



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0147412
(43) 공개일자 2023년10월23일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 9/51</i> (2006.01) <i>A23K 20/195</i> (2016.01)
 <i>A23K 50/80</i> (2016.01) <i>A61K 31/7105</i> (2006.01)
 <i>A61P 31/04</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A61K 9/5161</i> (2013.01)
 <i>A23K 20/195</i> (2016.05)</p> <p>(21) 출원번호 10-2022-0046404
 (22) 출원일자 2022년04월14일
 심사청구일자 2022년04월14일</p> | <p>(71) 출원인
 충남대학교산학협력단
 대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)</p> <p>(72) 발명자
 마하나마 디 조이사
 대전광역시 유성구 배울1로 35, 409동 501호(관평동, 대덕테크노밸리4단지아파트)
 신현진
 대전광역시 서구 계룡로264번길 4, 105동 610호(월평동, 월평타운)
 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
 리엔목특허법인</p> |
|---|--|

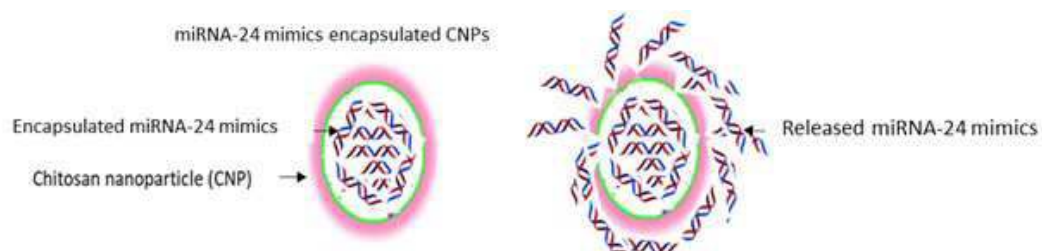
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자를 유효성분으로 포함하는 에드워드시엘라 피스시시다에 대한 어류용 항생 조성물**

(57) 요약

본 출원은 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자 및 이의 용도에 관한 것으로서, 상기 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자의 제조 방법, 상기 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자를 유효성분으로 포함하는 에드워드시엘라 피스시시다 (*Edwardsiella piscicida*)에 대한 어류용 항생 조성물, 및 이를 이용한 에드워드시엘라 피스시시다 감염성 어류 질병을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23K 50/80 (2016.05)

A61K 31/7105 (2013.01)

A61P 31/04 (2018.01)

(72) 발명자

차밀라니 니카피티야

대전광역시 유성구 죽동로279번길 69, 203호(죽동)

틸로마 딜룩시 리야나지

경기도 수원시 장안구 창훈로8번길 28, 102호(연무동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711115038

과제번호 2018R1A2B6007841

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)

연구과제명 어류 면역 조절 및 질병 제어 기능을 갖는 마이크로 RNA의 키토산 나노입자를 활용

한 효율적인 약물 전달 시스템 개발

기 여 율 2/10

과제수행기관명 충남대학교

연구기간 2020.03.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711088131

과제번호 2018R1A2B6007841

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)

연구과제명 어류 면역 조절 및 질병 제어 기능을 갖는 마이크로 RNA의 키토산 나노입자를 활용

한 효율적인 약물 전달 시스템 개발

기 여 율 4/10

과제수행기관명 충남대학교

연구기간 2019.03.01 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711075104

과제번호 2018R1A2B6007841

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)

연구과제명 어류 면역 조절 및 질병 제어 기능을 갖는 마이크로 RNA의 키토산 나노입자를 활용

한 효율적인 약물 전달 시스템 개발

기 여 율 4/10

과제수행기관명 충남대학교

연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자를 유효성분으로 포함하는 에드워드시엘라 피스시시다 (*Edwardsiella piscicida*)에 대한 어류용 항생 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 miRNA 24는 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 키토산 나노입자의 직경은 200 내지 500 nm인 것인, 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 사료, 사료 첨가제, 항생용 약제, 박테리아 감염성 질병의 예방 또는 치료용 약제, 또는 면역 증진용 약제인 것인, 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 에드워드시엘라 피스시시다 감염성 질병의 예방 또는 치료용 약제인 것인, 조성물.

청구항 6

(a) miRNA 24 및 트리폴리인산염 (tripolyphosphate) 용액을 혼합하는 단계;

(b) 키토산 (chitosan)을 산성 용매에 용해시키는 단계; 및

(c) 상기 (a) 단계에서 얻어진 혼합액 및 상기 (b) 단계에서 얻어진 용액을 혼합하여 교반하는 단계를 포함하는 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자를 제조하는 방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자는 에드워드시엘라 피스시시다 감염성 어류 질병에 대하여 예방 또는 치료 효과를 나타내는 것인, 방법.

청구항 8

어류에 청구항 1 내지 5 중 어느 한 항의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 에드워드시엘라 피스시시다 감염성 어류 질병을 예방 또는 치료하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자를 유효성분으로 포함하는 에드워드시엘라 피스시시다에 대한 어류용 항생 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

에드워드시엘라 피스시시다 (*Edwardsiella piscicida*, *E. piscicida*)는 장내세균과 (Enterobacteriaceae)에 속하는 그람 음성, 운동성, 및 막대 모양의 박테리아로서, 다양한 해수 및 담수 어종에서 에드워드 감염증 (Edwardsiellosis)을 유발하는 주요한 어류 병원성 박테리아이다. 특히 *E. piscicida*는 넙치 등 우리나라 주요 양식 어종에서 발생하는 심각한 질병의 원인균이기도 하다. 또한, *E. piscicida*는 인간에게도 병원성이며 위장

장애 및 기타 질병을 일으킬 수 있다. 이렇듯, *E. piscicida*는 수생 동물에 있어서, 중요한 병원균이기 때문에 *E. piscicida*에 대한 연구가 증가되고 있는 추세이나, 아직은 미비한 실정이다.

[0003] 또한, *E. piscicida*에 대한 기초 연구를 바탕으로, *E. piscicida* 불활성화 백신 등에 대한 연구가 수행되고 있으나 (중국 특허출원 제2020-11220240호), 박테리아의 병원성 회복의 위험성과 자연계로의 확산 위험성이 여전히 존재한다. 더하여, *E. piscicida*에 대한 억제 효과를 증가시키기 위하여, 장기간에 걸쳐 항생제를 과도하게 사용하는 것은 어류의 항생제 내성을 초래하는 문제점이 있다.

[0004] 한편, 키틴 (갑각류 껍질의 주성분)을 탈 아세틸화시킨 천연 생체 고분자인 키토산 ((1,4)-2-아미노-2-데옥시-β-D-글루칸)은 뛰어난 생체 적합성, 낮은 면역원성, 그리고 다른 폴리머들에 비해 낮은 세포 독성 때문에 섬유 고분자 산업이나 의공학을 비롯한 최첨단 기술 분야에서 응용되기 시작하였고 이에 대한 연구도 국내외적으로 활발하게 진행되고 있다.

[0005] 이런 배경 하에서, 본 발명자들은 *E. piscicida* 감염성 어류 질병에 대한 예방 또는 치료 효과를 나타내는 신규한 물질을 찾기 위해 연구를 계속한 결과, miRNA (micro RNA) 24 또는 이의 모방체 (mimic)를 키토산 나노입자에 봉입하여 어류에 투여하는 경우, 독성을 야기하지 않으면서 *E. piscicida* 감염으로부터 어류를 보호하는 우수한 효과를 확인함으로써, 본 출원을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 일 양상은 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자를 유효성분으로 포함하는 에드워드시엘라 피스시사 (*Edwardsiella piscicida*)에 대한 어류용 항생 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 다른 양상은 (a) miRNA 24 및 트리폴리인산염 (tripolyphosphate) 용액을 혼합하는 단계; (b) 키토산 (chitosan)을 산성 용매에 용해시키는 단계; 및 (c) 상기 (a) 단계에서 얻어진 혼합액 및 상기 (b) 단계에서 얻어진 용액을 혼합하여 교반하는 단계를 포함하는 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 또 다른 양상은 어류에 상기 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 에드워드시엘라 피스시사 감염성 어류 질병을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

[0009]

[0010] 본 출원의 다른 목적 및 이점은 첨부한 청구범위 및 도면과 함께 하기의 상세한 설명에 의해 보다 명확해질 것이다. 본 명세서에 기재되지 않은 내용은 본 출원의 기술 분야 또는 유사한 기술 분야 내 숙련된 자이면 충분히 인식하고 유추할 수 있는 것이므로 그 설명을 생략한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 출원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0012]

[0013] 일 양상은 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자를 유효성분으로 포함하는 에드워드시엘라 피스시사 (*Edwardsiella piscicida*)에 대한 어류용 항생 조성물을 제공한다.

[0014] 용어 "miRNA (micro RNA)"는 mRNA의 3' 비번역 영역 (UTR) 부위와의 염기결합을 통해 전사 후 단계에서 유전자의 발현을 조절하는 조절 RNA (regulatory RNA) 분자로서, 대략 20 내지 25 뉴클레오타이드 (nt)의 비번역 RNA를 의미한다. miRNA는 발생, 분화, 세포사멸, 및 증식과 관련된 결정적인 생물학적 과정뿐만 아니라 당뇨병, 신경 변성의 질환, 및 암과 같은 질환들과 관련되어 있는 것으로 알려져 있다.

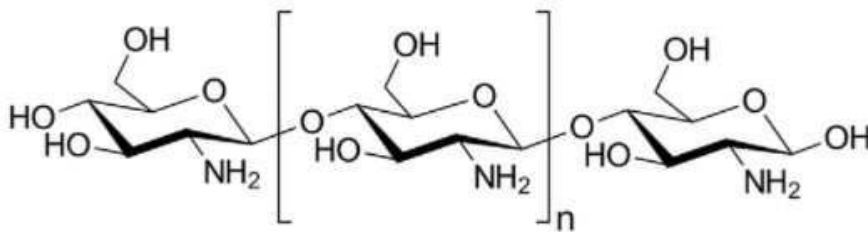
[0015] 상기 miRNA 24는 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 것일 수 있다.

[0016] 상기 miRNA 24는 인간 또는 마우스로부터 유래된 것일 수 있으며, 이에 한정되지 않고, 체외에서 인위적으로 합성 또는 제조된 것일 수 있다. 상기 miRNA 24를 합성 또는 제조하기 위하여, 화학적 또는 생물학적 방법 또는 이에 제한되지 않는 당업계에 공지된 방법을 이용할 수 있다. 따라서, 상기 miRNA 24는 miRNA 24 모방체

(mimic)를 포함할 수 있다. 상기 miRNA 24 모방체는 세포 내에 있는 miRNA 24의 서열과 동일하거나 일부 변형된 서열로 만들어진 합성 miRNA를 의미할 수 있다.

[0017] 용어 "키토산 (chitosan)"은 다당류로, 갑각류 껍질로부터 얻어지는 키틴의 $-CH_3CONH$ 의 탈아세틸화에 의하여 유도된 천연 고분자 물질을 의미한다. 즉, 키토산은 키틴의 단량체에 존재하는 아세틸기 (acetyl group; $-COCH_3$)가 아미노기($-NH_2$)로 치환된 형태를 가질 수 있다. 한편, 게, 가재, 새우 등 갑각류의 껍질로부터 얻어지는 키틴은 셀룰로오스 다음으로 풍부한 천연 고분자로, 셀룰로오스 C-2 위치의 OH가 CH_3CONH 로 치환된 구조를 가지며, 셀룰로오스와 매우 비슷한 구조를 가지는 물질일 수 있다. 예를 들어, 상기 키토산은 하기와 같은 화학식 1로 표시되는 화합물일 수 있다:

[0018] [화학식 1]



[0019] (상기 화학식 1에서, n 은 1 내지 10000으로부터 선택되는 어느 하나의 정수이다.).

[0020]

[0021] 상기 키토산은 저분자량의 키토산 (low molecular weight chitosan: LMWC)일 수 있다. 구체적으로, 상기 키토산의 중량평균분자량은 약 50,000 내지 190,000 Da일 수 있다.

[0022] 일 구체예에 따르면, 상기 키토산의 중량평균분자량이 약 50,000 Da 미만인 경우, 상기 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자는 miRNA 24와 키토산 사이의 정전기적 상호작용, 예컨대, 이온성 결합의 세기가 감소하여, 상기 miRNA 24를 키토산 나노입자의 내부에 봉입하기 위한 캡슐화 강도가 약해질 수 있다. 이로 인해, miRNA 24가 외부 환경에 노출되어 유효성이 감소할 수 있다. 또한, 상기 키토산의 중량평균분자량이 약 190,000 Da 초과인 경우, 상기 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자의 사이즈 증가로 인해 세포 침투력이 감소하여 miRNA 24를 어류의 생체 내 또는 세포 내로 전달하는 효율이 감소할 수 있다.

[0023] 또한, 상기 키토산은 생분해성 또는/및 생체적합성을 나타내는 것일 수 있고, 상기 키토산은 염의 형태 또는 키토산 유도체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 키토산 유도체는 키토산의 알킬화물, 아실화물, 아릴화물, 황산화물, 또는 인산화물일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0024] 상기 키토산을 이용하여 키토산 나노입자 (chitosan nanoparticles: CNPs)를 제조할 수 있고, 상기 키토산 나노입자의 내부에 특정 물질 (예컨대, miRNA 24)이 봉입 또는 캡슐화될 수 있다. 상기 키토산 나노입자의 내부에 봉입된 또는 캡슐화된 특정 물질 (예컨대, miRNA 24)은 외부 환경, 예컨대 효소 등으로부터 안정하게 보호될 수 있으며, 특정 조건에서 방출될 수 있다. 상기 효소는 DNA 분해효소 (DNase) 또는 RNA 분해효소 (RNase) 일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0025] 상기 키토산 나노입자는 상기 키토산을 일 구성 요소로 포함할 수 있고, 추가로, 트리폴리인산염 (tripolyphosphate: TPP)을 포함할 수 있다. 또한, 상기 키토산 나노입자는 상기 키토산과 상기 트리폴리인산염이 가교 결합을 형성하고 있는 것일 수 있다. 상기 트리폴리인산염은 트리폴리인산나트륨 (sodium tripolyphosphate; $Na_5P_3O_{10}$) 또는 트리폴리인산칼륨 (potassium tripolyphosphate; $K_5P_3O_{10}$)일 수 있다.

[0026] 상기 키토산은 양전하를 나타내고, 상기 miRNA 24는 음전하를 나타내는 것일 수 있다. 따라서, 상기 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자는 상기 키토산과 상기 miRNA 24가 정전기적 상호작용, 예컨대, 이온성 결합에 의하여 결합 또는 연결되어 있는 것일 수 있다. 즉, 상기 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자는 정전기적 상호작용에 의하여 miRNA 24의 표면이 키토산으로 코팅되어 외곽에 키토산 나노입자가 형성되고, 그 내부에 miRNA 24가 존재하는 구형의 나노입자 또는 나노구 (nanosphere)의 형태를 가지는 것일 수 있다. 이때, 상기 외곽에 형성된 키토산 나노입자는 상기 키토산과 상기 트리폴리인산염이 가교 결합을 형성하고 있는 것일 수 있다.

- [0027] 용어 "봉입 또는 캡슐화 (encapsulation)"는 특정 물질을 다른 물질로 둘러싸거나 코팅하는 기술을 의미한다.
- [0028] 용어 "나노캡슐 (nano capsule)"은 나노 크기의 캡슐을 의미하며, 나노캡슐의 내부에 특정 물질이 포함되어 있을 수 있다. 용어 "나노입자 (nanoparticle)"는 용어 "나노캡슐"과 상호교환적으로 사용될 수 있다.
- [0029] 다시 말해, 상기 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자는 상기 miRNA 24와 상기 키토산의 복합체; 또는 상기 miRNA 24, 상기 키토산, 및 상기 트리폴리인산염의 복합체일 수 있다.
- [0030] 상기 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자에 포함된 miRNA 24 및 키토산의 중량비는 약 1 : 6 내지 19, 1 : 6 내지 17, 1 : 6 내지 15, 1 : 6 내지 12, 1 : 7 내지 19, 1 : 7 내지 17, 1 : 7 내지 15, 1 : 7 내지 12, 1 : 8 내지 19, 1 : 8 내지 17, 1 : 8 내지 15, 1 : 8 내지 12, 1 : 9 내지 19, 1 : 9 내지 17, 1 : 9 내지 15, 1 : 9 내지 12, 1 : 9 내지 11, 또는 1 : 10일 수 있다. 상기 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자에 포함된 miRNA 24 및 키토산의 중량비가 상기 수치 또는 수치범위를 벗어나는 경우, 약 200 내지 500 nm의 균일한 사이즈의 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자가 형성되기 어렵고, miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자의 캡슐화 효율, 캡슐화 강도, 또는 miRNA 24 방출능이 현저히 감소할 수 있다. 그 결과, 상기 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자에 있어서, 유효한 miRNA 24를 어류의 생체 내 또는 세포 내로 전달하는 효율 및 어류의 박테리아 감염성 질병에 대한 예방 또는 치료 효과가 현저히 감소할 수 있다.
- [0031] 용어 "miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자"는 용어 "miRNA 24-CNPs"와 상호교환적으로 사용될 수 있다.
- [0032] 상기 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자는 표면 양전하를 나타내는 것일 수 있다. 또한, 상기 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자의 제타전위 (zeta potential)는 약 30 내지 60 또는 35 내지 45 mV인 것일 수 있다.
- [0033] 용어 "제타전위 (zeta potential)"는 입자사이의 반발력과 인력의 크기를 단위로 나타낸 것을 의미하고, 일반적으로, 제타전위는 입자의 표면전위 (구체적으로는, slipping plane의 전위) 즉, 표면 양전하 밀도를 나타낸다. 수중에 있는 콜로이드 물질의 입자는 침전되지 않고 부유하는 성질을 지닌다. 이러한 물질들은 입자들이 가지는 +, - 이온들로 인해 서로 반발하는 성질을 가지는데, 이렇게 반발하는 힘을 제타전위라고 할 수 있다. 따라서, 제타전위는 액상에 현탁된 입자의 분산 혹은 응집의 정도를 평가하는데 적용될 수 있으며, 일반적으로 제타전위의 절대값이 클수록 현탁액 내의 입자의 분산상태가 안정적이라고 평가할 수 있다.
- [0034] 일 구체예에 따르면, 상기 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자는 약 30 내지 60 mV의 높은 제타전위를 나타내므로, 액상에서 안정적인 분산상태를 유지할 수 있다. 이는 또한, 상기 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자는 내부 음전하와 외부 양전하가 강력한 정전기적 상호작용, 예컨대, 이온성 결합을 형성하여 매우 안정적인 캡슐화 상태를 유지할 수 있음을 의미한다. 이로 인해, 상기 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자는 매우 안정적인 나노구 형태를 나타내어 내부의 miRNA 24를 외부 환경으로부터 강력하게 보호하고, 액상에서 안정적으로 분산되므로 어류에 직접 투여하기 적합한 다양한 제형으로 용이하게 적용될 수 있다. 따라서, 유전자 발현 벡터 등을 이용하여 어류를 형질전환시키는 등의 방식에 의하지 않더라도, 상기 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자를 어류에 직접 투여 (경구 또는 비경구 투여)하는 간단한 방식만으로도 유효성이 유지된 miRNA 24를 어류의 생체 또는 세포 내로 효과적으로 전달하여 어류의 박테리아 감염성 질병을 예방 또는 치료할 수 있다.
- [0035] 상기 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자의 직경은 약 200 내지 500 또는 300 내지 400 nm인 것일 수 있다.
- [0036] 일 구체예에 따르면, 상기 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자의 직경이 약 200 nm 미만인 경우, 상기 키토산 나노입자의 내부에 봉입될 수 있는 miRNA 24의 양이 줄어들어, miRNA 24를 어류의 생체 내 또는 세포 내로 전달하는 효율이 감소할 수 있다. 또한, 상기 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자의 직경이 약 500 nm 초과인 경우, miRNA 24와 키토산 사이의 정전기적 상호작용, 예컨대, 이온성 결합의 세기가 감소하고 miRNA 24를 키토산 나노입자의 내부에 봉입하기 위한 캡슐화 강도가 약해져 miRNA 24가 외부 환경에 노출되어 유효성이 감소될 수 있다. 또한, 나노입자의 사이즈 증가로 인해 상기 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자의 세포 침투력이 감소하여 miRNA 24를 어류의 생체 내 또는 세포 내로 전달하는 효율이 감소할 수 있다.
- [0037] 상기 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자는 miRNA 24 방출능을 가지는 것일 수 있다. 일 구체예에 따르면, 상기 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자는 시간이 경과함에 따라 외곽의 키토산이 점진적으로 (gradually) 생분해되면서 miRNA 24가 지속적으로 방출되는 것일 수 있다. 이는 상기 키토산의 생분해에 의해 키토산과 miRNA 24 사이에서 형성되었던 강력한 정전기적 상호작용, 예컨대, 이온성 결합의 세기가 감소하여, miRNA 24가 방출되는 것으로 이해될 수 있다. 이로 인해, 상기 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자는 어류의 생체 또는 세포 내로 흡수된 후, miRNA 24를 지속적으로 방출하여 어류의 생체 내에서 miRNA 24의 효과를 지속적으로 유지시킬 수

있다.

- [0038] 용어 "유효성분 (effective ingredient)"은 이롭거나 바람직한 임상적 또는 생화학적 결과에 영향을 주는 적절한 한 유효량의 성분을 의미한다. 구체적으로는, 유효량의 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자를 의미할 수 있다.
- [0039] 상기 유효량은 개체에 대하여 질병을 예방하거나, 질병 상태를 비제한적으로, 증상의 완화, 질병 범위의 감소, 질병 상태의 안정화 (즉, 악화되지 않음), 질병 진행의 지연 또는 속도의 감소, 또는 질병 상태의 개선 또는 일시적 완화 및 경감 (부분적이거나 전체적으로)을 위한 적절한 양일 수 있다. 상기 유효량은 개체의 종류, 개체의 상태, 개체의 양, 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 관련 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0040] 일 구체예에 따르면, 상기 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자는 외부 환경에 의한 영향을 차단하여 miRNA 24의 안정성을 현저히 향상시키고, 유효성이 유지된 miRNA 24를 어류 생체 내 또는 세포 내로 효과적으로 전달할 수 있다. 또한, 상기 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자는 입자가 매우 작고, 표면 양전하를 나타내므로 생체 흡수율, 생체 이용률, 및 세포 투과성이 현저히 증가될 수 있고, 어류의 생체 또는 세포 내로 흡수된 후, 키토산의 점진적인 생분해로 인해 miRNA 24를 지속적으로 방출하여 어류의 생체 내에서 miRNA 24의 효과를 지속적으로 유지시킬 수 있다.
- [0041] 상기 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자를 유효성분으로 포함하는 어류용 항생 조성물은 에드워드시엘라 피스시시다에 대하여 항균 효과를 나타내는 것일 수 있다. 상기 항균 효과는 박테리아 성장 억제 효과, 박테리아 사멸 효과, 또는 용균 효과를 의미할 수 있다.
- [0042] 용어 "에드워드시엘라 피스시시다 (*Edwardsiella piscicida*, *E. piscicida*)"는 장내세균과 (Enterobacteriaceae)에 속하는 그람 음성, 운동성, 및 막대 모양의 박테리아로서, 다양한 해수 및 담수 어종에서 에드워드 감염증 (Edwardsiellosis)을 유발하는 주요한 어류 병원성 박테리아이다.
- [0043] 일 구체예에 따르면, 상기 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자를 투여받은 어류는 *E. piscicida*에 감염시, 어류 조직 내에서의 *E. piscicida*의 생존 또는 증식이 억제될 수 있고, *E. piscicida* 감염 어류의 생존율이 현저히 증가될 수 있다. 또한, 일 구체예에 따르면, 상기 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자를 투여받은 어류는 *E. piscicida*에 감염시, 어류 조직에서 내인성 miRNA 24의 발현이 증가될 수 있다. 이를 통해, 상기 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자는 어류의 *E. piscicida* 감염성 질병에 대하여 우수한 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있다.
- [0044] 용어 "어류용 항생 조성물"은 어류에게 제공되어 균을 억제시킬 수 있는 제제를 의미하며, 방부제, 살균제, 항생제, 및 항균제를 총칭하는 것이다. 구체적으로, 상기 어류용 항생 조성물은 어류에게 제공되어 균의 성장을 억제시키거나 균을 사멸시키는 등의 항균 효과를 나타낼 수 있는 제제를 의미할 수 있다.
- [0045] 용어 "투여"란 어떠한 적절한 방법으로 어류에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 상기 어류용 항생 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 구체적으로, 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비 내 투여, 폐 내 투여, 직장 내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 상기 어류용 항생 조성물의 투여량은 제제화 방법, 개체의 체중, 동물의 수명, 성별, 병적상태, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여경로, 투여방법, 배설율, 배설 속도, 질환의 중증도, 및 반응 감응성 등에 따라 그 범위가 달라질 수 있으며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 상기 어류용 항생 조성물의 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 예컨대, 상기 어류용 항생 조성물의 1일 투여량은 약 0.001 내지 10000 mg/kg일 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0046] 상기 어류용 항생 조성물은 어류에 대하여 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0047] 상기 어류용 항생 조성물은 어류에 사용되는 것으로서, 사료, 사료 첨가제, 항생용 약제, 박테리아 감염성 질병의 예방 또는 치료용 약제, 또는 면역 증진용 약제인 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 어류용 항생 조성물은 *E. piscicida* 감염성 질병의 예방 또는 치료용 약제인 것일 수 있다.

- [0048] 상기 *E. piscicida* 감염성 질병은 에드워드 감염증 (Edwardsiellosis)일 수 있다.
- [0049] 용어 "에드워드 감염증 (Edwardsiellosis)"은 해산어를 비롯 담수산어류에서 패혈증을 유발하며, 양식어류에서 가장 높은 피해를 유발하는 세균성 질병을 의미하고, 현재 수산어류의 세균성 질병의 대부분을 차지하고 있다. 에드워드 감염증의 증상은 항문돌출, 안구돌출, 발적, 피부 출혈, 및 확장이 일어나고 복부가 팽만 되며 꼬리지느러미가 적변화되는 등의 증상이 있을 수 있다. 에드워드 감염증은 봄부터 가을까지 특히 수온이 높은 여름에 다발하고, 최근에는 순환여과시설이 확대돼 가온양식에 의한 고수온 사육으로 연중 발생되고 있으며, 대량 폐사를 초래하기도 하는 중요한 질병이다. 상기 *E. piscicida*는 에드워드 감염증의 원인균일 수 있다.
- [0050] 용어 "예방"이란 조성물의 투여로 *E. piscicida* 감염성 질병의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0051] 용어 "치료"란 조성물의 투여로 *E. piscicida* 감염성 질병에 의해 이미 유발된 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.
- [0052] 상기 어류용 항생 조성물은 추가로 수의학적으로 허용 가능한 담체를 1 종이상 포함할 수 있다. 수의학적으로 허용가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로오스 용액, 말토텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제, 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 제형화할 수 있다.
- [0053] 상기 어류용 항생 조성물이 사료 또는 사료 첨가제로서 사용되는 경우에는, 품질 저하를 방지하기 위하여 첨가하는 결합제, 유화제, 보존제 등이 더 포함될 수 있고, 효용 증대를 위하여 아미노산제, 비타민제, 효소제, 생균제, 향미제, 비단백태질소화합물, 규산염제, 완충제, 착색제, 추출제, 올리고당 등을 더 포함할 수 있으며, 그 외에도 사료 혼합제 등을 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 어류용 항생 조성물이 사료 또는 사료 첨가제로서 사용되는 경우에는, 곡물류, 근과류, 식품가공 부산물류, 조류, 섬유질류, 유지류, 전분류, 박류, 곡물부산물류, 단백질류, 무기물류, 유지류, 광물성류, 유지류, 단세포 단백질, 동물성플라크톤류, 어분 등의 사료 또는 사료첨가제와 혼합되어 사용될 수 있다.
- [0054] 상기 어류는 *E. piscicida* 감염에 대한 예방이 필요한 정상 어류이거나, 이미 *E. piscicida*에 감염되어 치료가 필요한 감염 어류일 수 있다. 또한, 상기 어류는 *E. piscicida*에 감염될 수 있는 모든 어류를 제한없이 통칭할 수 있다. 구체적으로 상기 어류는 넙치 (*Paralichthys olivaceus*), 방어 (*Seriola quinqueradiata*), 참돔 (*Pagrus major*), 자주복 (*Takifugurubripes*), 부시리 (*Seriola aureovittata*), 송어 (*Oncorhynchus masou*), 무지개 송어 (*Oncorhynchus mykiss*), 갯방어 (*Seriola dumerili*), 전갱이 (*Trachurus japonicus*), 흑점줄전갱이 (*Pseudocaranx dentex*), 능성어 (*Epinephelus septemfasciatus*), 참다랑어 (*Thunnus thynnus*), 잉어 (*Cyprinus carpio*), 제브라피쉬 (*Danio rerio*), 메기 (*Silurus asotus*), 클라리아스 가리에피누스 (*Clarias gariepinus*), 틸라피아 (*Oreochromis niloticus*), 연어 (*Oncorhynchus keta*), 대서양 연어 (*Salmo salar*), 및 송사리 (*Oryzias latipes*)를 포함할 수 있고, 바람직하게는 양식 어류일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0055] 상기 어류용 항생 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제, 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0056]
- [0057] 다른 양상은 (a) miRNA 24 및 트리폴리인산염 용액을 혼합하는 단계; (b) 키토산을 산성 용매에 용해시키는 단계; 및 (c) 상기 (a) 단계에서 얻어진 혼합액 및 상기 (b) 단계에서 얻어진 용액을 혼합하여 교반하는 단계를 포함하는 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0058] 상기 방법에 사용된 키토산은 전술한 바와 같다.
- [0059] 상기 (a) 단계에서 상기 트리폴리인산염은 트리폴리인산나트륨 (sodium tripolyphosphate; $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) 또는 트리폴리인산칼륨 (potassium tripolyphosphate; $\text{K}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$)일 수 있다.
- [0060] 상기 (a) 단계에서 상기 miRNA 24 및 트리폴리인산염은 약 1 : 2 내지 4, 1 : 3 내지 4, 또는 1 : 3 내지 3.5

의 중량비로 혼합되는 것일 수 있다. 일 구체예에 따르면, 상기 (a) 단계에서 상기 miRNA 24 및 트리폴리인산염이 상기 중량비로 혼합되는 경우, 상기 방법에 의하여 제조된 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자는 캡슐화 효율, 캡슐화 강도, 또는 miRNA 24 방출능이 현저히 우수하여, 어류의 생체 내 또는 세포 내로 유효성이 유지된 miRNA 24를 효과적으로 전달할 수 있고, 이로 인해, 어류의 박테리아 감염성 질병에 대한 예방 또는 치료 효과가 현저히 증가할 수 있다.

[0061] 또한, 상기 (a) 단계에서 상기 트리폴리인산염 용액의 농도 및 용매의 종류는 상기 miRNA 24 및 트리폴리인산염의 특성에 영향을 미치지 않으면서, 상기 트리폴리인산염을 용해시킬 수 있는 농도 및 용매이면 제한없이 허용될 수 있다.

[0062] 상기 (b) 단계에서 상기 산성 용매는 아세트산 (acetic acid), 말론산 (malonic acid), CMEBAC (N-carboxymethyl N,N-diethylbenzene ammonium chloride), 젖산 (lactic acid), 시트르산 (citric acid), 또는 아세트산 나트륨 (sodium acetate)일 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니다. 일 구체예에 따르면, 상기 (b) 단계에서 상기 산성 용매로서, 산성 용액, 예컨대, 아세트산 수용액을 사용할 수 있다. 상기 아세트산 수용액의 농도는 약 0.01 내지 2, 0.01 내지 1, 0.01 내지 0.1, 또는 0.03 내지 0.07 중량%일 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0063] 또한, 상기 (b) 단계에서는 상기 산성 용매에 상기 키토산을 약 1 내지 5, 1 내지 4, 또는 1 내지 3 mg/mL의 농도로 용해시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0064] 상기 (c) 단계에서, 상기 (a) 단계에서 얻어진 혼합액 및 상기 (b) 단계에서 얻어진 용액은 약 1 : 1 내지 3, 1 : 1 내지 2, 또는 1 : 1 내지 1.5의 중량비로 혼합되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0065] 상기 (c) 단계에서 수득된 혼합물에 포함된 상기 miRNA 24 및 키토산의 중량비는 약 1 : 6 내지 19, 1 : 6 내지 17, 1 : 6 내지 15, 1 : 6 내지 12, 1 : 7 내지 19, 1 : 7 내지 17, 1 : 7 내지 15, 1 : 7 내지 12, 1 : 8 내지 19, 1 : 8 내지 17, 1 : 8 내지 15, 1 : 8 내지 12, 1 : 9 내지 19, 1 : 9 내지 17, 1 : 9 내지 15, 1 : 9 내지 12, 1 : 9 내지 11, 또는 1 : 10일 수 있다. 일 구체예에 따르면, 상기 (c) 단계에서 수득된 혼합물에 포함된 상기 miRNA 24 및 키토산의 중량비가 상기 수치범위 내인 경우, 상기 방법에 의하여 제조된 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자는 캡슐화 효율, 캡슐화 강도, 또는 miRNA 24 방출능이 현저히 우수하여, 어류의 생체 내 또는 세포 내로 유효성이 유지된 miRNA 24를 효과적으로 전달할 수 있고, 이로 인해, 어류의 박테리아 감염성 질병에 대한 예방 또는 치료 효과가 현저히 증가할 수 있다.

[0066] 상기 (c) 단계에서는, 상기 키토산 및 트리폴리인산염이 가교 결합을 형성하여 키토산 나노입자를 형성할 수 있고, 상기 키토산 및 miRNA 24 사이에서 정전기적 상호작용, 예컨대, 이온성 결합이 형성되어, 상기 키토산 나노입자의 내부에 miRNA 24가 봉입되어 상기 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자가 형성되는 것일 수 있다.

[0067] 상기 방법은 상기 (c) 단계에서 수득된 혼합물을 원심분리하여 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자를 수득하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0068] 일 구체예에 따르면, 상기 방법에 의하여 제조된 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자는 *E. piscicida* 감염성 어류 질병에 대하여 예방 또는 치료 효과를 나타내는 것일 수 있다.

[0069] 또한, 일 구체예에 따르면, 상기 방법에 의하여 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자를 제조하는 경우, 현저히 우수한 캡슐화 효율 및 현저히 낮은 다분산성 지수를 나타내어, 입자의 크기가 균일하며 매우 안정적으로 캡슐화된 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자를 제조할 수 있다. 이로 인해, 상기 방법에 의하여 제조된 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자는 매우 안정적인 나노구 형태를 나타내어 내부의 miRNA 24를 외부 환경으로부터 강력하게 보호할 수 있다. 또한, 상기 방법에 의하여 제조된 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자는 입자의 크기가 나노 사이즈로 매우 작고 표면 양전하를 나타내므로, 생체 흡수율, 생체 이용률, 및 세포 투과성이 현저히 증가될 수 있고, 어류의 생체 또는 세포 내로 흡수된 후 키토산의 점진적인 생분해로 인해 miRNA 24를 지속적으로 방출하여 어류의 생체 내에서 miRNA 24의 효과를 지속적으로 유지시킬 수 있다.

[0070] 종합하면, 상기 방법에 의하여 제조된 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자는 외부 환경에 의한 영향을 차단하여 miRNA 24의 안정성을 현저히 향상시키고, 유효성이 유지된 miRNA 24를 어류 생체 내로 효과적으로 전달할 수 있으며, 이로 인해, *E. piscicida* 감염성 어류 질병에 대하여 현저히 증가된 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있다.

[0071] 상기 제조 방법에서 언급된 용어 또는 요소 중 상기 조성물에 대한 설명에서 언급된 것과 같은 것은, 앞에서 상

기 조성물에 대한 설명에서 언급된 바와 같은 것으로 이해된다.

[0072]

[0073] 다른 양상은 어류에 상기 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자를 유효성분으로 포함하는 *E. piscicida*에 대한 어류용 항생 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 *E. piscicida* 감염성 어류 질병을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0074] 상기 *E. piscicida* 감염성 질병은 에드워드 감염증 (Edwardsiellosis)일 수 있다.

[0075] 상기 예방 또는 치료 방법에서 언급된 용어 또는 요소 중 상기 조성물 또는 제조 방법에 대한 설명에서 언급된 것과 같은 것은, 앞에서 상기 조성물 또는 제조 방법에 대한 설명에서 언급된 바와 같은 것으로 이해된다.

발명의 효과

[0076] 일 양상에 따른 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자를 유효성분으로 포함하는 어류용 항생 조성물 및 이를 이용하는 방법에 의하면, 어류가 *E. piscicida*에 감염되는 경우, 어류 조직 내에서의 *E. piscicida*의 생존 또는 증식이 억제되고, 어류의 생존율이 현저히 증가되어 *E. piscicida* 감염성 어류 질병을 예방 또는 치료할 수 있다.

[0077] 또한, 상기 miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자는 miRNA 24의 안정성을 현저히 향상시키고, 유효성이 유지된 miRNA 24를 어류 생체 내로 효과적으로 전달할 수 있으며, 어류 조직 내에서 독성을 유발하지 않아 어류의 *E. piscicida* 감염성 질병을 매우 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있는 안전한 치료제로서 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0078] 도 1은 일 실시예에 따른 miRNA 24-CNPs의 구성 및 miRNA 24-CNPs로부터 miRNA 24가 방출되는 작용을 개략적으로 나타내는 도면이다.

도 2는 일 실시예에 따른 miRNA 24-CNPs의 제조 과정을 개략적으로 나타내는 도면이다.

도 3은 일 실시예에 따른 miRNA 24-CNPs의 제조를 위해 사용된 저분자량의 키토산 (low molecular weight chitosan: LMWC)의 화학식을 나타내는 도면이다.

도 4는 일 실시예에 따른 miRNA 24-CNPs에 대하여 전계방출형 주사전자현미경 (field emission scanning electron microscopy: FE-SEM) 촬영을 수행한 결과를 나타내는 도면이다 ((a): CNPs, 4000 x; (b): CNPs, 50000 x; (c): miRNA 24-CNPs, 4000 x; (d): miRNA 24-CNPs, 50000 x).

도 5는 일 실시예에 따른 miRNA 24-CNPs의 시간 경과에 따른 miRNA 24 방출 수준을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 6은 일 실시예에 따른 miRNA 24-CNPs의 (a) 캡슐화 강도 및 (b) 내부에 저장된 miRNA 24의 무결성 (integrity)을 평가한 결과를 나타내는 도면이다.

도 7은 일 실시예에 따른 miRNA 24-CNPs의 어류의 *E. piscicida* 감염에 대한 효과를 확인하기 위한 실험 과정을 개략적으로 나타낸 도면이다.

도 8은 일 실시예에 따른 miRNA 24-CNPs의 어류의 *E. piscicida* 감염에 대한 효과를 확인하기 위하여, miRNA 24-CNPs를 투여한 후 *E. piscicida*에 감염시킨 어류의 생존율을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 9는 일 실시예에 따른 miRNA 24-CNPs의 어류의 *E. piscicida* 감염에 대한 효과를 확인하기 위하여, miRNA 24-CNPs를 투여한 후 *E. piscicida*에 감염시킨 어류의 (a) 비장 및 (b) 신장 조직 내에서의 *E. piscicida* 억제 효과를 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 10은 일 실시예에 따른 miRNA 24-CNPs의 어류의 *E. piscicida* 감염에 대한 효과를 확인하기 위하여, miRNA 24-CNPs 투여 어류 및 miRNA 24-CNPs를 투여한 후 *E. piscicida*에 감염시킨 어류의 (a) 아가미 및 (b) 신장 조직 내에서의 내인성 miRNA 24의 발현 수준을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 11은 일 실시예에 따른 miRNA 24-CNPs의 어류 조직 내 독성 유발 여부를 확인하기 위하여, miRNA 24-CNPs가 투여된 어류로부터 채취된 내장 조직 절편에 대하여 PAS 염색을 수행하여, 조직의 병리적 상태 (즉, 내장 형태)를 확인한 결과를 나타내는 도면이다 ((a): NF H₂O 투여 정상 대조군; (b): CNPs 투여 비교 대조군; (c): miRNA 24-CNPs 투여 실험군; (d): miRNA 24 억제제 투여 대조군; 화살표는 술잔 세포 (goblet cells)를

의미함.).

도 12는 일 실시예에 따른 miRNA 24-CNPs의 어류 조직 내 독성 유발 여부를 확인하기 위하여, miRNA 24-CNPs가 투여된 어류로부터 채취된 내장 조직 절편에 대하여 PAS 염색을 수행하여, 조직 절편의 용모 하나에 존재하는 PAS-양성 술잔 세포의 수를 측정하여 술잔 세포의 변화를 확인한 결과를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

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

또한, 본 명세서에서 특별한 정의가 없으면, 본 명세서에 사용된 모든 과학적 및 기술적인 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 당업자에 의하여 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가질 수 있다.

실시예 1. miRNA 24가 봉입된 키토산 나노입자 (miRNA 24-CNPs)의 제조

키토산 나노입자 (chitosan nanoparticles: CNPs)의 내부에 miRNA 24가 봉입된 구조를 가지는 miRNA 24 및 CNPs의 복합체 (miRNA 24-CNPs)를 제조하였다.

도 1은 일 실시예에 따른 miRNA 24-CNPs의 구성 및 miRNA 24-CNPs로부터 miRNA 24가 방출되는 작용을 개략적으로 나타내는 도면이다.

도 2는 일 실시예에 따른 miRNA 24-CNPs의 제조 과정을 개략적으로 나타내는 도면이다.

도 3은 일 실시예에 따른 miRNA 24-CNPs의 제조를 위해 사용된 저분자량의 키토산 (low molecular weight chitosan: LMWC)의 화학식을 나타내는 도면이다.

구체적으로, 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 miRNA 24 약 300 μ g을 소듐트리폴리포스페이트 (sodium TPP (tripolyphosphate); $\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_{10}$) 용액 (약 0.83 mg/mL) 약 1.2 mL에 첨가하여 혼합하였다. 상기 miRNA 24는 GenePharma (Shanghai, China)에서 구매하여 이용하였다. 그 후, 상기 혼합액과 저분자량의 키토산 (low molecular weight chitosan: LMWC) 용액을 혼합하였다. 구체적으로, 저분자량의 키토산을 약 0.05 % 아세트산 (acetic acid) 수용액에 약 2 mg/mL의 농도로 용해시켜 얻어진 키토산 용액 약 1.5 mL 및 상기 miRNA 24와 소듐트리폴리포스페이트의 혼합액 약 1.2 mL를 혼합한 후, 상온에서 약 1시간 동안 교반하면서 혼합하였다. 그 후, 혼합액을 약 4℃ 및 약 12,000 rpm의 조건에서 약 30분 동안 원심분리한 후, 상층액을 제거하고 수득된 침강물에 대하여 전계방출형 주사전자현미경 (field emission scanning electron microscopy: FE-SEM) 분석을 수행하였다.

도 4는 일 실시예에 따른 miRNA 24-CNPs에 대하여 전계방출형 주사전자현미경 (field emission scanning electron microscopy: FE-SEM) 촬영을 수행한 결과를 나타내는 도면이다 ((a): CNPs, 4000 x; (b): CNPs, 50000 x; (c): miRNA 24-CNPs, 4000 x; (d): miRNA 24-CNPs, 50000 x).

그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, miRNA 24가 내부에 봉입된 구형의 키토산 나노입자 (miRNA 24-CNPs)를 수득하였음을 확인하였다.

실시예 2. miRNA 24-CNPs의 특성 분석

2.1 miRNA 24-CNPs의 입자 사이즈, 제타전위, 다분산성, 캡슐화 효율, 및 miRNA 24 방출 수준 분석

상기 실시예 1에서 제조된 miRNA 24가 내부에 봉입된 키토산 나노입자 (miRNA 24-CNPs)의 입자 사이즈, 제타전위 (zeta potential), 다분산성 (polydispersity), 캡슐화 효율 (encapsulation efficiency), 및 miRNA 24 방출 수준을 분석하였다.

구체적으로, miRNA 24-CNPs 약 1 mL을 pH 7.4 PBS에 현탁하고 현탁액의 입자 크기 분포, 다분산 지수 (PDI), 및 제타전위를 Zetasizer[®] Nano-ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK)를 이용하여 측정하였다. 또한, 캡슐화 효율 (%)은, 상기 실시예 1에서 최종 miRNA 24-CNPs를 수득하기 위해 원심분리한 후 회수된 상층액에 존재하는 비포집 miRNA 24의 농도를 측정하여 분석되었다. 상기 상층액에 존재하는 비포집 miRNA 24의 농도는 NanoDrop

One UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA)를 사용하여 약 260 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 결정되었다. miRNA 24를 포함하지 않는 CNP의 상층액에 대한 흡광도를 블랭크로 사용하였다. 캡슐화 효율 (%)은 하기에 따라 계산되었다:

[0095] 캡슐화 효율 (%) = (캡슐화된 miRNA 24의 질량 / 사용된 miRNA 24의 초기 질량) * 100.

[0096] 또한, 상기 miRNA 24-CNPs의 시간 경과에 따른 miRNA 24 방출 수준을 측정하기 위하여, 상기 miRNA 24-CNPs를 PBS 용액 (pH 7.4)에 첨가하여 약 20일 동안 약 37℃에서 교반하면서 혼합하였고, 5일 간격으로 혼합액의 샘플을 채취하여 원심분리한 후, NanoDrop One UV-Vis 분광광도계 (spectrophotometer)를 사용하여 상층액에 포함된 miRNA 24의 양을 측정하였다.

[0097] 도 5는 일 실시예에 따른 miRNA 24-CNPs의 시간 경과에 따른 miRNA 24 방출 수준을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0098] 그 결과, 상기 miRNA 24-CNPs의 입자 사이즈는 약 303.8±5.5 nm이고, 표면 전하는 양전하를 나타내며, 제타전위는 약 38.25±3.75 mV임을 확인하였다.

[0099] 또한, 상기 miRNA 24-CNPs의 다분산성 및 캡슐화 효율 분석 결과, 다분산성 지수 (polydispersity index: PD I)는 약 0.361±0.01로 현저히 낮고, 캡슐화 효율 (encapsulation efficiency: EE (%))은 약 100%로 현저히 높음을 확인하였다.

[0100] 더하여, 도 5에 나타난 바와 같이, 상기 miRNA 24-CNPs는 일정 기간 동안 miRNA 24를 지속적으로 방출할 수 있음을 확인하였다. 구체적으로, 상기 miRNA 24-CNPs는 약 20일 이상 동안 miRNA 24를 지속적으로 방출하여 miRNA 24-CNPs에 포함된 miRNA 24 전체 양의 약 40% 이상을 방출할 수 있음을 확인하였다. 이는 CNPs가 점진적으로 (gradually) 생분해되면서, CNPs와 miRNA 24 사이에서 형성되었던 강력한 정전기적 상호작용, 예컨대, 이온성 결합의 세기가 감소하여 miRNA 24가 방출되는 것으로 이해될 수 있다.

[0101] 본 실시예를 통해, 상기 miRNA 24-CNPs는, 도 1에 나타난 바와 같이, miRNA 24의 표면이 양전하의 CNPs로 코팅되어, 내부에는 miRNA 24가 존재하고, 외곽에는 양전하의 CNPs가 내부의 miRNA 24를 둘러싼 구조를 가지는, 표면 양전하를 나타내는 나노구 (nanosphere) 또는 구형의 나노입자임을 확인하였다.

[0102] 또한, 상기 실시예 1의 제조 방법에 의한 경우, 현저히 우수한 캡슐화 효율 및 현저히 낮은 다분산성 지수를 나타내어, 입자의 크기가 균일하며 매우 안정적으로 캡슐화된 나노 사이즈의 miRNA 24-CNPs를 제조할 수 있음을 확인하였다.

[0103] 더불어, 상기 miRNA 24-CNPs는 상술한 바와 같은 매우 안정적인 나노구 형태를 나타내어 내부의 miRNA 24를 외부 환경으로부터 강력하게 보호하면서도, 시간이 경과함에 따라 외곽의 CNPs가 점진적으로 생분해되면서 miRNA 24를 지속적으로 방출할 수 있음을 확인하였다.

[0104] 이로 인해, 상기 miRNA 24-CNPs는 외부 환경에 의한 영향을 차단하여 miRNA 24의 안정성을 현저히 향상시키고, 유효성이 유지된 miRNA 24를 어류 생체 내로 효과적으로 전달할 수 있음을 알 수 있었다. 또한, 상기 miRNA 24-CNPs는 입자가 매우 작고, 표면 양전하를 나타내므로 생체 흡수율, 생체 이용률, 및 세포 투과성을 증가시킬 수 있으며, 어류의 생체 또는 세포 내로 흡수된 후, CNPs의 점진적인 생분해로 인해 miRNA 24를 지속적으로 방출하여 어류의 생체 내에서 miRNA 24의 효과를 지속적으로 유지시킬 수 있음을 알 수 있었다.

[0105]

[0106] 2.2 miRNA 24-CNPs의 miRNA 24 및 키토산의 중량비에 따른 캡슐화 효율 분석

[0107] 상기 실시예 1의 제조 방법에 따라 miRNA 24가 내부에 봉입된 키토산 나노입자 (miRNA 24-CNPs)를 제조하였고, 이때, miRNA 24 및 키토산의 중량비를 달리하는 여러 종류의 miRNA 24-CNPs를 제조한 후, miRNA 24 및 키토산의 중량비 차이에 따른 캡슐화 효율 차이를 비교 분석하였다. 캡슐화 효율 분석은 상기 실시예 2.1에 기재된 방법과 동일한 방법으로 수행되었다.

[0108] 그 결과, 표 1에 나타난 바와 같이, miRNA 24-CNPs에 포함된 miRNA 24 및 키토산의 중량비가 약 1 : 6 내지 19, 구체적으로는, 약 1 : 10인 경우, 가장 우수한 효율로 캡슐화할 수 있음을 확인하였다.

표 1

번호	miRNA 24 (ug)	low molecular weight chitosan (mg)	weight ratio (miRNA 24 : chitosan)	encapsulation efficiency (%)
1	300	6	1 : 20	88.59%
2	300	3	1 : 10	90.80%
3	300	1.5	1 : 5	82.54%
4	300	0.75	1 : 2.5	70.56%

실시예 3. miRNA 24-CNPs의 캡슐화 강도 및 내부에 저장된 miRNA 24의 무결성 평가

상기 실시예 1에서 제조된 miRNA 24가 내부에 봉입된 키토산 나노입자 (miRNA 24-CNPs)의 캡슐화 강도, 즉, CNPs와 miRNA 24의 결합강도 및 내부에 miRNA 24를 유지하는 저장능을 평가하였다. 또한, 상기 miRNA 24-CNPs 내부에 저장된 miRNA 24가 온전한 상태로 유지되는지 여부, 즉, RNA 무결성 (integrity)을 평가하였다.

구체적으로, miRNA 24-CNPs의 캡슐화 강도를 확인하기 위하여, DNA 마커 (100 bp); miRNA 24 (naked miR-24) 약 1.5 µg; CNPs 약 10 µL; miRNA 24-CNPs 약 1.5 µg을 포함하는 현탁액 약 10 µL; 및 miRNA 24-CNPs와 분리된 원심분리 상청액 (miRNA 24-CNPs SN) 약 10 µL의 각 샘플에 약 2 µL의 6x 로딩 버퍼를 추가한 후, 각 샘플을 약 1%의 아가로스 겔에 로딩하여 전기영동 분석하였다. 또한, 상기 miRNA 24-CNPs 내부에 저장된 miRNA 24의 무결성을 확인하기 위하여, DNA 마커 (100 bp); miRNA 24 (naked miR-24) 약 1.5 µg; miRNA 24-CNPs 약 1.5 µg을 포함하는 현탁액 약 10 µL; miRNA 24 및 약 0.1 µL의 RNase A 용액 (10 mg/mL)을 혼합하여 약 37 °C에서 약 5분 동안 인큐베이션한 혼합액; miRNA 24-CNPs 약 1.5 µg을 포함하는 현탁액 약 10 µL 및 약 1.9 µL의 키토사나아제 (chitosanase)를 약 37°C에서 약 4시간 동안 인큐베이션한 혼합액; 및 miRNA 24-CNPs 약 1.5 µg을 포함하는 현탁액 약 10 µL 및 약 0.1 µL의 RNase A 용액을 약 37°C에서 약 5분 동안 인큐베이션한 혼합액의 각 샘플에 약 2 µL의 6x 로딩 버퍼를 추가한 후, 각 샘플을 약 1%의 아가로스 겔에 로딩하여 전기영동 분석하였다. 상기 RNase A는 약 5분 동안 약 60°C까지 온도를 높이면서 불활성화되었다.

도 6은 일 실시예에 따른 miRNA 24-CNPs의 (a) 캡슐화 강도 및 (b) 내부에 저장된 miRNA 24의 무결성 (integrity)을 평가한 결과를 나타내는 도면이다.

그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 상기 miRNA 24-CNPs의 캡슐화는 매우 견고하여, 내부의 miRNA 24가 쉽게 외부 환경에 노출되지 않음을 확인하였다. 또한, 상기 miRNA 24-CNPs의 CNPs가 키토사나아제 (chitosanase)에 의해 분해되어 방출된 miRNA 24는 원래의 상태를 온전하게 유지하여 RNA 무결성이 유지됨을 확인하였다. 더하여, 상기 miRNA 24-CNPs는 리보핵산가수분해효소 A (RNase A)에 의하여 miRNA 24가 분해되는 것을 막아 내부에 저장된 miRNA 24를 외부 효소로부터 보호함을 확인하였다.

본 실시예를 통해, 상기 miRNA 24-CNPs는 CNPs와 miRNA 24의 결합 강도 및 내부에 miRNA 24를 유지하는 저장능이 현저히 우수함을 알 수 있었다. 또한, 상기 miRNA 24-CNPs의 내부에 저장된 miRNA 24는 외부 환경 (예컨대 RNase A 등) 등에 의하여 영향을 받지 않고, 원래의 상태를 온전하게 유지하여 RNA 무결성이 유지된 채로 상기 miRNA 24-CNPs의 내부에 저장되어 있다가 방출됨을 알 수 있었다. 따라서, 상기 miRNA 24-CNPs는 miRNA 24를 외부 환경으로부터 보호하고, miRNA 24의 유효성을 유지한 채 miRNA 24를 어류의 생체 또는 세포 내로 전달시켜 어류의 감염성 질병을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있는 치료제로 활용될 수 있음을 알 수 있었다.

실시예 4. 어류의 *E. piscicida* 감염에 대한 miRNA 24-CNPs의 효과 확인

상기 실시예 1에서 제조된 miRNA 24가 내부에 봉입된 키토산 나노입자 (miRNA 24-CNPs)의 어류의 에드워드시엘라 피스시사 (*Edwardsiella piscicida*, *E. piscicida*) 감염성 질병에 대한 예방 또는 치료 효과를 확인하기 위하여, 어류에 상기 miRNA 24-CNPs를 투여한 후, *E. piscicida*에 감염시켜 어류의 생존율; 어류 조직 내에서의 내인성 miRNA 24의 발현 수준; 및 어류 조직 내에서의 *E. piscicida* 억제 효과를 분석하였다.

도 7은 일 실시예에 따른 miRNA 24-CNPs의 어류의 *E. piscicida* 감염에 대한 효과를 확인하기 위한 실험 과정을 개략적으로 나타난 도면이다.

[0121] 구체적으로, 도 7에 나타난 바와 같이, 어류 (zebrafish)에 상기 miRNA 24-CNPs를 i.p. 주입 (복강내 주사)한 후, 약 14시간 후에, *E. piscicida* 배양액 (약 9.7×10^6 CFU/mL) 약 20 μ L를 i.p. 주입하여 감염시켰다 (n=8/group). 그 다음, *E. piscicida* 감염 후, 약 77시간 동안 *E. piscicida*에 감염된 상기 어류의 생존율을 분석하고, *E. piscicida* 감염 후 약 77시간 후에 *E. piscicida*에 감염된 상기 어류로부터 조직 (아가미, 비장, 신장 등)을 채취하여 어류 조직 내에서의 내인성 miRNA 24의 발현 수준 및 *E. piscicida* 억제 효과를 분석하여, 상기 miRNA 24-CNPs의 어류의 *E. piscicida* 감염성 질병에 대한 예방 또는 치료 효과를 분석하였다. 정상 대조군으로 miRNA 24-CNPs 및 *E. piscicida* 모두를 주입하지 않은 정상 어류를 사용하였고, 비교 대조군으로 miRNA 24-CNPs의 주입없이 *E. piscicida*만을 주입하여 감염시킨 어류 및 miRNA 24-CNPs 대신에 miRNA 24 억제제를 주입한 후 *E. piscicida*를 주입하여 감염시킨 어류를 사용하였다.

[0122]

[0123] 4.1 *E. piscicida* 감염 어류의 생존율 분석

[0124] 상술한 바와 같이, 어류 (zebrafish)에 상기 miRNA 24-CNPs를 i.p. 주입한 후, 약 14시간 후에, *E. piscicida* 감염시킨 다음, *E. piscicida* 감염 후 약 72시간 동안 *E. piscicida*에 감염된 상기 어류의 생존 여부를 관찰한 후, 생존율을 분석하였다.

[0125] 도 8은 일 실시예에 따른 miRNA 24-CNPs의 어류의 *E. piscicida* 감염에 대한 효과를 확인하기 위하여, miRNA 24-CNPs를 투여한 후 *E. piscicida*에 감염시킨 어류의 생존율을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0126] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, 상기 miRNA 24-CNPs를 투여받은 어류는 *E. piscicida*에 감염되더라도, 정상 대조군과 유사한 수준으로 약 87% 이상의 현저히 높은 수준의 생존율을 나타냄을 확인하였다. 반면, 상기 miRNA 24-CNPs를 투여받지 않은 대조군 어류의 경우, *E. piscicida*에 감염되었을 때, 약 40% 이하의 현저히 낮은 수준의 생존율을 나타냄을 확인하였다. 또한, 상기 miRNA 24 억제제를 투여받은 어류는 *E. piscicida*에 감염되더라도, 약 68%의 생존율을 나타냄을 확인하였고, 이로 인해, 상기 miRNA 24-CNPs 투여는, miRNA 24 억제제의 투여와 비교하여, *E. piscicida* 감염시, 어류의 생존율을 더욱 현저히 증가시킬 수 있음을 확인하였다.

[0127] 본 실시예를 통해, 상기 miRNA 24-CNPs를 투여받은 어류는 *E. piscicida* 감염시, 어류의 생존율이 현저히 증가될 수 있음을 확인하였고, 이로 인해, 상기 miRNA 24-CNPs는 어류의 *E. piscicida* 감염성 질병에 대하여 예방 또는 치료 효과를 나타냄을 확인하였다.

[0128]

[0129] 4.2 어류 조직 내에서의 *E. piscicida* 억제 효과 분석

[0130] 상술한 바와 같이, 어류 (zebrafish)에 상기 miRNA 24-CNPs를 i.p. 주입한 후, 약 14시간 후에, *E. piscicida* 감염시킨 다음, *E. piscicida* 감염 후 약 72시간 후에, 조직 (비장, 신장 등)을 채취하여 각 조직에서의 *E. piscicida*의 CFU (colony forming units)/mg를 측정하여 *E. piscicida*에 대한 억제 효과를 분석하였다 (n=4/group).

[0131] 구체적으로, 각 그룹당 4마리의 제브라피쉬로부터 비장과 신장 조직은 분리되었고, PBS에서 균질화되었다. 균질물을 펩톤수로 연속 희석하고 TSA 플레이트에 플레이팅하고 약 25°C에서 약 16시간 동안 인큐베이션하였다. 배양 후, TSA 플레이트에 위에 생성된 *E. piscicida*의 집락 (colony)을 계수하여, CFU/mg를 측정하였다.

[0132] 도 9는 일 실시예에 따른 miRNA 24-CNPs의 어류의 *E. piscicida* 감염에 대한 효과를 확인하기 위하여, miRNA 24-CNPs를 투여한 후 *E. piscicida*에 감염시킨 어류의 (a) 비장 및 (b) 신장 조직 내에서의 *E. piscicida* 억제 효과를 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0133] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, 어류가 *E. piscicida*에 감염되는 경우, 정상 상태와 비교하여, 비장 조직에서 *E. piscicida*의 증식이 현저히 증가함을 알 수 있었고, 상기 miRNA 24-CNPs를 투여받은 어류는 *E. piscicida*에 감염되는 경우, miRNA 24-CNPs 비투여 대조군 및 miRNA 24 억제제 투여 대조군에 비하여 어류의 비장 조직 내에서 *E. piscicida*의 생존 또는 증식이 현저하게 억제되었음을 확인하였다 (도 9의 (a)). 반면, 어류가 *E. piscicida*에 감염되는 경우, 정상 상태와 비교하여, 신장 조직에서 *E. piscicida*의 증식의 증가 수준이 비교적 높지 않은 수준임을 알 수 있었고, 상기 miRNA 24-CNPs 투여군, miRNA 24-CNPs 비투여 대조군, 및 miRNA 24 억제제 투여 대조군은, 신장 조직에서의 *E. piscicida* 증식 정도에 있어서 유의한 차이가 없음을 확인하였다 (도 9의 (b)).

[0134] 본 실시예를 통해, 어류가 *E. piscicida* 감염시, 비장 조직에서 *E. piscicida*의 증식이 현저히 증가하고, 상기 miRNA 24-CNPs를 투여받은 어류는 *E. piscicida* 감염시, 비장 조직에서 *E. piscicida*의 생존 또는 증식이 현저하게 억제될 수 있음을 확인하였다. 이로 인해, 상기 miRNA 24-CNPs는, *E. piscicida* 감염 어류의 비장 조직에서 *E. piscicida*의 생존 또는 증식을 현저하게 억제시킴으로써, 어류의 *E. piscicida* 감염성 질병에 대하여 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다.

[0135]

[0136] 4.3 어류 조직 내에서의 내인성 miRNA 24의 발현 수준 분석

[0137] 상술한 바와 같이, 어류 (zebrafish)에 상기 miRNA 24-CNPs를 i.p. 주입한 후, 약 14시간 후에 상기 어류의 조직 (아가미, 신장 등)을 채취하여 내인성 miRNA 24의 발현 수준을 분석하였다. 또한, 어류에 상기 miRNA 24-CNPs를 i.p. 주입한 후, 약 14시간 후에 *E. piscicida* 감염시킨 다음, *E. piscicida* 감염 후 약 77시간 후에, 상기 어류의 조직 (아가미, 신장 등)을 채취하여 각 조직에서의 내인성 miRNA 24의 발현 수준을 분석하였다.

[0138] 구체적으로, 총 RNA는 제조사의 프로토콜에 따라 TRIzol[®] (Invitrogen, USA)을 사용하여 성체 제브라피쉬의 신장 및 비장 조직에서 추출되었다. RNA 농도는 NanoDrop One (Thermo Scientific, USA)을 사용하여 측정하였다. 첫 번째 가닥 cDNA는 Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit (TaKaRa[®], Japan)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 총 2 µg의 RNA를 사용하여 합성되었다. 간단히 말해서, 약 5 µL의 mRQ 버퍼 (2x), 약 2 µL의 총 RNA, 약 1.25 µL의 mRQ 효소, 및 약 1.75 µL의 뉴클레아제-프리 워터를 포함하는 총 10 µL의 혼합물을 약 37 °C에서 약 1시간 동안 인큐베이션한 다음, 효소를 비활성화하기 위해 약 5분 동안 약 85°C에서 반응시켰다. 그 후, 합성된 cDNA를 40 배 희석하고 약 -20°C에서 보관하였다. miRNA-24의 발현은 Mir-X miRNA qRT-PCR SYBR Kit (TaKaRa[®], Japan) 및 TaKaRa Thermal Cycler Dice TP 800 real-time system (TaKaRa[®], Japan)을 사용한 qRT-PCR 분석에 의해 결정되었다. 간단히 말해서, 약 3 µL의 cDNA, 약 12.5 µL의 SYBR Advantage Premix (2x), 약 0.5 µL의 miRNA 특이적 프라이머 (약 10 µM), 약 0.5 µL의 mRQ 3' 프라이머, 및 약 8.5 µL의 뉴클레아제-프리 워터를 포함하는 총 25 µL의 혼합물을 반응시켰다. U6 snRNA는 내부 참조로 사용되었다. 발현 수준 (expression fold)은 $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ 방법으로 계산되었다.

[0139] 도 10은 일 실시예에 따른 miRNA 24-CNPs의 어류의 *E. piscicida* 감염에 대한 효과를 확인하기 위하여, miRNA 24-CNPs 투여 어류 및 miRNA 24-CNPs를 투여한 후 *E. piscicida*에 감염시킨 어류의 (a) 아가미 및 (b) 신장 조직 내에서의 내인성 miRNA 24의 발현 수준을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0140] 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이, 상기 miRNA 24-CNPs를 투여받은 어류는 *E. piscicida*에 감염되는 경우, miRNA 24-CNPs 비투여 대조군에 비하여 어류의 조직 내에서 내인성 miRNA 24의 발현 수준이 현저하게 증가되었음을 확인하였다.

[0141] 본 실시예를 통해, 상기 miRNA 24-CNPs를 투여받은 어류는 *E. piscicida* 감염시, 어류의 조직 내에서 내인성 miRNA 24의 발현 수준이 현저하게 증가됨을 알 수 있었다. 이러한, 내인성 miRNA 24의 과발현은 염증 반응을 완화시킬 수 있는 바, 본 실시예를 통해, 상기 miRNA 24-CNPs는, 내인성 miRNA 24의 과발현을 유도함으로써, *E. piscicida* 감염 어류의 염증 반응을 완화시킬 수 있고, 이로 인해, 어류의 *E. piscicida* 감염성 질병에 대하여 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다.

[0142]

[0143] 실시예 5. miRNA 24-CNPs의 *In vivo* 안전성 분석

[0144] 상기 실시예 1에서 제조된 miRNA 24가 내부에 봉입된 키토산 나노입자 (miRNA 24-CNPs)의 안전성을 분석하기 위해, 어류에 상기 miRNA 24-CNPs를 투여한 후, 어류 조직 내에서의 독성 유발 여부를 분석하였다.

[0145] 구체적으로, 어류 (zebrafish)에 약 100 µg/mL 농도의 상기 miRNA 24-CNPs 용액 약 20 µL를 i.p. 주입한 후 약 14시간 후에, 상기 어류의 내장 (gut) 조직을 채취하였다. 채취된 조직을 종단하여 얻어진 조직 절편에 대하여 PAS 염색을 수행하였고, 조직의 병리적 상태 (즉, 내장 형태)를 대조군과 비교하여 상기 miRNA 24-CNPs의 안전성을 분석하였다. 또한, 상기 조직 절편의 용모 하나에 존재하는 PAS-양성 술잔 세포 (goblet cells)의 수를 측정하여 술잔 세포의 변화를 분석하였다. 정상 대조군으로 상기 miRNA 24-CNPs 대신 NF H₂O를 투여한 정상 어류를 사용하였고, 비교 대조군으로 상기 miRNA 24-CNPs 대신 CNPs 또는 miRNA 24 억제제를 투여한 어류를 사용

하였다.

[0146] 도 11은 일 실시예에 따른 miRNA 24-CNPs의 어류 조직 내 독성 유발 여부를 확인하기 위하여, miRNA 24-CNPs가 투여된 어류로부터 채취된 내장 (gut) 조직 절편에 대하여 PAS 염색을 수행하여, 조직의 병리적 상태 (즉, 내장 형태)를 확인한 결과를 나타내는 도면이다 ((a): NF H₂O 투여 정상 대조군; (b): CNPs 투여 비교 대조군; (c): miRNA 24-CNPs 투여 실험군; (d): miRNA 24 억제제 투여 대조군; 화살표는 술잔 세포 (goblet cells)를 의미함.).

[0147] 도 12는 일 실시예에 따른 miRNA 24-CNPs의 어류 조직 내 독성 유발 여부를 확인하기 위하여, miRNA 24-CNPs가 투여된 어류로부터 채취된 내장 조직 절편에 대하여 PAS 염색을 수행하여, 조직 절편의 용모 하나에 존재하는 PAS-양성 술잔 세포의 수를 측정하여 술잔 세포의 변화를 확인한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0148] 그 결과, 도 11 및 12에 나타난 바와 같이, 상기 miRNA 24-CNPs 투여 어류의 내장 조직과 정상 어류의 내장 조직의 병리적 상태 (즉, 내장 형태)에 있어서 큰 차이를 발견할 수 없음을 확인하였다. 또한, 상기 miRNA 24-CNPs 투여 어류의 내장 조직과 정상 어류의 내장 조직에 존재하는 술잔 세포의 수에 있어서 큰 차이를 발견할 수 없었던 반면, 상기 miRNA 24 억제제를 투여한 어류의 내장 조직에서는 정상 어류의 내장 조직에 비하여 술잔 세포의 수가 현저히 감소함을 확인하였다.

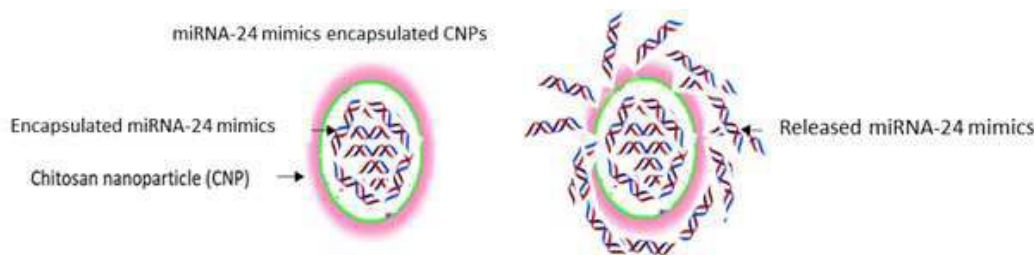
[0149] 본 실시예를 통해, 상기 miRNA 24-CNPs는 어류에 투여되었을 때 내장 생리 기능에 영향을 미치지 않음을 알 수 있었고, 이로 인해, 상기 miRNA 24-CNPs는 어류 조직 내에서 독성을 유발하지 않아 어류의 *E. piscicida* 감염성 질병을 예방 또는 치료할 수 있는 안전한 치료제로서 적용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0150]

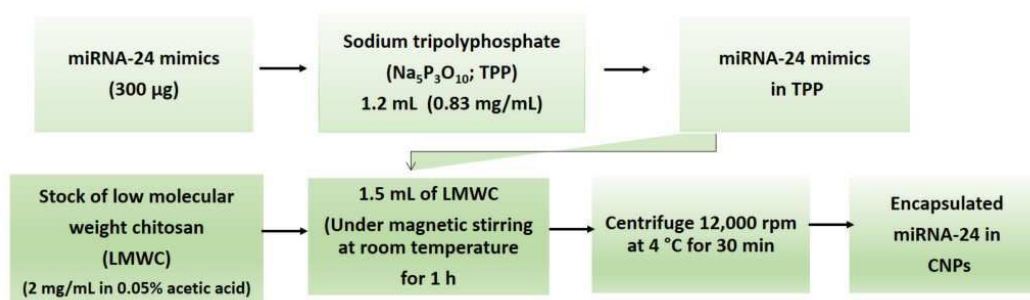
[0151] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

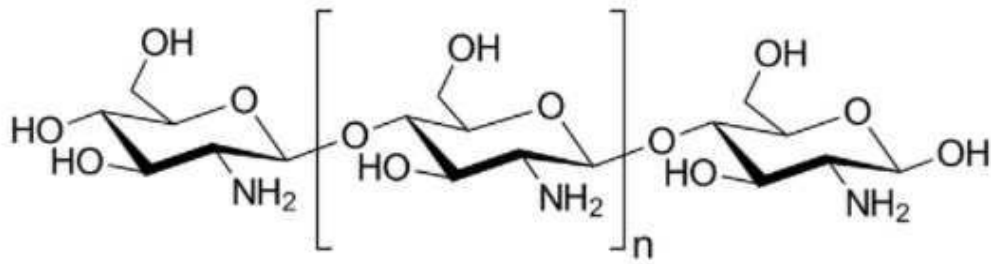
도면1



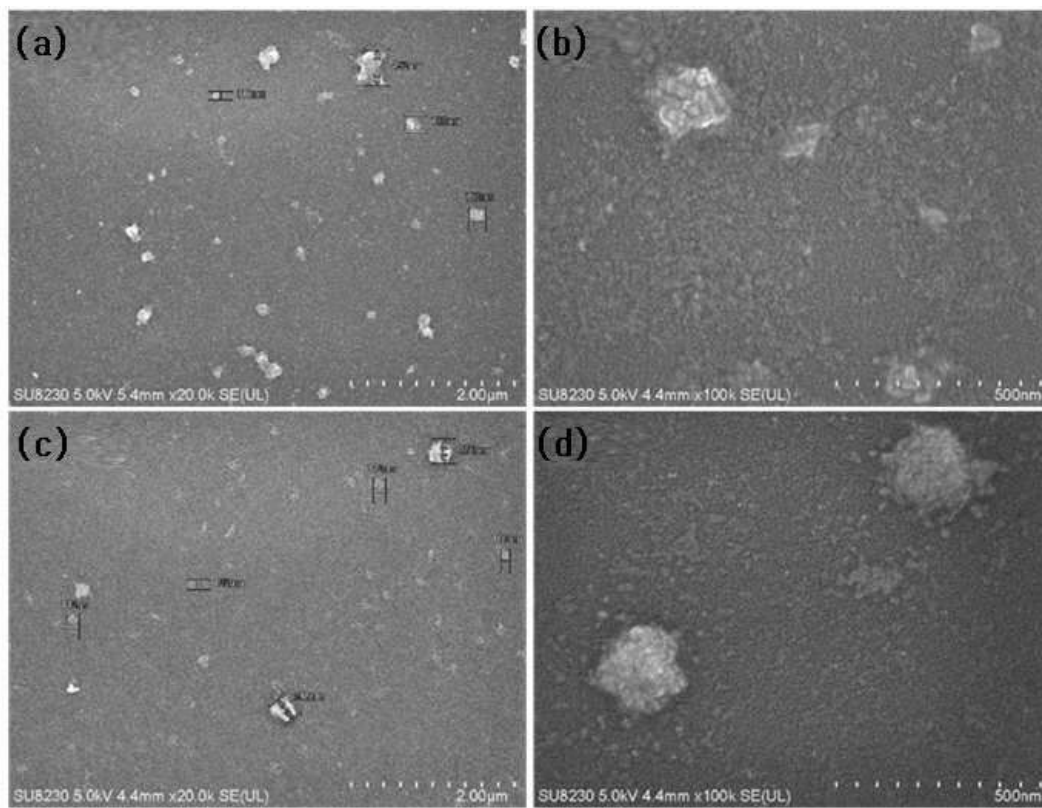
도면2



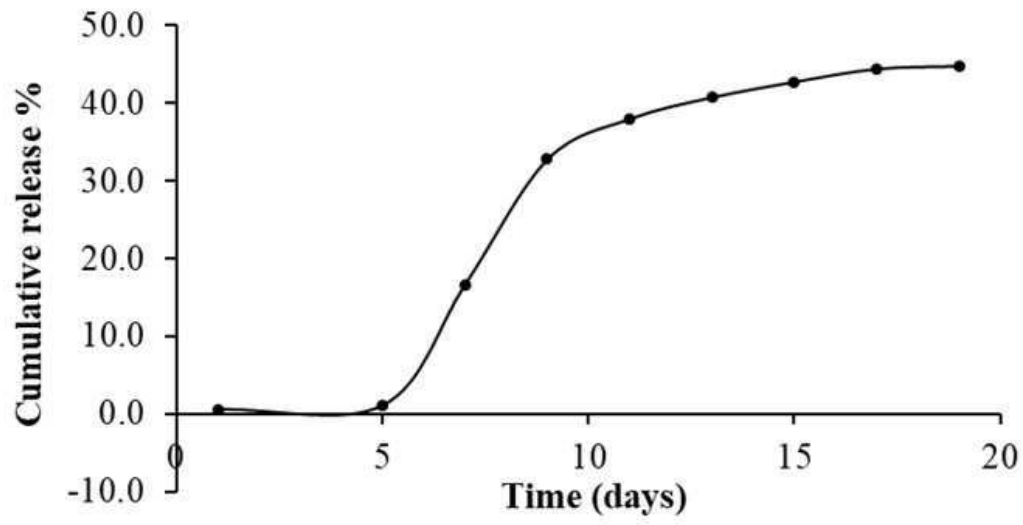
도면3



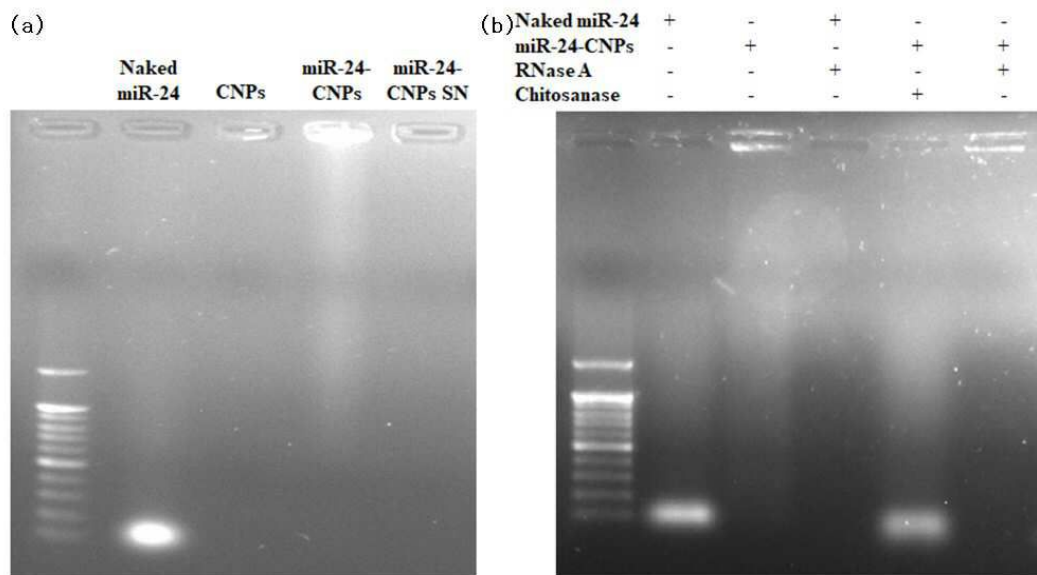
도면4



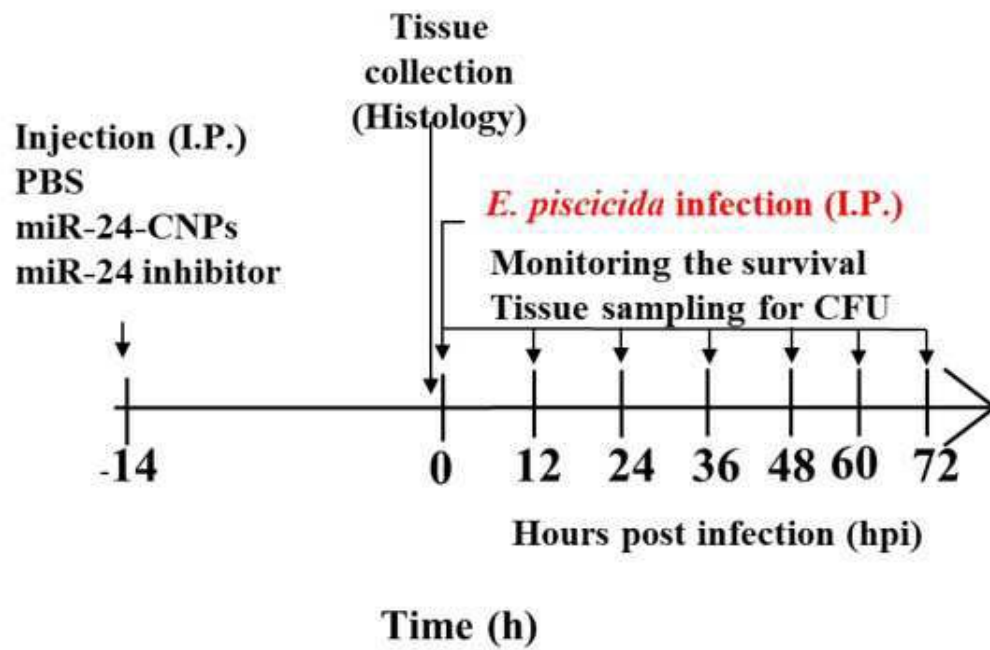
도면5



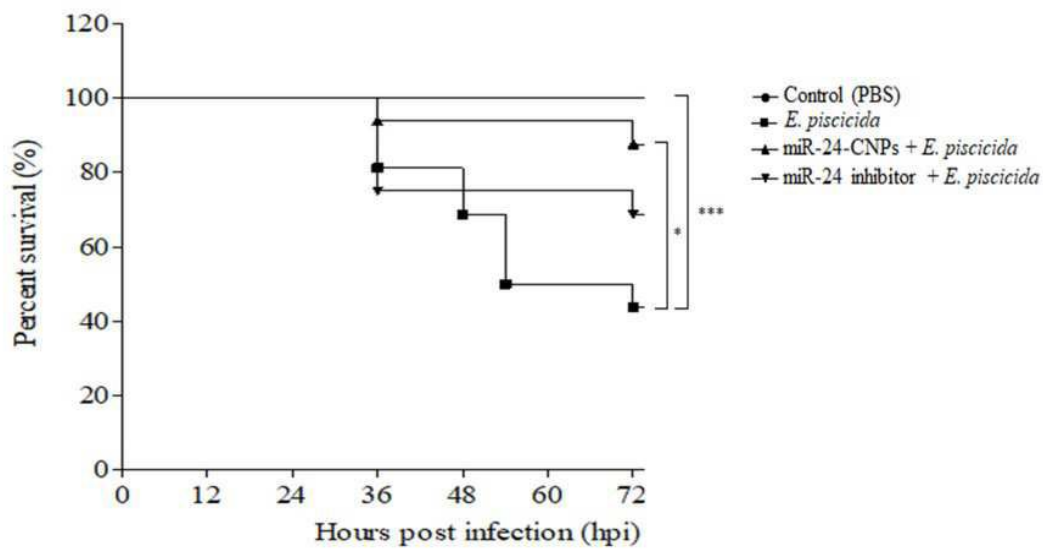
도면6



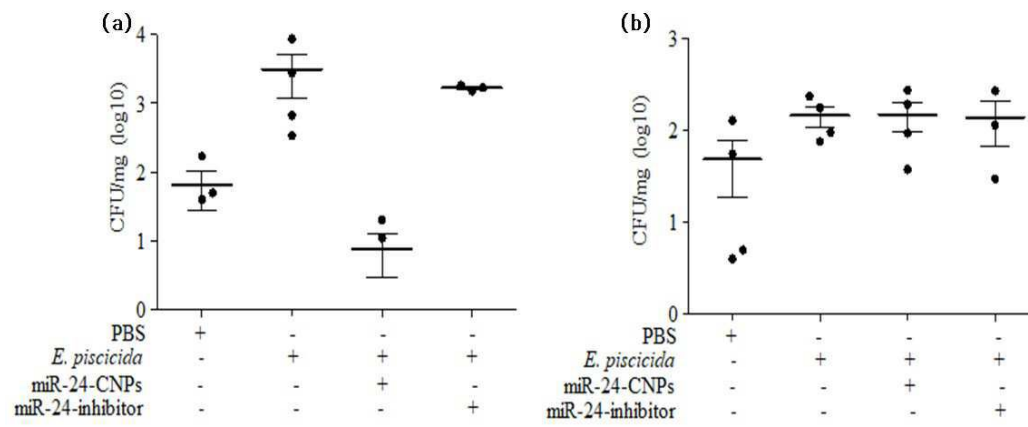
도면7



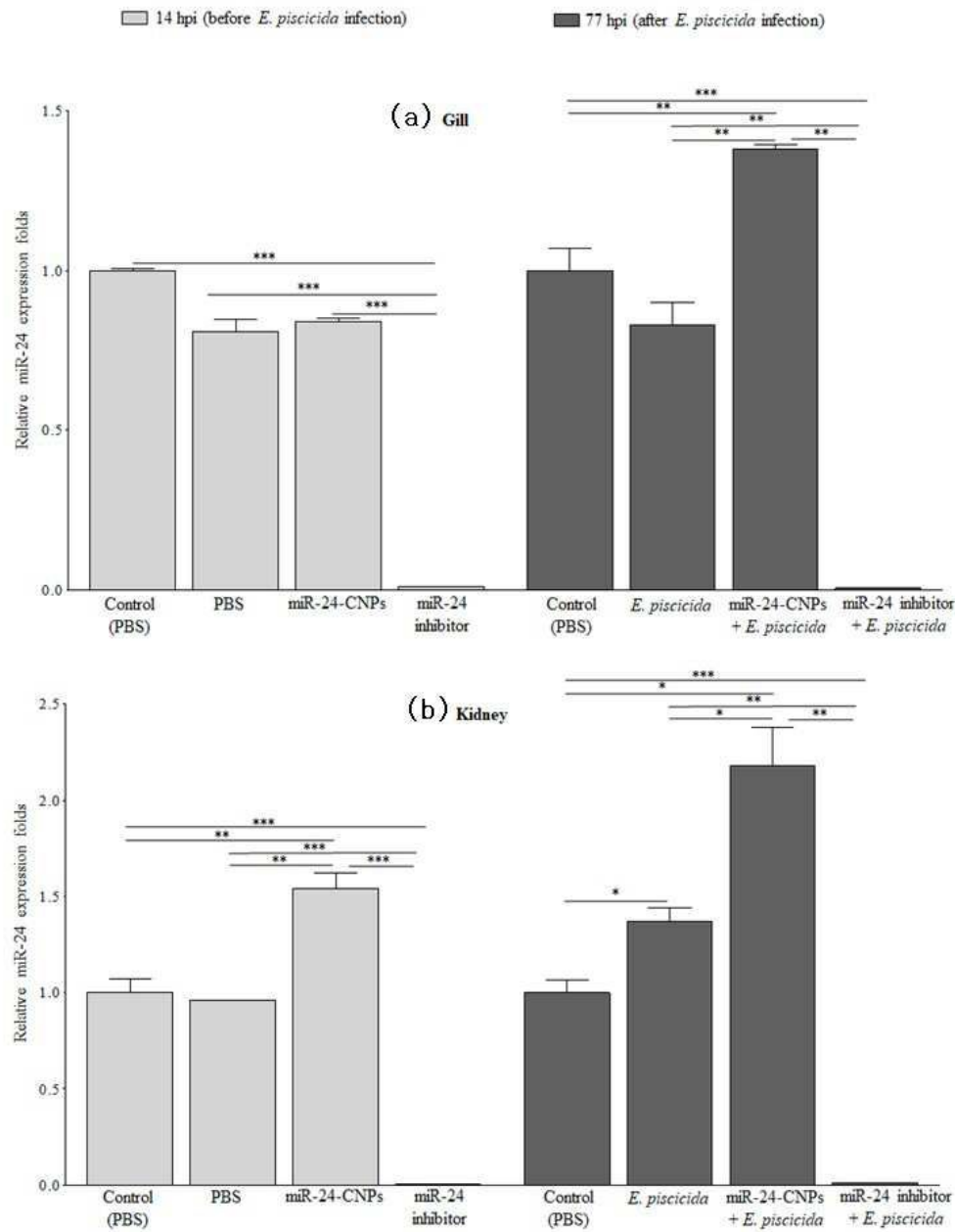
도면8



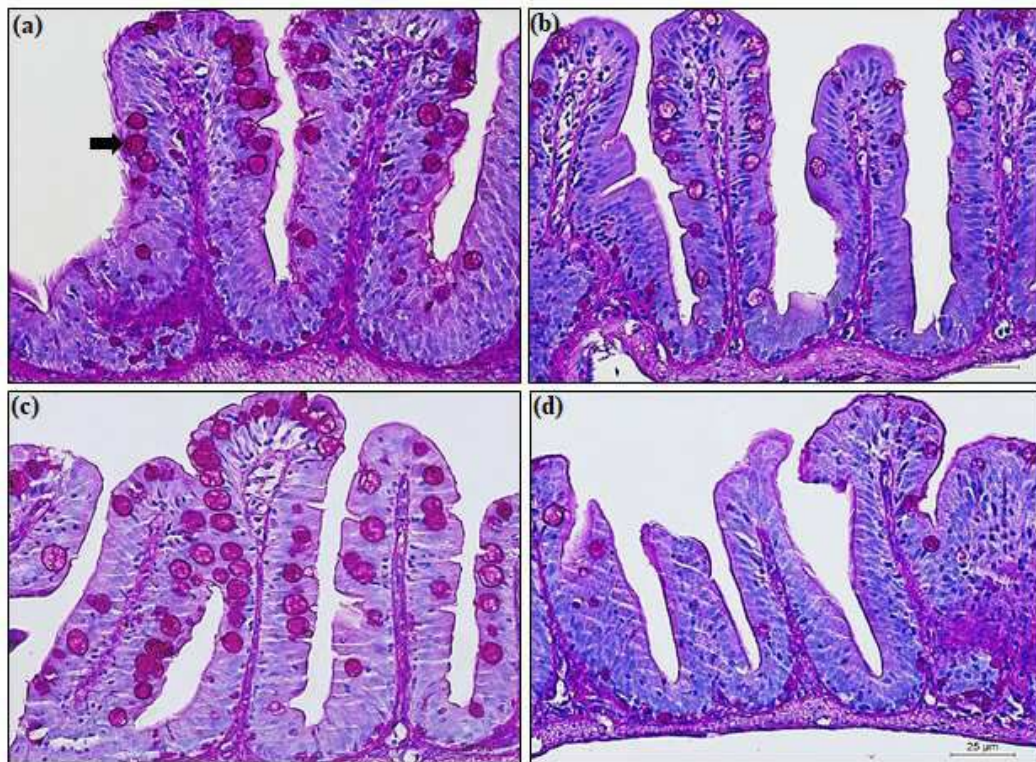
도면9



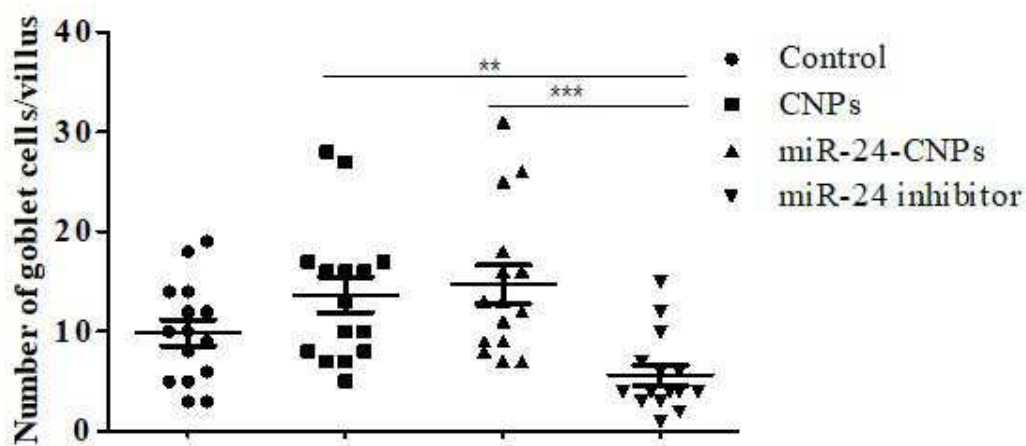
도면10



도면11



도면12



서열 목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> Antibiotic composition for fish against *Edwardsiella piscicida*
containing miRNA 24 encapsulated in chitosan nanoparticles as an
active ingredient
- <130> PN138336KR
- <160> 1

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> miRNA 24

<400> 1

uggcucaguu cagcaggaac ag

22