

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2018년 8월 30일 (30.08.2018) WIPO | PCT



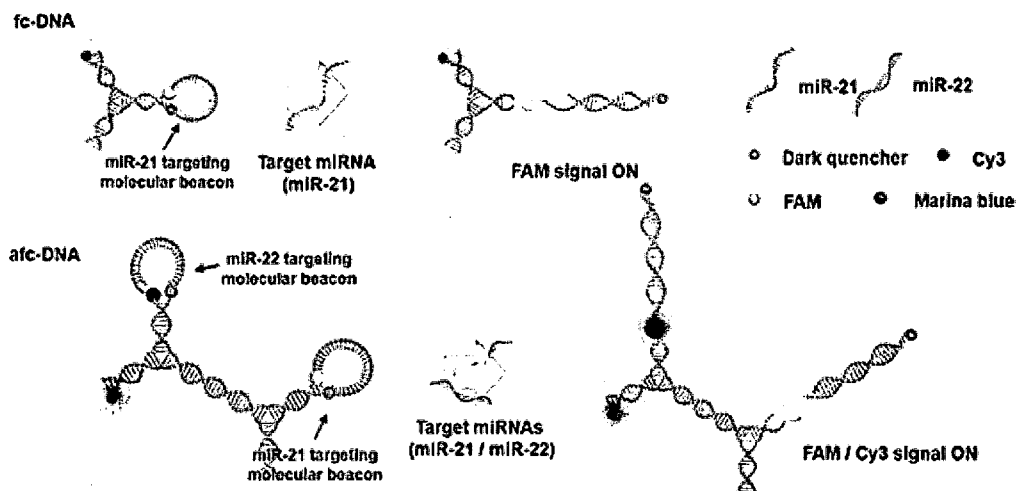
(10) 국제공개번호
WO 2018/155880 A1

- (51) 국제특허분류: C12Q 1/6818 (2018.01) A61K 49/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2018/002064
- (22) 국제출원일: 2018년 2월 20일 (20.02.2018)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2017-0022884 2017년 2월 21일 (21.02.2017) KR
- (71) 출원인: 성균관대학교산학협력단 (RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY) [KR/KR]; 16419 경기도 수원시 장안구 서부로 2066, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 엄승호 (UM, Soong-Ho); 04354 서울시 용산구 새창로 70, 113동 806호, Seoul (KR). 신승원 (SHIN, Seung-Won); 04747 서울시 성동구 고산자로 160, 107동 1403호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 위병갑 (WIE, Byoung-Gap); 06141 서울시 강남구 테헤란로33길7, 대영빌딩 7층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,

(54) Title: LIPOSOME -NUCLEIC ACID NANO-FUSION FOR QUANTITATIVE DIAGNOSIS OF MULTIPLE RIBONUCLEIC ACID MARKERS, THEORETICAL STABILITY EVALUATION METHOD THEREFOR, APPLICATION THEREOF, AND PRODUCTION METHOD THEREFOR

(54) 발명의 명칭: 다중 리보핵산 마커 정량진단용 리포솜-핵산 나노융합체, 이의 이론적 안정성 평가 방법, 이의 응용, 및 이의 제조 방법

[도1]



(57) Abstract: The present invention relates to: a liposome -nucleic acid nano-fusion for the quantitative diagnosis of multiple ribonucleic acid markers, the nano-fusion containing, in a liposome, a silica sphere having bound to the surface thereof a nucleic acid nano-structure having a first nucleic acid structure, which is branched and has a cyclic end, bonded with a second nucleic acid structure, which is branched and has a cyclic end; a theoretical stability evaluation method for the nano-fusion; an imaging system using the nano-fusion in disease diagnosis; and a production method for the nano-fusion. By using the liposome -nucleic acid nano-fusion according to the present invention, an advantage may be achieved whereby the difference in aspects of RNA expression among various cell lines may be quantitatively compared, and the difference among cells in a single cell line may be checked, and thus multiple intracellularly-expressed cancer-specific RNA markers acquired in an actual clinical setting may be diagnosed in real-time, and on the basis thereof, information required for diagnosis and treatment may be easily acquired.

[다음 쪽 계속]



WO 2018/155880 A1

MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

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

(57) 요약서: 본 발명은 고리형 말단을 가지는 가지형태의 제1 핵산구조체; 및 고리형 말단을 가지는 가지형태의 제2 핵산구조체가 접합된 핵산 나노 구조체가 표면에 결합된 실리카 구형체를 리포솜 내부에 포함하는, 다중 리보핵산 마커 정량진단용 리포솜-핵산 나노융합체, 상기 나노융합체의 이론적 안정성 평가 방법, 상기 나노융합체를 질병 진단에 활용하는 이미징 시스템, 및 상기 나노융합체의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 리포솜-핵산 나노융합체를 이용하여, 다종의 세포주간 RNA 발현 양상 차이의 정량적 비교 및 단일 세포주내 세포간 차이를 확인할 수 있으며, 이를 통해 실제 임상에서 얻어진 세포내에 발현되고 있는 암특이적 RNA 마커의 다중 실시간 진단이 가능해지고 이를 토대로 하여 진단 및 치료에 필요한 정보를 용이하게 얻을 수 있는 장점을 가진다.

명세서

발명의 명칭: 다중 리보핵산 마커 정량진단용 리포솜-핵산 나노융합체, 이의 이론적 안정성 평가 방법, 이의 응용, 및 이의 제조 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 다중 리보핵산 마커 정량진단용 리포솜-핵산 나노융합체, 상기 나노융합체 분자동력학적 시뮬레이션 기법을 이용하여 안정성을 확인하고 이를 질병 진단에 활용하는 이미징 시스템, 질병 진단 방법, 및 상기 나노융합체의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 현재 대부분의 암 진단은 금속, 고분자 중합체 등 인체에 유해한 물질을 사용하고 정확한 진단을 위해서 적게는 3일, 많게는 한 달 이상이 소요된다. 그리고 대부분의 진단체가 가시광선 파장대의 빛을 발생하지 않기 때문에 암이 상당히 진행되어 종양을 형성하기 전까지는 눈으로만 암을 진단하는 데에 한계가 있다. 또한 같은 이유로 진단이 생체 내에서 실시간으로 진행되는 데에 한계가 발생한다.
- [3] 이에 따라 최근에는 인체 유해성을 최소화하기 위해 생체 친화적 물질로 진단체를 제작하는 연구가 상당수 진행되고 있다. 핵산은 이들 중 많은 주목을 받고 있는 물질로 나노생명공학기술을 통해 다양한 형태로 제작되고 있다. 이렇게 만들어진 핵산 나노구조체에 형광체를 붙여 암 진단에 사용하는 기술이 크게 이목을 끌고 있다.
- [4] 그러나 핵산이 생체를 구성하는 물질인 만큼 생체 내에 삽입되었을 시 효소에 의해 부서지게 되어 본래 기능을 상실하게 될 가능성이 매우 높다. 또한 진단체가 암 세포 뿐 아니라 일반 세포에까지 비 특이적으로 결합하는 것을 최소화하기 위해 표적물질과 결합시키는 과정이 요구된다. 하지만 현재까지 상기 요구사항들을 동시에 만족시키는 연구는 아직까지 많이 진행되고 있지 않은 실정이다. 게다가 삼중음성유방암 등과 같이 특이적인 표적체가 발현되지 않는 암세포는 진단에 상당한 어려움을 겪고 있다.
- [5] 한편, 최근 대상 세포의 RNA의 발현 양상에 따라 암 전주기에 해당하는 진단이 가능한 것으로 밝혀지고 있으며, 그중에서 특정 miRNA의 발현 양상은 초기암에서 빠르게 변화하는 것이 알려져있다. 이로 인해 진단 마커로서 miRNA의 중요성이 나날이 부각되고 있다. 또한 한 부위에서 발생한 암조직 내부에 존재하는 종양 이질성 (Tumor heterogeneity) 으로 인해 정밀한 치료가 어려운 실정으로, 정밀한 환자 맞춤형 치료를 위해서 세포 간 차이를 확인하여 시공적인 (Spatio-temporal) 정보를 얻는 것이 중요하게 여겨지고 있다.
- [6] 이러한 필요성에 근거하여 단일 세포 실시간 중합효소 연쇄반응 (Single cell

real time polymerase chain reaction), 고효율 시퀀싱 (High-throughput sequencing) 등 기술들이 개발되고 있으나, 이 역시 분석에 필요한 시간 및 비용이 크다는 뚜렷한 한계를 가지고 있다. 또한 위의 문제점을 극복하기 위하여 나노기술을 이용한 세포내 실시간 분석을 위해 다양한 진단 시스템들이 보고되고 있으나(한국등록특허 제1464100호), 진단 시스템의 세포내 전달이 세포간 특성으로 크게 좌우되기 때문에 세포 종류에 따른 정량적 비교가 불가능하며, 이로 인해 실질적인 임상 적용에 문제가 있다.

- [7] 이에, 다종의 세포주 간 RNA 발현 양상 차이를 비교하여, 빠르게 암을 진단할 수 있는 고성능 암 진단체가 요구되고 있는 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본 발명자들은 종래기술의 문제점을 극복하기 위하여, 고효율, 저비용인 동시에 세포 간의 정량 비교가 가능한 다중 리보핵산 마커 정량진단용 리포솜-핵산 나노융합체를 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [9] 따라서 본 발명의 목적은 고리형 말단을 가지는 가지형태의 제1핵산구조체; 및 고리형 말단을 가지는 가지형태의 제2핵산구조체가 접합된 핵산 나노 구조체가 표면에 결합된 실리카 구형체를 리포솜 내부에 포함하는, 다중 리보핵산 마커 정량진단용 리포솜-핵산 나노융합체를 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명의 다른 목적은 상기 다중 리보핵산 마커 정량진단용 리포솜-핵산 나노융합체를 포함하는 생체 진단 이미징 시스템을 제공하는 것이다.
- [11] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 다중 리보핵산 마커 정량진단용 리포솜-핵산 나노융합체의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [12] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 다중 리보핵산 마커 정량진단용 리포솜-핵산 나노융합체의 안정성을 이론적으로 평가하는 평가방법을 제공하는 것이다.
- [13] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 다중 리보핵산 마커 정량진단용 리포솜-핵산 나노융합체를 포함하는 암 진단용 키트를 제공하는 것이다.
- [14] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [15] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 고리형 말단을 가지는 가지형태의 제1핵산구조체; 및 고리형 말단을 가지는 가지형태의 제2핵산구조체가 접합된 핵산 나노 구조체가 표면에 결합된 실리카 구형체를 리포솜 내부에 포함하는, 다중 리보핵산 마커 정량진단용 리포솜-핵산 나노융합체를 제공한다.
- [16] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 제1핵산구조체는 서열번호 1 내지 3의 염기서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 선형핵산들이 Y자 가지형태로

- 결합한 형태인 것일 수 있다.
- [17] 본 발명의 다른 실시예에 있어서, 상기 제2핵산구조체는 서열번호 4 내지 6의 염기서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 선형핵산들이 Y자 가지형태로 결합한 형태인 것일 수 있다.
- [18] 본 발명의 또 다른 실시예에 있어서, 상기 선형핵산은 5' 말단에 형광체를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [19] 본 발명의 또 다른 실시예에 있어서, 상기 제1핵산구조체는 고리형 말단이 표적 RNA와 상보적 서열을 가지는 서열번호 7의 염기서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [20] 본 발명의 또 다른 실시예에 있어서, 상기 제2핵산구조체는 고리형 말단이 표적 RNA와 상보적 서열을 가지는 서열번호 8의 염기서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [21] 본 발명의 또 다른 실시예에 있어서, 상기 제1핵산구조체 및 제2핵산구조체는 형광체 및 소광제가 추가로 표지된 것일 수 있다.
- [22] 본 발명의 또 다른 실시예에 있어서, 상기 핵산구조체는 표적 RNA와 상보적서열을 가지는 염기서열의 한 쪽 말단에 소광제가 추가로 표지된 것일 수 있다.
- [23] 본 발명의 또 다른 실시예에 있어서, 상기 실리카 구형체는 50 내지 90 nm인 것일 수 있다.
- [24] 본 발명의 또 다른 실시예에 있어서, 상기 실리카 구형체는 핵산 나노 구조체가 표면에 결합되기 전에, 아미노프로필 트리메톡시실란(Aminopropyl trimethoxysilane) 및 사이아누릭 클로라이드 (Cyanuric chloride)를 순차적으로 처리하여 표면개질된 것일 수 있다.
- [25] 본 발명의 또다른 실시예에 있어서, 상기 리포솜은 양이온성 지질로 이루어진 것일 수 있다.
- [26] 본 발명의 또 다른 실시예에 있어서, 상기 양이온성 지질은 DOTAP(1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane) 및 콜레스테롤을 구성 성분으로 하는 양이온성 지질로 이루어진 것일 수 있다.
- [27] 또한, 본 발명은 상기 리포솜-핵산 나노융합체를 포함하는 생체 진단 이미징 시스템을 제공한다.
- [28] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 시스템은 세포 내 형광을 측정하는 것일 수 있다.
- [29] 또한, 본 발명은 질병의 진단을 필요로 하는 개체에 상기 리포솜-핵산 나노융합체를 투여하고 형광을 측정하는 단계를 포함하는 질병 진단 방법을 제공한다.
- [30] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 질병은 암일 수 있다.
- [31] 본 발명의 다른 실시예에 있어서, 상기 투여는 경구 투여, 정맥 주사, 복강 주사, 근육 주사, 동맥 주사 또는 피하 주사를 통해 이루어지는 것일 수 있다.
- [32] 이에 더하여, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 다중 리보핵산 마커 정량진단용 리포솜-핵산 나노융합체의 제조방법을 제공한다:

- [33] 고리형 말단을 가지는 가지형태의 제1핵산구조체, 및 고리형 말단을 가지는 가지형태의 제2핵산구조체를 제조한 후, 리가아제 효소를 이용하여 서로 접합시켜 핵산 나노 구조체를 제조하는 단계(S1);
- [34] 용매에 실리케이트 용액을 첨가하여 실리카 나노입자체를 합성하는 단계(S2);
- [35] 상기 S2 단계의 나노입자체에 아미노프로필 트리메톡시실란(Aminopropyl trimethoxysilane) 및 사이아누릭 클로라이드 (Cyanuric chloride)를 순차처리하는 단계(S3);
- [36] 상기 S3 단계의 나노입자체와 S1 단계의 핵산 나노 구조체를 반응시켜 핵산 나노구조체를 제조하는 단계(S4);
- [37] 상기 S4 단계의 핵산 나노구조체에 양이온성 지질을 첨가한 후 초음파 처리하여 리포좀-핵산 나노융합체를 제조하는 단계(S5).
- [38] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 S2 단계의 용매는 메탄올, 에탄올, 증류수, 및 암모니아수를 포함하는 것일 수 있다.
- [39] 본 발명의 다른 실시예에 있어서, 상기 메탄올 및 에탄올은 6:4 내지 8:2의 부피비율로 혼합되는 것일 수 있다.
- [40] 아울러, 본 발명은 상기 다중 리보핵산 마커 정량진단용 리포좀-핵산 나노융합체의 안정성을 이론적으로 평가하는 평가방법으로,
- [41] 상기 방법은 나노융합체 내부에서 발생하는 수소결합 에너지를 측정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 평가방법을 제공한다.
- [42] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 측정은 35 내지 40°C에서 수행되는 것일 수 있다.
- [43] 또한, 본 발명은 상기 다중 리보핵산 마커 정량진단용 리포좀-핵산 나노융합체를 포함하는 암 진단용 키트를 제공한다.

발명의 효과

- [44] 본 발명에 따른 다중 리보핵산 마커 정량진단용 리포좀-핵산 나노융합체는 다종의 세포주간 RNA 발현 양상 차이의 정량적 비교 및 단일 세포주내 세포간 차이를 확인할 수 있는 효과를 가진다. 이를 통해 실제 임상에서 얻어진 세포내에 발현되고 있는 암특이적 RNA 마커의 다중 실시간 진단이 가능해지고, 이를 토대로 하여 진단 및 치료에 필요한 정보를 쉽고 빠르게 얻을 수 있는 장점이 있다.
- [45] 특히 세포 내에서 그 농도가 절대적으로 적은 마이크로 리보핵산을 표적으로 하여 고감도 진단이 가능하므로, 상대적으로 표적물질이 많이 발현되지 않는 초기 암의 진단 및 예후를 예측하는 것이 가능하며, 세포막 내외부에 발현되는 다양한 표적물질을 표적화할 수 있기 때문에 삼중음성유방암 등과 같이 진단이 어려운 암종 역시 용이하게 진단이 가능하다.
- [46] 이에 더하여, 다양한 형광체를 사용하여 다양한 종류의 miRNA 농도에 따른 다중 비색(Multi-colorimetric) 진단 평가가 가능하고, 단일 세포 내에서 다양한

종류의 miRNA 진단을 통해 세포 간 이종성(Heterogeneity)을 평가할 수 있는 특징이 있으며, 융합체 표면의 리포솜 이중막이 생체 내에서 진단체가 분해되는 것을 늦춰주기 때문에 생체 내 적용이 용이한 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [47] 도 1은 본 발명의 세포내 실시간 다중 RNA 마커 진단을 위한 리포솜-핵산 나노융합체의 제조방법 및 진단 방법을 도시적으로 나타낸 도면이다.
- [48] 도 2의 위쪽은 핵산 나노 구조체(afc-DNA)의 제조방법을 나타낸 것이고, 아래쪽은 핵산 나노 구조체의 합성을 전기영동기법을 통해 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [49] 도 3은 핵산 나노구조체의 삼차원적 구조를 확인하기 위한 시뮬레이션 조건을 나타낸 도면이다.
- [50] 도 4는 핵산 나노구조체의 삼차원적 구조를 도 3의 조건에 따라 oxDNA 프로그램을 통해 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [51] 도 5는 실리카 나노입자체의 표면에 핵산 나노구조체를 접합하는 과정과 결과를 나타낸 도면으로, 5a는 접합 과정의 모식도를 나타낸 것이고, 5b는 온도에 따른 결합 안정성(37도)을 확인한 결과이며, 5c는 표면 처리 단계별 입자체 크기 변화를 나타낸 것이고, 5d는 실리카 표면에 붙은 핵산 나노구조체를 형광현미경을 통해 시각화한 결과를 나타낸 도면이다.
- [52] 도 6은 본 발명의 리포솜-핵산 나노융합체의 제조 단계에 따른 크기와, 크기에 따른 형광 시그널 증폭 및 표면 전하 변화를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [53] 도 7은 본 발명에서 제조된 리포솜-핵산 나노융합체를 두가지 종류(MCF-7 및 SK-BR-3)의 유방암 세포주에 처리하여, 세포 내 전달이 잘 이루어지는지를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [54] 도 8은 본 발명의 나노융합체가 다중 진단능을 가지는지 확인한 결과로, 5종의 유방암 세포주(HCC-1937, MCF-7, MDA-MB-453, MDA-MB-231 및 SK-BR-3)를 대상으로 본 발명의 리포솜-핵산 나노융합체를 처리한 후, 유세포 분석을 통해 얻어지는 결과를 현재 표준적으로 사용되고 있는 RT-PCR의 결과와 비교한 결과를 나타낸 도면이다.
- [55] 도 9a는 대상 miRNA를 핵산 나노구조체에 처리하고, 그로 인해 발생하는 형광시그널의 증대를 측정한 결과를 나타낸 것이고, 도 9b는 대상 miRNA를 다양한 농도로 혼합하고, 상기 혼합액에의 농도에 따른 형광시그널의 변화를 확인한 결과를 나타낸 것이며, 도 9c는 상기 형광시그널의 변화를 색깔로 변환한 결과를 나타낸 도면이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [56] 본 발명자들은 실시간 세포내 다중 RNA 마커 진단이 가능한 암세포 진단체를 개발하기 위해 연구한 결과 본 발명을 완성하게 되었다.
- [57]

- [58] 따라서 본 발명은 고리형 말단을 가지는 가지형태의 제1핵산구조체; 및 고리형 말단을 가지는 가지형태의 제2핵산구조체가 접합된 핵산 나노 구조체가 표면에 결합된 실리카 구형체를 리포솜 내부에 포함하는, 다중 리보핵산 마커 정량진단용 리포솜-핵산 나노융합체 및 이를 포함하는 생체 진단 이미징 시스템을 제공하는 것을 그 특징으로 한다.
- [59] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 다중 리보핵산 마커 정량진단용 리포솜-핵산 나노융합체의 제조방법을 제공한다:
- [60] 고리형 말단을 가지는 가지형태의 제1핵산구조체, 및 고리형 말단을 가지는 가지형태의 제2핵산구조체를 제조한 후, 리가아제 효소를 이용하여 서로 접합시켜 핵산 나노 구조체를 제조하는 단계(S1);
- [61] 용매에 실리카이트 용액을 첨가하여 실리카 나노입자체를 합성하는 단계(S2);
- [62] 상기 S2 단계의 나노입자체에 아미노프로필 트리메톡시실란(Aminopropyl trimethoxysilane) 및 사이아누릭 클로라이드 (Cyanuric chloride)를 순차처리하는 단계(S3);
- [63] 상기 S3 단계의 나노입자체와 S1 단계의 핵산 나노 구조체를 반응시켜 핵산 나노구조체를 제조하는 단계(S4);
- [64] 상기 S4 단계의 핵산 나노구조체에 양이온성 지질을 첨가한 후 초음파 처리하여 리포솜-핵산 나노융합체를 제조하는 단계(S5).
- [65] 이때, 상기 제조방법은 본 발명에 따른 리포솜-핵산 나노융합체를 제조할 수 있다면, 적절하게 단계의 순서 및/또는 구성을 변경할 수 있으며 상기 단계에 제한되는 것은 아니다.
- [66] 본 발명에 따른 리포솜-핵산 나노융합체는 질병의 진단을 위해 사용될 수 있으며, 이를 위해 본 발명의 일실시예에서는 세포 내에서 구현 가능하도록 형광체를 표지한 핵산구조체 2종을 실리카 구형체에 부착한 다음 리포솜으로 상기 구형체 표면을 코팅하였다(도 1 참조). 이때, 본 발명의 일실시예에서는 지지를 위한 구형체로 실리카를 이용하였으나, 생체 내 사용가능한 나노사이즈의 구형체라면 이에 제한되지 않고 사용할 수 있으며, 제조된 나노융합체의 크기는 체내에 주입할 수 있는 크기 및 모양이라면 적절하게 조절 가능 하지만, 바람직하게는 직경이 50 nm 내지 90 nm인 구형으로 제조할 수 있다.
- [67] 본 발명에서 제1핵산구조체 및 제2핵산구조체는 점착성 말단을 가지는 선형핵산이 Y자 가지형태로 결합하거나 상기 Y자 가지형태로 반복 결합하게 함으로써 나뭇가지 형태로 제조할 수 있으며, 상기 점착성 말단이 가지는 최소 3개의 5' 말단에 형광체를 표지하는 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [68] 상기 핵산구조체는 고리형 말단을 가지는 것으로, 세포 내부 신호를 검출하기 위하여, 세포 내 표적 메신저 리보핵산(mRNA) 또는 표적 마이크로 리보핵산(miRNA)과 상보적으로 결합할 수 있도록 상기 표적 리보핵산과 상보적인 서열 및 고리형 핵산구조체로 묶이게 하는 짧은 서열을 포함하는

핵산을 Y자 가지의 어느 한 쪽 이상의 말단에 부착한 것일 수 있다. 이때, 상기 표적 리보핵산과 상보적인 서열의 한 쪽 말단에 소광제를 추가로 표지함으로써, 상기 표적 리보핵산과 결합하는 고리형 핵산구조체가 형광체와 소광제 사이의 포스터 공명에너지전달현상(Forster Resonance Energy Transfer, FRET)을 토대로 작동될 수 있도록 하였다. 즉, 상기 고리형 핵산구조체가 표적 리보핵산과 결합하지 않으면, 포스터공명에너지전달효과로 인해 빛이 발생하지 않고, 결합하면 형광체에서 빛이 발생할 수 있도록 하였다.

- [69] 바람직하게 상기 형광체는 플루오레신(fluorescein), 텍사스레드(TexasRed), 로다민(rhodamine), 알렉사(alexa), 시아닌(cyanine), 보디피(BODIPY) 또는 쿠마린(coumarin)일 수 있고, 더욱 바람직하게는 6-FAM, Texas 615, Alexa Fluor 488, Cy5, 또는 Cy3일 수 있으며, 바람직하게 상기 소광제는 탐라(TAMRA), 비에이치큐(BHQ), 아이오와블랙 알큐(Iowa Black RQ) 또는 엠지비엔에프큐(MGBNFQ, molecular groove binding non-fluorescence quencher)일 수 있고, 더욱 바람직하게는 Iowa Black RQ 일 수 있으나, 생체 내 사용 가능한 형광체 또는 소광제라면 이에 한정되지 않고 당업자가 적절하게 변경하여 사용할 수 있다.
- [70] 본 발명의 리포솜은 사용 목적에 따라 세포와의 상호작용을 조절할 수 있도록 지질조성을 달리할 수 있다. 본 발명의 일실시예에서는, 표적 세포에 비특이적으로 세포막과 융합하여 본 발명에 따른 리포솜-핵산 나노융합체가 세포질 내로 유입될 수 있도록 양전하를 띄는 지질로 리포솜을 제조하였으며, 바람직하게 상기 양전하를 띄는 지질은 DOTAP(1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane)를 이용하여 제조할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [71] 또한, 본 발명의 리포솜-핵산형광 융합체는 동일한 용액(용매)에 각각 첨가한 핵산나노융합체(제1핵산구조체 및 제2핵산구조체가 접합된 핵산 나노구조체가 표면에 결합된 실리카 구형체) 및 리포솜을 혼합함으로써 제조될 수 있으며, 바람직하게는 핵산 나노융합체가 표면 처리된 실리카 나노입자체 및 리포솜의 혼합 중량비는 제한이 없으며, 본 발명의 일실시예에서와 같이 핵산 나노융합체가 포함된 용액 및 리포솜이 포함된 용액을 8:7의 무게비로 혼합할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 이때, 동일한 용액(용매)를 사용해야 삼투압에 의한 리포솜의 파열을 방지할 수 있으며, 바람직하게 상기 용액은 증류수 또는 PBS(Phosphate buffersaline)와 같은 인산염 용액을 포함하는 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [72] 또한, 본 발명의 S2 단계의 용매는 메탄올, 에탄올, 증류수, 및 암모니아수를 포함하는 것일 수 있으며, 상기 메탄올 및 에탄올은 6:4 내지 8:2의 부피비율로 혼합되는 것일 수 있다.
- [73] 본 발명에 따른 리포솜-핵산 나노융합체는 제1핵산구조체와 제2핵산구조체의 말단에 상이한 색조의 형광체를 표지함으로써, 상기 색조의 발현에 따라 정량적

진단이 가능하도록 한 특징이 있다.

- [74] 따라서 본 발명의 리포솜-핵산 나노융합체는 생체 진단 이미징 시스템으로 활용될 수 있으며, 상기 시스템은 다중 RNA 마커를 포획하여 특이적인 형광물질의 활성화시킴으로써, miRNA 농도에 따른 형광 시그널 변화 및 색상 환산에 따라, 세포간 정량 비교가 가능한 특징을 가지는 것이다.
- [75] 이에 더하여, 본 발명은 질병의 진단을 필요로 하는 개체에 상기 리포솜-핵산 나노융합체를 투여하고 세포 내 형광을 측정하는 단계를 포함하는 질병 진단 방법을 제공할 수 있다. 상기 투여는 경구 투여, 정맥 주사, 복강 주사, 근육 주사, 동맥 주사 또는 피하 주사 방법을 통해 이루어질 수 있으며, 상기 개체란 질병의 진단을 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간, 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말, 또는 소 등의 포유류를 의미한다. 또한, 상기 진단 방법은 진단을 필요로 하는 질병의 종류에 따라 핵산 서열을 변경하고 리포솜-핵산 형광 나노융합체를 제조할 수 있기 때문에 어느 하나의 질병에 한정되는 것은 아니나, 바람직하게는 암 진단을 목적으로 하는 것일 수 있고, 가장 바람직하게는 본 발명의 일실시예에 따라 유방암 진단을 목적으로 하는 것일 수 있다.
- [76] 나아가 본 발명의 리포솜-핵산 형광 나노융합체는 내부가 비어 있어, 다양한 물질을 포함하도록 제조할 수 있다. 내부에 포함할 수 있는 물질에는 제한이 없으나, 바람직하게는 치료제를 포함하도록 함으로써 생체 진단 이미징과 동시에 치료용 시스템으로 활용할 수 있다.
- [77] 아울러, 본 발명은 상기 다중 리보핵산 마커 정량진단용 리포솜-핵산 나노융합체의 안정성을 이론적으로 평가하는 평가방법으로, 상기 방법은 나노융합체 내부에서 발생하는 수소결합 에너지를 측정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 평가방법을 제공할 수 있다.
- [78] 상기 평가방법은 oxDNA 시뮬레이션에 의해서 수행되는 것으로, 상기 oxDNA는 대단위-입자 DNA 모델을 구현하기 위해 개발된 시뮬레이션 코드로서, 분자동력학을 통해서 핵산 나노융합체의 물리적 안정성을 이론적으로 평가하는 것이 가능하게 한다.
- [79] 본 발명에서 상기 수소결합 에너지의 측정은 35 내지 40°C에서 수행되는 것을 특징으로 하며, 상기 평가방법은 나노융합체 또는 핵산 나노구조체의 내부에서 발생하는 수소결합 에너지를 일정시간($\times 10^6$) 동안 측정하여, 상기 수소결합 에너지가 일정하게 유지되는 것이 확인될 때, 제조된 나노융합체 또는 핵산 나노구조체에 구조적 안정성이 있는 것으로 판단한다.
- [80] 또한, 본 발명은 상기 다중 리보핵산 마커 정량진단용 리포솜-핵산 나노융합체를 포함하는 암 진단용 키트를 제공한다.
- [81] 본 발명에서 상기 암은 유방암, 담관암, 방광암, 뇌종양, 자궁경부암, 용모암, 대장암, 자궁내막암, 식도암, 위암, 다발성 골수종, AIDS-관련 백혈병 및 성인 T-세포 림프종/백혈병, 상피내암, 간암, 폐암, 림프종, 신경모세포종, 구강암,

난소암, 췌장암, 전립선암, 직장암, 육종, 피부암, 고환암, 갑상선암 또는 신세포암이고, 이에 제한되지 않는다.

[82] 본 명세서에서 용어 "키트"는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있다.

[83] 또한, 상기 키트는 암의 진단, 암의 다중 세포주 간의 차이 또는 단일 세포주내 세포간 차이를 진단하기 위하여 필요한 모든 생물학적 또는 화학적 시약, PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소, 안내서를 포함할 수 있다. PCR 키트는, 상기 프라이머 세트 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드 (dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수 (DEPC-water) 및 멸균수 등을 포함할 수 있다. 상기 안내서는 키트 사용법, 예를 들면, 제시되는 반응 조건 등을 설명하는 인쇄물이다. 안내서는 팜플렛 또는 전단지 형태의 안내책자, 키트에 부착된 라벨, 및 키트를 포함하는 패키지의 표면에 설명을 포함할 수 있다. 또한, 안내서는 인터넷과 같이 전기 매체를 통해 공개되거나 제공되는 정보를 포함할 수 있다. 본 발명의 목적 상, 본 발명의 리포좀-핵산 나노융합체는 대상이 되는 암의 다중 세포주 간의 차이 또는 단일 세포주내 세포간 miRNA와 특이적인 결합을 할 수 있는 Molecular beacon 구조와 나노구조체가 세포내로 전달되었을 때, 나노구조체 자체적인 정량화가 가능한 표지 형광인자로 구성되어 있기 때문에, 형광시그널 증대 및 색깔의 변환을 통하여 확인하여 암을 진단할 수 있다.

[84]

[85] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

발명의 실시를 위한 형태

[86] [실시예]

[87] 본 실시예에서는 효과적인 암진단 및 임상 적용을 위해, 대상 miRNA는 기존 연구에서 암과의 연관성이 깊은 것으로 알려진 miRNA들인 miR-21 및 miR-22로 선택하여 사용하였다. 진단 프로브의 단순 세포내 전달은 세포 특이적인 세포내 이입률로 인해 정량 분석이 어려운 한계가 있는 것으로, 예를 들면 진단 프로브가 세포 특성으로 인해 단순히 세포내로 다량 전달된 경우, 진단 프로브 자체의 Background noise로 인해 실제 대상 miRNA가 없을 경우에도 positive false를 야기할 가능성이 있으며, 대상 miRNA가 있을 경우에도 negative false를 야기하기도 한다. 이에 현재까지 개발된 나노기술 기반의 진단 프로브는 대부분 상대적 정량만이 가능한 특성을 가지고 있는 바, 본 발명자들은 상기 한계를 극복하고자, 세포내 효율적인 miRNA의 진단을 위해, 도 1에 도시된 방법과 같이 특이적인 리포좀-핵산 나노융합체를 개발하였다.

[88]

[89] 실시예 1. 리포좀-핵산 나노융합체의 제조[90] 1-1. 핵산 나노구조체 합성 및 분자동역학 시뮬레이션

[91] 제1핵산구조체(fc1-DNA) 및 제2핵산구조체(fc2-DNA)를 이루는 핵산 올리고머의 염기서열과 표적 RNA와 상보적 서열을 가지는 서열은 표 1에 나타내었다. TE buffer(10 mM Tris, pH 8.0, 0.1 mM EDTA)에 녹인 후, 각 핵산 올리고머를 동일한 몰수비(0.1 mM)로 혼합하였다. 이후 용액의 온도를 60°C에서 20°C까지 분당 1°C씩 서서히 낮추는 과정을 통해 제1핵산 구조체 및 제2핵산구조체를 합성하였다.

[92] 핵산 나노 구조체(afc-DNA)의 합성은 도 2의 위쪽에 나타낸 것과 같이 제1핵산구조체 및 제2핵산구조체 사이의 리가아제 효소를 통한 접합으로 수행되었다. 동일 몰수의 단위 핵산 나노구조체 혼합액 (0.1 mM)을 3 Weiss unit의 T4 리가아제 효소 및 버퍼에 하였다(4°C, 16시간). 도 2 아래에 나타낸 것과 같이, 핵산 나노구조체 합성은 전기영동기법을 통해 확인되었다.

[93] 합성된 핵산 나노구조체의 삼차원적 구조를 확인하기 위해 oxDNA 프로그램을 사용하였으며, 구체적인 시뮬레이션 조건은 도 3에 나타내었으며, 그 결과를 도 4에 나타내었다. 도 4에서 확인할 수 있는 것과 같이, 본 발명에서 합성된 핵산구조체와 핵산 나노구조체는 내부에서 발생하는 수소결합 에너지가 일정하게 유지되어, 안정성을 가진다는 것을 확인하였다.

[94] [표 1]

fc1-DNA	
Target	AAG CUG CCA GUU GAA GAA CUG U(서열번호 7)
(miR-22)	
fc1-a	IowaBlackRQ/GCGAGACAGTTCTTCACTGGCAGCTTCTCGC/Cy3/AGGCTGATTCGGTTCATGCGGATCCA(서열번호 1)
fc1-b	Marinablue/CTTACGGCGAATGACCGAATCAGCCT(서열번호 2)
fc1-c	AGT CTG GAT CCG CAT GAC ATT CGC CGT AAG(서열번호 3)
fc2-DNA	
Target	UAG CUU AUC AGA CUG AUG UUG A(서열번호 8)
(miR-21)	
fc2-a	IowaBlackFQ/GCGAGTCAACATCAGTCTGATAAGCTACTCGC/FAM/AGGCTGATTCGGTTCATGCGGATCCA(서열번호 4)
fc2-b	Amine/CTTACGGCGAATGACCGAATCAGCCT(서열번호 5)
fc2-c	GAC TTG GAT CCG CAT GAC ATT CGC CGT AAG(서열번호 6)

[96] 1-2. 다양한 크기의 실리카 나노입자체 합성 및 핵산 나노입자체 부착

[97] 입자체 합성을 위해서, 최종 부피가 46mL가 되도록 메탄올과 에탄올을 다양한 부피 비율로 혼합한 후, 1 mL의 증류수와 3 mL의 암모니아수(28~30 w/w%)를 첨가해주었고, 10분간 교반한 뒤 Tetraethyl orthosilicate (TEOS) 용액 0.6 ml을 서서히 처리하여 실리카 나노입자체를 제조하였다. 제조된 실리카 나노입자체는 원심분리를 통해(15,000 G, 30분) 3회 이상 에탄올로 씻어내었다.

[98] 에탄올로 씻어낸 후, 200 mg의 실리카 나노입자체에 0.8 mL의 APTMS(아미노프로필트리메톡시실란, (3-Aminopropyl)trimethoxysilane), 38 ml의

에탄올, 2 ml의 증류수, 및 0.25 ml의 아세트산을 첨가하였다. 이후 3회 이상의 원심분리를 통해 에탄올, 아세토니트릴 (Acetonitrile)로 씻어내고, 115.2 mg의 염화시아누르(cyanuric chloride)를 처리한 후 2시간 동안 교반해주었다. 3회 이상 아세토니트릴, 에탄올, 증류수, 붕산염 버퍼용액 (Borate buffer, pH 8.5)로 씻어내었다.

- [99] 마지막으로 4 mg의 실리카 나노입자체 당 25 pmole의 아민기가 말단에 치환된 헥산 나노 구조체를 처리한 후 16시간 이상 반응시켜 헥산 나노융합체를 제조하였다. 미반응된 헥산 나노 구조체는 원심분리를 통해 증류수로 씻어내 제거하였다.

[100]

[101] **1-3. 양이온성 인지질막 처리**

- [102] 헥산 나노입자체가 결합된 실리카 나노입자체에 양이온성 지질인 DOTAP(1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane)을 처리하였다. 반응에 앞서 3.5 mg의 DOTAP 인지질은 1.4 ml의 증류수에 10 % 진폭 (amplitude, Qsonica Q500)으로 초음파 처리하여 분산시켰다(4°C에서 분산되어 반응 전까지 저온 보관됨). DOTAP 용액과 나노융합체 용액을 혼합하고, 1시간 동안 교반하며 반응시킨 뒤, 원심분리를 통해 증류수, 생리식염수로 씻어주었다.

[103]

[104] **실시예 2. 실리카 나노입자체 합성 및 헥산 나노구조체 접합**

- [105] 본 실시예 2에서 헥산 나노구조체의 시그널 증폭과 효율적인 세포내 전달을 위해 다양한 크기의 실리카 나노입자체를 제조하여, 최적의 실리카 나노입자체 크기를 도출하고자하였다. 메탄올과 에탄올 혼합액을 사용한 합성법을 기반으로 하여, 20~270 nm의 크기를 갖는 실리카 나노입자체를 합성하였다.
- [106] 이후 도 5a에 나타낸 것과 같이 헥산 나노구조체를 표면에 접합하기 위해 실리카 나노입자체에 아미노프로필 트리메톡시실란(Aminopropyl trimethoxysilane) 및 사이아누릭 클로라이드 (Cyanuric chloride)를 순차적으로 처리하여 헥산 나노 구조체의 아민기 (Amine group)과 반응할 수 있도록 하였다.
- [107] 또한 도 5b에서는 실리카 표면에 부착된 형광인자가 37°C에서 시간이 지남에 따라 어느 정도 떨어지는지 확인한 결과를 나타낸 것으로, 실리카 나노입자체의 크기에 따라 헥산 나노구조체에서 발생하는 형광 시그널의 강도가 달라지고, 최적점이 있는 것을 확인하였다.

[108]

[109] **실시예 3. 양이온성 인지질막 처리 및 세포 내 miRNA 검출능 확인**

- [110] 본 발명에서는, 효율적인 세포내 전달 및 엔도조말 탈출 (Endosomal escape)을 위해서, 헥산 나노 구조체가 코팅된 실리카 나노입자체(즉, 헥산 나노융합체)를 양이온성 인지질인 DOTAP (Dioleoyl-trimethylammonium-propane) 처리하여 리포좀-헥산 나노융합체로 제조하여 진단에 사용한다. 본 실시예에서는 DOTAP 처리에 따른 입자체의 크기 및 표면 전하 변화를 확인하였다.

- [111] 그 결과, 도 5c에 나타낸 것과 같이, 다양한 크기의 실리카 나노입자체 표면에 핵산 나노구조체를 부착하고 이후 DOTAP를 처리하여 다양한 크기의 나노융합체를 제작하는 것이 가능하다는 것을 확인할 수 있으며, 메탄올 및 에탄올의 혼합 부피 비율이 8:2일 때 제작된 실리카 나노입자체를 사용하여 최종 나노융합체를 제작한 경우는 51.38 nm의 크기를, 6:4일 때는 80.56 nm의 크기를, 4:6일 때는 134.21 nm의 크기를, 2:8일 때는 225.70 nm의 크기를, 0:10일 때는 264.40 nm의 크기를 가진다는 것을 알 수 있다. 또한 도 5d에서 확인할 수 있는 것과 같이, 마이크로 크기의 실리카 비드의 표면에 동일한 아미노프로필 트리메톡시실란과 사이아누릭 클로라이드 화학반응을 통해 부착된 핵산 나노구조체를 형광현미경(Zeiss Axiovert 200M, Carl Zeiss)을 통해 확인하여 본 발명에서 실리카 나노입자체 표면의 핵산 나노융합체 부착을 검증하였다.
- [112] 도 6에서 본 발명의 리포좀-핵산 나노융합체의 제조 단계에 따른 크기와, 크기에 따른 형광 시그널 증폭 및 표면 전하 변화를 확인한 결과를 나타내었다. 형광세기는 형광광도계 (SpectraMax M5, Molecular Devices)를 이용하여 측정하였고, 표면 전하의 변화는 동적빛산란 기법으로 측정하였다 (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments). 도 6a는 본 발명의 제조단계를 모식적으로 나타낸 것이며, 다양한 분율의 메탄올/에탄올 혼합액을 사용하게 제작된 실리카 나노입자체의 표면에 핵산 나노구조체를 부착하고, 최종적으로 DOTAP을 처리하여 표면을 코팅하였다. 도 6b 및 6c는 메탄올 및 에탄올의 혼합 부피 비율에 따른 실리카 구형체의 크기와 주사전자현미경 (JEM-3010, JEOL)을 이용하여 촬영된 이미지를 나타낸 것이고, 도 6d는 구형체 크기에 따라 결합되는 핵산 나노구조체의 양과 형광 시그널을 나타낸 것이다. 해당 결과에서 구형체의 크기에 따라 핵산 나노구조체의 표면에 응집되는 양이 달라지고 그로인해 형광시그널의 크기가 변화한다는 것을 알 수 있다. 도 6e는 DOTAP 처리 전/후의 표면 전하 변화를 나타낸 것으로, DOTAP를 처리할 때 표면 전하가 음전하에서 양전하로 바뀌는 결과를 통해 DOTAP (양전하)으로 표면이 코팅되는 것을 확인할 수 있다.
- [113] 제조된 리포좀-핵산 나노융합체를 두가지 종류(MCF-7 및 SK-BR-3)의 유방암 세포주에 처리하여, 세포 내 전달이 잘 이루어지는지를 확인하였다. 도 7a에 나타낸 것과 같이, DOTAP가 존재할 때 보다 세포 내로 잘 전달된다는 것을 확인하였고, 최종 크기 70 nm 가량의 리포좀-핵산 나노융합체가 세포내로 가장 잘 전달되는 것으로 확인하였다.
- [114] 도 7b에서 확인할 수 있는 것과 같이, 유세포 분석 (MacQuant VYB, Miltenyi Biotec)을 통해 확인한 결과 본 발명의 핵산 나노 구조체가 세포내로 전달될 때, 형광체가 동일한 비율로 나타나 세포 내로 핵산구조체가 동일한 비율로 전달될 수 있다는 것을 확인하였다.
- [115] 실시간 세포내 다중 진단능을 확인하기 위해, 5종의 유방암 세포주(HCC-1937, MCF-7, MDA-MB-453, MDA-MB-231 및 SK-BR-3)를 대상으로 본 발명의

리포솜-핵산 나노융합체를 처리한 후, 유세포 분석을 통해 얻어지는 결과를 현재 표준적으로 사용되고 있는 RT-PCR의 결과와 비교하였다. 모든 암세포는 24-well plate에서 배양되었으며, 1×10^5 개의 세포를 대상으로 0.5 mg의 리포솜-핵산 나노융합체가 처리되었다. 처리 후 37°C, 5% CO₂ 농도에서 2시간 동안 배양 후 세포를 추출하여 유세포 분석 측정하였다. RT-PCR의 경우, TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)를 사용하여 측정되었으며, 동 업체에서 제공하는 miRNA 특이적 프라이머 키트를 구매하여 사용하였다(miR-21: Hs04231424_s1, miR-22: Hs00993773_g1). 대상 miRNA의 발현 정도를 본 발명에서 제시한 방식으로 얻어진 결과와 RT-PCR을 이용하여 확인한 결과를 도 8a에서 비교하였다. 사용된 프라이머 서열은 하기 표 2에 나타내었다. 그 결과 사용된 다섯가지 종류의 암세포종 모두에서 RT-PCR에서 얻어진 결과와 본 발명에서 제시된 방식으로 얻어진 결과의 상대적 비율이 일치하는 것을 확인하였다.

- [116] 결과적으로 세포간 miR-21과 miR-22의 발현 양상 차이를 정량적으로 비교하는 것이 가능함을 확인하였고, 동일 세포주 내 세포간 차이에 관한 데이터를 얻는 것이 가능함을 확인하였다.

[117]

[118] **실시예 4. 핵산 나노구조체 개발 및 대상 miRNA 검출능 확인**

- [119] 본 발명의 리포솜-핵산 나노융합체는 대상 miRNA와 특이적인 결합을 할 수 있는 Molecular beacon 구조와 나노구조체가 세포내로 전달되었을 때, 나노구조체 자체적인 정량화가 가능한 표지 형광인자로 구성된다는 것을 앞선 실시예를 통해서 확인하였다. 또한 합성된 리포솜-핵산 나노융합체의 구조적 안정성은 전기영동 기법과 분자동력학적 시뮬레이션을 통해 검증되었고, 대상 miRNA에 대한 특이적 검출능의 경우, 다양한 농도의 대상 miRNA의 혼합액과 다른 종류의 miRNA와의 비교 실험을 통해 miRNA 특이성 및 검출능이 유효한 것을 확인하였다. 구조적 안정성을 확인하기 위해 사용된 분자동력학적 시뮬레이션 프로그램은 프리웨어인 oxDNA를 사용하였다. oxDNA 시뮬레이션 상에서 본 발명에 사용된 동일한 염기서열을 갖는 핵산 가닥을 입력하고, 시간이 지남에 따라 내부 에너지가 안정적으로 유지되는 것을 도 4에서 확인하였다. 또한 검출능을 확인하기 위해 다양한 농도의 대상 miRNA를 핵산 나노구조체에 처리하고, 그로 인해 발생하는 형광시그널의 증대를 형광광도계 (SpectraMax M5, Molecular Devices)를 사용하여 측정하여 도 9a에 나타내었다. 핵산 나노구조체간 조립 과정 이후에도 대상 miRNA의 검출능에 변화가 없음을 확인하였고, 대상으로하는 miR-21과 miR-22를 다양한 농도로 혼합하고, 혼합액에서 대상으로하는 miRNA의 농도에만 의존적으로 형광시그널이 증가하는 것을 도 9b에서 확인하였다. 이와 같이 얻어진 형광시그널을 색깔로 변환하여 나타낸 결과는 도 9c와 같다.

[120]

[121] 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 한정적이 아닌 것으로 이해되어야 한다.

[122]

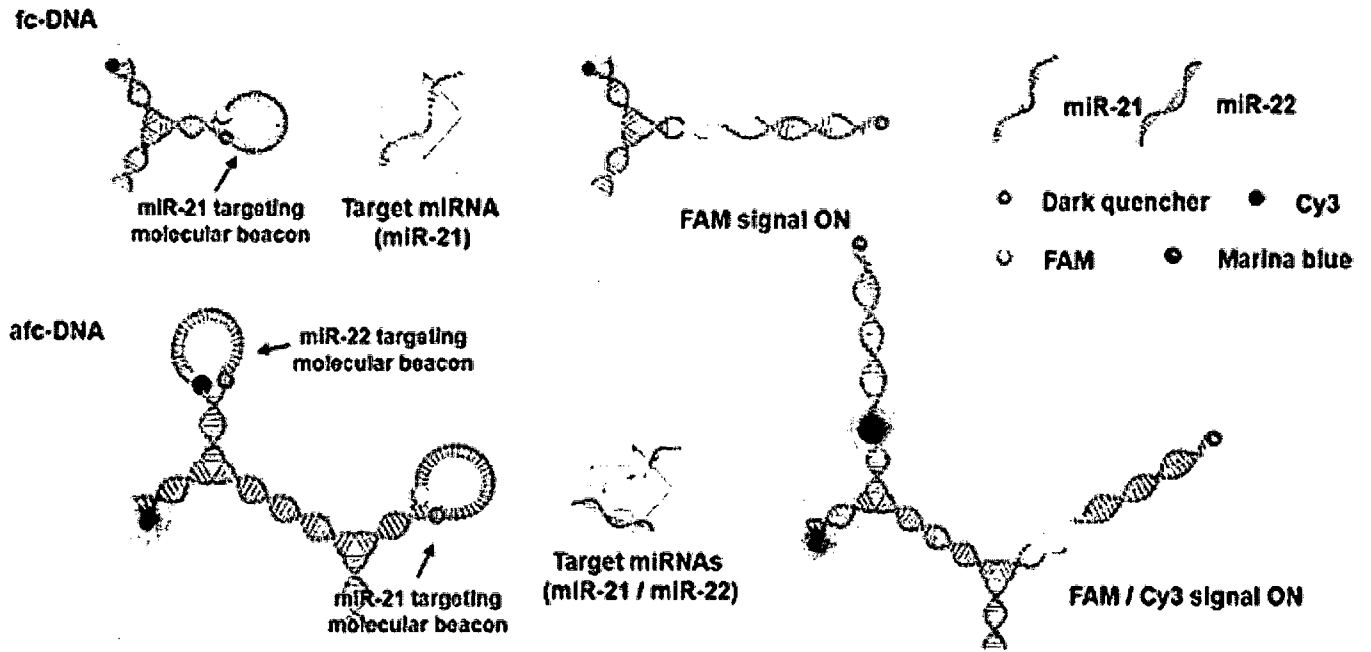
청구범위

- [청구항 1] 고리형 말단을 가지는 가지형태의 제1핵산구조체; 및 고리형 말단을 가지는 가지형태의 제2핵산구조체가 접합된 핵산 나노 구조체가 표면에 결합된 실리카 구형체를 리포솜 내부에 포함하는, 다중 리보핵산 마커 정량진단용 리포솜-핵산 나노융합체.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 제1핵산구조체는 서열번호 1 내지 3의 염기서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 선형핵산들이 Y자 가지형태로 결합한 형태인 것을 특징으로 하는, 다중 리보핵산 마커 정량진단용 리포솜-핵산 나노융합체.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 제2핵산구조체는 서열번호 4 내지 6의 염기서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 선형핵산들이 Y자 가지형태로 결합한 형태인 것을 특징으로 하는, 다중 리보핵산 마커 정량진단용 리포솜-핵산 나노융합체.
- [청구항 4] 제 2 항 또는 제 3 항에 있어서,
상기 선형핵산은 5' 말단에 형광체를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 다중 리보핵산 마커 정량진단용 리포솜-핵산 나노융합체.
- [청구항 5] 제 2 항에 있어서,
상기 제1핵산구조체는 고리형 말단이 표적 RNA와 상보적 서열을 가지는 서열번호 7의 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 다중 리보핵산 마커 정량진단용 리포솜-핵산 나노융합체.
- [청구항 6] 제 3 항에 있어서,
상기 제2핵산구조체는 고리형 말단이 표적 RNA와 상보적 서열을 가지는 서열번호 8의 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 다중 리보핵산 마커 정량진단용 리포솜-핵산 나노융합체.
- [청구항 7] 제 1 항에 있어서,
상기 제1핵산구조체 및 제2핵산구조체는 형광체 및 소광체가 추가로 표지된 것을 특징으로 하는, 다중 리보핵산 마커 정량진단용 리포솜-핵산 나노융합체.
- [청구항 8] 제 1 항에 있어서,
상기 실리카 구형체는 50 nm 내지 80 nm인 것을 특징으로 하는, 다중 리보핵산 마커 정량진단용 리포솜-핵산 나노융합체.
- [청구항 9] 제 1 항에 있어서,
상기 실리카 구형체는 핵산 나노 구조체가 표면에 결합되기 전에, 아미노프로필 트리메톡시실란(Aminopropyl trimethoxysilane) 및 사이아누릭 클로라이드 (Cyanuric chloride)를 순차적으로 처리하여 표면개질된 것을 특징으로 하는, 다중 리보핵산 마커 정량진단용 리포솜-핵산 나노융합체.

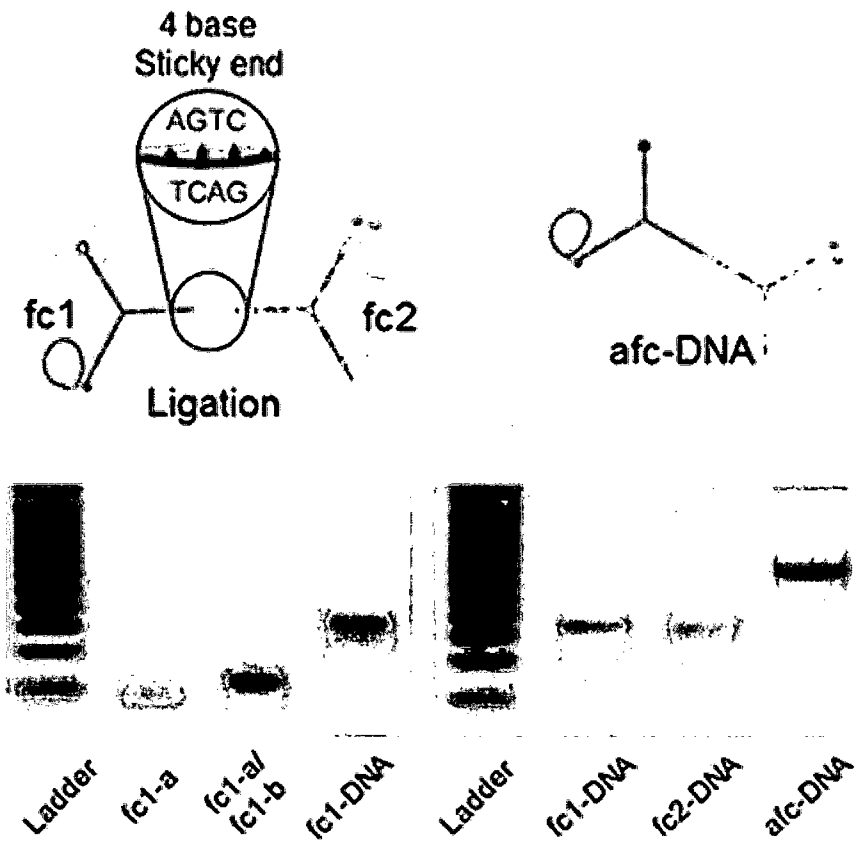
- [청구항 10] 제 1 항에 있어서,
상기 리포솜은 양이온성 지질로 이루어진 것을 특징으로 하는, 다중 리보핵산 마커 정량진단용 리포솜-핵산 나노융합체.
- [청구항 11] 제 10 항에 있어서,
상기 양이온성 지질은 DOTAP(1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane) 및 콜레스테롤을 구성 성분으로 하는 양이온성 지질로 이루어진 것을 특징으로 하는, 다중 리보핵산 마커 정량진단용 리포솜-핵산 나노융합체.
- [청구항 12] 제 1 항의 다중 리보핵산 마커 정량진단용 리포솜-핵산 나노융합체를 포함하는 생체 진단 이미징 시스템.
- [청구항 13] 제 12 항에 있어서,
상기 시스템은 세포 내 형광을 측정하는 것을 특징으로 하는, 생체 진단 이미징 시스템.
- [청구항 14] 하기 단계를 포함하는 다중 리보핵산 마커 정량진단용 리포솜-핵산 나노융합체의 제조방법:
고리형 말단을 가지는 가지형태의 제1핵산구조체, 및 고리형 말단을 가지는 가지형태의 제2핵산구조체를 제조한 후, 리가아제 효소를 이용하여 서로 접합시켜 핵산 나노 구조체를 제조하는 단계(S1);
용매에 실리케이트 용액을 첨가하여 실리카 나노입자체를 합성하는 단계(S2);
상기 S2 단계의 나노입자체에 아미노프로필 트리메톡시실란(Aminopropyl trimethoxysilane) 및 사이아누릭 클로라이드(Cyanuric chloride)를 순차처리하는 단계(S3);
상기 S3 단계의 나노입자체와 S1 단계의 핵산 나노 구조체를 반응시켜 핵산 나노구조체를 제조하는 단계(S4);
상기 S4 단계의 핵산 나노구조체에 양이온성 지질을 첨가한 후 초음파 처리하여 리포솜-핵산 나노융합체를 제조하는 단계(S5).
- [청구항 15] 제 14 항에 있어서,
상기 제1핵산구조체는 서열번호 1 내지 3의 염기서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 선형핵산들이 Y자 가지형태로 결합한 형태인 것을 특징으로 하는, 다중 리보핵산 마커 정량진단용 리포솜-핵산 나노융합체의 제조방법.
- [청구항 16] 제 14 항에 있어서,
상기 제2핵산구조체는 서열번호 4 내지 6의 염기서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 선형핵산들이 Y자 가지형태로 결합한 형태인 것을 특징으로 하는, 다중 리보핵산 마커 정량진단용 리포솜-핵산 나노융합체의 제조방법.
- [청구항 17] 제 15 항 또는 제 16 항에 있어서,
상기 선형핵산은 5' 말단에 형광체를 더 포함하는 것을 특징으로 하는,

- 다중 리보핵산 마커 정량진단용 리포솜-핵산 나노융합체의 제조방법.
- [청구항 18] 제 15 항에 있어서,
상기 제1핵산구조체는 고리형 말단이 표적 RNA와 상보적 서열을 가지는 서열번호 7의 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 다중 리보핵산 마커 정량진단용 리포솜-핵산 나노융합체의 제조방법.
- [청구항 19] 제 16 항에 있어서,
상기 제2핵산구조체는 고리형 말단이 표적 RNA와 상보적 서열을 가지는 서열번호 8의 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 다중 리보핵산 마커 정량진단용 리포솜-핵산 나노융합체의 제조방법.
- [청구항 20] 제 14 항에 있어서,
상기 제1핵산구조체 및 제2핵산구조체는 형광체 및 소광제가 추가로 표지된 것을 특징으로 하는, 다중 리보핵산 마커 정량진단용 리포솜-핵산 나노융합체의 제조방법.
- [청구항 21] 제 14 항에 있어서,
상기 실리카 구형체는 50 nm 내지 80 nm인 것을 특징으로 하는, 다중 리보핵산 마커 정량진단용 리포솜-핵산 나노융합체의 제조방법.
- [청구항 22] 제 14 항에 있어서,
상기 양이온성 지질은 DOTAP(1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane) 및 콜레스테롤을 구성 성분으로 하는 양이온성 지질로 이루어진 것을 특징으로 하는, 다중 리보핵산 마커 정량진단용 리포솜-핵산 나노융합체의 제조방법.
- [청구항 23] 제 14 항에 있어서,
상기 S2 단계의 용매는 메탄올, 에탄올, 증류수, 및 암모니아수를 포함하는 것을 특징으로 하는, 다중 리보핵산 마커 정량진단용 리포솜-핵산 나노융합체의 제조방법.
- [청구항 24] 제 23 항에 있어서,
상기 메탄올 및 에탄올은 6:4 내지 8:2의 부피비율로 혼합되는 것을 특징으로 하는, 다중 리보핵산 마커 정량진단용 리포솜-핵산 나노융합체의 제조방법.
- [청구항 25] 제 1 항의 다중 리보핵산 마커 정량진단용 리포솜-핵산 나노융합체의 안정성을 이론적으로 평가하는 평가방법으로,
상기 방법은 나노융합체 내부에서 발생하는 수소결합 에너지를 측정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 평가방법.
- [청구항 26] 제 25 항에 있어서,
상기 측정은 35 내지 40°C에서 수행되는 것을 특징으로 하는, 평가방법.
- [청구항 27] 제1항의 다중 리보핵산 마커 정량진단용 리포솜-핵산 나노융합체를 포함하는 암 진단용 키트.

[도1]



[도2]



[도3]

	Simulation type	Backend	Interaction type	Salt concentration	Simulation steps
Initial structure generation	Virtual move Monte Carlo (VMMC)	CPU	DNA2	0.15	1.00E+05
Structure analysis	Molecular dynamics (MD)	CUDA	DNA2	0.15	1.00E+07

	Temperature (°C)	Average sequence file	Used sequence dependent file	Simulation data print out Interval (Step)	External force (Mutual trap)
Initial structure generation	37	Not available	Not available	100	On
Structure analysis	37	Off	oxDNA2_sequence_dependent_parameters.txt	100	Off

Ladder

fc1-a

fc1-ar

fc1-b

fc1-DNA

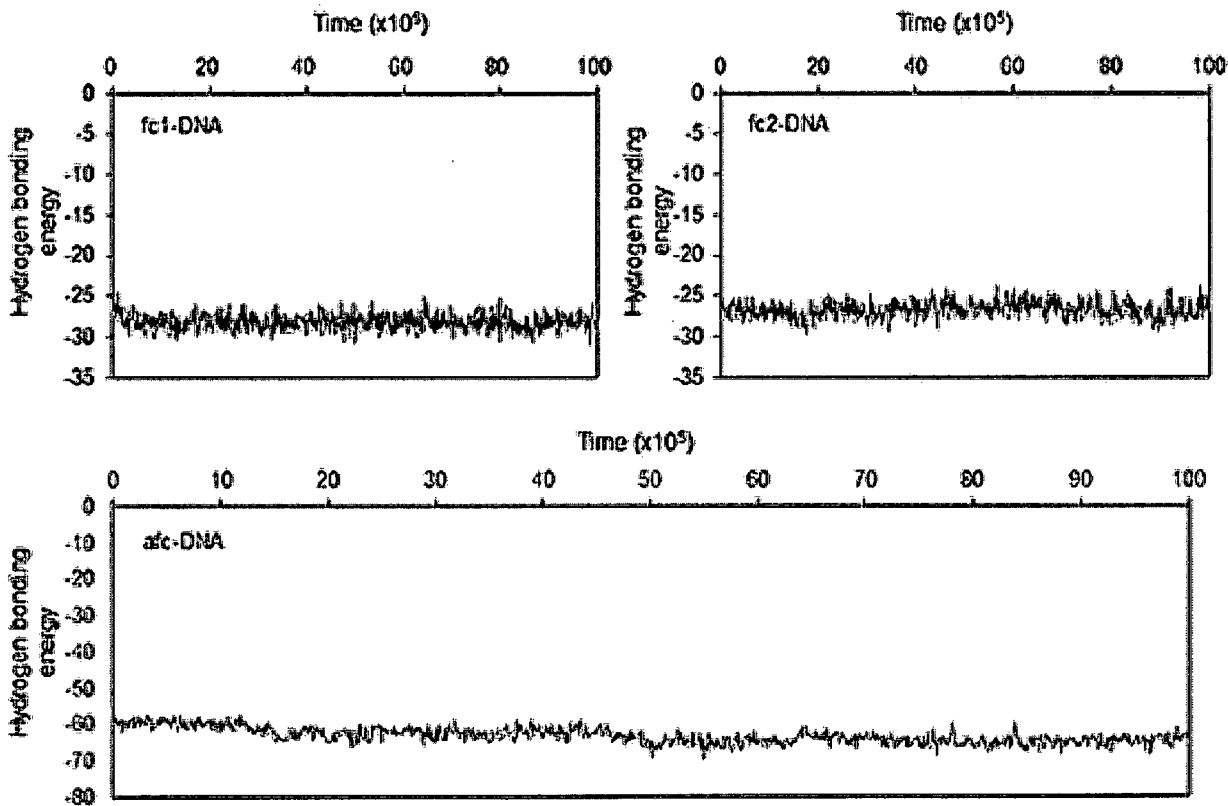
Ladder

fc1-DNA

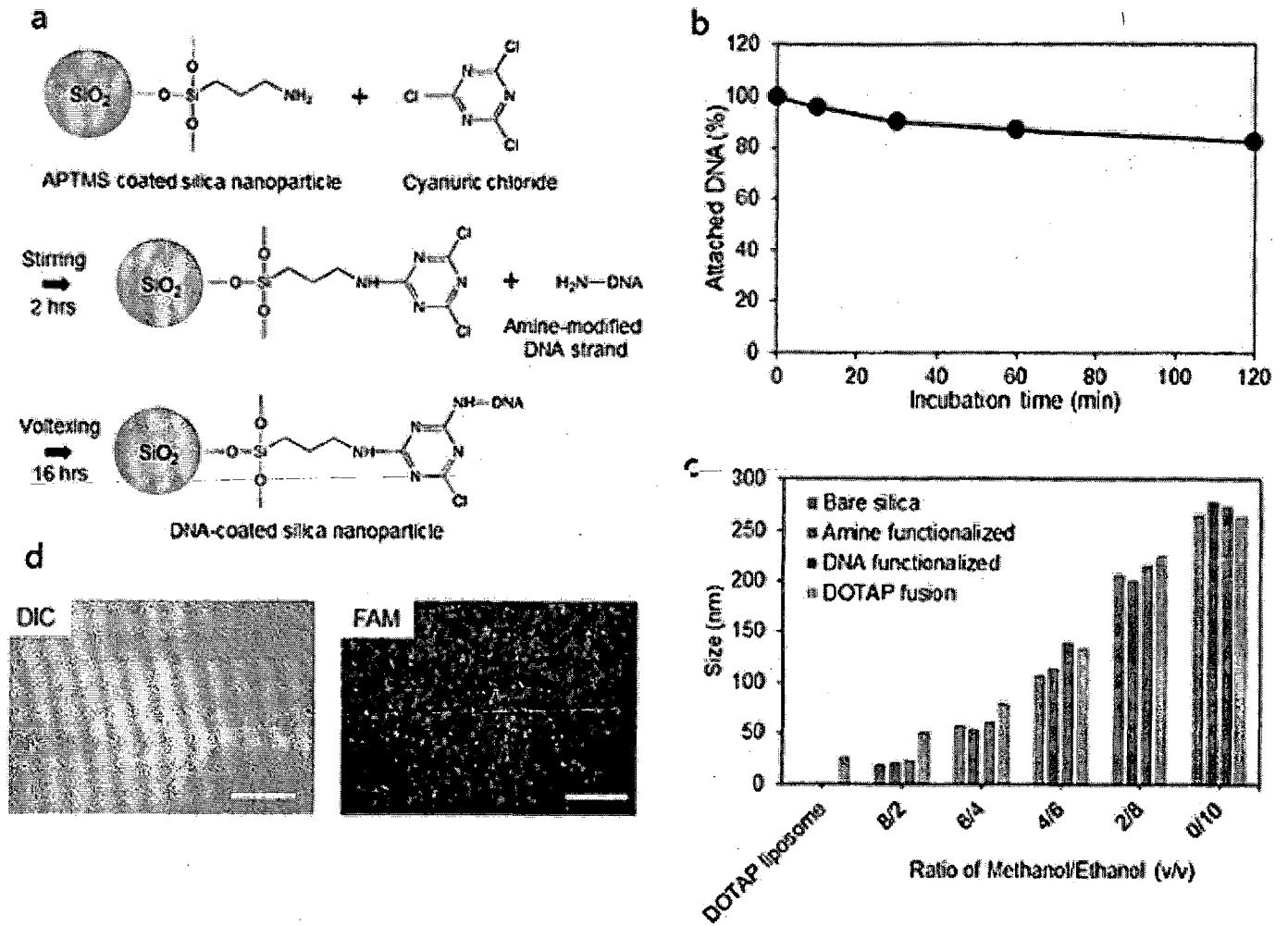
fc2-DNA

afc-DNA

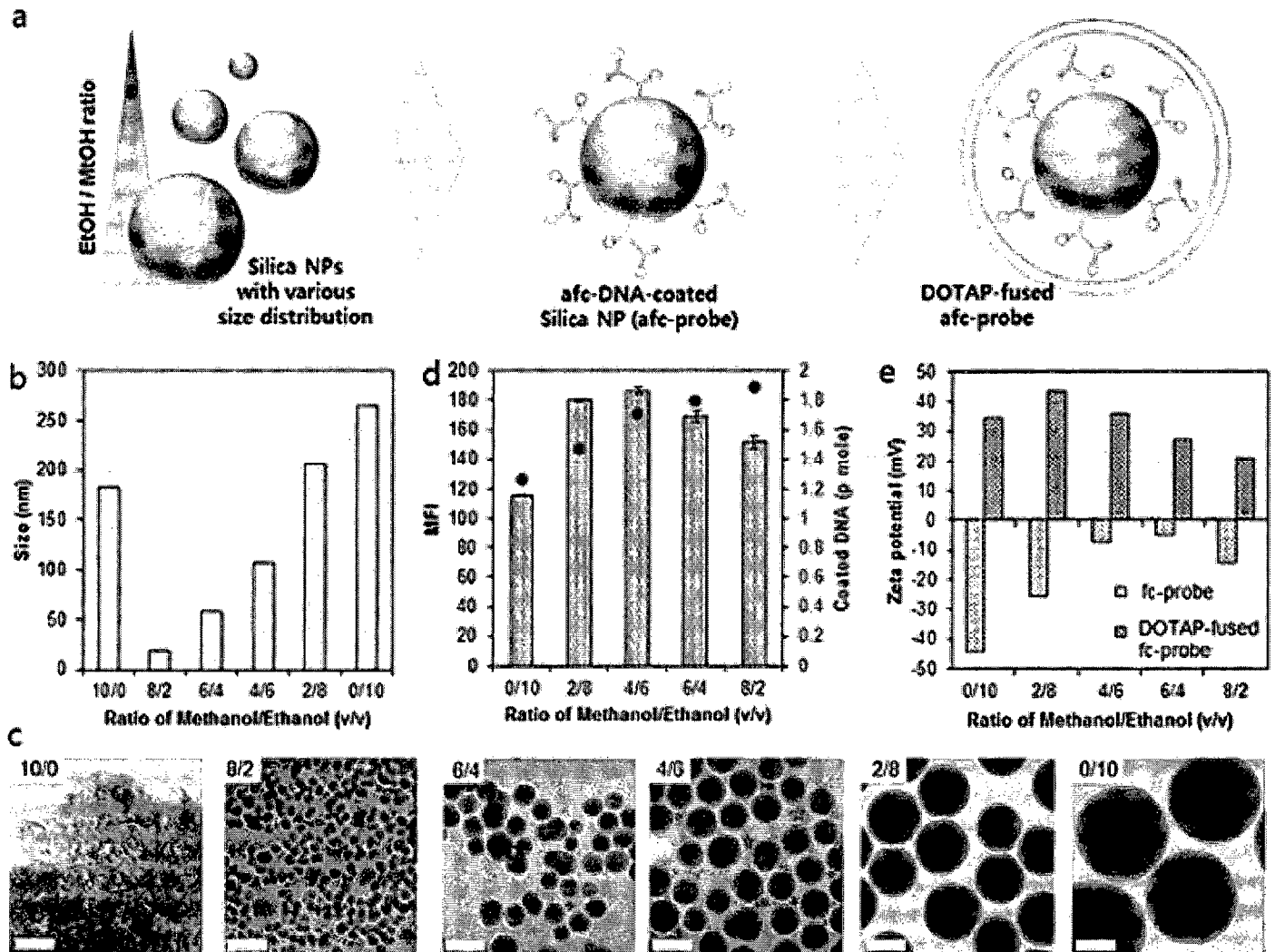
[도 4]



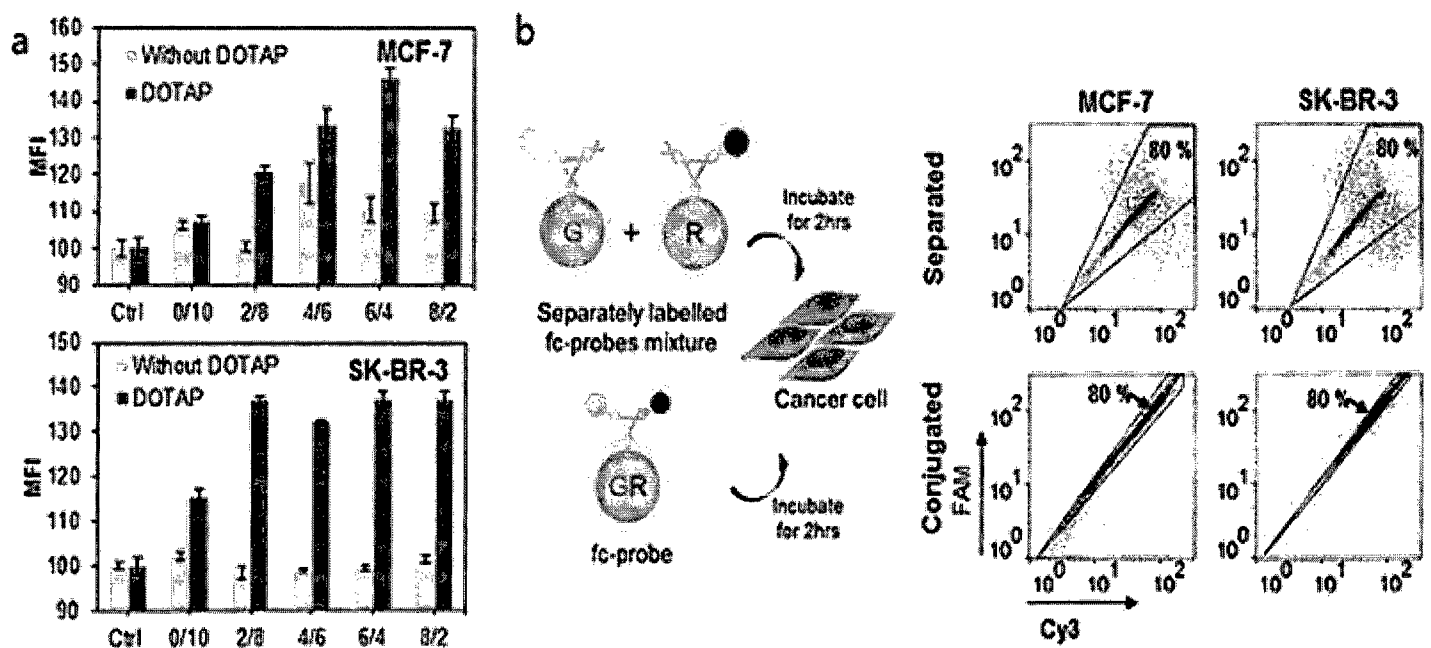
[도5]



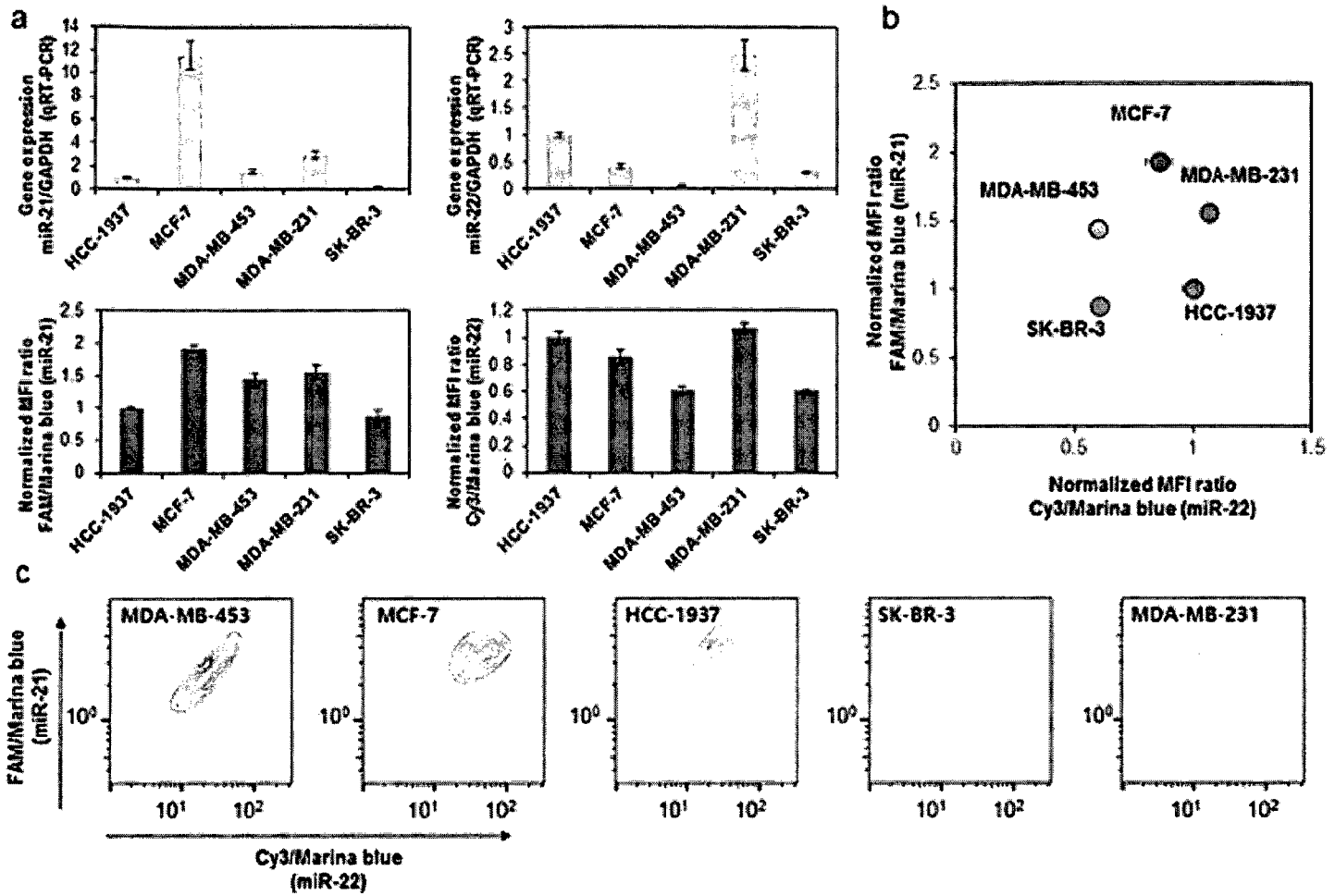
[도 6]



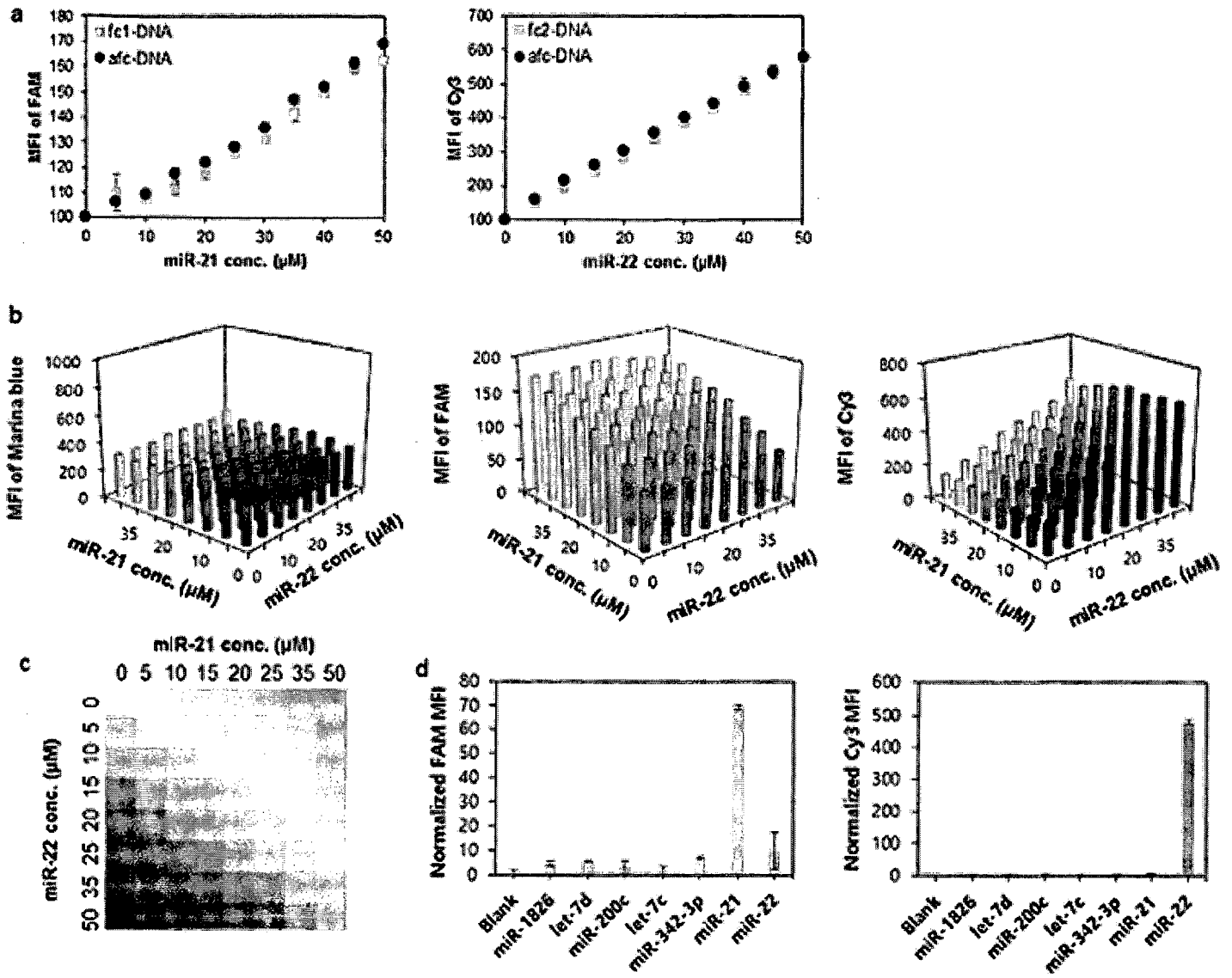
[도 7]



[도8]



[도 9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/002064

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/6818(2018.01)i, A61K 49/00(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 1/6818; C12N 5/09; G01N 33/52; A61K 9/127; C12N 15/10; C12Q 1/68; A61K 47/48; A61K 49/00

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

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

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

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

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: ring-type end, nucleic acid structure, silica sphere, liposome, multi-ribonucleic acid marker, phosphor, quencher, DOTAP, cholesterol

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2017-0017103 A (RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY) 15 February 2017 See paragraphs [0038]-[0046], [0081]-[0114]; examples 1-4; table 1; claims 1-21; figure 10a.	1-27
Y	KR 10-1464100 B1 (RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY) 21 November 2014 See examples 1-2; table 1; claims 1-21; figures 1-2.	1-27
A	KR 10-2016-0071925 A (CATHOLIC KWANDONG UNIVERSITY INDUSTRY FOUNDATION) 22 June 2016 See the entire document.	1-27
A	US 2013-0171646 A1 (PARK, So Jung et al.) 04 July 2013 See the entire document.	1-27
A	KR 10-2011-0120749 A (COLLEGE OF MEDICINE POCHON CHA UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 04 November 2011 See the entire document.	1-27



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

04 JUNE 2018 (04.06.2018)

Date of mailing of the international search report

04 JUNE 2018 (04.06.2018)

Name and mailing address of the ISA/KR

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

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

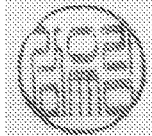
Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/002064

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2017-0017103 A	15/02/2017	KR 10-1726063 B1	26/04/2017
KR 10-1464100 B1	21/11/2014	US 2015-0211056 A1	30/07/2015
KR 10-2016-0071925 A	22/06/2016	KR 10-1667118 B1	17/10/2016
US 2013-0171646 A1	04/07/2013	US 9121065 B2	01/09/2015
		WO 2012-021516 A2	16/02/2012
		WO 2012-021516 A3	10/04/2014
KR 10-2011-0120749 A	04/11/2011	KR 10-1467938 B1	15/12/2014

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12Q 1/6818(2018.01)i, A61K 49/00(2006.01)i																				
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12Q 1/6818; C12N 5/09; G01N 33/52; A61K 9/127; C12N 15/10; C12Q 1/68; A61K 47/48; A61K 49/00 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 고리형 말단, 핵산구조체, 실리카 구형체, 리포솜, 다중 리보핵산 마커, 형광체, 소광제, DOTAP, 콜레스테롤																				
C. 관련 문헌 <table border="1"> <thead> <tr> <th>카테고리*</th> <th>인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th>관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>KR 10-2017-0017103 A (성균관대학교산학협력단) 2017.02.15 단락 [0038]-[0046], [0081]-[0114]; 실시예 1-4; 표 1; 청구항 1-21; 도 10a 참조.</td> <td>1-27</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>KR 10-1464100 B1 (성균관대학교산학협력단) 2014.11.21 실시예 1-2; 표 1; 청구항 1-21; 도 1-2 참조.</td> <td>1-27</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-2016-0071925 A (가톨릭관동대학교산학협력단) 2016.06.22 전체 문헌 참조.</td> <td>1-27</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2013-0171646 A1 (PARK, SO JUNG 등) 2013.07.04 전체 문헌 참조.</td> <td>1-27</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-2011-0120749 A (차의과학대학교 산학협력단) 2011.11.04 전체 문헌 참조.</td> <td>1-27</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	Y	KR 10-2017-0017103 A (성균관대학교산학협력단) 2017.02.15 단락 [0038]-[0046], [0081]-[0114]; 실시예 1-4; 표 1; 청구항 1-21; 도 10a 참조.	1-27	Y	KR 10-1464100 B1 (성균관대학교산학협력단) 2014.11.21 실시예 1-2; 표 1; 청구항 1-21; 도 1-2 참조.	1-27	A	KR 10-2016-0071925 A (가톨릭관동대학교산학협력단) 2016.06.22 전체 문헌 참조.	1-27	A	US 2013-0171646 A1 (PARK, SO JUNG 등) 2013.07.04 전체 문헌 참조.	1-27	A	KR 10-2011-0120749 A (차의과학대학교 산학협력단) 2011.11.04 전체 문헌 참조.	1-27
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항																		
Y	KR 10-2017-0017103 A (성균관대학교산학협력단) 2017.02.15 단락 [0038]-[0046], [0081]-[0114]; 실시예 1-4; 표 1; 청구항 1-21; 도 10a 참조.	1-27																		
Y	KR 10-1464100 B1 (성균관대학교산학협력단) 2014.11.21 실시예 1-2; 표 1; 청구항 1-21; 도 1-2 참조.	1-27																		
A	KR 10-2016-0071925 A (가톨릭관동대학교산학협력단) 2016.06.22 전체 문헌 참조.	1-27																		
A	US 2013-0171646 A1 (PARK, SO JUNG 등) 2013.07.04 전체 문헌 참조.	1-27																		
A	KR 10-2011-0120749 A (차의과학대학교 산학협력단) 2011.11.04 전체 문헌 참조.	1-27																		
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.																				
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌																				
국제조사의 실제 완료일 2018년 06월 04일 (04.06.2018)		국제조사보고서 발송일 2018년 06월 04일 (04.06.2018)																		
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 감유림 전화번호 +82-42-481-3516 																		

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2018/002064

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2017-0017103 A	2017/02/15	KR 10-1726063 B1	2017/04/26
KR 10-1464100 B1	2014/11/21	US 2015-0211056 A1	2015/07/30
KR 10-2016-0071925 A	2016/06/22	KR 10-1667118 B1	2016/10/17
US 2013-0171646 A1	2013/07/04	US 9121065 B2	2015/09/01
		WO 2012-021516 A2	2012/02/16
		WO 2012-021516 A3	2014/04/10
KR 10-2011-0120749 A	2011/11/04	KR 10-1467938 B1	2014/12/15