



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년08월10일

(11) 등록번호 10-2143160

(24) 등록일자 2020년08월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/127 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)

A61K 47/42 (2017.01) A61K 47/46 (2017.01)

A61K 9/00 (2006.01) C07K 7/08 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/1271 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0005329

(22) 출원일자 2019년01월15일

심사청구일자 2019년01월15일

(65) 공개번호 10-2019-0087331

(43) 공개일자 2019년07월24일

(30) 우선권주장

1020180005253 2018년01월15일 대한민국(KR)

(56) 선행기술조사문헌

JP2015500825 A*

US20120244136 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

정보영

서울특별시 서초구 남부순환로 2343-10, 505동 1104호 (서초동, 서초3차대림이편한세상)

윤누리

서울특별시 서대문구 연세로 50-1 연세의료원 (신촌동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

리엔목특허법인

전체 청구항 수 : 총 15 항

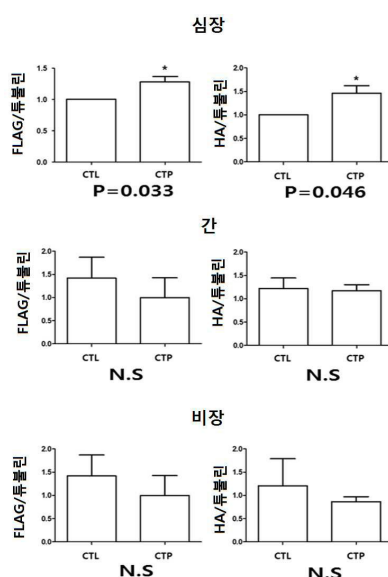
심사관 : 한정희

(54) 발명의 명칭 심장 표적 단백질을 함유한 마이크로베지클을 포함하는 활성 성분을 심장에 전달하기 위한 약학적 조성물 및 이를 이용한 방법

(57) 요약

활성 성분을 심장에 전달하기 위한 약학적 조성물, 활성 성분을 심장에 전달하기 위한 세포 유래 마이크로베지클을 제조하는 방법, 및 이를 이용하여 활성 성분을 심장에 전달하는 방법을 제공한다. 이에 따르면, 심장에 선택적 또는 특이적으로 활성 성분을 전달할 수 있다. 이에 의해, 심혈관계 질환을 진단 또는 치료하는데 이용할 수 있다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

A61K 47/42 (2013.01)
A61K 47/46 (2013.01)
A61K 9/0019 (2013.01)
C07K 7/08 (2013.01)
C07K 2319/03 (2013.01)

(72) 발명자

김효은

서울특별시 서대문구 연세로 50-1 연세의료원 (신촌동)

문다솜

서울특별시 서대문구 연세로 50-1 연세의료원 (신촌동)

박혜림

서울특별시 서대문구 연세로 50-1 연세의료원 (신촌동)

박혜원

서울특별시 서대문구 연세로 50-1 연세의료원 (신촌동)

강지영

서울특별시 서대문구 연세로 50-1 연세의료원 (신촌동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI16C0058

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 질병중심 중개중점연구

연구과제명 유전자치료 기법으로 성분 강화된 줄기세포에서 생산된 소포체를 이용한 심장 부정맥 치료

제 개발

기 여 율 2/5

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2016.04.01 ~ 2017.11.15

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711048968

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(미래부)

연구과제명 심장타겟 유전자 조작 엑소좀 개발 및 이를 이용한 심부전 치료제의 개발

기 여 율 2/5

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2017.03.01 ~ 2018.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI15C1200

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 국민건강임상연구사업

연구과제명 심방세동 항응고제, 부정맥 약물요법의 비교효과 연구

기 여 율 1/5

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2016.04.01 ~ 2017.11.15

명세서

청구범위

청구항 1

심장 표적 단백질(cardiac targeting peptide: CTP) 또는 그의 단편과, 엑소좀 막통과 단백질(exosomal transmembrane protein)의 융합 단백질로서,

상기 CTP는 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 포함하는 것인 융합 단백질; 및

상기 융합 단백질 및 활성 성분을 함유하는 세포 유래 마이크로베지클을 포함하는, 활성 성분을 심장에 전달하기 위한 약학적 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 CTP는 상기 마이크로베지클의 표면에 위치하는 것인 약학적 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 엑소좀 막통과 단백질은 LAMP-1, LAMP-2, CD13, CD86, 플로틸린(Flotillin), 및 신탭신(Syntaxin)-3로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 약학적 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 세포는 신장 세포인 것인 약학적 조성물.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 신장 세포는 인간 배아 신장 세포인 것인 약학적 조성물.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 마이크로베지클은 엑소좀인 것인 약학적 조성물.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 심장은 심장근육 세포인 것인 약학적 조성물.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 활성 성분은 심혈관계 질환의 진단, 예방, 치료, 또는 이들의 조합을 위한 약물인 것인 약학적 조성물.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 약물은 조영제, 방사성 동위원소, 형광 물질, 루시페라제, 또는 이들의 조합인 것인 약학적 조성물.

청구항 11

청구항 9에 있어서, 상기 약물은 항부정맥제(antiarrhythmic agent), 항혈소판제, 항응고제, 또는 이들의 조합인 것인 약학적 조성물.

청구항 12

청구항 1에 있어서, 상기 활성 성분은 상기 엑소좀의 지질이중층 또는 내부 수성층에 위치하는 것인 약학적 조성물.

청구항 13

CTP 또는 그의 단편과, 엑소좀 막통과 단백질의 융합 단백질을 발현시키는 벡터를 세포에 형질전환시키는 단계; 형질전환된 세포를 배양하여 세포 배양액을 수득하는 단계; 및

상기 세포 배양액으로부터 마이크로베지클을 분리하는 단계를 포함하는,

CTP 또는 그의 단편과, 엑소좀 막통과 단백질의 융합 단백질을 포함하는 세포 유래 마이크로베지클을 제조하는 방법으로서,

상기 CTP는 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 14

삭제

청구항 15

청구항 1의 약학적 조성물을 시험관 내 심장 세포 또는 인간을 제외한 포유동물에 투여하는 단계를 포함하는, 활성 성분을 심장 세포 또는 심장에 전달하는 방법.

청구항 16

삭제

청구항 17

청구항 15에 있어서, 상기 약학적 조성물은 생체 내로(in vivo) 인간을 제외한 포유동물에 투여되는 것인 방법.

청구항 18

청구항 17에 있어서, 상기 약학적 조성물은 인간을 제외한 포유동물의 혈관 내 주사로 투여되는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 심장 표적 단백질을 함유한 마이크로베지클을 포함하는 활성 성분을 심장에 전달하기 위한 약학적 조성물, 상기 마이크로베지클을 제조하는 방법, 및 상기 약학적 조성물을 이용한 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 심장 질환은 세계적으로 사망의 주요 원인으로 여겨지고 있으며, 급성 심장 마비 환자의 약 50%는 부정맥이 주요 원인이 되어 사망한 것으로 알려져 있다. 부정맥(arrhythmia)은 심장에서 전기 자극이 생성이 되지 않거나 자극의 전달이 제대로 이루어지지 않는 경우 규칙적인 수축이 계속되지 못하여 심장 박동이 비정상적으로 빨라지거나 늦어지거나 혹은 불규칙해지는 질병을 말한다. 심실세동(ventricular fibrillation)은 심실의 여러 부위가 무질서하게 뛰면서 분당 약 400 내지 600회로 매우 빠른 파형을 형성하고 이로 인해 불규칙한 맥박을 형성하는 부정맥이며, 심실빈맥(ventricular tachycardia)은 심실이 분당 100회 이상으로 빠르게 뛰면서 환자의 생명을 위협하는 치명적인 부정맥이다.

[0003] 엑소좀(exosome)은 여러 종류의 세포들로부터 분비되는 막 구조의 작은 소낭 또는 마이크로베지클이다. 엑소좀의 직경은 대략 30 nm 내지 100 nm인 것으로 보고되어 있다. 엑소좀은 전자 현미경을 통한 연구에서 원형질막(plasma membrane)으로부터 직접 떨어져 나가는 것이 아니라 다낭체(multivesicular bodies, MVBs)라고 불리는 세포내 특정 구획에서 기원하며 세포밖으로 방출, 분비되는 것으로 관찰되었다. 즉, 다낭체와 원형질막의 융합이 일어나면, 그러한 소낭들은 세포 밖 환경으로 방출되는데, 이것을 엑소좀이라고 부른다. 엑소좀 내에는 세포에서 유래된 다양한 종류의 단백질, 핵산, 지질 등이 포함되어 있는 것으로 보고되고 있다. 특히, 엑소좀은 마

이크로RNA(microRNA: miRNA)를 포함하는 것으로 알려져 있고, miRNA는 여러 종류의 mRNA를 차단할 수 있다. 엑소좀은 줄기 세포 등에 비해 종양 유발성 및 면역 반응 등의 위험성을 배제할 수 있다. 엑소좀 표면에는 다양한 단백질 등이 존재하여 여러 기관 또는 조직의 세포에 전달하는 약물 전달 시스템으로도 이용되고 있다(EP 2788019 B1). 그러나, 심장에 특이적으로 전달되는 엑소좀은 개발된 바가 없다.

[0004] 따라서, 엑소좀을 이용하여 심장에 선택적 또는 특이적으로 약물을 전달하는 약물 전달 시스템을 개발할 필요가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 활성 성분을 심장에 전달하기 위한 약학적 조성물을 제공한다.

[0006] 활성 성분을 심장에 전달하기 위한 세포 유래 마이크로베지클을 제조하는 방법을 제공한다.

[0007] 활성 성분을 심장에 전달하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0008] 일 양상은 심장 표적 단백질(cardiac targeting peptide: CTP) 또는 그의 단편과, 엑소좀 막통과 단백질(exosomal transmembrane protein)의 융합 단백질; 및

[0009] 상기 융합 단백질 및 활성 성분을 함유하는 세포 유래 마이크로베지클을 포함하는, 활성 성분을 심장에 전달하기 위한 약학적 조성물을 제공한다.

[0010] 상기 심장 표적 단백질(cardiac targeting peptide: CTP)은 심장 조직을 표적으로 하는 단백질이다. 상기 CTP는 외인성(exogenous) 단백질일 수 있다. 상기 CTP는 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 상기 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열은 사람 또는 포유동물에 주로 사용되는 코돈, 즉 코돈 선호도(codon usage)를 고려하여 변경할 수 있다.

[0011] 상기 CTP는 상기 마이크로베지클의 표면에 위치할 수 있다.

[0012] 상기 CTP의 단편은 CTP의 일부로서 5 개 내지 11 개, 6 개 내지 11 개, 7 개 내지 11 개, 8 개 내지 11 개, 9 개 내지 11 개, 또는 10 개 내지 11 개의 연속 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0013] 상기 엑소좀 막통과 단백질은 엑소좀의 이중막에 위치하는 단백질일 수 있다. 예를 들어, 상기 엑소좀 막통과 단백질은 LAMP(Lysosome-associated membrane protein)-1, LAMP-2, CD13, CD86, 플로틸린(Flotillin), 신타신(Syntaxin)-3, CD2, CD36, CD40, CD40L, CD41a, CD44, CD45, ICAM((Intercellular Adhesion Molecule)-1, 인테그린 알파(Integrin alpha)4, L1 단백질, LFA(Lymphocyte function-associated antigen)-1, 마크로파지-1 항원, Vti(Vesicle transport through interaction with t-SNAREs homolog)-1A, Vti-1B, CD3 앵클론, CD3 제타, CD9, CD18, CD37, CD53, CD63, CD81, CD82, CXCR4, FcR, GluR(Glutamate receptor)2/3, HLA-DM(human leukocyte antigen DM), 면역글로불린, MHC-I 성분, MHC-II 성분, TCR 베타, 및 테트라스파닌(tetraspanin)으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 상기 LAMP-2는 예를 들어 LAMP-2A, LAMP-2B 및 LAMP-2C이다.

[0014] 상기 융합 단백질에서 CTP는 엑소좀 막통과 단백질의 N-말단 방향에 위치할 수 있다. 상기 융합 단백질에서 CTP는 엑소좀의 외부 표면 방향에 위치하고, 엑소좀 막통과 단백질은 엑소좀의 지질 이중층에 통과하도록 배열될 수 있다.

[0015] 상기 융합 단백질은 CTP 및 엑소좀 막통과 단백질 외에, 신호 펩티드(signal peptide), 표지 단백질, 당화부위, 스페이스(spacer) 서열, 또는 이들의 조합을 더 포함할 수 있다. 상기 표지 단백질은 FLAG 태그, 헤마글루티닌(hemagglutinin: HA) 단백질, 히스티딘 태그, 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0016] 용어 "마이크로베지클(microvesicle)"은 여러 종류의 세포들에 존재하거나 세포로부터 분비되는 막 구조의 작은 소포를 말한다. 세포 외로 분비되는 마이크로베지클은 (i)엑소좀: 식균 기원의 직경 30 내지 100 nm의 막성 소포, (ii)엑토좀(shedding 마이크로베지클(shedding microvesicle: SMV)이라고도 함): 원형질막으로부터 직접 흘러지고 직경 50 내지 1000 nm의 큰 막성 소포, (iii) 세포자살성 수포(apoptotic bleb): 죽어가는 세포에 의해 유출된 직경 50 내지 5000 nm의 소포를 포함한다. 상기 마이크로베지클은 엑소좀일 수 있다. 엑소좀(exosome)은 여러 종류의 세포들로부터 분비되는 막 구조의 작은 소포이다. 엑소좀의 직경은 대략 30 내지 100 nm일 수 있다.

엑소솜은 전자 현미경을 통한 연구에서 원형질막(plasma membrane)으로부터 직접 떨어져 나가는 것이 아니라 다낭체(multivesicular body: MVB)라고 불리는 세포내 특정 구획에서 기원하며 세포밖으로 방출, 분비되는 것으로 관찰되었다. 즉, 다낭체와 원형질막의 융합이 일어나면, 그러한 소포들은 세포 밖 환경으로 방출되는데, 이것을 엑소솜이라고 부른다.

- [0017] 상기 세포는 신장 세포일 수 있다. 상기 신장 세포는 인간 배아 신장 세포(예, HEK293 세포)일 수 있다.
- [0018] 상기 세포 유래 마이크로베지클은 세포로부터 떨어져 나온 것일 수 있다.
- [0019] 상기 활성 성분은 심혈관계 질환의 진단, 예방, 치료, 또는 이들의 조합을 위한 약물일 수 있다. 상기 심혈관계 질환은 부정맥, 심실 세동, 심실 빈맥, 협심증, 심근경색증, 또는 이들의 조합일 수 있다. 상기 부정맥은 허혈 연관성 부정맥, 심방 세동 연관성 부정맥, 또는 이들의 조합일 수 있다. 용어 "진단"은 병명을 판정하는 행위를 말한다. 상기 진단은 병명, 병인, 병형(病形), 경증, 병상(病狀)의 상세한 양태, 합병증의 유무, 예후, 또는 이들의 조합을 판단하는 것을 포함할 수 있다. 용어 "예방"은 상기 약학적 조성물의 투여에 의해 심혈관계 질환의 발생을 억제하거나 그의 발병을 지연시키는 모든 행위를 말한다. 용어 "치료"는 상기 약학적 조성물의 투여에 의해 심혈관계 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 말한다.
- [0020] 상기 약물은 조영제, 방사성 동위원소, 형광 물질, 루시페라제, 또는 이들의 조합일 수 있다. 상기 조영제는 자기공명영상(MRI) 촬영, 초음파 촬영, 컴퓨터단층(CT) 촬영과 같은 검사 때에 조직이나 혈관을 잘 볼 수 있도록 각 조직의 X선 흡수차를 인위적으로 크게 함으로써 영상의 대조도를 크게 해주는 약물일 수 있다. 상기 조영제는 요오드 유기 화합물, 금속 콜로이드, 무기 염류(예, 황산 바륨, 옥시탄산비스무트, 요오드화물), 금속 콜로이드(예, 은-단백질 콜로이드, 요오드화은-젤라틴 콜로이드), 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.
- [0021] 상기 약물은 항부정맥제(antiarrhythmic agent), 항혈소판제, 항응고제, 또는 이들의 조합일 수 있다. 상기 항부정맥제는 나트륨 채널 차단제, 베타-차단제, 칼륨 채널 차단제, 칼슘 채널 차단제, 디곡신(digoxin), 아데노신(Adenosine), 또는 마그네슘 술페이트(Magnesium sulfate)일 수 있다. 상기 나트륨 채널 차단제는 예를 들어, 퀴니딘(Quinidine), 아즈말린(Ajmaline), 프로카인아미드(Procainamide), 디소피르아미드(Disopyramide), 리도카인(Lidocaine), 페니토인(Phenytoin), 멕실레틴(Mexiletine), 토카이니드(Tocainide), 엔카이니드(Encainide), 플레카이니드(Flecainide), 프로파페논(Propafenone), 및 모리시진(Moricizine)이다. 상기 베타-차단제는 예를 들어, 카르베딜롤(Carvedilol), 프로파놀롤(Propranolol), 에스몰롤(Esmolol), 티몰롤(Timolol), 메토프롤롤(Metoprolol), 아테놀롤(Atenolol), 비소프롤롤(Bisoprolol), 및 네비볼롤(Nebivolol)이다. 상기 칼륨 채널 차단제는 예를 들어, 아미오다론(Amiodarone), 소탈롤(Sotalol), 이부틸리드(Ibutilide), 도페틸리드(Dofetilide), 드로네다론(Dronedaron), 및 E-4031이다. 상기 칼슘 채널 차단제는 예를 들어, 베라파밀(Verapamil) 및 딜티아젠펜(Diltiazem)이다. 항응고제는 예를 들어, 와파린 및 헤파린이다. 항혈소판제는 예를 들어, 아스피린 및 클로피도그렐(Clopidogrel)이다.
- [0022] 상기 약물은 저해성 RNA를 포함할 수 있다. 상기 저해성 RNA는 세포 내에서 핵산의 전사, 번역, 또는 단백질의 기능을 저해하는 짧은 길이의 RNA일 수 있다. 상기 저해성 RNA는 마이크로RNA(microRNA: miRNA), 짧은 간섭 RNA(small interfering RNA: siRNA), 작은 헤어핀 RNA(small hairpin RNA: shRNA), 또는 이들의 단편일 수 있다.
- [0023] 상기 활성 성분은 상기 엑소솜의 지질 이중층 또는 내부 수성층에 위치할 수 있다. 활성 성분이 소수성인 경우, 상기 활성 성분은 상기 엑소솜의 지질 이중층에 위치할 수 있다. 활성 성분이 친수성인 경우, 상기 활성 성분은 상기 엑소솜의 내부 수성에 위치할 수 있다.
- [0024] 상기 활성 성분은 형질전환(transformation), 형질도입(transfection), 전기천공(electroporation), 또는 이들의 조합에 의해 상기 마이크로베지클에 도입될 수 있다.
- [0025] 상기 활성 성분은 심장에 특이적으로 또는 선택적으로 전달될 수 있다. 상기 활성 성분이 심장에 전달되는 비율은 다른 조직 예를 들어, 간, 비장, 신장, 폐, 골격근 또는 뇌에 대해 약 1.2배 이상, 약 1.5배 이상, 약 2배 이상, 또는 약 3배 이상 더 증가할 수 있다. 상기 활성 성분은 심장에 전달되는 비율은 음성 대조군에 비해 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상, 약 75% 이상, 또는 약 100% 증가할 수 있다.
- [0026] 상기 심장은 심장근육 세포일 수 있다. 상기 심장근육 세포는 예를 들어, H9C2 세포 또는 HL-1 심장근육 세포주이다.
- [0027] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다. 상기 담체는 부형제, 희석제 또는 보조제

를 포함하는 의미로 사용된다. 상기 담체는 예를 들면, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리트리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알기네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 생리식염수, PBS와 같은 완충액, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 및 미네랄 오일로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다. 상기 조성물은 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 풍미제, 유효제, 보존제, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.

[0028] 상기 약학적 조성물은 통상의 방법에 따라 임의의 제형으로 준비될 수 있다. 상기 조성물은 비경구 제형(예를 들면, 주사제) 또는 경구 투여 제형(예를 들면, 분말, 정제, 캡슐, 시럽, 알약, 또는 과립)으로 제형화될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 전신 제형, 또는 국부 제형으로 제조될 수 있다.

[0029] 상기 약학적 조성물은 상기 CTP 또는 그의 단편과, 엑소좀 막통과 단백질의 융합 단백질; 및 이를 함유하는 세포 유래 마이크로베지클을 유효한 양으로 포함할 수 있다. 용어 "유효한 양"은 예방 또는 치료를 필요로 하는 개체에게 투여되는 경우 예방 또는 치료의 효과를 나타내기에 충분한 양을 말한다. 상기 유효한 양은 당업자가 개체에 따라 적절하게 선택할 수 있다. 질환의 중증도, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 사용된 조성물과 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 상기 유효한 양은 상기 약학적 조성물 당 약 0.5 μg 내지 약 2 g, 약 1 μg 내지 약 1 g, 약 10 μg 내지 약 500 mg, 약 100 μg 내지 약 100 mg, 또는 약 1 mg 내지 약 50 mg일 수 있다.

[0030] 상기 약학적 조성물은 경구, 경피, 피하, 직장, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 국소, 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여될 수 있다. 상기 약학적 조성물은 예를 들어 혈관 내 주사로 투여된다. 상기 약학적 조성물의 투여량은 예를 들어, 성인 기준으로 약 0.001 mg/kg 내지 약 100 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 또는 약 0.1 mg/kg 내지 약 1 mg/kg의 범위 내 일 수 있다. 상기 투여는 1일 1회, 1일 다회, 또는 1주일에 1회, 2주일에 1회, 3주일에 1회, 또는 4주일에 1회 내지 1년에 1회 투여될 수 있다.

[0031] 다른 양상은 CTP 또는 그의 단편과, 엑소좀 막통과 단백질의 융합 단백질을 발현시키는 벡터를 세포에 형질전환시키는 단계;

[0032] 형질전환된 세포를 배양하여 세포 배양액을 수득하는 단계; 및

[0033] 상기 세포 배양액으로부터 마이크로베지클을 분리하는 단계를 포함하는,

[0034] CTP 또는 그의 단편과, 엑소좀 막통과 단백질의 융합 단백질을 포함하는 세포 유래 마이크로베지클을 제조하는 방법을 제공한다.

[0035] CTP, CTP의 단편, 엑소좀 막통과 단백질, 융합 단백질, 세포, 및 마이크로베지클은 전술한 바와 같다.

[0036] 상기 방법은 CTP 또는 그의 단편과, 엑소좀 막통과 단백질의 융합 단백질을 발현시키는 벡터를 세포에 형질전환시키는 단계를 포함한다.

[0037] 상기 벡터는 서열번호 1의 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열, 또는 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.

[0038] 상기 벡터는 발현 벡터일 수 있다. 발현 벡터는 세포 내에서 유전자 발현을 위해 고안된 컨스트럭트를 말한다. 상기 발현 벡터는 플라스미드 벡터 또는 바이러스 벡터일 수 있다. 상기 발현 벡터는 프로모터(promoter), 종결자(terminator), 인핸서(enhancer), 복제 원점(origin of replication), 선별 마커(selectable marker), 다중 클로닝 부위(multiple cloning site), 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.

[0039] 상기 형질전환(transformation)은 외인성 물질(예, 화합물, 단백질, 또는 핵산)이 마이크로베지클에 도입되는 것을 의미한다. 상기 형질전환은 형질감염(transfection), 리포펙션(lipofection), 전기천공(electroporation), 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.

[0040] 상기 방법은 형질전환된 세포를 배양하여 세포 배양액을 수득하는 단계를 포함한다.

[0041] 상기 방법은 상기 세포 배양액으로부터 마이크로베지클을 분리하는 단계를 포함한다. 상기 세포 배양액을 원심 분리, 밀도구배법, 여과, 침전, 투석, 면역친화성 크로마토그래피, 또는 이들의 조합을 수행하여 상기 마이크로베지클을 분리할 수 있다.

- [0042] 상기 방법은 상기 분리된 마이크로베지클에 활성 성분을 도입하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 분리된 마이크로베지클에 활성 성분을 도입하는 것은 형질전환, 형질도입, 전기천공, 또는 이들의 조합에 의해 수행될 수 있다.
- [0043] 다른 양상은 일 양상에 따른 약학적 조성물을 세포 또는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 활성 성분을 심장에 전달하는 방법을 제공한다.
- [0044] 상기 약학적 조성물, 세포, 활성 성분, 심장, 및 심장에 전달은 전술한 바와 같다.
- [0045] 상기 개체는 포유동물, 예를 들면, 인간, 소, 말, 돼지, 개, 양, 염소, 또는 고양이일 수 있다. 상기 개체는 심혈관계 질환을 앓거나 앓을 위험이 있는 개체일 수 있다.
- [0046] 상기 약학적 조성물을 시험관 내에서(in vitro) 세포에 투여될 수 있다.
- [0047] 상기 약학적 조성물은 생체 내로(in vivo) 개체에 투여될 수 있다. 투여 방법은 경구 또는 비경구 투여일 수 있다. 투여 방법은 경구, 경피, 피하, 직장, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 국소, 코안(intranasal), 기관내(intratracheal), 또는 피내 경로일 수 있다. 예를 들어, 상기 약학적 조성물은 개체에 혈관 내 주사로 투여된다. 상기 약학적 조성물은 전신적으로 또는 국부적으로 투여될 수 있고, 단독으로 또는 다른 약학적 활성 화합물과 함께 투여될 수 있다.
- [0048] 상기 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [0049] 상기 투여량은 예를 들어, 성인 기준으로 약 0.001 mg/kg 내지 약 100 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 또는 약 0.1 mg/kg 내지 약 1 mg/kg의 범위 내 일 수 있다. 상기 투여는 1일 1회, 1일 다회, 또는 1주일에 1회, 2주일에 1회, 3주일에 1회, 또는 4주일에 1회 내지 1년에 1회 투여될 수 있다.

발명의 효과

- [0050] 일 양상에 따른 활성 성분을 심장에 전달하기 위한 약학적 조성물, 활성 성분을 심장에 전달하기 위한 세포 유래 마이크로베지클을 제조하는 방법, 및 이를 이용하여 활성 성분을 심장에 전달하는 방법에 따르면, 심장에 선택적 또는 특이적으로 활성 성분을 전달할 수 있다. 이에 의해, 심혈관계 질환을 진단 또는 치료하는데 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0051] 도 1은 일 양상에 따른 방법의 간단한 모식도로서, 심장 표적 단백질(CTP)을 함유한 엑소솜을 심장 세포에 특이적으로 전달하는 방법을 나타낸다.
- 도 2는 CTP 암호화 뉴클레오타이드 서열을 포함한 LAMP2B 플라스미드의 모식도이다.
- 도 3은 세포 배양액으로부터 엑소솜을 분리하는 과정을 나타내는 모식도이다.
- 도 4는 세포 및 세포 배양액으로부터 분리된 엑소솜의 단백질을 면역블로팅으로 확인한 이미지이다.
- 도 5는 CTP-LAMP2 플라스미드와 CD81-mcherry의 공형질전환된 세포로부터 분리된 엑소솜의 발현 양상을 형광현미경(A), 면역블로팅(B), 및 나노입자 추적 분석법(C)으로 확인한 결과이다.
- 도 6은 시험관 내에서 신장 세포주 또는 심장 세포주의 시간에 따른 엑소솜 전달을 나타내는 형광 현미경 이미지이다(화살표: 세포내 엑소솜 전달).
- 도 7은 엑소솜을 생쥐의 꼬리 정맥에 주사한 뒤 생쥐의 심장, 간, 및 비장 조직에서 엑소솜 단백질의 발현 수준을 면역블로팅으로 확인하여 산출한 그래프이다(CTL: 대조군 엑소솜 주사, CTP: CTP 엑소솜 주사, *: $P < 0.1$, N.S.: 유의하지 않음).
- 도 8a는 쥐에 CTP 폴리펩티드 또는 CTP 엑소솜을 주사한 후 쥐 심장의 형광 이미지이고, 도 8b는 쥐의 심장 조직에서 측정된 형광 강도로부터 산출된 평균 복사 효율(average radiant efficiency)을 나타낸 그래프이다(n.s.: 유의하지 않음(not significant)).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0052] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0053] **실시예 1. 심장 표적 단백질을 함유한 엑소좀의 심장세포주 특이적 전달의 확인**
- [0054] **1. CTP-LAMP2B 플라스미드 제작**
- [0055] 발현 벡터를 준비하기 위해, pcDNA GNSTM-3-Flag-10-Lamp2b-HA(Addgene, Plasmid #71293)('LAMP2B 플라스미드')를 구매하였다.
- [0056] 알려진 심장 표적 단백질(CTP)의 아미노산 서열은 하기와 같다.
- [0057] CTP: N-APWHLSSQYSRT-C (서열번호 1)
- [0058] 서열번호 1의 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오타이드로서, 인간과 생쥐에서 자주 쓰이는 코돈으로 역번역한 뉴클레오타이드 서열은 하기와 같다.
- [0059] CTP 암호화 서열: 5'-GCCCCCTGGCACCTGTCTCCAGTACTCCCGGACC-3' (서열번호 2)
- [0060] 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 Bioneer 사(한국)에 의뢰하여 합성하였다. 합성된 폴리뉴클레오타이드를 중합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction: PCR)을 통해 LAMP2B 플라스미드에 삽입하였다(도 2). 도 2에서, 'SP'는 신호 펩티드(signal peptide)를 나타내고, 'GNSTM' 중 'NST'는 표준 N-연결된 당화 시퀀스(standard N-linked glycosylation sequon)를 나타내고, 'G'와 'M'은 포유동물에서 당화율을 증가시키는 아미노산을 나타내고, 'CTP'는 심장 표적 단백질(cardiac targeting peptide: CTP)을 나타낸다.
- [0061] 플라스미드에 삽입된 CTP 뉴클레오타이드 서열은 시퀀싱(sequencing)을 통해 확인하였다. CTP 암호화 서열이 삽입된 LAMP2B 플라스미드는 'CTP-LAMP2B 플라스미드'로 명명하였다.
- [0062] **2. CTP-LAMP2B 단백질의 세포 및 엑소좀에서 발현의 확인**
- [0063] **(1) CTP-LAMP2B 발현 엑소좀의 준비**
- [0064] HEK293 세포주(한국세포주은행(Korean Cell Line Bank), 한국)을 150 mm 세포 배양 접시에 접종하였다. 대조군인 LAMP2B 플라스미드 또는 실시예 1.1에 기재된 바와 같이 준비된 CTP-LAMP2 플라스미드를 준비된 HEK293 세포에 가하고, 리포펙타민 3000 시약(Thermo Fischer Scientific)을 사용하여 형질전환시켰다.
- [0065] 그로부터 약 8 시간 후, 혈청이 없고 글루타맥스 보조제(GlutaMax supplement)가 함유된 신선한 배지로 갈아주었다. 약 36시간 뒤 세포 배양 배지를 모아 300x g에서 10분간 원심분리하여 세포를 제거하였다. 그 후, 상층액을 2,000x g에서 10 분 동안 원심분리하여 세포 잔해물(debris)을 제거하고, 10,000x g에서 30 분 동안 원심분리하여 마이크로베식클(microvesicle)을 제거하였다. 상층액을 36,900 rpm의 속도로 2 시간 동안 초원심분리하여 엑소좀을 침전시키거나 침전된 엑소좀을 접선 유동 여과법(tangential flow filtration)을 이용해 엑소좀을 분리하였다. 분리한 엑소좀은 인산 완충 염수(phosphate buffered saline: PBS)로 투명해질 때까지 씻어준 뒤 재부유하였다(도 3). 배지를 모은 후 남은 세포주와 분리한 엑소좀은 RIPA 완충액에 녹인 후 660 nm Protein Assay 시약(Pierce)을 사용하여 정량하였다.
- [0066] **(2) 엑소좀 중 CTP-LAMP2B의 면역블로팅**
- [0067] 실시예 1.2(1)에서 준비된 세포 및 세포 배양액으로부터 분리된 엑소좀에서 CTP-LAMP2B의 발현을 확인하였다.
- [0068] 구체적으로, 동일한 양의 단백질에 대해 항-FLAG 항체(Sigma) 및 항-HA 항체(Santacruz Biotechnology)를 사용하여 면역블로팅을 수행하였다. 면역블로팅에 의해 얻어진 이미지를 도 4에 나타내었다.
- [0069] 도 4에 나타난 바와 같이, CTP-LAMP2B의 융합 단백질이 세포와 엑소좀 모두에서 발현되는 것을 확인하였다. CTP-LAMP2B의 융합 단백질을 함유한 엑소좀을 'CTP 엑소좀'으로 명명하였다. 한편, CTP가 없는 LAMP2B 플라스미드로 형질전환된 세포로부터 분리된 엑소좀을 '대조군 엑소좀'으로 명명하였다.
- [0070] **3. CTP-엑소좀의 확인**
- [0071] 실시예 1.2(1)에 기재된 바와 같이 준비된 CTP 엑소좀의 리포터로 사용하기 위해, mCherry-CD81 플라스미드(Addgene, 플라스미드 #55012)를 준비하였다. HEK293 세포에 mCherry-CD81 플라스미드(8 μ g)와, 대조군(8 μ g) 또는 CTP-LAMP2 플라스미드(8 μ g)를 함께 형질전환시켰다. 실시예 1.2(1)에 기재된 바와 같이 세포로부터 엑소좀

을 분리하였다.

[0072] 형질전환된 세포에서 mCherry-CD81 단백질의 발현을 형광현미경으로 확인하고 그 이미지를 도 5의 A에 나타내었다. 도 5의 A는 CD81-mcherry발현을 현미경으로 확인한 이미지이다(CTL: 대조군, CTP: CTP-LAMP2 플라스미드, BF: 명시야(Bright Field), TR: 적색 파장(Texas Red))

[0073] 형질전환된 세포 또는 이로부터 분리된 엑소좀의 단백질을 면역블로팅으로 확인하였다. 면역블로팅을 위해, 항-LAMP2 항체(Santacruz Biotechnology), 항-CD81 항체(Santacruz Biotechnology), 항-FLAG 항체(Sigma), 항-Alix 항체(Santacruz Biotechnology), 및 항-GAPDH 항체(Santacruz Biotechnology)를 사용하였다. 면역블로팅 결과를 도 5의 B에 나타내었다. 도 5의 B에 나타난 바와 같이, CD81 및 Alix는 엑소좀 표지 단백질이므로, 형질전환된 세포로부터 분리된 엑소좀에 CTP-LAMP2 융합 단백질이 존재함을 확인하였다.

[0074] 분리된 엑소좀을 NanoSight LM10(Malvern Instruments Ltd, UK) 기기를 사용한 나노입자 추적 분석법(Nanoparticle Tracking Analysis: NTA)을 이용하여 엑소좀의 크기와 농도를 10초의 비디오프레임으로 측정하였다. 분석된 이미지와 결과를 도 5의 C에 나타내었다(X 축: nm, Y 축: 농도($\times 10^6$ 개), 좌: 대조군 엑소좀, 우: CTP 엑소좀). 도 5의 C에 나타난 바와 같이, 입자의 크기 및 농도를 보아 엑소좀이 잘 분리되었다는 것을 확인하였다.

[0075] 4. 시험관 내 심장세포주로의 엑소좀 전달

[0076] 엑소좀을 처리하기 2일 전, HEK293 인간 배아 신장 세포주와 H9C2D 쥐 심장근육모 세포주를 6-웰 배양 접시에 접종하였다. 상기 세포에 20 μ g의 대조군 또는 CTP-엑소좀을 가하였다. 이때, 리포터로 CD81-mcherry 단백질을 사용하였다. 5, 24, 및 48 시간 후 형광현미경을 사용하여 상기 세포주의 엑소좀 흡수를 확인하였다. 형광현미경 이미지를 도 6에 나타내었다(CTL: 대조군 엑소좀, CTP: CTP 엑소좀).

[0077] 도 6에 나타난 바와 같이, HEK293 세포주에서는 대조군과 CTP 엑소좀 간에 세포내 흡수율 차이가 없지만, H9C2 세포주에서는 CTP 엑소좀이 세포내로 더욱 잘 흡수되었다. 따라서, 시험관 내에서 CTP가 스파이킹(spiking)된 엑소좀은 심장세포에 특이적으로 전달된다는 것을 확인하였다.

[0078] 5. CTP-엑소좀의 생쥐 심장세포 특이적 전달 확인

[0079] 분리한 150 μ g의 대조군과 CTP-엑소좀을 100 μ l의 5%(w/v) 포도당 용액에 재부유시켜 생쥐의 꼬리 정맥에 주입하였다(n=4). 24시간 후 쥐를 희생시키고, 쥐의 심장, 간, 및 비장 조직을 수득하였다. 수득된 조직을 RIPA 버퍼에 녹인 후 660 nm Protein Assay 시약(Pierce)을 이용해 정량하였다. 동일한 양의 단백질을 항-FLAG 항체(Sigma), 항-튜블린 항체(Santacruz Biotechnology), 및 항-HA 항체(Santacruz Biotechnology)를 사용하여 면역블로팅하였다. 면역블로팅의 밴드 강도를 측정하고, 심장, 간, 및 비장 조직에서 FLAG의 강도와 튜블린 강도의 비, 및 FLAG의 강도와 HA 강도의 비를 계산하여 FLAG의 상대적 발현 수준을 산출하였다. 각 조직에서 FLAG의 상대적 발현 수준을 나타내는 그래프를 도 7에 나타내었다(CTL: 대조군 엑소좀 주사, CTP: CTP 엑소좀 주사, *: $p < 0.1$, N.S.: 유의하지 않음(not significant)).

[0080] 도 7에 나타난 바와 같이, CTP 엑소좀이 대조군 엑소좀에 비해 심장에 더욱 잘 전달되었다. 따라서, CTP를 함유한 엑소좀은 심장 특이적 전달물질로서 유용함을 확인하였다.

[0081] 6. 생체 내에서 CTP-엑소좀의 생쥐심장세포 특이적 전달 확인

[0082] 실시예 1.1에 기재된 바와 같이 심장 표적 단백질(CTP)을 준비하고, CTP에 TAMRA(5-카르복시테트라메틸로다민, abcam) 염료를 부착시켜 CTP-TAMRA 폴리펩티드('CTP 폴리펩티드')를 제작하였다. 단백질 대조군으로 서열번호 3(5'-ARPLEHGSDKAT-3')의 폴리펩티드에 TAMRA를 부착시킨 대조군 폴리펩티드를 사용하였다. 서열번호 3의 폴리펩티드는 CTP와 길이는 동일하나 아미노산 서열이 상이한 것으로, 심장 세포에 특이적으로 전달되지 않는 폴리펩티드로 알려져 있다(Zahid et al., PLOS ONE, Aug 2010, vol.5, issue 8, e12252).

[0083] 실시예 1.3에 기재된 바와 같이 mCherry-CD81 단백질이 발현된 세포를 준비하고, 준비된 세포로부터 엑소좀을 분리하여 mcherry 형광이 표지된 엑소좀을 제작하였다.

[0084] CTP 폴리펩티드를 mcherry 형광이 표지된 엑소좀에 형질전환시켜 CTP 폴리펩티드를 함유한 엑소좀('CTP 엑소좀')을 준비하였다. 한편, 대조군 폴리펩티드를 mcherry 형광이 표지된 엑소좀에 형질전환시켜 대조군 폴리펩티드를 함유한 엑소좀('대조군 엑소좀')을 준비하였다.

[0085] 준비된 대조군 폴리펩티드, CTP 폴리펩티드, 대조군 엑소좀, 및 CTP 엑소좀을 쥐의 꼬리 정맥을 통해 투여하였

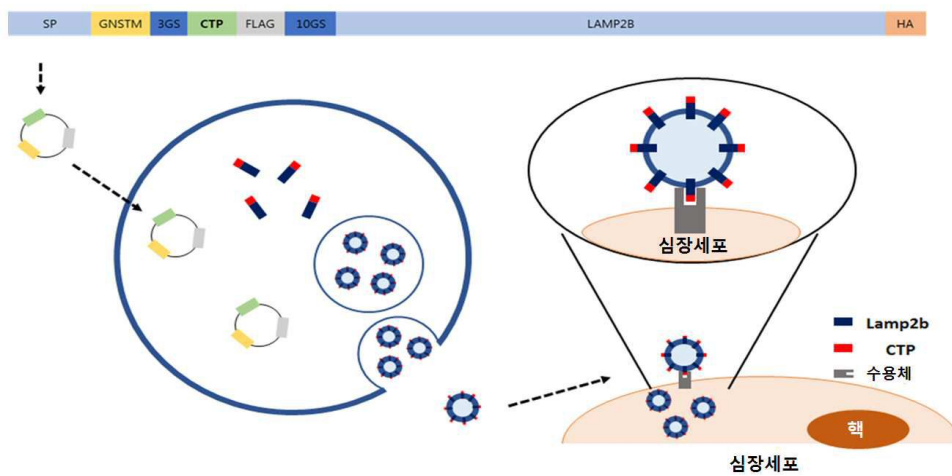
다(각 군에서, n=3). 폴리펩티드의 경우 쥐에 주사할 때에 마취 중임에도 쥐가 고통을 느꼈고 1 마리는 주사 놓는 도중 사망하였다.

[0086] 그 후, 쥐를 희생시키고, 심장을 적출하여 형광 이미지를 획득하였다. 획득된 이미지를 도 8a에 나타내었다. 쥐의 심장 조직에서 측정된 형광 강도로부터 평균 복사 효율(average radiant efficiency)를 산출하고, 그 결과를 도 8b에 나타내었다(n.s: 유의하지 않음(not significant)). 평균 복사 효율은 조사 범위에서(제곱 센티미터 당 마이크로와트) 스테라디안(steradian) 당 제곱 센티미터 당 초 당 총 광자수이다: $[(p/s/cm^2/sr)/(\mu W/cm^2)]$.

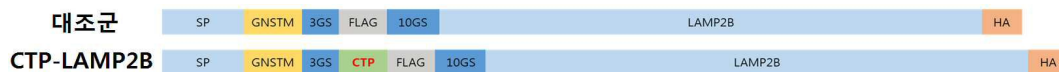
[0087] 도 8a 및 도 8b에 나타난 바와 같이, 대조군 폴리펩티드 및 대조군 엑소솜은 심장에 전달되지 않았다. CTP 폴리펩티드의 평균 복사 효율은 약 5% 증가하였고, CTP 엑소솜의 평균 복사 효율은 약 11% 증가하여, CTP 폴리펩티드 및 CTP 엑소솜은 심장에 유의하게 전달되었다. 특히, CTP 엑소솜은 CTP 폴리펩티드에 비해 현저하게 증가하여, 엑소솜과 CTP의 조합에 의해 심장 조직에 특이적이고 효과적으로 전달될 수 있는 것으로 확인되었다.

도면

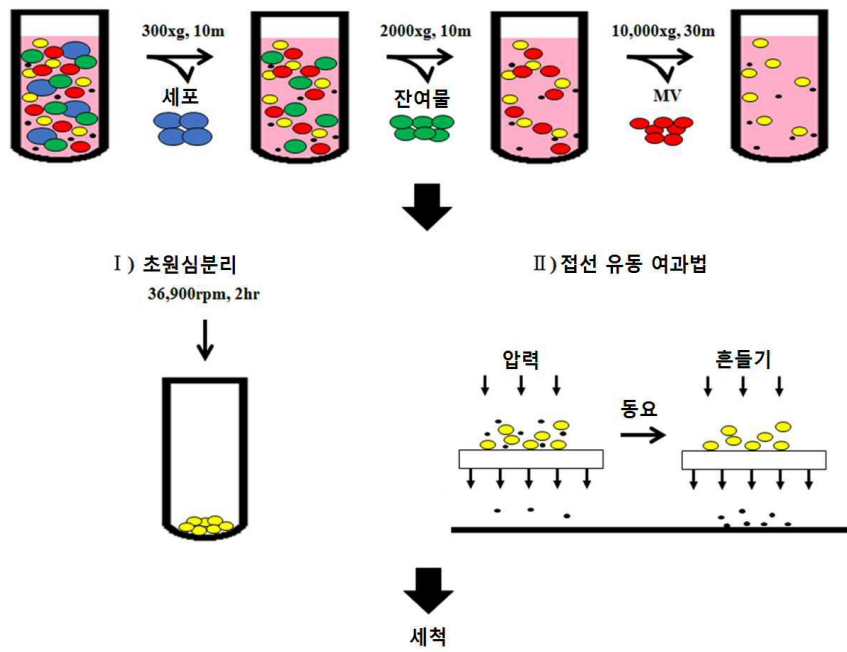
도면1



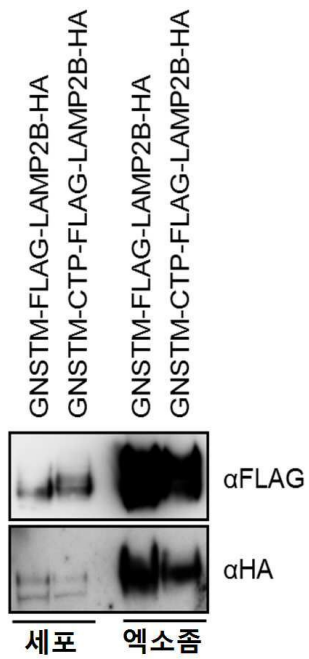
도면2



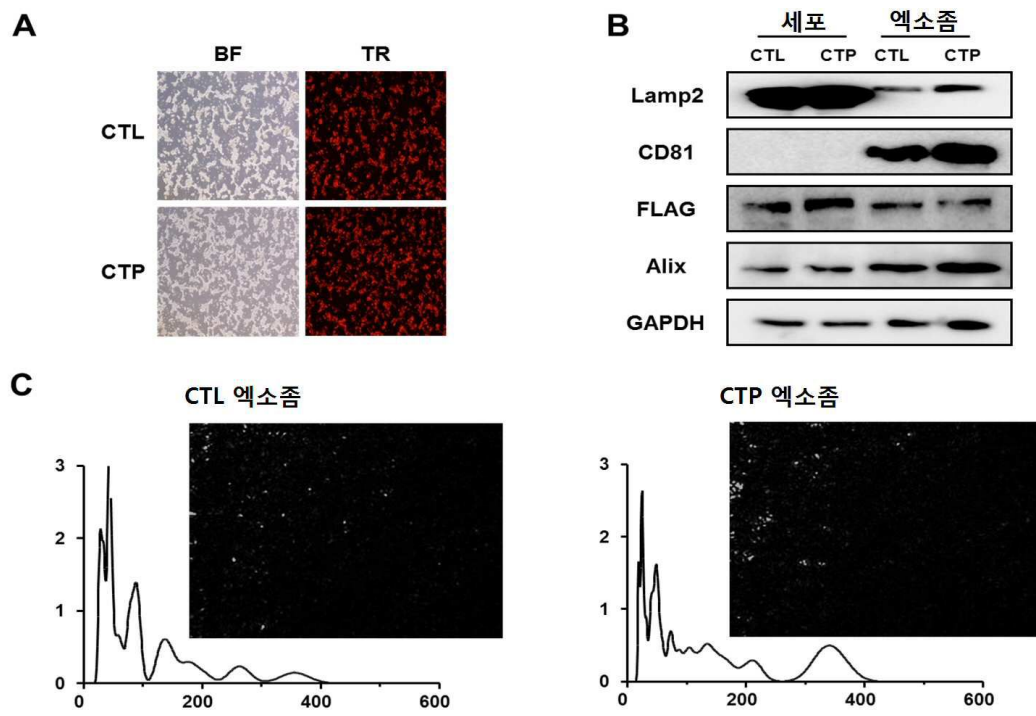
도면3



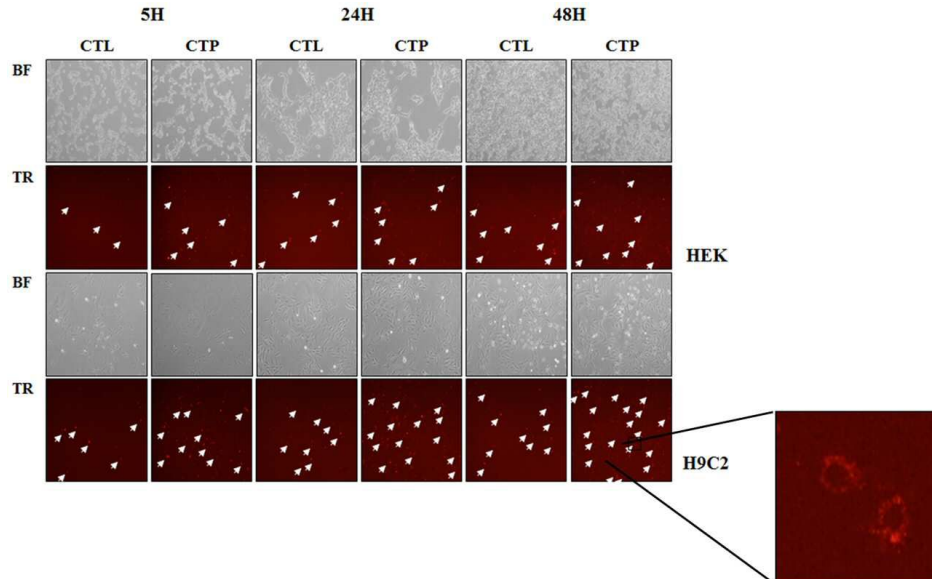
도면4



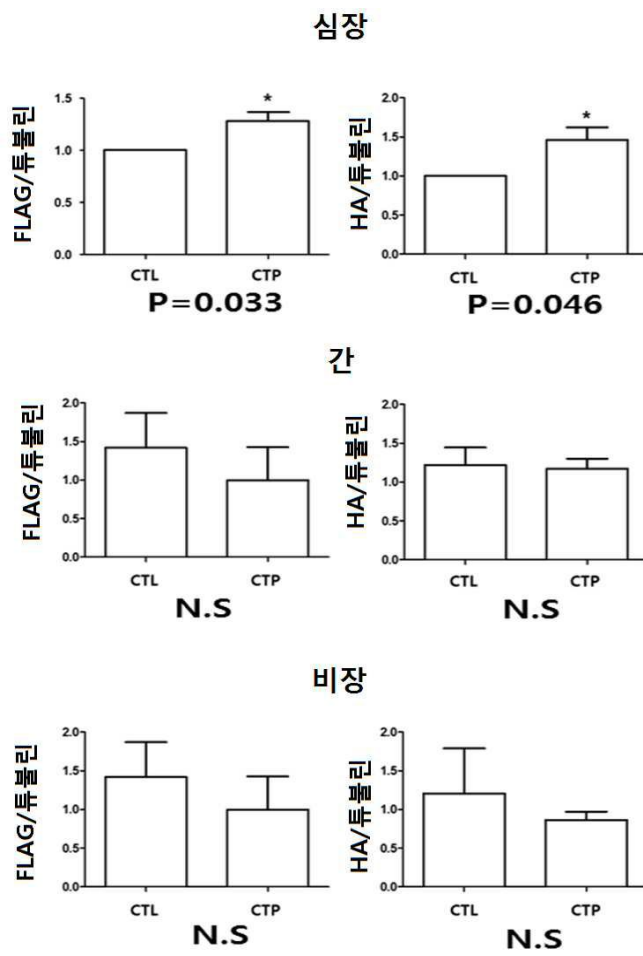
도면5



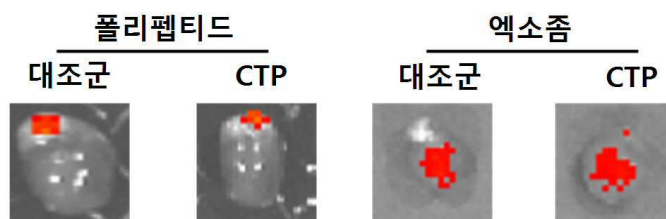
도면6



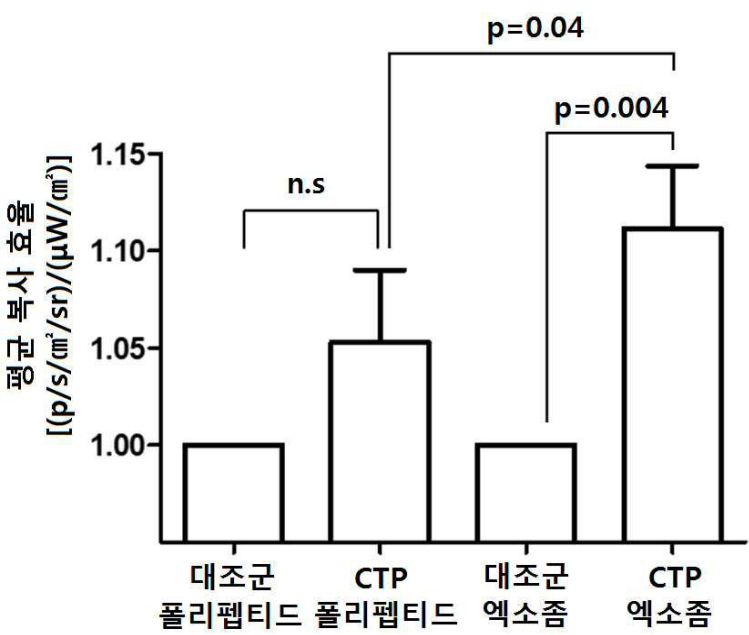
도면7



도면8a



도면8b



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> Pharmaceutical composition for delivering microvesicle including cardiac targeting protein to heart and method using the same
- <130> PN125583KR
- <160> 3
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 12
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Cardiac targeting protein
- <400> 1
- Ala Pro Trp His Leu Ser Ser Gln Tyr Ser Arg Thr
- 1 5 10
- <210>
- 2
- <211> 36
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Nucleic acids encoding cardiac targeting protein
- <400> 2

gccccctggc acctgtcctc ccagtactcc cggacc

36

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Control polypeptide

<400> 3

Ala Arg Pro Leu Glu His Gly Ser Asp Lys Ala Thr

1

5

10