



- (51) 국제특허분류:  
C12N 15/115 (2010.01) A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/001776
- (22) 국제출원일: 2014년 3월 4일 (04.03.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:  
10-2013-0023412 2013년 3월 5일 (05.03.2013) KR
- (71) 출원인: 국립암센터 (NATIONAL CANCER CENTER)  
[KR/KR]; 410-769 경기도 고양시 일산동구 일산로 323, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 허균 (HEO, Kyun); 122-731 서울시 은평구 진관1로 21-9, 103동 901호, Seoul (KR). 김인후 (KIM, In-Hoo); 410-717 경기도 고양시 일산동구 강석로 152, 706동 1503호, Gyeonggi-do (KR). 이은숙 (LEE, Eun-Sook); 427-732 경기도 과천시 별양로 111, 506동 1404호, Gyeonggi-do (KR). 김윤희 (KIM, Yun-Hee); 132-791 서울시 도봉구 노해로 69길 103, 110동 1002호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 위병갑 (WIE, Byoung-Gap); 137-873 서울시 서초구 반포대로 26길 21, 소소헌빌딩 1층, 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, 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, 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, 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.

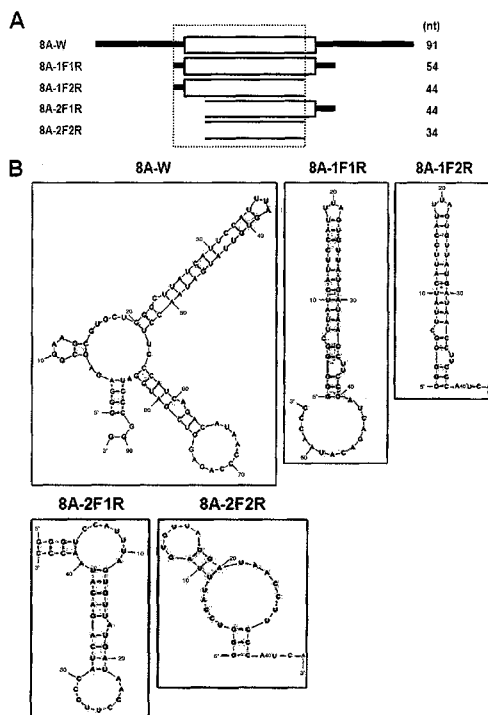
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: INTERLEUKIN-8 APTAMER AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 인터루킨-8 앵타머 및 이의 용도

[Fig. 2]



(57) Abstract: The present invention relates to an RNA aptamer binding to IL-8 and a use thereof. More particularly, an aptamer specifically binding to IL-8 was selected from an RNA library by using SELEX, and it was confirmed that the aptamer binds to IL-8, with high binding affinity, and thereby inhibits the movement and intracellular signal transduction of IL-8-induced neutrophil and the invasion of cancer cells. Also, a truncated form of the aptamer was produced, and it was confirmed that the truncated form of the aptamer binds to IL-8, with high binding affinity, and thereby inhibits the movement and intracellular signal transduction of IL-8-induced neutrophil, and  $Ca^{2+}$  mobilization. Therefore, it was confirmed that the aptamer binding to IL-8 in the present invention can be effectively used for preventing and treating cancer or inflammatory diseases.

(57) 요약서: 본 발명은 IL-8에 결합하는 RNA 앵타머 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로 SELEX를 이용하여 RNA 라이브러리에서 IL-8에 특이적으로 결합하는 앵타머를 선별하였고, 상기 앵타머가 IL-8에 높은 결합력으로 결합하여 IL-8-유도된 호중구의 이동 및 세포 내 신호전달, 및 암세포의 침입을 억제함을 확인하였다. 또한 상기 앵타머의 절단된 형태(truncated form)를 제작하여, 상기 앵타머의 절단된 형태가 IL-8에 높은 결합력으로 결합하여 IL-8-유도된 호중구의 이동 및 세포 내 신호전달, 및  $Ca^{2+}$  가동화(mobilization)을 억제함을 확인하였다. 따라서 본 발명의 IL-8에 결합하는 앵타머가 암 또는 염증성 질환의 예방 및 치료를 위하여 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.



공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

## 명세서

### 발명의 명칭: 인터루킨-8 앵타머 및 이의 용도

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 IL-8(interleukin-8)에 결합하는 RNA 앵타머(aptamer) 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로 IL-8에 결합하여 IL-8로 유도되는 기능을 억제하는 앵타머 및 상기 앵타머를 포함하는 암 및 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

#### 배경기술

- [2] 앵타머(aptamer)란, 독특한 3D 구조로 접히고(fold), 낮은 나노몰(nanomolar) 내지 피코몰(picomolar)의 농도에서 높은 결합력으로 표적(target)에 특이적으로 결합하는 단일-가닥(single-strand) DNA 또는 RNA 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)를 말한다. 상기 앵타머는 SELEX(systematic evolution of ligands by exponential enrichment)로 알려진 방법에 의해서 시험관 내에서(in vitro) 무작위 서열(randomized sequence)( $>10^{15}$ )의 라이브러리(library) 중에서 일반적으로 동정된다. 1990년도에 SELEX 방법이 개발된 이후, 단백질, 인지질(phospholipid), 당(sugar), 핵산(nucleic acid), 및 심지어 사람의 혈장(plasma) 및 전체 세포(whole cell) 등을 표적으로 하는 앵타머가 동정되었다.
- [3] 앵타머는 표적에 특이적으로 결합하고, 넓은 범위에 적용가능하다는 점에 있어서 자주 항체와 비교된다. 항체와 비교했을 때, 앵타머는 화학적 합성으로 쉽게 생산할 수 있고, 높은 온도에서 안정적이며, 표적에 접근이 용이하고, 화학적으로 쉽게 변형이 가능하며, 비-면역성(non-immunogenic), 및 무독성(nontoxic)이라는 점에서 치료상의 제제(therapeutic agent)로 이점을 갖는다. 반면 뉴클라아제-매개 분해(nuclease-mediated degradation)는 앵타머가 짧은 반감기(half-life)를 갖게한다. 이런 제한은 다양한 화학적 변형을 이용하여 극복할 수 있을 것이다. 예를 들어, 피리미딘(pyrimidine) 뉴클레오티드를 2'-플루오린(2'-fluorin, 2'-F) 또는 2'-아민(2'-amine, 2'-NH<sub>2</sub>)으로 변형 또는 푸린(purine) 뉴클레오티드에 2'-OMe로의 변형, 또는 3'-역 dT(3'-inverted dT, 3'-3'-dT)과 같은 화학적 변화에 의해서 앵타머의 뉴클라아제 저항성을 증가시킬 수 있다.
- [4]
- [5] 인터루킨-8(interleukin-8, IL-8)은 CXCL8이라고도 알려져 있고, 동정된 첫 번째 케모카인(chemokine)이다. 또한, IL-8은 호중구(neutrophil)의 화학주성인자(chemoattractant)로 알려져 있다. IL-8은 염증전 자극(proinflammatory stimuli), 화학적(chemical) 및 환경적(enviromental) 스트레스(stress), 및 스테로이드 호르몬(steroid hormone)에 의한 반응으로 단핵구(monocyte), 대식세포(macrophage), 내피세포(endothelial cell),

상피세포(epithelial cell), 및 종양세포(tumor cell)와 같은 다양한 형태의 세포에 의해 생산된다. IL-8은 ELR 모티프와, 수용체 결합에 중요하고 화학주성활성(chemotactic activity)에 필수적인 서열인 Glu-Leu-Arg을 포함하며, 또한 CXCR1 및 CXCR2를 통하여 혈관형성(angiogenesis)을 촉진한다. CXCR1(IL-8RA) 및 CXCR2(IL-8RB)는 G 단백질-연결된 수용체로 IL-8에 높은 결합력으로 결합하며, 세포 내로 IL-8로 시작되는 신호를 전달한다. 또한, IL-8은 암의 발달에 있어서 중요한 다른 생물학적 활성을 갖는다. 종양-유래된 IL-8은 암세포의 확산(proliferation), 생존(survival), 이동(migration), 및 침입(invasion)을 촉진할 수 있고, 혈관생성을 촉진하기 위해 내피세포를 활성화시킬 수 있다. 종양 진행(tumor progression)에 있어서 IL-8의 기여는 표적에 대한 치료상의 제제의 발전 및 암 치료를 위하여 매우 중요하다.

[6]

[7] 이에 본 발명자들은, IL-8의 활성을 억제하여 암을 치료할 수 있는 앵타머를 연구하던 중, SELEX를 이용하여 RNA 라이브러리에서 IL-8에 특이적으로 결합하는 앵타머를 선별하였고, 상기 앵타머가 IL-8에 높은 결합력으로 결합하여 IL-8-유도된 호중구의 이동 및 세포 내 신호전달, 및 암세포의 침입을 억제함을 확인하였다. 또한 상기 앵타머의 절단된 형태(truncated form)를 제작하여, IL-8에 높은 결합력으로 결합하여 IL-8-유도된 호중구의 이동 및 세포 내 신호전달, 및  $Ca^{2+}$ 가동화(mobilization)을 억제함으로써, 상기 앵타머를 암 또는 염증성 질환의 치료 및 예방에 유용하게 사용될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

### 발명의 상세한 설명

#### 기술적 과제

[8] 본 발명의 목적은 IL-8(interleukin-8)과 결합하여 IL-8로 유도되는 기능을 억제하는 앵타머(aptamer) 및 그 용도를 제공하는 것이다.

#### 과제 해결 수단

[9] 본 발명은 IL-8과 특이적으로 결합하는 앵타머를 제공한다.

[10] 또한, 본 발명은 IL-8과 특이적으로 결합하는 앵타머를 포함하는 암 또는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

#### 발명의 효과

[11] 본 발명의 IL-8(interleukin-1)에 결합하는 앵타머(aptamer)는, IL-8에 높은 결합력으로 결합하여 IL-8의 활성을 억제함으로써, IL-8에 의해 유도되는 암 및 염증성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

#### 도면의 간단한 설명

[12] 도 1A는 RNA 라이브러리와 SELEX를 통해 수득된 RNA 풀(pool)의 IL-8에 대한 결합력을 나타내는 도이다.

[13] 도 1B는 RNA 풀에서 수득된 RNA를 서열 유사성에 따라 몇 개의 군으로 나눈

것을 나타내는 도이다.

- [14] 도 1C는 RNA 풀 중 #8 앵타머가 특이적으로 His-IL-8에 결합하고, 다른 CXC-케모카인(chemokine)인 His-GRO- $\alpha$  및 His-GRO- $\beta$ 에는 결합하지 않음을 나타내는 도이다.
- [15] 도 2A 및 2B는 본 발명의 앵타머의 구조를 예상한 도이다.
- [16] 도 3은 본 발명의 앵타머가 호중구의 이동을 억제함을 나타내는 도이다.
- [17] 도 4는 8A-44(서열번호 23)가 IL-8에 강하게 결합함을 나타내는 도이다.
- [18] 도 5A는 8A-44(서열번호 23)가 IL-8에 의해 유도된 호중구의 이동을 억제함을 나타내는 도이다.
- [19] 도 5B는 8A-44(서열번호 23)가 IL-8에 의해 유도된 ERK의 활성을 억제함을 나타내는 도이다.
- [20] 도 6A 및 6B는 8A-44(서열번호 23)가 IL-8 유도된 구강암 세포주인 HSC-3 및 686-LN-e 세포주에서 IL-8에 의해 유도된 침입을 억제함을 나타내는 도이다.
- [21] 도 7은 8A-44(서열번호 23)의 절단된 형태인 8A-35(서열번호 24) 및 8A-30(서열번호 25)의 IL-8에 대한 결합력을 확인한 도이다.
- [22] 도 8A는 8A-44(서열번호 23), 8A-35(서열번호 24) 및 8A-30(서열번호 25)가 IL-8에 의해 유도된 호중구의 이동을 억제함을 나타내는 도이다.
- [23] 도 8B는 8A-44(서열번호 23), 8A-35(서열번호 24) 및 8A-30(서열번호 25)가 IL-8에 의해 유도된 ERK의 활성을 억제함을 나타내는 도이다.
- [24] 도 9는 호중구 세포에서 8A-44(서열번호 23), 8A-35(서열번호 24) 및 8A-30(서열번호 25)가 IL-8에 의해 유도된  $\text{Ca}^{2+}$  가동화(mobilization)를 농도-의존적으로 억제함을 나타내는 도이다.

### 발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [25] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [26]
- [27] 본 발명은 IL-8(interleukin-8)에 특이적으로 결합하는 30개의 RNA로 이루어진 RNA 앵타머로서, 상기 앵타머의 5'말단으로부터 4번째 내지 30번째 염기는 서열번호 22의 염기로 이루어진 것을 특징으로 하는 RNA 앵타머를 제공한다.
- [28] 또한, 본 발명은 IL-8에 특이적으로 결합하는 35개의 RNA로 이루어진 RNA 앵타머로서, 상기 앵타머의 5'말단으로부터 7번째 내지 30번째 염기는 서열번호 22의 염기로 이루어진 것을 특징으로 하는 RNA 앵타머를 제공한다.
- [29] 또한, 본 발명은 IL-8에 특이적으로 결합하는 44개의 RNA로 이루어진 RNA 앵타머로서, 상기 앵타머의 5'말단으로부터 7번째 내지 30번째 염기는 서열번호 22의 염기로 이루어지고, 1번째 내지 6번째 염기 및 30번째 내지 44번째 염기는 각각 서열번호 27 및 서열번호 28의 염기서열, 및 이와 80% 이상 상보적인 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 RNA 앵타머를 제공한다.
- [30] 상기 "RNA 앵타머"는 짧은 단일가닥의 올리고뉴클레오타이드로 높은 친화도와

특이성으로 표적 물질에 결합할 수 있는 3차원 구조를 형성할 수 있으며, 대부분의 경우에 표적 단백질에 특이적으로 결합할 수 있을 뿐 아니라 효율적으로 그 기능을 억제할 수 있어 표적 단백질의 기능을 알아내는데 이용될 수 있다. 반복된 생체 외 선별과정은 임의의 RNA 라이브러리로부터 특이적인 RNA 분자, 즉 앵타머의 선별이 가능하도록 하는데 (A.D. Ellington and J. W. Szostak, *Nature* 346: 818-822, 1990; C. Tuerk and L. Gold, *Science* 249: 505-510, 1990) RNA 라이브러리의 사이즈가 크고(10<sup>14</sup>-10<sup>15</sup>) 생체 외 효소 작용에 의해 RNA 분자를 생성하기 쉽기 때문에 RNA 라이브러리는 고 친화도 앵타머를 선별하기 위한 다른 생물학적 라이브러리 또는 합성 라이브러리보다 우수하다(E. N. Brody and L. Gold, *Rev. Mol. Biotechnol.* 74: 5-13, 2000).

- [31] 본 발명의 바람직한 실시예에서, 본 발명자들은 IL-8에 결합하고 IL-8로 유도되는 기능을 억제하는 RNA 앵타머를 선별하기 위하여 RNA 라이브러리를 이용하여 SELEX를 수행하였고, 그 결과 서열 유사성에 따라 5개의 군으로 나뉘는 15개의 서열을 선별하였다(도 1B 참조). 또한 상기 선별된 RNA 풀은 RNA 라이브러리에 비하여 IL-8에 대한 결합력이 19배 정도 높았으며(도 1A 참조), 그 중 8A-W(서열번호 16)가 IL-8에 특이적으로 결합하며, 다른 CXC-케모카인인 GRO- $\alpha$  및 GRO- $\beta$ 에는 결합하지 않는 것을 확인하였다(도 1C 참조).
- [32] 또한, 본 발명자들은 상기 8A-W(서열번호 16)를 주형으로 이의 잘라진 형태의 앵타머를 제작하였다. PCR을 수행하여 8A-1F1R, 8A-2F1R, 8A-2F2R, 8A-44(서열번호 23)를 제작한 후, 8A-44(서열번호 23)를 주형으로 다시 PCR을 수행하여 8A-35(서열번호 24) 및 8A-30(서열번호 25)의 절단된 형태(truncated form) RNA 앵타머를 추가적으로 제작하였으며, 이의 2차원 구조를 M 폴드 프로그램(M fold program)을 이용하여 예상하였다(도 2 참조).
- [33] 또한, 본 발명자들은 상기 수득된 절단된 형태의 앵타머 중 8A-W(서열번호 16), 8A-1F1R 및 8A-44(서열번호 23) 처리에 의해 호중구(neutrophil)의 이동이 농도-의존적으로 감소하였으나, 8A-2F2R 또는 8A-2F1R에 의해서는 영향을 받지 않음을 확인하였다(도 3 참조).
- [34] 아울러, 상기 결과에서 8A-44(서열번호 23)가 IL-8에 결합하기 충분하고, IL-8의 기능을 억제하는 것을 확인하였다. 8A-44(서열번호 23)는 대조군과 비교하여 IL-8에 높은 결합력으로 결합하였지만, 반면에 빠른 속도로 분리되는 것을 확인하였다(도 4 및 표 1 참조).
- [35] 또한, 본 발명자들은 8A-44(서열번호 23)가 대조군과 비교하여 농도-의존적으로 IL-8 유도된 호중구의 이동을 억제하고(도 5A 참조), 높은 농도에서 IL-8 유도된 ERK 활성화도 억제하는 것을 확인하였다(도 5B 참조).
- [36] 또한, IL-8에 의해 유도된 구강암 세포주의 침입이 8A-44(서열번호 23)의 농도-의존적으로 억제되는 것을 확인하였다(도 6 참조). 상기 결과는 8A-44(서열번호 23)가 정제된 IL-8 및 자연적으로 분비된 세포-유래 IL-8에

결합할 수 있고, 이의 기능을 억제함을 나타낸다.

- [37] 또한, 절단된 형태인 8A-35(서열번호 24) 및 8A-30(서열번호 25)의 IL-8에 대한 결합력을 확인한 결과, 8A-44(서열번호 23)와 비교하였을 때, 8A-35(서열번호 24)는 더욱 강한 결합력으로 IL-8에 결합하였으나, 8A-30(서열번호 25)는 조금 약한 결합력을 나타내었다(도 7 및 표 2 참조).
- [38] 또한, 8A-44(서열번호 23) 및 이의 절단된 형태인 8A-35(서열번호 24) 및 8A-30(서열번호 25)이 IL-8의 기능을 억제함으로써, 호중구에서의 이동, ERK 및 Akt 신호활성, 및  $Ca^{2+}$  가동화(mobilization)를 농도-의존적으로 억제함을 확인하였다(도 8A, 8B 및 도 9 참조).
- [39] 따라서, 본 발명의 앵타머들은 인간 IL-8에 결합하여 IL-8에 의해 유도된 세포 내 신호전달 경로를 유의적으로 억제함으로써, IL-8 유도되는 암 및 염증성 질환의 예방 및 치료를 위한 약학적 조성물로 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.
- [40] 본 발명은 상기 앵타머를 포함하는 암 또는 염증성 질환의 치료 및 예방을 위한 약학적 조성물을 제공한다.
- [41] 본 발명의 앵타머는 IL-8에 결합하여 IL-8로 유도되는 기능을 억제하는 것이 가장 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 상기 앵타머의 구조는 하나의 주요 줄기(main stem) 및 고리(loop) 구조로 구성되어 있는 것이 바람직하나, 본 발명의 앵타머의 서열을 포함하고 있다면 모두 사용가능하다.
- [42] 또한, 상기 앵타머는 RNaseA 저항성을 갖도록 하기 위하여, CTP 및 UTP를 대신하여 2'-F-dCTP 및 2'-F-dUTP를 사용하여 2'-플루오르-피리미딘-변형된(2'-Fluoro-pyrimidine-modified) RNA 라이브러리를 SELEX에 수행하는데 사용하였으나 이에 한정하지 않으며, RNaseA 저항성을 갖게 하기 위한 방법이라면 당업계에 널리 알려진 방법은 모두 사용가능하다.
- [43] 또한, 상기 앵타머는 하기의 군으로부터 선택된 하나 이상의 변형을 포함할 수 있으나, 이에 한정하지 않는다:
- [44] 뉴클레오타이드 내 당구조의 2' 탄소위치에서 -OH기가 -Me(메틸), -OMe, -NH<sub>2</sub>, -F(불소), -O-2-메톡시에틸-O-프로필, -O-2-메틸티오에틸(methylthioethyl), -O-3-아미노프로필, -O-3-디메틸아미노프로필, -O-N-메틸아세트아미도 또는 -O-디메틸아미도옥시에틸로의 치환에 의한 변형;
- [45] 뉴클레오타이드 내 당구조 내의 산소가 황으로 치환된 변형; 및
- [46] 뉴클레오타이드간 결합이 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 보라노 포스페이트(borano phosphophate) 또는 메틸 포스포네이트(methyl phosphonate) 결합으로의 변형을 포함한다.
- [47] 아울러, 본 발명은 본 발명의 RNA 앵타머와 생체 적합성(biocompatibility)을 가지는 거대 고분자 물질이 접합된 앵타머-복합체를 제공하나 이에 한정하지 않고, 상기 거대 고분자 물질은 폴리에틸렌글리콜(PEG), 디아실글리세롤(DAG) 또는 단클론항체(monoclonal antibody)인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

- [48] 본 발명은 본 발명의 RNA 앵타머fmf 포함하는 암 또는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [49] 상기 암은 IL-8 과발현으로 유도되는 구강암 및 피부암인 것이 바람직하고, 본 발명의 바람직한 실시예에 의하면 구강암인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [50] 아울러, 상기 염증성 질환은 피부염, 아토피, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 대장염, 치질, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통(fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome), 다발성 경화증, 및 급성 및 만성 염증 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [51]
- [52] 본 발명의 RNA 앵타머를 함유하는 조성물은 상기 성분에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- [53] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엷, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 덱스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 ~ 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [54] 즉, 본 발명의 조성물은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 RNA 앵타머에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose), 락토오스(Lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사

가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로폴, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[55] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하고, 국부적 면역억제 치료를 위해 필요하다면 병변 내 투여를 포함하는 적합한 방법에 의해 투여된다. 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.

[56] 본 발명의 조성물은 신경보호를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[57]

[58] 이하, 본 발명을 실시예 및 제조예에 의해서 상세히 설명한다.

[59] 단, 하기 실시예 및 제조예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 제조예에 의해서 한정되는 것은 아니다.

[60]

#### 발명의 실시를 위한 형태

[61] <실시예 1> 시험관 내에서 IL-8에 대한 RNA 앵타머의 선별, 복제 및 서열확인

[62] <1-1> SELEX를 이용한 RNA 앵타머 선별

[63] 사람 IL-8에 대한 RNaseA-저항성(RNaseA-resistant) RNA 앵타머를 수득하기 위하여, CTP 및 UTP를 대신해 2'-F-dCTP 및 2'-F-dUTP를 각각 사용하여 SELEX를 수행하였다.

[64] 구체적으로, 고정된 링커부위(linker region), T7 프로모터(promoter) 및 제한효소위치(restriction enzyme site)가 옆에 배치된, 40개의 무작위 단일-가닥 DNA 라이브러리(randomized single-stranded DNA library)를 같은몰(equimolar)의 dNTP 혼합체(mix)와 혼합하고, 0.25 uM의 5'- 및 3'- 프라이머를 각각 첨가한 후, 중합연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 10회(10 cycle) 수행하여 이중-가닥(double-stranded) DNA로 전환하였다. 상기 5'- 및 3'- 프라이머는 하기의 서열로 바이오니아(대전, 대한민국)에서 합성되었다.

[65] DNA 라이브러리(N40, 40 무작위 뉴클레오티드 서열):

5'-GGGAGAGCGGAAGCGTGCTGGGCCN40CATAACCCAGAGGTCGATGGAT  
CCCCC-3',

[66] 5'-프라이머(서열번호 1):

5'-GGTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCGGAAGCGTGCTGGG-3', 및

[67] 3'-프라이머(서열번호 2): 5'-GGGGGGATCCATCGACCTCTGGGTTATG-3.

[68] SELEX를 위한 시작물질(starting material)인 늘어난 상기 40개의 무작위

뉴클레오티드를 포함하는 2'-플루오르-피리미딘-변형된 RNA 라이브러리(2'-fluoro-pyrimidine-modified RNA library)는 두라스크리브 T7 전사 키트[DuraScribe T7 Transcription Kit, 에피센터 바이오테크놀로지(Epicentre Biotechnologise), 매디슨, WI, 미국)의 제조사의 설명서(manufacturer's instructions)에 따라, 상기 PCR 결과 산물을 시험관 내에서 전사과정을 통해 제작하였다. 상기 전사반응은 T7 프로모터를 갖는 0.2 ug의 이중-가닥 DNA 주형, 5 mM ATP, 5 mM GTP, 5mM 2'-F-dCTP, 5 mM 2'-F-dUTP, 10 mM DTT 및 1 ul 두라스크리브 T7 효소 혼합체(DuraScribe T7 enzyme mix)를 포함하는 20 ul 두라스크리브 T7 반응 용액(DuraScribe T7 reaction buffer)을 37°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 그리고나서, 상기 혼합체에 DNase I(에피센터 바이오테크놀로지)을 37°C에서 15분 동안 처리한 후, 8% 아크릴아마이드(acrylamide)/7 M 우레아(urea) 겔(gel)에서 전기영동으로 분리된 RNA를 페놀(phenol)/클로로포름(chloroform) 추출(extraction), 에탄올 침전(precipitation) 및 용출 완충액(elution buffer)[500 mM 초산 암모늄(ammonium acetate), 1 mM EDTA, 0.2%(w/v), 도데실 황산 나트륨(sodium dodecyl sulfate, SDS), pH0.7]으로 용출하여 채수득하였다. 각각의 SELEX 회(cycle)을 위한 라이브러리 RNA 풀(pool) 또는 RNA 풀은 His-GRO- $\alpha$ , His-GRO- $\beta$ , 또는 자성 비드(magnetic bead)에 결합하는 RNA를 제거하기 위하여, 200 ul 결합 완충액(binding buffer)[30 mM Tris-HCl(pH 7.5), 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 및 1% BSA]에 200 nM 제조합 사람 His-GRO- $\alpha$  또는 His-GRO- $\beta$  단백질 및 10 ul MagneHis Ni 입자(particles)(프로메가, 매디슨, WI, 미국)와 함께 실온에서 30분 동안 교반하여(shaking) 전처리하였다. 전처리된 RNA 풀은 100 nM His-IL-8 단백질[펠단(feldan)]과 결합 측정법(binding assay)을 수행하기 위하여, 실온에서 30분간 교반 반응시켰고, 이때 생성된 RNA-IL-8 복합체는 비드와 침전물을 형성한다. 상기 형성된 침전물은 결합 완충액으로 4번 세척하고, 37°C에서 1시간 동안 200 ug/ml 단백질 가수분해효소 K(proteinase K)를 처리하여, IL-8 단백질에 결합한 RNA를 용출하였다. 상기 채수득된 RNA는 RT-PCR을 통해 증폭되고, 다음 SELEX를 수행하기 위한 RNA 풀을 생성하기 위하여 시험관 내에서 전사되었다. His-IL-8의 농도는 보다 엄격한 조건을 위해 매 5회마다 2배씩 감소하였고, 15회를 이어서 수행한 후, 선택된 RNA는 RT-PCR로 증폭하였다. 상기 증폭된 PCR 산물은 pcDNA3(인비트로젠, 칼스배드, CA, 미국)에 복제한 후, 대장균(DH5 $\alpha$ )으로 형질전환하였다.

- [69] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 15개의 IL-8-특이적 RNA를 수득하였고(서열번호 11 내지 21), 상기 수득된 RNA 풀의 IL-8-특이적 결합 측정결과, SELEX를 수행하기 전의 RNA 라이브러리에 비해서 약 19배 정도 높은 결합력을 나타내는 것을 확인하였고(도 1A), 또한, 도 1B에 나타난 바와 같이 상기 수득된 RNA는 서열 유사성에 따라서 몇 개의 군으로 나뉘었다(도 1B).

[70]

[71] <1-2> 방사선 표지된 RNA 결합 측정법을 이용한 IL-8과 결합력 확인

[72] 상기 실시예 <1-1>에서 수득한 앵타머가 IL-8과 특이적으로 높은 결합력을 갖는지 확인하기 위하여, 방사선 표지된 RNA 결합 측정법을 수행하였다.

[73] 구체적으로, 1 ug RNA를 20 U CIAP[타카라(TaKaRa), 도쿄, 일본]와 함께 37°C에서 30분간 처리하여 탈인산화 시키고, 상기 탈인산화된 RNA는 페놀/클로로포름 추출 및 에탄올 용출로 정제하였다. 정제된 RNA를 10 U T4 폴리뉴클레오티드 키나아제(T4 polynucleotide kinase)로 37°C에서 30분간 처리하여, <sup>32</sup>P-표지된  $\gamma$ -ATP[펄킨엘머(PerkinElmer), 월섬(Waltham), MA, USA]로 인산화시켰다. 그 후, 상기 실시예 <1-1>과 동일한 방법으로 결합 측정법을 수행하는데, 이때, 50 nM 라이브러리 및 IL-8-특이적 RNA(표지되지 않은 것:표지된 것 = 10:1)를 25 nM His-GRO- $\alpha$ , His-GRO- $\beta$ , 또는 His-IL-8 단백질 및 10 ul 자성 Ni 입자를 포함하는 200 ul 결합 완충액으로 수행하였다. 단백질을 가수분해효소 K로 용출된, IL-8 결합하는 RNA는  $\beta$ -신틸레이션 계수기(scintillation counter, 베크만, 콜터, CA, 미국)를 사용하여 분당계수율(counter per minute, cpm)을 측정하여 분석하였다.

[74] 그 결과, 도 1C에 나타난 바와 같이, #8 앵타머가 특이적으로 His-IL-8에 결합하고, 다른 CXC-케모카인(chemokine)인 His-GRO- $\alpha$  및 His-GRO- $\beta$ 에는 결합하지 않음을 확인하였다(도 1C). 따라서, 본 발명의 상기 #8 앵타머를 8A-W(서열번호 16)로 명명하였다.

[75]

[76] <1-3> IL-8에 특이적으로 결합하는 앵타머의 잘라진 형태(truncated form) 제작

[77] IL-8에 결합하여 이의 기능을 억제하는 최소 서열을 확인하기 위하여, IL-8 8A-W(서열번호 16)를 5'말단 및 3'말단에서부터 연속적으로 잘라내고자 하였다(serially truncate). 이를 위하여, 하기 1F(서열번호 3), 1R(서열번호 4), 2F(서열번호 5) 및 2R(서열번호 6)의 프라이머를 조합하여 당업계에 널리 알려진 방법으로 PCR을 수행하여 4 종류의 잘라진 PCR 산물을 수득하였다[8A-1F1R, 8A-2F2R, 8A-2F1R, 8A-44(8A-1F2R, 서열번호 23)]. 또한 프라이머 35F(서열번호 7)/35R(서열번호 8) 및 30F(서열번호 9)/30R(서열번호 10)을 사용하여 상기 8A-44(8A-1F2R, 서열번호 23)으로부터 잘라진 산물 8A-35(서열번호 24), 및 8A-30(서열번호 25)을 추가적으로 수득하였다.

[78] 이때, 하기의 프라이머가 PCR에 사용되었다:

[79] 1F(서열번호 3):

5'-GGTAATACGACTCACTATAGGGGGCTTATCATTCCATTTAGTG-3',

[80] 1R(서열번호 4): 5'-GGGTTATGTCTGATGGGAAG-3',

[81] 2F(서열번호 5):

5'-GGTAATACGACTCACTATAGGGTCCATTTAGTGTTATGATAACC-3',

[82] 2R(서열번호 6): 5'-TGATGGGAAGGTTATCATAAC-3',

[83] 35F(서열번호 7):

- 5'-GGTAATACGACTCACTATAGGGGGCTTATCATTCCATTTAGT-3',  
 [84] 35R(서열번호 8): 5'-GGTTATCATAACACTAAATGGAATGATAAGCCC-3',  
 [85] 30F(서열번호 9):  
 5'-GGTAATACGACTCACTATAGGGTTATCATTCCATTTAGTGTTA-3', 및  
 [86] 30R(서열번호 10): 5'-TTATCATAACACTAAATGGAATGATAACC-3'.  
 [87] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 전체 서열의 RNA 및 이의 잘라진 RNA의  
 2차원 구조(secondary structure)는 M 폴드 프로그램(M fold program,  
<http://mfold.rna.albany.edu/?=mfold>)을 이용하여 예상하였다. 8A-W(서열번호  
 16)는 4개의 줄기(stem)/고리(loop)로 구성되어 있고, 8A-1F1R 및 8A-44(8A-1F2R,  
 ㅅ)는 주형인 8A-W(서열번호 16)의 가장 긴 주요 줄기/고리 부분이 남아있는  
 형태였다. 그러나, 8A-2F1R 및 8A-2F2R의 경우 주형인 8A-W와 전혀 다른  
 형태를 나타내었고, 따라서, 8A-W(서열번호 16)의 가장 긴 주요 줄기/고리  
 구조가 IL-8에 결합하는데 주요한 부분이라고 예측하였다.
- [88]  
 [89] <실시예 2> 8A-44(서열번호 23)가 IL-8로 유도된 호중구 이동(migration) 및  
 ERK 인산화 억제  
 [90] <2-1> 사람 혈액에서 호중구의 분리  
 [91] 히스토파케(Histopaque, 시그마 알드리치, 세인트루이스, MO, 미국)를 이용한  
 밀도 기울기 분리법(density gradient method)으로 전체 사람 혈액에서 호중구를  
 분리하였다.  
 [92] 구체적으로, 정맥혈(venous blood)을 같은 양의 히스토파케 용액 위에  
 조심스럽게 쌓아 올리고, 실온에서 1,500 rpm에서 30분 동안 원심분리 후, 호중구  
 막(적혈구 및 히스토파케 사이의 흰 막)을 모았다. 호중구 막에서 적혈구를  
 제거하기 위하여, 저삼투압의 용해(hypotonic lysis)가 수행되었다. 우선, 30 ml의  
 증류수를 첨가하여 부드럽게 피펫팅(pipetting)한 후, 상기 호중구 막에 최종 양이  
 10 ml이 되도록 PBS를 첨가하였다. 1분 후, 상기 용액에 10 ml 4% NaCl을  
 첨가하여 잘 섞고, 실온에서 1,200 rpm으로 7분간 원심분리를 수행하였다.  
 호중구를 수득하기 위해, RPMI1640 배지(웰진, 대구, 대한민국)로 세척하고, 10%  
 FBS가 첨가된 RPMI1640 배지를 이용하여 플레이트에 배양하였다.
- [93]  
 [94] <2-2> 호중구 이동 측정(migration assay)  
 [95] <실시예 1>의 방법으로 제조된 IL-8에 특이적으로 결합하는 앵타머가 IL-8의  
 기능을 억제하는지 확인하기 위해서 호중구 이동 측정법을 수행하였다.  
 [96] 구체적으로, 상기 <실시예 1>에서 수득한 다양한 농도의 RNA 앵타머 및 100  
 ng/ml IL-8(R&D 시스템)을 실온에서 30분간 무혈청 RPMI 1640 배지에 첨가하여  
 교반하며 전처리하였고, 상기 <2-1>의 방법으로 배양한 호중구를 모아서 무혈청  
 RPMI 1640 배지에 현탁하였다. 각각 웰의 아래 부분에 상기 IL-8 RNA 앵타머  
 혼합물을 넣고,  $2 \times 10^6$  세포를 트랜스웰 삽입(transwell insert) 부분에 두었다.

37°C에서 2시간 동안 배양한 후, 삽입 부분을 챔버(chamber)에서 제거하고, 각각 아래 웰에 WST-1(다카라)을 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 호중구의 이동은 마이크로플레이트 리더(microplate reader)를 이용하여 450 nm에서 샘플 내 포마잔(formazan)의 빛 흡수력(absorbance)을 측정함으로써 평가하였다.

- [97] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 IL-8-유도된 호중구 이동이 8A-W(서열번호 16), 8A-1F1R, 또는 8A-1F2R(8A-44, 서열번호 23) 처리에 의해서 농도-의존적으로 감소하였으나, 8A-2F2R 또는 8A-2F1R에 의해서는 영향을 받지 않음을 확인하였다. 상기 결과를 바탕으로 21 - 66 뉴클레오티드의 서열(8A-44, 서열번호 23)을 갖는 IL-8에 특이적으로 결합하는 앵타머가 IL-8에 결합하기 충분하고, IL-8 활성을 억제한다는 것을 확인하였다.

[98]

[99] <2-3> IL-8에 대하여 8A-44(서열번호 23) 앵타머의 결합력 확인

- [100] 상기 실시예 <2-2>의 결과에서 IL-8에 결합하기 충분한 21 - 66 뉴클레오티드 서열의 44머로 구성된 8A-44(8A-1F2R, 서열번호 23)의 IL-8에 대한 결합력을 확인하기 위하여, 음성대조군으로 8A-44(서열번호 23)의 상보적인 서열(8A-44COM, 서열번호 26))을 사용하였고, 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance, SPR) 기술을 사용하는 ProteOn XPR36 검정법(바이올래드 라보라토리, 허큘레스, CA, 미국)을 통해 IL-8에 대한 결합력을 측정하였다.

- [101] 구체적으로, 상기 검정법은 기존의 방법에 조금 변화를 주어 사용되었다. 10 mM 아세트산 나트륨 완충액(sodium acetate buffer, pH 8.0)에 His-표지된 IL-8 단백질을 1  $\mu$ M이 되도록 첨가하고, 아민 결합(amine coupling) 원리에 의해 GLM 센서 칩(sensor chip) 위에 고정되도록 유속 30  $\mu$ l/ml로 5분 동안 흘려주었다. 1 M 에탄올아민(ethanolamine)으로 칩 표면이 불활성화된 후, PBST 러닝완충액(running buffer)[10 mM 인산나트륨(sodium phosphate, pH 7.4), 150 mM NaCl, 및 0.005% 트윈(Tween) 20]으로 희석된 각각의 8A-44(서열번호 23) 앵타머를 20, 10, 5, 2, 1, 및 0 nM의 농도로 100  $\mu$ l/ml의 유속으로 1분 동안 수직으로 흘려주었다. 분리(dissociation)는 10분 동안 관찰하였고, 앵타머를 흘려주기 전에 재생기(regenerator)로 12.5 mM NaHO를 흘려주었다. 모든 상호결합 센서그램(sensorgrams)은 ProteOn 매니저 소프트웨어를 이용하여 수집, 가공 및 분석하였고, 채널 참조(channel reference)[인터스팟(interspot)]- 및 이중 참조(double reference)[0 nM, 빈칸(blank)]- 빠진(subtracted) 센서그램은 간단하게 1:1 랑뮈에 모델(Langmuir model)에 맞춰졌고, 결합(association,  $k_a$ ) 및 분리(dissociation,  $k_d$ ) 상수(constant)는 군으로 된 파라미터(parameters)에 맞춰졌다. 해리 평형상수(equilibrium dissociation constants,  $K_D$ )는 하기의 <수학식 1>에 의해 계산되었다. 모든 센서그램의 R최대(Rmax)는 200 공명단위(resonance units, RUs) 미만이고, 반면에 계산된 각 앵타머의  $\chi^2$  값은 약 5 RU이다.

- [102] 그 결과, 도 4 및 표 1에 나타난 바와 같이, IL-8에 대한 8A-44(서열번호 23)의  $K_D$

값이 5.15 nM로 높은 결합력을 보였으나, 높은  $k_d$  값( $2.73 \times 10^{-2} \text{s}^{-1}$ ) 때문에 결합된 8A-44(서열번호 23)는 빠른 속도로 분리되었다. 대조군인 8A-44COM(서열번호 8A0-44(서열번호 26)은 IL-8에 결합하지 않았다(결과는 나타내지 않음).

[103] 표 1

[Table 1]

| 파라미터  | $k_a$              | $k_d$                 | $K_D$                 |
|-------|--------------------|-----------------------|-----------------------|
| 단위    | 1/Ms               | 1/s                   | M                     |
| 8A-44 | $5.30 \times 10^6$ | $2.73 \times 10^{-2}$ | $5.15 \times 10^{-9}$ |

[104]

[105] <2-4> 8A-44(서열번호 23) 앵타머의, IL-8 유도된 호중구의 이동 및 ERK 인산화 억제 효과 확인

[106] 8A-44(서열번호 23) 앵타머가 IL-8로 유도된 호중구 이동을 억제하는지 상기 실시예 <2-2>와 동일한 방법을 사용하여 확인하였고, 또한 8A-44(서열번호 23)가 호중구에서 ERK 인산화를 억제하는지 확인하기 위하여 웨스턴 블랏(western blot)을 수행하였다.

[107] 구체적으로, 1 내지 1000 nM의 8A-44(서열번호 23)와 100 ng/ml IL-8을 전처리하고, 호중구는 상기 실시예 <2-2>의 호중구 준비 방법에 따라 준비한다.  $2 \times 10^6$  cells/ml의 호중구에 RNA-IL-8 혼합물을 첨가하고, 실온에서 2분 30초간 인산화 반응을 시킨다. 상기 인산화 반응은 SDS 샘플 완충액(sample buffer)를 첨가하여 반응을 멈추고, 상기 혼합물은 항-인산-p44/42 MAPK(anti-phospho-p44/42)(p-ERK1/2), p44/42 MAPK(ERK1/2), 인산-Akt, Akt(셀 시그날링 테크놀로지, 덴버, MA, 미국), 및  $\beta$ -액틴( $\beta$ -actin) 항체(산타크루즈 바이오테크놀로지, 산타크루즈, CA, 미국)를 이용하여 당업계에 잘 알려진 방법으로 웨스턴 블랏을 수행하였다.

[108] 그 결과, 도 5A에 나타난 바와 같이, IL-8에 의해 유도된 호중구의 이동이 8A-44(서열번호 23) 처리에 의해 농도-의존적으로 유의적인 감소를 보였으나, 대조군인 8A-44COM(서열번호 26)은 아무런 영향을 나타내지 않는 것을 확인하였다. 또한, 도 5B에 나타난 바와 같이, 8A-44(서열번호 23)가 8A-44COM(서열번호 26)과는 대조적으로 높은 농도에서 IL-8에 의해 유도된 ERK 활성을 억제하는 것을 확인하였다. 상기 결과는 8A-44(서열번호 23)가 인간 IL-8에 특이적으로 결합하여 IL-8에 의해 유도되는 세포 내 신호전달(intracellular signaling)을 억제함을 나타낸다.

[109]

[110] <실시예 3> 8A-44(서열번호 23) 앵타머의 암 세포-유래 IL-8에 의해 유도된 구강 세포주의 침입(invasion) 억제

- [111] 공지된 바에 의하면 침윤성 구강암(invasive oral cancer) 환자에게서 IL-8의 수준이 증가하는 것이 확인되었다. 따라서, 본 발명의 8A-44(서열번호 23)가 IL-8을 억제함으로써, IL-8에 의해 유도된 구강암 세포의 침입을 억제할 수 있는지 확인하였다.
- [112] 구체적으로, 인간 구강암 세포주 HSC-3 및 686-LN-e는 DMEM 배지(웰진)에 10% FBS(서모 피셔 사이언티픽, 월섬, 미국)를 첨가하여, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건하에 배양하였다. 또한, 침입 검증법은 8.0  $\mu$ m 구멍 필터(pore filter)(코스타)를 갖는 6.5 mm 트랜스웰 챔버에서 수행하였다. 안쪽의 필터는 1 mg/ml 차가운 성장 인자-감소된 매트릭셀 매트릭스(ice-cold growth factor-reduced Matrigel matrix, BD 바이오사이언스, 프랭클린 레이크, NJ, 미국)으로 미리 가공하였고, 그리고 나서 37°C에서 하룻밤 동안 두어 고체화하였다. 0.1, 1 및 5  $\mu$ M 농도의 8A-44(서열번호 23) 앵타머 또는 1000 ng/ml IL-8 중화항체(neutralizing antibody)를 구강암 세포주(HSC-3 및 686-LN-e)에서 얻은 배지(conditioned media)와 함께 실온에서 섞어주며 30분간 전처리하였고, 구강암 세포주에 트립신 처리하여 세포주만 수득한 후, 무혈청 DMEM에 재현탁하였다. 상기 배지 안의 8A-44(서열번호 23) 앵타머는 각 웰의 아랫부분에 두었고, 각각의 트랜스웰 삽입부분(Transwell insert)에  $1 \times 10^5$  cells을 분주하였다. 37°C에서 24시간 동안 반응한 후, Diff-Quick 용액(시스맥스, 고베, 일본)으로 삽입부분을 고정하고 염색하였다. 염색된 세포들은 위상차 현미경(올림푸스, 도쿄, 일본)으로 촬영하였으며, 5군데의 현미경 시야(microscope field) 세포 수를 세었다.
- [113] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, HSC-3 및 686-LN-e 세포주의 배지-유도된 침입이 8A-44(서열번호 23) 앵타머의 농도 의존적으로 유의적인 감소를 보였고, 반면에 8A-44COM(서열번호 26)은 어떠한 영향도 미치지 않았다. 상기 결과는 8A-44(서열번호 23) 앵타머가 정제된 IL-8 및 자연적으로 분비된 세포-유래된 IL-8에 결합할 수 있으며, 이의 기능을 억제함을 나타낸다.
- [114]
- [115] <실시예 4> 절단 돌연변이(truncated mutation) 8A-30(서열번호 24) 및 8A-35(서열번호 25) 앵타머의 IL-8에 대한 결합력 확인
- [116] 상기 결과에 의해서 8A-44(서열번호 23)는 IL-8과 특이적으로 결합하여 이의 기능을 억제하기에 충분한 서열이 포함되어있음을 확인하였고, 이에 IL-8과 결합하여 이의 기능을 억제하는 최소한의 올리고뉴클레오티드를 확인하였다. 이를 위하여 8A-44(서열번호 23)의 절단된 형태인 8A-35(35머, 서열번호 24) 및 8A-30(30머, 서열번호 25)가 사용되었다. 8A-35(서열번호 24)는 8A-44(서열번호 23)의 3' 말단에서부터 9개의 뉴클레오티드가 절단된 형태고, 8A-30(서열번호 25)는 8A-35(서열번호 24)에서 5' 말단에서부터 3개 및 3' 말단에서부터 2개의 뉴클레오티드가 절단된 형태이며, 상기 두 앵타머 모두 주요 줄기(stem)/고리(loop) 구조는 보존되어 있다. 상기 두 앵타머를 이용하여 실시예

<2-3>의 방법을 사용하여, IL-8에 높은 결합력으로 결합하는지 확인하였다.

- [117] 그 결과, 도 7 및 표 2에 나타난 바와 같이, 8A-35(서열번호 24)의  $k_a$  값은 8A-44(서열번호 23)와 비슷하게  $1.71 \times 10^6 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 이었으나,  $k_d$  값은 8A-44(서열번호 23)와 비교하여 약 300배 감소한  $7.92 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$ 을 나타내어, 8A-35(서열번호 24)가 IL-8에  $K_D$  값 46.3 pM으로 강하게 결합함을 나타낸다. 또한, 8A-30(서열번호 25)의  $k_a$  및  $k_d$  값은 각각  $4.31 \times 10^6 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  및  $5.79 \times 10^{-2} \text{s}^{-1}$ 을 나타내어, 13.5 nM의  $K_D$  값을 갖고, 이는 8A-44(서열번호 23)와 비교했을 때, 약간의 변화를 나타내었다.

[118]

[119] 표 2

[Table 2]

| 파라미터  | $k_a$              | $k_d$                 | $K_D$                 |
|-------|--------------------|-----------------------|-----------------------|
| 단위    | 1/Ms               | 1/s                   | M                     |
| 8A-35 | $1.71 \times 10^6$ | $7.92 \times 10^{-5}$ | $4.63 \times 10^{-9}$ |
| 8A-30 | $4.31 \times 10^6$ | $5.79 \times 10^{-2}$ | $1.35 \times 10^{-8}$ |

[120]

- [121] <실시예 5> 8A-44(서열번호 23), 8A-35(서열번호 24) 및 8A-30(서열번호 25)가 호중구의 이동, ERK 및 Akt 신호 활성화, 및  $\text{Ca}^{2+}$  가동화(mobilization) 억제

- [122] 상기 절단된 형태의 앵타머들이 IL-8 억제효과를 유지하는지 확인하기 위하여, <상기 실시예 2-2> 및 <2-4>의 방법을 이용하여 IL-8로 유도된 호중구의 이동 및 ERK 활성화 억제를 확인하였고, 또한 호중구에서  $\text{Ca}^{2+}$  가동화(mobilization)를 억제하는지 확인하였다.

- [123] 구체적으로, 형광  $\text{Ca}^{2+}$  지표(indicator)와 함께 배양된 호중구에 있어서  $\text{Ca}^{2+}$  가동화의 측정은 분광형광 광도계(spectrofluorophotometer, RF-5301PC; 시마즈, 교토, 일본)를 사용하였다. 바로 분리된 호중구를 무혈청 RPMI 1640 배지에 4 uM 푸라-2(fura-2) AM를 첨가하여 37°C에서 40분간 교반 반응시키고, 3번 세척한 후, 무혈청 RPMI 1640 배지에 재현탁 하였다. 2-푸라 AM을 반응시키는 동안, IL-8 및 본 발명의 앵타머[CTL, 8A-44(서열번호 23), 8A-35(서열번호 24) 및 8A-30(서열번호 25)]는 상온에서 30분간 전처리하였다. 푸라-2 AM이 첨가된 세포주는  $8 \times 10^5$  cells의 밀도로  $\text{Ca}^{2+}$ 가 없는 록케 용액(Locke's solution)[154 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 1.2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM HEPES(pH 7.3), 10 mM 글루코스, 및 0.2 mM EGTA]에 재현탁되어, IL-8(20 ng/ml) 및 앵타머(2, 20nM)의 혼합체와 전처리하였다. 형광비율(fluorescence ration)의 변화(340/380 nm)는 340 nm 및 380 nm의 이중의 흥분파장(dual excitation wavelength) 및 500 nm의 방출파장(emission wavelength)으로 확인되었다.

- [124] 그 결과, 도 8A에 나타난 바와 같이, 8A-35(서열번호 24) 및 8A-30(서열번호 25)의 IL-8-유도된 호중구 이동억제는 8A-44(서열번호 23)와 같이

농도-의존적이었다. 또한, 도 8B에 나타난 바와 같이, IL-8-유도된 ERK 및 Akt 신호전달의 억제능력 또한 농도-의존적으로 8A-35(서열번호 25) 및 8A-30(서열번호 26)에 의해서 억제되었다. 또한, 도 9에 나타난 바와 같이, 8A-44(서열번호 24), 8A-35(서열번호 25) 및 8A-30(서열번호 26)을 처리하였을 때, 농도-의존적으로 IL-8-유도된 세포 내  $Ca^{2+}$  가동화가 감소하고, 특히 8A-35(서열번호 26)는 낮은 농도인 20 nM에서도 완전하게  $Ca^{2+}$  가동화를 차단하였다. 상기 결과는 8A-44(서열번호 24), 8A-35(서열번호 25) 및 8A-30(서열번호 26)이 인간 IL-8에 결합하여 IL-8-유도된 세포 내 신호전달 경로(pathway)를 효과적으로 억제함을 나타낸다.

[125]

[126] &lt;제조예 1&gt; 약학적 제제의 제조

[127] &lt;1-1&gt; 산제의 제조

[128] 본 발명의 RNA 앵타머 2 g

[129] 유당 1 g

[130]

[131] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[132]

[133] &lt;1-2&gt; 정제의 제조

[134] 본 발명의 RNA 앵타머 100 mg

[135] 옥수수전분 100 mg

[136] 유 당 100 mg

[137] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[138] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[139]

[140] &lt;1-3&gt; 캡슐제의 제조

[141] 본 발명의 RNA 앵타머 100 mg

[142] 옥수수전분 100 mg

[143] 유 당 100 mg

[144] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[145] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[146]

[147] &lt;1-4&gt; 환의 제조

[148] 본 발명의 RNA 앵타머 1 g

[149] 유당 1.5 g

[150]

[151] 글리세린 1 g

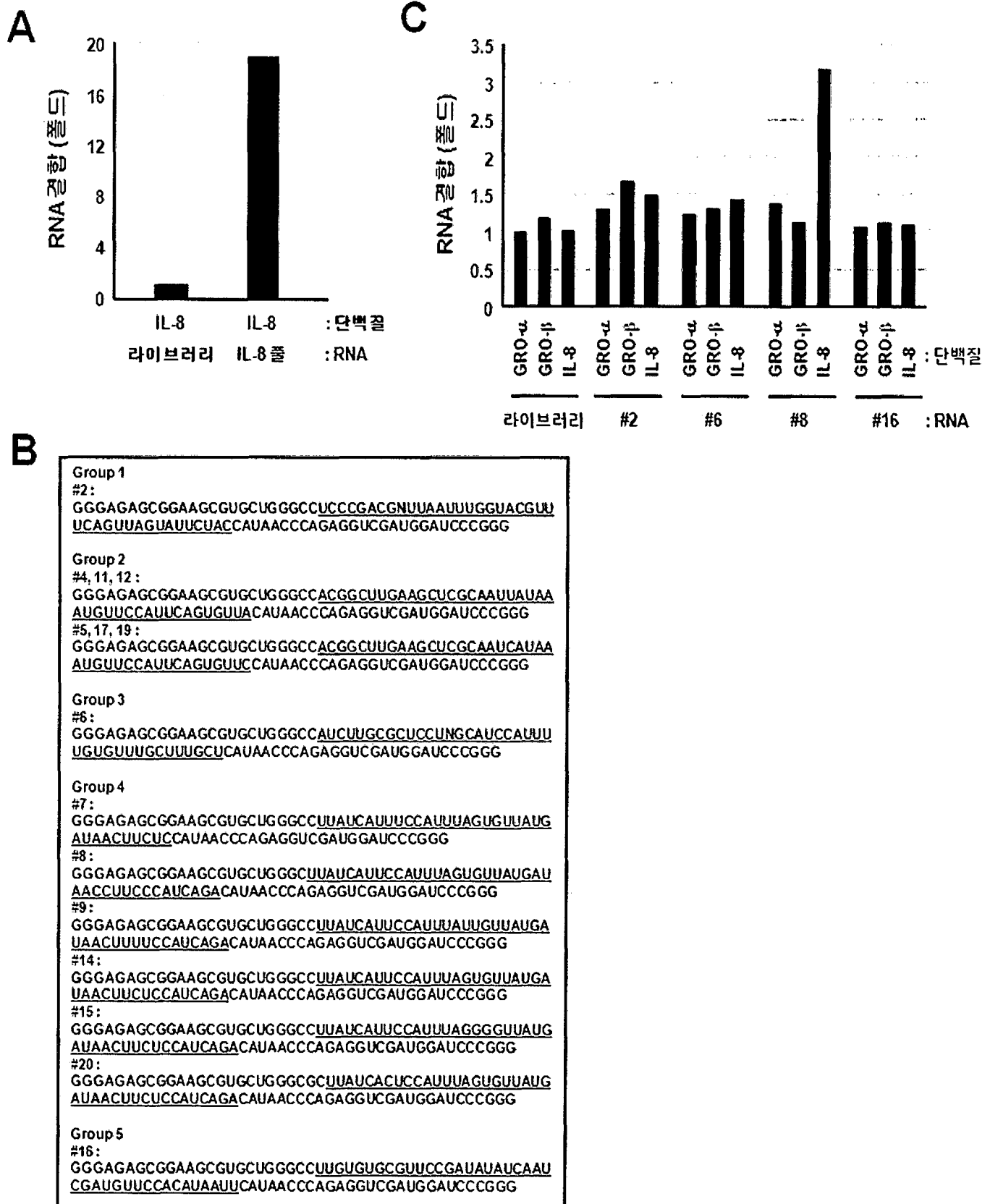
- [152] 자일리톨 0.5 g
- [153] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1환 당 4 g이 되도록 제조하였다.
- [154]
- [155] <1-5> 과립의 제조
- [156] 본 발명의 RNA 앵타머 150 mg
- [157] 대두추출물 50 mg
- [158] 포도당 200 mg
- [159] 전분 600 mg
- [160] 상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 섭씨 60°C에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하였다.
- [161]
- [162] <제조예 2> 주사액제의 제조방법
- [163] 본 발명의 RNA 앵타머 100 nM을 유효성분으로 함유하는 주사액제는 다음과 같은 방법으로 제조하였다.
- [164] 5'-클로로-3,2'-디하이드록시찰콘 또는  
5'-클로로-2,3'-디하이드록시찰콘 · 염산염 1 g, 염화나트륨 0.6 g 및  
아스코르브산 0.1 g을 증류수에 용해시켜서 100 ml을 만들었다. 이 용액을 병에  
넣고 20°C에서 30 분간 가열하여 멸균시켰다.
- [165] 상기 주사액제의 구성성분은 다음과 같다.
- [166] 본 발명의 RNA 앵타머 5  $\mu$ g(100nM)
- [167] 5'-클로로-3,2'-디하이드록시찰콘, 또는
- [168] 5'-클로로-2,3'-디하이드록시찰콘 · 염산염 1 g
- [169] 염화나트륨 0.6 g
- [170] 아스코르브산 0.1 g
- [171] 증류수 정량

## 청구범위

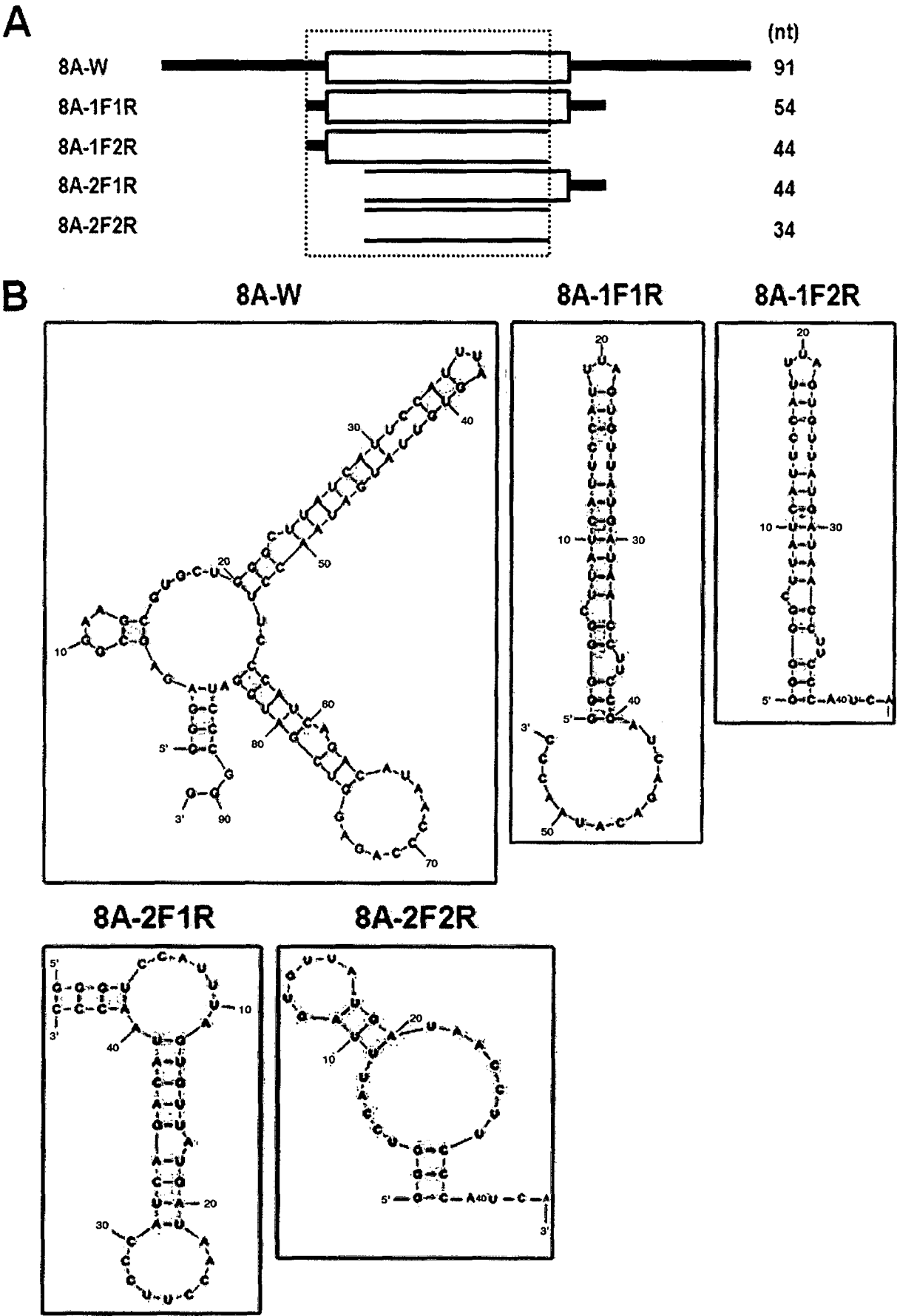
- [청구항 1] IL-8(interleukin-8)에 특이적으로 결합하는 30개의 RNA로 이루어진 RNA 앵타머로서, 상기 앵타머의 5'말단으로부터 4번째 내지 30번째 염기는 서열번호 22의 염기로 이루어진 것을 특징으로 하는 RNA 앵타머.
- [청구항 2] IL-8에 특이적으로 결합하는 35개의 RNA로 이루어진 RNA 앵타머로서, 상기 앵타머의 5'말단으로부터 7번째 내지 30번째 염기는 서열번호 22의 염기로 이루어진 것을 특징으로 하는 RNA 앵타머.
- [청구항 3] IL-8에 특이적으로 결합하는 44개의 RNA로 이루어진 RNA 앵타머로서, 상기 앵타머의 5'말단으로부터 7번째 내지 30번째 염기는 서열번호 22의 염기로 이루어지고, 1번째 내지 6번째 염기 및 30번째 내지 44번째 염기는 각각 서열번호 27 및 서열번호 28의 염기서열, 및 이와 80% 이상 상보적인 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 RNA 앵타머.
- [청구항 4] 제 1항 내지 제 3항에 있어서, 상기 RNA 앵타머는 IL-8에 결합하여 IL-8로 유도되는 기능을 억제하는 것을 특징으로 하는 RNA 앵타머.
- [청구항 5] 제 1항 내지 제 3항에 있어서, 상기 RNA 앵타머는 하나의 주요 줄기(main stem) 및 하나의 고리(loop) 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 RNA 앵타머.
- [청구항 6] 제 1항 내지 제 3항에 있어서, 상기 RNA 앵타머는 RNaseA 저항성을 갖는 것을 특징으로 하는 RNA 앵타머.
- [청구항 7] 제 1항 내지 제 3항에 있어서, 상기 RNA 앵타머는 하기의 군으로부터 선택된 하나 이상의 변형을 포함하는 것을 특징으로 하는 RNA 앵타머:  
 뉴클레오타이드 내 당구조의 2' 탄소위치에서 -OH기가 -Me(메틸), -OMe, -NH<sub>2</sub>, -F(불소), -O-2-메톡시에틸-O-프로필, -O-2-메틸티오에틸(methylthioethyl), -O-3-아미노프로필, -O-3-디메틸아미노프로필, -O-N-메틸아세트아미도 또는 -O-디메틸아미도옥시에틸로의 치환에 의한 변형;  
 뉴클레오타이드 내 당구조 내의 산소가 황으로 치환된 변형; 및  
 뉴클레오타이드간 결합이 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 보라노 포스페이트(borano phosphophate) 또는 메틸 포스포네이트(methyl phosphonate) 결합으로의 변형.
- [청구항 8] 제 1항 내지 제 3항 중 선택되는 어느 한 항에 따른 RNA 앵타머와 생체 적합성(biocompatibility)을 가지는 거대 고분자 물질이 접합된

- 애타머-복합체.
- [청구항 9] 제 8항에 있어서, 상기 거대 고분자 물질은 폴리에틸렌글리콜(PEG),디아실글리세롤(DAG) 또는 단클론항체(monoclonal antibody)인 것을 특징으로 하는 애타머-복합체.
- [청구항 10] 제 1항 내지 제 3항의 애타머를 포함하는 암 또는 염증성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 11] 제 10항에 있어서, 상기 암은 IL-8 과발현으로 유도되는 구강암 및 피부암인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.
- [청구항 12] 제 10항에 있어서, 상기 염증성 질환은 피부염, 아토피, 건선, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 대장염, 치질, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통(fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome), 다발성 경화증, 및 급성 및 만성 염증 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

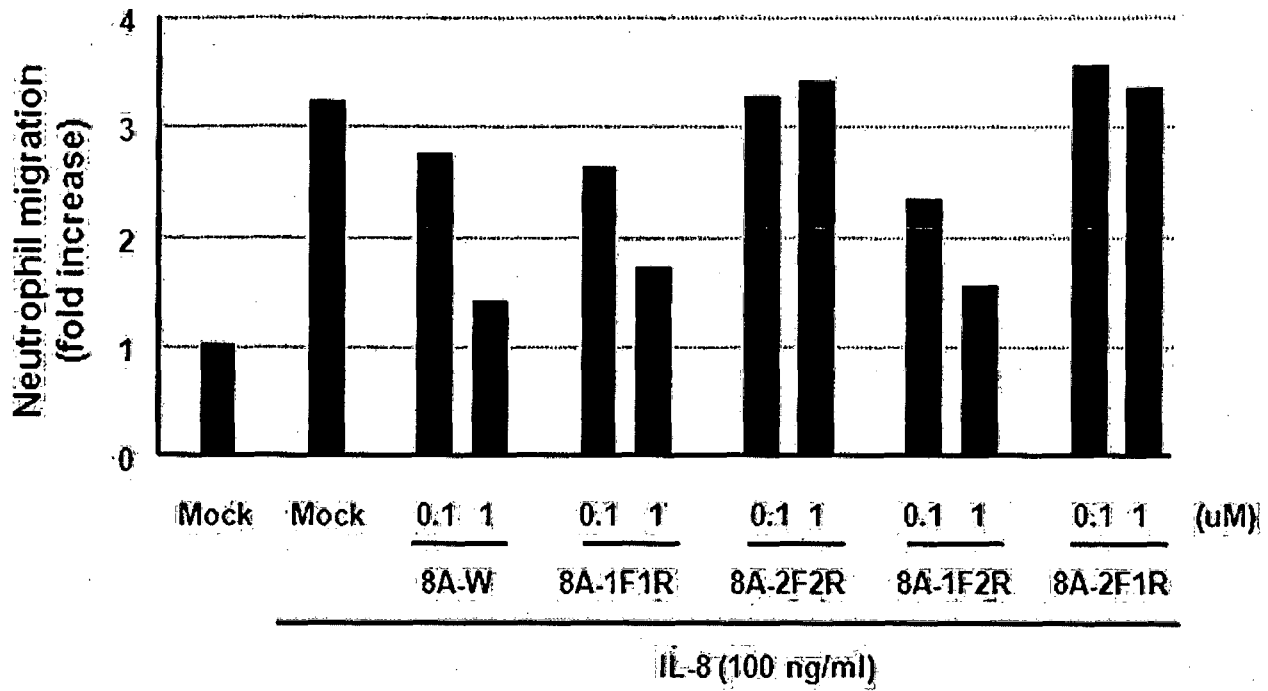
[Fig. 1]



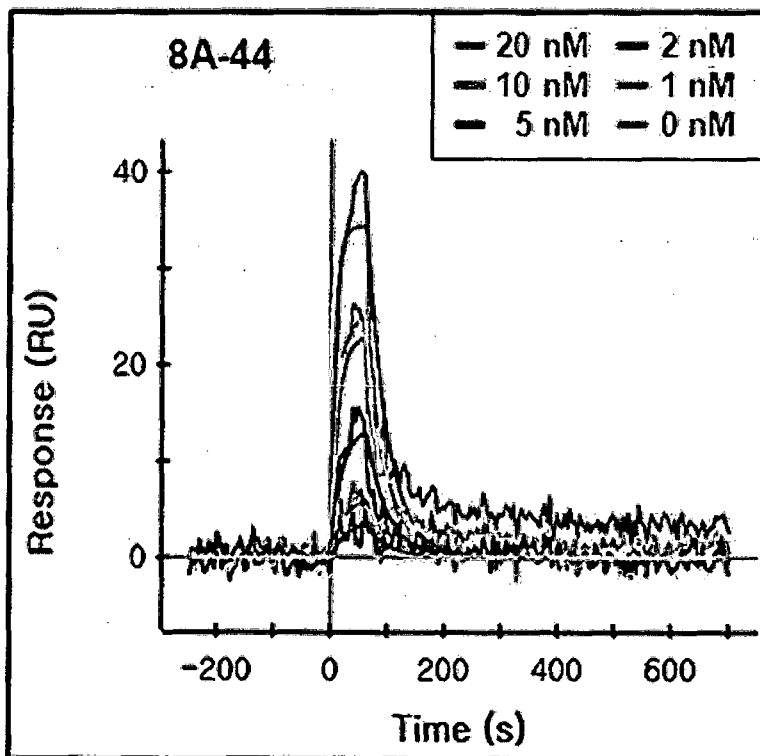
[Fig. 2]



[Fig. 3]

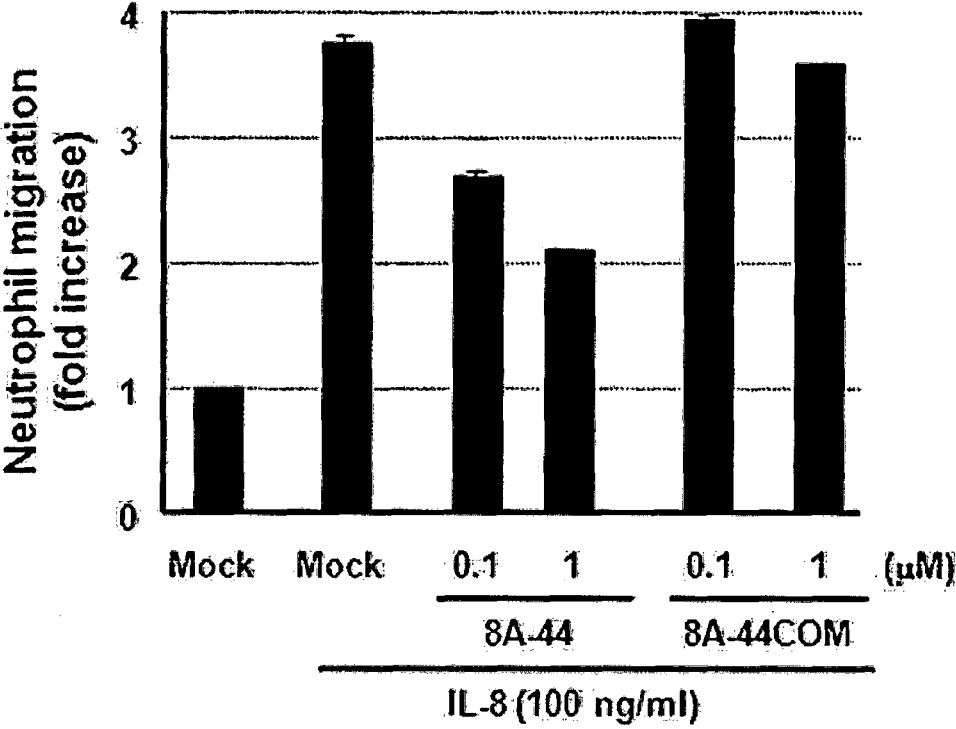


[Fig. 4]

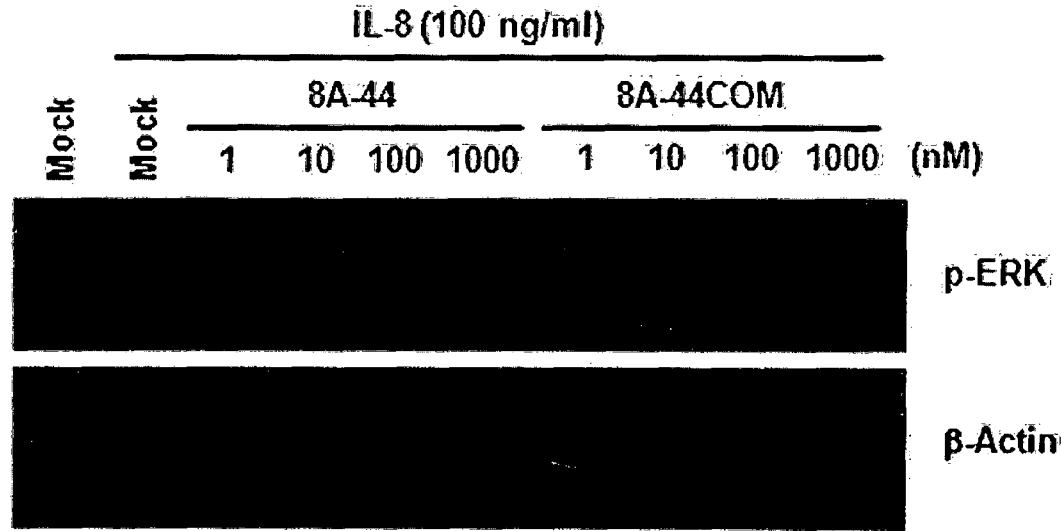


[Fig. 5]

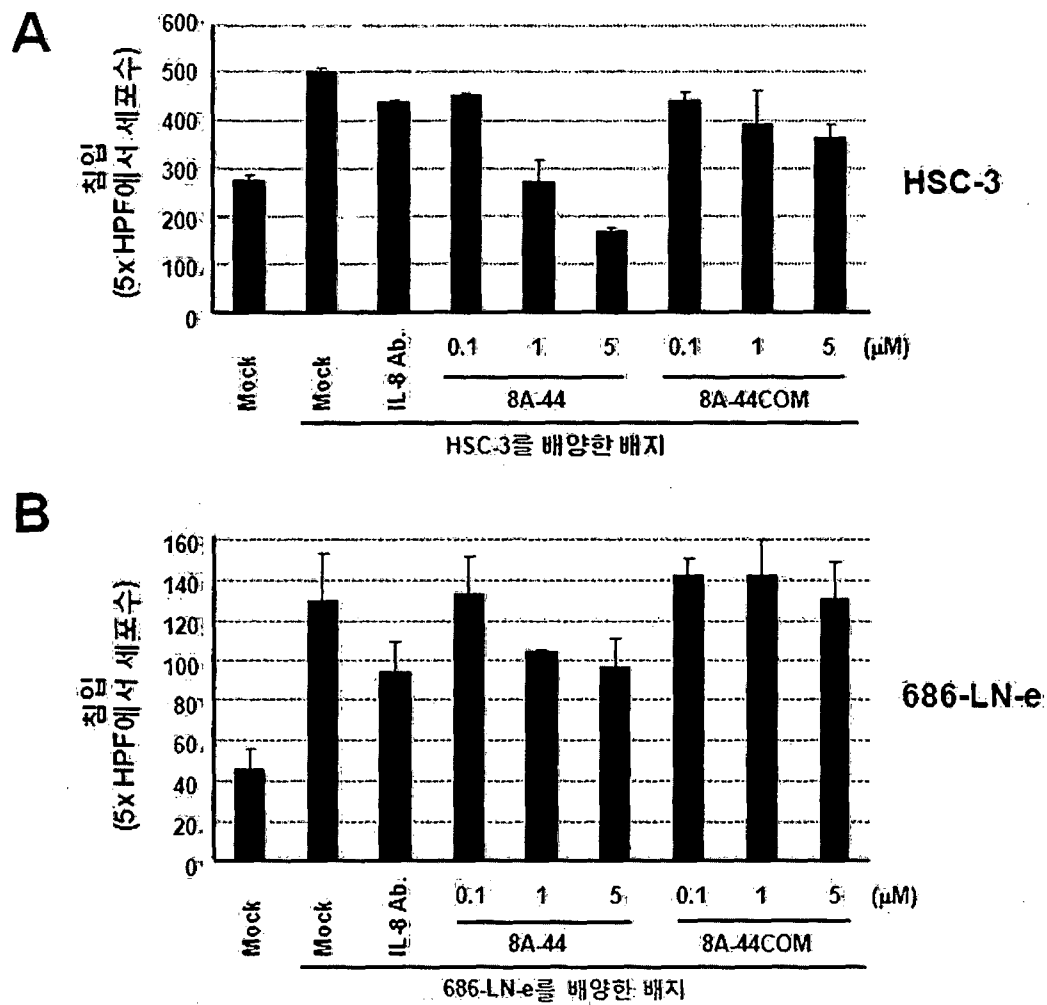
**A**



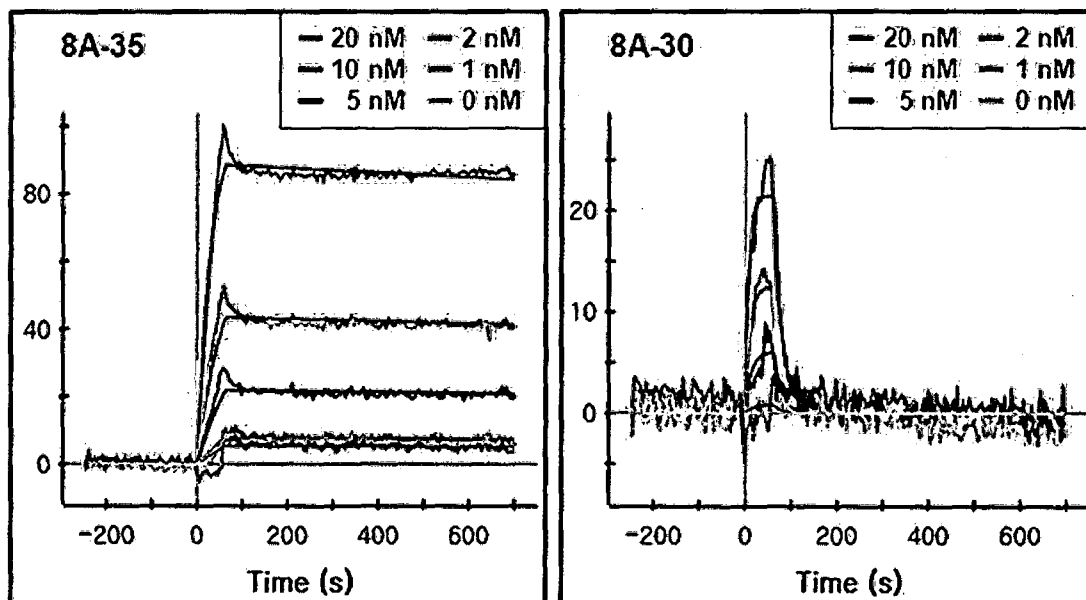
**B**



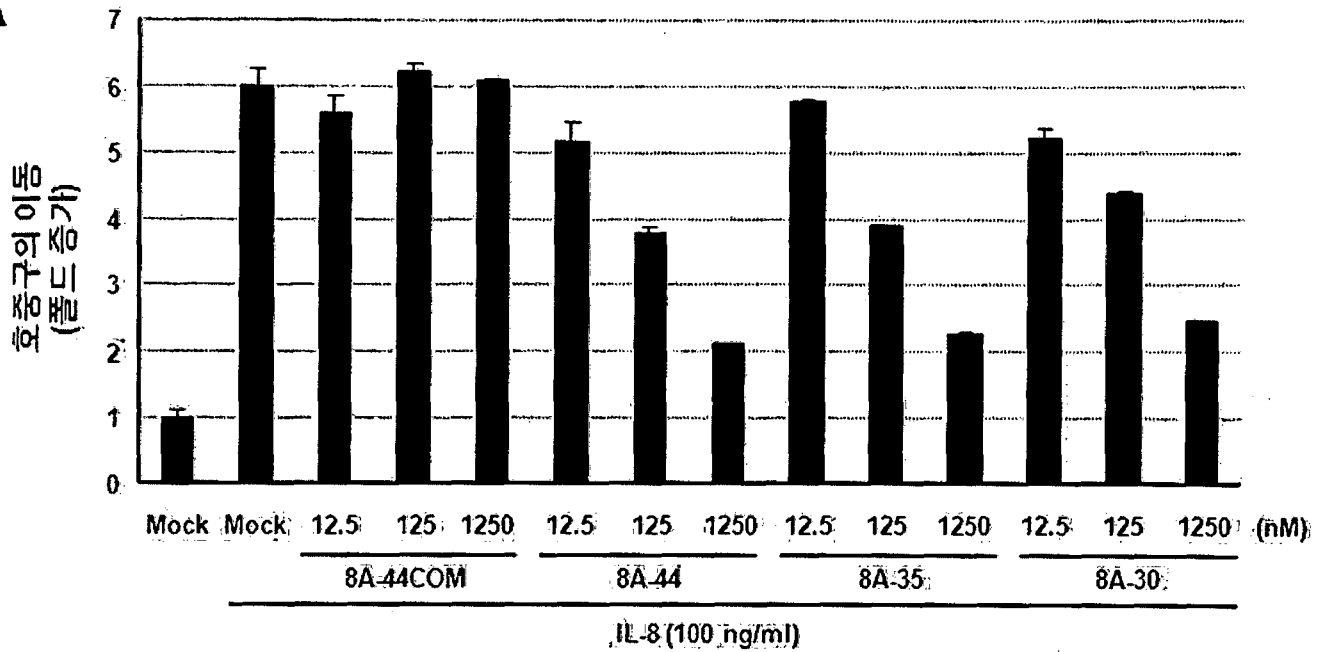
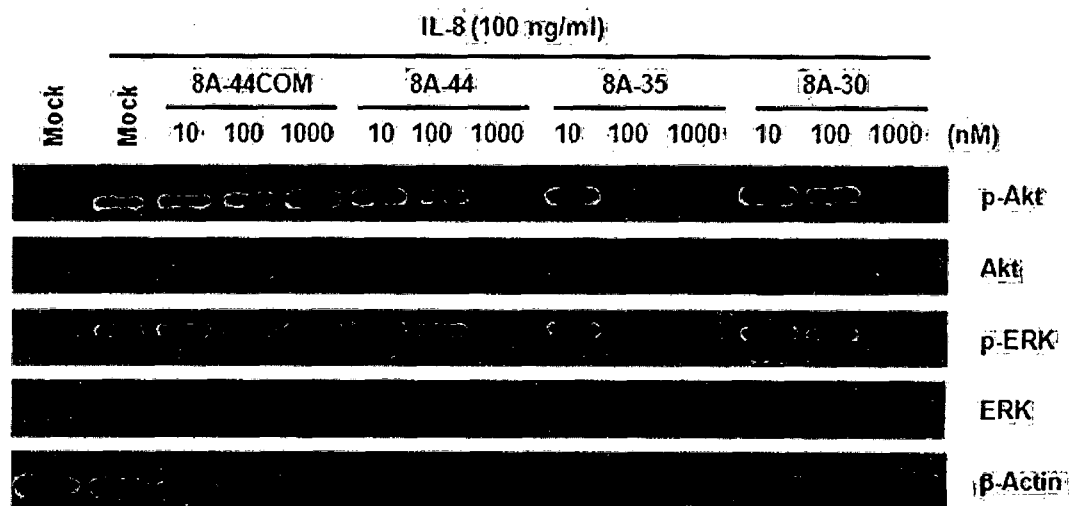
[Fig. 6]



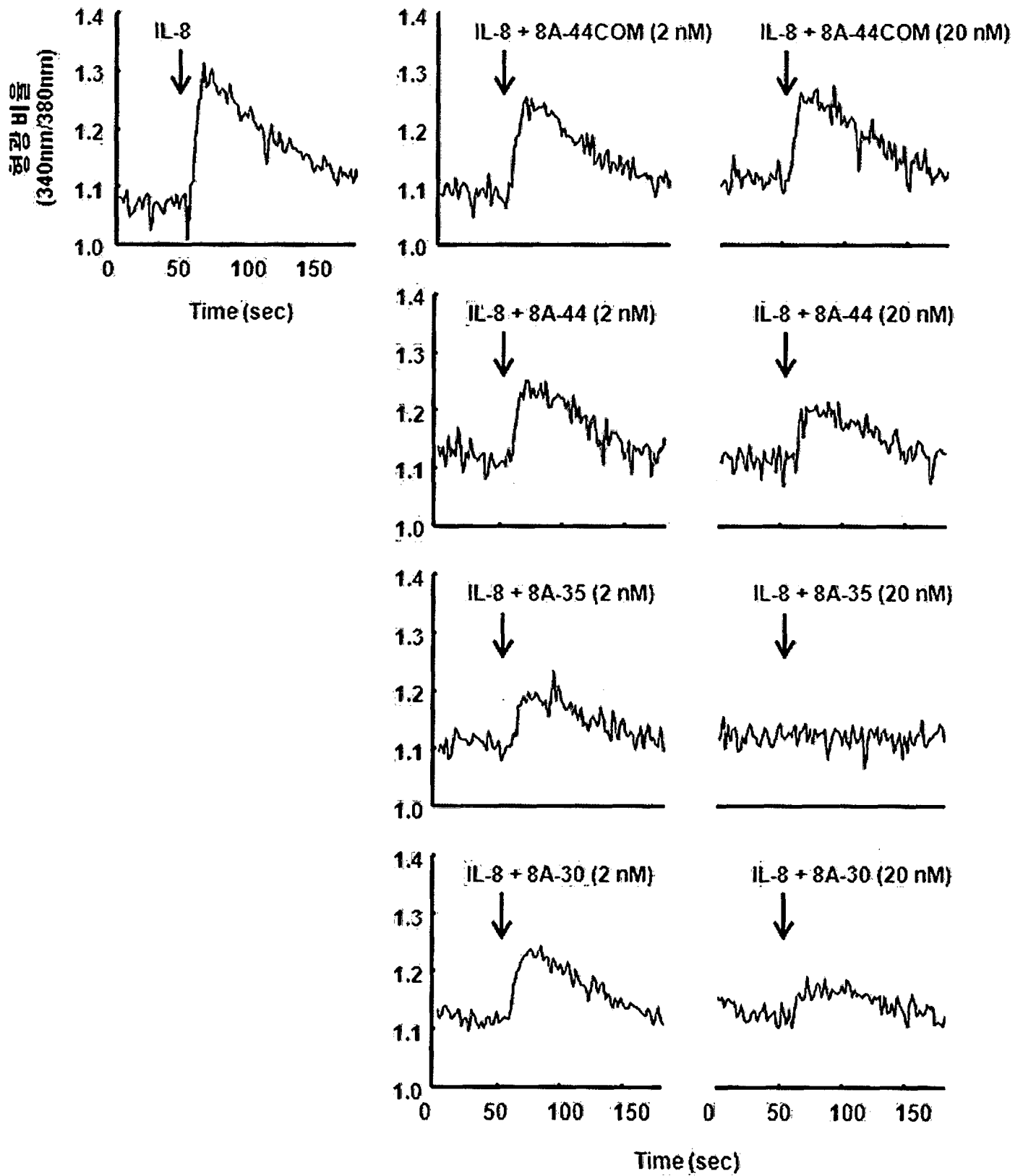
[Fig. 7]



[Fig. 8]

**A****B**

[Fig. 9]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/001776

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*C12N 15/115(2010.01)i, A61P 35/00(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)

C12N 15/115; A61P 35/00

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) &amp; Keywords: interleukin-8, RNA aptamer, SELEX, therapeutic agent

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                       | Relevant to claim No. |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | KIM S. et al. "Generation of antagonistic RNA aptamers specific to proinflammatory cytokine interleukin-32" Bull. Korean Chem. Soc. vol. 31, no. 12, pages 3561-3566(publication date: 2010)<br>See the entire document. | 1                     |
| A         | MEYER, C. et al. "Interleukin-6 receptor specific RNA aptamers for cargo delivery into target cells" RNA Biology, vol. 9, no. 1, pages 67-80 (publication date: January 2012).<br>See the entire document.               | 1                     |
| A         | ZHOU, J. et al. "Current progress of RNA aptamer-based therapeutics" Frontiers in Genetics, vol. 3, article 234(publication date: 02 November 2012).<br>See the entire document.                                         | 1                     |
| PX        | SUNG, H. et al. "Inhibition of human neutrophil activity by an activity by an RNA aptamer bound to interleukin-8" Biomaterials, vol. 35, Pages 578-589(publication date: 13 October 2013)<br>See the entire document.    | 1                     |



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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 JUNE 2014 (16.06.2014)

Date of mailing of the international search report

17 JUNE 2014 (17.06.2014)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office  
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,  
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/KR2014/001776**

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.: **2-12**  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
See extra sheet.
  
3. ☒ Claims Nos.: **4-7, 10**  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

### Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

<Continuation of Box No. II>

1. Claims 2 and 3 delimit 7th to 30th bases among aptamer configurations, that is 24 bases, to be consisting of the base of SEQ ID NO:22. However, SEQ ID NO:22 is unclear in that the aptamer configurations refer to a sequence consisting of 27 RNAs. In addition, claims 4 to 12 including the feature of claims 2 to 3 are also unclear for the same reason.
2. Claims 11 and 12 refer to claim 10, which is not drafted in accordance with the provisions of the second sentence in PCT Rule 6.4(a), and thus claims 11 and 12 are unclear.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2014/001776**

Patent document  
cited in search report

Publication  
date

Patent family  
member

Publication  
date

NONE

**A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))**

C12N 15/115(2010.01)i, A61P 35/00(2006.01)i

**B. 조사된 분야**

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 15/115; A61P 35/00

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: interleukin-8, RNA aptamer, SELEX, therapeutic agent

**C. 관련 문헌**

| 카테고리* | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재                                                                                                                                                               | 관련 청구항 |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| A     | KIM S. 등 'Generation of antagonistic RNA aptamers specific to proinflammatory cytokine interleukin-32' Bull. Korean Chem. Soc. Vol. 31, No. 12, Pages 3561-3566(공개일: 2010.)<br>본문 전체 참조. | 1      |
| A     | MEYER, C. 등 'Interleukin-6 receptor specific RNA aptamers for cargo delivery into target cells' RNA Biology, Vol. 9, No. 1, Pages 67-80 (공개일: 2012.1.).<br>본문 전체 참조.                     | 1      |
| A     | ZHOU, J. 등 'Current progress of RNA aptamer-based therapeutics' Frontiers in Genetics, Vol. 3, Article 234(공개일: 2012. 11. 2.).<br>본문 전체 참조.                                              | 1      |
| PX    | SUNG, H. 등 'Inhibition of human neutrophil activity by an activity by an RNA aptamer bound to interleukin-8' Biomaterials, Vol. 35, Pages 578-589(공개일: 2013.10.13.).<br>본문 전체 참조.        | 1      |



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

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

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

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

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2014년 06월 16일 (16.06.2014)

국제조사보고서 발송일

2014년 06월 17일 (17.06.2014)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

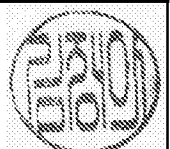
대한민국 특허청  
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,  
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

김정아

전화번호 +82-42-481-8747



제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☐ 청구항:  
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
2. ☒ 청구항: 2-12  
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,  
추가기재란에 계속
3. ☒ 청구항: 4-7, 10  
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에  
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

<제2기재란에서 계속>

1. 청구항 제2-3항은 청구하는 앵타머의 구성 중 7번째 내지 30번째 염기, 즉 24개의 염기를 서열번호 22의 염기로 이루어진 것으로 한정하고 있으나, 서열번호 22는 27개 RNA로 이루어진 서열로 청구하는 앵타머의 구성이 불명확합니다. 또한, 상기 청구항의 구성을 포함하는 제4-12항도 동일한 이유로 불명확합니다.
2. 청구항 제11-12항은 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 문장의 규정에 따라 작성되지 않은 청구항 제10항을 인용하고 있어 불명확합니다.

국제조사보고서에서  
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

없음