



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0040870
(43) 공개일자 2023년03월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/708 (2006.01) *A23K 20/163* (2016.01)
A23L 33/125 (2016.01) *A61P 11/00* (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/708 (2013.01)
A23K 20/163 (2016.05)

(21) 출원번호 10-2022-0088667

(22) 출원일자 2022년07월19일

심사청구일자 2022년07월19일

(30) 우선권주장

1020210124221 2021년09월16일 대한민국(KR)

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

배진우

서울특별시 동대문구 경희대로 26, 경희대학교 이과대학

조은경

대전광역시 중구 문화로 266, 충남대학교 의과대학

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인정진

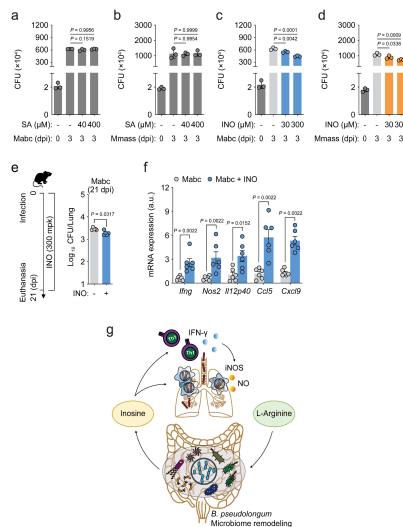
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 장내 대사산물을 이용한 비결핵항산균 감염증 치료

(57) 요약

본 발명은 장내 대사산물의 비결핵성 항산균 감염증 치료에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 이노신을 포함하는 비결핵성 항산균 감염증 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 이노신은 생체 내에서 보호 M1 및 Th1 면역 반응의 향상을 통해 비결핵성 항산균 폐질환에 대한 폐 숙주 방어를 촉진하는 것을 확인하였다. 이는 이노신이 비결핵성 항산균의 감염 예방뿐만 아니라, 비결핵성 항산균 감염에 의한 폐질환의 치료 효과가 있음을 의미하는바, 본 발명의 이노신은 비결핵성 항산균의 감염 예방 분야; 및 비결핵성 항산균 폐질환의 치료 분야;에 다양하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A23L 33/125 (2020.05)

A61P 11/00 (2018.01)

A61P 31/04 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/314 (2013.01)

(72) 발명자

김영재

대전광역시 중구 문화로 266, 충남대학교 의과대학

전상민

대전광역시 중구 문화로 266, 충남대학교 의과대학

이준영

서울특별시 동대문구 경희대로 26, 경희대학교 이
과대학

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711164209
과제번호	2020R1A2C3012797
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	약물 작용에 관여하는 장내미생물 기작 규명 및 마이크로바이옴 제어 연구
기 여 율	1/2
과제수행기관명	경희대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2025.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711169233
과제번호	2017R1A5A2015385
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원
연구과제명	감염 제어 컨버전스 연구센터
기 여 율	1/2
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2017.06.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

이노신을 포함하는 비결핵성 항산균 폐질환(Nontuberculous mycobacterial pulmonary disease, NTM-PD) 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 이노신은 농도가 1 내지 100 μ M인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 비결핵성 항산균은 마이코박테리움 아비움(*Mycobacterium avium*)(Mav), 마이코박테리움 압세수스 아종 압세수스(*Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus*)(Mabc), 마이코박테리움 압세수스 아종 마실리엔시스(*Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense*)(Mmass), 마이코박테리움 압세수스 아종 볼레티이(*Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii*), 마이코박테리움 인트라셀룰레어(*Mycobacterium Intracellulare*), 마이코박테리움 키메라(*Mycobacterium chimaera*), 마이코박테리움 스크로폴라세움(*Mycobacterium Scrofulaceum*), 마이코박테리움 켈로네(*Mycobacterium chelonae*), 마이코박테리움 폴투이텀(*Mycobacterium fortuitum*), 마이코박테리움 페레그리눔(*Mycobacterium peregrinum*), 마이코박테리움 울세란스(*Mycobacterium ulcerans*), 마이코박테리움 마리눔(*Mycobacterium marinum*), 마이코박테리움 칸사시(*Mycobacterium kansasii*), 마이코박테리움 제네반스(*Mycobacterium Genevans*), 마이코박테리움 시미에(*Mycobacterium simiae*), 마이코박테리움 테레(*Mycobacterium terrae*), 마이코박테리움 논크로모제니쿰(*Mycobacterium nonchromogenicum*), 마이코박테리움 셀라툼(*Mycobacterium celatum*), 마이코박테리움 고르도네(*Mycobacterium gordonae*), 마이코박테리움 스줄가이(*Mycobacterium szulgai*), 마이코박테리움 뮤코제니쿰(*Mycobacterium mucogenicum*) 및 마이코박테리움 아우바그넨스(*Mycobacterium aubagnens*)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 조성물.

청구항 4

이노신을 포함하는 비결핵성 항산균 폐질환 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 5

이노신을 포함하는 비결핵성 항산균 폐질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 6

이노신을 포함하는 비결핵성 항산균 폐질환 예방 또는 개선용 사료 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 장내 대사산물의 비결핵성 항산균 감염증 치료에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 이노신을 포함하는 비결핵성 항산균 감염증 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 비결핵성 항산균(Nontuberculous mycobacteria, NTM) 감염의 발병률, 유병률 및 사망률은 전 세계적으로 증가하고 있다. 비결핵성 항산균 폐 질환(NTM pulmonary diseases, NTM-PD)은 NTM 감염의 가장 흔한 임상 증상이다. 상기 비결핵성 항산균 폐 질환은 천천히 성장하는 마이코박테리움 아비움(*Mycobacterium avium*)(Mav) 복합체; 및 마이코박테리움 압세수스 아종 압세수스(*M. abscessus* subsp. *abscessus*)(Mabc), 마이코박테리움 압세수스 아종 마실리엔시스(*M. abscessus* subsp. *massiliense*)(Mmass), 및 마이코박테리움 압세수스 아종 볼레티이(*M. abscessus* subsp. *bolletii*)를 포함하는 빠르게 성장하는 마이코박테리움 압세수스 복합체;에 의해 유발된다. 특히 마이코박테리움 압세수스 복합체는 면역 적격 환자와 면역 저하 환자 모두에서 폐 감염의 중요한 원인으로 떠오르고 있다. 일반적으로 NTM-PD의 치료 기간은 12개월 이상이며 종종 좋지 않은 결과를 보인다. NTM-PD의 항생제 치료에 대한 최근 메타 분석에 따르면 aminoglycoside 및 macrolide 함유 요법의 성공률은 70% 이하이고, 자연 및 후천 항생제 내성으로 인해 치료가 복잡하고 어렵다. 게다가, 최근 연구에서는 인구 내에서 NTM이 직접 전파될 가능성이 있다고 제안했으며, 새로운 NTM-PD에 대한 새로운 보호 및 치료 양식의 개발이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0003] 이에 본 발명자들은 이노신이 비결핵성 항산균의 감염 예방 효과; 및 비결핵성 항산균의 치료 효과;가 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 하였다.

[0004] 따라서 본 발명의 목적은, 이노신(inosine)을 포함하는 비결핵성 항산균 폐질환(Nontuberculous mycobacterial pulmonary disease, NTM-PD) 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0005] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 이노신을 포함하는 비결핵성 항산균 폐질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0006] 또한 본 발명은 이노신을 포함하는 비결핵성 항산균 폐질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0007] 또한 본 발명은 이노신을 포함하는 비결핵성 항산균 폐질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0008] 또한 본 발명은 이노신을 포함하는 비결핵성 항산균 폐질환 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명에 따른 이노신은 생체 내에서 보조 M1 및 Th1 면역 반응의 향상을 통해 비결핵성 항산균 폐질환에 대한 폐 숙주 방어를 촉진하는 것을 확인하였다. 이는 이노신이 비결핵성 항산균의 감염 예방뿐만 아니라, 비결핵성 항산균 감염에 의한 폐질환의 치료 효과가 있음을 의미하는바, 본 발명의 이노신은 비결핵성 항산균의 감염 예방 분야; 및 비결핵성 항산균 폐질환의 치료 분야;에 다양하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1a는 비결핵성 항산균 감염 전후 비피도박테리움 슈도롱검의 경구 투여 일정을 나타낸 도이다.

도 1b는 비결핵성 항산균 감염 전후 비피도박테리움 슈도롱검의 경구 투여에 따른 생체 내 폐 세균 부하를 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 1c는 비결핵성 항산균 감염 전후 비피도박테리움 슈도롱검의 경구 투여에 따른 염증 관련 인자의 mRNA 발현을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 1d는 비결핵성 항산균 감염 전후 비피도박테리움 슈도롱검의 경구 투여에 따른 IFN- γ 발현을 분석한 결과를

나타낸 도이다.

도 1e는 비결핵성 항산균 감염 후 비피도박테리움 슈도롱검의 경구 투여 일정을 나타낸 도이다.

도 1f는 비결핵성 항산균 감염 후 비피도박테리움 슈도롱검의 경구 투여에 따른 생체 내 세균 부하 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 1g는 비결핵성 항산균 Mabc 감염 후 비피도박테리움 슈도롱검의 경구 투여에 따른 염증 관련 인자의 mRNA 발현을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 1h는 비결핵성 항산균 Mav 감염 후 비피도박테리움 슈도롱검의 경구 투여에 따른 염증 관련 인자의 mRNA 발현을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 1i는 비결핵성 항산균 Mabc 감염 후 비피도박테리움 슈도롱검의 경구 투여에 따른 IFN- γ -positive CD4⁺CD44⁺ T 세포 수를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 1j는 비결핵성 항산균 Mav 감염 후 비피도박테리움 슈도롱검의 경구 투여에 따른 IFN- γ -positive CD4⁺CD44⁺ T 세포 수를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 1k는 비결핵성 항산균 Mabc 감염 후 비피도박테리움 슈도롱검의 경구 투여에 따른 IFN- γ -positive CD4⁺CD44⁺ T 세포 수를 닷 블롯으로 나타낸 도이다.

도 1l은 비결핵성 항산균 Mav 감염 후 비피도박테리움 슈도롱검의 경구 투여에 따른 IFN- γ -positive CD4⁺CD44⁺ T 세포 수를 닷 블롯으로 나타낸 도이다.

도 2a는 다제내성 비결핵성 항산균 Mabc 감염 후 비피도박테리움 슈도롱검의 경구 투여에 따른 생체 내 부하를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 2b는 다제내성 비결핵성 항산균 Mav 감염 후 비피도박테리움 슈도롱검의 경구 투여에 따른 생체 내 부하를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 2c는 다제내성 비결핵성 항산균 Mabc KMRC-010 감염 후 비피도박테리움 슈도롱검의 경구 투여에 따른 염증 관련 인자의 mRNA 발현을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 2d는 다제내성 비결핵성 항산균 Mabc KMRC-011 감염 후 비피도박테리움 슈도롱검의 경구 투여에 따른 염증 관련 인자의 mRNA 발현을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 2e는 다제내성 비결핵성 항산균 Mav KMRC-012 감염 후 비피도박테리움 슈도롱검의 경구 투여에 따른 염증 관련 인자의 mRNA 발현을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 2f는 다제내성 비결핵성 항산균 Mav KMRC-013 감염 후 비피도박테리움 슈도롱검의 경구 투여에 따른 염증 관련 인자의 mRNA 발현을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 3a는 비결핵성 항산균 Mabc 감염 후 수베르산의 경구 투여에 따른 생체 내 세균 부하를 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 3b는 비결핵성 항산균 Mmass 감염 후 수베르산의 경구 투여에 따른 생체 내 세균 부하를 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 3c는 비결핵성 항산균 Mabc 감염 후 이노신의 경구 투여에 따른 생체 내 세균 부하를 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 3d는 비결핵성 항산균 Mmass 감염 후 이노신의 경구 투여에 따른 생체 내 세균 부하를 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 3e는 비결핵성 항산균 Mabc 감염 후 이노신의 장기 경구 투여에 따른 생체 내 세균 부하를 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 3f는 비결핵성 항산균 Mabc 감염 후 이노신의 장기 경구 투여에 따른 염증 관련 인자의 mRNA 발현을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 3g는 본 발명에 따른 비피도박테리움 슈도롱검 및 이노신의 비결핵성 항산균 폐질환 치료 또는 감염 예방 메커니즘을 나타낸 도이다.

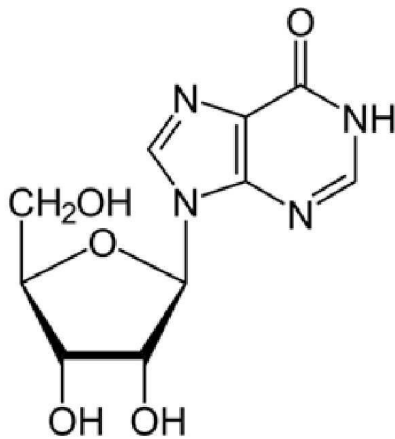
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0012] 본 발명의 양태에 따르면, 본 발명은 이노신을 포함하는 비결핵성 항산균 폐질환(Nontuberculous mycobacterial pulmonary disease, NTM-PD) 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공한다. 상기 비결핵성 항산균 폐질환 예방, 개선 또는 치료용 조성물은 비결핵성 항산균 폐질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물; 비결핵성 항산균 폐질환 예방 또는 개선용 식품 조성물; 비결핵성 항산균 폐질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물; 및 비결핵성 항산균 폐질환 예방 또는 개선용 사료 조성물;일 수 있다.

[0013] 본 발명에 있어서, 이노신(inosine)은 하이포잔틴이 β -N9-글리코사이드 결합을 통해 리보스 고리와 결합하여 형성되는 뉴클레오사이드이다. 이노신은 장내 미생물의 생성하는 소분자로, T세포와 직접 상호작용하고, 면역치료제와 함께 치료 효과를 향상시킨다고 알려져 있다.

[0014] [화학적 1]



[0015] 본 발명의 구체예에서, 상기 이노신은 농도가 1 내지 100 μ M인 것이 바람직하고, 더 바람직하게는 10 내지 500 μ M, 더욱 바람직하게는 30 내지 300 μ M일 수 있으나, 이에 본 발명의 범위가 제한되지 않는다.

[0017] 본 발명의 구체예에서, 상기 조성물은 비피도박테리움 속 균주를 더 포함할 수 있으며, 상기 균주의 예로는 비피도박테리움 슈도롱검 및 비피도박테리움 애니멀리스가 있다.

[0018] 본 발명의 조성물에는 이노신과 함께 비피도박테리움 속 균주를 포함할 수 있으며, 상기 이노신 및 비피도박테리움 속 균주를 병용 투여할 경우 비결핵성 항산균 감염 예방 및 치료 효과가 우수하다. 상기 이노신 및 비피도박테리움 속 균주는 동시에 또는 이시에 투여될 수 있으며, 순차적으로 투여될 수도 있다.

[0019] 본 발명에 있어서, 비결핵성 항산균(Nontuberculous mycobacteria : NTM)은 마이코박테리아(mycobacterium)속의 세균으로, 항산균 중에서 결핵균과 나병균을 제외한 균을 의미한다. 비결핵성 항산균은 수돗물, 지하수, 토양 등의 자연환경에 정상적으로 존재하며 사람에서 사람에게 전파되는 경우는 드물지만 이 균에 의해서도 다양한 감염병이 발생할 수 있는 것으로 알려져 있다.

[0020] 본 발명의 구체예에서, 상기 비결핵성 항산균은 마이코박테리움 아비움(*Mycobacterium avium*)(Mav), 마이코박테리움 압세수스 아종 압세수스(*Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus*)(Mabc), 마이코박테리움 압세수스 아종 마실리엔시스(*Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense*)(Mmass), 마이코박테리움 압세수스 아종 볼레티(*Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii*), 마이코박테리움 인트라셀룰레어(*Mycobacterium Intracellulare*), 마이코박테리움 키메라(*Mycobacterium chimaera*), 마이코박테리움 스크로풀라세움(*Mycobacterium Scrofulaceum*), 마이코박테리움 켈로네(*Mycobacterium chelonae*), 마이코박테리움 폴투이텀(*Mycobacterium fortuitum*), 마이코박테리움 페레그리눔(*Mycobacterium peregrinum*), 마이코박테리움 울세란스(*Mycobacterium ulcerans*), 마이코박테리움 마리눔(*Mycobacterium marinum*), 마이코박테리움 칸사시(*Mycobacterium kansasii*), 마이코박테리움 제네반스(*Mycobacterium Genevans*), 마이코박테리움 시미에

(*Mycobacterium simiae*), 마이코박테리움 테레(*Mycobacterium terrae*), 마이코박테리움 논크로모제니쿰(*Mycobacterium nonchromogenicum*), 마이코박테리움 셀라툼(*Mycobacterium celatum*), 마이코박테리움 고르도네(*Mycobacterium gordonae*), 마이코박테리움 스줄가이(*Mycobacterium szulgai*), 마이코박테리움 뮤코제니쿰(*Mycobacterium mucogenicum*) 및 마이코박테리움 아우바그넨스(*Mycobacterium aubagnens*)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

- [0021] 본 발명의 구체예에서, 상기 비결핵성 항산균은 다제내성(multidrug-resistant, MDR) 비결핵성 항산균 균주일 수 있으며, 그 예로는 KMRC-010, KMRC-011, KMRC-012 및 KMRC-013 등이 있다. 본 발명에 따른 대사산물 이노신은 다제내성 비결핵성 항산균의 생체 내 세균 부하를 감소시키고, 염증 관련 인자의 발현을 증가시킨다. 이는 본 발명의 이노신이 다제내성 임상균주에 의해 유발된 감염을 효과적으로 치료할 수 있음을 의미한다.
- [0022] 본 발명에 따른 이노신을 비결핵성 항산균 또는 다제내성 비결핵성 항산균 감염 전후에 투여할 경우 개체 내에서 생체 내 세균 부하를 감소시키고, 염증 관련 인자의 발현을 증가시키는 것을 확인하였다. 이는 이노신이 비결핵성 항산균의 감염 예방뿐만 아니라, 비결핵성 항산균 감염에 의한 폐질환의 치료 효과가 있음을 의미하는바, 본 발명의 이노신은 비결핵성 항산균의 감염 예방 분야; 및 비결핵성 항산균 폐질환의 치료 분야;에 다양하게 활용될 수 있다.
- [0023] 본 발명의 조성물이 약학적 조성물로 이용되는 경우, 본 발명의 약학적 조성물은 통상의 방법에 따라 다양한 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 예컨대, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽 등의 경구형 제형으로 제형화할 수 있고, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0024] 본 발명의 조성물은 이노신과 함께 비결핵성 항산균 폐질환에 대하여 예방 또는 치료 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엷, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 ~ 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0026] 본 발명의 조성물은 실제 임상투여 시에 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 회석제 또는 부형제를 사용하여 조제할 수 있으며, 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제는 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 최근, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 것을 이용하는 것이 바람직하다.
- [0027] 상기 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose) 또는 락토오스(Lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 또한, 상기 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순회석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0028] 상기 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 상기 약학적 조성물의 제제화 방법, 투여 방식, 투여 시간 및/또는 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있으며, 상기 약학적 조성물의 투여로 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 투여 대상이 되는 개체의 종류, 연령, 체중, 일반적인 건강 상태, 질병의 증세나 정도, 성별, 식이, 배설, 해당 개체에 동시 또는 이시에 함께 사용되는 약물 기타 조성물의 성분 등을 비롯한 여러 인자 및 의학 분야에서 잘 알려진 유사 인자에 따라 다양해질 수 있으며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 예를 들어, 0.05 내지 5 mg/kg의 농도로 투여되는 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 0.1 내지 0.4 mg/kg, 더욱 바람직하게는 0.2 내지 0.35 mg/kg, 더더욱 바람직하게는 0.25 mg/kg일

수 있으나, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

- [0031] 본 발명의 약학적 조성물의 투여 경로 및 투여 방식은 각각 독립적일 수 있으며, 그 방식에 있어 특별히 제한되지 아니하며, 목적하는 해당 부위에 상기 약학적 조성물이 도달할 수 있는 한 임의의 투여 경로 및 투여 방식에 따를 수 있다.
- [0032] 상기 약학적 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여 방식으로 투여할 수 있으며, 경구 투여하는 것이 더욱 바람직하다. 상기 비경구 투여 방식으로는 예를 들어 정맥 내 투여, 복강 내 투여, 근육 내 투여, 경피 투여 또는 피하 투여 등이 포함된다.
- [0033] 본 발명의 약학적 조성물은 비결핵성 항산균 폐질환의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 조성물은 이노신을 포함하는 식품 조성물 또는 건강기능식품 조성물일 수 있다.
- [0035] 본 발명에 있어서, 건강기능식품이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병 방지와 회복 등에 관한 체내조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 건강기능식품은 비결핵성 항산균 폐질환의 예방 또는 치료 활성을 증진시키기 위한 것이다.
- [0036] 본 발명에 있어서 식품 조성물은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조 시에는 당업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 식품 조성물의 제형 또한 식품 조성물로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다.
- [0037] 본 발명에 따른 식품으로는 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등이 있다. 또한 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영, 유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 묵류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 빵류, 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스낵류), 캔디류, 초코렛류, 껌류, 아이스크림류, 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과일 음료, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류 등), 천연조미료(예, 라면스프 등), 식품첨가제 등이 포함되나 이에 제한되지 않는다. 상기 식품, 음료 또는 식품첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.
- [0038] 본 발명의 조성물을 건강기능식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 건강기능식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 바람직하게는 50 중량부 이하, 보다 바람직하게는 25 중량부 이하의 양으로 첨가할 수 있다. 그러나, 건강 조절 및 위생을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안정성 면에서 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용할 수 있다.
- [0039] 본 발명의 식품 또는 건강기능식품 조성물은 유효성분인 이노신을 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당 알코올이다. 상술한 향미제는 천연 향미제(타우마틴), 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.
- [0040] 또한, 상기 식품 조성물은 이노신 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 조성물이 비결핵성 항산균 폐질환 예방 또는 개선용 사료 조성물인 경우, 상기 사료 조성물은 사료첨가제 또는 배합사료일 수 있다.
- [0042] 본 발명에 있어서, “사료첨가제”는 영양적 또는 특정 목적을 위하여 사료에 미량으로 첨가되는 물질을 의미하는 것으로서, 본 발명의 기능성 사료첨가제는 이노신 그 자체이거나 공지의 사료 첨가물들과 일정 비율로 배합

될 수 있다. 배합되는 경우 이노신은 사료첨가제 전체 중량에서 0.01 내지 99 중량%가 적용될 수 있다.

[0043] 본 발명의 사료 조성물은 배합사료 100중량부에 대하여 이노신을 유효성분으로 함유하는 사료첨가제 0.1 내지 5 중량부를 포함한다. 배합사료의 일 예로 옥수수 53.71중량%, 대두박 23.2중량%, 채종박 1.0중량%, 옥배아박 2.0 중량%, 주정박 3.0중량%, 소맥피 2.7중량%, 감자전분 0.3중량%, 유지 2.8중량%, 탄산칼슘 9.9중량%, 제2인산칼슘 0.68중량%, 염화나트륨 0.23중량%, 인 분해효소제 0.03중량%, 염화콜린 0.05중량%, 메치오닌 0.2중량%, 미네랄 믹스 0.1중량%, 비타민 믹스 0.1중량%로 조성된다. 이외에도 통상적인 양계용 배합사료가 이용될 수 있음은 물론이다. 또한, 배합사료는 사육대상인 가축의 종류에 따라 소, 돼지, 오리 등의 배합사료가 이용될 수 있음은 물론이다.

[0044] 상기 사료 조성물을 급이하여 가축을 사육할 수 있으며, 가축의 사육 시 비피도박테리움 슈도몽검을 물에 희석하여 식수로 제공될 수 있다.

[0045] 본 발명의 사료 조성물은 당업자가 예상할 수 있는 범위 내의 다른 기타 영양성분을 추가로 포함할 수 있다.

[0046] 본 발명의 이노신은 상업적으로 통상적인 동물 사료 조성물 내로 혼입될 수 있고, 예를 들어, 소, 돼지, 양, 가금류 등에 공급될 수 있다. 이를 위해 본 발명의 이노신 통상적인 동물 사료 구성 성분들과 혼합될 수 있고, 필요하다면 정제된 형태로 가공될 수 있다. 통상적인 동물 사료 구성성분은 예를 들어, 옥수수, 보리, 귀리, 대두, 어분, 겨, 대두유, 무기물, 미량 원소, 아미노산 및 비타민이다.

[0048] 중복되는 내용은 본 명세서의 복잡성을 고려하여 생략하며, 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.

[0050] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0052] [실험예 및 재료]

[0053] 실험예 1. 윤리 승인 및 참여 동의

[0054] 환자의 임상 및 실험실 데이터는 비결핵성 항산균 폐질환(Nontuberculous mycobacterial pulmonary disease, NTM-PD)을 조사하기 위해 진행 중인 전향적 관찰 코호트(prospective observational cohort) 연구에서 얻었으며, 이는 Institutional Review Board(clinicaltrials.gov identifier NCT00970801)에서 승인했다. 또한 대전 충남대학교병원 연구윤리위원회에서 본 연구를 승인하였다(202009A-CNU-155). 마우스는 기관 동물 관리 및 사용 위원회, 충남대학교 의과대학, 대전, 한국(CNUH-A0011-1) 및 한국 식품의약품의 지침에 따라 처리하였다.

[0056] 실험예 2. 비결핵성 항산균(Nontuberculous mycobacteria, NTM) 균주의 준비

[0057] Mabc(*M. abscessus* subsp. *abscessus*)(ATCC 19977) 및 Mav(ATCC 25291)는 ATCC(American Type Culture Collection)에서 얻었다. Mmass(*M. abscessus* subsp. *massiliense*)(KMRC-00136-13018) 및 Mabc(KMRC-00800-00010 및 -00011) 및 Mav(KMRC-00800-00012 및 -00013)의 다제내성 균주는 한국 마이코박테리움 자원 센터(Korean Mycobacterium Resource Center, KMRC)에서 입수했다. Mabc와 Mav의 다제내성 균주는 클래리스로마이신(clarithromycin), 에탐부톨(ethambutol) 및 리팜피신(rifampicin)에 내성을 보였다.

[0058] 상기 박테리아를 배양하고 다음과 같이 단일 세포 현탁액으로 제조하였다. NTM 균주를 10% 올레산 알부민 텍스트로스 카탈라아제를 함유하는 Middlebrook 7H9 배지(271310; BD Bioscience)에서 중간 로그 단계($OD_{600} = 0.4$)까지 진탕하면서 $37^{\circ}C$ 에서 배양하였다. 중간 로그 단계($OD_{600} = 0.4$)의 박테리아를 모든 실험에 사용하였다. 세균 배양 후 펠렛을 $500 \times g$ 에서 20분 동안 원심분리하여 수확하였고, 인산완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)로 3회 세척하여 소 혈청 알부민을 제거하였다. 직경 1mm의 유리 비드와 PBS를 첨가한 후, 침전된 펠렛을 20Hz에서 4분 동안 Mixer mill 200 비드 비터(Buch & Holm)를 사용하여 균질화하였다. 균질화된 현탁액을 $40 \mu m$ 세포 여과기를 사용하여 여과하여 분산되지 않은 세균 덩어리를 제거했다. 세균 단일 세포

현탁액은 실험에 사용할 때까지 -80°C 에서 냉동 보관했다.

[0060] 실험예 3. 항산균 감염 및 세균 부하 평가

[0061] 동결된 세균 세포를 해동 및 원심분리하고, 펠렛을 0.05% Tween 80을 함유하는 PBS(TBST)에 재현탁시켰다. 마우스를 마취시키고 세균(Mabc, Mmass, Mav 및 KMRC-011 1×10^7 CFU/mouse; KMRC-010, -012 및 -013 1×10^6 CFU/mouse)의 비강내 투여하여 마우스를 감염시켰다. NTM 감염 후 표시된 시간에 마우스를 안락사시키고 폐를 제거하여 세균 부하를 평가했다. 폐 조직은 조직 균질화기(OMNI TH)를 사용하여 PBST에서 균질화하였다. 균질액의 연속 희석액을 7H10 한천 플레이트에 도말하고, 빠르게 성장하는 항산균과 천천히 성장하는 항산균의 경우 각각 3-4일 또는 10-12일 동안 37°C 에서 배양한 후 집락을 계수했다.

[0063] 실험예 4. 마우스의 유지 및 처리

[0064] C57BL/6 마우스(3-8주령)는 Samtako Bio에서 구입했으며 특정 병원체가 없는 조건에서 12시간 명암 주기로 유지하였다. 연령 및 성별이 일치하는 동물을 약물 또는 비히클 처리 그룹에 무작위로 할당했다. 이노신(Inosine; Sigma-Aldrich)을 PBS에 30mg/mL 농도로 용해하고 감염 후 위관 영양법으로 매일 300mg/kg의 용량으로 마우스에 제공했다.

[0065] 비피도박테리움 균 보충을 위해 비피도박테리움 슈도롱검(*Bifidobacterium pseudolongum*) (KCTC 3224) 및 비피도박테리움 아니말리스(*Bifidobacterium animalis*) (KCTC 3219)의 유형 균주를 0.5%(w/v) L-cysteine hydrochloride가 보충된 Lactobacilli MRS agar(288210; BD Difco)에서 혐기성 조건 및 37°C 에서 배양했다. 마우스는 감염 3주 전부터 감염 3주 또는 5주까지 6주 동안 하루에 한 번 200 μL PBS(비히클)에 현탁된 *B. pseudolongum* (10^8 CFU/ml) 또는 *B. animalis* (10^8 CFU/ml)를 경구 투여했다(도 1a 및 e).

[0066] 장내 세균 제거를 위해 감염 전 5일부터 3일 동안 멸균수에 녹인 항생제 혼합물을 경구 투여하였다. 상기 항생제 조성물은 ampicillin sodium USP(AMP25B; Ambrothia) 1g/L, neomycin trisulfate salt hydrate(N6386; Sigma-Aldrich) 1g/L, gentamicin solution(G1397; Sigma-Aldrich) 1g/L, metronidazole(M3761; Sigma-Aldrich) 1g/L, vancomycin hydrochloride(V2002; Sigma-Aldrich) 0.5g/L, 및 amphotericin B(1397-89-3; Duchefa-Biochemie) 0.1g/L를 포함한다.

[0068] 실험예 5. RNA 추출 및 qRT-PCR

[0069] 마우스 폐 조직 균질물에서 총 RNA를 제조업체의 지침에 따라 TRIzol 시약(15596026; Invitrogen)을 사용하여 추출한 후 QIAxtract(Qiagen)을 사용하여 RNA 정량 및 평가를 수행했다. cDNA는 제조업체의 지침에 따라 역전사 마스터 프리믹스(EBT-1543; ELPIS Biotech)를 사용하여 전체 RNA로부터 합성하였다. Real-time PCR은 Real-Time PCR Cycler Rotor-Gene Q 2plex 시스템(9001620; Qiagen)에서 SYBR Green 시약(204074; Qiagen)을 사용하여 수행하였다. mRNA 발현은 Gapdh에 상대적인 정규화와 함께 $2^{-\Delta\Delta}$ threshold cycle(Ct) 방법으로 계산하였다. 본 연구에 사용된 프라이머의 서열은 표 2와 같다.

표 2

Species	Target	Forward(5' -3')	Reverse(5' -3')
---------	--------	-----------------	-----------------

<i>Mus musculus</i>	<i>Arg1</i>	CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG	AGGAGCTGTCATTAGGGACATC
	<i>Ccl12</i>	TGACCCCAAGAAGGAATGGG	ACCTTAGGGCAGATGCAGTT
	<i>Ccl15</i>	CCTGCTGCTTTGCCTACCTCTC	ACACACTTGGCGGTTCCTTCGA
	<i>Cxc12</i>	CATCCAGAGCTTGAGTGTGACG	GGCTTCAGGGTCAAGGCAAACT
	<i>Cxc19</i>	AACGTTGTCCACCTCCCTTC	CACAGGCTTGGCTAGTCGT
	<i>Gapdh</i>	CATCACTGCCACCCAGAAGACTG	ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG
	<i>Ifng</i>	CGGCACAGTCATTGAAAGCC	TGCATCCTTTTTCGCCTTGC
	<i>I112p40</i>	TTGAAGTGGCGTTGGAAGCACG	CCACCTGTGAGTCTTCAAAGGC
	<i>I11b</i>	TACGGACCCCAAAAGATGA	TGCTGCTGCCGAGATTGAAG
	<i>I16</i>	TAGTCCTTCTACCCCAATTTCC	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
	<i>Nos2</i>	GGTGAAGGGACTGAGCTGTTA	TGAAGAGAAACTTCCAGGGGC
	<i>Tnf</i>	ACGGCATGGATCTCAAAGAC	AGATAGCAAATCGGCTGACG

[0072] 실험예 6. 유세포 분석

[0073] NTM 감염 3주 후, 마우스를 CO₂ 질식으로 안락사시키고, 경부 림프절을 절제하여 단일 세포 현탁액(1×10^6 세포)을 제조하였다. 세포를 50ng/mL의 PMA(phorbol-12-myristate-13-acetate)(P8139; Sigma) 및 1 μ M 이오노마이신(I0634; Sigma)으로 2시간 동안 자극한 다음 Golgistop(554715; BD Biosciences)을 37° C에서 4시간 동안 첨가했다. 그런 다음 세포를 수확하고 PBS로 3회 세척했다. APC-Cy7-접합된 항-CD3(557596, 1:250; BD Biosciences), Brilliant Violet(BV) 605-접합된 항-CD4(563151, 1:250; BD Biosciences) 및 V450-접합된 항-CD44(560451, 1:250; BD Biosciences) 항체를 사용하여 세포 표면 마커에 대한 염색을 수행했다(37°C, 30분). PBS로 3회 세척한 후 세포를 고정하고 Cytofix/Cytoperm Kit(554715; BD Biosciences)를 사용하여 4° C에서 30분 동안 투과화시켰다. 세포를 Perm/Wash(BD Biosciences)로 3회 세척하고 PE-접합된 항-IFN- γ 항체(554412, 1:250; BD Biosciences)로 4° C에서 30분 동안 세포 내 염색했다. 염색된 세포를 PBS에 재현탁하고 Novocyte 2060R(Acea Biosciences)에서 즉시 분석했다. FlowJo 소프트웨어(BD Biosciences)를 사용하여 데이터를 수집하고 분석했다.

[0075] 실험예 7. 골수 유래 대식세포(bone marrow-derived macrophage, BMDM) 준비, 감염 및 세포내 CFU 분석

[0076] 야생형 마우스의 골수를 채취하여 10% FBS(fetal bovine serum)(16000-044; Gibco)을 함유한 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)(12-604F; Lonza)에서 macrophage colony-stimulating factor(416-ML; R&D Systems) 25ng/mL 존재 하에서 3-5일 동안 배양했다. 완전히 분화된 BMDM은 Mabc 또는 Mmass(MOI = 1)로 2시간 동안 감염시켰다. 그 후 PBS로 세척하여 세포의 세균을 제거하였다. BMDM을 수베르산(40 및 400 μ M) 또는 이노신(30 및 300 μ M)의 존재 또는 부재하에 3일 동안 추가로 배양하였다. 세포내 세균 생존율을 분석하기 위하여, 감염된 세포를 증류수에 용해시켜 세포내 세균을 방출시켰다. 연속 희석된 감염된 세포의 균질물을 n7H10 한천 플레이트에 도말하고 3-4일 배양 후 집락을 계수했다.

[0078] 실험예 8. 통계 분석

[0079] 모든 데이터는 GraphPad Prism(버전 8.0.2 또는 8.4.3)을 사용하여 분석되었으며 평균 $\pm$ 평균의 표준 오차(standard error of the mean, SEM)로 표시된다. 모든 분석에서 통계적 유의성을 나타내기 위해 $p < 0.05$ 를 취했다. 상대 존재비의 비교를 위한 이상치는 Q 계수 값이 1%로 설정된 Prism을 사용하는 ROUT(robust regression and outlier removal) 방법으로 제거하였다. Mann-Whitney U-test, unpaired t test 또는 Tukey's multiple comparison test가 있는 일원 분산 분석을 적절하게 사용하여 통계적 비교를 수행했다. PLS-DA의 유의미한 차이는 PASW Statistics 18 소프트웨어(SPSS)를 사용한 분산 분석(ANOVA)에 의해 결정하였다. 상자 플롯은 STATISTICA 7 소프트웨어(StatSoft Inc.)에 의해 고유한 대사 산물 질량의 상대 피크 면적을 사용하여 렌더링되었으며, 데이터는 GraphPad Prism을 사용한 다중 비교를 위해 Holm-Sidak 보정을 사용한 다중 t test로 분석하였다. 보고된 모든 결과는 복제 가능했다. 동물의 수와 각 실험의 반복 횟수는 그림 범례에 설명되어 있다.

[0081] [실시예]

[0082] 실시예 1. 비피도박테리움 슈도롱검(*Bifidobacterium pseudolongum*)의 NTM-PD 치료 효과 확인

[0083] 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) 속은 L-arginine 처리 마우스에서 유의하게 풍부한 것을 확인하였다. 이에, *Bifidobacterium*과 NTM 감염 사이의 관계를 평가했다. 비피도박테리움 속에 속하는 2개의 앰플리콘 서열 변이체가 확인하였다. 16S rRNA 유전자 염기서열 분석 결과 각각 비피도박테리움 슈도롱검(*Bifidobacterium pseudolongum*)과 비피도박테리움 아니말리스(*Bifidobacterium animalis*)의 염기서열을 확인하였다. 따라서 다음 실험을 위해 이러한 종을 선택했다.

[0085] 1-1. NTM 감염 전후 비피도박테리움 균주 투여에 따른 효과

[0086] 선택된 비피도박테리움 종이 NTM 감염에 대한 보호 효과를 유도했는지 여부를 조사하기 위해 도 1a와 같이 Mabc 감염 전후에 비피도박테리움 아니말리스 또는 비피도박테리움 슈도롱검을 마우스에 처리했다.

[0088] [생체 내 폐 세균 부하 분석]

[0089] 비피도박테리움 아니말리스 또는 비피도박테리움 슈도롱검 처리에 따른 Mabc 감염 마우스의 생체 내 폐 Mabc 부하를 분석하였다. 생체 내 폐 mabc 부하를 분석한 결과는 도 1b에 나타내었다.

[0090] 도 1b에 나타난 바와 같이, Mabc 감염 마우스의 생체 내 폐 Mabc 부하는 비피도박테리움 아니말리스(BA) 또는 비피도박테리움 슈도롱검(BP)을 단독 투여한 후 유의하게 감소된 것을 발견했다. 또한, 비피도박테리움 아니말리스 및 비피도박테리움 슈도롱검의 병용 투여는 비피도박테리움 중 단독 투여군보다 생체 내 폐 Mabc 부하가 감소한 것을 확인하였다.

[0092] [염증 관련 인자의 mRNA 발현 확인]

[0093] 비피도박테리움 아니말리스 또는 비피도박테리움 슈도롱검 처리에 따른 Mabc 감염 마우스의 염증 관련 인자(Ilfng, Nos2, Ccl15 및 Cxcl9)의 mRNA 발현을 분석하였다. mRNA 발현을 분석한 결과는 도 1c에 나타내었다.

[0094] 도 1c에 나타난 바와 같이, 비피도박테리움 슈도롱검 투여군은 미투여군 및 비피도박테리움 아니말리스 투여군보다 폐에서 Ilfng, iNOS, Ccl15 및 Cxcl9 mRNA 수준이 유의하게 증가한 것을 확인하였다.

[0096] 또한 비피도박테리움 아니말리스 또는 비피도박테리움 슈도롱검 처리에 따른 Mabc 감염 마우스의 폐에서 IFN- γ 발현을 분석하였으며, 그 결과는 도 1d에 나타내었다.

[0097] 도 1d에 나타난 바와 같이, Mabc 감염 마우스의 폐에서 IFN- γ 발현 수준은 대조군 마우스에 비해 비피도박테리움 아니말리스 또는 비피도박테리움 슈도롱검 단독 처리 또는 병용처리군에서 유의하게 더 높았다.

[0099] 1-2. NTM 감염 후 비피도박테리움 슈도롱검의 투여에 따른 효과 확인

[0100] 비피도박테리움 슈도롱검이 감염된 마우스의 폐 조직에서 항균 및 보호 사이토카인/케모카인 발현을 향상시킨다는 것을 확인하였다. 이에, 본 실시예에서는 Mabc 및 Mav 감염에 대한 비피도박테리움 슈도롱검의 치료 효과를 조사했다. 도 1e와 같이, Mabc 또는 Mav 감염된 마우스에 최소 3주 동안 비피도박테리움 슈도롱검을 투여하였다.

[0102] [생체 내 세균 부하 분석]

[0103] Mabc 또는 Mav 감염 후 비피도박테리움 슈도롱검을 투여한 마우스의 폐 조직에서 생체 내 세균 부하를 분석하였다. 생체 내 세균 부하를 분석한 결과는 도 1f에 나타내었다.

- [0104] 도 1f에 나타난 바와 같이, NTM 감염 후 비피도박테리움 슈도롱검을 투여한 군은 대조군에 비피도박테리움 슈도롱검 미처리군에 비해 생체 내 세균 부하가 유의하게 감소한 것을 확인하였다.
- [0106] **[염증 관련 인자의 mRNA 발현 확인]**
- [0107] 비피도박테리움 슈도롱검 처리에 따른 Mabc 또는 Mav 감염 마우스의 염증 관련 인자(Ifng, Nos2, I112p40, Cc15 및 Cxc19)의 mRNA 발현을 분석하였다. Mabc 감염 마우스에서 mRNA 발현을 분석한 결과는 도 1g에 나타내었고, Mav 감염 마우스에서 mRNA 발현을 분석한 결과는 도 1h에 나타내었다.
- [0108] 도 1g 및 1h에 나타난 바와 같이, Mabc 또는 Mav 감염 마우스는 비피도박테리움 슈도롱검 투여에 따라 폐에서 Ifng, iNOS, I112b, Cc15 및 Cxc19의 mRNA 발현 수준이 현저하게 증가한 것을 확인하였다.
- [0110] **[IFN- γ 생산 분석]**
- [0111] 비피도박테리움 슈도롱검 처리에 따른 Mabc 또는 Mav 감염 마우스의 경부 림프절에서 CD4⁺ 이펙터 T 세포 집단에서 IFN- γ 생산을 분석하였다. Mabc 감염 마우스에서 IFN- γ 생산을 분석한 결과는 도 1i 및 k에 나타내었고, Mav 감염 마우스에서 IFN- γ 생산을 분석한 결과는 도 1j 및 l에 나타내었다.
- [0112] 도 1i 내지 l에 나타난 바와 같이, 비피도박테리움 슈도롱검 투여군은 미처리군보다 IFN- γ 생산이 유의하게 증가했다.
- [0114] **1-3. 다제내성(multidrug-resistant, MDR) NTM 균주 감염 후 비피도박테리움 슈도롱검의 투여에 따른 효과 확인**
- [0115] 마우스를 MDR 임상 Mabc(KMRC-010 및 -011) 또는 Mav(KMRC-012 및 -013)로 비강 내 감염시키고 21일 동안 비히클 또는 비피도박테리움 슈도롱검을 투여하였다. 상기 MDR 임상 Mabc 및 Mav 균주는 clarithromycin, ethambutol 및 rifampicin에 대해 다제 내성을 나타낸다. 마우스를 21dpi에서 안락사시키고 폐를 절제하였다. 수득한 폐 조직을 이후 실험에 사용하였다.
- [0117] **[생체 내 세균 부하 분석]**
- [0118] 다제내성 Mabc 또는 Mav 감염 후 비피도박테리움 슈도롱검을 투여한 마우스의 폐 조직에서 생체 내 세균 부하를 분석하였으며, 그 결과는 각각 도 2a 및 b에 나타내었다.
- [0119] 도 2a 및 b에 나타난 바와 같이, 다제내성 Mabc 또는 Mav 감염 마우스는 비피도박테리움 슈도롱검 투여에 따라 생체 내 세균 부하가 크게 감소한 것을 확인하였다.
- [0121] **[염증 관련 인자의 mRNA 발현 확인]**
- [0122] 비피도박테리움 슈도롱검 처리에 따른 다제내성 Mabc 또는 Mav 감염의 염증 관련 인자(Ifng, Nos2, I112p40, Cc15 및 Cxc19)의 mRNA 발현을 분석하였다. 다제내성 Mabc 마우스에서 mRNA 발현을 분석한 결과는 도 2c 및 d에 나타내었고, 다제내성 Mav 감염 마우스에서 mRNA 발현을 분석한 결과는 도 2e 및 f에 나타내었다.
- [0123] 도 2c 내지 f에 나타난 바와 같이, Mabc 또는 Mav 감염 마우스에 비피도박테리움 슈도롱검을 투여한 경우 IFN- γ 관련 사이토카인 mRNA 발현이 현저히 증가했다.
- [0125] 상기 결과를 종합하여 보면, 상기 결과는 비피도박테리움 슈도롱검의 경구 투여가 NTM-PD에 대한 다제 내성 임상 균주에 의해 유발된 감염을 효과적으로 치료할 수 있음을 강력하게 시사한다.
- [0127] **실시예 2. 대사산물 이노신의 NTM 감염에 대한 항균 반응 확인**
- [0128] 최근 연구에서 비피도박테리움 슈도롱검이 소장에서 CD8⁺ T-bet⁺ T 세포의 개체수를 증가시키고, Th1 분화와

IFN- γ 생성을 유도하여 퓨린 대사산물인 이노신을 생성하여 항종양 면역 반응을 촉진하는 것으로 나타났다. 또한 비피도박테리움 투여는 유의하게 마우스 혈청에서 수베르산의 수준을 증가시킨다.

[0130] **2-1. 이노신 또는 수베르산 투여에 따른 효과 확인**

[0131] 이러한 이전 연구를 감안할 때 이노신 또는 수베르산이 NTM 감염에 대한 숙주 방어에 관여할 수 있는 가능성을 고려했다. 따라서 Mabc 또는 Mmass로 C57BL/6 마우스의 골수 유래 대식세포(BMDM)를 감염시키고 3일 동안 이노신 또는 수베르산 처리 여부에 관계없이 배양했다.

[0133] **[생체 내 세균 부하 분석]**

[0134] Mabc 또는 Mmass 감염 후 수베르산을 투여한 마우스의 폐 조직에서 생체 내 세균 부하를 분석하였다. 생체 내 세균 부하를 분석한 결과는 각각 도 3a 및 b에 나타내었다.

[0135] 도 3a 및 b에 나타난 바와 같이, Mabc 또는 Mmass 감염 마우스는 수베르산(SA) 투여에 따라 생체 내 세균 부하에 거의 변화되지 않은 것을 확인하였다.

[0137] Mabc 또는 Mmass 감염 후 이노신을 투여한 마우스의 폐 조직에서 생체 내 세균 부하를 분석하였다. 생체 내 세균 부하를 분석한 결과는 각각 도 3c 및 d에 나타내었다.

[0138] 도 3c 및 d에 나타난 바와 같이, Mabc 또는 Mmass 감염 마우스는 이노신(INO) 투여에 따라 생체 내 세균 부하를 유의하게 감소시킨 것을 확인하였다.

[0140] **2-2. 이노신 장기 투여에 따른 효과 확인**

[0141] C57BL/6 마우스의 골수 유래 대식세포(BMDM)를 Mabc로 감염시키고 21일 동안(21dpi) 이노신(300mpk)을 투여하였다. 마우스를 21dpi에서 안락사시키고 폐를 절제하였다. 수득한 폐 조직을 이후 실험에 사용하였다(도 3e 왼쪽).

[0143] 안락사된 마우스의 생체 내 세균 부하를 분석하였으며, 그 결과는 도 3e에 나타내었다.

[0144] 도 3e에 나타난 바와 같이, Mabc 감염 마우스는 이노신 장기 투여에 따라 생체 내 세균 부하가 유의하게 감소된 것을 확인하였다.

[0146] 또한 이노신 장기 처리에 따른 Mabc 감염 마우스의 염증 관련 인자(Ifng, Nos2, Il12p40, Ccl5 및 Cxcl9)의 mRNA 발현을 분석하였다. 염증 관련 인자의 mRNA 발현을 분석한 결과는 도 3f에 나타내었다.

[0147] 도 3f에 나타난 바와 같이, Mabc 감염 마우스는 이노신 투여에 따라 IFN- γ 관련 사이토카인의 발현이 현저히 증가된 것을 확인하였다.

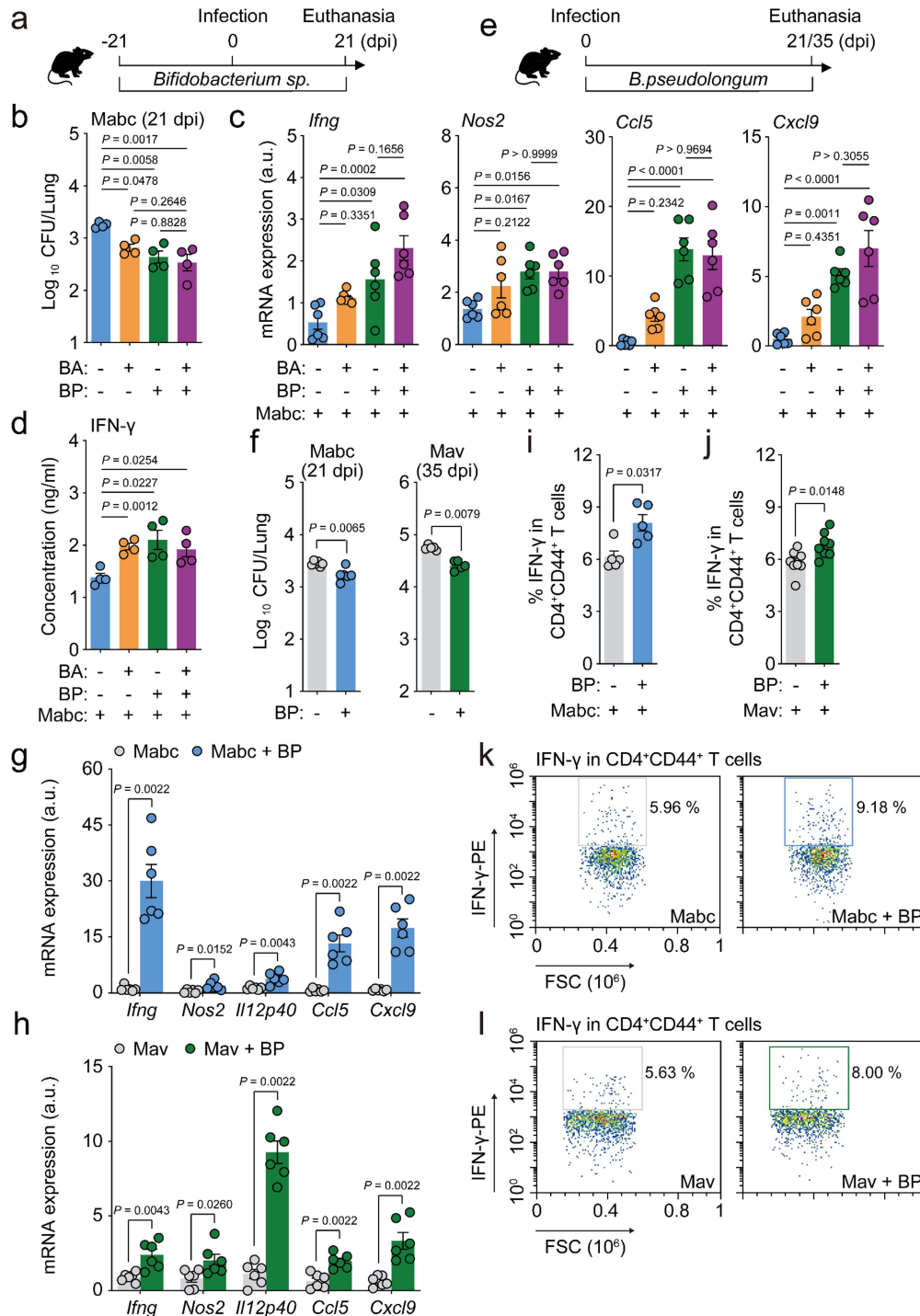
[0149] 상기 결과는 L-아르기닌 투여가 생체 내 비피도박테리움 슈도롱검 및 이노신 수준을 증가시키고, 이는 NTM 감염에 대한 항균성 숙주 방어를 향상시킨다는 것을 의미한다. 보다 상세하게는 비피도박테리움 슈도롱검 및 이노신의 경구 투여가 보호 M1 및 Th1 면역 반응의 향상을 통해 NTM-PD에 대한 폐 숙주 방어를 촉진함을 시사한다(도 3g).

[0151] 이상, 본 발명내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의해 정의된다고 할 것이

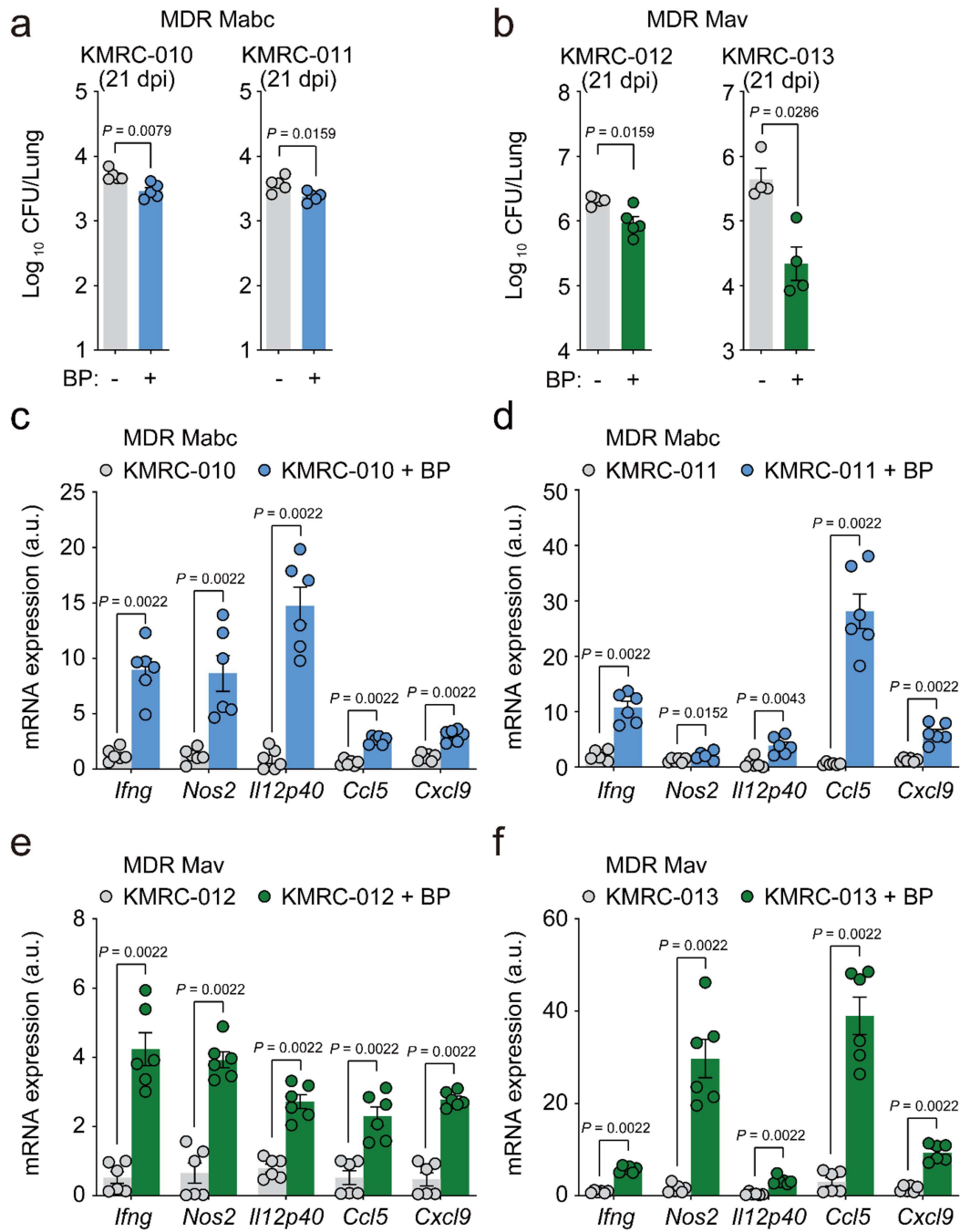
다.

도면

도면1



도면2



도면3

