



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0071139
(43) 공개일자 2022년05월31일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/16 (2006.01) A23L 33/195 (2017.01)
A61K 9/00 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
A61K 38/164 (2013.01)
A23L 33/195 (2016.08)</p> <p>(21) 출원번호 10-2021-0162690
(22) 출원일자 2021년11월23일
심사청구일자 2021년11월23일</p> <p>(30) 우선권주장
1020200158202 2020년11월23일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
주식회사 제노포커스
대전광역시 유성구 테크노1로 65 (관평동)</p> <p>(72) 발명자
반재구
대전광역시 유성구 테크노1로 65(관평동)
김의중
대전광역시 유성구 테크노1로 65(관평동)
김정현
대전광역시 유성구 테크노1로 65(관평동)</p> <p>(74) 대리인
제일특허법인(유)</p> |
|---|---|

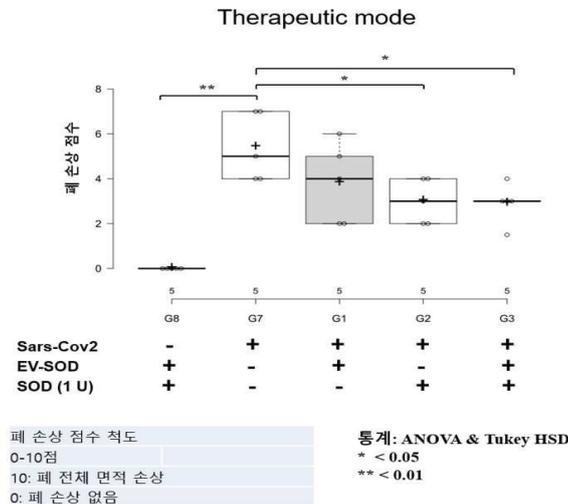
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **호흡기 바이러스 감염의 치료 또는 예방을 위한 수퍼옥시드 디스무타아제 활성을 갖는 폴리펩티드 및 세포의 소포체의 용도**

(57) 요약

본 발명은 대상체에서 호흡기 바이러스 감염 또는 호흡기 바이러스 감염에 의해 유래된 질환의 예방 및/또는 치료를 위한 수퍼옥시드 디스무타아제(SOD) 활성을 갖는 폴리펩티드 및/또는 SOD를 함유하는 세포의 소포체의 용도에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 대상체에서 호흡기 바이러스 감염 또는 호흡기 바이러스 감염에 의해 유래된 질환의 예방 및/또는 치료를 위한 바실러스 아밀로리퀴파시엔스(*Bacillus amyloliquefaciens*) 균주에서 유래한 수퍼옥시드 디스무타아제 활성을 갖는 폴리펩티드 및/또는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 균주에서 유래한 SOD를 함유하는 세포의 소포체의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61K 9/0043 (2013.01)

A61P 31/14 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/324 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

(i) 수퍼옥시드 디스무타아제(SOD) 활성을 갖는 폴리펩티드; (ii) SOD를 함유하는 세포외 소포체; 또는 (iii) SOD 활성을 갖는 폴리펩티드 및 SOD를 함유하는 세포외 소포체를 유효성분으로 포함하는 호흡기 바이러스 감염 또는 호흡기 바이러스 감염에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 호흡기 바이러스 감염에 의해 유발되는 질환은 감기, 폐렴, 간질성 폐렴, 중증 급성 호흡기 증후군(SARS), 중등 호흡기 증후군(MERS), 부비강염, Sars-Cov2 감염, 이염 또는 인두염으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 호흡기 바이러스는 코로나바이러스인, 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 호흡기 바이러스 감염에 의해 유발되는 질환은 바이러스성 폐 손상 또는 폐 질환인, 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 유효성분은 비강 분무로 투여되는, 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 SOD 활성을 갖는 폴리펩티드 및 상기 SOD를 함유하는 세포외 소포체는 동시에 또는 순차적으로 투여되는, 약학 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 폴리펩티드는 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 균주에서 유래한 것인, 약학 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 SOD를 함유하는 세포외 소포체는 바실러스 서브틸리스 균주에서 유래한 것인, 약학 조성물.

청구항 9

(i) 수퍼옥시드 디스무타아제(SOD) 활성을 갖는 폴리펩티드; (ii) SOD를 함유하는 세포외 소포체; 또는 (iii) SOD 활성을 갖는 폴리펩티드 및 SOD를 함유하는 세포외 소포체를 유효성분으로 포함하는 호흡기 바이러스 감염 또는 호흡기 바이러스 감염에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 대상체에서 호흡기 바이러스 감염의 예방 및/또는 치료를 위한 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 균주에서 유래한 수퍼옥시드 디스무타아제(이하, 간단히 "SOD" 라고 약칭한다) 활성을 갖는 폴리펩티드 및/또는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 균주에서 유래한 SOD를 함유하는 세포의 소포체(이하, 간단히 "SOD-EV"라고 약칭할 수 있다)의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 호흡기 감염을 일으키는 원인 중 하나인 호흡기 바이러스는 활성 산소를 생성하는 효소(예컨대, 니코틴아마이드 아데닌 디뉴클레오티드 포스페이트 옥시다아제(NADPH oxidase), 잔틴 옥시다아제(Xanthine oxidase) 등을 유도 하는 것으로 알려져 있다.

[0003] 또한, 대표적인 호흡기 바이러스인 코로나바이러스는 주로 포유류 및 조류의 기도 및 위장관을 감염시킨다. 이들 코로나바이러스는 리노바이러스, 인플루엔자 및 호흡기 융합 바이러스와 함께 감기의 기저를 이루는 감염 원 인체 중 하나인 것으로 알려져 있다.

[0004] 한편, SARS-CoV-2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)는 2019년에 처음 알려진 급성 중증 호흡 기 질환 코로나바이러스 2로서 양성 방향의 단일 사슬 RNA 바이러스(positive-sense single-stranded RNA virus)로 분류된다. 이 바이러스에 의해 감염된 질환을 코로나바이러스감염증-19(Coronavirus disease 2019)로 명명하였으며, 줄여서 COVID-19라고 부르고 있다. 세계보건기구(World Health Organization, WHO)에서는 코로 나바이러스 대유행(Coronavirus pandemic)을 공식 발표하였으며, 2020년 11월 현재 대한민국의 감염자수는 3만 명을 육박하고 있고, 전세계 약 5560만명이 감염된 것으로 조사되고 있으며, 계속 확산되고 있는 추세이다. COVID-19에 감염되면 약 2~14일의 잠복기를 거쳐 발열, 기침, 호흡곤란, 폐렴 등의 증상이 발현된다.

[0005] 상기 COVID-19는 호흡기 감염을 일으키는 바이러스의 일종으로서, 2019년 중국 후베이성의 우한시에서 처음 발 견된 바이러스로, 코로나바이러스(Coroviridae) 군에 속하며 사스 코로나바이러스(SARS-CoV, 중증급성호흡기증 후군 코로나바이러스), 메르스 코로나바이러스(Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV, 중 동호흡기증후군 코로나바이러스)와 유사한 바이러스로 알려져 있다.

[0006] 인간면역결핍 바이러스(Human Immunodeficiency Virus, HIV) 치료제인 칼레트라(Kaletra, 주성분: Lopinavir) 나 에볼라 바이러스 치료제인 렘데시비르(Remdesivir) 등의 COVID-19에 대한 임상 시험 등이 수행되었고. 2020 년 10월 미국 FDA가 렘데시비르에 대하여 COVID-19 치료제로서의 적응증 승인을 하였으나, 이는 COVID-19 예방 및 치료 효과를 모두 갖는 치료 효과를 갖는 약품은 아니다. 따라서, COVID-19를 포함한 코로나바이러스와 같은 호흡기 바이러스 감염을 예방하고 해당 감염을 치료할 수 있는 새로운 치료법을 찾는 것이 중요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 일 측면에서, 본 발명은 수퍼옥시드 디스무타아제(SOD) 활성을 갖는 폴리펩티드 및/또는 SOD를 함유 하는 세포의 소포체를 포함하는 호흡기 바이러스 감염 예방 및/또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 보다 구체적으로, 본 발명은 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 균주로부터 유래한 수퍼옥시드 디스무타아제 활성을 갖는 폴리펩티드 및/또는 바실러스 서브틸리스 균주에서 유래한 SOD를 함유하는 세포의 소포체를 포함하는 호흡 기 바이러스 감염 예방 및/또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 또한, 본 발명은 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 균주로부터 유래한 수퍼옥시드 디스무타아제 활성을 갖는 폴리펩 티드 및/또는 바실러스 서브틸리스 균주에서 유래한 SOD를 함유하는 세포의 소포체를 포함하는 코로나바이러스 감염 예방 및/또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명은 수퍼옥시드 디스무타아제 활성을 갖는 폴리펩티드 및/또는 SOD를 함유하는 세포의 소포체를 포함하는 호흡기 바이러스 감염 예방 및/또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 보다 구체적으로, 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 균주로부터 유래한 수퍼옥시드 디스무타아제 활성을 갖는 폴리 펩티드 및/또는 바실러스 서브틸리스 균주에서 유래한 SOD를 함유하는 세포의 소포체를 포함하는 호흡기 바이러

스 감염 예방 및/또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 또한, 본 발명은 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 균주로부터 유래한 수퍼옥시드 디스무타아제 활성을 갖는 폴리펩티드 및/또는 바실러스 서브틸리스 균주에서 유래한 SOD를 함유하는 세포의 소포체를 포함하는 코로나바이러스 감염 예방 및/또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명의 발명자들은 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 균주로부터 유래한 수퍼옥시드 디스무타아제 활성을 갖는 폴리펩티드가 단독으로 또는 바실러스 서브틸리스 균주에서 유래한 SOD를 함유하는 세포의 소포체와 함께 포유류에 사용될 경우 코로나바이러스 감염의 예방, 치료 또는 개선 효과를 나타냄을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따른 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 균주로부터 유래한 수퍼옥시드 디스무타아제 활성을 갖는 폴리펩티드 또는 바실러스 서브틸리스 균주에서 유래한 SOD를 함유하는 세포의 소포체는 각각 단독으로 사용되거나 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 균주로부터 유래한 수퍼옥시드 디스무타아제 활성을 갖는 폴리펩티드와 바실러스 서브틸리스 균주에서 유래한 SOD를 함유하는 세포의 소포체가 함께 사용하면 호흡기 바이러스 감염 또는 이로 인해 유발되는 질환을 예방, 치료 또는 개선하는 우수한 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 바실러스 서브틸리스 균주로부터 유래한 SOD를 함유하는 세포의 소포체의 입자크기 분석결과를 도시한다.

도 2는 바실러스 서브틸리스 균주로부터 유래한 SOD를 함유하는 세포의 소포체의 입자크기 분석결과를 도시한다.

도 3은 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 균주로부터 유래한 수퍼옥시드 디스무타아제 활성을 갖는 폴리펩티드 및/또는 바실러스 서브틸리스 균주로부터 유래한 SOD를 함유하는 세포의 소포체의 코로나바이러스 감염에 대한 예방 및 치료 효과를 확인하기 위한 동물실험 설계를 도시한다.

도 4는 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 균주로부터 유래한 수퍼옥시드 디스무타아제 활성을 갖는 폴리펩티드 및/또는 바실러스 서브틸리스 균주로부터 유래한 SOD를 함유하는 세포의 소포체의 코로나바이러스 감염에 의한 폐손상 치료 효과를 도시한다.

도 5는 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 균주로부터 유래한 수퍼옥시드 디스무타아제 활성을 갖는 폴리펩티드 및/또는 바실러스 서브틸리스 균주로부터 유래한 SOD를 함유하는 세포의 소포체의 코로나바이러스 감염에 의한 폐손상 예방 효과를 도시한다.

도 6은 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 균주로부터 유래한 수퍼옥시드 디스무타아제 활성을 갖는 폴리펩티드 및/또는 바실러스 서브틸리스 균주로부터 유래한 SOD를 함유하는 세포의 소포체를 투여한 시리안 햄스터에서 관찰되는 폐손상이 상기 폴리펩티드 및/또는 SOD를 함유하는 세포의 소포체를 투여하지 않은 시리안 햄스터에서의 폐손상과 유의미한 차이가 있음을 도시한다.

도 7은 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 균주로부터 유래한 수퍼옥시드 디스무타아제 활성을 갖는 폴리펩티드 및/또는 바실러스 서브틸리스 균주로부터 유래한 SOD를 함유하는 세포의 소포체 투여에 따른 폐의 조직병리학적 관찰결과를 도시한다.

도 8은 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 균주로부터 유래한 수퍼옥시드 디스무타아제 활성을 갖는 폴리펩티드 및/또는 바실러스 서브틸리스 균주로부터 유래한 SOD를 함유하는 세포의 소포체의 치료적 투여에 따른 폐의 조직병리학 점수를 도시한다.

도 9는 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 균주로부터 유래한 수퍼옥시드 디스무타아제 활성을 갖는 폴리펩티드 및/또는 바실러스 서브틸리스 균주로부터 유래한 SOD를 함유하는 세포의 소포체의 예방적 투여에 따른 폐의 조직병리학 점수를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 본 발명의 일 측면에 있어서, (i) 수퍼옥시드 디스무타아제(SOD) 활성을 갖는 폴리펩티드; (ii) SOD를 함유하는 세포의 소포체; 또는 (iii) SOD 활성을 갖는 폴리펩티드 및 SOD를 함유하는 세포의 소포체를 유효성분으로 포함하는 호흡기 바이러스 감염 또는 호흡기 바이러스 감염에 의해 유발되는 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0017] 이때, 상기 호흡기 바이러스 감염은 코로나바이러스 감염일 수 있다. 상기 코로나바이러스 감염은 감기, 폐렴, 간질성 폐렴, 중증 급성 호흡기 증후군(SARS), 중동 호흡기 증후군(MERS), 부비강염, COVID-19 감염, 이염 또는 인두염으로부터 선택된다. 또한, 상기 호흡기 바이러스 감염에 의해 유발된 질환은 바이러스성 폐 손상 또는 폐 질환일 수 있다.
- [0018] 또한, 코로나바이러스는 알파코로나바이러스, 베타코로나바이러스, 감마코로나바이러스 또는 델타코로나바이러스일 수 있다. 특히, 코로나바이러스는 인간 코로나바이러스일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 수퍼옥시드 디스무타아제 활성을 갖는 폴리펩티드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는다. 본 발명의 SOD 활성을 갖는 폴리펩티드는 상기한 아미노산 서열에 대하여 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 아미노산 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 아미노산 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 정렬하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 정렬된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 보다 바람직하게는 96%의 상동성, 가장 바람직하게는 98%의 상동성을 나타내는 아미노산 서열을 의미한다.
- [0020] 상기 폴리펩티드는 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 GF423 균주(*Bacillus amyloliquefaciens* GF423)로부터 분리될 수 있다. 상기 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 GF423 균주(*Bacillus amyloliquefaciens* GF423)는 한국생명공학연구원에 2017년 3월 6일자로 기탁번호 KCTC 13222 BP로 국제기탁되었으며, 상기 균주의 특성 및 배양방법은 대한민국등록특허 제1762199호에 기재되어 있다.
- [0021] 본 발명의 바실러스 서브틸리스 균주로부터 유래한 SOD를 함유하는 세포의 소포체는 SOD 활성을 갖는 세포의 소포체를 의미한다. 세포의 소포체는 단백질, 지질 및 핵산을 포함하는 복잡한 수화물을 가지고 있는 막으로 둘러싸인 나노크기의 소포체의 이질적인 집합을 의미한다.
- [0022] 상기 SOD를 함유하는 세포의 소포체는 바실러스 서브틸리스 SOD (*Bacillus subtilis* SOD) 균주로부터 분리될 수 있다.
- [0023] 본 발명에서 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 균주로부터 유래한 수퍼옥시드 디스무타아제 활성을 갖는 폴리펩티드 및/또는 바실러스 서브틸리스 균주로부터 유래한 SOD를 함유하는 세포의 소포체는 호흡기 바이러스로 이미 감염된 개체 내에서 바이러스 증식을 억제하는데 활용될 수 있다. 바람직하게는, 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 균주로부터 유래한 수퍼옥시드 디스무타아제 활성을 갖는 폴리펩티드 및/또는 바실러스 서브틸리스 균주로부터 유래한 SOD를 함유하는 세포의 소포체는 코로나바이러스로 이미 감염된 개체 내에서 바이러스 증식을 억제할 수 있다. 더욱 바람직하게는, 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 균주로부터 유래한 수퍼옥시드 디스무타아제 활성을 갖는 폴리펩티드 및/또는 바실러스 서브틸리스 균주로부터 유래한 SOD를 함유하는 세포의 소포체는 SARS 또는 COVID-19로 감염된 개체 내에서 바이러스 증식을 억제할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 다른 일 측면에서, 본 발명은 수퍼옥시드 디스무타아제 활성을 갖는 폴리펩티드 및/또는 SOD를 함유하는 세포의 소포체, 및 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 호흡기 바이러스 감염 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 상기 호흡기 바이러스 감염은 코로나바이러스 감염일 수 있다. 또한, 상기 코로나바이러스 감염은 SARS-CoV-2 감염일 수 있다.
- [0025] 본 발명의 약학적 조성물은 통상의 방법에 따라 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 에어로졸, 주사용액 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [0026] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 비

강분무, 피부 외용 또는 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하다.

- [0027] 이때, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 복합 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 포함되며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 사용될 수 있다.
- [0028] 비경구투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제 등을 포함할 수 있다. 비수성용제와 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일 등과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [0029] 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 흡입에 의해 투여될 수 있다. 폐로 직접 약물을 전달하면서도 독성을 나타내지 않고 적은 용량으로도 더 긴 작용 지속 시간을 나타낼 수 있다. 흡입용 투여는 약물을 함유하는 호흡 가능한 입자 또는 액적을 포함하여 기도, 비강 등을 통해 흡입 가능한 약학 제제를 이용한 투여일 수 있다. 이러한 흡입용 투여에 있어서는 이에 제한되는 것은 아니나, 예를 들어 건조 분말 흡입기 장치 (DPI) 또는 압축 계량 용량 흡입기 (pressurized metered dose inhaler, pMDI) 중 하나를 사용할 수 있다. 약물 입자는 예를 들어 전달 장치(건조 분말 흡입기) 내부에 함유된 취성의(frangible) 매트릭스 내로 가볍게(lightly) 압축된다. 작동시 전달 장치는 매트릭스로부터 약물 입자의 일부를 벗겨내고(abrades), 기도에 약물 입자를 전달하는 들숨 호흡 내로 이들을 분산시킨다. 대안적으로, 약물 입자는 전달 장치(건조 분말 흡입기) 내 저장소 내부에 함유되는 자유 유동성(free flowing) 분말일 수 있다. 저장소는 장치 내부의 일체식 챔버, 또는 캡슐, 블리스터 또는 작동 전에 장치 내부로 삽입되는 유사한 성능의 저장소일 수 있다. 작동시 장치는 저장소로부터 약물 입자의 일부를 분산시키고 기도에 약물 입자를 전달하는 흡입 호흡 내로 이들을 분산시킨다.
- [0030] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 담체, 부형제 또는 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 하이드록시 프로필 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 플로필히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 이산화규소 등의 광물 등이 사용될 수 있다.
- [0031] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 사용된 용어, 약학적으로 유효한 양은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 체중, 성별, 연령, 건강상태, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 다른 측면에서, 본 발명은 바실러스 수퍼옥시드 디스무타아제 활성을 갖는 폴리펩티드 및/또는 SOD를 함유하는 세포의 소포체를 포함하는 약학 조성물을 치료학적으로 유효한 양으로 투여하는 것을 포함하는 호흡기 바이러스 감염 또는 호흡기 바이러스 감염으로 인해 유발되는 질환의 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다. 이때, 상기 호흡기 바이러스 감염은 코로나바이러스 감염일 수 있다. 또한, 본 발명은 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 균주로부터 유래한 수퍼옥시드 디스무타아제 활성을 갖는 폴리펩티드 및/또는 바실러스 서브틸리스 균주로부터 유래한 SOD를 함유하는 세포의 소포체를 포함하는 조성물의 치료학적으로 유효한 양의 투여를 포함하는 호흡기 바이러스 감염 또는 호흡기 바이러스 감염으로 인해 유발되는 질환의 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다. 이때, 상기 호흡기 바이러스 감염은 코로나바이러스 감염일 수 있다. 또한, 상기 SOD 활성을 갖는 폴리펩티드 및 상기 SOD를 함유하는 세포의 소포체는 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 수퍼옥시드 디스무타아제 활성을 갖는 폴리펩티드 및/또는 SOD를 함유하는 세포의 소포체는 호흡기 바이러스 감염 또는 호흡기 바이러스 감염으로 인해 유발되는 질환의 예방 또는 치료 효과를 갖는 것으로 알려진 화합물, 폴리펩티드 등과 함께 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 균주로부터 유래한 수퍼옥시드 디스무타아제 활성을 갖는 폴리펩티드 및/또는 바실러스 서브틸리스 균주로부터 유래한 SOD를 함유하는 세포의 소포체는 호흡기 바이러스 감염 또는 호흡기 바이러스 감염으로 인해 유발되는 질환의 예방

또는 치료 효과를 갖는 것으로 알려진 화합물, 폴리펩티드 등과 함께 사용될 수 있다.

- [0034] 본 발명의 또 다른 측면에 있어서, 수퍼옥시드 디스무타아제 활성을 갖는 폴리펩티드 및/또는 SOD를 함유하는 세포의 소포체를 포함하는 호흡기 바이러스 감염으로 인해 유발되는 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다. 보다 구체적으로는, 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 균주로부터 유래한 수퍼옥시드 디스무타아제 활성을 갖는 폴리펩티드 및/또는 바실러스 서브틸리스 균주로부터 유래한 SOD를 함유하는 세포의 소포체를 포함하는 호흡기 바이러스 감염으로 인해 유발되는 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다. 이때, 상기 호흡기 바이러스 감염은 코로나바이러스 감염일 수 있다.
- [0035] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예로 한정되는 것은 아니다.
- [0036] **실시예 1. 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 GF423으로부터 수퍼옥시드디스무타아제 (SOD) 폴리펩티드의 분리/정제**
- [0037] **1.1 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 GF423의 배양**
- [0038] 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 GF423 균주의 배양을 위해, LB 한천 배지 (Luria-Bertani (LB) 아가; 트립토판 10 g/L, 효모 추출물 5 g/L, NaCl 10 g/L, 아가 15 g/L)에서 형성된 단일 콜로니를 LB 배지 30 ml에 접종하여, 37 °C에서 12시간 동안 배양하였다. 이 중 배양을 다시 3L의 1 mM 황산망간 (MnSO₄)이 포함된 LB 배지에 접종하고 37 °C에서 20시간 동안 배양하였다.
- [0039] **1.2 수퍼옥시드디스무타아제의 분리 및 정제**
- [0040] 세포 배양액을 4 °C, 3,578xg에서 20분간 원심분리하여 상등액을 취한 후, 초미세여과(Ultrafiltration, 이하 UF, MWCO 10,000)를 이용하여 10배 농축하였다. 농축된 상등액 300 ml을 4 °C에서 교반하면서 60% 포화도까지 황산암모늄 (ammonium sulfate)을 첨가하고, 30분 동안 교반하였다. 이후 3,578xg에서 30분간 원심분리하여 상등액을 취하여, 2 M 황산암모늄이 포함된 50 mM 인산칼륨 (potassium phosphate, pH 7.5)으로 평형화된 HiPrep™ Phenyl HP 16/10 컬럼에 로딩하였다. 이 후, 2 M 내지 0.1 M의 황산암모늄이 포함된 50 mM 인산칼륨 (pH 7.5)을 이용하여 용출하였다.
- [0041] SOD 함유 분획 (#35-#40)을 모은 후, UF (MWCO 10,000)를 이용하여 농축하고, 50 mM 인산칼륨 (pH 7.5)으로 투석하여 염을 제거하였다. 단백질의 농도는 브래드포드(Bradford M, Anal Biochem, 72, 248-254, 1976)의 방법으로 측정하였다.
- [0042] 수퍼옥시드 디스무타아제의 활성은 수퍼옥시드 디스무타아제 분석 키트(Cayman Chemical, Michigan, USA)를 이용하여 확인하였다. 수퍼옥시드 디스무타아제 활성의 1 단위는 수퍼옥시드 라디칼을 50% 억제하는 효소의 양으로 정의된다. 정제된 SOD의 활성은 2231.12 ± 269 U/mg, SDS 상의 분자량은 약 22,000 dalton이었다.
- [0043] **실시예 2. 바실러스 서브틸리스 균주로부터 SOD를 함유하는 세포의 소포체(SOD-EV) 분리/정제**
- [0044] **2.1. 바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis) SOD 균주의 배양**
- [0045] 본 발명자들이 동결보관하고 있던 바실러스 서브틸리스 SOD 균주를 수퍼옥시드 디스무타아제 분리 정제를 위한 균주로서 사용하였다. 기본 배지로 DSM(Nutrient broth 8 g/L, KCl 1 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.12 g/L, 1 mM Ca(NO₃)₂, 0.01 mM MnCl₂·4H₂O, 0.001 mM FeSO₄)을 사용하였다. 둥근 바닥 튜브(Round-bottom tube)와 플라스틱 배양은 진탕 배양기를 사용했으며, 교반 속도는 200 rpm, 온도는 37 °C로 하였다. 발효기는 5 L 자 발효조 (Jar fermenter, fermentec사, FMT-ST-M05)를 사용하였고, 교반 속도는 200 rpm, 온도는 37 °C, 통기량은 1.0 vvm, pH는 6.8로 하였다.
- [0046] 바실러스 서브틸리스 균주의 전 배양은 SOD 플레이트에서 한 개 콜로니(colony)를 취한 뒤 3 ml 기본 배지가 들어있는 둥근 바닥 튜브에 접종하여 9 시간 배양함으로써 수행되었다. 또한, 둥근 바닥 튜브에 배양된 배양액 3 ml를 30 ml 기본 배지가 들어있는 500 ml 플라스크에 접종하여 16 시간 배양한 후 주 배양(Main culture) 접종용으로 사용했다. 발효조에서는 3.0 L로 배양을 진행했으며, 접종량은 1%로 하고 24 시간 동안 배양하였다.
- [0047] **2.2. SOD-EV 분리**
- [0048] 진술한 방법과 같이, 바실러스 서브틸리스 SOD 균주를 자 발효조에서 24 시간 배양 후 배양액을 12,000 rpm, 4 °C, 30 분 동안 원심 분리하여 배양액 상등액을 얻었다. 배양액 상등액은 TFF 시스템의 0.22 μm 카세트를 이용

하여 배양액에 남아있는 잉여균을 제거하고 순수 배양액 상등액만 분리하였다. 순수 배양액 상등액은 TFF 시스템의 100 kDa 컷-오프 막을 이용하여 200 배 농축하여 SOD를 함유하는 세포외 소포체(Extracellular vesicles, SOD-EV)를 얻었다.

[0049] **2.3. SOD-EV의 정량 및 확인**

[0050] 전술한 방법에 의하여 얻은 SOD-EV에 대하여 단백질 전기영동을 수행하였고, 브래드포드 분석법(Bradford analysis), 비씨에이 분석법(BCA analysis)를 이용하여 SOD-EV의 단백질 양을 측정하였다.

[0051] [단백질 전기영동]

[0052] SDS-PAGE(Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) 4~20 % gradient gel(Biorad, mini-protean TGX precast gels)을 사용하였다. SDS-PAGE 완충액은 25 mM Tris-base, 192 Mm glycine, 0.1 % SDS, pH 8.3을 사용하였고, SOD-EV는 5x 샘플 버퍼와 혼합하여 100℃, 10분 열 처리하여 사용하였다. 단백질 전기영동 후 쿠마씨 염색과 웨스턴 블롯 (western blot)으로 단백질을 확인하였다. 쿠마씨 블루(Coomassie brilliant blue)로 30 분 동안 염색한 후, 디스테이닝 용액(Destaining buffer)으로 3시간 반응시켰다.

[0053] [웨스턴 블롯]

[0054] SDS-PAGE 단백질을 0.22 μm PVDF 멤브레인에 옮긴 후 5 % 스킵 밀크에 1 시간 블로킹하였다. 그 후 세척 버퍼로 3 차례 세척한 후 1차 항체(1:10,000 스킵 밀크)를 붙이고 상온에서 3시간 반응시켰다. 그 다음 세척 버퍼를 이용하여 3 차례 세척하고 2차 항체(1:100,000 스킵 밀크)를 붙이고 상온에서 1시간 반응시켰다. 그 다음 세척 버퍼를 이용하여 3번 세척하고 ECL 반응하여 확인하였다.

[0055] 단백질 전기영동 장치는 Bio-rad, Mini-Protean II를 사용하였고, 확인 장치는 Bio-rad, Chemi-doc MP imaging system을 사용하였다.

[0056] [SOD를 함유하는 세포외 소포체(SOD-EV)의 크기 확인]

[0057] 분리한 SOD-EV의 크기를 측정은 동적광산란광도계(Dynamic light scattering, DLS)를 사용하였다. SOD-EV 샘플은 8 μl씩 웰에 넣은 후, DLS 기기 챔버에 올려놓고, 레이저 광을 이용해 입자 크기를 측정하였다. 도 1 및 도 2에 입자 크기 분석 결과를 도시하였다. 이때, SOD-EV 농도는 브래드포드 분석에서 0.5 mg/ml이었으며, BCA 분석에서 0.124 mg/ml 이었다(하기 표 1 참조).

표 1

[0058]		SOD-EV 농도 (mg/ml)
	Bradford analysis	0.5
	BCA analysis	0.124

[0059] **실시예 3. SOD 및 SOD-EV의 코로나바이러스 감염 예방 및 치료 효과**

[0060] **실시예 3-1. SOD 및 SOD-EV의 예방 및 치료적 투여에 따른 폐의 육안 평가**

[0061] SOD 및 SOD-EV의 코로나바이러스 감염 예방 및 치료 효과를 확인하는 동물 실험을 위하여 중앙실험동물에서 6주령의 시리안 햄스터(Male) 40 마리를 구입하였다. 구입한 시리안 햄스터를 하기 표 2와 같이 8개의 군으로 구분하고 SOD, SOD-EV, 및 SOD-EV와 함께 SOD를 각각 투여하였으며, 호흡기 바이러스로 Sars-Cov2를 공격접종 바이러스로 사용하였다.

표 2

그룹	크기	그룹 설명	Sars-Cov2 공격 (500 PFU)	TI 경로	TI & 용량	용법
G1	N=5	치료모드 (Therapeutic mode)	있음	비강분무	SOD-EV 600 ng	0일 내지 4일, 매일 1회/일
G2	N=5			비강분무	SOD 1 U	0일 내지 4일, 매일 1회/일
G3	N=5			비강분무	SOD-EV 600 ng + SOD 1 U	0일 내지 4일, 매일 1회/일

G4	N=5	예방 모드 (Preventive mode)	있음	비강분무	EV 600 ng	-2일 내지 4일, 매일 1회/일
G5	N=5			비강분무	SOD 1 U	-2일 내지 4일, 매일 1회/일
G6	N=5			비강분무	SOD-EV 600 ng + SOD 1U	-2일 내지 4일, 매일 1회/일
G7	N=5	바이러스만 사용	있음	비강분무	없음	-
G8	N=5	공격 없음	없음	비강분무	SOD-EV 600 ng + SOD 1 U	-2일 내지 4일, 매일 1회/일

- [0063] 코로나바이러스 감염 치료 효과를 확인하기 위한 군으로서, G1 내지 G3이 치료모드로 분류되었다. G1, G2 및 G3에는 Sars-Cov2 공격접종일부터 공격접종후 4일이 되는 날까지 매일 SOD, SOD-EV, 및 SOD-EV와 SOD를 각각 투여하였다.
- [0064] 코로나바이러스 감염 예방 효과를 확인하기 위한 군으로서, G4 내지 G6이 예방모드로서 분류되었다. G4, G5 및 G6에는 사스 코로나바이러스(Sars-Cov2) 공격접종 2일 전부터 공격접종후 4일이 되는 날까지 매일 1회 SOD, SOD-EV, 및 SOD-EV와 SOD를 각각 투여하였다.
- [0065] G7에는 바이러스 공격 접종만을 하였으며, G8에는 바이러스 공격접종 없이 SOD-EV와 SOD만을 투여하였다. 치료 모드 및 예방모드 별 실험설계는 도 3에 도시된 바와 같다.
- [0066] Sars-Cov2 공격접종을 하지 않은 G8을 제외하고는, G1 내지 G7 모두에서 Sars-Cov2 공격접종이후 폐손상이 나타났다.
- [0067] 그러나 Sars-Cov2 공격접종 후에 SOD 및/또는 SOD-EV를 투여받은 G1 내지 G3에서 관찰된 폐손상은 G7에서 관찰된 폐손상에 비하여 적은 것으로 나타났다(도 4 참조). 특히, SOD만을 투여한 G2 및 SOD와 함께 SOD-EV를 투여한 G3에서 나타난 폐손상은 G7에서 관찰된 폐손상보다 통계적으로 유의미한 수준의 차이를 보였다(p<0.05). 즉, SOD 단독 또는 SOD와 EV를 함께 사용하게 되면 Sars-Cov2와 같은 호흡기 바이러스에 의한 감염 치료 효과가 우수한 것으로 나타났다.
- [0068] 또한, 공격접종 2일 전부터 SOD 및/또는 SOD-EV를 투여받은 G4, G5 및 G6은 SOD 및/또는 SOD-EV의 투여가 없었던 G7에 비하여 폐손상이 적게 나타났다(도 5 및 6 참조). 특히, SOD-EV와 SOD를 함께 투여한 G6은 G7보다 통계적으로 유의한 폐손상 차이를 보였다(p<0.05). 이와 같은 실험결과는 SOD와 EV를 함께 사용하는 경우 Sars-Cov2와 같은 호흡기 바이러스에 의한 감염 예방 효과가 탁월함을 보여준다.
- [0069] 또한, G7에서 확인된 폐부종 및 염증보다 SOD-EV 및/또는 SOD를 투여한 G1 내지 G3에서 폐 부종 및 염증이 더 적게 나타났다(도 7 Therapeutic mode 참조).
- [0070] 한편, Sars-Cov2 공격 접종 전에 SOD-EV 및/또는 SOD를 투여한 G4 내지 G6에서의 폐 부종 및 염증은 G7보다 적은 것으로 나타났다(도 7 Preventive mode 참조).
- [0071] **실시예 3-2. SOD 및 SOD-EV의 예방 및 치료적 투여에 따른 폐의 조직병리학적 평가**
- [0072] SOD 및 SOD-EV의 코로나바이러스 감염 예방 및 치료 효과를 확인하기 위하여 상기 실시예 3-1에서 육안으로 평가한 8개의 군의 폐의 조직병리 검사를 수행하였다.
- [0073] 구체적으로, 상기 8개의 군의 폐에서 조직 박편을 수득한 후, 각 조직 박편을 10% 중성 포르말린(neutral buffered formalin) 용액에 24 시간 고정시켰다. 고정된 조직 박편을 자동 칩투기에 넣어 조직내 수분을 제거하고 파라핀을 조직 내부에 칩투시켰다. 칩투 과정이 끝난 조직 박편을 틀에 넣고 파라핀을 부어 일정한 모양의 블록(block)을 만들었으며, 만들어진 블록을 냉각시킨 후에 Microtome을 이용하여 4 μm의 두께로 박절하였다.
- [0074] 상기 과정을 거쳐 생성된 슬라이드에 하기의 방법으로 H&E 염색을 수행하였다.
- [0075] 먼저, 파라핀 조직 박편이 있는 슬라이드를 5분간 각기 다른 자일렌(xylene)에 넣어 탈파라핀화(deparaffinize)하고, 100% 에탄올에서 3분간 2회, 80% 에탄올에서 2분, 70% 에탄올에서 2분 처리하여 다시 수화(rehydrate)하였다.
- [0076] 박편을 수돗물로 5분간 세척 한 후, 조직 슬라이드를 해리스 헤마톡실린(Harris haematoxylin)에 10분간 넣어두고 수돗물로 3분간 세척하였다. 0.5% 산성 알코올에 빠르게 2회 담가 잔여물을 제거하고 1분간 수돗물에 세척하

였으며, 세척된 박편을 2분간 1% 암모니아 용액에 넣어서 푸른색이 나타나도록 하였다. 이후, 10초간 95% 에탄올에 박편을 살짝 담갔다가 1분 30초 동안 에오신(eosin)으로 염색하였다. 염색한 박편을 100% 에탄올에 50초간 3회 탈수시키고 자일렌에 넣어 5분 간 2회 클리어링(clearing)하였다.

[0077] H&E 염색을 수행한 슬라이드의 커버슬립에 수성 고정 용액을 한 방울 떨어뜨린 후, 건조시키고 광학현미경을 통해 결과를 관찰하였다.

[0078] 하기 표 3을 조직병리학적 점수의 척도로 하여 조직병리 검사를 수행하였으며, 그 결과를 하기 표 4, 도 8 및 9에 도시하였다.

표 3

조직병리 기준	점수			
	0	1	2	3
출혈	출혈이 0%에서 10% 미만	경미한 출혈(면적의 10%-30%)	중간 정도의 출혈(면적의 30%-60%)	극심한 출혈(면적의 60% 초과)
염증세포 침윤	0%에서 10% 미만의 백혈구 침윤	적은 백혈구 침윤(면적의 10%-30%)	중간 정도의 백혈구 침윤(면적의 30%-60%)	극심한 백혈구 침윤(면적의 60% 초과)
세포괴사성/세포자멸성 소체(necrotic/apoptotic bodies)	실질 내 0%에서 10% 미만의 세포괴사성/세포자멸성 소체(necrotic/apoptotic bodies)	실질 내 적은 세포괴사성/세포자멸성 소체(necrosis/apoptotic bodies) (면적의 10%-30%)	실질 내 중간 정도의 세포괴사성/세포자멸성 소체(necrosis/apoptotic bodies) (면적의 30%-60%)	실질 내 극심한 세포괴사성/세포자멸성 소체(면적의 60% 초과)
폐포 대식세포 응집	0%에서 10% 미만의 폐포 대식세포 응집	경미한 폐포 대식세포 응집(면적의 10%-30%)	중간 정도의 폐포 대식세포 응집(면적의 30%-60%)	극심한 폐포 대식세포 응집(면적의 60% 초과)
폐경화(consolidation)	0%에서 10% 미만의 기관지/폐포 내 염증성 삼출물	경미한 기관지/폐포 내 염증성 삼출물(면적의 10%-30%)	중간 정도의 기관지/폐포 내 염증성 삼출물(면적의 30%-60%)	극심한 기관지/폐포 내 염증성 삼출물(면적의 60% 초과)
폐기종	없음	경미한 폐기종(면적의 30% 미만)	중간 정도의 폐기종(면적의 30%-60%)	극심한 폐기종(면적의 60% 초과)
기관지 상피 위축	기관지 상피 정상	기관지 상피의 경미한 위축(면적의 30% 미만)	중간 정도의 기관지 상피 위축(면적의 30%-60%)	극심한 기관지 상피 위축(면적의 60% 초과)
기관지 내 세포 잔여물 존재	기관지 내 0%에서 10% 미만의 세포 잔여물 존재	기관지 내 경미한 세포 잔여물 존재(면적의 10%-30%)	기관지 내 중간 정도의 세포 잔여물 존재(면적의 30%-60%)	기관지 내 극심한 세포 잔여물 존재(면적의 60% 초과)
상피 주위 단핵구 정렬(lining)	0%에서 10% 미만의 상피 주위 단핵구 정렬(lining)	경미한 상피 주위 단핵구 정렬(lining) (면적의 10%-30%)	중간 정도의 상피 주위 단핵구 정렬(lining) (면적의 30%-60%)	극심한 상피 주위 단핵구 정렬(lining) (면적의 60% 초과)

[0079]

표 4

그룹	번호	출혈	염증 세포 침윤	세포괴사성 /세포자멸 생성체	폐포 대식 세포 용집	폐경화	폐기종	기관지 상피 위축	기관지 내 세포 잔여물	상피 주위 단핵구 정렬	조직병리학 점수	
치료 모드	SOD-EV	G1 #1	1	2	1	2	1	2	0	1	1	11
		G1 #2	1	1	1	1	0	2	0	1	1	8
		G1 #3	0	2	2	1	1	1	0	2	1	10
		G1 #4	1	1	1	1	1	0	0	1	2	8
		G1 #5	1	2	1	1	0	1	0	1	1	8
		평균	0.8	1.6	1.2	1.2	0.6	1.2	0	1.2	1.2	9
	Free SOD	G2 #1	1	2	1	2	1	1	0	1	1	10
		G2 #2	1	2	1	0	0	0	0	1	1	6
		G2 #3	1	2	1	2	0	1	0	1	0	8
		G2 #4	0	1	1	0	1	1	0	1	0	5
		G2 #5	1	1	1	0	0	1	0	2	0	6
		평균	0.8	1.6	1	0.8	0.4	0.8	0	1.2	0.4	7
	SOD-EV + Free SOD	G3 #1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	4
		G3 #2	1	2	2	1	1	1	0	1	1	10
		G3 #3	1	1	0	1	0	1	2	0	0	6
		G3 #4	2	2	1	2	0	1	0	0	1	9
		G3 #5	0	2	1	2	0	1	0	1	1	8
		평균	1	1.6	1	1.2	0.4	0.8	0.4	0.4	0.6	7.4
예방 모드	SOD-EV	G4 #1	1	2	1	1	0	0	0	1	1	7
		G4 #2	1	2	1	0	1	1	2	1	1	10
		G4 #3	1	2	1	1	1	0	0	0	1	7
		G4 #4	1	2	2	2	0	2	3	0	0	12
		G4 #5	1	1	2	1	1	1	3	0	0	10
		평균	1	1.8	1.4	1	0.6	0.8	1.6	0.4	0.6	9.2
	Free SOD	G5 #1	1	3	2	1	1	1	0	1	1	11
		G5 #2	1	2	2	1	0	1	0	1	1	9
		G5 #3	2	2	1	2	1	2	0	0	1	11
		G5 #4	2	3	1	2	1	1	0	1	1	12
		G5 #5	2	2	2	0	0	0	0	1	1	8
		평균	1.6	2.4	1.6	1.2	0.6	1	0	0.8	1	10.2
	SOD-EV + Free SOD	G6 #1	1	2	2	1	1	1	0	1	1	10
		G6 #2	0	1	1	0	0	2	0	1	1	6
		G6 #3	1	2	1	0	1	1	0	1	1	8
		G6 #4	1	2	2	2	2	0	0	1	2	12
		G6 #5	1	2	1	2	1	0	0	1	1	9
		평균	0.8	1.8	1.4	1	1	0.8	0	1	1.2	9
바이러스 500PFU/he ad	G7 #1	1	2	2	1	1	1	2	2	1	13	
	G7 #2	0	2	1	2	2	1	3	1	1	13	
	G7 #3	1	3	2	2	1	0	3	1	1	14	
	G7 #4	1	2	1	2	3	1	2	1	0	13	
	G7 #5	1	2	2	1	2	1	3	1	0	13	
	평균	0.8	2.2	1.6	1.6	1.8	0.8	2.6	1.2	0.6	13.2	
약물 단독	SOD-EV + free SOD 공격 없음	G8 #1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
		G8 #2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
		G8 #3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		G8 #4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
		G8 #5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
		평균	0	0.8	0	0	0	0	0	0	0	0.8

[0080]

[0081] 조직병리 검사 결과, SOD 및/또는 SOD-EV를 투여받은 G1 내지 G6에서 관찰된 폐경화(Consolidation) 및 기관지 상피 위축(Bronchial epithelium atrophy)은 SOD 및/또는 SOD-EV의 투여가 없었던 G7에서 관찰된 폐경화 및 기관지 상피 위축에 비하여 유의하게 적은 것으로 나타났다(표 4 참조).

[0082] 또한, 공격접종 후 SOD 및/또는 SOD-EV를 투여받은 G1, G2 및 G3은 SOD 및/또는 SOD-EV의 투여가 없었던 G7에 비하여 조직병리학 점수가 낮게 나타났다(도 8 참조). 특히, SOD만을 투여한 G2 및 SOD와 함께 SOD-EV를 투여한 G3에서 나타난 조직병리학 점수는 G7에서 나타난 조직병리학 점수보다 유의미한 수준의 차이를 보였다(p<0.01).

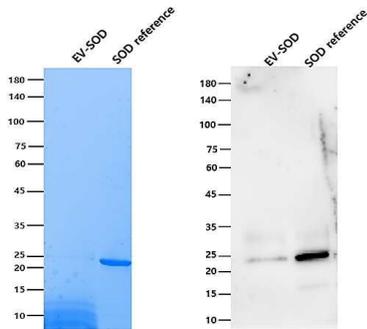
[0083] 또한, 바이러스 공격접종만을 투여받은 G7은 기관지 상피 위축이 심각하여 기관지 상피가 거의 관찰되지 않았으며, 공격접종 2일 전부터 SOD 및/또는 SOD-EV를 투여받은 G4, G5 및 G6은 G7에 비하여 조직병리학 점수가 낮게 나타났다(도 9 참조). 특히, SOD와 함께 SOD-EV를 투여한 G6에서 나타난 조직병리학 점수는 G7에서 나타난 조직병리학 점수보다 유의미한 수준의 차이를 보였다(p<0.05).

[0084]

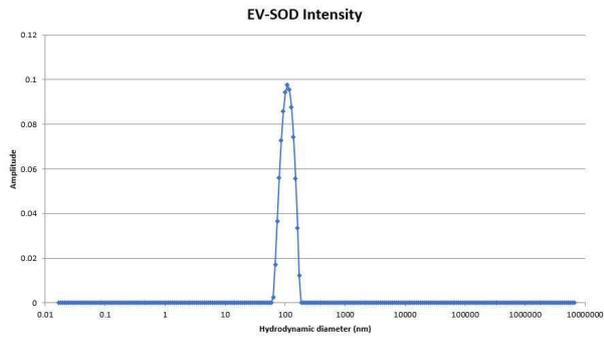
즉, 조직병리학 점수는 육안으로 관찰한 폐 손상 점수와 비슷한 양상을 나타내며, 특히, 폐경화 및 기관지 상피 위축의 예방 및 치료 효과가 우수한 것으로 나타났다.

도면

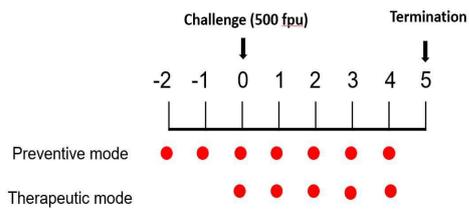
도면1



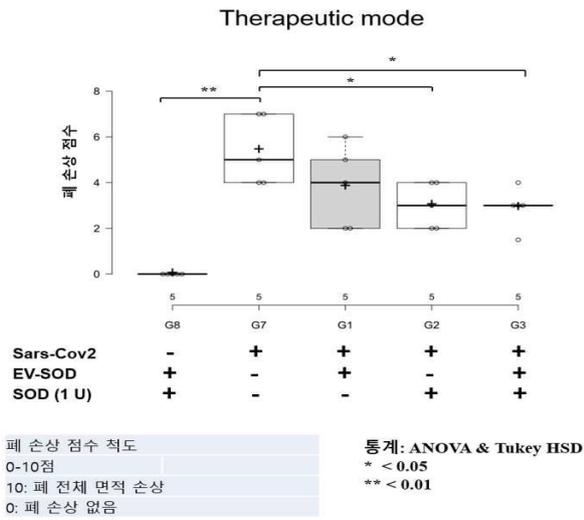
도면2



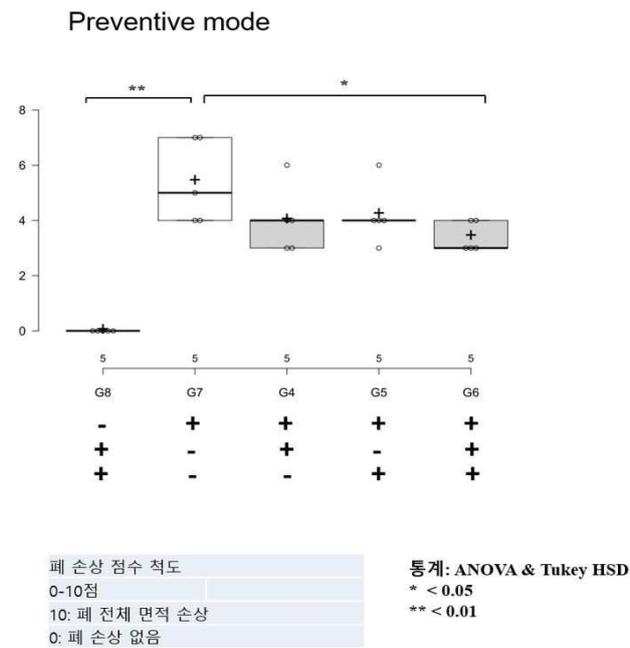
도면3



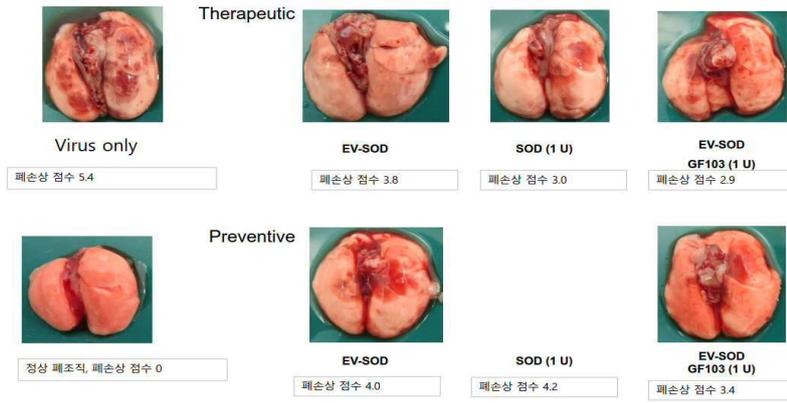
도면4



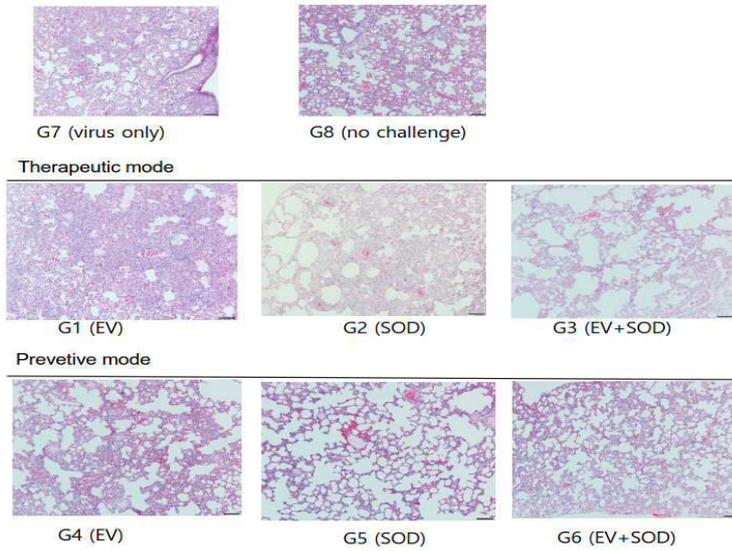
도면5



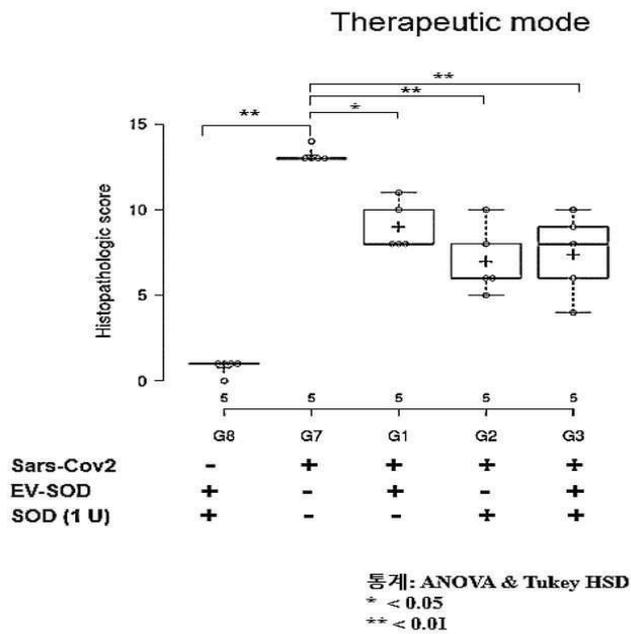
도면6



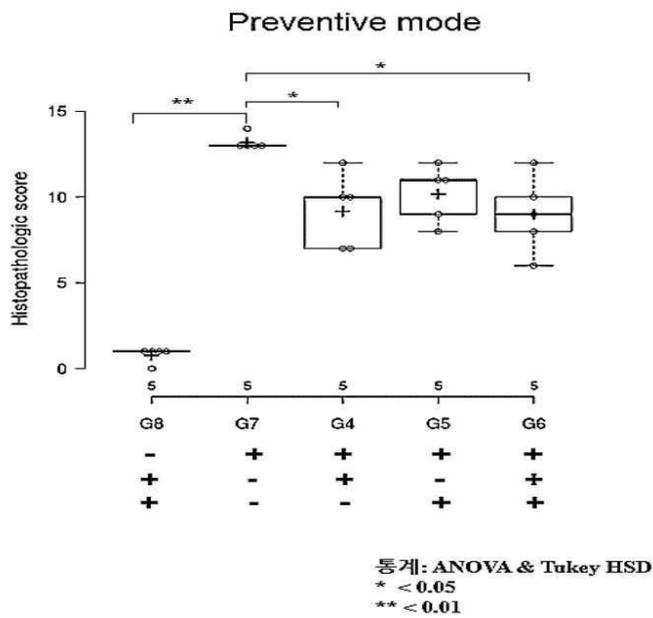
도면7



도면8



도면9



서열 목록

- <110> GENOFOCUS CO., LTD.
- <120> USE OF A POLYPEPTIDE HAVING A SUPEROXIDE DISMUTASE ACTIVITY AND AN EXTRACELLULAR VESICLE FOR TREATING OR PREVENTING A RESPIRATORY VIRAL INFECTION
- <130> FPD/202111-0018
- <150> KR 10-2020-0158202

<151> 2020-11-23
 <160> 1
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 201
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Bacillus amyloliquefaciens
 <400> 1

Met Ala Tyr Lys Leu Pro Glu Leu Pro Tyr Ala Tyr Asp Ala Leu Glu

1 5 10 15
 Pro His Ile Asp Lys Glu Thr Met Thr Ile His His Thr Lys His His
 20 25 30
 Asn Thr Tyr Val Thr Asn Leu Asn Lys Ala Ile Glu Gly Ser Ala Leu
 35 40 45
 Ala Glu Lys Ser Val Asp Glu Leu Val Ala Asp Leu Asn Ala Val Pro
 50 55 60
 Glu Asp Ile Arg Thr Ala Val Arg Asn Asn Gly Gly Gly His Ala Asn
 65 70 75 80

His Ser Leu Phe Trp Thr Leu Leu Ser Pro Asn Gly Gly Gly Glu Pro
 85 90 95
 Thr Gly Glu Leu Ala Glu Glu Ile Lys Ser Thr Phe Gly Ser Phe Asp
 100 105 110
 Gln Phe Lys Glu Lys Phe Ala Ala Ala Ala Ala Gly Arg Phe Gly Ser
 115 120 125
 Gly Trp Ala Trp Leu Val Val Asn Asn Gly Lys Leu Glu Ile Thr Ser
 130 135 140
 Thr Pro Asn Gln Asp Ser Pro Leu Ser Glu Gly Lys Thr Pro Val Leu

145 150 155 160
 Gly Leu Asp Val Trp Glu His Ala Tyr Tyr Leu Asn Tyr Gln Asn Arg
 165 170 175
 Arg Pro Asp Tyr Ile Ser Ala Phe Trp Asn Val Val Asn Trp Asp Glu

180 185 190
Val Ala Arg Leu Tyr Ser Glu Ala Lys
195 200