



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0003945  
(43) 공개일자 2023년01월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/395 (2006.01) A61K 31/7105 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01) A61P 31/16 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 39/395 (2013.01)

A61K 31/7105 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0085623

(22) 출원일자 2021년06월30일

심사청구일자 2021년06월30일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

유지환

서울특별시 서대문구 연희로32길 48

정연욱

서울특별시 동대문구 장안벚꽃로 107, 119-1501(장안동, 장안현대홈타운)

문성민

서울특별시 종로구 지봉로5길 7, 두산아파트 103동 1105호

(74) 대리인

파도특허법인유한회사

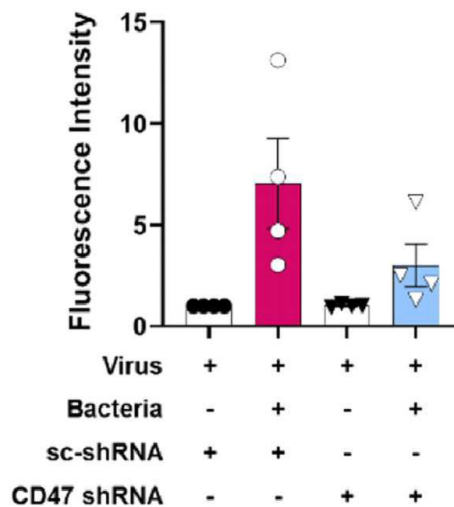
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 바이러스 및 박테리아의 중복 감염 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 바이러스와 박테리아에 의한 중복 감염을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료하기 위한 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

**A61P 31/04** (2018.01)

**A61P 31/16** (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |  |
|-------------|--|
| 과제고유번호      | 1711132084                             |
| 과제번호        | 2016M3A9D5A01952415                    |
| 부처명         | 과학기술정보통신부                              |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국연구재단                                 |
| 연구사업명       | 국가마우스표현형분석사업                           |
| 연구과제명       | 호흡기 질환 마우스 표현형 분석 기반 구축 및 병인 유전자 기능 규명 |
| 기 여 율       | 1/1                                    |
| 과제수행기관명     | 연세대학교                                  |
| 연구기간        | 2016.11.20 ~ 2023.11.19                |

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

CD47(Cluster of Differentiation 47) 단백질의 활성 또는 발현 억제제; 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 억제제를 유효 성분으로 포함하는 중독 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 CD47 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자는 인간 호흡기 상피 세포(human respiratory epithelial cells)에 존재하는 것인, 약학적 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 CD47 단백질의 활성 또는 발현 억제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 앵타머, 항체, 및 천연물로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 포함하는, 약학적 조성물.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 CD47 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 억제제는 상기 유전자에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드, 작은 간섭 RNA(short interfering RNA; siRNA), 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA; shRNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 포함하는, 약학적 조성물.

#### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 중독 감염은 적어도 하나의 바이러스 및 적어도 하나의 박테리아에 의한 동시 감염인, 약학적 조성물.

#### 청구항 6

제5항에 있어서,

상기 바이러스는 인플루엔자 바이러스(influenza virus)인, 약학적 조성물.

#### 청구항 7

제6항에 있어서,

상기 바이러스는 A형 인플루엔자 바이러스인, 약학적 조성물.

#### 청구항 8

제5항에 있어서,

상기 박테리아는 병원성 박테리아인, 약학적 조성물.

#### 청구항 9

제8항에 있어서,

상기 박테리아는 엔테로코커스 패칼리스 (Enterococcus faecalis), 보렐리아 부르그도르페리 (Borrelia burgdorferi), 리스테리아 모노시토게네스 (Listeria monocytogenes), 마이코박테리움 튜버쿨로시스 (Mycobacterium tuberculosis), 슈도모나스 애루지노사 (Pseudomonas aeruginosa), 스태필로코커스 아우레우스

(*Staphylococcus aureus*), 스타필로코커스 에피더미디스 (*Staphylococcus epidermidis*), 살모넬라 티피뮤리움 (*Salmonella Typhimurium*), 스트렙토코커스 뉴모니아에 (*Streptococcus pneumoniae*), 헤모필러스 인플루엔자에 (*Haemophilus influenzae*), 레지오넬라 뉴모필라 (*Legionella pneumophila*), 캄필로박터 (*Campylobacter*) spp., 살모넬라 (*Salmonella*) spp., 시겔라 (*Shigella*) spp., 예르시니아 엔테로콜리티카 (*Yersinia enterocolitica*), 비브리오 콜레라에 (*Vibrio cholerae*), 에스케리치아 콜라이 (*Escherichia coli*), 스타필로코커스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*), 바실러스 세레우스 (*Bacillus cereus*), 및 클로스트리듐 디피실 (*Clostridium difficile*)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 약학적 조성물.

#### 청구항 10

CD47(Cluster of Differentiation 47) 단백질의 활성 또는 발현 억제제; 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 억제제를 유효 성분으로 포함하는 중독 감염에 의한 호흡기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 11

제10항에 있어서,

상기 CD47 단백질의 활성 또는 발현 억제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 앵타머, 항체, 및 천연물로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 포함하는, 약학적 조성물.

#### 청구항 12

제10항에 있어서,

상기 CD47 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 억제제는 상기 유전자에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, 작은 간섭 RNA(short interfering RNA; siRNA), 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA; shRNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 포함하는, 약학적 조성물.

#### 청구항 13

제10항에 있어서,

상기 중독 감염은 적어도 하나의 바이러스 및 적어도 하나의 박테리아에 의한 동시 감염인, 약학적 조성물.

#### 청구항 14

제13항에 있어서,

상기 바이러스는 인플루엔자 바이러스(influenza virus)인, 약학적 조성물.

#### 청구항 15

제13항에 있어서,

상기 박테리아는 병원성 박테리아인, 약학적 조성물.

#### 청구항 16

제10항에 있어서,

상기 호흡기 질환은 호흡기 염증성 질환, 만성 폐색성 폐 질환 (COPD), 부비강염, 알레르기성 비염, 하기도 감염증, 기관지염, 폐기종, 폐렴, 기관지 천식, 폐결핵 후유증, 급성 호흡 궁박증후군, 낭포성 섬유증, 중이염 및 폐섬유증으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 약학적 조성물.

### 발명의 설명

### 기술 분야

본 발명은 바이러스와 박테리아에 의한 중독 감염 또는 이에 의해 유발되는 호흡기 질환을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료하기 위한 조성물에 관한 것이다.

[0001]

## 배경 기술

- [0002] 최근 연구 결과, 이전 인플루엔자 팬데믹 동안 인플루엔자 바이러스 감염 사례 중 중증이거나 치명적인 케이스의 50 내지 90%가 박테리아 중복 감염과 관련이 있는 것으로 밝혀졌다. 또한, 인플루엔자 바이러스와 중복 감염을 일으킬 수 있는 박테리아로는 적어도 15 종이 확인되었고, 이중 스타필로코커스 아우레우스 (Staphylococcus aureus), 스트렙토코커스 뉴모니아에 (Streptococcus pneumoniae), 헤모필러스 인플루엔자에 (Haemophilus influenzae) 및 레지오넬라 뉴모필라 (Legionella pneumophila)에 의한 중복 감염은 폐렴의 위험성과 이어지는 치명성을 높이는 것으로 알려진 바 있다. 더욱이, 슈도모나스 애루지노사 (Pseudomonas aeruginosa)는 인플루엔자 바이러스와 중복 감염되었을 때 심각한 폐렴을 유발시키는 것으로 보고된 바 있다. 하지만 몇몇의 연구들에서 S. aureus 및 인플루엔자 바이러스의 중복 감염 시 치명성이 가장 높은 것으로 확인된 바 있다. 2009년도 인플루엔자 H1N1 아형 팬데믹 동안, 네덜란드에서 관련 연구를 수행한 결과, 인플루엔자 감염 환자 중 59%에서 S. aureus가 공동-병원체로 확인되었고, 이는 S. pneumoniae에 비하여 4 배 이상 높은 중복 감염 비율을 보였다. UK 연구 결과 140개의 병원에서 A형 인플루엔자에 감염된 환자의 27%에서 S. aureus가 검출되었고, S. pneumoniae 및 Haemophilus가 각각 15%, 4% 검출된 것에 비하여 매우 높은 수준이다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0003] 본 발명의 일 목적은 바이러스와 박테리아에 의한 중복 감염의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0004] 본 발명의 다른 목적은 바이러스와 박테리아에 의한 중복 감염에 의해 유발되는 호흡기 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0005] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0006] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 바이러스와 박테리아에 의한 중복 감염; 또는 이에 의한 호흡기 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [0007] 본 발명의 조성물은 CD47(Cluster of Differentiation 47) 단백질의 활성화 또는 발현 억제제; 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 억제제를 유효 성분으로 포함할 수 있다.
- [0008] 본 발명에서 상기 "CD47(Cluster of Differentiation 47)"은 인테그린 관련 단백질(integrin associated protein; IAP)로 알려져 있으며 인간에서 CD47 유전자에 의해 코딩되는 막 통과 단백질에 해당한다. CD47은 이 류노글로불린 슈퍼패밀리에 속하며, 막 인테그린과 파트너가 되고, 트롬보스폰딘-1(thrombospondin-1; TSP-1) 및 신호-조절 단백질 알파(signal-regulatory protein alpha; SIRP $\alpha$ ) 리간드와 결합한다. 본 발명에서 상기 CD47은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0009] 본 발명에서 상기 CD47 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자는 인간 호흡기 상피 세포(human respiratory epithelial cells), 예를 들면 인간 코 상피세포(human nasal epithelial cells; HNEC) 또는 인간 폐 상피 세포(human bronchial epithelial cells; HBEC) 등에 존재하는 것일 수 있다.
- [0010] 본 발명에서 상기 CD47 단백질의 활성화 또는 발현 억제제는 이들 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 앵타머, 항체, 및 천연물로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0011] 본 발명에서 상기 "펩티드 미메틱스(Peptide Mimetics)"는 CD47 단백질의 결합 도메인을 억제하는 펩티드 또는 비펩티드이다. 비가수분해성 펩티드 유사체의 주요 잔기로는  $\beta$ -턴 디펩티드 코어(Nagai et al. Tetrahedron Lett 26:647, 1985), 케토-메틸렌 슈도펩티드류(Ewenson et al. J Med chem 29:295, 1986; 및 Ewenson et al. in Peptides: Structure and Function(Proceedings of the 9th American Peptide Symposium) Pierce chemical co. Rockland, IL, 1985), 아제핀(Huffman et al. in Peptides: chemistry and Biology, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988), 벤조디아제핀(Freidinger et al. in Peptides; chemistry and Biology, G.R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988),  $\beta$ -아미노알콜(Gordon et al. Biochem Biophys Res commun 126:419 1985) 및 치환 감마 락탐환(Garvey et al. in Peptides: chemistry and

Biology, G.R. Marshall ed., EScOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988)을 사용하여 생성할 수 있다.

- [0012] 본 발명에서 상기 "애타머(Aptamer)"는 그 자체로 안정된 삼차구조를 가지면서 표적분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 단일가닥 핵산(DNA, RNA 또는 변형핵산)이다. 애타머는 SELEX(Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment)라는 애타머 발굴 기술이 처음 개발된 이후(Ellington, AD and Szostak, JW., Nature 346:818-822, 1990), 저분자 유기물, 펩타이드, 막 단백질까지 다양한 표적분자에 결합할 수 있는 많은 애타머들이 계속해서 발굴되었다. 애타머는 고유의 높은 친화성(보통 pM 수준)과 특이성으로 표적분자에 결합할 수 있다는 특성 때문에 단일 항체와 비교가 되고, 특히 "화학 항체"라고 할 만큼 대체 항체로서의 높은 가능성이 있다.
- [0013] 본 발명에서 상기 "항체"는 CD47 단백질의 주입을 통해 제조된 것 또는 시판되어 구입한 것이 모두 사용 가능하다. 또한, 상기 항체는 다클론 항체, 단클론 항체 및 에피토프와 결합할 수 있는 단편 등을 포함한다.
- [0014] 여기서, 상기 다클론 항체는 상기 CD47 단백질을 동물에 주사하고, 해당 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 종래의 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 다클론 항체는 당업계에 알려진 어떠한 방법에 의해서든 정제될 수 있고, 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물 중 숙주로부터 만들어질 수 있다.
- [0015] 또한, 상기 단클론 항체는 연속 세포주의 배양을 통한 항체 분자의 생성을 제공하는 어떠한 기술을 사용하여도 제조할 수 있다. 이러한 기술로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 하이브리도마 기술, 사람 B-세포주 하이브리도마 기술 및 EBV-하이브리도마 기술이 포함된다.
- [0016] 또한, 상기 CD47 단백질에 대한 특정 결합 부위를 함유한 항체 단편이 제조될 수 있다. 예를 들면 이들로 한정되는 것은 아니지만 F(ab')<sub>2</sub> 단편은 항체 분자를 펩신으로 분해시켜 제조할 수 있으며, Fab 단편은 F(ab')<sub>2</sub> 단편의 디설파이드 브릿지를 환원시킴으로써 제조할 수 있다. 다른 방도로서, Fab 발현 라이브러리를 작게 하여 원하는 특이성을 갖는 단클론 Fab 단편을 신속하고 간편하게 동정할 수 있다.
- [0017] 본 발명에서 상기 항체는 세척이나 복합체의 분리 등 그 이후의 단계를 용이하게 하기 위해 고형 기질(solid substrate)에 결합될 수 있다. 고형 기질은 예를 들어 합성수지, 니트로셀룰로오스, 유리기관, 금속기관, 유리 섬유, 미세구체 및 미세비드 등이 있다. 또한, 상기 합성수지에는 폴리에스터, 폴리염화비닐, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, PVDF 및 나일론 등이 있다.
- [0018] 본 발명에서 상기 CD47 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 억제제는 상기 유전자에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, 작은 간섭 RNA(short interfering RNA; siRNA), 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA; shRNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0019] 본 발명에서 상기 "안티센스 뉴클레오티드"는 왓슨-크릭 염기쌍에 정의된 바에 따라, DNA, 미성숙-mRNA 또는 성숙된 mRNA의 상보적 염기서열에 결합(혼성화)하여 DNA에서 단백질로서 유전정보의 흐름을 방해하는 것이다. 표적 서열에 특이성이 있는 안티센스 뉴클레오티드의 성질은 그것들을 예외적으로 다기능이 되도록 한다. 안티센스 뉴클레오티드는 모노머 단위의 긴 사슬이기 때문에 이들은 표적 RNA 서열에 대해 쉽게 합성될 수 있다. 최근 많은 연구들은 표적 단백질을 연구하기 위한 생화학적 수단으로 안티센스 뉴클레오티드의 유용성을 증명하였다. 올리고뉴클레오티드 화학 및 향상된 세포주흡착, 표적결합 친화도 및 뉴클레아제 내성을 나타내는 뉴클레오티드 합성 분야에서 최근 많은 진보가 있었으므로 안티센스 뉴클레오티드의 사용은 새로운 형태의 억제제로 고려될 수 있다.
- [0020] 본 발명에서 상기 "siRNA" 및 "shRNA"는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱(silencing)을 매개할 수 있는 핵산 분자로서, 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운(knockdown) 방법 또는 유전자 치료 방법으로 사용된다. shRNA는 단일 가닥의 올리고 뉴클레오티드 내에서 상보적인 서열간의 결합에 의해 헤어핀(hairpin) 구조를 형성한 것이고, 생체 내에서 상기 shRNA는 다이스어(dicer)에 의해 절단되면서 21 내지 25 뉴클레오티드 크기의 작은 RNA 조각으로 이중 가닥의 올리고 뉴클레오티드인 siRNA가 되며, 상보적인 서열을 갖는 mRNA에 특이적으로 결합하여 발현을 억제할 수 있다. 따라서 shRNA 및 siRNA 중 어느 수단을 이용할지는 당업자의 선택에 의해 결정될 수 있으며 이들이 표적으로 하는 mRNA 서열이 동일한 경우라면 유사한 발현 감소 효과를 기대할 수 있다. 본 발명의 목적상 상기 CD47 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적으로 작용하여 CD47 유전자(예; mRNA 분자)를 절단하여 RNA 간섭(RNAi, RNA interference) 현상을 유도함으로써, 상기 CD47 유전자의 발현을 억제할 수 있다. siRNA는 화학적으로 또는 효소학적으로 합성될 수 있다. siRNA의 제조방법으로는 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 공지된 방법을 사용할 수 있다. 예를 들면, siRNA를 직접 화학적으로 합성하는



방법, 시험관 내 (in vitro) 전사를 이용한 siRNA의 합성법, 시험관 내 (in vitro) 전사에 의해 합성된 긴 이중 가닥 RNA를 효소를 이용하여 절단하는 방법, shRNA 발현 플라스미드나 바이러스성 벡터의 세포 내 전달을 통한 발현법 및 PCR (polymerase chain reaction) 유도 siRNA 발현 카세트 (cassette)의 세포 내 전달을 통한 발현법 등이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0021] 본 발명의 일 예시로, 상기 CD47 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적인 shRNA는 서열번호 2로 표시될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0022] 본 발명에서 상기 "리보자임(ribozyme)"은 촉매 활성을 갖는 RNA 분자를 말한다. 다양한 활성을 갖는 리보자임이 공지되어 있으며, CD47 단백질을 코딩하는 유전자의 리보자임은 공지된 또는 인공적으로 생성된 리보자임을 포함하며, 선택적으로 표적 특이적 RNA 절단 활성을 갖는 리보자임이 공지의 표준 기법에 의해 제조될 수 있다.
- [0023] 본 발명에서 상기 "중복 감염(superinfection)"은 "균 교대 감염"이라고도 하며, 1차 감염 후 상이한 병원체에 의한 2차 감염을 의미하는 것으로, 대개는 항생물질을 장기간 다량으로 사용하면, 폐, 장관, 질 등의 정상균총이 변화해서 균교대 현상이 발생된다. 즉, 이 정상균총의 상주균 중 약제에 저항성이 센 균이 우위를 차지하고 이에 따라서 새로운 감염증이 나타나는 것으로, 칸디다 알비칸스, 내성포도구균, 녹농균 등이 종종 원인균이 되는 경우가 많다.
- [0024] 본 발명에서 상기 중복 감염은 적어도 하나의 바이러스 및 적어도 하나의 박테리아에 의한 동시 감염일 수 있다.
- [0025] 본 발명에서 상기 바이러스는 인플루엔자 바이러스(influenza virus)일 수 있고, 바람직하게는 상기 A형 인플루엔자 바이러스일 수 있으며, 구체적인 종류는 특별히 제한하지는 않으나, 예를 들면 H1N1, H1N2, H2N2, H3N2, H5N1, H5N6 또는 H7N9의 아형일 수 있으며, 바람직하게는 H1N1 아형일 수 있다.
- [0026] 본 발명에서 상기 박테리아는 병원성 박테리아일 수 있고, 구체적인 종류를 특별히 제한하지는 않으나, 예를 들면, 엔테로코커스 패칼리스 (Enterococcus faecalis), 보렐리아 부르그도르페리 (Borrelia burgdorferi), 리스테리아 모노시토게네스 (Listeria monocytogenes), 마이코박테리움 튜버쿨로시스 (Mycobacterium tuberculosis), 슈도모나스 에루지노사 (Pseudomonas aeruginosa), 스태필로코커스 아우레우스 (Staphylococcus aureus), 스태필로코커스 에피더미디스 (Staphylococcus epidermidis), 살모넬라 티피무리움 (Salmonella Typhimurium), 스트렙토코커스 뉴모니아에 (Streptococcus pneumoniae), 헤모필루스 인플루엔자에 (Haemophilus influenzae), 레지오넬라 뉴모필라 (Legionella pneumophila), 캄필로박터 (Campylobacter) spp., 살모넬라 (Salmonella) spp., 시겔라 (Shigella) spp., 예르시니아 엔테로콜리티카 (Yersinia enterocolitica), 비브리오 콜레라에 (Vibrio cholerae), 에스케리치아 콜라이 (Escherichia coli), 스태필로코커스 아우레우스 (Staphylococcus aureus), 바실러스 세레우스 (Bacillus cereus), 및 클로스트리듐 디피실 (Clostridium difficile) 등일 수 있으며, 바람직하게는 스태필로코커스 아우레우스 (Staphylococcus aureus)일 수 있다.
- [0027] 본 발명에서 상기 중복 감염에 의한 호흡기 질환은 호흡기 기관에서 발생하는 모든 질환을 제한없이 포함할 수 있으며, 특별히 제한하지 않으나, 예를 들어, 호흡기 염증성 질환, 만성 폐색성 폐 질환 (COPD), 부비강염, 알레르기성 비염, 하기도 감염증, 기관지염, 폐기종, 폐렴, 기관지 천식, 폐결핵 후유증, 급성 호흡 곤란증후군 (窮迫症候群), 낭포성 섬유증, 중이염 및 폐섬유증 등을 포함할 수 있다.
- [0028] 본 발명에서 상기 조성물은 약학적 조성물 또는 식품 조성물의 형태로 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0029] 본 발명에서, "예방"은 본 발명의 조성물을 이용하여 중복 감염 또는 이에 의한 호흡기 질환의 증상을 차단하거나, 중복 감염 또는 이에 의한 호흡기 질환의 증상의 억제 또는 지연시키는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.
- [0030] 본 발명에서, "개선" 및 "치료"는 본 발명의 조성물을 투여하여 중복 감염 또는 이에 의한 호흡기 질환의 증상이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 조성물은 적어도 하나의 다른 활성제와도 추가로 병용 투여할 수 있으며, 이를 통해서 중복 감염의 예방, 개선 또는 치료 효과를 더욱 증강시킬 수 있다.
- [0032] 본 발명에서 상기 활성제로는 항바이러스성 화합물, 항박테리아성 화합물, 항기생충성 화합물, 항진균 화합물, 및 예방 또는 치료 백신으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0033] 본 발명에 있어서, 상기 약학적 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학적 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 약학적 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 약제적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다.
- [0035] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0036] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투하가 바람직하다.
- [0037] 본 발명에서, "비경구"는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.
- [0038] 본 발명의 약학적 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 증증을 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학적 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 담당자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50mg/kg 또는 0.001 내지 50mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형될 수 있다.
- [0039] 본 발명의 상기 식품 조성물은 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 과자, 떡, 빵 등의 형태로 제조될 수 있다.
- [0040] 본 발명의 상기 조성물이 유효성분으로 식품 조성물에 포함될 때 그 양은 전체 중량의 0.1 내지 50%의 비율로 첨가할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0041] 본 발명의 상기 식품 조성물이 음료 형태로 제조되는 경우 지시된 비율로 상기 식품 조성물을 포함하는 것 외에 특별한 제한점은 없으며, 통상의 음료와 같이 다양한 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 구체적으로, 천연 탄수화물로서 포도당 등의 모노사카라이드, 과당 등의 디사카라이드, 슈크로스 등의 및 폴리사카라이드, 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜 등을 포함할 수 있다. 상기 향미제로서는 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등) 등일 수 있다.
- [0042] 본 발명의 상기 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등이 더 포함될 수 있다.
- [0043] 본 발명의 상기 식품 조성물에 포함되는 성분들은 독립적으로 또는 조합하여 사용될 수 있다. 상기 첨가제의 비율은 본 발명의 핵심적인 요소에 해당하지 아니하지만, 본 발명의 식품 조성물 100 중량부 당 0.1 내지 약 50 중량부의 범위에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.



## 발명의 효과

[0044] 본 발명에 따른 조성물을 이용하는 경우, 적어도 하나의 바이러스와 적어도 하나의 박테리아에 의한 동시 감염, 즉 중복 감염을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있으며, 더 나아가서는 상기 중복 감염에 의해 유발되는 호흡기 질환 또한 예방, 개선 또는 치료가 가능하다.

## 도면의 간단한 설명

[0045] 도 1은 실시예 1에서 HNECs에 CD47 특이적 shRNA(CD47 shRNA) 또는 스크램블 shRNA로 형질 주입시킨 뒤, qRT-PCR로 CD47 유전자의 발현 수준을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 실시예 1에서 HNECs에 CD47 특이적 shRNA(CD47 shRNA) 또는 스크램블 shRNA로 형질 주입시킨 뒤, 웨스턴 블롯으로 CD47 단백질의 발현 수준을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 실시예 1에서 HNECs에 CD47 특이적 shRNA(CD47 shRNA) 또는 스크램블 shRNA로 형질 주입시킨 뒤, 표면 단백질 CD47 및 E-카데린의 발현을 면역형광 공초점 현미경으로 관찰한 사진을 나타낸 것이다.

도 4는 실시예 1에서 HNECs에 CD47 특이적 shRNA(CD47 shRNA) 또는 스크램블 shRNA의 존재 하에서 바이러스 및/또는 박테리아를 감염시킨 뒤, FITC-텍스트란의 세포 주위 투과성을 검출한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 실시예 1에서 HNECs에 CD47 특이적 shRNA(CD47 shRNA) 또는 스크램블 shRNA로 존재 하에서 바이러스 및/또는 박테리아를 감염시킨 뒤, 경상피 저항성(TEER)을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 실시예 1에서 HNECs에 IgG 또는 항-CD47 항체의 존재 하에서 바이러스 및/또는 박테리아를 감염시킨 뒤, 광학 현미경으로 관찰한 사진을 나타낸 것이다.

도 7은 실시예 1에서 HNECs에 IgG 또는 항-CD47 항체의 존재 하에서 바이러스 및/또는 박테리아를 감염시킨 뒤, FITC-텍스트란의 세포 주위 투과성을 검출한 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 실시예 1에서 HNECs에 IgG 또는 항-CD47 항체의 존재 하에서 바이러스 및/또는 박테리아를 감염시킨 뒤, 경상피 저항성(TEER)을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 실시예 2에서 HBECs에 CD47 특이적 shRNA(CD47 shRNA) 또는 스크램블 shRNA로 형질 주입시킨 뒤, qRT-PCR로 CD47 유전자의 발현 수준을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 실시예 2에서 HNECs에 CD47 특이적 shRNA(CD47 shRNA) 또는 스크램블 shRNA로 형질 주입시킨 뒤, 웨스턴 블롯으로 CD47 단백질의 발현 수준을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 실시예 2에서 HBECs에 CD47 특이적 shRNA(CD47 shRNA) 또는 스크램블 shRNA의 존재 하에서 바이러스 및/또는 박테리아를 감염시킨 뒤, FITC-텍스트란의 세포 주위 투과성을 검출한 결과를 나타낸 것이다.

도 12는 실시예 2에서 HBECs에 IgG 또는 항-CD47 항체의 존재 하에서 바이러스 및/또는 박테리아를 감염시킨 뒤, FITC-텍스트란의 세포 주위 투과성을 검출한 결과를 나타낸 것이다.

도 13은 실시예 3의 실험 설계도를 간략히 나타낸 것이다.

도 14는 실시예 3에서 바이러스-박테리아 중복 감염 마우스 모델에 항-마우스 CD47 항체 또는 대조군으로 IgG를 주입한 뒤 마우스의 생존율의 변화를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 15는 실시예 3에서 바이러스-박테리아 중복 감염 마우스 모델에 항-마우스 CD47 항체 또는 대조군으로 IgG를 주입한 뒤 마우스의 생존율의 변화를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

## [0048] 실시예

- [0050] [실시예 1] 인-비트로에서의 중복 감염 치료 효과의 평가(1)
- [0051] 1. 세포 배양
- [0052] 인간 코 상피 세포(Human nasal epithelial cells; HNECs)를 코의 폴립(polyps)으로부터 분리한 뒤 공기-액체 계면(air-liquid interface; ALI) 배양 시스템으로 배양하였다. ALI 배양을 위하여 2 계대의 HNECs를 12 mm, 0.45  $\mu\text{m}$  포어 트랜스웰-클리어 배양 삽입물(Costar)에  $2 \times 10^5$  세포/ $\text{cm}^2$ 의 밀도로 접종하였다. 세포를 기본 상피 배양 배지와 돌베코 변형 이글 배지(Lonza)의 1:1 혼합물에 이하의 성장 인자를 첨가하여 배양하였다: 하이드로코티손(hydrocortisone) (0.5  $\mu\text{g/ml}$ ), 인슐린(insulin) (5  $\mu\text{g/ml}$ ), 트랜스페린(transferrin) (10  $\mu\text{g/ml}$ ), 에피네프린(epinephrine) (0.5  $\mu\text{g/ml}$ ), 트리요오트티로닌(triiodothyronine) (6.5  $\mu\text{g/ml}$ ), 겐타마이신(gentamicin) (50  $\mu\text{g/ml}$ ), 암포테리신-B(amphotericin-B) (50  $\mu\text{g/ml}$ ), 레티노산(retinoic acid) (15 ng/ml), 소 뇌하수체 추출물(bovine pituitary extract) (50  $\mu\text{g/ml}$ ), 소 혈청 알부민(bovine serum albumin) (1.5  $\mu\text{g/ml}$ ), 및 상피 성장 인자(epidermal growth factor) (0.5 ng/ml). 세포가 트랜스웰 막을 채우면, 트랜스웰의 끝단을 공기에 노출시켰다. 기저 배양 배지를 14일 간 매일 교체해 주었다. ALI 배양 14일 후, 충분히 분화된 HNECs를 사용하여 바이러스 및 박테리아의 중복 감염을 유도하였다.
- [0053] 2. 바이러스 및 박테리아의 접종
- [0054] A형 인플루엔자 바이러스 (H1N1, Korea/01/2009)와, 스타필로코커스 아우레우스 (*S. aureus*, ATCC® 29213™)를 본 실험에 사용하였다. 바이러스 역가(viral titer)는 플라크 어췌이로 결정하였고, 완전히 분화된 HNECs에 상기 A형 인플루엔자 바이러스 MOI=1로 2 시간 동안 접종하였다. 접종 후 세포를 PBS를 3회 세척한 뒤 신선한 배지로 교체해 주었다. 다음날, 바이러스 감염된 세포에 *S. aureus*를 접종하여 중복 감염을 유도하였다. *S. aureus* 콜로니를 Bacto™ Brain Heart Infusion (BHI) (BD Biosciences) 아가 플레이트에서, 37 °C의 온도 하에서 밤새 배양하였다. 박테리아 접종 하루 전에 콜로니를 10 ml BHI 배지에 접종한 뒤 진탕 배양기에서 200 rpm으로 교반하며 37 °C의 온도 하에서 밤새 배양하였다. 다음날, 배양 배지를 신선한 BHI 배지에 접종한 후 OD 600이 1에 달할 때까지 진탕 배양기 상에서 배양하였다. 배양 배지를 8000 rpm으로 10 분 동안 원심 분리한 후 PBS로 3회 세척하였다.
- [0055] 박테리아 감염, 즉 중복 감염을 위하여, HNECs를 mock-감염(PBS) 또는 *S. aureus*로 MOI=2 및 5로 3 시간 동안 접종하였다. 접종 후 세포를 PBS를 3회 세척한 뒤 신선한 배지로 교체해 주었다.
- [0056] 이후, 분석을 위하여 CD47 단일클론항체(Invitrogen)를 사용하여 중화 어췌이를 수행하였다. 간단히는 A형 인플루엔자 바이러스 감염 후 HNECs에 CD47 항체 (2  $\mu\text{g/ml}$  in 200  $\mu\text{l}$  PBS)로 1 시간 동안 처리한 뒤 PBS로 3회 세척한 후 *S. aureus*로 감염시켰다.
- [0057] 3. shRNA 실험
- [0058] 인간 CD47 녹다운을 위하여, 플라스미드-기반 렌티바이러스 shRNA (Lugen Sci Co., Ltd)를 사용하였다. CD47-특이적 shRNA의 서열은 다음과 같다: 5'-GCA TGG CCC TCT TCT GAT TTC-3'(서열번호 2); 및 스크램블 shRNA(scrambled shRNA; sc-shRNA)는 다음과 같다: 5'-GCA CTA CCA GAG CTA ACT CAG ATA GTA CT-3'(서열번호 3). 2 계대에서 폴리브렌 시약(Lugen Sci Co., Ltd)을 이용하여 HNECs를 MOI=10 shRNAs로 4 시간 동안 형질 주입시켰다. 형질 주입 후 shRNA 처리 배지를 신선한 배지로 교체해 주었다.
- [0059] 4. 면역형광 공초점 현미경
- [0060] 면역형광 염색을 위하여, 세포 슬라이드를 4% 파라포름알데히드로 20분 동안 고정시킨 뒤, 0.1% Triton X-100 (Amresco)로 5 분간 투과시키고, 50 mM 암모늄 클로라이드(Sigma Aldrich)를 15 분간 처리하였다. 블러킹을 위하여, 세포 슬라이드를 0.1% 소 혈청 알부민 (BSA), 0.1% Triton X-100, 1% 정상 당나귀 혈청(normal donkey serum; NDS)으로 상온에서 1 시간 동안 배양하였다. 이후, 세포 슬라이드를 토끼 다클론 ZO-1 항체 (Invitrogen) 및 마우스 단일클론 CD47 항체 (Invitrogen)로, Dako 항체 희석액 (Dako)에서 4 °C 온도 하에서 밤새 배양하였다. 2차 항체 배양 후 세포 슬라이드를 Fluoroshield™ 로 DAPI (Sigma Aldrich)로 커버 슬립하고 공초점 레이저-스캐닝 현미경 (LSM780, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Germany)으로 분석하였다.
- [0061] 5. 웨스턴 블롯
- [0062] 웨스턴 블롯을 위해, HNECs를 Halt™ 프로테아제 & 포스파타제 억제제 단일-용도 콕테일, EDTA-프리 (100X)

(Thermo SCIENTIFIC)를 포함하는 RIPA 버퍼(Sigma Aldrich)를 사용하였다. 8% SDS-PAGE 겔을 이용하여 단백질을 25 ug를 분리한 뒤 PVDF 막(Merck Millipore)에 이동시켰다. 막을 0.5% Tween 20 (TTBS)를 함유하는 Tris-버퍼 식염수(50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 150 mM NaCl)에서 5% 탈지유로 상온에서 1 시간 동안 배양하고, 토끼 다클론 ZO-1 항체(Invitrogen), 마우스 단일클론 CD47 항체(Invitrogen)로 4 °C에서 밤새 배양하였다. 2차 항체로 배양한 뒤 타겟 단백질 밴드를 Pierce ECL 웨스턴 블롯 기질(Thermo scientific)로 검출하였다.

6. 세포 주위 투과성

HNECs에 바이러스 및/또는 박테리아 감염 후, HNECs의 끝단에 4-kd 플루오로세인 이소티오시아네이트(FITC)-텍스트란(Sigma Aldrich, 2 µg/ml in 200 µl HBSS)을 처리하였다. 배양 2 시간 후, 기저 배지를 회수하여 FITC-텍스트란의 세포 주위 투과성을 CYTATION 5 이미징 리더(BioTEK)를 이용하여 검출하였다.

7. 경상피 저항성(transsepithelial Resistance; TEER)의 측정

HNECs에 바이러스 및/또는 박테리아 감염 후, EVOM 볼트미터(World Precision Instruments, Sarasota, FL)을 이용하여 경상피 저항성을 측정하였다.

8. HNECs에서 CD47의 너-다운 및 중화에 의한 바이러스-박테리아 중복 감염의 치료 효과 확인

앞서, HNECs에 CD47 특이적 shRNA(CD47 shRNA) 또는 스크램블 shRNA로 형질 주입시킨 뒤, qRT-PCR 또는 웨스턴 블롯으로 CD47 유전자 또는 단백질의 발현 수준을 확인한 결과, CD47 특이적 shRNA(CD47 shRNA)로 형질 주입시킨 경우 CD47 유전자 및 단백질의 발현 수준이 현저히 감소한 것을 확인할 수 있었고(도 1 및 2), 표면 단백질 CD47의 면역형광 Z-스택 데이터를 분석한 결과에서도 CD47 특이적 shRNA(CD47 shRNA)로 형질 주입시킨 경우 CD47 단백질의 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다(도 3).

다음으로, CD47 특이적 shRNA(CD47 shRNA) 또는 스크램블 shRNA의 존재 하에서, HNECs에 바이러스 및/또는 박테리아를 감염시킨 뒤 세포 주위 FITC-텍스트란 투과성 어세이를 수행한 결과, 스크램블 shRNA의 존재 하에서 바이러스와 박테리아를 중복 감염시키자 바이러스만을 감염시킨 경우에 비하여 투과성이 현저히 증가하였으나, CD47 특이적 shRNA(CD47 shRNA)를 형질 주입한 경우에는 바이러스만 감염시킨 경우와 비교하여 투과성의 증가 수준이 미미하였고, 스크램블 shRNA를 주입한 경우와 비교하여도 투과성이 현저히 낮은 것을 확인할 수 있었다(도 4). 한편, 경상피 저항성(TEER)의 변화를 측정한 결과, 스크램블 shRNA의 존재 하에서 바이러스와 박테리아를 중복 감염시키자 바이러스만 감염시킨 경우와 비교하여 경상피 저항성이 현저히 감소하였으나, CD47 특이적 shRNA(CD47 shRNA)를 형질 주입한 경우에는 바이러스만 감염시킨 경우와 비교하여 경상피 저항성의 감소 수준이 미미하였고, 스크램블 shRNA를 주입한 경우와 비교하여도 경상피 저항성이 현저히 높은 것을 확인할 수 있었다(도 5).

HNECs 세포에 바이러스 및/또는 박테리아를 감염시키고 IgG 또는 항-CD47 항체를 처리한 뒤 광학 현미경으로 이들 세포를 관찰한 결과, HNECs 세포에 바이러스 단독 또는 박테리아 단독 감염 시킨 경우에 비하여 이들을 중복 감염 시켰을 때 세포의 수가 현저히 감소하였고, IgG를 처리하여도 여전히 세포의 수가 매우 낮은 것을 확인할 수 있었지만, 항-CD47 항체를 처리하자 세포의 수가 매우 증가한 것을 확인할 수 있었다(도 6). 또한, 항-CD47 항체 또는 IgG의 존재 하에서, HNECs에 바이러스 및/또는 박테리아를 감염시킨 뒤 세포 주위 FITC-텍스트란 투과성 어세이를 수행한 결과, IgG의 존재 하에서 바이러스와 박테리아를 중복 감염시키자 바이러스만을 감염시킨 경우에 비하여 투과성이 현저히 증가하였으나, 항-CD47 항체를 처리한 경우에는 바이러스만 감염시킨 경우와 비교하여 투과성의 증가 수준이 미미하였고, IgG를 처리한 경우와 비교하여도 투과성이 현저히 낮은 것을 확인할 수 있었다(도 7). 경상피 저항성(TEER)의 변화를 측정한 결과, IgG의 존재 하에서 바이러스와 박테리아를 중복 감염시키자 바이러스만 감염시킨 경우와 비교하여 경상피 저항성이 현저히 감소하였으나, 항-CD47 항체를 처리한 경우에는 바이러스만 감염시킨 경우와 비교하여 경상피 저항성의 감소 수준이 미미하였고, IgG를 처리한 경우와 비교하여도 경상피 저항성이 현저히 높은 것을 확인할 수 있었다(도 8).

[실시예 2] 인-비트로에서의 중복 감염 치료 효과의 평가(2)

상기 실시예 1과 동일한 방법으로 실험을 수행하되, '인간 코 상피 세포(HNECs)' 대신에 '인간 폐 상피 세포(human bronchial epithelial cells; HBECs)'를 사용하여 실험을 수행하였다.

HBECs에 CD47 특이적 shRNA(CD47 shRNA) 또는 스크램블 shRNA로 형질 주입시킨 뒤, qRT-PCR 또는 웨스턴 블롯으로 CD47 유전자 또는 단백질의 발현 수준을 확인한 결과, CD47 특이적 shRNA(CD47 shRNA)로 형질 주입시킨 경

우 CD47 유전자 및 단백질의 발현 수준이 현저히 감소한 것을 확인할 수 있었다(도 9 및 10).

[0075] 다음으로, CD47 특이적 shRNA(CD47 shRNA) 또는 스크램블 shRNA의 존재 하에서, HBECs에 바이러스 및/또는 박테리아를 감염시킨 뒤 세포 주위 FITC-텍스트란 투과성 어썰이를 수행한 결과, 스크램블 shRNA의 존재 하에서 바이러스와 박테리아를 중복 감염시키자 바이러스만을 감염시킨 경우에 비하여 투과성이 현저히 증가하였으나, CD47 특이적 shRNA(CD47 shRNA)를 형질 주입한 경우에는 바이러스만 감염시킨 경우와 비교하여 투과성의 증가 수준이 미미하였고, 스크램블 shRNA를 주입한 경우와 비교하여도 투과성이 현저히 낮은 것을 확인할 수 있었다(도 11).

[0076] 항-CD47 항체 또는 IgG의 존재 하에서, HBECs에 바이러스 및/또는 박테리아를 감염시킨 뒤 세포 주위 FITC-텍스트란 투과성 어썰이를 수행한 결과, IgG의 존재 하에서 바이러스와 박테리아를 중복 감염시키자 바이러스만을 감염시킨 경우에 비하여 투과성이 현저히 증가하였으나, 항-CD47 항체를 처리한 경우에는 바이러스만 감염시킨 경우와 비교하여 투과성의 증가 수준이 미미하였고, IgG를 처리한 경우와 비교하여도 투과성이 현저히 낮은 것을 확인할 수 있었다(도 12).

[0078] [실시예 3] 인-비보에서의 중복 감염 치료 효과의 평가(3)

[0079] 도 13은 이하의 실험 설계도를 나타낸 것이다.

[0080] 1. 바이러스-박테리아 중복 감염 마우스 모델의 제작

[0081] 8주령 C57BL/6 수컷 마우스를 Orient Bio Inc. (Seoul, Korea)로부터 구입하였다. 마우스를 졸레틸(Zoletil):롬퐁(Rompun):PBS의 1:1:8 혼합물(100  $\mu$ l)을 복강 내 주사하여 마취시킨 뒤 20  $\mu$ l 멸균 PBS 내 인플루엔자 바이러스 A/Korea/01/2009 H1N1 100 PFU로 비강 감염시켰다. 바이러스 감염 7일 후 20  $\mu$ l 멸균 PBS 내 *S. aureus* (ATCC® 29213<sup>TM</sup>) 105 CFU를 비강을 통해 서서히 주입하였다. 마우스 체중을 매일 측정하고 다른 질환의 증상은 없는 지 모니터링 하였다. 마우스에 심각한 질환의 증상으로, 예를 들면 사료 및/또는 물의 섭취가 어려운 경우, 드러누운 자세, 무반응, 심각한 호흡 곤란, 심각한 통증 또는 신체 조건의 상실 등이 발생하면 안락사시켰다. 마우스의 사망률 및 몸무게 감소율을 29 일째까지 관찰하였다.

[0082] 2. 인-비보 항체 블러킹

[0083] 바이러스 감염 5일 및 7 일 째에, 마우스에 20  $\mu$ l 멸균 PBS 내 항-마우스 CD47 항체(MIAP301, BioXCell) 160  $\mu$ g 또는 항-마우스 CD47 항체(B6.H12, BioXCell) 160  $\mu$ g를 비강을 통해 주입하였다. 바이러스 감염 7 일 째에 마우스를 졸레틸(Zoletil):롬퐁(Rompun):PBS의 1:1:8 혼합물(100  $\mu$ l)을 복강 내 주사하여 마취시킨 뒤 상기 항-마우스 CD47 항체를 2차로 주입하였다. 30 분 경과 후, *S. aureus* (ATCC® 29213<sup>TM</sup>) 105 CFU를 마우스의 비강을 통해 서서히 주입하였다.

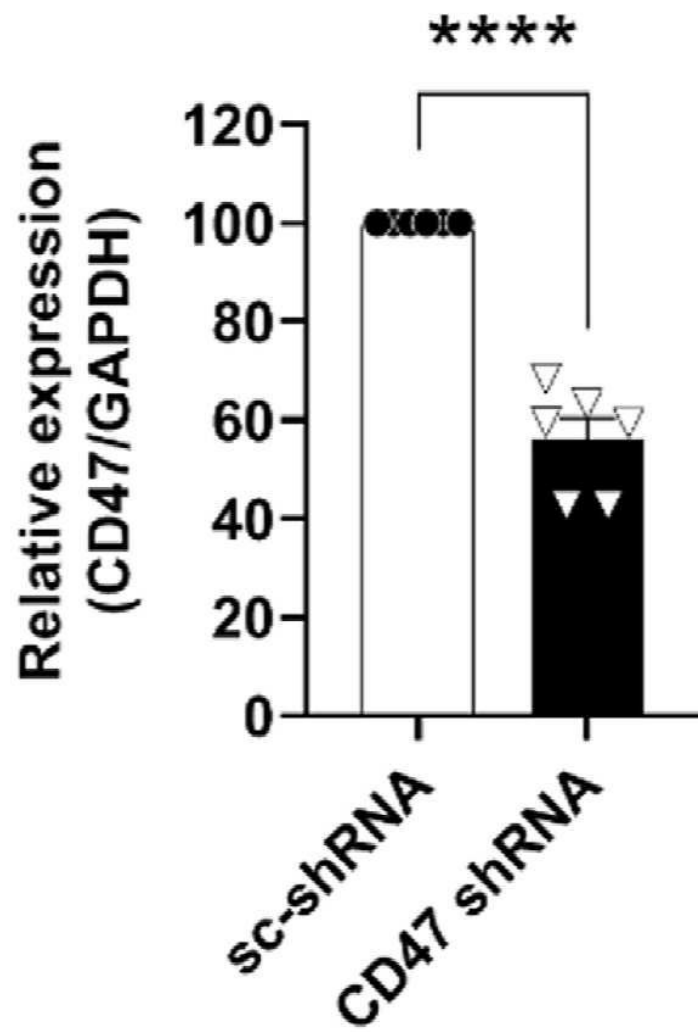
[0084] 3. 바이러스-박테리아 중복 감염 마우스 모델에서 항-CD47 항체에 의한 치료 효과 확인

[0085] 상기 제작된 바이러스-박테리아 중복 감염 마우스 모델에 항-마우스 CD47 항체 또는 대조군으로 IgG를 주입한 결과, 항-마우스 CD47 항체를 주입한 경우 마우스의 생존율이 현저히 증가한 것을 확인할 수 있었다(도 14 및 15).

[0087] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

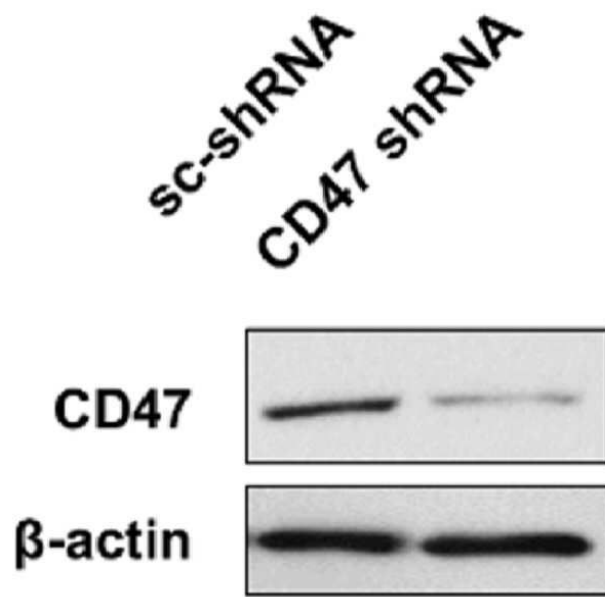
도면

도면1

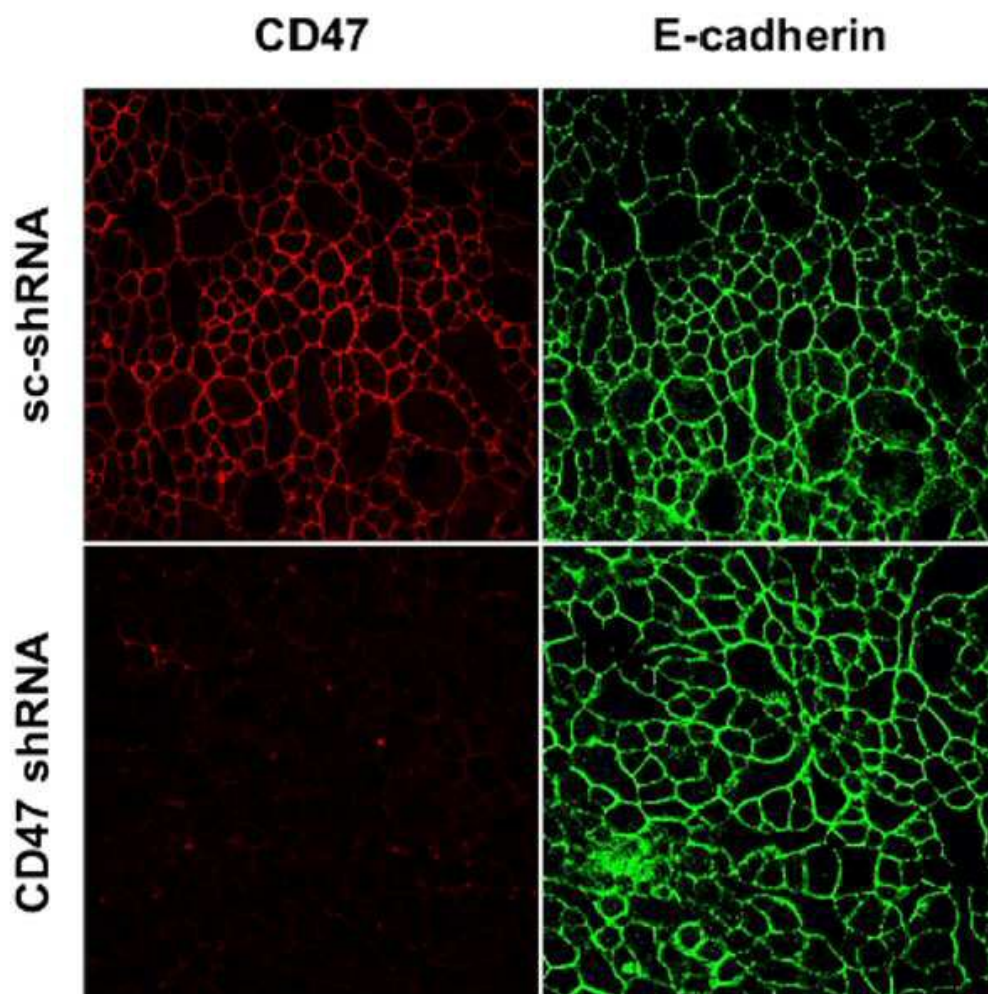




도면2

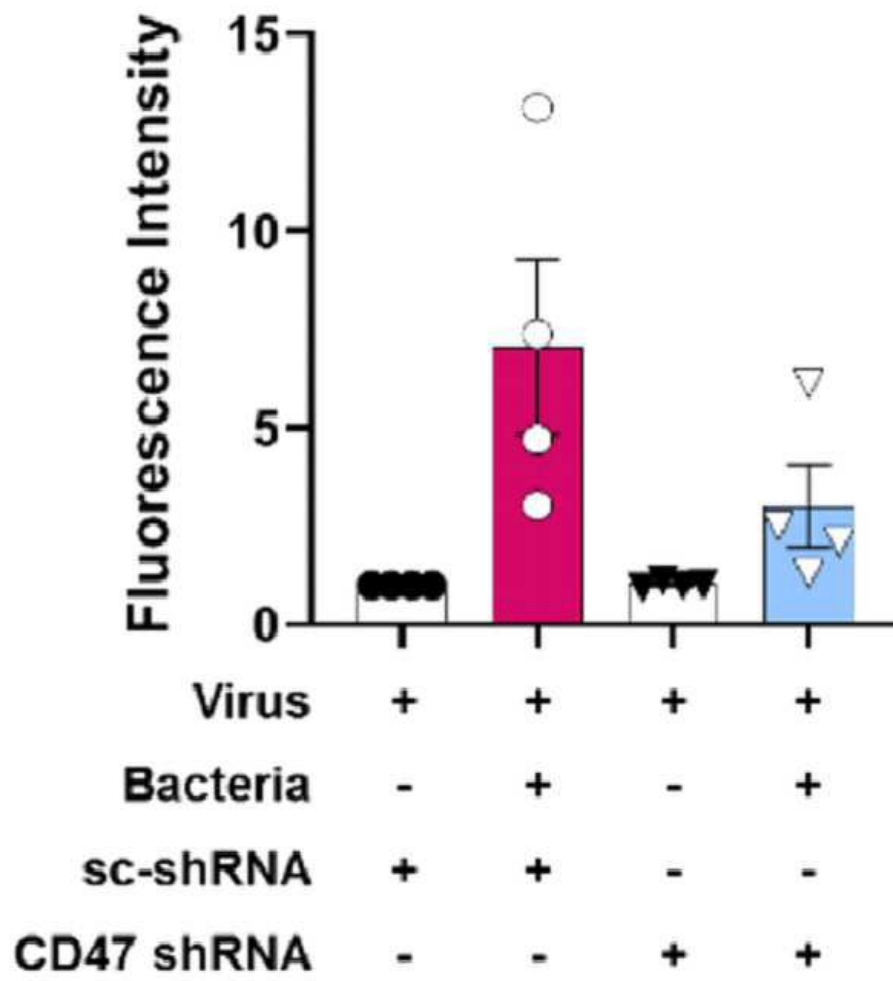


도면3

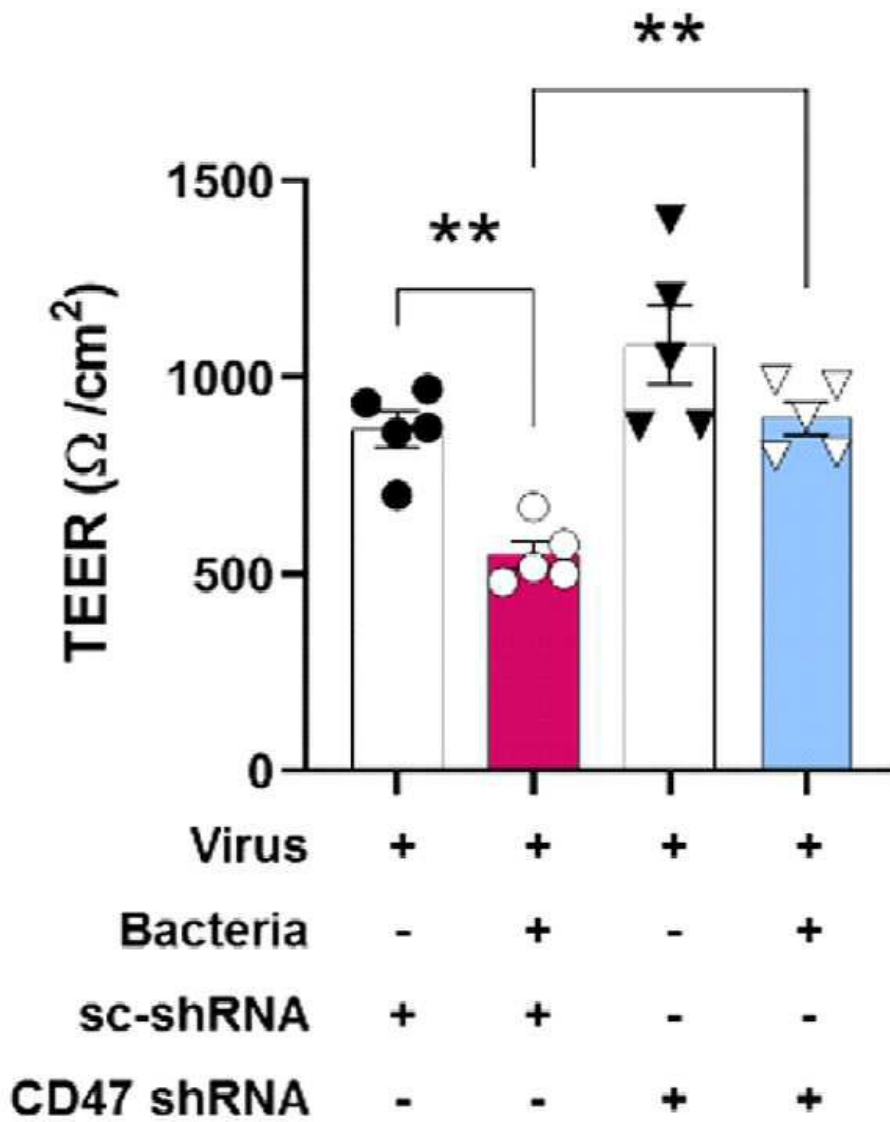




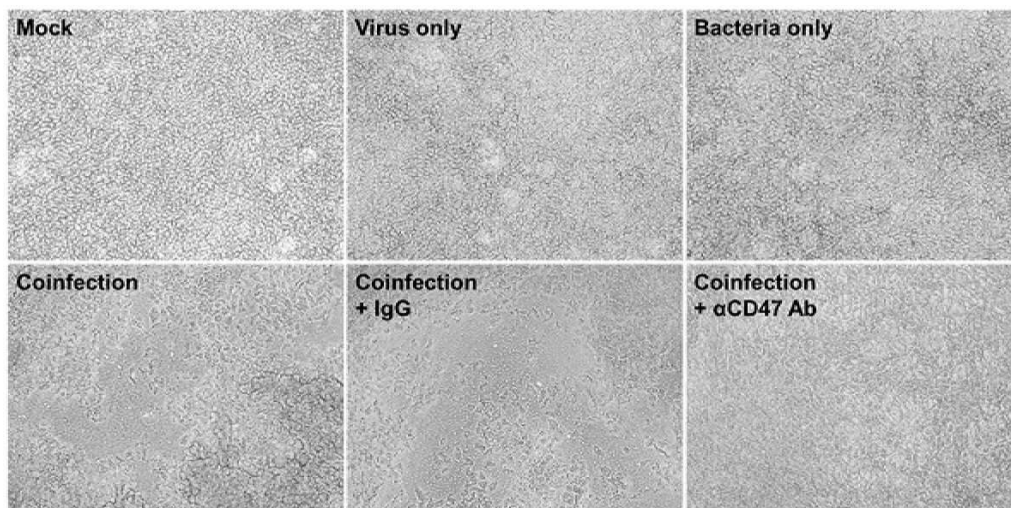
도면4



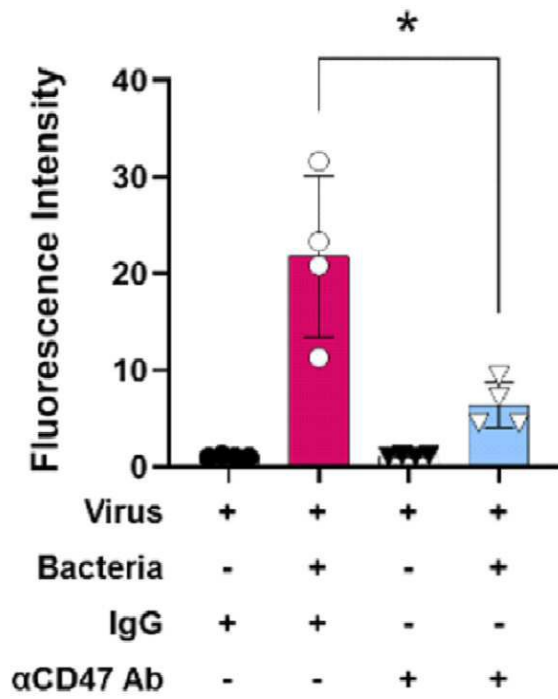
도면5



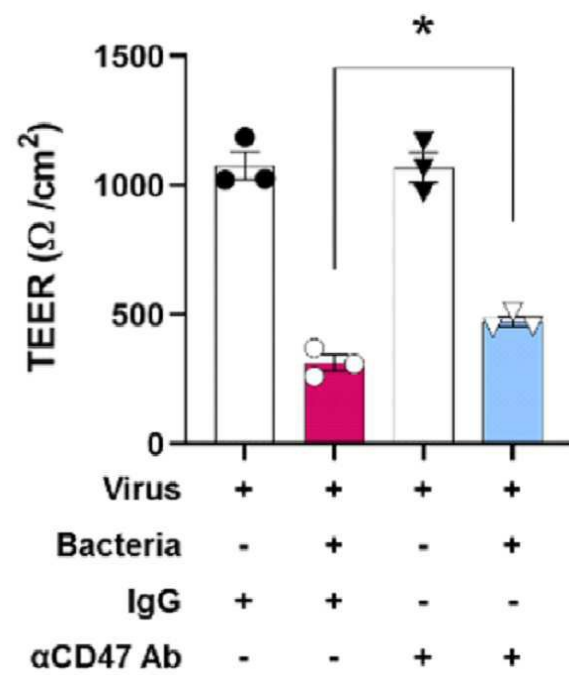
도면6



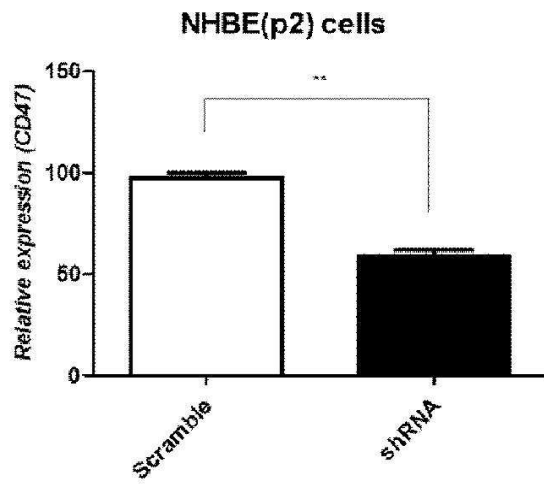
도면7



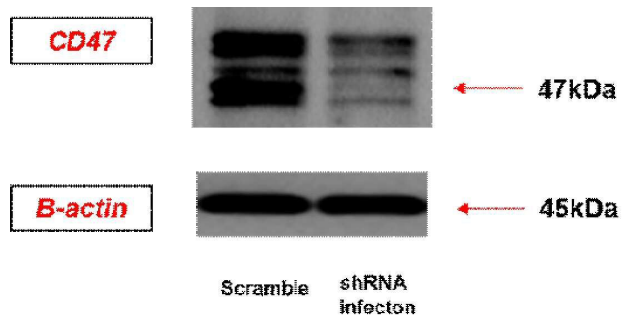
도면8



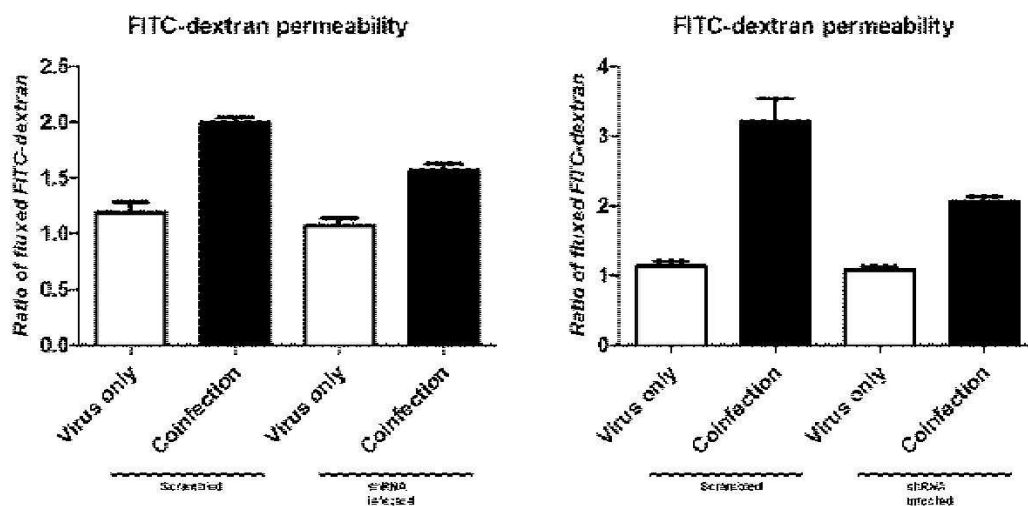
도면9



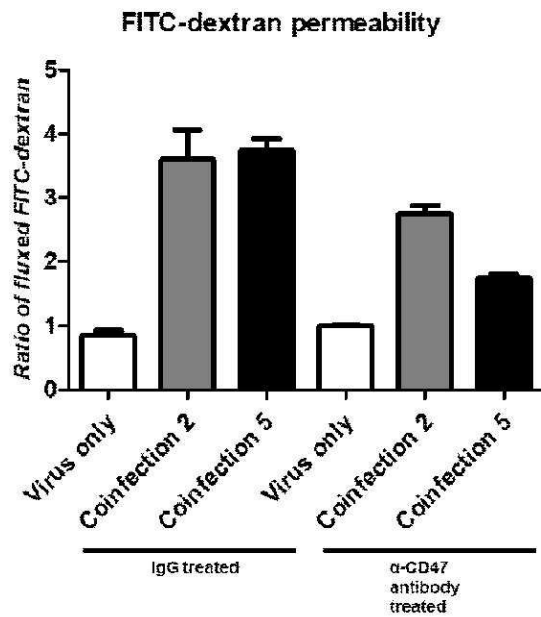
도면10



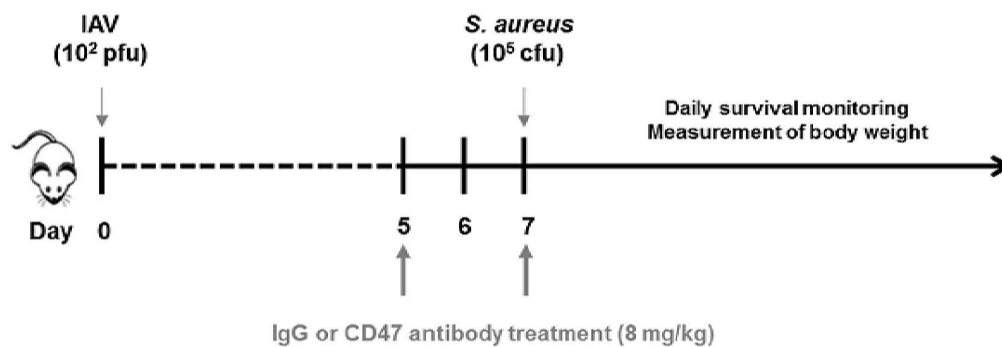
도면11



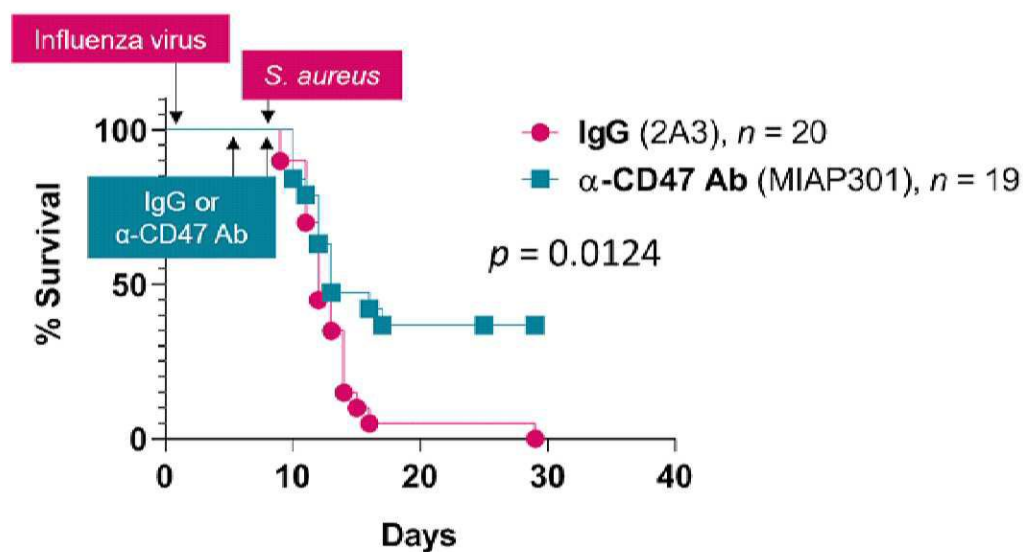
도면12



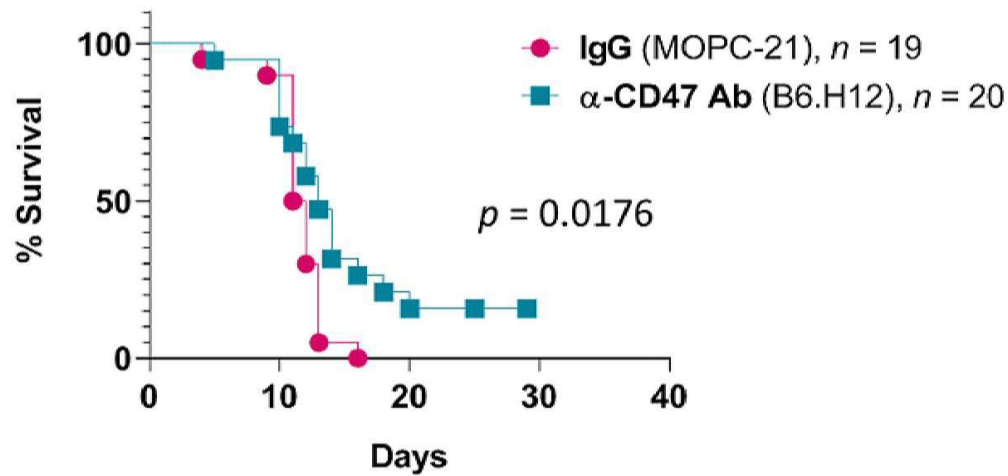
도면13



도면14



도면15



## 서열 목록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University  
 <120> Composition for treating superinfection of virus and bacteria  
 <130> PDPB214179  
 <160> 3  
 <170> KoPatentIn 3.0  
 <210> 1  
 <211> 293  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 1

Met Trp Pro Leu Val Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Ala Cys Cys Gly

1 5 10 15

Ser Ala Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe

20 25 30

Cys Asn Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala

35 40 45

Gln Asn Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp

50 55 60

Ile Tyr Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp

65 70 75 80

Phe Ser Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala

85 90 95



Ser Leu Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr

100 105 110  
 Thr Cys Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu  
 115 120 125  
 Leu Lys Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn Ile Leu  
 130 135 140  
 Ile Val Ile Phe Pro Ile Phe Ala Ile Leu Leu Phe Trp Gly Gln Phe  
 145 150 155 160  
 Gly Ile Lys Thr Leu Lys Tyr Arg Ser Gly Gly Met Asp Glu Lys Thr  
 165 170 175

Ile Ala Leu Leu Val Ala Gly Leu Val Ile Thr Val Ile Val Ile Val  
 180 185 190  
 Gly Ala Ile Leu Phe Val Pro Gly Glu Tyr Ser Leu Lys Asn Ala Thr  
 195 200 205  
 Gly Leu Gly Leu Ile Val Thr Ser Thr Gly Ile Leu Ile Leu Leu His  
 210 215 220  
 Tyr Tyr Val Phe Ser Thr Ala Ile Gly Leu Thr Ser Phe Val Ile Ala  
 225 230 235 240  
 Ile Leu Val Ile Gln Val Ile Ala Tyr Ile Leu Ala Val Val Gly Leu

245 250 255  
 Ser Leu Cys Ile Ala Ala Cys Ile Pro Met His Gly Pro Leu Leu Ile  
 260 265 270  
 Ser Gly Leu Ser Ile Leu Ala Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Val Tyr  
 275 280 285

Met Lys Phe Val Glu

290

<210> 2

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD47 specific shRNA

<400> 2

gcatggccct cttctgattt c

21

<210> 3

<211> 29

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> scrambled shRNA

<400> 3

gcactaccag agctaactca gatagtact

29