(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017 년 11 월 23 일 (23.11.2017)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2017/200156 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 47/48 (2006.01) *A61K 31/704* (2006.01)
A61K 47/42 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2016/011348

(22) 국제출원일: 2016 년 10 월 11 일 (11.10.2016)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2016-0062155 2016 년 5 월 20 일 (20.05.2016) KR

(71) 출원인: 서강대학교 산학협력단 (SOGANG UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION) [KR/KR]; 04107 서울시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교), Seoul (KR).

(72) 발명자: 김현철 (KIM, Hyun Cheol); 07344 서울시 영등포구 63로 45, 6동 97호 (여의도동, 시범아파트), Seoul (KR). 이호현 (LEE, Ho Hyun); 07380 서울시 영등포구 도림로 313 건영아파트 가동 705호, Seoul (KR).

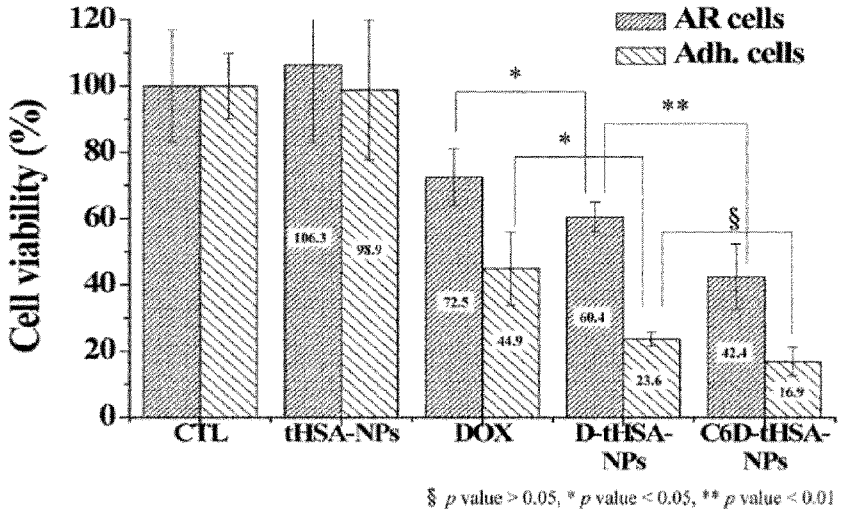
(74) 대리인: 김현진 (KIM, Hyun Jin); 06142 서울시 강남구 테헤란로37길 7, 조이타워 301호 (대신국제특허법률사무소), Seoul (KR).

(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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, 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, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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

(54) **Title:** NANOPARTICLES FOR CHEMOTHERAPY FOR ANOIKIS-RESISTANT CANCER CELLS

(54) **발명의 명칭:** 아노이키스 내성 암세포의 화학요법을 위한 나노입자



(57) **Abstract:** The present invention relates to albumin nanoparticles for chemotherapy for anoikis-resistant cancer cells, and more specifically, to albumin nanoparticles for chemotherapy for anoikis-resistant cancer cells, the albumin nanoparticles comprising: albumin nanoparticles having a drug impregnated therein; and a CEACAM6 antibody bonding with the albumin nanoparticles, wherein the albumin nanoparticles are formed by means of disulfide bonds formed among albumin molecules, and the CEACAM6 antibody forms an amide bond with an amine group on the surface of the albumin nanoparticles, and thus the CEACAM6 antibody targets anoikis-resistant cancer cells, and the albumin nanoparticles ingested by the cancer cells discharge the drug by having the disulfide bonds thereof broken due to glutathione existing in the cytosol.

WO 2017/200156 A1

[다음 쪽 계속]

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

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

명세서

발명의 명칭: 아노이키스 내성 암세포의 화학요법을 위한 나노입자

기술분야

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

배경기술

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

[3] <특허문헌>

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

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

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[6] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로,

[7] 본 발명은 전이 암세포를 효과적으로 사멸시킬 수 있는 아노이키스 내성 암세포의 화학요법을 위한 나노입자를 제공하는데 그 목적이 있다.

[8] 또한, 본 발명은 알부민 나노입자에 결합한 CEACAM6 항체가 아노이키스 내성 암세포를 타켓팅하여 전이 암세포에 약물을 효과적으로 전달할 수 있는 아노이키스 내성 암세포의 화학요법을 위한 나노입자를 제공하는데 그 목적이 있다.

[9] 또한, 본 발명은 약물을 담지하는 알부민 나노입자는 디설파이드 결합에 의해 생성되므로, 암세포 내에 섭취된 알부민 나노입자는 세포기질에 존재하는 글루타틴온에 의해 쪼개져 비목적 지역에 약물을 방출을 억제할 수 있는 아노이키스 내성 암세포의 화학요법을 위한 나노입자를 제공하는데 그 목적이 있다.

과제 해결 수단

[10] 본 발병은 앞서 본 목적을 달성하기 위하여 다음과 같은 구성을 가진 실시예에 의해 구현된다.

[11] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 암세포 화학요법을 위한 나노입자는 약물을 담지한 알부민 나노입자와, 상기 알부민 나노입자에 결합한 CEACAM6 항체를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[12] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 암세포 화학요법을 위한 나노입자에 있어서 상기 약물을 담지한 알부민 나노입자는 알부민 분자 사이의 디설파이드 결합에 의해서 형성되는 것을 특징으로 한다.

[13] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 암세포 화학요법을 위한 나노입자에 있어서 상기 약물을 담지한 알부민 나노입자는 구형의 형태를 가지는 것을 특징으로 한다.

[14] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 암세포 화학요법을 위한 나노입자는 150 내지 350nm의 직경을 가지는 것을 특징으로 한다.

[15] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 암세포 화학요법을 위한 나노입자에 있어서 상기 CEACAM6 항체는 상기 약물을 담지한 알부민 나노입자 표면의 아민 그룹과 아마이드 결합하는 것을 특징으로 한다.

[16] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 암세포 화학요법을 위한 나노입자에 있어서 상기 약물은 독소루비신이 사용되는 것을 특징으로 한다.

[17] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 암세포 화학요법을 위한 나노입자는 전이 암세포를 타켓팅하여 사멸시키는 것을 특징으로 한다.

[18] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 암세포 화학요법을 위한 나노입자는 전이 암세포 내에 섭취되어 세포 기질에 존재하는 글루타티온에 의해 쪼개져 약물을 방출하는 것을 특징으로 한다.

[19] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 암세포 화학요법을 위한 나노입자의 제조방법은 알부민을 티올화하는 티올화단계와, 티올화된 알부민과 약물을 이용하여 이황화 결합 및 탈용매화 과정을 통해 약물이 담지된 알부민 나노입자를 형성하는 입자형성단계와, 상기 약물이 담지된 알부민 나노입자에 CEACAM6 항체를 결합시키는 항체결합단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[20] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 암세포 화학요법을 위한 나노입자의 제조방법에 있어서 상기 티올화단계는 piperazine-N'-ethanesulfonic acid와 ethylenediaminetetraacetic acid를 함유하는 반응버퍼에 알부민을 녹이고,

2-Iminothiolane hydrochloride에 의한 티올화 과정을 통해 티올화된 알부민을 생성하는 것을 특징으로 한다.

[21] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 암세포 화학요법을 위한 나노입자의 제조방법에 있어서 상기 티올화단계에서 알부민과 2-IT의 몰비율은 1 대 20 내지 30인 것을 특징으로 한다.

[22] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 암세포 화학요법을 위한 나노입자의 제조방법에 있어서 상기 입자형성단계는 HEPES 버퍼에 상기 티올화된 알부민과 약물이 혼합된 용액에 에탄올을 드롭방식으로 첨가반응시켜 약물이 담지된 알부민 나노입자를 생성하는 것을 특징으로 한다.

[23] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 암세포 화학요법을 위한 나노입자의 제조방법에 있어서 상기 항체결합단계는 N-Hydroxysuccinimide와 N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride를 포함하는 MES 반응버퍼 내에 CEACAM6 항체 용액을 혼합하여 반응시켜 NHS/EDC-활성화된 항체를 형성하고, 상기 활성화된 황체를 상기 약물이 담지된 알부민 나노입자 용액에 혼합반응시켜, 약물이 담지된 알부민 나노입자에 CEACAM6 항체를 결합시키는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[24] 본 발명은 앞서 본 실시예에 의해 다음과 같은 효과를 얻을 수 있다.

[25] 본 발명은 전이 암세포를 효과적으로 사멸시킬 수 있는 효과가 있다.

[26] 또한, 본 발명은 알부민 나노입자에 결합한 CEACAM6 항체가 아노이키스 내성 암세포를 타켓팅하여 전이 암세포에 약물을 효과적으로 전달할 수 있는 효과가 있다.

[27] 또한, 본 발명은 약물을 담지하는 알부민 나노입자는 디설파이드 결합에 의해 생성되므로, 암세포 내에 섭취된 알부민 나노입자는 세포기질에 존재하는 글루타틴온에 의해 쪼개져 비목적 지역에 약물을 방출을 억제할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[28] 도 1은 tHSA-NPs의 Zetasizer 및 TEM 측정결과를 나타내는 도표.

[29] 도 2는 D-tHSA-NPs의 Zetasizer 측정결과를 나타내는 도표.

[30] 도 3은 티올화 비율에 따라 약물 담지효율을 나타내는 도표.

[31] 도 4는 글푸타티온 여부에 따라 D-tHSA-NPs의 약물 방출 양을 나타내는 도표.

[32] 도 5는 글루타티온 여부에 따라 D-tHSA-NPs의 크기 변화를 나타내는 도표.

[33] 도 6은 D-tHSA-NPs 및 C6D-tHSA-NPs의 입자 분포를 나타내는 도표.

[34] 도 7 및 8은 C6D-tHSA-NPs에서 D-tHSA-NPs의 표면에 CEACAM6가 결합한 것을 확인하기 위한 공초점 현미경 이미지.

[35] 도 9는 배양된 암세포의 CEACAM6 단백질 발현을 확인하기 위한 형광 현미경 이미지.

[36] 도 10은 배양된 암세포의 CEACAM6 유전자 발현을 확인하기 위한 RT-PCT 결과를 나타내는 도표.

[37] 도 11은 C6-tHSA-NPs의 아노이키스 내성 암세포로의 표적 능력을 확인하기 위한 공초점 현미경 이미지.

[38] 도 12는 C6D-tHSA-NPs의 아노이키스 내성 암세포의 치료 효율을 확인하기 위한 Cell viability 결과를 나타내는 도표.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

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

[40]

[41] 본 발명의 일 실시예에 따른 아노이키스 내성 암세포의 화학요법을 위한 나노입자는 약물을 담지한 알부민 나노입자와, 상기 알부민 나노입자에 결합한 CEACAM6 항체를 포함하며, 상기 알부민 나노입자는 알부민 분자 사이의 디설파이드 결합(disulfide bonding)에 의해서 형성되고, 상기 CEACAM6 항체는 알부민 나노입자 표면의 아민 그룹(amine group)과 아마이드 결합(amide bonding)하여 알부민 나노입자의 표면에 결합한다. 상기 아노이키스 내성 암세포의 화학요법을 위한 나노입자는 150 내지 350nm의 직경을 가지며, 상기 알부민 나노입자는 구형의 형태를 가진다. 상기 약물은 암세포를 사멸할 수 있는 다양한 약물이 사용될 수 있으며 일 예로 독소루비신이 사용될 수 있다. 혈관 또는 림프관을 통해 이동하는 암세포(floating cancer cell)에 의한 전이(metastasis)에서, 앵커리지 의존 프로그램드 세포 사멸(anchorage dependent programmed cell death)을 의미하는 아노이키스에 대한 내성은 필수적이며, 아노이키스 내성 특성을 갖는 암세포에서는 CEACAM6(carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6)가 과발현(overexpressing)되므로, 본 발명의 암세포의 화학요법을 위한 나노입자는 알부민 나노입자의 표면에 CEACAM6를 타켓팅하는 CEACAM6 항체가 결합하여 전이 암세포(floting(metastasis) cancer cell)를 효과적으로 타켓팅할 수 있고, 알부민 나노입자는 상대적으로 강한 디설파이드 결합에 형성되므로 약물을 효과적으로 담지할 수 있으며, 디설파이드 결합을 끊는 글루타티온(glutathione)은 세포 기질(cell cytosol)에는 존재하나 혈액 및 림프액에는 존재하지 않아 본 발명의

나노입자는 암세포에 섭취된 다음 약물을 방출하므로 비목적하는 지역이 아닌 암세포에 효과적으로 약물을 방출할 수 있어 부작용을 줄이고 암세포 사멸효과를 증가시킬 수 있다. 본 발명의 나노입자는 아노이키스 내성을 가지는 유방암, 위암, 결장암, 췌장암 등의 다양한 전이암에 적용될 수 있다.

[42]

[43] 본 발명의 다른 실시예에 따른 아노이키스 내성 암세포의 화학요법을 위한 나노입자의 제조방법에 대한 것으로, 상기 나노입자의 제조방법은 알부민을 티올화하는 티올화단계와, 티올화된 알부민과 약물을 이용하여 이황화 결합 및 탈용매화 과정을 통해 약물이 담지된 알부민 나노입자를 형성하는 입자형성단계와, 상기 약물이 담지된 알부민 나노입자에 CEACAM6 항체를 결합시키는 항체결합단계를 포함한다.

[44] 상기 티올화단계는 알부민을 티올화하는 단계로, 구체적으로 piperazine-N'-ethanesulfonic acid(HEPES)와 ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)를 함유하는 반응버퍼에 알부민(human serum albumin)을 녹이고, 2-Iminothiolane hydrochloride(2-IT)에 의한 티올화 과정(thiolation process)을 통해 티올화된 알부민(thiolated albumin)을 생성한다. 상기 티올화단계에서 알부민과 2-IT의 몰비율은 1 대 20 내지 30인 것이 바람직하다.

[45] 상기 입자형성단계는 티올화된 알부민과 약물을 이용하여 이황화 결합 및 탈용매화 과정을 통해 약물이 담지된 알부민 나노입자를 형성하는 단계로, 구체적으로 HEPES 버퍼에 상기 티올화된 알부민과 약물이 혼합된 용액에 에탄올을 드롭방식(dropwise)으로 첨가반응시켜 약물이 담지된 알부민 나노입자를 생성한다.

[46] 상기 항체결합단계는 상기 약물이 담지된 알부민 나노입자에 CEACAM6 항체를 결합시키는 단계로, 구체적으로 N-Hydroxysuccinimide(NHS)와 N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride(EDC)를 포함하는 MES 반응버퍼 내에 CEACAM6 항체 용액을 혼합하여 반응시키고 정제하여 NHS/EDC-활성화된 항체(NHS/EDC-activated antibody)를 형성하고, 활성화된 항체와 상기 약물이 담지된 알부민 나노입자 표면의 아민 그룹(amine group) 사이에 아마이드 결합(amide bonding)을 형성하기 위해, 상기 활성화된 황체를 상기 약물이 담지된 알부민 나노입자 용액에 혼합반응시켜, 약물이 담지된 알부민 나노입자에 CEACAM6 항체가 결합시킨다.

[47]

[48] 이하, 실시예를 통해서 본 발명을 보다 상세히 설명하기로 한다. 하지만, 이들은 본 발명을 보다 상세하게 설명하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 권리범위가 이에 한정되는 것은 아니다.

[49]

[50] <실시예 1> 항체가 결합하고 약물이 담지된 알부민 나노입자의 제조

[51] (1) 1mM piperazine-N'-ethanesulfonic acid(HEPES)와 0.1mM

ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)를 함유하는 반응버퍼(pH 8.0)에 알부민(human serum albumin) 40mg을 녹이고, 몰비율 1:25로 2-Iminothiolane hydrochloride(2-IT)에 의한 티올화 과정(thiolation process)을 통해 티올화된 알부민(thiolated albumin)을 생성하였다.

[52] (2) 이황화 결합(disulfide bonding) 반응 및 탈용매화 과정(desolvation)에 의한 티올화된 알부민 분자의 나노 집합체를 만들기 위해 HEPES 버퍼에 상기 티올화된 알부민과 독소루비신(doxorubicin)이 혼합된 용액에 에탄올을 드롭방식(dropwise)으로 첨가하여 실온에서 하룻밤 동안 반응시켜 독소루비신이 담지된 알부민 나노입자(D-tHSA-NPs)를 생성하였다.

[53] (3) 5mM N-Hydroxysuccinimide(NHS)와 2mM N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride(EDC)를 포함하는 MES 반응버퍼 내에 CEACAM6 항체 용액 1mg/ml를 혼합하고 실온에서 15분 반응시키고 정제하여 NHS/EDC-활성화된 항체(NHS/EDC-activated antibody)를 형성하고, 활성화된 항체와 나노입자(D-tHSA-NPs)의 표면의 아민 그룹(amine group) 사이에 아마이드 결합(amide bonding)을 형성하기 위해, 상기 활성화된 황체를 나노입자 용액(D-tHSA-NPs solution)에 혼합하여 1.5시간 반응시켜, 독소루비신이 담지된 알부민 나노입자에 CEACAM6 항체가 결합한 알부민 나노입자(C6D-tHSA-NPs)를 생성하였다.

[54]

[55] <실시예 2> 알부민 나노입자의 특성 확인

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

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

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

[59] (4) 50% serum 내에 실시예 (1)의 2에서 제조한 나노입자를 첨가하고 5mM의 glutathion이 있는 경우와 없는 경우로 나누어 입자 사이즈 측정하여 도 5에 나타내었다. 도 5를 보면, GSH가 없는 경우 24시간 동안 입자 크기의 변화가 거의 없는데, GSH가 첨가된 경우 1시간이 지난 후에 입자 크기 현저하게 커졌음을 알 수 있다. 이는 GSH가 나노입자의 이황화 결합을 끊어 나노입자의 사이즈가 커진 것으로 보인다.

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

[61]

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

[63] (1) MDA-MB-231 and MCF-7 human breast cancer cell이 10% fetal bovine serum(FBS)이 보충된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에서 5% CO_2, 37℃ 환경으로 배양된다. 부착 배양(adherent culture)은 the tissue culture dishes(Falcon, San Jose, CA)에서 행하여지며, 유방암 세포의 아노이키스 내성 성질(anoikis resistant property)을 유도하기 위한 부유 배양(Suspension culture)은 10mg/ml Poly-HEMA(Poly(2-hydroxyethyl methacrylate))(Sigma, St. Louis, MO)가 고팅된 dishes에서 행하여진다. 구체적으로, 1×10^6 세포를 poly-HEMA가 코팅된 디쉬에 시트하고 일주일 이상 성장시키고, 3일마다 신선한 배지를 첨가하고 7일 후 trypsin-EDTA를 처리한다. 이하에서 부착 배양된 것을 adherent라 표시하고

아노이키스 내성 성질을 유도하기 위해 부유 배양된 것을 AR로 표시하고 한다.

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

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

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

[67]

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

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

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

[71] (3) 도 11을 보면, C6-tHSA-NPs가 아노이키스 내성 특성을 가진 MCF-7 세포 내에 많이 분포하는 것을 알 수 있어 CEACAM6 항체가 결합된 나노입자는

아노이키스 내성 특성을 가진 암 세포로 방향성을 가지고 있음을 알 수 있다.

[72]

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

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

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

[76]

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

청구범위

[청구항 1] 약물을 담지한 알부민 나노입자와, 상기 알부민 나노입자에 결합한 CEACAM6 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 암세포 화학요법을 위한 나노입자.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 약물을 담지한 알부민 나노입자는 알부민 분자 사이의 디설파이드 결합에 의해서 형성되는 것을 특징으로 하는 암세포 화학요법을 위한 나노입자.

[청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 약물을 담지한 알부민 나노입자는 구형의 형태를 가지는 것을 특징으로 하는 암세포 화학요법을 위한 나노입자.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 암세포 화학요법을 위한 나노입자는 150 내지 350nm의 직경을 가지는 것을 특징으로 하는 암세포 화학요법을 위한 나노입자.

[청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 CEACAM6 항체는 상기 약물을 담지한 알부민 나노입자 표면의 아민 그룹과 아마이드 결합하는 것을 특징으로 하는 암세포 화학요법을 위한 나노입자.

[청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 약물은 독소루비신이 사용되는 것을 특징으로 하는 암세포 화학요법을 위한 나노입자.

[청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 암세포 화학요법을 위한 나노입자는 전이 암세포를 타켓팅하여 사멸시키는 것을 특징으로 하는 암세포 화학요법을 위한 나노입자.

[청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 암세포 화학요법을 위한 나노입자는 전이 암세포 내에 섭취되어 세포 기질에 존재하는 글루타티온에 의해 쪼개져 약물을 방출하는 것을 특징으로 하는 암세포 화학요법을 위한 나노입자.

[청구항 9] 알부민을 티올화하는 티올화단계와, 티올화된 알부민과 약물을 이용하여 이황화 결합 및 탈용매화 과정을 통해 약물이 담지된 알부민 나노입자를 형성하는 입자형성단계와, 상기 약물이 담지된 알부민 나노입자에 CEACAM6 항체를 결합시키는 항체결합단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 암세포 화학요법을 위한 나노입자의 제조방법.

[청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 티올화단계는 piperazine-N'-ethanesulfonic acid와 ethylenediaminetetraacetic acid를 함유하는 반응버퍼에 알부민을 녹이고, 2-Iminothiolane hydrochloride에 의한 티올화 과정을 통해 티올화된 알부민을 생성하는 것을 특징으로 하는 암세포 화학요법을 위한 나노입자의 제조방법.

[청구항 11] 제10항에 있어서,

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

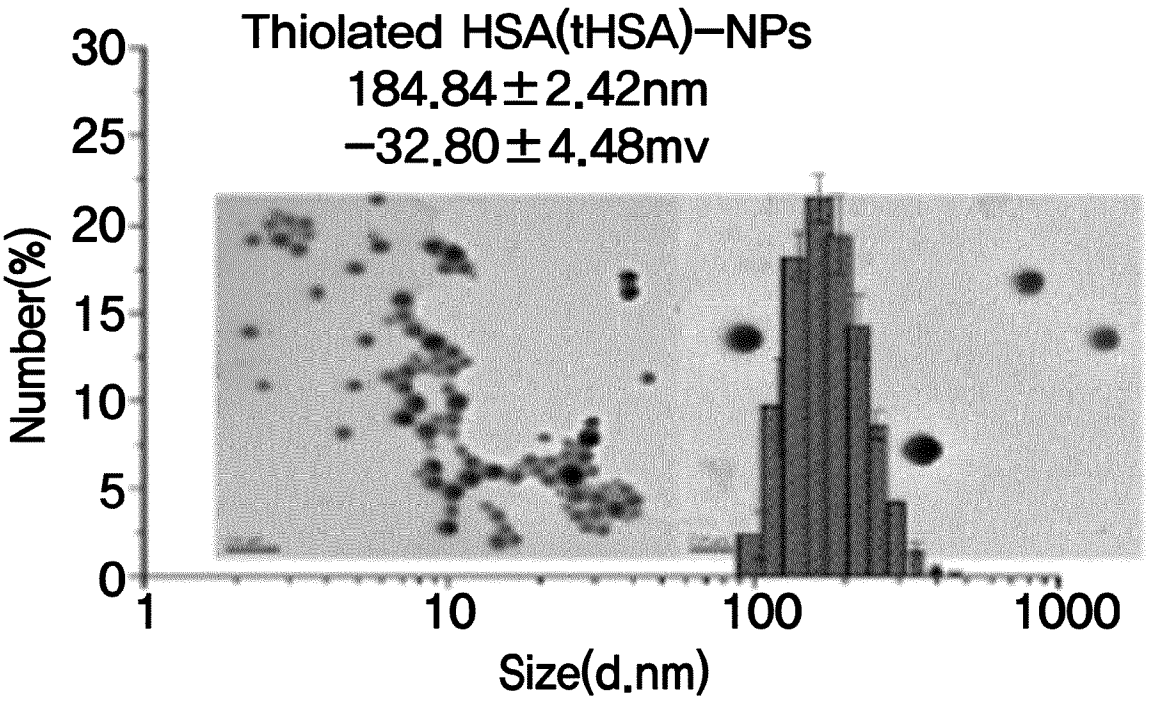
[청구항 12] 제9항에 있어서, 상기 입자형성단계는

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

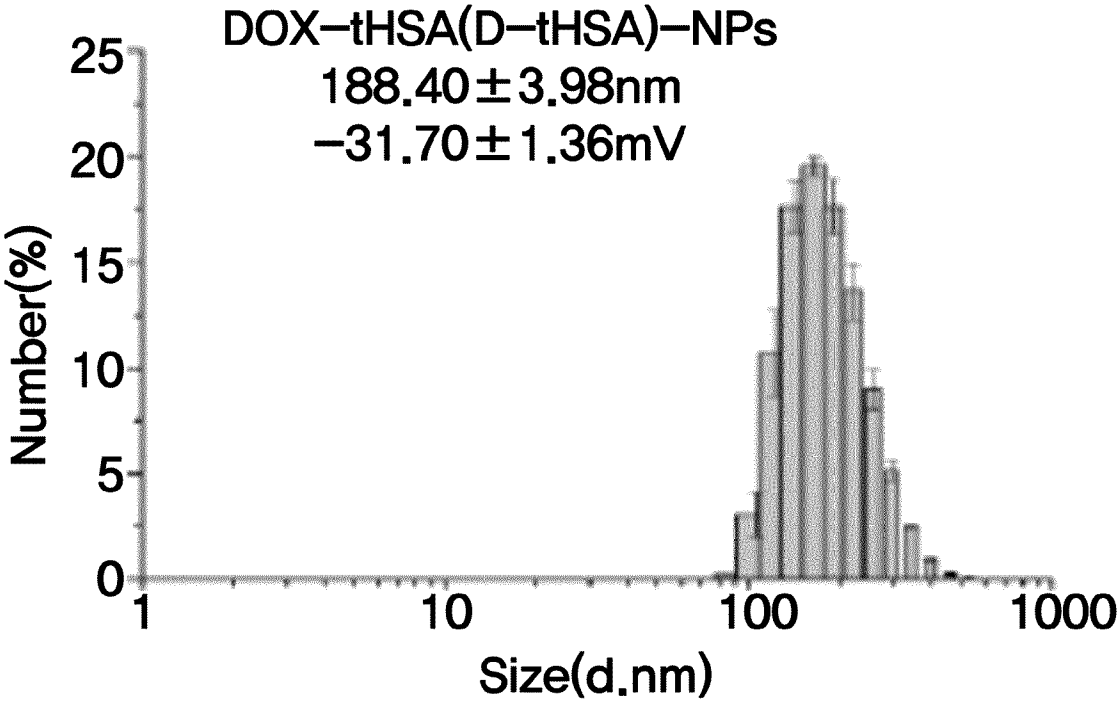
[청구항 13] 제9항에 있어서, 상기 항체결합단계는

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

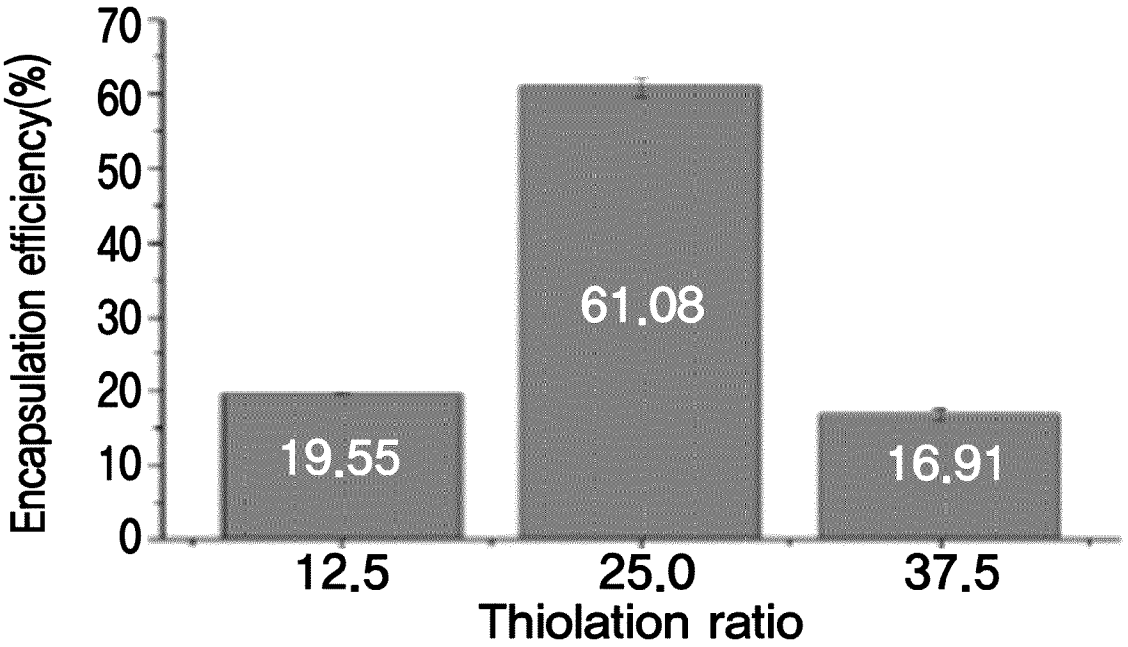
[도1]


Thiolated HSA(tHSA)-NPs
184.84±2.42nm
-32.80±4.48mv
Number(%)
30
25
20
15
10
5
0
1
10
100
1000
Size(d.nm)

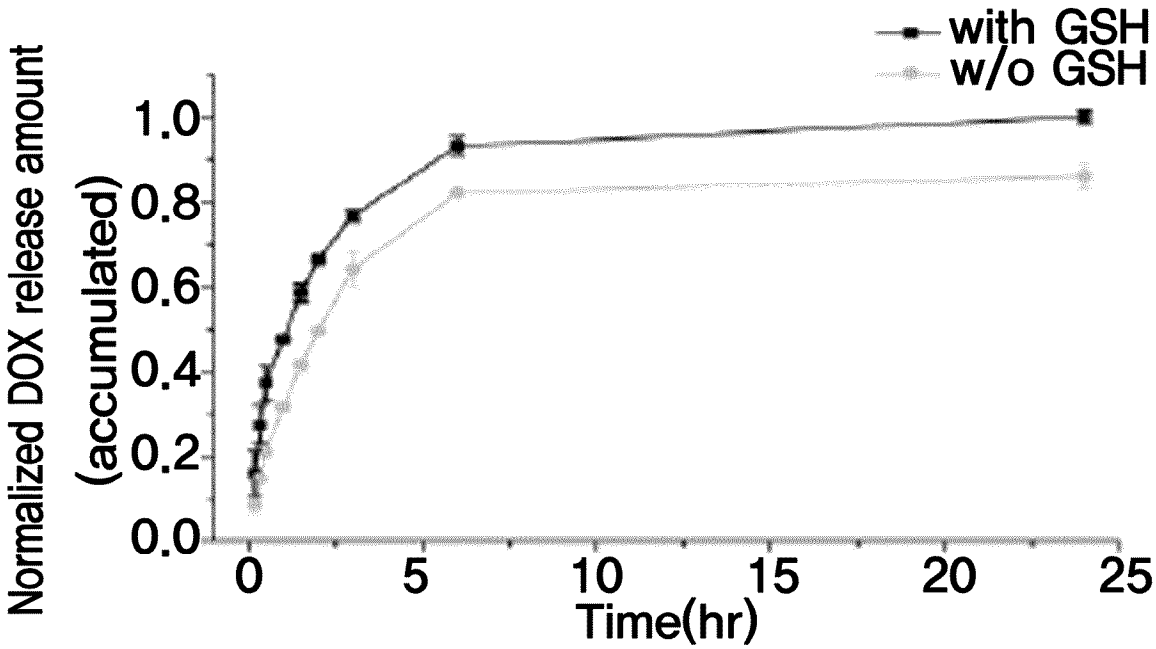
[도2]


DOX-tHSA(D-tHSA)-NPs
188.40±3.98nm
-31.70±1.36mV
Number(%)
25
20
15
10
5
0
1
10
100
1000
Size(d.nm)

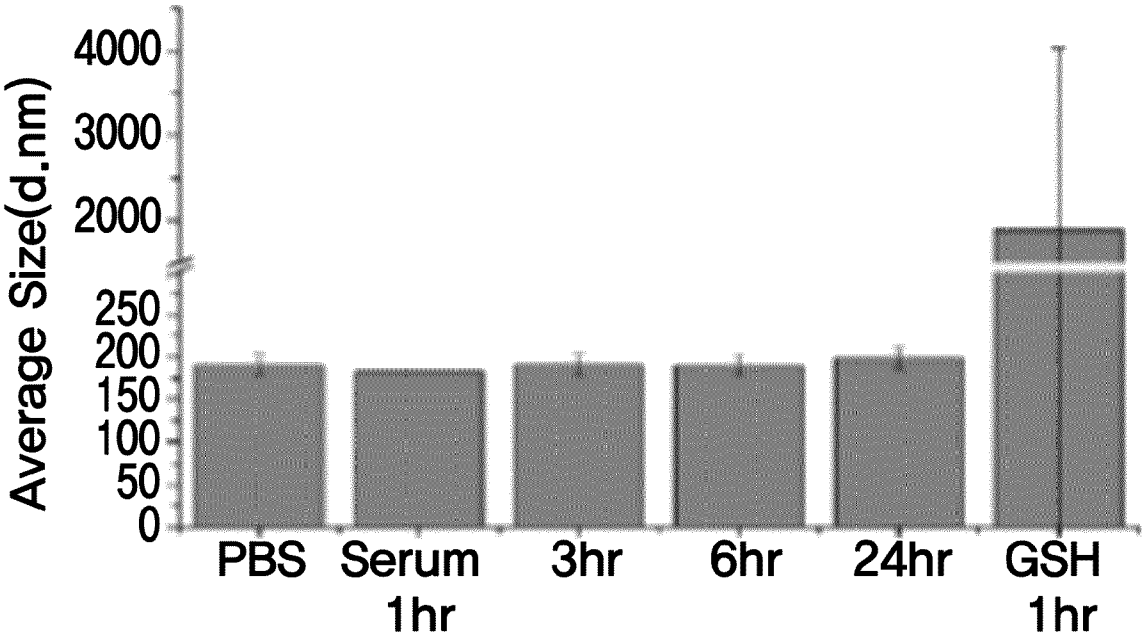
[도3]


Encapsulation efficiency(%)
70
60
50
40
30
20
10
0
19.55
61.08
16.91
12.5
25.0
37.5
Thiolation ratio

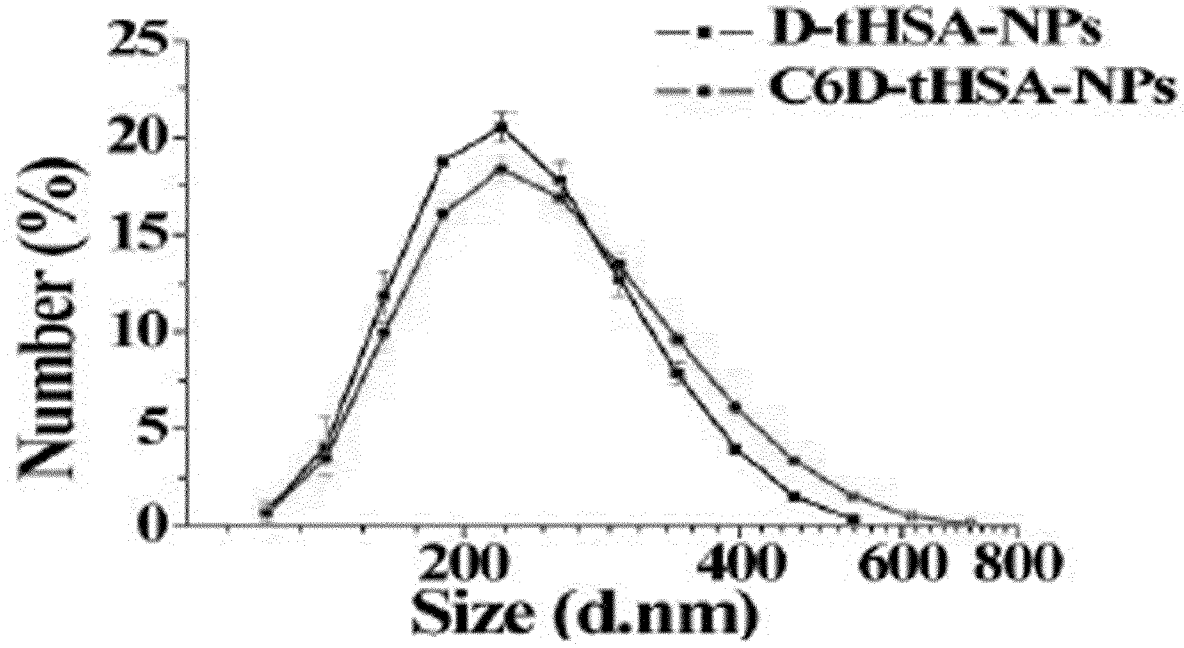
[도4]


with GSH
w/o GSH
Normalized DOX release amount
(accumulated)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
5
10
15
20
25
Time(hr)

[도5]


Average Size(d.nm)
4000
3000
2000
250
200
150
100
50
0
PBS
Serum 1hr
3hr
6hr
24hr
GSH 1hr

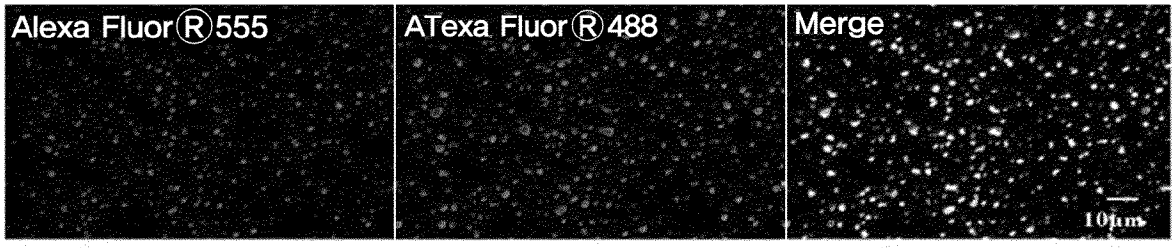
[도6]


D-tHSA-NPs
C6D-tHSA-NPs
Number (%)
25
20
15
10
5
0
200
400
600
800
Size (d.nm)

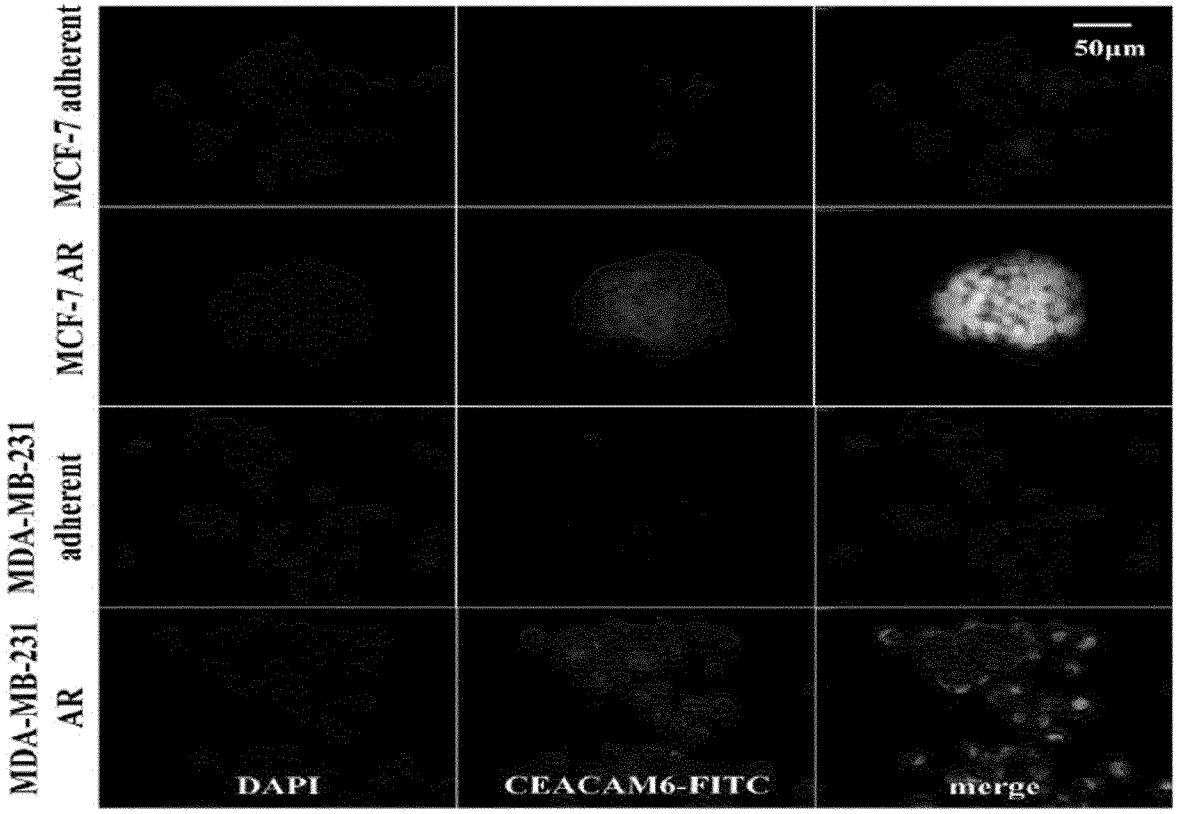
[도7]


Alexa Fluor®555
Alexa Fluor®488
Merge
10μm

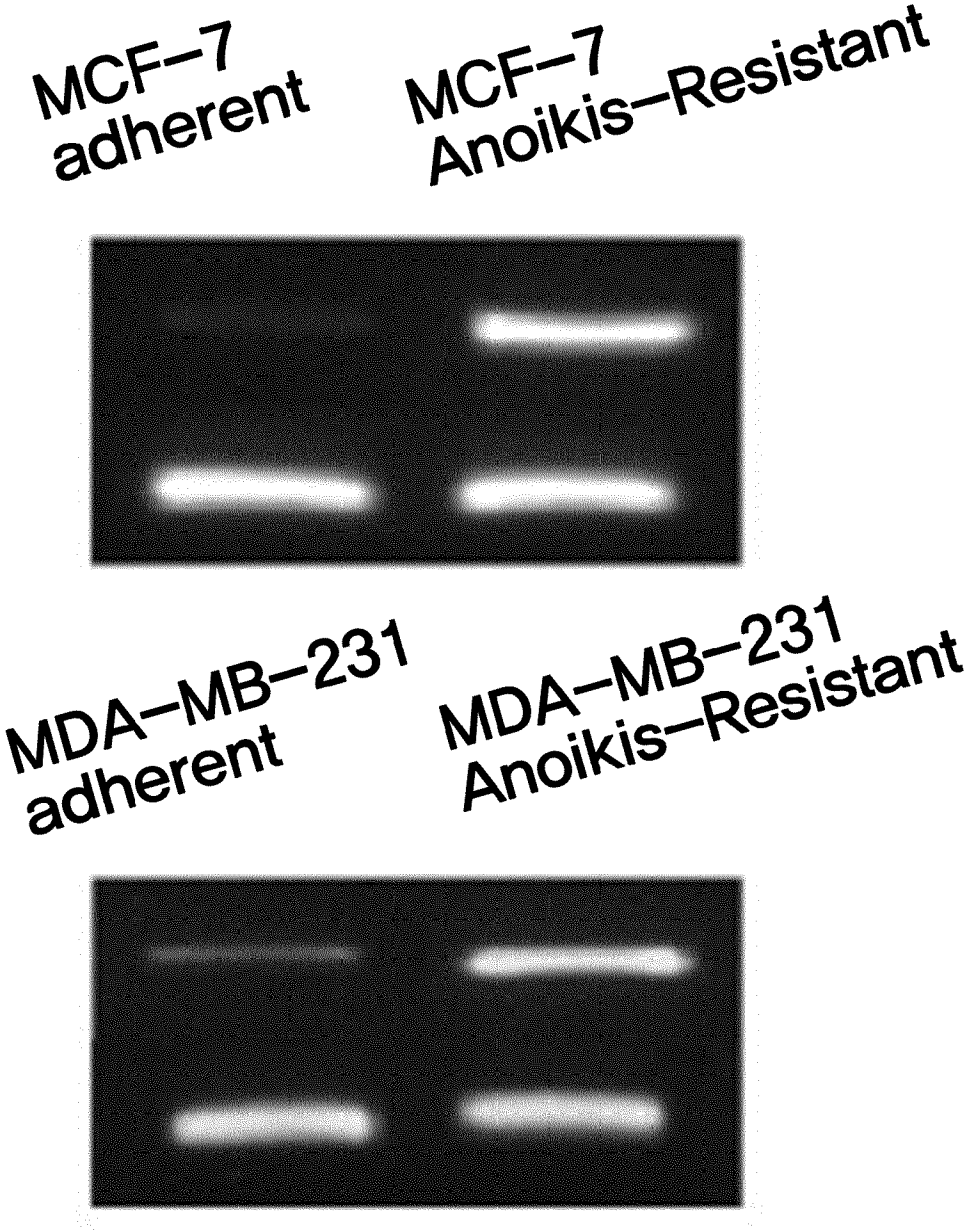
[도8]


Alexa Fluor®555
ATexa Fluor®488
Merge
10μm

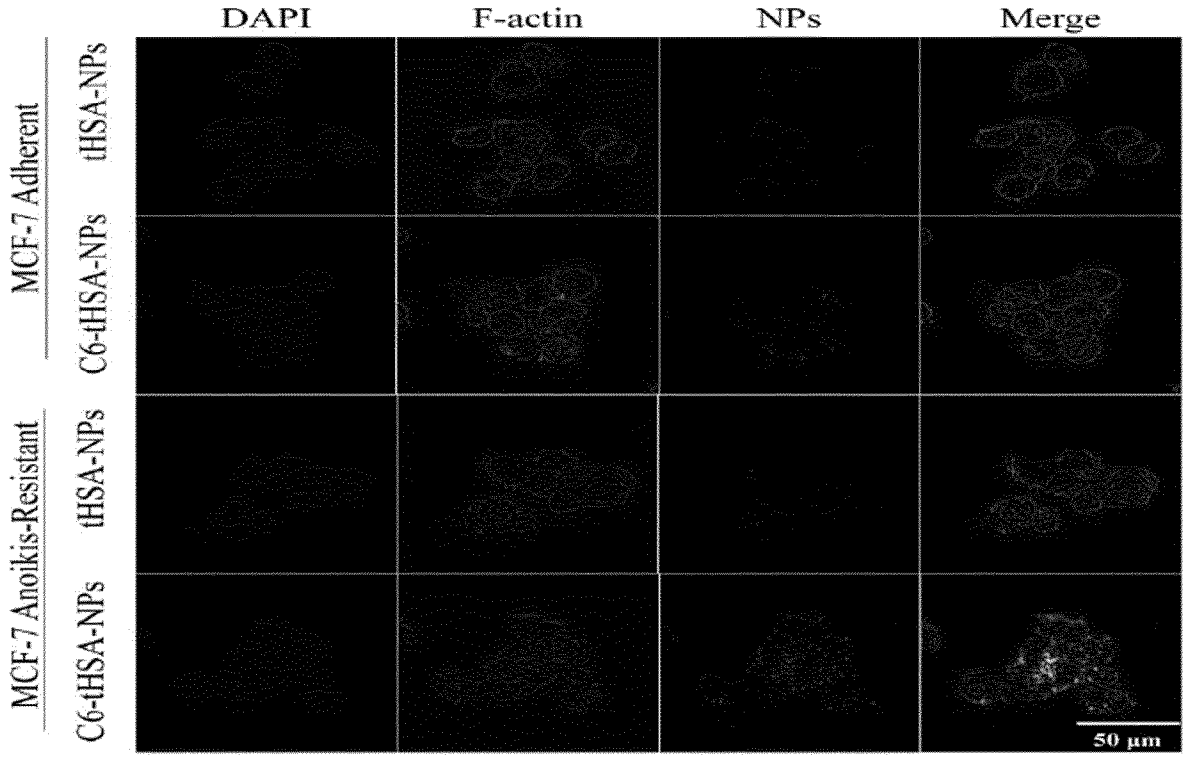
[도9]


MCF-7 adherent
MCF-7 AR
MDA-MB-231 adherent
MDA-MB-231 AR
50μm
DAPI
CEACAM6-FITC
merge

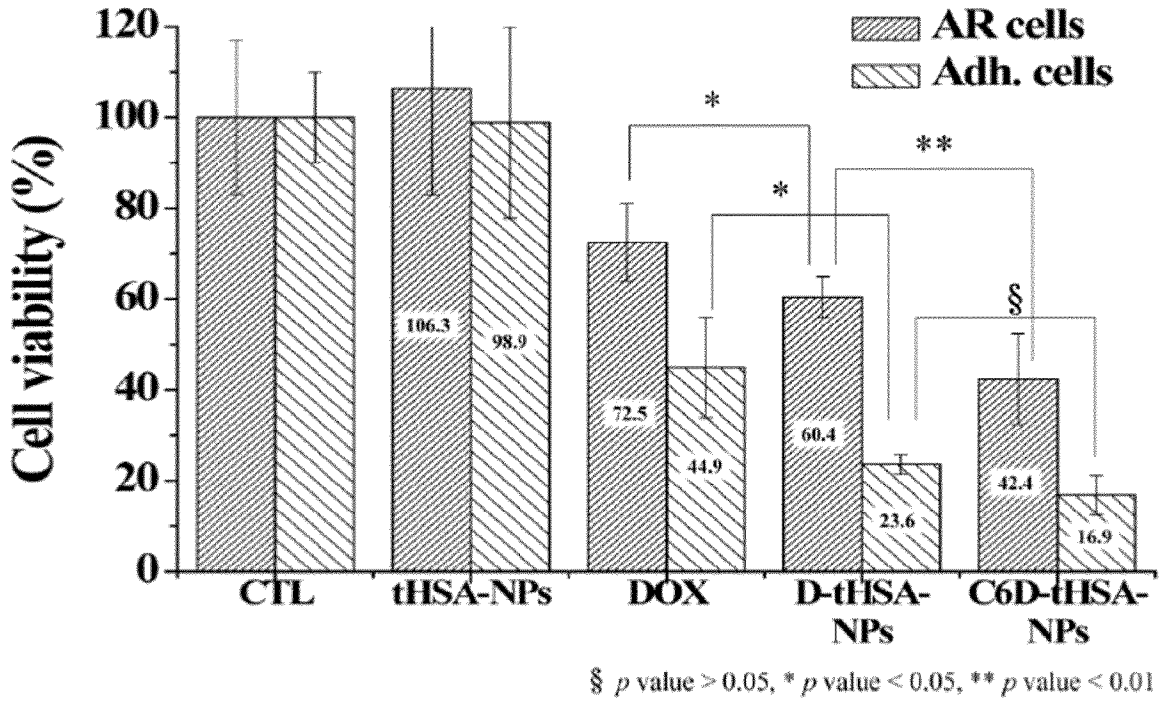
[도10]


MCF-7
adherent
MCF-7
Anoikis-Resistant
MDA-MB-231
adherent
MDA-MB-231
Anoikis-Resistant

[도11]


DAPI
F-actin
NPs
Merge
MCF-7 Adherent
tHSA-NPs
C6-tHSA-NPs
MCF-7 Anoikis-Resistant
tHSA-NPs
C6-tHSA-NPs
50 μm

[도12]


AR cells
Adh. cells
Cell viability (%)
120
100
80
60
40
20
0
106.3
98.9
72.5
44.9
60.4
23.6
42.4
16.9
*
*
**
§
CTL
tHSA-NPs
DOX
D-tHSA-NPs
C6D-tHSA-NPs
§ p value > 0.05, * p value < 0.05, ** p value < 0.01

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2016/011348

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 47/48(2006.01)i, A61K 47/42(2006.01)i, A61K 31/704(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 47/48; A61K 9/51; A61K 47/42; A61K 31/704

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: albumin, nano-particle, CEACAM6, antibody, disulfide coupling, transition in cancer, thiolation, NHS/EDC activation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Lee, H. et al., "Chemotherapy of Breast Cancer Cells during the Metastatic Phase by CEACAM6-Targeting Albumin Nanoparticles", Abstracts of Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Conference, 2015, page 523 See abstract.	1,4,5,7,8
Y		2,3,6,9-13
Y	CN 104490847 A (CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY) 08 April 2015 See abstract; and paragraph [0005].	2,3,6
Y	SON, S. et al., "Self-crosslinked Human Serum Albumin Nanocarriers for Systemic Delivery of Polymerized siRNA to Tumors", Biomaterials, 2013, vol. 34, pages 9475-9485 See abstract; pages 9476-9478; and figure 1.	9-13
Y	LI, C. et al., "Preparation and Characterization of Galactosylated Bovine Serumalbumin Nanoparticles for Liver-targeted Delivery of Oridonin", International Journal of Pharmaceutics, 2013, vol. 448, pages 79-86 See abstract; and page 80.	13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
17 FEBRUARY 2017 (17.02.2017)	**17 FEBRUARY 2017 (17.02.2017)**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2016/011348

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WAGNER, S, et al., "Enhanced Drug Targeting by Attachment of an Anti αv Integrin Antibody to Doxorubicin Loaded Human Serum Albumin Nanoparticles", Biomaterials, 2010, vol. 31, pages 2388-2398. See the entire document.	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2016/011348

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
CN 104490847 A	08/04/2015	NONE	

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2016/011348

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 47/48(2006.01)i, A61K 47/42(2006.01)i, A61K 31/704(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
A61K 47/48; A61K 9/51; A61K 47/42; A61K 31/704

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 알부민, 나노파티클, CEACAM6, 항체, 디설파이드 결합, 전이 암, 티올화, NHS/EDC 활성화

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	Lee, H. 등, "Chemotherapy of Breast Cancer Cells during the Metastatic Phase by CEACAM6-Targeting Albumin Nanoparticles", 한국생물공학회 학술대회 [초록집], 2015, 페이지 523 초록 참조.	1,4,5,7,8
Y		2,3,6,9-13
Y	CN 104490847 A (CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY) 2015.04.08 요약; 및 단락 [0005] 참조.	2,3,6
Y	SON, S. 등, "Self-crosslinked human serum albumin nanocarriers for systemic delivery of polymerized siRNA to tumors", Biomaterials, 2013, 34권, 페이지 9475-9485 초록; 페이지 9476-9478; 및 도면 1 참조.	9-13
Y	LI, C. 등, "Preparation and characterization of galactosylated bovine serum albumin nanoparticles for liver-targeted delivery of oridonin", International Journal of Pharmaceutics, 2013, 448권, 페이지 79-86 초록; 및 페이지 80 참조.	13

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2017년 02월 17일 (17.02.2017)	2017년 02월 17일 (17.02.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
박정민
전화번호 +82-42-481-3516

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2016/011348

C(계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	WAGNER, S, 등, "Enhanced drug targeting by attachment of an anti αv integrin antibody to doxorubicin loaded human serum albumin nanoparticles", Biomaterials, 2010, 31권, 페이지 2388-2398 전체 문헌 참조.	1-13

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2016/011348

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
CN 104490847 A	2015/04/08	없음	