(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0087886
(43) 공개일자 2023년06월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/51 (2006.01) *A61K 31/7105* (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01) *A61P 29/00* (2023.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/5176 (2013.01)
A61K 31/7105 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0176523
(22) 출원일자 2021년12월10일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
창원대학교 산학협력단
경상남도 창원시 의창구 창원대학로 20(퇴촌동)
(72) 발명자
이희두
경상남도 창원시 성산구 원이대로 449, 103동 907호
박수정
경상남도 밀양시 미리벌중앙로 10, 101동 3303호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
윤대웅

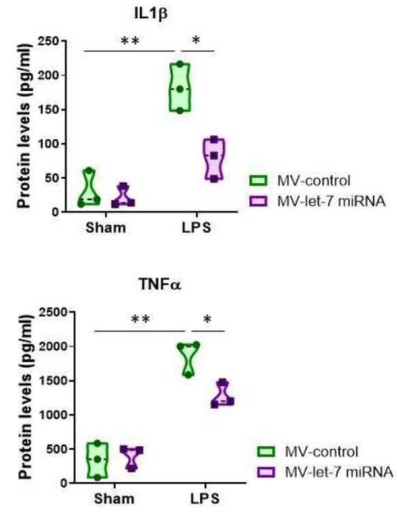
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **let-7 miRNA를 이용한 염증성 폐질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 let-7 miRNA를 이용한 염증성 폐질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물 및 이의 제조 방법에 관한 것으로서, 상기 조성물은 let-7 miRNA를 미세소포체(microvesicle, MV) 내에 도입시켜 폐 대식세포(Alveolar macrophages; AMs)까지 전달하여 폐 염증반응을 효과적으로 억제하므로, 이를 효과적으로 급성폐손상(acute lung injury)의 예방 또는 치료에 이용할 수 있다.

대 표 도 - 도4b



(52) CPC특허분류
A61P 11/00 (2018.01)
A61P 29/00 (2023.02)
(72) 발명자
김미지
경상남도 김해시 진영읍 장등로19번길 18, 203동 1902호
우승희
제주특별자치도 제주시 조천읍 신북로 324, 102동 103호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711133466
과제번호	2020R1F1A1074822
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	급성폐손상 관련 생체 바이오마커 발굴을 위한 호흡기 유래 세포밖소포체의 불균질성 분석체계 확립
기 여 율	1/1
과제수행기관명	창원대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

let-7 miRNA가 도입된 막 구조체(membranous structure)를 포함하는 염증성 폐질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 막 구조체는 미세소포체(microvesicle), 엑소좀(exosome), 소포(vesicle), 미세-입자(micro-particle), 엔도좀-유래 소포(endosomal-derived vesicle), 다소포체(multivesicular body), 및 세포사멸체(apoptotic body)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 염증성 폐질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 염증성 폐질환은 급성폐손상(acute lung injury), 낭성 섬유증, 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease; COPD), 결핵, 폐렴, 모세기관지염, 미만성 간질성 폐질환, 천식, 폐섬유증, 급성 호흡 촉박 증후군, 폐색성 호흡기 질환, 제한성 호흡기 질환, 농흉, 폐농양, 폐기종, 하기도 감염증, 및 특발성폐섬유화증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 염증성 폐질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 4

막 구조체(membranous structure)에 let-7 miRNA를 도입시키는 도입 단계를 포함하는 염증성 폐질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물의 제조 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 도입 단계는 $CaCl_2$ 형질감염(transfection) 방법을 활용하여 수행되는 것인, 염증성 폐질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물의 제조 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 막 구조체는 미세소포체(microvesicle), 엑소좀(exosome), 소포(vesicle), 미세-입자(micro-particle), 엔도좀-유래 소포(endosomal-derived vesicle), 다소포체(multivesicular body), 및 세포사멸체(apoptotic body)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 염증성 폐질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물의 제조 방법.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 염증성 폐질환은 급성폐손상(acute lung injury), 낭성 섬유증, 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease; COPD), 결핵, 폐렴, 모세기관지염, 미만성 간질성 폐질환, 천식, 폐섬유증, 급성 호흡 촉박 증후군, 폐색성 호흡기 질환, 제한성 호흡기 질환, 농흉, 폐농양, 폐기종, 하기도 감염증, 및 특발성폐섬유화증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것인, 염증성 폐질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물의 제조 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 let-7 miRNA를 이용한 염증성 폐질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 let-7 miRNA가 도입된 미세소포체(Microvesicle, MV)를 기관지를 통해 폐 대식세포(Alveolar macrophages; AMs)에 도달시킴으로써 급성폐손상(acute lung injury)을 치료할 수 있는 기술에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 폐(호흡기)손상 및 염증은 미세먼지, 바이러스, 폐렴균 등 다양한 원인에 의해 유발되며, 최근 관련 질환의 급증으로 심각한 사회적 문제로 인식되고 있다. 폐 손상 및 염증은 일반적으로 급성폐손상(aucte lung injury)으로 일컬어지며, 과도한 염증반응에 의해 폐의 상피세포 및 내피세포의 구조가 붕괴되면서 유발하는 질환인 것으로 규명되었다. 그러나 아직까지도 효과적이고 성공적인 치료기술이 없는 실정이며, 40%에 육박하는 병원치사율을 보이고 있다.

[0003] 폐 대식세포(alveolar macrophages; AMs)는 폐포 내에 상주하는 유일한 면역세포로서, 외부에서 호흡기로 들어오는 병원체를 가장 먼저 인지하며 폐 면역(염증)반응의 시작 및 조절에서 중추적 역할을 담당한다. 따라서 폐 대식세포의 기능 조절은 폐 손상 및 염증반응을 제어할 수 있는 중요 인자로 인식되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 이에 본 발명자들은 급성폐손상(acute lung injury) 동물모델을 확립하고 이에 대하여 let-7 miRNA를 탑재한 미세소포체(Microvesicles, MVs)를 기관지를 통해 주입한 결과, 폐 대식세포(Alveolar macrophages; AMs)까지 도달하여 폐 염증반응을 억제하는 효과가 우수한 것을 확인하였다.

[0005] 이에, 본 발명의 목적은 let-7 miRNA가 도입된 막 구조체(membranous structure)를 포함하는 염증성 폐질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 막 구조체에 let-7 miRNA를 도입시키는 도입 단계를 포함하는 염증성 폐질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 let-7 miRNA의 염증성 폐질환 예방 또는 치료 용도에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 let-7 miRNA를 이용한 염증성 폐질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 조성물은 let-7 miRNA가 도입된 미세소포체(Microvesicle, MV)를 기관지를 통해 폐 대식세포(Alveolar macrophages; AMs)에 도달시킴으로써 급성폐손상(acute lung injury)을 치료할 수 있다.

[0009] 본 발명자들은 약물전달체로서 생체 유래 나노입자인 미세소포체에 염증조절인자로 알려진 let-7 miRNA를 탑재하여, 기도를 통하여 폐 대식세포로 전달함으로써 결과적으로 폐 대식세포의 면역반응 및 폐 조직의 염증반응을 효과적으로 제어하는 기술을 개발하였다.

[0010] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[0011] 본 발명의 일 양태는 let-7 miRNA가 도입된 막 구조체(membranous structure)를 포함하는 염증성 폐질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물이다.

[0012] 본 발명에 있어서 상기 막 구조체는 미세소포체, 엑소좀(exosome), 소포(vesicle), 미세-입자(micro-particle), 엔도좀-유래 소포(endosomal-derived vesicle), 다소포체(multivesicular body), 및 세포사멸체(apoptotic body)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있고, 예를 들어, 미세소포체인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0013] 본 발명에 있어서 상기 염증성 폐질환은 급성폐손상, 낭성 섬유증, 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease; COPD), 결핵, 폐렴, 모세기관지염, 미만성 간질성 폐질환, 천식, 폐섬유증, 급성 호흡 촉박증후군, 폐색성 호흡기 질환, 제한성 호흡기 질환, 농흉, 폐농양, 폐기종, 하기도 감염증, 및 특발성폐섬유화증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있고, 예를 들어, 급성폐손상인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0014] 본 발명의 약제학적 조성물은 let-7 miRNA의 약제학적 유효량 및/또는 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물로 이용될 수 있다.

[0015] 본 명세서에서 용어 "약제학적 유효량"은 상술한 let-7 miRNA의 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.

[0016] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 인간을 포함하는 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여 방식은 통상적으로 사용되는 모든 방식일 수 있으며, 바람직하게는 흡입 투여, 경구 투여, 또는 정맥내 투여될 수 있고, 예를 들어, 흡입 투여되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0017] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여방식, 환자의 연령, 체중, 성별, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다.

[0018] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제, 캅셀제 또는 젤(예컨대, 하이드로젤) 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0019] 본 발명의 다른 양태는 막 구조체에 let-7 miRNA를 도입시키는 도입 단계를 포함하는 염증성 폐질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물의 제조 방법이다.

[0020] 본 발명에 있어서 상기 도입 단계는 $CaCl_2$ 형질감염(transfection), 전기영동법(electrophoresis) 형질감염, 및 음파처리(sonication) 형질감염으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법을 활용하여 수행되는 것일 수 있다.

[0021] 본 발명에 있어서 상기 막 구조체는 미세소포체, 엑소좀, 소포, 미세-입자, 엔도좀-유래 소포, 다소포체, 및 세포사멸체로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있고, 예를 들어, 미세소포체인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0022] 본 발명에 있어서 상기 염증성 폐질환은 급성폐손상, 낭성 섬유증, 만성 폐쇄성 폐질환, 결핵, 폐렴, 모세기관지염, 미만성 간질성 폐질환, 천식, 폐섬유증, 급성 호흡 촉박 증후군, 폐색성 호흡기 질환, 제한성 호흡기 질환, 농흉, 폐농양, 폐기종, 하기도 감염증, 및 특발성폐섬유화증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있고, 예를 들어, 급성폐손상인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0023] 본 발명은 let-7 miRNA를 이용한 염증성 폐질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물 및 이의 제조 방법에 관한 것으로서, 상기 조성물은 let-7 miRNA를 미세소포체(microvesicle, MV) 내에 도입시켜 폐 대식세포(Alveolar macrophages; AMs)까지 전달하여 폐 염증반응을 효과적으로 억제하므로, 이를 효과적으로 급성폐손상(acute lung injury)의 예방 또는 치료에 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1a는 본 발명의 일 실시예에 따른 급성폐손상(acute lung injury) 동물모델의 폐 조직에서 염증세포를 확인한 사진이다.

도 1b는 본 발명의 일 실시예에 따른 급성폐손상 동물모델의 폐 조직에서 염증성 사이토카인의 발현량을 분석한 그래프이다.

도 2a는 본 발명의 일 실시예에 따라 분리된 미세소포체(Microvesicle, MV)의 주사전자현미경(Scanning Electron Microscope; SEM) 관찰 사진이다.

도 2b는 본 발명의 일 실시예에 따라 let-7 miRNA를 미세소포체에 형질감염(transfection)시키는 과정(좌) 및 미세소포체로의 let-7 miRNA 형질감염 여부를 확인한 그래프이다.

도 3a는 본 발명의 일 실시예에 따라 미세소포체의 이동 경로를 확인하기 위한 실험 과정의 모식도 및 결과 사진이다.

도 3b는 본 발명의 일 실시예에 따라 미세소포체의 폐 대식세포(Alveolar macrophages; AMs)로의 전달 효율을 PKH26(red-fluorescent dye)을 이용하여 염색하여 확인한 사진이다.

도 4a는 본 발명의 일 실시예에 따라 급성폐손상 동물모델의 폐 염증반응을 관찰하기 위한 실험의 모식도이다.

도 4b는 본 발명의 일 실시예에 따라 let-7 miRNA를 형질감염시킨 미세소포체의 주입에 의한 급성폐손상 동물모

델에서의 염증성 사이토카인 분비량을 나타낸 그래프이다.

도 5a는 본 발명의 일 실시예에 따른 let-7 저해제(inhibitor)를 형질감염시킨 미세소포체의 주입에 의한 급성 폐손상 동물모델에서의 let-7 miRNA의 타깃 유전자 발현량을 나타낸 그래프이다.

도 5b는 본 발명의 일 실시예에 따라 확인된 let-7 miRNA 탑재 미세소포체에 의한 TLR4 유전자 발현 및 염증성 사이토카인인 TNFa 및 IL1b의 발현을 조절하는 기전에 대한 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0026] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 "%"는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량)%, 고체/액체는 (중량/부피)%, 그리고 액체/액체는 (부피/부피)%이다.

[0028] **실시예 1: 급성폐손상 동물모델의 확립**

[0029] 먼저 마우스(C57BL/6, 6-8 wk)를 이용하여 폐 손상/염증모델을 확립하였다. 구체적으로, 실험군에 해당하는 급성폐손상 동물모델의 확립을 위하여 폐렴균 유래 LPS(lipopolysaccharides) 5 ug를 마우스의 기도를 통하여 폐로 주입하였다. 약 20시간 후, 폐 손상/염증 정도를 검증하기 위해 폐 조직을 채취하고 단면 조직을 H&E(hematoxylin and eosin) 염색기법을 수행하여 관찰하였다.

[0030] 도 1a에서 확인할 수 있듯이, 획득한 폐 조직에서 염증세포의 침투를 확인하였다.

[0031] 이어서 상기 폐 조직의 총 RNA를 분리 및 정제하여, 염증성 사이토카인의 발현량을 분석하였다. ($p<0.001$)

[0032] 도 1b에서 확인할 수 있듯이, 급성폐손상 동물모델로부터 분리된 폐 조직으로부터 염증성 사이토카인인 IL1b 및 TNFa의 급격한 발현량 증가를 확인할 수 있었다.

[0034] **실시예 2: let-7 miRNA를 탑재한 미세소포체의 준비**

[0035] 폐에서 유래한 생체 유래 나노입자인 미세소포체(Microvesicle, MV)를 분리하기 위해, 마우스에서 기관지-폐포세척액(Bronchoalveolar lavage fluid, BALF)을 이용하여 채취하였다. 획득한 BALF를 순차적 원심분리(sequential centrifugation)하여 미세소포체를 정제/분리하였다.

[0036] 도 2a에서 확인할 수 있듯이, 주사전자현미경(Scanning Electron Microscope; SEM)을 이용하여 관찰함으로써 미세소포체를 성공적으로 획득하였음을 검증하였다.

[0037] 이어서 획득한 미세소포체에 $CaCl_2$ 형질감염(transfection) 기법을 활용하여 염증조절-핵심인자로 알려진 let-7 miRNA를 주입하였다.

표 1

[0038]

서열번호	명칭	서열(5'->3')
1	let-7 miRNA	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU

[0039] 도 2b에서 확인할 수 있듯이, RT-qPCR을 이용하여 검증한 결과 미세소포체 형질감염(MV-transfection)이 성공적으로 완료되었다. (* $p<0.05$)

[0041] **실시예 3: 미세소포체의 폐 대식세포로의 전달 효율 확인**

[0042] 미세소포체의 이동 경로를 확인하기 위해, 미세소포체를 PKH26(red-fluorescent dye)을 이용하여 염색하였다. 염색된 미세소포체를 마우스의 기관지를 통하여 주입하였으며, 도 3a와 같이 약 16시간 후 폐 대식세포(Alveolar macrophages; AMs)를 기관지-폐포세척액에서 분리하였다.

[0043] 도 3b에서 확인할 수 있듯이, 폐 대식세포는 매우 효과적으로 미세소포체를 받아들이는 것으로 관찰되었다.

[0045] **실시예 4: let-7 miRNA 탑재 미세소포체에 의한 폐 염증반응의 억제 효과**

[0046] 도 4a와 같이 상기 실시예 1의 급성폐손상 동물모델 확립 방법에 따라 LPS 5 ug를 주입시킨 후 20시간이 경과한 실험군(LPS)의 기관지를 통하여 let-7 miRNA가 탑재된 미세소포체 및 let-7 miRNA가 탑재되지 않은 미세소포체를 각각 주입하였다. 대조군(Sham)은 급성폐손상을 유도하지 않은 마우스에 대하여 동일한 과정을 수행하여 준비하였다. 약 16시간 후 실험군 및 대조군에 해당하는 마우스로부터 기관지-폐포 세척액을 채취하여 ELISA를 통하여 분석하였다.

[0047] 도 4b에서 확인할 수 있듯이, 주입된 미세소포체에 let-7 miRNA를 탑재한 경우, 기관지-폐포 세척액으로부터 나타나는 염증성 사이토카인 IL1b 및 TNFa의 분비량이 유의하게 감소함으로써 전반적인 폐 염증반응이 완화되는 것이 입증되었다. (* $p<0.05$, ** $p<0.01$)

[0049] **실시예 5: let-7 miRNA에 의한 폐 대식세포 면역유전자 조절 검증**

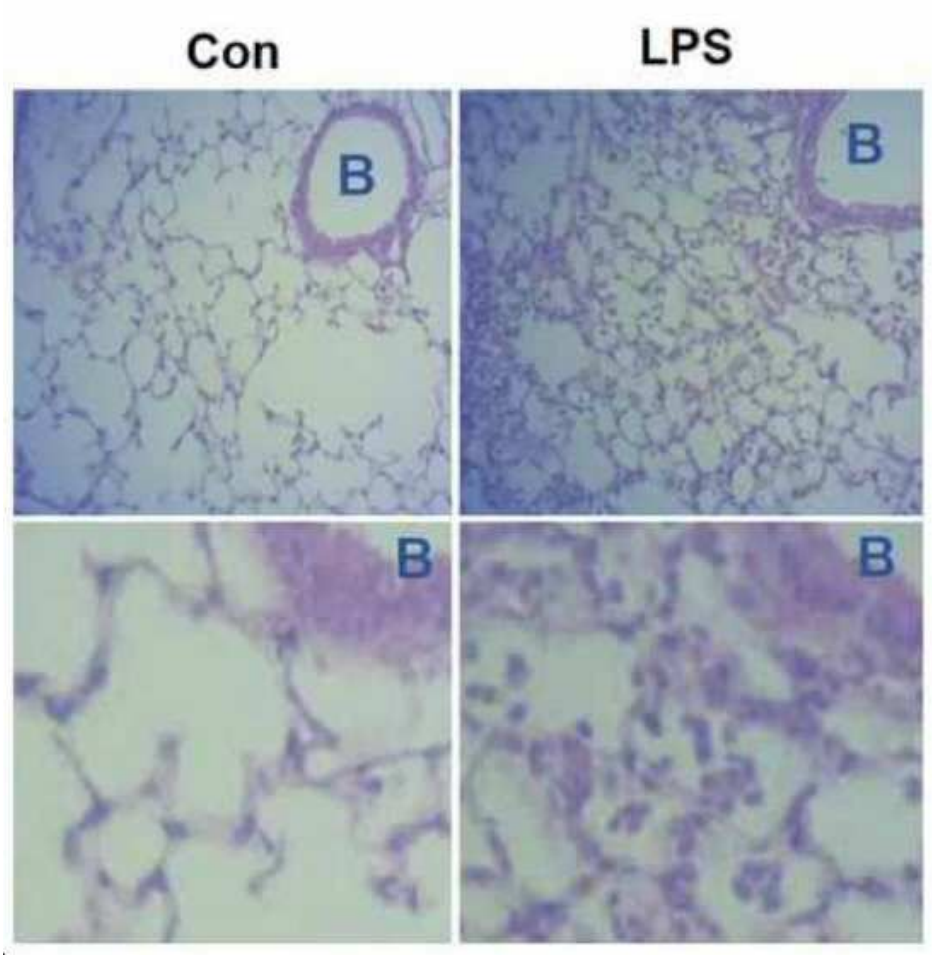
[0050] 폐 대식세포 내에서 let-7 miRNA에 의해 조절되는 면역 유전자를 검증하기 위해, 미세소포체에 let-7 저해제(MISSION®Synthetic microRNA Inhibitor, Sigma-Aldrich)를 형질감염시켰으며, 상기 미세소포체를 마우스의 기관지를 통하여 주입함으로써 폐 대식세포에 삽입하였다. 이후 마우스의 폐 대식세포로부터 획득한 총 RNA에 대하여 RT-qPCR을 이용하여 let-7 miRNA의 타깃 유전자(TLR4, STAT3, NKiras2, PAK1)의 발현 정도를 조사하였다.

[0051] 도 5a에서 확인할 수 있듯이, let-7 저해제에 의해서 병원성 물질의 인식에 중요한 기능을 하는 유전자인 TLR4의 발현량이 증가함을 확인하였다.

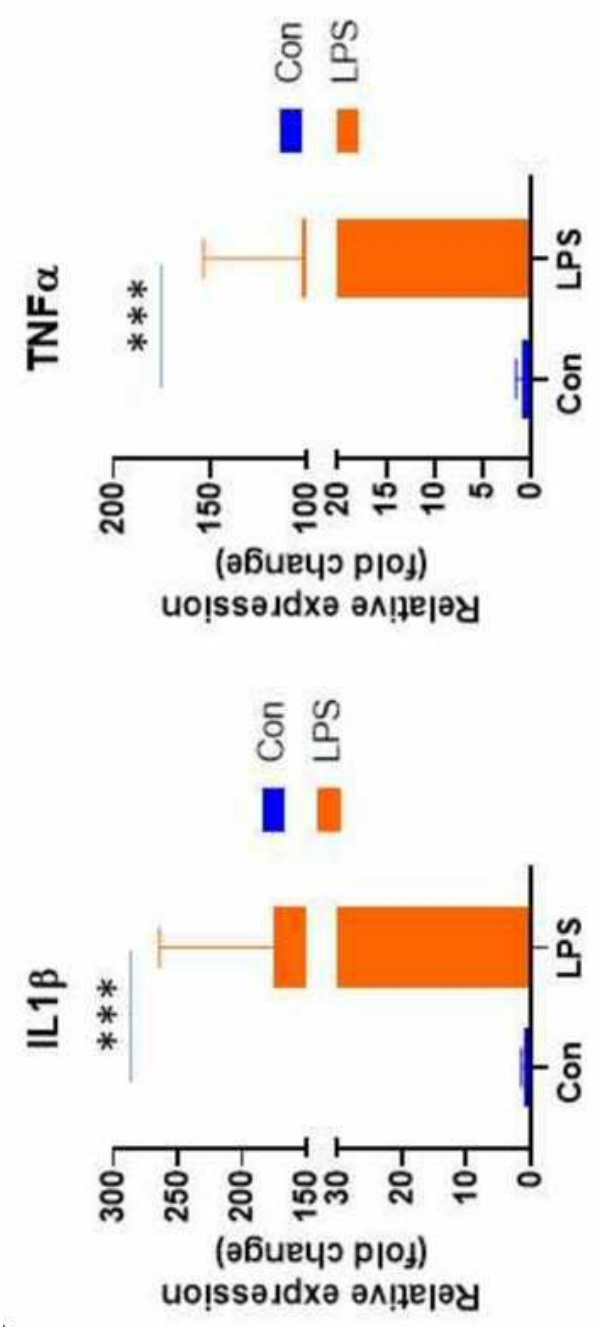
[0052] 따라서 도 5b와 같이, let-7 miRNA 탑재 미세소포체에 의해 폐 대식세포의 TLR4 유전자의 발현이 증가하고 염증성 사이토카인인 TNFa 및 IL1b의 발현이 효과적으로 억제될 수 있음을 확인하였다.

도면

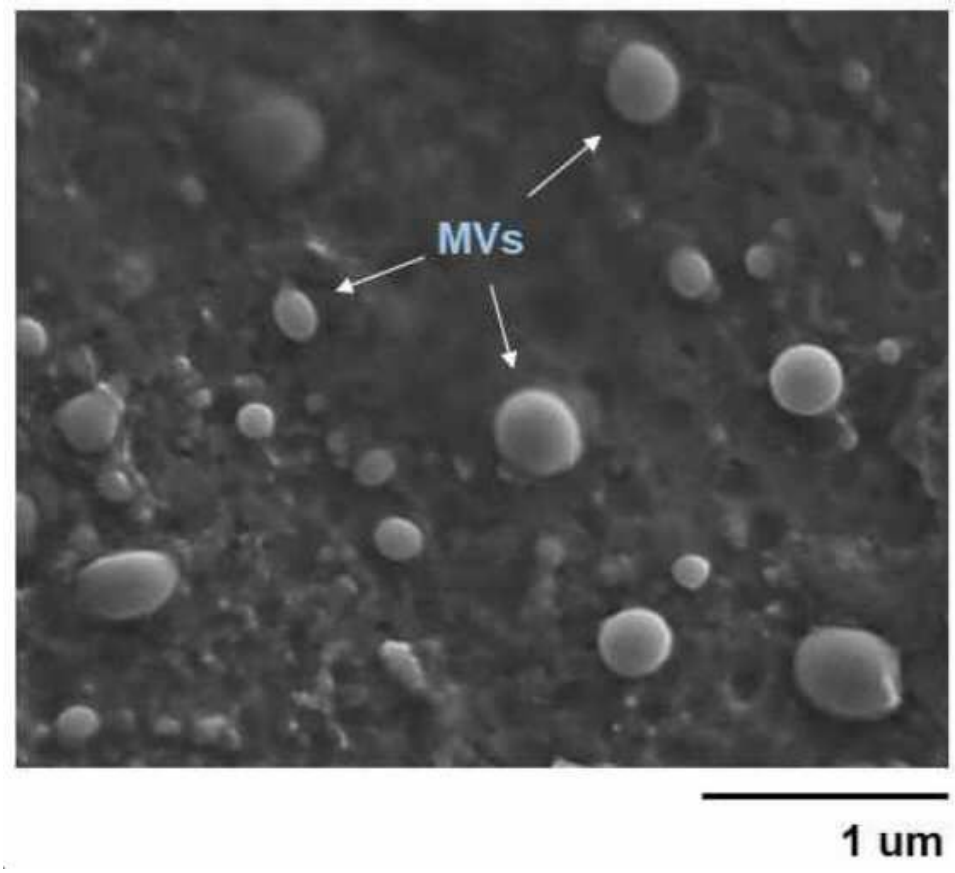
도면1a



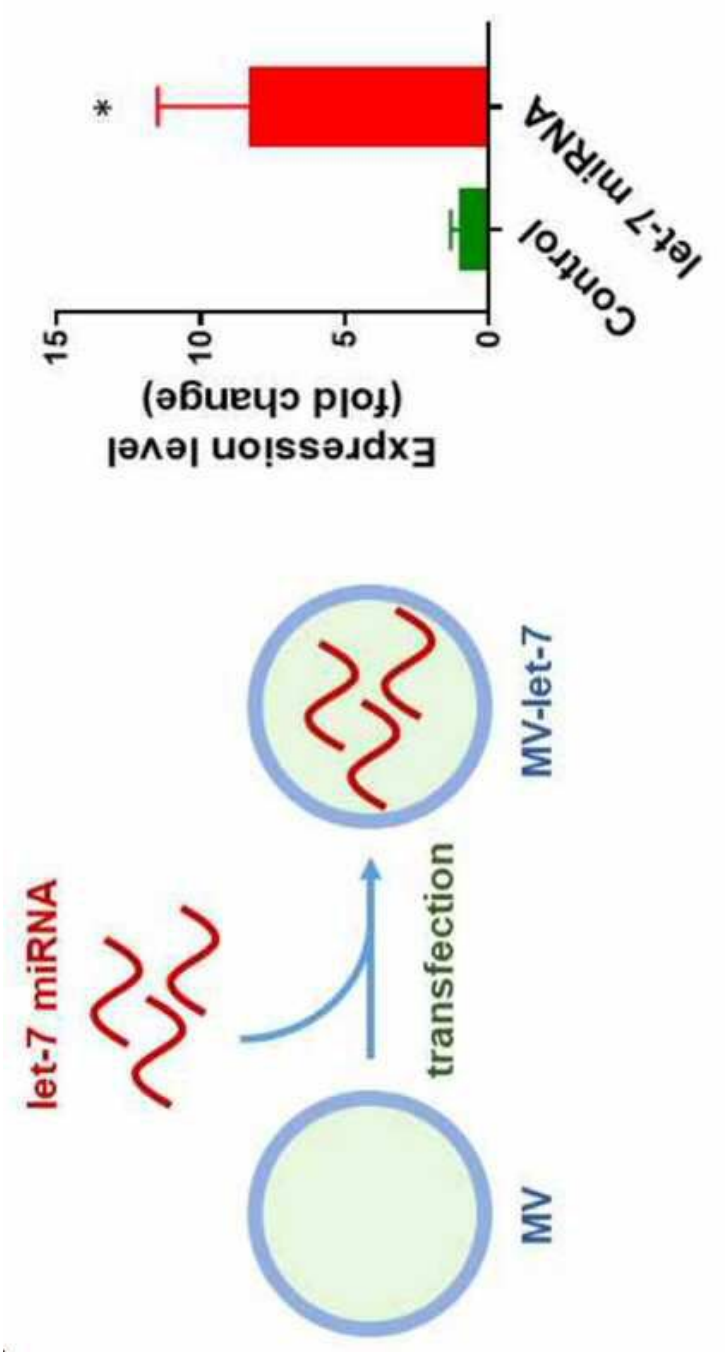
도면1b


TNFα
***
Con
LPS
Relative expression
(fold change)
0
5
10
15
20
100
150
200
Con
LPS
IL1β
***
Con
LPS
Relative expression
(fold change)
0
10
20
30
150
200
250
300
Con
LPS

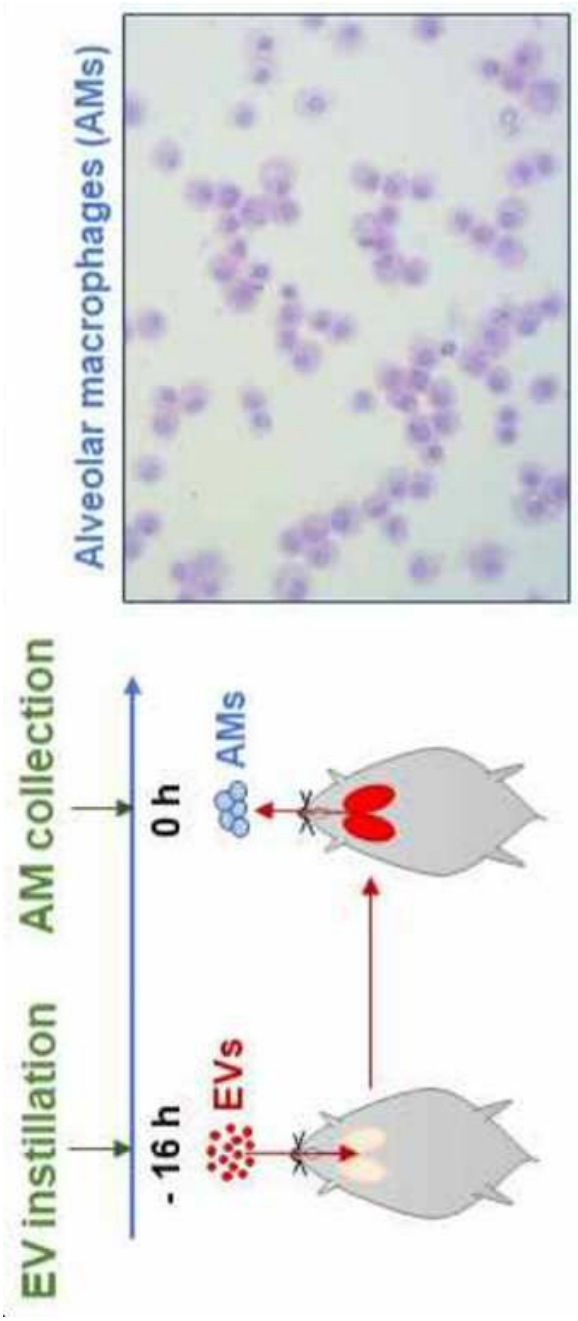
도면2a



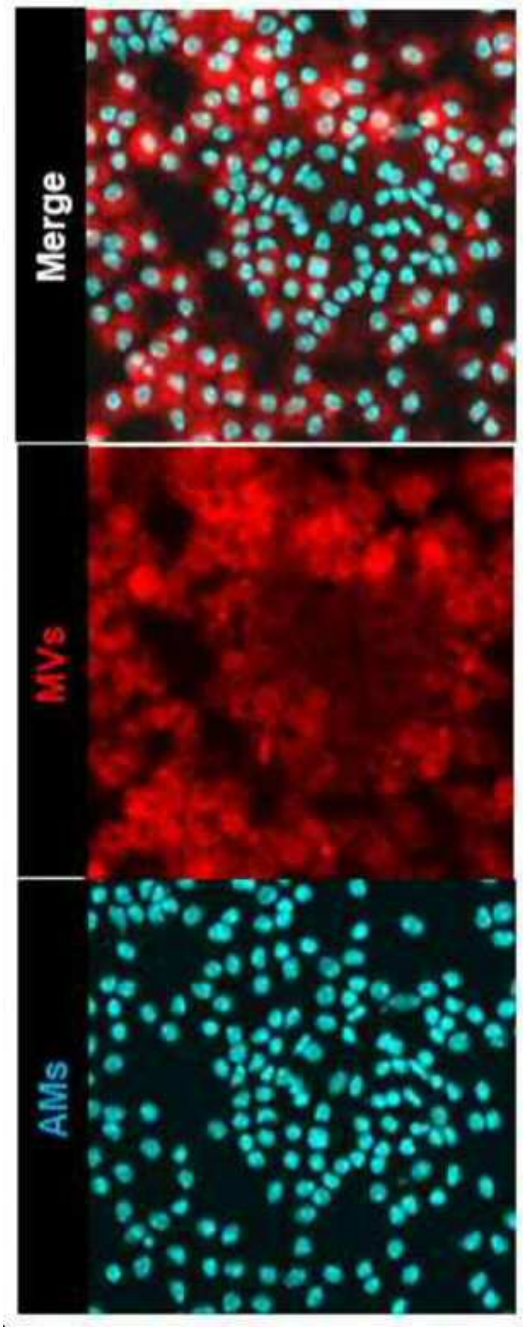
도면2b


Expression level
(fold change)
15
10
5
0
Control
let-7 miRNA
*
let-7 miRNA
transfection
MV
MV-let-7

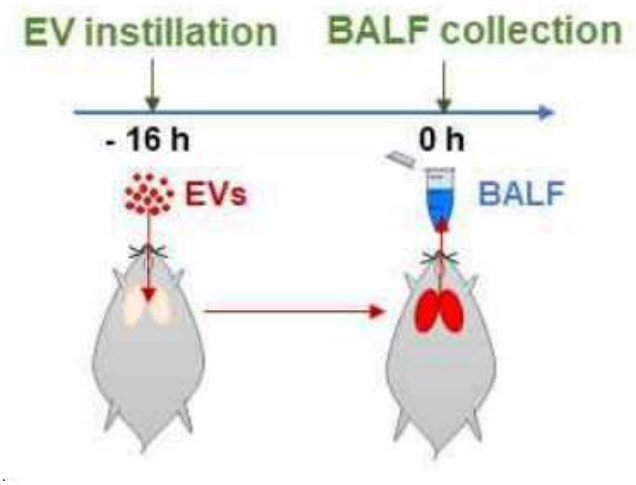
도면3a


Alveolar macrophages (AMs)
EV instillation
AM collection
- 16 h
0 h
EVs
AMs

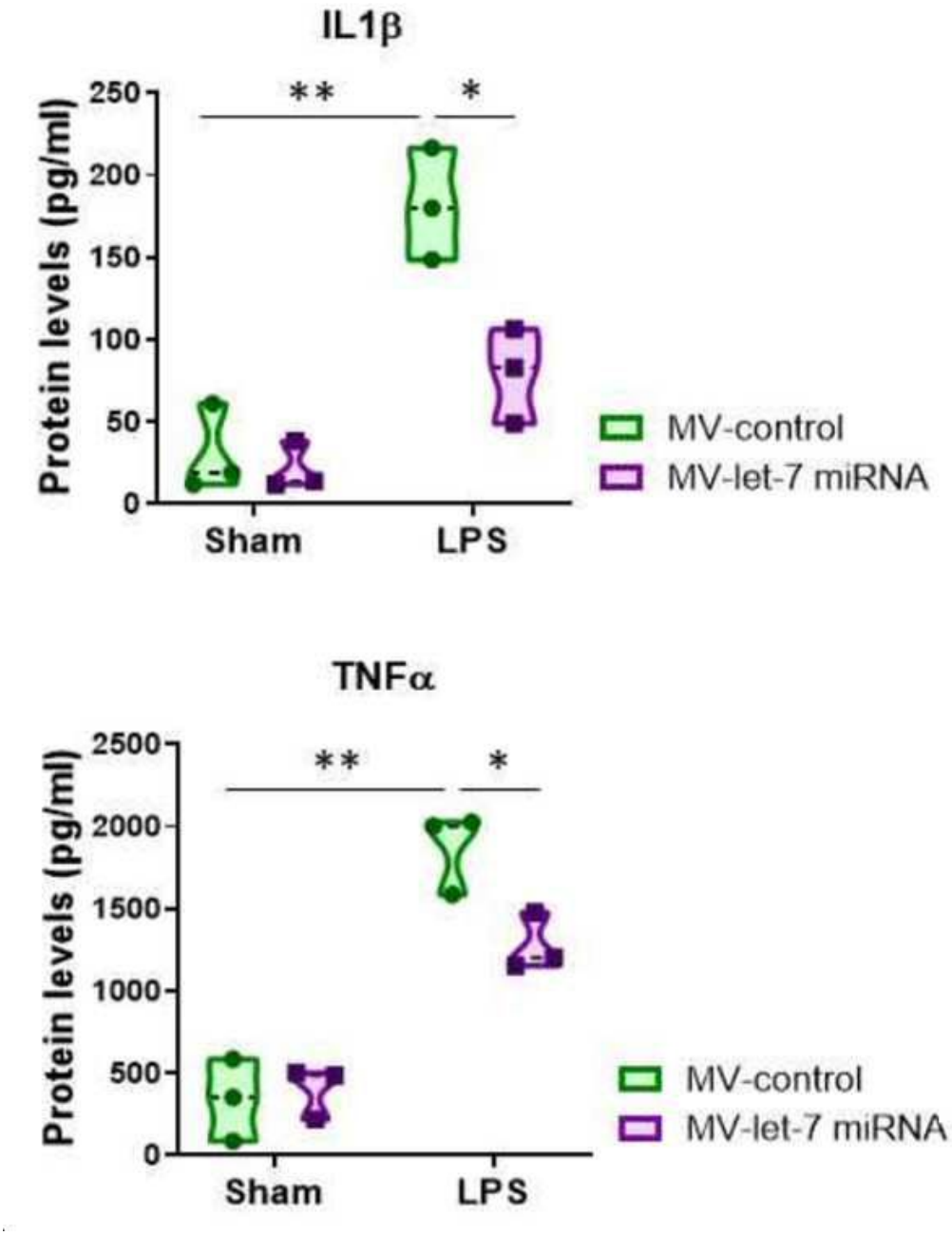
도면3b



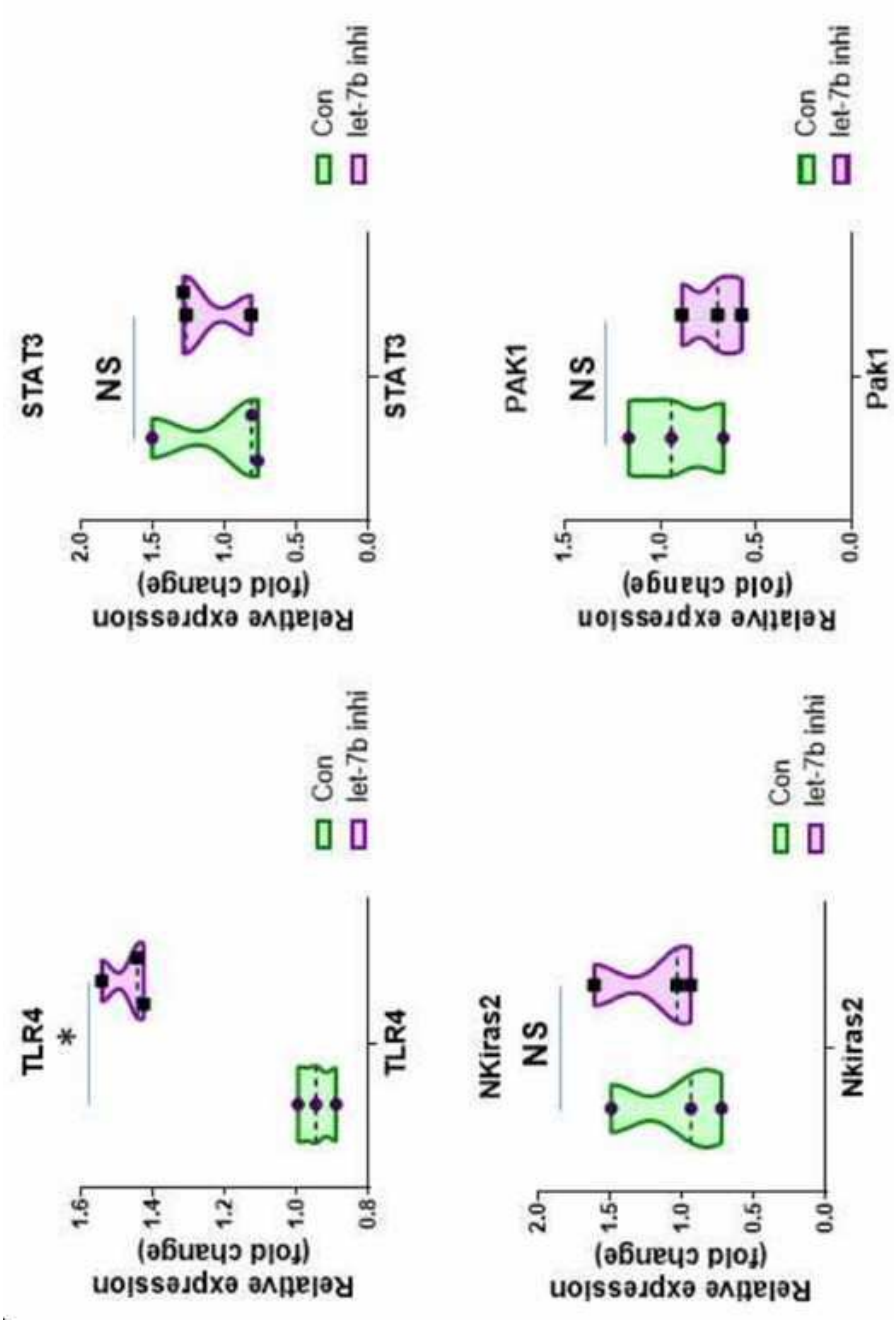
도면4a



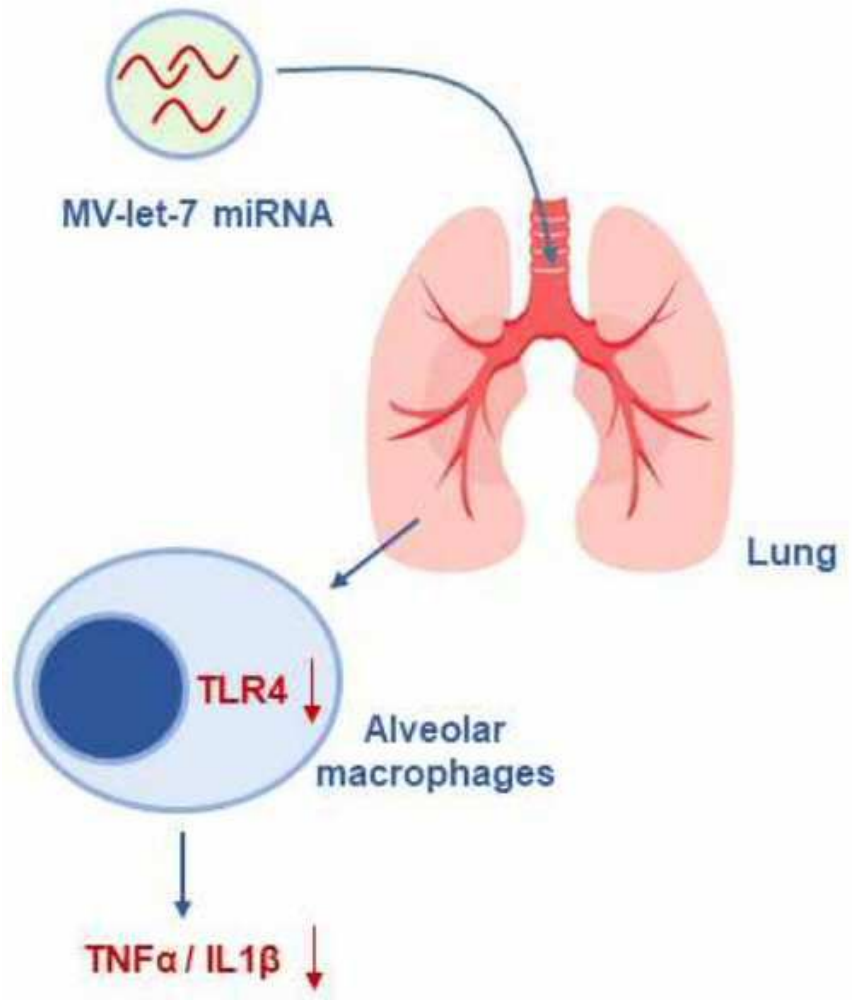
도면4b


IL1β
Protein levels (pg/ml)
250
200
150
100
50
0
**
*
Sham
LPS
MV-control
MV-let-7 miRNA
TNFα
Protein levels (pg/ml)
2500
2000
1500
1000
500
0
**
*
Sham
LPS
MV-control
MV-let-7 miRNA

도면5a


STAT3
NS
Relative expression (fold change)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
STAT3
Con
let-7b inhi
PAK1
NS
Relative expression (fold change)
1.5
1.0
0.5
0.0
Pak1
Con
let-7b inhi
TLR4
*
Relative expression (fold change)
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
TLR4
Con
let-7b inhi
NKiras2
NS
Relative expression (fold change)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Nkiras2
Con
let-7b inhi

도면5b



.

서 열 목 록

<110> CHANGWON NATIONAL UNIVERSITY Industry Academy Cooperation Corps

<120> Pharmaceutical composition for preventing or treating inflammatory lung disease using let-7 miRNA

<130> PN210352

<160> 1

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 22

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

ugagguagua gguugugugg uu 22