(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0009623
(43) 공개일자 2023년01월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/127 (2006.01) *A61K 31/575* (2006.01)
A61K 47/18 (2017.01) *A61P 37/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/1271 (2013.01)
A61K 31/575 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0090257
(22) 출원일자 2021년07월09일
심사청구일자 2021년07월09일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
이재영
서울특별시 관악구 봉천로 387, 110동 2001호(봉천동, 두산아파트)
이원화
대전광역시 유성구 죽동로298번길 36, 302호(죽동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 공간

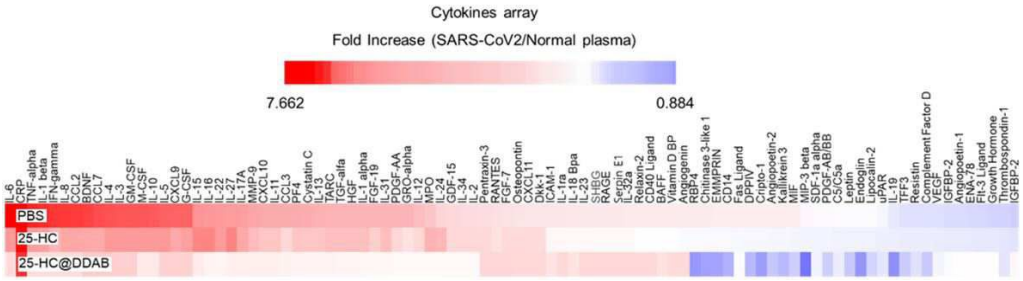
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **폐 표적 25-하이드록시 콜레스테롤 나노하이브리드를 포함하는 COVID-19 관련 사이토카인 폭풍 억제 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 폐 표적 25-하이드록시 콜레스테롤 나노하이브리드를 포함하는 COVID-19 관련 사이토 사이토카인 폭풍 억제 조성물에 관한 것으로, SARS-CoV-2 감염에 의한 폐 보호와 사이토카인 폭풍에 의한 중증화의 억제와 예방으로 이환율 및 사망률의 개선에 중요한 역할을 할 수 있다.

대 표 도 - 도9



(52) CPC특허분류
A61K 47/186 (2013.01)
A61K 47/6911 (2017.08)
A61K 9/5123 (2013.01)
A61P 37/00 (2018.01)

(72) 발명자
송규용
세종특별자치시 국책연구원1로 15, 906동 1905호(소담동, 새샘마을9단지)
이한솔
대전광역시 중구 태평로 35, 205-1801(태평동, 버드내마을아파트2단지)
김혜림
전라남도 순천시 해룡면 상대석길 13, 902동 302호(부영9차아파트)
안지선
대전광역시 동구 새울로 19, 203-1306(판암동)
유소열
대전광역시 유성구 온천북로 7, 102동 1093호(봉명동, 레자미 멀티홈)
문용현
대전광역시 유성구 유성대로821번길 27, 402호(장대동)
구장모
대전광역시 유성구 죽동로280번길 45, 302호(죽동)
이동환
대전광역시 유성구 유성대로811번길 36, 304호(장대동)
고석진
대전광역시 유성구 대학로75번길 12-16, 503호(궁동)
유지훈
대전광역시 유성구 온천로 45, 알파동 1530호(봉명동, 푸르지오 시티)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1009320
과제번호 2021R1C1C1009320
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부) (R&D)
연구과제명 종양미세환경 극복 및 암조직 표적화를 위한 재조합 히알루론산분해효소 융합단백질 기반 나노약물전달플랫폼
기 여 율 1/2
과제수행기관명 충남대학교
연구기간 2021.03.01 ~ 2026.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 200006896
과제번호 2021R1C1C200006896
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 신진연구지원사업 - 세종과학펠로우쉽
연구과제명 포스트 판데믹 질환 대비 예후 바이오마커 및 치료 후보물질 개발
기 여 율 1/2
과제수행기관명 한국생명공학연구원
연구기간 2021.03.01 ~ 2026.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드(Dimethyldioctadecylammonium bromide, DDAB) 및 25-하이드록시콜레스테롤(25-hydroxycholesterol, 25-HC)을 포함하는 나노하이브리드(Nanohybrids, NHs).

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 나노하이브리드(Nanohybrids, NHs)는

디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드(Dimethyldioctadecylammonium bromide, DDAB) 및 25-하이드록시콜레스테롤(25-hydroxycholesterol, 25-HC)을 메탄올 및 에탄올에 각각 용해시키는 단계 (1);

상기 1 단계에스 용해시킨 DDAB 및 25-HC 을 혼합하여 70 ℃에서 3 시간 동안 증발시키는 단계 (2); 및

상기 증발시키고 남은 고형물을 이중 탈이온수 (DDW)를 가하고 초음파 처리하여 재현탁시키는 단계(3)를 포함하는 나노하이브리드(Nanohybrids, NHs) 제조방법에 의하여 제조된 것을 특징으로 하는 나노하이브리드(Nanohybrids, NHs).

청구항 3

제1항에 있어서,

25-하이드록시콜레스테롤(25-hydroxycholesterol, 25-HC) 및 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드(Dimethyldioctadecylammonium bromide, DDAB)이 중량비 1 : 2~6인 것을 특징으로 하는 나노하이브리드(Nanohybrids, NHs).

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 나노하이브리드(Nanohybrids, NHs)는 간, 비장, 신장, 심장 및 폐로 이루어진 군으로부터 선택된 1 이상의 장기에 선택적으로 국소화하는 것을 특징으로 하는 나노하이브리드(Nanohybrids, NHs).

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 나노하이브리드(Nanohybrids, NHs)는 폐 선택적으로 국소화하는 것을 특징으로 하는 나노하이브리드(Nanohybrids, NHs).

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 나노하이브리드(Nanohybrids, NHs)를 포함하는 세균 또는 바이러스에 의하여 유도되는 사이토카인 폭풍 억제 또는 예방용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 사이토카인 폭풍 억제 또는 예방용 조성물은 25-하이드록시콜레스테롤(25-hydroxycholesterol, 25-HC)을 국소화되는 장기로 전달하는 것을 특징으로 하는 사이토카인 폭풍 억제 또는 예방용 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 바이러스는 COVID-19(coronavirus disease 2019, SARS-CoV-2), 스페인독감(H1N1), 조류독감(H5N1), 메르스(Middle East Respiratory Syndrome, MERS-CoV), 사스-코로나(SARS-CoV)로 구성된 군으로부터 선택된 1 이상인 것임을 특징으로 하는 사이토카인 폭풍 억제 또는 예방용 조성물.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 세균은 황색포도상구균(Staphylococcus aureus), 폐렴구균(Streptococcus pneumoniae), 헤모필루스 인플루엔자균(Haemophilus influenzae), 수막염균(Neisseria meningitidis), 폐렴막대균(Klebsiella pneumoniae), 대장균(Escherichia coli) 및 B군연쇄상구균(group B streptococci)으로 구성된 군으로부터 선택된 1 이상인 것임을 특징으로 하는 사이토카인 폭풍 억제 또는 예방용 조성물.

청구항 10

제6항에 있어서,

상기 사이토카인 폭풍 억제 또는 예방용 조성물은 세포 내 IL-6, CRP, TNF-alpha, IL-1 beta, IFN-gamma, IL-8, CCL2, BDNF, CCL7, IL-4, IL-3, GM-CSF, M-CSF, IL-10, IL-5, CXCL9, G-CSF, IL-15, IL-16, IL-22, IL-27, IL-17A, MMP-9, CXCL 10, IL-11, CCL3, PF4, Cystatin C, IL-13, TARC, TGF-alpha, HGF, IL-1 alpha, FGF-19, IL-31, PDGF-AA, GRO-alpha, IL-12, MPO, RBP4, Chitinase 3-like 1, EMMPRIN, CD14, DPPIV, Cripto-1, Angiopoetin-2, Kallikrein 3, MIF, MIP-3 beta, PDGF-AB/BB, Leptin, Endoglin, Lipocalin-2, uPAR, IL-19, TFF3, Resistin, 및 Complement Factor D로 이루어진 군으로부터 선택된 1 이상을 감소시키는 것을 특징으로 하는 사이토카인 폭풍 억제 또는 예방용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 폐 표적 25-하이드록시 콜레스테롤 나노하이브리드를 포함하는 COVID-19 관련 사이토카인 폭풍 억제 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 25-하이드록시 콜레스테롤 및 디도데실디메틸 암모늄브로마이드 (DDAB) 나노하이브리드(25-HC@DDAB)를 포함하는 폐 표적 COVID-19 관련 사이토카인 폭풍 억제 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 2019년 말 COVID-19의 발병 이후 과학자들은 코로나 바이러스 (COVID-19) 치료제를 개발하기 위해 노력해 왔으며, 이들 치료제 연구의 대부분은 중증 급성 호흡기 증후군 코로나 바이러스 2 (SARS-CoV-2) 자체를 제거하는 데 초점을 맞추고 있다. 그러나, 면역력이 저하된 환자가 특히 SARS-CoV-2에 취약하며, 사이토카인 폭풍(cytokine release syndrome, CRS)과 같은 심각한 합병증이 발생하여 과도하고 제어할 수 없는 염증 반응이 유발되는 점에서, 코로나 바이러스와 염증의 관계를 이해하는 것이 매우 중요하다.

[0003] 최근 SARS-CoV-2 감염에 의하여 I 형 인터페론(Type I interferons) 활성이 저하되고 생산이 감소되며, 이는 염증의 악화, 단핵구의 주화성, 다발성 장기 부전 및 사망을 유발하는 것이 보고되었다 (Hadjadj 등, 2020). 이에 따라 I 형 인터페론 수준을 중증 COVID-19의 고위험 환자를 선별하는 척도로 사용할 가능성이 제기되고 있다. I 형 인터페론은 면역 체계의 활동을 조절하는 데 도움이 되는 인터페론 단백질의 한 그룹으로, I 형 인터페론 수준은 콜레스테롤 25-하이드록실라제 (CH25H) 발현 조절과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다. CH25H는 탄소 위치 25에서 콜레스테롤의 하이드록 실화를 촉매하여 25-하이드록시 콜레스테롤 (25-HC)을 생성하는 효소이다. I 형 인터페론과 같은 사이토카인은 바이러스 감염에 의해 유발된 염증 반응을 억제하는 효과를 나타낸다. 즉, 바이러스 감염시 인터페론(IFN) 수용체와 JAK/STAT1 경로를 통한 I 형 IFN의 유도를 통해 CH25H의 발현이 증가하는데(McDonald 및 Russell, 2010), 이때 생성된 25-HC는 스테롤 조절 요소 결합 단백질 2 (SREBP2) 매개 사이토카인 생성 및 세포 사멸의 중요한 억제제 역할을 한다 (Xiao 등, 2013; Reboldi 등, 2014). 또한 CH25H가 결핍된 마우스는 SREBP2 활성화를 통해 증가된 호중구와 인플라좀 활동을 나타내는 패혈성 쇼크에 대하여 매우 취약하다는 것이 보고되었다 (Reboldi 등, 2014).

[0004] 한편, 1950 년대부터 바이러스 감염이 콜레스테롤 수치를 낮추는 것으로 잘 알려져 있으며 (Jacobs 등, 1997),

25-HC는 돼지 전염성 설사 바이러스 (PEDV)와 전염성 위장염 바이러스 (TGEV)를 포함한 코로나 바이러스에 대한 광범위한 항바이러스 활성을 가지고 있는 것으로 알려지기도 하였다 (Zhang 등, 2019). 그러나 25-HC의 바이러스 감염 시 유도되는 염증반응에서 대한 효과에 대한 연구는 미미한 실정이다.

[0005] 종래선행기술인 한국등록특허 제2126038호에는 25-하이드로콜레스테롤 또는 이의 유도체를 유효성분으로 함유하는 X-연관 부신백질이영양증 예방 또는 치료용 조성물가 기재되어 있으나, 본 발명의 목적, 구성 및 효과에서 차이가 있다. 또한 한국공개특허 제2008-0066962호에는 호흡기 질병을 치료하기 위한 폐 조직 내의 표적에결합하는 작용제가 기재되어 있으나, 역시 본 발명의 구성 및 효과에서 차이가 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제2126038호, 25-하이드로콜레스테롤 또는 이의 유도체를 유효성분으로 함유하는 X-연관 부신백질이영양증 예방 또는 치료용 조성물, 2020년06월17일 등록.

(특허문헌 0002) 한국공개특허 제2008-0066962호, 호흡기 질병을 치료하기 위한 폐 조직 내의 표적에결합하는 작용제, 2008년07월17일 공개.

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) J. Hadjadj, N. Yatim, L. Barnabei, A. Corneau, J. Boussier, N. Smith, H. Pere, B. Charbit, V. Bondet, C. Chenevier-Gobeaux, P. Breillat, N. Carlier, R. Gauzit, C. Morbieu, F. Pene, N. Marin, N. Roche, T.A. Szwebel, S.H. Merkling, J.M. Treluyer, D. Veyer, L. Mouthon, C. Blanc, P.L. Tharaux, F. Rozenberg, A. Fischer, D. Duffy, F. Rieux-Laucat, S. Kerneis, B. Terrier, Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients, Science, 369 (2020) 718-724.

(비특허문헌 0002) J.G. McDonald, D.W. Russell, J. Leukoc. Biol., Editorial: 25-Hydroxycholesterol: a new life in immunology, 88 (2010) 1071.

(비특허문헌 0003) H. Xiao, M. Lu, T.Y. Lin, Z. Chen, G. Chen, W.C. Wang, T. Marin, T.P. Shentu, L. Wen, B. Gongol, W. Sun, X. Liang, J. Chen, H.D. Huang, J.H. Pedra, D.A. Johnson, J.Y. Shyy, Sterol Regulatory Element Binding Protein 2 Activation of NLRP3 Inflammasome in Endothelium Mediates Hemodynamic-Induced Atherosclerosis Susceptibility, Circulation, 128 (2013) 632-642.

(비특허문헌 0004) A. Reboldi, E.V. Dang, J.G. McDonald, G. Liang, D.W. Russell, J.G. Cyster, 25-Hydroxycholesterol suppresses interleukin-1-driven inflammation downstream of type I interferon, Science, 345 (2014) 679-684.

(비특허문헌 0005) D.R. Jacobs, Jr., B. Hebert, P.J. Schreiner, S. Sidney, C. Iribarren, S. Hulley, Reduced cholesterol is associated with recent minor illness: the CARDIA Study. Coronary Artery Risk Development in Young Adults, Am J Epidemiol, 146 (1997) 558-564.

(비특허문헌 0006) Y. Zhang, Z. Song, M. Wang, M. Lan, K. Zhang, P. Jiang, Y. Li, J. Bai, X. Wang, Cholesterol 25-hydroxylase negatively regulates porcine intestinal coronavirus replication by the production of 25-hydroxycholesterol, Vet. Microbiol., 231 (2019) 129-138.

(비특허문헌 0007) K.-i. Kusumoto, T. Ishikawa, Didodecyldimethylammonium bromide (DDAB) induces caspase-mediated apoptosis in human leukemia HL-60 cells, J. Control. Release, 147 (2010) 246-252.

(비특허문헌 0008) D. Rittirsch, M.S. Huber-Lang, M.A. Flierl, P.A. Ward, Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture, Nat. Protoc., 4 (2009) 31-36.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 폐 표적 25-하이드록시 콜레스테롤 나노하이브리드를 포함하는 COVID-19 관련 사이토카인 폭풍 억제 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 과제를 해결하기 위하여 본 발명은 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드(Dimethyldioctadecylammonium bromide, DDAB) 및 25-하이드록시콜레스테롤(25-hydroxycholesterol, 25-HC)을 포함하는 나노하이브리드(Nanohybrids, NHs)를 제공한다.

[0010] 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드(Dimethyldioctadecylammonium bromide, DDAB)는 물에서 단층 소포(Unilamellar Vesicles, ULV) 또는 다중층 소포(multilamellar vesicles)를 형성하는 이중 사슬 4차 암모늄 계면활성제이다. 본 발명의 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드(Dimethyldioctadecylammonium bromide, DDAB) 및 25-하이드록시콜레스테롤(25-hydroxycholesterol, 25-HC)을 포함하는 나노하이브리드(Nanohybrids, NHs)는 친수성 머리와 소수성 꼬리가 있는 지질로 구성된 DDAB가 층상 지질 이중층으로 형성한 폐쇄소포체의 층상 내부에 25-HC가 함몰된 형태로 구성된다. 상기 나노하이브리드는 미셀, 마이크로스피어, 리포좀, 다층리포좀으로 형성될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0011] 상기 나노하이브리드(Nanohybrids, NHs)는 25-하이드록시콜레스테롤(25-hydroxycholesterol, 25-HC) 및 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드(Dimethyldioctadecylammonium bromide, DDAB)이 중량비 1 : 2~6인 것을 특징으로 하는 나노하이브리드(Nanohybrids, NHs)일 수 있다.

[0012] 상기 나노하이브리드(Nanohybrids, NHs)는,

[0013] 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드 (Dimethyldioctadecylammonium bromide, DDAB) 및 25-하이드록시콜레스테롤(25-hydroxycholesterol, 25-HC)을 메탄올 및 에탄올에 각각 용해시키는 단계 (1);

[0014] 상기 1 단계에서 용해시킨 DDAB 및 25-HC 을 혼합하여 70 ℃에서 3 시간 동안 증발시키는 단계 (2); 및

[0015] 상기 증발시키고 남은 고형물을 이중 탈이온수 (DDW)를 가하고 초음파 처리하여 재현탁시키는 단계(3)를 포함하는 나노하이브리드(Nanohybrids, NHs) 제조방법에 의하여 제조된 것일 수 있다.

[0016] 상기 노하이브리드(Nanohybrids, NHs)는 25-하이드록시콜레스테롤(25-hydroxycholesterol, 25-HC) 및 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드(Dimethyldioctadecylammonium bromide, DDAB)이 중량비 1 : 2~6일 수 있다. 중량비 1 : 2보다 낮을 경우, 전달되는 25-HC의 양이 적어 비효율적이거나 나노하이브리드의 크기가 너무 커질 수 있으며, 중량비 1 : 6보다 큰 경우, 나노하이브리드의 표면전하가 너무 높아 표적화에 바람직하지 않다. 바람직하게는 노하이브리드(Nanohybrids, NHs)는 25-하이드록시콜레스테롤(25-hydroxycholesterol, 25-HC) 및 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드(Dimethyldioctadecylammonium bromide, DDAB)의 중량비는 1 : 4이다.

[0017] 상기 나노하이브리드(Nanohybrids, NHs)는 간, 비장, 신장, 심장 및 폐로 이루어진 군으로부터 선택된 1 이상의 장기에 선택적으로 국소화하는 것을 특징으로 한다. 특히 상기 나노하이브리드(Nanohybrids, NHs)는 간, 신장 및 폐로 더욱 선택적으로 국소화하며, 상기 나노하이브리드(Nanohybrids, NHs)는 폐에 선택적으로 국소화 한다. 따라서 본 발명은 특히 폐 선택적으로 국소화하는 것을 특징으로 하는 나노하이브리드(Nanohybrids, NHs)를 제공한다. 그러나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0018] 본 발명은 상기 나노하이브리드(Nanohybrids, NHs)를 포함하는 사이토카인 폭풍 억제 또는 예방용 조성물을 제공한다. 상기 나노하이브리드에 포함되는 25-HC는 스테롤 조절 요소 결합 단백질 2 (SREBP2) 매개 사이토카인 생성 및 세포 사멸의 중요한 억제제로 작용할 수 있으며, 이에 따라 SREBP2 활성화를 통해 증가된 호중구와 인플라좀 활동을 억제할 수 있다. 특히 본 발명의 나노하이브리드(Nanohybrids, NHs)는 폐에 선택적으로 국소화하여 폐 조직의 SREBP2 활성을 억제할 수 있다.

[0019] SREBP2 활성을 억제는 SREBP2와 관련된 Nox2, Nrlp3, IL1b, Mcp1, Icam1 및 Srebp2의 발현 또는 활성 억제를 유도할 수 있다.

[0020] 본 발명의 사이토카인 폭풍 억제 또는 예방용 조성물은 25-하이드록시콜레스테롤(25-hydroxycholesterol, 25-HC)을 국소화되는 장기로 전달하는 것을 특징으로 한다.

[0021] 본 발명에서 사이토카인 폭풍은 외부에서 침투한 세균 또는 바이러스에 대항하기 위한 인체 내 면역체계의 과도

한 반응이 정상 세포까지 공격하여 일어나는 대규모 염증 반응을 의미하며 사이토카인 방출 증후군(cytokine release syndrome) 또는 고사이토카인혈증(hypercytoinemia)으로 불린다. 즉, 외부 바이러스 등의 침투에 의하여 면역 물질인 사이토카인의 과다 분비로 인해 발열이 과도하게 일어나는 반응이다. 그 결과, 정상세포가 면역세포에 의해 공격받을 수 있으며, 사이토카인 폭풍으로 면역체계가 과민 반응을 일으켜 신체조직을 파괴하는 과정에서 장기부전과 같은 2차 피해가 발생할 수 있다.

[0022] 상기 사이토카인 폭풍은 세균 또는 바이러스 감염에 의한 패혈증에 의하여 발생할 수 있다.

[0023] 상기 사이토카인 폭풍을 유도하는 바이러스는 COVID-19(coronavirus disease 2019, SARS-CoV-2), 스페인독감(H1N1), 조류독감(H5N1), 메르스(Middle East Respiratory Syndrome, MERS-CoV), 사스-코로나(SARS-CoV)일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0024] 상기 사이토카인 폭풍을 유도하는 세균은 황색포도상구균(Staphylococcus aureus), 폐렴구균(Streptococcus pneumoniae), 헤모필루스 인플루엔자균(Haemophilus influenzae), 수막염균(Neisseria meningitidis), 폐렴막대균(Klebsiella pneumoniae), 대장균(Escherichia coli) 및 B군연쇄상구균(group B streptococci)으로 이루어진 군으로부터 1 이상일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0025] 상기 사이토카인 폭풍 억제 또는 예방용 조성물은 세포 내 IL-6, CRP, TNF-alpha, IL-1 beta, IFN-gamma, IL-8, CCL2, BDNF, CCL7, IL-4, IL-3, GM-CSF, M-CSF, IL-10, IL-5, CXCL9, G-CSF , IL-15, IL-16, IL-22, IL-27, IL-17A, MMP-9, CXCL 10, IL-11, CCL3, PF4, Cystatin C, IL-13, TARC, TGF-alpha, HGF, IL-1 alpha, FGF-19, IL-31, PDGF-AA, GRO-alpha, IL-12, MPO, RBP4, Chitinase 3-like 1, EMMPRIN, CD14, DPPIV, Cripto-1, Angiopoetin-2, Kallikrein 3, MIF, MIP-3 beta, PDGF-AB/BB, Leptin, Endoglin, Lipocalin-2, uPAR, IL-19, TFF3, Resistin, 및 Complement Factor D로 이루어진 군으로부터 선택된 1 이상을 감소시키는 것을 특징으로 한다.

[0026] 본 발명은 폐 표적 25-하이드록시 콜레스테롤 나노하이브리드를 포함하는 COVID-19 관련 사이토카인 폭풍 억제 조성물을 제공한다.

[0027] 본 발명의 사이토카인 폭풍 억제 또는 예방용 조성물은 염증 혈관의 투과성을 감소시킬 수 있다.

[0028] 또한 본 발명의 사이토카인 폭풍 억제 또는 예방용 조성물는 C-반응성 단백질 (CRP), 젖산 탈수소 효소 (LDH), 알라닌 아미노 전이 효소 (ALT), 아스파르트 산 아미노 전이 효소 (AST) 및 크레아티닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 이상의 조직 손상 마커를 감소시킬 수 있다.

[0029] 본 발명의 사이토카인 폭풍 억제 또는 예방용 조성물은 Nox2, Nrlp3, IL1b, Mcp1, Icam1 및 Srebp2로 이루어진 군으로부터 선택된 1 이상의 SREBP2 관련 전사를 감소시킬 수 있다.

[0030] 상기 사이토카인 폭풍 억제 또는 예방용 조성물은 약학조성물로 제공될 수 있다. 상기 사이토카인 폭풍 억제 또는 예방용 조성물은 총 중량에 대하여 바람직하게는 0.001~50중량%, 더 바람직하게는 0.001~40중량%, 가장 바람직하게는 0.001~30중량%로 하여 첨가될 수 있다.

[0031] 상기 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 액제, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제, 감미제, 산미제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween)-61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0032] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 치료받을 대상의 연령, 성별, 체중과, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여 경로 및 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 0.01mg/kg/일 내지 대략 500mg/kg/일의 범위이다. 바람직한 투여량은 0.1mg/kg/일 내지 200mg/kg/일이며, 더 바람직한 투여량은 1mg/kg/일 내지 200mg/kg/일이다.

투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0033] 본 발명의 약학적 조성물은 쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사 및 피부 도포에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드(Dimethyldioctadecylammonium bromide, DDAB) 및 25-하이드록시콜레스테롤(25-hydroxycholesterol, 25-HC)을 포함하는 나노하이브리드(Nanohybrids, NHs) 또는 이를 포함하는 사이토카인 폭풍 억제 또는 예방용 조성물은 독성 및 부작용이 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

발명의 효과

[0034] 본 발명은 폐 표적 25-하이드록시 콜레스테롤 나노하이브리드를 포함하는 COVID-19 관련 사이토 사이토카인 폭풍 억제 조성물에 관한 것으로, SARS-CoV-2 감염에 의한 폐 보호와 사이토카인 폭풍에 의한 중증화의 억제와 예방으로 이환율 및 사망률의 개선에 중요한 역할을 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1은 25-HC@DDAB NHs의 폐 표적화를 나타낸 것이다. a. Cy5.5-loaded 25-HC@EPC (negatively-charged), 25-HC@DDAB/EPC (less positively-charged), and 25-HC@DDAB (high positively-charged) NHs의 물리화학적 특성. b. NHs의 크기 분포 다이어그램. c. 각 NH의 정맥주사 6 시간 후 Cys5.5-로딩된 NHs의 각 기관의 생체 외 이미지. d. 각 기관의 형광효율. e. 패혈증 모델 마우스에서 Cys5.5-로딩된 NHs의 전신 이미지. f. 패혈증 모델 마우스에서 Cys5.5-로딩된 NHs의 각 기관에서의 생체 외 이미지.

도 2는 폐 표적 25-HC@DDAB 나노하이브리드의 준비 및 평가를 나타낸 그림이다. a. 25-Hydroxycholesterol@Didodecyldimethylammonium bromide (25-HC@DDAB) 나노하이브리드의 제조 개략도, b. 25-HC@DDAB 나노하이브리드의 투과 전자 현미경 (TEM) 이미지. (스케일 바의 길이는 100nm), c. 25-HC@DDAB의 평균 유체 역학적 직경, 다분산지수, 및 제타 전위 값의 나노하이브리드의 특성을 나타낸 표. d. 25-HC@DDAB 나노하이브리드의 크기 분포 다이어그램. e. Cy5.5가 로드된 25-HC@DDAB의 정맥 투여 후 적출한 간, 비장, 신장, 심장 및 폐의 시간별 ex vivo 이미지. (n = 5). f. 각 기관의 상대 복사 효율. g. Cy5.5가 로드된 25-HC@DDAB의 정맥 투여 후 시간에 따라 Cy5.5가 첨가된 나노하이브리드 처리군의 폐에서 평균 복사 효율을 유리 Cy5.5 처리군과 비교한 그래프.

도 3은 마우스 폐 내피세포에서 25-HC@DDAB의 세포독성을 확인한 결과이다. a. 세포 내 콜레스테롤의 시각화를 위한 25-HC@DDAB 처리된 마우스 폐 내피 세포의 Filipin 염색. b 각 농도로 25-HC@DDAB 처리된 마우스 폐 내피 세포의 유세포 분석 결과.

도 4는 HUVECs 및 MRC5 세포주에서 25-HC@DDAB의 세포독성을 확인한 결과이다.

도 5는 본 발명의 25-HC@DDAB의 생체 내 독성 테스트 결과이다. a. 25-HC@DDAB를 마우스 모델에 투여하고 투여 48 시간 후 장기 손상 마커 변화. b. 혈구 수 변화.

도 6은 CLP 패혈증 마우스 모델에서 25-HC 및 25-HC@DDAB의 마우스 모델에 미치는 효과를 나타낸 것이다. a. 25-HC 및 25-HC@DDAB (n = 10 / 각 그룹)의 처리 후 시간 경과에 따른 맹장 결찰 및 천자 (CLP) 마우스 모델의 생존율. b. CLP 마우스 모델에서 폐 조직의 조직학적 분석. c. CLP 처리 후 25-HC 및 25-HC@DDAB 의 마우스 모델에서 염증 관련 시그니처의 변화 (혈청 25-HC 수준 (n = 10), 혈관 투과성 (n = 5), 폐 조직의 ICAM-1 (n = 5) 수준, 기관지 폐포 세척액(BAL) 에서 백혈구 (n = 5) 및 호중구 이동 (n = 5) 및 폐 조직에서 SREBP2 활성 (n = 10)). d. 패혈증 마커의 변화 (n = 5). e. SREBP2 관련 mRNA 발현의 변화. f. 사이토카인 수준의 변화.

도 7은 본 발명의 25-HC@DDAB이 중증 COVID-19 환자의 PBMC에서 사이토카인 폭풍에 대한 효과를 나타낸 것이다. a. 경증 및 중증 COVID-19 환자의 PBMC에서 CH25H 수준의 웨스턴 블롯 분석 (n = 5). b. CH25H mRNA 수준의 qRT-PCR 분석 (n = 10) c. 0.5 μM 및 1.0 μM 농도의 25-HC 및 25-HC@DDAB 처리에 의한 25-HC 수준 (n = 10). d. 중증 COVID-19 환자로부터 분리한 PBMC의 생존율에 대한 25-HC 및 25-HC@DDAB의 효과 (n = 10). e. ELISA에 의해 정량화 된 IL-1β 및 TNF-α의 생산 억제에 대한 25-HC 및 25-HC @ DDAB의 효과 (n = 5). f. 25-HC 및 25-HC @ DDAB 처리에 의한 사이토카인 어레이 분석 (n = 3) ** P <0.01. f. 중증 COVID-19 환자로부터 분리한 PBM에서 25-HC 또는 25-HC @ DDAB 1 μM 처리 후 SREBP2의 활성.

도 8은 중증 COVID-19 환자로부터 분리된 PBMC에서 1μM의 25-HC 또는 25-HC@DDAB 처리 후 IL-1β, TNF-α, NOX2, NRLP3, MCP1 및 SREBP2 사이토 카인 생성 및 염증과 관련된 mRNA 발현 수준을 나타낸 그래프이다.

도 9는 중증 COVID-19 환자로부터 분리된 PBMC에서 1μM의 25-HC 또는 25-HC@DDAB 처리 후 사이토 카인 어레이 분석결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 25-HC는 스테롤 조절 요소 결합 단백질 2 (SREBP2) 매개 사이토카인 생성 및 세포 사멸의 중요한 억제제로 보고되고 있다. 특히 콜레스테롤의 하이드록실화를 촉매하여 25-하이드록시 콜레스테롤 (25-HC)을 생성하는 효소인 CH25H가 결핍된 마우스는 패혈성 쇼크에 대한 취약성을 나타내는 것으로 알려져 있다.

[0037] 하기 표 1은 대한민국 대구 보건소에서 SARS-CoV-2 감염 진단을 받은 영남 대학교 병원에 입원한 환자 중, 경증(Mild) 및 중증(Severe) COVID-19 환자의 혈장 내의 각 콜레스테롤 수치를 나타낸 것이다. 표 1에서 보는 바와 같이, 중증 COVID-19 환자의 혈장에서는 25-HC, LDL, HDL 및 총 콜레스테롤 수치가 감소하여 전반적으로 혈장 콜레스테롤이 감소하는 경향을 보였다. 특히 25-Hydroxycholesterol의 경우 중증 환자의 혈장 내 농도는 경증 환자의 16%로 급감하였다. 또한 중증 환자의 경우, 모든 환자에게서 경증환자에서는 나타나지 않았던 패혈증이 나타났다.

표 1

Cholesterol level in COVID-19 patient Blood

[0038]

	Mild COVID-19 (n=10)	Severe COVID-19 (n=10)	p-value
Age	45.3 ± 19.8	76.5 ± 12.1	0.001
Sepsis	0	10	<0.001
25-Hydroxycholesterol 20-24 μg/ml	17.5 ± 10.5	2.8 ± 4.9	<0.01
LDL-Cholesterol (Normal: 100-129 mg/dL)	98.6 ± 14.2	65.7 ± 8.8	<0.01
HDL-Cholesterol (Normal: 60 mg/dL)	57.8 ± 13.4	40.8 ± 6.3	<0.01
Total Cholesterol (Normal: 200-239 mg/dL)	188.5 ± 15.7	137.1 ± 14.5	<0.01

[0039] 본 발명자들은 25-CH의 패혈증 및 사이토카인과의 관계를 바탕으로, 중증COVID-19 환자의 폐 조직으로 25-CH를 직접 타겟팅함으로써, COVID-19 관련 사이토카인 폭풍을 치료 또는 예방 효과를 증가시킬 수 있을 것으로 기대하고 본 발명을 완성하였다.

[0040] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 내용이 철저하고 완전해지고, 당업자에게 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공하는 것이다.

[0041] **<실시예 1 폐 표적 25-HC@DDAB 나노하이브리드의 제작>**

[0042] **1.1. 25-HC@DDAB, 25-HC@DDAB/EPC 및 25-HC@EPC 제조**

[0043] 25-HC는 낮은 수용해도 (≈ 224 ng/mL)로 인해 인체 투여 시, 적절한 용해 과정을 거쳐야 한다. 소포 형성 양친 매성 지질과 막 안정화 콜레스테롤로 구성된 기존의 리포좀 구조에서 영감을 받아 소포와 같은 형태를 나타내는 필름 수화 방법을 통해 25-HC @ DDAB를 성공적으로 제조하였다.

[0044] 먼저 25-HC를 폐 조직으로 표적화하기 위하여 전달체를 선별하였다. Dimethyldioctadecylammonium bromide (DDAB) 및 egg phosphatidylcholine (EPC)를 각각 메탄올에, 25-HC를 에탄올에 용해 시킨 후, DDAB/EPC/25-HC의 중량비가 0/4/1, 2/2/1 또는 4/0/1이 되도록 혼합하였다. 상기 혼합용액의 용매를 가열 블록 (Eyela MG-2200, Tokyo, Japan)을 사용하여 70℃에서 3 시간 동안 증발시킨 다음, 남은 고형물을 25-HC 최종 농도 1

mg/mL 가 되도록 이중 탈이온수 (DDW)를 가하고 20% amplitude, 펄스주기 2s on 및 3s off 조건으로 초음파 처리 (VC-750; Sonics & Materials, Inc. Newtown, CT, USA)하여 재현탁시켜 25-HC@DDAB 나노하이브리드 (Nanohybrid, NHs)를 제조하였다. 이후 모니터링을 위하여 Cy5.5를 로딩하였다.

[0045] 생성된 나노하이브리드 (NHs)의 입자 크기, 다분산 지수 및 제타 전위는 제조업체의 프로토콜에 따라 Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical, Malvern, UK)로측정하여 도 1a 및 1b에 나타내었다. 도 1a 및 1b에서 보는 바와 같이 NHs의 입자크기는 25-HC@DDAB/EPC가 가장 작았으며, 다분산성은 세 종류의 NHs에서 비슷하게 나타났다. 그러나, 표면 전하의 경우, 25-HC@EPC는 평균 -32.15 mV의 음전하를 띠는 반면, 25-HC@DDAB는 평균 94.37 mV로 양전하를 띠었다. 25-HC@DDAB/EPC 는 25-HC@DDAB 보다는 작은 양전하(66.73 mV)를 나타내었다.

[0046] **1.2. 25-HC@DDAB, 25-HC@DDAB/EPC 및 25-HC@EPC 의 폐 표적화**

[0047] 상기 실시예 1.1에서 제조한 Cy5.5 로딩된 25-HC@DDAB, 25-HC@DDAB/EPC 및 25-HC@EPC의 폐 표적화를 확인하였다.

[0048] **맹장 결찰 및 천자 (Cecal ligation and puncture, CLP) 패혈증 동물 모델의 준비**

[0049] 6-7 주령, 무게 18-20g의 수컷 C57BL/6 마우스는 Orient Bio Co. (한국 성남)에서 구입했다. 4 주령, 체중 21-24g의 수컷 ICR 마우스와 5 주령, 무게 18-22g의 암컷 BALB/c 누드 마우스는 나라 바이오텍 (한국 서울)에서 구입했다. 동물에는 12:12 시간의 명암주기 하에 20-25℃ 및 40% - 45%로 제어된 온도 및 습도 하에서 폴리카보네이트 케이지 당 5 마리를 수용하고 정상적인 설치류 펠릿 사료를 공급하고 물을 임의로 공급되었다. 모든 동물은 12 일간의 순응 기간 후 실험에 사용하였으며 충남대학교에서 발행한 실험 동물 관리 및 사용 지침 (IRB No.; CNU-01050)에 따라 처리하였다.

[0050] 마우스 패혈증 모델 제작을 위해 마우스에 맹장 결찰 및 천자(CLP)를 시행하였다. 수컷 마우스를 소형 설치류 가스 마취 기계 (RC2, Vetequip, Pleasanton, CA)를 통해 전달된 산소에 2% 이소플루란 (Forane, JW Pharmaceutical, South Korea)을 혼합하여 먼저 호흡실에서, 다음으로는 안면 마스크를 통해 흡입하도록 하여 마취시켰다. 마우스는 시술 중에 자발적으로 숨을 쉴 수 있었다. CLP로 유도된 패혈증 모델은 Rittirsch 등 (2009)이 설명한 대로 준비되었다. 간략히 설명하면, 2cm 중간선 절개를 만들어 맹장과 인접한 장을 노출시킨 후, 맹장 끝으로부터 5.0mm 떨어진 곳에 3.0 실크 봉합사로 단단히 결찰하였고, 높은 등급의 패혈증을 유도하기 위해 22 게이지 바늘을 사용하여 한 번 뚫었다. 이후 천공 부위에서 소량의 대변을 밀어 내고 천공된 장을 복강으로 돌려 놓은 후, 개복술 부위를 4.0 실크로 봉합하였다. 샴 대조군 동물에서 맹장은 노출시켰으나 결찰되거나 천공시키지 않고 복강으로 돌려 놓았다.

[0051] **25-HC@DDAB의 폐 표적화 생체 외 이미징**

[0052] 수컷 ICR 마우스에 유리 Cy5.5가 로딩된 25-HC@DDAB, 25-HC@DDAB/EPC 및 25-HC@EPC을 35 μg/kg의 Cy5.5 용량으로 꼬리 정맥을 통해 주사하였다. 주사 후 3, 6 및 12 시간의 각 시점에서 각각 3 마리의 마우스를 희생시키고 그들의 간, 비장, 신장, 심장 및 폐를 적출하여 생체 외 영상화에 사용하였다. VISQUE® InVivo Smart (Vieworks, Anyang, Korea)를 사용하여 상기에서 얻은 장기의 형광 강도를 측정하여 도 1c에 나타내고 각 기관의 형광효율을 계산하여 도 1d에 나타내었다. 도 1c 및 도 1d에서 보는 바와 같이, 25-HC@DDAB, 25-HC@DDAB/EPC 및 25-HC@EPC 모두 간, 신장 및 폐에 국소화되었으며, 특히 25-HC@DDAB가 폐에 선택적으로 국소화되었음을 확인하였다.

[0053] NHs의 폐 국소화는 정전 기적 상호 작용을 통한 적혈구 (RBC)와의 일시적인 응집에 의해 설명될 수 있다. 보다 구체적으로, 말초 정맥을 통해 투여된 NHs는 먼저 RBC를 만나고, NH (양전하)와 RBC (음전하) 사이의 정전 기적 매력으로 인해 일시적인 응집체가 혈류에서 생성될 수 있으며, 이는 폐 순환으로 관류된다. 입자 크기가 큰 일시적 응집체는 폐 모세관에 유지되어 NHs의 폐 체류 가능성을 높일 수 있다. 특히 음전하를 띠거나 양전하가 덜한 대조군 NH는 25-HC@DDAB에 비해 폐 분포가 현저히 저하된 것으로 나타났는데, 이는 NH의 폐 국소화가 양전하 제타 전위에 기인할 수 있음을 의미한. 마우스 폐 조직 용해물은 또한 25-HC 단독보다 25-HC@DDAB의 전달시 더 높은 수준의 25-HC를 나타내어 본 발명의 25-HC@DDAB 나노하이브리드(NHs)가 25-HC의 폐 전달에 더욱 효율적인 것을 보여준다. 따라서 이러한 25-HC의 효육적인 폐 국소화는 본 발명의 25-HC@DDAB가 호흡기 질환 치료에 효율적인 도구가 될 수 있음을 시사한다.

[0054] **25-HC@DDAB의 폐 표적화 생체 내 이미징**

[0055] 생체 내 이미징을 위해 CLP BALB/c 누드 마우스에 Cy5.5 로딩된 25-HC@DDAB를 35 μg/kg의 Cy5.5 용량으로 투

여하고, 주사 후 30, 90 및 120 분에 전신 스캔을 수행했다. 흉부 부위의 복사 효율은 CleVue™ 소프트웨어(Vieworks)를 사용하여 측정하여 도 1e에 나타내었다. 또한 간, 비장, 신장, 심장 및 폐를 적출하여 생체 외 영상화하여 도 1f에 나타내었다. 도 1e 및 도 1f에서 보는 바와 같이, 25-HC@DDAB가 폐 특이적으로 국소화됨을 확인하였다.

[0056] **1.2. 폐 표적화 25-HC@DDAB의 최적화**

[0057] **25-HC@DDAB 최적화**

[0058] 상기 실시예 1.1.에서 폐 표적화가 가장 효과적인 것으로 확인한 25-HC@DDAB의 최적화된 나노하이브리드를 제작하였다.

[0059] 본 발명의 25-HC@DDAB 나노하이브리드의 제조 개략도를 도 2a에 나타내었다. DDAB 및 25-HC를 각각 메탄올 및 에탄올에 용해시킨 후, DDAB/25-HC 중량비가 2, 4 또는 6의 되도록 혼합하였다. 상기 혼합용액의 용매를 가열 블록 (Eyela MG-2200, Tokyo, Japan)을 사용하여 70℃에서 3 시간 동안 증발시킨 다음, 남은 고형물을 25-HC 최종 농도 1 mg/mL가 되도록 이중 탈이온수 (DDW)를 가하고 20% amplitude, 펄스주기 2s on 및 3s off 조건으로 초음파 처리 (VC-750; Sonics & Materials, Inc. Newtown, CT, USA)하여 재현탁시켜 25-HC@DDAB 나노하이브리드(Nanohybrid, NHs)를 제조하였다.

[0060] 상기에서 제조된 25-HC@DDAB 나노하이브리드의 형태를 확인하기 위하여 극저온에서 투과 전자 현미경 (Talos L120C; FEI, Hillsboro, OR, USA)을 사용하여 관찰하고 이를 도 2b에 나타내었다. 샘플 (5 μL)을 플런지 디핑 방법으로 탄소 코팅된 구리 그리드의 표면에 놓고 액체 질소로 냉각된 액체 에탄을 사용하여 유리화했다. 이후 샘플을 탄소 코팅된 구리 그리드의 표면에 놓고 우라닐 아세테이트로 네거티브 염색하였다. 도 2b에서 보는 바와 같이, 25-HC@DDAB 나노하이브리드가 일정 형태로 제조된 것을 확인하였다.

[0061] 본 발명의 25-HC@DDAB 나노하이브리드의 입자 크기, 다분산 지수 및 제타 전위는 제조업체의 프로토콜에 따라 Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical, Malvern, UK)로 측정하고 그 결과를 도 2c 및 2d에 나타내었다.

[0062] 약물 캡슐화 효율 (EE)을 측정하기 위하여 상기 제조된 NHs 현탁액의 25-HC 농도를 Kinetex C18 컬럼 (4.6mm × 250mm, 5μm; Phenomenex, Torrance, CA, USA)을 장착한 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC) 시스템 (Agilent 1260 infinity; Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)을 사용하여 측정하였다. 크로마토그래피 분리는 등용매 용출 모드 (유속 : 1.8 mL/분)에서 수행되었으며, 여기서 이동상은 아세토니트릴과 DDW (80:20, v/v)로 구성되었다. 25-HC의 검출 파장은 205 nm이었다. 분석 샘플은 에탄을 (40 x 부피)로 25-HC @ DDAB를 파괴하여 준비되었다. 주입량 및 정량 하한 (LLOQ)은 각각 20 μL 및 1 μg/mL이었고, 25-HC의 머무름 시간과 총 실행 시간은 각각 7.8 분과 10.0 분이었다. 25-HC의 캡슐화 효율은 상기 고성능 액체 크로마토 그래피 분석을 통해 101.7 ± 1.3 %로 측정되었다. Cy5.5는 형광 프로브로 나노하이브리드에 로드되었으며, 평균 직경은 204.2 ± 4.1 nm 였다.

[0063] 도 2c 및 2d에서 보는 바와 같이, 동적 광산란 분석 결과, DDAB/25-HC 중량비가 4 인 나노하이브리드 (NHs)는 최적의 평균 직경이 126.5 ± 2.3 nm (다 분산 지수 [PDI] 0.26 ± 0.01)이고 양전하 제타 전위가 93.81 ± 3.76 mV인 것으로 나타났다. DDAB/25-HC 중량비가 2 또는 6 인 NH는 입자 크기가 더 크거나 (179.3 ± 8.6 nm) 더 넓은 크기 분포 (PDI 0.72 ± 0.10)를 나타내었다. 또한, 25-HC의 캡슐화 효율(EE)은 고성능 액체 크로마토그래피 분석을 통해 101.7 ± 1.3 %로 측정되었다. Cy5.5는 형광 프로브로 나노 하이브리드에 로드되었으며, 평균 직경은 204.2 ± 4.1 nm였다 (도 2c 및 2d).

[0064] **25-HC@DDAB 폐표적화**

[0065] 수컷 ICR 마우스에 유리 Cy5.5 또는 Cy5.5가 로딩된 25-HC@DDAB을 35 μg/kg의 용량으로 꼬리 정맥을 통해 주사하였다. 유리 Cy5.5 주사를 제외하고는 상기 생체외 이미징 방법과 동일한 방법을 적용하였다.

[0066] DMSO에 1 mg/mL의 농도로 용해된 Cy5.5 저장 용액 7 μL을 식염수 993 μL와 혼합, 희석하여 유리 Cy5.5 주사 용액을 제조하였다. 주사 후 3, 6, 9, 12, 24 및 48 시간의 각 시점에서 각각 마우스를 희생시키고 그들의 간, 신장, 비장, 심장 및 폐를 절개하여 생체 외 영상화에 사용하였다. VISQUE® InVivo Smart (Vieworks, Anyang, Korea)를 사용하여 상기에서 얻은 장기의 형광 강도를 측정함으로써 유리 Cy5.5 또는 Cy5.5 로딩된 25-HC@DDAB의 생체 분포를 모니터링하여 도 2e에 나타내었다(n=5). 또한 시간별 상대 복사 효율을 측정하여 도 2f에 나타내었다. 이때 간, 비장, 신장, 심장 및 폐의 3 시간에 대한 복사 효율 값의 합은 100 %로 설정하였다. 도 2e 및 도 2f에서 보는 바와 같이, 25-HC@DDAB는 선택적으로 폐 표적화하는 것을 확인하였다. Cy5.5를 로딩한

NH 처리군의 폐에서 평균 복사 효율을 투여 후 경과 시간에 따라 유리 Cy5.5 처리 군과 비교하여 도 2g에 나타내었다. 도 2g에서 보는 바와 같이, 25-HC@DDAB에 Cy5.5를 로딩한 경우, 유리 Cy5.5보다 복사 효율이 높은 것을 확인할 수 있다.

[0067] **<실시예 2 폐 표적화 25-HC@DDAB의 세포독성 확인>**

[0068] **2.1 마우스 폐 내피세포에서 세포독성 확인**

[0069] **마우스에서 내피 세포의 분리**

[0070] 항-CD31 항체 및 Dynal Magnetic 홀더에 연결된 Dynabeads를 사용하여 제조업체 (Dynal Biotec, Lake Success, NY)의 지침에 따라 내피 세포를 분리했다. 먼저, 내피세포 분리를 위해 4 ~ 6 마리의 마우스 (6 ~ 10 주령)를 마취한 다음 폐를 적출하였다. 적출된 폐를 RPMI 배지에 넣고 다른 조직을 제거한 다음, PBS에서 한 번 세척하였다. 이 후, 1.0 mg/mL의 콜라게나아제 A와 함께 1 시간 동안 37 ℃에서 흔들며 배양하였다. 이 배양 동안 5 분마다 튜브를 몇 초 동안 부드럽게 흔들었다. 다음, 현탁액을 70 μm 조직체 (BD Falcon)를 통과시키고 새로운 50 mL 튜브로 옮겼다. 여과된 세포 현탁액을 1000 rpm에서 10 분 동안 원심 분리하여 상청액을 제거한 후, 세포 펠렛을 새로운 15 mL 튜브에서 차가운 PBS로 1 회 세척했다.

[0071] Dynabead와 결합된 anti-mouse CD31 항체를 준비하기 위해 Dynabeads (60 μL)를 마그네틱 홀더 (Invitrogen)에서 MACS 버퍼 (PBS, 0.5 % BSA, 2mM EDTA)로 세척했다. Dynabeads를 MACS 완충액 (600 μL)으로 재현탁하고 안티 마우스 CD31 (비드 10 μL 당 5 μg)을 첨가하고 혼합물을 4 ℃에서 12 시간 동안 배양했다. 세포를 실온에서 10 분 동안 Dynabead 결합 항-마우스 CD31 항체와 함께 배양 한 다음 자석 홀더에 넣었다. 세포 현탁액을 15mL 튜브에 천천히 첨가하여 5 분 동안 배양한 후, PBS를 조심스럽게 제거했다. Dynabead-결합된 항-마우스 CD31 항체를 차가운 PBS에서 3 회 세척하고, 펠릿을 EBM-2 성장 배지에 재현탁한 다음, 수확하여 얼음 위에 프로테아제 억제제 칵테일 (Roche)을 포함하는 RIPA 완충액에 용해시켰다.

[0072] **마우스에서 내피세포에서 폐 표적화 25-HC@DDAB의 세포독성 확인**

[0073] Filipin 은 콜레스테롤에는 결합하지만 에스테르화된 스테롤에는 결합하지 않는 천연 형광성 폴리엔 항생제이다. 상기 분리한 마우스 폐 내피세포를 Nunc Lab-Tek II 8-Chamber Slide에 접종하고 PBS(대조군), 25-HC 및 25-HC@DDAB를 0, 0.1, 1 및 10 μM의 농도로 24 시간 동안 처리하였다. 세포를 실온에서 1 시간 동안 4% 파라포름알데히드로 고정시킨 다음, 10 분 동안 0.5% Triton X-100 으로 투과를 용이하게 했다. 이후, 3% 소혈청 알부민(bovine serum albumin, BSA), 0.1% Tween-20이 포함된 PBS의 차단 완충용액으로 12 시간 동안 차단시켰다. 차단 완충액에 Filipin statining 염료를 넣고 4℃에서 밤새 세포를 배양하였다. 이후, 세포를 PBS로 세척한 후, Immu-mount로 장착하고, 형광 현미경으로 200x 배율로 시각화하여(Leica microsystem, Germany) 도 3a에 나타내었다.

[0074] 또한 상기 분리한 마우스 폐 내피세포를 0, 0.1, 1 및 10 μM 농도의 25-HC@DDAB로 24 시간 동안 처리하고 LIVE/DEAD™ Fixable Far Red Dead Cell Stain Kit (L34973, Invitrogen™)를 사용하여 염색했다. 그 후 세포를 PBS로 2 회 세척하였다. 염색된 세포를 1 mL의 PBS에 재현탁하고 FACScan 유세포 분석기 (BD)를 사용하여 형광을 정량화하여 도 3b에 나타내었다.

[0075] 도 3a 및 도 3b에서 보는 바와 같이, 25-HC@DDAB 처리에 의하여 마우스 폐 내피세포 내에 25-HC가 증가하였으며, 세포독성은 나타나지 않았다.

[0076] **2.2 HUVECs 및 MRC5 세포주에서 세포독성 확인**

[0077] 시험관 내 배양된 인간 폐 내피세포 (HUVEC) 및 인간 태아 폐 섬유아세포 세포주 (MRC5)에서 25-HC@DDAB의 세포독성 효과를 평가했다. HUVEC 및 MRC5 세포를 0, 0.1 및 1.0 μM의 농도로 25-HC 및 25-HC@DDAB에 노출시키고, WST-1 시약을 웰당 10 μL를 첨가하고 37℃에서 5% CO_2로 배양했다. 세포 활성도를 측정하여 도 4에 나타내었다. 도 4에서 보는 바와 같이 HUVEC 및 MRC5 세포에서도 25-HC@DDAB의 세포독성은 관찰되지 않았다.

[0078] **2.3 생체 내 세포독성 확인**

[0079] 25-HC@DDAB의 생체 내 독성 테스트를 실시하였다. 25-HC@DDAB를 마우스 모델에 투여하고 투여 48 시간 후 장기 손상 마커 및 혈구수를 관찰하였다. 생화학 키트 (MyBioSource Inc., San Diego, Inc.)를 사용하여 장기 및 조직 손상마커인 젖산 탈수소효소(LDH), 알라닌 아미노 전이효소 (ALT), 아스파테이트 아미노 전이효소 (AST), 혈액 요소 질소 (BUN) 및 크레아티닌을 측정하였으며, 마우스 모델의 백혈구 (WBC), 호중구 (ANC), 림프구 (ALC)

및 단핵구를 포함한 혈액 세포 수를 계수하여 도 5a 및 5b에 나타내었다. 도 5a 및 5b에서 보는 바와 같이, 25-HC@DDAB는 마우스 모델에서 특별한 장기 또는 조직 손상을 일으키지 않았다.

[0080] **<실시예 3 CLP 동물 모델에서 폐 표적화 25-HC@DDAB의 효과 확인>**

[0081] **3.1 CLP 동물 모델에서 폐 표적화 25-HC@DDAB의 생존율 및 폐조직에 미치는 효과 확인**

[0082] **CLP 동물 모델의 생존율**

[0083] CLP로 유도된 패혈증 모델은 상기 실시예 1과 동일하게 맹장과 인접한 장을 노출시킨 후 결찰, 천자하여 준비하였으며, 샴 대조군 동물에서 맹장은 노출시켰으나 결찰시키거나 천공시키지 않고 복강으로 돌려놓았다. CLP 시행 6 시간 후에 25-HC 및 25-HC@DDAB (1 μM)를 정맥 내로 투여했다.

[0084] 샴 대조군, CLP 처치군, 정상적인 설치류 펠렛 사료를 공급하고 물을 임의로 공급하며 관찰하고 생존 결과를 도 6a에 나타내었다. 도 6a에서 보는 바와 같이, CLP 처치 군, 96 시간 째에 100% 폐사하였다 (n=10). 그러나 25-HC 처리는 CLP 마우스의 생존율을 30% 증가시켰으며, 25-HC@DDAB는 50% 증가시킨 것을 확인하였다.

[0085] **헤마톡실린 및 에오신 염색**

[0086] 수컷 C57BL/6 마우스를 CLP 시행 6 시간 후에 25-HC 및 25-HC@DDAB (1 μM)를 정맥 내로 투여했다 (n = 5). 상기 마우스는 CLP 시행 96 시간 후 안락사시키고, 각 마우스에서 폐 샘플을 적출하였다. 적출한 폐는 PBS (pH 7.4)에서 3 회 세척하여 남아있는 혈액을 제거하고 4% 포름 알데히드 용액 (Junsei, Tokyo, Japan)으로 4℃에서 20 시간 동안 고정했다. 고정 후, 샘플을 에탄올 시리즈를 통해 탈수하고 파라핀에 매립하고 4-μm 섹션으로 절단하여 슬라이드에 배치했다. 슬라이드를 60℃ 오븐에서 탈파라핀화하고 재수화하여 헤마톡실린 (Sigma)으로 염색했다. 과도한 염색을 제거하기 위해 슬라이드를 0.3% 산성 알코올에 3 회 빠르게 담근 후 에오신 (Sigma)으로 대조 염색했다. 이후, 에탄올 시리즈와 자일렌으로 세척한 다음, 커버를 올리고 맹검 관찰을 통해 폐 표본의 광학 현미경 분석을 수행하여 폐 구조, 조직 부종 및 염증 세포의 침윤을 평가하고 이를 도 6b에 나타내었다. 도 6b에서 보는 바와 같이, CLP에 의하여 폐 조직의 부종, 침윤이 발생하였으며, 본 발명의 25-HC@DDAB 처리된 사례에서 혈관과 폐 조직의 손상이 감소한 것으로 나타났다.

[0087] **3.2 폐 표적화 25-HC@DDAB의 CLP 동물 모델 혈장 성분에 미치는 영향 확인**

[0088] **염증반응에 미치는 영향**

[0089] 상기 실시예 3.1의 CLP 수술 후 25-HC 또는 25-HC@DDAB를 처리한 경우, CLP 마우스 혈장의 염증반응을 확인하였다. 혈액 내 25-HC 농도는 25-HC ELISA 키트 (MyBioSource, MBS7254215)를 사용하여 제조업체의 프로토콜에 따라 정량하였다. 생체 내 투과율은 에반스 블루 염료의 표준 곡선에 따라 복막강으로 누출된 염료 (μg/mouse)로 표시되었다. CRP 마우스에 25-HC 또는 25-HC@DDAB를 정맥 주사하고 6 시간 후, 1% 에반스 블루 염료를 함유한 생리 식염수 용액을 각 마우스에 정맥 내 주사하였다. 30 분 후 마우스를 안락사시킨 다음, 복막 삼출물을 취하여 이를 원심분리한 뒤 상청액의 흡광도를 650 nm에서 측정하였다.

[0090] 폐 조직에서 세포 간 접착분자-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)의 발현은 ELISA로 결정하였다. 용해된 폐 조직을 Nunc-Immuno™ MicroWell™ 96 웰 플레이트에 코팅하고 4℃에서 밤새 배양했다. 세척 후, 항-마우스 단일 클론 ICAM-1 항체 (Millipore Corporation, Billerica, MA, 각각 1:50)를 첨가하고, 1 시간 후 (37 ℃, 5% CO_2), 세포를 3 회 세척 한 다음 1:2000 퍼옥시다제 결합 항-마우스 IgG 항체 (100 μL; Sigma, Saint Louis, MO)를 첨가하고 1 시간 동안 반응시켰다. 세포를 다시 3 회 세척하고 *o*-페닐렌디아민 기질 (Sigma, Saint Louis, MO)을 사용하여 전개시킨 다음, 490 nm에서 흡광도를 측정하여 비색 분석을 수행했다. 모든 측정은 3반복 웰로 수행하였다.

[0091] 백혈구/호중구 이동 분석을 위하여 CLP 수술 6 시간 후 CLP 수술 마우스를 25-HC@DDAB 1 μM로 처리했다. 이후, 마우스를 안락사시키고 기관지 폐포 세척액 (bronchoalveolar lavage, BAL)을 0.8 mL의 생리 식염수로 세척하였다. BAL 유체 (200 μL)는 자동 혈액 분석기 (Mindray, BC 5000 Vet)에 의해 계수되었다. 결과는 BAL 유체 당 백혈구/호중구 × 10^5로 표시하였다.

[0092] 폐 조직에서 SREBP-2의 전사 활성은 제조업체의 프로토콜에 따라 Abcam (ab133111, Abcam)의 키트를 사용하여 ELISA 방법으로 결정하였다. 수컷 C57BL/6 마우스를 CLP 시행 6 시간 후에 25-HC 및 25-HC@DDAB (1 μM)를 정맥 내로 투여했다 (n = 5). 상기 마우스는 CLP 시행 96 시간 후 안락사시킨 후, 각 마우스에서 폐 샘플을 적출하였다. 적출한 폐로부터 핵 추출물을 추출한 후, 단백질 함량 30 μg에 해당하는 컨센서스 SREBP 결합 서열

(the consensus SRE, 스테롤 조절 요소, SRE)을 갖는 이중가닥 DNA 서열이 코팅된 96 웰에 추가하였다. 상기 핵 추출물이 공통 SREBP 결합 서열과 혼성화하도록 4℃에서 밤새 방치시켰다. 이후 활성화된 SREBP 전사인자 복합체는 SREBP-2에 대한 특정 1차 항체와 HRP에 접합 된 2차 항체를 첨가하여 450 nm에서 민감한 비색 판독으로 검출하였다.

[0093] 상기 검출한 염증반응 지표를 도 6c에 나타내었다. 마우스의 혈장 분석은 25-HC@DDAB의 경우 혈액에서 낮은 25-HC 수준을 보였으며, 이는 조직 세포에서 25-HC가 더 많이 흡수되었음을 의미한다 (도 6c). 염증과 관련된 지표는 25-HC@DDAB 처리군에서 대부분 낮게 나타났는데, 예를 들어 생체 내 투과성, 폐 조직에서의 세포 간 접착 분자-1 (ICAM-1) 발현, 기관지 폐포 세척액 (BAL)에서의 백혈구 및 호중구 이동, 그리고 폐 조직에서 SREBP2 활성 모두 감소하여 샴 대조군과 유사한 값을 나타내었다.

[0094] **Septic marker에 미치는 영향**

[0095] 상기 CLP 수술 후 25-HC 또는 25-HC@DDAB 처리된 마우스 혈장은 생화학 키트 (MyBioSource Inc., San Diego, Inc.)를 사용하여 C-반응 단백(CRP), 젖산 탈수소 효소 (LDH), 알라닌 아미노 전이효소 (ALT), 아스파테이트 아미노 전이효소 (AST), 혈액 요소 질소 (BUN) 및 크레아티닌을 측정하고, 이를 도 6d에 나타내었다. 도 6d에서 보는 바와 같이, C-반응성 단백질 (CRP), 젖산 탈수소 효소 (LDH), 알라닌 아미노 전이효소 (ALT), 아스파테이트 아미노 전이효소 (AST), 혈액 요소 질소 (BUN) 및 크레아티닌을 포함한 패혈증에 대한 마커도 25-HC@DDAB 처리에 의하여 현저히 감소했다.

[0096] **SREBP2-관련 mRNA 발현에 미치는 영향**

[0097] 상기 CLP 수술 후 25-HC 또는 25-HC@DDAB 처리된 마우스의 SREBP2 관련 *Nox2, Nr1p3, IL1b, Mcp1, Icam1* 및 *Srebp2*의 mRNA 발현 변화를 확인하여 도 6e에 나타내었다. SN50/Fatostatin A가 투여된 CLP 마우스 폐 조직 샘플에서 cDNA를 생성하기 위해, 전체 RNA 1 μg을 확장된 역전사 중합 효소 (Roche)를 사용하여 무작위 6 량체로 역전사하였다. 제조업체의 프로토콜에 따라 Roche Diagnostics GmbH의 LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I을 사용하여 실시간 PCR을 수행했다. 실시간 PCR 조건은 다음과 같다 : 95℃에서 10 분 동안 초기 변성, 95℃에서 10 분 동안 45 사이클 변성, 60℃에서 5 분 동안 결합 및 72℃에서 15 분 동안 신장. 이때 사용된 유전자 프라이머는 하기 표 2에 나타내었다. 샘플에서 특정 mRNA의 양은 해당 유전자 특이적 표준 곡선에 따라 측정되었다.

표 2

[0098]

Gene symbol	Forward primer	Reverse primer
Srebf2	TGTGGCTGGTAAATGGTGTGA	AGCACGGATAAGCAGGTTTGT
Nox2	ACTCCTTGGAGCACTGG	GTTCCTGTCCAGTTGTCTTCG
Nlrp3	TCGCCCAAGGAGGAAGAAGAA	TGAGAAGAGACCACGGCAGAA
Il-1β	GGTGTGTGACGTTCCCATTAG	TCGTTGCTTGGTTCTCCTTGT
Icam-1	GCTACCATCACCGTGTATTCG	TAGCCAGCACCGTGAATGTG
Mcp-1	TTAAAAACCTGGATCGGAACCAA	GCATTAGCTTCAGATTTACGGGT
β-actin	CATGTACGTTGCTATCCAGGC	CTCCTTAATGTCACGCACGAT

[0099] 도 6e에서 보는 바와 같이, *Nox2, Nlrp3, Il-1b, Mcp1, Icam1* 및 *Srebp2*를 포함한 SREBP2 관련 mRNA 발현은 마우스 모델에서 25-HC@DDAB를 처리에 의하여 감소되었다.

[0100] **혈장 사이토카인 수준에 미치는 영향**

[0101] 상기 CLP 수술 후 25-HC 또는 25-HC@DDAB 처리된 마우스의 IL-1β, IL-6, IL-10, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) 및 TNF-α의 농도를 결정하기 위해 제조업체의 프로토콜 (R&D Systems)에 따라 시판 중인 ELISA 키트를 사용했다. ELISA 플레이트 리더 (Tecan, Austria GmbH, Austria)를 사용하여 값을 측정하고, 이를 도 6f에 나타내었다.

[0102] 도 6f에서 보는 바와 같이, IL-1β, IL-6, IL-8 및 TNF-α와 같은 혈장 사이토카인 수치는 25-HC@DDAB 처리군에서 현저히 감소하여 25-HC@DDAB가 사이토카인 폭풍 저해제로 작용할 수 있음을 확인했다.

[0103] **<실시예 4 COVID-19 환자 혈액에서 25-HC@DDAB의 효과 확인>**

[0104] **4.1 COVID-19 환자 혈액에서 CH25H 발현량 확인**

[0105] **혈장 샘플**

[0106] 대한민국 대구 보건소에서 SARS-CoV-2 감염 진단을 받은 뒤, 영남대학교 병원에 입원한 환자로부터 전혈을 채취했다. COVID-19 패혈증 환자는 패혈증 합의 회의위원회에서 제공한 기준을 사용하여 정의되었으며, 폐렴 및 패혈성 쇼크 환자는 영남대학교 의료원에 입원한 환자로부터 수집되었다. 대조군으로는 건강한 지원자의 혈액이 사용되었다. 사용된 샘플의 모든 환자에 대한 임상 데이터를 수집했다. 혈장 샘플은 항응고제가 포함되도록 전혈을 채취한 후 12 시간 이내에 5 분 동안 2000 g에서 원심분리하여 준비하였다. 인체 연구 프로토콜은 대한민국 대구 영남대학교 병원 기관 심의위원회 (YUH 2020-03-057, 2020-05-031-001)의 승인을 받았으며, 연구에 사용하도록 승인된 후 환자로부터 전혈을 수집했다. 병원에서 받은 혈액 샘플 분석은 맹검 방식으로 수행되었으며, 분석 후 환자 정보와 비교하여 분석하였다.

[0107] COVID-19 환자의 혈액 내에서는 바이러스가 관찰되었으며 환자 코호트 연구를 기반으로 중증 호흡기 질환 또는 패혈증으로 진행되었다. COVID-19 패혈증 환자는 패혈증 합의 회의위원회에서 제공한 기준을 사용하여 정의되었다. i) 고막 온도 38℃ 이상의 열, ii) 전신 감염 의심, iii) SIRS (systemic inflammatory response syndrome) 기준 2개 이상의 전신 염증 반응 증후군, iv) 수축기 혈압 90 mmHg 이하의 저혈압, 및/또는 v) 쇼크 중, 하나 이상의 급성 발병 의학적 상태를 갖는 18세 이상의 기준을 충족하는 경우 적격 환자로 취급하였다. 건강한 지원자가 대조군으로 사용되었고 실험에 포함된 모든 환자에 대한 임상 데이터를 수집했다.

[0108] COVID-19 환자는 질병 중증도에 따라 분류되었다. "경증"은 일반 병동에서 격리 치료를 받는 환자 또는 무증상 환자로 정의되며, "중증"은 급성 호흡 곤란 증후군(Acute respiratory distress syndrome, ARDS) 또는 패혈증이 있거나 집중 치료 장치(intensive care unit, ICU)에서 집중 치료를 받는 환자로 정의된다. 여기에는 산소 요법으로 치료받은 환자나 인공 호흡기와 같은 기계식 호흡기에 의존하는 환자도 포함된다.

[0109] **COVID-19 환자 혈액에서 CH25H 확인**

[0110] 건강한 지원자, COVID-19 의 경증 및 중증 환자의 혈액 샘플을 영남 대학교 의료원에서 채취하였다. 본 연구는 관련 지역 기관 검토위원회와 윤리위원회가 승인했다. 헤파린 처리된 혈액 샘플은 4 시간 이내에 사용되었으며, Ficoll-Hypaquek 또는 NycoPrepk를 사용하여 제조업체의 권장 사항에 따라 말초 혈액 단핵 세포 (and peripheral blood mononuclear cells, PBMC)를 혈액에서 분리하였다. 그 후, MACSprep™ PBMC Isolation Kit를 통해 보다 정제된 PBMC를 얻어 RPMI-1640에 1mM Sodium pyruvate, 2mM L-glutamine, 4.5 mg/L 포도당, 10mM HEPES 및 2 mg/L 중탄산 나트륨을 보충한 배지에서 배양했다.

[0111] 상기 분리된 경증 또는 중증 COVID-19 환자로부터 분리된 PBMC에서 면역 블롯팅을 통해 콜레스테롤 25-수산화효소 (cholesterol 25-hydroxylase, CH25H)는 검출하였다. 나트륨 도데실설페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (SDS-PAGE) 후, 단일 클론 마우스 항-CH25H 항체 (CH25H 단일 클론 항체 (M01), 클론 1G8, H00009023-M01, Abnova)로 면역 블롯팅 분석을 수행하고 이를 도 7a에 나타내었다.

[0112] 도 7a에서 보는 바와 같이, CH25H 효소 수준은 경증 COVID-19 환자보다 중증 COVID-19 환자에서 분리된 PBMC에서 더 낮았다.

[0113] 또한, 경증 또는 중증 COVID-19 환자로부터 분리된 PBMC에서 qRT-PCR 분석을 통해 CH25H의 mRNA 수준을 분석하여 도 7b에 나타내었다. 도 7b에서 보는 바와 같이 CH25H의 mRNA 수준 또한 경증 COVID-19 환자보다 중증 COVID-19 환자에서 현저히 낮았다.

[0114] **4.2 25-HC@DDAB의 COVID-19 환자 PBMC에 미치는 효과**

[0115] **COVID-19 환자의 PBMC 내 CH25H 농도에 미치는 효과**

[0116] 중증 COVID-19 환자의 PBMC에서 25-HC@DDAB의 처리가 25-HC의 수준을 증가시킬 수 있는지 조사하였다. 상기 중증 COVID-19 환자로부터 분리된 PBMC 배양접시에 25-HC 또는 25-HC@DDAB를 0.5 또는 1.0 μM 씩 처리하고 PBMC 내의 25-HC 농도를 측정하여 도 7c에 나타내었다.

[0117] 도 7c에서 보는 바와 같이, 중증 COVID-19 환자의 PBMC에서 용량 의존적 방식으로 25-HC 수준을 크게 증가시켰다.

[0118] **COVID-19 환자의 PBMC 생존율에 미치는 효과**

[0119] 중증 COVID-19 환자의 PBMC에서 25-HC@DDAB의 처리가 중증 COVID-19 환자의 PBMC의 생존율에 미치는 효과를 확인하였다. 상기 중증 COVID-19 환자로부터 분리된 PBMC를 RPMI-1640에 1mM Sodium pyruvate, 2mM L-glutamine,

4.5 mg/L 포도당, 10mM HEPES 및 2 mg/L 중탄산 나트륨을 보충한 배지에서 배양하면서 배양접시에 25-HC 또는 25-HC@DDAB를 1.0 μM 씩 처리하고 생존율을 관찰하여 도 7d에 나타내었다.

[0120] 도 7d에서 보는 바와 같이, 배양 24 및 48시간 후, 25-HC 또는 25-HC@DDAB 처리는 COVID-19 환자로부터 분리된 PBMC의 생존율을 증가시켰으며, 배양 48시간 후, 25-HC@DDAB 처리는 COVID-19 환자로부터 분리된 PBMC의 생존율을 100% 가까이 증가시켰다.

[0121] **COVID-19 환자의 사이토카인 증가에 미치는 효과**

[0122] 25-HC@DDAB의 처리가 중증 COVID-19 환자의 혈장 내 사이토카인 수준에 미치는 영향을 조사하였다. 상기에서 분리한 건강한 지원자(Normal) 및 중증 COVID-19 환자의 PBMC를 2 x 10^6/웰의 농도로 12 시간 동안 FBS가 없는 RPMI 배지에서 PBS, 1 μM 25-HC 및 25-HC@DDAB로 처리한 후, IL-1β 및 TNF-α의 수준을 인간 ELISA 키트(Quantikine ELISA, R & D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 측정하고 이를 도 7e에 나타내었다.

[0123] 도 7e에서 보는 바와 같이, 정상인(Normal)과 비교하여 중증 COVID-19 환자의 PBMC (PBS)는 염증성 사이토카인 IL-1β 및 TNF-α의 수준이 현저히 증가하였으며, 1 μM 25-HC 또는 25-HC@DDAB에 의하여 억제되었다. 특히 25-HC@DDAB에 의하여 정상인(Normal) 수준으로 회복되는 것을 확인하였다.

[0124] **COVID-19 환자의 SREBP2 활성에 미치는 효과**

[0125] 25-HC@DDAB의 COVID-19 환자에서 SREBP2 활성에 미치는 효과를 확인하였다. 실험방법은 COVID-19 환자 PBMC를 사용한 점을 제외하고 상기 실시예 3.2와 동일한 방법으로 실시하고 그 결과를 도 7f에 나타내었다.

[0126] 도 7f에서 보는 바와 같이, 중증 COVID-19 환자에서 증가한 SREBP2 활성은 25-HC 또는 25-HC@DDAB에 의하여 억제되었으며, 특히 25-HC@DDAB에 의하여 현저히 억제되었다.

[0127] **COVID-19 환자의 사이토카인 생산 또는 염증관련 mRNA 발현에 미치는 효과**

[0128] 25-HC@DDAB의 COVID-19 환자에서 사이토카인 생산 또는 염증관련 mRNA 발현에 미치는 효과를 확인하였다. 상기에서 분리한 중증 COVID-19 환자의 PBMC에 25-HC 또는 25-HC@DDAB 각 1 μM 되도록 처리 후, IL-1β, TNF-α, NOX-2, NRLPS, MCP1 및 SREBP2의 mRNA를 상기 실시예 3.2와 같은 방법으로 측정하고 그 결과를 도 8에 나타내었다. 단, 이때 사용한 프라이머는 하기 표 3과 같다.

표 3

[0129]

Gene symbol	Forward primer	Reverse primer
SREBF2	CCTTCCTGTGCCTCTCCTTTA	AGGCATCATCCAGTCAAACCA
IL1B	TACCTGTCCTGCGTGTTGAAA	CTGCTTGAGAGGTGCTGATGT
TNF	TGGCGTGGAGCTGAGAGATAA	TTGATGGCAGAGAGGAGGTTGA
NLRP3	TGCCGGGGCCTCTTTTCAGT	CCACAGCGCCCCAACCACAA
NOX	AACGAATTGTACGTGGGCAGA	GAGGGTTTCCAGCAAACTGAG
MCP-1	CGCTCAGCCAGATGCAATCAATGC	GGTTTGCTTGTCCAGGTGGTCCA
β-actin	CATGTACGTTGCTATCCAGGC	CTCCTTAATGTCACGCACGAT

[0130] 도 8에서 보는 바와 같이, IL-1β, TNF-α, NOX-2, NRLPS, MCP1 및 SREBP2의 mRNA는 중증 COVID-19 환자에서 크게 증가하였으며, 25-HC 또는 25-HC@DDAB에 의하여 억제되었고, 25-HC@DDAB에 의하여 현저히 억제되었다.

[0131] **4.3 25-HC@DDAB에 의한 COVID-19 환자의 사이토카인 프로파일링 변화**

[0132] 25-HC@DDAB이 COVID-19 환자의 사이토카인 폭풍에 미치는 영향을 확인하였다. 그룹당 2 x 10^6/웰의 세포를 12 시간 동안 FBS가 없는 RPMI 배지에서 1 μM 25-HC 및 25-HC@DDAB로 처리하고, 이후, Human XL Cytokine Array Kit (R & D Systems)에 표시된 대로 처리하고, 현상된 필름을 스캔하고 얻은 이미지를 ImageJ 버전 1.43을 사용하여 분석하여 도 9에 나타내었다.

[0133] 도 9에서 보는 바와 같이, 중증 COVID-19 환자는 IL-6, CRP, TNF-alpha, IL-1 beta, IFN-gamma, IL-8, CCL2, BDNF, CCL7, IL-4, IL-3, GM-CSF, M-CSF, IL-10, IL-5, CXCL9, G-CSF가 매우 높은 수준으로 나타났으며, IL-15, IL-16, IL-22, IL-27, IL-17A, MMP-9, CXCL 10, IL-11, CCL3, PF4, Cystatin C, IL-13, TARC, TGF-alpha,

HGF, IL-1 alpha, FGF-19, IL-31, PDGF-AA, GRO-alpha, IL-12, MPO 등의 사이토카인이 높은 수준으로 나타났다. 그러나 25-HC 또는 25-HC@DDAB 처리에 의하여 상기 증가된 사이토 카인은 매우 억제되었으며, 특히 25-HC@DDAB 처리에 의하여 현저히 억제되었다. 또한, RBP4, Chitinase 3-like 1, EMMPRIN, CD14, DPPIV, Cripto-1, Angiopoetin-2, Kallikrein 3, MIF, MIP-3 beta, PDGF-AB/BB, Leptin, Endoglin, Lipocalin-2, uPAR, IL-19, TFF3, Resistin, Complement Factor D의 농도 또한 현저히 억제되었다.

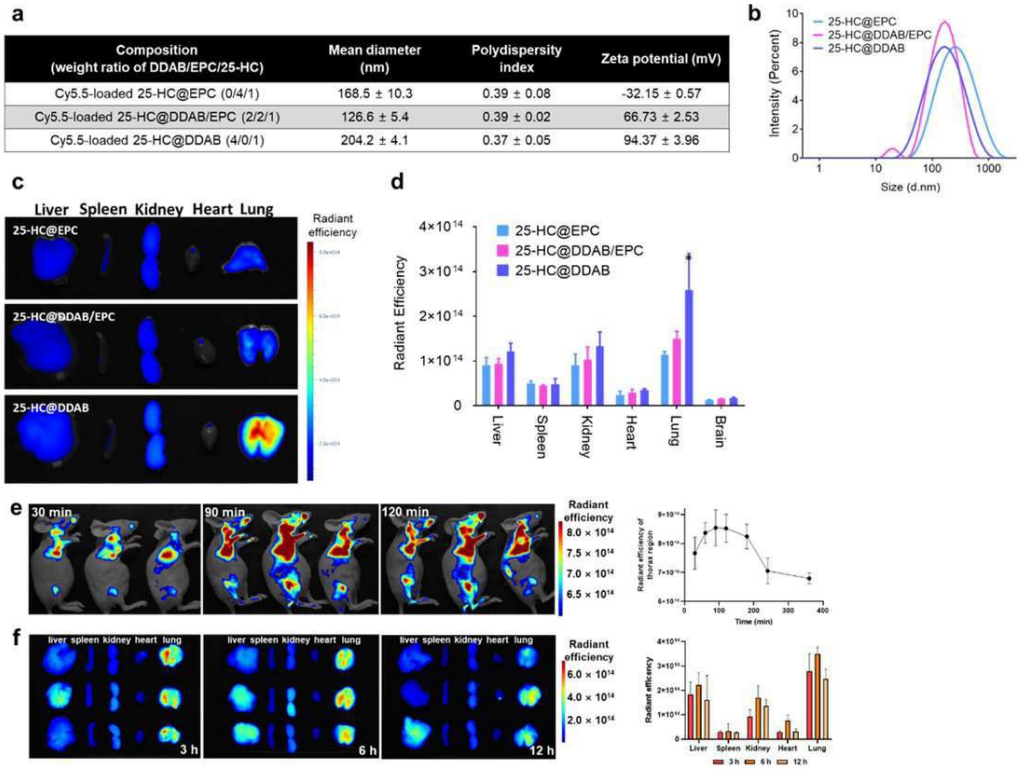
[0134] SARS-CoV-2 바이러스의 세포 내 침입은 COVID-19 감염을 유발하여 심각한 폐 조직 손상과 염증을 초래한다. 본 발명의 25-HC@DDAB 처리는 상기와 같이 다종의 과도한 사이토카인을 억제하는 것을 확인하였으며, 고도로 강화된 폐 국소화를 통해 본 발명의 25-HC@DDAB가 중증 COVID-19 환자에서 사이토카인 폭풍을 치료 또는 예방할 수 있음을 확인하였다.

도면

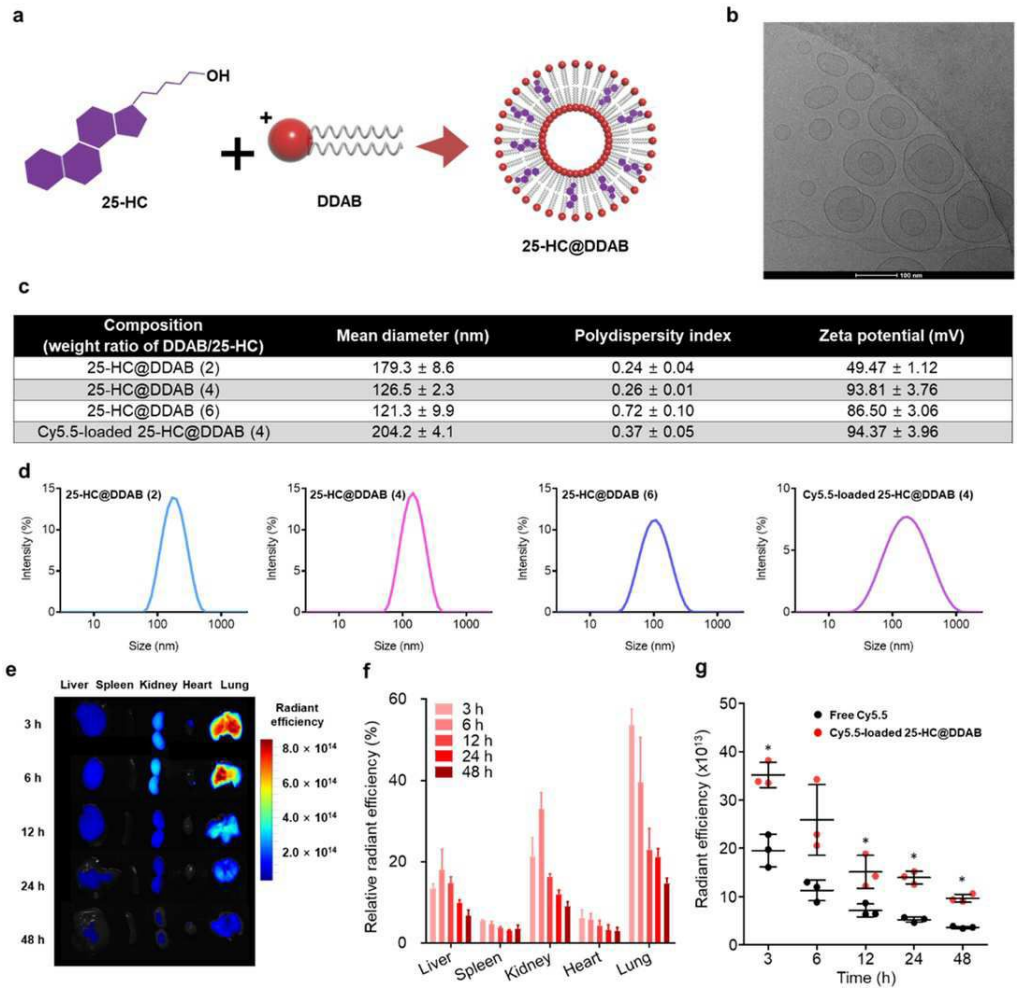
도면1

a

Composition (weight ratio of DDAB/EPC/25-HC)	Mean diameter (nm)	Polydispersity index	Zeta potential (mV)
Cy5.5-loaded 25-HC@EPC (0/4/1)	168.5 ± 10.3	0.39 ± 0.08	-32.15 ± 0.57
Cy5.5-loaded 25-HC@DDAB/EPC (2/2/1)	126.6 ± 5.4	0.39 ± 0.02	66.73 ± 2.53
Cy5.5-loaded 25-HC@DDAB (4/0/1)	204.2 ± 4.1	0.37 ± 0.05	94.37 ± 3.96

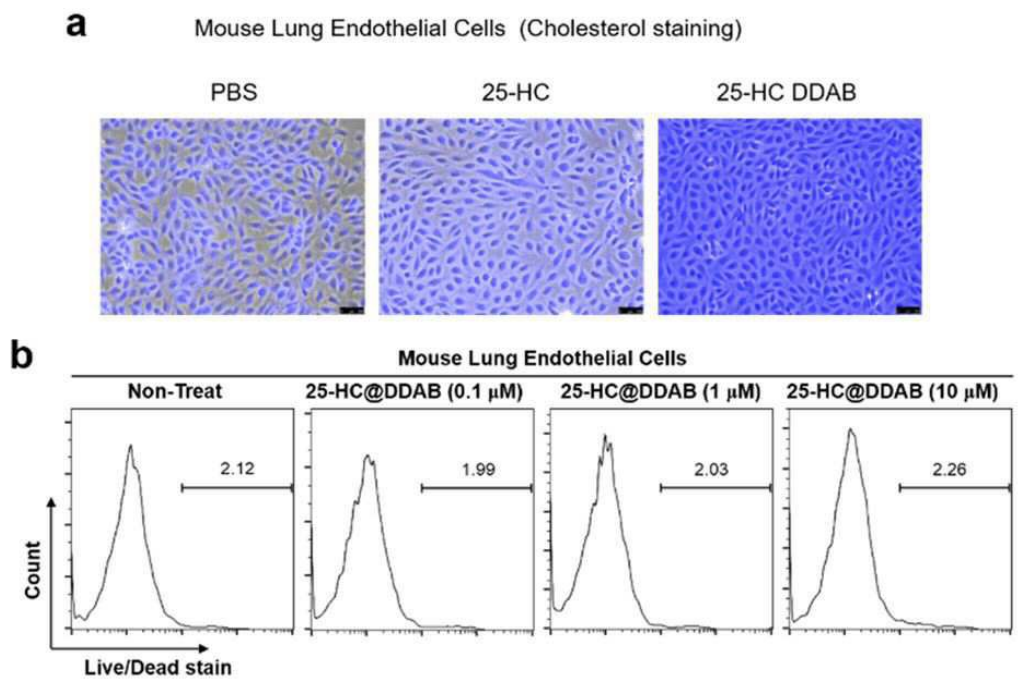


도면2

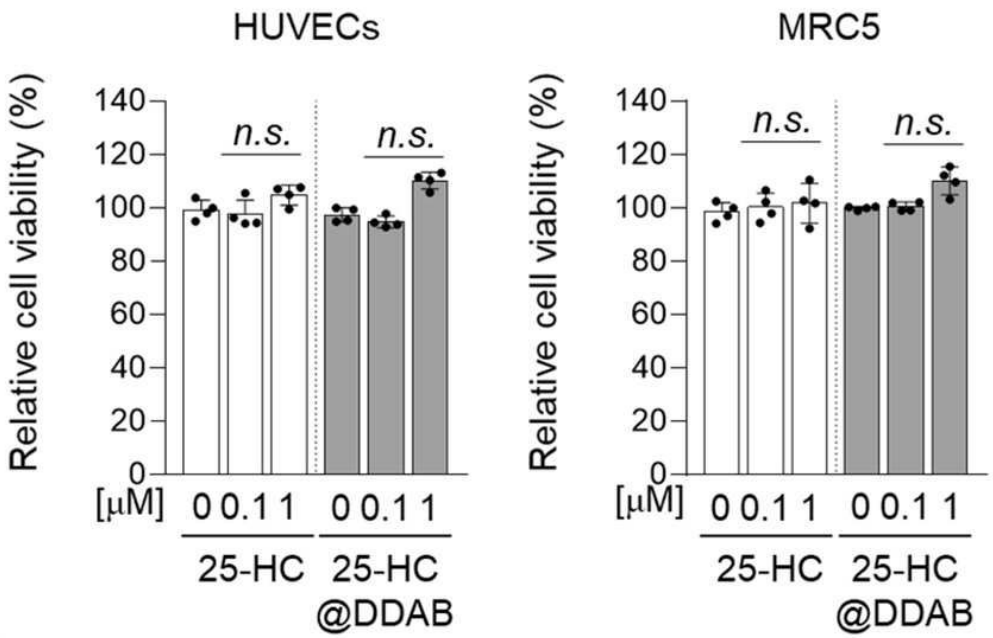


Composition (weight ratio of DDAB/25-HC)	Mean diameter (nm)	Polydispersity index	Zeta potential (mV)
25-HC@DDAB (2)	179.3 ± 8.6	0.24 ± 0.04	49.47 ± 1.12
25-HC@DDAB (4)	126.5 ± 2.3	0.26 ± 0.01	93.81 ± 3.76
25-HC@DDAB (6)	121.3 ± 9.9	0.72 ± 0.10	86.50 ± 3.06
Cy5.5-loaded 25-HC@DDAB (4)	204.2 ± 4.1	0.37 ± 0.05	94.37 ± 3.96

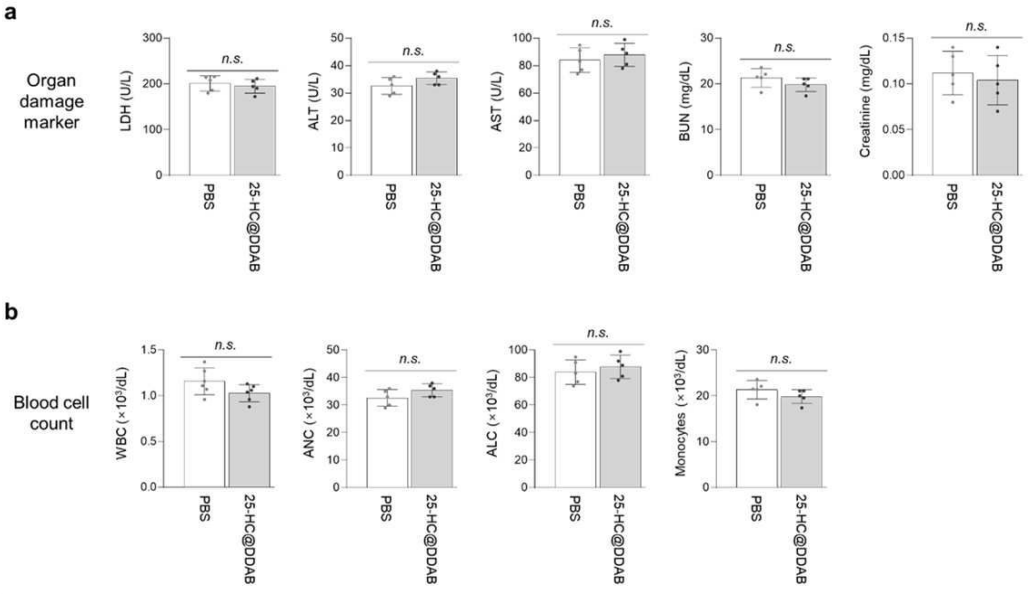
도면3



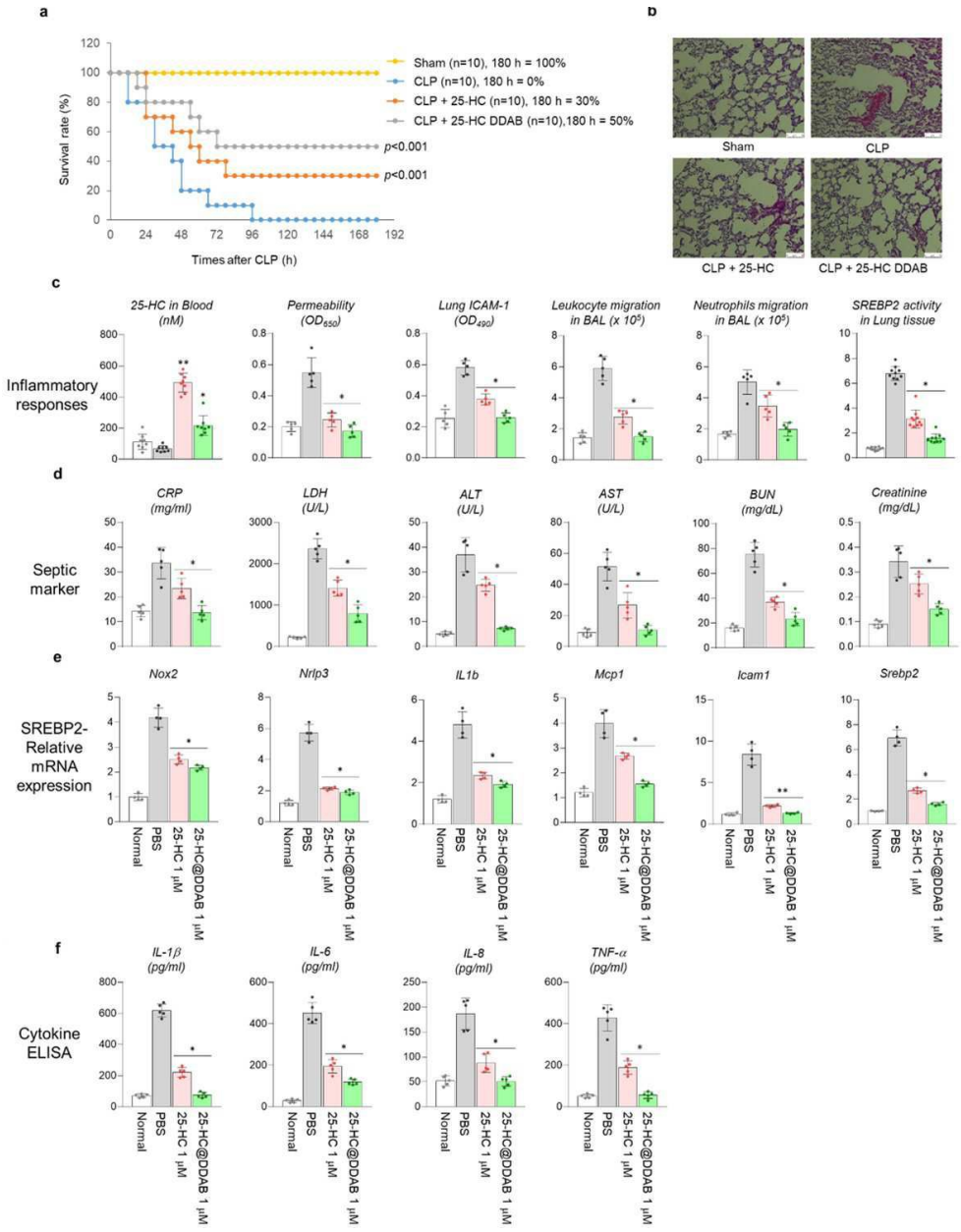
도면4


HUVECs
MRC5
Relative cell viability (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
n.s.
n.s.
[μM]
0 0.1 1
0 0.1 1
25-HC
25-HC @DDAB

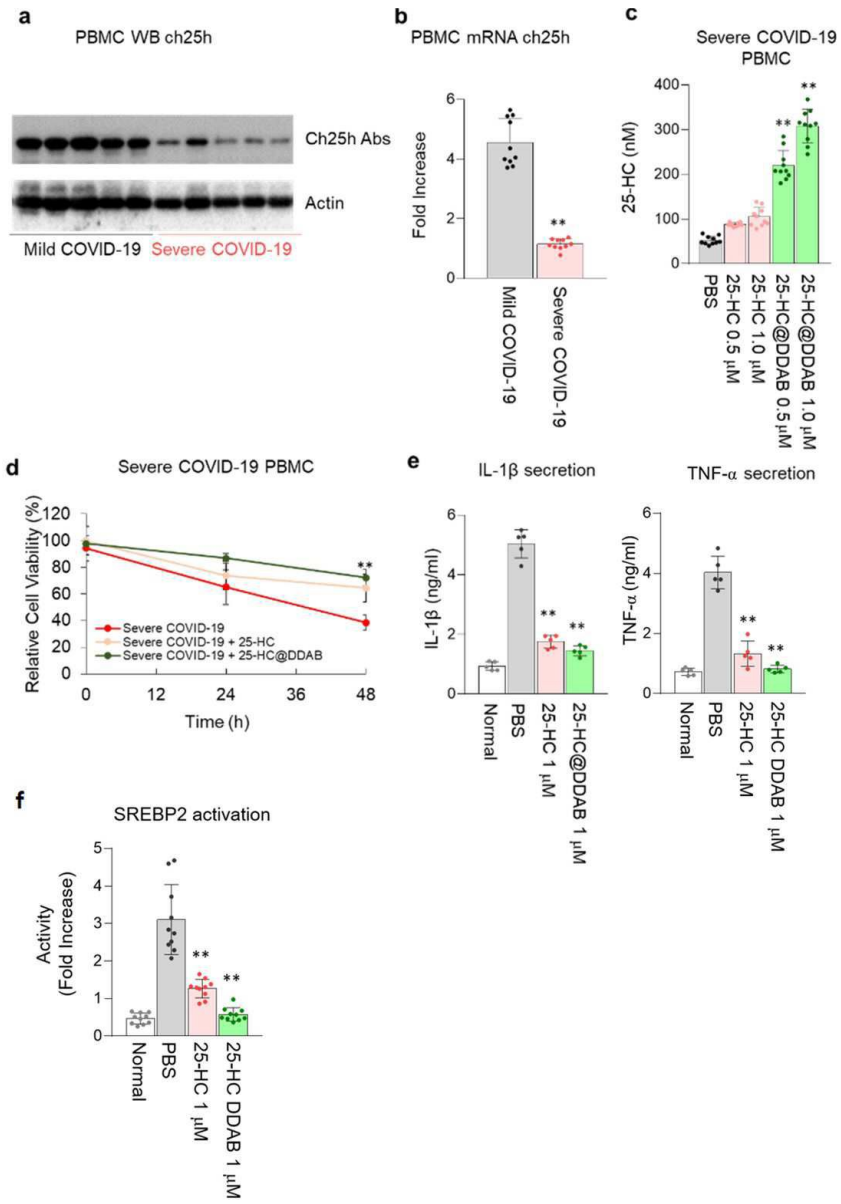
도면5


a
Organ damage marker
LDH (U/L)
ALT (U/L)
AST (U/L)
BUN (mg/dL)
Creatinine (mg/dL)
n.s.
PBS
25-HC@DDAB
b
Blood cell count
WBC (×10³/dL)
ANC (×10³/dL)
ALC (×10³/dL)
Monocytes (×10³/dL)

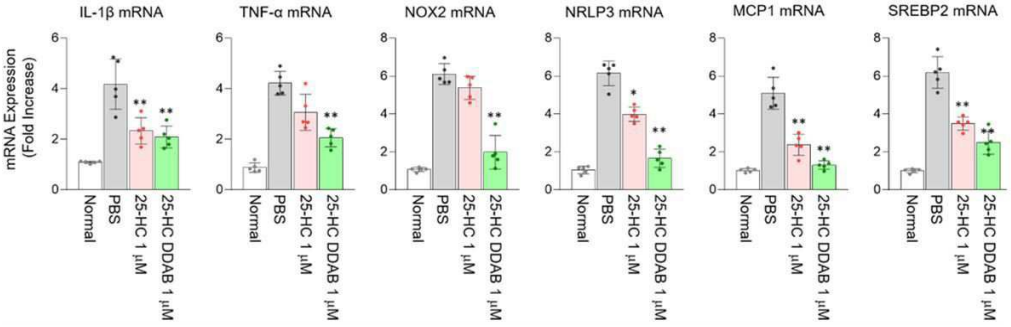
도면6


a
Survival rate (%)
Times after CLP (h)
Sham (n=10), 180 h = 100%
CLP (n=10), 180 h = 0%
CLP + 25-HC (n=10), 180 h = 30%
CLP + 25-HC DDAB (n=10),180 h = 50%
p<0.001
p<0.001
b
Sham
CLP
CLP + 25-HC
CLP + 25-HC DDAB
c
Inflammatory responses
25-HC in Blood (nM)
Permeability (OD550)
Lung ICAM-1 (OD490)
Leukocyte migration in BAL (x 10⁵)
Neutrophils migration in BAL (x 10⁵)
SREBP2 activity in Lung tissue
d
Septic marker
CRP (mg/ml)
LDH (U/L)
ALT (U/L)
AST (U/L)
BUN (mg/dL)
Creatinine (mg/dL)
e
SREBP2-Relative mRNA expression
Nox2
Nrlp3
Il1b
Mcp1
Icam1
Srebp2
Normal
PBS
25-HC 1 μM
25-HC@DDAB 1 μM
f
Cytokine ELISA
IL-1β (pg/ml)
IL-6 (pg/ml)
IL-8 (pg/ml)
TNF-α (pg/ml)

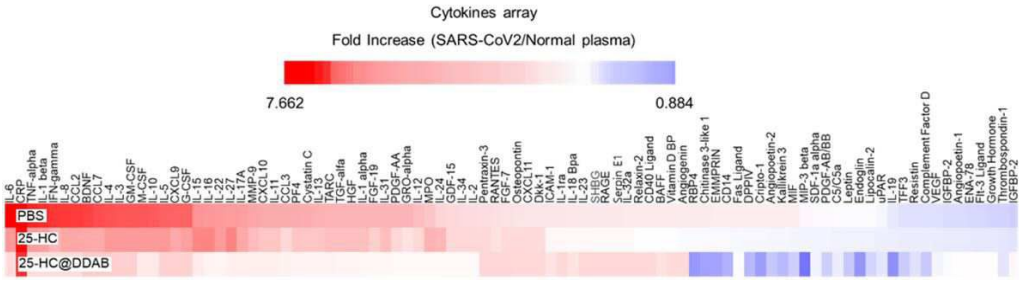
도면7


a
PBMC WB ch25h
Ch25h Abs
Actin
Mild COVID-19
Severe COVID-19
b
PBMC mRNA ch25h
Fold Increase
Mild COVID-19
Severe COVID-19
c
Severe COVID-19 PBMC
25-HC (nM)
PBS
25-HC 0.5 μM
25-HC 1.0 μM
25-HC@DDAB 0.5 μM
25-HC@DDAB 1.0 μM
d
Severe COVID-19 PBMC
Relative Cell Viability (%)
Time (h)
Severe COVID-19
Severe COVID-19 + 25-HC
Severe COVID-19 + 25-HC@DDAB
e
IL-1β secretion
IL-1β (ng/ml)
TNF-α secretion
TNF-α (ng/ml)
Normal
PBS
25-HC 1 μM
25-HC@DDAB 1 μM
25-HC DDAB 1 μM
f
SREBP2 activation
Activity (Fold Increase)

도면8


IL-1β mRNA
TNF-α mRNA
NOX2 mRNA
NRLP3 mRNA
MCP1 mRNA
SREBP2 mRNA
mRNA Expression (Fold Increase)
Normal
PBS
25-HC 1 μM
25-HC DDAB 1 μM

도면9


Cytokines array
Fold Increase (SARS-CoV2/Normal plasma)
7.662
0.884
PBS
25-HC
25-HC@DDAB