



- (51) 국제특허분류:
A61K 39/085 (2006.01) A61K 49/08 (2006.01)
A61K 9/133 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2011/004821
- (22) 국제출원일: 2011년 6월 30일 (30.06.2011)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2010-0063637 2010년 7월 1일 (01.07.2010) KR
10-2011-0065151 2011년 6월 30일 (30.06.2011) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 포항공과대학교 산학협력단 (POSTECH ACADEMY-INDUSTRY FOUNDATION) [KR/KR]; 경상북도 포항시 남구 효자동 산 31 포항공과대학교내, 790-784 Gyeongsangbuk-do (KR).
- (72) 발명자; 경
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 곽용송 (GHO, Yong Song) [KR/KR]; 경상북도 포항시 남구 지곡동 교수아

파트 4 동 1003 호, 790-751 Gyeongsangbuk-do (KR). 김오연 (KIM, Oh Youn) [KR/KR]; 서울 용산구 이촌 1 동 한가람아파트 214 동 1803 호, 140-728 Seoul (KR). 장수철 (JANG, Su Chul) [KR/KR]; 경상북도 예천군 감천면 현내리 591 번지, 757-913 Gyeongsangbuk-do (KR). 윤창민 (YOON, Chang Min) [KR/KR]; 경상북도 포항시 남구 효자동 승리빌라 7 동 104 호, 790-330 Gyeongsangbuk-do (KR). 김윤근 (KIM, Yoon Keun) [KR/KR]; 경상북도 포항시 남구 지곡동 교수아파트 8 동 1302 호, 790-751 Gyeongsangbuk-do (KR).

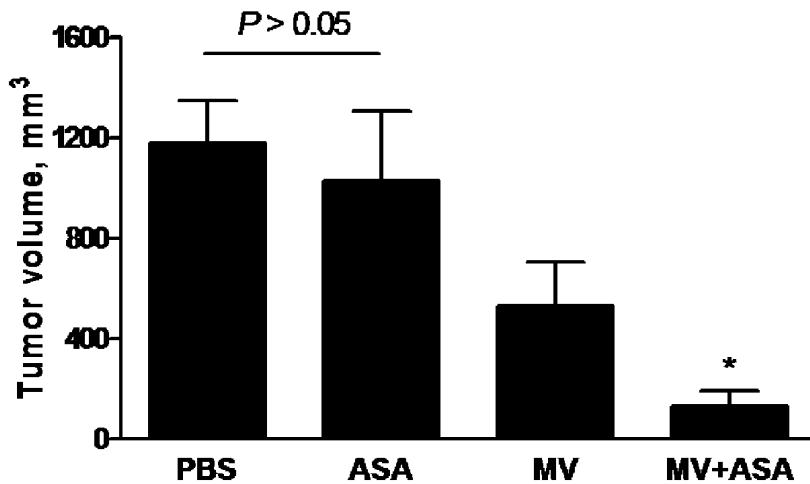
- (74) 대리인: 특허법인 이룸 (ERUUM PATENT & LAW FRIM); 서울특별시 강남구 대치동 1005-8 보성빌딩 5층, 135-851 Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: METHOD FOR TREATING AND DIAGNOSING CANCER BY USING CELL-DERIVED MICROVESICLES

(54) 발명의 명칭 : 세균유래 마이크로베시클을 이용한 암치료 및 암진단 방법

[Fig. 10]



*, P < 0.05 vs. the other groups

(57) Abstract: The present invention relates to a method for treating and/or diagnosing cancer by using cell-derived microvesicles. In addition, the present invention provides a method for increasing cancer treatment efficacy and for reducing the side effects of a therapeutic drug in cancer treatment using cell-derived microvesicles. Further, the present invention provides a method for loading a drug in treating or diagnosing diseases on cell-derived microvesicles to deliver the drug to a target cell or tissue, and the like.

(57) 요약서: 본 발명은 세균유래 마이크로베시클을 이용하여 암을 치료 및/또는 진단하는 방법에 관한 것이다. 또한 본 발명은 세균유래 마이크로베시클을 이용하여 암을 치료함에 있어 항암치료효능을 증가시키고, 치료약물의 부작용을 감소시키는 방법을 제공한다. 이에 더하여, 본 발명은 세균유래 마이크로베시클에 질병 치료용 또는 진단용 약물을 로딩하여 표적 세포 또는 조직에 전달하는 방법 등을 제공한다.

WO 2012/002760 A2



SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM,
KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,

MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를
별도 공개함 (규칙 48.2(g))

명세서

발명의 명칭: 세균유래 마이크로베시클을 이용한 암치료 및 암진단 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 세균유래 마이크로베시클을 이용하여 암을 치료 및/또는 진단하는 방법, 세균유래 마이크로베시클의 구성성분을 이용하여 암을 치료하는 방법 등에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 1813년 Vautier는 자신이 돌보는 암 환자 중, 가스 괴저(gas gangrene)를 앓고 있는 환자에서 암이 치유되는 현상을 처음 보고하였다. 이후 가스 괴저는 클로스트리듐균(*Clostridium perfringens*)이라는 혐기성(anaerobic) 세균으로 인해 발생한다는 사실이 밝혀지게 되었으며, 세균으로 암을 치유할 수 있다는 개념으로 클로스트리듐 이외에 살모넬라균(*Salmonella typhimurium*)을 포함한 다양한 종의 세균을 대상으로 많은 연구가 진행되어 왔다. 암이 성장하면서 일정 크기(약 1 mm³) 이상으로 자라게 되면 주변 혈관으로부터의 산소공급이 원활이 이루어지지 않음에 따라 암조직 내부는 저산소증(hypoxia) 상태에 빠지게 된다. 이러한 저산소증 상태인 암조직은 혐기성(anaerobic) 세균이 쉽게 살아가며 증식할 수 있는 환경을 제공하며, 세균이 가지고 있는 다양한 독소 및 알려지지 않은 여러 기전을 통해 주변의 암세포를 공격하여 암을 괴사시킨다. 세균의 항암 효과를 증진시키고자, 세균에서 항암단백질을 발현하도록 형질전환시키거나, 세균을 이용하여 항암단백질 유전자를 가지고 있는 플라스미드(plasmid)를 암조직에 전달하는 시도가 진행되었으며, 세균의 증식 및 세균의 독소로 인해 생겨나는 부작용을 완화시키고자, 영양요구돌연변이주(auxotrophic mutant), 포자(spore), 및 독성 약화(attenuated) 세균을 사용하여 암 치료에 적용을 하려는 시도 역시 진행되었다. 그러나, 이러한 노력에도 불구하고 세균을 이용하여 항암치료를 진행하려던 시도는 암조직 뿐만 아니라, 주변 및 중요 정상 장기에서 세균이 증식을 하는 문제점 등이 나타났다.

- [3] 세균은 통칭 박테리아를 의미하며, 그람음성균과 그람양성균을 포함한다. 지금까지 대장균(*Escherichia coli*), 수막구균(*Neisseria meningitidis*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*), 및 시겔라균(*Shigella flexneri*) 등과 같은 그람음성균의 세포외막에서 쉼딩(shedding) 마이크로베시클(microvesicle)이 자연적으로 분비되는 것으로 알려져 있다. 상기 그람음성균에서 분비되는 쉼딩 마이크로베시클은 외세포막 소포체(outer membrane vesicle)로 알려져 있으며, 구형이고 인지질 이중층으로 되어 있으며 그 크기는 20~200 nm 이고, 지질다당류(lipopolysaccharide, LPS) 뿐만 아니라 숙주의 염증반응을 조절할 수 있는 외막 단백질(outer membrane protein), 지질(lipids), 및 유전 물질(DNA,

RNA)과 같은 다양한 생물학적 활성을 가진 물질들을 가지고 있다. 상기 세균유래 웨딩 마이크로베시클은 동종간의 단백질 혹은 유전 물질의 전달, 세포 신호 전달과 같은 정보전달체로서의 기능과 경쟁적 생물체의 제거 혹은 세균의 생존 증진에 기여하고, 뿐만 아니라 숙주에 독소 등을 전달함으로써 세균성 질병의 병인 현상을 조절한다고 알려져 있다. 특히 중증 패혈증으로 사망한 환자의 혈액에서 웨딩 마이크로베시클이 발견되었다는 보고는 전신적인 염증반응을 특징으로 하는 패혈증의 병인에서 염증의 발생에 웨딩 마이크로베시클이 중요한 역할을 할 수 있다는 것을 시사한다. 세균유래 웨딩 마이크로베시클이 숙주 세포를 자극해 염증성 사이토카인(inflammatory cytokine) 및 응고 유도 물질(coagulant)의 분비를 유도한다는 연구 결과는 이를 뒷받침한다.

- [4] 고초균(*Bacillus subtilis*) 및 포도상구균 (*Staphylococcus aureus*)을 포함한 그람양성균도 웨딩 마이크로베시클을 분비한다는 사실을 본 발명자들이 처음으로 규명하였으나, 그람양성균 유래 웨딩 마이크로베시클의 구성성분이나 기능 등에 대한 연구는 초보적인 수준이다.
- [5] 현재까지 다양한 종류의 세균에서 자연적으로 분비되는 웨딩 마이크로베시클이 관찰, 분리되었으며, 일반적으로 웨딩 마이크로베시클은 세균 배양액에서 여과(filtration)와 초원심분리(ultracentrifugation)의 방법을 통해서 분리되고 있다. 또한, 세균에 겐타마이신(gentamicin)과 같은 항생제를 처리하여 웨딩 마이크로베시클의 생성을 조절할 수 있음이 알려져 있으며, 특히 세제(detergent)를 처리하여 만든 웨딩 마이크로베시클이 세균성 감염 질환 중의 하나인 수막구균(*N. meningitidis*) 감염에 대하여 백신으로써의 응용 가능성이 제기되고 있다. 하지만, 상기의 방법으로 제조할 수 있는 양에는 한계가 있다.
- [6] 암과 세균과의 관련성이 있음에도 불구하고, 아직까지 암 발생 및 진행에 세균유래 웨딩 마이크로베시클의 역할에 대한 보고는 전무한 상태이고, 특히 세균유래 웨딩 마이크로베시클을 암 치료 및/또는 진단에 적용한 사례는 현재까지 보고된 바 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명자들은 상기 종래 기술의 문제점을 해결하기 위하여 연구한 결과, 세균 또는 형질전환된 세균에서 유래한 마이크로베시클이 포함된 조성물을 투여하여 암의 성장을 효과적으로 억제할 수 있음을 발견하여 본 발명을 완성하였다.
- [8] 이에, 본 발명은 세균유래 마이크로베시클을 이용하여 암을 치료 및/또는 진단하는 방법, 상기 마이크로베시클을 이용하여 암을 치료함에 있어 그 부작용을 감소시키고 항암치료효능을 증가시키는 방법, 및 상기 마이크로베시클에 질병 치료용 또는 진단용 약물을 로딩(loading)하여 질병을 치료하거나, 특히 세포 또는 조직에 약물을 효율적으로 전달하는 방법 등을

제공하고자 한다.

- [9] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [10] 본 발명의 일 측면은 세균유래 마이크로베시클을 포함하는 암치료 및/또는 암진단용 약제학적 조성물을 제공한다. 본 발명에 사용되는 세균은 자연적으로 존재하는 세균 및 유전적으로 형질전환된 세균을 포함하며, 또한 그람음성균 및 그람양성균을 포함한다. 상기 조성물은 상기 마이크로베시클의 독성을 억제하는 약물, 항암효능을 증가시키는 약물, 약물을 로딩한 나노입자 치료제 및 세포치료제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [11] 상기 나노입자 치료제는 10 nm ~ 10 μ m 크기를 가지는 입자로서, 리포솜 (liposome), 덴드리머 (dendrimer), 폴리머 (polymer), 마이크로베시클 (microvesicle) 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [12] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 세균유래 마이크로베시클을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암치료 및/또는 암진단 방법을 제공한다. 상기 마이크로베시클은 그 부작용을 감소시키는 약물, 항암효능을 증가시키는 약물, 약물을 로딩한 나노입자치료제 및 세포치료제 등과 병용/순차 투여할 수 있다.
- [13] 본 발명의 또 다른 측면은 암치료 및/또는 암진단용 세균유래 마이크로베시클을 제조하는 방법을 제공한다. 상기 세균유래 마이크로베시클 제조 방법은 세균에서 자연적으로 분비되는 쉼딩 마이크로베시클 및 인공(artificial) 마이크로베시클을 제조하는 방법을 포함한다.
- [14] 상기 암치료용 또는 암진단용 쉼딩 마이크로베시클 제조 방법의 일 구현예로 하기 단계를 포함하는 방법을 제공한다: 세균 또는 형질전환된 세균을 포함하는 현탁액에 약물을 첨가하여 상기 세균 또는 형질전환된 세균과 상기 약물을 포함하는 혼합 현탁액을 수득하는 단계; 및 상기 혼합 현탁액에서 분비되는 상기 약물들이 로딩된 쉼딩 마이크로베시클을 분리하는 단계.
- [15] 상기 암치료용 또는 암진단용 쉼딩 마이크로베시클 제조 방법의 또 다른 구현예로 하기 단계를 포함하는 방법을 제공한다: 세균 또는 형질전환된 세균의 배양액에서 분비되는 쉼딩 마이크로베시클을 분리하는 단계; 및 상기 분리된 마이크로베시클을 포함하는 현탁액에 약물을 첨가하여 배양하는 단계. 상기 쉼딩 마이크로베시클이 포함된 현탁액으로부터 상기 암치료용 또는 암진단용 물질이 로딩된 쉼딩 마이크로베시클을 분리하는 단계를 더 포함할 수도 있다.
- [16] 상기 암치료용 또는 암진단용 인공 마이크로베시클 제조 방법의 일 구현예로 하기 단계를 포함하는 방법을 제공한다: 세균 또는 형질전환된 세균을 포함하는 현탁액에 약물을 첨가하여 상기 세균 또는 형질전환된 세균과 상기 약물을 포함하는 혼합 현탁액을 수득하는 단계; 상기 혼합 현탁액을 압출, 초음파 분해,

세포 용해, 균질화, 냉동-해동, 전기 천공, 기계적 분해, 및 화학 물질 처리로 이루어진 군에서 선택된 방법을 사용하여 인공 마이크로베시클을 제조하는 단계; 및 상기 인공 마이크로베시클을 분리하는 단계.

- [17] 상기 암치료용 또는 암진단용 인공 마이크로베시클 제조 방법의 또 다른 구현예로 하기 단계를 포함하는 방법을 제공한다: 세균 또는 형질전환된 세균을 포함하는 현탁액을 압출, 초음파 분해, 세포 용해, 균질화, 냉동-해동, 전기 천공, 기계적 분해, 및 화학 물질 처리로 이루어진 군에서 선택된 방법을 사용하여 인공 마이크로베시클을 제조하는 단계; 상기 인공 마이크로베시클을 분리하는 단계; 및 상기 분리된 인공 마이크로베시클을 포함하는 현탁액에 약물을 첨가하여 배양하는 단계. 상기 인공 마이크로베시클이 포함된 현탁액으로부터 상기 암치료용 또는 암진단용 물질이 로딩된 인공 마이크로베시클을 분리하는 단계를 더 포함할 수도 있다.
- [18] 상기 방법으로 제조된 암치료용 또는 암진단용 웨딩 마이크로베시클 또는 인공 마이크로베시클은 항생제 처리, 자외선 노출, 감마선 노출, 및 필터링으로 이루어진 군에서 선택된 방법을 사용하여 마이크로베시클을 살균하는 단계를 포함할 수도 있다.
- [19] 본 발명의 또 다른 측면은 암치료용 및/또는 암진단용 약물이 로딩된 세균유래 마이크로베시클을 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.
- [20] 본 발명의 또 다른 측면은 암세포 또는 암조직으로 타겟팅(targeting) 되도록 형질전환된 세균에서 유래되며, 암치료용 및/또는 암진단용 약물이 로딩된 마이크로베시클을 포함하는, 암치료용 또는 암진단용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [21] 본 발명의 또 다른 측면은 암세포 또는 암조직으로 타겟팅되도록 형질전환된 세균에서 유래되며, 암치료용 및/또는 암진단용 약물이 로딩된 마이크로베시클을 사용하는 것을 포함하는, 암치료용 및/또는 암진단용 약물을 암세포 또는 암조직에 전달하는 방법을 제공한다.
- [22] 본 발명의 또 다른 측면은 암세포 또는 암조직으로 타겟팅되도록 형질전환된 세균에서 유래되며, 암치료용 및/또는 암진단용 약물이 로딩된 마이크로베시클을 사용하는 것을 포함하는, 암치료 및/또는 암진단 방법을 제공한다.
- [23] 본 발명의 또 다른 측면은 질병 치료용 및/또는 진단용 물질이 로딩된 세균유래 마이크로베시클을 포함하는 질병 치료용 및/또는 진단용 물질 전달용 조성물을 제공한다.
- [24] 본 발명의 또 다른 측면은 질병 치료용 및/또는 진단용 약물이 로딩된 세균유래 마이크로베시클을 사용하는 것을 특징으로 하는, 질병 치료용 및/또는 진단용 약물을 전달하는 방법을 제공한다.
- [25] 본 발명의 또 다른 측면은 특정 세포 또는 특정 조직으로 타겟팅되도록 형질전환된 세균에서 유래되며, 질병 치료용 및/또는 질병 진단용 약물이 로딩된

마이크로베시클을 사용하는 것을 특징으로 하는, 질병 치료용 및/또는 질병 진단용 물질을 특정 세포 또는 특정 조직에 전달하는 방법을 제공한다.

- [26] 본 발명의 또 다른 측면은 질병 치료용 또는 진단용 약물이 로딩된 세균유래 마이크로베시클을 표적세포 또는 조직에 전달하는 단계를 포함하는 질병 치료 및/또는 진단방법을 제공한다.
- [27] 본 발명의 또 다른 측면은 질병 치료용 또는 진단용 약물이 로딩된 세균유래 마이크로베시클을 이용한 질병 진단용 및/또는 치료용 약물전달 시스템을 제공한다.
- [28] 본 발명의 또 다른 측면은 질병 진단용 물질이 로딩된 세균유래 마이크로베시클을 포함하는 질병 진단용 키트를 제공한다.
- [29] 본 발명의 또 다른 측면은 세균유래 마이크로베시클의 구성성분 중 단백질을 포함하는 암치료용 방법을 제공한다. 본 발명에 사용되는 단백질은 그람음성균 및 그람양성균으로부터 유래한 단백질 등을 포함한다. 상기 방법은 상기 마이크로베시클 유래 구성성분의 부작용을 감소시키는 약물, 항암효능을 증가시키는 약물, 약물을 로딩한 나노입자 치료제 및 세포치료제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [30] 본 발명의 또 다른 측면은 세균유래 마이크로베시클의 구성성분 중 핵산을 포함하는 암치료용 방법을 제공한다. 본 발명에 사용되는 핵산은 그람음성균 및 그람양성균으로부터 유래한 핵산 등을 포함한다. 상기 방법은 상기 마이크로베시클 유래 핵산의 부작용을 감소시키는 약물, 항암효능을 증가시키는 약물, 약물을 로딩한 나노입자 치료제 및 세포치료제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [31] 본 발명의 또 다른 측면은 세균유래 마이크로베시클의 구성성분 중 지질을 포함하는 암치료용 방법을 제공한다. 본 발명에 사용되는 지질은 그람음성균 및 그람양성균으로부터 유래한 지질 등을 포함한다. 상기 방법은 상기 마이크로베시클 유래 지질의 부작용을 감소시키는 약물, 항암효능을 증가시키는 약물, 약물을 로딩한 나노입자 치료제 및 세포치료제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [32] 본 발명의 또 다른 측면은 세균유래 마이크로베시클의 구성성분 중 2가지 이상을 포함하는 암치료용 방법을 제공한다. 상기 방법은 상기 마이크로베시클 유래 구성성분들의 독성을 억제하는 약물, 항암효능을 증가시키는 약물, 약물을 로딩한 나노입자 치료제 및 세포치료제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [33] 본 발명의 또 다른 측면은 세균유래 마이크로베시클의 구성성분 중 단백질을 재구성(reconstitution)한 나노입자 치료제를 제조하여 항암치료에 사용하는 방법을 제공한다.
- [34] 본 발명의 또 다른 측면은 세균유래 마이크로베시클의 구성성분 중 핵산을 나노입자 치료제에 삽입하여 항암치료에 사용하는 방법을 제공한다.
- [35] 본 발명의 또 다른 측면은 세균유래 마이크로베시클의 구성성분 중 지질을

재구성(reconstitution)한 나노입자 치료제를 제조하여 항암치료에 사용하는 방법을 제공한다.

- [36] 본 발명의 또 다른 측면은 세균유래 마이크로베시클의 구성성분 중 2가지 이상의 구성성분을 삽입 또는 재구성(reconstitution)한 나노입자 치료제를 제조하여 항암치료에 사용하는 방법을 제공한다.
- [37] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 세균유래 마이크로베시클의 구성성분을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암치료 방법을 제공한다. 상기 마이크로베시클의 구성성분은 그 부작용을 감소시키는 약물, 항암효능을 증가시키는 약물, 약물을 로딩한 나노입자치료제 및 세포치료제 등과 병용/순차 투여할 수 있다.
- [38] 상기 나노입자 치료제는 10 nm ~ 10 μ m 크기를 가지는 입자로서, 리포솜(liposome), 덴드리머(dendrimer), 폴리머(polymer), 마이크로베시클(microvesicle) 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [39] 상기 단백질은 세균유래 마이크로베시클을 구성하는 하나의 요소로서, 수용성 단백질, 지용성 단백질, 또는 막단백질 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [40] 상기 핵산은 세균유래 마이크로베시클을 구성하는 하나의 요소로서, DNA 또는 RNA 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

- [41] 본 발명에 따른 상기 세균유래 마이크로베시클을 사용함으로써, 기존 항암제의 부작용을 줄여서 질병 치료 과정에서 환자의 고통과 불편을 줄일 수 있다.
- [42] 기존의 항암제는 증식하는 세포에 비특이적(non-specific)으로 작용하여 세포독성을 초래함으로써 심각한 독성이 문제가 되고 있고, 기존의 항암제 투여방법으로는 암세포 또는 암조직에 특이적으로 약물을 전달할 수 없어 암이 발생한 장기 이외에도 약물이 전달되어 심각한 부작용이 문제가 되고 있다. 최근 인구의 고령화와 함께 고령자에서 암 발생이 큰 문제가 되고 있는데, 암의 성장을 제대로 제어하지 못하는 면역기능 이상이 암 발생 및 진행에 중요한 원인이지만, 아직까지 암의 성장을 효율적으로 억제하는 방어기작을 향상시켜 암을 치료하고자 하는 사례가 드문 실정이다.
- [43] 본 발명에 따른 세균유래 마이크로베시클을 이용하여 암의 성장을 효율적으로 억제할 수 있다. 암 혈관, 암세포 또는 암조직으로 유도되도록 표적유도 물질(targeting molecule)이 로딩된 세균유래 마이크로베시클 혹은 형질전환된 세균에서 유래한 마이크로베시클을 사용하여 표적 암세포 또는 암조직에만 마이크로베시클을 특이적으로 전달시킴으로써 마이크로베시클에 의한 부작용을 최소화시킬 수 있고, 마이크로베시클에 항암제, 항염증제 등과 같은 약물을 포함하여 투여함으로써 효능을 극대화시킬 뿐만 아니라 부작용을 최소화할 수 있다. 이에 더하여, 본 발명은 세균을 유전적, 화학적 또는 기계적 방법 등으로 처리하여 마이크로베시클의 독성을 감소시킴과 아울러 치료효능이

증가된 마이크로베시클을 제조할 수 있다.

- [44] 또한, 본 발명의 세균유래 마이크로베시클은 암을 치료하는 것과 동시에 암을 진단할 수 있는 장점이 있다. 특히, 표적 암세포 또는 암조직에 타겟팅되도록 형질전환된 세균유래 마이크로베시클을 사용하거나, 암세포 및 암조직에 타겟팅하는 물질을 세균유래 마이크로베시클에 노출(display)하고, 또는 형광물질과 같은 외부에서 감지할 수 있는 물질을 포함한 마이크로베시클을 사용하면 세균유래 마이크로베시클이 갖는 항암치료 효과뿐만 아니라 암을 동시에 진단할 수 있는 장점이 있다.
- [45] 또한, 본 발명의 세균유래 마이크로베시클은 암 이외의 질병에 대하여도 그 치료용 또는 진단용 물질을 목표하는 세포 또는 조직에 특이적으로 전달하여 질병 치료의 효율을 높이고 진단을 용이하게 하는 데 이용될 수 있다.
- [46] 또한, 본 발명의 세균유래 마이크로베시클은 대량생산(mass production)이 가능하며, 넓은 범주의 개체에 적용할 수 있다는 장점을 가지고 있다.
- [47] 또한, 세균이 발현하는 표적유도 물질, 치료용 물질, 또는 진단용 물질은 단일물질의 정제 과정 없이 세균유래 마이크로베시클의 표면 및/또는 내부에 로딩할 수 있으며 로딩된 물질은 본래의 기능을 효과적으로 수행할 수 있다.
- [48] 또한, 질병 치료용 및/또는 진단용 물질이 로딩된 본 발명의 세균유래 마이크로베시클 및 그의 제조 방법은 *in vitro* 및/또는 *in vivo*에서 치료 및/또는 진단용, 또는 실험용으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [49] 도 1은 그람음성균인 대장균에서 압출법에 의해 인공 마이크로베시클을 제조하여 투과전자현미경으로 관찰한 이미지이다.
- [50] 도 2는 대장암 동물모델에서 그람음성균인 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클(*E. coli* MV)에 의한 항암치료 효과(tumor volume)를 나타낸 것이다.
- [51] 도 3은 대장암 동물모델에서 그람음성균인 녹농균 유래 웨딩 마이크로베시클(*P. aeruginosa* MV)에 의한 항암치료 효과(tumor volume)를 나타낸 것이다.
- [52] 도 4는 대장암 동물모델에서 그람음성균인 살모넬라균 유래 웨딩 마이크로베시클(*S. enteritidis* MV)에 의한 항암치료 효과(tumor volume)를 나타낸 것이다.
- [53] 도 5는 대장암 동물모델에서 그람양성균인 포도상구균 유래 웨딩 마이크로베시클(*S. aureus* MV)에 의한 항암치료 효과(tumor volume)를 나타낸 것이다.
- [54] 도 6은 대장암 동물모델에서 그람양성균인 락토바실러스균 유래 웨딩 마이크로베시클(*L. acidophilus* MV)에 의한 항암치료 효과(tumor volume)를 나타낸 것이다.
- [55] 도 7은 야생형 대장균(wild type)과 지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된 대장균(mutant) 유래 웨딩 마이크로베시클(*E. coli* MV)의 항암치료

효과(tumor volume)를 대장암 동물모델에서 비교한 것이다.

- [56] 도 8은 야생형 포도상구균(wild type)과 리포타이코산의 독성이 약화되도록 형질전환된 포도상구균(mutant) 유래 웨딩 마이크로베시클(*S. aureus* MV)의 항암치료 효과(tumor volume)를 대장암 동물모델에서 비교한 것이다.
- [57] 도 9는 흑색종 전이암 동물모델에서 지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클(mutant *E. coli* MV)에 의한 항암치료 효과(number of colony)를 나타낸 것이다.
- [58] 도 10은 대장암 동물모델에서 지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클(MV)에 의한 항암치료 효과에 아스피린(ASA) 병용투여의 효능을 평가한 것이다.
- [59] 도 11은 녹색형광(DiO)으로 표지된 지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클(mutant *E. coli* MV)에 독소루비신을 로딩한 결과를 나타낸 것이다.
- [60] 도 12는 독소루비신(Doxo)을 로딩한 지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클(MV+Doxo)의 생쥐 대장암 26 세포주에 대한 항암 효능을 평가한 것이다.
- [61] 도 13은 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클(*E. coli* MV)에 의한 부작용(전신염증반응에 의한 사망)발생에 대한 polymyxin B(PMB) 효과를 나타낸 것이다.
- [62] 도 14는 야생형 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클(wild type MV)과 지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클(mutant MV)에 의한 부작용(전신염증반응에 의한 사망) 발생의 차이를 비교한 것이다.
- [63] 도 15는 지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클(mutant *E. coli* MV)을 정맥주사 하였을 때 혈소판(platelet) 수의 변화를 측정한 것이다.
- [64] 도 16은 지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클(mutant *E. coli* MV)을 정맥주사 하였을 때 디-다이머(D-dimer) 생성량을 측정한 것이다.
- [65] 도 17은 지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클(mutant MV)을 혈액배지에 분주하여 키웠을 때 적혈구의 용해 현상을 관찰한 것이다.
- [66] 도 18은 야생형 포도상구균(wild type) 유래 웨딩 마이크로베시클과 리포타이코산의 독성이 약화되도록 형질전환된 포도상구균(mutant) 유래 웨딩 마이크로베시클(*S. aureus* MV)에 의한 부작용(염증세포에서 IL-6 분비) 발생의 차이를 비교한 것이다.
- [67] 도 19는 대장암 동물모델에서 지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클(MV)에 의한 부작용(전신염증반응의 지표인

말초혈액 백혈구 수, WBC count) 발생에 대한 아스피린(ASA) 병용 투여의 효과를 나타낸 것이다.

- [68] 도 20은 대장암 동물모델에서 지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클(mutant *E. coli* MV)을 사용하여 100 nm 크기의 형광 비드를 암조직으로 전달하는 효과를 나타내는 것이다.
- [69] 도 21는 대장암 동물모델에서 세균유래 웨딩 마이크로베시클의 주요 외막단백질인 OmpA 단백질(OmpA)에 의한 항암효과(tumor volume)를 나타낸 것이다.
- [70] 도 22은 대장암 동물모델에서 세균유래 웨딩 마이크로베시클의 또 다른 주요 외막단백질인 OmpF(OmpF-/-)가 결여된 형질전환 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클(*E. coli* MV)에 의한 항암효과(tumor volume)를 야생형 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클(WT)의 항암효과와 비교하여 나타낸 것이다.
- [71] 도 23은 세균유래 마이크로베시클의 구성성분 중 OmpA 단백질을 나노입자 전달체인 리포솜(liposome)에 재구성(reconstitution) 한 후, 리포솜에서 OmpA를 확인한 그림이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [72] 본 발명은 세균유래 마이크로베시클을 포함하는 암치료 및/또는 진단용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [73] 본 발명에 사용되는 세균은 그람음성균 및 그람양성균을 포함한다. 상기 그람음성균은 대장균, 녹농균, 및 살모넬라균 등을 포함하며, 그람양성균은 포도상구균 및 락토바실러스균 등을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [74] 본 발명에서의 '세균'은 자연적으로 존재하는 세균 또는 형질전환된 세균을 포함한다. 구체적으로, 상기 형질전환된 세균은 상기 마이크로베시클의 독성이 약화되도록 형질전환된 세균을 포함하며, 그 예로 내독소(endotoxin) 생성 유전자 변형 세균을 들 수 있다. 또한 특이세포나 조직으로 타겟팅되도록 형질전환된 세균을 포함하며, 그 예로 암혈관, 암조직 또는 암세포로 타겟팅되도록 형질전환된 세균을 들 수 있다. 이에 더하여, 본 발명에서 사용되는 세균은 표적세포의 세포막과 융합(fusion)하도록 형질전환된 세균, 질병 치료용 및/또는 진단용 물질이 발현되도록 형질전환된 세균, 및 상기 특정물질의 억제와 특정 물질의 발현이 동시에 일어나도록 형질전환된 세균 등을 포함한다. 그러나 본 발명의 세균유래 마이크로베시클을 제조하는 세균은 상기에 제한되지 아니한다.
- [75] 상기 세균은 물질 처리 또는 유전자 도입에 의해 형질전환된 것일 수 있으며, 2회 이상 형질전환된 것일 수 있다.
- [76] 상기 본 발명의 일 구현예에서, 상기 세균이, 하나 이상의 특정 단백질의 발현을 억제하도록 형질전환된 것일 수 있다.
- [77] 상기 본 발명의 일 구현예에서, 상기 세균이, 세포 접합 분자(cell adhesion

molecule), 항체(antibody), 표적유도(targeting) 단백질, 세포막융합(fusion) 단백질 또는 이들의 융합 단백질로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 발현하도록 형질전환된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [78] 본 발명의 '세균유래 마이크로베시클'은 세균에서 자연적으로 분비되는 '쉐딩 마이크로베시클', 및 세균을 유전적, 화학적, 또는 기계적 방법 등을 사용하여 인위적으로 제조된 '인공 마이크로베시클'을 포함한다.
- [79] 본 발명의 '세균유래 마이크로베시클'은 유래한 세균의 세포막 성분으로 이루어진 지질 이중막에 의해 내부와 외부가 구분되며, 세균의 세포막 지질(plasma membrane lipid)과 세포막 단백질(plasma membrane protein), 핵산(nucleic acid) 및 세균 성분 등을 가지고 있으며, 원래 세균보다 크기가 작은 것을 의미하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [80] 본 발명의 쉐딩 마이크로베시클은 다양한 방법에 의해 얻을 수 있으며 그 예를 소개하면 하기와 같지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [81] (1) 세균 또는 형질전환된 세균을 배양하고 그 배양액을 여과 및 초원심분리하여 쉐딩 마이크로베시클을 얻을 수 있다.
- [82] (2) 세균 또는 형질전환된 세균에 세제를 처리하고 그 배양액을 여과 및 초원심분리하여 쉐딩 마이크로베시클을 얻을 수 있다. 상기 세제에는 제한이 없다.
- [83] (3) 세균 또는 형질전환된 세균에 항생제를 처리하고 그 배양액을 여과 및 초원심분리하여 쉐딩 마이크로베시클을 얻을 수 있다. 상기 항생제는 제한이 없으며, 젠타마이신, 암피실린(ampicillin), 카나마이신(kanamycin) 등을 포함한다.
- [84] 본 발명의 인공 마이크로베시클은 세균을 포함하는 현탁액을 압출, 초음파 분해, 세포 용해, 균질화, 냉동-해동, 전기천공, 기계적 분해, 및 화학 물질 처리로 이루어진 군에서 선택된 방법을 사용하여 제조할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [85] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 세균유래 마이크로베시클의 막이 상기 세균의 세포막 이외의 성분을 추가로 포함할 수 있다.
- [86] 상기 세포막 이외의 성분으로서 표적유도 물질, 세포막융합 물질(fusogen), 사이클로덱스트린(cyclodextrin), 폴리에틸렌글리콜(polyethyleneglycol) 등을 포함할 수 있다. 또한 상기 세포막 이외의 성분은 다양한 방법에 의해 추가될 수 있으며, 세포막의 화학적 변형 등을 포함한다.
- [87] 예를 들어, 상기 세균유래 마이크로베시클의 막 성분이 티올기(-SH) 또는 아민기(-NH₂)를 이용한 화학적 방법으로 변형되거나, 상기 세균유래 마이크로베시클에 폴리에틸렌글리콜을 화학적으로 결합시킴으로써 상기 세균유래 마이크로베시클의 막 성분이 화학적으로 변형된 것일 수 있다.
- [88] 본 발명의 세균유래 마이크로베시클 제조시 상기 세균유래 마이크로베시클의 막 성분을 화학적으로 변형하는 단계를 더 포함할 수 있다.

- [89] 본 발명의 일 구현예로 상기 억제학적 조성물은 상기 마이크로베시클에 의한 독성을 억제시키는 약물을 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 약물을 마이크로베시클에 로딩할 수도 있다. 상기 약물은 내독소에 의한 독성을 억제하는 약물을 포함하며, 그 예로 폴리믹신(polymyxin) B를 들 수 있다.
- [90] 본 발명의 또 다른 구현예로 상기 억제학적 조성물은 항암효능을 증가시키는 약물을 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 약물을 마이크로베시클에 로딩할 수도 있다. 상기 약물은 Th17(T helper 17 세포) 면역반응을 억제하는 약물, 인터루킨(interleukin, IL)-6의 생성 혹은 활성을 억제하는 약물, 혈관내피세포성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)의 생성 혹은 활성을 억제하는 약물, STAT3(signal transducer and activator of transcription 3) 신호전달을 억제하는 약물, 항암제, 약물을 로딩한 나노입자 치료제, 암치료를 위한 세포치료제 등을 포함한다. Th17 면역반응을 억제하는 약물의 예로는 아스피린(aspirin)을 들 수 있으며, VEGF의 생성 혹은 활성을 억제하는 약물의 예로는 VEGF 수용체에 의한 신호전달을 억제하는 약물을 들 수 있다. 항암제를 로딩한 리포솜의 예로는 독실(DOXIL)을 들 수 있다.
- [91] 상기 나노입자 치료제는 10 nm ~ 10 μ m 크기를 가지는 입자로서, 리포솜(liposome), 덴드리머(dendrimer), 폴리머(polymer), 마이크로베시클(microvesicle) 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [92] 본 발명에서의 상기 억제학적 조성물은 유효성분 이외에 억제학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다. 즉 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 사이클로덱스트린, 덱스트로즈(dextrose) 용액, 말토덱스트린(maltodextrin) 용액, 글리세롤(glycerol), 에탄올(ethanol), 리포솜(liposome) 및 이들 성분 중 1종 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액 등 다른 통상의 첨가제를 더 포함할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및/또는 운환제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당해 기술분야의 적절한 방법으로 또는 레밍턴의 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 제형에 특별한 제한은 없으나 주사제 또는 흡입제로 제제화하는 것이 바람직하다.
- [93] 본 발명의 억제학적 조성물의 투여방법은 특별히 제한되는 것은 아니나, 목적하는 방법에 따라 정맥내, 피하, 복강 내, 흡입 또는 국소적용과 같이 비경구 투여하거나 경구 투여할 수 있다. 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 일일 투여량은 치료를 필요로 하는 개체에 투여됨으로서 경감된 질병 상태에 대한 치료에 충분한 본 발명의 치료용 물질의 양을 의미한다. 치료용 물질의 효과적인 양은 특정 화합물, 질병 상태 및 그의 심각도, 치료를 필요로 하는 개체에 따라 달라지며, 이는 당업자에 의해 통상적으로 결정될 수 있다.

비제한적 예로서, 본 발명에 의한 조성물의 인체에 대한 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여 형태, 건강 상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 몸무게가 70 kg인 성인 환자를 기준으로 할 때, 일반적으로는 0.1 ~ 1000 mg/일, 바람직하게는 1 ~ 500 mg/일이며, 일정시간 간격으로 1일 1회 내지 수회에 분할 투여할 수도 있다.

- [94] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 세균유래 마이크로메시클을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암치료 및/또는 암진단 방법을 제공한다.
- [95] 본 발명에서 '개체'란, 특정질환(예를 들면 암, 혈관질환, 또는 염증성 질환 등)의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말 및 소 등의 포유류를 의미한다.
- [96] 본 발명에서의 '암'이란 정상적인 세포사멸 균형이 깨지는 경우 세포가 과다 증식하고, 주변 조직으로 침윤할 수 있는 특징을 갖는 질병군을 말한다. 폐암, 후두암, 위암, 대장/직장암, 간암, 담낭암, 췌장암, 유방암, 자궁경부암, 전립선암, 신장암, 피부암 등의 상피세포 등에서 유래하는 암종(carcinoma), 골암, 근육암, 지방암, 섬유세포암 등의 결합조직세포에서 유래하는 육종(sarcoma), 백혈병, 림프종, 다발성골수종 등의 조혈세포에서 유래하는 혈액암, 신경조직에 발생하는 종양 등으로 이루어진 군으로부터 본 발명이 치료하려는 표적이 선택될 수 있으나, 이것으로 제한되는 것은 아니다.
- [97] 본 발명에서의 '혈관질환'은 혈관내 혹은 혈관벽에 대사성, 감염성, 독성, 또는 면역성 원인에 의해 혈관내 혹은 혈관벽에 장애가 발생하는 질환군이다. 동맥경화증(혹은 죽상경화증), 협심증, 급성 심근경색, 뇌졸중, 혈관성치매, 그외 허혈성 혈관질환 등의 대사성 혈관질환, 폐혈증, 전신성파종성혈관내혈액응고(disseminated intravascular coagulation), 혈전/색전증, 혈관염, 사구체신염, 급성호흡부전증후군, 폐기종 등의 감염성, 독성, 또는 면역성 혈관질환 등으로 이루어진 군으로부터 본 발명이 치료하려는 표적이 선택될 수 있으나, 이것으로 제한되는 것은 아니다.
- [98] 본 발명에서의 '염증'은 체액이 조직 세포 사이에 증가하여 나타나는 부종, 혈관확장에 따른 충혈, 발열물질과 혈관확장에 의한 발열, 아라키돈산(arachidonic acid) 대사산물에 의한 통증 현상 등과 같은 증상 또는 징후로 나타나고, 시간에 따라 급성, 아급성, 만성 염증으로 분류할 수 있고, 병태생리에 따라 감염성, 알레르기성, 자가면역성, 독성, 대사성, 외상성 염증질환으로 분류할 수 있다. 비염, 부비동염, 중이염, 비인두염, 후두염, 기관지염, 천식, 만성폐쇄성폐질환, 기관지확장증, 세기관지염, 폐렴, 폐섬유화증 등의 호흡기계 염증질환, 구강염, 식도염, 위염, 소화성궤양, 과민성장증후군, 염증성장질환, 담낭염, 담도염, 췌장염, 간염 등의 소화기계 염증질환, 아토피피부염, 건선 등의 피부 염증질환, 심내막염, 심근염, 심낭염, 혈관염, 동맥경화증, 폐혈증 등의 심혈관계 염증질환, 갑상선염, 부갑상선염,

당뇨병, 등의 내분비계 염증질환, 사구체신염, 신병증, 간질성 신질환, 고환염, 난소염, 자궁내막염, 질염 등의 비노생식계 염증질환, 류마티스관절염, 척추관절병증, 골관절염, 통풍, 전신성홍반성루프스, 전신성경화증, 근병증, 쇼그렌증후군, 베체트병, 항인지질증후군 등의 근골격계 염증질환, 혈관성치매, 알츠하이머병, 퇴행성뇌질환, 우울증, 정신분열증 등의 뇌정신계 염증질환 등으로 이루어진 군으로부터 본 발명이 치료하려는 표적이 선택될 수 있으나, 이것으로 제한되는 것은 아니다.

- [99] 상기 본 발명의 방법에서 사용되는 세균 및 세균유래 마이크로베시클은 전술한 바와 같다.
- [100] 본 발명의 일 구현예로, 상기 방법은 상기 마이크로베시클의 부작용을 감소시키기 위하여 약물이 로딩된 세균유래 마이크로베시클을 사용할 수 있다.
- [101] 상기 세균유래 마이크로베시클의 부작용을 감소시키기 위하여는 하기와 같은 다양한 방법들이 있다.
- [102] (1) 세균의 독성이 약화되도록 유전적으로 형질전환된 세균을 사용하여 마이크로베시클을 제조할 수 있다. 예를 들면, 숙주의 염증반응을 매개하는 지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된 세균(*msbB* mutant), 또는 리포타이코산 (lipoteichoic acid, LTA)의 독성이 약화되도록 형질전환된 세균(LTA mutant)을 사용하여 마이크로베시클을 제조할 수 있다.
- [103] (2) 내독소의 활성을 억제시키는 약물을 사용하여 세균의 독성을 감소시킬 수 있다. 상기 약물의 일 예로 폴리믹신 B를 들 수 있다. 상기 약물은 세균유래 마이크로베시클과 병용투여할 수도 있으며, 배양시 약물을 처리한 세균으로부터 마이크로베시클을 제조할 수도 있다.
- [104] (3) 항염증 및/또는 항응고 작용을 하는 약물을 사용하여 부작용을 감소시킬 수 있다. 상기 약물은 아스피린을 포함한다. 세균유래 마이크로베시클과 아스피린을 병용 투여하면 세균유래 마이크로베시클에 의한 염증반응, 혈액응고 반응 등의 부작용을 방지할 수 있다. 또한 배양시 상기 약물을 처리한 세균으로부터 마이크로베시클을 제조할 수도 있다.
- [105] (4) 상기 마이크로베시클의 막 성분에 화학적 방법으로 변형을 가하여 사용할 수 있다. 예를 들어, 상기 마이크로베시클의 막 성분이 티올기 또는 아민기를 이용한 화학적 방법으로 변형되거나, 상기 마이크로베시클에 폴리에틸렌글리콜을 화학적 방법으로 결합시킴으로써 상기 마이크로베시클의 막 성분을 화학적으로 변형시켜서 사용할 수 있다.
- [106] (5) 살균된 마이크로베시클을 사용함으로써 살아 있는 세균의 감염을 막을 수 있다. 예를 들면, 자외선 및 감마선을 이용한 살균 또는 필터링을 이용한 세균의 제거 등을 통해 살균된 마이크로베시클을 얻을 수 있다.
- [107] 본 발명의 세균유래 마이크로베시클의 부작용을 감소시키는 방법은 상기 예에 제한되지 아니하며 상기 방법 각각을 단독으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.
- [108] 본 발명의 또 다른 구현예로 항암효능을 증가시키는 약물을 로딩한

마이크로베시클을 사용할 수 있다. 항암효능을 증가시키는 약물은 전술한 바와 같다.

- [109] 또한 상기 방법의 일 구현예로, 상기 마이크로베시클을 개체에 투여시 상기 마이크로베시클의 부작용을 감소시키는 약물 및/또는 항암효능을 증가시키는 약물, 약물을 로딩한 나노입자 치료제 및 세포치료제 등을 병용투여할 수 있다.
- [110] 상기 나노입자 치료제는 10 nm ~ 10 μ m 크기를 가지는 입자로서, 리포솜 (liposome), 덴드리머 (dendrimer), 폴리머 (polymer), 마이크로베시클 (microvesicle) 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [111] 본 발명에서 '로딩'은 필요한 물질을 세균유래 마이크로베시클의 표면에 노출시키거나 내부에 내포(encapsulation)시키는 것을 의미하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [112] 본 발명의 또 다른 측면은 암치료 및/또는 암진단용 세균유래 마이크로베시클을 제조하는 방법을 제공한다. 상기 세균유래 마이크로베시클 제조 방법은 세균에서 자연적으로 분비되는 쉼딩 마이크로베시클 및 인공(artificial) 마이크로베시클을 제조하는 방법을 포함한다.
- [113] 상기 암치료용 또는 암진단용 쉼딩 마이크로베시클 제조 방법의 일 구현예로 하기 단계를 포함하는 방법을 제공한다: 세균 또는 형질전환된 세균을 포함하는 현탁액에 약물을 첨가하여 상기 세균 또는 형질전환된 세균과 상기 약물을 포함하는 혼합 현탁액을 수득하는 단계; 및 상기 혼합 현탁액에서 분비되는 상기 약물들이 로딩된 쉼딩 마이크로베시클을 분리하는 단계.
- [114] 상기 암치료용 또는 암진단용 쉼딩 마이크로베시클 제조 방법의 또 다른 구현예로 하기 단계를 포함하는 방법을 제공한다: 세균 또는 형질전환된 세균의 배양액에서 분비되는 쉼딩 마이크로베시클을 분리하는 단계; 및 상기 분리된 마이크로베시클을 포함하는 현탁액에 약물을 첨가하여 배양하는 단계. 상기 쉼딩 마이크로베시클이 포함된 현탁액으로부터 상기 암치료용 또는 암진단용 물질이 로딩된 쉼딩 마이크로베시클을 분리하는 단계를 더 포함할 수도 있다.
- [115] 상기 암치료용 또는 암진단용 인공 마이크로베시클 제조 방법의 일 구현예로 하기 단계를 포함하는 방법을 제공한다: 세균 또는 형질전환된 세균을 포함하는 현탁액에 약물을 첨가하여 상기 세균 또는 형질전환된 세균과 상기 약물을 포함하는 혼합 현탁액을 수득하는 단계; 상기 혼합 현탁액을 압출, 초음파 분해, 세포 용해, 균질화, 냉동-해동, 전기 천공, 기계적 분해, 및 화학 물질 처리로 이루어진 군에서 선택된 방법을 사용하여 인공 마이크로베시클을 제조하는 단계; 및 상기 인공 마이크로베시클을 분리하는 단계.
- [116] 상기 암치료용 또는 암진단용 인공 마이크로베시클 제조 방법의 또 다른 구현예로 하기 단계를 포함하는 방법을 제공한다: 세균 또는 형질전환된 세균을 포함하는 현탁액을 압출, 초음파 분해, 세포 용해, 균질화, 냉동-해동, 전기 천공, 기계적 분해, 및 화학 물질 처리로 이루어진 군에서 선택된 방법을 사용하여 인공 마이크로베시클을 제조하는 단계; 상기 인공 마이크로베시클을 분리하는

단계; 및 상기 분리된 인공 마이크로베시클을 포함하는 현탁액에 약물을 첨가하여 배양하는 단계. 상기 인공 마이크로베시클이 포함된 현탁액으로부터 상기 암치료용 또는 암진단용 물질이 로딩된 인공 마이크로베시클을 분리하는 단계를 더 포함할 수도 있다.

- [117] 상기 방법으로 제조된 암치료용 또는 암진단용 웨딩 마이크로베시클 또는 인공 마이크로베시클은 항생제 처리, 자외선 노출, 감마선 노출, 및 필터링으로 이루어진 군에서 선택된 방법을 사용하여 마이크로베시클을 살균하는 단계를 포함할 수도 있다.
- [118] 상기 제조 방법은 상기 세균보다 크기가 작고 상기 약물이 로딩된 마이크로베시클을 분리하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [119] 상기 분리 단계는 밀도 구배(density gradient), 초원심분리(ultracentrifugation), 여과(filtration), 투석(dialysis) 및 자유 유동 전기이동법(free-flow electrophoresis)으로 이루어진 군으로부터 선택된 방법을 사용하여 수행될 수 있다.
- [120] 또한 상기 본 발명의 제조 방법은 상기 세균의 세포막과 비교하여 토폴로지(topology)가 변형된 막을 갖는 마이크로베시클을 제거하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 즉, 마이크로베시클을 제조한 후에, 목적에 따라 원래 세포의 세포막과 토폴로지가 동일한 마이크로베시클만을 선택하여 사용할 수 있다. 세포막 단백질 중 세포질 도메인(cytoplasmic domain)을 인지하는 항체와 같은 물질을 사용해서 이 세포질 도메인이 외부에 노출된 마이크로베시클을 제거할 수 있다. 이렇게 하면 세포막의 안팎이 바뀐 마이크로베시클은 제거되고 남은 마이크로베시클의 외부에는 원래 세포의 세포막 외부에 노출된 세포막 단백질만이 존재한다.
- [121] 본 발명의 또 다른 측면은 암치료용 및/또는 암진단용 약물이 로딩된 세균유래 마이크로베시클을 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.
- [122] 본 발명의 또 다른 측면은 암세포 또는 암조직으로 타겟팅되도록 형질전환된 세균에서 유래되며, 암치료용 및/또는 암진단용 약물이 로딩된 마이크로베시클을 포함하는, 암치료용 또는 암진단용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [123] 본 발명의 또 다른 측면은 암세포 또는 암조직으로 타겟팅되도록 형질전환된 세균에서 유래되며, 암치료용 및/또는 암진단용 약물이 로딩된 마이크로베시클을 사용하는 것을 포함하는, 암치료용 및/또는 암진단용 약물을 암세포 또는 암조직에 전달하는 방법을 제공한다.
- [124] 본 발명의 또 다른 측면은 암세포 또는 암조직으로 타겟팅되도록 형질전환된 세균에서 유래되며, 암치료용 및/또는 암진단용 약물이 로딩된 마이크로베시클을 사용하는 것을 포함하는, 암치료 및/또는 암진단 방법을 제공한다.
- [125] 본 발명의 또 다른 측면은 질병 치료용 및/또는 진단용 물질이 로딩된 세균유래

마이크로베시클을 포함하는 질병 치료용 및/또는 진단용 물질 전달용 조성물을 제공한다.

- [126] 본 발명의 세균유래 마이크로베시클에 로딩되는 물질은 특별히 제한되지 않으며, 예를 들어, 치료용 및/또는 진단용 물질일 수 있으며, 상기 세균 또는 형질전환된 세균이 발현하고 있는 물질이 로딩될 수도 있으며 필요에 따라 상기 세균에서 유래하지 않고 세균의 외부에서 준비된 물질을 로딩할 수도 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 즉, 상기 치료용 및/또는 진단용 물질은 상기 세균에서 유래된 것 및 세균외부에서 주입된 것 등을 포함한다. 또한 로딩되는 물질은 1개 일 수도 있고 2개 이상일 수도 있다. 또한, 상기 물질들을 세균유래 마이크로베시클의 표면에 물리, 화학, 및/또는 생물학적 방법으로 로딩할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [127] 상기 치료 및/또는 진단을 위한 다양한 물질을 본 발명의 세균유래 마이크로베시클에 로딩하는 방법은 하기를 포함한다.
- [128] 첫째, 치료 및/또는 진단을 위한 다양한 물질을 이미 로딩한 세균에서 마이크로베시클을 제조한다. 예를 들어, 치료 및/또는 진단을 위한 다양한 물질을 배양액에 포함시켜서 세균을 배양하면 상기 물질이 로딩된 세균을 수득할 수 있으며, 또는 전기 천공 방법으로 세균에 물질을 로딩할 수도 있다.
- [129] 또한, 이러한 세균에서 자연적으로 분비되는 웨딩 마이크로베시클, 또는 초음파 분해, 압출, 기계적 분해 등의 방법으로 제조한 인공 마이크로베시클에는 상기 물질이 로딩되어 있다.
- [130] 둘째, 세균유래 마이크로베시클의 제조 과정에서 상기 물질을 세균유래 마이크로베시클에 로딩한다. 예를 들어, 세균이 포함된 용액에 상기 물질을 첨가한 후 세균보다 크기가 작은 필터를 통과시키는 압출법으로 마이크로베시클을 제조하면 마이크로베시클에 상기 물질이 로딩된다.
- [131] 셋째, 웨딩 마이크로베시클 또는 인공 마이크로베시클을 제조한 후에 상기 물질을 로딩할 수 있다. 예를 들어, 전기 천공 방법으로 이미 제조한 웨딩 마이크로베시클 또는 인공 마이크로베시클에 물질을 로딩할 수 있다.
- [132] 그러나 본 발명에서 사용될 수 있는 물질을 마이크로베시클에 로딩하는 방법은 상기예들에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [133] 본 발명에 사용되는 치료용 및/또는 진단용 물질은 항암제, 항염증제, 혈관신생 저해제(angiogenesis inhibitor), 펩타이드(peptide), 단백질(protein), 독소(toxin), 핵산, 비드(bead), 마이크로입자(microparticle) 및 나노입자(nanoparticle)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [134] 상기 핵산은 DNA, RNA, 앵타머(aptamer), LNA(locked nucleic acid), PNA(peptide nucleic acid), 및 모폴리노(morpholino)로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [135] 상기 나노입자는 산화철, 금, 탄소나노튜브(carbon nanotube), 또는 자기

비드(magnetic bead)를 포함하는 나노입자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [136] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 치료용 및/또는 진단용 물질이 형광을 방출하는 물질일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 상기 형광을 방출하는 물질이 형광단백질 또는 양자점 (quantum dot, Qdot)일 수 있다.
- [137] 상기 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 치료용 및/또는 진단용 물질이 하나 이상의 항암제일 수 있다.
- [138] 본 발명의 마이크로베시클은 특정 세포 또는 조직 등으로 타겟팅이 가능한 마이크로베시클을 포함한다. 상기 특이 조직은 혈관, 암 또는 염증 조직일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [139] 본 발명의 또 다른 측면은 질병 치료용 및/또는 진단용 약물이 로딩된 세균유래 마이크로베시클을 사용하는 것을 특징으로 하는, 질병 치료용 및/또는 진단용 약물, 약물을 로딩한 나노입자 치료제 및 세포치료제 등을 전달하는 방법을 제공한다.
- [140] 본 발명의 또 다른 측면은 특정 세포 또는 특정 조직으로 타겟팅되도록 형질전환된 세균에서 유래되며, 질병 치료용 및/또는 질병 진단용 약물이 로딩된 마이크로베시클을 사용하는 것을 특징으로 하는, 질병 치료용 및/또는 질병 진단용 물질, 질병 치료용 및/또는 질병 진단용 물질을 로딩한 나노입자 치료제 및 세포치료제 등을 특정 세포 또는 특정 조직에 전달하는 방법을 제공한다.
- [141] 상기 나노입자 치료제는 10 nm ~ 10 μ m 크기를 가지는 입자로서, 리포솜 (liposome), 덴드리머 (dendrimer), 폴리머 (polymer), 마이크로베시클 (microvesicle) 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [142] 본 발명의 마이크로베시클을 사용하여 질병 치료용 또는 진단용 물질, 질병 치료용 및/또는 질병 진단용 물질을 로딩한 나노입자 치료제 및 세포치료제 등을 표적 세포 또는 조직으로 전달하는 것이 가능하다.
- [143] 상기 본 발명의 일 구현예에서, 2 가지 이상의 상기 치료용 또는 진단용 물질을 특이 세포 또는 조직에 전달할 수 있다.
- [144] 예를 들어, 상기 마이크로베시클에 2 가지 이상의 상기 치료용 또는 진단용 물질이 함께 로딩되어 있는 것을 사용하여 2 가지 이상의 상기 치료용 또는 진단용 물질을 전달할 수 있다.
- [145] 상기 본 발명의 또 다른 구현예에서, 1 가지 상기 치료용 또는 진단용 물질이 로딩된 마이크로베시클, 2 가지 이상의 상기 치료용 또는 진단용 물질이 로딩된 마이크로베시클, 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 2 개 이상의 마이크로베시클을 사용하여 상기 치료용 또는 진단용 물질을 전달할 수 있다. 예를 들어, 상기 2 개 이상의 마이크로베시클을 동시에 투여할 수 있다.
- [146] 상기 본 발명의 또 다른 구현예에서, 1 가지 상기 치료용 또는 진단용 물질이 로딩된 마이크로베시클, 2 가지 이상의 상기 치료용 또는 진단용 물질이 로딩된 마이크로베시클, 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 2 개 이상의

마이크로베시클을 순차적으로 투여하여 상기 치료용 또는 진단용 물질을 전달할 수 있다.

- [147] 상기 본 발명의 또 다른 구현예에서, 1 가지 이상의 상기 치료용 또는 진단용 물질이 로딩된 마이크로베시클과 1 가지 이상의 질병 치료용 및/또는 질병 진단용 물질을 로딩한 나노입자 치료제, 또는 질병 치료용 세포치료제를 조합하여 순차적으로 투여할 수 있다.
- [148] 본 발명의 또 다른 측면은 질병 치료용 또는 진단용 약물이 로딩된 세균유래 마이크로베시클을 표적세포 또는 조직에 전달하는 단계를 포함하는 질병 치료 및/또는 진단방법을 제공한다.
- [149] 본 발명의 또 다른 측면은 질병 치료용 또는 진단용 약물이 로딩된 세균유래 마이크로베시클을 이용한 질병 진단용 및/또는 치료용 약물전달 시스템을 제공한다.
- [150] 본 발명의 또 다른 측면은 질병 진단용 물질이 로딩된 세균유래 마이크로베시클을 포함하는 질병 진단용 키트(kit)를 제공한다. 상기 질병 진단용 물질은 진단에 필요한 프라이머(primer), 프로브(probe), 안티센스(anti-sense) 핵산 및 항체로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [151]
- [152] [세균유래 마이크로베시클을 이용한 물질 전달]
- [153] 본 발명에서는 특정 조직으로 유도되는 세균유래 마이크로베시클을 사용하거나 표적 단백질을 발현한 형질전환 세균유래 마이크로베시클을 사용할 수 있다. 이에 더해, 상기 세균과 형질전환 세균에 표적세포와의 세포막 융합에 필요한 물질이 발현하도록 형질전환된 세균유래 마이크로베시클을 사용할 수 있다.
- [154] 혈액내에 존재하는 단핵구, 림프구, 호중구, 호산구, 호염구, 혈소판, 및 골수에서 유래한 억제 세포(myeloid derived suppressor cell), 골수, 혈액, 및 지방 조직에 존재하는 줄기세포 등은 암 및 염증조직으로 유도된다는 것이 알려져 있다. 따라서, 상기의 면역/염증세포와 줄기세포 등의 세포막으로 이루어진 마이크로베시클은 암 및 염증조직으로 유도된다. 특정 세포나 조직에 특이적으로 발현된 기질에 선택적으로 결합하는 단백질을 발현하도록 형질전환시킨 세균유래 마이크로베시클은 특정 세포나 조직으로 유도된다. 이에, 본 발명에서는, 이러한 세균으로부터 마이크로베시클을 제조하고, 마이크로베시클에 치료 및/또는 진단을 위한 물질을 로딩하여 이 물질을 표적한 세포, 조직이나 혈액에 전달한다.
- [155] 혈액내 면역/염증세포와 줄기세포 등이 특정조직으로 타겟팅될 때 세포막에 존재하는 다양한 세포막 단백질(plasma membrane protein)들이 관여한다. 예를 들어, 단핵구 세포 표면에는 LFA-1(leukocyte function-associated antigen-1), Mac-1(macrophage-1 antigen) 등의 인테그린(integrin)을 포함한 다양한 세포 접합 분자들이 존재한다. 이들 세포 접합 분자는 혈관 세포 표면에 존재하는

ICAM-1(intercellular adhesion molecule-1), VCAM-1(vascular cell adhesion molecule-1) 등의 세포 접합 분자와 결합할 수 있다. 단핵구는 LFA-1과 같은 세포 접합 분자를 이용해 혈관 세포 표면에 발현된 ICAM-1과 같은 세포막 단백질과 상호작용하여, 혈관 내피세포를 통과하여 염증조직 및 암조직으로 유도된다.

- [156] 세균을 형질전환하여 암 또는 조직 특이적 세포막 단백질을 세균유래 마이크로베시클 표면에 발현시켜 암조직과 염증조직을 포함한 다양한 조직으로 유도할 수 있다. 예를 들어, 유방암조직의 세포 표면에는 ERBB2 세포막 단백질이 과다발현된다. 세균의 세포막을 관통하여 발현되고 있는 단백질과 ERBB2 세포막 단백질을 인지할 수 있는 항체를 융합한 융합 단백질(fusion protein)을 발현시키도록 형질전환한 세균유래 마이크로베시클은 유방암조직으로 유도된다. 또한, 대장암, 췌장암, 폐암 등에서 과다발현되는 암배아항원 (carcinoembryonic antigen, CEA)를 인지하는 항체와 세균의 세포막을 관통하여 발현되고 있는 단백질을 융합한 융합 단백질이 발현되도록 형질전환한 세균유래 마이크로베시클은 대장암, 췌장암, 폐암조직으로 유도된다.
- [157] 세균유래 마이크로베시클은 세포막 단백질을 비롯한 세포막 성분들이 원래 세균과 유사하거나 사실상 동일하기 때문에 원래 세균이 표적하는 동일한 특정 조직이나 세포로 유도된다. 필요한 경우 마이크로베시클을 제조하는 과정에서 핵산 분해 효소 등을 첨가하여 치료용 또는 진단용 물질 전달에 필요가 없는 핵산 등을 마이크로베시클 내부에서 제거할 수 있다.
- [158]
- [159] [세균유래 마이크로베시클 및 그의 제조]
- [160] 세균유래 마이크로베시클은 전달하고자 하는 다양한 치료용 또는 진단용 물질을 쉽게 로딩시킬 수 있어 한가지 또는 여러 가지 물질을 전달할 수 있으므로 단독 치료, 병합 치료, 진단 뿐만 아니라 진단과 치료의 두 가지 목적으로 사용하는 진단-치료(theragnosis, pharmacodiagnosis)에 이용할 수 있다. 이때 전달하고자 하는 다양한 물질은 마이크로베시클에 내포되어 마이크로베시클의 이중막의 안쪽에 존재할 수도 있고, 세포막 단백질처럼 상기 물질의 전부 또는 일부가 마이크로베시클의 이중막에 묻혀 있거나 끼워져 (embedded) 있을 수도 있고, 마이크로베시클 표면에 결합되어 있을 수도 있다.
- [161] 세균유래 인공 마이크로베시클은 기존의 리포솜처럼 다양한 크기로 쉽게 만들 수 있다. 암 혈관을 통해 암조직에 어떠한 물질이 전달될 때, 일반적으로 100 nm이상의 물질은 EPR(enhanced permeability and retention) 효과에 의해 암조직에 오래 머무를 수 있다. 따라서 100 nm보다 큰 마이크로베시클에 로딩된 약물은 암조직에 머무를 수 있는 시간이 길어서 약물의 효과를 극대화할 수 있어 진단 및 치료에 유용하다. 또한 폐조직은 그 구조상 1 μ m 이하 크기의 입자만이 흡입을 통해 폐포까지 전달될 수 있으므로, 1 μ m 이하 크기의 마이크로베시클에 천식 등의 치료를 위한 염증억제제 등의 물질을 로딩하여 폐조직에 효과적으로

약물을 전달할 수 있다. 이와 같이 마이크로베시클 크기는 진단용 또는 치료용 물질이 필요한 조직에 따라 다양한 크기로 제조될 수 있다. 바람직하게 본 발명의 마이크로베시클의 크기는 10 nm 이상 10 μ m 이하일 수 있다.

- [162] 본 발명의 마이크로베시클에 치료용 및/또는 진단용 물질을 로딩하여 '개체'에 투여하기 위해서 면역억제제와 같이 사용할 수도 있다.
- [163] 본 발명에 있어서, 모든 세균으로부터 마이크로베시클을 제조할 수 있으며, 예를 들어, 특정 세포 또는 조직 등의 표적으로 타겟팅되도록 형질전환된 세균으로부터 제조될 수 있다. 특정 조직으로 물질을 전달하기 위해 특정 조직으로 타겟팅되는 세균 또는 형질전환된 세균유래 마이크로베시클을 사용할 수 있다. 특정 조직으로 유도가 되는 단백질을 과다발현하거나 비특이적 타겟팅에 관여하는 단백질의 발현을 감소시킨 또는 이들을 조합한 형질전환 세균유래 마이크로베시클은 혈관, 암조직 또는 염증조직으로 효과적으로 타겟팅된다.
- [164] 세균의 형질전환은 세균에 자극을 주어 단백질 등 물질 발현을 증가 또는 변화시키는 방법과 유전자 도입을 통한 단백질 발현 증가 또는 발현 억제시키는 방법으로서 당업계에서 통상 사용되는 방법들을 사용할 수 있다. 세균에 특정 자극을 주어 단백질 발현의 변화를 유도할 수 있다. 유전자 도입을 통한 세균의 형질전환을 통해 특정 단백질을 발현시키거나 혹은 억제시킬 수 있다. 특정 단백질의 발현을 증가시키는 방법은 플라스미드 DNA, RNA 또는 파지(phage)를 이용할 수 있으며, 전기 천공, 미량주사법(microinjection), 초음파 유도 (ultrasound mediated) 등의 방법뿐만 아니라 일반적으로 알려진 모든 방법을 사용할 수 있다.
- [165] 암세포, 암 혈관을 포함한 암조직 또는 염증조직 등에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 또는 항체를 세균의 표면에 직접 발현하거나 융합 단백질로 발현시키고 이 세균으로부터 마이크로베시클을 제조할 수 있다. 또한, 치료용 및/또는 진단용 물질을 발현하는 세균 또는 발현하도록 형질전환된 세균으로부터 마이크로베시클을 제조할 수 있다. 또한, 상기의 조합 물질이 발현하거나 발현하도록 형질전환된 세균에서도 마이크로베시클을 제조할 수도 있다. 특정 단백질의 발현을 억제시키기 위해서, 안티센스 RNA, LNA, PNA 등을 이용할 수 있다. 어떤 세균에서 유래한 마이크로베시클이 두 가지 표적으로 유도되는 경우 그 세균에서 한 가지 또는 여러 가지 특정 단백질의 발현을 억제시켜서 한 가지 표적으로의 유도를 감소시켜서 물질 전달의 특이성을 높일 수 있다. 또는, 2회 이상 형질전환한 세균을 사용할 수도 있다. 예를 들어, 1차 형질전환한 세균을 2차 형질전환하여 사용할 수 있다. 하지만, 본 발명의 제조 방법이 이것들로 제한되는 것은 아니다.
- [166] 본 발명에 따른 상기 인공 마이크로베시클은 다양한 기계적, 전기적, 화학적 방법으로도 제조될 수 있다. 삼투압을 이용한 세포 용해, 전기 천공, 초음파 분해, 균질화, 세제 처리, 냉동-해동, 압출, 기계적 분해, 화학 물질 처리 등의 방법을 사용할 수 있으나, 본 발명의 제조 방법이 이것들로 제한되는 것은 아니다. 예를

들어, 세균이 들어있는 용액에 금속, 세라믹, 또는 충분히 딱딱한 플라스틱 공을 넣고 흔들어서 세균을 기계적인 방법으로 분해할 수도 있다. 압출하여 마이크로베시클을 제조하는 경우에는 구멍 크기가 큰 필터에서 작은 필터로 세균을 포함한 용액을 차례로 통과시켜 세균이 적당한 크기로 부취지게 할 수 있다. 예를 들어, 구멍 크기가 $10\ \mu\text{m} \rightarrow 5\ \mu\text{m} \rightarrow 1\ \mu\text{m}$ 의 순서로 작아지는 필터 3개를 차례로 사용하여 마이크로베시클을 제조할 수 있다.

[167]

[168] [치료용 또는 진단용 물질]

[169]

[170] 본 발명에서는 세균 또는 형질전환된 세균이 발현하고 있는 물질을 사용하거나 필요에 따라 상기 세균에서 유래하지 않고 세균의 외부에서 준비된 물질을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[171] 본 발명에 있어서, 치료용 또는 진단용 물질은 마이크로베시클에 로딩하여 사용하거나, 필요 및 목적에 따라 마이크로베시클과 병용하여 투여할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[172] 본 발명에 있어서, 치료용 또는 진단용 물질은 단독 혹은 나노입자 치료제 및 세포치료제에 로딩되어 마이크로베시클과 병용하여 투여할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[173] 상기 나노입자 치료제는 $10\ \text{nm} \sim 10\ \mu\text{m}$ 크기를 가지는 입자로서, 리포솜 (liposome), 덴드리머 (dendrimer), 폴리머 (polymer), 마이크로베시클 (microvesicle) 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[174] 본 발명에 있어서, 마이크로베시클 또는 나노입자 치료제 및 세포치료제에 로딩할 수 있는 세균유래 상기 치료용 또는 진단용 물질로는 당업계에서 통상적으로 사용되는 단백질 또는 펩타이드, 핵산, 지질 및 세균 대사산물 (metabolite) 등 다양한 종류의 물질이 제한없이 사용될 수 있다.

[175] 상기 단백질 또는 펩타이드는 VEGF, EGF (epidermal growth factor) 등과 같은 성장 인자, IL-1, IFN- γ (interferon-gamma), IL-10과 같은 사이토카인 (cytokine) 류, 각종 항체 치료제, 수용체, 형광단백질 및 다양한 펩타이드 또는 단백질을 제한없이 사용할 수 있다. 상기 단백질 또는 펩타이드는 세균 내에 발현될 수도 있으며 세포막에 노출될 수도 있으며 전체 또는 활성을 보이는 부위가 단독 또는 융합 단백질 형태로 발현될 수도 있다. 특히, 마이크로베시클 표면에 로딩된 단백질 또는 펩타이드는 국소 농도 (local concentration)가 높아 단독으로 존재하는 경우보다 활성이 높음이 잘 알려져 있다. 이러한 단백질 또는 펩타이드는 리간드 (ligand)로서 작용해 세포에 신호전달을 할 수 있거나 다양한 리간드의 기능을 저해하는 데 이용될 수 있으나, 상기 예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[176] 본 발명에 따른 상기 마이크로베시클 또는 나노입자 치료제 및 세포치료제에 로딩할 수 있는 핵산으로서 DNA, miRNA (microRNA), siRNA (small interfering RNA), 안티센스 RNA, 센스 (sense) RNA를 사용할 수 있으나 이것들로 제한되는

것은 아니다. 이러한 핵산은 센스 효과, 안티센스 효과, RNA 간섭 및 단백질의 기능 저해 등의 목적으로 이용될 수 있다.

- [177] 본 발명에 있어서, 상기 세균에서 유래하지 않고 마이크로베시클 또는 나노입자 치료제 및 세포치료제에 포함시킬 수 있는 치료용 또는 진단용 물질로는 당업계에서 통상적으로 사용되는 항암제, 항염증제, 혈관신생 저해제, 펩타이드, 단백질, 독소, 핵산, 비드, 마이크로입자 및 나노입자 등 다양한 종류의 물질이 제한없이 사용될 수 있다.
- [178] 상기 항암제는 암의 성장과 전이를 억제시키기 위해 사용되는 모든 약제를 총칭하며, 대부분의 항암제는 암세포의 DNA의 복제, 전사, 번역 과정을 차단한다. 본 발명의 치료용 물질로 사용될 수 있는 항암제의 종류는 특별히 한정되지 않는다. 항암제는 암세포의 종류, 항암제의 흡수 속도(치료기간과 항암제 투여 경로), 종양의 위치, 종양의 크기 등의 항암제 선택시 고려하는 일반적인 원칙하에 선택될 수 있다. 상기 본 발명에서 사용될 수 있는 항암제는 DNA 알킬화제(DNA alkylating agent)인 메칠로에타민(mechloethamine), 클로람부실(chlorambucil), 페닐알라닌(phenylalanine), 무스타드(mustard), 시크로포스파미드(cyclophosphamide), 이포스파미드(ifosfamide), 카르무스틴(carmustine: BCNU), 로무스틴(lomustine: CCNU), 스트렙토조토신(streptozotocin), 부설판(busulfan), 티오테파(thiotepa), 시스플라틴(cisplatin) 및 카보플라틴(carboplatin) 등이 사용될 수 있고, 항암 항생제(anti-cancer antibiotics)인 닥티노마이신(dactinomycin: actinomycin D), 독소루비신(doxorubicin: adriamycin), 에피루비신(epirubicin), 이다루비신(idarubicin), 미토산트론(mitoxantrone), 플리카마이신(plicamycin), 미토마이신(mitomycin) 및 C 블레오마이신(C Bleomycin) 등이 사용될 수 있으며, 식물 알칼로이드(plant alkaloid)인 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine), 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel), 다노루비신(daunorubicin), 탁솔(taxol), 온코빈(ovcovin), 프레드니손(prednisone), 시스플라틴, 허셉틴(herceptin), 리툽시맵(rituximab), 에토포사이드(etoposide), 테니포사이드(teniposide), 토포테산(topotecan) 및 이리도테산(iridotecan) 등으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 또한, 당 업계에서 통상적으로 사용되는 방사성 물질들을 이용할 수도 있다. 그러나 본 발명에서 사용될 수 있는 항암제가 상기 예들에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [179] 또한, 본 발명의 마이크로베시클 또는 나노입자 치료제 및 세포치료제에 포함될 수 있는 항염증제는 텍사메타손(dexamethasone), 인도메타신(indomethacin), 이부프로펜(ibuprofen), 클로메타졸 프로피오네이트(clobetasol propionate), 디팔오르손 디아세테이트(diflorasone diacetate), 할로메타솔 프로피오네이트(halobetasol propionate), 암시온니드(amcinonide), 플루시온니드(flucicnonide), 모메타손 푸로에이트(mometasone furoate), 데옥시메타손(desoximetasone),

디클로페낙(diclofenac) 및 피록시캠(piroxicam)등으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 본 발명에서 사용될 수 있는 항염증제가 상기 예에 의해 제한되는 것은 아니다.

- [180] 상기 혈관신생 저해제는 기존 혈관에서 새로운 혈관이 만들어지는 과정을 억제하기 위해 사용되는 모든 약제를 총칭하며, 대부분의 혈관신생 저해제는 암의 성장과 전이를 억제하고 염증 반응을 억제할 수 있다. 본 발명의 치료용 물질로 사용될 수 있는 혈관신생 저해제의 종류는 특별히 한정되지 않는다.
- [181] 본 발명에 따른 상기 마이크로베시클 또는 나노입자 치료제 및 세포치료제에 치료용 또는 진단용 물질로서 단백질 또는 펩타이드를 포함시킬 수 있다. 예를 들어, RNase A 뿐만 아니라, VEGF, EGF 등과 같은 성장 인자, IL-1, IFN-gamma, IL-10과 같은 사이토카인류, 각종 항체 치료제, 다양한 펩타이드 또는 단백질, DNase 이 외에 암의 성장과 전이를 억제하고 염증반응을 억제할 수 있는 다양한 단백질 및 펩타이드를 제한없이 사용할 수 있다.
- [182] 본 발명에 따른 상기 마이크로베시클 또는 나노입자 치료제 및 세포치료제에 치료용 또는 진단용 물질로서 독소를 포함시킬 수 있다. 독소는 다양한 생물체에서 유래된 것으로 체내에 흡수되었을 때 독성을 나타낼 수 있는 것을 총칭하며, 독소를 통해 세포 사멸을 유도할 수 있다. 본 발명의 치료용 물질로 사용될 수 있는 독소의 종류는 특별히 한정되지 않는다.
- [183] 본 발명에 따른 상기 마이크로베시클 또는 나노입자 치료제 및 세포치료제에 로딩할 수 있는 핵산으로서 DNA, miRNA, siRNA, 안티센스 RNA, 센스 RNA, 앵타머를 사용할 수 있고 핵산 유사체인 LNA, PNA, 모폴리노 등을 사용할 수 있으나 이것들로 제한되는 것은 아니다. 이러한 핵산은 센스 효과, 안티센스 효과, RNA 간섭 및 단백질의 기능 저해 등의 목적으로 이용될 수 있다.
- [184] 본 발명에 있어서, 형광단백질을 암호화(encode)하는 핵산 또는 다양한 형광물질을 로딩한 마이크로베시클을 진단에 이용할 수 있다. 특정 세포 또는 조직을 표적으로 하는 마이크로베시클에 형광단백질을 암호화하고 있는 플라스미드 DNA를 로딩하여 생체에 주입하면 그 표적 세포 또는 조직의 존재를 형광단백질에서 방출되는 형광 신호로부터 알 수 있다. 또한, 특정 세포 또는 조직을 표적으로 하는 마이크로베시클에 형광 방출 양자점을 포함한 다양한 형광물질을 포함시켜서 생체에 주입하면 그 표적 세포 또는 조직의 존재를 형광 신호로부터 알 수 있다. 특정한 표적 세포 또는 조직에서 발생하는 형광을 진단에 이용할 수 있다. 세포 사멸을 유도하는 형광 방출 양자점은 치료 목적으로도 이용할 수 있다.
- [185] 마이크로베시클 또는 나노입자 치료제 및 세포치료제에 로딩할 수 있는 다른 치료용 또는 진단용 물질의 예로서 형광 물질 이외에 다른 마이크로입자 또는 나노입자를 사용할 수 있다. 산화철, 금, 탄소나노튜브 등의 마이크로입자 또는 나노입자를 사용할 수 있으나 이것들로 제한되는 것은 아니다. 자기 비드 등의 비드를 마이크로베시클에 로딩하여 사용할 수도 있다. 산화철 등의 자성입자는

자기공명영상(magnetic resonance imaging, MRI)을 얻는 조영제로 이용될 수 있다. 나노입자와 결합한 핵산, 나노입자와 결합한 단백질 등도 사용할 수 있으며 진단에 유용한 방사성 물질도 사용 가능하다.

- [186] 본 발명에 따른 상기 마이크로베시클을 사용하여 2가지 이상의 물질을 전달할 수 있다. 예를 들어, 2가지 이상의 물질을 동시에 로딩한 마이크로베시클을 사용하여 2가지 이상의 물질을 전달할 수 있다. 또는, 한 가지 또는 두 가지 이상의 물질이 로딩된 마이크로베시클을 복수 개 사용하여 2가지 이상의 물질을 전달할 수 있다. 예를 들어, 3가지 물질을 전달하는 경우, 각 물질을 포함한 제 1, 제 2, 제 3 마이크로베시클을 제조하여 사용할 수 있다. 제 1, 제 2 물질을 포함한 제 4 마이크로베시클과 제 3 물질을 포함한 제 5 마이크로베시클을 준비하고 제 4, 제 5 마이크로베시클을 사용하여 3가지 물질을 전달할 수 있다. 제 1, 제 2, 제 3 마이크로베시클을 동시에 투여할 수도 있고 순차적으로 투여할 수도 있다. 제 4, 제 5 마이크로베시클을 동시에 투여할 수도 있고 순차적으로 투여할 수도 있다.
- [187] 마이크로베시클을 다른 분자나 다른 세포 구성 성분으로부터 분리하기 위해 밀도 구배, 초원심분리, 여과, 투석 및 자유 유동 전기이동법 등의 방법을 사용할 수 있으나, 본 발명의 상기 선별 방법이 이것들로 제한되는 것은 아니다.
- [188] 밀도 구배는 밀도가 다른 물질을 구분할 때 가장 많이 사용되는 방법으로서, 본 발명의 마이크로베시클은 자유 분자(free molecule)등과 밀도가 구분되기 때문에 밀도 구배를 통해 분리할 수 있다. 이 방법의 구체적인 예로는 피콜(ficoll), 글리세롤, 수크로스(sucrose), 옵티프렙(OptiPrep™) 등의 밀도 구배를 사용할 수 있으나 본 발명의 밀도 선별 방법이 이것들로 제한되는 것은 아니다. 치료 및 진단을 위한 분자가 로딩된 마이크로베시클과 로딩되지 않은 마이크로베시클의 밀도가 다른 성질을 이용하여 두 가지 마이크로베시클을 분리할 수 있다. 밀도 구배는 원심분리 또는 전기영동(electrophoresis) 등과 함께 사용할 수 있다. 마이크로베시클을 선별하기 위해 겔 여과(gel filtration) 또는 한외여과(ultrafiltration)를 사용할 수도 있다. 크기가 작은 분자를 제거하기 위해 여과 대신 투석을 사용할 수 있다. 이 외에도 자유 유동 전기이동법을 사용할 수도 있다.
- [189] 목적에 따라 크기가 일정한 범위에 있는 마이크로베시클을 선별하여 사용할 수 있다. 마이크로베시클의 크기를 선별하는 단계는 치료용 또는 진단용 물질을 마이크로베시클에 로딩하는 단계보다 먼저 진행할 수도 있고, 동시에 진행할 수도 있고, 나중에 진행할 수도 있다.
- [190] 본 발명에 있어서, 세포막의 구성 성분의 일부가 개질(modification)된 마이크로베시클을 제조하여 사용할 수도 있다. 예를 들어, 따로 준비한 융합단백질과 세균의 혼합액으로부터 마이크로베시클을 제조하여 융합단백질이 표면에 노출된 마이크로베시클을 준비할 수 있다. 마이크로베시클 표면에 폴리에틸렌글리콜을 결합시켜

스텔스-마이크로베시클(*stealth-microvesicle*)의 제조가 가능하다. 또한, 마이크로베시클에 사이클로텍스트린을 첨가할 경우 비특이적 타겟팅을 감소시킬 수 있다. 사이클로텍스트린은 수용성과 지용성을 동시에 가지고 있는 물질로서, 마이크로베시클에 표면에 붙어 지질간의 비특이적 결합을 저해할 수 있다. 화학적으로 마이크로베시클을 개질하여 사용할 수도 있다. 예를 들어, 세포막의 표면에 시스테인(*cystein*)을 포함한 단백질의 부분이 노출된 세균으로부터 마이크로베시클을 제조한 후에 시스테인의 티올기에 화학적인 방법으로 여러 가지 분자를 결합시켜 마이크로베시클을 개질할 수 있다. 또한, 세포막 단백질에 존재하는 아민기에 화학적인 방법으로 여러 분자를 결합시켜 개질할 수도 있다.

- [191] 본 발명은 세균유래 마이크로베시클의 구성성분을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암치료 방법을 제공한다.
- [192] 본 발명에 사용되는 세균은 그람음성균 및 그람양성균을 포함한다. 상기 그람음성균은 대장균, 녹농균, 및 살모넬라균 등을 포함하며, 그람양성균은 포도상구균 및 락토바실러스균 등을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [193] 본 발명에서 상기 마이크로베시클의 구성성분이 단백질, 핵산 및 지질을 포함하고 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [194] 상기 본 발명의 일 구현예에서, 단백질은 세균유래 마이크로베시클을 구성하는 하나의 요소로서, 수용성 단백질, 지용성 단백질, 또는 막단백질 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [195] 상기 본 발명의 일 구현예에서, 상기 막 단백질은 OmpA, OmpF, OmpC, Flagellin 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [196] 상기 본 발명의 일 구현예에서, 핵산은 DNA 또는 RNA 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [197] 상기 본 발명의 일 구현예에서, 상기 단백질이, 세포 접합 분자(*cell adhesion molecule*), 항체(*antibody*), 표적유도(*targeting*) 단백질, 세포막융합 (*fusion*) 단백질 또는 이들의 융합 단백질로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상과 결합된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [198] 본 발명의 또 다른 측면은 세균유래 마이크로베시클의 구성성분 중, 단백질을 재구성(*reconstitution*)한 나노입자 치료제를 제조하여 항암치료에 사용하는 방법을 제공한다.
- [199] 본 발명의 또 다른 측면은 세균유래 마이크로베시클의 구성성분 중, 핵산을 나노입자 치료제에 삽입하여 항암치료에 사용하는 방법을 제공한다.
- [200] 본 발명의 또 다른 측면은 세균유래 마이크로베시클의 구성성분 중, 지질을 재구성(*reconstitution*)한 나노입자 치료제를 제조하여 항암치료에 사용하는 방법을 제공한다.
- [201] 본 발명의 또 다른 측면은 세균유래 마이크로베시클의 구성성분 중 2가지 이상의 구성성분을 삽입 또는 재구성(*reconstitution*)한 나노입자 치료제를

제조하여 항암치료에 사용하는 방법을 제공한다.

- [202] 상기 나노입자 치료제는 10 nm ~ 10 μ m 크기를 가지는 입자로써, 리포솜 (liposome), 덴드리머 (dendrimer), 폴리머 (polymer), 마이크로베시클 (microvesicle) 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [203] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 세균유래 마이크로베시클 구성성분은 새로운 성분을 추가로 포함할 수 있다.
- [204] 상기 성분으로서 사이클로덱스트린(cyclodextrin), 폴리에틸렌글리콜(polyethyleneglycol) 등을 포함할 수 있다. 또한 상기 성분은 다양한 방법에 의해 추가될 수 있으며, 화학적 변형 등을 포함한다.
- [205] 본 발명의 또 다른 구현예로 상기 방법은 부작용을 감소시키는 약물 또는 항암효능을 증가시키는 약물을 추가로 포함할 수 있다. 상기 부작용을 감소시키는 약물은 아스피린일 수 있다. 또한, 상기 항암효능을 증가시키는 약물은 Th17(T helper 17 세포) 면역반응을 억제하는 약물, 인터루킨(interleukin, IL)-6의 생성 혹은 활성을 억제하는 약물, 혈관내피세포성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)의 생성 혹은 활성을 억제하는 약물, STAT3(signal transducer and activator of transcription 3) 신호전달을 억제하는 약물, 항암제를 포함한다. Th17 면역반응을 억제하는 약물의 예로는 아스피린(aspirin)을 들 수 있으며, VEGF의 생성 혹은 활성을 억제하는 약물의 예로는 VEGF 수용체에 의한 신호전달을 억제하는 약물을 들 수 있다.
- [206] 본 발명의 일 구현예로, 상기 마이크로베시클의 구성성분과 함께 그 부작용을 감소시키는 약물, 항암효능을 증가시키는 약물, 약물을 로딩한 나노입자치료제 및 세포치료제 등을 병용/순차 투여할 수 있다.
- [207] 상기 나노입자 치료제는 10 nm ~ 10 μ m 크기를 가지는 입자로써, 리포솜 (liposome), 덴드리머 (dendrimer), 폴리머 (polymer), 마이크로베시클 (microvesicle) 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [208] 상기 본 발명의 또 다른 구현예에서, 1가지 상기 마이크로베시클 유래 구성성분, 2 가지 이상의 상기 마이크로베시클 유래 구성성분, 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 2개 이상의 구성성분을 동시에 투여할 수 있다.
- [209] 상기 본 발명의 또 다른 구현예에서, 1가지 상기 마이크로베시클 유래 구성성분, 2 가지 이상의 상기 마이크로베시클 유래 구성성분, 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 2개 이상의 구성성분을 순차적으로 투여할 수 있다.
- [210] 상기 본 발명의 또 다른 구현예에서, 1가지 상기 마이크로베시클 유래 구성성분, 2 가지 이상의 상기 마이크로베시클 유래 구성성분, 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 2개 이상의 구성성분을 부작용을 감소시키는 약물, 항암효능을 증가시키는 약물, 약물을 로딩한 나노입자 치료제, 또는 질병 치료용 세포치료제와 조합하여 순차적으로 투여할 수 있다.

[211]

[212] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[213]

[214] [실시예]

[215]

[216] 실시예 1. 압출법에 의한 그람음성균 유래 인공 마이크로베시클의 제조 및 특성 분석

[217]

[218] 압출법을 이용하여 인공적으로 세균유래 마이크로베시클을 제조하였다.

[219] 본 실험에서는 그람음성균인 대장균을 사용하였다. 구체적으로, 50 ml의 LB 배지에 흡광도(600 nm) 값이 1.0이 될 때까지 배양하였다. 배양된 세균을 3,500 x g에서 10분간 원심분리하여 배양액으로부터 세균을 분리하였으며, 분리된 세균은 다시 생리식염수(phosphate buffered saline, PBS)에 현탁하였다.

[220] 상기 현탁 용액을 구멍 크기가 10 μm 인 멤브레인 필터(membrane filter)에 3회 통과시키고 다시 구멍 크기가 5 μm 인 멤브레인 필터에 3회 통과시킨 다음, 구멍 크기가 1 μm 인 멤브레인 필터를 3회 통과시켰다. 5 ml 용량의 초원심분리 튜브에 각각 50% 옵티프랩 1 ml, 5% 옵티프랩 1 ml, 멤브레인 필터를 통과한 세균 현탁액 3 ml 을 차례로 담았다. 이후, 150,000 x g 에서 3 시간 동안 초원심분리하였다. 50% 옵티프랩과 5% 옵티프랩 사이의 층에서 마이크로베시클을 얻었다.

[221]

[222] 상기의 방법에 따라 인공적으로 제조한 그람음성균 유래 인공 마이크로베시클의 특성을 분석하였다. 구체적으로, 상기 그람음성균 유래 인공 마이크로베시클을 글로방전탄소 코팅 구리 그리드(glow-discharged carbon-coated copper grid)에서 3분간 흡착시켰다. 상기 그리드를 증류수로 세척한 후, 2% 우라닐아세테이트(uranylacetate)로 1분 동안 염색(staining)한 다음 JEM101(Jeol, Japan) 전자현미경으로 관찰하여 그 결과를 도 1에 나타내었다. 도 1의 투과전자현미경(transmission electron microscope, TEM) 사진에서 알 수 있는 바와 같이, 압출법을 이용하여 인공적으로 제조한 세균유래 마이크로베시클은 지질 이중층으로 이루어져 있으며, 크기가 10 ~ 100 nm 이고 구형을 나타내는 것으로 확인되었다.

[223]

[224] 실시예 2. 그람음성균 유래 쉼딩 마이크로베시클을 이용한 *in vivo* 항암 효능

[225]

[226] 본 실험에서는 그람음성균에서 자연적으로 분비되는 쉼딩 마이크로베시클을 분리하여 사용하였다. 그람음성균으로는 대장균, 녹농균, 살모넬라균을

사용하였다. 구체적으로, 세균을 100 ml의 LB 배지가 들어있는 삼각플라스크에 접종한 후 37°C에서 6시간 동안 배양한 다음, 그 중 8 ml을 600 ml LB 배지가 들어있는 2 L 삼각 플라스크에 옮겨 37°C, 5시간 동안 배양하여 흡광도(600 nm) 값이 1.5가 되도록 하였다. 배양액을 500 ml 용량의 고속원심분리튜브(high speed centrifuge tube)에 담은 후 4°C에서 10,000 x g로 20분 동안 원심분리하였다. 세균을 제거한 상층액을 구멍 크기가 0.45 µm인 멤브레인 필터에 1회 통과 시킨 후, 100 kDa 분자량 이하의 단백질을 제거할 수 있는 멤브레인을 장착한 퀵스탠드 시스템(Quixstand system)을 사용하여 25배 농축하였다. 농축액을 0.22 µm의 구멍 크기를 가진 멤브레인 필터에 1회 통과 시킨 후, 70 ml 용량의 초원심분리 튜브(ultracentrifuge tube)에 담고 4°C에서 150,000 x g로 3시간 동안 초원심분리하였다. 침전물을 PBS로 현탁한 후, 세균유래 웨딩 마이크로베시클을 얻었다.

- [227] 상기의 방법에 따라 대장균, 녹농균, 및 살모넬라균 유래 웨딩 마이크로베시클을 수득한 후 이를 사용하여 본 실험을 실시하였다. 구체적으로, 생쥐 대장암 26 세포주(mouse colon 26 cell line) 1 x 10⁶ 세포를 생쥐의 피부 밑에 주사하고 키웠다. 1주일 후, PBS, 상기 세균유래 웨딩 마이크로베시클 1 µg 또는 5 µg을 포함하는 PBS 용액 100 µl를 각 실험군 별로 3마리의 생쥐에 일주일에 두 번씩 꼬리정맥에 주사하고, 대장암세포 투여 23일 후, 대장암조직의 크기를 측정하였다. 대장암조직의 부피(V)는 가장 긴 길이(l)와 이에 수직인 길이(s)를 측정하여 $V = 1 \times s^2/2$ 의 공식으로 계산하였다.
- [228] 상기 대장암세포를 피하 접종한 이후 대장암조직의 크기를 측정한 결과를 도 2 내지 도 4에 나타내었다. PBS 투여한 대조군에 비하여 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클을 투여한 경우, 용량에 의존적으로 대장암조직의 크기가 감소하였고(도 2 참조), 녹농균 유래 웨딩 마이크로베시클을 투여한 경우에도 대장암조직의 크기가 현저히 감소하였다(도 3 참조). 또한, 살모넬라균 유래 웨딩 마이크로베시클을 투여한 경우도 대장암조직의 크기가 감소하였다(도 4 참조).
- [229]
- [230] 실시예 3. 그람양성균 유래 웨딩 마이크로베시클을 이용한 *in vivo* 항암 효능
- [231]
- [232] 본 실험에서는 그람양성균에서 자연적으로 분비되는 웨딩 마이크로베시클을 분리하여 사용하였다. 그람양성균으로는 포도상구균과 유산균인 락토바실러스균을 사용하였다. 구체적으로, 세균을 100 ml의 영양 배지(nutrient broth)가 들어있는 삼각플라스크에 접종한 후 37°C에서 6시간 동안 배양한 다음, 그 중 8 ml을 600 ml 영양 배지가 들어있는 2 L 삼각 플라스크에 옮겨 37°C, 5시간 동안 배양하여 흡광도(600 nm) 값이 1.5가 되도록 하였다. 배양액을 500 ml 용량의 고속원심분리튜브에 담은 후 4°C에서 10,000 x g로 20분 동안 원심분리하였다. 세균을 제거한 상층액을 구멍 크기가 0.45 µm인 멤브레인 필터에 1회 통과 시킨 후, 100 kDa 분자량 이하의 단백질을 제거할 수 있는

멤브레인을 장착한 쿼스텐드 시스템을 사용하여 25배 농축하였다. 농축액을 0.22 μm 의 구멍 크기를 가진 멤브레인 필터에 1회 통과 시킨 후, 70 ml 용량의 초원심분리 튜브에 담고 4°C에서 150,000 x g로 3시간 동안 초원심분리하였다. 침전물을 PBS로 현탁한 후, 세균유래 웨딩 마이크로베시클을 얻었다.

- [233] 상기의 방법에 따라 얻은 포도상구균과 락토바실러스균 유래 웨딩 마이크로베시클을 사용하여 하기 실험을 실시하였다. 구체적으로, 생쥐 대장암 26 세포주 1×10^6 세포를 생쥐의 피부 밑에 주사하고 키웠다. 1주일 후, PBS, 상기 세균유래 웨딩 마이크로베시클 각 10 μg 을 포함한 PBS 용액 100 μl 를 각 실험군 별로 3마리의 생쥐에 일주일에 두 번씩 꼬리정맥에 주사하고, 대장암세포 투여 23일 후, 대장암조직의 크기를 측정하였다. 대장암조직의 부피(V)는 가장 긴 길이(l)와 이에 수직인 길이(s)를 측정하여 $V = 1 \times s^2/2$ 의 공식으로 계산하였다.
- [234] 상기 대장암세포를 피하 접종한 이후 대장암조직의 크기를 측정한 결과를 도 5 및 도 6에 나타내었다. 그림에 나타난 바와 같이, 대조군인 PBS 투여군에 비하여 포도상구균 유래 웨딩 마이크로베시클 투여군에서 대장암조직의 크기가 현저히 감소하였고(도 5 참조), 락토바실러스균 유래 웨딩 마이크로베시클을 투여한 군에서도 PBS 투여군에 비하여 대장암조직의 크기가 현저히 감소하였다(도 6 참조).
- [235]
- [236] 실시예 4. 형질전환 그람음성균 유래 웨딩 마이크로베시클을 이용한 *in vivo* 항암 효능
- [237]
- [238] 지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된(*msbB* mutant) 대장균을 사용하여 실시예 2의 방법에 따라 웨딩 마이크로베시클을 얻은 후 이를 사용하여 하기 실험을 실시하였다.
- [239] 생쥐 대장암 26 세포주 1×10^6 세포를 생쥐의 피부 밑에 주사하고 키웠다. 1주일 후, PBS, 야생형(wild type) 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클 또는 지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클 1 mg 을 포함한 PBS 용액 100 ml를 각 실험군 별로 3마리의 생쥐에 일주일에 두 번씩 꼬리정맥에 주사하고, 대장암세포 투여 23일 후, 대장암조직의 크기를 측정하였다. 대장암조직의 부피(V)는 가장 긴 길이(l)와 이에 수직인 길이(s)를 측정하여 $V = 1 \times s^2/2$ 의 공식으로 계산하였다.
- [240] 상기 대장암세포를 피하 접종한 이후 대장암조직의 크기를 측정한 결과를 도 7에 나타내었다. 도 7에 나타난 바와 같이, 대조군인 PBS 투여군에 비하여 지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클 투여시, 대조군인 PBS 투여군은 물론, 야생형 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클 투여군과 비교시에도 대장암조직의 크기가 현저히 감소하였다.
- [241]

- [242] 실시예 5. 형질전환 그람양성균 유래 웨딩 마이크로베시클을 이용한 *in vivo* 항암 효능
- [243] 리포타이코산의 독성이 약화되도록 형질전환된(LTA mutant) 포도상구균을 사용하여 실시예 3의 방법에 따라 웨딩 마이크로베시클을 얻은 후 이를 사용하여 하기 실험을 실시하였다.
- [244] 생쥐 대장암 26 세포주 1×10^6 세포를 생쥐의 피부 밑에 주사하고 키웠다. 1주일 후, PBS, 야생형 포도상구균 유래 웨딩 마이크로베시클 또는 리포타이코산의 독성이 약화되도록 형질전환된 포도상구균 유래 웨딩 마이크로베시클 $10 \mu\text{g}$ 을 포함한 PBS 용액 $100 \mu\text{l}$ 를 각 실험군 별로 3마리의 생쥐에 일주일에 두 번씩 꼬리정맥에 주사하고, 대장암세포 투여 23일 후, 대장암조직의 크기를 측정하였다. 대장암조직의 부피(V)는 가장 긴 길이(l)와 이에 수직한 길이(s)를 측정하여 $V = 1 \times s^2/2$ 의 공식으로 계산하였다.
- [245] 상기 대장암세포를 피하 접종한 이후 대장암조직의 크기를 측정한 결과를 도 8에 나타내었다. 도 8에 나타난 바와 같이, 대조군인 PBS 투여군에 비하여 리포타이코산의 독성이 약화되도록 형질전환된 포도상구균 유래 웨딩 마이크로베시클 투여시, 대조군인 PBS 투여군은 물론, 야생형 포도상구균 유래 웨딩 마이크로베시클 투여군과 비교시에도 대장암조직의 크기가 현저히 감소하였다.
- [246]
- [247] 실시예 6. 형질전환 그람음성균 유래 웨딩 마이크로베시클을 이용한 전이암에 대한 *in vivo* 치료 효과
- [248]
- [249] 지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된 대장균을 사용하여 실시예 2의 방법에 따라 웨딩 마이크로베시클을 얻은 후 이를 사용하여 하기 실험을 실시하였다.
- [250] 생쥐 흑색종(melanoma) 세포주인 B16BL6 세포 1×10^5 세포를 생쥐의 꼬리 정맥으로 주사하였다. 3일 후, PBS, 지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클 $1 \mu\text{g}$ 을 포함한 PBS 용액 $100 \mu\text{l}$ 를 각 실험군 별로 3마리의 생쥐에 10일 동안 매일 꼬리정맥에 주사하였다. 흑색종암세포 투여 14일 후, 생쥐에서 폐를 꺼내어 폐에 전이된 흑색종 군체(colony)의 수를 측정하였다.
- [251] 도 9는 각 조건당 3 마리의 생쥐에서 폐로 전이된 흑색종 군체의 수를 측정하여 나타낸 그래프이다. 도 9에 나타난 바와 같이 대조군인 PBS 투여군에 비하여 지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클 투여시, 폐 조직으로 전이된 흑색종 군체의 수가 효과적으로 감소됨을 알 수 있다.
- [252]
- [253] 실시예 7. 약물 병용 투여에 의한 세균유래 웨딩 마이크로베시클에 의한 항암

효능

[254]

[255] 암 발생에 염증의 중요성이 수세간 전부터 제기되었고, 최근 VEGF/IL-6, STAT3(signal transducer and activator of transcription 3) 신호전달, Th17 면역반응 등으로 생기는 염증반응이 암 발생 및 진행에 중요하다는 연구결과가 주목을 받고 있다. 아스피린 투여에 의해 대장암 발생이 감소한다는 보고가 있었고, 최근 본 발명자들은 아스피린이 Th17 면역반응에 의한 염증반응을 억제한다는 사실을 밝혀냈다. 본 실험에서는 세균유래 마이크로베시클에 의한 항암효능에 Th17 면역반응을 억제하는 약물을 병용 투여하였을 때 항암효능이 증가되는지를 평가하였다. 본 실험에는 지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된 대장균에서 실시예 2의 방법에 따라 웨딩 마이크로베시클을 얻은 후 이를 사용하였다. Th17 면역반응을 억제하는 약물로 아스피린을 병용 투여하였다.

[256]

생쥐 대장암 26 세포주 1×10^6 세포를 생쥐의 피부 밑에 주사하고 키웠다. 1주일 후, PBS, 18 mg/kg의 아스피린을 포함한 PBS 용액, 0.1 μg 의 상기 세균유래 마이크로베시클을 포함한 PBS 용액, 0.1 μg 의 상기 세균유래 마이크로베시클과 18 mg/kg의 아스피린을 포함한 PBS 용액 100 μl 를 각 실험군 별로 4마리의 생쥐에 일주일에 두 번씩 꼬리정맥에 주사하고, 대장암세포 투여 23일 후, 대장암조직의 크기를 측정하였다. 대장암조직의 부피(V)는 가장 긴 길이(l)와 이에 수직인 길이(s)를 측정하여 $V = 1 \times s^2/2$ 의 공식으로 계산하였다.

[257]

상기 대장암세포를 피하 접종한 이후 대장암조직의 크기를 측정한 결과를 도 10에 나타내었다. 도 10에 나타난 바와 같이, 아스피린 단독 투여군은 PBS투여군과 비교시 대장암조직의 크기에 차이가 없었다. 즉, 아스피린에 의한 항암효능을 관찰할 수 없었다. 그러나, 지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클과 아스피린을 동시에 투여한 경우, 지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클 단독 투여군에 비하여 대장암조직의 크기가 현저히 감소하는 것으로 나타났다.

[258]

상기 결과로부터 아스피린과 같은 Th17 면역반응을 억제하는 약물과 병용 투여하는 경우에 본 발명의 세균유래 웨딩 마이크로베시클에 의한 항암효능을 증진시킬 수 있음이 명백하다.

[259]

[260]

실시예 8. 그람음성균 유래 웨딩 마이크로베시클에 항암제 약물의 로딩

[261]

[262]

지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된 대장균을 사용하여 실시예 2의 방법에 따라 웨딩 마이크로베시클을 얻은 후 이를 사용하여 하기 실험을 실시하였다.

[263]

상기 실시예 2의 방법에 따라 얻은 웨딩 마이크로베시클에 0.4 mg/ml 농도의

독소루비신을 1:1 비율로 섞어 4°C에서 12시간 동안 배양하였다. 배양된 용액을 4°C에서 150,000 x g로 3시간 동안 초고속 원심분리를 진행하여 독소루비신을 로딩한 쉘딩 마이크로베시클과 용액 내 쉘딩 마이크로베시클에 들어가지 않은 독소루비신을 분리하였다. 독소루비신을 로딩한 쉘딩 마이크로베시클에 녹색형광을 띄며 지질 이중막에 삽입되어 표지할 수 있는 DiO용액을 넣어 쉘딩 마이크로베시클을 녹색형광으로 표지한 다음, 커버 글라스에 붙이고 공초점 현미경(confocal microscope)에서 독소루비신이 쉘딩 마이크로베시클에 로딩되는가를 확인하였으며 이 결과를 도 12에 나타내었다.

[264] 도 11에 나타난 바와 같이, 빨간색 형광의 독소루비신이 모두 녹색 형광의 쉘딩 마이크로베시클에 로딩 되어있음을 확인하였으며, 상기 결과로부터 세균유래 마이크로베시클에 질병 치료용 또는 진단용 약물을 효과적으로 로딩할 수 있음을 알 수 있다.

[265]

[266] 실시예 9. 항암 약물이 로딩된 세균유래 마이크로베시클의 *in vitro* 항암 효능

[267]

[268] 항암 약물을 로딩한 세균유래 마이크로베시클이 암세포로 항암 약물을 전달하여 세균유래 마이크로베시클에 의한 항암 효능 증대에 영향을 주는가를 평가하였다. 본 실험에서는 항암 약물의 일 예로 독소루비신을 사용하였다.

[269] 상기 실시예 8의 방법에 따라 독소루비신이 로딩된 지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된 대장균 유래 쉘딩 마이크로베시클을 제조하여 하기 실험에 사용하였다.

[270] 생쥐 대장암 26 세포주 5×10^4 세포를 24 웰 플레이트에서 하루 동안 배양하였다. PBS, 독소루비신을 로딩하지 않은 상기 세균유래 마이크로베시클을 포함하는 PBS 용액, 및 독소루비신을 로딩한 상기 세균유래 마이크로베시클을 포함하는 PBS 용액 1 ml을 각각 생쥐 대장암 26 세포주에 6시간 동안 처리한 다음, 18시간 동안 추가 배양하였다. 살아있는 생쥐 대장암 26 세포주의 수를 현미경으로 계수하여 그 결과를 도 12에 나타내었다.

[271] 도 12에서 알 수 있는 바와 같이, 독소루비신을 로딩한 상기 세균유래 마이크로베시클은 독소루비신을 로딩하지 않는 상기 세균유래 마이크로베시클에 비해 암세포 사멸효과가 크게 나타남을 알 수 있다.

[272] 상기 결과로부터, 항암 약물을 로딩한 상기 세균유래 마이크로베시클을 처리하였을 때, 세균유래 마이크로베시클에 의한 항암효과뿐만 아니라 로딩된 항암 약물에 의한 항암효과가 추가적으로 더해져서 더 큰 항암효과를 나타낼 수 있음을 알 수 있다.

[273]

[274] 실시예 10. 세균유래 마이크로베시클의 부작용에 대한 지질다당류 활성 억제제의 효과

[275]

- [276] 세균유래 마이크로베시클의 부작용과 관련하여 마이크로베시클의 구성성분인 지질다당류가 패혈증 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 본 발명자들은 상기 마이크로베시클이 함유하고 있는 지질다당류의 활성을 억제시키는 약물을 처리하여 지질다당류에 의한 부작용에 미치는 영향을 평가하였다. 본 실험에서는 지질다당류의 활성을 억제하는 약물의 일 예로 polymyxin B를 사용하였다.
- [277] 상기 실시예 2의 방법에 따라 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클을 제조하였다. 생쥐의 복강에 PBS, 25 μg 의 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클을 함유하고 있는 PBS 용액, 25 μg 의 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클과 250 μg 의 polymyxin B를 함유하고 있는 PBS 용액 100 μl 를 각 실험군 별로 주사한 다음, 12시간 간격으로 120시간까지 생쥐의 생존률을 관찰하였으며, 그 결과를 도 13에 나타내었다.
- [278] 도 13에서 알 수 있는 바와 같이, 25 μg 의 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클을 포함하는 PBS 용액을 투여하였을 경우, 투여 후 120시간이 경과한 시점에서의 생쥐의 생존률은 10%였으나, 25 μg 의 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클과 250 μg 의 polymyxin B를 함유하고 있는 PBS 용액을 투여한 경우, 동일 시점에서 생쥐의 생존률은 55%였다.
- [279] 상기 결과로부터, 대장균 유래 마이크로베시클에 의한 부작용의 발생에 상기 마이크로베시클에 함유된 지질다당류의 활성을 억제시키는 약물을 처리하였을 때 세균유래 마이크로베시클에 함유된 지질다당류에 의한 부작용의 발생이 효과적으로 억제될 수 있음을 알 수 있다.
- [280]
- [281] 실시예 11. 야생형 및 형질전환 그람음성균 유래 마이크로베시클에 의한 부작용의 차이
- [282]
- [283] 세균유래 마이크로베시클의 부작용과 관련하여 마이크로베시클의 구성성분인 지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된 대장균에서 유래한 마이크로베시클을 사용하여 지질다당류에 의한 부작용의 발생에 미치는 영향을 평가하였다. 본 실험에서는 지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된 대장균의 일 예로 *msbB* mutant를 사용하였다.
- [284] 지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된 대장균으로부터 상기 실시예 2의 방법에 따라 웨딩 마이크로베시클을 분리하여 사용하였다. 생쥐의 복강에 PBS, 25 μg 의 야생형 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클을 함유하고 있는 PBS 용액, 25 μg 의 지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클을 함유하고 있는 PBS 용액 100 μl 를 각 실험군 별로 주사한 다음, 12시간 간격으로 120시간까지 생쥐의 생존률을 관찰하였으며, 그 결과로도 14에 나타내었다.
- [285] 도 14에서 알 수 있는 바와 같이, 25 μg 의 야생형 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클 투여군의 경우, 투여 후 120시간이 경과한 시점에서의 생쥐의

생존률은 45%였으나, 25 μg 의 지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클 투여군은 동일 시점에서 65%의 생존률을 보였다.

[286] 상기 결과로부터, 마이크로베시클에 의한 부작용을 일으키는 물질 중의 하나인 지질다당류 생성에 관련된 유전자를 변형시켜 지질다당류의 활성을 제거시킨 형질전환된 세균유래 마이크로베시클을 사용하는 경우, 야생형 세균유래 마이크로베시클을 사용하는 것에 비하여 마이크로베시클에 의한 부작용을 효과적으로 감소시킬 수 있음을 알 수 있다.

[287]

[288] 실시예 12. 형질전환 그람음성균 유래 마이크로베시클에 의한 부작용 완화

[289]

[290] 세균유래 마이크로베시클을 정맥주사 할 경우 발생할 수 있는 부작용에 대한 평가를 위해 본 실험에서는 지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클을 사용하였다. 또한, 정맥주사 할 경우 발생할 수 있는 부작용에 대한 일 예로 혈소판 수의 변화, 혈액응고, 용혈 반응에 대해 평가하였다.

[291] 지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된 대장균으로부터 상기 실시예 2의 방법에 따라 웨딩 마이크로베시클을 분리하여 사용하였다.

[292] 생쥐 대장암 26 세포주 1×10^6 세포를 생쥐의 피부 밑에 주사하고 키웠다. 1주일 후, PBS 또는 지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클 5 μg 을 포함한 PBS 용액 100 μl 를 각 실험군 별로 2마리의 생쥐에 한 번 꼬리정맥에 주사하고, 3시간 또는 6시간 뒤 생쥐의 혈액을 채취하였다.

[293] 혈소판은 혈액 응고에 중요한 역할을 하는 고형성분의 하나이다. 세균유래 마이크로베시클을 정맥주사 할 경우 혈소판의 수가 변화되는 것을 알아보기 위해 하기의 실험을 진행하였다. 상기 실험에서 얻은 혈액을 혈소판 희석액(Rees-Ecker액)에 100배 희석한 다음, 혈구 계산기(hemocytometer)에 넣고 10분간 상온에서 배양하여 광학현미경으로 혈소판의 수를 측정하였다. 이 결과를 도 15에 나타내었다.

[294] 도 15에 나타난 바와 같이, 지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클은 정맥주사 시, 혈액 응고에 중요한 역할을 하는 혈소판에 영향을 주지 않음을 알 수 있다.

[295] 섬유소 용해기전을 대표하고 응고기전의 활성화를 반영하는 산물인 디-다이머(D-dimer)는 혈관내응고증을 진단하는 중요한 검사법의 하나이다. 지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클에 의한 혈관내 응고현상을 판별하기 위해 하기의 실험을 진행하였다. 상기 실험에서 채취한 혈액을 $1,300 \times \text{g}$ 에서 10분간 원심분리하여 혈장을 얻었다. 디-다이머를 인지하는 포획 항체가 코팅된 96 웰 플레이트에

연은 혈장을 3배 희석하여 넣어준 다음, 과산화효소가 접합되어 있으며 다-다이머를 인지하는 검출 항체를 넣었다. 이 후, BM-POD 기질을 넣어 발색을 유도하고 그 결과를 도 16에 나타내었다.

- [296] 도 16에 나타난 바와 같이, 지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클은 정맥주사 시, 응고기전을 활성화시키지 않음을 알 수 있다.
- [297] 지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클에 의한 적혈구의 파괴 현상을 확인하기 위하여 하기의 실험을 진행하였다. PBS, 상기 실시예 2의 방법으로 분리한 지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클 1 $\mu\text{g/ml}$ 또는 2 $\mu\text{g/ml}$ 을 포함하는 PBS 용액 10 μl 를 혈액배지에 점적한 다음, 12시간 동안 37°C에서 배양하였다. 배양 후 혈액배지를 도 17에 나타내었다.
- [298] 도 17에 나타난 바와 같이, 지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클은 적혈구를 파괴하지 못함을 알 수 있다.
- [299] 상기 도 15 내지 도 17에 나타난 바와 같이, 지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클을 정맥주사로 투여할 경우, 혈소판의 수 감소, 혈액응고, 및 용혈반응이 혈액 내에서 발생하지 않음을 알 수 있다. 따라서, 지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된 세균유래 마이크로베시클을 사용하는 경우, 세균유래 마이크로베시클에 의한 부작용을 효과적으로 감소시킬 수 있음을 알 수 있다.
- [300]
- [301] 실시예 13. 야생형 및 형질전환 그람양성균 유래 마이크로베시클에 의한 부작용의 차이
- [302]
- [303] 세균유래 마이크로베시클의 부작용과 관련하여 그람양성균 유래 마이크로베시클의 구성성분인 리포타이코산이 면역반응을 통해 염증반응을 유도하는 중요한 물질로 알려져 있다. 따라서, 리포타이코산의 합성관련 유전자를 제거한 형질전환 세균유래 마이크로베시클을 사용하여, 그람양성균 유래 마이크로베시클에 의한 부작용의 발생에 리포타이코산의 역할을 평가하였다. 본 실험에서는 상기 리포타이코산의 독성이 약화되도록 형질전환된 포도상구균의 일 예로 세포벽에서 리포타이코산 성분을 없앤 LTA mutant 포도상구균을 사용하였다.
- [304] 상기 실시예 3의 방법에 따라, 리포타이코산의 독성이 약화되도록 형질전환된 포도상구균으로부터 웨딩 마이크로베시클을 제조하였다. 생쥐의 복강에서 분리한 대식세포(macrophage, 2.5×10^5 cells)에 PBS, 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 의 야생형 포도상구균 유래 웨딩 마이크로베시클을 함유하고 있는 PBS 용액, 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 의 리포타이코산의 독성이 약화되도록 형질전환된 포도상구균 유래 웨딩 마이크로베시클을 함유하고 있는 PBS 용액을 각각 0.5 ml씩 처리한 다음, 12시간

이후 세포의 조건 배지를 수득한 다음, 500 x g에서 5분간 원심분리하였다.

- [305] IL-6 포획 항체(capture antibody)가 코팅된 96 웰 플레이트를 준비하고, 웰 플레이트에 1% BSA(bovine serum albumin)을 100 μ l를 넣어 1시간 동안 고정(blocking)하였다. 얻은 조건 배지를 1/2 희석하여 넣어주고 실온에서 2시간 배양한 후, 바이오틴(biotin)이 붙어있는 IL-6에 대한 검출 항체(detection antibody)로 2시간 배양하였다. 1% BSA로 세척한 후, 스트렙타비딘-POD(streptavidin-POD)로 30분간 배양하고 BM-POD 기질을 넣어 발색을 유도하고 그 결과를 도 18에 나타내었다.
- [306] 도 18에서 알 수 있는 바와 같이, 야생형 포도상구균 유래 웨딩 마이크로베시클 투여군의 경우에 비하여 리포타이코산의 독성이 약화되도록 형질전환된 포도상구균 유래 웨딩 마이크로베시클을 투여한 경우에 IL-6의 분비량이 감소하였다.
- [307] 상기 결과로부터, 마이크로베시클에 의한 부작용을 일으키는 물질 중의 하나인 리포타이코산의 유전자를 변형시켜 리포타이코산의 독성이 약화되도록 형질전환된 세균유래 마이크로베시클을 사용하는 경우, 야생형 세균유래 마이크로베시클을 사용하는 것에 비하여 마이크로베시클의 부작용을 효과적으로 감소시킬 수 있음을 알 수 있다.
- [308]
- [309] 실시예 14. 항염 및/또는 항응고작용을 하는 약물 병용 투여가 세균유래 마이크로베시클에 의한 부작용에 미치는 효과
- [310]
- [311] 세균유래 마이크로베시클을 사용하는 경우에 부작용의 발생기전에 중요한 것은 마이크로베시클에 의한 면역반응으로 염증성 매개체가 분비되어 국소적 또는 전신적인 염증반응이 발생하고, 동시에 마이크로베시클에 의한 응고(coagulation) 작용으로 혈관에 혈전/색전(thromboembolism) 또는 파종성혈관내응고(disseminated intravascular coagulation)가 발생하는 것이다. 본 실험에서는 세균유래 마이크로베시클에 의한 부작용을 감소시킬 목적으로 항염 및 항응고작용을 하는 약물의 일 예로 아스피린을 사용하여 세균유래 마이크로베시클에 의한 부작용을 평가하였다.
- [312] 생쥐 대장암 26 세포주 1×10^6 세포를 생쥐의 피부 밑에 주사하고 키웠다. 지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된 대장균으로부터 실시예 2의 방법에 따라 웨딩 마이크로베시클을 분리하였다. 1주일 후, PBS, 18 mg/kg의 아스피린을 포함한 PBS 용액, 0.1 μ g의 상기 세균유래 마이크로베시클을 포함한 PBS 용액, 0.1 μ g의 상기 세균유래 마이크로베시클과 18 mg/kg의 아스피린을 포함한 PBS 용액 100 μ l를 각 실험군 별로 4마리의 생쥐에 일주일에 두 번씩 꼬리정맥에 주사하고, 5번째 정맥주사를 하고 난 다음 6시간 뒤 각 실험군의 쥐에서 눈 속 출혈을 통해 혈액 0.2 ml을 채취하여 50 mM EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid)가 들어있는 응고 방지용 튜브에 넣었다. 이

중 혈액 10 μl 와 1% 염산 90 μl 를 섞은 후, 상온에서 7분간 보관한 다음 혈구 계산기(hematocytometer)에 10 μl 를 넣고, 전신적인 염증반응의 지표 중의 하나인 백혈구 수를 측정하여 도 19에 나타내었다.

- [313] 도 19에 나타난 바와 같이, 아스피린 단독 투여군의 경우 PBS 투여군과 비교시 백혈구의 수치에는 영향이 없었으나, 지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된 대장균 유래 마이크로베시클 투여한 경우 PBS 투여군에 비해 백혈구가 감소하였다. 그러나 상기 지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된 대장균 유래 마이크로베시클 및 아스피린을 병용투여한 경우, 마이크로베시클에 의해 줄어든 백혈구의 수가 원상태로 복귀됨을 관찰할 수 있다.
- [314] 상기 결과로부터, 항염 및/또는 항응고작용을 갖는 약물의 병용 투여로 세균유래 마이크로베시클에 의한 부작용(백혈구 감소)을 효과적으로 줄일 수 있음을 알 수 있다.
- [315]
- [316] 실시예 15. 세균유래 마이크로베시클을 이용한 암조직으로의 약물 전달
- [317]
- [318] 본 실험에서는 지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클을 사용하여 항암 약물뿐만 아니라 다양한 크기의 약물 전달체 및 세포를 암조직으로 전달할 수 있는 효율을 증가시킬 수 있는가를 평가하였다.
- [319] 생쥐 대장암 26 세포주 1×10^6 세포를 생쥐의 피부 밑에 주사하고 1주일간 키운 다음, PBS 또는 실시예 2의 방법에 따라 분리한 지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클 5 μg 을 포함하는 PBS 용액 100 μl 를 정맥주사로 주입하였다. 6시간 뒤, 100 nm 크기의 녹색형광의 비드를 추가로 정맥주사 한 다음, 5분간 비드가 충분히 혈액을 통해 개체에 골고루 분포하게 하였다. 이후, 생쥐의 혈액을 모두 PBS용액으로 치환하여 혈관 내에 존재하는 형광 비드를 제거하였다. 대장암암조직을 떼어내 열린 다음, 20 μm 두께로 암조직을 동결절삭하고, 세포의 핵을 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 Hoechst 용액으로 염색하였다. 공초점 현미경으로 암조직 내에 존재하는 형광 비드를 관찰하였으며, 이 결과를 도 20에 나타내었다.
- [320] 도 20에서 나타난 바와 같이 지질다당류의 독성이 약화되도록 형질전환된 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클을 처리하였을 때, 100 nm 크기의 형광 비드가 암조직 내에 존재함을 확인할 수 있었으며, 대조군으로 PBS 용액을 처리한 경우, 형광 비드가 암조직 내에 존재하지 않음을 알 수 있었다.
- [321] 상기 결과로부터 세균유래 마이크로베시클을 먼저 주입하고 난 다음, 항암 약물이나 항암 약물이 로딩된 수십에서 수백 나노미터 크기의 약물 전달체를 주입하게 되면 단독으로 항암 약물이나 약물 전달체를 주입한 경우보다 더욱 효율적으로 암조직으로 전달할 수 있음을 유추할 수 있다.
- [322]

- [323] 실시예 16. 세균유래 마이크로베시클의 주요 구성성분 중 OmpA의 항암 효과
- [324]
- [325] 그람음성균의 세포외막에 가장 많이 존재하는 외막단백질 중 하나인 OmpA는 웨딩 마이크로베시클에도 가장 많이 존재하고 있음을 본 연구진의 단백질체 분석 결과를 토대로 확인할 수 있었다. 따라서, 세균유래 마이크로베시클의 항암 활성을 매개하는 인자로서, 웨딩 마이크로베시클 외막 단백질의 주요 구성성분 중 하나인 OmpA에 대해 항암 활성을 평가하였다.
- [326] 생쥐 대장암 26 세포주 1×10^6 세포를 생쥐의 피부 밑에 주사하고 키웠다. 1주일 후, PBS 또는 1 mg의 재조합 OmpA 단백질을 포함한 PBS 용액 100 μ l를 각 실험군 별로 4마리씩 생쥐의 꼬리정맥에 일주일에 두 번씩 주사하고, 대장암세포 투여 21일 후, 대장암조직의 크기를 측정하였다. 대장암조직의 부피(V)는 가장 긴 길이(l)와 이에 수직한 길이(s)를 측정하여 $V = l \times s^2/2$ 의 공식으로 계산하였다. 대장암조직의 크기를 측정한 결과를 도 21에 나타내었다.
- [327] 도 21에 나타난 바와 같이, 대조군과 비교하여 재조합 OmpA 단백질을 투여한 실험군에서 대장암조직의 크기가 현저히 감소되어 있음을 확인할 수 있다. 상기 결과로부터 세균유래 웨딩 마이크로베시클의 외막에 존재하는 OmpA 단백질은 세균유래 웨딩 마이크로베시클의 항암 활성을 매개하는 주요 구성성분임을 알 수 있다.
- [328]
- [329] 실시예 17. OmpF 외막 단백질이 결핍된 형질전환 세균유래 웨딩 마이크로베시클의 항암 활성
- [330]
- [331] 본 연구진에서 수행한 세균유래 웨딩 마이크로베시클의 단백질체 분석 결과를 바탕으로, OmpA 뿐만 아니라 OmpF 외막 단백질도 그람음성균 유래 웨딩 마이크로베시클의 주요 구성성분임을 확인하였다. 이에 따라, OmpF 외막 단백질에 의한 세균유래 웨딩 마이크로베시클의 항암 활성을 평가하였다.
- [332] 상기 실시예에서는 OmpF가 결여된 형질전환된 대장균으로부터 상기 실시예 2의 방법으로 분리된 웨딩 마이크로베시클을 사용하였다.
- [333] 생쥐 대장암 26 세포주 1×10^6 세포를 생쥐의 피부 밑에 주사하고 키웠다. 1주일 후, PBS, 또는 1 μ g의 야생형 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클을 포함하는 PBS 용액, 및 1 μ g의 OmpF가 결여된 형질전환된 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클을 포함하는 PBS 용액 100 μ l를 생쥐의 꼬리정맥에 일주일에 두 번씩 주사하고, 대장암세포 투여 21일 후, 대장암조직의 크기를 측정하였다. 대장암조직의 부피(V)는 가장 긴 길이(l)와 이에 수직한 길이(s)를 측정하여 $V = l \times s^2/2$ 의 공식으로 계산하였다. 대장암조직의 크기를 측정한 결과를 도 22에 나타내었다.
- [334] 도 22에 나타난 바와 같이, OmpF가 결여된 형질전환된 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클의 경우 야생형 대장균 유래 웨딩 마이크로베시클을 투여한

경우와는 달리 세균유래 웨딩 마이크로베시클의 항암 활성이 저해되었다.

- [335] 상기 결과로부터 세균유래 웨딩 마이크로베시클의 외막에 존재하는 OmpF 외막 단백질이 실시예 1에서 확인된 OmpA와 함께 세균유래 웨딩 마이크로베시클의 항암 활성에 필요한 주요 구성성분임을 알 수 있다.
- [336]
- [337] 실시예 18. 리포솜에 OmpA 외막 단백질을 재구성
- [338]
- [339] 리포솜을 만들기 위해, N- (carbonyl-methoxypolyethylene glycol 2000)-1,2-distearoyl-sn-glycero-3 phosphoethanolamine sodium salt (MPEG-DSPE), fully hydrogenated soy phosphatidylcholine (HSPC), 및 cholesterol을 각각 3.19 mg/mL, 9.58 mg/mL, 3.19 mg/mL의 농도로 클로로포름 (chloroform)에 녹인 후, 세 지질을 1:1:1의 비율로 혼합하였다. 그 후 질소 가스를 이용해 클로로포름을 제거하고, 얇은 필름 (thin film)을 생성하였다. 생성된 필름에 urea buffer (344 mM urea, 10 mM KCl, 10 mM HEPES (pH 7.0, 3 mM NaN₃))를 넣고, 물통 초음파 발생기 (water bath sonicator)를 이용해 56°C에서 1시간 동안 초음파 분해를 하였다. 상기 용액을 구멍 크기가 1 µm인 멤브레인 필터 (membrane filter)에 5회 통과시킨 후, 구멍 크기가 400 nm인 멤브레인 필터에 5회 통과시키고, 이어서 구멍 크기가 100 nm인 멤브레인 필터를 5회 통과시켜 리포솜을 생성하였다.
- [340] 앞서 생성된 리포솜 0.3 ml에 280 µg의 OmpA 단백질을 포함하고 있는 urea buffer 0.7 ml을 추가하고, octyl-β-D-glucopyranoside가 1.1%가 되도록 넣어주었다. 37°C에서 2시간 배양한 후, urea buffer를 15 ml 추가하였다. 상기 용액을 100,000 x g에서 1시간 동안 초원심분리 하였다. 생성된 pellet을 urea buffer 0.2 ml로 현탁한 후, 50% 옵티프랩 용액을 넣어 최종 30%가 되도록 하였다. 5 ml 용량의 초원심분리 튜브 (ultracentrifuge tube)에 각각 30% 리포솜 현탁액 2 ml, 20% 옵티프랩 1 ml, 5% 옵티프랩 1 ml을 차례로 담았다. 이후 100,000 x g에서 2시간 동안 초원심분리 하였다. 20% 옵티프랩과 5% 옵티프랩 사이의 층에서 OmpA가 로딩된 리포솜을 얻었다.
- [341] OmpA 단백질 200 ng과 OmpA를 로딩한 리포솜 5 µg을 준비한 후, 5 x 로딩 염색제를 최종적으로 1 x가 되도록 넣고, 100°C에서 5분간 처리하였다. 12% 폴리아크릴아마이드 겔을 준비하고, 샘플을 로딩하였다. 80V에서 2시간 전기영동 한 후, 400 mA에서 2시간 동안 단백질을 PVDF 멤브레인으로 트랜스퍼하였다. Skim milk를 PBS에 3%가 되도록 녹인 후, 멤브레인을 이 용액에서 상온에서 2시간 블로킹하였다. OmpA 항체를 4°C에서 12시간 처리하였다. PBS로 2번 세척한 후, 페록시다아제가 붙어있는 이차 항체를 실온에서 1시간 처리하였다. PBS로 30분 세척한 후, ECL 기질로 확인하여 도 23에 나타내었다.
- [342] 도 23에 나타난 바와 같이, 리포솜에 OmpA가 로딩되었음을 확인하였다. OmpA 단백질은 detergent와 함께 존재하기 때문에 denaturation된 형태로 존재하지만,

리포좀에 재구성될 경우, folding와 denaturation된 형태로 존재함을 확인할 수 있다. 상기 결과로부터, OmpA는 리포좀에 재구성될 수 있음을 확인하였다.

[343]

[344] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

산업상 이용가능성

[345] 본 발명의 세균유래 마이크로베시클은 암을 포함한 다양한 질병에 대하여 그 치료용 또는 진단용 물질을 목표하는 세포 또는 조직에 특이적으로 전달하여 질병 치료의 효율을 높이고 진단을 용이하게 하는 데 이용될 수 있다.

[346] 또한, 질병 치료용 및/또는 진단용 물질이 로딩된 본 발명의 세균유래 마이크로베시클 및 그의 제조 방법은 *in vitro* 및/또는 *in vivo*에서 치료 및/또는 진단용, 또는 실험용으로 사용될 수 있다.

청구범위

- [청구항 1] 세균유래 마이크로베시클을 포함하는 암치료용 또는 암진단용 약제학적 조성물.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서,
상기 세균은 자연적으로 존재하는 세균인 조성물.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 세균이 암 치료용 또는 암 진단용 물질을 발현하는 세균인 조성물.
- [청구항 4] 제 2항에 있어서,
상기 세균이 암혈관, 암조직 또는 암세포로 타겟팅하는 물질을 발현하는 세균인 조성물.
- [청구항 5] 제 1항에 있어서,
상기 세균은 형질전환된 세균인 조성물.
- [청구항 6] 제 5항에 있어서,
상기 세균은 상기 마이크로베시클의 독성이 약화되도록 형질전환된 세균인 조성물.
- [청구항 7] 제 5항에 있어서,
상기 세균은 내독소 생성 유전자 변형 세균인 조성물.
- [청구항 8] 제 5항에 있어서,
상기 세균은 세포막융합 물질이 발현하도록 형질전환된 세균인 조성물.
- [청구항 9] 제 5항에 있어서,
상기 세균은 암혈관, 암조직 또는 암세포로 타겟팅되도록 형질전환된 세균인 조성물.
- [청구항 10] 제 5항에 있어서,
상기 세균은 암 치료용 또는 암 진단용 물질을 발현하도록 형질전환된 세균인 조성물.
- [청구항 11] 제 5항에 있어서,
상기 세균은 세포 접합 분자, 항체, 표적유도 단백질, 세포막융합 단백질 자체 또는 이들의 융합 단백질로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 발현하도록 형질전환된 세균인 조성물.
- [청구항 12] 제 5 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 세균이 2회 이상 형질전환된 세균인 조성물.
- [청구항 13] 제 1항에 있어서,
상기 세균은 그람음성균인 조성물.
- [청구항 14] 제 1항에 있어서,
상기 세균은 그람양성균인 조성물.

- [청구항 15] 제 1항에 있어서,
상기 조성물은 상기 마이크로베시클에 의한 독성을 억제시키는
약물을 추가로 포함하는 조성물.
- [청구항 16] 제 15항에 있어서,
상기 약물이 마이크로베시클에 로딩(loading)된 조성물.
- [청구항 17] 제 15항에 있어서,
상기 약물이 내독소에 의한 독성을 억제하는 약물인 조성물.
- [청구항 18] 제 15항에 있어서,
상기 약물이 폴리믹신 B 인 조성물.
- [청구항 19] 제 15항에 있어서,
상기 약물이 아스피린인 조성물.
- [청구항 20] 제 1항에 있어서,
상기 조성물은 항암효능을 증가시키는 약물을 추가로 포함하는
조성물.
- [청구항 21] 제 20항에 있어서,
상기 약물이 마이크로베시클에 로딩된 조성물.
- [청구항 22] 제 20항에 있어서,
상기 약물이 아스피린인 조성물.
- [청구항 23] 제 20항에 있어서,
상기 약물이 Th17 (T helper 17 세포) 면역반응을 억제하는 약물인
조성물.
- [청구항 24] 제 20항에 있어서,
상기 약물이 인터루킨-6의 생성 혹은 활성을 억제하는 약물인
조성물.
- [청구항 25] 제 20항에 있어서,
상기 약물이 혈관의 생성을 억제하는 약물인 조성물.
- [청구항 26] 제 25항에 있어서,
상기 약물이 혈관내피세포성장인자의 생성 혹은 활성을 억제하는
약물인 조성물.
- [청구항 27] 제 25항에 있어서,
상기 약물이 혈관내피세포성장인자 수용체에 의한 신호전달을
억제하는 약물인 조성물.
- [청구항 28] 제 20항에 있어서,
상기 약물이 STAT3 (Signal transducer and activator of transcription)
신호전달을 억제하는 약물인 조성물.
- [청구항 29] 제 20항에 있어서,
상기 약물이 항암제인 조성물.
- [청구항 30] 제 1항에 있어서,

- 상기 세균유래 마이크로베시클의 막이 상기 세균의 막 이외의 성분을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 31] 제 30항에 있어서,
상기 막 이외의 성분이 사이클로텍스트린 또는 폴리에틸렌글리콜인 조성물.
- [청구항 32] 제 1항에 있어서,
상기 마이크로베시클의 막 성분이 화학적으로 변형된 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 33] 제 32항에 있어서,
상기 화학적 변형은 티올기 또는 아민기를 이용한 화학적인 방법으로 막 성분이 변형된 조성물.
- [청구항 34] 세균유래 마이크로베시클을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암치료 또는 암진단 방법.
- [청구항 35] 제 34항에 있어서,
상기 세균은 자연적으로 존재하는 세균인 방법.
- [청구항 36] 제 34항에 있어서,
상기 세균이 암 치료용 또는 암 진단용 물질을 발현하는 세균인 방법.
- [청구항 37] 제 34항에 있어서,
상기 세균이 암혈관, 암조직 또는 암세포로 타겟팅하는 물질을 발현하는 세균인 방법.
- [청구항 38] 제 34항에 있어서,
상기 세균이 암혈관, 암조직 또는 암세포로 타겟팅하는 물질과 암 치료용 또는 암 진단용 물질을 발현하는 세균인 방법.
- [청구항 39] 제 34항에 있어서,
상기 세균은 유전적으로 형질전환된 세균인 방법.
- [청구항 40] 제 34항에 있어서,
상기 세균은 상기 마이크로베시클의 독성이 약화되도록 형질전환된 세균인 방법.
- [청구항 41] 제 34항에 있어서,
상기 세균은 내독소 생성 유전자 변형 세균인 방법.
- [청구항 42] 제 34항에 있어서,
상기 세균은 세포막융합 물질이 발현하도록 형질전환된 세균인 방법.
- [청구항 43] 제 34항에 있어서,
상기 세균은 암혈관, 암조직 또는 암세포로 타겟팅되도록 형질전환된 세균인 방법.
- [청구항 44] 제 34항에 있어서,

- 상기 세균은 암 치료용 또는 암 진단용 물질을 발현하도록 형질전환된 세균인 방법.
- [청구항 45] 제 34항에 있어서,
상기 세균은 세포 접합 분자, 항체, 표적유도 단백질, 세포막융합 단백질 자체 또는 이들의 융합 단백질로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 발현하도록 형질전환된 세균인 방법.
- [청구항 46] 제 39 항 내지 제 45 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 세균이 2회 이상 형질전환된 세균인 방법.
- [청구항 47] 제 34항에 있어서,
상기 세균유래 마이크로베시클은 부작용을 감소시키는 약물 또는 항암효능을 증가시키는 약물이 로딩된 마이크로베시클인 방법.
- [청구항 48] 제 34항에 있어서,
상기 방법은 부작용을 감소시키는 약물 또는 항암효능을 증가시키는 약물을 세균유래 마이크로베시클과 병용 투여하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 49] 제 34항에 있어서,
상기 방법은 부작용을 감소시키는 약물 또는 항암효능을 증가시키는 약물을 나노입자 치료제 또는 세포치료제에 로딩한 후, 세균유래 마이크로베시클과 병용 투여하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 50] 제 47항 내지 제 49항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 부작용을 감소시키는 약물이 내독소에 의한 독성을 억제하는 약물인 방법.
- [청구항 51] 제 47항 내지 제 49항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 부작용을 감소시키는 약물이 폴리믹신 B 인 방법.
- [청구항 52] 제 47항 내지 제 49항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 부작용을 감소시키는 또는 항암효능을 증가시키는 약물이 아스피린인 방법.
- [청구항 53] 제 47항 내지 제 49항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 항암효능을 증가시키는 약물이 Th17 면역반응을 억제하는 약물인 방법.
- [청구항 54] 제 47항 내지 제 49항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 항암효능을 증가시키는 약물이 인터루킨-6의 생성 혹은 활성을 억제하는 약물인 방법.
- [청구항 55] 제 47항 내지 제 49항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 항암효능을 증가시키는 약물이 혈관의 생성을 억제하는 약물인 방법.
- [청구항 56] 제 47항 내지 제 49항 중 어느 한 항에 있어서,

- 상기 항암효능을 증가시키는 약물이 혈관내피세포성장인자의 생성 혹은 활성을 억제하는 약물인 방법.
- [청구항 57] 제 47항 내지 제 49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항암효능을 증가시키는 약물이 혈관내피세포성장인자 수용체에 의한 신호전달을 억제하는 약물인 방법.
- [청구항 58] 제 47항 내지 제 49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항암효능을 증가시키는 약물이 STAT3 신호전달을 억제하는 약물인 방법.
- [청구항 59] 제 47항 내지 제 49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항암효능을 증가시키는 약물이 항암제인 방법.
- [청구항 60] 제 34항에 있어서, 상기 세균은 그람음성균인 방법.
- [청구항 61] 제 34항에 있어서, 상기 세균은 그람양성균인 방법.
- [청구항 62] 암치료용 또는 암진단용 마이크로베시클을 제조하는 방법으로, 하기 단계들을 포함하는 방법:
 (a)세균 또는 형질전환된 세균을 포함하는 현탁액에 약물을 첨가하여 상기 세균 또는 형질전환된 세균과 상기 약물을 포함하는 혼합 현탁액을 수득하는 단계; 및
 (b)상기 혼합 현탁액에서 분리되는 상기 약물들이 로딩된 슈딩 마이크로베시클을 분리하는 단계.
- [청구항 63] 암치료용 또는 암진단용 마이크로베시클을 제조하는 방법으로, 하기 단계들을 포함하는 방법:
 (a)세균 또는 형질전환된 세균을 포함하는 현탁액에 약물을 첨가하여 상기 세균 또는 형질전환된 세균과 상기 약물을 포함하는 혼합 현탁액을 수득하는 단계;
 (b)상기 혼합 현탁액을 압출, 초음파 분해, 세포 용해, 균질화, 냉동-해동, 전기 천공, 기계적 분해, 및 화학 물질 처리로 이루어진 군에서 선택된 방법을 사용하여 마이크로베시클을 제조하는 단계; 및
 (c)상기 마이크로베시클을 분리하는 단계.
- [청구항 64] 암치료용 또는 암진단용 세균유래 마이크로베시클을 제조하는 방법으로, 하기 단계들을 포함하는 방법:
 (a)세균 또는 형질전환된 세균의 배양액에서 분리되는 슈딩 마이크로베시클을 분리하는 단계; 및
 (b)상기 분리된 마이크로베시클을 포함하는 현탁액에 약물을 첨가하여 배양하는 단계.
- [청구항 65] 암치료용 또는 암진단용 세균유래 마이크로베시클을 제조하는

방법으로, 하기 단계들을 포함하는 방법:

(a) 세균 또는 형질전환된 세균을 포함하는 현탁액을 압출, 초음파 분해, 세포 용해, 균질화, 냉동-해동, 전기 천공, 기계적 분해, 및 화학 물질 처리로 이루어진 군에서 선택된 방법을 사용하여 마이크로베시클을 제조하는 단계;

(b) 상기 마이크로베시클을 분리하는 단계; 및

(c) 상기 분리된 마이크로베시클을 포함하는 현탁액에 약물을 첨가하여 배양하는 단계.

[청구항 66]

제 64항 또는 제 65항에 있어서,

상기 마이크로베시클 또는 웨딩 마이크로베시클이 포함된 현탁액으로부터 상기 약물이 로딩된 마이크로베시클 또는 웨딩 마이크로베시클을 분리하는 단계를 더 포함하는 제조 방법.

[청구항 67]

제 62 항 내지 제 66항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 분리 단계가 밀도 구배, 초원심분리, 여과, 투석 및 자유 유동 전기이동법으로 이루어진 군으로부터 선택된 방법을 사용하여 수행되는 것인 제조 방법.

[청구항 68]

제 62 항 내지 제 66항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 분리된 마이크로베시클을 항생제 처리, 자외선 노출, 감마선 노출, 및 필터링으로 이루어진 군에서 선택된 방법을 사용하여 마이크로베시클을 살균하는 단계.

[청구항 69]

암치료용 또는 암진단용 약물이 로딩된 세균유래

마이크로베시클을 포함하는 약제학적 조성물.

[청구항 70]

암세포 또는 암조직으로 타겟팅 되도록 형질전환된 세균에서

유래되며, 암치료용 또는 암진단용 약물이 로딩된

마이크로베시클을 포함하는, 암치료용 또는 암진단용 약제학적 조성물.

[청구항 71]

암세포 또는 암조직으로 타겟팅 되도록 형질전환된 세균에서

유래되며, 암치료용 또는 암진단용 약물이 로딩된

마이크로베시클을 사용하는 것을 포함하는, 암치료용 또는 암진단용 약물을 암세포 또는 암조직에 전달하는 방법.

[청구항 72]

제 71항에 있어서,

2 가지 이상의 상기 암치료용 또는 암진단용 약물이 상기

마이크로베시클에 함께 로딩되어 있는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 73]

제 71항에 있어서,

상기 암치료용 또는 암진단용 약물이 로딩된 2개 이상의

마이크로베시클을 사용하는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 74]

제 73항에 있어서,

상기 2 개 이상의 마이크로베시클을 동시에 투여하는 것을

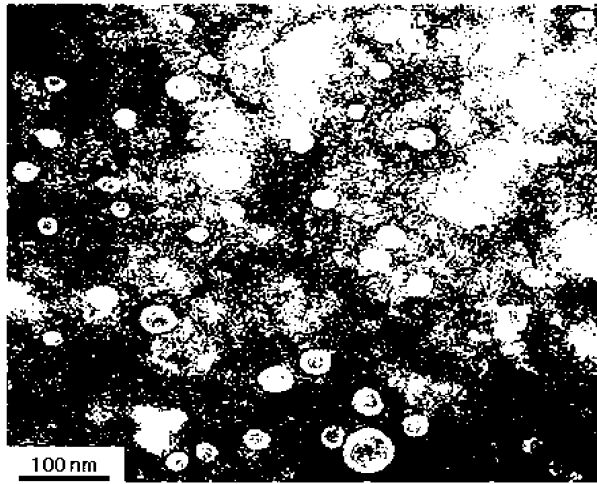
- 특징으로 하는 방법.
- [청구항 75] 제 71항에 있어서,
1가지 상기 암치료용 또는 암진단용 약물이 로딩된 마이크로베시클, 2 가지 이상의 상기 암치료용 또는 암진단용 약물이 로딩된 마이크로베시클, 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 2개 이상의 마이크로베시클을 순차적으로 투여하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 76] 암세포 또는 암 조직으로 타겟팅 되도록 형질전환된 세균에서 유래되며, 암치료용 또는 암진단용 약물이 로딩된 마이크로베시클을 사용하는 것을 포함하는, 암치료 또는 암진단 방법.
- [청구항 77] 질병 치료용 또는 진단용 물질이 로딩된 세균유래 마이크로베시클을 포함하는 질병 치료용 또는 진단용 물질 전달용 조성물
- [청구항 78] 제 77항에 있어서,
상기 치료용 또는 진단용 물질이 항암제, 항염증제, 혈관신생 억제제, 펩타이드, 단백질, 독소, 핵산, 플라스미드, 비드, 마이크로입자 및 나노입자로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 조성물.
- [청구항 79] 제 78항에 있어서,
상기 핵산이 DNA, RNA, 앵타머(aptamer), LNA(locked nucleic acid), PNA(peptide nucleic acid), 및 모폴리노(morpholino)로 이루어진 군에서 선택된 것인 조성물.
- [청구항 80] 제 78항에 있어서,
상기 나노입자가 산화철, 금, 탄소나노튜브, 및 자기 비드로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 조성물.
- [청구항 81] 제 77항에 있어서,
상기 치료용 또는 진단용 물질이 형광을 방출하는 물질인 조성물.
- [청구항 82] 제 81항에 있어서,
상기 형광을 방출하는 물질이 형광단백질 또는 양자점인 조성물.
- [청구항 83] 질병 치료용 또는 진단용 약물이 로딩된 세균유래 마이크로베시클을 사용하는 것을 특징으로 하는, 질병 치료용 또는 진단용 약물을 전달하는 방법.
- [청구항 84] 제 83항에 있어서,
2 가지 이상의 상기 치료용 또는 진단용 물질이 상기 마이크로베시클에 함께 로딩되어 있는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 85] 제 83항에 있어서,
상기 치료용 또는 진단용 물질이 로딩된 2개 이상의

- 마이크로베시클을 사용하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 86] 제 83항에 있어서,
상기 2 개 이상의 마이크로베시클을 동시에 투여하는 것을
특징으로 하는 방법.
- [청구항 87] 제 83항에 있어서,
1가지 상기 치료용 또는 진단용 물질이 로딩된 마이크로베시클, 2
가지 이상의 상기 치료용 또는 진단용 물질이 로딩된
마이크로베시클, 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 2개
이상의 마이크로베시클을 순차적으로 투여하는 것을 특징으로
하는 방법.
- [청구항 88] 특정 세포 또는 특정 조직으로 타겟팅되도록 형질전환된 세균에서
유래되며, 질병 치료용 또는 질병 진단용 약물이 로딩된
마이크로베시클을 사용하는 것을 특징으로 하는, 질병 치료용
또는 질병 진단용 물질을 특정 세포 또는 특정 조직에 전달하는
방법.
- [청구항 89] 질병 치료용 또는 진단용 약물이 로딩된 세균유래
마이크로베시클을 표적세포 또는 조직에 전달하는 단계를
포함하는 질병 치료 또는 진단방법.
- [청구항 90] 질병 치료용 또는 진단용 약물이 로딩된 세균유래
마이크로베시클을 이용한 질병 진단용 또는 치료용 약물전달
시스템.
- [청구항 91] 질병 진단용 물질이 로딩된 세균유래 마이크로베시클을 포함하는
질병 진단용 키트.
- [청구항 92] 제 91항에 있어서,
상기 질병 진단용 물질은 진단에 필요한 프라이머, 프로브,
안티센스 핵산 및 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을
특징으로 하는 키트.
- [청구항 93] 세균의 마이크로베시클 유래 물질을 투여하는 단계를 포함하는
암치료 방법.
- [청구항 94] 제 93항에 있어서,
상기 세균이 그람음성균인 방법.
- [청구항 95] 제 93항에 있어서,
상기 세균이 그람양성균인 방법.
- [청구항 96] 제 93항에 있어서,
상기 물질이 단백질, 핵산, 및 지질로 이루어진 군에서 선택된 것인
방법.
- [청구항 97] 제 93항에 있어서,
상기 물질이 단백질, 핵산, 및 지질로 이루어진 군에서 선택된 두

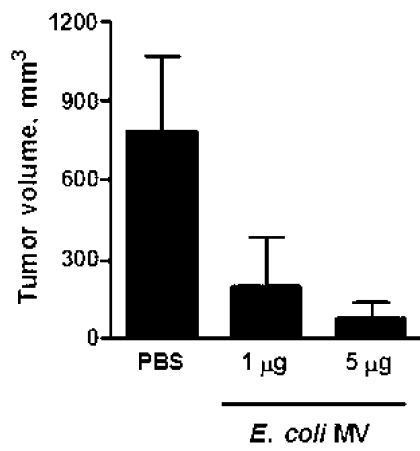
- 개 이상인 방법.
- [청구항 98] 제97항에 있어서,
상기 단백질이 OmpA, OmpF, OmpC, 및 Flagellin으로 이루어진
군에서 선택된 것 또는 그 특정 도메인 (domain)인 방법.
- [청구항 99] 제97항에 있어서,
상기 단백질이 OmpA, OmpF, OmpC, 및 Flagellin으로 이루어진
군에서 선택된 것의 변이체 또는 그 특정 도메인 (domain)인 방법.
- [청구항 100] 제 98항 또는 제 99항에 있어서,
상기 방법은 상기 단백질에서 유래한 펩타이드를 이용하는 것을
특징으로 하는, 방법.
- [청구항 101] 제97항에 있어서,
상기 핵산이 플라스미드(plasmid) 또는 RNA인 방법.
- [청구항 102] 제 93항에 있어서,
상기 물질이 세포 접합 분자, 항체, 표적유도 단백질, 세포막융합
단백질 자체, Fc 펩타이드 및 이들의 융합 단백질로 이루어진
군에서 선택되는 하나 이상과 결합된 물질인 것을 특징으로 하는,
방법.
- [청구항 103] 제 93항에 있어서,
상기 물질이 폴리에틸렌글리콜(polyethylenglycol)을 추가로
포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [청구항 104] 제 93항에 있어서,
상기 물질이 나노입자 전달체에 로딩된 것인 방법.
- [청구항 105] 제 104항에 있어서,
상기 나노입자 전달체가 리포솜 (liposome), 덴드리머 (dendrimer),
및 폴리머 (polymer)로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.
- [청구항 106] 제93항에 있어서,
상기 방법은 부작용을 감소시키는 약물 또는 항암효능을
증가시키는 약물을 세균유래 물질과 병용 투여하는 것을 특징으로
하는 방법.
- [청구항 107] 제93항에 있어서,
상기 방법은 부작용을 감소시키는 약물 또는 항암효능을
증가시키는 약물을 나노입자 치료제 또는 세포치료제에 로딩한
후, 세균유래 마이크로베시클과 병용 투여하는 것을 특징으로
하는 방법.
- [청구항 108] 제 106항 또는 107항에 있어서,
상기 부작용을 감소시키는 또는 항암효능을 증가시키는 약물이
아스피린인 방법.
- [청구항 109] 제 106항 또는 107항에 있어서,

- [청구항 110] 상기 부작용을 감소시키는 약물이 항염증제인 방법.
제 106항 또는 107항에 있어서,
상기 항암효능을 증가시키는 약물이 Th17 면역반응을 억제하는
약물인 방법.
- [청구항 111] 제 106항 또는 107항에 있어서,
상기 항암효능을 증가시키는 약물이 인터루킨-6의 생성 혹은
활성을 억제하는 약물인 방법.
- [청구항 112] 제 106항 또는 107항에 있어서,
상기 항암효능을 증가시키는 약물이 혈관의 생성을 억제하는
약물인 방법.
- [청구항 113] 제 106항 또는 107항에 있어서,
상기 항암효능을 증가시키는 약물이 혈관내피세포성장인자의
생성 혹은 활성을 억제하는 약물인 방법.
- [청구항 114] 제 106항 또는 107항에 있어서,
상기 항암효능을 증가시키는 약물이 혈관내피세포성장인자
수용체에 의한 신호전달을 억제하는 약물인 방법.
- [청구항 115] 제 106항 또는 107항에 있어서,
상기 항암효능을 증가시키는 약물이 STAT3(Signal transducer and
activator of transcription) 신호전달을 억제하는 약물인 방법.
- [청구항 116] 제 106항 또는 107항에 있어서,
상기 항암효능을 증가시키는 약물이 항암제인 방법.

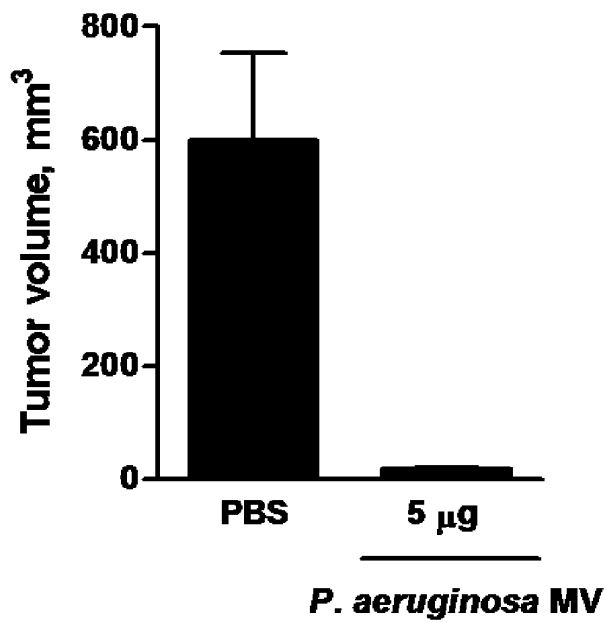
[Fig. 1]



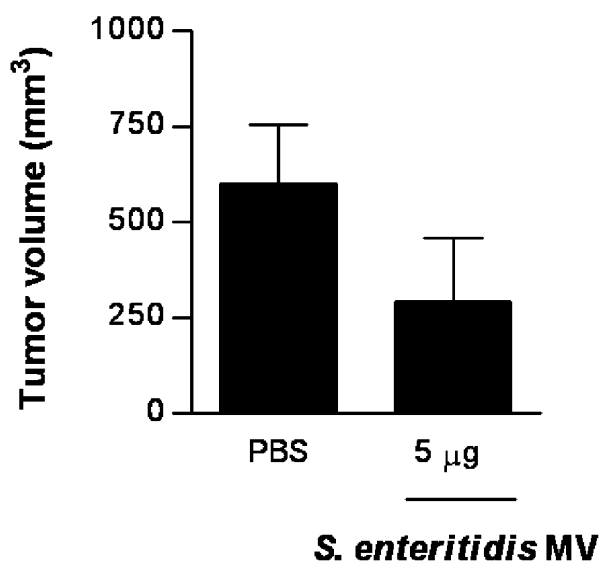
[Fig. 2]



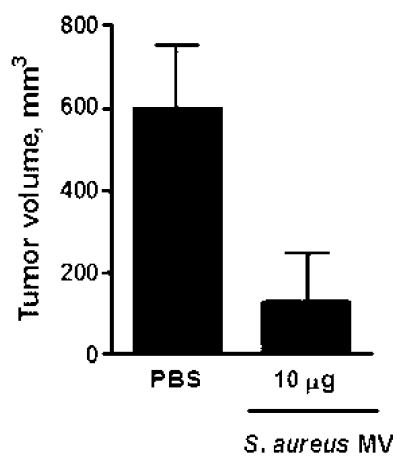
[Fig. 3]



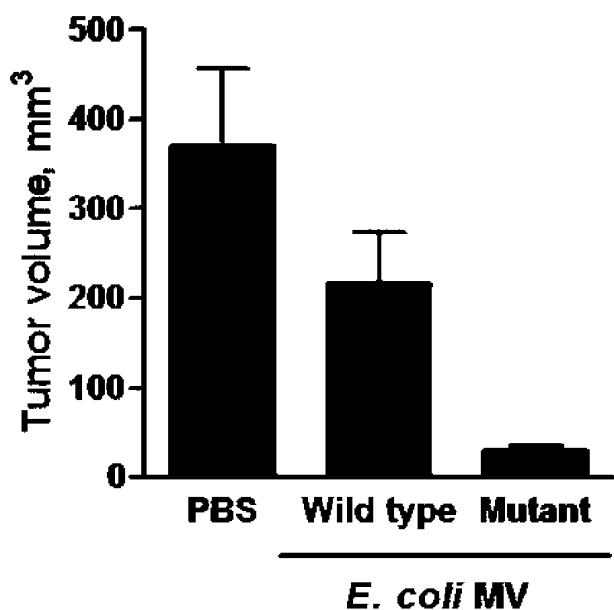
[Fig. 4]



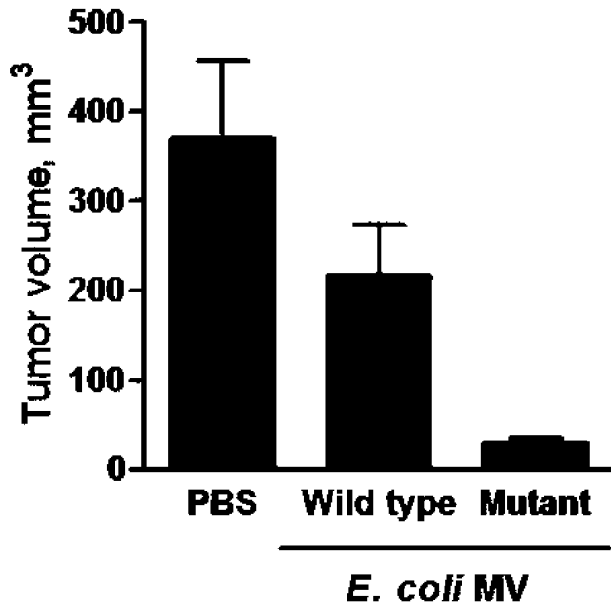
[Fig. 5]



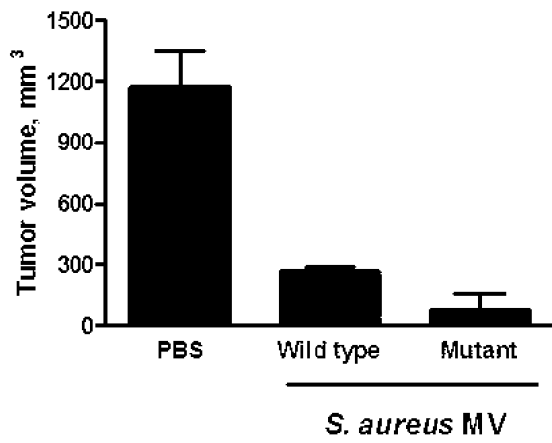
[Fig. 6]



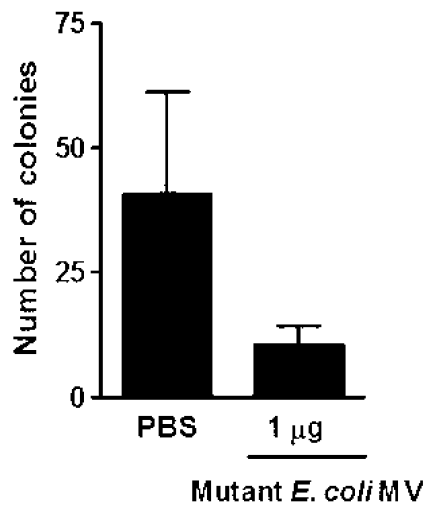
[Fig. 7]



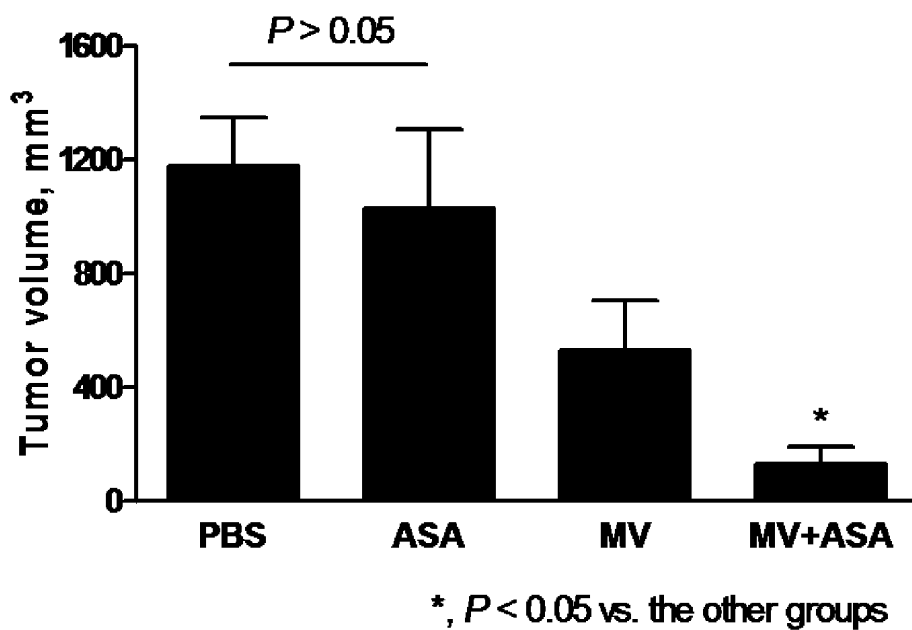
[Fig. 8]



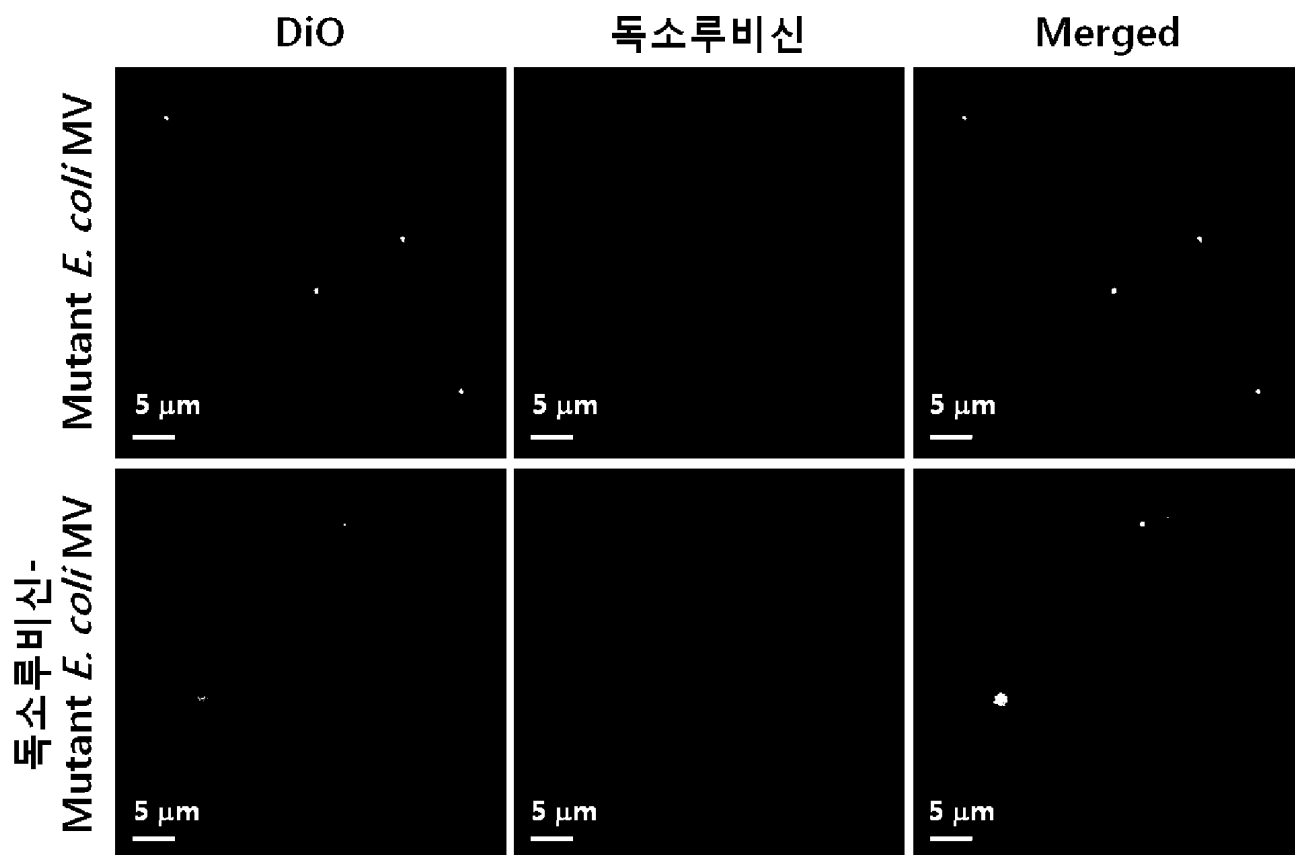
[Fig. 9]



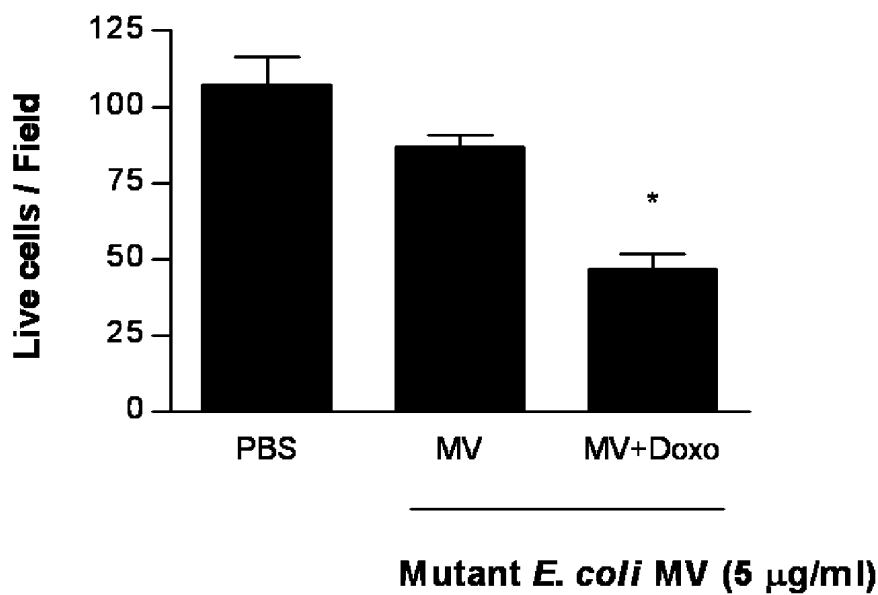
[Fig. 10]



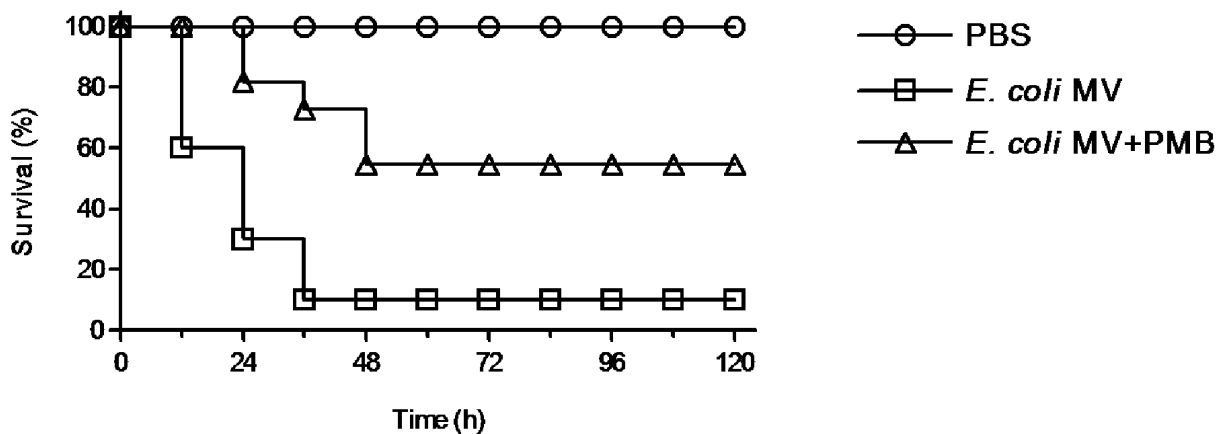
[Fig. 11]



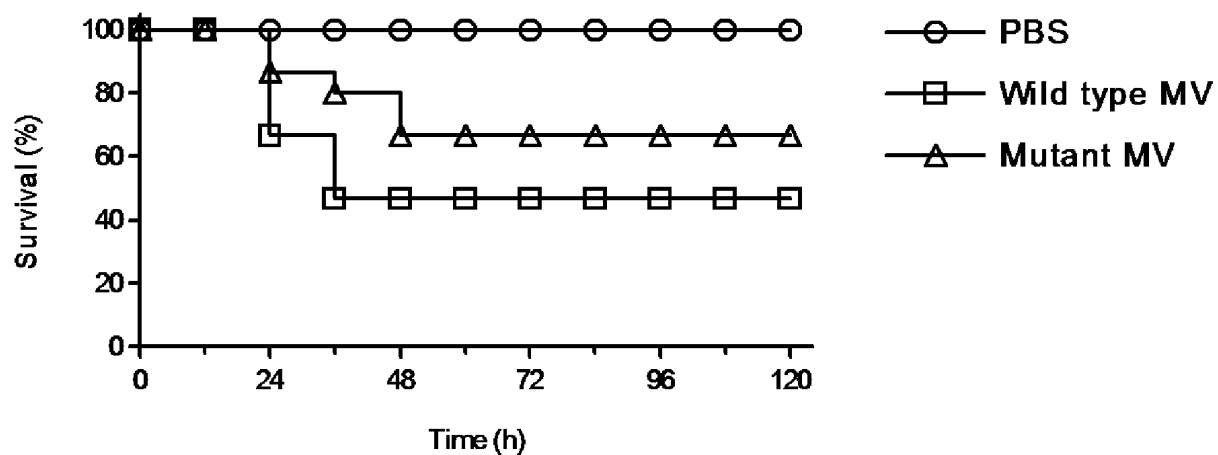
[Fig. 12]



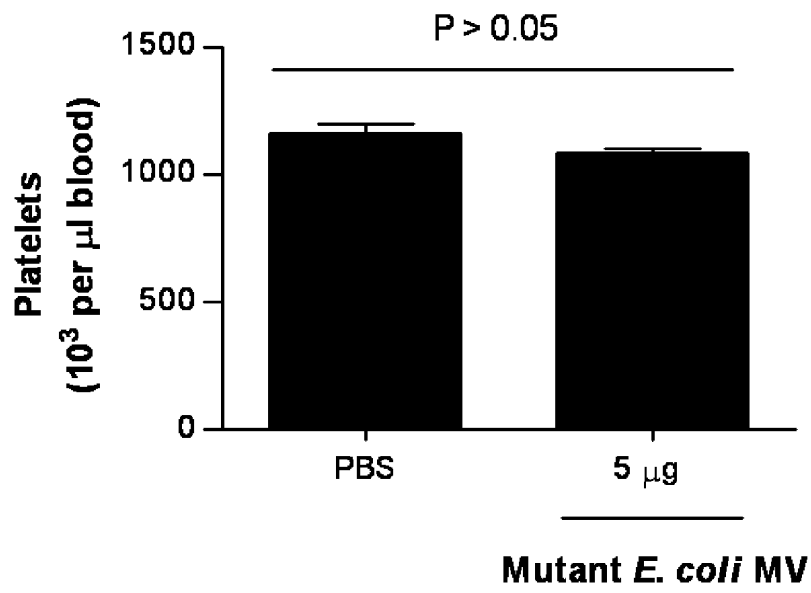
[Fig. 13]



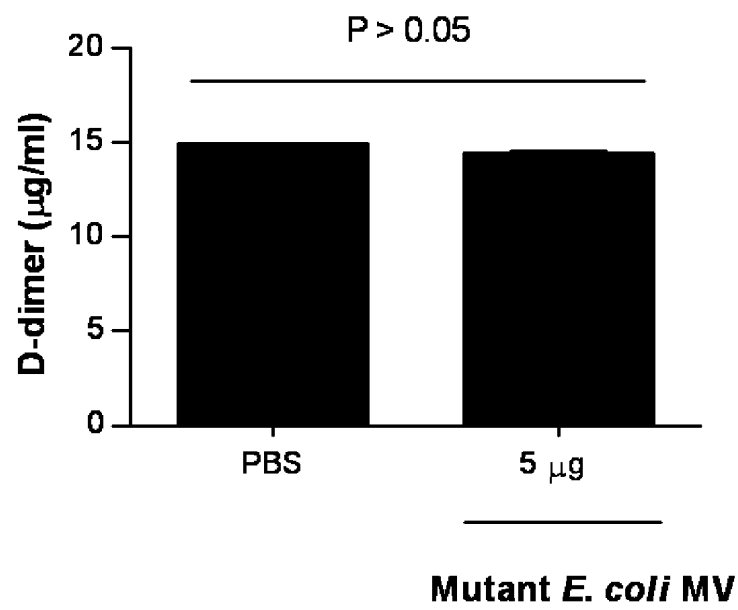
[Fig. 14]



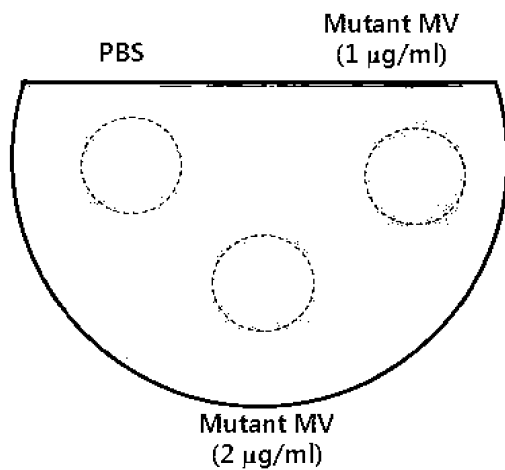
[Fig. 15]



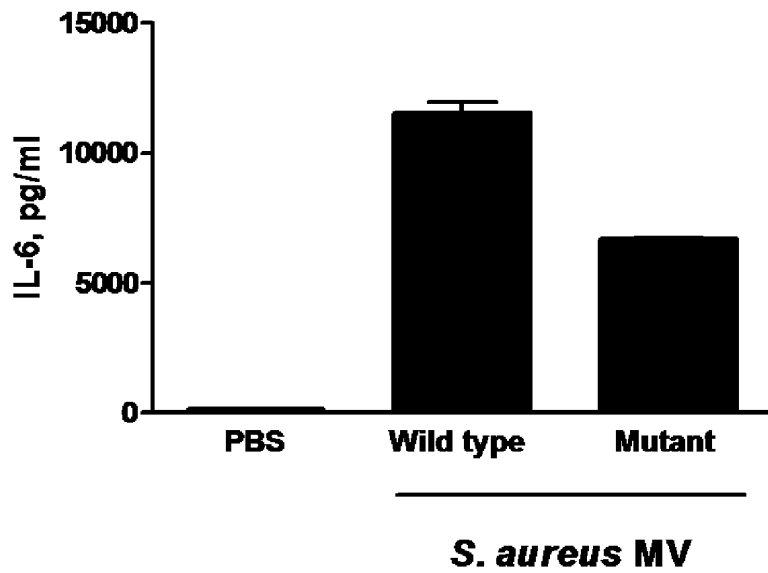
[Fig. 16]



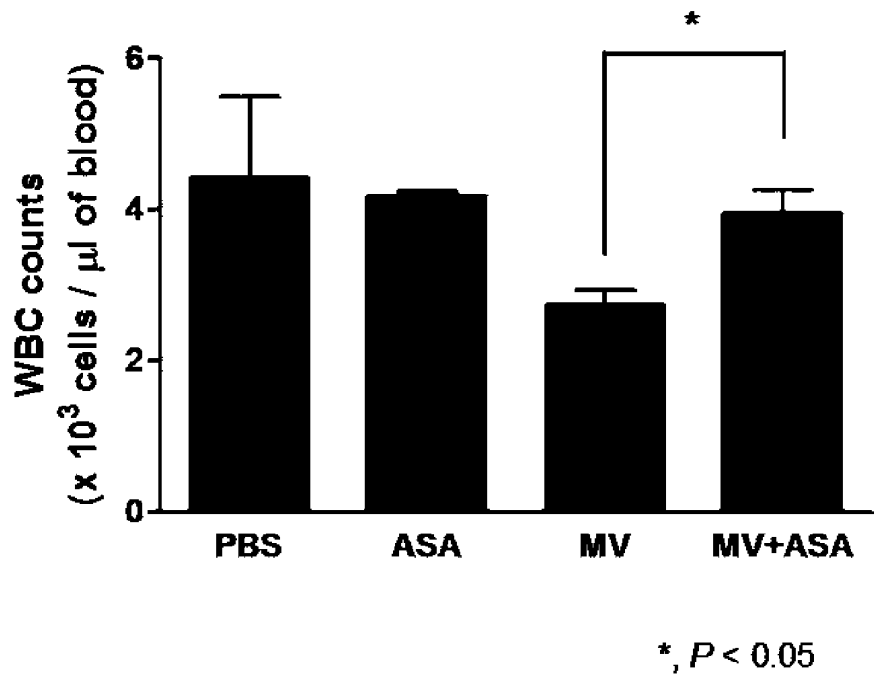
[Fig. 17]



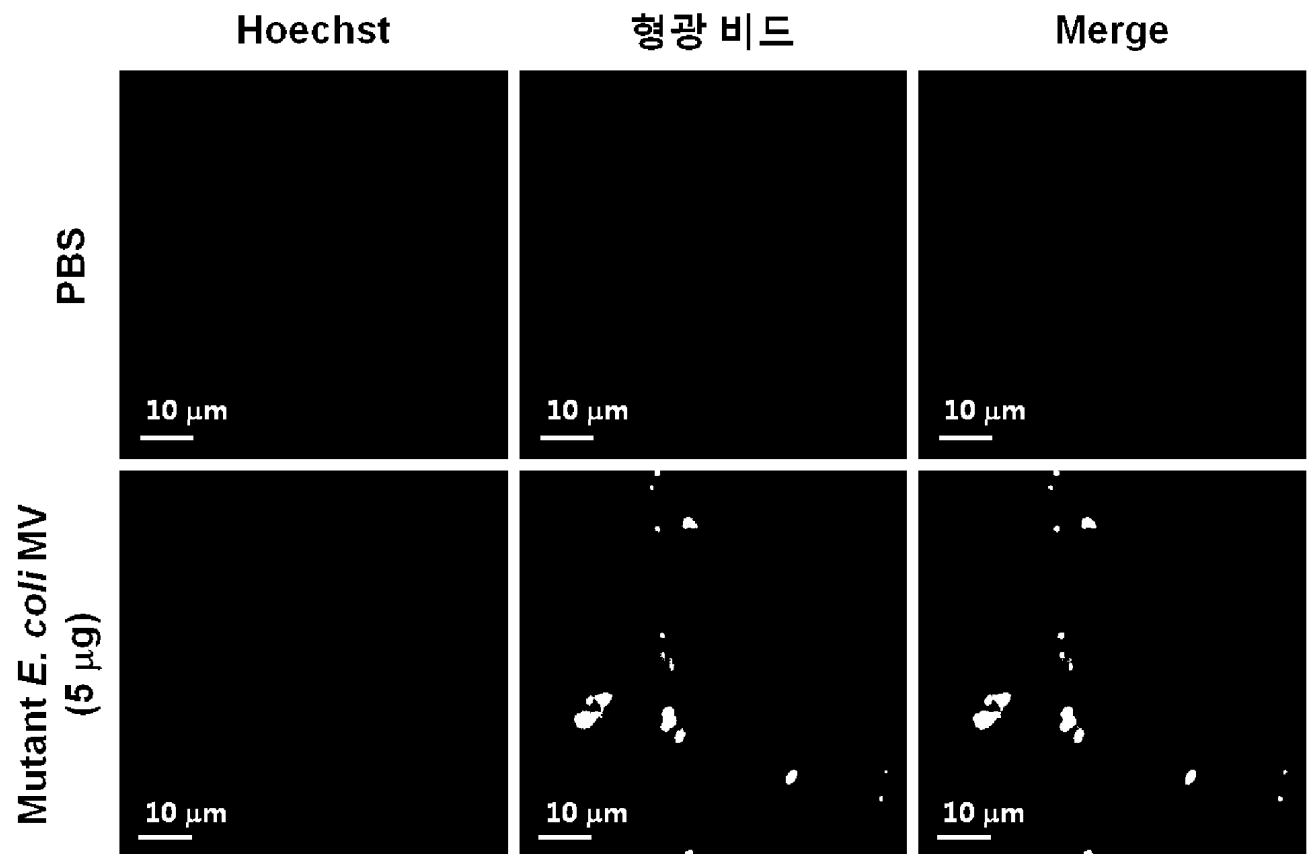
[Fig. 18]



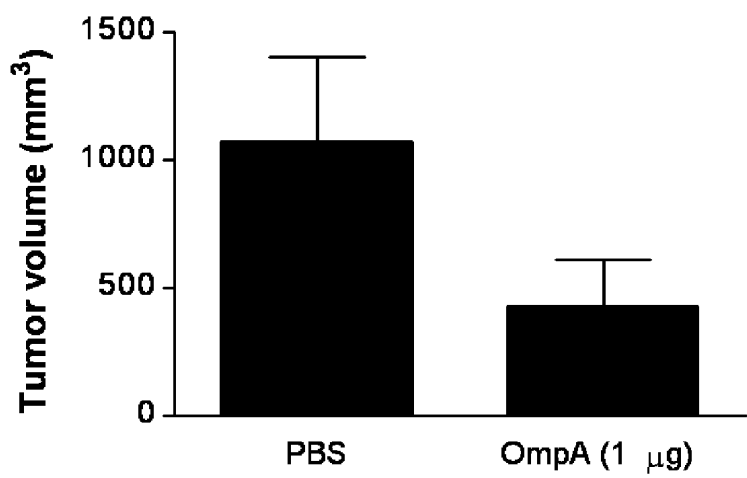
[Fig. 19]



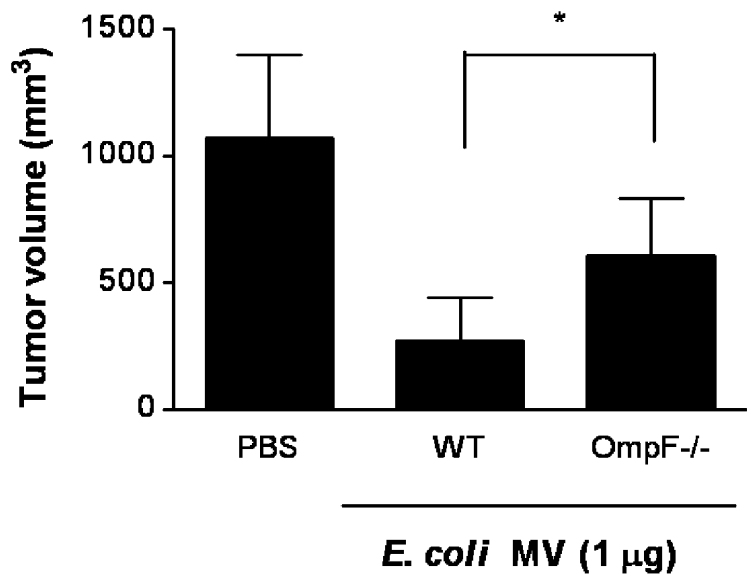
[Fig. 20]



[Fig. 21]



[Fig. 22]



^{*}, $P < 0.05$

[Fig. 23]

