



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0101608
(43) 공개일자 2023년07월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/51 (2006.01) A61K 31/7105 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/5161 (2013.01)
A61K 31/7105 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0191859
(22) 출원일자 2021년12월29일
심사청구일자 2021년12월29일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
디조이사 마하나마
대전광역시 유성구 배울1로 35, 409동 501호 (관
평동, 대덕테크노밸리4단지아파트)
신현진
대전광역시 서구 계룡로264번길 4, 105동 610호 (월
평동, 월평타운)
(뒤편에 계속)
(74) 대리인
리엔목특허법인

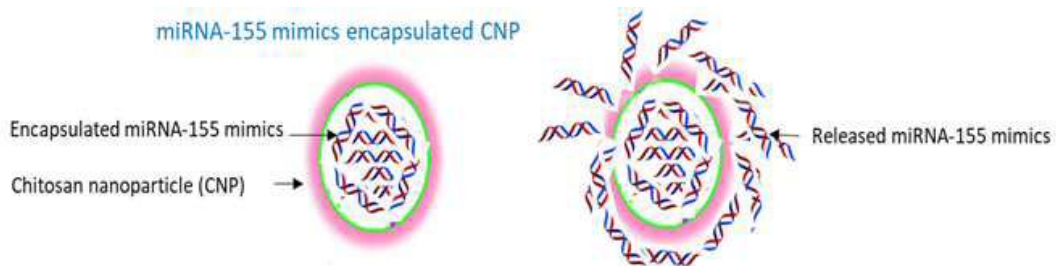
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자를 유효성분으로 포함하는 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스에 대한 어류용 항바이러스 조성물

(57) 요약

본 출원은 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자 및 이의 용도에 관한 것으로서, 상기 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자의 제조 방법, 상기 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자를 유효성분으로 포함하는 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스 (VHSV)에 대한 어류용 항바이러스 조성물, 및 이를 이용한 VHSV 감염성 어류 질병을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 48/0025 (2013.01)

A61P 31/14 (2018.01)

(72) 발명자

니크피티야 차밀라니 라란티

대전광역시 유성구 죽동로279번길 69, 203호 (죽동)

틸로마 딜록시 리야나지

경기도 수원시 장안구 창훈로8번길 28, 102호(연무동)

명세서

청구범위

청구항 1

miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자를 유효성분으로 포함하는 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스 (viral hemorrhagic septicemia virus: VHSV)에 대한 어류용 항바이러스 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 miRNA 155는 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 3

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

청구항 4

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

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스 감염성 질병의 예방 또는 치료용 약제인 것인, 조성물.

청구항 6

(a) miRNA 155 및 트리폴리인산염 (tripolyphosphate) 용액을 혼합하는 단계;

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

(c) 상기 (a) 단계에서 얻어진 혼합액 및 상기 (b) 단계에서 얻어진 용액을 혼합하여 교반하는 단계를 포함하는 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자를 제조하는 방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자는 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스 감염성 어류 질병에 대하여 예방 또는 치료 효과를 나타내는 것인, 방법.

청구항 8

어류에 청구항 1 내지 5 중 어느 한 항의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스 감염성 어류 질병을 예방 또는 치료하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자를 유효성분으로 포함하는 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스 (VHSV)에 대한 어류용 항바이러스 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스 (viral hemorrhagic septicemia virus: VHSV)는 단일가닥의 RNA 바이러스로 Rhabdoviridae과 Novirhabdovirus속의 외막을 가진 바이러스이다. VHSV에 감염된 넙치를 육안으로 살펴보면, 체색흑화, 전신의 출혈, 복수 저류로 인한 복부팽만, 탈장, 아가미 퇴색, 무안축 체표에 붉은 반점모양의 출혈이 관찰된다. VHSV로 인한 발병은 수온이 낮은 10-13 °C의 겨울철에 발생하고 종묘 입식시기에 주로 발생하여

치어의 대량폐사를 일으킨다. 감염 표적 장기는 심장과 신장이며 이외에도 비장, 뇌, 근육, 아가미 등의 손상을 초래한다. VHSV는 무지개송어의 중요 바이러스성 질병으로 처음 보고가 되었는데 최근 다양한 어류, 송어, 무지개송어, 은연어, 강송어, 브라운송어, 스틸헤드 송어 (steelhead trout) 등의 연어과 어류뿐만 아니라 대구, 청어 등과 같은 자연수계의 어류 및 넙치 등과 같은 해산 양식 어류에서도 널리 발생하며, 주로 유럽, 북미, 아시아 지역에서 널리 발생한다.

[0003] 바이러스성 출혈성 패혈증 (viral hemorrhagic septicemia: VHS)은 국내에서는 2001년 넙치에서 처음 보고되었고, 이후 각종 자연산 해산어에서도 보고되고 있으며, 현재 넙치의 바이러스성 질병 중 가장 높은 비율을 차지하는 양식 넙치의 피해가 매우 심각한 치명적인 질병이다. 또한, VHS는 국제수역사무국 (OIE)에서 'OIE 신고대상 질병 (OIE notifiable disease)'으로 규정되어 있어 수산물 유통시 검역 대상이 되는 질병으로 넙치를 포함한 양식 어류의 수출입에 있어서 무역장벽으로 작용하는 중요한 질병 요인이기도 하다.

[0004] VHSV의 구조와 항원단백질에 대한 연구, 및 이들 기초 연구를 바탕으로 불활화 백신, 단백질 재조합 백신, 약독화 백신, DNA 백신 등에 대한 연구가 수행되고 있다 (한국 공개특허 제10-2014-0003826호). 그러나 약독화 (attenuated) 바이러스 백신은 실험 조건에서는 효과가 있는 것으로 보고되고 있으나 바이러스의 병원성 회복의 위험성과 자연계로의 확산 위험성 때문에 허가가 되지 않고 있다. 또한, 출혈성 패혈증 바이러스 G 혹은 N 유전자를 삽입한 플라스미드를 근육 주사한 DNA 백신 실험에서는 강력한 면역반응이 유도되고 폐사율도 경감되었다는 보고가 무지개송어와 넙치에서 보고되고 있으나 DNA 백신의 유전자 조작에 대한 안전성의 문제 때문에 상용화되어 있지 않다.

[0005] 한편, 키틴 (갑각류 껍질의 주성분)을 탈 아세틸화시킨 천연 생체 고분자인 키토산 ((1,4)-2-아미노-2-데옥시-β-D-글루칸)은 뛰어난 생체 적합성, 낮은 면역원성, 그리고 다른 폴리머들에 비해 낮은 세포 독성 때문에 섬유고분자 산업이나 의공학을 비롯한 최첨단 기술 분야에서 응용되기 시작하였고 이에 대한 연구도 국내외적으로 활발하게 진행되고 있다.

[0006] 이런 배경 하에서, 본 발명자들은 VHSV 감염성 어류 질병에 대한 예방 또는 치료 효과를 나타내는 신규한 물질을 찾기 위해 연구를 계속한 결과, miRNA (micro RNA) 155 또는 이의 모방체 (mimic)를 키토산 나노입자에 봉입하여 어류에 투여하는 경우, 독성을 야기하지 않으면서 VHSV 감염으로부터 어류를 보호하는 우수한 효과를 확인함으로써, 본 출원을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 일 양상은 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자를 유효성분으로 포함하는 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스 (viral hemorrhagic septicemia virus: VHSV)에 대한 어류용 항바이러스 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 다른 양상은 (a) miRNA 155 및 트리폴리인산염 (tripolyphosphate) 용액을 혼합하는 단계; (b) 키토산 (chitosan)을 산성 용매에 용해시키는 단계; 및 (c) 상기 (a) 단계에서 얻어진 혼합액 및 상기 (b) 단계에서 얻어진 용액을 혼합하여 교반하는 단계를 포함하는 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 또 다른 양상은 어류에 상기 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스 (viral hemorrhagic septicemia virus: VHSV) 감염성 어류 질병을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

[0010]

[0011] 본 출원의 다른 목적 및 이점은 첨부한 청구범위 및 도면과 함께 하기의 상세한 설명에 의해 보다 명확해질 것이다. 본 명세서에 기재되지 않은 내용은 본 출원의 기술 분야 또는 유사한 기술 분야 내 숙련된 자이면 충분히 인식하고 유추할 수 있는 것이므로 그 설명을 생략한다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 출원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0013]

[0014] 일 양상은 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자를 유효성분으로 포함하는 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스 (viral hemorrhagic septicemia virus: VHSV)에 대한 어류용 항바이러스 조성물을 제공한다.

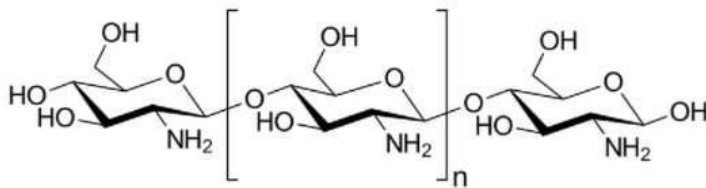
[0015] 용어 "miRNA (micro RNA)"는 mRNA의 3' 비번역 영역 (UTR) 부위와의 염기결합을 통해 전사 후 단계에서 유전자의 발현을 조절하는 조절 RNA (regulatory RNA) 분자로서, 대략 20 내지 25 뉴클레오티드 (nt)의 비번역 RNA를 의미한다. miRNA는 발생, 분화, 세포사멸, 및 증식과 관련된 결정적인 생물학적 과정뿐만 아니라 당뇨병, 신경 변성의 질환, 및 암과 같은 질환들과 관련되어 있는 것으로 알려져 있다.

[0016] 상기 miRNA 155는 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 것일 수 있다.

[0017] 상기 miRNA 155는 인간 또는 마우스로부터 유래된 것일 수 있으며, 이에 한정되지 않고, 체외에서 인위적으로 합성 또는 제조된 것일 수 있다. 상기 miRNA 155를 합성 또는 제조하기 위하여, 화학적 또는 생물학적 방법 또는 이에 제한되지 않는 당업계에 공지된 방법을 이용할 수 있다. 따라서, 상기 miRNA 155는 miRNA 155 모방체 (mimic)를 포함할 수 있다. 상기 miRNA 155 모방체는 세포 내에 있는 miRNA 155의 서열과 동일하거나 일부 변형된 서열로 만들어진 합성 miRNA를 의미할 수 있다.

[0018] 용어 "키토산 (chitosan)"은 다당류로, 갑각류 껍질로부터 얻어지는 키틴의 $-CH_3CONH$ 의 탈아세틸화에 의하여 유도된 천연 고분자 물질을 의미한다. 즉, 키토산은 키틴의 단량체에 존재하는 아세틸기 (acetyl group; $-COCH_3$)가 아미노기($-NH_2$)로 치환된 형태를 가질 수 있다. 한편, 게, 가재, 새우 등 갑각류의 껍질로부터 얻어지는 키틴은 셀룰로오스 다음으로 풍부한 천연 고분자로, 셀룰로오스 C-2 위치의 OH가 CH_3CONH 로 치환된 구조를 가지며, 셀룰로오스와 매우 비슷한 구조를 가지는 물질일 수 있다. 예를 들어, 상기 키토산은 하기와 같은 화학식 1로 표시되는 화합물일 수 있다:

[0019] [화학식 1]



[0020]

[0021] (상기 화학식 1에서, n은 1 내지 10000으로부터 선택되는 어느 하나의 정수이다.).

[0022] 상기 키토산은 저분자량의 키토산 (low molecular weight chitosan: LMWC)일 수 있다. 구체적으로, 상기 키토산의 중량평균분자량은 약 50,000 내지 190,000 Da일 수 있다.

[0023] 일 구체예에 따르면, 상기 키토산의 중량평균분자량이 약 50,000 Da 미만인 경우, 상기 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자는 miRNA 155와 키토산 사이의 정전기적 상호작용, 예컨대, 이온성 결합의 세기가 감소하여, 상기 miRNA 155를 키토산 나노입자의 내부에 봉입하기 위한 캡슐화 강도가 약해질 수 있다. 이로 인해, miRNA 155가 외부 환경에 노출되어 유효성이 감소할 수 있다. 또한, 상기 키토산의 중량평균분자량이 약 190,000 Da 초과인 경우, 상기 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자의 사이즈 증가로 인해 세포 침투력이 감소하여 miRNA 155를 어류의 생체 내 또는 세포 내로 전달하는 효율이 감소할 수 있다.

[0024] 또한, 상기 키토산은 생분해성 또는/및 생체적합성을 나타내는 것일 수 있고, 상기 키토산은 염의 형태 또는 키토산 유도체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 키토산 유도체는 키토산의 알킬화물, 아실화물, 아릴화물, 황산화물, 또는 인산화물일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0025] 상기 키토산을 이용하여 키토산 나노입자 (chitosan nanoparticles: CNPs)를 제조할 수 있고, 상기 키토산 나노입자의 내부에 특정 물질 (예컨대, miRNA 155)이 봉입 또는 캡슐화될 수 있다. 상기 키토산 나노입자의 내부에 봉입된 또는 캡슐화된 특정 물질 (예컨대, miRNA 155)은 외부 환경, 예컨대 효소 등으로부터 안정하게 보호될 수 있으며, 특정 조건에서 방출될 수 있다. 상기 효소는 DNA 분해효소 (DNase) 또는 RNA 분해효소 (RNase) 일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0026] 상기 키토산 나노입자는 상기 키토산을 일 구성 요소로 포함할 수 있고, 추가로, 트리폴리인산염

(tripolyphosphate: TPP)을 포함할 수 있다. 또한, 상기 키토산 나노입자는 상기 키토산과 상기 트리폴리인산염이 가교 결합을 형성하고 있는 것일 수 있다. 상기 트리폴리인산염은 트리폴리인산나트륨 (sodium tripolyphosphate; $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) 또는 트리폴리인산칼륨 (potassium tripolyphosphate; $\text{K}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$)일 수 있다.

[0027] 상기 키토산은 양전하를 나타내고, 상기 miRNA 155는 음전하를 나타내는 것일 수 있다. 따라서, 상기 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자는 상기 키토산과 상기 miRNA 155가 정전기적 상호작용, 예컨대, 이온성 결합에 의하여 결합 또는 연결되어 있는 것일 수 있다. 즉, 상기 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자는 정전기적 상호작용에 의하여 miRNA 155의 표면이 키토산으로 코팅되어 외곽에 키토산 나노입자가 형성되고, 그 내부에 miRNA 155가 존재하는 구형의 나노입자 또는 나노구 (nanosphere)의 형태를 가지는 것일 수 있다. 이때, 상기 외곽에 형성된 키토산 나노입자는 상기 키토산과 상기 트리폴리인산염이 가교 결합을 형성하고 있는 것일 수 있다.

[0028] 용어 "봉입 또는 캡슐화 (encapsulation)"는 특정 물질을 다른 물질로 둘러싸거나 코팅하는 기술을 의미한다.

[0029] 용어 "나노캡슐 (nano capsule)"은 나노 크기의 캡슐을 의미하며, 나노캡슐의 내부에 특정 물질이 포함되어 있을 수 있다. 용어 "나노입자 (nanoparticle)"는 용어 "나노캡슐"과 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0030] 다시 말해, 상기 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자는 상기 miRNA 155와 상기 키토산의 복합체; 또는 상기 miRNA 155, 상기 키토산, 및 상기 트리폴리인산염의 복합체일 수 있다.

[0031] 상기 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자에 포함된 miRNA 155 및 키토산의 중량비는 약 1 : 5 내지 15, 1 : 7 내지 13, 1 : 9 내지 11, 또는 1 : 10일 수 있다. 상기 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자에 포함된 miRNA 155 및 키토산의 중량비가 상기 수치 또는 수치범위를 벗어나는 경우, 약 200 내지 500 nm의 균일한 사이즈의 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자가 형성되기 어렵고, miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자의 캡슐화 효율, 캡슐화 강도, 또는 miRNA 155 방출능이 현저히 감소할 수 있다. 그 결과, 상기 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자에 있어서, 유효한 miRNA 155를 어류의 생체 내 또는 세포 내로 전달하는 효율 및 어류의 바이러스 감염성 질병에 대한 예방 또는 치료 효과가 현저히 감소할 수 있다.

[0032] 용어 "miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자"는 용어 "miRNA 155-CNPs"와 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0033] 상기 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자는 표면 양전하를 나타내는 것일 수 있다. 또한, 상기 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자의 제타전위 (zeta potential)는 약 30 내지 60 또는 35 내지 45 mV인 것일 수 있다.

[0034] 용어 "제타전위 (zeta potential)"는 입자사이의 반발력과 인력의 크기를 단위로 나타낸 것을 의미하고, 일반적으로, 제타전위는 입자의 표면전위 (구체적으로는, slipping plane의 전위) 즉, 표면 양전하 밀도를 나타낸다. 수중에 있는 콜로이드 물질의 입자는 침전되지 않고 부유하는 성질을 지닌다. 이러한 물질들은 입자들이 가지는 +, - 이온들로 인해 서로 반발하는 성질을 가지는데, 이렇게 반발하는 힘을 제타전위라고 할 수 있다. 따라서, 제타전위는 액상에 현탁된 입자의 분산 혹은 응집의 정도를 평가하는데 적용될 수 있으며, 일반적으로 제타전위의 절대값이 클수록 현탁액 내의 입자의 분산상태가 안정적이라고 평가할 수 있다.

[0035] 일 구체예에 따르면, 상기 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자는 약 30 내지 60 mV의 높은 제타전위를 나타내므로, 액상에서 안정적인 분산상태를 유지할 수 있다. 이는 또한, 상기 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자는 내부 음전하와 외부 양전하가 강력한 정전기적 상호작용, 예컨대, 이온성 결합을 형성하여 매우 안정적인 캡슐화 상태를 유지할 수 있음을 의미한다. 이로 인해, 상기 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자는 매우 안정적인 나노구 형태를 나타내어 내부의 miRNA 155를 외부 환경으로부터 강력하게 보호하고, 액상에서 안정적으로 분산되므로 어류에 직접 투여하기 적합한 다양한 제형으로 용이하게 적용될 수 있다. 따라서, 유전자 발현 벡터 등을 이용하여 어류를 형질전환시키는 등의 방식에 의하지 않더라도, 상기 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자를 어류에 직접 투여 (경구 또는 비경구 투여)하는 간단한 방식만으로도 유효성이 유지된 miRNA 155를 어류의 생체 또는 세포 내로 효과적으로 전달하여 어류의 바이러스 감염성 질병을 예방 또는 치료할 수 있다.

[0036] 상기 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자의 직경은 약 200 내지 500 또는 300 내지 400 nm인 것일 수 있다.

[0037] 일 구체예에 따르면, 상기 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자의 직경이 약 200 nm 미만인 경우, 상기 키토산 나노입자의 내부에 봉입될 수 있는 miRNA 155의 양이 줄어들어, miRNA 155를 어류의 생체 내 또는 세포 내로 전달하는 효율이 감소할 수 있다. 또한, 상기 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자의 직경이 약 500 nm 초과인 경우, miRNA 155와 키토산 사이의 정전기적 상호작용, 예컨대, 이온성 결합의 세기가 감소하고 miRNA 155를 키토산 나노입자의 내부에 봉입하기 위한 캡슐화 강도가 약해져 miRNA 155가 외부 환경에 노출되어 유효성이 감소될 수 있다. 또한, 나노입자의 사이즈 증가로 인해 상기 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자의 세포 침투력이 감

소하여 miRNA 155를 어류의 생체 내 또는 세포 내로 전달하는 효율이 감소할 수 있다.

- [0038] 상기 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자는 miRNA 155 방출능을 가지는 것일 수 있다. 일 구체예에 따르면, 상기 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자는 시간이 경과함에 따라 외곽의 키토산이 점진적으로 (gradually) 생분해되면서 miRNA 155가 지속적으로 방출되는 것일 수 있다. 이는 상기 키토산의 생분해에 의해 키토산과 miRNA 155 사이에서 형성되었던 강력한 정전기적 상호작용, 예컨대, 이온성 결합의 세기가 감소하여, miRNA 155가 방출되는 것으로 이해될 수 있다. 이로 인해, 상기 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자는 어류의 생체 또는 세포 내로 흡수된 후, miRNA 155를 지속적으로 방출하여 어류의 생체 내에서 miRNA 155의 효과를 지속적으로 유지시킬 수 있다.
- [0039] 용어 "유효성분 (effective ingredient)"은 이롭거나 바람직한 임상적 또는 생화학적 결과에 영향을 주는 적절한 유효량의 성분을 의미한다. 구체적으로는, 유효량의 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자를 의미할 수 있다.
- [0040] 상기 유효량은 개체에 대하여 질병을 예방하거나, 질병 상태를 비제한적으로, 증상의 완화, 질병 범위의 감소, 질병 상태의 안정화 (즉, 악화되지 않음), 질병 진행의 지연 또는 속도의 감소, 또는 질병 상태의 개선 또는 일시적 완화 및 경감 (부분적이거나 전체적으로)을 위한 적절한 양일 수 있다. 상기 유효량은 개체의 종류, 개체의 상태, 개체의 양, 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 관련 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0041] 일 구체예에 따르면, 상기 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자는 외부 환경에 의한 영향을 차단하여 miRNA 155의 안정성을 현저히 향상시키고, 유효성이 유지된 miRNA 155를 어류 생체 내 또는 세포 내로 효과적으로 전달할 수 있다. 또한, 상기 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자는 입자가 매우 작고, 표면 양전하를 나타내므로 생체 흡수율, 생체 이용률, 및 세포 투과성이 현저히 증가될 수 있고, 어류의 생체 또는 세포 내로 흡수된 후, 키토산의 점진적인 생분해로 인해 miRNA 155를 지속적으로 방출하여 어류의 생체 내에서 miRNA 155의 효과를 지속적으로 유지시킬 수 있다.
- [0042] 상기 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자를 유효성분으로 포함하는 어류용 항바이러스 조성물은 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스에 대하여 항바이러스 효과를 나타내는 것일 수 있다.
- [0043] 용어 "바이러스성 출혈성 패혈증 (viral hemorrhagic septicemia: VHS)"은 유럽, 미국 및 동남 아시아 전역의 담수 및 해양 어류 약 70 종 이상에 큰 피해를 주고 있는 특정 바이러스의 감염으로 인한 패혈증을 의미한다. 늦은 겨울부터 봄철에 주로 발생하며, 수온이 약 8 내지 15℃에서 넙치의 모든 연령군 (치어부터 성어)에서 약 50 내지 70%의 높은 사망률을 보인다.
- [0044] 용어 "바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스 (viral hemorrhagic septicemia virus: VHSV)"는 상기 바이러스성 출혈성 패혈증의 원인 바이러스를 의미하고, 음성 단일가닥 RNA 바이러스로 람도바이러스 (rhabdovirus)과에 속한다. VHSV는 어린 치어기뿐 아니라 출하 시기의 큰 성어에서도 폐사를 일으키며 감염어는 체색흑화, 복막과 복강 내의 투명 복수액 저류, 간 울혈, 비장 비대, 신장중대, 간, 신장, 비장 및 골격근에 괴사와 아가미 새엽의 비후, 간농축, 골격근 혈구 축적 등의 내부증상이 나타나며, 피부 상피층 또는 아가미 내피 세포를 통해 바이러스가 어체로 침입하여 혈류를 타고 신장, 비장의 조혈 형성조직 등 내부장기로 빠르게 이동하는 것으로 알려져 있다.
- [0045] 일 구체예에 따르면, 상기 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자를 투여받은 어류는 VHSV에 감염시, 어류 조직 내에서의 VHSV의 증식 또는 복제가 감소될 수 있고, VHSV 감염 어류의 생존율이 현저히 증가될 수 있다. 또한, 일 구체예에 따르면, 상기 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자를 투여받은 어류는 VHSV에 감염시, 어류 조직 내에서의 VHSV에 의해 유도된 항바이러스성 반응, 면역반응 조절, 및 세포 사멸 반응과 관련된 인자의 유전자 발현이 조절될 수 있다. 즉, 상기 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자는 VHSV 감염 어류의 항바이러스성 반응, 면역반응, 및 세포 사멸 반응 등을 조절할 수 있다. 이를 통해, 상기 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자는 어류의 VHSV 감염성 질병에 대하여 우수한 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있다.
- [0046] 용어 "투여"란 어떠한 적절한 방법으로 어류에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 상기 어류용 항바이러스 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 구체적으로, 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비 내 투여, 폐 내 투여, 직장 내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 상기 어류용 항바이러스 조성물의 투여량은 제제화 방법, 개체의 체중, 동물의 수령, 성별, 병적상태, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여경로,

투여방법, 배설율, 배설 속도, 질환의 중증도, 및 반응 감응성 등에 따라 그 범위가 달라질 수 있으며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 상기 어류용 항바이러스 조성물의 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 예컨대, 상기 어류용 항바이러스 조성물의 1일 투여량은 약 0.001 내지 10000 mg/kg일 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0047] 상기 어류용 항바이러스 조성물은 어류에 대하여 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0048] 상기 어류용 항바이러스 조성물은 어류에 사용되는 것으로서, 사료, 사료 첨가제, 항바이러스용 약제, 바이러스 감염성 질병의 예방 또는 치료용 약제, 또는 면역 증진용 약제인 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 어류용 항바이러스 조성물은 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스 감염성 질병의 예방 또는 치료용 약제인 것일 수 있다.

[0049] 용어 "예방"이란 조성물의 투여로 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스 감염성 질병의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0050] 용어 "치료"란 조성물의 투여로 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스 감염성 질병에 의해 이미 유발된 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.

[0051] 상기 어류용 항바이러스 조성물은 추가로 수의학적으로 허용 가능한 담체를 1 종이상 포함할 수 있다. 수의학적으로 허용가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로오스 용액, 말토텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제, 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 제형화할 수 있다.

[0052] 상기 어류용 항바이러스 조성물이 사료 또는 사료 첨가제로서 사용되는 경우에는, 품질 저하를 방지하기 위하여 첨가하는 결합제, 유화제, 보존제 등이 더 포함될 수 있고, 효용 증대를 위하여 아미노산제, 비타민제, 효소제, 생균제, 향미제, 비단백태질소화합물, 규산염제, 완충제, 착색제, 추출제, 올리고당 등을 더 포함할 수 있으며, 그 외에도 사료 혼합제 등을 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 어류용 항바이러스 조성물이 사료 또는 사료 첨가제로서 사용되는 경우에는, 곡물류, 근과류, 식품가공 부산물류, 조류, 섬유질류, 유지류, 전분류, 박류, 곡물부산물류, 단백질류, 무기물류, 유지류, 광물성류, 유지류, 단세포 단백질, 동물성플라크톤류, 어분 등의 사료 또는 사료첨가제와 혼합되어 사용될 수 있다.

[0053] 상기 어류는 VHSV 감염에 대한 예방이 필요한 정상 어류이거나, 이미 VHSV에 감염되어 치료가 필요한 감염 어류일 수 있다. 또한, 상기 어류는 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스에 감염될 수 있는 모든 어류를 제한없이 통칭할 수 있다. 구체적으로 상기 어류는 넙치 (*Paralichthys olivaceus*), 방어 (*Seriola quinqueradiata*), 참돔 (*Pagrus major*), 자주복 (*Takifugurubripes*), 부시리 (*Seriola aureovittata*), 송어 (*Oncorhynchus masou*), 무지개 송어 (*Oncorhynchus mykiss*), 잭방어 (*Seriola dumerili*), 전갱이 (*Trachurus japonicus*), 흑점줄전갱이 (*Pseudocaranx dentex*), 능성어 (*Epinephelus septemfasciatus*), 참다랑어 (*Thunnus thynnus*), 잉어 (*Cyprinus carpio*), 제브라피쉬 (*Danio rerio*), 메기 (*Silurus asotus*), 클라리아스 가리에피누스 (*Clarias gariepinus*), 틸라피아 (*Oreochromis niloticus*), 연어 (*Oncorhynchus keta*), 대서양 연어 (*Salmo salar*), 및 송사리 (*Oryzias latipes*)를 포함할 수 있고, 바람직하게는 양식 어류일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0054] 상기 어류용 항바이러스 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제, 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0055]

[0056] 다른 양상은 (a) miRNA 155 및 트리폴리인산염 용액을 혼합하는 단계; (b) 키토산을 산성 용매에 용해시키는 단계; 및 (c) 상기 (a) 단계에서 얻어진 혼합액 및 상기 (b) 단계에서 얻어진 용액을 혼합하여 교반하는 단계를 포함하는 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자를 제조하는 방법을 제공한다.

[0057] 상기 방법에 사용된 키토산은 전술한 바와 같다.

- [0058] 상기 (a) 단계에서 상기 트리폴리인산염은 트리폴리인산나트륨 (sodium tripolyphosphate; $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) 또는 트리폴리인산칼륨 (potassium tripolyphosphate; $\text{K}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$)일 수 있다.
- [0059] 상기 (a) 단계에서 상기 miRNA 155 및 트리폴리인산염은 약 1 : 2 내지 4, 1 : 3 내지 4, 또는 1 : 3 내지 3.5의 중량비로 혼합되는 것일 수 있다. 일 구체예에 따르면, 상기 (a) 단계에서 상기 miRNA 155 및 트리폴리인산염이 상기 중량비로 혼합되는 경우, 상기 방법에 의하여 제조된 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자는 캡슐화 효율, 캡슐화 강도, 또는 miRNA 155 방출능이 현저히 우수하여, 어류의 생체 내 또는 세포 내로 유효성이 유지된 miRNA 155를 효과적으로 전달할 수 있고, 이로 인해, 어류의 바이러스 감염성 질병에 대한 예방 또는 치료 효과가 현저히 증가할 수 있다.
- [0060] 또한, 상기 (a) 단계에서 상기 트리폴리인산염 용액의 농도 및 용매의 종류는 상기 miRNA 155 및 트리폴리인산염의 특성에 영향을 미치지 않으면서, 상기 트리폴리인산염을 용해시킬 수 있는 농도 및 용매이면 제한없이 허용될 수 있다.
- [0061] 상기 (b) 단계에서 상기 산성 용매는 아세트산 (acetic acid), 말론산 (malonic acid), CMEBAC (N carboxymethyl N,N diethylbenzene ammonium chloride), 젖산 (lactic acid), 시트르산 (citric acid), 또는 아세트산 나트륨 (sodium acetate)일 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니다. 일 구체예에 따르면, 상기 (b) 단계에서 상기 산성 용매로서, 산성 용액, 예컨대, 아세트산 수용액을 사용할 수 있다. 상기 아세트산 수용액의 농도는 약 0.01 내지 2, 0.01 내지 1, 0.01 내지 0.1, 또는 0.03 내지 0.07 중량%일 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0062] 또한, 상기 (b) 단계에서는 상기 산성 용매에 상기 키토산을 약 1 내지 5, 1 내지 4, 또는 1 내지 3 mg/mL의 농도로 용해시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0063] 상기 (c) 단계에서, 상기 (a) 단계에서 얻어진 혼합액 및 상기 (b) 단계에서 얻어진 용액은 약 1 : 1 내지 3, 1 : 1 내지 2, 또는 1 : 1 내지 1.5의 중량비로 혼합되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0064] 상기 (c) 단계에서 수득된 혼합물에 포함된 상기 miRNA 155 및 키토산의 중량비는 약 1 : 5 내지 15, 1 : 7 내지 13, 1 : 9 내지 11, 또는 1 : 10일 수 있다. 일 구체예에 따르면, 상기 (c) 단계에서 수득된 혼합물에 포함된 상기 miRNA 155 및 키토산의 중량비가 약 1 : 5 내지 15인 경우, 상기 방법에 의하여 제조된 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자는 캡슐화 효율, 캡슐화 강도, 또는 miRNA 155 방출능이 현저히 우수하여, 어류의 생체 내 또는 세포 내로 유효성이 유지된 miRNA 155를 효과적으로 전달할 수 있고, 이로 인해, 어류의 바이러스 감염성 질병에 대한 예방 또는 치료 효과가 현저히 증가할 수 있다.
- [0065] 상기 (c) 단계에서는, 상기 키토산 및 트리폴리인산염이 가교 결합을 형성하여 키토산 나노입자를 형성할 수 있고, 상기 키토산 및 miRNA 155 사이에서 정전기적 상호작용, 예컨대, 이온성 결합이 형성되어, 상기 키토산 나노입자의 내부에 miRNA 155가 봉입되어 상기 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자가 형성되는 것일 수 있다.
- [0066] 상기 방법은 상기 (c) 단계에서 수득된 혼합물을 원심분리하여 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자를 수득하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0067] 일 구체예에 따르면, 상기 방법에 의하여 제조된 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자는 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스 감염성 어류 질병에 대하여 예방 또는 치료 효과를 나타내는 것일 수 있다.
- [0068] 또한, 일 구체예에 따르면, 상기 방법에 의하여 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자를 제조하는 경우, 현저히 우수한 캡슐화 효율 및 현저히 낮은 다분산성 지수를 나타내어, 입자의 크기가 균일하며 매우 안정적으로 캡슐화된 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자를 제조할 수 있다. 이로 인해, 상기 방법에 의하여 제조된 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자는 매우 안정적인 나노구 형태를 나타내어 내부의 miRNA 155를 외부 환경으로부터 강력하게 보호할 수 있다. 또한, 상기 방법에 의하여 제조된 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자는 입자의 크기가 나노 사이즈로 매우 작고 표면 양전하를 나타내므로, 생체 흡수율, 생체 이용률, 및 세포 투과성이 현저히 증가될 수 있고, 어류의 생체 또는 세포 내로 흡수된 후 키토산의 점진적인 생분해로 인해 miRNA 155를 지속적으로 방출하여 어류의 생체 내에서 miRNA 155의 효과를 지속적으로 유지시킬 수 있다.
- [0069] 종합하면, 상기 방법에 의하여 제조된 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자는 외부 환경에 의한 영향을 차단하여 miRNA 155의 안정성을 현저히 향상시키고, 유효성이 유지된 miRNA 155를 어류 생체 내로 효과적으로 전달할 수 있으며, 이로 인해, 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스 감염성 어류 질병에 대하여 현저히 증가된 예방 또

는 치료 효과를 나타낼 수 있다.

[0070] 상기 제조 방법에서 언급된 용어 또는 요소 중 상기 조성물에 대한 설명에서 언급된 것과 같은 것은, 앞에서 상기 조성물에 대한 설명에서 언급된 바와 같은 것으로 이해된다.

[0071]

[0072] 다른 양상은 어류에 상기 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자를 유효성분으로 포함하는 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스에 대한 어류용 항바이러스 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스 감염성 어류 질병을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0073] 상기 예방 또는 치료 방법에서 언급된 용어 또는 요소 중 상기 조성물 또는 제조 방법에 대한 설명에서 언급된 것과 같은 것은, 앞에서 상기 조성물 또는 제조 방법에 대한 설명에서 언급된 바와 같은 것으로 이해된다.

발명의 효과

[0074] 일 양상에 따른 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자를 유효성분으로 포함하는 어류용 항바이러스 조성물 및 이를 이용하는 방법에 의하면, 어류가 VHSV에 감염되는 경우, 어류 조직 내에서의 VHSV의 증식 또는 복제가 감소되고, 항바이러스성 반응, 면역반응, 및 세포 사멸 반응 등이 조절되며, 어류의 생존율이 현저히 증가되어 VHSV 감염성 어류 질병을 예방 또는 치료할 수 있다.

[0075] 또한, 상기 miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자는 miRNA 155의 안정성을 현저히 향상시키고, 유효성이 유지된 miRNA 155를 어류 생체 내로 효과적으로 전달할 수 있으며, 어류 조직 내에서 독성을 유발하지 않아 어류의 VHSV 감염성 질병을 매우 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있는 안전한 치료제로서 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0076] 도 1은 일 실시예에 따른 miRNA 155-CNPs의 구성 및 miRNA 155-CNPs로부터 miRNA 155가 방출되는 작용을 개략적으로 나타내는 도면이다.

도 2는 일 실시예에 따른 miRNA 155-CNPs의 제조 과정을 개략적으로 나타내는 도면이다.

도 3은 일 실시예에 따른 miRNA 155-CNPs의 제조를 위해 사용된 저분자량의 키토산 (low molecular weight chitosan: LMWC)의 화학식을 나타내는 도면이다.

도 4는 일 실시예에 따른 miRNA 155-CNPs에 대하여 (a) 주사전자현미경 (scanning electron microscopy: SEM) 및 (b) 투과전자현미경 (transmission electron microscopy: TEM) 촬영을 수행한 결과를 나타내는 도면이다.

도 5는 일 실시예에 따른 miRNA 155-CNPs의 입자 크기를 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 6은 일 실시예에 따른 miRNA 155-CNPs의 제타전위 (zeta potential)를 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 7은 일 실시예에 따른 miRNA 155-CNPs의 시간 경과에 따른 miRNA 155 방출 수준을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 8은 일 실시예에 따른 miRNA 155-CNPs의 (a) 캡슐화 강도 및 (b) 내부에 저장된 miRNA 155의 무결성 (integrity)을 평가한 결과를 나타내는 도면이다.

도 9는 일 실시예에 따른 miRNA 155-CNPs의 어류의 VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) 감염에 대한 효과를 확인하기 위한 실험 과정을 개략적으로 나타낸 도면이다.

도 10은 일 실시예에 따른 miRNA 155-CNPs의 어류의 VHSV 감염에 대한 효과를 확인하기 위하여, miRNA 155-CNPs를 투여한 후 VHSV에 감염시킨 어류의 조직 내에서의 (a) viral mRNA copy numbers (VCN) 및 (b) viral gRNA copy numbers (VCN) 수준을 측정된 결과를 나타내는 그래프이다.

도 11은 일 실시예에 따른 miRNA 155-CNPs의 어류의 VHSV 감염에 대한 효과를 확인하기 위하여, miRNA 155-CNPs를 투여한 후 VHSV에 감염시킨 어류의 생존율을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 12는 일 실시예에 따른 miRNA 155-CNPs의 어류의 VHSV 감염에 대한 항바이러스성 반응 조절 효과를 확인하기 위하여, miRNA 155-CNPs를 투여한 후 VHSV에 감염시킨 어류의 조직 내에서의 (a) ifn γ ; (b) irf2bp1; 및 (c) irf9의 mRNA 발현 수준을 측정된 결과를 나타내는 그래프이다.

도 13은 일 실시예에 따른 miRNA 155-CNPs의 어류의 VHSV 감염에 대한 면역반응 조절 효과를 확인하기 위하여, miRNA 155-CNPs를 투여한 후 VHSV에 감염시킨 어류의 조직 내에서의 (a) socs1a; (b) il1 β ; (c) tnfa; (d) il6; (e) il10; 및 (f) cxcl18b의 mRNA 발현 수준을 측정된 결과를 나타내는 그래프이다.

도 14는 일 실시예에 따른 miRNA 155-CNPs의 어류의 VHSV 감염에 대한 세포 사멸 반응 조절 효과를 확인하기 위하여, miRNA 155-CNPs를 투여한 후 VHSV에 감염시킨 어류의 조직 내에서의 (a) cd8a; (b) caspase3; 및 (c) p53의 mRNA 발현 수준을 측정된 결과를 나타내는 그래프이다.

도 15는 일 실시예에 따른 miRNA 155-CNPs의 어류 조직 내 독성 유발 여부를 확인하기 위하여, miRNA 155-CNPs가 투여된 어류로부터 채취된 아가미 조직 필라멘트 (filaments)를 종단하여 얻어진 조직 절편에 대하여 H & E 염색을 수행하여, 조직의 병리적 상태를 확인한 결과를 나타내는 도면이다 ((a): NF H₂O 투여 정상 대조군; (b): CNPs 투여 비교 대조군; (c): miRNA 155-CNPs 투여 실험군). EC는 상피세포의 한 층을 나타내고, PL은 1차 판 상피 (primary lamellar epithelium)를 나타내며, SL은 2차 판 (secondary lamella)을 나타내고, MC는 상기 SL의 내벽의 점액세포 (mucous cell)를 나타낸다.

도 16은 일 실시예에 따른 miRNA 155-CNPs가 주입되고 VHSV에 감염된 어류에서의 VCN을 측정하기 위해 N 유전자 (VHSV)의 절대 정량화 (qRT-PCR)에 사용된 표준 곡선 및 표준식을 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0077] 이하 본 발명을 실험에 및 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실험에 및 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실험에 및 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0078] 또한, 본 명세서에서 특별한 정의가 없으면, 본 명세서에 사용된 모든 과학적 및 기술적인 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 당업자에 의하여 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가질 수 있다.

[0079]

[0080] 실시예 1. miRNA 155가 봉입된 키토산 나노입자 (miRNA 155-CNPs)의 제조

[0081] 키토산 나노입자 (chitosan nanoparticles: CNPs)의 내부에 miRNA 155가 봉입된 구조를 가지는 miRNA 155 및 CNPs의 복합체 (miRNA 155-CNPs)를 제조하였다.

[0082] 도 1은 일 실시예에 따른 miRNA 155-CNPs의 구성 및 miRNA 155-CNPs로부터 miRNA 155가 방출되는 작용을 개략적으로 나타내는 도면이다.

[0083] 도 2는 일 실시예에 따른 miRNA 155-CNPs의 제조 과정을 개략적으로 나타내는 도면이다.

[0084] 도 3은 일 실시예에 따른 miRNA 155-CNPs의 제조를 위해 사용된 저분자량의 키토산 (low molecular weight chitosan: LMWC)의 화학식을 나타내는 도면이다.

[0085] 구체적으로, 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 miRNA 155 약 300 μ g를 소듐트리폴리포스페이트 (sodium TPP (tripolyphosphate); Na₃P₃O₁₀) 용액 (약 0.83 mg/mL) 약 1.2 mL에 첨가하여 혼합하였다. 상기 miRNA 155는 GenePharma (Shanghai, China)에서 구매하여 이용하였다. 그 후, 상기 혼합액과 저분자량의 키토산 (low molecular weight chitosan: LMWC) 용액을 혼합하였다. 구체적으로, 저분자량의 키토산을 약 0.05 % 아세트산 (acetic acid) 수용액에 약 2 mg/mL의 농도로 용해시켜 얻어진 키토산 용액 약 1.5 mL 및 상기 miRNA 155와 소듐트리폴리포스페이트의 혼합액 약 1.2 mL를 혼합한 후, 상온에서 약 1시간 동안 교반하면서 혼합하였다. 그 후, 혼합액을 약 4℃ 및 약 12,000 rpm의 조건에서 약 30분 동안 원심분리한 후, 상층액을 제거하고 수득된 침강물에 대하여 주사전자현미경 (scanning electron microscopy: SEM) 및 투과전자현미경 (transmission electron microscopy: TEM) 분석을 수행하였다.

[0086] 도 4는 일 실시예에 따른 miRNA 155-CNPs에 대하여 (a) 주사전자현미경 (scanning electron microscopy: SEM) 및 (b) 투과전자현미경 (transmission electron microscopy: TEM) 촬영을 수행한 결과를 나타내는 도면이다.

[0087] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, miRNA 155가 내부에 봉입된 구형의 키토산 나노입자 (miRNA 155-CNPs)를 수득하였음을 확인하였다.

[0088]

- [0089] 실시예 2. miRNA 155-CNPs의 특성 분석
- [0090] 2.1 miRNA 155-CNPs의 입자 사이즈, 제타전위, 다분산성, 캡슐화 효율, 및 miRNA 155 방출 수준 분석
- [0091] 상기 실시예 1에서 제조된 miRNA 155가 내부에 봉입된 키토산 나노입자 (miRNA 155-CNPs)의 입자 사이즈, 제타 전위 (zeta potential), 다분산성 (polydispersity), 캡슐화 효율 (encapsulation efficiency), 및 miRNA 155 방출 수준을 분석하였다.
- [0092] 구체적으로, miRNA 155-CNPs 약 1 mL을 pH 7.4 PBS에 현탁하고 현탁액의 입자 크기 분포, 다분산 지수 (PDI), 및 제타전위를 Zetasizer[®] Nano-ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK)를 이용하여 측정하였다. 또한, 캡슐화 효율 (%)은, 상기 실시예 1에서 최종 miRNA 155-CNPs를 수득하기 위해 원심분리한 후 회수된 상층액에 존재하는 비포집 miRNA 155의 농도를 측정하여 분석되었다. 상기 상층액에 존재하는 비포집 miRNA 155의 농도는 NanoDrop One UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA)를 사용하여 약 260 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 결정되었다. miRNA 155를 포함하지 않는 CNP의 상층액에 대한 흡광도를 블랭크로 사용하였다. 캡슐화 효율 (%)은 하기에 따라 계산되었다:
- [0093] $\text{캡슐화 효율 (\%)} = (\text{캡슐화된 miRNA 155의 질량} / \text{사용된 miRNA 155의 초기 질량}) * 100.$
- [0094] 또한, 상기 miRNA 155-CNPs의 시간 경과에 따른 miRNA 155 방출 수준을 측정하기 위하여, 상기 miRNA 155-CNPs를 PBS 용액 (pH 7.4)에 첨가하여 약 20일 동안 약 37℃에서 교반하면서 혼합하였고, 5일 간격으로 혼합액의 샘플을 채취하여 원심분리한 후, NanoDrop One UV-Vis 분광광도계 (spectrophotometer)를 사용하여 상층액에 포함된 miRNA 155의 양을 측정하였다.
- [0095] 도 5는 일 실시예에 따른 miRNA 155-CNPs의 입자 사이즈를 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [0096] 도 6은 일 실시예에 따른 miRNA 155-CNPs의 제타전위 (zeta potential)를 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [0097] 도 7은 일 실시예에 따른 miRNA 155-CNPs의 시간 경과에 따른 miRNA 155 방출 수준을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [0098] 그 결과, 도 5 및 6에 나타난 바와 같이, 상기 miRNA 155-CNPs의 입자 사이즈는 약 341.45 ± 10.00 nm이고, 표면 전하는 양전하를 나타내며, 제타전위는 약 39.30 ± 3.90 mV임을 확인하였다.
- [0099] 또한, 상기 miRNA 155-CNPs의 다분산성 및 캡슐화 효율 분석 결과, 다분산성 지수 (polydispersity index: PDI)는 약 0.516 ± 0.05 로 현저히 낮고, 캡슐화 효율 (encapsulation efficiency: EE (%))은 약 98.80%로 현저히 높음을 확인하였다.
- [0100] 더하여, 도 7에 나타난 바와 같이, 상기 miRNA 155-CNPs는 일정 기간 동안 miRNA 155를 지속적으로 방출할 수 있음을 확인하였다. 구체적으로, 상기 miRNA 155-CNPs는 약 20일 이상 동안 miRNA 155를 지속적으로 방출하여 miRNA 155-CNPs에 포함된 miRNA 155 전체 양의 약 40% 이상을 방출할 수 있음을 확인하였다. 이는 CNPs가 점진적으로 (gradually) 생분해되면서, CNPs와 miRNA 155 사이에서 형성되었던 강력한 정전기적 상호작용, 예컨대, 이온성 결합의 세기가 감소하여 miRNA 155가 방출되는 것으로 이해될 수 있다.
- [0101] 본 실시예를 통해, 상기 miRNA 155-CNPs는, 도 1에 나타난 바와 같이, miRNA 155의 표면이 양전하의 CNPs로 코팅되어, 내부에는 miRNA 155가 존재하고, 외곽에는 양전하의 CNPs가 내부의 miRNA 155를 둘러싼 구조를 가지는, 표면 양전하를 나타내는 나노구 (nanosphere) 또는 구형의 나노입자임을 확인하였다.
- [0102] 또한, 상기 실시예 1의 제조 방법에 의할 경우, 현저히 우수한 캡슐화 효율 및 현저히 낮은 다분산성 지수를 나타내어, 입자의 크기가 균일하며 매우 안정적으로 캡슐화된 나노 사이즈의 miRNA 155-CNPs를 제조할 수 있음을 확인하였다.
- [0103] 더불어, 상기 miRNA 155-CNPs는 상술한 바와 같은 매우 안정적인 나노구 형태를 나타내어 내부의 miRNA 155를 외부 환경으로부터 강력하게 보호하면서도, 시간이 경과함에 따라 외곽의 CNPs가 점진적으로 생분해되면서 miRNA 155를 지속적으로 방출할 수 있음을 확인하였다.
- [0104] 이로 인해, 상기 miRNA 155-CNPs는 외부 환경에 의한 영향을 차단하여 miRNA 155의 안정성을 현저히 향상시키고, 유효성이 유지된 miRNA 155를 어류 생체 내로 효과적으로 전달할 수 있음을 알 수 있었다. 또한, 상기 miRNA 155-CNPs는 입자가 매우 작고, 표면 양전하를 나타내므로 생체 흡수율, 생체 이용률, 및 세포 투과성을 증가시킬 수 있으며, 어류의 생체 또는 세포 내로 흡수된 후, CNPs의 점진적인 생분해로 인해 miRNA 155를

지속적으로 방출하여 어류의 생체 내에서 miRNA 155의 효과를 지속적으로 유지시킬 수 있음을 알 수 있었다.

2.2 miRNA 155-CNPs의 miRNA 155 및 키토산의 중량비에 따른 캡슐화 효율 분석

상기 실시예 1의 제조 방법에 따라 miRNA 155가 내부에 봉입된 키토산 나노입자 (miRNA 155-CNPs)를 제조하였고, 이때, miRNA 155 및 키토산의 중량비를 달리하는 여러 종류의 miRNA 155-CNPs를 제조한 후, miRNA 155 및 키토산의 중량비 차이에 따른 캡슐화 효율 차이를 비교 분석하였다. 캡슐화 효율 분석은 상기 실시예 2.1에 기재된 방법과 동일한 방법으로 수행되었다.

그 결과, 표 1에 나타난 바와 같이, miRNA 155-CNPs에 포함된 miRNA 155 및 키토산의 중량비가 약 1 : 10인 경우, 약 98% 이상의 캡슐화 효율을 나타내어 miRNA 155를 가장 우수한 효율로 캡슐화할 수 있음을 확인하였다.

표 1

번호	miRNA 155 (ug)	low molecular weight chitosan (mg)	weight ratio (miRNA 155 : chitosan)	encapsulation efficiency (%)
1	300	6	1 : 20	90.45±3.38
2	300	3	1 : 10	98.80±0.56
3	300	1.5	1 : 5	85.64±0.64
4	300	0.75	1 : 2.5	45.35±2.15

실시예 3. miRNA 155-CNPs의 캡슐화 강도 및 내부에 저장된 miRNA 155의 무결성 평가

상기 실시예 1에서 제조된 miRNA 155가 내부에 봉입된 키토산 나노입자 (miRNA 155-CNPs)의 캡슐화 강도, 즉, CNPs와 miRNA 155의 결합강도 및 내부에 miRNA 155를 유지하는 저장능을 평가하였다. 또한, 상기 miRNA 155-CNPs 내부에 저장된 miRNA 155가 온전한 상태로 유지되는지 여부, 즉, RNA 무결성 (integrity)을 평가하였다.

구체적으로, miRNA 155-CNPs의 캡슐화 강도를 확인하기 위하여, DNA 마커 (100 bp); miRNA 155 (naked miR-155) 약 1.5 µg; CNPs 약 10 µL; miRNA 155-CNPs 약 1.5 µg을 포함하는 현탁액 약 10 µL; 및 miRNA 155-CNPs와 분리된 원심분리 상청액 (miRNA 155-CNPs SN) 약 10 µL의 각 샘플에 약 2 µL의 6x 로딩 버퍼를 추가한 후, 각 샘플을 약 1%의 아가로스 겔에 로딩하여 전기영동 분석하였다. 또한, 상기 miRNA 155-CNPs 내부에 저장된 miRNA 155의 무결성을 확인하기 위하여, DNA 마커 (100 bp); miRNA 155 (naked miR-155) 약 1.5 µg; miRNA 155-CNPs 약 1.5 µg을 포함하는 현탁액 약 10 µL; miRNA 155 및 약 0.1 µL의 RNase A 용액 (10 mg/mL)을 혼합하여 약 37℃에서 약 5분 동안 인큐베이션한 혼합액; miRNA 155-CNPs 약 1.5 µg을 포함하는 현탁액 약 10 µL 및 약 1.9 µL의 키토사나아제 (chitosanase)를 약 37℃에서 약 4시간 동안 인큐베이션한 혼합액; 및 miRNA 155-CNPs 약 1.5 µg을 포함하는 현탁액 약 10 µL 및 약 0.1 µL의 RNase A 용액을 약 37℃에서 약 5분 동안 인큐베이션한 혼합액의 각 샘플에 약 2 µL의 6x 로딩 버퍼를 추가한 후, 각 샘플을 약 1%의 아가로스 겔에 로딩하여 전기영동 분석하였다. 상기 RNase A는 약 5분 동안 약 60℃까지 온도를 높이면서 불활성화되었다.

도 8은 일 실시예에 따른 miRNA 155-CNPs의 (a) 캡슐화 강도 및 (b) 내부에 저장된 miRNA 155의 무결성 (integrity)을 평가한 결과를 나타내는 도면이다.

그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, 상기 miRNA 155-CNPs의 캡슐화는 매우 견고하여, 내부의 miRNA 155가 쉽게 외부 환경에 노출되지 않음을 확인하였다. 또한, 상기 miRNA 155-CNPs의 CNPs가 키토사나아제 (chitosanase)에 의해 분해되어 방출된 miRNA 155는 원래의 상태를 온전하게 유지하여 RNA 무결성이 유지됨을 확인하였다. 더하여, 상기 miRNA 155-CNPs는 리보핵산가수분해효소 A (RNase A)에 의하여 miRNA 155가 분해되는 것을 막아 내부에 저장된 miRNA 155를 외부 효소로부터 보호함을 확인하였다.

본 실시예를 통해, 상기 miRNA 155-CNPs는 CNPs와 miRNA 155의 결합 강도 및 내부에 miRNA 155를 유지하는 저장능이 현저히 우수함을 알 수 있었다. 또한, 상기 miRNA 155-CNPs의 내부에 저장된 miRNA 155는 외부 환경 (예컨대 RNase A 등) 등에 의하여 영향을 받지 않고, 원래의 상태를 온전하게 유지하여 RNA 무결성이 유지된 채로 상기 miRNA 155-CNPs의 내부에 저장되어 있다가 방출됨을 알 수 있었다. 따라서, 상기 miRNA 155-CNPs는 miRNA 155를 외부 환경으로부터 보호하고, miRNA 155의 유효성을 유지한 채 miRNA 155를 어류의 생체 또는 세포 내로

전달시켜 어류의 감염성 질병을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있는 치료제로 활용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0117]

[0118] 실시예 4. 어류의 VHSV 감염에 대한 miRNA 155-CNPs의 효과 확인

[0119]

상기 실시예 1에서 제조된 miRNA 155가 내부에 봉입된 키토산 나노입자 (miRNA 155-CNPs)의 어류의 VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) 감염성 질병에 대한 예방 또는 치료 효과를 확인하기 위하여, 어류에 상기 miRNA 155-CNPs를 투여한 후, VHSV에 감염시켜 어류의 생존율; 어류 조직 내에서의 viral RNA copy numbers (VCN) 수준; 및 어류 조직 내에서의 VHSV에 의해 유도된 항바이러스성 반응 (antiviral responses), 면역반응 조절 (regulatory and inflammatory responses), 및 세포 사멸 반응 (apoptotic responses)과 관련된 인자의 유전자 발현 수준을 분석하였다.

[0120]

도 9는 일 실시예에 따른 miRNA 155-CNPs의 어류의 VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) 감염에 대한 효과를 확인하기 위한 실험 과정을 개략적으로 나타낸 도면이다.

[0121]

구체적으로, 도 9에 나타낸 바와 같이, 어류 (zebrafish)에 상기 miRNA 155-CNPs를 i.p. 주입 (복강내 주사)한 후, 약 14시간 후에, VHSV 배양액 약 20 μ L (약 10^5 TCID₅₀/mL/fish)를 i.p. 주입하여 감염시켰다 (n=10). 그 다음, VHSV 감염 후 약 57시간 후에 VHSV에 감염된 상기 어류로부터 조직 (아가미, 근육, 신장 등)을 채취하고, VHSV 감염 후 약 120시간 동안 VHSV에 감염된 상기 어류의 생존율을 분석하여, 상기 miRNA 155-CNPs의 어류의 VHSV 감염성 질병에 대한 예방 또는 치료 효과를 분석하였다. 정상 대조군으로 miRNA 155-CNPs 및 VHSV 모두를 주입하지 않은 정상 어류를 사용하였고, 비교 대조군으로 miRNA 155-CNPs의 주입없이 VHSV만을 주입하여 감염시킨 어류 및 miRNA 155-CNPs 대신에 miRNA 155 억제제를 주입한 후 VHSV를 주입하여 감염시킨 어류를 사용하였다.

[0122]

[0123] 4.1 VHSV 감염 어류의 생존율 및 VHSV 감염 어류 조직 내에서의 viral RNA copy numbers (VCN) 수준 분석

[0124]

상술한 바와 같이, 어류 (zebrafish)에 상기 miRNA 155-CNPs를 i.p. 주입한 후, 약 14시간 후에, VHSV 감염시킨 다음, VHSV 감염 후 약 57시간 후에, 조직 (아가미, 근육, 신장 등)을 채취하여 각 조직의 중량 (g) 당 viral mRNA copy numbers (VCN) 및 viral gRNA copy numbers (VCN) 수준을 측정하였다.

[0125]

구체적으로, VCN은 각 조직으로부터 분리된 RNA로부터 VHSV의 N 유전자 전사체의 절대 정량화 (qRT-PCR)에 의해 계산되었다. 사용한 표준 곡선 및 표준식은 도 16에 나타내었다. 구체적인 VCN 수준 측정 방법은 공지된 방법에 따라 수행되었다 (Avunje et al., 2011).

[0126]

또한, 어류에 상기 miRNA 155-CNPs를 i.p. 주입한 후, 약 14시간 후에, VHSV 감염시킨 다음, VHSV 감염 후 약 120시간 동안 VHSV에 감염된 상기 어류의 생존 여부를 관찰한 후, 생존율을 분석하였다.

[0127]

도 10은 일 실시예에 따른 miRNA 155-CNPs의 어류의 VHSV 감염에 대한 효과를 확인하기 위하여, miRNA 155-CNPs를 투여한 후 VHSV에 감염시킨 어류의 조직 내에서의 (a) viral mRNA copy numbers (VCN) 및 (b) viral gRNA copy numbers (VCN) 수준을 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0128]

도 11은 일 실시예에 따른 miRNA 155-CNPs의 어류의 VHSV 감염에 대한 효과를 확인하기 위하여, miRNA 155-CNPs를 투여한 후 VHSV에 감염시킨 어류의 생존율을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0129]

그 결과, 도 10에 나타낸 바와 같이, 상기 miRNA 155-CNPs를 투여받은 어류는 VHSV에 감염되었을 때, 상기 miRNA 155-CNPs를 투여받지 않은 대조군에 비해 어류의 조직 내에서의 viral RNA copy numbers (VCN) 수준이 감소함을 확인하였다.

[0130]

또한, 도 11에 나타낸 바와 같이, 상기 miRNA 155-CNPs를 투여받은 어류는 VHSV에 감염되더라도, 정상 대조군과 유사한 수준으로 약 80% 이상의 현저히 높은 수준의 생존율을 나타냄을 확인하였다. 반면, 상기 miRNA 155-CNPs를 투여받지 않은 대조군 어류의 경우, VHSV에 감염되었을 때, 약 50% 이하의 현저히 낮은 수준의 생존율을 나타냄을 확인하였다.

[0131]

본 실시예를 통해, 상기 miRNA 155-CNPs를 투여받은 어류는 VHSV 감염시, 어류 조직 내에서의 VHSV의 증식 또는 복제가 감소될 수 있고, 생존율이 현저히 증가될 수 있음을 확인하였다. 이로 인해, 상기 miRNA 155-CNPs는 어

류의 VHSV 감염성 질병에 대하여 예방 또는 치료 효과를 나타냄을 확인하였다.

[0132]

[0133]

4.2 어류 조직 내에서의 VHSV에 의해 유도된 항바이러스성 반응, 면역반응 조절, 및 세포 사멸 반응과 관련된 인자의 유전자 발현 수준의 변화 분석

[0134]

상술한 바와 같이, 어류 (zebrafish)에 상기 miRNA 155-CNPs를 i.p. 주입한 후, 약 14시간 후에, VHSV 감염시킨 다음, VHSV 감염 후 약 57시간 후에, 조직 (아가미, 근육, 신장 등)을 채취하여 각 조직에서의 VHSV에 의해 유도된 항바이러스성 반응, 면역반응 조절, 및 세포 사멸 반응과 관련된 인자의 유전자 발현 수준의 변화를 분석하였다. 항바이러스성 반응과 관련하여 *ifn γ* , *irf2bp1*, 및 *irf9*의 mRNA 발현 수준의 변화를 분석하였고, 면역반응 조절과 관련하여 *socs1a*, *il1 β* , *tnf α* , *il6*, *il10*, 및 *cxcl18b*의 mRNA 발현 수준의 변화를 분석하였으며, 세포 사멸 반응과 관련하여 *cd8a*, *caspase3*, 및 *p53*의 mRNA 발현 수준의 변화를 분석하였다.

[0135]

구체적으로, mRNA 발현 수준은 공지된 방법에 의하여 분석될 수 있고, 예컨대, RT-PCR을 이용하여 각 조직으로부터 분리한 mRNA를 역전사하여 cDNA를 수득한 후, cDNA를 주형으로 하여 상기 항바이러스성 반응, 면역반응 조절, 및 세포 사멸 반응과 관련된 인자의 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머로 유전자 증폭하여 mRNA 발현 수준을 분석할 수 있다. 상기 항바이러스성 반응, 면역반응 조절, 및 세포 사멸 반응과 관련된 인자의 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머는 기존의 판매 업체로부터 모두 구매 가능하다.

[0136]

도 12는 일 실시예에 따른 miRNA 155-CNPs의 어류의 VHSV 감염에 대한 항바이러스성 반응 조절 효과를 확인하기 위하여, miRNA 155-CNPs를 투여한 후 VHSV에 감염시킨 어류의 조직 내에서의 (a) *ifn γ* ; (b) *irf2bp1*; 및 (c) *irf9*의 mRNA 발현 수준을 측정된 결과를 나타내는 그래프이다.

[0137]

도 13은 일 실시예에 따른 miRNA 155-CNPs의 어류의 VHSV 감염에 대한 면역반응 조절 효과를 확인하기 위하여, miRNA 155-CNPs를 투여한 후 VHSV에 감염시킨 어류의 조직 내에서의 (a) *socs1a*; (b) *il1 β* ; (c) *tnf α* ; (d) *il6*; (e) *il10*; 및 (f) *cxcl18b*의 mRNA 발현 수준을 측정된 결과를 나타내는 그래프이다.

[0138]

도 14는 일 실시예에 따른 miRNA 155-CNPs의 어류의 VHSV 감염에 대한 세포 사멸 반응 조절 효과를 확인하기 위하여, miRNA 155-CNPs를 투여한 후 VHSV에 감염시킨 어류의 조직 내에서의 (a) *cd8a*; (b) *caspase3*; 및 (c) *p53*의 mRNA 발현 수준을 측정된 결과를 나타내는 그래프이다.

[0139]

그 결과, 도 12에 나타난 바와 같이, 상기 miRNA 155-CNPs를 투여받은 어류는 VHSV 감염시, miRNA 155-CNPs가 비투여된 VHSV 감염 어류에 비해 아가미, 근육, 및 신장의 모든 조직에서 항바이러스성 반응 관련 인자인 *ifn γ* 및 *irf9*의 mRNA 발현이 감소하였음을 확인하였다. 반면, 신장 조직에서 측정된 *irf2bp1*의 mRNA 발현 수준은, 아가미 및 근육 조직에서 측정된 것과 달리, miRNA 155-CNPs가 비투여된 VHSV 감염 어류에 비해 증가되었음을 확인하였다.

[0140]

또한, 도 13에 나타난 바와 같이, 상기 miRNA 155-CNPs를 투여받은 어류는 VHSV 감염시, miRNA 155-CNPs가 비투여된 VHSV 감염 어류에 비해 아가미, 근육, 및 신장의 모든 조직에서 면역반응 조절 관련 인자인 *il10* 및 *cxcl18b*의 mRNA 발현이 감소한 반면, *il1 β* 및 *tnf α* 의 mRNA 발현이 증가하였음을 확인하였다. 또한, 신장 조직에서 측정된 *socs1a* 및 *il6*의 mRNA 발현 수준은, 아가미 및 근육 조직에서 측정된 것과 달리, miRNA 155-CNPs가 비투여된 VHSV 감염 어류에 비해 증가되었음을 확인하였다.

[0141]

더하여, 도 14에 나타난 바와 같이, 상기 miRNA 155-CNPs를 투여받은 어류는 VHSV 감염시, miRNA 155-CNPs가 비투여된 VHSV 감염 어류에 비해 아가미 및 근육 조직에서 세포 사멸 반응 관련 인자인 *cd8a*, *caspase3*, 및 *p53*의 mRNA 발현이 모두 감소한 반면, 신장 조직에서는 상기 인자의 mRNA 발현이 모두 증가하였음을 확인하였다.

[0142]

본 실시예를 통해, 상기 miRNA 155-CNPs를 투여받은 어류는 VHSV 감염시, 어류 조직 내에서의 VHSV에 의해 유도된 항바이러스성 반응, 면역반응 조절, 및 세포 사멸 반응과 관련된 인자의 유전자 발현이 조절됨을 확인하였다. 이로 인해, 상기 miRNA 155-CNPs는 어류의 항바이러스성 반응, 면역반응, 및 세포 사멸 반응 등을 조절함으로써, 어류의 VHSV 감염성 질병에 대하여 예방 또는 치료 효과를 나타냄을 확인하였다.

[0143]

[0144]

실시예 5. miRNA 155-CNPs의 *In vivo* 안전성 분석

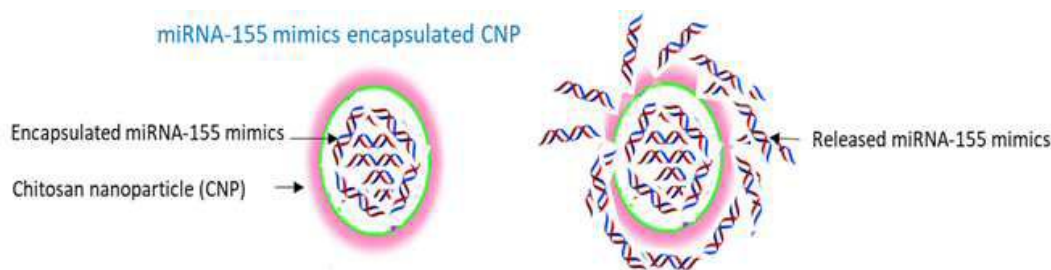
[0145]

상기 실시예 1에서 제조된 miRNA 155가 내부에 봉입된 키토산 나노입자 (miRNA 155-CNPs)의 안전성을 분석하기 위해, 어류에 상기 miRNA 155-CNPs를 투여한 후, 어류 조직 내에서의 독성 유발 여부를 분석하였다.

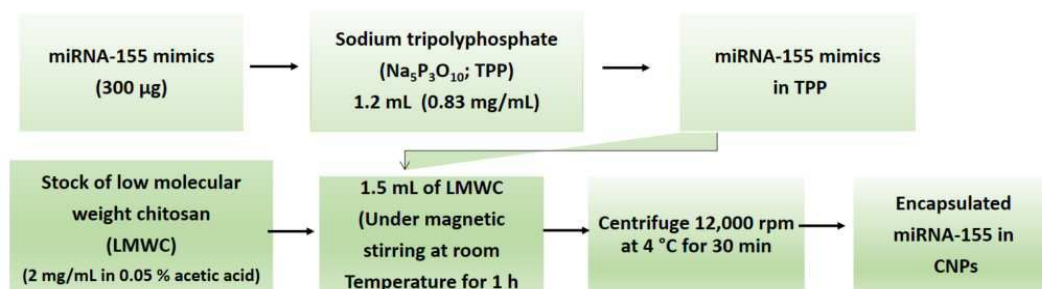
- [0146] 구체적으로, 어류 (zebrafish)에 약 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 상기 miRNA 155-CNPs 용액을 i.p. 주입한 후 약 48시간 후에, 상기 어류의 아가미 조직을 채취하였다. 채취된 조직을 종단하여 얻어진 조직 절편에 대하여 H & E 염색을 수행하였고, 조직의 병리적 상태를 대조군과 비교하여 상기 miRNA 155-CNPs의 안전성을 분석하였다. 정상 대조군으로 상기 miRNA 155-CNPs 대신 NF H₂O를 투여한 정상 어류를 사용하였고, 비교 대조군으로 상기 miRNA 155-CNPs 대신 CNPs를 투여한 어류를 사용하였다.
- [0147] 도 15는 일 실시예에 따른 miRNA 155-CNPs의 어류 조직 내 독성 유발 여부를 확인하기 위하여, miRNA 155-CNPs가 투여된 어류로부터 채취된 아가미 조직 필라멘트 (filaments)를 종단하여 얻어진 조직 절편에 대하여 H & E 염색을 수행하여, 조직의 병리적 상태를 확인한 결과를 나타내는 도면이다 ((a): NF H₂O 투여 정상 대조군; (b): CNPs 투여 비교 대조군; (c): miRNA 155-CNPs 투여 실험군). EC는 상피세포의 한 층을 나타내고, PL은 1차 판 상피 (primary lamellar epithelium)를 나타내며, SL은 2차 판 (secondary lamella)을 나타내고, MC는 상기 SL의 내벽의 점액세포 (mucous cell)를 나타낸다.
- [0148] 그 결과, 도 15에 나타낸 바와 같이, 상기 miRNA 155-CNPs 투여 어류의 조직과 정상 어류의 조직의 병리적 상태에 있어서 어떠한 차이도 발견할 수 없음을 확인하였다.
- [0149] 본 실시예를 통해, 상기 miRNA 155-CNPs는 어류 조직 내에서 독성을 유발하지 않아 어류의 VHSV 감염성 질병을 예방 또는 치료할 수 있는 안전한 치료제로서 적용될 수 있음을 확인하였다.
- [0150]
- [0151] 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

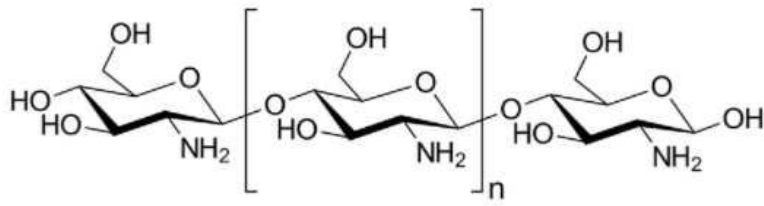
도면1



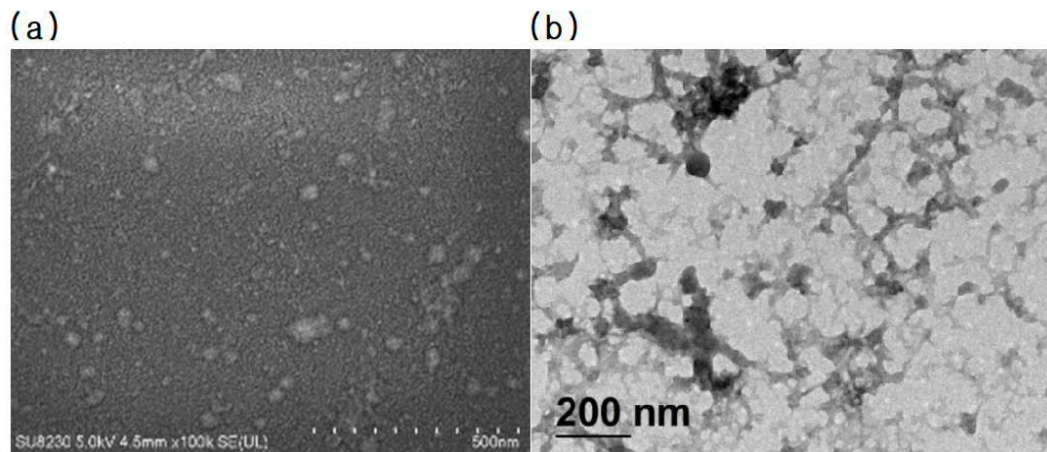
도면2



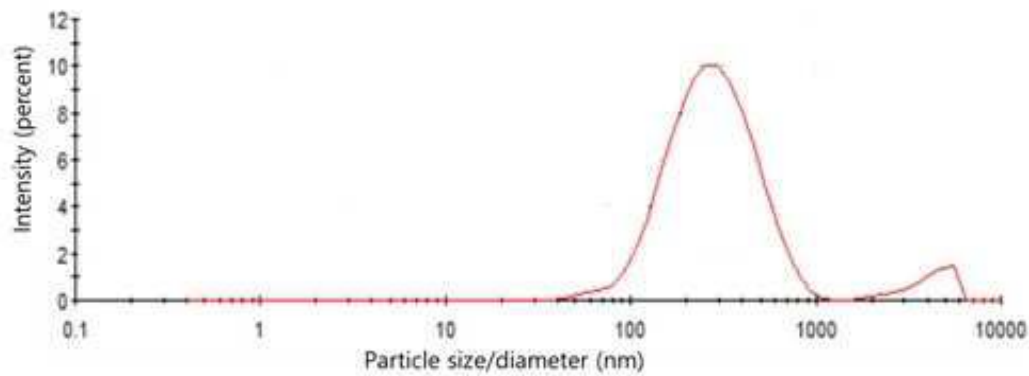
도면3



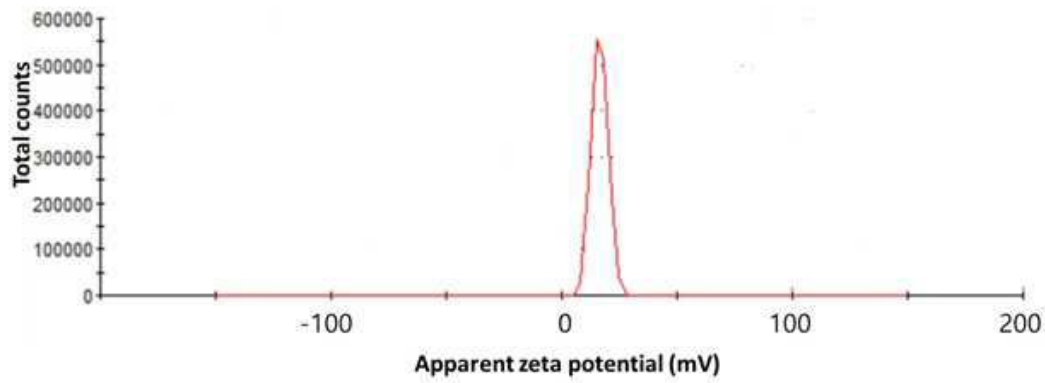
도면4



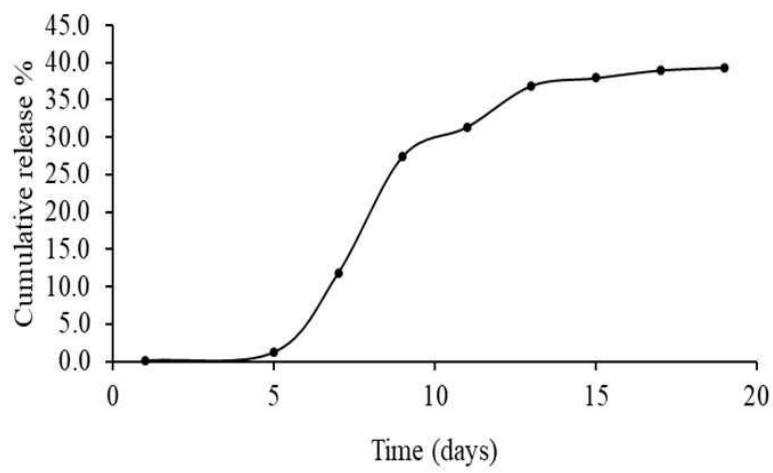
도면5



도면6

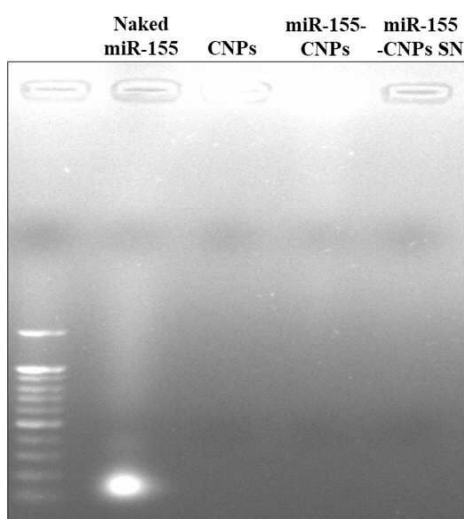


도면7

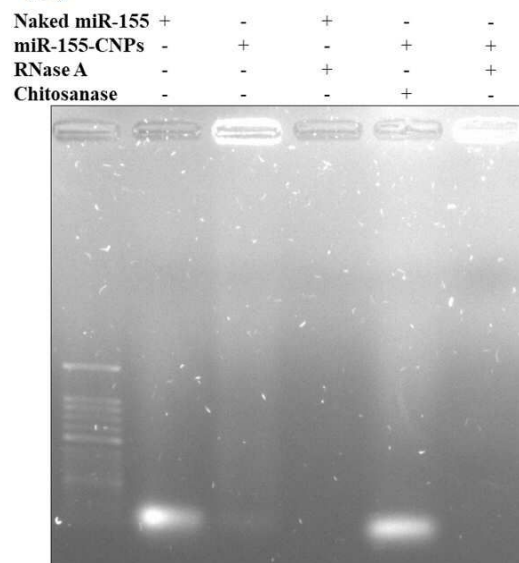


도면8

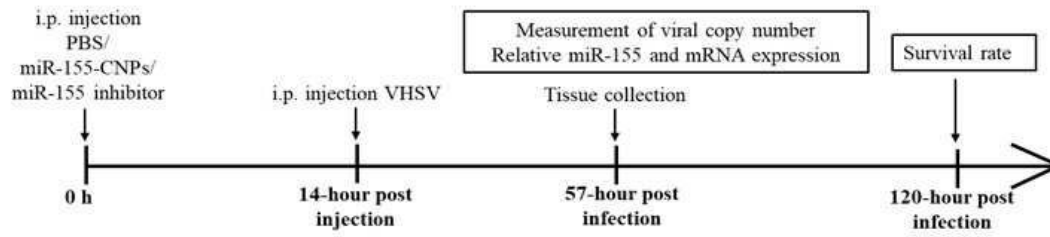
(a)



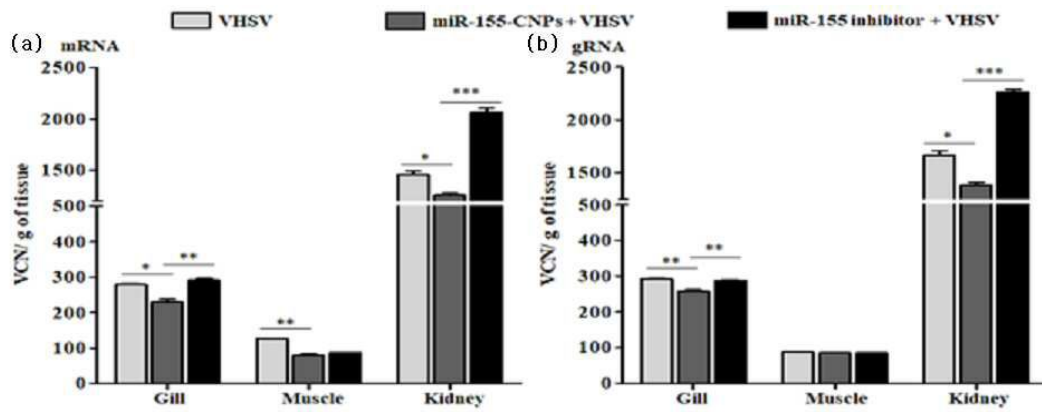
(b)



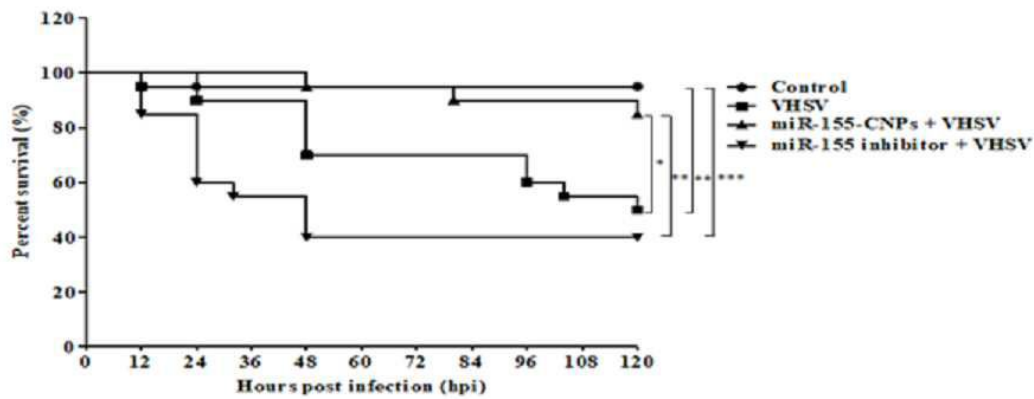
도면9



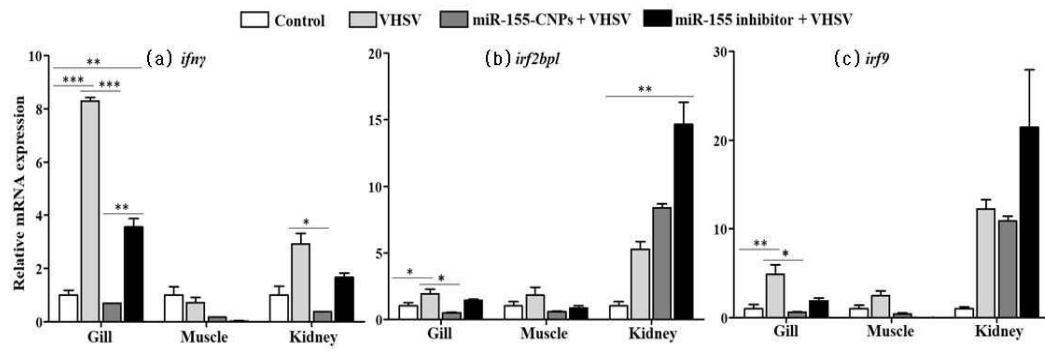
도면10



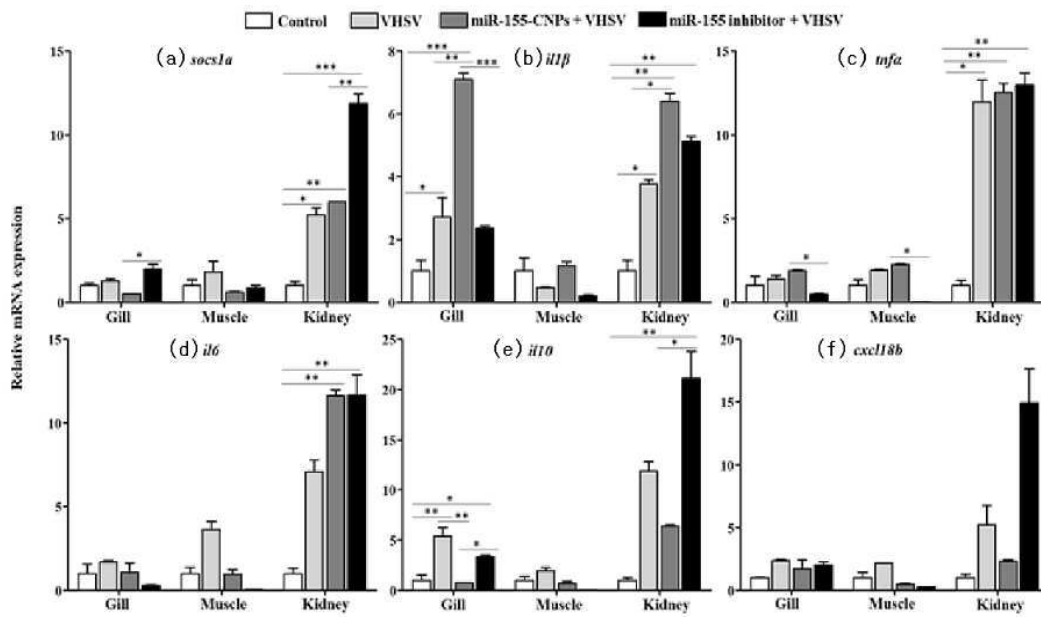
도면11



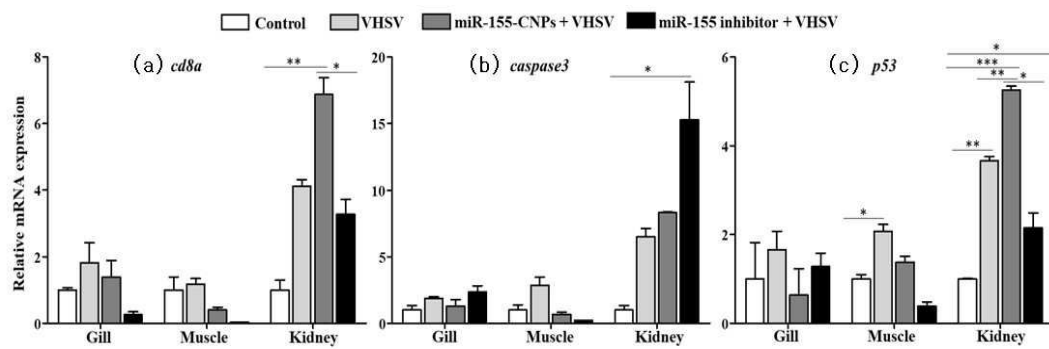
도면12



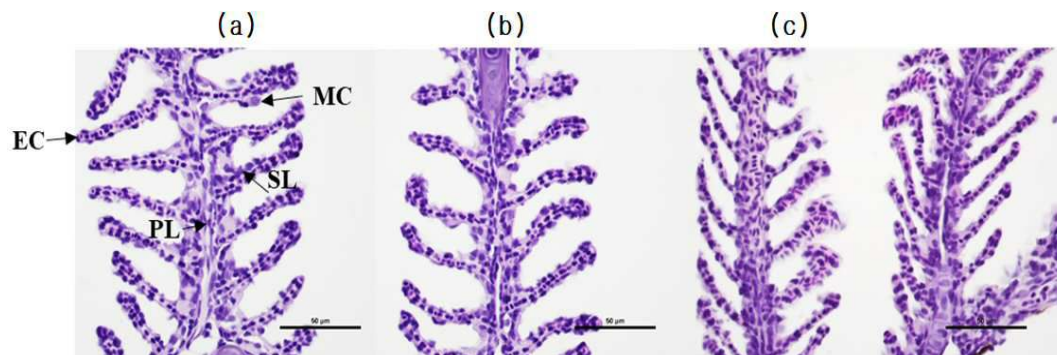
도면13



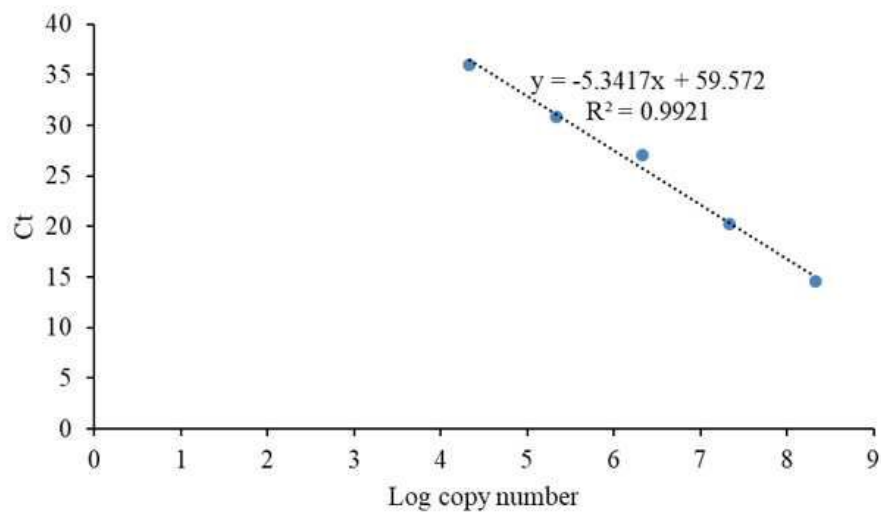
도면14



도면15



도면16



서열 목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> Antiviral composition for fish against viral hemorrhagic septicemia virus containing miRNA 155 encapsulated in chitosan nanoparticles as an active ingredient
- <130> PN138337KR
- <160> 1
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 22
- <212> RNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> miRNA 155
- <400> 1

uuaaugcuaa ucgugauagg gg

22