(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년05월15일
(11) 등록번호 10-2101179
(24) 등록일자 2020년04월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/69 (2017.01) *A61K 31/337* (2006.01)
A61K 31/675 (2006.01) *A61K 31/704* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) *A61K 47/68* (2017.01)
A61K 9/127 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61P 35/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/6913 (2017.08)
A61K 31/337 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0116323
(22) 출원일자 2019년09월20일
심사청구일자 2019년09월20일
(56) 선행기술조사문헌
KR101977532 B1
(뒷면에 계속)
전체 청구항 수 : 총 10 항

(73) 특허권자
건양대학교 산학협력단
충청남도 논산시 대학로 121 (내동)
(72) 발명자
김평환
대전광역시 서구 둔산로 201, 103동 1111호
김근식
서울특별시 동작구 장승배기로4길 9 상도더샵아파트 19동 1001호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인도담

심사관 : 이재정

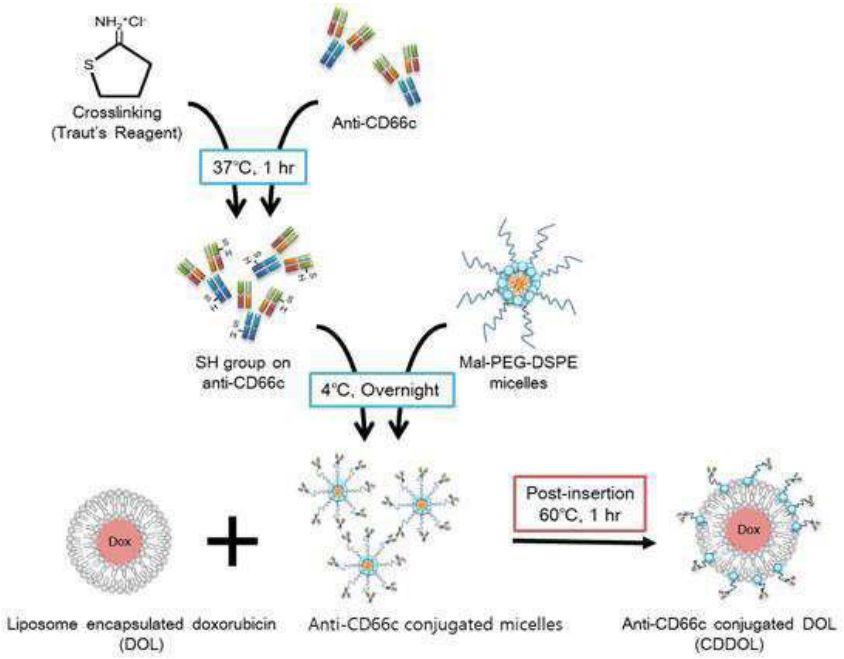
(54) 발명의 명칭 **유방암유래 암줄기세포의 선택적 표적치료를 위한 나노복합체 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 유방암유래 암줄기세포의 고유 표면 바이오마커인 CD66c를 선택적으로 표적화하는 항체가 결합되어 암줄기세포로의 선택성이 부여되고, 항암제 탑재를 통해 선택적으로 세포살상을 유도할 수 있는 리포좀(Liposome) 기반의 나노복합체(Nanocomplex) 제조방법과 이의 항암효과에 관한 것이다. 리포좀(Liposome) 표면에 항-CD66c

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1



단클론항체를 결합시켜 제작된 나노복합체의 선택적 세포내 도입능과 암줄기세포 살상능 및 생체내 투여시 나타나는 나노복합체의 주요 장기로의 감소된 축적 결과 등을 통해 부작용이 적고 치료효능이 향상됨을 증명하였다. 이를 통하여 본원에 따른 리포좀(Liposome) 기반의 나노복합체(Nanocomplex)를 이용한 연구를 통해 유방암유래 암줄기세포의 표적 치료제로 향상된 암치료를 유도하고 제작된 liposome 기반의 나노복합체의 다양한 질병으로의 응용가능성을 통해 질환의 예방 및 치료를 위한 선택적 약물 전달용 조성물로 진보된 항암치료제로 유용하게 이용 될 수 있다.

(52) CPC특허분류
A61K 31/675 (2013.01)
A61K 31/704 (2013.01)
A61K 47/6849 (2017.08)
A61K 47/6855 (2017.08)
A61K 9/1271 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A61P 35/04 (2018.01)
A61K 2039/505 (2013.01)

(72) 발명자
고은영
서울특별시 강동구 양재대로134길 87, 101동 1306호
박희빈
충청남도 계룡시 엄사면 엄사중앙로 66 성원아파트 1동 1310호

(56) 선행기술조사문헌
JP2008214324 A
JP2003535832 A
KR1020150034517 A
AACR 106th Annual Meeting 2015; April 18-22, 2015; Philadelphia, PA
Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 160 (2017) p.572-580

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2016R1D1A1B0393498
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 이공학개인기초
연구과제명 Proteogenomics 분석 기반 cancer 및 cancer stem cell 특이적 표적 세포면역치료제와 다기능성 나노바이오복합체 개발
기 여 율 1/2
주관기관 건양대학교 산학협력단
연구기간 2016.11.01 ~ 2019.10.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2018R1D1A1B07045861
부처명 과학기술정통부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 이공학개인기초
연구과제명 항 PD-L1 압타머 기반 리포솜을 이용한 HDAC 저해제와 miR-34a의 이중 전달에 의한 항암 면역치료 연구
기 여 율 1/2
주관기관 건양대학교 산학협력단
연구기간 2018.06.01 ~ 2021.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

(a) 항-CD66c 항체를 micelle에 결합시키는 단계;

(b) 독소루비신이 함유되고, 팔미토일오레오일포스파티딜콜린 (Palmitoyloleoyl phosphatidylcholine, POPC) : 콜레스테롤 : 폴리에틸렌글리콜 2000(Polyethylene glycol 2000)이 2 : 1 : 0.1 의 몰비로 리포좀(Liposome)을 제조하는 단계; 및

(c) 상기 (a)단계에서 제조된 micelle을 상기 (b)단계에서 제조된 리포좀(Liposome)에 결합하는 단계;

를 포함하는, 유방암유래 암줄기세포 표적화 나노복합체를 제조하는 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 (a)단계에서 항-CD66c 항체와 micelle을 결합하는 cross-linker는 Traut's 시약 (Thermo Scientific)인 것을 특징으로 하는, 유방암유래 암줄기세포 표적화 나노복합체를 제조하는 방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 항-CD66c 항체와 Traut's 시약은 1 : 10 비율로 혼합하여 제조하는 것을 특징으로 하는, 유방암유래 암줄기세포 표적화 나노복합체를 제조하는 방법.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

Traut's 시약이 cross-linker로 결합된 항-CD66c 항체와 micelle은 1 : 10 비율로 혼합하여 제조하는 것을 특징으로 하는, 유방암유래 암줄기세포 표적화 나노복합체를 제조하는 방법.

청구항 5

삭제

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 항-CD66c 항체는 유방암 줄기세포 특이적 바이오마커인 CD66c와 결합하는 항체 또는 항체단편인 것을 특징으로 하는, 유방암유래 암줄기세포 표적화 나노복합체를 제조하는 방법.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

항-CD66c 항체가 결합된 micelle과, 독소루비신이 함유되고, 팔미토일오레오일포스파티딜콜린 (Palmitoyloleoyl phosphatidylcholine, POPC) : 콜레스테롤 : 폴리에틸렌글리콜 2000(Polyethylene glycol 2000)이 2 : 1 : 0.1의 몰비로 제조된 리포좀(Liposome)을 포함하는, 유방암유래 암줄기세포 표적화 나노복합체.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

상기 항-CD66c 항체는 Traut's 시약 (Thermo Scientific)으로 micelle에 cross-link 된 것을 특징으로 하는, 유방암유래 암줄기세포 표적화 나노복합체.

청구항 11

삭제

청구항 12

제 9 항에 있어서,

상기 항-CD66c 항체는 유방암 줄기세포 특이적 바이오마커인 CD66c와 결합하는 항체 또는 항체단편인 것을 특징으로 하는, 유방암유래 암줄기세포 표적화 나노복합체.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

제 9, 10, 12 항 중 어느 한 항의 유방암유래 암줄기세포 표적화 나노복합체를 유효성분으로 포함하는, 유방암의 치료 또는 전이를 억제하기 위한 항암용 조성물.

청구항 16

삭제

청구항 17

제 9, 10, 12 항 중 어느 한 항의 유방암유래 암줄기세포 표적화 나노복합체을 이용하여 유방암의 발병 및/또는 전이를 예방 또는 치료하기 위한 정보를 제공하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 유방암유래 암줄기세포를 선택적으로 표적치료하기 위하여, 암줄기세포 표면의 고유 바이오마커를 표

적화하고 세포살상을 유도하는 항암제가 탑제된 리포좀(liposome) 기반의 나노복합체 (nanocomplex) 제조 공정과 그에 대한 암줄기세포의 선택적 항암치료 효능에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 유방암 발생률은 해마다 증가하고 있는 것으로 나타난다. 보건복지부와 국립 암센터 중앙 암등록 본부가 발표한 '2016년 국가 암등록 통계' 을 보면 2016년 유방암 연령 표준화 발생률은 여성 10만 명당 62.6명으로 2014년 54.7명, 2015년 56.1명에 비교하여 크게 증가하였다. 연령 표준화 발생률이란, 연령 구조가 다른 지역이나 특정 기간별 암 발생을 비교하기 위해 각 연령군에 해당하는 표준인구 비율을 가중치로 부여해 산출하는 지표이다. 2016년 새로 암 진단을 받은 여성 10만9112명 가운데 유방암 환자가 2만1747명 (19.9%)으로 가장 큰 비중을 차지했다. 2005년 이후 여성에게서 가장 많이 발생한 암 1위는 줄곧 갑상선암이었으나, 2016년엔 유방암 발생이 갑상선암(18.8%)보다 많았다.

[0003] 유방암은 유방에 발생한 암세포로 이루어진 덩이리을 의미하며, 일반적으로 유방의 유관과 유엽에서 발생하는 암을 일컫는다. 유방암은 유방 구성조직 어디 에서든 발생할 수 있어 다른 암에 비해 종류가 다양하다. 유방암 대부분은 유관과 유엽에 있는 세포, 그 중에서도 유관의 상피세포에서 기원한다. 유방암도 다른 암과 마찬가지로 적절한 치료가 이루어지지 않을 경우 혈류와 림프관을 따라 전신으로 전이하여 심각한 결과를 초래한다. 유방암 치료는 발생 연령, 병기, 암의 병리학적 특성, 환자의 심리 상태 등을 고려하여 수술, 방사선치료, 항암화학요법, 내분비치료, 표적치료 등 적절한 치료법을 적용하게 된다. (유방암 백서, 2018) 하지만, 다양한 항암치료 후에도 암은 재발하여 다른 새로운 치료법이 요구되어지고 있으며, 재발되는 암의 원인으로 많은 연구와 보고서들에서 암 발병원인 65%가 암줄기세포에 의한 것으로 보고하고 있다 (Science, 2015).

[0004] 암줄기세포(cancer stem cell, CSC)는 전분화능 및 자가 재생이라는 줄기세포와 유사한 특징을 가진 암세포의 부분 집합으로 종양형성 및 종양미세환경의 적응에 영향이 있는 것으로 여겨진다. 현재 몇몇 증거들은, CSC가, 특히 잔존 질병(residual disease)이 최소인 경우, 암의 약물 내성, 전이 및 재발과 관련이 있음을 보고하였다. 사실상 최근의 임상 증거는, 치료 기준이 되는 요법 후에 살아남은 유방암 세포의 분획에서 CSC 특징을 갖는 세포가 잔존하여 있었음을 보여주었다 (Creighton et al., 2009). 현재 많은 임상분야에서 초기 치료적 반응에도 불구하고, 내성 암세포의 생성 및 재발에 따른 잠재적인 전이를 암줄기세포 때문으로 여기고 있다.

[0005] 따라서 이러한 암 줄기세포를 치료하기 위해 선별적인 치료방법이 필요한데, 암줄기세포는 개인마다 많은 이질성이 있고, 항암제나 방사선치료에 대해 저항성을 가진다는데 가장 큰 문제로 작용하고 있기에 치료에 어려움을 가진다. 또한 암줄기세포는 임상에서 중요한 암 치료 예후 평가의 인자로 작용하기에 이를 선별하여 인지하고 추적할 수 있는 기술 개발이 필요하다. 암줄기세포 치료제 개발에 관한 기반기술은 아직 초기 연구단계로 표적화를 위한 연구 보다는 암줄기세포의 특성 규명에 대한 연구에 치중되어있다. 암세포 및 암줄기세포에 대한 치료효과를 극대화시키기 위해서는 세포 기능조절물질 발굴 외에 암줄기세포 추적기술과 세포 특이 추적용 마커의 개발이 요구되어진다.

[0006] 이러한 문제를 해결하고자, 본 발명은 선행 연구를 통해 발굴된 CD66c는 유방암유래 암줄기세포의 신규 바이오마커로서의 가능성과 암줄기세포에서의 그 생물학적 기능을 평가한 바 있다. CD66c는 CEACAM6(Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6, 암배아성 항원-관련 세포 부착 분자 6) 또는 NCA(non-specific cross-reacting glycoprotein antigen, 비-특이적 교차반응 항원)-90으로도 불리며 골수성 및 상피조직의 표면에 발현하고 있다. 상기 CD66c는 세포사멸의 일종인 아노이키스(anoikis)를 억제하여 암발생 및 암전이를 촉진하는 것으로 알려져 있으며, 정상세포의 경우 세포접착이 이뤄지지 않을 경우 세포사멸로 이뤄지지만 종양세포의 경우 아노이키스에 대한 저항력을 갖고 있기에 이로 인해 전이가 발생되는 특징을 가지고 있다. 그러므로 이 기능을 억제할 수만 있다면 좋은 암치료제가 됨과 동시에 선택적 표적치료가 가능할 것으로 사료된다.

[0007] 이를 위하여 본 발명은 리포좀 (Liposome) 기반 유방암유래 암줄기세포 표적 나노치료제를 제작하고자 하였다. Liposome은 생체의 세포막을 구성하는 인지질로 구성되어 생체 적합성이 높고, 또한 생체 내에서 약물과 활성성분을 분해 효소 등으로부터 보호하면서 운반할 수 있으며, 약물 전달 시스템의 유용한 도구로 주목받고 있다. 오늘날 혈중 체류성을 향상시키기 위해 폴리에틸렌 글리콜(PEG)로 변형된 리포좀, 혈중 안정성 및 강도를 높이기 위해 구성 지질로서 불포화 결합을 포함하지 않는 수소 첨가 포스파티딜콜린 (POPC)과 막의 상전이 온도를 높이는 콜레스테롤 (Cholesterol)을 포함하는 리포좀이 개발되어 범용되고 있다.

[0008] 또한 선택적인 표적 세포에서의 유전자 혹은 약물전달을 통해 정상세포에서의 부작용을 줄임과 동시에 표적 세포로의 치료효능을 증가시키기 위해서, 약물전달체 (drug carriers)는 목적부위(Target sites)를 표적화하고 목

적부위에서 약물을 선택적으로 방출시켜야 향상된 항암치료효과를 유도할 수 있다. 그래서 본 발명은 선행연구를 통해 발굴된 유방암유래 암줄기세포 표면의 신규 바이오마커를 활용하고 암줄기세포만 선택적으로 세포살상을 유도할 수 있는 표적치료제를 개발하고자 하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) (연구논문 0001) Stirland, D. L.; Nichols, J. W.; Miura, S.; Bae, Y. H., Mind the gap: a survey of how cancer drug carriers are susceptible to the gap between research and practice. J Control Release 2013, 172 (3), 1045-64.

(비특허문헌 0002) (연구논문 0002) Jain, R. K.; Stylianopoulos, T., Delivering nanomedicine to solid tumors. Nat Rev Clin Oncol 2010, 7 (11), 653-64.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 이에 본 발명자들은 유방암 줄기세포를 검출할 수 있는 유전자를 탐색한 결과, 세포의 특이적 바이오마커 CD66c(CEACAM6)를 발견하였고, 이를 리포좀에 결합시켜 암줄기세포의 선택적 표적화 효율을 높일 수 있었고, 리포좀내에 항암제를 담지하여 암줄기세포의 살상능을 증가시킬 수 있는 암줄기세포 표적화 나노복합제를 제조하고, 이의 효과를 규명하여 본 발명을 완성하였다.

[0011] 본 발명은 암의 재발을 예방하고자 암줄기세포에서의 선택적 세포살상을 유도하여 향상된 항암효과가 관찰되는지를 평가하고자 하였다. 이를 위해, 표적물질로는 항-CD66c 항체가 나노복합체 표면에 결합되고 대표적인 항암약제인 독소루비신(Doxorubicin)이 함유된 smart liposome을 이용하여 암세포를 표적화(targeting)하는 리포좀 개발 및 유방암유래 줄기세포를 표적 치료하는 방법을 제공하는데 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기와 같은 과제를 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 항-CD66c 항체를 micelle에 결합시키는 단계; b) 항암제가 함유된 liposome을 제조하는 단계; 및 (c) 상기 (a)단계에서 제조된 micelle을 상기 (b)단계에서 제조된 liposome에 결합하는 단계; 를 포함하는, 암줄기세포 표적화 나노복합체 및 이를 제조하는 방법을 제공한다.

[0013] 본 발명의 암줄기세포 표적화 나노복합체는, liposome 외부에 암줄기세포를 선택적으로 표적화할 수 있는 항체를 결합하여 암줄기세포에 선택적으로 결합할 수 있으며 liposome 내부에 항암제를 담지 함으로써 암줄기세포의 직접적인 살상효과를 나타낼 수 있다.

[0014] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 항체는 유방암에서 유래한 암줄기세포의 특이적 바이오마커인 CD66c를 표적화하는 항체로 유방암 유래 암줄기세포를 선택적으로 표적화할 수 있다. 본 발명에서 상기 항체는 전체 항체 또는 항체단편일 수 있고, 전체항체는 IgA, IgD, IgE, IgM IgG를 포함하며, 항체 단편은 Fab, Fab' F(ab')2 Fv 등을 포함할 수 있으나, 본 발명에서는 IgG_2 타입의 전체 항체를 사용하였다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 항-CD66c 항체는 Traut’s 시약 (Thermo Scientific)을 cross-linker로 사용하여 micelle에 공유결합 시킬 수 있다. 먼저 항-CD66c 항체에 링커를 부착시키기 위해 항체와 Traut’s 시약은 1 : 1 내지 1 : 50의 비율로 혼합하여 37 ℃에서 1 시간동안 반응시켜 제조할 수 있으나, 바람직하게는 1 : 10의 비율이다. 상기 링커가 부착된 항체를 micell에 결합시키기 위해 항체와 micell을 1 : 1 내지 1 : 50 의 비율로 혼합하여 4 ℃에서 12 내지 16 시간 반응시켜 최종 항-CD66c 항체가 결합된 micelle을 제조할 수 있으나, 바람직하게는 1 : 10의 비율이다.

[0016] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 liposome은 팔미토일오레오일포스파티딜콜린(Palmitoyloleoylphosphatidylcholine, POPC) : 콜레스테롤 : 폴리에틸렌글리콜 2000(Polyethylene glycol 2000)이 2 : 1 : 0.1 의 몰비로 구성된 지질 이중막으로 구성된 구형의 중공체인 것을 특징으로 하는 것이다.

[0017] 본 발명에서 이용한 POPC는 포스파티딜콜린을 기본으로 이루어진 중성지질이다. 이러한 포스파티딜콜린은 접목

된 지방산의 종류에 따라 다른 합성 인지질을 이룬다.

[0018] 본 발명에서는 암줄기세포 표적화를 위해 세포표면에 결합력이 약한 중성지질을 기반으로 한 liposome을 제작함으로써 표적 liposome과 대조군 liposome을 제작하여 그 효능을 평가하였다. 이때 사용한 지방산은 콜레스테롤을 함유하고 있으며, liposome 막의 강직성, 두께, 안전성, 유동성을 조절함으로서 지질이중층의 구조를 안정화시키고 세포실험, 동물실험에 있어서 liposome의 안정성을 높여준다.

[0019] 본 발명에서는 liposome의 친수성 성질을 증가시키고 구조적 안전성을 부여하기 위해, liposome이 세포 또는 생체 내에서 회전시간을 증가시키고 면역체계에 의해 사라지는 것을 방지하기 위해 PEG-접합 지질을 사용하였다. 예를 들면, 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-메톡시-폴리에틸렌글리콜-2000 (1,2-Distearoyl-sn-glycero-3- phosphoethanolamine- N-amino polyethylene glycol-2000, DSPE-mPEG-2000) 또는 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-메톡시-폴리에틸렌글리콜-5000 (1,2-Distearoyl-sn-glycero-3- phosphoethanolamine-N-amino polyethylene glycol-5000, DSPE-mPEG-5000)으로 이루어지는 군에서 선택된 1 종을 사용하였으며, 보다 바람직하게는 분자량이 2650 내지 3050 범위의 DSPE-mPEG-2000을 사용하였다.

[0020] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 liposome 내부에는 항암제를 담지 할 수 있다. 항암제는 조기 및 진행성 암의 치료를 위한 1차 항암제와 전이성 암의 치료에 사용되는 항암제를 포함할 수 있다. 예를 들면 독소루비신, 사이클로포스파마이드, 파크리탁셀, 도세탁셀, 플루오로우라실, 젬시타빈, 카페시타빈 및 이들의 유도체로 이루어진 군으로부터 어떤 것이든 사용할 수 있으나, 본 발명에서는 liposome 내부에 독소루비신을 담지하여 암줄기세포의 살상능을 확인할 수 있었다.

[0021] 본 발명의 또 다른 실시예에 있어서, 본 발명의 나노복합체는 항-CD66c 항체에 의한 표적화 기능으로 암줄기세포를 선택적으로 인식할 수 있고, liposome에 담지된 항암제에 의해 암줄기세포를 직접적으로 살상할 수 있어 암의 치료와 동시에 암의 전이를 억제할 수 있다.

[0022] 본 발명에 따라 제조된 나노복합체는 생체내 투여를 위해 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 항암용 조성물로 제조할 수 있다. 예를 들어 상기 나노복합체는 암을 치료하기 정맥내 투여를 위해 제제화 할 수 있고, 이 외에도 또 다른 투여경로인 종양내, 경구, 분무, 경피, 내시경하, 국소, 복강내, 피하 투여에 맞게 제제화 할 수 있다.

발명의 효과

[0023] 본 발명은 선행연구를 통해 발굴된 유방암유래 암줄기세포의 표면 바이오마커인 CD66c를 표적화 할 수 있는 항-CD66c 항체가 결합되고 항암약물을 함유한 리포좀 기반 나노복합체의 제조방법에 관한 것으로, 암줄기세포로의 선택적인 세포내 약물도입효과 및 이로 인한 증가된 암줄기세포 살상력을 검증함으로써 보다 근본적인 암의 진단과 치료를 가능하게 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 독소루비신 항암약제를 함유하고 표적화를 위한 항-CD66c 항체가 결합된 나노복합체의 제작공정도를 나타낸 것이다.

도 2는 CD66c를 표적화하는 리포좀 기반 나노복합체 제작을 위해, 항-CD66c 항체 only, 항-CD66c 항체와 결합한 micelle, 그리고 항-CD66c 항체-micelle이 결합된 liposome을 SDS-PAGE을 통해 검증한 결과이다.

도 3은 유방암에서 유래된 암줄기세포의 characterization을 위한 암줄기세포의 확인에 관한 결과이다. 유방암유래 암줄기세포를 마커인 CD44+/CD24-을 통해 유방암 줄기세포임을 확인한 결과(A와 B)와, 암줄기세포의 표적물질로 사용될 암줄기세포 고유의 바이오마커 CD66c의 발현을 유세포 분석법(Flow cytometry)을 통해 대조군 유방암 세포와 비교한 결과(C와 D)이다.

도 4는 제작된 유방암유래 암줄기세포 표적 치료제의 처리시간을 평가한 것이다. 결과를 가시적으로 확인할 수 있는 빨강 로다민 형광물질이 결합되어 있는 표적 리포좀(Anti-CD66c-rhodamine-liposome: CDRHOL)의 시간별 세포내 도입 효율을 형광현미경으로 관찰한 결과이다.

도 5는 선정된 CDRHOL 표적 치료제의 최적 처리시간에 따른 최적의 농도를 결정하기 위한 평가 결과이다. 리포좀의 농도를 기준으로 농도 의존적으로 처리하여 형광 결과를 관찰하였다.

도 6은 독소루비신(Doxorubicin)이 함유된 항-CD66c 표적 치료제(CDDOXL)의 함유된 항암제 농도별 유방암유래 암줄기세포의 세포살상력을 평가한 결과이다 (A). 또한, 형광현미경을 통해 항암제 기준으로 4 uM의 농도 처리 시, 표적 치료제의 유방암유래 암줄기세포에 증가된 항암제 전달효율을 확인한 결과이다(B).

도 7은 항-CD66c 표적 치료제가 실질적으로 표적세포의 CD66c를 통해 항암효과가 나타나는지를 확인하기 위한 competition assay 결과이다.

도 8은 제작된 항-CD66c 표적 치료제의 생체내 정맥투여시 나타나는 주요 장기의 biodistribution 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 본 발명은 선행연구를 통해 발굴된 유방암유래 암줄기세포의 표면 바이오마커인 CD66c를 표적화 할 수 있는 항-CD66c 항체가 결합되고 항암약물을 함유한 리포좀 기반 나노복합체 및 이의 제조방법을 제공함에 그 특징이 있다.

[0026] IT 기술의 눈부신 발전에도 불구하고 초정밀 영상장비가 동원되고 생물학적 기술과 장비가 개발됨에도 불구하고 암 치료는 아직까지 이렇다 할 치료제가 개발되지 않고 있다. 보고된 많은 최신의 치료제 또한 부작용의 발생을 최소화하고 치료효능을 최대화해야 하는 기본적 문제에 직면해 있다. 보다 효율적인 암치료를 위해서는 표적 부위로의 정밀하고 선택적인 전달에 따른 치료효과를 유도해야 하는데 암줄기세포에 대한 표적치료제 연구는 제한적이다.

[0027] 본 발명은 선행연구를 통해 발굴된 유방암 유래 암줄기세포의 표면 신규 바이오마커를 활용한 표적치료제를 개발하였다.

[0028] 본 발명자들은 암줄기세포를 표적으로 하는 항-CD66c 항체 및 항암약물을 함유한 리포좀 기반 나노복합체를 제작한 후 암줄기세포로의 약물전달 효율 및 항암효과가 향상되었는지를 평가하였다.

[0029] 그 결과 항-CD66c 항체에 의한 암줄기세포의 표적화가 증가하였고, 이로 인해 항암약물에 의한 세포사멸 효과 또한 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0031] 이하 실시예를 바탕으로 본 발명을 상세히 설명한다. 본 발명에 사용된 용어, 실시예 등은 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고 통상의 기술자의 이해를 돕기 위하여 예시된 것에 불과할 뿐이며, 본 발명의 권리범위 등이 이에 한정되어 해석되어서는 안 된다.

[0032] 본 발명에 사용되는 기술 용어 및 과학 용어는 다른 정의가 없다면 이 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 이해하고 있는 의미를 나타낸다.

[0034] (시험예)

[0036] 1. Liposome

[0037] 1) Control liposome과 중성 liposome은 POPC : cholesterol : DSPE-PEG2000을 2 : 1 : 0.1 M의 비율로 제조하였으며, 두 liposome의 최종 지질 농도는 1 mg/mL가 되도록 하였다. Rhodamine (Rho)이 표지된 중성 liposome은 POPC : cholesterol : DSPE-PEG2000 : Rho-DOPE는 2 : 1 : 0.1 : 0.05 M의 비율로 최종 lipid 농도는 1 mg/mL이다. Liposome의 제조는 각각의 지질을 클로로포름, 메탄올에 용해시킨 후, 플라스크를 45° 기울여 회전시키며 둥근 바닥 플라스크 내벽에 얇은 지질막을 형성시켰다. 유기용매를 제거하기 위해 30분 ~ 1시간동안 진공처리 한 후 형성된 지질막은 pH 4.0 citric acid 용액을 사용하여 용해하였다. 제조된 liposome 용액은 입자의 크기를 조절하기 위하여 가압압출기로 각각 800 nm, 400 nm, 200 nm, 100 nm의 공극을 갖는 폴리카보네이트 분리막 (Whatman, USA)을 이 용하여 각각 10 회 이상 가압 압출하여 100 nm까지 크기조절을 하였다.

[0038] 2) Control liposome과 중성 liposome 내부의 pH는 4.6으로 유지하고 겉은 pH 7.5를 유지하기 위해 투석 카세트 (Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette) 을 이용하여 버퍼교환을 실시하였다. 투석 카세트를 pH 7.5 HEPES buffer에 담가놓고 실온에서 2 시간 incubation 시킨다. 버퍼를 갈아준 후 -4 ℃에서 18 시간 이상 반응시킨 후 liposome을 채취하였다. 이때 liposome의 pH는 겉은 pH 7.5, 내부는 pH 4.6이 된다.

[0039] 3) 2.5 mg/mL 의 독소루비신 (doxorubicin: Dox)용액을 1 mg/mL 농도의 상기 liposome 용액에 첨가한 후, 60 ℃에서 2 분 동안 진탕시켰다. Liposome의 구조가 벌어지면서 내부에 있던 수소이온이 삼투압 현상에 의해 외부에 있는 독소루비신과 교체되어 독소루비신이 liposome 내부에 봉입되는 Dox-liposome (DOXL)을 제조하였다. 봉입되지 않은 독소루비신은 사이즈 배제 크로마토그래피를 이용하여 제거하였고, 아미콘 울트라 센트리퓨지 필터

(Amicon Ultra Centrifugal Filters)를 이용하여 1 mL로 농축시켰다. 독소루비신의 봉입효율은 UV-분광광도계를 이용하여 최대 흡수파장 480 nm에서 독소루비신의 농도를 측정한 후 농도를 산출하였다.

[0040] 4) CEACAM6 항체 (Thermo Scientific)와 crosslinker인 Traut's 시약 (Thermo Scientific)을 1 : 10 M의 비율로 제조하여 37 ℃에서 1 시간 반응하였다. 이후 항체와 결합하지 못한 Traut's 시약을 제거하기 위해 10 K nanosep (Pall laboratory)을 이용하여 14,000 rpm, 5 분 내지 10 분 원심분리를 한 후 필터를 통과하지 않은 항체와 Traut's 시약 결합 (66c-linker) 시료만을 분리하여 사용하였다. 항체 농도를 측정하기 위해 BCA protein assay kit (Thermo Scientific)로 확인하였다. 이후 항체와 마이셀을 1 : 10 M의 비율로 혼합하여 4 ℃에서 12 시간 내지 16 시간 반응하였다.

[0042] 5) 항-CD66c 항체/micelle 복합체를 상기 과정을 통해 만들어진 중성 liposome 및 Rho-liposome에 결합시키기 위해 60 ℃ 에서 1 시간 진탕하여 liposom에 항-CD66c 항체/micelle 복합체가 끼어들어가게 하는 후삽입 (post insertion)방법을 실시하였다. 결합되지 않은 항CD66c/micelle을 제거하기 위해 사이즈 배제 크로마토그래피를 이용하여 제거하였고, 아미콘 울트라 센트리퓨지 필터(Amicon Ultra Centrifugal Filters)를 이용하여 1 mL로 농축시켰다. 항-CD66c 항체/micelle이 결합된 liposome의 독소루비신 농도는 UV-분광광도계를 이용하여 최대 흡수파장 480 nm에서 독소루비신의 농도를 측정한 후 농도를 산출하였다.

[0044] 2. SDS-PAGE analysis

[0045] 10 % polyacrylamide gel에 250 kDa protein ladder (Thermo Scientific), 대략 150 kDa인 항-CD66c 항체, crosslinker로 사용된 Traut's 시약 (Thermo Scientific)과 결합된 항-CD66c 항체 (66c-linker), 66c-linker와 결합한 micelle (66c-micelle), 그리고 66c-micelle과 결합한 liposome을 각 well에 loading 한다. 전기영동은 50 mA, 70 분 진행한다. 이후 gel을 Coomassie blue stain (Bio-rad)으로 1 시간 이상 염색한 후 methanol : acetic acid (1 : 1) 용액으로 destain하여 결과를 확인한다.

[0047] 3. 세포배양

[0048] 유방암 세포주인 MCF-7 (ATCC, USA)을 5 % CO_2, 37 ℃ 조건에서 DMEM/ high glucose (Dulbeco's Modified Eagle Medium; Hyclone)에 10 % 태아 소혈청(Fetal bovine serum, FBS; Hyclone)과 1 % penicilin/streptomycin (Corning)을 첨가하여 배양하였다. MCF-7 으로부터 유래한 유방암 줄기세포(Breast cancer stem cell, BCSC)는 Ultra-Low attachment 6-well plate (Corning)에 2 x 10^4 cells/well 되도록 분주하여 5 % CO_2, 37 ℃ 조건하에 배양하였다. 7 일 마다 sub-culture하여 최종적으로 14 일 차 BCSC를 실험에 사용하였다. 배지는 DMEM/F12 (Gibco)에 10 % FBS, 1 % penicilin /streptomycin와 성장인자들인 insulin (Gibco), B27 (serum free; Gibco), hEGF (Human epidermal growth faction; Sigma), 그리고 bFGF (Basic human fibroblast growth factor; Gibco)을 첨가하여 배양하였다.

[0050] 4. Flow cytometry analysis

[0051] MCF-7와 MCF-7 유래 BCSC를 각각 2 x 10^5 cells씩 single cell로 각 tube에 준비한다. Human CD24-APC detection antibody (R&D), Human CD44-PE detection antibody (R&D), 그리고 CEACAM6 (Thermo Scientific) 및 goat anti-mouse IgG (H+L) Alexa fluor™ Plus 488 (Thermo Scientific)을 처리하여 유방암줄기세포 및 CD66c 발현을 검증하였고 novocyte flow cytometry (ACEA biosciences inc.)로 분석하였다.

[0053] 5. 표적 liposome의 암줄기세포 처리 Optimal 조건 선정을 위한 uptake assay

[0054] 제조된 리포좀 나노복합체의 암줄기세포에 도입되기 위한 최적의 물질처리시간을 선정하기 위하여, 14일 동안 배양한 BCSC을 48 well plate에 5~6 x 10^4_cells/well을 seeding하여 하루 배양하였다. 제조된 로다민 표지 liposome (RHOL)과 항CD66c가 결합된 로다민 표지 liposome (CDRHOL)을 BCSC에 lipid 농도 32 ㎍ 씩 처리 후 37 ℃에서 1, 2, 4, 6, 12, 24 시간 반응 시킨 후 ZOE 형광 현미경으로 확인하였다. 정량화된 결과를 얻기 위하여 6, 12, 24 시간의 샘플을 trypsin-EDTA로 떼어 최종적으로 100 uL free-media에 single cell로 희석한 후 유세포 분석기(Flow cytometer)와 Tali Image-based cytometer 및 TaliPCApp (version 1.0)을 이용하여 분석하였다.

[0055] 또한, 최적의 liposome 처리 농도를 선정하기 위하여 Rho-lipo와 CDRHOL을 BCSC에 lipid 농도 8, 16, 32 ㎍씩 처리 후 37 ℃, 6 시간 반응 시킨 후 ZOE 형광 현미경으로 확인하였다.

[0057] 6. Cell viability

[0058] MCF-7 및 14 일 동안 배양한 BCSC을 96well plate에 3~4 x 10^4 cells/well을 seeding 하여 하루 배양하였다. 항암제가 함유된 liposome인 DOXL과 CDDOXL은 독소루비신 농도 0, 1, 2, 4, 5 uM을 free media에 37 ℃, 6 시간 처리 후 세포를 관찰하고, 그 후 배양배지로 배지를 갈아준 뒤 48 시간 후에 생존능을 평가하였다. 이를 위하여 thiazolyl blue tetrazolium blue (MTT) 5 mg/mL을 한 well 당 100 uL씩 넣어 37 ℃, 4 시간 반응시켜준다. 이후 dimethylsulfoxide (DMSO)를 한 well 당 300 uL씩 분주하고 37℃, 15 분 반응 후 VersaMax microplate reader (Molecular devices)를 사용하여 570 nm에서 흡광도(optical density, OD)를 분석하였다. Negative control (NC)은 liposome을 처리하지 않은 그룹이며, 결과는 각 sample의 OD 값/ control의 OD 값으로 측정하였다.

[0060] 7. Competition assay

[0061] 14 일 동안 배양한 BCSC을 96 well plate에 3~4 x 10^4 cells/well을 seeding 하여 하루 배양하였다. Competition assay을 진행하기 위해 Free media로 30 분 동안 세포를 안정화시킨 뒤, 항-CD66c 항체를 0, 0.2, 0.5 ㎍ 으로 각각 처리하여 4 ℃에서 1 시간 반응하였다. 이 후 DOXL과 CDDOXL을 독소루비신 농도 4 μM을 기준으로 free media에 37 ℃, 6 시간 처리 후 배양배지로 배지를 갈아준 뒤 48 시간 후에 MTT를 시행하였다.

[0063] 8. *In vivo* biodistribution assay

[0064] 생체 내에서 표적 liposome의 거동을 평가하기 위해, 면역반응이 없는 SCID mice에 RHOL과 CDRHOL를 90 ㎍ /mice 농도로 꼬리를 통해 정맥주사 하였다. 10분 후, 희생된 쥐의 주요 장기를 적출하여 vieworks사의 VISQUE InVivo Smart장비를 이용하여 나노복합체의 형광 이미지를 촬영하였다.

실 시 예 1

[0066] **항-CD66c 항체가 결합된 이미징 및 항암약제가 탑재된 기능성 liposome의 제작 확인**

[0067] 시험예 1의 liposome 제조방법(도 1)에 의해 제작된 다기능성 liposome에 실질적으로 항-CD66c 항체가 결합되었는지를 확인하기 위하여 SDS-PAGE assay를 실시하였다(도 2). 항CD66c는 IgG_2 type이며 평균 150 kDa의 크기이다. Traut' s 시약은 3 KDa이하의 크기이며 사용된 rhodamine 표지 중성 liposome은 평균 지름 100 nm로 10 KDa 이상이다. 도면 2에서 보듯이, 각 제조과정 단계에서의 산물들에 대한 크기는 최종 표적 liposome이 되어갈수록 크기가 증가하는 것을 확인할 수 있다 (lane 4와 5). 또한 대조군인 liposome (lane 6)에서는 protein의 부재로 인해 항체가 검출되는 크기에 밴드가 나타나지 않음을 확인할 수 있다. 따라서 최종 산물의 표적 liposome (lane 5)의 크기가 증가한 것을 통해 본 제조공정을 통해서 항-CD66c 항체가 liposome에 결합된 다기능성 liposome이 잘 제조된 것을 확인할 수 있었다.

실 시 예 2

[0069] **BCSC 검증 및 CD66c 발현 확인**

[0070] 본 발명에서 사용한 암줄기세포가 유방암 세포주에서 유래되었는지를 확인하기 위해서 암줄기세포의 대표적인 마커인 CD44+/CD24-의 발현을 유세포 분석기(flow cytometry, FACS)을 통하여 분석하였다. MCF-7의 CD44+/CD24-의 발현을 나타내는 IV 분면의 값은 3.31 % 인데 비해, BCSC의 값은 50.64 %로 MCF7에 비해 상당히 증가된 것을 확인하였다. 이를 통해 본 발명의 실험에 사용될 암줄기세포가 유방암으로부터 잘 유래되었음을 알 수 있었다(도 3의 A와 B).

[0071] 또한, 실질적인 표적 물질로 사용될 암줄기세포의 세포표면 고유의 신규 바이오마커 발현률을 FACS로 평가해 보았다. 암줄기세포 배양 14 일째에 암줄기세포로서의 특징이 가장 높다는 것을 확인한 뒤, 같은 시간 안에 분화유도된 암줄기세포의 표면 CD66c 바이오마커 발현값을 비교하였다. 그 결과, MCF7에서의 CD66C의 발현률이 9.86 % 인데 비해 BCSC에서의 CD66C의 발현률은 16.8 %로 두 배정도 차이가 남을 확인할 수 있었다(도 3의 C와 D). 이를 통해 CD66c는 유방암유래 암줄기세포에서 높게 발현되어 표적물질로써 사용이 용이하다는 것을 입증하였다.

실 시 예 3

[0073] **유방암유래 암줄기세포의 고유 바이오마커를 표적화하는 liposome의 최적 처리조건 확인**

[0074] 유방암유래 암줄기세포의 세포표면 바이오마커를 표적화하기 위해 제작된 CDRHOL의 표적세로의 최적 처리시간을 선정하고 동시에 암줄기세포에서의 세포내 도입율이 향상되는지를 확인하기 위해 시간별 uptake assay를 시행하였다. 각 liposome 처리 후 시간별로 세포내 도입을 확인하기 위한 형광현미경 관찰시 시간이 지남에 따라 두 물질 처리세포에서 로다민의 형광발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 liposome 처리 후 6시간부터 RHOL 처리 세포에서보다 CDRHOL 처리군에서 형광이 훨씬 더 증가하는 것을 확인할 수 있었다(도 4A). 처리 시간에 대한 로다민 형광 발현률을 정량화 하고자 수행한 FACS 분석에서 CDRHOL 처리 세포에서의 형광값이 약 3.2 mean fluorescent intensity (MFI) 값이 평가된데 비해 RHOL이 처리된 세포에서의 로다민 형광값은 약 1.6 MFI로 CDRHOL 처리군이 2 배 더 많이 암줄기세포 내로 도입되는 것을 확인할 수 있었다(도 4B). 이를 통해 CD66c를 표적화 하는 항체가 결합된 liposome이 대조군 세포에 비해 암줄기세포로의 세포내 도입률이 증가되는 것을 검증하였다.

[0075] 위 결과를 바탕으로, 암줄기세포 표적 liposome의 최적 처리 용량을 결정하기 위하여 RHOL과 CDRHOL을 농도별로 암줄기세포에 6 시간씩 처리하였다. 그 결과 도 5에서와 같이 각 liposome의 처리 용량 의존적으로 세포내 도입률이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 그 중에서도, 32 ug을 처리하였을 때 가장 높은 세포내 도입이 유도되었음을 로다민 형광을 통해 확인하였고, RHOL 처리군 보다는 CDRHOL 처리군이 같은 liposome 용량을 처리하였을 때 더 증가된 세포내 도입이 나타나는 것을 하였다.

실 시 예 4

[0077] **항암약물이 함유된 표적 liposome의 암줄기세포 살상능 비교**

[0078] 실질적으로 유방암유래 암줄기세포를 표적화하기 위해 제작된 liposome 기반 나노복합체의 실질적인 암줄기세포 살상능을 평가하기 위해서 현재 임상에서 사용되고 있는 대표적인 항암제인 doxorubicin을 함유한 liposome (CDDOXL)을 제작하여 세포 살상능을 평가하였다. Liposome 기반 처리 시간과 농도는 앞서 평가한 조건대로 6 시간동안 항암제가 함유된 표적 liposome (CDDOXL)과 대조군 liposome인 DOXL을 CD66c 고발현 세포인 BCSC와 저발현 세포인 MCF7 암세포에 처리하였다. 또한 실질적인 항암효력이 나타나는 농도를 선정하고자 doxorubicin 기준으로 농도 의존적으로 처리하여 그 세포살상 효과를 평가하였다.

[0079] 암줄기세포 살상력은 liposome 안에 함유된 항암제에 의해 나타나므로 항암제 농도가 높을수록 암줄기세포 살상력이 증가하는 현상을 관찰할 수 있었다(도 6A). CD66c가 고발현되어 있는 BCSC 세포에서의 세포살상력은 DOXL의 처리군 보다는 CDDOXL이 처리된 세포에서 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 항암제 농도 2 μM에서 DOXL보다 CDDOXL의 세포살상력이 현저히 증가하였다. CD66c를 표적화하는 liposome(CDDOXL)에서 암줄기세포 살상력이 증가하는 현상으로 보아 CDDOXL이 세포내로 항암약제를 잘 전달하여 암줄기세포 살상력이 증가됨을 알 수 있었다. 반면에, CD66c가 저발현되는 MCF7 세포에서의 실험결과는 도 6B에서 보듯이 DOXL과 CDDOXL 처리군에서 큰 세포살상력이 나지 않는 것을 관찰할 수 있었다. BCSC 세포에서의 CDDOXL 4 μM 처리 시 49%의 세포살상력이 나타나는데 비해 DOXL의 세포살상력은 25% 로 CDDOXL보다 약한 세포살상을 유도하는 것을 확인할 수 있었다. 같은 항암제 농도에서 MCF7 세포에서의 CDDOXL의 세포살상력은 21%로 BCSC에서의 결과와 비교해 세포살상력이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 이를 가시적으로 확인한 항암약제 형광이미지 결과에서도 이 경향이 일치되게 나타나는 것을 확인할 수 있는 것으로 보아(도 6C), CD66C가 고발현되는 세포에서 증가된 CDDOXL의 세포살상력은 CDDOXL이 CD66c의 발현에 따른 선택적 항암효과가 나타남을 알 수 있었고, 표적화 liposome이 선택성을 가지고 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[0080]

실 시 예 5

[0081] **표적세포에서의 항-CD66c 항체가 결합된 liposome의 선택성 확인**

[0082] 실질적으로 항-CD66c 항체가 결합된 표적화 liposome이 암줄기세포의 세표 표면에 있는 CD66c를 표적화하여 증가된 세포내 도입과 살상효과를 나타내는지를 확인하기 위하여 CD66c 항체를 이용하여 competition assay를 시행하였다. Competition assay를 위한 항-CD66c 항체의 농도는 0.2와 0.5 ㎍의 두 가지 농도를 4 ℃에서 1 시간 처리한 뒤, washing 후 항암제가 함유된 DOXL과 CDDOXL을 6 시간 처리 하고 48 시간째에 세포 살상능을 평가하였다. 그 결과, 항체를 처리하지 않은 세포에서는 실시예 4의 데이터와 유사하게 DOXL이 처리된 그룹에서의 암줄기세포 살상력이 17.1%인데 반해, CDDOXL이 처리된 그룹에서의 세포살상력은 40.4 %로 DOXL보다 2.3 배 높은

살상력이 유도되었음을 확인할 수 있었다(도 7A). 하지만, 0.5 ㎍의 항-CD66c 항체가 선 처리된 세포에서의 DOXL의 세포살상력은 17.3 %로 항체가 처리 되지 않은 그룹과 비교해 큰 차이가 나지 않음을 확인할 수 있었다. 그에 비해 CDDOXL의 경우에는, 0.5 ㎍의 항체가 처리 되었을 때 20.5 %로 세포살상력이 약 2 배정도 감소되었다. CD66c가 저발현되는 MCF7 세포의 경우, 항-CD66c 항체가 처리되지 않은 DOXL과 CDDOXL 처리그룹들에서는 각각12.8 %와 15.1 %의 세포살상력이 관찰되었다. 이 결과는 도 6B에서와 유사한 경향으로 나타났다. 이 그룹들에 0.2와 0.5 ㎍의 항-CD66c 항체를 전처리한 후 liposomes을 처리하였을 때는 BCSC에서의 결과와 달리 두 그룹들 모두 암줄기세포 살상력에 큰 차이가 관찰되지 않았다.

[0083] 따라서 CD66c가 고발현되는 세포에서 항-CD66c 항체가 처리되었을 때 암줄기세포의 세포살상력이 감소하는 현상을 통해 항-CD66c 항체가 결합된 항암제가 탑재된 liposome은 암줄기세포 표면에 발현된 CD66c를 매개로 세포살상력이 증가한다는 것을 증명하였다. 이를 통해, 항-CD66c 항체 결합 liposome은 암줄기세포를 선택적으로 표적화하여 세포내 약물도입을 증가시킬 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

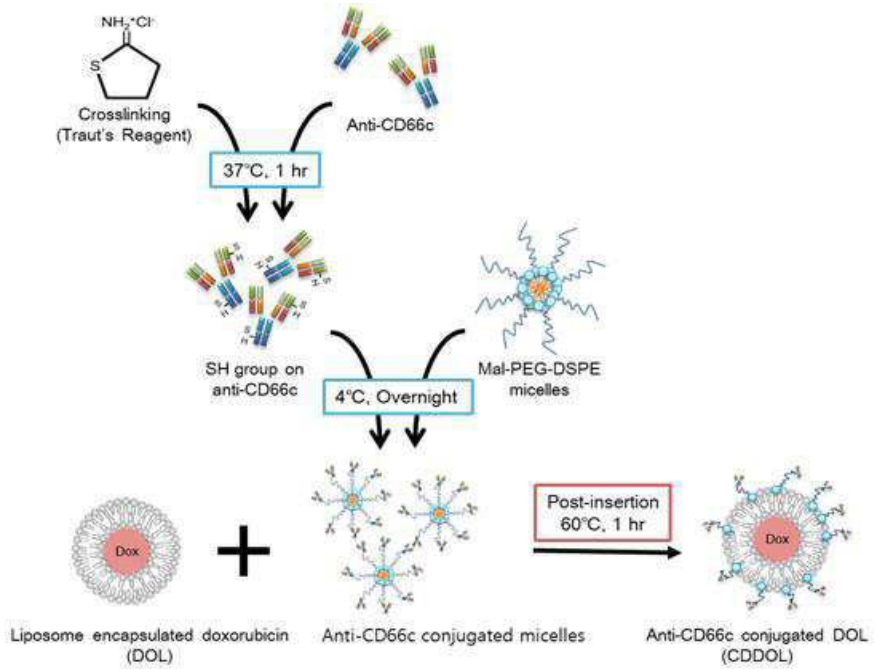
실 시 예 6

[0085] **쥐에 정맥 투여된 항-CD66c 항체 결합 liposome의 생체 내 분포 평가**

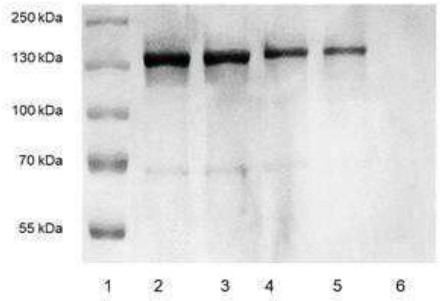
[0086] 나노복합체의 생체 내 전신투여 시 치료물질들은 주로 간과 폐에 축적되어 부작용을 유발하는 경향이 있다. 이에 본 발명을 통해 개발된 유방암유래 암줄기세포 표적치료제의 생체 내 투여 시 주요 장기들의 분포를 확인하기 위해 쥐의 꼬리 정맥을 통해 90 ㎍의 ROHL과 CDROHL을 투여 한 뒤 장기를 적출하여 소동물 이미징 장비를 통해 liposome에 결합되어 있는 로다민 형광염료를 촬영하였다. 주요 장기들에서의 투여된 liposome의 축적 및 분포결과는 빨강색 형광 염료인 로다민을 관찰하여 확인할 수 있었다. 표적화 기능이 없는 RHOL의 경우 간과 폐에 축적이 되는 것을 관찰할 수 있었으나, 표적화 기능이 있는 CDRHOL의 경우에는 RHOL의 결과에 비해 현저히 로다민 축적이 감소되어 있음을 확인할 수 있었다. 이는 각 장기에서의 로다민의 형광수치를 측정한 후 정량화한 그래프 결과에서도 확연히 차이가 나타남을 알 수 있었다 (도 8B). 이를 통해, liposome을 이용한 표적화용 항체의 결합은 대조군 치료물질에 비해 생체 내 부작용을 줄일 수 있음을 검증할 수 있었다.

도면

도면1

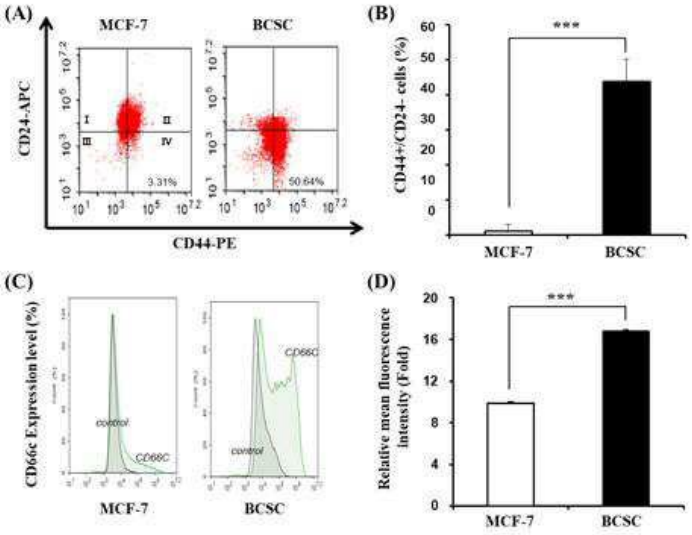


도면2

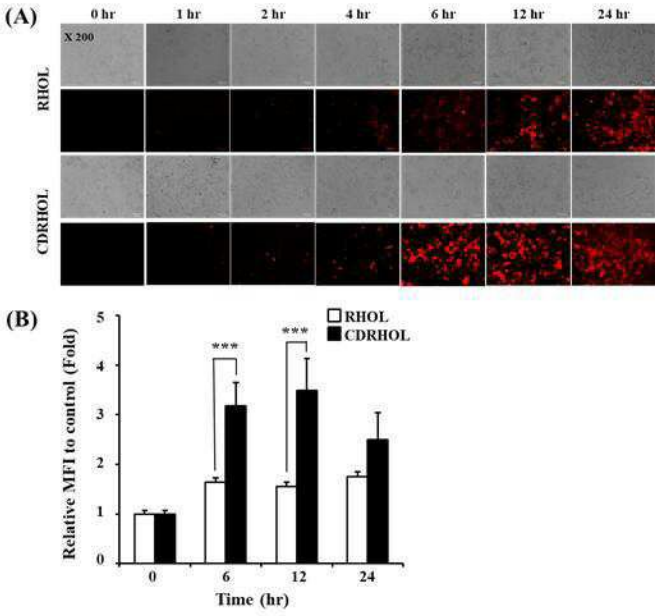


1 : Protein ladder
2 : Anti-CD66c (in PBS)
3 : Anti-CD66c + traut's reagent (in PBS)
4 : Anti-CD66c/traut + micelle (in HEPES)
5 : Anti-CD66c/micelle + Rho-liposome (in HEPES)
6 : Rho-liposome only (in HEPES)

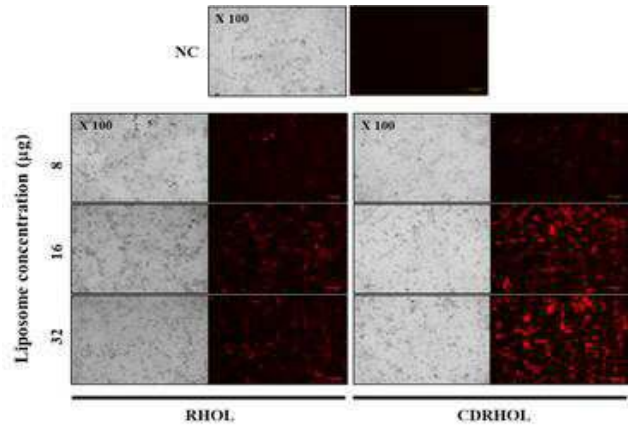
도면3



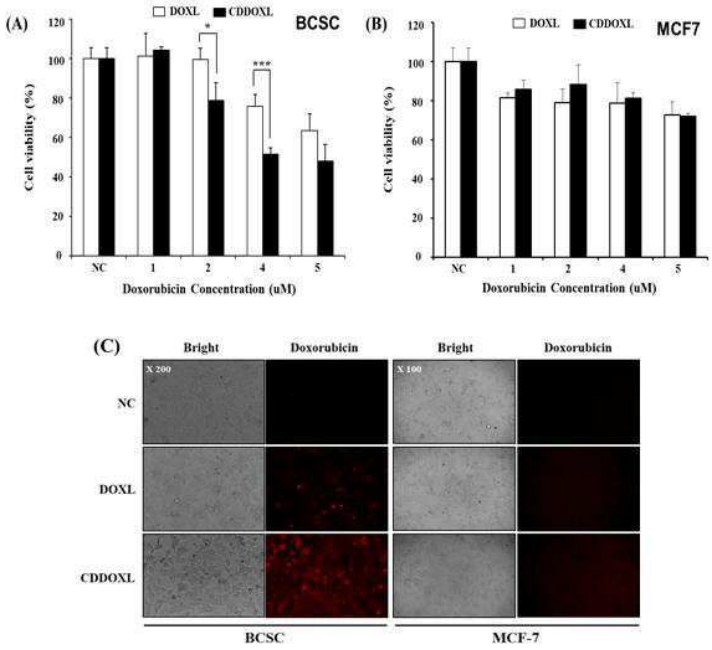
도면4



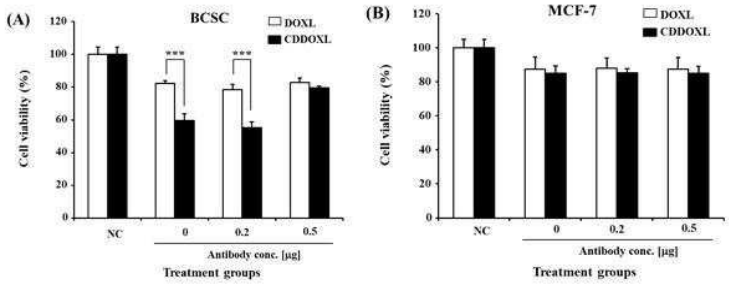
도면5


NC
X 100
X 100
X 100
Liposome concentration (μg)
8
16
32
RHOL
CDRHOL

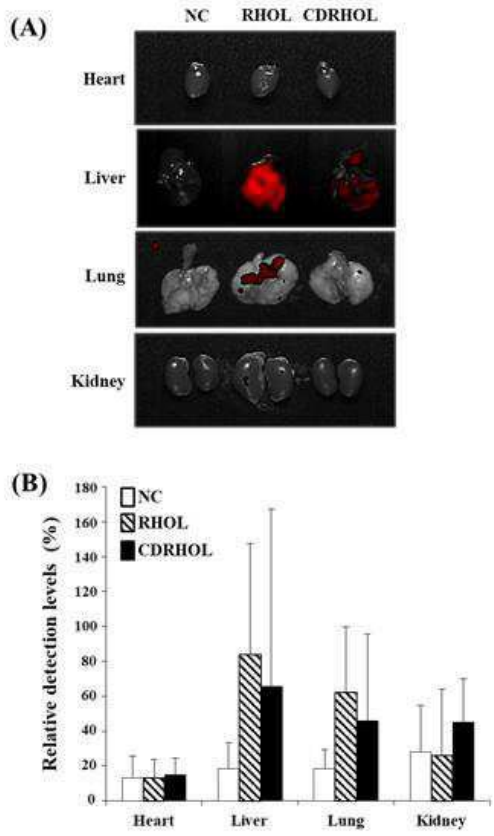
도면6


(A)
DOXL
CDDOXL
BCSC
Cell viability (%)
Doxorubicin Concentration (uM)
(B)
MCF7
(C)
Bright
Doxorubicin
X 200
X 100
NC
DOXL
CDDOXL
BCSC
MCF-7

도면7


(A)
BCSC
DOXL
CDDOXL
Cell viability (%)
Antibody conc. [μg]
Treatment groups
(B)
MCF-7

도면8



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 17

【변경전】

제 9 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항의 ---

【변경후】

제 9, 10, 12 항 중 어느 한 항의 ---

【직권보정 2】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 15

【변경전】

제 9 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항의 ---

【변경후】

제 9, 10, 12 항 중 어느 한 항의 ---