(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014 년 2 월 6 일 (06.02.2014)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2014/021630 A1

(51) 국제특허분류:
C12N 15/115 (2010.01) *A61K 49/04* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2013/006889

(22) 국제출원일: 2013 년 7 월 31 일 (31.07.2013)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2012-0084069 2012 년 7 월 31 일 (31.07.2012) KR

(71) 출원인: **포항공과대학교 산학협력단 (POSTECH ACADEMY-INDUSTRY FOUNDATION)** [KR/KR]; 790-784 경상북도 포항시 남구 효자동 산 31, Gyeongsangbuk-do (KR). **연세대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY)** [KR/KR]; 120-749 서울시 서대문구 신촌동 134 연세대학교, Seoul (KR).

(72) 발명자: **이중환 (LEE, Jung Hwan)**; 790-751 경상북도 포항시 남구 지곡동 교수아파트 4 동 702 호, Gyeongsangbuk-do (KR). **함승주 (HAAM, Seungjoo)**; 137-871 서울시 서초구 서초 3 동 1523-9 오로라 빌라 103 호, Seoul (KR). **허용민 (HUH, Yong-Min)**; 137-040 서울시 서초구 반포동 반포자이아파트 140 동 902 호, Seoul (KR). **채영찬 (CHAE, Young Chan)**; 790-784 경상북도 포항시 남구 효자동 포항공과대학교 기숙사 18-417, Gyeongsangbuk-do (KR). **류성호 (RYU, Sung Ho)**; 790-751 경상북도 포항시 남구 지곡동 교수아파트 5 동 204 호, Gyeongsangbuk-do (KR). **임은경 (LIM, Eun-Kyung)**; 443-470 경기도 수원시 영통구 영통동 청명마을 동신아파트 315 동 802 호, Gyeonggi-do (KR). **김종인 (KIM, Jong In)**; 790-752 경상북도 포항시 남구 지곡동 효자그린 2 차아파트 239 동 204 호, Gyeongsangbuk-do (KR).

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

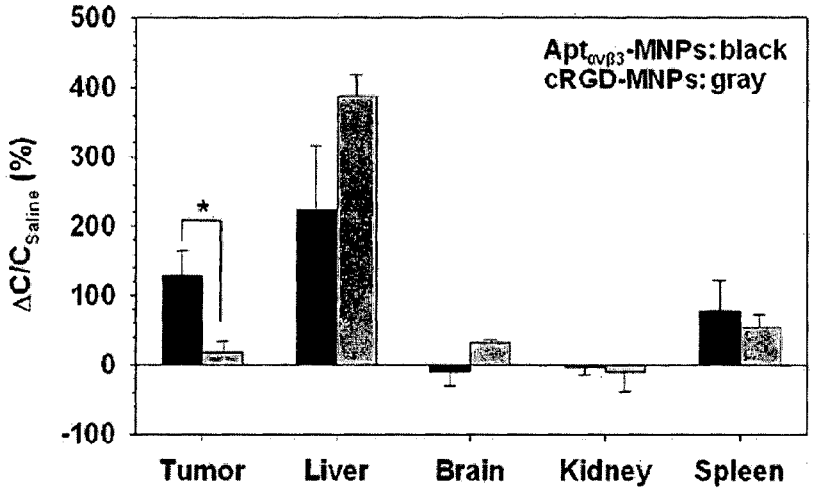
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: APTAMER SPECIFIC TO INTEGRIN A_VB_3 AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭 : 인테그린 $\alpha_v\beta_3$에 특이적 압타머 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a DNA aptamer specifically binding to integrin $\alpha_v\beta_3$, and a composition for diagnosing cancer or metastasis of cancer including the aptamer as an active ingredient. Also, the present invention relates to a composition for imaging neoplastic diseases including the aptamer, and a contrast medium including same.

(57) 요약서: 본 발명은 인테그린 $\alpha_v\beta_3$에 특이적으로 결합하는 DNA 압타머, 및 이를 유효성분으로 포함하는 암 또는 암전이 진단용 조성물에 관한 것이다. 또한 본 발명은 상기 압타머를 포함하는 종양성 질환 부위의 영상화용 조성물, 및 이를 포함하는 조영제에 관한 것이다.

WO 2014/021630 A1

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))

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

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

【명세서】

【발명의 명칭】

인테그린$\alpha_v\beta_3$에 특이적 압타머 및 이의 용도

【기술분야】

본 발명은 인테그린$\alpha_v\beta_3$에 특이적으로 결합하는 DNA 압타머, 및 이를 유효성분으로 포함하는 암 또는 암전이 진단용 조성물에 관한 것이다. 또한 본 발명은 상기 압타머를 포함하는 종양성 질환 부위의 영상화용 조성물, 및 이를 포함하는 조영제에 관한 것이다.

【배경기술】

인테그린(Integrin)은 세포 부착 및 이동, 분화, 증식 등과 같은 세포의 중요한 생리작용을 조절하는 세포 표면 수용체이다. 인테그린은 α와 β 서브유닛이 비 공유 결합으로 이루어진 헤테로다이머로 작용하며, α와 β 서브유닛이 쌍을 이루어 22가지의 인테그린 패밀리를 구성하고 있다. 인테그린은 주로 비브로넥틴, 피브로넥틴, 콜라겐, 라미닌, vWF, 피브리노겐 등의 세포외 메트릭스 단백질에 결합하나, 인테그린의 종류별로 리간드 특이성에 차이가 있으며, 한 종류의 인테그린이 여러 가지 리간드에 동시에 결합할 수 있다.

이 중, 인테그린$\alpha_v\beta_3$는 피부암, 전립선암, 유방암, 자궁경부암, 대장암, 폐암, 담낭암, 췌장암, 위암을 포함하는 다양한 암들 중 대부분의 공격적인 종양 세포들에서 발현되며, 부착에 의존적인 종양 세포의 성장, 생존과 침투를 조절하여, 다양한 인간 종양들의 악성을 향상시키는 것으로 알려져 있다. 최근에는 인테그린$\alpha_v\beta_3$이 세포 내 신호 전달을 조절하여 부착에 독립적인 매개체로서 종양의 성장 및 전이를 증가시킨다는 것이 밝혀지기도 하였다 (David A Cheresh et al., Nature Medicine 2009, 15 (10): 1163).

보다 구체적으로, 인테그린$\alpha_v\beta_3$은 피부암에서 종양의 양성적인 방사선 성장을 악성적인 수직적 성장 단계로 변환시키며, 유방암과 전립선암에서 향상된 종양 세포 부착을 통해 뼈의 전이를 매개한다. 자궁경부암 환자에서 인테그린$\alpha_v\beta_3$의 발현은 질병의 진행과 짧은 생존 기간과 상관관계가 있으며, 췌장 관선암종 (pancreatic ductal adenocarcinoma)에서 인테그린$\alpha_v\beta_3$의 발현은 인간 종양의 약 58%에서 관찰되고 증가된 림프절 전이와 연관되어 있다.

이와 같이, 인테그린이 각종 암 세포에서 특이적으로 발현하며 암의 진행과 전이에 관여하므로, 인테그린을 암 또는 암전이의 진단 표지 및 치료 타겟으로 개발할 수 있다는 가능성이 제시되었다.

그 예로, Brooks 등(1994)에 의하면 암 조직 혈관 내피세포에서만 특이하게 발현된 인테그린 단백질이 신생혈관의 생화학적 표지로서 보고되었으며, Gasparini 등(1998)은 이를 유방암 조직에서 확인하였다. 최근에는 박테리오파아지를 이용한 펩타이드 라이브러리를 이용하여 각 기관 혹은 종양별 특이한 표지를 찾는 시도가 이루어지고 있는데, Pasqualini 등(1997)에 의하면 Arg-Gly-Asp (RGD) 펩타이드를 포함한 파아지가 인테그린에 특이하게 결합하는 것이 보고되었다. 이러한 RGD 펩타이드는 인테그린의 길항제로 개발되고 있다.

또한, 미국특허등록 제6,171,588호는 인테그린$\alpha_v\beta_3$에 특이적으로 결합하는 단클론항체를 종양 부위를 탐지 또는 치료하기 위한 용도로 제공하고 있으며, 미국특허공개 제20090263320호는 인테그린$\alpha_v\beta_3$에 특이적으로 결합하는 펩티드계화합물을 이용한 암 진단 제제를 제공하고 있다.

그러나, 인테그린을 특이적으로 인식하는 항체 또는 펩타이드의 경우 분자가 크기 때문에 제조에 어려움이 있고, 변형이 용이하지 못하며, 실온에서 보관이나 운반이 불가능하여 안정성이 낮은 문제가 있다. 또한 생체 내 투입시 면역거부반응이 일어날 수 있는 문제가 있다.

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

이에, 본 발명자들은 기존의 문제점들을 해결하고 인테그린$\alpha_v\beta_3$을 특이적으로 인식 및 결합하는 새로운 물질을 제공하기 위하여 연구한 결과, 인테그린$\alpha_v\beta_3$에 높은 친화력을 가지고 특이적으로 결합하는 DNA 기반의 압타머를 발굴하였다.

본 발명의 압타머는 기존 단백질 기반의 제제에 비하여 안정성과 민감도가 우수하며, 크기가 작아 제조가 용이하고, 화학적 합성방법으로 단시간에 적은 비용으로 생산이 가능하며, 결합력을 높이기 위해 다양한 변형이 용이한 장점이 있다.

또한, 본 발명의 압타머는 높은 안정성과 민감도로 인테그린$\alpha_v\beta_3$을 탐지하므로, 인테그린$\alpha_v\beta_3$과 관련된 모든 종류의 암 및 암 전이를 진단하는데 유용하게 사용될 수 있다. 실제로 본 발명자들은 신규 발굴한 압타머의 암세포 표적 지향성을 확인하고, 상기 압타머가 결합된 자성나노입자를 제조하여 MRI 로 암세포를 영상화하는데 성공하여 본 발명을 완성하였다.

【기술적 해결방법】

본 발명의 하나의 목적은 인테그린$\alpha_v\beta_3$에 특이적으로 결합하는 압타머를 제공하는 것이다.

본 발명의 또 하나의 목적은 상기 압타머를 유효성분으로 포함하는 암 또는 암 전이 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 하나의 목적은 상기 압타머를 이용한 암 또는 암 전이 진단 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 하나의 목적은 상기 압타머를 이용한 암 또는 암 전이를 진단하는 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 하나의 목적은 상기 압타머를 유효성분으로 포함하는 종양성 질환 부위의 영상화용 조성물을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 하나의 목적은 상기 압타머를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 종양성 질환 부위 영상화 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 하나의 목적은 상기 종양성 질환 부위의 영상화용 조성물을 포함하는 나노입자 조영제를 제공하는 것이다.

【유리한 효과】

본 발명은 인테그린$\alpha_v\beta_3$에 높은 결합력과 선택성을 가지는 압타머를 제공하며, 상기 압타머는 인테그린$\alpha_v\beta_3$와 관련된 모든 종류의 암 및 이로부터의 암전이 진단에 유용하게 사용될 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 적외선 스펙트럼을 통해 P80-triCOOH 의 제조 시 형성되는 에스터 (-COO-) 구조를 확인한 결과를 나타낸다.

도 2는 인테그린$\alpha_v\beta_3$ 압타머가 결합된 자성 나노입자를 제조하는 과정을 나타낸다.

도 3의 (a)는 제조된 인테그린$\alpha_v\beta_3$ 압타머가 결합된 자성나노입자의 크기를 동적 레이저 광 산란법을 사용하여 측정한 결과를 나타내고, (b)는 투과 전자 현미경을 통해 입자의 형태를 확인한 결과를 나타내고, (c)는 진동 시료 마그네토미터를 이용하여 초상자성을 확인한 결과를 나타내고, (d)는 열분석기를 통해 자성 나노입자의 함량을 측정한 결과를 나타낸다.

도 4의 (a)는 MR 영상 실험에 인테그린$\alpha_v\beta_3$ 압타머를 적용하였을 때 1.5T 에서 자성 나노입자의 농도가 증가함에 따라 현저히 어두운 MR contrast가 나타남을 확인한 결과이고, (b)는 농도가 증가함에 따라 $r2$ (T2 relaxvity coefficients)가 증가함을 확인한 결과를 나타낸다.

도 5는 인테그린$\alpha_v\beta_3$ 압타머가 결합된 자성 나노입자($Apt_{\alpha v\beta 3}$-MNPs)와 cRGD가 결합된 자성 나노입자 cRGD-MNPs)가 농도 조건에 따라 세럼이 포함된 버퍼 조건에서 안정성을 가짐을 확인한 결과를 나타낸다.

도 6은 인테그린$\alpha_v\beta_3$ 압타머가 결합된 자성 나노입자($Apt_{\alpha v\beta 3}$-MNPs)와 cRGD가 결합된 자성 나노입자 cRGD-MNPs) 모두 높은 농도에서도 세포 독성을 나타내지 않는다는 결과를 나타낸다.

도 7의 (a)는 PAE/KDR (인테그린$\alpha_v\beta_3$ 과발현, 실험군) 세포와 A431 (인테그린$\alpha_v\beta_3$ 저발현, 대조군) 세포에 각각 $Apt_{\alpha v\beta 3}$-MNPs 과 cRGD-MNPs 를 처리한 경우 시간에 따른 영상 대조 효과를 확인한 결과를 나타내며, (b) 는 도 7(a) 에서 측정된 영상 결과로부터 MR signal intensity (R2) 를 측정하여 물질을 처리하지 않은 (non-treat) 세포의 R2 값을 기준으로, 신호 증가율 그래프를 도시한 것이다.

도 8의 (a)는 암 동물 모델에 각각 $Apt_{\alpha v\beta 3}$-MNPs 과 cRGD-MNPs 를 주사한 후 암 조직에서 시간에 따른 영상 대조 효과를 확인한 결과를 나타내며, (b) 는 도 8(a) 에서 측정된 영상 결과로부터 MR signal intensity 를 그래프로 나타낸 것이다.

도 9은 암 동물 모델에 각각 $Apt_{\alpha v\beta 3}$-MNPs 과 cRGD-MNPs 를 주사하여 24시간 영상 확인 후, 각 동물에서 적출한 각 장기 내에 축적된 $Apt_{\alpha v\beta 3}$-MNPs 과 cRGD-MNPs 의 양을 플라스마-원자 방출 분광법을 통해 측정한 결과를 나타낸다.

【발명의 실시를 위한 최선의 형태】

본 발명은 인테그린 $\alpha_v\beta_3$에 특이적으로 결합하는 DNA 압타머, 이를 유효성분으로 포함하는 암 또는 암 전이 진단용 조성물, 이를 이용한 암 또는 암 전이 진단 방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 상기 압타머를 포함하는 종양성 질환 부위의 영상화용 조성물, 및 이를 포함하는 조영제를 제공한다.

하나의 양태로서, 본 발명은 인테그린$\alpha_v\beta_3$에 특이적으로 결합하는 압타머에 관한 것이다.

본 발명에서 상기 인테그린 $\alpha_v\beta_3$는 포유류, 바람직하게는 인간에서 유래하는 것일 수 있다.

본 발명의 압타머는 변형된 염기를 포함할 수 있으며, 변형된 염기를 포함하여 총 염기 길이가 25 내지 100개, 바람직하게는 30 내지 80개, 더욱 바람직하게는 35 내지 50개일 수 있고, 인테그린$\alpha_v\beta_3$에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 압타머에서 상기 변형된 염기 이외에 사용되는 염기는 특별한 언급이 없는 한, A, G, C, T, 및 이들의 deoxy 형태 (예컨대, 2'-deoxy 형태)의 염기들로 이루어진 군에서 선택된 것이다.

상기 변형된 염기는 dU(deoxyuracil)의 5-위치가 소수성 작용기로 치환되어 변형된 형태를 의미하는 것으로, 염기 'T'를 대체하는 것일 수 있다. 소수성 작용기는 벤질기, 나프틸기, 피롤벤질기, 트립토판 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 바람직하게는 벤질기이다. 이와 같이 dU 염기의 5-위치가 소수성 작용기로 치환되어 변형됨으로써, 변형되지 않은 경우와 비교하여 인테그린$\alpha_v\beta_3$와의 친화력(affinity)이 현저하게 높아지는 이점이 있다.

본 발명에서 압타머 내의 상기 변형된 염기 개수는 5 내지 20개, 바람직하게는 10 내지 17개일 수 있다.

구체예에서 상기 압타머는 서열번호 1 내지 서열번호 56 (염기서열 중 'n'은 변형된 염기 또는 'T'임)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 염기서열을 포함하여 총 염기 길이가 25 내지 100개, 바람직하게는 30 내지 80개, 더욱 바람직하게는 35 내지 50개인 것일 수 있다.

본 발명의 구체예에서, 상기 압타머는 상기 서열번호 1 내지 서열번호 56으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 염기서열로만 이루어지거나,

상기 염기서열 5' 말단, 3' 말단, 또는 양 말단에 3 내지 25개, 구체적으로 5 내지 20개의 염기로 이루어진 염기서열을 추가로 포함하여 총 길이가 30 내지 120개, 35 내지 100개, 또는 45 내지 90개의 염기인 것일 수 있다. 상기 5' 말단, 3' 말단 또는 양 말단에 추가로 포함되는 염기서열은 서열번호 57 내지 서열번호 60으로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다. 예컨대, 상기 압타머는 서열번호 1 내지 서열번호 56으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 염기서열의 5' 말단에 TCAGCCGCCAGCCAGTTC (서열번호 57)를 갖고 3' 말단에 GACCAGAGCACCACAGAG (서열번호 58)를 갖는 것, 또는 5' 말단에 AGTTC (서열번호 59)를 갖고 3' 말단에 GACCA (서열번호 60)를 갖는 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

한 구체예에서, 본 발명의 압타머는 다음의 서열번호 61 또는 서열번호 62의 염기서열을 갖는 것일 수 있다:

5'- TCAGCCGCCAGCCAGTTC-[N]-GACCAGAGCACCACAGAG-3'(서열번호 61)

5'- AGTTC-[N]- GACCA-3'(서열번호 62),

(상기 염기서열에서 N은 압타머의 가변 중심 서열로서, 25 내지 100개, 바람직하게는 30 내지 80개, 더욱 바람직하게는 35 내지 50개의 염기로 이루어지며, 각 염기는 A, C, G, T, 이들의 deoxy 형태, 및 dU(deoxyuracil)의 5-위치가 소수성 작용기(예컨대, 벤질기, 나프틸기, 피롤벤질기, 트립토판로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상)로 치환되어 변형된 염기로 이루어진 군에서 독립적으로 선택됨).

앞서 설명한 바와 같이, 상기 N은 서열번호 1 내지 서열번호 56 으로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다.

본 명세서 및 첨부된 염기서열에 기재된 염기 서열에서, 'n'은, 특별한 언급이 없는 한, 'T' 또는 dU(deoxyuracil)의 5-위치가 소수성 작용기로 치환되어 변형된 형태를 의미하며, 바람직하게는 dU(deoxyuracil)의 5-위치가 소수성 작용기로 치환되어 변형된 형태이다. 상기 소수성 작용기는 벤질기, 나프틸기, 피롤벤질기, 트립토판 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이며, 바람직하게는 벤질기이다.

또한, 상기 압타머는, 혈청 내 안정성 증진을 위하여, 5' 말단, 3' 말단, 또는 양 말단 모두가 변형되어 혈청 내 안정성이 증진된 것일 수 있다. 상기 변형은 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 콜레스테롤 등으로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상이 결합되어 변형된 것일 수 있다. 바람직한 구체예에서, 상기 압타머는 5' 말단에 PEG(polyethylene glycol; 예컨대, 분자량 500-50,000 Da)가 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 분자 중 하나로서, 핵산단위체는 앞 단위체의 3'-OH와 다음 단위체의 5'-0H와 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.

인테그린$\alpha_v\beta_3$은 다양한 고형암 및 암 전이 환자에게서 과발현이 관찰되므로, 본 발명의 압타머는 암 또는 암전이 진단용 조성물로서 사용 가능하다.

따라서, 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 인테그린$\alpha_v\beta_3$에 특이적으로 결합하는 인테그린$\alpha_v\beta_3$압타머를 유효성분으로 포함하는 암 또는 암 전이 진단용 조성물에 관한 것이다.

또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 인테그린$\alpha_v\beta_3$에 특이적으로 결합하는 인테그린$\alpha_v\beta_3$ 압타머를 이용한 암 또는 암 전이 진단 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

바람직하게, 본 발명에서 암 또는 암 전이 진단에 정보를 제공하는 방법은

환자의 생물학적 시료에 본 발명의 압타머를 반응시키는 단계, 및

상기 생물학적 시료에서의 압타머의 결합 정도를 측정하는 단계를 포함하고,

환자의 생물학적 시료에서의 압타머의 결합 정도가 정상 시료보다 높은 경우, 상기 환자를 암 환자로 판단하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다. 따라서, 상기 방법은 정상 시료에서의 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 의미한다.

상기 방법으로 진단에 정보를 제공할 수 있는 암 종류는 인테그린$\alpha_v\beta_3$과 관련된 모든 종류의 암일 수 있으며, 예컨대, 피부암, 전립선암, 유방암, 자궁경부암, 대장암, 폐암, 담낭암, 췌장암, 및 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, 예컨대, 피부암, 전립선암, 유방암, 자궁경부암, 대장암, 폐암, 담낭암, 췌장암, 및 위암 등으로 이루어진 군에서 선택된 암의 발생 및 상기 암의 전이가 없는 개체로부터 얻어진 생물학적 시료를 의미한다.

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

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

한 구체예에서, 상기 압타머 중 인테그린$\alpha_v\beta_3$과 결합부위가 상이하여 서로 결합에 방해하지 않는 한 쌍의 압타머를 선택하여, 하나는 기판에 고정시키고(capture aptamer), 다른 하나(detection aptamer)는 말단에 검출가능한 표지로 표지하여 그 세기를 측정함으로써, 시료 내 인테그린$\alpha_v\beta_3$ 존재 여부 또는 과발현 여부를 측정할 수 있다.

상기 검출가능한 표지는 형광 물질 또는 방사성 물질 표지 (또는 형광 물질 또는 방사성 물질과 반응 가능한 물질 결합)일 수 있고, 예를 들어, 발색효소(예: 퍼옥시다제, 알칼라인 포스파타제), 방사성 동위원소(예: ^{124}I, ^{125}I, ^{111}In, ^{99m}Tc, ^{32}P, ^{35}S), 크로모포어(chromophore), FITC, RITC, 형광단백질(GFP(Green Fluorescent Protein); EGFP(Enhanced Green Fluorescent Protein), RFP(Red Fluorescent Protein); DsRed(Discosoma sp. red fluorescent protein); CFP(Cyan Fluorescent Protein), CGFP(Cyan Green Fluorescent Protein), YFP(Yellow Fluorescent Protein), Cy3, Cy5 및 Cy7.5 등을 예시할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

이와 같이, 압타머를 사용하여 시료 내 인테그린$\alpha_v\beta_3$ 의 존재 여부 또는 과발현 여부를 확인하는 경우, 기존의 항체 또는 펩타이드를 이용한 검출보다 현저하게 우수한 민감도를 보인다.

아울러, 본 발명의 압타머는 인테그린$\alpha_v\beta_3$ 와 특이적으로 결합하므로 종양성 질환의 발병 부위의 영상화에도 유용하게 사용될 수 있다.

따라서, 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 압타머를 유효성분으로 포함하는 종양성 질환의 영상화용 조성물에 관한 것이다.

또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 압타머를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 종양성 질환의 영상화 방법에 관한 것이다.

종양성 질환의 영상화 및 진단은, 이에 한정되지는 않으나, 종양성 질환의 초진 목적 뿐만 아니라, 진행 경과, 종양 치료에 대한 치료 경과, 치료제에 대한 반응 모니터링 등을 포괄하여 사용할 수 있다. 상기 압타머는 결합 여부의 확인, 검출 및 정량을 용이하게 하기 위하여, 검출가능한 표지에 링크(예: 공유 결합 또는 가교)되어 제공될 수 있다.

바람직하게, 종양성 질환 부위 영상화를 위한 상기 검출가능한 표지는, 방사선 동위원소, 플루오로포어, 양자점(quantum dot), 또는 자성입자, 예를 들어 상자성입자(super paramagnetic particles) 또는 초상자성입자(ultrasuper paramagnetic particles) 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

바람직하게, 본 발명의 압타머를 나노입자에 결합하여 종양성 질환 부위의 영상화를 위한 나노입자 조영제 형태로 제공될 수 있다.

따라서, 또 하나의 양태로서 본 발명은 압타머를 함유하는 상기

종양성 질환 부위의 영상화용 조성물을 포함하는 나노입자 조영제에 관한 것이다. 이 때, 본 발명의 압타머는 인테그린$\alpha_v\beta_3$ 와 특이적으로 결합하여 종양성 질환 부위를 표적화하기 위한 표적지향 리간드(target ligand) 역할을 하여, 능동적 표적지향 방법에 의해 보다 빠르고 정확하게 종양 부위를 진단할 수 있다.

본 발명에서 용어, "조영제"란 기관, 진단을 목적으로 하여 혈관이나 조직 등이 보다 잘 보이도록 인위적으로 대조도의 차를 만들어 영상으로 나타내기 위해서 사용되는 제제를 말한다. 조영제는 연구 대상 표면의 가시도 및 대조도를 증가시킴으로써, 질환 또는 손상의 존재 여부 및 그 정도를 결정할 수 있다.

조영제로 사용되기 위해서는 생체 내에서 생체적합성 및 생분해성이 우수해야 하고, 생체 내의 안정성이 우수하여 혈액 내에서의 생체분포도가 높아서 충분한 시간 동안 암 조직에 계속적으로 축적되는 특성이 필요하다. 본 발명의 압타머가 결합된 나노입자 조영제는 암 조직 축척 효율이 매우 높으며, 생체에 독성이 없고 이상 소견을 나타내지 않는 안전한 물질임을 확인되었으므로, 조영제로 사용하기에 적합하다.

본 발명의 조영제가 적용될 수 있는 구현예로, 자기공명영상(magnetic resonance imaging, MRI), X-선 영상화 기술, 및 PET(positron emission tomography)를 비롯한 핵 영상화 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

자기공명영상(MRI)은 자기장 안에서 수소 원자의 스핀이 이완되는 현상을 이용해 신체의 해부학적, 생리학적, 생화학적 정보를 영상으로 얻는 영상 진단 기술을 말한다. 본 발명을 MRI를 위한 나노입자 조영제에 적용하는 경우, 당업계에서 널리 사용되는 상자성 나노입자 또는 초상자성 나노입자를 사용할 수 있다. 예를 들어, 상자성 입자의 경우 Gd, Fe, Mn 등의 전이금속이온을 사용할 수 있고, 초상자성 입자로는 초상자성 산화철(superparamagnetic iron oxide) 나노입자 등을 사용할 수 있다.

바람직한 일구현예로, 본 발명의 나노입자 조영제는, 자성 나노입자를 함유하는 코어에 양친매성 화합물을 부가하여 쉘을 형성시킨 구조일 수 있다. 이 때, 양친매성 화합물의 파이렌의 구조를 포함하는 소수성 영역은

파이-파이 결합의 화학적 결합에 의하여 나노입자의 표면과 결합할 수 있고, 양친매성 화합물의 친수성 영역은 나노입자의 최외곽에 분포하여 수불용성의 나노입자를 수용성 매질 중에서도 안정화시켜 생체 이용률을 극대화시킬 수 있다.

이러한 나노입자의 합성 방법으로는 공침법(coprecipotation), 열수합성법(hydrothermal synthesis), 마이크로유화법(microemulsion; oil-in-water 또는 water-in-oil), 열분해법(thermal decomposition) 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

상기 자성 나노입자는 직경이 1 내지 1000 nm, 보다 바람직하게는 2 내지 100 nm인 입자인 것이 바람직하며, 상기 직경을 갖는 금속, 자성 물질, 또는 자성 합금을 사용할 수 있다. 상기 금속은 특별히 제한하지는 않으나, Pt, Pd, Ag, Cu, 또는 Au 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다. 상기 자성 물질은 특별히 제한하지는 않으나, Co, Mn, Fe, Ni, Gd, Mo, MM'_2O_4, 또는 MxOy (M 및 M'는 각각 독립적으로 Co, Fe, Ni, Mn, Zn, Gd, 또는 Cr을 나타내고, x 및 y는 각각 식 "$0 < x \leq 3$" 및 "$0 < y \leq 5$"을 만족한다.) 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다. 상기 자성 합금은 특별히 제한하지는 않으나, CoCu, CoPt, FePt, CoSm, NiFe, 또는 NiFeCo 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다.

또한, 상기 자성 나노입자는 양친매성 화합물과의 결합을 안정화시키기 위하여 유기성 표면안정제와 결합될 수 있다. 자성 나노입자와 유기성 표면안정제의 결합은 자성 나노입자의 전구물질에 유기성 표면안정제가 배위하여 착화합물을 형성하여 이루어질 수 있다.

상기 유기성 표면안정제는 상기 나노입자의 상태와 크기를 안정화시킬 수 있는 유기 기능성 분자를 의미하며, 예를 들어 계면활성제를 들 수 있다. 상기 계면활성제는 알킬 트라이메틸암모늄 할라이드(alkyl trimethylammonium halide)를 포함하는 양이온 계면활성제, 올레산(oleic acid), 라우르산(lauric acid), 또는 도데실산(dodecylic acid)과 같은 포화 또는 불포화 지방산, 트리옥틸포스핀 옥사이드(trioctylphosphine oxide: TOPO), 트리옥틸포스핀(trioctylphosphine: TOP), 또는 트리부틸포스핀(tributylphosphine)과 같은 트리알킬포스핀 또는 트리알킬포스핀옥사이드, 올레익아민(oleic amine), 트리옥틸아민(trioctylamine),

또는 옥틸아민(octylamine)과 같은 알킬아민(alkyl amine), 또는 알킬티올(alkyl thiol)을 포함하는 중성 계면활성제, 및 소디움 알킬 설페이트(sodium alkyl sulfate), 또는 소디움 알킬 포스페이트(sodium alkyl phosphate)을 포함하는 음이온 계면활성제를 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

또한, 상기 양친매성 화합물은 매트릭스 내에 나노입자를 분포시키거나, 나노입자의 표면과 결합할 수 있고, 표적지향 리간드를 고분자의 일 말단에 화학적으로 결합시킬 수 있다.

양친매성 화합물의 소수성 영역은 파이렌 구조를 포함한 물질이 결합된 소수성 화합물을 포함할 수 있다. 상기 소수성 화합물은 포화 지방산, 불포화 지방산 또는 소수성 고분자 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다. 상기 포화 지방산은 특별히 제한되지 않으나, 부티르산, 카프로산, 카프릴산, 카프릭산, 라우르산(도데실산), 미리스트산, 팔미트산, 스테아르산, 에이코사노산, 또는 도코사노산 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다. 상기 불포화 지방산은 특별히 제한되지 않으나, 올레산, 리놀레산, 리놀렌산, 아라키돈산, 에이코사펜타노산, 도코사헥사노산, 또는 에르크산 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다. 상기 소수성 고분자는 특별히 제한되지 않으나, 폴리포스파젠, 폴리락티드, 폴리락티드-코-글리콜라이드, 폴리카프로락톤, 폴리안하이드라이드, 폴리말릭산 또는 그 유도체, 폴리알킬시아노아크릴레이트, 폴리하이드록시부틸레이트, 폴리카보네이트, 폴리오르소에스테르, 소수성 폴리 아미노산, 또는 소수성 비닐계열 고분자 등 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다. 상기 파이렌 구조를 포함하는 물질은 특별히 제한되지 않으나, 파이렌(pyrene), 파이렌부티릭산(Pyrenebutyric acid), 파이렌 메틸 아민(Pyrene methylamine), 아미노 파이렌(1-Aminopyrene), 파이렌 보로닉 산(Pyrene-1-boronic acid), 파이렌 구조를 포함하는 유기 분자 등을 단독 또는 2종 이상 사용 할 수 있다.

양친매성 화합물의 친수성 영역은 폴리알킬렌글리콜(PAG), 폴리에테르이미드(PEI), 폴리비닐피롤리돈(PVP), 친수성 폴리 아미노산(PAA), 친수성 비닐계 고분자, 친수성 아크릴계 고분자 또는 덱스트란(Dextran), 히알루론산(Hyauronic acid) 등의 다당류계 고분자 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다.

또한, 본 발명에 따른 자성 나노입자는 친수성 영역에 압타머를 도입하여 자성 나노입자에 표적지향성을 제공할 수 있다. 압타머는 5'- 및 3'-말단에 $-NH_2$, -SH, -COOH 등의 작용기가 있어 활성성분 결합영역의 작용기와 결합하는데 유용하게 이용될 수 있다. 또한, 나노입자의 표면에 카르복실산, 포스페이트, 설페이트, 아민기, 하이드록시기, 티올기 등의 기능기를 개질하여 압타머의 결합을 용이하게 할 수 있다.

본 발명의 영상화 조성물 또는 나노입자 조영제는 영상학적으로 허용 가능한 담체를 함께 사용할 수 있으며, 상기 영상학적으로 허용 가능한 담체는 의약 분야에서 통상 사용되는 담체 및 비히클을 포함하며, 구체적으로 이온 교환 수지, 알루미나, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질(예, 사람 혈청 알부민), 완충 물질(예, 각종 인산염, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 포화 식물성 지방산의 부분적인 글리세라이드 혼합물), 물, 염 또는 전해질(예, 프로타민 설페이트, 인산수소이나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨 및 아연 염), 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈계 기질, 폴리에틸렌글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌글리콜 또는 양모지 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 유화제, 현탁제, 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

암 전이는 암 관련 사망에 가장 주된 원인이다. 특히, 암 환자들 중에는 전이가 진행된 후에 진단되는 경우가 많고 수술 및 화학요법에도 불구하고 높은 재발률을 나타내기도 한다. 따라서, 암전이의 치료는 암 치료의 주요 목표이다. 새로운 기관의 미세환경에서 전이암이 성장하기 위해서, 암세포는 다양한 유형의 스트레스와 한계(rate-limiting steps)를 극복해야 한다. 인테그린$\alpha_v\beta_3$ 은 암세포에서 과도하게 발현하며 전이성 및 악성 종양으로의 진행을 촉진하는 것으로 알려져 있으므로, 암 또는 암전이의 진단과 치료를 위한 유력한 표적이 될 수 있다.

인테그린$\alpha_v\beta_3$ 에 대한 몇몇 항체들과 펩타이드들이 전이를 포함하는 인간 암의 치료 전략뿐 아니라 항암제- 또는 방사성동위원소-캐리어로서 제안되어 왔다. 그러나, 이들 단백질 기반의 제체는 낮은 친화성(uM range Kd)과 바람직하지 못한 약물동태학적 성질(예컨대, 종양 침투성이 낮고

신속하게 제거됨)을 갖기 때문에, 표적 운반에 적용되는데 한계가 있고, 따라서 개선된 약물동태학적 성질 및 혈청 안정성을 갖는 고친화성 분자의 개발이 중요해지고 있다.

반면, DNA 압타머는 화학적으로 합성 가능하고 생체내 적용을 위한 변형이 용이하고 종양조직으로의 침투능이 우수하기 때문에 암 표적화 분자로서 다양한 이점을 갖는다. 천연 올리고뉴클레오타이드는 뉴클리에이즈에 의한 가수분해에 민감하기 때문에, 본 발명자들은 뉴클리에이즈에 대한 저항성을 증가시키면서도 결합 친화도를 높이고 slow off-rate 감소시키기 위하여, dU(deoxyuracil)의 5-위치가 소수성 작용기인 벤질기로 변형된 뉴클레오타이드를 사용하여 SELEX를 수행하였다.

바람직하게, 본 발명의 압타머는 인테그린$\alpha_v\beta_3$-매개 전이의 진단 또는 분자 수준 영상화에 유용할 수 있다.

본 발명의 구체적인 실시예에서는, MR 조영제로 사용할 목적으로 본 발명의 압타머가 결합된 자성 나노입자를 제조하였고 (실시예 2), 상기 자성 나노입자가 암세포에 대해 표적지향성을 가진다는 것을 확인하고, 나아가 상기 자성 나노입자를 암 동물모델에 투여하여 MR 영상을 확인하였을 때 자성 나노입자가 암 조직 내에 축적되어 효과적으로 암조직을 영상화한다는 것을 확인하였다 (실시예 3). 또한, 생체내 안전성 평가를 통하여 상기 압타머가 생체에 독성이 없고 이상 소견을 나타내지 않는 안전한 물질임을 확인하였다 (실시예 3).

또한, 인테그린$\alpha_v\beta_3$에 대한 표적지향성이 이미 잘 알려져 있는 cyclo (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys) (cRGD) 펩타이드가 결합된 자성 나노입자를 사용한 경우와 비교하였을 때, 동물 모델에서 c-RGD가 결합된 자성 나노입자의 경우 1시간이 지난 후 영상 대조도가 감소하였음에 반하여 본 발명의 압타머가 결합된 자성 나노입자의 경우 24시간까지 지속적인 영상 대조 효과를 나타내었으며, 신호 강도도 더 강하게 나타났고, 암 조직에 보다 많은 양이 축적된 것으로 확인되었다 (도 8 및 도 9). 따라서, 본 발명의 DNA 압타머가 기존 제제인 cRGD 펩타이드보다도 더 우수한 암 표적지향성 영상화 효과를 나타냄을 알 수 있다.

따라서, 본 발명의 압타머는 인 비트로 및 인 비조에서 암 환자의

전이 가능성 및 암 예후를 측정하는데 유용하게 사용될 수 있다.

단백질 기반의 기존 제제와 비교하여, 본 발명의 DNA 압타머는 보다 신속한 종양 흡수(uptake), 보다 신속한 혈액 제거 및 보다 지속적인 종양 정체 (tumor retention)을 나타냄으로써, 보다 높은 혈액에 대한 종양 비율로 현저한 이미지화가 가능하게 한다. 따라서, 본 발명의 압타머는, 특히 종양이 전이된 생체 미세 환경에서 인테그린$\alpha_v\beta_3$발현 암 세포의 생체 내 이미지화에 유용하게 사용될 수 있다.

【발명의 실시를 위한 형태】

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 인테그린$\alpha_v\beta_3$ 압타머의 발굴

1.1: 변형핵산 라이브러리 합성

SELEX에 필요한 single strand modified DNA library를 제조하기 위하여, 5' 말단에 Biotin이 결합된 antisense library [5'-Biotin-d(CTC TGT GGT GCT CTG GTC-(N x 40)-GAA CTG GCT GGC GGC TGA -3'; (서열번호 64)]를 합성하였다.

이와 같이 합성된 antisense를 가지고 20μM 5' primer(TCA GCC GCC AGC CAG TTC; 서열번호 65)와, 0.5mM dNTP(ATP, GTP, CTP, BzdUTP), 0.25U/ul KOD XL(KOD XL DNA polymerase, Novagen), 10X extension buffer(1.2M Tris-HCl pH7.8, 100mM KCl, 60mM $(NH_4)_2SO_4$, 70mM $MgSO_4$, 1% Triton X-100, 1mg/ml BSA) 상에서 70℃에서 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 library는 Amicon ultra-15(Millipore)를 이용하여 농축한 뒤 UV spectrophotometer로 정량하였다.

1.2: SELEX 방법으로 인테그린$\alpha_v\beta_3$에 대한 압타머 발굴

인테그린$\alpha_v\beta_3$ (R&D systems,3050-AV)에 결합하는 DNA aptamer를 선별하기 위하여 SELEX 기법을 이용하였다.

(1) 인테그린$\alpha_v\beta_3$ 태깅(tagging):

Non-tag protein 인 **인테그린$\alpha_v\beta_3$**에 EZ-Link NHS-PEG4-Biotin(Thermo scientific)을 사용하여 biotinylation 후 SELEX 사용에 맞게 분주해두었다.

(2) 인테그린$\alpha_v\beta_3$ 와의 결합:

먼저 상기 합성된 Library 1nmole을 selection buffer(200mM HEPES, 510mM NaCl, 25mM KCl, 25mM $MgCl_2$)에 넣고 95℃, 70℃, 48℃, 37℃에서 각각 5분간 반응시킨 후, Negative selection을 위하여 10X protein competition buffer(10μM prothrombin, 10μM casein, 0.1%(w/v) HSA (human serum albumin, SIGMA) 10μL를 혼합한 뒤, 상층액이 제거된 Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1(SA bead)(50%(v/v) slurry, 10mg/ml Invitrogen)에 첨가하여 37℃에서 10분간 반응 시켰다.

Negative selection반응 후, 상층 액만을 취하여 새로운 tube에 옮긴 후, biotinylation 된 인테그린$\alpha_v\beta_3$와 결합시킨 Dynal MyOne SA beads에 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다. Selection buffer(200mM HEPES, 510mM NaCl, 25mM KCl, 25mM $MgCl_2$) 100μL로 DNA와 인테그린$\alpha_v\beta_3$ 복합체와 결합한 Dynal MyOne SA beads를 5번 세척하였다. 5번째 세척시에는 새로운 plate에 옮겨 세척하였다. 2mM NaOH 용액 85μL를 첨가하여 표적에 결합하는 library를 elution한 뒤 8mM HCl 용액 20μL로 neutralization하였다.

(3) 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(TCA GCC GCC AGC CAG TTC; 서열번호 65)와 3' primer(Biotin-CTC TGT GGT GCT CTG GTC; 서열번호 66) 각각 5uM (5 X QPCR master Mix, Novagen), 0.075U/ul KOD(Novagen), 1mM dNTP(Roche Applied science), 25mM $MgCl_2$, 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.

(4) 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(인테그린$\alpha_v\beta_3$) 복합체를 10mM $DxSO_4$(sigma)용액에 1/200, 1/400로 희석하여 DNA aptamer를 선별하였다.

(5) Pool binding assay:

인테그린$\alpha_v\beta_3$와 SELEX round가 진행된 DNA pool의 결합력을 알아보기 위하여 filter binding assay을 수행하였다. 먼저 수행된 6 round와 8 round의 pool을 α-P^{32}ATP(Perkin Elmer)와 TdT(Terminal deoxynucleotidyl transferase, NEB)로 말단에 표지 하였다. 상기 SELEX 과정을 통하여 얻어진 library DNA 1μM, 0.25μL α-P^{32}ATP(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.

표지된 DNA pool 20,000cpm을 100μL 1xSB buffer(200mM HEPES, 510mM NaCl, 25mM KCl, 25mM $MgCl_2$)에 넣고 95℃에서부터 1초에 0.1℃씩 37℃까지 천천히 냉각시켰다. 그리고, buffer (200mM HEPES, 510mM NaCl, 25mM KCl, 25mM $MgCl_2$)를 이용하여 인테그린$\alpha_v\beta_3$ (R&D systems, 3050-AV)을 100nM에서 12 point로 serial dilution한 뒤, 상기 가열 및 냉각시킨 DNA pool 30μL를 각각 첨가하여 37℃에서 30분간 반응시켰다. Nylon membrane(GE healthcare)에 DNA와 인테그린$\alpha_v\beta_3$의 혼합물을 각각 2μL씩 spotting 한 뒤 zorbax resin(Agilent) 5.5μL를 첨가하였다. 그리고 미리 1X SB buffer(200mM HEPES, 510mM NaCl, 25mM KCl, 25mM $MgCl_2$) 50μL로 적셔놓은 Durapore filter(Millipore)에 넣고 vacuum을 걸어주었다. 그리고 membrane filter를 100μL의 1X selection buffer(200mM HEPES, 510mM NaCl, 25mM KCl, 25mM $MgCl_2$)로 씻어주었다. Filter plate를 image plate에 overnight expose한 뒤 FLA-5100(Fuji)으로 image를 정량화 하였다.

상기 얻어진 인테그린$\alpha_v\beta_3$와 SELEX round를 거친 DNA pool간의 결합

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 B_{max}는 input 대비 결합한 압타머의 비율을 나타낸 것이고, K_d(dissociation constant)는 친화력을 나타낸다.

【표 1】

	library	pool binding
B_{max}	3.23E-11	0.45
K_d(nM)	6500.86	43.3

상기 표 중, library는 사용된 벤질기 변형핵산 무작위 염기서열을 갖는 DNA이고, pool binding 은 특정한 library를 이용한 앞서 기재된 SELEX 단계 중 8 Round 후 얻어지는 ssDNA Pool을 의미한다.

(6) 인테그린$\alpha_v\beta_3$ 압타머 염기서열 분석:

8번의 SELEX round를 거친 후 결합 친화력이 가장 높은 8 Round ssDNA Pool을 위에 언급한 QPCR 방법으로 double strand DNA로 증폭한 뒤 TA cloning kit(SolGent)를 이용하여 cloning하였다. 그리고 vector상에 존재하는 M13 primer(CAGGAAACAGCTATGAC; 서열번호 67)을 가지고 sequencing하여 다음과 같은 sequence를 얻었다.

얻어진 인테그린$\alpha_v\beta_3$에 매우 특이적으로 결합하는 DNA aptamer는

5'- TCAGCCGCCAGCCAGTTC-[Core sequence]-GACCAGAGCACCACAGAG-3' (서열번호 61)

의 염기서열을 가지며, 여기서 Core Sequence는 아래의 표 2에 나타낸 바와 같고, 이 중에서 5은 benzyl-dU를 나타낸다.

【표 2】

#	**Description (클론 번호)**	**Core sequence**
#1	S003-A4-001-T7_A01	5CGGAGGC555ACA5CGG5AACCGAGAC55AGGAC5G55G (서열번호 1)
#2	S003-A4-002-T7_B01	5C5CA55C55ACACAAGGCCAGA5AAAG5G5AGCAAAG55 (서열번호 2)
#3	S003-A4-003-T7_C01	5AG55G5ACA55C5GAG555AGAGCAAA5AA5AG

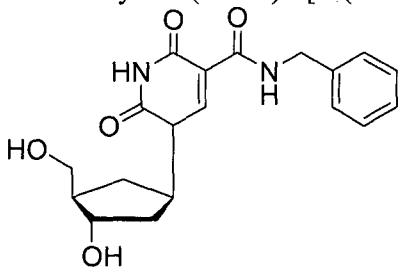
		AG5CCA (서열번호 3)
#4	S003-A4-004-T7_D01	5AC5AAACACGCAGAC5GAAA5555ACA5CGG5AACAG5C (서열번호 4)
#5	S003-A4-005-T7_E01	5555AA5C55C5C5G5CAGA5GGC5GG5AGGG5G5A5GAC (서열번호 5)
#6	S003-A4-006-T7_F01	CGAGGGAG55A5GGAGA55G5G55G555AAGG5CGGAAC5 (서열번호 6)
#7	S003-A4-007-T7_G01	CGAGGGAG55A5GGGGA55G5G55G555AAGG5CGGAAC5 (서열번호 7)
#8	S003-A4-008-T7_H01	5555AA5C55C5C5G5CAGA5GGC5GG5AGGG5G5A5GAC (서열번호 8)
#9	S003-A4-009-T7_A02	AG55GCCAA555GCAGCC5AGGA5ACG5555CGAAAC5GCA (서열번호 9)
#10	S003-A4-010-T7_B02	CCG5CAGCGCGG55CGAAGG5ACAA5555AGA5CGC5AAG (서열번호 10)
#11	S003-A4-011-T7_C02	5555AA5C55C5C5G5CAGA5GGC5GG5AGGG5G5A5GAC (서열번호 11)
#12	S003-A4-012-T7_D02	AG55GCCAA555GCAGCC5AGGA5ACG5555CGAAAC5GCA (서열번호 12)
#13	S003-A4-013-T7_E02	5555AA5C55C5C5G5CAGA5GGC5GG5AGGG5G5A5GAC (서열번호 13)
#14	S003-A4-014-T7_F02	5555AA5C55C5C5G5CAGA5GGC5GG5AGGG5G5A55AC (서열번호 14)
#15	S003-A4-015-T7_G02	ACG5AAAGGAGACGGA5555GACCCG5G5A5AC5CGACGC (서열번호 15)
#16	S003-A4-016-T7_H02	GA555CGGAA5AAGGCC55A5GAACCA5GAGCC5G5C5C (서열번호 16)
#17	S003-A4-017-T7_A03	5G5GA5A5G5C55G55AAGC55C5GA5GA5GCAGGGC5GG (서열번호 17)
#18	S003-A4-018-T7_B03	5C5CC55C55ACCCCG5G5AGCAAAGA55CAGC5

		GAGGAG (서열번호 18)
#19	S003-A4-019-T7_C03	5AA5AAGCCAC5CGGCG5CAC5G5AG5A5G555A5C5A5C (서열번호 19)
#20	S003-A4-020-T7_D03	AGCG5GAGACAGG5G5GAGGAGGCAA5555ACA5AGG5AA (서열번호 20)
#21	S003-A4-021-T7_E03	CGAGGGAG55A5GGAGA55G5G55G555AAGG5CGGAAC5 (서열번호 21)
#22	S003-A4-022-T7_F03	AG55GCCAA555GCAGCC5AGGA5ACG5555CGAAAC5GCA (서열번호 22)
#23	S003-A4-023-T7_G03	AG55GCCAA555GCAGCC5AGGA5ACG5555CGAAAC5GCA (서열번호 23)
#24	S003-A4-024-T7_H03	CGAGGGAG55A5GGAGA55G5G55G555AAGG5CGGAAC5 (서열번호 24)
#25	S003-A4-025-T7_A04	G5555AAGAAA55AGCACACCG55GAC55G555AG5GGCG (서열번호 25)
#26	S003-A4-026-T7_B04	G5555AAGAAA55AGCACA5CG55GAC55G555AG5GGCG (서열번호 26)
#27	S003-A4-027-T7_C04	AGG5CAC5A5GA5555GACCCG5G555GC5CGACGCG5AA (서열번호 27)
#28	S003-A4-028-T7_D04	AGG5CAC5A5GA5555GACCCG5G555AC5CGACGCGCAA (서열번호 28)
#29	S003-A4-029-T7_E04	5G5GA5A5G5C55G55AAGC55C5GA5GA5ACCGGGC5GG (서열번호 29)
#30	S003-A4-030-T7_F04	G5555AAGAAA55AGCACACCG55GAC55G555AG5GGCG (서열번호 30)
#31	S003-A4-031-T7_G04	5555AA5C55C5C5G5CAGA5GGC5GG5AGGG5G5A5GAA (서열번호 31)
#32	S003-A4-032-T7_H04	55CAGACCAA55A5GG5AA555C5CAAA5C5GAG5G5CA5 (서열번호 32)
#33	S003-A4-033-T7_A05	5CG5A5555GACCCG5G5A5CC5CGA5GCGG55A

		GCAGCA (서열번호 33)
#34	S003-A4-034-T7_B05	5AA5AAGCCAC5CGGCG5CAC5G5AG5A5G555A5C5A5C (서열번호 34)
#35	S003-A4-035-T7_C05	G5555AAGAAA55AGCACACCG55GAC55G555AG5GGCG (서열번호 35)
#36	S003-A4-036-T7_D05	G5555AAGAAA55AGCACACCG55GAC55G555AG5GGCG (서열번호 36)
#37	S003-A4-037-T7_E05	CGAGGGAG55A5G5AGA55G5G55G555AAGG5C5GAAC5 (서열번호 37)
#38	S003-A4-038-T7_F05	5C5CA55C55ACACAAGGCCAGAGAAAG5G5AGCAAAG55 (서열번호 38)
#39	S003-A4-039-T7_G05	GAC5555ACA5CGG5AAAGAAC5CAGA5A5GCACAAG55A (서열번호 39)
#40	S003-A4-040-T7_H05	5CGAGCCA5GG5CGAGCCCCA5555ACA5CGG5AAGGGC5 (서열번호 40)
#41	S003-A4-041-T7_A06	G5555AAGAAA55AGCACACCG55GAC55G555AG5GGCG (서열번호 41)
#42	S003-A4-042-T7_B06	5G5GA5A5G5C55G55AAGC55C5GA5GA5GCAGGGC5GG (서열번호 42)
#43	S003-A4-043-T7_C06	CGAGGGAG55A5GGAGA55G5G55G555AAGG5CGGAAC5 (서열번호 43)
#44	S003-A4-044-T7_D06	AGC5AACGACA5555ACA5CGG5AAG5CAAACC5CAGCAC5 (서열번호 44)
#45	S003-A4-045-T7_E06	5AA5C5GG5AG555AAGCACA55G5GA55GCACGCGGA5G555GA5 (서열번호 45)
#46	S003-A4-046-T7_F06	GA555CGGAA5AAGGCC55A5GAACCA5GAGCC5G5C5C (서열번호 46)
#47	S003-A4-047-T7_G06	AG55GCCAA555GCAGCC5AGGA5ACG5555CGAAAC5GCA (서열번호 47)
#48	S003-A4-048-T7_H06	5C5GGCAAC5555ACA5CGG5AAGCC5A55GAGC

		GCGAC5 (서열번호 48)
#49	S003-A4-049-T7_A07	5555AA5C55C5C5G5CAGA5GGC5GG5AGGG5G5G5GAC (서열번호 49)
#50	S003-A4-050-T7_B07	CGAGGGAG55A5GGAGA55G5G55G555AAGG5CGGAAC5 (서열번호 50)
#51	S003-A4-051-T7_C07	5A55GGGAGG5GGGGGCCA555ACA5AGG5AACAGCCAC5 (서열번호 51)
#52	S003-A4-052-T7_D07	5555AA5C55C5C5G5CAGA5GGC5GG5AGGG5G5A5GAC (서열번호 52)
#53	S003-A4-053-T7_E07	AG55G5CAA555GCAGCC5A5GA5ACG5555CGAAAC5GCA (서열번호 53)
#54	S003-A4-054-T7_F07	CGAACGGAA5GGA5CAG5CC5GGGCAA5555ACA5AGG5AA (서열번호 54)
#55	S003-A4-055-T7_G07	CGAGGGAG55A5GGAGA55G5G55G555AAGG5CGGAAC5 (서열번호 55)
#56	S003-A4-056-T7_H07	AGGC5AGCGGGACAG5A555GAACCG5G5A5CC5CGACGC (서열번호 56)

5 = Benzyl-dU(BzdU) : [5-(N-Benzylaminocarbonylamide)-2'-deoxyuridine]



A = 2'-deoxyAdenosine

G = 2'-deoxyGuanosine

C = 2'-deoxyCytidine

T = 2'-deoxyThymidine(Thymidine)

상기 발굴된 인테그린$\alpha_v\beta_3$ 압타머들을 다음과 같이 유사 family로 분류하였다(서열 상동성은 염기서열의 85% 상동성을 기준으로 함):

【표 3】

69.64.00% (39/56) Multi-Copy				
#	Description	개수	(%)	core seq.
[11]	**S003-A4-011-T7_C02**	8	14.29	5555AA5C55C5C5G5CAGA5GGC5GG5AGGG5G5A5GAC (서열번호 11) [5, 8, 11, 13, 14, 31, 49, 52]
[12]	**S003-A4-012-T7_D02**	6	10.72	AG55GCCAA555GCAGCC5AGGA5ACG5555CGAAAC5GCA (서열번호 12) [9, 12, 22, 23, 47, 53]
[16]	**S003-A4-016-T7_H02**	2	3.57	GA555CGGAA5AAGGCC55A5GAACCA5GAGCC5G5C5C (서열번호 16) [16, 46]
[17]	**S003-A4-017-T7_A03**	3	5.36	5G5GA5A5G5C55G55AAGC55C5GA5GA5GCAGGGC5GG (서열번호 17) [17, 29, 42]
[19]	**S003-A4-019-T7_C03**	2	3.57	5AA5AAGCCAC5CGGCG5CAC5G5AG5A5G555A5C5A5C (서열번호 19) [19, 34]
[2]	**S003-A4-002-T7_B01**	2	3.57	5C5CA55C55ACACAAGGCCAGA5AAAG5G5AGCAAAG55 (서열번호 2) [2, 38]
[21]	**S003-A4-021-T7_E03**	8	14.29	CGAGGGAG55A5GGAGA55G5G55G555AAGG5CGGAAC5 (서열번호 21) [6, 7, 21, 24, 37, 43, 50, 55]
[25]	**S003-A4-025-T7_A04**	6	10.71	G5555AAGAAA55AGCACACCG55GAC55G555AG5GGCG (서열번호 25) [25, 26, 30, 35, 36, 41]

[27]	**S003-A4-027-T7_C04**	2	3.57	AGG5CAC5A5GA5555GACCCG5G555GC5CGACGCG5AA (서열번호 27) [27, 28]

#11 clone의 경우 56개의 sequence중 8번의 같은 염기서열이 반복되어 나타났다. 그리고 #21도 8번, #12, #25는 6번, #17은 3번, #2, #16, #19, #27은 2번의 반복되는 염기서열이 나타났다.

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

57.144% (32/56) Families

[44] S003-A4-044-T7_D06 Count: 1 0.02%

AGCTAACGA**CATTTTACATCGGTAAG**TCAAACCTCAGCACT

****

_____**TTTACATCGGTAA**_____ **Pattern_6** X 6 times

_____**ATTTTACAT**_____ **Pattern_7** X 5 times

_____**ACATAGGTAA**_____ **Pattern_8** X 9 times

_____**TTTTACATCGGTAA**_____ **Pattern_13** X 5 times

_____**ACTTTTACATCGGTAA**_____ **Pattern_14** X 5 times

_____**CATTTTACATCGGTAAG**_____ **Pattern_15** X 3 times

Score: 33

[40] S003-A4-040-T7_H05 Count: 1 0.02%

TCGAGCCATGGTCGAGCCC**CATTTTACATCGGTAAG**GGCT

****

_____**TTTACATCGGTAA**_____ **Pattern_6** X 6 times

_____**ATTTTACAT**_____ **Pattern_7** X 5 times

_____**ACATAGGTAA**_____ **Pattern_8** X 9 times

_____**TTTTACATCGGTAA**_____ **Pattern_13** X 5 times

_____**ACTTTTACATCGGTAA**_____ **Pattern_14** X 5 times

_____**CATTTTACATCGGTAAG**____ **Pattern_15** X 3 times

Score: 33

[4] S003-A4-004-T7_D01 Count: 1 0.02%

TACTAAACACGCAGACTGA**AATTTTACATCGGTAACAG**TC

****

_____**TTTACATCGGTAA**_____ **Pattern_6** X 6 times

_____**ATTTTACAT**_____ **Pattern_7** X 5 times

_____**ACATAGGTAA**_____ **Pattern_8** X 9 times

_____**TTTTACATCGGTAA**_____ **Pattern_13** X 5 times

_____**ACTTTTACATCGGTAA**_____ **Pattern_14** X 5 times

_____**GGTAACAG**__ **Pattern_16** X 3 times

Score: 33

[48] S003-A4-048-T7_H06 Count: 1 0.02%

TCTGGCA**ACTTTTACATCGGTAAG**CCTATTGAGCGCGACT

****

_____**TTTACATCGGTAA**_____ **Pattern_6** X 6 times

_____**ACATAGGTAA**_____ **Pattern_8** X 9 times

_____**TTTTACATCGGTAA**_____ **Pattern_13** X 5 times

_____**ACTTTTACATCGGTAA**_____ **Pattern_14** X 5 times

_____**CATTTTACATCGGTAAG**_____ **Pattern_15** X 3 times

Score: 28

[39] S003-A4-039-T7_G05 Count: 1 0.02%

GA**CTTTTACATCGGTAA**AGAACTCAGATATGCACAAGTTA

****

___**TTTACATCGGTAA**_____ **Pattern_6** X 6 times

_____**ACATAGGTAA**_____ **Pattern_8** X 9 times

__**TTTTACATCGGTAA**_____ **Pattern_13** X 5 times

_**ACTTTTACATCGGTAA**_____ **Pattern_14** X 5 times

Score: 25

[54] S003-A4-054-T7_F07 Count: 1 0.02%

CGAACGGAATGGATCAGTCCTG**GGCAATTTTACATAGGTAA**

****

_____**CAATTTTA**_____ **Pattern_1** X 3 times

_____**ATTTTACAT**_____ **Pattern_7** X 5 times

_____**ACATAGGTAA Pattern_8** X 9 times

_____**GGCAATTTTACATAGGTAA Pattern_9** X 2 times

Score: 19

[20] S003-A4-020-T7_D03 Count: 1 0.02%

AGCGTGAGACAGGTGTGAGGA**GGCAATTTTACATAGGTAA**

****

_____**CAATTTTA**_____ **Pattern_1** X 3 times

_____**ATTTTACAT**_____ **Pattern_7** X 5 times

_____**ACATAGGTAA Pattern_8** X 9 times

_____**GGCAATTTTACATAGGTAA Pattern_9** X 2 times

Score: 19

[1] S003-A4-001-T7_A01 Count: 1 0.02%

TCGGAGGC**TTTACATCGGTAACCG**AGACTTAGGACTGTTG

****

_____**TTTACATCGGTAA**_____ **Pattern_6** X 6 times

_____**ACATAGGTAA**_____ **Pattern_8** X 9 times

_____**GGTAACAG**_____ **Pattern_16** X 3 times

Score: 18

[15] S003-A4-015-T7_G02 Count: 1 0.02%

ACGTAAAGGAGACG**GATTTTGACCCGTGTATACTCGACGC**

****

_____**CCCGTGTA**_____ **Pattern_2** X 3 times

_____**GATTTTGACCCGTGT**_____ **Pattern_3** X 3 times

_____**ATTTTGACCCGTGTAT**_____ **Pattern_4** X 2 times

_____**CTCGACGC Pattern_11** X 4 times

_____**CCGTGTATCCTCGA**___ **Pattern_12** X 3 times

Score: 15

[25] S003-A4-025-T7_A04 Count: 60.11%

GTTTTAAGAAATTAGCACACCGTTGAC**TTGTTTA**GTGGCG

****

_____**TTGTTTA**_____ **Pattern_10** X 14 times

Score: 14

[21] S003-A4-021-T7_E03 Count: 80.14%

CGAGGGAGTTATGGAGATTGTG**TTGTTTA**AGGTCGGAACT

****

_____**TTGTTTA**_____ **Pattern_10** X 14 times

Score: 14

[51] S003-A4-051-T7_C07 Count: 1 0.02%

TATTGGGAGGTGGGGGCCATTT**ACATAGGTAACAG**CCACT

****

_____**ACATAGGTAA**_____ **Pattern_8** X 9 times

_____**GGTAACAG**____ **Pattern_16** X 3 times

Score: 12

[33] S003-A4-033-T7_A05 Count: 1 0.02%

TCGT**ATTTTGACCCGTGTATCCTCGA**TGCGGTTAGCAGCA

****

_____**CCCGTGTA**_____ **Pattern_2** X 3 times

____**ATTTTGACCCGTGTAT**_____ **Pattern_4** X 2 times

_____**CCGTGTATCCTCGA**_____ **Pattern_12** X 3 times

Score: 8

[56] S003-A4-056-T7_H07 Count: 1 0.02%

AGGCTAGCGGGACAGTATTTGAA**CCGTGTATCCTCGACGC**

****

_____**CTCGACGC Pattern_11** X 4 times

_____**CCGTGTATCCTCGA**___ **Pattern_12** X 3 times

Score: 7

[27] S003-A4-027-T7_C04 Count: 20.04%

AGGTCACTAT**GATTTTGACCCGTGT**TTG**CTCGACGC**GTAA

*************** ********

_____**GATTTTGACCCGTGT**_____ **Pattern_3** X 3 times

_____**CTCGACGC**____ **Pattern_11** X 4 times

Score: 7

[18] S003-A4-018-T7_B03 Count: 1 0.02%

TCTCC**TTCTTACCCCGTGTA**GCAAAGATTCAGCTGAGGAG

****

_____**CCCGTGTA**_____ **Pattern_2** X 3 times

_____**TTCTTAC**_____ **Pattern_5** X 3 times

Score: 6

[10] S003-A4-010-T7_B02 Count: 1 0.02%

CCGTCAGCGCGGTTCGAAGGTA**CAATTTTA**GATCGCTAAG

****

_____**CAATTTTA**_____ **Pattern_1** X 3 times

Score: 3

[2] S003-A4-002-T7_B01 Count: 20.04%

TCTCA**TTCTTAC**ACAAGGCCAGATAAAGTGTAGCAAAGTT

****

_____**TTCTTAC**_____ **Pattern_5** X 3 times

Score: 3

5.36% (3/56) Orphans

[3] S003-A4-003-T7_C01 1 0.02%

TAGTTGTACATTCTGAGTTTAGAGCAAATAATAGAGTCCA

[32] S003-A4-032-T7_H04 1 0.02%

TTCAGACCAATTATGGTAATTTCTCAAATCTGAGTGTCAT

[45] S003-A4-045-T7_E06 1 0.02%

TAATCTGGTAGTTTAAGCACATTGTGATTGCACGCGGATGTTTGAT

(7) Clone binding assay:

반복적으로 관찰된 염기서열을 갖는 clone의 결합 친화력을 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 B_{max}는 input 대비 결합한 압타머의 양을 나타낸 것으로, 1에 가까울수록 좋은 성능을 의미하는 것이고, K_d(dissociation constant)는 친화력을 나타내는 수치로 수치가 낮을수록 결합력이 높음을 나타낸다.

【표 4】

	#11	#12	#21	#25	8R Pool	Bz library
B_{max}	0.56	0.69	0.88	0.82	0.45	3.23E-11
K_d(nM)	38.02	23.22	58.95	17.57	43.3	6500.86

총 5종류의 clone을 가지고 assay하였고 이들 중 하나는 K_d를 얻을 수 없었고 #25 clone(S003-A4-025-T7_A04)의 K_d가 17.57nM로 표적 단백질에 가장 높은 친화력을 나타내는 결과를 보였다.

(8) Full length 압타머로부터 truncation을 통한 최적의 압타머 서열 결정:

SELEX 과정을 통하여 cloning된 DNA 압타머는 sequence가 80mer 전후의 길이를 가지는데, 이 정도의 길이가 타겟 단백질과의 해리상수(K_d)가 적합한 범위인 것으로 선별되었다. 이 중 가장 좋게 평가되는 클론인 #25 Clone(2100-25-))을 가지고 프라이머 영역을 일부 포함한

5'-AGTTC-[Core sequence]- GACCA-3'(서열번호 62)

의 염기서열을 가지는 50mer의 압타머 2100-25-02를 합성하였다 (표 5

참조). 표 5에서 염기서열 내에 5는 benzyl-dU를 나타낸다.

【표 5】

Sequence ID	서열	샘플명	계산된 분자량 (Da)	관찰된 분자량 (Da)
HO-2100-25-2	AGTTCG5555AAG AAA55AGCACACC G55GAC55G555AG 5GGCGGACCA (서열번호 63)	$Intigrin_{aVb3}$ 50mer	17097.65	17099.53

(9) 인테그린$\alpha_v\beta_3$ 압타머 합성:

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

(10) 인테그린$\alpha_v\beta_3$ 압타머 합성 분리/정제/동정 및 QC:

상기 변형 핵산체를 가지는 발굴된 압타머들을 oligonucleotide 합성기(Bioautomation, Mermade12)를 이용하여 solide phase □-cyanoethyl phosphoramidite chemistry로 합성하였으며, 합성 후 CPG(200nmole synthesis column, 1000A(MM1-1000-))를 cleavage 용액[t-butylamine:methanol:water(1:1:2 부피비)]에 넣고 70℃에서 5시간 동안 cleavage/deprotection 후 진공 건조를 시킨 다음, HPLC(GE, AKTA basic)를 이용하여 분리/정제하였다. 사용한 column은 RP-C18 column (Waters, Xbridge OST C18 10x50mm)이고 UV 254 nm/290nm,flow rate: 5ml/min, 온도:65℃의 조건으로 0.1M TEAB/Acetonitrile Buffer를 이용하였다. 이들 압타머들은 모두 LC-ESI MS spectrometer(Waters HPLC systems(Waters) + Qtrap2000(ABI))로 0.02% 오차범위 내에서 정확한 분자량을 측정하였으며 HPLC를 이용한 순도측정에서 80-90%를 얻을 수 있었다.

<실시예 2> 인테그린$\alpha_v\beta_3$ 압타머가 결합된 자성나노입자의 제조

2.1: 열분해 화학반응을 이용한 고민감도 자성 나노크리스탈의 제조

7nm의 마그네틱 나노크리스탈 (magnetic nano-crystals, MNCs) 는 각각 0.6몰의 도데실산, 도데실 아민을 215℃의 벤질에테르 용매에서 철

트리아세틸아세토네이트과 망가네즈 트리아세틸아세토네이트 (Aldrich)를 2 시간 동안 가열하고, 315℃에서 1시간 동안 열분해 화학반응(thermal decomposition)하여 합성하였다.

상기 7nm의 MNCs (10 mg/ml) 및 도데실산(0.2몰), 도데실 아민 (0.1몰), 철 트리아세틸아세토네이트과 망가네즈 트리아세틸아세토네이트 포함하는 벤질에테르 용액을 115℃에서 30분, 215℃에서 2시간, 315℃에서 1시간 가열하여 12nm 의 MNCs 을 제조하였다.

2.2: 친수성 부분에 인테그린$\alpha_v\beta_3$ 압타머를 결합시킬 수 있는 작용기가 결합된 양친매성 화합물의 중합

5g 의 폴리옥시에틸렌 솔비탄 모노올레이트 (Polyoxyethylene sorbitan monooleate, Polysrobate 80), 1.5g 의 숙시닉 안하이드라이드 (succinic anhydride, SA), 1.8g 의 4-다이메틸아미노피리딘 (4-dimetlaminopridine, DMAP), 1.5g 의 트리에틸아민 (triethylamine, TEA) 을 120mL 의 1,4-다이옥센 (1,4-Dioxane) 용매에 첨가하여 48 시간 동안 마그네틱바 (magnetic bar) 를 이용하여 교반시킨다. 반응 종료 후 1,4-다이옥센을 동결건조를 통해 제거하고, 용매가 제거된 생성물은 사염화탄소 (CCl_4) 에 분산시킨 후 필터링을 통해 잔류하는 반응물을 제거한다. 필터링된 용액은 에틸에스터 (ethyl ether) 를 통해 침전시키고, 침전물을 건조하여 인테그린$\alpha_v\beta_3$ 압타머 ($Aptamer_{\alpha v\beta 3}$, $Apt_{\alpha v\beta 3}$) 가 결합할 수 있는 작용기 (COOH) 를 가지면서 동시에 양친매성을 나타내는 화합물 (tri-carboxylated polysorbate 80, P80-triCOOH) 을 얻는다. 적외선 스펙트럼을 통해 P80-triCOOH 의 제조 시 형성되는 에스터 (-COO-) 구조를 확인한 결과를 도 1 에 나타내었다.

2.3: 인테그린$\alpha_v\beta_3$ 압타머를 결합 시킬 수 있는 양친매성 화합물로 코팅된 자성 나노입자의 제조

오일상인 10mL 의 헥산 (n-hexane)에 용해된 실시예 2.1 에서 제조한 MNCs 10mg 과 수용상에 용해된 실시예 2.2 에서 제조한 P80-triCOOH 100mg 를 혼합시킨 후 이 혼합물을 450W 의 초음파에 의해 10분 동안 포화시킨다. 상이 에멀젼을 12시간 동안 상온에서 교반하여 오일상을 증발 시키고 원심분리 필터 (centrifugal filter, Centriprep YM-3, 3 kDa NMWL) 를 사용하여 원심분리 (RPM: 18,000) 후 과량의 P80-triCOOHH 가 제거된 압타머 결합

가능 양친매성 화합물로 코팅된 자성 나노입자 (magnetic nano-particles, MNPs)를 제조하였다.

2.4: 암 및 암전이 진단이 가능한 인테그린$\alpha_v\beta_3$ 압타머가 결합된 자성나노입자의 제조

인테그린$\alpha_v\beta_3$ 압타머 (Aptamer$_{\alpha v\beta 3}$, Apt$_{\alpha v\beta 3}$) 가 결합된 자성나노입자 (aptamer$_{\alpha v\beta 3}$-conjugated magnetic nano-particles, Apt$_{\alpha v\beta 3}$-MNPs) 를 제조하기 위해 상기 실시예 2.3 에서 제조된 MNPs 표면의 작용기 (COOH) 에 Apt$_{\alpha v\beta 3}$ 를 결합하여 시키는 과정을 도 2 에 나타내었다. 2.5mL 의 포스페이트 버퍼 용액 (phosphate buffer solution, 10mM, pH7.4) 에 상기 실시예 2.3 에서 제조된 MNPs 와 38.2 μmol 의 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC), 38.2 μmol 의 sulfo-n-hydroxysuccinimide (sulfo-NHS), 0.2 mg (11.5 nmol) 의 Apt$_{\alpha v\beta 3}$ 를 용해 시킨 후 4℃ 에서 4시간 동안 반응시켰다. 4시간 뒤, 이 혼합물서 Centrifugal filter (Amicon Ultra) 를 이용하여 결합하지 않은 Apt$_{\alpha v\beta 3}$ 를 분리하였다.

동적 레이저 광 산란법을 사용하여 Apt$_{\alpha v\beta 3}$-MNPs 의 크기를 측정하고, 투과 전자 현미경을 통해 입자의 형태를 확인하였으며, 진동 시료 마그네토미터 (vibration sample magnetometer, VSM) 을 이용하여 초상자성을 확인한 후, 열분석기 (thermogravimetric analyzer, TGA) 를 통해 자성 나노크리스탈의 함량을 측정, 이를 도 3a, 3b, 3c, 3d 에 도시하였다.

<실시예 3> 인테그린$\alpha_v\beta_3$ 압타머가 결합된 자성나노입자를 이용한 동물 모델에서의 암세포 영상화

3.1: 인테그린$\alpha_v\beta_3$ 압타머가 결합된 자성나노입자의 MR 조영 효과 분석

제조된 인테그린$\alpha_v\beta_3$ 압타머가 결합된 자성나노입자 (Apt$_{\alpha v\beta 3}$-MNPs) 의 MRI 조영제로서의 활용 가능성을 확인하기 위하여 $r2$ (T2 relaxvity coefficients)의 측정을 통해 자성 나노복합체의 MR 조영 효과를 조사하였다. 구체적으로, MR 영상 시험은, Micro-47 surface coil을 갖는 1.5 T clinical MRI instrument(Intera, Philips Medical System)를 사용하여 수행하였다. 자성 나노복합체의 $r2$ (unit of $mM^{-1}s^{-1}$)값은 실온에서 CPMG(Carr-Purcell-Meiboom-Gill) 시퀀스(sequence)를 사용하여 측정하였다(TR

= 10s, 32 echoes with 12 ms even echo space, number of acquisitions = 1, point resolution of 156 × 156 ㎛, section thickness of 0.6 mm).

도 4a 에 나타난 바와 같이, 1.5T에서, $Apt_{\alpha v\beta 3}$-MNPs 농도가 증가하면서 현저히 어두운 MR contrast를 제공하였고, 또한 도 4b 에서 농도가 증가함에 따라 *r*2가 명백히 증가하였다. 따라서, MR 영상 프로브(MR imaging probe)로서의 $Apt_{\alpha v\beta 3}$-MNPs 는 분자 영상(molecular imaging)용으로 충분한 자기적 특성을 보유하고 있음을 확인할 수 있었다.

3.2: 인테그린$\alpha_v\beta_3$ 압타머가 결합된 자성나노입자의 안정성 평가

제조된 인테그린$\alpha_v\beta_3$ 압타머가 결합된 자성나노입자 ($Apt_{\alpha v\beta 3}$-MNPs)와의 안정성 평가를 위하여 다양한 농도별로 세럼이 포함된 조건에 분산시킨 후, 입자의 크기를 측정하였다. 이미 잘 알려져 있는 펩타이드인 cyclo (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys) (cRGD) 가 결합 되어있는 MNPs (cRGD-MNPs) 에 대한 세포 친화도 시험도 동시에 수행하였다.

도 5에 나타난 바와 같이, 농도 조건이 변하여도 입자 크기는 변함이 없음을 확인 하여, 세포 내 조건에서도 입자가 안정성을 가질 수 있음을 확인 하였다.

3.3: 인테그린$\alpha_v\beta_3$ 압타머가 결합된 자성나노입자의 세포 친화도 확인

상기 실시예 3.1 에서 제조된 인테그린$\alpha_v\beta_3$ 압타머가 결합된 자성나노입자 ($Apt_{\alpha v\beta 3}$-MNPs) 의 세포 친화도 시험을 실시하였고, 안정성의 비교를 위해 인테그린$\alpha_v\beta_3$에 대한 표적지향성이 이미 잘 알려져 있는 펩타이드인 cyclo (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys) (cRGD) 가 결합되어있는 MNPs (cRGD-MNPs) 에 대한 세포 친화도 시험도 동시에 수행하였다. 96-웰에 세포 (PAE/KDR) 를 웰당 1×10^4개를 분주하여, 5% 의 소태아혈청 (fetal bovine serum, FBS) 과 1% 의 항생물질 (antibiotics) 를 함유하는 MEM culture medium 에서 37℃, 5% 이산화탄소 조건에서 배양하였다. 그 후 다양한 농도의 $Apt_{\alpha v\beta 3}$-MNPs 와 cRGD-MNPs 를 세포에 처리한 후 24 시간 동안 추가 배양하였다.

$Apt_{\alpha v\beta 3}$-MNPs 와 cRGD-MNPs 의 세포 독성은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay 를 사용하여 세포 성장 저해 정도를 측정하였다. 도 6 에 나타난 바와 같이

$Apt_{\alpha v\beta 3}$-MNPs 와 cRGD-MNPs 모두 높은 농도에서도 세포 독성을 나타내지 않음을 확인하였다.

3.4: 인테그린$\alpha_v\beta_3$ 압타머가 결합된 자성나노입자의 표적지향성 확인

상기 실시예 2.4 에서 제조된 인테그린$\alpha_v\beta_3$ 압타머가 결합된 자성나노입자 ($Apt_{\alpha v\beta 3}$-MNPs) 의 인테그린$\alpha_v\beta_3$에 대한 표적지향성을 확인하고 이를 cRGD-MNPs 의 표적지향성과 비교하였다.

PAE/KDR (인테그린$\alpha_v\beta_3$ 과발현, 실험군) 세포와 A431 (인테그린$\alpha_v\beta_3$ 저발현, 대조군) 세포를 각각 1.0×10^7 개씩 채취하여 입자의 non-specific 결합을 줄이기 위해 blocking buffer (0.2% FBS and 0.02% NaN3 in phosphate-buffered solution, pH 7.4, 10 mM) 를 통해서 3회 세척한다. 그 후, $Apt_{\alpha v\beta 3}$-MNPs 과 cRGD-MNPs 를 각각 처리하여 4℃ 에서 2 시간 동안 배양한 후, 세척을 통해 세포에 담지 되지 않은 $Apt_{\alpha v\beta 3}$-MNPs 과 cRGD-MNPs 를 제거한다.

도 7a 에서 나타난 바와 같이, 실험군 세포에서 $Apt_{\alpha v\beta 3}$-MNPs 과 cRGD-MNPs 는 모두 표적지향성을 나타내어 어두운 대조 효과를 나타내었으나, 같은 농도로 물질을 처리하였을 경우 $Apt_{\alpha v\beta 3}$-MNPs 가 더 높은 표적지향성을 나타내어 cRGD-MNPs 의 영상보다 더 어두운 대조 효과를 나타내는 것을 확인하였다. 대조군 세포에서는 낮은 $Integrin_{\square v\square 3}$ 발현율로 인해 $Apt_{\alpha v\beta 3}$-MNPs 과 cRGD-MNPs 모두 대조효과를 보이지 않았다. 도 7b 에서는 도 7a 에서 측정된 영상결과로부터 MR signal intensity (R2) 를 측정하여 물질을 처리하지 않은 (non-treat) 세포의 R2 값을 기준으로, 신호 증가율 그래프를 도시하였으며 이는 도 7a 의 영상 결과와 같은 경향성을 나타낸다.

상기 결과를 통해, 효과적으로 $Apt_{\alpha v\beta 3}$-MNPs 가 표적지향됨을 확인할 수 있었고, cRGD-MNPs 보다 높은 표적지향성을 나타냄을 확인하였다.

3.5: 인테그린$\alpha_v\beta_3$ 압타머가 결합된 자성나노입자를 이용한 동물 모델에서의 암세포 영상화

상기 실시예 2.4 에서 제조된 인테그린$\alpha_v\beta_3$ 압타머가 결합된 자성나노입자 ($Apt_{\alpha v\beta 3}$-MNPs) 의 암세포에 대한 표적지향성과 암세포내의 분포를 측정하기 위해 1.0×10^7 개의 A431 세포를 4-5 주령의 수컷

BALB/C-Slc nude mouse 에 이식하여 제조한 동물 모델을 바탕으로, in vivo MR 영상을 위해서 3T clinical MRI 장비 및 micro-47 surface coil (Intera; Philips Medical Systems, Best, The Netherlands) 를 사용하였고, T2 강조 영상을 얻기 위해 다음의 parameter 를 사용하였다: resolution of 234 ×234 mm, section thickness of 2.0 mm, TE = 60 ms, TR = 4000 ms, number of acquisitions = 1.

200 μg 의 Fe+Mn 이온 농도의 $Apt_{\alpha v\beta 3}$-MNPs 와 cRGD-MNPs 를 tail vein 에 주사하기 전 (pre-injection; Pre) 과 주사한 직후 (immediately; Imm), 1시간, 3시간 24시간의 MR 영상을 측정하였다.

도 8a 에서 나타난 바와 같이 $Apt_{\alpha v\beta 3}$-MNPs 를 주사한 결과 암세포 조직에서 형성된 신생혈관이 매우 어두운 영상 대조를 보여주었고 color mapping 을 통해 더욱 뚜렷하게 영상 대조가 나타남을 확인하였다. 또한 영상 대조 효과가 시간이 흐름에 따라 더욱 높아져 24시간의 MR 영상에서 가장 어두운 대조도가 나타남을 확인하였다. 이를 통해 $Apt_{\alpha v\beta 3}$-MNPs 가 암 조직의 신생혈관에서 발현되는 인테그린$\alpha_v\beta_3$ 을 표적지향할 수 있고, 암 조직 내에 축적되어 효과적으로 암 조직을 영상화 있음을 확인하였다.

도 8a 에서 나타난 바와 같이 cRGD-MNPs 를 주사한 결과 $Apt_{\alpha v\beta 3}$-MNPs 와 같이 암세포 조직에서 영상 대조 효과가 나타나는 것을 알 수 있으나, $Apt_{\alpha v\beta 3}$-MNPs 를 주사한 경우 24시간 까지 지속적으로 영상 대조 효과가 증가하는 반면, cRGD-MNPs 를 주사한 경우 1시간이 지난 후 영상의 대조도가 감소하는 것을 확인하였다. 이를 통해 cRGD-MNPs 가 $Apt_{\alpha v\beta 3}$-MNPs 에 비해 인테그린$\alpha_v\beta_3$ 에 대한 표적지향성이 낮음을 확인하였다.

도 8b 에서는 도 8a 의 영상 결과로부터 측정한 암 조직의 MR signal intensity ($\triangle R2/R2_{Pre}$; $\triangle R2 = R2 - R2_{Pre}$) 를 그래프로 표현하였다. 영상 결과에서 나타난 바와 같이 $Apt_{\alpha v\beta 3}$-MNPs 를 주사한 경우 signal intensity 가 24시간 까지 지속적으로 증가하여 최대 ~33.7% 증가하는 반면 cRGD-MNPs 를 주사한 경우 signal intensity 는 1시간 에서 최대 ~30.0% 는 나타낸 후 시간이 흐름에 따라 감소함을 확인하였다.

$Apt_{\alpha v\beta 3}$-MNPs 와 cRGD-MNPs 을 주사하여 24시간 영상 확인 후, 각각의 mouse 는 희생하여 암 조직과 간, 뇌, 신장, 비장을 적출하고, 각

장기 내에 축적된 $Apt_{\alpha v\beta 3}$-MNPs 와 cRGD-MNPs 의 양을 유도결합 플라스마-원자 방출 분광법 (ICP-AES) 을 통해 측정하였다. 각 장기의 상대적 MNCs (Fe + Mn) 농도 ($\triangle C/C_{saline}$; $\triangle C = C - C_{saline}$) 를 도 9 에서 도시하였다.

도 9 에 나타난 바와 같이 암 조직에 축적된 $Apt_{\alpha v\beta 3}$-MNPs (129 ± 34.3%) 는 cRGD-MNPs (17.6 ± 15.4 %) 보다 매우 높은 값을 나타냄을 확인하였고, 이는 $Apt_{\alpha v\beta 3}$-MNPs 이 암 조직에 발현된 인테그린$\alpha_v\beta_3$ 를 더욱 효과적으로 표적 지향함을 확인하였다.

【청구의 범위】

【청구항 1】

인테그린$\alpha_v\beta_3$ 에 특이적으로 결합 하고, dU(deoxyuracil)의 5-위치가 나프틸기, 벤질기, 피롤벤질기, 및 트립토판으로 이루어진 군에서 선택된 소수성 작용기로 치환되어 있는 변형된 염기를 5 내지 20개 포함하고, 총 염기 길이가 25 내지 100개인 압타머.

【청구항 2】

제1항에 있어서,

상기 압타머는 서열번호 1 내지 서열번호 56 으로 이루어진 군에서 선택된 염기서열을 포함하고, 총 염기 길이가 25 내지 100개인 압타머.

【청구항 3】

제2항에 있어서,

상기 서열번호 1 내지 서열번호 56 으로 이루어진 군에서 선택된 염기서열의 5' 말단, 3' 말단, 또는 양 말단에 각각 3 내지 25개의 염기로 이루어진 염기서열을 추가로 포함하고, 총 염기길이가 30 내지 120개인 압타머.

【청구항 4】

제3항에 있어서, 상기 5' 말단, 3' 말단 또는 양 말단에 추가로 포함되는 염기서열은 서열번호 57 내지 서열번호 60으로 이루어진 군에서 선택된 것인 압타머.

【청구항 5】

제 4 항에 있어서,

다음의 서열번호 61 또는 서열번호 62 의 염기서열을 가지는 압타머:

5'- TCAGCCGCCAGCCAGTTC-[N]-GACCAGAGCACCACAGAG-3'(서열번호 61)

5'- AGTTC-[N]- GACCA-3'(서열번호 62),

상기 염기서열에서 'N'은 서열번호 1 내지 서열번호 56 으로 이루어진 군에서 선택된 염기서열로 이루어지며, 각 염기는 A, C, G, T, 이들의 deoxy 형태, 및 dU(deoxyuracil)의 5-위치가 벤질기로 치환되어 변형된 염기로 이루어진 군에서 독립적으로 선택됨.

【청구항 6】

제5항에 있어서, 서열번호 63의 염기서열을 가지는 압타머.

【청구항 7】

제2항에 있어서,

상기 압타머는 5' 말단, 3' 말단, 또는 양 말단에 각각 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 결합되어 변형된 것을 특징으로 하는 압타머.

【청구항 8】

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 압타머를 유효성분으로 포함하는,

암 또는 암 전이 진단용 조성물.

【청구항 9】

제8항에 있어서,

상기 암은 피부암, 전립선암, 유방암, 자궁경부암, 대장암, 폐암, 담낭암, 췌장암, 및 위암으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인,

암 또는 암 전이 진단용 조성물.

【청구항 10】

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 압타머를 유효성분으로 포함하는,

종양성 질환 부위의 영상화용 조성물.

【청구항 11】

제10항에 있어서, 방사선 동위원소, 플루오로포어, 양자점(quantum dot), 상자성입자(super paramagnetic particles) 또는 초상자성입자(ultrasuper paramagnetic particles) 를 더 포함하는 것인 조성물.

【청구항 12】

제10항의 종양성 질환 부위의 영상화용 조성물을 포함하는 나노입자 조영제.

【청구항 13】

환자의 생물학적 시료에 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 압타머를

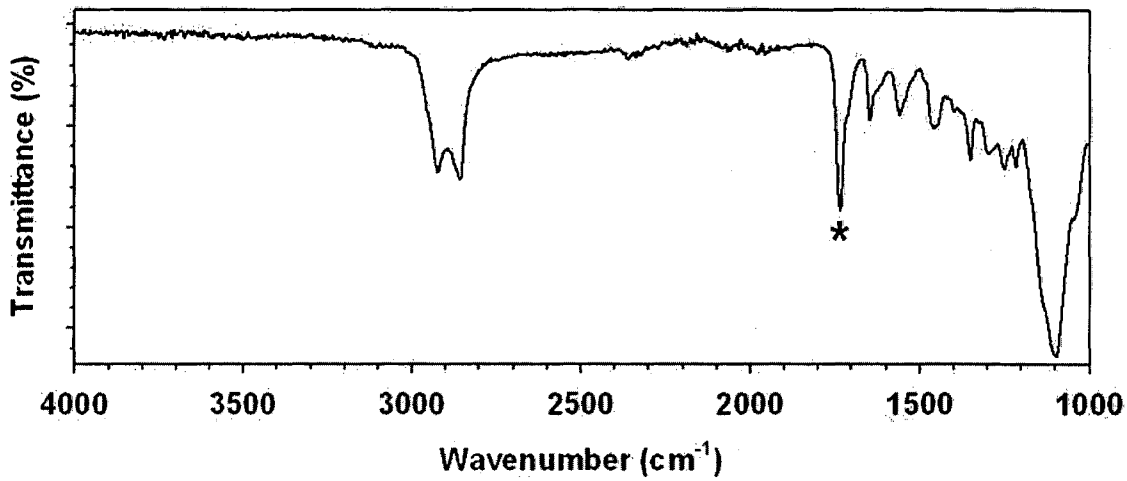
반응시키는 단계, 및 상기 생물학적 시료에서의 압타머의 결합 정도를 측정하는 단계를 포함하고,

환자의 생물학적 시료에서의 압타머의 결합 정도가 정상 시료보다 높은 경우, 상기 환자를 암 환자로 판단하는 것을 특징으로 하는,

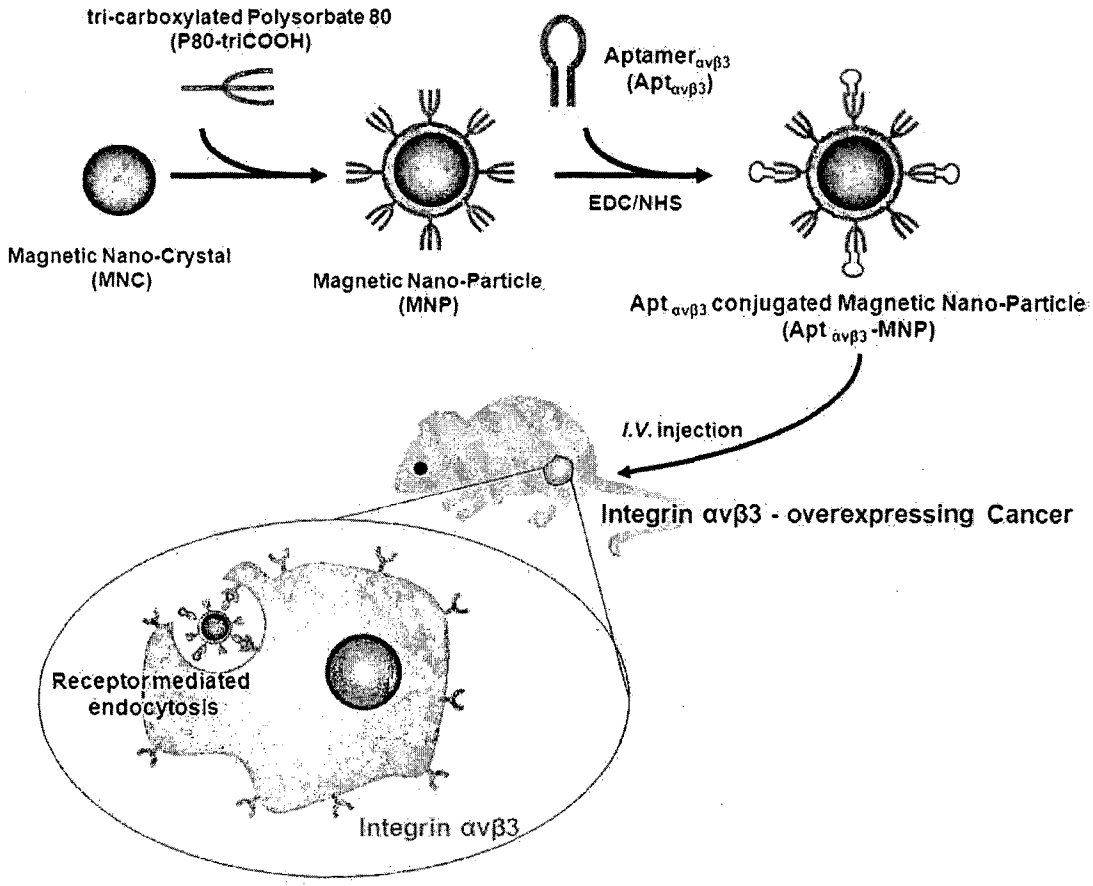
암 또는 암 전이 진단 정보를 제공하는 방법.

【도면】

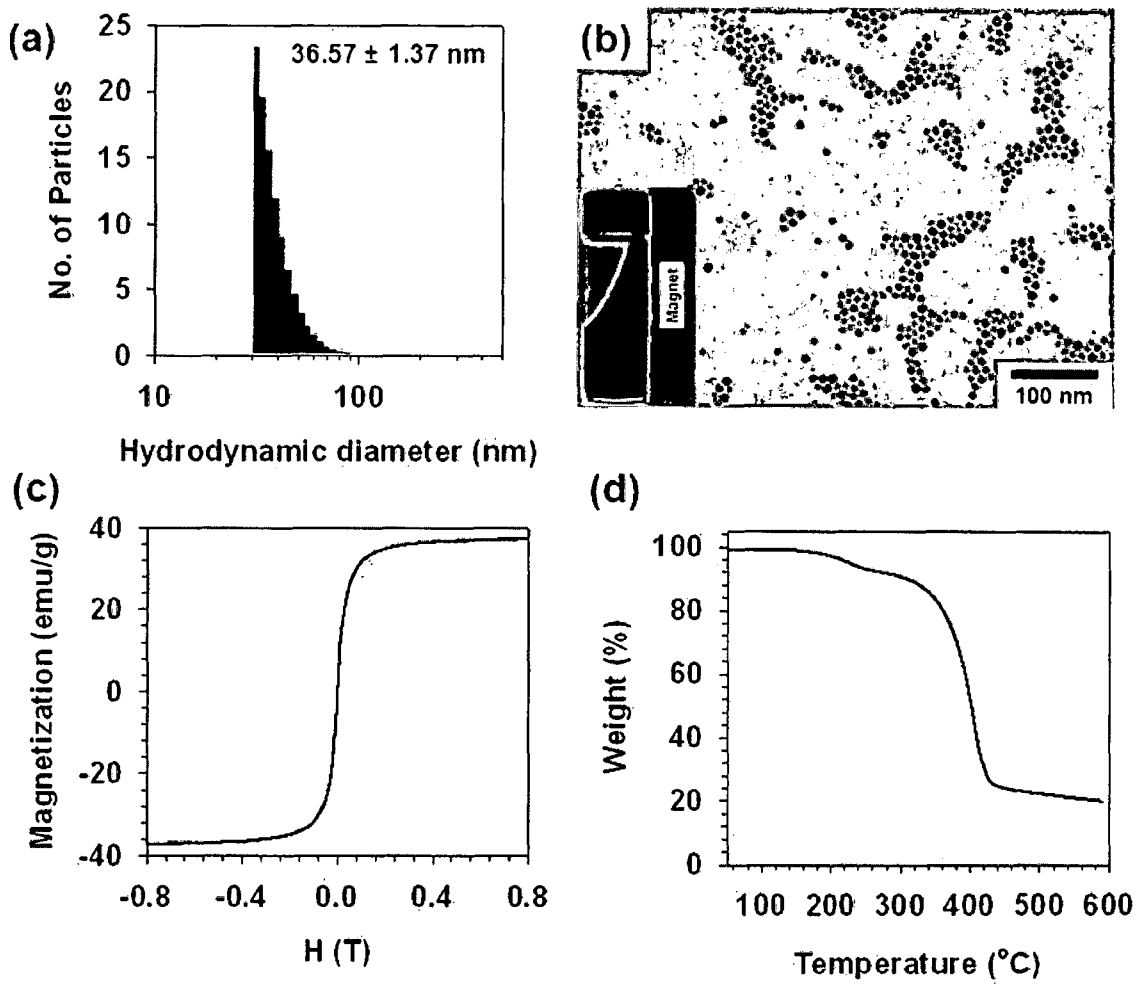
【도 1】


Transmittance (%)
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
Wavenumber (cm-1)
*

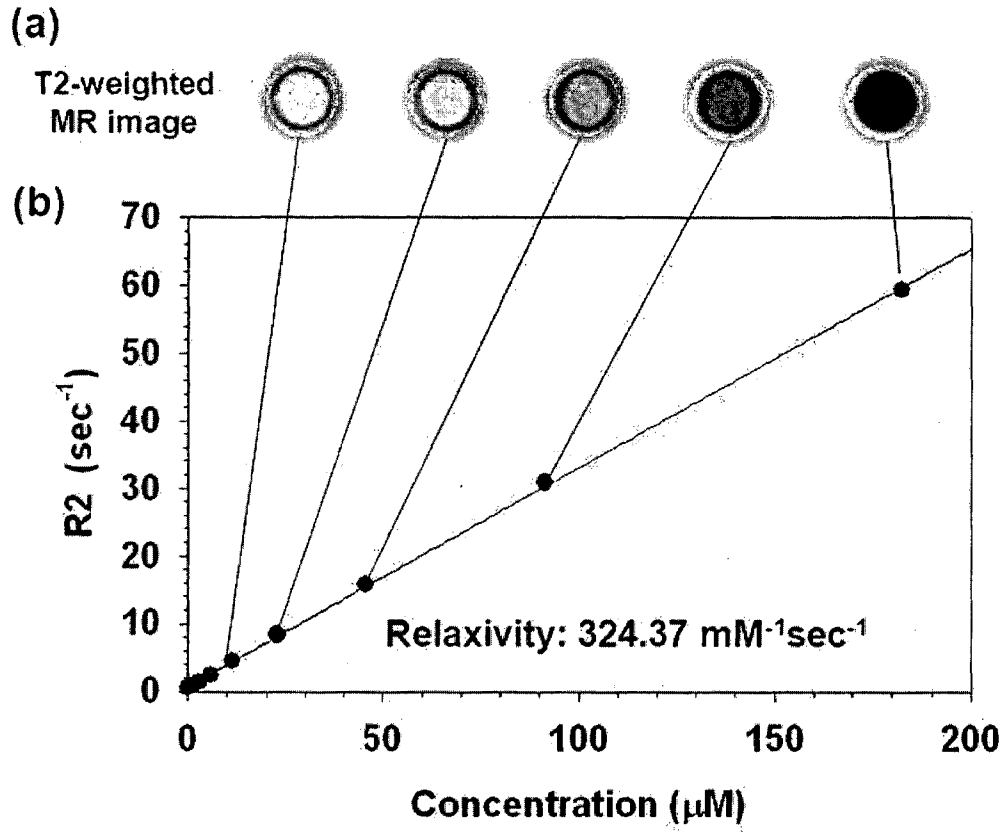
【도 2】


tri-carboxylated Polysorbate 80
(P80-triCOOH)
Aptamer$_{\alpha v\beta 3}$
(Apt$_{\alpha v\beta 3}$)
Magnetic Nano-Crystal
(MNC)
Magnetic Nano-Particle
(MNP)
EDC/NHS
Apt $_{\alpha v\beta 3}$ conjugated Magnetic Nano-Particle
(Apt $_{\alpha v\beta 3}$ -MNP)
I.V. injection
Integrin αvβ3 - overexpressing Cancer
Receptor mediated
endocytosis
Integrin αvβ3

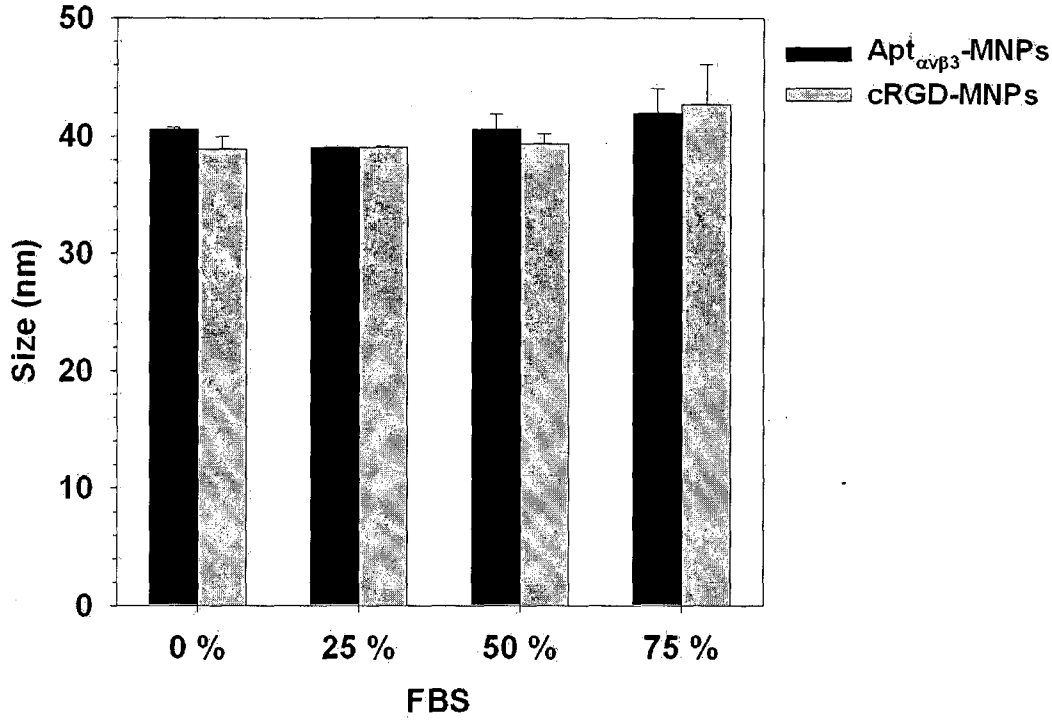
【도 3】


(a)
36.57 ± 1.37 nm
No. of Particles
Hydrodynamic diameter (nm)
(b)
Magnet
100 nm
(c)
Magnetization (emu/g)
H (T)
(d)
Weight (%)
Temperature (°C)

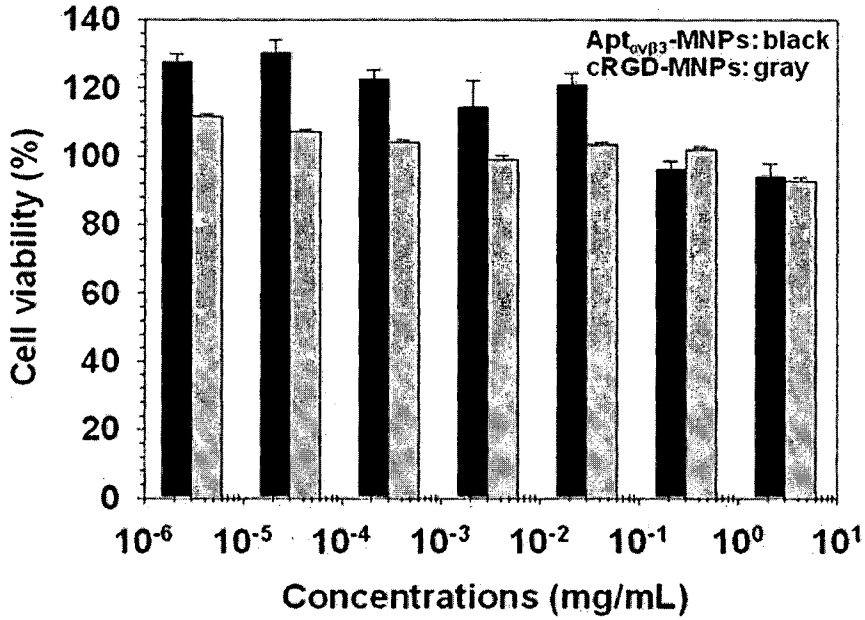
【도 4】


(a)
T2-weighted
MR image
(b)
R2 (sec-1)
70
60
50
40
30
20
10
0
0
50
100
150
200
Concentration (μM)
Relaxivity: 324.37 mM-1sec-1

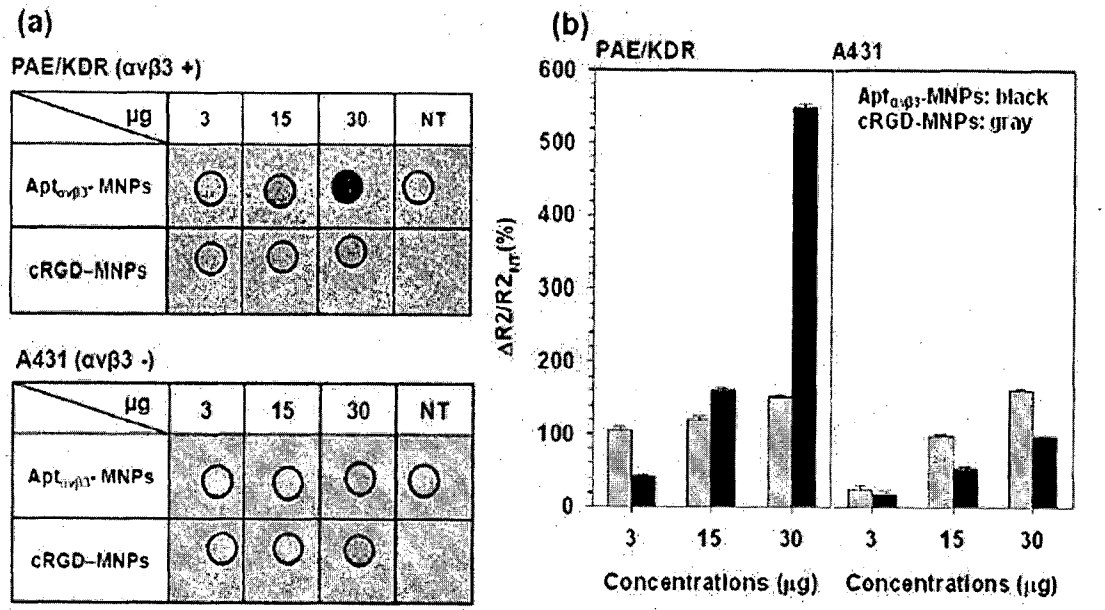
【도 5】


50
40
30
20
10
0
Size (nm)
0 %
25 %
50 %
75 %
FBS
Apt$_{\alpha v\beta 3}$-MNPs
cRGD-MNPs

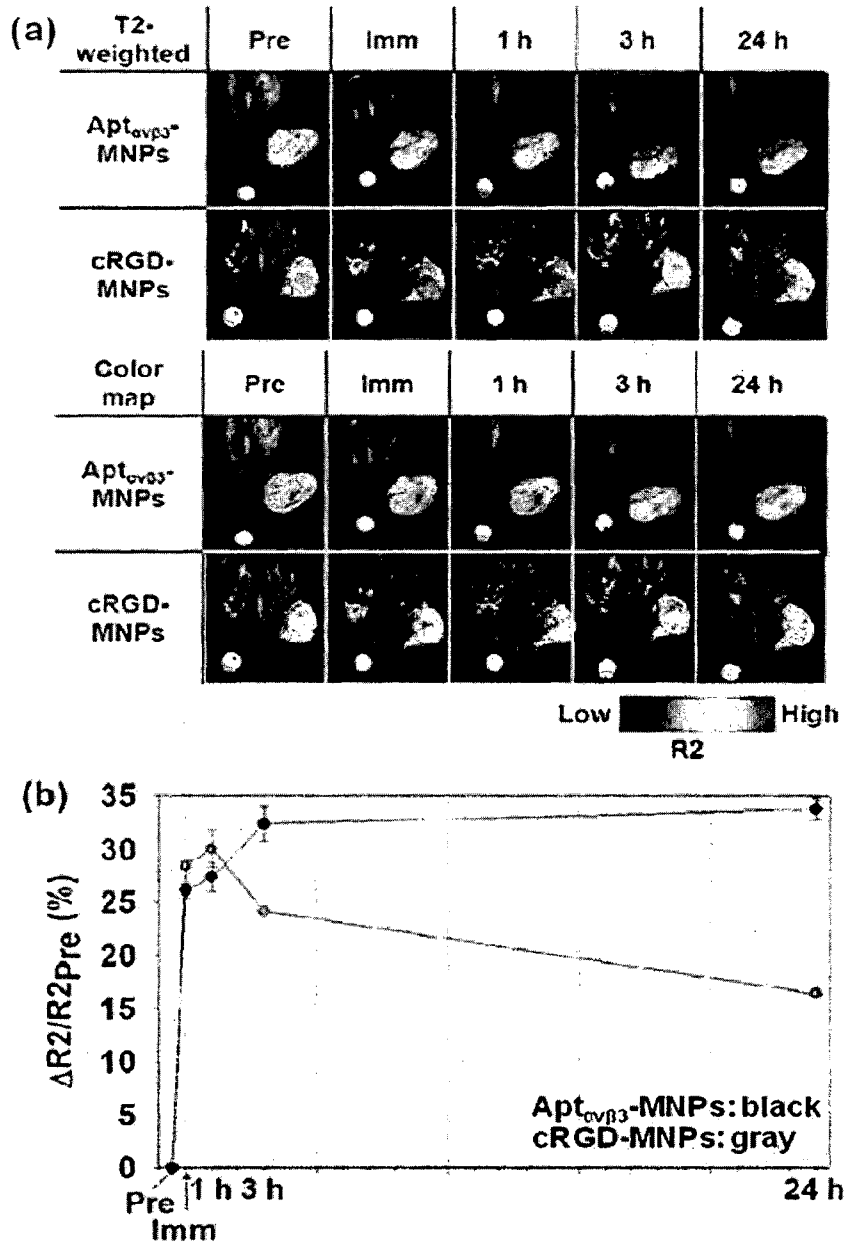
【도 6】


Apt$_{\alpha v\beta 3}$-MNPs: black
cRGD-MNPs: gray
Cell viability (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
10^{-6}
10^{-5}
10^{-4}
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
Concentrations (mg/mL)

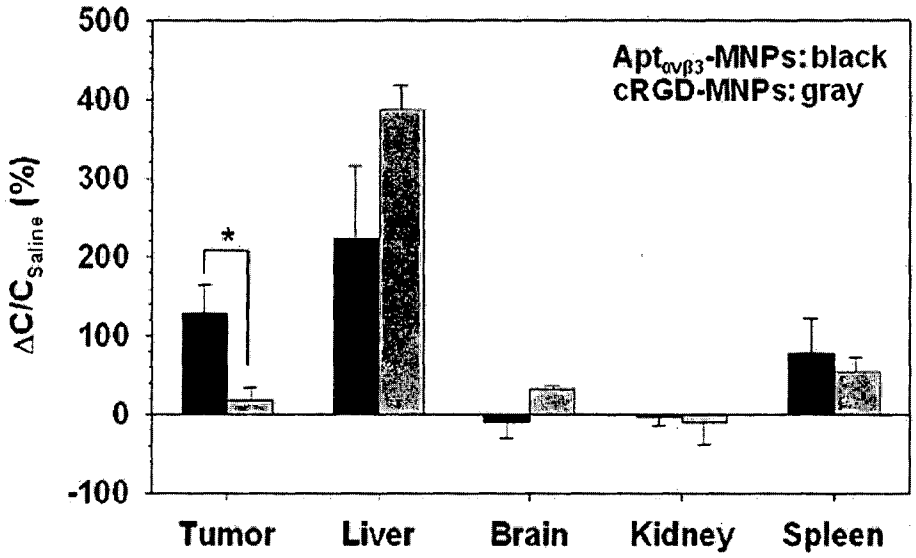
【도 7】


(a)
PAE/KDR (αvβ3 +)
μg
3
15
30
NT
Apt$_{\alpha v\beta 3}$-MNPs
cRGD-MNPs
A431 (αvβ3 -)
μg
3
15
30
NT
Apt$_{\alpha v\beta 3}$-MNPs
cRGD-MNPs
(b)
PAE/KDR
A431
Apt$_{\alpha v\beta 3}$-MNPs: black
cRGD-MNPs: gray
ΔR2/R2$_{int}$(%)
600
500
400
300
200
100
0
3
15
30
3
15
30
Concentrations (μg)
Concentrations (μg)

【도 8】


(a)
T2-weighted
Pre
Imm
1 h
3 h
24 h
Apt$_{\alpha v\beta 3}$-MNPs
cRGD-MNPs
Color map
Pre
Imm
1 h
3 h
24 h
Apt$_{\alpha v\beta 3}$-MNPs
cRGD-MNPs
Low
High
R2
(b)
ΔR2/R2Pre (%)
35
30
25
20
15
10
5
0
Apt$_{\alpha v\beta 3}$-MNPs: black
cRGD-MNPs: gray
Pre
Imm
1 h 3 h
24 h

【도 9】


500
400
300
200
100
0
-100
ΔC/C Saline (%)
Apt αvβ3-MNPs: black
cRGD-MNPs: gray
*
Tumor
Liver
Brain
Kidney
Spleen

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2013/006889

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/115(2010.01)i, C12Q 1/68(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)

C12N 15/115; A61K 49/06; B82Y 5/00; C12Q 1/68; 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: aptamer, integrin, alpha v beta 3, cancer diagnosis, nanoparticle, MR imaging

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MI, J. et al., "Targeted inhibition of α v β 3 integrin with an RNA aptamer impairs endothelial cell growth and survival," Biochem. Biophys. Res. Commun., vol. 338, pp. 956-963 (2005) See abstract, materials and methods, figure 1 etc.	1-12
A	CHEN, T. et al., "Aptamer-conjugated nanomaterials for bioanalysis and biotechnology applications," Nanoscale, vol. 3, pp. 546-556 (Online 25 November 2010) See abstract, figures 2-5 etc.	1-12
A	KR 10-2008-0035926 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY FOUNDATION) 24 April 2008 See abstract, claims 3, 9 and 21, figures 1, 7 etc.	1-12

☐ 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	Date of mailing of the international search report
27 NOVEMBER 2013 (27.11.2013)	**28 NOVEMBER 2013 (28.11.2013)**

Name and mailing address of the ISA/KR
Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea
Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2013/006889

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.: **13**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 13 claims a method for providing information on the diagnosis of cancer or cancer metastasis but since the method comprises a step of determining a patient with cancer, it is considered that the method corresponds to a method for diagnosis of the human body, and thus pertains to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT 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:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2013/006889

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2008-0035926 A	24/04/2008	WO 2008-048074 A1	24/04/2008

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2013/006889

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/115(2010.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i, A61K 49/04(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 15/115; A61K 49/06; B82Y 5/00; C12Q 1/68; 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: aptamer, integrin, alpha v beta 3, cancer diagnosis, nanoparticle, MR imaging

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	MI, J. 외 7인, "Targeted inhibition of αvβ3 integrin with an RNA aptamer impairs endothelial cell growth and survival," Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 338, pp. 956-963 (2005) 초록, 재료 및 방법, 그림 1 등 참조	1-12
A	CHEN, T. 외 7인, "Aptamer-conjugated nanomaterials for bioanalysis and biotechnology applications," Nanoscale, Vol. 3, pp. 546-556 (Online 25 November 2010) 초록, 그림 2-5 등 참조	1-12
A	KR 10-2008-0035926 A (재단법인서울대학교산학협력재단) 24 April 2008 요약, 청구항 3, 9, 21, 도면 1, 7 등 참조	1-12

☐ 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	국제조사보고서 발송일
2013년 11월 27일 (27.11.2013)	2013년 11월 28일 (28.11.2013)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관
조영균
전화번호 +82-42-481-8298

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2013/006889

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

   a. 출원시 또는 추후 제출된 서열목록
   - ☐ 서면
   - ☒ 전자적 형태

   b. 제출시기
   - ☒ 출원시 국제출원에 포함
   - ☐ 전자적 형태로 국제출원과 함께 제출
   - ☐ 조사를 위해 본 기관에 추후 제출

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시의 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2013/006889

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: 13
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제13항은 암 또는 암 전이 진단정보를 제공하는 방법을 청구하고 있으나, 환자를 암환자로 판단하는 단계를 포함하고 있는바 이는 실질적으로 사람을 대상으로 하는 진단방법에 해당한다고 인정되므로 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당합니다.

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.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.

2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.

3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.

4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에 관한 기재

☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.

☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.

☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2013/006889

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2008-0035926 A	2008/04/24	WO 2008-048074 A1	2008/04/24