



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0105819
(43) 공개일자 2021년08월27일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) A61K 47/62 (2017.01)
A61K 47/69 (2017.01) A61K 9/51 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
A61K 47/62 (2017.08)
- (21) 출원번호 10-2021-0018153
(22) 출원일자 2021년02월09일
심사청구일자 2021년02월09일
- (30) 우선권주장
1020200020537 2020년02월19일 대한민국(KR)

- (71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
- 한국과학기술원
대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)
- (72) 발명자
정규하
서울특별시 구로구 구로동로 148 고려대부속구로병원 신경외과 의국
- 페이 일 쏜
중국 510120 광저우 쑨원대학 쑨원기념병원 광둥성 중앙후생유전학 및 유전자규제학 연구실
- 이정설
경기도 용인시 처인구 남사면 처인성로 827번길 91-18
- (74) 대리인
특허법인 다해

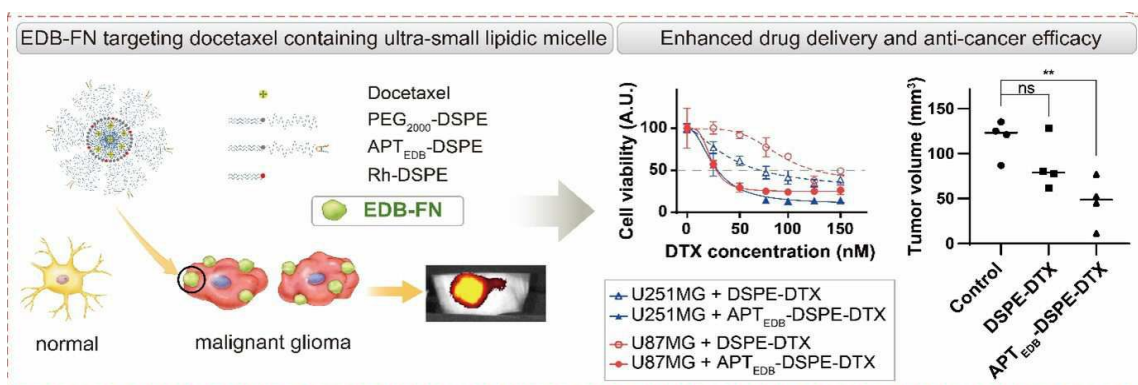
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 암 및/또는 뇌질환 바이오마커인 EDB-FN 및 이를 표적하는 나노약물전달체

(57) 요약

본 발명은 PEG₂₀₀₀-DSPE 중합지질 및 APT_{EDB}-PEG₂₀₀₀-DSPE 중합체를 포함하는 마이셀 구조의 약물전달체 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 상기 약물전달체는 뇌 종양(brain tumor)에서 과발현되는 섬유결합소 엑스트라도메인 B(extracell domain B of fibronectin, EDB-FN)를 표적하는 바, 뇌혈관장벽(BBB) 또는 뇌혈관 종양 장벽(BBTB)를 통과하여 뇌 종양 세포 특이적으로 약물을 전달할 수 있다. 또한, 본 발명은 약물이 로딩된 상기 약물전달체를 유효성분으로 포함하는 뇌 종양 진단 또는 치료용 약학적 조성물을 제공할 수 있으며, 상기 조성물은 뇌 종양 내부에 축적되고 종양 세포 내부로 흡입되어 특이적으로 종양 성장을 억제할 수 있는 바, 뇌 종양 진단 또는 치료에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도9



(52) CPC특허분류

A61K 47/6935 (2017.08)

A61K 9/5169 (2013.01)

G01N 33/57484 (2013.01)

G01N 2333/78 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711094752
과제번호	2019M3A9E2061791
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오. 의료기술개발(R&D)
연구과제명	난치성 뇌종양의 광-테라노시스 효율 증진을 위한 나노약물의 개발
기 여 율	25/100
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2019.06.01 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711107814
과제번호	2019M3A9E2061791
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오. 의료기술개발(R&D)
연구과제명	난치성 뇌종양의 광-테라노시스 효율 증진을 위한 나노약물의 개발
기 여 율	25/100
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2020.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711097054
과제번호	2019M3E5D1A01068993
부처명	다부처(과학기술정보통신부, 보건복지부)
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	혁신형의사과학자공동연구사업(R&D)(복지부, 과기정통부)
연구과제명	난치성 암 실시간 형광진단을 위한 능동표적 나노 약물 개발
기 여 율	15/100
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2019.07.01 ~ 2019.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711103537
과제번호	2019M3E5D1A01068993
부처명	다부처(과학기술정보통신부, 보건복지부)
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	혁신형의사과학자공동연구사업(R&D)(복지부, 과기정통부)
연구과제명	난치성 암 실시간 형광진단을 위한 능동표적 나노 약물 개발
기 여 율	15/100
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711106195
과제번호	2020R1C1C1010686
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단

연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	세포주 NGS-임상 빅데이터 융합 분석 및 설치류 동물모델을 이용한 악성뇌종양 치료
용 뇌질환치료제 약물스크리닝 및 유용성 검증	
기 여 율	10/100
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업	
과제고유번호	1345317025
과제번호	2017R1D1A1B03028979
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명	GEO 빅데이터와 환자검체에 기반한 악성뇌종양 특이 바이오마커 발굴 및 이를 이용
한 악성뇌종양 표적 광역동-나노약물의 개발	
기 여 율	2/100
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2020.05.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업	
과제고유번호	1345297415
과제번호	2017R1D1A1B03028979
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명	GEO 빅데이터와 환자검체에 기반한 악성뇌종양 특이 바이오마커 발굴 및 이를 이용
한 악성뇌종양 표적 광역동-나노약물의 개발	
기 여 율	3/100
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29
이 발명을 지원한 국가연구개발사업	
과제고유번호	1345275747
과제번호	2017R1D1A1B03028979
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명	GEO 빅데이터와 환자검체에 기반한 악성뇌종양 특이 바이오마커 발굴 및 이를 이용
한 악성뇌종양 표적 광역동-나노약물의 개발	
기 여 율	3/100
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2018.03.01 ~ 2019.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업	
과제고유번호	1345262968
과제번호	2017R1D1A1B03028979
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(교육부)
연구과제명	GEO 빅데이터와 환자검체에 기반한 악성뇌종양 특이 바이오마커 발굴 및 이를 이용
한 악성뇌종양 표적 광역동-나노약물의 개발	
기 여 율	2/100
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2017.06.01 ~ 2018.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

PEG₂₀₀₀-DSPE 중합지질 및 APT_{EDB}-PEG₂₀₀₀-DSPE 중합체를 포함하는 마이셀 구조의 약물전달체로서,

상기 APT_{EDB}는 섬유결합소 엑스트라도메인 B(extradomain B of fibronectin, EDB-FN) 유전자(Entrez Gene ID: 2335)에 특이적 결합력을 나타내는 앵타이드인, 약물전달체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 약물전달체는 PEG₂₀₀₀-DSPE 중합지질 100 중량부 기준으로 APT_{EDB}-PEG₂₀₀₀-DSPE 중합체를 1 내지 2.5 중량부 포함하는 것인, 약물전달체.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 약물전달체의 직경은 5.0 내지 12.0 nm이고,

zeta potential은 -8.0 내지 -11.0인,

약물전달체.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 약물전달체는 뇌혈관장벽(blood-brain barrier, BBB) 또는 뇌혈관 종양 장벽(blood-brain tumor barrier, BBTB)을 통과하여 뇌 종양 세포 특이적으로 약물을 전달하는 것인, 약물전달체.

청구항 5

약물이 로딩된 제1항의 약물전달체를 유효성분으로 포함하는 뇌 종양 진단 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 약물은 조영제 또는 항암제이고,

상기 항암제는 도세탁셀(Docetaxel), 할라벤(Halaven), 빈크리스틴(Vincristine), 시스플라틴(cisplatin), 빈블라스틴(Vinblastine), 비노렐빈(Vinorelbine), 파클리탁셀(Paclitaxel), 에토포사이드(Etoposide), 토포테칸(Topotecan), 이리노테칸(Irinotecan), 닥티노마이신(Dactinomycin), 독소루비신(Doxorubicin), 다우노루비신(Daunorubicin), 미토마이신(Mitomycin), 글리벡(gleevec), 카보플라틴(carboplatin), 발루비신(valrubicin), 플로타미드(flutamide), 겐시타빈(gemcitabine), 블레오마이신(Bleomycin), 테모졸로마이드(Temozolomide), 프로카바진(Procarbazine), 로무스틴(Lomustine, CCNU; 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea), 빈크리

스틴(Vincristine) 및 카르무스틴(Carmustine, BCNU)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 뇌 종양은 성상세포종(astrocytoma), 다형성교모세포종(glioblastoma multiforme), 뿔지신경교종(oligodendroglioma), 뿔지교성상세포종(oligoastrocytoma), 상의세포종(ependymoma), 수모세포종(medulloblastoma), 혈관모세포종(hemangioblastoma), 뇌수막종(meningioma), 뇌하수체선종(pituitary adenoma), 두개인두종(craniopharyngioma), 및 맥락총유두종(choroid plexus papilloma)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 8

(1) 시스테인 잔기를 포함하는 APT_{EDB} 및 Mal-PEG₂₀₀₀-DSPE를 유기용매에 1:2 몰비율로 혼합하고 중합반응을 유도하는 단계;

(2) 상기 (1) 단계의 혼합 용액에서 APT_{EDB}-PEG₂₀₀₀-DSPE 중합체를 수득하는 단계;

(3) 물, PBS, HBS 및 HBG로 이루어지는 군으로부터 1 종 이상 선택되는 용매에 상기 APT_{EDB}-PEG₂₀₀₀-DSPE 중합체와 PEG₂₀₀₀-DSPE 중합지질을 혼합하여 마이셀 구조체 형성을 유도하는 단계; 및

(4) 상기 (3) 단계의 혼합 용액을 여과하고 마이셀 구조체를 정제하는 단계;를 포함하는 뇌 종양 특이적 약물전달체의 제조방법으로서,

상기 (1) 단계의 APT_{EDB}는 섬유결합소 엑스트라도메인 B(extradomain B of fibronectin, EDB-FN) 유전자(Entrez Gene ID: 2335)에 특이적 결합력을 나타내는 앵타이드인, 제조방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 (1) 단계의 유기용매는 클로로포름, 다이메틸설폭사이드, 다이메틸포름아마이드, 에탄올, 메탄올, 테트라하이드로퓨란, 톨루엔, 자일렌 및 헥산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 뇌 종양 특이적 약물전달체의 제조방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 (1) 단계는 상온에서 12시간 동안 불활성 조건 유지하에 수행되는 것을 특징으로 하는, 뇌 종양 특이적 약물전달체의 제조방법.

청구항 11

제8항에 있어서,

상기 (2) 단계는 액체 크로마토그래피(liquid chromatography)를 이용하여 혼합 용액에서 APT_{EDB}-PEG₂₀₀₀-DSPE 중합체를 수득하는 것을 특징으로 하는, 뇌 종양 특이적 약물전달체의 제조방법.

청구항 12

제8항에 있어서,

상기 (3) 단계는 APT_{EDB}-PEG₂₀₀₀-DSPE 중합체와 PEG₂₀₀₀-DSPE 중합지질을 용매에 혼합하고 음과 과쇄를 수행하여 수화시켜 마이셀 구조체 형성을 유도하는 것을 특징으로 하는, 뇌 종양 특이적 약물전달체의 제조방법.

청구항 13

제8항에 있어서,

상기 (4) 단계는 0.025~0.1 μm membrane으로 혼합 용액을 여과하고, 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)를 통해 마이셀 구조체를 정제하는 것을 특징으로 하는, 뇌 종양 특이적 약물전달체의 제조방법.

청구항 14

제8항에 있어서,

상기 뇌 종양은 성상세포종(astrocytoma), 다형성교모세포종(glioblastoma multiforme), 뿔지신경교종(oligodendroglioma), 뿔지교성상세포종(oligoastrocytoma), 상의세포종(ependymoma), 수모세포종(medulloblastoma), 혈관모세포종(hemangioblastoma), 뇌수막종(meningioma), 뇌하수체선종(pituitary adenoma), 두개인두종(craniopharyngioma), 및 맥락총유두종(choroid plexus papilloma)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 뇌 종양 특이적 약물 전달체의 제조방법.

청구항 15

제8항의 방법으로 제조된 뇌 종양 특이적 약물전달체로서,

상기 약물 전달체는 5.0 내지 12.0 nm 직경을 갖고, -8.0 내지 -11.0의 zeta potential인 마이셀 구조체인 것을 특징으로 하는, 약물전달체.

청구항 16

제8항의 (1) 내지 (4) 단계를 포함하되,

상기 (3) 단계는 APT_{EDB}-PEG₂₀₀₀-DSPE 중합체 및 PEG₂₀₀₀-DSPE 중합지질이 용해된 용액에 항암제를 추가로 혼합하여 마이셀 구조체 형성을 유도하는 것인, 뇌 종양 치료용 약제의 제조방법.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 항암제를 최종 농도가 50 mg/mL가 되도록 혼합하는 것을 특징으로 하는, 뇌 종양 치료용 약제의 제조방법.

청구항 18

제16항에 있어서,

상기 항암제는 도세탁셀(Docetaxel), 할라벤(Halaven), 빈크리스틴(Vincristine), 시스플라틴(cisplatin), 빈

블라스틴(Vinblastine), 비노렐빈(Vinorelbine), 파클리탁셀(Paclitaxel), 에토포사이드(Etoposide), 토폠테칸(Topotecan), 이리노테칸(Irinotecan), 닥티노마이신(Dactinomycin), 독소루비신(Doxorubicin), 다우노루비신(Daunorubicin), 미토마이신(Mitomycin), 글리벡(gleevec), 카보플라틴(carboplatin), 발루비신(valrubicin), 플로타미드(flutamide), 젬시타빈(gemcitabine), 블레오마이신(Bleomycin), 테모졸로마이드(Temozolomide), 프로카바진(Procarbazine), 로무스틴(Lomustine, CCNU; 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea), 빈크리스틴(Vincristine) 및 카르무스틴(Carmustine, BCNU)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 뇌 종양 치료용 약제의 제조방법.

청구항 19

제16항의 방법으로 제조된 뇌 종양 치료용 약제로서,

상기 약제는 뇌혈관장벽(blood-brain barrier, BBB) 또는 뇌혈관 종양 장벽(blood-brain tumor barrier, BBTB)을 통과하여 뇌 종양(brain tumor) 내부에 축적되고 종양 세포 내부로 함입되는 것을 특징으로 하는, 약제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 뇌 종양(brain tumor)에서 과발현되는 섬유결합소 엑스트라도메인 B(extradomain B of fibronectin, EDB-FN)를 표적으로 하는 나노약물전달체 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 악성 뇌교종(malignant glioma, MG)은 적극적인 치료에도 낫기 어려운 무서운 종양 중 하나이다. 다형성교모세포종(glioblastoma multiforme, GBM)은 가장 악성이고 흔한 신경교종(glioma)으로서, 외과적 및 내과적 치료에도 생존 기간의 평균값이 2년 이하이다. 악성 뇌교종은 빠르게 증식하며, 침습성이 높을 뿐 아니라, 뇌혈관 장벽(blood-brain barrier)과의 세포 이질성(cellular heterogeneity) 및 뇌혈관 종양 장벽(blood-brain tumor barrier, BBTB)에 의해 치료가 어렵다. 상기 한계를 극복하기 위해, 뇌 종양 분류에 대한 분자적, 유전적 연구가 더욱 중요한 실정이다. 이는 병리학적 분류에 분자생물학을 접목하고, 진단적, 치료적 전략을 개선하는데 영향을 주었다.

[0004] 현재 이용되는 대표적인 표현형-유전자형 진단 마커는 다음과 같다: O^6 -methylguanine-deoxyribonucleic acid (DNA) methyltransferase promoter (MGMT) methylation, isocitrate dehydrogenase-1 (IDH-1) mutation, 및 chromosomal 1p/19q deletion. 상기 마커들을 평가하는 것은 환자 개개인에 맞는 치료를 제안하고 예후를 예측하는데 큰 영향을 미친다. 또한, alpha-thalassemia/mental retardation syndrome X-linked 및 telomerase reverse transcriptase promoter mutations와 같은 많은 다른 바이오마커들은 아직 검증 중이며, 상기 마커들의 유효성은 활발히 입증되고 있다. 그러나, 지금까지 대부분 바이오마커들은 악성 뇌교종에서 평가 및 입증되어 치료제로 발전하지 못하는 실정이다. 따라서, 효과적인 진단 및 치료를 제공할 수 있는 바이오마커 발굴이 여전히 필요하다.

[0005] 섬유결합소(fibronectin)는 세포외 기질(extracellular matrix) 및 원형질 막(plasma membrane)에서 주로 발견되는 당단백질(glycoprotein)이다. 이는 인테그린, 콜라겐, 및 피브린과 같은 다양한 세포외 기질 단백질에 결합하면서 세포 이동 및 부착(cell migration and adhesion)을 조절한다. 섬유결합소 단량체는 반복되는 유닛에 따라 세 가지 유형(type I, II 및 III)으로 분류된다. 섬유결합소 유전자의 세 영역에서 제조된 선택적 스플라이싱 도메인(alternative splicing domain)은 일정한 스플라이싱 패턴을 가진다. 생성된 동형 단백질(isoform)은 type III 반복 유닛에 위치한 스플라이싱 부위에 따라 명명된다: 섬유결합소의 엑스트라도메인 A(extra-domain A, EDA-FN), 엑스트라도메인 B(extra-domain B, EDB-FN), 및 type III 연결 부분(type III connecting segment, IIICS-FN). EDB-FN은 종양태아성 항원(oncofetal antigen)이다. EDB-FN은 비소세포폐암(non small cell lung carcinoma), 호지킨 림프종(Hodgkin lymphoma), 및 전립선암(prostate cancer)과 같은 다양한 인간 암에서 과발현된다. 또한, EDB-FN은 두경부암(head and neck cancer)의 신혈관생성 마커로 활용된다. 뇌에서 섬유결합소의 역할에도 불구하고, EDB-FN은 환자의 주요 다형성교모세포종을 진단하기 위한 추적 도구로 활용될

수 있음은 물론, 설치류 모델에서 다형성교모세포종 치료 및 신경교종 방사면역치료(radioimmunotherapy)의 신규 표적(target)으로 제안되었다. EDB-FN에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있음에도 불구하고, EDB-FN의 역할은 여전히 밝혀지지 않았다.

[0006] 종래에 모든 주요 기관의 암에서 EDB-FN 발현 수준을 비교하는 연구는 수행된 바 없으며, 생물정보학 데이터세트를 이용하여 EDB-FN 발현을 통한 예후 예측을 포함하는 연구는 아직 수행되지 않았다.

[0007] 종래에 EDB-FN을 표적하는 특이적인 크기가 34 nm 크기 무기물 초상자석 산화철 나노입자(superparamagnetic iron oxide nanoparticles, SPIONs) 나노약물전달체 또는 115 ± 13 nm 크기 리포솜 구조의 약물전달체에 관한 연구가 수행되었으나, 12 nm 이상 크기 나노약물전달체의 경우 뇌혈관 장벽 및 뇌혈관 종양 장벽의 한계에 부딪혀 전임상에서부터 약물전달에 한계를 보인 결과가 보고된 바 있다. 따라서, 본 발명자들은 악성 뇌교종에 대한 잠재적인 진단 바이오마커로서 EDB-FN를 연구하고, 이를 표적하는 12 nm 이하 크기를 가진 마이셀 구조의 나노약물 전달체를 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) KR 10-1554564

비특허문헌

[0010] (비특허문헌 0001) Chong K, Ku T, Saw PE, Jon S, Park JH, Choi C. Enhancement of the photocytotoxic efficiency of sub-12 nm therapeutic polymeric micelles with increased co-localisation in mitochondria. Chem Commun (Camb). 2013; 49: 11476-8.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 PEG₂₀₀₀-DSPE 중합지질 및 APT_{EDB}-PEG₂₀₀₀-DSPE 중합체를 포함하는 마이셀 구조의 약물전달체를 제공하는 것으로서, 상기 APT_{EDB}는 섬유결합소 엑스트라도메인 B(extradomain B of fibronectin, EDB-FN) 유전자(FN1, Entrez Gene ID: 2335)에 특이적 결합력을 나타내는 앵타이드이다.

[0012] 또한, 본 발명의 다른 목적은 약물이 로딩된 상기 약물전달체를 유효성분으로 포함하는 뇌 종양 진단 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 또한, 본 발명의 다른 목적은 하기 단계를 포함하는 뇌 종양 특이적 약물전달체의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0014] (1) 시스테인 잔기를 포함하는 APT_{EDB} 및 Mal-PEG₂₀₀₀-DSPE를 유기용매에 1:2 몰비율로 혼합하고 중합반응을 유도하는 단계;

[0015] (2) 상기 (1) 단계의 혼합 용액에서 APT_{EDB}-PEG₂₀₀₀-DSPE 중합체를 수득하는 단계;

[0016] (3) 물, PBS, HBS 및 HBG로 이루어지는 군으로부터 1 종 이상 선택되는 용매에 상기 APT_{EDB}-PEG₂₀₀₀-DSPE 중합체와 PEG₂₀₀₀-DSPE 중합지질을 혼합하여 마이셀 구조체 형성을 유도하는 단계; 및

[0017] (4) 상기 (3) 단계의 혼합 용액을 여과하고 마이셀 구조체를 정제하는 단계.

[0018] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 (1) 내지 (4) 단계를 포함하되, 상기 (3) 단계는 APT_{EDB}-PEG₂₀₀₀-DSPE 중합체 및 PEG₂₀₀₀-DSPE 중합지질이 용해된 용액에 항암제를 추가로 혼합하여 마이셀 구조체 형성을 유도하는 것인, 뇌 종양 치료용 약제의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0019] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0021] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 PEG₂₀₀₀-DSPE 중합지질 및 APT_{EDB}-PEG₂₀₀₀-DSPE 중합체를 포함하는 마이셀 구조의 약물전달체를 제공한다.

[0022] 본 발명의 일 구현 예로서, 상기 APT_{EDB}는 섬유결합소 엑스트라도메인 B(extradomain B of fibronectin, EDB-FN) 유전자(FN1, Entrez Gene ID: 2335)에 특이적 결합력을 나타내는 앵타이드이다.

[0023] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 약물전달체는 PEG₂₀₀₀-DSPE 중합지질 100 중량부 기준으로 APT_{EDB}-PEG₂₀₀₀-DSPE 중합체를 1 내지 2.5 중량부 포함하는 것일 수 있다.

[0024] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 약물전달체의 직경은 5.0 내지 12.0 nm이고, zeta potential은 -8.0 내지 -11.0일 수 있다.

[0025] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 약물전달체는 뇌혈관장벽(blood-brain barrier, BBB) 또는 뇌혈관 종양 장벽(blood-brain tumor barrier, BBTB)을 통과하여 뇌 종양 세포 특이적으로 약물을 전달하는 것일 수 있다.

[0027] 또한, 본 발명은 약물이 로딩된 상기 약물전달체를 유효성분으로 포함하는 뇌 종양 진단 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0028] 또한, 본 발명은 약물이 로딩된 상기 약물전달체를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 뇌 종양 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0029] 또한, 본 발명은 뇌종양 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한 상기 약물이 로딩된 약물전달체의 용도를 제공한다.

[0030] 또한, 본 발명은 약물이 로딩된 상기 약물전달체를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 뇌 종양의 진단 방법을 제공한다.

[0031] 또한, 본 발명은 뇌 종양의 진단용 약제의 제조를 위한 상기 약물이 로딩된 약물전달체의 용도를 제공한다.

[0032] 본 발명의 일 구현 예로서, 상기 약물은 조영제 또는 항암제이고, 상기 항암제는 도세탁셀(Docetaxel), 할라벤(Halaven), 빈크리스틴(Vincristine), 시스플라틴(cisplatin), 빈블라스틴(Vinblastine), 비노렐빈(Vinorelbine), 파클리탁셀(Paclitaxel), 에토포사이드(Etoposide), 토포테칸(Topotecan), 이리노테칸(Irinotecan), 닥티노마이신(Dactinomycin), 독소루비신(Doxorubicin), 다우노루비신(Daunorubicin), 미토마이신(Mitomycin), 글리벡(gleevec), 카보플라틴(carboplatin), 발루비신(valrubicin), 플루타미드(flutamide), 겐시타빈(gemcitabine), 블레오마이신(Bleomycin), 테모졸로마이드(Temozolomide), 프로카바진(Procarbazine), 로무스틴(Lomustine, CCNU; 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea), 빈크리스틴(Vincristine) 또는 카르무스틴(Carmustine, BCNU) 등으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0033] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 뇌 종양은 성상세포종(astrocytoma), 다형성교모세포종(glioblastoma multiforme), 뿔지신경교종(oligodendroglioma), 뿔지교성상세포종(oligoastrocytoma), 상의세포종(ependymoma), 수모세포종(medulloblastoma), 혈관모세포종(hemangioblastoma), 뇌수막종(meningioma), 뇌하수체선종(pituitary adenoma), 두개인두종(craniopharyngioma), 및 맥락총유두종(choroid plexus papilloma)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0036] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 뇌 종양 특이적 약물전달체의 제조방법을 제공한다.

[0037] (1) 시스테인 잔기를 포함하는 APT_{EDB} 및 Mal-PEG₂₀₀₀-DSPE를 유기용매에 1:2 몰비율로 혼합하고 중합반응을 유도

하는 단계;

[0038] (2) 상기 (1) 단계의 혼합 용액에서 APT_{EDB} -PEG₂₀₀₀-DSPE 중합체를 수득하는 단계;

[0039] (3) 물, PBS, HBS 및 HBG로 이루어지는 군으로부터 1 종 이상 선택되는 용매에 상기 APT_{EDB} -PEG₂₀₀₀-DSPE 중합체와 PEG₂₀₀₀-DSPE 중합지질을 혼합하여 마이셀 구조체 형성을 유도하는 단계; 및

[0040] (4) 상기 (3) 단계의 혼합 용액을 여과하고 마이셀 구조체를 정제하는 단계.

[0041] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 (1) 단계의 유기용매는 클로로포름, 다이메틸설폭사이드, 다이메틸포름아마이드, 에탄올, 메탄올, 테트라하이드로퓨란, 톨루엔, 자일렌 및 헥산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0042] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 (1) 단계는 상온에서 12시간 동안 불활성 조건 유지하에 수행되는 것일 수 있다.

[0043] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 (2) 단계는 액체 크로마토그래피(liquid chromatography)를 이용하여 혼합 용액에서 APT_{EDB} -PEG₂₀₀₀-DSPE 중합체를 수득하는 것일 수 있다.

[0044] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 (3) 단계는 APT_{EDB} -PEG₂₀₀₀-DSPE 중합체와 PEG₂₀₀₀-DSPE 중합지질을 용매에 혼합하고 음과 과제를 수행하여 수화시켜 마이셀 구조체 형성을 유도하는 것일 수 있다.

[0045] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 (4) 단계는 0.0025~0.1 μ m membrane으로 혼합 용액을 여과하고, 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)를 통해 마이셀 구조체를 정제하는 것일 수 있다. 상기 membrane은 바람직하게는 0.1 μ m membrane일 수 있다.

[0047] 또한, 본 발명은 상기 제조방법으로 제조된 뇌 종양 특이적 약물전달체로서, 5.0 내지 12.0 nm 직경을 갖고, -8.0 내지 -11.0의 zeta potential인 마이셀 구조체인 것을 특징으로 하는, 약물전달체를 제공한다.

[0049] 또한, 본 발명은 상기 제조방법의 (1) 내지 (4) 단계를 포함하되, 상기 (3) 단계는 APT_{EDB} -PEG₂₀₀₀-DSPE 중합체 및 PEG₂₀₀₀-DSPE 중합지질이 용해된 용액에 항암제를 추가로 혼합하여 마이셀 구조체 형성을 유도하는 것인, 뇌 종양 치료용 약제의 제조방법을 제공한다.

[0050] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 항암제를 최종 농도가 50 mg/mL가 되도록 혼합하는 것일 수 있다.

[0051] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 약제는 뇌혈관장벽(blood-brain barrier, BBB) 또는 뇌혈관 종양 장벽(blood-brain tumor barrier, BBTB)을 통과하여 뇌 종양(brain tumor) 내부에 축적되고 종양 세포 내부로 함입되는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0053] 본 발명은 PEG₂₀₀₀-DSPE 중합지질 및 APT_{EDB} -PEG₂₀₀₀-DSPE 중합체를 포함하는 마이셀 구조의 약물전달체 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 상기 약물전달체는 뇌 종양(brain tumor)에서 과발현되는 섬유결합소 엑스트라도메인 B(extracellular domain of fibronectin, EDB-FN)를 표적하는 바, 뇌혈관장벽(BBB) 또는 뇌혈관 종양 장벽(BBTB)를 통과하여 뇌 종양 세포 특이적으로 약물을 전달할 수 있다. 또한, 본 발명은 약물이 로딩된 상기 약물전달체를 유효성분으로 포함하는 뇌 종양 진단 또는 치료용 약학적 조성물을 제공할 수 있으며, 상기 조성물은 뇌 종양 내부에 축적되고 종양 세포 내부로 함입되어 특이적으로 종양 성장을 억제할 수 있는 바, 뇌 종양 진단 또는 치료에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0055]

도 1는 EDB-FN의 발현을 입증하기 위해, 악성 뇌교종 세포에서 EDB-FN의 과발현을 나타낸 것이다. (A)는 다양한 암 세포주의 2D 배양에서 EDB-FN 발현 패턴을 나타낸 것이다(크기 바 = 100 μm). 초록은 EDB-FN를 가리키고; 파랑은 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)를 가리킨다. (B)는 다양한 암의 2D 배양된 세포로부터 총 RNA를 추출한 후, 정량적인 실시간 PCR(qRT-PCR)을 이용하여 EDB-FN mRNA 발현 분석을 수행한 결과를 나타낸 것이다. $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 가 사용되었고, 글리세르알데하이드 3-인산 탈수소효소(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)를 내부 대조군으로 설정하였다. 3D 배양에서 면역 형광 염색을 통해 EDB-FN 발현 패턴을 확인하였다(크기 바 = 200 μm). (C)는 피하 이식된 암 조직을 나타낸 것이다(크기 바 = 100 μm). (D)는 악성 뇌교종 세포주를 나타낸 것이다. (E)는 U373MG 세포(2D 단일층 배양) 또는 U87MG 세포(2D 단일층 배양, 3D 회전 타원체 배양, 및 피하 종양 조직)로부터 추출한 총 RNA를 이용하여 qRT-PCR 분석을 수행한 결과이다. 통계학적 분석: Welch's t test. $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$, ns: 통계학적으로 유의하지 않음. 상기 결과는 4중성 결정(quadruplet determinations)의 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. EDB-FN: 섬유결합소 엑스트라도메인 B; MG: 악성 뇌교종.

도 2는 합성 APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS의 특성 분석을 나타낸 것이다. (A)는 Mal-PEG₂₀₀₀-DSPE과 cysteinylated APT_{EDB}를 이용한 합성 방법 및 도세탁셀(docetaxel)로 캡슐화한 APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS(APT_{EDB}-DSPE-DTX) 대표적인 체제를 나타낸 것이다. (B)는 PEG₂₀₀₀-DSPE 마이셀 나노-DDS (APT_{EDB}-unconjugated)과 APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDSs (APT_{EDB}-conjugated)의 동적광산란(DLS) 크기 측정을 나타낸 것이며, 양 나노입자는 12 nm보다 작았다(3 replicates per group). (C)는 모든 나노입자 체제가 음의 zeta potential을 가진다는 점을 나타낸 것이다. APT_{EDB}-DSPE 농도가 증가함에 따라, 나노-DDS의 zeta potential은 더욱 음의 방향이 된다. 통계학적 분석: Welch's t test. $*p < 0.05$, ns: 통계학적으로 유의하지 않음. 상기 결과는 4중성 결정(quadruplet determinations)의 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. DMSO: dimethyl sulfoxide; PEG₂₀₀₀-DSPE: polyethylene glycol (2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (ammonium salt); Rh-DSPE: DSPE-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl) (ammonium salt).

도 3은 EDB-FN 발현에 의한 APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS의 *In vitro* 세포흡수를 나타낸 것이다. PEG₂₀₀₀-DSPE 및 APT_{EDB}-DSPE의 흡수 실험 및 경쟁 분석은 (A) EDB-FN 과발현 세포(U87MG and U251) 및 (B) 저발현 세포(MCF7 및 B16F1)에서 수행하였다. Phosphate buffered saline을 대조군으로 비교하였다. PEG₂₀₀₀-DSPE, 및 APT_{EDB}-DSPE는 APT_{EDB} 처리하거나 처리하지 않고 세포주에 첨가되었으며 로다민 B-표지된 마이셀 DDS의 흡수(빨강)를 공초점 현미경으로 확인하였다(크기 바= 100 μm). APT_{EDB}: EDB-FN-특이적 아타머 유사 펩타이드(aptide); APT_{EDB}-DSPE: APT_{EDB}-conjugated PEG₂₀₀₀-DSPE; PEG₂₀₀₀-DSPE: polyethylene glycol (2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine.

도 4는 APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS의 *In vitro* EDB-FN- 및 시간-의존적 세포 흡수를 나타낸 것이다. (A)는 qRT-PCR을 통해 siRNA-매개 EDB-FN 녹다운을 확인한 것이다. 내부 대조군으로 GAPDH 발현을 사용하였다. 통계학적 분석: Welch's t test. $**p < 0.01$. 상기 결과는 삼중성 결정(triplicate determinations)의 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. (B)는 EDB-FN 발현에 따른 APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS의 세포 흡수를 나타낸 것이다. 염색 이미지상 siRNA 형질주입된 U87 세포에서 EDB-FN (초록), 로다민 B-표지된 APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS (빨강), 및 nuclei (파랑)를 나타낸다. 크기 바 = 100 μm . (C)는 U87MG 세포에서 APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS의 시간-의존적 세포 흡수를 나타낸 것이다. 빨강: 로다민 B-표지된 APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS, 파랑: DAPI, 크기 바 = 100 μm . NP: 나노입자.

도 5는 APT_{EDB}-DSPE 및 APT_{EDB}-DSPE-DTX 마이셀 나노-DDS의 *In vitro* 세포 흡수 및 세포 독성을 나타낸 것이다. (A)는 악성 뇌교종에서 APT_{EDB}-DSPE의 농도에 따른 로다민 B fluorophore-표지된 나노-DDSs의 세포 흡수를 나타낸 것이다(왼쪽). 빨강: 나노-DDSs, 파랑: DAPI, 크기 바 = 100 μm . ImageJ를 통해 APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS 세포 흡수의 수량화 분석(Quantification analysis)을 나타낸 것이다(오른쪽). 형광 강도는 각 세포주의 DAPI 신호로 정규화하였다(4중성 결정(quadruplet determinations)). (B)는 U251MG 및 U87MG 세포에서 DSPE-DTX 및 APT_{EDB}-DSPE-DTX의 *In vitro* 세포독성을 나타낸 것이다. 나노-DDS 하 0.D. 값을 PBS 처리 하 0.D. 값으

로 나눔으로써(DSPE-DTX의 경우 7 replicates, APT_{EDB}-DSPE-DTX의 경우 6 replicates) Y축의 % 세포 생존능을 계산하였다. (C)는 치료하는데 사용한 나노입자의 종류에 따라 계산한(DSPE-DTX의 경우 7 replicates, APT_{EDB}-DSPE-DTX의 경우 6 replicates) U87MG 및 U251MG 세포에서 IC₅₀ 값을 나타낸 것이다. 통계학적 분석 : Welch's *t* test. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, *****p* < 0.0001, ns: 통계학적으로 유의하지 않음. 상기 결과는 평균 ± 표준편차로 나타내었다. A.U: arbitrary unit. APT_{EDB}-DSPE: APT_{EDB}-conjugated PEG₂₀₀₀-DSPE; APT_{EDB}-DSPE-DTX: DTX-loaded APT_{EDB}-DSPE micellar nano-DDS; DSPE-DTX: DTX-loaded PEG₂₀₀₀-DSPE micellar nano-DDS; DTX: docetaxel; PEG₂₀₀₀-DSPE: polyethylene glycol (2000)-DSPE (ammonium salt).

도 6은 U87MG 피하 이종이식 마우스 모델에서 APT_{EDB}-DSPE-DTX의 *in vivo* 흡수 및 항암 효능을 나타낸 것이다. (A)는 U87MG 이종이식 종양 보유 설치류 모델에서(n = 3 mice per group) PEG₂₀₀₀-DSPE 마이셀 나노-DDS 및 APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS 흡수의 IVIS 로다민 B 실시간 이미지를 나타낸 것이다. 크기 바 = 10 mm. (B)는 약물 치료에 따른 U87MG 이종이식 종양 성장 곡선을 나타낸 것이다. 마우스에서 종양 크기를 3 일마다 측정하였다(n = 4 mice per group). 빨강 화살표는 drug IV infusion schedule을 나타낸 것이다. (C)는 마이셀 나노-DDS의 항암 효과를 나타낸 것이다. DSPE-DTX, APT_{EDB}-DSPE-DTX, 또는 염분(saline) 처리에 따른 종양 크기 변화를 나타냈으며, 염분은 음성 대조군으로 비교하였다(n = 4 mice per group). (D)는 이종이식 모델로부터 절개한 종양의 대표적인 이미지를 나타낸 것이다. 약물 처리한 마우스를 각각 7, 10, 14, 및 17 일째에 희생하였다(n = 1 mouse per group). 크기 바 = 10 mm. U87MG 피하 이종이식 마우스 모델에서, (E)는 동소 모델의 실험 스케줄을 나타낸 것이고, (F)는 악성 뇌 종양에서 마이셀 나노-DDS의 저해 효과를 나타낸 것이다(n = 4 per group). 각 검체에서 가장 큰 종양 부위의 뇌 슬라이스를 선별하고 분석하였다. (G)는 뇌 종양 크기의 비교를 나타낸 대표적인 이미지이다. 마우스 뇌는 20 μm의 두께로 절단하였고, 뇌 종양은 H&E 염색으로 나타내었다. 크기 바 = 1 mm. 통계학적 분석 : Welch's *t* test. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, *****p* < 0.0001, ns: 통계학적으로 유의하지 않음. 상기 결과는 평균 ± 표준편차로 나타내었다. APT_{EDB}-DSPE-DTX: docetaxel-loaded APT_{EDB}-DSPE micellar nano-DDS; DDS: drug delivery system; DSPE-DTX: docetaxel-loaded PEG₂₀₀₀-DSPE micellar nano-DDS; DTX: docetaxel; nano DDS Tx: nano drug delivery system treatment.

도 7은 APT_{EDB}-DSPE-DTX의 *in vivo* 생체적합성을 나타낸 것이다. (A)는 APT_{EDB}-DSPE-DTX의 암 표적 능력을 나타낸 것이다. 각 U87MG 옆구리 이종이식 마우스에(n = 3 mice per group) PEG₂₀₀₀-DSPE 마이셀 나노-DDS 또는 APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS를 주입하였고, 미리 지정된 시간(6, 12, 24, 및 48 시간)에, IVIS *in vivo* 이미징 시스템을 이용하여 로다민 B-표지된 마이셀의 종양 흡수를 비교하였다. 크기 바 = 1 cm. (B)는 정상 주요 기관에 미치는 마이셀 나노-DDS의 최소 독성을 나타낸 것이다. 실험 마지막에(day 17, 종양 부피가 80-120 mm³ 일 때), U87MG 옆구리 이종이식 모델로부터 심장, 간, 비장, 폐, 및 신장을 추출하였고, H&E 염색을 수행하였다. 크기 바 = 100 μm. (C)는 U87MG 피하 이종이식 모델에서(왼쪽, n = 3 mice per group), 마우스 체중에 미치는 마이셀 나노-DDS의 최소 독성을 나타낸 것이다. 실험에서, 마우스의 체중을 매일 측정했으며, 마우스의 초기 및 최종 체중을 그래프로 나타내었다. 통계학적 분석 : Welch's *t* test. **p* < 0.05. 상기 결과는 평균 ± 표준편차로 나타내었다. APT_{EDB}-DSPE-DTX: docetaxel-loaded APT_{EDB}-DSPE micellar nano-DDS; DSPE-DTX: docetaxel-loaded PEG₂₀₀₀-DSPE micellar nano-DDS.

도 8은 동소 이종이식 모델에서 EDB-FN 발현을 나타낸 것이다. 보다 구체적으로 동소 이종이식된 뇌 종양에서 EDB-FN의 발현을 나타낸 것이다. 모델 마우스에 염분(대조군), DSPE-DTX, 또는 APT_{EDB}-DSPE-DTX 마이셀 나노-DDS를 2 주간 주입하였다. 마우스 뇌는 20 μm의 두께로 절개하였다. (A)는 EDB-FN (초록) 및 Nuclei (파랑)으로 IHC 이미지를 나타내었다. 크기 바 = 1 mm. (B)는 종양 부위의 확대 이미지를 나타낸 것이다. 크기 바 = 100 μm. APT_{EDB}-DSPE-DTX: docetaxel-loaded APT_{EDB}-DSPE micellar nano-DDS; DSPE-DTX: docetaxel-loaded PEG₂₀₀₀-DSPE micellar nano-DDS.

도 9는 EDB-FN의 잠재적 바이오마커로서 임상적 중요성 및 악성 뇌교종의 표적 리간드로서 실현가능성을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0056] 본 발명자들은 뇌 종양(brain tumor)에서 과발현되는 섬유결합소 엑스트라도메인 B(extradomain B of fibronectin, EDB-FN)에 대해 예의 연구한 결과, EDB-FN을 표적하는 나노약물전달체를 개발하여 본 발명을 완성하였다.

[0057] 보다 구체적으로, 중합지질인 PEG₂₀₀₀-DSPE로 형성된 마이셀 나노 제제보다 APT_{EDB} : PEG₂₀₀₀-DSPE = 1:2로 포함하는 APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노 제제가 EDB-FN 친화력이 높아 뇌 종양에서 세포 흡수율이 더 높으며, 종양 내에 많이 축적될 수 있다는 점, 상기 나노 제제가 12 nm 이하로서 뇌혈관 종양 장벽을 용이하게 투과할 수 있다는 점, 상기 나노제제를 포함하는 나노약물전달체는 종양 억제 효과가 높고 정상 조직 및 다른 기관에 영향을 미치지 않아 항암 효능이 높은 것을 확인하였다.

[0059] 본 발명에서, 용어 "애타이드(aptide)"는 표적에 대한 친화도는 유지하면서 안정성이 개선된 애타머 유사 펩타이드(aptamer-like peptide)를 의미한다. 상기 애타이드는 환형의 β-헤어핀 기반의 펩타이드 바인더로 구성된 스캐폴드와 상기 스캐폴드의 양 말단에 n개의 아미노산이 포함되는 구성으로, 이는 특정 생물학적 표적과 결합할 수 있다. 애타이드는 다양한 라이브러리 구축이 가능한 표적 결합 부위(target-binding region)를 포함할 수 있다. 상기 애타이드는 L-아미노산 및 D-아미노산으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산으로 구성될 수 있다. 상기 용어, "안정성"은 애타이드의 물리적, 화학적 및 생물학적 안정성을 포함할 수 있고, 구체적으로는 생물학적 안정성을 의미할 수 있다. 즉, 생물학적으로 안정한 애타이드는 생체 내에서 단백질 분해효소의 작용에 대한 내성을 가질 수 있다.

[0060] 본 발명에 따른 애타이드는 EDB-FN 유전자(Entrez Gene ID: 2335)에 특이적으로 결합하는 애타이드이고, 구체적으로 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성될 수 있다. 상기 아미노산 서열은 리신(K)에 시스테인(C) 잔기가 붙어있는 것을 특징으로 할 수 있다(도 2A). 상기 EDB-FN에 대한 애타이드는 3 kDa의 크기로 안정적이며, EDB-FN에 대해 < 100 nm의 높은 친화도로 결합할 수 있다.

표 1

[0061]	APT _{EDB} 아미노산 서열	N'-CSSPIQGSWTWENGK(C)WTWGIIRLEQ-C'	서열번호 1
--------	----------------------------	------------------------------------	--------

[0063] 상기 애타이드는 본 발명에 따른 애타이드의 구조 및 활성에 영향을 미치지 않는 범위 내에서 아미노산 잔기의 결실, 삽입, 치환 또는 이들의 조합에 의해 상이한 서열을 갖는 애타이드의 변이체 또는 단편일 수 있다. 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 또는 펩타이드에서의 아미노산 교환은 통상의 기술분야에 공지되어 있다. 경우에 따라서는 인산화, 황화, 아크릴화, 당화, 메틸화, 파네실화 등으로 수식될 수 있다. 상기 애타이드는 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열과 70, 80, 85, 90, 95 또는 98%의 상동성을 가질 수 있다.

[0065] 본 발명에서, 용어 "약물전달체"는 표적 세포, 조직, 또는 기관에 활성 성분(예를 들어, 약물)과 화학적 또는 물리적으로 결합된 복합체로서, 상기 활성 성분을 운반 및 전달하기에 적합한 담체 또는 비히클을 의미한다. 상기 화학적 결합은 화학반응을 통한 화학결합을 의미하고, 물리적인 결합은 흡착(adsorption), 응집(cohesion), 사슬엉킴(entanglement), 갇힘(entrapment) 등과 같은 물리적 고정뿐만 아니라 반데르 발스 결합과 같은 전기적 상호작용이 그 단독으로 또는 상기 물리적 고정과 함께 작용하여 발생하는 비화학적 고정을 포함하는 개념이다.

[0066] 본 발명에서, 용어 "나노약물전달체"란 상기 약물전달체가 약 1 나노미터(nm) 내지 약 1000 nm의 크기 범위를 가지는 것을 의미한다. 상기 나노약물전달체는 약제학적으로 허용가능한 담체일 수 있다.

[0067] 상기 용어 "약물"은 약리활성을 가지는 것으로서 폴리펩타이드, 단백질 등을 포함하며, 본 발명에서는 바람직하게 조영제 또는 항암제를 의미한다. 상기 항암제의 구체적인 예로는 도세탁셀(Docetaxel), 할라벤(Halaven), 빈크리스틴(Vincristine), 시스플라틴(cisplatin), 빈블라스틴(Vinblastine), 비노렐빈(Vinorelbine), 파클리탁셀(Paclitaxel), 에토포사이드(Etoposide), 토포테칸(Topotecan), 이리노테칸(Irinotecan), 닥티노마이신(Dactinomycin), 독소루비신(Doxorubicin), 다우노루비신(Daunorubicin), 미토마이신(Mitomycin), 글리벡

(gleevec), 카보플라틴(carboplatin), 발루비신(valrubicin), 플로타미드(flutamide), 젬시타빈(gemcitabine), 블레오마이신(Bleomycin), 테모졸로마이드(Temozolomide), 프로카바진(Procarbazine), 로무스틴(Lomustine, CCNU; 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea), 빈크리스틴(Vincristine) 또는 카르무스틴(Carmustine, BCNU) 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

- [0069] 본 발명에서 용어, "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 암의 발생, 확산 또는 재발을 억제시키거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"는 본 발명의 조성물의 투여로 상기 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0070] 본 발명에서 "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 개체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 개체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 개체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 개체의 상태를 모니터링하는 것)을 포함한다.
- [0071] 본 발명에서 용어, "약학적 조성물"은 질병의 예방 또는 치료를 목적으로 제조된 것을 의미하며, 각각 통상의 방법에 따라 다양한 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 예컨대, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽 등의 경구형 제형으로 제형화할 수 있고, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0072] 본 발명에서, "유효성분으로 포함"은 원하는 생물학적 효과를 실현하는데 필요하거나 또는 충분한 양으로 해당 성분이 포함되는 것을 의미한다 실제 적용에 있어서 유효 성분으로 포함되는 양의 결정은 대상 질병을 치료하기 위한 양으로서, 다른 독성을 야기하지 않는 사항을 고려해서 결정될 수 있으며, 예를 들어 치료되는 질병 또는 병태, 투여되는 조성물의 형태, 피험체의 크기, 또는 질병 또는 병태의 심각도 등과 같은 다양한 인자에 따라서 변화될 수 있다 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 기술을 지닌 기술자라면 과도한 실험을 동반하지 않고 개별적 조성물의 유효량을 경험적으로 결정할 수 있다.
- [0073] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 약학적으로 유효한 양으로 경구 투여하거나 비경구 투여할 수 있으며, 본 발명의 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수해/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 건강상태, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0074] 따라서, 본 발명의 약학적 조성물을 개체에 투여하여 뇌 종양(brain tumor)을 예방, 치료, 및/또는 진단할 수 있으며, 상기 '뇌 종양(brain tumor)'은 악성이거나 양성이든지 관계없이 모든 신생 세포 성장 및 증식을 나타내는 모든 전암(pre-cancerous) 세포 및 암 세포를 칭하며, 바람직하게는 악성 뇌교종(malignant glioma)를 의미한다. 비제한적인 예로서 성상세포종(astrocytoma), 다형성교모세포종(glioblastoma multiforme), 핍지신경교종(oligodendroglioma), 핍지교성상세포종(oligoastrocytoma), 상의세포종(ependymoma), 수모세포종(medulloblastoma), 혈관모세포종(hemangioblastoma), 뇌수막종(meningioma), 뇌하수체선종(pituitary adenoma), 두개인두종(craniopharyngioma), 또는 맥락총유두종(choroid plexus papilloma)일 수 있다.
- [0075] 본 발명에서 용어, "개체"는 쥐, 가축, 생쥐, 인간 등 포유류일 수 있으며, 바람직하게는 인간일 수 있다.
- [0076] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에 투여를 위한 다양한 형태로 제형화 될 수 있으며, 비경구 투여용 제형의 대표적인 것은 주사용 제형으로 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하다. 주사용 제형은 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁화제를 사용하여 당업계에 공지된 기술에 따라 제조할 수 있다. 예를 들면, 각 성분을 식염수 또는 완충액에 용해시켜 주사용으로 제형화 될 수 있다. 또한, 경구 투여용 제형으로는 예를들면 섭취형 정제, 협착정제, 트로키, 캡슐, 엘릭시르, 서스펜션, 시럽 및 웨이퍼 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예: 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신)와 활탁제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 포함할 수 있다. 상기 정제는 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 포함할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제, 흡수제, 착색제, 향미제 및/또는 감미제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 제형은 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0077] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 방부제, 수화제, 유효 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 또는 완충제와 같은 보

조제와 기타 치료적으로 유용한 물질을 추가로 포함할 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 제제화 될 수 있다.

[0078] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있으며, 활성 성분의 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 환자의 중증도 등의 여러 인자에 따라 적절히 선택될 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 목적하는 효과를 상승시킬 수 있는 공지의 화합물과도 병행하여 투여할 수 있다.

[0080] 본 발명에서, 용어 '동물모델'은 사람의 질병과 아주 유사한 형태의 질병을 가진 동물을 말한다. 사람의 질병 연구에 있어 질환모델 동물이 의미를 갖는 것은 사람과 동물들 간의 생리적 또는 유전적인 유사성에 의한다. 질병 연구에 있어 생체의학 질환모델 동물은 질병의 다양한 원인과 발병과정 및 진단에 대한 연구용 재료를 제공해주고, 질환모델 동물의 연구를 통해 질병에 관련된 유전자들을 알아내고, 유전자들 간의 상호작용을 이해할 수 있게 하고, 개발된 신약후보물질의 실제 효능 및 독성 검사를 통해 실용화 가능성의 여부를 판단하는 기초 자료를 얻을 수 있다. 상기 용어 "동물" 또는 "실험동물"은 인간 이외의 임의의 포유류 동물을 의미한다. 상기 동물은 배아, 태아, 신생아 및 성인을 포함하는 모든 연령의 동물을 포함한다. 본 발명에서 사용하기 위한 동물들은, 예를 들어, 상업용 소스로부터 이용할 수 있다. 이런 동물들은 실험용 동물 또는 다른 동물, 토끼, 설치류(예를 들어, 생쥐, 쥐, 햄스터, 게르빌루스 및 기니피그), 소, 양, 돼지, 염소, 말, 개, 고양이, 새(예를 들어, 닭, 칠면조, 오리, 거위), 영장류(예를 들어, 침팬지, 원숭이, 붉은털원숭이)를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0081] 본 발명에서, 용어 '배양'은 생물체나 생물체의 일부(기관 · 조직 · 세포 등)를 적당히 인공적으로 조절한 환경조건에서 생육시키는 일로써, 이 경우 외적 조건으로 온도 · 습도 · 빛 · 기체상의 조성(이산화탄소나 산소의 분압) 등이 중요하며, 그 밖에 배양되는 생물체에 가장 중요한 직접적인 영향을 주는 것은 배지(배양기)로, 그 생물체의 직접적인 환경인 동시에 생존이나 증식에 필요한 각종 영양소의 공급장이다.

[0082] 본 발명에서, 용어 '체외배양'은 세포 등이 체내에서 자라는 상태와 구분되는 방법으로 실험실의 인큐베이터(incubator)에서 체내의 환경과 유사한 조건으로 배양하는 일련의 실험실 과정을 의미하는 것이다.

[0083] 본 발명에서, 용어 '배지' 또는 '배지 조성물'은 당, 아미노산, 각종 영양물질, 혈청, 성장인자, 무기질 등의 세포의 성장 및 증식에 필수적인 요소를 포함하는 생체 외에서 세포 등의 성장 및 증식을 위한 혼합물을 말한다.

[0085] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 이하 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0087] 실시예 1. 유전자 발현 프로파일(gene expression profile) 및 생존 분석(survival analysis)

[0088] 모든 유전자 발현 프로파일은 Oncopression으로부터 내려받았으며, EDB-FN 관련 데이터는 FN 또는 ED-B로도 알려진 섬유결합소 1(fibronectin 1, FN1, Entrez Gene ID: 2335)을 연구함으로써 수집하였다. FN1 유전자의 변이체는 ClinVar(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>)를 사용하여 조사했으며, 126개의 변이체가 확인되었다. 악성 뇌교종에서 발현 수준을 스크리닝하기 위해, 전사체학 데이터베이스 분석을 수행했기 때문에, 변이체의 분석은 본 발명에서 수행되지 않았다. EDB-FN의 전사체학 발현 수준은 Single Channel Array Normalization and Universal exPression Codes(SCAN.UPC) package of R로 정규화하였고, UPC 값으로 나타내었다. 보다 구체적으로, Oncopression 데이터를 위해 단일 샘플 정규화 방법(single sample normalization method)를 사용했으며, 모든 샘플은 Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 (GPL570 or A-AFFY-44) platform 으로부터 받았다. 발현 값은 0.0 내지 1.0으로 나타내었으며, 1.0은 완전히 전사 활성화된 경우를 나타낸다. 정상세포 대비 암세포의 비율(cancer-to-normal ratio)은 암세포에서 발현 값을 정상 세포에서 평균 발현 값으로 나누어 계산하였다. 생존 분석을 위해, 발현 프로파일 및 환자 예후 정보를 포함한 뇌 종양 데이터세트를 수집한 후, 30개 이하의 샘플은 분석에서 제외하였다. 모든 유전자 발현 값은 데이터세트에 의해 켄타일 정규화

(quantile normalization)되었다. Z-value는 각 데이터세트로 로그순위 검정(log-rank test)하여 계산하였고, 체중으로서 각 데이터세트의 환자 수의 제곱근을 이용하여 Lipták method로 평균을 내었다.

[0090] **실시예 2. 환자 조직 마이크로어레이(tissue microarray, TMA) 샘플 제조 및 해석**

[0091] 환자 조직 샘플은 수술 및 병리학적 진단 후 파라핀 블록(paraffin block)에 보관하였으며, 상기 환자는 성인 21명으로, 연령 18세부터 75세이며, 다형성교모세포종으로 진단받았다. 각 환자별로 3 ~4가지의 다른 종양 부위로부터 총 65개의 조직 샘플을 포함하는 조직 마이크로어레이 슬라이드를 제조하였다. 조직 심(tissue core)은 직경 2 mm로 각 블록별로 45개의 구멍을 포함하는 피이식자 파라핀 블록(recipient paraffin block)으로 이식되었다. 파라핀으로 채워진 상기 블록을 3 μ m 두께로 잘라 슬라이드 위에 두었다. 이후 상기 조직을 후술할 면역조직 화학(immunohistochemistry) 부분에 기재한 바와 같이 염색하였다. 면역 염색 후, 병리학자로부터 맹목적 재검토(blind review)를 통해 EDG-FN 존재 및 수준에 대한 판독을 받았다. 염색 강도는 none 또는 '1+'(매우 약한 양성) 부터 '4+'(매우 강한 양성)으로 나타내었다. 본 발명에서, '1+' 및 '2+'는 저발현군(low-expression group)으로, '3+' 및 '4+'는 고발현군(high-expression group)으로 분류하였다. EDB-FN 발현과 환자의 예후 예측간의 상관관계를 분석하기 위해 환자 조직 마이크로어레이에서 EDB-FN 발현 수준의 결과와 각 환자의 임상적 데이터를 연결시키는 작업을 수행하였다. 변수로서 무진행 생존기간(progression-free survival, PFS) 및 전체 생존기간(overall survival, OS)을 이용하여 환자 예후를 분석하였다.

[0093] **실시예 3. 재료(materials)**

[0094] Polyethylene glycol (₂₀₀₀)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (ammonium salt) (PEG₂₀₀₀-DSPE), DSPE-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl) (ammonium salt) (Rh-DSPE), and N-maleimide-PEG₂₀₀₀-DSPE (ammonium salt) (Mal-PEG₂₀₀₀-DSPE)은 Avanti Polar Lipids (CA, USA)로부터 구매하였다. EDB-FN-특이적 펩타이드 *N'*-CSSPIQGSWTWENGK(C)WTWGIIRLEQ-C' 는 Anygen Corp. (Gwangju, Republic of Korea)에서 주문 제작하였다. mouse anti-EDB-FN antibody 및 anti-mouse fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated secondary antibody는 Abcam (Cambridge, UK)로부터 구매하였다. Docetaxel (DTX) 및 Sepharose CL-4B columns은 Sigma-Aldrich (MO, USA)로부터 구매하였으며, mounting solution은 Dako Diagnostics (Glostrup, Denmark)에서 구매하였고, an Alamar Blue assay kit는 Thermo Fisher Scientific (MA, USA)에서 구매하였다. 모든 시약은 laboratory grade이며, 제공받은대로 사용하였다.

[0096] **실시예 4. 세포 배양**

[0097] U87MG, U251MG, U373MG, MCF-7, PC3, B16F10, 및 B16F1 세포는 American Type Culture Collection (VA, USA)에서 구매하였다. 모든 세포는 습도 5% CO₂ 환경에서 37 ° C를 유지하였다. 세포는 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, IL, USA), 100 U/mL penicillin (Gibco), 및 100 μ g/mL streptomycin (Gibco)을 첨가하여 minimal essential medium (MCF-7), RPMI (PC3, B16F10, B16F1), 또는 Dulbecco's modified Eagle's medium (U87MG, U251MG, U373MG)에서 배양하였다. 상기 모든 세포 배양 배지는 Gibco에서 구매하였다.

[0099] **실시예 5. *In vitro* 3D 회전 타원체 배양(spheroid culture)**

[0100] 3D 회전 타원체 배양을 위해, 모든 세 악성 뇌교종 세포주(U87MG, U251MG, and U373MG)를 웰(well) 당 1-5 X 10³ 세포(cell)로 Nunclon Sphera Microplate 96-well round bottom plate (Thermo Fisher Scientific)에서 배양하였다. 상기 플레이트(plate)를 2 분동안 200 x g로 원심분리한 후, 37 ° C, 5% CO₂ 배양기에 두었다. 상기 세포는 6 일동안 배양하였으며, 3 일째에 배지의 절반을 변경하였다. 이미징을 위해, 형성된 회전 타원체를 4% (w/v) paraformaldehyde (Wako, VA, USA)로 고정된 8-well chambered coverglass slide (Thermo Fisher Scientific)로 옮겼으며, 이후 후술할 면역 세포 화학(immunocytochemistry)이 수행되었다.

[0102] **실시예 6. *In vivo* EDB-FN 면역 세포 화학을 위한 악성 뇌교종 옆구리 이종이식(MG flank xenograft) 모델**

[0103] 옆구리 피하 이종이식(flank subcutaneous xenograft) 마우스 모델(n = 1 mouse per group)을 형성하기 위해 BALB/c nude 마우스의 오른쪽 옆구리에 마우스 당 5×10^6 세포로 U87MG, U251MG, 및 U373MG 세포를 주입하였다. 종양이 80-120 mm³의 부피가 되면, 마우스를 희생하고, 잘라낸 종양의 면역 세포 화학을 수행하였다.

[0105] **실시예 7. 실시간 정량 역전사-중합효소 연쇄 반응(Real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction)**

[0106] 세포를 수집하고, RNA isolation kit (GeneAll, Seoul, Republic of Korea)를 이용하여 RiboEx로 리보핵산(ribonucleic acid, RNA)를 추출하였다. 각 샘플로부터 총 1 µg의 RNA를 이용하여 역전사(reverse transcription)로 상보적 DNA(complementary DNA, cDNA)를 합성하였다. 그 결과 하기의 유전자가 추정되었다: EDB-FN 유전자 (정방향 프라이머: 5' - AACTCACTGACCTAAGCTTT -3'; 역방향 프라이머: 5' - CGTTTGTGTGTCAGTGTAG-3'); 및 글리세르알데하이드 3-인산 탈수소효소(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) 유전자 (정방향 프라이머: 5' -AATCCCATCACCATCTTCCA- 3' ; 역방향 프라이머: 5' - TGGACTCCACGACGTACTCA-3'). 중합효소 연쇄 반응 프로토콜은 다음과 같다: 94 ° C에서 5 분간 최초 변성 단계(initial denaturation step); 94 ° C에서 1 분간 변성, 55 ° C에서 1 분간 프라이머 결합(annealing), 및 72 ° C에서 2 분간 신장(extension)을 30 회 반복하는 단계; 및 72 ° C에서 7 분간 최종 신장하는 단계. 4 µL의 초순수(ultrapure water)에 1 µg의 cDNA를 첨가하고, 실시간 중합효소연쇄반응(real-time polymerase chain reaction) (Qiagen, Tokyo, Japan) 수행 전에 5 µL의 SYBR Green real-time mixture (Takara, Tokyo, Japan)을 첨가하였다. 2^{-ΔΔCt} method를 이용하여 각 유전자의 메신저 RNA(messenger RNA, mRNA) 수준을 정량화하고, 글리세르알데하이드 3-인산 탈수소효소의 메신저 RNA로 정규화하였다.

[0108] **실시예 8. 세포 및 조직 염색(cell and tissue staining)**

[0109] **8.1. 면역 세포 화학(immunocytochemistry)**

[0110] 7 개의 상이한 세포주를 2D 염색하기 위해, 염색 전에 8-well chambered 커버글라스 슬라이드에 24 시간동안 10,000개의 세포를 배양하였다. 3D 염색을 위해, 회전 타원체(spheroids)를 배양된 디쉬로부터 8-well chambered 커버글라스 슬라이드로 옮겼다. 상기 배양된 세포는 cold phosphate buffered saline (PBS; Welgene, Gyeongsan, Republic of Korea)으로 세 번 세척한 후, 실온에서 15 분간 4% (w/v) paraformaldehyde 로 고정하고, PBS로 세척했으며, 0.1% (v/v) Triton X-100 (Amresco, PA, USA)/PBS 로 10 분간 투과하고, 4 ° C 에서 밤새도록 1% (w/v) bovine serum albumin (BSA; Millipore, MA, USA)/0.1% (v/v) Triton X-100/PBS에서 primary antibody against EDB-FN (ab154210, 1:500 for 2D, 1:100 for 3D; Abcam)로 배양하였다. PBS로 세척한 후, 면역-표지된 단백질을 fluorescence-conjugated secondary antibodies를 실온에서 60 분간 처리하여 시각화하였다. 세포는 PBS로 세척한 후 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) mounting medium (Vector laboratories, CA, USA)으로 봉입하고, 커버슬립(cover slips)으로 밀봉시킨 후, 공초점 레이저 스캐닝 현미경(confocal laser scanning microscope) (LSM 700; Carl Zeiss, NY, USA)을 이용하여 검사하였다.

[0112] **8.2. 파라핀 첨가된 조직 마이크로어레이 및 동물 샘플의 면역 조직 화학(immunohistochemistry)**

[0113] EDB-FN의 염색 정도는 환자 조직 샘플에 대해 조직 마이크로어레이를, 피하 이종이식 동물 조직 샘플에 대해 면역 조직 화학을 적용하여 분석하였다. 조직 마이크로어레이 슬라이드를 55 ° C에서 30분간 가열하여 밀랍을 제거한 후, 5 분간 세 번 세척하고, 100, 95, and 80% (v/v) ethanol로 5 분간 세척하여 연속적으로 순수한 증류수가 되도록 재수화(rehydration)하였다. 10 mM sodium citrate (pH 6.0)에서 95 ° C, 30 분간 구간을 가열함으로써 항원 회수(antigen retrieval)하였다. 3% (w/v) hydrogen peroxide에서 30 분간 배양함으로써 내생적인 과옥시데이스 활성(endogenous peroxidase activity)을 저해하였다. 실온에서 30 분간 universal blocking serum (Dako Diagnostics)을 이용하여 기본 반응성(background reactivity)를 제거하였다. 슬라이드에 EDB-FN에 특이적인 항체 (orb227981, 1:50; Biorbyt, Cambridge, UK)를 처리하여 1 시간동안 배양한 후, 비오틴-표지된 2차 항체(biotin-labeled secondary antibody)를 처리하여 30 분간 배양하였다. Streptavidin-peroxidase

(Dako Diagnostics)를 이용하고, 개발하였다. hematoxylin을 처리하여 약간의 대조염색(counterstaining) 후, 현미경 관찰을 위해 슬라이드를 탈수하고, 커버슬립으로 봉입하였다.

[0115] **실시예 9. 활성 EDB-FN 표적 마이셀 나노-DDS의 합성**

[0116] **9.1. APT_{EDB}-conjugated PEG₂₀₀₀-DSPE의 합성**

[0117] 추가적인 시스테인 잔기를 포함하는(cysteinylated) EDB-FN-특이적 압타머 유사 펩타이드(aptamer-like peptide) (APT_{EDB}, Anygen)를 dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich)에 용해하고, Mal-PEG₂₀₀₀-DSPE를 클로로포름(chloroform) (Sigma-Aldrich)에 용해하였다. APT_{EDB}:Mal-PEG₂₀₀₀-DSPE의 몰비율을 1:2로 하여 불활성 조건에서 주위 온도(ambient temperature)로 12 시간동안 컨쥬게이션(conjugation) 반응을 수행하였다. APT_{EDB}-conjugated PEG₂₀₀₀-DSPE (APT_{EDB}-DSPE)을 역위상 고성능 액체 크로마토그래피(reversed-phase high-performance liquid chromatography)로 정제하고, 매트릭스 보조 레이저 탈착/이온화 비행 시간 질량 분광계(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry)를 이용하여 컨쥬게이션 효율을 결정하였다. 컨쥬게이션되지 않은 펩타이드를 제거하기 위해, dialysis membrane (Spectrum Chemical, NJ, USA)를 이용하여 분자량 3.5 kDa를 기준으로 투석을 수행하였다. 48시간 후, 컨쥬게이트를 감압 하에 동결 건조(lyophilize)하였다.

[0119] **9.2. 다양한 중량 퍼센트의 APT_{EDB}-DSPE를 처리한 마이셀 나노-DDS의 제조**

[0120] 모액(stock solution)으로부터 2 mg/mL PEG₂₀₀₀-DSPE의 음이온 지질 필름(anionic lipid film)을 제조하였다. 형광 표지된 마이셀 나노-DDS를 제조하기 위해, PEG₂₀₀₀-DSPE solution에 0.5 wt% rhodamine B fluorophore로 표지된 Rh-DSPE를 첨가하였다. 상기 제제에 1.0, 2.5, 또는 5.0 wt%의 농도로 APT_{EDB}-DSPE를 첨가하였다. 예를 들어, 1.0 wt% APT_{EDB}-DSPE의 활성 표적 APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS (APT_{EDB}-conjugated)을 형성하기 위해, 0.5 wt% Rh-DSPE를 포함하는 PEG₂₀₀₀-DSPE solution 2 mg/mL에 20 µg의 APT_{EDB}-DSPE conjugate를 첨가하였다. 음성 대조군으로서, 수동적인/비표적(passive/nontargeting) PEG₂₀₀₀-DSPE 마이셀 나노-DDS (APT_{EDB}-unconjugated)을 합성하였다. 모든 성분을 유리 바이알에 넣고, 진공 하 건조하고, 밤새도록 감압 후 동결건조하여 남아있는 클로로포름을 모두 제거하였다. 최종 2 mg/mL의 농도의 마이셀 용액을 수득하기 위해, 재수화동안 지질 필름에 1 mL의 초순수(Welgene)를 첨가하였다. 균일한 크기의 마이셀을 형성하기 위해, 분당 1,000 revolution의 일정한 교반 하에 재수화를 수행하였다. Amicon ® Ultra-15 centrifugal filter 3 kDa Units (Merck, Darmstadt, Germany)을 사용하여, 마이셀이 용해된 용액을 PBS buffer로 바꾸었다. 초과-크기의 나노입자 또는 응집체를 제거하기 위해, 상기 용액을 0.1-µm membrane (Millipore)으로 여과하고, 크기 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography) (CL-4B column; Merck)로 정제하였다. 제조 후, PBS에서 모든 마이셀 제제의 크기 및 zeta potential을 동적 광산란(dynamic light scattering, DLS) 및 zeta potential analysis로 분석하였다. 2 mg/mL 마이셀의 1 mL를 투명한 큐벳(transparent cuvette)에 옮기고, Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, UK)를 이용하여 각 마이셀의 유체역학적 직경(hydrodynamic diameter) 및 zeta potential을 측정하였다.

[0122] **9.3. DSPE-DTX 및 APT_{EDB}-DSPE-DTX의 합성 및 개발**

[0123] 수동적인/비표적 DSPE-DTX (APT_{EDB}-unconjugated) 및 활성 표적 APT_{EDB}-DSPE-DTX (APT_{EDB}-conjugated)는 종래 개시된 방법을 적용하여 개발하였다(Chong K et al., Chem Commun (Camb). 2013; 49: 11476-8). 먼저, APT_{EDB}-DSPE lipid를 수득하기 위해, cysteinylated APT_{EDB}을 PEG₂₀₀₀-DSPE lipid의 maleimide group과 컨쥬게이션하였다. DTX를 로딩하기 위해, DTX를 클로로포름에 용해하고, 재수화동안 최종 농도가 50 mg/mL가 되도록 마이셀 지질 필름에 첨가하였다. 본 발명에서, DTX-로딩된 PEG₂₀₀₀-DSPE 마이셀 나노-DDS 및 APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS를 각각, 'DSPE-DTX' 및 'APT_{EDB}-DSPE-DTX'로 명명하였다. DSPE-DTX 및 APT_{EDB}-DPSE-DTX를 0.1-µm membrane

으로 여과하고, 크기 배제 크로마토그래피로 정제하였다.

[0125] 실시에 10. APT_{EDB}-컨쥬게이션된 마이셀 나노입자를 이용하여 악성 뇌교종의 치료 표적으로서 EDB-FN 검증

[0126] 10.1. APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS의 *In vitro* 세포 흡수(cellular uptake)

[0127] APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS의 세포 흡수 효율은 EDB-FN-양성 U87MG 및 U251MG 세포에 각 마이셀 제제를 처리함으로써 결정하였다. U87MG 및 U251MG 세포는 5,000 cells/well로 96-well plate에서 배양하였다. 세포를 살균된 커버슬립에서 confluence로 배양한 후, 상기 세포를 APT_{EDB}-DSPE를 1.0, 2.5, 또는 5.0 wt%의 농도로 처리하고, 100 µg/mL PEG₂₀₀₀-DSPE 마이셀 나노-DDSs 또는 APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS와 함께 1 시간동안 37 ° C에서 배양하였다. 상기 세포를 PBS로 세척하고, 4% (w/v) paraformaldehyde로 고정했으며, nuclear dye DAPI (Invitrogen, CA, USA)로 대조 염색한 후, glass slides로 봉입하고, 로다민 B(rhodamine B)-표지된 마이셀의 흡수율을 확인하기 위해 공초점 레이저 스캐닝 현미경으로 확인하였다.

[0129] 10.2. 경쟁 분석(Competition assay)

[0130] EDB-FN 고발현 세포(U87MG 및 U251MG)와 EDB-FN 저발현 세포(MCF-7 및 B16F1)을 약 80% 회류점(confluence)에 도달할 때까지 글라스 커버슬립에 배양하였다. 상기 세포들을 다양한 농도(100 µg/ml and 500 µg/ml)의 자유 APT_{EDB} 펩타이드로 30 분간 미리 처리하였다. 이후, 로다민-표지된 APT_{EDB}-DSPE를 첨가하고, 상기 세포들을 추가적으로 30 분간 배양하였다. 이후, 상기 세포들을 PBS로 세척하고, 4% (w/v) paraformaldehyde로 고정한 후, 공초점 현미경 하에서 보기 위해 현미경 슬라이드로 봉입하였다.

[0132] 10.3. siRNA(small interfering RNA)의 형질주입

[0133] EDB-FN 특이적 siRNA와 스크램블 대조군 siRNA(scrambled control siRNA)는 Bioneer (Daejeon, Republic of Korea)에서 구매하였다. RNA 간섭에 사용되는 EDB-FN siRNA의 타겟 서열은 하기와 같다; sense; ACAGUCCAGAUCAUGGAG, antisense; CUCCAUGAUCUGGGACUGU. Lipofectamine 2000(Invitrogen, CA, USA)를 형질주입하기 위해, 세포를 밤새도록 성장시킨 후 60-70% 회류점(confluence)에서 96-well 또는 6-well 플레이트에서 배양하였다. 제조사의 설명에 따라 Lipofectamine-siRNA 복합체를 제조하였다. 형질주입 효능은 48 시간 후에 분석하였다.

[0135] 10.4. APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS의 *In vitro* 세포 흡수(cellular uptake)

[0136] EDB-FN 발현량에 따른 세포내 흡수를 확인하기 위해, U87MG 세포에 상술한 대조군 siRNA 또는 EDB-FN siRNA를 형질주입하였다. 상기 형질주입된 세포에 100 µg/mL의 PEG₂₀₀₀-DSPE 마이셀 나노-DDS 또는 APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS를 1.0 wt% 농도로 처리하고 1 시간동안 37 ° C에서 배양하였다. APT_{EDB}-DSPE는 EDB-FN에 대항하는 항체를 사용하여 면역 세포 화학을 통해 염색하였고, DAPI-포함하는 봉입액(mounting solution)으로 봉입하였다. 시간-의존적 세포 흡수를 확인하기 위해, U87MG 세포에 1.0 wt% 농도의 APT_{EDB}-DSPE로 100 µg/mL APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS를 5 분, 15 분, 30 분, 1 시간 및 4 시간동안 처리하였다.

[0138] 10.5. U87MG 및 U251MG 세포에서 APT_{EDB}-DSPE-DTX의 *In vitro* 세포 독성(cytotoxicity)

[0139] 악성 뇌교종의 분자적 표적으로서 EDB-FN의 유용성 및 가치를 결정하기 위해, 상술한 방법으로 DTX를 PEG₂₀₀₀-DSPE 및 APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDSs의 중심으로 캡슐화하였다. 24 시간동안 각 나노-DDS 제형을 단계적으로 희석하며 세포와 공배양하였다. 상기 제제를 제거한 후, 세포를 Alamar Blue assay (Bio-Rad, CA, USA) 전에 추가적으로 24 시간동안 배양하였다. 각 제형의 IC₅₀ 값은 ProBit analysis로 결정하였다.

- [0141] 10.6. 피하 이종이식 모델(subcutaneous xenograft model)에서 APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS의 *In vivo* 흡수(uptake)
- [0142] *in vivo* 이종이식 모델에서, APT_{EDB}-DPSE 마이셀나노-DDS의 흡수를 평가하기 위해, BALB/c nude 마우스(n = 3 mice per group)의 오른쪽 옆구리에 5×10^6 cells/mouse로 U87MG 세포를 주입하였다. 3주 후, 종양 성장을 측정했으며, 이 때, 종양 부피는 $80-120 \text{ mm}^3$ 이었다. 이후, 200 μg 의 PEG₂₀₀₀-DSPE 마이셀 나노-DDS in PBS 또는 APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS in PBS를 각 마우스에 주입하고, 미리 지정된 시간(15, 30, 60, 및 120 분)에, IVIS *in vivo* imaging system (PerkinElmer, MA, USA)을 이용하여 로다민 B-표지된 마이셀의 종양 흡수를 비교하였다.
- [0144] 10.7. APT_{EDB}-DSPE의 *In vivo* 흡수 및 독성
- [0145] APT_{EDB}-DPSE 마이셀 나노-DDS *in vivo* 조직 흡수를 평가하기 위해, U87MG 세포를 5×10^6 cells/mouse로 BALB/c nude 마우스의 오른쪽 옆구리에 주입하였다(n = 3 mice per group). 3주 후, 종양 성장을 측정하였고, 종양 부피는 $80-120 \text{ mm}^3$ 로 결정되었다. 이후, 200 μg 의 PEG₂₀₀₀-DSPE 마이셀 나노-DDS 또는 APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS를 각 마우스에 주입하였고, 미리 지정된 시간(6, 12, 24, 및 48 시간)에, IVIS *in vivo* 이미징 시스템 (PerkinElmer, MA, USA)을 이용하여 로다민 B-표지된 마이셀의 종양 흡수를 비교하였다.
- [0146] APT_{EDB}-DSPE의 안전성을 검증하기 위해, 실험 전 후 마우스의 체중을 확인하였다. 실험 막바지에, H&E 염색을 위해 주요 기관(심장, 폐, 비장, 폐, 및 신장)을 수집하기 위해 마우스를 안락사하였다.
- [0148] 10.8. 피하 이종이식 모델의 동결 샘플의 면역 조직 화학(Immunohistochemistry)
- [0149] 슬라이드 글라스에 부착된 피하 이종이식 모델의 뇌 슬라이스를 차가운 PBS로 두 번 세척하고, 블로킹한 후, 블로킹 버퍼(blocking buffer) (PBS containing 0.3% Triton X-100 and 2% BSA)로 1 시간동안 투과할 수 있도록 하였다. EDB-FN에 특이적인 주요 항체(ab154210 Abcam, MA, USA)를 블로킹 버퍼에서 1:100로 희석하고, 조직과 함께 4 ° C에서 밤새도록 배양하였다. PBS로 세척한 후, 블로킹 버퍼에서 1:200으로 희석된 Alexa Fluor 488 컨쥬게이션된 2차 항체(A11001; Invitrogen, CA, USA)를 처리하여 실온에서 1 시간동안 배양하였다. 상기 조직을 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Invitrogen, NY, USA)로 대조 염색하고, 커버 슬라이드로 덮은 후, 공초점 레이저 스캐닝 현미경 및 슬라이드 스캐너(Axio Scan.Z1; Carl Zeiss, NY, USA)를 이용하여 분석하였다.
- [0151] 10.9. APT_{EDB}-DSPE-DTX의 *In vivo* 항암 효능
- [0152] 옆구리 피하 이종이식 마우스 모델을 제작하기 위해, BALB/c nude 마우스의 오른쪽 옆구리에 5×10^6 cells/mouse로 U87MG 세포를 주입하였다. 종양 부피가 $80-120 \text{ mm}^3$ 가 되면, 마우스에 염분을 5 mg/kg의 DTX 농도로 (대표적인 종양 조직 적출을 위한 n = 1 mouse per group을 포함하여, n = 5 mice per group) DPSE-DTX in PBS, 또는 APT_{EDB}-DSPE-DTX in PBS를 정맥주사하였다. 이전 연구 프로토콜에 기초하여, 각 제제를 이틀마다 세 번씩 정맥 주사하였다. 종양 크기는 적출할 때까지 사후에 한 번씩 측정하였다. 하기의 식을 이용하여 종양 부피를 계산하였다: (길이(length) x 너비(width) x 높이(height)) x 0.5. 하기의 식을 이용하여 종양 억제율을 계산하였다: $[1 - \{ (T_{\text{DayE}} - T_{\text{Day1}}) / T_{\text{Day1}} \times C_{\text{Day1}} / (C_{\text{DayE}} - C_{\text{Day1}}) \}] \times 100$ (T_{DayE} = 실험군의 최종 종양 부피; T_{Day1} = 실험군의 최초(Day 1) 종양 부피; C_{DayE} = 대조군의 최종 종양 부피; C_{Day1} = 대조군의 최초 종양 부피).
- [0153] 동소 이종이식 마우스 모델(orthotopic xenograft mouse models)을 제작하기 위해, BALB/c nude 마우스의 머리를 주축성 장치(stereotactic device)로 고정하고, Ozawa 및 James의 방법에 따라 정수리점(bregma)으로부터 2 mm 측면 및 관상 봉합(coronal suture)으로부터 1 mm 전면에 고속 드릴로 소형 버르홀(burr hole)을

시술하였다. 22-gauge needle (Hamilton Company, NV, USA)을 이용하여 3×10^5 cells/mouse로 두개골의 내부 치밀골(inner cortical bone)으로부터 3 mm의 깊이로 U87MG 세포를 주입하였다. 7일 후, 마우스에 한 번 염분, 10 mg/kg DTX의 농도로 DSPE-DTX, 또는 APT_{EDB}-DSPE-DTX를 한 번 정맥주사하였다($n = 4$ mice per group). 이식 후 21일째에 종양 크기 분석을 위해 마우스를 희생하였다. 10% (v/v) formalin (Sigma-Aldrich)를 살포한 후, 각 뇌를 제거하고 optimal cutting temperature compound (Sakura Finetek, Tokyo, Japan)에 끼워 넣었다. 상기 뇌 샘플을 동결하고, cryostat sectioning을 이용하여 20 μ m로 슬라이스하였다. 상기 뇌 슬라이스를 hematoxylin and eosin (H&E) staining kit (ScyTek, UT, USA)를 이용하여 염색하고, 하기의 식을 이용하여 종양 부피를 계산하였다: (길이 x 너비 x 너비) x 0.5. 가장 긴 치수를 길이로 설정하고, 가장 긴 수직 직경을 너비로 설정하였다.

[0155] **실시예 11. 이미징 및 통계학적 분석**

[0156] ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)을 이용하여 이미지 프로세싱 및 데이터 분석을 수행하였다. 모든 데이터는 GraphPad Prism 7 software (GraphPad, La Jolla, CA, USA)을 이용하여 분석하였고, means $\pm$ standard errors (std. errors)로 나타내는 IC₅₀ 값을 제외하고, means $\pm$ standard deviations (std. devs.)로 나타내었다. 군 간의 비교는 주로 정규 분포 데이터의 경우 unpaired two-tailed *t* test with Welch's correction (Welch's *t* test), 비정규 분포 데이터의 경우 Mann-Whitney test를 수행하였다. *P* values of < 0.05 는 통계적으로 유의한 것으로 보며, 하기와 같이 표시하였다: $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), and $p < 0.0001$ (****).

[0158] **실시예 12. 윤리적 승인(Ethical approval)**

[0159] 동물실험을 위해 모든 적용가능한 국제, 국내, 및/또는 기관의 가이드라인을 준수하였다. 본 발명에서 동물에 관한 모든 실험은 KAIST 동물실험윤리위원회(KAIST Institutional Animal Care and Use Committee) 및 고려대학교 의과대학(Korea University College of Medicine) (IACUC No. KA2013-13 및 KOREA-2019-0123)의 윤리적 기준에 부합한다. 환자 샘플 연구는 고려대학교 구로병원 기관감사위원회(Korea University Guro Hospital Institutional Review Board) (IRB No. 2017GR0330)에서 승인받은 가이드라인 및 프로토콜을 준수하였다.

[0161] **실험결과**

[0162] 본 발명자들은 EDB-FN이 다양한 암에 대해 마커이자 표적으로 실현가능한지 평가하기 위해 정규화된 빅데이터 및 EDB-FN 발현 수준의 환자 조직 샘플을 분석하였다. 또한, 정상세포 대비 암세포에서 EDB-FN의 발현율이 가장 높은 암 중 하나인 악성 뇌교종의 진단 마커이자 약물 전달 표적으로서 EDB-FN의 유용성을 검증하였다.

[0164] **실험결과 1. 암 세포주에서 EDB-FN 발현**

[0165] 다양한 인간 암 세포주에서 EDB-FN 발현 수준을 결정하기 위해 스크리닝을 하였다. 유방암 세포주 MCF7, 전립선암 세포주 PC3, 흑색종 세포주 B16F1 및 B16F10, 및 악성 뇌교종 세포주 U373MG, U87MG, 및 U251MG이 실험에 사용되었다. EDB-FN 단백질의 발현 패턴은 2D 단일층 배양(two-dimensional monolayer culture) 동안 정량적 분석으로 확인하였다(도 1A). PC3 세포주 및 U373MG 세포주에서는 EDB-FN 발현이 약한 것으로 탐지되었으나, U87MG 세포주에서는 뚜렷한 발현이 관찰되었다. 또한, EDB-FN 발현의 정량적 분석을 위해 mRNA를 추출함으로써 qRT-PCR을 수행하였다(도 1B). 그 결과(MCF7, 47.8 ± 7.9 ; PC3, 12.1 ± 2.1 ; B16F1, 0.6 ± 0.5 ; B16F10, 23.3 ± 1.4 ; U373MG, 2.6 ± 0.8 ; U251MG, 643.0 ± 31.0 ; U87MG, 1430.3 ± 61.4), U251MG 세포주에서 통계학적으로 상당한 과발현이 관찰되었으며($p < 0.001$, 다른 모든 세포주 대비, Welch's *t* test), 가장 높은 발현은 U87MG 세포주에서 관찰되었다($p < 0.001$, 다른 모든 세포주 대비, Welch's *t* test). 상기 결과를 통해, 다른 암에 비해 악성 뇌교종에서 EDB-FN이 과발현되었다는 점을 확인하였다.

[0166] 종양 미세환경(tumor microenvironment)을 조성하기 위해, 3D에서 악성 뇌교종세포주를 배양하고, 악성 뇌교종 옆구리 이중이식 동물 모델을 제작하였다. 면역염색을 이용한 EDB-FN 발현의 정량적 분석 결과, 3D 배양동안

U87MG 세포주에서 U251MG 및 U373MG 세포주에서보다 EDB-FN이 더 과발현되었다(도 1C). 이중이식 마우스 모델에서, U251MG 및 U87MG 세포주가 U373MG 세포주보다 상대적으로 높은 발현 패턴을 보였다(도 1D). mRNA qRT-PCR를 통한 정량적 분석 결과(도 1E), 2D 배양된 U373MG 세포주와 비교하여 U87MG 세포주에서 EDB-FN이 상당히 발현되었다($p < 0.01$, Welch's t test). 상기 결과와 비교하여, 종양 미세환경을 모방한 3D 배양된 U87MG 세포주에서 더 높은 EDB-FN 발현을 나타내었으며($p < 0.001$, 2D 배양된 U87MG 세포주와 비교하여, Welch's t test), 이중이식 동물모델에서 가장 높은 EDB-FN 발현을 나타내었다($p < 0.0001$, 3D 배양된 U87MG 세포주와 비교하여, Welch's t test). 상기 결과는 악성 뇌교종에서 EDB-FN 발현과 종양 미세환경 유사성간의 선형 상관관계를 시사하며, 이는 EDB-FN을 악성 뇌교종의 바이오마커로 사용가능함을 나타낸다.

[0167] 최종적으로, 악성 뇌교종 세포에서 다른 암 세포보다 EDB-FN이 더 과발현하였으며, 악성 뇌교종 세포주 중에 느리게 증식하는 U373MG 세포에서 EDB-FN이 상대적으로 낮은 발현을 나타내었다. 적극적으로 증식하는 것으로 알려진 U87MG 세포주는 가장 높은 EDB-FN 발현 수준을 나타냈으며, 다형성교모세포종 줄기세포 같은 특징을 가진 U251MG 세포주가 그 다음에 해당했다, 상기 결과를 기반으로, 후술할 연구에서는 U87MG 및 U251MG 세포주를 사용하였다.

[0169] 실험결과 2. 합성 APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS의 특성 분석(characteristic analysis)

[0170] 마이셀의 동적광산란(DLS) 분석 결과, 11.5 ± 1.9 nm for the PEG₂₀₀₀-DSPE 마이셀 나노-DDS에 대해 11.5 ± 1.9 nm의 직경, 1.0, 2.5, 및 5.0 wt% 농도의 APT_{EDB}-DSPE를 처리한 APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS에 대해 각각 8.2 ± 1.3 nm, 10.5 ± 1.9 nm, 및 10.3 ± 1.3 nm의 직경을 나타내었다(도 2A 및 B). PEG₂₀₀₀-DSPE 마이셀 나노-DDS와 비교하여 APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS의 DLS-측정 크기가 감소한 점과, 1.0 wt% 농도에서 동일한 DDS와 비교하여 2.5 및 5.0 wt% 농도의 APT_{EDB}-DSPE에서 APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS의 측정된 크기가 증가한 점은 마이셀의 외부 표면에 APT_{EDB}의 존재가 마이셀 나노-DDS에서 형태학적 변화에 영향을 준다는 점을 나타내었다. 각 나노-DDS의 zeta potential(나노입자의 표면 전하를 추론할 수 있음)을 측정하였다; PEG₂₀₀₀-DSPE 마이셀 나노-DDS의 zeta potential은 -9.3 ± 1.1 mV였으며, 1.0, 2.5, 및 5.0 wt% 농도의 APT_{EDB}-DSPE를 처리한 APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS의 zeta potential은 각각 -9.5 ± 0.7 mV, -10.4 ± 1.3 mV, 및 -12.1 ± 0.7 mV이었다(도 2C).

[0172] 실험결과 3. APT_{EDB}-DSPE 밀도에 따른 세포 흡수

[0173] 최적화된 표적 리간드 밀도를 결정하기 위해, 지질 필름 형성 이전에, 1.0, 2.5, 및 5.0 wt% 농도에서 PEG₂₀₀₀-DSPE를 혼합한 Rh-DSPE의 클로로포름 용액에 APT_{EDB}-DSPE를 첨가하였다. 모든 조건 하에서, 암 세포에서 활성 표적 APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS의 흡수 효능(uptake efficacy)은 소극적인/비표적 PEG₂₀₀₀-DSPE 마이셀 나노-DDS의 흡수 효능보다 높았다(도 4A). 흥미롭게도, 2.5 wt% 농도의 APT_{EDB}-DSPE를 처리한 APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS는 U251MG 세포에서 가장 높은 세포 흡수를 나타내었다(PEG₂₀₀₀-DSPE, 44.5 ± 9.6 ; 1.0% APT_{EDB}-DSPE, 76.4 ± 8.1 ; 2.5% APT_{EDB}-DSPE, 128.8 ± 12.1 ; 5.0% APT_{EDB}-DSPE, 53.4 ± 5.1), 반면에 1.0 wt% 농도의 APT_{EDB}-DSPE를 처리한 APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS는 U87MG 세포에서 가장 높은 세포 흡수를 나타내었다(PEG₂₀₀₀-DSPE, 6.8 ± 5.1 ; 1.0% APT_{EDB}-DSPE, 165.7 ± 3.7 ; 2.5% APT_{EDB}-DSPE, 93.2 ± 6.7 ; 5.0% APT_{EDB}-DSPE, 56.7 ± 7.9). APT_{EDB}-DSPE의 농도가 증가함에 따라 더 음의 방향인 바(도 2C), 5.0 wt% 농도의 APT_{EDB}-DSPE를 처리한 APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS의 감소된 세포 흡수는 나노-DDS에서 음전하를 통해 부분적으로 설명 가능하다. 그러나, U87MG 및 U251MG 세포가 모두 악성 뇌교종 세포이고, 동일 표적 리간드가 사용되었음에도 불구하고, 가장 높은 세포 흡수 효능을 가지는 APT_{EDB}-DSPE 농도가 각 세포주마다 달랐다. 따라서, 리간드 밀도는 세포주 및 세포형에 따라 다르며, 그에 따라 세포 흡수도 다르다는 점을 알 수 있었다.

[0174] APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS의 EDB-FN을 표적하는 능력을 입증하기 위해, EDB-FN 과발현 및 저발현 세포를 EDB-

FN를 표적하는 앵타이드(targeting aptide)와 APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS로 동시에 처리함으로써, 경쟁 분석을 수행하였다. EDB-FN 고발현 세포인 U87MG 및 U251MG에서 APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS의 흡수는 EDB-FN를 표적하는 앵타이드의 농도가 증가함에 따라 감소하였다. APT_{EDB}-DSPE의 흡수가 최소였음에도 불구하고, EDB-FN 저발현 세포인 MCF-7 및 B16F1에서도 EDB-FN 방해 효과가 나타났다(도 3A 및 B).

[0175] 활성 표적 APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS가 EDB-FN 발현에 의존적인지 확인하기 위해 U87MG 세포에서 EDB-FN을 녹다운(knock down)하였다. U87MG 세포에서 EDB-FN 발현은 EDB-FN-siRNA 처리 후에 상당히 감소하였다; 반면에 대조군 siRNA(control siRNA, 1.00 ± 0.08 ; EDB-FN siRNA, 0.45 ± 0.01 ; $p < 0.01$, Welch's t test)를 처리한 세포의 EDB-FN 발현은 일정하였다(도 4A). 상기 siRNA를 처리한 후, APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS 잔여량의 흡수도 변화가 없었다. 그러나, EDB-FN 발현이 억제된 세포에서, 활성 표적 APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS의 흡수는 감소하였다(도 4B). 더욱이, U87 세포에서 APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS의 시간-의존적 흡수 또한 4 시간동안 관찰하였다. 5 분간 처리 후, 세포 내 APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS 농도를 점진적으로 증가시켰으며, 1 시간 내지 4 시간 내에 포화에 이르렀다(도 4C).

[0176] 상기 결과는 APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS는 EDB-FN 발현-의존적 및 시간-의존적으로 세포에 의해 흡수된다는 점을 시사하며, 보다 명확하게 표적 리간드 밀도가 사실 나노입자의 세포 흡수에 중요하다는 점을 나타낸다.

[0178] 실험결과 4. EDB-FN를 표적함에 따른 암 표적 및 항암 효능 향상

[0179] 4.1. APT_{EDB}-DSPE-DTX의 *In vitro* 독성

[0180] EDB-FN의 악성 뇌교종의 분자적 표적으로서 가치 및 유용성을 결정하기 위해, PEG₂₀₀₀-DSPE 및 APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS의 중심으로 DTX를 캡슐화하였다. 각 마이셀 나노-DDS의 로딩 능력은 10 wt%, 캡슐화 효율은 약 95%로 계산하였다. 세포 생존능(cell viability)은 DSPE-DTX 및 APT_{EDB}-DSPE-DTX를 사용하여 평가하였다(도 5B). DSPE-DTX 및 APT_{EDB}-DSPE-DTX 시스템에서 DTX가 U251MG 및 U87MG 세포의 생존능을 저해함에도 불구하고, 저해의 정도는 상이했다. U87MG 세포에서 IC₅₀ 값은 DSPE-DTX의 경우 87.38 ± 6.87 nM, APT_{EDB}-DSPE-DTX의 경우 23.15 ± 1.67 nM로서, APT_{EDB}-DSPE-DTX이 DSPE-DTX 보다 약 3.8배 낮았다($p < 0.0001$, Welch's t test). U251MG 세포에서 IC₅₀ 값은 DSPE-DTX의 경우 43.16 ± 7.05 nM, APT_{EDB}-DSPE-DTX의 경우 26.20 ± 1.53 nM로서, APT_{EDB}-DSPE-DTX가 DSPE-DTX보다 약 1.6배 낮았다($p < 0.05$, Welch's t test) (도 5C). U87MG 및 U251MG 세포에서 *in vitro* 세포 독성 데이터는 우수한 암 표적 능력을 암시하며, 약물 흡수의 증가는 소극적인/비표적에 비해 EDB-FN 활성 표적을 통해 달성할 수 있을 것으로 생각된다. DSPE-DTX 및 APT_{EDB}-DSPE-DTX의 IC₅₀ 값의 상당한 차이가 U87MG 세포에서 관찰되었는 바, U87MG 세포를 *in vivo* 모델링 및 악성 뇌교종의 분자적 표적으로서 EDB-FN을 평가하는데 사용하는 것으로 선별하였다.

[0182] 4.2. APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS의 *In vivo* 흡수

[0183] U87MG 옆구리 이종이식 마우스 모델에서 실시간 IVIS 이미징 연구 결과, APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS는 소극적인/비표적 PEG₂₀₀₀-DSPE 마이셀 나노-DDS와 비교하여 종양 현지화(tumor localization)의 상당한 증가를 보였다: 상기 종양 현지화의 증가는 15 분에서 120 분동안 지속적으로 관찰되었다(도 6A). 15 분에서, 최소의 나노입자 축적이 관찰되었다. 30 분 후, APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS군에서 더 높은 축적이 시작되었다. 60 분 후, APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS군은 PEG₂₀₀₀-DSPE 마이셀 나노-DDS군보다 종양 부위에서 더 많은 축적이 나타났다. 또한, DDS가 종양보다 다른 기관에 영향을 미치는지 결정하기 위해, 마이셀 나노-DDS의 조직 흡수를 48 시간동안 측정하였다(도 7A). 소극적인/비표적 PEG₂₀₀₀-DSPE 마이셀 나노-DDS는 점진적으로 48 시간 내에 체내 전반에 확산되었다. 그러나, APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS는 안정적인고, 제한된 종양 부위로 남아있었다. 상기 결과는 APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS의 안정성 및 높은 악성 뇌교종-표적 능력을 나타낸다. APT_{EDB}-DSPE이 높은 EDB-FN

표적 능력을 가지는 바, 높은 친화성으로 EDB-FN에 결합함으로써 악성 뇌교종에서 상당히 증가된 APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS의 보유시간(retention time)을 보였으며, 그에 따라, 증가된 종양에서 약물의 생물학적 이용가능성을 가졌다.

[0185]

4.3. APT_{EDB}-DSPE-DTX의 *In vivo* 항암 효능

[0186]

in vivo 항암 효능은 U87MG 피하 이종이식 동물 모델에서 검증하였다. 상기 효능은 시간에 따른 대조군, DSPE-DTX, 및 APT_{EDB}-DSPE-DTX군에서 종양 성장의 경향을 비교함으로써 평가되었다(도 6B). 대조군에서 종양 부피는 16 일 내(day 17)에 첫 날(day 1)보다 약 5.9 배 증가하였다(Day 1: $91.5 \pm 7.4 \text{ mm}^3$ vs. Day 17: $538.0 \pm 115.9 \text{ mm}^3$; $p < 0.01$, Welch's *t* test). DSPE-DTX 또는 APT_{EDB}-DSPE-DTX를 처리함으로써 종양 성장을 상당히 저해하였다. 상술한 바와 같이 종양 저해의 퍼센트를 계산한 결과, DSPE-DTX가 종양 성장을 약 54.8% 억제한(Day 1: $87.9 \pm 12.6 \text{ mm}^3$ vs. Day 17: $281.7 \pm 29.4 \text{ mm}^3$; $p < 0.001$, Welch's *t* test) 반면, APT_{EDB}-DSPE-DTX는 종양 성장을 약 97.6%로 상당히 억제함을 확인하였다(Day 1: $87.5 \pm 12.6 \text{ mm}^3$ vs. Day 17: $97.8 \pm 2.6 \text{ mm}^3$; $p < 0.20$, Welch's *t* test). 첫 날, 종양 부피는 군 간에 상당한 차이가 없었다. 그러나, 나노-DDS를 3 회 복용한 2 일째, 4 일째, 및 6 일째에, 군 간의 종양 부피 차이는 시간이 흐를수록 상당해졌다(도 6C 및 D). APT_{EDB}-DSPE-DTX 군은 대조군에 비해 7 일째부터 상당한 종양 억제를 보였으며($p < 0.001$, Welch's *t* test), DSPE-DTX 군과 비교했을 때 17 일째부터 차이가 있었다($p < 0.01$, Welch's *t* test).

[0187]

도 7B에서 도시한 바와 같이, 마이셀 나노-DDS를 체내 투여한 결과, 심장, 간, 비장, 폐, 및 신장과 같은 주요 기관에서 아무런 부작용이 관찰되지 않았으며, 실험이 끝날 때까지 마우스의 체중에는 큰 변화가 없었다(Day 1, control = $20.4 \pm 0.6 \text{ g}$, DSPE-DTX = $21.4 \pm 0.2 \text{ g}$, APT_{EDB}-DSPE-DTX = $18.9 \pm 0.6 \text{ g}$; Day 17, control = $19.8 \pm 1.6 \text{ g}$, DSPE-DTX = $20.7 \pm 1.2 \text{ g}$, APT_{EDB}-DSPE-DTX = $19.5 \pm 0.9 \text{ g}$) (도 7C). 이는 APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS가 독성을 거의 갖지 않아 생체적합성을 가진다는 점을 나타낸다.

[0189]

4.4. 동소 뇌 종양 마우스 모델에서 APT_{EDB}-DSPE-DTX의 항암 효능

[0190]

뇌 종양의 치료 표적으로서 이의 실현가능성을 평가하기 위해, U87MG 동소 이종이식 동물 모델을 제작하였다. 도 6E에 도시된 바와 같이, 염분(saline)을 대조군으로, DSPE-DTX 및 APT_{EDB}-DSPE-DTX를 세포 이식 후 7 일간 정맥 주사를 통해 주입하였다($n = 4 \text{ mice per group}$). 2주 후, 뇌를 추출하고, 각 군의 종양 부피를 비교하였다. H&E 염색을 사용하여 슬라이스된 뇌 조직의 정상 및 종양 부위의 현지화(tumor localization)를 수행하였고, 각 모델에서 가장 큰 종양의 슬라이스를 기반으로 종양의 크기를 측정하였다(도 6F 및 G). 그 결과, EDB-FN 표적 마이셀 나노-DDS 처리에 의해 종양 성장이 상당히 저해된다는 점을 알 수 있었다. 대조군과 비교하여($116.9 \pm 21.0 \text{ mm}^3$), DSPE-DTX($86.7 \pm 28.7 \text{ mm}^3$) 및 APT_{EDB}-DSPE-DTX($46.5 \pm 27.0 \text{ mm}^3$)군은 각각 25.8%($p < 0.15$, Welch's *t* test) 및 60.2%($p < 0.01$, Welch's *t* test) 종양 성장을 억제했다. 통계학적으로 큰 차이가 보이지 않았지만, APT_{EDB}-DSPE-DTX군은 DSPE-DTX 군($p < 0.09$, Welch's *t* test)보다 약 34.4% 더 높은 종양 성장 억제를 보였다. 실험 동안 모든 군에서 상당한 체중 변화가 관찰되지는 않았다(Day 1, control = $22.7 \pm 1.3 \text{ g}$, DSPE-DTX = $23.3 \pm 2.5 \text{ g}$, APT_{EDB}-DSPE-DTX = $23.3 \pm 1.6 \text{ g}$; Day 21, control = $24.5 \pm 1.3 \text{ g}$, DSPE-DTX = $25.1 \pm 1.7 \text{ g}$, APT_{EDB}-DSPE-DTX = $25.5 \pm 1.5 \text{ g}$) (도 8C). 상기 결과는 본 발명의 EDB-FN-표적 마이셀 나노-DDS가 악성 뇌교종을 치료하는데 잠재력을 가지고 있으며, EDB-FN이 약물 치료를 위한 유용한 표적이라는 점을 나타낸다.

[0191]

악성 뇌교종 동소 마우스 모델에서 이식된 U87MG 세포가 EDB-FN을 과발현한다는 점을 확인하기 위해, 모든 군에서 종양을 포함한 마우스 뇌 슬라이스를 이용한 면역 조직 화학 분석이 수행되었다. 마우스 뇌조직의 정상 부위와 비교하여, 모든 군의 종양 부위에서 EDB-FN가 더 높게 발현되었다(도 8A). 흥미롭게도, 종양에서 EDB-FN 발현은 대조군 및 DSPE-DTX군과 비교하여 APT_{EDB}-DSPE-DTX군에서 살짝 감소하였으며(도 8B), 이는 APT_{EDB}-DSPE-

DTX가 종양에서 EDB-FN 발현 수준에 영향을 미칠 가능성이 있음을 시사한다.

[0193] **고찰**

[0194] 본 발명은 암 세포의 표면 및 세포 외 기질 내에 위치한 EDB-FN에 관한 것이다. 보다 구체적으로 상기 표면과 세포 외 기질 내의 단백질은 약물전달체(drug delivery systems, DDSs)을 위한 유용한 표적뿐 아니라, 암 진단 바이오마커로서 활용될 수 있다.

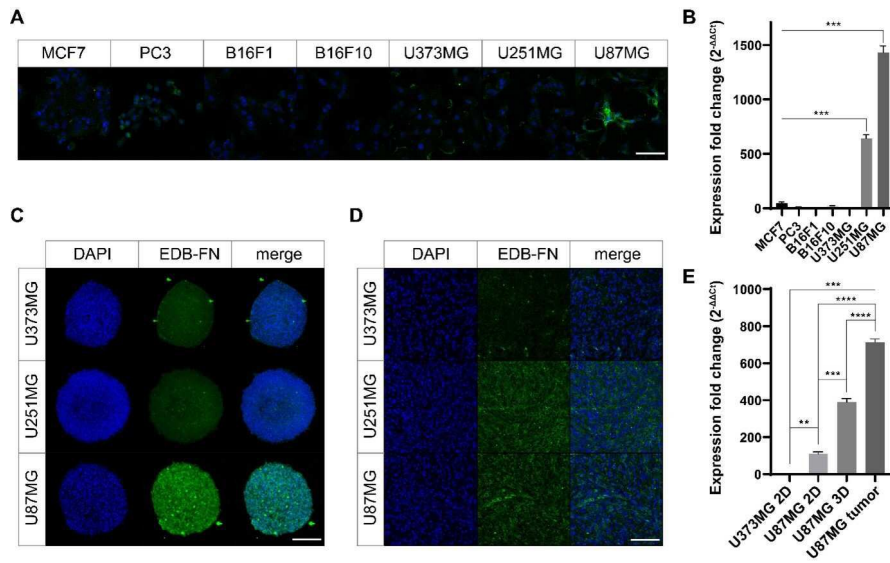
[0195] 상기 결과들을 고려할 때, 본 발명자들은 검증을 위해 피하 이종이식 동물 모델 실험을 포함한 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 수행하였다. 세균 등의 중추신경계 침입을 방지하기 위해 발달된 BBB가 적용된 BBTB는 12 nm보다 작은 극미한 생리학적인 구멍 크기를 가지므로, 훨씬 작은 크기의 나노-DDS를 사용하는 것이 BBTB를 통한 용이한 투과를 보장할 수 있다. 따라서, 본 발명자는 약물 전달을 향상시키기 위해 DSPE 고분자를 사용하여 초소형 마이셀(~12 nm)을 개발하고, 마이셀의 표면에 APT_{EDB}를 부착함으로써, 악성 뇌교종의 진단 및 치료에 사용할 수 있는 시스템을 제작하였다. 종래에는 약물전달체가 약 115 ± 13 nm 크기의 리포솜 또는 34 nm 크기의 초상자성 산화철 나노입자(superparamagnetic iron oxide nanoparticles)를 포함하여 매우 큰 편이었으나, 본 발명은 소형의 12 nm 마이셀로 매우 감소시켰다(도 2).

[0196] 본 발명자들은 EDB-FN 발현 수준과 환자의 예후간 상관관계를 정량적으로 비교하였고(도 2) 악성 뇌교종에서 EDB-FN 표적의 유용성을 검증하였다(도 5 및 6). EDB-FN의 과발현 및 EDB-FN 표적 DDS에 의한 향상된 약물 전달은 단일층 세포 배양뿐 아니라 동소 이종이식 모델에서도 확인되었으며, 이는 EDB-FN이 악성 뇌교종 세포 및 조직에서 발현되며, 나노-DDS가 EDB-FN 표적을 통해 악성 뇌교종과 연결되거나 기반을 두고 있다는 점을 시사한다(도 9). 동소 이종이식 동물 모델을 위한 DTX 복용량이 DTX의 신경독성을 고려하여 옌구리 이종이식 동물 모델을 위한 15 mg/kg보다 33% 적은 총 10 mg/kg으로 결정되었음에도 불구하고, 이종이식 모델에서 옌구리 모델에서 나타난 상당한 항암 효능이 나타났다. BBTB의 한계에도 불구하고, 제조된 EDB-FN 표적 마이셀 나노-DDS는 통계학적으로 상당한 항암 효능이 없는 비표적 마이셀 나노-DDS와 비교하여 상당한 치료 효과를 보였다. APT_{EDB}의 악성 뇌교종 세포에 대한 특이적인 결합은 APT_{EDB}-DSPE 마이셀 나노-DDS의 종양 보유 시간을 효율적으로 증가시켜, 우수한 항암 효능을 나타내었다. EDB-FN은 악성 뇌교종 조직에서 특이적으로 높은 발현을 나타냈으나, 인접한 정상 조직 및 정상 뇌 조직에서는 최소한으로 발현하였다. 상기 특성은 악성 뇌교종 치료를 위한 표적 리간드로서 EDB-FN 사용에 있어 실현가능성을 높이는데 도움을 줄 것이다.

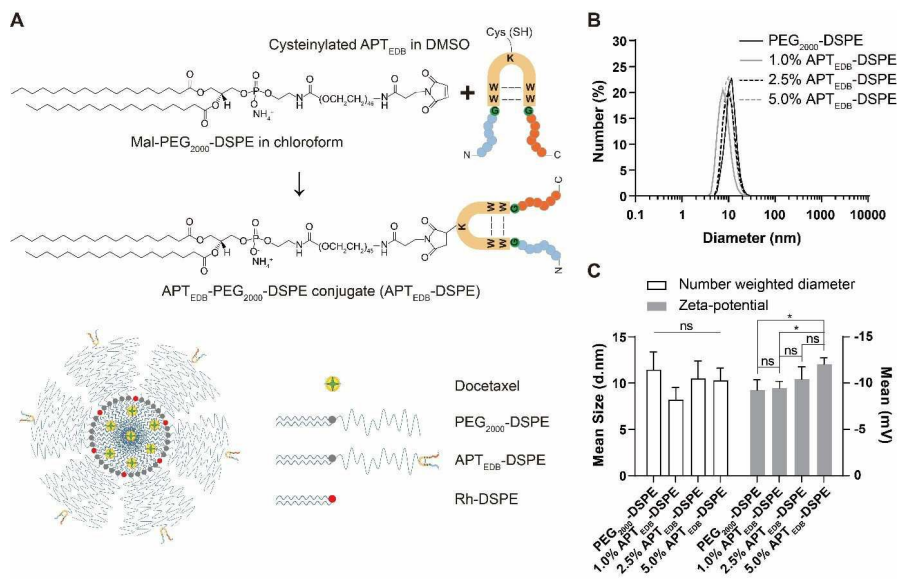
[0198] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

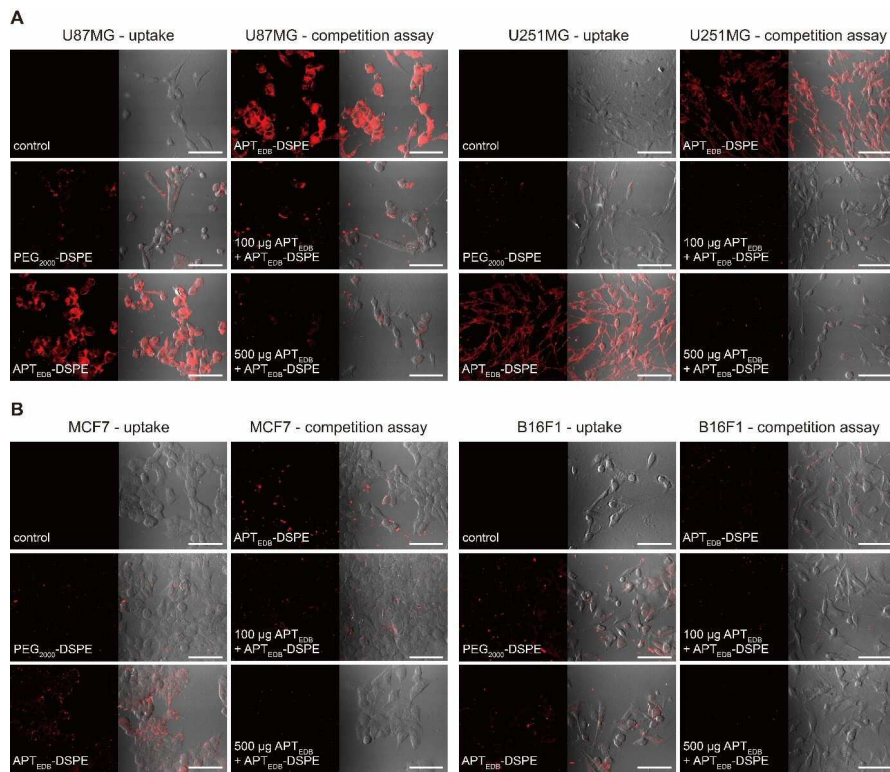
도면1



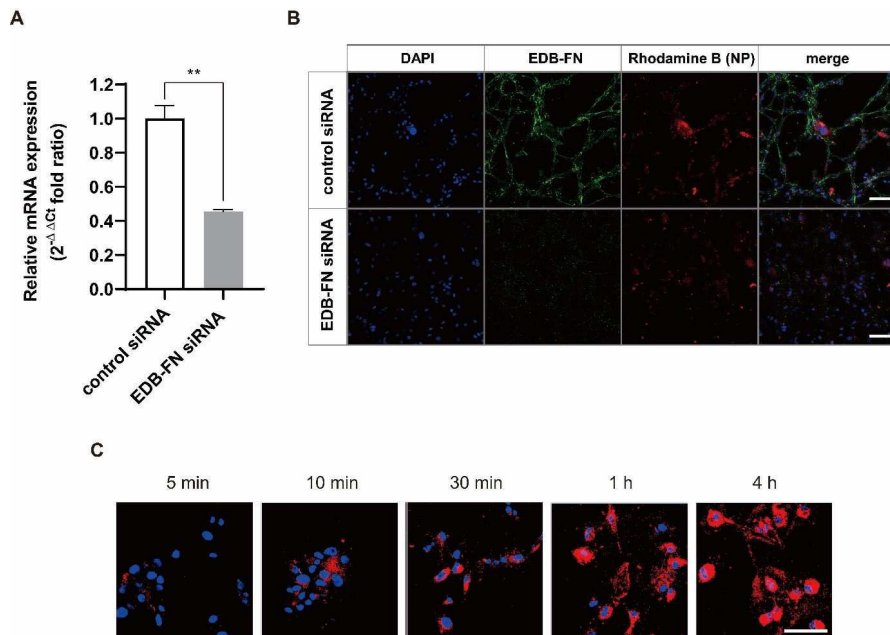
도면2



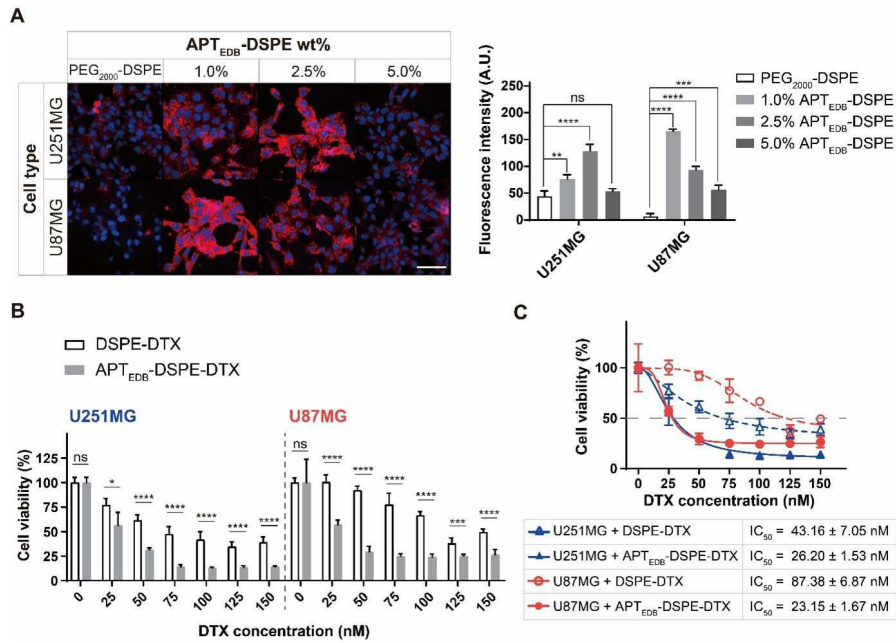
도면3



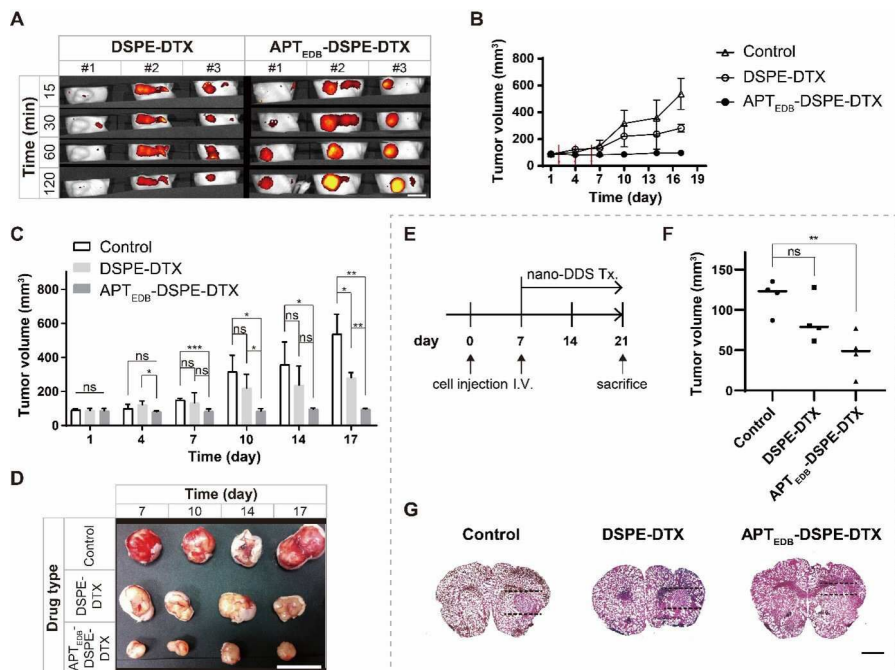
도면4



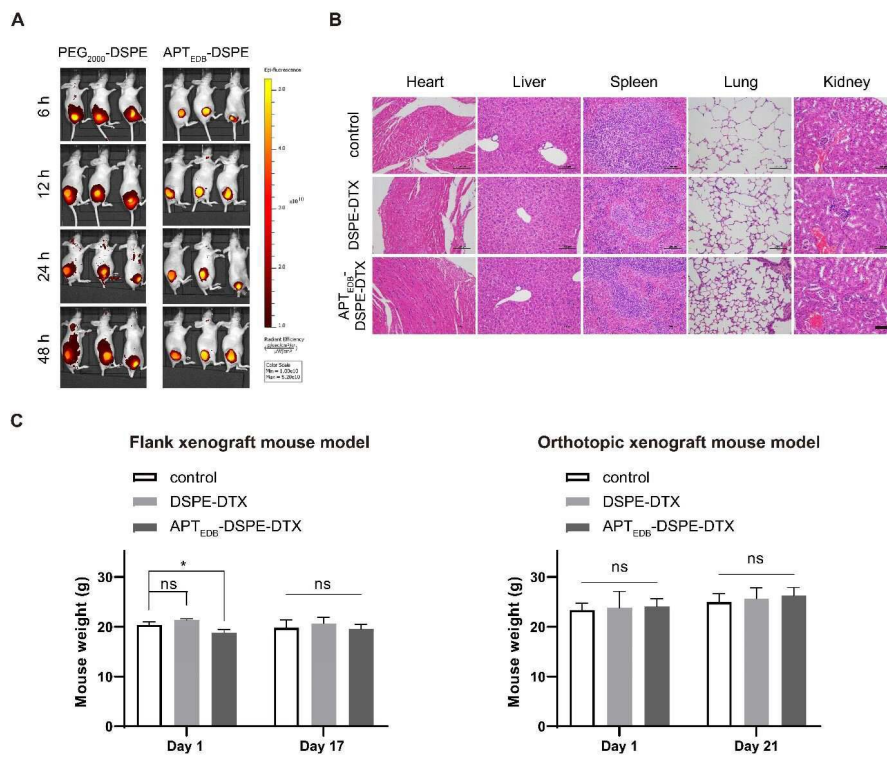
도면5



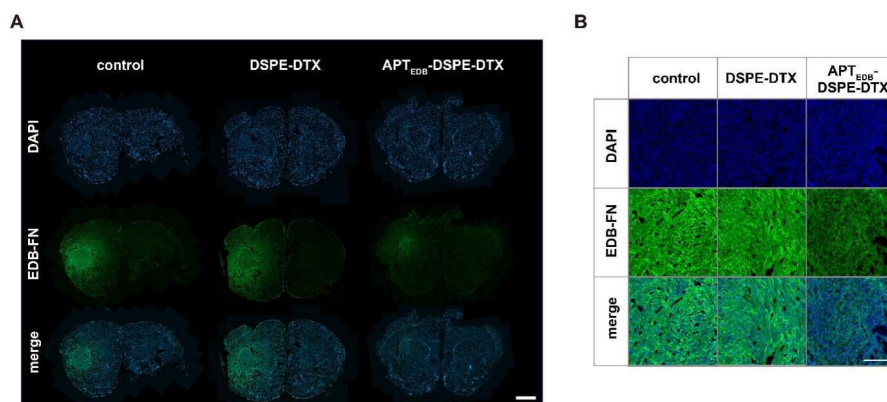
도면6



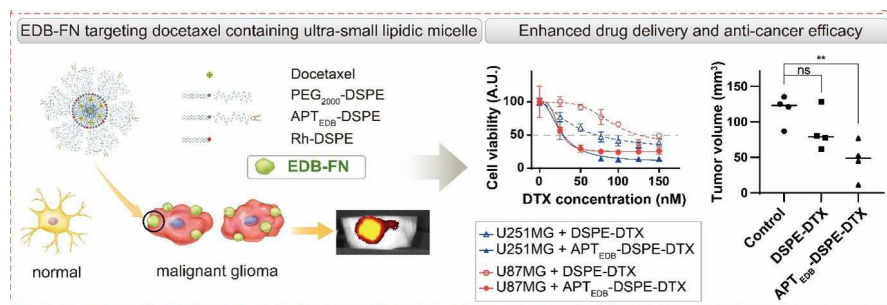
도면7



도면8



도면9



서열 목록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> Extra-domain B of fibronectin biomarker for cancer and/or brain diseases and nano drug delivery system targeting the extra-domain B of fibronectin

<130> DP-2019-1027P1, P-18750, DHP20-103

<150> KR 10-2020-0020537

<151> 2020-02-19

<160> 1

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> CHAIN

<222> (15)

<223> K is attached by C

<

400> 1

Cys Ser Ser Pro Ile Gln Gly Ser Trp Thr Trp Glu Asn Gly Lys Trp

1 5 10 15

Thr Trp Gly Ile Ile Arg Leu Glu Gln

20 25