

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 11월 10일 (10.11.2016)



(10) 국제공개번호
WO 2016/178532 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 15/85 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01)
C12N 5/078 (2010.01) A61K 47/48 (2006.01)
C12N 5/09 (2010.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/004750
- (22) 국제출원일: 2016년 5월 4일 (04.05.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0062604 2015년 5월 4일 (04.05.2015) KR
10-2015-0120934 2015년 8월 27일 (27.08.2015) KR
- (71) 출원인: 한국과학기술원 (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 34141 대전시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 최철희 (CHOI, Chulhee); 34112 대전시 유성구 대덕대로 617, 101 동 304 호, Daejeon (KR). 임남빈 (YIM, Nambin); 34141 대전시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR). 허원도 (HEO, Won Do); 34125 대전시 유성구 엑스포로 123 번 65-38 201 동 2801 호, Daejeon (KR). 류승욱 (RYU, Seung-Wook); 34907 대전시 중구 계룡

로 852, 26 동 102 호, Daejeon (KR). 최호준 (CHOI, Ho-jun); 34141 대전시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR). 최경선 (CHOI, Kyungsun); 34075 대전시 유성구 지족동로 124 105 동 2501 호, Daejeon (KR).

(74) 대리인: 이원희 (LEE, Won Hee); 06132 서울시 강남구 테헤란로 147 성지하이츠 2 차 8 층, Seoul (KR).

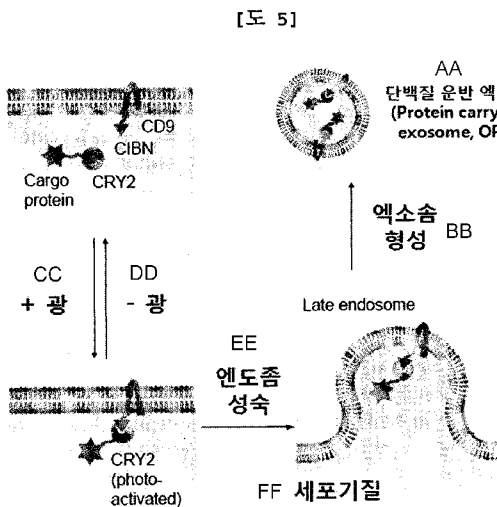
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA,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

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

[다음 쪽 계속]

(54) Title: PRODUCTION METHOD FOR EXOSOME COMPRISING TARGET PROTEIN, AND METHOD FOR TRANSFERRING TARGET PROTEIN INTO CYTOPLASM BY USING EXOSOME PRODUCED BY MEANS OF THE PRODUCTION METHOD

(54) 발명의 명칭 : 목적 단백질을 포함하는 엑소솜의 제조 방법 및 상기 제조 방법에 의해 제조된 엑소솜을 이용하여 목적 단백질을 세포질로 전달시키는 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a method for producing a large volume of an exosome comprising a target protein, to an exosome-producing vector that can be used in the exosome production, to an exosome comprising a target protein produced by means of the method, and to a method for transferring the target protein into cytoplasm by using the exosome which is produced. When using the production method for an exosome comprising the target protein provided by the present invention, the exosome comprising the target protein can be produced in high yield, and thus the present invention can be widely used in disease treatment using the exosome.

(57) 요약서: 본 발명은 목적 단백질을 포함하는 엑소솜을 대량으로 제조하는 방법, 상기 엑소솜 제조에 사용될 수 있는 엑소솜 제조용 벡터, 상기 방법으로 제조된 목적 단백질을 포함하는 엑소솜 및 제조된 엑소솜을 이용하여 목적 단백질을 세포질로 전달시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명에서 제공하는 목적 단백질을 포함하는 엑소솜의 제조방법을 이용하면, 목적 단백질을 포함하는 엑소솜을 높은 수율로 제조할 수 있으므로, 상기 엑소솜을 이용한 질환의 치료에 널리 활용될 수 있을 것이다.

- AA ... Protein carrying exosome (OPE)
- BB ... Exosome formation
- CC ... + light
- DD ... - light
- EE ... Endosome maturation
- FF ... Cell substrate

WO 2016/178532 A1

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

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

【명세서】

【발명의 명칭】

목적 단백질을 포함하는 엑소솜의 제조 방법 및 상기 제조 방법에 의해 제조된 엑소솜을 이용하여 목적 단백질을 세포질로 전달시키는 방법

【기술분야】

본 발명은 광특이적 결합 단백질을 이용하여 목적 단백질을 포함하는 엑소솜의 제조방법, 및 상기 제조 방법에 의해 제조된 엑소솜을 이용하여 목적 단백질을 세포질로 전달시키는 방법에 관한 것이다.

【발명의 배경이 되는 기술】

인체는 대략 200여 종류 100조개의 세포로 이루어져 있고, 세포 내에서 다양한 단백질의 작용에 의해 생리 활성이 조절되어 생명을 유지하고 있다.

세포는 인지질로 구성된 이중막 구조의 세포막으로 둘러 싸여져 있으며, 세포막은 이물질의 세포 내로의 유입을 막고 있다. 지금까지 개발된 단백질 치료제들 역시 대부분 세포막을 통과하여 세포질 내로 들어가지 못하고, 세포 외부에서 작용하거나 혹은 세포막에 있는 수용체(receptor)에 작용하여 세포 내로 신호를 전달하는 방법으로 생리 효과를 나타내고 있다.

세포질에는 수 많은 단백질들이 존재하고, 이들은 서로 작용하여 생리활성을 조절하고 있는 바, 단백질 치료제를 직접 세포 안으로 즉, 세포질로 넣을 수 있다면, 세포의 활성을 좀 더 효과적으로 제어할 수 있을 것이다.

최근 목적 단백질을 세포막을 통과하여 세포 내로 직접 유입시키는 방법에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 세포막을 통과하는 펩타이드인 세포막 통과 도메인(Protein Transduction Domains, PTDs)과 목적 단백질의 재조합 단백질(recombinant protein)을 만들어 투여하면, 세포막을 통과하여 세포질 내로 들어갈 수 있다(도 1). 세포막 통과 도메인(PTD)에는 HIV-1 TAT, HSV VP22, Antp, dfTAT, Hph-1 등이 있으며, 이들과 목적 단백질을 결합시킨 융합 단백질은 재조합 단백질 형태로 생산하고 분리하는 과정이 필요하며, 이 과정에 단백질의 재접힘(refolding)이 제대로 되지 않아, 활성이 떨어지며, 단백질이 비특이적으로

전달되고, 생체 내에서는 면역 반응을 일으킬 위험이 크며, 비용이 많이 들고, 수율이 낮은 문제점이 있다.

다양한 나노 입자(nanoparticle)와 결합된 목적 단백질은 식작용(Endocytosis)에 의해 세포막을 통과하여 세포질로 들어 갈 수 있다(도 2). 나노 입자에는 Gold NP, Liposome NP, Magnetic NP, Polymeric NP 등이 있으며, 이들과 목적 단백질의 결합체의 분해는 세포 내에서 대부분 리소좀(lysosome)에서 발생하여 목적 단백질이 리소좀 내부에서 분해되어 활성을 잃어버리거나, 세포질에서 목적 단백질과 나노 입자가 따로 분리되기가 어렵고, 나노 입자의 독성이 문제가 될 수 있다.

엑소솜(Exosome)은 세포 간 신호전달을 하기 위하여, 단백질, DNA, RNA 등을 가지고 세포 밖으로 분비되어지는 50 - 200 nm 크기의 막구조의 작은 소낭을 가리킨다.

엑소솜은 원래 적혈구가 성숙되어지는 마지막 단계에서 세포 내 단백질을 배출하여 제거함으로써 적혈구 내에 헤모글로빈만 남기는 과정에서 발견된 것으로서, 이러한 엑소솜은 전자 현미경을 통한 연구에서 원형질막(plasma membrane)으로부터 직접 떨어져 나가는 것이 아니라, 다낭체(Multivesicular bodies, MVBs)라고 불리는 세포 내 특정 구획에서 기원하여 세포 밖으로 방출, 분비되는 것으로 관찰되었다. 즉, 다낭체와 원형질막의 융합이 일어나면, 그러한 소낭들은 세포 밖 환경으로 방출되는데, 이것을 엑소솜이라 부른다(도 3).

이러한 엑소솜이 어떤 분자적 기작에 의해 만들어지는지는 확실히 밝혀진 바가 없으나, B-림프구, T-림프구, 수지상세포, 거대핵세포(megakaryocyte), 대식세포 등을 포함한 다양한 종류의 면역 세포들과 줄기세포 및 종양세포 등도 살아 있는 상태에서 엑소솜을 생산하여 분비한다고 알려져 있다.

엑소솜에는 세포 내의 다양한 단백질, DNA, RNA 등이 포함되어 있다. 이러한 엑소솜에 포함되어 세포 밖으로 분비되는 물질들은 세포막과의 융합(fusion) 혹은 내포작용(endocytosis)에 의해 다른 세포 내로 다시 유입되어 세포 간의 통신자로서의 역할을 하기도 한다. 또한, 이러한 엑소솜에 포함되어 세포 밖으로 분비되는 물질들을 분석하여 특정 질환의 진단에 이용될 수 있다.

엑소솜 내에는 여러 종류의 microRNA가 포함되어 있으며, 이것의 존재 유무

및 존재량을 검출하여 질병을 진단하는 방법에 대하여 알려져 있다(KR 10-2010-0127768A 참조). 특히 국제 공개 WO2009-015357A에는 암 유래의 시료(혈액, 타액, 눈물 등)에 존재하는 엑소솜을 검출하여, microRNA의 변화량을 측정하여, 대조군에 비하여 증가 또는 감소할 경우 특정 질환과의 관련성을 예측하고, 진단하는 방법이 개시되어 있다. 특히, 특정 질환(폐질환)을 갖는 환자로부터 얻은 엑소솜을 분석하여, 특정 microRNA와 폐질환과의 관련성에 대하여, 구체적으로 개시하고 있다. 또한, 폐질환 외에도 엑소솜에 포함된 단백질을 이용하여 신장질환을 진단할 수 있는 방법에 대하여도 연구되고 있는 실정이다.

또한, 엑소솜에는 항원을 포함하기도 한다. 한편, 항원제시세포(antigen presenting cell, APC)에서는 다낭체를 포함해 막구조를 가지는 세포 내 구획에서 항원 펩티드가 MHC(major histocompatibility complex) 클래스 II 분자에 선적되기 때문에 이로부터 기원되는 엑소솜도 항원 펩티드-MHC 클래스 II 콤플렉스를 가지고 있다. 따라서, 엑소솜은 면역원(immunogen)의 수송체로서 CD4+ T 림프구에 항원 펩티드를 제시할 수 있고, 그에 따라 T 림프구의 증식과 같은 면역 반응을 유도할 수 있다. 또한, 엑소솜에는 MHC 클래스 I, 열 충격 단백질(HSPs; heat-shock proteins) 등 면역 반응을 자극시킬 수 있는 능력을 가진 분자들이 농축되어 있기 때문에 자가면역 질환(autoimmune disease)이나 종양 치료에 있어서 면역증강 또는 감소의 목적으로 이용될 수 있다.

또한, 상기 목적 단백질이 내부에 포함된 엑소솜은, 생체 내에서 다양한 질환의 치료에 사용될 수 있다. 예를 들어, 목적 단백질로서 항암 효과를 나타내는 단백질이나, siRNA를 포함하는 엑소솜을 제조하고, 이를 암세포에 처리하여 암치료에 사용할 수 있다(도 4).

이와 같이 목적 단백질을 포함하는 엑소솜은 질병의 치료에 사용될 수 있다. 이를 위해서는 목적 단백질을 포함하는 엑소솜을 효율적으로 만들 수 있어야 한다. 한국 공개 특허 제 2004-0015508에는 특정 항원을 포함하는 엑소솜의 제조 방법이 기재되어 있다. 특정 항원에 대한 유전자를 세포주 내에 도입하여 도입된 유전자의 단백질이 세포주 내에서 안정하게 발현되어, 엑소솜을 통하여 세포 밖으로 방출되는 방법과 이러한 엑소솜을 백신(vaccine)으로 사용하는 방법이 개시되어 있다.

그러나, 상기 엑소솜은 세포 내에서 자연적으로 형성되기 때문에, 상기

엑소솜을 생성하는 세포에 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 도입한다 하여도, 발현된 단백질이 내부에 포함된 형태의 엑소솜이 제조될 가능성이 매우 낮다는 문제점이 있다.

이에, 본 발명자들은 목적 단백질이 포함된 엑소솜을 보다 효과적으로 제조하는 방법을 개발하기 위하여 연구 노력한 결과, 엑소솜 특이 마커와 목적 단백질을 융합시킨 융합 단백질을 엑소솜을 대량으로 만들어내는 세포에서 발현시킴으로써, 목적 단백질이 포함된 엑소솜을 효율적으로 제조할 수 있음을 확인하였다(도 5).

또한, 상기 방법은 목적 단백질이 엑소솜의 막에 부착되어 있는 바, 엑소솜 특이 마커와 목적 단백질 각각에 광특이적 결합 단백질 쌍의 각각을 융합시킨 융합 단백질을 엑소솜을 대량으로 만들어내는 세포에서 발현시키고, 빛을 조사하여 각각의 융합 단백질을 결합시키면, 이들 결합 단백질이 엑소솜 특이 마커에 의해 엑소솜 내부로 유입되고, 유입된 후에 빛의 조사가 중단되면 엑소솜 내부에서 목적 단백질과 광특이적 결합 단백질의 융합 단백질이 분리되어 목적 단백질이 내부에 유리(free) 상태로 포함된 엑소솜을 효과적으로 제조할 수 있음을 확인하였다(도 6).

또한, 상기 목적 단백질이 내부에 포함된 엑소솜을 이용하여, 목적 단백질이 타겟 세포의 세포질에 전달되는 것을 확인함으로써, 세포질에서의 세포 내 신호(Intracellular signaling)를 효율적으로 조절하여 질병을 치료할 수 있는 방법을 제시하였다.

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

본 발명의 목적은 엑소솜 특이 마커와 목적 단백질의 융합 단백질을 포함하는 엑소솜의 대량 제조 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 광특이적 결합 단백질 쌍을 이용하여 엑소솜 막에서 분리된 목적 단백질을 포함하는 엑소솜의 대량 제조 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 엑소솜의 제조에 사용될 수 있는 엑소솜 제조용 벡터를 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 엑소솜을 이용하여 세포질로 목적 단백질을

유입시키는 방법에 관한 것이다.

【기술적 해결방법】

본 발명은 목적 단백질을 포함하는 엑소솜을 효율적으로 대량으로 제조하는 방법에 관한 것이다.

본 발명자들은 목적 단백질이 내부에 포함된 엑소솜을 보다 효과적으로 제조하는 방법을 개발하기 위하여 다양한 연구를 수행하던 중, 엑소솜 특이 마커(CD9, CD63, CD81 또는 CD82)에 주목하게 되었다. 상기 엑소솜 특이 마커는 테트라스파닌 패밀리에 속하는 4회 막 관통형의 막 단백질이라는 공통점을 갖고 있으므로, 상기 엑소솜의 막단백질에 목적 단백질을 결합시킬 경우, 비교적 용이하게 엑소솜 내부에 포함될 수 있을 것으로 예측하였다.

이와 같이 엑소솜 막에 특이적으로 많이 존재하고 세포막을 관통하는 엑소솜 특이 마커와 목적 단백질의 융합 단백질을 엑소솜을 대량으로 만드는 세포에서 발현시키면 목적 단백질이 포함된 엑소솜을 대량으로 만들 수 있다.

구체적으로, 본 발명의 목적 단백질을 포함하는 엑소솜의 제조 방법은 엑소솜 생산 세포에서 엑소솜 특이 마커와 목적 단백질이 결합된 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 도입하여 발현시키는 것을 특징으로 한다.

이 때 생성된 엑소솜에는 목적 단백질이 엑소솜막에 박혀 있는 엑소솜 특이 마커와 융합되어 있다.

상기 목적 단백질은 상기 엑소솜의 막단백질에 결합되어 있는 상태로서, 표적세포에 도달한 후에도 분리되지 아니한다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여, 다양한 연구를 수행한 결과, 광특이적 결합 단백질을 사용하여, 일시적으로 목적 단백질을 상기 마커 단백질과 결합시켜서, 상기 목적 단백질이 내부에 포함된 엑소솜을 제조하는 기술을 개발하였다. 예를 들어, 광특이적 결합 단백질인 CIBN과 CRY2를 이용할 수 있는데, 구체적으로, 상기 CIBN은 상기 마커 단백질의 하나인 CD9과 융합된 형태로 발현되도록 하고, 상기 CRY2는 목적 단백질과 융합된 형태로 발현되도록 이들 융합 단백질을 코딩하는 유전자를 엑소솜 생산 세포에 도입하였다. 상기 엑소솜 생산세포에서 발현된 CIBN-CD9 융합 단백질은 CD9으로 인하여 엑소솜에 포함되는데, 이때, 상기 세포에 푸른 빛 LED 조명을 조사하면,

상기 엑소솜 생산세포에서 발현된 목적단백질-CRY2 융합 단백질의 CRY2 도메인이 CD9에 융합된 CIBN 도메인에 결합되므로, 목적단백질-CRY2-CIBN-CD9 형태의 가역적으로 유도된 융합 단백질이 형성되고, 이와 같은 융합 단백질은 CD9으로 인하여 엑소솜 내부에 포함된다. 이처럼 목적단백질이 내부에 포함된 엑소솜이 생산된 후, 상기 푸른 빛 LED 조명을 더 이상 조사하지 않으면, CIBN-CRY2 결합이 해제되어, 목적단백질이 엑소솜의 세포막에 결합되지 않은 상태로 엑소솜 내부에 포함되게 되므로, 결과적으로는 목적 단백질을 포함하는 엑소솜을 제조할 수 있다(도 5 내지 도 10).

이같이 제조된 엑소솜은 종래의 표적 물질을 포함하는 엑소솜과는 전혀 다른 효과를 나타낼 수 있다. 종래의 엑소솜은 목적 단백질을 엑소솜 내부에 포집시키기 위하여, 엑소솜 특이 마커에 융합시킨 형태로 발현시켰으므로, 상기 목적 단백질이 엑소솜 내부에 포집되기는 하였으나, 엑소솜막에 부착되어 있는 상태로 있으므로 엑소솜막으로부터 분리되지 못하므로, 상기 엑소솜이 표적 세포의 세포막에 융합되는 경우에만, 상기 목적 단백질이 표적 세포로 전달될 수 있고, 이처럼 표적 세포에 융합된 후에도, 엑소솜막에 융합된 엑소솜에 결합된 형태로 존재하기 때문에, 상기 목적 단백질이 표적 세포내에서 그의 효과를 나타낼 확률이 매우 낮다는 한계가 있었다. 그러나, 본 발명에서 제공하는 엑소솜은 엑소솜 내부에 목적 단백질이 막에 결합되지 않은 상태로 포집되어 있으므로, 상기 엑소솜이 표적 세포에 의하여 endocytosis되어 세포질로 들어갔을 때, 엑소솜막에 부착되어 있는 것이 아니므로 엑소솜이 분해되는 경우, 목적 단백질이 표적 세포의 세포질로 전달될 수 있으며, 표적 세포의 세포질 내에서 자유롭게 이동이 가능하므로, 목적 단백질이 표적 세포질에서 생리 활성을 충분히 나타낼 수 있다는 장점이 있다(도 11).

뿐만 아니라, 광조사시 조사되는 광의 세기에 따라서, 마커 단백질에 결합되는 목적 단백질의 결합수준이 변화되므로, 상기 광의 세기를 조절할 경우, 엑소솜내에 포집되는 목적 단백질의 함량을 조절할 수 있다는 장점이 있다.

따라서, 광특이적 결합 단백질을 사용하여 목적 단백질을 포함하는 엑소솜을 제조하는 방법은 지금까지 전혀 알려져 있지 않으며, 본 발명자에 의하여 최초로 개발되었다.

구체적으로, 본 발명의 목적 단백질을 포함하는 엑소솜의 제조방법은 (a) 엑소솜 생산 세포에, 엑소솜 특이 마커와 제1 광특이적 결합 단백질이 결합된 형태의 융합 단백질(제1 융합 단백질)을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 상기 제1 광특이적 결합 단백질과 결합할 수 있는 제2 광특이적 결합 단백질과 목적 단백질이 결합된 형태의 융합 단백질(제2 융합 단백질)을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 도입하는 단계; (b) 상기 엑소솜 생산 세포에 상기 제1 광특이적 결합 단백질과 상기 제2 광특이적 결합 단백질의 결합을 유발할 수 있는 광을 조사하는 단계; 및 (c) 상기 엑소솜 생산 세포에서 엑소솜이 생산된 다음, 상기 광의 조사를 중지하는 단계를 포함한다.

본 발명의 용어 "엑소솜(exosome)"이란, 다낭체(multivesicular bodies, MVBs)라고 불리는 세포 내 특정 구획에서 기원하여 세포 밖으로 방출 또는 분비되는 원형질막 구조의 작은 소낭을 의미한다.

본 발명에 있어서, 상기 엑소솜은 목적 단백질을 내부에 포함하여 목적 단백질의 표적 세포 또는 조직으로 목적 단백질을 운반하는 운반체로서 역할을 수행할 수 있는데, 상기 엑소솜에 의하여 운반된 목적 단백질은 표적 세포 또는 조직에 작용하여 특정 질환을 치료하거나 또는 특정 질환을 진단하는데 사용될 수 있다.

본 발명의 용어 "엑소솜 생산 세포"란, 상기 엑소솜을 생산할 수 있는 세포를 의미한다.

본 발명에 있어서, 상기 엑소솜 생산 세포는 특별히 이에 제한되지 않으나 한 가지 예로서, B-림프구, T-림프구, 수지상세포, 거대핵세포(megakaryocyte), 대식세포, 줄기세포 및 종양 세포 등이 될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 실시예에서는 상기 엑소솜 생산 세포로서 불멸화세포주(immortalized cell line)의 일종인 HEK293T 세포를 사용하였다.

본 발명의 용어 "엑소솜 특이 마커"란, 엑소솜의 막에 풍부하게 존재하는 단백질을 의미한다.

본 발명에 있어서, 상기 엑소솜 특이 마커는 특별히 이에 제한되지 않으나,

한 가지 예로서, CD9, CD63, CD81, CD82 등이 될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 실시예에서는 엑소솜 특이 마커로서 CD9을 사용하였다. CD9, CD63, CD81, CD82는 4회 관통형 막단백질로써, 엑소솜의 막단백질에 목적 단백질을 결합시킬 경우 용이하게 목적 단백질을 엑소솜 내부에 존재하게 한다.

본 발명의 용어 "광특이적 결합 단백질"이란, 광유도 이형이합체 형성 단백질 또는 광유도 동형이합체 형성단백질이라고도 하는데, 특정 파장의 광이 조사될 경우, 서로 상이한 단백질과 결합하여 이형이합체를 형성할 수 있는 단백질 또는 서로 동일한 종류의 다른 단백질과 결합하여 동형이합체를 형성할 수 있는 단백질을 의미한다.

본 발명에 있어서, 상기 광특이적 결합 단백질은 특별히 이에 제한되지 않으나, 한 가지 예로서, 광유도 이형이합체 형성 단백질이 될 수 있고, 다른 예로서, CIB(cryptochrome-interacting basic-helix-loop-helix protein), CIBN(N-terminal domain of CIB), PhyB(phytochrome B), PIF(phytochrome interacting factor), FKF1(Flavinbinding, Kelch repeat, F-box 1), GIGANTEA, CRY(chrytochrome), PHR(phytolylase homologous region) 등이 될 수 있다.

특히, 이형이합체를 형성하는 경우, 두 가지 광특이적 결합 단백질(제1 광특이적 결합 단백질 및 제2 광특이적 결합 단백질)이 사용될 수 있는데, 상기 제1 광특이적 결합 단백질이 CIB 또는 CIBN인 경우, 이에 대한 제2 광특이적 결합 단백질은 CRY 또는 PHR이 될 수 있고, 상기 제1 광특이적 결합 단백질이 PhyB인 경우, 이에 대한 제2 광특이적 결합 단백질은 PIF가 될 수 있으며, 상기 제1 광특이적 결합 단백질이 GIGANTEA인 경우, 이에 대한 제2 광특이적 결합 단백질은 FKF1가 될 수 있다.

예를 들어, 본 발명의 실시예에서는 제1 광특이적 결합 단백질로서 CIBN을 사용하고, 제2 광특이적 결합 단백질로서 CRY2를 사용하였으며, 사용된 빛의 파장은 청색광을 나타내는 460 내지 490nm로 설정하고, 상기 빛의 세기는 20 내지 50 μ W로 설정하였다.

한편, 엑소솜 특이 마커와 제1 광특이적 결합 단백질이 결합된 제1 융합 단백질의 발현여부 및 세포 내 위치를 확인하기 위하여, 마커 단백질을 함께 융합시킬 수도 있다. 예를 들어, 본 발명의 실시예에서는 CIBN과 CD9, 또는 GIGANTEA와 CD9이 결합된 제1 융합 단백질에 형광단백질인 EGFP가 삽입된 형태로

발현시킴으로써, 상기 제1 융합 단백질의 발현여부, 발현수준 및 세포 내 위치를 확인하고자 하였다.

본 발명의 용어 "목적 단백질"이란, 상기 엑소솜의 내부에 포함되도록 상기 제2 광특이적 결합 단백질과 융합된 형태로 발현되는 단백질을 의미한다.

본 발명에 있어서, 상기 목적 단백질은 세포 내에서 발현되어 엑소솜을 통해 운반될 수 있는 것으로서 특별히 제한되지 않으나, 한 가지 예로서 질환 치료용 단백질, 질환 진단용 단백질 등이 될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 실시예에서는 상기 목적 단백질로서 형광을 띄는 mCherry를 사용하였다.

본 발명의 용어 "배양"이란, 세포 혹은 미생물을 적당히 인공적으로 조절된 환경조건에서 생육시키는 방법을 의미한다.

본 발명에 있어서, 형질전환체를 1 내지 3일간 배양한 후, 소태아혈청이 포함되지 아니한 배지로 교체하고 2 내지 5일간 추가로 배양한다.

본 발명에 있어서, 상기 형질전환체를 배양하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다.

상기 배지는 동물세포 배양 시 사용되는 공지된 배지를 의미하고, 시판중인 무혈청 배지(serum free media), 무단백 배지(protein free media) 및 화학 정의 배지(chemically defined media) 등의 그룹 중에서 선택될 수 있다.

상기 무혈청 배지는 동물 세포를 배양하는데 사용되는 소혈청 성분이 제거된 배지로 SFM4CHO(HyClone), EX-Cell(JHR Bioscience) 등이 바람직하고, 인슐린형 성장인자 I(Insulin like growth factor I, IGF-I), 에탄올아민(Ethanolamine), 페릭 클로라이드(Ferric chloride), 및 포스파티딜콜린(Phosphatidyl choline) 등이 첨가될 수 있으나 이에 한정하지 않는다.

상기 무단백 배지는 소혈청 성분이 제거된 무혈청 배지에서 동물 유래 단백질, 특히, 분자량 10kDa 이상인 고분자 단백질이 제거된 동물세포 배양 배지로서, ProCHO(Lonza) 및 PF-CHO(HyClone) 등이 선택될 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.

상기 화학 정의 배지는 동물 유래의 성분이 없고, 배지를 구성하는 모든 구성 성분이 공지된 화학적 구조를 가진 동물 세포 배양용 배지로서,

CDM4CHO(HyClone), PowerCHO2CD(Lonza), 및 CD-optiCHO(Life Technologies) 등이 선택 될 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.

본 발명의 용어 "제1 융합 단백질"이란, 상기 엑소솜 특이 마커와 상기 제1 광특이적 결합 단백질이 결합된 형태의 융합 단백질을 의미한다.

본 발명에 있어서, 상기 제1 융합 단백질에 포함된 엑소솜 특이 마커와 제1 광특이적 결합 단백질의 배열순서는 상기 제1 융합 단백질이 엑소솜 생산 세포에서 엑소솜의 내부방향으로 상기 제1 광특이적 결합 단백질이 위치하도록 발현될 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 한 가지 예로서 엑소솜 특이 마커의 C-말단에 제1 광특이적 결합 단백질의 N-말단이 결합된 형태로 구성될 수 있다.

또한, 상기 제1 융합 단백질을 구성하는 엑소솜 특이 마커와 제1 광특이적 결합 단백질은 상호 직접적으로 연결될 수도 있고, 링커를 통해 연결될 수도 있다. 상기 링커는 제1 융합 단백질이 엑소솜 생산 세포에서 엑소솜의 내부방향으로 상기 제1 광특이적 결합 단백질이 위치하도록 발현될 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 아미노산으로 구성된 펩타이드 링커를 사용할 수 있고, 보다 바람직하게는 잘 구부러지는(flexible) 펩타이드 링커를 사용할 수 있다. 상기 펩타이드 링커는 상기 링커를 코딩하는 핵산을 각 도메인을 코딩하는 핵산 사이에 인프레임(in frame)으로 연결하여 발현벡터 내에 작동 가능하게 연결하여 발현시킬 수 있다.

본 발명의 용어 "제2 융합 단백질"이란, 상기 제2 광특이적 결합 단백질과 상기 목적 단백질이 결합된 형태의 융합 단백질을 의미한다.

본 발명에 있어서, 상기 제2 융합 단백질에 포함된 제2 광특이적 결합 단백질과 목적 단백질의 배열순서는, 상기 제2 융합 단백질이 엑소솜 생산 세포에서 상기 제1 융합 단백질의 제1 광특이적 결합 단백질 부위와 결합하여 엑소솜 내부에 위치할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 한 가지 예로서 제2 광특이적 결합 단백질의 C-말단에 목적 단백질의 N-말단이 결합된 형태로 구성될 수 있다.

또한, 상기 제2 융합 단백질을 구성하는 제2 광특이적 결합 단백질과 목적 단백질은 상호 직접적으로 연결될 수도 있고, 링커를 통해 연결될 수도 있다.

상기 링커는 제2 융합 단백질이 엑소솜 생산 세포에서 상기 제1 융합 단백질의 제1 광특이적 결합 단백질 부위와 결합하여 엑소솜 내부에 위치할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 아미노산으로 구성된 펩타이드 링커를 사용할 수 있고, 보다 바람직하게는 잘 구부러지는(flexible) 펩타이드 링커를 사용할 수 있다. 상기 펩타이드 링커는 상기 링커를 코딩하는 핵산을 각 도메인을 코딩하는 핵산 사이에 인프레임(in frame)으로 연결하여 발현벡터 내에 작동 가능하게 연결하여 발현시킬 수 있다.

아울러, 상기 각 융합 단백질은 이에 포함되는 각 도메인의 야생형의 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 상이한 서열을 가지는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 폴리펩티드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다. 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다. 또한, 아미노산 서열상의 변이 또는 수식에 의해서 단백질의 열, pH등에 대한 구조적 안정성이 증가하거나 단백질 활성이 증가한 단백질을 포함할 수 있다.

끝으로, 상기 융합 단백질 또는 상기 융합 단백질을 구성하는 각 도메인의 폴리펩티드는 당해 분야에 공지된 화학적 펩티드 합성방법으로 제조하거나, 상기 도메인을 코딩하는 유전자를 PCR(polymerase chain reaction)에 의해 증폭하거나 공지된 방법으로 합성한 후 발현벡터에 클로닝하여 발현시켜서 제조할 수 있다.

한편, 상기 각 융합 단백질은 이들을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 엑소솜 생산 세포에 도입함으로써, 상기 엑소솜 생산 세포에서 발현될 수 있는데, 상기 폴리뉴클레오티드를 엑소솜 생산 세포에 도입하는 방법으로는 당업자에게 공지된 방법을 사용할 수 있는데, 예를 들어, 발현벡터를 사용하여 도입하는 방법을 사용할 수 있다.

본 발명의 용어 "발현벡터"란, 목적하는 숙주세포에서 목적 펩타이드를 발현할 수 있는 재조합 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 제작물을 의미한다. 상기 발현벡터는

개시코돈, 종결코돈, 프로모터, 오퍼레이터 등의 발현조절 요소들을 포함하는데, 상기 개시코돈 및 종결코돈은 일반적으로 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 일부로 간주되며, 유전자 제작물이 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을 나타내야 하며 코딩 서열과 인프레임(in frame)에 있어야 한다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다.

본 발명의 용어 "작동가능하게 연결(operably linked)"이란, 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결(functional linkage)되어 있는 상태를 의미다. 예를 들어 프로모터와 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 작동가능하게 연결되어 코딩서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 발현벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용할 수 있다.

또한, 상기 발현벡터는 세포 배양액으로부터 단백질의 분리를 촉진하기 위하여 융합 폴리펩타이드의 배출을 위한 시그널 서열을 포함할 수 있다. 특이적인 개시 시그널은 또한 삽입된 핵산 서열의 효율적인 번역에 필요할 수도 있다. 이들 시그널은 ATG 개시코돈 및 인접한 서열들을 포함한다. 어떤 경우에는, ATG 개시 코돈을 포함할 수 있는 외인성 번역 조절 시그널이 제공되어야 한다. 이들 외인성 번역 조절 시그널들 및 개시코돈들은 다양한 천연 및 합성 공급원일 수 있다. 발현 효율은 적당한 전사 또는 번역 강화 인자의 도입에 의하여 증가될 수 있다.

본 발명의 바람직한 실시양태에 의하면, 상기 발현벡터는 목적 단백질이 엑소솜의 내부에 삽입되었는지의 여부를 확인할 수 있는 태그를 상기 목적 단백질에 결합시켜서 발현시킬 수 있다. 상기 태그는 목적 단백질의 존재 여부를 확인하기 위한 것이므로, 목적 단백질이 제2 광특이적 결합 단백질과 결합된 반대부위에 결합시킬 수 있는데, 한 가지 예로서, 적색형광단백질, 녹색형광단백질 등의 형광단백질을 태그로 사용하여, 목적 단백질의 C-말단 부위에 결합시킬 수 있다.

이 같이 설계된 목적 단백질을 엑소솜 생산 세포에서 발현시키고, 엑소솜이

생산된 후, 상기 형광단백질 태그가 엑소솜에서 검출되는지의 여부를 확인함으로써, 상기 엑소솜이 목적 단백질을 포함하는지의 여부를 확인할 수 있다.

본 발명의 용어 "광(light)"이란, 엑소솜 생산 세포에서 발현된 제1 광특이적 결합 단백질과 제2 광특이적 결합 단백질을 임시적으로 결합시키기 위하여 조사하는 빛을 의미한다.

상술한 바와 같이, 엑소솜 생산 세포 내에서 제1 광특이적 결합 단백질은 엑소솜 특이 마커와 함께 제1 융합 단백질 형태로 발현되고, 제2 광특이적 결합 단백질은 목적 단백질과 함께 제2 융합 단백질 형태로 발현되는데, 상기 엑소솜 생산 세포에 상기 제1 광특이적 결합 단백질과 제2 광특이적 결합 단백질의 결합에 필요한 광을 조사하면, 상기 제1 광특이적 결합 단백질과 제2 광특이적 결합 단백질이 결합되어 결과적으로는, 엑소솜 특이 마커-제1 광특이적 결합 단백질-제2 광특이적 결합 단백질-목적 단백질의 형상을 갖는 융합 단백질 복합체를 임시적으로 형성하는데, 상기 엑소솜 생산 세포에서 엑소솜을 생산하면, 상기 엑소솜 특이 마커로 인하여 목적 단백질이 엑소솜에 연결될 수 있다. 이 경우, 상기 목적 단백질은 엑소솜의 내부에 존재하며, 엑소솜이 생산된 후에 광의 조사를 중지하면, 제1 광특이적 결합 단백질과 제2 광특이적 결합 단백질이 분리되고, 이에 따라, 엑소솜 내부에 존재하는 목적 단백질은 엑소솜의 방출시 엑소솜에 포함된 형태로 외부로 방출된다. 또한, 상기 광은 목적 단백질이 엑소솜의 내부로 보다 효과적으로 도입될 수 있도록, 지속적으로 조사하기보다는 간헐적으로 조사함이 바람직하다. 즉, 광을 간헐적으로 조사할 경우에는, 제1 광특이적 결합 단백질과 제2 광특이적 결합 단백질의 결합과 분리가 반복되기 때문에, 목적 단백질이 엑소솜 내부로 도입될 확률을 향상시킬 수 있다.

한편, 상기 제1 광특이적 결합 단백질과 제2 광특이적 결합 단백질의 결합을 유도하는 광의 파장은 상기 제1 광특이적 결합 단백질과 제2 광특이적 결합 단백질의 종류에 따라 달라지므로, 당업자에게 공지된 바에 따라, 광의 파장을 선택할 수 있다. 즉, CRY2와 CIBN을 결합시킬 경우에는 460 내지 490nm의 파장을 갖는 빛을 조사하고, 상기 빛을 10분 이상 조사하지 않을 경우에는 CRY2와 CIBN이 서로 해리되며; PhyB와 PIF를 결합시킬 경우에는 650nm의 파장을 갖는 빛을 10분 동안 조사하고, 750nm의 파장을 갖는 빛을 5분 동안 조사할 경우에는 PhyB와 PIF가

서로 해리되며; FKF1과 GIGANTEA를 결합시킬 경우에는 460nm의 파장을 갖는 빛을 30분 동안 조사할 수 있다. 본 발명의 실시예에서는 CIBN과 CRY2의 결합을 유도하기 위하여 460 내지 490nm의 파장을 갖는 빛을 조사하였다.

본 발명의 실시예에 의하면, CRY2 및 mCherry의 융합 단백질과 CIB 및 CD9의 융합 단백질을 엑소솜을 많이 만들어내는 불멸세포주인 HEK293T 세포 내에서 발현한 결과, 세포질에 균일하게 퍼져있던 mCherry 단백질의 분포가 푸른 빛을 쬐어주었을 때 세포막, 엔도솜 유사 구조등의 막에 있는 것을 관찰할 수 있었다(도 7). 또한, FKF1 및 mCherry의 융합 단백질과 GIGANTEA 및 CD9의 융합 단백질을 HEK293T 세포에서 발현시켰을 때도 유사한 결과를 관찰할 수 있었다(도 12). 또한, CRY2 및 mCherry의 융합 단백질과 CIBN 및 CD9의 융합 단백질을 HEK293T에 발현시키고, 푸른 빛의 세기를 조절한 결과, 20 내지 50 μ W의 빛을 조사하였을 때, 엑소솜 내에 포집된 mCherry 단백질이 가장 높은 수준을 나타냄을 확인하였으며(도 9), 상기 세포에서 생산 분리된 엑소솜을 이종세포인 HT1080 세포에 약 250 μ g/ml의 농도로 처리한 결과, HT1080 세포에 대하여 특별한 세포독성을 나타내지 않았고, 상기 HT1080 세포의 세포질로 mCherry 단백질이 전달됨을 확인하였다(도 10).

또한, 본 발명의 엑소솜 내의 목적 단백질의 도입 효율 및 표적 세포로의 엑소솜 전달 효율을 기존의 방법과 비교하기 위하여, 기존 방법으로 XPACK 벡터를 이용하고, 본 발명의 CRY2 및 mCherry 단백질이 결합된 형태의 융합 단백질과 CIBN 및 CD9 단백질이 결합된 형태의 융합 단백질의 발현 벡터를 HEK293T에 도입한 후, 엑소솜 내의 목적 단백질 생산량을 비교한 결과, 본 발명의 방법을 사용하였을 경우 현저하게 도입 효율이 높음을 확인하였다(도 15). 또한, 엑소솜 생산 세포로부터 분리한 엑소솜을 표적 세포(HeLa)에 처리하여, 목적 단백질의 발현 정도를 비교하였을 때에도 본 발명의 방법으로 분리된 엑소솜을 이용하였을 때, 표적 세포에서 목적 단백질의 발현이 가장 높음을 확인하였다(도 16).

본 발명은 다른 양태로서 (a) 엑소솜 특이 마커와 제1광특이적 결합 단백질이 결합된 형태의 융합 단백질(제1 융합 단백질)을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제1 발현벡터; 및 (b) 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 도입될 수 있는 다클론 부위(multicloning site)와 상기 제1

광특이적 결합 단백질과 결합할 수 있는 제2 광특이적 결합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제2 발현벡터를 포함하는, 엑소솜 제조용 벡터를 제공한다.

본 발명에서 제공하는 엑소솜 제조용 벡터에 있어서, 엑소솜 특이 마커, 제1 광특이적 결합 단백질, 엑소솜 생산 세포 및 제2 광특이적 결합 단백질은 상술한 바와 동일하다.

본 발명의 용어 "엑소솜 생산용 형질전환 세포"란, 상기 엑소솜 생산 세포에 엑소솜 특이 마커와 제1 광특이적 결합 단백질이 결합된 형태의 융합 단백질(제1 융합 단백질)을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 도입되어, 상기 제1 융합 단백질을 발현할 수 있는 엑소솜 생산 세포를 의미한다.

본 발명에 있어서, 상기 제2 발현벡터는 상기 제2 광특이적 결합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 포함되어 있고, 이에 인접하여 다클론 부위를 포함하도록 구성될 수 있는데, 이처럼 구성된 제2 발현벡터의 상기 다클론 부위에 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 도입될 경우, 상기 제2 광특이적 결합 단백질과 목적 단백질이 융합된 형태(제2 융합 단백질)로 발현될 수 있다.

본 발명에서 제공하는 엑소솜 제조용 벡터는 상기 엑소솜 생산용 형질전환 세포 및 발현벡터뿐만 아니라, 상기 발현벡터의 도입, 엑소솜 생산용 형질전환 세포의 배양, 상기 엑소솜 생산용 형질전환 세포로부터 생산된 엑소솜을 분리, 정제하는데 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수도 있다. 예를 들어, 상기 발현벡터의 도입에 필요한 적절한 완충액, 상기 엑소솜 생산용 형질전환 세포의 배양에 필요한 배지 및 용기 등을 추가로 포함할 수 있다.

본 발명은 또 다른 양태로서 상기 방법으로 제조되어, 목적 단백질이 내부에 포함된 엑소솜을 제공한다.

상술한 방법으로 제조된 엑소솜은 이를 구성하는 원형질 막에는 엑소솜 특이 마커와 제1 광특이적 결합 단백질이 결합된 형태의 융합 단백질(제1 융합 단백질)이 포함되어 있고, 엑소솜의 내부에는 상기 제1 광특이적 결합 단백질과 결합할 수 있는 제2 광특이적 결합 단백질과 목적 단백질이 결합된 형태의 융합 단백질(제2 융합 단백질)이 포함되어 있으므로, 상기 엑소솜을 목적 조직 내의 세포에 처리하면, 원형질 막의 융합을 통해, 엑소솜 내부에 포함된 제2 융합 단백질이 목적 조직 내의 세포질로 전달 될 수 있다.

상기 목적 단백질이 내부에 포함된 엑소솜은 생체 내에서 다양한 질환의 치료에 사용될 수 있다. 예를 들어, 목적 단백질로서 항암효과를 나타내는 단백질성 고 분자(예를 들어, 항체 등)를 포함하는 엑소솜을 제조하고, 이를 암 세포에 처리하면, 종래의 리포솜 보다도 생체 친화적인 항암치료에 사용될 수 있다.

【발명의 효과】

본 발명에서 제공하는 목적 단백질을 포함하는 엑소솜의 제조방법을 이용하면, 목적 단백질을 포함하는 엑소솜을 높은 수율로 제조할 수 있으며, 또한, 목적 단백질이 엑소솜 막으로부터 분리되어 존재하므로 상기 엑소솜을 이용한 질환의 치료에 널리 활용될 수 있을 것이다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 세포막 통과 도메인(PTD)과 목적 단백질의 재조합 단백질을 통한 목적 단백질의 세포질 내 전달방법을 보여주는 그림이다(Steven R. et al. Protein transduction: unrestricted delivery into all cells? Trends in Cell biology, 2000).

도 2는 나노 입자와 목적 단백질을 결합시킨 결합체를 endocytosis를 통해 목적 단백질의 세포질 내 전달방법을 보여주는 그림이다(Munish Chanana et al. Physicochemical properties of protein-coated gold nanoparticles in biological fluids and cells before and after proteolytic digestion. Angew. Chem. Int. Ed. 2013).

도 3은 엑소솜이 세포 내 다낭체(Multi vesicular bodies, MVBs)로부터 세포 밖으로 방출, 분리되어 발생하는 과정을 보여주는 그림이다(Graca Raposo and Willem

Stoorvogel. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *Cell Biology* 200(4), 373-383, 2013).

도 4는 표적화된 엑소솜을 통해 siRNA를 생체 내 전달하여 암을 치료하는 과정을 보여주는 그림이다(Alvarez-Erviti, L. et al. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature biotechnology* 29, 341-345, 2011).

도 5는 본 발명에 따른 광유전자로 디자인된 단백질 운반 엑소솜(Optogenetically-designed, protein-carrying exosomes, EXPLORs)의 제조 공정을 보여주는 개요도이다.

도 6은 본 발명에 따른 EXPLORs의 광 조사가 중단되면 엑소솜 내부에서 목적 단백질과 광특이적 결합 단백질의 융합 단백질이 분리되는 과정을 보여주는 그림이다.

도 7은 CIBN-EGFP-CD9 유전자와 mCherry-CRY2 유전자가 HEK293T 세포에 도입된 형질전환체에서 청색광의 조사 여부에 따른 mCherry 단백질의 세포 내 위치변화를 나타내는 형광사진이다.

도 8은 본 발명에 따른 EXPLORs를 수득하는 실험 과정을 보여주는 그림이다.

도 9는 청색광의 세기에 따라, 엑소솜의 내부에 포집된 목적 단백질(mCherry 단백질)의 함량변화를 측정된 결과를 나타내는 면역블롯 분석사진이다.

도 10은 목적 단백질(mCherry)을 포함하는 엑소솜을 표적 세포(HT1080 세포)에 처리한 후, 상기 표적 세포에 목적 단백질의 도입 여부를 확인한 결과를 나타내는 전자현미경 사진으로서, 좌측은 엑소솜이 처리되지 않은 표적 세포를 나타내고 우측은 엑소솜이 처리된 표적 세포를 나타낸다.

도 11는 목적 단백질(mCherry)을 포함하는 엑소솜을 표적 세포(HT1080 세포)에 처리한 후, 상기 표적 세포에 목적 단백질의 도입 여부를 확인한 결과를 나타내는 형광사진(a) 및 상기 엑소솜 처리에 의하여 유발된 사멸세포의 비율을 비교한 결과를 나타내는 그래프(b)이다.

도 12는 GIGANTEA-EGFP-CD9 유전자 및 mCherry-FKF1LOV가 HEK293T 세포에 도입된 형질전환체에서 청색광의 조사 여부에 따른 mCherry 단백질의 세포 내 위치변화를 나타내는 형광사진이다.

도 13은 형광이미징을 이용한 Luciferase-mCherry 융합단백질의 발현 정도(a)

및 생산 세포에서의 루시퍼라제 활성 및 분자 개수를 확인한 도이다(b):

Control: 아무것도 처리하지 않은 HEK293T 세포;

OVER: Luciferase-mCherry-CRY2 만을 도입한 HEK293T 세포;

XP: 엑소솜 탑재 기술을 위해 만들어진 상용 벡터인 XPACK (Systems Biosciences)을 이용하여 XPACK-Luciferase-mCherry를 도입한 HEK293T 세포;

EXPLOR: 본 발명의 방법에 따른, Luciferase-mCherry-CRY2와 CIBN-EGFP-CD9를 도입한 HEK293T 세포.

도 14는 생산된 엑소솜 내에서의 루시퍼라제 활성 측정(a) 및 분자 개수(b)를 확인한 도이다:

NEG: 아무것도 처리하지 않은 HEK293T 세포에서 생산된 엑소솜;

OVER: Luciferase-mCherry-CRY2를 도입한 HEK293T 세포에서 생산된 엑소솜;

XP: 엑소솜 탑재 기술을 위해 만들어진 상용 벡터인 XPACK (Systems Biosciences)을 이용하여 XPACK-Luciferase-mCherry를 도입한 HEK293T 세포에서 생산된 엑소솜;

EXPLOR: 본 발명에 따른, Luciferase-mCherry-CRY2와 CIBN-EGFP-CD9를 도입한 HEK293T 세포에서 생산된 엑소솜;

ON: 200 μ W의 청색광에서 72시간 배양하여 생산한 엑소솜,

OFF: 빛이 없는 조건에서 72시간 배양하여 생산한 엑소솜.

도 15는 생산된 엑소솜 내의 목적 단백질의 도입 효율/loading efficiency)을 나타낸 도이다.

도 16은 엑소솜을 이용한 표적 세포(HeLa)로의 목적 단백질 전달 효율을 나타낸 도이다:

Control: 아무것도 처리하지 않은 HEK293T 세포에서 생산된 엑소솜;

OVER: Luciferase-mCherry-CRY2를 도입한 HEK293T 세포에서 생산된 엑소솜;

XP: 엑소솜 탑재 기술을 위해 만들어진 상용 벡터인 XPACK (Systems Biosciences)을 이용하여 XPACK-Luciferase-mCherry를 도입한 HEK293T 세포에서 생산된 엑소솜;

EXPLOR: 본 발명에 따른, Luciferase-mCherry-CRY2와 CIBN-EGFP-CD9를 도입한 HEK293T 세포에서 생산된 엑소솜;

ON: 200 μ W의 청색광에서 72시간 배양하여 생산한 엑소솜,

OFF: 빛이 없는 조건에서 72시간 배양하여 생산한 엑소솜.

도 17은 세포 내에서 Luciferase-mCherry-CRY2와 CIBN-EGFP-CD9가 HEK293T 세포내에서 같은 위치에 발현하고 있음을 확인한 도이다.

【발명의 실시를 위한 최선의 형태】

이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 엑소솜의 제조

<1-1> 엑소솜의 제조를 위한 CIBN 및 CRY2의 결합 확인

빛이 없는 조건에서 CIBN-EGFP-CD9 유전자를 포함하는 pcDNA3.1(+) 벡터와 mCherry-CRY2 유전자를 포함하는 pcDNA3.1(+) 벡터를 엑소솜 생산 세포인 HEK293T 세포에 도입하고, 24시간 동안 배양한 다음, 소태아 혈청이 포함되지 않은 배지로 교체하고 48시간 동안 추가로 배양하였다. 배양이 종료된 후, 460 내지 490 nm의 파장을 갖는 청색광을 조사하고, 상기 청색광을 조사하기 전과 조사한 후의 mCherry에서 나타나는 적색 형광의 위치를 공초점 현미경을 통해 확인하였다(도 7).

도 7은 CIBN-EGFP-CD9 유전자와 mCherry-CRY2 유전자가 HEK293T 세포에 도입된 형질전환체에서 청색광의 조사여부에 따른 mCherry 단백질의 세포내 위치변화를 나타내는 형광사진이다. 도 7에서 보듯이, 광특이적 결합 단백질인 CIBN과 CRY2의 결합을 유발시키는 청색광이 조사되기 전에는 mCherry 단백질이 세포질에 고르게 분포하고 있으나, 상기 청색광이 조사된 후에는 mCherry 단백질이 막에 밀집되는 현상이 나타남을 알 수 있었다. 이러한 mCherry 단백질의 밀집은 광특이적 결합 단백질인 CIBN과 CRY2의 결합에 의하여 유발된 것으로 분석되었다.

<1-2> 엑소솜의 제조를 위한 GIGANTEA 및 FKF1의 결합 확인

GIGANTEA-EGFP-CD9 유전자를 포함하는 pcDNA3.1(+) 벡터 및 mCherry-FKF1LOV 유전자를 포함하는 pcDNA3.1(+) 벡터를 사용하고, 상기 실시예 <1-1>과 동일한 방법을 사용하여, 세포 내 엑소솜을 확인하였다. (상기 FKF1LOV에서 LOV는

light-oxygen-voltage domain의 약어로 FKF1 단백질에서 실제로 빛에 의해 다른 단백질과 결합하는 도메인을 나타내며, 따라서 FKF1과 FKF1LOV는 같은 의미로 사용된다.)

상기 실시예 <1-1>과 마찬가지로, 도 12에 나타난 바와 같이, 광특이적 결합 단백질인 GIGANTEA과 FKF1의 결합을 유발시키는 청색광이 조사되기 전에는 mCherry 단백질이 세포질에 고르게 분포하고 있으나, 청색광이 조사된 후에는 mCherry 단백질이 막에 밀집되는 현상이 나타남을 확인하였다(도 12). 따라서, 상기 <1-1>의 결과와 유사하게, mCherry 단백질의 밀집이 광특이적 결합 단백질의 GIGANTEA 및 FKF1의 결합에 의해 유도될 수 있음을 확인할 수 있었다.

<실시예 2> 엑소솜 생산 및 엑소솜 생산에 있어 빛의 세기가 미치는 효과

0, 5, 20, 50 또는 200 μW 의 세기로 460 nm 파장의 빛을 조사하는 LED 등 아래에서, 각각 CIBN-EGFP-CD9 유전자 및 mCherry-CRY2 유전자를 포함하는 각각의 발현벡터를 엑소솜 생산 세포인 HEK293T 세포에 도입하고, 24시간 동안 배양한 다음, 소태아 혈청이 포함되지 않은 배지로 교체하고 48시간 동안 추가로 배양하였다. 배양이 종료된 후, 배양액을 분리하고, 이를 원심분리(3000 \times g, 15분)하여 세포잔해물이 제거된 상층액을 수득하였다. 상기 수득한 상층액에 상기 상층액의 5배 부피의 ExoQuick-TC Exosome Precipitation Solution(System Biosciences, Mountain View, California, USA)를 가하여 혼합하고, 원심분리(1500 \times g, 30분)하여 침전된 엑소솜을 수득하고, 상기 수득한 엑소솜에 PBS를 가하여 현탁시켜서 엑소솜 현탁액을 수득하였다. 상기 엑소솜 현탁액을 27-G 바늘이 장착된 주사기를 이용하여 0.2 μm 필터로 여과하여 단일 크기의 엑소솜을 수득하였다(도 8). 그 후 Lysis buffer를 이용하여, Exosome Lysate를 만들고, 면역블롯 분석을 통하여, 엑소솜 안에 들어 있는 mCherry 단백질의 양을 비교하였다(도 9).

도 9는 청색광의 세기에 따라, 엑소솜의 내부에 포집된 목적 단백질(mCherry 단백질)의 함량변화를 측정된 결과를 나타내는 면역블롯 분석사진이다. 도 9에서 보듯이, 20 내지 50 μW 의 세기로 청색광을 조사할 경우, 엑소솜내에 포집된 목적 단백질(mCherry 단백질)의 함량이 최대값을 나타냄을 확인하였다. 상기 결과로부터, 광특이적 결합 단백질의 결합시에 조사하는 빛의 세기를 조절함으로써,

엑소솜 내부에 포집되는 목적 단백질의 함량을 조절할 수 있음을 알 수 있었다.

<실시예 3> 엑소솜의 처리효과

50 μ W의 세기로 460 nm 파장의 빛을 조사하는 LED 등 아래에서, 각각 CIBN-EGFP-CD9 유전자 및 mCherry-CRY2 유전자를 포함하는 각각의 발현벡터를 엑소솜 생산 세포인 HEK293T 세포에 도입하고, 실시예 2의 방법으로 엑소솜을 추출하였다. 이어, 상기 추출된 엑소솜을 HT1080 세포에 250 μ g/ml의 농도로 24시간 동안 처리하였다. 그런 다음, 상기 HT1080 세포에 4% PFA와 0.01% GA를 포함하는 0.1 M 인산염완충액(pH 7.4)을 가하여 고정시키고, 10% 젤라틴 젤 위에 부착하였다. 젤라틴 젤 위에 부착된 세포는 액체질소를 이용해 하루 동안 냉각시켰으며, -120 °C에서 cryoultramicrotome을 이용하여 45nm 두께로 절단된 박편을 수득하였다. 이어, 상기 박편에 항-mCherry 항체와 Protein A-gold를 이용하여 면역염색하고, Tecnai G2 Spirit Twin TEM을 통하여 mCherry 단백질을 관찰하였다(도 10).

도 10은 목적 단백질(mCherry)을 포함하는 엑소솜을 표적 세포(HT1080 세포)에 처리한 후, 상기 표적 세포에 목적 단백질의 도입 여부를 확인한 결과를 나타내는 전자현미경 사진으로서, 좌측은 엑소솜이 처리되지 않은 표적 세포를 나타내고 우측은 엑소솜이 처리된 표적 세포를 나타낸다. 도 10에서 보듯이, 본 발명의 엑소솜을 표적 세포에 처리한 경우, 목적 단백질이 표적 세포 내로 전달됨을 확인하였다.

<실시예 4> 목적 단백질이 포함된 엑소솜의 분석

50 μ W의 세기로 460 nm 파장의 빛을 조사하는 LED 등 아래에서, 각각 CIBN-EGFP-CD9 유전자 및 mCherry-CRY2 유전자를 포함하는 각각의 발현벡터를 엑소솜 생산 세포인 HEK293T 세포에 도입하고, 실시예 2의 방법으로 엑소솜을 추출하였다. 이어, 상기 추출된 엑소솜을 HT1080 세포에 250 μ g/ml의 농도로 24시간 동안 처리하였다. 그런 다음, 형광 현미경을 통하여, mCherry 단백질의 붉은 형광을 확인하고, LDH cell death assay를 통해 엑소솜을 처리한 세포와 처리하지 않은 세포의 죽은 세포의 비율을 비교하였다(도 11).

도 11은 목적 단백질(mCherry)을 포함하는 엑소솜을 표적 세포(HT1080

세포)에 처리한 후, 상기 표적 세포에 목적 단백질의 도입여부를 확인한 결과를 나타내는 형광사진(a) 및 상기 엑소솜 처리에 의하여 유발된 사멸세포의 비율을 비교한 결과를 나타내는 그래프(b)이다. 도 11에서 보듯이, 엑소솜의 처리에 의하여 세포사멸이 유발되지 않음을 확인하였다.

<실시에 5> 엑소솜 생산 및 생산된 엑소솜 내 목적 단백질의 도입 효율 비교

<5-1> 엑소솜 생산 효율 확인

본 발명의 엑소솜 생산 및 생산된 엑소솜 내의 목적 단백질의 도입 정도를 기존의 방법과 비교하고자 엑소솜 생산 세포에서 목적 단백질의 발현을 확인하기 위하여, 루시페라제 활성(luciferase activity) 측정 실험을 수행하였다.

기존의 방법으로는 엑소솜 탑재 기술을 위해 만들어진 상용 벡터인 XPACK (Systems Biosciences)을 이용하여 XPACK-Luciferase-mCherry를 HEK293T 세포에 도입하였고(XP), 본 발명의 방법을 이용하여 Luciferase-mCherry-CRY2와 CIBN-EGFP-CD9를 HEK293T 세포에 도입하였으며(EXPLOR), 그 후 세포 내 루시페라제 활성을 측정하여 상기 두 방법의 효율을 비교하였다. 루시페라제 활성은 제조사의 지침을 따라 측정하였으며(Luciferase Assay Reagent, Promega), 결과 값의 표준 곡선을 그린다음, 이를 통해 세포 내 엑소솜의 개수를 정량적으로 계산하였다.

도 14에 나타난 바와 같이, 본 발명의 광특이적 결합 단백질인 CIBN 및 CRY2를 이용한 방법이 기존의 방법인 XP 보다 현저하게 엑소솜으로의 도입 효율이 높음을 확인하였다(도 14).

<5-2> 생산된 엑소솜 내에서 목적 단백질의 발현 확인

상기 실시예 <5-1>의 세포를 72시간 배양하고, 엑소솜을 분리(Exoquick-TC, Systems biosciences)한 후, 기존의 방법인 XP 및 본 발명의 방법을 통해 분리된 엑소솜에 포함된 목적 단백질의 양을 루시페라제 활성 측정을 통해 간접적으로 비교한 결과, 도 15에 나타난 바와 같이, 본 발명의 방법은 기존의 방법 보다 현저하게 많은 양의 목적 단백질이 포함된 엑소솜을 생산할 수 있음을 확인하였다(도 15).

<5-3> 목적 단백질의 도입 효율 비교

상기 실시예 <5-1> 및 <5-2>의 루시퍼라제 활성 측정값을 이용하여, 하기 수학적 식 1로 목적 단백질의 도입 효율(E)을 계산하였다.

[수학적 식 1]

$$E = \frac{\text{생산된 엑소솜 내의 루시퍼라제 활성 측정값}}{\text{엑소솜 생산 세포에서의 루시퍼라제 활성 측정값}}$$

도 15에 나타난 바와 같이, 본 발명의 CRY2 및 CIBN의 결합을 이용하여 생산된 엑소솜이 다른 비교군과 비교하여, 4배 내지 120배 효율이 높음을 확인하였다(도 15).

<실시예 6> 표적 세포로의 엑소솜 전달 효율 비교

목적 단백질이 도입된 엑소솜을 표적 세포에 처리하였을 때의 효율을 비교하고자, HeLa 세포에 5×10^9 개의 엑소솜을 24시간 동안 처리하고 세포에서 발현되는 형광 세기를 측정한 결과, 도 16에 나타난 바와 같이, 본 발명의 엑소솜(EXPLOR)의 형광 세기가 현저하게 높음을 확인하였다(도 16).

따라서, 본 발명의 엑소솜 이용 방법은 기존의 방법 보다 효과적으로 목적 단백질을 표적 세포로 전달할 수 있음을 알 수 있다.

【청구의 범위】**【청구항 1】**

a) 엑소솜 생산 세포에, 엑소솜 특이 마커와 목적 단백질이 결합된 형태의 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 도입하여 형질전환된 세포를 얻는 단계; 및

b) 상기 형질전환된 세포를 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 목적 단백질이 엑소솜막에 부착된 엑소솜을 대량으로 제조하는 방법.

【청구항 2】

제 1항을 포함하되, 목적 단백질이 엑소솜막에서 분리되어 엑소솜 내부에 존재하는 엑소솜을 대량으로 제조하는 방법.

【청구항 3】

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 엑소솜 생산 세포는 B-림프구, T-림프구, 수지상세포, 거대핵세포(megakaryocyte), 대식세포, 줄기세포 및 종양 세포로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 세포인 것을 특징으로 하는 엑소솜을 대량으로 제조하는 방법.

【청구항 4】

제 1항에 있어서, 상기 엑소솜 특이 마커는 CD9, CD63, CD81 또는 CD82인 것을 특징으로 하는 엑소솜을 대량으로 제조하는 방법.

【청구항 5】

a) 엑소솜 생산 세포에, 엑소솜 특이 마커와 제1 광특이적 결합 단백질이 결합된 형태의 융합 단백질(제1 융합 단백질)을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 상기 제1 광특이적 결합 단백질과 결합할 수 있는 제2 광특이적 결합 단백질과 목적 단백질이 결합된 형태의 융합 단백질(제2 융합 단백질)을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 도입하는 단계;

b) 상기 엑소솜 생산 세포에 상기 제1 광특이적 결합 단백질과 상기 제2 광특이적 결합 단백질의 결합을 유발할 수 있는 광을 조사하는 단계; 및

c) 상기 엑소솜 생산 세포에서 엑소솜이 생산된 다음, 상기 광의 조사를 중지하는 단계를 포함하는, 목적 단백질을 포함하는 엑소솜을 대량으로 제조하는 방법.

【청구항 6】

제 5항에 있어서, 상기 제1 광특이적 결합 단백질은 CIB(cryptochrome-interacting basic helix-loop-helix protein), CIBN(N-terminal domain of CIB), PhyB(phytochrome B), PIF(phytochrome interacting factor), FKF1(Flavinbinding, Kelch repeat, Fbox 1), GIGANTEA, CRY(chrytochrome) 및 PHR(phytolylase homologous region)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 단백질인 것을 특징으로 하는 엑소솜을 대량으로 제조하는 방법.

【청구항 7】

제 5항에 있어서, 상기 제1 광특이적 결합 단백질이 CIB 또는 CIBN인 경우, 상기 제2 광특이적 결합 단백질은 CRY 또는 PHR이며, 상기 제1 광특이적 결합 단백질과 제2 광특이적 결합 단백질의 결합은 460 내지 490 nm의 파장을 갖는 빛을 조사하여 수행되는 것을 특징으로 하는 엑소솜을 대량으로 제조하는 방법.

【청구항 8】

제 5항에 있어서, 상기 제1 광특이적 결합 단백질이 PhyB인 경우, 상기 제2 광특이적 결합 단백질은 PIF이며, 상기 제1 광특이적 결합 단백질과 제2 광특이적 결합 단백질의 결합은 600 내지 650 nm의 파장을 갖는 빛을 조사하여 수행되는 것을 특징으로 하는 엑소솜을 대량으로 제조하는 방법.

【청구항 9】

제 5항에 있어서, 상기 제1 광특이적 결합 단백질이 GIGANTEA인 경우, 상기 제2 광특이적 결합 단백질은 FKF1이며, 상기 제1 광특이적 결합 단백질과 제2 광특이적 결합 단백질의 결합은 460 내지 490 nm의 파장을 갖는 빛을 조사하여 수행되는 것을 특징으로 하는 엑소솜을 대량으로 제조하는 방법.

【청구항 10】

제 1항, 제 2항 또는 제 5항의 방법에 의해 제조된 엑소솜을 이용하는 것을 특징으로 하는 세포질로 단백질 약물을 전달하는 방법.

【청구항 11】

제 1항, 제 2항 또는 제 5항의 방법에 의해 제조된 엑소솜을 유효성분으로 포함하는 단백질 약물의 세포질 전달용 약학적 조성물.

【청구항 12】

(a) 엑소솜 특이 마커와 제1 광특이적 결합 단백질이 결합된 형태의 융합 단백질(제1 융합 단백질)을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제1 발현벡터; 및

(b) 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 도입될 수 있는 다클론 부위와 상기 제1 광특이적 결합 단백질과 결합할 수 있는 제2 광특이적 결합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제2 발현벡터를 포함하는, 엑소솜 제조용 벡터.

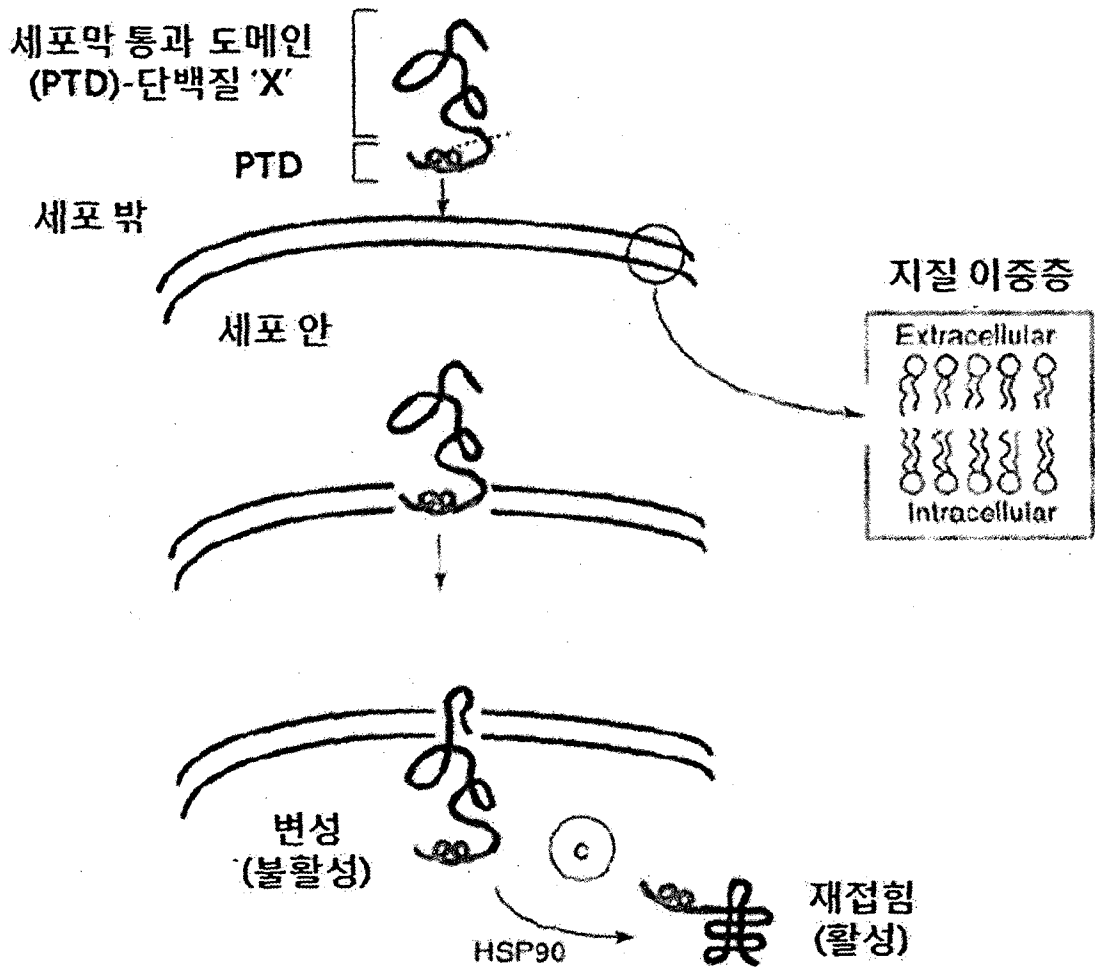
【청구항 13】

제 12항에 있어서, 상기 제2 발현벡터는 상기 제2 광특이적 결합 단백질과 목적 단백질이 융합된 형태의 융합 단백질(제2 융합 단백질)을 엑소솜 생산 세포에서 발현시키는 것인 엑소솜 제조용 벡터.

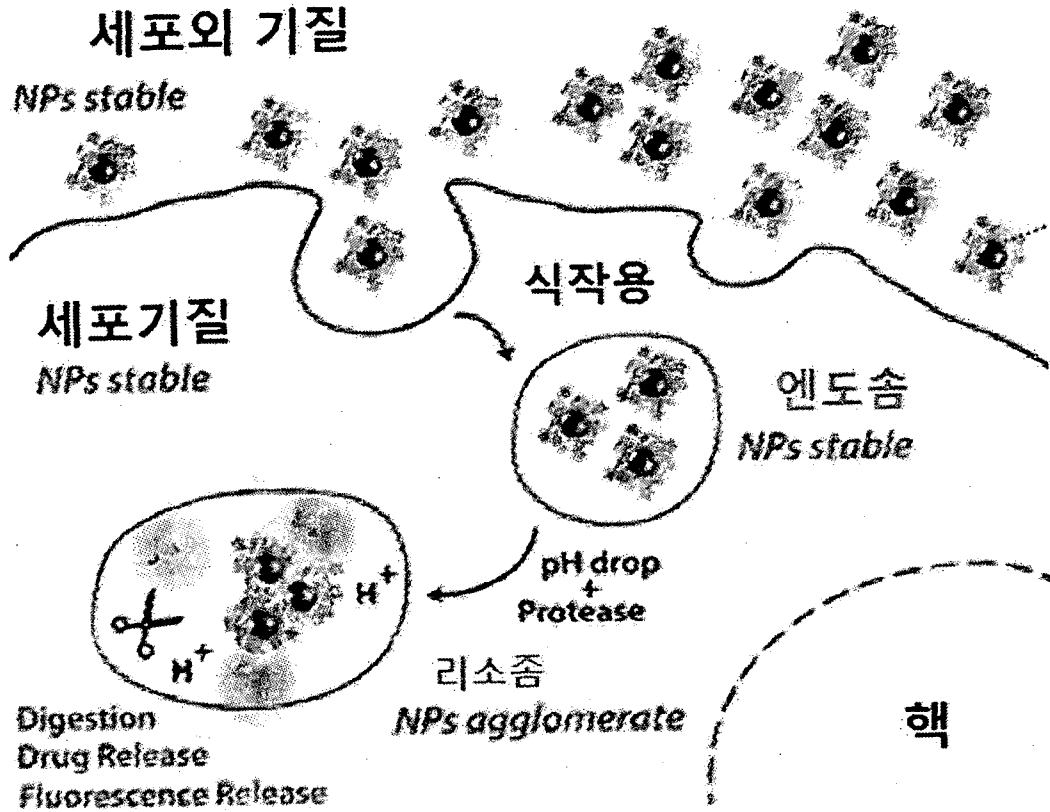
【청구항 14】

제 1항, 제 2항 또는 제 5항 중 어느 한 항의 방법을 사용하여 제조된, 목적 단백질이 내부에 포함된 엑소솜.

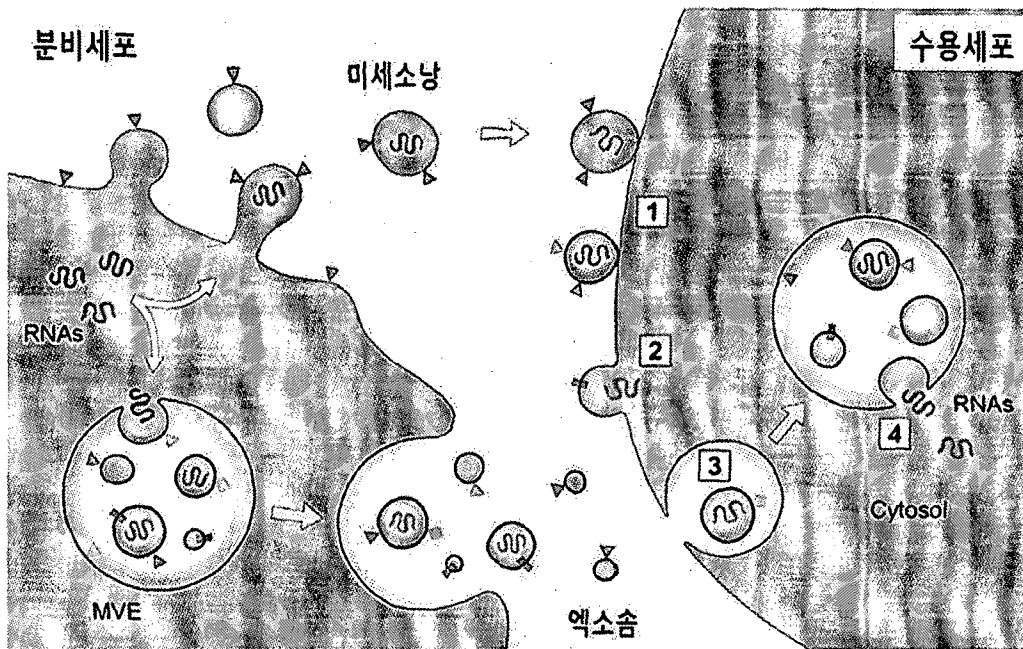
[도 1]



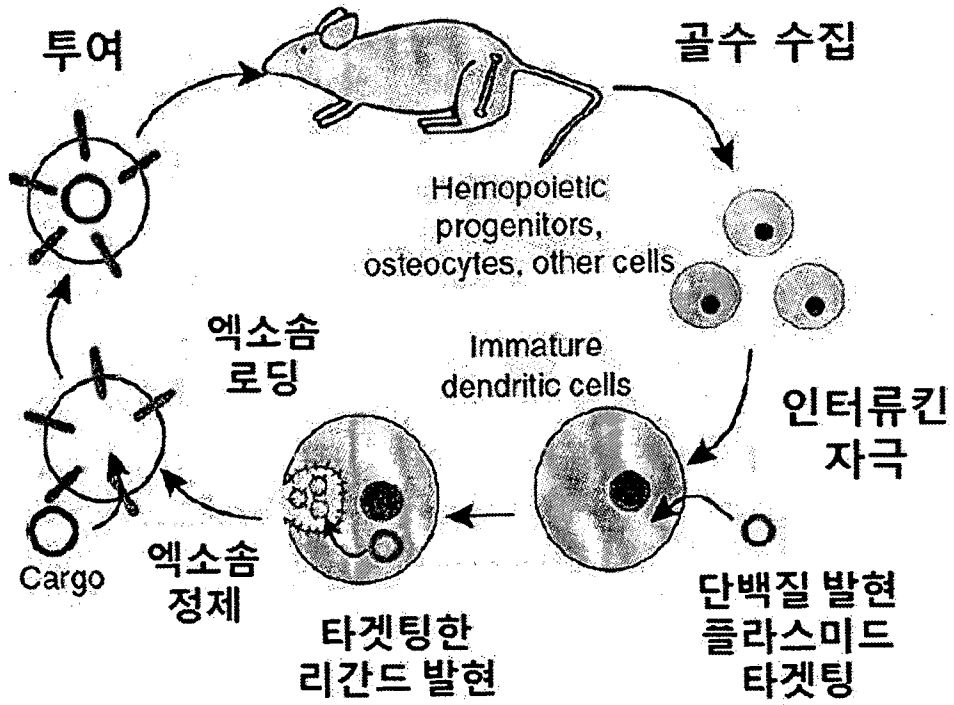
[도 2]



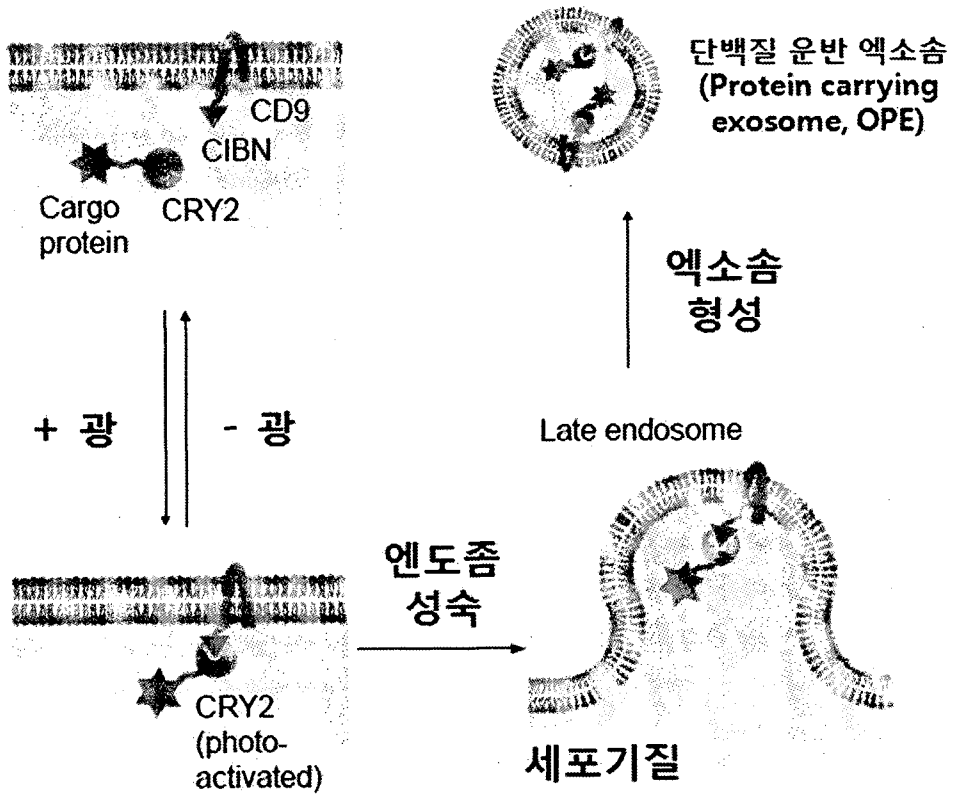
[도 3]



[도 4]



[도 5]



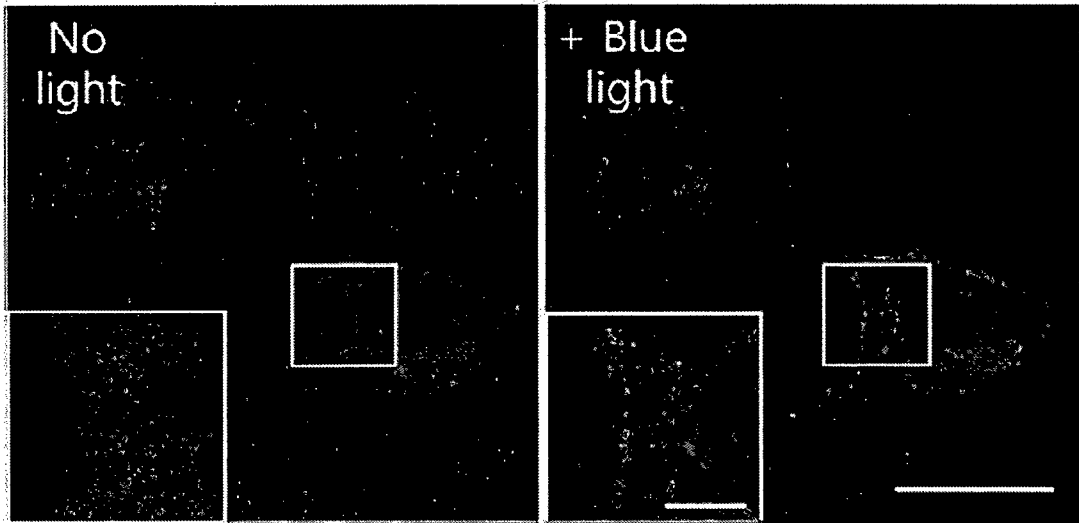


빛 조사
중단



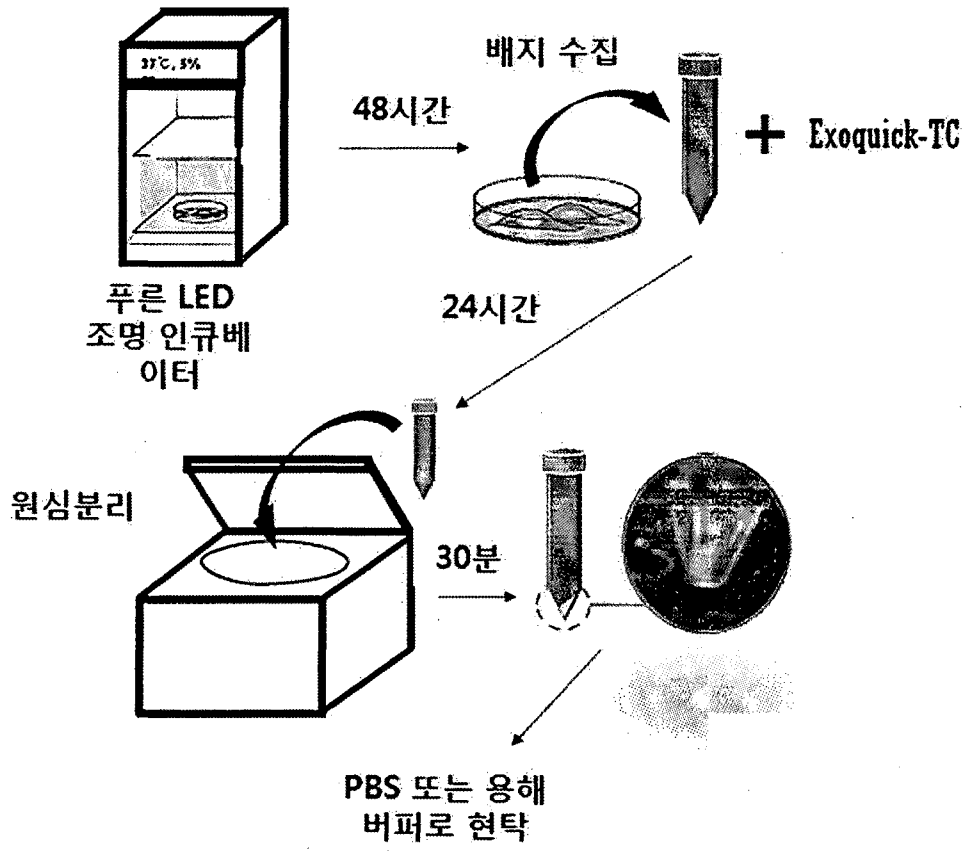
7/17

[도 7]



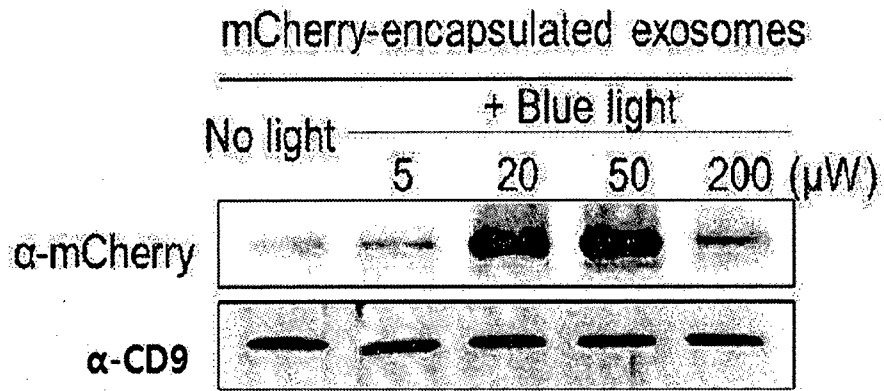
8/17

[도 8]



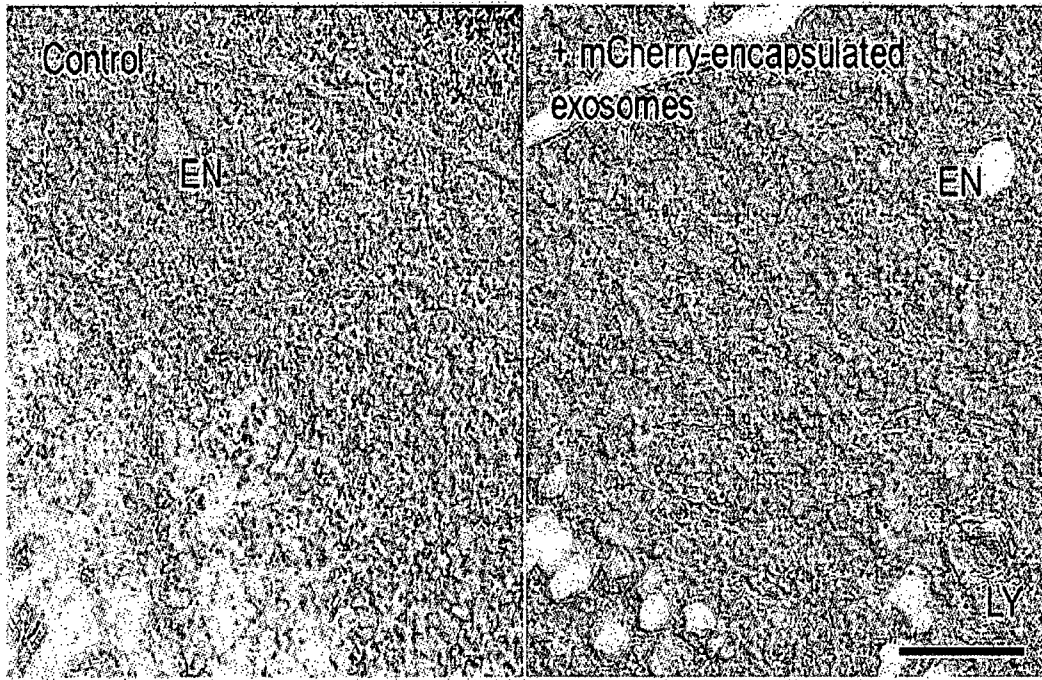
9/17

[도 9]



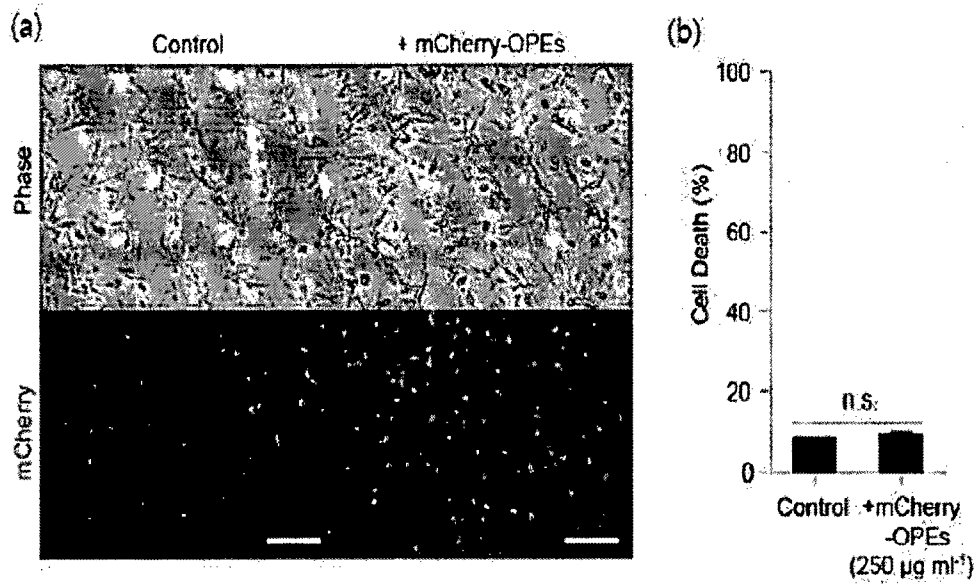
10/17

[도 10]



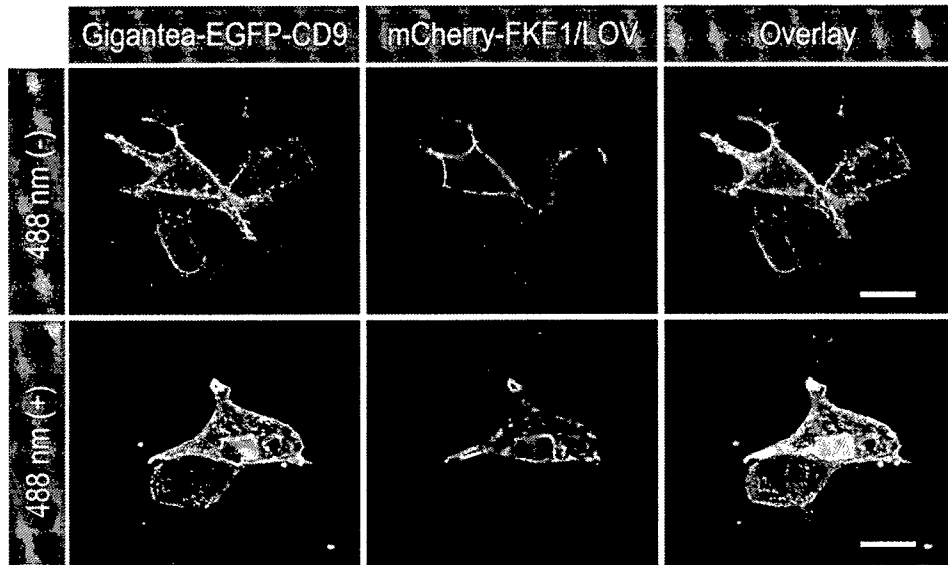
11/17

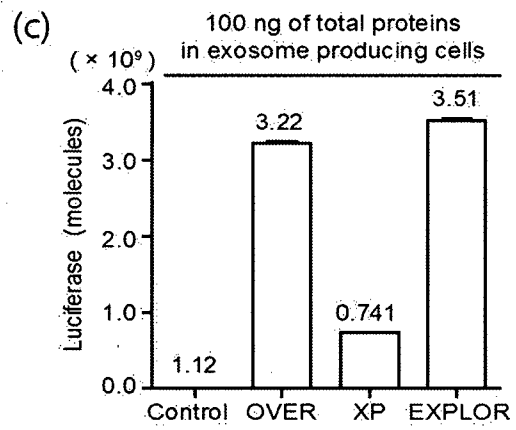
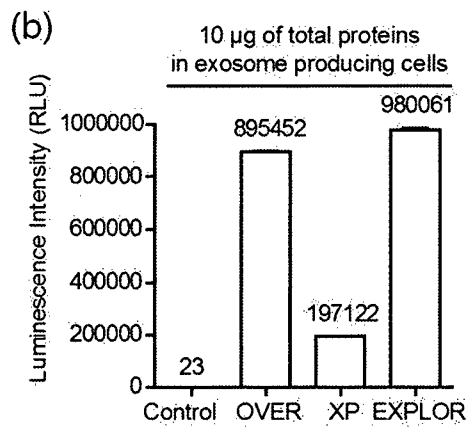
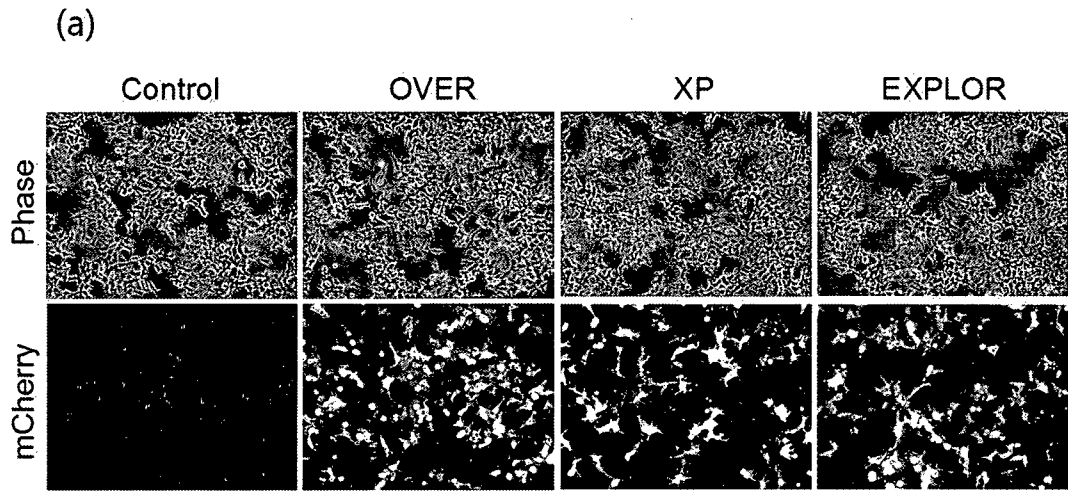
[도 11]

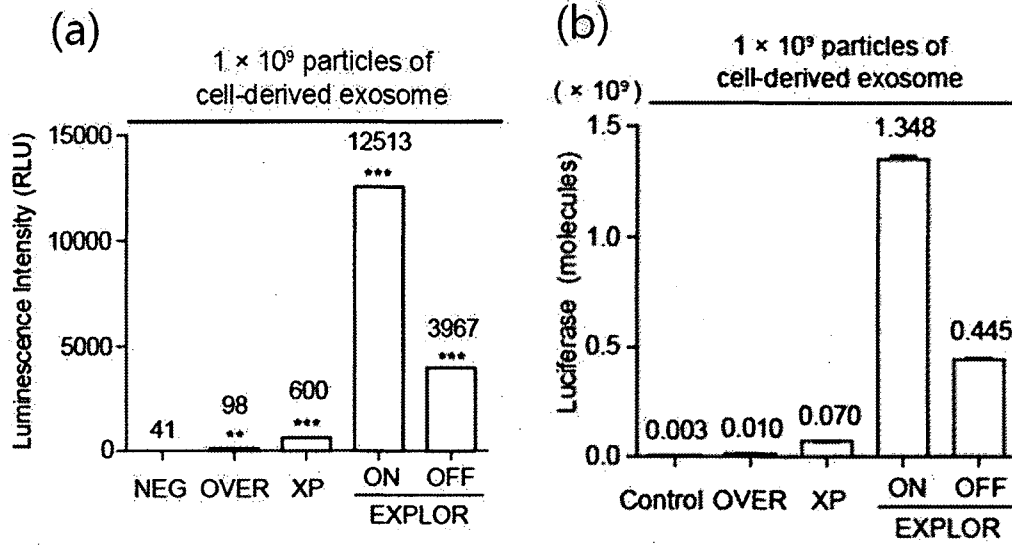


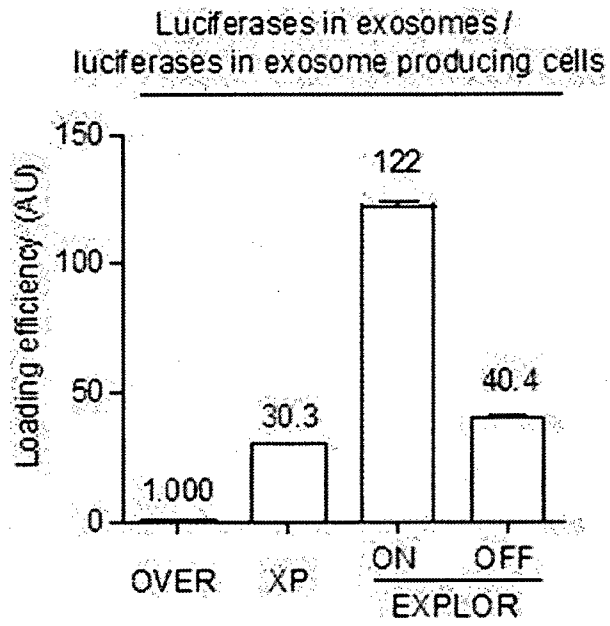
12/17

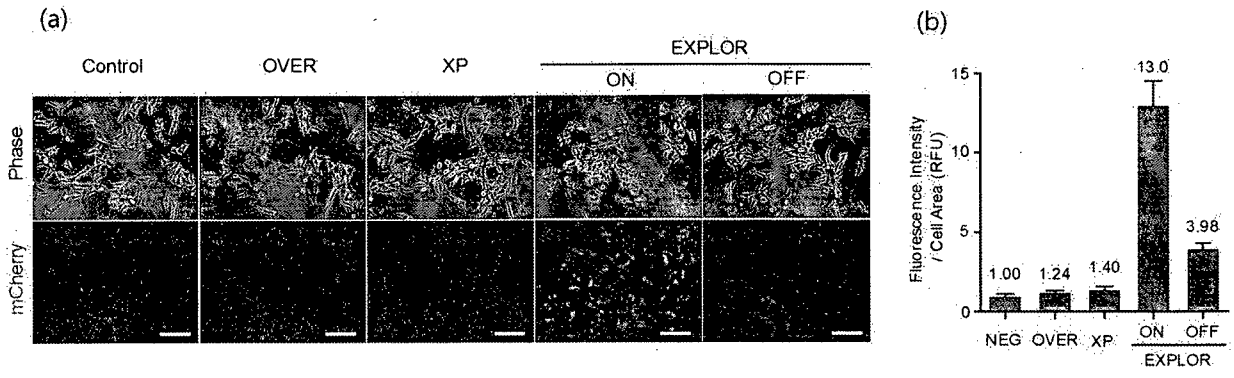
[도 12]

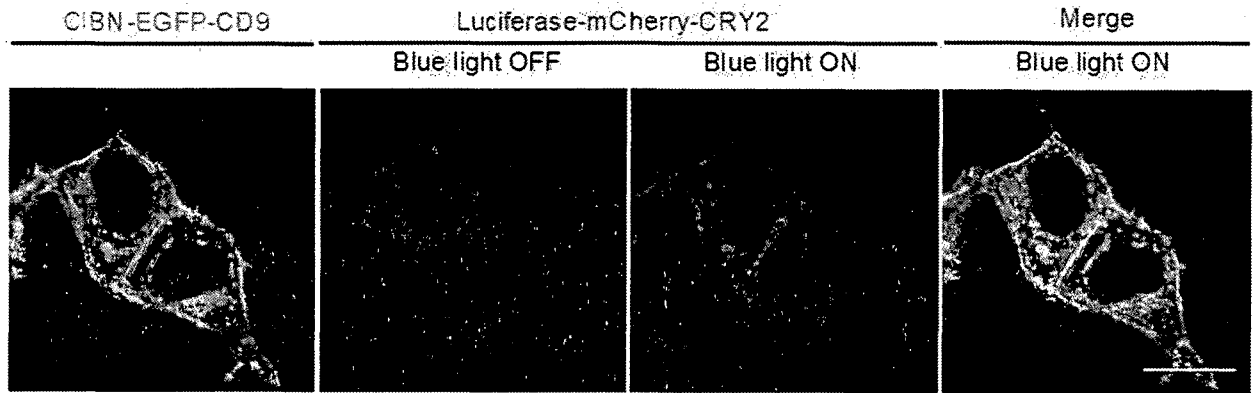













INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/004750

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12N 15/85(2006.01)i, C12N 15/62(2006.01)i, C12N 5/078(2010.01)i, C12N 5/09(2010.01)i, C07K 16/28(2006.01)i, C07K 19/00(2006.01)i, A61K 47/48(2006.01)i</i> According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 15/85; C12N 5/07; A61K 48/00; A61K 47/48; C12N 15/62; C12N 5/078; C12N 5/09; C07K 16/28; C07K 19/00 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: exosome, specific marker, target protein, light-specific coupling protein		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014-168548 A2 (SAMIR, El Andaloussi) 16 October 2014 See abstract; claims 1, 4 and 9; page 11, paragraph [3]; page 33, paragraph [2]; page 38, paragraph [2]; page 41, paragraph [3].	1,3-4,10-11,14
A		2,5-9,12-13
A	WO 2015-002956 A1 (OHIO STATE INNOVATION FOUNDATION) 08 January 2015 See abstract; claims 1, 4, 11, 24 and 36.	1-14
A	KR 10-2013-0032646 A (SAMSUNG ELECTRONICS CO., LTD.) 02 April 2013 See abstract; claims 1-3.	1-14
A	KOOLMANS, Sander Aa et al., "Exosome Mimetics: a Novel Class of Drug Delivery Systems", International Journal of Nanomedicine, 2012, vol. 7, pages 1525-1541 See the entire document.	1-14
A	YAZAWA, Masayuki et al., "Induction of Protein-protein Interactions in Live Cells Using Light", Nature Biotechnology, (Electronic Publishing) 04 October 2009, vol. 27, no. 10, pages 941-945 See the entire document.	1-14
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 05 AUGUST 2016 (05.08.2016)		Date of mailing of the international search report 08 AUGUST 2016 (08.08.2016)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/004750

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2014-168548 A2	16/10/2014	AU 2014-251388 A1 CA 2910802 A1 EP 2983721 A2 SG 11201508433 A WO 2014-168548 A3 WO 2014-168548 A8	12/11/2015 16/10/2014 17/02/2016 27/11/2015 04/12/2014 29/01/2015
WO 2015-002956 A1	08/01/2015	NONE	
KR 10-2013-0032646 A	02/04/2013	US 2013-0078658 A1	28/03/2013

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/85(2006.01)i, C12N 15/62(2006.01)i, C12N 5/078(2010.01)i, C12N 5/09(2010.01)i, C07K 16/28(2006.01)i, C07K 19/00(2006.01)i, A61K 47/48(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 15/85; C12N 5/07; A61K 48/00; A61K 47/48; C12N 15/62; C12N 5/078; C12N 5/09; C07K 16/28; C07K 19/00

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: 엑소솜, 특이 마커, 목적 단백질, 광특이적 결합 단백질

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	WO 2014-168548 A2 (SAMIR, EL ANDALOUSSI) 2014.10.16 요약; 청구항 1, 4 및 9; 페이지 11, 단락 3; 페이지 33, 단락 2; 페이지 38, 단락 2; 페이지 41, 단락 3 참조.	1,3-4,10-11,14
A		2,5-9,12-13
A	WO 2015-002956 A1 (OHIO STATE INNOVATION FOUNDATION) 2015.01.08 요약; 청구항 1, 4, 11, 24 및 36 참조.	1-14
A	KR 10-2013-0032646 A (삼성전자주식회사) 2013.04.02 요약; 청구항 1-3 참조.	1-14
A	KOOIJMANS, SANDER AA 등, 'Exosome mimetics: a novel class of drug delivery systems', International Journal of Nanomedicine, 2012, 제7권, 페이지 1525-1541 전체 문헌 참조.	1-14
A	YAZAWA, MASAYUKI 등, 'Induction of protein-protein interactions in live cells using light', Nature Biotechnology, (전자공개) 2009.10.04, 제27권, 제10호, 페이지 941-945 전체 문헌 참조.	1-14

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

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2016년 08월 05일 (05.08.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 08월 08일 (08.08.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



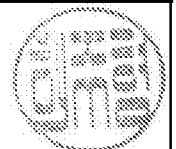
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2014-168548 A2	2014/10/16	AU 2014-251388 A1 CA 2910802 A1 EP 2983721 A2 SG 11201508433 A WO 2014-168548 A3 WO 2014-168548 A8	2015/11/12 2014/10/16 2016/02/17 2015/11/27 2014/12/04 2015/01/29
WO 2015-002956 A1	2015/01/08	없음	
KR 10-2013-0032646 A	2013/04/02	US 2013-0078658 A1	2013/03/28