

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2024년 6월 20일 (20.06.2024) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호
WO 2024/128719 A1

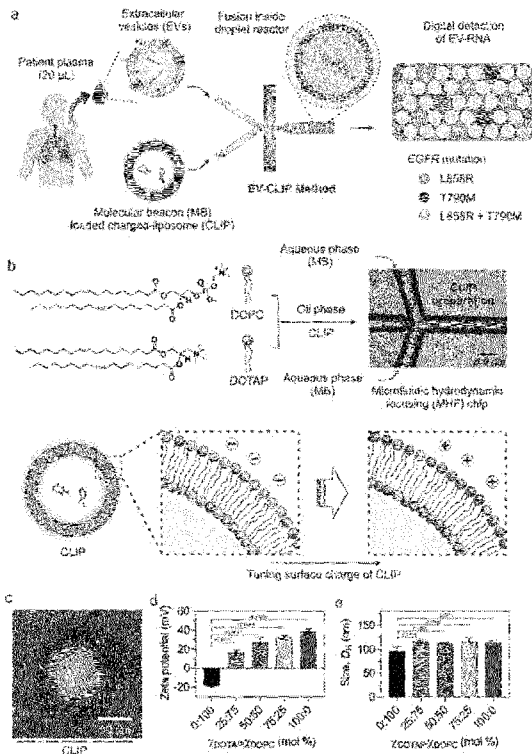
- (51) 국제특허분류: *G01N 33/574* (2006.01) *C12Q 1/6886* (2018.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2023/020308
- (22) 국제출원일: 2023년 12월 11일 (11.12.2023)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2022-0172870 2022년 12월 12일 (12.12.2022) KR
- (71) 출원인: 기초과학연구원 (INSTITUTE FOR BASIC SCIENCE) [KR/KR]; 34126 대전광역시 유성구 엑스포로 55, Daejeon (KR). 울산과학기술원 (UNIST(ULSAN NATIONAL INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)) [KR/KR]; 44919 울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50, Ulsan (KR).
- (72) 발명자: 조윤경 (CHO, Yoon-Kyoung); 44920 울산광역시 울주군 범서읍 대리로 55-17, #703-305, Ulsan (KR). 쿠마르수밋 (KUMAR, Sumit); 44919 울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50. 연구원아파트 #403-1701, Ulsan (KR). 클라리사엘리자베스 마리아 (CLARISSA, Elizabeth

Maria); 44919 울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50. 학생기숙사 #305, Ulsan (KR).

- (74) 대리인: 이처영 등 (LEE, Cheo Young et al.); 06210 서울특별시 강남구 언주로 430, 16층, 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, 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,

(54) Title: METHOD FOR DETECTING HIGH SENSITIVITY OF CANCER CELL-DERIVED EXTRACELLULAR VESICLE GENE BY USING FUSION REACTION WITH LIPOSOMES

(54) 발명의 명칭: 리포솜과의 융합 반응을 활용한 암세포 유래 세포외소포체 유전자의 고민감도 검출 방법



(57) Abstract: The present invention successfully introduced a new approach to target specific EV subpopulations on the basis of charge-mediated fusion of EVs and CLIPs. By adjusting the surface charge of liposomes through the ratio of positively and negatively charged lipids, the optimal ratio that allows efficient and stable fusion with exosomes was confirmed. A method according to the present invention uses the advantages of a CLIP's high fusion rate, and rapid and broad applicability, and verified excellent sensitivity and selectivity for tumor-derived EV miRNA in a lysis-free manner using droplet-microfluidics. Particularly, the EV-CLIP method enables digital detection of EGFR L858R and T790M mutations without pretreating a sample, and thus can simplify detection processes and prevent EV loss.

(57) 요약서: 본 발명은 EV와 CLIP의 전하-매개 융합을 기반으로 특정 EV 부분 모집단을 표적으로 하는 새로운 접근 방식을 성공적으로 도입했다. 양전하와 음전하를 띤 지질의 비율을 통해 리포솜의 표면 전하를 조정함으로써 엑소솜과 효율적이고 안정적인 융합이 가능한 최적의 비율을 확인하였다. 본 발명에 따른 방법은 CLIP의 높은 융합률, 빠르고 광범위한 적용 가능성의 장점을 활용하며, 액적-미세유체를 사용하여 무-용해(lysis-free) 방식으로 종양-유래 EV miRNA에 대한 탁월한 민감도와 선택성을 입증했다. 특히, EV-CLIP 방법은 샘플의 전처리 없이도 EGFR L858R 및 T790M 돌연변이의 디지털 검출을 가능하게 하여 검출 프로세스를 간소화하고 EV 손실을 방지할 수 있다.



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

공개:

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

명세서

발명의 명칭: 리포솜과의 융합 반응을 활용한 암세포 유래 세포외소포체 유전자의 고민감도 검출 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 세포외소포체(extracellular vesicle; EV) 검출을 위한 하전된 리포솜(charged-liposome) 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 양이온성 지질 및 중성 지질을 포함하는 세포외소포체 검출용 리포솜, 상기 리포솜을 포함하는 암세포 유래 세포외소포체 검출용 조성물, 검출용 키트, 검출방법, 암 진단용 조성물, 암 진단용 키트, 암 진단을 위한 정보제공방법 및 암 진단방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 단일 세포외소포체(extracellular vesicle; EV) 분석은 생물 의학 연구 분야에서 강력한 도구로 부상하여 다양한 질병과 장애에 대한 가치 있는 통찰력을 제공한다(Sullivan, L. B., *Nature Chemical Biology* 2017, 13 (9), 924-925). 이는 특정 질병을 나타내는 독특한 핵산(Cocks, A., et al., *Seminars in Cancer Biology* 2021, 75, 127-135), 단백질(Whittle, K., et al., *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2022, 171, 103603) 또는 다른 분자를 식별함으로써(Yu, W., et al., *Ann Oncol* 2021, 32 (4), 466-477), EV 이질성(heterogeneity)의 상세한 조사(Tkach, M.; Thery, C., *Cell* 2016, 164 (6), 1226-1232), 질병 특이적 바이오마커의 식별(Peinado, H., et al., *Nature Medicine* 2012, 18 (6), 883-891) 및 질병 진행의 동적 변화를 모니터링할 수 있게 한다. 따라서 단일 EV의 내용물과 특성을 조사하면 질병 과정에 대한 중요한 정보를 밝힐 수 있는 가능성이 있다(Marar, C., et al., *Nature Immunology* 2021, 22 (5), 560-570). 뛰어난 민감도로 EV-유래 RNA를 검출하기 위해 최적의 표준 정량적 역전사 중합효소 연쇄 반응(quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, qRT-PCR)(Gandham, S., et al., *Trends Biotechnol* 2020, 38 (10), 1066-1098) 및 다양한 새로운 접근법은 제안되었다(Shao, H., et al., *Chem Rev* 2018, 118 (4), 1917-1950). 이러한 방법이 제공하는 주목할만한 이점에도 불구하고, 특히 이러한 검출 방법의 대부분은 혈장 등 생체시료로부터 EV분리, EV 용해, RNA 추출 및 역전사 증폭과 같은 힘들고 시간이 많이 소요되는 단계를 포함시키는 등 여전히 주의가 필요한 과제를 제시하고 있다(Erdbrugger, U.; Lannigan, J., *Cytometry Part A* 2016, 89 (2), 123-134). 또한, 생체시료에는 종양 세포-유래 EV와 비종양세포 유래-EV로부터 유래한 EV가 혼재되어 있고, 대량 용액에서 상기 RNA 분리 및 분석을 하는 방법들을 수행하는 종래 관행으로 인해, 종양세포 유래 RNA 신호를 구별하는 것은 계속해서 어려운 과제로 남아있다(Bordanaba-Florit, G., et al., *Nature Protocols* 2021, 16 (7), 3163-3185). 결과적으로, 종양세포 유래 EV RNA 검

출을 위한 보다 효율적이고 정확한 전략을 개발하기 위한 추가 연구가 필수적이다.

- [4] SNARE 단백질에 의해 매개되고 종종 칼슘 이온(Ca^{2+})에 의해 촉진되는 막 융합(membrane fusion)은 세포외유출(exocytosis) 및 세포내이입(endocytosis), 막 리모델링, 세포 분열, 신호 전달 및 세포내 수송을 포함한 다양한 세포 과정에 필수적이다(Koike, S.; Jahn, R., *Nature Communications* 2019, 10 (1), 1608). 인지질 구획의 융합 메커니즘에 대한 광범위한 연구가 수행되어(Ma, M.; Bong, D., *Accounts of Chemical Research* 2013, 46 (12), 2988-2997), 진단 및 치료에 적용할 수 있는 기능적 시스템 개발에 적용되었다(Mazur, F.; Chandrawati, R., *ChemNanoMat* 2021, 7 (3), 223-237). pH-의존성(Yang, Y., et al., *Advanced Materials* 2017, 29 (13), 1605604), 폴리에틸렌 글리콜-매개(Piffoux, M., et al., *ACS Nano* 2018, 12 (7), 6830-6842), 카테콜-금속 초분자 복합체(Kumar, S., et al., *Nature Catalysis* 2021, 4 (9), 763-774), 동결-해동-사이클-매개(Cheng, L., et al., *Biomaterials* 2021, 275, 120964) 및 DNA 지퍼-매개(Peruzzi, J. A., et al., *Angew Chem Int Ed Engl* 2019, 58 (51), 18683-18690)와 같은 여러 EVs 막 융합 과정이 제안되었다. 막과 연결되거나 도킹되는 플라즈마 막 위의 다양한 분자 조성이 관련되며, 이들을 근접하게 하는 동시에 국소적인 교란을 유도하여 융합을 위한 에너지 장벽을 감소시킨다. 최근, 자연적 환경 내에서 EV RNA의 검출을 위해, 바이러스 감염 메커니즘(Gao, X., et al., *Angewandte Chemie International Edition* 2019, 58 (26), 8719-8723) 및 앵타머-매개 융합(Feng, J., et al., *Analytical Chemistry* 2023, 95 (19), 7743-7752)에서 영감을 얻은 융합성 소포체(fusogenic vesicles)를 활용하는 많은 전략이 개발되었다. 그러나 이 방법 역시 복잡한 유전자 조작이나 수많은 앵타머 최적화를 필요로 하며, 이는 기술적으로 어렵고 시간이 많이 소요될 수 있어 광범위한 임상 시나리오에서의 유용성이 제한된다. 따라서 임상에서 쉽게 적용될 수 있는 종양-유래 EV RNA 검출을 위한 보다 일반화되고 단순화된 접근법을 개발하는 것이 중요하다.

- [5] 본 발명에서는, 미세유체 액적 반응기(microfluidic droplet reactor) 내에서 EVs/리포솜 융합을 위한 간단하고 효율적이며 표면단백질 종류에 무관한, 하전-유도 융합 방법을 성공적으로 개발하여, 개별 EV 내부의 miRNA 및 mRNA를 조사할 수 있었다. 양전하 및 음전하 지질 비율의 조작을 통해 리포솜의 표면 전하를 미세 조정하여, EV와의 효율적인 융합을 가능하게 하고 5% 미만에서 60% 이상 범위의 융합을 정밀하게 제어할 수 있었다. 하전된 리포솜의 특정 조합은 상이한 전하 유형 중에서 가장 높은 융합 효율을 나타냈다. 또한, 본 발명에 따르면, 유화 액적(emulsion droplets)에서 개별 EV를 분류하고 액적 스캐닝을 통해 하전-리포솜(Charged LIPosome; CLIP) EV 검출(EV-CLIP)을 활용함으로써 고효율의 단일 소포체 miRNA 또는 mRNA 프로파일링을 가능하게 한다. 본 발명자들은, 폐암 환자 73명(돌연변이가 없는 환자 17명, 돌연변이가 있는 환자 56명)과 건강한 기증자 10명의 혈장 샘플에서 EGFR L858R 및 T790M 돌연변이를 디지털 방식으로

성공적으로 검출하였으며, 특히, 혁신적인 EV-CLIP 방법은 샘플의 전처리 없이 검출 과정을 단순화하여 EV 손실을 최소화했다.

[6]

[7] 본 배경기술 부분에 기재된 상기 정보는 오직 본 발명의 배경에 대한 이해를 향상시키기 위한 것이며, 이에 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가지는 자에게 있어 이미 알려진 선행기술을 형성하는 정보를 포함하지 않을 수 있다.

[8]

[9] **발명의 요약**

[10] 본 발명의 목적은 암세포 유래 세포외소포체(extracellular vesicle; EV) 유전자를 높은 민감도 및 높은 선택성으로 검출하기 위한 리포솜(charged-liposome)을 제공하는 데 있다.

[11] 본 발명의 다른 목적은 상기 리포솜을 포함하는 암세포 유래 세포외소포체 검출용 조성물, 검출용 키트, 검출방법, 암 진단용 조성물, 암 진단용 키트, 암 진단을 위한 정보제공방법 및 암 진단방법을 제공하는 데 있다.

[12]

[13] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 양이온성 지질 및 중성 지질을 포함하는 암세포 유래 세포외소포체(extracellular vesicle; EV) 검출용 리포솜(liposome)으로서, 리포솜 내에 암세포 특이적 분자비콘(molecular beacon)이 캡슐화(encapsulation)된 것을 특징으로 하는 리포솜을 제공한다.

[14] 본 발명은 또한, 상기 세포외소포체 검출용 리포솜을 포함하는 암세포 유래 세포외소포체 검출용 조성물 및 검출용 키트를 제공한다.

[15] 본 발명은 또한, 상기 세포외소포체 검출용 리포솜을 생물학적 샘플(biological sample) 유래 세포외소포체와 융합시키는 단계를 포함하는 암세포 유래 세포외소포체 검출방법을 제공한다.

[16] 본 발명은 또한, 상기 세포외소포체 검출용 리포솜을 포함하는 암 진단용 조성물 및 암 진단용 키트를 제공한다.

[17] 본 발명은 또한, 상기 세포외소포체 검출용 리포솜을 생물학적 샘플(biological sample) 유래 세포외소포체와 융합시키는 단계를 포함하는 암 진단을 위한 정보제공방법 및 암 진단방법을 제공한다.

[18]

도면의 간단한 설명

[19] 도 1. EV-CLIP 융합 반응 기반 EV의 RNA 분석 방법의 개념도. (a) 분석하고자 하는 RNA에 맞추어 제작된 Molecular beacon(MB)이 로딩된 CLIP과 EV를 Droplet 반응기 내에서 융합 반응을 유도하고, EV 내부에 특정 유전자 변이를 검출하는 방법에 대한 개념도이다. 예를 들어 폐암 환자 표적치료제 선택과 관련된 유전자 EGFR L858R 돌연변이를 검출하기 위한 MB에는 초록

색 형광, 약제 내성과 관련된 EGFR T790M과 관련된 MB에는 빨간색 형광 분자를 tagging하여, 각 액적 반응기 내 EV 안에서 돌연변이 유전자와 MB가 반응하면 형광신호를 내게 되고, 형광신호가 검출되는 액적 수를 세어 EV 유래 RNA 디지털 정량 분석에 활용한다. (b) 미세유체 유체역학 포커싱 방법을 사용한 CLIP(하전-리포솜) 제형의 개략도이다. CLIP은 양전하를 띤 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium propane(DOTAP, red) 및 음전하를 띤 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DOPC, green) 지질로 구성된다. (c) 투과전자현미경(TEM) (직경: 92.5 ± 5.65 nm, $n = 3$ with 9 data points)으로 촬영한 CLIP의 대표 이미지이다. Scale bar: 100 nm. (d) DOTAP 및 DOPC의 다양한 몰비 조성(%)에 따른 CLIP의 제타 전위(ζ_{DOTAP} , ζ_{DOPC}) (0% DOTAP: -18.63 ± 0.76 , 25% DOTAP: 16.17 ± 3.05 , 50% DOTAP: 26.90 ± 5.27 , 75% DOTAP: 32.20 ± 2.26 , 100% DOTAP: 38.67 ± 2.51)로, 데이터는 평균 $\pm$ SD를 나타내며 독립적으로 합성된 3개의 CLIP 배치를 기반으로 한다. (e) DOTAP 비율이 다른 CLIP의 유체역학적 크기(DH) 분포로, 크기와 표면 전하 측정은 DLS를 사용하여 수행되었다(0% DOTAP: 95.82 ± 8.87 nm, 25% DOTAP: 116.40 ± 3.67 nm, 50% DOTAP: 113.40 ± 1.00 nm, 75% DOTAP: 115.03 ± 8.86 nm, 100% DOTAP: 113.7 ± 4.3 nm). 데이터는 평균 $\pm$ SD를 나타내며 독립적으로 합성된 3개의 CLIP 배치를 기반으로 한다. 모든 통계 분석은 One Way ANOVA로 수행되었다.

- [20] 도 2. 미세유체 유체역학적 포커싱(Microfluidic Hydrodynamic Focusing; MHF) 기반 리포솜 생성 실험 설정. 설정은 디지털 현미경, 칩 스탠드, 유성상 및 수성상 펌프, 컴퓨터 및 5-입력 칩으로 구성된다. 에탄올(EtOH)에 용해된 지질은 유성상 펌프 내부로 로딩되고, 수성상 펌프에는 PBS가 로딩된다. 유성상 펌프는 지질을 칩의 왼쪽으로 밀어 넣고, 수성상 펌프는 PBS를 칩의 오른쪽으로 밀어 넣게 된다. 적절한 흐름 제어를 통해 유성 층은 두 개의 수성 층에 끼워져 5-입력 칩 내부에 리포솜이 형성된다.
- [21] 도 3. 나노입자 추적 분석(NTA)으로 측정된 리포솜의 크기 분포. 리포솜은 단일 피크 분포 곡선을 보여 균질한 리포솜 집단을 나타낸다.
- [22] 도 4. 시간 경과에 따른 다양한 CLIP의 안정성. 48시간에 걸쳐 리포솜의 크기 변화를 평가하기 위해 시간에 따른 크기를 측정하였다. 0%, 25%, 50%, 75% DOTAP의 크기는 시간이 지나도 안정적으로 유지되는 반면, 100% DOTAP의 크기는 48시간 후 300nm까지 지속적으로 증가했다(6 시간: 160.53 ± 8.15 nm, 12 시간: 188.27 ± 7.58 nm, 24 시간: 230.37 ± 14.96 nm, 48 시간: 311.50 ± 8.51 nm).
- [23] 도 5. EV 분리. (a) 기공 직경이 $0.02 \mu\text{m}$ 인 양극산화알루미늄 필터가 장착된 원심 디스크인 ExoDisc 플랫폼(Exodisc, LabSpinner)이다. 상층액을 3000rpm(약 500g)의 원심분리로 필터를 통과시키고, 수집 챔버에서 농축된 EV 100 μL 를 희석배율 2로 1X PBS에 재현탁하였다. (b) ExoDisc 작동을 위한 tabletop 원심분리기 플랫폼이다. (c) Exodisc 작동 원리이다. (d) EV는 나노입자 추적 분석(NTA)으로 특성화되었다.

- [24] 도 6. 액적 생성 실험 설정. 설정은 디지털 현미경, 칩 스탠드, 유성 펌프, 두 개의 샘플 펌프, 샘플 저장소, 액적 배출구, 액적 칩, 컴퓨터 및 액적 저장소 칩으로 구성된다. EV와 CLIP는 두 개의 샘플 펌프에 별도로 로딩되고 FC-40 계면활성제는 유성 펌프와 샘플 저장소에 로딩된다. 유성상 펌프는 FC-40을 T-junction의 수직 측면으로, 샘플 펌프는 EV와 CLIP를 샘플 채널로 밀어 넣고, EV와 CLIP는 T-junction에서 만나 water-in-oil 액적을 형성하고 액적 배출구에서 수집될 것이다. 그런 다음, 형광 현미경으로 액적 저장소 칩을 사용하여 분석을 위해 액적을 이미지화 한다.
- [25] 도 7. EV와 CLIP의 제어된 융합. (a) 액적 생성 칩을 사용한 CLIP 및 EV 융합의 개략도이다. 미세유체 장치는 유동-집중 접합부(flow-focusing junction)에서 water-in-oil 액적 반응기를 생성하도록 설계되었으며, 두 개의 수성상(EV 및 CLIP)이 만나 액적을 만들기 위해 유성 스트림(FC-40의 계면활성제 PFPE-PEG)으로 전달되었다 (b) EV와 CLIP의 융합 반응을 분석하기 위한 Forster Resonance Energy Transfer(FRET)-기반 지질 혼합 분석의 개략도이다. FRET 쌍 기증자(녹색, 니트로벤족사디아졸)와 수용자(빨간색, 로다민) 지질 프로브 사이의 평균 거리가 표지된 CLIP 막과 표지되지 않은 EV 막의 전하 기반 융합에 따라 증가하여 FRET 효율이 감소한다(PE: 포스포에탄올아민, PS: 포스파티딜세린). (c) EV와 CLIP의 융합 비율과 CLIP 조성물의 DOTAP 백분율에 따른 융합 소포체의 지질 혼합 정도 분석 결과이다. 모든 통계 분석은 Dunnett의 다중 비교 테스트를 사용하여 일원 분산 분석으로 수행되었다. (d) EV, CLIP 및 융합 소포체의 공초점 레이저 주사 현미경(CLSM) 이미지로 EV(녹색) 및 CLIP(빨간색)의 공존을 보여준다. EV와 CLIP(75% DOTAP)의 세 가지 비율(몰비 10:1, 1:1 및 1:10)의 EV, CLIP 및 융합 소포체(EV-CLIP)의 고해상도 공초점 레이저 스캐닝 현미경(CLSM) 이미지이다. 강도 분석은 EV(녹색)와 CLIP(빨간색)의 공동 지역화를 보여준다. (e) (d)의 분석 결과에서 각 vesicle의 비율을 나타낸 그래프이다. 10개의 독립적인 이미지로부터 분석되었으며, 소포체 수의 범위는 100 내지 160이다. 통계 분석은 일원 분산 분석(one-way ANOVA)으로 수행되었다. (f) 투과전자현미경(TEM)으로 촬영한 CLIP, EV 및 융합 소포체의 대표 이미지(융합 소포체의 직경: 174.85 ± 13.83 nm, $n = 5$)이다. Scale bar: 100 nm. (g) 제어된 융합 전후의 소포체 크기(EVs: 137.00 ± 14.30 nm, CLIP: 115.03 ± 8.86 nm, EVs-CLIP: 174.10 ± 10.28)로, 데이터는 평균 $\pm$ SD를 나타내며, $n=3$ 이다. 모든 통계 분석은 Tukey의 다중 비교 테스트를 사용하여 일원 분산 분석으로 수행되었다. (h) 제어된 융합 전후의 소포체의 제타 전위로, 데이터는 평균 $\pm$ SD, $n = 3$ 을 나타낸다. 모든 통계 분석은 Tukey의 다중 비교 테스트를 사용하여 일원 분산 분석으로 수행되었다.
- [26] 도 8. 액적 크기 분포 그래프로, Droplet Monitor application을 사용하여 액적을 측정하였다. 액적의 평균 크기는 27.40 ± 2.06 μ m로 확인되었다.
- [27] 도 9. DOTAP 백분율에 따른 융합 소포체의 크기 및 제타 전위 증가. (a) DOTAP 백분율에 따른 융합 소포체의 크기 증가를 나타낸 그래프이다(0% DOTAP:

- 135.9±24.7 nm, 25% DOTAP: 150.5±24.3 nm, 50% DOTAP: 161.6±11.9 nm, 75% DOTAP: 174.1±10.3 nm, 100% DOTAP: 231.3±42.8 nm). 각 데이터 포인트는 평균±SD를 나타내며, n=3이다. 모든 통계 분석은 one way ANOVA로 수행되었다.
- (b) DOTAP 백분율에 따른 융합 소포체의 표면 전하 변화를 나타낸 그래프이다 (0% DOTAP: -18.4±6.9, 25% DOTAP: -12.3±3.0, 50% DOTAP: -9.24±4.55, 75% DOTAP: -3.74±3.80, 100% DOTAP: -0.71±4.39). 각 데이터 포인트는 평균±SD를 나타내며, n=3이다. 모든 통계 분석은 one way ANOVA로 수행되었다.
- [28] 도 10. 융합 소포체, 리포솜 및 EV의 Pearson 상관계수(PCC) 값. Pearson 상관계수(PCC)는 10개의 상이한 단일 소포체에서 측정되었으며, ImageJ에서 JaCoP 알고리즘을 사용하여 계산되었다. 융합 소포체의 PCC는 0.690±0.096, 리포솜의 PCC는 -0.0139±0.01264, EVs의 PCC는 0.0021±0.0066으로 확인되었다.
- [29] 도 11. 제타 전위 측면에서 리포솜에 대한 Rho-NBD 첨가의 효과. 다양한 DOTAP 비율(0%, 25%, 75%, 100% DOTAP)을 갖는 리포솜의 제타 전위 변화. 각 데이터 포인트는 평균±SD를 나타내며, n=3이다. 모든 통계 분석은 two-tailed unpaired Student's t-test로 수행되었다.
- [30] 도 12. 벌크 스케일 EV-리포솜 융합 시 생성되는 응집체의 TEM 이미지 및 크기 비교. (a) EV-리포솜 융합이 벌크 스케일로 이루어질 때 생성되는 응집체를 나타낸 TEM 이미지이다. Scale bar: 100nm. (b) 액적 및 벌크 스케일에서의 융합 소포체의 크기 비교 결과이다. 액적 내 융합 소포체의 평균 크기: 174.1±10.28 nm, 벌크 스케일 내 융합 소포체의 평균 크기: 1173.17±508.58 nm. 각 데이터 포인트는 평균±SD를 나타내며, n=3이다. 모든 통계 분석은 two-tailed unpaired Student's t-test로 수행되었다.
- [31] 도 13. 크기 및 제타 전위 측면에서 리포솜에 MB 삽입의 효과. (a) 세 가지 상이한 리포솜 집단(분자비콘(MB) 없음; miR-21 검출 MB 있음; EGFR 돌연변이 검출 MB 있음)의 크기 분포를 나타낸 그래프이다. (b) 세 가지 상이한 리포솜 집단(분자비콘(MB) 없음; miR-21 검출 MB 있음; EGFR 돌연변이 검출 MB 있음)의 제타 전위를 나타낸 그래프이다. 각 데이터 포인트는 평균±SD를 나타내며, n=3이다. 모든 통계 분석은 one way ANOVA로 수행되었다.
- [32] 도 14. 분자비콘-기반 종양 EV 검출. (a) MHF chip을 이용한 CLIP 제작 및 droplet 반응기를 이용한 EV와의 융합 반응, detection chamber chip을 이용한 검출 과정을 나타낸 모식도이다. (b) 상기 3가지 칩을 나타낸 사진이다. (c) 인산염 완충 식염수(PBS)에서 다양한 농도의 H1975 세포 유래 EV의 miR-21 분자비콘-기반 검출의 대표적 형광 이미지이다. (d) H1975 세포 유래 EV의 농도 관련 miR-21 검출 결과로, 데이터는 평균±SD를 나타내며, n=3이고, (e) 검출 한계(LOD)는 79 EVs/μL로 확인되었다. (f) 정상인과 암환자의 miR-21 분자비콘-기반 검출 결과를 나타낸 그래프로, 차이가 있음을 확인할 수 있다.
- [33] 도 15. 분자비콘-기반 종양 EV 검출. (a) 인산염 완충 식염수(PBS)에서 H1975 세포 유래 EV의 L858R, T70M, L858R+T790M 분자비콘-기반 검출의 대표적 형광

이미지이다. (b) 인산염 완충 식염수(PBS)에서 H1975 세포 유래 EV의 농도 관련 각 L858R, T790M의 돌연변이 검출 결과로, 데이터는 평균 $\pm$ SD를 나타내며, $n=3$ 이고, 검출 한계(LOD)는 각각 1348 EVs/ μ L, 3595 EVs/ μ L로 확인되었다. (c) 인간 혈장(human plasma)에서 H1975 세포 유래 EV의 농도 관련 L858R, T790M의 돌연변이 검출 결과로, 데이터는 평균 $\pm$ SD를 나타내며, $n=3$ 이고, 검출 한계(LOD)는 각각 1348 EVs/ μ L, 2926 EVs/ μ L로 확인되었다. (d) EV 분리 후의 액적 디지털 중합효소 연쇄 반응(Droplet Digital Polymerase Chain Reaction; ddPCR)을 수행한 결과이다. 각 데이터 포인트는 평균 $\pm$ SD를 나타내며, $n=3$ 이다. (e) PBS 및 인간 혈장에서 EGFR L858R 돌연변이 및 T790M 돌연변이의 검출 관독값의 상관관계로, 데이터는 독립적 분석의 평균 $\pm$ SD를 나타내며, $n=3$ 이다.

[34] 도 16. 액적 이미지 처리 플로우차트. 플로우차트는 이미지 획득부터 처리, 정량화 및 분석에 이르기까지 분석을 위한 액적 이미지의 처리 단계를 설명한다.

[35] 도 17. 폐암 환자 샘플에서 융합 시스템을 사용한 EGFR L858R 및 T790M 돌연변이 검출. (A) 정상인 및 환자의 plasma 샘플로부터 EV-CLIP 융합을 이용하여 10명의 건강한 기증자, 73명의 폐암 환자로부터 EGFR L858R 및 T790M 돌연변이 검출의 개략도이다. (B) 10명의 정상인, 17명의 EGFR 돌연변이가 없는 폐암환자, 56명의 EGFR 돌연변이가 있는 폐암환자의 L858R 돌연변이, T790M 돌연변이 액적 검출 %이다. (C) 그룹별 각 L858R, T790M 돌연변이 검출 비교를 나타낸다. (D) L858R 및 T790M 돌연변이 검출을 위한 ROC(Receiver Operating Characteristic) 곡선으로, AUC(Area Under the Curve)는 L858R은 1.0, T790M은 0.9762로 나타났다. 각 데이터 포인트는 3회 독립적인 반복의 평균을 나타낸다. 모든 통계 분석은 one way ANOVA로 수행되었다.

[36]

[37] 발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예

[38] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[39]

[40] 개별 세포외소포체(extracellular vesicle; EV)와 리포솜에서 무-단백질(protein-free) 융합 메커니즘을 조사하면 다양한 EV 집단에 대한 이해를 향상시킬 뿐만 아니라 질병 상태에서 뚜렷한 부분 모집단(subpopulation)을 식별할 수 있는 단일 EV의 RNA를 조사할 수 있다. 그러나 이러한 분석 기술은 EV 용해를 필요로 하며, 대부분의 방법에서 민감도 감소, 고비용, 노동 집약도 및 시간 소모적 프로세스를 요구한다. 본 발명자들은, EV와 리포솜의 전하 매개 융합(charge-mediated fusion)에 기반하여 개별 EV 부분 모집단의 검출을 위한 접근 방식을 개발하였다. 리포솜의 표면 전하는 양전하를 띤 지질과 음전하를 띤 지질의 비율을 변경하여 조정되며, 특정 비율은 막-혼합 분석으로 확인된 막 특성을 손상시키지 않으면서

엑소좀에 대한 매우 효율적이고 안정적인 융합을 나타냈다. 높은 융합 속도, 빠른 적용 가능성 및 광범위한 하전-리포좀 EV 검출(charged-liposome EV detection; EV-CLIP)의 이점을 활용하는 이 방법은 액적-미세유체(droplet-microfluidics)를 사용하여 무-용해(lysis-free) 방식으로 EV-유래 RNA에 대한 놀라운 민감도와 선택성을 나타낸다. 또한, 폐암 환자 73명(돌연변이가 없는 환자 17명, 돌연변이가 있는 환자 56명)과 건강한 기증자 10명으로부터 채취한 혈장 샘플에서 EV-CLIP을 통해 사전 EV 분리 단계 없이 EGFR L858R 및 T790M 돌연변이를 디지털 검출할 수 있어, 검출 프로세스를 더욱 단순화하고 EV 손실을 방지할 수 있다. 종합하면, EV-CLIP은 희귀 EV 부분 모집단의 정확한 정량화를 위한 임상 환경에서 큰 가능성을 갖고 있으며 암 생물학의 근본적인 의문을 탐구할 수 있는 새로운 기회를 제공한다.

[41]

[42] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 양이온성 지질 및 중성 지질을 포함하는 암 세포 유래 세포외소포체(extracellular vesicle; EV) 검출용 리포좀(liposome)으로서, 상기 리포좀 내에 암세포 특이적 분자비콘(molecular beacon)이 캡슐화(encapsulation)된 것을 특징으로 하는 리포좀에 관한 것이다.

[43] 본 명세서에서, “세포외소포체(extracellular vesicle; EV)”는 핵산, 단백질 또는 기타 생체 분자를 포함할 수 있는 작은 분비 소포(일반적으로 약 30-800nm)로서, 엑소좀(exosome) 및 미세소낭(microvesicle)을 포함한다. 생명체 또는 생물학적 시스템의 다양한 위치에 생체분자 물질을 이동시킴으로써 세포 전달자 역할을 할 수 있다.

[44] 본 발명에 있어서, 상기 “암세포 특이적 분자비콘”이란, 정상세포 유래 세포외소포체에는 존재하지 않고, 암세포 유래 세포외소포체에 존재하는 암 특이적 물질에 특이적으로 결합하는 분자비콘을 의미한다.

[45] 본 발명에 있어서, 상기 암세포 유래 세포외소포체에 존재하는 암 특이적 물질은 microRNA-21(miR-21), microRNA-25(miR-25), microRNA-27(miR-27), microRNA-54(miR-54), microRNA-155(miR-155), microRNA-210(miR-210), microRNA-375(miR-375), microRNA-451(miR-451), microRNA-486(miR-486), microRNA-495(miR-495), microRNA-574-3p(miR-574-3p), EGFR L858R 돌연변이, EGFR T790M 돌연변이, GPC1, KRAS, AR-V7, survivin, TK-1, c-Myc, GalNAc-T, Cyclin D1 등을 포함할 수 있으나(Wei Pan, et al., Anal. Chem. 2013, 85, 21, 10581-10588; Xiang-Hong Peng, et al., Cancer Res (2005) 65 (5): 1909-1917), 이에 한정되는 것은 아니다.

[46] 본 명세서에서, “분자비콘(molecular beacon; MB)”은 3' 말단을 quencher 물질로 태그한 헤어핀 형태의 2차 구조를 형성하는 올리고뉴클레오타이드로, 분자비콘 프로브는 어닐링(annealing)과정에서 주형 유전자와 상보적인 영역에서 특이적으로 혼성화하며, 형광물질과 quencher 물질과의 거리가 멀어져 quencher 물질에 의한 발광의 억제가 해제되고 형광을 발하게 되는 것을 말한다. 반면, 혼성화되

지 않은 분자비콘은 2차 구조를 유지하고 있으므로 quencher에 의해 억제되어 형광을 띄지 않는다.

- [47] 본 발명의 일 실시예에서, H1975 폐암 세포주의 EGFR L858R 및 T790M 돌연변이 검출하기 위해 각각 서열번호 1 및 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열로 표시되는 분자비콘을 사용하였으며, 유방암, 결장암, 폐암, 췌장암, 전립선암 및 위암과 같은 다양한 종양 유형에서 상향조절되는 것으로 알려진 microRNA-21(또는 miR-21)을 표적하도록 설계된 서열번호 3의 뉴클레오타이드 서열로 표시되는 분자비콘을 사용하여 종양-유래 세포외소포체(tEV)를 검출하였다.
- [48] 본 명세서에서, 용어 "지질" 또는 "지질-유사 물질"은, 하나 이상의 소수성 모이어티 또는 그룹 및 선택적으로 또한 하나 이상의 친수성 모이어티 또는 그룹을 포함하는 분자를 지칭하기 위해 사용된다. 소수성 모이어티 및 친수성 모이어티를 포함하는 분자는 또한 종종 양친매성 물질로 표시된다. 지질은 일반적으로 물에 잘 녹지 않는다. 수성 환경에서 양친매성 성질은 분자로 하여금 조직화된 구조 및 다른 상(phase) 내로 자가-조립되도록 한다. 이들 상 중 하나는, 그들이 수성 환경에서 소포, 다층/단층 리포솜 또는 막에 존재할 때, 지질 이중층으로 구성된다. 소수성은 장쇄 포화 및 불포화 지방족 탄화수소 그룹 및 하나 이상의 방향족, 지환족 또는 헤테로시클릭 그룹(들)로 치환된 그러한 그룹을 포함하지만 이에 제한되지 않는 비극성 그룹을 포함한다. 친수성 그룹은 극성 및/또는 하전된 그룹을 포함할 수 있고 탄수화물, 포스페이트, 카르복실, 설페이트, 아미노, 설프하이드릴, 니트로, 하이드록실, 및 기타 유사한 그룹을 포함할 수 있다.
- [49] 본 명세서에, 용어 "양친매성"은 극성 부분 및 비-극성 부분 모두를 갖는 분자를 지칭한다. 종종 양친매성 화합물은 긴 소수성 꼬리에 부착되는 극성 헤드를 갖는다. 일부 구체예에서, 극성 부분은 물에 용해되는 반면, 비-극성 부분은 물에 불용성이다. 또한 극성 부분은 형식적 양전하 또는 형식적 음전하를 가질 수 있다. 혹은, 극성 부분은 형식적 양전하 및 음전하를 모두 가질 수 있고, 양쪽성 이온(zwitter ion) 또는 내부 염일 수 있다. 본 명세서의 목적상, 양친매성 화합물은 하나 또는 복수의 천연 또는 비-천연 지질 및 지질-유사 화합물일 수 있지만 이에 제한되지 않는다.
- [50] "지질-유사 물질", "지질-유사 화합물" 또는 "지질-유사 분자"라는 용어는 구조적으로 및/또는 기능적으로 지질에 관한 것이지만 엄격한 의미에서 지질로 간주되지 않을 수 있는 물질에 관한 것이다. 예를 들어, 이 용어는 그들이 수성 환경에서 소포, 다층/단층 리포솜 또는 막에 존재할 때 양친매성 층을 형성할 수 있는 화합물을 포함하고, 계면활성제 또는 친수성 및 소수성 모이어티를 모두 갖는 합성 화합물을 포함한다. 일반적으로 말해서, 이 용어는, 지질의 그것과 유사하거나 유사하지 않을 수 있는 상이한 구조적 조직을 갖는 친수성 및 소수성 모이어티들을 포함하는 분자를 지칭한다. 본원에서, 용어 "지질"은 문맥상 명백히 모순되지 않는 한 지질 및 지질-유사 물질 모두를 포괄하는 것으로 해석되어야 한다.

- [51] 본 명세서에서, "양이온성 지질(cationic lipid)" 또는 "양이온성 지질-유사 물질"은 순 양전하를 갖는 지질 또는 지질-유사 물질을 지칭한다. 양이온성 지질 또는 지질-유사 물질은 정전기적 상호작용에 의해 음전하를 띤 핵산에 결합한다. 일반적으로, 양이온성 지질은 스테롤, 아실 사슬, 디아실 또는 더 큰 아실 사슬과 같은 친유성 모이어티를 가지며, 지질의 헤드 그룹은 일반적으로 양전하를 띤다.
- [52] 특정 구체예에서, 양이온성 지질 또는 지질-유사 물질은 특정 pH, 특히 산성 pH에서만 순 양전하를 갖는 반면, 바람직하게는, 생리학적 pH와 같은 더 높은 pH에서는 어떠한 순 양전하를 갖지 않고, 전하를 갖지 않으며, 즉 중성이다. 이러한 이온화 가능 거동은 생리학적 pH에서 양이온성을 유지하는 입자와 비교하여 엔도솜 탈출을 돕고 독성을 감소시켜 효능을 향상시키는 것으로 여겨진다.
- [53] 본 발명에 있어서, 상기 양이온성 지질은 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄 프로판(1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium propane; DOTAP), 1,2-디올레일옥시-3-디메틸아미노-프로판(1,2-dioleoyloxy-3-dimethylamino-propane; DODMA), 1,2-디-O-옥타데세닐-3-트리메틸암모늄 프로판(1,2-di-O-octadecenyl-3-trimethylammonium propane; DOTMA), 3β-디메틸아미노에탄-카바모일]콜레스테롤(3β''DC-Chol), 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드(dimethyldioctadecylammonium bromide; DODAB), 1,2-디올레오일-3-디메틸암모늄-프로판(1,2-dioleoyl-3-dimethylammonium propane; DODAP), 디옥타데실디메틸 암모늄 클로라이드(dioctadecyldimethyl ammonium chloride; DODAC), 1,2-디스테아릴옥시-N,N-디메틸-3-아미노프로판(1,2-distearoyloxy-N,N-dimethyl-3-aminopropane; DSDMA), 1,2-디미리스토일옥시-프로필-3-디메틸-하이드록시에틸암모늄 브로마이드(1,2-dimyristyloxy-propyl-3-dimethyl-hydroxy ethyl ammonium bromide; DMRIE), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine; DMEPC), 1,2-디미리스토일-3-트리메틸암모늄 프로판(1,2-dimyristoyl-3-trimethylammonium propane; DMTAP), 1,2-디올레오일-3-디메틸-하이드록시에틸 암모늄 브로마이드(1,2-dioleoyl-3-dimethyl-hydroxyethyl ammonium bromide; DORIE), 2,3-디올레오일옥시-N-[2(스퍼민카르복사마이드)에틸]-N,N-디메틸-1-프로파나늄(2,3-dioleoyloxy-N-[2-(spermincarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium; DOSPA), 1,2-디리놀레일옥시-N,N-디메틸-3-아미노프로판(1,2-dilinoleoyloxy-N,N-dimethyl-3-aminopropane; DLinDMA), 1,2-디리놀레닐옥시-N,N-디메틸-3-아미노프로판(1,2-dilinenyloxy-N,N-dimethyl-3-amino propane; DLenDMA), 디옥타데실아미도글리실스퍼민(dioctadecylamidoglycylspermine; DOGS), 3-디메틸아미노-2-(콜레스트-5-엔-3-베타-옥시부탄-4-옥시)-1-(시스,시스-9,12-옥타데카디엔옥시)프로판(3-dimethylamino-2-(cholest-5-en-3-β-oxybutan-4-oxy)-1-(cis,cis-9,12-octadecadienoxy)propane; CLinDMA), 2-[5'-(콜레스트-5-엔-3-베타-옥시)-3'-옥사펜톡시]-3-디메틸-1-(시스,시스-9',12'-옥타데카디엔옥시)프로판(2-[5'-(cholest-5-en-3-β'-oxapentoxy)-3-dimethyl-1-(cis,cis-9',12'-octadecadienoxy)propane; CpLinDMA), N,N-디메틸-3,4-디올레일옥시벤질아

민(N,N-dimethyl-3,4-dioleoyloxybenzylamine; DMOBA), 1,2-N,N'-디올레일카바밀-3-디메틸아미노프로판(1,2-N,N'DOcarbDAP), 2,3-디리놀레오일옥시-N,N-디메틸프로필아민(2,3-dilinoleoyloxy-N,N-dimethylpropylamine; DLinDAP), 1,2-N,N'-디리놀레일카바밀-3-디메틸아미노프로판(1,2-N,N'DLincarbDAP), 1,2-디리놀레오일카바밀-3-디메틸아미노프로판(1,2-dilinoleoylcarbanyl-3-dimethylaminopropane; DLinCDAP), 2,2-디리놀레일-4-디메틸아미노메틸-[1,3]-디옥솔란(2,2-dilinoleyl-4-dimethylaminomethyl-[1,3]-dioxolane; DLin-KDMA), 2,2-디리놀레일-4-디메틸아미노에틸-[1,3]-디옥솔란(2,2-dilinoleyl-4-dimethylaminoethyl-[1,3]-dioxolane; DLin-K-XTC2-DMA), 2,2-디리놀레일-4-(2-디메틸아미노에틸)-[1,3]-디옥솔란(2,2-dilinoleyl-4-(2-dimethylaminoethyl)-[1,3]-dioxolane; DLin-KC2-DMA), 헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일-4-(디메틸아미노)부타노에이트(heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-yl-4-(dimethylamino)butanoate; DLin-MC3-DMA), (±)-N-(3-아미노프로필)-N,N-디메틸-2,3-비스(시스-9-테트라데세닐옥시)-1-프로판아미늄 브로마이드((±)-N-(3-aminopropyl)-N,N-dimethyl-2,3-bis(*cis*-9-tetradecenyl-oxy)-1-propanaminium bromide; GAP-DMORIE), (±)-N-(3-아미노프로필)-N,N-디메틸-2,3-비스(도데실옥시)-1-프로판아미늄 브로마이드((±)-N-(3-aminopropyl)-N,N-dimethyl-2,3-bis(dodecyl-oxy)-1-propanaminium bromide; GAP-DLRIE), (±)-N-(3-아미노프로필)-N,N-디메틸-2,3-비스(테트라데실옥시)-1-프로판아미늄 브로마이드((±)-N-(3-aminopropyl)-N,N-dimethyl-2,3-bis(tetradecyl-oxy)-1-propanaminium bromide; GAP-DMRIE), (±)-N-(2-아미노에틸)-N,N-디메틸-2,3-비스(테트라데실옥시)-1-프로판아미늄 브로마이드((±)-N-(2-aminoethyl)-N,N-dimethyl-2,3-bis(tetradecyl-oxy)-1-propanaminium bromide; βN-(4-카르복시벤질)-N,N-디메틸-2,3-비스(올레오일옥시)프로판-1-아미늄(N-(4-carboxybenzyl)-N,N-dimethyl-2,3-bis(oleoyloxy)propan-1-aminium; DOBAQ), 1,2-디미리스토일-3-디메틸암모늄-프로판(1,2-dimyristoleoyl-3-dimethylaminopropane; DMDAP), 1,2-디팔미토일-3-디메틸암모늄-프로판(1,2-dipalmitoyl-3-dimethylammonium-propane; DPDAP), N1-[2-((1S)-1-[(3-아미노프로필)아미노]-4-[디(3-아미노-프로필)아미노]부틸카르복사미도)에틸]-3,4-디[올레오일옥시]-벤즈아미드(N1-[2-((1S)-1-[(3-aminopropyl)amino]-4-[di(3-amino-propyl)amino]butylcarboxamido)ethyl]-3,4-di[oleoyloxy]-benzamide; MVL5), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine; DOEPC), 2,3-비스(도데실옥시)-N-(2-하이드록시에틸)-N,N-디메틸프로판-1-암모늄 브로마이드(2,3-bis(dodecyl-oxy)-N-(2-hydroxyethyl)-N,N-dimethylpropan-1-aminium bromide; DLRIE), N-(2-아미노에틸)-N,N-디메틸-2,3-비스(테트라데실옥시)프로판-1-아미늄 브로마이드(N-(2-aminoethyl)-N,N-dimethyl-2,3-bis(tetradecyl-oxy)propan-1-aminium bromide; DMORIE), 디((Z)-논-2-엔-1-일)8,8'-(((2(디메틸아미노)에틸)티오)카르보닐)아잔디일)디옥타노에이트(Di((Z)-non-2-en-1-yl)8,8'-(((2(dimethylamino)ethyl)thio)carbonyl)azanediyl)dioctanoate;

ATX), N,N-디메틸-2,3-비스(도데실옥시)프로판-1-아민(N,N-dimethyl-2,3-bis(dodecyloxy)propan-1-amine; DLDMA), N,N-디메틸-2,3-비스(테트라데실옥시)프로판-1-아민(N,N-dimethyl-2,3-bis(tetradecyloxy)propan-1-amine; DMDMA), 디((Z)-논-2-엔-1-일)-9-((4-(디메틸아미노부타노일)옥시)헵타데칸디오에이트(Di((Z)-non-2-en-1-yl)-9-((4-(dimethylaminobutanoyl)oxy)heptadecanedioate; L319), N-도데실-3-((2-도데실카바모일-에틸)-{2-[(2-도데실카바모일-에틸)-2-{(2-도데실카바모일-에틸)-[2-(2-도데실카바모일-에틸아미노)-에틸]-아미노}-에틸아미노}프로피온아미드(N-dodecyl-3-((2-dodecylcarbamoyl-ethyl)-{2-[(2-dodecylcarbamoyl-ethyl)-2-{(2-dodecylcarbamoyl-ethyl)-[2-(2-dodecylcarbamoyl-ethylamino)-ethyl]-amino}-ethylamino)propionamide; lipidoid 98N12-5) 및 1-[2-[비스(2-하이드록시도데실)아미노]에틸-2-[4-[2-[비스(2 하이드록시도데실)아미노]에틸]피페라진-1-일]에틸]아미노]도데칸-2-올(1-[2-[bis(2-hydroxydodecyl)amino]ethyl-2-[4-[2-[bis(2 hydroxydodecyl)amino]ethyl]piperazin-1-yl]ethyl]amino]dodecan-2-ol; lipidoid C12-200)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [54] 본 발명에 있어서, 상기 리포솜은 하나 이상의 음이온성 지질 및/또는 중성 지질과 같은 비-양이온성 지질을 포함할 수 있다.
- [55] 본 명세서에서, "음이온성 지질"은 선택된 pH에서 음으로 하전된 임의의 지질을 지칭한다. 본 명세서에서, "중성 지질"은 선택된 pH에서 전하를 띠지 않거나 중성 양쪽성 이온(zwitter ion, 쯔비터이온) 형태 중 하나로 존재하는 다수의 지질 중 중 임의의 것을 지칭한다.
- [56] 본 발명에 있어서, 상기 중성 지질은 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; DOPC), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스파티딜콜린(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; DMPC), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine; DOPE), 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; DPPC), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; DSPC), 1,2-디리놀레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dilinoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; DLPC), 포스파티딜세린(phosphatidylserine; PS), 포스파티딜에탄올아민(phosphatidylethanolamine; PE), 포스파티딜글리세롤(phosphatidylglycerol; PG), 인산(phosphoric acid; PA) 및 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine; PC)으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [57] 바람직하게는, 상기 양이온성 지질은 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄 프로판(1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium propane; DOTAP)이고, 상기 중성 지질은 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; DOPC)인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [58] 본 발명에 있어서, 상기 리포솜 내 양이온성 지질의 몰비(%)는 25 내지 75%인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [59] 본 발명의 일 실시예에서, 총 지질 중 25% DOTAP을 포함시킬 때 표면 전하가 음에서 양으로 크게 이동하였고, 100%까지 표면 전하가 양전하로 유지되었으며 (도 1d), 세포외소포체와의 융합률이 증가되었다(도 7c). 다만, 100% DOTAP을 함유한 CLIP이 가장 높은 융합 효율에도 불구하고 시간이 지남에 따라 불안정성을 나타내고 응집체를 형성하였다(도 4, 도 12). 따라서, 리포솜 내 양이온성 지질의 몰비(%)는 바람직하게는 75%로, 양이온성 지질:중성 지질의 몰비가 75:25인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [60]
- [61] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 세포외소포체 검출용 리포솜을 포함하는 암세포 유래 세포외소포체 검출용 조성물에 관한 것이다.
- [62] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 세포외소포체 검출용 리포솜을 포함하는 암세포 유래 세포외소포체 검출용 키트에 관한 것이다.
- [63] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 세포외소포체 검출용 리포솜을 생물학적 샘플(biological sample) 유래 세포외소포체와 융합시키는 단계; 및 형광(fluorescence) 신호 발생시 암세포 유래 세포외소포체인 것으로 결정하는 단계를 포함하는 암세포 유래 세포외소포체 검출방법에 관한 것이다.
- [64] 본 발명에 있어서, 상기 융합은 액적 반응기(droplet reactor)에서 수행하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [65] 본 발명에 있어서, 상기 액적 반응기는 두 개의 수성상(aqueous phase) 채널, 하나의 유성상(oil phase) 채널, 하나의 접합부(junction) 및 하나의 출력(outlet) 채널을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 두 개의 수성상 채널에 리포솜과 생물학적 샘플 유래 세포외소포체를 각각 투입하여 접합부에서 수성 액적이 생성되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [66] 본 발명의 일 실시예에서, 소포체(EV 및 CLIP)의 화학양론(stoichiometry)에 대한 정확한 제어를 보장하고 원하지 않는 응집을 방지하기 위해, 전체 융합 과정은 정확한 제어가 가능한 μ encapsulator를 사용하여 액적 반응기 내에서 수행되었으며, 벌크 스케일 반응에서 발생할 수 있는 잠재적 응집을 최소화하였다(도 6). μ encapsulator는 1.5 μ L/min의 유속으로 두 개의 수성 입구를 통해 별도의 상으로 EV와 CLIP을 흐르게 하여 작동하는 반면, 연속 유성상 입구는 생체적합성 계면활성제 FC-40을 35 μ L/min의 유속으로 운반하여 유성상 내의 접합부에서 두 소포체가 서로 만날 때 두 소포체를 포함하는 수성 액적의 생성을 가능하게 하였다(도 7a).
- [67] 본 발명에 있어서, 상기 리포솜과 생물학적 샘플 유래 세포외소포체의 몰비는 1:1 내지 10:1인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [68] 본 발명의 일 실시예에서, 세포외소포체:리포솜의 몰비가 10:1일 때 지질 막 혼합 백분율 35.67 $\pm$ 1.35%, 1:1일 때 백분율 45.91 $\pm$ 6.33%, 1:10일 때 백분율

71.45±6.58%였다. 따라서, 바람직하게는 1:10의 세포외소포체:리포솜의 몰비인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[69] 본 발명의 일 실시예에서, 폐암 환자와 건강한 기증자로부터 채취한 혈장 샘플에서 하전-리포솜 EV 검출(EV-CLIP)을 통해 사전 EV 분리 단계 없이 EGFR L858R 및 T790M 돌연변이를 디지털 방식으로 검출할 수 있었으며, 검출 과정의 단순화로 EV 손실이 최소화됨을 확인하였다. 즉, 본 발명에 따른 리포솜과 샘플 유래 EV를 융합시키고 형광 신호 발생 여부를 확인함으로써 샘플이 암세포인지 여부를 쉽게 결정할 수 있다.

[70] 본 명세서에서, 용어 “생물학적 샘플(biological sample)”은 생물학적 유체 샘플(biological-fluid sample) 및 생물학적 조직 샘플(biological tissue sample)을 포함한다.

[71] 본 명세서에서, 용어 “생물학적 유체(biological-fluid)”는 원핵생물, 진핵생물, 박테리아, 진균, 효모, 무척추동물, 척추동물, 파충류, 어류, 곤충, 식물 및 동물을 포함하는 유기체로부터 분리되거나 유래된 임의의 유체를 의미하며, 혈청, 혈장, 전혈, 소변, 타액, 모유, 눈물, 땀, 관절액, 뇌척수액, 정액, 질액, 객담, 흉수, 림프액, 복수 및 양수를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 기관지 세척액 및 배양된 세포에서 채취한 배양액(예를 들어, 세포 배양 상층액, 조건(conditioned) 배양액, 세포 배양액 또는 세포 배양 배지)도 생물학적 유체일 수 있다.

[72] 본 명세서에서, 용어 “생물학적 조직(biological tissue)”은 원핵생물, 진핵생물, 박테리아, 진균, 효모, 무척추동물, 척추동물, 파충류, 어류, 곤충, 식물 또는 동물로부터 유래된 세포의 집합을 의미한다. 또한, 배양된 세포는 생물학적 조직일 수 있다. 생물학적 조직 샘플의 비제한적인 예로 수술 샘플, 생검 샘플, 조직, 대변, 식물 조직, 곤충 조직 및 배양된 세포를 포함한다.

[73]

[74] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 세포외소포체 검출용 리포솜을 포함하는 암 진단용 조성물에 관한 것이다.

[75] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 세포외소포체 검출용 리포솜을 포함하는 암 진단용 키트에 관한 것이다.

[76] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 세포외소포체 검출용 리포솜을 생물학적 샘플(biological sample) 유래 세포외소포체와 융합시키는 단계; 및 형광(fluorescence) 신호 발생시 암인 것으로 결정하는 단계를 포함하는 암 진단을 위한 정보제공방법 및 암 진단방법에 관한 것이다.

[77] 본 발명에 있어서, 두 개의 수성상(aqueous phase) 채널, 하나의 유성상(oil phase) 채널, 하나의 접합부(junction) 및 하나의 출력(outlet) 채널을 포함하는 액적 반응기(droplet reactor)에서 수행하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [78] 본 발명의 일 실시예에서, 폐암 환자와 건강한 기증자로부터 채취한 혈장 샘플에서 하전-리포좀 EV 검출(EV-CLIP)을 통해 사전 EV 분리 단계 없이 EGFR L858R 및 T790M 돌연변이를 디지털 방식으로 검출할 수 있었다. 즉, 본 발명에 따른 리포좀과 샘플 유래 EV를 융합시키고 형광 신호 발생 여부를 확인함으로써 샘플이 암인지 여부를 쉽게 결정할 수 있다. 초기 암에서도 전처리 없이 단시간 내에 높은 수준으로 돌연변이를 검출할 수 있어 암 환자와 건강한 기증자를 쉽게 구별할 수 있으며, 따라서 종양-유래 EV의 miRNA를 암 진단을 위한 표준 임상 지표로 변환하는 데 있어 종래 방법에 비해 가치가 있음이 입증되었다.
- [79] 본 발명에 있어서, 상기 암은 편평세포암, 소형 세포 폐암, 비-소형 세포 폐암, 폐암, 복막암, 결장암, 담도 종양, 비인두암, 후두암, 기관지암, 갑상선암, 구강암, 골육종, 담낭암, 담도암, 신장암, 방광암, 신장세포암, 흑색종, 뇌암, 신경 교종, 교모세포종, 뇌종양, 피부암, 췌장암, 유방암, 간암, 골수암, 소장암, 식도암, 대장암, 위암, 안암, 요도암, 자궁경부암, 전립선암, 난소암, 전이암, 두경부암, 직장암, 비호지킨 림프종, 다발성골수종, 급성 골수성 백혈병, 림프종, 급성 림프모구 백혈병 및 만성 골수성 백혈병으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [80] 본 발명에 있어서, 상기 진단키트는 진단방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치 등의 다양한 구성요소를 추가로 포함할 수 있다. 상기 진단키트는 생물학적 샘플을 담는 구획된 캐리어 수단, 시약을 포함하는 용기 등을 추가로 포함할 수 있다. 상기 캐리어 수단은 병, 튜브와 같은 하나 이상의 용기를 함유하기에 적합하고, 각 용기는 본 발명의 방법에 사용되는 독립적 구성요소들을 함유한다. 본 명세서에서, 당해 분야의 통상의 지식을 가진 자는 용기 중의 필요한 제제를 손쉽게 분배할 수 있다.
- [81]
- [82] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [83]
- [84] 실시예 1: 재료 및 방법
- [85] 실시예 1-1: 시약 및 장비
- [86] 0.2 μm 주사기 필터(Minisart® NML Syringe Filters, S6534), 1x 인산염 완충 식염수(pH 7.4, Gibco), 항생제/항진균제(Gibco, 15240062), 항-CD63(BD Bioscience, BD556019), 항-CD81(BD Bioscience, BD555675), 항-CD9(BD Bioscience, BD555370), 항-EGFR(abcam, ab192263), EV-depleted FBS(Systems Biosciences Inc), Exodisc™-C(LabSpinner), 분자비콘(Oligo, Macrogen), NBD-PE(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt, Thermofisher, N360), Rhodamine-

DHPE(Lissamine rhodamine B 1,2 dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt, Thermofisher, L1392), TMB 용액(Sigma-Aldrich, T0440-100ML).

- [87] 0.2 μ m 주사기 필터(Minisart® CA Syringe Filters, 16534K), μ Encapsulator 2 시약 액적 칩(Dolomite Microfluidics 3200529), 100K Amicon 원심분리 필터(Merck milipore, UFC810096), 150 μ m 수정 5 입력 칩 3D(Dolomite Microfluidic 3200834), 30 μ m 챔버 칩(Microfluidic ChipShop, 10001447), 96-웰 플레이트(Corning, 3364), 공초점 레이저 주사 현미경(Zeiss LSM 780NLO, Zeiss), Malvern Zetasizer(Nano ZS), NanoSight 기기(Nanosight NS500, Malvern Instruments), TECAN M2000 Pro Plate Reader(Tecan), 투과전자현미경(JEOL, JEM-2100).

[88]

- [89] 실시예 1-2: 세포 배양

- [90] H1975 세포(ATCC)를 5%(v/v) FBS(Gibco) 및 1% Antibiotic/Antimycotic(100 U/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin, Gibco, 15240062)로 보충된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)(Gibco, 11965092)에서 정적 조건, 5% CO₂ 존재 하, 37°C에서 배양하였다.

[91]

- [92] 실시예 1-3: 세포 배양액으로부터 세포외소포체 분리

- [93] 상용화된 Exo-Disc 플랫폼(Woo, H.-K., et al., Acs Nano, 2017. 11(2): p. 1360-1370)을 사용하여 세포외소포체를 세포 배양 배지에서 분리하였다. 세포의 70-80% 합류성 10cm 배양 접시를 1x 인산염 완충 식염수(pH 7.4, Gibco)로 2회 세척한 후, 5% EV-고갈 FBS(Systems Biosciences Inc) 및 1% Antibiotic/Antimycotic이 보충된 각각의 배지에서 48시간 동안 배양한 다음, 세포배양상층액을 수집하고, 300g에서 10분간 원심분리하고 2000g에서 10분간 더 원심분리하여 세포 잔해를 제거한 후, 0.2 μ m 주사기 필터(Minisart® NML Syringe Filters, S6534)를 통과시켰다. 그런 다음, 정제된 상층액을 기공 직경이 0.02 μ m인 양극산화알루미늄 필터가 장착된 원심 디스크인 ExoDisc 플랫폼(Exodisc™-C, LabSpinner)을 사용하여 농축하였다. 상층액을 3000rpm(약 500g)으로 원심분리하여 필터를 통과시키고, 수집 챔버에서 농축된 EV 100 μ L를 희석배율 2로 1X PBS에 재현탁시켰다. 그 다음, 분리된 EV를 NanoSight 기기 및 Malvern Zetasizer로 분석하여 농도, 크기 및 제타 전위 분포를 각각 확인하였고, EV를 분취하여 추가 실험에 사용할 때까지 -80°C에서 보관하였다.

[94]

- [95] 실시예 1-4: 리포솜 합성

- [96] 리포솜은 상용화된 플랫폼(Dolomite Microfluidics)을 사용하여 미세유체 유체 역학적 포커싱 방법으로 합성되었다. 리포솜을 위한 지질 혼합물은 0.2 μ m 주사기 필터(Minisart® CA Syringe Filters, 16534K)를 사용하여 여과한 순수 에탄올(Duksan Pure Chemicals, UN1170) 1mL에 18:1 TAP 또는 DOTAP(1,2-dioleoyl-3-

trimethylammonium propane, Avanti 890890P) 및 18:1(Δ 9-Cis) PC 또는 DOPC(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, Avanti 850375P)-0%, 25%, 50%, 75% 및 100% DOTAP-을 다양한 비율로 최종 농도 5mg/mL가 되도록 용해하여 만든다. 150 μ m 친수성 5 input chip 3D(Dolomite Microfluidic 3200834)를 사용하여 수성상(1X Phosphate Buffered Saline, pH 7.4, Gibco)의 유속 50 μ L/분, 유성상(지질 혼합물)의 유속 5 μ L/분으로 조절하여 CLIP 합성을 수행하였다. 현탁액을 1.5mL 마이크로원심분리 튜브에서 15분 동안 수집한 후, 100K Amicon 원심분리 필터(Merck milipore, UFC810096)를 사용하여 정제하고 PBS로 2회 세척한 다음, NanoSight 기기(Nanosight NS500, Malvern Instruments) 및 Malvern Zetasizer(Nano ZS)로 분석하여 농도, 크기 및 제타 전위 분포를 측정하였다. 이후 CLIP를 분취하고 추가 사용 시까지 4°C에서 보관하였다.

[97]

[98] 실시예 1-5: 미세유체 보조 EV-CLIP 융합(Microfluidic Aided EV-CLIP Fusion)

[99] 미세유체 보조 융합은 상용화된 플랫폼(Dolomite Microfluidics)을 사용하여 수행하였다. 유리 칩(μ Encapsulator 2 Reagent Droplet Chip, Dolomite Microfluidics 3200529)은 4개의 채널(수성상(aqueous phase) 채널 2개, 유성상(oil phase) 채널 1개, 출력 채널 1개)로 구성된다. PBS의 동일한 농도의 리포솜과 세포외소포체가 미세유체 칩의 수성 채널에 로딩되었으며, 직경 30 μ m의 액적이 FC-40(RAN Biosciences, 008-FluoroSurfactant-2wtF-50G) 유성상에서 생성되었다. 세포외소포체와 리포솜의 수는 초기 샘플 투입 농도를 10~10⁵ particles/ μ L 범위로 변화시켜 조절할 수 있으며, 펌프의 압력은 유성상과 수성상에서 각각 2500mBar와 1100mBar로 유지되었다. 액적을 미세원심분리 튜브에서 20분 동안 수집하고 추가 실험에 사용될 때까지 4°C에서 보관하였다.

[100]

[101] 실시예 1-6: MB-CLIP와의 융합을 통한 세포외소포체 검출

[102] 세포외소포체 검출은 상술한 미세유체 보조 융합 방법을 통해 수행되었다. 모두 1X PBS에 있는 다양한 농도의 세포외소포체(10~10⁵ particles/ μ L)와 CLIP(miR-21 또는 EGFR L858R 및 T790M 돌연변이)을 포함하는 고정 농도의 분자비콘을 FC-40 유성상에서 직경 30 μ m의 액적이 생성된 미세유체 칩의 수성 채널에 로딩하였다. 펌프의 압력은 유성상과 수성상에서 각각 2500mBar와 1100mBar로 유지되었다. 액적 용액을 1.5mL 갈색 미세원심분리 튜브에서 20분 동안 수집하고 추가 실험에 사용될 때까지 4°C에서 보관하였다.

[103]

[104] 실시예 1-7: EV-CLIP 공존(colocalization) 실험

[105] EV-리포솜 공존 연구를 위해 EV와 리포솜을 각각 3,3'-

Diocetadecyloxycarbocyanine perchlorate(DiO) 염료(Thermofisher Scientific, V22886) 및 Rhodamine-DHPE(Lissamine rhodamine B 1,2 dihexadecanoyl-sn-glycero-3-

phosphoethanolamine, triethylammonium salt)(Thermofisher, L1392)로 라벨링하였다. EV 라벨링을 위해, ExoDisc 플랫폼에서 사전 농축된 EV 100 μ L를 200nM DiO 염료 용액 2 μ L와 함께 진탕기에서 실온에서 20분간 배양하였다. 배양 후 EV를 3000rpm에서 원심분리하여 1X PBS로 두 번 세척하였다. 챔버에서 농축된 EV는 희석배율 2로 1X PBS에 재현탁되었다. 리포솜 라벨링을 위해, 1 mol% Rhodamine-DHPE를 지질 혼합물에 혼입시켰다. 그런 다음 최종 지질 농도가 5 mg/mL에 도달하도록 부피를 조정하였다. Rho-리포솜은 상술한 미세유체 유체역학적 포커싱 방법에 의해 합성되었다. 합성된 리포솜을 100K Amicon 원심분리 필터를 사용하여 PBS 세척으로 정제하여 유리 염료를 제거했다. 염료로 변형된 리포솜은 상술한 미세유체 보조 융합 방법을 사용하여 세포외소포체와 융합되었다. 그런 다음 융합된 소포체를 1X PBS로 희석하고, $\times 10$ Plan-Apochromat와 LU-NV laser unit 488 nm(green/Alexa Fluor 488) 및 560 nm(red/Cy5)를 구비한 0.45 NA objective lens를 사용하여 공초점 레이저 주사 현미경(Zeiss LSM 780NLO)으로 이미지화 하였다. 공존 분석은 FIJI를 사용하여 수행되었다.

[106]

[107] 실시예 1-8: NBD-PE 융합 정량 분석

[108] 융합 정량화는 공개된 방법(Murtas, G., Systems and synthetic biology, 2010. 4(2): p. 85-93)을 사용하여 수행되었다. 1 mol% Rhodamine-DHPE(Lissamine rhodamine B 1,2 dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt)(Thermofisher, L1392) 및 NBD-PE(*N*-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-1,2-dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt)(Thermofisher, N360)를 지질 혼합물에 혼입시켰다. 그런 다음, 최종 지질 농도가 5 mg/mL에 도달하도록 부피를 조정했다. Rho-NBD 리포솜은 상술한 미세유체 유체역학적 포커싱 방법에 의해 합성되었다. 합성된 리포솜을 100K Amicon 원심분리 필터를 사용하여 PBS 세척으로 정제하여 유리 염료를 제거했다. 염료로 변형된 리포솜은 상술한 미세유체 보조 융합 방법을 사용하여 세포외소포체와 융합되었다. 융합된 소포체로부터의 형광 신호는 여기-방출 파장이 각각 485/535nm인 분광 광도계(M2000 Pro, Tecan)를 사용하여 측정되었다. 융합 백분율은 다음 공식을 사용하여 계산되었다:

[109]

$$Fusion \% = \frac{F - F_{min}}{F_{max} - F_{min}} \times 100\%$$

[110]

[111] 실시예 1-9: 리포솜에 분자비콘(Molecular Beacon) 로딩

[112] miR-21, EGFR L858R 및 EGFR T790M 표적 분자비콘(Oligo, Macrogen)은 1X PBS에 총 농도 1 μ M의 일정량의 분자비콘을 통합하여 리포솜에 로딩되었다. 그 다음, 최종 지질 농도가 5mg/mL인 미세유체 유체역학적 포커싱(MHF) 방법을 사용하여 리포솜을 합성하였다. miR-21 표적 비콘은 리포솜 배치에 로딩된 한편,

EGFR L858R 및 T790M 돌연변이 특이적 비콘은 리포솜의 다른 배치에 동시에 로딩되었다. 펌프의 유속은 수성상 및 유성상 각각 50 μ L/min 및 5 μ L/min으로 유지되었다. 그런 다음, 분자비콘이 탑재된 리포솜을 100K amicon 원심분리 필터를 사용하여 2회 PBS 세척으로 정제한 후, Nanosight 기기 및 Malvern Zetasizer로 분석하여 농도, 크기 및 제타 전위 분포를 확인하였다. 이후 리포솜은 추가 사용 전까지 4°C에서 보관하였다.

[113]

[114] 실시예 1-10: 액적 이미징

[115] 이미지화를 위해, 6 μ L의 액적 용액을 30 μ m 챔버 칩(Microfluidic ChipShop, 10001447)에 로딩하고, $\times 10$ Plan-Apochromat와 LU-NV laser unit 488 nm(green/Alexa Fluor 488) 및 560 nm(red/Cy5)를 구비한 0.45 NA objective lens를 사용하여 공초점 레이저 주사 현미경(Zeiss LSM 780NLO)으로 액적을 관찰하였다.

[116] 액적 분석을 위한 모든 이미지는 FIJI를 사용하여 처리되었다.

[117]

[118] 실시예 1-11: 건강한 플라즈마 스파이킹 실험

[119] 임상시험심사위원회(IRB)가 승인한 건강한 인간 혈장은 적십자(UNISTIRB-19-41-C)에서 얻었다. 인간 혈장을 희석배율 10으로 1X PBS에 희석한 다음, 10~105 particles/ μ L까지 다양한 농도로 H1975 세포 유래 EV로 스파이크했다. 스파이크된 혈장 샘플과 분자-비콘-로딩된 CLIP(miR-21 또는 EGFR L858R 및 T790M 돌연변이)을 미세유체 보조 융합을 위해 액적 칩에 로딩하였다. 펌프의 압력은 유성상 및 수성상에서 각각 2500mBar 및 1100mBar로 유지되었다. 액적을 미세원심분리 튜브에서 20분 동안 수집하고 추가 분석에 사용될 때까지 4°C에서 보관하였다.

[120]

[121] 실시예 1-12: 환자 샘플에서 EGFR 돌연변이 검출

[122] 건강한 기증자 10명, 돌연변이가 없는 폐암 샘플 17명(I기 6명, II기 3명, III기 3명, IV기 5명) 및 EGFR 돌연변이가 있는 폐암 샘플 56명(I기 18명, II기 6명, III기 7명, IV기 25명)의 총 83개 샘플을 인하대학교병원(2019-11-017), 전남대학교 화순병원(CNUHH-2022-021) 및 부산대학교병원(2106-044-104)에서 확보하였다: 건강한 기증자 혈장 샘플은 모두 인하대학교병원에서, 돌연변이가 없는 II기 1개와 III기 1개 샘플, EGFR 돌연변이가 있는 I기 12개, II기 5개, III기 6개, IV기 16개 샘플은 전남대학교 화순병원에서, 나머지 샘플은 부산대학교병원에서 제공받았다. 20 μ L의 환자 샘플과 CLIP을 포함하는 분자비콘을 검출하는 EGFR L858R 및 T790M을 미세유체 보조 융합을 위한 액적 칩에 로딩하였다. 펌프의 압력은 유성상 및 수성상에서 각각 2500mBar 및 1100mBar로 유지되었다. 액적을 미세원심분리 튜브에서 20분간 수집하고 추가 분석에 사용할 때까지 4°C에서 보관하였다.

[123]

[124] 실시예 1-13: 통계 분석

- [125] 실험은 독립적으로 최소 3회 수행되었으며 각 실험에 사용된 독립적인 반복 실험 횟수는 각 도면 범례에 명시되어 있다. 두 그룹 간의 비교는 two-tailed unpaired Student's t-test로 수행하였고, 3개 이상의 그룹 간 비교는 one-way ANOVA로 수행하였다. 모든 통계 분석은 Graphpad Prism 9.3.1에서 수행되었다.
- [126]
- [127] 실시예 2: 고효율 리포솜의 전하 조정(High-throughput charge-tuning of liposomes)
- [128] 본 발명에서는, 양이온성(cationic) 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄 프로판(1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium propane; DOTAP)과 양쪽성이온성(zwitterionic) 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; DOPC)의 두 가지 유형의 지질을 하전-리포솜(CLIP) 제조를 위한 빌딩 블록으로 활용하여 리포솜의 고효율 전하 조정을 달성했다. 리포솜 제조를 위한 미세유체 유체역학적 포커싱(MHF) 활용을 통해(Jahn, A., et al., *J Am Chem Soc* 2004, 126 (9), 2674-5) 지질 조성의 변화를 성공적으로 달성하여 CLIP의 표면 전하를 효율적이고 신속하게 조정할 수 있었다(도 1a, 도 1b 및 도 2). 미세유체 장치는 에틸 알코올에 5mg/mL의 농도로 용해된 지질 용액(DOTAP 및 DOPC로 구성)을 5 μ L/min의 속도로 중앙 입구 채널을 통해 흐르게 하고, 수용액이 50 μ L/min의 속도로 두 개의 측면 입구 채널을 통해 흐르게 함으로써 CLIP 형성을 용이하게 하였으며, 결과적으로 CLIP이 성공적으로 형성되었다. 도 1c는 투과전자현미경(TEM)(직경: 92.5 $\pm$ 5.65nm)으로 확인된 리포솜의 둥근 형태가 동적광산란(DLS) 실험 및 나노입자 추적 분석(NTA)을 통해 측정된 크기와 일치함을 보여준다(도 3). 도 1d에 나타난 바와 같이, 빌딩 블록 지질, DOTAP 및 DOPC의 조성을 변경하여 CLIP의 표면 전하를 -18.63 $\pm$ 0.76mV에서 +38.67 $\pm$ 2.51mV로 조정하였다. 이상적으로는, DOTAP의 비율이 높을수록 CLIP의 표면 전하가 더 양성이고 그 반대의 경우도 마찬가지이다. 지질의 DOTAP 비율을 0%(순수 DOPC)에서 100%(순수 DOTAP) 범위로 조정함으로써 총 지질 양에 25% DOTAP을 포함시킬 때 표면 전하가 음에서 양으로 눈에 띄게 이동하는 것을 확인하였다. 이 변화는 예측 결과와 일치했으며, 표면 전하는 DOTAP의 비율이 높을수록 비례적으로 증가하는 것으로 나타났다(도 1d). 특히, 리포솜을 48시간 동안 보관한 후, DOTAP을 0%, 25%, 50%, 75% 포함하는 리포솜의 크기는 시간이 지나도 안정적으로 유지되었다. 다만, 100% DOTAP을 함유한 리포솜은 300nm까지 크기가 지속적으로 증가하였으며, 구체적으로 311.50 $\pm$ 8.51nm로서 약 3배의 크기 증가를 나타냈다(도 1e, 도 4).
- [129]
- [130] 실시예 3: 리포솜의 하전-유도 융합
- [131] 리포솜의 표면 전하를 미세 조정한 후, 세포외소포체와 CLIP 융합에 대한 효과를 확인하고자 하였다. 우선, H1975 세포에서 EV를 분리하기 위해 나노 필터(Exodisc)가 내장된 lab-on-a-disc 시스템을 활용하여 신속, 무라벨, 높은 수율의 방

법을 사용하였으며(도 5a), tabletop 크기의 원심형 미세유체 시스템에서 세포배양상층액(CCS)을 출발 물질로 사용하여 20-200nm 크기의 EV를 30분 이내에 농축시킬 수 있었다(도 5b). 나노입자 추적 분석(NTA)과 동적 광산란(DLS)을 활용하여 EV의 크기 분포가 균질한 것을 확인하였다(도 5c, 도 5d).

- [132] 다음으로, 소포체(EV 및 CLIP)의 화학양론(stoichiometry)에 대한 정확한 제어를 보장하고 원하지 않는 응집을 방지하기 위해, 전체 융합 과정은 정확한 제어가 가능한 μ encapsulator를 사용하여 액적 반응기 내에서 수행되었으며, 벌크 스케일 반응에서 발생할 수 있는 잠재적 응집을 최소화하였다(도 6). μ encapsulator는 1.5 μ L/min의 유속으로 두 개의 수성 입구를 통해 별도의 상(phase)으로 EV와 CLIP을 흐르게 하여 작동하는 반면, 연속 유정상 입구는 생체적합성 계면활성제 FC-40을 35 μ L/min의 유속으로 운반하여 유정상 내의 접합부에서 두 소포체가 서로 만날 때 두 소포체를 포함하는 수성 액적의 생성을 가능하게 한다(도 7a). 하나의 액적 내에 포함된 EV 및 CLIP의 양은 Poisson 분포 계산에 따라 소포체의 초기 입력 농도를 조정하여 제어할 수 있다(표 1).

- [133] [표1]

개별 액적의 EV 분포에 대한 Poisson 분포 계산

Concentration (particles/mL)	Average # of EV / droplet	Probability of a droplet containing (%)				
		0 EV	1 EV	2 EVs	3 EVs	4 EVs
10^4	0.00007	99.993	0.007	0	0	0
10^5	0.0007	99.93	0.07	0	0	0
10^6	0.007	99	1	0	0	0
10^7	0.07	93	7	0	0	0
10^8	0.7	49	35	12	3	1

- [134] 표 1에서는, $10^4 \sim 10^8$ particles/mL의 농도 범위에서 특정 수의 EV를 포함하는 액적의 확률을 %로 표시한다.

- [135] 이 미세유체 설정에서, $27.40 \pm 2.06 \mu\text{m}$ 크기의 단일 액적 내에서 EV의 초기 입력 농도($10 \sim 10^5$ EVs/ μL 범위)와 CLIP과의 비율을 제어했다(도 8). 도 7f에 도시된 바와 같이, TEM 분석을 통해, 반-융합 및 융합 소포체의 각각의 규칙적인 형태를 확인하였다. 또한, DLS 분석에서는 융합 후 소포체 집단의 크기가 증가한 것으로 나타났으며 이는 관찰된 결과와 일치한다(도 7g). 그러나 EV 융합을 위한 CLIP에서 DOTAP의 비율을 점진적으로 증가시키면 융합된 소포체의 크기는

75% DOTAP에 도달할 때까지 변하지 않고 유지되었으며, 그 이상에서는 소포체 크기가 상당히 증가하는 것이 관찰되었다(도 9a). 소포체 융합의 확인은 zeta sizer를 사용하여 융합 소포체의 표면 전하 변화를 관찰함으로써 더욱 뒷받침되었으며, 증가된 제타 전위는 더 높은 비율의 DOTAP과 상관관계가 있어 융합 발생이 검증되었다(도 9b).

- [136] EV-CLIP 융합 이벤트를 시각적으로 나타내기 위해, EV를 녹색 형광 염료(3,3'-Diocetadecyloxacarbocyanine perchlorate (DiO) dye (ThermoFisher Scientific, V22886))로 표지하고, CLIP을 적색 형광 염료(Rhodamine-DHPE (Lissamine rhodamine B 1,2 dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt))로 표지하여, 공초점 레이저 주사 현미경(CLSM) 이미징을 수행하였다. CLSM 이미징은 TEM 이미지 및 DLS 실험과 일치하는 융합된 소포체 내 염료의 공존을 보여주었다(도 7d, 도 7e). 또한, 융합 효율을 평가하기 위해 Forster Resonance Energy Transfer(FRET; 형광 공명 에너지 이동)-기반 지질 혼합 분석(Stryer, L.; Haugland, R. P., *Proc Natl Acad Sci U S A* 1967, 58 (2), 719-26)을 활용했으며, CLIP은 nitro-2,1,3-benzoxadiazole-4-yl(NBD)을 donor로, Lissamine Rhodamine B(Rho)를 acceptor로 이중-표지하였으며, 이들이 근접할 때 여기된 NBD donor로부터 Rho acceptor로 에너지 전달이 발생한다(Francois-Martin, C.; Pincet, F., *Scientific Reports* 2017, 7 (1), 43860)(도 7b, 도 7c). 처음에 이중-표지 지질이 CLIP의 제타 전위에 미치는 영향을 조사했는데, 표면 전하에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(도 11).

- [137] FRET-기반 분석을 사용하여 DOTAP 백분율에 반응하는 융합 백분율의 증가를 관찰하였다(도 7c). 그러나 100% DOTAP을 함유한 CLIP이 가장 높은 융합 효율에도 불구하고 시간이 지남에 따라 불안정성을 나타내고 응집체를 형성하는 것을 관찰하였다(도 4). 액적 반응기의 융합 방법을 벌크 스케일과 비교해 보았을 때, 잠재적인 응집체가 나타났다(도 12). 결과적으로, 후속 실험을 위해 75% DOTAP을 선택된 제형으로 진행하였다. 또한 CLSM 이미징으로 추가 확인된 10:1의 최대 융합 백분율($74.96 \pm 2.63\%$)을 확인할 수 있는 CLIP 대 EV의 비율을 조정했다(도 7c).

[138]

- [139] 실시예 4: 종양-유래 EV miRNA의 디지털 검출

- [140] CLIP과 EV 사이의 효율적인 융합을 성공적으로 입증한 후, 자연적 환경에서 EV miRNA를 검출하기 위한 하전-융합 전략의 효과를 평가하기 위하여, 공초점 레이저 주사 현미경(Confocal Laser Scanning Microscope; CLSM)을 사용하여 분자비콘(molecular beacon; MB) 캡슐화 CLIP과 종양-유래 EV(tEV) miR-21 사이의 융합 과정 동안 형광 반응을 직접 조사하는 데 초점을 맞췄다. 본 실시예에서, MB는 5' 말단에 cyanine 3 fluorophore, 3' 말단에 tetrachlorofluorescein quencher, 그리고 fluorophore와 quencher를 가깝게 만드는 양쪽 끝의 상보적 염기를 특징으로 하여 형광 소광(fluorescence quenching)을 유도하는 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드

이드 프로브를 포함하는 헤어핀 구조를 활용하였다(Zhang, P., et al., *Angew Chem Int Ed Engl* 2001, 40 (2), 402-405)(표 2).

[141] [표2]

miR-21, EGFR L858R 및 T790M 돌연변이에 사용된 분자비콘 서열

분자비콘(MB)	서열	서 열 번 호
EGFR (p.T790M mutation)	AGCTGC/ <u>iCy5</u> /ATGATGAGCTGCACGGTGGCAGCTCAT CAT/ <u>BHQ2</u>	1
EGFR (p.L858R mutation)	TTGGCC/ <u>iCy3</u> /CGCCCCAAAATCTGTGATTAGATTGGGC G/ <u>BHQ2</u>	2
miR-21	TCAACA/ <u>iCy3</u> /TCAGTCTGATAAGCTAGTATTATCAGACT GA/ <u>BHQ2</u>	3

[142] 표 2에서 밑줄로 표시된 부분은 각각 fluorophore와 quencher이다. 서열은 Hu, J., et al., *Biomaterials*, 2018. 183: p. 20-29를 참조할 수 있다.

[143]

[144] 우선, 유방암, 결장암, 폐암, 췌장암, 전립선암 및 위암과 같은 다양한 종양 유형에서 상향조절되는 것으로 알려진 microRNA-21(또는 miR-21)(Krichevsky, A. M.; Gabriely, G., *J Cell Mol Med* 2009, 13 (1), 39-53)을 표적하도록 특별히 설계된 분자 프로브(MB)를 사용하여 종양-유래 세포외소포체(tEV)를 검출하였다. 상술한 미세유체 유체역학적 포커싱 방법을 사용하여 CLIP을 생성하는 동안, miR-21 특이적 MB(miR-21 MB)는 1 μ M의 miR-21 MB를 수성 상에 통합하여 로딩되었으며 이러한 삽입은 리포솜의 크기나 제타 전위에 큰 영향을 미치지 않았다(도 13b). 개념 증명으로서, 이러한 EV를 액적 반응기에서 miR-21MB를 포함하는 CLIP과 융합하여 인산염 완충 식염수(PBS)에서 H1975 폐암 세포주 유래-EV의 검출을 시작했다. 실험 전반에 걸쳐 CLIP의 농도를 일정하게 유지시켰으며, H1975 EV

의 농도를 10에서 10^5 EVs/ μ L로 변경하여 일련의 이미지 처리를 통해 분석한 결과 형광 신호가 검출되는 액적의 개수가 비례적으로 증가했다(도 14a-도 14e).

- [145] 시스템을 성능을 평가하기 위해 H1975 폐암 세포주에서 EGFR L858R 및 T790M 돌연변이(Zhao, B. X., et al., *Mol Med Rep* 2015, 11 (4), 2767-74)를 검출하는 능력을 확인하고자 하였다. 이를 달성하기 위해, miR-21 MB를 로딩하는 데 사용된 것과 동일한 방법을 사용하여 미세유체 유체역학적 포커싱 방법을 통해 각 비콘의 1μ M을 수성 상에 통합함으로써, EGFR L858R 및 T790M 돌연변이 특이적 MB 서열(Hu, J., et al., *Biomaterials* 2018, 183, 20-29)을 도입하였다. 특히, 이러한 비콘의 포함은 CLIP의 크기 또는 제타 전위에 큰 영향을 미치지 않았다(도 13).
- [146] 다음으로, μ encapsulator에 의해 생성된 액적 반응기에 대한 이전 설정과 동일한 실험 조건이 되, 유일한 차이는 CLIP에서 EGFR L858R 및 T790M 돌연변이를 표적으로 하는 특정 비콘을 포함하는 것을 사용하여, 이러한 돌연변이를 성공적으로 검출하였다. 형광 신호는 표적 EV 존재 하에서만 관찰되었다(도 15). 암 환자의 혈장 샘플에서 EGFR 돌연변이를 검출하기 전에, 먼저 건강한 인간 혈장에 다양한 농도의 H1975-유래 EV를 도입하여 EGFR L858R 및 T790M 돌연변이의 검출을 증명했다(도 15b-15d). 농도 범위는 10 내지 10^5 EVs/ μ L였으며, 두 돌연변이에 대한 검출 결과는 PBS에서 얻은 결과와 일치하여(도 15e, 도 15f), CLIP 및 EV 융합 시스템의 견고성을 확인할 수 있었다. 놀랍게도, 이 시스템은 100 나노리터당 단일 EV만큼 낮은 수준으로 검출할 수 있는데, 이는 종래 방법보다 약 100배 이상 더 민감하다(도 15d).
- [147]
- [148] 실시예 5: 환자 샘플 분석을 위한 EV-CLIP(charged-liposome EV detection; 하전-리포솜 EV 검출)의 임상 적용가능성
- [149] 마지막으로, 폐암 환자로부터 수집한 혈장 임상 샘플에서 EGFR L858R 및 T790M 돌연변이를 테스트하여 EV-CLIP 시스템을 실용화하고자 하였다(도 17a). 10명의 건강한 기증자와 73명의 폐암 환자의 혈장 샘플이 포함되었다(표 3).
- [150] [표3]

특징		정상인 (n=10)	EGFR돌연변이 있는 환자(n=17)	EGFR돌연변이 없는 환자(n=56)
성별	여자	5	9	32
	남자	5	8	24
나이	>60	4	16	8
	≤60	6	1	48
조직 학 형태	선암	0	17	53
	비선암	0	0	3
흡연 상태	비흡연자	7	0	18
	흡연자	3	0	11
	모름	0	17	27
돌연 변이	L858R		0	50
	L858R+T790M		0	6
병기	I	0	6	18
	II	0	3	6
	III	0	3	7
	IV	0	5	25

[151] 표 3에는 실시예에 사용된 10명의 건강인, 73명 환자의 성별, 나이, 조직학적 형태, 흡연상태, 돌연변이, 병기를 포함한 기본 정보를 나타냈다. 건강한 기증자 10명, 돌연변이가 없는 암 환자 17명(I기 6명, II기 3명, III기 3명, IV기 5명), 돌연변이가 있는 암 환자 56명(I기 18명, II기 6명, III기 7명, IV기 25명). 샘플은 임상시험

심사위원회(Institutional Review Board)의 승인을 받은 후 인하대학교병원, 전남대학교 화순병원, 부산대학교병원에서 제공받았다.

[152]

[153] 폐암 환자 중 돌연변이가 없는 환자는 17명, 돌연변이가 있는 환자는 56명이었다. 검출 과정은 샘플 전처리 없이 수행되었다. 흥미롭게도, L858R과 T790M 돌연변이를 모두 가진 암 환자의 혈장에서 얻은 신호는 ROI 곡선에서 도출된 임계값에 비해 현저하게 높았다(도 17d). 이러한 결과는 이들 돌연변이의 존재와 EV-CLIP 시스템의 상승된 신호 수준 사이의 강한 상관관계를 시사한다. 암 병기와 상관없이, 양성 돌연변이가 있는 암 환자 샘플만이 유의하게 상승된 신호를 나타내는 것이 관찰되었다. 본 EV-CLIP 방법은 초기 암에서도 전처리 없이 단시간 내에 높은 수준으로 돌연변이를 검출할 수 있어 암 환자와 건강한 기증자를 쉽게 구별할 수 있을 뿐만 아니라, 암환자의 약제 내성을 조기에 진단할 수 있다.

[154]

산업상 이용가능성

[155] 본 발명에 따른 하전-리포좀 EV 검출(EV-CLIP)은 희귀한 EV 부분 모집단(subpopulation)의 정확한 정량화를 제공하고 암 생물학의 근본적인 의문을 탐구할 수 있는 새로운 길을 열어줌으로써, 임상 현장에서 매우 유용하게 적용될 수 있다. 이러한 융합 시스템은 진단 분야에 직접 적용하는 것 외에도 약물 전달 운반체 개발, EV 마커 프로파일링 및 기타 수많은 가능성을 포함한 다양한 구현에 대한 엄청난 잠재력을 가지고 있다.

[156]

[157] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[158]

서열목록 Free Text

[159] 전자파일 첨부하였음.

청구범위

- [청구항 1] 양이온성 지질 및 중성 지질을 포함하는 암세포 유래 세포외소포체 (extracellular vesicle; EV) 검출용 리포솜(liposome)으로서, 상기 리포솜 내에 암세포 특이적 분자비콘(molecular beacon)이 캡슐화(encapsulation)된 것을 특징으로 하는 리포솜.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 양이온성 지질은 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄 프로판(DOTAP), 1,2-디올레일옥시-3-디메틸아미노-프로판(DODMA), 1,2-디-O-옥타데세닐-3-트리메틸암모늄 프로판(DOTMA), 3 β -[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카바모일]콜레스테롤(DC-Chol), 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드(DODAB), 1,2-디올레오일-3-디메틸암모늄-프로판(DODAP), 디옥타데실디메틸 암모늄 클로라이드(DODAC), 1,2-디스테아릴옥시-N,N-디메틸-3-아미노프로판(DSDMA), 1,2-디미리스토일옥시-프로필-3-디메틸-하이드록시에틸암모늄 브로마이드(DMRIE), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(DMEPC), 1,2-디미리스토일-3-트리메틸암모늄 프로판(DMTAP), 1,2-디올레오일-3-디메틸-하이드록시에틸 암모늄 브로마이드(DORIE), 2,3-디올레오일옥시-N-[2(스퍼민카르복사마이드)에틸]-N,N-디메틸-1-프로파나륨(DOSPA), 1,2-디리놀레일옥시-N,N-디메틸-3-아미노프로판(DLinDMA), 1,2-디리놀레닐옥시-N,N-디메틸-3-아미노프로판(DLenDMA), 디옥타데실아미도글리실스퍼민(DOGS), 3-디메틸아미노-2-(콜레스트-5-엔-3-베타-옥시부탄-4-옥시)-1-(시스,시스-9,12-옥타데카디엔옥시)프로판(CLinDMA), 2-[5'-(콜레스트-5-엔-3-베타-옥시)-3'-옥사헥톡시]-3-디메틸-1-(시스,시스-9',12'-옥타데카디엔옥시)프로판(CpLinDMA), N,N-디메틸-3,4-디올레일옥시벤질아민(DMOBA), 1,2-N,N'-디올레일카바틸-3-디메틸아미노프로판(DOcarbDAP), 2,3-디리놀레오일옥시-N,N-디메틸프로필아민(DLinDAP), 1,2-N,N'-디리놀레일카바틸-3-디메틸아미노프로판(DLincarbDAP), 1,2-디리놀레오일카바틸-3-디메틸아미노프로판(DLinCDAP), 2,2-디리놀레일-4-디메틸아미노메틸-[1,3]-디옥솔란(DLin-KDMA), 2,2-디리놀레일-4-디메틸아미노에틸-[1,3]-디옥솔란(DLin-K-XTC2-DMA), 2,2-디리놀레일-4-(2-디메틸아미노에틸)-[1,3]-디옥솔란(DLin-KC2-DMA), 헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일-4-(디메틸아미노)부타노에이트(DLin-MC3-DMA), ($\pm$)-N-(3-아미노프로필)-N,N-디메틸-2,3-비스(시스-9-테트라데세닐옥시)-1-프로판아미늄 브로마이드(GAP-DMORIE), ($\pm$)-N-(3-아미노프로필)-N,N-디메틸-2,3-비스(도데실옥시)-1-프로판아미늄 브로마이드(GAP-DLRIE), ($\pm$)-N-(3-아미노프로필)-N,N-디메틸-2,3-비스(테트라데실옥시)-1-프로판아미늄 브로마이드(GAP-DMRIE), ($\pm$)-N-(2-아미노에틸)-N,N-디메틸-2,3-비스(테트라데실옥시)-1-프로판아미늄 브로마이드(β AE-DMRIE), N-(4-카르복시벤질)-

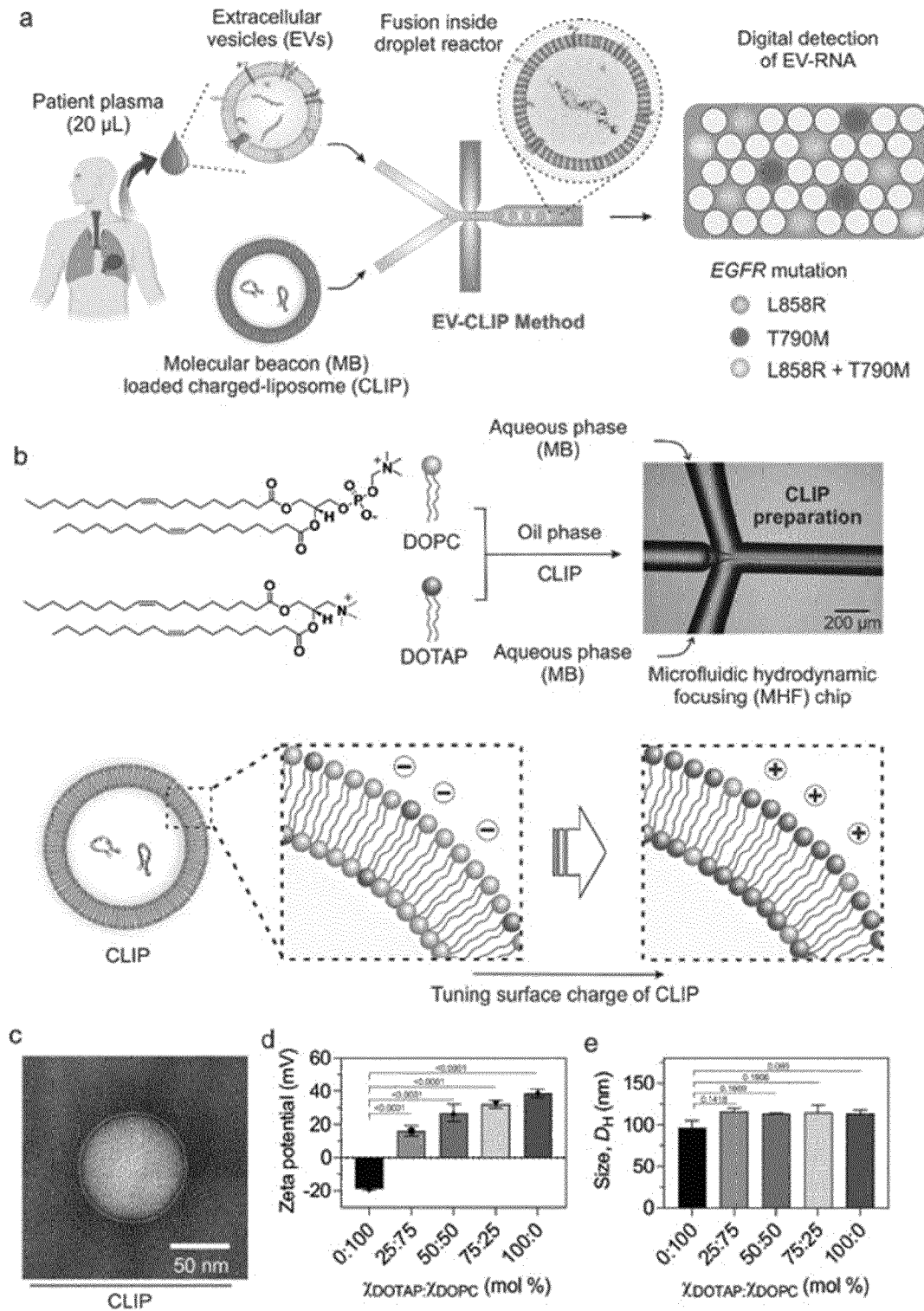
N,N-디메틸-2,3-비스(올레오일옥시)프로판-1-아미늄(DOBAQ), 1,2-디미리스토일-3-디메틸암모늄-프로판(DMDAP), 1,2-디팔미토일-3-디메틸암모늄-프로판(DPDAP), N1-[2-((1S)-1-[(3-아미노프로필)아미노]-4-[디(3-아미노-프로필)아미노]부틸카르복사미도)에틸]-3,4-디[올레일옥시]-벤즈아미드(MVL5), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(DOEPc), 2,3-비스(도데실옥시)-N-(2-하이드록시에틸)-N,N-디메틸프로판-1-암모늄 브로마이드(DLRIE), N-(2-아미노에틸)-N,N-디메틸-2,3-비스(테트라데실옥시)프로판-1-아미늄 브로마이드(DMORIE), 디((Z)-논-2-엔-1-일)8,8'-((((2(디메틸아미노)에틸)티오)카르보닐)아잔디일)디옥타노에이트(ATX), N,N-디메틸-2,3-비스(도데실옥시)프로판-1-아민(DLDMA), N,N-디메틸2,3-비스(테트라데실옥시)프로판-1-아민(DMDMA), 디((Z)-논-2-엔-1-일)-9-((4-(디메틸아미노부타노일)옥시)헵타데칸디오에이트(L319), N-도데실-3-((2-도데실카바모일-에틸)-{2-[(2-도데실카바모일-에틸)-2-{(2-도데실카바모일-에틸)-[2-(2-도데실카바모일-에틸아미노)-에틸]-아미노}-에틸아미노)프로피온아미드(lipidoid 98N12-5) 및 1-[2-[비스(2-하이드록시도데실)아미노]에틸]-[2-[4-[2-[비스(2-하이드록시도데실)아미노]에틸]피페라진-1-일]에틸]아미노]도데칸-2-올(lipidoid C12-200)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 세포외소포체 검출용 리포솜.

- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 중성 지질은 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DOPC), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스파티딜콜린(DMPC), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE), 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DPPC), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DSPC), 1,2-디리놀레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DLPC), 포스파티딜세린(PS), 포스파티딜에탄올아민(PE), 포스파티딜글리세롤(PG), 인산(PA) 및 포스파티딜콜린(PC)으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 세포외소포체 검출용 리포솜.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 양이온성 지질은 1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄 프로판(1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium propane; DOTAP)이고, 상기 중성 지질은 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; DOPC)인 것을 특징으로 하는 세포외소포체 검출용 리포솜.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 리포솜 내 양이온성 지질의 몰비(%)는 25 내지 75%인 것을 특징으로 하는 세포외소포체 검출용 리포솜.
- [청구항 6] 제1항의 리포솜을 포함하는 암세포 유래 세포외소포체 검출용 조성물.
- [청구항 7] 제1항의 리포솜을 포함하는 암세포 유래 세포외소포체 검출용 키트.
- [청구항 8] 제1항의 리포솜을 생물학적 샘플(biological sample) 유래 세포외소포체와 융합시키는 단계; 및 형광(fluorescence) 신호 발생시 암세포 유래 세포외

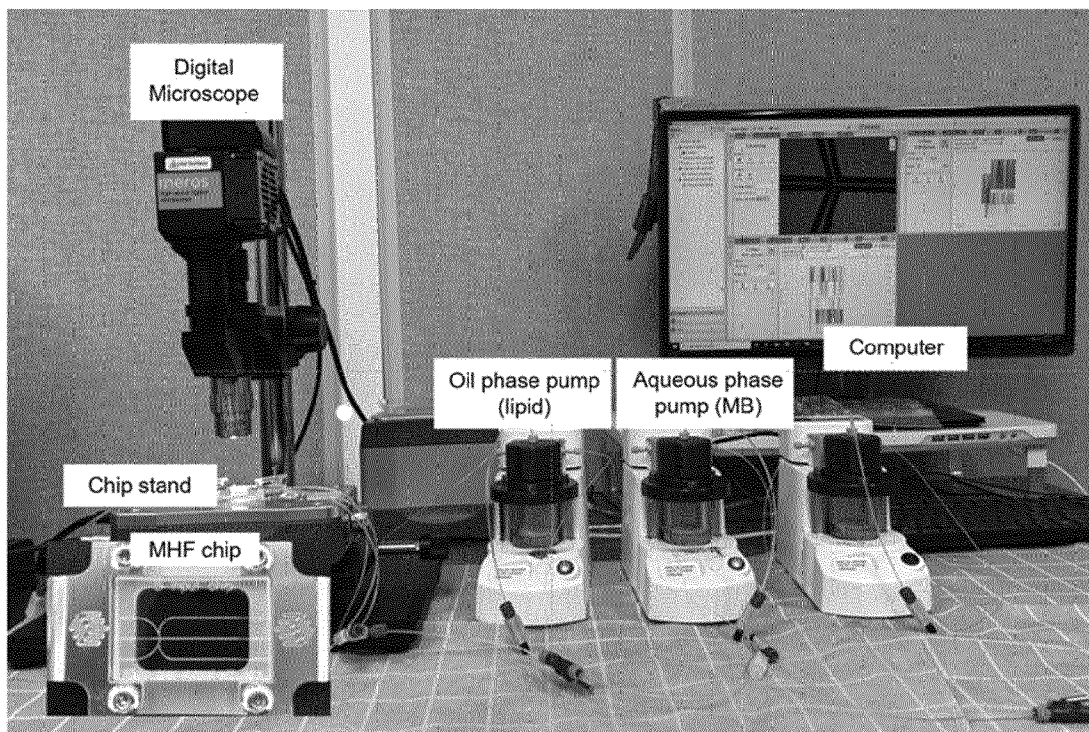
- 소포체인 것으로 결정하는 단계를 포함하는 암세포 유래 세포외소포체 검출방법.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 융합은 두 개의 수성상(aqueous phase) 채널, 하나의 유성상(oil phase) 채널, 하나의 접합부(junction) 및 하나의 출력(outlet) 채널을 포함하는 액적 반응기(droplet reactor)에서 수행하는 것을 특징으로 하는 암세포 유래 세포외소포체 검출방법.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 두 개의 수성상 채널에 리포솜과 생물학적 샘플 유래 세포외소포체를 각각 투입하여 접합부에서 수성 액적이 생성되는 것을 특징으로 하는 암세포 유래 세포외소포체 검출방법.
- [청구항 11] 제1항의 리포솜을 포함하는 암 진단용 조성물.
- [청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 암은 편평세포암, 소형 세포 폐암, 비-소형 세포 폐암, 폐암, 복막암, 결장암, 담도 종양, 비인두암, 후두암, 기관지암, 갑상선암, 구강암, 골육종, 담낭암, 담도암, 신장암, 방광암, 신장세포암, 흑색종, 뇌암, 신경 교종, 교모세포종, 뇌종양, 피부암, 췌장암, 유방암, 간암, 골수암, 소장암, 식도암, 대장암, 위암, 안암, 요도암, 자궁경부암, 전립선암, 난소암, 전이암, 두경부암, 직장암, 비호지킨 림프종, 다발성골수종, 급성 골수성 백혈병, 림프종, 급성 림프모구 백혈병 및 만성 골수성 백혈병으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 암 진단용 조성물.
- [청구항 13] 제1항의 리포솜을 포함하는 암 진단용 키트.
- [청구항 14] 제13항에 있어서, 상기 암은 편평세포암, 소형 세포 폐암, 비-소형 세포 폐암, 폐암, 복막암, 결장암, 담도 종양, 비인두암, 후두암, 기관지암, 갑상선암, 구강암, 골육종, 담낭암, 담도암, 신장암, 방광암, 신장세포암, 흑색종, 뇌암, 신경 교종, 교모세포종, 뇌종양, 피부암, 췌장암, 유방암, 간암, 골수암, 소장암, 식도암, 대장암, 위암, 안암, 요도암, 자궁경부암, 전립선암, 난소암, 전이암, 두경부암, 직장암, 비호지킨 림프종, 다발성골수종, 급성 골수성 백혈병, 림프종, 급성 림프모구 백혈병 및 만성 골수성 백혈병으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 암 진단용 키트.
- [청구항 15] 제1항의 리포솜을 생물학적 샘플(biological sample) 유래 세포외소포체와 융합시키는 단계; 및 형광(fluorescence) 신호 발생시 암인 것으로 결정하는 단계를 포함하는 암 진단을 위한 정보제공방법.
- [청구항 16] 제15항에 있어서, 상기 융합은 두 개의 수성상(aqueous phase) 채널, 하나의 유성상(oil phase) 채널, 하나의 접합부(junction) 및 하나의 출력(outlet) 채널을 포함하는 액적 반응기(droplet reactor)에서 수행하는 것을 특징으로 하는 정보제공방법.
- [청구항 17] 제15항에 있어서, 상기 암은 편평세포암, 소형 세포 폐암, 비-소형 세포 폐암, 폐암, 복막암, 결장암, 담도 종양, 비인두암, 후두암, 기관지암, 갑상선암, 구강암, 골육종, 담낭암, 담도암, 신장암, 방광암, 신장세포암, 흑색종, 뇌암, 신경 교종, 교모세포종, 뇌종양, 피부암, 췌장암, 유방암, 간암, 골수

암, 소장암, 식도암, 대장암, 위암, 안암, 요도암, 자궁경부암, 전립선암, 난소암, 전이암, 두경부암, 직장암, 비호지킨 림프종, 다발성골수종, 급성 골수성 백혈병, 림프종, 급성 림프모구 백혈병 및 만성 골수성 백혈병으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 암 진단을 위한 정보제공방법.

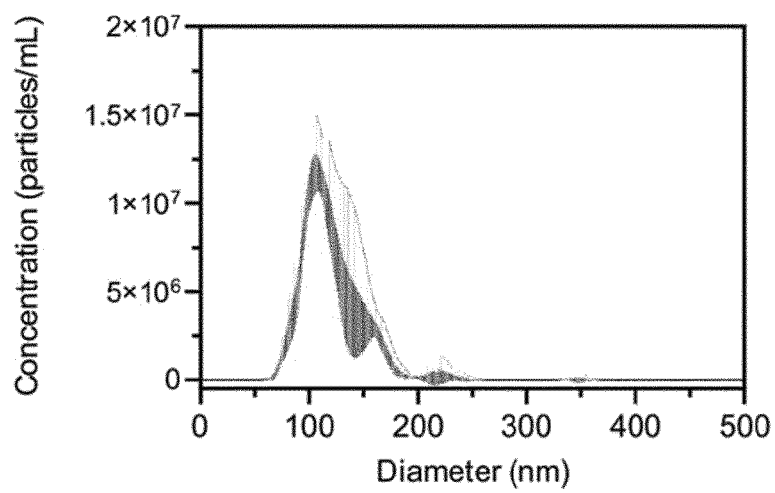
[도 1]



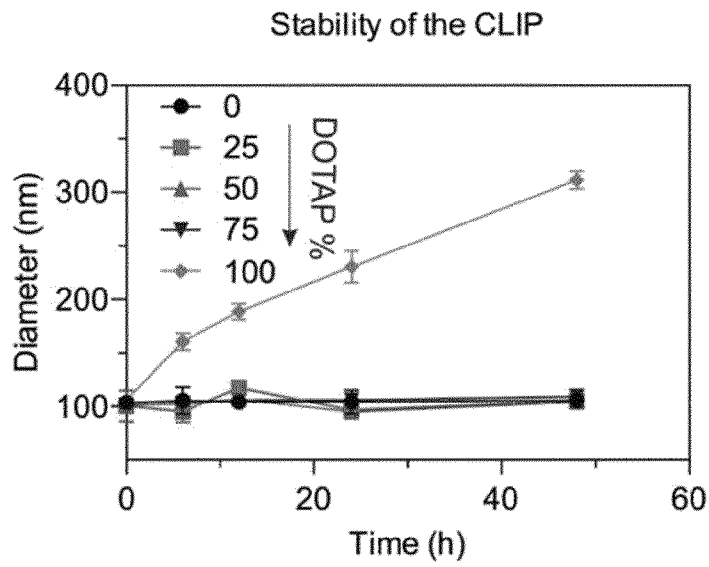
[도2]



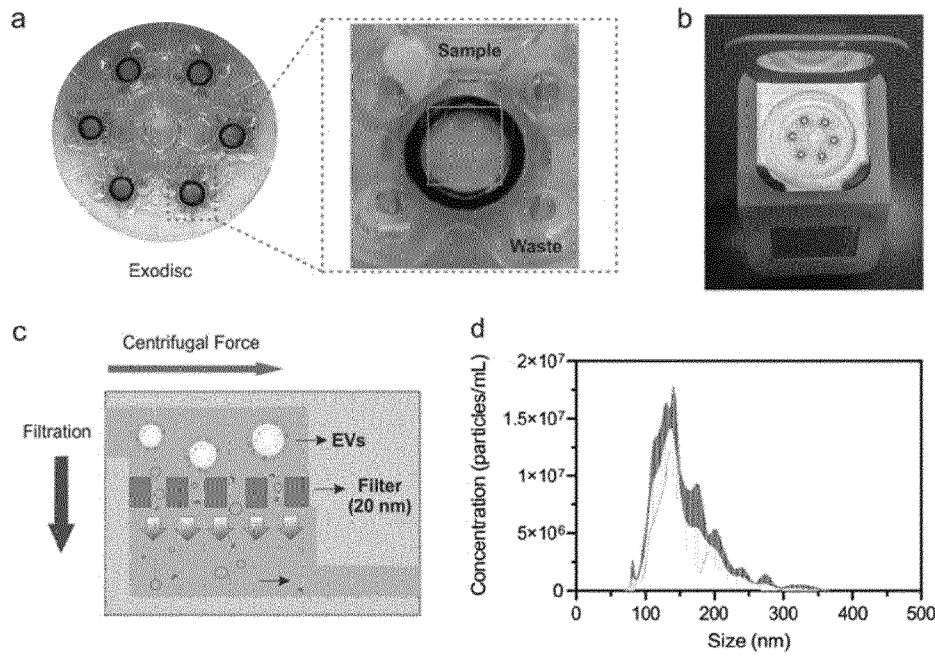
[도3]



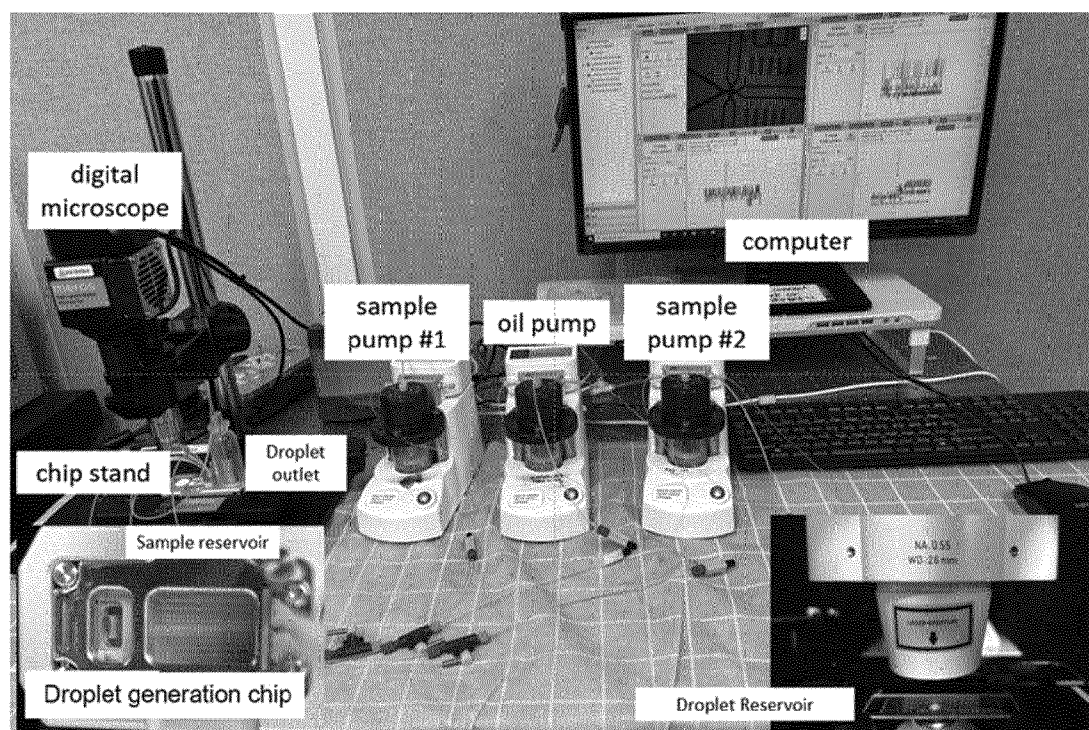
[도4]



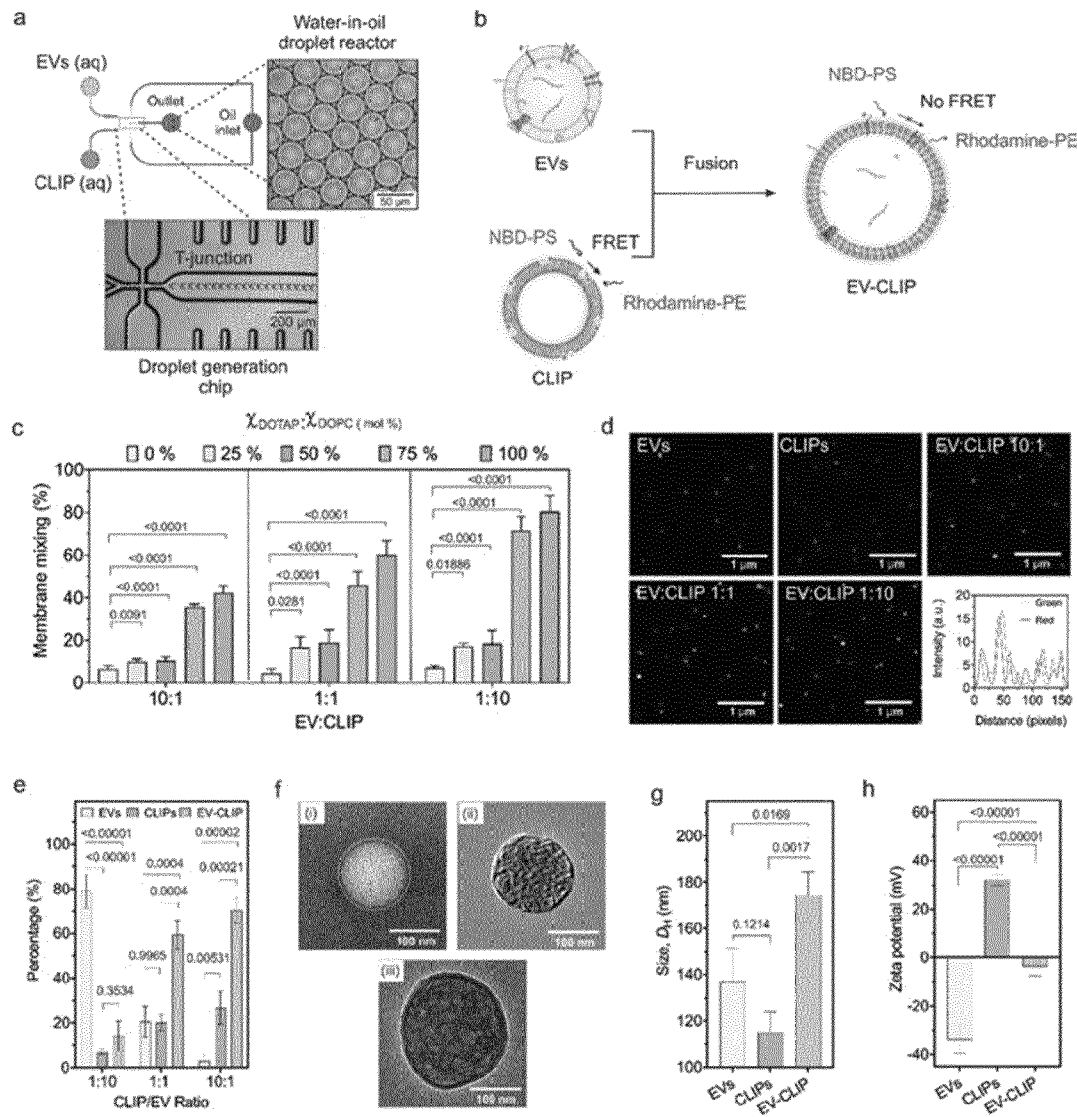
[도5]



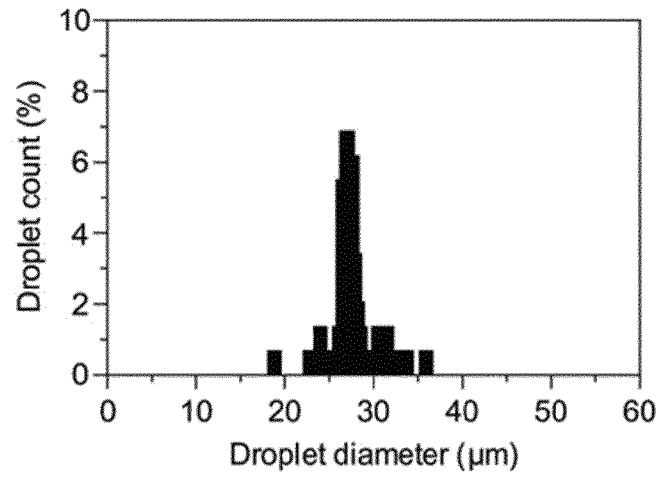
[도6]



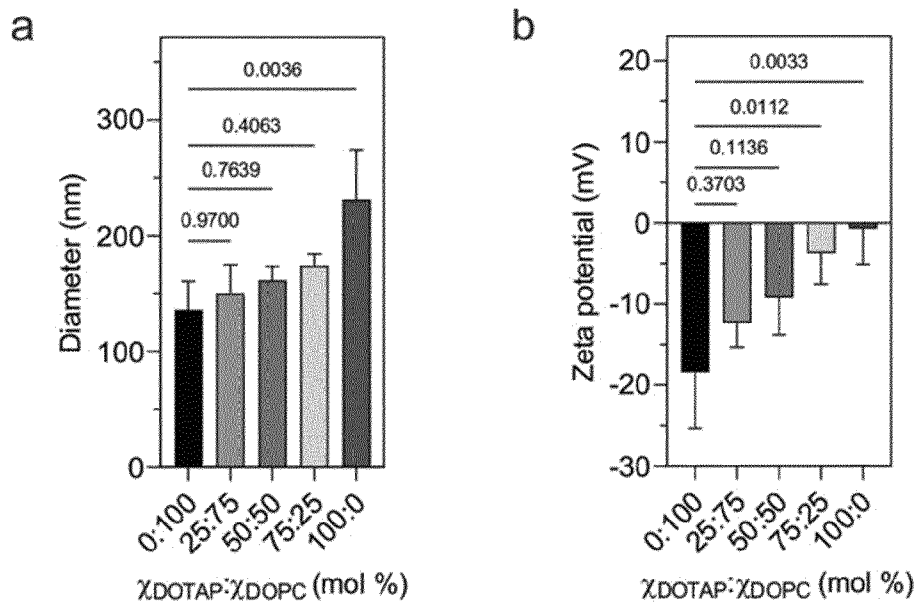
[도7]



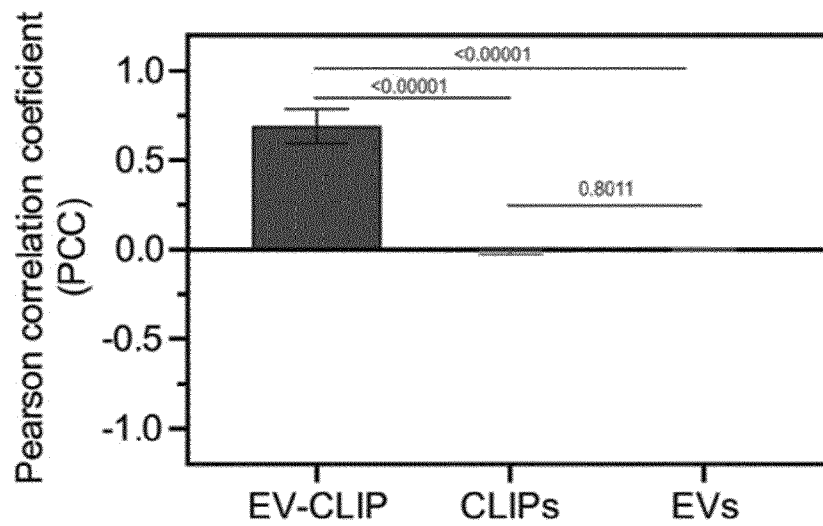
[도8]



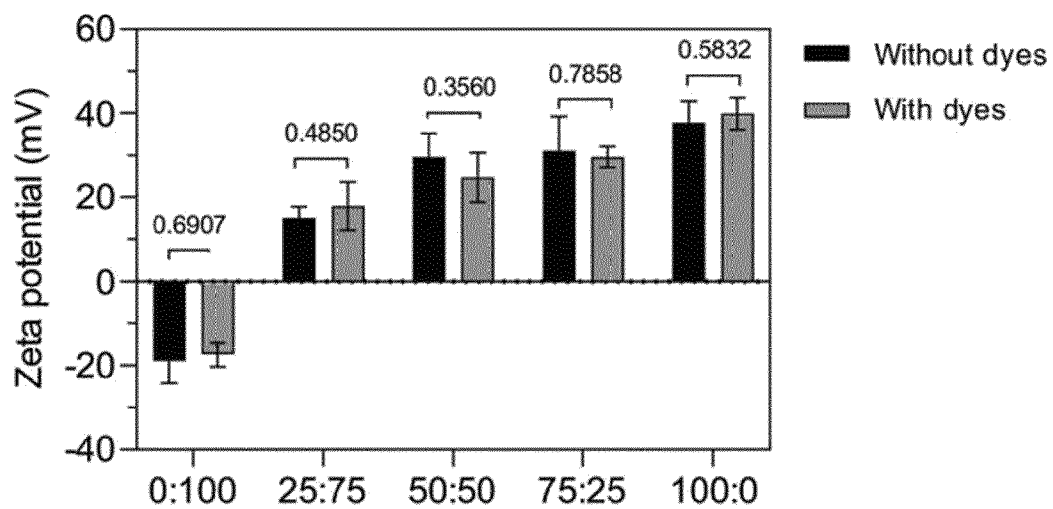
[도9]



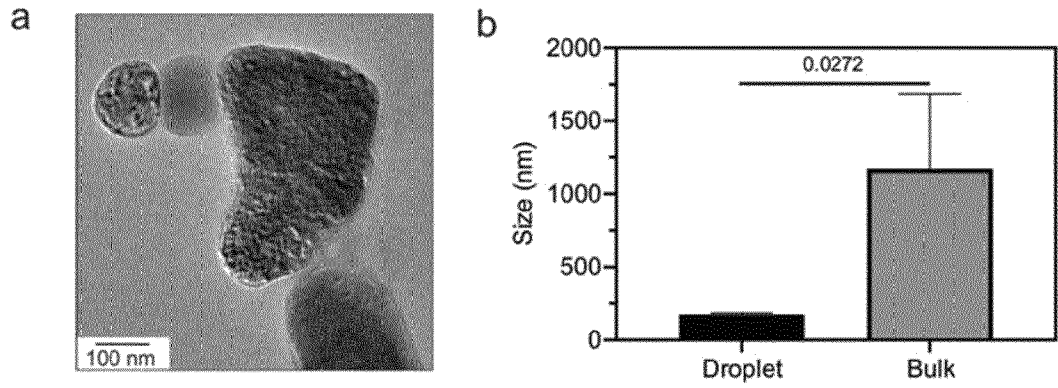
[도10]



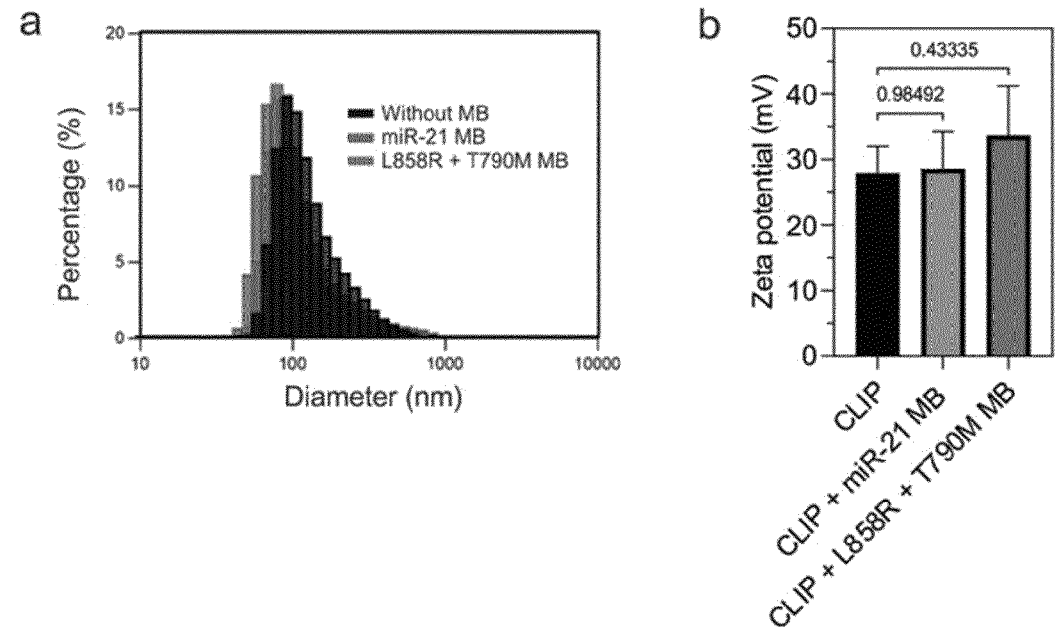
[도11]



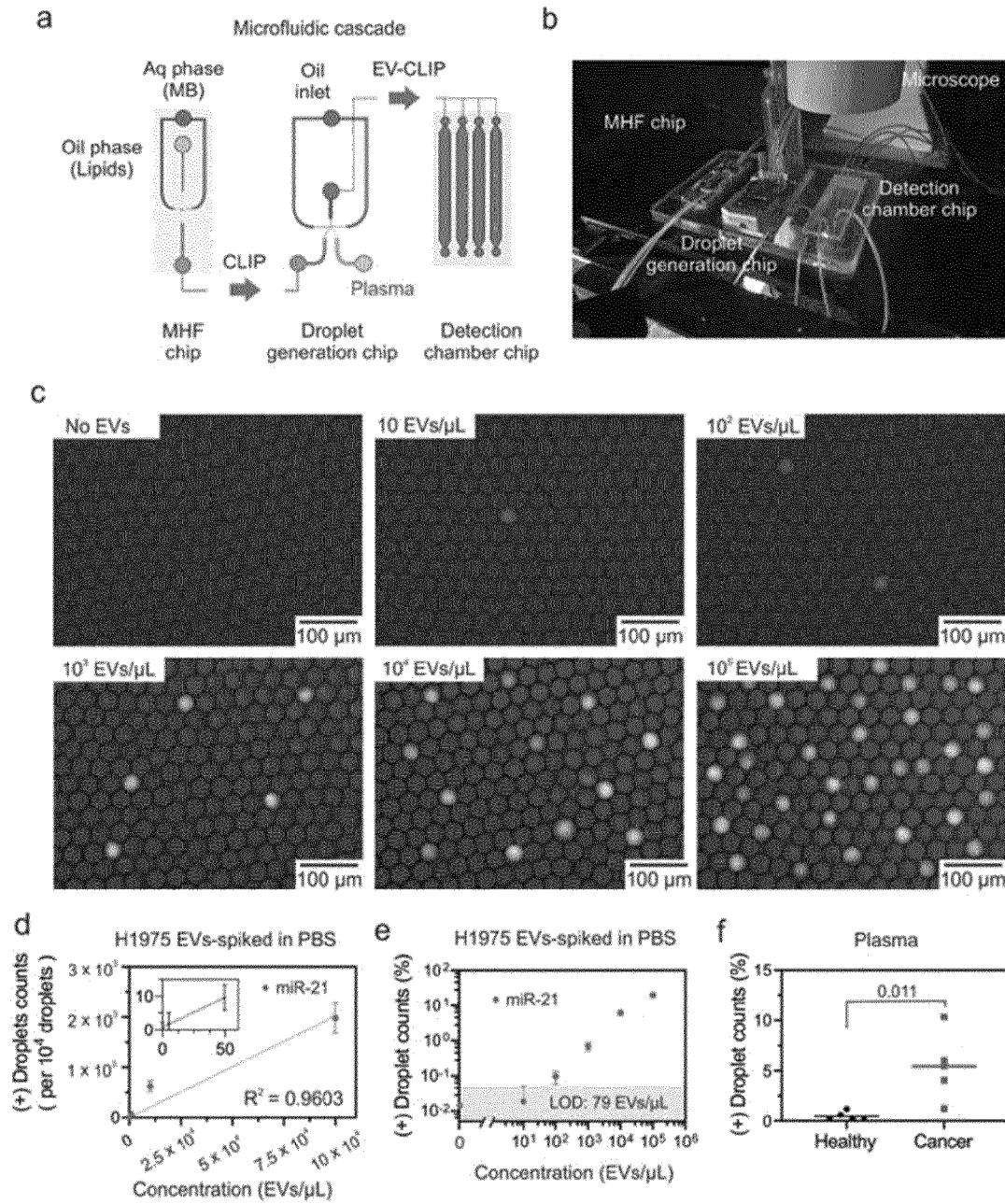
[도12]



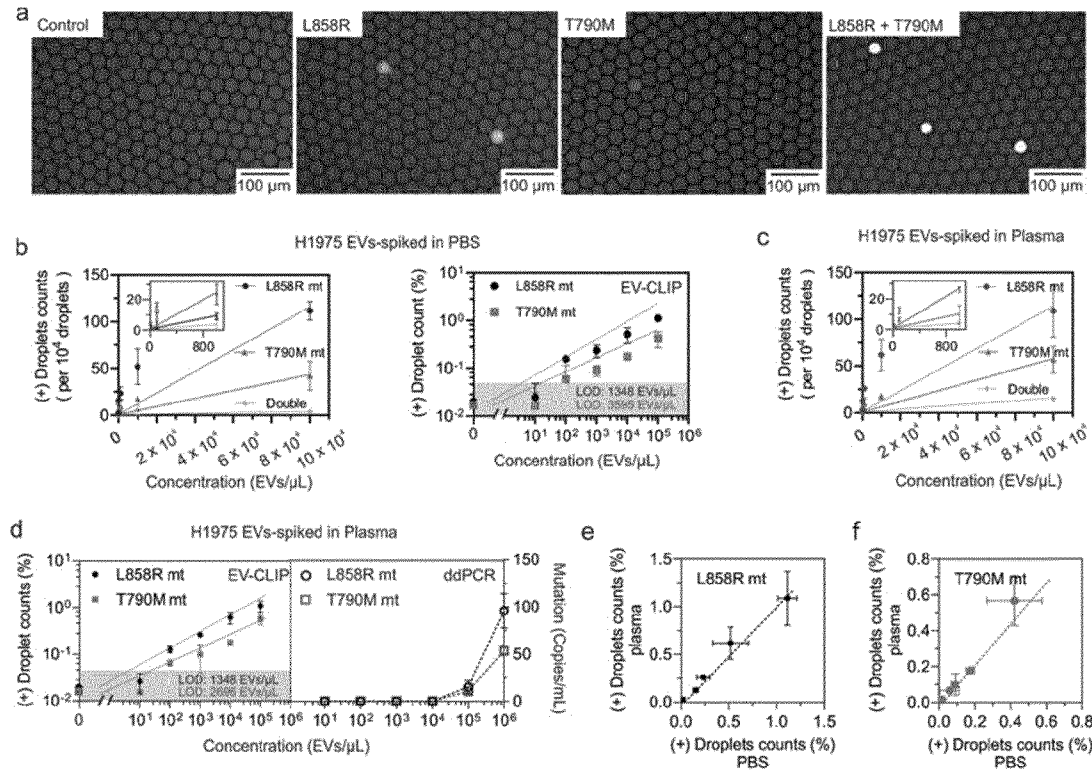
[도13]



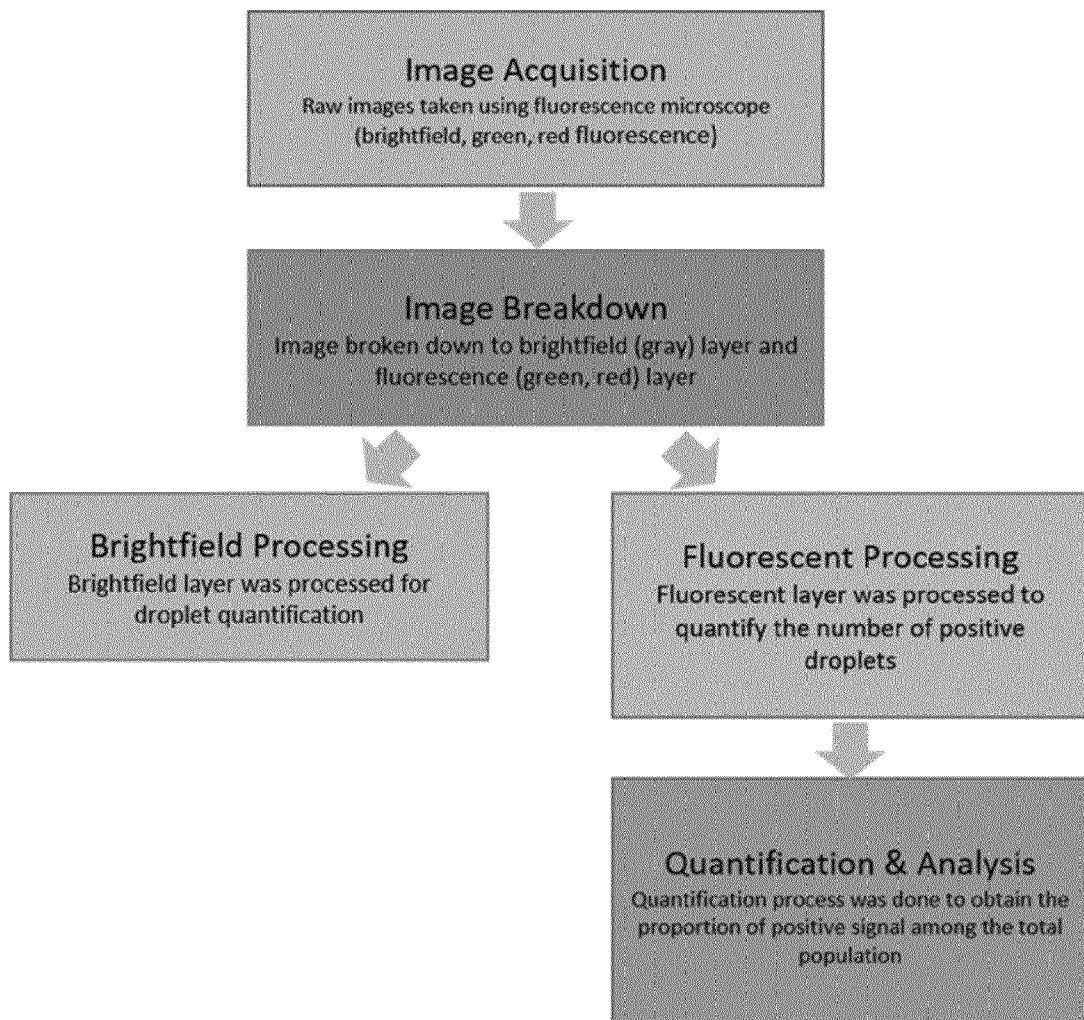
[도14]



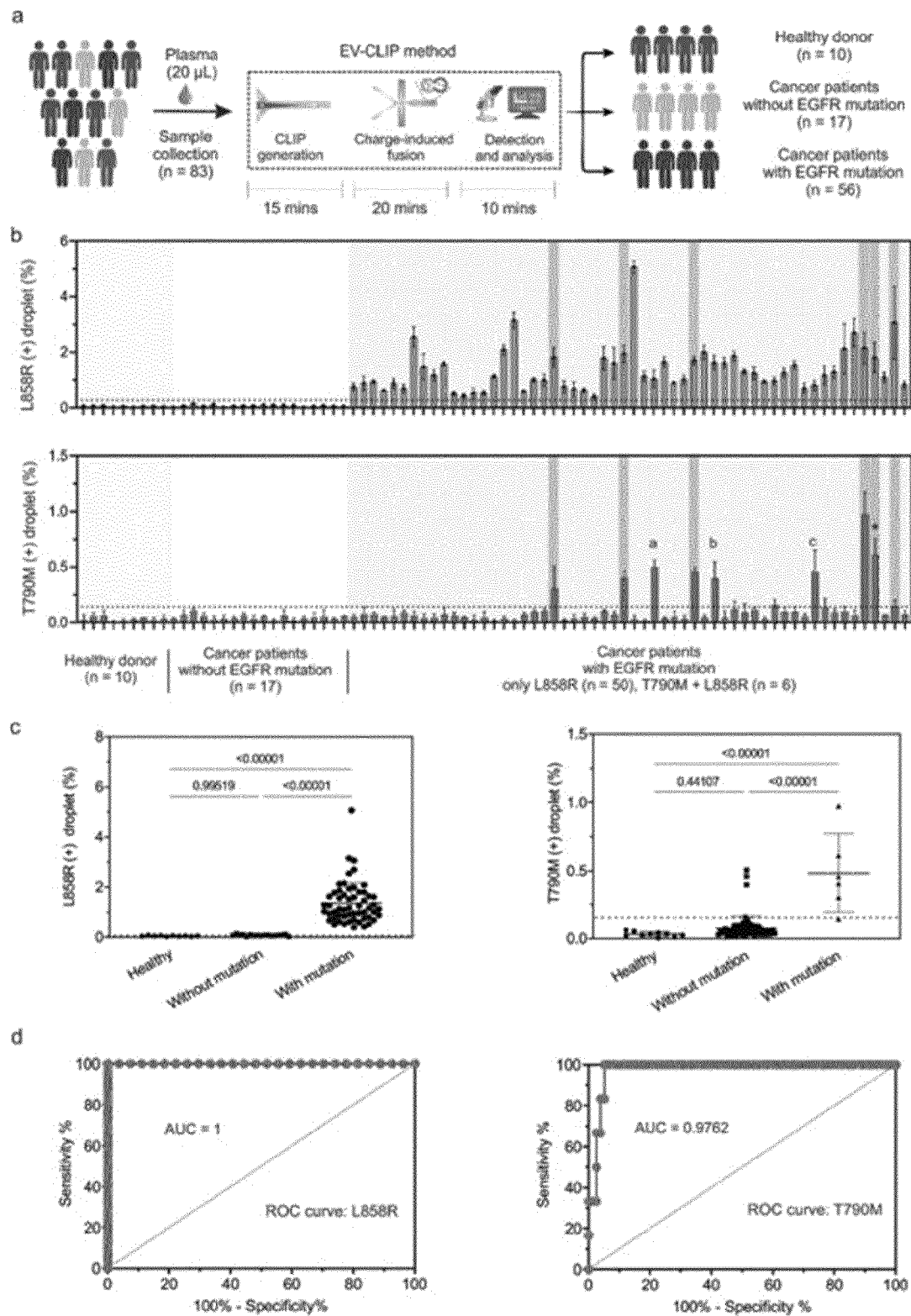
[도15]



[도16]



[도17]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/020308

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/574(2006.01)i; C12Q 1/6886(2018.01)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)

G01N 33/574(2006.01); C12Q 1/6837(2018.01); C12Q 1/6886(2018.01); G01N 21/64(2006.01); G01N 33/543(2006.01); G01N 33/545(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) & keywords: 리포좀(liposomes), 세포외소포체(extracellular vesicles; EV), 종양세포(tumor cells), 검출(detection), 분자비컨(molecular beacons), 캡슐화(encapsulation), 미세유체 액적 반응기(microfluidic droplet reactor), 진단(diagnosis)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	HU, J. et al. Overhang molecular beacons encapsulated in tethered cationic lipoplex nanoparticles for detection of single-point mutation in extracellular vesicle-associated RNAs. Biomaterials. 2018, vol. 183, pp. 20-29. See abstract; pages 20-27; and figures 1 and 4-6.	1-8,11-15,17 9,10,16
A	US 2022-0074929 A1 (THE HONG KONG UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 10 March 2022 (2022-03-10) See abstract; and claims 1-20.	1-17
A	YANG, Y. et al. Ultrafast detection of exosomal RNAs via cationic lipoplex nanoparticles in a micromixer biochip for cancer diagnosis. ACS Applied Nano Materials. 2021, vol. 4, no. 3, pp. 2806-2819. See abstract; pages 2806-2817; and figure 1.	1-17
A	HU, J. et al. A signal-amplifiable biochip quantifies extracellular vesicle-associated RNAs for early cancer detection. Nature Communications. 2017, vol. 8, article no. 1683, inner pp. 1-11. See abstract; and inner pages 1-8.	1-17



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

14 March 2024

Date of mailing of the international search report

15 March 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

International application No.

PCT/KR2023/020308

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 112048554 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 08 December 2020 (2020-12-08) See abstract; and claims 1-6.	1-17
A	KR 10-2022-0069858 A (INJE UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 27 May 2022 (2022-05-27) See abstract; and claims 1-16.	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/020308

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2023/020308

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2022-0074929	A1	10 March 2022	CN	109490528	A	19 March 2019
				CN	115047182	A	13 September 2022
				WO	2019-068269	A1	11 April 2019
CN	112048554	A	08 December 2020	None			
KR	10-2022-0069858	A	27 May 2022	None			

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) G01N 33/574(2006.01)i; C12Q 1/6886(2018.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) G01N 33/574(2006.01); C12Q 1/6837(2018.01); C12Q 1/6886(2018.01); G01N 21/64(2006.01); G01N 33/543(2006.01); G01N 33/545(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 내부 검색시스템) & 키워드: 리포좀(liposomes), 세포외소포체(extracellular vesicles; EV), 종양세포(tumor cells), 검출(detection), 분자비컨(molecular beacons), 캡슐화(encapsulation), 미세유체 액적 반응기(microfluidic droplet reactor), 진단(diagnosis)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X A	HU, J. 등, "Overhang molecular beacons encapsulated in tethered cationic lipoplex nanoparticles for detection of single-point mutation in extracellular vesicle-associated RNAs", Biomaterials, 2018년, 183권, 페이지 20-29 요약; 페이지 20-27; 및 도 1, 4-6	1-8,11-15,17 9,10,16
A	US 2022-0074929 A1 (THE HONG KONG UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 2022.03.10 요약; 및 청구항 1-20	1-17
A	YANG, Y. 등, "Ultrafast detection of exosomal RNAs via cationic lipoplex nanoparticles in a micromixer biochip for cancer diagnosis" ACS Applied Nano Materials, 2021년, 4권, 3호, 페이지 2806-2819 요약; 페이지 2806-2817; 및 도 1	1-17
A	HU, J. 등, "A signal-amplifiable biochip quantifies extracellular vesicle-associated RNAs for early cancer detection", Nature Communications, 2017년, 8권, 기사번호 1683, 내부페이지 1-11 요약; 및 내부페이지 1-8	1-17
☒ 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 2024년03월14일(14.03.2024)		국제조사보고서 발송일 2024년03월15일(15.03.2024)
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

C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	CN 112048554 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 2020.12.08 요약; 및 청구항 1-6	1-17
A	KR 10-2022-0069858 A (인제대학교 산학협력단) 2022.05.27 요약; 및 청구항 1-16	1-17

제1기제란 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 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
- b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))
☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부

2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다

3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2022-0074929 A1	2022/03/10	CN 109490528 A	2019/03/19
		CN 115047182 A	2022/09/13
		WO 2019-068269 A1	2019/04/11
CN 112048554 A	2020/12/08	없음	
KR 10-2022-0069858 A	2022/05/27	없음	