(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2022 년 3 월 17 일 (17.03.2022)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2022/055077 A1

(51) 국제특허분류:
C12N 5/00 (2006.01) *A61K 47/46* (2006.01)
C12N 5/09 (2010.01) *A61K 31/704* (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2021/006905

(22) 국제출원일: 2021 년 6 월 3 일 (03.06.2021)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2020-0115145 2020 년 9 월 9 일 (09.09.2020) KR

(71) 출원인: 조선대학교산학협력단 **(INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, CHOSUN UNIVERSITY)** [KR/KR]; 61452 광주시 동구 필문대로 309, Gwangju (KR).

(72) 발명자: **김태형 (KIM, Tae-Hyoung)**; 62053 광주시 서구 풍암신흥로 40 104동 602호, Gwangju (KR). **박정희 (PARK, Jung Hee)**; 62013 광주시 서구 화개1로78번길 8 505동 304호, Gwangju (KR). **한지혜 (HAN, Ji Hye)**; 61666 광주시 남구 용대로 194 302호, Gwangju (KR). **명승현 (MYUNG, Seung-Hyun)**; 61095 광주시 북구 북문대로242번길 50 205동 1103호, Gwangju (KR).

(74) 대리인: **윤대웅 (YOON, Dae Woong)**; 08793 서울시 관악구 남부순환로 1922 603호, Seoul (KR).

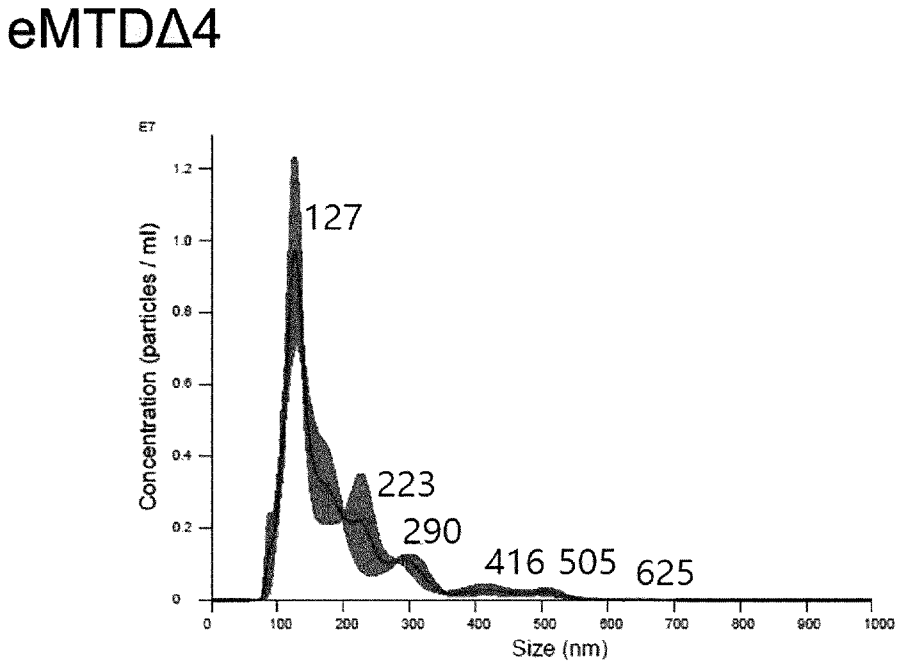
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, 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, 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, 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), 유

WO 2022/055077 A1

(54) **Title:** COMPOSITION FOR PROMOTING PRODUCTION OF EXTRA-CELLULAR VESICLES CONTAINING PEPTIDE DERIVED FROM NOXA PROTEIN, AND METHOD FOR PRODUCING EXTRA-CELLULAR VESICLES USING SAME

(54) **발명의 명칭:** Noxa 단백질에서 유래한 펩타이드를 포함하는 세포외 소포 생산 촉진용 조성물 및 이를 이용한 세포외 소포의 생산 방법



(57) **Abstract:** The present invention relates to a method for producing large quantities of extra-cellular vesicles (EVs) by using a peptide derived from the Noxa protein, which plays an important role in apoptosis, and a derivative thereof. Using the peptide for promoting the production of EVs and a method for producing EVs using the peptide according to the present invention makes it possible to mass-produce EVs efficiently and uniformly, and produce EVs carrying not only recombinant protein or plasmid DNA, but also drugs that cannot easily pass through cell membranes.

[다음 쪽 계속]

럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 본 발명은 세포 사멸에 중요한 역할을 하는 Noxa 단백질에서 유래한 펩타이드 (peptide) 와 이의 유도체 (derivative) 를 이용하여 다량의 세포외 소포 (Extra-cellular vesicle, EV)를 생산하는 방법에 관한 것으로, 본 발명의 세포외 소포 생산 촉진용 펩타이드 및 이를 이용한 세포외 소포의 생산 방법을 이용하면, 세포외 소포를 효율적이고 대량으로 균일하게 생산할 수 있고 또한, 재조합 단백질 또는 플라스미드 DNA 뿐만 아니라 세포막을 잘 통과하지 못하는 약물을 담지한 세포외 소포를 생산할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: Noxa 단백질에서 유래한 펩타이드를 포함하는 세포외 소포 생산 촉진용 조성물 및 이를 이용한 세포외 소포의 생산 방법

기술분야

[1] 본 특허출원은 2020년 9월 9일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제10-2020-0115145호에 대하여 우선권을 주장하며, 상기 특허출원의 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

[2] 본 발명은 Noxa 단백질 유래 펩타이드를 포함하는 세포외 소포 생산 촉진용 조성물 및 이를 이용한 세포외 소포 (Extra-cellular vesicle, EV)의 생산 방법에 관한 것으로, 구체적으로, 세포 사멸에 중요한 역할을 하는 Noxa 단백질에서 유래한 펩타이드 (Peptide)를 포함하는 조성물, 및 당을 포함하는 용액을 이용하여 세포외 소포를 효율적으로 대량 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[3] 세포외 소포 (Extra-cellular vesicle, EV)는 세포보다 작은 단위의 인지질 이중층으로 둘러싸인 주머니를 말하는 것으로 모든 종류의 체액에 존재한다. 이는 세포간 내용물 또는 정보를 주고받는 역할을 하며 최근에는 새로운 약물 전달 방식으로 이용될 수 있다는 가능성에 주목 받고 있다. 다른 약물 전달 방식과 크게 비교되는 장점으로는 개개인의 면역 체계의 저항을 받지 않고, 세포막과 같은 자연적인 장벽들에 크게 영향을 받지 않으며, 특정 세포로의 선택성을 가지게 할 수 있다는 점 등이 있다.

[4] 세포외 소포는 그 크기 및 생성 과정에 따라 엑소좀 (Exosome), 자멸 사체 (Apoptotic body) 및 미세 소포 (Microveslcles, Ectosome)와 같이 3가지로 분류된다. 엑소좀의 크기는 30 내지 150 nm로 세포내 엔도좀 (Endosome)에서 유래한다. 자멸 사체는 크기가 100 내지 5000 nm로 세포 사멸의 초반 단계에서 망가지는 세포 골격에서 유래한다. 미세 소포는 크기가 50 내지 1000 nm로 특정 약물이나 물리적 스트레스에 의해 세포막이 돌출되면서 형성된다. 세포외 소포 중에서 엑소좀 및 미세소포는 새로운 약물 전달 수단으로서 주목받고 있으며, 특히 엑소좀을 이용한 연구가 많이 진행되고 있다.

[5] 엑소좀은 세포내로 함입된 세포막으로부터 만들어 진다. 세포내 이입 (Endocytosis)을 통하여 세포막이 세포안 쪽으로 함입되면 초기 엔도좀 (Early sorting endosome, ESE)이 형성되고, 초기 엔도좀은 소포체 (Endoplasmic reticulum, ER)나 골지체 (Trans-golgi network, TGN) 등과 결합할 수 있다. 초기 엔도좀은 후기 엔도좀 (Late sorting endosome, LSE)을 형성한 후, 다른 세포질내 물질들을 엔도좀으로 가져오거나 엔도좀 내의 물질을 세포질 내로 내보내면서 강내소포 (Intraluminal vesicle)를 포함하는 다낭체 (Multivesicular bodies, MVB)를

형성한다. 다낭체는 자가포식소체 (Autophagosome)와 결합한 후, 리소좀 (Lysosome)과 결합하여 분해되거나 세포막의 안쪽에 결합하여 강내소포를 세포밖으로 내보낸다. 이렇게 내보내진 강내소포를 엑소좀이라 칭한다. 엑소좀을 분리 및 정제하기 위한 표지자로는 CD9, CD63, CD81, flotillin, HSP70 또는 HSP90 등이 있다.

[6] 엑소좀은 세포와 세포사이를 오가며 다양한 기능을 수행한다. 엑소좀은 세포내 다양한 소기관들과 상호작용하는데, 그 결과로 엑소좀은 내부에 단백질, DNA 또는 RNA 등 세포 구성물을 포함할 뿐만 아니라 아미노산이나 기타 대사산물들을 포함하기도 한다. 이를 통해 엑소좀은 세포간의 상호작용을 통해서 생식, 발생, 면역 반응 또는 암을 포함한 다양한 질병의 발생 등에서 중요한 역할을 한다.

[7] 엑소좀의 진단과 치료 목적으로의 이용 방안이 활발하게 연구되고 있다. 엑소좀은 세포안과 바깥에 존재하는 물질들을 모두 반영할 수 있으며, 엑소좀을 이용한 뇌혈관 질환 또는 중추신경계 질환 등의 진단을 시도하고 있으며, 특히 암의 진단에 대한 연구가 다수 시행되고 있다. 엑소좀이 포함하는 DNA, RNA 또는 단백질 등의 분석에 따른 암 진단 가능성은 최근 매우 활발하게 제시되고 있다.

[8] 또한, 엑소좀은 새로운 약물 전달 수단으로 주목 받고 있다. 엑소좀은 리포좀 (Liposome)에 비해 세포내로 더 쉽게 들어갈 뿐만 아니라 면역 체계의 저항을 거의 받지 않는다. 뿐만 아니라, 엑소좀의 막 표면에 존재하는 풍부한 양의 리간드 (Ligand)는 수용체를 통한 세포 특이적 전달 가능성을 보여주고 있다.

[9] 그리고, 미세소포는 세포막이 세포의 바깥쪽으로 돌출되어 나오면서 형성된다. 대표적으로는 혈소판과 적혈구에서 만들어지는 미세소포들이 있는데 이들은 세포가 활성화되거나 전단 응력 (Shear stress)이 가해지거나 세포사멸이 이루어질 때 만들어진다. 미세소포 또한 유래한 세포의 세포막과 구성이 비슷하기 때문에 면역체계의 영향을 거의 받지 않고 세포내로 쉽게 들어갈 수 있으며 세포 특이적 전달의 가능성을 보여주고 있다.

[10] 다만, 이러한 장점에도 불구하고 세포외 소포를 효율적이고 대량으로 균일하게 생산하는 것이 곤란하다는 문제점이 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[11] 이에, 본 발명자들은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 세포 사멸에서 중요한 역할을 하는 Noxa 단백질에서 유래하는 펩타이드 (Peptide)와 이의 유도체 (Derivative)를 특정 조건 하에서 세포주에 처리하여 다량의 세포외 소포 (Extra-cellular vesicle, EV)를 효율적이고 대량으로 균일하게 생산하는 방법을 완성하였다.

[12] 또한, 본 발명자들은 세포외 소포에 세포막을 잘 통과하지 못하는 물질을

담지시킬 수 있음을 확인하였다.

[13] 이에, 본 발명의 목적은 Noxa 단백질 유래 펩타이드를 포함하는 세포외 소포 생산 촉진용 조성물을 제공하는 것이다.

[14] 본 발명의 다른 목적은 Noxa 단백질 유래 펩타이드; 및 당을 포함하는 용액;을 포함하는 세포외 소포 생산용 배지를 제공하는 것이다.

[15] 본 발명의 또 다른 목적은 세포외 소포 생산용 배지를 이용한 세포외 소포 생산 방법을 제공하는 것이다.

[16] 본 발명의 또 다른 목적은 세포외 소포 생산용 배지를 이용한 세포외 소포 페이로드 (Payload) 로딩 방법을 제공하는 것이다.

기술적 해결방법

[17] 본 발명은 Noxa 단백질 유래 펩타이드를 포함하는 세포외 소포 생산 촉진용 조성물 및 이를 이용한 세포외 소포 (Extra-cellular vesicle, EV)의 생산 방법에 관한 것으로, 구체적으로, 세포 사멸에 중요한 역할을 하는 Noxa 단백질에서 유래한 펩타이드 (Peptide)를 포함하는 조성물, 및 당을 포함하는 용액을 이용하여 세포외 소포를 효율적으로 대량 생산하는 방법에 관한 것이다.

[18] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[19] 본 발명의 일 예는 Noxa 단백질 유래 펩타이드, 이의 유도체 또는 이들의 조합을 포함하는 세포외 소포 생산 촉진용 조성물에 관한 것이다.

[20] 본 발명에 있어서 Noxa 단백질은 BH3 (Bcl-2 homology 3) 도메인을 이용하여 Mcl1과 Bcl2A1에 결합하여 억제시킴으로써, BAX와 BAK 단백질이 활성화되고 시토크롬 C (Cytochrome-c)가 세포질로 유출되어 Caspase system이 작동하여 세포자멸사를 일으키는 것일 수 있다.

[21] 본 발명에 있어서 용어 “펩타이드 (peptide)”는 펩타이드 결합에 의해 아미노산 잔기들이 서로 결합되어 형성된 선형의 분자를 의미하는 것일 수 있다.

[22] 본 발명의 용어 "유도체"란, 본 발명의 펩타이드의 N-말단, C-말단 등이 화학적으로 수식되거나 또는 아미노산이 추가되어 변형된 펩타이드를 의미하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니고, 본 발명의 펩타이드와 동일하거나 유사한 기능을 수행하는 펩타이드를 의미하는 것일 수도 있다.

[23] 본 발명에 일 구체예에 있어서 Noxa 단백질 유래 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드와 약 60% 이상, 약70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 약 95% 이상, 약 98% 이상, 또는 약 99% 이상의 상동성을 갖는 펩타이드인 것일 수 있다.

[24] 본 발명에 다른 일 구체예에 있어서 Noxa 단백질 유래 펩타이드의 유도체는 서열번호 2 내지 21 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드와 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 약 95% 이상, 약 98% 이상, 또는 약 99% 이상의 상동성을 갖는 펩타이드인 것일 수 있다.

[25] 본 발명에 있어서 펩타이드는 고체상 합성법 (Solid phase peptide synthesis)을

이용하여 화학적 직접 합성하는 방법, 자동 합성기를 이용하여 합성하는 방법, 펩타이드를 암호화하는 염기서열을 벡터에 삽입하고 발현시켜 제조하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[26] 본 발명에 있어서 용어 "벡터 (Vector)"는 숙주 세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단을 의미하는 것일 수 있다.

[27] 본 발명에 있어서 벡터는 예를 들어, 플라스미드 (Plasmid) 벡터, 코즈미드 (Cosmid) 벡터 및 박테리오파아지 (Bacteriophage) 벡터, 아데노바이러스 (Adenovirus) 벡터, 레트로바이러스 (Retrovirus) 벡터 및 아데노-연관 바이러스 (Adeno-associated virus, AAV) 벡터와 같은 바이러스 벡터를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[28] 본 발명의 다른 일 예는 서열번호 1 내지 서열번호 21 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 군으로부터 선택되는 1종 이상의 펩타이드; 및 당을 포함하는 용액;을 포함하는 세포외 소포 생산용 배지에 관한 것이다.

[29] 본 발명에 있어서 용액에 포함된 펩타이드의 농도는 10 내지 80 uM, 10 내지 70 uM, 10 내지 60 uM, 10 내지 50 uM, 10 내지 40 uM, 15 내지 80 uM, 15 내지 70 uM, 15 내지 60 uM, 15 내지 50 uM, 15 내지 40 uM, 20 내지 80 uM, 20 내지 70 uM, 20 내지 60 uM, 20 내지 50 uM 또는 20 내지 40 uM 인 것일 수 있으며, 예를 들어, 20 내지 40 mM인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[30] 본 발명에 있어서 당은 글루코스, 소르비톨 및 수크로스로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있으며, 예를 들어, 수크로스인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[31] 본 발명에 있어서 용액에 포함된 글루코스의 농도는, 용액이 본 발명의 글루코스가 아닌 다른 당을 포함하는 경우, 3 내지 70 mM, 3 내지 60 mM, 3 내지 50 mM, 4 내지 70 mM, 4 내지 60 mM, 4 내지 50 mM, 5 내지 70 mM, 5 내지 60 mM 또는 5 내지 50 mM인 것일 수 있으며, 예를 들어, 5 내지 50 mM인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[32] 본 발명에 있어서 용액에 포함된 글루코스의 농도는, 용액이 본 발명의 글루코스가 아닌 다른 당을 포함하지 않은 경우, 80 내지 300 mM, 80 내지 290 mM, 80 내지 280 mM, 80 내지 270 mM, 80 내지 260 mM, 80 내지 250 mM, 90 내지 300 mM, 90내지 290 mM, 90내지 280 mM, 90내지 270 mM, 90내지 260 mM, 90내지 250 mM, 100 내지 300 mM, 100 내지 290 mM, 100 내지 280 mM, 100 내지 270 mM, 100 내지 260 mM 또는 100 내지 250 mM인 것일 수 있으며, 예를 들어, 100 mM 내지 250 mM인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[33] 본 발명에 있어서 용액에 포함된 수크로스의 농도는 80 내지 300 mM, 80 내지 290 mM, 80 내지 280 mM, 80 내지 270 mM, 80 내지 260 mM, 80 내지 250 mM, 90 내지 300 mM, 90내지 290 mM, 90내지 280 mM, 90내지 270 mM, 90내지 260 mM, 90내지 250 mM, 100 내지 300 mM, 100 내지 290 mM, 100 내지 280 mM, 100 내지 270 mM, 100 내지 260 mM 또는 100 내지 250 mM인 것일 수 있으며, 예를 들어,

100 mM 내지 250 mM인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[34] 본 발명에 있어서 용액에 포함된 소르비톨의 농도는 100 내지 350 mM, 100 내지 340 mM, 100 내지 330 mM, 100 내지 320 mM, 100 내지 310 mM, 100 내지 300 mM, 125 내지 350 mM, 125 내지 340 mM, 125 내지 330 mM, 125 내지 320 mM, 125 내지 310 mM, 125 내지 300 mM, 150 내지 350 mM, 150 내지 340 mM, 150 내지 330 mM, 150 내지 320 mM, 150 내지 310 mM 또는 150 내지 300 mM인 것일 수 있으며, 예를 들어, 150 mM 내지 300 mM인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[35] 본 발명에 있어서 배지는 고체상 배지 및 액체상 배지로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있으며, 예를 들어, 액체상 배지일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[36] 본 발명에 있어서 용액에 포함된 MOPS [3-(N-morpholino)propanesulfonic acid]의 농도는 7 내지 13 mM, 7 내지 12 mM, 7 내지 11 mM, 8 내지 13 mM, 8 내지 12 mM, 8 내지 11 mM, 9 내지 13 mM, 9 내지 12 mM, 9 내지 11 mM, 10 내지 13 mM, 10 내지 12 mM, 10 내지 11 mM인 것일 수 있으며, 예를 들어, 10 mM인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[37] 본 발명에 있어서 용액의 pH는 5 내지 10, 5 내지 9, 5 내지 8, 6 내지 10, 6 내지 9, 6 내지 8, 7 내지 10, 7 내지 9 또는 7 내지 8일 수 있으며, 예를 들어, 7 내지 8일 수 있다.

[38] 본 발명에 있어서 용액의 pH는 세포외 소포를 생산하기 위하여 중요하고, pH가 10을 초과하거나, 5 미만인 경우에는 세포외 소포가 생산되지 않을 수 있다.

[39] 본 발명에 있어서 용액은 염화나트륨 (NaCl), 염화칼륨 (KCl), 글루콘산나트륨 (Na-gluconate), 글루콘산칼륨 (K-gluconate), 인산나트륨 ($NaPO_4$) 및 인산칼륨 (KPO_4)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 더 포함하는 것일 수 있다.

[40] 본 발명에 있어서 용액에 포함된 염화나트륨 (NaCl)의 농도는 1 mM 이하인 것일 수 있으며, 0 내지 0.8 mM, 0 내지 0.6 mM, 0 내지 0.4 mM, 0.1 내지 1 mM, 0.1 내지 0.8 mM, 0.1 내지 0.6 mM 또는 0.1 내지 0.4 mM인 것일 수 있고, 예를 들어, 0.1 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[41] 본 발명에 있어서 용액에 포함된 염화칼륨 (KCl)의 농도는 1 mM 이하인 것일 수 있으며, 0 내지 0.8 mM, 0 내지 0.6 mM, 0 내지 0.4 mM, 0.1 내지 1 mM, 0.1 내지 0.8 mM, 0.1 내지 0.6 mM 또는 0.1 내지 0.4 mM인 것일 수 있고, 예를 들어, 0.1 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[42] 본 발명에 있어서 용액에 포함된 글루콘산나트륨 (Na-gluconate)의 농도는 1 mM 이하인 것일 수 있으며, 0 내지 0.8 mM, 0 내지 0.6 mM, 0 내지 0.4 mM, 0.1 내지 1 mM, 0.1 내지 0.8 mM, 0.1 내지 0.6 mM 또는 0.1 내지 0.4 mM인 것일 수 있고, 예를 들어, 0.1 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[43] 본 발명에 있어서 용액에 포함된 글루콘산칼륨 (K-gluconate)의 농도는 1 mM 이하인 것일 수 있으며, 0 내지 0.8 mM, 0 내지 0.6 mM, 0 내지 0.4 mM, 0.1 내지 1

mM, 0.1 내지 0.8 mM, 0.1 내지 0.6 mM 또는 0.1 내지 0.4 mM인 것일 수 있고, 예를 들어, 0.1 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[44] 본 발명에 있어서 용액에 포함된 인산나트륨 ($NaPO_4$)의 농도는 1 mM 이하인 것일 수 있으며, 0 내지 0.8 mM, 0 내지 0.6 mM, 0 내지 0.4 mM, 0.1 내지 1 mM, 0.1 내지 0.8 mM, 0.1 내지 0.6 mM 또는 0.1 내지 0.4 mM인 것일 수 있고, 예를 들어, 0.1 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[45] 본 발명에 있어서 용액에 포함된 인산칼륨 (KPO_4)의 농도는 1 mM 이하인 것일 수 있으며, 0 내지 0.8 mM, 0 내지 0.6 mM, 0 내지 0.4 mM, 0.1 내지 1 mM, 0.1 내지 0.8 mM, 0.1 내지 0.6 mM 또는 0.1 내지 0.4 mM인 것일 수 있고, 예를 들어, 0.1 mM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[46] 본 발명의 일 실시예에서, 용액은 글루코스 5 mM, MOPS 10 mM 및 수크로스 250 mM를 포함하는 것일 수 있다.

[47] 본 발명의 일 실시예에서, 용액은 글루코스 255 mM 및 MOPS 10 mM 를 포함하는 것일 수 있다.

[48] 본 발명의 일 실시예에서, 용액은 글루코스 5 mM, MOPS 10 mM 및 소르비톨 250 mM 를 포함하는 것일 수 있다.

[49] 본 발명의 또 다른 일 예는 다음의 단계를 포함하는 세포외 소포 생산 방법에 관한 것이다:

[50] 서열번호 1 내지 서열번호 21 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 군으로부터 선택되는 1종 이상의 펩타이드, 및 당을 포함하는 용액을 포함하는 배지를 준비하는 배지 준비 단계; 및

[51] 배지와 세포주를 혼합하는 혼합 단계.

[52] 본 발명에 있어서 세포주는 CT26 (마우스 결장 암종), HeLa (사람 자궁경부 암), HEK293 (사람 신장 상피), 3T3-L1 (마우스 지방선구세포) 및 HMSC (사람 간엽 줄기 세포)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종인 것일 수 있으며, 예를 들어, HeLa 또는 HEK293인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[53] 본 발명의 또 다른 일 예는 다음의 단계를 포함하는 세포외 소포 페이로드 (Payload) 로딩 방법에 관한 것이다:

[54] 서열번호 1 내지 서열번호 21 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 군으로부터 선택되는 1종 이상의 펩타이드, 및 당을 포함하는 용액을 포함하는 배지를 준비하는 배지 준비 단계; 및

[55] 배지, 페이로드 및 세포주를 혼합하는 혼합 단계.

[56] 본 발명에 있어서 페이로드 (Payload)는 단백질, DNA, RNA, 플라스미드 DNA 및 항암 물질로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있으며, 예를 들어, 플라스미드 DNA인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[57] 본 발명에 있어서 로딩 (loading)은 세포외 소포에 페이로드를 담지시키는 것을 의미하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[58] 본 발명에 있어서 항암 물질은 항암 단백질, 종양 억제 유전자 및 항암 화합물로

이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[59] 본 발명에 있어서 항암 단백질은 아스파라기네이즈, 보툴리눔 독소 (Botulinum toxin), 테타누스 독소 (Tetanus toxin), 시가 독소 (Shiga toxin), 디프테리아 독소 (Diphtheria toxin, DT), 리신 (ricin), 슈도모나스 외독소 (Pseudomonas exotoxin, PE), 사이토라이신 A (cytolysin A, ClyA), γ-Gelonin, VEGF (vscular endothelial growth factor), 안지오포이에틴1 (angiopoietin 1, Ang1), 안지오포이에틴2 (Ang2), 형질전환 성장인자-β (transforming growth factor-β), TGF-β인테그린 (integrin), 혈관 내피 캐드헤드린 (VE-cadherin), 플라스미노겐 활성제 (plasminogen activator, PA), 에프린 (ephrin), 혈소판 유래 성장인자 (PDGF), 단핵구 주화성 단백질-1 (MCP-1, monocyte chemotactic protein-1), 섬유아세포 성장인자 (FGF), 태반성장인자 (placenta growth factor, PIGF), VHL (von HippelLindau), APC (Adenomatous polyposis coli), CD95 (cluster of differentiation 95), ST5 (Suppression of tumorigenicity 5), YPEL3 (Yippee like 3), ST7 (Suppression of tumorigenicity 7) 및 ST14 (Suppression of tumorigenicity 14)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[60] 본 발명에 있어서 종양 억제 유전자는 VHL (von HippelLindau), APC (Adenomatous polyposis coli), CD95 (cluster of differentiation 95), ST5 (Suppression of tumorigenicity 5), YPEL3 (Yippee like 3), ST7 (Suppression of tumorigenicity 7) 및 ST14 (Suppression of tumorigenicity 14)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[61] 본 발명에 있어서 항암 화합물은 메토트렉세이트 (methotrexate), 5-플루오로우라실 (5-fluorouracil), 젬시타빈 (gemcitabine), 아라비노실시토신 (arabinosylcytosine), 히드록시우레아 (hydroxy urea), 머캅토퓨린(mercaptopurine), 티오구아닌 (thioguanine), 니트로겐 머스타드 (nitrogen mustad), 사이클로스포라미드 (cyclosporamide), 안트라사이클린 (anthracycline), 다우노루비신 (daunorubicin), 독소루비신 (doxorubicin), 에피루비신 (epirubicin), 이다루비신 (idarubicin), 픽산트론 (pixantrone), 사바루비신 (sabarubicin), 발루비신 (valrubicin), 악티노마이신 D (actinomycin D), 빈크리스틴 (vincristine), 탁솔 (taxol), 콤브레타스타틴 A4 (combretastatin A4), 푸마길린 (Fumagillin), 허비마이신 (herbimycin A), 2-메톡시에스트라디올 (2-methoxyestradiol), OGT 2115, TNP 470, 트라닐라스트 (tranilast), XRP44X, 탈리도마이드 (thalidomide), 엔도스타틴 (endostatin), 살모신 (salmosin), 안지오스타틴 (angiostatin), 플라스미노겐 (plasminogen), 아포리포단백질 (apolipoprotein)의 크링글 도메인 (kringle domain), 옥살로플라틴, 카르보틀라틴 (carboplatin), 시스플라틴 (cisplatin), 보르테조밉 (Bortezomib) 및 방사성 핵종 (radionuclides)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[62] 본 발명의 세포외 소포 생산 촉진용 펩타이드 및 이를 이용한 세포외 소포의 생산 방법을 이용하면, 세포외 소포를 효율적이고 대량으로 균일하게 생산할 수 있고, 또한, 재조합 단백질 또는 플라스미드 DNA 뿐만 아니라 세포막을 잘 통과하지 못하는 약물을 담지한 세포외 소포를 효율적으로 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[63] 도 1은 eMTDΔ4 펩타이드를 본 발명의 일 실시예에 따른 용액과 함께 HeLa 세포주에 처리한 경우, 세포외 소포가 생성되어 플레이트 바닥에 가라앉은 모습을 현미경으로 관찰한 사진이다.

[64] 도 2는 eMTDΔ4 펩타이드를 본 발명의 일 실시예에 따른 용액들과 조합하여 HeLa 세포주에 처리한 경우, 세포외 소포가 생성된 모습을 현미경으로 관찰한 사진이다.

[65] 도 3은 eMTDΔ4 펩타이드를 글루코스, 소르비톨 또는 수크로스를 포함하는 용액과 함께 HeLa 세포주에 처리하였을 때 세포외 소포가 생성되는 모습을 현미경으로 관찰한 사진이다.

[66] 도 4는 엑소좀 표지자인 HSP90에 형광단백질인 EGFP를 부착하여 HeLa 세포주에 형질감염시킨 후 세포외 소포를 형성시켜 공초점 현미경으로 관찰한 사진이다.

[67] 도 5는 막단백질인 CD9에 mEmerald를, CD81에 mCherry를 부착하여 HeLa 세포주에 형질감염시킨 후 공초점 현미경을 이용하여 세포외 소포가 만들어지는 과정을 2초 간격으로 촬영한 사진이다.

[68] 도 6은 HeLa 세포주에서 생산된 세포외 소포의 크기를 원자현미경으로 측정한 사진이다.

[69] 도 7은 HEK-293 세포주에서 MTD, eMTDΔ4 및 이의 유도체가 생산하는 세포외 소포의 수량을 Bradford 용액으로 정량한 Heat-map이다.

[70] 도 8은 HEK-293 세포주에서 MTD, eMTDΔ4 및 이의 유도체가 생산하는 세포외 소포의 크기와 수량을 Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) system으로 분석한 그래프이다.

[71] 도 9는 세포외 소포에 재조합 단백질인 TRAIL 단백질을 담지시킨 후 아크릴아마이드 젤 전기영동 (acrylamide gel electrophoresis)을 수행한 결과이다.

[72] 도 10은 세포외 소포에 플라스미드 DNA인 pUC19과 pEGFP-C1을 담지시킨 후 아가로스 젤 전기영동 (agarose gel electrophoresis)을 수행한 결과이다.

[73] 도 11은 세포외 소포에 플라스미드 DNA를 담지시킨 후 이를 분리하는 과정을 도식화한 모식도이다.

[74] 도 12는 HeLa 세포주에 eMTDΔ4를 처리하여 생산한 세포외 소포에 세포막을 잘 통과하는 약물인 독소루비신 (doxorubicin)을 담지시킨 후 공초점 현미경으로 그 결과를 확인한 사진이다.

[75] 도 13은 HeLa 세포주에 eMTDΔ4를 처리하여 생산한 세포외 소포에 세포막을 잘 통과하지 않는 약물인 PI (propidium iodide)를 담지시킨 후 공초점 현미경으로 그 결과를 확인한 사진이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[76] 서열번호 1 내지 서열번호 21 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 군으로부터 선택되는 1종 이상의 펩타이드를 포함하는 세포외 소포 생산 촉진용 조성물.

발명의 실시를 위한 형태

[77] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[78]

[79] **제조예 1. Noxa 단백질 유래 펩타이드 및 그 유도체의 제조**

[80] Noxa 단백질의 미토콘드리아 표적 도메인 (mitochondrial targeting domain, MTD)을 표 1의 서열번호 1에 나타내었다. MTD로부터 유래한 펩타이드의 합성은 0.25 mmol을 단위로 하는 수동 Fmoc 합성방법을 기본적으로 이용하였다. 구체적으로 기술하면, 레진 (resin)을 디메틸포름아마이드 (Dimethylformamide, DMF)로 깨끗이 씻은 후 10 mL의 20% 피페리딘/디메틸포름아마이드 (piperidine/DMF) 용액을 레진에 넣었다. 1분 동안 저어준 후 다시 10 mL의 20% 피페리딘/디메틸포름아마이드 용액을 넣고 30분 동안 흔들어주었다. 다시 디메틸포름아마이드로 깨끗이 씻은 후, 피페리딘이 남아있지 않음을 닌히드린 반응 (ninhydrin test)으로 확인하였다 (레진이 파란색으로 변함).

[81] 커플링 (coupling)을 진행하기 위해 다음의 용액을 준비하였다: 1 mmol Fmoc-아미노산 (Fmoc-amino acid), 2.1 ml 0.45 M HBTU/HOBT [(2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate, Hexafluorophosphate Benzotriazole Tetramethyl Uronium/Hydroxybenzotriazole] (1 mmol), 348 uL DIEA (N,N-Diisopropylethylamine) (2 mmol).

[82] 준비된 용액을 레진에 넣고 30분 동안 흔들어 주었다. 용액을 레진에서 따라낸 후 디메틸포름아마이드를 이용하여 레진을 세척하였다. 다음으로 아미노산을 커플링 시키기 위하여 상기 용액을 다시 넣은 후 커플링 단계를 반복하여 Noxa 단백질 유래 eMTDΔ4 및 그 유도체 펩타이드를 합성하였다.

[83] 이렇게 합성된 펩타이드는 고성능 액체 크로마토그래피 (High-performance liquid chromatography, 기기: Waters 2690 separations module, Flow rate: 1.0 ml/min, gradient: 0-20% B, 5분; 20-50%, B 20분; 50-80%, B 5분, A; 0.1% TFA water, B; 0.1% TFA acetonitrile, column: waters C18, 5 micron, Detection: 220 nm, purity: 95%) 및 질량분석기 (HP 1100 series LC/MSD)로 분석하였으며, 합성된

펩타이드를 표 1의 서열번호 2 내지 서열번호 21에 나타내었다.

[84] [표1]

서열번호	명명	서열	비고
1	MTD	KLLNLISKLF	10aa
2	eMTDΔ4	KLNFRQKLLNLISKLF	16aa
3	TU17	RPARPARGGKLLNLISKLF	19aa
4	R(8):MTD	RRRRRRRRKLLNLISKLF	18aa
5	TU103	KLLNLWSLLFGYTIK	15aa
6	TU104	MEWWYLLKLLNLISKLF	17aa
7	TU107	LRSLRDKLLNLISKLF	16aa
8	TU111	GLKSLRKLLNLISKLF	16aa
9	TU114	KWYAKLLNLISKLF	14aa
10	TU124	KLLNLWSLLKGYTIK	15aa
11	TU128	AEYRKLLNLISKLF	14aa
12	TU135	AEYSRKLLNLISKLF	15aa
13	TU146	YWLPLRKLLNLISKLF	16aa
14	TU149	AHFLRKLLNLISKLF	15aa
15	TU151	AFFLRKLLNLISKLF	15aa
16	TU155	QFAQYLRNLISKLF	14aa
17	TU156	KVSIFLKNLISKLF	14aa
18	TU166	KLNFAEFLRNLISKLF	16aa
19	TU168	KLNFRLGLRSLREKLF	16aa
20	TU171	KLNFRQKLARLLTKLF	16aa
21	TU172	LNFKWYSLLNLISKLF	16aa

[85]

[86] **실시예 2. 세포외 소포 생산용 용액의 제조**

[87] Noxa 단백질의 미토콘드리아 표적 도메인으로부터 유래한 eMTDΔ4와 그 유도체 펩타이드를 이용한 세포외 소포 생산을 위하여, 하기 표 2에 나타낸 조성과 함량을 포함하는 실시예 1 및 비교예 1 내지 18의 용액을 제조하였다.

[88]

[89] [표2]

(mM)	Glucose	MOPS	NaCl	KCl	Na-gluconate	K-gluconate	Sucrose	$NaPO_4$ (pH7.4)	KPO_4 (pH7.4)
실시예 1	5	10	-	-	-	-	250.00	-	-
비교예 1	5	10	145	-	-	-	-	-	-
비교예 2	5	10	-	145	-	-	-	-	-
비교예 3	5	10	-	-	145	-	-	-	-
비교예 4	5	10	-	-	-	145	-	-	-
비교예 5	5	10	50	-	95	-	-	-	-
비교예 6	5	10	-	50	-	95	-	-	-
비교예 7	5	10	-	-	-	-	241.37	10	-
비교예 8	5	10	-	-	-	-	232.37	20	-
비교예 9	5	10	-	-	-	-	200.00	58	-
비교예 10	5	10	75	-	-	-	91.37	10	-
비교예 11	5	10	75	-	-	-	82.75	20	-
비교예 12	5	10	75	-	-	-	50.00	58	-
비교예 13	5	10	-	-	-	-	241.37	-	10
비교예 14	5	10	-	-	-	-	232.37	-	20

비교예 15	5	10	-	-	-	-	200.00	-	58
비교예 16	5	10	-	75	-	-	91.37	-	10
비교예 17	5	10	-	75	-	-	82.75	-	20
비교예 18	5	10	-	75	-	-	50.00	-	58

[90]

[91] **실험예 1. 암세포주의 배양**

[92] **1-1. 세포주 및 시약의 준비**

[93] 제조예 1의 Noxa 단백질 유래 펩타이드 및 그 유도체의 세포외 소포 생산 유도 활성을 시험하기에 앞서 암세포주를 배양하였다.

[94] 배양에 필요한 DMEM (Dulbecco'modified eagle medium), RPMI 1640, FBS (Fatal bovine serum), Trypsin-EDTA (Trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid) 및 HBSS (Hank's balanced salt solution)은 깁코 (Gibco) 사에서 구입하였고, 형질감염 (transfection) 시약인 이펙틴 (Effectene)은 퀴아젠 (Qiagen) 사에서 구입하였다. HeLa 및 HEK293 세포주는 한국세포주은행 (KCLB)에서 구입하였다.

[95]

[96] **1-2. 배양**

[97] HeLa 및 HEK293 세포주를 3회 이상 계대배양 (Subculture)하여 실험에 이용하였다. HeLa 세포주는 10%의 소태아혈청 (Fetal bovine serum, FBS)이 포함된 DMEM을 사용하였고, HEK-293 세포주는 10%의 소태아혈정이 포함된 RPMI 1640을 사용하여 5%(v/v) CO_2 가스 조건, 37 ℃ 온도 조건 하에서 배양하였다.

[98]

[99] **실험예 2. 세포외 소포의 생산**

[100] **2-1. 세포외 소포의 생산**

[101] HeLa 세포주를 6 웰 플레이트 (Well plate)에 배양한 후, 배양액을 제거한 후, 실시예 1의 용액을 HeLa 세포주에 처리하였다.

[102] 대조군 (Control)에는 아무런 펩타이드를 처리하지 않고, 비교군 (Experiment)에는 서열번호 2의 eMTDΔ4 펩타이드 (최종 농도: 20 uM)를 처리하였다. 10분 경과 후 광학 현미경 (Bright field)을 이용하여 세포외 소포가 생성되는 것을 관찰한 결과를 도 1에 나타내었다.

[103] 도 1에서 확인할 수 있듯이, 대조군 플레이트의 바닥은 깨끗하였지만, 비교군에는 작은 세포외 소포 입자들이 형성되어 플레이트의 바닥에 가라앉아

있었다.

[104]

[105] **2-2. 다양한 용액을 이용한 세포외 소포의 생산**

[106] 서열번호 4의 R(8):MTD 펩타이드 및 실시예 1 및 비교예 1 내지 18의 용액을 이용하여, 실험예 2-1의 실험 방법에 따라 세포외 소포를 생산한 결과를 도 2a 내지 2s에 나타내었다.

[107] 도 2a에서 확인할 수 있듯이, 세포외 소포 입자가 다수 생성되었고 대부분의 입자들은 플레이트 바닥에 가라앉아 있었다.

[108] 그러나, 도 2b 내지 2s에서 확인할 수 있듯이, 세포외 소포 입자가 생성되지 않아, 플레이트 바닥에 가라앉은 세포외 소포를 관찰할 수 없었으며, 단지, 세포 내부에서 세포가 죽을 때 발생하는 파티클화 현상만이 관찰될 뿐이었다.

[109]

[110] **2-3. 다양한 당을 이용한 세포외 소포 생산**

[111] 서열번호 4의 R(8):MTD 펩타이드 및 표 3에 나타낸 실시예 1 내지 실시예 21의 용액을 이용하여, 실험예 2-1의 실험 방법에 따라 세포외 소포를 생산한 결과를 도 3a 내지 3c에 나타내었다.

[112] [표3]

(mM)	Glucose	Sucrose	Sorbitol	MOPS
실시예 1	5	250	-	10
실시예 2	255	-	-	10
실시예 3	5	-	250	10

[113]

[114] 도 3a 내지 3c 에서 확인할 수 있듯이, 용액에 수크로스 대신 글루코스 또는 소르비톨이 과량 첨가되어도, 세포외 소포가 잘 생성되었다.

[115]

[116] **실험예 3. 세포외 소포의 모양 확인**

[117] 엑소좀의 표지자인 HSP90 단백질을 HeLa 세포주에 형질감염(Transfection)시키기 위하여, HeLa 세포주를 6 웰 플레이트에 오버나이트 배양 후, 이펙틴과 pEGFP-HSP90이 클로닝된 플라스미드를 세포주에 처리하고 4시간 후 배양액을 교체하였다.

[118] 다음 날 HeLa 세포주에서 배양액을 제거하고 실시예 1 용액을 첨가하였다. 대조군에는 펩타이드를 처리하지 않았고, 비교군에는 서열번호 2의 eMTDΔ4 펩타이드 (최종농도: 20 uM)를 처리하였다. HSP90 단백질은 488 nm의 아르곤

레이저를 이용하여 여기 (Excitation)시켰다. 10분 후 공초점 현미경 (Leica TCS SP5 Microsystems)을 이용하여 대조군과 비교군을 관찰하였고, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[119] 도 4에서 확인할 수 있듯이, 대조군 (Control)의 세포 모양은 망가지지 않았고 HSP90 단백질이 세포질 내에 위치하였다. 반면, 비교군 (eMTDΔ4)은 세포 모양이 망가져 있었으며 HSP90 단백질을 포함하는 세포외 소포는 플레이트 바닥에 가라앉아 있었다.

[120] 이는 세포외 소포를 만드는 과정에서 발생한 세포막 결손을 통해 세포질의 HSP90 단백질이 세포 밖으로 빠져나갔기 때문이라 판단하였다.

[121]

[122] **실험예 4. 세포외 소포의 생성 과정 확인**

[123] HeLa 세포주를 12 웰 플레이트에 하룻밤 배양하였고, 세포외 소포의 표지자인 CD9 단백질을 확인하기 위하여 Effectene과 mEmerald-CD9이 클로닝된 플라스미드를 처리하고 4시간 후 배양액을 교체해주었다.

[124] 다음 날 HeLa 세포주에서 배양액을 제거하고 실시예 1 용액을 처리하였다. 각각의 HeLa 세포주에 eMTDΔ4 펩타이드 (최종농도: 20 uM)를 처리한 후, mEmerald-CD9를 여기시키기 위해 488 nm 파장을 갖는 레이저를 이용하였다. 그 후, 공초점 현미경을 이용하여 약 2초 간격으로 사진을 찍으며 10분 동안 관찰하였고, 그 결과를 도 5a에 나타내었다.

[125] 또한, 세포외 소포의 표지자인 CD81 단백질을 확인하기 위하여, HeLa 세포주에 mEmerald-CD9 대신 mCherry-CD81이 클로닝된 플라스미드를 처리하는 것과 mCherry-CD81을 561 nm 파장을 갖는 레이저를 이용하여 여기시키는 것을 제외하고, 상기 CD9 단백질을 관찰하기 위한 방법과 동일한 과정을 수행하였고, 그 결과를 도 5b에 나타내었다.

[126] 도 5a 및 도 5b에서 확인할 수 있듯이, CD9 및 CD81 단백질 모두 세포외 소포의 형성을 관찰하기 충분하였고, CD9 및 CD81 단백질이 세포외 기질로 방출되었다. 비록 방출 과정을 구체적으로 확인할 수는 없었지만, 세포외 소포는 생성 후 수 초만에 세포외 기질로 방출됨을 확인할 수 있었다.

[127]

[128] **실험예 5. 세포외 소포의 크기 확인**

[129] HeLa 세포주를 배양 플레이트 (Culture plate)에 배양하고 eMTDΔ4 펩타이드 (최종농도: 20 uM)를 실시예 1 용액과 함께 세포주에 처리하고 10분 후, 4%(v/v) 파라포름알데히드 (Paraformaldehyde)로 고정하였다.

[130] 그 후, 원자현미경 (Surface Imaging Systems, NANO Station II)을 이용하여 관찰하였고 (cantilever with a pyramidal-shaped tip, a frequency of 146-236 kHz, a spring constant of 21-98 N/m, a length of 225 nm, and a resistance of 0.01-0.02Ωcm), 관찰한 결과를 도 6a 내지 6c에 나타내었다.

[131] 도 6a에서 확인할 수 있듯이, 다양한 크기의 세포외 소포가 생성되었고, 그

크기를 측정할 수 있었다. 세포외 소포의 크기를 측정한 결과를 도 6b 및 6c의 그래프에 나타내었다.

[132] 도 6b 및 6c에서 확인할 수 있듯이, 세포외 소포의 크기는 약 200 nm 정도 임이 측정되었다. 이러한 결과는 지금까지 본 발명의 세포외 소포가 기존에 알려진 세포외 소포 크기와 유사한 크기를 갖고 있음을 증명하는 것이다.

[133]

[134] **실험예 6. 세포외 소포의 생산량 확인**

[135] 293-HEK 세포주를 6 웰 플레이트에 2 x 10^5 개/mL씩 배양하고, 다음 날 실시예 1 용액 및 서열번호 1 내지 21 중 어느 하나의 펩타이드를 세포주에 처리하였다. 20분 후 용액을 걷어내고 12000 rcf로 원심분리한 후, 상층액을 이용하여 Bradford 용액으로 세포외 소포의 수량을 정량하였고, 그 결과를 도 7 및 표 4에 나타내었다.

[136] [표4]

항목	명명	세포외 소포에 포함된 단백질 양 (단위: ug/ul)		
		10 uM	20 uM	40 uM
1	Media(Control)	1.03	0.75	0.76
2	MTD	0.80	1.17	2.87
3	eMTDΔ4	4.93	6.40	7.56
4	TU103	0.75	0.40	0.55
5	TU104	0.62	0.75	1.02
6	TU107	5.58	6.69	7.45
7	TU111	4.17	4.98	6.44
8	TU124	3.30	5.02	6.24
9	TU128	3.86	5.29	7.25
10	TU135	1.81	4.41	6.54
11	TU146	2.01	2.89	3.50
12	TU149	1.71	2.00	2.57
13	TU151	1.51	1.30	1.40
14	TU155	1.56	1.77	2.85
15	TU156	1.17	1.55	3.93
16	TU166	5.77	6.68	8.10
17	TU168	0.77	2.17	3.74
18	TU171	2.64	3.62	5.30
19	TU172	0.83	0.44	0.59

[137]

[138] 도 7 및 표 4에서 확인할 수 있듯이, 표 4에 나타낸 펩타이드들은 비록 생산량의 차이는 있었으나, 대부분 세포외 소포를 잘 생산하였다.

[139] 또한, 펩타이드 최종 처리 농도가 10 uM에서 20 uM 및 40 uM로 증가할수록 세포외 소포에 포함된 단백질 양이 증가하는 경향이 있음을 확인할 수 있었다.

[140]

[141] **실험예 6. 세포외 소포의 크기 및 수량 확인**

[142] 293-HEK 세포주를 10 cm culture dish에 90% confluency (약 2 x 10^7 cell)로 배양한 후 배양액을 제거하고 eMTDΔ4 펩타이드 (최종 농도: 20 um)를 실시예 1의 용액 5 ml에 녹여 세포주에 처리하였다. 20분 후 용액을 덜어내고 12000 rcf로

원심분리한 후, Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) system (Nanosight LM10, Malvern Instruments)을 이용하여 세포외 소포의 크기와 수량을 측정하여, 그 결과를 도 8a 내지 8d 및 표 5에 나타내었다.

[143] [표5]

	Stats: Merged data (nm)		수량 (개/ml, 50배 희석)
eMTDΔ4	Mean	184.5	$7.44 \times 10^8 \pm 6.51 \times 10^7$
	Mode	126.3	
	SD	87.8	
	D10	111.0	
	D50	152.6	
	D90	298.4	
MTD	Mean	181.1	$8.01 \times 10^8 \pm 1.75 \times 10^7$
	Mode	115.6	
	SD	75.2	
	D10	113.4	
	D50	154.9	
	D90	288.5	
TU17	Mean	229.6	$7.95 \times 10^8 \pm 7.15 \times 10^7$
	Mode	150.9	
	SD	104.3	
	D10	131.6	
	D50	193.2	
	D90	407.9	
TU114	Mean	231.1	$8.75 \times 10^8 \pm 9.27 \times 10^7$
	Mode	182.3	
	SD	110.2	
	D10	137.9	
	D50	191.3	
	D90	390.5	

[144]

[145] 도 8a 내지 8d 및 표 5에서 확인할 수 있듯이, 세포외 소포의 크기는 eMTDΔ4 펩타이드를 이용하면, 평균 (mean) 184.5 nm, 최빈값 (mode) 126.3 nm 및 표준편차 (SD) 87.8 nm를 나타내었다.

[146] MTD 펩타이드를 이용하면, 평균 181.1 nm, 최빈값 115.6 nm 및 표준편차 75.2 nm를 나타내었다.

[147] TU17 펩타이드를 이용하면, 평균 229.6 nm, 최빈값 150.9 nm 및 표준편차 104.3 nm를 나타내었다.

[148] TU114 펩타이드를 이용하면, 평균 231.1 nm, 최빈값 182.3 nm 및 표준편차 110.2 nm를 나타내었다.

[149] 따라서, 본 발명의 세포외 소포 생산 촉진용 펩타이드를 특정 용액 조건 하에서 이용하면, 다양한 크기를 갖는 세포외 소포를 효율적으로 대량 생산이 가능함을 확인할 수 있었다.

[150]

[151] **실험예 7. 재조합 단백질을 담지한 세포외 소포의 생산**

[152] 293-HEK 세포주를 6 웰 플레이트에 90% confluency로 배양한 후, 배양액을 제거하고, eMTDΔ4 펩타이드 (최종 농도: 25 uM)와 recombinant TRAIL을 각각 25 uM, 2 ug/ml의 농도로 실시예 1의 용액에 녹여 세포주에 처리하였다. 상층액을 채취하여 PEG (최종농도: 8%)를 첨가한 후 12000 rcf로 10분 동안 원심분리하여 세포외 소포를 침전시켰고, 이를 SDS-아크릴아마이드 젤에 걸어서 TRAIL 단백질을 확인하여, 그 결과를 도 9 및 표 6에 나타내었다.

[153] [표6]

	처리 여부							
Cell	-	-	-	-	+	+	+	+
Recombinant TRAIL	-	+	-	+	-	+	-	+
Peptide	-	-	+	+	-	-	+	+
단백질 검출 여부	X	X	X	X	X	X	X	O

[154]

[155] 도 9 및 표 6에서 확인할 수 있듯이, 본 발명의 세포외 소포 생산 촉진용 펩타이드를 특정 용액 조건 하에서 이용하면, 세포외 소포 생성 과정에서 외부에서 첨가한 재조합 단백질을 세포외 소포에 효율적으로 담지할 수 있었다.

[156]

[157] **실험예 8. 플라스미드 DNA를 담지한 세포외 소포의 생산**

[158] 293-HEK 세포주를 6 웰 플레이트에 90% confluency로 배양한 후 배양액을 제거하고, eMTDΔ4 펩타이드 (최종 농도: 25 uM)와 플라스미드 DNA (PUC19 3

ug/ml, EGFP-C1 6 ug/ml)를 실시예 1의 용액에 녹여 세포주에 처리하였다.

[159] 상층액 1.15 ml를 채취하여 Qiagen buffer P3 0.35 ml를 추가하여 총 부피를 1.5 ml로 만들고, 그 중 0.75 ml를 DNA miniprep column (Qiagen)에 통과시키고 통과된 용액은 폐놀로 정제하고 에탄올을 이용하여 침전시켰다.

[160] Column에 결합한 DNA 30 ul와 에탄올로 침전시킨 DNA 30 ul를 물에 녹인 후 Column에 결합한 DNA 10 ul 및 에탄올로 침전시킨 DNA 10 ul를 아가로스 젤 전기영동하고 EtBr로 염색하여 확인한 결과를 도 10에 나타내었다.

[161] 도 10에서 확인할 수 있듯이, 세포외 소포 생성 과정에서 외부에서 첨가한 플라스미드 DNA를 세포외 소포에 담지할 수 있었다.

[162] 또한, 도 11에 나타낸 과정에 따라, 세포외 소포로부터 플라스미드 DNA를 다시 분리해낼 수 있다.

[163] 따라서, 본 발명의 세포외 소포 생산 촉진용 펩타이드를 특정 용액 조건 하에서 이용하면, 세포외 소포에 플라스미드 DNA를 효율적으로 담지할 수 있다.

[164]

[165] **실험예 9. 독소루비신 (Doxorubicin)을 담지한 세포외 소포의 생산**

[166] 독소루비신은 세포막을 잘 통과하는 약물로서, 유방암, 방광암, 카포시 육종, 림프종 또는 급성 림프모구 백혈병 등과 같은 암 치료에 사용되는 약물이다. 먼저 HeLa 세포주를 12 웰 플레이트에 하룻밤 배양한 후 Effetene을 pEGFP-HSP90이 클로닝된 플라스미드와 처리하고 4시간 후 배양액을 교체해주었다. 다음날 HeLa 세포주에서 배양액을 제거하여 세포주를 준비하였다.

[167] 대조군에는 펩타이드를 처리하지 않고 독소루비신만 처리하였고, 비교군에는 eMTDΔ4 펩타이드 (최종농도: 25 uM)와 독소루비신 (최종농도: 100 uM)을 실시예 1 용액에 녹여 처리한 후 10분 뒤에 공초점 현미경을 이용하여 관찰하여, 그 결과를 도 12에 나타내었다.

[168] 도 12에서 확인할 수 있듯이, 생성된 세포외 소포들은 엑소좀 표지자인 HSP90 단백질뿐만 아니라 독소루비신 역시 포함하고 있었다.

[169]

[170] **실험예 10. PI (propidium iodide)를 담지한 세포외 소포의 생산**

[171] PI (propidium iodide)는 세포막을 잘 통과하지 못하는 약물로서, 세포를 염색하는데 사용할 수 있는 형광 물질이다. 먼저, HSP90 단백질을 HeLa 세포주에 형질감염시켜 세포주를 준비하였다.

[172] 대조군에는 펩타이드를 처리하지 않고 PI만 처리하였고, 비교군에는 eMTDΔ4 펩타이드 (최종농도: 25 uM)를 5 ug/ml PI와 같이 실시예 1 용액에 녹여 세포주에 처리한 후, 10분 뒤에 공초점 현미경을 이용하여 관찰하여, 그 결과를 도 13에 나타내었다.

[173] 도 13에서 확인할 수 있듯이, 생성된 세포외 소포들은 엑소좀 표지자인 HSP90 단백질뿐만 아니라 PI 역시 포함하고 있었다.

[174] 따라서, 단백질, DNA, 세포막을 통과할 수 없는 다양한 약물 등을 세포외 소포에 담지할 수 있으며, 이는 새로운 약물 전달 시스템으로서 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

산업상 이용가능성

[175] 본 발명은 발명은 Noxa 단백질 유래 펩타이드를 포함하는 세포외 소포 생산 촉진용 조성물 및 이를 이용한 세포외 소포 (Extra-cellular vesicle, EV)의 생산 방법에 관한 것으로, 구체적으로, 세포 사멸에 중요한 역할을 하는 Noxa 단백질에서 유래한 펩타이드 (Peptide)를 포함하는 조성물, 및 당을 포함하는 용액을 이용하여 세포외 소포를 효율적으로 대량 생산하는 방법에 관한 것이다.

청구범위

[청구항 1] 서열번호 1 내지 서열번호 21 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 군으로부터 선택되는 1종 이상의 펩타이드를 포함하는 세포외 소포 생산 촉진용 조성물.

[청구항 2] 서열번호 1 내지 서열번호 21 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 군으로부터 선택되는 1종 이상의 펩타이드; 및
당을 포함하는 용액;
을 포함하는 세포외 소포 생산용 배지.

[청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 당은 글루코스 (glucose), 수크로스 (sucrose) 및 소르비톨 (sorbitol)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 세포외 소포 생산용 배지.

[청구항 4] 제2항에 있어서, 상기 용액은 MOPS [3-(N-morpholino)propanesulfonic acid]를 더 포함하는 것인, 세포외 소포 생산용 배지.

[청구항 5] 제2항에 있어서, 상기 용액은 염화나트륨 (NaCl), 염화칼륨 (KCl), 글루콘산나트륨 (Na-gluconate), 글루콘산칼륨 (K-gluconate), 인산나트륨 ($NaPO_4$) 및 인산칼륨 (KPO_4)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 더 포함하는 것인, 세포외 소포 생산용 배지.

[청구항 6] 다음의 단계를 포함하는 세포외 소포 생산 방법:
서열번호 1 내지 서열번호 21 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 군으로부터 선택되는 1종 이상의 펩타이드, 및 당을 포함하는 용액을 포함하는 배지를 준비하는 배지 준비 단계; 및
배지와 세포주를 혼합하는 혼합 단계.

[청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 당은 글루코스 (glucose), 수크로스 (sucrose) 및 소르비톨 (sorbitol)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 세포외 소포 생산 방법.

[청구항 8] 제6항에 있어서, 상기 용액은 MOPS [3-(N-morpholino)propanesulfonic acid]를 더 포함하는 것인, 세포외 소포 생산 방법.

[청구항 9] 제6항에 있어서, 상기 용액은 염화나트륨 (NaCl), 염화칼륨 (KCl), 글루콘산나트륨 (Na-gluconate), 글루콘산칼륨 (K-gluconate), 수크로스 (Sucrose), 인산나트륨 ($NaPO_4$) 및 인산칼륨 (KPO_4)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 더 포함하는 것인, 세포외 소포 생산 방법.

[청구항 10] 제6항에 있어서, 상기 세포주는 CT26 (마우스 결장 암종), HeLa (사람 자궁경부 암), HEK293 (사람 신장 상피), 3T3-L1 (마우스 지방선구세포) 및 HMSC (사람 간엽 줄기 세포)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, 세포 소포의 생산 방법.

[청구항 11] 다음의 단계를 포함하는 세포외 소포 페이로드 (Payload) 로딩 방법:

서열번호 1 내지 서열번호 21 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드 군으로부터 선택되는 1종 이상의 펩타이드, 및 당을 포함하는 용액을 포함하는 배지를 준비하는 배지 준비 단계; 및
배지, 페이로드 및 세포주를 혼합하는 혼합 단계.

[청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 페이로드는 단백질, DNA, RNA, 플라스미드 DNA 및 항암 물질로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 세포외 소포 페이로드 로딩 방법.

[청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 항암 물질은 항암 단백질, 종양 억제 유전자 및 항암 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 세포외 소포 페이로드 로딩 방법.

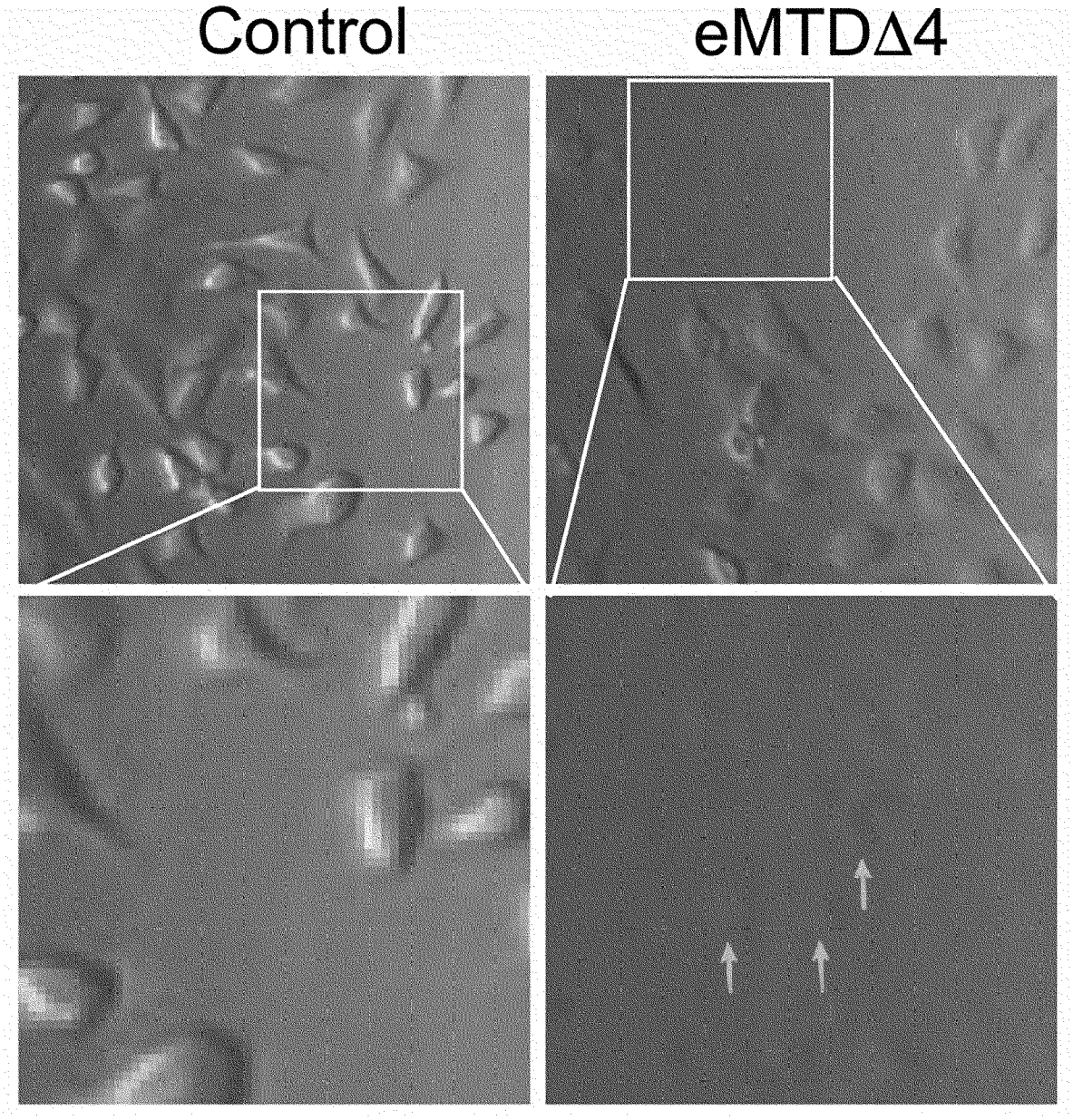
[청구항 14] 제13항에 있어서, 상기 항암 단백질은 아스파라기네이즈, 보툴리눔 독소 (Botulinum toxin), 테타누스 독소 (Tetanus toxin), 시가 독소 (Shiga toxin), 디프테리아 독소 (Diphtheria toxin, DT), 리신 (ricin), 슈도모나스 외독소 (Pseudomonas exotoxin, PE), 사이토라이신 A (cytolysin A, ClyA), γ-Gelonin, VEGF (vscular endothelial growth factor), 안지오포이에틴1 (angiopoietin 1, Ang1), 안지오포이에틴2 (Ang2), 형질전환 성장인자-β (transforming growth factor-β), TGF-β인테그린 (integrin), 혈관 내피 캐드헤드린 (VE-cadherin), 플라스미노겐 활성제 (plasminogen activator, PA), 에프린 (ephrin), 혈소판 유래 성장인자 (PDGF), 단핵구 주화성 단백질-1 (MCP-1, monocyte chemotactic protein-1), 섬유아세포 성장인자 (FGF), 태반성장인자 (placenta growth factor, PIGF), VHL (von HippelLindau), APC (Adenomatous polyposis coli), CD95 (cluster of differentiation 95), ST5 (Suppression of tumorigenicity 5), YPEL3 (Yippee like 3), ST7 (Suppression of tumorigenicity 7) 및 ST14 (Suppression of tumorigenicity 14)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 세포외 소포 페이로드 로딩 방법.

[청구항 15] 제13항에 있어서, 상기 종양 억제 유전자는 VHL (von HippelLindau), APC (Adenomatous polyposis coli), CD95 (cluster of differentiation 95), ST5 (Suppression of tumorigenicity 5), YPEL3 (Yippee like 3), ST7 (Suppression of tumorigenicity 7) 및 ST14 (Suppression of tumorigenicity 14)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 세포외 소포 페이로드 로딩 방법.

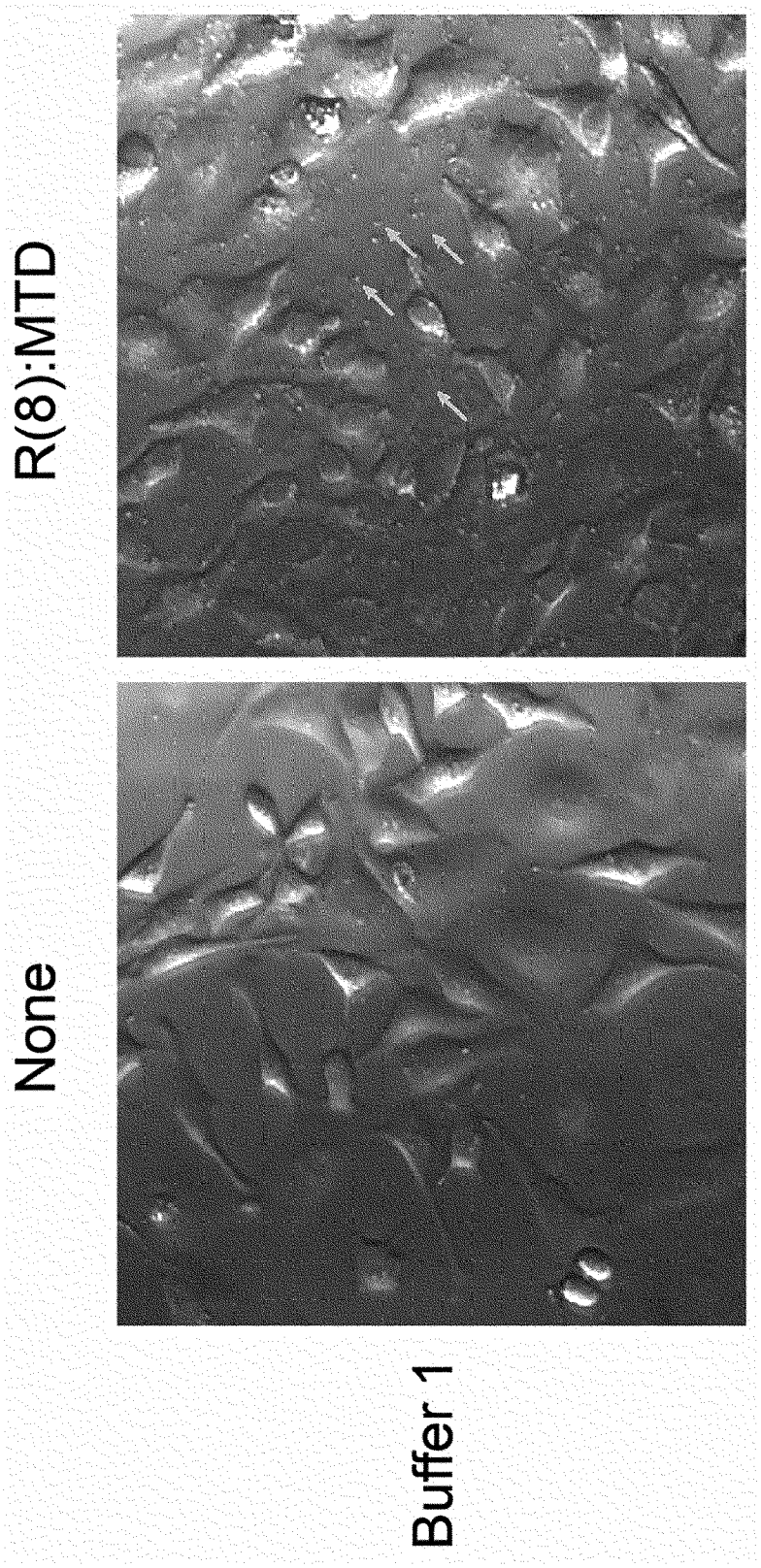
[청구항 16] 제13항에 있어서, 상기 항암 화합물은 메토트렉세이트 (methotrexate), 5-플루오로우라실 (5-fluorouracil), 젬시타빈 (gemcitabine), 아라비노실시토신 (arabinosylcytosine), 히드록시우레아 (hydroxy urea), 머캅토퓨린(mercaptopurine), 티오구아닌 (thioguanine), 니트로겐 머스타드 (nitrogen mustad), 사이클로스포라미드 (cyclosporamide), 안트라사이클린 (anthracycline), 다우노루비신 (daunorubicin), 독소루비신 (doxorubicin), 에피루비신 (epirubicin), 이다루비신 (idarubicin), 픽산트론 (pixantrone),

사바루비신 (sabarubicin), 발루비신 (valrubicin), 악티노마이신 D (actinomycin D), 빈크리스틴 (vincristine), 탁솔 (taxol), 콤브레타스타틴 A4 (combretastatin A4), 푸마길린 (Fumagillin), 허비마이신 (herbimycin A), 2-메톡시에스트라디올 (2-methoxyestradiol), OGT 2115, TNP 470, 트라닐라스트 (tranilast), XRP44X, 탈리도마이드 (thalidomide), 엔도스타틴 (endostatin), 살모신 (salmosin), 안지오스타틴 (angiostatin), 플라스미노겐 (plasminogen), 아포리포단백질 (apolipoprotein)의 크링글 도메인 (kringle domain), 옥살로플라틴, 카르보틀라틴(carboplatin), 시스플라틴 (cisplatin), 보르테조밉 (Bortezomib) 및 방사성 핵종(radionuclides)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 세포외 소포 페이로드 로딩 방법.

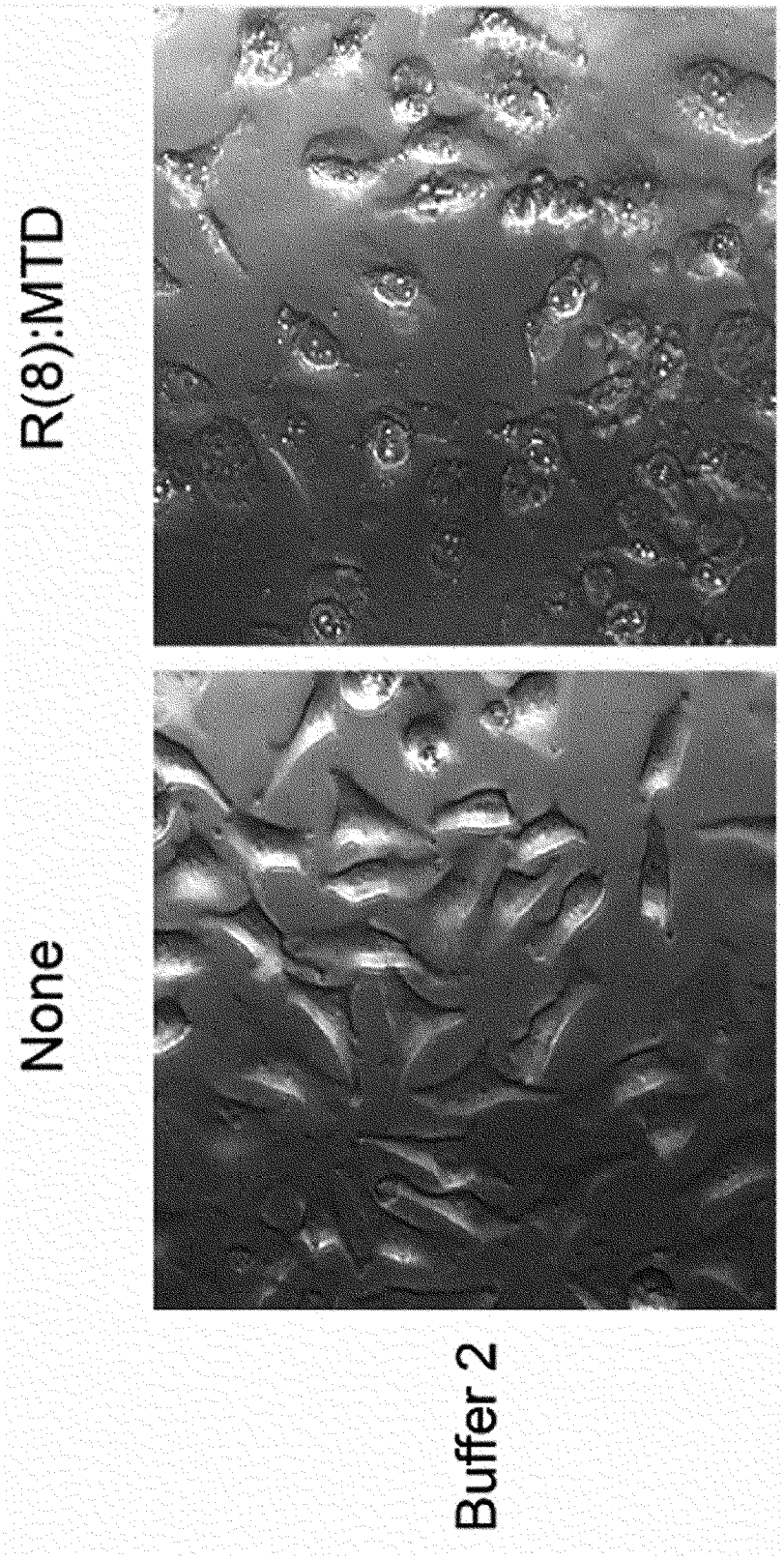
[도1]



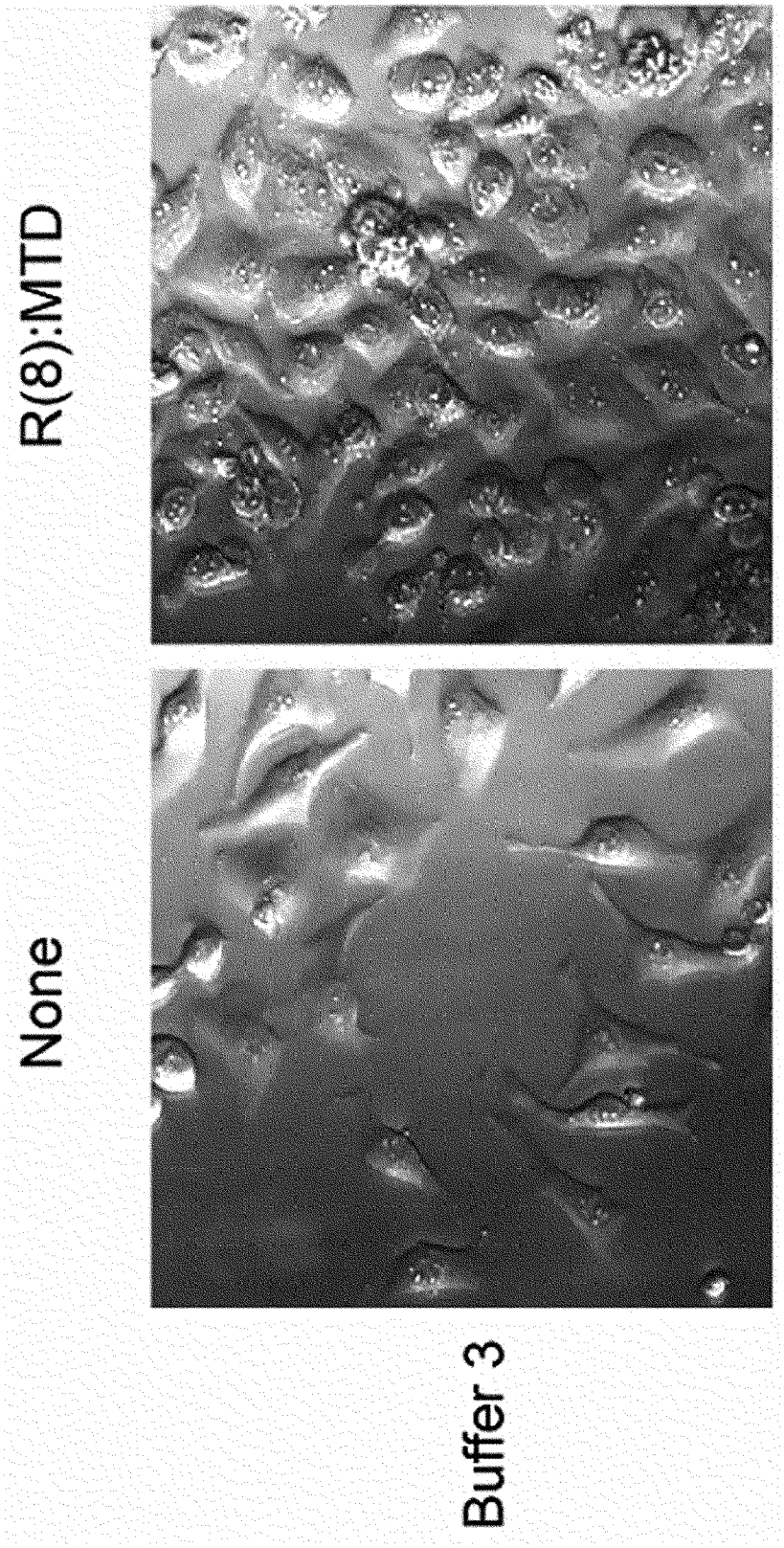
[도2a]



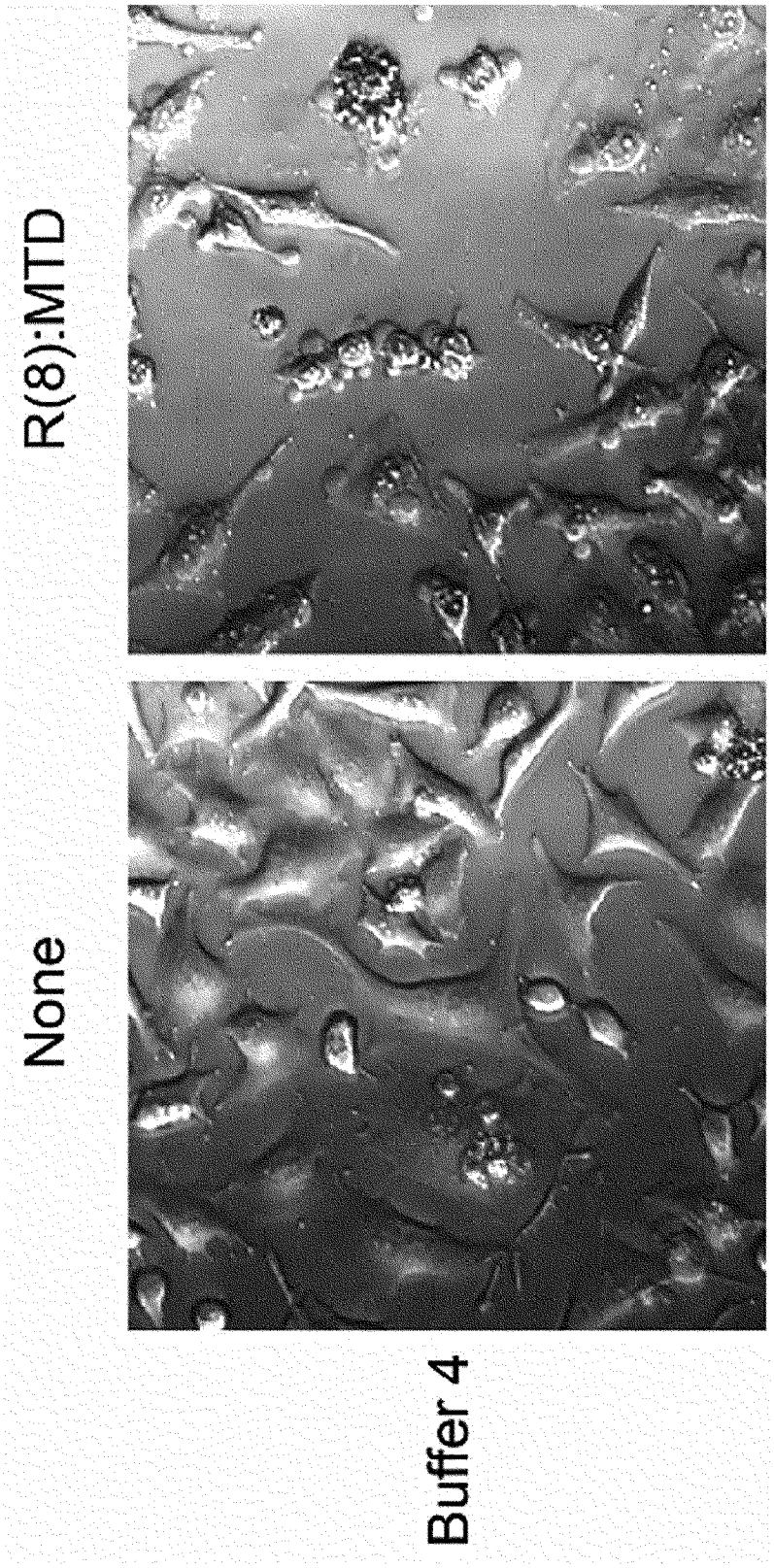
[도2b]



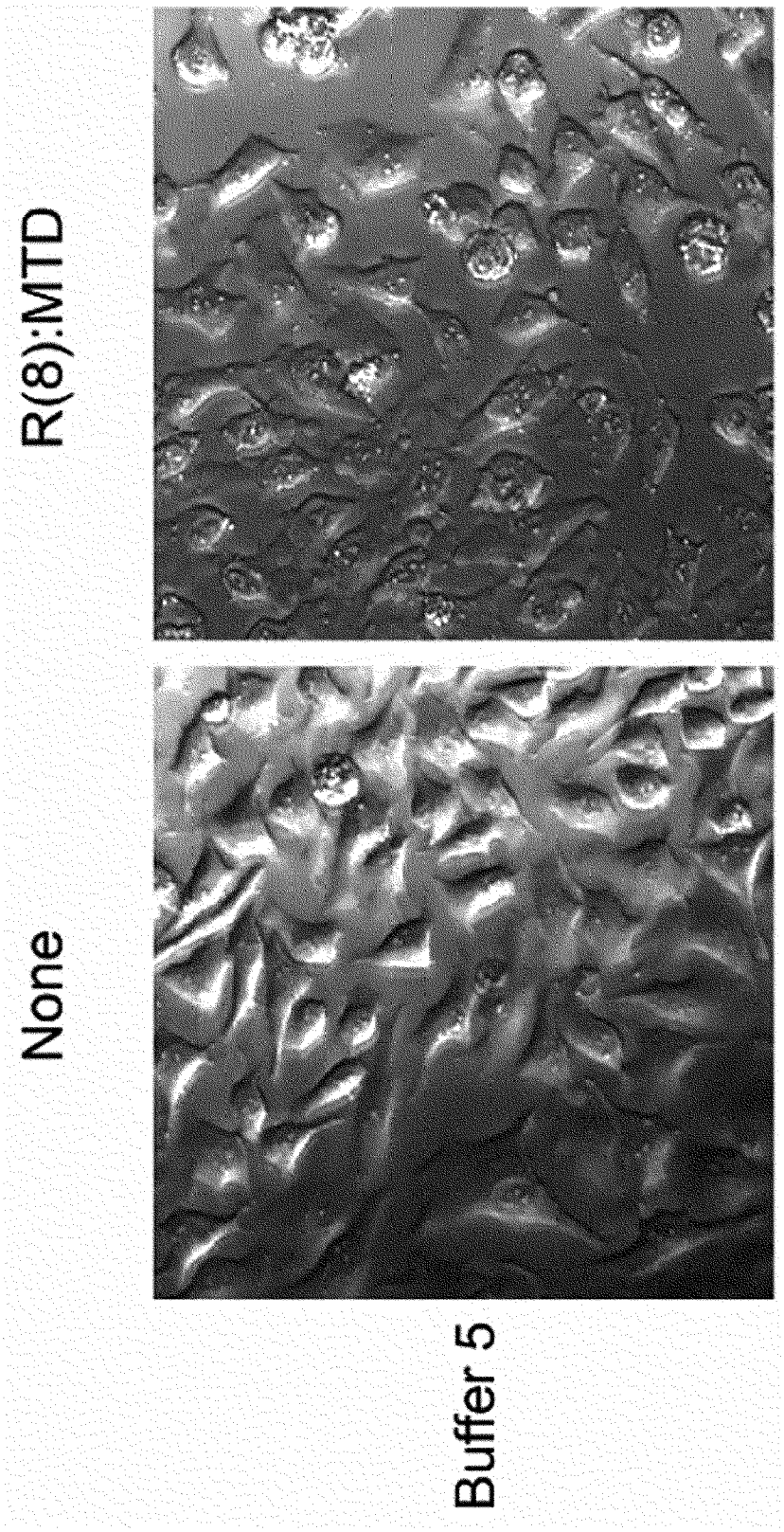
[도2c]



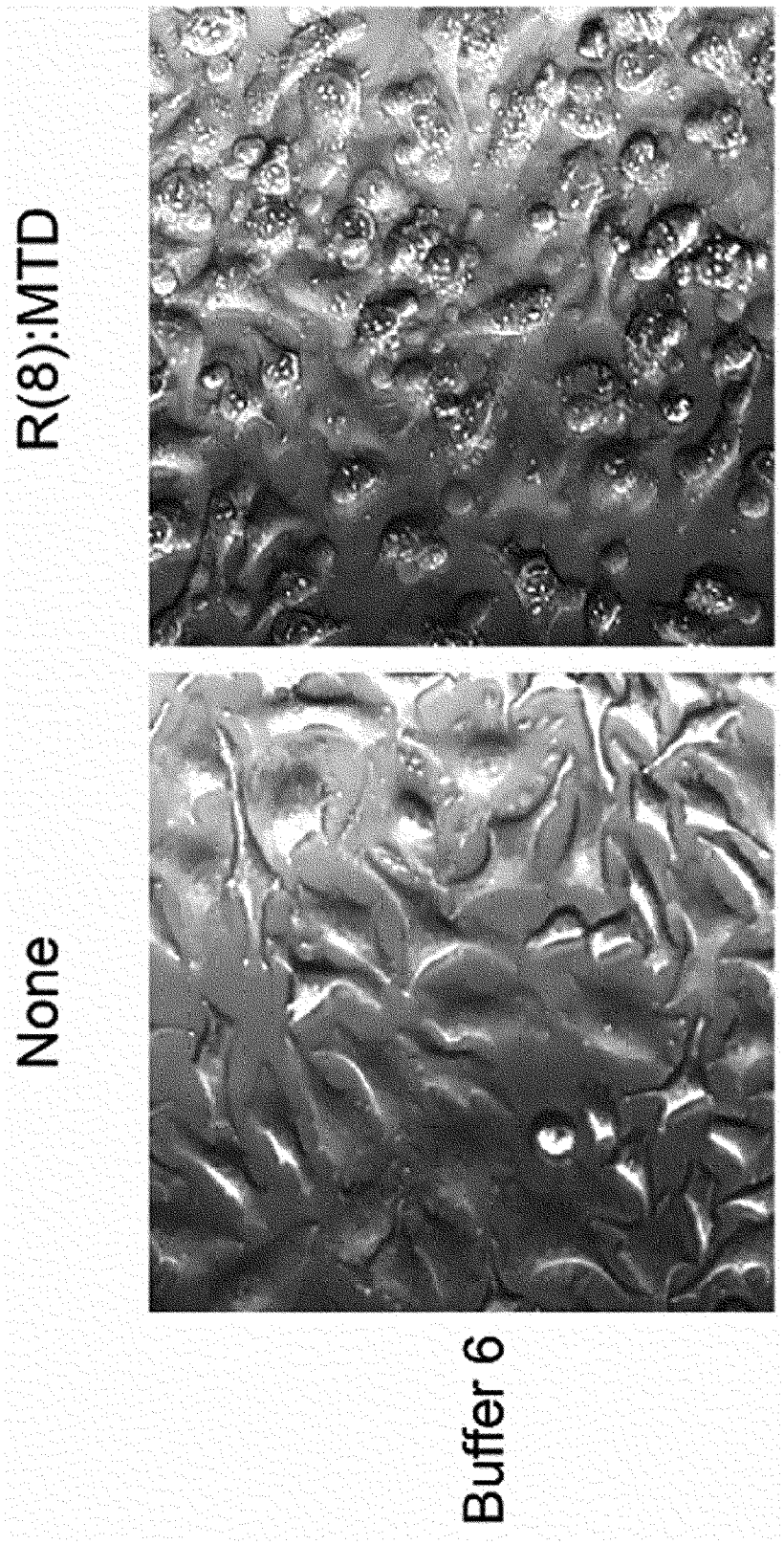
[도2d]



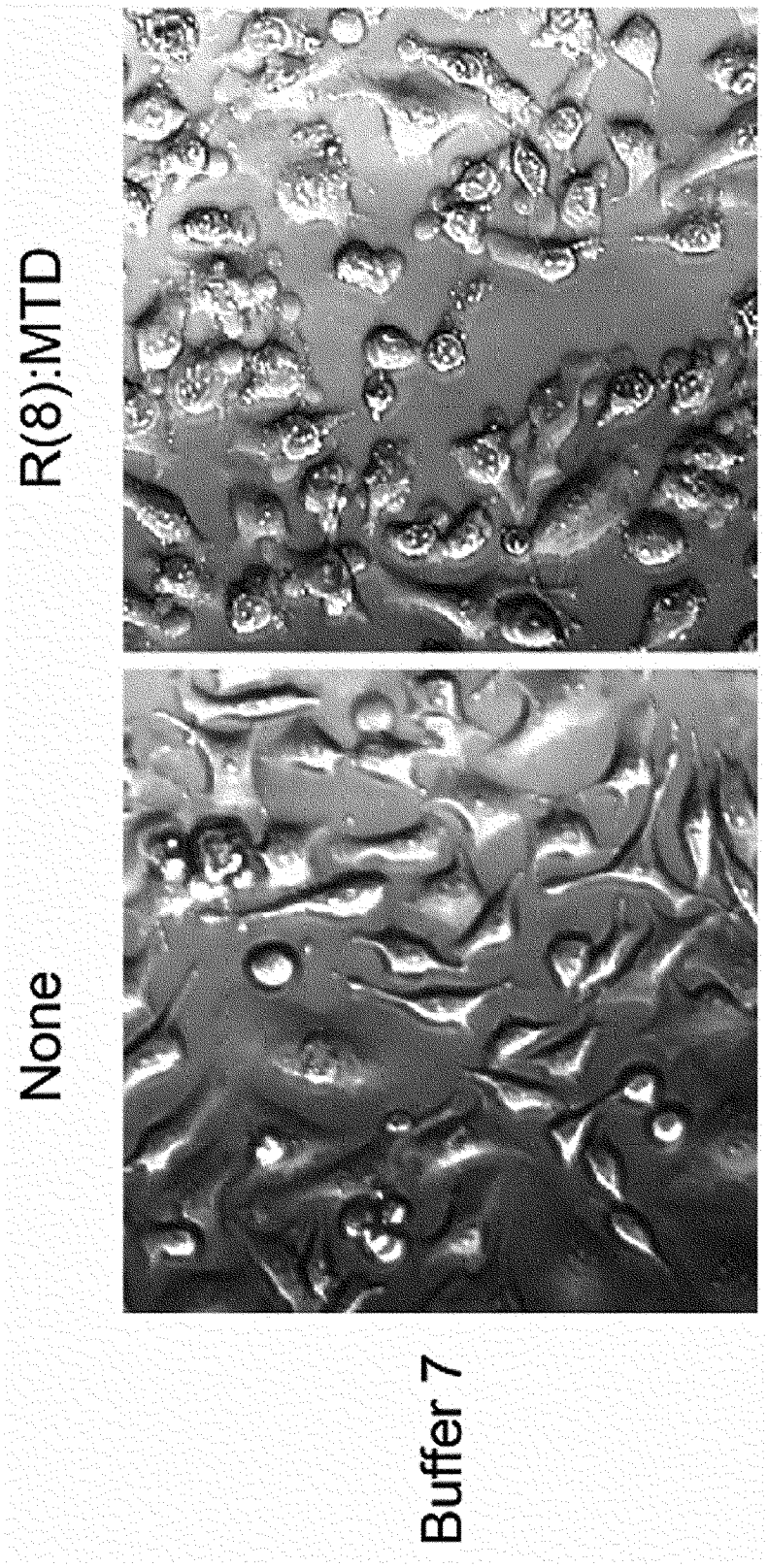
[도2e]



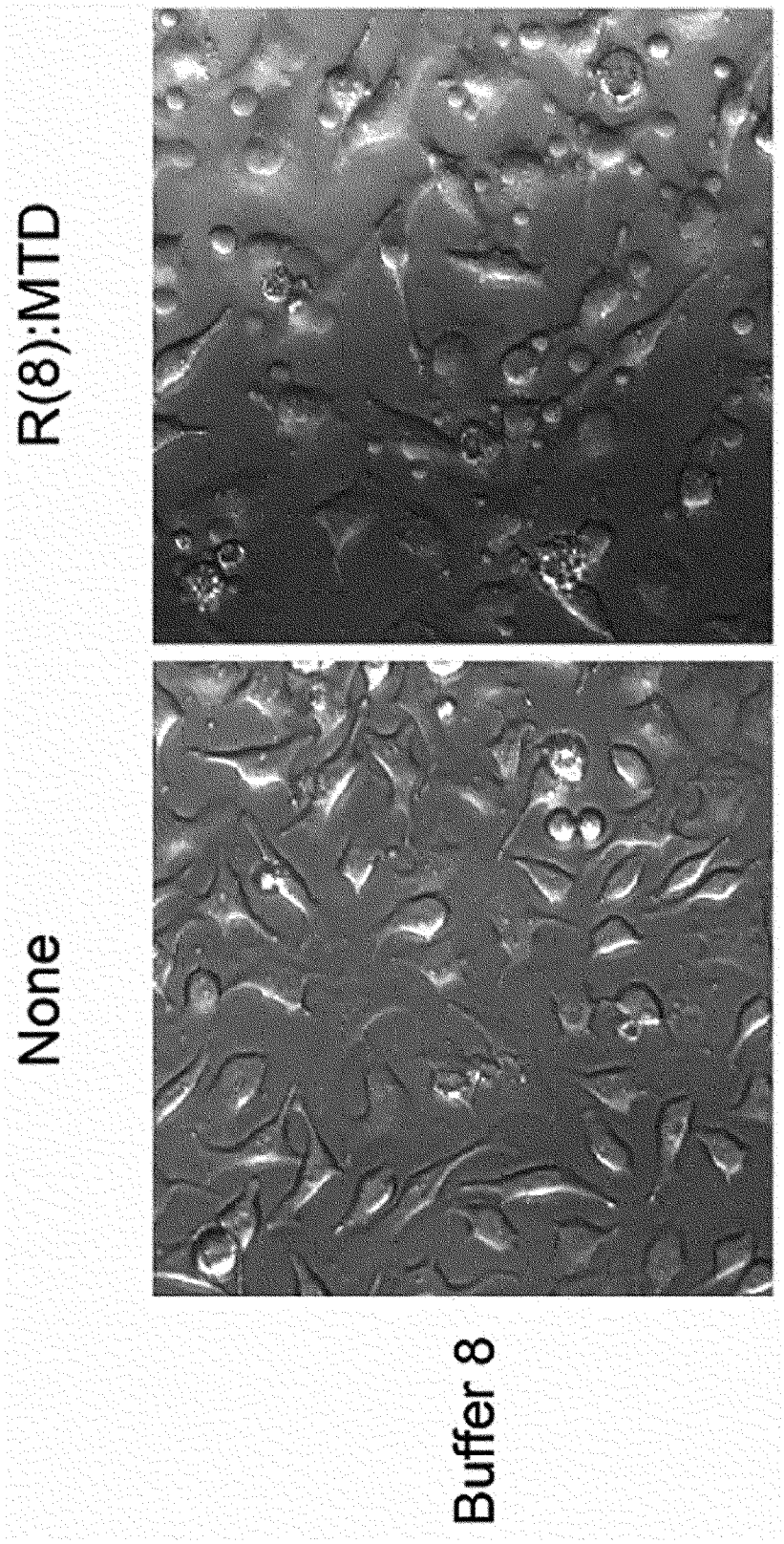
[도2f]



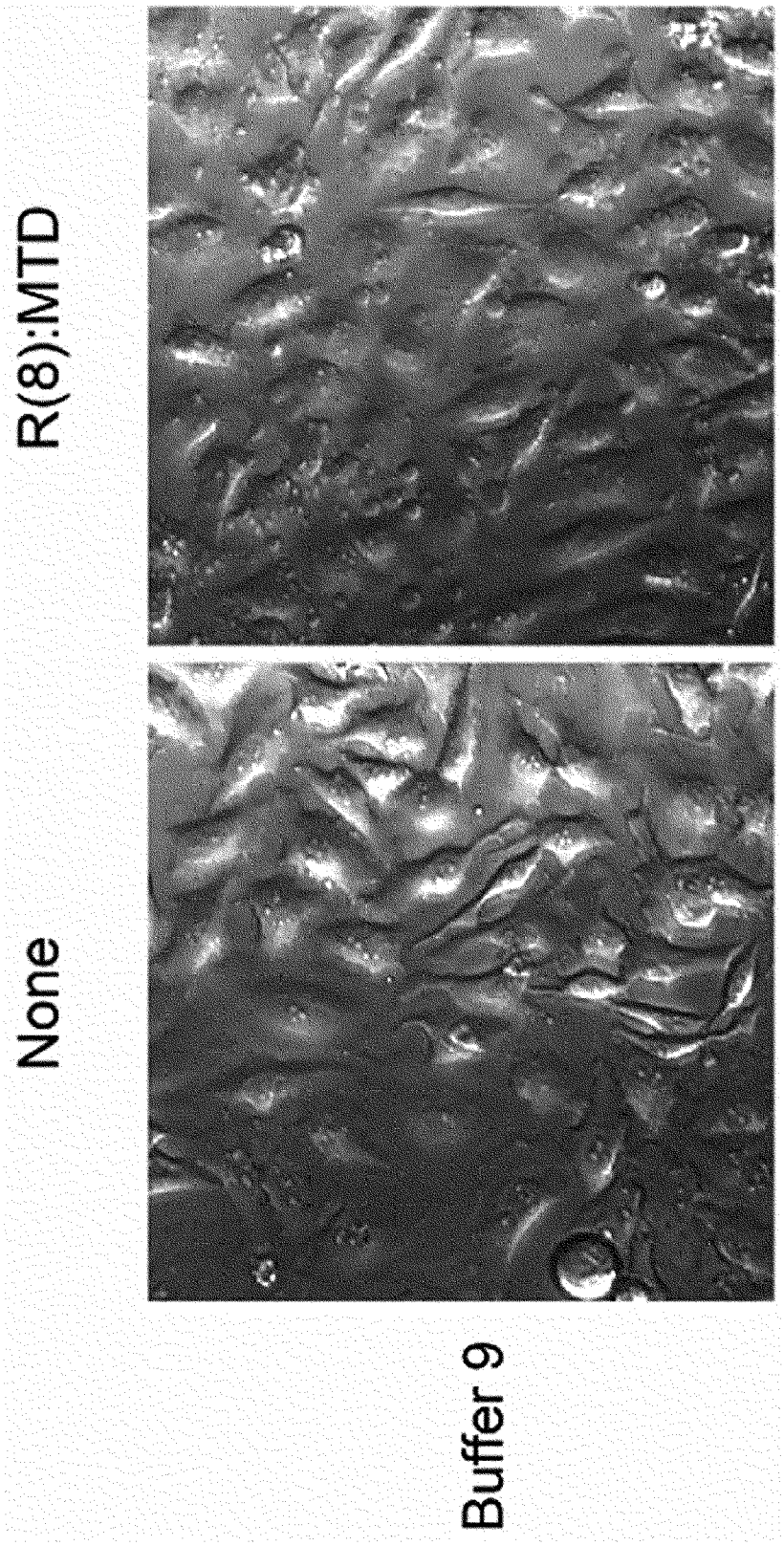
[도2g]



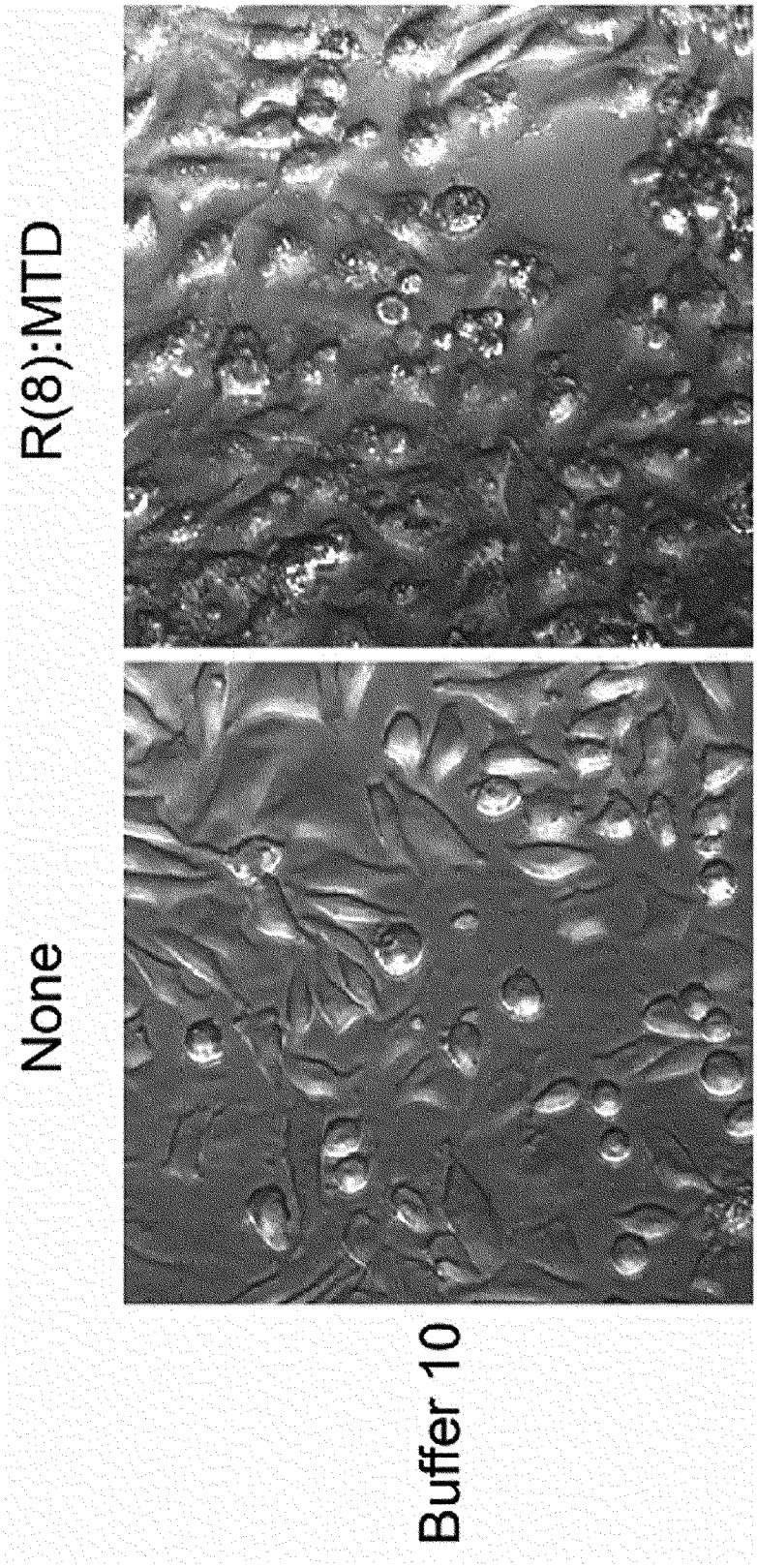
[도2h]



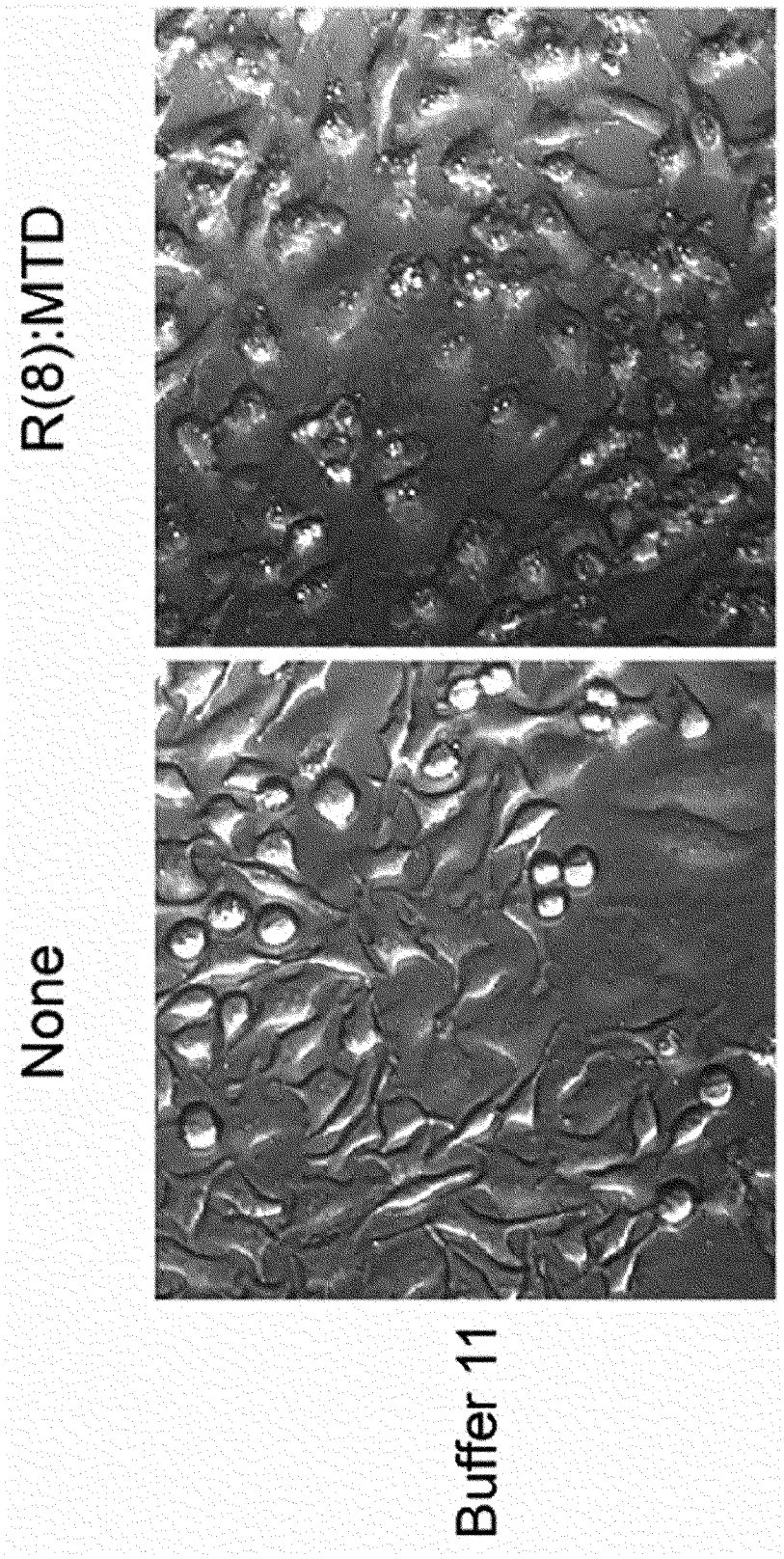
[도2i]



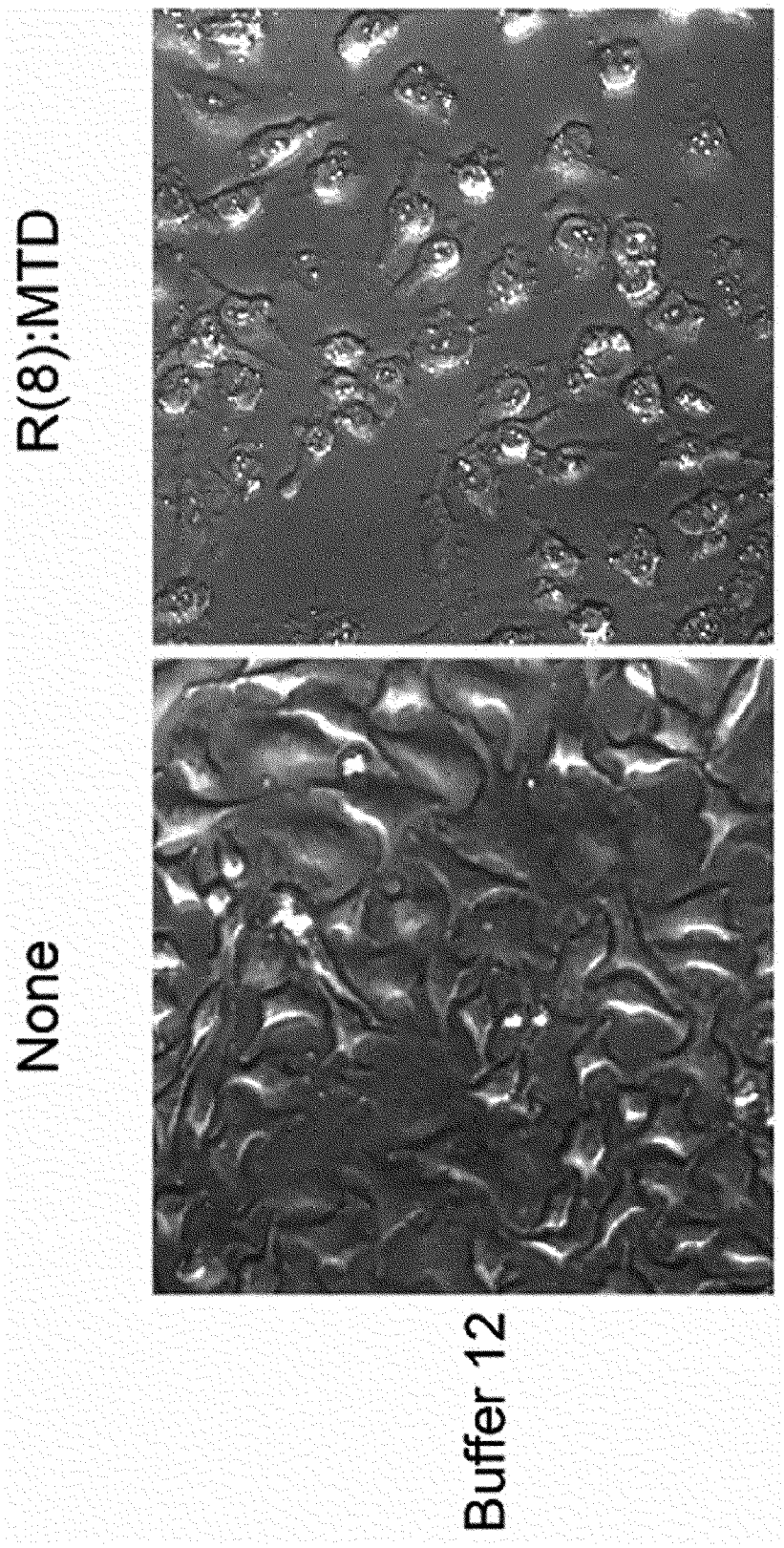
[도2j]



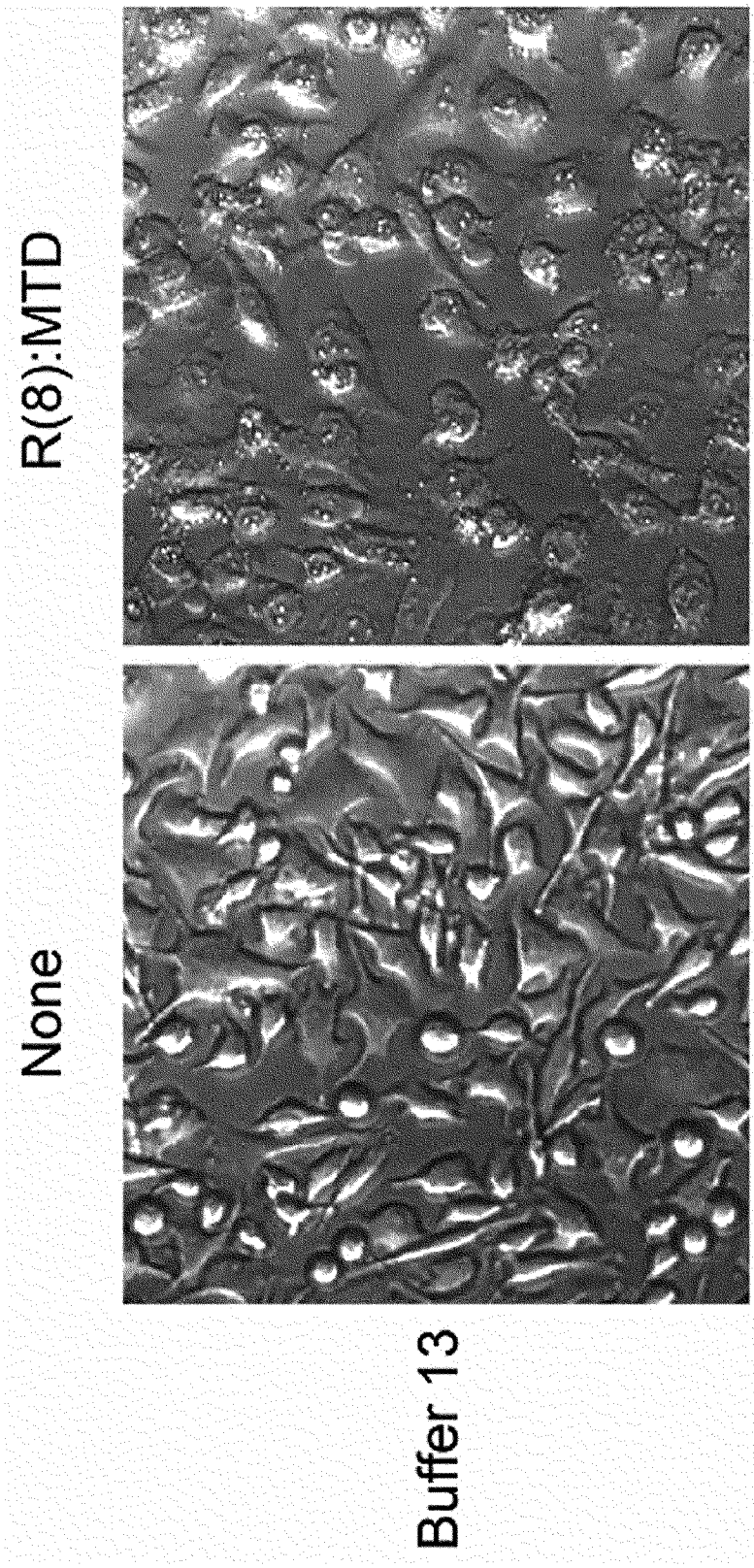
[도2k]



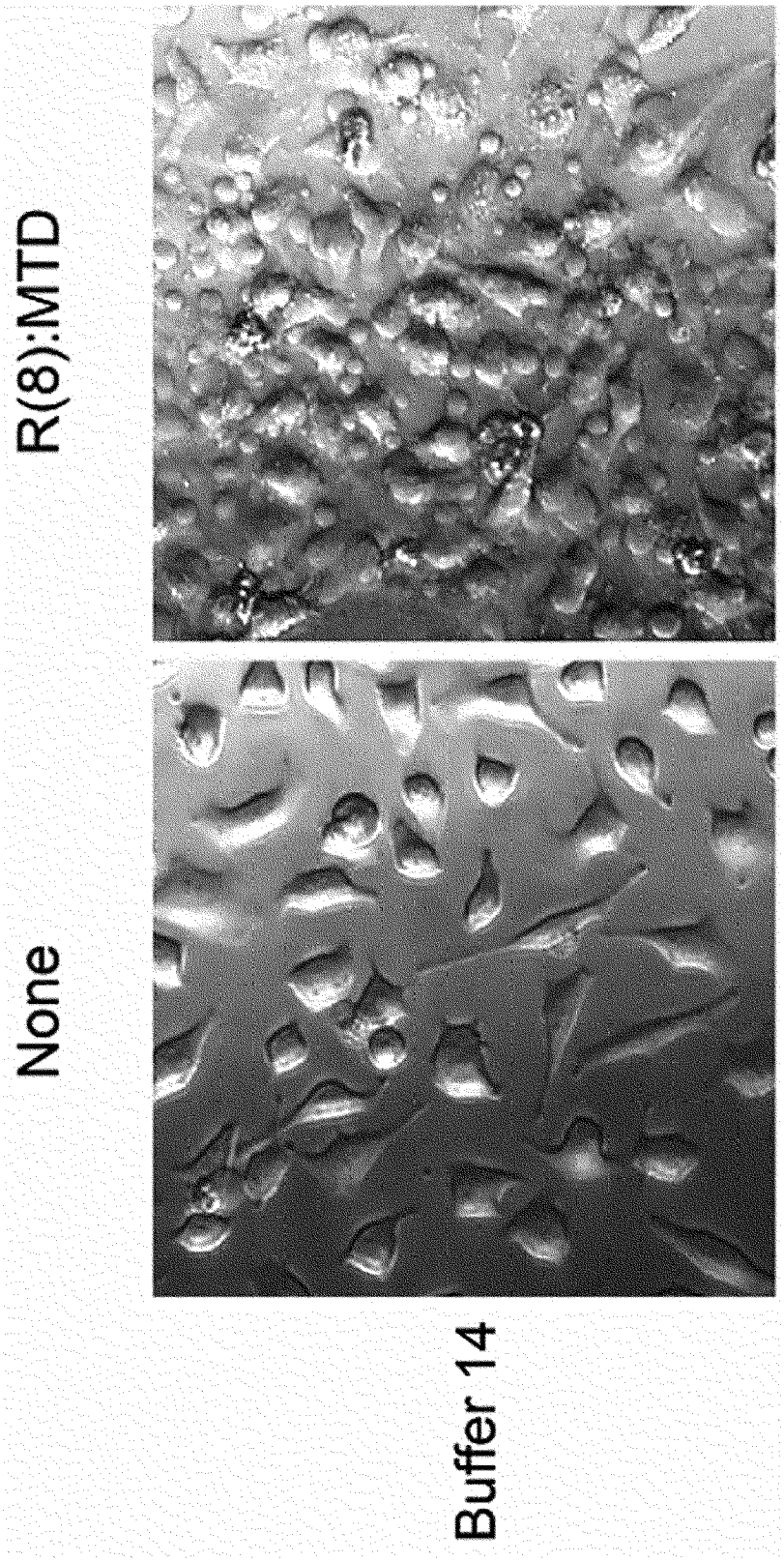
[도2l]



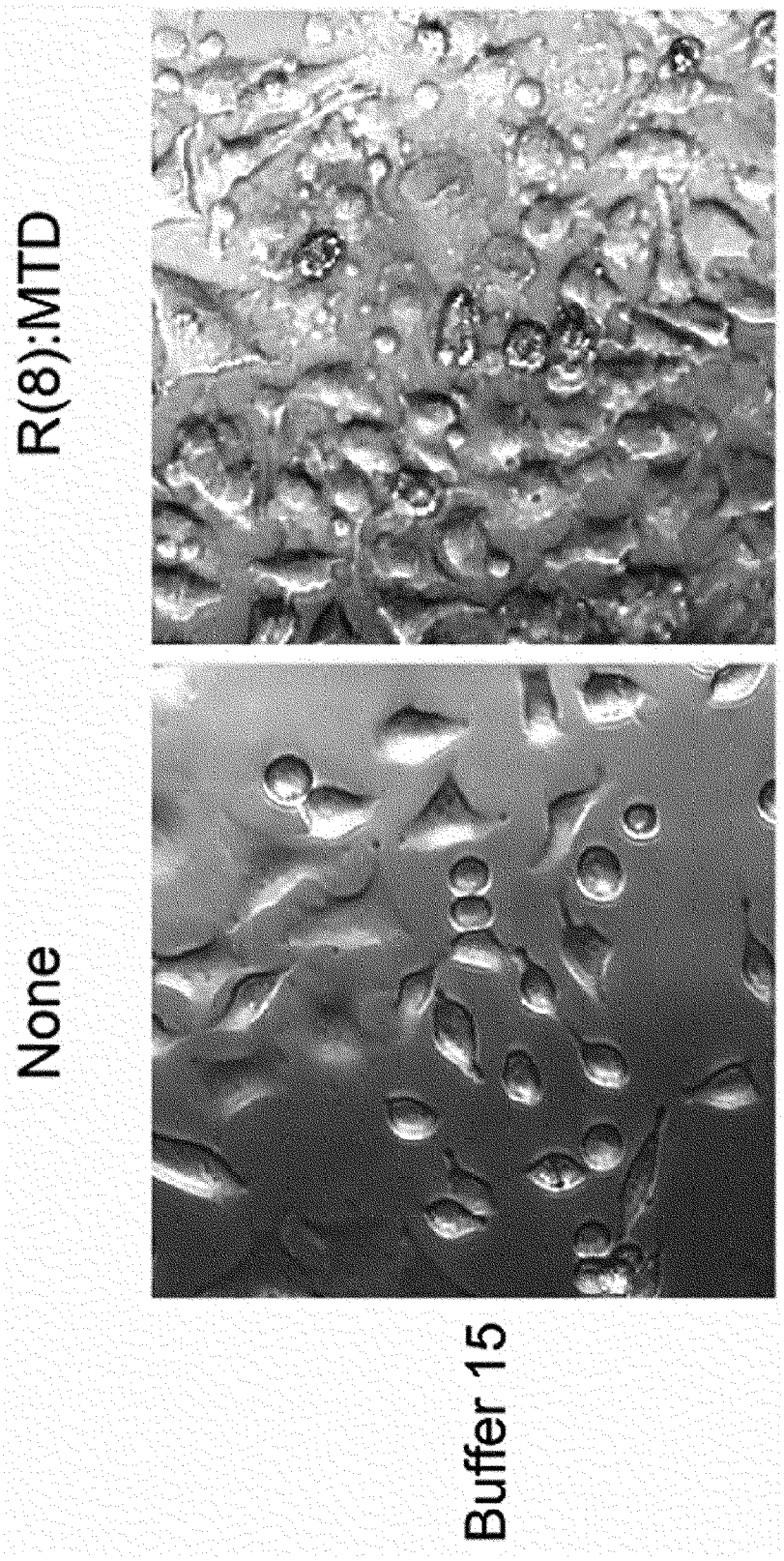
[도2m]



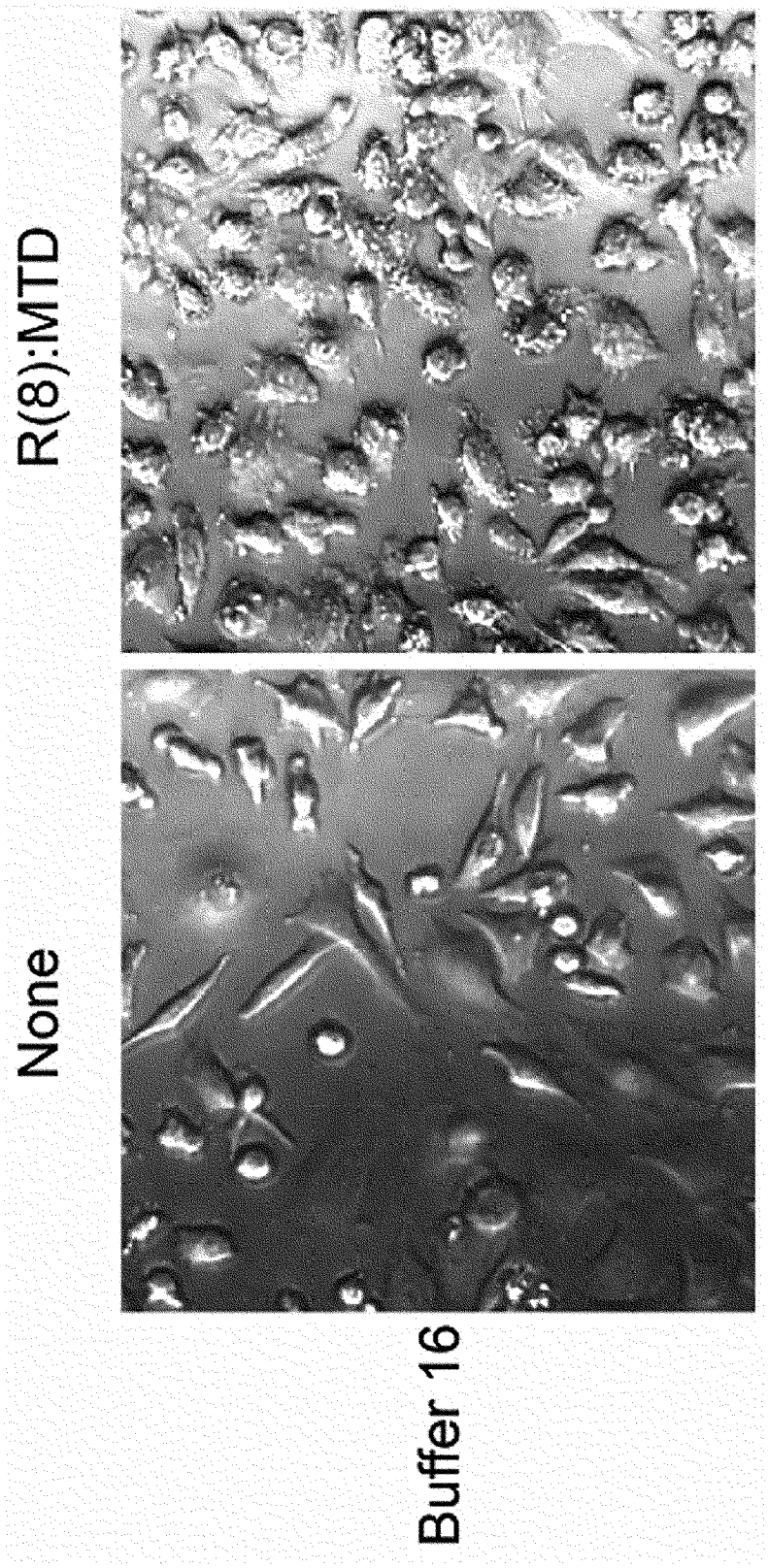
[도2n]



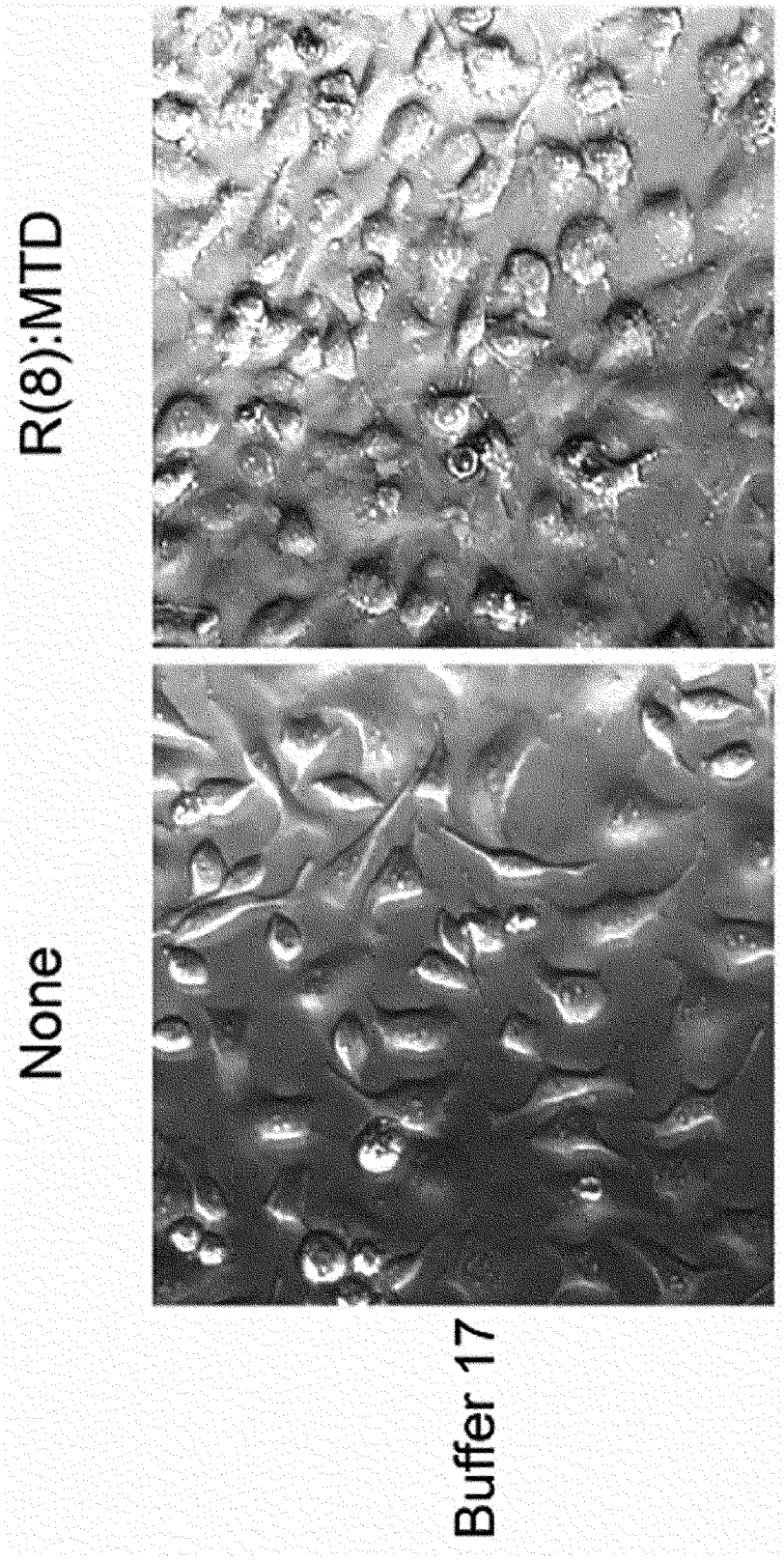
[도2o]



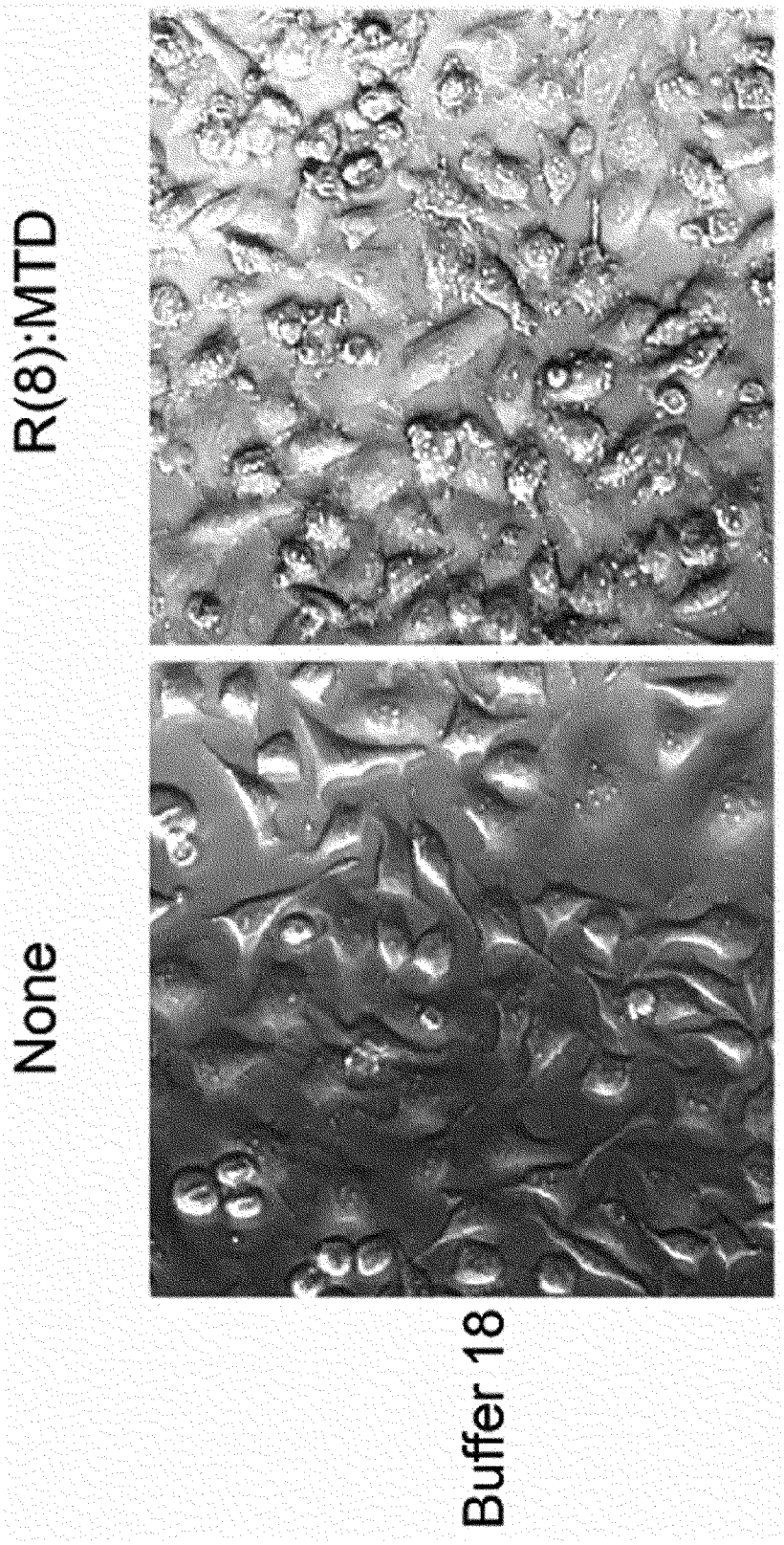
[도2p]



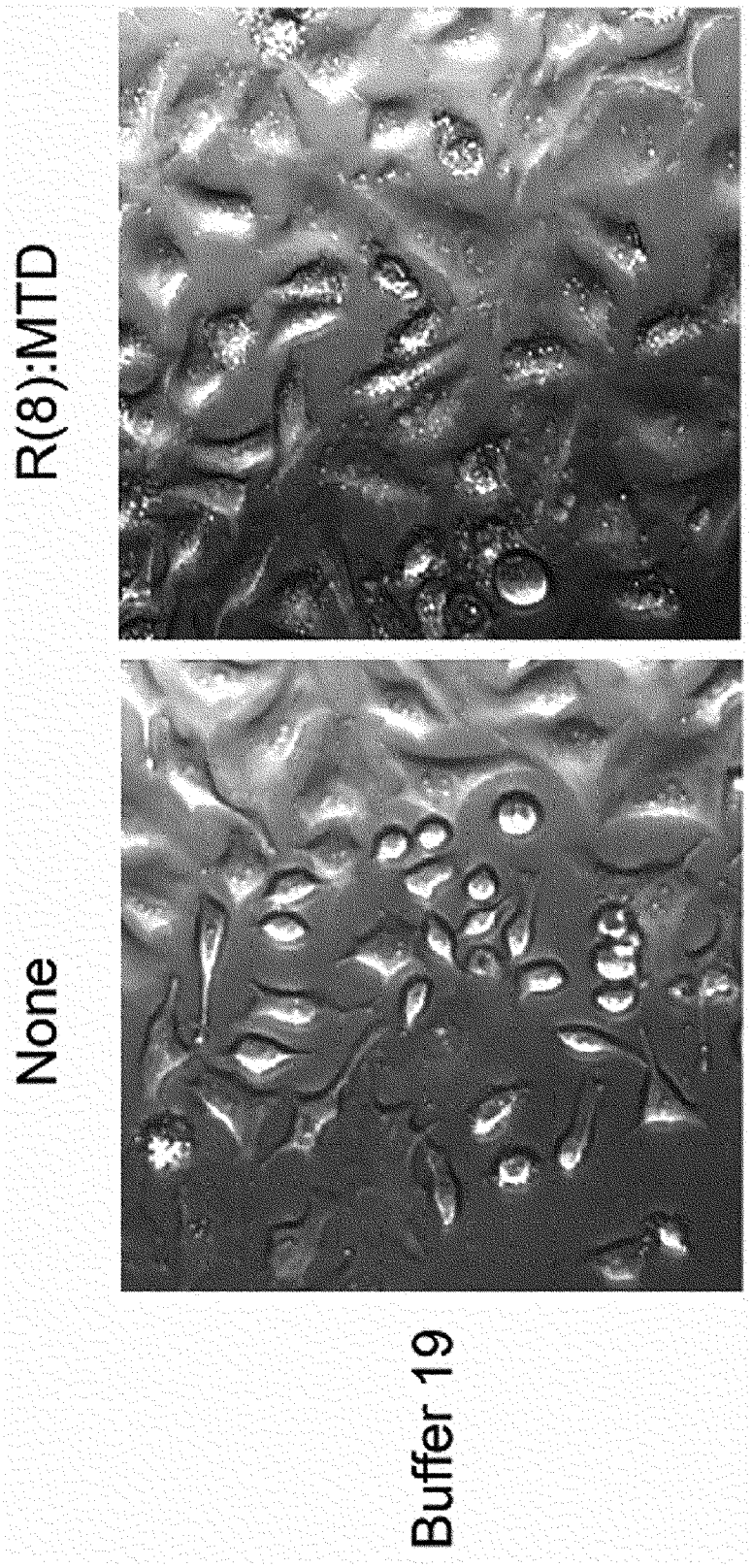
[도2q]



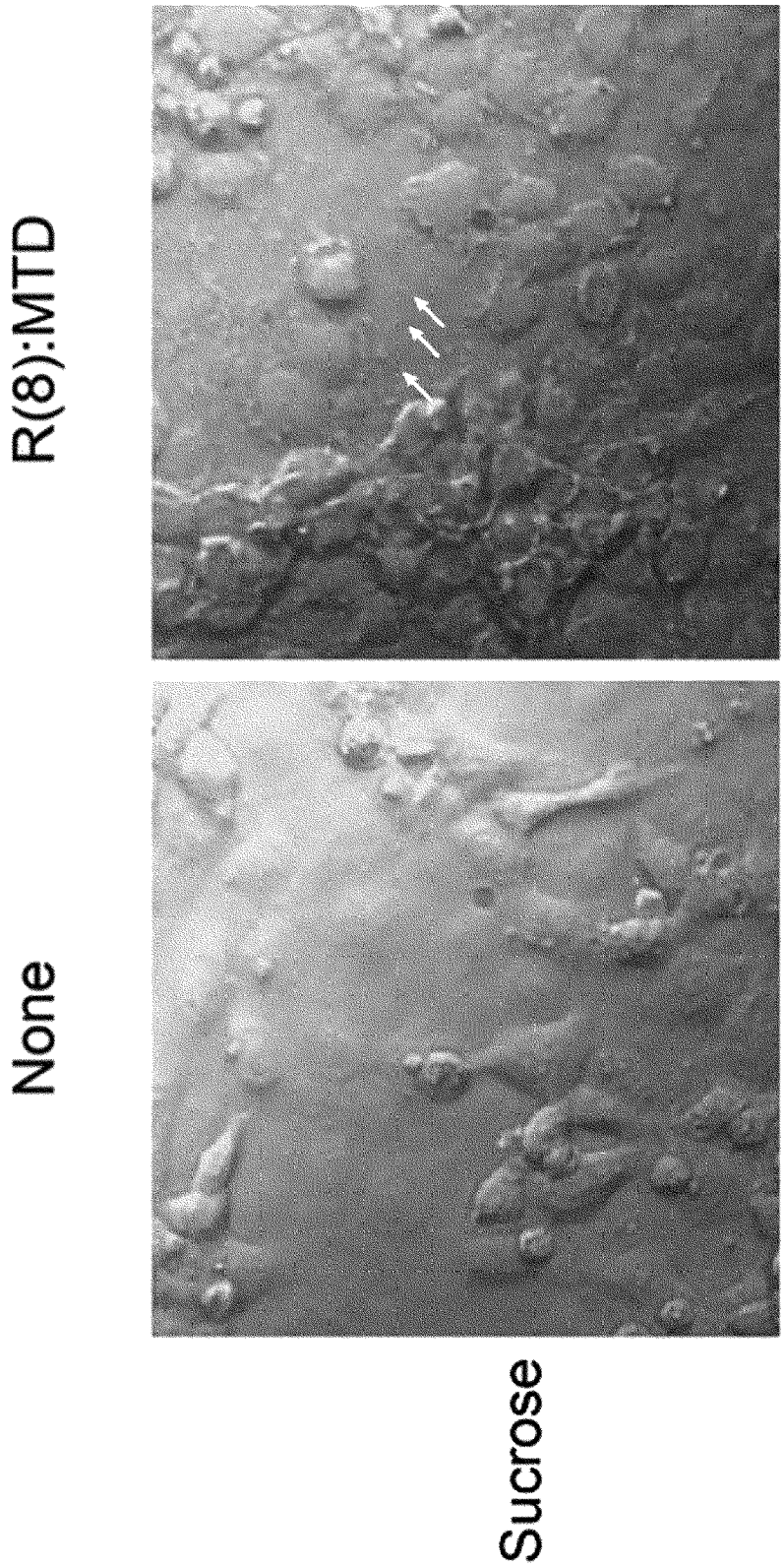
[도2r]



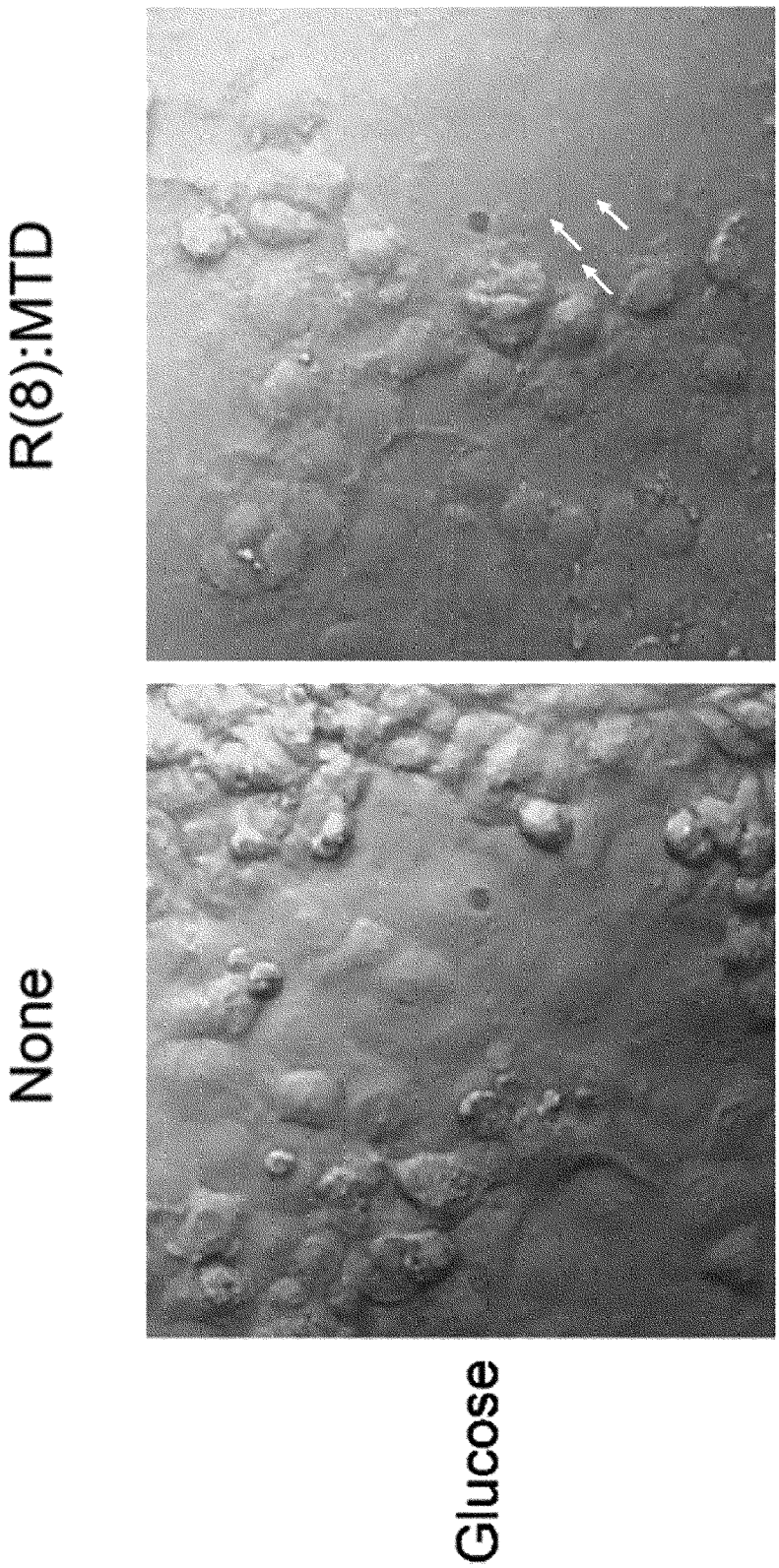
[도2s]



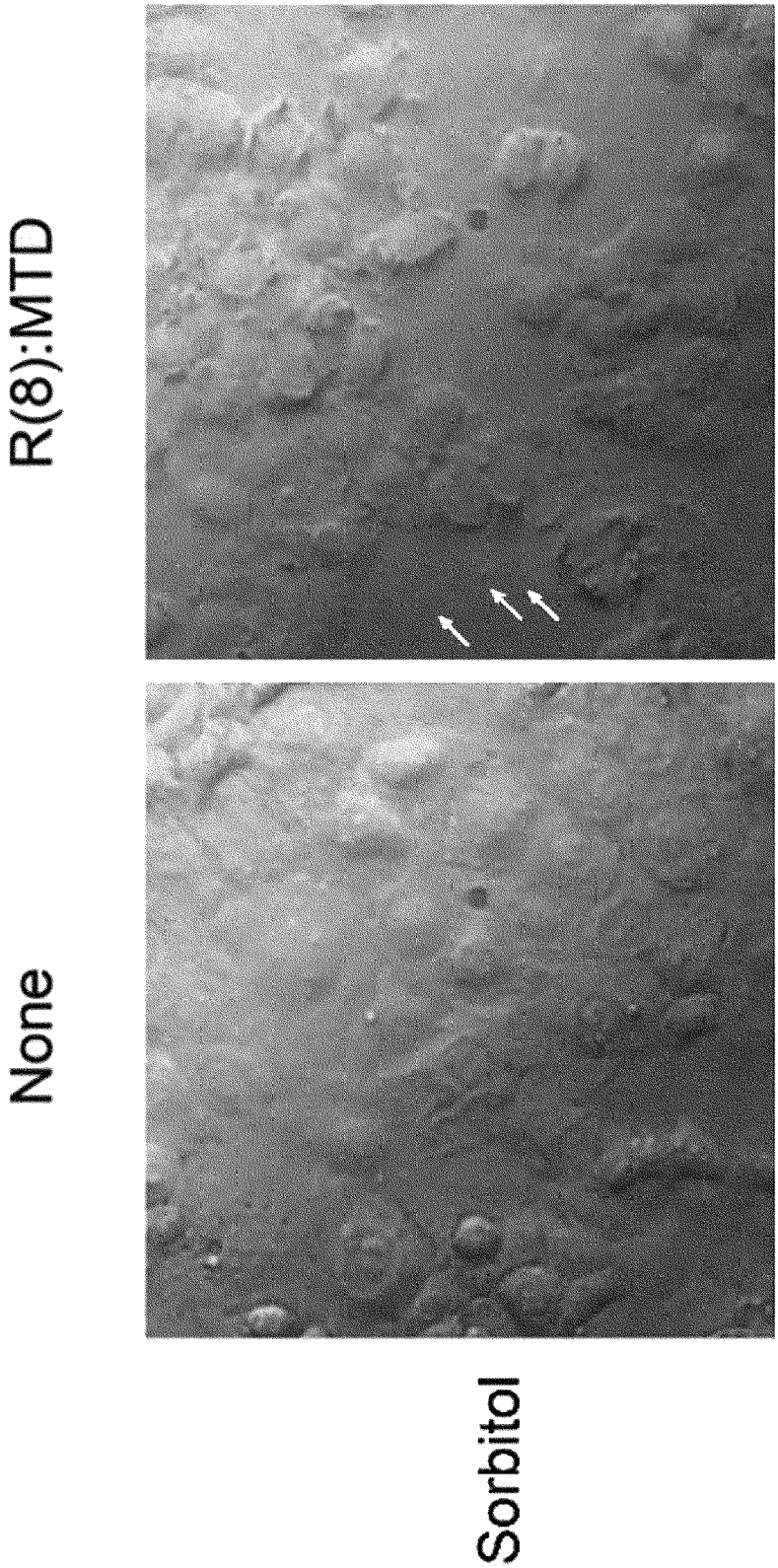
[도3a]



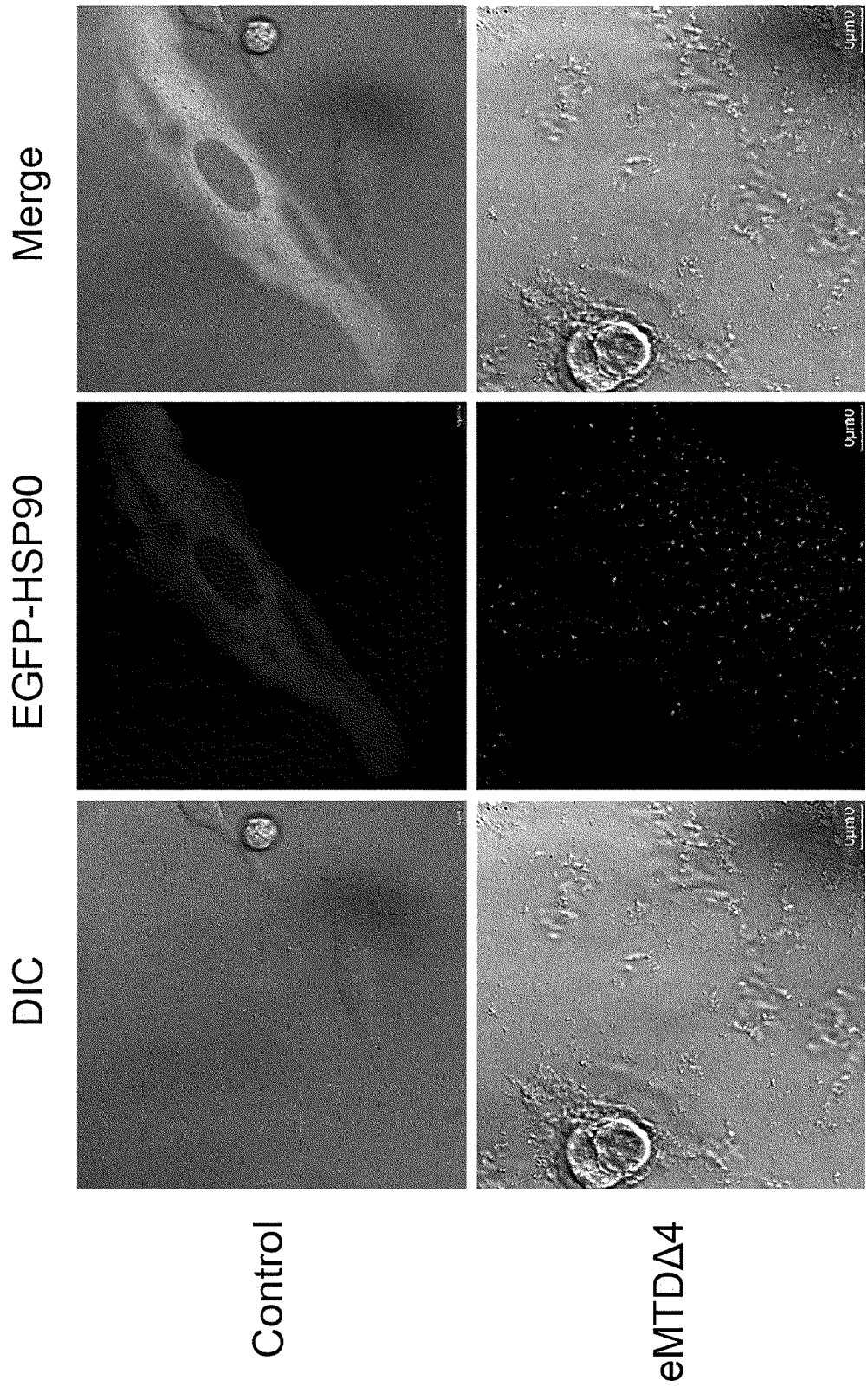
[도3b]



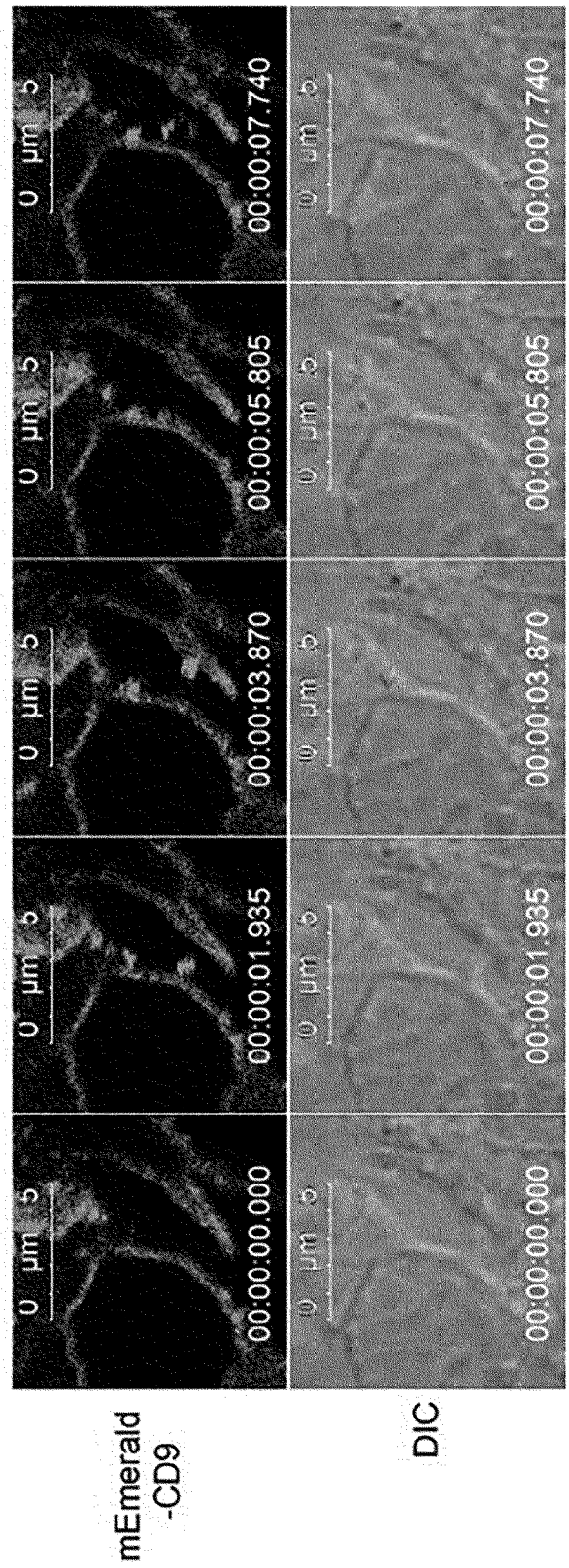
[도3c]



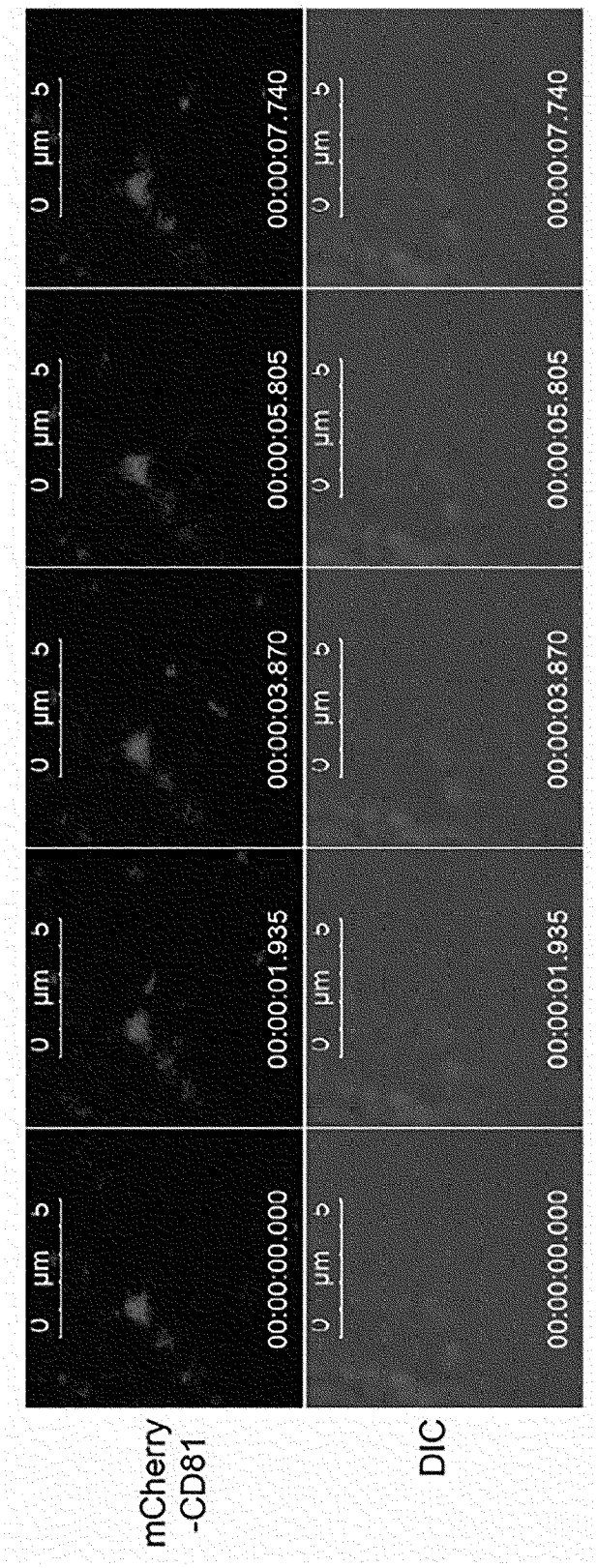
[도4]



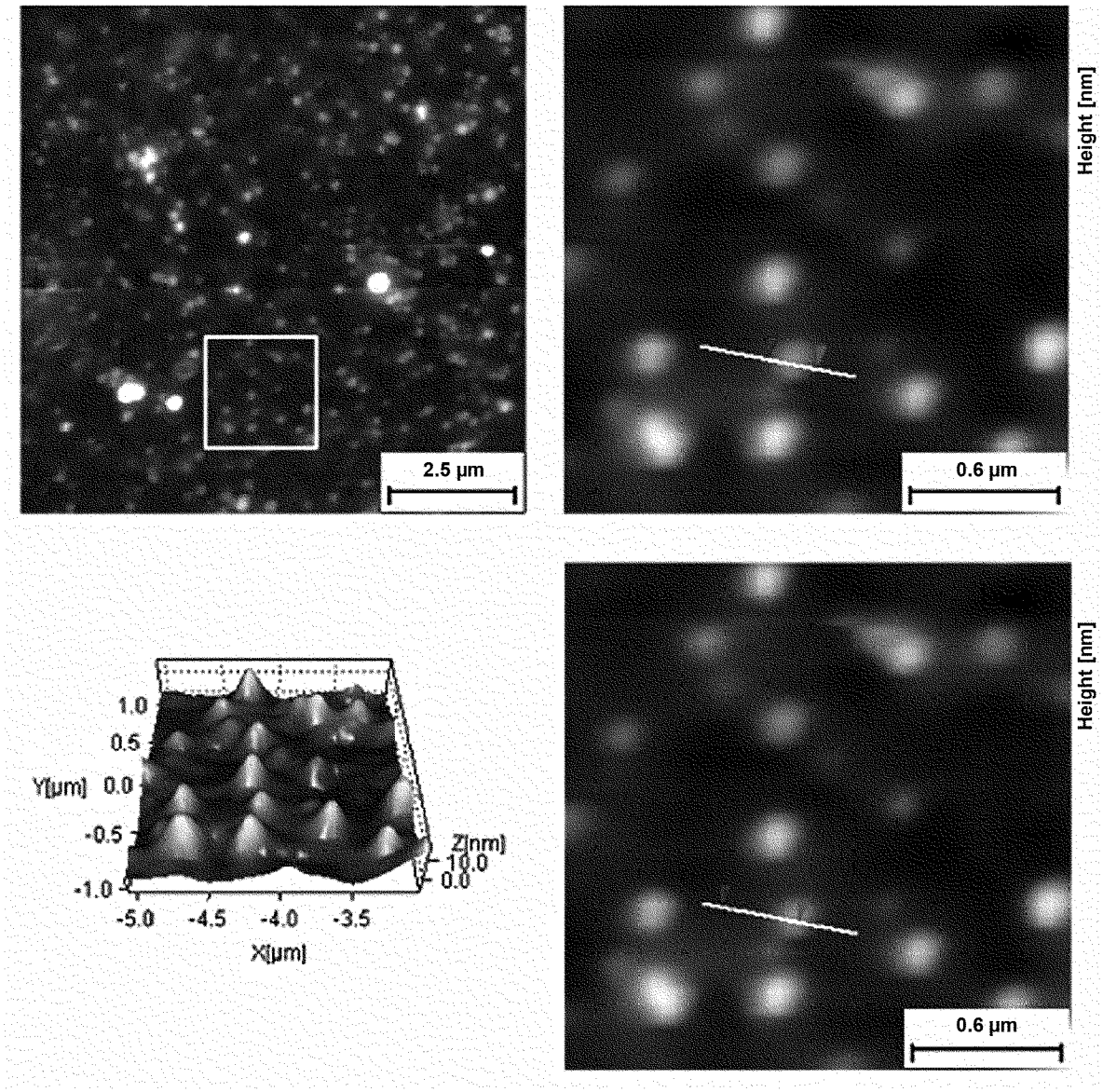
[도5a]


mEmerald -CD9
DIC
0 μm 5
00:00:00.000
00:00:01.935
00:00:03.870
00:00:05.805
00:00:07.740

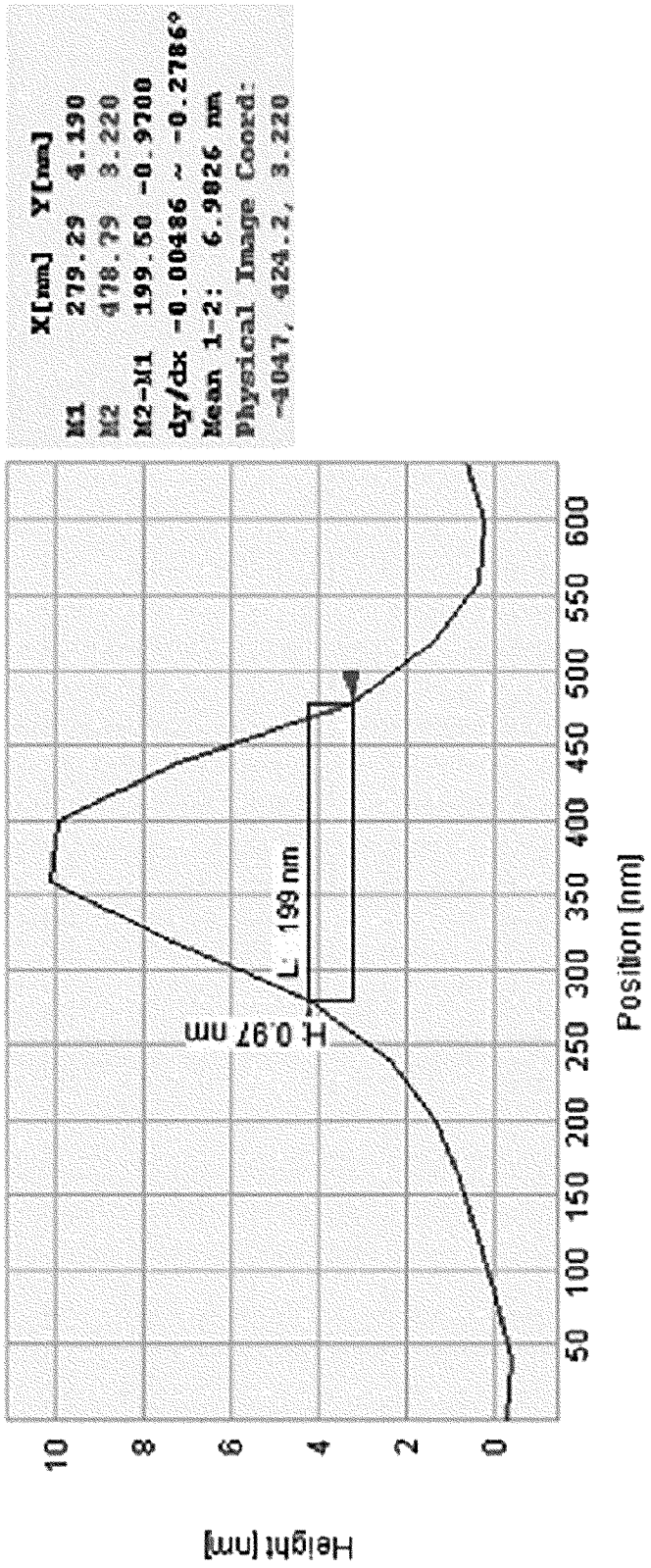
[도5b]


mCherry -CD81
DIC
0 μm 5
00:00:00.000
00:00:01.935
00:00:03.870
00:00:05.805
00:00:07.740

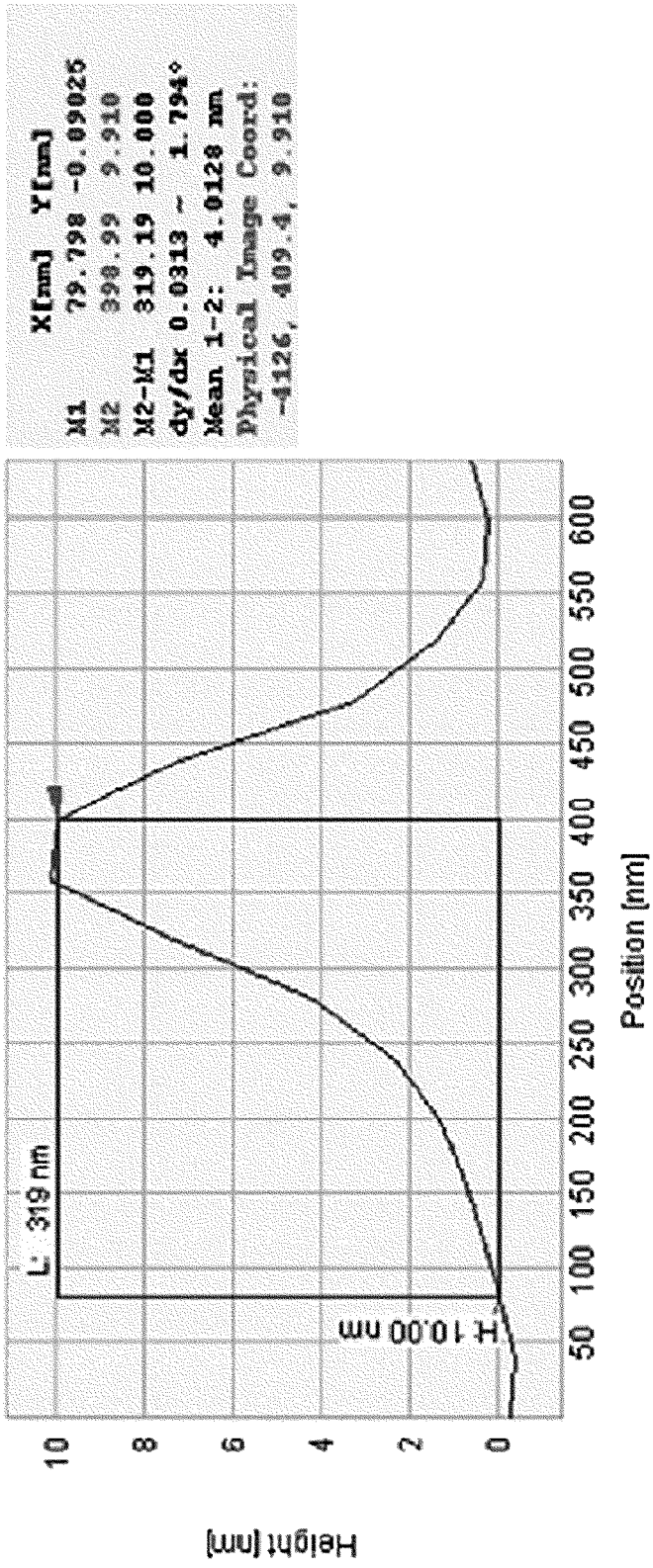
[도6a]


2.5 μm
0.6 μm
Height [nm]
1.0
0.5
Y[μm] 0.0
-0.5
-1.0
-5.0
-4.5
-4.0
-3.5
X[μm]
Z[nm]
10.0
0.0
0.6 μm
Height [nm]

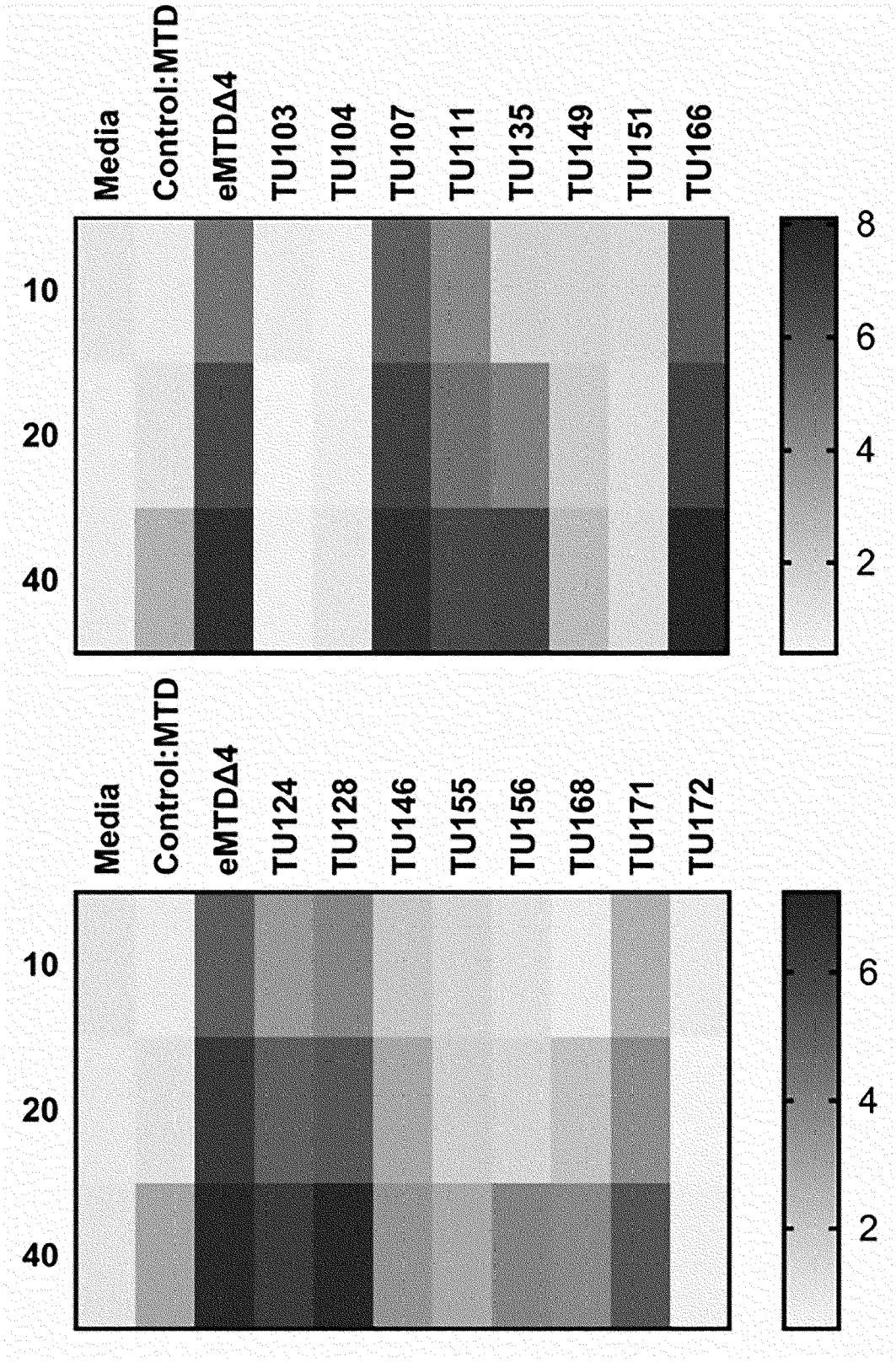
[도6b]


X[nm] Y[nm]
M1 279.29 4.190
M2 478.79 3.220
M2-M1 199.50 -0.9700
dy/dx -0.00486 ~ -0.2786°
Mean 1-2: 6.9826 nm
Physical Image Coord:
-4047, 424.2, 3.220
H 0.97 nm
L 199 nm
Height [nm]
Position [nm]
0
2
4
6
8
10
50
100
150
200
250
300
350
400
450
500
550
600

[도6c]

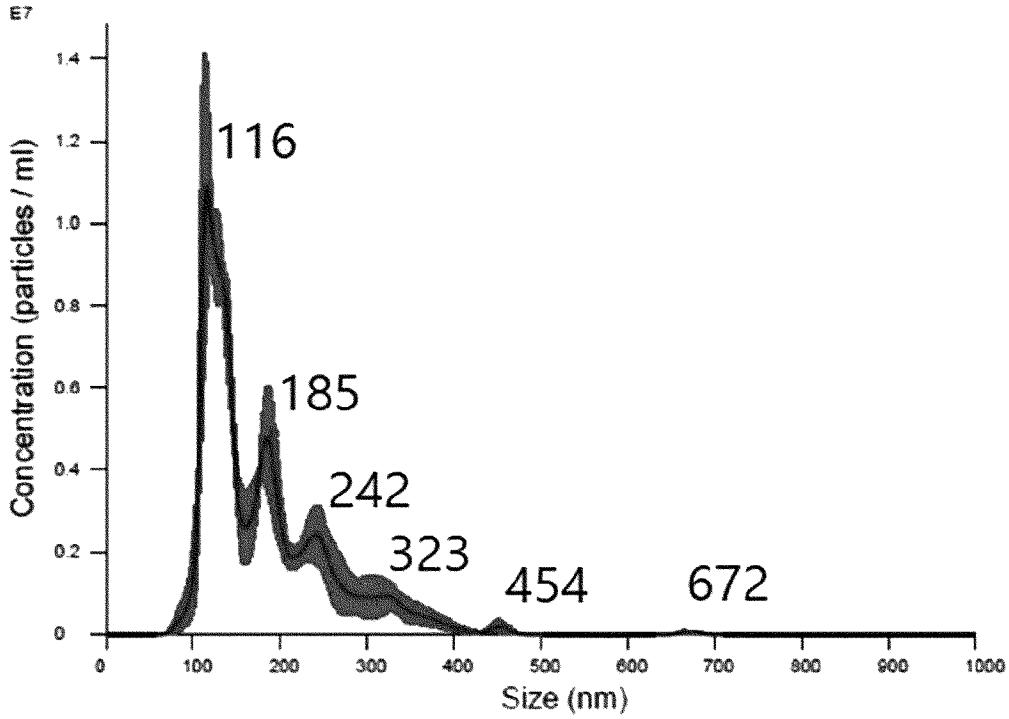

X[mm] Y[mm]
M1 79.798 -0.09025
M2 398.99 9.910
M2-M1 319.19 10.000
dy/dx 0.0313 ~ 1.794°
Mean 1-2: 4.0128 nm
Physical Image Coord:
-4126, 409.4, 9.910
L: 319 nm
H: 10.00 nm
Height [nm]
Position [nm]
0
2
4
6
8
10
50
100
150
200
250
300
350
400
450
500
550
600

[도7]


Media
Control:MTD
eMTDΔ4
TU103
TU104
TU107
TU111
TU135
TU149
TU151
TU166
10
20
40
8
6
4
2
Media
Control:MTD
eMTDΔ4
TU124
TU128
TU146
TU155
TU156
TU168
TU171
TU172
10
20
40
6
4
2

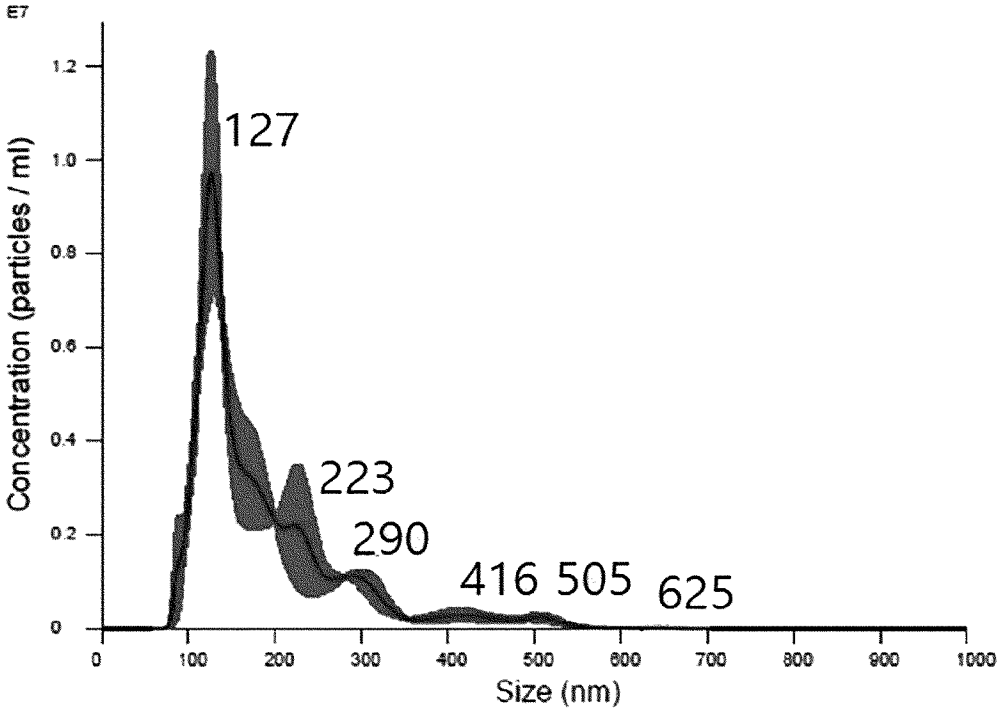
[도8a]

MTD



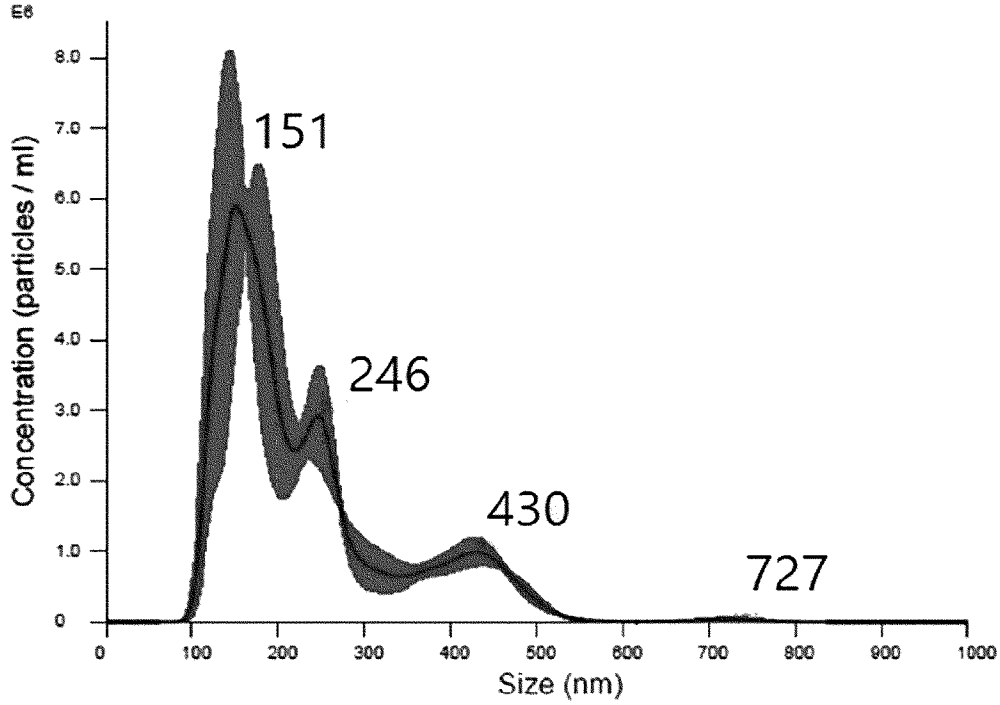
[도8b]

eMTDΔ4



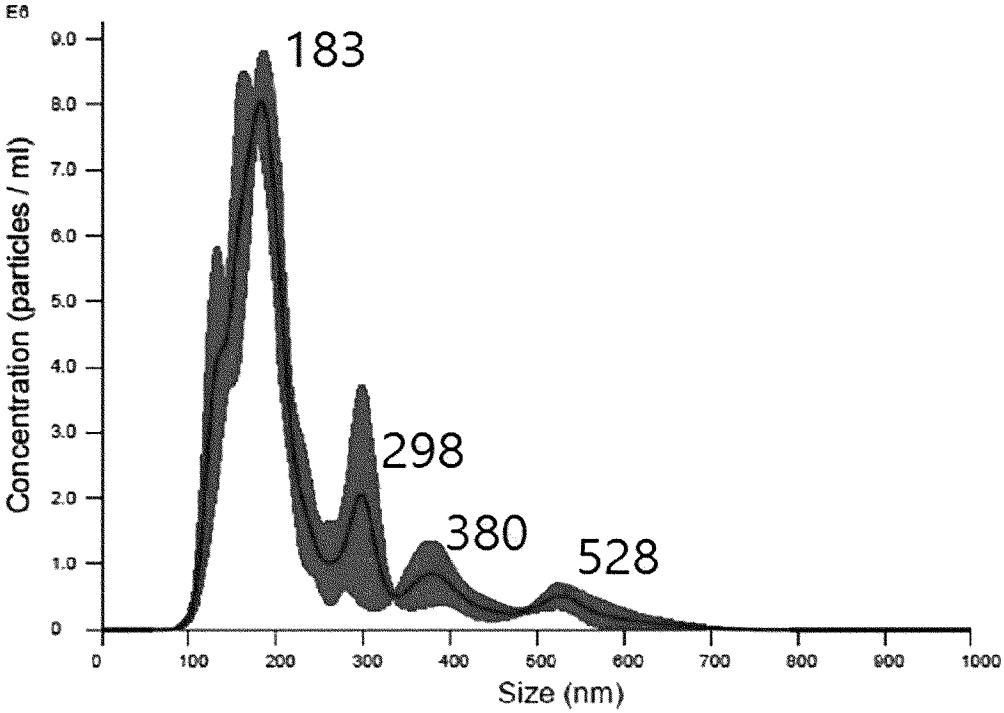
[도8c]

TU17

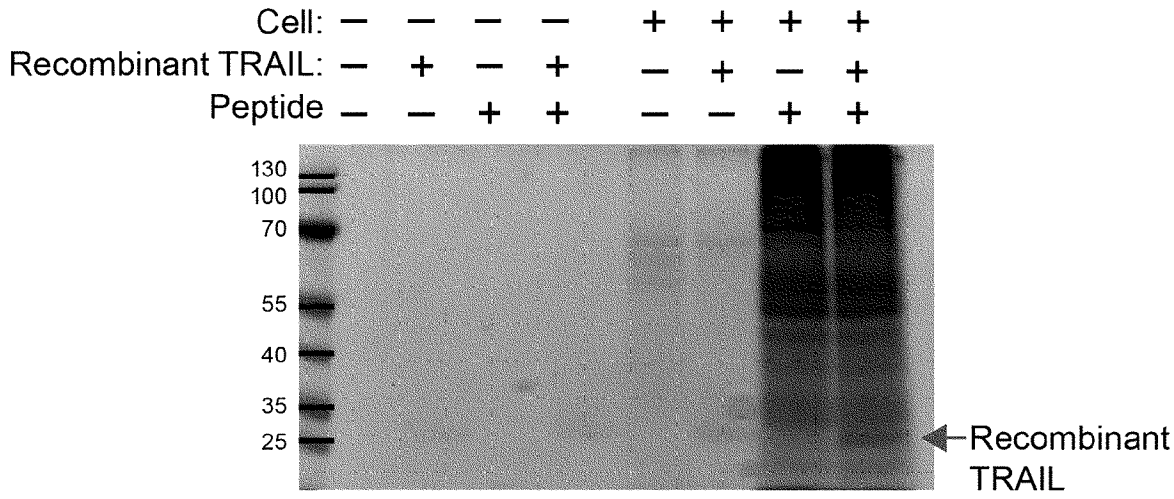


[도8d]

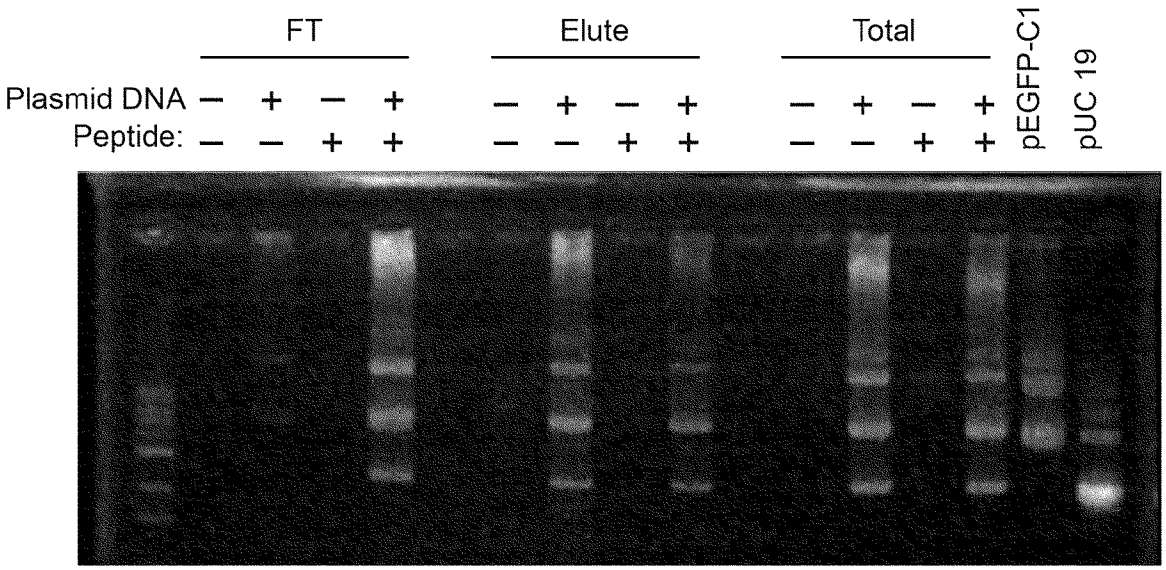
TU114



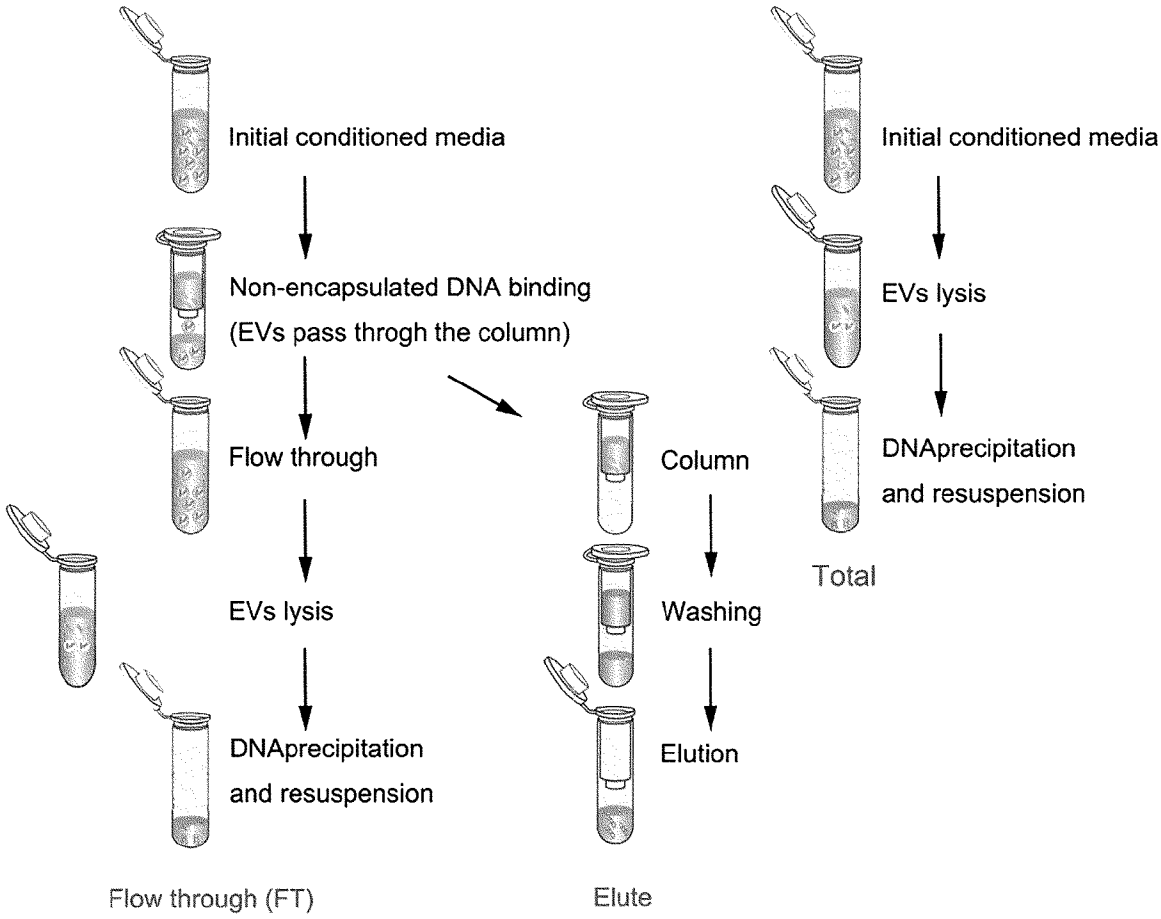
[도9]


Cell: – – – – + + + +
Recombinant TRAIL: – + – + – + – +
Peptide – – + + – – + +
130
100
70
55
40
35
25
Recombinant TRAIL

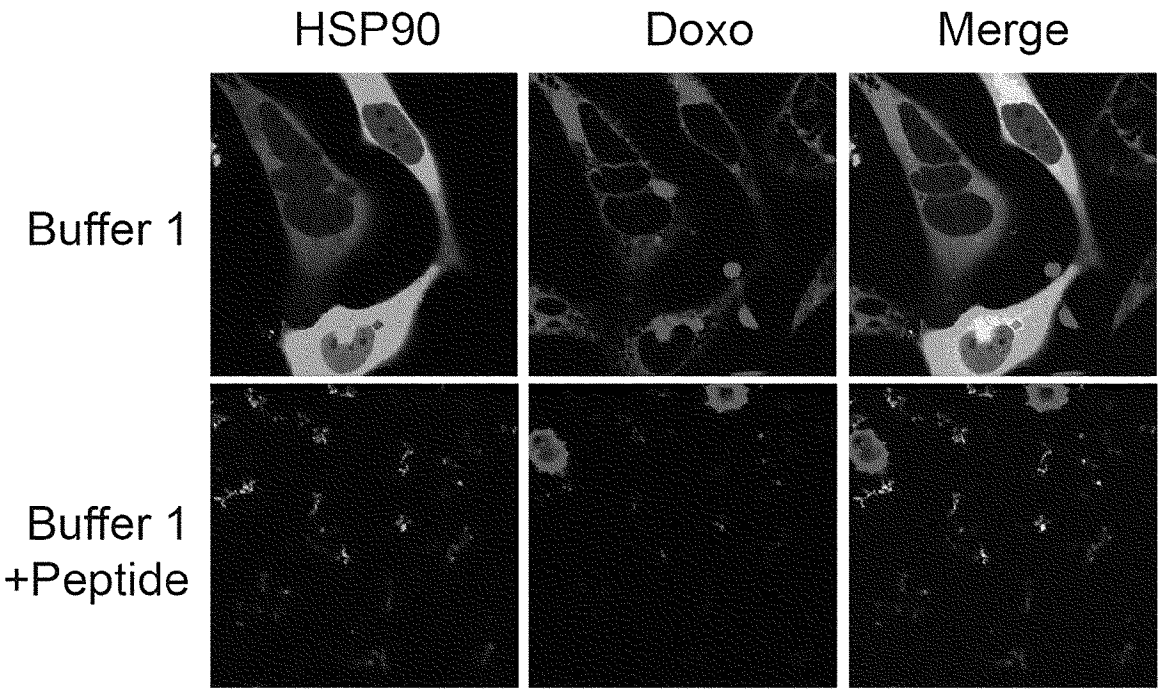
[도10]


FT
Elute
Total
Plasmid DNA – + – + – + – + – + – +
Peptide: – – + + – – + + – – + +
pEGFP-C1
pUC 19

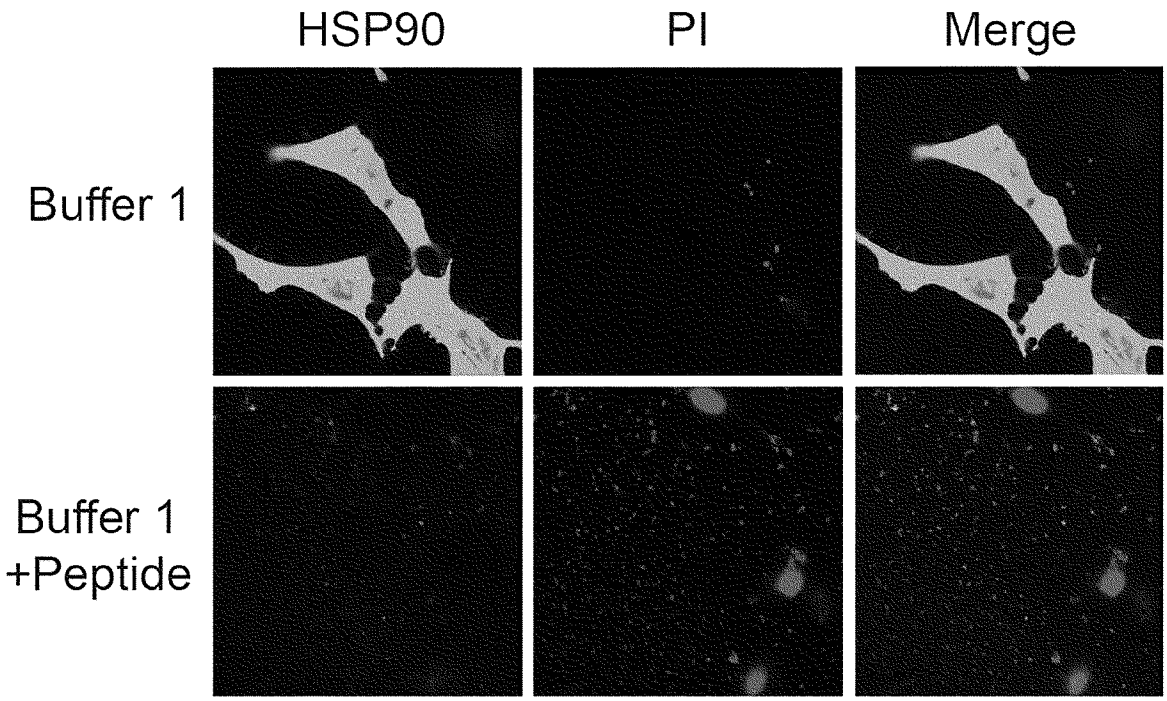
[도11]


Initial conditioned media
Non-encapsulated DNA binding
(EVs pass throgh the column)
Flow through
EVs lysis
DNAprecipitation
and resuspension
Flow through (FT)
Column
Washing
Elution
Elute
Initial conditioned media
EVs lysis
DNAprecipitation
and resuspension
Total

[도12]


HSP90
Doxo
Merge
Buffer 1
Buffer 1
+Peptide

[도13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2021/006905

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/00(2006.01)i; **C12N 5/09**(2010.01)i; **C07K 14/47**(2006.01)i; **A61K 47/46**(2006.01)i; **A61K 31/704**(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 5/00(2006.01); A61K 35/28(2006.01); A61K 38/00(2006.01); C07K 7/08(2006.01); G01N 33/48(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: 세포외 소포(extracellular vesicle), 녹사(Noxa), 배지(broth), MOPS, 페이로드(payload), 항암 물질(anticancer substance)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2020-0093328 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, CHOSUN UNIVERSITY) 05 August 2020 (2020-08-05) See claims 1 and 7; and paragraphs [0005], [0015] and [0085]-[0089].	1-16
Y	김정미. 케스페이즈 의존성 세포사멸에서 분비되는 엑소좀의 특성 규명. 석사논문, 의생명과학과, 아주대학교 대학원. 2017, pp. 1-50 (KIM, Jeong-Mi. Characteristics of Exosomes released from caspasedependent cell deaths. Master, Department of Biomedical Sciences, Graduate School of Ajou University.). See pages 14, 24 and 25, and figure 4.	1-16
Y	WO 2019-124522 A1 (MIRACA RESEARCH INSTITUTE G.K. et al.) 27 June 2019 (2019-06-27) See claim 11; and paragraph [0055].	4,5,8,9
Y	KR 10-2020-0088408 A (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 22 July 2020 (2020-07-22) See claims 1 and 43-45; and paragraphs [0112], [0113] and [0163].	11-16

☑ 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	Date of mailing of the international search report
14 December 2021	**14 December 2021**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SEO, Y.-W. et al. The Cell Death-Inducing Activity of the Peptide Containing Noxa Mitochondrial-Targeting Domain Is Associated with Calcium Release. Cancer Research. 01 November 2009, vol. 69, no. 21, pp. 8356-8365. See entire document.	1-16
A	CRUICKSHANKS, N. et al. Lapatinib and obatoclax kill breast cancer cells through reactive oxygen species-dependent endoplasmic reticulum stress. Molecular Pharmacology. 2012, vol. 82, no. 6, pp. 1217-1229. See entire document.	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2021/006905

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:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2021/006905

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2020-0093328 A	05 August 2020	KR 10-2189574 B1	11 December 2020
		US 2020-0239521 A1	30 July 2020
WO 2019-124522 A1	27 June 2019	EP 3730603 A1	28 October 2020
		EP 3730603 A4	24 November 2021
		US 2020-0319175 A1	08 October 2020
		WO 2019-124522 A1	27 June 2019
KR 10-2020-0088408 A	22 July 2020	CA 3082436 A1	23 May 2019
		CN 111527199 A	11 August 2020
		EP 3709973 A1	23 September 2020
		EP 3709973 A4	25 August 2021
		JP 2021-503286 A	12 February 2021
		US 2021-0186877 A1	24 June 2021
		WO 2019-099927 A1	23 May 2019

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2021/006905

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 5/00(2006.01)i; **C12N 5/09**(2010.01)i; **C07K 14/47**(2006.01)i; **A61K 47/46**(2006.01)i; **A61K 31/704**(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 5/00(2006.01); A61K 35/28(2006.01); A61K 38/00(2006.01); C07K 7/08(2006.01); G01N 33/48(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: 세포외 소포(extracellular vesicle), 녹사(Noxa), 배지(broth), MOPS, 페이로드(payload), 항암 물질(anticancer substance)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2020-0093328 A (조선대학교산학협력단) 2020.08.05 청구항 1, 7; 단락 [0005], [0015], [0085]-[0089]	1-16
Y	김정미, '케스페이즈 의존성 세포사멸에서 분비되는 엑소좀의 특성 규명', 석사논문, 2017, 아주대학교 대학원, 의생명과학과, 1-50 페이지 페이지 14, 24, 25, 도면 4	1-16
Y	WO 2019-124522 A1 (MIRACA RESEARCH INSTITUTE G.K. 등) 2019.06.27 청구항 11; 단락 [0055]	4,5,8,9
Y	KR 10-2020-0088408 A (보드 오브 리전츠, 더 유니버시티 오브 텍사스 시스템) 2020.07.22 청구항 1, 43-45; 단락 [0112], [0113], [0163]	11-16
A	SEO, Y.-W. 등, 'The Cell Death-Inducing Activity of the Peptide Containing Noxa Mitochondrial-Targeting Domain Is Associated with Calcium Release', Cancer Research, 2009.11.01, 69권, 21호, 8356-8365 페이지 전체 문헌	1-16

☑ 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	국제조사보고서 발송일
2021년12월14일(14.12.2021)	**2021년12월14일(14.12.2021)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관
대한민국 특허청 **(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)**	**정다원**
팩스 번호 **+82-42-481-8578**	전화번호 **+82-42-481-5373**

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	CRUICKSHANKS, N. 등, 'Lapatinib and obatoclax kill breast cancer cells through reactive oxygen species-dependent endoplasmic reticulum stress', Molecular Pharmacology, 2012, 82권, 6호, 1217-1229 페이지 전체 문헌	1-16

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2021/006905

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

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

   a. ☑ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
      - ☑ 부록 C/ST.25 텍스트 파일
      - ☐ 서면 혹은 이미지 파일

   b. ☐ PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록

   c. ☐ 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록
      - ☐ 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))
      - ☐ 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).

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

3. 추가 의견:

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2021/006905

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2020-0093328 A	2020/08/05	KR 10-2189574 B1	2020/12/11
		US 2020-0239521 A1	2020/07/30
WO 2019-124522 A1	2019/06/27	EP 3730603 A1	2020/10/28
		EP 3730603 A4	2021/11/24
		US 2020-0319175 A1	2020/10/08
		WO 2019-124522 A1	2019/06/27
KR 10-2020-0088408 A	2020/07/22	CA 3082436 A1	2019/05/23
		CN 111527199 A	2020/08/11
		EP 3709973 A1	2020/09/23
		EP 3709973 A4	2021/08/25
		JP 2021-503286 A	2021/02/12
		US 2021-0186877 A1	2021/06/24
		WO 2019-099927 A1	2019/05/23