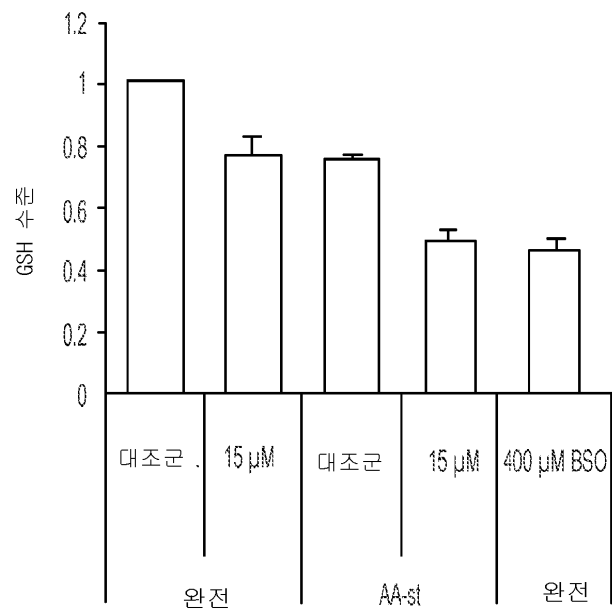
도면7b



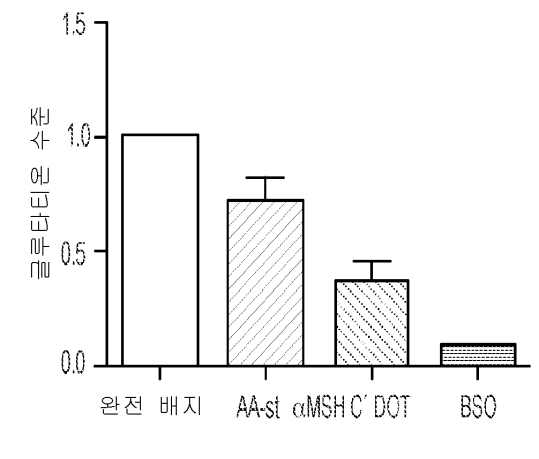
도면7c



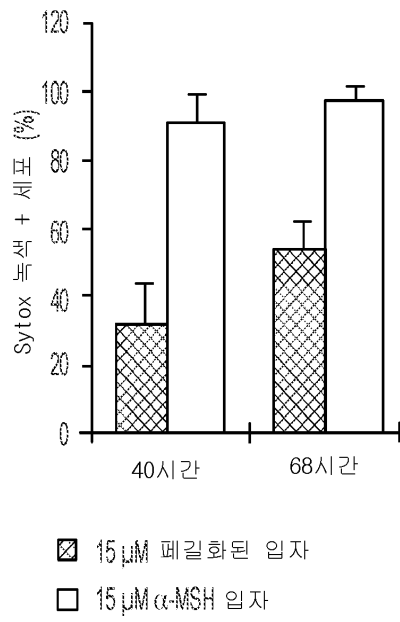
도면7d



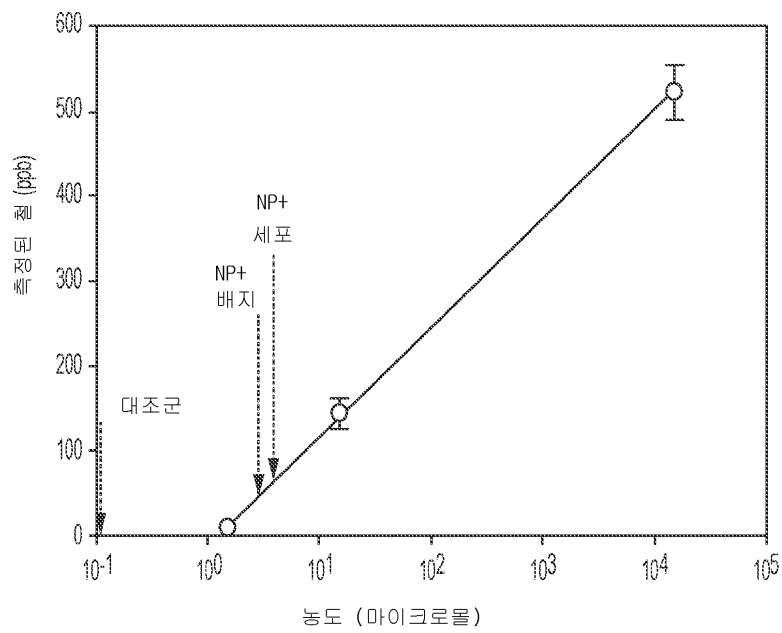
도면7e



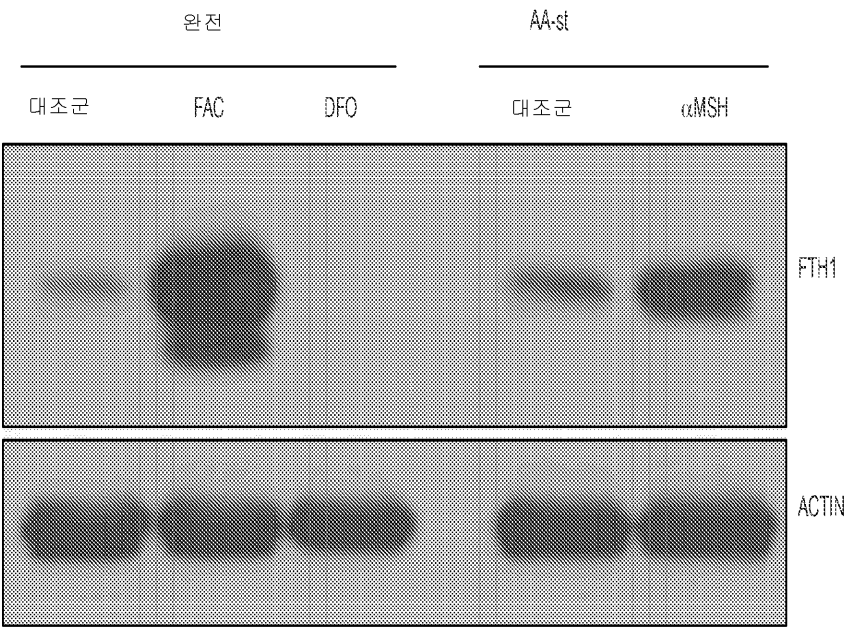
도면7f



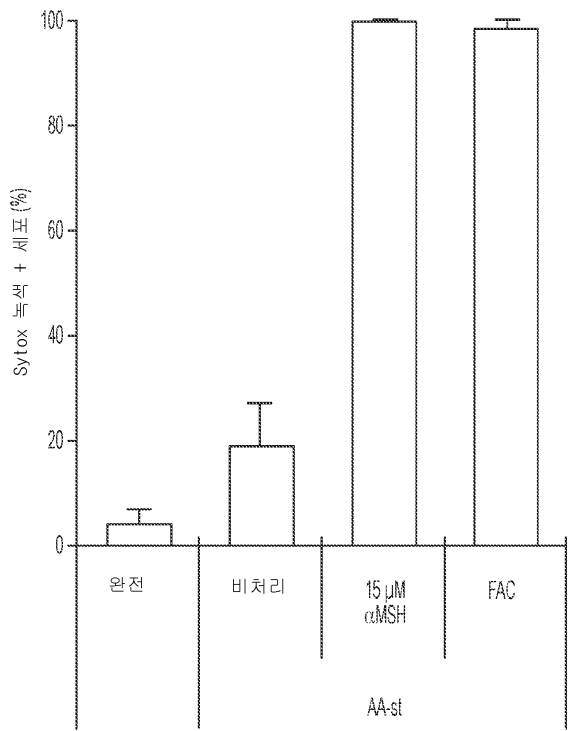
도면7g



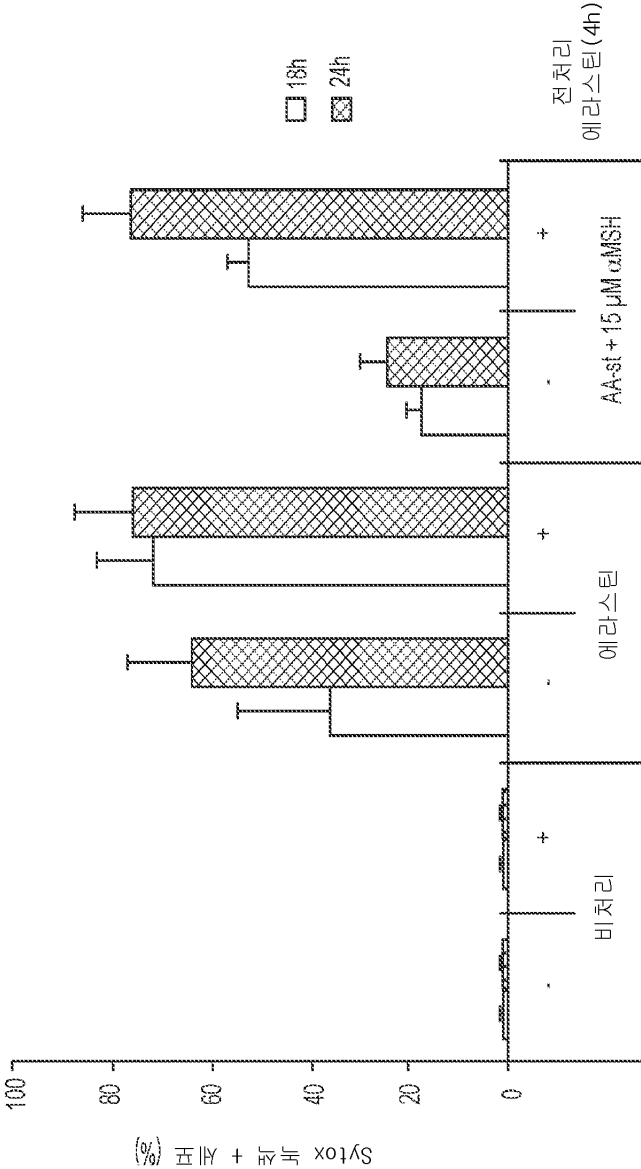
도면7h



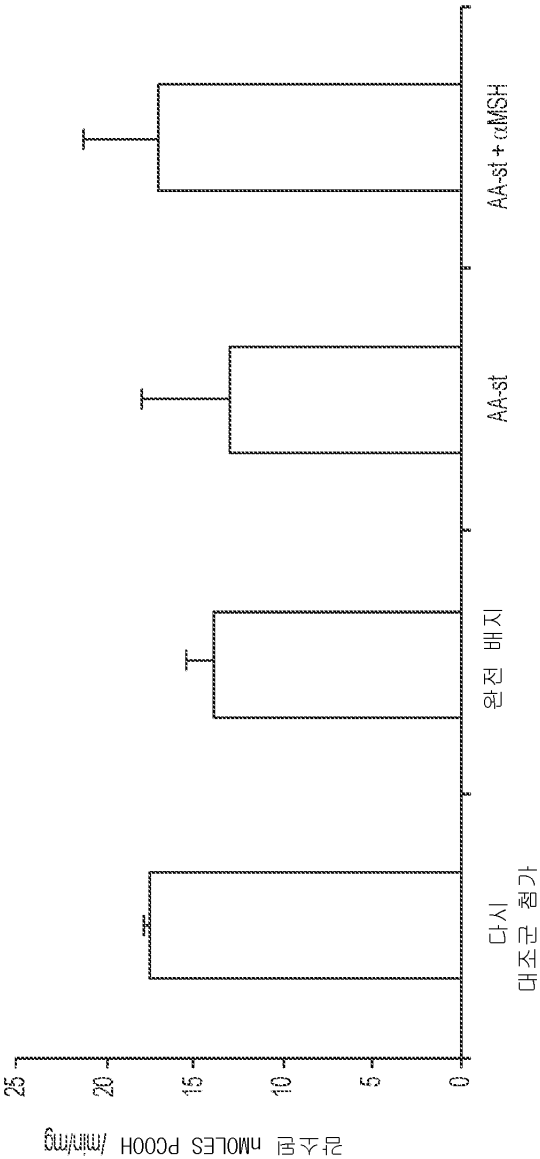
도면7i



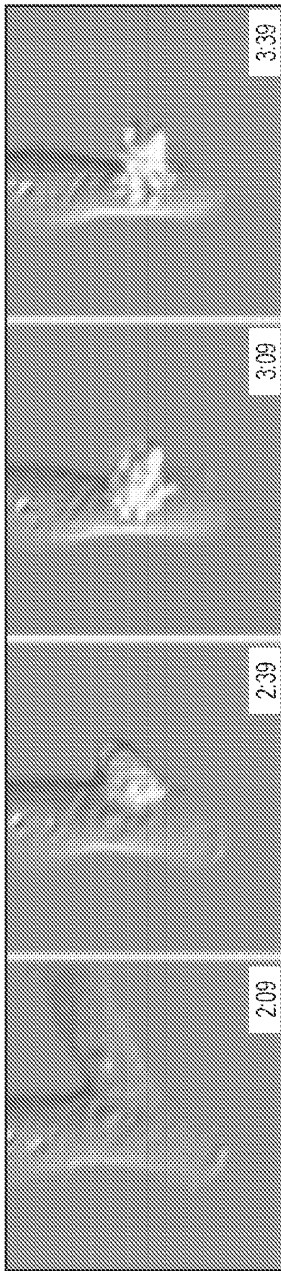
도면7j



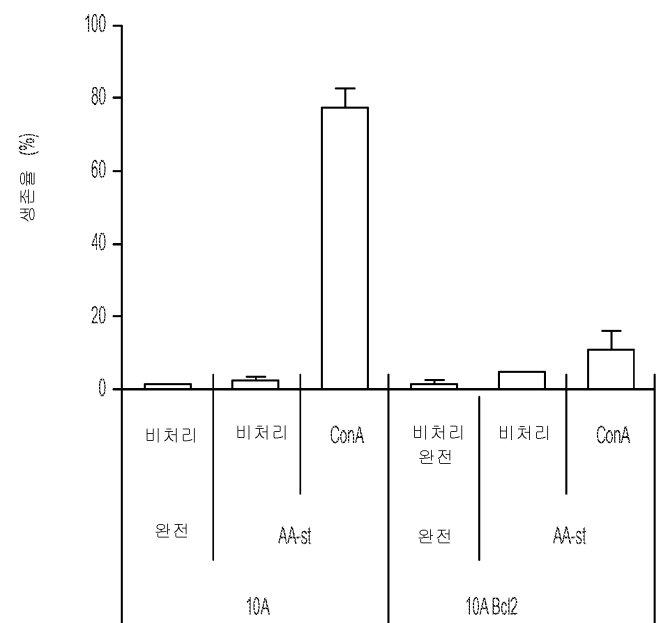
도면7k



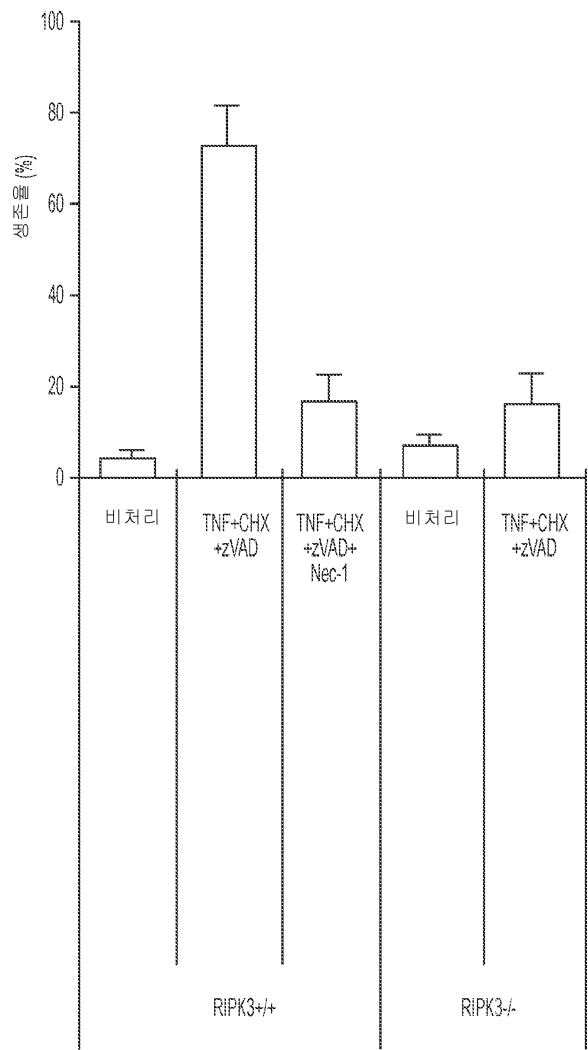
도면8a



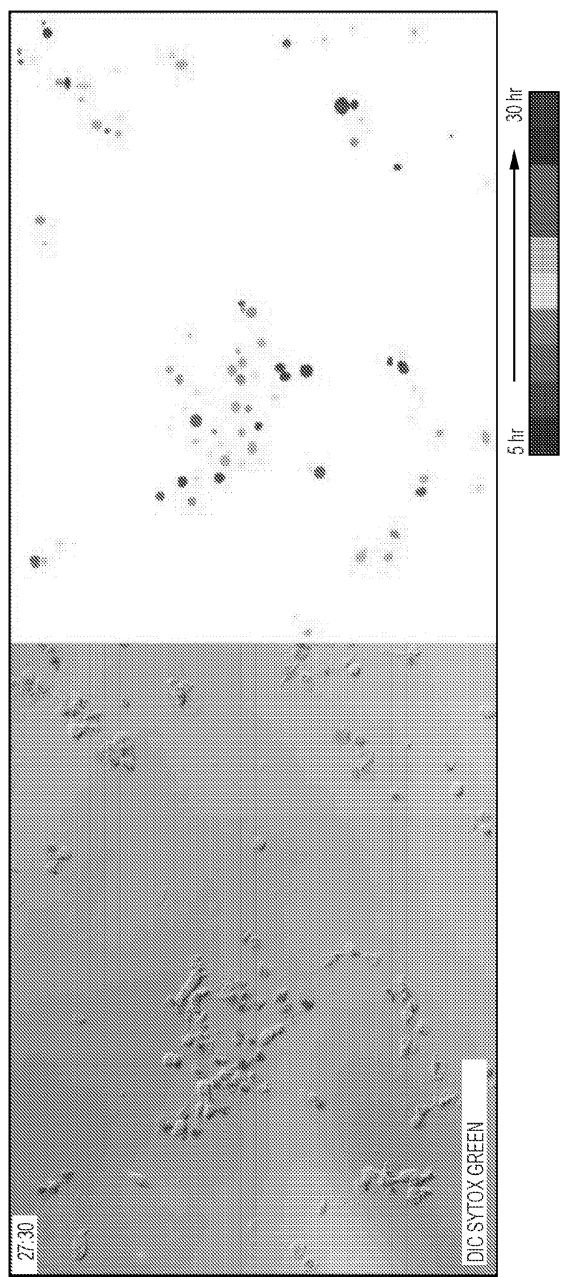
도면 8b



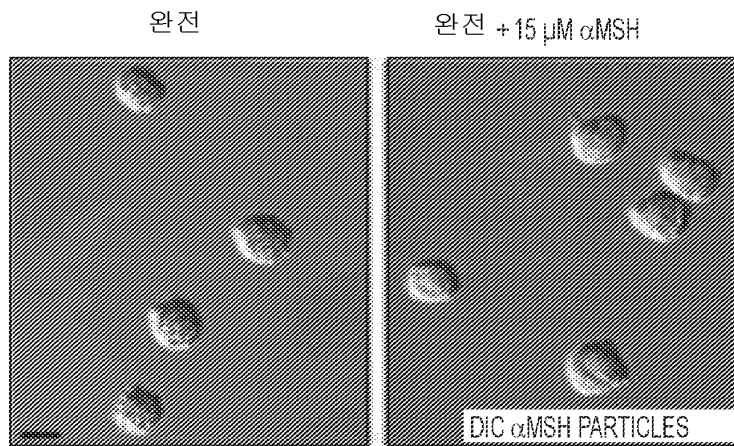
도면8c



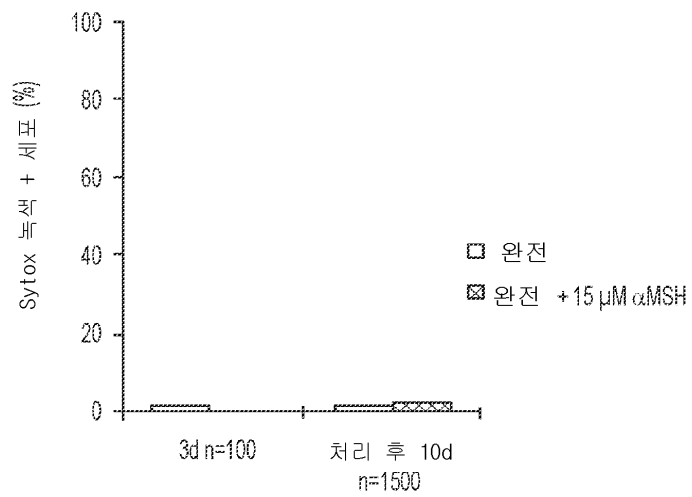
도면8d



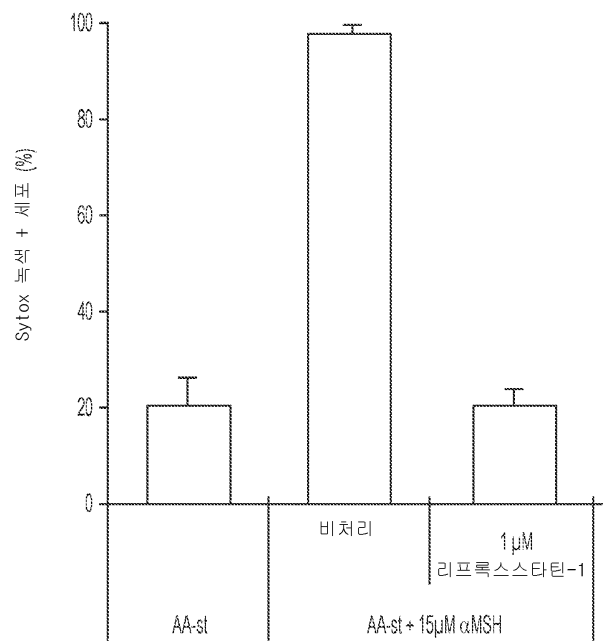
도면8e



도면8f

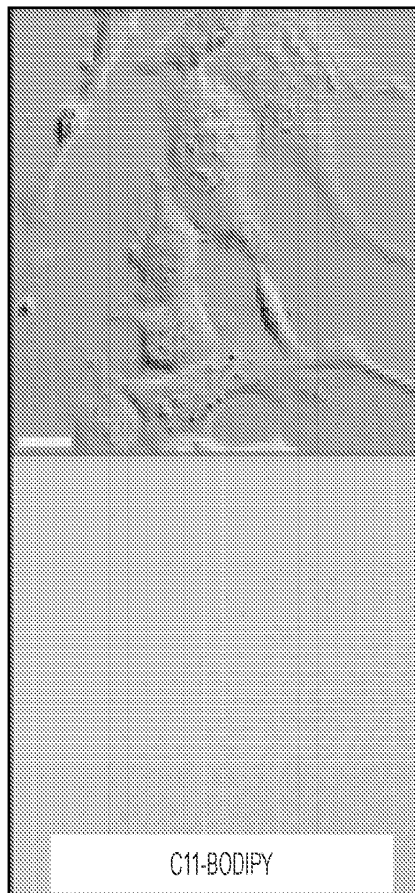


도면8g

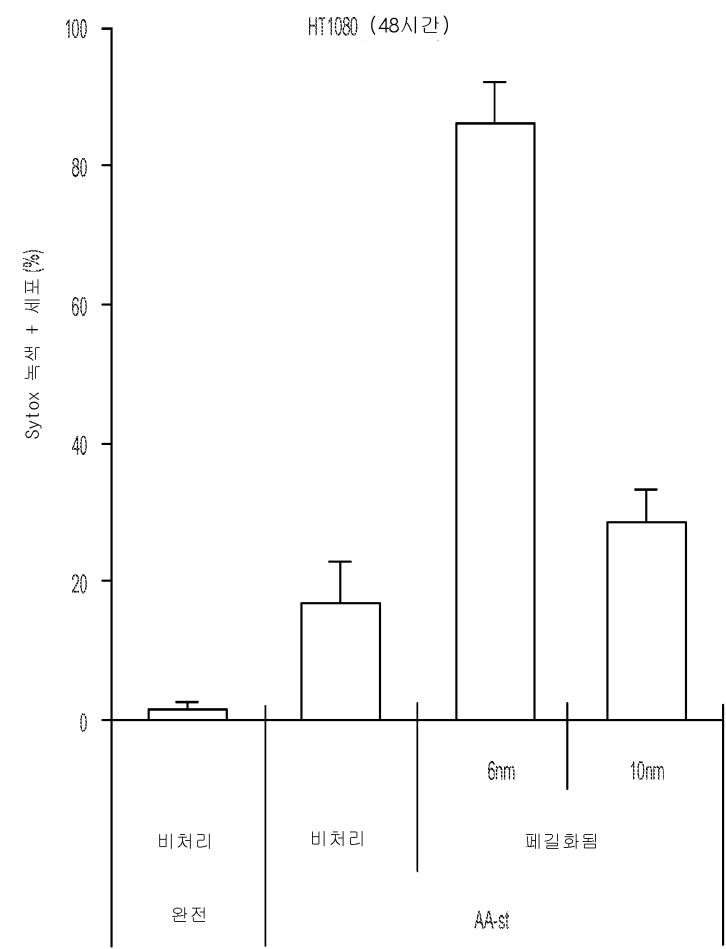


도면8h

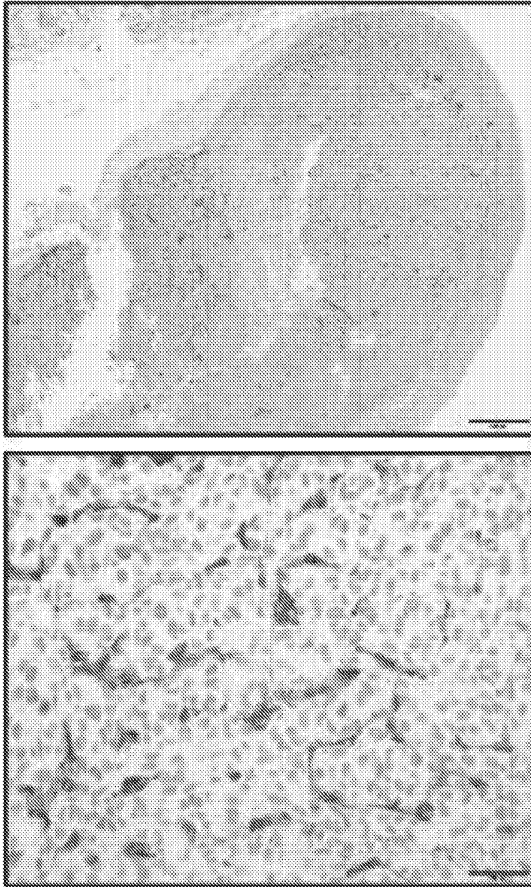
에라스틴 + 리프록스타틴



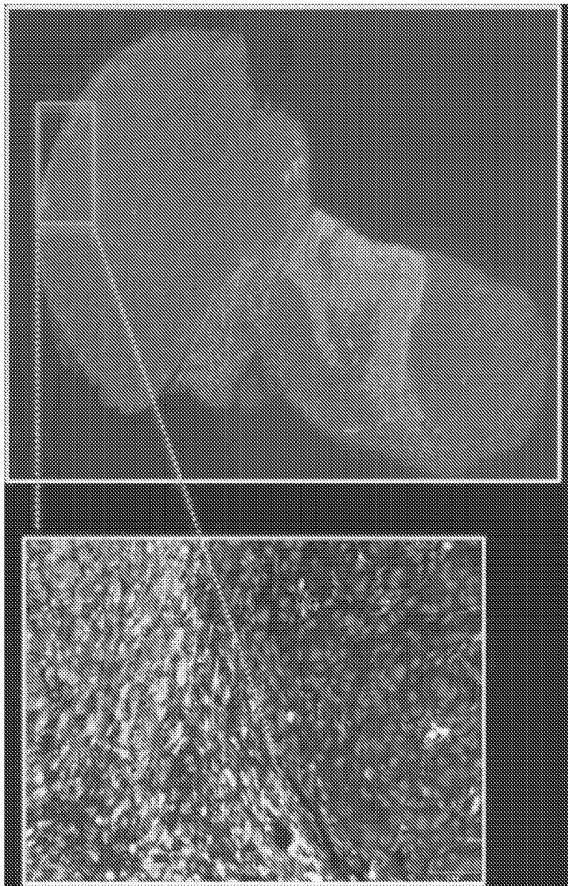
도면9a



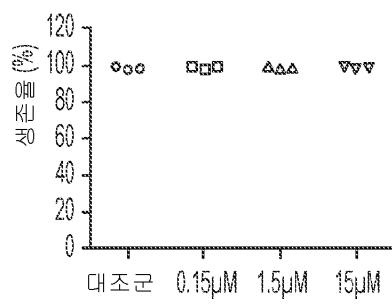
도면9b



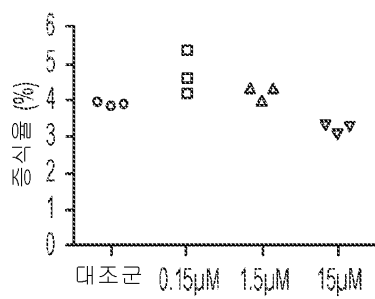
도면9c



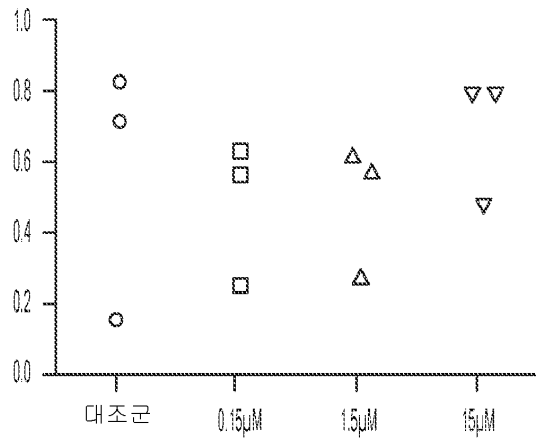
도면10a



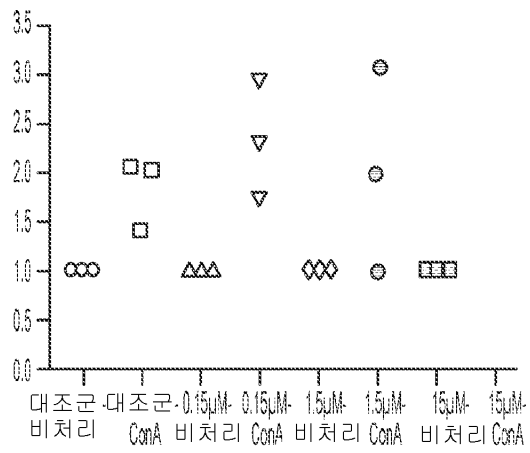
도면10b



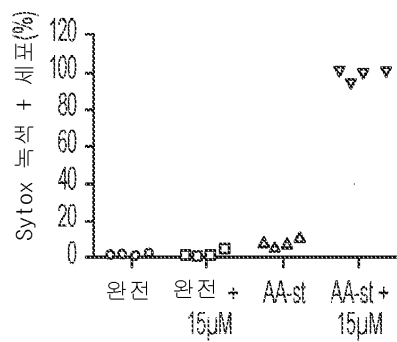
도면10c



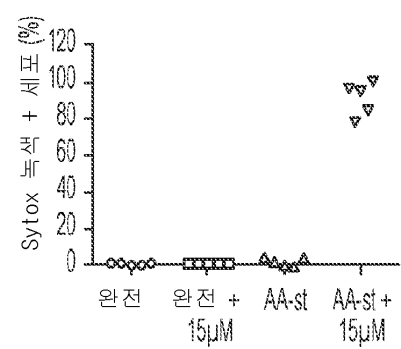
도면10d



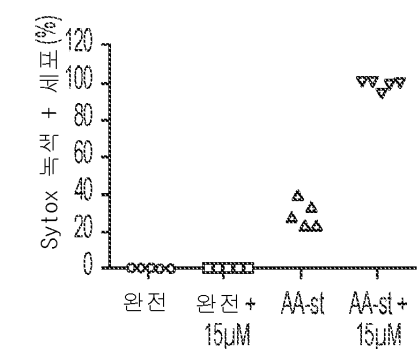
도면10e



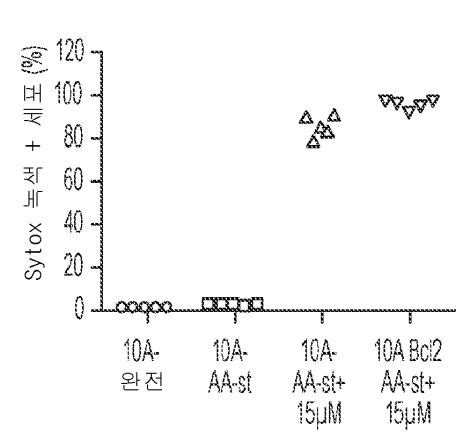
도면10f



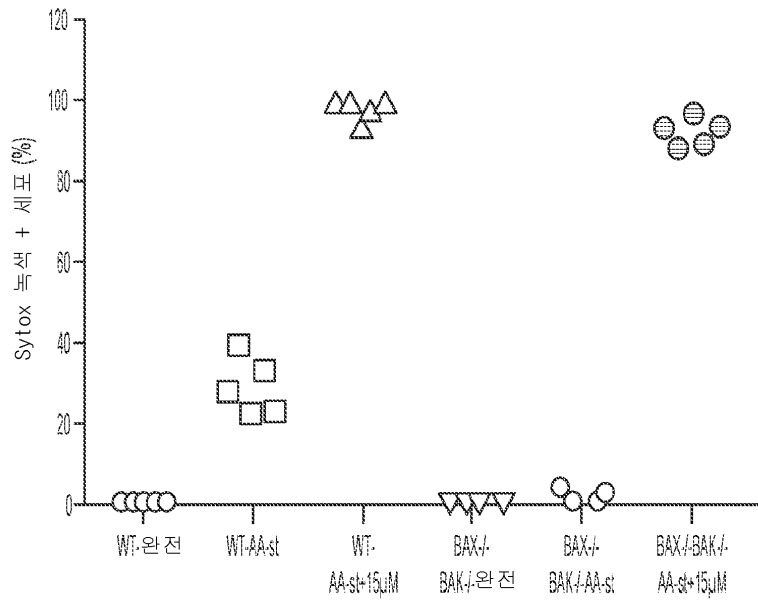
도면10g



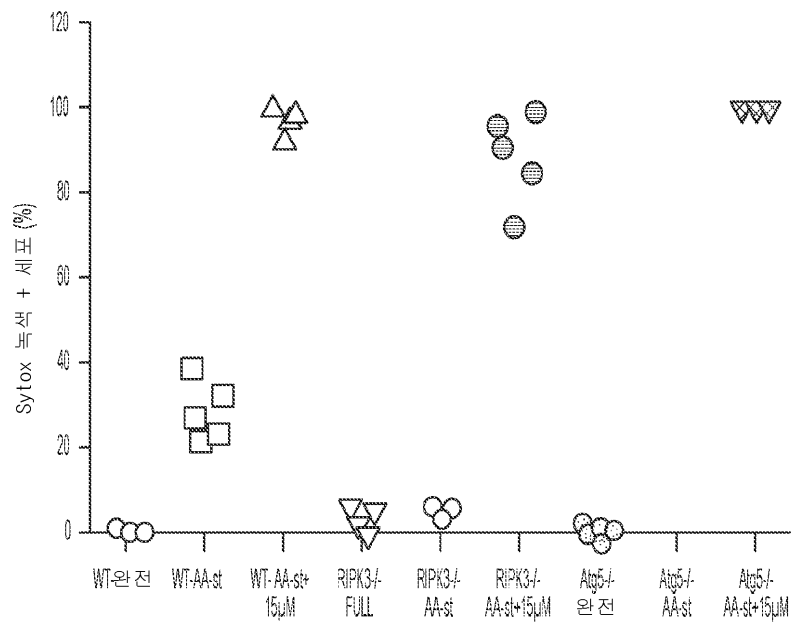
도면10h



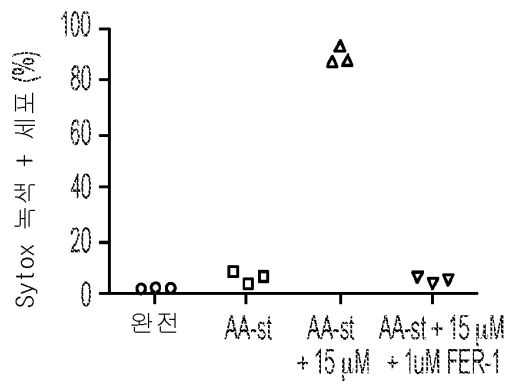
도면10i



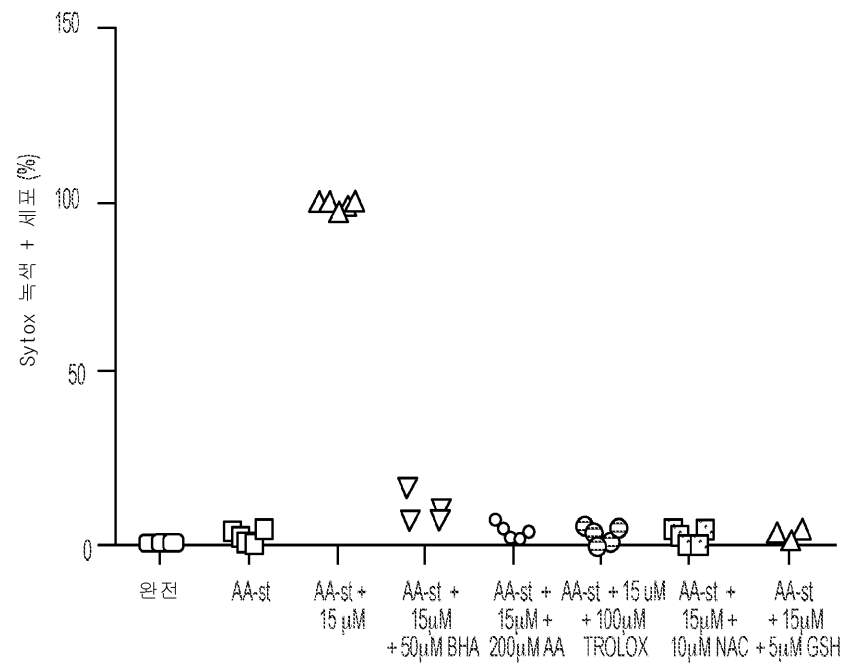
도면10j



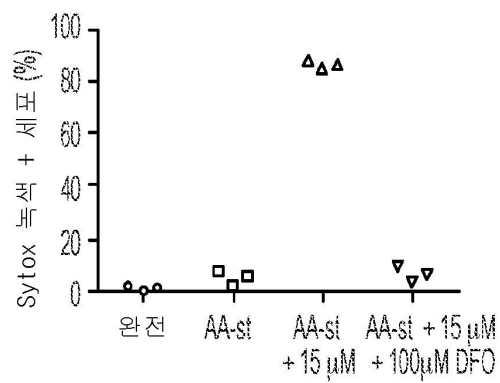
도면11a



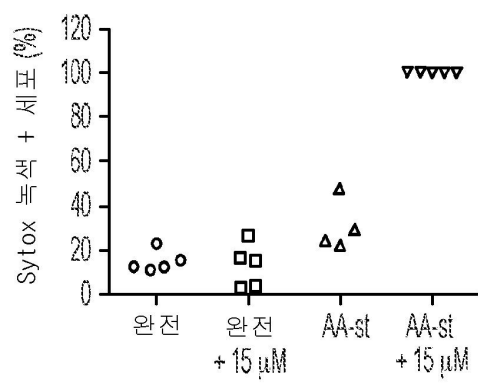
도면11b



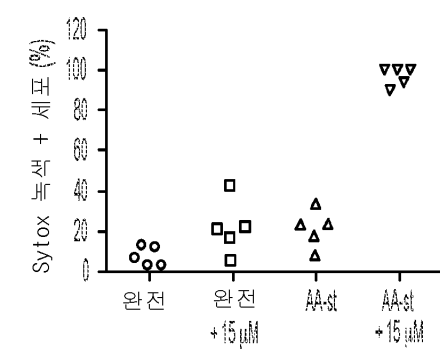
도면11c



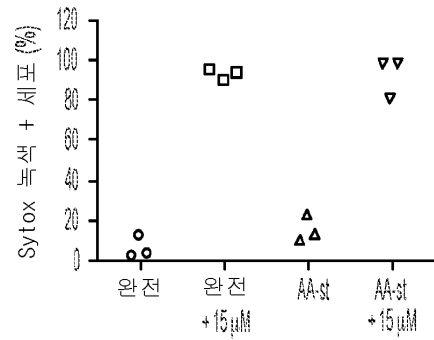
도면11d



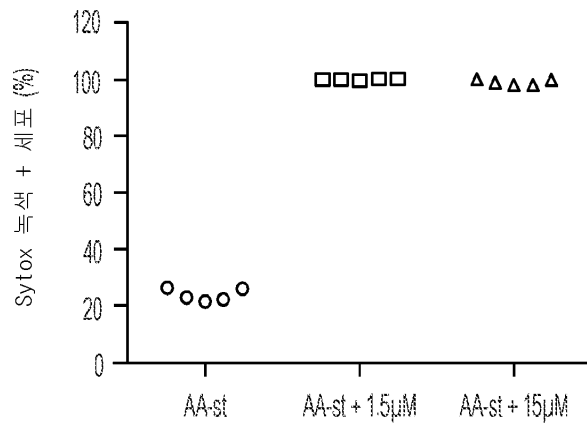
도면11e



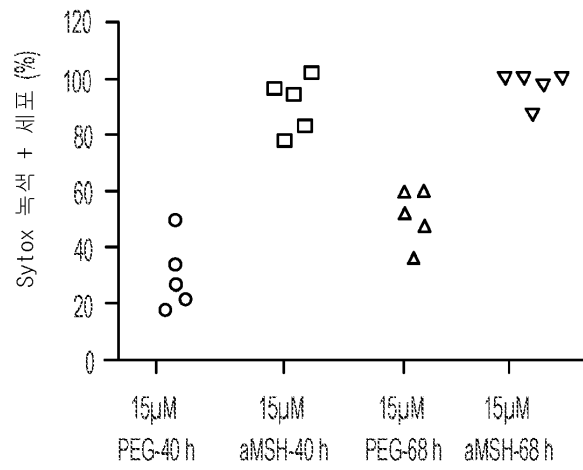
도면11f



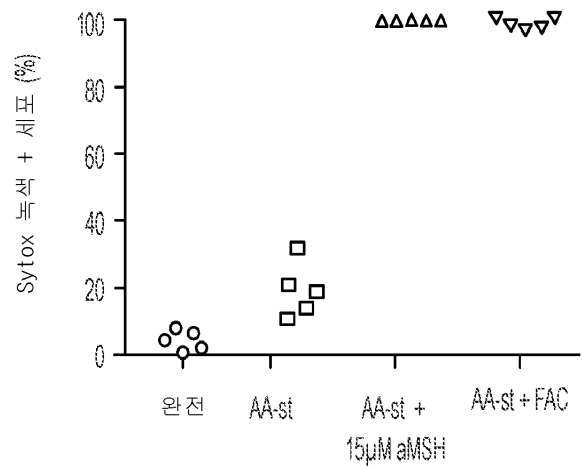
도면12a



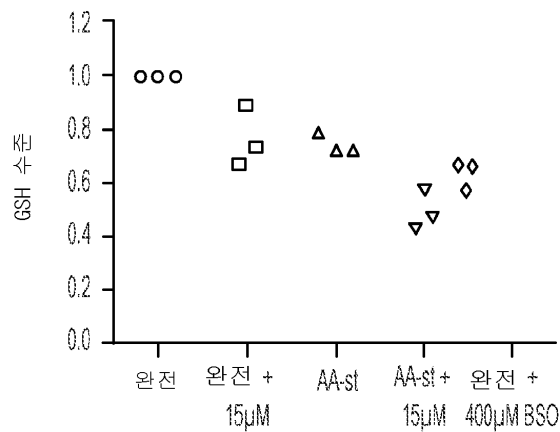
도면12b



도면12c



도면12d



도면12e

