



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0102430
(43) 공개일자 2018년09월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0029060

(22) 출원일자 2017년03월07일

심사청구일자 2017년03월07일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

정보영

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동)

박혜림

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

리엔목특허법인

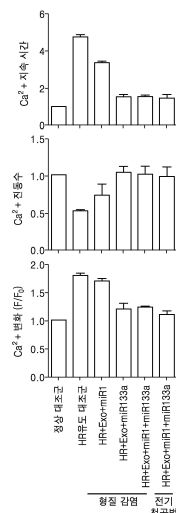
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 심혈관계 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물 및 이를 이용한 방법

(57) 요약

일 양상에 따른 생물학적 시료 유래 마이크로베지클, 및 상기 마이크로베지클에 함유된 저해성 RNA를 포함하는, 심혈관계 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물, 및 이를 이용한 방법을 제공한다. 이에 따르면, 심혈관계 질환을 유효하게 예방 또는 치료하는데 이용할 수 있다.

대표도 - 도3b



(52) CPC특허분류

A61K 48/005 (2013.01)

A61K 9/0019 (2013.01)

(72) 발명자

박혜원

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동)

김효은

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동)

문다솜

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동)

최선옥

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동)

윤누리

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI16C0058

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 의료기술개발단

연구사업명 질환극복기술개발

연구과제명 유전자치료 기법으로 성분 강화된 미세소포체 및 엑소좀을 이용한 심장 부정맥 치료법 개

발

기 여 율 1/2

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2016.04.01 ~ 2019.03.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HC15C1200

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건의료연구원

연구사업명 임상연구인프라조성(국민건강임상연구)

연구과제명 심방세동 항응고제, 부정맥 약물요법의 비교효과 연구

기 여 율 1/2

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2016.05.11 ~ 2018.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

생물학적 시료 유래 마이크로베지클, 및
상기 마이크로베지클에 함유된 저해성 RNA를 포함하는,
심혈관계 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 생물학적 시료는 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 점액, 타액, 눈물, 객담, 척수액, 흉수, 유두 흡인물, 림프액, 기도액, 장액, 비뇨생식관액, 모유, 림프계 체액, 정액, 뇌척수액, 기관계내 체액, 복수, 낭성 종양 체액, 양수액 또는 이들의 조합인 것인 약학적 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 생물학적 시료는 심혈관계 질환을 앓거나 앓을 위험이 있는 개체로부터 유래된 것인 약학적 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 생물학적 시료는 부정맥을 앓거나 앓을 위험이 있는 개체로부터 유래된 것인 약학적 조성물.

청구항 5

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

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 저해성 RNA는 마이크로RNA(microRNA: miRNA), 짧은 간섭 RNA(small interfering RNA: siRNA), 작은 헤어핀 RNA(small hairpin RNA: shRNA), 또는 이들의 단편인 것인 약학적 조성물.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 miRNA는 miR-1, miR-133, 또는 이들의 조합인 것인 약학적 조성물.

청구항 8

청구항 6에 있어서, 상기 miRNA는 인간 miR-1, 인간 miR-133, 또는 이들의 조합인 것인 약학적 조성물.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 심혈관계 질환은 부정맥, 심실 세동, 심실 빈맥, 협심증, 심근경색증, 또는 이들의 조합인 것인 약학적 조성물.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 부정맥은 허혈 연관성 부정맥, 심방 세동 연관성 부정맥, 또는 이들의 조합인 것인 약학적 조성물.

청구항 11

청구항 1에 있어서, 상기 약학적 조성물은 항부정맥제(antiarrhythmic agent), 항혈소판제, 항응고제, 또는 이들의 조합을 더 포함하는 것인 약학적 조성물.

청구항 12

청구항 1의 약학적 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 심혈관계 질환을 예방 또는 치료하는 방법.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 상기 개체는 심혈관계 질환을 앓거나 앓을 위험이 있는 것인 방법.

청구항 14

청구항 12에 있어서, 상기 약학적 조성물은 개체의 혈관 내 주사로 투여되는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 생물학적 시료, 특히 혈액 유래 엑소솜을 포함하는 심혈관계 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물 및 이를 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. 심장의 수축은 심장의 흥분-수축 연결(cardiac excitation-contraction coupling)에 의하여 조절되고 있는데, 이 때 Ca^{2+} 은 심장의 수축을 일으키는 근세사(myofilament)의 직접적인 활성인자(activator)로서 작용한다. 근세포 내 Ca^{2+} 농도의 조절에 이상이 생길 경우 심근 수축의 이상과 부정맥을 일으키게 되므로, 심근 세포의 칼슘 과부하는 심장 부정맥의 중요한 원인이 된다. 특히, 심장 급사와 관련된 허혈 연관성 부정맥의 발생에도 심근 세포의 칼슘 과부하가 중요한 원인으로 보고되고 있다.

[0003] 엑소솜(exosome)은 여러 종류의 세포들로부터 분비되는 막 구조의 작은 소낭 또는 마이크로베지클이다. 엑소솜의 직경은 대략 30 nm 내지 100 nm인 것으로 보고되어 있다. 엑소솜은 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 엑소솜이라고 부른다. 엑소솜 내에는 세포에서 유래된 다양한 종류의 단백질, 핵산, 지질 등이 포함되어 있는 것으로 보고되고 있다. 특히, 엑소솜은 마이크로RNA(microRNA: miRNA)를 포함하는 것으로 알려져 있고, miRNA는 여러 종류의 mRNA를 차단할 수 있다. 엑소솜은 줄기 세포 등에 비해 종양 유발성 및 면역 반응 등의 위험성을 배제할 수 있다.

[0004] 따라서, 심장 질환을 예방 또는 치료하기 위해 엑소솜을 이용하는 방법을 개발할 필요가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 심혈관계 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물을 제공한다.

[0006] 심혈관계 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0007] 일 양상은 생물학적 시료 유래 마이크로베지클, 및 상기 마이크로베지클에 함유된 저해성 RNA를 포함하는, 심혈관계 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물을 제공한다.

[0008] 상기 생물학적 시료는 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 점액, 타액, 눈물, 객담, 척수액, 흉수, 유두 흡인물, 림프액,

기도액, 장액, 비뇨생식관액, 모유, 림프계 체액, 정액, 뇌척수액, 기관계내 체액, 복수, 낭성 종양 체액, 양수액 또는 이들의 조합일 수 있다. 상기 생물학적 시료는 심혈관계 질환을 앓거나 앓을 위험이 있는 개체로부터 유래된 시료일 수 있다. 상기 생물학적 시료는 부정맥을 앓거나 앓을 위험이 있는 개체로부터 유래된 시료일 수 있다. 예를 들어, 상기 생물학적 시료는 부정맥(예, 초기 부정맥)을 앓고 있는 환자의 혈장이다.

[0009] 상기 용어 "마이크로베지클(microvesicle)"은 여러 종류의 세포들에 존재하거나 세포로부터 분비되는 막 구조의 작은 소포를 말한다. 세포 외로 분비되는 마이크로베지클은 (i)엑소솜: 식균 기원의 직경 30 내지 100 nm의 막성 소포, (ii)엑토솜(shedding 마이크로베지클(shedding microvesicles, SMVs)이라고도 함): 원형질막으로부터 직접 흘러지고 직경 50 내지 1000 nm의 큰 막성 소포, (iii) 세포자살성 수포(apoptotic blebs): 죽어가는 세포에 의해 유출된 직경 50 내지 5000 nm의 소포를 포함한다. 상기 마이크로베지클은 엑소솜일 수 있다. 엑소솜(exosome)은 여러 종류의 세포들로부터 분비되는 막 구조의 작은 소포이다. 엑소솜의 직경은 대략 30 내지 100 nm일 수 있다. 엑소솜은 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 소포들은 세포 밖 환경으로 방출되는데, 이것을 엑소솜이라고 부른다.

[0010] 상기 생물학적 시료 유래 마이크로베지클은 생물학적 시료로부터 분리 또는 정제된 마이크로베지클일 수 있다. 상기 마이크로베지클은 생물학적 시료를 원심분리, 밀도구배법, 여과, 침전, 투석, 면역친화성 크로마토그래피, 또는 이들의 조합을 수행하여 수득된 것일 수 있다.

[0011] 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. 상기 마이크로RNA(microRNA: miRNA)는 진행 세포에서 발견되는 짧은 리보핵산을 말한다. 마이크로RNA는 생체 내에서 유전자 발현을 조절하는 역할을 하고, 길이가 약 17 내지 약 25 뉴클레오티드(이하, "nt"라고 한다)이며, 이들은 DNA에 의해 암호화된다. 이들은 게놈으로부터 전사 후, 단편으로 잘려서 특정 단백질의 발현을 증가시키거나 감소시키는 역할을 한다. 현재까지 포유류에서 알려진 마이크로RNA의 기능은 인슐린 분비 조절, 임파구 분화 조절, 세포분열 조절, 세포사멸 조절, 바이러스 복제 조절 등이다. 상기 siRNA는 RNA 간섭을 야기하는 19 nt 내지 27 nt의 이중 가닥 RNA일 수 있다. 상기 shRNA는 RNA 간섭을 야기할 수 있고 헤어핀 구조를 갖는 이중 가닥 RNA일 수 있다. 상기 저해성 RNA의 단편은 저해성 RNA의 연속된 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 말한다. 상기 단편의 길이는 예를 들면 2 nt 내지 25 nt, 3 nt 내지 24 nt, 4 nt 내지 23 nt, 5 nt 내지 22 nt, 6 nt 내지 21 nt, 7 nt 내지 20 nt, 8 nt 내지 19 nt, 9 nt 내지 18 nt, 10 nt 내지 17 nt, 11 nt 내지 16 nt, 12 nt 내지 15 nt, 또는 13 nt 내지 14 nt일 수 있다.

[0012] 상기 저해성 RNA는 인간 저해성 RNA일 수 있다.

[0013] 상기 저해성 RNA는 상기 생물학적 시료 유래 마이크로베지클에 내재적(endogenous)인 것이거나, 또는 외부로부터 도입된 외인성(exogenous)인 것일 수 있다. 상기 저해성 RNA는 상기 마이크로베지클에 형질도입(transfection), 전기천공(electroporation), 또는 이들의 조합에 의해 도입될 수 있다.

[0014] 상기 miRNA는 miR-1, miR-133, 또는 이들의 조합일 수 있다. 상기 miRNA는 인간 miR-1, 인간 miR-133, 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0015] 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.

[0016] 상기 약학적 조성물은 항부정맥제(antiarrhythmic agent), 항혈소판제, 항응고제, 또는 이들의 조합을 더 포함할 수 있다. 상기 약학적 조성물은 단일 또는 개별적인 조성물일 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), 프로카인다미드(Procainamide), 디소피르아미드(Disopyramide), 리도카인(Lidocaine), 페니토인(Phenytoin), 맥실레틴(Mexiletine), 토카이니드(Tocainide), 엔카이니드(Encainide), 플레카이니드(Flecainide), 프로파페논(Propafenone), 및 모리시진(Moricizine)이다. 상기 베타-차단제는 예를 들어, 카르베딜롤(Carvedilol), 프로프라놀롤(Propranolol), 에스몰롤(Esmolol), 티몰롤(Timolol), 메토프롤롤(Metoprolol), 아테놀롤(Atenolol), 비소프롤롤(Bisoprolol), 및 네비볼롤(Nebivolol)이다. 상기 칼륨 채널 차

단제는 예를 들어, 아미오다론(Amiodarone), 소탈롤(Sotalol), 이부틸리드(Ibutilide), 도페틸리드(Dofetilide), 드로네다론(Dronedarone), 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.

- [0017] 상기 용어 "예방"은 상기 약학적 조성물의 투여에 의해 심혈관계 질환의 발생을 억제하거나 그의 발병을 지연시키는 모든 행위를 말한다. 상기 용어 "치료"는 상기 약학적 조성물의 투여에 의해 심혈관계 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 말한다.
- [0018] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다. 상기 담체는 부형제, 희석제 또는 보조제를 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, 유화제, 보존제, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.
- [0019] 상기 약학적 조성물은 통상의 방법에 따라 임의의 제형으로 준비될 수 있다. 상기 조성물은 예를 들면, 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.
- [0020] 상기 약학적 조성물은 상기 생물학적 시료 유래 마이크로베지클 및 상기 마이크로베지클에 함유된 마이크로RNA를 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.
- [0021] 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.
- [0022] 다른 양상은 일 양상에 따른 약학적 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 심혈관계 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [0023] 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.
- [0024] 상기 약학적 조성물은 개체의 혈관 내 주사로 투여될 수 있다.
- [0025] 상기 방법은 상기 개체에게 항부정맥제, 항혈소판제, 항응고제, 또는 이들의 조합을 투여하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 항부정맥제, 항혈소판제, 항응고제, 또는 이들의 조합은 일 양상에 따른 약학적 조성물과 동시, 개별, 또는 순차로 투여될 수 있다.
- [0026] 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.
- [0027] 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.
- [0028] 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

[0029] 일 양상에 따른 생물학적 시료 유래 마이크로베지클, 및 상기 마이크로베지클에 함유된 저해성 RNA를 포함하는 약학적 조성물, 및 이를 이용한 방법에 따르면, 심혈관계 질환을 유효하게 예방 또는 치료하는데 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1a는 사람 혈액으로부터 분리된 엑소좀의 전자현미경 이미지이고, 도 1b는 분리된 엑소좀을 항-CD9 항체, 항-CD63 항체, 또는 항-CD81 항체를 사용하는 유세포 분석법으로 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 2는 miRNA로 형질감염된 엑소좀을 세포에 처리한 후, 세포 내로 miRNA가 전달되었는지 여부를 공초점 현미경 및 차등 간섭 대비(Differential interference contrast: DIC) 현미경으로 확인한 이미지이다(좌: 공초점 현미경, 가운데: DIC 현미경, 우: 병합 이미지, 위: 형질감염 시약 Exo-fect 사용, 아래: 형질감염 시약 RNAiMax 사용).

도 3a는 저산소증으로 유도된 HL-1 세포 내 유리 Ca^{2+} 의 농도 변화를 시간에 따른 형광 강도로 나타내는 그래프이고, 도 3b는 시간에 따른 형광 강도를 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 4a는 심방세동으로 유도된 HL-1 세포 내 유리 Ca^{2+} 의 농도 변화를 시간에 따른 형광 강도로 나타내는 그래프이고, 도 4b는 시간에 따른 형광 강도를 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0032] 실시예 1. miRNA를 함유한 엑소좀의 부정맥 치료 효과의 확인

[0033] 1. 엑소좀의 분리 및 정제

[0034] 혈액으로부터 엑소좀을 분리하기 위하여 임상시험심사위원회를 통과한 부정맥 환자의 혈액을 준비하였다.

[0035] 준비된 혈액을 상온에서 약 30분간 방치한 후, 300 x g로 10분간 원심분리하여 혈청을 수득하였다. 12 ml의 인산 완충 염수(phosphate buffered saline: PBS)에 수득된 500 μ l의 혈청을 가하여 혈청을 희석하였다. 희석된 혈청을 750 x g에서 5분 및 1500 x g에서 5분 동안 연속적 원심분리를 수행하여 상층액을 수득하였다. 수득된 상층액을 0.2 μ m 필터를 사용하여 여과하였다. 여과된 상층액을 14,000 x g에서 45분 동안 원심분리하였다. 상층액은 버리고 펠렛에 PBS를 가하여 세척하고, 14,000 x g에서 45분 동안 원심분리하였다. 이 과정을 3회 반복하였다.

[0036] 수득된 25 μ l의 엑소좀 현탁액을 파라필름 상에 로딩하고, 탄소 코팅 그리드를 현탁시킨 후 약 1분 동안 실온에서 건조시켰다. 그 후, 그리드를 약 1분 동안 3회 세척한 후 그리드에 아세트산우라닐(Polyscience, Warrington, UK)을 가하여 엑소좀을 염색하였고, 다시 세척하였다. JEM 1011(Jeol, 일본) 투과전자현미경(transmission electron microscope)을 사용하여, 수득된 엑소좀의 크기 및 모양을 확인하고, 그 이미지를 도 1a에 나타내었다.

[0037] 또한, 엑소좀의 표면 항원을 확인하기 위해, 항-CD9 항체, 항-CD63 항체, 또는 항-CD81 항체(모두 System Biosciences, CA, USA)를 사용하여 수득된 엑소좀을 염색하고, 엑소좀을 유세포 분석기(Beckman Coulter)로 분석하였다. 그 결과를 도 1b에 나타내었다.

[0038] 도 1a 및 도 1b에 나타난 바와 같이, 수득된 엑소좀은 크기 및 모양이 온전하고, 엑소좀의 표면 항원을 함유하고 있다는 것을 확인하였다.

[0039] 2. 엑소좀 내 miRNA를 이용한 세포 내로의 전달

[0040] 1.에서 기재된 바와 같이 준비된 부정맥 환자 유래 엑소좀과, 인간 miR-1-3p 또는 miR-133-3p 유사체를 혼합하여, miRNA의 최종 농도가 100 nM인 혼합물을 준비하였다.

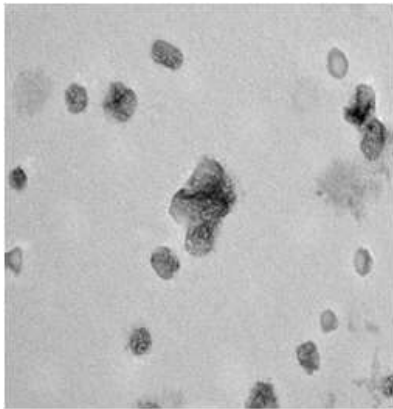
- [0041] 사용된 miRNA 및 음성대조군 miRBA는 (주)바이오니아(대전, 한국)에 의뢰하여 제조하였고, 제조된 miRNA의 핵산 서열은 다음과 같다.
- [0042] miR-1-3p miRNA: 5'-uggauguaaagaaguau-3' (서열번호 1)
- [0043] miR-133-3p miRNA: 5'-uuuggucccucaaccagcug-3' (서열번호 2)
- [0044] 각 miRNA는 Tx-Red(Thermo Fisher Scientific)로 표지하고, 형광 현미경으로 확인하였다. 음성 대조군 miRNA로서, Cy3™ Dye-Labeled Anti-miR™ Negative Control(Thermo Fisher Scientific)을 사용하였다.
- [0045] TransIT-siQUEST 형질감염(transfection) 시약(Exo-fect, RNAiMax)을 사용하여 형질감염시키거나, 또는 전기천 공법을 이용하여, 엑소솜에 miRNA를 도입하였다. miRNA가 도입된 엑소솜을 HL-1 세포에 가하고 37℃에서 약 24 시간 동안 인큐베이션하여, 세포와 엑소솜을 융합시켰다. 그 후, 세포를 PBS로 세척하고, 세포를 공초점 현미경 으로 관찰하여, 엑소솜 내의 miRNA가 세포 내로 전달되었는지 여부를 확인하였다.
- [0046] 공초점 현미경으로 취득된 이미지, 차등 간섭 대비(Differential interference contrast: DIC) 현미경으로 수 득된 이미지, 및 이들을 병합한 이미지를 도 2에 나타내었다. 도 2에 나타난 바와 같이, 세포와 엑소솜이 융합 하여 엑소솜 내 miRNA가 세포 내로 잘 전달됨을 확인하였다.
- [0047] **3. 부정맥에 대한 miRNA를 함유한 엑소솜의 효과**
- [0048] **(1) 저산소증에 대한 miRNA를 함유한 엑소솜의 효과**
- [0049] miRNA를 함유한 부정맥 환자 유래 엑소솜이 부정맥의 발생을 감소시키는지 여부를 확인하기 위해, 저산소증을 유도한 심근 세포 내 유리 Ca^{2+} 의 농도 변화를 측정하였다.
- [0050] 구체적으로, 2.에 기재된 바와 같이, miR-1-3p, miR-133-3p, 또는 이의 조합을 부정맥 환자 유래 엑소솜에 도입 하였다. HL-1 심근 세포에 miRNA를 함유한 엑소솜을 가하고, 37℃에서 약 24 시간 동안 인큐베이션하여 HL-1 세 포와 엑소솜을 융합시키고, 세포 내로 miRNA를 전달하였다.
- [0051] 준비된 HL-1 세포에 10%(v/v) 소 태아 혈청 MEM(Gibco BRL)을 가하고, 0.1 μ M의 BrdU(Sigma)을 함유한 α -MEM(Gibco BRL) 중 1.5%(w/v) 젤라틴으로 코팅된 4개 벽 슬라이드 챔버에서 약 1시간 동안 배양하였다.
- [0052] 세포를 저산소화 조건 하에 60 분 동안 인큐베이션하여 세포의 저산소화(Hypoxia)를 유도하고, 그 후 세포를 재 산소화 조건에서 180 분 동안 배양하여 세포를 재산소화(reoxygenation)시켰다.
- [0053] 세포를 0.265 g/L의 $CaCl_2$, 0.214 g/L의 $MgCl_2$, 0.2 g/L의 KCl, 8.0 g/L의 NaCl, 1 g/L의 글루코스, 0.05 g/L 의 NaH_2PO_4 , 및 1.0 g/L의 $NaHCO_3$ 을 포함한 타이로드(Tyrod) 용액으로 세척하였다. 암실에서 세척된 세포에 10 μ mol/L의 아세톡시메틸 에스테르 플루오-4 (Fluo-4 AM, Molecular Probe)를 가하고, 37℃에서 약 20분 동안 인큐베이션하였다. 파장 488 nm의 아르곤 레이저를 방출하는 공초점 현미경을 이용하여 방출된 빛을 510-560 nm 밴드-패스 필터를 통하여 HL-1 세포 내 유리 Ca^{2+} 의 농도 변화를 측정하였다.
- [0054] HL-1 세포 내 유리 Ca^{2+} 의 농도 변화를 나타내는 결과로서, 시간에 따른 형광 강도에 관한 그래프를 도 3a에 나 타내고, 이를 분석한 결과를 도 3b에 나타내었다(HR: 저산소화 및 재산소화, exo: 엑소솜). 도 3b에서 모든 값 은 정상 대조군에 대해 정규화하였고, Ca^{2+} 지속시간 및 Ca^{2+} 진동수는 정상대조군으로 표준화시킨 임의 단위 (Arbitrary unit: A.U.)로 나타내었다.
- [0055] 도 3a 및 도 3b에 나타난 바와 같이, 저산소증을 유도한 HL-1 세포는 세포 내 칼슘의 농도가 증가하였으나, miRNA-1 또는 miR-133을 단독 처리한 군, 및 miRNA-1과 miRNA-133을 함께 처리한 군은 저산소증 유도 대조군에 비해 세포 내 칼슘의 농도가 유의하게 감소하였다. 심근 세포의 칼슘 과부하는 부정맥의 주요 원인이므로, miRNA-1, miR-133, 또는 이들의 조합을 함유한 인간 유래 엑소솜은 저산소증으로 인한 부정맥의 예방 또는 치료 에 효과가 있음을 확인하였다.
- [0056] **(2) 심방 세동에 대한 miRNA를 함유한 엑소솜의 효과**
- [0057] 3.(1)에 기재된 바와 같이, miR-1-3p, miR-133-3p, 또는 이의 조합을 부정맥 환자 유래 엑소솜을 HL-1 세포에 처리하였다. 그 후, HL-1 세포에 빠른 빈맥 조율(tachycardia rapid rhythm)(5 Hz, 1.5 V/cm 전기장 강도 (field strength), 8시간)을 가하여 심방 세동(atrial fibrillation)을 유도하였다.

[0058] 3.(1)에 기재된 바와 같이, 심근 세포 내 유리 Ca^{2+} 의 농도 변화를 측정하고, 그 결과를 도 4a 및 도 4b에 나타내었다. 도 4b에서 모든 값은 정상 대조군에 대해 정규화하였고, Ca^{2+} 지속시간 및 Ca^{2+} 진동수는 정상대조군으로 표준화시킨 임의 단위(Arbitrary unit: A.U.)로 나타내었다.

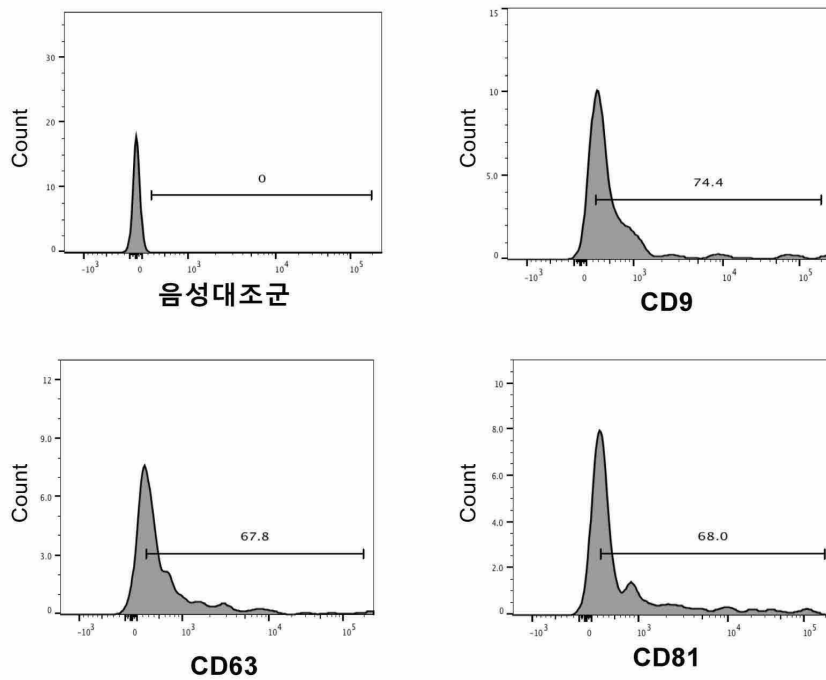
[0059] 도 4a 및 도 4b에 나타난 바와 같이, 심방 세동을 유도한 세포에서는 Ca^{2+} 진동수가 증가하였으나, miRNA-1 또는 miR-133을 단독 처리한 군, 및 miRNA-1과 miRNA-133을 함께 처리한 군은 심방 세동 유도 대조군에 비해 Ca^{2+} 진동수가 유의하게 감소하였다. 따라서, miRNA-1, miR-133, 또는 이들의 조합을 함유한 인간 유래 엑소솜은 저산소증뿐만 아니라 심방 세동으로 인한 부정맥의 예방 또는 치료에 효과가 있음을 확인하였다.

도면

도면1a

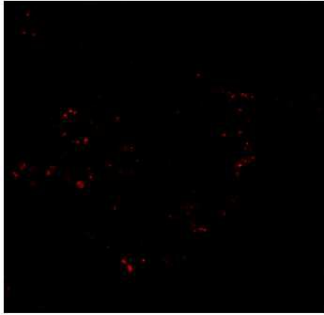


도면1b

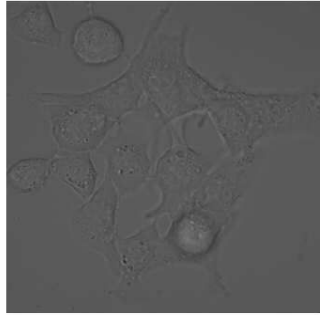


도면2

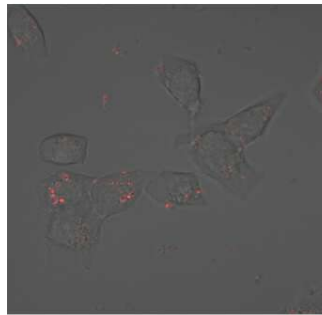
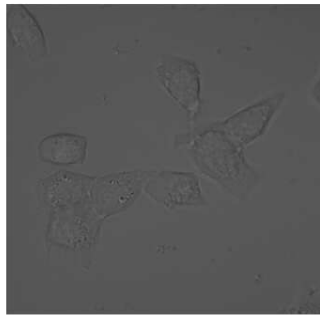
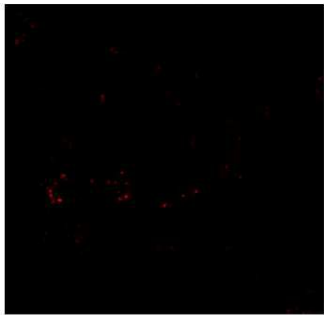
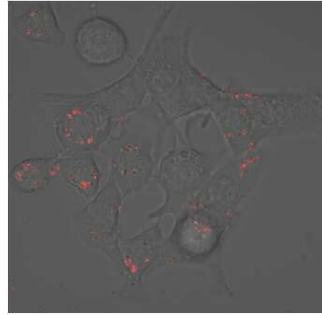
TxRed-miRNA



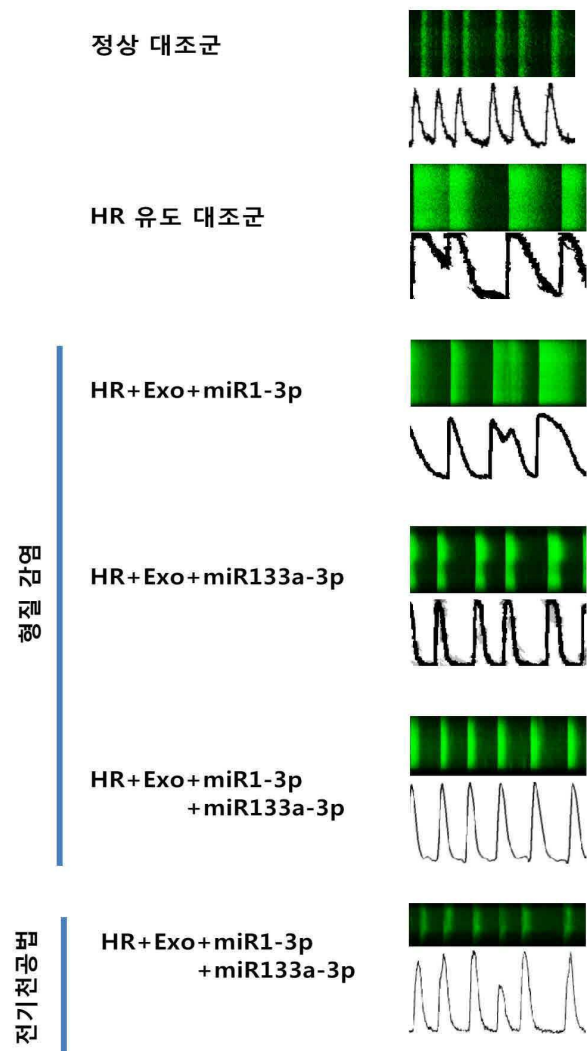
DIC



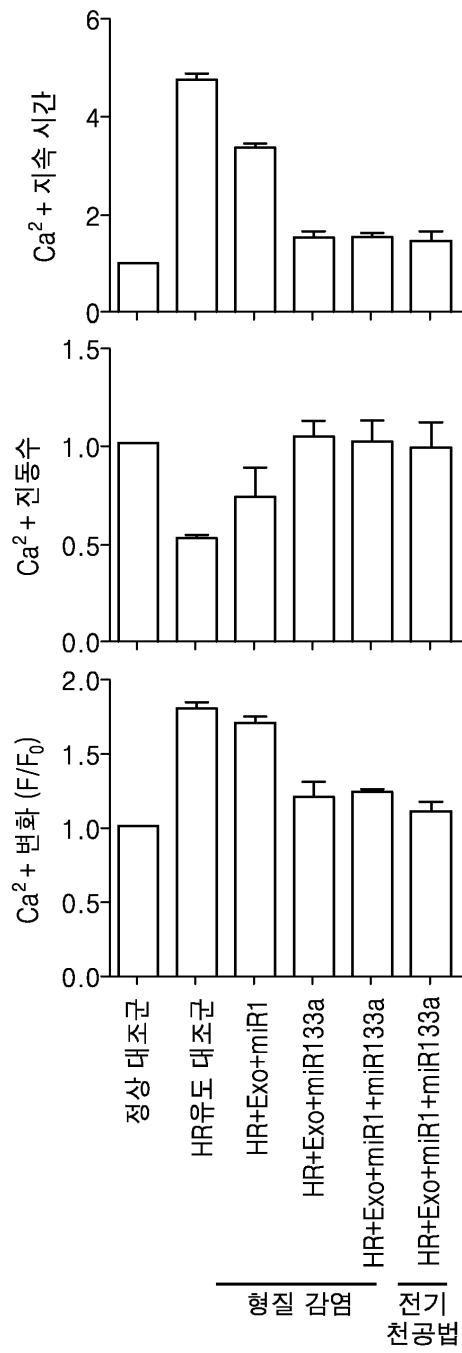
병합



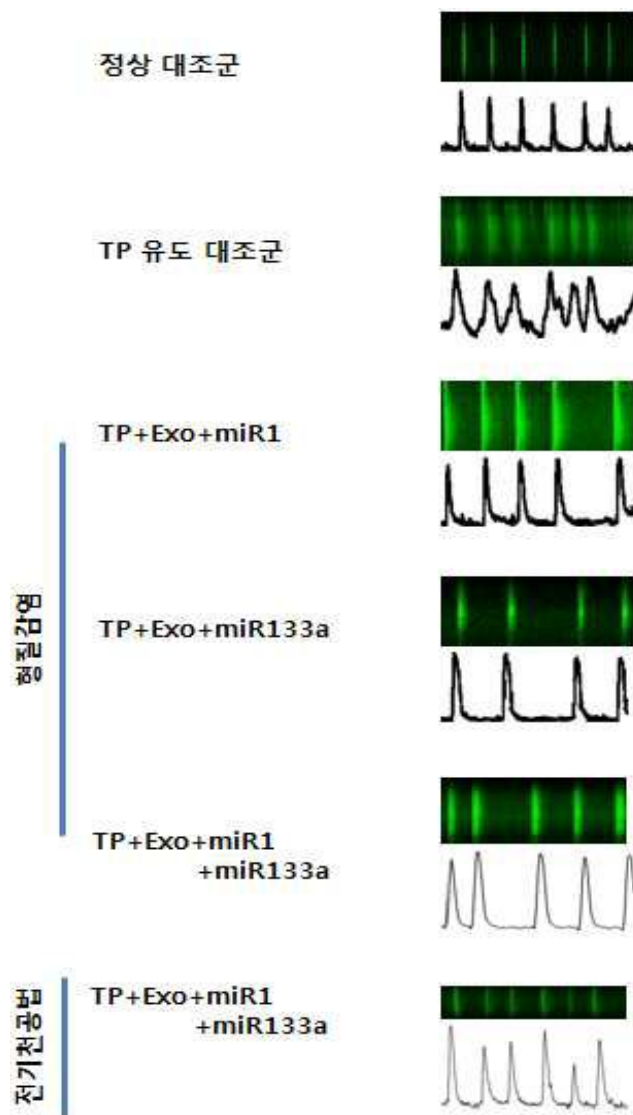
도면3a



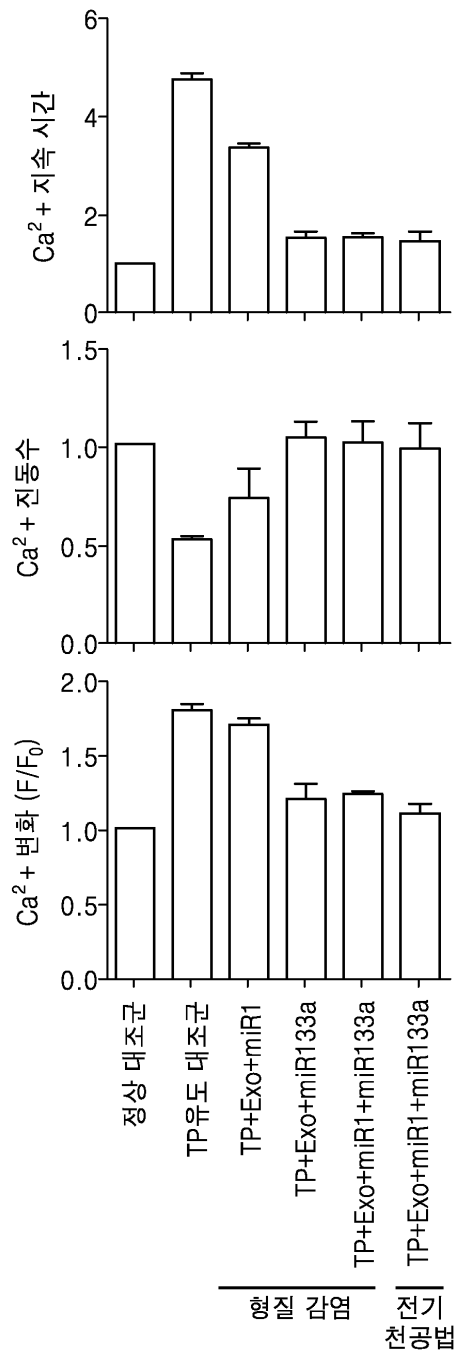
도면3b



도면4a



도면4b



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> Pharmaceutical composition for preventing or treating cardiovascular disease and method using the same
- <130> PN117014KR
- <160> 2
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1

<211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-1-3p miRNA
 <400> 1
 uggaauguaa agaaguaugu au 22
 <210> 2
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR-133-3p miRNA
 <400> 2
 uuuggucccc uucaaccagc ug 22