

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2025년 1월 16일 (16.01.2025) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호

WO 2025/014306 A1

(51) 국제특허분류:

C12Q 1/6806 (2018.01)

G01N 1/36 (2006.01)

C12Q 1/6869 (2018.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2024/009958

(22) 국제출원일:

2024년 7월 11일 (11.07.2024)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2023-0090359 2023년 7월 12일 (12.07.2023) KR

10-2023-0165146 2023년 11월 24일 (24.11.2023) KR

(71) 출원인: 연세대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) [KR/KR]; 03722 서울특별시 서대문구 연세로 50, Seoul (KR).

(72) 발명자: 손창호 (SOHN, Chang Ho); 06752 서울특별시 서초구 바우피로23길 20-5, B-301, Seoul (KR). 박한얼 (PARK, Han Eol); 08788 서울특별시 관악로 168, C-504, Seoul (KR). 이유탁 (LEE, Yu Tak); 10423 경기도 고양시 노루목로 80, 302-401, Gyeonggi-do (KR).

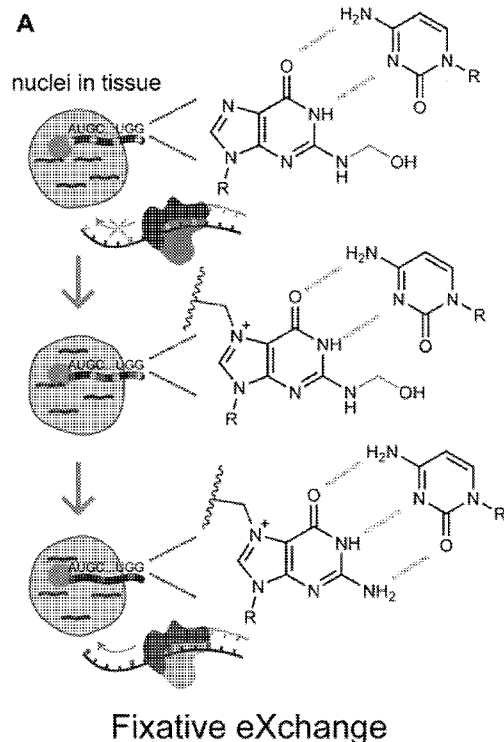
(74) 대리인: 특허법인 지담 (JIDAM IP LAW FIRM); 13494 경기도 성남시 분당구 대왕판교로 670, 유스페이스2 A-201, Gyeonggi-do (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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).

(54) Title: COMPOSITION FOR FIXATIVE EXCHANGE OF PFA-FIXED OR FFPE-TREATED BIOLOGICAL SAMPLES, AND METHOD THEREFOR

(54) 발명의 명칭: PFA 고정 또는 FFPE 처리된 생물학적 샘플의 고정액 교환용 조성물 및 이의 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for fixative exchange, comprising an organic catalyst and a platinum-based cross-linking agent. The composition of the present invention allows site-selective binding without interfering with Watson-Crick base pairs of nucleic acids and allows nucleic acids having reacted with a fixative to be restored to the state before reacting with the fixative, thereby enabling reverse transcription efficiency to be maximized, and thus can be effectively used in the field of diagnosing diseases or discovering a target material for new drug development through transcriptome analysis or multi-omics analysis from a single cell or a single nucleus.

(57) 요약서: 본 발명은 유기촉매 및 백금 기반의 가교제를 포함하는 고정액 교환용 조성물에 관한 것으로서, 본 발명의 조성물은 핵산의 Watson-Crick 염기쌍을 방해하지 않으면서 위치선택적으로 결합하고 고정액과 반응한 핵산을 고정액과 반응하기 전의 상태로 회복시켜 역전사의 효율을 극대화할 수 있어, 단일세포 또는 단일핵으로부터의 전사체 분석 또는 다중 오믹스 분석을 통해 신약 개발을 위한 타겟 물질 발굴 또는 질환의 진단 분야에 유용하게 사용될 수 있다.

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: PFA 고정 또는 FFPE 처리된 생물

학적 샘플의 고정액 교환용 조성물 및 이의 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 유기촉매 및 백금 기반의 가교제를 포함하는 고정액 교환용 조성물, 키트 및 이의 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 차세대 염기서열 분석기를 이용한 단일세포, 단일핵 전사체 분석은 신선한 조직이거나 신선한 조직을 아무런 처리없이 냉각(-80°C)한 상태에서 가능하나, 때 번 신선한 조직을 얻기 어렵다는 문제가 있었다. 이에 다양한 연구 및 임상 분야에서는 조직 또는 샘플을 화학적으로 고정 처리를 하여 보관하거나 분석에 사용하였다. 이러한 화학적 고정 처리는 조직의 생물학적 상태를 급속으로 정지시킬 수 있어 샘플의 장기보관 및 절편화를 통한 구조적 분석도 가능하게 한다. 특히, 임상 환경에서 포르말린 고정 파라핀 포매(FFPE) 조직은 병리학적 진단 및 장기 보관을 위한 주요 자원 역할을 하며 전 세계 아카이브의 수는 수십억 개가 넘는 것으로 추정된다 (N. Blow, Tissue issues. Nature. 448, 959-960 (2007); 및 S. Sah *et al.*, Genome Med. 5, 77 (2013)).
- [4] 그러나, FFPE 조직과 같이 고정 처리된 샘플들은 핵산과 고정액의 반응, 핵산과 단백질의 고정반응으로 인해 단일세포에서 충분한 양의 역전사를 통한 cDNA를 얻지 못한다는 문제가 있다. 이로 인해 고정 처리된 조직 또는 세포의 전사체 분석은 매우 비효율적인 과정으로 여겨졌다. 따라서, 파라포름알데히드(PFA) 고정 또는 FFPE 샘플에 대한 고품질의 확장 가능한 단일핵-RNA 염기서열 방법에 대한 요구가 높은 실정이다.
- [5] 이에 본 발명자들은 고품질의 단일세포 또는 단일핵 전사체 분석 또는 다중 오믹스 분석을 위한 고정액 교환 방법을 개발하여 본 발명을 완성하였다.

[6]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명의 목적은 유기촉매 및 백금 기반의 가교제를 포함하는 고정액 교환용 조성물을 제공하는 것이다.
- [8] 본 발명의 다른 목적은 상기 고정액 교환용 조성물을 포함하는 고정액 교환용 키트를 제공하는 것이다.
- [9] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 균질화된 생물학적 샘플에 백금 기반의 가교제가 포함된 용액을 처리하는 단계; (b) 상기 (a) 단계 후 펠릿을 분리한 후 유기촉매가

포함된 용액으로 재현탁하는 단계; 및 (c) 상기 재현탁된 용액을 가열하는 단계를 포함하는 고정액 교환 방법을 제공하는 것이다.

[10]

과제 해결 수단

[11] 본 발명은 유기촉매 및 백금 기반의 가교제를 포함하는 고정액 교환용 조성물을 제공한다.

[12] 또한, 본 발명은 상기 고정액 교환용 조성물을 포함하는 고정액 교환용 키트를 제공한다.

[13] 또한, 본 발명은 (a) 균질화된 생물학적 샘플에 백금 기반의 가교제가 포함된 용액을 처리하는 단계; (b) 상기 (a) 단계 후 펠릿을 분리한 후 유기촉매가 포함된 용액으로 재현탁하는 단계; 및 (c) 상기 재현탁된 용액을 가열하는 단계를 포함하는 고정액 교환 방법을 제공한다.

[14]

발명의 효과

[15] 본 발명에 따른 조성물은 핵산의 Watson-Crick 염기쌍을 방해하지 않으면서 위치선택적으로 결합하고 고정액과 반응한 핵산을 고정액과 반응하기 전의 상태로 회복시켜 역전사의 효율을 극대화할 수 있어, 단일세포 또는 단일핵으로부터의 전사체 분석 또는 다중 오믹스 분석을 통해 신약 개발을 위한 타겟 물질 발굴 또는 질환의 진단 분야에 유용하게 사용될 수 있다.

[16]

도면의 간단한 설명

[17] 도 1A는 고정액 교환(FX)의 전략을 제시한 개략도이고, 1B는 시간에 따른 PFA 고정 후 qPCR을 통해 상대적 cDNA 합성 수율을 측정한 결과이며, 1C는 촉매를 처리한 후 qPCR을 통해 상대적 cDNA 합성 수율을 비교한 결과이고, 1D 및 1E는 가교제의 추가 여부에 따른 cDNA 합성 수율 및 누출된 RNA 농도를 비교한 결과이며, 1F는 RNase 억제제인 PVSA를 나타낸 것이고, 1G는 다양한 RNase 억제제를 처리한 후 고정된 마우스 뇌 조직에서 추출된 전체 RNA의 자동 겔 전기영동 분석 결과이며, 1H는 고정액 교환 후 RNA 서열분석 방법(FX-seq)에 대한 전체 개략도이고, 1I 내지 1L은 PFA로 고정된 마우스 뇌 조직(n=3)에 대하여 미처리(Ctrl), 트리스-버퍼 처리(Tris Ctrl), 트리스-버퍼에 촉매-처리(Cat. 2) 및 가교제가 포함된 고정액 교환 처리(FX)를 수행한 후, 확인된 유전자 수(J), UMIs(K) 및 상위 유전자 수(L)를 비교한 결과이며, 1M 내지 1T는 PFA-고정된 대조군 샘플(n=7497) 및 FX-seq 처리군(n=8654)에 대한 독립형(M,N) 및 병합형(O,P) UMAP 클러스터링 및 세포 유형 분석 결과(세포군 분포: Q,R; 및 마커 유전자 특이적 가시화: S,T)를 나타낸 것이다.

[18] 도 2는 FX-seq의 전체 과정을 나타낸 것으로서, 2A는 PFA 고정된 블록에 적용하는 FX-seq 방법이고, 2B는 FFPE 블록 샘플에 적용하는 FX-seq 방법이며, 2C는

FFPE 절편 샘플에 적용하는 FX-seq 방법이고, 2D는 H&E 염색된 절편에 적용하는 FX-seq 방법이다.

- [19] 도 3A는 신선한 마우스 뇌 조직에서 분리된 핵의 이미지이고, 3B는 심하게 고정된 마우스 뇌 조직에서 분리된 핵의 이미지이며, 3C 내지 3G는 신선한 마우스 뇌 조직에서 분리된 핵(fresh, n=11807) 및 FX-처리된 심하게 고정된 마우스 뇌 조직에서 분리된 핵(FX, n=7569)의 QC 매트릭스로서, 각각 확인된 유전자 수의 분포(C), UMIs(D), 미토콘드리아 유전자 판독 비율(E), 리보솜 RNA 판독 비율(F) 및 엑손 판독 비율(G)을 나타낸 결과이고, 3H 내지 3K는 각 샘플의 UMAP 분석 결과로서 독립형 클러스터링(H, I) 및 병합형 클러스터링(J, K) 결과이며, 3L은 병합형 유전자 발현 매트릭스의 UMAP 분석에서 엑손 영역에 매핑된 분획의 백분을 컬러맵 결과이고, 3M은 동일한 세포 유형에서 신선한 조직 유래 전사체 및 FX 유래 전사체 사이의 차별적으로 발현된 유전자 분석을 통해 확인된 상위 10개 유전자에 대한 엑손 판독 분획 분포를 나타낸 결과이다.
- [20] 도 4A는 마우스 뇌 조직의 FFPE 블록(n=3)을 나타낸 것이고, 4B 내지 4D는 FFPE 마우스 뇌 조직에 미처리(Ctrl), 트리스-버퍼 처리(Tris Ctrl), 트리스-버퍼에 촉매-처리(Cat. 2) 및 가교제가 포함된 고정액 교환 처리(FX)를 수행한 후, 확인된 유전자 수(B), UMIs(C) 및 상위 유전자 수(D)를 비교한 결과이며, 4E 내지 4L은 FFPE 대조군 샘플 및 FX-seq 처리군에 대한 독립형(E,F) 및 병합형(G,H) UMAP 클러스터링 및 세포 유형 분석 결과(세포군 분포: I,J; 및 마커 유전자 특이적 가시화: K,L)를 나타낸 것이다.
- [21] 도 5A는 10 μ m FFPE 절편 또는 H&E 염색된 절편을 나타낸 것이고, 5B 내지 5E는 FFPE 절편(n = 11334) 또는 H&E 염색된 절편(n = 8648)의 QC 매트릭스로서, 확인된 유전자 수(B), UMIs(C), 미토콘드리아 판독 비율(D) 및 리보솜 RNA 판독 비율(E)를 비교한 결과이며, 5F 내지 5K는 FFPE 절편 또는 H&E 염색된 절편의 FX-seq 처리군에 대한 병합형(F,G) UMAP 클러스터링 및 세포 유형 분석 결과(세포군 분포: H,I; 및 마커 유전자 특이적 가시화: J,K)이고, 5L은 대망 전이암(omental metastasis cancer) 샘플에서 4 μ m 및 10 μ m FFPE 절편 및 H&E 염색된 절편을 준비한 것이고 (각각 4F (n = 8590), 10F (n = 10395), 4H (n = 14658) 및 10H (n = 11206)로 표시함), 5M은 4가지 조건의 병합형 유전자 발현 매트릭스의 UMAP 분석 결과이며, 5N은 UMAP의 개별 핵 분포를 나타낸 결과이고, 5O 내지 5R은 4가지 조건에 대한 FX-seq의 QC 매트릭스로서, 확인된 유전자 수(O), UMIs(P), 미토콘드리아 판독 비율(Q) 및 상위 유전자 수(R)를 비교한 결과이며, 5S는 각 세포 유형에서의 UMIs 분포 결과이고, 5T는 각 세포 유형에 대한 세포수의 분포 결과이며, 5U는 각 클러스터에 특이적인 마커 유전자의 도트 플롯 결과이다.
- [22] 도 6A는 수술적으로 절제된 인간 GIST 조직을 FX-seq 방법으로 처리한 과정을 나타낸 것이고, 6B는 각 클러스터에 특이적인 마커 유전자의 도트 플롯 결과이며, 6C 내지 6F는 FX-seq의 QC 매트릭스로서 확인된 유전자 수(C), 핵당 UMIs의 수(D), 미토콘드리아 유전자의 판독 비율(E) 및 rRNA 판독 비율(F) 결과이고, 6G

는 전사체 분포 및 클러스터링의 UMAP 분석 결과이며, 6H 및 6I는 PAGA 분석 (H) 및 확산 슈도타임 히트맵(I)을 기반으로 구축된 클러스터 네트워크 결과이고, 6J 및 6K는 전사체 경로(Path) 1(J) 및 클러스터당 해당 유전자 발현 변화(K)이고, 6L 및 6M은 전사체 경로(Path) 2(L) 및 클러스터당 해당 유전자 발현 변화(M)이다.

- [23] 도 7A는 보관된 CRC FFPE 절편에 대한 FX-seq 방법을 적용한 과정을 나타낸 것이고, 7B는 FFPE 절편(T, n = 47966; 및 NT, n = 13559)으로부터 영역 기원으로 표시된 전사체의 UMAP 분석 결과이며, 7C는 각 클러스터에 대한 대표적인 마커 유전자이고, 7D는 영역 기원으로 표시된 세포군의 분포이며, 7E는 각 영역에서 식별된 모든 세포로부터 계산된 각 클러스터에 속한 세포수의 비율이고, 7F는 7B의 녹색 원에 표시된 상피 전구 세포와 종양 집단의 병합된 유전자 매트릭스의 하위 클러스터를 식별하기 위한 UMAP 분석 결과이며, 7G는 7F의 영역 기원에서 표지된 세포군의 분포 결과이고, 7H는 7F의 하위 클러스터에 의해 식별된 세포 유형의 대표적인 마커 유전자이며, 7I는 inferCNV 패키지를 사용하여 종양 및 상피 전구 세포군의 유전자 발현을 확인한 클러스터-수준의 CNV 추론 결과이고, 7J는 7B의 주황색 원에 나타난 섬유아세포 클러스터의 하위 클러스터를 식별하기 위한 UMAP 분석 결과이며, 7K는 7J의 영역 기원에 의해 표지된 섬유아세포 하위 클러스터의 집단 분포 결과이고, 7L은 7J 및 7K에 나타난 각 클러스터의 세포수 분포 결과이며, 7M은 7J의 하위 클러스터 분석에 의해 식별된 대표적인 마커 유전자이다.

[24]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [25] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

- [26] 본 발명에 사용되는 용어는 본 발명의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 기술분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 또한, 특정한 경우는 임의로 선정된 용어도 있으며, 이 경우 해당 실시예의 설명 부분에서 상세히 그 의미를 기재할 것이다. 따라서, 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.

- [27] 본 발명에서 어느 구성요소 또는 어느 단계를 "포함한다"고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소 또는 다른 단계를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소 또는 다른 단계를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[28]

- [29] 본 발명은 유기촉매(organocatalyst) 및 백금 기반의 가교제(Pt-based crosslinker)를 포함하는 고정액 교환용 조성물을 제공한다.

- [30] 본 발명의 용어, "유기촉매"는 탄소, 수소, 황 및 기타 비금속 원소로 구성되며, 화학 반응 속도를 증가시키는 촉매의 한 형태이다. 본 발명의 유기촉매는 고정액과 반응한 핵산을 고정액과 반응하기 전의 상태로 회복시키는 것일 수 있다.
- [31] 본 발명에 있어서, 상기 유기촉매는 2-아미노페닐보론산(2-aminophenylboronic acid)인 것일 수 있다.
- [32] 본 발명에 있어서, 상기 신규한 백금 기반의 가교제는 디클로로(에틸렌디아민)백금(II)(Pt(en)Cl₂) 및 디메틸포름아미드(DMF)를 자석 교반 막대가 있는 둥근 바닥 플라스크에 첨가한 후, DMF에 용해된 질산은(AgNO₃)을 적가하고 염화은(AgCl)을 제거한 후 NH₃-PEG₁₁-NH₃을 첨가하여 합성하였다.
- [33] 본 발명에 있어서, 상기 백금 기반의 가교제는 핵산의 Watson-Crick 염기쌍을 방해하지 않으면서 위치선택적으로 결합하는 것일 수 있고, 바람직하게는 N7-구아닌 잔기에서 결합을 형성하는 것일 수 있다. 상기 결합은 비공유결합인 것일 수 있다.
- [34] 본 발명에 있어서, 상기 백금 기반의 가교제는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물인 것일 수 있다.
- [35] [화학식 1]
- [36]
- [37]
- [38] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 RNase 억제제를 추가적으로 더 포함하는 것일 수 있고, 바람직하게는, 상기 RNase 억제제는 PVSA(polyvinyl sulfonic acid)인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [39] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 고정액으로 고정된 생물학적 샘플로부터 고정액을 제거하기 위한 것일 수 있고, 상기 생물학적 샘플은 파라포름알데히드(PFA) 고정 또는 포르말린 고정 파라핀 포매(FFPE) 조직의 블록 또는 절편인 것일 수 있다. 상기에서, 상기 절편은 4μm 내지 10μm인 것일 수 있다.
- [40] 본 발명에 있어서, 상기 고정액 교환은 단일세포 또는 단일핵을 분리하기 전에 수행하는 것일 수 있다.
- [41] 본 발명에 있어서, 상기 고정액 교환은 단일세포 전사체 분석, 단일핵 전사체 분석, 다중 오믹스 분석 및 이의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 수행하기 위한 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [42] 또한, 본 발명은 상기 고정액 교환용 조성물을 포함하는 고정액 교환용 키트를 제공한다.

- [43] 본 발명에 있어서, 상기 키트는 완충액을 추가로 더 포함하는 것일 수 있고, 상기 완충액은 PBS, Tris, MOPS, SSC 및 HEPES로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [44] 또한, 본 발명은 (a) 균질화된 생물학적 샘플에 백금 기반의 가교제가 포함된 용액을 처리하는 단계; (b) 상기 (a) 단계 후 펠릿을 분리한 후 유기촉매가 포함된 용액으로 재현탁하는 단계; 및 (c) 상기 재현탁된 용액을 가열하는 단계를 포함하는 고정액 교환 방법을 제공한다.
- [45] 본 발명에 있어서, 상기 가열은 50 내지 60°C에서 10분 내지 60분 동안 수행되는 것일 수 있고, 바람직하게는 50 내지 60°C에서 20분 내지 50분 동안, 50 내지 60°C에서 25분 내지 40분 동안 수행되는 것일 수 있고, 더욱 바람직하게는 55°C에서 30분 동안 수행되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [46] 본 발명에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 파라포름알데히드(PFA) 고정 또는 포르말린 고정 파라핀 포매(FFPE) 조직의 블록 또는 절편인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [47] 본 발명에 있어서, 상기 백금 기반의 가교제가 포함된 용액 및 유기촉매가 포함된 용액에는 RNase 억제제를 추가적으로 더 포함하는 것일 수 있고, 상기 RNase 억제제는 PVSA(polyvinyl sulfonic acid)인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [48] 본 발명에 있어서, 상기 고정액 교환은 단일세포 또는 단일핵을 분리하기 전에 수행하는 것일 수 있다.

[49]

발명의 실시를 위한 형태

- [50] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[51]

[52] 실시예 1. 촉매, 가교제 및 RNase 억제제의 선별

- [53] 본 발명에서는 온화한 조건 하에서 파라포름알데히드(PFA) 부가물의 제거를 촉진하고 효율적인 역전사를 가능하게 하기 위해 유기촉매를 사용한 고정액 교환 방법(FX)을 개발하였다. 도 1A에 나타낸 바와 같이, PFA 고정은 1차 아민에 메틸올(methylol) 부가물을 생성하여 Watson-Crick 염기쌍을 억제하고 후속 효소 활성을 억제한다. 이에 본 발명자들은 추가 가교를 통해 RNA 분자를 유지시키고, 유기촉매의 처리를 통해 온화한 조건에서 메틸올 부가물을 제거하는데 촉진하는 전략을 개발하였다.

- [54] 우선, PFA 가교가 역전사를 억제하는지 확인을 실험을 수행하였다. 상대적 cDNA 합성 수율은 qPCR을 통해 동일한 양의 신선한 RNA로 정규화하여 평가하였다. 그 결과, PFA 고정은 분리된 RNA의 cDNA 합성 수율을 억제함을 확인하였

다 (도 1B). 이후, 뛰어난 촉매 활성을 가진 촉매 후보를 스크리닝하였다. 그 결과, 촉매 중 2-아미노페닐보론산 HCl (2-aminophenylboronic acid HCl, "Cat. 2")은 (2-아미노-5-메틸페닐)포스폰산 (2-amino-5 methylphenyl phosphonic acid, "Cat. 1")에 비해 더 나은 촉매 활성을 나타내었다 (도 1C).

[55] 상기와 같이, 유기촉매인 2-아미노페닐보론산 HCl의 처리는 cDNA 수율을 향상시켰으므로, 연장된 촉매 처리가 *in situ* 역전사 수율을 증가시킬 수 있을 것으로 예상하였다. 그러나, 촉매를 처리하더라도, 고정된 세포로부터 RNA 누출을 의미하는 비-세포질 RNA과 주변 RNA 농도가 증가하였다. 이에 따라, RNA 손실을 피하기 위해 신규한 위치특이적 Pt-기반의 화학적 가교제를 고정된 세포에 처리하였다. 상기 Pt-기반의 화학적 가교는 N7-구아닌 특이적 시스플라틴 유도체를 디-아미노-운데카-폴리에틸렌 글리콜(PEG) 링커와 커플링하여 합성한 것으로서, Watson-Crick 염기쌍을 방해하지 않으면서 위치선택성 방식으로 N7-구아닌 잔기에서 결합을 형성할 수 있다. 신규한 Pt-기반의 가교제에 의한 추가 가교 공정은 PFA의 점진적 제거 시 RNA 누출을 최소화하여 RNA 보유를 최적화하고 cDNA 수율을 증가시킬 수 있음을 확인하였다 (도 1D 및 1E).

[56] 추가적으로, 핵 분리와 관련된 샘플 조작 및 PFA 제거를 위한 가열 시 RNAase 활성 또는 RNA 자가분해에 의해 RNA 품질이 심각하게 손상될 수 있음을 확인하였다 (도 1G). 이에 따라, 고비용의 단백질-기반 RNase 억제제를 대체할 수 있는 효율적인 RNase 억제제를 검색하였다. 그 결과, PVSA (polyvinyl sulfonic acid)는 내열성이 있고 하류 효소 반응과 호환될 수 있으며, 비-반응성 경쟁자로서 활성 부위 차단에 의해 RNase 활성을 억제할 수 있었다. 특히, PVSA는 디에틸피로카보네이트(DEPC, diethyl pyrocarbonate) 또는 SUPERase-In™ (ThermoFisher) RNase 억제제에 비해 촉매 처리를 위한 적당한 가열 조건 하에서 RNase 분해를 막는데 가장 효과가 뛰어남을 확인하였다 (도 1F 및 1G).

[57]

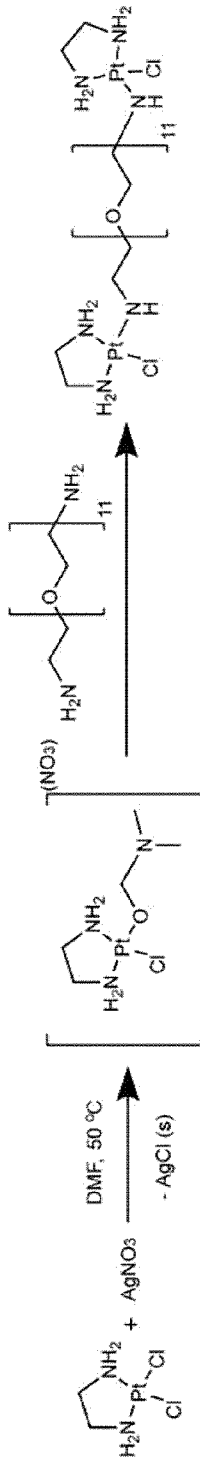
[58] 실시예 2. 신규한 Pt-기반의 화학적 가교제의 합성

[59] 신규한 Pt-기반의 화학적 가교제는 다음의 방법으로 합성하였다. 우선, 디클로로(에틸렌디아민)백금(II)(Pt(en)Cl₂, 100mg, 0.31mmol, Sigma Aldrich) 및 디메틸포름아미드(DMF, 6mL, Sigma Aldrich)를 자석 교반 막대가 있는 둥근 바닥 플라스크에 첨가하였다. 이후, DMF(6 mL)에 용해된 질산은(AgNO₃, 58mg, 0.31mmol, Sigma Aldrich)을 적가하고, 혼합물을 암조건 하에 16시간 동안 교반하였다. 이후, 혼합물을 Millex-GV 멤브레인 필터(기공 크기: 0.22 μm, Merck Millipore)를 통해 여과하여 염화은(AgCl)을 제거하였다. 이후, NH₃-PEG₁₁-NH₃(65mg, 0.12mmol, Broadpharm)을 첨가하고 암조건 하에 50°C에서 밤새 교반하였다. 완료 후, 혼합물을 감압 농축하였다.

[60] 신규한 Pt-기반의 화학적 가교제의 합성은 다음의 반응식 1과 같다.

[61] [반응식 1]

[62]



[63]

[64] 이후, 잔류물을 3mL의 Milli-Q water에 용해시키고 암조건에서 4°C 에서 밤새 보관하였다. 혼합물을 Millex-GV 멤브레인 필터(기공 크기: $0.22\ \mu\text{m}$, Merck Millipore)를 통해 여과하여 불용성 황색 입자 $[\text{Pt(en)Cl(NO}_3\text{)}]$ 를 제거하였다. 이후, 여과된 용액을 감압 농축하고 C18 플래쉬 컬럼 크로마토그래피(물 중 0.1% 포름산 및 아세토니트릴 중 0.1% 포름산, 10분 내에 아세토니트릴을 0에서 100%로 구배 증가)로 정제하였다. 분리된 분획으로부터 용매를 감압 하에 제거하고

생성된 잔류물을 3 mL의 MeOH에 용해시켰다. 용액을 Millex-GV 멤브레인 필터(기공 크기: 0.22 μm , Merck Millipore)를 통해 여과하여 잔류 $[\text{Pt}(\text{en})\text{Cl}(\text{NO}_3)]$ 를 제거하여 노란색 오일(119 mg, 88.2%)을 얻었다. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, MeOD-d_4): δ = 3.97-3.68(m, 52H), 2.98-2.56(m, 14H). LC-MS(ESI+) m/z ($\text{C}_{28}\text{H}_{66}\text{Cl}_2\text{N}_6\text{O}_{11}\text{Pt}_2$ $[\text{M}-2\text{H}]^{2+}$ 에 대해 계산됨: 562.68, 실측치: 562.4.

[65]

[66] 실시예 3. 고정액 교환(FX, Fixative eXchnge) 전략

[67] 3.1. 고정액 교환(FX) 방법

[68] 본 발명의 고정액 교환(FX) 방법은 다음과 같다. 우선, 균질화되고 세척된 조직 샘플을 투과 용액 (PBST3 solution: 1X PBS, 0.2% TritonX-100, 3% PVSA)으로 실온에서 15분 동안 투과시켰다. 이후, 펠릿을 수집하고, 가교제가 없는 용액(-CL solution: 1X MOPS, 3% PVSA, 0.025% Tween-20)과 가교제가 포함된 용액(+CL solution: 1X MOPS, 3% PVSA, 0.025% Tween-20, 2X 가교제)을 넣고 5분 동안 냉장실에서 2회 인큐베이션한 후, 25°C에서 15분 동안 진탕하였다. 이후, 펠릿을 수집하고, 촉매가 없는 용액 (-CT solution: 200 mM Tris pH 8.3, 3% PVSA)에서 1회 세척하고, 상청액에 있는 -CT solution을 제거하였다. 이후, 펠릿을 촉매가 포함된 용액 (+CT solution: 200 mM Tris pH 8.3, 50 mM 2-aminophenylboronic acid HCl, 3% PVSA, 8% w/v PEG-8000)으로 재현탁하고, PFA 가교 결합을 제거하기 위해 55°C에서 30분 동안 진탕하였다.

[69]

[70] 3.2. 핵 분리 방법

[71] 본 발명의 핵 분리 방법은 다음과 같다. 우선, 고정액 교환(FX) 처리된 조직을 단백질분해효소가 포함되지 않은 용액 (-DS solution: 50 mM Tris pH 7.0, 10 mM EDTA pH 8.0, 10 mM NaCl, 1% PVSA, 0.2% Tween-20)으로 한번 세척한 후, 펠릿을 수집하고 단백질분해효소가 포함된 용액(+DS solution: 50 mM Tris pH 7.0, 10 mM EDTA pH 8.0, 10 mM NaCl, 1% PVSA, 0.2% Tween-20, 0.01% Proteinase K)에 재현탁하여 37°C에서 20분 동안 진탕하였다. 일부 샘플의 ECM은 더 단단하고 덜 소화되기 쉽기 때문에 조직 소화 기간은 각 조직 유형에 따라 최적화되었다. 소화된 펠릿은 수크로스 용액(1X PBS, 1% PVSA, 1.5 M sucrose)에 완전히 현탁하고, 3,000 g에서 20분 동안 원심분리하여 핵을 분리하였다. 이후, 분리된 핵은 투과 용액(PBST1 solution: 1X PBS, 0.2% TritonX-100, 1% PVSA)으로 실온에서 15분 동안 추가 투과시켰다. 절편된 샘플에서는 과도한 Triton X-100 처리로 인해 핵에서 심각한 RNA 누출이 발생하였기 때문에 두 번째 투과 단계를 생략하였다. 이후, 수집된 핵은 SSC(Saline-sodium citrate) 버퍼 용액 (BR solution: 5X SSC, 0.025% Tween-20, 0.1% SUPERase-In)으로 3회 세척하였다. 세척된 핵은 역전사를 위해 버퍼 용액(PBSRI solution: 1X PBS, 0.04% BSA, 1% SUPERase-In)으로 재

현탁하였다. 핵은 DAPI로 염색하였고, EVOS imaging system (Invitrogen)을 이용하여 카운팅하였다.

[72]

[73] 실시예 4. PFA-고정 마우스 뇌 조직을 이용한 고정액 교환-RNA 서열분석(FX-seq) 방법의 검증

[74] 고정액 교환(FX) 처리된 핵의 확장성이 뛰어난 서열분석을 달성하기 위해, 본 발명자들은 업데이트된 sci-RNA-seq3 프로토콜에 따른 조합 세포 바코딩을 약간 수정하여 사용하였다 (J. Cao *et al.*, Nature. 566, 496-502 (2019)). 고정액 교환(FX) 방법의 재현성 및 성능을 검증하기 위해, PFA-고정 마우스 뇌 조직을 준비하여 실험을 수행하였다. 모든 동물 취급 및 실험은 연세대학교의 실험동물운영위원회 지침에 따라 수행하였다. 8주령의 C57BL/6N 야생형 마우스는 한국 코아텍에서 구입하여 연세첨단과학원 동물시설에서 엄격한 SPF 조건으로 유지하였다.

[75] PFA-고정된 마우스 뇌 조직을 준비하기 위해, 8-10주령 마우스를 3% 이소플루란과 0.8 L/min 산소로 마취하고 2% 이소플루란과 0.8 L/min 산소로 유지한 후, 마우스를 차가운 1X PBS, 차가운 4% PFA 및 1X PBS 용액으로 차례로 경심 관류시켰다. 이후, 관류된 마우스의 뇌 전체를 분리하고, 분리된 뇌는 4% PFA, 1X PBS 용액에 넣고 4°C에서 48시간 동안 진탕하여 고정하였다. 이후, 고정된 뇌 조직은 고정액 교환(FX) 공정을 수행하였으며 (도 2), 분리된 핵을 조합적으로 바코드화하고 서열분석을 수행하였다 (도 1H 및 1I, n=3).

[76] 그 결과, 고정액 교환-RNA 서열분석(FX-seq) 방법을 통해 cDNA 합성 수율을 증가시킴으로써 고정된 생물학적 샘플에 있는 전사체 정보를 획득할 수 있음을 확인하였다. 특히, FX-seq 처리군에서는 UMIs (unique molecular identifiers) 및 유전자 수(gene counts)에 관한 데이터 품질을 개선시킴으로써, 미처리군(Ctrl), 트리스-버퍼 처리군(200 mM, Tris Ctrl) 및 트리스 버퍼에 촉매-처리군(Cat. 2)에 비해 단일핵 전사체 정보가 현저하게 회복시켜 명확하게 세포 유형을 확인할 수 있었고, 미토콘드리아 유전자 함량과 같은 품질 관리 지표에 미치는 영향을 최소화하였음을 확인하였다 (도 1J 내지 1L). 또한, FX-seq 방법은 뉴런의 정확한 분류, 특히 중간 가지 뉴런(MSNs, medium spiny neurons)과 억제 뉴런(inhibitory neurons)을 구별하게 할 수 있어 세포 유형 식별을 현저히 향상시킬 수 있음을 확인하였다 (도 1M 내지 1T). 또한, FX-seq 방법은 독립형 및 병합형 UMAP 클러스터링 모두에서 고전적인 분자 분류 기준에 따라 Purkinje 세포, 후각 외피 세포(OECs) 및 대식세포를 포함하는 특정 세포 유형을 더 정확하게 분류할 수 있음을 확인하였다.

[77]

[78] 실시예 5. 신선한 조직을 이용한 snRNA-seq 방법과 PFA-고정 마우스 뇌 조직을 이용한 FX-seq 방법의 비교

[79] 본 발명자들은 신선한 조직을 이용한 snRNA-seq 방법과 PFA 고정 마우스 뇌 조직을 이용한 FX-seq 방법을 비교하는 실험을 수행하였다. 신선한 조직을 이용

한 snRNA-seq 방법은 EasySci의 최근 프로토콜을 약간 수정하여 이용하였고(A. Sziraki *et al.*, bioRxiv. 2022, p. 2022.09.28.509825), 매우 짧은 고정 처리(0.1% PFA 10분)를 수행한 후 추출된 핵을 이용하여 수행하였다.

- [80] 그 결과, 신선한 조직에서 추출된 핵은 높은 전사 범위를 나타냈으며, 강하게 고정된 핵에서의 FX-seq 방법 역시 신선한 조직을 이용한 방법과 유사한 UMIs와 유전자 수를 가진 데이터셋을 생산하였다 (도 3C 및 3D). 다만, 신선한 조직에서 추출된 핵에서의 효소 소화의 부족은 더 높은 세포질 분획과 핵의 불완전한 분리를 야기하였으며 (도 3A 및 3B), 이는 더 높은 미토콘드리아 및 리보솜 RNA와 더 높은 엑손 판독 비율에 의해 확증되었다 (도 3E 내지 3G). 그럼에도, 각 데이터셋에 독립적으로 주석이 달린 동일한 세포 유형(도 3H 및 3I)은 병합된 유전자 매트릭스를 사용하여 감독되지 않은 클러스터링에서 공동 클러스터링되었다 (도 3J 및 3K). 신선한 조직 대 고정된 조직에 FX 처리된 샘플 사이에서의 클러스터 내 세포 분포는 엑손 판독 비율에 기인되며 (도 3L), 이는 동일한 클러스터 내의 각 샘플로부터 차별적으로 발현되는 유전자의 엑손 판독 비율을 대조하여 추가 뒷받침되었다 (도 3M).

- [81] 상기 결과로부터, 본 발명의 FX 처리 방법은 강하게 고정된 조직에서의 세포 해상도를 신선한 조직에서 추출된 핵과 유사한 정도로 복원할 수 있음을 확인하였다.

[82]

- [83] 실시예 6. FFPE(formalin-fixed paraffin-embedded) 마우스 뇌 조직을 이용한 FX-seq 방법의 검증

- [84] 본 발명자들은 FFPE 샘플에 대한 FX-seq 방법의 적용 가능성을 확인하였다. 이를 위해, FFPE 마우스 뇌 조직 샘플을 이용하여 실험을 수행하였으며, FFPE 마우스 뇌 조직은 다음의 방법으로 준비하였다. 8-10주령 마우스를 CO₂ 챔버에서 안락사시킨 후 즉시 마우스 뇌를 분리하였다. 수득된 조직은 4% PFA, 1X PBS 용액에 넣어 4°C에 넣고 48시간 동안 진탕하였다. 고정액은 일관된 뇌 품질을 보장하기 위해 2-3시간 마다 한번씩 교체하였다. 48시간 후, 강하게 고정된 뇌를 임베딩 카세트에 넣고 다음의 프로토콜에 따라 FFPE 블록에 임베딩시켰다: 1시간 동안 70% 에탄올로 1회 변경, 1시간 동안 80% 에탄올로 1회 변경, 각각 1시간 동안 95% 에탄올 2회 변경, 각각 1시간 동안 100% 에탄올 3회 변경으로 탈수, 각각 1시간 동안 자일렌으로 3회 변경, 각각 1시간 동안 56-58°C로 가열된 파라핀 왁스로 3회 변경, 및 마지막으로 파라핀 블록에 임베딩시켰다. 조직 가공은 Leica ASP 300S 장비를 사용하였고, 파라핀 임베딩은 Leica Arcadia C/H 장비를 사용하였다. 모든 FFPE 임베딩 프로토콜은 연세대학교 에비슨 의생명연구센터 조직병리학 과에서 수행하였다.

- [85] 이후, FX 처리를 수행하기 전에 FFPE 샘플의 균질화, 탈파라핀화 및 재수화를 수행하였다 (도 2). 우선, FFPE 블록을 임베딩 카세트에서 제거하고 150 x 20mm 페트리 접시에 놓았다. 외부 파라핀 왁스는 조직을 제거하지 않도록 주의하면서

면도날을 사용하여 수동으로 제거하였다. 이후, 블록을 4등분하여 5 mm 스테인리스 스틸 비드가 있는 2 mL eppendorf Safe-Lock 튜브에 각각 넣었다. 조직은 화학 흡 후드에서 Tissue Lyser II 장치(Qiagen)를 사용하여 30 Hz에서 4분 동안 균질화하였다. 수집된 조직 용액은 1,000g에서 3분 동안 펠렛화하였다. 상청액을 버리고 펠렛을 자일렌에 재현탁하고 실온에서 5분 동안 인큐베이션하고 1회 반복하였다. 이후, 조직을 차가운 100% 에탄올에 재현탁시키고, 실온에서 5분 동안 인큐베이션하고, 1회 반복하였다. 이후, 90% 및 70% 에탄올에 단일 배양 단계를 수행하였다. 재수화된 조직은 BC 용액(3X SSC, 3% PVSA, 0.025% Tween-20)에 현탁시키고 20 µm 필터(필요한 경우 조직을 먼저 100 µm 필터로 처리)로 여과시켰다. 여과된 조직은 추가적인 가교 처리 전에 BC 용액에서 2회 더 세척하였다. FX 처리는 3개의 FFPE 마우스 뇌 조직 샘플에서 수행하였다 (도 4A).

[86] 그 결과, FFPE 프로세싱에 의해 샘플 품질이 감소되었더라도, FX-seq 방법은 전체 세포수 및 확인된 유전자 수를 모두 증가시켰다 (도 4B 내지 4D). 특히, 독립형 및 병합형 UMAP 클러스터링 결과에서는 FX 처리가 피질 해마 전구세포(cortex hippocampal progenitor cells, CTX/HP Proj.), 피질하 뉴런(subcortical neurons, Sub-CTX) 및 억제성 개재뉴런(inhibitory interneurons, Int. Neurons)를 포함하는 특정 세포집단을 명확한 해상도로 제공할 수 있어 세포 유형 주석을 개선하여 추가 정보를 제공할 수 있음을 확인하였다 (도 4E 내지 4L). 반면, FX가 처리되지 않은 대조군 샘플의 서열분석 결과는 특정 세포 유형을 구별하는 정보가 충분하지 않아 일반 뉴런으로 분류되는 것을 확인하였다.

[87] 상기 결과로부터, 본 발명의 FX 처리 방법은 FFPE 샘플에서도 RNA 서열분석을 가능하게 하며, 세포 유형 분류의 분해능을 현저하게 향상시키는 효과가 있음을 확인하였다.

[88]

[89] 실시예 7. FFPE 절편 및 H&E 염색된 절편을 이용한 FX-seq 방법의 검증

[90] 본 발명자들은 FFPE 절편 및 H&E(hematoxylin and eosin) 염색된 절편으로 FX-seq 방법의 적용 가능성을 실험하였다. 마우스 뇌 조직의 FFPE 절편 및 H&E 염색된 절편은 다음의 방법으로 준비하였다. 우선, FFPE 블록을 10µm 두께로 절단하였다. 절편화된 FFPE 슬라이드는 샘플 품질을 보존하기 위해 건조시킨 후 실리콘 카젤이 있는 냉장실에 보관하였다. 이후, 10 µm 절편으로 H&E 염색을 수행하였다. H&E 염색은 다음의 프로토콜에 따라 Leica Autostainer XL, CV5030을 사용하여 수행하였다: 각각 7분 동안 자일렌으로 3회 변경, 각각 1분 동안 100% 에탄올로 2회 변경, 각각 1분 동안 95% 에탄올로 2회 변경, 1분 동안 물로 세척, 5분 동안 해리스 헤마톡실린 용액으로 염색, 1분 동안 물로 세척, 3초 동안 1% HCl로 분화, 30초 동안 물로 세척, 3초 동안 0.3% 암모니아 용액 처리, 20-60초 동안 에오신 Y로 염색, 각각 30초 동안 95 % 알코올로 2회 행굼, 각각 1 분 동안 100 % 에탄올로 3회 탈수, 각각 2분 동안 자일렌으로 3회 교체한다. 모든 절편화 및 염색 프로토콜은 연세대학교 에비슨 의생명연구센터 조직병리학과에서 수행하였다.

- [91] 이후, FX 처리를 수행하기 전에 FFPE 샘플의 균질화, 탈파라핀화 및 재수화를 수행하였다 (도 2). FFPE 절편은 조직을 면도날로 긁어내어 유리 슬라이드에서 수동으로 제거하였다. 이후, FFPE 절편으로부터 수집된 조직을 FFPE 블록에서와 같이 탈파라핀화하고 재수화하였다. 또한, H&E 염색된 절편 역시 슬라이드에서 수동으로 제거하였다. H&E 염색된 절편은 이미 탈파라핀화되었기 때문에 재수화만 수행하였다. 각 실험 전에는 핵의 수율을 예비적으로 평가하기 위해 FX-seq 프로토콜을 통해 1-2개의 슬라이드를 실행하였다. 이후, FX 처리 및 핵 분리를 수행하였다 (도 2).
- [92] 그 결과, 하나의 FFPE 절편 또는 H&E 염색된 절편에서 200,000개의 핵이 성공적으로 분리되었다 (도 5A). 다만, 절편화된 FFPE 샘플에서는 전체 UMIs 및 유전자 수가 감소되었다. 그러나, FFPE 절편 역시 FFPE 블록 실험에서와 유사한 클러스터 결과가 관찰됨으로써, FFPE 절편에 대한 FX 처리는 전사체 정보를 보존 또는 회복시킬 수 있음을 확인하였다 (도 5B 및 5C). 또한, H&E 염색된 절편에 대하여 FX-seq 방법을 적용시킨 경우에는 UMIs 및 유전자 수가 감소하고, 미토콘드리아 및 리보솜 RNA 판독이 증가하였다 (도 5B 내지 5E). 이는 제한된 효소 소화 효율 및 가혹한 염색 조건의 영향으로 인해 세포 잔해가 축적되었기 때문일 수 있다. 그럼에도, FFPE 및 H&E 절편의 병합된 전사체 분석 결과에서는 동일한 세포 유형의 공동-클러스터링을 나타냈으며 (도 5F 내지 5K), 이는 FFPE 또는 H&E 절편에 처리된 FX-seq 방법을 통해 일관된 전사체 프로파일을 제공할 수 있음을 의미한다.
- [93] 다음으로, 절편의 두께와 H&E 염색이 인간 임상 샘플의 서열분석 데이터 품질에 영향을 주는지 확인하는 실험을 수행하였다. 본 발명에 이용된 모든 인간 환자의 샘플은 연세대학교 세브란스병원 기관검토위원회가 정한 범위 내에서 수술 전 서면 동의를 통해 승인되었다. 인간 임상 샘플의 FFPE 임베딩을 위해, 인간 종양 샘플은 연세브란스병원에서 원발성 방광암(=요로상피암(urothelial carcinoma))에서 유래된 전이성 대망 덩어리(metastatic omental mass)로부터 절제된 수술 표본(슬라이드당 대략 2.5 cm x 1.2 cm)을 입수하였다. 모든 수득된 샘플은 즉시 4% PFA, 1X PBS 용액에 넣고 4°C에서 48시간 동안 진탕하여 고정하였다. 강하게 고정된 인간 임상 샘플은 마우스 뇌 조직의 FFPE 임베딩에 사용된 프로토콜과 동일한 방법으로 임베딩하였다. 이후, FFPE 블록을 4 μ m 또는 10 μ m 두께로 절단하였고, H&E 염색을 수행하였다 (도 5L). 이후, 샘플의 균질화, 탈파라핀화 및 재수화를 수행하였고, FX 처리 및 핵 분리를 수행하였다 (도 2).
- [94] 그 결과, 인간 수술 표본의 FFPE 절편 및 H&E 염색된 절편으로부터 수득된 단일핵 전사체는 세포 유형에 따라 일관되게 공동 식별되었다 (도 5M 및 5N). 다만, 4 μ m FFPE 절편에서는 10 μ m FFPE 절편에 비해 더 적은 유전자수 및 UMIs가 확인되었고, H&E 염색된 절편에서는 FFPE 절편에 비해 더 적은 유전자수 및 UMIs가 확인되었으며, 미토콘드리아 판독수가 증가하였다 (도 5O 내지 5R). 즉, 절편의 두께와 H&E 염색으로 인해 유전자수, UMIs 및 미토콘드리아 수에 영향을 주

었다. 그럼에도, 각 실험군의 회복된 UMIs의 수와 각 세포군당 세포수는 하나의 통합된 그룹으로서의 유사한 특징을 공유함을 확인하였다 (도 5S 및 5T). 상기와 같이, 본 발명의 FX-seq 방법은 확장 가능한 snRNA-seq 방법으로서, 인간 수술 표본에서 준비된 FFPE 절편 및 H&E 염색된 절편으로부터 단일핵 수준의 전사체를 회복시킬 수 있음을 확인하였다 (도 5U).

[95]

[96] 실시예 8. GIST(gastrointestinal stromal tumor) FFPE 블록을 이용한 FX-seq 방법의 확장성 검증

[97] 더 큰 규모의 전사체 프로파일링은 세포 유형에 대한 더 나은 적용 범위를 제공하여 생물학적 과정과 세포 이질성에 대한 더 나은 이해를 향한 다양하고 희귀한 세포 유형의 식별로 이어진다 (J. Cao *et al.*, Nature. 566, 496-502 (2019); J. Cao *et al.*, Science. 370, eaba7721 (2020); 및 C. Qiu *et al.*, bioRxiv. 2023 Apr 5;2023.04.05.535726). 이에 5년 간의 티로신 키나제 억제제(imatinib) 치료에 대한 부분 반응을 보인 후 최근 종양이 진행되어 외과적으로 절제된 GIST (gastrointestinal stromal tumor) 표본에서 얻은 FFPE 블록을 통해 FX-seq 방법의 확장성 및 다양성을 평가하기 위한 실험을 수행하였다. 종양 조직은 소장에서 유래하였으며, 대략 1.5cm x 0.8cm x 1cm로 측정되었다 (도 3A). 수술적으로 절제된 인간 GIST 조직은 즉시 4% PFA로 4°C에서 48시간 동안 고정하였다.

[98] 본 발명자들은 단일 실험에서 균질화된 GIST FFPE 블록의 10분의 1에서 약 400만개의 핵을 분리하였고, 핵당 평균 5,000개의 리드로 199,293개 핵의 하위 집합을 프로파일링하였다. 이후, 생성된 서열분석에 대한 로우 데이터는 품질 관리 및 이중선 제거를 위해 추가 처리되어 169,787개의 단일핵 전사체에서 평균 UMIs가 1543.7로 확인되었다 (도 6B 내지 6F). 또한, 분석된 데이터세트는 cDC(conventional dendritic cells) 및 pDC(plasmacytoid dendritic cells)과 같은 희귀 면역세포군을 포함하여 다양한 세포유형의 포괄적인 분류를 나타내었다 (도 6G).

[99] 특히, GIST FFPE 블록의 FX-seq 방법으로 관찰된 발현 패턴에 대한 심층 분석을 통해 특정 세포군과 장기간 이마티닙(imatinib) 치료 효과 간의 전환을 밝힐 수 있었다. 구체적으로, 가장 큰 클러스터에서 위장관의 ICC 세포(interstitial cells of Cajal)의 특이적 마커 유전자이자 ICC 유래의 GIST 종양 세포에 대한 마커인 ANO1의 현저한 상향 조절을 확인하였다. 종양 클러스터의 궤적추론(trjectory inference) 및 PAGA(partition-based graph abstraction) 분석을 통해 정상 ICC (마커: *MYH11*, *MYLK* 및 *TPM1*)에서 증식하는 세포군(마커: *CENPF*, *TOP2A* 및 *MKI67*)으로의 전환을 나타내는 전사체에서의 순차적 변화의 두 가지 뚜렷한 경로를 확인하였다 (도 6H 및 6I). 이후, 증식하는 세포군에 대한 두 가지 경로가 장기간의 이마티닙(imatinib) 치료 후 나타나는 획득된 내성과 관련된 2차 돌연변이로 보고된 *KIT* exon 17 mutation (p.N822K)을 가진 GIST에서 이마티닙(imatinib)에 대한 내성 메커니즘이 나타나는지 추가로 조사하였다 (B. Liegl *et al.*, J. Pathol. 216,

64-74 (2008); 및 M. C. Heinrich *et al.*, J. Clin. Oncol. 24, 4764-4774 (2006)). 두 경로 모두는 돌연변이 활성화에 의해 GIST의 종양 유발 유전자인 *KIT* 및 *PDGFRA*의 순차적으로 과발현되는 것으로 밝혀졌다 (S. Hirota *et al.*, Science. 279, 577-580 (1998); 및 M. C. Heinrich *et al.*, Science. 299, 708-710 (2003)).

[100] Path 1에 따라 전사체는 *PCNA*, *DNMT1* 및 *UHRF1*를 포함하는 DNA 메틸화 관련 유전자의 일시적인 증가된 발현을 보였고, *EZH2*에 의해 인코딩되는 히스톤 메틸화 효소의 지속적인 상향 조절을 보였다 (도 6J). 이러한 유전자의 상향 조절은 후생적 변형과 관련되며, *ALK*, *ATAD2* 및 *MYO3A*를 포함하는 여러 유전자의 일시적 발현과 관련이 있는 것으로 추측된다 (도 6K). 이러한 변형된 유전자 발현 패턴은 *DNMT3B*, *CIT* 및 *DIAPH3*의 과발현으로 나타나는 전사체 변화를 통해 증식하는 *KIT*^{low}/*PDGFRA*^{high} 세포에서 이마티닙(imatinib) 내성을 초래할 수 있다고 추측되었다. 또한, Path 2에 따라 *EZH2*의 유사한 과발현은 다수 유전자의 비정상적인 발현으로 관찰되지만 DNA 메틸화 유전자에 대한 변화가 없음을 확인하였다 (도 6L). 특히, 종양 집단(도 6L의 클러스터 9)에서 향상된 유전자 발현 (*GDF15*, *PURPL*, *PLEKHG1*, *GFRA1* 및 *SYNDIG1*)은 증식 집단에서 감소하였고 증식 마커와 함께 유전자의 비정상적인 발현이 수반되었다 (도 6M). 상기 결과로부터, GIST 종양 세포의 증식 집단에서 후생적 변형과 관련된 유전자를 포함하는 두 가지 경로가 이마티닙(imatinib)에 대한 세포 반응과 내성 획득에 대하여 새로운 통찰력을 제공할 수 있음을 확인하였다.

[101] 상기와 같이, 본 발명의 FX-seq 방법은 임상 FFPE 샘플에 대한 높은 확장성과 데이터 품질을 입증하였으며, 인간 질병과 관련된 통합 세포 과정의 동적 특성을 이해하는데 도움이 되는 새로운 분자 마커를 발견할 수 있는 기회를 제공할 수 있음을 확인하였다.

[102]

[103] 실시예 9. CRC(human colorectal cancer) FFPE 절편을 이용한 FX-seq 방법의 추가 검증

[104] 본 발명자들은 FX-seq 방법을 사용하여 약 2개월 동안 보관된 CRC(human colorectal cancer) FFPE 슬라이드 절편으로부터 단일핵 전사체를 분석하였다. 병리학자의 주석에 기초하여 확인된 종양(T) 영역은 FFPE 절편의 비종양(NT) 영역과 물리적으로 분리하였다. 각 샘플에 대해 FX 처리 및 핵 분리를 수행하였고, 영역 기원을 근거로 첫 번째 역전사 프라이머를 사용하여 바코드를 표시하였으며, 순차적으로 조합 라벨링과 서열분석을 수행하였다 (도 7A). 이러한 접근 방식을 통해 공간적으로 상황에 맞는 병리학적 주석을 사용하여 FX-seq을 수행할 수 있었다.

[105] 서열분석 결과는 면역세포(immune cells), 내피세포(endothelial cells), 장 신경교(enteric glia) 및 상피 계통 세포가 우세한 결합세포(connective cells)를 포함하는 CRC에 존재하는 표준 세포 유형의 존재를 확인하였다 (도 7B 및 7C). 개별 핵의 공간적 기원을 인코딩하는 영역 바코드를 통해 각 클러스터 내의 영역 분포

를 식별할 수 있었다 (도 7D 및 7E). 흥미롭게도, 정상 상피 세포와 상이한 큰 상피 계통 클러스터는 영역 기원을 근거로 상피 전구 세포 및 종양 세포로 식별되었다 (도 7F 및 7G). 도 7G의 클러스터에 대한 하위 클러스터 분석에서는 전구 세포와 종양에 할당된 각 세포군의 뚜렷한 전사체 프로파일을 확인하였다 (도 7H). 데이터세트에 대해 inferCNV 패키지(broadinstitute/infercnv (2023))를 이용한 각 분석 결과는 정상 상피 세포군과 비교하여 상피 전구 세포와 종양 모두에서 CNV(copy number variation) 상태의 변화를 추론하였다. 기존에 보고된 CRC 샘플의 scRNA-seq과 유사하게, 종양에서는 Chr7p, Chr8q, Chr13q 및 Chr 20p의 식별가능한 증가가 관찰된 반면, 상피 전구세포에는 CNV 상태에서 최소 변형을 나타내었다 (도 7I). 추론된 CNV 결과는 scRNA-seq을 사용한 기존 보고된 CNV 추론의 하위 집합인 것으로 밝혀졌다 (I. Joanito *et al.*, Nat. Genet. 54, 963-975 (2022)). 이를 근거로 확인된 종양 집단은 LGR5⁺ crypt-bottom stem cell에서 유래된 MSS(microsatellite-stable) iCMS2(intrinsic consensus molecular subtype 2)에 해당한다 (I. Joanito *et al.*, Nat. Genet. 54, 963-975 (2022)). 상기와 같이, FX-seq 방법에 의해 얻은 단일핵 전사체 프로파일은 상행 결장에서 MSS- 및 KRAS-야생형을 갖는 환자의 조직학적 및 분자적 소견과 일치하였다.

[106] 또한, FX-seq 방법은 CRC 조직의 복잡한 종양 미세환경(TME)에 대한 통찰력을 제공할 수 있음을 확인하였다. 구체적으로, 섬유아세포 집단에 대한 추가 하위 클러스터링 분석 결과에서는 TME에서 주요 조절자로서 역할을 하는 활성화된 섬유아세포의 하위 집합인 두 개의 CAFs(cancer-associated fibroblasts)를 확인하였다 (도 7J). CAF 집단이 종양 영역으로 편향된 반면, 정상 섬유아세포(NMF)와 그 전구세포는 종양 및 비종양 영역 모두에서 고른 분포를 보였다 (도 7K 및 7L). CAF-A 및 CAF-B 집단이 전사체 상태를 기반으로 확인되었으며, 각 집단에 풍부한 특정 유전자가 확인되었다 (도 4M). CAF-A에 대하여 FAP, PDPN, COL1A2 및 MMP2, CAF-B에 대하여 ACTA2, TAGLN 및 PDGFRA를 포함한 클러스터 특정 유전자의 분석은 이전 연구와 강한 상관관계를 보여준다 (H. Li *et al.*, Nat. Genet. 49, 708-718 (2017)). 결과적으로, 상기 FX-seq 방법을 통해 각 클러스터에 더욱 특이적인 추가 마커 유전자를 밝힐 수 있어 CAF 집단의 이질성에 대한 통찰력을 제공할 수 있음을 확인하였다.

[107] 이로써, 본 발명의 FX-seq 방법은 새로운 표본을 얻기 위한 추가 수술 절차 없이, FX-seq를 통해 FFPE 절편으로부터 단일세포 또는 단일핵 수준 분해능의 정보로부터 암 하위 유형을 식별할 수 있어 질병의 진단 분야에서 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

[108]

[109] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적

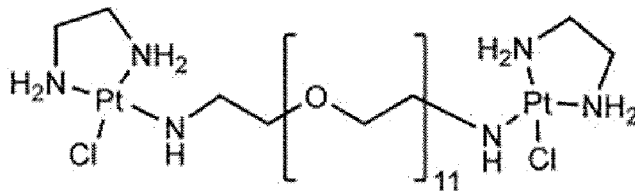
이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

- [110] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

- [청구항 1] 유기촉매(organocatalyst) 및 백금 기반의 가교제(Pt-based crosslinker)를 포함하는 고정액 교환용 조성물.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 유기촉매는 2-아미노페닐보론산(2-aminophenylboronic acid)인 것인, 조성물.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서,
상기 백금 기반의 가교제는 핵산의 Watson-Crick 염기쌍을 방해하지 않으면서 위치선택적으로 결합하는 것인, 조성물.
- [청구항 4] 제 1 항에 있어서,
상기 백금 기반의 가교제는 N7-구아닌 잔기에서 결합을 형성하는 것인, 조성물.
- [청구항 5] 제 1 항에 있어서,
상기 백금 기반의 가교제는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물인 것인, 조성물:

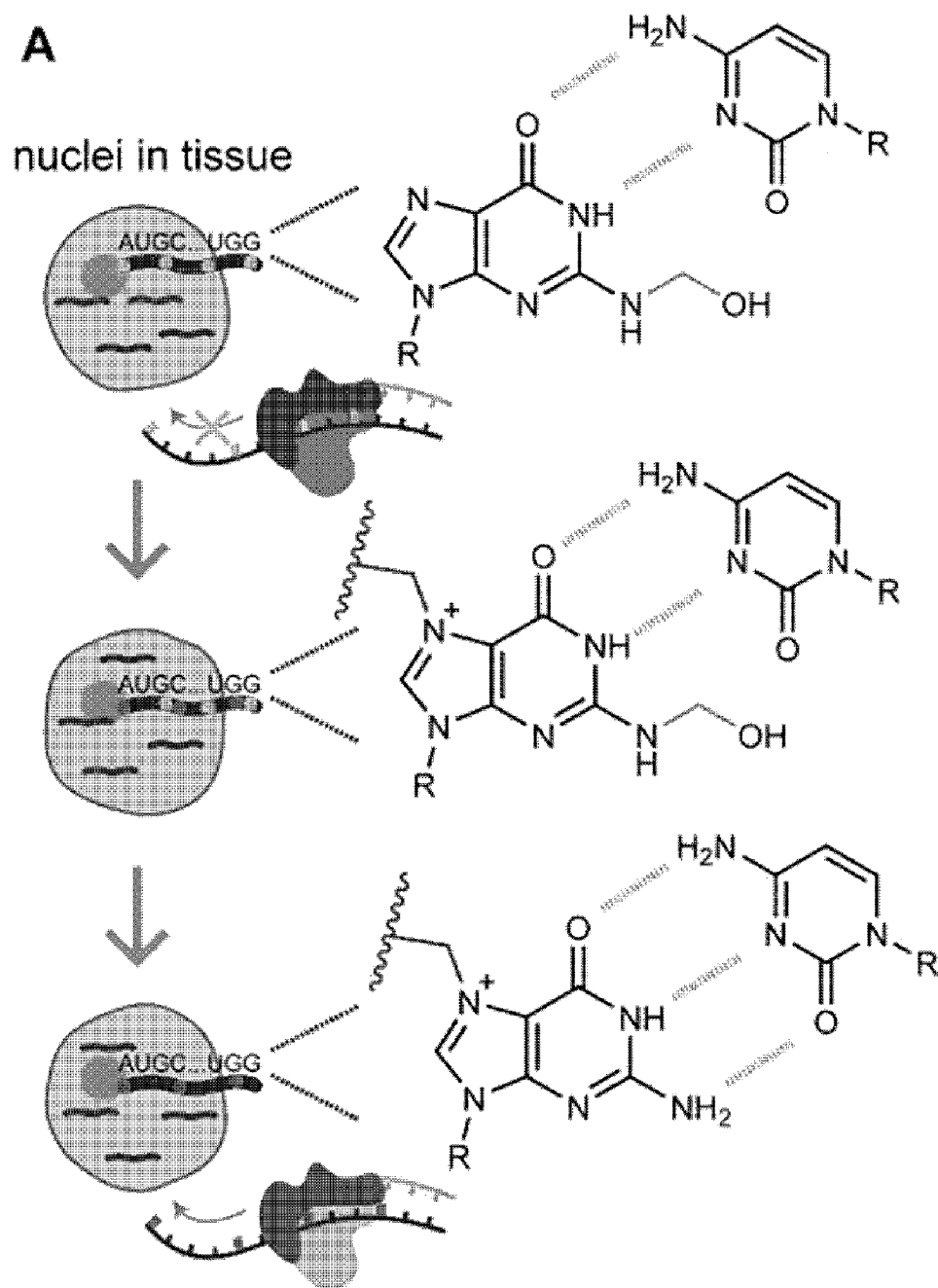
[화학식 1]



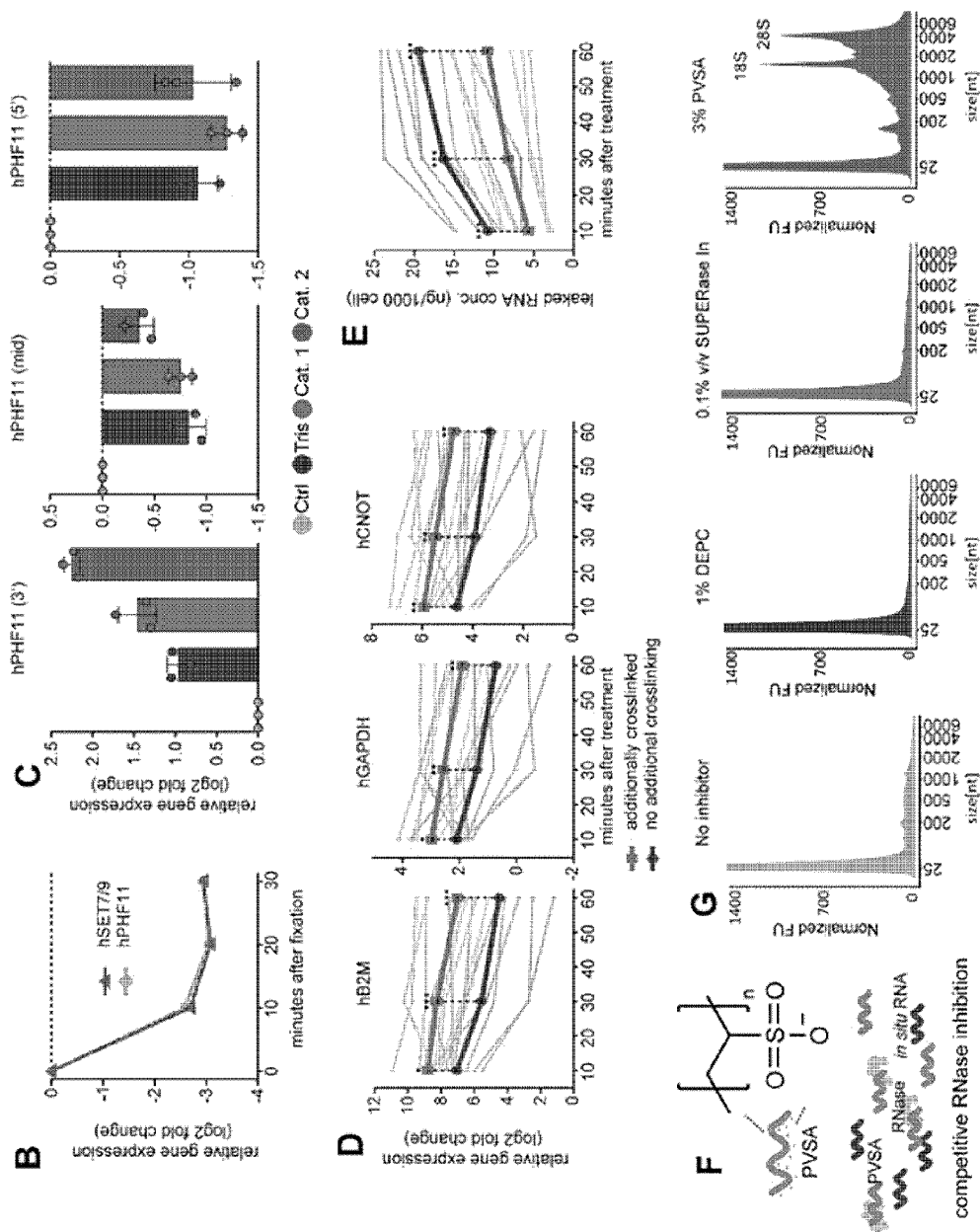
- [청구항 6] 제 1 항에 있어서,
상기 조성물은 RNase 억제제를 추가적으로 더 포함하는 것인, 조성물.
- [청구항 7] 제 6 항에 있어서,
상기 RNase 억제제는 PVSA(polyvinyl sulfonic acid)인 것인, 조성물.
- [청구항 8] 제 1 항에 있어서,
상기 조성물은 고정액으로 고정된 생물학적 샘플로부터 고정액을 제거하기 위한 것인, 조성물.
- [청구항 9] 제 8 항에 있어서,
상기 생물학적 샘플은 파라포름알데히드(PFA) 고정 또는 포르말린 고정 파라핀 포매(FFPE) 조직의 블록 또는 이의 절편인 것인, 조성물.
- [청구항 10] 제 1 항에 있어서,
상기 고정액 교환은 단일세포 또는 단일핵을 분리하기 전에 수행하는 것인, 조성물.
- [청구항 11] 제 1 항에 있어서,
상기 고정액 교환은 단일세포 전사체 분석, 단일핵 전사체 분석, 다중 오믹스 분석 및 이의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 수행하기 위한 것인, 조성물.

- [청구항 12] 제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 따른 고정액 교환용 조성물을 포함하는 고정액 교환용 키트.
- [청구항 13] 제 12 항에 있어서,
상기 키트는 완충액을 추가로 더 포함하는 것인, 키트.
- [청구항 14] (a) 균질화된 생물학적 샘플에 백금 기반의 가교제가 포함된 용액을 처리하는 단계;
(b) 상기 (a) 단계 후 펠릿을 분리한 후 유기촉매가 포함된 용액으로 재현탁하는 단계; 및
(c) 상기 재현탁된 용액을 가열하는 단계를 포함하는 고정액 교환 방법.
- [청구항 15] 제 14 항에 있어서,
상기 가열은 50 내지 60°C에서 10분 내지 60분 동안 수행되는 것인, 방법.
- [청구항 16] 제 14 항에 있어서,
상기 생물학적 샘플은 파라포름알데히드(PFA) 고정 또는 포르말린 고정 파라핀 포매(FFPE) 조직의 블록 또는 절편인 것인, 방법.
- [청구항 17] 제 14 항에 있어서,
상기 백금 기반의 가교제가 포함된 용액 및 유기촉매가 포함된 용액에는 RNase 억제제를 추가적으로 더 포함하는 것인, 방법.
- [청구항 18] 제 17 항에 있어서,
상기 RNase 억제제는 PVSA(polyvinyl sulfonic acid)인 것인, 방법.
- [청구항 19] 제 14 항에 있어서,
상기 고정액 교환은 단일세포 또는 단일핵을 분리하기 전에 수행하는 것인, 방법.

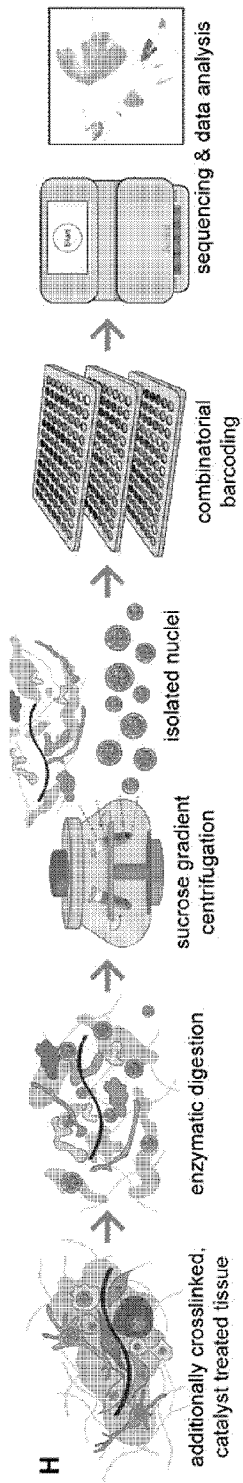
[도 1a]

A**Fixative eXchange**

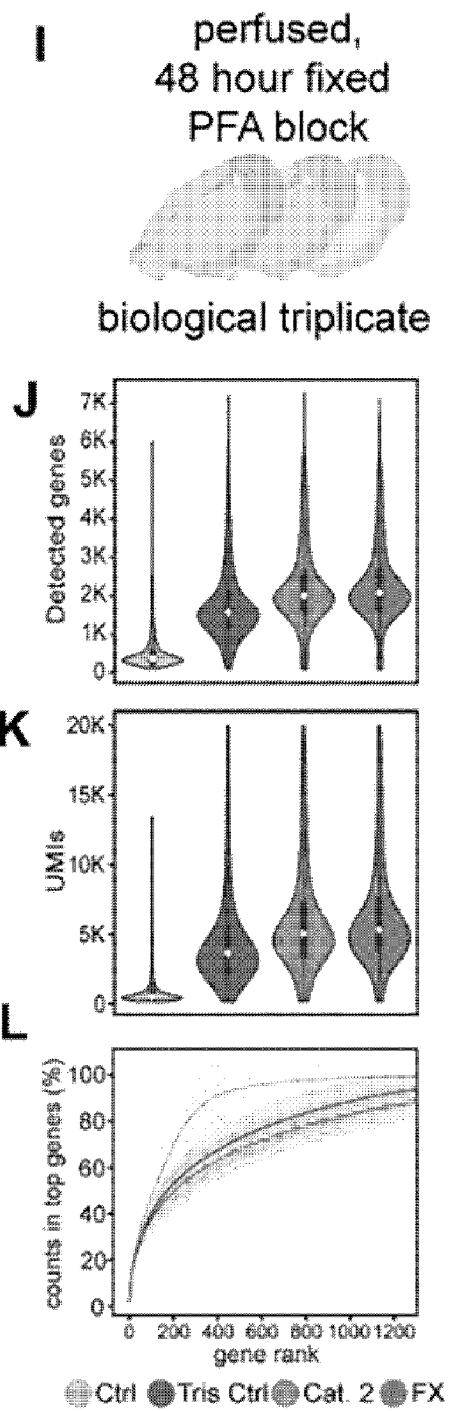
[15]



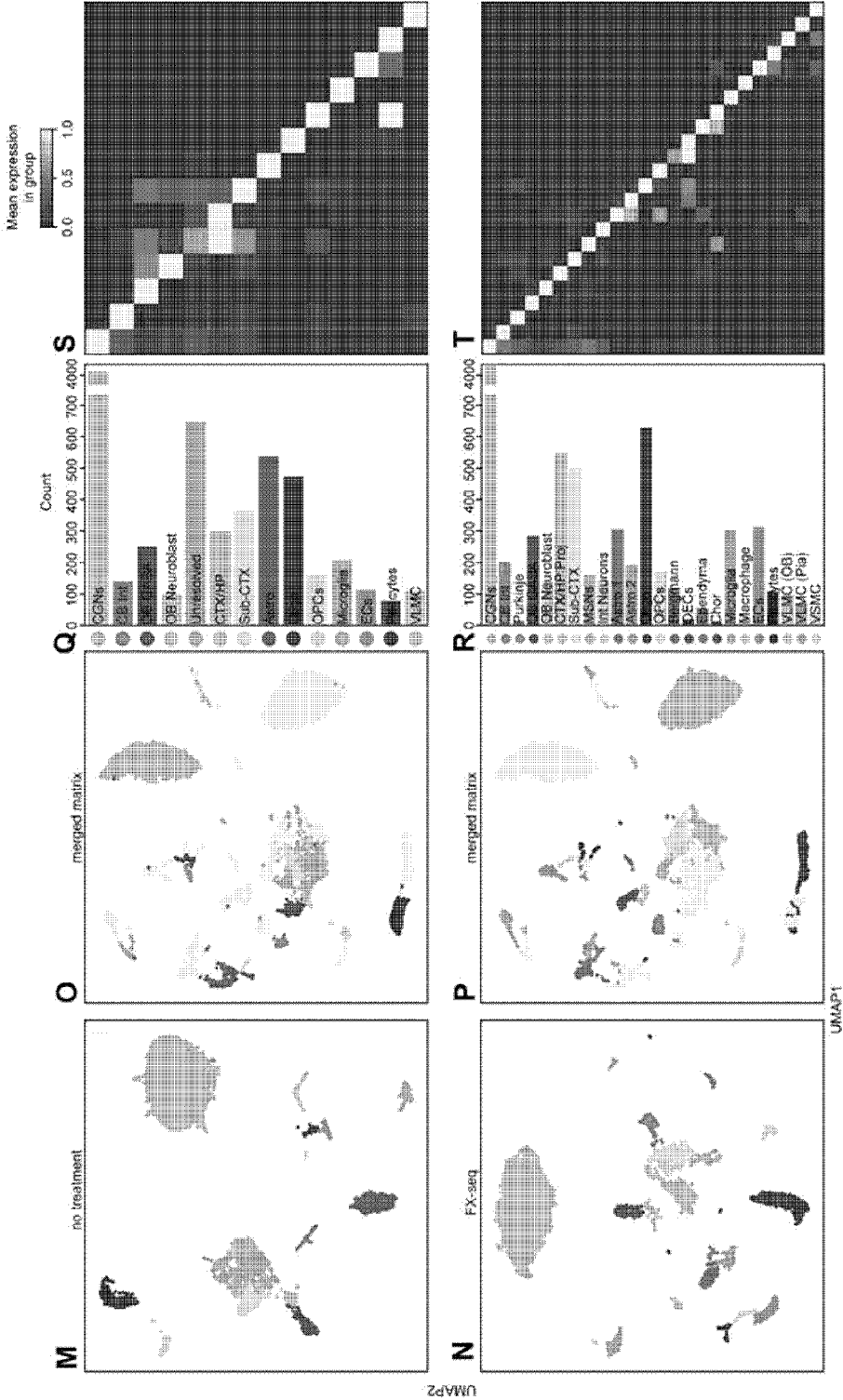
[도 1h]



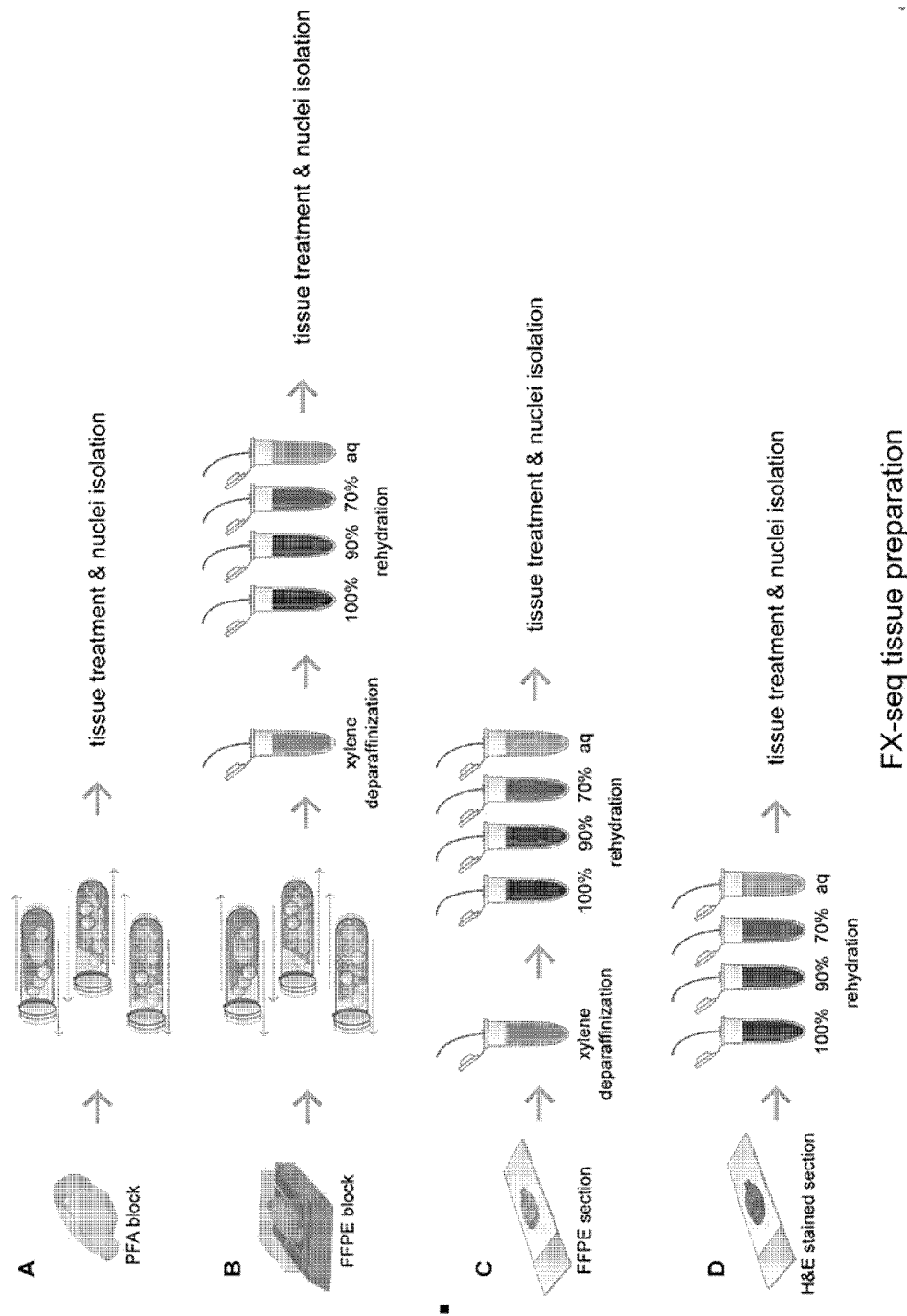
[도 1i]



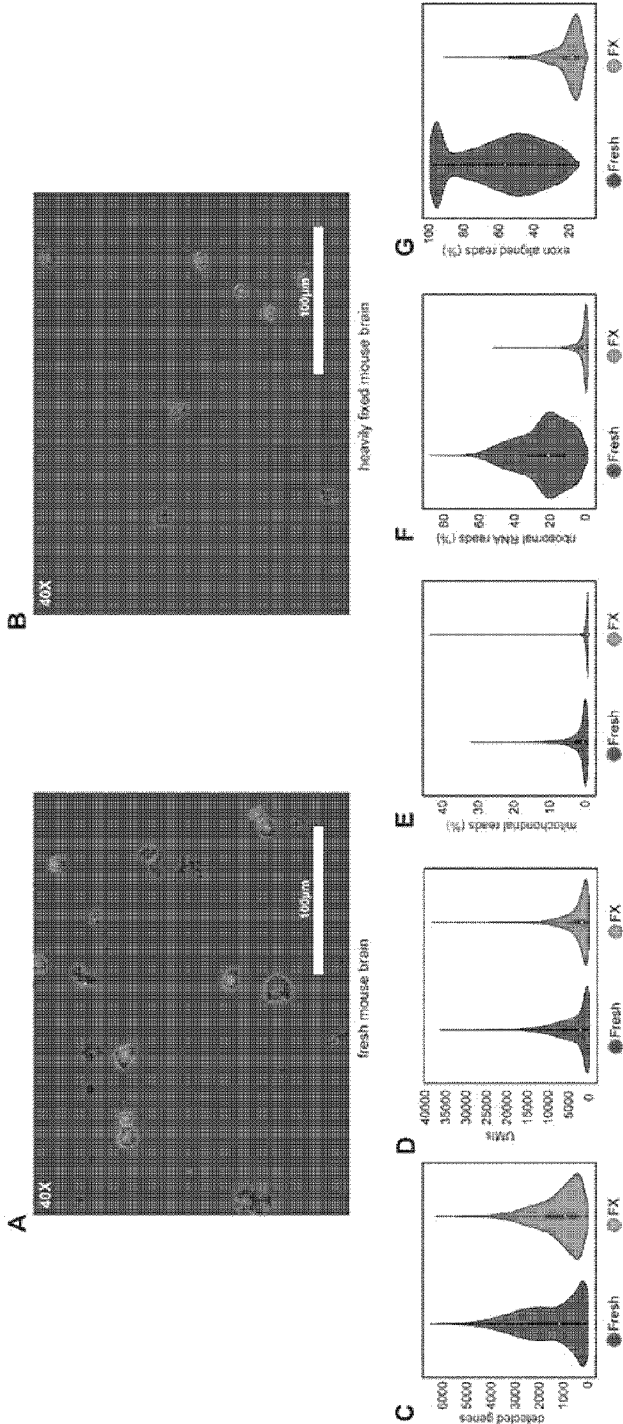
[5m]



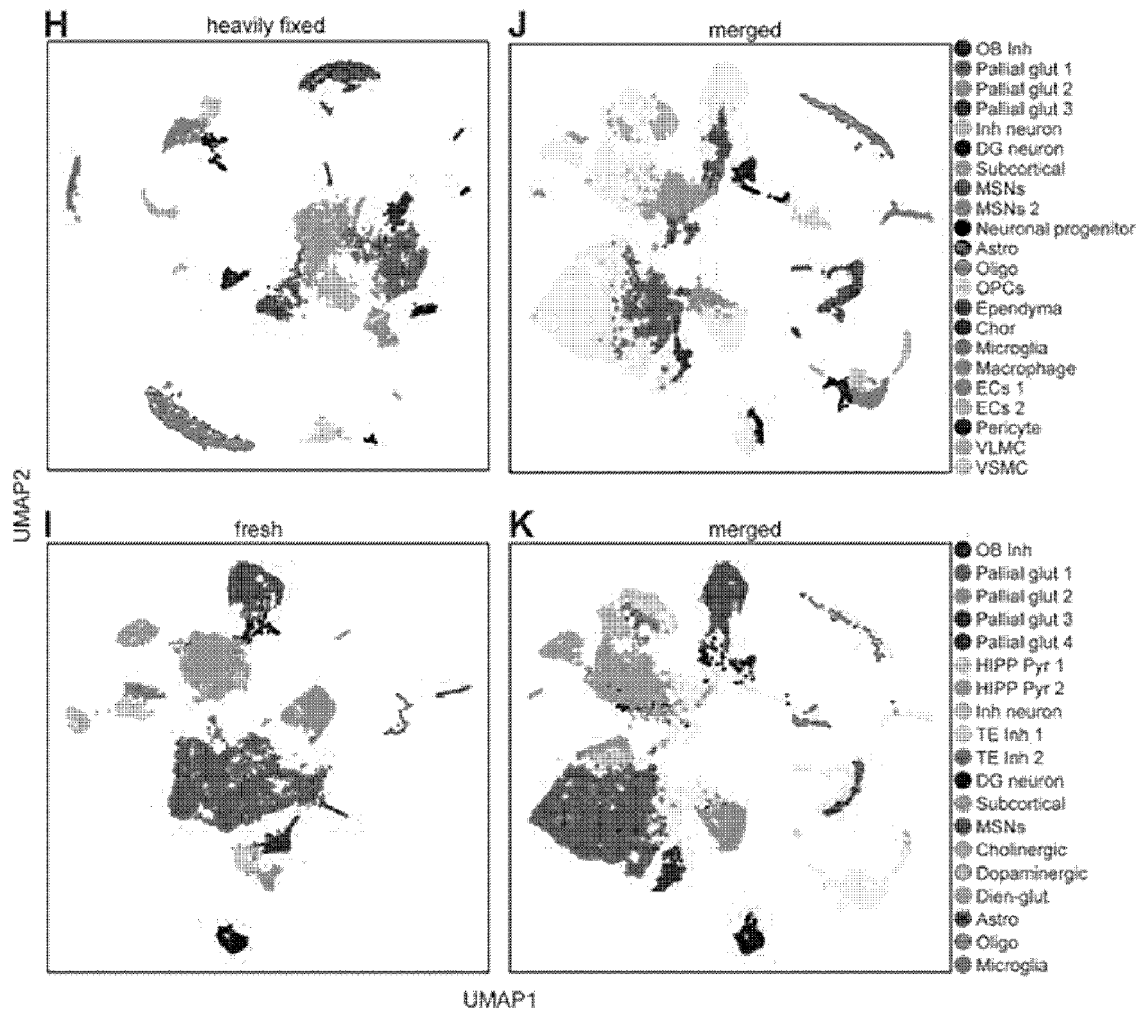
[도2]



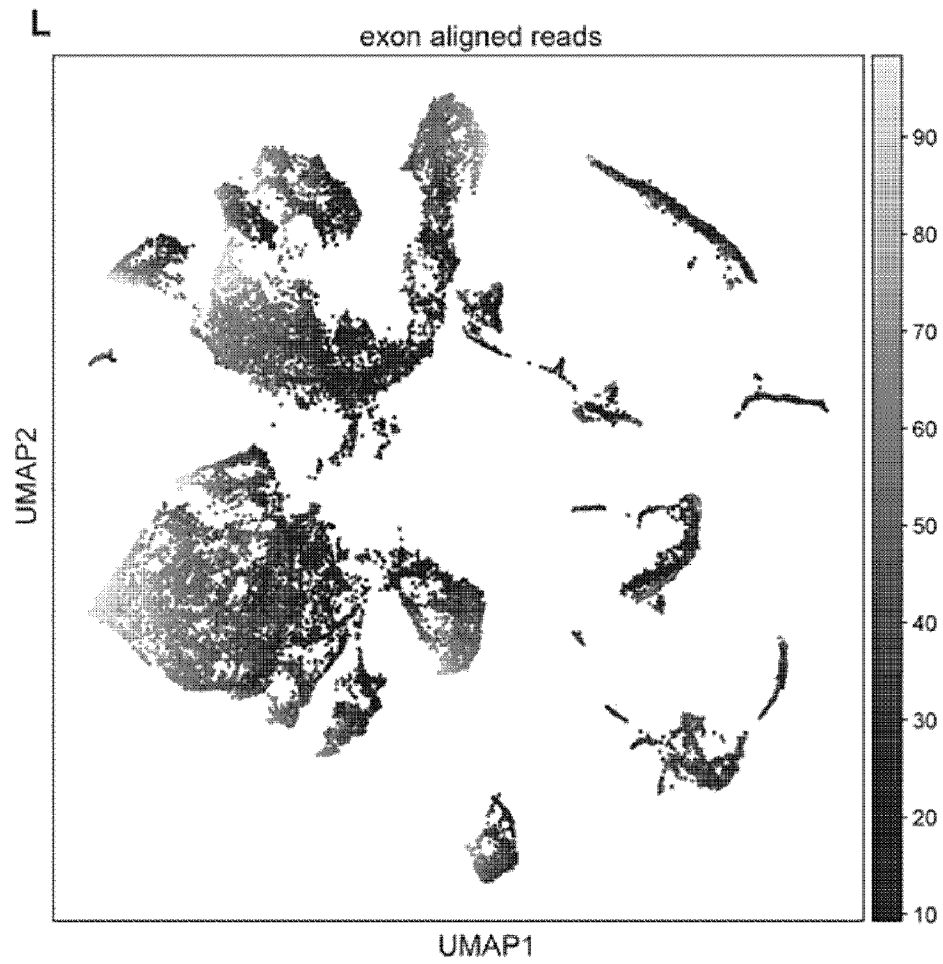
[도3a]

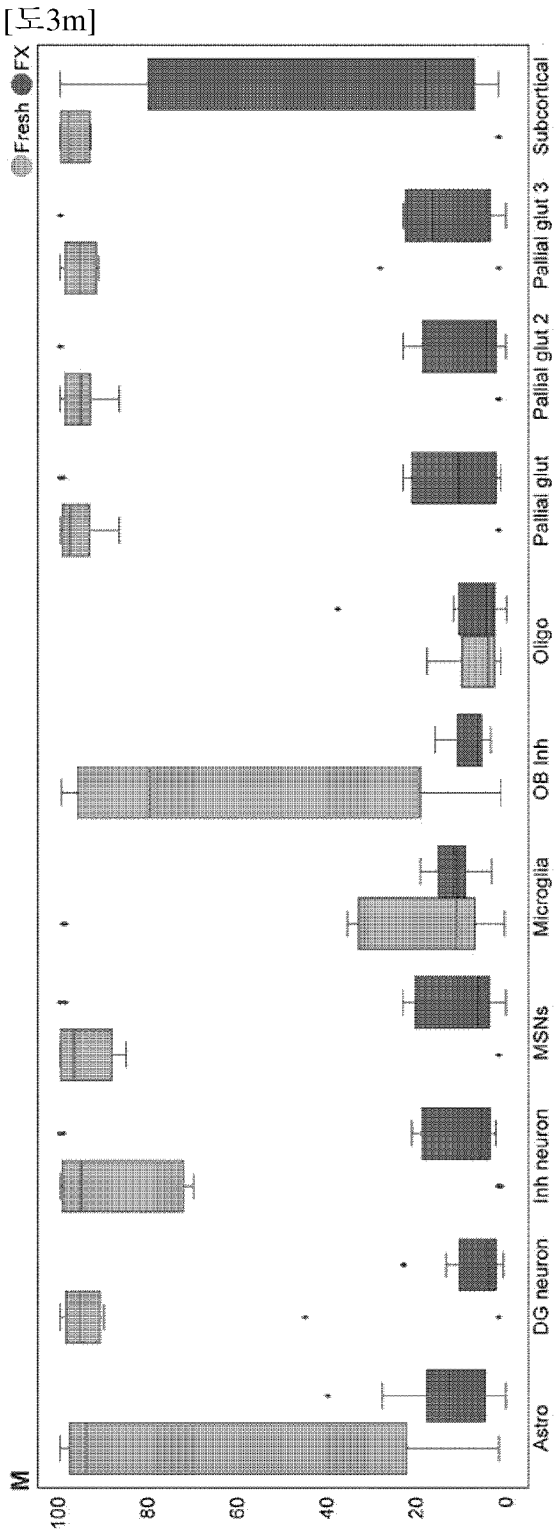


[도3h]

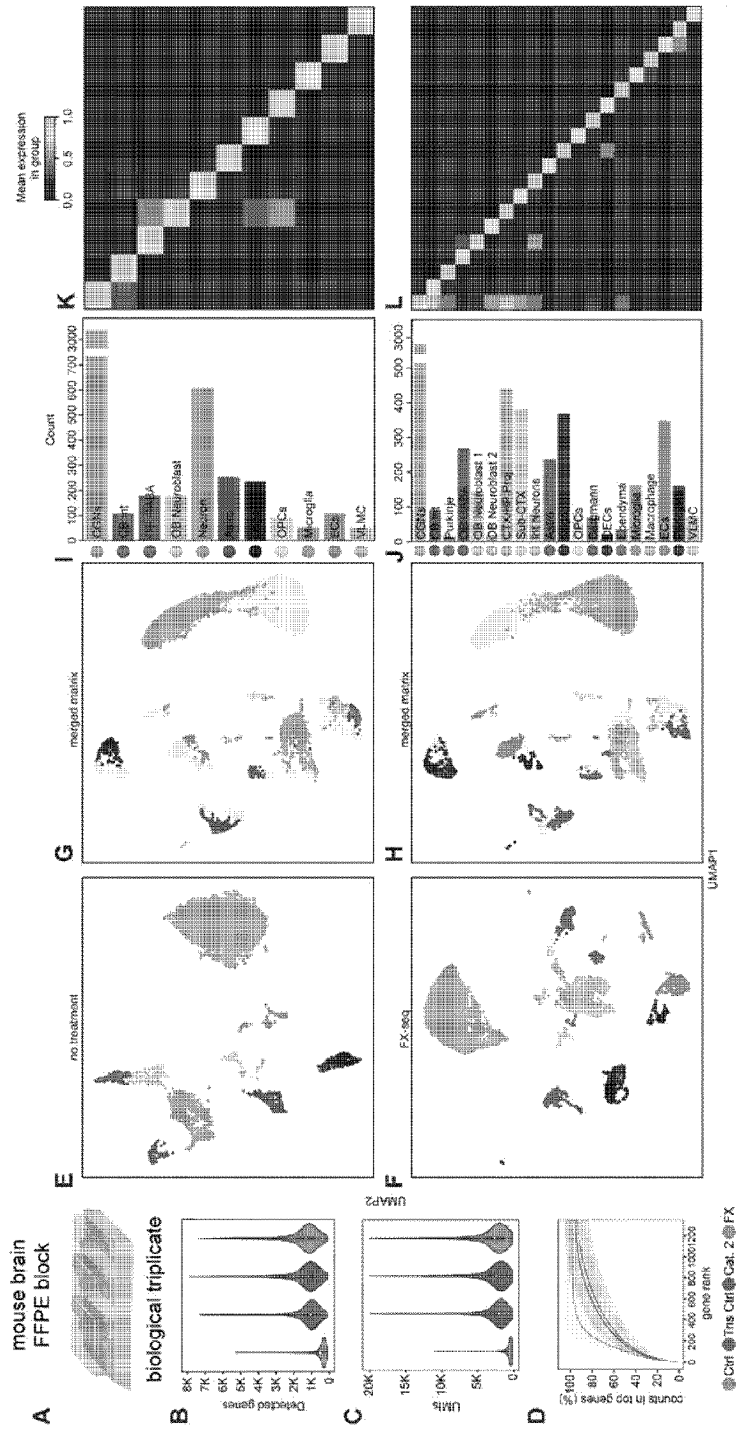


[도31]

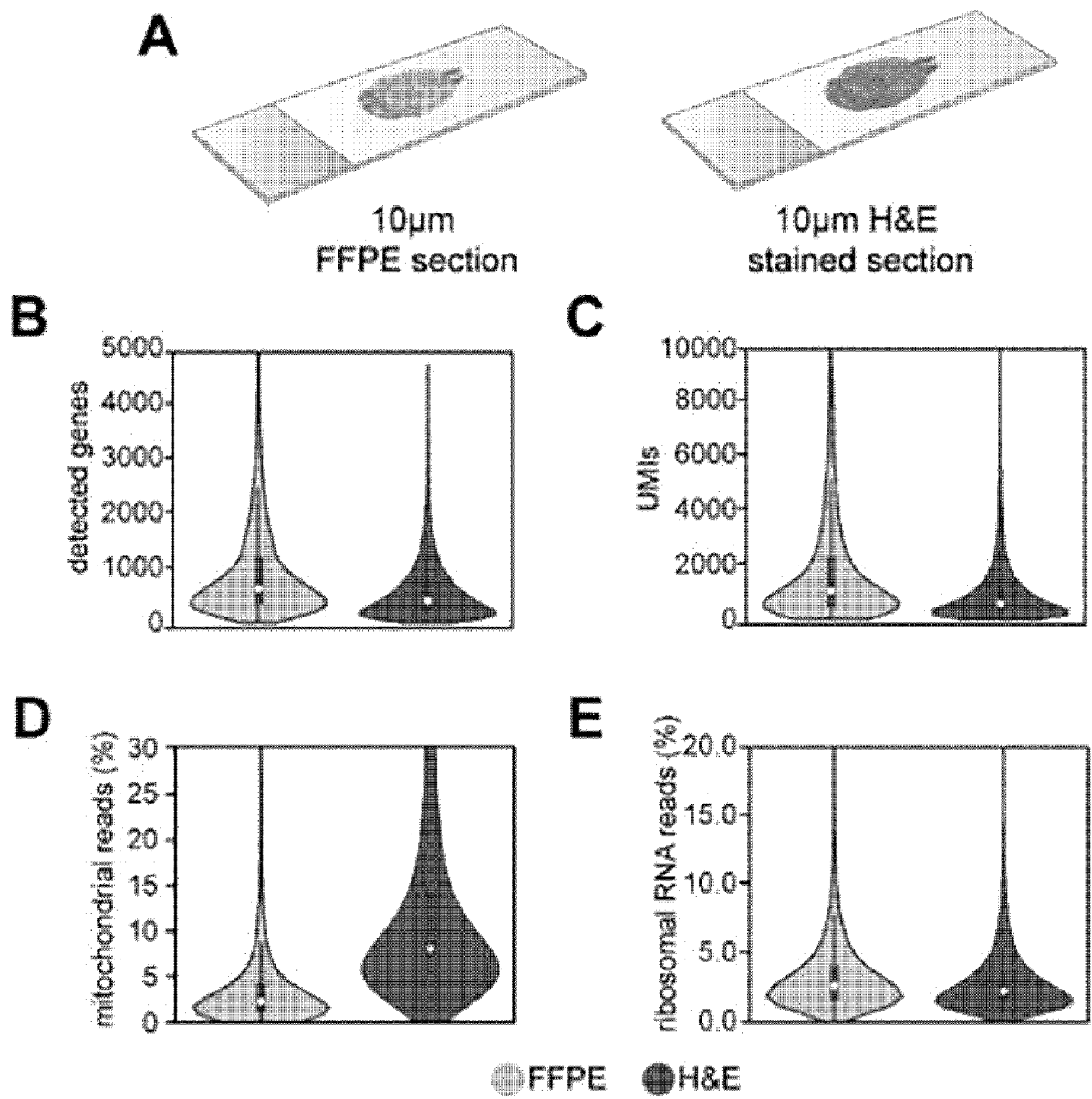




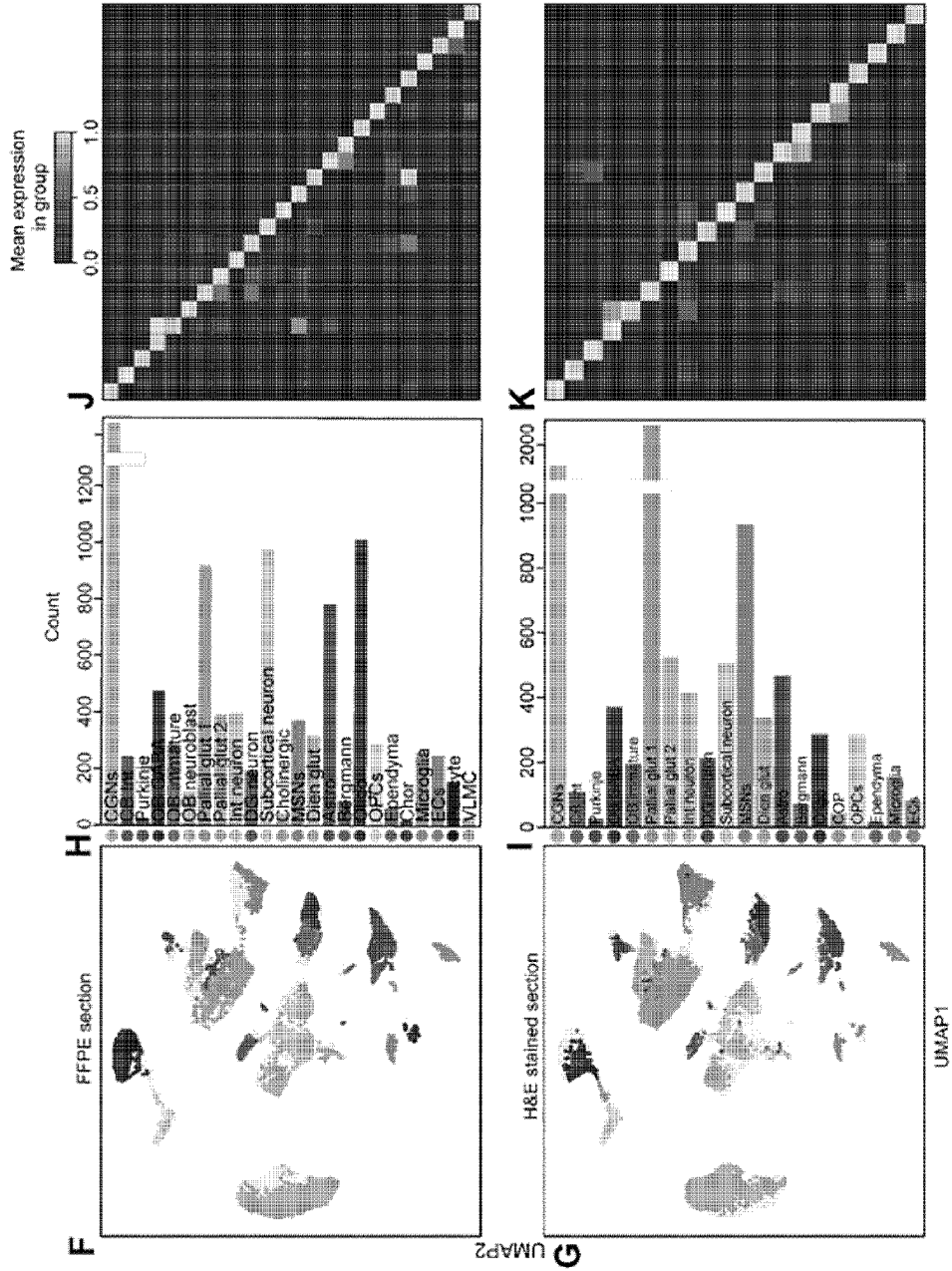
[54]



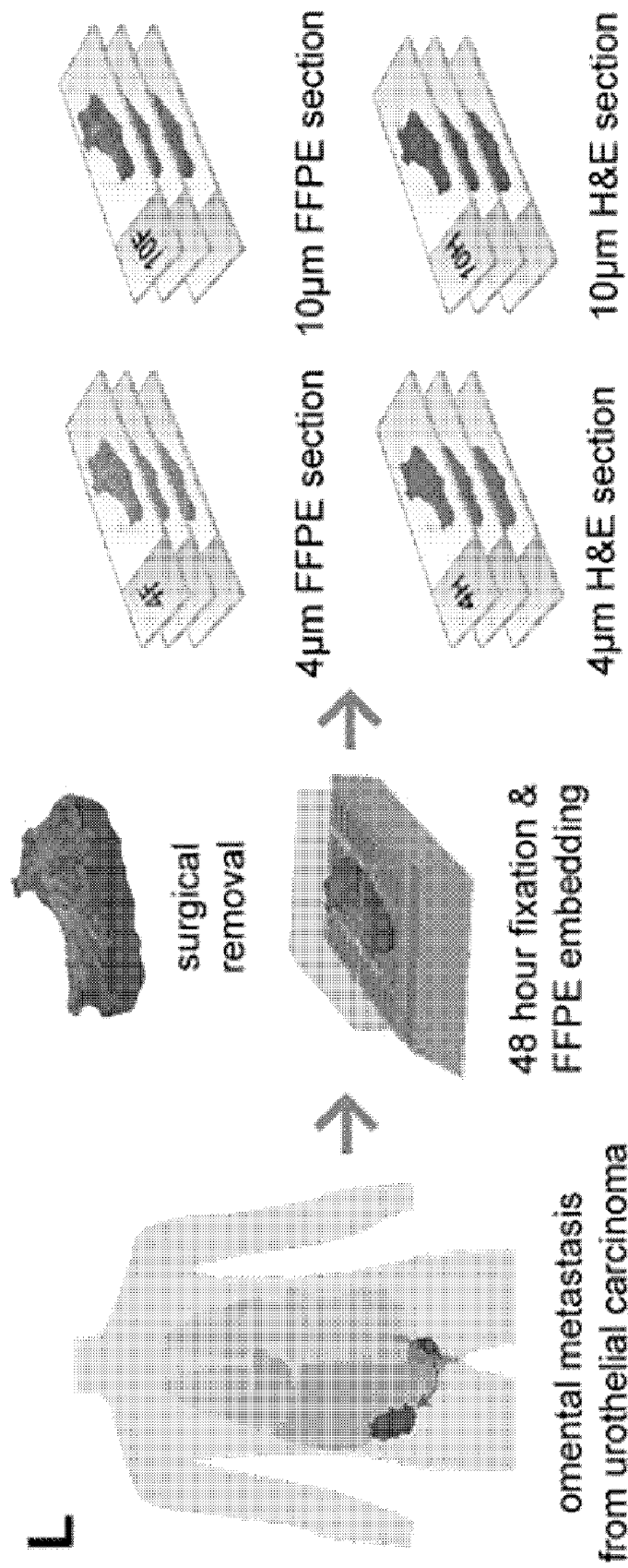
[도5a]



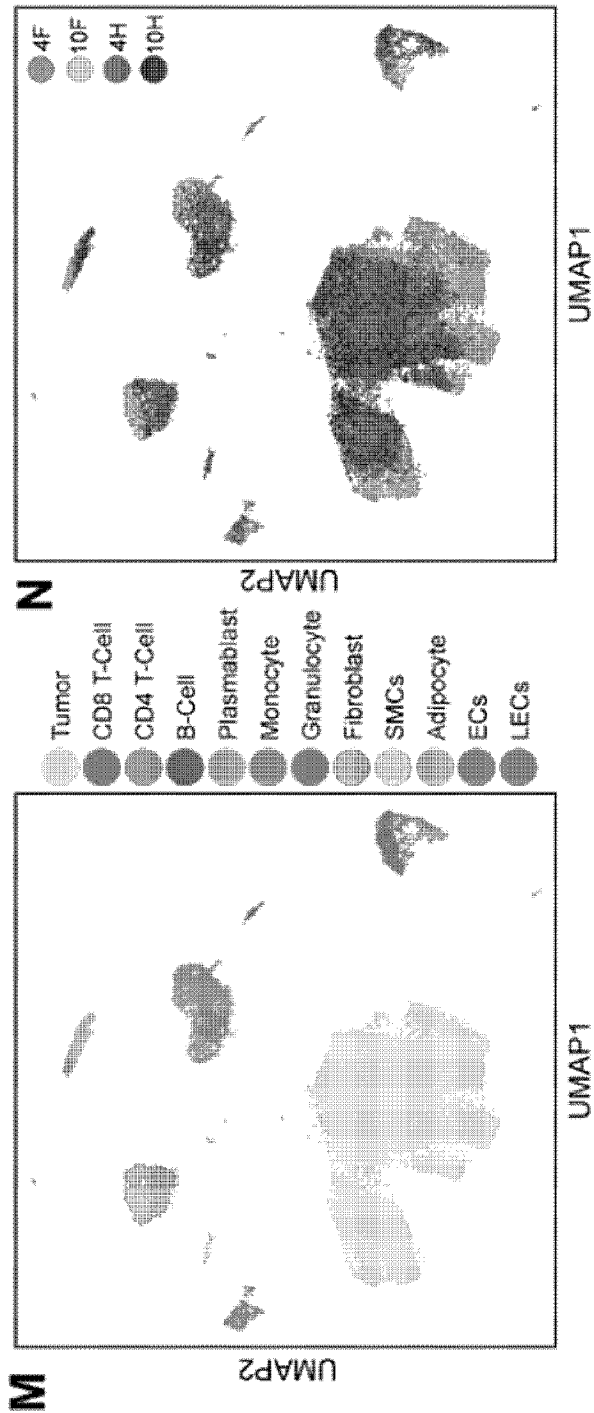
[도5f]



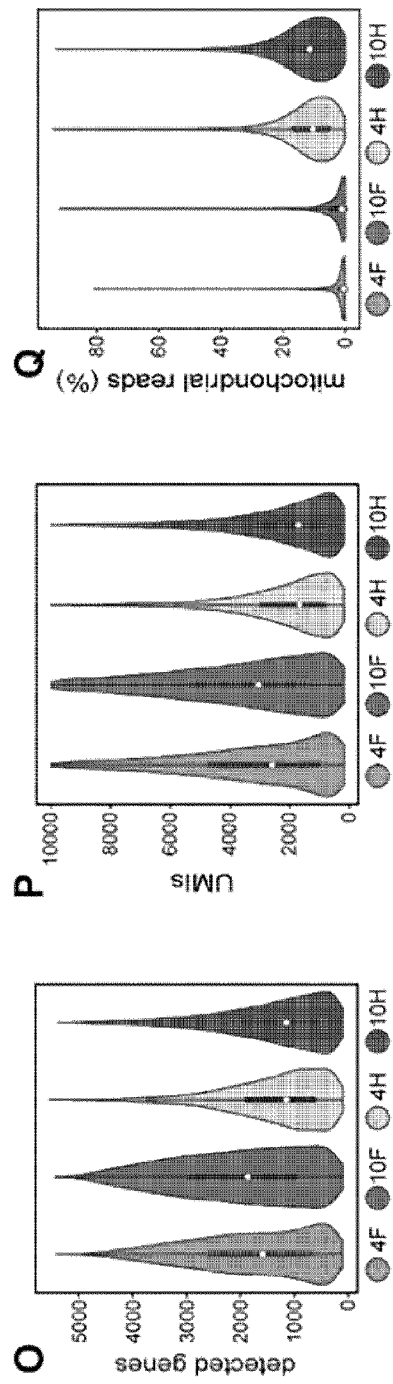
[도51]



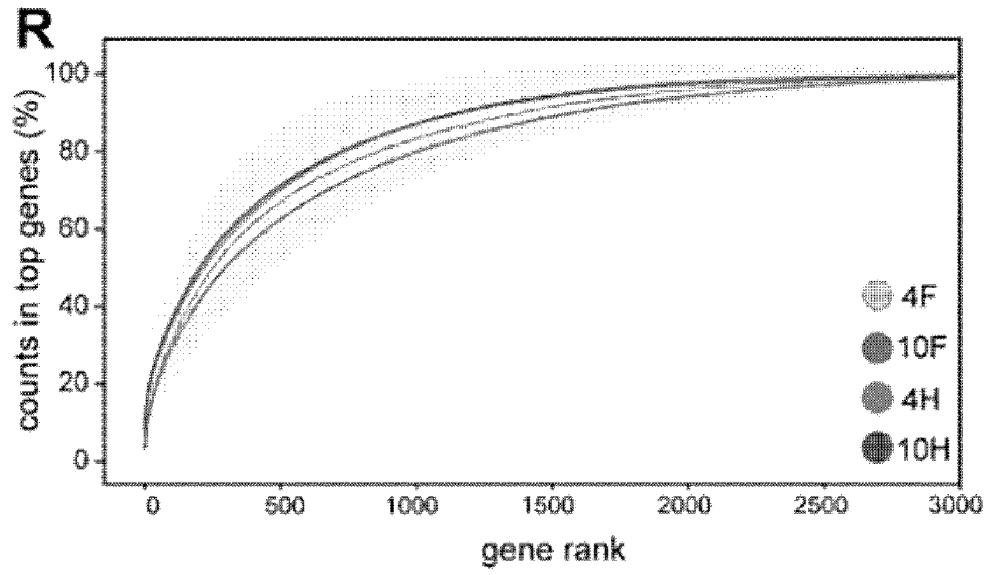
[도5m]



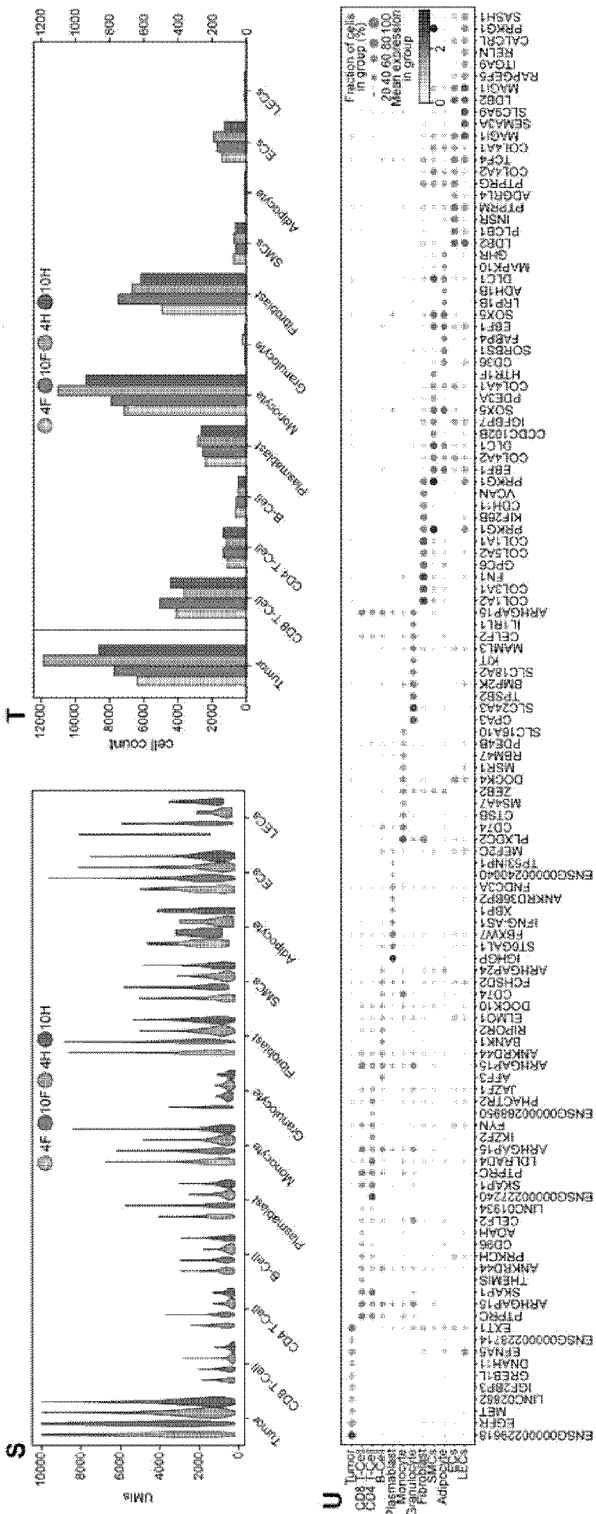
[도50]



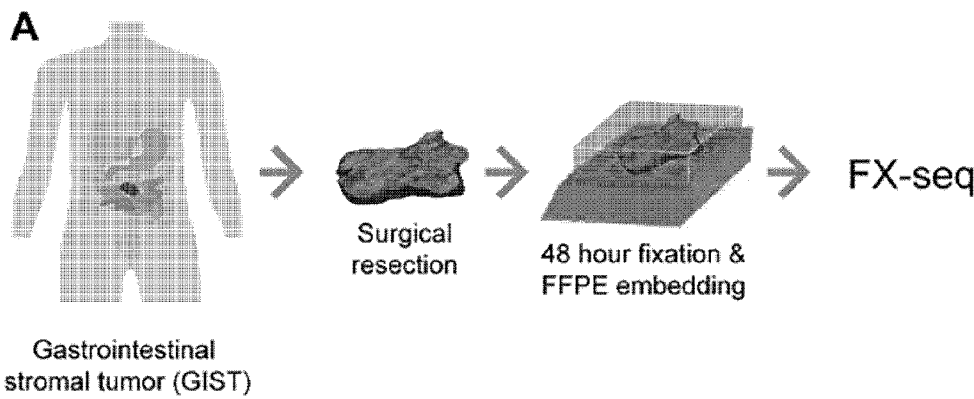
[도5r]



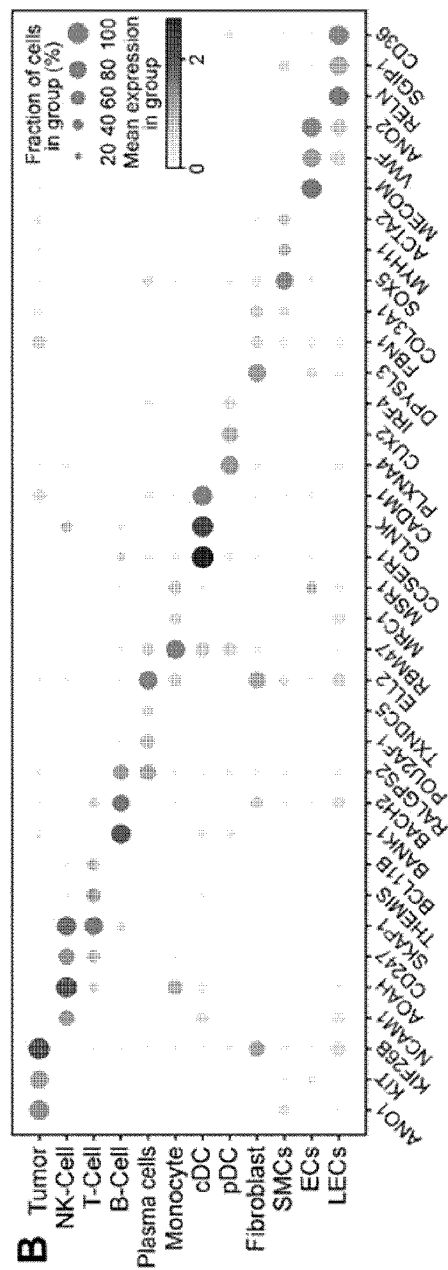
[도5s]



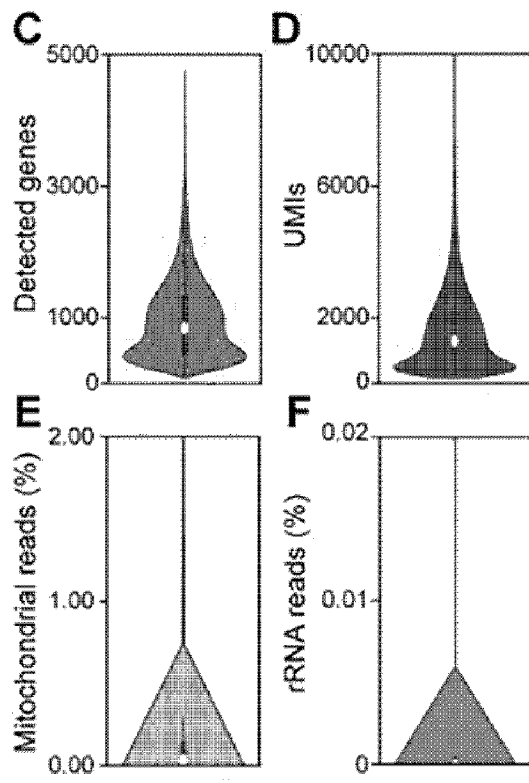
[도6a]



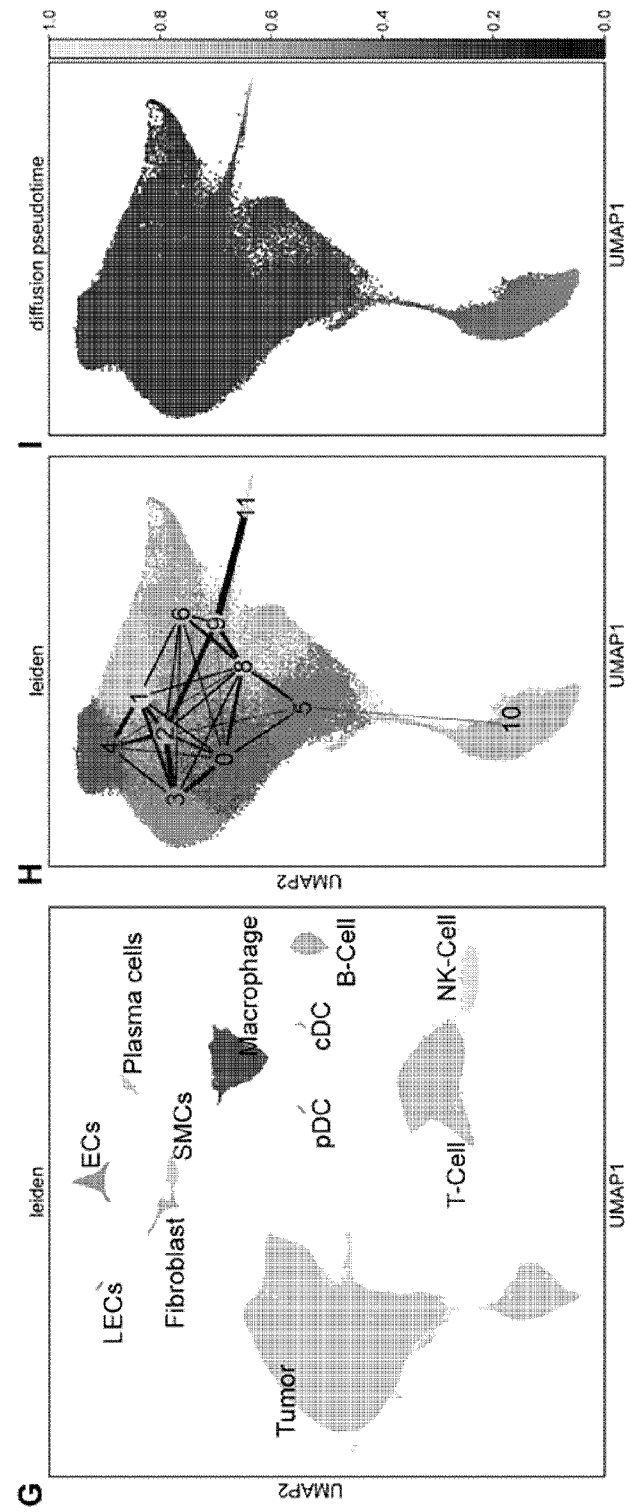
[도6b]



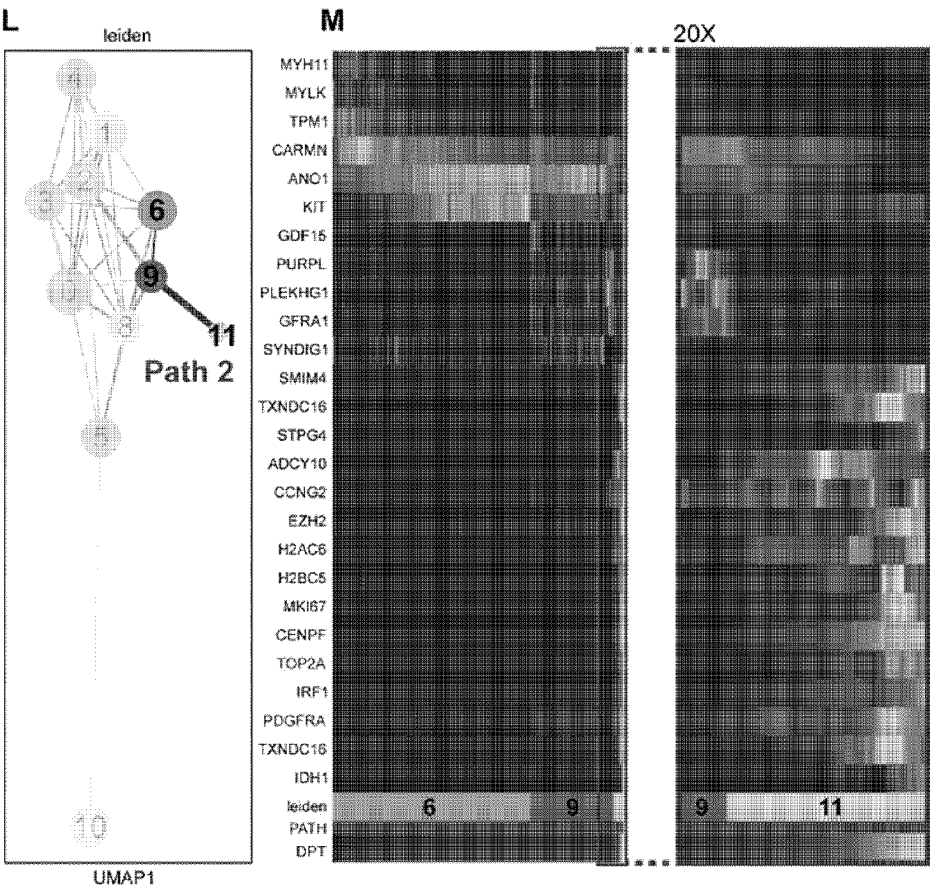
[도6c]



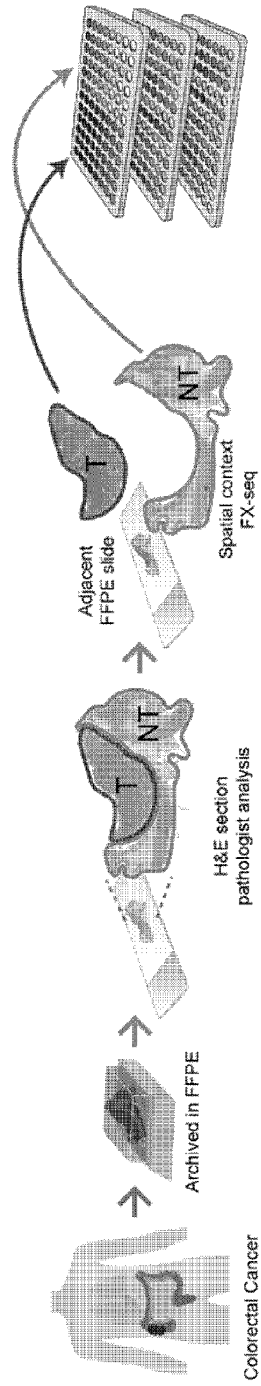
[도 6g]



[도6]

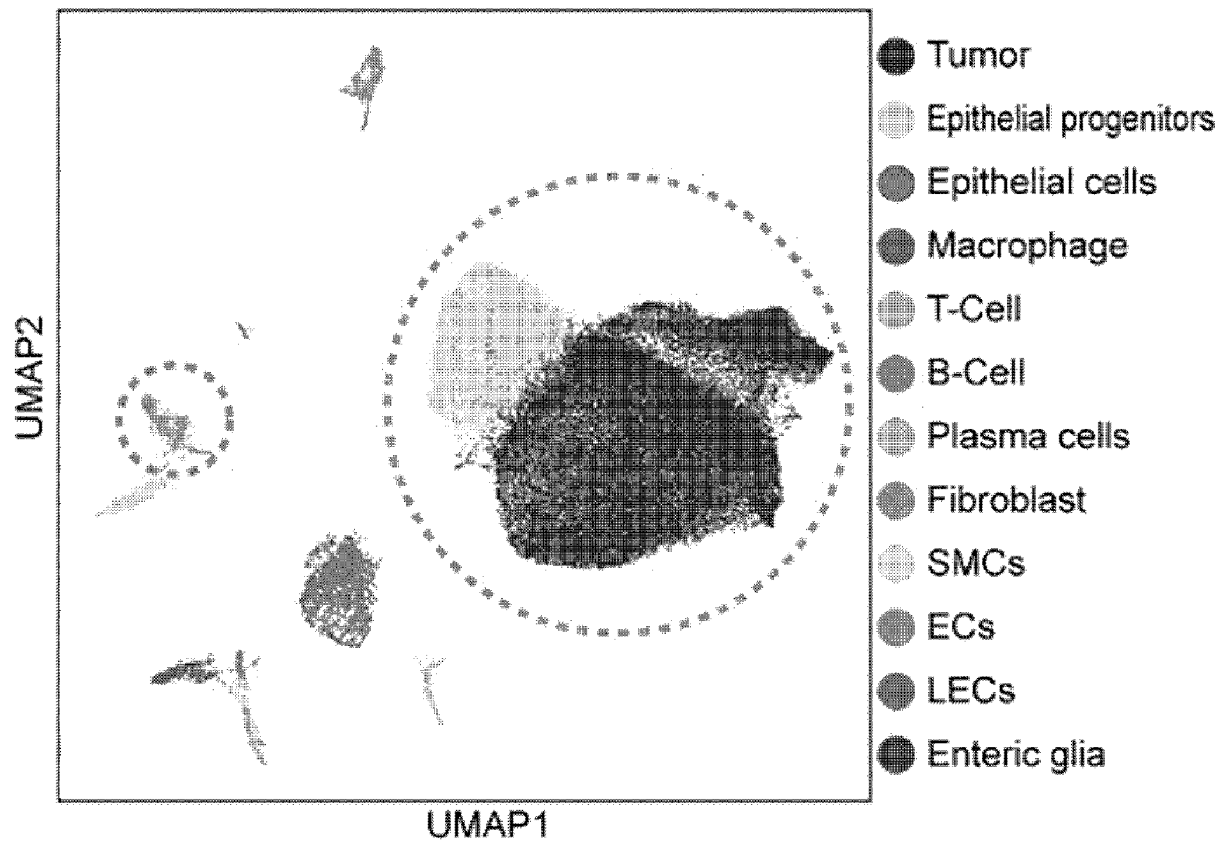


[도7a]

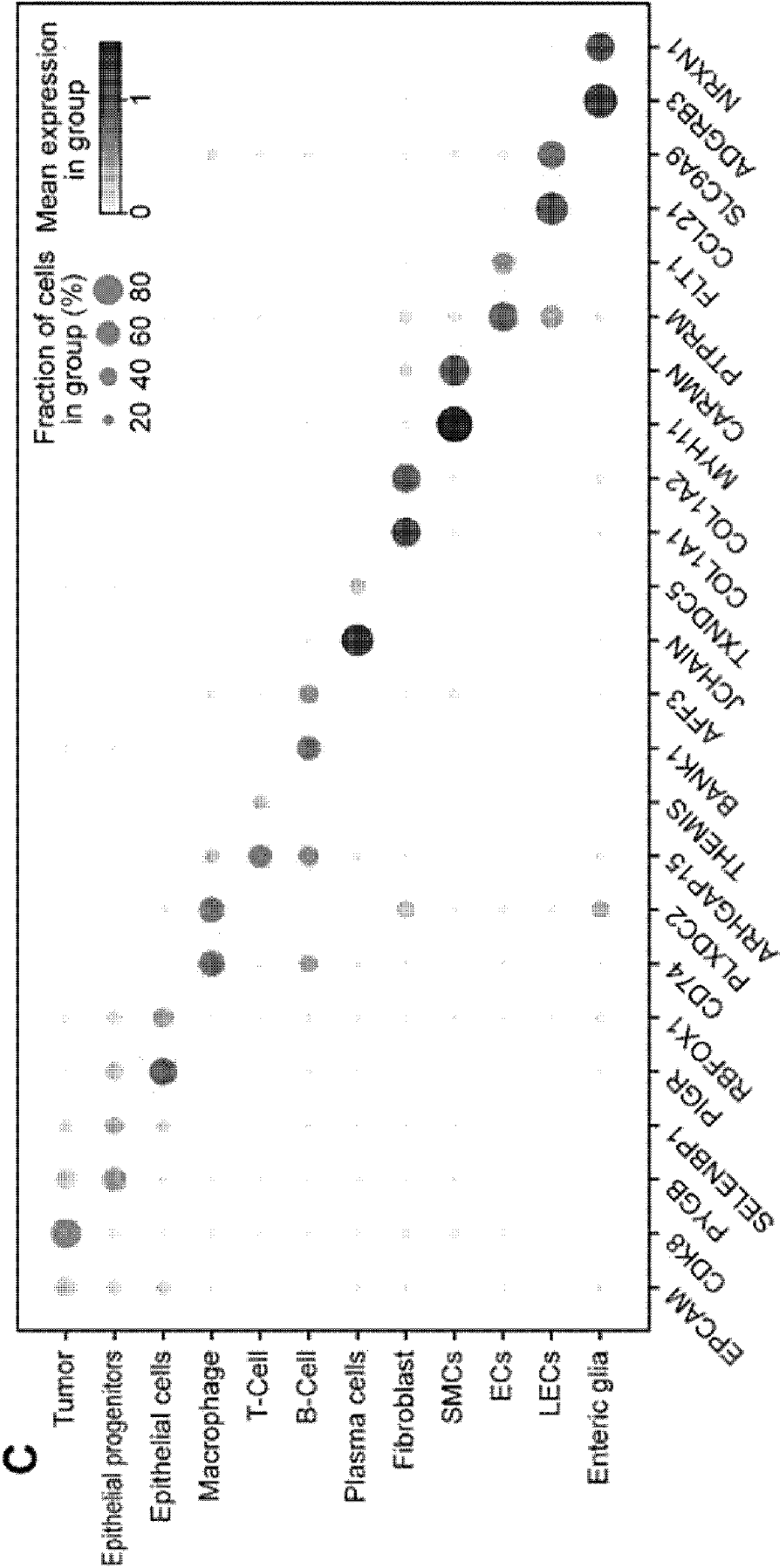


A

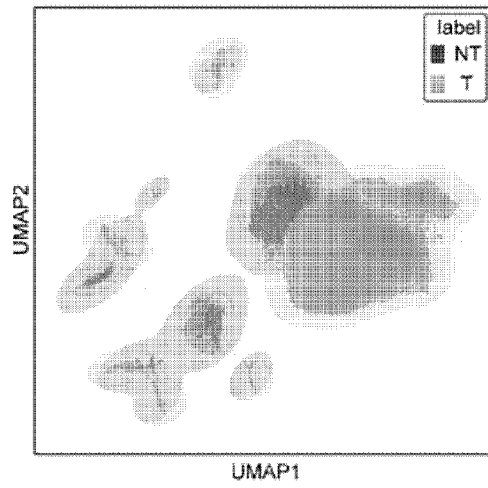
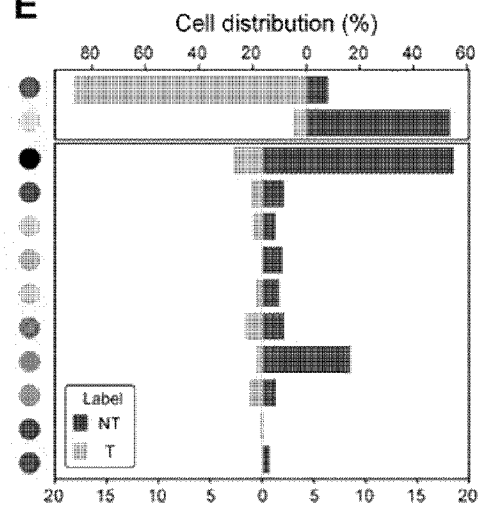
[도7b]

B

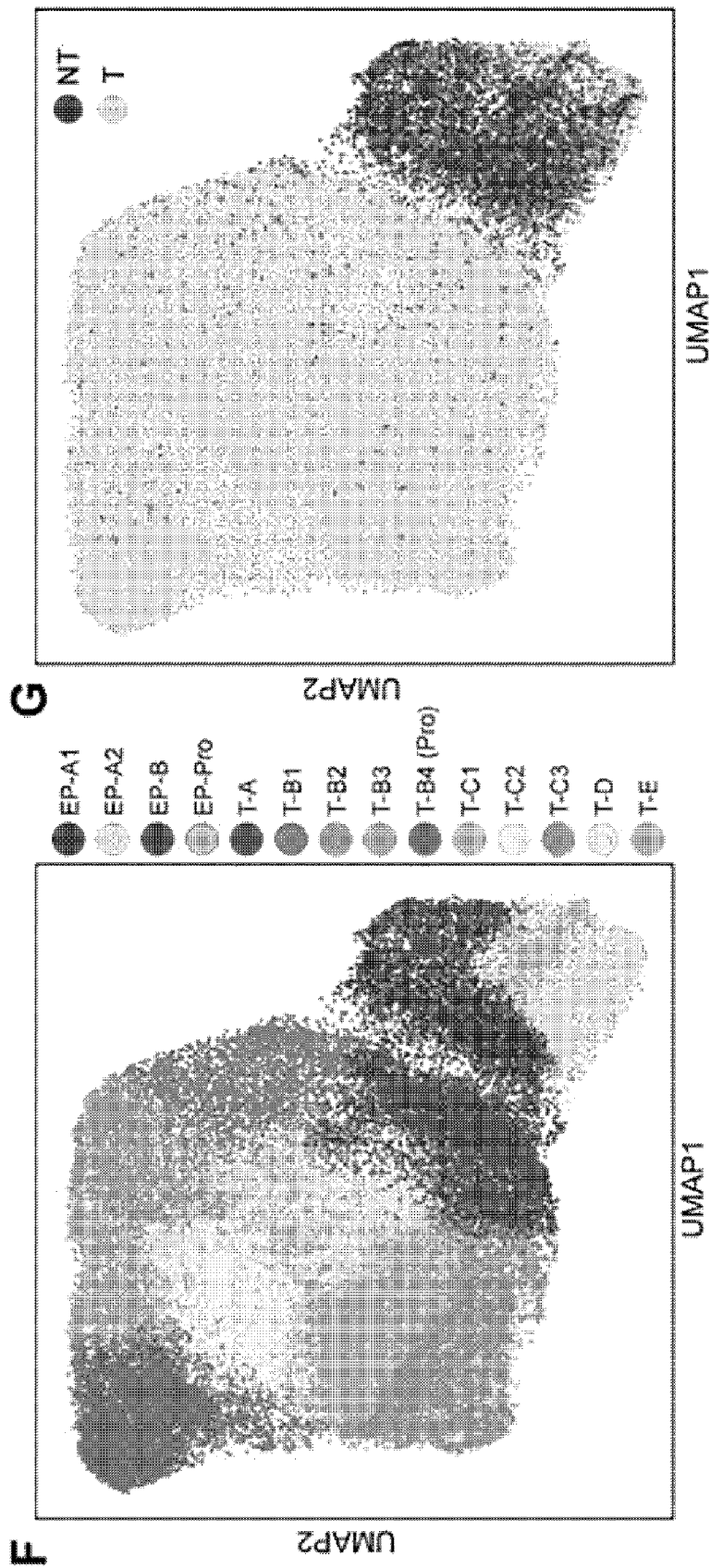
[도7c]



[도7d]

D**E**

[도7f]

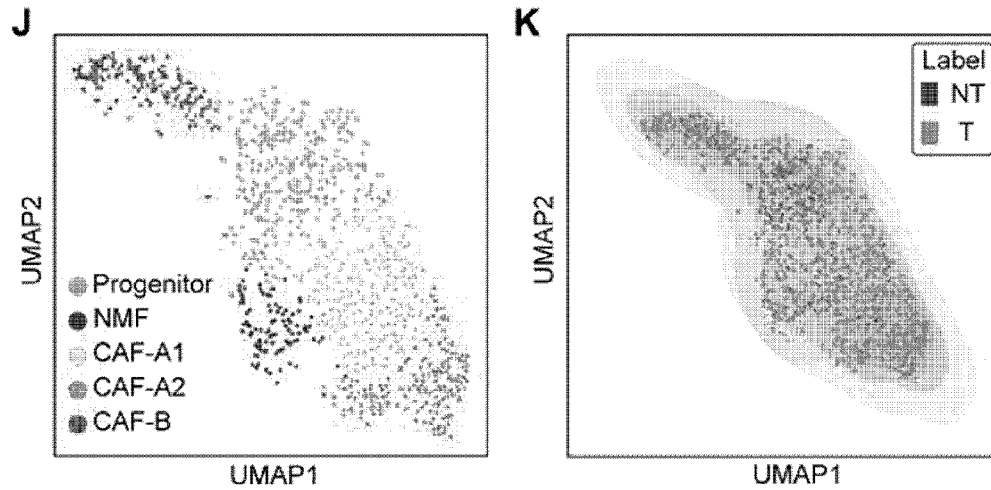


[도7h]

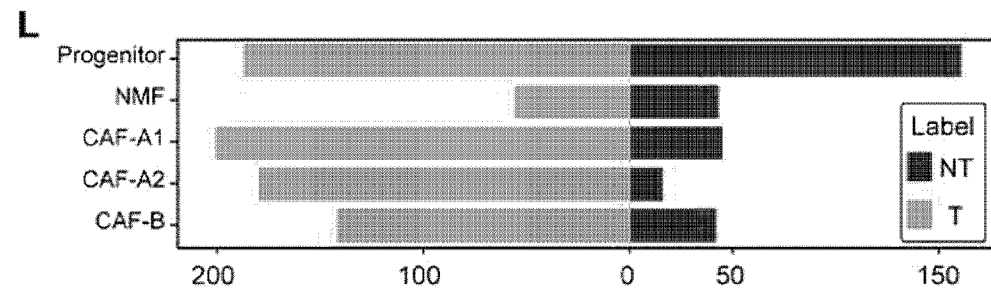
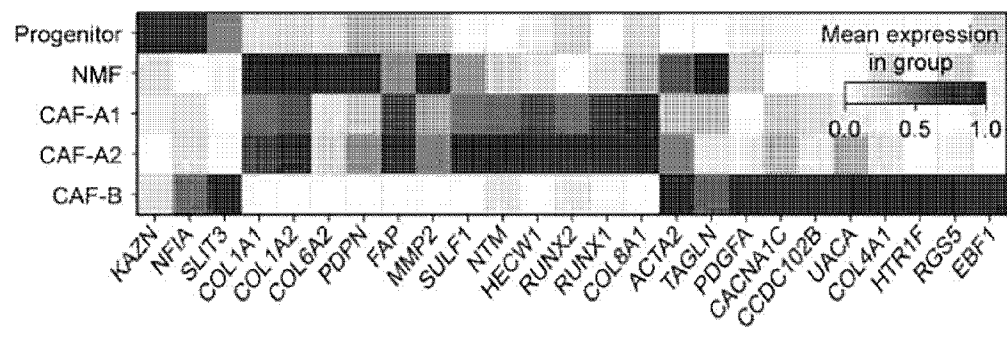


[illegible]

[도7j]



[도7l]

**M**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/009958

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q 1/6806(2018.01)i; C12Q 1/6869(2018.01)i; G01N 1/36(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) C12Q 1/6806(2018.01); A01N 1/02(2006.01); A61K 47/48(2006.01); C02F 1/42(2006.01); G01N 1/30(2006.01) 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), STN (Registry, Caplus), Google & keywords: 유기촉매 (organocatalyst), 백금 기반의 가교제 (Pt-based crosslinker), 고정 (fixation), 교환 (exchange)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2018-219997 A1 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH et al.) 06 December 2018 (2018-12-06) See claims 1-22.	1-19
A	EP 1745802 A1 (KREATECH BIOTECHNOLOGY B.V.) 24 January 2007 (2007-01-24) See figure 3.	1-19
A	WO 2016-044313 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 24 March 2016 (2016-03-24) See claims 1-73.	1-19
A	NONAKA, H. et al. Revisiting PFA-mediated tissue fixation chemistry: FixEL enables trapping of small molecules in the brain to visualize their distribution changes. Chem. 09 February 2023, vol. 9, pp. 523-540. See abstract; and page 523.	1-19
A	O'ROURKE, M. B. et al. Analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue via proteomic techniques and misconceptions of antigen retrieval. Biotechniques. 2016, vol. 60, pp. 229-238. See abstract.	1-19
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “D” document cited by the applicant in the international application “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 16 October 2024		Date of mailing of the international search report 16 October 2024
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2024/009958

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2018-219997	A1	06 December 2018	CA	3061863	A1	06 December 2018
				CN	110678729	A	10 January 2020
				CN	110678729	B	11 April 2023
				EP	3631408	A1	08 April 2020
				JP	2020-522246	A	30 July 2020
				JP	7291081	B2	14 June 2023
				US	10995104	B2	04 May 2021
				US	2018-0370992	A1	27 December 2018
EP	1745802	A1	24 January 2007	AU	2006-270566	A1	25 January 2007
				AU	2006-270566	B2	31 May 2012
				CA	2616116	A1	25 January 2007
				EP	1907011	A2	09 April 2008
				JP	2009-501791	A	22 January 2009
				JP	5178513	B2	10 April 2013
				US	2011-0104103	A1	05 May 2011
				WO	2007-011217	A2	25 January 2007
				WO	2007-011217	A3	22 November 2007
WO	2016-044313	A1	24 March 2016	US	2017-0283860	A1	05 October 2017

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12Q 1/6806(2018.01)i; C12Q 1/6869(2018.01)i; G01N 1/36(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12Q 1/6806(2018.01); A01N 1/02(2006.01); A61K 47/48(2006.01); C02F 1/42(2006.01); G01N 1/30(2006.01) 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 내부검색 시스템), STN (Registry, Caplus), Google & 키워드: 유기촉매 (organocatalyst), 백금 기반의 가교제 (Pt-based crosslinker, 고정 (fixation), 교환 (exchange))		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	WO 2018-219997 A1 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH 등) 2018.12.06 청구항 1-22	1-19
A	EP 1745802 A1 (KREATECH BIOTECHNOLOGY B.V.) 2007.01.24 도면 3	1-19
A	WO 2016-044313 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 2016.03.24 청구항 1-73	1-19
A	NONAKA, H. 등, "Revisiting PFA-mediated tissue fixation chemistry: FixEL enables trapping of small molecules in the brain to visualize their distribution changes", Chem, 2023.02.09, 9권, 페이지 523-540 초록; 페이지 523	1-19
A	O'ROURKE, M. B. 등, "Analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue via proteomic techniques and misconceptions of antigen retrieval", Biotechniques, 2016, 60권, 페이지 229-238 초록	1-19
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 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 2024년10월16일(16.10.2024)	국제조사보고서 발송일 2024년10월16일(16.10.2024)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373	

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2018-219997 A1	2018/12/06	CA 3061863 A1	2018/12/06
		CN 110678729 A	2020/01/10
		CN 110678729 B	2023/04/11
		EP 3631408 A1	2020/04/08
		JP 2020-522246 A	2020/07/30
		JP 7291081 B2	2023/06/14
		US 10995104 B2	2021/05/04
		US 2018-0370992 A1	2018/12/27
EP 1745802 A1	2007/01/24	AU 2006-270566 A1	2007/01/25
		AU 2006-270566 B2	2012/05/31
		CA 2616116 A1	2007/01/25
		EP 1907011 A2	2008/04/09
		JP 2009-501791 A	2009/01/22
		JP 5178513 B2	2013/04/10
		US 2011-0104103 A1	2011/05/05
		WO 2007-011217 A2	2007/01/25
WO 2016-044313 A1	2016/03/24	WO 2007-011217 A3	2007/11/22
		US 2017-0283860 A1	2017/10/05