

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2022년 1월 13일 (13.01.2022) WIPO | PCT

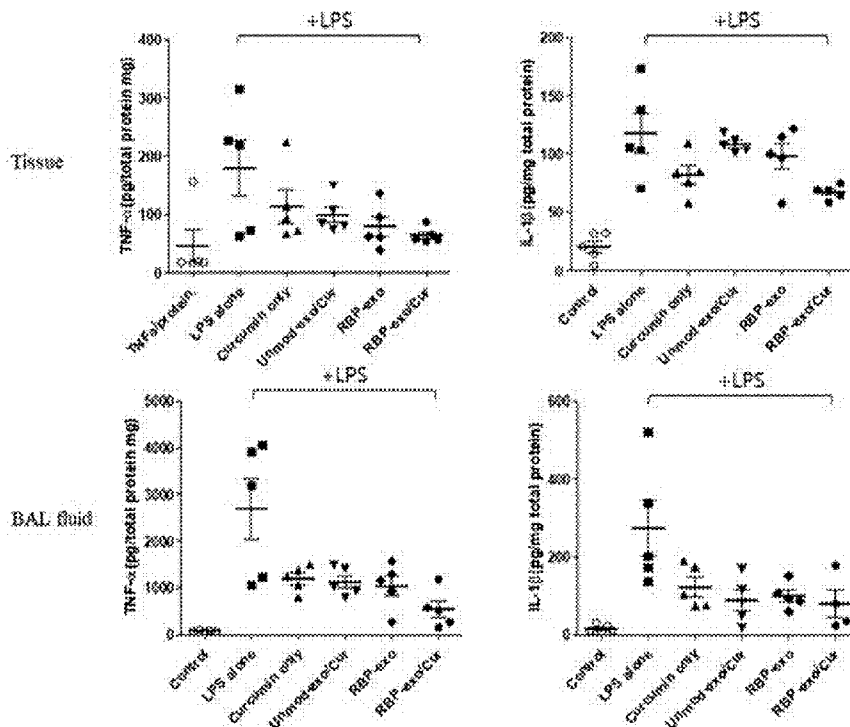


(10) 국제공개번호
WO 2022/010263 A1

- (51) 국제특허분류: *A61K 9/50* (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01) *C07K 14/705* (2006.01)
A61K 47/42 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2021/008664
- (22) 국제출원일: 2021년 7월 7일 (07.07.2021)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2020-0085407 2020년 7월 10일 (10.07.2020) KR
- (71) 출원인: 한양대학교 산학협력단 (IUCF-HYU (INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION HANYANG UNIVERSITY)) [KR/KR]; 04763 서울시 성동구 왕십리로 222, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 이민형 (LEE, Min Hyung); 13836 경기도 과천시 별양로 111, 507-702, Gyeonggi-do (KR). 김경윤 (KIM, Gyeong Yun); 15002 경기도 시흥시 진발로 46, 109-401, Gyeonggi-do (KR). 김민경 (KIM, Min Kyung); 02084 서울시 중랑구 신내로7나길 24, 211-2202, Seoul (KR). 이영기 (LEE, Young Ki); 04805 서울시 성동구 용답중앙25길 1, 5층, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 아이시스 (ISIS IP LAW LLC); 06160 서울시 강남구 테헤란로63길 14, 8층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK,

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING PEPTIDE-BOUND RECOMBINANT EXOSOMES FOR PREVENTING OR TREATING INFLAMMATION-MEDIATED DISEASES CAUSED BY RAGE OVEREXPRESSION

(54) 발명의 명칭: 펩타이드가 결합된 재조합 엑소솜을 포함하는 RAGE 과발현에 의한 염증 매개 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to: a pharmaceutical composition containing peptide-bound recombinant exosomes for preventing or treating inflammation-mediated diseases caused by RAGE overexpression; and a pharmaceutical preparation comprising the composition. According to the present invention, exosomes bound to a RAGE-targeting peptide specifically bind to RAGE to inhibit RAGE-mediated signaling pathways, and thus exosomes themselves exhibit anti-inflammatory effects and treatment effects on inflammation-mediated diseases, and more synergistic effects could be achieved by encapsulating an appropriate treatment drug in the exosomes. Therefore, it is expected that exosomes according to the present invention can be developed into a therapeutic agent

MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

exhibiting excellent treatment effects on the inflammation-mediated diseases for which there is no non-cytotoxic, safe, economical, and effective treatment.

(57) 요약서: 본 발명은 펩타이드가 결합된 재조합 엑소솜을 포함하는 RAGE 과발현에 의한 염증 매개 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 상기 조성물을 포함하는 약학 제제에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, RAGE를 표적하는 펩타이드가 결합된 엑소솜은 RAGE에 특이적으로 결합함으로써 RAGE 매개 신호전달경로를 억제하여 자체적으로 항염증 효과 및 염증 매개 질환에 대한 치료효과를 나타내며, 상기 엑소솜에 적절한 치료 약물을 봉입함으로써 보다 상승적 치료효과를 달성할 수 있는바, 본 발명에 따른 상기 엑소솜은 세포독성이 없는 안전하고 경제적이며 효과적인 치료법이 없는 상기 염증 매개 질환에 대한 우수한 치료효과를 나타내는 치료제로써의 개발이 가능할 것으로 기대된다.

명세서

발명의 명칭: 펩타이드가 결합된 재조합 엑소좀을 포함하는 RAGE 과발현에 의한 염증 매개 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 기술분야

- [1] 본 발명은 펩타이드가 결합된 재조합 엑소좀을 포함하는 RAGE 과발현에 의한 염증 매개 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 상기 조성물을 포함하는 약학 제제에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 최종당화산물 수용체(receptor for advanced glycation endproducts, RAGE)란 면역글로불린 계열에 속하는 다양한 종류의 리간드와 결합하는 세포막 다중수용체(multiligand receptor)로서, 다른 다중 수용체와는 달리 이에 결합하는 다양한 종류의 리간드가 모두 세포내 생성물이라는 특징이 있다. RAGE에 결합하는 리간드는 세포 내에서 비효소적으로 당화가 일어난 물질로서, RAGE에 결합하는 리간드의 종류에 따라 매개하는 질환이 달라지는 것으로 알려져 있다. RAGE는 정상 상태에서는 발현수준이 낮지만, 리간드가 RAGE에 결합하면 수용체 의존적 신호전달에 의해 세포에서 지속적으로 세포활성화가 유도되고, 리간드의 농도가 높으면 세포막의 RAGE의 발현이 상향 조절된다. 이러한 상향 조절에 의해 RAGE 의존성 세포내 반응이 지속되며, 결과적으로 당뇨병, 당뇨병병증, 아밀로이도시스(Amyloidosis), 면역/염증반응, 만성 신장질환 및 암과 같은 다양한 질환을 매개하는 것으로 알려져 있다.
- [3] RAGE 매개 면역/염증반응과 관련하여, 중요한 리간드로는 최종당화산물(advanced glycation endproducts; AGE), S100/calgranulins 및 amphoterin이 알려져 있다. AGE와 RAGE 사이의 상호작용은 염증관련 유전자들의 활성화를 촉진하는 것으로 잘 알려져 있으며, S100/calgranulins는 밀접하게 연관되어 있는 칼슘결합 폴리펩타이드 패밀리로 RAGE와의 상호작용은 염증반응 매개에서 주요 축을 담당하며 IL-12 및 TNF- α 를 활성화시켜 염증반응의 개시에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 또한, 당뇨병 환자 등 다양한 질병의 환자군에서 RAGE의 수준이 높게 관찰되는 것으로부터, RAGE가 이러한 질병들에서 염증 유발에 핵심적인 역할을 수행하는 것으로 보고되어 있다. 예컨대, RAGE의 리간드 중 하나인 HMGB1이 허혈성 심근경색 등의 허혈성 질환에서 조직 손상, 괴사에 중요한 역할을 한다고 보고되었으며, 허혈성 뇌졸중 환자의 혈청에서도 HMGB1의 농도가 높게 나타나고 중뇌대동맥 폐색을 유발시킨 허혈성 뇌졸중 마우스 모델에서 HMGB1이 핵에서 세포질로 분비된다고 알려져 있다. 뿐만 아니라 패혈증, 당뇨병을 포함한 만성 신장질환, 급성호흡곤란증후군 등에서 RAGE가 이들 질환의 병태생리기전과 밀접하게 연관되어 있으며, 이들 질환의 치료 표적으로 주목 받고 있다.

- [4] 이러한 측면에서, RAGE에 의한 다양한 염증 매개 질환의 발병을 억제하기 위하여, RAGE에 결합하여 RAGE 매개 신호전달경로를 억제하기 위한 연구들이 진행되어오고 있다. 예를 들어, RAGE의 막투과 도메인 및 세포질 도메인이 결합된 sRAGE(가용성 RAGE)를 이용한 심근염 예방 또는 치료용도(대한민국 공개특허공보 제2013-0082474호) 및 RAGE에 특이적으로 결합하는 항체를 사용하는 치료기술 등이 보고되었다. 그러나, 상기 선행기술들은 큰 분자량을 갖는 거대 단백질들에 기반한 것으로서, 상대적으로 안정성이 떨어질 뿐만 아니라, 모두 RAGE의 신호전달과정만을 억제하기 위한 것이다.
- [5] 따라서 RAGE를 표적하여 RAGE 매개 신호전달과정을 억제하는 것뿐만 아니라 대상질환에 대한 치료물질을 함께 이용하여 보다 상승적인 치료효과를 달성할 수 있는 혁신적인 치료제의 개발이 필요하다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 상기와 같은 배경하에, 본 발명자들은 RAGE에 특이적으로 결합하여 RAGE-매개 신호전달 경로를 억제할 수 있으면서 대상 질환에 대한 치료약물을 봉입할 수 있는 제조합 엑소좀을 제작하였고, 상기 엑소좀은 그 자체로 항염증 효과 및 상기 염증 매개 질환에 대한 치료효과를 나타내며 치료약물을 봉입하는 경우 상승적 치료효과를 달성할 수 있음을 확인하였는바, 이로써 본 발명을 완성하였다.
- [7] 이에, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드가 결합된 엑소좀을 유효성분으로 포함하는, RAGE 과발현에 의한 염증 매개 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 상기 조성물을 포함하는 약학 제제를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [8]
- [9] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [10] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드가 결합된 엑소좀을 유효성분으로 포함하는, RAGE(receptor for advanced glycation endproducts) 과발현에 의한 염증 매개 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [11] 본 발명의 일구현예로, 상기 펩타이드는 RAGE에 특이적으로 결합하는 것일 수 있다.
- [12] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 엑소좀은 상기 펩타이드를 암호화하는 플라스미드 벡터를 세포에 형질감염시킨 후 상기 세포를 배양하여 수득된 것일 수 있다.

- [13] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 배양은 10일 내지 20일 동안 이루어지는 것일 수 있다.
- [14] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 약학적 조성물은 약물을 더 포함할 수 있다.
- [15] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 약물은 엑소좀 내부에 봉입되는 것일 수 있다.
- [16] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 약물은 화합물, 바이오약물, 핵산, 펩타이드, 단백질, 천연물, 호르몬, 조영제, 항체 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것일 수 있다.
- [17] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 RAGE 과발현에 의한 염증 매개 질환은 급성폐손상, 급성호흡곤란증후군, 폐렴, 천식, 허혈성 뇌질환, 허혈성 심근경색, 뇌종양, 패혈증, 당뇨병 및 당뇨병성 신장질환으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것일 수 있다.
- [18] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는, RAGE(receptor for advanced glycation endproducts) 과발현에 의한 염증 매개 질환의 예방 또는 치료용 약학 제제를 제공한다.
- [19] 본 발명의 일구현예로, 상기 제제는 주사제형, 주입제형 또는 분무제형인 것일 수 있다.
- [20] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드가 결합된 엑소좀을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, RAGE 과발현에 의한 염증 매개 질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [21] 또한, 본 발명은 상기 약학적 조성물의, RAGE 과발현에 의한 염증 매개 질환 예방 또는 치료용도를 제공한다.

발명의 효과

- [22] 본 발명에 따르면, RAGE를 표적하는 펩타이드가 결합된 엑소좀은 RAGE에 특이적으로 결합함으로써 RAGE 매개 신호전달경로를 억제하여 자체적으로 항염증 효과 및 염증 매개 질환에 대한 치료효과를 나타내며, 상기 엑소좀에 적절한 치료 약물을 봉입함으로써 보다 상승적 치료효과를 달성할 수 있는바, 본 발명에 따른 상기 엑소좀은 세포독성이 없는 안전하고 경제적이며 효과적인 치료법이 없는 상기 염증 매개 질환에 대한 우수한 치료효과를 나타내는 치료제로써의 개발이 가능할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [23] 도 1은 RBP-Lamp2b 및 hygromycin 저항 유전자가 삽입된 플라스미드 DNA의 구조 및 서열을 도시한 것이다.
- [24] 도 2는 도 1의 플라스미드를 형질감염시킨 세포가 RBP가 결합된 엑소좀(RBP-엑소좀)을 생산하는지 여부를 검증하기 위해 웨스턴 블롯을 실시한 결과이다(Unmod-exo; 정상세포에서 분리된 일반적 엑소좀, RBP-exo:

RBP-엑소좀).

- [25] 도 3a는 본 발명에 따른 RBP-엑소좀의 크기 및 제타전위를 동적 광산란법으로 측정한 결과이다.
- [26] 도 3b는 일반 엑소좀 및 본 발명에 따른 RBP-엑소좀에 대한 주사전자현미경(SEM) 이미지를 나타낸 것이다.
- [27] 도 4는 본 발명에 따른 RBP-엑소좀의 항염증 효과를 평가하기 위해, Raw264.7 세포에 LPS를 처리하고 상기 엑소좀을 농도별(1, 3, 5, 10, 20 μ g)로 처리한 후 염증유발 인자인 TNF- α 의 농도를 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- [28] 도 5는 급성폐손상 마우스 모델의 기관 내로 LPS를 처리하고 2시간 후 RBP-엑소좀을 비롯한 각 물질을 폐에 주입한 후 다음날 마우스의 기관지폐포세척액(BAL fluid) 및 폐 조직(Tissue)을 수집하여 TNF- α 및 IL-1 β 농도를 측정한 결과이다(Control: 음성대조군, LPS alone: LPS 단독 처리군, Curcumin only: 커큐민 단독 처리군, Unmod-exo-Cur: 커큐민이 봉입된 일반 엑소좀 처리군, RBP-exo: RBP-엑소좀 단독 처리군, RBP-exo/Cur: 커큐민이 봉입된 RBP-엑소좀 처리군).
- [29] 도 6은 상기 도 5에서 수집한 각 마우스 유래 폐 조직에 대하여 H&E 염색을 실시한 결과이다.
- [30] 도 7은 신경세포에 일반 엑소좀(Unmod-exo), 본 발명에 따른 RBP-엑소좀(RBP-exo) 및 높은 양전하를 띠는 물질인 PEI25k를 각각 처리하고 세포 생존율(Cell viability)을 측정하여 세포독성 여부를 분석한 결과이다.
- [31] 도 8은 저산소 환경에서 배양한 신경세포에 일반적 엑소좀 또는 RBP-엑소좀을 처리한 후 FACS를 통해 RAGE의 발현수준을 측정한 결과이다.
- [32] 도 9는 마우스에 중뇌동맥 폐색을 유도하여 허혈성 뇌졸중 모델을 제작하고 모델이 성공적으로 제작되었는지 여부를 확인하기 위해 laser Doppler 분석을 통해 시간 흐름에 따른 대뇌혈류 변화를 측정한 결과이다.
- [33] 도 10은 상기 도 9의 허혈성 뇌졸중 마우스 모델에 각 물질을 처리하고 24시간 후 뇌를 적출하여 제작한 뇌 조직 절편을 이용해 면역조직화학염색을 실시하여 TNF- α 의 발현수준을 분석한 결과이다(Control: 음성대조군 마우스 유래 조직, MCAO: 허혈성 뇌졸중 마우스 유래 조직, Naked-AMO: 엑소좀에 봉입되지 않은 anti-miRNA oligonucleotide 투여 마우스 유래 조직, Unmod-EXO: AMO가 봉입된 일반적 엑소좀 투여 마우스 유래 조직, RBP-EXO: AMO가 봉입된 RBP-엑소좀 투여 마우스 유래 조직).
- [34] 도 11은 상기 도 10의 실험을 수행한 다음, 3일이 경과했을 때, TNF- α 의 발현을 확인한 결과이다.
- [35] 도 12는 상기 도 9의 허혈성 뇌졸중 마우스 모델에서 면역조직화학염색을 수행하여 RAGE 발현수준을 분석한 결과이다.
- [36] 도 13은 상기 도 10과 동일한 뇌 조직 절편을 이용해 면역조직화학염색을 실시하여 Bcl-2의 발현수준을 분석한 결과이다.

[37] 도 14는 상기 도 10과 동일한 뇌 조직 절편을 이용해 TUNEL 어세이를 실시한 결과이다.

[38] 도 15은 상기 도 9의 허혈성 뇌졸중 마우스 모델에 각 물질을 처리하고 3일이 경과한 다음, 뇌경색 감소 효과를 확인한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[39] 본 발명자들은 RAGE에 특이적으로 결합하여 RAGE-매개 신호전달 경로를 억제할 수 있으면서 대상 질환에 대한 다양한 치료약물을 봉입할 수 있는 RAGE를 특이적으로 표적하는 펩타이드가 결합된 엑소솜을 제작하고, 이의 우수한 항염증 및 염증 매개 질환의 치료효과를 확인하였다.

[40] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[41] 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드가 결합된 엑소솜을 유효성분으로 포함하는, RAGE(receptor for advanced glycation endproducts) 과발현에 의한 염증 매개 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[42] 또한, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 포함하는, RAGE 과발현에 의한 염증 매개 질환의 예방 또는 치료용 약학 제제를 제공한다.

[43] 본 발명에서 사용되는 용어, "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 RAGE 과발현에 의한 염증 매개 질환을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[44] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 RAGE 과발현에 의한 염증 매개 질환에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[45] 본 발명에 있어서, 상기 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것으로서, 세포막에 발현된 RAGE에 특이적으로 결합하는 기능을 갖는다. 이때, 상기 펩타이드는 상기 서열번호 1의 아미노산 서열과 각각 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수도 있다.

[46] 본 발명에서, 상기 "엑소솜(exosome)"이란 다양한 세포들로부터 분비되는 막 구조의 작은 소낭으로서, 다낭체와 원형질막의 융합이 일어나 세포 밖 환경으로 방출되는 소낭을 의미한다. 상기 엑소솜은 세포로부터 자연적으로 분비된 것이거나 또는 인공적으로 분비된 것 모두를 포함한다.

[47] 본 발명에 있어서, 상기 엑소솜은 상기 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 암호화하는 플라스미드 벡터를 세포에 형질감염시킨 후 상기 세포를 배양하여 수득된 것일 수 있다. 바람직하게 상기 플라스미드 벡터는 RBP-Lamp2b 및 하이그로마이신(hygromycin) 저항 유전자를 포함하는 것일 수 있다.

- [48] 상기 플라스미드 벡터를 세포에 형질감염시키는 방법은 특별히 제한되지 않고 당업자가 해당 기술분야의 공지된 방법을 선택적으로 적용하여 수행할 수 있으며, 바람직하게 본 발명에서는 리포솜(liposome)을 이용해 형질감염을 실시하였다.
- [49] 상기 배양은 세포의 종류에 따라 당업자가 해당 기술분야에 공지된 방법으로 적절한 배양 조건을 설정할 수 있으며, 배양 기간은 10일 내지 20일 동안 이루어질 수 있고, 바람직하게는 10일 내지 18일, 더욱 바람직하게는 12일 내지 16일, 가장 바람직하게는 14일 동안 이루어질 수 있으나, 상기 세포의 종류 및 배양 조건에 따라 당업자가 적절히 조절할 수 있다.
- [50] 본 발명에 따른 상기 약학적 조성물은 치료하고자 하는 대상 질환에 대한 약물(drug)을 추가로 포함할 수 있으며, 이때 상기 약물은 본 발명에 따른 펩타이드가 결합된 엑소솜 내부에 봉입될 수 있다.
- [51] 상기 약물은 화합물 약물(chemical drug), 바이오 약물(biologics), 핵산 약물(nucleic acid drug), 펩타이드 약물(peptide drug), 단백질 약물(protein drug), 천연물 약물(natural product drug), 호르몬(hormone), 조영제(contrast agent), 항체(antibody) 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것일 수 있다.
- [52] 상기 "바이오 약물"은 (오리지널) 생물학적 치료제(biologics) 및 바이오제네릭(biologics), 바이오베터(biobetters), 바이오서피어리어(biosuperiors) 등 다양한 바이오 의약품을 의미한다. 상기 바이오 약물은 생물학적 기원으로부터 제조, 분비 또는 반합성된 임의의 약물을 의미하며, 백신, 혈액 제제, 항원, 세포 제제, 유전자 치료제, 줄기세포 등을 모두 포함하며 이에 제한되지는 않는다.
- [53] 본 발명에 있어서, 상기 약물은 바람직하게는 소수성 항염증제, 소수성 천연약물, 소핵산 약물, 소수성 항암제 또는 항염증 펩타이드 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [54] 본 발명에 있어서, 상기 상기 RAGE 과발현에 의한 염증 매개 질환은 급성폐손상, 급성호흡곤란증후군, 폐렴, 천식, 허혈성 뇌질환, 허혈성 심근경색, 뇌종양, 패혈증, 당뇨병 및 당뇨병성 신장질환으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [55] 본 발명자들은 구체적인 실시예를 통해 본 발명에 따른 펩타이드가 결합된 엑소솜의 RAGE에 대한 특이성 및 이를 통한 항염증 및 염증 매개 질환의 치료효과를 확인하였다.
- [56] 본 발명의 일실시예에서는, 상기 펩타이드를 암호화하는 플라스미드 벡터를 세포에 형질감염시키고 상기 세포를 배양함으로써 RAGE에 특이적으로 결합하는 펩타이드(RBP)가 표면에 발현된 형태의 엑소솜을 수득하였고, 이의 물리적 특성을 확인하였다(실시예 1 참조).
- [57] 본 발명의 다른 실시예에서는, Raw264.7 세포에 염증을 유발하는 LPS를

처리한 후 본 발명에 따른 RBP가 결합된 엑소솜을 농도별로 처리하여 상기 엑소솜 자체로도 RAGE를 표적함으로써 항염증 효과를 나타내는 것을 확인하였다(실시예 2 참조).

[58] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 본 발명에 따른 RBP가 결합된 엑소솜이 실제로 RAGE의 과발현에 의한 염증 매개 질환의 한 종류인 급성폐손상에 대한 치료효과가 있는지 평가하기 위해, 급성폐손상 마우스 모델의 폐로 상기 엑소솜을 주입하고 이후 기관지폐포세척액 및 폐 조직을 수집하여 치료효과를 분석하였다. 그 결과, 상기 엑소솜이 단독으로 주입된 군에서 유의한 치료효과가 나타났으며, 더욱이 상기 엑소솜에 항염증 천연약물인 커큐민을 봉입하여 처리한 군에서는 보다 높은 치료효과가 나타나는 것을 확인하였다(실시예 3 참조).

[59] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, RAGE의 과발현에 의한 염증 매개 질환의 또 다른 일례로 허혈성 뇌졸중에서 본 발명에 따른 RBP가 결합된 엑소솜의 치료효과를 검증하였다. 구체적으로, 신경세포에 상기 RBP가 결합된 엑소솜을 처리한 결과 예민한 신경세포에서도 상기 엑소솜이 세포독성을 유발하지 않는 것을 확인하였고, 허혈성 뇌졸중과 유사한 저산소 조건에서 배양한 신경세포에 본 발명에 따른 상기 엑소솜을 처리할 경우 RAGE의 발현이 현저히 감소하는 것을 알 수 있었다(실시예 4-1 참조). 나아가 허혈성 뇌졸중 마우스 모델을 이용해 본 발명에 따른 엑소솜의 허혈성 뇌졸중 치료효과를 조직학적 분석을 통해 검증한 결과, 상기 엑소솜에 약물을 봉입하여 처리함으로써 우수한 치료효과가 나타남을 확인하였다(실시예 4-2 참조).

[60] 상기 본 발명의 실시예 결과들로부터, 본 발명에 따른 RBP가 결합된 엑소솜은 세포독성을 유발하지 않으면서 RAGE 발현세포에 대한 높은 특이성을 통해 그 자체로도 항염증 효과 및 염증 매개 질환의 치료효과를 나타내며, 엑소솜 내부에 약물을 봉입하여 함께 처리하는 경우 상승적 치료효과를 달성할 수 있음을 알 수 있다.

[61] 본 발명에 따른 상기 약학적 조성물은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드가 결합된 엑소솜을 유효성분으로 포함하며, 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 사이클로덱스트린, 덱스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포솜 등을 포함하지만 이에 한정되지 않으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액 등 다른 통상의 첨가제를 더 포함할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제, 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제화에 관해서는 레밍턴의 문헌에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 제형에 특별한 제한은 없으나 주사제형, 주입제형, 분무제형, 흡입제형

또는 피부 외용제 등으로 제제화할 수 있다.

[62] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내, 비강 내, 흡입 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[63] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료 또는 진단에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료 또는 진단하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 다른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[64] 구체적으로 본 발명의 약학적 조성물의 유효량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에 활성 성분의 흡수도, 불활성률 및 배설속도, 질병종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1kg 당 0.001 내지 150mg, 바람직하게는 0.01 내지 100mg을 매일 또는 격일 투여하거나, 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감 될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[65] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 RAGE 과발현에 의한 염증 매개 질환 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[66] 본 발명에서 "개체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말 및 소 등의 포유류를 의미한다.

[67] 또한, 본 발명은 상기 약학적 조성물의 RAGE 과발현에 의한 염증 매개 질환 예방 또는 치료용도를 제공한다.

[68]

[69] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[70]

[71] **[실시예]**

[72] **실시예 1. RBP-엑소좀 제작 및 특성 확인**

- [73] 본 발명자들은 RAGE에 특이적으로 결합하는 펩타이드(RAGE-binding peptide; RBP)가 표면에 결합된 엑소솜(이하, RBP-엑소솜)을 제조하고, 이의 효능을 평가하고자 하였다.
- [74] 먼저, 상기 RBP-엑소솜을 제조하기 위하여, HEK293T 세포를 10% Fetal Bovine Serum(FBS)(v/v)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다. 다음으로 175mm² 넓이의 세포 배양 플라스크에 상기 배양된 세포를 분주하고 배양 면적의 약 70% 정도 증식하였을 때 배지를 FBS가 함유되지 않은 DMEM으로 교체한 후 Lipofectamine 2000(Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 RBP-Lamp2b 및 hygromycin 저항 유전자가 삽입된 플라스미드 벡터를 형질감염시켜 세포 내로 도입하였다. 상기에서 이용한 플라스미드 벡터의 구조 및 RBP 서열(서열번호 1)은 도 1에 그림으로 도시하였다. 상기 형질감염을 진행하고 4시간 후 배지를 10% FBS와 200 μ g/ml의 hygromycin이 포함된 DMEM으로 교체한 후 2주 동안 배양을 진행하였다. 이후 생존한 세포들은 여러 개의 플라스크로 나눠서 배양하였고, 웨스턴 블롯(western blot)을 실시하여 도 2에서 볼 수 있는 바와 같이 RBP와 연결된 HA 태그의 발현 여부를 통해 RBP-엑소솜(RBP-exo)이 생산된 것을 확인하였다. 이어서 상기 과정에 따라 제조된 RBP-엑소솜을 분리하는 세포주의 배양액(DMEM)에는 상기 엑소솜이 다량 함유되어 있는바, exoEasy Maxi kit(Qiagen사 제품)를 이용해 상기 배양액에서 엑소솜을 정제하고 이의 농도를 정량적으로 측정하였다.
- [75] 나아가 상기에서 제조된 RBP-엑소솜의 물리적 특성을 분석하기 위하여, 나노 사이즈 물질의 수용체 내 크기와 표면 전하를 확인할 수 있는 동적 광산란(dynamic light scattering) 측정을 진행하였다. 그 결과, 도 3a에 나타낸 바와 같이 RBP-엑소솜의 크기는 31.62nm $\pm$ 13.67이며, -8.19 mV $\pm$ 2.50의 음전하를 띠는 것을 확인하였다. 상기 결과는 일반적인 엑소솜(Unmod-exo)의 물리적인 특성과 유사한 것임을 알 수 있었으며, 도 3b에서 볼 수 있는 바와 같이 주사전자현미경(SEM)을 통해 RBP-엑소솜(RBP-exo)을 시각적으로도 확인하였다.
- [76]
- [77] **실시예 2. RBP-엑소솜의 항염증 효과 확인**
- [78] 본 발명에 따른 RBP-엑소솜은 RAGE에 결합하는 펩타이드가 엑소솜의 표면에 존재하는 것으로, 상기 RAGE는 면역/염증반응에서 중요한 역할을 하며, 해당 리간드와의 상호작용은 IL-12와 TNF- α 를 활성화시켜 염증반응의 개시에 있어 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 따라서 본 발명의 RBP-엑소솜이 RAGE에 특이적으로 결합하여 RAGE 매개 신호전달경로를 억제함으로써 항염증 효과를 유도할 수 있는지 여부를 알아보하고자 하였다.
- [79] 이를 위해, Raw264.7 세포에 LPS(lipopolysaccharide)를 처리하여 염증반응을 유도하고, RBP-엑소솜(RBP-exo)을 농도별로 처리한 후 TNF- α 의 농도를 측정하였다. 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이 RBP-엑소솜 자체는

음성대조군(control)과 유사한 수준으로 그 자체로는 세포독성을 유발시키지 않는 것으로 나타났으며, LPS만 처리한 군에 비하여 RBP-엑소솜을 처리한 군에서 TNF- α 의 농도가 감소하는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 RBP-엑소솜 표면의 RBP가 RAGE를 발현하는 세포를 표적하여 이에 특이적으로 결합하고 이의 활성을 억제함으로써 NF- κ B의 감소를 통해 항염증 효과가 유도됨을 시사하는 것이다.

[80]

[81] **실시예 3. RBP-엑소솜의 급성폐손상 치료효과 확인**

[82] 본 발명자들은 본 발명에 따른 RBP-엑소솜이 실제로 *in vivo*에서 RAGE의 과발현에 의해 염증반응이 나타나는 질병에 대한 치료효과가 있는지 평가하고자 하였다. 이를 위해, 상기 질병의 일례로 급성폐손상 동물모델을 제작하여 이에 대한 치료효과를 확인하기 위한 실험을 진행하였다. 급성폐손상은 종래 기관 삽관을 통해 인공적으로 폐포에 공기를 넣는 방법으로 치료가 이루어지며, 치사율을 낮추기 위해 다양한 약물 및 이를 전달하기 위한 시스템이 개발되고 있으나, 효율성 독성, 염증세포 특이성 부족 등의 한계점으로 치료에 어려움이 있는 실정이다.

[83] 구체적으로, 본 발명자들은 평균 체중 21g의 수컷 BALB/c 마우스의 기관 내로 20 μ g의 LPS를 처리하고 2시간 후 RBP-엑소솜을 기관 내 주사로 폐에 주입하였다. 이때, RBP-엑소솜 단독뿐만 아니라 상기 엑소솜에 치료물질을 봉입한 경우의 치료효과를 함께 평가하기 위하여 강력한 항염증 효과가 있다고 알려져 있는 소수성 천연약물인 커큐민(Curcumin)이 봉입된 RBP-엑소솜(RBP-exo/Cur) 및 커큐민이 봉입된 일반 엑소솜(Unmod-exo/Cur)을 동일한 조건에서 각각 주입하였다. 다음날, 상기 각 물질이 주입된 마우스로부터 기관지폐포세척액(BAL fluid)과 폐 조직을 수집한 후 ELISA를 실시하였다.

[84] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이 RBP-exo/cur이 주입된 마우스의 경우 폐 조직과 기관지폐포세척액 모두 염증 유발 인자인 TNF- α 및 IL-1 β 의 농도가 LPS가 처리되지 않은 정상 마우스에서와 유사한 수준으로 감소한 것으로 나타났다. 또한, 커큐민이 봉입되지 않은 RBP-엑소솜만을 주입한 경우에도 현저한 항염증 효과가 나타난 것을 알 수 있었다. 더욱이, 상기와 같은 결과는 도 6의 폐 조직을 헤마톡실린&에오신(H&E) 염색을 실시한 조직학적 분석 결과를 통해서도 확인할 수 있었다. 이러한 결과들은 치료물질이 봉입되지 않은 RBP-엑소솜 자체가 급성폐손상에 대한 유의한 치료효과를 나타내며, 항염증 물질인 커큐민을 봉입시킨 경우(RBP-exo/cur)에는 치료 약물의 탑재를 통해 보다 높은 상승적 치료효과를 달성할 수 있는바, 효율적인 치료법이 없는 급성폐손상 환자의 치료 및 생존에 기여할 수 있음을 시사한다.

[85]

[86] **실시예 4. RBP-엑소솜의 뇌졸중 치료효과 확인**

[87] **4-1. 신경세포에 대한 세포독성 및 RAGE 발현 변화 분석**

- [88] 본 발명자들은 급성폐손상과 더불어 RAGE의 과발현에 의한 염증반응이 나타나는 다른 질환에서 RBP-엑소솜 매개 치료효과를 확인하고자 하였으며, 혈전용해제 주사 외에는 FDA 승인을 받은 약물이 없으며, 치료 가능 시간이 최대 4.5시간으로 짧아 손상 조직 특이적인 치료제 개발이 필요한 허혈성 뇌졸중을 대상 질환으로 선정하여 실험을 진행하였다.
- [89] 먼저, 매우 예민한 신경세포에서 본 발명에 따른 RBP-엑소솜이 세포독성을 유발하는지 여부를 알아보기 위해, RBP-엑소솜(RBP-Exo), 일반 엑소솜(Unmod-Exo) 및 매우 높은 (+)전하를 띠는 PEI25k를 신경세포에 각각 처리한 후 세포생존율을 측정하였다. 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이 본 발명에 따른 RBP-엑소솜은 세포독성이 매우 낮은 것을 확인하였다.
- [90] 나아가 뇌졸중과 유사한 허혈성 조건을 위해 1% 산소(O₂) 환경에서 24시간 동안 배양한 신경세포에 상기 두 종류의 엑소솜을 처리한 후 RAGE의 발현수준을 FACS로 분석하였다. 그 결과, 도 8에서 볼 수 있는 바와 같이 정상 조건(Control-Normoxia)과 비교하여 저산소 조건(Control-Hypoxia)에서 RAGE의 발현이 현저히 증가한 것으로 나타난 반면, 저산소 조건으로 배양한 신경세포에 RBP-엑소솜을 처리한 경우에는 RAGE의 발현이 현저히 감소한 것을 확인하였다. 이러한 결과는 과를 통해 RBP-엑소솜이 RAGE 하위의 NF- κ b와 관련된 염증 관련 신호전달경로의 억제를 유도함을 간접적으로 예상할 수 있었다.
- [91]
- [92] **4-2. 동물모델에서 RBP-엑소솜의 뇌졸중 치료효능 분석**
- [93] 이에, 상기 결과를 토대로 하기 방법에 따라 허혈성 뇌졸중 동물모델을 제작하여 RBP-엑소솜의 실질적인 치료효과를 알아보하고자 하였다. 구체적으로, 마우스에 중뇌동맥 폐색(Middle Cerebral Artery occlusion, MCAo)을 유도하여 허혈성 뇌졸중을 유발시키기 위해, Nylon suture의 끝을 녹여서 혈관을 막을 수 있는 head를 일정한 크기로 준비하였고 적절한 마취 조치 후 external carotid artery를 통하여 suture를 약 1.8~2cm 삽입하였다. 수술용 클립과 실을 이용하여 suture 삽입 부분과 전체적인 출혈 부분을 마무리한 후 일정 온도에서 쥐들을 휴식시킨 후 1시간 후에 suture를 제거하여 재관류를 유도해 실제 뇌졸중과 매우 유사한 모델을 제작하였다. 이때, laser doppler 분석을 실시하여 도 9에서 볼 수 있는 바와 같이 허혈성 뇌졸중 동물모델이 성공적으로 제작된 것을 확인하였다. 이후 각 물질을 처리하고 24시간 후에 뇌를 적출하여 조직 절편을 제작하여 치료효과를 분석하였다. 이때, 상기 물질은 항-마이크로RNA 올리고뉴클레오티드(Anti-miRNA oligonucleotide) 단독(Naked-AMO), 상기 AMO가 봉입된 일반 엑소솜(Unmod-EXO), AMO가 봉입된 RBP-엑소솜(RBP-EXO)을 각각 처리하고 결과를 비교하였다.
- [94] 먼저, 면역조직화학염색법을 실시하여 뇌졸중 모델 마우스의 뇌 조직 내에서 염증 유발인자인 TNF- α 의 발현 수준을 분석하였다. 그 결과, 도 10에 나타난

바와 같이 치료핵산이 봉입된 RBP-엑소솜을 처리한군의 경우 TNF- α 의 발현이 현저히 감소한 것을 확인하였다. RBP가 발현되지 않은 일반 엑소솜(Unmod-EXO)의 경우에도 TNF- α 의 발현이 높은 수준으로 감소하였으나, 본 발명에 따른 RBP-엑소솜이 RAGE가 발현되는 저산소 상태의 세포에 특이적으로 작용하여 더욱 높은 항염증 효과를 나타내는 것으로 판단되었다. 상기와 같은 RBP-엑소솜의 현저한 항염증 효과는 도 11에 나타낸 바와 같이, 처리한 다음 3일이 경과한 후에도, TNF- α 의 발현이 낮게 유지되는 것으로 확인되었다.

[95] 상기 도8 에서 확인한 RAGE 발현 감소 효과가 허혈성 뇌졸중 동물모델에서도 동일하게 발생하는지 여부를 확인하기 위하여, RAGE의 발현을 면역조직화학염색법을 통하여 확인하였다. 그 결과, 도 12에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 RBP-엑소솜을 처리한 마우스 그룹에서 다른 실험군에 비해 RAGE 인자의 현저한 발현저하를 확인할 수 있었다.

[96]

[97] 또한, 세포사멸과 관련하여 내인성 경로로 미토콘드리아와 작용하며 세포의 생존과 사멸을 결정하는데 큰 영향을 끼치는 Bcl-2의 발현수준을 면역조직화학염색법으로 관찰한 결과, 도 13에 나타낸 바와 같이 RBP-엑소솜에 치료 핵산을 봉입하여 처리한 군(RBP-EXO)에서 Bcl-2가 가장 높은 수준으로 발현되는 것을 확인하였다. 더욱이, 세포 사멸 시 발생하는 DNA 결절 형성을 이용한 도 14의 TUNEL assay 실험결과에서도 RBP-엑소솜을 이용한 군에서 가장 뛰어난 치료효과 및 낮은 독성으로 인하여 가장 감소된 BrdU 신호를 띠는 것을 확인할 수 있었다.

[98]

[99] 종합적으로 RBP-엑소솜은 낮은 독성을 나타내고 엑소솜 표면에 발현된 RBP로 인해 RAGE 발현세포에 대한 높은 특이성을 보이는바, 염증질환에서 많이 발현되는 RAGE를 효과적으로 표적치료 할 수 있다. 또한, 상기 엑소솜 자체만으로 RAGE를 억제하는 효과를 나타내기 때문에 NF-Kb와 관련 된 여러 염증반응을 억제하는 항염증 효과를 유도할 수 있다. 이를 통해 급성폐손상, 뇌졸중 등 적절한 치료법이 없으며 염증과 관련된 질환에 대한 치료 용도로 이용할 수 있으며, 상기 엑소솜 내부에 치료약물을 봉입함으로써 더욱 높은 수준으로 치료효과를 달성할 수 있음을 알 수 있었다.

[100]

[101] 4-3. RBP-엑소솜의 뇌경색 치료효능 분석

[102] 상기 실시예 4-2에서 제작한 허혈성 뇌졸중 동물모델(MCAO control)에 Unmod-Exo, RBP-Exo 및 PEI25k를 투여한 다음, 실질적인 뇌경색 치료효능을 확인하였다. 구체적으로 상기 물질 및 엑소솜을 투여하고, 3일이 경과한 다음, 구체적인 뇌경색 개선효과를 확인했을 때, 도 15에 나타낸 바와 같이, 본원발명의 RBP-엑소솜(RBP-Exo)가 가장 현저한 효과로 뇌경색을 개선할 수

있음을 확인할 수 있었다.

[103]

[104] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 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.

[105]

산업상 이용가능성

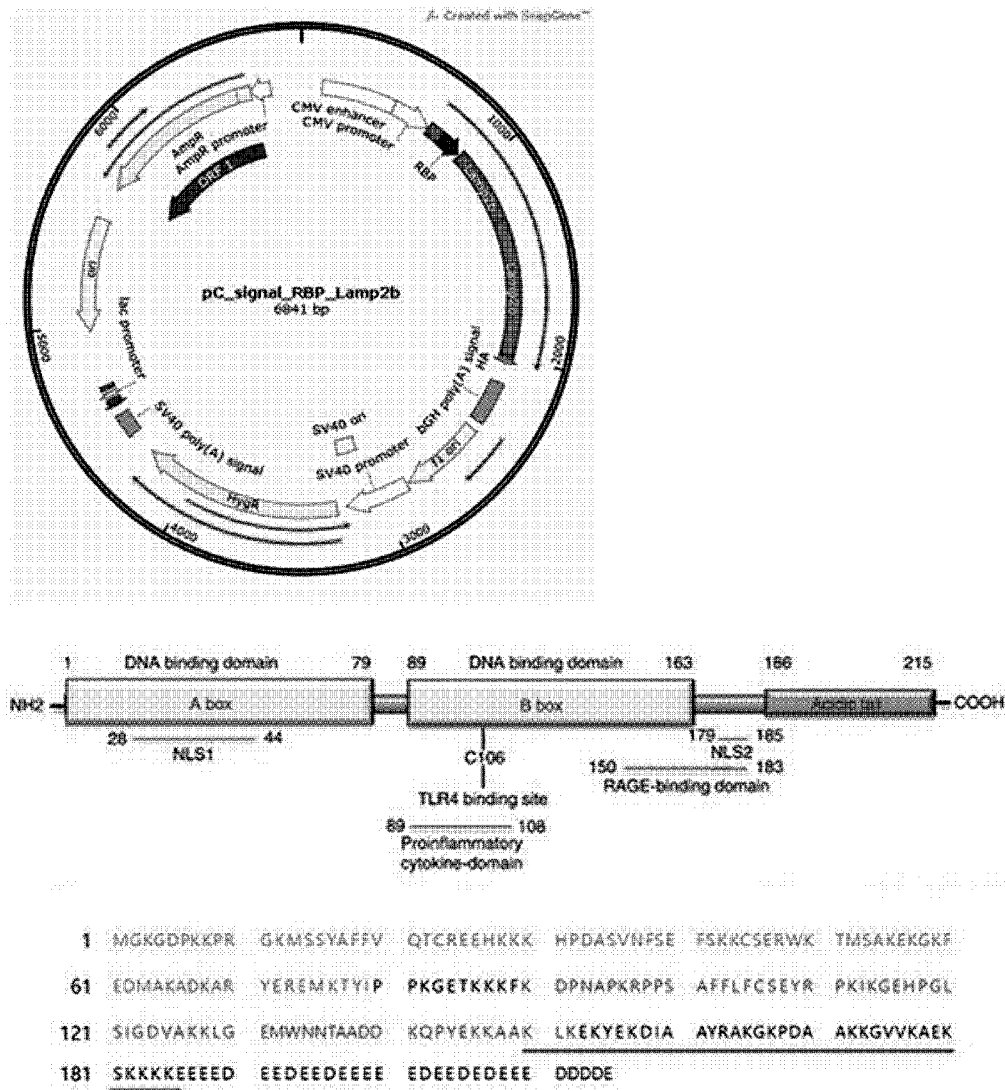
[106]

본 발명에 따르면, RAGE를 표적하는 펩타이드가 결합된 엑소솜은 RAGE에 특이적으로 결합함으로써 RAGE 매개 신호전달경로를 억제하여 자체적으로 항염증 효과 및 염증 매개 질환에 대한 치료효과를 나타내며, 상기 엑소솜에 적절한 치료 약물을 봉입함으로써 보다 상승적 치료효과를 달성할 수 있는바, 본 발명에 따른 상기 엑소솜은 세포독성이 없는 안전하고 경제적이며 효과적인 치료법이 없는 상기 염증 매개 질환의 치료와 관련된 분야에 폭 넓게 활용될 수 있을 것으로 예상된다.

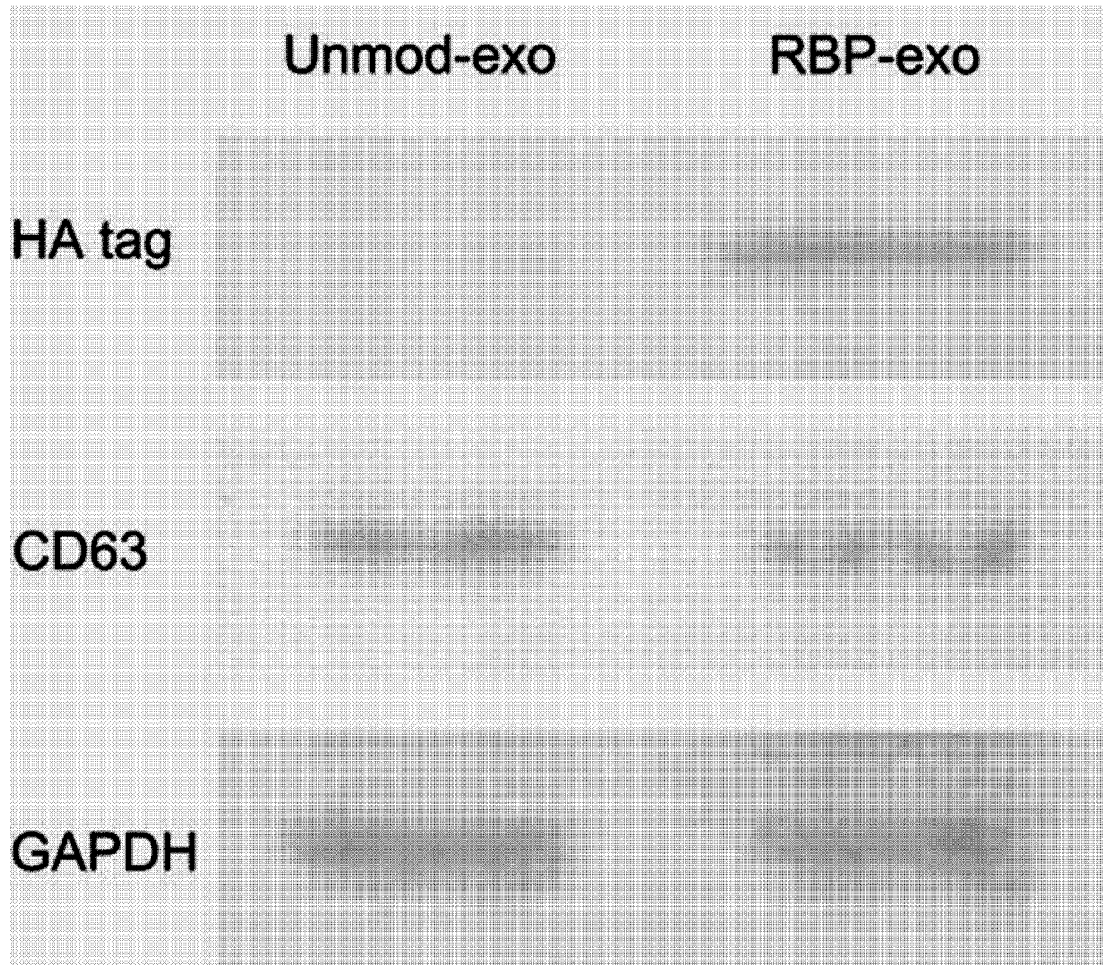
청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드가 결합된 엑소좀을 유효성분으로 포함하는, RAGE(receptor for advanced glycation endproducts) 과발현에 의한 염증 매개 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 펩타이드는 RAGE에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 엑소좀은 상기 펩타이드를 암호화하는 플라스미드 벡터를 세포에 형질감염시킨 후 상기 세포를 배양하여 수득된 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 4] 제3항에 있어서,
상기 배양은 10일 내지 20일 동안 이루어지는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 약학적 조성물은 약물을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 6] 제5항에 있어서,
상기 약물은 엑소좀 내부에 봉입되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 7] 제6항에 있어서,
상기 약물은 화합물, 바이오약물, 핵산, 펩타이드, 단백질, 천연물, 호르몬, 조영제, 항체 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 RAGE 과발현에 의한 염증 매개 질환은 급성폐손상, 급성호흡곤란증후군, 폐렴, 천식, 허혈성 뇌질환, 허혈성 심근경색, 뇌종양, 패혈증, 당뇨병 및 당뇨병성 신장질환으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.
- [청구항 9] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 주사제형, 주입제형 또는 분무제형으로 제제화되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

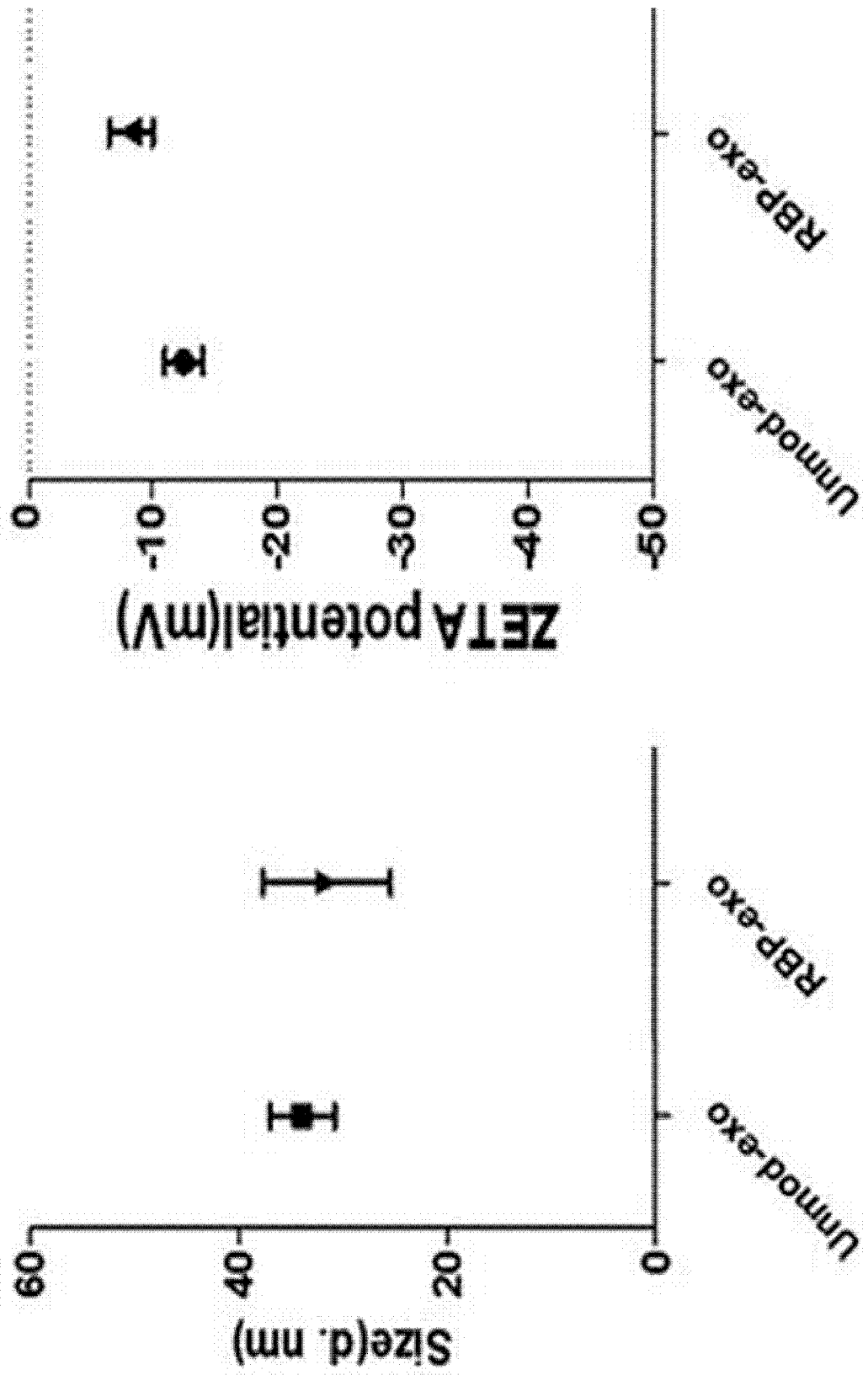
[도1]



[도2]

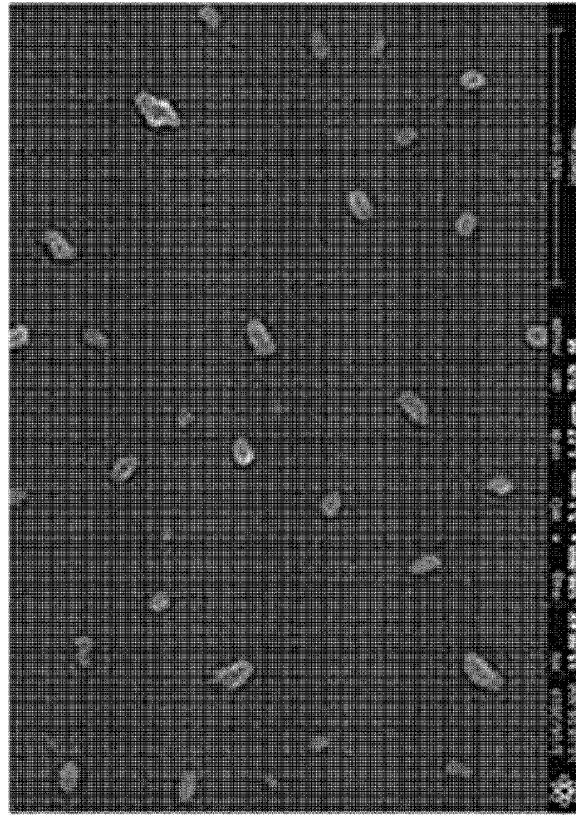


[도3a]

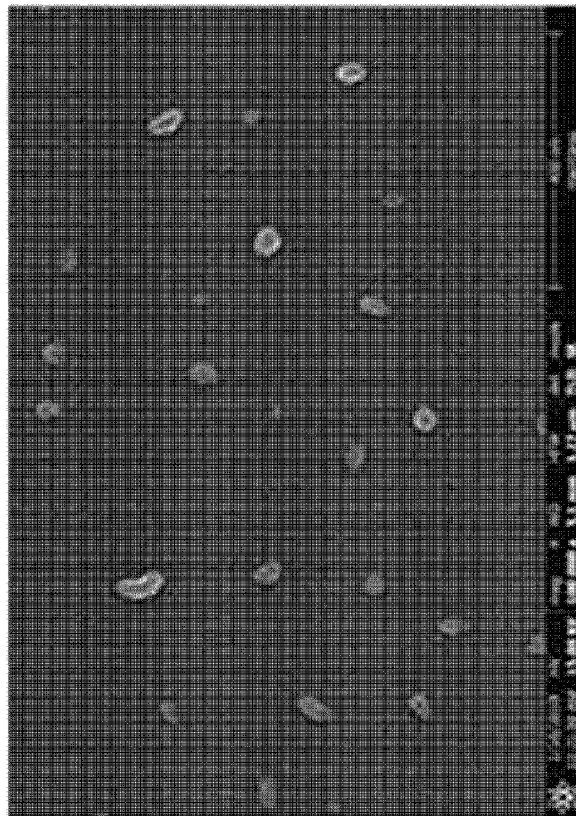


[도3b]

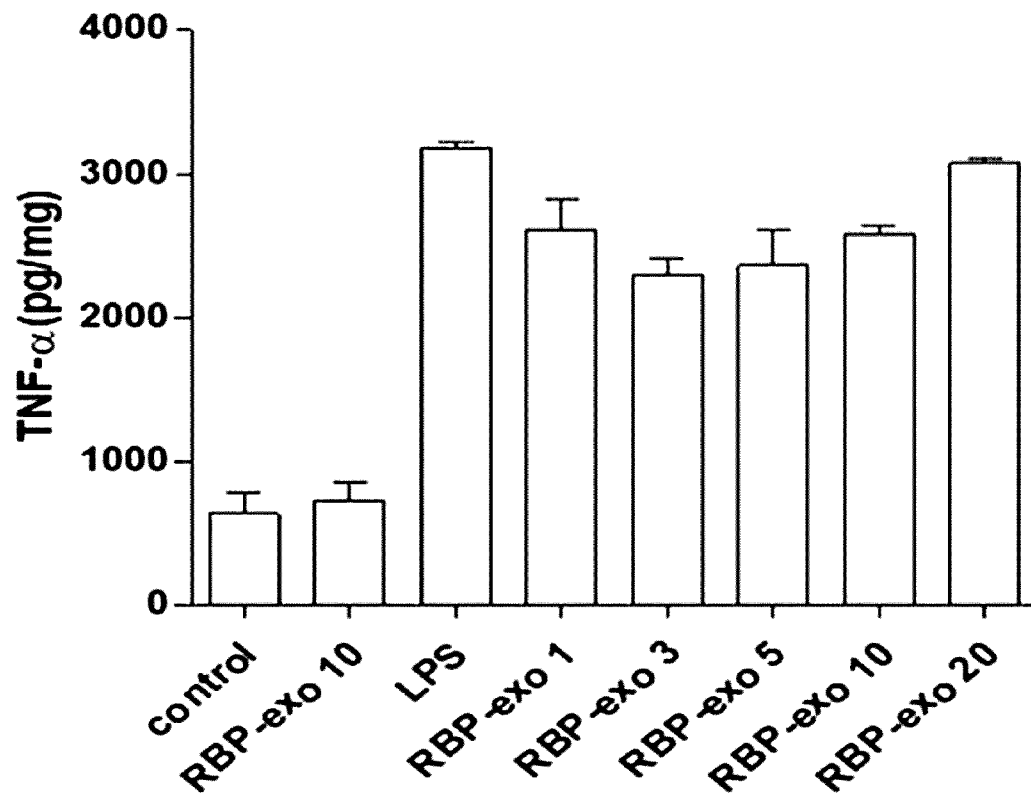
RBP-exo



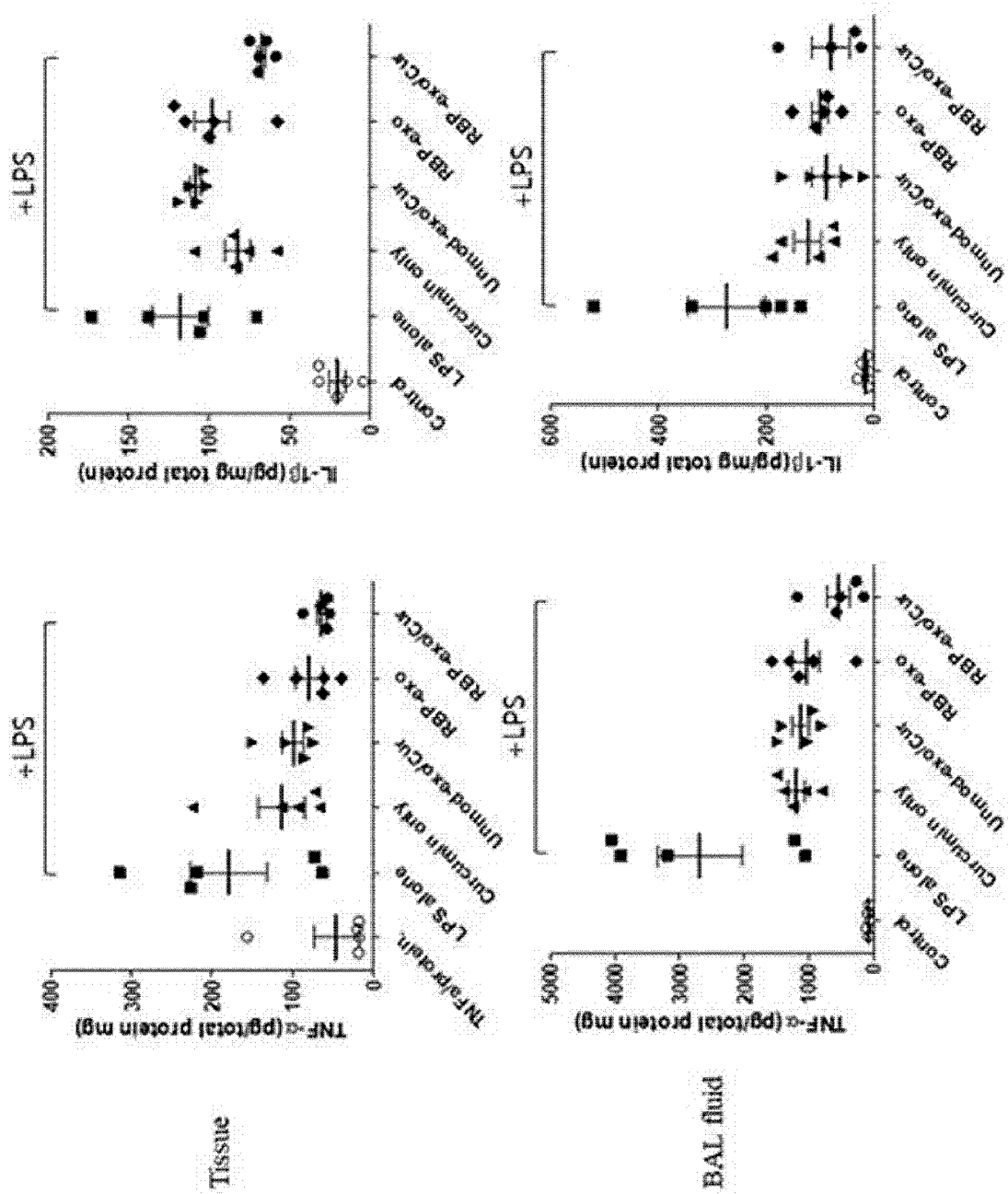
Unmod-exo



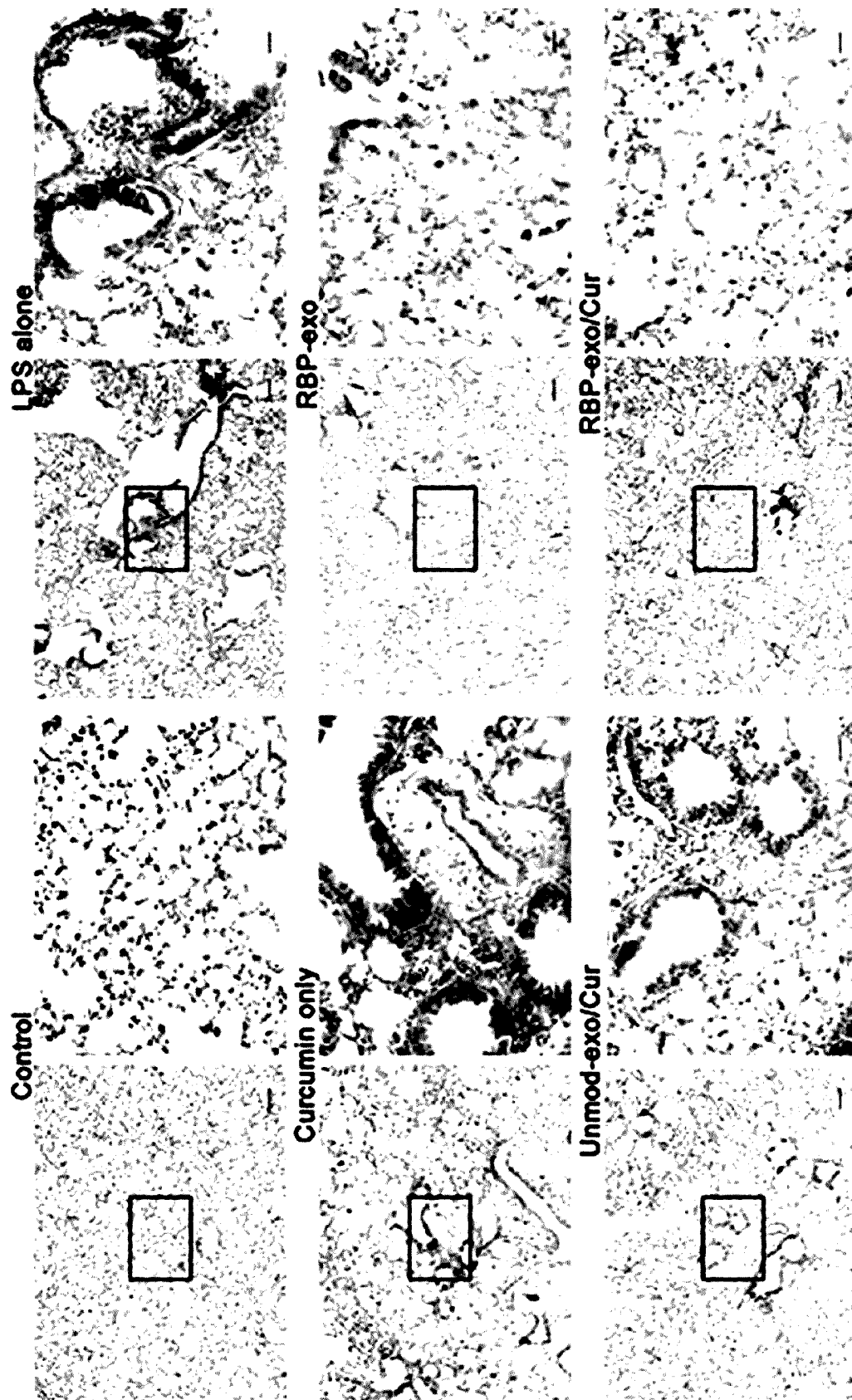
[도4]



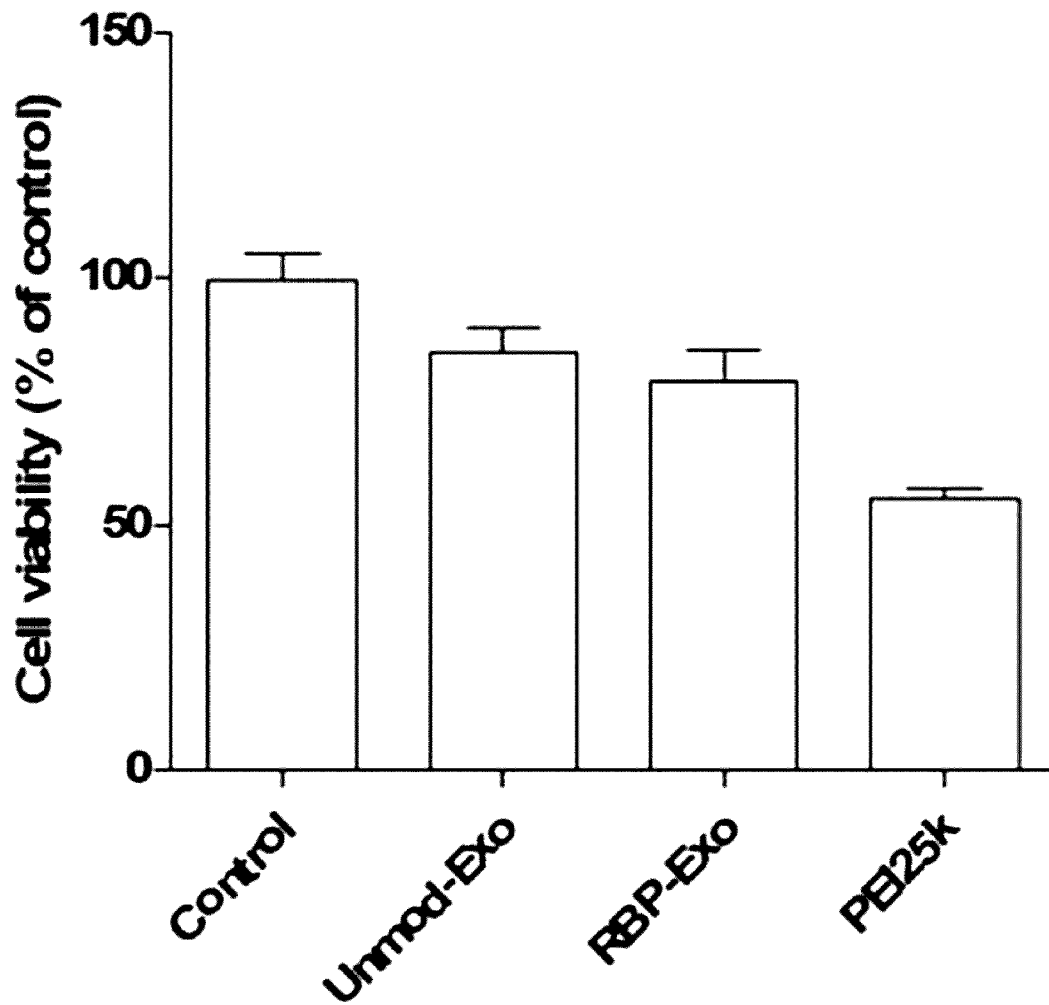
[도5]



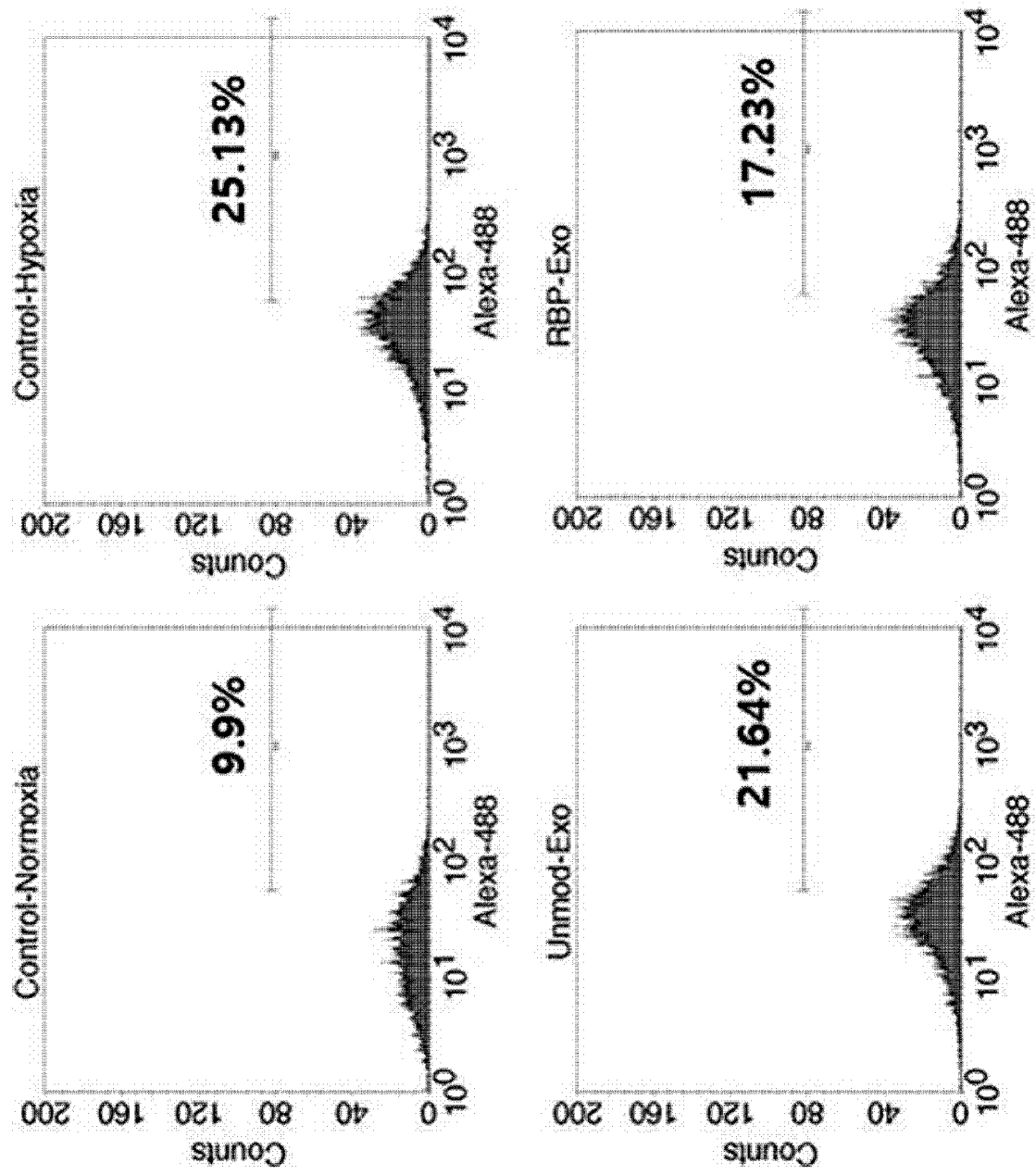
[도6]



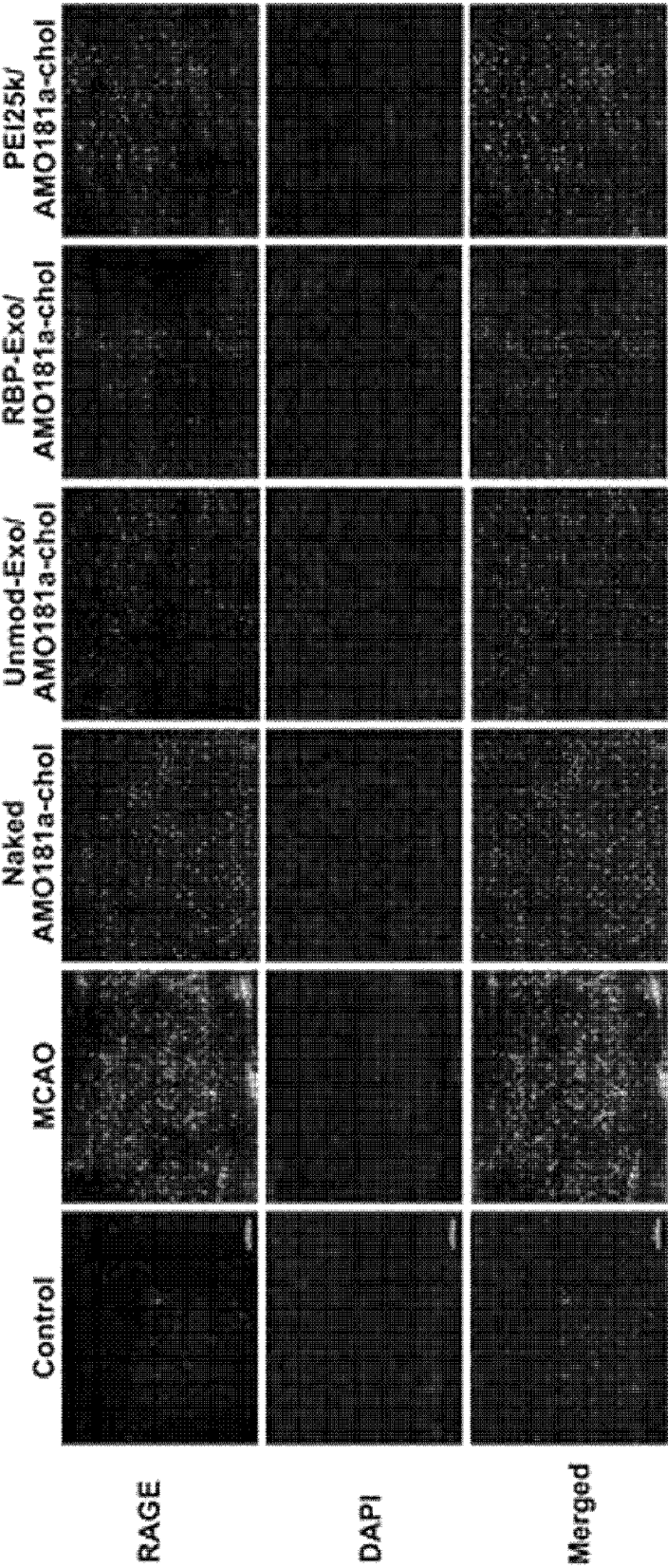
[도7]



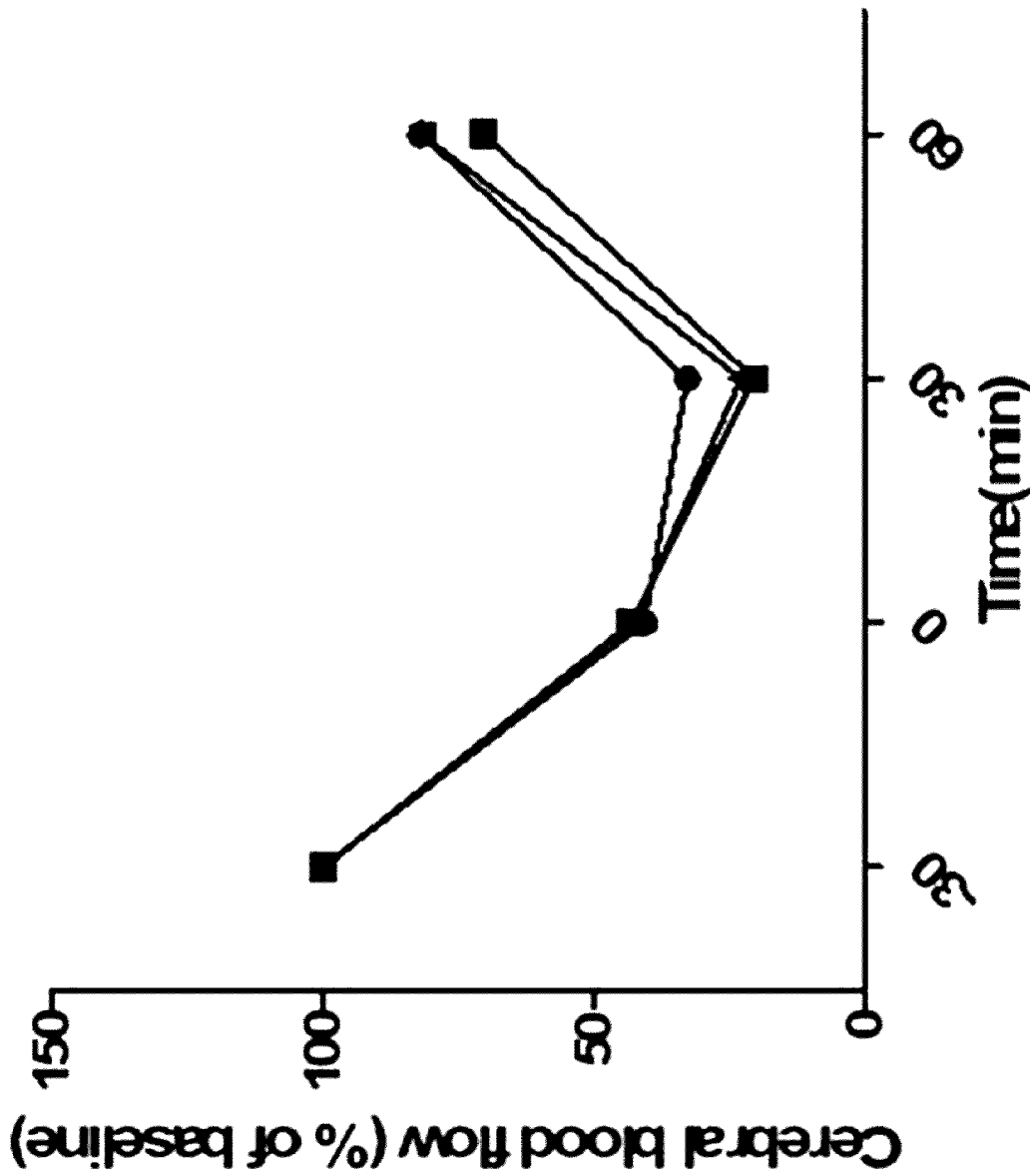
[도8a]



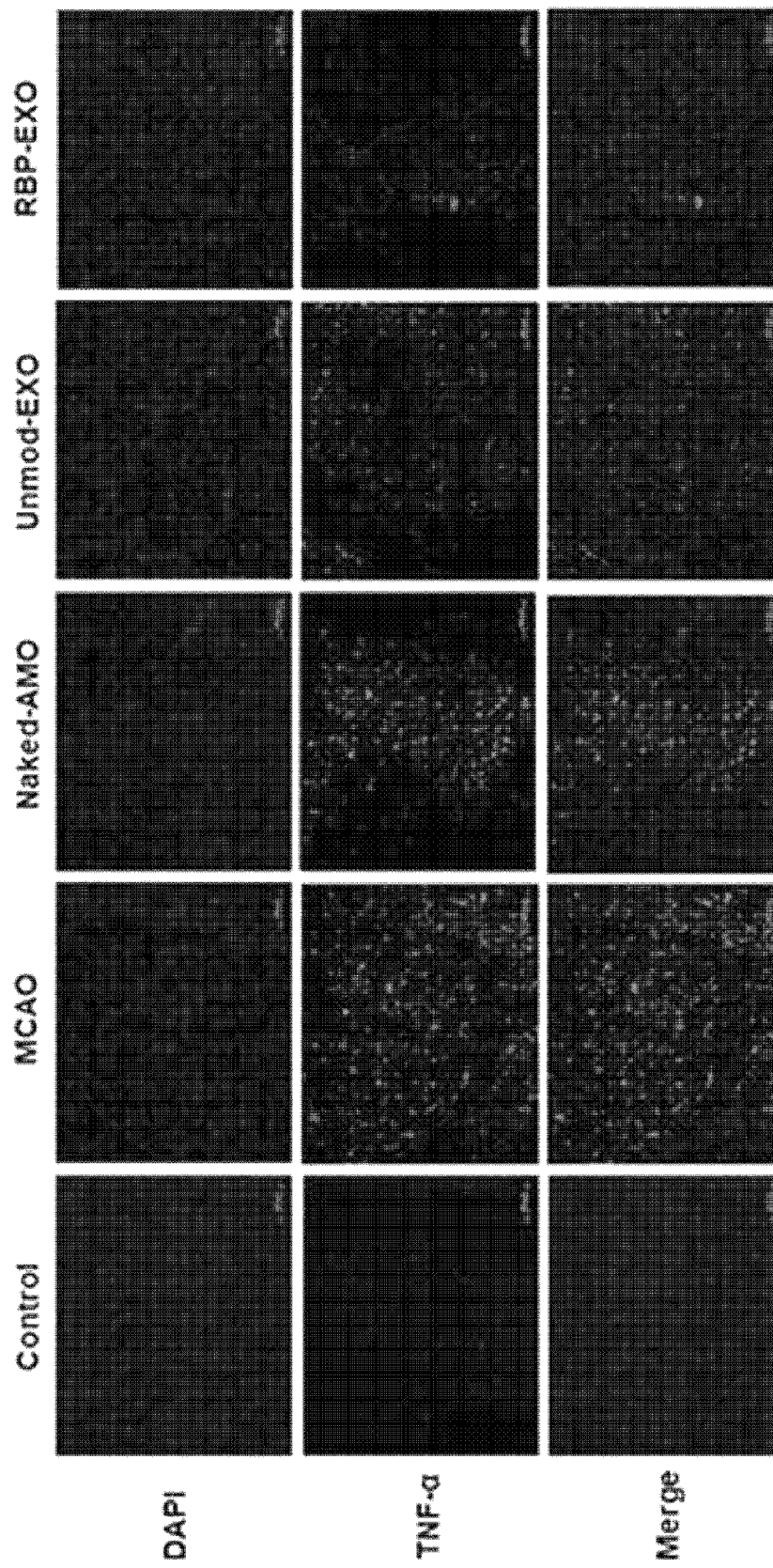
[도8b]



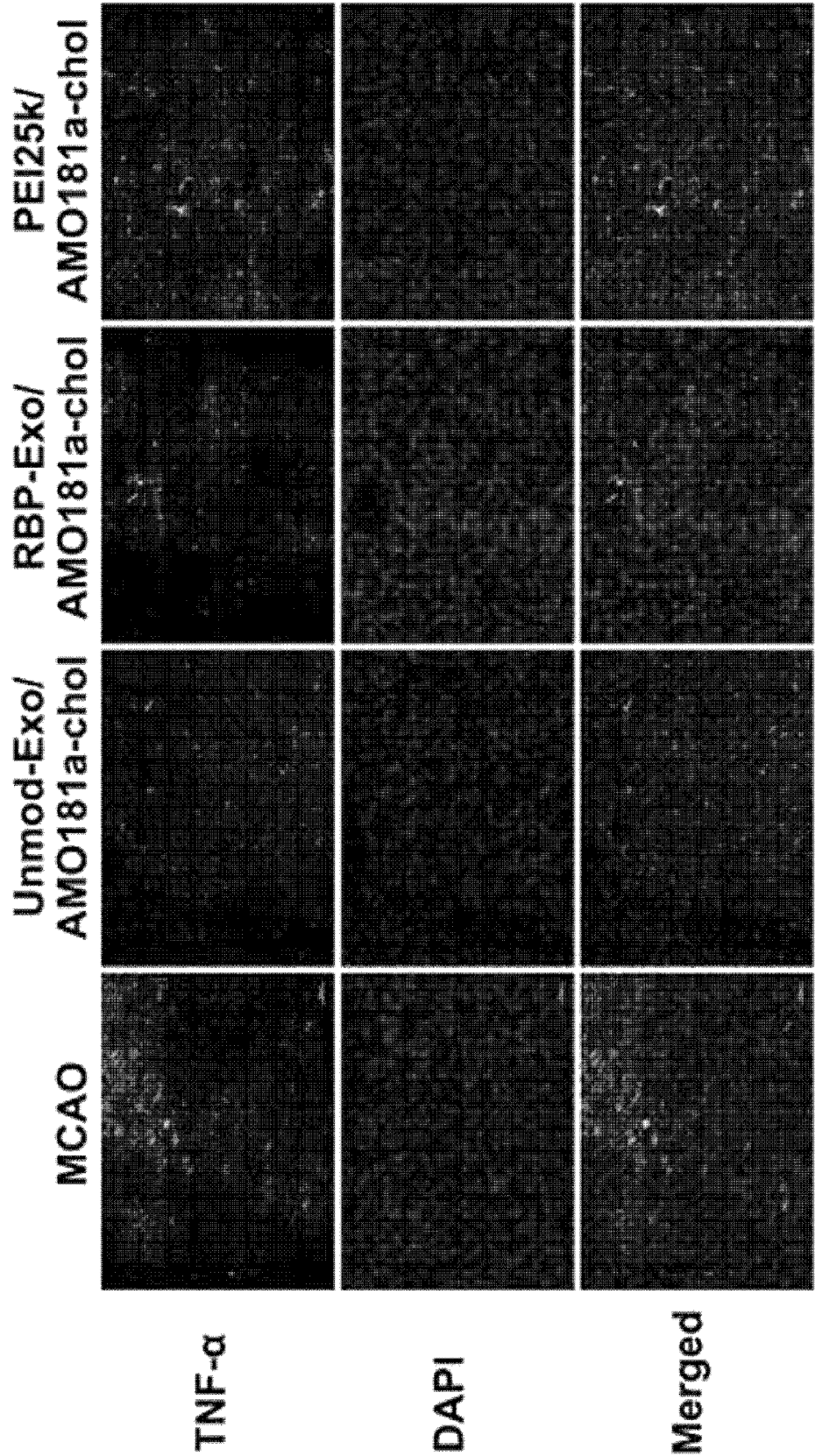
[도9]



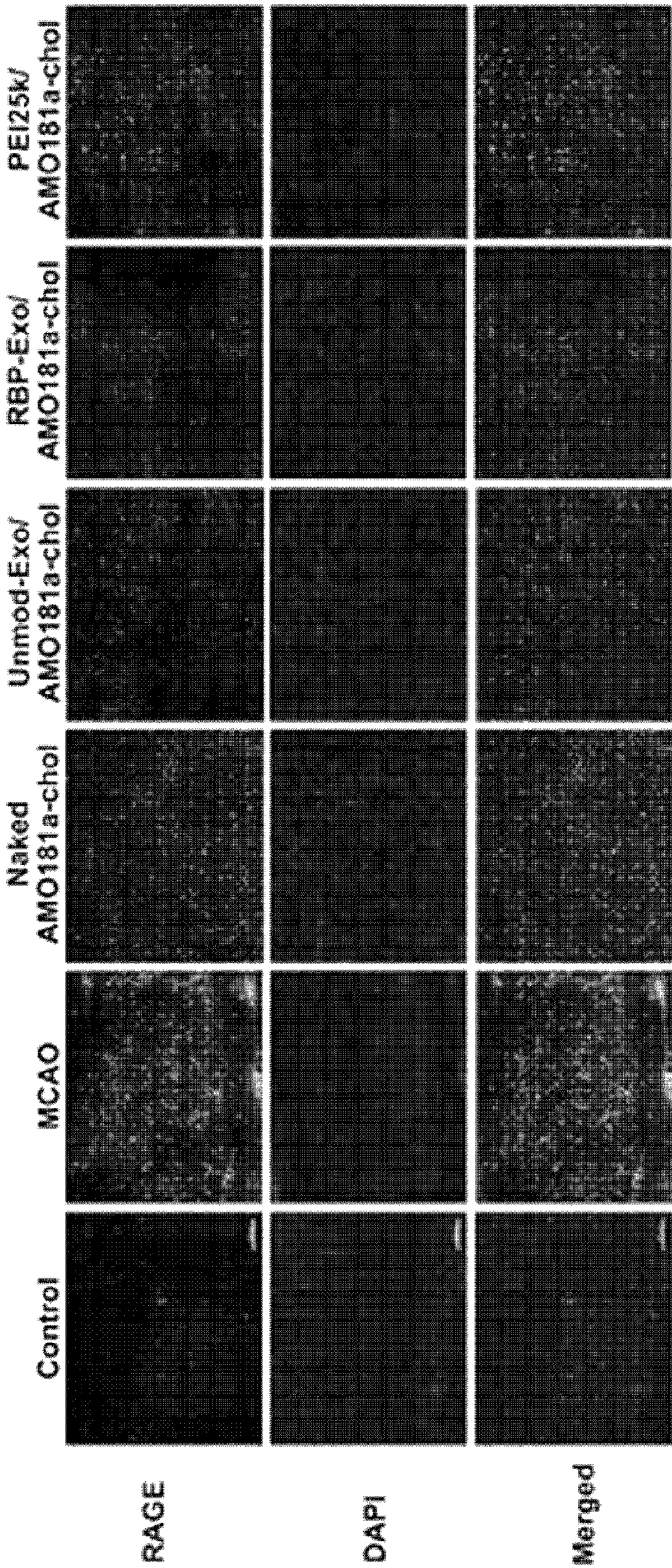
[도10]



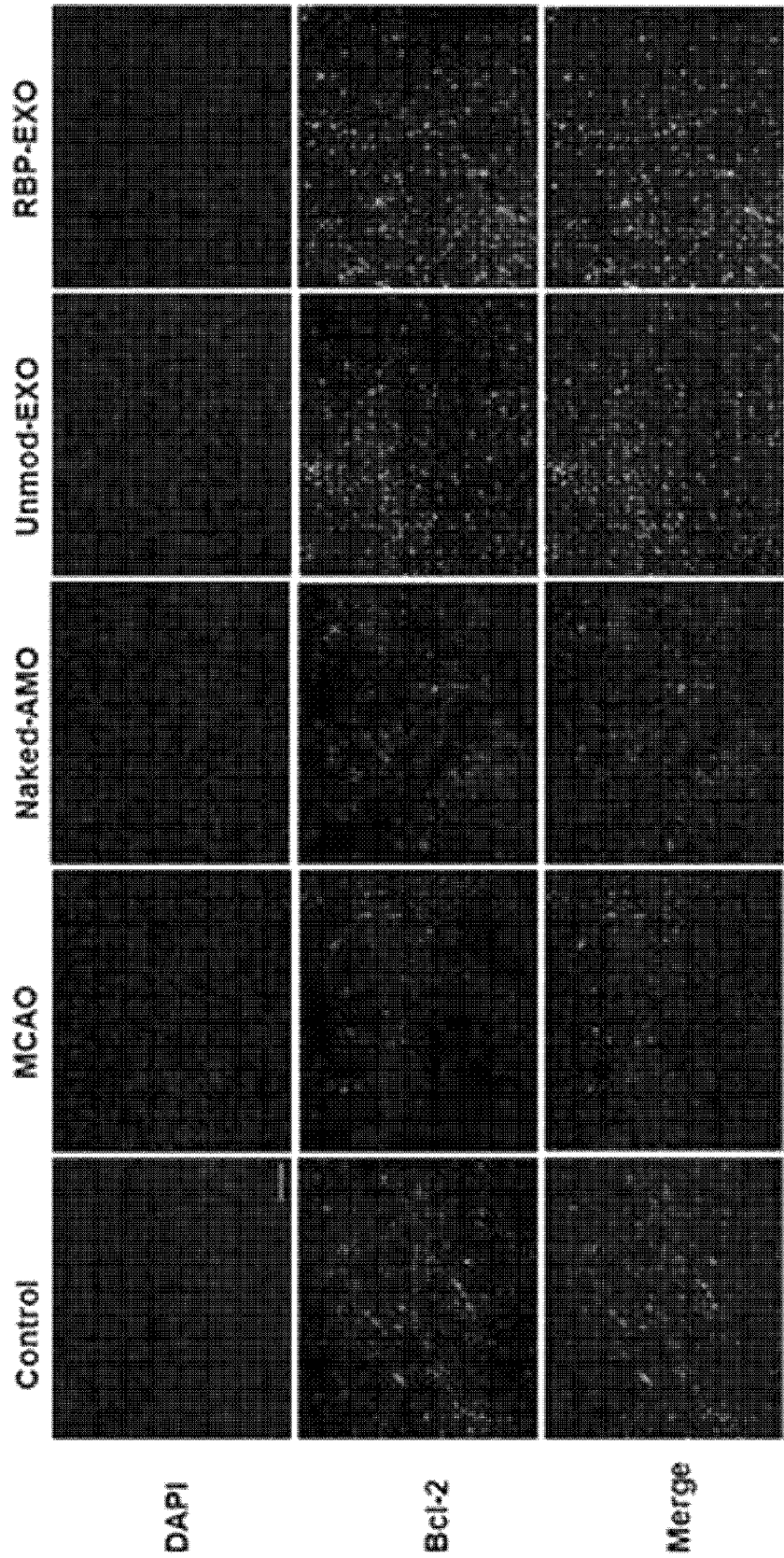
[도11]



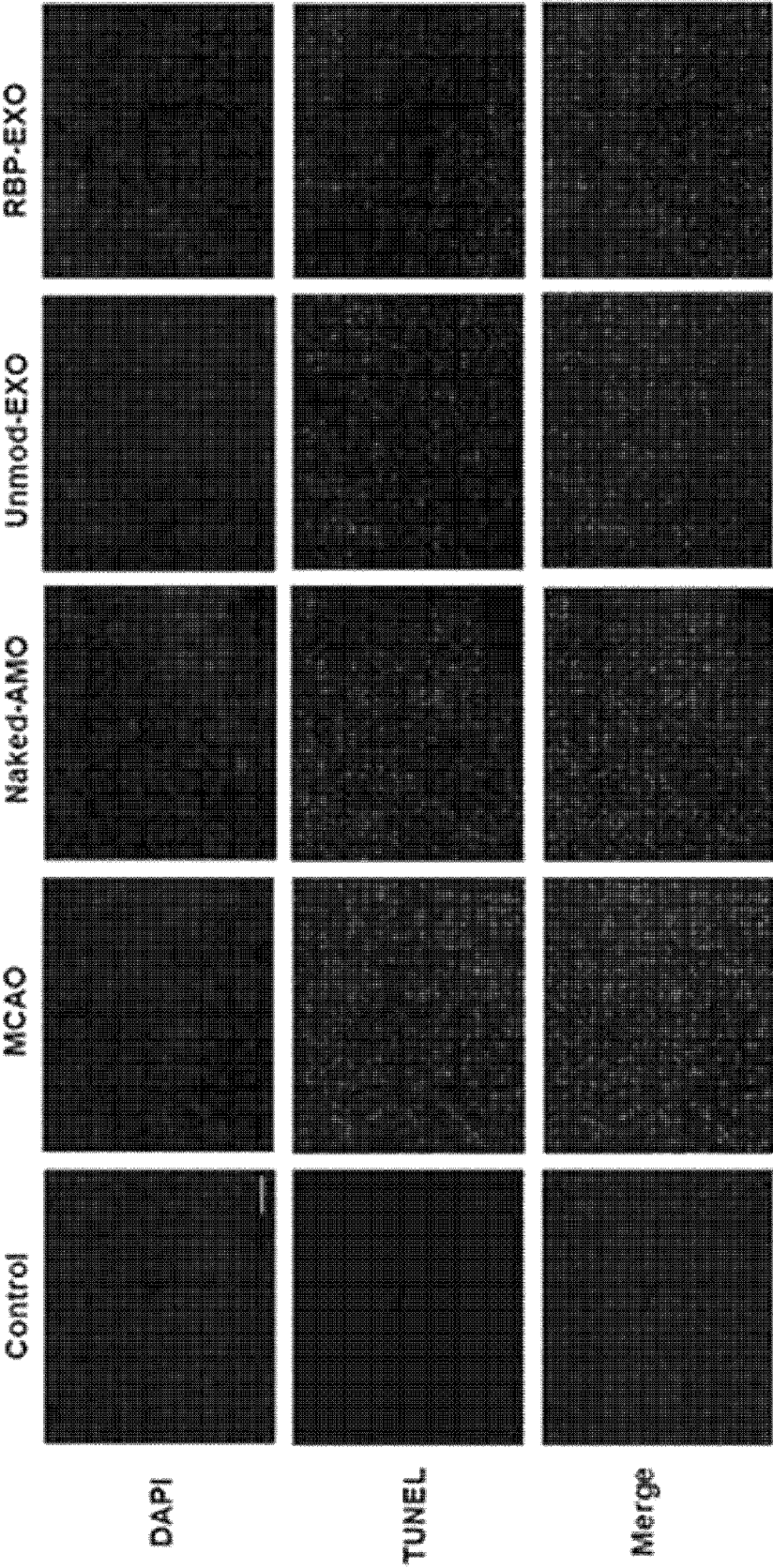
[도12]



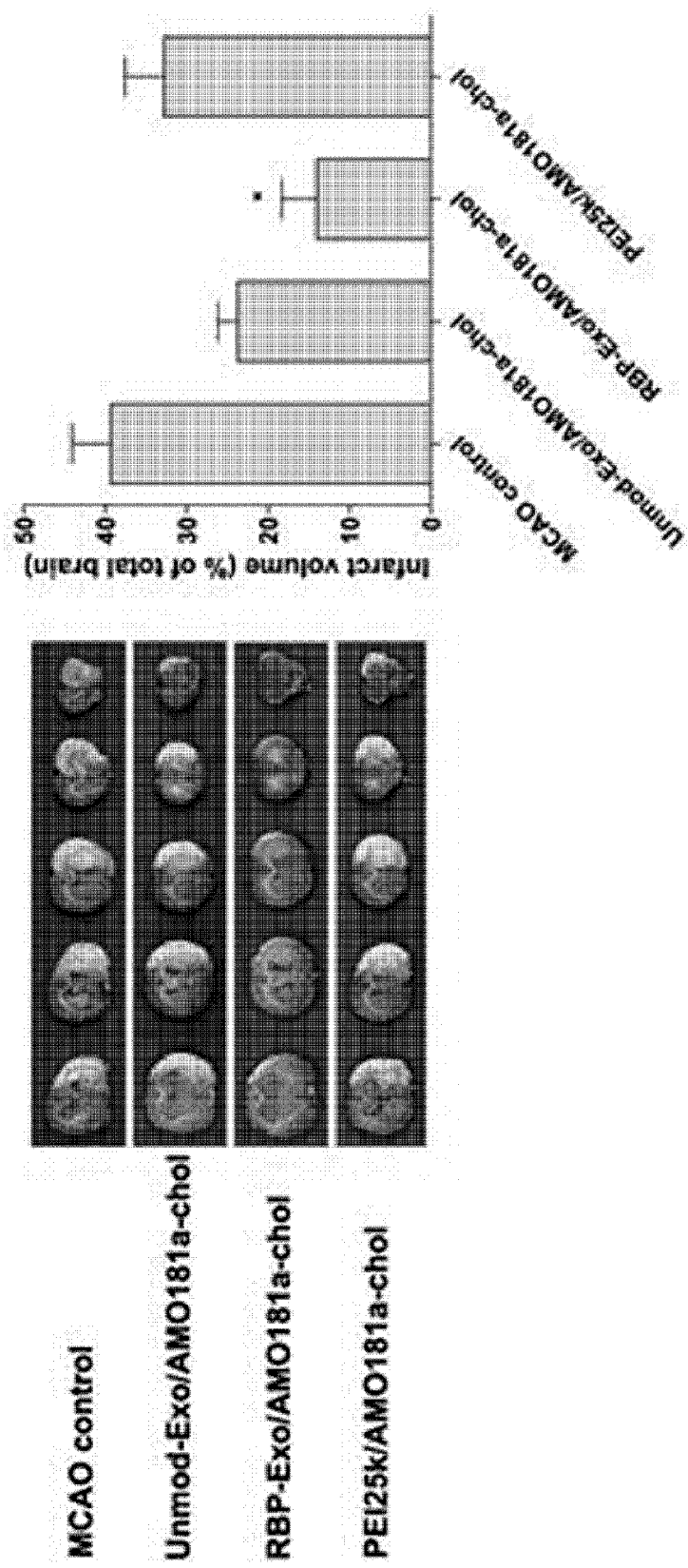
[도13]



[도14]



[도15]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/008664

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 9/50(2006.01)i; A61K 9/127(2006.01)i; A61K 47/42(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i; C07K 14/705(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 9/50(2006.01); A61K 47/42(2006.01); A61K 47/48(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: RAGE, 엑소좀(exosome), RAGE 결합 펩티드(RAGE binding peptide), 약물(drug)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KIM, G. et al. RAGE targeting therapeutic exosome for drug delivery. In: 42nd Society for Biomaterials Annual Meeting and Exposition 2019: The Pinnacle of Biomaterials Innovation and Excellence. 03-06 April 2019, Seattle, United State. chapter 1.	1-9
Y	CHOI, E. et al. A ternary-complex of a suicide gene, a RAGE-binding peptide, and polyethylenimine as a gene delivery system with anti-tumor and anti-angiogenic dual effects in glioblastoma. Journal of Controlled Release. 2018, vol. 279, pp. 40-52. See abstract; page 41, left column, third paragraph; and page 45, right column.	1-9
Y	이민형 등. 뇌표적형 리간드가 수식된 엑소좀을 이용한 뇌졸중 치료용 miRNA 전달시스템. 중견연구자지원사업 최종보고서. March 2020, pp. 1-27 (LEE, Min Hyung et al. Delivery system of miRNAs for the treatment of ischemic stroke using brain targeting ligand decorated exosomes. Final Report on the Project to Support Mid-Sized Researcher.). See pages 9-11 and 14.	1-9
A	LEE, S. et al. Production and application of HMGB1 derived recombinant RAGE-antagonist peptide for anti-inflammatory therapy in acute lung injury. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2018, vol. 114, pp. 275-284. See entire document.	1-9



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- “D” document cited by the applicant in the international application
- “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
- “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

01 November 2021

Date of mailing of the international search report

01 November 2021

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/008664**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LEE, D. et al. RAGE-binding peptide-conjugated polyethylenimine as a dual-functional carrier: A RAGE-mediated gene carrier and an anti-angiogenic reagent. Journal of Industrial and Engineering Chemistry. (electronic publication)05 July 2018, vol. 67, pp. 284-292. See entire document.	1-9
A	KR 10-2011-0136504 A (UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION) 21 December 2011 (2011-12-21) See entire document.	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/008664

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/008664

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2011-0136504 A	21 December 2011	None	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 9/50(2006.01)i; A61K 9/127(2006.01)i; A61K 47/42(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i; C07K 14/705(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 9/50(2006.01); A61K 47/42(2006.01); A61K 47/48(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: RAGE, 엑소좀(exosome), RAGE 결합 펩티드(RAGE binding peptide), 약물(drug)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KIM, G. 등, 'RAGE targeting therapeutic exosome for drug delivery', In: 42nd Society for Biomaterials Annual Meeting and Exposition 2019: The Pinnacle of Biomaterials Innovation and Excellence, 2019.04.03-06, Seattle, United State 1장	1-9
Y	CHOI, E. 등, 'A ternary-complex of a suicide gene, a RAGE-binding peptide, and polyethylenimine as a gene delivery system with anti-tumor and anti-angiogenic dual effects in glioblastoma', Journal of Controlled Release, 2018, 279권, 40-52 페이지 초록; 페이지 41, 좌컬럼, 3번째 단락; 페이지 45, 우컬럼	1-9
Y	이민형 등, '뇌표적형 리간드가 수식된 엑소좀을 이용한 뇌종양 치료용 miRNA 전달시스템', 중견연구자지원사업 최종보고서, 2020.03, 1-27 페이지 페이지 9-11, 14	1-9
A	LEE, S. 등, 'Production and application of HMGB1 derived recombinant RAGE-antagonist peptide for anti-inflammatory therapy in acute lung injury', European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2018, 114권, 275-284 페이지 전체 문헌	1-9
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2021년11월01일(01.11.2021)		국제조사보고서 발송일 2021년11월01일(01.11.2021)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 정다원 전화번호 +82-42-481-5373

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	LEE, D. 등, 'RAGE-binding peptide-conjugated polyethylenimine as a dual-functional carrier: A RAGE-mediated gene carrier and an anti-angiogenic reagent', Journal of Industrial and Engineering Chemistry, (전자공개)2018.07.05, 67권, 284-292 페이지 전체 문헌	1-9
A	KR 10-2011-0136504 A (울산대학교 산학협력단) 2011.12.21 전체 문헌	1-9

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

- a. ☒ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - ☒ 부록 C/ST.25 텍스트 파일
 - ☐ 서면 혹은 이미지 파일
- b. ☐ PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록
- c. ☐ 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록
 - ☐ 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))
 - ☐ 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2011-0136504 A	2011/12/21	없음	