(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0118040
(43) 공개일자 2023년08월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 45/00 (2006.01) *A61P 1/16* (2006.01)
C12Q 1/6883 (2018.01)
(52) CPC특허분류
A61K 45/00 (2013.01)
A61P 1/16 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2023-0014712
(22) 출원일자 2023년02월03일
심사청구일자 2023년02월03일
(30) 우선권주장
1020220014106 2022년02월03일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
이영선
강남구 언주로 110, 1동 605호(개포동, 경남아파트)
이윤석
경기도 성남시 중원구 도촌남로 101, 709동 503호(도촌동, 분당파크뷰)
(74) 대리인
특허법인 무한

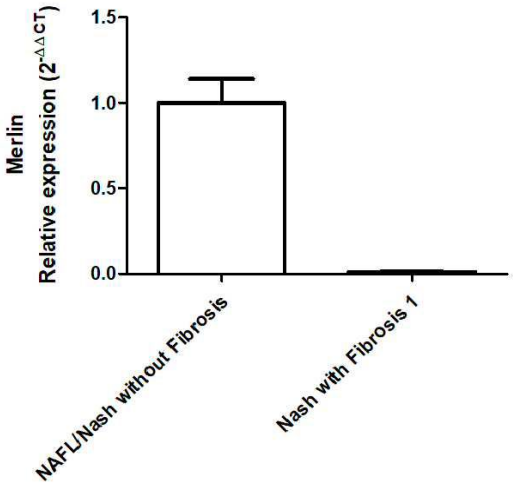
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **비알코올 지방간염 환자에서 miR-4449 억제제를 유효성분으로 포함하는 간 섬유화의 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 비알코올 지방간염 환자를 대상으로 간 섬유화의 발병 또는 그 진행 가능성을 진단하기 위한 바이오마커로서 miR-4449를 제공하며, 상기 miR-4449 억제를 통해서 간 섬유화의 예방 또는 치료가 가능함을 분자적 수준에서 확인하였는바, 간 섬유화의 예방 또는 치료르 ㄹ위한 타겟으로서 miR-4449를 제공한다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2022.01)
C12Q 2600/118 (2013.01)
C12Q 2600/136 (2013.01)
C12Q 2600/178 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711155898
과제번호	2019M3E5D1A01068997
부처명	다부처
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	혁신형의사과학자공동연구(과기정통부,복지부)
연구과제명	혈청 miRNA 분석을 이용한 비알코올 지방간염 진단 바이오마커 발굴
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

miRNA-4449의 발현을 억제하는 제제를 포함하는, 간 섬유화의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 제제는 siRNA, 앱타머(aptamer), 안티센스 올리고뉴클레오티드, 및 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 제제는 간 세포에서 과발현된 miRNA-4449에 의해 감소된 멀린(merilin) 발현 수준을 증가시키는 것인, 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 제제는 간 세포에서 TAZ를 활성화시키는 것인, 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 비알코올 지방간염 환자를 대상으로 간 섬유화의 예방 또는 치료 용도인 것인, 약학적 조성물.

청구항 6

하기 단계를 포함하는, 간 섬유화 예방 또는 치료용 약제의 스크리닝 방법:

(1) 간 세포에 후보물질을 처리하고 miRNA-4449의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

(2) miRNA-4449의 발현 수준이 감소한 경우 상기 후보물질을 비알코올 지방간염의 예방 또는 치료용 약제로 선정하는 단계.

청구항 7

하기 단계를 포함하는 비알코올 지방간염 질환 환자에서 간 섬유화 진행의 위험도 예측을 위한 정보제공방법:

(1) 비알코올 지방간염 환자의 생물학적 시료를 준비하는 단계;

(2) 상기 생물학적 시료에서 miRNA-4449의 수준을 확인하는 단계; 및

(3) 상기 miRNA-4449의 발현 수준이 섬유화가 진행되지 않은 비알코올 지방간염 환자의 그것을 대조군으로 하여 대조군 보다 높은 경우 간 섬유화 고위험군으로 구분하는 단계.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 비알코올 지방간염 환자를 대상으로 한 간 섬유화 예방 또는 치료 타겟으로서 miR-4449를 제공하는 것이다.

배 경 기 술

[0003] 비알코올 지방간 질환(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)은 알코올 섭취와 관계없이 간에 중성지방이 과도하게 축적되는 질환으로 전세계적으로 유병률이 증가하고 있고, 우리나라도 전체 인구의 30% 내외가 비알코올 지방간질환을 가지고 있다고 보고되고 있다.

[0004] NAFLD는 단순 지방간(simple steatosis)와 비알코올 지방간염(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)로 구분되며, 전체 NAFLD 중에서 약 75%에 해당하는 단순 지방간은 과도하게 지방이 침착된 상태로 대체로 임상적 예후가 양호한 양성질환으로 여겨지나, 약 25%를 차지하는 NASH는 지방침작과 함께 간세포 손상과 염증이 동반된 상태로 간섬유화, 간경변증, 간세포암종을로 진행될 가능성이 높다.

[0005] 비알코올 지방간염의 치료와 병증의 진행을 예방하기 위한 약물의 필요가 있으나, 현재까지 섬유화와 지방간염을 효과적으로 호전시키는 약제는 개발되지 않은 실정이다.

[0006] 본 발명자들은 병의 진행을 예방하고 조기 치료가 가능하도록 NAFLD 환자 중에서 단순 지방간 환자와 비알코올 지방간염 감별 진단을 위한 miR-4449를 바이오마커로 제시한바 있다(10-2020-0065623). 이에, 나아가 본 발명자들은 상기 바이오마커가 치료를 위한 타겟으로 제공될 수 있는지 예의 연구하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) KR 10-2020-0065623

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 비알코올 지방간 질환 환자를 대상으로 간 섬유화의 발병 여부 또는 그 가능성을 진단하기 위한 바이오마커로서 miR-4449를 제공하는 것이다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 miR-4449의 억제를 통해서 간 섬유화의 진행을 억제할 수 있음을 확인하였는바, miR-4449의 억제제를 유효성분으로 포함하는 간 섬유화 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 비알코올 지방간 환자를 대상으로 간 섬유화의 발병 여부 또는 그 가능성을 진단하기 위한 정보제공방법과 비알코올 지방간 환자에서 간 섬유화의 발병을 예방 또는 치료할 수 있는 약제의 개발을 위한 약물 스크리닝 방법을 제공한다.

[0012] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 간 섬유화의 예방 또는 치료를 위한 타겟으로서 miR-4449를 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 miRNA-4449의 발현을 억제하는 제제를 포함하는, 간 섬유화의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 제제는 siRNA, 앱타머(aptamer), 안티센스 올리고뉴클레오티드, 및 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0017] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 제제는 간 세포에서 과발현된 miRNA-4449에 의해 감소된 멀린(merilin) 발현 수준을 증가시킬 수 있으며, 간 세포에서 TAZ의 인산화 수준을 증가시키는 것일 수 있다.

[0018] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 조성물은 비알코올 지방간염 환자를 대상으로 간 섬유화의 예방 또는 치료 용

도로 제공될 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 간 섬유화 예방 또는 치료용 약제의 스크리닝 방법을 제공한다:

[0020] (1) 간 세포에 후보물질을 처리하고 miRNA-4449의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[0021] (2) miRNA-4449의 발현 수준이 감소한 경우 상기 후보물질을 비알코올 지방간염의 예방 또는 치료용 약제로 선정하는 단계.

[0022] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 비알코올 지방간 질환 환자에서 간 섬유화 진행의 위험도 예측을 위한 정보제공방법을 제공한다:

[0023] (1) 비알코올 지방간 환자의 생물학적 시료를 준비하는 단계;

[0024] (2) 상기 생물학적 시료에서 miRNA-4449의 수준을 확인하는 단계; 및

[0025] (3) 상기 miRNA-4449의 발현 수준이 섬유화가 진행되지 않은 비알코올 지방간 환자의 그것을 대조군으로 하여 대조군 보다 높은 경우 간 섬유화 고위험군으로 구분하는 단계.

발명의 효과

[0027] 본 발명은 비알코올 지방간염 환자를 대상으로 간 섬유화로 진행 여부 또는 그 가능성을 진단할 수 있는 바이오마커로서 miR-4449에 관한 것으로서, 본 발명은 miR-4449의 발현 억제를 통해서 간 섬유화로의 진행을 억제할 수 있음을 확인하였는바, 본 발명은 비알코올 지방간염 환자를 대상으로 간 섬유화로의 진행을 예방하거나 간 섬유화의 진단을 위해 유용하게 이용될 것으로 생각된다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 단순 지방간 혹은 섬유화를 동반하지 않은 비알코올 지방간염 환자 15명과 섬유화를 동반한 비알코올 지방간염 환자 9명에서 혈청에서 miRNA의 발현을 비교한 heat map이다.

도 2는 단순 지방간 혹은 섬유화를 동반하지 않은 비알코올 지방간염 환자와 섬유화를 동반한 비알코올 지방간염 환자의 간 조직에서 miR-4449의 발현 수준을 RT-RCR을 수행하여 확인한 것이다.

도 3은 miR-4449의 타겟으로서 멀린과 이의 상호작용에 의한 2차 구조를 예측한 도면이다.

도 4는 섬유화를 동반하거나 동반하지 아니한 비알코올 지방간염 환자의 간 조직에서 멀린의 발현 수준을 RT-RCR을 수행하여 확인한 것이다.

도 5는 간 세포에 miR-4449 모사체 또는 억제제를 처리하는 경우에 멀린의 발현 수준을 비교확인한 것이다.

도 6은 간 세포에 miR-4449 모사체 또는 억제제를 처리하는 경우에 TAZ의 인산화 수준을 비교확인한 것이다.

도 7은 간 세포에 miR-4449 모사체 또는 억제제를 처리하여 얻은 상층액을 간 성상세포에 처리하여 간섬유화와 관련된 유전자 발현을 비교확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 본 발명자들은 비알코올 지방간 질환에서 과발현되는 miR-4449의 영향에 대해서 연구하여, 비알코올 지방간 질환 환자 중에서 섬유화가 진행된 지방간염 환자의 경우 miR-4449의 발현 수준이 단순지방간이나 섬유화가 진행되지 않은 비알코올 지방간염 환자에 비하여 높음을 확인하였고, miR-4449가 멀린의 발현에 영향을 미치고 간 섬유화 기전에 관여하는 TAZ의 활성화에 관여함을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0031] 이에, 본 발명은 miR-4449를 간 섬유화의 예방 또는 치료를 위한 타겟으로 제공한다.

[0032] 본 발명자들은 섬유화가 진행된 비알코올 지방간염 환자의 간 조직에서 단순지방간이나 섬유화가 진행되지 않은 비알코올 지방간염 환자와 비교하여 높은 수준의 miR-4449의 발현을 확인하였으며, 간 세포에서 miR-4449의 모사체(mimic)의 처리는 멀린의 발현을 감소시키고 miR-4449의 억제제(inhibitor)의 처리는 멀린의 발현을 증가시킴을 확인하였다. 또한, 본 발명자들은 간 섬유화를 조절하는 중요한 시그널인 TAZ의 활성이 miR-4449의 발현

수준에 의해 조절됨을 확인하였다.

[0033] 이에, 본 발명자들은 miR-4449 억제제를 유효성분으로 포함하는 간 섬유화 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0034] 본 발명에서 miR-4449 억제제는 miR-4449의 발현을 억제하는 것으로서, 본 명세서에서 miR-4449의 발현을 억제하는 것은 miR-4449의 타겟과의 작용을 방해하거나, miR-4449의 분해를 유도하는 siRNA, 앱타머(aptamer), 안티센스 올리고뉴클레오티드, 및 화합물 등일 수 있다.

[0035] 또한, 본 발명은 비알코올 지방간 질환으로 진단된 환자에 있어서 간 섬유화로 진행될 가능성이 높은 고위험군 환자를 진단하기 위한 정보제공방법을 제공한다.

[0036] 시료 내 존재하는 miRNA-4449의 발현 수준의 측정하기 위해서 마이크로RNA를 검출할 수 있는 각종 제제들을 사용할 수 있다.

[0037] 본 발명에서 “진단”이란 특정 질병 또는 질환에 대한 한 개체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 개체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 개체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 개체의 상태를 모니터링하는 것)을 포함한다.

[0038] 또한, 본 발명은 miRNA-4449의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 비알코올 지방간 질환 환자를 대상으로 간 섬유화를 동반한 지방간염 고위험군을 구별하기 위한 키트를 제공한다.

[0039] 본 발명에서 간 섬유화를 동반한 지방간염 고위험군은 간 섬유화가 이미 발병하였거나 발병될 가능성이 높은 것을 의미한다.

[0040] 본 발명에서 miRNA-4449 발현 수준 측정 제제로서 miRNA-4449에 특이적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 프라이머, 프로브, 및/또는 항체를 사용할 수 있으며, 유전자 발현 정도를 측정하는데 이용되는 공지의 방법, 예를 들면 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하거나, 프로브를 이용한 혼성화 반응을 통하여 실시하여 miRNA-4449의 발현 수준을 측정할 수 있다. 또한, 상기 키트에는 상기 측정 제제 이외에도 검출을 용이하게 하는 당업계에 공지된 여러 도구, 시약, 예를 들어 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지 물질, 안정화제 등이 포함될 수 있다.

[0041] 본 발명에서 생물학적 시료는 비침습적 시료일 수 있으며, 상기 비침습적 시료는 혈액, 혈청, 소변, 또는 타액일 수 있고, 바람직하게는 혈액 또는 혈청일 수 있고, 더욱 바람직하게는 혈청일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0042] 본 발명에서 miRNA-4449는 이를 구성하는 올리고뉴클레오티드의 작용성 등가물, 예를 들어, miRNA-4449 올리고뉴클레오티드의 일부 염기서열이 결실(deletion), 치환(substitution) 또는 삽입(insertion)에 의해 변형되었지만, 마이크로RNA-4449 핵산분자와 기능적으로 동일한 작용을 할 수 있는 변이체(variants) 및 모방체(mimic)를 포함하는 개념이다.

[0043] 본 발명에서 "안티센스 올리고뉴클레오티드"는 상기 miRNA에 상보적으로 결합하여 발현을 억제하는 염기서열로서, 이에 제한되지는 않으나 antisenseRNA, antagonist miRNA를 포함한다.

[0044] 본 발명에서 “프로브”는 miRNA와 특이적으로 결합할 수 있는 수개 내지 수백개의 염기로 이루어진 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링되어 있어 특정 miRNA의 존재유무를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드 프로브, 단쇄 DNA 프로브, 이중쇄 DNA 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있고 비오틴, FITC, 로다민, DIG 등으로 표지되거나 방사선 동위 원소 등으로 표지될 수 있다.

[0045] 본 발명에서 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 일 예로서 RT-PCR 키트의 경우, 마커 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오티드(dNTPs), Taq-중합효소 및 역전사효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-물(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.

[0046] 또한, 본 발명은 환자의 생물학적 시료에서 miRNA-4449의 발현 수준을 측정하는 단계;를 포함하는 비알코올 지방간 환자를 대상으로 간 섬유화 고위험군 진단을 위한 정보제공방법을 제공할 수 있으며, 상기 정보제공방법은 상기 측정된 miRNA-4449의 발현 수준을 섬유화가 진행되지 않은 비알코올 지방간 환자의 그것과 비교하여 이보다 높은 경우 간 섬유화 고위험군으로 판정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0047] 상기 miRNA 발현 수준 측정은 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), 정량적 중합효소반응(quantitative RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블롯팅(Northern blotting), 또는 DNA 칩 방식으로 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0048] 본 발명에 있어서 상기 miRNA의 발현 억제제는 miRNA-4449에 특이적인 억제제를 사용하는 것을 특징으로 하며, 상기 발현 억제제는 miRNA4449의 발현량을 감소시키거나 분해를 촉진함으로써 세포 내 miRNA-4449의 수준을 감소시키거나 miRNA-4449와 특이적으로 결합하여 그 활성을 감소시키는 것일 수 있으며, siRNA, 앱타머(aptamer), 안티센스 올리고뉴클레오티드 및 화합물로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 한다. 상기 화합물은 항산화제, 세포성장에 영향을 미치는 물질 및 세포신호전달물질 중 miRNA의 발현을 억제시키는 화합물이라면 어느 것이든지 사용할 수 있다. 하지만 이에 한정되지 않으며 miRNA-4449의 발현을 억제하는 물질이라면 어느 것이든지 사용할 수 있다.

[0049] 본 발명에서 "siRNA"는 이중가닥의 RNA가 다이서에 의해 절단되어 생성되는 21-25 뉴클레오티드 크기의 작은 RNA 조각으로 상보적인 서열을 갖는 miRNA에 특이적으로 결합하여 발현을 억제하는 것을 말한다. 본 발명의 목적상 miRNA-4449에 특이적으로 결합하여 상기 miRNA의 발현을 억제하는 것을 의미한다. siRNA는 화학적으로 또는 효소학적으로 합성될 수 있다. siRNA의 제조방법으로는 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 공지된 방법을 사용할 수 있다. 예를 들면, siRNA를 직접 화학적으로 합성하는 방법, 시험관 내(in vitro) 전사를 이용한 siRNA의 합성법, 시험관 내(in vitro) 전사에 의해 합성된 긴 이중-가닥 RNA를 효소를 이용하여 절단하는 방법, shRNA 발현 플라스미드나 바이러스성 벡터의 세포내 전달을 통한 발현법 및 PCR(polymerase chain reaction) 유도 siRNA 발현 카세트(cassette)의 세포 내 전달을 통한 발현법 등이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0050] 본 발명에 있어서, 상기 miRNA 억제제의 세포 내로의 도입은 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 공동-침전법, 전기천공법 및 리포좀 이용법 등을 이용하여 실시할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0051] 본 발명에서 예방이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 간 조직의 섬유화 또는 그에 따른 이상을 지연시키는 모든 행위를 의미하고, 치료란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 간 조직의 섬유화와 그에 따른 대사 이상 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물의 투여 대상 개체는 포유류라면 제한되지 아니하나, 바람직하게는 인간일 수 있고, 보다 구체적으로 비알코올 지방간질환 환자일 수 있다.

[0052] 본 발명에서 약학적 조성물(pharmaceutical composition)은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제, 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0053] 본 발명에서 "담체(carrier)"란 비이클(vehicle)이라고도 불리며, 세포 또는 조직 내로의 단백질 또는 펩타이드의 부가를 용이하게 하는 화합물을 의미하는 것으로서, 예를 들어 디메틸술폭사이드(DMSO)는 생물체의 세포 또는 조직 내로의 많은 유기물의 투입을 용이하게 하는 통상 사용되는 담체이다.

[0054] 본 발명에서 "희석제(diluent)"란 대상 단백질 또는 펩타이드의 생물학적 활성 형태를 안정화시킬 뿐만 아니라, 단백질 또는 펩타이드를 용해시키게 되는 물에서 희석되는 화합물로 정의된다. 버퍼 용액에 용해되어 있는 염은 당해 분야에서 희석제로 사용된다. 통상 사용되는 버퍼 용액은 포스페이트 버퍼 식염수이며, 이는 인간 용액의 염 상태를 모방하고 있기 때문이다. 버퍼 염은 낮은 농도에서 용액의 pH를 제어할 수 있기 때문에, 버퍼 희석제가 화합물의 생물학적 활성을 변형하는 일은 드물다. 여기에 사용된 아젤라산을 함유하는 화합물들은 인간 환자에게 그 자체로서, 또는 결합 요법에서와 같이 다른 성분들과 함께 또는 적당한 담체나 부형제와 함께 혼합된 약학적 조성물로서, 투여될 수 있다.

[0055] 또한, 본 발명에 따른 비알코올 지방간염 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 외용제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 분해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이

트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 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.

[0056] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구, 바람직하게는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 근육 주입, 정맥내 주입, 피하 주입, 복강 주입, 국소 투여, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.

[0057] 본 발명의 약학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.

[0058] 본 발명의 약학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 대용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캅셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0060] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 그러나, 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있어서 특허출원의 권리 범위가 이러한 실시예들에 의해 제한되거나 한정되는 것은 아니다. 실시예들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물이 권리 범위에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.

[0062] 실시예에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0064] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0066] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0068] **[실시예]**

[0069] **실시예 1. 섬유화를 동반한 지방간염 환자에서 miRNA-4449의 과발현의 확인**

[0070] 1-1. 혈청 샘플을 대상으로 miRNA 발현 heat map 제작

[0071] 조직검사를 통해서 비알코올 지방간질환으로 진단된 환자 24명의 혈청과 간 조직을 수집하여 분석하였다. 단순 지방간 혹은 섬유화를 동반하지 않은 비알코올 지방간염 환자 15명과 섬유화를 동반한 비알코올 지방간염 환자 9명에서 혈청에서 miRNA의 발현을 RNA sequencing을 이용하여 비교하였을 때 miR-4449 는 섬유화를 동반한 비알코올 지방간염 환자에서 유의하게 증가하였다 (도 1).

[0073] 1-2. 조직 샘플을 대상으로 miRNA-4449 과발현 확인

[0074] 상기 실시예 1의 환자의 간 조직을 이용하여 RT-RCT을 수행하였다. 그 결과, 단순지방간혹은 섬유화를 동반하지 않은 비알코올 지방간염 환자보다 섬유화를 동반한 비알코올 지방간염 환자의 간 조직에서 miRNA-4449의 발현 수준이 높음을 확인할 수 있었다(도 2).

[0076] **실시예 2. miRNA-4449의 타겟 분자 탐색 및 miRNA-44449와의 관계 확인**

[0077] miR-4449의 후보 타겟 유전자는 다양하다. 그 중에서 멀린(Moesin-Ezrin-Radixin-Like Protein, merlin)을 특정하고 miRNA-4449과 상호작용을 통한 2차 구조를 예측하였다(도 3). 이어서, 상기 실시예 1의 환자의 간 조직에서 멀린 유전자의 발현 수준을 확인한 결과, 섬유화를 동반한 비알코올 지방간염 환자의 간 조직에서 단순지방간 혹은 섬유화를 동반하지 않은 비알코올 지방간염 환자와 비교하여 낮은 수준의 멀린의 발현을 확인할 수 있었다(도 4).

[0078] 이어서, miRNA-4449의 발현 수준이 멀린의 발현 수준에 직접적으로 영향을 미치는지 여부를 확인하기 위하여 간세포주인 Hep3B에 miR-4449의 모사체 (has-miR-4449 mimics, Ambion, ID : MC22101, Cat#4464066 / mirVana™ miRNA mimics Negative control #1 , Ambion, Cat# 4464058) 또는 억제제 (has-miR-4449 inhibitor, Ambion, ID : MH22101, Cat# 4464084 / mirVana™ miRNA inhibitor Negative control #1, Cat# 4464076) Nega 처리하고 RT-PCR을 수행하여 멀린의 발현 수준을 확인하였다. 대조군으로는 palmitic acid을 처리하였다. 그 결과, miR-4449 모사체의 처리 시 멀린의 발현이 현저하게 감소하였으며, miR-4449 억제제의 처리 시 멀린의 발현이 증가함을 확인할 수 있었다(도 5).

[0080] **실시예 3. miRNA-4449와 TAZ와의 관계 확인**

[0081] 비알코올 지방간질환에서 간 섬유화를 조절하는데 있어서 TAZ의 phosphorylation을 멀린 이 조절하는 것으로 알려져 있다. 이에, miR-4449가 비알코올 지방간 질환에서 섬유화로 진행에참여하는 기전을 확인하기 위하여, miR-4449의 모사체와 억제제를 처리한 간 세포에서 인산화 TAZ의 수준을 확인하였다. 그 결과, miR-4449의 모사체를 처리한 간 세포에서는 TAZ의 phosphorylation이 억제되고, miR-4449의 억제제를 처리한 간 세포에서는 TAZ의 phosphorylation이 증가되는 것이 웨스턴 블롯을 통해 확인되었다(도 6).

[0083] **실시예 4. miRNA-4449와 간 선상세포와의 관계 확인**

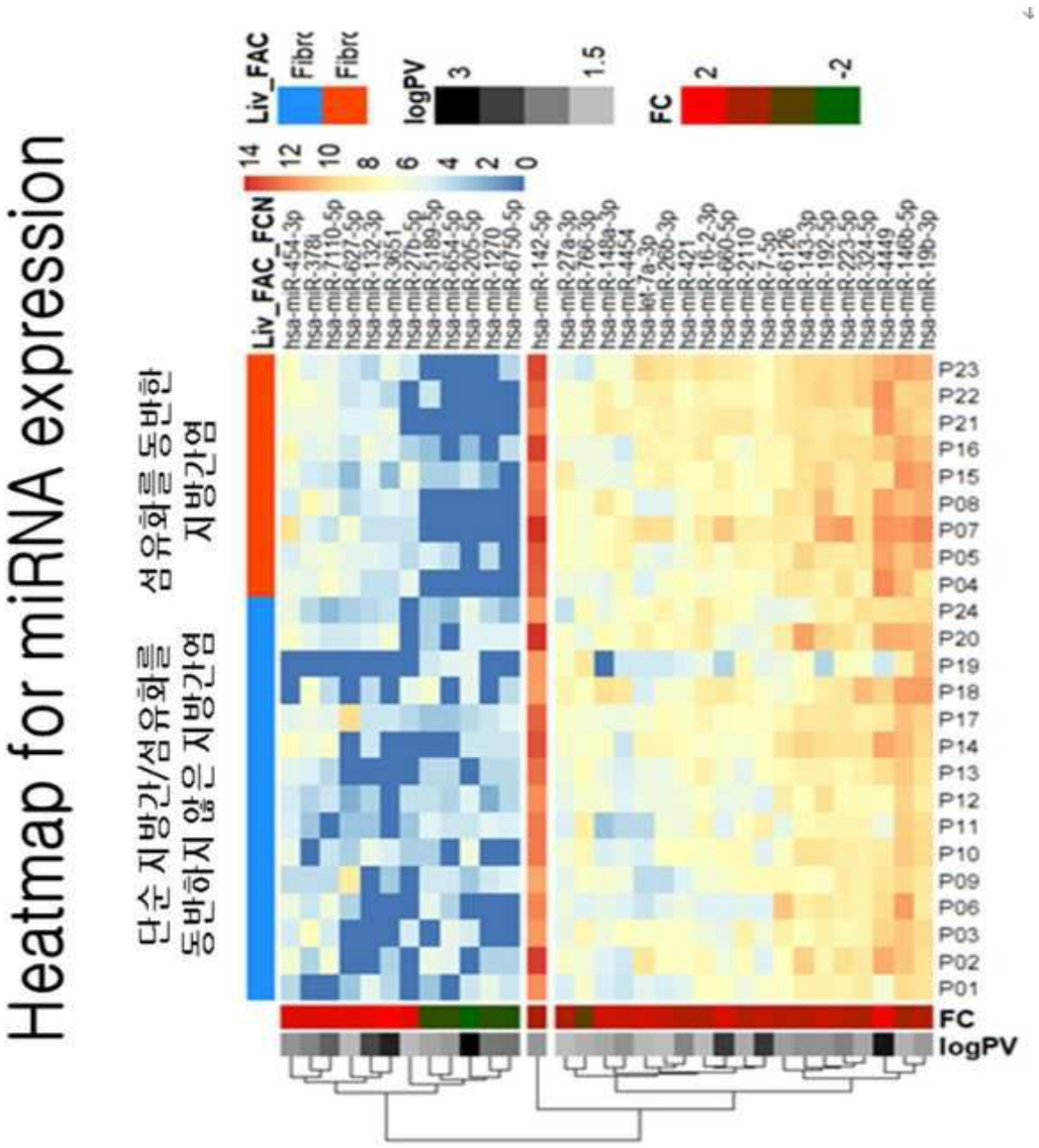
[0084] 모든 간질환에서 간 섬유화의 진행에 가장 중요한 세포는 간 성상세포로 알려져 있다. 이에, miR-4449가 비알코올 지방간 질환에서 섬유화로 진행을 조절하는 기전을 확인하기 위하여, miR-4449의 모사체 또는 억제제를 처리한 간 세포의 배양액을 간 성상세포에 처리하여 간섬유화와 관련된 유전자 발현을 확인하였다. 그 결과, miR-4449의 모사체를 처리한 간세포에서 유래한 배양액을 처리한 간성상세포에서는 a-SMA, collagenase 1a1, 및 TGF-β 와 같은 섬유화와 관련된 유전자의 발현이 증가하였고, miR-4449의 억제제를 처리한 간세포에서 유래한 배양액을 처리한 간성상세포에서는 a-SMA, collagenase 1a1, 및 TGF-β 와 같은 섬유화와 관련된 유전자의 발현이 감소하였다 (도 7).

[0086] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및 변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 시스템, 구조, 장치, 회로 등의 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

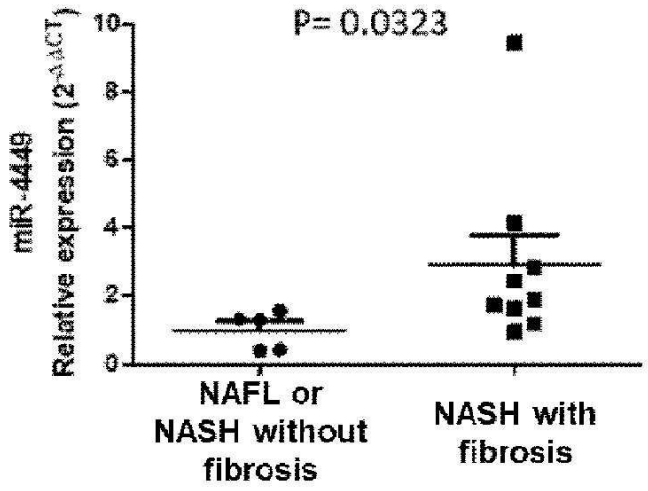
[0087] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

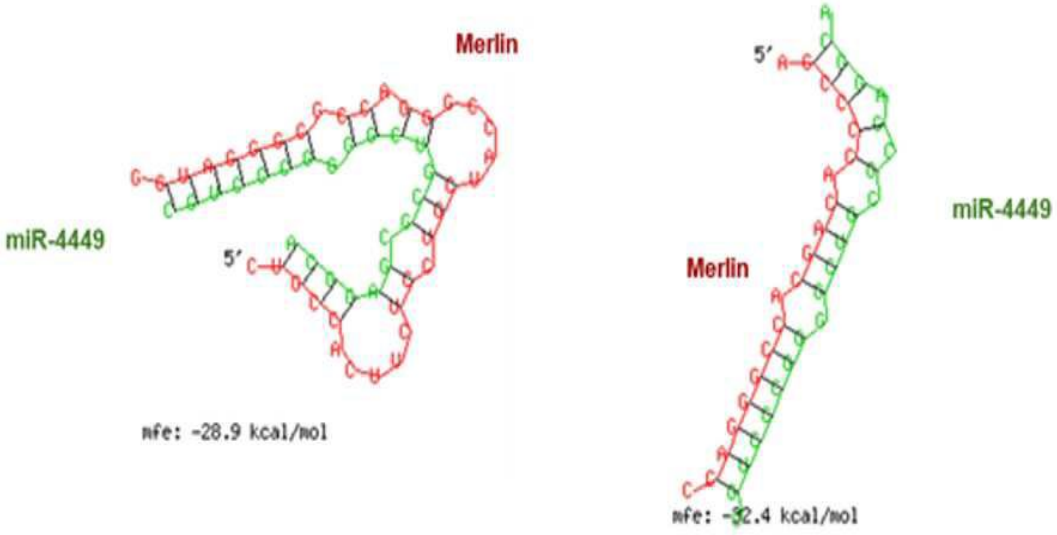
도면1


Heatmap for miRNA expression
Liv_FAC
Fibr
Fibr
logPV
3
1.5
FC
2
-2
14
12
10
8
6
4
2
0
Liv_FAC_FCN
hsa-miR-454-3p
hsa-miR-378i
hsa-miR-7110-5p
hsa-miR-627-5p
hsa-miR-132-3p
hsa-miR-3651
hsa-miR-27b-5p
hsa-miR-5189-5p
hsa-miR-654-5p
hsa-miR-205-5p
hsa-miR-1270
hsa-miR-6750-5p
hsa-miR-142-5p
hsa-miR-27a-3p
hsa-miR-766-3p
hsa-miR-148a-3p
hsa-miR-4454
hsa-let-7a-3p
hsa-miR-26b-3p
hsa-miR-421
hsa-miR-16-2-3p
hsa-miR-660-5p
hsa-miR-2110
hsa-miR-7-5p
hsa-miR-6126
hsa-miR-143-3p
hsa-miR-192-5p
hsa-miR-223-5p
hsa-miR-324-5p
hsa-miR-4449
hsa-miR-146b-5p
hsa-miR-19b-3p
섬유화를 동반한 지방간염
단순 지방간/섬유화를 동반하지 않은 지방간염
P23
P22
P21
P16
P15
P08
P07
P05
P04
P24
P20
P19
P18
P17
P14
P13
P12
P11
P10
P09
P06
P03
P02
P01
FC
logPV

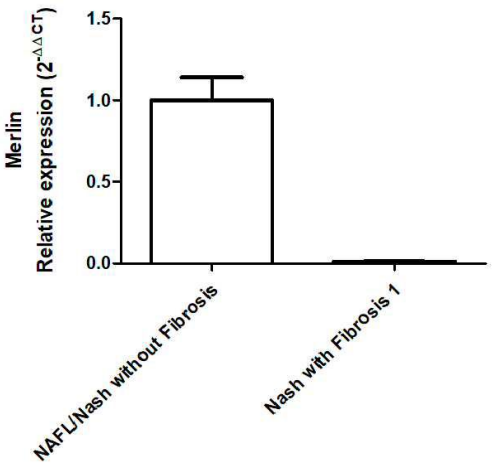
도면2


P= 0.0323
miR-4449
Relative expression (2-ΔΔCT)
10
8
6
4
2
0
NAFL or
NASH without
fibrosis
NASH with
fibrosis

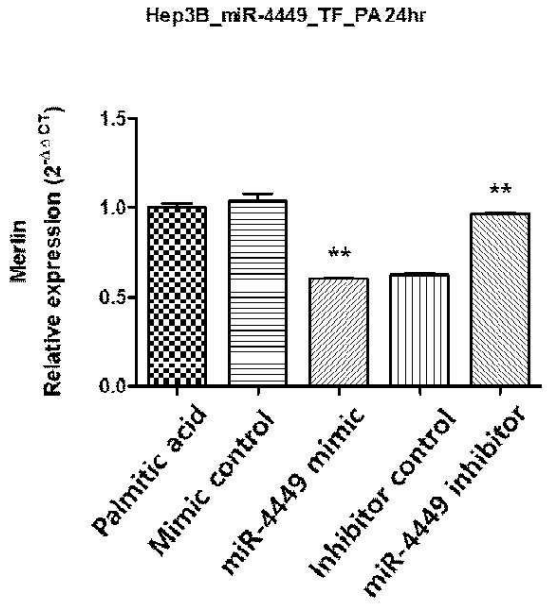
도면3


Merlin
miR-4449
5′
mfe: -28.9 kcal/mol
5′
miR-4449
Merlin
mfe: -32.4 kcal/mol

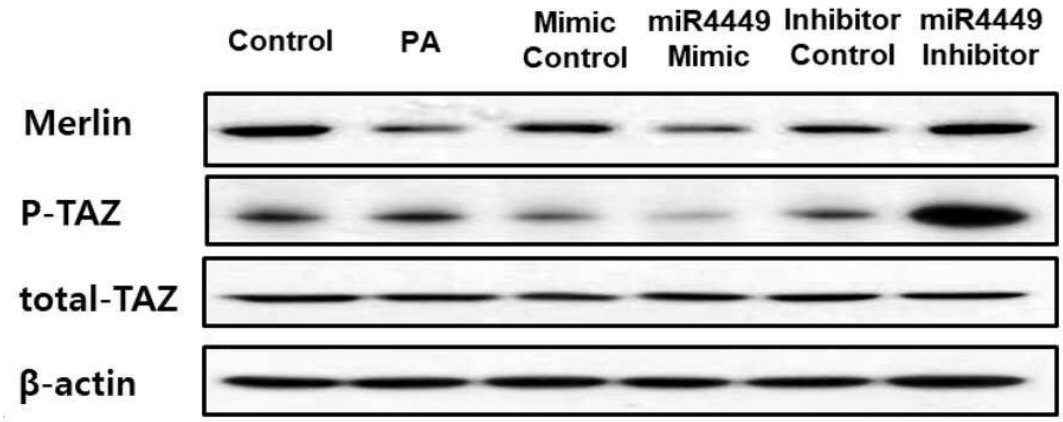
도면4


Merlin
Relative expression (2-ΔΔCT)
1.5
1.0
0.5
0.0
NAFL/Nash without Fibrosis
Nash with Fibrosis 1

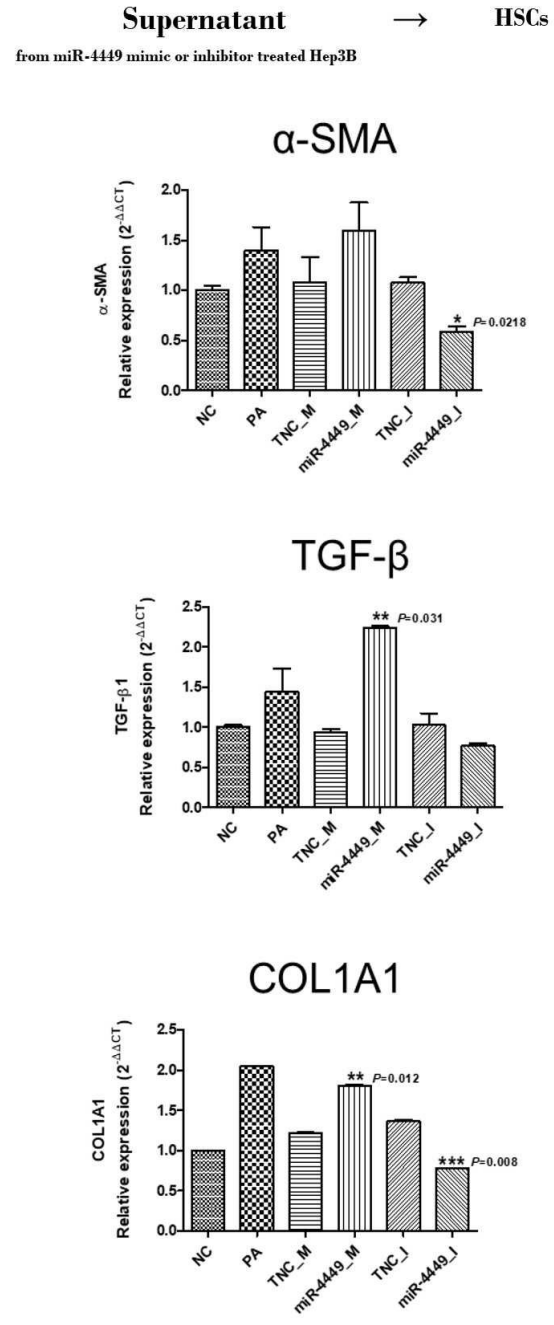
도면5


Hep3B_miR-4449_TF_PA 24hr
Merlin
1.5
1.0
0.5
0.0
**
**
Palmitic acid
Mimic control
miR-4449 mimic
Inhibitor control
miR-4449 inhibitor

도면6


Control
PA
Mimic Control
miR4449 Mimic
Inhibitor Control
miR4449 Inhibitor
Merlin
P-TAZ
total-TAZ
β-actin

도면7


Supernatant → HSCs
from miR-4449 mimic or inhibitor treated Hep3B
α-SMA
α-SMA Relative expression (2^-ΔΔCT)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
* P=0.0218
NC
PA
TNC_M
miR-4449_M
TNC_I
miR-4449_I
TGF-β
TGF-β1 Relative expression (2^-ΔΔCT)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
** P=0.031
NC
PA
TNC_M
miR-4449_M
TNC_I
miR-4449_I
COL1A1
COL1A1 Relative expression (2^-ΔΔCT)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
** P=0.012
*** P=0.008
NC
PA
TNC_M
miR-4449_M
TNC_I
miR-4449_I