



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0142257
(43) 공개일자 2022년10월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) A23L 33/13 (2016.01)
A61K 31/7105 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
A23L 33/13 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2021-0048746
(22) 출원일자 2021년04월14일
심사청구일자 2021년04월14일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
주식회사 나노글리아
대전광역시 중구 문화로 266, 102호(문화동, 충남
대학교의과대학본관)
(72) 발명자
김동운
세종특별자치시 보람동로 14, 810동 301호 (호려
울마을8단지)
(74) 대리인
김순웅

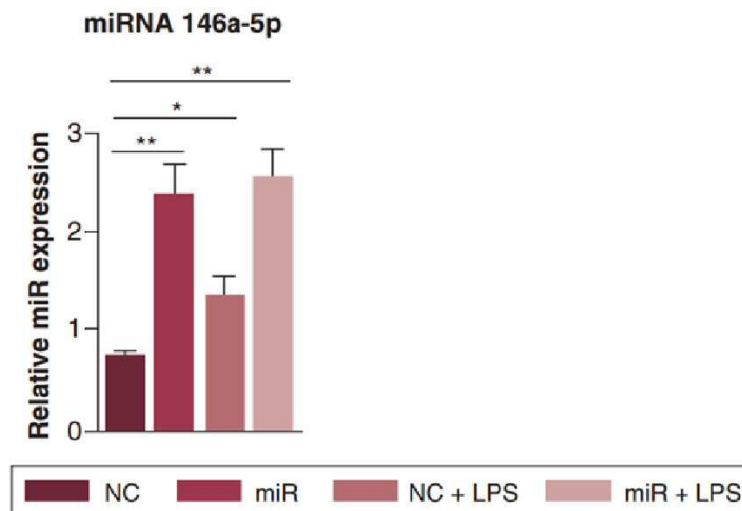
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **염증 유전자의 발현을 억제하는 제제를 포함하는 나노입자 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 염증 유전자의 발현을 억제하는 제제가 함유된 나노입자에 관한 것으로, 보다 상세하게는 TRAF6 또는 IRAK1 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자;의 발현을 억제하는 제제가 함유된 나노입자를 포함하는 신경병증성 통증 예방, 개선 또는 치료용 조성물과, 신경병증성 통증 치료방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 TRAF6 또는 IRAK1 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자;의 발현을 억제하는 제제가 함유된 나노입자는 생체적합성 및 생분해성이 우수하며, 세포 및 동물 수준에서 신경병증성 통증을 감소시키는 효과가 우수한바, 신경병증성 통증의 예방, 개선 및 치료 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61K 31/7105 (2013.01)

A61K 9/0085 (2013.01)

A61K 9/5153 (2013.01)

A61P 29/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/322 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711110145
과제번호	2019R1A2C2004884
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	CRISPR/Cas9시스템과 나노융합기술을 이용한 미세아교세포 특이적 신경병증성통증
제어 기술 개발	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	충남대학교 산학협력단
연구기간	2019.03.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

TRAF6 또는 IRAK1 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자;의 발현을 억제하는 제제가 함유된 나노입자를 포함하는, 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 TRAF6 또는 IRAK1 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자;의 발현을 억제하는 제제는 siRNA(small interference RNA), shRNA(short hairpin RNA), miRNA(microRNA), 리보자임(ribozyme), DNase, PNA(peptide nucleic acids), 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 항체 및 앵타머로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상인, 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 miRNA는 서열번호 1의 염기서열로 표시되는, 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 나노입자는 PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid) 나노입자인, 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 TRAF6 또는 IRAK1 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자;의 발현을 억제하는 제제가 함유된 나노입자를 0.01 내지 100 μ M의 농도로 포함하는, 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 TRAF6 또는 IRAK1 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자;의 발현을 억제하는 제제가 함유된 나노입자는 미세아교세포(microglia cell), 뉴런 세포(neuronal cell) 및 성상세포(astrocytic cell)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 타겟하는 것인, 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 조성물은 척수강 주사용인, 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

TRAF6 또는 IRAK1 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자;의 발현을 억제하는 제제가 함유된 나노입자를 포함하는, 신경병증성 통증 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 인간을 제외한 개체에 주입하는 단계;를 포함하는 신경병증성

통증 치료방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 주입은 척수강에 주입되는 것인, 신경병증성 통증 치료방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 염증 유전자의 발현을 억제하는 제제가 함유된 나노입자에 관한 것으로, 보다 상세하게는 TRAF6 또는 IRAK1 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자;의 발현을 억제하는 제제가 함유된 나노입자를 포함하는 신경병증성 통증 예방, 개선 또는 치료용 조성물과, 신경병증성 통증 치료방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 신경병증성 통증은 종종 신경 손상 후 만성 신경 염증으로 인해 발생하는 최악 유형의 만성 통증이다. 신경병증성 통증의 발병 기전은 광범위하게 연구되고 있다. 초기 연구는 신경병증성 통증의 메커니즘을 밝히기 위한 뉴런과 그 활동에 초점을 맞추었다. 그러나 최근 연구에서는 신경병증성 통증의 병태 생리학에서 미세아교세포의 주요 역할을 확인하였다. 중추신경계에서 대식세포와 유사한 세포로서 미세아교세포는 세포 환경을 감지하고 뇌와 척수의 항상성을 조절하여 조직 복구를 촉진한다. 그러나 신경 염증 상태에서 미세아교세포의 과잉 활성화는 신경 염증과 통증의 유발과 발달에 기여하기 때문에 해로운 역할을 할 수 있습니다. 이 경우 미세아교세포는 일반적으로 초기 단계에서 M1(classically activated) 표현형을 보여주고 신경 손상 후 신경 세포 활동에 반응하여 미세아교세포 매개체를 방출하여 염증을 촉진한다. IL-6, IL-1 β 및 TNF- α 와 같은 매개체는 세포 사멸, 세포 사멸 및 조직 손상을 초래하며, 이는 신경 염증과 통증 행동을 촉진한다. 이에 미세아교세포 활성화를 억제하거나 미세아교세포 활동(microglial activity)을 감소시켜 지속적인 통증의 발생을 예방할 수 있을 것으로 보인다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0003] 이에 본 발명자들은 신경병증성 통증의 치료제를 개발하던 중 miRNA 146a-5p를 포함하는 PLGA 나노입자를 개발하고, 상기 miRNA 146a-5p를 포함하는 PLGA 나노입자가 생체적합성 및 생분해성이 우수하며, 세포 및 동물 수준에서 신경병증성 통증을 감소시킨다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0004] 따라서 본 발명의 목적은, TRAF6 또는 IRAK1 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자;의 발현을 억제하는 제제가 함유된 나노입자를 포함하는 신경병증성 통증 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0005] 본 발명의 다른 목적은, 상기 조성물을 인간을 제외한 개체에 주입하는 단계를 포함하는 신경병증성 통증 치료방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 TRAF6 또는 IRAK1 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자;의 발현을 억제하는 제제가 함유된 나노입자를 포함하는, 신경병증성 통증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0007] 또한 본 발명은 TRAF6 또는 IRAK1 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자;의 발현을 억제하는 제제가 함유된 나노입자를 포함하는, 신경병증성 통증 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0008] 또한 본 발명은 상기 약학적 조성물을 인간을 제외한 개체에 주입하는 단계;를 포함하는 신경병증성 통증 치료방법을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명에 따른 TRAF6 또는 IRAK1 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자;의 발현을 억제하는 제제가 함유된 나노입자는 생체적합성 및 생분해성이 우수하며, 세포 및 동물 수준에서 신경병증성 통증을 감소시키는 효과가 우수

한바, 신경병증성 통증의 예방, 개선 및 치료 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0010]

도 1A는 시험관 내 미세아교세포에 대한 miR 146a-5p의 형질감염 효율성을 확인한 결과를 나타낸 도이다(one-way ANOVA followed by Tukey' s post hoc test, *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 vs sham).

도 1B 및 C는 웨스턴 블롯팅을 통해 BV2 세포에서 LPS 유도 염증에 대한 miR 146a-5p의 효과를 확인한 결과를 나타낸 도이다(one-way ANOVA followed by Tukey' s post hoc test, *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 vs sham).

도 1D는 qPCR을 통해 전염증성 사이토카인의 방출을 분석한 결과를 나타낸 도이다(one-way ANOVA followed by Tukey' s post hoc test, *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 vs NC + LPS).

도 2A는 miRNA 146a-5p가 캡슐화된 PLGA NP의 크기 및 ζ 전위를 측정한 결과를 나타낸 도이다.

도 2B는 miRNA 146a-5p가 캡슐화된 PLGA NP의 방출 프로파일을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 2C는 전자 현미경으로 miRNA 146a-5p가 캡슐화된 PLGA NP의 무결성 및 형태를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 3A SNL 수술에 따른 래트의 기계적 역치를 확인한 결과를 나타낸 도이다(Student' s t-test, ***p < 0.001 vs sham).

도 3B는 miRNA 146a-5p가 캡슐화된 PLGA NP 처리에 따른 기계적 역치를 확인한 결과를 나타낸 도이다(one-way ANOVA followed by Tukey' s post hoc test, *p < 0.05 vs SNL-untreated).

도 3C는 SNL 수술 후 9일(POD9) 시점에서 miRNA 146a-5p가 캡슐화된 PLGA NP 처리에 따른 기계적 역치를 확인한 결과를 나타낸 도이다(one-way ANOVA followed by Tukey' s post hoc test, *p < 0.05 vs SNL-untreated).

도 4A는 POD3 시점에서 래트의 척추 등쪽뿔(spinal dorsal horn)의 miR 146a-5p의 발현을 조사한 결과를 나타낸 도이다(Student' s t-test, **p < 0.01 vs sham).

도 4B는 POD9 시점에서 래트의 척추 등쪽뿔의 miR 146a-5p의 발현을 조사한 결과를 나타낸 도이다(one-way ANOVA followed by Tukey' s post hoc test, *p < 0.05, ns vs sham).

도 4C는 POD14 시점에서 래트의 척추 등쪽뿔의 miR 146a-5p의 발현을 조사한 결과를 나타낸 도이다(one-way ANOVA followed by Tukey' s post hoc test, ns vs sham).

도 4D는 POD9 시점에서 miRNA 146a-5p가 캡슐화된 PLGA NP 처리에 따른 척추 등쪽뿔의 미세아교세포 활성화를 확인한 결과를 나타낸 도이다(one-way ANOVA followed by Tukey' s post hoc test, ***p < 0.001 vs SNL NC-NPs).

도 4E는 miRNA 146a-5p가 캡슐화된 PLGA NP 처리에 따른 NF-κB 경로의 활성화를 확인한 결과를 나타낸 도이다(one-way ANOVA followed by Tukey' s post hoc test, ***p < 0.001 vs SNL NC-NPs).

도 4F는 miRNA 146a-5p가 캡슐화된 PLGA NP 처리에 따른 p38 MAPK 경로의 활성화를 확인한 결과를 나타낸 도이다(one-way ANOVA followed by Tukey' s post hoc test, ***p < 0.001 vs SNL NC-NPs).

도 5A는 웨스턴 블롯팅을 통해 miRNA 146a-5p가 캡슐화된 PLGA NP 처리에 따른 miR 146a-5p 표적 단백질의 발현을 분석한 결과를 나타낸 도이다(one-way ANOVA followed by Tukey' s post hoc test, *p < 0.05; **p < 0.01 vs SNL NC-NPs).

도 5B는 qPCR을 통해 miRNA 146a-5p가 캡슐화된 PLGA NP 처리에 따른 전염증성 사이토카인의 발현을 분석한 결과를 나타낸 도이다(one-way ANOVA followed by Tukey' s post hoc test, *p < 0.05; **p < 0.01, ns vs SNL NC-NPs).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011]

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0012]

본 발명의 양태에 따르면, 본 발명은 TRAF6 또는 IRAK1 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자;의 발현을 억제하는 제제가 함유된 나노입자를 포함하는 신경병증성 통증 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다. 상기 조성물

은 약학적 조성물 및 식품 조성물을 포함한다.

- [0013] 본 발명에 있어서, TRAF6(TNF Receptor Associated Factor 6)는 TNF 수용체 관련인자 단백질 패밀리의 구성원으로, TNF 수용체 수퍼 패밀리의 구성원 및 Toll / IL-1 패밀리의 구성원의 신호전달을 매개한다. 또한 TRAF6는 CD40, TNFSF11 / TRANCE / RANKL 및 IL-1과 같은 수용체의 신호를 매개하며, IRAK1 / IRAK, SRC를 포함한 다양한 단백질 인산화효소와 상호작용한다.
- [0014] 본 발명에 있어서, IRAK1(Interleukin-1 receptor-associated kinase 1)은 외부 병원체에 대한 선천적 면역 반응을 시작하는 데 중요한 역할을 하는 세린 / 트레오닌 단백질 인산화효소. Toll-like receptor(TLR) 및 IL-1R 신호 전달 경로에 관여한다.
- [0015] 본 발명에 있어서, "TRAF6 또는 IRAK1 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자;의 발현을 억제하는 제제"는 생물학적 시료에서 TRAF6 또는 IRAK1 단백질에 직접 결합하거나, TRAF6 또는 IRAK1을 코딩하는 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하여, 이의 발현을 억제함으로써 척수 내 세포의 TRAF6 또는 IRAK1의 인산화 감소 및 염증관련 인자의 발현을 억제하여 신경병증성 통증을 감소시킬 수 있는 물질을 의미한다.
- [0016] 본 발명의 구체예에서, 상기 TRAF6 또는 IRAK1 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자;의 발현을 억제하는 제제는 siRNA(small interference RNA), shRNA(short hairpin RNA), miRNA(microRNA), 리보자임(ribozyme), DNase, PNA(peptide nucleic acids), 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 항체 및 앵타머로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 miRNA이다.
- [0017] 본 발명에 있어서, siRNA는 이중가닥의 RNA가 다이에 의해 절단되어 생성되는 21-25 뉴클레오타이드 크기의 작은 RNA 조각으로 상보적인 서열을 갖는 mRNA에 특이적으로 결합하여 발현을 억제하는 것을 말한다. 본 발명의 목적상, mRNA에 특이적으로 결합하여 상기 유전자의 발현을 억제하는 것을 의미한다. siRNA는 화학적으로 또는 효소학적으로 합성될 수 있다. siRNA의 제조방법으로는 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 공지된 방법을 사용할 수 있다.
- [0018] 본 발명에서 사용되는 siRNA는 그 자체로 폴리뉴클레오타이드 페어링을 갖는 완전한 형태, 즉 시험관에서 siRNA를 직접 합성한 두 형질전환 과정을 거쳐 세포 안으로 도입되는 형태이거나, 생체 내에 투여된 후 이러한 형태를 갖도록 하나의 단일쇄 올리고뉴클레오타이드 단편과 이의 역방향(reverse) 상보물이 스페이서에 의해 분리된 단일쇄 폴리뉴클레오타이드로부터 유도될 수 있는 형태, 예를 들어 siRNA가 세포 안에서 발현되도록 제조된 siRNA 발현 벡터 또는 PCR-유도된 siRNA 발현 카세트 형질전환 또는 감염(infection) 과정을 거쳐 세포 안으로 도입되는 형태일 수 있다. siRNA를 제조하고 세포 또는 동물로 도입하는 방법의 결정은 목적 및 표적 유전자 산물의 세포 생물학적 기능에 따라 달라질 수 있다.
- [0019] 본 발명에 있어서, shRNA는, 45 내지 70 뉴클레오타이드의 길이를 가지는 단일가닥의 RNA로서 타겟유전자 siRNA 염기서열의 sense와 상보적인 nonsense 사이에 3-10 개의 염기 링커를 연결하는 올리고 DNA를 합성한 후 플라스미드 벡터에 클로닝하거나 또는 shRNA(short hairpin RNA)가 만들어지고 세포 내의 Dicer에 의해 siRNA로 전환되어 RNAi 효과를 나타내는 것을 의미한다. shRNA(small hairpin RNA)를 포함한 발현 컨스트럭트/벡터는 당분야에서 공지된 방법으로 제조할 수 있다.
- [0020] 본 발명에 있어서 miRNA는, mRNA의 3' 비번역 영역(UTR) 부위와의 염기결합을 통해 전사 후 억제자 역할을 하는 대략 22nt의 비번역 RNA를 의미한다. miRNA의 제조방법으로는 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 공지된 방법을 사용할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 상기 miRNA는 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 것이 바람직하다.
- [0022] 또한, 상기 염기서열의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기서열과 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 것으로, 서열번호 1로 표시되는 염기서열과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 서열을 의미한다. 폴리뉴클레오타이드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오타이드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.
- [0023] 본 발명에 있어서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 상기 miRNA에 상보적으로 결합하여 발현을 억제하는 염기서열로서, 이에 제한되지는 않으나 안티센스 RNA, 안티센스 DNA 및 안타고니스트(antagonist) mRNA를 포함한다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 항체는 당해 분야에서 공지된 용어로서 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분

자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 본 발명의 TRAF6 또는 IRAK1 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 이러한 항체는, 각 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 마커 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 여기에는 상기 단백질에서 만들어질 수 있는 부분 펩티드도 포함된다. 본 발명의 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그것의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역 글로불린 항체가 포함된다. 나아가, 본 발명의 항체에는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함된다.

[0025] 본 발명의 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며 Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.

[0026] 본 발명에 있어서, 나노입자는 약물을 중심으로 하여 고분자의 코팅층이 형성되어 이루어진 입자를 의미하는 것으로서, 편의상 "고분자의 종류 나노입자"의 형태로 표기할 수 있다. 예를 들면, 고분자의 종류가 폴리 락티드-코-글리콜라이드(PLGA)인 경우에는 PLGA 나노입자로 표기된다.

[0027] 상기 약물을 둘러싸는(즉, 코팅하는) 고분자로는 당업계에 공지된 생분해성 고분자(biodegradable polymer)가 이용될 수 있다. 또한, 오랜 시간 동안 체내에서 머물기 위해 다양한 분자량의 폴리에틸렌글리콜과 결합되어 있는 생분해성 고분자를 사용한다. 그 예로는 폴리스티렌-코-에틸렌글리콜, 폴리에틸렌이민-코-에틸렌글리콜, 폴리포스파젠-코-에틸렌글리콜, 폴리락타이드-코-에틸렌글리콜, 폴리락티드-코-글리콜라이드-코-에틸렌글리콜, 폴리카프로락톤-코-에틸렌글리콜, 폴리안하이드라이드-코-에틸렌글리콜, 폴리말릭산-코-에틸렌글리콜 및 이의 유도체, 폴리알킬시아노아크릴레이트-코-에틸렌글리콜, 폴리하이드록시부틸레이트-코-에틸렌글리콜, 폴리카르보네이트-코-에틸렌글리콜 및 폴리오르소에스테르-코-에틸렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 폴리-L-라이신-코-에틸렌글리콜, 폴리글리콜라이드-코-에틸렌글리콜, 폴리메틸메타아크릴레이트-코-에틸렌글리콜, 폴리비닐피롤리돈-코-에틸렌글리콜, 및 이의 공중합체로 이루어진 군으로부터 선택된 것이 이용될 수 있다. 상기 고분자들은 낮은 독성뿐만 아니라 탁월한 생체 적합성을 보여주는 것으로 알려져 있다[A. J. Domb, et al. Handbook of biodegradable polymers, Harwood academic publishers, USA, 1997].

[0028] 본 발명의 구체예에서, 상기 나노입자는 PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid) 나노입자인 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.

[0029] 본 발명에 따른 TRAF6 또는 IRAK1 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자;의 발현을 억제하는 제제가 함유된 나노입자의 내부에 존재하는 약물은 TRAF6 또는 IRAK1 억제제로서, 약물이 고분자 나노입자의 내부 임의의 위치에 위치하고 있는 것이다. TRAF6 또는 IRAK1 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자;의 발현을 억제하는 제제가 함유된 나노입자를 척수관 주사할 경우 고분자가 서서히 분해되면서 담지되어 있는 TRAF6 또는 IRAK1 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자;의 발현을 억제하는 제제가 방출되기 때문에 오랫동안 높은 약물 농도를 유지할 수 있다.

[0030] 본 발명의 구체예에서, 상기 조성물은 TRAF6 또는 IRAK1 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자;의 발현을 억제하는 제제가 함유된 나노입자를 0.01 내지 100 μ M의 농도로 포함하는 것이 바람직하고, 더 바람직하게는 0.1 내지 10 μ M의 농도인 것이나, 이에 제한되지 않는다.

[0031] 본 발명에 있어서, “예방”은 본 발명의 조성물에 의해 병인을 제거하거나 조기 발견하여 해당질환을 막는 모든 행위를 의미한다.

[0032] 본 발명에 있어서, “치료”는 본 발명의 조성물에 의해 질환의 증세가 호전되는 모든 행위를 의미한다.

[0033] 본 발명에 있어서, “개선”은 본 발명의 조성물에 의해 생체 대사, 세포 또는 기관의 기능이 이렇게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0034] 본 발명의 조성물은 상기 TRAF6 또는 IRAK1 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자;의 발현을 억제하는 제제와 함께 신경병증성 통증의 예방, 치료 또는 개선 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다.

[0035] 본 발명의 바람직한 구체예에 따르면, TRAF6 또는 IRAK1 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자;의 발현을 억제하는 제제가 함유된 나노입자는 미세아교세포(microglia cell), 뉴런 세포(neuronal cell) 및 성상세포(astrocytic cell)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 타겟하는 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.

[0036] 본 발명의 구체예에서, 상기 조성물은 척수강 주사용인 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.

- [0038] 본 발명의 조성물이 약학적 조성물인 경우, 본 발명의 약학적 조성물은 투여를 위하여 약학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로오스 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 이상의 성분을 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 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화 할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적절한 방법으로 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 제제화 할 수 있다.
- [0039] 상기 약학적 조성물은 추가적인 성분을 더 포함할 수 있다. 상기 추가적인 성분의 예로는 유당, 탈크, 전분, 스테아린산 마그네슘, 결정성 셀룰로오스, 락토오스, 젤라틴, 만니톨, 과옥소산, 이성화당, 폴리비닐알코올, 붕산 및 탄산나트륨이 있다.
- [0040] 상기 약학적 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여할 수 있으며, 신속한 효과를 위하여 비경구 투여하는 것이 바람직하며, 척수강에 척수관 주사되는 것이 더 바람직하다. 비경구 투여를 하는 경우, 정맥내 주입, 근육내 주입, 관절내(intra-articular) 주입, 활액내(intra-synovial) 주입, 수막강내 주입, 간내(intrahepatic) 주입, 병변내(intralesional) 주입 또는 두 개강내(intracranial) 주입 등으로 투여할 수 있다. 상기 약학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.
- [0042] 본 발명의 조성물이 식품 조성물인 경우, 본 발명의 식품 조성물은 건강기능식품, 식품 첨가제 또는 식이보조제일 수 있다. 본 발명의 조성물이 식품 첨가제인 경우, TRAF6 또는 IRAK1 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자;의 발현을 억제하는 제제를 그대로 첨가하거나, 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 혼합하여 사용되는 등 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [0043] 구체적인 예로, 식품 또는 음료의 제조 시에는 본 발명의 TRAF6 또는 IRAK1 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자;의 발현을 억제하는 제제는 원료에 대하여 15중량% 이하, 바람직하게는 10중량% 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하여 장기간 섭취할 경우에는 상기 범위 이하의 양으로 첨가될 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다. 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없으나, 본 발명의 TRAF6 또는 IRAK1 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자;의 발현을 억제하는 제제를 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료, 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0044] 본 발명의 식품 조성물이 음료로 제조될 경우 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등의 추가 성분을 포함할 수 있다. 상기 천연 탄수화물로는 포도당, 과당 등의 모노사카라이드; 말토오스, 수크로오스 등의 디사카라이드; 텍스트린, 사이클로덱스트린 등의 천연 감미제; 사카린, 아스파르탐 등의 합성 감미제 등이 사용될 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 본 발명의 식품 조성물 총 중량에 대하여 0.01 내지 10중량%, 바람직하게는 0.01 내지 0.1중량%로 포함된다.
- [0045] 본 발명의 식품 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, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있으며, 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 상기의 첨가제 비율은 크게 제한되지 않으나, 본 발명의 식품 조성물 총 중량에 대하여 0.01 내지 0.1중량% 범위내로 포함되는 것이 바람직하다.
- [0046] 건강 및 위생을 목적으로 하거나 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취인 경우, 본 발명의 식품 조성물은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 장기간 복용이 가능하다.
- [0048] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 인간을 제외한 개체에 주입하는 단계;를 포함하는 신경병증성 통증 치료방법을 제공한다.

- [0049] 본 발명의 구체예에서, 상기 주입은 척수강에 주입되는 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0050] TRAF6 또는 IRAK1 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자;의 발현을 억제하는 제제가 함유된 나노입자를 척수관 주사할 경우 고분자가 서서히 분해되면서 담지되어 있는 TRAF6 또는 IRAK1 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자;의 발현을 억제하는 제제가 방출되기 때문에 오랫동안 높은 약물 농도를 유지할 수 있다.
- [0051] 본 발명에 따른 신경병증성 통증 치료방법은 TRAF6 또는 IRAK1 단백질; 또는 이를 코딩하는 유전자;의 발현을 억제하는 제제가 함유된 나노입자가 척수 내 세포의 TRAF6 또는 IRAK1의 인산화 및 염증관련인자의 발현을 감소 시킴으로써, 신경병증성 통증을 치료할 수 있다.
- [0053] 중복되는 내용은 본 명세서의 복잡성을 고려하여 생략하며, 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.
- [0055] 이하, 실험예 및 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실험예 및 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실험예 및 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0057] 후술되는 실험예 및 실시예에 사용된 모든 화학 시약은 달리 명시되지 않는 한 Sigma-Aldrich(MO, USA) 및 Thermo Fisher Scientific(MA, USA)에서 구입했습니다. PLGA NP의 제조를 위한 음성 대조군(NC) miRNA(cat. 4464058) 및 miRNA 146a-5p(cat. 4464067 및 assay ID MC10722)는 Ambion(TX, USA)에서 구입했습니다.
- [0059] **실험예 1. BV2 세포로의 miRNA 146a-5p 형질감염**
- [0060] 설치류 미세아교세포주 BV2는 불활성화된 10% FBS 및 1% 항생제를 포함하는 DMEM 배지에서 배양하였다. 모든 배양물은 5% CO₂ 및 37℃ 조건인 인큐베이터에서 배양하였다. NC miRNA 또는 miRNA 146a-5p(UGAGAACUGAAUCCAUUGGUU, 서열번호 1)는 10 nM 농도에 도달하도록 제조업체의 지침에 따라 Lipofectamine™ RNAiMAX Transfection Reagent(Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 BV2 세포에 도입하였다. 형질감염된 세포는 감염 48시간 후 정량적 실시간 PCR(quantitative real-time PCR, qPCR) 및 웨스턴 블롯팅 분석에 사용하였다. 세포 수확 3 시간 전에 NC + 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide, LPS) 그룹 및 miRNA + LPS 그룹의 형질감염된 세포를 LPS로 자극하였다.
- [0062] **실험예 2. 웨스턴 블롯팅**
- [0063] NC miRNA- / miRNA-146a-5p 처리된 세포 또는 척추 등쪽뿔 조직(spinal dorsal horn tissue)(L4-L5 세그먼트, 1cm)을 감염 48 시간 후 단백질 추출 완충액(PRO-PREP; Intron, Daejeon, Korea)으로 수확하여 anti-TRAF6, anti-IRAK1, anti-phosphorylated-p65(p-p65), anti-phosphorylated-p38(p-p38), anti-IκB-α 및 anti-β-actin 항체를 사용한 웨스턴 블롯팅을 수행하였다.
- [0065] **실험예 3. 정량적 실시간 PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)**
- [0066] 총 RNA는 Hybrid-R 키트(GeneAll, Seoul, Korea)를 사용하여 척수의 등측등쪽뿔(L4-L5 세그먼트, 1cm) 또는 BV2 세포에서 분리하고 TOPscript RT DryMix(Enzynomics, 대전, 한국). qPCR은 Livak KJ, et al.,(2001)에 설명한대로 수행 및 분석하였다.
- [0068] **실험예 4. PLGA NP의 준비**
- [0069] PLGA 나노입자(PLGA NP)를 준비하기 위해 TE7.5 버퍼(Sigma-Aldrich)에 200 μl(20 μM) miRNA 146a-5p 또는 NC miRNA를 한방울씩 추가하여 25 mg PLGA(Corbion, 네덜란드 암스테르담) 및 초음파 처리(UP100H ultrasonic

processor; Hielscher Ultrasonics, Teltow, Germany)를 통해 1 차 W1/O 에멀전으로 유화시켰다. 2 ml 2% PVA1500(w/v)을 1차 에멀전에 직접 첨가하고 초음파 처리하여 추가로 유화시켜 W1/O/W2 이중 에멀전을 생성시켰다. 생성된 생성물을 2% PVA1500 6 ml로 희석하고 실온에서 3시간 동안 교반하여 DCM을 증발시켰다. 생성된 PLGA NP를 38,000 xg에서 4℃에서 10분 동안 초원심분리(Optima Max Ultracentrifuge; Beckman Coulter, CA, USA)하여 수집하고, deionized RNase-free water로 2회 세척하였다. 세척 후 PLGA NP를 물에 재현탁하였고, 이를 동결건조하였다. 세포 및 척수에서 PLGA NP를 추적하기 위해 DCM/PLGA 용액에 1 mg/ml Coumarin 6을 포함시켰다. PLGA NP의 물리적 특성은 ZetaSizer Nano ZS(Malvern Instruments, Malvern, UK) 및 전자 현미경으로 분석하였다. PLGA NP의 동역학 및 포획 효율은 Shin, et al.(2020)과 같이 평가하였다.

[0071] 실험예 5. 동물

[0072] Sprague-Dawley 래트(6주령, 수컷, 150~200g)는 대한 바이오 링크(대한민국, 충북)에서 구입하여 실험 1주일 전에 새로운 환경에 적응시켰다. 모든 동물은 12시간의 명암주기와 음식과 물에 자유롭게 접근할 수 있는 통제된 환경에서 케이지 당 3마리씩 수용하였다. 실험은 충남대학교 동물관리사용위원회(CNUH-A017-0017)의 승인을 받았고, 국립보건원 및 국제통증연구협회의 윤리 지침에 따라 진행하였다.

[0074] 실험예 6. L5 척수 신경 절찰에 의한 신경병증성 통증 유도

[0075] 래트에서 L5 SNL에 의해 유도된 신경병증성 통증 모델은 관련 분야에서 활용되는 동물 모델이다. 래트에서 신경병증성 통증을 유도하기 위하여, 래트를 이소플루란 마취(산소 혼합 2%, 경기도, 하나약품)로 수술을 시행하였다. 마취된 래트를 등쪽 표면을 현미경에 놓았다. L4에서 S2까지의 절개는 왼쪽 뒷면에 수행하였다. 절개 후 피하 조직을 제거하고 척추 주위 근육을 좌측으로 노출시켰고, 2cm 길이로 피부를 절개하였다. L4 및 L5 척추를 드러내기 위해 L6 transverse process를 제거한 후 척추를 손상없이 조심스럽게 분리하였다. L5 척추 신경을 3-0 실크 봉합사(Ethicon, Diegem, Belgium)로 3회 단단히 결찰하였다. 완전한 지혈을 확인한 후 봉합하였다. 음성 대조군(shame, sham)은 신경이 연결되지 않은 것을 제외하고는 동일한 기술을 사용하여 거짓 수술을 수행하였다.

[0077] 실험예 7. 본 프레이 필라멘트를 사용한 통증 행동 테스트

[0078] 통증 행동 테스트는 본 프레이 필라멘트(NC12775-99, Touch Test® Sensory Evaluators, 20-Piece Hand Kit; North Coast Medical & Rehabilitation Products, CA, USA)를 사용하여 수행하였다.

[0080] 실험예 8. 척수강 내 주사

[0081] 척수강내 주사를 위하여, 래트를 이소플루란 마취하였고, 엎드린 자세로 수술대에 위치시켰다. miRNA 146a-5p 또는 NC miRNA이 캡슐화된 PLGA NP 용액을 다섯 번째 및 여섯번째 요추(L5-L6)의 척수강에 26G 바늘이 장착된 주사기(50 µl; Hamilton, NV, USA)로 주사하였다. miRNA 146a-5p이 캡슐화된 PLGA NP 용액은 miRNA 146a-5p(0.035, 0.07, 0.1, 0.17 µM)를 포함한다. 성공적으로 PLGA NP 용액이 주입되었을 때 명백한 테일 플릭(tail flick)이 관찰되었다.

[0083] 실험예 9. 면역조직화학분석

[0084] 동물을 펜토바르비탈 나트륨(100 mg/kg, ip.)으로 마취하고, 연동 펌프를 사용하여 4% 파라포름알데히드(Merck, Darmstadt, Germany)를 포함하는 PBS(pH 7.4)를 20 ml/min로 관류시켰다. 관류 후 척수의 요추 부위(L4-L6)를 얻어 면역조직화학적 분석에 사용하였다.

[0086] 실시예 1. 시험관 내 미세아교세포에 대한 miR 146a-5p의 효과 확인

[0087] 시험관 내 미세아교세포에 대한 miR 146a-5p의 효과를 조사하기 위하여, BV2 세포를 배양한 후 LPS 자극 전 miR

또는 NC miR로 형질감염시켰다.

1-1. 형질감염 효율성 확인

형질감염의 효율성을 확인하기 위하여, 배양된 각각의 세포 그룹에서 miR 146a-5p 발현을 확인하였다. miR 146a-5p 발현을 확인한 결과는 도 1A에 나타내었다.

도 1A에 나타난 바와 같이, 세포가 miR로 형질감염된 두 그룹(miR 및 miR + LPS 그룹)은 miR 146a-5p 발현이 NC-miR 형질감염된 그룹에 비해 유의하게 증가하였다.

1-2. LPS 유도 염증에 대한 miR 146a-5p의 효과 조사

BV2 세포에서 LPS 유도 염증에 대한 miR 146a-5p의 효과를 웨스턴 블롯팅을 통해 조사하였다. 웨스턴 블롯팅 결과는 도 1B에 나타내었으며, 이를 도식화하여 도 1C에 나타내었다.

도 1B 및 1C에 나타난 바와 같이, TRAF6 및 IRAK1의 발현은 NC 그룹과 비교하여 NC + LPS 그룹에서 LPS에 의해 상향 조절된 것을 확인하였다. 한편, miR의 형질감염은 miR + LPS 그룹에서 LPS에 의한 단백질의 상향 조절을 효과적으로 차단하였다. 더 높은 수준의 p-p65, p-p38, 활성 NF- κ B 및 p38 MAPK 분자가 나타내는 바와 같이, LPS 처리에 대한 반응으로 NC + LPS 그룹에서 NF- κ B 및 p38 MAPK 경로가 모두 활성화되었다. 그러나, miR + LPS 그룹에서, TRAF6 및 IRAK1 발현의 miR 유도 감소는 p-p65 및 p-p38 활성화의 억제를 초래했다. 활성 분자 p-p65가 증가된 수준은 NF- κ B 경로의 두 가지 억제제 중 하나 인 I κ B- α 의 감소와 일치하였다. NC-LPS 그룹에서 I κ B- α 의 하향 조절은 이 그룹의 p-p65의 상향 조절과 일치하는 반면, miR 146a-5p는 LPS + miR 그룹에서 부분적으로 NF- κ B 활성화 유도 I κ B- α 감소를 구제하였다.

1-3. 유전자 발현 분석

미세아교세포에서 NF- κ B 및 MAPK 경로의 활성화는 IL-6, IL-1 β 및 TNF- α 와 같은 전염증성 사이토카인의 방출을 증가시킨다. 이에, IL-6, IL-1 β 및 TNF- α 유전자의 발현을 qPCR을 통해 분석하였다. 분석 결과는 도 1D에 나타내었다.

도 1D에 나타난 바와 같이, LPS 활성화 BV2 세포에 의해 방출되는 IL-6, IL-1 β 및 TNF- α 의 수준은 NC 그룹에 비해 NC + LPS 그룹에서 현저히 증가하였다. 이와 대조적으로, miR 146a-5p는 miR + LPS 그룹에서 사이토카인의 방출을 억제하였다. 사이토카인은 아니지만 전염증성 마커인 iNOS 발현 조절은 전염증성 사이토카인의 조절과 일치했다.

실시예 2. miRNA 146a-5p가 캡슐화된 PLGA NP의 특성

2-1. 캡슐화된 PLGA NP의 크기 및 ζ 전위 측정

생체 내에서 miR 146a-5p의 효과를 조사하기 위하여, miR 146a-5p가 캡슐화된 PLGA NP를 SNL 래트에 도입하였다. miRNA 또는 NC miRNA가 포함된 PLGA NP는 일반적인 이중 에멀전(W/O/W) 방법을 사용하여 초음파 처리하여 제조하였다. ZetaSizer를 이용하여, 캡슐화된 PLGA NP의 크기 및 ζ 전위를 측정하였으며, 그 결과는 도 2A에 나타내었다.

도 2A에 나타난 바와 같이, miR NP는 크기가 224.1 ± 94.01 nm이고, ζ 전위는 -38.5 ± 8.16 mV임을 확인하였다. 대조군인 NC-NP의 크기 및 ζ 전위는 각각 225.3 ± 89.46 nm 및 -37.1 ± 5.58 mV임을 확인하였다.

2-2. 방출 프로파일 분석

miR NP의 방출 프로파일은 지속 방출 역학 접근법을 사용하여 분석하였으며, 그 결과는 도 2B에 나타내었다. 또한 miR NP 및 NC NP의 무결성(integrity) 및 형태(morphology)는 주사 전자 현미경으로 확인하였으며, 도 2C에 나타내었다.

- [0108] 도 2B 및 C는 miR NP가 miRNA를 점진적으로 방출한다는 것을 확인하였다. miR NP의 miRNA 방출의 초기 버스트(initial burst of release)(41.8 %)는 주입 후 24시간에 기록되었고, miRNA의 방출은 다른 시점에서 지속적인 방식으로 관찰되었다. 이 누적 방출은 주입 후 72 시간(99.2 %)에 정점에 도달했다.
- [0109] 또한 캡슐화 효율은 “동결건조된 PLGA NP에서 방출된 miRNA의 양/NP를 준비하기 위해 처음에 취한 miRNA의 양 $\times 100\%$ ”으로 계산하였고, 그 결과 $29.6 \pm 0.24\%$ 임을 확인하였다.
- [0111] **실시예 3. miRNA 146a-5p가 캡슐화된 PLGA NP의 통증 감소 효과 확인**
- [0112] **3-1. SNL 수술에 따른 기계적 역치 확인**
- [0113] in vitro 에서 얻은 결과를 기반으로 miR 146a-5p가 척수에서 미세아교세포 활동을 조절하여 통증 행동을 바꿀 수 있는지 시험하였다. 구체적으로, L5 SNL 수술을 통해 신경병증성 통증 래트 모델을 확립하였다. 수술 후 SNL 래트의 동측면(ipsilateral side)에서 본 프레이 필라멘트 테스트를 수행하여 통증 과민성을 확인하였다. 본 프레이 필라멘트 테스트 결과는 도 3A에 나타내었다.
- [0114] 도 3A에 나타낸 바와 같이, SNL 수술을 하지 않은 음성 대조군(sham)은 기계적 역치가 유지되는 반면, SNL 수술을 한 SNL 래트는 수술 후(postoperative day, POD) 3일에 기계적 역치가 급격히 감소한 것을 확인하였다. 이는 SNL 수술이 성공적으로 수행되었음을 의미한다.
- [0116] **3-2. miRNA 146a-5p가 캡슐화된 PLGA NP 처리에 따른 기계적 역치 확인**
- [0117] miRNA 146a-5p가 캡슐화된 PLGA NP 처리에 따른 역치를 확인하였다. miR NP는 POD 3에서 래트의 척수에 척수강 내 주사하였고, 기계적 역치는 주사 후 다른 시점에서 결정되었다.
- [0118] 신경병증성 통증이 있는 래트에서 miR NP를 처음 사용하는바, 유효 용량을 결정하였다. 구체적으로, 상이한 용량의 miR-NP(0.035, 0.07, 0.1 및 0.17 μM)를 SNL 래트에 투여하였다. 대조군(NC-NPs)은 래트에 NC-NP를 0.1 μM 로 투여하였다. 유효 용량을 확인하기 위하여 기계적 역치를 확인한 결과는 도 3B에 나타내었고, 시점 POD9에서 miR-NP 농도에 따른 기계적 역치를 확인한 결과는 3C에 나타내었다.
- [0119] 도 3B 및 C에 나타낸 바와 같이, miR NP를 0.07, 0.1 및 0.17 μM 의 농도로 처리한 그룹은 기계적 역치가 증가한 것을 확인하였다. 대부분의 그룹에서 진통 효과는 POD9(주사 후 6일)에 최고치에 이르렀고, POD 14(주사 후 11일) 통증 감소가 관찰되었다.
- [0120] 상기 결과는 이러한 용량에서 miR NP를 사용한 치료가 SNL 래트의 통증 과민성을 효과적으로 개선했음을 의미한다. 또한 통증이 가장 크게 감소한 용량은 miR NP 0.1 μM 의 용량(POD 9)임을 확인하였다.
- [0122] **실시예 4. miRNA 146a-5p NP가 NF- κ B 및 phospholyrated-p38 MAPK 경로의 활성화에 미치는 영향 확인**
- [0123] **4-1. 시점에 따른 miR 146a-5p의 발현 확인**
- [0124] miR이 SNL 래트의 통증을 줄이는 메커니즘을 조사하였다. 먼저 다른 시점에서 래트의 척추 등쪽뿔(spinal dorsal horn)의 miR 146a-5p의 발현을 조사하였다. 구체적인 시점은 POD3(주사 전), POD9(주사 후 6 일) 및 POD14(주사 후 11 일)이다. 시점에 따른 miR 146a-5p의 발현을 확인한 결과는 각각 도 4A 내지 C에 나타내었다.
- [0125] 도 4A에 나타낸 바와 같이, POD3(주사 전)에서 miR 146a-5p는 SNL 래트의 척추 등쪽뿔에서 음성 대조군(sham, 거짓 SNL 수술 수행)과 비교하여 상향 조절된 것을 확인하였다. 이는 신경 손상에 대한 miR 146a-5p의 음성 피드백 루프의 내인성 메커니즘을 시사한다.
- [0126] 도 4B 및 C에 나타낸 바와 같이, POD9 및 POD14에서는 SNL NC-NP와 음성 대조군(sham) 간에 miR 146a-5p 발현에 유의한 차이가 없었다. 이는 수술이 초기 단계(POD3)에서 miR 146a-5p 발현을 유도하였으나, 오랫동안 유지되지 않았음을 의미한다.
- [0127] 이와 대조적으로, miR NP에 노출된 SNL 래트에서는 진통 효과가 최고조에 달했던 POD9에서 음성 대조군(sham) 및 SNL NC-NP에 비해 miR 발현이 현저하게 증가하였다(도 4B). 그러나 POD14에서 miR은 다른 그룹에 비해 miR NP에서 유의하게 증가하지 않았다(도 4C). 이는 본 프레이 필라멘트 테스트의 결과와 연관되어 miR NP 처리에

따른 진통 효과가 POD9에서 정점에 이르렀고 POD 14에서 감소했음을 의미한다.

[0129] **4-2. POD9에서 척추 미세아교세포에 대한 miR 과발현**

[0130] 상기 실시예 4-1에서 miR 146a-5p 발현을 확인한 후, POD9에서 척추 미세아교세포에 대한 miR 과발현의 효과를 조사하였다. miR NP는 in vitro 실험에서 확인된 바와 같이 척추의 미세아교세포에 주로 영향을 미치고 항염증 효과를 얻을 것으로 예상하였다. 이를 확인하기 위하여, POD9에서 음성 대조군(sham), NC-NP 및 miR NP 그룹의 척추 등쪽뿔에서 미세아교세포의 활성화를 확인하였다. 미세아교세포의 활성화를 확인한 결과는 도 4D에 나타내었다.

[0131] 도 4D에 나타난 바와 같이, 음성 대조군(sham), NC-NP 및 miR NP 그룹의 래트의 척추 부분은 anti-iba1 항체(microglial marker)로 면역염색된 것을 확인하였다. 보다 상세하게는, SNL NC-NP 래트는 척추 등쪽뿔에서 미세아교세포가 음성 대조군(sham)에 비해 강력하게 활성화된 것을 확인하였다. 한편, SNL miR NP 래트는 미세아교세포의 활성화를 감소시켰으며, 이는 낮은 iba1 면역 반응성에 의해 나타난 것으로 보인다.

[0133] **4-3. NF- κ B 및 p38 MAPK 경로의 활성화 조사**

[0134] 미세아교세포 활동에 대한 miR의 특정 효과를 추가로 결정하기 위하여, 척추 미세아교세포에서 NF- κ B 및 p38 MAPK 경로의 활성화를 조사하였다. 척추 절편은 anti-iba1 + anti-p-p65; 또는 anti-iba1 + anti-p-p38;로 공동 염색하였다. 면역염색 결과는 각각 4E 및 F에 나타내었다.

[0135] 도 4E 및 F에 나타난 바와 같이, SNL NC-NP 래트는 p-p65 및 p-p38이 척추 등쪽뿔에서 강하게 활성화된 반면, 음성 대조군(sham)은 p-p65 및 p-p38에 대한 신호가 검출되지 않은 것을 확인하였다. 이와 달리, SNL miR NP 래트는 p-p65 및 p-p38의 활성이 miR NP에 의해 억제된 것을 확인하였다.

[0136] 대부분의 p-p65 및 p-p38 신호는 미세아교세포와 겹치며, 이는 p-p65/p-p38 + iba1-co-expressing cells/total iba1-expressing cell를 보여주는 그래프에 의해 확인되었다. 상기 결과는 NF- κ B 및 p38 MAPK 경로가 SNL 수술에 따라 미세아교세포에서 강력하게 활성화되었음을 의미하며, miR NP 처리에 따라 척추 미세아교세포에서 이러한 경로의 활성화가 효과적으로 차단되었음을 의미한다.

[0138] 본 실시예를 통해 miR NP가 미세아교세포 활성화를 감소시키고, 이러한 신경아교세포에서 NF- κ B 및 p38 MAPK 염증 경로의 활성화를 차단함으로써 척추 미세아교세포에 영향을 미친다는 것을 확인하였다.

[0140] **실시예 5. miRNA 146a-5p NP가 염증 조절에 미치는 영향 확인**

[0141] **5-1. miR 146a-5p 표적 단백질의 발현 분석**

[0142] miR에 의한 SNL miR NP 래트의 통증 행동 개선의 기본 메커니즘을 추가로 조사하였다. 이에, miR 146a-5p 표적 단백질인 IRAK1 및 TRAF6을 포함한 단백질의 발현을 웨스턴 블롯팅으로 분석하였다. 웨스턴 블롯팅 결과는 도 5A에 나타내었다.

[0143] 도 5A에 나타난 바와 같이, SNL NC-NP 래트에서 SNL 수술 후 어댑터 단백질인 IRAK1 및 TRAF6의 발현이 증가하였으나, 이는 SNL miR NP 래트에서 miR NP 처리에 의해 발현이 감소하였다. 따라서 TRAF6 및 IRAK1의 하류(downstream)인 p-p65 및 p-p38의 발현은 SNL NC-NP 래트의 척추 등쪽뿔에서 증가하였으나, miR NP에 의해 그 발현이 감소하였다.

[0144] 정상 세포상향에서 NF- κ B는 I κ B에 의해 잡혀 있는 상태로 억제되어 있으나, TNF 수용체나 TLR4 수용체가 활성화된 경우, I κ B kinase(IKK)가 활성화되어 I κ B를 인산화시켜 ubiquitination과정을 통해 분해된다. 그 결과 억제된 NF- κ B가 자유롭게 되어(disinhibition) 핵 안을 이동하며 다양한 IL1 유전자를 발현시킨다. 이 과정에서 IRAK1과 TRAF6는 TLR4 또는 TNF수용체에 반응하여 IKK를 활성화시키는 Adaptor 단백질로 기능하고 있다.

[0145] 따라서 상기 결과는 miR NP처리가 IRAK1 및 TRAF6의 발현을 억제하여 이들 인자의 하류인 p-p65, p-p38의 활성을 억제하여 염증을 줄일 수 있음을 의미한다.

[0147] **5-2. microglial mediator의 방출 조사**

[0148] 미세아교세포는 신경 활동에 대한 반응으로 proinflammatory mediator를 방출하여 신경병증성 통증의 발달에 기여한다. 이에, qPCR을 통해 래트의 척추 등쪽뿔에서 microglial mediator의 방출을 조사하였다. microglial mediator의 방출을 조사한 결과는 도 5B에 나타내었다.

[0149] 도 5B에 나타낸 바와 같이, SNL NC-NP 래트의 척추 등쪽뿔에서 전염증성 사이토카인 IL-6, IL-1 β 및 TNF- α 의 방출이 증가된 것을 확인하였다. 이는 앞서 확인한 시험관 내 결과와 일치한다. 이와 대조적으로, SNL miR NP 래트에서 IL-6 및 IL-1 β 의 유전자 발현은 SNL NC-NP에서보다 유의하게 낮았다. TNF- α 의 조절은 다른 사이토카인의 경향과 일치하였다.

[0150] iNOS는 전염증성 표지자이며 미세아교세포에서 특별히 발현되지 않는다. 그러나 in vivo 및 in vitro 실험에서 miR 처리 그룹에서 iNOS의 수준이 낮은 것을 확인하였다.

[0151] IL-4 및 IL-10은 항염증성 사이토카인으로, POD9에서 SNL NC-NP 래트의 척추 등쪽뿔에서 방출이 증가하였다. 그러나 NC-NP 및 miR NP 그룹 간에 이러한 사이토카인의 발현에는 유의한 차이가 없었다.

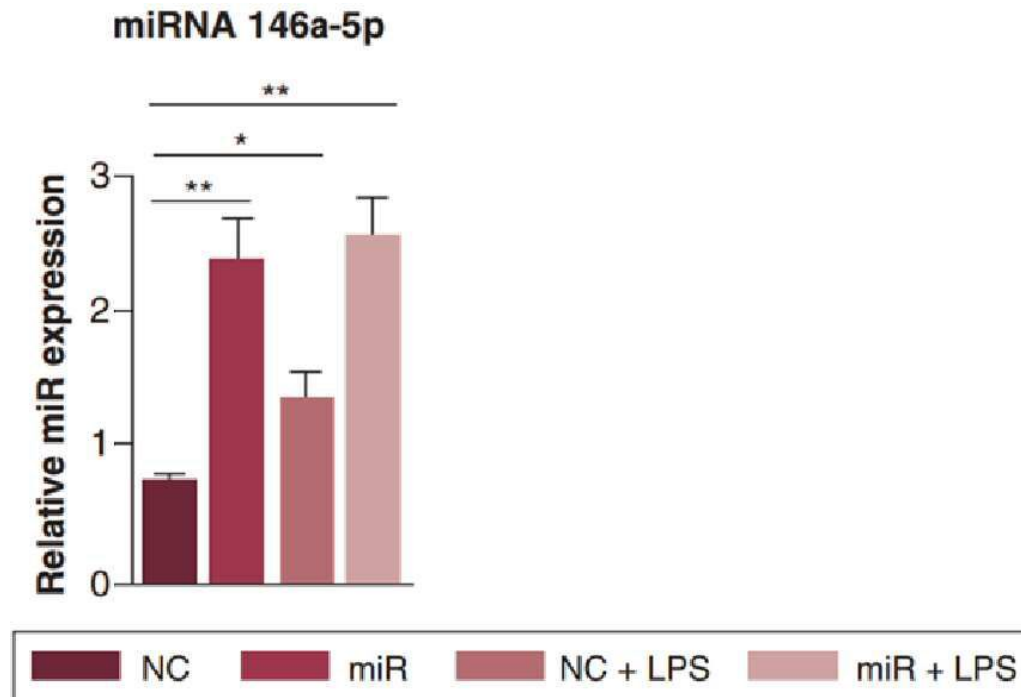
[0152] 상기 결과는 miR 146a-5p가 전염증 반응만을 조절하고, 항염증 과정에는 영향을 미치지 않음을 시사한다.

[0154] 종합적으로 본 발명자들은 miRNA 146a-5p를 포함하는 PLGA 나노입자를 개발하고, 상기 miRNA 146a-5p를 포함하는 PLGA 나노입자가 생체적합성 및 생분해성이 우수하며, 세포 및 동물 수준에서 신경병증성 통증을 감소시킨다는 것을 확인하였다. 이는 본 발명의 miRNA 146a-5p를 포함하는 PLGA 나노입자가 신경병증성 통증의 치료제로서 이용될 수 있음을 의미하는바, 신경병증성 통증의 예방, 개선 및 치료 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.

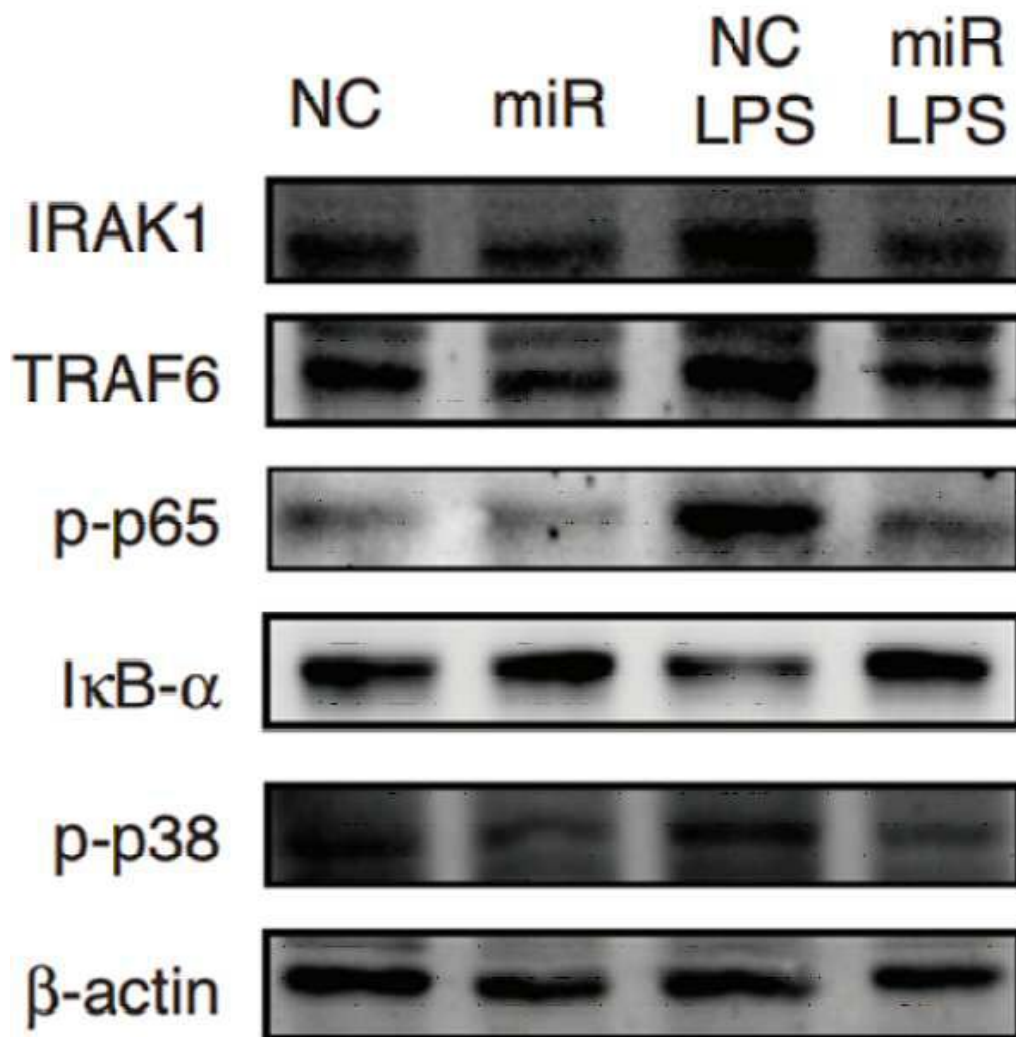
[0156] 이상, 본 발명내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의해 정의된다고 할 것이다.

도면

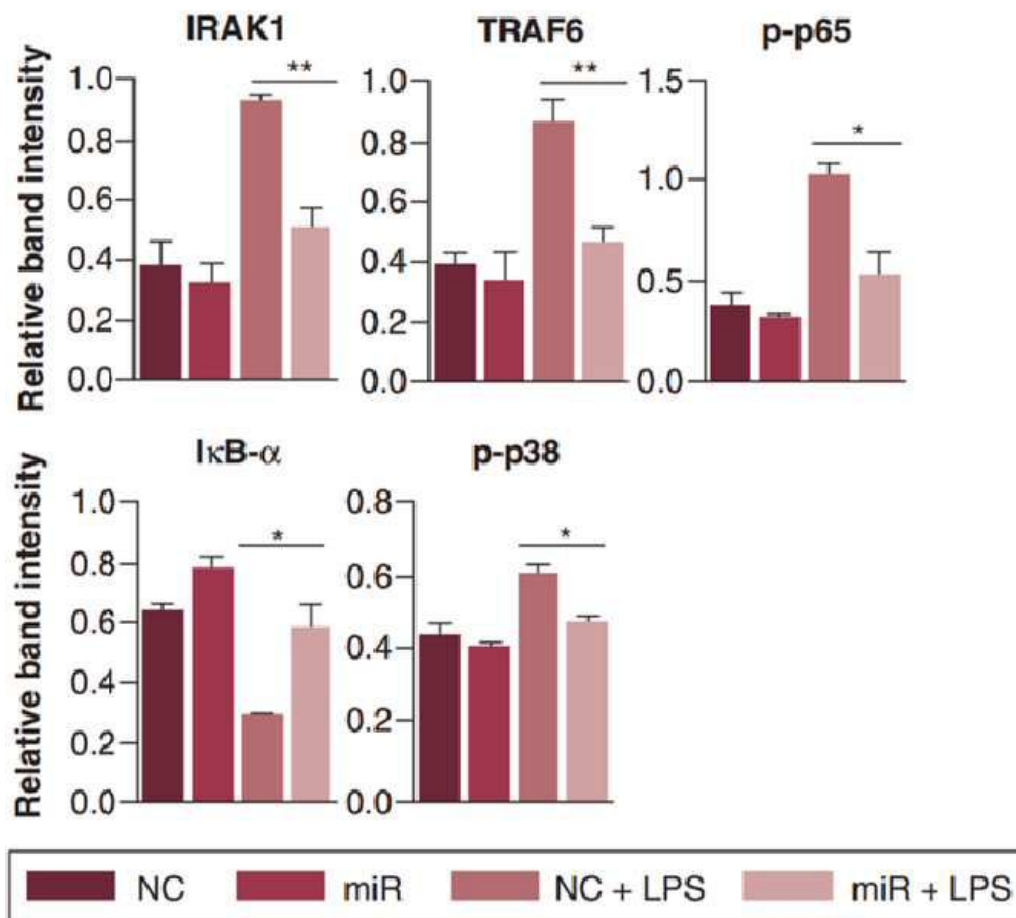
도면1a



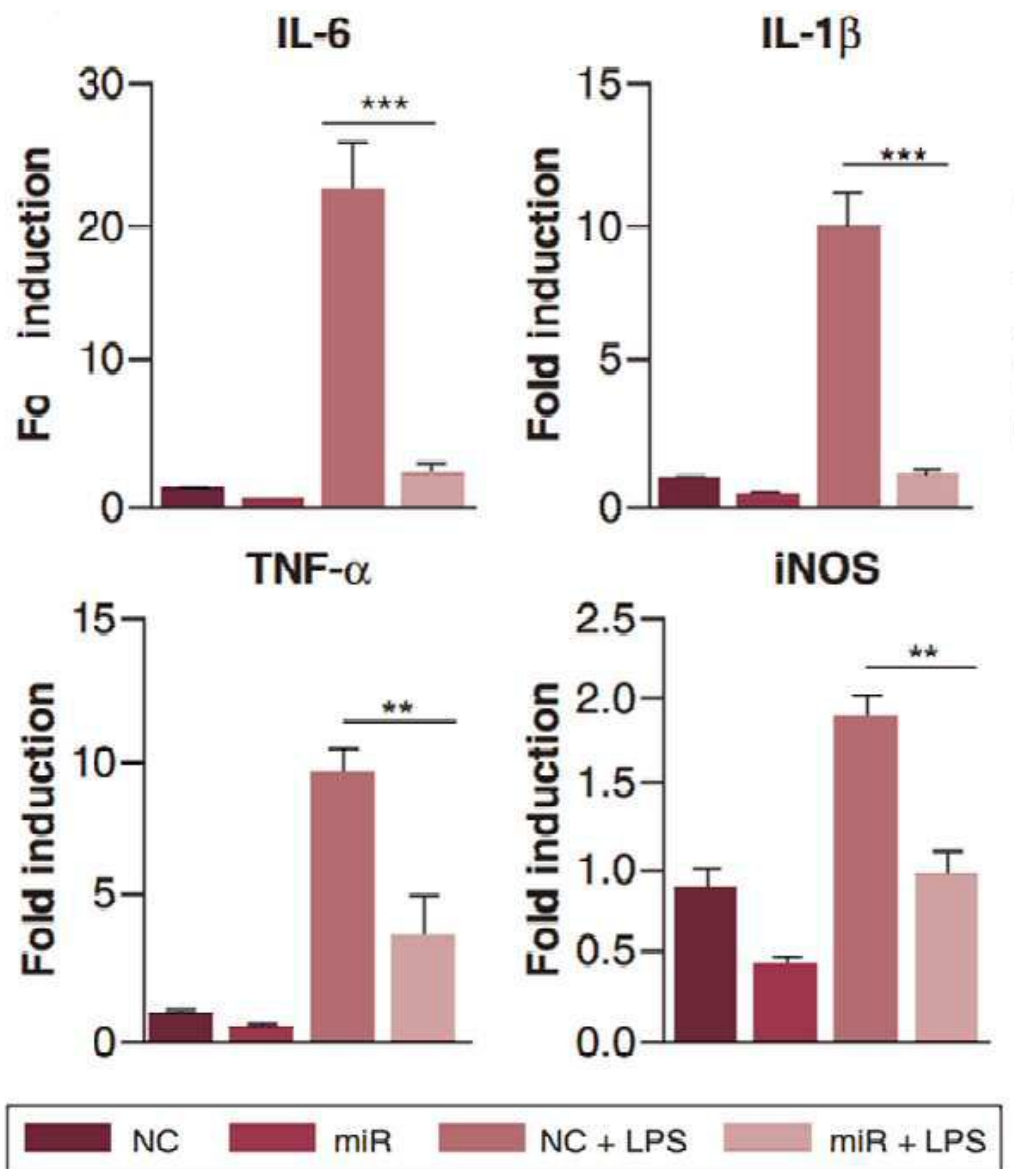
도면1b



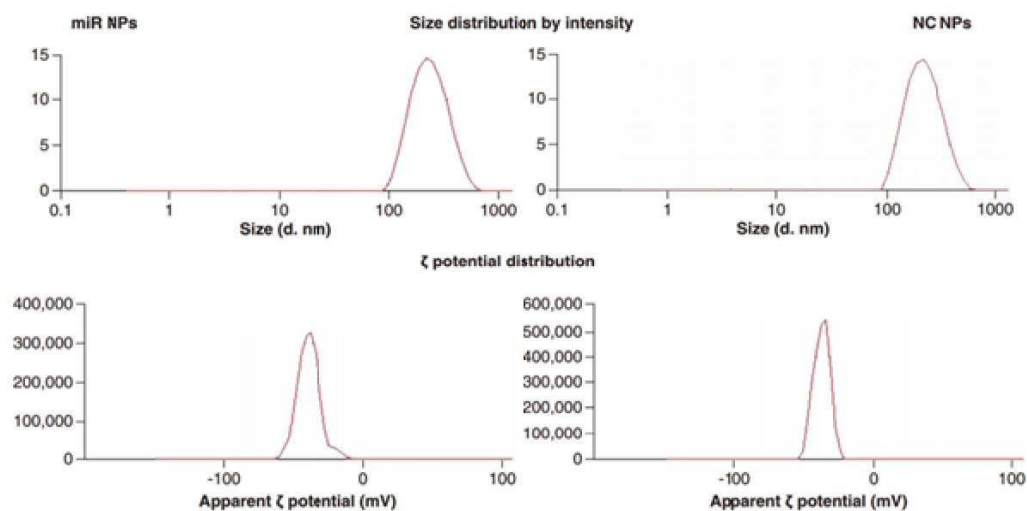
도면1c



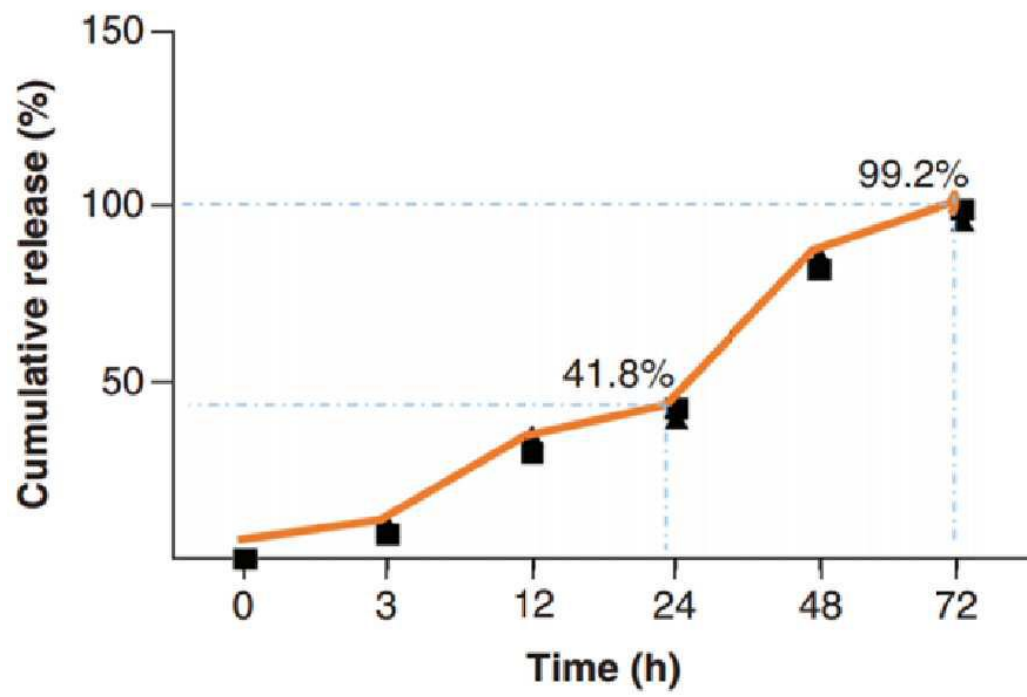
도면1d



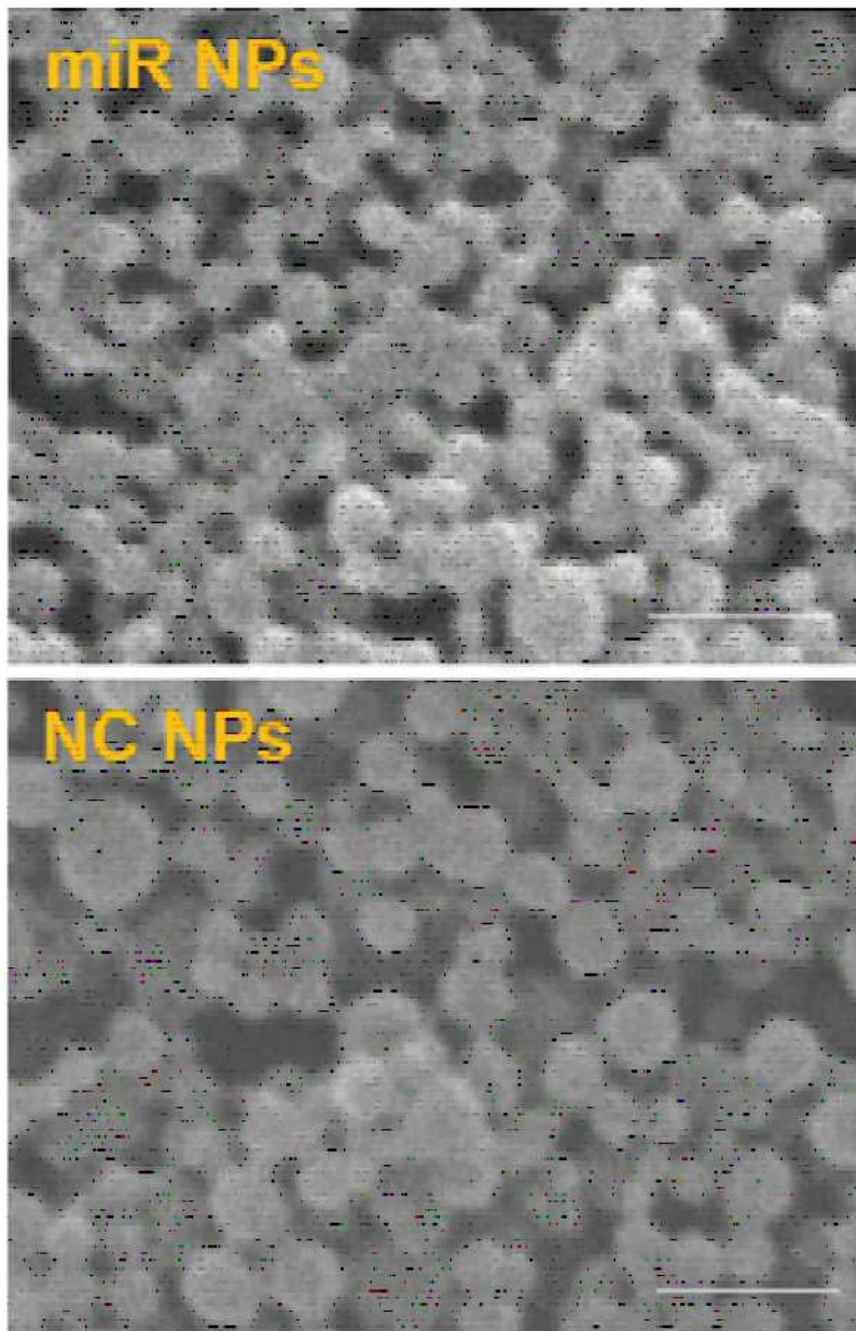
도면2a



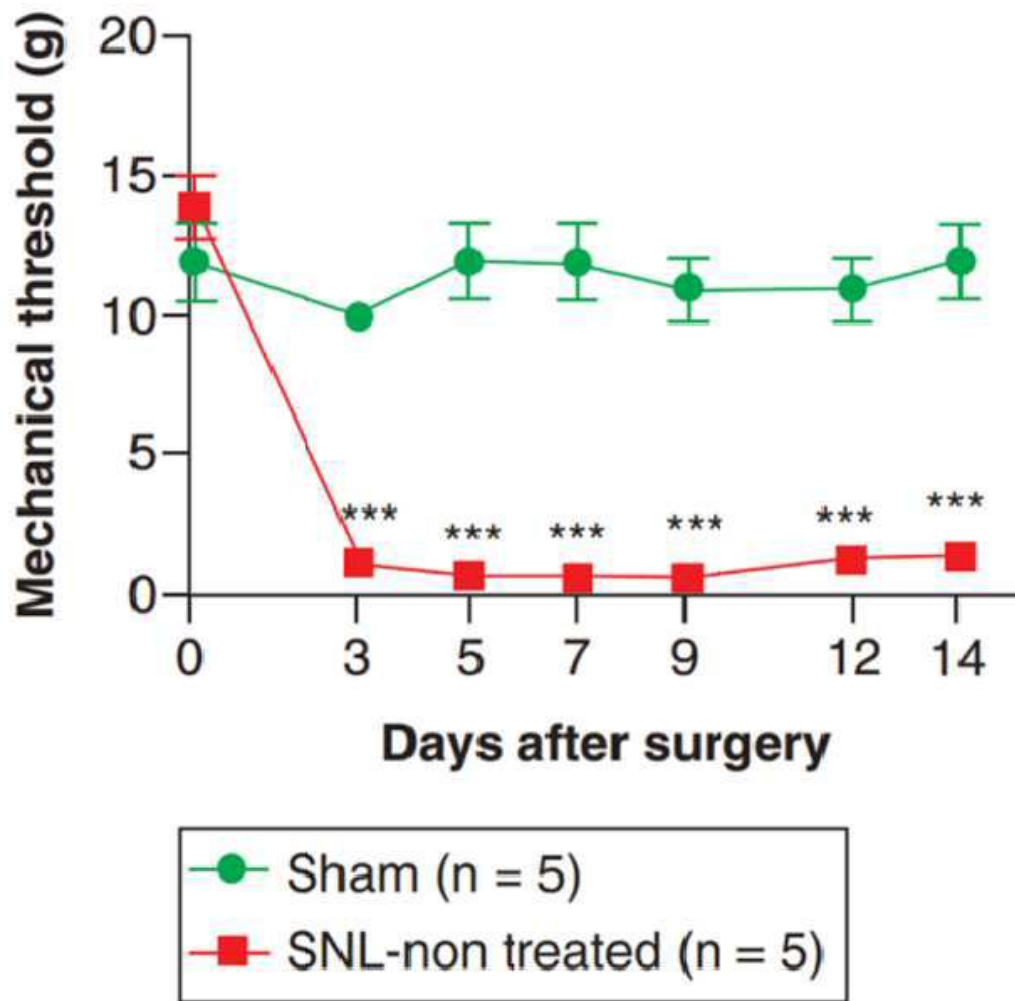
도면2b



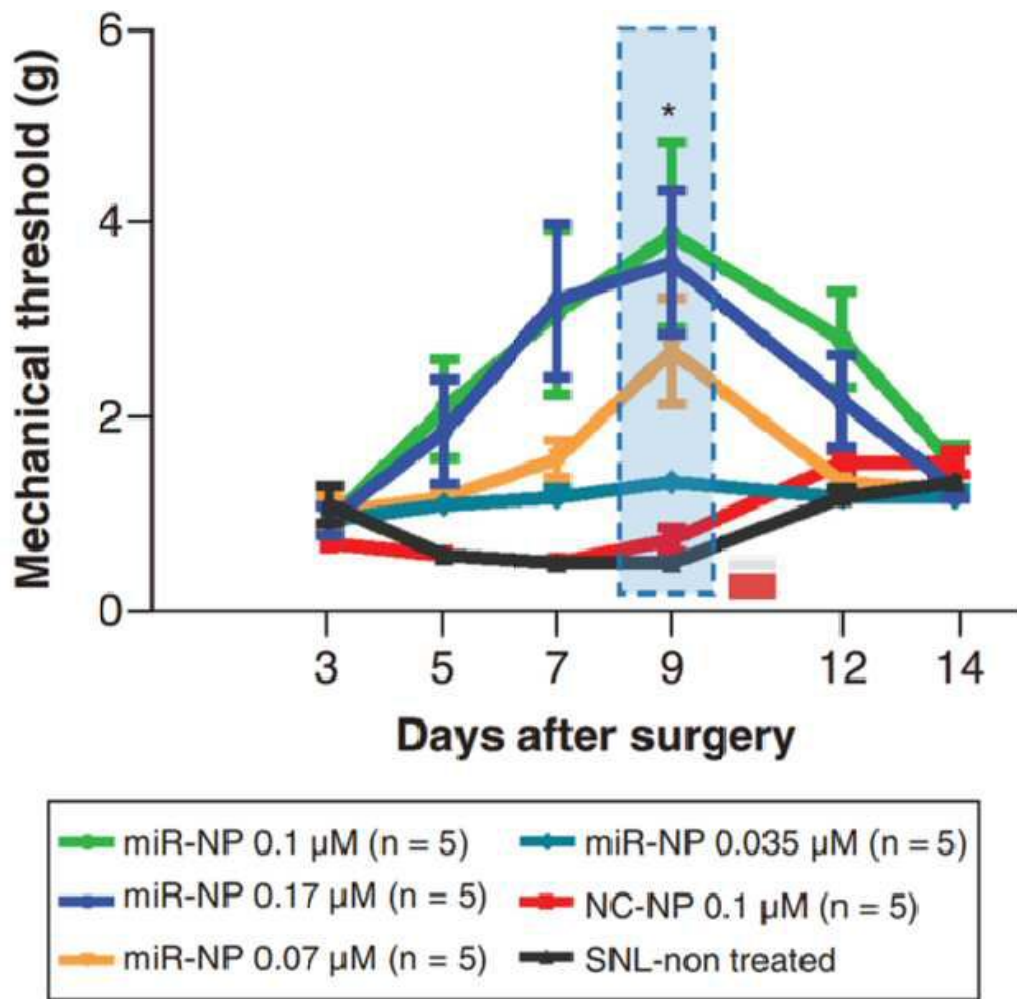
도면2c



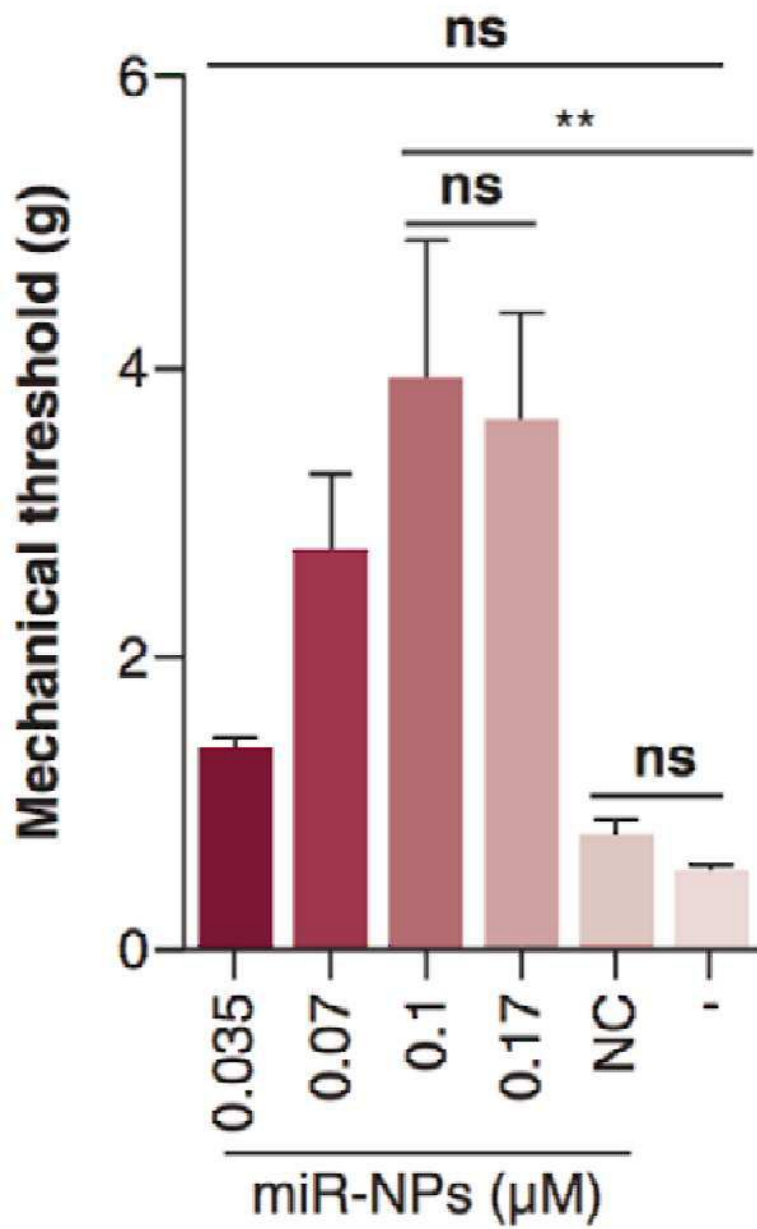
도면3a



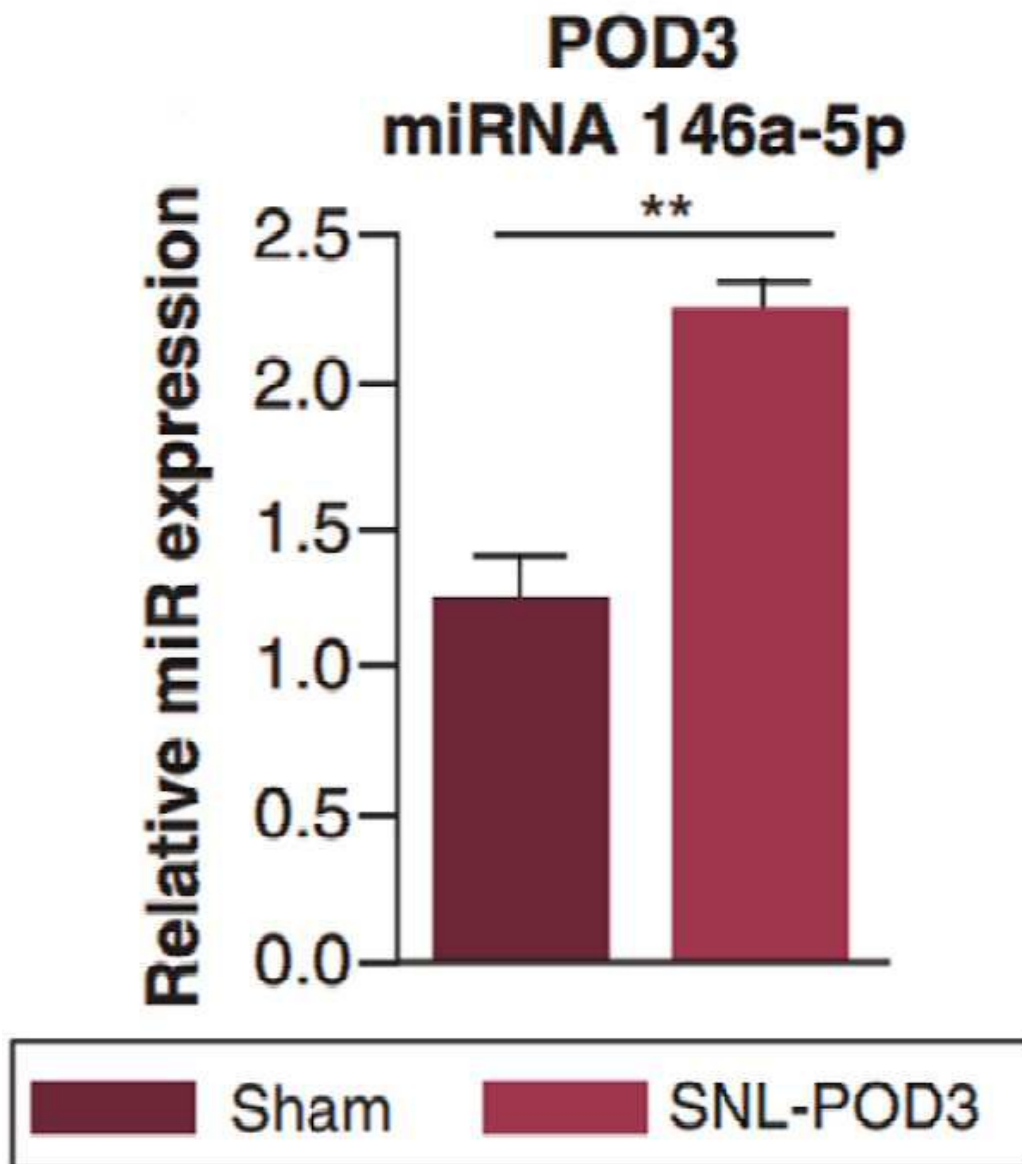
도면3b



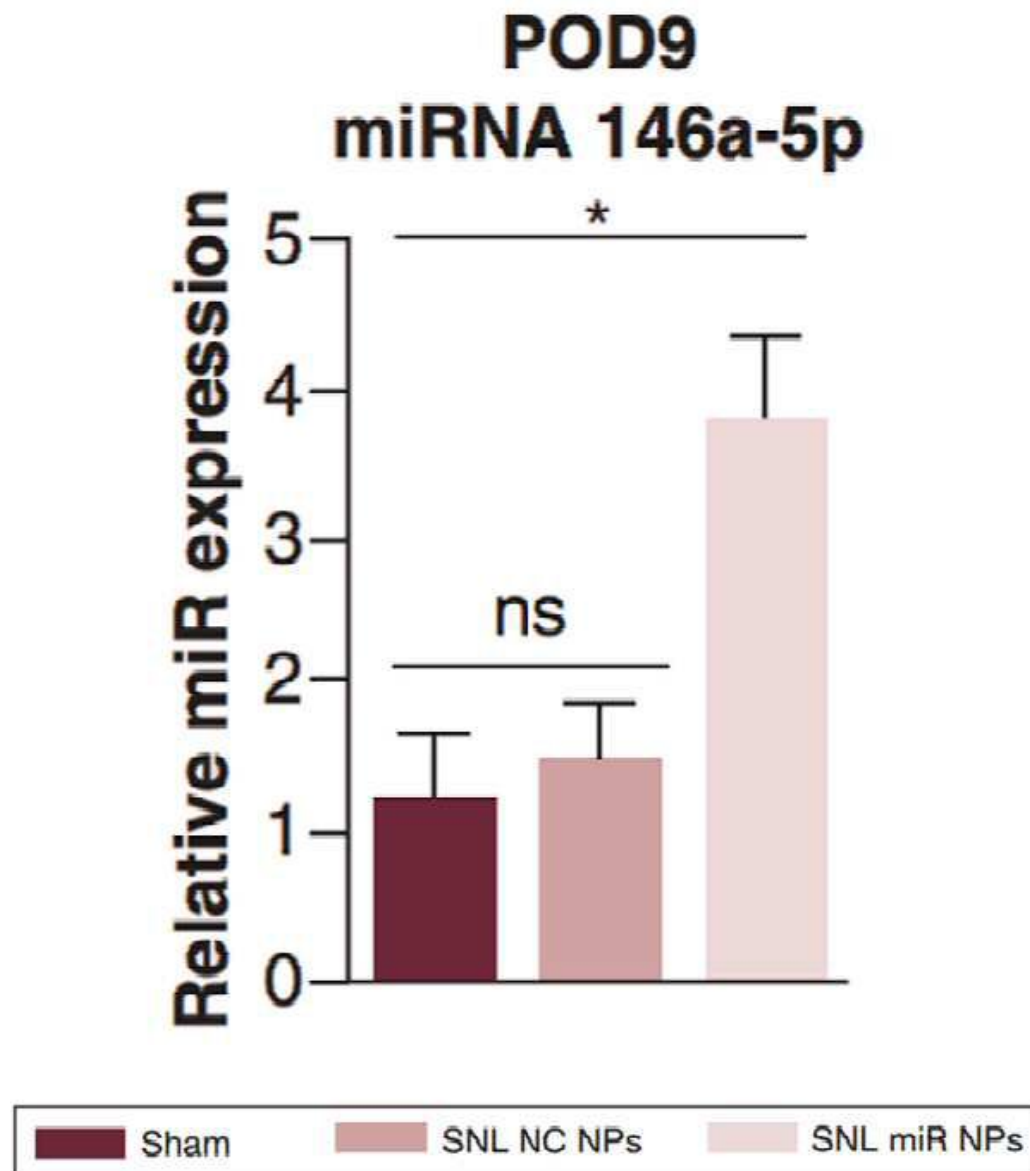
도면3c



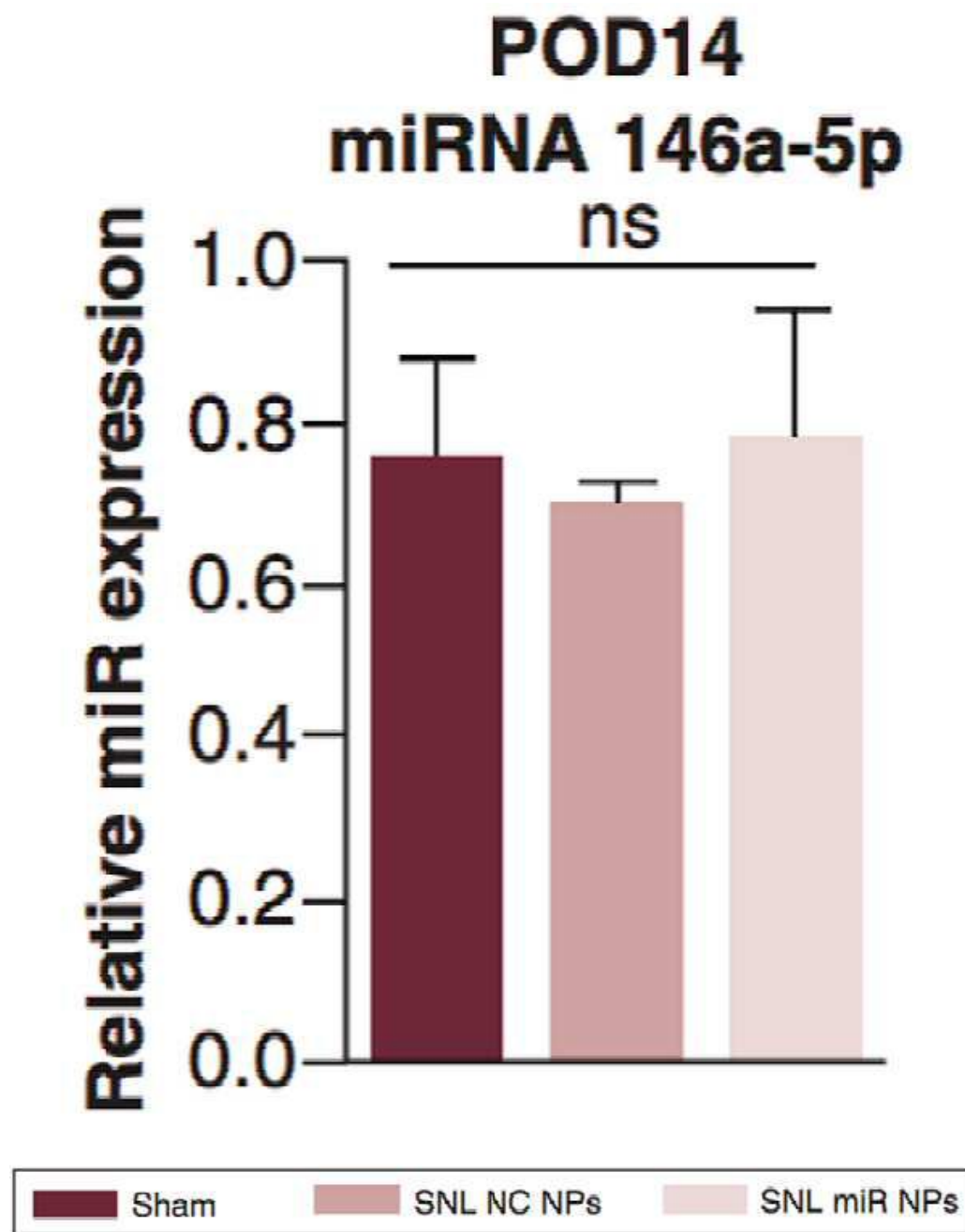
도면4a



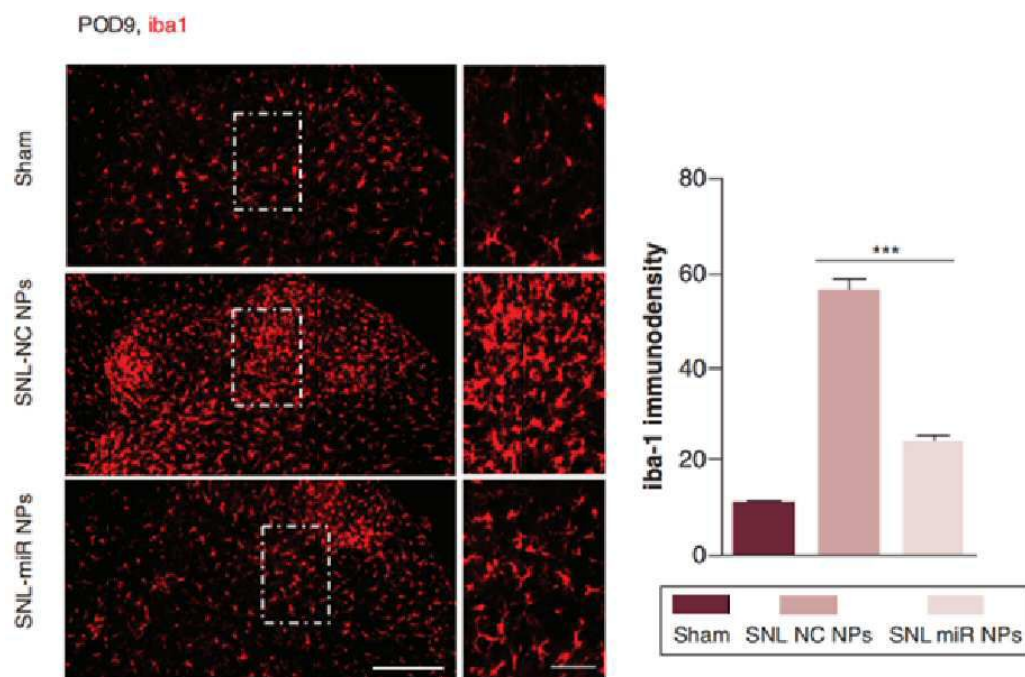
도면4b



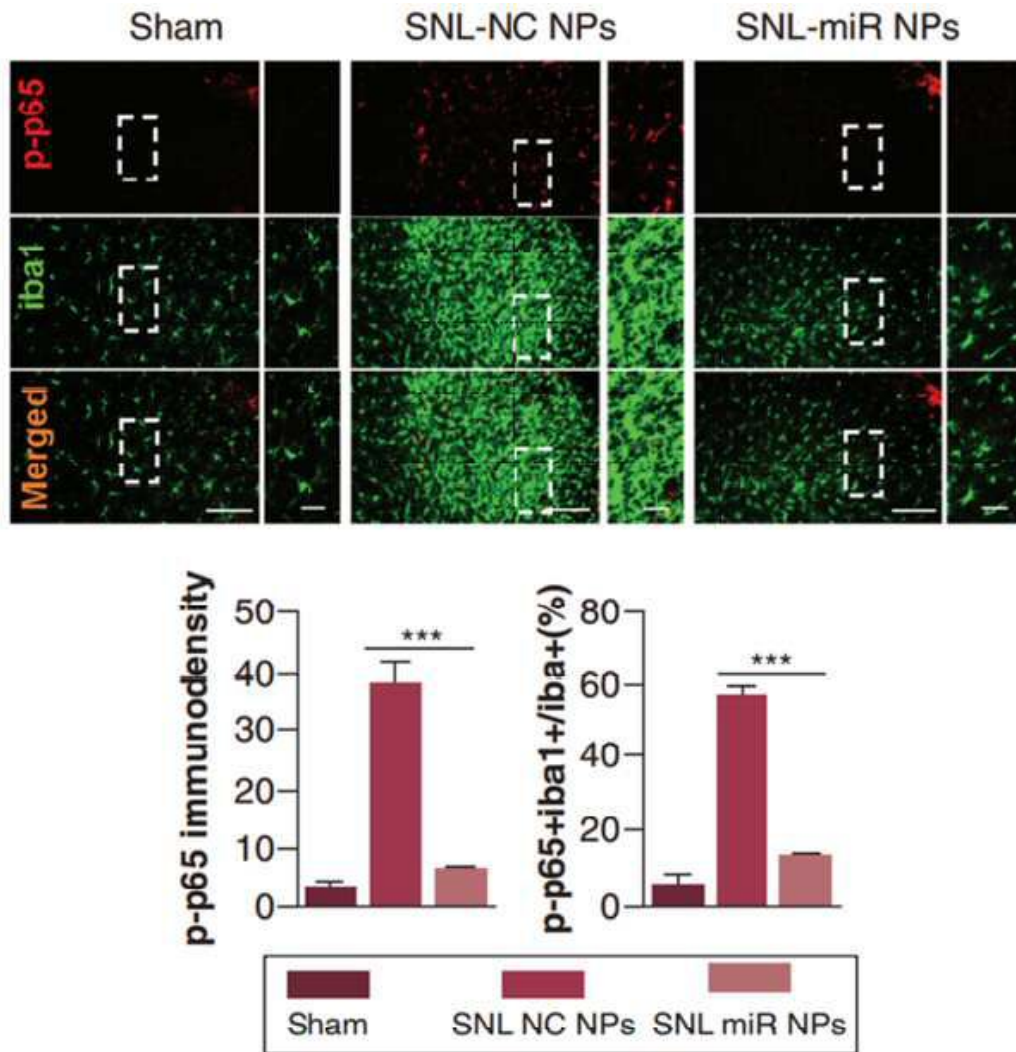
도면4c



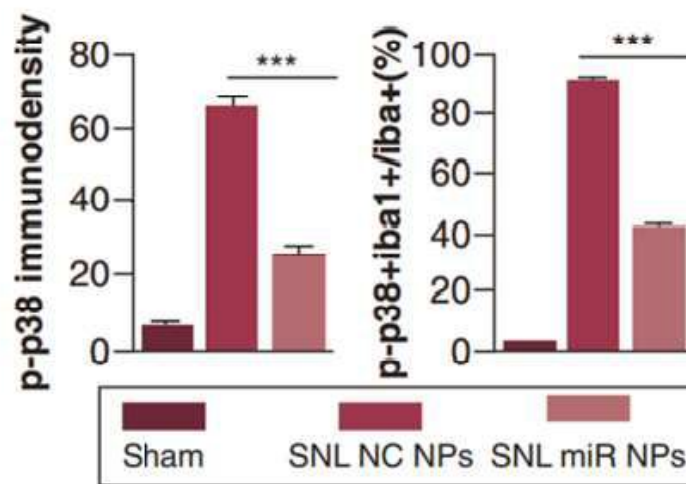
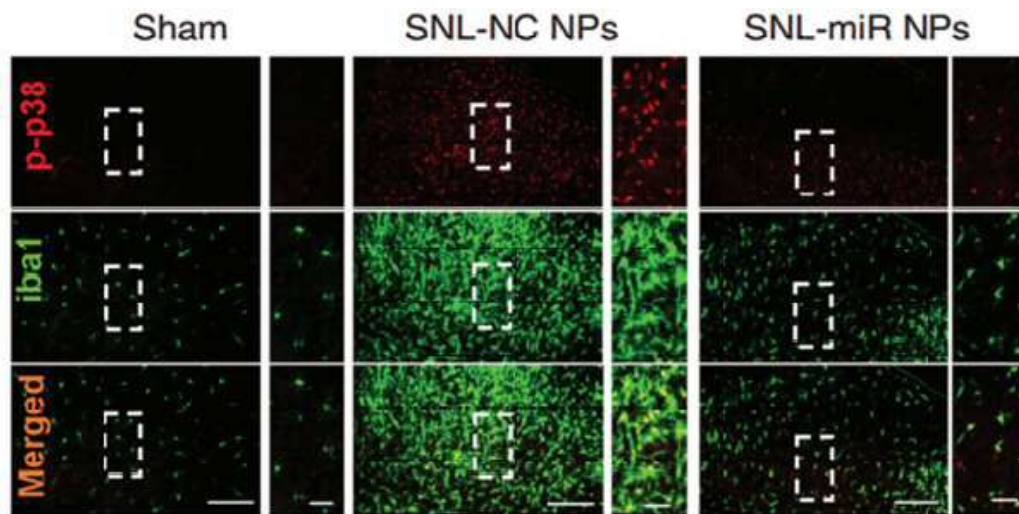
도면4d



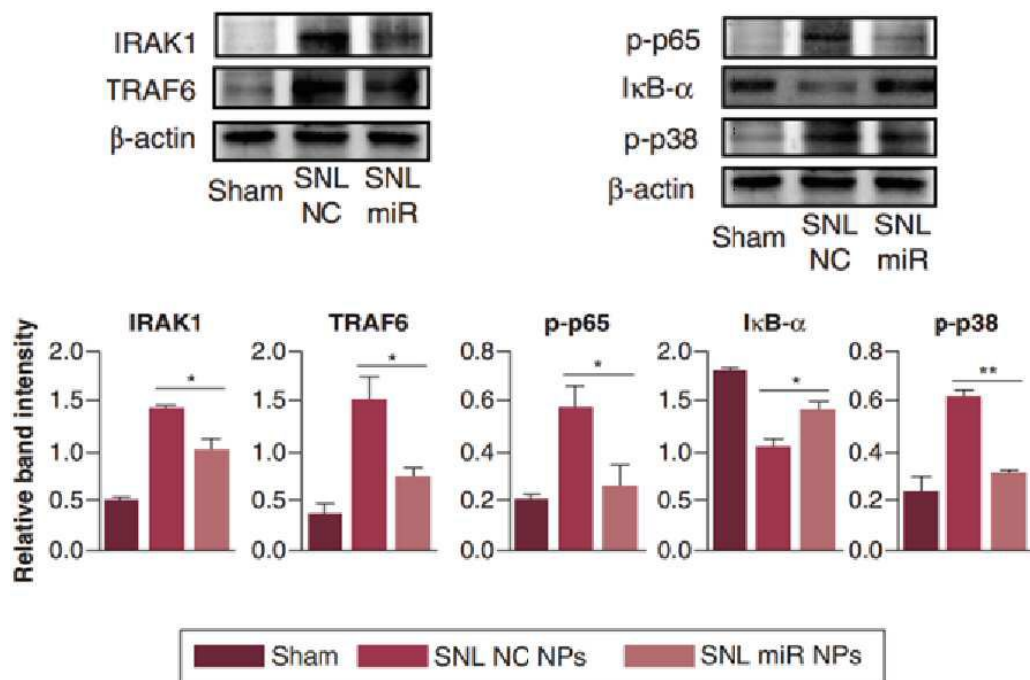
도면4e



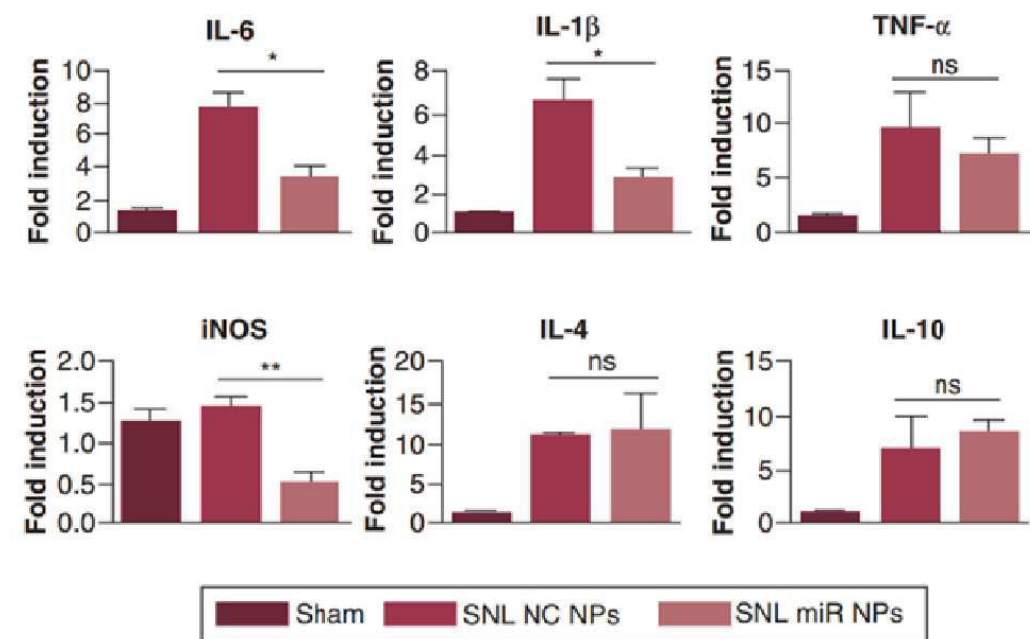
도면4f



도면5a



도면5b



서열 목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> Nanoparticle comprising agent that inhibit the expression of inflammatory gene and uses thereof
- <130> 1-76
- <160> 1
- <170> KoPatentIn 3.0

<210> 1
<211> 22
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> miRNA 146a-5p
<400> 1
ugagaacuga auuccauggg uu

22