



(51) 국제특허분류:

A61K 47/48 (2006.01)

C12N 15/115 (2010.01)

A61K 31/5365 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2016/008337

(22) 국제출원일:

2016년 7월 29일 (29.07.2016)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2016-0096227 2016년 7월 28일 (28.07.2016) KR

(71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가), Seoul (KR).

(72) 발명자: 서재홍 (SEO, Jae Hong); 13803 경기도 과천시 관문로 166 주공아파트 1018동 303호, Gyeonggi-do (KR). 반창일 (BAN, Changill); 37673 경상북도 포항시 남구 청암로 77 교수아파트 7동 302호, Gyeongsangbuk-do (KR). 조현호 (JO, Hunho); 49481 부산시 사하구 하신중앙로 2 동원로얄듀크아파트 113동 1402호, Busan (KR). 김지영 (KIM, JiYoung); 08307 서울 구로구 가마산로 20라길 28-8 비전빌에이 204호, Seoul (KR). 오은혜

(OH, EunHye); 01416 서울시 도봉구 노해로70길 12 동아아파트 6동 603호, Seoul (KR).

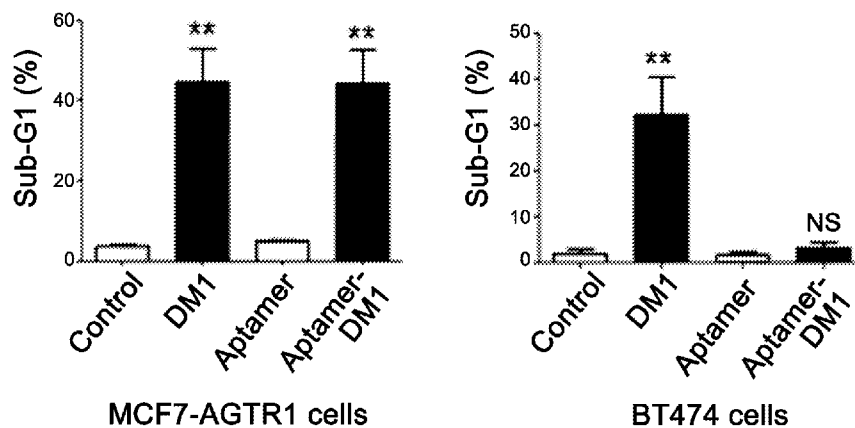
(74) 대리인: 특허법인 다해 (DAHAI INTERNATIONAL PATENT AND LAW FIRM); 06158 서울시 강남구 테헤란로 443, 15층 (삼성동, 애플 트리타워), Seoul (KR).

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

(54) Title: AGTR1 APTAMER-ANTICANCER DRUG COMPOSITE FOR CANCER CELL CHEMOTHERAPY

(54) 발명의 명칭: 암세포 화학요법을 위한 AGTR1 aptamer-항암약물 복합체



(57) Abstract: The present invention relates to a composite for cancer cell chemotherapy and, more specifically, to an AGTR-1 aptamer-anticancer drug composite for cancer cell chemotherapy which selectively targets an AGTR-1 positive (overexpressed) breast cancer cell and destroys the same, by containing a nucleic acid aptamer which specifically binds to AGTR-1 and an anticancer drug bound to the nucleic acid aptamer.

(57) 요약서: 본 발명은 암세포 화학요법을 위한 복합체에 대한 것으로, 더욱 상세하게는 AGTR-1에 특이적으로 결합하는 핵산 aptamer와 상기 핵산 aptamer와 결합한 항암약물을 포함하여, AGTR-1 양성(과발현) 유방암 세포를 선택적으로 타겟팅하여 사멸시키는 암세포 화학요법을 위한 AGTR-1 aptamer-항암약물 복합체에 대한 것이다.

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

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 암세포 화학요법을 위한 AGTR1 압타머-항암약물 복합체

기술분야

- [1] 본 발명은 한국 보건복지부에 의해 출자된 한국보건산업진흥원으로부터 수여 받은 HI12C1852의 정부 지원으로 만들어졌다.
- [2] 본 발명은 암세포 화학요법을 위한 복합체에 대한 것으로, 더욱 상세하게는 AGTR-1에 특이적으로 결합하는 핵산 압타머와 상기 핵산 압타머와 결합한 항암약물을 포함하여, AGTR-1 양성(과발현) 유방암 세포를 선택적으로 타겟팅하여 사멸시키는 암세포 화학요법을 위한 AGTR-1 압타머-항암약물 복합체에 대한 것이다.

배경기술

- [3] 유방암은 여성에게 빈번하게 발생하는 암으로, 유방암의 정확한 진단 및 치료를 하기 위한 기술이 널리 개발되고 있다. 유방암 등의 암을 치료하기 위한 대표적인 방법으로 외과적인 수술 방법, 방사선 치료방법 및 화학요법 등이 있는데, 이중 화학요법은 암세포의 복제 또는 대사를 교란시킴으로써 암을 치료한다. 하지만, 상기 화학요법은 암세포뿐만 아니라 정상적인 세포도 사멸시키는 문제가 있어, 이를 해결하기 위해 하기의 특허문헌처럼 암에서 발현되는 특정 단백질(예컨대, 유방암에서 과발현되는 HER-2(Human epidermal growth factor receptor 2) 등)을 표적하여 암을 치료하는 표적치료제가 널리 개발되고 있다.
- [4] <특허문헌>
- [5] 공개특허공보 제10-2015-0140417호(2015. 12. 15. 공개) "HER2 항체 조성물"
- [6] 하지만, 종래의 유방암 표적치료제는 HER-2를 표적하여 암을 치료하는데, HER-2는 전체 유방암 환자 중 15-20%의 환자에서만 과발현되므로, 종래의 유방암 표적치료제를 적용할 수 있는 환자가 제한되는 문제가 있다. 또한, 종래의 유방암 표적치료제는 항체로 이루어져 안정성이 떨어지고 생산에 비용이 많이 드는 문제가 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로,
- [8] 본 발명은 AGTR-1 양성 유방암 세포를 효과적으로 사멸시킬 수 있는 암세포 화학요법을 위한 AGTR-1 압타머-항암약물 복합체를 제공하는데 그 목적이 있다.
- [9] 또한, 본 발명은 압타머가 AGTR-1을 타겟팅하여 AGTR-1 양성 유방암 세포에 항암약물을 효과적으로 전달할 수 있는 암세포 화학요법을 위한 AGTR-1

압타머-항암약물 복합체를 제공하는데 그 목적이 있다.

- [10] 또한, 본 발명은 압타머와 항암약물은 디설파이드 결합에 의해 생성되므로, 암세포 내에 섭취된 복합체는 세포기질에 존재하는 글루타티온에 의해 쪼개져 비목적 지역에 약물의 방출을 억제할 수 있는 암세포 화학요법을 위한 AGTR-1 압타머-항암약물 복합체를 제공하는데 그 목적이 있다.

과제 해결 수단

- [11] 본 발명은 앞서 본 목적을 달성하기 위하여 다음과 같은 구성을 가진 실시예에 의해 구현된다.
- [12] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 암세포 화학요법을 위한 복합체는 AGTR-1에 특이적으로 결합하는 핵산 압타머와, 상기 핵산 압타머와 결합한 항암약물을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [13] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 암세포 화학요법을 위한 복합체는 핵산 압타머와 항암약물의 디설파이드 결합에 의해 형성되는 것을 특징으로 한다.
- [14] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 암세포 화학요법을 위한 복합체에 있어서 상기 핵산 압타머의 3'말단에는 티올기가 도입되고, 상기 항암약물은 티올기를 가진 항암약물이 사용되어, 상기 핵산 압타머와 항암약물은 티설파이드 결합을 하는 것을 특징으로 한다.
- [15] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 암세포 화학요법을 위한 복합체에 있어서 상기 핵산 압타머는 서열번호 1 내지 6중 어느 하나의 염기서열을 가지는 것을 특징으로 한다.
- [16] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 암세포 화학요법을 위한 복합체에 있어서 상기 핵산 압타머는 서열번호 4의 염기서열을 가지는 것을 특징으로 한다.
- [17] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 암세포 화학요법을 위한 복합체에 있어서 상기 항암약물은 DM1이 사용되는 것을 특징으로 한다.
- [18] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 암세포 화학요법을 위한 복합체에 있어서 유방암 치료용으로 사용되는 것을 특징으로 한다.
- [19] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 암세포 화학요법을 위한 복합체는 AGTR-1 양성 유방암 세포 내에 섭취되어 세포 기질에 존재하는 글루타티온에 의해 디설파이드 결합이 끊어져 항암약물이 유리되는 것을 특징으로 한다.
- [20] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 암세포 화학요법을 위한 복합체의 제조방법은 AGTR-1에 특이적으로 결합하는 압타머 염기서열을 가지는 핵산 압타머를 준비하는 압타머준비단계와, 상기 압타머준비단계에서 준비된 압타머와 항암약물을 반응시켜 압타머-항암약물 복합체를 형성하는 복합체형성단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

- [21] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 암세포 화학요법을 위한 복합체의 제조방법에 있어서 상기 압타머준비단계에서는 AGTR-1에 특이적으로 결합하는 서열번호 1 내지 6 중 어느 하나의 염기서열을 가지는 핵산 압타머를 형성하고, 상기 핵산 압타머의 3'말단에 티올기를 도입하고, triethylammonium acetate buffer에서 Dithiothreitol과 반응시킴으로써, 3' 티올기의 activation을 실시하는 것을 특징으로 한다.
- [22] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 암세포 화학요법을 위한 복합체의 제조방법에 있어서 상기 복합체형성단계에서는 DM1을 Dimethyl sulfoxide에 녹여 준비한 후, DMSO와 EDTA를 포함하는 potassium phosphate buffer 내에서 상기 압타머와 DM1의 비율을 1:1000으로 반응시켜 압타머-항암약물 복합체를 형성하는 것을 특징으로 한다.
- [23] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 AGTR-1에 특이적으로 결합하는 핵산 압타머는 서열번호 1 내지 6 중 어느 하나의 염기서열을 가지는 것을 특징으로 한다.
- [24] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 AGTR-1에 특이적으로 결합하는 핵산 압타머는 서열번호 4의 염기서열을 가지는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [25] 본 발명은 앞서 본 실시예에 의해 다음과 같은 효과를 얻을 수 있다.
- [26] 본 발명은 AGTR-1 양성 유방암 세포를 효과적으로 사멸시킬 수 있는 효과가 있다.
- [27] 또한, 본 발명은 압타머가 AGTR-1을 타겟팅하여 AGTR-1 양성 유방암 세포에 항암약물을 효과적으로 전달할 수 있는 효과가 있다.
- [28] 또한, 본 발명은 압타머와 항암약물은 디설파이드 결합에 의해 생성되므로, 암세포 내에 섭취된 복합체는 세포기질에 존재하는 글루타티온에 의해 쪼개져 비목적 지역에 약물의 방출을 억제할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [29] 도 1은 AGTR-1이 과발현되도록 생성한 유방암 세포주의 AGTR-1 발현 정도를 나타내는 이미지.
- [30] 도 2는 AGTR-1 양성 유방암 세포주가 이식된 동물의 종양 부피 측정결과를 나타내는 도표.
- [31] 도 3은 AGTR-1 양성 유방암 세포에 대한 압타머 염기서열을 결합력을 확인하기 위한 공초점 현미경 이미지.
- [32] 도 4는 동시 배양된 AGTR-1 양성 유방암 세포주와 AGTR-1 음성 유방암 세포주에서 복합체의 표적 능력을 확인하기 위한 공초점 현미경 이미지.
- [33] 도 5는 AGTR-1 발현 유무에 따라 His3가 검출된 세포의 수를 정량화하여 표시한 도표.
- [34] 도 6은 복합체의 AGTR-1 양성 유방암 세포에 대한 선택적 세포 사멸 능력을

확인하기 위한 도표.

- [35] 도 7은 유방암 질환 동물 모델에서 복합체의 AGTR-1 양성 유방암 세포에 대한 선택적 세포 사멸 능력을 확인하기 위한 중앙 부피 측정결과를 나타내는 도표.
- [36] 도 8은 유방암 질환 동물 모델에서 복합체의 AGTR-1 양성 유방암 세포에 대한 선택적 세포 사멸 능력을 확인하기 위한 동물 체중 측정결과를 나타내는 도표.
- [37] 도 9는 유방암 질환 동물 모델에서 복합체의 AGTR-1 양성 유방암 세포에 대한 선택적 세포 사멸 능력을 확인하기 위한 TUNEL assay에 의한 분석결과를 나타내는 이미지.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [38] 이하에서는 본 발명에 따른 암세포 화학요법을 위한 AGTR-1 압타머-항암약물 복합체를 첨부된 도면을 참조하여 상세히 설명한다. 특별한 정의가 없는 한 본 명세서의 모든 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 기술자가 이해하는 당해 용어의 일반적 의미와 동일하고 만약 본 명세서에 사용된 용어의 의미와 충돌하는 경우에는 본 명세서에 사용된 정의에 따른다. 또한, 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 공지 기능 및 구성에 대해 상세한 설명은 생략한다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [39]
- [40] 본 발명의 일 실시예에 따른 암세포 화학요법을 위한 복합체는 AGTR-1에 특이적으로 결합하는 핵산 압타머와, 상기 핵산 압타머와 결합한 항암약물을 포함한다. 상기 AGTR-1(Angiotensin II type I receptor)은 Angiotensin II와 결합하여 세포 내 기작을 전달하는 수용체로 유방암 환자의 20%에서 과발현된다. 또한, 하기의 실시예에서 MCF7 유방암 세포주에서 AGTR-1의 과발현에 의한 유방암의 증식을 확인하였다. 이에, 본 발명은 압타머가 AGTR-1을 타겟팅하여 AGTR-1 양성 유방암 세포에 항암약물을 효과적으로 전달하여, AGTR-1이 과발현된 유방암을 효과적으로 치료할 수 있게 한다.
- [41]
- [42] 본 발명에서 사용되는 용어 "핵산 압타머(Nucleic acid aptamer)"는 특정 표적물질에 대해 높은 친화도와 선택성을 가지는 단일가닥 DNA 또는 RNA를 말하는데, 압타머는 항체에 비해 표적물질에 대한 친화도가 높고, 열 안정성이 우수하여 실온에서 장기간 보존이 가능하며, 화학적 변형이 용이하여 비교적 간단하고 적은 비용으로 생산할 수 있고, 변성이 되더라도 다시 짧은 시간에 재생 가능한 여러 장점을 가지므로, 본 발명은 복합체 형성시 AGTR-1에 특이적으로 결합하는 핵산 압타머를 사용하였다. 상기 핵산 압타머의 염기서열은 AGTR-1에 특이적으로 결합하는 다양한 압타머 염기서열을 가질 수 있으나, 바람직하게는 서열번호 1 내지 6중 어느 하나의 염기서열로 이루어질 수

있으며, 더욱 바람직하게는 서열번호 4의 염기서열로 이루어질 수 있다. AGTR-1에 특이적으로 결합하는 상기 서열번호 1 내지 6중 어느 하나의 염기서열을 가지는 핵산 압타머의 선별 과정은 하기에서 자세히 설명하기로 한다. 상기 항암약물과 복합체를 형성하기 위해 상기 핵산 압타머의 3'말단에는 티올기가 도입되게 된다.

[43]

[44] 상기 항암약물은 상기 핵산 압타머와 결합하여 암세포를 사멸시키는 다양한 약물이 사용될 수 있으나, 바람직하게는 티올기를 가진 약물이 사용될 수 있으며, 더욱 바람직하게는 maytansine(maytansinoid, DM1)이 사용될 수 있다. 상기 maytansine(DM1)은 세포분열시기인 G2/M기에 방추사를 형성하는 tubulin 단백질에 결합 및 이를 억제하여 비정상적 방추사의 형성을 유도하여, 염색체의 정상적인 배열을 저해함으로써 세포분열 (mitosis)을 억제, 암세포를 사멸(apoptosis)로 이르게 하는 기능을 가진 약물이다. 상기 핵산 압타머의 3'말단에는 티올기가 도입되고, 상기 항암약물은 티올기를 가진 항암약물이 사용되어, 상기 핵산 압타머와 항암약물은 디설파이드 결합을 하여 복합체를 형성하게 된다. 유방암에서 과발현된 AGTR-1이 발견되므로, 상기 복합체는 AGTR-1을 타겟팅하는 핵산 압타머를 포함하여 유방암 세포를 효과적으로 타겟팅할 수 있고, 복합체는 디설파이드 결합에 의해 형성되는데 디설파이드 결합을 끊는 글루타티온(glutathione)은 세포 기질(cell cytosol)에는 존재하나 혈액 및 림프액에는 존재하지 않아 본 발명의 복합체는 유방암 세포에 섭취된 다음 항암약물이 유리되므로 비목적하는 지역이 아닌 암세포에 효과적으로 약물을 방출할 수 있어 부작용을 줄이고 암세포 사멸효과를 증가시킬 수 있다.

[45]

[46] 본 발명의 다른 실시예는 암세포 화학요법을 위한 복합체의 제조방법에 대한 것으로, 상기 복합체의 제조방법은 AGTR-1에 특이적으로 결합하는 압타머 염기서열을 가지는 핵산 압타머를 준비하는 압타머준비단계와, 상기 압타머준비단계에서 준비된 압타머와 항암약물을 반응시켜 압타머-항암약물 복합체를 형성하는 복합체형성단계를 포함한다.

[47]

[48] 상기 압타머준비단계는 AGTR-1에 특이적으로 결합하는 압타머 염기서열을 가지는 핵산 압타머를 준비하는 단계로, 구체적으로 AGTR-1에 특이적으로 결합하는 서열번호 1 내지 6중 어느 하나의 염기서열을 가지는 핵산 압타머를 형성하고, 상기 핵산 압타머의 3'말단에 티올기를 도입하고(OH를 SH로 치환), triethylammonium acetate buffer에서 Dithiothreitol과 반응시킴으로써, 3' 티올기의 activation을 실시하여 핵산 압타머를 준비한다.

[49]

[50] 상기 복합체형성단계는 상기 압타머준비단계에서 준비된 압타머와 항암약물을 반응시켜 압타머-항암약물 복합체를 형성하는 단계로, 구체적으로

DM1을 Dimethyl sulfoxide에 녹여 준비한 후, DMSO와 EDTA를 포함하는 potassium phosphate buffer 내에서 상기 압타머와 DM1의 비율을 1:1000으로 반응시켜 압타머-항암약물 복합체를 형성한다.

[51]

[52] 본 발명의 또 다른 실시예는 상기 암세포 화학요법을 위한 복합체를 포함하는 유방암 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[53] 상기 유방암 치료용 약학적 조성물은 (a) 상술한 암세포 화학요법을 위한 복체의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다.

[54] 본 명세서에서 사용하는 용어 "약제학적 유효량"은 상술한 유방암에 대한 치료효과를 달성하는 데 충분한 양을 의미할 수 있다.

[55] 상기 유방암 치료용 약학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 유방암 치료용 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[56] 상기 유방암 치료용 약학적 조성물은 경구 투여하거나 비경구투여(예컨대 정맥내 투여, 복강내 투여, 근육내 투여, 피하 투여 또는 국부 투여)를 이용하여 투여할 수 있다.

[57] 상기 유방암 치료용 약학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 대상의 연령, 체중, 성, 질병 증상의 정도, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다.

[58] 상기 유방암 치료용 약학적 조성물은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화됨으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[59]

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

[61]

[62] <실시예 1> AGTR-1이 과발현되는 세포주 제작 및 특성 확인

- [63] (1) 인간 유방암 세포주 SK-BR-3, MCF7, BT474 각각은 10% fetal bovine serum(FBS), streptomycin-penicillin(100U/ml) 및 Fungizone(0.625 μ g/ml)을 함유하는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에서 5% CO₂, 37°C 환경으로 배양된다.
- [64] (2) AGTR-1 과발현 세포는 렌티바이러스 시스템(lentiviral system)을 이용하여 생성하는데, AGTR-1 유전자는 특정 프라이머(enzyme site: NheI/NotI)를 사용하여 PCR에 의해 증폭되고, dual promoter lentivector(CD550A-1, System Biosciences, USA)에 삽입된다. 바이러스들은 lentiviral packaging을 가지고 생산되며 HEK293T producer cell로 형질주입된다. 위바이러스성 입자(pseudoviral particle)는 원심분리를 통해 모여지고 농축되며, 배양된 SK-BR-3, MCF7, BT474 세포 각각에 형질주입된다. 감염 후에, puromycin selection(puromycin의 최종 농도는 3 μ g/ml)이 수행되며, 단일콜로니(single colony)가 용기로부터 분리되어 AGTR-1이 과발현되는 SK-BR-3, MCF7, BT474 세포주 각각을 얻는다. 상기 AGTR-1 과발현(양성) 유방암 SK-BR-3, MCF7, BT474 세포주는 하기 실시예의 실험에서 사용되게 된다.
- [65] (3) parental MCF7과 실시예 1의 (2)에서 얻은 AGTR-1 과발현 MCF7(AGTR-1 clone number 1(AGTR1-c1), AGTR-1 clone number 2(AGTR1-c2)라 명명함)의 mRNA 및 protein level을 RT-PCR과 Western blot 기법으로 각각 측정하고 AGTR-1의 발현을 정량화하고 수치화하여, 그 결과를 도 1에 나타내었다.
- [66] 상기 RT-PCR에서, 총 RNA는 RNeasy mini kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 추출되며, 전사의 증폭은 1 μ g/ μ l RNA, Molony Murine Leukemia Virus reverse transcriptase(MMLV; Gibco/BRL, Gaithersburg, MD, USA)와 oligo-d(T)15 primers(Roche Applied Sciences)를 사용하는 reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR)에 의해 수행된다. PCR 증폭은 다음의 프라이머를 가지고 Takara PCR Thermal Cycler(Thermo Scientific Inc., Rockford, IL)를 수행된다. AGTR-1, forward 5'-GATGATTGTCCCAAAGCTGG-3', reverse 5'-TAGGTAATTGCCAAAGGGCC-3', Actin, forward: 5'-ACCCAGATGTTTGAGAC-3', reverse 5'-GGAGTTGAAGGTAGTTTCGT-3'. PCR 생성물은 1.2% agarose gels에서 분리되고, Gel Doc™ XR+System(Bio-Rad Laboratories)을 이용하여 시각화된다.
- [67] 상기 Western blot에서, 상기 세포들은 phosphatase과 protease inhibitor를 포함하는 lysis buffer(30mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 50mM Tris-HCl; pH 7.4)에서 용해되고, 상층액이 모여진 후 단백질 농축은 Bradford protein assay kit를 가지고 수행된다. 단백질 30 μ g이 SDS-PAGE로 서브젝트되고 nitrocellulose membrane으로 전기이동된다. 상기 멤브레인은 5% bovine serum albumin(BSA)에 희석된 프라이머리 항체를 가지고 4°C에서 하룻밤 동안 배양된 후, horseradish peroxidase(HRP)-conjugated rabbit IgG(1:3000-1:10,000)를 가지고 배양된다. 신호강도(Signal intensity)는 Enhanced Chemiluminescence Kit와 x-ray film을

가지고 측정되며, AlphaEaseFC software를 가지고 정량화된다.

[68] (4) 면역결핍된 6주령의 암컷 BALB/c 누드 마우스의 4번째 유방 지방체(fat pads)에 AGTR-1 과발현 MCF7(MCF7-AGTR1) 암세포(3×10^6 cells) 및 MCF7 암세포(3×10^6 cells)를 각각 이식하여 종양을 발생시킨 후, 21일 동안 종양 부피(tumor volume)를 측정하여 그 결과를 도 2에 나타내었다. 종양 부피(V)는 caliper의 의해 측정되고, $V = (\text{length} \times \text{width}^2) / 2$ 의 식을 이용하여 계산하였다.

[69] (5) 도 1을 보면, Parental-MCF7과 비교하여 AGTR-1 과발현 MCF7(AGTR1-c1, AGTR1-c2)은 AGTR-1 발현량이 4배 이상 증가되어 있음을 확인할 수 있어, AGTR-1이 과발현되는 세포주를 효과적으로 생성하였음을 알 수 있다. 도 2를 보면, AGTR-1 과발현 유방암 세포를 이식한 종양의 부피가 현저히 컸으며, 2주일 후부터는 종양의 크기가 두 그룹 간에서 유의한 차이를 나타내었다. 이를 통해, AGTR-1이 유방암의 새로운 바이오 마커로서 이용될 수 있음을 확인할 수 있었다.

[70]

[71] <실시예 2> AGTR-1에 특이적으로 결합하는 압타머의 선별

[72]

[73] (1) 핵산 라이브러리의 합성

[74] 양 말단에 PCR을 위한 고정 시퀀스 영역이 있고 중앙에 40개의 임의의 염기서열을 가진 핵산 라이브러리(ssDNA library)를 합성하였다. 상기 ssDNA 라이브러리는

5'-ATCCAGAGTGACGCAGCA(서열번호:7)-N40-TGGACACGGTGGCTTAGT(서열번호:8)-3'과 같이 나타내어지며, 양 말단은 프라이머쌍이 어닐링되는 고정된 염기 서열 영역으로 구성되며, 중앙에는 무작위로 배열된 염기서열 영역(N40)을 가진다. 여기서 N40은 일반적으로 40개의 임의의 A, T, G, C 염기로 이루어지는 것을 의미한다.

[75]

[76] (2) 세포의 배양 및 핵산 라이브러리의 준비

[77] 1) 실시예 1에서 생성한 AGTR-1 양성 세포주(AGTR-1 overexpressed SK-BR-3)와 AGTR-1 음성 세포주(SK-BR-3)를 90% 이상의 confluency로 배양한 후, washing buffer(DPBS(+Ca²⁺, +Mg²⁺), 6.25mM glucose, 5mM MgCl₂)를 이용하여 2회 세척하였다.

[78] 2) 합성된 ssDNA library를 binding buffer(DPBS(+Ca²⁺, +Mg²⁺), 6.25mM glucose, 5mM MgCl₂, 0.1%(w/v) BSA, 0.01%(w/v) tRNA) 1mL에 최종농도 1 μ M로 맞춘 후, 5분간 끓인 후 얼음 수조에 1시간 보관하였다.

[79]

[80] (3) ssDNA의 선별

[81] 1) 냉각된 DNA library를 AGTR-1 양성 세포주에 처리하고 4°C에서 1시간 동안 반응시키고, 아스피레이터를 이용하여 버퍼를 제거하고 2mL의 washing buffer를

이용하여 2회 세정하고, 스크레이퍼를 이용하여 플레이트 표면에 부착된 세포들을 binding buffer에 모은 후, 세포들과 결합한 DNA를 떼어내기 위해 10분간 끓이고 13000rpm에서 10분간 원심분리를 하였다.

[82] 2) 상층액만 따서 AGTR-1 음성 세포주에 4°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 결합하지 않은 서열들을 모아 PCR로 DNA 서열들을 증폭시켰다.

[83] 3) 위 과정들은 한 라운드로 하여 마지막에 증폭된 서열들을 다음 라운드의 라이브러리으로 준비하고, 15라운드를 반복 실시하였다.

[84]

[85] (4) ssDNA 염기서열의 분석

[86] 1) 실시예 2의 (3)에서 최종적으로 얻은 ssDNA를 TOPO TA cloning kit를 이용하여 클로닝한 후, 서열 분석을 시행하였다.

[87] 2) 그 결과, 6개의 서로 다른 시퀀스를 가지는 ssDNA를 확보하였으며, AGTR-1에 높은 친화도를 가지고 특이적으로 결합하는 서로 다른 6개의 ssDNA의 염기서열은 하기의 표 1과 같다.

[88] [표1]

서열번호	염기서열(Sequence of random region)
1	TCTCCATGCTTTATAACGTGTATGAGGGAAGTTTGTGTGTT
2	TCTGAGAATAGTGGTTTGCTGTATGGTGGGCGTTGAAAGAGGGG
3	TGGTGTGGTTGGTAAGGATTTGGTGCGTTCTTGCTTCGACTTCCGTCATCA
4	AAGTCGTCTTTGCCAAATACCGGTCTGTCGGTGGGTATTG
5	CGCCTCGAAGTACCGGTATGTCGGTGGGTAGTTCGGTGTA
6	CCCACGGTGCATTCTATCATAGTGCTTTCATTTAGTCCGA

[89]

[90] (5) 압타머-항암약물 복합체에 사용될 압타머의 선별

[91] 1) 표적 세포인 AGTR-1 과발현 SK-BR-3 100uL(10^7 cells)와 500nM의 압타머 100uL를 상온에서 반응시킨 후, 공초점 현미경을 이용하여 이미지화하여 도 3에 나타내었다. 상기 압타머 각각은 서열번호 1 내지 6의 염기서열을 가지며, 압타머의 끝에는 형광 염료 Cy3가 결합되어 있다.

[92] 2) 도 3을 보면, 서열번호 4의 염기서열을 가지는 압타머를 반응시킨 네번째 이미지(4)에서 가장 강한 형광의 세기를 가지고 internalization이 일어난 것을 확인할 수 있어, AGTR-1 양성 유방암 세포에 가장 높은 결합력을 가지는 서열번호 4의 염기서열을 가지는 압타머를 압타머-항암약물 복합체에 사용될

압타머로 선정하였다.

[93]

[94] <실시예 3> 압타머(Aptamer)의 제조

[95] (1) AGTR-1에 특이적으로 결합하는 압타머 염기서열을 가지는 핵산(DNA) 압타머[5'-AAGTCGTCTTTGCCAAATACCGGTCTGTCGGTGGGTATTG-3'(서열 번호:4)]를 설계하고, 상기 핵산 압타머의 3'말단에 티올기를 도입하였다(OH를 SH로 치환).

[96] (2) 이후, 0.1M triethylammonium acetate(TEAA) buffer에서 1.0M Dithiothreitol(DTT) 10 μ L와 상온에서 15분 동안 반응시킴으로써, 3' 티올기의 activation을 실시하였고, 또한 과량의 DTT를 제거하기 위하여 ethyl acetate를 이용하여 3회 이상 추출하였다.

[97]

[98] <실시예 4> 압타머-항암약물 복합체(Aptamer-DM1)의 제조

[99] 실시예 3에서 최종적으로 얻은 압타머와 항암약물(DM1)을 반응시켜 압타머-항암약물 복합체를 제조하였다. 구체적으로, DM1은 Dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 10mM stock으로 제조하고, 50% DMSO와 2mM ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)를 포함하는 100mM potassium phosphate buffer(pH 7.0) 내에서 압타머와 DM1의 복합체 형성이 이루어졌으며, 압타머와 DM1의 비율은 1:1000으로 하여 상온에서 48시간 반응시켰다.

[100]

[101] <실시예 5> 압타머 및 압타머-항암약물 복합체의 정제

[102] 실시예 3을 통해 최종적으로 얻은 압타머와, 실시예 4를 통해 최종적으로 얻은 압타머-항암약물 복합체 각각에 대하여 High Performance Liquid Chromatography(HPLC)를 실시하여 정제하였다. Eclipse XDB-C18 column을 이용하여 분리를 진행하였고, binding buffer(95% 0.1M TEAA, 5% Acetonitrile)와 elution buffer(50% 0.1M TEAA, 50% Acetonitrile)의 gradient를 통해 분리하였다. HPLC의 피크들은 mass spectroscopy 방법을 통해서 분석되었고, 그 중에서 압타머, 압타머-항암약물 복합체 분자량과 일치하는 피크들만 취하였다. 상기 실시예 5를 통해 정제된 압타머(Aptmaer) 및 압타머-항암물질 복합체(Aptamer-DM1)를 하기 실시예의 실험에서 사용하였다.

[103]

[104] <실시예 6> 압타머-항암약물 복합체의 AGTR-1 과발현 유방암 세포에 대한 표적 능력 확인

[105] (1) 실시예 1에서 생성한 AGTR-1 양성 유방암 MCF7 세포주(MCF7-AGTR1)와 AGTR-1 음성 유방암 BT474 세포주(기본적으로, MCF7은 HER-2 음성 유방암 세포주이고, BT474는 HER-2 양성 유방암 세포주임)를 함께 1:1 비율로 동시배양(Co-Culture)하여, HER-2 및 세포분열기 정체(Mitotic arrest) 표지자인 phospho-Histone H3(p-His3)를 ICC로 염색하고 DAPI로 핵을 염색하고,

control(DMSO), DM1, Aptamer-DM1을 각각 10nM의 농도로 24시간 처리하였다. 이후, 공초점 현미경을 이용하여 핵(파란색), p-His3(녹색), HER-2(붉은색)를 이미지화하여 그 결과를 도 4에 나타내었고, p-His3가 검출된 세포의 수를 AGTR-1 발현 유무에 따라 정량화하여 도 5에 나타내었다.

- [106] 상기 염색 과정에서, 8-well chamber slides 상의 MCF7-AGTR1 및 BT474 세포들은 4% paraformaldehyde를 가지고 고정되고, PBS를 가지고 세척된 후, 10분 동안 0.2% Triton X-100을 가지고 배양된다. 이후, 세포들은 항체 희석액 내의 프라이머리 항체를 가지고 4°C에서 하룻밤 동안 배양된 후 상온에 2시간 동안 fluorescence-conjugated secondary antibodies를 가지고 배양된다. 이후, 세포들은 DAPI(4',6'-diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride)를 가진 ProLong Gold Antifade Reagent에 마운팅된다.
- [107] (2) 도 4를 보면, 대조군에서 보이는 것처럼 HER-2가 발현되어 있는 세포는 BT474로 추정되며, 발현되어 있지 않은 세포는 MCF7-AGTR1으로 추정되고, DM1을 처리한 경우 HER-2의 발현 유무와 상관없이 p-His3이 발현됨을 확인하였으나, Aptamer-DM1을 처리한 경우 p-His3는 HER-2가 발현되어 있지 않은 MCF7-AGTR1 세포에서만 검출되었다. 또한, 도 5를 보면, Aptamer-DM1을 처리한 경우 AGTR-1 양성 세포주에서는 p-His3가 검출된 세포 비율이 큰데 반해, AGTR-1 음성 세포주에서는 p-His3가 검출된 세포 비율이 작음을 알 수 있다. 이는, Aptamer-DM1이 AGTR-1이 발현된 세포주의 세포질로 유입되면서, 유린된 DM1에 의해 Mitotic arrest가 유도됨과 동시에 p-His3의 발현이 증가한 것으로, Aptamer-DM1이 AGTR-1만 특이적으로 표적함을 알 수 있다.
- [108]
- [109] <실시예 7> aptamer-항암약물 복합체의 AGTR-1 과발현 유방암 세포에 대한 선택적 세포 사멸 능력 확인
- [110] (1) AGTR-1 양성 유방암 세포주(MCF7-AGTR1)와 AGTR-1 음성 유방암 세포주(BT474)에 대하여, control(DMSO), DM1, Aptamer, Aptamer-DM1을 각각 10nM의 농도로 48시간 처리한 후, 상기 세포들은 24시간 동안 0.5% Tween-20을 포함하는 95% 에탄올을 가지고 수확고정되며, 30분 동안 propidium iodide(PI, 50µg/ml)과 RNase(50µg/ml)를 가지고 배양된다. 이후, 유세포 측정기(Flow cytometry)를 이용하여 암세포의 사멸정도(세포사멸율, Sub-G1 %)를 DNA 함량분석을 통하여 측정하여, 그 결과를 도 6에 나타내었다.
- [111] (2) 일반적으로 세포주기(cell cycle)는 세포 내 DNA의 함량에 따라 G1(세포성장기)-S(세포복제기)-G2/M(세포분열기)로 나누어지는데, 세포사멸이 유도되면 DNA의 절편현상(DNA fragmentation)을 동반하여 더 이상 DNA의 복제와 분열이 불가능해지며 DNA의 함량이 G1기보다 현저히 적어지게 된다. 이러한 세포사멸의 결과는 Sub G1 부위로써 세포 주기상에 나타나게 된다.
- [112] (3) 도 6을 보면, Control과 Aptamer를 처리한 경우 모든 세포주에서 현저히 낮은 세포사멸율을 가지나, DM1 처리한 경우 모든 세포주에 상대적으로 높은

세포사멸을 유도하고, Aptamer-DM1을 처리한 경우 AGTR-1 양성 세포주에서는 높은 세포사멸율을 가지나 AGTR-1 음성세포주에서는 낮은 세포사멸율을 가짐을 알 수 있다. 이를 통해, Aptamer-DM1은 AGTR-1이 발현되어 있는 양성 유방암 세포주에서만 특이적으로 세포사멸을 유도함을 알 수 있다.

[113]

[114] <실시에 8> 유방암 질환 동물 모델에서 압타머-항암약물 복합체의 항암 효과 확인

[115] (1) 면역결핍된 6주령의 암컷 BALB/c 누드 마우스의 4번째 유방 지방체(fat pads)에 MCF7-AGTR1 암세포(3×10^6 cells)를 이식한 후, 4일부터 주 3회 Aptamer(0.75mg/kg), Aptamer-DM1(0.5mg/kg, 0.75mg/kg)를 복강 내 투여하였다. 이후, 3주 동안 종양 부피(tumor volume)를 측정하여 그 결과를 도 7에 나타내었고, 3주 동안 마우스의 체중을 측정하여 그 결과를 도 8에 나타내었으며, TUNEL assay에 의한 분석결과를 도 9에 나타내었다. 종양 부피(V)는 caliper의 의해 측정되고, $V = (\text{length} \times \text{width}^2) / 2$ 의 식을 이용하여 계산하였다. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling(TUNEL) assay에서, 종양은 마우스로부터 제거되고 10% neutral-buffered formalin에 고정되고 paraffin에 임베드된다. 4- μm 두께의 조직 섹션(tissue section)은 양 전하 유리 슬라이드에 마운팅되고 자일렌(xylene)을 가지고 디파라핀나이즈되며(deparaffinized), graded alcohol series를 통해 탈수된다. antigen retrieval 후에, 상기 조직 섹션은 citric acid buffer(pH 6.0)에 끓여지고 면역형광법이 시행된다. In situ TUNEL은 TUNEL kit(Roche Applied Sciences, Penzberg, GER)를 사용하여 상기 조직 섹션에서 수행되고 이미지는 공초점 주사 현미경(confocal scanning microscope)를 가지고 얻어진다.

[116] (2) 도 7을 보면, Aptamer-DM1을 처리한 경우 0.5mg/kg 및 0.75mg/kg 투여군 모두에서 종양의 성장을 유의하게 감소시켰을 뿐만 아니라, Aptamer를 처리한 경우에서도 종양의 성장을 일부 억제하는 것을 확인하였다. 또한, 도 8을 보면, 대조군과 비교하여 모든 실험군에서 약물 투여에 따른 체중 변화가 관찰되지 않음을 확인하였다. 또한, 도 9를 보면, TUNEL assay에 의한 세포사멸 분석 결과 Aptamer-DM1을 처리한 경우 TUNEL 양성 세포수가 유의하게 증가하였음을 확인하였다. 이를 통해, 동물모델에서 Aptamer-DM1은 AGTR-1이 과발현된 유방암에 대해 항암 효과를 가짐을 알 수 있다.

[117]

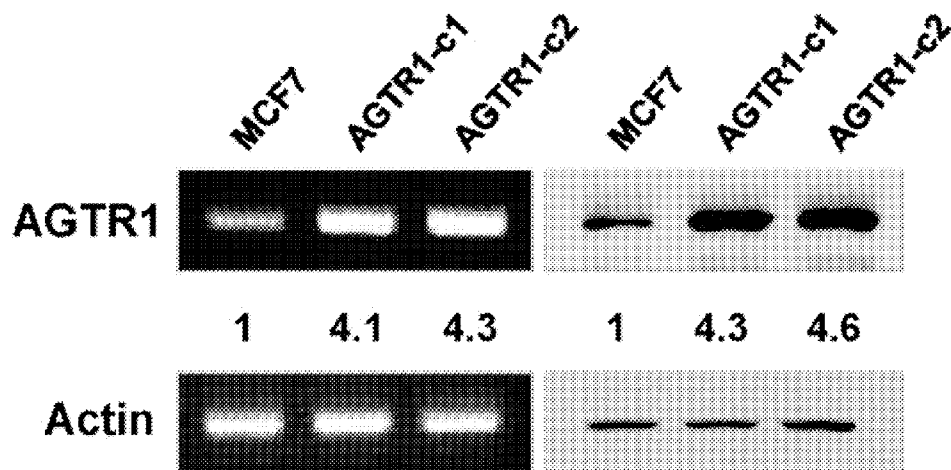
[118] 이상에서, 출원인은 본 발명의 다양한 실시예들을 설명하였지만, 이와 같은 실시예들은 본 발명의 기술적 사상을 구현하는 일 실시예일 뿐이며, 본 발명의 기술적 사상을 구현하는 한 어떠한 변경에 또는 수정에도 본 발명의 범위에 속하는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

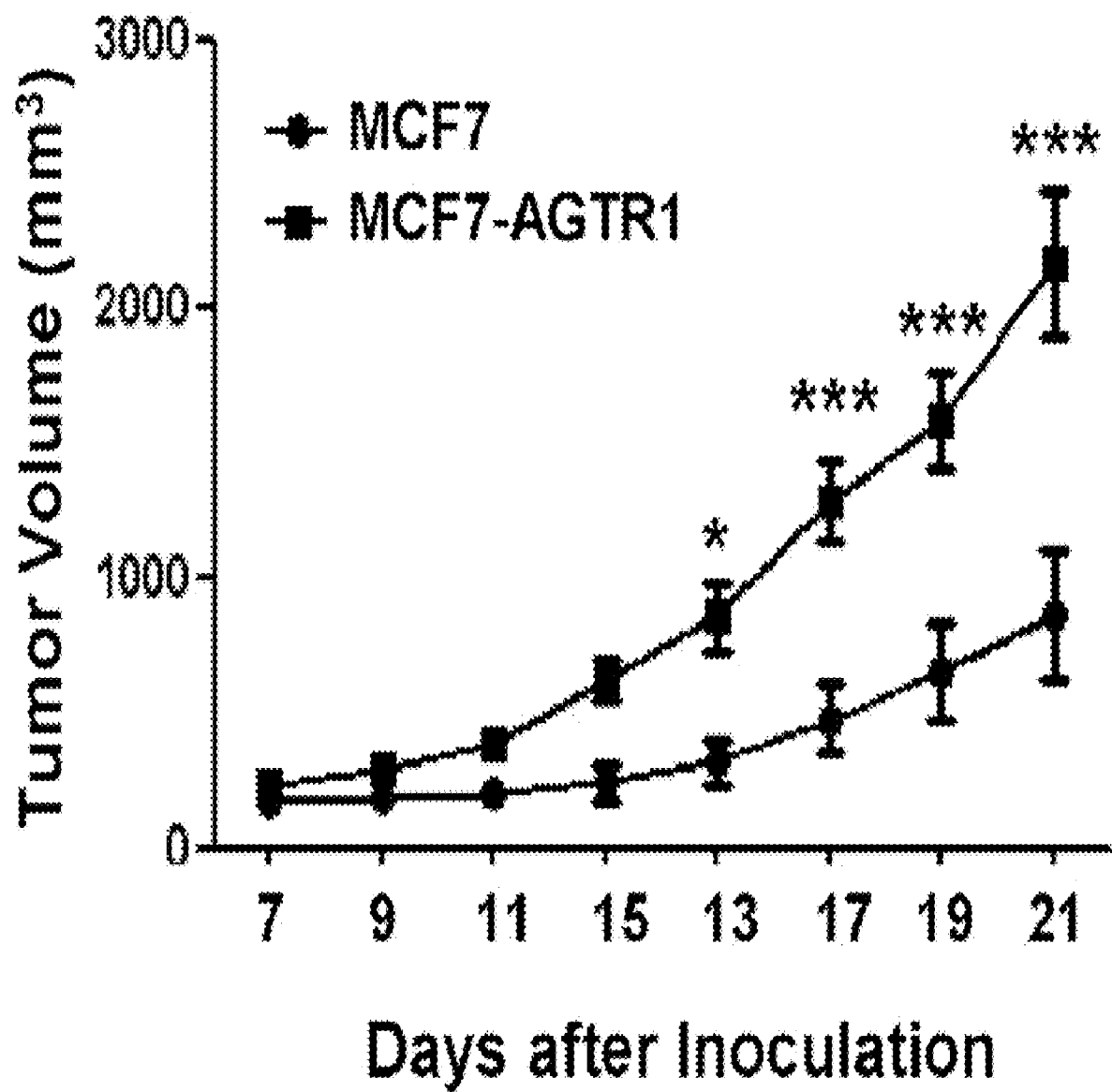
- [청구항 1] AGTR-1에 특이적으로 결합하는 핵산 압타머와, 상기 핵산 압타머와 결합한 항암약물을 포함하는 것을 특징으로 하는 암세포 화학요법을 위한 복합체.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 암세포 화학요법을 위한 복합체는 핵산 압타머와 항암약물의 디설파이드 결합에 의해 형성되는 것을 특징으로 하는 암세포 화학요법을 위한 복합체.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 핵산 압타머의 3'말단에는 티올기가 도입되고, 상기 항암약물은 티올기를 가진 항암약물이 사용되어, 상기 핵산 압타머와 항암약물은 디설파이드 결합을 하는 것을 특징으로 하는 암세포 화학요법을 위한 복합체.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 핵산 압타머는 서열번호 1 내지 6 중 어느 하나의 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 암세포 화학요법을 위한 복합체.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 핵산 압타머는 서열번호 4의 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 암세포 화학요법을 위한 복합체.
- [청구항 6] 제2항에 있어서, 상기 항암약물은 DM1이 사용되는 것을 특징으로 하는 암세포 화학요법을 위한 복합체.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 암세포 화학요법을 위한 복합체는 유방암 치료용으로 사용되는 것을 특징으로 하는 암세포 항암요법을 위한 복합체.
- [청구항 8] 제2항에 있어서, 상기 암세포 화학요법을 위한 복합체는 AGTR-1 양성 유방암 세포 내에 섭취되어 세포 기질에 존재하는 글루타티온에 의해 디설파이드 결합이 끊어져 항암약물이 유리되는 것을 특징으로 하는 암세포 화학요법을 위한 복합체.
- [청구항 9] AGTR-1에 특이적으로 결합하는 압타머 염기서열을 가지는 핵산 압타머를 준비하는 압타머준비단계와, 상기 압타머준비단계에서 준비된 압타머와 항암약물을 반응시켜 압타머-항암약물 복합체를 형성하는 복합체형성단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 암세포 화학요법을 위한 복합체의 제조방법.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 압타머준비단계에서는 AGTR-1에 특이적으로 결합하는 서열번호 1 내지 6 중 어느 하나의 염기서열을 가지는 핵산 압타머를 형성하고, 상기 핵산 압타머의 3'말단에 티올기를 도입하고, triethylammonium acetate buffer에서 Dithiothreitol과 반응시킴으로써, 3' 티올기의 activation을 실시하는 것을

- 특징으로 하는 암세포 화학요법을 위한 복합체의 제조방법.
- [청구항 11] 제9항에 있어서, 상기 복합체형성단계에서는 DM1을 Dimethyl sulfoxide에 녹여 준비한 후, DMSO와 EDTA를 포함하는 potassium phosphate buffer 내에서 상기 압타머와 DM1의 비율을 1:1000으로 반응시켜 압타머-항암약물 복합체를 형성하는 것을 특징으로 하는 암세포 화학요법을 위한 복합체의 제조방법.
- [청구항 12] 서열번호 1 내지 6중 어느 하나의 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 AGTR-1에 특이적으로 결합하는 핵산 압타머.
- [청구항 13] 서열번호 4의 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 AGTR-1에 특이적으로 결합하는 핵산 압타머.

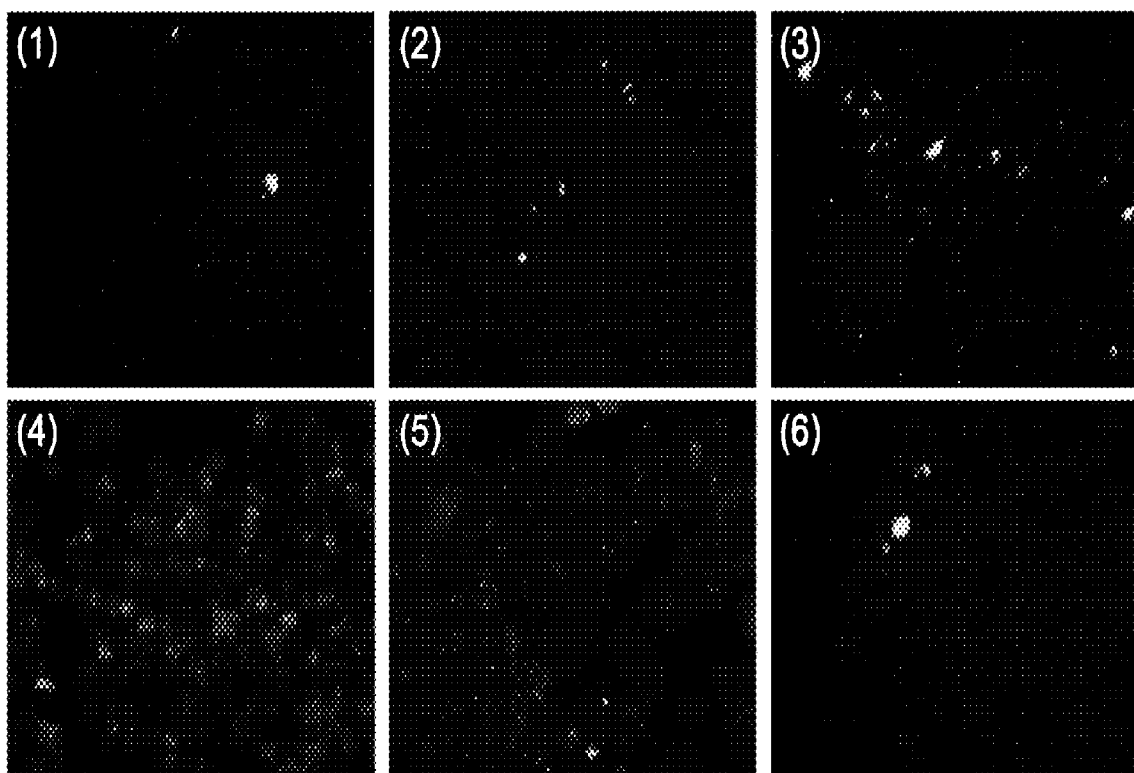
[도1]



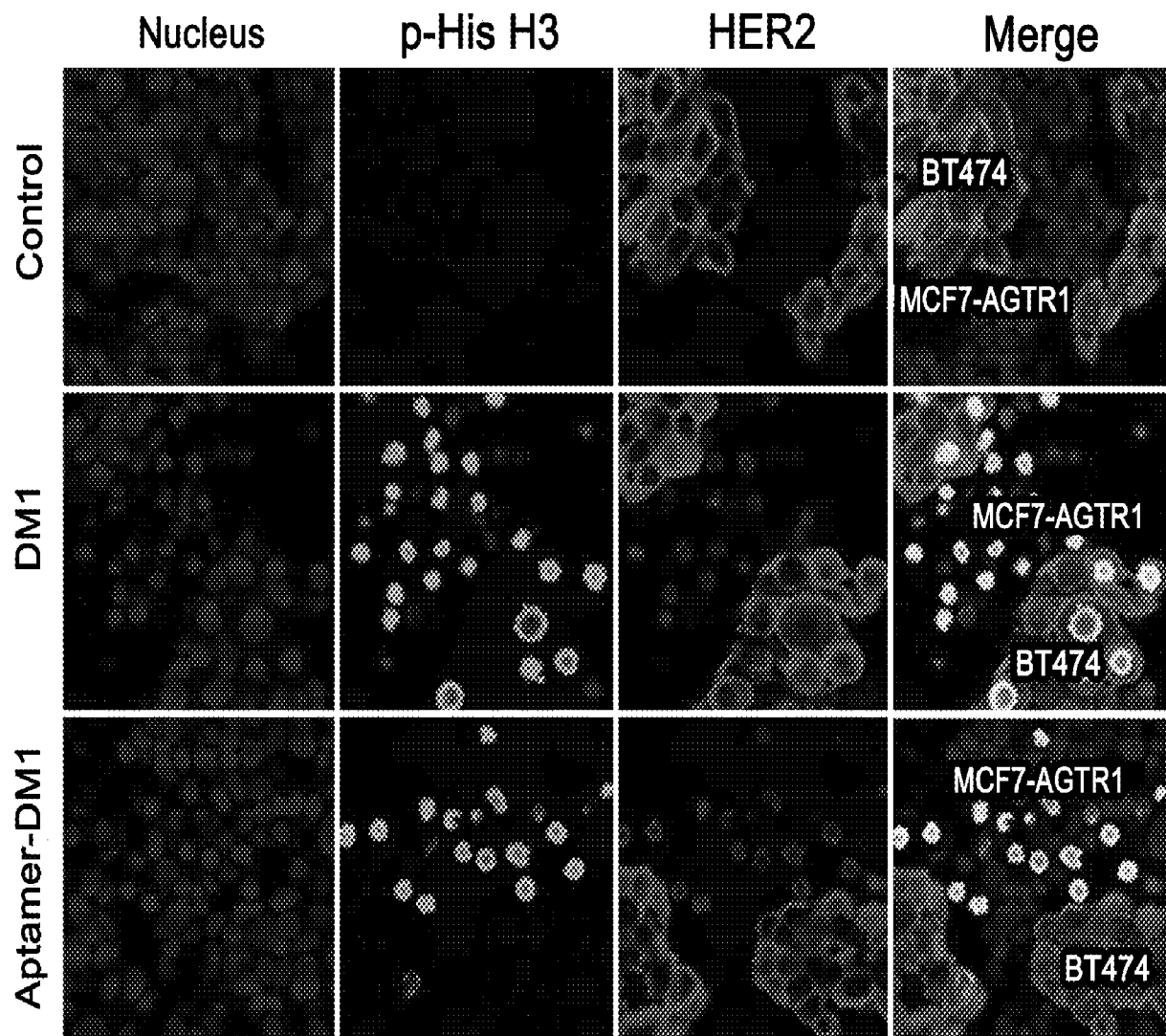
[도2]



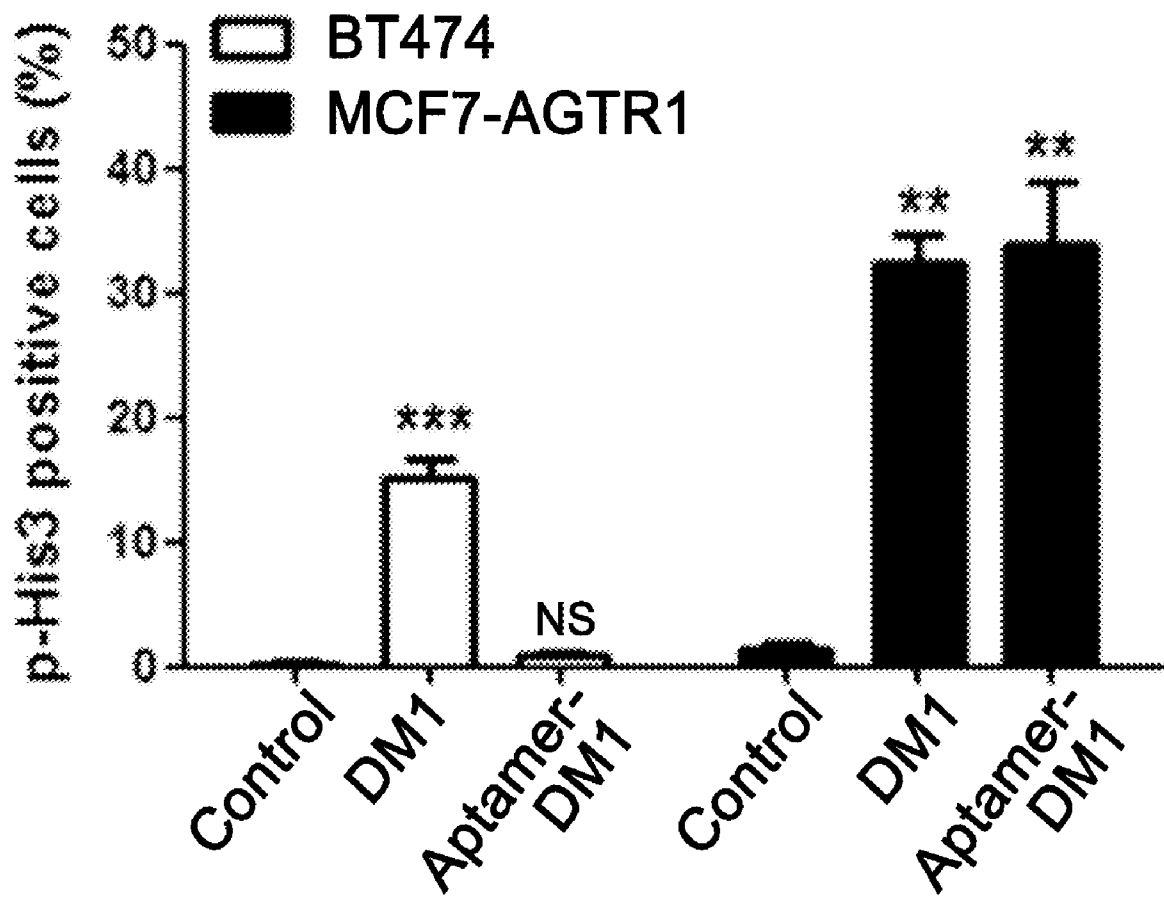
[도3]



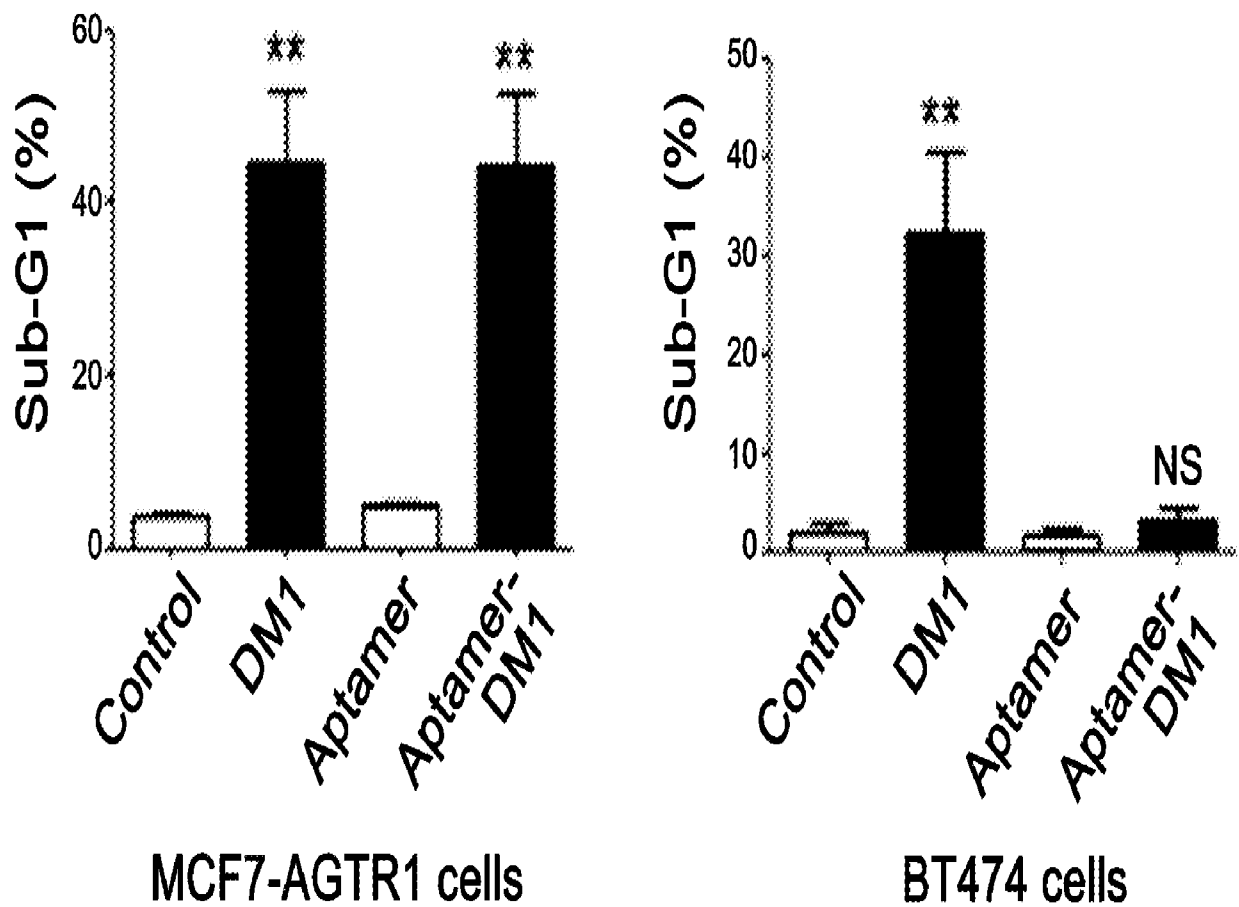
[도4]



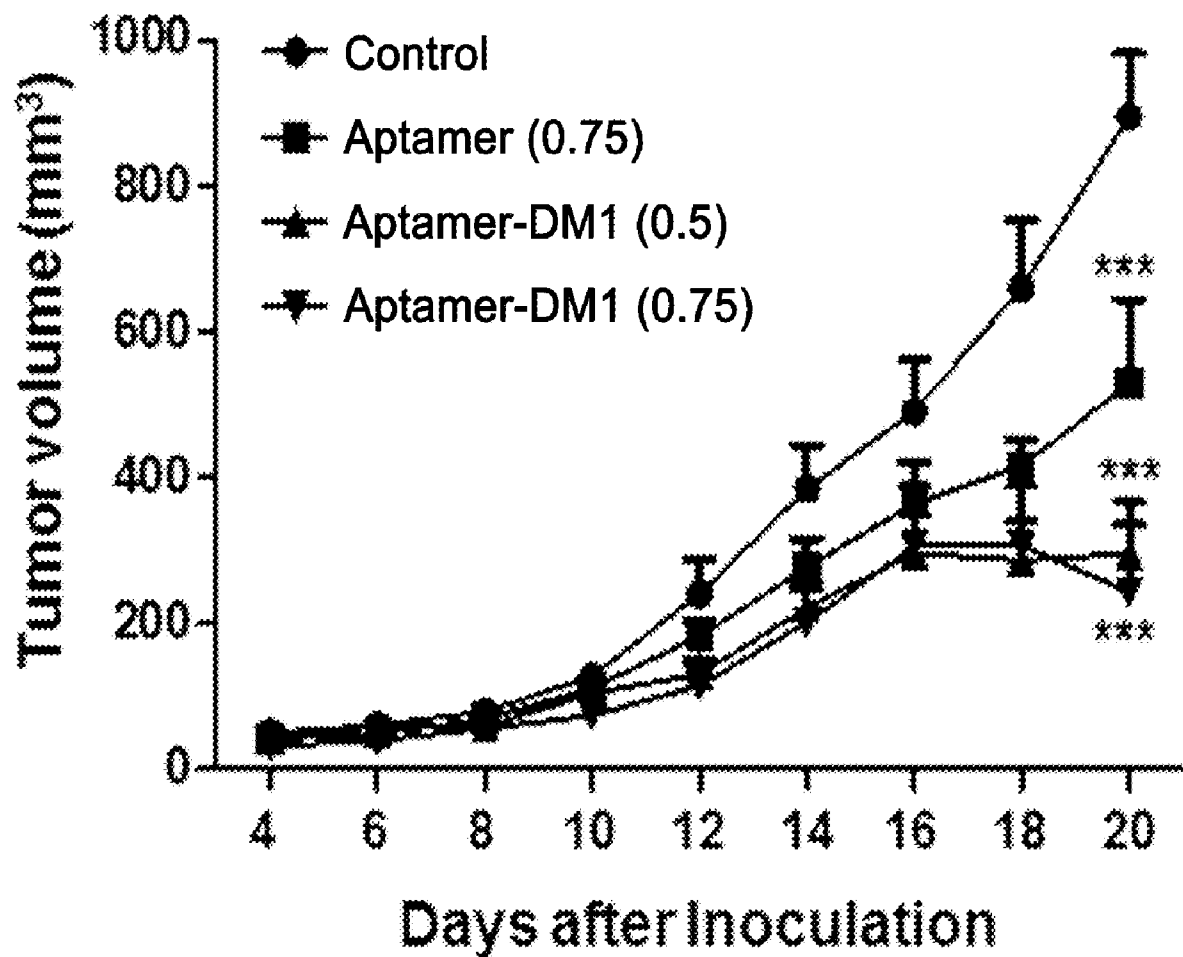
[도5]



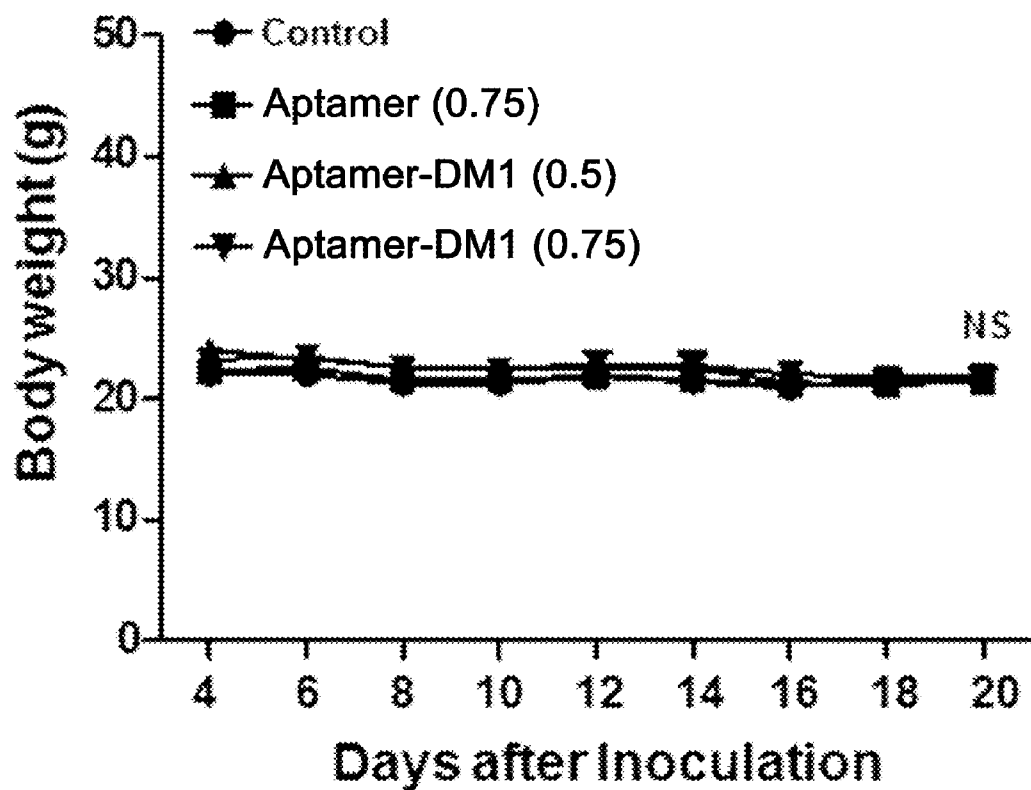
[도6]



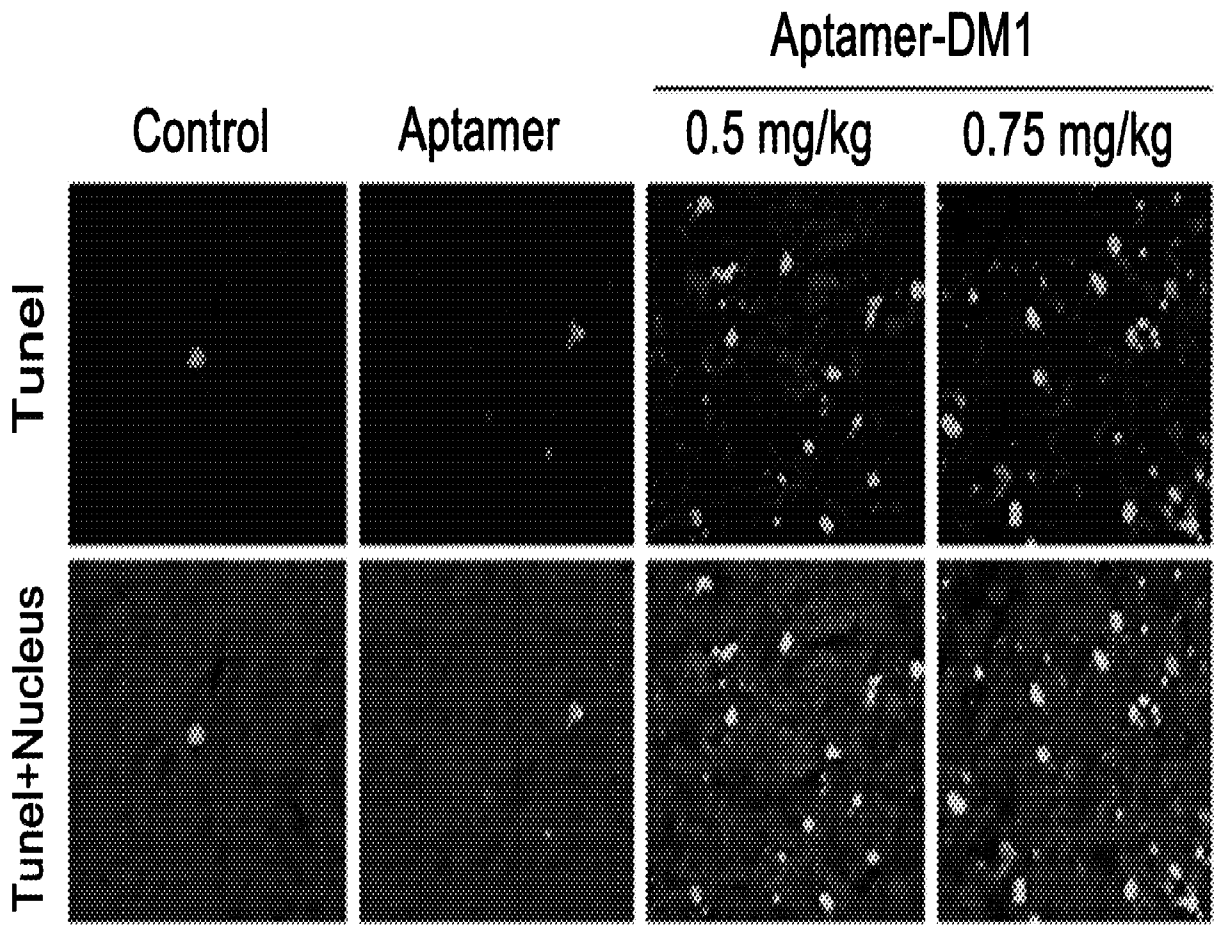
[도7]



[도8]



[도9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/008337

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 47/48(2006.01)i, A61K 31/5365(2006.01)i, C12N 15/115(2010.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 47/48; A61K 47/36; A61K 51/00; C07H 21/00; A61K 51/04; C12N 15/11; C07K 2/00; A61M 36/14; A61K 31/5365; C12N 15/115

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: aptamer, AGTR1, medicine, complex, DM1, thiol, disulfide coupling

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012-178173 A1 (CENTROSE, LLC.) 27 December 2012 See abstract; pages 3, 17, 20, 45, 55, 77.	1,7,9
Y		2-6,8,10-13
Y	KR 10-2016-0032989 A (POSTECH ACADEMY-INDUSTRY FOUNDATION et al.) 25 March 2016 See abstract; and paragraphs [0036]-[0038].	2,3,6,8,10,11
Y	GONG, Q. et al., "Selection Strategy to Generate Aptamer Pairs that Bind to Distinct Sites on Protein Targets", Analytical Chemistry, 2012, vol. 84, pages 5365-5371 See abstract; pages 5366-5371; and figure 1.	4,5,10,12,13
A	KR 10-2011-0086433 A (RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY) 28 July 2011 See the entire document.	1-13
A	US 2012-0114558 A1 (STOJANOVIC, M. N. et al.) 10 May 2012 See the entire document.	1-13



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 APRIL 2017 (26.04.2017)

Date of mailing of the international search report

26 APRIL 2017 (26.04.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Sconsa-ro, Daejeon 302-701,
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/KR2016/008337

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2012-178173 A1	27/12/2012	CN 103732259 A EP 2683737 A1 EP 2723393 A1 EP 2723393 A4 JP 2014-510080 A JP 2014-523884 A US 2014-0079722 A1 US 2014-0193436 A1 WO 2012-122514 A1	16/04/2014 15/01/2014 30/04/2014 25/02/2015 24/04/2014 18/09/2014 20/03/2014 10/07/2014 13/09/2012
KR 10-2016-0032989 A	25/03/2016	KR 10-1653451 B1	01/09/2016
KR 10-2011-0086433 A	28/07/2011	NONE	
US 2012-0114558 A1	10/05/2012	US 9243024 B2 WO 2010-111466 A1	26/01/2016 30/09/2010

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 47/48(2006.01)i, A61K 31/5365(2006.01)i, C12N 15/115(2010.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 47/48; A61K 47/36; A61K 51/00; C07H 21/00; A61K 51/04; C12N 15/11; C07K 2/00; A61M 36/14; A61K 31/5365; C12N 15/115

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: 아타머, AGTR1, 약물, 복합체, DM1, 티올, 티설파이드 결합

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	WO 2012-178173 A1 (CENTROSE, LLC) 2012.12.27 요약; 페이지 3, 17, 20, 45, 55, 77 참조.	1, 7, 9
Y		2-6, 8, 10-13
Y	KR 10-2016-0032989 A (포항공과대학교 산학협력단 등) 2016.03.25 요약; 및 단락 [0036]-[0038] 참조.	2, 3, 6, 8, 10, 11
Y	GONG, Q. 등, 'Selection strategy to generate aptamer pairs that bind to distinct sites on protein targets' Analytical Chemistry, 2012, 84권, 페이지 5365-5371 초록; 페이지 5366-5371; 및 도면 1 참조.	4, 5, 10, 12, 13
A	KR 10-2011-0086433 A (성균관대학교산학협력단) 2011.07.28 전체 문헌 참조.	1-13
A	US 2012-0114558 A1 (STOJANOVIC, M. N. 등) 2012.05.10 전체 문헌 참조.	1-13

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

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

"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

2017년 04월 26일 (26.04.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 04월 26일 (26.04.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



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

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

박정민

전화번호 +82-42-481-3516



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2012-178173 A1	2012/12/27	CN 103732259 A EP 2683737 A1 EP 2723393 A1 EP 2723393 A4 JP 2014-510080 A JP 2014-523884 A US 2014-0079722 A1 US 2014-0193436 A1 WO 2012-122514 A1	2014/04/16 2014/01/15 2014/04/30 2015/02/25 2014/04/24 2014/09/18 2014/03/20 2014/07/10 2012/09/13
KR 10-2016-0032989 A	2016/03/25	KR 10-1653451 B1	2016/09/01
KR 10-2011-0086433 A	2011/07/28	없음	
US 2012-0114558 A1	2012/05/10	US 9243024 B2 WO 2010-111466 A1	2016/01/26 2010/09/30