



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0131212
(43) 공개일자 2017년11월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/50 (2017.01) A61K 31/704 (2006.01)
A61K 47/42 (2017.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/6929 (2017.08)
A61K 31/704 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0045949
(22) 출원일자 2017년04월10일
심사청구일자 2017년04월10일
(30) 우선권주장
1020160062155 2016년05월20일 대한민국(KR)

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
김현철
서울특별시 영등포구 63로 45 여의도시범아파트
6동 97호
이호현
서울특별시 광진구 긴고랑로16길 50, 101호(중곡동, 미주빌)
이민지
서울특별시 강동구 천중로43길 40, 503호
(74) 대리인
김현진

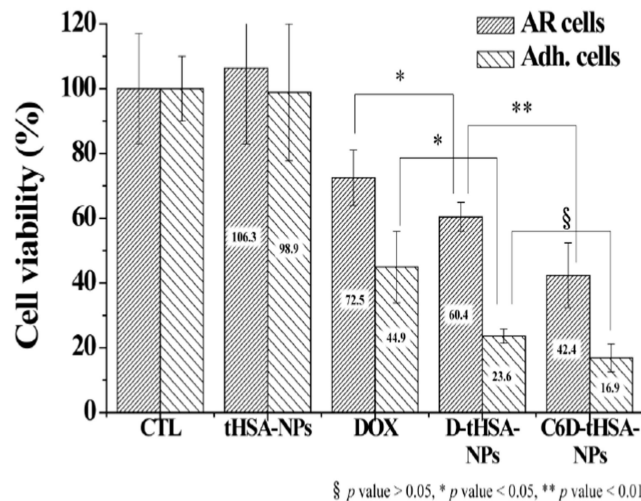
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 아노이키스 내성 암세포의 화학요법을 위한 나노입자

(57) 요약

본 발명은 아노이키스 내성 암세포의 화학요법을 위한 알부민 나노입자에 대한 것으로, 더욱 상세하게는 약물을 담지한 알부민 나노입자와 상기 알부민 나노입자에 결합한 CEACAM6 항체를 포함하며, 상기 알부민 나노입자는 알부민 분자 사이 디설파이드 결합에 의해 형성되고, 상기 CEACAM6 항체는 알부민 나노입자 표면의 아민 그룹과 아미드 결합을 하여, CEACAM6 항체가 아노이키스 내성 암세포를 타겟팅하며 암세포에 섭취된 알부민 나노입자는 세포기질에 존재하는 글루타틴온에 의해 디설파이드 결합이 끊어져 약물을 방출하는 아노이키스 내성 암세포의 화학요법을 위한 알부민 나노입자에 대한 것이다.

대표도 - 도12



(52) CPC특허분류

A61K 47/42 (2013.01)

A61K 47/6851 (2017.08)

A61K 47/6855 (2017.08)

A61K 47/6921 (2017.08)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711019666

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 신진연구자지원

연구과제명 항암저항 및 전이암 세포인 Cancer Stem-Like 세포에 대한 표적지향의 나노메디슨 개발

기 여 율 1/1

주관기관 서강대학교

연구기간 2014.11.01 ~ 2015.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

약물을 담지한 알부민 나노입자와, 상기 알부민 나노입자에 결합한 CEACAM6 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 암세포 화학요법을 위한 나노입자.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 약물을 담지한 알부민 나노입자는 알부민 분자 사이의 디설파이드 결합에 의해서 형성되는 것을 특징으로 하는 암세포 화학요법을 위한 나노입자.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 약물을 담지한 알부민 나노입자는 구형의 형태를 가지는 것을 특징으로 하는 암세포 화학요법을 위한 나노입자.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 암세포 화학요법을 위한 나노입자는 150 내지 350nm의 직경을 가지는 것을 특징으로 하는 암세포 화학요법을 위한 나노입자.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 CEACAM6 항체는 상기 약물을 담지한 알부민 나노입자 표면의 아민 그룹과 아마이드 결합하는 것을 특징으로 하는 암세포 화학요법을 위한 나노입자.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 약물은 독소루비신이 사용되는 것을 특징으로 하는 암세포 화학요법을 위한 나노입자.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 암세포 화학요법을 위한 나노입자는 전이 암세포를 타겟팅하여 사멸시키는 것을 특징으로 하는 암세포 화학요법을 위한 나노입자.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 암세포 화학요법을 위한 나노입자는 전이 암세포 내에 섭취되어 세포 기질에 존재하는 글루타티온에 의해 쪼개져 약물을 방출하는 것을 특징으로 하는 암세포 화학요법을 위한 나노입자.

청구항 9

알부민을 티올화하는 티올화단계와, 티올화된 알부민과 약물을 이용하여 이황화 결합 및 탈용매화 과정을 통해 약물이 담지된 알부민 나노입자를 형성하는 입자형성단계와, 상기 약물이 담지된 알부민 나노입자에 CEACAM6 항체를 결합시키는 항체결합단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 암세포 화학요법을 위한 나노입자의 제조방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 티올화단계는

piperazine-N'-ethanesulfonic acid와 ethylenediaminetetraacetic acid를 함유하는 반응버퍼에 알부민을 녹이고, 2-Iminothiolane hydrochloride에 의한 티올화 과정을 통해 티올화된 알부민을 생성하는 것을 특징으로 하는 암세포 화학요법을 위한 나노입자의 제조방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 티올화단계에서 알부민과 2-IT의 몰비율은 1 대 20 내지 30인 것을 특징으로 하는 암세포 화학요법을 위한 나노입자의 제조방법.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 입자형성단계는

HEPES 버퍼에 상기 티올화된 알부민과 약물이 혼합된 용액에 에탄올을 드롭방식으로 첨가반응시켜 약물이 담지된 알부민 나노입자를 생성하는 것을 특징으로 하는 암세포 화학요법을 위한 나노입자의 제조방법.

청구항 13

제9항에 있어서, 상기 항체결합단계는

N-Hydroxysuccinimide와 N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride를 포함하는 MES 반응버퍼 내에 CEACAM6 항체 용액을 혼합하여 반응시켜 NHS/EDC-활성화된 항체를 형성하고, 상기 활성화된 항체를 상기 약물이 담지된 알부민 나노입자 용액에 혼합반응시켜, 약물이 담지된 알부민 나노입자에 CEACAM6 항체를 결합시키는 것을 특징으로 하는 암세포 화학요법을 위한 나노입자의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 아노이키스 내성 암세포의 화학요법을 위한 나노입자에 대한 것으로, 더욱 상세하게는 약물을 담지한 알부민 나노입자와 상기 알부민 나노입자에 결합한 CEACAM6 항체를 포함하며, 상기 알부민 나노입자는 알부민 분자 사이 디설파이드 결합에 의해 형성되고, 상기 CEACAM6 항체는 알부민 나노입자 표면의 아민 그룹과 아미드 결합을 하여, CEACAM6 항체가 아노이키스 내성 암세포를 타겟팅하며 암세포에 섭취된 알부민 나노입자는 세포기질에 존재하는 글루타틴온에 의해 디설파이드 결합이 끊어져 약물을 방출하는 아노이키스 내성 암세포의 화학요법을 위한 나노입자에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 암은 조직 내에서 질서를 무시하고 무제한 증식하는 미분화 세포로 구성된 종괴 또는 종양을 형성하는 병을 말하며, 궁극적으로는 주위의 정상조직이나 기관을 침윤하여 파괴시키고 원발병소에서 개체의 어떤 기관이든 전이하여 새로운 성장 장소를 만들 수 있어 개체의 생명을 빼앗아 갈 수 있는 질환군을 총칭한다. 따라서, 암의 정확한 진단 및 치료하기 기술이 널리 개발되고 있으며, 암치료를 위한 대표적인 방법으로 외과적인 수술 방법, 방사선 치료 방법 및 화학요법 등이 있다. 이중, 화학요법은 하기의 특허문헌처럼 암세포에 항암제를 전달하여 암세포를 사멸시킨다.

[0003] <특허문헌>

[0004] 특허공개공보 제10-2013-0088081호(2013. 08. 07. 공개) "수난용성 약물을 내부에 포함하는 알부민 나노입자의 제조방법"

[0005] 하지만, 종래의 암을 치료하기 위한 나노입자의 전달은 EPR(enhanced permeability and retention) 효과를 이용하였는데, 혈관 또는 림프관을 따라 플로우팅(floating)하는 전이 암세포에서는 EPR 효과를 기대할 수 없어, 종래의 화학요법은 위한 나노입자는 전이 암세포를 사멸시키기 어려운 문제가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로,
- [0007] 본 발명은 전이 암세포를 효과적으로 사멸시킬 수 있는 아노이키스 내성 암세포의 화학요법을 위한 나노입자를 제공하는데 그 목적이 있다.
- [0008] 또한, 본 발명은 알부민 나노입자에 결합한 CEACAM6 항체가 아노이키스 내성 암세포를 타겟팅하여 전이 암세포에 약물을 효과적으로 전달할 수 있는 아노이키스 내성 암세포의 화학요법을 위한 나노입자를 제공하는데 그 목적이 있다.
- [0009] 또한, 본 발명은 약물을 담지하는 알부민 나노입자는 디설파이드 결합에 의해 생성되므로, 암세포 내에 섭취된 알부민 나노입자는 세포기질에 존재하는 글루타티온에 의해 쪼개져 비목적 지역에 약물을 방출을 억제할 수 있는 아노이키스 내성 암세포의 화학요법을 위한 나노입자를 제공하는데 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명은 앞서 본 목적을 달성하기 위하여 다음과 같은 구성을 가진 실시예에 의해 구현된다.
- [0011] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 암세포 화학요법을 위한 나노입자는 약물을 담지한 알부민 나노입자와, 상기 알부민 나노입자에 결합한 CEACAM6 항체를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0012] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 암세포 화학요법을 위한 나노입자에 있어서 상기 약물을 담지한 알부민 나노입자는 알부민 분자 사이의 디설파이드 결합에 의해서 형성되는 것을 특징으로 한다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 암세포 화학요법을 위한 나노입자에 있어서 상기 약물을 담지한 알부민 나노입자는 구형의 형태를 가지는 것을 특징으로 한다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 암세포 화학요법을 위한 나노입자는 150 내지 350nm의 직경을 가지는 것을 특징으로 한다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 암세포 화학요법을 위한 나노입자에 있어서 상기 CEACAM6 항체는 상기 약물을 담지한 알부민 나노입자 표면의 아민 그룹과 아마이드 결합하는 것을 특징으로 한다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 암세포 화학요법을 위한 나노입자에 있어서 상기 약물은 독소루비신이 사용되는 것을 특징으로 한다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 암세포 화학요법을 위한 나노입자는 전이 암세포를 타겟팅하여 사멸시키는 것을 특징으로 한다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 암세포 화학요법을 위한 나노입자는 전이 암세포 내에 섭취되어 세포 기질에 존재하는 글루타티온에 의해 쪼개져 약물을 방출하는 것을 특징으로 한다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 암세포 화학요법을 위한 나노입자의 제조방법은 알부민을 티올화하는 티올화단계와, 티올화된 알부민과 약물을 이용하여 이황화 결합 및 탈용매화 과정을 통해 약물이 담지된 알부민 나노입자를 형성하는 입자형성단계와, 상기 약물이 담지된 알부민 나노입자에 CEACAM6 항체를 결합시키는 항체결합단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 암세포 화학요법을 위한 나노입자의 제조방법에 있어서 상기 티올화단계는 piperazine-N'-ethanesulfonic acid와 ethylenediaminetetraacetic acid를 함유하는 반응버퍼에 알부민을 녹이고, 2-Iminothiolane hydrochloride에 의한 티올화 과정을 통해 티올화된 알부민을 생성하는 것을 특징으로 한다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 암세포 화학요법을 위한 나노입자의 제조방법에 있어서 상기 티올화단계에서 알부민과 2-IT의 몰비율은 1 대 20 내지 30인 것을 특징으로 한다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 암세포 화학요법을 위한 나노입자의 제조방법에 있어서 상기 입자형성단계는 HEPES 버퍼에 상기 티올화된 알부민과 약물이 혼합된 용액에 에탄올을 드롭방식으로 첨가반응시켜 약물이 담지된 알부민 나노입자를 생성하는 것을 특징으로 한다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 암세포 화학요법을 위한 나노입자의 제조방법에 있어서 상기 항체결합단계는 N-Hydroxysuccinimide와 N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride를 포함하는 MES 반응버퍼 내에 CEACAM6 항체 용액을 혼합하여 반응시켜 NHS/EDC-활성화된 항체를 형성하고, 상

기 활성화된 항체를 상기 약물이 담지된 알부민 나노입자 용액에 혼합반응시켜, 약물이 담지된 알부민 나노입자에 CEACAM6 항체를 결합시키는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [0024] 본 발명은 앞서 본 실시예에 의해 다음과 같은 효과를 얻을 수 있다.
- [0025] 본 발명은 전이 암세포를 효과적으로 사멸시킬 수 있는 효과가 있다.
- [0026] 또한, 본 발명은 알부민 나노입자에 결합한 CEACAM6 항체가 아노이키스 내성 암세포를 타겟팅하여 전이 암세포에 약물을 효과적으로 전달할 수 있는 효과가 있다.
- [0027] 또한, 본 발명은 약물을 담지하는 알부민 나노입자는 디설파이드 결합에 의해 생성되므로, 암세포 내에 섭취된 알부민 나노입자는 세포기질에 존재하는 글루타티온에 의해 쪼개져 비목적 지역에 약물을 방출을 억제할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0028] 도 1은 tHSA-NPs의 Zetasizer 및 TEM 측정결과를 나타내는 도표.
- 도 2는 D-tHSA-NPs의 Zetasizer 측정결과를 나타내는 도표.
- 도 3은 티올화 비율에 따라 약물 담지효율을 나타내는 도표.
- 도 4는 글루타티온 여부에 따라 D-tHSA-NPs의 약물 방출 양을 나타내는 도표.
- 도 5는 글루타티온 여부에 따라 D-tHSA-NPs의 크기 변화를 나타내는 도표.
- 도 6은 D-tHSA-NPs 및 C6D-tHSA-NPs의 입자 분포를 나타내는 도표.
- 도 7 및 8은 C6D-tHSA-NPs에서 D-tHSA-NPs의 표면에 CEACAM6가 결합한 것을 확인하기 위한 공초점 현미경 이미지.
- 도 9는 배양된 암세포의 CEACAM6 단백질 발현을 확인하기 위한 형광 현미경 이미지.
- 도 10은 배양된 암세포의 CEACAM6 유전자 발현을 확인하기 위한 RT-PCT 결과를 나타내는 도표.
- 도 11은 C6-tHSA-NPs의 아노이키스 내성 암세포로의 표적 능력을 확인하기 위한 공초점 현미경 이미지.
- 도 12는 C6D-tHSA-NPs의 아노이키스 내성 암세포의 치료 효율을 확인하기 위한 Cell viability 결과를 나타내는 도표.
- 도 13은 동물모델에서 C6D-tHSA-NPs의 효과를 확인하기 위한 마우스 체중 측정결과를 나타내는 도표.
- 도 14는 동물모델에서 C6D-tHSA-NPs의 효과를 확인하기 위한 폐 조직을 촬영한 이미지.
- 도 15는 동물모델에서 C6D-tHSA-NPs의 효과를 확인하기 위한 폐 조직의 전이암 면적 비율을 나타내는 도표.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 이하에서는 본 발명에 따른 아노이키스 내성 암세포의 화학요법을 위한 나노입자를 첨부된 도면을 참조하여 상세히 설명한다. 특별한 정의가 없는 한 본 명세서의 모든 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 기술자가 이해하는 당해 용어의 일반적 의미와 동일하고 만약 본 명세서에 사용된 용어의 의미와 충돌하는 경우에는 본 명세서에 사용된 정의에 따른다. 또한, 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 공지 기능 및 구성에 대해 상세한 설명은 생략한다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

- [0031] 본 발명의 일 실시예에 따른 아노이키스 내성 암세포의 화학요법을 위한 나노입자는 약물을 담지한 알부민 나노입자와, 상기 알부민 나노입자에 결합한 CEACAM6 항체를 포함하며, 상기 알부민 나노입자는 알부민 분자 사이의 디설파이드 결합(disulfide bonding)에 의해서 형성되고, 상기 CEACAM6 항체는 알부민 나노입자 표면의 아민 그룹(amine group)과 아마이드 결합(amide bonding)하여 알부민 나노입자의 표면에 결합한다. 상기 아노이키스 내

성 암세포의 화학요법을 위한 나노입자는 150 내지 350nm의 직경을 가지며, 상기 알부민 나노입자는 구형의 형태를 가진다. 상기 약물은 암세포를 사멸할 수 있는 다양한 약물이 사용될 수 있으며 일 예로 독소루비신이 사용될 수 있다. 혈관 또는 림프관을 통해 이동하는 암세포(floating cancer cell)에 의한 전이(metastasis)에서, 앵커리지 의존 프로그래밍 세포 사멸(anchorage dependent programmed cell death)을 의미하는 아노이키스에 대한 내성은 필수적이며, 아노이키스 내성 특성을 갖는 암세포에서는 CEACAM6(carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6)가 과발현(overexpressing)되므로, 본 발명의 암세포의 화학요법을 위한 나노입자는 알부민 나노입자의 표면에 CEACAM6를 타겟팅하는 CEACAM6 항체가 결합하여 전이 암세포(floating(metastasis) cancer cell)를 효과적으로 타겟팅할 수 있고, 알부민 나노입자는 상대적으로 강한 디설파이드 결합에 형성되므로 약물을 효과적으로 담지할 수 있으며, 디설파이드 결합을 끊는 글루타티온(glutathione)은 세포 기질(cell cytosol)에는 존재하나 혈액 및 림프액에는 존재하지 않아 본 발명의 나노입자는 암세포에 섭취된 다음 약물을 방출하므로 비특정하는 지역이 아닌 암세포에 효과적으로 약물을 방출할 수 있어 부작용을 줄이고 암세포 사멸효과를 증가시킬 수 있다. 본 발명의 나노입자는 아노이키스 내성을 가지는 유방암, 위암, 결장암, 췌장암 등의 다양한 전이암에 적용될 수 있다.

- [0033] 본 발명의 다른 실시예에 따른 아노이키스 내성 암세포의 화학요법을 위한 나노입자의 제조방법에 대한 것으로, 상기 나노입자의 제조방법은 알부민을 티올화하는 티올화단계와, 티올화된 알부민과 약물을 이용하여 이황화 결합 및 탈용매화 과정을 통해 약물이 담지된 알부민 나노입자를 형성하는 입자형성단계와, 상기 약물이 담지된 알부민 나노입자에 CEACAM6 항체를 결합시키는 항체결합단계를 포함한다.
- [0034] 상기 티올화단계는 알부민을 티올화하는 단계로, 구체적으로 piperazine-N'-ethanesulfonic acid(HEPES)와 ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)를 함유하는 반응버퍼에 알부민(human serum albumin)을 녹이고, 2-Iminothiolane hydrochloride(2-IT)에 의한 티올화 과정(thiolation process)을 통해 티올화된 알부민(thiolated albumin)을 생성한다. 상기 티올화단계에서 알부민과 2-IT의 몰비율은 1 대 20 내지 30인 것이 바람직하다.
- [0035] 상기 입자형성단계는 티올화된 알부민과 약물을 이용하여 이황화 결합 및 탈용매화 과정을 통해 약물이 담지된 알부민 나노입자를 형성하는 단계로, 구체적으로 HEPES 버퍼에 상기 티올화된 알부민과 약물이 혼합된 용액에 에탄올을 드롭방식(dropwise)으로 첨가반응시켜 약물이 담지된 알부민 나노입자를 생성한다.
- [0036] 상기 항체결합단계는 상기 약물이 담지된 알부민 나노입자에 CEACAM6 항체를 결합시키는 단계로, 구체적으로 N-Hydroxysuccinimide(NHS)와 N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride(EDC)를 포함하는 MES 반응버퍼 내에 CEACAM6 항체 용액을 혼합하여 반응시키고 정제하여 NHS/EDC-활성화된 항체(NHS/EDC-activated antibody)를 형성하고, 활성화된 항체와 상기 약물이 담지된 알부민 나노입자 표면의 아민 그룹(amine group) 사이에 아마이드 결합(amide bonding)을 형성하기 위해, 상기 활성화된 항체를 상기 약물이 담지된 알부민 나노입자 용액에 혼합반응시켜, 약물이 담지된 알부민 나노입자에 CEACAM6 항체가 결합시킨다.
- [0038] 이하, 실시예를 통해서 본 발명을 보다 상세히 설명하기로 한다. 하지만, 이들은 본 발명을 보다 상세하게 설명하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 권리범위가 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0040] <실시예 1> 항체가 결합하고 약물이 담지된 알부민 나노입자의 제조
- [0041] (1) 1mM piperazine-N'-ethanesulfonic acid(HEPES)와 0.1mM ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)를 함유하는 반응버퍼(pH 8.0)에 알부민(human serum albumin) 40mg을 녹이고, 몰비율 1:25로 2-Iminothiolane hydrochloride(2-IT)에 의한 티올화 과정(thiolation process)을 통해 티올화된 알부민(thiolated albumin)을 생성하였다.
- [0042] (2) 이황화 결합(disulfide bonding) 반응 및 탈용매화 과정(desolvation)에 의한 티올화된 알부민 분자의 나노 집합체를 만들기 위해 HEPES 버퍼에 상기 티올화된 알부민과 독소루비신(doxorubicin)이 혼합된 용액에 에탄올을 드롭방식(dropwise)으로 첨가하여 실온에서 하룻밤 동안 반응시켜 독소루비신이 담지된 알부민 나노입자(D-tHSA-NPs)를 생성하였다.
- [0043] (3) 5mM N-Hydroxysuccinimide(NHS)와 2mM N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide

hydrochloride(EDC)를 포함하는 MES 반응버퍼 내에 CEACAM6 항체 용액 1mg/ml를 혼합하고 실온에서 15분 반응시키고 정제하여 NHS/EDC-활성화된 항체(NHS/EDC-activated antibody)를 형성하고, 활성화된 항체와 나노입자(D-tHSA-NPs)의 표면의 아민 그룹(amine group) 사이에 아마이드 결합(amide bonding)을 형성하기 위해, 상기 활성화된 항체를 나노입자 용액(D-tHSA-NPs solution)에 혼합하여 1.5시간 반응시켜, 독소루비신이 담지된 알부민 나노입자에 CEACAM6 항체가 결합한 알부민 나노입자(C6D-tHSA-NPs)를 생성하였다.

[0045] <실시예 2> 알부민 나노입자의 특성 확인

[0046] (1) 독소루비신을 사용하지 않는 것을 제외하고는 실시예 1의 (2)의 방법과 동일하게 하여 독소루비신이 담지되지 않은 알부민 나노입자(tHSA-NPs)를 생성하고, Zetasizer(Nano-ZS, Malvern) 및 TEM으로 측정하여 그 결과로도 1에 나타내었다. 또한, 실시예 1의 (2)에서 제조된 알부민 나노입자(D-tHSA-NPs)를 Zetasizer로 측정하여 도 2에 나타내었다. 도 1 및 2를 통해, 약물의 캡슐화 여부와 상관없이 상기 입자들은 대략 180nm대의 직경을 가짐을 알 수 있고, 도 1을 보면 상기 나노입자(tHSA-NPs)는 구형의 형태를 가짐을 알 수 있다.

[0047] (2) 알부민과 2-IT의 몰비율을 1:25에서 1:12.5 및 37.5로 바꾼 것을 제외하고는 실시예 1의 (2)의 방법과 동일하게 하여 알부민 나노입자들(D-tHSA-NPs(12.5), D-tHSA-NPs(37.5))를 제조하였다. 실시예 1의 (2)에서 제조된 알부민 나노입자(D-tHSA-NPs(25)) 및 상기 나노입자들(D-tHSA-NPs(12.5), D-tHSA-NPs(37.5))을 HPLC 방법에 의해 독소루비신 담지 효율을 측정하여 도 3에 나타내었다. 도 3을 보면 티올화 비율 1: 25일 때 담지 효율이 가장 큰 것을 알 수 있는데, 티올화 비율 1:12.5인 경우 내부분자의 불충분한 가교가 일어났기 때문에 담지 효율이 낮은 것으로 보이고, 위의 실험 전에 원심분리를 통해 마이크로 사이즈의 나노입자를 제거하는데 티올화 비율이 1:37.5인 경우는 과한 가교가 일어나 마이크로 사이즈의 나노입자가 많이 생성되어 담지 효율이 낮은 것으로 보인다.

[0048] (3) 나노입자(D-tHSA-NPs)로부터 독소루비신 방출 속도를 확인하기 위해서, 실시예 1의 (2)에서 제조된 나노입자(D-tHSA-NPs)는 dispersion medium 내의 dialysis membrane(molecular weight cutoff 30kDa)에 패키징되어 나노입자 내에 담지된 독소루비신은 증류수 10mL로 배출되도록 한 후, HPLC를 통해 분석하여 그 결과를 도 4에 나타내었다. 실험은 dispersion medium 내에 glutathione이 있는 경우(with GSH)와 없는 경우(w/o GSH)로 나누어 실험하였다. 도 4를 보면, glutathione이 있는 경우(6시간 내에 90% 방출) 없는 경우보다 빠른 시간 내 많은 양의 독소루비신을 방출함을 알 수 있다.

[0049] (4) 50% serum 내에 실시예 (1)의 2에서 제조한 나노입자를 첨가하고 5mM의 glutathione이 있는 경우와 없는 경우로 나누어 입자 사이즈 측정하여 도 5에 나타내었다. 도 5를 보면, GSH가 없는 경우 24시간 동안 입자 크기의 변화가 거의 없는데, GSH가 첨가된 경우 1시간이 지난 후에 입자 크기 현저하게 커졌음을 알 수 있다. 이는 GSH가 나노입자의 이황화 결합을 끊어 나노입자의 사이즈가 커진 것으로 보인다.

[0050] (5) 실시예 1의 (2)에서 제조된 나노입자(D-tHSA-NPs)와 실시예 1의 (3)에서 제조된 나노입자(C6D-tHSA-NPs)를 Zetasizer로 측정하여, 도 6에 나타내었다. 또한, 실시예 1의 (2)에서 제조된 나노입자(D-tHSA-NPs)와 실시예 1의 (3)에서 제조된 나노입자(C6D-tHSA-NPs) 각각에 Alexa Fluor 555-NHS ester(나노입자를 시각화하기 위해 사용) 및 goat anti-rabbit IgG(Alexa Fluor 488-conjugated)(나노입자 표면의 항체를 시각화하기 위해 사용)를 적용하고 confocal laser scanning microscopy로 측정하여 그 결과를 도 7 및 8에 나타내었다. 도 6을 보면, C6D-tHSA-NPs의 입자크기가 D-tHSA-NPs보다 큼을 알 수 있고, 도 7을 보면 항체를 시각화하는 Alexa Fluor 488에 의해 형광이미지가 형성되지 않음을 알 수 있고, 도 8을 보면 Alexa Fluor 488에 의한 형광이미지(녹색)가 나노입자를 시각화하는 Alexa Fluor 555(붉은색)과 일치하여 합친(merge) 영상이 녹색으로 표현됨을 알 수 있어, D-tHSA-NPs의 외면에 CEACAM6 항체가 결합하여 C6D-tHSA-NPs가 형성되었음을 알 수 있다.

[0052] <실시예 3> 세포 배양 및 세포의 CEACAM6 발현 확인

[0053] (1) MDA-MB-231 and MCF-7 human breast cancer cell이 10% fetal bovine serum(FBS)이 보충된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에서 5% CO₂, 37℃ 환경으로 배양된다. 부착 배양(adherent culture)은 the tissue culture dishes(Falcon, San Jose, CA)에서 행하여지며, 유방암 세포의 아노이키스 내성 성질(anoikis resistant property)을 유도하기 위한 부유 배양(Suspension culture)은 10mg/ml Poly-HEMA(Poly(2-hydroxyethyl methacrylate))(Sigma, St. Louis, MO)가 코팅된 dishes에서 행하여진다. 구체적으로, 1×10⁶ 세

포를 poly-HEMA가 코팅된 디쉬에 시트하고 일주일 이상 성장시키고, 3일마다 신선한 배지를 첨가하고 7일 후 trypsin-EDTA를 처리한다. 이하에서 부착 배양된 것을 adherent라 표시하고 아노이키스 내성 성질을 유도하기 위해 부유 배양된 것을 AR로 표시하고 한다.

[0054] (2) 상기 과정에서 배양된 세포를 각각 펠릿화하고 1X PBS(500ul)에 재부유하고, 3.7 PFA 고정화한 후에 PBTA 버퍼용액에서 투과(permeability) 및 블락킹(blocking) 과정을 수행한다. 이후, 상기 세포는 rabbit anti-human CEACAM6 antibody(Sigma, Saint Louis, MO)를 가지고 실온에서 1시간 동안 인큐베이션되고, 1X PBS로 린스되고 goat anti-rabbit IgG(FITC-conjugated)와 실온에서 30분 동안 반응시킨다. 커버 글라스에 염색된 세포를 DAPI를 가진 마운팅 배지에 마운팅된 후 형광현미경으로 측정하여 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[0055] (3) 또한, CEACAM6의 발현을 수량화하기 위해 adherent 세포와 AR 세포에 대한 RT-PCT를 수행하여 그 결과를 도 10에 나타내었다. 사용된 CEACAM6 primer(Bioneer, Daejeon, Korea)는 다음 서열을 가지고 있다. CEACAM6 forward: 5'-TACTCAGCGTCAAAGGAAC-3', CEACAM6 reverse: 5'-AGAGACTGTGATCATCGTGA-3'. RT-PCR gel retardation assay에서 유전자 밴드(gene bands)는 EtBr로 염색되고, Gel Doc imaging device에 의해 시각화된다.

[0056] (4) 도 9를 보면, CEACAM6 단백질을 표지하는 녹색 형광이 anoikis resistant 특성을 유도한 MDA-MB-231 and MCF-7 암세포에서 높게 발현됨을 알 수 있다. 또한, 도 10을 보면, CEACAM6 유전자 역시 anoikis resistant 특성을 유도한 MDA-MB-231 and MCF-7 암세포에서 높게 발현됨을 알 수 있다. 이를 통해, 아노이키스 내성이 유도된 플로우팅 조건에서 CEACAM6가 유방암에 세포에서 과발현됨을 알 수 있다.

[0058] <실시예 4> 알부민 나노입자의 아노이키스 내성 암세포로의 표적 능력 확인

[0059] (1) 독소루비신을 사용하지 않는 것을 제외하고는 실시예 1의 (3)의 방법과 동일하게 하여 독소루비신이 담지되지 않은 알부민 나노입자(C6-tHSA-NPs)를 생성하였다.

[0060] (2) MCF-7 anoikis-resistant cell(5×10^5 cells/each well)을 Poly-HEMA가 코팅된 12-well cell culture dish에 시트하고 배양하였다. 상기 세포는 37°C에서 C6-tHSA-NPs, tHSA-NPs를 가지고 처리되며, 30분 이내로 배양한 후, 세포를 모으고 1X PBS로 워싱하고 3.7% PFA 용액을 이용하여 10분 동안 고정하고, 세포막을 1/40로 희석된 F-actin antibody(invitrogen, Alexa Fluor 488 Phalloidin)을 가지고 30분 동안 염색하고 PBTA buffer를 가지고 워싱한다. 이후, 상기 세포는 DAPI를 가진 마운팅 배지에 이식되며, 532nm/580nm(red color), 488nm/521nm(green color), and 358nm/461nm(blue color)의 광원 및 공초점 현미경을 이용하여 나노입자(Alexa Fluor 555), 세포막(F-actin), 세포핵(DAPI) 각각을 이미지화하여 그 결과를 도 11에 나타내었다.

[0061] (3) 도 11을 보면, C6-tHSA-NPs가 아노이키스 내성 특성을 가진 MCF-7 세포 내에 많이 분포하는 것을 알 수 있어 CEACAM6 항체가 결합된 나노입자는 아노이키스 내성 특성을 가진 암 세포로 방향성을 가지고 있음을 알 수 있다.

[0063] <실시예 5> 아노이키스 암세포에서 알부민 나노입자의 치료 효율 확인

[0064] (1) 정상적인(Adh.) MDA-MB-231 세포 및 아노이키스 내성 특성을 가진(AR) MDA-MB-231 세포를 6-well plates에 시트하고, 각각 tHSA-NPs, 독소루비신(100mM), D-tHSA-NPs(100mM의 독소루비신 포함), C6D-tHSA-NPs(100mM의 독소루비신 포함)을 포함하는 배지를 가지고 37°C에서 6시간 배양하며, 이후 상기 세포를 노멀 배지(normal media)를 가지고 72시간 동안 배양하여 Cell viability를 수행하여 그 결과를 도 12에 나타내었다. Cell viability는 MTT assay와 trypan blue dye exclusion method를 이용하는데, Cell viability는 0.4% trypan blue dye를 가진 세포를 배양하고 Neubauer hemocytometer로 카운팅하는 것에 의해 결정된다. MTT assay에서 96-well plates와 1.5mg/ml MTT reagent(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)가 사용되며, 15ul의 MTT reagent를 가지고 2시간 배양한 후 200ul의 DMSO가 각 well에 추가되고, Resulting culture plates는 plate reader(Bio Tek Instruments, Inc, Winooski, VT, USA)로 570nm에서 측정하였다.

[0065] (2) 도 12를 보면, C6D-tHSA-NPs의 세포독성(cytotoxicity)은 Adh. 및 AR 암세포 모두에 가장 효율적임을 알 수 있고, AR 암세포에서 C6D-tHSA-NPs와 D-tHSA-NPs 사이의 p값은 0.01보다 작고(p값이 0.01보다 작은 것은 통계적으로 중요한 의미를 가짐), Adh. 암세포에서 C6D-tHSA-NPs와 D-tHSA-NPs 사이의 p값은 0.05보다 크다(p값

이 0.05보다 큰 것은 통계적으로 중요한 의미를 갖지 않음).

[0067] <실시예 6> 동물 모델에서 알부민 나노입자의 항암 효과 확인

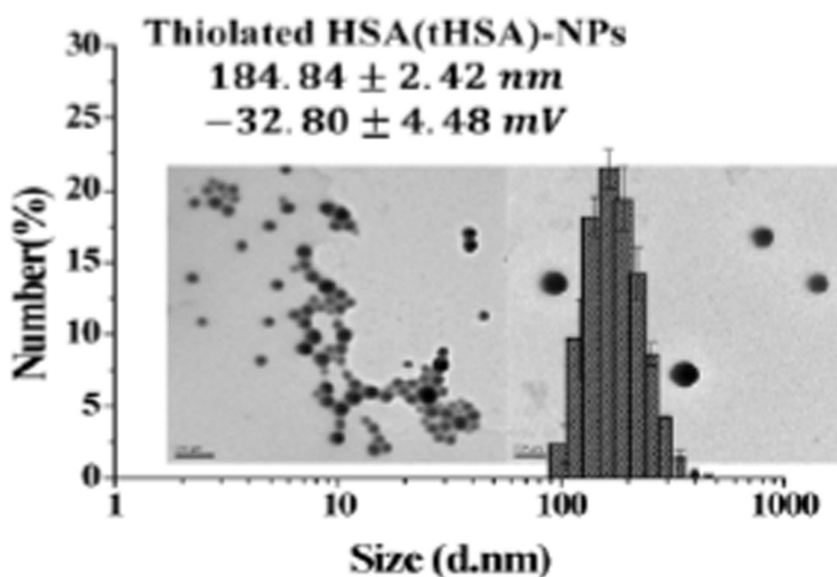
[0068] (1) BALB/c 누드 마우스의 꼬리에 정맥주사로 전이암 A549 AR 세포(마리당 2×10^6 cells)를 각각 이식한 후, 세포 주입 즉시 및 이로부터 4일 후 각각 독소루비신(DOX), D-tHSA-NPs, C6D-tHSA-NPs를 정맥주사를 통해 주입하였다(독소루비신(DOX), D-tHSA-NPs 및 C6D-tHSA-NPs 각각에 사용된 독소루비신 양은 동일함). 이후, 2일 간격으로 14일 동안 체중을 측정하여 그 결과를 도 13에 나타내었고, 2주 후 마우스 안락사시킨 후 폐 조직을 적출하고 적출된 폐 조직은 전이암 colony의 명확한 구분을 위하여 Bouin's solution에 염색하고 24시간 이후 폐 조직을 촬영하여 그 결과를 도 14에 나타내었고, 상기 조직 촬영 결과를 Image-Pro Plus software(Media Cybernetics, LP, USA)를 이용하여 전이암 면적 비율(%)을 분석하여, 그 결과를 도 15에 나타내었다. 이때, 전이암 면적 비율(%)은 전체 폐 면적 대비 전이암 면적으로 계산하였다. 도 14에서 front는 폐 조직 앞면을 촬영한 것이고 Back는 폐 조직 뒷면을 촬영한 것으로, 표면에서 특히 밝게 보이는 부분이 주입된 A549 AR 세포가 폐로 전이되어 생긴 전이암 colony를 나타낸다.

[0069] (2) 도 13을 보면 C6D-tHSA-NPs가 사용된 경우 체중감소의 부작용이 전혀 나타나지 않음을 알 수 있고, 도 14 및 15를 보면 C6D-tHSA-NPs가 사용된 경우 타 그룹에 비해 월등한 전이암 억제 효과를 보임을 알 수 있다. 즉, 독소루비신이 사용된 경우 초기 치료 이후 약간의 체중 감소가 있음을 알 수 있고, D-tHSA-NPs가 사용된 경우 표적능의 부재로 인해 매우 불규칙적이고 난류 조건을 가지는 혈류 내를 부유하고 있는 전이 암세포에 대한 약물전달이 오히려 단순 항암제(독소루비신) 주입에 비하여 비효율적임을 알 수 있는데 반해, C6D-tHSA-NPs가 사용된 경우 전이 암세포를 효과적으로 표적하여 세포 내로 도입됨으로써 담지하고 있는 항암제를 암세포에 전달하여 이를 높은 효율로 사멸시켜 전이를 억제할 수 있음을 알 수 있다.

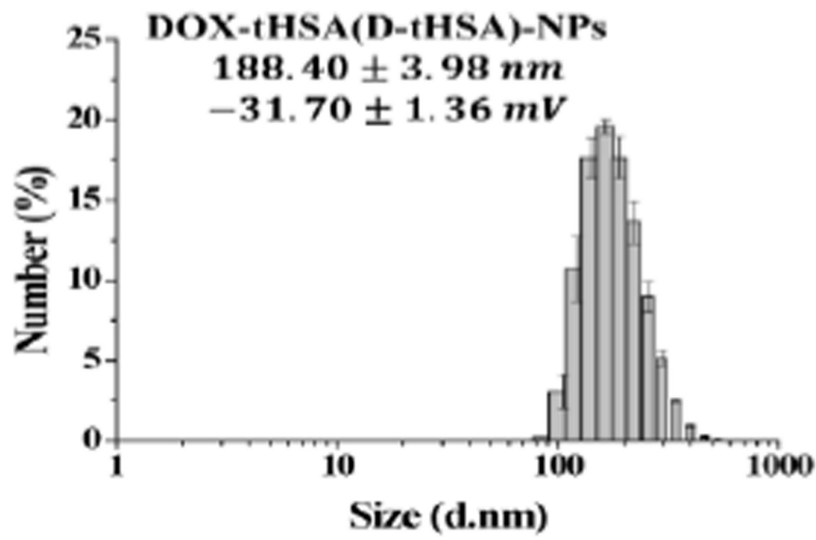
[0071] 이상에서, 출원인은 본 발명의 다양한 실시예들을 설명하였지만, 이와 같은 실시예들은 본 발명의 기술적 사상을 구현하는 일 실시예일 뿐이며, 본 발명의 기술적 사상을 구현하는 한 어떠한 변경에 또는 수정에도 본 발명의 범위에 속하는 것으로 해석되어야 한다.

도면

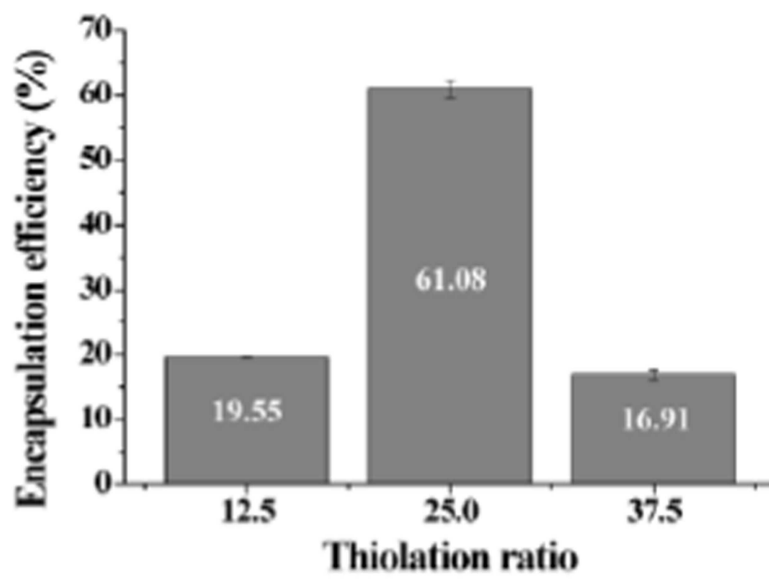
도면1



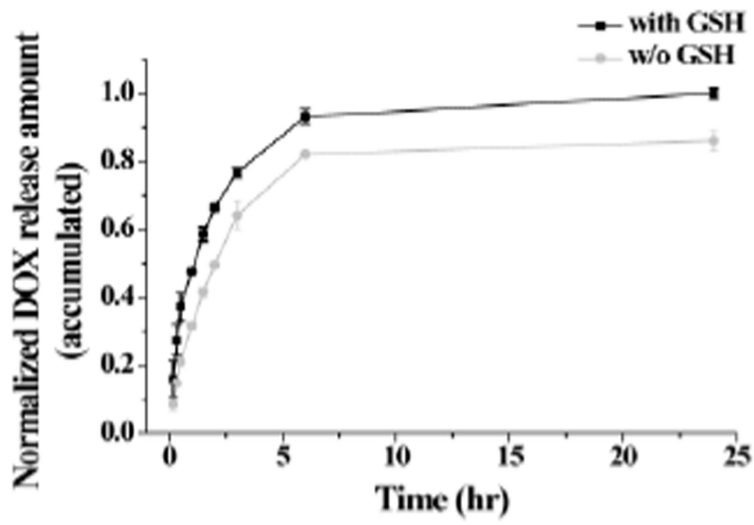
도면2



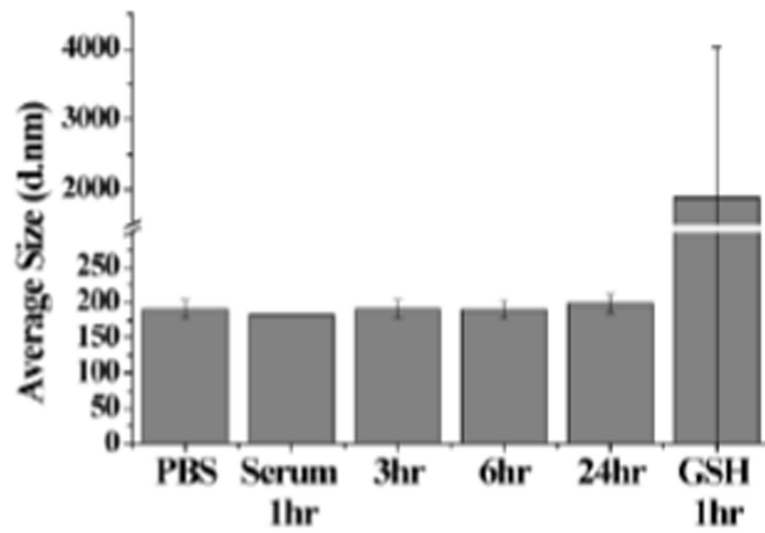
도면3



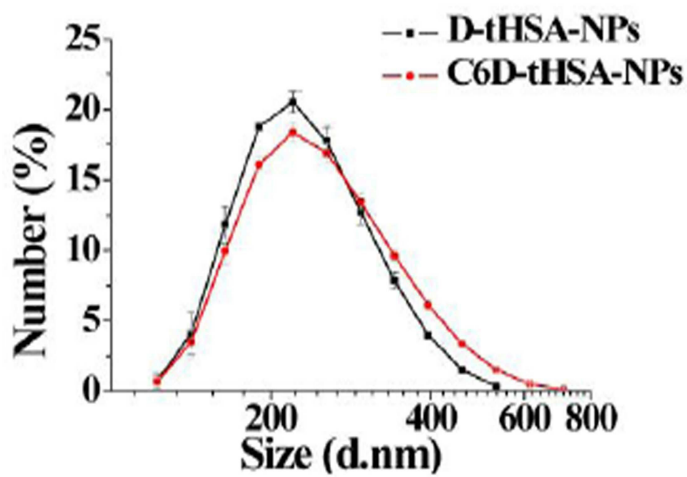
도면4



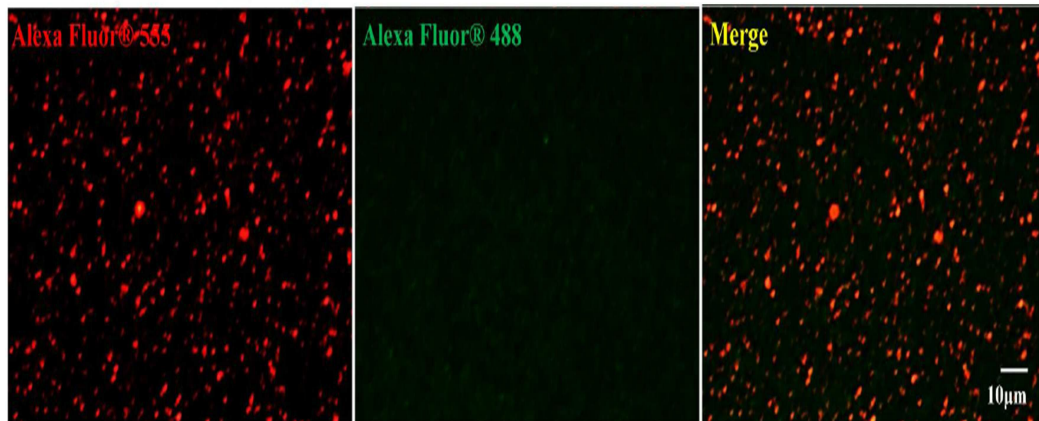
도면5



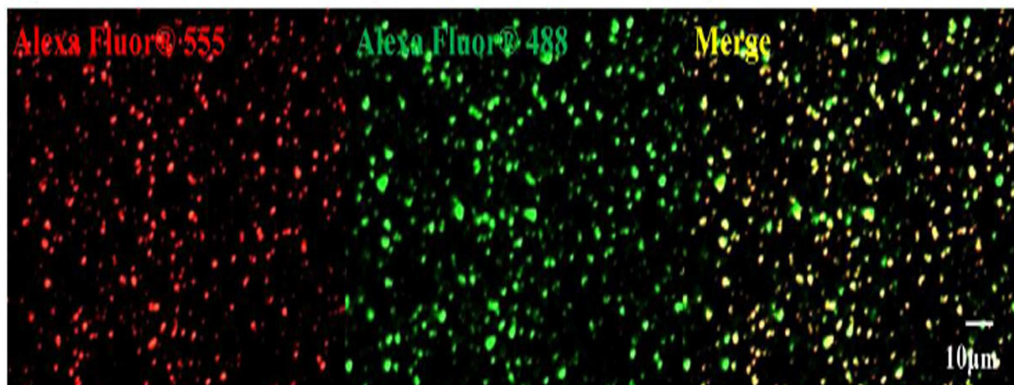
도면6



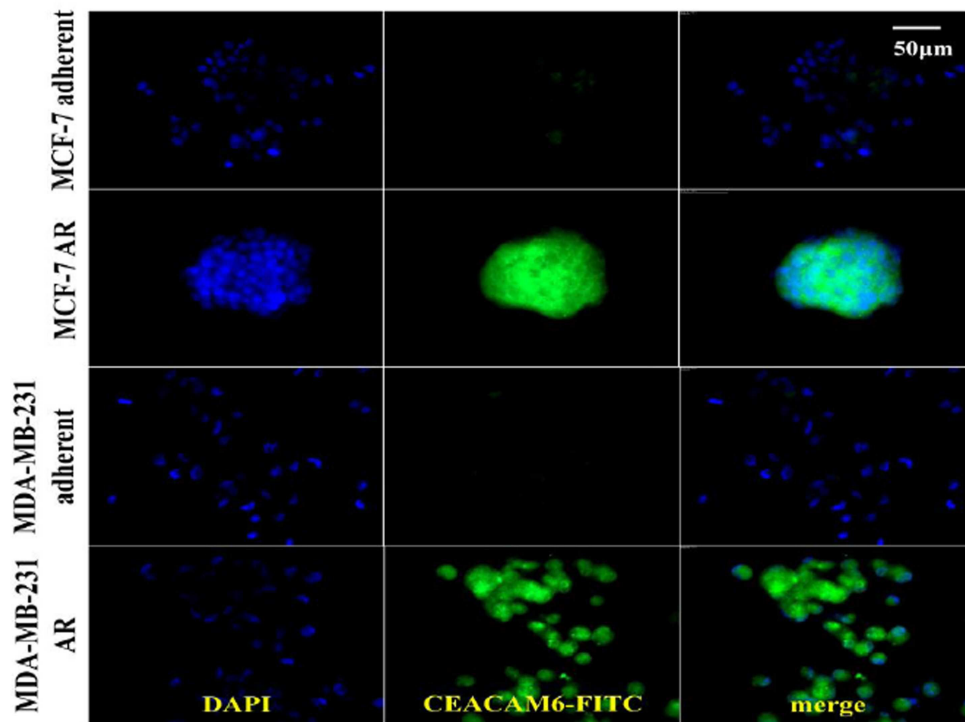
도면7



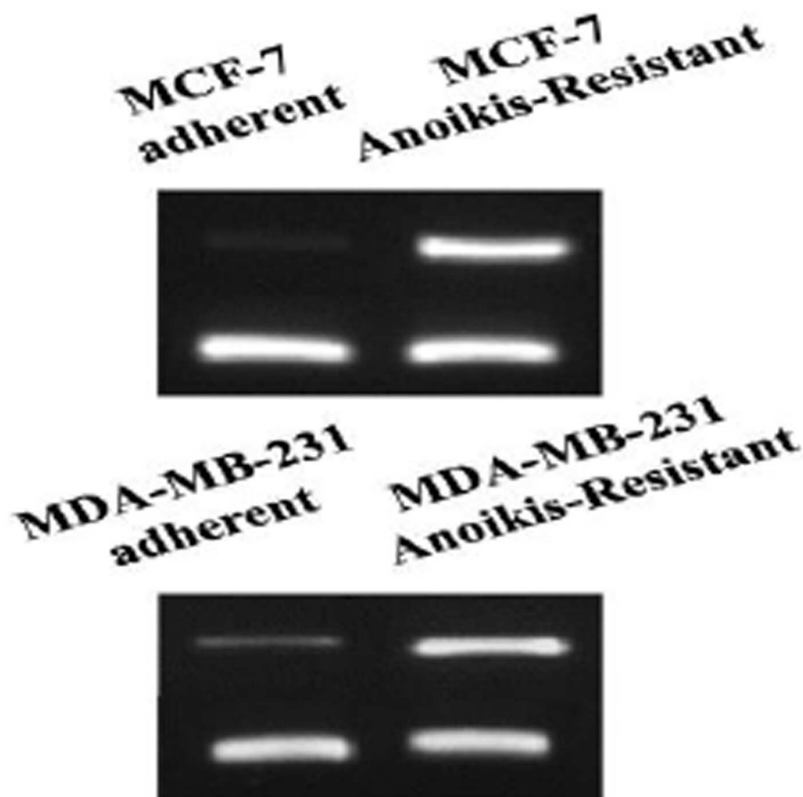
도면8



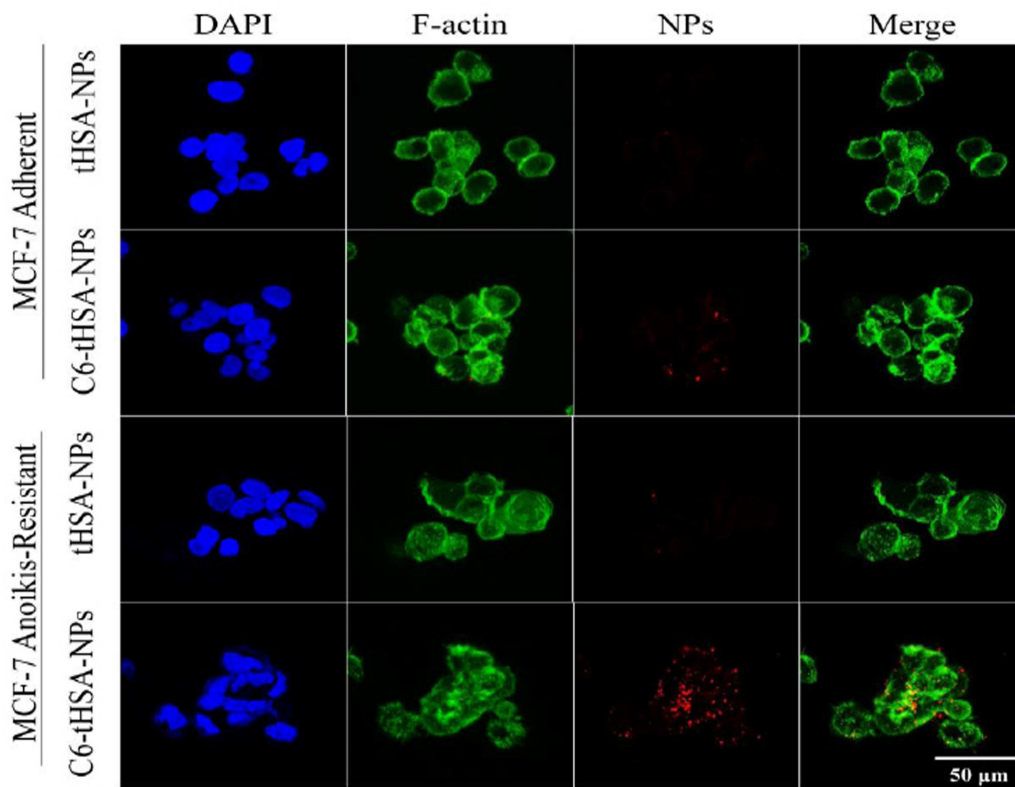
도면9



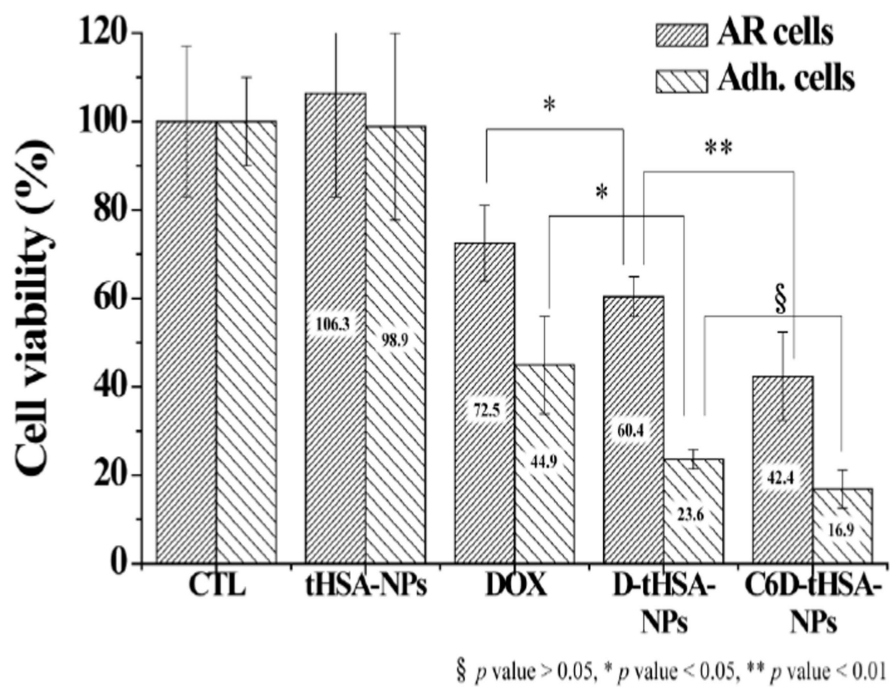
도면10



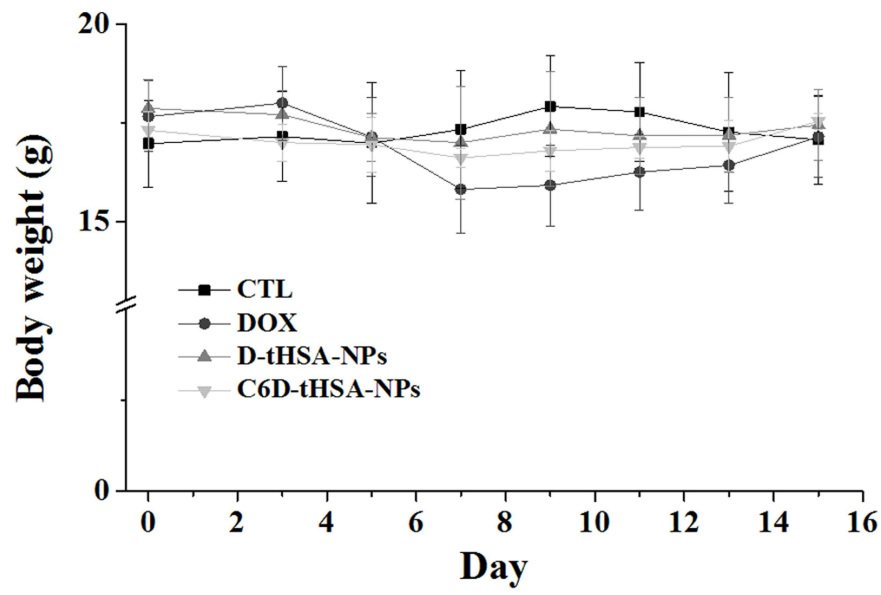
도면11



도면12



도면13



도면14



도면15

