



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0073225
(43) 공개일자 2024년05월24일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/51 (2006.01) A23L 33/13 (2016.01)
A61K 31/713 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) A61P 37/00 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
A61K 9/5153 (2013.01)
A23L 33/13 (2016.08)</p> <p>(21) 출원번호 10-2023-0155187
(22) 출원일자 2023년11월10일
심사청구일자 2023년11월10일</p> <p>(30) 우선권주장
1020220149680 2022년11월10일 대한민국(KR)
기술이전 희망 : 기술양도</p> | <p>(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)</p> <p>(72) 발명자
조익현
서울특별시 서초구 신반포로23길 41, 105동 204호(잠원동, 신반포2지구아파트)</p> <p>권태우
서울시 송파구 거마로56, 송파시그니처롯데캐슬 104동 1604호</p> <p>(74) 대리인
위병갑</p> |
|---|---|

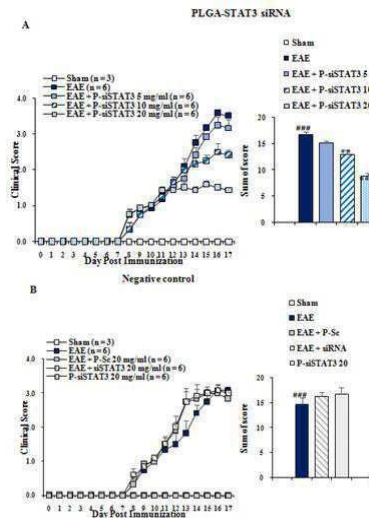
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 PLGA-siSTAT3를 유효성분으로 포함하는 자가면역성 신경질환의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 STAT3 특이적 siRNA 및 생분해성 고분자 물질로 구성된 나노입자(PLGA-siSTAT3)를 포함하는 자가면역성 신경질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 본 발명은 다발성 경화증 또는 뇌척수염 동물모델인 EAE 동물모델에서, 상기 PLGA-siSTAT3가 EAE로 유도되는 임상 증상 지수를 감소시키는 것을 확인하였으며, 척수의 탈수초화를 억제시키는 것을 확인하였다. 또한, EAE와 관련된 STAT3 신호전달 경로를 차단하여, 탈수초화를 감소시키며, 미세아교세포 및 신경교세포의 발현을 억제시키는 것을 확인하였다. 또한, 염증 인자인 iNOS, IL-1 β , IL-6, TNF- α 를 억제시키고, 염증매개 효소인 COX-2 및 케모카인 MIP-1 α , RANTES의 발현을 억제시키는 것을 확인하였다. 또한, 자가면역과 관련된 Th1 및 Th17 세포의 침윤 및 활성을 억제시키는 것을 확인하여, 자가면역성 신경질환을 개선시킬 수 있는 것을 확인하였다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61K 31/713 (2013.01)
A61K 48/0041 (2013.01)
A61P 25/00 (2018.01)
A61P 37/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/25 (2013.01)
A23V 2200/322 (2013.01)
A23V 2200/324 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	0000000000
과제번호	2022R1A2C200981712
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업/유형1-2
연구과제명	다발성경화증에서 Yap/Taz 신호 기전의 기능 규명 및 세포 선택적 조절 기술 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2022.03.01 ~ 2027.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

STAT3 특이적 siRNA 및 생분해성 고분자 물질로 구성된 나노입자를 포함하는, 자가면역성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 STAT3 특이적 siRNA는 서열번호 1 및 서열번호 2로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 생분해성 고분자 물질은 PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid)), 폴리-L-락트산(poly-L-lactic acid), 폴리-글리콜산(poly-glycol acid), 폴리-D-락트산-co-글리콜산(poly-D-lactic acid-co-glycol acid), 폴리-L-락트산-co-글리콜산(poly-L-lactic acid-coglycol acid), 폴리-D,L-락트산-co-글리콜산(poly-D,L-lactic acid-co-glycol acid), 폴리-카프로락톤(polycaprolactone), 폴리-발레로락톤(poly-valerolacton), 폴리-하이드록시 부티레이트(poly-hydroxy butyrate), 폴리-하이드록시 발레레이트(poly-hydroxy valerate), 덱스트란(dextran), 폴리-포스파젠(poly-phosphazene) 및 폴리-아미노에스터(poly-amino ester)로 이루어진 군에서 선택된 어느 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 자가면역성 신경질환은 다발성경화증(multiple sclerosis), 시신경척수염(neuromyelitis optica), 급성파종성뇌척수염(acute disseminated encephalomyelitis),上行성 척수염(ascending myelitis), 중심성 척수염(central myelitis), 하행성 척수염(descending myelitis) 횡단성 척수염(transverse myelitis), 중증근무력증(myasthenia gravis), 길랑바레증후군(guillain-barre syndrome), 자가면역성 포도막염(autoimmuneuveitis), 자가면역성뇌증(autoimmune encephalopathy) 및 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증(chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 1종 이상인 것인, 약학적 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 나노입자는 생분해성 고분자 물질의 표면에 STAT3 특이적 siRNA이 결합된 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 STAT3 특이적 siRNA 및 생분해성 고분자 물질로 구성된 나노입자는 탈수초화를 억제시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 STAT3 특이적 siRNA 및 생분해성 고분자 물질로 구성된 나노입자는 STAT3의 인산화를 억제시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 STAT3 특이적 siRNA 및 생분해성 고분자 물질로 구성된 나노입자는 Iba-1 또는 GFAP의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 9

제 1항에 있어서,

상기 STAT3 특이적 siRNA 및 생분해성 고분자 물질로 구성된 나노입자는 염증성 사이토카인, 염증매개 효소 또는 케모카인의 발현을 억제시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 염증성 사이토카인은 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인, 약학적 조성물.

청구항 11

제 9항에 있어서,

상기 염증매개 효소는 COX-2 및 iNOS로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인, 약학적 조성물.

청구항 12

제 9항에 있어서,

상기 케모카인은 MIP-1 α 및 RANTES로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인, 약학적 조성물.

청구항 13

제 1항에 있어서,

상기 STAT3 특이적 siRNA 및 생분해성 고분자 물질로 구성된 나노입자는 면역세포의 침윤 또는 활성을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 14

제 13항에 있어서,

상기 면역세포는 Th1 및 Th17로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인, 약학적 조성물.

청구항 15

제 1항에 있어서,

상기 STAT3 특이적 siRNA 및 생분해성 고분자 물질로 구성된 나노입자는 혈액뇌장벽(Blood-brain barrier, BBB)의 손상을 예방하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 16

STAT3 특이적 siRNA 및 생분해성 고분자 물질로 구성된 나노입자를 포함하는, 자가면역성 신경질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 17

STAT3 특이적 siRNA 및 생분해성 고분자 물질로 구성된 나노입자를 포함하는, 자가면역성 신경질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은, STAT3 특이적 siRNA 및 생분해성 고분자 물질로 구성된 나노입자(PLGA-siSTAT3)를 유효성분으로 포함하는 자가면역성 신경질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 면역질환은 면역계의 구성성분들이 병리상태를 야기하거나, 매개 또는 기타 공헌하는 질환을 의미하는데, 특히 염증성 장애는 전 세계적으로 가장 중요한 건강 문제 중 하나이다. 염증은 일반적으로 외부 물질 또는 해로운 자극에 의한 숙주 침입에 대한 신체 조직의 국소화된 보호 반응을 말한다. 염증의 원인으로는 박테리아, 바이러스 및 기생충과 같은 감염성 원인; 화상 또는 방사선 조사와 같은 물리적 원인; 독소, 약물 또는 산업적 제제와 같은 화학약품; 알레르기 및 자가면역 반응과 같은 면역적 반응, 또는 산화성 스트레스와 연관된 상태등이 있다.

[0003] 또한, 면역질환 중 하나인 자가면역 질환은 면역 체계가 그 자신의 기관을 공격하여 자발적인 반응을 일으키는 것을 특징으로 한다. 이러한 반응들은 T 림프구에 의한 자가항원(auto-antigen)의 인식에 기인하며, 이로 인하여 체액상(자가항원 생성) 및 세포상(림프구 및 대식세포 세포독성 활성 증가) 면역 반응이 유발된다. 자가면역 질환으로는 류마티스성 질환, 건선, 전신성 피부근염, 다발성 경화증, 홍반성 낭창, 또는 항원에 의한 면역반응 약화, 즉, 천식, 약물 또는 음식에 대한 알레르기 등이 있다. 이러한 질환들은 모두 제한성이고 만성인 질환들이며, 경우에 따라서는 치명적이고, 현재까지 상기 질환들을 치료할 수 있는 효과적인 치료 방법이 존재하지 않는 실정이다. 그러므로 당해 질환의 진행 중에 질환을 경감시키거나 완화시킬 수 있는 약물, 의약 또는 매체라면 환자의 건강을 위해서 중요한 해결 수단이 된다고 할 것이다.

[0004] 한편, 다발성경화증은 인체 내 면역계의 결손에 의해 유발되는 질환으로 뇌와 척수의 백질부분의 신경을 덮는 지방질로 된 수초(myelin sheath)를 침범하여 탈수초화(demyelination)를 산발적으로 일으키는 질환으로 수초가 손상을 받아 수초층의 두께가 감소하면 신경자극은 전달되지만, 효율성이 떨어지고 이에 정상적인 신경자극 전달이 방해받아 발병되는 질병이다. 쉽게 설명하자면, 전선을 둘러싸고 있는 절연체가 손상되면 전기의 전도가 느려지는 것과 마찬가지로 신경세포 간의 전도 속도가 느려지는 현상을 초래하여 증상을 일으킨다. 초기에는

수초가 회복되면서 완화증상이 나타나지만, 결국 악화가 반복되며 손상이 영구화된다. 이 같은 수초의 손상으로 인해 신경이 적절히 작용을 하지 못하여 시야장애나 균형감 상실 등의 증상이 야기되고 일부 환자에서는 마비가 올 수 있다.

[0005] 뇌척수염(encephalomyelitis)은 탈수초성 질환이다. 수초란 신경섬유에서 중축을 이루는 축색의 둘레를 싸고 있는 칼집 모양의 부분으로 이러한 수초만 선택적으로 없어지는 현상을 탈수초라고 한다. 이러한 탈수초를 특징으로 하면서 약간의 염증을 동반하는 원발성 백질(고등 동물의 중추부 속에서 신경 섬유의 집단을 이루는 부분)질환을 탈수초성 질환이라고 한다. 뇌척수염은 뇌와 척수가 동시에 염증을 일으키는 것으로, 미생물이나 바이러스 감염에 의해 일어나며 신경조직 구성 요소의 퇴행성 변화, 혈액으로부터의 세포성 및 액성 삼출(exudation), 혈관주위세포(pericyte) 침윤, 신경교 및 혈관결합조직의 증식에 의해 특징지어지는 염증성 변화가 나타난 상태를 일컫는다. 급성산재성 뇌척수염(Acute Disseminated Encephalomyelitis)은 급성과중성 뇌척수염이라고도 하며 척수를 중심으로 중추신경계 전반에 걸쳐 급성 염증이 산재하는 탈수질환으로, 예방 접종 후나 감염 질환에 걸린 후에 나타나는 질환이다. 신경계에 장애를 일으키기 쉬운 각종 바이러스나 세균과 관련된 예방접종 및 감염증이 주요 원인으로 광견병, 천연두, 인플루엔자, 소아마비, 파상풍, 홍역, 백일해 등의 예방 접종 후에 올 수 있으며 예방 접종이 아니라 홍역, 볼거리, 수두, 천연두 등을 앓고 난 후에도 생길 수 있다. 바이러스성 전염병을 앓은 2~4일 안에 혹은 예방주사를 맞은 후 10~13일에 두통, 경부경직 등으로 시작해 미비와 혼수가 오고, 30~50%의 치사율을 가진다.

[0006] 다발성경화증 또는 뇌척수염의 치료는 크게 급성기 치료와 장기적인 질병완화 치료, 그리고 증상완화 치료로 나눌 수 있다. 급성기에는 일반적으로 고용량 스테로이드(steroid)의 정맥주사 요법을 사용한다. 스테로이드는 급성기에 증상을 완화시키고 회복 기간을 줄여주지만, 장기적으로 투여할 경우에는 다양한 부작용이 나타날 수 있으므로 사용에 주의를 요한다. 여러 가지 원인에 의해 질병완화 치료를 하기 어려운 환자들은 저용량 스테로이드 유지 요법을 사용하기도 한다. 대표적인 질병완화 치료제로는 인터페론(beta-interferon)과 글라티라머 아세테이트(glatiramer acetate)가 있다. 이들은 재발완화형 다발성경화증(relapsing-remitting multiple sclerosis, RRMS)에서 재발하는 횡수를 줄이고, 재발 시에 나타나는 증상을 완화하는 효과를 가지고 있다. 그러나 이차진행형으로 전환된 환자에서는 뚜렷한 효과가 나타나지 않기 때문에 이 경우에는 환자의 장애를 예방하기 위한 조기 치료가 가장 중요하다. 다발성경화증 또는 뇌척수염으로 인해 나타나는 여러 증상과 신경학적 장애를 줄여주기 위한 증상완화 치료도 시행한다. 이러한 치료들은 재발율이 높으며, 재발을 확실하게 방지하는 방법은 없다.

[0007] 한편, PLGA[poly(lactic-co-glycolic acid)]는 생체 내에서 젖산과 글리콜산으로 분해되고 최종적으로 이산화탄소와 물로 배출되는 생분해성, 생체 적합성을 갖고 있으며 미국 식품의약품안전청에서 승인된 고분자물질이다. 또한, 생분해성 고분자 나노-/미립자를 제조하는 기술은 전달 시스템으로의 이용뿐만 아니라 백신 제조, 생체면역 질병치료 등에 관한 연구를 통해 최근 들어 많은 관심을 받고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 자가면역성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 자가면역성 신경질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 자가면역성 신경질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 STAT3 특이적 siRNA 및 생분해성 고분자 물질로 구성된 나노입자를 포함하는, 자가면역성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0012] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 STAT3 특이적 siRNA 및 생분해성 고분자 물질로 구성된 나노입자를 포함하는, 자가면역성 신경질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0013] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 STAT3 특이적 siRNA 및 생분해성 고분자 물질로 구성된 나노입자를 포함하는, 자가면역성 신경질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명은, STAT3 특이적 siRNA 및 생분해성 고분자 물질로 구성된 나노입자(PLGA-siSTAT3)를 포함하는 자가면역성 신경질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명은 다발성 경화증 또는 뇌척수염 동물모델인 EAE 동물모델에서, PLGA-siSTAT3가 EAE로 유도되는 임상 증상 지수를 감소시키는 것을 확인하였으며, 척수의 탈수초화를 억제시키는 것을 확인하였다. 또한, EAE와 관련된 STAT3 신호전달 경로를 차단하여, 탈수초화를 감소시키며, 미세아교세포 및 신경교세포의 발현을 억제시킴을 확인하였다. 또한, 염증 인자인 iNOS, IL-1 β , IL-6, TNF- α 를 억제시키고, 염증매개 효소인 COX-2 및 케모카인 MIP-1 α , RANTES의 발현을 억제시키는 것을 확인하였다. 또한, 자가면역과 관련된 Th1 및 Th17 세포의 침윤 및 활성을 억제시키는 것을 확인하여, 자가면역성 신경질환을 개선시킬 수 있는 것을 확인하여, 관련 분야에 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 본 발명의 STAT3 특이적 siRNA 및 생분해성 고분자 물질로 구성된 나노입자(P-siSTAT3)를 염증 반응을 유도한 미세아교세포에 농도별로 처리하고 염증매개 효소, 염증성 사이토카인 및 주요 신호전달 기전 인자의 발현에 미치는 영향을 확인한 결과이다. 도 1 중 A는 각 인자의 단백질 발현을 확인한 결과이며, 도 1 중 B는 Iba-1의 발현을 확인한 결과이고, 도 1 중 C는 iNOS의 발현을 확인한 결과이며, 도 1 중 D는 IL-6의 발현을 확인한 결과이고, 도 1 중 E는 TNF- α 의 발현을 확인한 결과이며, 도 1 중 F는 p-STAT3 발현을 확인한 결과이고, 도 1 중 G는 STAT3의 발현을 확인한 결과이다. 상기 도 1에 있어서, *는 $P>0.05$ 를 의미하고, **는 $p>0.01$ 를 의미하며, ##는 $p>0.01$ 를 의미하고, ###는 $p>0.001$ 을 의미한다.

도 2는 본 발명의 P-siSTAT3를 염증 반응을 유도한 미세아교세포에 농도별로 처리하고 혈액뇌장벽(Blood-brain barrier, BBB)과 관련된 인자의 발현에 미치는 영향을 확인한 결과이다. 도 2 중 A는 각 인자의 단백질 발현을 확인한 결과이며, 도 2 중 B는 PECAM-1의 발현을 확인한 결과이고, 도 2 중 C는 claudin-5의 발현을 확인한 결과이며, 도 2 중 D는 ZO-1의 발현을 확인한 결과이다. 상기 도 2에 있어서, *는 $P>0.05$ 를 의미하고, **는 $P>0.01$ 를 의미하며, #는 $P>0.05$ 를 의미하고, ##는 $P>0.01$ 를 의미한다.

도 3은 본 발명의 P-siSTAT3를 자가면역성 신경질환 동물모델에 농도별로 투여하고 임상 증상 개선 효과를 확인한 결과이다. 도 3 중 A는 P-siSTAT3의 농도별 개선 효과를 확인한 결과이며, 도 3 중 B는 P-siSTAT3와 대조군의 결과를 비교한 것이다. 상기 도 3에 있어서, **는 $P>0.0$ 를 의미하고, ###는 $P>0.001$ 을 의미한다.

도 4는 본 발명의 P-siSTAT3를 자가면역성 신경질환 동물모델에 농도별로 투여하고 탈수초화 억제 효과를 록솔 페스트 블루(luxol fast blue, LFB) 염색으로 확인한 결과이다. 상기 도 4 중 A는 P-siSTAT3의 농도별 억제 효과를 확인한 결과이며, 도 4 중 B는 P-siSTAT3와 대조군의 결과를 비교한 것이다.

도 5는 본 발명의 P-siSTAT3를 자가면역성 신경질환 동물모델에 농도별로 투여하고 수초형성 단백질인 MBP을 면역형광분석으로 확인한 결과이다. 상기 도 5 중 A는 P-siSTAT3의 농도별 증가 효과를 확인한 결과이며, 도 5 중 B는 P-siSTAT3와 대조군의 결과를 비교한 것이다.

도 6은 본 발명의 P-siSTAT3를 자가면역성 신경질환 동물모델에 농도별로 투여하고 STAT3 발현 억제를 면역형광 분석으로 확인한 결과이다. 상기 도 6 중 A는 P-siSTAT3의 농도별 억제 효과를 확인한 결과이며, 도 6 중 B는 P-siSTAT3와 대조군의 결과를 비교한 것이다.

도 7은 본 발명의 P-siSTAT3를 자가면역성 신경질환 동물모델에 농도별로 투여하고 BBB 손상 억제 효과를 확인한 결과이다. 상기 도 7 중 A는 별아교세포의 활성화 마커인 GFAP와 세포접착 단백질인 PECAM-1의 발현을 확인한 결과이며, 도 7 중 B는 GFAP 발현 강도(intensity)를 확인한 결과이고, 도 7 중 C는 PECAM-1 발현 강도를 확인한 결과이며, 도 7 중 D는 GFAP 발현 정도를 확인한 결과이고, 도 7 중 E는 PECAM-1 발현 정도를 확인한 결과이며, 도 7 중 F는 세포연접 단백질인 claudin-5, occludin 및 ZO-1(zonula occludens)의 발현을 확인한 결과이며, 도 7 중 G는 claudin-5의 발현 강도를 확인한 결과이고, 도 7 중 H는 occludin의 발현 강도를 확인한 결과이며, 도 7 중 I는 ZO-1의 발현 강도를 확인한 결과이고, 도 7 중 J는 알부민의 발현을 확인한 결과이며, 도 7중 K는 알부민의 발현 강도를 확인한 결과이다. 상기 도 7에 있어서, **는 $P>0.01$ 을 의미하고, ***는 $P>0.001$ 을 의미하며, ##은 $P>0.01$ 을 의미하고 ###은 $P>0.001$ 을 의미한다.

도 8은 본 발명의 P-siSTAT3의 미세아교세포에 대한 선택성을 확인한 결과이다. 상기 도 8 중 A는 미세아교세포 마커인 Iba-1, 별아교세포 마커인 GFAP 및 희소돌기아교세포 마커인 Oligo-2을 발현하는 세포에서 P-siSTAT3에 포함된 쿠마린-6의 발현을 확인한 결과이고, 도 8 중 B는 대조군과 EVE 동물모델의 Iba-1 발현 세포에 대한 결과를 비교한 것이며, 도 8 중 C는 대조군과 EVE 동물모델의 GFAP 발현 세포에 대한 결과를 비교한 것이고, 도 8 중 D는 대조군과 EVE 동물모델의 Oligo-2 발현 세포에 대한 결과를 비교한 것이다. 상기 도 8에 있어서, ###는

P>0.001을 의미한다.

도 9는 본 발명의 P-siSTAT3를 자가면역성 신경질환 동물모델에 농도별로 투여하고 면역세포 침윤의 억제 효과를 H&E 염색으로 확인한 결과이다. 상기 도 9 중 A는 P-siSTAT3의 농도별 억제 효과를 확인한 결과이며, 도 9 중 B는 P-siSTAT3와 대조군의 결과를 비교한 것이다.

도 10은 본 발명의 P-siSTAT3를 자가면역성 신경질환 동물모델에 농도별로 투여하고 미세아교세포 마커인 Iba-1의 발현을 면역형광분석으로 확인한 결과이다. 상기 도 10 중 A는 P-siSTAT3의 농도별 억제 효과를 확인한 결과이며, 도 10 중 B는 P-siSTAT3와 대조군의 결과를 비교한 것이다.

도 11은 본 발명의 P-siSTAT3를 자가면역성 신경질환 동물모델에 농도별로 투여하고 염증성 단백질의 발현 억제 효과를 웨스턴블랏으로 분석한 결과이다. 도 11 중 A는 각 인자의 발현에 대한 P-siSTAT3의 농도별 억제 효과를 확인한 결과이고, 도 11 중 B는 P-siSTAT3와 대조군의 결과를 비교한 것이며, 도 11 중 C는 P-siSTAT3군의 STAT3의 발현을 확인한 결과이며, 도 11 중 D는 P-siSTAT3군의 pSTAT3의 발현을 확인한 결과이고, 도 11 중 E는 P-siSTAT3군의 GFAP의 발현을 확인한 결과이며, 도 11 중 F는 P-siSTAT3군의 Iba-1의 발현을 확인한 결과이고, 도 11 중 G는 P-siSTAT3군의 iNOS 발현을 확인한 결과이며, 도 11 중 H는 대조군의 STAT3의 발현을 확인한 결과이고, 도 11 중 I는 대조군의 pSTAT3의 발현을 확인한 결과이며, 도 11 중 J는 대조군의 GFAP의 발현을 확인한 결과이고, 도 11 중 K는 대조군의 Iba-1의 발현을 확인한 결과이며, 도 11 중 L은 대조군의 iNOS 발현을 확인한 결과이다. 상기 도 11에 있어서, **는 P>0.01을 의미하고, ***는 P>0.001을 의미하며, #는 P>0.05을 의미하고, ##는 P>0.01을 의미하며, ###는 P>0.001을 의미한다.

도 12는 본 발명의 P-siSTAT3를 자가면역성 신경질환 동물모델에 농도별로 투여하고 염증 인자 mRNA 발현을 RT-PCR로 분석한 결과이다. 도 12 중 A는 각 인자의 발현에 대한 P-siSTAT3의 농도별 억제 효과를 확인한 결과이고, 도 12 중 B는 COX-2 발현을 확인한 결과이며, 도 12 중 C는 iNOS의 발현을 확인한 결과이고, 도 12 중 D는 IL-1 β 의 발현을 확인한 결과이며, 도 12 중 E는 IL-6의 발현을 확인한 결과이고, 도 12 중 F는 TNF- α 의 발현을 확인한 결과이며, 도 12 중 G는 MIP-1 α 발현을 확인한 결과이고, 도 12 중 H는 RANTES의 발현을 확인한 결과이다. 상기 도 12에 있어서, *는 P>0.05을 의미하고, **는 P>0.01을 의미하며, ***는 P>0.001을 의미하고, ##는 P>0.01을 의미하며, ###는 P>0.001을 의미한다.

도 13은 본 발명의 P-siSTAT3를 자가면역성 신경질환 동물모델에 농도별로 투여하고 면역세포 침윤 및 미세아교세포 활성화 효과를 유세포분석으로 분석한 결과이다. 도 13 중 A는 CD4 양성세포 발현을 확인한 결과이고, 도 13 중 B는 CD4+INF- γ 양성세포 발현을 확인한 결과이며, 도 13 중 C는 CD4+IL-17A 양성세포 발현을 확인한 결과이고, 도 13 중 D는 CD11b+CD45^{low} 양성세포 발현을 확인한 결과이며, 도 13 중 E는 CD11b+CD45^{high} 양성세포 발현을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 이하 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예들을 상세히 설명한다. 이하의 설명에 있어, 당업자에게 주지 명한 기술에 대해서는 그 상세한 설명을 생략할 수 있다. 또한, 본 발명을 설명함에 있어서, 관련된 공지 기능 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다.
- [0017] 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0018] 본 발명은 STAT3 특이적 siRNA 및 생분해성 고분자 물질로 구성된 나노입자를 포함하는, 자가면역성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0019] 본 발명에서 사용되는 용어 “예방”은 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환의 증상을 억제하거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0020] 본 발명에서 사용되는 용어 “치료”는 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환의 증상을 호전 또는 이롭게 변경시키는 모든 행위를 의미한다.

- [0021] 작은 RNA(small RNA: 이하 "sRNA"라 칭함)는 생체 내에서 유전자 발현을 조절하는 역할을 하는 17 내지 25 뉴클레오티드(nucleotide: 이하 "nt"라 칭함) 정도 길이의 리보핵산을 말한다. sRNA는 그 생성되는 방식에 따라 크게 마이크로RNA(microRNA: 이하 "miRNA"라 칭함)와 작은 간섭 RNA(small interfering RNA: 이하 "siRNA"라 칭함)로 분류된다. miRNA는 부분적으로 이중나선을 이루는 헤어핀 RNA(hairpin RNA)로부터 생성되며, siRNA는 긴 이중가닥 RNA(double strand RNA: 이하 "dsRNA"라 칭함)으로부터 유래한다. 일반적으로 생체 내의 여러 조절과정에서 중요한 역할을 하는 sRNA는 miRNA이며, 실험 기술적으로 특정 유전자의 발현을 조절하는데 사용되는 sRNA는 siRNA로 분류된다. siRNA(small interfering RNA)는 특정 mRNA의 절단을 통하여 RNA 간섭을 유도할 수 있는 짧은 이중가닥 RNA를 말한다. siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중가닥 RNA 부분이 완전히 쌍을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 쌍을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. 쌍을 이루는 염기 길이는 바람직하게 50 내지 80 염기일 수 있다. siRNA 말단 구조는 표적 유전자의 발현을 RNA 간섭 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평할 말단 또는 돌출 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3' 말단 돌출 구조와 5' 말단 돌출 구조 모두 가능하다.
- [0022] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 STAT3 특이적 siRNA는, 서열번호 1 및 서열번호 2로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 염기서열을 포함하는 것일 수 있으며, 이는 STAT3 단백질을 인코딩하는 유전자에 상보적으로 결합하는 siRNA것일 수 있다. 바람직하게는 상기 서열번호 1로 표시되는 염기서열은 STAT3 유전자에 상보적으로 결합하는 센스가닥(sense strand)일 수 있고, 상기 서열번호 2로 표시되는 염기서열은 이에 상보적 서열인, 안티센스 가닥일 수 있다.
- [0023] 본 발명에 따른 STAT3 특이적 siRNA는 해당 유전자를 암호화하는 mRNA와 상보적으로 결합할 수 있도록 설계된 염기서열을 가지므로, 해당 유전자의 발현을 효과적으로 억제할 수 있으며, 이에 따라 해당 단백질의 발현 또한 현저하게 저해시킬 수 있음이 특징이다. 또한, 상기 siRNA의 3' 말단에 하나 또는 두 개 이상의 비결합(unpaired)된 뉴클레오티드를 포함하는 구조인 오버행(overhang)을 포함할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 "서열번호 1" 또는 "서열번호 2"로 표시되는 염기서열은, RNA 서열로서 우라실(uracil, U)을 포함하는 염기서열이나, 국제 서열목록 작성에 따른, WIPO의 ST.26 표기 기준에 따라, 우라실의 표기가 티민(Thymine, T)으로 변환된 것으로서, 본 발명의 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 염기서열은 표기상 DNA와 같은 T를 포함하는 서열로 표기되나, 실체적으로는 RNA의 U를 포함하는 서열인 것이다.
- [0025] 본 발명은 상기 siRNA 자체를 포함할 수도 있으나 그의 단편을 포함할 수도 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0026] 본 발명에 있어서, 상기 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 염기서열의 변이체 또한 본 발명의 범위 내에 포함된다. 본 발명은 상기 염기서열의 등가물, 예를 들어, 일부 염기서열이 결실(deletion), 치환(substitution) 또는 삽입(insertion)에 의해 변형되었지만, 자가면역성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서 상기 siRNA와 기능적으로 동일한 작용을 할 수 있는 변이체(variants)를 포함하는 개념이다. 구체적으로, 상기 siRNA는 각 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 염기 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 상기 RNA에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 RNA 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.
- [0027] 본 발명에서, siRNA는 변형되지 않고 자연에 존재하는 리보핵산 단위구조를 가지고 있는 것이거나, 화학적으로 변형된 것일 수 있다. 이러한 siRNA의 화학적 변형은 생체 내 안정성 향상, 핵산 분해효소 저항성 부여 및 비특이적 면역반응 감소를 위한 것이다.
- [0028] 상기 화학적 변형을 통해, RNAi 능력에는 영향을 미치지 않고, 뉴클레아제(nuclease)에 대한 저항성 증진, 세포 내 흡수(uptake) 증가, 세포 표적화 향상, 안정성 증가, 인터페론 활성 감소, 면역 반응 및 센스(sense) 효과와 같은 타겟 이외의(off-target) 효과 감소 등을 포함하는 siRNA의 다양한 특성을 변형되지 않은 siRNA 보다 향상시킬 수 있다.
- [0029] 이러한 siRNA의 화학적 변형 방법은 특별히 제한되지 않으며, 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 당업자라면 당해 기술 분야에 공지된 방법을 이용하여 원하는 방식대로 상기 siRNA를 합성하고 변형시킬 수 있다. 예컨대 뉴클레오티드 내 당 구조의 2' 탄소 위치에서 -OH기가 -CH₃(메틸), -OCH₃(methoxy), -NH₂, -F(불소), -O-2-메톡시에틸 -O-프로필(propyl), -O-2-메틸티오에틸(methylthioethyl), -O-3-아미노프로필, -O-3-디

메틸아미노프로필, -O-N-메틸아세트아미도 또는 -O-디메틸아미도옥시에틸로의 치환에 의한 변형; 뉴클레오티드 내 당(sugar) 구조 내의 산소가 황으로 치환된 변형; 또는 뉴클레오티드 결합의 포스포로티오에이트(phosphorothioate) 또는 보라노포스페이트(boranophosphate), 메틸 포스포네이트(methyl phosphonate) 결합으로의 변형에서 선택된 하나 이상의 변형이 조합되어 사용될 수 있으며, PNA(peptide nucleic acid), LNA(locked nucleic acid) 또는 UNA(unlocked nucleic acid) 형태로의 변형도 사용이 가능하고, siRNA의 5'-또는 3'-말단에 콜레스테롤, 비오틴, 세포 투과성 펩타이드(cell penetrating peptide)와 같은 리간드(ligand)를 붙이는 것도 가능하다.

[0030] 상기 화학적 변형 중 siRNA 센스(sense) 및 안티센스(antisense) 가닥의 포스포디에스테르 결합을 포스포로티오에이트(phosphorothioate) 또는 보라노포스페이트(boranophosphate) 결합으로 치환하는 방법을 통해 뉴클레아제(nuclease)의 핵산 분해에 대한 저항성을 높일 수 있다. 예컨대, siRNA 센스(sense)와 안티센스(antisense) 양쪽 가닥의 3'-말단 포스포디에스테르 결합을 포스포로티오에이트 결합으로 변경할 수 있다.

[0031] 상기 화학적 변형 중 siRNA 센스 또는 안티센스 가닥의 5' 말단, 3' 말단, 또는 양 말단에 ENA(Ethylene bridge nucleic acid), PNA(peptide nucleic acid), LNA(locked nucleic acid) 또는 UNA(unlocked nucleic acid)를 도입하는 방법이 있을 통해 RNAi 능력에 영향을 미치지 않고 siRNA 안정성을 증가시키고 면역 반응 및 비특이적 억제 효과를 줄일 수 있다.

[0032] 상기 화학적 변형 외에도 다양한 화학적 변형을 가할 수 있으며, 이러한 화학적 변형은 어느 한 가지 형태의 변형만 이루어질 수도 있고, 여러 가지 화학적 변형이 함께 이루어질 수도 있다.

[0033] 다만 상기 변형에 있어서, siRNA 이중 가닥구조를 안정화시키는 동시에 유전자 발현 저해활성을 감소시키지 않도록, 바람직하게는 최소한의 변형이 이루어지도록 하는 것이 좋다.

[0034] 본 발명에 있어서, 상기 생분해성 고분자 물질은 PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid)), 폴리-L-락트산(poly-L-lactic acid), 폴리-글리콜산(poly-glycol acid), 폴리-D-락트산-co-글리콜산(poly-D-lactic acid-co-glycol acid), 폴리-L-락트산-co-글리콜산(poly-L-lactic acid-co-glycol acid), 폴리-D,L-락트산-co-글리콜산(poly-D,L-lactic acid-co-glycol acid), 폴리-카프로락톤(polycaprolactone), 폴리-발레로락톤(poly-valerolactone), 폴리-하이드록시 부티레이트(poly-hydroxy butyrate), 폴리-하이드록시 발레레이트(poly-hydroxy valerate), 덱스트란(dextran), 폴리-포스파젠(poly-phosphazene) 및 폴리-아미노에스터(poly-amino ester)로 이루어진 군에서 선택된 어느 1종 이상인 것일 수 있다. 보다 바람직하게는 PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid))일 수 있다.

[0035] 상기 PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid))는 생분해성 및 생체적합성 공중합체이다. PLGA는 두 개의 상이한 단량체인 글리콜산 및 락트산의 고리형 이량체인 1,4-디옥산-2,5-디온(1,4-dioxane-2,5-diones)의 개환 공중합체에서 합성된다. PLGA는 FDA에서 승인한 drug carriers로서, 다양한 약물을 담지하여, 치료분야에서 응용되고 있으며, 생분해성 고분자 나노-/미립자를 제조하는 기술은 전달 시스템으로의 이용뿐만 아니라 백신 제조, 생체 면역 질병치료 등에 관한 연구를 통해 최근 들어 많은 관심을 받고 있다.

[0036] 본 발명에 있어서, STAT3 특이적 siRNA는 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 생분해성 고분자 물질의 표면에 단순 공유결합, 이온결합 또는 링커가 매개된 공유결합 등에 의해 결합될 수 있다. 상기 공유결합을 매개하는 링커는 생분해성 고분자 물질과 STAT3 특이적 siRNA의 말단에서 공유결합하며, 필요에 따라 특정 환경에서 분해가 가능한 결합을 제공하는 한 특별히 한정되는 것은 아니다. 따라서, 상기 링커는 본 발명에 따른 나노입자의 제조과정 중 STAT3 특이적 siRNA 및/또는 생분해성 고분자 물질을 활성화하기 위해 결합시키는 어떠한 화합물도 제한없이 사용될 수 있다.

[0037] 본 발명의 일실시예에 따르면 본 발명에 따른 STAT3 특이적 siRNA 및 생분해성 고분자 물질로 구성된 나노입자를 실험적 자가면역성 뇌척수염(EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis) 동물 모델에 투여시 척수의 탈수초화가 억제됨을 확인하였다. 더불어 본 발명에 따른 STAT3 특이적 siRNA 및 생분해성 고분자 물질로 구성된 나노입자는 STAT3의 인산화를 억제시키며, Iba-1 또는 GFAP의 발현을 감소시키고, 염증성 사이토카인, 염증 매개 효소 또는 케모카인의 발현을 효과적으로 억제하였다. 보다 구체적으로 본 발명에 따른 STAT3 특이적 siRNA 및 생분해성 고분자 물질로 구성된 나노입자는 IL-1 β , IL-6 및 TNF- α 로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 염증성 사이토카인의 발현을 억제시켰다. 더불어 본 발명에 따른 STAT3 특이적 siRNA 및 생분해성 고분자 물질로 구성된 나노입자는 COX-2 및 iNOS로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 염증매개 효소의 발현을 억제시켰다. 또한 본 발명에 따른 STAT3 특이적 siRNA 및 생분해성 고분자 물질로 구성된 나노입자는 MIP-1 α 및

RANTES로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 케모카인의 발현을 억제시켰다. 더불어 본 발명에 따른 STAT3 특이적 siRNA 및 생분해성 고분자 물질로 구성된 나노입자는 면역세포의 침윤 또는 활성을 감소시키는 효과를 보였다. 더욱 구체적으로 본 발명에 따른 STAT3 특이적 siRNA 및 생분해성 고분자 물질로 구성된 나노입자는 Th1 및 Th17로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 침윤 또는 활성을 감소시켰다. 더욱이 본 발명에 따른 STAT3 특이적 siRNA 및 생분해성 고분자 물질로 구성된 나노입자는 척수에서혈액뇌장벽(Blood-brain barrier, BBB)의 손상을 예방할 수 있음을 확인하였다.

[0038] 따라서 본 발명에 따른 STAT3 특이적 siRNA 및 생분해성 고분자 물질로 구성된 나노입자는 자가면역성 신경질환을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있으며, 상기 자가면역성 신경질환은 다발성경화증(multiple sclerosis), 시신경척수염(neuromyelitis optica), 급성파종성뇌척수염(acute disseminated encephalomyelitis), 상행성 척수염(ascending myelitis), 중심성 척수염(central myelitis), 하행성 척수염(descending myelitis) 횡단성 척수염(transverse myelitis), 중증근무력증(myasthenia gravis), 길랑바레증후군(guillain-barre syndrome), 자가면역성 포도막염(autoimmuneuveitis), 자가면역성뇌증(autoimmune encephalopathy) 및 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증(chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는 상기 자가면역성 신경질환은 다발성 경화증(Multiple Sclerosis) 및 뇌척수염(encephalomyelitis)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0039] 본 발명의 약학적 조성물에는 유효성분 이외에 보조제(adjutant)를 추가로 포함할 수 있다. 상기 보조제는 당해 기술분야에 알려진 것이거나 어느 것이나 제한 없이 사용할 수 있으나, 예를 들어 프로인트(Freund)의 완전 보조제 또는 불완전 보조제를 더 포함하여 그 효과를 증가시킬 수 있다.

[0040] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 유효성분을 약학적으로 허용된 담체에 혼입시킨 형태로 제조될 수 있다. 여기서, 약학적으로 허용된 담체는 제약 분야에서 통상 사용되는 담체, 부형제 및 희석제를 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물에 이용할 수 있는 약학적으로 허용된 담체는 이들로 제한되는 것은 아니지만, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0041] 본 발명의 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0042] 제제화할 경우에는 통상 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 그러한 고형 제제는 유효성분에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘 카르보네이트, 수크로스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 일반적으로 사용되는 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수용성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유와 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0043] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 개체에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식이 예상될 수 있는데, 예를 들면 경구, 정맥, 근육, 피하, 복강내 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0044] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여량은 개체의 연령, 체중, 성별, 신체 상태 등을 고려하여 선택된다. 상기 약학적 조성물 중 포함되는 유효성분의 농도는 대상에 따라 다양하게 선택할 수 있음은 자명하며, 바람직하게는 약학적 조성물에 0.01 ~ 5,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 포함되는 것이다. 그 농도가 0.01 $\mu\text{g/ml}$ 미만일 경우에는 약학 활성이 나타나지 않을 수 있고, 5,000 $\mu\text{g/ml}$ 를 초과할 경우에는 인체에 독성을 나타낼 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0045] 더불어 본 발명의 약학적 조성물은 자가면역성 신경질환의 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다. 또한 본 발명

의 약학적 조성물은 본 발명에 따른 STAT3 특이적 siRNA 및 생분해성 고분자 물질로 구성된 나노입자 이외에, 자가면역성 신경질환 예방, 개선 또는 치료 효과의 상승, 보강을 위하여 이미 안전성이 검증되고 자가면역성 신경질환 예방 또는 치료 효과를 갖는 것으로 공지된 임의의 화합물이나 천연 추출물을 추가로 포함할 수 있다.

[0046] 또한 본 발명은 STAT3 특이적 siRNA 및 생분해성 고분자 물질로 구성된 나노입자를 포함하는, 자가면역성 신경질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0047] 더불어 본 발명은 STAT3 특이적 siRNA 및 생분해성 고분자 물질로 구성된 나노입자를 포함하는, 자가면역성 신경질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0048] 본 발명에 따른 식품 조성물은 기능성 식품(functional food), 영양 보조제(nutritional supplement), 건강식품(health food), 건강보조식품(health supplement) 및 식품 첨가제(food additives) 등의 모든 형태를 포함한다. 상기 유형의 식품 조성물은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 분말제, 정제, 캡슐제, 환제 및 액제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 형태로 제형화 될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 당 업계에 공지된 방법을 이용하여 다양한 형태로 제조할 수 있다.

[0049] 예를 들면, 건강식품으로는 본 발명의 STAT3 특이적 siRNA 및 생분해성 고분자 물질로 구성된 나노입자 자체를 과립화, 캡슐화 및 분말화하여 섭취하거나 차, 주스 및 드링크의 형태로 제조하여 음용하도록 할 수 있다. 또한, 본 발명의 STAT3 특이적 siRNA 및 생분해성 고분자 물질로 구성된 나노입자를 자가면역성 신경질환의 예방, 개선 또는 치료 활성이 있다고 알려진 공지의 물질 또는 활성 성분과 함께 혼합하여 조성물의 형태로 제조할 수 있다.

[0050] 또한, 기능성 식품으로는 음료(알콜성 음료 포함), 과일 및 그의 가공식품(예: 과일통조림, 병조림, 잼, 마멀레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(예: 햄, 소시지콘비이프 등), 빵류 및 면류(예: 우동, 메밀국수, 라면, 스파게티, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 엿, 유제품(예: 버터, 치즈 등), 식용식물유지, 마아가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품, 각종 조미료(예: 된장, 간장, 소스 등) 등에 본 발명의 STAT3 특이적 siRNA 및 생분해성 고분자 물질로 구성된 나노입자를 첨가하여 제조할 수 있다.

[0051] 또한 본 발명의 식품 조성물은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 상기 "식품 첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전처에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다. 상기 "식품 첨가물 공전"에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류들을 들 수 있다.

[0052] 본 발명의 식품 조성물에 있어, 상기 STAT3 특이적 siRNA 및 생분해성 고분자 물질로 구성된 나노입자는 바람직하게 식품 조성물 대비 0.00001~50 중량%로 포함될 수 있다. 상기 함량이 0.00001 중량% 미만일 경우에는 그 효과가 미비하고, 50 중량%를 초과하는 경우에는 사용량 대비 효과 증가가 미미하여 비경제적이다.

[0053] 또한, 본 발명의 STAT3 특이적 siRNA 및 생분해성 고분자 물질로 구성된 나노입자를 식품 첨가제의 형태로 사용하기 위해서는 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조하여 사용할 수 있다.

[0054] 본 발명의 조성물이 음료로 제조될 경우, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 포함할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스, 수크로오스와 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로덱스트린과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml 당 일반적으로 약 0.01 내지 10 g, 바람직하게는 약 0.01 내지 0.1 g이다.

[0055] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0056] 본 발명에 있어서, “건강보조식품” 또는 “건강기능식품(health functional food)”이란 건강기능식품에 관한 법률에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, “기능성”

이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

[0058] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0060] <실시예 1> PLGA-siSTAT3의 자가면역성 신경질환 개선 효과 확인을 위한 준비

[0061] <1-1> siSTAT3를 포함하는 poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA) 나노입자 (P-siSTAT3)의 제조

[0062] 본 발명의 PLGA에 STAT3 siRNA(siSTAT3)가 담지된 PLGA-siSTAT3 나노입자(P-siSTAT3)를 제조하였다. 구체적으로, STAT3 siRNA(서열번호 1, 5'-AAA CGT GAG CGA CTC AAA CTG CCC T-3' 및 서열번호 2, 5'-AGG GCA GTT TGA GUC GCT CAC GTT T-3')가 20 μ M의 농도로 포함된 TE 7.5 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 버퍼 및 PLGA (Corbion, Amsterdam, the Netherlands) 25 mg가 포함된 디클로로메탄(dichloromethane, DCM) 800 μ l을 준비하였다. 한편, 본 발명의 P-siSTAT3의 미세아교세포에 대한 친화력을 확인하기 위하여, STAT3 siRNA(siSTAT3) 대신에 녹색 형광을 나타내는 쿠마린-6(Coumarin-6)을 포함하는 PLGA도 사용하였다. 그 후 상기 TE7.5 버퍼 200 μ l를 디클로로메탄에 한 방울씩 첨가하여 혼합물을 제조하였다. 상기 혼합물을 초음파 처리하여(UP100H ultrasonic processor, Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Germany) 1차 W1/O 에멀전으로 유화시켰다. 2% PVA1500 (w/v) 2 ml를 1차 W1/O 에멀전에 첨가한 후 초음파 처리하여 W1/O/W2 이중 에멀전을 제조하였다. 제조된 W1/O/W2 이중 에멀전을 2% PVA1500(w/v) 6ml에 희석하였으며, DCM을 증발시키기 위하여 실온에서 3시간 동안 교반시켰다. 또한 4℃에서 10분 동안 38,000 g에서 초원심분리(Optima™ Max Ultracentrifuge, Beckman COULTER, Brea, CA)하여 PLGA 나노입자를 수집하였다. 수집된 PLGA 나노입자를 탈이온화된 RNase 프리-워터로 2회 세척하였다. 세척된 PLGA 나노입자를 물에 다시 희석한 후 동결 건조하여 준비하였다.

[0064] <1-2> 다발성 경화증 또는 뇌척수염 동물모델 제작 및 분류

[0065] 본 발명의 PLGA-siSTAT3의 다발성 경화증 또는 뇌척수염 개선 효과를 확인하기 위하여, 다발성 경화증 및 뇌척수염 동물모델인, 실험적 자가면역성 척수염 동물모델을 제작하였다. 구체적으로, Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG₃₅₋₅₅) 펩타이드를 이용하여 실험적 자가면역성 뇌척수염(EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis) 동물 모델을 제작하였으며, 동물모델은 출생 후 8주령의 암컷 C57BL/6 마우스(Narabiototechnology, 대한민국; 체중 20-21 g)를 준비하여 1주일 동안 안정시켰다. 그 후 마우스에 MOG₃₅₋₅₅ 펩타이드 (Sigma-Aldrich, 미국) 200 μ g이 포함된 에멀전(emulsion)과 결핵균(mycobacterium tuberculosis; Difco, 미국) 550 μ g이 포함된 IFA (Incomplete Freund's adjuvant; Difco, 미국)를 혼합하여 100 μ l의 에멀전을 EAE군의 양쪽 허리부위에 피하로 주사하였고, 동시에 백일해독소(PTX, pertussis toxin; List Biologic, 미국) 200 ng을 복강으로 주사하였다. 48시간 후에 동일한 양의 백일해독소를 복강으로 추가 주사하였다. 상기 MOG₃₅₋₅₅ 펩타이드에 의해 유도된 만성 EAE 동물모델의 임상 증상의 척도를 8가지로 구분하여 확인하였다. 즉, 반응이 없음(0 단계), 꼬리 끝이 처짐(1 단계), 꼬리 전체가 처짐(2 단계), 양쪽 뒷다리의 약한 마비(3 단계), 양쪽 뒷다리의 마비(4 단계), 한쪽 앞 다리까지 마비(5 단계), 앞쪽 양쪽 다리까지 마비(6 단계) 및 죽음(7 단계)으로 구분하였다. 본 발명의 P-siSTAT3는 5, 10 및 20 mg/ml의 농도로 PBS에 녹인 후, EAE 유도 후 임상적 증상이 나타나는 시점(7~8일 째)에 척수 내로 1회 투여하였으며, P-siSTAT3는 개체 당 투여량이 10 μ l이 되도록 조정하였다. 또한, 본 발명의 P-siSTAT3의 대조군으로서, 이용된 “scrambled siRNA”는 상기의 siRNA의 염기서열을 무작위적으로 섞은 RNA로서, 타겟으로 하는 mRNA에 특이적으로 결합하는 siRNA를 이용하였다. 그 후 행동 실험을 위하여, 하기 표 1에 기재된 군으로 마우스를 분류하였다.

표 1

[0066]

실험군	약물 투여
Sham군	MOG ₃₅₋₅₅ 펩타이드와 P-siSTAT3를 투여하지 않은 정상 대조군
EAE + PBS 군	MOG ₃₅₋₅₅ 펩타이드로 EAE를 유도하고, PBS를 척수강 내로 직접 투여한 군

EAE + P-siSTAT3 군	MOG ₃₅₋₅₅ 펩타이드로 EAE를 유도하고, P-siSTAT3를 PBS에 녹여 척수강 내로 직접 투여한 군
EAE + PLGA-scrambled siRNA (P-Sc)군	MOG ₃₅₋₅₅ 펩타이드로 EAE를 유도하고 P-Sc를 척수강 내로 투여한 군
EAE + siRNA (siSTAT3)군	MOG ₃₅₋₅₅ 펩타이드로 EAE를 유도하고, siRNA를 척수강 내로 직접 투여한 군
P-siSTAT3군	MOG ₃₅₋₅₅ 펩타이드로 EAE를 유도하지 않은 정상 마우스에 P-siSTAT3를 PBS에 녹여(20 mg/ml) 척수강 내로 직접 투여한 군

또한, 조직학 및 분자생물학적 분석을 위하여, 하기 표 2에 기재된 군으로 마우스를 분류하였다.

표 2

실험군	약물 투여
Sham군	MOG ₃₅₋₅₅ 펩타이드와 P-siSTAT3를 투여하지 않은 정상 대조군
EAE + PBS 군	MOG ₃₅₋₅₅ 펩타이드로 EAE를 유도하고, PBS를 척수강 내로 직접 투여한 군
EAE + P-siSTAT3 군	MOG ₃₅₋₅₅ 펩타이드로 EAE를 유도하고, P-siSTAT3를 PBS에 녹여 척수강 내로 직접 투여한 군
EAE + PLGA-STAT3 scrambled siRNA (P-Sc)군	MOG ₃₅₋₅₅ 펩타이드로 EAE를 유도하고 P-Sc를 척수강 내로 투여한 군
P-siSTAT3군	MOG ₃₅₋₅₅ 펩타이드로 EAE를 유도하지 않은 정상 마우스에 P-siSTAT3를 PBS에 녹여(20 mg/ml) 척수강 내로 직접 투여한 군

<1-3> 조직 병리학적 분석

조직 병리학적 분석을 위하여, 상기 실시예 1-2의 각 군의 마우스에 EAE 유발 후, 임상증상이 심화되는 16 내지 17일차에, 마우스를 마취하고, 4% 파라포름알데하이드(PFA, paraformaldehyde)를 심장으로 관류하여 고정하였으며, 허리부위의 척수(요추 4-5번; L4-5)를 적출하였다. 적출한 척수는 4% PFA에 담가 4℃에서 추가로 1일간 고정한 후, 0% 수크로스(sucrose)로 바꾸어 4℃에서 3일간 침지하여, 동결 손상을 방지하였다.

그 후 EAE 동물모델에서 P-siSTAT3의 탈수초화 현상의 억제 효과를 확인하기 위하여 수초의 주성분인 인지질을 염색하는 룩솔 페스트 블루(luxol fast blue, LFB) 염색을 이용하여, 탈수초화 정도를 확인하였으며, H&E염색을 이용하여, 면역세포의 침윤을 확인하였다. 구체적으로, LFB 염색을 위하여, 동결절편기를 이용하여 척수를 10 μ m 두께로 잘라 절편을 제작한 후, 100% 자일렌(xylene)에서 100%, 95%, 90%, 80% 및 70% EtOH 순서로 각 용액마다 2분씩 담가 침수시킨 이후, 0.1% 룩솔 페스트 블루 용액 A를 이용해 염색해주고, B를 이용해 탈염색하였다. 그 후 70%, 80%, 90%, 95% 및 100% EtOH을 각 용액마다 2분씩 담가 탈수시킨 이후 100% 자일렌에 담근 뒤 마운팅 용액을 처리하였다. 척수 바깥 부분의 백질에 축삭이 존재하기 때문에 정상 조직을 염색한 경우에는 척수 백질이 진한 파란색으로 나타나지만, 외상 후 탈수초화 현상으로 인하여 수초가 소실되게 되면, 염색 강도가 약해지고, 파란색을 띄게 됨으로, 이를 이용하여, 탈수초화 정도를 확인하였다.

H&E 염색은, 상기와 동일한 방법으로 준비한 척수조직을 H&E 염색을 위해 슬라이드에 두고 헤마톡실린(hematoxyline) 용액에 담가 3분간 기다린 후 증류수로 1분씩 세 번 세척하였다. 그리고 에오진(eosin) 용액에 담가 10분간 기다린 후 증류수로 1분씩 세 번 세척하였으며, 70%, 80%, 90%, 95% 및 100% EtOH에 차례로 2분간 담가서 탈수한 후 자일렌에 반응시켜, 면역세포의 침윤을 확인하였다.

<1-4> 면역조직화학염색

면역조직화학염색을 위하여, 상기 실시예 1-3과 동일한 방법으로 동결 절편을 제작하였다. 그 후 절편을 블로킹 솔루션(200 μ g 소혈청알부민(BSA, Bovin serum albumin, sigma, 미국), 500 μ l FBS (Fetal bovine serum, Gibco, 독일), 500 μ l NGS (Normal goat serum, Vector, 미국) 및 10 μ l Triton X-100 (sigma, 미국)을 PBS에 혼합하여 10ml을 준비)을 넣은 플레이트에 담가 1시간 반응시킨 후, PBS로 세척하고, 미세아교세포의 마커인 Iba-1에 대한 1차 항체(Iba-1(ionized calcium-binding adapter molecule-1), 미엘린 수초의 마커인

MBP(Myelin basic protein)에 대한 1차 항체, 별아교세포의 마커인 GFAP(Glial fibrillary acidic protein)에 대한 1차 항체 또는 희소돌기아교세포의 마커인 Olig-2에 대한 1차 항체를 블로킹 솔루션에 희석한 용액으로 교체하여, 12시간 이상 반응시켰다. 그 후 PBS로 세척한 후 2차 항체를 PBS에 1:1000으로 희석한 용액으로 교체하고, 1시간동안 반응시킨 후 PBS로 세척하였다. 그 후 마운팅 용액을 이용해 커버글라스를 덮었다.

[0078] <1-5> 웨스턴블롯 분석

[0079] MOG₃₅₋₅₅ 펩타이드로 EAE가 유도된 동물 모델에서 탈수초화, 아교세포의 활성화, 염증성 사이토카인의 분비 및 염증기작의 활성화에 대해 P-siSTAT3의 억제 효과를 확인하기 위해 다양한 마커들의 발현을 웨스턴 블롯 분석을 이용해서 확인하였다. 구체적으로, 각 군의 마우스에서, 임상증상이 심화되는 시기인 16 내지 17일 사이에 마우스를 인도적으로 희생한 후, 허리부위의 척추(요추 4-5번; L4-5)를 적출하였고, 이를 단백질 용해 완충액(protein lysis buffer; 10 mM 트리스, 0.5 mM EDTA, 0.25 M 수크로스) 200 μ l를 첨가한 후, 분쇄기를 이용하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질은 소혈청알부민(BSA, bovine serum albumin, sigma, 미국)를 사용한 Bradford(Bio-rad, 미국) 방법을 이용하여 각 개체의 단백질을 정량한 뒤 단백질 25 μ g은 10% SDS-PAGE(Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)에 의해 분리하여 PVDF(polyvinylidene difluoride) 멤브레인(membrane, Gendepot, 영국)으로 이동시켰다. PVDF 멤브레인은 5% 소혈청알부민(BSA, Bovin serum albumin, sigma, 미국)에서 1시간 동안 블로킹시켰다. TBST로 씻은 후 1차 항체[STAT3(염증마커), GFAP(별아교세포 마커), iNOS(염증마커) 및 GAPDH]를 3% BSA에 1:1,000으로 희석시켜 4°C에서 하루 동안 반응시킨 후 TBST로 10분씩 3회 세척하고, 2차 항체와 함께 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 2차 항체 반응 후 TBST로 세척한 뒤 ECL system(Santacruz, 미국)을 이용하여, 밴드를 확인하였다. 단백질의 확인 및 정량 분석은 이미지 장비 ChemiDoc XRS+(Bio-Rad)를 이용하였다.

[0081] <1-6> 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction)

[0082] MOG₃₅₋₅₅ 펩타이드로 EAE가 유도된 동물모델에서 염증성사이토카인의 분비 및 염증기작의 활성화에 대한 P-siSTAT3의 억제 효과를 확인하기 위하여 실시간 PCR 분석을 이용하여 mRNA 발현을 확인하였다. 구체적으로, 각 군의 마우스에서, 임상증상이 심화되는 시기인 16 내지 17일 사이에 마우스를 인도적으로 희생한 후, 허리부위의 척추(요추 4-5번; L4-5)를 적출하였다. 적출된 척추 조직은 트리졸(Trizol, Invitrogen, 미국) 1 ml를 첨가하여 분쇄기로 조직을 갈고 원심분리하여 RNA를 분리하였다. cDNA를 합성하기 위해 0.5 μ g의 Oligo dT, 0.5 mM dNTP mix, 5x first-strand buffer, RNase out, 5 mM dithiothreitol (DTT), 및 M-MLV 역전사효소를 포함하는 반응 혼합물(reaction mixture) 중에서 1 μ g의 총 RNA를 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. RT-PCR 분석은 제조사(RT-PCR kit; Roche, Germany)의 메뉴얼에 따라 수행하였으며, PCR에 이용된 프라이머 서열은 하기 표 3에 나타내었다. PCR 증폭을 위해, 특정 올리고뉴클레오타이드 프라이머 쌍은 6 μ l of PCR Master Mix (Lucigen, WI, USA) 중에서 2 μ l의 cDNA 및 0.6 U의 Econo TaqDNA 중합효소를 반응시켰다. PCR 결과물 중 7.5 μ l를 3% 아가로스 젤에서 전기영동하고 트랜스일루미네이터에서 브롬화 에티듐(ethidium bromide)으로 염색한 mRNA의 발현을 확인하였으며, 각 유전자의 발현 수준은 GAPDH(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)으로 정량화하였다.

표 3

표적 유전자	primer		서열번호
	서열(5` - 3`)		
COX-2	COX-2_F	GCT CGG CTT CCA GTA TTG AG	3
	COX-2_R	AGA AGG AAA TGG CTG CAG AA	4
iNOS	iNOS_F	GGC AAA CCC AAG GTC TAG GTT	5
	iNOS_R	TCG CTC AAG TTC AGC TTG GT	6
IL-1 β	IL-1 β_F	TTG TTG CTG TGG AGA AGC TGT	7
	IL-1 β_R	AAC GTC ACA CAC CAG CAG GTT	8
IL-6	IL-6_F	TCC ATC CAG TTG CCT TCT TGG	9
	IL-6_R	CCA CGA TTT CCC AGA GAA CAT	10
TNF- α	TNF- α_F	AGC CCC CAG TCT GTA TCC TT	11
	TNF- α_R	CTC CCT TTG CAG AAC TCA GG	12

MIP-1 α	MIP-1 α_F	CAG CCA GGT GTC ATT TTC CT	13
	MIP-1 α_R	AGG CAT TCA GTT CCA GGT CA	14
RANTES	RANTES_F	ACA CCA CTC CCT GCT GCT TT	15
	RANTES_R	GAC TGC AAG ATT GGA GCA CTT G	16
GAPDH	GAPDH_F	AGG TCA TCC CAG AGC TGA ACG	17
	GAPDH_R	CAC CCT GTT GCT GTA GCC GTA T	18

[0085] <1-7> 세포주 배양

[0086] 미세아교세포의 세포주인 BV2와 뇌조각유래 상피세포주인 bEND.3를 10% FBS 및 1% 페니실린(penicillin)/스트렙토마이신(Streptomycin)이 보충된 DMEM에서 37℃, 5% CO₂ 인큐베이터에서 유지하였다. 세포가 안정화된 후, 3 x 10⁵ 개 세포/웰의 밀도로 6-웰 플레이트에 시딩하고 24시간 동안 플레이트에 부착시켰다. 그런 다음 BV2 세포에 LPS 1 μg/ml를 처리하여 4시간 동안 자극하였다. 미세아교세포 활성화와 BBB 손상에 대한 P-siSTAT3의 효과를 조사하기 위해 LPS 자극 1시간 전에 P-siSTAT3(10, 50 및 100 μg/ml)를 처리하였다. 이어서, 배양액 일부를 수득한 후, 48시간동안 배양하였다. 48시간 후, 미리 배양한 bEND.3 세포주에 상기 BV2 배양액 2ml을 처리하여 48시간 동안 배양하고, 다음 분석을 위해 세포를 수집하였다.

[0088] <1-8> 통계학적 분석

[0089] 모든 결과는 SPSS 23.0 package (SPSS Inc, Chicago, USA)을 이용하여 분석하였으며, 실험결과는 mean ± standard deviation(평균 ± 표준편차) 값으로 표시하였다. 통계적 유의성 검증은 ANOVA(일원배치 분산분석)를 이용하여 분석 후 Tukey post hoc로 사후분석하였고, 유의확률(p-value) 값은 p<0.05 및 p<0.01 미만인 경우에 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[0091] <실시예 2> P-siSTAT3가 미세아교세포에 미치는 영향 확인

[0092] <2-1> 미세아교세포의 염증성 반응에 미치는 영향 확인

[0093] 다발성 경화증(Multiple sclerosis, MS) 및 EAE 동물모델에 있어서, 염증과 탈수초화가 진행되는 동안 미세아교세포의 활성화는 NOS와 ROS와 같은 세포독성 인자의 방출을 유도하여 미엘린(myelin, 수초) 손상을 유도하고, 전염증성 사이토카인(IL-6, TNF-α)의 방출을 촉발한다. 이는 결국 혈액뇌장벽(Blood-brain barrier, BBB)의 손상을 유도한다. 더욱이, 활성화된 미세아교세포는 단단한 접합 분자(카드헤린(cadherin), 오클루딘(occludin) 및 클라우딘-5(claudin-5))의 발현을 억제하고, 희소돌기아교세포의 사멸을 유발하며 BBB 투과성을 증가시킨다. 따라서 본 발명에 따른 P-siSTAT3이 미세아교세포의 염증 반응에 영향을 미치는지 여부를 조사하기 위하여, P-siSTAT3를 미세아교세포의 세포주(BV2)에 처리한 후, 이에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과, LPS(Lipopolysaccharide)를 처리하여 염증 반응을 유도한 실험군은 Sham 실험군에 비해 Iba-1 단백질 발현이 유의하게 증가함을 확인하였다. 그러나 본 발명에 따른 P-siSTAT3를 처리한 실험군은 용량 의존적으로 증가가 억제됨이 확인되었다(도 1A 및 도 1B). 이러한 결과와 일치하여, 대표적인 염증효소(iNOS), 사이토카인(IL-6, TNF-α) 및 주요 신호전달 기전(p-STAT3 및 STAT3)의 단백질 발현은 Sham 실험군에 비해 LPS 자극 실험군에서 현저하게 증가하였다. 이에 반해, 본 발명에 따른 P-siSTAT3 처리군에서는 용량 의존적으로 그 발현이 감소함을 확인하였다(도 1A, 도 1C 내지 도 1G). 이러한 결과를 통해 본 발명의 P-siSTAT3가 미세아교세포의 염증성 반응을 억제할 수 있음을 확인하였다.

[0095] <2-2> 미세아교세포의 염증성 반응과 BBB 손상 억제 효과 확인

[0096] 또한 활성화된 미세아교세포 매개 BBB 손상 조건에서 P-siSTAT3의 역할을 분석하였다. P-siSTAT3에 의하여 활성화가 억제된 미세아교세포가 BBB 손상에 미치는 영향을 조사하기 위하여, LPS로 유도한 BV2 세포의 배양액(LPS-BCM) 2ml 및 P-siSTAT3를 처리한 BV2 세포의 배양액(P-siSTAT3-BCM) 2ml을 bEnd.3 세포에 처리하였다. 그 결과, LPS-BCM로 처리한 실험군은 PBS-BCM로 처리한 실험군에 비하여 BBB의 주요 구성분자인 PECAM-1의 단백질

이 더 높은 발현을 보였고, 대표적인 밀착연접 분자인 claudin-5와 ZO-1의 단백질은 더 낮은 발현을 보였다. 이에 반해, P-siSTAT3-BCM을 처리한 실험군은 LPS-BCM을 처리한 실험군에 비해 PECAM-1 단백질 발현의 감소를 보였으며, claudin-5와 ZO-1의 단백질 수준의 개선이 관찰되었다(도 2A 내지 도 2D).

[0098] <실시예 3> P-siSTAT3의 다발성 경화증 또는 뇌척수염 개선효과 확인

[0099] <3-1> P-siSTAT3의 행동학적 개선 및 신경보호 효과 확인

[0100] 본 발명의 PLGA-siSTAT3가 다발성 경화증 또는 뇌척수염에 의한 행동학적 이상 및 신경손상을 보호하는지 확인하였다. 실시예 1-2의 각 군의 마우스에서, EAE가 유도된 날부터 17일 동안, 매일 임상 증상의 척도를 평가하였다. EAE군의 행동학적 증상은 EAE 유도 후 7일 쯤부터 나타나기 시작하여, 16일째에 최고조(3.6)로 나타났으며, EAE 유도 후 12일째부터 17일까지의 임상 증상 지수의 합은 16.7이었다. 그러나, EAE + P-siSTAT3 군에서는 EAE 군과 비교하여, 임상 증상 척도의 지수가 감소하는 것을 확인하였으며, EAE + P-siSTAT3 군 중 10 및 20 mg/ml의 P-siSTAT3를 처리한 군에서는 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다. EAE 유도 후 12일째부터 17일 까지 임상 증상 지수의 합은 P-siSTAT3를 10 mg/ml 처리한 군에서 13 ± 0.8 이었고, 20 mg/ml 투여군에서 8.8 ± 0.6 이었다(도 3A). P-Sc 군 및 siSTAT3 군에서는 행동학적 이상이 유의적으로 개선되지 않아, 본 발명의 PLGA-siSTAT3만이 행동학적 이상을 개선시킬 수 있는 것을 확인하였다(도 3B).

[0101] 또한, 탈수초화를 확인하기 위하여, LFB 염색을 수행한 결과, EAE 군에서는 Sham군과 비교하여, 탈수초화가 증가하였으나, EAE + P-siSTAT3 군에서는 증가된 탈수초화가 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다(도 4 및 도 5A). 또한, EAE 군과 비교하여, P-Sc 군 및 siSTAT3 군에서는 탈수초화는 유의하게 개선되지 않아, 본 발명의 P-siSTAT3가 EAE를 개선시킬 수 있는 것을 확인하였다(도 5B).

[0103] <3-2> P-siSTAT3의 STAT3 신호전달 억제 확인

[0104] 본 발명의 PLGA-siSTAT3가 STAT3 신호전달을 차단하는지 확인하였으며, STAT3에 대한 항체를 이용하여, 관련 경로의 신호전달 억제를 면역염색방법으로 확인하였다. 그 결과, 도 6A에 나타난 바와 같이, EAE군에서 증가한 STAT3의 발현이 EAE + P-siSTAT3 군에서 농도 의존적으로 감소한 것을 확인하였으며, 이로 인해, 척수에서 염증 신호전달 경로인 STAT3의 억제가 탈수초화를 감소시키는 것을 확인하였다. 또한, P-Sc군과 siSTAT3 군에서는 STAT3 신호기전에 대한 유의미한 억제가 확인되지 않아(도 6B), 본 발명의 P-siSTAT3가 STAT3 신호전달을 억제시킬 수 있음을 확인하였다.

[0106] <3-3> P-siSTAT3의 BBB 손상 억제 효과 확인

[0107] BBB는 중추신경계 혈관의 내피세포(endothelial cells), 혈관주위세포(pericytes) 및 별아교세포(astrocyte)로 구성된다. BBB 손상은 다발성경화증의 주요 병리학적 특징이다. 따라서 EVE 동물모델에 있어서, 임상 증상이 가장 심한 시기인 16-17일 사이에 면역염색과 웨스턴 블롯 분석을 통해 BBB 손상 정도에 대한 P-siSTAT3의 영향을 확인하였다. 그 결과, 별아교세포의 활성화 마커인 GFAP와 세포접착 단백질인 PECAM-1의 단백질 발현의 정도는 Sham 실험군에 비해 EAE 실험군에서 크게 증가하였다. 반면, P-siSTAT3 처리 실험군에서는 두 마커의 발현 정도가 용량 의존적으로 감소하였다(도 7A 내지 도 7E). 세포연접 단백질(junctional proteins)인 claudin-5, occludin 및 ZO-1(zonula occludens)의 단백질 발현 정도는 Sham 실험군에 비해 EAE 실험군에서 크게 감소하였다. 반면, 이들 세 단백질의 발현 정도는 P-siSTAT3 처리에 의해 증가하였다(도 7F 내지 도 7I). 동시에 BBB 손상에 의한 혈관 내 알부민(albumin)의 신경조직 내로의 유출 정도에 미치는 P-siSTAT3의 효능을 평가한 결과, Sham 실험군에 비해 EAE 그룹의 알부민의 발현 정도가 증가된 것을 확인하였다. 그러나 P-siSTAT3 처리 실험군에서는 유의하게 감소하였다(도 7J 내지 도 7K). 이러한 결과를 통해 P-siSTAT3이 EAE 동물모델의 척수(요수)에서 BBB 손상을 예방할 수 있음을 명확히 확인하였다.

[0109] <3-4> P-siSTAT3의 미세아교세포에 대한 선택성 확인

[0110] 탈수초화, 신경염증 및 BBB 손상에 대한 P-siSTAT3의 신경 보호 효과를 고려할 때, P-siSTAT3가 타겟하는 세포의 유형을 감별할 필요성이 있다. 따라서 P-siSTAT3에 포함된 P-coumarin-6를 사용하여 감별하였다. siSTAT3는

형광을 띠지는 않으나, coumarin-6는 초록색의 형광색을 띠므로 P-coumarin-6를 발현하는 세포를 P-siSTAT3가 타겟한 세포로 선별하였다.

[0111] 그 결과, EAE 모델의 척수 조직에서 미세아교세포에 대한 PLGA의 높은 친화력을 관찰했다. 구체적으로, EAE 모델의 척수조직에서 Iba-1(미세아교세포 마커), GFAP (별아교세포 마커) 및 Oligo-2(최소돌기아교세포 마커)를 포함한 세포 유형별 마커에 대한 면역염색을 실시하였다. 그 결과, P-coumarin-6의 발현은 Iba-1을 발현하는 미세아교세포에서 뚜렷이 관찰되었다(도 8A 내지 도 8D). 그러므로 본 발명에 따른 P-siSTAT3은 EAE 모델의 척수 조직에서 미세아교세포를 선택적으로 타겟할 수 있음을 확인하였다.

[0113] <3-5> P-siSTAT3의 척수 손상 보호 확인

[0114] EAE 동물모델에서 PLGA-siSTAT3가 척수 조직의 손상을 보호하는지 확인하기 위하여, 조직학적 손상을 H&E 염색으로 확인하였다. 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, EAE군은 Sham 군과 비교하여, 척수 조직의 손상이 확인되었으나, P-siSTAT3 군에서는 EAE군과 비교하여, 조직 손상이 개선된 것을 확인하였다. 또한, P-Sc 군 및 siRNA 군에서는 척수 조직 손상이 EAE군과 유사하여, 척수 손상이 개선되지 않아, 본 발명의 P-siSTAT3만이 척수 손상을 보호할 수 있는 것을 확인하였다.

[0116] <3-6> P-siSTAT3의 면역세포 침윤 및 염증 억제 확인

[0117] EAE 동물모델에서 PLGA-siSTAT3가 면역세포 침윤 및 염증 반응을 억제시키는지 확인하기 위하여, 미세아교세포 활성화 인자인 Iba-1에 대한 면역조직화학 염색을 이용하였다. 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이, EAE군은 Sham 군과 비교하여, 척수 조직 내 면역세포의 침윤이 증가하여, 미세아교세포의 활성화가 증가되었으나, P-siSTAT3 군에서는 EAE군과 비교하여, 면역세포의 침윤 및 활성화가 감소한 것을 확인하였다(도 10A). P-Sc 군 및 siRNA 군에서는 면역세포의 침윤 및 활성화가 개선되지 않아(도 10B), 본 발명의 P-siSTAT3만이, 면역세포의 침윤 및 활성화를 개선시키는 것을 확인하였다.

[0119] <3-7> P-siSTAT3의 염증성 단백질의 발현 억제 확인

[0120] P-siSTAT3가 염증성 단백질의 발현을 감소시키는지 확인하기 위하여, 웨스턴블롯 분석으로, 염증성 단백질의 발현을 확인하여 그 결과를 도 11A 내지 도 11L에 나타내었다. 그 결과, 도 11A에 나타난 바와 같이, EAE + P-siSTAT3 군에서는 EAE 군과 비교하여 STAT3와 pSTAT3의 발현이 유의적으로 감소하였으며, 신경교세포 마커인 GFAP 및 Iba-1의 발현 또한, 유의적으로 감소한 것을 확인하였다. 또한, 염증 매개 효소인 iNOS의 발현 또한 유의적으로 감소한 것을 확인하여, P-siSTAT3가 EAE로 유도된 척수 염증을 유의적으로 감소시키는 것을 확인하였다. P-Sc 군 및 siRNA 군에서는 염증 인자의 발현이, EAE군과 유의적인 차이가 없어(도 11B), 본 발명의 P-siSTAT3만이, 염증 인자의 발현을 억제시키는 것을 확인하였다.

[0122] <3-8> P-siSTAT3의 염증성 사이토카인 감소 확인

[0123] 본 발명의 P-siSTAT3의 전염증성 사이토카인, 염증매개 효소 및 단핵구 관련 케모카인의 mRNA 발현 억제 효과를 RT-PCR로 확인하였다. 그 결과, EAE + P-siSTAT3군은 EAE군에 비하여 전염증성 사이토카인(IL-1 β , IL-6 및 TNF- α), 염증매개 효소(COX-2 및 iNOS), 백혈구 관련 케모카인(MIP-1 α 및 RANTES)의 mRNA 발현이 유의적으로 감소한 것을 확인하여, P-siSTAT3가 척수에서 염증 반응을 유의적으로 억제시키는 것을 확인하였다(도 12A 내지 도 12H).

[0125] <3-9> P-siSTAT3의 T세포 분화 및 침윤 억제 확인

[0126] 본 발명의 P-siSTAT3의 T 세포 분화 및 침윤 억제 효과를 확인하기 위하여 T 세포 마커인 CD4를 이용하여 유세포분석을 수행하였다. 추가적으로, T 세포의 활성을 확인하기 위해 Th1 세포의 마커(IFN- γ)와 Th17의 마커(IL-17)를 사용하였으며 미세아교세포와 말초 유래 대식세포의 활성 및 침윤을 확인하기 위해서 두 세포의 마커(CD11b+/CD45)를 사용하였다. 그 결과, 도 13A 내지 도 13E에 나타난 바와 같이, EAE + P-siSTAT3 투여군은

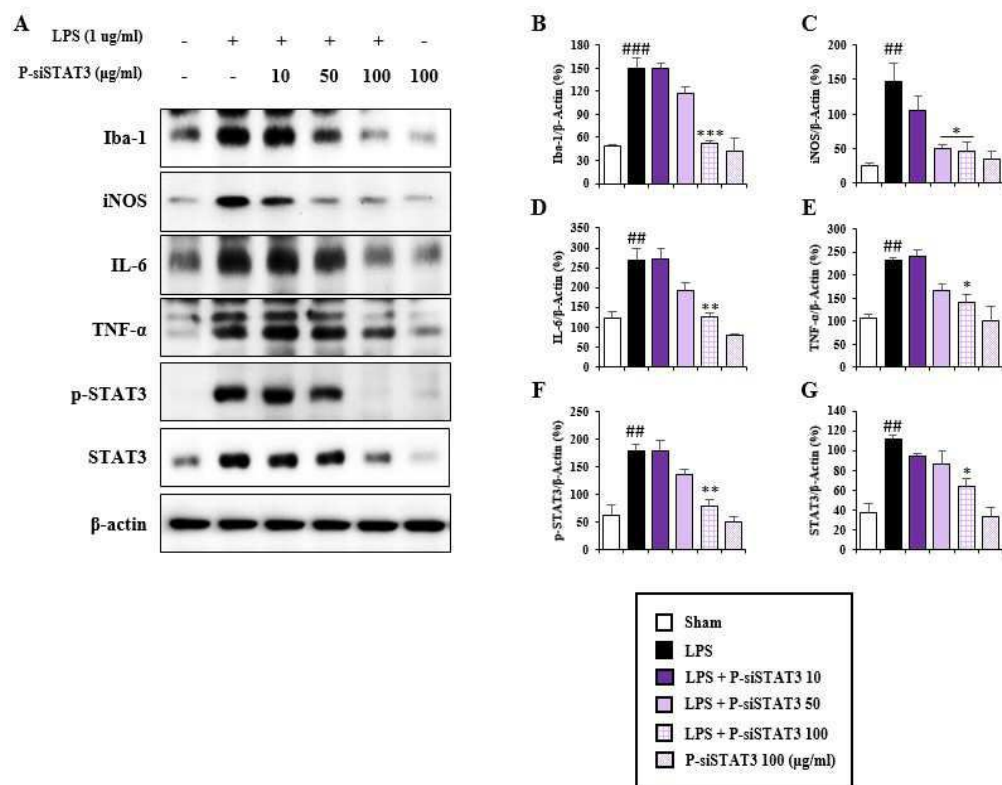
EAE군과 비교하여 T세포의 침윤 정도와 활성을 감소되는 것을 확인하였으며 미세아교세포(CD11b⁺/CD45^{+(low)})와 대식세포(CD11b⁺/CD45^{+(high)})의 활성과 침윤 또한 유의적으로 감소한 것을 확인하였다.

[0128]

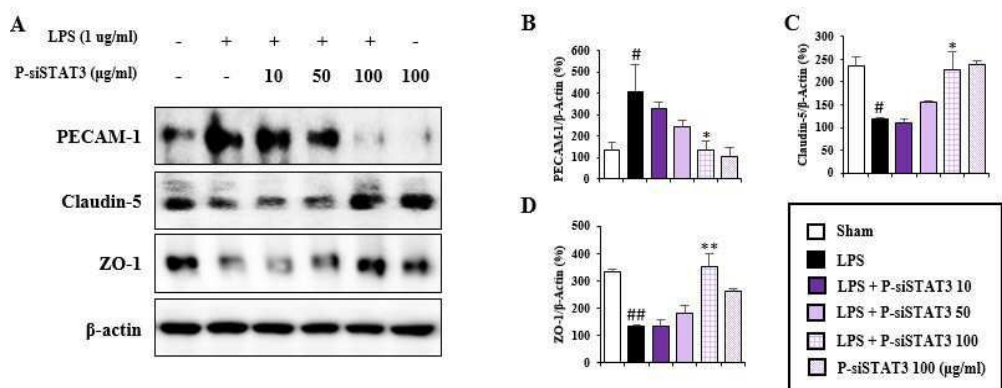
따라서, 본 발명은 다발성 경화증 또는 뇌척수염 동물모델인 EAE 동물모델에서, P-siSTAT3가 EAE로 유도되는 임상 증상 지수를 감소시키는 것을 확인하였으며, 척수의 탈수초화를 억제시키는 것을 확인하였다. 또한, EAE와 관련된 STAT3 신호전달 경로를 차단하여, 탈수초화를 감소시키며, 미세아교세포 및 신경교세포의 발현을 억제시키고, 염증 인자인 iNOS, IL-1 β , IL-6, TNF- α 를 억제시키고, 염증매개 효소인 COX-2 및 케모카인 MIP-1 α , RANTES의 발현을 억제시키는 것을 확인하였다. 또한, 자가면역과 관련된 Th1 및 Th17 세포의 침윤 및 활성을 억제시키는 것을 확인하여, 자가면역성 신경질환을 개선시킬 수 있는 것을 확인하였다.

도면

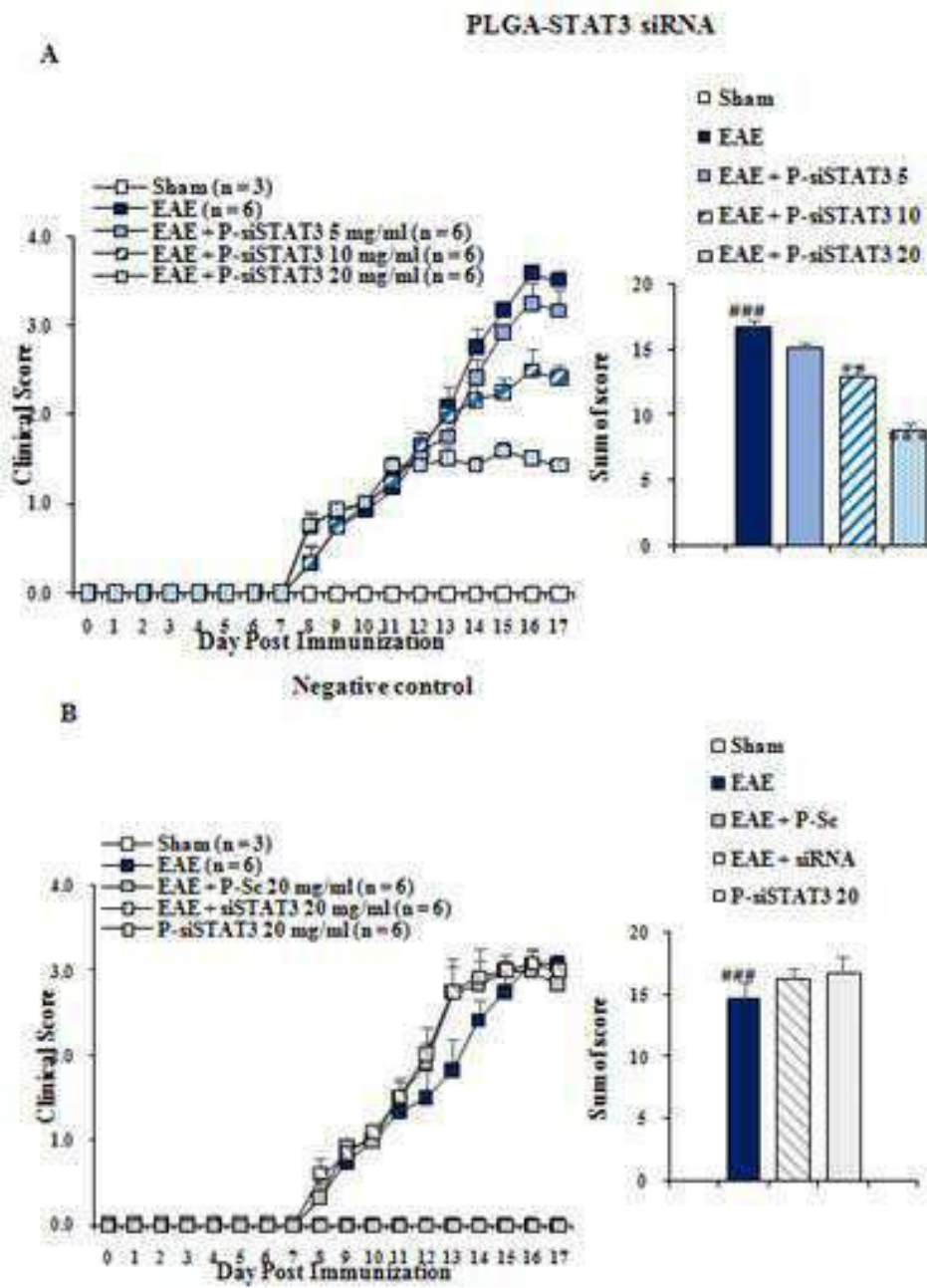
도면1



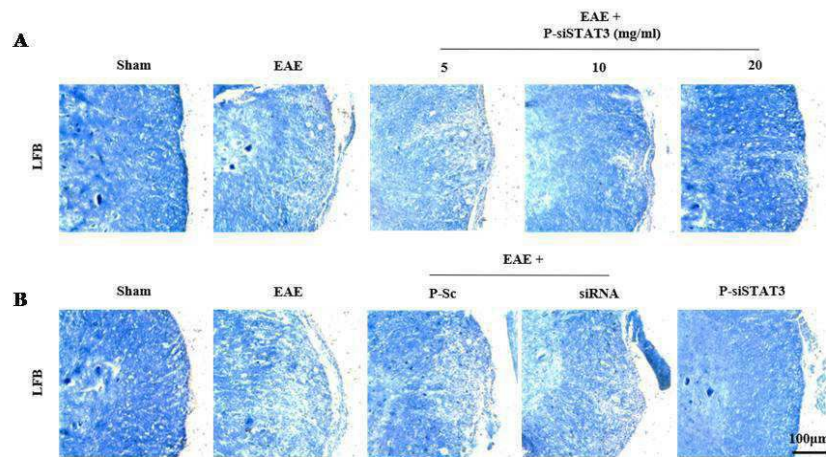
도면2



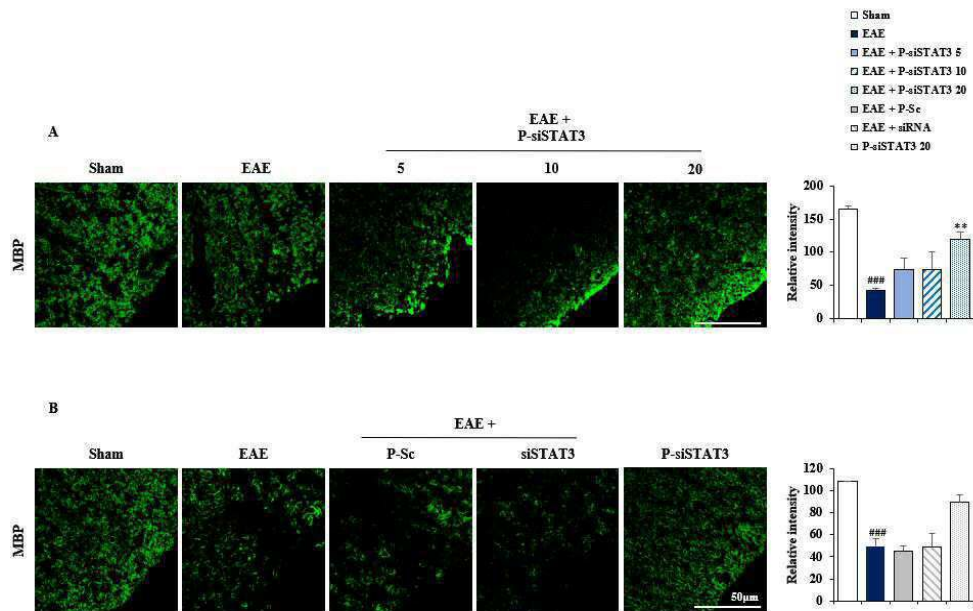
도면3



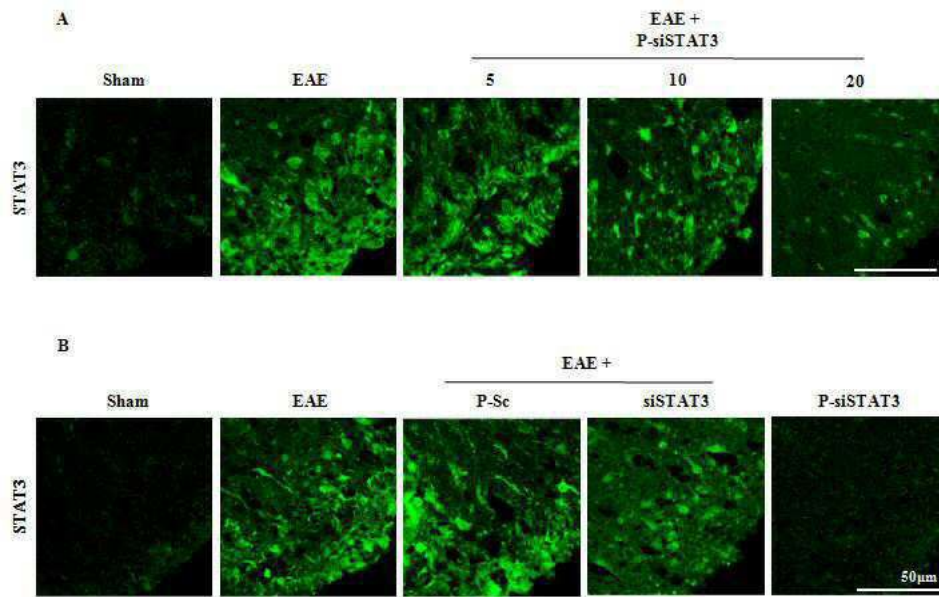
도면4



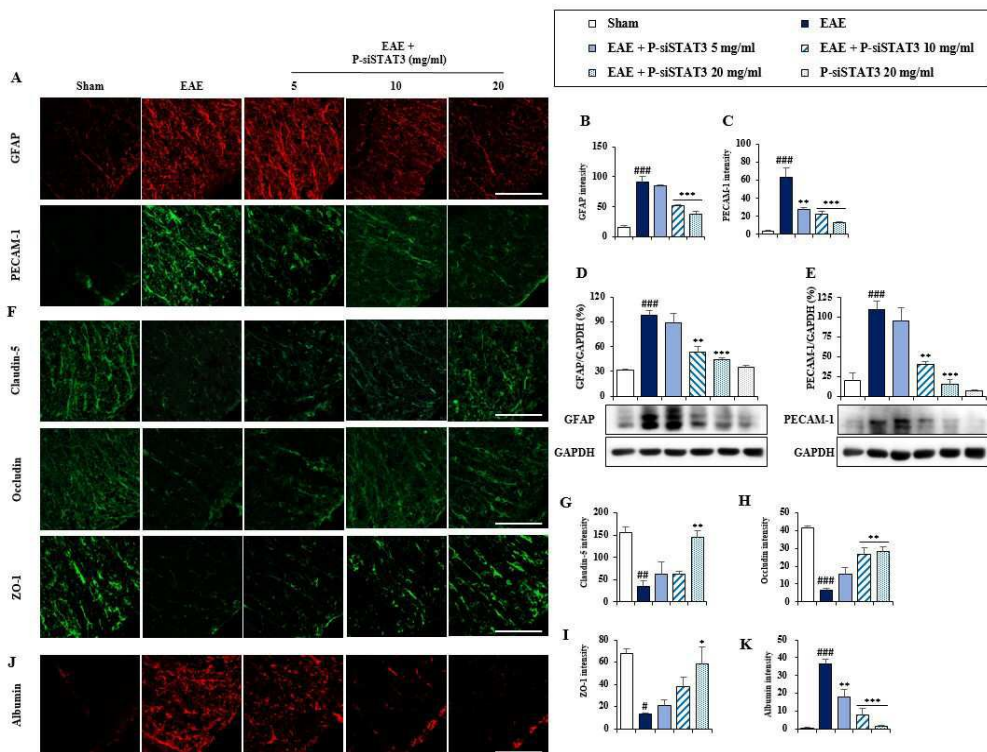
도면5



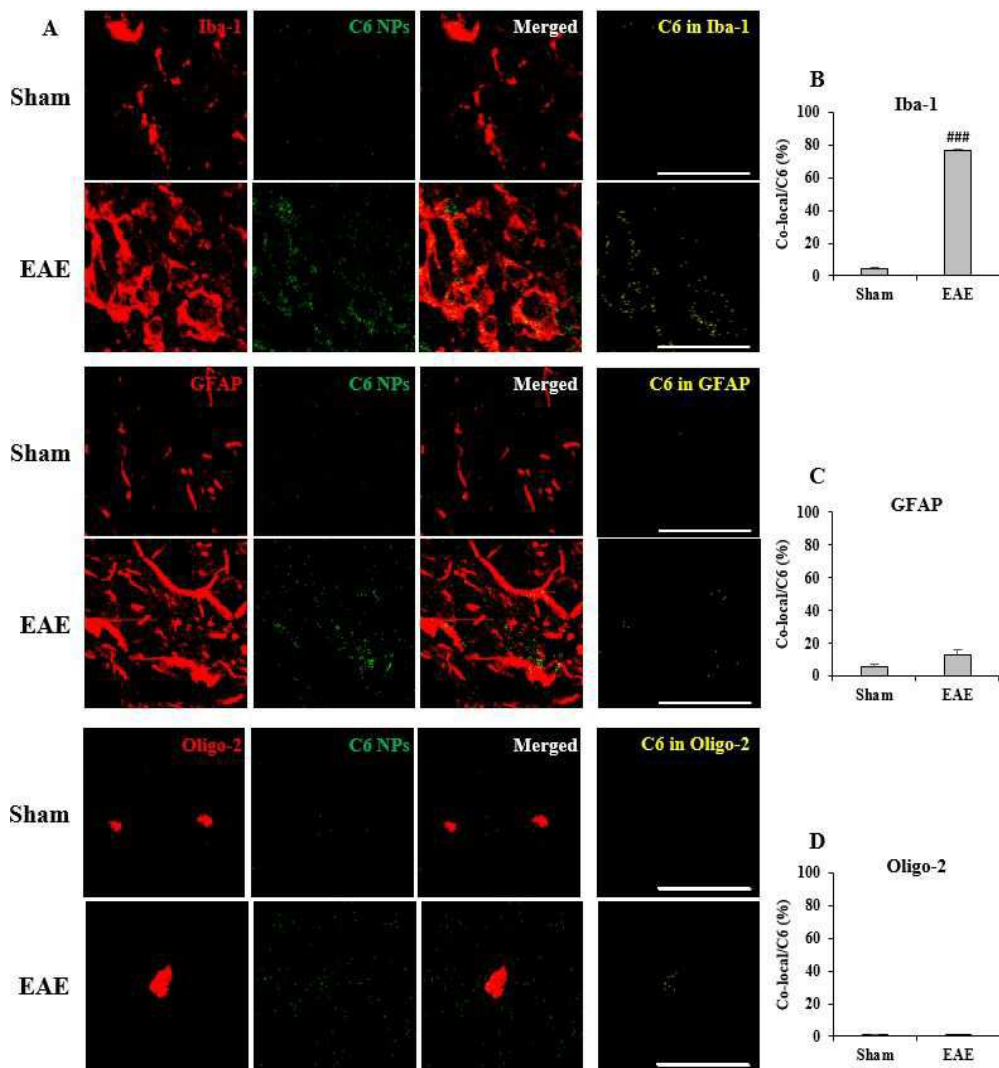
도면6



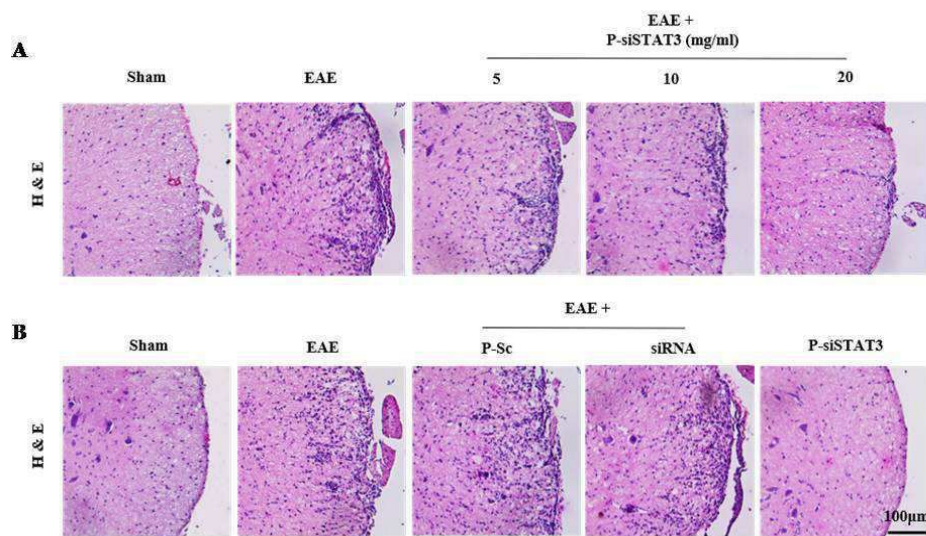
도면7



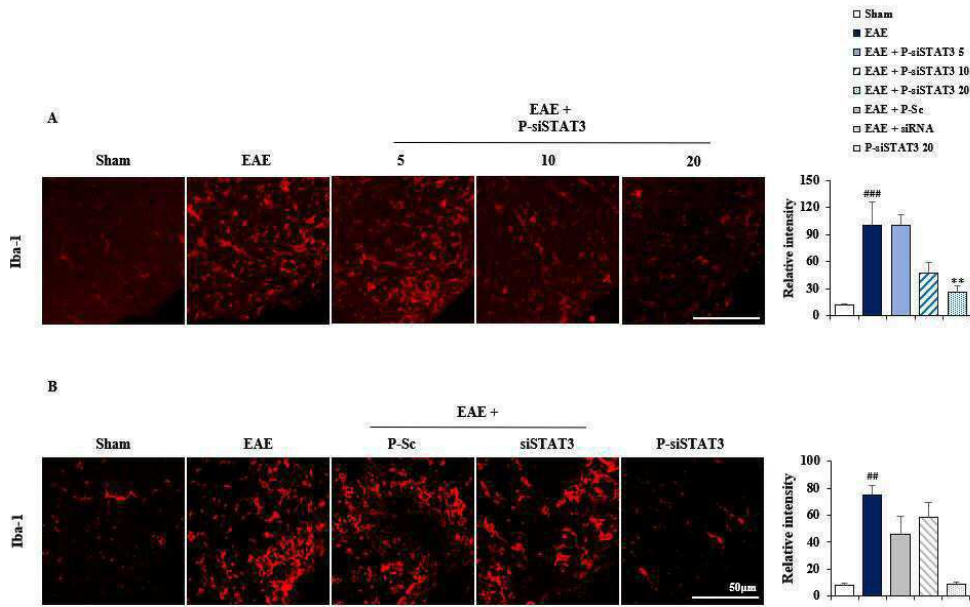
도면8



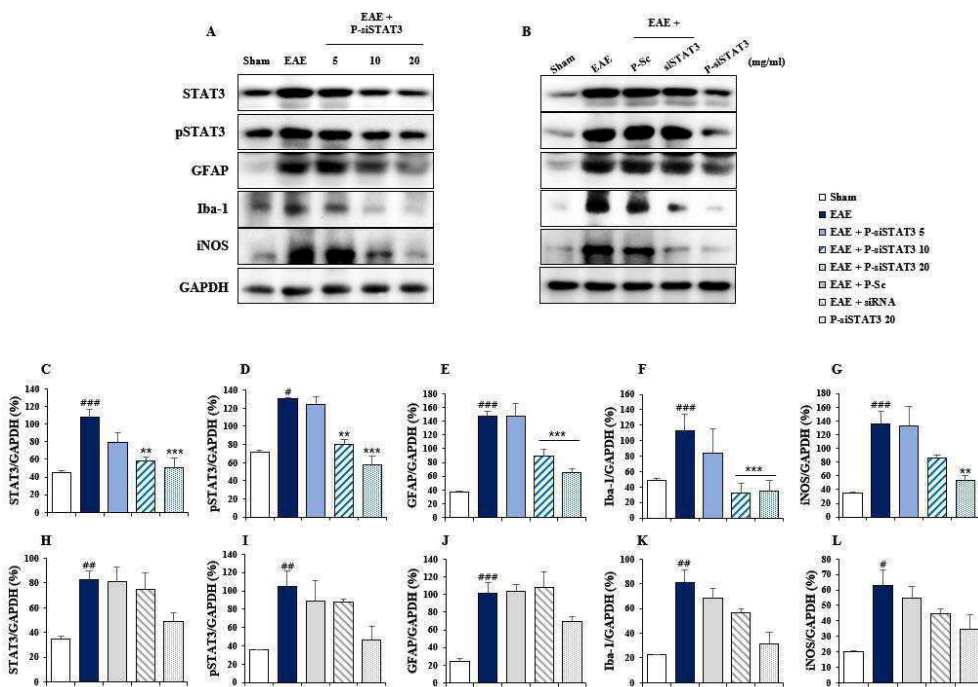
도면9



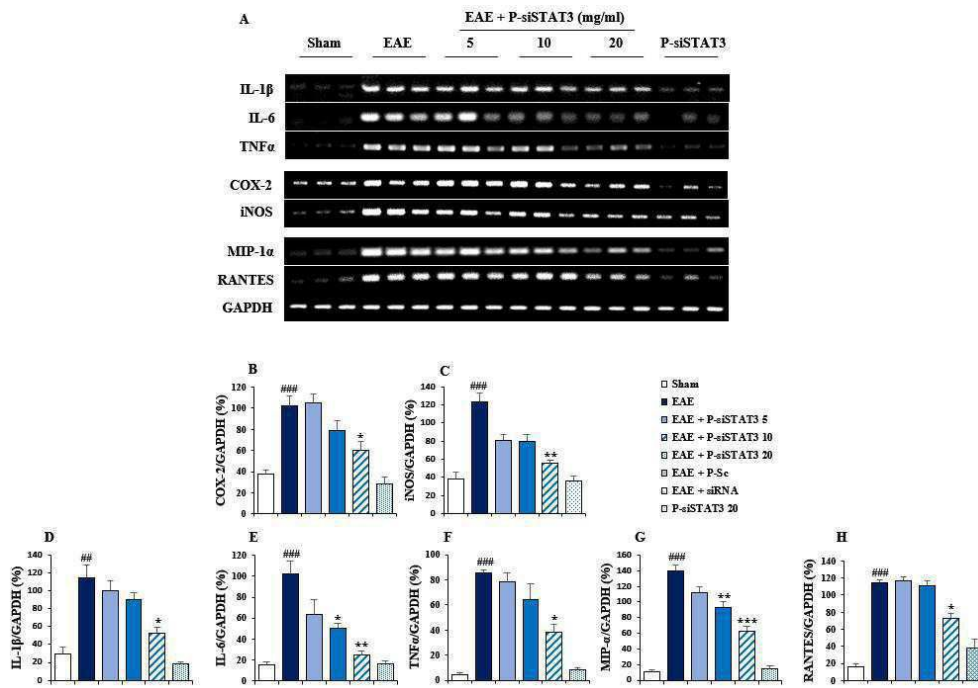
도면10



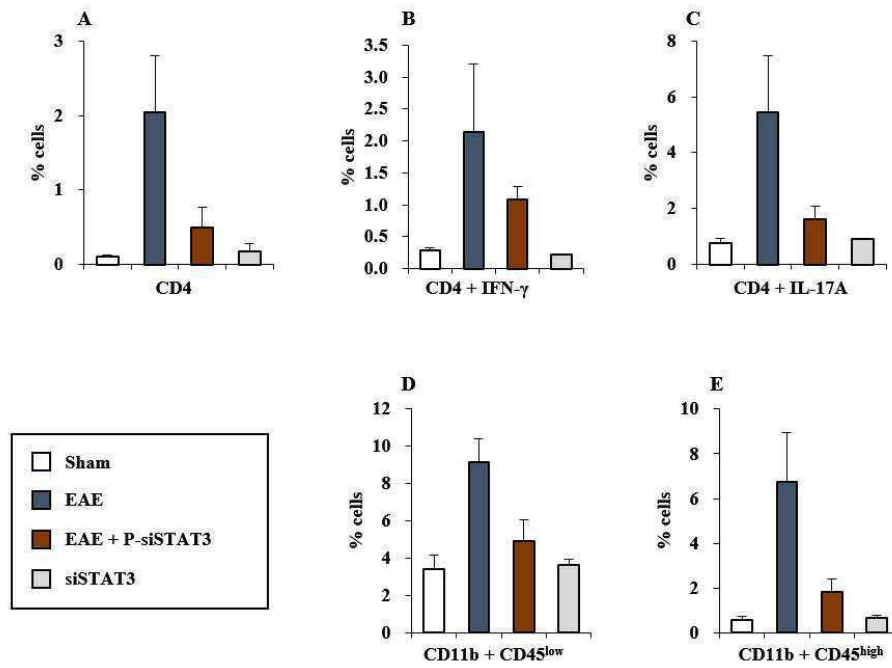
도면11



도면12



도면13



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.