

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2019년 4월 18일 (18.04.2019)



(10) 국제공개번호

WO 2019/074258 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 9/06 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 31/704 (2006.01)

A61K 49/04 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2018/011855

(22) 국제출원일:

2018년 10월 10일 (10.10.2018)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2017-0132259 2017년 10월 12일 (12.10.2017) KR

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

(72) 발명자: 김현철 (KIM, Hyuncheol); 07344 서울시 영등포구 63로 7 B-501, Seoul (KR). 한현구 (HAN, Hyunkoo); 06289 서울시 강남구 선릉로 120 15-805, Seoul (KR). 박수현 (PARK, Suhyun); 08563 서울시 금천구 독산로50길 89 501, Seoul (KR). 김도연 (KIM, Doyeon); 02831 서울시 성북구 성북로4길 52 110-705, Seoul (KR). 서민규 (SEO, Minkyu); 11917 경기도 구리시 건원대로 76번길 39, 209-1304, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 이준혁 (LEE, Junhyek); 13493 경기도 성남시 분당구 판교역로230 삼환하이팩스 B-419, Gyeonggi-do (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ,

LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

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

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

(54) Title: COMPOSITION FOR TRANSCATHETER ARTERIAL CHEMOEMBOLIZATION, COMPRISING NANOPARTICLE FOR ANTICANCER THERAPY AND GENE THERAPY

(54) 발명의 명칭: 항암치료 및 유전자 치료용 나노입자를 포함하는 간동맥 화학색전술용 조성물

(57) Abstract: The present invention relates to a nanoparticle that comprises a gene therapy-enabling siRNA hydrogel containing an anticancer agent-impregnated nanoparticle and an embolic material therein and which can be used in chemoembolization and perform both gene therapy and drug therapy, and a composition comprising the same. Designed to comprise an siRNA hydrogel core containing a drug therein, a medium layer of cationic chitosan surrounding the core, and an outer layer of anionic hyaluronic acid, the present invention can release siRNA and the drug for a long period of time and thus shows very long sustainability of a medicinal effect. A composition for transcatheter arterial chemoembolization, comprising the nanoparticle according to the present invention can exert chemoembolization and drug therapy and effectively regulate the expression of a target gene, thereby increasing anticancer therapeutic effect. The nanoparticle of the present invention is coated with hyaluronic acid having (-) charges and thus can be effectively delivered into cells through the CD44 receptor expressed on liver cancer cells, bringing about a maximum effect on gene therapy and anticancer therapy.

(57) 요약서: 본 발명은 유전자 치료가 가능한 siRNA 하이드로겔에 항암제가 담지된 나노입자와 색전물질을 포함하여 화학색전술에 사용됨과 동시에 유전자 치료와 약물 치료를 동시에 수행할 수 있는 나노입자 및 이를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 약물을 담지한 siRNA 하이드로겔 코어와 이를 둘러싸는 양이온의 키토산 중간층과 음이온의 히알루론산 외곽층을 구비함으로써 siRNA와 약물을 장기간에 걸쳐 방출시킬 수 있으므로 약효의 지속성이 매우 크다. 본 발명의 나노입자를 포함하는 화학색전술용 조성물은 화학색전술 및 약물 치료와 함께 타겟 유전자의 발현을 효율적으로 억제할 수 있으므로 항암 치료 효과를 높일 수 있다. 본 발명의 나노입자는 (-) 전하를 띠는 히알루론산으로 코팅함으로써 간암세포에 발현된 CD44 receptor를 통하여 효과적으로 세포내로 전달되어 유전자 치료 및 항암치료 효과를 극대화할 수 있다.

WO 2019/074258 A1

명세서

발명의 명칭: 항암치료 및 유전자 치료용 나노입자를 포함하는 간동맥 화학색전술용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 항암치료 및 유전자 치료용 나노입자를 포함하는 간동맥화학색전술용 조성물에 관한 것으로서, 보다 자세하게는, 유전자 치료가 가능한 siRNA 하이드로젤에 항암제가 담지된 나노입자가 색전물질을 포함하여 화학색전술에 사용됨과 동시에 유전자 치료와 약물 치료를 동시에 수행할 수 있는 나노입자 및 이를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 최근 영상기술이 발전하여 몸 안에 숨어 있는 암의 정확한 위치를 찾아내어 방사선 조사, 내시경 수술 등 여러 가지 방법으로 제거할 수 있게 되었다. 하지만, 암의 위치를 정확히 발견하더라도 암이 전체 장기에 퍼져 있거나, 다른 장기와 붙어 있는 경우 등 여러 가지 이유로 인해 수술적 제거가 불가능한 경우가 있다. 또한, 간암, 췌장암은 발견하더라도 수술적 완치가 불가능한 경우가 많다.
- [3] 현재, 간 종양의 치료에 가장 많이 시행되고 있는 시술인 화학색전술은 간 종양에 영양을 공급하는 동맥을 찾아 항암제를 투여한 다음 혈관을 막아주는 치료법이다. 간 조직은 소장 및 대장 등을 돌아 나오는 문맥 (portal vein)과 대동맥에서 직접 나오는 간동맥을 통하여 산소와 영양을 공급받는데, 정상 간 조직은 주로 문맥에서, 종양 조직은 주로 간동맥에서 혈액을 공급받는다. 따라서, 종양에 영양을 공급하는 간동맥에 항암제를 투여하고 혈관을 막아주면 정상 간 조직에 해를 입히지 않으면서 종양만을 선택적으로 괴사시킬 수 있다. 이러한 치료법은 암의 진행 정도에 따른 제약이 없이 적용범위가 넓고, 치료 대상의 제한이 적은 등 장점이 많기 때문에 현재 간암 치료율 향상에 가장 큰 기여를 하고 있는 방법이다. 화학색전술은 먼저 서혜부에 위치한 대퇴동맥에 카테터를 삽입하여 간동맥으로 접근한 후 혈관 조영제를 주사하여 종양의 위치, 크기 및 혈액 공급 양상 등 치료에 필요한 정보를 얻고, 치료 방침이 정해지면 약 1mm 정도 굵기의 가는 관을 카테터에 삽입하여 표적이 되는 동맥을 찾아 시술한다.
- [4] 간동맥 화학 색전술을 위하여 주입되는 색전물질, 항암제 혼합액은 색전물질과 항암제로 이루어진 에멀전(emulsion)으로, 색전물질인 리피오돌 (Lipiodol)과 항암제인 아드리아마이신(Adriamycin)을 1:4 비율로 혼합하여 에멀전 (emulsion) 형태로 사용되는 것이 일반적이다. 이때 아드리아마이신은 리피오돌과 비중이 비슷한 Xray 조영제인 파미레이에 용해시켜 사용되어 장시간 에멀전 형태로 유지할 수 있도록 한다. 본 혼합액에 의해 간암치료 효과는 Lipiodol의 색전 효과와 함께 항암제가 간암으로 집중 전달됨으로써, 영양분 공급을 차단함과

동시에 항암 효과의 극대화가 유도된다.

- [5] 하지만, 상기 기술은 색전을 시행하였으나, 색전물질이 일정시간 이후에 씻겨져 나가 약물이 혈관을 따라 전신으로 퍼짐에 따라 정상 세포를 사멸시킬 수 있는 반면 암세포를 사멸시키기에는 한계가 있었다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명은 약물을 효과적으로 암세포에 집중 침투시킴과 동시에 장기간 지속적으로 약물 방출 효과를 제공할 수 있는 나노입자 및 조성물을 제공하는 것이다.
- [7] 본 발명은 화학 색전술과 항암제에 의한 치료뿐만 아니라 유전자 치료까지도 병행할 수 있는 나노입자 및 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [8] 본 발명의 하나의 양상은
- [9] 항암치료 및 유전자 치료용 나노입자, 수성조영제 및 색전물질을 포함하는 간동맥 색전술용 조성물에 관련된다.
- [10] 상기 조성물은 상기 수성조영제나 색전물질에 분산 내지 용해되는 제 1 항암제를 추가로 포함할 수 있다.
- [11] 상기 항암치료 및 유전자 치료용 나노입자는 제 2 항암제를 담지한 siRNA 하이드로젤, 상기 하이드로젤 외면에 코팅된 키토산 또는 폴리에틸렌이민 및 상기 키토산을 둘러싸는 히알루론산 외곽층을 포함할 수 있다.
- [12] 다른 양상에서 본 발명은
- [13] 항암치료 및 유전자 치료용 나노입자를 증류수에 분산시키는 단계 ;
- [14] 분산용액을 수성 조영제와 혼합하는 단계 ; 및
- [15] 유성조영제인 색전물질을 상기 수성 조영제를 포함하는 혼합용액에 넣어 에멀전을 형성하는 단계를 포함하는 간동맥 색전술용 조성물의 제조방법에 관련된다.
- [16] 상기 조성물 제조방법은 상기 색전물질에 제 1 항암제를 분산 내지 혼합한 후 상기 혼합용액에 넣어 에멀전을 형성할 수 있다.

발명의 효과

- [17] 본 발명은 기존의 화학색전술 제형에 제 2 항암제가 담지된 유전자 치료용 siRNA 나노입자를 포함함으로써 화학색전술 및 약물 치료와 함께 타겟 유전자의 발현을 효율적으로 억제할 수 있으므로 항암 치료 효과를 높일 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 siRNA 나노입자에 담지된 제 2 항암제뿐만 아니라 에멀전 조성물에 함유된 free한 제 1 항암제를 포함하고 있어 초기에는 제 1 항암제가 방출되고 제 2 항암제는 siRNA 나노입자 분해와 함께 약물을 장기간에 걸쳐 방출시킬 수 있으므로 항암치료를 효율적으로 수행할 수 있다.
- [18] 본 발명의 나노입자는 히알루론산으로 코팅함으로써 간암세포에 발현된 CD44

receptor를 통하여 효과적으로 세포내로 전달되어 유전자 치료 및 항암치료 효과를 극대화 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [19] 도 1은 본 발명의 일구현예에 의한 항암치료 및 유전자 치료용 나노입자를 포함한 간동맥화학색전술 조성물의 개념도를 나타낸다.
- [20] 도 2는 siRNA 하이드로젤에 아크릴레이트 키토산 중간층과 히알루론산 외곽층으로 코팅된 항암-siRNA 나노입자의 SEM 이미지를 나타낸다.
- [21] 도 3은 파미레이에 녹인 free 항암제(독소루비슨)와 항암-siRNA 하이드로젤 기반 나노입자를 리피오돌과 섞어 에멀전이 형성된 것을 보여주는 DIC 이미지와 형광 이미지를 나타낸다.
- [22] 도 4는 siRNA 하이드로젤에 각각 아크릴레이트 키토산 또는 branched PEI 로 중간층을 코팅한 후 외곽층을 히알루론산으로 코팅하여 완성된 나노입자의 사이즈를 보여준다.
- [23] 도 5는 중간층을 키토산 또는 아크릴레이트 키토산으로 코팅한 후 외곽층을 히알루론산으로 코팅하여 완성된 나노입자의 생체 외 조건하 세포에 전달된 나노입자가 목표로 하는 VEGF 유전자의 발현을 선택적으로 억제함을 보여주는 PCR 데이터이다.
- [24] 도 6는 중간층을 branched PEI 로 코팅한 후 최외각층을 히알루론산으로 코팅하여 완성된 나노입자의 생체 외 조건하 세포에 전달된 나노입자가 목표로 하는 VEGF 유전자의 발현을 선택적으로 억제함을 보여주는 PCR 데이터이다.
- [25] 도 7은 제작된 항암-siRNA 나노입자로부터 지속적으로 방출된 항암제에 의한 세포 독성 실험을 한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [26] 본 발명은 하기의 설명에 의하여 모두 달성될 수 있다. 하기의 설명은 본 발명의 바람직한 구체 예를 기술하는 것으로 이해되어야 하며, 본 발명이 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.
- [27] 도 1은 본 발명의 일구현예에 의한 항암치료 및 유전자 치료용 나노입자를 포함한 간동맥(화학)색전술용 조성물의 개념도를 나타낸다.
- [28] 도 1을 참고하면, 본 발명의 간동맥 색전술 조성물은 항암치료 및 유전자 치료용 나노입자(10), 수성조영제(20) 및 색전물질(30)을 포함한다.
- [29] 상기 색전물질(30)은 유성 조영제이고, 상기 나노입자(10)는 수성 조영제(20)에 분산된다. 상기 조성물은 유성조영제와 수성 조영제가 혼합되어 오일(유성)-in-물(수성) 형태의 에멀전을 형성한다.
- [30] 상기 조성물은 상기 수성조영제나 유성인 색전물질에 분산 내지 용해되는 제 1 항암제(40)를 추가로 포함할 수 있다. 즉, 상기 제 1 항암제로 친수성이나 소수성 항암제를 모두 사용할 수 있다.
- [31] 상기 색전물질은 리피오돌, 콜라겐, 트롬빈, 젤라틴, 알기닉산, 알기네이트,

초산 섬유소, 폴리아세트산비닐, 폴리에틸렌비닐알코올, 에틸렌-비닐알코올 공중합체, 폴리비닐 알코올 또는 이들의 혼합물일 수 있다.

- [32] 상기 조성물은 상기 나노입자와 상기 색전물질을 1 : 1~5, 바람직하게는 1 : 1~4, 더욱 바람직하게는 1 : 2~5의 부피비로 포함할 수 있다.
- [33] 상기 수성조영제는 이오파미돌(Iopamidol), 파미레이(Pamiray), 메트리자미드(Metrizamide), 디아트리지에이트 (Diatrizoate), 이옥사글레이트(Ioxaglate), 이오펜톨(Iopentol), 이오메프롤(Iomeprol), 이오톨란(Iotrolan), 이오헉솔(Iohexol), 이오베르솔 (Ioversol), 이옥실란(Ioxilan), 이오프로마이드(Iopromide), 이오딕사놀 (Iodixanol) 및 이오비트리돌(Iobitridol)의 군에서 선택될 수 있다.
- [34] 상기 수성 조영제(20)는 상기 나노입자(10)와 상기 제 1 항암제(40)를 분산시킬 수 있다.
- [35] 상기 항암치료 및 유전자 치료용 나노입자(10)는 제 2 항암제(14)를 담지한 siRNA 하이드로젤(11), 상기 하이드로젤 외면에 코팅된 키토산(12) 또는 폴리에틸렌이민, 및 상기 키토산 또는 폴리에틸렌이민을 둘러싸는 히알루론산 외곽층(13)을 포함할 수 있다.
- [36] 상기 siRNA 하이드로젤(11)은 특정 유전자의 mRNA 들을 표적한다. siRNA는 그의 센서 (sense) 가닥과 염기 서열이 동일한 메신저 RNA (messenger RNA, mRNA)와 결합하여 RNA 유도 침묵 복합체 (RNA induced silencing complex, RISC)가 결합된 mRNA를 분해시킴으로서 특정 단백질의 발현을 저해할 수 있다.
- [37] 상기 특정 유전자로는 암 또는 특정 질병을 유발하는 모든 mRNA가 해당될 수 있다. 예를 들면, 상기 siRNA 하이드로젤(11)은 과도하게 발현되면 암을 유발하는 혈관내피 성장인자 (VEGF)를 표적하는 anti-VEGF siRNA 하이드로젤일 수 있다.
- [38] 상기 siRNA 하이드로젤은 분자량이 1×10^5 g/mol 이상일 수 있다. 상기 siRNA 하이드로젤은 작은 간접 RNA(siRNA) 단위 서열이 1×10^3 이상 탑재될 수 있으며, $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^{10}$ 개 범위 이상 복제되어 탑재될 수 있다.
- [39] 상기 제 2 항암제(14)는 상기 siRNA의 이중 나선 사이에 담지될 수 있다.
- [40] 상기 제 2 항암제(14)는 독소루비신 (DOX), 마이토마이신, 시스플라틴, 아드리아마이신일 수 있다.
- [41] 상기 제 1 항암제(40)와 제 2 항암제(14)는 동일할 수 있다.
- [42] 약물을 siRNA 하이드로젤에 담지시키는 방법은 다음과 같다.
- [43] 약물과 siRNA 하이드로젤을 용매(물)에 넣어 혼합한 후 소정시간 동안 보관하는 단계 및 siRNA 하이드로젤이 침전되면 용매로부터 분리하는 단계를 포함한다.
- [44] 예를 들면, 먼저 anti-VEGF siRNA 하이드로젤을 용매 (Nuclease free water)에 원하는 농도로 풀어주고 1분 정도 bath sonication을 시켜준 후 제 2 항암제 약물(예를 들면, 독소루비신, DOX)를 로딩하고 싶은 만큼 섞어서 암실에 하루

동안 보관한다. 이어서, 바닥에 붉은 색으로 제 2 항암제가 loading 된 입자가 가라앉은 것이 확인되면 원심분리시켜(13,200rpm, 10분) 상층액을 제거하면 약물이 로딩된 siRNA 하이드로젤을 수득할 수 있다. 상층액은 따로 보관하여 로딩된 DOX의 양을 확인할 수 있다.

- [45] 본 발명의 나노입자는 중간층(12)으로 키토산 또는 양이온성 고분자를 사용한다. 바람직하게는 상기 키토산은 아크릴레이트 키토산일 수 있다.
- [46] 상기 양이온성 고분자는 폴리에틸렌이민, 폴리아민 및 폴리비닐아민으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있으며, 바람직하게는 독성이 상대적으로 낮은 branched PEI를 사용할 수 있다.
- [47] 본 발명에서 상기 키토산과 bPEI는 양전하를 띠므로 음전하를 띠는 siRNA 하이드로젤과 히알루론산 (HA)의 상이에 코팅되는 중간층으로 사용된다. 상기 키토산과 bPEI는 음전하를 띠는 siRNA 하이드로젤을 응축 또는 압축하여 하이드로젤의 입자 사이즈를 줄일 수 있다. 또한, 상기 키토산과 bPEI는 코어인 하이드로젤 외면에 강한 (+) 전하를 띠는 양이온성 고분자층을 형성할 수 있으므로 (-) 전하를 띠는 히알루론산과 강한 정전기적 인력으로 결합하여 히알루론산 외곽 코팅 구조를 견고히 유지할 수 있다.
- [48] 또한, 상기 키토산은 우리 인체조직과 매우 유사한 구조를 이루고 있고 인체 친화성이 우수하여 면역반응이 일어나지 않기 때문에 인체 내 약물 전달 물질로 유용하다.
- [49] 키토산은 산성에서만 녹기 때문에 인체 내 중성 조건에서 잘 용해되지 않아 코어의 항암 약물이나 siRNA 하이드로젤의 방출을 방해할 수 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해, 본 발명에서는 키토산의 표면 기능을 아크릴레이트로 개질하여 중성인 물에도 키토산이 잘 분해되도록 하였다.
- [50] 상기 외곽층(13)은 상기 중간층(12) 외면에 코팅된 히알루론산층이다.
- [51] 상기 히알루론산 외곽층은 (-)전하를 나타내고, 따라서, 본 발명의 코어를 포함한 입자도 그 외부가 (-) 전하를 나타낸다.
- [52] 본 발명의 목적에는 다양한 형태의 히알루론산이 가능하다. 특히, 분자량이 큰 것과 작은 히알루론산이 이용될 수 있으며, 바람직하게는 5~10K, 더욱 바람직하게는 5K 히알루론산을 사용할 수 있다.
- [53] 히알루론산(HA)은 기본단위로 디사카라이드 글루쿠로닌산- β (1-3) N-아세틸글루코즈-아민 β (1-4)이 최고 50,000쌍으로 구성된 큰 복합 올리고사카라이드이다. 이는 세포외 매트릭스(extracellular matrix)의 주요 성분으로써 생체 내에서 발견된다. 이의 3차 구조는 직경이 약 50nm인 무작위(random) 코일 형태이다.
- [54] 본 발명의 나노입자는 (-) 전하를 띠는 히알루론산으로 코팅함으로써 간암세포에 발현된 CD44 receptor를 통하여 효과적으로 세포내로 전달되어 유전자 치료 및 항암치료 효과를 극대화 할 수 있는 장점이 있다.
- [55] 상기 방법은 상기 아크릴레이트된 키토산 또는 bPEI, 히알루론산을 상기

siRNA 하이드로젤 수용액의 RNA 농도가 100nmole 정도일 때 siRNA 하이드로젤 대비 1 : 0.1~1 : 0.5~2, 바람직하게는 1 : 0.1~0.5 : 1~2(하이드로젤 : 키토산/bPEI : 히알루론산)를 첨가할 수 있다.

[56] 본 발명의 상기 항암치료 및 유전자 치료용 나노입자는 사이즈가 100~400nm, 바람직하게는 200nm 이내일 수 있다.

[57] 다른 양상에서 본 발명은 간동맥 색전술용 조성물의 제조방법에 관련된다.

[58] 상기 조성물 제조방법은

[59] 항암치료 및 유전자 치료용 나노입자(10)를 증류수에 분산시키는 단계 ;

[60] 분산용액을 수성 조영제(20)와 혼합하는 단계 ; 및

[61] 유성조영제인 색전물질(30)을 상기 수성 조영제를 포함하는 혼합용액에 넣어 에멀전을 형성하는 단계를 포함한다.

[62] 상기 항암치료 및 유전자 치료용 나노입자는 앞에서 상술한 나노입자(10)를 사용할 수 있다. 상기 나노입자(10)는 제 2 항암제(14)를 담지한 siRNA 하이드로젤(11), 상기 하이드로젤 외면에 코팅된 키토산(12) 또는 양이온성 고분자 및 상기 키토산 또는 양이온성 고분자를 둘러싸는 히알루론산 외곽층(13)을 포함할 수 있다.

[63] 상기 나노입자(10)를 제조하는 방법은 제 2 항암제를 상기 siRNA 하이드로젤에 담지하는 단계, 중간층 코팅단계, 히알루론산 코팅단계 및 분리 건조 단계를 포함한다.

[64] 제 2 항암제를 상기 siRNA 하이드로젤에 담지하는 단계는 제 2 항암제(14)와 siRNA 하이드로젤(11)을 용매(RNA 분해 효소 활성을 제거한 증류수)에 넣어 혼합한 후 소정시간 동안 보관하는 단계 및 siRNA 하이드로젤이 침전되면 용매로부터 분리하는 단계를 포함할 수 있다.

[65] 중간층 코팅단계는 제 2 항암제가 담지된 상기 siRNA 하이드로젤 용액에 키토산 또는 양이온성 고분자를 혼합하여 코팅하는 단계이다.

[66] 외곽층 코팅단계는 상기 용액에 히알루론산을 혼합하여 상기 키토산 또는 양이온성 고분자 표면에 히알루론산을 코팅하는 단계를 포함한다.

[67] 상기 분리 건조 단계는 외곽층이 코팅된 나노입자를 용액에서 분리시켜 건조시키는 단계이다.

[68] 상기 방법은 상기 아크릴레이트된 키토산, 히알루론산을 상기 siRNA 하이드로젤 대비 1 : 0.1~1 : 0.5~2, 바람직하게는 1 : 0.1~0.5 : 1~2(하이드로젤 : 키토산/bPEI : 히알루론산)를 첨가할 수 있다.

[69] 상기 방법은 상기 색전물질(30)에 제 1 항암제(40)를 분산 내지 혼합한 후 상기 혼합용액에 넣어 에멀전을 형성할 수 있다.

[70] 상기 색전물질(30), 수성조영제(20), 제 1 항암제(40) 및 제 2 항암제(14)는 앞에서 상술한 내용을 참고할 수 있다.

[71] 상기 방법은 상기 나노입자와 상기 색전물질을 1 : 1~5, 바람직하게는 1 : 1~4 또는 1 : 2~5의 부피비로 혼합할 수 있다.

- [72] 상기 방법은 상기 색전물질과 상기 수성 조영제를 1 : 1~5, 바람직하게는 1 : 1 ~ 4의 부피비로 혼합할 수 있다.
- [73] 본 발명의 조성물 제조 방법은 제 2 항암제가 담지된 유전자 치료용 나노입자를 증류수(RNA 분해 효소 활성을 제거한 증류수임)에 원하는 농도로 재분산시킨다. 이후에 제 1항암제를 원하는 농도가 되도록 수성조영제(예를 들면, 오파미돌(Iopamidol) 또는 파미레이(Pamiray))에 분산시켜 항암치료 및 유전자 치료용 나노입자가 재분산된 용액과 섞어준다.
- [74] 이때 수성 조영제는 충분한 양을 사용할 수 있다. 색전물질과의 혼합을 위하여 나노입자와 제 1 항암제(DOX)가 섞인 수성 조영제 용액에 색전물질(예를 들면, 리피오돌)을 1 : 1~5의 부피비(색전물질 : 수성 조영제)로 분산시킨다.

발명의 실시를 위한 형태

- [75] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위해 바람직한 실시예를 제시하지만, 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.
- [76]
- [77] 실시예 1
- [78] anti-VEGF siRNA 하이드로젤 합성
- [79] 쥐의 혈관내피 성장 인자 (vascular endothelial growth factoer A (VEGF-A))의 센스는 5'-AUGUGAAUGCAGACCAAAGAA TT-3'이고, 안티 센스는 5'-UUCUUUGGUCUGCAUUCA CAU TT-3'이다. 상기 센스 및 안티센스를 인코딩한 긴 선형 단일가닥 DNA를 제조하였다.
- [80] Ligase된 원형 DNA 템플릿을 T7 RNA 폴리머레이즈와 같이 37°C에서 20 시간 동안 반응버퍼 (8mM Tris-HCl, 0.4mM spermidine, 1.2mM MgCl₂, and 2mM dithiothreitol)에서 배양하였다. 생성된 용액을 여러 번 피펫하고 5분 동안 초음파처리해서 입자를 분해하였다. 용액을 4°C 조건하 13,200rpm에서 20분 동안 원심분리하고 상층액을 제거하였다. 그 후 RNase-free water를 첨가해 입자를 세척하였다. 용액을 1분 동안 다시 초음파처리하고 원심 분리하였다. 세척단계를 세 번 더 반복해서 RCT 시약을 제거하여 RNA-microsponge (anti-VEGF siRNA 하이드로젤)를 수득하였다. RNA-microsponge의 농도는 Quant-iT RNA BR assay kits (Invitrogen)를 사용하여 측정하였다. 코어 제조는 본 발명자의 선행 논문을 참고하였다.(Self-assembled RNA interference microsponges for efficient siRNA delivery(nature material, 2012. 11. 26 공개))
- [81]
- [82] Doxorubicin(DOX)을 담지한 siRNA 하이드로젤 (DOX-siRNA 하이드로젤) 합성
- [83] DOX에 anti-VEGF siRNA 하이드로젤을 섞어서 암실에 overnight 보관하였다. 바닥에 붉은 색으로 DOX가 loading 된 입자가 가라앉아 있는 게 확인되면 13,200 rpm 으로 10분 동안 원심 분리시켰다. 상층액을 따로 걸어서 DOX의 loading

양을 측정하고 상층액을 제거한 DOX-siRNA 하이드로젤 입자를 수득하였다.

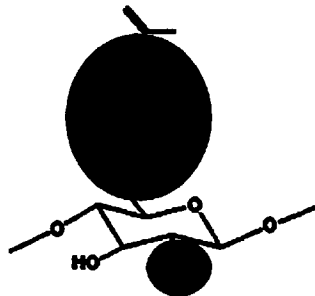
- [84] DOX에 anti-VEGF siRNA hydrogel을 섞어서 암실에 overnight 보관하였다. 바닥에 붉은 색으로 DOX가 loading 된 입자가 가라앉아 있는 게 확인되면 13,200 rpm으로 10분 동안 원심분리 시켰다. 상층액을 따로 걷어서 DOX의 loading 양을 측정하고 상층액을 제거한 DOX-siVEGF hydrogel 입자를 수득하였다.

[85]

[86] 아크릴레이트 키토산 합성

- [87] 48kDa 키토산 80mg을 8 mL distilled water (DW)에 섞은 다음 0.4 M acetic acid 182.4 μ L를 넣어서 60°C에 stirring 시키면서 1~2시간 정도 완전히 녹였다. 0.05% NaOH 400 μ L와 Glycidyl methacrylate (GMA) 472 μ L를 첨가하고 60°C에 overnight stirring 하였다. 이를 상온으로 온도를 내린 후에 2M NaOH 5mL와 Acetic anhydride 10 μ L 첨가하고 3~4 hr 교반하였다. Dialysis membrane을 이용하여 4,000 rpm에 10분씩 여러 번 원심 분리시켜서 미반응물을 제거하여 하기 아크릴레이트 키토산을 수득하였다.

[88] [화학식1]



[89] 나노입자 제조

- [90] 앞에서 제조한 아크릴레이트 키토산을 1 mg/mL으로 nuclease free water에 녹였다. 48kDa 키토산과 25 kDa bPEI 역시 1 mg/mL 으로 nuclease free water에 녹였다.
- [91] (1)1 mg/mL chitosan/bPEI 1 μ L와 nuclease free water 9 μ L를 섞고
- [92] (2)sonication 시킨 DOX-siRNA hydrogel 3 μ L에 nuclease free water 12 μ L를 섞은 후 두 개의 용액(1, 2)을 모두 섞었다.
- [93] 혼합용액을 10분간 incubation한 후 sonication 처리하였다. 혼합용액에 1 mg/mL hyaluronic acid (HA)를 5 μ L 섞어서 30분 정도 incubation하였다.
- [94] 최종적으로 제조된 나노입자의 SEM 사진을 도2에 나타냈고 나노입자의 사이즈는 도3에 나타냈다.
- [95] 도 3은 각각 중간층을 키토산과 bPEI 로 코팅한 나노입자의 사이즈로서 중간층이 키토산으로 코팅된 입자의 평균 사이즈는 386.6nm이고 bPEI로 코팅된 입자의 평균 사이즈는 362.5nm이다. 두 입자 모두 제타 전위는 마이너스 10 정도로 나타났다.

[96]

[97] 색전술용 조성물 제조

[98] 형광 dye 인 YOPRO-1을 로딩한 DOX-siRNA 하이드로젤에 bPEI 와 히알루론산으로 코팅한 나노입자와 파미레이에 녹인 free DOX를 섞어주었다. 이때 나노입자에 로딩된 DOX의 양과 free DOX의 양이 총 6.25mg/mL이 되도록 섞었다. 이 용액에 리피오돌을 1:2 비율이 되도록 3 way pumping을 이용하여 섞어주면 나노입자와 free DOX를 함유한 에멀전을 수득할 수 있다.

[99] 도 4를 참고하면 수용액 상에 DOX와 siRNA 나노입자를 함유한 에멀전이 존재하는 것을 확인할 수 있다.

[100] 도4의 좌측 그림은 에멀전의 형성 여부를 볼 수 있는 마이크로현미경 사진이고, 중간 그림은 에멀전 내에 포함된 DOX의 여부를 알 수 있는 DOX 형광 현미경 사진이며 우측 그림은 에멀전 내에 포함된 siRNA hydrogel 여부를 알 수 있는 siRNA hydrogel 의 형광 현미경 사진이다. DOX는 그 자체로 형광을 띠기 때문에 따로 형광을 입히지 않았고 siRNA hydrogel은 YOPRO-1이라는 형광 물질을 킬레이트하여 형광을 확인하였다. 즉, 도 4 사진을 참고하면, 용액 내 에멀전 형성 여부와 에멀전 내에 DOX와 siRNA hydrogel이 포함되었다는 것을 확인할 수 있다.

[101] Gene silencing 실험 방법 및 RT-PCR 데이터

[102] 도 5의 경우 6 well cell culture plate (세포배양 플레이트)에 HepG2 세포 (한국세포주은행)을 40만개씩 seeding 하고 하루 동안 incubation 하였다. 3시간 후에 opti-MEM을 제거하고 DPBS로 washing 해 준 후에 나노입자를 섞은 opti-MEM을 조심스럽게 넣어주고 12시간 후에 일반 media로 갈아주었다. 24시간 incubation 시킨 후 cell을 걸어서 RNA를 추출하고 cDNA로 만든 후 PCR과 전기영동을 거쳐 젤 이미지를 확인하였다. 상기 cell에 control(1), siVEGF hydrogel + 1mg/ml chitosan + HA(2), siVEGF hydrogel + 1mg/mL acylated chitosan + HA(3)을 medium과 섞어 처리하였다.

[103] 도 5를 참고하면, control (1)에 비해 chitosan (2) 이나 acrylated chitosan (3) 으로 코팅된 나노입자를 처리한 세포의 VEGF 유전자의 발현이 현저히 줄어든 것을 확인할 수 있다. 또한 일반 키토산으로 코팅을 했을 때 보다 acrylated chitosan 으로 코팅을 했을 때 VEGF 유전자 발현이 더욱 잘 억제됨을 확인할 수 있다.

[104] 도 6의 경우 B16F10 cell을 이용하였고 처리한 나노입자의 중간층을 bPEI로 코팅하였다는 점을 제외하고는 위 실험과 같은 방식으로 진행되었다(1mg/mL bPEI 사용하였음). 이 때, control(1)에 비해 bPEI(2,3)로 코팅한 나노입자를 처리한 cell의 VEGF 유전자의 발현이 현저히 줄어든 것을 확인할 수 있다.

[105]

[106] 세포 생존율 시험

[107] 96 well plate 에 B16F10 암세포를 1×10^4 seeding 한 후 24시간 경과 후, 대조군, free DOX (항암제) 그리고 실시예 1의 나노입자(DOX-siVEGF + 아크릴레이트

키토산 + HA)로 처리한 그룹으로 구분하여 실험을 진행하였다.

[108] 세 개 그룹 모두 DOX 농도를 200nM로 처리한 후, 6 시간 동안 보관하였다. 항암제 약물을 제거한 후에 새로운 cell media를 처리한 후에 24시간, 48시간, 그리고 72시간 후에 cell viability를 도 7에 나타내었다.

[109] 도 7을 참고하면, 48시간 경과 후, 실시예 1은 대조군에 비해 23%의 사멸효과를 보였고, 72시간 경과 후에는 대조군에 비해 52%의 사멸효과를 보여주고 있다.

[110] 본 발명의 단순한 변형 내지 변경은 모두 본 발명의 영역에 속하는 것으로, 본 발명의 구체적인 보호범위는 첨부된 특허청구범위에 의하여 명확해질 것이다.

산업상 이용가능성

[111] 본 발명의 조성물은 화학색전술, 약물치료 및 유전자 치료를 동시에 시행할 수 있어 간암치료에 사용될 수 있다.

[112]

[113]

청구범위

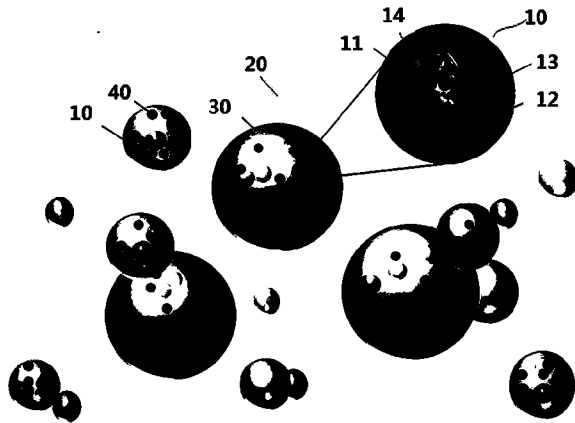
- [청구항 1] 항암치료 및 유전자 치료용 나노입자, 수성조영제 및 색전물질을 포함하는 간동맥 색전술용 조성물.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 색전물질은 유성 조영제이고, 상기 나노입자는 수성 조영제에 분산되어 상기 조성물은 에멀전을 형성하는 것을 특징으로 하는 간동맥 색전술용 조성물.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서, 상기 조성물은 상기 수성조영제나 색전물질에 분산 내지 용해되는 제 1 항암제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 간동맥 색전술용 조성물.
- [청구항 4] 제 1항에 있어서, 상기 색전물질은 리피오돌, 콜라겐, 트롬빈, 젤라틴, 알기닉산, 알기네이트, 초산 섬유소, 폴리아세트산비닐, 폴리에틸렌비닐알코올, 에틸렌-비닐알코올 공중합체, 폴리비닐 알코올 또는 이들의 혼합물인 것을 특징으로 하는 간동맥색전술용 조성물.
- [청구항 5] 제 1항에 있어서, 상기 조성물은 상기 나노입자와 상기 색전물질을 1 : 1~5의 부피비로 포함하는 것을 특징으로 하는 간동맥색전술용 조성물.
- [청구항 6] 제 1항에 있어서, 상기 수성조영제는 이오파미돌(Iopamidol), 파미레이(Pamiray), 메트리자미드(Metrizamide), 디아트리지오에이트(Diatrizoate), 이옥사글레이트(Ioxaglate), 이오펜톨(Iopentol), 이오메프롤(Iomeprol), 이오톨롤란(Iotrolan), 이오헉솔(Iohexol), 이오베르솔(Ioversol), 이옥실란(Ioxilan), 이오프로마이드(Iopromide), 이오딧사놀(Iodixanol) 및 이오비트리돌(Iobitridol)의 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것임을 특징으로 하는 간동맥색전술용 조성물.
- [청구항 7] 제 1 항에 있어서, 상기 항암치료 및 유전자 치료용 나노입자는 제 2 항암제를 담지한 siRNA 하이드로젤 ;
상기 하이드로젤 외면에 코팅된 키토산 또는 폴리에틸렌이민 ; 및
상기 키토산 또는 폴리에틸렌이민을 둘러싸는 히알루론산 외곽층을 포함하는 것을 특징으로 하는 간동맥 색전술용 조성물.
- [청구항 8] 제 7항에 있어서, 상기 키토산은 아크릴레이트 키토산인 것을 특징으로 하는 간동맥 색전술용 조성물.
- [청구항 9] 제 7항에 있어서, 상기 siRNA 하이드로젤은 특정 유전자의 mRNA를 표적하여 이의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 간동맥 색전술용 조성물.
- [청구항 10] 제 7항에 있어서, 상기 제 2 항암제는 상기 siRNA의 이중 나선 사이에 담지되는 것을 특징으로 하는 간동맥 색전술용 조성물.
- [청구항 11] 제 7항에 있어서, 상기 제 2 항암제는 약물은 독소루비신(DOX), 마이토마이신, 시스플라틴, 아드리아마이신, 젬시타빈 인 것을 특징으로 하는 간동맥 색전술용 조성물.

- [청구항 12] 제 7항에 있어서, 상기 siRNA 하이드로겔과 히알루론산층은 (-) 전하, 상기 키토산 내지 폴리에틸렌이민층은 (+) 전하를 띠며, 상기 나노입자는 전체적으로 (-) 전하를 나타내는 것을 특징으로 하는 간동맥 색전술용 조성물.
- [청구항 13] 제 7항에 있어서, 상기 항암치료 및 유전자 치료용 나노입자는 사이즈가 100~400nm인 것을 특징으로 하는 간동맥 색전술용 조성물.
- [청구항 14] 항암치료 및 유전자 치료용 나노입자를 증류수에 분산시키는 단계 ; 분산용액을 수성 조영제와 혼합하는 단계 ; 및 유성조영제인 색전물질을 상기 수성 조영제를 포함하는 혼합용액에 넣어 에멀전을 형성하는 단계를 포함하는 간동맥 색전술용 조성물의 제조방법.
- [청구항 15] 제 14항에 있어서, 상기 방법은 상기 색전물질에 제 1 항암제를 분산 내지 혼합한 후 상기 혼합용액에 넣어 에멀전을 형성하는 것을 특징으로 하는 간동맥 색전술용 조성물의 제조방법.
- [청구항 16] 제 14항에 있어서, 상기 방법은 상기 나노입자와 상기 색전물질을 1 : 1~5의 부피비로 혼합하는 것을 특징으로 하는 간동맥 색전술용 조성물의 제조방법.
- [청구항 17] 제 14항에 있어서, 상기 방법은 상기 색전물질과 상기 수성 조영제를 1 : 1~4의 부피비로 혼합하는 것을 특징으로 하는 간동맥 색전술용 조성물의 제조방법.
- [청구항 18] 제 14항에 있어서, 상기 항암치료 및 유전자 치료용 나노입자는 제 2 항암제를 담지한 siRNA 하이드로겔 ; 상기 하이드로겔 외면에 코팅된 키토산 또는 폴리에틸렌이민 ; 및 상기 키토산 내지 폴리에틸렌이민을 둘러싸는 히알루론산 외곽층을 포함하는 것을 특징으로 하는 간동맥 색전술용 조성물의 제조방법.
- [청구항 19] 제 14항에 있어서, 상기 항암치료 및 유전자 치료용 나노입자를 제조하는 방법은 제 2 항암제와 siRNA 하이드로겔을 용매에 넣어 혼합한 후 소정시간 동안 보관하는 단계 및 siRNA 하이드로겔이 침전되면 용매로부터 분리하는 단계를 포함하는 상기 제 2 항암제를 상기 siRNA 하이드로겔에 담지하는 단계 ; 제 2 항암제가 담지된 상기 siRNA 하이드로겔 용액에 아크릴레이트된 키토산 또는 폴리에틸렌이민을 혼합하여 코팅하는 단계 ; 및 상기 용액에 히알루론산을 혼합하여 상기 키토산 또는 폴리에틸렌이민 표면에 히알루론산을 코팅하는 단계 ; 및 입자를 분리 검조시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 간동맥 색전술용 조성물의 제조방법.
- [청구항 20] 제 19항에 있어서, 상기 방법은 상기 아크릴레이트된 키토산,

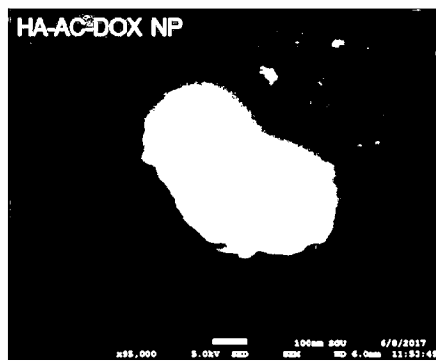
히알루론산을 상기 siRNA 하이드로젤 대비 1 : 0.1~1 : 0.5~2(하이드로젤 : 키토산 : 히알루론산)를 첨가하는 것을 특징으로 하는 간동맥 색전술용 조성물의 제조방법.

- [청구항 21] 항암제와 siRNA 하이드로젤을 용매에 넣어 혼합한 후 소정시간 동안 보관하는 단계 및 siRNA 하이드로젤이 침전되면 용매로부터 분리하는 단계를 포함하는 항암제를 상기 siRNA 하이드로젤에 담지하는 단계 ; 항암제가 담지된 상기 siRNA 하이드로젤 용액에 아크릴레이트된 키토산을 혼합하여 코팅하는 단계 ; 및 상기 용액에 히알루론산을 혼합하여 상기 키토산 표면에 히알루론산을 코팅하는 단계 ; 및 입자를 분리 검조시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 항암치료 및 유전자 치료용 나노입자 제조방법.

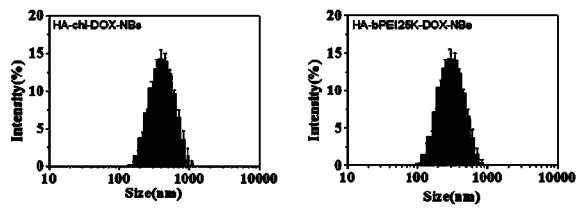
[도1]



[도2]



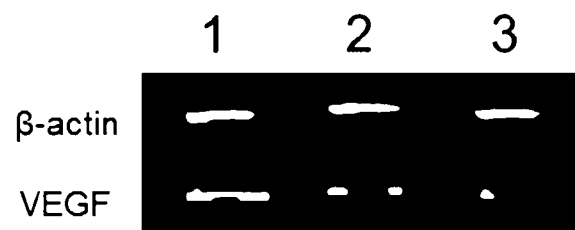
[도3]



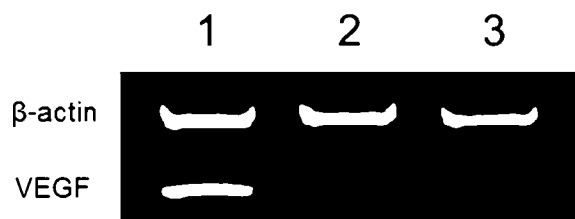
[도4]



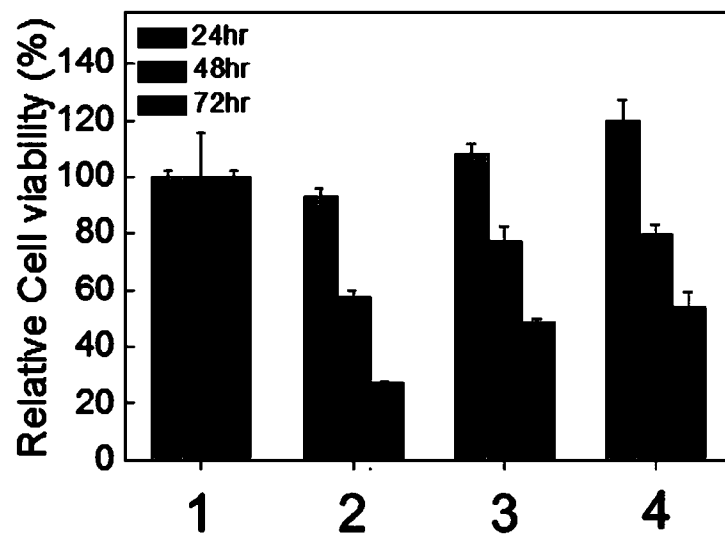
[도5]



[도6]



[도7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/011855

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 9/51(2006.01)i, A61K 9/06(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i, A61K 31/704(2006.01)i, A61K 49/04(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 9/51; A61K 47/32; A61K 47/34; A61K 47/44; A61K 9/107; A61L 31/12; A61L 31/14; A61K 9/06; A61K 48/00; A61K 31/704; A61K 49/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

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

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: anticancer agent, siRNA, nano-particle, contrast media, hepatic artery embolization

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2004-0020679 A (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 09 March 2004 See pages 3, 4; examples 1, 5; claims 1, 3, 5, 18; and table 1.	1-21
Y	JP 2017-506568 A (BOSTON SCIENTIFIC SCIMED, INC. et al.) 09 March 2017 See paragraphs [0004], [0028], [0040]; and claim 1.	1-21
Y	KR 10-1706047 B1 (SOGANG UNIVERSITY RESEARCH & BUSINESS DEVELOPMENT FOUNDATION) 16 February 2017 See abstract; and paragraphs [0016], [0025], [0032], [0033], [0036], [0037], [0039], [0042]-[0044], [0049], [0050].	7-13, 18-21
A	KR 10-2004-0066300 A (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY et al.) 27 July 2004 See the entire document.	1-21
A	BUTT, Adeel Masood et al., "Doxorubicin and siRNA Codelivery via Chitosan-coated pH-responsive Mixed Micellar Polyplexes for Enhanced Cancer Therapy in Multidrug-resistant Tumors", Molecular Pharmaceutics, 2016, vol. 13, pages 4179-4190 See the entire document.	1-21



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

28 FEBRUARY 2019 (28.02.2019)

Date of mailing of the international search report

28 FEBRUARY 2019 (28.02.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/011855

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2004-0020679 A	09/03/2004	KR 10-0505434 B1	05/08/2005
JP 2017-506568 A	09/03/2017	CN 106170307 A	30/11/2016
		EP 3104901 A1	21/12/2016
		JP 6280996 B2	14/02/2018
		US 2015-0231075 A1	20/08/2015
		WO 2015-123082 A1	20/08/2015
KR 10-1706047 B1	16/02/2017	NONE	
KR 10-2004-0066300 A	27/07/2004	KR 10-0497258 B1	28/06/2005

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 9/51(2006.01)i, A61K 9/06(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i, A61K 31/704(2006.01)i, A61K 49/04(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 9/51; A61K 47/32; A61K 47/34; A61K 47/44; A61K 9/107; A61L 31/12; A61L 31/14; A61K 9/06; A61K 48/00; A61K 31/704; A61K 49/04

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: 항암제, siRNA, 나노입자, 조영제, 간동맥 색전술

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2004-0020679 A (한국과학기술연구원) 2004.03.09 페이지 3, 4; 실시예 1, 5; 청구항 1, 3, 5, 18; 및 표 1 참조.	1-21
Y	JP 2017-506568 A (BOSTON SCIENTIFIC SCIMED, INC. 등) 2017.03.09 단락 [0004], [0028], [0040]; 및 청구항 1 참조.	1-21
Y	KR 10-1706047 B1 (서강대학교산학협력단) 2017.02.16 요약; 및 단락 [0016], [0025], [0032], [0033], [0036], [0037], [0039], [0042]-[0044], [0049], [0050] 참조.	7-13, 18-21
A	KR 10-2004-0066300 A (한국과학기술연구원 등) 2004.07.27 전체 문헌 참조.	1-21
A	BUTT, ADEEL MASOOD 등, 'Doxorubicin and siRNA codelivery via chitosan-coated pH-responsive mixed micellar polyplexes for enhanced cancer therapy in multidrug-resistant tumors', Molecular Pharmaceutics, 2016, 13권, 페이지 4179-4190 전체 문헌 참조.	1-21

☐ 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

2019년 02월 28일 (28.02.2019)

국제조사보고서 발송일

2019년 02월 28일 (28.02.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

감유림

전화번호 +82-42-481-3516



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2004-0020679 A	2004/03/09	KR 10-0505434 B1	2005/08/05
JP 2017-506568 A	2017/03/09	CN 106170307 A	2016/11/30
		EP 3104901 A1	2016/12/21
		JP 6280996 B2	2018/02/14
		US 2015-0231075 A1	2015/08/20
		WO 2015-123082 A1	2015/08/20
KR 10-1706047 B1	2017/02/16	없음	
KR 10-2004-0066300 A	2004/07/27	KR 10-0497258 B1	2005/06/28