

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-522149
(P2024-522149A)

(43)公表日 令和6年6月11日(2024.6.11)

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N 5/12 (2006.01) C 1 2 N 5/12 4 B 0 3 3

C 1 2 N 11/04 (2006.01) C 1 2 N 11/04 4 B 0 6 5

C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/10

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全29頁)

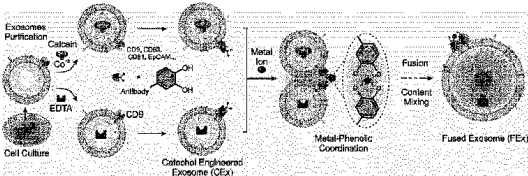
(21)出願番号	特願2023-574640(P2023-574640)	(71)出願人	516355542
(86)(22)出願日	令和4年6月7日(2022.6.7)		インスティテュート フォー ベーシック
(85)翻訳文提出日	令和6年1月24日(2024.1.24)		サイエンス
(86)国際出願番号	PCT/KR2022/007994		INSTITUTE FOR BASIC
(87)国際公開番号	WO2022/255851		SCIENCE
(87)国際公開日	令和4年12月8日(2022.12.8)		大韓民国 3 4 1 2 6 テジョン, ユソ
(31)優先権主張番号	10-2021-0072646		ーク, エクスポート, 5 5
(32)優先日	令和3年6月4日(2021.6.4)	(71)出願人	316016667
(33)優先権主張国・地域又は機関	韓国(KR)		ウルサン ナショナル インスティテュー
(31)優先権主張番号	10-2022-0068477		ト オブ サイエンス アンド テクノロジー
(32)優先日	令和4年6月3日(2022.6.3)		大韓民国, 4 4 9 1 9 ウルサン, ウル
(33)優先権主張国・地域又は機関	韓国(KR)		ジューグン, オンヤン-ウップ, ユニス
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA	(74)代理人	100107984
	最終頁に続く		弁理士 廣田 雅紀
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ナノベシクルリアクター及びその製造方法

(57)【要約】

本発明は、ナノベシクルリアクター及びその製造方法に関し、詳しくは、ベシクルの表面に第1受容体を含む第1ベシクル、及びベシクルの表面に第2受容体を含む第2ベシクルを含み、前記第1受容体及び第2受容体は、リガンドシステムにより互いに結合され、第1ベシクルと第2ベシクルが融合してナノベシクルリアクターを形成することを特徴とするナノベシクルリアクター製造用組成物及びその製造方法を提供することにより、細胞の酵素反応による細胞エネルギー生成、薬物伝達システム、及び診断システムに活用することができる。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ナノベシクルリアクター製造用組成物であって、ベシクルの表面に第 1 受容体を含有する第 1 ベシクル、及びベシクルの表面に第 2 受容体を含有する第 2 ベシクルを含み、

前記第 1 受容体及び第 2 受容体は、リガンドシステムにより互いに結合され、第 1 ベシクルと第 2 ベシクルが融合してナノベシクルリアクターを形成することを特徴とする、前記ナノベシクルリアクター製造用組成物。

【請求項 2】

前記第 1 受容体と第 2 受容体は、互いに独立して C D 9、C D 6 3、C D 8 1、C D 8 2、C D 1 4 7、C D 1 0 7 a、C D 1 5 1、C D 1 3、C D 2 6、I T G A 3、I T G A 6、I T G B 1、I T G B 4、A D A M 1 0、C D 3 1 B、E G F R、E p C A M、H S P 7 0、H S P 9、P S M A、及び P S A からなる群より選択される、請求項 1 に記載のナノベシクルリアクター製造用組成物。

10

【請求項 3】

前記リガンドシステムは、配位結合性化合物を含む、請求項 1 に記載のナノベシクルリアクター製造用組成物。

【請求項 4】

前記配位結合性化合物は、極性置換基を含む芳香族化合物である、請求項 3 に記載のナノベシクルリアクター製造用組成物。

【請求項 5】

前記極性置換基は、ドロキシル基又はカルボン酸基を含む、請求項 4 に記載のナノベシクルリアクター製造用組成物。

20

【請求項 6】

前記リガンドシステムは、多価金属イオンをさらに含む、請求項 1 に記載のナノベシクルリアクター製造用組成物。

【請求項 7】

前記第 1 ベシクルと第 2 ベシクルは、細胞外ベシクル (E x t r a c e l l u l a r v e s i c l e) である、請求項 1 に記載のナノベシクルリアクター製造用組成物。

【請求項 8】

前記第 1 ベシクルと第 2 ベシクルは、互いに異なる酵素を含む、請求項 1 に記載のナノベシクルリアクター製造用組成物。

30

【請求項 9】

前記第 1 ベシクルと第 2 ベシクルは、10～1000nm の平均直径を有する、請求項 1 に記載のナノベシクルリアクター製造用組成物。

【請求項 10】

請求項 1 に記載のナノベシクルリアクター製造用組成物を、エマルジョン内部の水相中に含む、ナノベシクルリアクター含有エマルジョン。

【請求項 11】

前記エマルジョンは、2～100μm の平均直径を有する、請求項 10 に記載のナノベシクルリアクター含有エマルジョン。

40

【請求項 12】

請求項 1 に記載のナノベシクルリアクターを含む、細胞。

【請求項 13】

前記ナノベシクルリアクターは、エネルギー生成用である、請求項 12 に記載の細胞。

【請求項 14】

前記ナノベシクルリアクターに含まれる第 1 ベシクルは A T P 合成酵素を含み、第 2 ベシクルは b o 3 オキシダーゼを含む、請求項 12 に記載の細胞。

【請求項 15】

前記ナノベシクルリアクターは薬物をさらに含む、請求項 12 に記載の細胞。

【請求項 16】

50

(S 1) ベシクルの表面に第 1 受容体を含有する第 1 ベシクル溶液を製造するステップと、
(S 2) ベシクルの表面に第 2 受容体を含有する第 2 ベシクル溶液を製造するステップと、
(S 3) 第 1 ベシクル溶液と第 2 ベシクル溶液を混合して混合液を製造するステップと、
(S 4) 前記混合液に多価金属イオンを混合して第 1 ベシクルと第 2 ベシクルを融合するステップと、
を含む、ナノベシクルリアクターの製造方法。

【請求項 17】

前記 (S 1) 及び (S 2) ステップにおける第 1 ベシクル溶液及び第 2 ベシクル溶液は、互いに独立して配位結合性化合物で処理するステップをさらに含む、請求項 16 に記載のナノベシクルリアクターの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ナノベシクルリアクター及びその製造方法に関し、詳しくは、改質されたナノベシクルを用いて、生きている細胞内で起こる化学反応を容易に制御するナノベシクルリアクターに関する。

【背景技術】

【0002】

生命活動は、体内の物質やエネルギーの移動によって維持される。生体内における様々な触媒反応を担う酵素や補助因子を収容するための細胞器官又は細胞のコア構造が存在し、生体内における化学反応が調節され、最近、細胞小器官を人工的に合成して生体触媒反応をシミュレートしようとする研究が行われている。

【0003】

細胞小器官は細胞の臓器と言え、細胞呼吸を担うミトコンドリアや、細胞内の消化器官を担うリソソームが具体的な例である。ベシクル (Vesicle) は、脂質二重層で取り囲まれ、細胞質と区分される細胞小器官であり、細胞の生産物、副産物、排泄物を貯蔵、運搬又は消化する役割を担う。

【0004】

細胞小器官は、複雑な生化学反応を行う微細空間に分かれており、その内部には重要な細胞機能を行う様々な酵素が存在する。このうち、エクソソームは、細胞から分泌される直径 50 ~ 200 nm の細胞外ベシクルであり、細胞間の信号伝達を行うキャリアとして機能することが知られている。エクソソームには、タンパク質、脂肪、RNA、成長因子など親細胞の様々な情報が含まれているため、疾患の診断マーカーとして用いられるほか、生体適合性の特徴より薬物キャリアとしての活用に関する研究が活発に行われている。エクソソームの成分及び機能に関する研究が盛んに行われているが、エクソソームにはタンパク質、遺伝子及び核酸などの多量の生体指標が含まれているため、エクソソームの分離精製技術には依然として限界がある。

【0005】

また、エクソソームのような人工細胞小器官を生きている細胞に適用するためには、細胞内の物質伝達効率、安定性、生体適合性などの要素を考慮しなければならない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

そこで、本発明は、生きている細胞へのより安定的かつ効率的な細胞内物質伝達方法を提示する技術的課題を解決するために、ナノベシクルの改質及びその融合を用いて細胞の機能を制御できるナノベシクルリアクターを提供することを目的とする。

【0007】

本発明の一実施形態によると、ナノリアクタープラットフォーム技術を用いて、細胞内でエネルギー生成が可能なナノベシクルリアクターを提供することを目的とする。

【0008】

本発明の一実施形態によると、ナノベシクルの融合を用いた効果的な薬物伝達システムを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は、前記技術的課題を解決するために、ナノベシクルリアクター製造用組成物であって、ベシクルの表面に第1受容体を含有する第1ベシクル、及びベシクルの表面に第2受容体を含有する第2ベシクルを含み、前記第1受容体及び第2受容体は、リガンドシステムにより互いに結合され、第1ベシクルと第2ベシクルが融合してナノベシクルリアクターを形成することを特徴とする、前記ナノベシクルリアクター製造用組成物を提供することができる。

【0010】

本発明の一実施形態において、前記第1受容体と第2受容体は、互いに独立してCD9、CD63、CD81、CD82、CD147、CD107a、CD151、CD13、CD26、ITGA3、ITGA6、ITGB1、ITGB4、ADAM10、CD31B、EGFR、EpCAM、HSP70、HSP9、PSMA、及びPSAからなる群より選択されてもよい。

【0011】

本発明の一実施形態において、前記リガンドシステムは、配位結合性化合物を含んでもよい。

【0012】

本発明の一実施形態において、前記配位結合性化合物は、極性置換基を含む芳香族化合物であってもよい。

【0013】

本発明の一実施形態において、前記極性置換基は、ヒドロキシル基又はカルボン酸基を含んでもよい。

【0014】

本発明の一実施形態において、前記リガンドシステムは、多価金属イオンをさらに含んでもよい。

【0015】

本発明の一実施形態において、前記第1ベシクルと第2ベシクルは、細胞外ベシクル (Extracellular vesicle) であってもよい。

【0016】

本発明の一実施形態において、前記第1ベシクルと第2ベシクルは、互いに異なる酵素を含んでもよい。

【0017】

本発明の一実施形態において、前記第1ベシクルと第2ベシクルは、10～1000 nmの平均直径を有してもよい。

【0018】

また、本発明は、上述のナノベシクルリアクター製造用組成物を、エマルジョン内部の水相中に含むナノリアクター含有エマルジョンを提供することができる。

【0019】

本発明の一実施形態において、前記エマルジョンは、2～100 μmの平均直径を有してもよい。

【0020】

また、本発明は、内部に上述のナノベシクルリアクターを含む細胞を提供することができる。

【0021】

10

20

30

40

50

本発明の一実施形態において、前記ナノベシクルリアクターは、エネルギー生成用であってもよい。

【0022】

本発明の一実施形態において、前記ナノベシクルリアクターに含まれる第1ベシクルはATP合成酵素を含み、第2ベシクルはb o 3オキシダーゼを含んでもよい。

【0023】

本発明の一実施形態において、前記ナノベシクルリアクターは薬物をさらに含んでもよい。

【0024】

また、本発明は、(S1)ベシクルの表面に第1受容体を含有する第1ベシクル溶液を製造するステップと、(S2)ベシクルの表面に第2受容体を含有する第2ベシクル溶液を製造するステップと、(S3)第1ベシクル溶液と第2ベシクル溶液を混合して混合液を製造するステップと、(S4)前記混合液に多価金属イオンを混合して第1ベシクルと第2ベシクルを融合するステップと、を含むナノベシクルリアクターの製造方法を提供することができる。

【0025】

本発明の一実施形態において、前記(S1)及び(S2)ステップの第1ベシクル溶液及び第2ベシクル溶液は、互いに独立して配位結合性化合物で処理するステップをさらに含んでもよい。

【発明の効果】

【0026】

本発明は、生きている細胞間の情報伝達体として細胞外ベシクル(Extracellular Vesicles)をリプログラミングすることにより、細胞内でエネルギー生成が可能な人工細胞小器官を提供することができる。これは、細胞内で安定しており、組織内の深くまで浸透する点から、薬物伝達システムとしての活用価値が高い。

【0027】

本発明の一実施形態によると、細胞内でATPを直接合成し、エネルギー供給が欠乏している癌細胞の深部までATPを伝達することができるため、損傷した細胞にエネルギーを供給することができる。

【0028】

本発明の一実施形態によると、ナノベシクルリアクターに薬物をさらに含み、効果的な薬物伝達システムとして活用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1】本発明によって表面にカテコール基を有するように改質されたエクソソーム(CEx)と金属イオンとを反応させてエクソソーム融合を誘導する原理を示す模式図である。

【図2】NTA(ナノ粒子追跡分析)を用いたエクソソーム、CEx及びFExのサイズ特性を確認した結果を示す図である。

【図3】(a)は、CEx(コア直径=115±26nm)及びFEx(コア直径=247±33nm)のサイズを示すTEM画像であり、(b)は、動的光散乱によるCEx(CEx-1=121±8nm、CEx-2=123±5nm)及びFEx(265±14nm)のサイズ分布を示すグラフである。

【図4】CEx融合をモニタリングするためのコバルト-カルセイン分析の結果を示す図である。

【図5】多価金属イオンの種類を変えて融合の程度を確認した結果を示す図である。

【図6】FEx内にグルコースオキシダーゼ(glucose oxidase、GOx)とHRP(horseradish peroxidase)酵素の連続段階反応に対する模式図を示す図である。グルコースを添加して開始され、好気酸化によってH₂O₂が生成され、これは、アンプレックスレッド(Amplerex Red)を酸化させてレゾ

10

20

30

40

50

ルフィンを生成したことを示す。

【図 7】F E x ナノリアクターにカプセル化された 3 つの酵素の触媒作用を示す模式図である。乳糖の存在下では、 β -ガラクトシダーゼ触媒の加水分解によりグルコースとガラクトースが生成される。このグルコースの好気性 G O x 触媒の酸化は、グルコン酸と H₂O₂ を生成し、これによって、アンブレックスレッドの酸化を触媒してレゾルフィンが生成された。

【図 8】F E x - G O x - H R P ナノリアクターにカプセル化された 2 - 酵素カスケードによるレゾルフィンの蛍光強度の経時変化を示す図である。レゾルフィンの蛍光強度が徐々に増加し、80 分後に飽和状態に達することを確認することができる。

【図 9】F E x - β -ガラクトシダーゼ - G O x - H R P ナノリアクターにカプセル化された 3 - 酵素カスケードによる乳糖の濃度に応じた反応速度を示す図である。

【図 10】F E x ナノリアクター (F E x - G O x - H R P) 内にカプセル化された酵素及び溶液内の遊離酵素の相対的活性変化を示す図であり、(a) 貯蔵性、(b) 熱安定性、及び (c) サイクル特性に対する酵素特性の結果グラフである。

【図 11】本発明による区画化されたプラットフォーム内の触媒機能を評価した実験例 3 に関し、(a) パラジウムナノ粒子 (P d) を融合して製造した F E x - P d - p r o R h o ナノリアクターを用いて細胞内で p r o R h o の遊離ローダミンへの触媒転換を示す模式図である。(b) F E x - P d - p r o R h o の代表的な T E M 画像 (~ 6 nm の P d ナノ構造、スケールバー、10 nm) を示す図である。

【図 12】(a) は、F E x 及び C E x でローダミンをデマスキングするための蛍光放出スペクトル ($\lambda_{E x} = 498$ nm)、(b) は、F E x - P d - p r o R h o 及び C E x - p r o R h o で時間関数としてのデマスキング反応の蛍光強度 (%) (527 nm における) 変化を示す図である。

【図 13】(a) は、F E x - P d - p r o F U ナノリアクターを用いたプロドラッグ (p r o - d r u g) の薬物への触媒による転換を示す模式図である。F E x - P d - p r o F U ナノリアクターを用いた抗がん剤 5-フルオロウラシル (p r o - F U) の活性化を示し、(b) は、様々な濃度 ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $60 \mu\text{g}/\text{mL}$ 及び $90 \mu\text{g}/\text{mL}$) のナノリアクター F E x - P d - p r o F U 及び C E x - p r o F U を培養した後の M C F - 10 A 細胞の細胞生存率の結果を示すグラフである。

【図 14】本発明の実施例 2 によるエネルギー生成用の人工細胞小器官 (F E x - 1) を示す模式図である。エクソソーム膜と内部にそれぞれ A T P 合成酵素とグルコースオキシダーゼを搭載したエクソソーム (A T P s y n - C E x - G O x) と、b o 3 オキシダーゼと H R P 酵素を搭載したエクソソーム (b o 3 O x i - C E x - H R P) との融合によって作成された人工細胞小器官で A T P 産生を行って低酸素条件の細胞までエネルギーを供給することができる。

【図 15】細胞に吸収された後、F E x - 1 ナノリアクター内部でエネルギーが生成されたか否かを確認するための、(a) 経時による pH 勾配、(b) 経時による A T P 産生を観察した結果グラフである。

【図 16】(a) は、F E x - 1 が、低酸素症が誘導された細胞に吸収された後の A T P 活性を示す図であり、(b) は、異なる濃度で処理された F E x - 1 ナノリアクターの細胞内 R O S レベルを定量化して示す図である。

【図 17】本発明の実施例 2 及び比較例 2 による融合エクソソーム又は個別エクソソームにより合成された A T P を発光の程度で示すグラフである。

【図 18】低酸素コアを含む生体内組織と非常に類似の三次元多細胞スフェロイド構造を示す図であり、F E x がスフェロイドに侵透し、A T P 産生により低酸素条件で細胞酸化還元を制御できることを示す模式図である。

【図 19】融合エクソソーム (F E x - 1) を処理し、24 時間培養した後のスフェロイドの A T P 活性レベルを測定した結果を示すグラフである。

【図 20】カルセイン - A M (a c e t o x y m e t h y l) を用いたスフェロイドの細胞の生存力を分析した結果を示すグラフである。

10

20

30

40

50

【図 2 1】融合エクソソーム（F E x - 1）処理した後のスフェロイドの活性酸素（R O S）レベルを測定した結果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0030】

以下、本発明によるナノベシクルリアクター製造用組成物、ナノベシクルリアクター含有エマルジョン、ナノベシクルリアクターを含む細胞、及びナノベシクルリアクターの製造方法について詳しく説明する。

【0031】

このとき、他に定義されない限り、本明細書のすべての技術的用語及び科学的用語は、本発明が属する技術分野における通常の知識を有する者が通常理解している意味を有する。

10

【0032】

本発明の詳細な説明に用いられる用語は、単に特定の実施形態を効果的に記述するためのものであり、本発明をこれに限定することを意図したものではない。

【0033】

また、本発明の構成要素を説明するにあたって、第 1、第 2、A、B、（a）、（b）などの用語を使用することができる。このような用語はその構成要素を他の構成要素と区別するためのものであり、その用語によって該当の構成要素の本質や順番又は手順などが限定されない。

【0034】

20

また、本明細書で特に記載しない添加物の単位は重量%であってもよい。

【0035】

また、本明細書で単数形は文脈で特に指示がない限り複数形も含むことを意図することができる。

【0036】

また、ある部分がある構成要素を「含む」という場合、これは、特に反対の記載がない限り、他の構成要素を除外するのではなく、他の構成要素をさらに含み得ることを意味する。

【0037】

なお、本明細書において、本発明の要旨を不必要に曖昧にする公知効果及び構成についての記載は省略する。

30

【0038】

本明細書において、「ナノベシクルリアクター」は、細胞や生体にナノ粒子を入れ、生体内で起こるか又は起こらない化学反応を誘導する機能を行うプラットフォームを意味することができる。本明細書において、「ナノリアクター」又は「ベシクルナノリアクター」と同じ意味で解釈することができる。

【0039】

本明細書において、「受容体」は、ベシクル膜表面に結合された分子であって、特異物質と選択的に結合する分子を意味することができる。

【0040】

40

本明細書において、「リガンドシステム」は、前記受容体と特異的に結合する特異物質を意味することができる。

【0041】

細胞小器官を人工的に合成して活用する人工細胞小器官の開発は、まだ初期段階にあり、中でも細胞外ベシクルであるエクソソームは、ナノサイズで生体由来の物質という点から、薬物、遺伝子及びワクチンの伝達に多様に活用できるという利点のため研究が続けられているが、生きている細胞に適用するためには、細胞内でも活性を長く維持でき、細胞の生存に影響を与えない必要がある。

【0042】

本発明者は、生きている細胞間の情報伝達体として機能する細胞外ベシクルをリプログ

50

ラミングすることにより、液滴ベースのマイクロ流体リアクター上での化学反応によって2種類のナノベシクルリアクターが結合することで、内部物質同士の化学反応により融合することを確認し、本発明を完成した。

【0043】

本発明は、内部及び膜タンパク質に互いに異なる酵素を有するナノベシクルリアクターの融合反応によって、生触媒反応を容易に制御でき、細胞のエネルギー源であるATPを合成できる酵素を含むことで、生きている細胞内でエネルギー生成が可能な融合ナノベシクルリアクターを提供することができる。

【0044】

以下、本発明によるナノベシクルリアクター製造用組成物について詳しく説明する。

【0045】

具体的に、ナノベシクルリアクター製造用組成物は、ベシクルの表面に第1受容体を含有する第1ベシクル、及びベシクルの表面に第2受容体を含有する第2ベシクルを含み、第1受容体及び第2受容体は、リガンドシステムにより互いに結合され、第1ベシクルと第2ベシクルが融合してナノベシクルリアクターを形成することの特徴とすることができる。このとき、本発明の一実施形態において、第1受容体と第2受容体は互いに同一であってもよく、異なってもよい。本発明の目的によって、必要に応じて同一又は異なる受容体を選択してもよい。

【0046】

具体的に、第1受容体と第2受容体は、細胞表面タンパク質であってもよい。細胞表面タンパク質の具体的な例としては、CD9、CD63、CD81、CD82、CD147、CD107a、CD151、CD13、CD26、ITGA3、ITGA6、ITGB1、ITGB4、ADAM10、CD31B、EGFR、EpCAM、PSMA、及びPSAからなる群より選択されるものであってもよいが、これらに特に限定されるものではない。

【0047】

また、本発明の一実施形態において、第1受容体と第2受容体は癌特異的抗体であってもよい。

【0048】

前記リガンドシステムは、受容体と特異的な非共有結合によって相互作用する受容体結合部を含んでもよい。非共有結合の例としては、水素結合、イオン結合、疎水性相互作用、又はファンデルワールス力であってもよい。前記受容体結合部は、受容体と特異的な非共有結合を形成できる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、及びanti-PSAであってもよいが、これらに必ずしも限定されるものではない。このとき、「anti-」は、前記細胞表面タンパク質と特異的な結合を形成する1つ以上のエピトープを含む分子又は分子群を意味することができる。

【0049】

また、本発明によるナノベシクルリアクター製造用組成物は、前記リガンドシステムに配位結合性化合物を含んでもよい。このとき、本発明の一実施形態において、配位結合性化合物は、極性置換基を含む芳香族化合物であってもよい。具体的に、フェノール系化合物であってもよい。より具体的に、ヒドロキシル基又はカルボン酸基を1つ以上含むフェノール系化合物であってもよく、例えば、フェノール(Phenol)、カテコール(Catechol)、プロトカテク酸(Protocatechuic acid)、タンニン酸(Tannic acid)、没食子酸(Gallic acid)、リグニン(Lignin)、エラグ酸(Elagic acid)などであってもよいが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0050】

また、リガンドシステムは、多価金属イオンをさらに含んでもよい。具体的に、多価金属イオンは、アルミニウムイオン、チタンイオン、セシウムイオン、亜鉛イオン、又は鉄イオンであってもよい。より具体的に、 Al^{3+} 、 Ti^{4+} 、 Ce^{3+} 、 Zn^{2+} 、又は Fe^{3+} であってもよく、さらに具体的には、 Al^{3+} 、 Zn^{2+} 、又は Fe^{3+} であってもよい。

【0051】

これによって、前記受容体結合部及び配位結合性化合物の複合体は、前記多価金属イオンと配位結合を形成することができ、配位結合性化合物の極性置換基は、ヒドロキシル基又はカルボン酸基を含み、前記多価金属イオンと共に容易に金属-フェノール配位結合 (Metal-phenolic coordination) を形成することができる。金属-フェノール配位結合によって、図1に示すように、第1ベシクル及び第2ベシクルの融合を誘導することができる。

【0052】

本発明において、ベシクルは、細胞膜の構造と同一のリン脂質 (phospholipid) の二重膜の形態からなり、外膜が内部の物質を安定して維持できるものであれば種類は特に限定されない。ベシクルの平均直径は、10~1000nm、又は30~500nmであってもよい。ベシクルは、天然来由又は人工的に合成されたナノベシクルであってもよい。

【0053】

本発明の非限定的な一実施形態において、ナノベシクルは、生物来由の様々な細胞外ベシクルであってもよい。

【0054】

本発明の一実施形態において、10µm以下の平均直径を有する液滴ベースのマイクロ流体リアクターを用いて、2種類のナノベシクル融合を行うことができる。このとき、2種類のナノベシクルは、エクソソーム、エクソソーム以外の細胞外ベシクル又はこれらの組み合わせであってもよい。具体的に、例えば、i) 互いに異なるエクソソーム、ii) 異なるエクソソーム以外の細胞外ベシクル、iii) エクソソーム、及びエクソソーム以外の細胞外ベシクルであってもよい。

【0055】

液滴ベースのマイクロ流体リアクターは、水と油のように互いに混ざらない2つの流体を用いて、マイクロ流体チップ上に複数の液滴 (droplet) を形成し、このように互いに分離された区域を有する複数の小さな液滴を、バイオリアクターで活用して新しい機能性材料を合成するか、又は生体物質を高感度分析するために用いる。本発明の一実施形態によると、液滴ベースのマイクロ流体リアクターを用いたナノベシクルの融合によって、各ナノベシクルの内部物質の化学反応を誘導することができる。

【0056】

本発明の一実施形態において、前記液滴ベースのマイクロ流体リアクター当たりのベシクルは、200個以下、具体的に100個以下、より具体的に60個以下で含まれてもよい。これによって、ナノベシクル内部及び膜タンパク質に互いに異なる酵素を有するナノベシクルの融合反応により生触媒反応を成功的に制御することができる。

【0057】

本発明の非限定的な一実施形態において、細胞外ベシクルは、酵素カスケード反応を安定して行うことができ、標的に優れたエクソソームであってもよい。エクソソームナノリアクターの主な利点は、膜タンパク質が透過性シェルの役割をし、化学試薬の流れを促進し、向上した生体触媒性能のために組み込まれた酵素の浸出を防止して深部組織への浸透が容易であるという点である。

【0058】

本発明の一実施形態において、第1ベシクルと第2ベシクルは同じ受容体を含むものであり、互いに異なる酵素を含んでもよい。このとき、酵素は、2種類以上又は3種類以上

10

20

30

40

50

であってもよく、ナノベシクルリアクターは、複数の酵素によってカスケード反応を行うことができる。

【0059】

酵素の具体的な例としては、NADH dehydrogenase (NADH脱水素酵素)、Acetylcholinesterase、Alcohol dehydrogenase (アルコール脱水素酵素)、Bacteriorhodopsin (バクテリオロドプシン)、Photosystem II (光化学系II) などであってもよいが、これらに限定されず、ベシクル内にカプセル化できるものであれば必要に応じて多様に適用することができる。

【0060】

図9は、3触媒-カスケード反応の結果を示し、具体的には、Fex-β-ガラクトシダーゼ-GOx-HRPナノリアクターにカプセル化された3種の酵素カスケードを示す図である。基質として乳糖の存在下で、β-ガラクトシダーゼ(23.6 μg/mg)は、乳糖の加水分解を触媒してグルコースとガラクトースを生成した。生成されたグルコースの好気性GOx触媒(31.2 μg/mg)の酸化により、グルコン酸とH₂O₂が生成され、HRP(18.9 μg/mg)がこれを用いてアンブレックスレッドを酸化させてレゾルフィン形成した。蛍光顕微鏡を用いてレゾルフィンの蛍光乳糖依存性の変化をモニタリングした。運動定数(K_m及びV_{max})を計算するために、反応速度(μM/sec)を乳糖の濃度(μM)に対して示した。Fex-β-ガラクトシダーゼ-GOx-HRPナノリアクターとCex-β-ガラクトシダーゼがあるFex-GOx-HRPに対するK_m値は、それぞれ28.78×10⁻⁶M及び489.65×10⁻⁶Mであり、Fexに対するV_{max}値は、β-ガラクトシダーゼ-GOx-HRPナノリアクターとCex-β-ガラクトシダーゼがあるFex-GOx-HRPの場合、それぞれ123.16×10⁻⁶M/min及び43.06×10⁻⁶M/minであった。

【0061】

また、本発明は、内水相に上述のナノベシクルリアクター製造用組成物を含むエマルジョンを提供することができる。このとき、前記エマルジョンは、2~100 μm、又は1~50 μmの平均直径を有してもよい。

【0062】

さらに、本発明は、上述のナノベシクルリアクター製造用組成物を含む細胞を提供することができる。非限定的な例として、前記ナノベシクルリアクターは、第1ベシクル内にATP合成酵素、第2ベシクル内にb_o3オキシダーゼを含んでもよい。これによって、ナノベシクルリアクターは、エネルギーを生成するために用いられ、低酸素症により損傷した細胞にエネルギーを供給するナノ錠剤として活用できるという利点を提供することができる。

【0063】

本発明の一実施形態において、ナノベシクルリアクターは、細胞に吸収されて作動することができる。具体的に、エンドサイトーシス(endocytosis)によってもよいが、これに限定されず、様々なメカニズムにより細胞に吸収されてもよい。

【0064】

本発明によるナノベシクルリアクターは、低酸素コアを含む多細胞スフェロイドのコア部まで深く侵透することができる。図19~図21に示すように、人工エクソソームは、乳がんを模したスフェロイド内の深部まで侵透できることを確認した。これは、人工エクソソームが低酸素症により損傷した細胞にエネルギーを供給するナノ錠剤として活用される可能性を示唆する。これによって、腫瘍中心部のATP欠乏に対する解決策を提供することができる。

【0065】

ナノベシクルリアクターを含む細胞は、バクテリア、植物又はヒトを含む動物由来の細胞であってもよい。

【0066】

また、本発明は、(S1)ベシクルの表面に第1受容体を含有する第1ベシクル溶液を製造するステップと、(S2)ベシクルの表面に第2受容体を含有する第2ベシクル溶液を製造するステップと、(S3)第1ベシクル溶液と第2ベシクル溶液を混合して含んで混合液を製造するステップと、(S4)前記混合液に多価金属イオンを混合して第1ベシクルと第2ベシクルを融合するステップと、を含むナノベシクルリアクターの製造方法を提供することができる。

【0067】

本発明の一実施形態において、前記(S1)及び(S2)ステップにおける第1ベシクル溶液及び第2ベシクル溶液は、互いに独立して配位結合性化合物で処理するステップをさらに含んでもよい。

【0068】

以下、実施例により本発明についてより詳しく説明する。ただし、下記の実施例は、本発明を詳しく説明するための参照例にすぎず、本発明はこれらに限定されるものではなく、多様な形態で実施することができる。

【0069】

製造例1. カテコールで改質されたエクソソーム(CEX)の製造

ヒト乳房上皮細胞MCF-10A(cat#CRL-10317、American Type Culture Collection(ATCC))を、5%ウマ血清(Invitrogen #16050-122)、20ng/ml表皮成長因子(EGF、cat#AF-100-15、Peprotech)、0.5mg/mlヒドロコルチゾン(cat#H0888、Millipore)、10µg/mlインスリン(cat#I1882、Millipore)、1%抗生剤/抗真菌剤(100U/mlペニシリン及び100mg/mlストレプトマイシン)が補充されたダルベッコ変形培地(DMEM/F-12; cat#11330-032)18mlを含むT75細胞培養フラスコ(Corning、NY、USA)にフラスコ当たり5×10⁶個細胞の密度で播種した。細胞を60~70%コンフルエントになるまで5%CO₂を含む加湿雰囲気の内インキュベーター内で37℃で培養した後、1xリン酸塩緩衝生理食塩水(PBS)を用いて2回洗浄し、また10%Exo-Free FBS(Systems Biosciences Inc、CA、USA)及び1%抗生剤/抗真菌溶液で補充したRPMI(Roswell Park Memorial Institute)培地(Gibco、Thermo Fisher Scientific)で洗浄した。その後、細胞を37℃の内インキュベーター内で48時間インキュベーションした後、細胞培養上清を収集し、超遠心分離によってエクソソームを直ちに単離した。

【0070】

ドーパミン塩酸塩(1mM、cat#62-31-7、Sigma Aldrich)及び2mMジスクシンイミジルカーボネート溶液をそれぞれ1mL及び15mLジメチルホルムアミドで製造し、ドーパミン塩酸塩溶液を2mMジスクシンイミジルカーボネート溶液に攪拌しながら30分間かけて滴加した後、2mMのEt₃Nをゆっくり添加した。1時間後、溶媒を部分的に蒸発させて1NのHClを添加した。最後に、EtOAcを用いてこの混合物から生成物を抽出した。その後、抗CD9抗体を結合するために、カテコール-NHS(1mg)を最小量のジメチルホルムアミドに溶解し、PBS(0.2mg/ml)中のCD9抗体溶液(BioLegend、マウスモノクローナル)に添加した。試薬に対する抗体溶液のモル比は、>10に調整された。2時間後、PBSに対する透析により生成物を精製した。MCF-10A来由のエクソソームをカテコール抗CD9(500ng/ml)と共に37℃で1時間インキュベーションし、カテコールで操作されたエクソソーム(CEX)を得た。最終生成物を超遠心分離(120,000×g、4℃で2時間)によって反応混合物から精製して得ることができた。

【0071】

実施例1. 融合エクソソームFEXの製造

50µMカルセイン(calcein)、1µMのCoCl₂、10mMのMOPS(

10

20

30

40

50

pH 7.4)、及び前記製造例1によって製造された $10\mu\text{g}/\text{mL}$ のCEX混合物を室温で3分間超音波処理して、カルセイン及び Co^{2+} 錯体をCEX内にカプセル化(CEX-1)した。また、 $10\mu\text{M}$ のEDTA、 10mM のMOPS(pH 7.4)、及び前記製造例1によって製造された $10\mu\text{g}/\text{mL}$ のCEXと混合して、EDTAをCEX内にカプセル化(CEX-2)した。前記CEX-1及びCEX-2は、いずれも $120,000\times g$ で1時間の間2回遠心分離して過剰のEDTAとコバルトカルセインを除去した。明るいオレンジ色のペレットを 10mM のMOPS(pH 7.4)を含む 0.6mL 緩衝液に再懸濁し、CEX懸濁液($3\times 10^9\text{ particles}/\text{mL}$)と $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($40\text{ ng}/\text{mL}$)溶液の水相をマイクロ流体装置に注入してCEX-1及びCEX-2エクソソーム融合を行った。

10

【0072】

実施例2. 融合エクソソームFEX-1(ATPsyn-bo3Oxi-FEX-Gox-HRP)の製造

10% ナトリウムコレート(sodium cholate) $60\mu\text{L}$ 、MCF-10A由来のエクソソーム懸濁液 $300\mu\text{L}$ (NTAを用いて計算した $5\times 10^9\pm 2.6\times 10^8\text{ particles}/\text{mL}$ 、BCA分析を用いて計算した $87\mu\text{g}$)及びMOPS緩衝液(pH 7.4) $200\mu\text{L}$ の混合物に、ATP合成酵素及びbo3オキシダーゼ(BCA分析を用いて計算した $1\text{ mg}/\text{mL}$) $100\mu\text{L}$ を各2つの反応に別に添加した。この混合物を 4°C で15分間攪拌し、これを室温でMOPS緩衝液で平衡化したSephadex G-50樹脂を含有する重力カラムに通した。濁った画分を新しい超遠心分離器管に移し、エクソソーム懸濁液を2回洗浄してTi45固定角回転子(Beckman Coulter)で $120,000\times g$ 及び 4°C で2時間遠心分離して過剰なATP合成酵素を除去し、融合エクソソームFEX-1(ATPsyn-bo3Oxi-FEX-Gox-HRP)を製造した。

20

【0073】

エクソソームペレットを $200\mu\text{L}$ の予め濾過したPBSに再懸濁し、すぐに使用するために 4°C で、又は長期保管するために -80°C で保管した。エクソソームに融合されたATP合成酵素とbo3オキシダーゼの量は、それぞれ $23\text{ ng}/\mu\text{g}$ 及び $17\text{ ng}/\mu\text{g}$ であると測定された。

【0074】

30

実施例3. 融合エクソソームFEX-Pd-proRhoの製造

前記製造例1によって製造された $10\mu\text{g}/\text{mL}$ のCEX混合物にパラジウムナノ粒子(Pd NPs)を入れ、CEXにカプセル化したエクソソーム(CEX-Pd)を製造し、同一の方法によりビス-アリルオキシカルボニル保護ローダミン(proRho)が組み込まれたエクソソーム(CEX-proRho)を製造した。前記CEX-Pd及びCEX-proRhoエクソソーム間の融合を行うことで、融合されたエクソソーム(FEX-Pd-proRho)を製造した。

【0075】

比較例2. 酵素を直接組み込んだエクソソームの製造(A)Gox、Hrp、ATPsynthase及びbo3Oxidaseを併用してエクソソーム内にカプセル化したエクソソームの製造

40

最終のタンパク質濃度が $3.6\mu\text{g}/\text{mL}$ のエクソソーム懸濁液($250\mu\text{L}$)を氷上で冷却し、 0.2% サポニン溶液を添加した。混合物を 42 kHz の周波数及び 100 W の電力でFS30D bath型超音波処理器(Fisher Scientific)を用いて、2分間蓋付きガラスバイアルで超音波処理した。室温で20分間振とうした後、酵素が組み込まれたエクソソームを超遠心分離($120,000\times g$ 及び 4°C で2時間)で遊離酵素を除去した後、PierceTM BCAタンパク質分析キット(Thermo Fisher Scientific)を用いて定量した。

【0076】

(B)Gox、Hrp、ATPsynthase及びbo3Oxidaseを順にエクソ

50

ソーム内にカプセル化したエクソソームの製造

すべての酵素（G O x、H r p、A T p s y n t h a s e 及び b o 3 O x i d a s e）をステップの間で洗浄する度に順にカプセル化したことを除いて、前記（A）製造過程と同様に行った。

【0077】

〔実験例1〕融合エクソソーム特性の確認

1-1. D L S（D y n a m i c L i g h t S c a t t e r i n g）を用いて測定したエクソソームのサイズ分布

M a l v e r n Z e t a s i z e r（N a n o Z S）を用いて固定された角度で散乱光強度の動的変動によるエクソソームの移動速度の分布を分析してエクソソームのサイズ分布を記録した。ブラウン運動によって、エクソソームの流体力学的半径は、ストック-アインシュタイン方程式で計算された。エクソソーム溶液を無粒子P B S（1000x、200nmフィルターを通過する）に希釈した。約1mLのサンプルを30秒間ボルテックスし、凝集を避けるために使い捨てキュベツに迅速にロードした。エクソソーム、C E x 及びF E x のサイズ分布は、最小3回の独立した実験により測定した。その結果を図3に示す。

【0078】

1-2. カルセイン-C o²⁺の分析

融合エクソソーム（F E x）が単純接合でなく内部内容物の混合であることを確認するために、C E x-1とC E x-2を別に融合した後、カルセイン-C o²⁺分析を行った。その結果を図4に示す。時間に対する蛍光強度をプロットすると、融合後に信号が約10倍増加し、10分以内に飽和することが分かった。これは、膜と内部物質との間の混合が起こると、C E x-2内にカプセル化されたE D T AがC E x-1内にカプセル化されたC o²⁺に優先して結合し、カルセインが蛍光を起こさないようにするためであり、内容物の混合が確認された。

【0079】

〔実験例2〕融合エクソソームナノリアクター内のマルチ酵素カスケード作動の評価

t w o - e n z y m e c a s c a d e r e a c t i o n s :

図6の模式図に示すように、グルコースオキシダーゼ（G O x）とH R P酵素をそれぞれ搭載したエクソソームを融合した後、融合エクソソームナノリアクター（F E x-G O x-H R P）の内部でマルチ酵素生体触媒連続段階反応（c a s c a d e r e a c t i o n）を行った。ブドウ糖（グルコース）を添加して好気性酸化によって過酸化水素及びグルコン酸（g l u c o n i c a c i d）が生成され、H R P付近で生成された過酸化水素は基質として作用し、H R Pがアンブレックスレッド酸化を触媒し、蛍光生成物であるレゾルフィンを生成できるようにした。

【0080】

F E x-G o x-H R Pナノリアクターの酵素活性と動力学をモニタリングした。酵素カプセル化効率は、他の染料で標識された酵素に対する補正曲線を用いて、蛍光分光光度法によって決定された。酵素生体触媒カスケード反応の速度は、マイクロプレートリーダー（T E C A N 無限M200PRO）を用いて563nmでレゾルフィン（r e s o r u f i n）の蛍光強度を用いて測定した。F E xナノリアクターのV m a x及びK Mを決定するために、標準ミカエリス・メンテン（M i c h a e l i s - M e n t e n）酵素動力学方程式を用い、G r a p h P a d P r i s m 8.0.1を用いた。F E x-G O x-H R Pナノリアクターのミカエリス・メンテン定数（K m）値は、C E x-G O xとC E x-H R Pの均質混合物に比べて16倍まで減少し、最大反応速度（V m a x）は、F E x-G O x-H R Pナノリアクターの場合、3倍まで増加することが確認された。

【0081】

1) 貯蔵安定性の評価

F E xナノリアクター（F E x-G O x-H R P）内にカプセル化された溶液及び酵素内の遊離G O x及びH R Pの相対的活性変化を調べるために、室温（25℃）で数日間保

10

20

30

40

50

管した後、貯蔵安定性を測定するために、遊離酵素（ $GOx + HRP$ ）と $FEx - GOx - HRP$ を PBS に室温（ $25^{\circ}C$ ）で貯蔵した。貯蔵中に安定性を決定するために 7 日間活性を測定した。結果は、図 10 の（a）に示す。遊離酵素の場合、相対活性が 20 % に減少した一方、 FEx ナノリアクター内のカプセル化された酵素は、7 日後でも活性の 69 % を維持することが確認された。

【0082】

2) 熱安定性の評価

$60^{\circ}C$ で 1 時間培養した後、溶液及び FEx ナノリアクター（ $FEx - GOx - HRP$ ）内にカプセル化された遊離 GOx 及び HRP の相対的活性変化を分析し、結果を図 10 の（b）に示す。触媒活性は、熱安定性を決定するために 10 分ごとに測定された。遊離酵素の場合、相対的活性が ~5 % に減少した一方、カプセル化された酵素は、1 時間培養後にも活性の 64 % を示すことを確認した。

【0083】

3) リサイクル性の評価

5 回の繰り返しサイクルの後、 $MFEx - GOx - HRP$ システムの相対活性変化を分析し、結果を図 10 の（c）に示す。 $FEx - GOx - HRP$ の初期活性は、5 回の繰り返し実験後でも 89 % 以上維持されることを確認した。

【0084】

【実験例 3】融合エクソソームにおける生体直交触媒の作用

3-1. 融合エクソソームの区画化内の触媒機能の評価

区画化内の触媒機能を評価するために、図 11 に示すように、細胞内のアリルカルバメート（allyl carbamate）に捕捉された蛍光団から蛍光を生成するためのモデル生体直交反応によりパラジウム触媒脱アリル化を行った。実施例 3 によって製造された $FEx - Pd - proRho$ 内の $Pd - NP$ は、 $ICP - MS$ で定量化した。 $Pd - NP$ の存在は、図 11 の（b）に示す高解像度 TEM によって確認することができる。

【0085】

ナノリアクターの触媒特性は、蛍光計でモニタリングした蛍光生成物ローダミンの形成によって評価された。図 12 に示すように、反応溶液の蛍光強度は $FEx - Pd - proRho$ の場合、527 nm から時間の経過と共に増加したが、 $CEx - proRho$ はほとんど変化がなかった。

【0086】

3-2. 融合エクソソームの細胞内触媒作用

1) 蛍光画像の確認

$FEx - Pd - proRho$ ナノリアクター（ $30 \mu g / mL$ ）を $MCF - 10A$ 細胞と共に $37^{\circ}C$ で 24 時間培養して細胞内触媒実験を行った。 $MCF - 10A$ 細胞の CLSM 画像は、 $proRho$ の蛍光性ローダミンへの触媒転換によって緑蛍光を示したが、 CEx を用いた対照実験では蛍光信号が検出されなかった。

【0087】

2) 前駆染料の活性化に対するフローサイトメトリーの分析

$MCF - 10A$ ヒト乳房上皮細胞（ 1×10^5 cells）を 6 ウェルプレートに接種し、5 % ウマ血清（Invitrogen #16050-122）、 $20 ng / mL$ 表皮成長因子（EGF、cat # AF-100-15、Peprotech）、 $0.5 mg / mL$ ヒドロコルチゾン（cat # H0888、Millipore）、 $10 \mu g / mL$ インスリン（cat # I1882、Millipore）、及び 1 % 抗生剤／抗真菌剤（ $100 U / mL$ ペニシリン及び $100 mg / mL$ ストレプトマイシン）が補充された DMEM で $37^{\circ}C$ 及び 5 % CO_2 で培養した。24 時間後、上清を除去し、 $FEx - Pd - proRho$ （ $30 \mu g / mL$ ）の懸濁液が含有された新鮮な培地と交換した。過剰な $FEx - Pd - proRho$ を除去するために、24 時間培養した後に PBS で洗浄した。セルを PBS で洗浄した後、セルストリッパー液（Corning（登録商標）100 mL CellstripperTM）で 20 分間培養して分離した。その後、1200

rpmで3分間細胞を採取し、2%のウシ胎児血清(FBS)を用いてPBSでまた再懸濁させた。細胞は、FSC xV、SSC xV、FITC xV、APC xV設定を用いてフローサイトメトリー測定(CytoFLEX、Beckman Coulter Life)のために準備した。サンプル当たり50,000個のイベントが記録された。使用された励起波長と放出波長は、それぞれローダミンの場合、530/30nm FITCであった。データは、FlowJoソフトウェア(FlowJo、LLC)を用いて分析した。図示されていないが、フローサイトメトリー分析によって、蛍光強度信号が反応後に100倍高いことが確認された。

【0088】

3) 薬物伝達システム特性の評価

図13の(a)に示すように、FEx-Pd-proFUナノリアクターを用いたプロドラッグ(pro-drug)の薬物への転換特性を確認した。5-フルオロウラシル(5-FU)の生体直交デマスキングのために、CEx-Pdとマスクされた不活性治療分子[5-fluoro-1-propargyl uracil(proFU)]-loaded CExとの間の融合を行った。この薬物は、N1位置の機能化によって細胞毒性ヌクレオチド代謝産物を転換させた後、チミジレートシンターゼ(thymidylate synthase)を抑制し、RNA及びDNA鎖に統合して細胞機能を妨害する役割をする。この薬物の細胞内機能/脱マスクを確認するために、FEx-Pd-proFUと共に24時間培養した後、MCF-10A細胞に対してlive/dead細胞分析によって細胞毒性を評価した。その結果を図13の(b)に示す。FEx-Pd-proFUと共に培養すると細胞生存率が23%に低下する一方、CEx細胞の場合には91%が生存することを確認することができる。

【0089】

【実験例4】融合エクソソームのエネルギー生成の確認

実施例2によって製造された融合エクソソームFEx-1(ATPase-bo3Oxi-FEx-Gox-HRP)ナノリアクター、及び比較例2によって製造された酵素の直接組み込みによるエクソソームのATP産生の有無を確認するために、pH変化及びATP活性を測定した。

【0090】

4-1. pH変化

他の酵素(HRP、Gox、ATP合成酵素及びbo3オキシダーゼ)を含むFEx-1ナノリアクターをグルコースとDTTで処理して酵素反応を開始させた。HPTSをFEx-1にカプセル化して黒い96ウェルプレートでタンパク質を最終濃度137µg/mLに希釈した後、30℃で5分間培養した。その後、40µMコエンザイムQ1と2mMのDTTを加えた。DTTは、Q1を還元してbo3オキシダーゼに使用できるようにする。DTT添加1分後、グルコース(300nM)を反応混合物に添加した。蛍光スペクトルは、380±5~480±5nmの励起、及び512±5nmの放出で分光光度計(TECAN、Morrisville、NC、USA)を用いて、0分~90分まで測定し、pHは検量線から求めた。その結果を図9の(a)に示す。

【0091】

pH検出指示薬であるHPTS(hydroxypyrene-1,3,6-trisulphonic acid)の蛍光信号を測定してナノリアクター内部のプロトンの生成を確認した。グルコースの濃度を増加させると、FEx-Gox-HRP及びFEx-1に対してナノリアクター内部の酸性化(ΔpH=0.4)が観察されたが、膜貫通pH勾配は低かった。FEx-1膜の組み立てられた電子伝達鎖の活性化は、還元したDTTを添加することで引き起こされ、これは、補助酵素Q1を還元してbo3オキシダーゼ活性に用い、bo3オキシダーゼによって還元したQ1(Q1H)が酸化してプロトンを各融合した後、小胞でポンピングして90分後にΔpH=-1.6になった。これは、ATP合成を誘導するに十分なプロトン原動力(PMF)を構築した。すなわち、融合エクソソームナノリアクターのbo3オキシダーゼプロトンポンプの活性によって再構成された

タンパク質が完全な機能を行うことができることを確認した。

【0092】

4-2. ATP 活性

ATP 測定キット A22066 (Invitrogen) プロトコールによって標準検量曲線を描いた。8.9 mL の H_2O 、0.5 mL 反応緩衝液 (500 mM トリシン緩衝液 (pH 7.8) 100 mM、 $MgSO_4$ 、及び 2 mM の EDTA、2 mM のアジ化ナトリウム) を含む標準溶液、0.1 M DTT 0.5 mL、10 mM D-ルシフェリン 0.5 mL 及び 5 mg/mL ホタルルシフェラーゼ 2.5 μ L を準備した。合成された ATP がルシフェラーゼによってピロリン酸とアデノシン-リン酸に変換されると発光するため、分光光度計 (TECAN, Morrisville, NC, USA) を用いて発光性を測定した。その結果を図 9 の (b) に示す。グルコース又は DTT のみ添加した ATP 産生と比較して、グルコース-DTT (1.31 $\pm$ 0.05 ATP μ mol/mg) を添加した ATP 産生の場合、相対的に速く増加した。これに対し、グルコースと DTT がないと、ATP 産生はほとんど検出されなかった。

10

【0093】

図 11 は、比較例 2 によって製造された個別構成要素 (GOx、HRP、ATP synthase 及び bo3Oxidase) をエクソソームに直接組み込んだ場合、及び実施例 2 によって製造された融合エクソソームの ATP 産生を発光の程度で示す図である。酵素を直接カプセル化した場合よりも、本発明によって融合されたエクソソームでの ATP 産生が顕著に増加したことが確認された。

20

【0094】

〔実験例 5〕融合エクソソームのスフェロイド浸透効果の確認

5-1. 融合エクソソームを含む低酸素症が誘導されたスフェロイドの準備

MCF-10A (30 μ L、 10^5 cells/mL) 細胞懸濁液をペトリ皿に分注し、反転した状態で維持した。プレートの下部には蒸発を防止して湿度を維持するために 10 mL の PBS が満たされた。24 時間ごとに培地を $\sim 5 \mu$ L ずつ吸引し、10 μ L の新鮮な培地と交換してスフェロイドを培養した。Fex-1 ナノリアクター (206 μ g) を含む 10 μ L の新鮮な細胞培地と交換し、24 時間後にスフェロイドを PBS で洗浄した。その後、600 μ M の ADP 及び 5 mM の $MgCl_2$ を含む 30 μ L の細胞培地を添加した後、60 μ M の補酵素 Q1 及び 3 mM の DTT (Dithiothreitol) を添加した。24 時間培養後、スフェロイドを 30 μ M の TBHP (tert-butyl hydroperoxide) で 3 時間処理し、低酸素症が誘導されたスフェロイドを製造した。

30

【0095】

5-2. ATP 活性の測定

ATP 産生は、ルシフェリン-ルシフェラーゼ (luciferin-luciferase) 分析を用いて発光で測定された。標準検量曲線は、ATP の量を 0 $\sim$ 1000 nM の範囲で変化させ、発光強度 (ルシフェリンからオキシ-ルシフェリン) をモニタリングして得て、ATP 活性 (%) は、正常条件で存在する ATP の総量を基準として求めた。その結果を図 12 に示す。低酸素条件では ATP 活性は 13 倍ほど減少したが、Fex-1 ナノリアクターが内部化されたスフェロイドにグルコース-DTT を加えると、ATP 活性レベルは、低酸素症のない陽性対照群のレベルに近い 81.1 $\pm$ 5.9 % レベルに回復することが観察された。

40

【0096】

5-3. 細胞生存率 (Cell viability) の測定

低酸素症を誘導した後、哺乳類細胞用 LIVE/DEAD 生存率/細胞毒性キット (cat# L3224, Thermo Fisher Scientific) を用いてスフェロイドの細胞生存率を測定した。PBS に 8 μ M のカルセイン-AM 及び 16 μ M のエチジウムホモダイマー 1 を混合して入れ、低酸素症が誘導されたスフェロイドを含むハンギングドロップの体積の 25 % をこの混合物で置き換えた。45 分間インキュベシヨ

50

ンした後、スフェロイドを新鮮なPBSで3回洗浄して過剰な染料を除去した。細胞生存率は、カルセイン-AM ($\lambda_{ex} = 490 \text{ nm}$ 及び $\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$) を用いて測定して図13に示す。データは、 $n = 3$ 個の独立した実験の平均 $\pm$ SDを示す。

【0097】

低酸素条件下では細胞生存率は6倍ほど減少したが、FEx-1ナノリアクターが内部化されたスフェロイドにグルコース-DTTを加えると、細胞生存率は、低酸素症のない陽性対照群のレベルに近い $93.7 \pm 4.5\%$ レベルに回復することが観察された。

【0098】

5-4. 酸化ストレス (Reactive oxidative stress, ROS) レベルの測定

ROSを測定するための陽性及び陰性対照群の場合、スフェロイドをそれぞれ1時間の間 $30 \mu\text{M}$ パラコート又は $50 \mu\text{M}$ グルタチオンで処理し、PBSで2回洗浄した後、スフェロイドを $100 \mu\text{L}$ ジクロロジヒドロフルオレセイン二酢酸と共に 37°C で1時間インキュベーションした。その後、PBSで穏やかに洗浄し、 485 nm での励起及び 535 nm での放出によって、分光光度計 (TECAN、Morrisville、NC、USA) を用いて蛍光強度を測定した。データは、 $n = 3$ 個の独立した実験の平均 $\pm$ SDを示す。図14に示すように、FEx-1ナノリアクター及びグルコース-DTTで処理したとき、スフェロイドでROSが2倍ほど減少する結果により、本発明によるナノベシクルリアクターは、酸化ストレス除去効果を提供できることが確認された。

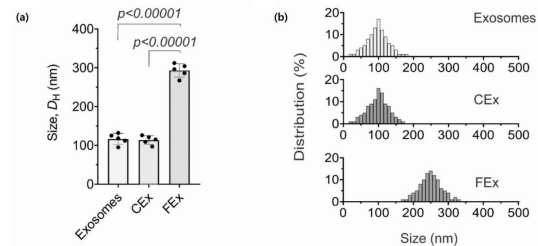
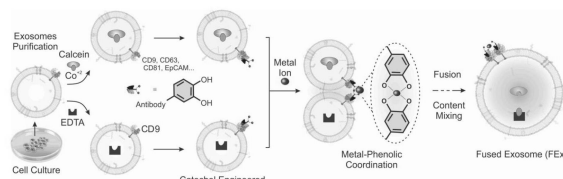
【0099】

これによって、本発明によるベシクルナノリアクターは、様々な疾患の条件下で観察される低酸素症による細胞損傷を低減でき、細胞の代謝活性を調節できることを確認した。また、スフェロイドコアまで深く浸透された結果から、本発明のナノベシクルリアクターは、組み込まれた酵素が浸出することなく、腫瘍の深部組織まで侵透することにより、生体触媒の性能を向上させることができることが予想される。

【図面】

【図1】

【図2】



10

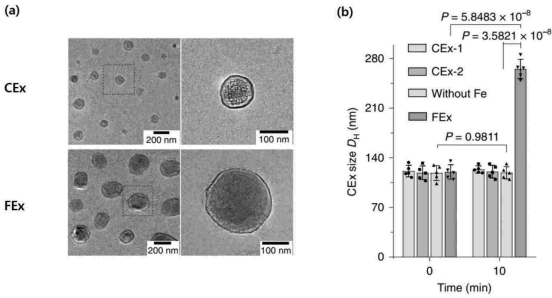
20

30

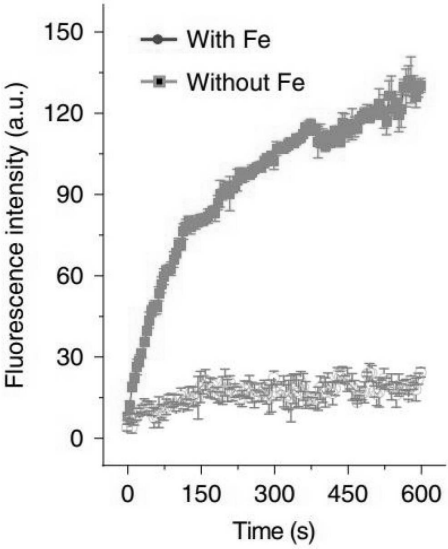
40

50

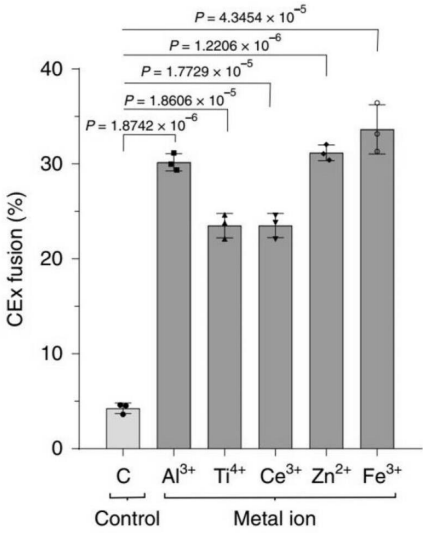
【 図 3 】



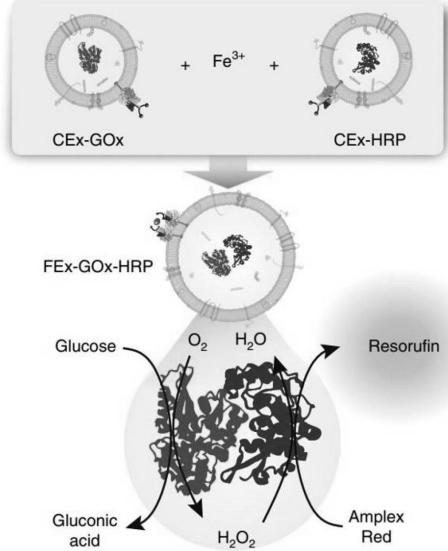
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



10

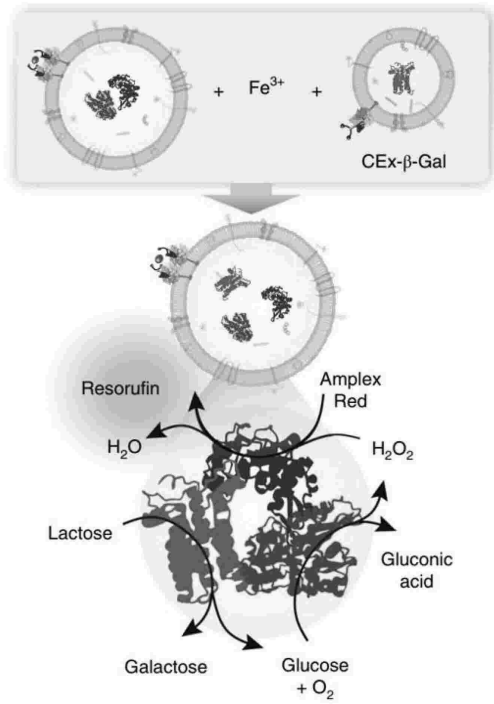
20

30

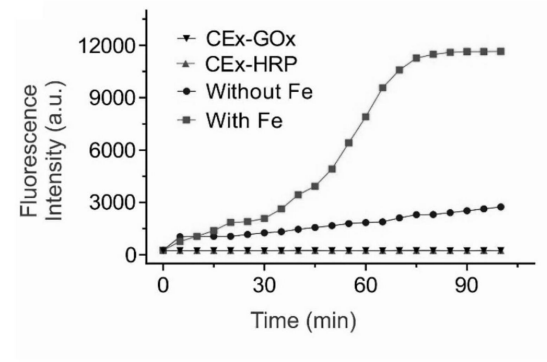
40

50

【圖 7】



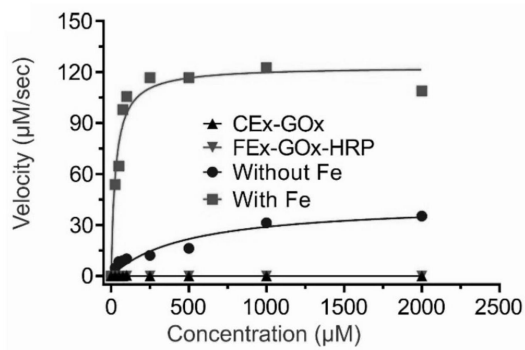
【圖 8】



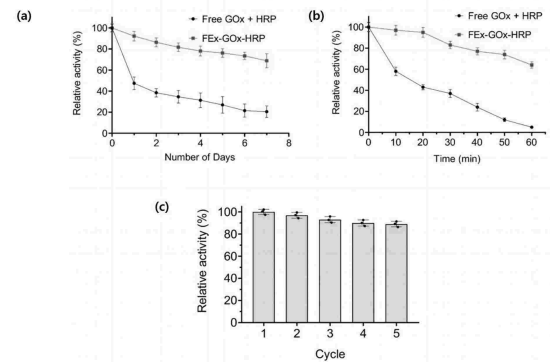
10

20

【圖 9】



【図 10】

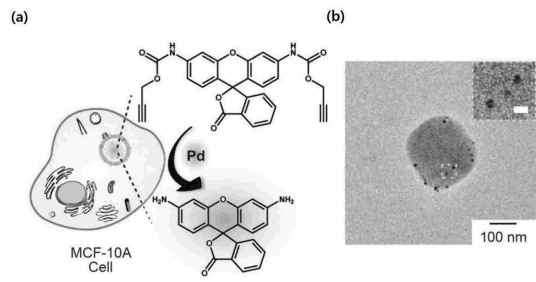


30

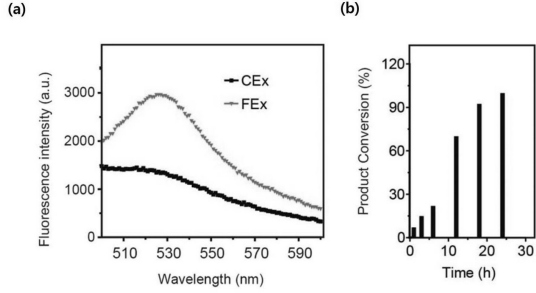
40

50

【 図 1 1 】

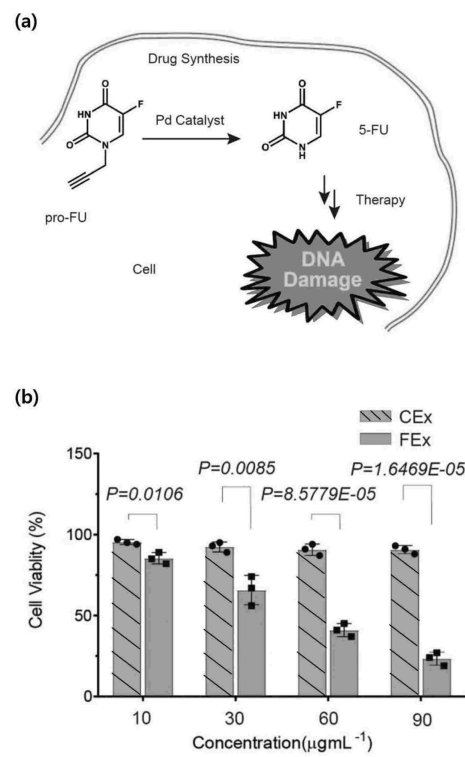


【 図 1 2 】



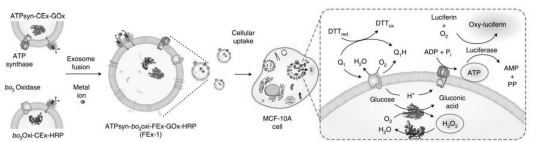
10

【 図 1 3 】



20

【 図 1 4 】

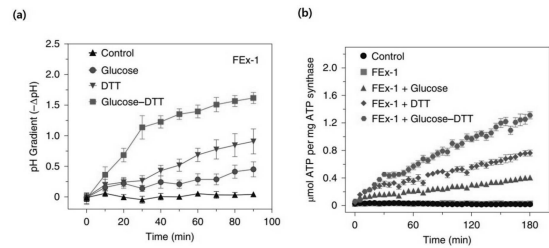


30

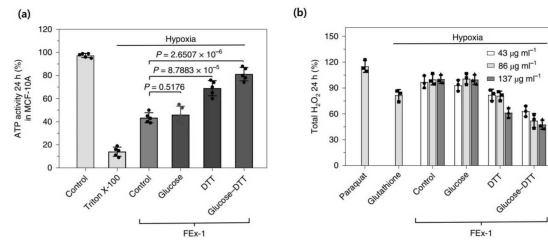
40

50

【図 15】

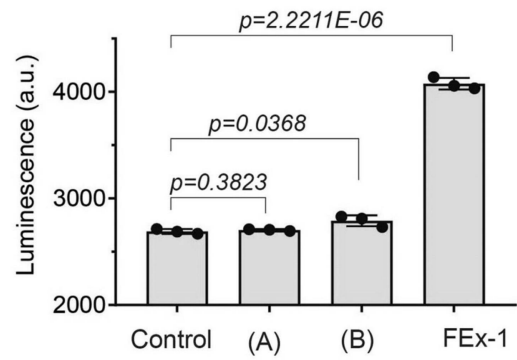


【図 16】

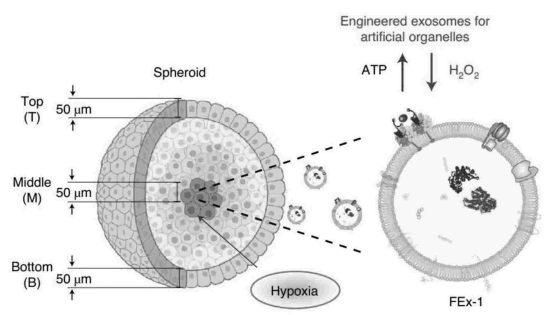


10

【図 17】

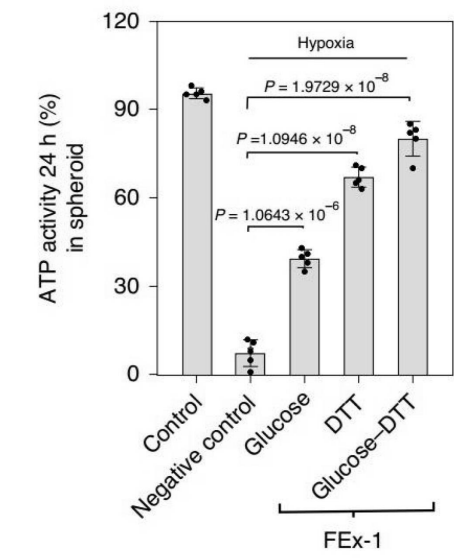


【図 18】

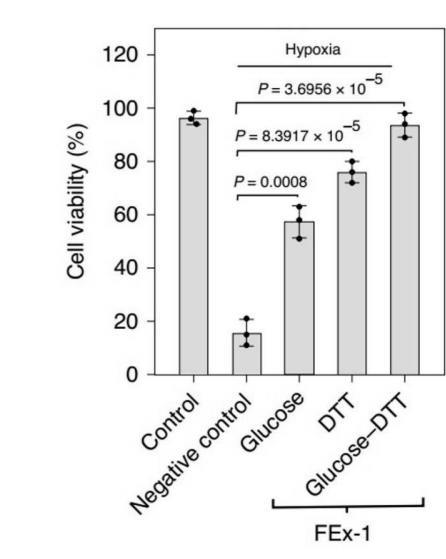


20

【図 19】



【図 20】

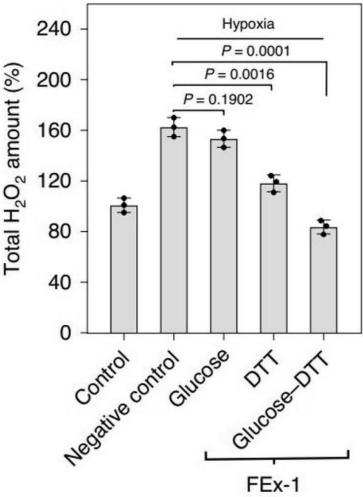


30

40

50

【 図 2 1 】



10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/007994

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 5/071(2010.01); C12N 11/02(2006.01); B01J 19/00(2006.01) 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 5/071(2010.01); A61K 9/127(2006.01); C12N 15/88(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: 소포체(vesicle), 수용체(receptor), 리간드(ligand), 융합(fusion), 배위 화합물(coordination compound), 세포외소포체(extracellular vesicle), 금속 이온(metal ion), ATP 합성효소(ATP synthase), bo3 산화효소(bo3 oxidase)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	VOSKUHL, J. et al. Molecular recognition of bilayer vesicles. Chemical Society Reviews. 2009, vol. 38, pp. 495-505. See abstract; page 497, right column, third paragraph and page 501, right column, third paragraph; and figures 5 and 9-10.	1-17
Y	ISHMUKHAMETOV, R. R. et al. A modular platform for one-step assembly of multi-component membrane systems by fusion of charged proteoliposomes. Nature Communications. 06 October 2016, vol. 7, pp. 1-10. See abstract; page 8, left column, fourth paragraph; and figures 1 and 3.	1-17
A	SATO, Y. T. et al. Engineering hybrid exosomes by membrane fusion with liposomes. Scientific Reports. 25 February 2016, vol. 6, thesis no. 21933, pp. 1-11. See entire document.	1-17
A	LI, J. et al. Exosome-Mimetic Supramolecular Vesicles with Reversible and Controllable Fusion and Fission. Angewandte Chemie. 2020, vol. 132, pp. 21694-21698. See entire document.	1-17
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 05 September 2022		Date of mailing of the international search report 06 September 2022
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2022/007994

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2020-0222324 A1 (ANJARIUM BIOSCIENCES AG) 16 July 2020 (2020-07-16) See entire document.	1-17
PX	KUMAR, S. et al. Programmed exosome fusion for energy generation in living cells. Nature Catalysis. September 2021, vol. 4, pp. 763-774. See entire document.	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2022/007994

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2020-0222324	A1	16 July 2020	AU	2015-208837	A1	11 August 2016
				AU	2015-208837	B2	18 June 2020
				AU	2020-227129	A1	01 October 2020
				CA	2936514	A1	30 July 2015
				CN	105934240	A	07 September 2016
				CN	105934240	B	09 February 2021
				CN	112870163	A	01 June 2021
				EP	3096741	A2	30 November 2016
				EP	3096741	B1	02 September 2020
				EP	3791863	A1	17 March 2021
				JP	2017-502997	A	26 January 2017
				JP	2019-218349	A	26 December 2019
				JP	6598786	B2	30 October 2019
				KR	10-2016-0110410	A	21 September 2016
				MX	2016009529	A	17 October 2016
				US	10561610	B2	18 February 2020
				US	2016-0354313	A1	08 December 2016
				WO	2015-110957	A2	30 July 2015
				WO	2015-110957	A3	03 December 2015
				ZA	201604831	B	30 May 2018

국제조사보고서

국제출원번호

PCT/KR2022/007994

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 5/071(2010.01)i; C12N 11/02(2006.01)i; B01J 19/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 5/071(2010.01); A61K 9/127(2006.01); C12N 15/88(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: 소포체(vesicle), 수용체(receptor), 리간드(ligand), 융합(fusion), 배위 화합물(coordination compound), 세포외소포체(extracellular vesicle), 금속 이온(metal ion), ATP 합성효소(ATP synthase), bo3 산화효소(bo3 oxidase)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	VOSKUHL, J. 등, 'Molecular recognition of bilayer vesicles', Chemical Society Reviews, 2009, 38권, 49 5-505 페이지 초록; 페이지 497, 우컬럼, 3번째 단락; 페이지 501, 우컬럼, 3번째 단락; 도면 5, 9-10	1-17
Y	ISHMUKHAMETOV, R. R. 등, 'A modular platform for one-step assembly of multi-component membrane systems by fusion of charged proteoliposomes', Nature Communications, 2016.10.06, 7권, 1-1 0 페이지 초록; 페이지 8, 좌컬럼, 4번째 단락; 도면 1, 3	1-17
A	SATO, Y. T. 등, 'Engineering hybrid exosomes by membrane fusion with liposomes', Scientific Reports, 2016.02.25, 6권, 논문번호 21933, 1-11 페이지 전체 문헌	1-17
A	LI, J. 등, 'Exosome-Mimetic Supramolecular Vesicles with Reversible and Controllable Fusion and Fission', Angewandte Chemie, 2020, 132권, 21694-21698 페이지 전체 문헌	1-17
A	US 2020-0222324 A1 (ANJARIUM BIOSCIENCES AG) 2020.07.16 전체 문헌	1-17
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가진 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		
국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. 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 2022년09월05일(05.09.2022)		국제조사보고서 발송일 2022년09월06일(06.09.2022)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 전선애 전화번호 +82-42-481-8150

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2019년 7월)

10

20

30

40

50

국 제 조 사 보 고 서 대응특허에 관한 정보		국제출원번호 PCT/KR2022/007994	
국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2020-0222324 A1	2020/07/16	AU 2015-208837 A1	2016/08/11
		AU 2015-208837 B2	2020/06/18
		AU 2020-227129 A1	2020/10/01
		CA 2936514 A1	2015/07/30
		CN 105934240 A	2016/09/07
		CN 105934240 B	2021/02/09
		CN 112870163 A	2021/06/01
		EP 3096741 A2	2016/11/30
		EP 3096741 B1	2020/09/02
		EP 3791863 A1	2021/03/17
		JP 2017-502997 A	2017/01/26
		JP 2019-218349 A	2019/12/26
		JP 6598786 B2	2019/10/30
		KR 10-2016-0110410 A	2016/09/21
		MX 2016009529 A	2016/10/17
		US 10561610 B2	2020/02/18
		US 2016-0354313 A1	2016/12/08
		WO 2015-110957 A2	2015/07/30
		WO 2015-110957 A3	2015/12/03
		ZA 201604831 B	2018/05/30

서식 PCT/ISA/210 (대응특허 추가용지) (2019년 7월)

フロントページの続き

,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,D
K,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),O
A(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,B
B,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,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,L
U,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,Z
M,ZW

(74)代理人 100182305
弁理士 廣田 鉄平

(74)代理人 100096482
弁理士 東海 裕作

(74)代理人 100131093
弁理士 堀内 真

(74)代理人 100150902
弁理士 山内 正子

(74)代理人 100141391
弁理士 園元 修一

(74)代理人 100221958
弁理士 篠田 真希恵

(74)代理人 100192441
弁理士 渡辺 仁

(72)発明者 チョ ユン－ギョン
大韓民国 44920 ウルサン ウルジューグン ポムソウブ テリロ 15－17 703－305

(72)発明者 サミット クマール
大韓民国 44919 ウルサン ウルジューグン オンヤン－ウップ ユニストーギル 50 403
－1701

F ターム (参考) 4B033 NA22 NB62 ND20
4B065 AB01 AB02 CA27 CA46 CA54