



- (51) 국제특허분류:
C12N 15/115 (2010.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2011/005852
- (22) 국제출원일: 2011년 8월 10일 (10.08.2011)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2011-0061939 2011년 6월 24일 (24.06.2011) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 포항 공과대학교 산학협력단 (POSTECH ACADEMY-INDUSTRY FOUNDATION) [KR/KR]; 경상북도 포항시 남구 효자동 산 31, 790-784 Kyungsangbuk-do (KR). 대한민국 (식품의약품안전청장) (KOREA FOOD & DRUG ADMINISTRATION) [KR/KR]; 충청북도 청원군 강외면 연제리 643, 363-951 Chungcheongbuk-do (KR).
- (72) 발명자; 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 이중환 (LEE, Jung Hwan) [KR/KR]; 경상북도 포항시 남구 지곡동 교수아파트 4동 702호, 790-751 Gyeongsangbuk-do (KR). 채영찬 (CHAE, Young Chan) [KR/KR]; 경상북도 포항시 남구 효자동 포항공과대학교 기숙사 18-417, 790-784 Gyeongsangbuk-do (KR). 김윤동 (KIM, Youndong)

[KR/KR]; 경상북도 포항시 남구 효자동 산 31번지 포항공과대학교 생명공학연구센터, 790-784 Gyeongsangbuk-do (KR). 강현구 (KANG, Hyungu) [KR/KR]; 대구 수성구 노변동 월드메르디앙아파트 109동 1405호, 706-230 Daegu (KR). 임종훈 (IM, Jong Hun) [KR/KR]; 서울 송파구 잠실5동 주공아파트 525동 509호, 138-917 Seoul (KR). 김종인 (KIM, Jong In) [KR/KR]; 경상북도 포항시 남구 지곡동 효자그린 2차아파트 239동 204호, 790-752 Gyeongsangbuk-do (KR). 김기석 (KIM, Ki Seok) [KR/KR]; 경상북도 포항시 남구 지곡동 낙원아파트 3동 302호, 790-751 Gyeongsangbuk-do (KR). 장승기 (JANG, Sung Key) [KR/KR]; 경상북도 포항시 남구 지곡동 교수아파트 7동 1002호, 790-751 Gyeongsangbuk-do (KR). 오일웅 (OH, Il Ung) [KR/KR]; 충청북도 청주시 흥덕구 사직동 푸르지오캐슬아파트 405동 2504호, 361-100 Chungcheongbuk-do (KR). 최민정 (CHOI, Min Jeong) [KR/KR]; 서울 강북구 미아동 삼각산아이원아파트 114동 902호, 142-100 Seoul (KR). 강원준 (KANG, Woon Jun) [KR/KR]; 경기도 고양시 일산동구 장항동 호수마을아파트 407동 1103호, 410-380 Gyeonggi-do (KR).

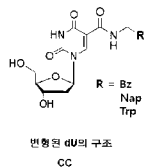
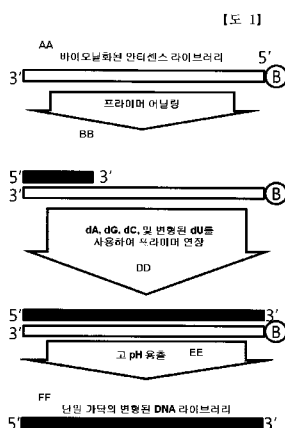
(74) 대리인: 유미특허법인 (YOU ME PATENT AND LAW FIRM); 서울 강남구 역삼동 649-10 서림빌딩, 135-080 Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: APTAMER WHICH SELECTIVELY BINDS TO ERBB2 RECEPTOR AND USES THEREOF

(54) 발명의 명칭: ERBB2 수용체에 선택적으로 결합하는 압타머 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a DNA aptamer which selectively binds to a breast cancer-related Her2 (ERBB2) receptor, and a composition for inhibiting cancer metastasis and a composition for diagnosing cancer which contain the DNA aptamer as an active ingredient, wherein the aptamer has a binding mechanism different from existing antibodies and thus can more effectively inhibit cancer metastasis and diagnose cancer.

(57) 요약서: 본 발명은 유방암 관련 Her2 (ERBB2) 수용체에 특이적으로 결합하는 DNA 압타머, 이를 유효성분으로 함유하는 압전이 억제용 조성물 및 암진단용 조성물에 관한 것으로, 상기 압타머는 기존의 항체와는 다른 결합 기작을 가짐으로써 보다 효과적으로 암 전이를 억제하고 암을 진단할 수 있는 것을 특징으로 한다.

AA ... Biotinylated antisense library
BB ... Primer annealing
CC ... Modified dU structure
DD ... Primer extension using dA, dG, dC, and modified dU
EE ... High pH elution
FF ... Single strand modified DNA library



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, QA, RO, RS, RU, 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, 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:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

【명세서】

【발명의 명칭】

E R B B 2 수용체에 선택적으로 결합하는 압타머 및 이의 용도

5 【기술분야】

유방암 관련 Her2 (ERBB2) 수용체에 특이적으로 결합하는 DNA 압타머, 이를 유효성분으로 함유하는 암전이 억제용 조성물 및 암진단용 조성물에 관한 것이다.

10 【배경기술】

유방암은 미국이나 유럽 등 선진 국가에서의 여성암 중에서 가장 흔한 암으로, 40세에서 55세 사이의 미국 여성의 제1의 사망원인이 되고 있다. 평생 동안 9명의 여성 중 1명에서 유방암이 발생하고 유방암 환자 수 역시 매년 약 15%씩 증가하는 추세이다. 우리나라에서는 1995년 여성 암 환자 중 약 11.9%를 유방암이 차지하고 있으며 자궁경부암과 위암에 이어 세 번째로 흔한 암이 되었고, 위암, 간암, 자궁암, 폐암에 이어 다섯 번째로 사망률이 높은 암으로, 그 빈도가 매년 증가하는 추세에 있다.

전체 유방암 환자의 약 20~25%에서 HER-2 단백질(ERBB2)의 과발현이 관찰되는데, HER-2 과발현이 관찰되는 유방암은 그렇지 않은 유방암에 비해 진행이 빠르고 공격적이며, 타목시펜이나 특정한 항암화학요법에 반응이 낮은 것으로 알려져 왔다. 허셉틴(Herceptin, Trastuzumab, Genentech)은 HER-2 수용체에 결합하는 인체형 단클론성 항체(Humanized Monoclonal Antibody)로서 허셉틴은 Her-2 수용체의 다имер화를 차단함으로써 Her-2 수용체의 신호를 차단하여 유방암 세포만을 특이적으로 공격하여 유방암 환자의 생존기간을 의미 있게 향상시킨다. 따라서 Her-2를 표적으로 하는 허셉틴은 판매량이 매년 급증하는 blockbuster로써 각광받고 있다.

하지만 허셉틴 단독투여 시 반응률은 약 20%에 불과하며, 1년 치료 비용부담이 매우 높고, 심장독성이 일부 발생할 수 있으며 대부분의 환자에서 1년 후 허셉틴에 대한 치료 효과가 사라지는 허셉틴 내성이 발생하고 있다. 이는 허셉틴이 Her-2 수용체의 다имер화를 차단하는 부위가 아닌 Her-2의 다른 부위에 결합하며 그 결합력이 약함으로 인하여 기인된다고 알려져 있다. 따라서 많은 제약회사들은 이러한 허셉틴을 대체할 수 있는 Pertuzumab과 같은 많은 치료제를 개발하기 위한 연구를

집중하고 있다.

본 발명에서는 허셉틴의 단점을 보완할 수 있는 Her-2 수용체에 특이적으로 결합 하는 압타머를 개발하고자 하였다. 이를 통하여 유방암 치료 및 진단에 사용될 수 있을 뿐 만 아니라 기존 항체와는 다른 결합
5 메커니즘을 갖는 압타머는 허셉틴과 병용함으로써 유방암 세포를 보다 효과적으로 제거 할 수 있을 것으로 기대된다.

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

10 이에, 본 발명의 일례는 ERBB2에 특이적으로 결합하고, dUTP(deoxyuracil)의 5' 위치가 나프틸기, 벤질기, 피롤벤질기, 트립토판 등과 같은 소수성 작용기로 치환된 변형된 염기를 포함하는, ERBB2 압타머를 제공한다.

또 다른 예는 상기 ERBB2 압타머를 유효성분으로 포함하는 암
15 치료용 조성물을 제공한다.

또 다른 예는 상기 ERBB2 압타머를 암 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 암 치료 방법을 제공한다.

또 다른 예는 상기 ERBB2 압타머의 암 치료를 위한 용도를 제공한다

20 또 다른 예는 상기 ERBB2 압타머를 유효성분으로 포함하는 암 진단용 조성물을 제공한다.

또 다른 예는 상기 ERBB2 압타머를 이용하는 암 진단 방법을 제공한다.

25 또 다른 예는 상기 ERBB2 압타머의 암 진단을 위한 용도를 제공한다

【기술적 해결방법】

본 발명의 목적은, 암의 발생 및 전이에 관여하는 Her2 단백질에 매우 특이적으로 결합함으로써, 암 또는 암 전이를 억제하거나 암의 검출이
30 가능한 ERBB2 압타머 및 이를 유효 성분으로하는 암전이 억제제를 제공하는 것이다.

본 발명에서는 EGF(Epidermal Growth Factor) 또는 HRG(heregulin)에 의하여 매개되는 EGFR(Epidermal Growth Factor Receptor)-ERBB2 또는 ERBB2-ERBB3의 hetero-dimerization을 차단(block)하며 암생존(cancer

survival)과 관련이 있는 AKT(RAC-alpha serin/threonine-protein kinase) 및 ERK(Extracellular signal-regulated kinase)와 같은 다운스트림 신호전달(Downstream signaling pathway)을 차단(block)하는 ERBB2 압타머, 이를 유효성분으로 포함하는 암 또는 암 억제제 및 암 또는 암 진단용 조성물, 5 및 이를 이용한 암 또는 암 전이 억제(치료) 방법 및 암 진단 방법이 제공된다.

상기 ERBB2는 포유류, 바람직하게는 인간에서 유래하는 것일 수 있으며, 예컨대, 등재번호 P04626, P70424, P06494, O18735, 또는 Q60553 등일 수 있으며, 예컨대 P04626(ERBB2_human)일 수 있다.

10 상기 ERBB2 압타머는 변형된 염기를 포함할 수 있으며, 상기 변형된 염기를 포함하여 20 내지 100개, 바람직하게는, 25 내지 100개, 예컨대 40 내지 100개, 또는 40 내지 80개의 염기로 이루어지고, ERBB2에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 한다. 상기 변형된 염기 이외의 본 발명의 ERBB2 압타머에 사용되는 염기는 특별한 언급이 없는 한, A, G, C, T, 및 이들의 15 deoxy 형태의 염기들로 이루어진 군에서 선택된 것이다.

상기 변형된 염기는 dUTP(deoxyuracil)의 5' 위치가 소수성 작용기로 치환되어 변형된 형태를 의미한다. 상기 소수성 작용기는 벤질기, 나프틸기, 피롤벤질기, 트립토판 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 이와 같이 dUTP 염기의 5' 위치가 소수성 작용기로 치환되어 변형됨으로써, 20 변형되지 않은 경우와 비교하여 ERBB2와의 친화력(affinity)이 현저하게 높아지는 이점이 있다.

ERBB2 압타머 내의 상기 변형된 염기 개수는 5 내지 15개, 바람직하게는 7 내지 13개일 수 있다.

상기 ERBB2 압타머는 SEQ ID NO: 1 내지 SEQ ID NO: 35로 이루어진 25 군에서 선택된 1종 이상의 염기서열을 포함하는 40 내지 100개, 바람직하게는 40 내지 80개의 염기로 이루어진 것일 수 있다.

본 발명의 구체예에서, ERBB2 압타머는 SEQ ID NO: 1 내지 SEQ ID NO: 35로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 염기서열로만 이루어지거나, 상기 염기서열 5' 말단, 3' 말단, 또는 양 말단에 15 내지 30개의 염기로 이루어진 염기서열을 추가로 포함하는 것일 수 있다. 예컨대, ERBB2 압타머는 SEQ ID NO: 1 내지 SEQ ID NO: 35로 이루어진 군에서 선택된 1종 30 이상의 염기서열의 5' 말단에 GGCTGGTGGTGTGGCTG (SEQ ID NO: 40) 또는 GAGTGACCGTCTGCCTGA (SEQ ID NO: 39)를 갖고, 3' 말단에 CAGGCAGACGGTCACTC (SEQ ID NO: 41) 또는 CAGCCACACCACCAGCC

(SEQ ID NO: 42)를 갖는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

또한, 상기 ERBB2 압타머는, 혈청 내 안정성 증진을 위하여, 5' 말단, 3' 말단, 또는 양 말단 모두가 변형되어 혈청 내 안정성이 증진된 것일 수 있다 (실시예 3 및 4 참조). 상기 변형은 5' 말단, 3' 말단, 또는 양 말단에

5 PEG(polyethylene glycol), idT(inverted deoxythymidine), LNA(Locked Nucleic Acid), 2'-메톡시 뉴클레오사이드, 2'-아미노 뉴클레오사이드, 2'F-뉴클레오사이드, 아민 링커, 티올 링커, 및 콜레스테롤 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이 결합되어 변형된 것일 수 있다. 바람직한 구체예에서, 상기 ERBB2 압타머는 5' 말단에 PEG(polyethylene glycol; 예컨대, 분자량 500-50,000 Da)가

10 부착되어 있거나, 3' 말단에 idT(inverted deoxythymidine)가 부착되어 있거나, 5' 말단에 PEG(예컨대, 분자량 500-50,000 Da)가 부착되고 3' 말단에 idT(inverted deoxythymidine)가 부착된 것일 수 있다.

상기 'idT(inverted deoxythymidine)'는 일반적으로 뉴클레아제에 대한 내성이 약한 압타머의 뉴클레아제에 의한 분해를 막기 위하여 사용되는

15 분자 중 하나로서, 핵산단위체는 앞 단위체의 3'-OH와 다음 단위체의 5'-OH와 결합하여 사슬을 이루지만 idT는 앞 단위체의 3'-OH에 다음 단위체의 3'-OH를 결합하여 3'-OH가 아닌 5'-OH가 노출이 되도록 인위적인 변화를 가함으로써 뉴클레아제의 일종인 3' 엑소뉴클레아제(3' exonuclease)에 의한 분해를 억제하는 효과를 일으키는 분자이다.

20 EGFR family는 전체 4종류의 isotype(EGFR1, ERBB2, ERBB3, ERBB4)로 이루어져 있으며, 이들 중 ERBB2는 세포막 바깥쪽에 EGF, NRG, TGF- α 등 리간드가 결합하는 도메인이 없으며 항상 활성화 되어있는 구조로 이루어져 있다. 실제 정상 세포내에서 EGF는 EGFR1에 결합하여 EGFR1의 구조를 변화시키고 ERBB2와 결합을 통하여 hetero-dimer형태가 되며, 이에

25 따라 수용체의 tyrosine kinase activity가 활성화되어 세포내로 신호를 전달하게 된다. 하지만 유방암, 대장암 등의 특정 암세포에서 ERBB2 수용체가 활성화 되면 EGFR1, ERBB3 등 다른 수용체를 거치지 않고 리간드가 결합할 수 없는 항상 활성화 형태인 ERBB2 수용체끼리 homo-dimer 형태를 형성함으로써 ERBB2 수용체의 tyrosine kinase활성이 증가되어 암세포의

30 성장과 암전이를 유발하게 된다.

본 발명자들은 상기 ERBB2 압타머가 ERBB2의 이합체화를 차단하고 생체내에서 종양 억제 효과를 갖는 것을 확인하였다 (실시예 2 및 실시예 4 참조). 예컨대, 본 발명에 따른 ERBB2 압타머는 ERBB2의 세포외 도메인 (extracellular domain)에 결합하는 것일 수 있다.

EGFR family는 전체 4종류의 isotype(EGFR1, ERBB2, ERBB3, ERBB4)로 이루어져 있으며, 이들 중 ERBB2는 세포막 바깥쪽에 EGF, NRG, TGF- α 등 리간드가 결합하는 도메인이 없으며 항상 활성화 되어있는 구조로 이루어져 있다. 실제 정상 세포내에서 EGF는 EGFR1에 결합하여 EGFR1의 구조를 변화시키고 ERBB2와 결합을 통하여 헤테로 다이머 형태가 되며, 이에 따라 수용체의 티로신 카이네이즈 활성이 활성화되어 세포내로 신호를 전달하게 된다. 하지만 유방암, 대장암 등의 특정 암세포에서 ERBB2 수용체가 활성화 되면 EGFR1, ERBB3 등 다른 수용체를 거치지 않고 리간드가 결합할 수 없는 항상 활성화 형태인 ERBB2 수용체끼리 호모 다이머 형태를 형성함으로써 ERBB2 수용체의 티로신 카이네이즈 활성이 증가되어 암세포의 성장을 유발하게 된다.

본 발명자들은 이러한 암의 형성 및 전이 과정에 중요한 ERBB2에 대하여 결합하는 압타머를 발굴하였고 이와 같은 결합 압타머 중 ERBB2의 활성을 저해하는 역할을 하는 압타머를 발굴하기 위하여 아래와 같은 스크리닝 방법을 수립하였다. 우선 스크리닝할 세포주를 선택하기 위하여 여러 암세포들 주에 EGFR의 발현량을 비교하여 A431 skin carcinoma 세포주가 많은 양의 EGFR를 발현하고 있음을 확인하였다. 또한 EGF농도가 16nM 이상까지 EGFR의 활성이 증가하며 5분 처리 시 가장 높은 활성도를 나타냄을 확인하였다.

또한, 생체내 안전성 평가를 통하여 상기 ERBB2 압타머가 생체에 독성이 없고 이상 소견을 나타내지 않는 안전한 물질임을 확인하였다 (실시예 5 참조). 보다 구체적으로, ICR 계통의 암수 마우스에 대한 단회 정맥내투여 실험에서 암컷에서의 본 발명에 따른 ERBB2 압타머의 개략의 치사량(approximate lethal dose; ALD)은 1,000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단되었고, 수컷에서의 반수치사량(LD₅₀)은 1215.8 mg/kg으로 산출되었다. 또한 ICR 계통의 암수 마우스에 2주간 반복 정맥내투여 하여 개략적인 독성을 확인하였을 때, 이상 소견이 관찰되지 않았다. 따라서, 본 발명에 따른 ERBB2 압타머는 암세포의 성장을 억제하는데 유용하게 사용될 수 있다.

이에, 본 발명의 또 다른 측면은 상기한 바와 같은 ERBB2 압타머를 유효성분으로 함유하는 암의 치료 또는 암 전이 억제용 약학 조성물을 제공한다.

상기 약학 조성물은 다양한 경구 투여 형태 또는 비경구 투여 형태로 제형화될 수 있다. 예를 들어, 정제, 환제, 경,연질 캡셀제, 액제, 현탁제,

유화제, 시럽제, 과립제, 엘릭서제(elixirs) 등의 임의의 경구 투여용 제형으로 될 수 있다. 이러한 경구 투여용 제형은 각 제형의 통상적인 구성에 따라 상기 유효 성분 외에, 예를 들어, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신 등의 희석제나, 실리카, 탈크, 스테아르산
5 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜 등의 활택제 등의 제약상 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다.

또한, 상기 경구 투여용 제형이 정제인 경우, 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘 등의 결합제를 포함할 수
10 있고, 경우에 따라, 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제나, 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제 또는 감미제 등을 포함할 수도 있다.

그리고, 상기 약학 조성물은 비경구 투여 형태로 제형화될 수도 있는데, 이러한 경우 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사
15 등의 비경구 투여 경로에 의해 투여된다. 이 때, 상기 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위하여, 상기 약학 조성물은 유효 성분, 즉, 화학식 I의 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합되어 용액 또는 현탁액으로 제조되고, 이러한 용액 또는 현탁액이 앰플 또는 바이알의 단위 투여형으로 제조될 수 있다.

또한, 상기 약학 조성물은 멸균되거나, 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 보조제를 더 포함할 수도 있고, 기타 치료적으로 유용한 물질을 더 포함할 수도 있으며,
20 혼합, 과립화 또는 코팅의 통상적인 방법에 따라 제제화될 수 있다.

그리고, 상기 유효 성분, 즉, ERBB2 압타머는 하루에 0.1 내지 500
25 mg/kg(체중), 바람직하게는 0.5 내지 100 mg/kg(체중)의 유효량으로 상기 약학 조성물에 포함될 수 있고, 이러한 약학 조성물이 1 일 1 회 또는 2 회 이상 분할되어 경구 또는 비경구적 경로를 통해 투여될 수 있다.

본 발명의 약학적 조성물에 의하여 치료 또는 전이 억제가 가능한 암은 ERBB2와 관련된 모든 종류의 암일 수 있으며, 예컨대, 유방암, 대장암,
30 폐암, 담낭암, 췌장암, 위암 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

본 발명의 약학 조성물의 투여 대상은 인간을 포함하는 포유류일 수 있으며, 바람직하게는 설치류, 또는 인간일 수 있다.

또 다른 예는 상기 ERBB2 압타머의 치료적 유효량을 암 치료를

필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 암 치료 또는 암전이 억제 방법을 제공한다. 상기 방법은 ERBB2 압타머 투여 단계 이전에 암 치료를 필요로 하는 환자를 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 치료적 유효량은 투여 대상 환자에서 치료 효과를 발휘할 수 있는 투여량을 의미하는 것으로, 환자의 상태, 병세 등에 따라서 적절히 조절될 수 있으며, 예컨대 하루에 0.1 내지 500 mg/kg(체중), 바람직하게는 0.5 내지 100 mg/kg(체중) 정도일 수 있으며, 상기 유효량이 1 일 1 회 또는 2 회 이상 분량되어 투여될 수 있다.

또 다른 예는 상기 ERBB2 압타머의 암 치료 또는 암 전이 억제를 위한 용도, 또는 암 치료제 또는 암 전이 억제제 제조에 사용되기 위한 용도를 제공한다. 또 다른 예는 상기 ERBB2 압타머의 암 진단을 위한 용도를 제공한다.

상기 방법 또는 용도에 있어서의 투여 경로, 환자 (투여 대상), 치료 가능한 암 종류는 상기한 바와 같다.

또한, ERBB2는 유방암과 대장암을 비롯하여 다양한 암에서 과발현이 관찰되므로, 상기 ERBB2 압타머는 암 진단용 조성물로서 사용 가능하다.

또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 ERBB2 압타머를 이용하여 암 진단에 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

상기 암 진단에 정보를 제공하는 방법은
 20 환자의 생물학적 시료를 준비하는 단계;
 상기 생물학적 시료에 ERBB2 압타머를 반응시키는 단계; 및
 상기 생물학적 시료에서의 ERBB2 압타머의 결합 정도를 측정하는 단계를 포함하고,

환자의 생물학적 시료에서의 ERBB2 압타머의 결합 정도가 정상
 25 시료보다 높은 경우, 상기 환자를 암이 발생한 환자로 판단하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다. 따라서, 상기 방법은 정상 시료에서의 ERBB2 압타머의 결합 정도를 측정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

상기 환자는 인간을 포함하는 포유류일 수 있으며, 바람직하게는 설치류, 또는 인간으로서, 암의 발생 또는 암의 전이 여부를 판단할 대상을
 30 의미한다.

상기 방법으로 진단에 정보를 제공할 수 있는 암 종류는 ERBB2와 관련된 모든 종류의 암일 수 있으며, 예컨대, 유방암, 대장암, 폐암, 담낭암, 췌장암, 위암 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

상기 정상 시료는 인간을 포함하는 포유류일 수 있으며,

바람직하게는 설치류, 또는 인간으로부터 얻어진 것으로, 진단에 정보를 제공할 대상 암, 예컨대, 유방암, 대장암, 폐암, 담낭암, 췌장암, 위암 등으로 이루어진 군에서 선택된 암의 발생 및 상기 암의 전이가 없는 개체로부터 얻어진 생물학적 시료를 의미한다.

- 5 상기 생물학적 시료는 인간을 제외한 포유류 생체, 인간을 포함한 포유류로부터 분리된 세포, 조직, 혈액, 체액, 타액 등일 수 있다.

상기 생물학적 시료에서의 ERBB2 압타머의 결합 정도를 측정하는 단계는 관련 기술분야에서 통상적으로 사용되는 DNA 압타머 결합 측정 기술을 이용하여 수행될 수 있으며, 예컨대, ERBB2 압타머 말단에 형광 또는 방사성 물질 표지하여 형광 또는 방사성 세기를 측정하거나, 이미지화하여 관찰하는 방법 등을 이용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

한 구체예에서, 상기 ERBB2 압타머 중 ERBB2 결합부위가 상이하여 서로 결합에 방해하지 않는 한 쌍의 압타머를 선택하여, 하나는 기판에 고정시키고(capture aptamer), 다른 하나(detection aptamer)는 말단에 형광 물질 또는 방사성 물질 표지 (또는 형광 물질 또는 방사성 물질과 반응 가능한 물질 결합)하여, 그 세기를 측정함으로써, 시료 내 ERBB2 존재 여부 또는 ERBB2 과발현 여부를 측정할 수 있다(도 2A 참조).

이와 같이, 압타머를 사용하여 시료 내 ERBB2 존재 여부 또는 과발현 여부를 확인하는 경우, 기존의 항체를 이용한 검출보다 현저하게 우수한 민감도를 보이는 것으로 나타났다 (도 2B 참조)

【발명의 효과】

본 발명은 ERBB2를 효과적으로 억제할 수 있는 압타머를 제공하며, 상기 압타머는 ERBB2와 관련된 모든 종류의 암의 진단, 치료 및/또는 전이 억제에 유용하게 사용될 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 변형 염기(dUTP)를 사용하여 변형 염기 함유 안티센스 라이브러리를 합성하는 과정을 모식적으로 나타낸 것이다.

2A는 ERBB2 압타머를 이용한 샌드위치 방식 에세이 과정을 모식적으로 보여주는 것이고, 도 2B는 본 발명의 ERBB2 압타머를 이용한 assay와 ELISA에 의한 분석 결과를 비교하여 보여주는 것이다.

도 3A는 EGF 농도에 따른 EGFR (ERBB1)의 티로신(Tyr845) 인산화 변화를 보여주는 것이고, 3B는 시간에 따른 EGFR (ERBB1)의 티로신(Tyr845)

인산화 변화를 보여준다.

도 4A는 ERBB2 압타머를 이용하여 ERBB2 활성 저해를 스크리닝하는 과정을 모식적으로 보여주는 것이고(1: EGFR, 2: ERBB2 압타머), 4B는 이와 같은 스크리닝에 의하여 얻어진 결과 중 AP001-24(SEQ ID NO: 11)의 결과를 대표적으로 보여주는 것이다.

도 5A는 ERBB2 압타머(녹색)가 EGF 매개 다이머화를 차단하여 ERBB2 활성 (Tyr877 인산화)을 저해하는 과정을 모식적으로 보여주는 것이고, 도 5B는 ERBB2 압타머(녹색)가 HRG 매개 다이머화를 차단하여 ERBB2 활성 (Tyr877 인산화)을 저해하는 과정을 모식적으로 보여주는 것이고, 도 5C는 ERBB2 압타머 AP001-24(SEQ ID NO: 11)가 EGF 매개 다이머화와 HRG 매개 다이머화를 차단하여 ERBB2 활성화 (Tyr877 인산화)를 저해하는 결과를 보여주는 것이다 (NT: No Treatment, Control aptamer: Ap001-24의 reverse complement sequence).

도 6은 ERBB2 압타머 AP001-24(SEQ ID NO: 11)에 의한 AKt 및 ERK의 활성도 저해 결과를 보여주는 것이다.

도 7A는 ERBB2 압타머 AP001-24(SEQ ID NO: 11)의 EGFR 및 ERBB2와의 결합력을 분석한 결과이고 (x 축: 표적 단백질의 농도(nM), y축: cpm), 7B는 MCF7에서의 ERBB2 압타머 AP001-24(SEQ ID NO: 11)의 ERBB2와의 결합을 Cytochemistry 방법을 통하여 확인한 결과를 보여주는 것이고, 7C는 FACS assay 방법에 의하여 확인한 결과를 보여주는 것이다 (control aptamer: Ap001-24의 reverse complement sequence).

도 8은 실시예 3에서 제조된 ERBB2 압타머 제제 중 PEG-ERBB2 압타머-idT(E2)와 Control T40mer aptamer(T1)의 혈청 내 반감기를 비교한 결과를 보여주는 것이다.

도 9는 ERBB2 압타머 투여 후 마우스 유방암 조직의 크기 변화를 측정한 결과를 보여주는 것이다.

도 10은 ERBB2 압타머 제제를 사용한 치료 전 (Day 0)과 치료 후 (Day 6)의 육안소견(위)과 FDG PET영상 결과(아래)를 보여주는 것이다.

30 【발명의 실시를 위한 형태】

이하, 본 발명을 하기 실시예에 의거하여 보다 자세하게 설명하나, 이들은 본 발명을 설명하기 위한 것일 뿐 이들에 의하여 본 발명의 범위가 어떤 식으로든 제한되는 것은 아니다.

<실시예 1> ERBB2 압타머 발굴

1.1: 변형핵산 라이브러리 합성

SELEX에 필요한 single strand modified DNA library를 제조하기 위하여,
5' 말단에 Biotin이 결합된 antisense library
5 [5'-Biotin-d(GGCTGGTGGTGTGGCTG-N40-CAGGCAGACGGTCACTC)-3'; (SEQ
ID NO: 36)]를 합성하였다. 이 과정을 도 1에 모식적으로 나타내었다.

이와 같이 합성된 antisense를 가지고 20 μ M 5'
primer(GAGTGACCGTCTGCCTG; SEQ ID NO: 39)와, 0.5mM dNTP(ATP, GTP,
CTP, NapdUTP), 0.25U/ μ l KOD XL(KOD XL DNA polymerase, Novagen), 10X
10 extension buffer(1.2M Tris-HCl pH7.8, 100mM KCl, 60mM (NH₄)₂SO₄, 70mM
MgSO₄, 1% Triton X-100, 1mg/ml BSA) 상에서 70 $^{\circ}$ C에서 1 시간 동안
인큐베이션하여 double strand DNA를 제조하였다.

여기에 20mM NaOH 이용하여 elution한 뒤, 80mM HCl용액으로
중화하여 single strand modified DNA library를 제조하였다. 제조된 DNA
15 library는 Amicon ultra-15(Millipore)를 이용하여 농축한 뒤 UV
spectrophotometer로 정량하였다.

1.2: SELEX 방법으로 ERBB2 단백질에 대한 압타머 발굴

ERBB2(R&D systems, 1129-ER-050)에 결합하는 DNA aptamer를
20 선별하기 위하여 SELEX 기법을 이용하였다.

ERBB2와의 결합: 먼저 상기 합성된 Library 1nmole을 selection
buffer(200mM HEPES, 510mM NaCl, 25mM KCl, 25mM MgCl₂)에 넣고 95 $^{\circ}$ C,
70 $^{\circ}$ C, 48 $^{\circ}$ C, 37 $^{\circ}$ C에서 각각 5분간 반응시킨 후, Negative selection을 위하여 10X
25 protein competition buffer(10 μ M prothrombin, 10 μ M casein, 0.1%(w/v) HSA (human
serum albumin, SIGMA) 10 μ L를 혼합한 뒤, 상층액이 제거된 Hexa-His가
결합되어있는 Talon bead(50%(w/v) slurry, 10mg/ml Invitrogen)에 첨가하여
37 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응 시켰다.

Negative selection반응 후, 상층 액만을 취하여 새로운 tube에 옮긴 후,
30 ERBB2와 결합시킨 Talon bead에 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시켰다. Selection
buffer(200mM HEPES, 510mM NaCl, 25mM KCl, 25mM MgCl₂) 100 μ L로 DNA와
ERBB2 복합체와 결합한 Talon bead를 5번 세척하였다. 5번째 세척시에는
새로운 plate에 옮겨 세척하였다. 2mM NaOH 용액 85 μ L를 첨가하여 표적에
결합하는 library를 elution한 뒤 8mM HCl 용액 20 μ L로 neutralization하였다.

증폭: 표적에 결합하는 library DNA를 QPCR(quantitative PCR, IQ5 multicolor real time PCR detection system, Bio-rad)을 이용하여 증폭하였다. 앞서 library 제조에 사용된 5' primer (GAGTGACCGTCTGCCTG (SEQ ID NO: 39)와 3' primer(Biotin-GGCTGGTGGTGTGGCTG, Biotin-(SEQ ID NO: 40)) 각각 5uM (5 X QPCR master Mix, Novagen), 0.075U/ul KOD(Novagen)(임종훈), 1mM dNTP(Roche Applied science), 25mM MgCl₂, 5XSYBR green I (Invitrogen)를 총부피가 125μL가 되도록 혼합하여, 96℃ 15초, 55℃ 10초, 68℃ 30분 조건으로 1 cycle, 그리고 96℃ 15초, 72℃ 1분 조건으로 30 cycle을 반복하여 double strand library을 제조하였다.

10

eDNA 제조: eDNA는 enzymatic DNA로 DNA template와 polymerase를 이용해 생산한 압타머를 의미한다. 상기 QPCR을 통하여 만들어진 DNA library를 25μL Myone SA bead(Invitrogen)에 상온에서 10분간 혼합하여 고정하였다. 이 때 혼합된 DNA 양은 QPCR product로 60ul로 하였다. 20mM NaOH 용액을 첨가하여 single strand DNA로 만들어주었다. 그리고 상기 실시예 1.1의 Library 제조와 같은 방법으로 변형된 핵산을 포함하는 DNA를 합성하여 다음 round에 사용하였다. SELEX round는 총 8회 수행하였고 보다 선택적인 결합을 위하여 4회부터 6회까지 그리고 7회부터 8회까지 각각 DNA와 단백질 (ERBB2) 복합체를 10mM DxSO₄(sigma)용액에 1/200, 1/400로 희석하여 DNA aptamer를 선별하였다.

20

Pool binding assay: ERBB2와 SELEX round가 진행된 DNA pool의 결합력을 알아보기 위하여 filter binding assay을 수행하였다. 먼저 수행된 6 round와 8 round의 pool을 α-P³²ATP(Perkin Elmer)와 TdT(Terminal deoxynucleotidyl transferase, NEB)로 말단에 표지 하였다. 상기 SELEX 과정을 통하여 얻어진 library DNA 1μM, 0.25μL α-P³²ATP(5μM, perkinelmer), 0.25μL TdT, 및 10XNEB buffer4(NEB) 10μL reaction volume으로 37℃에서 30분간 반응시키고, 70℃에서 10분간 incubation 하여, TdT를 불활성화시켰다. 표지된 DNA pool은 Micro spin G-50 column(GE healthcare)을 이용하여 정제하였다.

25

표지된 DNA pool 20,000cpm을 100μL 1xSB buffer(200mM HEPES, 510mM NaCl, 25mM KCl, 25mM MgCl₂)에 넣고 95℃에서부터 1초에 0.1℃씩 37℃까지 천천히 냉각시켰다. 그리고, buffer (200mM HEPES, 510mM NaCl, 25mM KCl, 25mM MgCl₂)를 이용하여 ERBB2 protein(R&D systems, 1129-ER-050)을 100nM에서 12 point로 serial dilution한 뒤, 상기 가열 및

30

냉각시킨 DNA pool 30 μ L를 각각 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켰다. Nylon membrane(GE healthcare)에 DNA와 ERBB2의 혼합물을 각각 2 μ L씩 spotting한 뒤 zorbax resin(Agilent) 5.5 μ L를 첨가하였다. 그리고 미리 1X SB buffer(200mM HEPES, 510mM NaCl, 25mM KCl, 25mM MgCl₂) 50 μ L로 적셔놓은

5 Durapore filter(Millipore)에 넣고 vacuum을 걸어주었다. 그리고 membrane filter를 100 μ L의 1X selection buffer(200mM HEPES, 510mM NaCl, 25mM KCl, 25mM MgCl₂)로 씻어주었다. Filter plate를 image plate에 overnight expose한 뒤 FLA-5100(Fuji)으로 image를 정량화 하였다.

상기 얻어진 ERBB2와 SELEX round를 거친 DNA pool간의 결합

10 친화력을 다음의 표 1에 나타내었다. 상기 결합 친화력은 상기 filter binding assay를 통하여 얻어진 값을 SigmaPlot 11(Systat Software Inc.)을 이용하여 구하였으며, 표 1 중 BMax는 input 대비 결합한 압타머의 비율을 나타낸 것이고, Kd(dissociation constant)는 친화력을 나타낸다.

【표 1】

	Bz library	Trp Library	Nap Library	Group1	Group2	Group3	Group4	Group5
Bmax	3.23E-11	1.32E-02	1.79E-02	0.23	0.26	0.22	0.51	0.36
K _d (nM)	6500.86	1.19E-03	7.35E-03	0.56	21.86	10.41	7.34	61.76

15 상기 표 중, library는 사용된 벤질기, 트립토판기, 나프틸기3가지 종류의 변형핵산 무작위 염기서열을 갖는 DNA이고 각group은 특정한 library를 이용한 앞서 기재된 SELEX 단계 중 특정 Round 후 얻어지는 ssDNA Pool을 의미하여 각각 다음과 같다. Group1은 Nap Library 6R pool, Group2는 Bz library 6R Pool, Group3는 Nap library의 8R pool, Group4는 Trp

20 library 8R pool, Group5는 Bz library의 8R pool을 의미한다.

ERBB2 압타머 염기서열 분석: 6번의 SELEX round를 거친 group 1의 경우 결합 친화력이 가장 높아 위에 언급한 QPCR 방법으로 double strand DNA로 증폭한 뒤 TA cloning kit(SolGent)를 이용하여 cloning하였다. 그리고

25 vector상에 존재하는 M13 primer(CAGGAAACAGCTATGAC)을 가지고 sequencing하여 다음과 같은 sequence를 얻었다.

얻어진 ERBB2에 매우 특이적으로 결합하는 DNA aptamer는

5'-GAGTGACCGTCTGCCTG-[Core
sequence]-CAGCCACACCACAGCC-3'

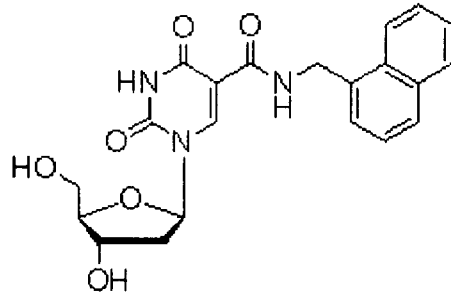
30 의 염기서열을 가지며, 여기서 Core Sequence는 아래의 표 2에 나타낸 바와 같고, 이 중에서 6은 Naphthyl-dU를 나타낸다.

【표 2】

#	Description (클론 번호)	Core sequence
1	9-ER-N-A01_A05	A6G66AGAG666GCC6GAG6GCC6CG6AAGGGCG6AACAA (SEQ ID NO: 1)
2	9-ER-N-A02_B05	6AC6GGGCCCCG66AGCC6C6GGCGC6CC66CGC66G6GCC (SEQ ID NO: 2)
3	9-ER-N-A03_C05	66A6CAACGCAC6GAGGGCG6CAGC66C66666AGG (SEQ ID NO: 3)
4	9-ER-N-A04_D05	A6G6AGAG666GCC6GAG6GCC6CGCAAGGGCG6AACAG (SEQ ID NO: 4)
5	9-ER-N-A06_E05	6CC6G6CCCGG666ACACAAG66AAGGCAGCCGC6GGA6A (SEQ ID NO: 5)
6	9-ER-N-B02_F05	G6C6GAACACCGAGA66AGC6GAACGAACGG6A6GGACG6 (SEQ ID NO: 6)
7	9-ER-N-B03_G05	6CC6GGCA6G66CGA6GGAGGCC666GA66ACAGCCCAGA (SEQ ID NO: 7)
8	9-ER-N-B04_H05	CGCGA66AGA6GAACGCACAA6ACCCG66C6GAG6AAAG6 (SEQ ID NO: 8)
9	9-ER-N-B08_A06	G6C6GAACACCGAGA66AGCCGAACGAACGG6A6GGACG6 (SEQ ID NO: 9)
10	9-ER-N-B09_B06	G66AGAC6GAACGCAC6GAGGGCCGCAGCC6A6C6GAAGG (SEQ ID NO: 10)
11	9-ER-N-B12_C06	A6G66AGAG666GCC6GAG6GCC6CGCAAGGGCG6AACAA (SEQ ID NO: 11)
12	9-ER-N-C02_D06	6CC6GGCA6G66CGA6GGAGGCC666GA66ACAGCCCAGA (SEQ ID NO: 7)
13	9-ER-N-C03_E06	G6C6GAGCA6CGCG666AGCCGAACGC6CGG6GAGG6AGA6 (SEQ ID NO: 12)
14	9-ER-N-C05_F06	6CA6GGCA6G66CGA6GGAGGCC666GA66ACAGCCCAGA (SEQ ID NO: 13)
15	9-ER-N-C06_G06	C6ACACGAA6CAAC6CCCC6CCGCA6AC6GAACA6CACAA (SEQ ID NO: 14)
16	9-ER-N-C08_H06	66AGCAAAA6GCCA6G6GCG6CC6G6CCCGG666ACAGC (SEQ ID NO: 15)
17	9-ER-N-C10_A07	6GA6G6CCCCAAC6CAGC6G6GAA6C6A6GCCCCCGCCA (SEQ ID NO: 16)
18	9-ER-N-D01_B07	C6GAGCGG66AC6ACACCACCG6GAGACC66AG66ACAAA (SEQ ID NO: 17)
19	9-ER-N-D02_C07	A66AGA6GAAAGCGCA66CCAACAACAGA6AA6C6GAGGG (SEQ ID NO: 18)
20	9-ER-N-D03_D07	6CC6GGCA6G66CGA6GGAGGCC666GA66ACAGCCCAGA (SEQ ID NO: 7)
21	9-ER-N-D04_E07	666GGAG6G6C66ACGG66GGAG6AA6CGAGGA6GGA6GA (SEQ ID NO: 19)
22	9-ER-N-D05_F07	CCG66ACC6ACC6CC6CGACCG6GGG6GCCC66AG6CCCA (SEQ ID NO: 20)
23	9-ER-N-D06_G07	6CC6GGCA6G66CGA6GGAGGCC666GA66ACAGCCAGA (SEQ ID NO: 21)
24	9-ER-N-D07_H07	CCG66ACC6ACC6CC6CGACCG6GGG6GCC666AG6CCCA (SEQ ID NO: 22)
25	9-ER-N-D09_A08	A6G66AGAG666GCC6GAG6GCC6CGCAAGGGCG6AACAA (SEQ ID NO: 23)
26	9-ER-N-D11_B08	6CC6GGCA6G66CGA6GGAGGCC666GA66ACAGCCCAG6 (SEQ ID NO: 24)
27	9-ER-N-E02_C08	CCG66ACC6ACC6CC6CGACCG6GGG6GCCC66AG6CCCA

		(SEQ ID NO: 20)
28	9-ER-N-E04_D08	A66AGA6GAAAGCACA66CCAACAACAGA6AA6C6GAGGG (SEQ ID NO: 25)
29	9-ER-N-E09_E08	6CC6GGCA6G66CGA6GGAGGCC666GA66ACAGCCCAGA (SEQ ID NO: 7)
30	9-ER-N-E11_F08	A6G66AGAG666GCC6GAG6GCC6CGCAAGGGCG6AACAG (SEQ ID NO: 26)
31	9-ER-N-E12_G08	6GAGAAGGGC6G6GCC66AC6CAAAA666GGGA6C6GAA (SEQ ID NO: 27)
32	9-ER-N-F01_H08	G66AGAC6GAACGCAC6GAGGGCCGCAGCC6A6C6GAAGG (SEQ ID NO: 10)
33	9-ER-N-F02_A09	G6C6GAACACCGAGA66AGCCGAACGAACGG6A6GGACG6 (SEQ ID NO: 9)
34	9-ER-N-F03_B09	G6C6GAACACCGAGA66AGCCGAACGAACGG6A6GGACG6 (SEQ ID NO: 9)
35	9-ER-N-F04_C09	G6C6GAACACCGAGA66AGCCGAACGAACGG6A6GGACG6 (SEQ ID NO: 9)
36	9-ER-N-F05_D09	6CC6GG6A6G66CGA6GGAGGCC666GA66ACAGCCCAGA (SEQ ID NO: 28)
37	9-ER-N-F08_E09	6AGA6C6C6GA66AGG6AGAACGCCC6AC6C6AACGGCAG (SEQ ID NO: 29)
38	9-ER-N-F09_F09	6GAGAAGGGC6G6GCC66AC6CAAAA666GGGA6C6GAA (SEQ ID NO: 30)
39	9-ER-N-F11_G09	6GAGAAGGGC6G6GCC66AC6CAAAA666GGGA6C6GAA (SEQ ID NO: 31)
40	9-ER-N-G02_H09	A66AGA6GAAAGCGCA66CCAACAACAGA6AA6C6GAGGG (SEQ ID NO: 18)
41	9-ER-N-G03_A10	G6C6GAACACCGAGA66AGCCGAACGAACGG6A6GGACG6 (SEQ ID NO: 9)
42	9-ER-N-G04_B10	CG6CC66GG6GAG666GGG6C6GAGCAGGAGCACG6GAG6 (SEQ ID NO: 32)
43	9-ER-N-G08_C10	6CC6GGCA6G66CGA6GGAGGCC666GA66ACAGCCCAGA (SEQ ID NO: 7)
44	9-ER-N-G09_D10	G6C6GAACACCGAGA66AGCCGAACGAACGG6A6GGACG6 (SEQ ID NO: 9)
45	9-ER-N-H01_E10	A66AGA6GAAAGCACA66CCAACAACAGA6AA6C6GAGGG (SEQ ID NO: 33)
46	9-ER-N-H02_F10	6CC6GGCA6G66CGA6GGAGGCC666GA66ACAGCCCAGA (SEQ ID NO: 7)
47	9-ER-N-H03_G10	A66AGA6GAAAGCACA66CCAACAACAGA6AA6C6GAGGG (SEQ ID NO: 34)
48	9-ER-N-H04_H10	G66AGAC6GAACGCAC6GAGGGCCGCAGCC6A6C6GAAGG (SEQ ID NO: 10)
49	9-ER-N-H08_A11	6CC6GGCA6G66CGA6GGAGGCC666GA66ACAGCCCAGA (SEQ ID NO: 7)
50	9-ER-N-H09_B11	A6G66AGAG6C6GCC6GAG6GCC6CGCAAGGGCG6AACAG (SEQ ID NO: 35)

6 = NapdU [5-(N-Naphthylcarboxamide)-2'-deoxyuridine]



A = 2'-deoxyAdenosine

G = 2'-deoxyGuanosine

C = 2'-deoxyCytidine

T = 2'-deoxyThymidine(Thymidine)

5

상기 발굴된 ERBB2 압타머들을 다음과 같이 유사 family로 분류하였다(서열 상동성은 염기서열의 85% 상동성을 기준으로 함):

【표 3】 74.00% (37/50) Multi-Copy

#	Description	개수	(%)	
[1]	9-ER-N-A01_A05	5	10.00	A6G66AGAG666GCC6GAG6GCC6CG6AAGGGCG6AACAA (SEQ ID NO: 1) [1, 11, 25, 30, 50]
[10]	9-ER-N-B09_B06	3	6.00	G66AGAC6GAACGCAC6GAGGGCCGCGAGCC6A6C6GAAGG (SEQ ID NO: 10) [10, 32, 48]
[12]	9-ER-N-C02_D06	11	22.00	6CC6GGCA6G66CGA6GGAGGCC666GA66ACAGCCCAGA (SEQ ID NO: 7) [7, 12, 14, 20, 23, 26, 29, 36, 43, 46, 49]
[19]	9-ER-N-D02_C07	5	10.00	A66AGA6GAAAGCGCA66CCAACAACAG A6AA6C6GAGGG (SEQ ID NO: 18) [19, 28, 40, 45, 47]
[22]	9-ER-N-D05_F07	3	6.00	CCG66ACC6ACC6CC6CGACCG6GGG6GCC C66AG6CCCA (SEQ ID NO: 20) [22, 24, 27]
[31]	9-ER-N-E12_G08	3	6.00	6GAGAAGGGC6G6GCC66AC6CAAAA666G GGA6C6GAA (SEQ ID NO: 27) [31, 38, 39]
[33]	9-ER-N-F02_A09	7	14.00	G6C6GAACACCGAGA66AGCCGAACGAA CGG6A6GGACG6 (SEQ ID NO: 9) [6, 9, 33, 34, 35, 41, 44]

10

#12 clone(9-ER-N-C02_D06)의 경우 50개의 sequence중 11번의 같은 염기서열이 반복되어 나타났다. 그리고 #33(9-ER-N-F02_A09)은 7번, #1(9-ER-N-A01_A05)은 5번, #19(9-ER-N-D02_C07)은 5번, #10(9-ER-N-B09_B06)은 3번의 반복되는 염기서열이 나타났다.

15

상기 발굴된 ERBB2 압타머의 서열 상의 유사성을 clone들간의 염기서열 중 반복적으로 나타나는 부분과 빈도를 측정하여 확인하였으며, 그 결과는 다음과 같다:

86.00% (43/50) Families

[10] 9-ER-N-B09_B06 Count: 3 0.00%

GAGGAGACG**GGAA**GGCAC**GGAGGGG**GGCAGGGG**AAGCGAA**GG

$\frac{1}{2} \times \frac{1}{2} = \frac{1}{4}$

$$v_1 = \frac{1}{2} \left(\frac{1}{\sqrt{2}} \begin{bmatrix} 1 \\ 1 \end{bmatrix} + \frac{1}{\sqrt{2}} \begin{bmatrix} 1 \\ -1 \end{bmatrix} \right) = \begin{bmatrix} 1 \\ 0 \end{bmatrix}$$

	A6C8GAA	Pattern_1 X 18 times
AACGCACGGAGGGC		Pattern_6 X 4 times
6GAACGCAC		Pattern_10 X 9 times
		Score: 91

[33] 9-ER-N-F02_A09 Count: 7 0.11%

G6C6GAAACACCGAGA **66AGCCGAACG**ACCGGATGGGACG6

✦ ✦ ✦ ✦ ✦ ✦ ✦

✱ ✱ ✱ ✱ ✱ ✱ ✱ ✱ ✱ ✱

ABC8GAA _____ **Pattern_1** X 18 times
 _____ **GGAGCGGAAAG** _____ **Pattern_2** X 7 times
Score: 25

[31] 9-ER-N-E12_G08 Count: 3 0.06%

6GAGAAGGGC6G6G**CC88AC8**CAAAA666GGG**A6C8GA**

* * * * *

```

_____A6C8GAA Pattern_1 X 18 times
_____CC68AG6 Pattern_4 X 7 times
_____Score: 25

```

[19] 9-ER-N-D02_C07 Count: 5 0.10%

A65AGA6GAAAGCGCA66CCAACAACAGA6A1608GAGG

A6C8GAA Pattern_1 X 18 times
A6CAGABGAA Pattern_11 X 7 times
Score: 25

[8] ~~9-ER-N-B04_H05~~ Count: 1 0.02%

CGCGA66AGA6GAACGCACAA6ACCCG66C6GAG6AAAG6

<u>8GAAGCAC</u>	Pattern_10 X 9 times
<u>A66AGA8GAA</u>	Pattern_11 X 7 times
	Score: 16

[16] 9-ER-N-C08_H08 Count: 1 0.02%

66AGCAAAA6GCCA6G6GCG**8008G8000GG888ACAGC**

66ACAGC Pattern_3 X 12 times
6008G8000GG888ACA Pattern_9 X 2 times
Score: 14

[3] 9-ER-N-A03_C05 Count: 1 0.02%

66A8CAADGCAC6GAGGGG6CAGC66C66666AGG

AAGCACBGAGGGC **Pattern_6** X 4 times
BGAAGGCAC **Pattern_10** X 9 times
 Score: 13

10.00% (5/50) Orphans**[2] 9-ER-N-A02_B05** 1 0.02%

GACGAGGCCCCGAGGAGCCGCGGCGGCCGCGCGCGCGCC

[15] 9-ER-N-C06_G06 1 0.02%

CGACACGAAACAGGCCCCGCGGCAAGACGGAACAACACAA

[17] 9-ER-N-C10_A07 1 0.02%

GCAAGGCCCCAACGACGCGGGAAGCAGGCCCCCGCCCA

[21] 9-ER-N-D04_E07 1 0.02%

GAGGAGGAGGCGGACGGGAGGAAAGCGAGGAAGGAAGCA

[37] 9-ER-N-F08_E09 1 0.02%

GAGAGCGGGAAGGAGAGACGCCCCAGCAGCAACGGCAG

- Clone binding assay:** 반복적으로 관찰된 염기서열을 갖는 clone의
- 5 결합친화력을 알아보기 위하여 위의 pool binding assay와 같은 방법으로 filter binding assay를 수행하였다. 상기 결합 친화력은 상기 filter binding assay를 통하여 얻어진 값을 SigmaPlot 11(Systat Software Inc.)을 이용하여 구하였으며, 그 결과를 아래의 표 4에 나타내었다. 표 4 중 BMax는 input 대비 결합한
- 10 Kd(dissociation constant)는 친화력을 나타내는 수치로 수치가 낮을수록 결합력이 높음을 나타낸다.

【표 4】

	#12	#33	#11	#19	#10	Group1	Nap Library
Bmax	0.33	0.03	0.29	0.37	0.25	0.19	0.06
K _d (nM)	0.78	9.79	3.06	15.79	3.71	3.36	10.31

- 총 5종류의 clone을 가지고 assay하였고 이들 중 #12 clone(9-ER-N-C02_D06)의 경우 K_d가 0.78nM로 표적 단백질에 높은 친화력을
- 15 나타내는 결과를 보였다. #11 clone(9-ER-N-B12_C06)의 경우 screening 결과 표적단백질에 대하여 좋은 억제력(inhibition)을 보였다.

- Full length 압타머로부터 truncation을 통한 최적의 압타머 서열 결정:**
- SELEX 과정을 통하여 cloning된 DNA 압타머는 sequence가 80mer 전후의
- 20 길이를 가지는데, 이 정도의 길이가 타겟 단백질과의 해리상수(K_d)가 적합한 범위인 것으로 선별되었다. 이 중 가장 좋게 평가되는 두 가지 클론인 #11 Clone(1194-2로 표시, SEQ ID NO: 37) 및 #12 clone(1194-1로 표시, SEQ ID NO: 38)을 가지고 전체 sequence 길이를 가지는 74mer와 프라이머 영역을 제외한 랜덤영역 40mer인 압타머 1194-35(AP001-25, SEQ ID NO: 7) 및 압타머
- 25 1194-34(AP001-24, SEQ ID NO: 11)를 각각 합성하였다 (표 5 참조).

ERBB2 압타머 합성: 압타머는 핵산전용 고정상합성기인 Bioautomation사의 Mermade 12 합성기를 사용하여 Solid Phase Oligo Synthesis 방법으로 자체 합성하였다.

5 **ERBB2 압타머 분리/정제 및 QC:** 상기 변형 핵산체를 가지는 압타머의 합성, 정제 및 동정을 통하여 발굴된 변형 압타머들을 modified-dU-phosphoramidite로부터 Oligonucleotide 합성기(Bioautomation사의 Mermade12)를 이용한 phosphoramidite coupling 반응으로 합성하였으며, 합성 후 resin(200nmole-dA(Bz) synthesis column, 1000A(MM1-1000-2))을
10 t-butylamine:methanol:water(1:1:2 부피비)에 넣고 70℃에서 5시간 동안 deprotection후 진공 건조를 시킨 다음, C18 column (Waters, Xbridge OST C18 10x50mm)를 사용하여 5ml/min의 속도로 65℃에서 Acetonitrile의 농도를 높여가면서 HPLC의 방법으로 분리/정제하였다.

HPLC에서 UV 254 nm 및 290nm를 chromatogram을 분석한 결과 70 ~
15 90%의 순도를 보이는 변형 압타머들을 성공적으로 합성하였다. 이들 압타머들은 모두 LC-ESI MS spectrometer(Waters HPLC systems(Waters) + Qtrap2000(ABI))로 정확한 분자량을 측정하여 표 5에 나타내었다.

20 **【표 5】 ERBB2 압타머 서열 (ERBB2 압타머 = NapdU-modified DNA aptamer, 6 = NapdU)**

Code #	Sequence(DNA)	분자량 (g/mole)
#11	GAGTGACCGTCTGCCTGA6G66AGAG666GCC6G AG6GCC6CGCAAGGGCG6AACAAACAGCCACAC CACCAGCC (SEQ ID NO: 37)	24448.45
#12	GAGTGACCGTCTGCCTG6CC6GGCA6G66CGA6 GGAGGCC666GA66ACAGCCCAGACAGCCACA CCACCAGCC (SEQ ID NO: 38)	24544.55
AP001-24	#11 short A6G66AGAG666GCC6GAG6GCC6CGCAAGGGCG 6AACAA (SEQ ID NO: 11)	14067.80
AP001-25	#12 short 6CC6GGCA6G66CGA6GGAGGCC666GA66ACAGC CCAGA (SEQ ID NO: 7)	14163.90

#11(1194-2): 9-ER-N-B12_C06,

#12 (1194-1): 9-ER-N-C02_D06

6 = NapdU [5-(N-Naphthylcarboxyamide)-2'-deoxyuridine]

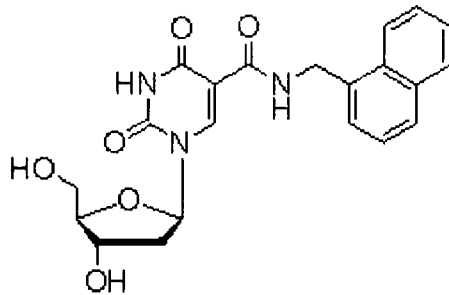
A = 2'-deoxyAdenosine

25 G = 2'-deoxyGuanosine

C = 2'-deoxyCytidine

T = 2'-deoxyThymidine(Thymidine)

상기 NapdU는 다음의 구조를 갖는다:



합성 ERBB2 압타머 분자량 측정: LC-ESI MS spectrometer를 이용하여
 5 10,000g/mole 이상의 분자량을 가진 압타머 및 압타머 제제를 0.02% 오차범위 내에서 정확한 분자량을 측정하였다.

ERBB2 압타머의 샌드위치 방식의 어세이 적용: 상기 발굴된 ERBB2 압타머를 이용하여 샘플에 있는 ERBB2의 농도를 정확히 측정하는 어세이
 10 개발 가능성을 살펴보기 위하여, ERBB2에 결합하지만 서로 방해하지 않으면서 동시에 결합하는 2종류의 압타머 AP001-24(SEQ ID NO: 11)와 AP001-25(SEQ ID NO: 7)를 이용하여 ELISA 방식의 어세이를 진행하여 5%의 serum(sigma)존재 하에서 정제된 ERBB2의 검출 능력을 확인하였다. 이를
 15 위하여 압타머에 대해서는 AP001-25를 바닥에 고정하고 AP001-24말단에 biotin을 conjugation하여 Streptavidin-HRP를 이용한 발색반응으로 확인하였고 (도 2A 참조), 항체와 비교를 위하여 RnD systems 사의 ERBB2 ELISA Kit를 사용하여 어세이를 진행하였다.

이와 같이 얻어진 결과를 도 2B에 나타내었다. 도 2B에서 알 수
 있는 바와 같이, 본 발명에 따른 ERBB2 압타머를 사용하는 경우 5% serum이
 20 존재하는 복잡한 샘플 조건에서 추가로 넣어준 정제된 ERBB2(R&D systems, 1129-ER-050)를 50pg/ml의 뛰어난 민감도로 측정 가능함을 확인하였다.

<실시예 2> ERBB2 압타머의 생체의 (in vitro) 효능 실험

2.1: ERBB2 signaling blocking을 위한 발굴 압타머 스크리닝

25 EGFR family는 전체 4종류의 isotype(EGFR1, ERBB2, ERBB3, ERBB4)로 이루어져 있으며, 이들 중 ERBB2는 세포막 바깥쪽에 EGF, NRG, TGF-alpha 등 리간드가 결합하는 도메인이 없으며 항상 활성화 되어있는 구조로 이루어져 있다. 실제 정상 세포내에서 EGF는 EGFR1에 결합하여 EGFR1의 구조를 변화시키고 ERBB2와 결합을 통하여 hetero-dimer형태가 되며, 이에

따라 수용체의 tyrosine kinase activity가 활성화되어 세포내로 신호를 전달하게 된다. 하지만 유방암, 대장암 등의 특정 암세포에서 ERBB2 수용체가 활성화 되면 EGFR1, ERBB3 등 다른 수용체를 거치지 않고 리간드가 결합할 수 없는 항상 활성화 형태인 ERBB2 수용체끼리 homo-dimer 형태를 형성함으로써 ERBB2 수용체의 tyrosine kinase활성이 증가되어 암세포의 성장을 유발하게 된다.

본 발명에서는 이러한 암의 형성 및 전이 과정에 중요한 ERBB2에 대하여 결합하는 aptamer를 발굴하였고, 이와 같은 결합 압타머 중 ERBB2의 활성을 저해하는 역할을 하는 압타머를 발굴하기 위하여 아래와 같은 screening 방법을 수립하였다.

EGF 농도 및 시간에 따른 EGFR의 티로신(Tyr845) 인산화 변화를 측정하기 위하여 세포주(A431, ATCC)에 EGF(P01133, Sigma)를 5분간 다양한 농도로 처리하거나 (도 3A), 10nM의 EGF를 다양한 시간동안 처리한 후 (도 3B) Lysis buffer(1% Triton X-100, Tris buffered saline)에서 ice에서 1시간동안 lysis시킨 후, 전기 영동 및 Nitro cellulose paper에 transfer 후 phospho-EGFR antibody(Cell Signal)를 이용하여 western blot을 수행함으로써 EGFR의 활성화에 따른 EGFR 인산화를 확인하였다.

도 3A 및 3B에 나타낸 바와 같이, EGF농도가 16nM 이상으로 증가할 때까지 EGFR의 활성이 증가하며, 5분 처리 시 가장 높은 활성도를 나타냄을 확인하였다.

이에 따라 본 연구진은 약 50여개의 ERBB2 결합 압타머를 스크리닝할 조건으로 EGF 10nM을 5분간 처리하고 이때 압타머를 동시에 넣음으로써 EGF에 의한 ERBB2 수용체의 티로신 인산화 정도를 측정함으로써 ERBB2의 활성도를 스크리닝하였다.

A431 세포(ATCC)를 6well plate에 고정하여 24시간 serum을 첨가하지 않은 DMEM(HyClone)으로 starvation을 진행 한 후, 10nM의 EGF(P01133, Sigma)와 함께 각각의 압타머를 첨가한 DMEM으로 미디어를 교환하여 5분간 incubation하였다. 그 후, media를 제거한 뒤 300ul의 lysis buffer(1%Triton X-100, Tris buffered saline)를 처리하여 scrapper를 이용해 세포를 모은 뒤 ice에서 1시간 동안 incubation하여 세포를 용해시킨 후, centrifuge를 이용하여 10분간 4C 1000g에서 원심분리하였다. 펠렛으로 나오는 핵을 제거하고 상층액만을 모은 후, 이렇게 얻은 세포 용해물을 전기영동 및 nitro cellulose paper에 transfer한 뒤 anti-human phospho ERBB2 antibody(Cell Signal)를 이용하여 western blotting을 하여ERBB2의 인산화

여부를 확인하였다. 이와 같은 스크리닝 방법을 대략적으로 도 4A에 나타내었다. 이는 ERBB2 압타머를 이용하여 EGFR과 ERBB2의 헤테로다이머 형성 저해를 확인하기 위하여 설계되었다.

표 2에 기재된 50개 압타머에 대한 p-ERBB2 저해율을 압타머 농도별(0.63, 2, 6.3, 20 nM)측정하였으며, 그 결과 AP001-24(SEQ ID NO: 11)가 가장 효과적으로 EGF에 의한 ERBB2의 활성화(인산화)를 저해함을 확인하여 그 결과를 도 4B에 나타내었다. AP001-24는 IC₅₀ 값이 약 1nM인 정도로 ERBB2의 활성을 저해함을 알 수 있다.

10 2.2: ERBB2 압타머의 암억제 효과

ERBB2 압타머가 EGF, HRG mediated EGFR-ERBB2 또는 ERBB2-ERBB3 hetero-dimerization을 차단(block)하며 암생존(cancer survival)과 관련이 있는 AKT 및 ERK와 같은 다운스트림 신호전달(Down stream signaling pathway)를 차단(block)하는 것을 관찰하였다.

15 도 5A와 5B는 각각 ERBB2 압타머(녹색)가 EGF 매개 다이머화와 HRG 매개 다이머화를 차단하여 ERBB2 활성화 (Tyr877 인산화)를 저해하는 과정을 모식적으로 보여준다.

ERBB2 압타머 AP001-24(SEQ ID NO: 11)를 EGF 또는 HRG와 함께 첨가하였을 때, EGF 또는 HRG만 첨가한 경우보다 ERBB2 활성화 (Tyr877 인산화)가 저해됨을 확인하였다. 이를 위하여 A431 cell line(ATCC)을 6well plate에 고정하여 50%-70% confluent가 될 때 성장인자가 없는 DMEM 배지(HyClone)로 교체 후, 24시간 동안 serum starvation을 진행하고, 세포가 있는 배지에 최종 농도20nM의 압타머를 15분간 첨가하여 incubation하였다. 그 후, 다시 최종농도 10nM 의 EGF(P01133, Sigma), 또는 2nM의 HRG(Q02297, Sigma)를 첨가하여 5분간 incubation 하였다. 그 후, 상층액을 제거하고, 300ul의 lysis buffer(1%Triton X-100, Tris buffered saline)을 첨가하여 모은 뒤, ice에서 1시간동안 incubation을 하여 cell lysate를 만들었다. 만들어진 lysate를 5분간 4C 15000 rpm의 원심분리를 하여 (table top centrifuge, Eppendorf), 상층액만을 모아 세포 핵을 제거한 뒤, 전기영동 및 Nitro cellulose paper에 transfer하여 phospho-ERBB2 specific antibody(Cell Signal)를 이용하여 Western blot을 수행하였다. (도 5C 참조, NT: No Treatment, Control aptamer: Ap001-24의 reverse complement sequence).

또한 이러한 AP001-24 aptamer에 의한 ERBB2 수용체의 활성화 저해는 암세포의 성장에 중요한 역할을 한다고 알려진 ERBB2 down stream의

Akt, ERK단백질의 활성화 또한 저해함을 확인하였다.

이를 위하여 A431 cell line(ATCC)을 6well plate에 고정하여 50%-70% confluent가 될 때 성장인자가 없는 DMEM 배지(HyClone)로 교체 후 24시간 동안 serum starvation을 진행 한 후, 세포가 있는 배지에 최종 농도20nM의
 5 압타머 AP001-24를 15분간 첨가하여 incubation 후 다시 최종농도 10nM 의 EGF(P01133, Sigma), 또는 2nM의 HRG(Q02297, Sigma)를 첨가하여 5분간 incubation하였다. 그 후, 상층액을 제거하고 300ul의 lysis buffer(1%Triton X-100, Tris buffered saline)을 첨가하여 모은 뒤 ice에서 1시간동안 incubation을
 10 하여 cell lysate를 만들었다. 만들어진 lysate를 5분간 4C 15000 rpm의 원심분리를 하여 (table top centrifuge, Eppendorf), 상층액만을 모아 세포 핵을 제거한 뒤, 전기영동 및 Nitro cellulose paper에 transfer하여 phospho-Akt specific antibody(Cell Signal) 및, phospho-ERK specific antibody(Cell Signal)를 이용하여 Western blot을 수행하였다 (도 6 참조).

15 2.3: ERBB2 압타머의 선택성(Specificity) 확인

본 발명에서 발굴된 ERBB2 압타머가 ERBB2만을 특이적으로 결합하는지를 확인하기 위하여, ERBB2 압타머 AP001-24(SEQ ID NO: 11)의 ERBB2와 아미노산 서열이 비슷한 EGFR(Acc# P04412)와의 결합력을 비교해 보았다.

20 결합력을 측정하기 위하여 α -P³²ATP(Perkin Elmer)와 TdT(Terminal deoxynucleotidyl transferase, NEB)로 말단에 표지 하였다. 상기 SELEX 과정을 통하여 얻어진 library DNA 1 μ M, 0.25 μ L α -P³²ATP(5 μ M, perkinelmer), 0.25 μ L TdT, 및 10XNEB buffer4(NEB) 10 μ L reaction volume으로 37℃에서 30분간 반응시키고, 70℃에서 10분간 incubation 하여, TdT를 불활성화시켰다. 표지된
 25 DNA pool은 Micro spin G-50 column(GE healthcare)을 이용하여 정제하였다.

표지된 DNA pool 20,000cpm을 100 μ L 1xSB buffer(200mM HEPES, 510mM NaCl, 25mM KCl, 25mM MgCl₂)에 넣고 95℃에서부터 1초에 0.1℃씩 37℃까지 천천히 냉각시켰다. 그리고, buffer (200mM HEPES, 510mM NaCl, 25mM KCl, 25mM MgCl₂)를 이용하여 ERBB2 protein(R&D systems,
 30 1129-ER-050)을 100nM에서 12 point로 serial dilution한 뒤, 상기 가열 및 냉각시킨 DNA pool 30 μ L를 각각 첨가하여 37℃에서 30분간 반응시켰다. Nylon membrane(GE healthcare)에 DNA와 ERBB2의 혼합물을 각각 2 μ L씩 spotting한 뒤 zorbax resin(Agilent) 5.5 μ L를 첨가하였다. 그리고 미리 1X SB buffer(200mM HEPES, 510mM NaCl, 25mM KCl, 25mM MgCl₂) 50 μ L로 적셔놓은

Durapore filter(Millipore)에 넣고 vacuum을 걸어주었다. 그리고 membrane filter를 100 μ L의 1X selection buffer(200mM HEPES, 510mM NaCl, 25mM KCl, 25mM MgCl₂)로 씻어주었다. Filter plate를 image plate에 overnight expose한 뒤 FLA-5100(Fuji)으로 image를 정량화 한 후 그 결과를 도 7A에 나타내었다.

5 도 7A에 나타난 바와 같이, ERBB2 결합 압타머는 ERBB2에 대한 결합력이 EGFR 수용체보다 1,000배 이상의 높은 것으로 확인되었다.

또한, 상기 ERBB2 압타머 AP001-24(SEQ ID NO: 11)에 Cy3 fluorescent(BioGenex)를 conjugation한 뒤, 이를 이용하여 유방암 세포주인 MCF7(ATCC)에서의 ERBB2와의 결합을 Cytochemistry (도 7B), 및 FACS assay

10 방법(도 7C)을 통하여 확인하였다.

Cytochemistry를 위하여 MCF7 세포(ATCC)를 24well plate에 cover glass를 넣고 키운 후 30~50% confluent하게 되었을 때 1%(w/v) 파라포름 알데히드가 포함된 PBS로 세포를 고정시킨 뒤, 15분간 1% BSA가 포함된 Tris buffered saline으로 blocking 하였다. 그 후 항체의 경우 ErBB2 specific

15 antibody(Cell Signaling)을 1:1000(v/v)의 비율로 1%(w/v)의 BSA(RnD systems)가 첨가된 PBS로 희석하여 처리하고 압타머의 경우 10pmole의 압타머 AP001-24(SEQ ID NO: 11)를 37℃에서 30분간 처리한 뒤, cover glass를 PBS로 3회 세척한 뒤 dehydration 및 건조시킨 후, slide glass에 permount 시킨 뒤 Microscope를 이용하여 관찰하였다.

FACs assay를 위하여 MCF7 세포(ATCC)를 10cm plate에 5x10⁴ 내지 2x10⁵ 세포수만큼 배양한 뒤, 2mM EDTA를 첨가하여 세포를 떼어낸 뒤, 4℃로 냉각된 PBS로 세척하였다. 그 후, 항체의 경우 ErBB2 specific

20 antibody(Santacruz)를 1:1000(v/v)의 비율로 1%(w/v)의 BSA(RnD systems)가 첨가된 PBS로 희석하여 4℃에서 60분간 처리하고 PBC로 3회 세척 뒤, FITC conjugated secondary antibody(Santacruz)를 RT에서 30분간 처리하였다.

25 압타머의 경우 100pmole의 압타머 AP001-24(SEQ ID NO: 11)를 넣어 4℃에서 1시간 반응시키고, 4℃로 냉각된 PBS로 세척하여 준비하였다. 항체 및 압타머를 처리한 세포들은 1%(w/v) 파라포름알데히드 용액을 1.5ml씩 첨가하여 4℃에서 고정시킨 후 FACs 기기(FACSCalibur flow cytochemistry, BD

30 bioscience)를 이용하여 측정하였다.

도 7B 및 7C에 나타난 바와 같이, ERBB2 압타머 AP001-24(SEQ ID NO: 11)는 ERBB2에만 특이적으로 결합함을 확인할 수 있다 (control aptamer: Ap001-24의 reverse complement sequence).

<실시예 3> ERBB2 압타머 제제(formulation)의 제조

Truncated aptamer AP001-24(SEQ ID NO: 11)로부터 4종류의 ERBB2 압타머 제제를 다음과 같이 합성하였다.

E1: (2'-OMeU)₂-ERBB2 압타머-(2'-OMeU)₂

5 [(2'-OMeU)₂-Cy3-O-(AP001-24)-O-(2'-OMeU)₂-T]

E2: PEG-ERBB2 압타머-idT [Cy3-T-PEG₇₈₄-O-(AP001-24)-idT]

E3: ERBB2 압타머-idT [Cy3-O-(AP001-24)-idT]

E4: ERBB2 압타머 [Cy3-O-(AP001-24)-OH]

(T: 2'-deoxyThymidine(Thymidine), idT: inverted deoxythymidine)

10 (PEG 분자량: 784 Da)

정제 후 2차 증류수에 녹여 압타머의 농도를 측정한 후 각각의 압타머가 0.1mM 농도가 되도록 준비하였다.

ERBB2-aptamer 제제의 혈청 내 안정성을 확인하기 위하여 혈청 내 반감기 측정하였다. 구체적으로, 상기 준비된 압타머를 94℃에서 4분간
15 방치 후, 상온까지 1시간 동안 천천히 온도를 낮추어서 압타머가 2차 구조를 잘 형성하도록 하였다. 각각의 압타머 용액 40uL(4 nmoles)를 200uL의 Human Serum (Human male AB plasma/sigma H4522)에 첨가하여 vortex한 후, 20uL씩 열개의 E-tube에 분주하여 37℃ 항온기에 방치하였다. 각 샘플을 10min, 30min, 1h, 2h, 4h, 8h, 21h, 24h, 30h, 48h, 72h 마다 순서대로 극저온 냉동고에
20 보관하고 분석전에 20uL의 증류수를 첨가한 후 10uL씩 취하여 Anion Exchange HPLC(Column: GE Healthcare, HPLC:Waters)_를 이용하여 정량하고 혈청 내의 잔존 양을 graph로 나타낸 결과를 분석하여 ERBB2 압타머의 혈청 내 안정성을 측정하였다.

HPLC 조건은 Anion exchange Resource-Q column을 사용하였으며, A
25 buffer는 25mM Tris-HCl pH8.5, B buffer는 1M NaCl 25mM Tris-HCl pH 8.5를 사용하고 25분간 B buffer의 비율을 10%(v/v)에서 100%(v/v)까지 서서히 올려주었으며 551nm의 파장을 조사해 566nm의 형광을 측정하였다.

위 분석으로 얻어진 결과를 아래의 표 6에 나타내었다.

30

【표 6】

	10min	30min	1h	4h	8h	21h	24h	30h	48h	72h
(2'-OMeU) ₂ -Cy3-1194-3 4-O-(2'-OMeU) ₂ -T	100.0	99.4	98.6	98.6	93.9	94.0	93.1	90.3	87.0	82.2
Cy3-T-PEG 784-1194-34-idT	100.0	94.9	94.7	94.4	94.2	93.9	92.7	88.6	88.4	83.9
Cy3-1194-3 4-idT	100.0	98.8	96.3	96.6	97.0	94.7	93.5	90.3	87.3	77.0
Cy3-1194-3 4-idT	100.0	97.7	97.7	95.0	89.9	88.0	83.7	78.9	70.4	66.0

위 결과로부터, 4종의 ERBB2 압타머에 대한 혈청에서의 안정성 실험 결과 3종류의 압타머제제 모두 반감기가 72시간 이상 안정함을 확인하였다($t_{1/2}$ in serum > 72 hr). 특히 압타머의 5' 및 3' 말단이 변형된 경우 전체적으로 안정성이 현저하게 증대되는 것으로 나타났다.

위 결과 나타난 압타머 제제의 안정성 순서는 다음과 같다:

PEG-ERBB2 압타머-idT(E2) = (2'-OMeU)₂-ERBB2 압타머-(2'-OMeU)₂(E1) > ERBB2 압타머-idT(E3) > ERBB2 압타머(E4)

상기 가장 안정한 것으로 나타난 PEG-ERBB2 압타머-idT(E2)의 반감기를 Control T40 mer aptamer(T1, T가 40번 반복된 구조)와 비교하였다. 상기와 같은 방법으로 혈청 내 반감기를 측정한 결과를 도 9에 나타내었다. 도 8에서와 같이, T1은 반감기가 3시간($t_{1/2}$ in serum = 3 hr)인 반면, PEG-ERBB2 압타머-idT(E2)은 반감기가 170 시간($t_{1/2}$ in serum = 170 hr)인 것으로 나타나, 본 발명의 ERBB2 압타머 변형체가 혈청 내에서 매우 안정 함을 확인하였다.

<실시예 4> ERBB2 압타머 제제(PEG-ERBB2 압타머-idT)의 in vivo 효능

실험 방법

동물 모델의 제작: 6주령 Balb/c nude female 마우스를 이용하여 종양 in vivo 모델을 만들었다. 실험에 사용된 마우스의 평균 무게는 평균 20g 이었다. 마우스의 등 피하 조직에 estradiol pellet을 이식하였다. 사람에서 유래된 유방암 세포주인 BT-474세포를 ATCC사에서 구매하여 증식시켰다. Pellet주입 이틀 후에 증식된 BT-474세포를 5×10^7 세포수만큼의 양으로 마우스의 허벅지에 피하 주사하여 종양을 형성하도록 하였다. 주사 후 2-3주간 매일 관찰하여 종양의 성장을 육안으로 확인하고 caliper를 사용하여 종양의 크기를 측정하였다.

FDG PET영상 획득: 종양의 형성을 확인하기 위하여 FDG PET영상을 시행하였다. 검사 24시간 전부터 물 이외에 음식을 시켰다. F-18 FDG (F-18플루오로디옥시글루코스, 세브란스병원 핵의학과 사이클로트론 센터) 220-230 μ Ci를 마우스 복강내로 주사하고, 1시간 후에 Siemens Inveon animal PET(Positron emission tomography)을 이용하여 영상을 얻었다. 치료 후 효과

5 관정을 위하여 같은 프로토콜을 사용하여 다시 FDG PET영상을 얻었다.

ERBB2 압타머를 이용한 치료: ERBB2 압타머(AP001-24, SEQ ID No: 11)와 ERBB2 압타머 제제(E2 제제, PEG-ERBB2 압타머-idT, AP001-24, SEQ ID

10 No: 11)를 각각 5mg/kg 및 20mg/kg의 양으로 복강 내로 5일간 매일 주사하였다. 대조군에서는 PBS 200ul을 복강 내로 주사하였다. 2-3일간격으로 종양의 크기를 caliper를 이용하여 측정하고, 6일째에 FDG PET영상을 얻어 비교하였다.

15 결과

종양의 크기 변화: ERBB2 압타머 제제(PEG-ERBB2, E2)를 투여한 경우의 종양 크기 변화를 측정하여 PBS 을 투여한 경우와 비교하여, 그 결과를 도 9에 나타내었다. 도 9에서 확인되는 바와 같이, ERBB2 압타머 제제(PEG-ERBB2, E2) 5mg, 20mg, ERBB2 20mg 에서 유의한 종양의 크기

20 변화를 보였다. 종양 크기 억제 효과는 치료가 종결된 7일 이후에도 지속되어 2주 이상 지속되었다.

FDG PET영상 결과: 상기 FDG PET영상을 통하여 종양의 대사 활성 정도를 평가한 결과를 도 10에 나타내었다. 도 10에 나타낸 바와 같이, 치료 전 종양 부위에서 높게 관찰되던 포도당 대사 정도는 ERBB2 압타머 제제 (PEG-ERBB2, E2) 5mg/kg를 복강내로 5일간 치료 후 6일째 영상에서 지속적으로 낮게 측정되어 ERBB2압타머 제제에 의하여 종양의 포도당 대사가 억제되고 있음을 확인할 수 있다. 또한, 종양부위 (화살표)의 크기가 감소하는 것도 확인할 수 있다.

30 위와 같은 ERBB2 압타머 제제를 이용한 종양 마우스 모델 실험을 통하여 대조군과 비교하여 유의미한 정도의 종양의 크기 감소 효과를 확인할 수 있었다. 또한 FDG PET을 이용하여 종양의 포도당 대사 정도를 확인하였으며, ERBB2압타머 제제 치료 후에 유의한 포도당 대사 정도의

35 감소를 확인할 수 있었다. 이와 같은 종양의 크기 변화와 포도당 대사에

대한 평가를 통하여 ERBB2 압타머 제제의 BT-474 유방암 세포주에 대한 항암효과를 확인할 수 있다.

<실시에 5> 압타머 제제의 생체내 안전성평가

5 5.1. 압타머제제(Aptamer Formulation)의 ICR 마우스를 이용한 단회 정맥내투여 독성시험

본 시험은 시험 물질 압타머제제(Aptamer Formulation)를 ICR 계통의 마우스에 단회 정맥내투여 하였을 때 나타나는 개략적인 독성을 알아보기 위하여 실시하였다. 시험물질로 40kDa PEG를 사용하여 제조된 압타머
10 제제인 PEG-ERBB2 압타머-idT를 사용하였다.

시험물질을 0 (vehicle control), 10, 100 및 1,000 mg/kg의 용량으로, 군당 10 마리(암수 각 5 마리)에 단회 투여한 후 사망률, 일반증상, 체중 및 부검소견을 관찰하여 부형제 대조군과 비교하였다.

15 재료 및 방법

시험물질은 상기 실시예 3에서 ERBB2 압타머(AP001-24)로부터 만든 40kDa PEG-ERBB2 압타머-idT (E2)를 사용하였다. 부형제는 1X D-PBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, GIBCO)를 사용하였다. 상기 부형제는 시험물질이 잘 용해되고, 정맥내 투여 시 독성시험에서 일반적으로 사용하는
20 물질이기 때문에 선택하였다. 시험군으로 사용한 동물은 특정병원균 부재(SPF) 마우스, HsdKoat:ICR(CD-1[®] 코아텍)으로, 입수시 7 주령이고 성별은 암수 각각 24마리이며, 입수시 체중은 수컷 30.13-32.97 g, 암컷 23.81-26.36 g이었으며, 투여시에는 8 주령, 암수 각 20 마리 및 투여시 체중은 수컷 31.33-34.70 g, 암컷 24.87-27.40 g 이었다.

25 동물 공급처에서 제공한 시험군의 병원체 검사 성적서를 참고 하여 입수동물의 검수검역을 실시하였다. 동물은 입수 후 5 일간 시험을 실시하는 동물실내에서 순화시켰고, 순화기간 중 일반증상을 관찰하여 건강한 동물만을 시험에 제공하였다.

사육환경은 본 실험을 온도 23±3 °C, 상대습도 55±15 %, 환기횟수
30 10-20 회/hr, 조명 12 시간(오전 8 시 점등-오후 8 시 소등) 및 조도 150-300 Lux로 유지되는 (주)캠온 전임상연구센터 제2동물사육구역 3 호실에서 수행하였다. 모든 시험자들은 고압증기멸균(121 °C, 20 분)한 작업복과 보호장구를 착용하고 실험을 수행하였다. 실험기간 동안 동물실의 온도와 상대습도 범위는 각각 22.5-22.8 °C 및 63.7-69.2 % 였고, 자동제어시스템을

이용하여 기록하였다. 환기횟수, 조도 등은 (주)캠온 전임상연구센터의 표준작업수순서(SOPs)에 따라 정기적으로 측정하였다. 그 결과, 시험 결과에 영향을 미치는 이탈은 관찰되지 않았다. 동물은 스테인레스제 망 사육상자(W 165 x L 240 x H 145 mm)에서 수컷은 모든 실험기간 동안 1 마리/사육상자로, 암컷은 검역 및 순화기간에는 5 마리/사육상자 이하, 투여 및 관찰기간에는 3 마리/사육상자 이하로 사육하였다. 실험에 공급된 사료는 방사선조사로 멸균된 실험동물용 고형사료(TEKLAD CERTIFIED IRRADIATED GLOBAL 18 % PROTEIN RODENT DIET, 2918C, Harlan Co. Ltd., USA)를 코아텍으로부터 공급받아 자유롭게 섭취하도록 하였다. 사료의 성분분석성적서를 검토한 결과, 시험 결과에 영향을 줄만한 요인은 없었다.

물은 지하수를 자외선 살균기와 미세여과장치를 거친 후, 물병을 이용하여 자유롭게 섭취하도록 하였다. 수질검사는 경기도보건환경연구원(경기도 수원시 장안구 파장동 324-1)에서 수행하였고, 먹는 물 수질 기준에 적합하였다.

본 시험은 동물보호법(제정 1991 년 05 월 31 일 법률제 4379 호, 일부개정 2008 년 02 월 29 일 법률제 8852 호)에 근거한 (주)캠온 전임상연구센터의 동물윤리위원회에 승인되었다.

시험군 구성 및 투여량 설정

시험군 구성은 다음과 같다:

【표 7】

Group	성별	개체수	동 물 번 호	투여액량(mL/kg)	투여량(mg/kg)
G1 ^{a)}	M / F	5 / 5	01-05 / 21-25	10	0
G2	M / F	5 / 5	06-10 / 26-30	10	10
G3	M / F	5 / 5	11-15 / 31-35	10	100
G4	M / F	5 / 5	16-20 / 36-40	10	1,000

a) 부형제대조군(1X D-PBS)

투여량은 1,000 mg/kg을 고용량으로 두고, 그 아래로 공비 10으로 두 개군을 설정하였으며, 1X D-PBS만을 투여하는 부형제 대조군을 설정하였다.

동물의 군분리는 다음과 같이 실시하였다. 먼저, 순화기간 중 건강한 것으로 판정한 동물의 체중을 측정하고, 평균체중에 가까운 동물들을 암수 각각 20 마리씩 선택하였다. 선택한 동물들은 순위화한 체중에 따라 각 군의 평균체중이 최대한 균일하게 분포하도록 무작위법으로 분배하여 '시험군의 구성' 표에 지정된 수가 되도록 하였다. 군분리 후 잔여동물은 연습동물로 사용하였다.

개체식별은 순화기간에는 유성 매직을 이용한 미부표식법을

- 사용하였고, 투여 및 관찰기간에는 포화피크린산용액을 이용한 피모색소표식법을 사용하였다. 사육상자에는 용량별로 다른 색상의 개체식별카드를 부착하였으며, 사육상자대에는 고유번호를 부여하였다. 사육실 입구에는 시험번호, 동물실 사용기간, 시험책임자명, 시험담당자명, 비상연락처 등을 기재한 동물실사용기록지를 부착하였다.

- 시험물질은 순도에 대한 보정 없이 조제에 사용하였고, 투여직전에 조제하였다. 고용량군의 투여액은 시험물질을 칭량한 후 부형제에 용해시켜 100 mg/mL의 농도로 조제하였다. 중간 및 저 용량군의 투여액은 앞서 조제한 고용량군의 투여액을 동일한 부형제로 단계희석하여 조제하였다.
- 10 고용량군의 투여액에 한하여 pH Test Strips (P-4536, SIGMA)를 이용하여 pH를 측정된 결과 6.0-6.5 사이로 관찰되었다.

- 사람에 대한 임상예정경로인 정맥내투여를 선택하였다. 투여할 동물을 보정기에 넣은 후, 꼬리를 70 %, 알코올 솜으로 소독하고, 거즈를 이용하여 알코올 성분을 제거한 후, 26 G 주사침을 이용하여 약 1 mL/분의 속도로 정맥내투여하였다. 투여당일에 측정된 절식시의 체중을 기준으로 10 mL/kg으로 투여액을 산출하였다. 1 회/일, 단회투여 하였으며, 투여는 11:30 이전에 완료하였다. 투여일을 day 0으로 설정하였다.

관찰 및 검사항목

- 20 일반증상은 투여 당일에는 투여 후 1 시간까지는 지속적으로, 투여 후 6 시간까지는 매시간마다 사망여부 및 증상을 관찰하였으며, 그 이후에는 매일 1 회 이상 투여 후 14 일까지 관찰하였다.

체중은 모든 동물에 대하여 투여 전, 투여 후 1, 3, 7 및 14 일째에, 사망동물에 대하여 발견 즉시 체중을 측정하였다.

- 25 부검은 투여 후 14 일째에 생존동물을 CO₂를 이용하여 흡입마취시켜 개복한 후, 후대정맥과 복대동맥을 절단하여 방혈치사 시킨 다음, 체표 및 장기에 대한 육안적인 부검소견을 관찰하였다.

- 통계는 체중 및 증체량은 일원배치 분산분석(one-way ANOVA test)으로 유의성을 평가하였고, $P < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의하다고 판정하였다. 정규성을 가정하고, Levene test로 등분산성을 검정한 결과, 등분산성이어서 Duncan's multiple range test를 수행하였다. 사망동물에 대한 반수치사량(LD₅₀)은 Probit 법에 따라 산출하였고, 통계를 위한 전산 프로그램으로는 SPSS 10.1 K를 이용하였다.

결과

상기 얻어진 결과를 하기의 표 8 내지 표 17에 나타내었다:

【표 8】 압타머제제(E2)를 ICR 마우스에 단회 정맥내투여시 독성시험 결과

STUDY: 10-MA-337		DAYS AFTER DOSE										SEX: MALE
groups (mg/kg)	No. DEAD/ No. DOSED	0	1	2	3	4	5	6	7	8-14	LD ₅₀ Value	
G1 (0)	0 / 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
G2 (10)	0 / 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
G3 (100)	0 / 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
G4 (1,000)	1 / 5	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1215.8 mg/kg	
												SEX: FEMALE
groups (mg/kg)	No. DEAD/ No. DOSED	0	1	2	3	4	5	6	7	8-14	LD ₅₀ Value	
G1 (0)	0 / 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
G2 (10)	0 / 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
G3 (100)	0 / 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
G4 (1,000)	0 / 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	> 1,000 mg/kg	

5

a) LD₅₀: Lethal Dose 50

b) ALD: Approximate Lethal Dose

【표 9】 수컷 마우스에서의 임상적 증상

SEX: MALE		CLINICAL SIGNS	
Groups (mg/kg)	Animal ID	SIGNS	OBSERVED ON
G1 (0)	1	Normal Terminal sacrifice	DAY 0-14 DAY 14
	2	Normal Terminal sacrifice	DAY 0-14 DAY 14
	3	Normal Terminal sacrifice	DAY 0-14 DAY 14
	4	Normal Terminal sacrifice	DAY 0-14 DAY 14
	5	Normal Terminal sacrifice	DAY 0-14 DAY 14
G2 (10)	6	Normal Terminal sacrifice	DAY 0-14 DAY 14
	7	Normal Terminal sacrifice	DAY 0-14 DAY 14
	8	Normal Terminal sacrifice	DAY 0-14 DAY 14
	9	Normal Terminal sacrifice	DAY 0-14 DAY 14
	10	Normal Terminal sacrifice	DAY 0-14 DAY 14
G3 (100)	11	Normal Terminal sacrifice	DAY 0-14 DAY 14
	12	Normal Terminal sacrifice	DAY 0-14 DAY 14
	13	Normal Terminal sacrifice	DAY 0-14 DAY 14
	14	Normal Terminal sacrifice	DAY 0-14 DAY 14
	15	Normal Terminal sacrifice	DAY 0-14 DAY 14
G4 (1,000)	16	Normal Terminal sacrifice	DAY 0-14 DAY 14
	17	Normal Terminal sacrifice	DAY 0-14 DAY 14
	18	Normal Death	DAY 0-6 DAY 7
	19	Normal Terminal sacrifice	DAY 0-14 DAY 14
	20	Normal Terminal sacrifice	DAY 0-14 DAY 14

a) The day of administration was designated as day 0.

【표 10】 암컷 마우스에서의 임상적 증상

STUDY: 10-W-337	CLINICAL SIGNS		sex: FEMALE
groups (mg/kg)	Animal ID	SIGNS	OBSERVED ON
G1 (0)	21	Normal	DAY 0-14
		Terminal sacrifice	DAY 14
	22	Normal	DAY 0-14
		Terminal sacrifice	DAY 14
	23	Normal	DAY 0-14
		Terminal sacrifice	DAY 14
G2 (10)	24	Normal	DAY 0-14
		Terminal sacrifice	DAY 14
	25	Normal	DAY 0-14
		Terminal sacrifice	DAY 14
	26	Normal	DAY 0-14
		Terminal sacrifice	DAY 14
G3 (100)	27	Normal	DAY 0-14
		Terminal sacrifice	DAY 14
	28	Normal	DAY 0-14
		Terminal sacrifice	DAY 14
	29	Normal	DAY 0-14
		Terminal sacrifice	DAY 14
G4 (1,000)	30	Normal	DAY 0-14
		Terminal sacrifice	DAY 14
	31	Normal	DAY 0-14
		Terminal sacrifice	DAY 14
	32	Normal	DAY 0-14
		Terminal sacrifice	DAY 14
	33	Normal	DAY 0-14
		Terminal sacrifice	DAY 14
	34	Normal	DAY 0-14
		Terminal sacrifice	DAY 14
	35	Normal	DAY 0-14
		Terminal sacrifice	DAY 14
	36	Normal	DAY 0-14
		Terminal sacrifice	DAY 14
	37	Normal	DAY 0-14
		Terminal sacrifice	DAY 14
	38	Normal	DAY 0-14
		Terminal sacrifice	DAY 14
	39	Normal	DAY 0-14
		Terminal sacrifice	DAY 14
	40	Normal	DAY 0-14
		Terminal sacrifice	DAY 14

a) The day of administration was designated as day 0.

【표 11】 마우스의 임상적 증상

STUDY: 10-MA-337		CLINICAL SIGNS		SEX: MALE	
DAYS	SIGNS	groups (mg/kg)			
		G1 (0)	G2 (10)	G3 (100)	G4 (1,000)
0-3	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
7	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	4 / 5
	Death	0 / 5	0 / 5	0 / 5	1 / 5
8-13	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	4 / 4
14	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	4 / 4
	Terminal sacrifice	5 / 5	5 / 5	5 / 5	4 / 4
SEX: FEMALE					
DAYS	SIGNS	groups (mg/kg)			
		G1 (0)	G2 (10)	G3 (100)	G4 (1,000)
0-13	Normal	5 / 5 ^a	5 / 5	5 / 5	5 / 5
14	Normal	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5
	Terminal sacrifice	5 / 5	5 / 5	5 / 5	5 / 5

상기 표 8 내지 표 11에 나타낸 바와 같이, 사망률은 1,000 mg/kg 투여군에서 투여 후 7 일째에 수컷 1 마리가 사망하여 수컷에서 본 시험물질의 반수치사량은 1215.8 mg/kg (신뢰구간은 산출되지 않았음)으로 산출되었으며, 모든 생존동물 및 사망동물에서 이상증상은 관찰되지 않았다.

【표 12】 마우스의 체중 변화

BODY WEIGHTS (g)				
STUDY: 10-MA-337		groups (mg/kg)		SEX: MALE
DAYS	G1 (0)	G2 (10)	G3 (100)	G4 (1,000)
DAY 0	33.38±1.27 (5) ^{b)}	33.60±1.11 (5)	33.72±0.75 (5)	33.59±0.76 (5)
DAY 1	33.57±1.55 (5)	33.54±0.58 (5)	33.62±0.67 (5)	33.02±0.22 (5)
DAY 3	34.50±0.98 (5)	34.09±1.15 (5)	34.83±0.61 (5)	32.19±1.24 (5) ^{a)}
DAY 7	33.58±1.38 (5)	33.74±1.43 (5)	34.27±0.68 (5)	33.04±0.75 (4)
DAY 14	35.07±1.97 (5)	36.05±1.80 (5)	35.35±0.64 (5)	35.18±1.40 (4)
GAINS ^{a)}	1.69±1.54 (5)	2.45±1.13 (5)	1.63±0.96 (5)	1.80±1.37 (4)
SEX: FEMALE				
DAYS	G1 (0)	G2 (10)	G3 (100)	G4 (1,000)
DAY 0	26.05±0.88 (5)	25.88±0.84 (5)	26.36±1.01 (5)	26.14±0.64 (5)
DAY 1	26.25±0.95 (5)	26.10±0.81 (5)	26.44±0.74 (5)	25.93±0.88 (5)
DAY 3	27.05±1.49 (5)	27.12±0.94 (5)	26.92±0.95 (5)	27.29±1.26 (5)
DAY 7	26.73±1.93 (5)	27.57±0.89 (5)	26.70±0.81 (5)	26.96±1.19 (5)
DAY 14	28.46±2.15 (5)	29.73±0.88 (5)	28.20±0.75 (5)	28.80±1.42 (5)
GAINS ^{a)}	2.41±1.42 (5)	3.85±0.40 (5)	1.84±0.95 (5)	2.66±1.54 (5)

10

a) Weight gains are body weight difference between day 14 and the day 0.

b) Numbers in parenthesis represent the number of survived animals.

** A significant difference at $P<0.01$ level compared with the vehicle control.

【표 13】 수컷 마우스의 체중 변화

STUDY: 30M11231	BODY WEIGHTS (g)				SEX: MALE		
groups (n/g kg)	ANIMAL ID	Day 0	Day 1	Day 3	Day 7	Day 14	GAINS
G1 (10)	1	34.19	34.38	34.51	35.82	36.71	1.61
	2	34.33	34.39	35.25	36.57	37.79	1.46
	3	34.70	34.86	35.07	36.41	36.16	1.46
	4	33.31	34.31	35.77	35.26	37.31	4.10
	5	33.48	33.30	33.92	34.83	33.28	-0.20
	MEAN	33.38	33.57	34.50	33.58	35.07	1.69
	S.D.	1.27	1.55	0.98	1.38	1.97	1.54
	N	5	5	5	5	5	5
G2 (10)	6	31.90	32.85	33.13	32.66	34.71	2.81
	7	34.42	34.15	34.99	34.95	37.07	2.65
	8	34.21	33.94	34.87	34.42	37.85	3.64
	9	33.04	33.01	32.57	31.79	33.61	0.57
	10	34.45	33.77	34.91	34.88	37.01	2.56
	MEAN	33.60	33.54	34.09	33.74	36.05	2.45
	S.D.	1.11	0.58	1.15	1.43	1.80	1.13
	N	5	5	5	5	5	5
G3 (100)	11	33.03	32.85	34.04	33.33	34.80	1.77
	12	33.07	33.14	34.75	34.37	36.23	3.16
	13	34.50	34.59	35.24	35.20	35.81	1.31
	14	34.53	33.75	35.60	34.41	35.09	0.56
	15	33.45	33.75	34.50	34.03	34.81	1.36
	MEAN	33.72	33.62	34.83	34.27	35.35	1.63
	S.D.	0.75	0.67	0.61	0.68	0.64	0.96
	N	5	5	5	5	5	5
G4 (1,000)	16	33.15	32.91	34.32	33.95	36.47	3.32
	17	34.03	32.96	32.16	33.13	36.30	2.27
	18	34.46	32.97	31.28	29.71 ^{a)}	-	-
	19	33.80	33.41	31.39	32.97	33.86	0.06
	20	32.53	32.85	31.80	32.12	34.07	1.54
	MEAN	33.59	33.02	32.19	33.04	35.18	1.80
	S.D.	0.76	0.22	1.24	0.75	1.40	1.37
	N	5	5	5	4	4	4

a) Weight gains are body weight difference between day 14 and the day 0.

b) Body weight at the time of death.

-: Not applicable (Death).

【표 14】 암컷 마우스에서의 체중 변화

Study Group	BODY WEIGHTS (g)						S.D.
	ANIMAL ID	Day 0	Day 1	Day 5	Day 7	Day 14	
G1 (100)	21	27.07	26.81	28.28	28.23	29.20	2.22
	22	26.00	26.00	27.73	28.28	29.21	2.11
	23	25.22	26.39	26.70	26.91	27.48	2.26
	24	25.15	25.43	27.06	27.06	27.11	2.00
	25	26.79	27.31	27.83	28.00	29.96	2.17
	MEAN	26.05	26.25	27.03	27.13	28.46	2.41
	S.D.	0.88	0.95	1.49	1.93	2.15	1.42
	N	5	5	5	5	5	5
G2 (100)	26	25.22	25.19	26.13	26.61	28.79	2.37
	27	25.34	25.96	26.22	26.82	29.03	2.69
	28	26.93	27.20	28.28	28.41	30.98	1.05
	29	25.27	25.56	27.11	27.41	29.72	1.45
	30	26.66	26.60	27.79	28.51	30.13	2.47
	MEAN	25.88	26.10	27.12	27.57	29.73	2.85
	S.D.	0.84	0.81	0.94	0.89	0.88	0.40
	N	5	5	5	5	5	5
G3 (100)	31	24.87	25.35	25.91	25.53	27.10	2.23
	32	25.88	25.99	26.89	26.50	28.70	2.82
	33	27.05	26.89	26.05	27.29	28.28	1.23
	34	26.60	26.90	27.78	26.55	29.02	2.42
	35	27.40	27.06	27.95	27.63	27.89	0.49
	MEAN	26.36	26.44	26.92	26.70	28.20	1.84
	S.D.	1.01	0.74	0.95	0.81	0.75	0.95
	N	5	5	5	5	5	5
G4 (1,000)	36	26.49	25.41	25.94	26.57	26.91	0.42
	37	25.92	26.05	27.26	26.23	29.28	3.36
	38	26.42	26.95	29.27	28.71	30.82	4.40
	39	26.75	26.50	27.41	27.57	28.65	1.90
	40	25.12	24.72	26.55	25.72	28.36	3.24
	MEAN	26.14	25.93	27.29	26.96	28.80	2.66
	S.D.	0.64	0.88	1.26	1.19	1.42	1.51
	N	5	5	5	5	5	5

a) Weight gains are body weight difference between day 14 and the day 0.

- 표 12 내지 표 14에 나타난 바와 같이, 체중변화는 1,000 mg/kg
 5 투여군 수컷의 평균체중이 투여 후 3 일째에 부형제대조군에 비하여 유의성
 있게 낮았으나($P<0.01$), 투여 후 7 일째부터는 부형제대조군과 유사하게
 관찰되었다. 사망동물은 투여 후 사망 시까지 지속적인 체중감소를 보였다.

【표 15】마우스의 부검 소견

STUDY: 10-MA-337		GROSS FINDINGS		SEX: MALE	
groups (mg/kg)	LOCATION	FINDINGS	SAMPLING		
			Left	Right	
G1 (0)		No gross findings	0 / 0	5 / 5	
G2 (10)		No gross findings	0 / 0	5 / 5	
G3 (100)		No gross findings	0 / 0	5 / 5	
G4 (1,000)		No gross findings	0 / 1	4 / 4	
	Interior	Autolysis	1 / 1	0 / 4	
SEX: FEMALE					
G1 (0)		No gross findings	0 / 0	5 / 5	
G2 (10)		No gross findings	0 / 0	5 / 5	
G3 (100)		No gross findings	0 / 0	5 / 5	
G4 (1,000)		No gross findings	0 / 0	5 / 5	

a) Number of animals observed/Number of animals examined.

【표 16】수컷 마우스의 부검 소견

STUDY: 10-MA-337			Sex: MALE	
groups (mg/kg)	Animal ID	FATE	LOCATION	FINDINGS
G1 (0)	1	Terminal sacrifice		No gross findings
	2	Terminal sacrifice		No gross findings
	3	Terminal sacrifice		No gross findings
	4	Terminal sacrifice		No gross findings
	5	Terminal sacrifice		No gross findings
G2 (10)	6	Terminal sacrifice		No gross findings
	7	Terminal sacrifice		No gross findings
	8	Terminal sacrifice		No gross findings
	9	Terminal sacrifice		No gross findings
	10	Terminal sacrifice		No gross findings
G3 (100)	11	Terminal sacrifice		No gross findings
	12	Terminal sacrifice		No gross findings
	13	Terminal sacrifice		No gross findings
	14	Terminal sacrifice		No gross findings
	15	Terminal sacrifice		No gross findings
G4 (1,000)	16	Terminal sacrifice		No gross findings
	17	Terminal sacrifice		No gross findings
	18	Death	Interior	Autolysis
	19	Terminal sacrifice		No gross findings
	20	Terminal sacrifice		No gross findings

【표 17】 암컷 마우스에서의 부검 소견

STUDY NO: MA-337		Sex: FEMALE		
groups (mg/kg)	Animal ID	EASE	LOCATION	FINDINGS
G1 (0)	21	Terminal sacrifice		No gross findings
	22	Terminal sacrifice		No gross findings
	23	Terminal sacrifice		No gross findings
	24	Terminal sacrifice		No gross findings
	25	Terminal sacrifice		No gross findings
G2 (10)	26	Terminal sacrifice		No gross findings
	27	Terminal sacrifice		No gross findings
	28	Terminal sacrifice		No gross findings
	29	Terminal sacrifice		No gross findings
	30	Terminal sacrifice		No gross findings
G3 (100)	31	Terminal sacrifice		No gross findings
	32	Terminal sacrifice		No gross findings
	33	Terminal sacrifice		No gross findings
	34	Terminal sacrifice		No gross findings
	35	Terminal sacrifice		No gross findings
G4 (1,000)	36	Terminal sacrifice		No gross findings
	37	Terminal sacrifice		No gross findings
	38	Terminal sacrifice		No gross findings
	39	Terminal sacrifice		No gross findings
	40	Terminal sacrifice		No gross findings

상기 표 15 내지 표 17에 나타난 바와 같이, 모든 생존동물에서
 5 육안적 이상소견은 관찰되지 않았고, 사망동물은 사후변화로 인한
 자가용해(autolysis)가 진행된 상태였다.

고찰 및 결론

시험은 시험물질 압타머 제제 E2를 ICR 계통의 마우스에 단회
 10 정맥내투여 하였을 때 나타나는 개략적인 독성을 알아보기 위하여

실시하였다.

실험결과, 1,000 mg/kg 투여군 수컷 1 마리에서 관찰된 사망은, 동일군에서 관찰된 체중감소와 결부하여 볼 때, 시험물질 투여에 의한 변화로 판단하였다. 특히, 사망발견 시 사망동물의 체중은 투여당일의 체중에 비하여 약 14 % 감소하였다. 단, 1,000 mg/kg 투여군 수컷에서 관찰된 체중감소는, 투여 후 7 일째부터는 평균체중이 부형제대조군과 유사하게 관찰된 것으로 보아, 한시적인 변화로 판단되었다.

이상의 결과로 보아, 시험물질 Aptamer Formulation을 ICR 계통의 암수 마우스에 대한 단회 정맥내투여는 1,000 mg/kg 투여군 수컷에서 사망 및 한시적인 체중감소를 유발하였다.

또한, 암컷에서는 사망이 관찰되지 않아 암컷에서 본 시험물질의 개략의 치사량(approximate lethal dose; ALD)은 1,000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단하였고, 수컷에서 본 시험물질의 반수치사량(LD₅₀)은 1215.8 mg/kg (신뢰구간은 산출되지 않았음)으로 산출되었다.

부검소견 관찰결과, 모든 생존동물에서 육안적 이상소견은 관찰되지 않았다.

5.2. 애타머제제(Aptamer Formulation)의 ICR 마우스를 이용한 2 주간 반복 정맥내투여 DRF 독성시험

식품의약품안전청고시 제2009-116호(2009 년 08 월 24 일) '의약품등의 독성시험기준' 및 식품의약품안전청고시 제2009-183호(2009 년 12 월 22 일) '비임상시험관리기준'에 준하여 실시하였다.

재료 및 방법

시험군으로는 특정병원균부재(SPF) 마우스, HsdKoat:ICR(CD-1 ®), 6 주령 투여 개시하였고, 투여 물질은 애타머 제제 E2이고, 시험군의 구성은 다음과 같다.

【표 18】

군	성 별	동물수	동 물 번 호	투여액량(mL/kg/day)	투여량(mg/kg/day)
G1 ^{a)}	M / F	5 / 5	1-05 / 26-30	5	0
G2	M / F	5 / 5	06-10 / 31-35	5	5
G3	M / F	5 / 5	11-15 / 36-40	5	10
G4	M / F	5 / 5	16-20 / 41-45	5	20
G5	M / F	5 / 5	21-25 / 46-50	5	40

a) 부형제대조군(1X D-PBS)

투여횟수 및 기간은 1 회/일, 7 일/주로 2 주간 정맥내 투여하였고, 관찰 및 검사 항목으로는 사망률, 일반증상, 체중변화, 사료 및 물 섭취량, 요검사, 안검사, 혈액학적 및 혈액생화학적 검사, 부검소견, 장기중량 등을 하였다.

5

결 과

실험기간 중 사망동물은 관찰되지 않았다. 일반증상 관찰결과, 모든 투여군에서 어떠한 이상증상도 관찰되지 않았다. 체중변화는 시험물질 투여군 암수 모두 부형제대조군과 유사하게 관찰되었다. 안검사 결과, 모든 동물에서 이상소견은 관찰되지 않았다. 요검사 결과, 시험물질 투여군 수컷에서 백혈구(WBC)가 부형제대조군에 비하여 높은 경향을 보였고, 통계학적인 유의성은 5, 20 및 40 mg/kg/day 투여군에서 확인되었다($P<0.05$, $P<0.01$). 그 밖의 항목과 시험물질 투여군 암컷에서 부형제대조군과의 차이는 관찰되지 않았다. 혈액학적검사 결과, 40 mg/kg/day 투여군 암컷에서 Hematocrit (HCT)가 부형제대조군에 비하여 유의성 있게 낮았고($P<0.05$), 수컷에서는 부형제대조군과의 유의성 있는 차이가 관찰되지 않았다. 혈액생화학적 검사 결과, 시험물질 투여군 암수에서 Sodium ion (Na^+)과 Chloride ion (Cl^-)이 부형제대조군에 비하여 높은 경향을 보였고, 통계학적인 유의성은 Na^+ 은 20 mg/kg/day 이상의 투여군 수컷과 5, 20 및 40 mg/kg/day 투여군 암컷에서, Cl^- 는 40 mg/kg/day 투여군 수컷과 20 mg/kg/day 이상의 투여군 암컷에서 확인되었다($P<0.05$, $P<0.01$).

그 밖에 20 mg/kg/day 투여군 암컷에서 Inorganic phosphorus (IP)와 Calcium ion (Ca^{2+})이 부형제대조군에 비하여 유의성 있게 낮았으나($P<0.01$), 용량상관성 없는 변화이었다. 장기중량은 시험물질 투여군 암수 모두에서 부형제대조군과의 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았다. 육안적 부검소견은 5 mg/kg/day 투여군 암컷에서 자궁내 맑은액체저류(retention of clear fluids)가 3례 관찰되었으나, 이는 성주기에 따른 생리적인 변화이었고, 그 밖의 장기 및 수컷에서는 육안적 이상소견이 관찰되지 않았다.

고찰 및 결론

본 시험은 압타머 제제 E2를 ICR 계통의 암수 마우스에 2 주간 반복 정맥내투여 하였을 때 나타나는 개략적인 독성을 확인하기 위하여 수행하였다.

20 mg/kg/day 이상의 투여군에서 관찰된 혈중 Na^+ 및 Cl^- 의 증가 또는

증가경향은 암수 모두에서 관찰되었고, 어느 정도의 용량상관성을 보였으며, 전해질은 항상 좁은 범위 내에서 항상성을 유지하기에, 이는 시험물질 투여에 의한 영향으로 판단되었다. 단, 정상범위 이내의 수치이었고, 관련항목에서 유의한 변화를 동반하지 않았기에 독성학적인 의미는 미약한 것으로 사료되었다.

40 mg/kg/day 투여군 암컷에서 관찰된 혈중 HCT의 감소는 정상범위 이내의 수치이었다(장승훈, 정기준: aptamer(Aptamer) 개발의 최근 연구 동향, THE KOREAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY).

시험물질 투여군 수컷에서 관찰된 요 중 WBC의 증가는 trace ($\pm$)의 정도로 관찰되었는데, 이는 정상동물에서도 종종 관찰되는 변화이고, 관련 항목에서 유의성 있는 변화를 동반하지 않았기에 시험물질 투여에 의한 영향은 아닌 것으로 판단하였다.

상기와 같은 결과를 토대로, Aptamer Formulation을 ICR 마우스에 5, 10, 20 및 40 mg/kg/day 용량으로 2 주간 반복 정맥내 투여하였을 때, 20 mg/kg/day 이상의 용량에서 혈중 Na^+ 및 Cl^- 가 증가하였고, 그 밖에 시험물질 투여에 따른 뚜렷한 변화는 관찰되지 않았다.

【청구의 범위】

1. ERBB2에 특이적으로 결합 하고, dUTP(deoxyuracil)의 5' 위치가 나프틸기, 벤질기, 피롤벤질기, 및 트립토판으로 이루어진 군에서 선택된
 5 소수성 작용기로 치환되어 있는 변형된 염기를 5 내지 15개 포함하고, 총 20 내지 100개의 염기로 이루어진,
 ERBB2 압타머(aptamer).

2. 제1항에 있어서,
 10 상기 ERBB2 압타머는 SEQ ID NO: 1 내지 SEQ ID NO: 35로 이루어진 군에서 선택된 염기서열을 포함하는, 40 내지 100개의 염기로 이루어진 것인,
 ERBB2 압타머.

3. 제2항에 있어서,
 15 상기 ERBB2 압타머는 SEQ ID NO: 7 또는 SEQ ID NO: 11의 염기서열을 포함하는, 40 내지 100개의 염기로 이루어진 것인,
 ERBB2 압타머.

4. 제2항에 있어서,
 20 SEQ ID NO: 1 내지 SEQ ID NO: 35로 이루어진 군에서 선택된 염기서열의 5' 말단, 3' 말단, 또는 양 말단에 15 내지 30개의 염기로 이루어진 염기 서열을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는,
 ERBB2 압타머.

25 5. 제2항에 있어서,
 상기 ERBB2 압타머는 5' 말단, 3' 말단, 또는 양 말단에 PEG(polyethylene glycol), idT(inverted deoxythymidine), LNA(Locked Nucleic Acid), 2'-메톡시 뉴클레오사이드, 2'-아미노 뉴클레오사이드, 2'F-뉴클레오사이드, 아민 링커, 티올 링커, 및 콜레스테롤로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이
 30 결합되어 변형된 것을 특징으로 하는,
 ERBB2 압타머.

6. 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 ERBB2 압타머를 유효성분으로 함유하는, 약학 조성물.

7. 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 ERBB2 압타머를
유효성분으로 함유하는,
암 치료용 약학 조성물.

5 8. 제7항에 있어서,
상기 암은 유방암, 대장암, 유방암, 대장암, 폐암, 담낭암, 췌장암, 및
위암으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인,
암 치료용 약학 조성물.

10 9. 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 ERBB2 압타머를
유효성분으로 함유하는 암 진단용 조성물.

10. 제1항에 따른 ERBB2 압타머를 암 치료를 필요로 하는
환자에게 투여하는 단계를 포함하는 암 치료 방법.

15 11. 제10항에 있어서,
상기 ERBB2 압타머는 SEQ ID NO: 1 내지 SEQ ID NO: 35로 이루어진
군에서 선택된 염기서열을 포함하는, 40 내지 100개의 염기로 이루어진 것인,
암 치료 방법.

20 12. 제11항에 있어서,
상기 ERBB2 압타머는 SEQ ID NO: 7 또는 SEQ ID NO: 11의
염기서열을 포함하는, 40 내지 100개의 염기로 이루어진 것인,
암 치료 방법.

25 13. 제11항에 있어서,
SEQ ID NO: 1 내지 SEQ ID NO: 35로 이루어진 군에서 선택된
염기서열의 5' 말단, 3' 말단, 또는 양 말단에 15 내지 30개의 염기로
이루어진 염기 서열을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는,
30 암 치료 방법.

14. 제11항에 있어서,
상기 ERBB2 압타머는 5' 말단, 3' 말단, 또는 양 말단에
PEG(polyethylene glycol), idT(inverted deoxythymidine), LNA(Locked Nucleic Acid),
35 2'-메톡시 뉴클레오사이드, 2'-아미노 뉴클레오사이드, 2'F-뉴클레오사이드, 아민

링커, 티올 링커, 및 콜레스테롤로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이 결합되어 변형된 것을 특징으로 하는,
암 치료 방법.

5 15. 제10항에 있어서,
상기 암은 유방암, 대장암, 유방암, 대장암, 폐암, 담낭암, 췌장암, 및
위암으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인,
암 치료 방법.

10 16. 환자의 생물학적 시료를 준비하는 단계;
상기 생물학적 시료에 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 ERBB2
압타머를 반응시키는 단계; 및
상기 생물학적 시료에서의 ERBB2 압타머의 결합 정도를 측정하는
단계를 포함하고,
15 환자의 생물학적 시료에서의 ERBB2 압타머의 결합 정도가 정상
시료보다 높은 경우, 상기 환자를 암 환자로 판단하는 것을 특징으로 하는,
암 진단에 정보를 제공하는 방법.

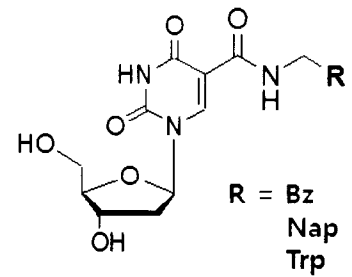
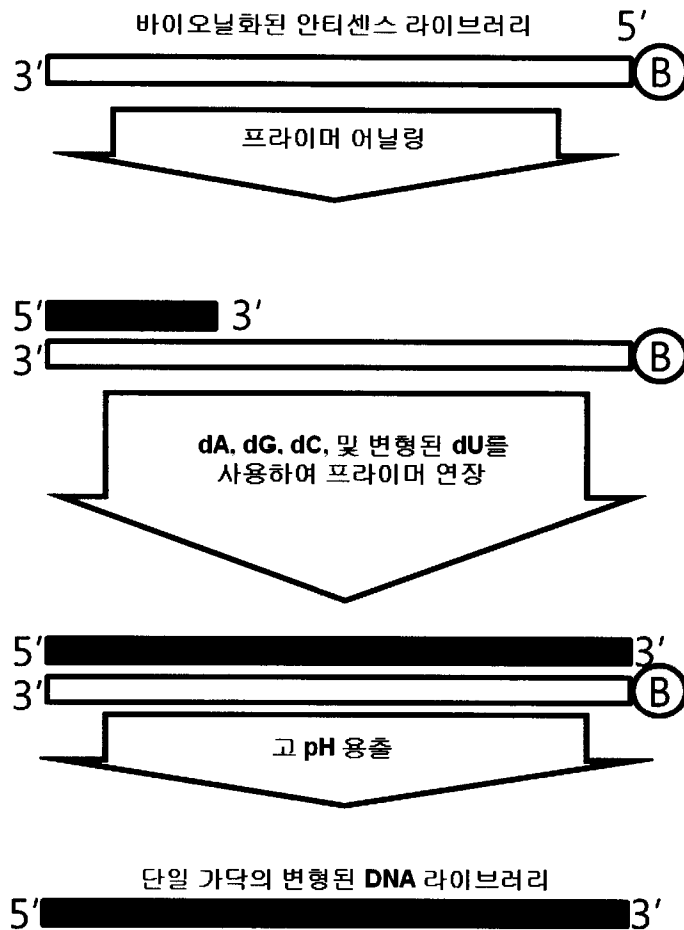
20 17. 암 치료에 사용하기 위한 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의
ERBB2 압타머.

 18. 제17항에 있어서,
상기 암은 유방암, 대장암, 유방암, 대장암, 폐암, 담낭암, 췌장암, 및
위암으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인,
25 ERBB2 압타머.

 19. 암 진단에 사용하기 위한 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의
ERBB2 압타머.

30

【도 1】

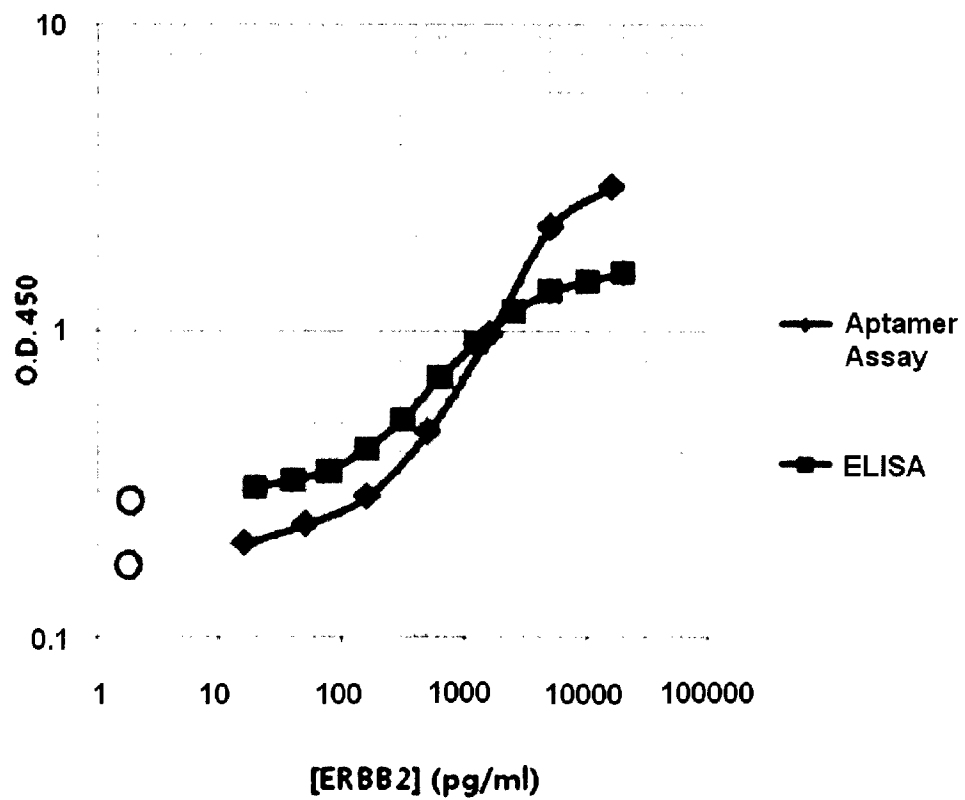


변형된 dU의 구조

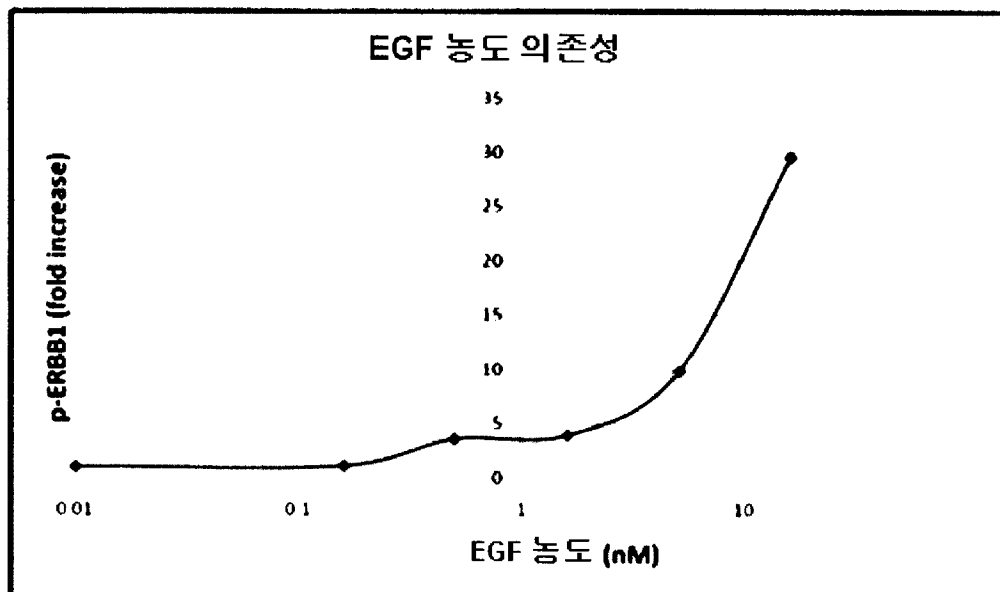
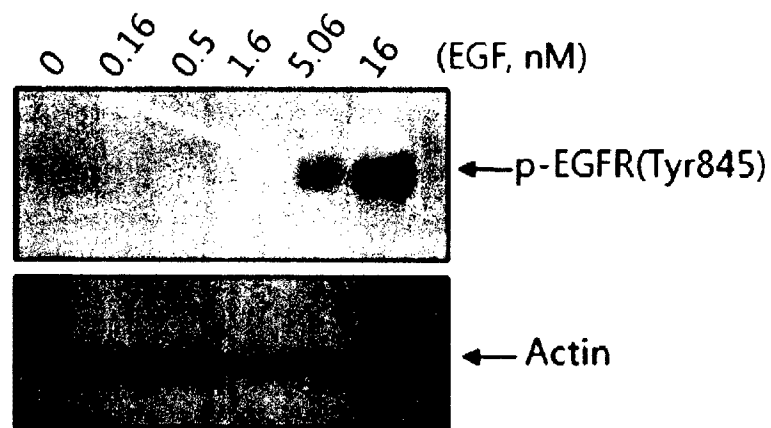
【도 2A】



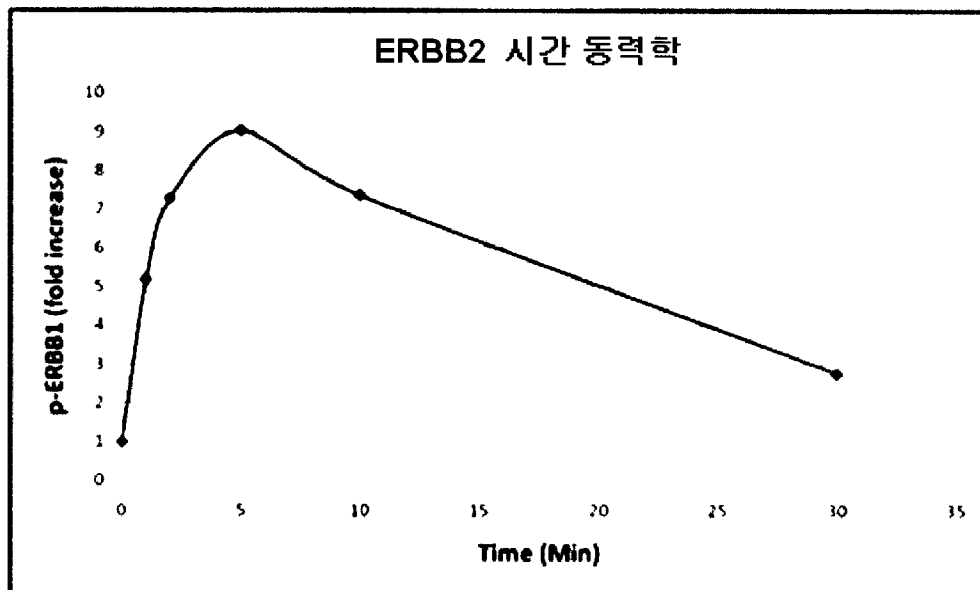
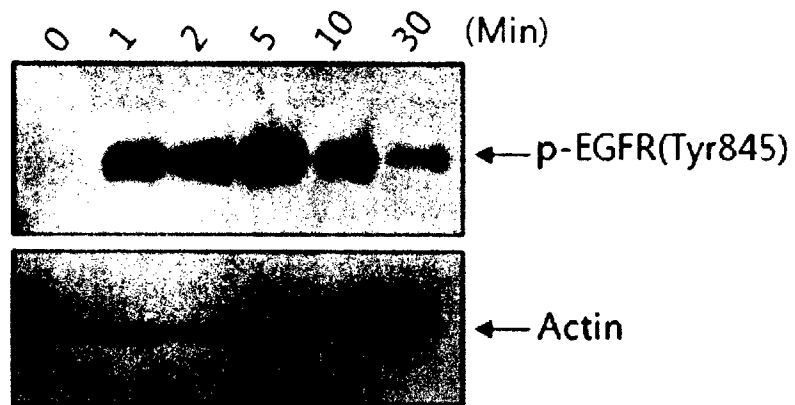
【도 2B】



【도 3A】

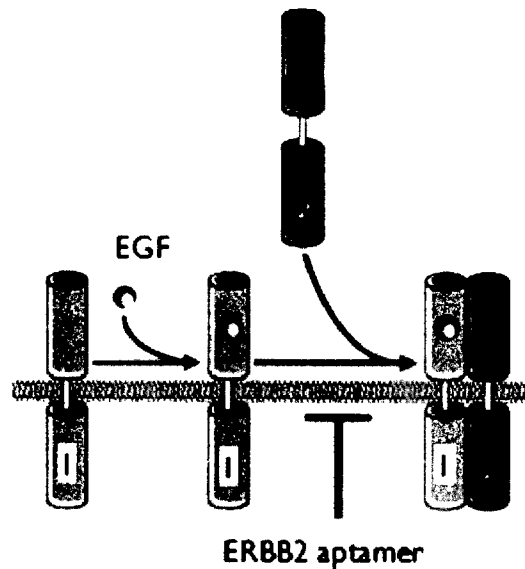


【도 3B】



【도 4A】

스크리닝 방법: ERBB2-EGFR
 헤테로다имер 차단 aptamer의 확인



A431 (피부암종 세포주)이 스크리닝에 사용됨

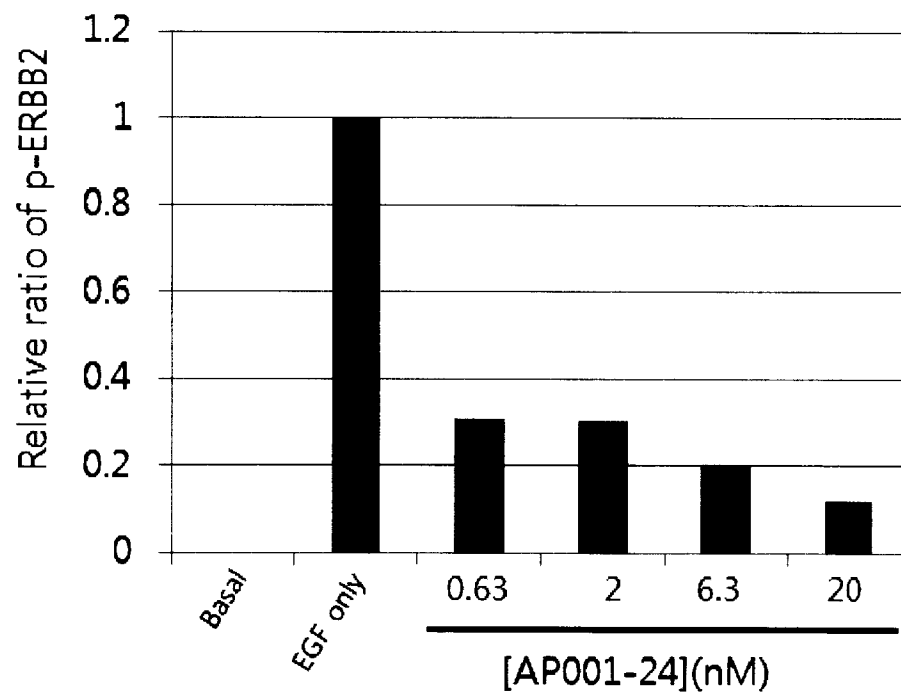
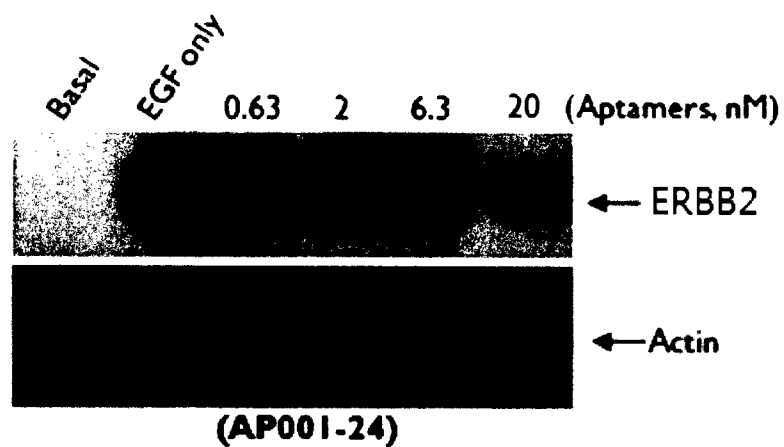
1. aptamer (20nM)를 15분간 전처리
2. EGF 10nM을 5분 처리
3. 세포 용해 및 항-인간 포스포 ERBB2 (p-Tyr877)를 사용하여 웨스턴 블라팅

【도 4B】

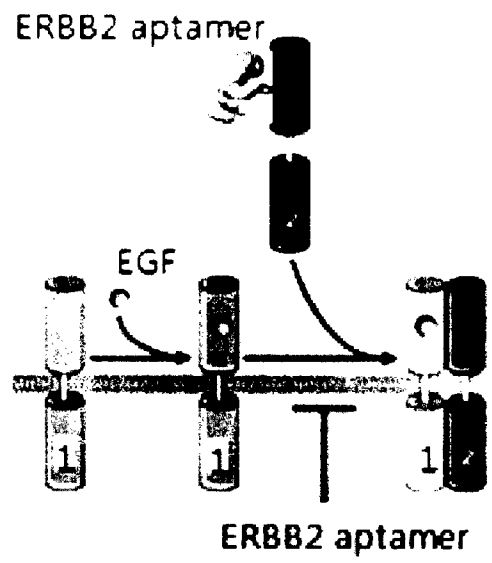
50 clones of ERBB2 aptamers Screening



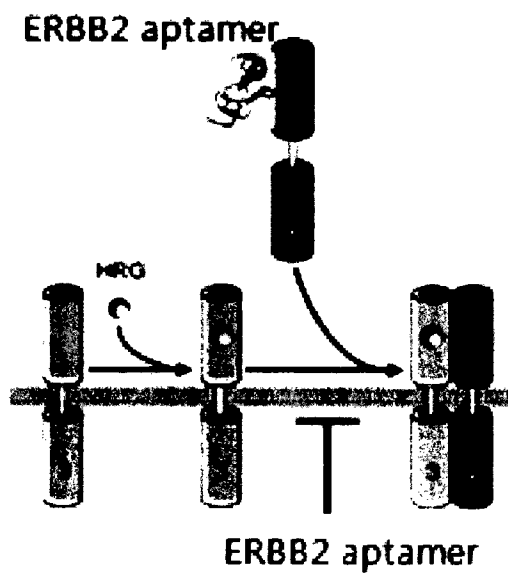
EGF (10 nM)



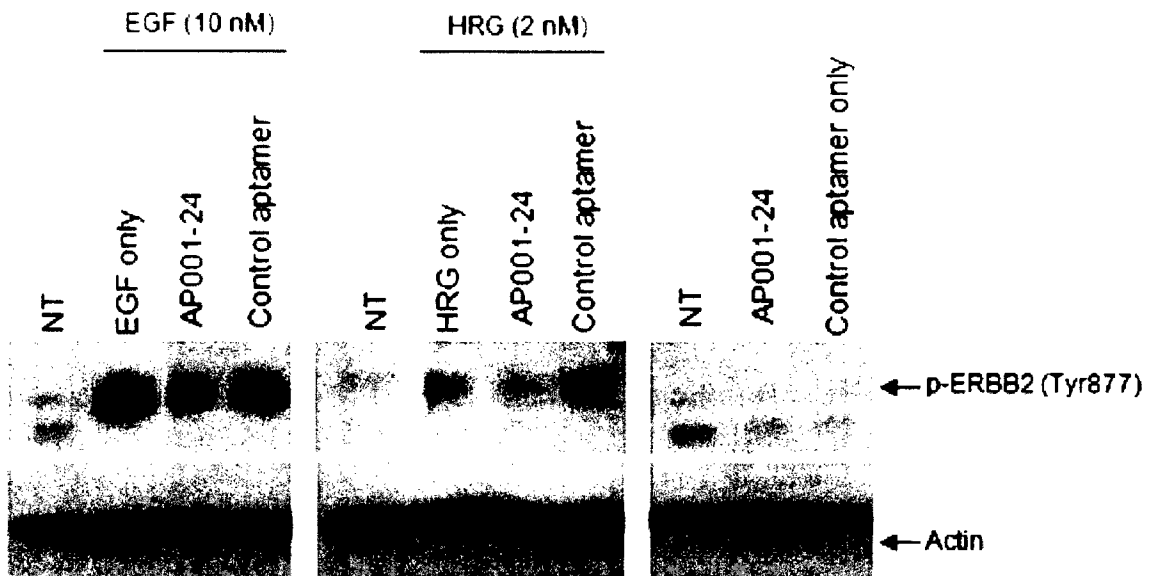
【도 5A】



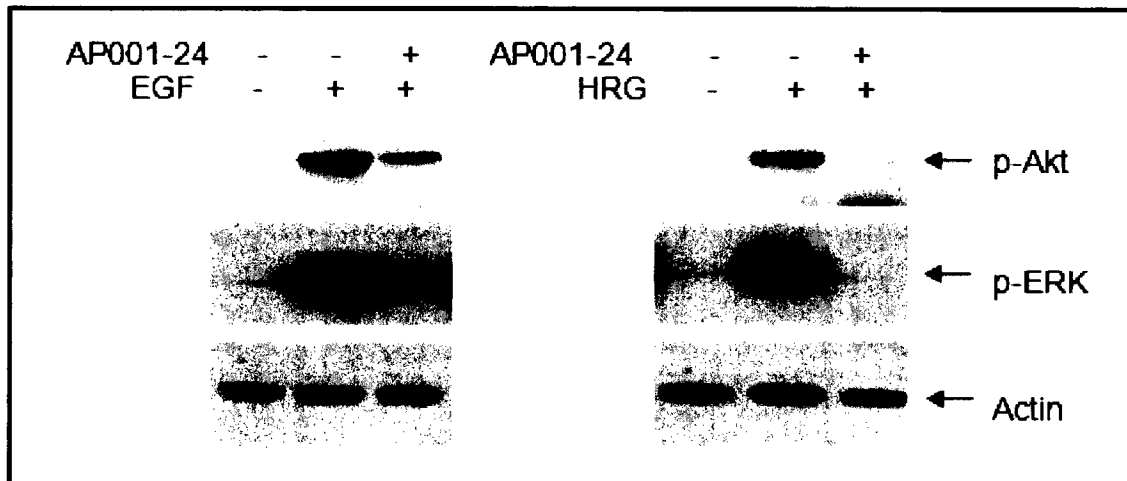
【도 5B】



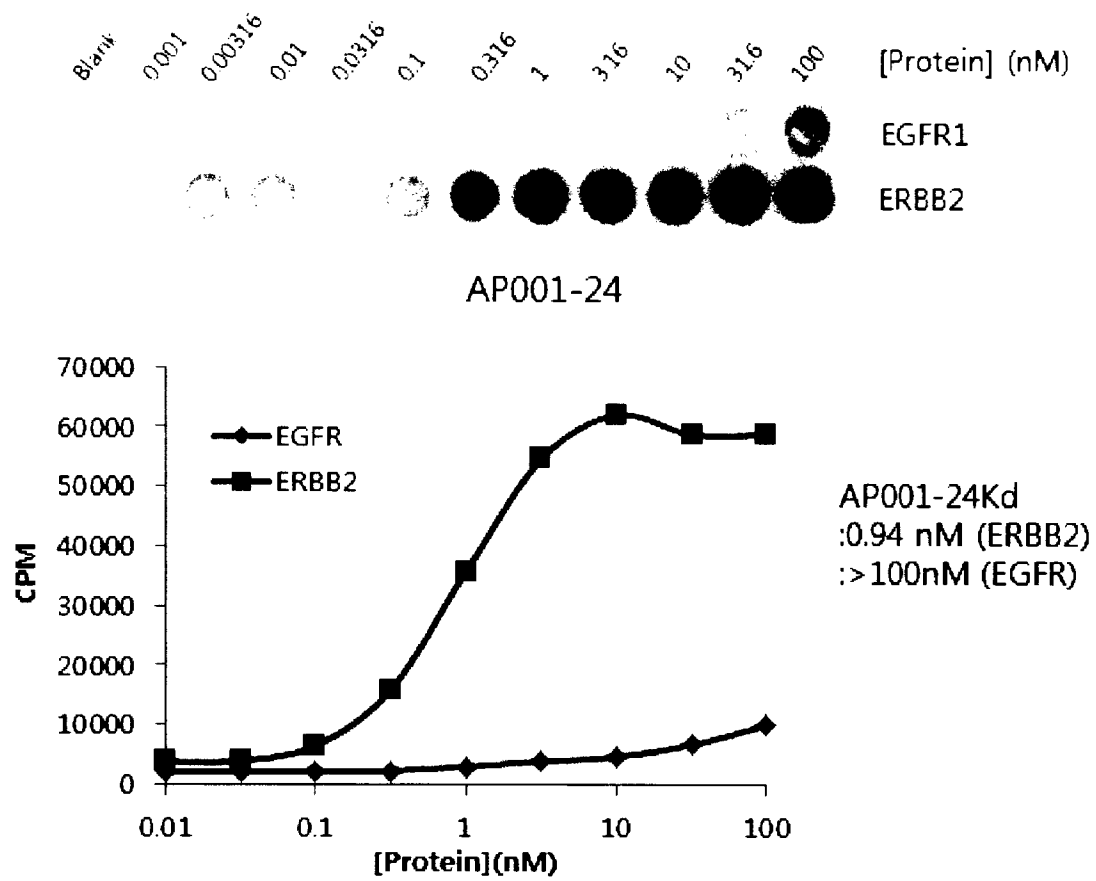
【도 5C】



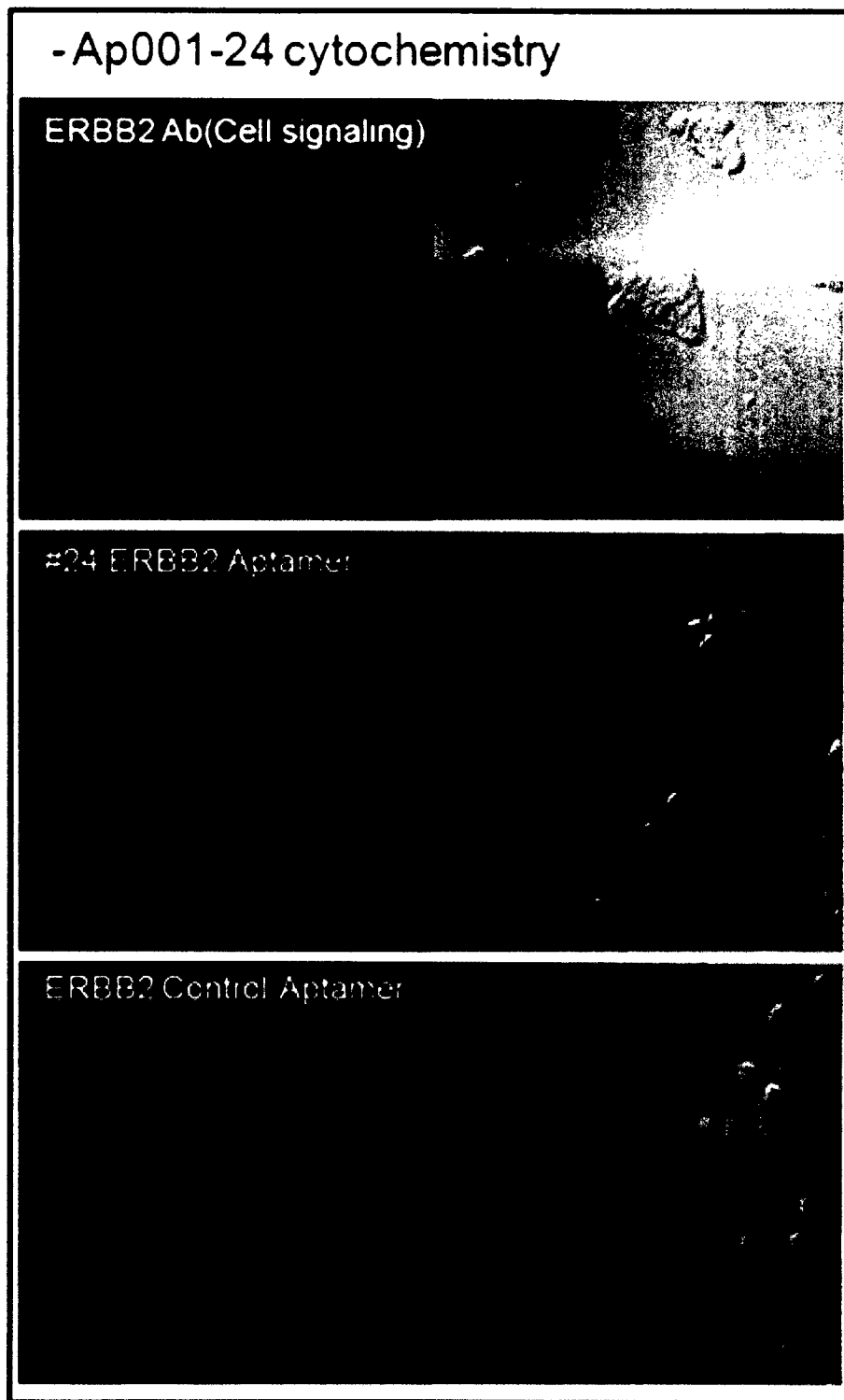
【도 6】



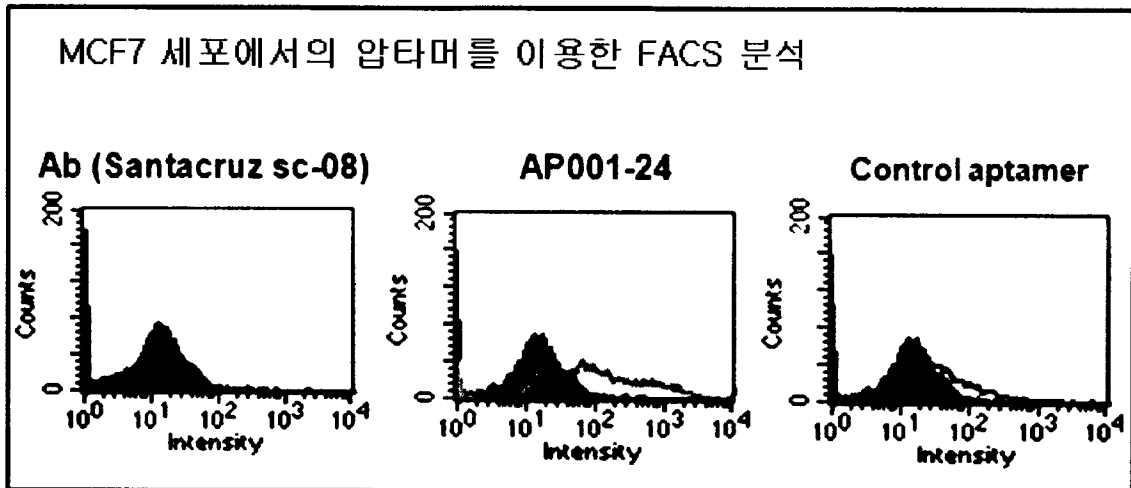
【도 7A】



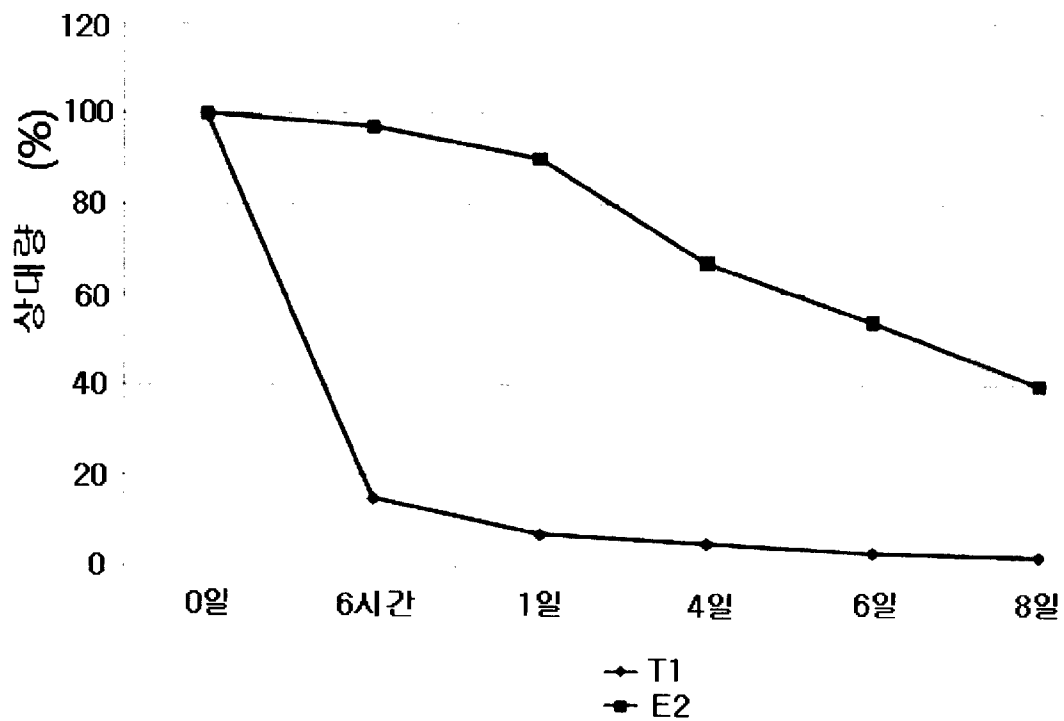
【도 7B】



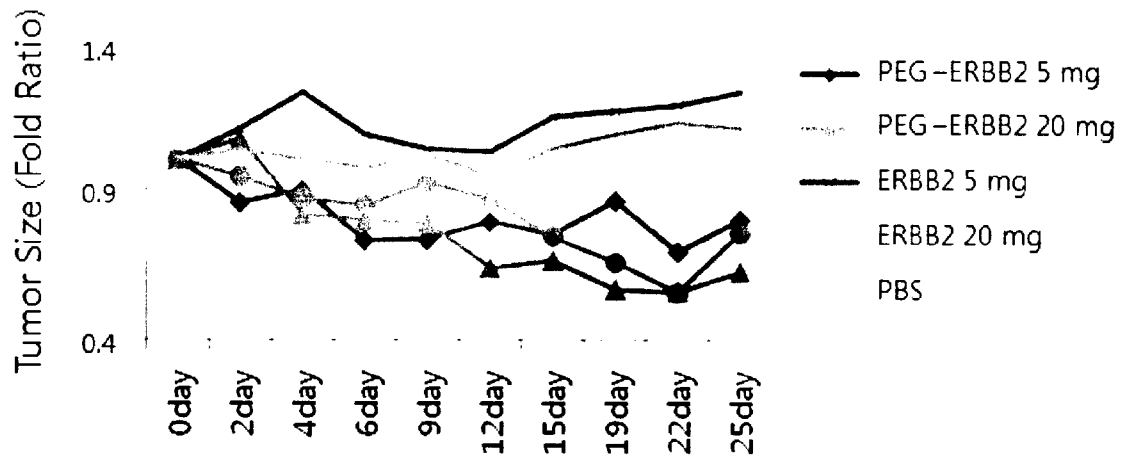
【도 7C】



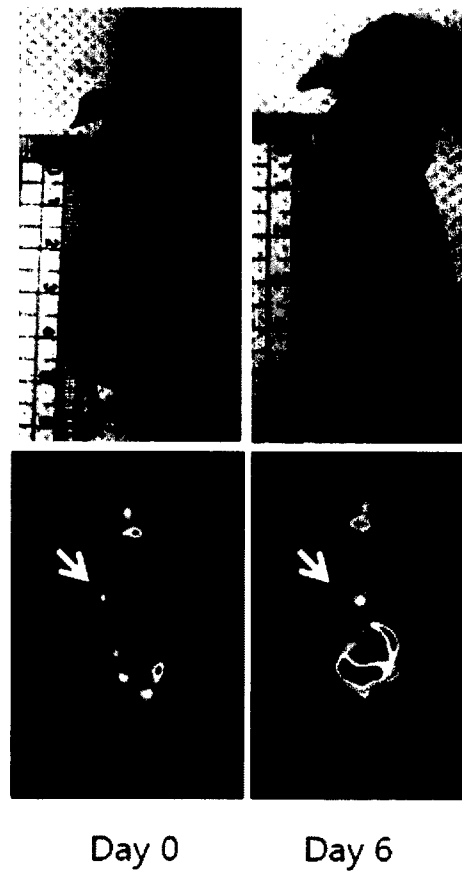
【도 8】



【도 9】



【도 10】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2011/005852**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12N 15/115(2010.01)i, A61K 31/7088(2006.01)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; C07H 21/00; C12Q 1/68

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), Pubmed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KIM, M. Y and JEONG, S " In vitro selection of RNA aptamer and specific targeting of ErbB2 in breast cancer cells" Oligonucleotides. Vol. 21, No. 6 doi:10.1089/oli.2011.0283 (06 June 2011) See abstract; figures 1 and 2.	1-9,16-19
Y	US 2009/0004667 A1 (ZICHI, D. et al.) 01 January 2009 See abstract: paras. [0010], [0052]-[0055]; figure 14.	1-9,16-19
A	KANG, H. S et al. "Isolation of RNA Aptamers targeting HER-2 overexpressing breast cancer cells using-SELEX" Bulletin of the Korean Chemical Society. Vol.30(8), pp. 1827-1831 (20 August 2009) ISSN 1229-5949 (online) See abstract.	1-9,16-19
A	KUNZ, C. et al. "Peptide aptamers with binding specificity for the intracellular domain of the ErbB2 receptor interfere with AKT signaling and sensitize breast cancer cells to Taxol" Molecular Cancer Research. Vol.4(12), pp.983-998 (December 2006) See abstract.	1-9,16-19



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

26 JULY 2012 (26.07.2012)

Date of mailing of the international search report

27 JULY 2012 (27.07.2012)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 139 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/KR2011/005852**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.: **10-15**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 10-15 pertain to a method for treatment of the human body (PCT Art. 17(2)(a)(i) and Rule 39.1(iv)).
2. ☐ Claims Nos.:
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:
3. ☐ Claims Nos.:
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:

Invention 1: an ERBB2 aptamer comprising a base sequence of SEQ ID NO:1 (claims 1-9, 16-19, and a part of claims)

Inventions 2-35: an ERBB2 aptamer comprising one base sequence selected from SEQ ID NOs:2-35 (claims 1-9, 16-19, and a part of claims)

The common feature of 35 inventions is an aptamer which is specifically bound to ERBB2 and comprises a modified base in which a dUTP 5' position is substituted with a hydrophobic functional group. However, an RNA aptamer which is specifically bound to ErbB2 is already known from the document by KIM, M. Y. et al and a technique of substituting dUTP 5' of the aptamer is also already known from US 2009/0004667 A1. Since it is not considered that the common technical feature is improved over the prior art as a whole, the application does not meet the requirements of PCT Rule 13.1.

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.:
Claims 1-9, 16-19, and a part of the claims (relating to inventions 1, 7 and 11)
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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2011/005852

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KUWAHARA, M. and SUGIMOTO, N. "Molecular evolution of functional nucleic acids with chemical modifications" Molecules. Vol. 15(8), pp.5423-5444 (09 Augut 2010) See abstract.	1-9,16-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2011/005852

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2009-0004667 A1	01.01.2009	AU 1999-18231 A1	05.07.1999
		AU 1999-18231 B2	28.11.2002
		AU 2003-217379 A1	09.09.2003
		AU 2007-205974 A1	26.07.2007
		AU 2008-275915 A1	22.01.2009
		AU 2008-275915 A2	22.01.2009
		AU 2008-275917 A1	22.01.2009
		AU 2008-275917 A2	22.01.2009
		AU 2008-276001 A1	22.01.2009
		AU 2008-276001 A2	22.01.2009
		AU 2008-276001 A9	22.01.2009
		CA 2312429 A1	24.06.1999
		CA 2476309 A1	28.08.2003
		CA 2634987 A1	26.07.2007
		CA 2693448 A1	22.01.2009
		CA 2693453 A1	22.01.2009
		CA 2696431 A1	22.01.2009
		CA 2765857 A1	13.01.2011
		CN 101374965 A	25.02.2009
		CN 101802225 A	11.08.2010
		CN 101809167 A	18.08.2010
		EP 1040203 A1	04.10.2000
		EP 1040203 B1	26.10.2011
		EP 1481090 A1	01.12.2004
		EP 1994171 A2	26.11.2008
		EP 2069496 A1	17.06.2009
		EP 2069529 A2	17.06.2009
		EP 2076613 A1	08.07.2009
		EP 2172566 A1	07.04.2010
		EP 2280083 A1	02.02.2011
		EP 2336314 A1	22.06.2011
		EP 2451981 A1	16.05.2012
		JP 2002-508191 A	19.03.2002
		JP 2005-517456 A	16.06.2005
		JP 2009-159965 A	23.07.2009
		JP 2009-523430 A	25.06.2009
		JP 2010-533499 A	28.10.2010
		JP 2010-533872 A	28.10.2010
		KR 10-0603115 B1	20.07.2006
		KR 10-1149688 B1	24.05.2012
		KR 10-2010-0044787 A	30.04.2010
		KR 10-2010-0058485 A	03.06.2010
		US 2003-0162216 A1	28.08.2003
		US 2006-0057573 A1	16.03.2006
		US 2007-0166740 A1	19.07.2007
		US 2007-0166741 A1	19.07.2007
		US 2007-0166742 A1	19.07.2007
		US 2008-0160535 A1	03.07.2008
		US 2009-0042206 A1	12.02.2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2011/005852

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		US 2010-0055695 A1	04.03.2010
		US 2010-0209935 A1	19.08.2010
		US 2010-0317120 A1	16.12.2010
		US 2011-0082286 A1	07.04.2011
		US 2011-0136099 A1	09.06.2011
		US 2011-245479 A1	06.10.2011
		US 6242246 B1	05.06.2001
		US 6458543 B1	01.10.2002
		US 6503715 B1	07.01.2003
		US 6544776 B1	08.04.2003
		US 7709192 B2	04.05.2010
		US 7855054 B2	21.12.2010
		US 7947447 B2	24.05.2011
		US 7964356 B2	21.06.2011
		US 8071288 B2	06.12.2011
		WO 03-070984 A1	28.08.2003
		WO 2007-084886 A2	26.07.2007
		WO 2009-012410 A1	22.01.2009
		WO 2009-012418 A2	22.01.2009
		WO 2009-012420 A1	22.01.2009
		WO 2011-006075 A1	13.01.2011
		WO 99-31275 A1	24.06.1999

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) <i>C12N 15/115(2010.01)i, A61K 31/7088(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i</i>		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 15/115; C07H 21/00; C12Q 1/68 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), Pubmed		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KIM, M. Y. and JEONG, S. 'In vitro selection of RNA aptamer and specific targeting of ErbB2 in breast cancer cells' Oligonucleotides. Vol. 21, No. 6 doi:10.1089/oli.2011.0283 (6 June 2011) 초록; 도면 1 및 2 참조.	1-9, 16-19
Y	US 2009/0004667 A1 (ZICHI, D. et al.) 1 January 2009 초록: paras. [0010], [0052]-[0055]; 도면 14 참조.	1-9, 16-19
A	KANG, H. S. et al. 'Isolation of RNA Aptamers targeting HER-2 overexpressing breast cancer cells using cell-SELEX' Bulletin of the Korean Chemical Society. Vol.30(8), pp.1827-1831 (20 August 2009) ISSN 1229-5949 (online) 초록 참조.	1-9, 16-19
A	KUNZ, C. et al. 'Peptide aptamers with binding specificity for the intracellular domain of the ErbB2 receptor interfere with AKT signaling and sensitize breast cancer cells to Taxol' Molecular Cancer Research. Vol.4(12), pp.983-998 (December 2006) 초록 참조.	1-9, 16-19
☒ 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 2012년 07월 26일 (26.07.2012)		국제조사보고서 발송일 2012년 07월 27일 (27.07.2012)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 82-42-472-7140		심사관 김지윤 전화번호 82-42-481-8288

C (계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KUWAHARA, M. and SUGIMOTO, N. 'Molecular evolution of functional nucleic acids with chemical modifications' Molecules. Vol.15(8), pp.5423-5444 (9 August 2010) 초록 참조.	1-9, 16-19

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: 10-15
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
상기항은 인체에 대한 치료방법에 관한 것입니다(PCT Art. 17(2)(a)(i) and Rule 39.1(iv)).
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
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.

발명 1: SEQ ID NO:1로 이루어지는 염기서열을 포함하는 ERBB2 압타머 (청구항 1~9, 16-19, 부분)

발명 2~35: SEQ ID NO:2~35에서 선택되는 하나의 염기서열을 포함하는 ERBB2 압타머 (청구항 1~9, 16-19, 부분)

상기 35개의 발명들 간의 공통된 특징은 ERBB2에 특이적으로 결합하고 dUTP 5' 위치가 소수성 작용기로 치환되어 있는 변형된 염기를 포함하는 압타머라는 점입니다. 그러나, KIM, M. Y. et al. 의 문헌에 ErbB2에 특이적으로 결합하는 RNA 압타머가 개시되어 있으며 압타머의 dUTP 5' 를 치환하여 개선하는 기술도 US 2009/0004667 A1에 이미 개시되어 있습니다. 상기 공통된 기술적 특징은 선행기술 전체에 대하여 개선된 것이라 할 수 없으므로 이 출원은 PCT 규칙 13.1의 규정을 충족하지 못합니다.

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.
청구항 1~9, 16-19, 부분 (발명 1, 7, 11 관련)
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.

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

US 2009-0004667 A1

2009.01.01

AU 1999-18231 A1

1999.07.05

AU 1999-18231 B2

2002.11.28

AU 2003-217379 A1

2003.09.09

AU 2007-205974 A1

2007.07.26

AU 2008-275915 A1

2009.01.22

AU 2008-275915 A2

2009.01.22

AU 2008-275917 A1

2009.01.22

AU 2008-275917 A2

2009.01.22

AU 2008-276001 A1

2009.01.22

AU 2008-276001 A2

2009.01.22

AU 2008-276001 A9

2009.01.22

CA 2312429 A1

1999.06.24

CA 2476309 A1

2003.08.28

CA 2634987 A1

2007.07.26

CA 2693448 A1

2009.01.22

CA 2693453 A1

2009.01.22

CA 2696431 A1

2009.01.22

CA 2765857 A1

2011.01.13

CN 101374965 A

2009.02.25

CN 101802225 A

2010.08.11

CN 101809167 A

2010.08.18

EP 1040203 A1

2000.10.04

EP 1040203 B1

2011.10.26

EP 1481090 A1

2004.12.01

EP 1994171 A2

2008.11.26

EP 2069496 A1

2009.06.17

EP 2069529 A2

2009.06.17

EP 2076613 A1

2009.07.08

EP 2172566 A1

2010.04.07

EP 2280083 A1

2011.02.02

EP 2336314 A1

2011.06.22

EP 2451981 A1

2012.05.16

JP 2002-508191 A

2002.03.19

JP 2005-517456 A

2005.06.16

JP 2009-159965 A

2009.07.23

JP 2009-523430 A

2009.06.25

JP 2010-533499 A

2010.10.28

JP 2010-533872 A

2010.10.28

KR 10-0603115 B1

2006.07.20

KR 10-1149688 B1

2012.05.24

KR 10-2010-0044787 A

2010.04.30

KR 10-2010-0058485 A

2010.06.03

US 2003-0162216 A1

2003.08.28

US 2006-0057573 A1

2006.03.16

US 2007-0166740 A1

2007.07.19

US 2007-0166741 A1

2007.07.19

US 2007-0166742 A1

2007.07.19

US 2008-0160535 A1

2008.07.03

US 2009-0042206 A1

2009.02.12

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

US 2010-0055695 A1	2010.03.04
US 2010-0209935 A1	2010.08.19
US 2010-0317120 A1	2010.12.16
US 2011-0082286 A1	2011.04.07
US 2011-0136099 A1	2011.06.09
US 2011-245479 A1	2011.10.06
US 6242246 B1	2001.06.05
US 6458543 B1	2002.10.01
US 6503715 B1	2003.01.07
US 6544776 B1	2003.04.08
US 7709192 B2	2010.05.04
US 7855054 B2	2010.12.21
US 7947447 B2	2011.05.24
US 7964356 B2	2011.06.21
US 8071288 B2	2011.12.06
WO 03-070984 A1	2003.08.28
WO 2007-084886 A2	2007.07.26
WO 2009-012410 A1	2009.01.22
WO 2009-012418 A2	2009.01.22
WO 2009-012420 A1	2009.01.22
WO 2011-006075 A1	2011.01.13
WO 99-31275 A1	1999.06.24