

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2022-0161784
(43) 공개일자 2022년12월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/51 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01) C07K 7/06 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/5169 (2013.01)

A61K 38/1709 (2020.05)

(21) 출원번호 10-2021-0069959

(22) 출원일자 2021년05월31일

심사청구일자 2021년05월31일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

주식회사 나노글리아

대전광역시 중구 문화로 266, 102호(문화동, 충남대학교의과대학본관)

(72) 발명자

김동운

세종특별자치시 보람동로 13, 810동 301호 (호려울마을8단지)

신효정

대전광역시 서구 도안북로 125, 108동 205호 (금성백조예미지아파트)

(74) 대리인

김순웅

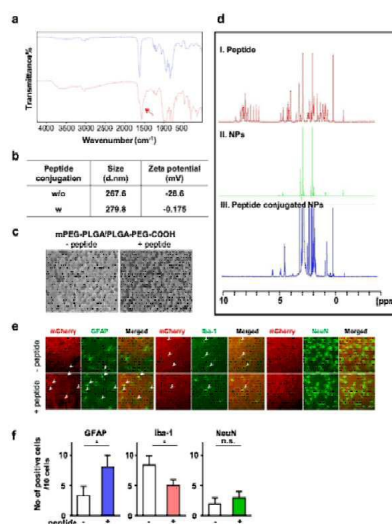
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 나노입자 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 나노입자에 관한 것으로, 보다 상세하게는 상기 나노입자를 포함하는 허혈성 뇌질환 예방, 개선 또는 치료용도에 관한 것이다. 본 발명에 따른 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 나노입자는 생체적합성 및 생분해성이 우수하며, 동물 수준에서 허혈성 뇌손상을 치료하는 효과가 있음을 확인하였다. 이는 본 발명의 나노입자가 허혈성 뇌질환의 치료제로서 이용될 수 있음을 의미하는바, 허혈성 뇌질환의 예방, 개선 및 치료 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 9/5153 (2013.01)

A61P 9/10 (2018.01)

C07K 7/06 (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

서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 별아교세포 선택적 펩타이드를 포함하는, 별아교세포 표적용 나노입자.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 별아교세포 선택적 펩타이드는 PLGA 나노입자의 표면에 결합된 것인, 별아교세포 표적용 나노입자.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 PLGA 나노입자는 SOX9 또는 이를 코딩하는 유전자를 더 포함하는 것인, 별아교세포 표적용 나노입자.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 SOX9를 코딩하는 유전자는 세포 내 전달을 위한 발현 벡터에 포함된 것인, 별아교세포 표적용 나노입자.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 나노입자는 폴리락티드-코-글리콜라이드, 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, 폴리하이드로옥시부틸레이트-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 선택되는 1종 이상인, 별아교세포 표적용 나노입자.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 별아교세포 표적용 나노입자를 포함하는, 허혈성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 별아교세포 표적용 나노입자를 포함하는, 허혈성 뇌질환 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 8

제6항에 따른 허혈성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계;를 포함하는 허혈성 뇌질환 치료방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 나노입자에 관한 것으로, 보다 상세하게는 상기 나노입자를 포함하는 허혈성 뇌질환 예방, 개선 또는 치료용도에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 허혈성 뇌졸중(ischemic stroke)은 주로 혈전 형성에 의해 대뇌 동맥이 막힐 때 발생한다. 이는 산소와 포도당의 공급을 심각하게 낮추어 뉴런 세포의 대사 에너지를 빼앗아 결국 뉴런의 죽음을 초래한다. 뇌졸중 환자의 대부분은 영구적인 뇌 허혈성 경색을 앓고 있으며, 2% 미만의 환자만 시기 적절한 치료를 받는다. 혈전 경로 및 염증 경로는 모두 허혈성 뇌손상의 중요한 병태생리학적 원인이라는 것이 밝혀졌다. 급성 허혈성 뇌졸중에 대한 입증된 치료법에 대한 임상 시험이 진행되었으나, 효과적인 치료 방법은 미비한 실정이다. 최근 허혈성 뇌졸중 병변에 치료제인 별아교세포의 표적 전달을 통한 치료 방법이 대두되고 있다.
- [0003] 별아교세포는 허혈성 뇌손상 중에 형태학적 및 기능적 변화를 겪는다. 신경교세포가 심각한 손상이나 퇴행에 대응하기 위해 세포 생존을 촉진할 수 있기 때문에 반응성있는 별아교세포증(reactive astrogliosis)이 신경보호적이라는 것이 널리 알려져있다. 반면에 최근 관찰에 따르면 반응성있는 별아교세포증은 '신경 독성'과 '신경 보호' '반응성 상태를 모두 가질 수 있다. 따라서 손상이 유발되는 동안 별아교세포의 메커니즘과 기능은 불분명하다.
- [0004] 한편, SOX9는 고도로 보존된 전사 인자 계열에 속하며 배아 및 성인 중추 신경계에서 신경줄기세포 풀을 유지하는 데 중요한 것으로 밝혀졌다. SOX9는 심실 영역을 따라 특별히 발현되며, 소뇌를 발달시키고 신경교 형성 및 신경 전구 특성을 확립하는 데 기여한다. 또한, SOX9는 발달 과정에서 별아교세포와 희소 돌기 세포의 계통별 분화를 주도하며, 많은 병리학적 조건에서 반응성 별아교세포에 의해 상향 조절되는 것으로 나타났다. 따라서 SOX9는 발달과 병인을 조절하는 전사 캐스케이드의 핵심 역할을 하지만, 성인 뇌 손상에서의 역할은 잘 알려져 있지 않다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 이에 본 발명자들은 (i) 별아교세포에 특이적인 SOX9 유전자 발현을 위한 플라스미스가 캡슐화되고, (ii) 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 PLGA 나노입자를 개발하고, 이의 허혈성 뇌손상 치료 효과를 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0006] 따라서 본 발명의 목적은, 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 별아교세포 선택적 펩타이드를 포함하는, 별아교세포 표적용 나노입자를 제공하는 것이다.
- [0007] 본 발명의 다른 목적은, 상기 별아교세포 표적용 나노입자를 포함하는 허혈성 뇌질환 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 또 다른 목적은, 허혈성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계;를 포함하는 허혈성 뇌질환 치료방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 별아교세포 선택적 펩타이드를 포함하는, 별아교세포 표적용 나노입자를 제공한다.
- [0010] 또한 본 발명은 상기 별아교세포 표적용 나노입자를 포함하는 허혈성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0011] 또한 본 발명은 상기 별아교세포 표적용 나노입자를 포함하는 허혈성 뇌질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0012] 또한 본 발명은 상기 허혈성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계;를 포함하는 허혈성 뇌질환 치료방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0013] 본 발명에 따른 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 나노입자는 생체적합성 및 생분해성이 우수하며, 동물 수준에서 허혈성 뇌손상을 치료하는 효과가 있음을 확인하였다. 이는 본 발명의 나노입자가 허혈성 뇌질환의 치료제로서 이용될 수 있음을 의미하는바, 허혈성 뇌질환의 예방, 개선 및 치료 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014]

도 1a는 FT-IR을 통해 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 PLGA 나노입자의 특성을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 1b는 zetasizer를 이용하여 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 PLGA 나노입자의 특성을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 1c는 주사전자현미경을 이용하여 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 PLGA 나노입자의 특성을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 1d는 ^1H NMR을 이용하여 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 PLGA 나노입자의 특성을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 1e 및 1f는 면역염색을 통해 세포 유형에 따른 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 PLGA 나노입자의 흡수 여부를 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 2a는 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 플라스미드 캡슐화 PLGA 나노입자를 제조하기 위한 SOX9 발현 플라스미드의 개열지도를 나타낸 도이다.

도 2b는 SOX9 발현 플라스미드를 형질감염시킨 1차 별아교세포에서 tdTomato의 발현을 관찰한 결과를 나타낸 도이다.

도 2c는 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 플라스미드 캡슐화 PLGA 나노입자의 입자 크기 및 제타 전위를 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 2d는 FT-IR을 통해 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 플라스미드 캡슐화 PLGA 나노입자의 특성을 분석한 결과를 나타낸 도이다(파란색: 유전자발현이 없는 공벡터 플라스미드 캡슐화 NP, 주황색: SOX9 발현 플라스미드 캡슐화 NP, 빨간색: 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 플라스미드 캡슐화 NP, 초록색: 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합되고 SOX9 발현 플라스미드 캡슐화 NP).

도 2e는 주사전자현미경을 통해 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 플라스미드 캡슐화 PLGA 나노입자의 특성을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 3a는 행잉테스트를 통해 광혈전성 허혈 마우스 모델의 운동장애 발생 여부를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 3b는 광혈전성 허혈 마우스 모델의 경색 부위를 육안으로 관찰한 결과를 나타낸 도이다.

도 3c는 광혈전성 허혈 마우스 모델의 경색 부피를 측정한 결과를 나타낸 도이다.

도 3d는 면역염색을 통해 M2 및 cg1 영역에서 GFAP의 발현을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 3e는 이중면역염색을 통해 반응영 부위에서 별 GFAP의 발현을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 4a는 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 플라스미드 캡슐화 PLGA 나노입자의 신경 보호 효과를 확인하기 위한 실험 스케줄을 나타낸 도이다.

도 4b는 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 플라스미드 캡슐화 PLGA 나노입자를 투여한 마우스 모델의 행잉 테스트 결과를 나타낸 도이다.

도 4c 및 4d는 TTC 염색을 통해 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 플라스미드 캡슐화 PLGA 나노입자 투여에 따른 경색 부피를 측정한 결과를 나타낸 도이다.

도 5a 및 5b는 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 플라스미드 캡슐화 PLGA 나노입자 투여에 따른 반응영 부위에서 SOX9 발현을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 5c는 웨스턴 블롯팅을 통해 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 플라스미드 캡슐화 PLGA 나노입자 투여에 따른 SOX9 단백질 발현을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 5d는 웨스턴 블롯팅을 통해 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 플라스미드 캡슐화 PLGA 나노입자 투여에 따른 프로스타글란딘 D2 합성 효소의 발현을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 5e는 웨스턴 블롯팅을 통해 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 플라스미드 캡슐화 PLGA 나노입자 투여에

따른 프로스타글란딘 D2의 발현을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0016] 본 발명의 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 별아교세포 선택적 펩타이드를 포함하는, 별아교세포 표적용 나노입자를 제공한다.
- [0017] 본 발명의 구체예에서, 본 발명의 별아교세포 선택적 펩타이드는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어질 수 있고, 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다.
- [0018] 상기 "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 80% 이상의, 바람직하게는 90%, 더욱 바람직하게는 95%이상의 서열 상동성(즉, 동일성)을 갖는 것으로 예를 들면, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%의 서열 상동성을 갖는 것을 포함하며, 서열번호 1로 표시되는 펩타이드와 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 펩타이드를 말한다. 또한, 본 발명의 서열번호 1로 표시되는 펩타이드에는 이의 천연형 아미노산 서열을 갖는 단백질뿐만 아니라 이의 아미노산 서열 변이체가 또한 본 발명의 범위에 포함된다. 변이체란, 서열번호 1로 표시되는 펩타이드의 천연 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 단백질을 의미한다. 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 펩타이드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다. 상기 서열번호 1로 표시되는 펩타이드 또는 이의 변이체는 천연에서 추출하거나 합성(Merrifield, J. Amer. chem. Soc. 85:2149-2156, 1963) 또는 DNA 서열을 기본으로 하는 유전자 재조합 방법에 의해 제조될 수 있다(Sambrook et al, Molecular Cloning, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA, 2판, 1989).
- [0019] 또한 상기 서열 상동성은 단백질을 구성하는 아미노산 서열의 유사한 부분을 비교하기 위해 사용되는 일반적인 표준 방법에 의해 결정할 수 있다. BLAST 또는 FASTA와 같은 컴퓨터 프로그램은 두 개 이상의 단백질을 각각 구성하는 아미노산이 최적으로 매칭(matching) 되도록 정렬한다(하나 또는 두 서열의 전장서열을 따라 또는 하나 또는 두 서열의 예측된 부분을 따라). 상기 프로그램은 디펄트 오픈닝 페널티(default opening penalty) 및 디펄트 갭 페널티(default gap penalty)를 제공하며 컴퓨터 프로그램과 함께 연계되어 사용될 수 있는 PAM250(표준 스코어링 매트릭스; Dayhoff et al., in Atlas of Protein Sequence and Structure, vol 5, supp. 3, 1978)와 같은 스코어링 매트릭스를 제공한다. 예를 들어, 백분율로 표시되는 서열 상동성은 다음과 같이 계산할 수 있다: 일치하는 서열(identical matches)의 총 수에 100을 곱한 다음 대응되는 스팬(matched span) 내의 보다 긴 서열의 길이와 두 서열을 정렬하기 위해 보다 긴 서열내로 도입된 갭(gaps)의 수의 합으로 나눈다.
- [0020] 상기에서 "실질적으로 동질의 생리활성"이란 허혈성 뇌질환의 개선, 예방 또는 치료 활성을 의미한다.
- [0021] 또한 상기 기능적 동등물의 범위에는 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 별아교세포 선택적 펩타이드의 기본골격; 및 허혈성 질환의 개선, 예방 또는 치료 활성을 유지하면서 구성하는 아미노산의 일부 화학 구조가 변형된 유도체;가 포함된다. 예를 들어 단백질의 안정성, 저장성, 휘발성 또는 용해도 등을 변경시키기 위한 구조 변경이 이에 포함된다.
- [0022] 본 발명의 구체예에서, 상기 별아교세포 선택적 펩타이드는 PLGA 나노입자의 표면에 결합된 것이 바람직하다.
- [0023] 본 발명의 구체예에서, 상기 PLGA 나노입자는 SOX9 또는 이를 코딩하는 유전자를 더 포함하는 것이 바람직하다.
- [0024] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 상기 SOX9를 코딩하는 유전자는 세포 내 전달을 위한 발현 벡터에 포함된 것이 바람직하다. 상기 SOX9를 코딩하는 유전자는 DNA 및 DEAE-텍스트란의 복합체, DNA 및 핵 단백질의 복합체, DNA 및 지질의 복합체 등의 다양한 형질전환 기술을 이용하여 세포 내로 도입시킬 수 있는데, 이를 위해 상기 SOX9를 코딩하는 유전자는 세포 내로의 효율적인 도입을 가능하게 하는 전달체 내에 포함된 형태일 수 있다. 상기 전달체는 바이러스 벡터 및 비바이러스 벡터 모두 사용할 수 있으며, 상기 벡터의 종류는 플라스미드, 파지, 코즈미드 등이 있다.
- [0025] 본 발명에 있어서, 나노입자는 약물을 중심으로 하여 고분자의 코팅층이 형성되어 이루어진 입자를 의미하는 것으로서, 편의상 "고분자의 종류 나노입자"의 형태로 표기할 수 있다. 상기 약물을 둘러싸는(즉, 코팅하는) 고분자로는 당업계에 공지된 생분해성 고분자(biodegradable polymer)가 이용될 수 있다.

- [0026] 본 발명의 구체예에서, 상기 나노입자는 폴리락티드-코-글리콜라이드, 폴리스티렌-코-에틸렌글리콜, 폴리에틸렌 이민-코-에틸렌글리콜, 폴리포스포젠-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 선택되는 1종 이상인 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 폴리락티드-코-글리콜라이드(PLGA, (poly(lactic-co-glycolic acid)일 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 다른 양태에 따르면, 상기 별아교세포 표적용 나노입자를 포함하는 허혈성 뇌질환 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0029] 본 발명에 있어서, 예방은 본 발명의 조성물에 의해 병인을 제거하거나 조기 발견하여 해당질환을 막는 모든 행위를 의미한다.
- [0030] 본 발명에 있어서, 치료는 본 발명의 조성물에 의해 질환의 증세가 호전되는 모든 행위를 의미한다.
- [0031] 본 발명에 있어서, 개선은 본 발명의 조성물에 의해 생체 대사, 세포 또는 기관의 기능이 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0032] 본 발명의 조성물은 상기 별아교세포 표적용 나노입자와 함께 허혈성 뇌질환의 예방, 치료 또는 개선 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다.
- [0033] 본 발명에 따른 조성물은 허혈성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물; 또는 허혈성 뇌질환 예방 또는 개선용 식품 조성물;일 수 있다.
- [0034] 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.
- [0035] 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.
- [0036] 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.
- [0037] 본 발명의 조성물이 식품 조성물인 경우, 본 발명의 식품 조성물은 건강기능식품, 식품 첨가제 또는 식이보조제 일 수 있다. 본 발명의 조성물이 식품 첨가제인 경우, 별아교세포 표적용 나노입자를 그대로 첨가하거나, 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 혼합하여 사용되는 등 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [0038] 구체적인 예로, 식품 또는 음료의 제조 시에는 본 발명의 별아교세포 표적용 나노입자는 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 별아교세포 표적용 나노입자를 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.

[0039] 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, 사이클로텍스트린 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.

[0040] 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 제한되지는 않으나, 본 발명의 식품 조성물 총 중량에 대하여 0.01 내지 0.1중량% 범위내로 포함되는 것이 바람직하다.

[0041] 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.

[0043] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 상기 허혈성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계;를 포함하는 허혈성 뇌질환 치료방법을 제공한다.

[0044] 본 발명의 바람직한 구체예에 따르면, 상기 약학적 조성물은 개체의 척수에 주입되는 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.

[0045] 본 발명에 따른 치료방법은 별아교세포 표적용 나노입자가 척수 내 세포의 SOX9의 발현을 증가시킴으로써, 허혈성 뇌질환을 치료할 수 있다.

[0046] 중복되는 내용은 본 명세서의 복잡성을 고려하여 생략하며, 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.

[0048] 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.

[0050] [실험예]

[0051] 본 실험에 사용한 보는 시약은 분석용 등급(analytical grade)을 사용하였다. PLGA-PEG-COOH(poly(lactide-co-glycolide)-b-poly(ethylene glycol)-carboxylic acid endcap; AI078)는 mPEG-PLGA(Methoxy poly(ethylene glycol)-b-(poly(lactide-co-glycolide)); AK037; PolySciTech, AkiNA, Inc; West Lafayette, USA)을 가진 PLGA의 변형을 통해 수득하였다.

[0053] 실험예 1. 플라스미드 캡슐화 PLGA 나노입자(PLGA NP)의 제조

[0054] GFAP-SOX9-tdTomato-pZac2.1 벡터와 대조 벡터는 조은혜(아주대학교 의과대학, 수원)으로부터 받았다. 플라스미드 캡슐화 PLGA NP는 약간의 변형을 가하여 제조하였다. 플라스미드 캡슐화 PLGA NP를 제조하기 위하여, 200 μ L의 TE 8.0 완충액에 담긴 플라스미드 100 μ g를 PLGA-PEG-COOH 2.5 mg 및 초음파 처리(10%, 30 sec; SFX 550; Branson Ultrasonics, Sterling Heights, MI, USA)에 의해 유화된 mPEG-PLGA 22.5 mg를 함유하는 1.0 mL의 디클로로메탄(dichloromethane, DCM)에 적가하였다(1차 W/O 에멀전). 1% PVA1500(w/v; Thermo Fisher Scientific) 2 mL을 1차 에멀전에 직접 첨가하였고, 1분 동안 초음파 처리 및 유화시켜 W/O/W 이중 에멀전을 제조하였다. 제조된 W/O/W 이중 에멀전을 6 mL의 1% PVA1500(w/v)으로 희석하고 실온에서 3시간 동안 후드에서 교반하여 디클로로메탄을 증발시켰다. PLGA NP를 4°C에서 10분 동안 13,000 RPM으로 원심분리(한일 과학사, 대

전)하여 수집하고, 탈이온수로 2회 세척 및 동결건조하여 플라스미드 캡슐화 PLGA NP를 수득하였다.

[0056] **실험예 2. 펩티드 결합 나노입자의 표면 개질**

[0057] 실험에 사용된 펩타이드는 Pepton(대한민국, 대전)에서 합성했다. PLGA 나노입자는 펩타이드 2 mg와 함께 배양하였다. 펩티드 결합 반응은 환원 시약의 존재하에 실온에서 4시간 동안 EDC/Sulfo-NHS 공유 결합 프로토콜(EDC 22980; Sulfo-NHS 24510; Thermo Scientific, Massachusetts, USA)로 처리하였다. 결합되지 않은 펩타이드는 4℃에서 10분 동안 13,000 RPM으로 원심분리하여 제거하고, 펩티드 결합된 PLGA 나노입자를 수집하여 동결건조하였다.

[0059] **실험예 3. 플라스미드 캡슐화 PLGA 나노입자의 특징**

[0060] 제조된 PLGA 나노입자의 크기와 제타 전위는 Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK)를 사용하여 동적광산란(dynamic light scattering, DLS)으로 측정하였다. 제조된 PLGA 나노입자의 직경 및 형태는 SEM(SNE-4500 M; SEC Co., Ltd., Suwon, Republic of Korea)을 사용하여 평가하였다. SEM 관찰을 위하여, 나노입자 샘플을 금으로 음성 염색하였다. FT-IR 스펙트럼은 ALPHA II 분광계(Bruker)에서 투과 모드로 기록하였다. 64개의 스캔은 실온에서 3 cm^{-1} 의 해상도로 기록하였다. 나노입자용 투명 필름은 각 분말을 캐스팅하여 준비하였다. 또한 중수소로 치환된 용매(DMSO- d_6)에서 나노입자의 ^1H NMR 스펙트럼을 획득하였다.

[0062] **실험예 4. 동물 및 나노입자 투여**

[0063] 수컷 C57BL/6 마우스(20-25g)는 다물 사이언스(대한민국, 대전)에서 구입하여 실험 전 1주일 동안 적응시켰다. 동물 연구는 충남대학교 동물 관리 및 사용위원회(CNUH-019-A0065)의 승인을 받았으며 국립 보건원과 국제뇌졸중동물연구협회의 윤리 지침을 따랐다. 마우스는 암흑과 빛의 12주기를 번갈아 가며 22℃에 수용하고, 상업적인 식단을 공급하고 물을 제공하였다. 각 그룹은 마우스 6마리로 구성하였고, 모든 투여는 보정된 기화기(calibrated vaporizer)를 이용하여 이소플루란 마취 후 수행하였다. 나노입자는 두개골과 C1 척추 사이의 환추 후두막(atlanto-occipital membrane)을 통해 대조(cisterna magna)의 CSF에 직접 투여하였다. 해밀턴 주사기(26 게이지)를 사용하여 나노입자(in PBS) 20 μL 를 주입하고, 바늘을 제거하기 전에 추가 1분 동안 제자리에 두었다.

[0065] **실험예 5. 광혈전성 피질 허혈(Photothrombotic cortical ischemia)**

[0066] 광혈전성 피질 허혈을 유도하기 위하여, 마우스를 공기 중 1% 이소플루란을 사용하여 마취하였다. 마우스의 두피 주위 조직 절개를 위해 중간선 두피를 절개하였고, 브레그마(bregma) 및 람다 점(lambda point)을 확인하였다. 미세조작장치(micromanipulator)를 사용하여 CL 6000 LED 냉광원(Carl Zeiss, Gottingen, Germany) 및 4mm 조리개가 있는 광섬유 번들을 브레그마에서 2.0 mm 측면 중앙에 배치하였다. 감광성 로즈벵갈(Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA) 염료를 멸균 식염수(10 mg/mL)에 용해시키고 로즈벵갈 0.1 mL을 빛을 조사하기 30분 전에 각 마우스에 복강 내 주사하였다. 노출된 부분 중 손상되지 않은 두개골에 6분 동안 빛을 조사하였다. 마지막으로 수술 상처를 봉합하고 마우스를 마취에서 회복시켰다. 냉광원을 제외하고 대조군 그룹(sham)의 마우스에서 동일한 절차를 수행하였다.

[0068] **실험예 6. 행잉 테스트 및 경색 부피 측정**

[0069] 신경학적 결손은 행잉 테스트(hanging test)로 평가하였다. 뇌졸중 전에 블라인드 관찰자가 행동 테스트를 수행하였다. 마우스를 지면에서 50 내지 60 cm 높이의 두 기둥 사이에 뻗어있는 단일 와이어에 매달리도록 훈련시켰다. 동물의 운동 변화를 평가하기 위해 신경학적 평가가 수행되었고, 같은 관찰자가 광혈전성 피질 허혈 유발 2일 후에 행동 테스트를 수행하였다. 마우스를 와이어 위에 놓고 두 앞다리로 매달린 후 떨어질 때까지의 시간을 측정하였다.

[0070] 경색 부피를 측정하기 위하여, 뇌의 앞쪽 끝에서 2 mm 두께로 컷팅하여 절편 4개를 얻었다. 상기 절편 4개를 멸균된 증류수에 희석된 1% 2,3,5-트리페닐테트라졸륨클로라이드(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC; T8877, Sigma-Aldrich; St. Louis; MO, USA)에 담겼고, 실온에서 30분 동안 4% PFA로 고정하였다. 고정된 절편을 카메라로 촬영하고 경색 부피를 이미지 분석 소프트웨어 Image J(NIH, Bethesda, MD, USA)을 활용하여 계산하였다. 접합 경색 부피는 이전에 설명한 공식에 따라 계산하였다.

[0072] 실험예 7. 1차 별아교세포 배양

[0073] 1차 대뇌 별아교세포는 마우스의 새끼에서 정제하였다. 구체적으로, 50 마리의 Sprague-Dawley 마우스의 새끼(생후 1일, P1)(다물 사이언스, 한국)로부터 대뇌 피질을 채취한 후 해부 배지에서 해리하였다. 원심분리 후, 세포를 폴리-L-라이신이 코팅된 T75 플라스크에 접종하고, 이를 최소 필수 배지(Minimum Essential Medium, MEM) 기반의 성장 배지에서 유지하였다. 14일 후, 플라스크를 오비탈 셰이커로 교반하여 모든 비부착 회소돌기교세포 및 미세교세포를 제거하였다. 그 후 부착성 별아교세포를 트립신으로 분리하고, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) 기반 별아교세포 배지에서 증식시켰다.

[0075] 실험예 8. 면역조직화학(Immunohistochemistry) 및 이중 면역형광(double immunofluorescence)

[0076] 내인성 퍼옥시다제의 활성을 차단하기 위하여, 떠있는(free-floating) 뇌 절편에 1% H₂O₂(in PBS)를 처리한 후, 블로킹 버퍼(0.3% Triton X-100 및 1% chicken serum in PBS)을 처리하여 30분 동안 반응시켰다. 절편에 1차 항-GFAP 항체(1:200; cat no. MAB360, Millipore), 항-IBA-1 항체(1:200; catalog no. 019-19741, Wako) 및 항-NeuN 항체(1:200; catalog no. 324307s, Cell Signaling)을 처리한 후 하룻밤동안 배양하였다.

[0077] 이중 면역형광 분석은 Cy3-conjugated anti-rabbit IgG 항체(Amersham, UK) 및 Cy2-conjugated anti-rabbit IgG 항체(Amersham Pharmacia Biotech)를 사용하여 수행하였다. 세포 핵은 4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)로 염색하였다. 이중염색된 절편은 AxioPhot 현미경(Leica, TCS SP8, Wetzlar, Germany)을 사용하여 분석하였다.

[0079] 실험예 9. 웨스턴 블롯팅

[0080] 마우스 뇌 조직을 해부하고 차가운 PBS 완충액에서 균질화시켰다. 균질화 된 조직 샘플을 1200 RPM에서 3분 동안 원심 분리하고 상층액을 제거하였다. 단백질을 추출 완충액(PRO-PERP, iNtRON Biotechnology, 대전, 대한민국)과 1X 프로테아제 억제제를 조직 샘플에 첨가한 후 균질화시켰다. 균질화 후 원심분리하여 세포파편을 제거하여, 단백질을 샘플을 얻었다. 5X 로딩 버퍼를 단백질 샘플과 혼합하고, 100℃에서 10분 동안 끓였다. 추출된 단백질을 12% SDS-PAGE로 분리하고 멤브레인에 블롯팅하였다. 멤브레인에 SOX9 항체(1:1000; catalog no. sc-20095, Santa Cruz biotechnology), Prostaglandin D synthase 항체(1:1000; catalog no. 160013, Cayman)에 대한 적절한 1차 항체를 1,000배 희석하여 4℃에서 밤새 배양하였다. 멤브레인 세척 후 HRP(horseradish peroxidase)-결합된 2차 항체(anti-rabbit-HRP 또는 anti-mouse-HRP; AbFrontier, Korea)를 처리하여 배양하였다. 배양 후 enhanced chemiluminescence solution(Bio-Rad, 170-5061)과 함께 ChemiDoc Touch 이미징 시스템(Bio-Rad)을 사용하여 단백질 발현을 분석하였다. 발현 수준은 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 베타 액틴의 수준으로 정규화하였다.

[0082] 실험예 10. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

[0083] 뇌 조직에서 프로스타글란딘 D₂의 농도는 ELISA 키트(Prostaglandin D2 kit, 512031, Cayman)를 사용하여 분석하였다. 구체적으로, 50 µg의 전체 세포용해물을 각 웰에 분주하고, 제조사의 매뉴얼에 따라 실험을 수행하였다.

[0085] [통계분석]

- [0086] 모든 통계 분석은 GraphPad Prism 6(GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)을 사용하여 수행하였다. 모든 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표현되었으며, Tukey의 사후 검정 다중 비교 테스트와 함께 일원 분산 분석(ANOVA)을 사용하였다. 그룹 간의 분석은 짝을 이루지 않은 Student's t-test를 사용하여 수행하였다. 또한 P -value < 0.05 는 통계적으로 유의한 결과를 나타내는 것으로 간주하였다.
- [0088] [실시예]
- [0089] 실시예 1. 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 PLGA 나노입자의 제조 및 특성화
- [0090] 별아교세포 선택적 펩타이드(K-C-LNSSQPS-C, AstroLa, 서열번호 1)를 결합시키기 위하여, 두 가지 유형의 PLGA를 이용한 W/O/W 에멀전을 사용하여 나노입자를 얻었다. 기능화된 나노입자는 PLGA-polyethylene glycol(PEG)-COOH(10% v/v) 및 methyl-PEG-PLGA(90% v/v)를 혼합하여 제조하였다. PLGA-PEG-COOH의 카르복실기는 원하는 아미노산과 펩티드 결합을 생성하는데 필요하다.
- [0092] 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 PLGA 나노입자의 특성을 분석하기 위하여, 공중합체(copolymer)는 FT-IR, zetasizer, 주사전자현미경(SEM) 및 ^1H NMR로 분석하였다. 펩타이드가 없는 나노입자(NP); 및 펩타이드가 결합된 NP;의 FTIR 스펙트럼을 측정 및 분석하였다. FT-IR, zetasizer, 주사전자현미경(SEM) 및 ^1H NMR 분석 결과는 각각 도 1a 내지 1d에 나타내었다.
- [0093] 도 1a에 나타난 바와 같이, FT-IR 스펙트럼에서, 펩타이드가 결합된 NP(빨간색 화살표)는 1760 cm^{-1} 에서 에서 carbonyl 그룹의 강한 신호가 검출되었다.
- [0094] 도 1b에 나타난 바와 같이, NP 및 펩타이드가 결합된 NP의 입자 크기 및 제타 전위를 측정한 결과, 직경이 약 270 nm 인 두 종류의 나노입자 크기는 유의한 차이가 없었다. 그러나 NP의 펩타이드 결합은 펩타이드가 없는 NP에 비해 제타 전위를 증가시키는 것을 관찰하였다. 구체적으로, NP는 제타 전위가 -30 mV 에 가까웠으나, 펩타이드가 결합된 NP의 제타 전위 값은 펩타이드 내 아미노 그룹의 양전하로 인해 -0.175 mV 임을 확인하였다.
- [0095] 도 1c에 나타난 바와 같이, SEM 이미지에서 NP 및 펩타이드가 결합된 NP는 모두 표면이 매끄럽고 응집이 없는 구형이며, 이들 간의 유의한 형태학적 차이는 없는 것을 확인하였다.
- [0096] 도 1d에 나타난 바와 같이, 별아교세포 선택적 펩타이드, NP 및 펩타이드가 결합된 NP의 ^1H NMR 스펙트럼으로부터 나노입자에 별아교세포 선택적 펩타이드가 잘 결합된 것을 확인하였다.
- [0098] 아데노-관련 바이러스(adeno-associated virus, AAV)-mCherry 발현 벡터 시스템을 사용하여, 뇌의 어떤 세포 유형이 NP 및 펩타이드가 결합된 NP를 흡수하는지 평가하였다. 이를 위해 마우스의 두개골과 C1 척추 사이의 환추후두막(atlanto-occipital membrane)을 통해 대조(cisterna magna)의 CSF에 NP 및 펩타이드가 결합된 NP를 직접 투여하였다. 또한 뇌 조직 절편은 세포 유형을 구분하기 위해 면역염색하였다. 면역염색 결과 및 NP 흡수 여부를 분석한 결과는 각각 도 1e 및 1f에 나타내었다.
- [0099] 도 1e 및 1f에 나타난 바와 같이, 뇌 조직 절편은 세포 유형에 특이적인 마커로 면역염색하였다: 별아교세포의 경우 GFAP, 미세아교세포의 경우 Iba-1, 뉴런의 경우 NeuN. mCherry와 상기 세포 유형에 특이적인 마커의 공동 발현을 분석한 결과, 펩타이드가 결합된 NP가 주로 별아교세포로 흡수되는 것을 확인하였다. 보다 상세하게는, NP는 모든 유형의 세포에서 관찰되었으나, 다른 세포에 비해 미세아교세포에서 더 높았다. 반면에, 펩타이드가 결합된 NP는 모든 유형의 세포에서 관찰되었으나, 대뇌 피질의 별아교세포에서 2배 이상 높은 수준으로 검출되었다.
- [0100] 상기 결과는 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 나노입자는 미세아교세포 및 뉴런보다 별아교세포에 흡수 및 결합된다는 것을 의미한다.
- [0102] 실시예 2. 별아교세포에서 특이적으로 GFAP:SOX9:tdTOM을 발현하는 PLGA 나노입자의 생산 및 분석

[0103] 본 실시예를 통해, (i) 별아교세포에 특이적인 SOX9 유전자 발현을 위한 플라스미드가 캡슐화되고, (ii) 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 NP를 생산하였다.

[0105] 2-1. 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 플라스미드 캡슐화 NP 제조

[0106] SOX9 과발현이 광혈전성 피질 허혈에서 별아교세포증(astrogliosis)의 영향을 역전시키는지 여부를 조사하기 위하여, SOX9 발현 플라스미드 캡슐화 NP를 합성하였다. 또한 상기 SOX9 발현 플라스미드 캡슐화 NP에 별아교세포 선택적 펩타이드(서열번호 1)를 결합시켰다. SOX9 발현 플라스미드는 도 2a와 같이 별아교세포 선택적 GFAP 프로모터 및 tdTomato 발현 리포터 시스템을 포함한다.

[0108] 2-2. 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 플라스미드 캡슐화 NP의 특성분석

[0109] 세포에서 tdTomato의 발현 관찰

[0110] 1차 별아교세포에서 SOX9 및 tdTomato의 발현을 확인하기 위해, (i) 음성 대조군(pNC); 또는 (ii) pSOX9를 형질감염시킨 세포(pSOX9);에서 24시간 동안 tdTomato 발현을 관찰하였다. 세포에서 tdTomato의 발현을 관찰한 결과는 도 2b에 나타내었다.

[0111] 도 2b에 나타난 바와 같이, pNC-tdtomato 및 pSOX9-tdTomato는 모두 1차 별아교세포에서 발현되는 것을 확인하였다.

[0113] 입자 크기 및 제타 전위 분석

[0114] 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 플라스미드 캡슐화 NP를 준비하였다. 준비된 NP는 입자 크기 및 제타 전위를 분석하였으며, 그 결과는 도 2c에 나타내었다.

[0115] 도 2c에 나타난 바와 같이, 펩타이드 결합 여부에 관계없이 NP의 크기는 유사한 것을 확인하였다. 그러나 펩타이드가 결합된 NP는 펩타이드가 결합되지 않은 NP에 비해 제타 전위가 증가한 것을 확인하였다.

[0117] FT-IR 분석

[0118] 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 플라스미드 캡슐화 NP의 FT-IR 분석을 실시하였고, 그 결과는 도 2d에 나타내었다.

[0119] 도 2d에 나타난 바와 같이, FT-IR 스펙트럼에서, 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 플라스미드 캡슐화 NP는 1760 cm^{-1} 에서 carbonyl 그룹의 강한 신호(빨간색 및 초록색 데이터, 빨간색 화살표)가 검출되었다.

[0121] 주사전자현미경 분석

[0122] SEM을 통해 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 플라스미드 캡슐화 NP의 표면을 분석하였다. SEM 이미지는 도 2e에 나타내었다.

[0123] 도 2e에 나타난 바와 같이, 펩타이드 결합 여부에 관계없이 NP의 모양 및 표면은 유사한 것을 확인하였다.

[0125] 실시예 3. 반음영 부위(penumbra)에서 별아교세포의 GFAP 면역 반응성 분석

[0126] 3-1. 행잉 테스트(hanging test)

[0127] 생체 내 SOX9의 신경 보호 효과를 확인하기 위하여, 로즈벵갈(Rose Bengal, RB)을 복강 내 주사한 광혈전성 허혈 마우스 모델을 제조하였다. 제조된 광혈전성 허혈 유도 2일째에 행잉 테스트(hanging test)를 수행하였으며, 그 결과는 도 3a에 나타내었다.

[0128] 도 3a에 나타난 바와 같이, 와이어 걸이 시간은 대조군($n=5$, 134.4 ± 19.5)보다 로즈벵갈 투여 그룹($n=7$, 15.1

±3.2)에서 더 짧았으며, 이는 광혈전성 허혈 유도 후 광혈전성 허혈 마우스 모델에서 운동장애가 발생하였다는 것을 의미한다.

[0130] 행잉 테스트 후 마우스를 희생시켜 뇌의 경색 부위를 관찰하였다. 관찰 부위는 도 3b에 나타내었다.

[0131] 도 3b에 나타낸 바와 같이, 로즈벵갈 투여 그룹은 광혈전으로 인한 허혈이 육안으로 관찰되었다.

[0133] 3-2. 경색 부피 측정

[0134] TTC(2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride, TTC) 염색을 통해 경색 부피를 측정하였다. 경색 부피를 측정한 결과는 도 3c에 나타내었다.

[0135] 도 3c에 나타낸 바와 같이, 로즈벵갈 투여 그룹(즉, 광혈전 허혈 유도 그룹)은 반음영 부위(penumbra)와 허혈성 코어 영역 사이에서 허혈 부위가 관찰되었다.

[0137] 3-3. GFAP 발현 확인

[0138] GFAP 발현 확인에 앞서, GFAP 면역 반응성 별아교세포는 광혈전성 허혈 유도 후 대뇌 영역에 따라 다른 패턴으로 관찰되는 것을 확인하였다. 이를 기반으로, M2(secondary motor cortex) 영역 및 cgl(cingulate area 1) 영역에 초점을 맞추어 GFAP의 발현을 분석하였다. GFAP의 발현을 분석한 결과는 도 3d 및 3e에 나타내었다.

[0139] 도 3d에 나타낸 바와 같이, M2 영역의 GFAP 활성화는 정상 상태에서 거의 관찰되지 않았다. cgl 영역은 전체 피질에서 GFAP의 발현이 높았다. 그러나 M2 영역의 GFAP 발현은 로즈벵갈에 의한 허혈 상태에서 48시간 후 훨씬 높아진 것을 확인하였다.

[0140] 도 3e에 나타낸 바와 같이, 내부 반음영 부위(penumbra)의 별아교세포는 손상된 코어를 향한 확장과 함께 극성화된 형태인 것을 확인하였다. 이와 대조적으로, 외부 반음영 부위의 별아교세포는 비대성이지만 극성화되지 않은 형태인 것을 확인하였다.

[0141] 상기 결과는 광혈전성 허혈 후 반음영 부위의 별아교세포를 표적할 때 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 플라스미드 캡슐화 NP를 사용하는 것이 적합하다는 것을 의미한다.

[0143] 실시예 4. 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 플라스미드 캡슐화 NP의 허혈성 뇌졸중 치료 효과

[0144] SOX9-과발현의 신경 보호 효과를 확인하기 위한 실험을 도 4a와 같이 수행하였다. 구체적으로, 행잉 테스트 및 NP 주입은 로즈벵갈 투여 1일 전에 동시에 수행하였다. 상기 NP 주입은 NP 20 μ L(in 250 μ L PBS)을 마우스의 대조(cisterna magna)에 투여하였다. 광혈전성 허혈 유도 2일 후 행잉 테스트를 수행하고, 마우스를 희생시켰다. 희생된 마우스의 뇌를 채취하여 TTC 염색하였다. 상기 행잉 테스트 결과는 도 4b에 나타내었고, TTC 염색결과는 도 4c 및 4d에 나타내었다.

[0145] 도 4b에 나타낸 바와 같이, 대조군(NPs-pNC 그룹, AstroLa-NPs-pNP 그룹)은 광혈전성 허혈 유도에 따라 운동장애가 발생한 것을 확인하였다. 이와 달리, pSOX9 플라스미드 캡슐화 NP 처리 그룹은 대조군에 비해 운동장애가 개선된 것을 확인하였다. 특히, 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 플라스미드 캡슐화 NP 처리 그룹(AstroLa-NPs-pSOX9)은 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합되지 않은 NP 처리 그룹(NPs-pSOX9)에 비해 현저한 운동장애 개선 효과가 있는 것을 확인하였다.

[0146] 도 4c 및 4d에 나타낸 바와 같이, 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 플라스미드 캡슐화 NP 처리 그룹(AstroLa-NPs-pSOX9)은 다른 실험 그룹 및 대조군에 비해 경색 부피가 현저히 감소한 것을 확인하였다.

[0147] 상기 결과는 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 플라스미드 캡슐화 NP가 로즈벵갈로 유도된 광혈전성 허혈에 따른 허혈성 뇌 손상을 효과적으로 치료할 수 있음을 의미한다.

[0149] 실시예 5. SOX9 과발현에 따른 PGD2 경로 분석

[0150] 5-1. 면역염색을 통한 SOX9 발현 조사

[0151] SOX9가 로즈벵갈로 유도된 뇌졸중 모델에서 뇌 손상을 줄이는 메커니즘을 조사하였다. 구체적으로, 로즈벵갈 주입 전에 플라스미드 캡슐화 NP(pSOX9 NP) 또는 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 플라스미드 캡슐화 NP(AstroLa-pSOX9 NP)를 주입하였다. 광혈전성 허혈 유도 후 반응영 부위에서 SOX9 발현을 조사하였다. SOX9의 발현을 조사한 결과는 도 5a 및 5b에 나타내었다.

[0152] 도 5a 및 5b에 나타난 바와 같이, 플라스미드 캡슐화 NP(pSOX9 NP) 또는 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 플라스미드 캡슐화 NP(AstroLa-pSOX9 NP)는 모두 허혈성 반응영 부위의 별아교세포에 국한된 것을 확인하였다. 또한 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 플라스미드 캡슐화 NP(AstroLa-pSOX9 NP) 처리 그룹의 반응영 부위에서 SOX9의 발현은 플라스미드 캡슐화 NP(pSOX9 NP)에 비해 유의하게 증가하였다.

[0154] 5-2. 웨스턴 블롯팅을 통한 SOX9 발현 조사

[0155] 상기 실시예 5-1의 결과를 바탕으로 각 그룹의 SOX9 관련 단백질 발현을 웨스턴 블롯팅을 통해 분석하였다. 웨스턴 블롯팅 결과는 도 5c에 나타내었다.

[0156] 도 5c에 나타난 바와 같이, 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 플라스미드 캡슐화 NP(AstroLa-pSOX9 NP) 처리 그룹에서 SOX9의 발현이 가장 높은 것을 확인하였다.

[0158] 5-3. 웨스턴 블롯팅을 통한 프로스타글란딘 D2의 발현 조사

[0159] SOX9 발현의 특이적인 효과를 확인하기 위하여, SOX9-다운스트림 유전자인 프로스타글란딘 D2 합성 효소 (prostaglandin D2 synthase, PTGDS)의 발현을 웨스턴 블롯팅을 통해 조사하였다. 웨스턴 블롯팅 결과는 도 5d에 나타내었다.

[0160] 도 5d에 나타난 바와 같이, 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 플라스미드 캡슐화 NP(AstroLa-pSOX9 NP) 처리 그룹은 플라스미드 캡슐화 NP(pSOX9 NP)에 비해 PTGDS의 발현이 유의하게 증가한 것을 확인하였다.

[0162] 당업계에서, PTGDS의 산물인 프로스타글란딘 D2(prostaglandin D2, PGD2)가 DP2 수용체를 통해 HO-1의 발현을 유도하는 것으로 알려져 있다. PTGDS 발현에 따라 PGD2의 발현량을 ELISA를 통해 분석하였고, 그 결과는 도 5e에 나타내었다.

[0163] 도 5e에 나타난 바와 같이, 플라스미드 캡슐화 NP(NPs-pSOX9) 처리 그룹은 발현된 PGD2의 양이 30.6 pg/ml이고, 플라스미드가 캡슐화되지 않은 NP(NPs-pNP) 처리 그룹은 22.7 pg/ml인 것을 확인하였다.

[0164] 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 플라스미드 캡슐화 NP(AstroLa-pSOX9 NP) 처리 그룹은 PGD2의 양이 43.2 pg/ml로, 가장 높은 것을 확인하였다.

[0165] 상기 결과는 광혈전성 허혈 유도 후 SOX9 발현 증가가 별아교세포에서 PTGDS 및 PGD2의 유도에 의해 신경 보호를 조절한다는 것을 의미한다.

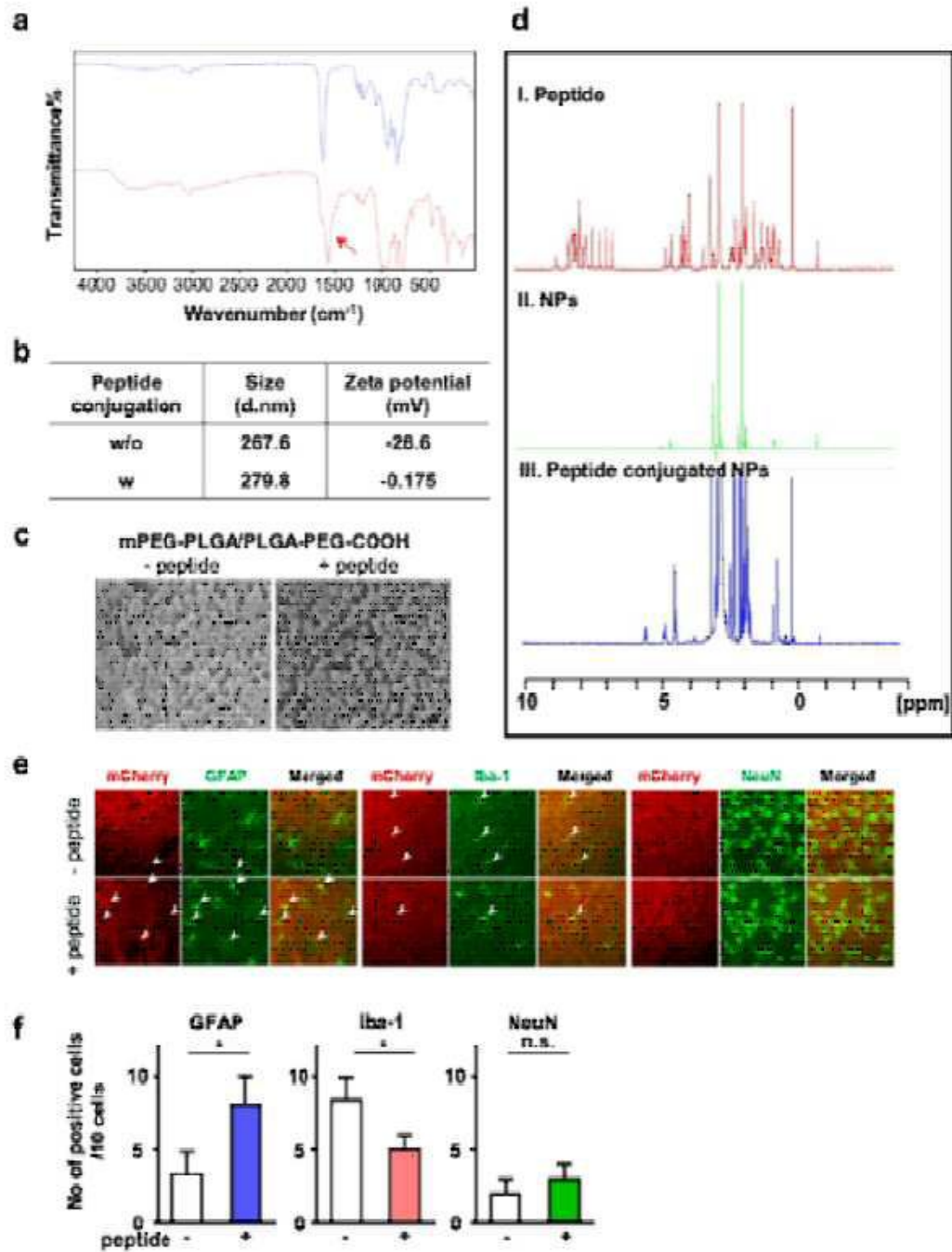
[0167] 종합적으로 본 발명자들은 (i) 별아교세포에 특이적인 SOX9 유전자 발현을 위한 플라스미스가 캡슐화되고, (ii) 별아교세포 선택적 펩타이드가 결합된 PLGA 나노입자를 개발하고, 개발된 PLGA 나노입자가 생체적합성 및 생분해성이 우수하며, 동물 수준에서 허혈성 뇌손상을 치료하는 효과가 있음을 확인하였다. 이는 본 발명의 PLGA 나노입자가 허혈성 뇌질환의 치료제로서 이용될 수 있음을 의미하는바, 허혈성 뇌질환의 예방, 개선 및 치료 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.

[0169] 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 것이

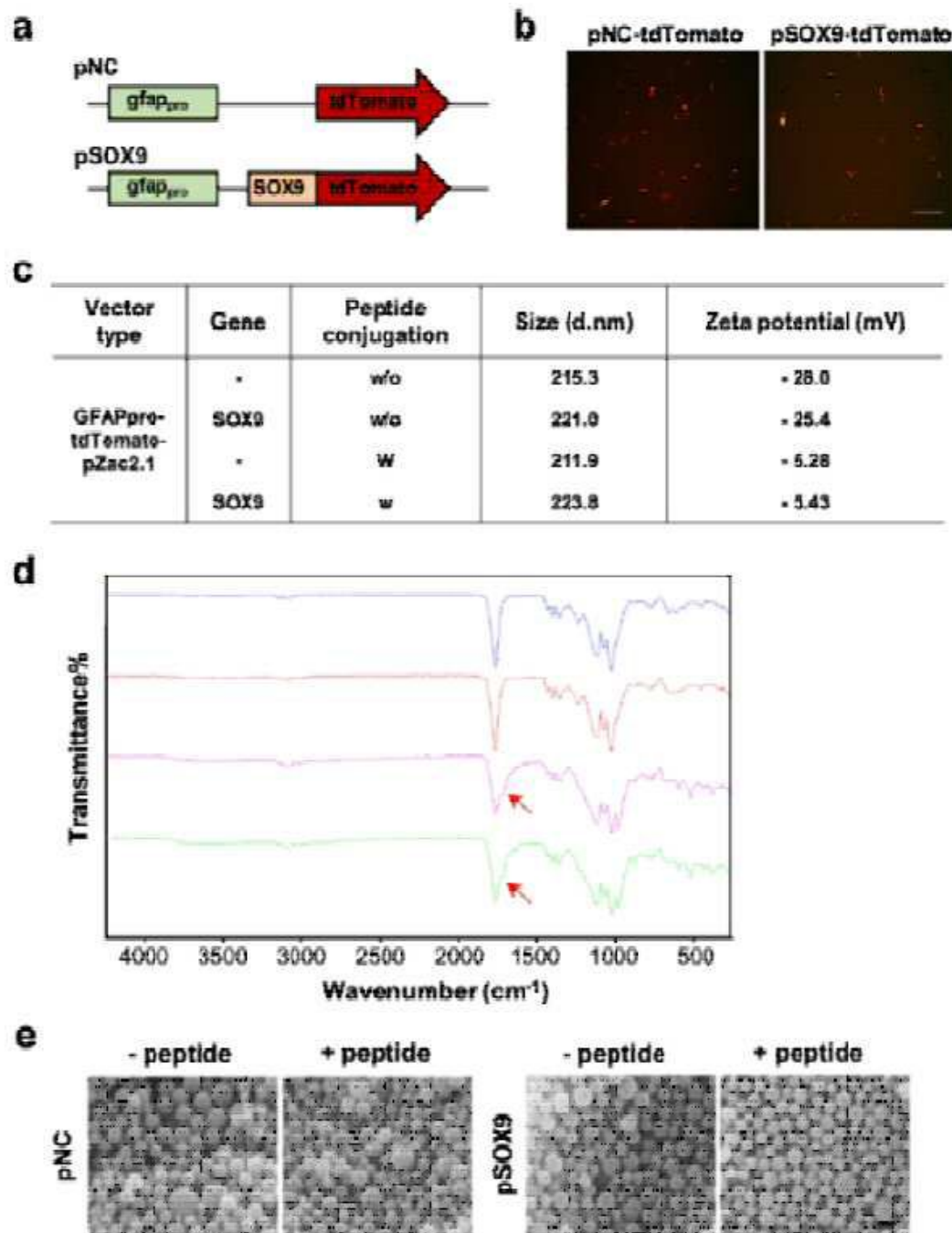
다.

도면

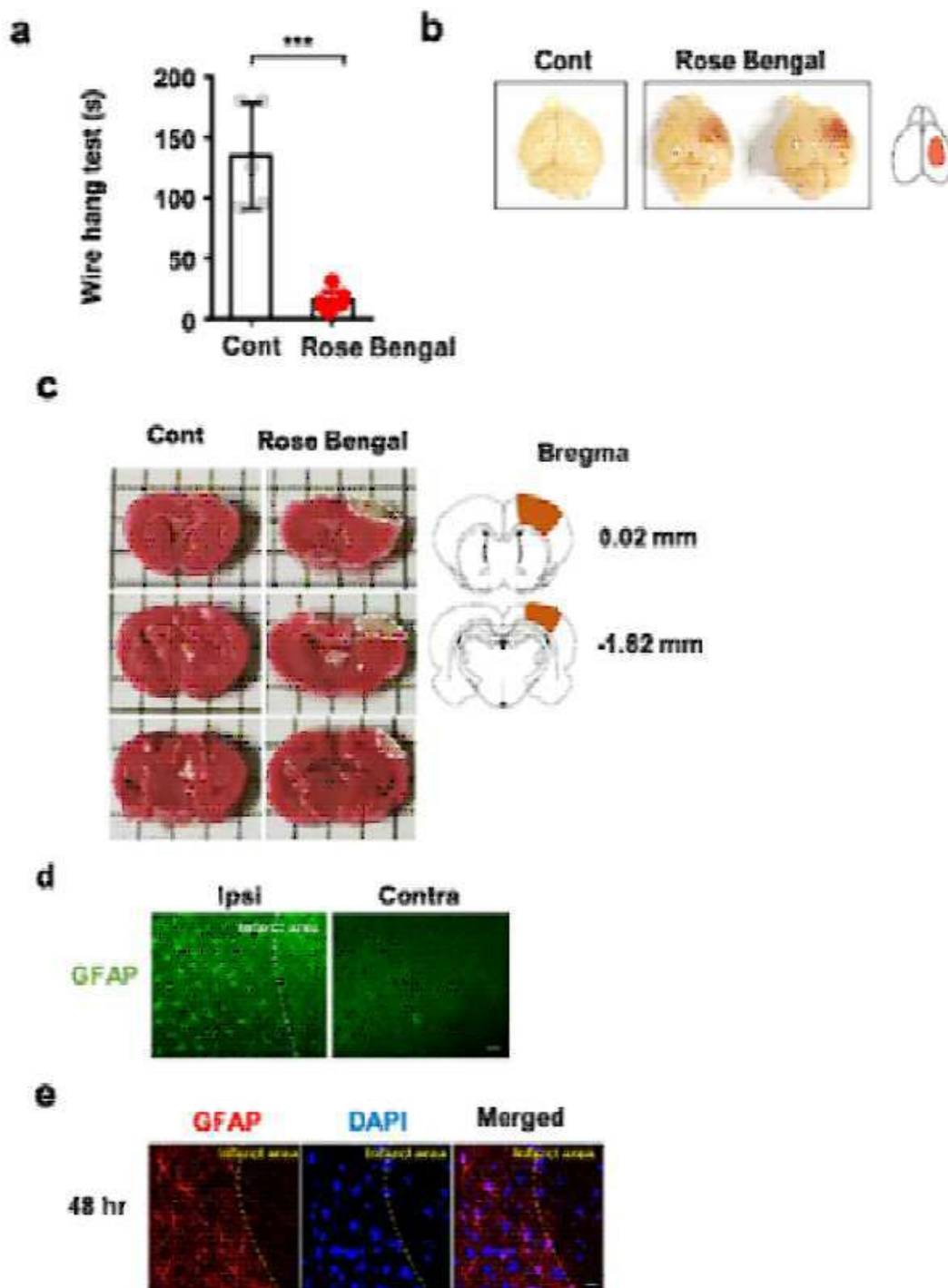
도면1



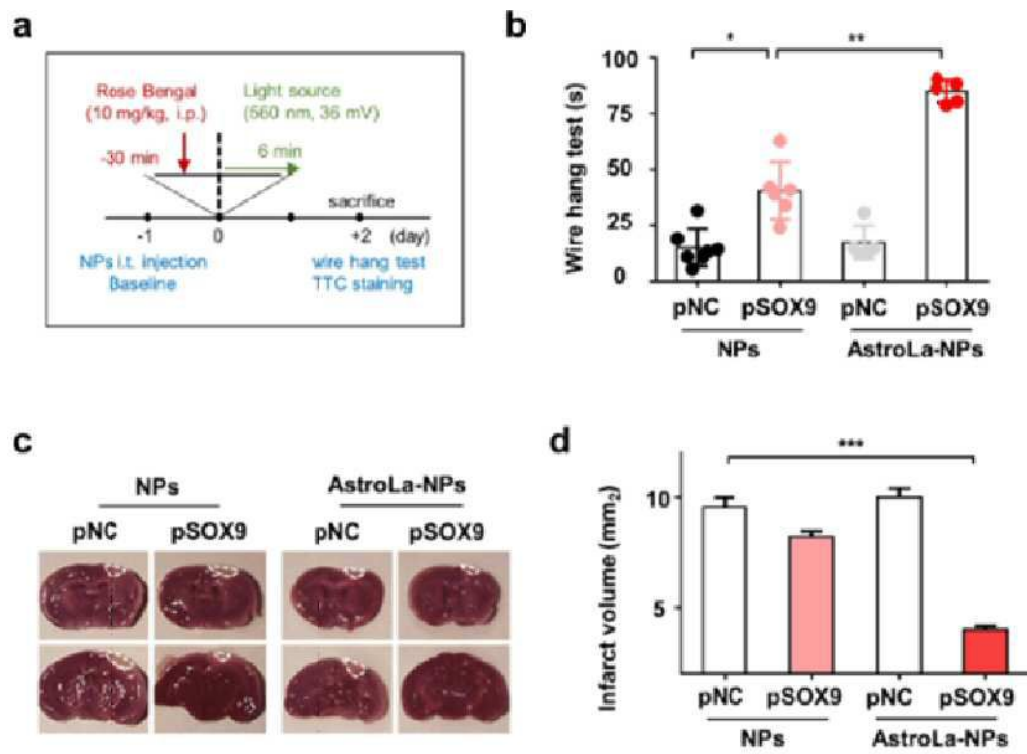
도면2



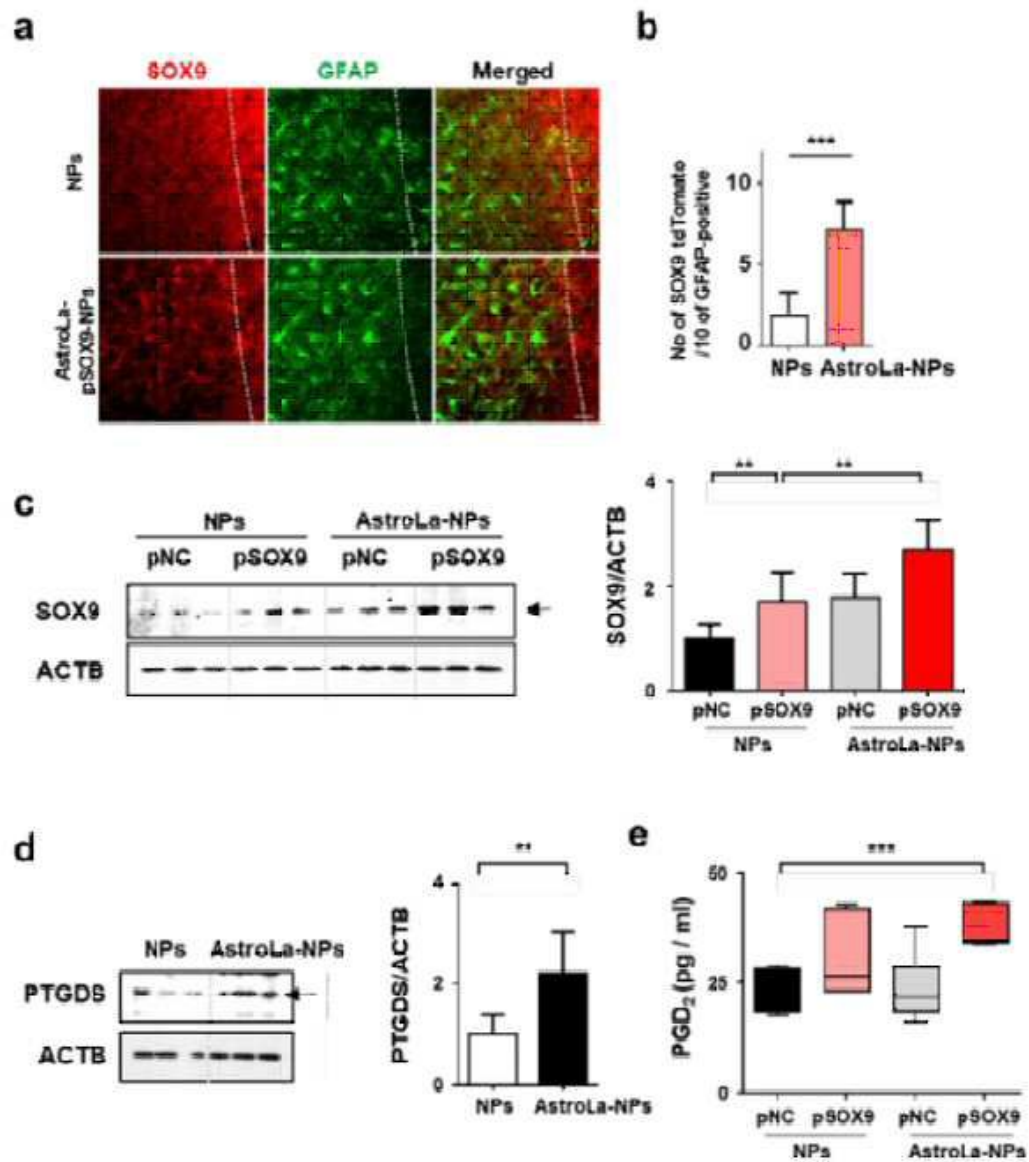
도면3



도면4



도면5



서열 목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- Nanoglia
- <120> Nanoparticle conjugated with astrocyte-selective peptide and uses thereof
- <130> 1-77
- <160> 1
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 10
- <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> astrocyte-targeting peptide, AstroLa

<400> 1

Lys Cys Leu Asn Ser Ser Gln Pro Ser Cys

1

5

10