



- (51) 국제특허분류:
C12N 15/113 (2010.01) A61K 48/00 (2006.01)
C07K 14/76 (2006.01) B82Y 5/00 (2011.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/009385
- (22) 국제출원일: 2014년 10월 6일 (06.10.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2013-0122147 2013년 10월 14일 (14.10.2013) KR
- (71) 출원인: 서강대학교 산학협력단 (INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION SOGANG UNIVERSITY) [KR/KR]; 121-742 서울시 마포구 백범로 35 서강대학교 데이아르관 306호, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 오병근 (OH, Byung-Keun); 122-052 서울시 은평구 서오릉로 258 우남아파트 102동 501호, Seoul (KR). 최진하 (CHOI, Jin-Ha); 136-130 서울시 성북구 오패산로 16가길 40 꿈의숲푸르지오아파트 115동 801호, Seoul (KR). 김현수 (KIM, Hyun-Soo); 121-110 서울시 마포구 신수로 90, 101호, Seoul (KR). 엄승호 (UM, Soong-Ho); 140-070 서울시 용산구 새창로 70 삼성래미안아파트 113동 806호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 양부현 (YANG, Boo-Hyun); 151-832 서울시 관악구 남부순환로 1922, 청동빌딩 301호, 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 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

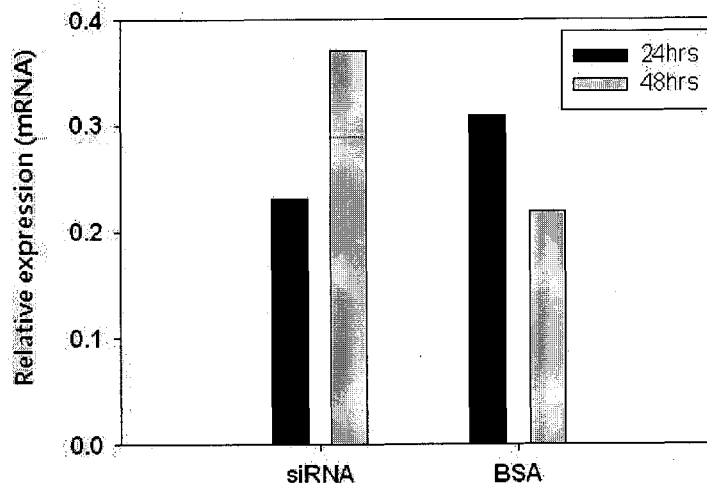
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

[다음 쪽 계속]

(54) Title: CONJUGATE FOR siRNA TRANSFER AND PREPARATION METHOD THEREFOR

(54) 발명의 명칭: siRNA 전달용 복합체 및 그의 제조방법



(57) Abstract: The present invention relates to: a conjugate for siRNA transfer, comprising (a) serum albumin, (b) a gold nanorod, (c) siRNA, and (d) an antibody; and a preparation method therefor. The conjugate for siRNA transfer, of the present invention, has remarkable stability and economical efficiency, can be easily mass produced, and the size thereof is controllable, thereby enabling preparation into a size suitable for cell transfer. In addition, cancer cell-specific transfection can be carried out by using the antibody of the present invention, and cancer cell death can be effectively induced by using the synergistic effect of siRNA and a photothermal effect.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

본 발명은 (a) 혈청 알부민(Serum albumin); (b) 금 나노막대; (c) siRNA; 및 (d) 항체를 포함하는 siRNA 전달용 복합체 및 그의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 siRNA 전달용 복합체는 안정성 및 경제성이 우수하고, 대량생산이 용이하며 크기 조절이 가능해 세포 전달에 알맞은 크기로의 제작이 가능하다. 또한, 본 발명의 항체를 이용하여 암 세포 특이적으로 이입하고, siRNA 및 광열 효과의 동반 상승 효과를 이용하여 효과적으로 암 사멸 유도할 수 있다.

【명세서】**【발명의 명칭】**

siRNA 전달용 복합체 및 그의 제조방법

5 【기술분야】

본 특허출원은 2013 년 10 월 14 일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제 10-2013-0122147 호에 대하여 우선권을 주장하며, 상기 특허출원의 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

본 발명은 siRNA 전달용 복합체 및 그의 제조방법에 관한 것이다.

10

【발명의 배경이 되는 기술】

최근, 고령화 사회로 급속하게 진행되면서, 사망원인의 1 위가 암이라는 질병이 차지했으며, 이를 극복하기 위해 다양한 효과의 약물 치료를 시도하고 있다. 기존에 사용되는 항암제는 암 사멸 효과가 우수하나 정상 세포를 공격하고, 내성이 생기는 등 여러 가지 문제점을 내포하고 있다. 이러한 단점을 극복하기 위해 나노 물질 기반의 암 치료제가 각광을 받고 있으며, 기존에 사용하던 항암제나 짧은 간섭 RNA (siRNA), 항체 등을 높은 농도로 표적 치료가 가능하게 하는 장점이 있다. 특히 두 가지 이상의 암 치료제를 조합하여 암 치료의 동반 상승 효과를 유도할 수 있다.

15

알부민 단백질을 이용한 나노 입자는 생체 친화성 및 분해능이 우수하여 인체 안에서의 독성이 없으며 반면에 체내에 오래 잔류할 수 있어서 암 치료에 유리한 조건을 다수 가지고 있고, 금 나노 막대와 짧은 간섭 RNA 를 동시에 전달할 수 있는 복합체로 사용이 가능하며 금 나노 막대의 독성을 막아준다는 장점이 있다.

20

본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

25

【발명의 내용】

【해결하고자 하는 과제】

본 발명자들은 암 세포 특이적으로 작용할 수 있는 siRNA 전달체를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 항-세포사멸 단백질을 코딩하는 mRNA 에
 5 특이적으로 결합하는 siRNA 및 암세포에 특이적으로 발현하는 단백질에 대한 항체를 적용하여 혈청 알부민(Serum albumin) 및 금 나노막대를 기반으로 하는 siRNA 전달용 복합체를 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

따라서, 본 발명의 목적은 siRNA 전달용 복합체를 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 siRNA 전달용 복합체의 제조방법을 제공하는
 10 데 있다.

본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

15 【과제의 해결 수단】

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 혈청 알부민(Serum albumin); (b) 금 나노막대; (c) siRNA; 및 (d) 항체를 포함하는 siRNA 전달용 복합체를 제공한다.

20 본 발명자들은 암 세포 특이적으로 작용할 수 있는 siRNA 전달체를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 항-세포사멸 단백질을 코딩하는 mRNA 에 특이적으로 결합하는 siRNA 및 암세포에 특이적으로 발현하는 단백질에 대한 항체를 적용하여 혈청 알부민(Serum albumin) 및 금 나노막대를 기반으로 하는 siRNA 전달용 복합체를 개발하였다.

25

본 발명의 siRNA 전달용 복합체는 (a) 혈청 알부민; (b) 금 나노막대; (c) siRNA; 및 (d) 항체를 포함한다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 혈청 알부민은 티올(thiol) 잔기가 도입되어 금 나노막대와 직접적으로 결합된다. 즉, 티올기를 통해
 30 혈청 단백질과 금 나노입자가 직접적으로 결합된다.

본 발명은 혈청 알부민을 사용함으로써 우수한 생체적합성을 갖는다(도 9).

본 발명의 siRNA 전달용 복합체는 구형 형태 및 음성 표면 전하를 갖는다.

5 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 siRNA 전달용 복합체는 150 nm 내지 300 nm의 직경을 갖는다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 siRNA 전달용 복합체는 180 nm 내지 300 nm의 직경을 갖는다. 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 siRNA 전달용 복합체는 건조 상태의 경우에, 180 nm 내지 250 nm의 직경을 갖고, 비건조 상태의 경우에, 250 nm 내지
10 300 nm의 직경을 갖는다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 siRNA 전달용 복합체는 -50 mV 내지 -30 mV 또는 -45 mV 내지 -35 mV의 평균 표면 전하를 갖는다.

본 발명의 siRNA 전달용 복합체에 포함되는 금 나노막대는 당업계에서 공지된 방법[예컨대, CTAB(Cetyl Trimethylammonium Bromide), HAuCl₄ 및
15 NaBH₄의 혼합물 및 HAuCl₄, CTAB, AgNO₃ 및 아스코르브산의 혼합물을 혼합하는 방법]에 따라 제조될 수 있다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 금 나노막대는 15-30 nm의 가로 길이 및 1-10 nm의 세로 길이, 또는 16-28 nm의 가로 길이 및 5-10 nm의 세로 길이를 갖는다.

20 본 발명의 siRNA 전달용 복합체는 혈청 알부민이 결합된 금 나노막대를 포함한다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 상기 siRNA 전달용 복합체는 약 1-20 개 또는 5-15 개의 금 나노막대를 포함한다.

본 발명의 siRNA 전달용 복합체는 암세포 특이적으로 세포 내
25 이입된다. 본 발명의 이러한 특징은 상기 siRNA 전달용 복합체를 구성하는 항체에 의해 부여된다.

상기 siRNA는 항-세포사멸(apoptosis) 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 상보적으로 결합하는 siRNA이다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 항-세포사멸 단백질은 Bcl-2, Bcl-w 및 Bcl-xL와
30 같은 Bcl-2 패밀리 중 하나이고, 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 항-세포사멸 단백질은 Bcl-2이다.

본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 siRNA 는 서열목록 제 1 서열의 뉴클레오타이드 서열을 갖는다.

본 발명의 본 발명의 siRNA 전달용 복합체를 구성하는 항체는 암 세포 표면에 특이적으로 발현하는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체이다.

5 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 항체는 HER-2(유방암), AFP(Alpha-fetoprotein; 간암), BCR-ABL(만성 골수성 백혈병), BRCA1/BRCA2 (유방암 및 난소암), BRAF V600E(흑색종 및 결장암), CA-125(난소암) , CA19.9 (췌장암), CEA(Carcinoembryonic antigen; 결장암), EGFR(Epidermal Growth Factor Receptor; 비-소세포 폐암), KIT(위장관 간질성 종양),
10 PSA(Prostate Specific Antigen; 전립선암) 또는 S100(흑색종)에 특이적인 항체이며, 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 항체는 HER-2 에 특이적인 항체이다.

본 발명의 siRNA 전달용 복합체는 우수한 광열효과를 갖는다.

본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 siRNA 전달용 복합체와 동일한
15 금 나노막대의 양의 광열 효과를 비교했을 때, 비슷한 정도의 광열효과를 보이며 10 분 경과 후에는 거의 동일한 광열효과를 나타낸다. BSA 입자 한 개당 약 7 개의 금 나노막대가 캡슐화 되어 있는 것으로 보면, BSA/금 나노막대 복합체 및 금 나노막대의 입자 기준 광열 효과 비교 시, 약 7 배의 광열 효과의 차이를 보이는 것으로 볼 수 있다.

20

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 siRNA 전달용 복합체의 제조방법을 제공한다:

(a) 금 나노막대와 혈청 알부민을 접촉하여 혈청 알부민/금 나노막대 복합체를 제조하는 단계;

25 (b) 상기 혈청 알부민/금 나노막대 복합체에 siRNA 를 첨가하고 탈용매 작용(desolvation)하여 혈청 알부민/금 나노막대/siRNA 복합체를 제조하는 단계; 및

(c) 상기 혈청 알부민/금 나노막대/siRNA 복합체와 항체를 접촉하여 siRNA 전달용 복합체를 제조하는 단계.

30

본 발명의 siRNA 전달용 복합체의 제조방법은 상기 siRNA 전달용 복합체를 제조하는 방법으로, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재 생략한다.

본 발명의 siRNA 전달용 복합체의 제조방법의 단계 (b)에서 실시하는
5 탈용매 작용은 당업계에 공지된 방법에 따라 제조될 수 있다.

본 발명의 조성물은 약제학적 조성물로 제조될 수 있다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 (a) 상술한 본 발명의 siRNA 전달용 복합체의 약제학적 유효량; 및 (b)
10 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물이다. 본 명세서에서 용어 “약제학적 유효량”은 상술한 siRNA 전달용 복합체의 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.

본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의
15 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석,
20 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

25 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 바람직하게는 경구 비투여 방식으로 적용된다.

본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.
30 본 발명의 약제학적 조성물의 일반적인 투여량은 성인 기준으로 0.001-100 mg/kg 범위 내이다.

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

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 혈청 알부민(Serum albumin); (b) 금 나노막대; (c) siRNA; 및 (d) 항체를 포함하는 siRNA 전달용 복합체를 세포에 접촉시키는 단계를 포함하는 siRNA 전달 방법을 제공한다.

본 발명의 siRNA 전달 방법은 상술한 siRNA 전달용 복합체를 이용하여 실시하는 것으로서, 이 둘 사이의 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

【발명의 효과】

본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

- (a) 본 발명은 체내 분해성의 siRNA 전달용 복합체를 제공한다.
- (b) 본 발명의 siRNA 전달용 복합체는 안정성 및 경제성이 우수하고, 대량생산이 용이하며 크기 조절이 가능해 세포 전달에 알맞은 크기로의 제작이 가능하다.
- (c) 본 발명의 항체를 이용하여 암 세포 특이적으로 이입하고, siRNA 및 광열 효과의 동반 상승 효과를 이용하여 효과적으로 암 사멸 유도할 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1 은 BSA/금 나노막대/siRNA 복합체의 제조방법을 도식적으로 보여준다.

도 2 는 BSA/금 나노막대/siRNA 복합체의 TEM 이미지를 나타낸다. 스케일 바는 100 nm를 나타낸다.

도 3a 및 도 3b 는 BSA/금 나노막대/siRNA 복합체의 특성을 보여준다.
 도 3a 는 BSA/금 나노막대/siRNA 복합체의 평균 직경이 278 nm임을 나타낸다.
 도 3b 는 BSA/금 나노막대/siRNA 복합체의 평균 표면 전하가 -39.6 mV임을 나타낸다.

5 도 4 는 BSA/금 나노막대 복합체의 표면에 결합된 항-HER2 항체를 정량하기 위한 브래드포드(Bradford) 분석법의 표준 곡선을 나타낸다.

도 5 는 BSA/금 나노막대에 캡슐화된 siRNA 를 정량하기 위한 리보그린(Ribogreen) 분석법의 표준 곡선을 나타낸다.

10 도 6 은 금 나노막대 및 BSA/금 나노막대 복합체의 광열 효과를 분석한 그래프이다.

도 7 은 BSA/금 나노막대 복합체에 결합된 항-HER2 항체에 의한 세포 이입을 확인한 결과를 보여준다.

도 8 은 HER2 를 발현하는 SkBr-2 세포에 항-HER2 항체가 결합된 BSA/금 나노입자의 세포 이입을 현미경으로 확인한 결과를 보여준다.

15 도 9 는 BSA/금 나노입자의 독성 실험 결과를 나타낸다.

도 10 은 BSA/금 나노입자/siRNA 에 의한 mRNA 발현 억제 효과를 24 시간 및 48 시간에 분석한 결과를 나타낸다.

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

20 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

25 실시예

실험 재료 및 실험 방법

BSA/금 나노막대/siRNA 복합체 제작 방법

1) 실험에 사용될 금 나노막대(가로 길이: 22 ± 3 nm/세로 길이: 6 ± 2 nm)를 제작하였다

30 - 상기 금 나노막대의 제작방법

(i) 0.2M CTAB 7.5 ml(sigma)과 0.01M HAuCl₄ 0.25 ml(sigma)를 혼합하였다.

(ii) 0.01M NaBH₄(sigma) 0.6 ml를 첨가하여 혼합한 후 보관하였다.

(iii) 0.01M HAuCl₄ 10 ml 및 0.1M CTAB, 237.5 ml를 혼합하였다.

5 (iv) 0.01M AgNO₃(sigma) 1.5 ml을 첨가하여 혼합하였다.

(v) 0.1M ascorbic acid(sigma) 1.6 ml을 첨가하여 혼합하였다. 혼합물의 색이 투명하게 변하였다.

(vi) 단계 (v)의 혼합물에 (ii) 단계에서 제작한 용액 2 ml을 첨가하고 3 시간 이상 반응하여 금 나노막대를 제조하였다.

10 2) 금 나노막대를 원심분리기로 13,000rpm, 30 분 돌려 상층액을 제거하고, 증류수를 첨가하여 다시 현탁하는 과정을 반복하여 3 차례 세척하였다.

3) 마지막 상층액을 제거하고 침전된 금 나노막대에 20 mg/ml BSA 용액 1 ml 및 50 mg/ml SH-BSA 용액 20 μ l(ProteinMODS, 미국)을 첨가한 후
15 3 시간 상온에서 반응하였다.

4) 상기 2 번과 동일한 방식으로 금 나노막대를 세척하였다.

5) 20 mg/ml pH 6 BSA 용액 100 μ l 및 siRNA(siBcl-2: GGAUUGUGGCCUUCUUUGAUU, Bioneer, 한국) 1 nmol 을 동시에 투입하고 혼합하였다.

20 6) 탈용매 작용을 통해 BSA 로 금 나노막대 및 siRNA 를 캡슐화하여 BSA/금 나노입자/siRNA 복합체를 제조하였다. 금 나노막대 및 siRNA 가 혼합된 용액에 100% 에탄올을 10 μ l씩 20 회 첨가하였다(60 μ l/분).

BSA 와 같은 단백질 혹은 고분자 물질 등은 보통 탈용매(desolvation)이라는 방법을 이용하여 나노입자로 만들 수 있다.
25 이 방법의 원리는 BSA 분자 사이사이에 있는 물 분자를 제거하여 결과적으로 BSA 끼리 서로 뭉칠 수 있는 기회를 좀 더 많이 제공하게 된다. 이로 인해 BSA 가 뭉쳐져서 나노입자를 형성하게 된다. 본 연구에서는 탈용매를 시행하는 방법으로 에탄올을 천천히 투입하는 방법을 사용하였다. 금 나노막대는 BSA 와 같이 뭉쳐지게 하기 위해 표면에 BSA 를 기능화하여
30 BSA 와 같이 뭉쳐질 수 있도록 하였다. siRNA 는 크기가 작은 분자이기 때문에 BSA 가 뭉쳐질 때 같이 뭉쳐지게 되는 것으로 보인다.

7) 용액이 투명한 색에서 뿌옇게 변하면 8% 글루타르알데하이드 2 μl 를 첨가하여 BSA 간의 가교시켜 12 시간 이상 반응하였다.

8) 상기 2 번과 동일한 방식으로 BSA/금 나노입자/siRNA 복합체를 PBS 로 10 분 동안 세척하였다.

5 9) 상기 BSA/금 나노입자/siRNA 복합체 표면에 항체를 부착하기 위해 1 mg/ml Amine-PEG-Biotin, 1 mg/ml 스트렙타비딘 10 μl 을 상온에서 각각 3 시간 동안 항온반응하였다.

10) 상기 8 단계와 동일한 방식으로 입자를 세척하였다.

10 11) 바이오틴이 부착된 1 mg/ml 항-Her2 항체 5 μl 를 첨가하고 12 시간 이상 4°C에서 반응하였다.

12) 상기 8 단계와 동일한 방식으로 BSA/금 나노입자/siRNA/항체 복합체를 세척한다. 사용하기 전 PBS, 4°C에 보관하였다(도 1).

15 siRNA 및 항체(리간드) 정량

BSA/금 나노입자/siRNA 복합체와 항-HER2 항체(Abcam)를 반응[상기 'BSA/금 나노입자/siRNA 복합체 제작 방법' 의 9) 내지 12) 단계]시킨 후, 원심분리기를 통해 BSA 복합체와 용액을 분리하여 용액 안의 항-HER2 농도를 측정하고, 이를 반응시키기 전 항-HER2 항체의 농도와 비교해 BSA
20 복합체에 고정화된 정도를 확인하였다.

항체의 농도 측정은 단백질 정량 방법 중 하나인 브래드포드(Bradford) 분석법을 이용하였다.

광열효과 분석

25 상기 과정에서 합성된 BSA/금 나노입자/siRNA 복합체 1 ml를 이용하여 광열효과 실험을 진행하였다. 가해진 빛의 세기는 4 w/cm²s⁻³ 로 동일하며, 파장은 근적외선(810nm)을 이용하였다. 빛을 가해진 시간은 2.5 분, 5 분, 10 분으로 진행하였고, 실험 초기 온도를 25°C로 고정하여 진행하였다. BSA/금 나노입자/siRNA 복합체의 광열효과를 비교하기 위해
30 같은 부피의 물, BSA 나노입자, 금 나노입자 동일 양과 비교하였다.

인 비트로 분석

해당 암세포는 SK-BR-3 이며 이 세포는 HER2 가 과발현된 암세포이다(정상세포는 과발현되지 않음).

합성된 BSA/금 나노입자/siRNA 복합체의 세포 이입 확인 방법은 FACS
 5 분석/ 공촛점 현미경 분석의 두 가지 방법으로 진행하였으며 위의 방법은
 형광을 측정하는 방식으로, BSA 복합체 안에 FITC 를 캡슐화하여 입자의
 형광을 측정하는 방식으로 진행하였다. 해당 세포(SK-BR-3) 1×10^6 에 BSA
 복합체 1×10^9 을 투입하고 3 시간동안 37°C 의 조건에서 반응시킨 후, PBS 를
 이용하여 세포를 3 회 이상 세척하였다. 이후 4%
 10 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)를 이용하여 세포를 고정화시킨 후,
 FACS 기기를 이용하여 형광(FITC)을 띄고 있는 세포의 비율을 얻어 세포
 이입률을 평가하였다. 또한 공촛점 현미경을 이용하여 실제 세포에
 복합체가 이입되었는지의 여부를 시각적으로 이미징하여 세포 이입을
 평가하였다.

15 복합체 안에 있는 siRNA 의 작용을 관찰하기 위해 siRNA 가
 직접적으로 반응하는 mRNA 의 농도를 정량할 수 있는 RT-PCR 기법을
 이용하였다. 세포 이입 해당 세포(SK-BR-3) 1×10^6 에 BSA 복합체
 1×10^9 을 투입하고, 24 시간, 48 시간 및 72 시간 동안 37°C 의 조건에서
 반응하였다. 복합체의 siRNA 작동 효율을 살펴보기 위해 siRNA 를
 20 리포펙타민(lipofectamine) 처리를 하여 siRNA 단독으로 이입시키는 경우와
 비교하였다. 시간이 지난 뒤 해당 세포를 mRNA 추출 키트(nucleospin RNA
 II, MACHEREY-NAGEL)을 이용하여 mRNA 를 분리하고, LightCycler® RNA
 Master SYBR Green I 과 RT-PCR(roche)을 통해 mRNA 농도를 측정 및
 비교하였다(siRNA 의 타겟은 세포 사멸과 관계되는 단백질 중 하나인 Bcl-
 25 2 임).

결과

BSA/금 나노입자의 특성

본 실험에서 사용한 나노막대는 Langmuir 2004, 20, 6414-6420 을
 30 참고하여 제조하였으며 약 750 nm 정도에서 흡광도를 나타내었다.

TEM 이미지 분석을 통해 약 200 nm 크기를 갖는 구형의 BSA/금 나노입자가 균일하게 형성되었음을 확인하였다. 상기 BSA/금 나노입자는 건조된 상태로 실제 크기는 약 278 nm로 측정되었다. BSA 입자 안에 금 나노막대(6 nm×22 nm)가 비교적 고르게 분포되어 있음을 확인하였다.

5 BSA 입자 하나 당 금 나노막대가 약 $7.7(\pm 0.8)$ 개 정도 캡슐화 되었다(TEM 이미지를 직접 개수하여 분석).

동적 광산란(Dynamic light scattering) 장비를 이용해 BSA/금 나노입자 복합체의 크기 및 전하를 측정하였다. 상기 BSA/금 나노입자의 크기는 약 278 nm 정도이고, 이는 TEM 이미지와 비교하여 약간 크게 측정되었다. 이는 TEM 의 경우에 BSA/금 나노입자 복합체를 건조시켰기

10 때문에 수치에 차이가 있는 것으로 파악된다. BSA/금 나노입자 복합체의 표면 전하는 약 -40 mV를 나타내며, 이는 BSA 의 pI 값(pI 4.7, 중성의 조건에서 음전하를 갖음)이 영향을 미친 것으로 분석된다.

세포 전달 및 치료용으로의 크기나 표면 전하는 비교적 적당하다고

15 생각된다.

복합체 내 siRNA 및 항체(리간드) 정량

제작된 BSA/금 나노입자 복합체의 항-HER2 항체 고정화율을 확인하기 위한 실험을 진행하였다. 실험 결과, 투입한 항-HER2 항체(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의

20 약 43%에 해당하는 항-HER2 항체가 고정화된 것을 확인하였다(표 1).

【표 1】

주입된 항체 농도: 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$	평균 흡광도	상층액 농도($\mu\text{g}/\text{ml}$)	부착된 항체 농도($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Only Ab - Only Ab (NC)	0.222433333	18.34397163	1.656028369
ST-Ab - ST-Ab(NC)	0.157666667	11.45390071	8.546099291

상기 표 1 의 ‘only Ab- only Ab(NC)’ 은 스트렙타비딘을 부착하지

25 많은 BSA 입자의 항체 고정화 정도를 나타내는 것이며, ‘ST-Ab-ST-

Ab(NC)' 은 스트렙타비딘을 부착했을 시의 항체 고정화 정도로 이를 통해 입자 제작 시 스트렙타비딘이 필요하다는 것을 알 수 있다.

캡슐화된 짧은 간섭 RNA(siRNA)의 양을 측정하기 위해, 상기 항-HER2 고정화를 측정에서 사용한 방법과 동일한 방법으로 상층액의 농도를 측정하는 방식으로 실험을 진행하였다. 농도 측정법은 RNA 정량 방법 중 하나인 리보그린(Ribogreen) 분석법을 이용하였다. 실험 결과, BSA/금 나노입자/siRNA 복합체에 캡슐화된 siRNA 는 투입한 RNA(4000 nM)의 약 96%에 해당하는 siRNA 가 캡슐화된 것을 확인하였다(표 2).

【표 2】

리보그린 분석법			
	형광 세기(평균)	추측된 상층액 농도	캡슐화된 siRNA의 백분율
BSA	220.745	149.0674352	94.481375
BSA/금 나노입자	144.92225	61.66368876	96.37694375

실험 결과를 통해 BSA/금 나노입자/siRNA 복합체에 표적(targeting) 기능을 수행하는 항-HER2 항체 및 암 치료 효과를 증대시키는 siRNA 가 효과적으로 고정화 및 캡슐화 되어 다기능성을 띄는 나노 복합체로 형성되었음을 확인하였다.

광열효과

실제 만들어진 BSA/금 나노입자/siRNA/항체 복합체의 광열효과를 확인하기 위해, 동일한 양의 금 나노막대와 비교하여 시간별로 광열효과를 측정하였다.

결과적으로 동일한 금 나노막대의 양과 비교했을 때, 비슷한 정도의 광열효과를 보이며 10 분 경과 후에는 거의 동일한 광열효과를 나타내었다. BSA 입자 한 개당 약 7 개의 금 나노막대가 캡슐화 되어 있는 것으로 보면, BSA/금 나노막대 복합체 및 금 나노막대의 입자 기준 광열 효과 비교 시, 약 7 배의 광열 효과의 차이를 보이는 것으로 볼 수 있다(10 분 기준).

광열 효과의 온도 측정 결과, 본 입자를 통해 충분히 암 세포 사멸을 유도할 수 있을 것으로 보이며, 그 시간은 대략 5 분 정도로 추측할 수 있다. 일반적으로, 42℃ 이상에서 세포 아포토시스(apoptosis)가 일어난다.

- 본 BSA 복합체의 광열효과는 rod 와 비교했을 시 우수한 것으로
 5 확인되었으며 특히, 금 나노막대와 비교했을 시 입자 1 개가 갖는 광열효과가 훨씬 더 우수할 것으로 예측되며 이를 세포에 적용했을 시 금 나노막대 단독으로 쓰이는 것 보다 광열효과로 인한 세포 사멸 유도 효과가 우수할 것으로 예상된다.

10 BSA 의 인비트로 분석

나노 입자를 이용한 암세포 치료를 위한 가장 중요한 요건 중 하나는 원하는 암 세포에 선택적으로 작용할 수 있는 능력의 여부이다. 이를 판단하기 위해, BSA/금 나노입자 복합체에 항-HER2 항체 고정화에 따른 세포 이입률을 확인하였다.

- 15 실험 결과, 항-HER2 항체를 고정화하지 않은 복합체는 세포 안으로 이입되지 않은 것을 확인할 수 있으며 반대로 항-HER2 항체를 고정화한 것은 암 세포 안으로 복합체가 이입되는 것을 확인하였다. 생체 외, 혹은 생체 내 실험을 진행하기 위해, 제작된 복합체의 독성을 확인할 필요성이 있다.

- 20 독성을 확인하기 위해, 무처리(대조군), 금 나노막대, BSA, BSA/금 나노막대의 네 군으로 진행하였다. 세포 독성 확인법은 MTT 분석법으로 진행하였다. 독성 확인 결과, 무처리 세포에 비해 금 나노막대를 넣어 준 세포의 생존률이 현저히 낮았으며, 이는 금 나노막대에 존재하는 계면활성제(CTAB)로 인한 결과로 추측된다. 반면에, BSA 입자 및 BSA/금
 25 나노막대 복합체는 생체 물질로 구성된 입자를 이용하였기 때문에, 세포 독성이 없는 것을 확인하였다.

siRNA 의 인비트로 분석

- 30 제작된 나노입자의 siRNA 작용을 확인하기 위해, mRNA 농도를 측정하는 방식 중 하나인 RT-PCR 기법을 이용하였다. 대조군으로 아무것도 처리하지 않은 세포와, siRNA 만을 처리한 세포를 비교하였다.

실험 결과, 24 시간이 지난 후의 mRNA 농도를 비교했을 때, siRNA 를 넣어준 것의 농도는 처리하지 않은 세포와 비교했을 시 23%, BSA 복합체는 48%의 mRNA 발현율을 나타내었다. 48 시간 후의 mRNA 발현율은 siRNA 단독 기준 32%, BSA 복합체는 21%의 발현율을 나타내었다. 이는, 24 시간
5 소요시 siRNA 작용은 siRNA 를 단독으로 처리했을 시 더 우수하며, 48 시간 소요시 BSA 복합체의 siRNA 작용이 더 우수한 것으로 판별되었다.

이 결과를 통해, BSA 복합체의 siRNA 작용 또한 비교적 우수한 것으로 보이며, 시간에 따라 비교했을 때 복합체의 siRNA 작용은 시간이 지날수록 우수한 것으로 보인다. siRNA 단독으로 넣었을 때는 siRNA 가
10 바로 작용하여 비교적 짧은 시간이 지났을 때 siRNA 작용이 우수하나, 시간이 지나면서 작용해야 하는 siRNA 가 분해되거나 작용을 끝내서 mRNA 가 회복되는 경향을 보인다. 그러나, 복합체를 통한 siRNA 전달 시, BSA 의 캡슐화 및 세포 내의 효소를 통한 지속적인 siRNA 방출로 인해 시간이 지나면서 siRNA 효과가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 siRNA 를
15 이용하는 데에 단점으로 지적되어온 지속적인 작용이라는 문제점을 해결할 수 있는 대안이 될 수 있을 것으로 기대된다.

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한
20 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

(a) 혈청 알부민(Serum albumin); (b) 금 나노막대; (c) siRNA; 및 (d) 항체를 포함하는 siRNA 전달용 복합체.

5

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 혈청 알부민은 티올(thiol) 잔기가 도입되어 금 나노막대와 직접적으로 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 siRNA 전달용 복합체.

10

【청구항 3】

제 1 항에 있어서, 상기 (a) 혈청 알부민(Serum albumin); (b) 금 나노막대; 및 (c) siRNA;는 탈용매(desolvation)에 의해 결합하는 것을 특징으로 하는 siRNA 전달용 복합체

15

【청구항 4】

제 1 항에 있어서, 상기 금 나노막대는 15-30 nm의 가로 길이 및 1-10 nm의 세로 길이를 갖는 것을 특징으로 하는 siRNA 전달용 복합체.

20 **【청구항 5】**

제 1 항에 있어서, 상기 siRNA 는 항-세포사멸(apoptosis) 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 상보적으로 결합하는 siRNA 인 것을 특징으로 하는 siRNA 전달용 복합체.

25 **【청구항 6】**

제 1 항에 있어서, 상기 복합체는 150 nm 내지 300 nm의 직경을 갖는 것을 특징으로 하는 siRNA 전달용 복합체.

【청구항 7】

30 제 1 항에 있어서, 상기 복합체는 -50 mV 내지 -30 mV의 평균 표면 전하를 갖는 것을 특징으로 하는 siRNA 전달용 복합체.

【청구항 8】

제 1 항에 있어서, 상기 siRNA 전달용 복합체는 약 1-20 개의 금 나노막대를 포함하는 것을 특징으로 하는 siRNA 전달용 복합체.

5

【청구항 9】

제 1 항에 있어서, 상기 항체는 암 세포 표면에 특이적으로 발현하는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체인 것을 특징으로 하는 복합체.

10 【청구항 10】

다음의 단계를 포함하는 siRNA 전달용 복합체의 제조방법:

(a) 금 나노막대와 혈청 알부민을 접촉하여 혈청 알부민/금 나노막대 복합체를 제조하는 단계;

(b) 상기 혈청 알부민/금 나노막대 복합체에 siRNA 를 첨가하고
15 탈용매 작용(desolvation)하여 혈청 알부민/금 나노막대/siRNA 복합체를 제조하는 단계; 및

(c) 상기 혈청 알부민/금 나노막대/siRNA 복합체와 항체를 접촉하여 siRNA 전달용 복합체를 제조하는 단계.

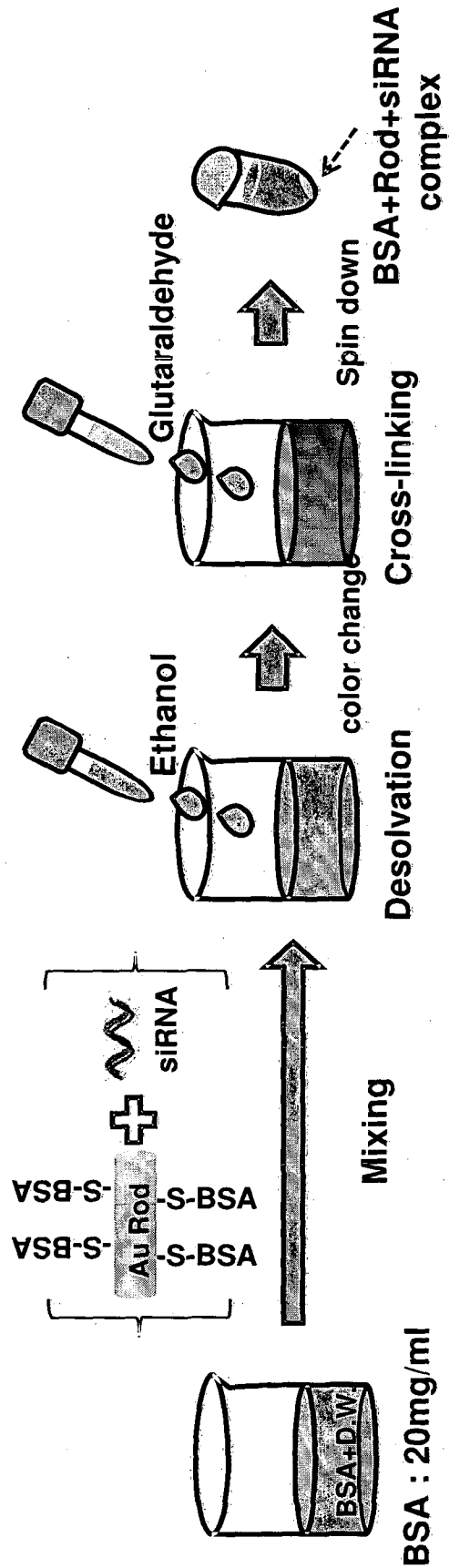
20 【청구항 11】

(a) 혈청 알부민(Serum albumin); (b) 금 나노막대; (c) siRNA; 및
(d) 항체를 포함하는 siRNA 전달용 복합체를 세포에 접촉시키는 단계를 포함하는 siRNA 전달 방법.

25

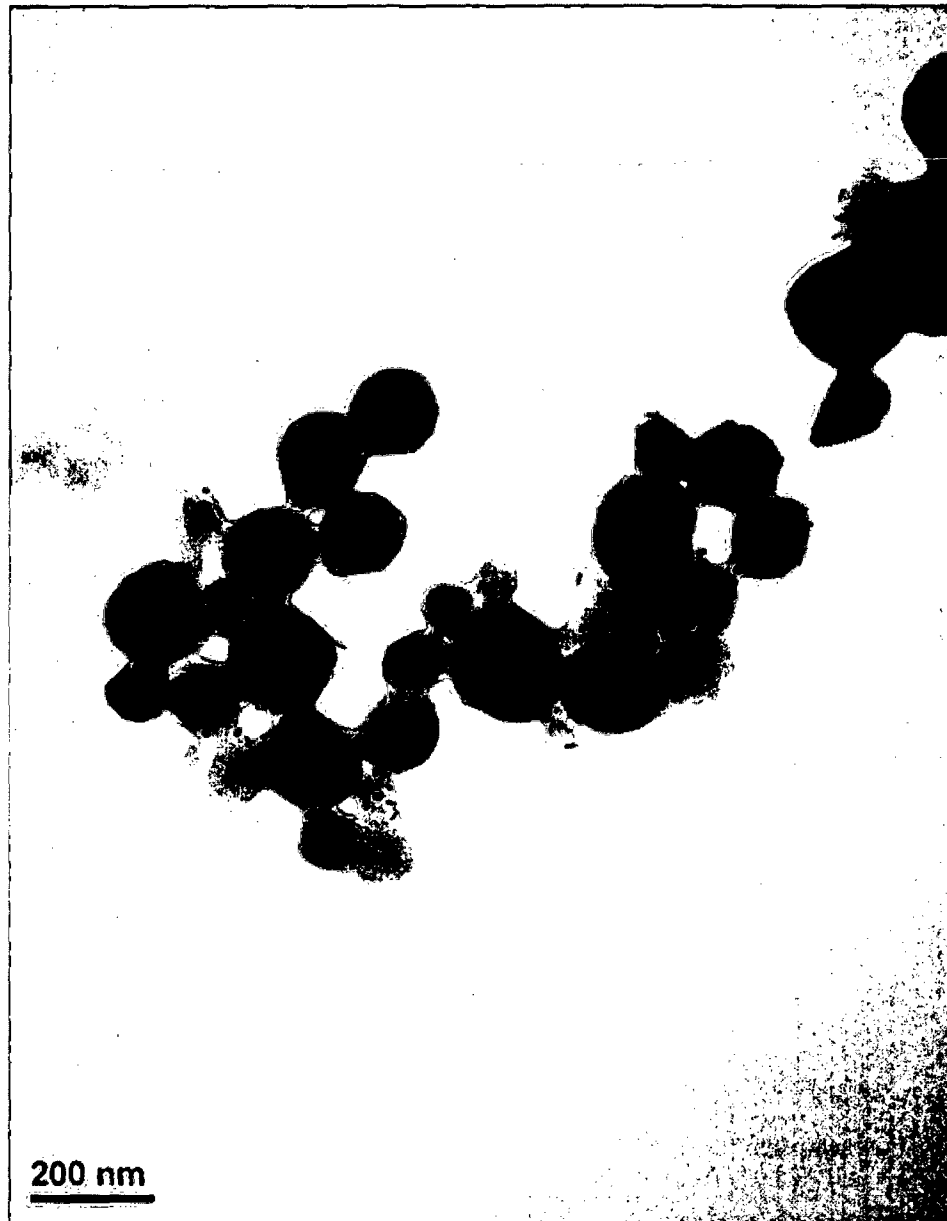
1/10

Fig. 1

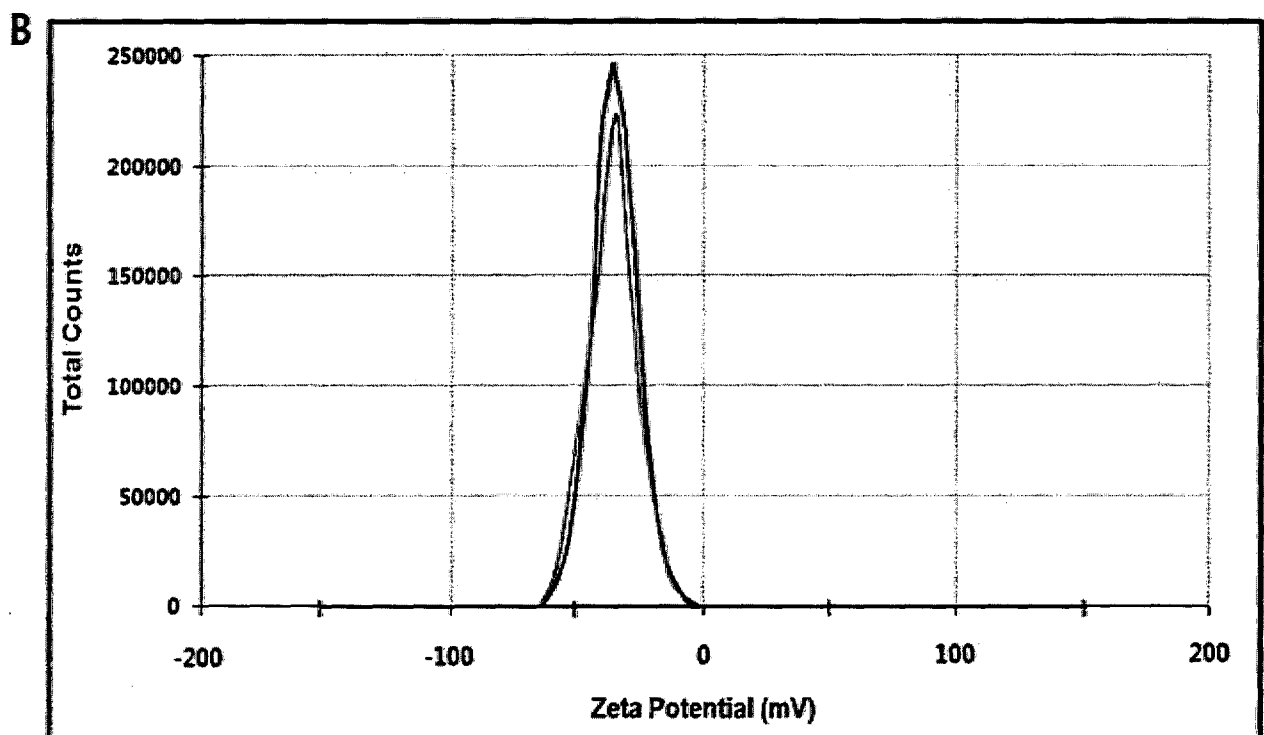
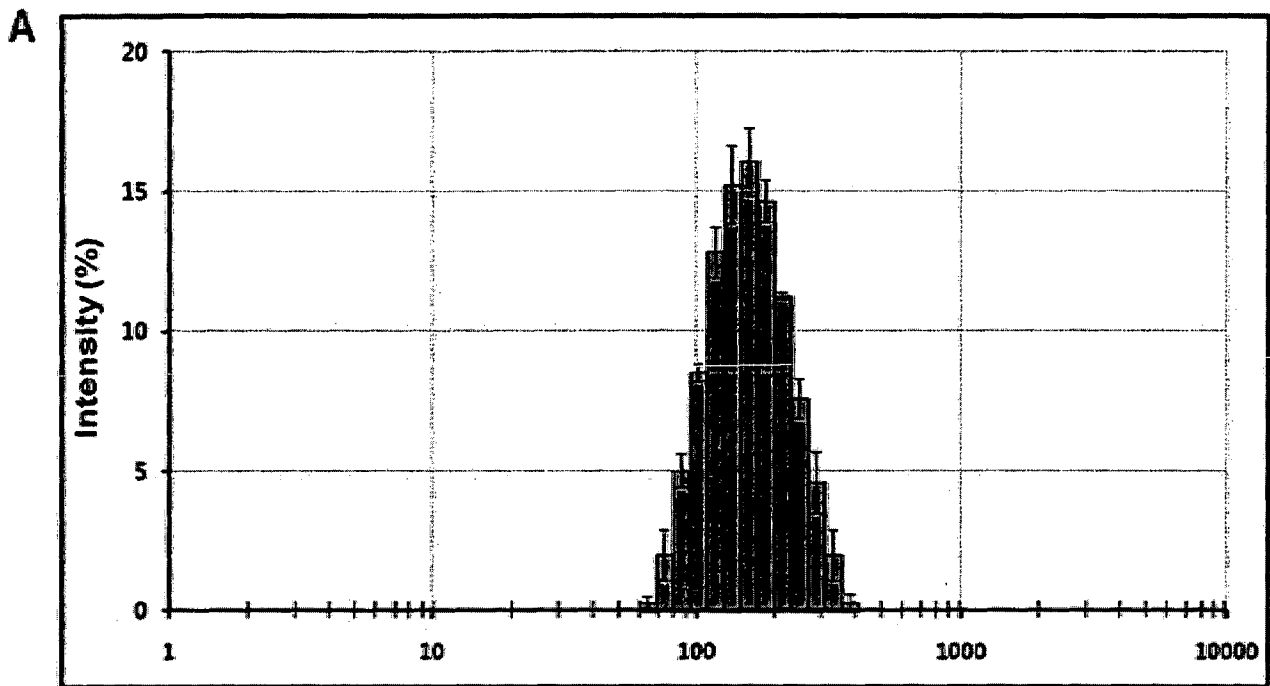


2/10

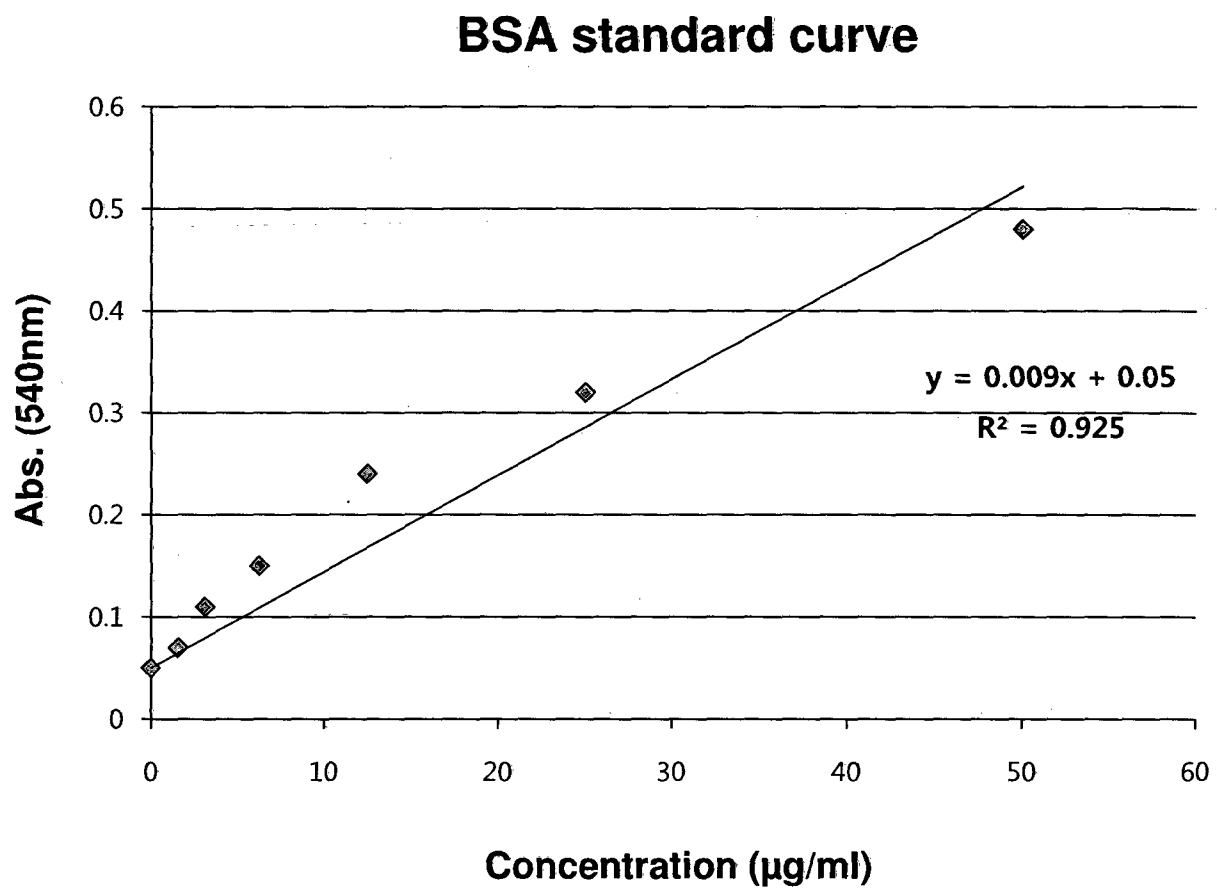
Fig. 2



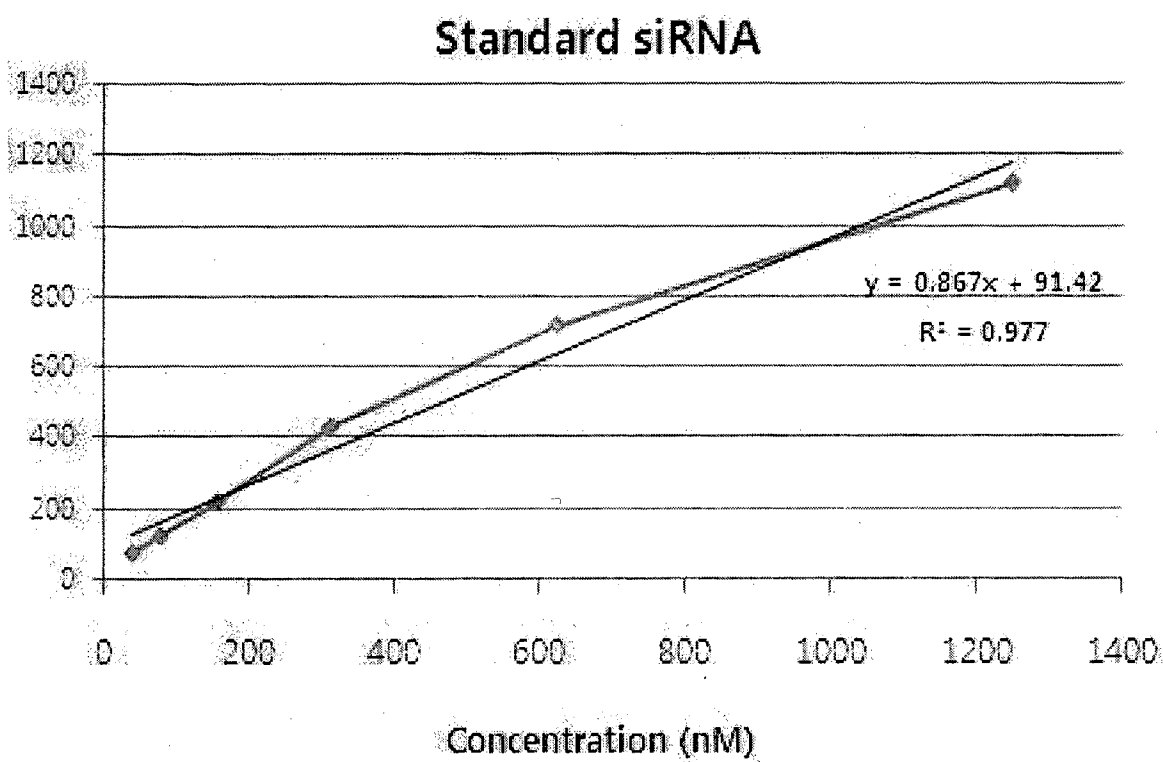
3/10

Fig. 3

4/10

Fig. 4

5/10

Fig. 5

6/10

Fig. 6

Photothermal effect

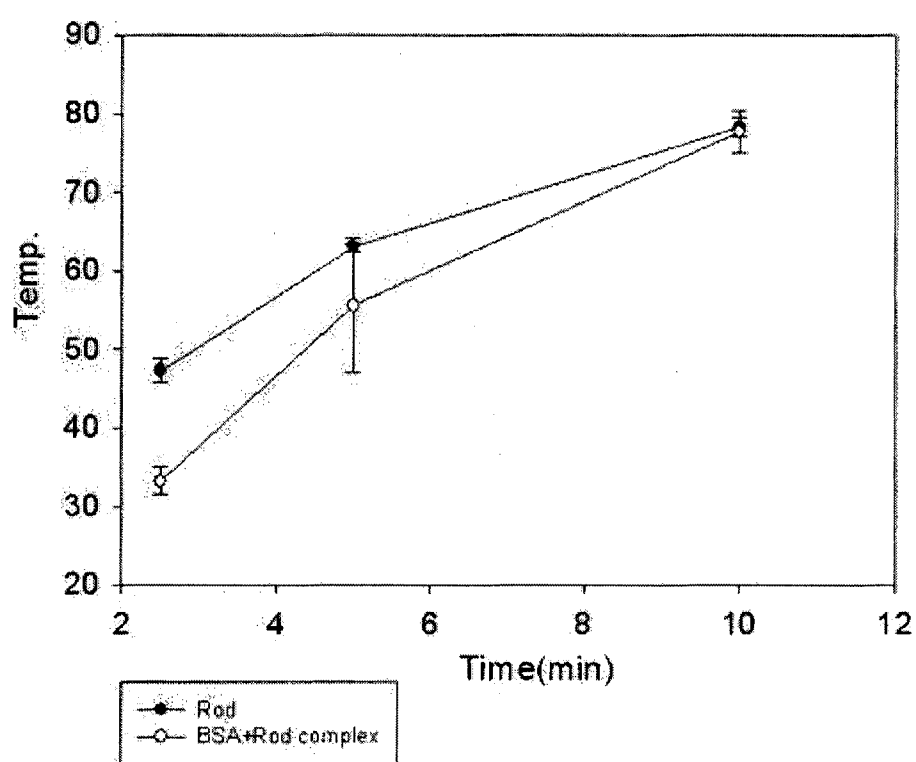
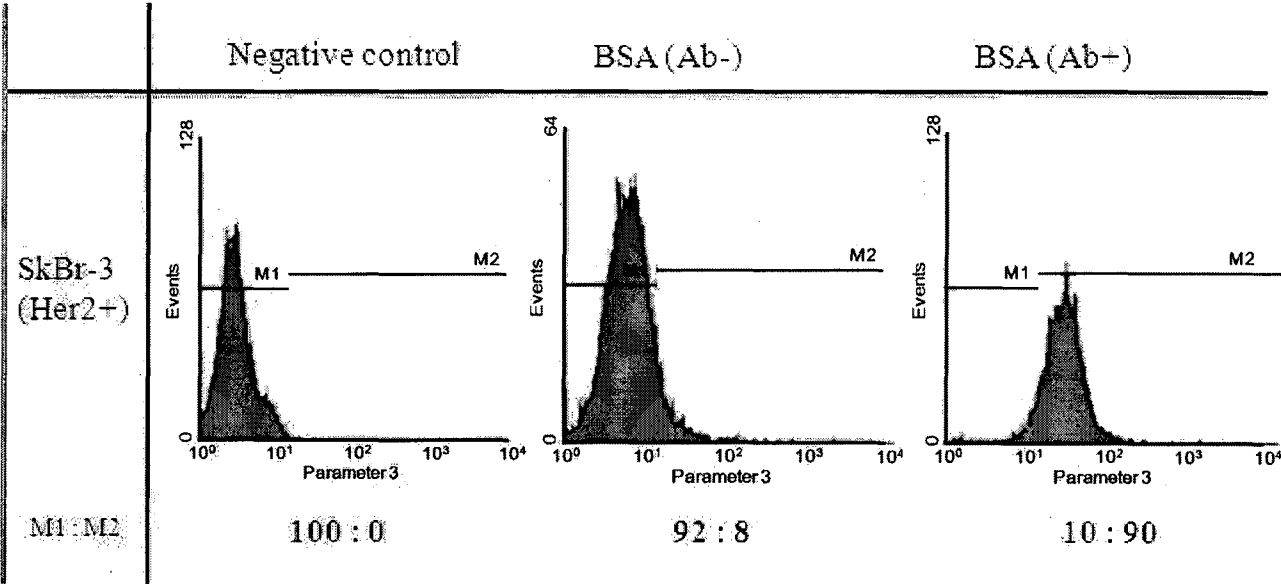


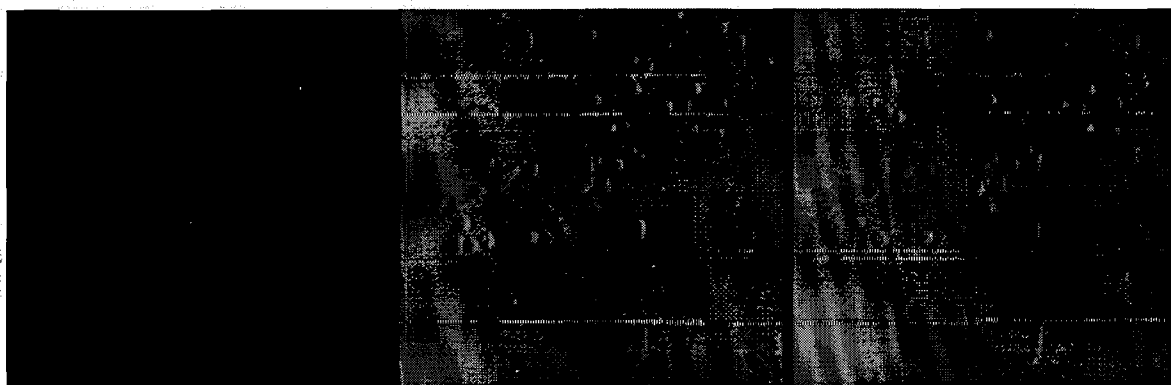
Fig. 7



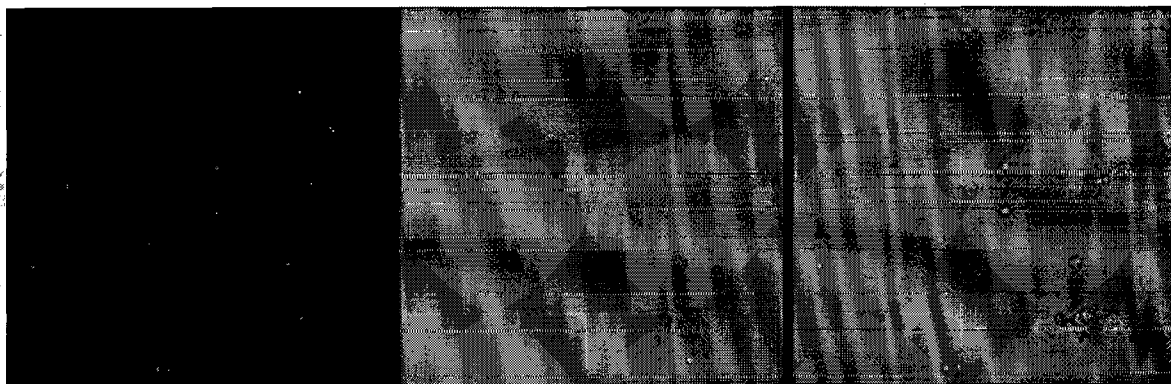
8/10

Fig. 8

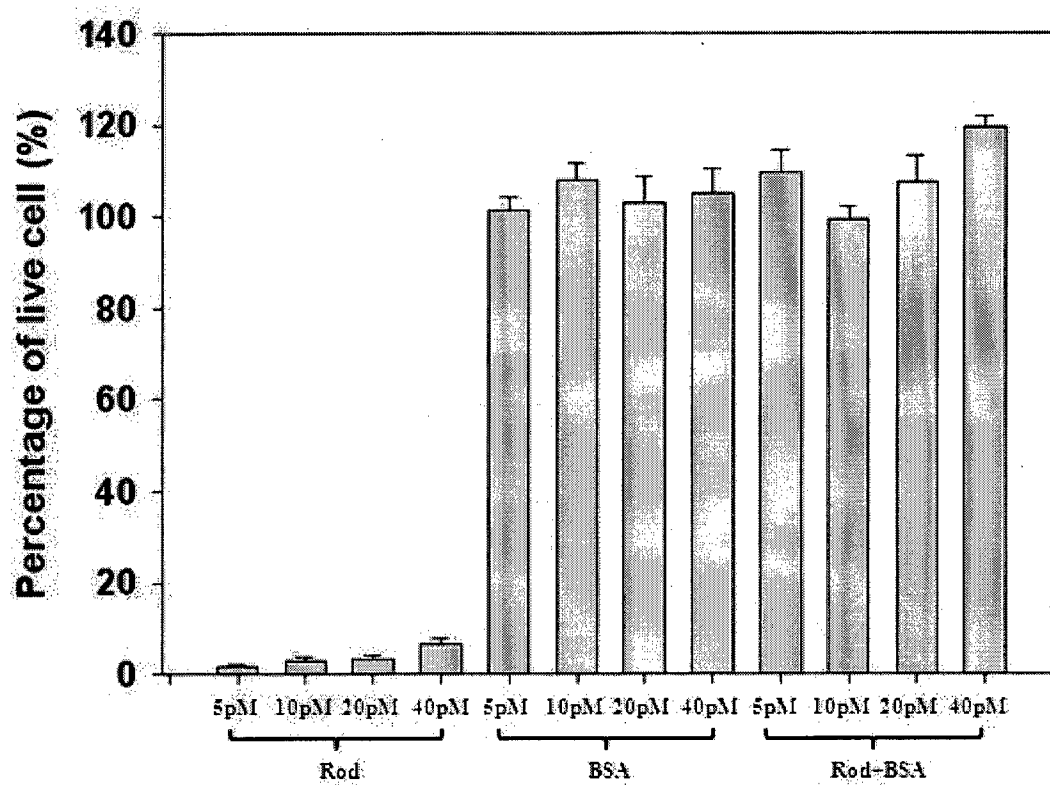
BSA
(Ab-)



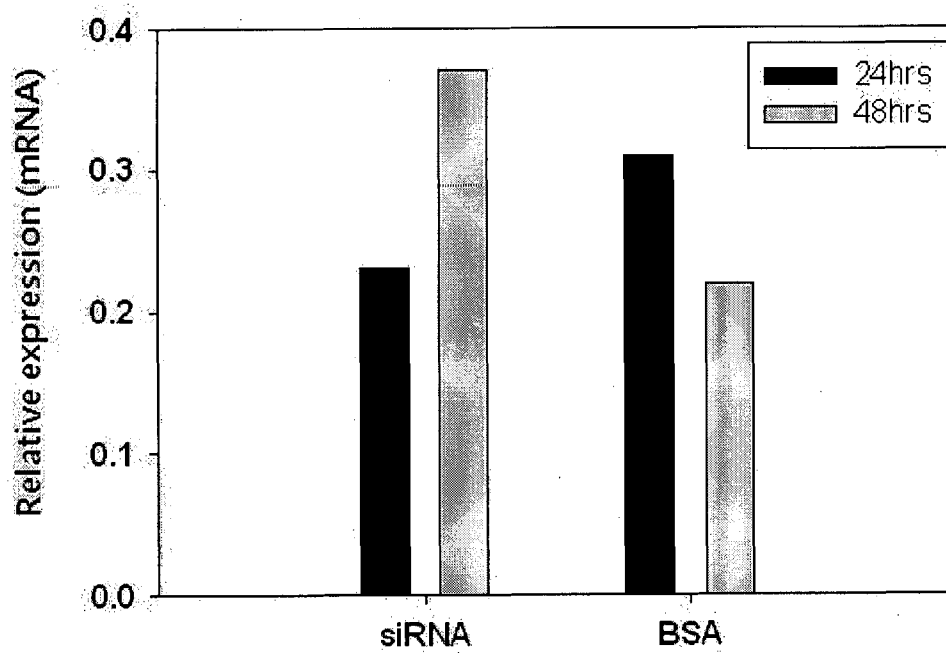
BSA
(Ab+)



9/10

Fig. 9

10/10

Fig. 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/009385**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****C12N 15/113(2010.01)i, C07K 14/76(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i, B82Y 5/00(2011.01)n**

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 15/113; C07K 14/76; A61K 48/00; B82Y 5/00

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

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

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

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

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: siRNA, serum albumin, gold nanowire, antibody, antibody, thiol, gold

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2012-0035498 A (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 16 April 2012 See abstract and claims 1-10	1-11
A	John G. Bruno, "A Review of Therapeutic Aptamer Conjugates with Emphasis on New Approaches", Pharmaceuticals, March, 2013, Vol. 6, pp. 340-357 See abstract and page 348	1-11
A	SOGANG UNIVERSITY, OH, Byeong Geun, Final(Result) Report for General Research Supporting Business, Ministry of Education and Science Technology, 27 June 2012 See the entire document	1-11



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

"I" 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

29 JANUARY 2015 (29.01.2015)

Date of mailing of the international search report

29 JANUARY 2015 (29.01.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

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

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/009385

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2012-0035498 A	16/04/2012	CN102441175 A	09/05/2012
		US 2012-0083455 A1	05/04/2012
		US 8513402 B2	20/08/2013

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 15/113(2010.01)i, C07K 14/76(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i, B82Y 5/00(2011.01)n														
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 15/113; C07K 14/76; A61K 48/00; B82Y 5/00 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: sirna, 혈청 알부민, 금 나노막대, 항체, antibody, thiol, gold														
C. 관련 문헌 <table border="1"> <thead> <tr> <th>카테고리*</th> <th>인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th>관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-2012-0035498 A (한국과학기술연구원) 2012.04.16 요약 및 청구항 1-10 참조</td> <td>1-11</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>John G. Bruno, 'A Review of Therapeutic Aptamer Conjugates with Emphasis on New Approaches', Pharmaceuticals, March, 2013, Vol.6, p.340-357 요약 및 p348 참조</td> <td>1-11</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>서강대학교 오병근 주관, 일반연구자지원사업 최종(결과)보고서, 교육과학기술부, 2012.06.27 전문 참조</td> <td>1-11</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	A	KR 10-2012-0035498 A (한국과학기술연구원) 2012.04.16 요약 및 청구항 1-10 참조	1-11	A	John G. Bruno, 'A Review of Therapeutic Aptamer Conjugates with Emphasis on New Approaches', Pharmaceuticals, March, 2013, Vol.6, p.340-357 요약 및 p348 참조	1-11	A	서강대학교 오병근 주관, 일반연구자지원사업 최종(결과)보고서, 교육과학기술부, 2012.06.27 전문 참조	1-11
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항												
A	KR 10-2012-0035498 A (한국과학기술연구원) 2012.04.16 요약 및 청구항 1-10 참조	1-11												
A	John G. Bruno, 'A Review of Therapeutic Aptamer Conjugates with Emphasis on New Approaches', Pharmaceuticals, March, 2013, Vol.6, p.340-357 요약 및 p348 참조	1-11												
A	서강대학교 오병근 주관, 일반연구자지원사업 최종(결과)보고서, 교육과학기술부, 2012.06.27 전문 참조	1-11												
☐ 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 2015년 01월 29일 (29.01.2015)		국제조사보고서 발송일 2015년 01월 29일 (29.01.2015)												
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 ++82 42 472 3473		심사관 조현경 전화번호 +82-42-481-5559 												

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2014/009385

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-2012-0035498 A

2012/04/16

CN102441175 A

2012/05/09

US 2012-0083455 A1

2012/04/05

US 8513402 B2

2013/08/20