



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0164449  
(43) 공개일자 2022년12월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 5/071 (2010.01) A61K 9/51 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01) B01J 19/00 (2018.01)  
C12N 11/02 (2020.01)  
(52) CPC특허분류  
C12N 5/0631 (2013.01)  
A61K 9/5176 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2022-0068477  
(22) 출원일자 2022년06월03일  
심사청구일자 2022년06월03일  
(30) 우선권주장  
1020210072646 2021년06월04일 대한민국(KR)

(71) 출원인  
기초과학연구원  
대전광역시 유성구 엑스포로 55(도룡동)  
울산과학기술원  
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50  
(72) 발명자  
조윤경  
울산광역시 울주군 범서읍 대리로 15-17, 703동 305호  
수밋 쿠마르  
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50, 403동 1701호  
(74) 대리인  
특허법인 플러스

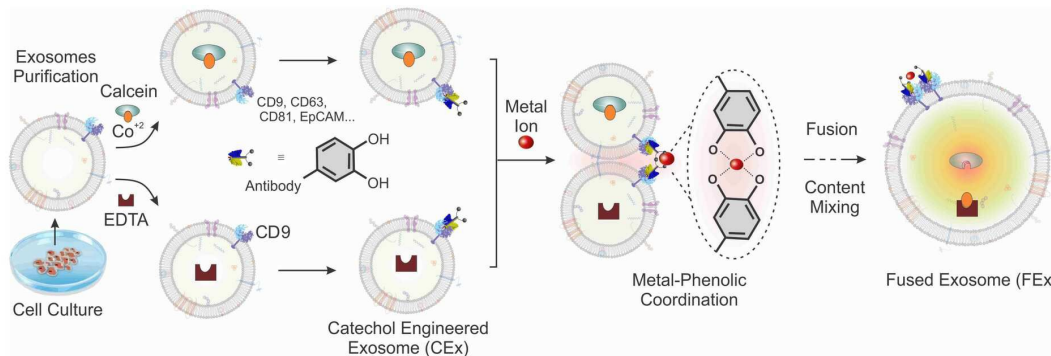
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 나노소포체 반응기 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 나노소포체 반응기 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 상세하게는 표면에 제1수용체를 함유하는 제1소포체 및 표면에 제2수용체를 함유하는 제2소포체를 포함하며, 상기 제1수용체 및 제2수용체는 리간드 시스템을 통해 서로 결합되어 제1소포체와 제2소포체가 융합되어 나노소포체 반응기를 형성하는 것을 특징으로 하는 나노소포체 반응기 제조용 조성물 및 이의 제조방법을 제공함으로써, 세포의 효소 반응을 통한 세포 에너지 생산, 약물 전달시스템, 및 진단 시스템에 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**A61K 9/5192** (2013.01)

**A61P 35/00** (2018.01)

**B01J 19/0093** (2013.01)

**C12N 11/02** (2013.01)

**C12N 2509/00** (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                         |
|-------------|-------------------------|
| 과제고유번호      | 1711101393              |
| 과제번호        | IBS-R020-D1             |
| 부처명         | 과학기술정보통신부               |
| 과제관리(전문)기관명 | 기초과학연구원                 |
| 연구사업명       | 기초과학연구단사업               |
| 연구과제명       | 첨단연성물질연구단               |
| 기 여 율       | 1/1                     |
| 과제수행기관명     | 기초과학연구원                 |
| 연구기간        | 2020.01.01 ~ 2020.12.31 |

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

표면에 제1수용체를 함유하는 제1소포체 및 표면에 제2수용체를 함유하는 제2소포체를 포함하며,  
상기 제1수용체 및 제2수용체는 리간드 시스템을 통해 서로 결합되어 제1소포체와 제2소포체가 융합되어 나노소포체 반응기를 형성하는 것을 특징으로 하는 나노소포체 반응기 제조용 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,  
상기 제1수용체와 제2수용체는 서로 독립적으로 CD9, CD63, CD81, CD82, CD147, CD107a, CD151, CD13, CD26, ITGA3, ITGA6, ITGB1, ITGB4, ADAM10, CD31B, EGFR, EpCAM, HSP70, HSP9, PSMA, 및 PSA로 이루어지는 군에서 선택되는 나노소포체 반응기 제조용 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,  
상기 리간드 시스템은 배위결합성 화합물을 포함하는, 나노소포체 반응기 제조용 조성물.

#### 청구항 4

제3항에 있어서,  
상기 배위결합성 화합물은 극성 치환기를 포함하는 방향족 화합물인, 나노소포체 반응기 제조용 조성물.

#### 청구항 5

제4항에 있어서,  
상기 극성 치환기는 히드록실기 또는 카르복실산기를 포함하는, 나노소포체 반응기 제조용 조성물.

#### 청구항 6

제1항에 있어서,  
상기 리간드 시스템은 다가 금속이온을 더 포함하는, 나노소포체 반응기 제조용 조성물.

#### 청구항 7

제1항에 있어서,  
상기 제1소포체와 제2소포체는 세포외소포체(Extracellular vesicle)인, 나노소포체 반응기 제조용 조성물.

#### 청구항 8

제1항에 있어서,  
상기 제1소포체와 제2소포체는 서로 다른 효소를 포함하는, 나노소포체 반응기 제조용 조성물.

#### 청구항 9

제1항에 있어서,  
상기 제1소포체와 제2소포체는 10 내지 1000 nm의 평균직경을 가지는, 나노소포체 반응기 제조용 조성물.

#### 청구항 10

에멀전에 있어서,

상기 에멀전의 내부 수상은 제1항에 따른 나노소포체 반응기 제조용 조성물을 포함하는 나노소포체 반응기 함유 에멀전.

#### 청구항 11

제10항에 있어서,

상기 에멀전은 2 내지 100  $\mu\text{m}$ 의 평균직경을 가지는, 나노소포체 반응기 함유 에멀전.

#### 청구항 12

제1항에 따른 나노소포체 반응기를 포함하는 세포.

#### 청구항 13

제12항에 있어서,

상기 나노소포체 반응기는 에너지 생산용인, 세포.

#### 청구항 14

제12항에 있어서,

상기 나노소포체 반응기에 포함되는 제1소포체는 ATP 합성효소를 포함하고, 제2소포체는 bo3 산화효소를 포함하는, 세포.

#### 청구항 15

제12항에 있어서,

상기 나노소포체 반응기는 약물을 더 포함하는, 세포.

#### 청구항 16

(S1) 표면에 제1수용체를 함유하는 제1소포체 용액을 제조하는 단계;

(S2) 표면에 제2수용체를 함유하는 제2소포체 용액을 제조하는 단계;

(S3) 제1소포체 용액과 제2소포체 용액을 혼합하여 혼합액을 제조하는 단계; 및

(S4) 상기 혼합액에 다가 금속이온을 혼합하여 제1소포체와 제2소포체를 융합하는 단계;

를 포함하는 나노소포체 반응기의 제조방법.

#### 청구항 17

제16항에 있어서,

상기 (S1) 및 (S2) 단계의 제1소포체 용액 및 제2소포체 용액은 서로 독립적으로 배위결합성 화합물로 처리하는 단계를 더 포함하는, 나노소포체 반응기의 제조방법.

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 나노소포체 반응기 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 상세하게는 개질된 나노소포체를 이용하여 살아있는 세포 내에서 일어나는 화학 반응을 용이하게 제어하는 나노소포체 반응기에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 생명 활동은 체내 물질이나 에너지가 이동되면서 유지된다. 생체 내 다양한 촉매반응을 담당하는 효소나 보조인자를 수용하기 위한 세포 기관 또는 세포의 핵심 구조가 존재하여 생체 내에서 화학반응이 조절되는데, 최근

세포 소기관을 인위적으로 합성하여 생체 촉매 반응을 모사하려는 연구가 시도되고 있다.

[0003] 세포 소기관은 세포의 장기라고 할 수 있는데, 세포 호흡을 담당하는 미토콘드리아, 세포 내 소화기관을 담당하는 리소좀이 구체적인 예이다. 소포체(Vesicle)는 지방 이중층에 둘러싸여 세포질과 구분되는 세포 소기관으로서, 세포의 생산물, 부산물, 배설물을 저장, 운송 또는 소화하는 역할을 담당한다.

[0004] 세포 소기관은 복잡한 생화학 반응을 수행하는 미세 공간들이 나누어져 있고, 그내부에는 중요한 세포 기능을 실행하는 다양한 효소들이 존재한다. 이 중 엑소좀은 세포가 분비하는 지름 50 내지 200 nm 크기의 세포외소포체로서 세포 간 신호 전달을 하는 운반체 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 엑소좀에는 단백질, 지방, RNA, 성장인자 등 모세포의 다양한 정보가 담겨 있어 질환의 진단 마커로 사용되거나 생체친화적인 특징으로 인해 약물 전달체로서의 활용에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 엑소좀의 성분 및 기능적 연구가 활발히 진행되는 반면, 엑소좀에는 단백질, 유전자 및 핵산을 비롯한 다량 생체지표를 포함하고 있기 때문에 엑소좀 분리정제 기술에 있어 여전히 한계점이 존재한다.

[0005] 또한 엑소좀과 같은 인공 세포 소기관을 살아있는 세포에 적용하기 위해서는 세포 내 물질 전달 효율, 안정성, 생체적합성 등의 요소를 고려해야 한다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0006] 이에 본 발명은 살아있는 세포에 보다 안정적이고, 효율적인 세포 내 물질 전달 방법을 제시하는 기술적 과제를 해결하고자, 나노소포체 개질 및 이의 융합을 이용하여 세포의 기능을 제어할 수 있는 나노소포체 반응기를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0007] 본 발명의 일 실시예에 따르면 나노반응기 플랫폼 기술을 이용하여, 세포 내에서 에너지 생성이 가능한 나노소포체 반응기를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 본 발명의 일 실시예에 따르면 나노소포체 반응기의 융합을 이용한 효과적인 약물전달시스템을 제공하는 것을 목적으로 한다.

### 과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 상술한 기술적 과제해결을 위하여, 표면에 제1수용체를 함유하는 제1소포체 및 표면에 제2수용체를 함유하는 제2소포체를 포함하며, 상기 제1수용체 및 제2수용체는 리간드 시스템을 통해 서로 결합되어 제1소포체와 제2소포체가 융합되어 나노소포체 반응기를 형성하는 것을 특징으로 하는 나노소포체 반응기 제조용 조성물을 제공할 수 있다.

[0010] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 제1수용체와 제2수용체는 서로 독립적으로 CD9, CD63, CD81, CD82, CD147, CD107a, CD151, CD13, CD26, ITGA3, ITGA6, ITGB1, ITGB4, ADAM10, CD31B, EGFR, EpCAM, HSP70, HSP9, PSMA, 및 PSA로 이루어지는 군에서 선택될 수 있다.

[0011] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 리간드 시스템은 배위결합성 화합물을 포함할 수 있다.

[0012] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 배위결합성 화합물은 극성 치환기를 포함하는 방향족 화합물일 수 있다.

[0013] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 극성 치환기는 히드록실기 또는 카르복실산기를 포함할 수 있다.

[0014] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 리간드 시스템은 다가 금속이온을 더 포함할 수 있다.

[0015] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 제1소포체와 제2소포체는 세포외소포체(Extracellular vesicle)일 수 있다.

[0016] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 제1소포체와 제2소포체는 서로 다른 효소를 포함할 수 있다.

[0017] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 제1소포체와 제2소포체는 10 내지 1000 nm의 평균직경을 가질 수 있다.

[0018] 또한 본 발명은 내부 수상에 상술한 나노소포체 반응기 제조용 조성물을 포함하는 나노반응기 함유 에멀전을 제공할 수 있다.

[0019] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 에멀전은 2 내지 100  $\mu\text{m}$ 의 평균직경을 가질 수 있다.

- [0020] 또한 본 발명은 내부에 상술한 나노소포체 반응기를 포함하는 세포를 제공할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 나노소포체 반응기는 에너지 생산용일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 나노소포체 반응기에 포함되는 제1소포체는 ATP 합성효소를 포함하고, 제2소포체는 bo3 산화효소를 포함할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 나노소포체 반응기는 약물을 더 포함할 수 있다.
- [0024] 또한 본 발명은 (S1) 표면에 제1수용체를 함유하는 제1소포체 용액을 제조하는 단계; (S2) 표면에 제2수용체를 함유하는 제2소포체 용액을 제조하는 단계; (S3) 제1소포체 용액과 제2소포체 용액을 혼합하여 혼합액을 제조하는 단계; 및 (S4) 상기 혼합액에 다가 금속이온을 혼합하여 제1소포체와 제2소포체를 융합하는 단계; 를 포함하는 나노소포체 반응기의 제조방법을 제공할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 (S1) 및 (S2) 단계의 제1소포체 용액 및 제2소포체 용액은 서로 독립적으로 배위결합성 화합물로 처리하는 단계를 더 포함할 수 있다.

### 발명의 효과

- [0026] 본 발명은 살아있는 세포 간 정보전달체로서 세포외소포체 (Extracellular Vesicles)를 리프로그래밍하여 세포 내에서 에너지 생성이 가능한 인공 세포 소기관을 제공할 수 있다. 이는 세포 내에서 안정적이며 조직 깊은 곳까지 침투되어 약물 전달 시스템으로서 높은 가치로 활용될 수 있다.
- [0027] 본 발명의 일 실시예에 따르면 세포 내에서 ATP를 직접 합성하여, 에너지 공급이 부족한 암세포 깊숙한 곳까지 ATP를 전달할 수 있어 손상된 세포에 에너지를 공급할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 일 실시예에 따르면 나노소포체 반응기에 약물을 더 포함하여, 효과적인 약물전달시스템으로 활용할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0029] 도 1은 본 발명에 따라 표면에 카테콜기를 갖도록 개질된 엑소솜(CEx)을 금속이온과 함께 반응시켜 엑소솜 융합을 유도하는 원리를 나타낸 모식도이다.
- 도 2는 NTA(나노입자 추적 분석)를 사용한 엑소솜, CEx 및 FEx의 크기 특성을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3(a)는 CEx (core diameter =  $115 \pm 26\text{nm}$ ) 및 FEx (core diameter =  $247 \pm 33\text{nm}$ )의 사이즈를 보여주는 TEM 이미지이다. (b)는 동적광산란을 통한 CEx (CEx-1 =  $121 \pm 8\text{nm}$ ; CEx-2 =  $123 \pm 5\text{nm}$ ) 및 FEx ( $265 \pm 14\text{nm}$ )의 크기 분포를 나타낸 그래프이다.
- 도 4는 CEx 융합 모니터링을 위한 코발트-칼세인 분석 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 다가금속이온의 종류를 달리하여 융합 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 FEx 내부에 글루코오스산화효소 (glucose oxidase, GOx)와 HRP (horseradish peroxidase) 효소의 연속 단계 반응에 대한 모식도를 나타낸 것이다. 포도당을 첨가하여 개시되었고, 호기성 산화에 의해  $\text{H}_2\text{O}_2$ 가 생성되었고, 이것은 Amplex Red를 산화시켜 레소루핀을 생성하였음을 보여준다.
- 도 7은 FEx 나노 반응기에 캡슐화된 3가지 효소 촉매 작용을 나타낸 모식도이다. 유당이 있을 때  $\beta$ -갈락토시다아제 촉매 가수분해는 포도당과 갈락토스를 생성한다. 이 포도당의 호기성 GOx 촉매 산화는 글루콘산과  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 생성하며, 이는 Amplex red의 산화를 촉매하여 레소루핀을 생성하였다.
- 도 8은 FEx-GOx-HRP 나노반응기에 캡슐화된 2-효소 캐스케이드에 의한 레소루핀의 시간에 따른 형광 강도의 변화를 나타낸 것이다. 레소루핀의 형광 강도가 점차 증가하여 80분 후에 포화 상태에 도달함을 확인할 수 있다.
- 도 9는 FEx- $\beta$ -갈락토시다아제-GOx-HRP 나노반응기에 캡슐화된 3-효소 캐스케이드에 의한 유당 농도에 따른 반응 속도를 나타낸 것이다.
- 도 10은 FEx 나노반응기 (FEx-GOx-HRP) 내부에 캡슐화된 효소 및 용액 내 유리효소의 상대적 활성 변화를 나타낸 것으로서, (a)저장성, (b)열안정성 및 (c)사이클 특성에 대한 효소 특성 결과 그래프이다.
- 도 11은 본 발명에 따른 구획화된 플랫폼 내 촉매 기능을 평가한 실험예 3에 관한 것으로서, (a) 팔라듐 나노

입자(Pd)를 융합하여 제조한 FEx-Pd-proRho 나노 반응기를 사용하여 세포 내부에서 proRho의 유리 로다민으로의 축매 전환을 나타낸 모식도이다. (b) FEx-Pd-proRho의 대표적인 TEM 이미지 (~6 nm 크기의 Pd 나노구조. 스케일 바, 10 nm)를 나타낸 것이다.

도 12 (a)는 FEx 및 CEx에서 로다민의 탈마스킹을 위한 형광 방출 스펙트럼 ( $\lambda_{ex}$  = 498 nm), (b)는 FEx-Pd-proRho 및 CEx-proRho에서 시간의 함수로서의 탈마스킹 반응의 형광 강도(%) (527 nm에서) 변화를 나타낸 것이다.

도 13 (a)는 FEx-Pd-proFU 나노반응기를 사용한 전구약물 (pro-drug)의 약물로의 축매에 따른 전환을 나타낸 모식도이다. FEx-Pd-proFU 나노반응기를 이용한 항암제 5-fluorouracil (pro-FU)의 활성화를 보여준다. (b)는 다양한 농도 (10  $\mu$ g/mL, 30  $\mu$ g/mL, 60  $\mu$ g/mL 및 90  $\mu$ g/mL)의 나노반응기 FEx-Pd-proFU 및 CEx-proFU를 배양한 후, MCF-10A 세포의 세포 생존율 결과를 나타낸 그래프이다.

도 14(a)는 본 발명 실시예 2에 따른 에너지 생성을 위한 인공 세포 소기관 (FEx-1)을 나타낸 모식도이다. 엑소좀 막과 내부에 각각 ATP 합성효소와 글루코오산산화효소를 탑재한 엑소좀 (ATPsyn-CEx-GOx)와 bo3 산화효소와 HRP효소를 탑재한 엑소좀 (bo3Oxi-CEx-HRP)의 융합에 의해 만들어진 인공 세포소기관으로 ATP 생산을 하여 저산소 조건에 있는 세포까지 에너지 공급할 수 있다. (b)는 본 발명 비교예 2에 따라 개별 효소를 엑소좀에 직접 로딩한 것을 나타낸 모식도이다.

도 15는 세포에 흡수된 후, FEx-1 나노반응기 내부의 에너지 생성 여부를 확인하기 위한 (a) 시간에 따른 pH 구배 및 (b) 시간에 따른 ATP 생산을 관찰한 결과 그래프이다.

도 16(a)는 FEx-1가 저산소증이 유도된 세포에 흡수된 후, ATP 활성을 나타낸 것이다. (b)는 다른 농도로 처리된 FEx-1 나노반응기의 세포 내 ROS 수준을 정량화하여 나타낸 것이다.

도 17은 본 발명 실시예 2 및 비교예 2에 의한 융합 엑소좀 또는 개별 엑소좀에 따른 합성된 ATP를 발광정도로 나타낸 그래프이다.

도 18은 저산소 코어를 포함하는 생체 내 조직과 매우 유사한 3차원 다세포 스펜로이드 구조를 나타낸 것으로서, FEx가 스펜로이드로 침투하고, ATP 생산을 통해 저산소 조건에서 세포 산화-환원을 제어할 수 있음을 보여주는 모식도이다.

도 19는 융합 엑소좀 (FEx-1)을 처리하고 24시간 배양 후의 스펜로이드의 ATP 활성 수준을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 20은 칼세인-AM (acetoxymethyl)을 사용한 스펜로이드의 세포 생존력의 분석 결과를 나타낸 그래프이다.

도 21은 융합 엑소좀 (FEx-1) 처리 후 스펜로이드의 활성산소 (ROS) 수준을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0030] 이하 본 발명에 따른 나노소포체 반응기 제조용 조성물, 나노소포체 반응기 함유 에멀전, 나노소포체 반응기를 포함하는 세포 및 나노소포체 반응기의 제조방법에 대하여 상세히 설명한다.
- [0031] 이때, 달리 정의되지 않는 한, 본 발명 명세서의 모든 기술적 용어 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 이해하고 있는 의미를 갖는다.
- [0032] 본 발명 상세한 설명에 사용되는 용어는 단지 특정 구체예를 효과적으로 기술하기 위함이고 본 발명을 제한하는 것으로 의도되지 않는다.
- [0033] 또한 본 발명의 구성 요소를 설명하는 데 있어서, 제1, 제2, A, B (a), (b) 등의 용어를 사용할 수 있다. 이러한 용어는 그 구성 요소를 다른 구성 요소와 구별하기 위한 것일 뿐, 그 용어에 의해 해당 구성 요소의 본질이나 차례 또는 순서 등이 한정되지 않는다.
- [0034] 또한 본 명세서에서 특별히 기재하지 않은 첨가물의 단위는 중량%일 수 있다.
- [0035] 또한 본 명세서에서 단수 형태는 문맥에서 특별한 지시가 없는 한 복수 형태도 포함하는 것으로 의도할 수 있다.
- [0036] 또한 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를

제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

- [0037] 하기의 설명에서 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 공지 효과 및 구성에 대한 설명은 생략한다.
- [0038] 본 발명 명세서에서 '나노소포체 반응기'는 세포나 생체에 나노입자를 넣고 생체 내에서 일어나는 또는 일어나지 않는 화학반응을 유도하는 기능을 수행하는 플랫폼을 의미할 수 있다. 본 명세서 내에서 '나노반응기' 또는 '소포체 나노반응기'와 동일한 의미로 해석될 수 있다.
- [0039] 본 발명 명세서에서 '수용체'는 소포체 막 표면에 결합된 분자로서, 특이물질과 선택적으로 결합하는 분자를 의미할 수 있다.
- [0040] 본 발명 명세서에서 '리간드 시스템'은 상기 수용체와 특이적으로 결합하는 특이물질을 의미할 수 있다.
- [0041] 세포 소기관을 인위적으로 합성하여 활용하는 인공 세포 소기관 개발은 아직 초기 단계로, 그 중 세포외소포체인 엑소좀은 나노사이즈의 크기를 가지며 생체 유래 물질이라는 점에서 약물, 유전자 및 백신 전달에 다양하게 활용될 수 있다는 이점 때문에 연구가 지속되고 있지만, 살아있는 세포에 적용하기 위해서는 세포 내에서도 오랜 기간 활성을 유지할 수 있고, 세포의 생존에 영향을 주지 않을 것이 필요하다.
- [0042] 본 발명의 발명자는 살아있는 세포 간 정보전달체로 기능하는 세포외소포체를 리프로그래밍하여 액적 기반 미세유체 반응기 상에서 화학반응을 통해 두 종류의 나노소포체 반응기가 합쳐지면서 내부 물질끼리 화학반응이 일어나 융합되는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [0043] 본 발명은 내부 및 막단백질에 서로 다른 효소를 갖고 있는 나노소포체 반응기의 융합 반응을 통하여 생축매 반응을 용이하게 제어할 수 있고, 세포의 에너지원인 ATP를 합성할 수 있는 효소들을 포함함으로써 살아있는 세포 내에서 에너지 생성이 가능한 융합 나노소포체 반응기를 제공할 수 있다.
- [0044] 이하, 본 발명에 따른 나노소포체 반응기 제조용 조성물에 대하여 상세히 설명한다.
- [0045] 구체적으로, 나노소포체 반응기 제조용 조성물은 표면에 제1수용체를 함유하는 제1소포체 및 표면에 제2수용체를 함유하는 제2소포체를 포함하며, 제1수용체 및 제2수용체는 리간드 시스템을 통해 서로 결합되어 제1소포체와 제2소포체가 융합되어 나노소포체 반응기를 형성하는 것을 특징으로 할 수 있다. 이때 본 발명의 일 실시예에 있어서, 제1수용체와 제2수용체는 서로 동일 또는 상이할 수 있다. 본 발명의 목적에 따라 필요에 의해 동일 또는 상이한 수용체를 선택할 수 있다.
- [0046] 구체적으로 제1수용체와 제2수용체는 세포 표면 단백질일 수 있다. 세포 표면 단백질의 구체적인 예를 들면, CD9, CD63, CD81, CD82, CD147, CD107a, CD151, CD13, CD26, ITGA3, ITGA6, ITGB1, ITGB4, ADAM10, CD31B, EGFR, EpCAM, PSMA, 및 PSA로 이루어지는 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [0047] 또한 본 발명의 일 실시예에 있어서, 제1수용체와 제2수용체는 암특이적 항체일 수 있다.
- [0048] 상기 리간드 시스템은 수용체와 특이적인 비공유결합을 이루어 상호작용하는 수용체 결합부를 포함할 수 있다. 비공유결합의 예를 들면 수소결합, 이온결합, 소수성 상호작용, 또는 반데르발스힘일 수 있다. 상기 수용체 결합부는 수용체와 특이적 비공유결합을 형성할 수 있는 anti-CD9, anti-CD63, anti-CD81, anti-CD82, anti-CD147, anti-CD107a, anti-CD151, anti-CD13, anti-CD26, anti-ITGA3, anti-ITGA6, anti-ITGB1, anti-ITGB4, anti-ADAM10, anti-CD31B, anti-EGFR, anti-EpCAM, anti-PSMA, 및 anti-PSA일 수 있으나, 이에 반드시 제한되는 것은 아니다. 이때 'anti-'는 상기 세포 표면 단백질과 특이적 결합을 형성하는 하나 이상의 에피토프를 포함하는 분자 또는 분자단을 의미할 수 있다.
- [0049] 또한 본 발명에 따른 나노소포체 반응기 제조용 조성물은 상기 리간드 시스템에 배위결합성 화합물을 포함할 수 있다. 이때 본 발명의 일 실시예에 있어서, 배위결합성 화합물은 극성 치환기를 포함하는 방향족 화합물일 수 있다. 구체적으로 페놀계 화합물일 수 있다. 보다 구체적으로, 히드록실기 또는 카르복실산기를 하나 이상 포함하는 페놀계 화합물일 수 있고, 예를 들어 페놀(Phenol), 카테콜(Catechol), 프로토키테추산(Protocatechuic acid), 탄닌산(Tannic acid), 갈산 (Gallic acid), 리그닌 (lignin), 엘라그산 (Ellagic acid) 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0050] 또한 리간드 시스템은 다가 금속이온을 더 포함할 수 있다. 구체적으로 다가 금속이온은 알루미늄 이온, 티타늄 이온, 세슘 이온, 아연 이온, 또는 철 이온일 수 있다. 보다 구체적으로  $Al^{3+}$ ,  $Ti^{4+}$ ,  $Ce^{3+}$ ,  $Zn^{2+}$ , 또는  $Fe^{3+}$  일 수 있고, 더욱 구체적으로는  $Al^{3+}$ ,  $Zn^{2+}$ , 또는  $Fe^{3+}$  일 수 있다.

- [0051] 이에 따라 상기 수용체 결합부 및 배위결합성 화합물 복합체는 상기 다가 금속이온과 배위결합을 형성할 수 있고, 배위결합성 화합물의 극성 치환기는 히드록실기 또는 카르복실산기를 포함하여, 상기 다가 금속이온과 함께 용이하게 금속-페놀 배위결합(Metal-phenolic coordination)을 형성할 수 있다. 금속-페놀 배위결합을 통해 도 1에 도시된 바와 같이, 제1소포체 및 제2소포체의 융합이 유도될 수 있다.
- [0052] 본 발명에 있어서 소포체는 세포막의 구조와 동일한 인지질(phospholipid) 이중막 형태로 이루어져 있어, 외막이 내부의 물질을 안정적으로 유지할 수 있는 것이면 종류에 특별히 제한되지 않는다. 소포체의 평균 직경은 10 내지 1000 nm, 또는 30 내지 500 nm일 수 있다. 소포체는 천연 유래 또는 인공적으로 합성된 나노소포체일 수 있다.
- [0053] 본 발명의 비제한적인 일 실시예에 있어서, 나노소포체는 생물 유래의 다양한 세포외소포체일 수 있다.
- [0054] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 10  $\mu\text{m}$  이하의 평균 직경을 가지는 액적 기반의 미세유체 반응기를 이용하여, 두 종류의 나노소포체 융합을 수행할 수 있다. 이때 두 종류의 나노소포체는 엑소솜, 엑소솜 외의 세포외소포체 또는 둘의 조합일 수 있다. 구체적으로 예를 들어, i) 서로 상이한 엑소솜; ii) 상이한 엑소솜 외의 세포외소포체; iii) 엑소솜 및 엑소솜 외 세포외소포체;일 수 있다.
- [0055] 액적 기반 미세유체 반응기는 물과 기름과 같이 서로 섞이지 않는 두 유체를 이용하여 미세유체 칩 상에 여러 개의 액적(droplet)을 형성하고, 이렇게 상호 분리된 구역을 갖는 여러 개의 작은 액적들을 생화학 반응기로 활용하여 새로운 기능성 재료를 합성하거나 생체물질의 고민감도 분석에 이용된다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 액적 기반 미세유체 반응기를 이용한 나노소포체의 융합을 통해 각 나노소포체 내부 물질의 화학 반응을 유도할 수 있다.
- [0056] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 액적 기반 미세유체 반응기당 소포체는 200개 이하, 구체적으로 100개 이하, 보다 구체적으로 60개 이하로 포함될 수 있다. 이에 나노소포체 내부 및 막단백질에 서로 다른 효소를 갖는 나노소포체의 융합 반응을 통하여 생촉매 반응을 성공적으로 제어할 수 있다.
- [0057] 본 발명의 비제한적인 일 실시예에 있어서, 세포외소포체는 효소 캐스케이드 반응이 안정적으로 수행될 수 있고, 표적능이 우수한 엑소솜일 수 있다. 엑소솜 나노반응기의 주요 이점은 막 단백질이 투과성 껍질 역할을 하여 화학 시약의 흐름을 촉진하고 더 나은 생체 촉매 성능을 위해 로딩된 효소의 침출을 방지하여 깊은 조직 내로 침투가 용이하다는 점이다.
- [0058] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 제1소포체와 제2소포체는 동일한 수용체를 포함하는 것으로서, 서로 다른 효소를 포함할 수 있다. 이때 효소는 2종류 이상, 또는 3종류 이상일 수 있으며, 복수 개의 효소에 의해 나노소포체 반응기는 캐스케이드 반응을 수행할 수 있다.
- [0059] 효소의 구체적인 예를 들면, NADH dehydrogenase (NADH 탈수소효소), Acetylcholinesterase, Alcohol dehydrogenase (알코올 탈수소효소), Bacteriorhodopsin (박테리오포도신), Photosystem II (광계 II) 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않고 소포체 내부에 캡슐화될 수 있는 것이면 필요에 따라 다양하게 적용할 수 있다.
- [0060] 도 9는 3촉매-캐스케이드 반응 결과를 도시한 것으로서, 구체적으로는 FEx- $\beta$ -갈락토시다아제-GOx-HRP 나노반응기에 캡슐화된 3가지 효소 캐스케이드를 나타낸 것이다. 기질로 유당의 존재 하에,  $\beta$ -갈락토시다아제(23.6  $\mu\text{g}/\text{mg}$ )는 유당의 가수분해를 촉매하여 포도당과 갈락토오스를 생성하였다. 생성된 포도당의 호기성 GOx 촉매(31.2  $\mu\text{g}/\text{mg}$ )의 산화로 글루콘산과  $\text{H}_2\text{O}_2$ 가 생성되었고, HRP(18.9  $\mu\text{g}/\text{mg}$ )가 이를 사용하여 Amplex Red를 산화시켜 레소루핀을 형성하였다. 형광현미경을 사용하여 레소루핀의 형광 유당 의존적 변화를 모니터링하였다. 운동 상수( $K_m$  및  $V_{max}$ )를 계산하기 위해 반응 속도( $\mu\text{M}/\text{sec}$ )를 유당 농도( $\mu\text{M}$ )에 대해 나타내었다. FEx- $\beta$ -갈락토시다아제-GOx-HRP 나노반응기와 CEx- $\beta$ -갈락토시다아제가 있는 FEx-GOx-HRP에 대한  $K_m$  값은 각각  $28.78 \times 10^{-6} \text{ M}$  및  $489.65 \times 10^{-6} \text{ M}$ 이었고, FEx에 대한  $V_{max}$  값  $\beta$ -갈락토시다아제-GOx-HRP 나노반응기와 CEx- $\beta$ -갈락토시다아제가 있는 FEx-GOx-HRP의 경우 각각  $123.16 \times 10^{-6} \text{ M}/\text{min}$  및  $43.06 \times 10^{-6} \text{ M}/\text{min}$ 이었다.
- [0061] 또한 본 발명은 내부 수상에 상술한 나노소포체 반응기 제조용 조성물을 포함하는 에멀전을 제공할 수 있다. 이때 상기 에멀전은 2 내지 100  $\mu\text{m}$ , 또는 1 내지 50  $\mu\text{m}$ 의 평균 직경을 가질 수 있다.
- [0062] 아울러 본 발명은 상술한 나노소포체 반응기 제조용 조성물을 포함하는 세포를 제공할 수 있다. 비제한적인 일 예로서, 상기 나노소포체 반응기는 제1소포체 내에 ATP 합성효소, 제2소포체 내에 bo3 산화효소를 포함할 수 있다. 이를 통해 나노소포체 반응기는 에너지를 생산하는 용도로 사용되고, 저산소증으로 손상된 세포에 에너지를

공급하는 나노 알약으로 활용될 수 있는 이점을 제공할 수 있다.

[0063] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 나노소포체 반응기는 세포에 흡수되어 작동할 수 있다. 구체적으로 엔도사이토시스(endocytosis)에 의할 수 있으나, 이에 제한되지 않고 다양한 메커니즘을 통해 세포에 흡수될 수 있다.

[0064] 본 발명에 따른 나노소포체 반응기는 저산소 코어를 포함하는 다세포 스페로이드의 코어 부분까지 깊숙히 침투할 수 있다. 도 19 내지 도 21에 도시된 바와 같이, 인공 엑소솜은 유방암 모사 스페로이드의 내부 깊숙한 부분까지 침투할 수 있음을 확인하였다. 이는 인공 엑소솜이 저산소증으로 손상된 세포에 에너지를 공급하는 나노 알약으로 활용될 가능성을 시사하는 것이다. 이를 통해 종양 중심부의 ATP 부족 현상에 대한 해법을 제공할 수 있다.

[0065] 나노소포체 반응기를 포함하는 세포는 박테리아, 식물 또는 인간을 포함하는 동물 유래 세포일 수 있다.

[0066] 또한 본 발명은 (S1) 표면에 제1수용체를 함유하는 제1소포체 용액을 제조하는 단계; (S2) 표면에 제2수용체를 함유하는 제2소포체 용액을 제조하는 단계; (S3) 제1소포체 용액과 제2소포체 용액을 혼합하여 포함하며 혼합액을 제조하는 단계; 및 (S4) 상기 혼합액에 다가 금속이온을 혼합하여 제1소포체와 제2소포체를 융합하는 단계를 포함하는 나노소포체 반응기의 제조방법을 제공할 수 있다.

[0067] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 (S1) 및 (S2) 단계의 제1소포체 용액 및 제2소포체 용액은 서로 독립적으로 배위결합성 화합물로 처리하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0069] 이하 실시예를 통해 본 발명에 대하여 더욱 상세히 설명한다. 다만 하기 실시예는 본 발명을 상세히 설명하기 위한 하나의 참조일 뿐 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니며, 여러 형태로 구현될 수 있다.

#### [0071] 제조예 1. 카테콜로 개질된 엑소솜(CEx) 제조

[0072] 인간 유방 상피세포 MCF-10A (cat#CRL-10317, American Type Culture Collection(ATCC))를 5% 말 혈청(Invitrogen #16050-122), 20 ng/ml 표피 성장 인자(EGF, cat# AF-100-15, Peprotech), 0.5 mg/ml 하이드로코르티손(cat# H0888, Millipore), 10 µg/ml 인슐린(cat# I1882, Millipore), 1% 항생제/항진균제(100 U/ml 페니실린 및 100 mg/ml 스트렙토마이신)이 보충된 둘베리코 변형 배지(DMEM/F-12; cat# 11330-032) 18 ml를 포함하는 T75 세포 배양 플라스크(Corning, NY, USA)에 플라스크당  $5 \times 10^6$  개 세포의 밀도로 시딩하였다. 세포를 60-70% 합류가 될 때까지 5% CO<sub>2</sub>를 포함하는 가습 분위기의 인큐베이터에서 37 °C에서 배양한 다음 1x 인산염 완충 식염수(PBS)를 사용하여 두 번 세척하고 다시 10% Exo-Free FBS(Systems Biosciences Inc, CA, USA) 및 1% 항생제/항진균 용액으로 보충된 RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 배지(Gibco, Thermo Fisher Scientific)로 세척하였다. 이후에 세포를 37 °C의 인큐베이터에서 48시간 동안 인큐베이션한 후, 세포 배양 상청액을 수집하고, 초원심분리에 의해 엑소솜을 즉시 단리하였다.

[0073] 도파민 염산염(1 mM, cat# 62-31-7, Sigma Aldrich) 및 2 mM 디숙신이미딜 카보네이트 용액을 각각 1 mL 및 15 mL 디메틸 포름아미드에서 제조하여, 도파민 염산염 용액을 2 mM 디숙신이미딜 카보네이트 용액에 교반하면서 30분에 걸쳐 적가한 다음, 2 mM Et<sub>3</sub>N을 천천히 첨가하였다. 1시간 후 용매를 부분적으로 증발시키고 1N HCl을 첨가하였다. 마지막으로, EtOAc를 사용하여 이 혼합물로부터 생성물을 추출하였다. 이후, 항-CD9 항체를 결합하기 위해 카테콜-NHS(1 mg)를 최소량의 디메틸 포름아미드에 용해시키고 PBS(0.2 mg/mL) 중 CD9 항체 용액(BioLegend, 마우스 모노클로날)에 첨가하였다. 시약 대 항체 용액의 물비는 >10으로 조정되었다. 2시간 후, PBS에 대한 투석으로 생성물을 정제하였다. MCF-10A 유래 엑소솜을 카테콜-항CD9 (500 ng/mL)와 함께 37 °C에서 1시간 동안 인큐베이션하여 카테콜로 조작된 엑소솜(CEx)를 수득하였다. 최종 생성물을 초원심분리(120,000 x g 및 4 °C에서 2시간)에 의해 반응 혼합물로부터 정제하여 얻을 수 있었다.

#### [0075] 실시예 1. 융합 엑소솜 FEx 제조

[0076] 50 µM 칼세인(calcein), 1 µM CoCl<sub>2</sub>, 10 mM MOPS(pH 7.4) 및 상기 제조예 1에 따라 제조된 10 µg/mL의 CEx 혼합물을 실온에서 3분 동안 초음파 처리하여 칼세인 및 Co<sup>2+</sup> 착물을 CEx 내부에 캡슐화(CEx-1)하였다. 그리고

10  $\mu$ M EDTA, 10 mM MOPS(pH 7.4) 및 상기 제조예 1에 따라 제조된 CEx 10  $\mu$ g/mL과 혼합하여 EDTA를 CEx 내부에 캡슐화(CEx-2)하였다. 상기 CEx-1 및 CEx-2 모두 120,000 xg에서 1시간 동안 두 번 원심분리하여 과량의 EDTA와 코발트 칼세인을 제거하였다. 밝은 주황색 펠릿을 10 mM MOPS(pH 7.4)를 포함하는 0.6 mL 완충액에 재현탁하고, CEx 현탁액( $3 \times 10^9$  particles/mL)과  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (40 ng/mL) 용액의 수상을 미세유체 장치에 주입하여 CEx-1 및 CEx-2 엑소좀 융합을 수행하였다.

[0078] 실시예 2. 융합 엑소좀 FEx-1 (ATPsyn-bo30xi-FEx-Gox-HRP) 제조

[0079] 10% 나트륨 콜레이트(sodium cholate) 60  $\mu$ L, MCF-10A 유래 엑소좀 현탁액 300  $\mu$ L(NTA를 사용하여 계산한  $5 \times 10^9 \pm 2.6 \times 10^8$  particles/mL, BCA 분석을 사용하여 계산한 87  $\mu$ g) 및 MOPS 완충액(pH 7.4) 200  $\mu$ L의 혼합물에 ATP 합성효소 및 bo3 산화효소(BCA 분석을 사용하여 계산한 1 mg/mL) 100  $\mu$ L를 각 두 반응에 별도로 첨가하였다. 이 혼합물을 4  $^{\circ}\text{C}$ 에서 15분 동안 교반하고, 이를 실온에서 MOPS 완충액으로 평형화된 Sephadex G-50 수지를 함유하는 중력 컬럼에 통과시켰다. 탁한 분획을 새로운 초원심분리기 튜브로 옮기고, 엑소좀 현탁액을 두 번 세척하여 Ti45 고정각 회전자(Beckman Coulter)에서 120,000 xg 및 4  $^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 동안 원심분리하여 과잉 ATP 합성효소를 제거하여, 융합 엑소좀 FEx-1 (ATPsyn-bo30xi-FEx-Gox-HRP)을 제조하였다.

[0080] 엑소좀 펠릿을 200  $\mu$ L의 사전 여과된 PBS에 재현탁하고, 즉각적인 사용을 위해 4  $^{\circ}\text{C}$ 에서 또는 장기 보관을 위해 -80  $^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다. 엑소좀에 융합된 ATP 합성효소와 bo3 산화효소의 양은 각각 23 ng/ $\mu$ g 및 17 ng/ $\mu$ g 인 것으로 측정되었다.

[0082] 실시예 3. 융합 엑소좀 FEx-Pd-proRho 제조

[0083] 상기 제조예 1에 따라 제조된 10  $\mu$ g/mL의 CEx 혼합물에 팔라듐 나노입자(Pd NPs)를 넣어 CEx에 캡슐화시킨 엑소좀(CEx-Pd)를 제조하고, 동일한 방법으로 비스-알릴옥시카르보닐 보호 로다민(proRho)이 로딩된 엑소좀(CEx-proRho)을 제조하였다. 상기 CEx-Pd 및 CEx-proRho 엑소좀 간의 융합을 수행하여 융합된 엑소좀(FEx-Pd-proRho)을 제조하였다.

[0085] 비교예 2. 효소를 직접 로딩한 엑소좀 제조

[0086] (A) GOx, HRP, ATPsynthase 및 bo3oxidase를 함께 사용하여 엑소좀 내부에 캡슐화한 엑소좀 제조

[0087] 최종 단백질 농도가 3.6  $\mu$ g/mL인 엑소좀 현탁액(250  $\mu$ L)을 얼음 위에서 냉각시키고 0.2% 사포닌 용액을 첨가하였다. 혼합물을 42 kHz의 주파수 및 100W의 전력에서 FS30D bath형 초음파 처리기(Fisher Scientific)를 사용하여 2분 동안 뚜껑이 있는 유리 바이알에서 초음파를 처리하였다. 실온에서 20분 동안 진탕한 후, 효소가 로딩된 엑소좀을 초원심분리( $120,000 \times g$  및 4  $^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간)로 유리 효소를 제거한 후, Pierce<sup>TM</sup> BCA 단백질 분석 키트(Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 정량하였다.

[0088] (B) GOx, HRP, ATPsynthase 및 bo3oxidase를 순차적으로 엑소좀 내부에 캡슐화한 엑소좀 제조

[0089] 모든 효소(GOx, Hrp, ATPsynthase 및 bo3oxidase)를 단계 사이에 세척할 때마다 차례로 캡슐화한 것을 제외하면, 상기 (A) 제조 과정과 동일하게 수행하였다.

[0091] [실험예 1] 융합 엑소좀 특성 확인

[0092] 1-1. DLS(Dynamic Light Scattering)를 이용하여 측정한 엑소좀 크기 분포

[0093] Malvern Zetasizer(Nano ZS)를 사용하여 고정된 각도에서 산란광 강도의 동적 변동으로 인한 엑소좀 이동 속도 분포를 분석하여 엑소좀 크기 분포를 기록하였다. 브라운 운동에 의해 엑소좀의 유체역학적 반경은 스톡-아인슈타인 방정식으로 계산되었다. 엑소좀 용액을 무입자 PBS(1000x, 200 nm 필터를 통과함)에 희석하였다. 약 1 mL의 샘플을 30초 동안 블랭킹하고 응집을 피하기 위해 일회용 큐벳에 빠르게 로드하였다. 엑소좀, CEx 및 FEx의 크기 분포는 최소 3번의 독립적인 실험을 거쳐 측정하였다. 그 결과는 도 3에 도시되었다.

[0095] 1-2. 칼세인- $\text{Co}^{2+}$  분석

[0096] 융합 엑소솜(FEx)이 단순 접합이 아닌 내부 내용물의 혼합임을 확인하기 위하여, CEx-1과 CEx-2를 별도로 융합 후 calcein- $\text{Co}^{2+}$  분석을 수행하였다. 그 결과는 도 4에 도시되었다. 시간에 대한 형광 강도를 플롯팅하면 융합 후 신호가 약 10배 증가하고 10분 이내에 포화되는 것으로 나타났다. 이는 막과 내부 물질 간의 혼합이 일어남에 따라, CEx-2 내부에 캡슐화된 EDTA가 CEx-1 내부에 캡슐화된  $\text{Co}^{2+}$ 에 우선적으로 결합하여 칼세인이 형광을 일으키지 않도록 하기 때문인 것으로, 내용물의 혼합을 확인할 수 있었다.

[0098] [실험예 2] 융합 엑소솜 나노반응기 내의 다중 효소 캐스케이드 작동 평가

[0099] two-enzyme cascade reactions :

[0100] 도 6의 모식도에 도시된 바와 같이, 글루코스산화효소(GOx)와 HRP효소를 각각 탑재한 엑소솜을 융합한 후 융합 엑소솜 나노 반응기 (FEx-GOx-HRP) 내부에서 다중효소 생체촉매 연속단계 반응 (cascade reaction)을 수행하였다. 포도당(글루코스)을 첨가하여 호기성 산화에 따라 과산화수소 및 글루콘산(gluconic acid)가 생성되었고, HRP 부근에서 생성된 과산화수소는 기질로 작용하여 HRP가 Amplex Red 산화를 촉매하여 형광 생성물인 레조루핀을 생성할 수 있도록 하였다.

[0101] FEx-GOx-HRP 나노반응기의 효소 활성과 동역학을 모니터링하였다. 효소 캡슐화 효율은 다른 염료로 표지된 효소에 대한 보정 곡선을 사용하여 형광 분광광도법에 의해 결정되었다. 효소 생체촉매 캐스케이드 반응의 속도는 마이크로플레이트 리더(TECAN 무한 M200PRO)를 사용하여 563 nm에서 resorufin의 형광 강도를 이용하여 측정하였다. FEx 나노반응기의  $V_{\max}$  및  $K_M$ 을 결정하기 위해 표준 Michaelis-Menten 효소 동역학 방정식을 사용하였고, GraphPad Prism 8.0.1을 사용하였다. FEx-GOx-HRP 나노반응기의 Michaelis-Menten 상수( $K_M$ ) 값은 CEx-GOx와 CEx-HRP의 균질 혼합물에 비해 16배까지 감소했으며 최대 반응 속도( $V_{\max}$ )는 FEx-GOx-HRP 나노 반응기의 경우 3배까지 증가함을 보여주었다.

[0103] 1) 저장 안정성 평가

[0104] FEx 나노반응기(FEx-GOx-HRP) 내부에 캡슐화된 용액 및 효소 내 유리 GOx 및 HRP의 상대적 활성 변화를 알아보기 위해 실온(25 ° C)에서 며칠 동안 보관 후, 저장 안정성 측정을 위해 유리 효소(GOx + HRP)와 FEx-GOx-HRP를 PBS에 실온(25 ° C)에서 저장하였다. 저장 중 안정성을 결정하기 위해 7일 동안 활성을 측정하였다. 결과는 도 10 (a)에 도시되었다. 유리 효소의 경우 상대 활성이 20%로 감소한 반면 FEx 나노 반응기 내부의 캡슐화된 효소는 7일 후에도 활성의 69%를 유지함을 확인할 수 있었다.

[0106] 2) 열 안정성 평가

[0107] 60 ° C 에서 1시간 동안 배양한 후, 용액 및 FEx 나노반응기(FEx-GOx-HRP) 내부에 캡슐화된 유리 GOx 및 HRP의 상대적 활성 변화를 분석하여 결과는 도 10 (b)에 도시되었다. 촉매 활성은 열 안정성을 결정하기 위해 10분마다 측정되었다. 유리 효소의 경우 상대적 활성이 ~5%로 감소한 반면 캡슐화된 효소는 1시간 배양 후에도 활성의 64%를 나타냄을 확인하였다.

[0109] 3) 재활용성 평가

[0110] 5회 반복 사이클 후 FEx-GOx-HRP 시스템의 상대 활성 변화를 분석하여 결과는 도 10 (c)에 도시되었다. FEx-GOx-HRP의 초기 활성은 5회 반복 실험 후에도 89% 이상 유지됨을 확인하였다.

[0112] [실험예 3] 융합 엑소솜에서의 생체직교 촉매 작용

[0113] 3-1. 융합 엑소좀의 구획화 내 촉매기능 평가

[0114] 구획화 내 촉매 기능을 평가하기 위해 도 11에 도시된 바와 같이, 세포 내부의 카르바미산 알릴(allylcarbamate)에 갇힌 형광단으로부터 형광을 생성하기 위한 모델 생체 직교 반응으로 팔라듐 촉매 탈알릴화를 수행하였다. 실시예 3에 의해 제조된 FEx-Pd-proRho 내부의 Pd NP는 ICP-MS로 정량화하였다. Pd NP 존재는 도 11 (b)에 도시된 고해상도 TEM으로 확인할 수 있다.

[0115] 나노반응기의 촉매 특성은 형광계로 모니터링한 형광 생성물 로다민의 형성에 의해 평가되었다. 도 12에 도시된 바에 따르면 반응 용액의 형광 강도는 FEx-Pd-proRho의 경우 527 nm에서 시간이 지남에 따라 증가했지만 CEx-proRho는 거의 변화가 나타나지 않았다.

[0117] 3-2. 융합 엑소좀의 세포 내 촉매 작용

[0118] 1) 형광 이미지 확인

[0119] FEx-Pd-proRho 나노반응기 (30  $\mu$ g/mL)를 MCF-10A 세포와 함께 37 °C에서 24시간 동안 배양하여 세포 내 촉매 실험을 수행하였다. MCF-10A 세포의 CLSM 이미지는 proRho의 형광성 로다민으로의 촉매 전환으로 인해 녹색 형광을 나타냈으나, CEx를 사용한 대조 실험에서는 형광 신호가 감지되지 않았다.

[0121] 2) 전구 염료 활성화에 대한 유세포 분석

[0122] MCF-10A 인간 유방 상피 세포( $1 \times 10^5$  cells)를 6웰 플레이트에 접종하고 5% 말 혈청(Invitrogen #16050-122), 20 ng/mL 표피 성장 인자(EGF, cat# AF-100-15, Peprotech), 0.5 mg/mL 하이드로코르티손(cat# H0888, Millipore), 10  $\mu$ g/mL 인슐린(cat# I1882, Millipore) 및 1% 항생제/항진균제(100 U/mL 페니실린 및 100 mg/mL 스트렙토마이신)가 보충된 DMEM에서 37 °C 및 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였다. 24시간 후 상등액을 제거하고 FEx-Pd-proRho(30  $\mu$ g/mL)의 현탁액이 함유된 신선한 배지로 교체하였다. 과량의 FEx-Pd-proRho를 제거하기 위해 24시간 배양한 후 PBS로 세척하였다. 셀을 PBS로 세척한 후 셀 스트리퍼액(Corning®100 mL Cellstriper™)으로 20분간 배양하여 분리하였다. 그런 다음 1200 rpm에서 3분간 세포를 채취하고 2 %의 우태아혈청(FBS)을 사용하여 PBS에서 다시 재현탁시켰다. 세포는 FSC xV, SSC xV, FITC xV, APC xV 설정을 사용하여 유세포 측정(CytoFLEX, Beckman Coulter Life)을 위해 준비되었다. 샘플당 50,000개의 이벤트가 기록되었다. 사용된 여기 파장과 방출 파장은 각각 로다민의 경우 530/30 nm FITC였다. 데이터는 FlowJo 소프트웨어(FlowJo, LLC)를 사용하여 분석하였다. 도시되지 않았으나, 유세포 분석을 통해 형광 강도 신호가 반응 후 100배 더 높음을 확인할 수 있었다.

[0124] 3) 약물전달시스템 특성 평가

[0125] 도 13(a)에 도시된 바와 같이, FEx-Pd-proFU 나노반응기를 사용한 전구약물(pro-drug)의 약물로의 전환 특성을 확인하였다. 5-fluorouracil(5-FU)의 생체 직교 탈마스킹을 위해 CEx-Pd와 마스크된 불활성 치료 분자 [5-fluoro-1-propargyl uracil (proFU)]-loaded CEx 간의 융합을 수행하였다. 이 약물은 N1 위치의 기능화를 통해 세포 독성 뉴클레오타이드 대사 산물을 전환시킨 다음 thymidylate synthase를 억제하고 RNA 및 DNA 가닥으로 통합하여 세포 기능을 방해하는 역할을 한다. 이 약물의 세포 내 기능/탈마스킹을 확인하기 위해 FEx-Pd-proFU와 함께 24시간 동안 배양한 후 MCF-10A 세포에 대해 live/dead 세포 분석을 통해 세포 독성을 평가하였다. 그 결과는 도 13(b)에 도시되었다. FEx-Pd-proFU와 함께 배양하면 세포 생존율이 23%로 떨어지는 반면 CEx 세포의 경우에는 91%가 생존함을 확인할 수 있다.

[0127] [실험예 4] 융합 엑소좀의 에너지 생성 확인

[0128] 실시예 2에 따라 제조된 융합 엑소좀 FEx-1 (ATPase-bo30xi-FEx-Gox-HRP) 나노반응기 및 비교예 2에 따라 제조된 효소의 직접 로딩에 의한 엑소좀의 ATP 생성 여부를 확인하기 위하여 pH 변화 및 ATP 활성을 측정하였다.

[0130] 4-1. pH 변화

[0131] 다른 효소(HRP, GOx, ATP 합성효소 및 bo3 산화효소)를 포함하는 FEx-1 나노반응기를 포도당과 DTT로 처리하여 효소 반응이 시작되도록 하였다. HPTS를 FEx-1에 캡슐화하고 검은 96웰 플레이트에서 단백질을 최종 농도 137  $\mu\text{g/mL}$ 로 희석한 다음 30  $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분 동안 배양하였다. 이후, 40  $\mu\text{M}$  코엔자임 Q1과 2 mM DTT를 추가하였다. DTT는 Q1을 환원시켜 bo3 산화효소에 사용될 수 있도록 한다. DTT 첨가 1분 후, 글루코스(300 nM)를 반응 혼합물에 첨가하였다. 형광 스펙트럼은  $380 \pm 5 \sim 480 \pm 5 \text{ nm}$ 의 여기와  $512 \pm 5 \text{ nm}$ 의 방출로 분광 광도계(TECAN, Morrisville, NC, USA)를 사용하여, 0분부터 90분까지 측정하였고, pH는 검량선으로부터 구하였다. 그 결과는 도 9 (a) 에 도시되었다.

[0132] pH 감지 지시약인 HPTS(hydroxypyrene-1,3,6-trisulphonic acid)의 형광 신호를 측정하여 나노반응기 내부의 양성자 생성을 확인하였다. 글루코스 농도를 증가시키면 FEx-GOx-HRP 및 FEx-1에 대해 나노반응기 내부의 산성화( $\Delta\text{pH}=0.4$ )가 관찰되었지만, 막형단 pH 구배는 낮게 나타났다. FEx-1 막의 조립된 전자 수송 사슬의 활성화는 환원된 DTT를 첨가함으로써 촉발되었고, 이는 보조효소 Q1을 환원시켜 bo3 산화효소 활성화에 이용되어, bo3 산화효소에 의해 환원된 Q1(Q1H)가 산화되면서 양성자를 각 용합 후 소포로 펌핑하여 90분 후에  $\Delta\text{pH}=-1.6$ 가 되었다. 이는 ATP 합성을 유도하기에 충분한 양성자 원동력(PMF)을 구축하였다. 즉, 용합 엑소좀 나노반응기의 bo3 산화효소 양성자 펌프의 활성을 통해 재구성된 단백질이 완전한 기능을 수행할 수 있음을 확인하였다.

[0134] 4-2. ATP 활성

[0135] ATP 결정 키트 A22066(Invitrogen) 프로토콜에 따라 표준 검량 곡선을 그렸다.  $\text{H}_2\text{O}$  8.9 mL, 반응 완충액 0.5 mL (500 mM 트리신 완충액(pH 7.8) 100 mM,  $\text{MgSO}_4$ , 및 2 mM EDTA, 2 mM 아지드화나트륨)를 포함하는 표준 용액, 0.1 M DTT 0.5 mL, 10 mM D-루시페린 0.5 mL 및 5 mg/mL 반딧불이 루시페라제 2.5  $\mu\text{L}$ 를 준비하였다. 합성된 ATP가 루시페라제에 의해 피로인산과 아데노신 일인산으로 전환되면 발광하므로, 분광광도계(TECAN, Morrisville, NC, USA)를 사용하여 발광성을 측정하였다. 그 결과는 도 9 (b) 에 도시되었다. 포도당 또는 DTT 만 첨가한 ATP 생산과 비교하여 포도당-DTT( $1.31 \pm 0.05 \text{ ATP } \mu\text{mol/mg}$ )를 첨가한 ATP 생산의 경우 상대적으로 빠르게 증가하였다. 이에 반해, 포도당과 DTT가 없을 때 ATP 생산은 거의 감지되지 않았다.

[0136] 도 11은 비교예 2에 따라 제조된 개별 구성 요소(GOx, HRP, ATPsynthase 및 bo3oxidase)를 엑소좀에 직접 로딩한 경우 및 실시예 2에 따라 제조된 용합 엑소좀의 ATP 생산을 발광 정도로 나타낸 것이다. 직접 효소를 캡슐화한 경우보다 본 발명에 따라 용합된 엑소좀에서의 ATP 생산이 현저히 더 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0138] [실험예 5] 용합 엑소좀의 스페로이드 침투 효과 확인

[0139] 5-1. 용합 엑소좀을 포함하는 저산소증 유도된 스페로이드 준비

[0140] MCF-10A (30  $\mu\text{L}$ ,  $10^5 \text{ cells/mL}$ ) 세포 현탁액을 페트리 플레이트에 분주하고, 반전된 상태로 유지하였다. 플레이트 하부에는 증발을 방지하고 습도를 유지하기 위해 10 mL PBS가 채워졌다. 매 24시간마다 배지를  $\sim 5 \mu\text{L}$ 씩 흡인하여 10  $\mu\text{L}$ 의 신선한 배지로 교체하여 스페로이드를 배양하였다. FEx-1 나노 반응기(206  $\mu\text{g}$ )를 포함하는 10  $\mu\text{L}$ 의 신선한 세포 배지로 교체하고 24시간 후, 스페로이드를 PBS로 세척하였다. 이후, 600  $\mu\text{M}$  ADP 및 5 mM  $\text{MgCl}_2$ 를 포함하는 30  $\mu\text{L}$ 의 세포 배지를 첨가한 다음 60  $\mu\text{M}$  조효소 Q1 및 3 mM DTT(Dithiothreitol)를 첨가하였다. 24시간 배양 후, 스페로이드를 30  $\mu\text{M}$ 의 TBHP(tert-butyl hydroperoxide)로 3시간 동안 처리하여, 저산소증이 유도된 스페로이드를 제조하였다.

[0142] 5-2. ATP 활성 측정

[0143] ATP 생성은 루시페린-루시페라제(luciferin-luciferase) 분석을 사용하여 발광으로 측정되었다. 표준 검량곡선은 ATP의 양을 0 에서 1000 nM의 범위에서 변화시켜, 발광 강도(루시페린에서 옥시-루시페린)를 모니터링하여 얻었고, ATP 활성(%)은 정상 조건에서 존재하는 ATP의 총량을 기준으로 결정하였다. 그 결과는 도 12에 도시되었다. 저산소 조건에서 ATP 활성은 13배 가량 감소하였으나, FEx-1 나노반응기가 내부화된 스페로이드에 글루코스-DTT를 추가하면 ATP 활성 수준은 저산소증이 없는 양성 대조군의 수준에 가까운  $81.1 \pm 5.9\%$  수준으로 회복

되는 것을 관찰할 수 있었다.

[0145] 5-3. 세포 생존율 (Cell viability) 측정

[0146] 저산소증 유도 후, 포유류 세포용 LIVE/DEAD 생존율/세포독성 키트(cat# L3224, Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 스페로이드의 세포 생존율을 측정하였다. PBS에 8  $\mu$ M 칼세인-AM 및 16  $\mu$ M ethidium homodimer-1을 혼합하여 넣고, 저산소증이 유도된 스페로이드를 포함하는 매달린 방울 부피의 25%를 이 혼합물로 대체하였다. 45분 동안 인큐베이션한 후, 스페로이드를 신선한 PBS로 3회 세척하여 과잉 염료를 제거하였다. 세포 생존율은 칼세인-AM( $\lambda_{ex}$  = 490 nm 및  $\lambda_{em}$  = 520 nm)을 사용하여 측정하여 도 13에 도시되었다. 데이터는 n = 3개의 독립적인 실험의 평균  $\pm$  SD를 나타낸다.

[0147] 저산소 조건에서 세포 생존율은 6배 가량 감소하였으나, FEx-1 나노반응기가 내부화된 스페로이드에 글루코스-DTT를 추가하면 세포 생존율은 저산소증이 없는 양성 대조군의 수준에 가까운  $93.7 \pm 4.5\%$  수준으로 회복되는 것을 관찰할 수 있었다.

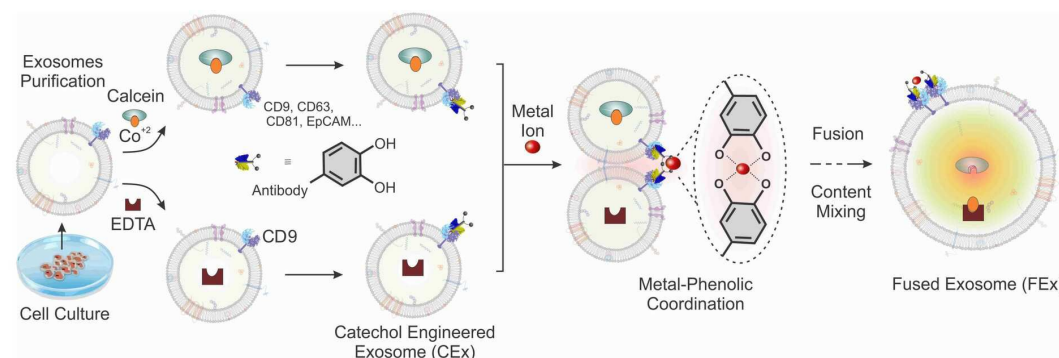
[0149] 5-4. 산화스트레스(Reactive oxidative stress, ROS) 수준 측정

[0150] ROS 측정을 위한 양성 및 음성 대조군의 경우, 스페로이드를 각각 1시간 동안 30  $\mu$ M 파라과트 또는 50  $\mu$ M 글루타티온으로 처리하고, PBS로 두 번 세척한 후, 스페로이드를 100  $\mu$ L 디클로로디하이드로플루오레세인 디아세테이트와 함께 37  $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 이후, PBS로 부드럽게 세척하고 485 nm에서 여기 및 535 nm에서 방출에 의해 분광 광도계(TECAN, Morrisville, NC, USA)를 사용하여 형광 강도를 측정하였다. 데이터는 n = 3개의 독립적인 실험의 평균  $\pm$  SD를 나타낸다. 도 14에 도시된 바와 같이, FEx-1 나노반응기 및 글루코스-DTT로 처리했을 때 스페로이드에서 ROS가 2배 가량 감소하는 결과를 통해, 본 발명에 따른 나노소포체 반응기는 산화스트레스 제거 효과를 제공할 수 있음을 확인할 수 있었다.

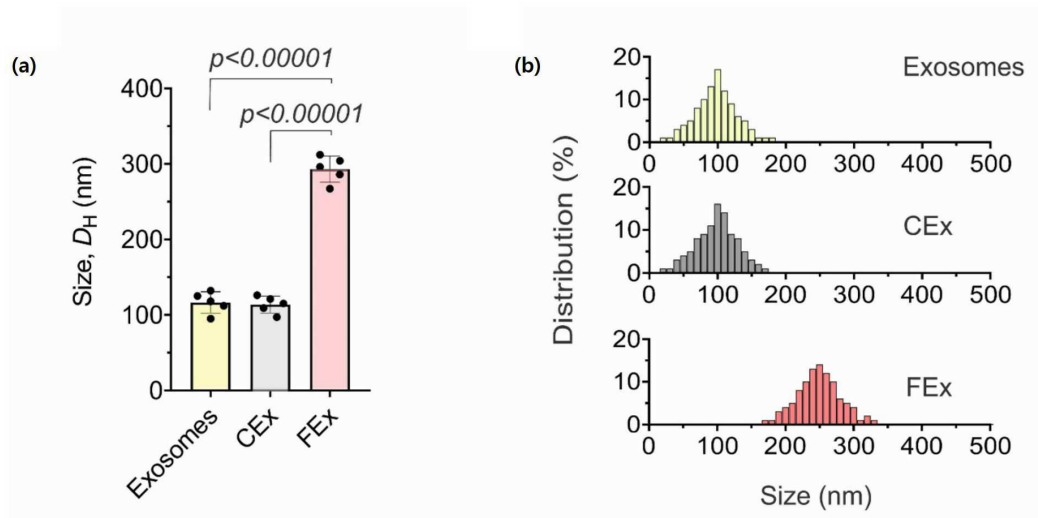
[0151] 이를 통해 본 발명에 따른 소포체 나노반응기는 다양한 질병 조건에서 관찰되는 저산소증에 따른 세포 손상을 감소시킬 수 있고, 세포의 대사 활성을 조절할 수 있음을 확인하였다. 또한 스페로이드 코어까지 깊이 침투된 결과로부터 본 발명의 나노소포체 반응기는 로딩된 효소의 침출 없이, 종양 속 깊은 조직으로 침투하여 생체 촉매의 성능을 향상시킬 수 있음을 예상할 수 있다.

## 도면

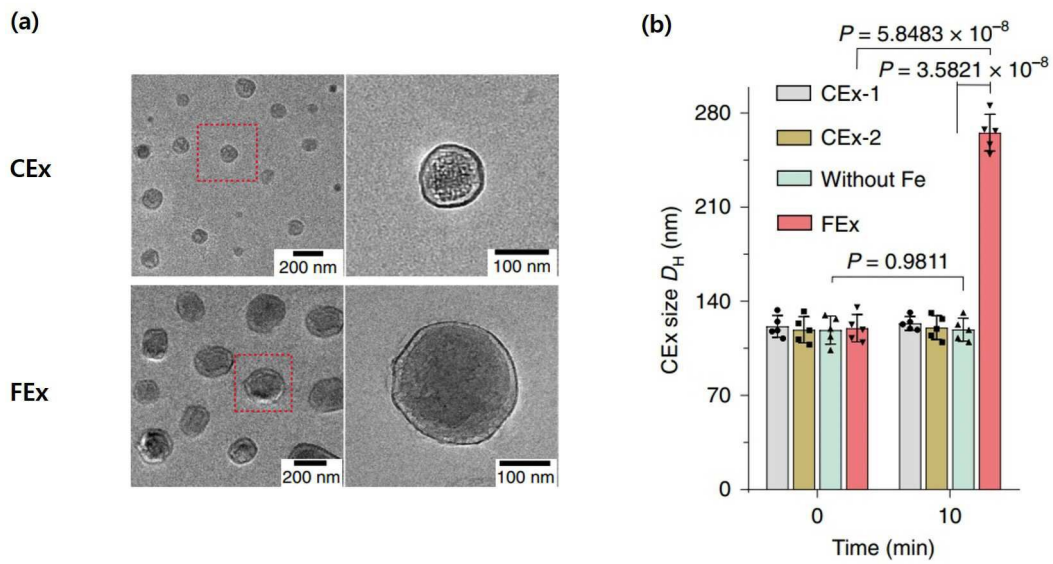
### 도면1



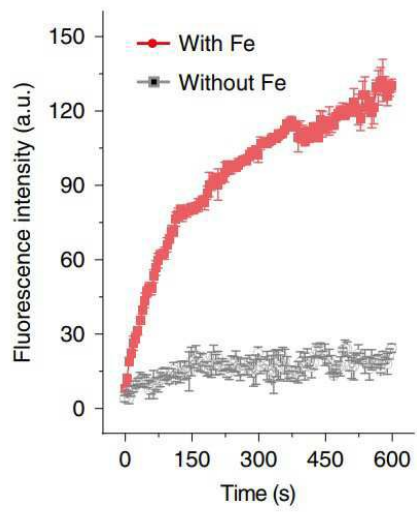
도면2



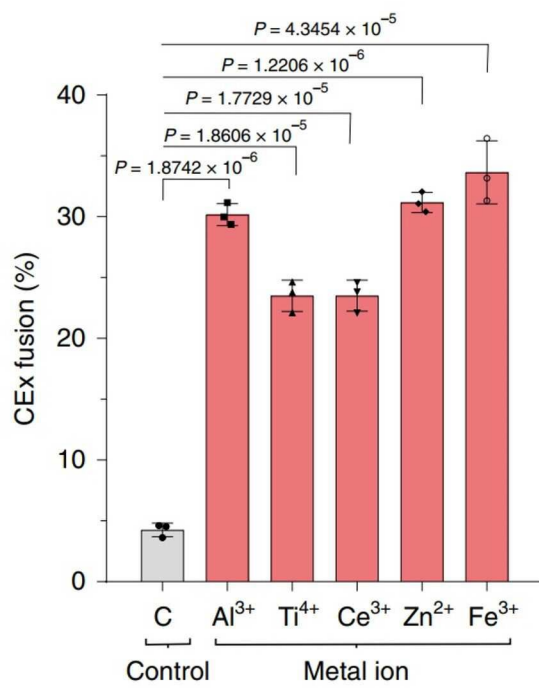
도면3



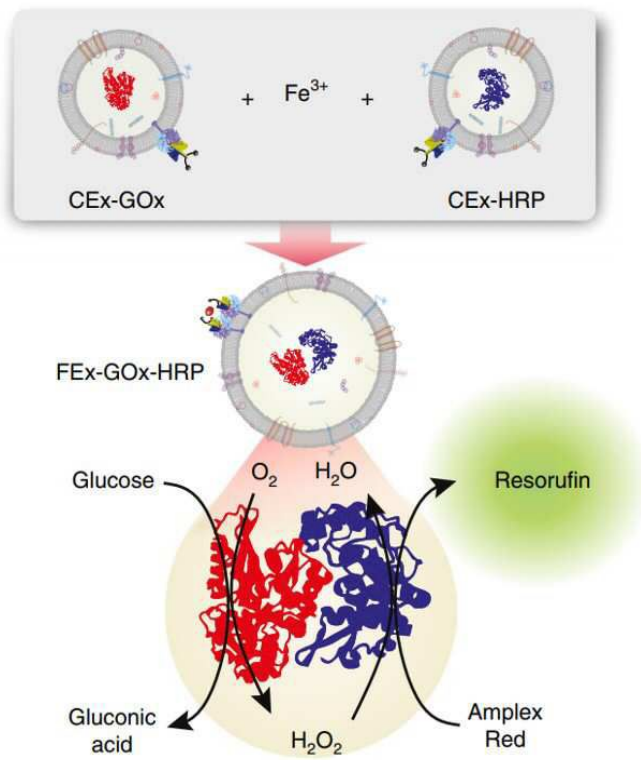
도면4



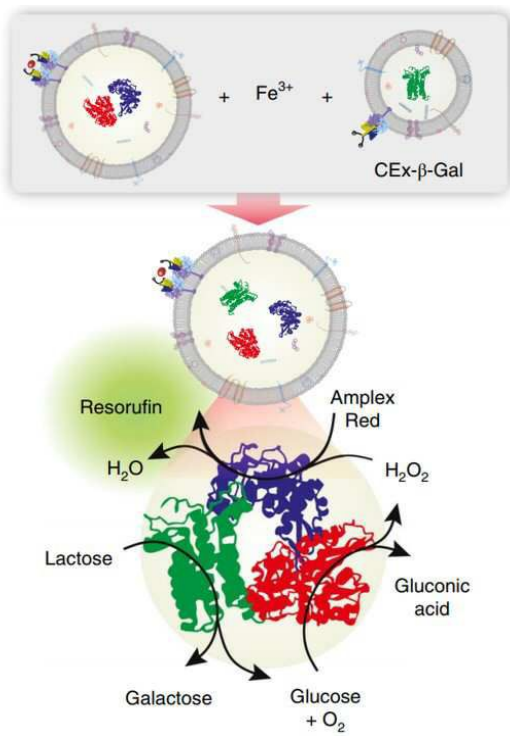
도면5



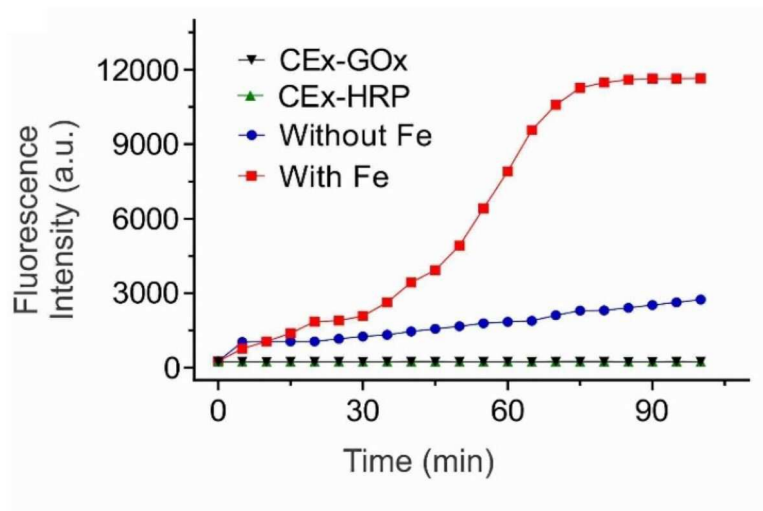
도면6



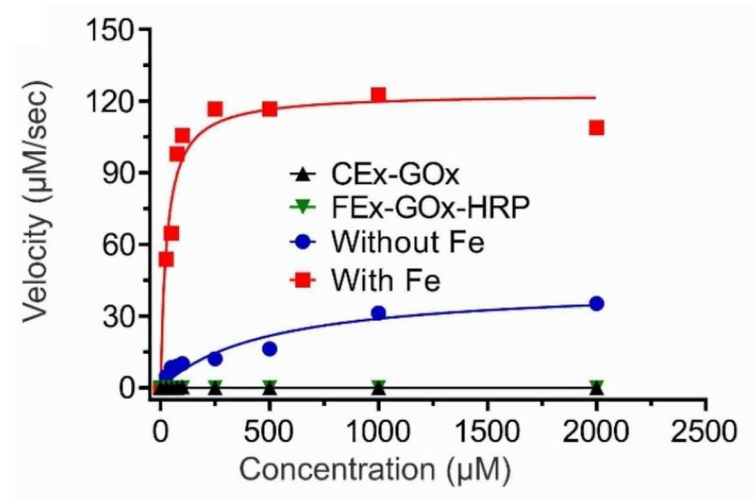
도면7



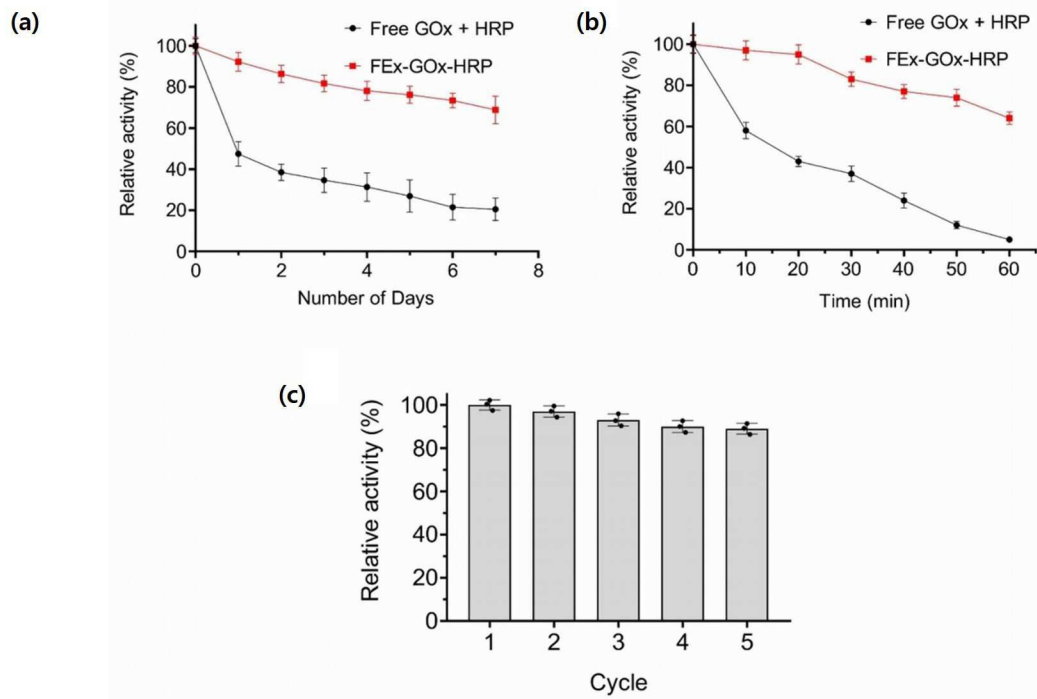
도면8



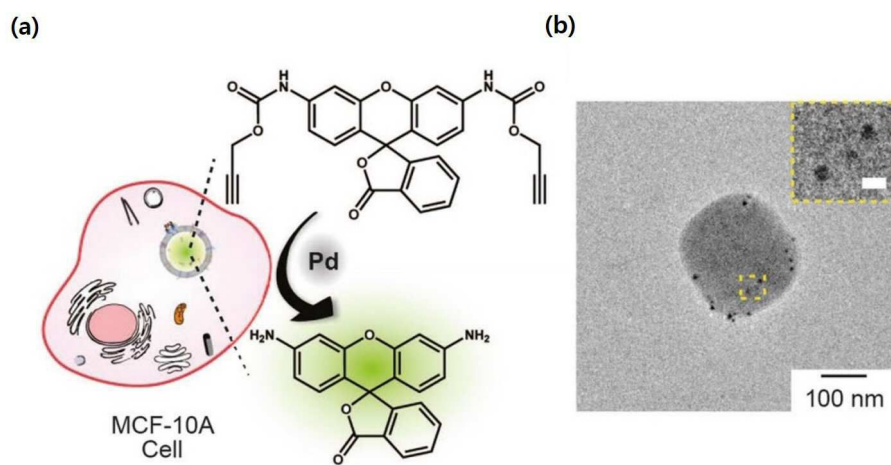
도면9



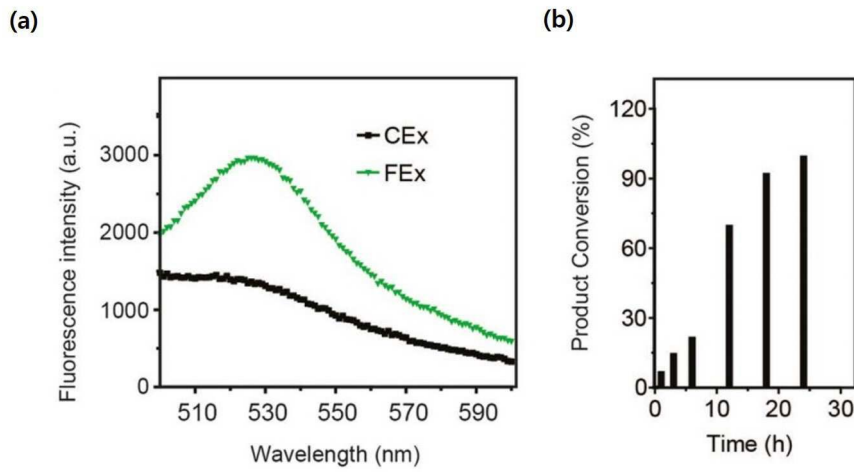
도면10



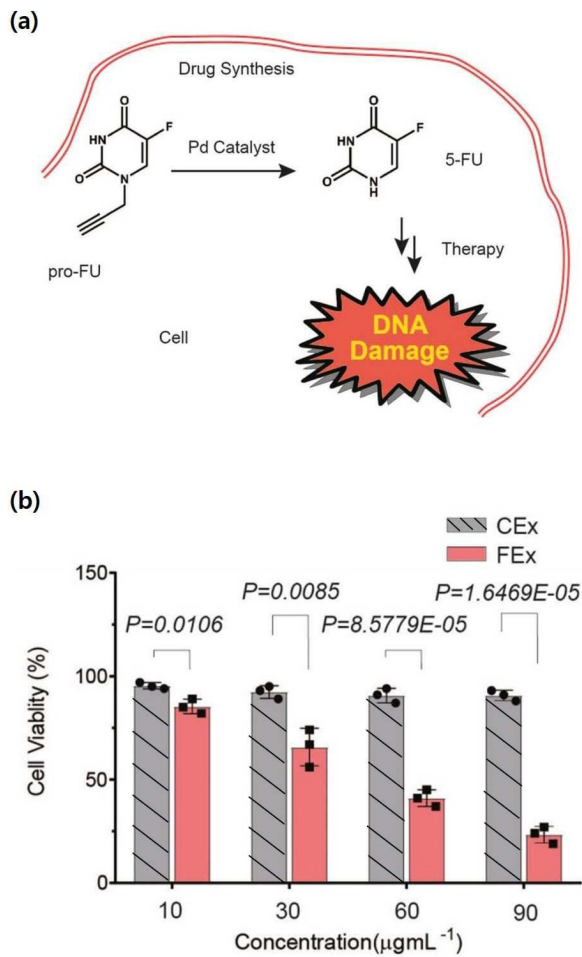
도면11



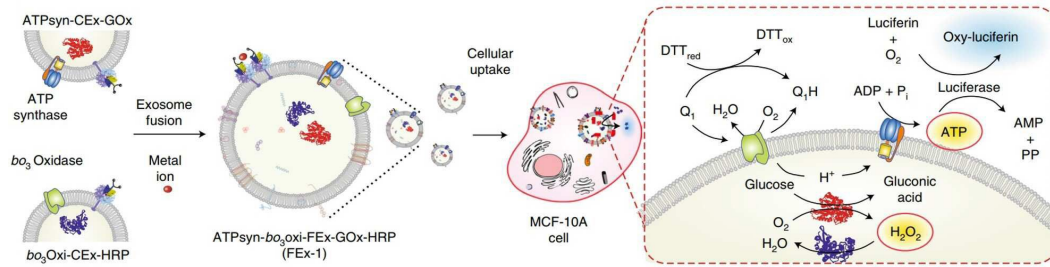
도면12



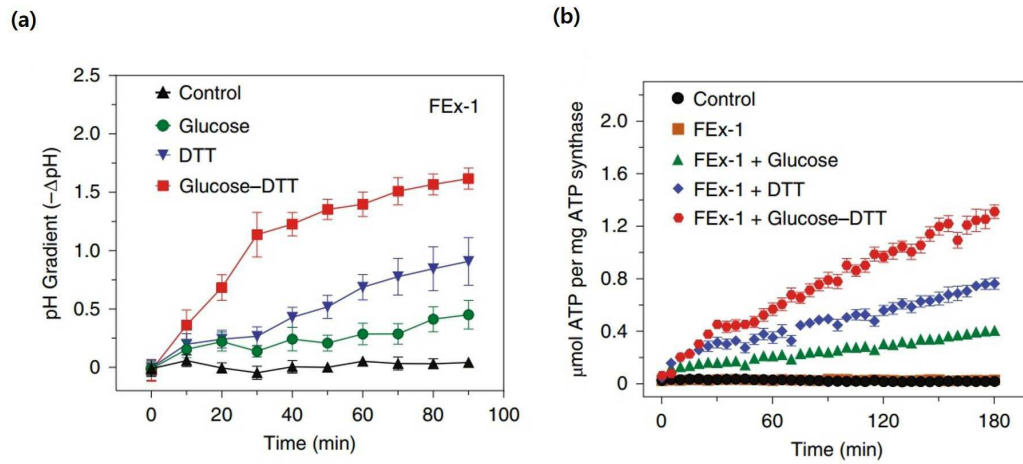
도면13



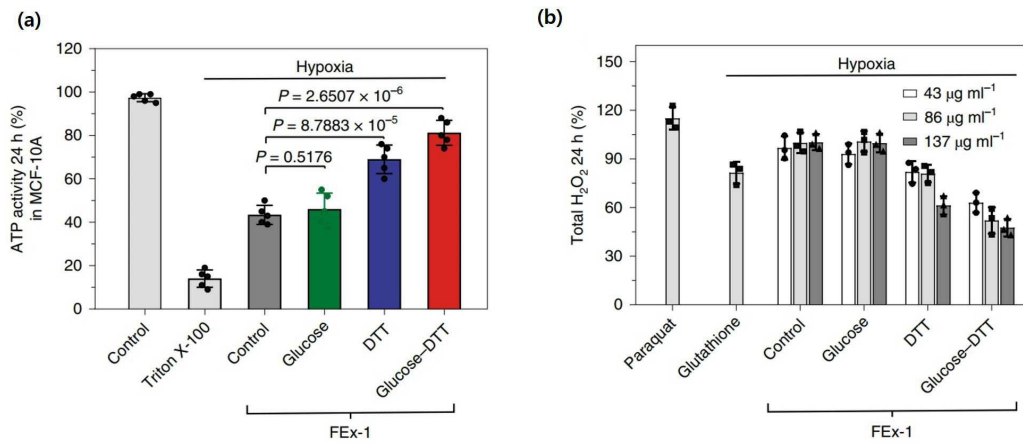
도면14



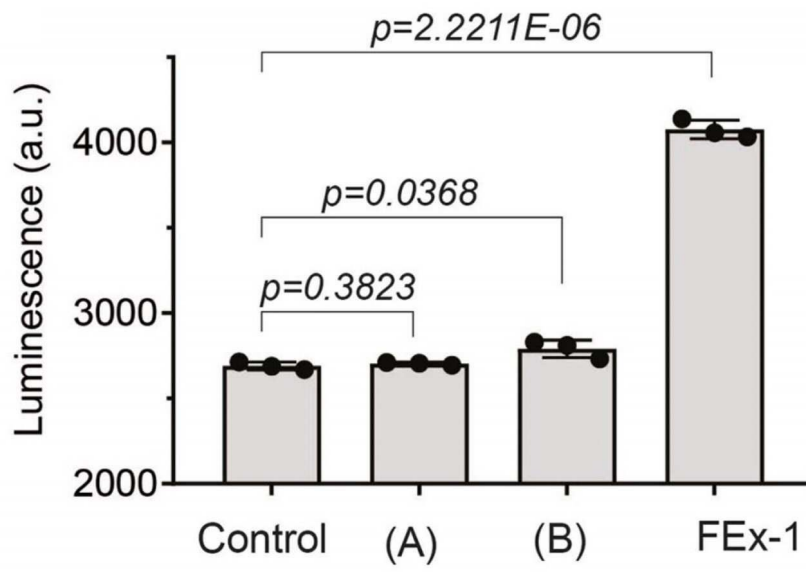
도면15



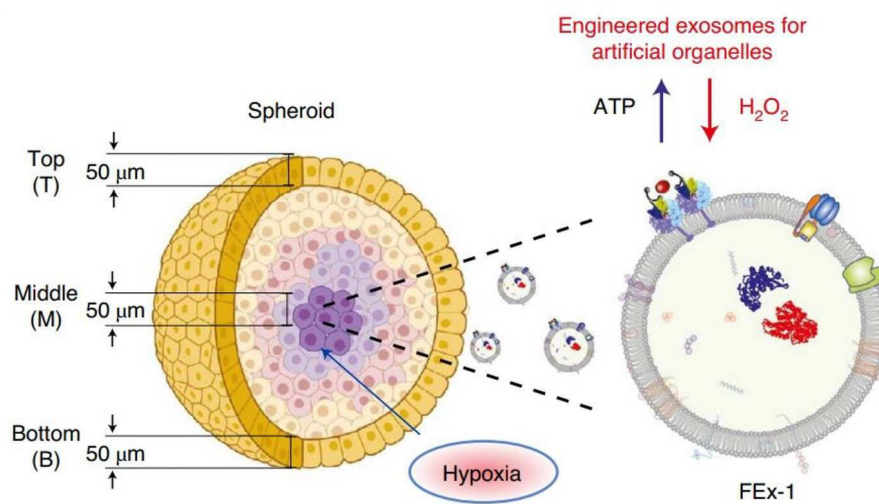
도면16



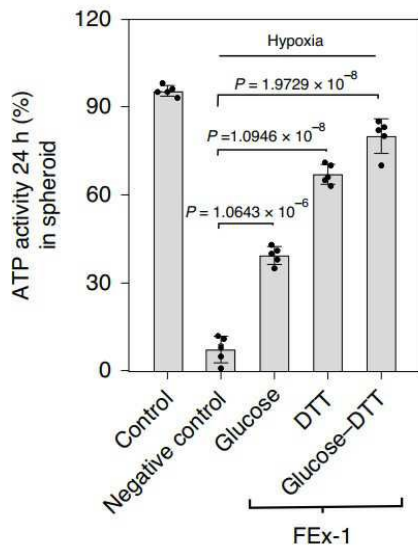
도면17



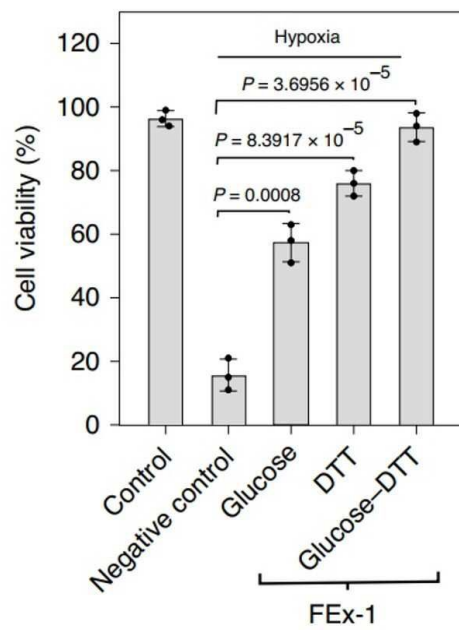
도면18



도면19



도면20



도면21

