



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0084544
(43) 공개일자 2022년06월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2022.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0174113
(22) 출원일자 2020년12월14일
심사청구일자 2020년12월14일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
사회복지법인 삼성생명공익재단
서울특별시 용산구 이태원로55길 48 (한남동)
전남대학교산학협력단
광주광역시 북구 용봉로 77 (용봉동)
(72) 발명자
조은경
대전광역시 중구 계백로1716번길 87, 301동 2302호(문화동, 센트럴파크3단지아파트)
김인수
강원도 원주시 우산공단길 23, 109동 1702호(우산동, 신일유토빌)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김원준

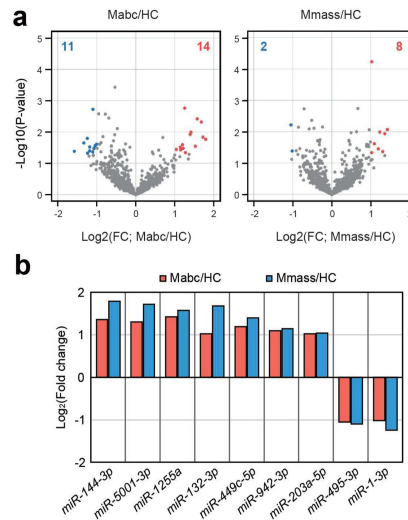
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 비결핵항산균 감염의 진단용 바이오마커 및 비결핵항산균 감염질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 비결핵항산균 감염의 진단을 위한 새로운 바이오마커 조성물과 비결핵항산균 감염질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 miRNA-144-3p를 포함하는 것을 특징으로 하는 비결핵항산균 감염 진단용 바이오마커 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/178 (2013.01)
(72) 발명자

전병우

서울특별시 강남구 일원로 81(일원동)

박춘구

전라남도 화순군 화순읍 광덕로 165, 102동 1106호(화순유창허니문맨션2차)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711111501
과제번호	2017R1A5A2015385
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	선도연구센터사업
연구과제명	감염 제어 컨버전스 연구센터
기 여 율	1/2
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2017.06.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465031446
과제번호	HI20C0017010020
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	감염병예방치료기술개발사업(R&D)
연구과제명	MAC 폐질환 환자의 치료반응 바이오마커 기반 항생제 관용 유발기전 규명과 새로운
치료기법 개발	
기 여 율	1/2
과제수행기관명	삼성서울병원
연구기간	2020.04.23 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

miRNA-144-3p를 포함하는 것을 특징으로 하는 비결핵항산균 감염 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 2

비결핵항산균 감염에 의해 발현이 증가되는 miRNA-144-3p의 발현수준을 측정하는 제제를 포함하는 것을 특징으로 하는 비결핵항산균 감염 진단용 조성물.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 제제는 프라이머 또는 프로브인 것을 특징으로 하는 비결핵항산균 감염 진단용 조성물.

청구항 4

제 2 항 또는 제 3 항에 있어서,

상기 프라이머는 miRNA-144-3p와 동일한 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 비결핵항산균 감염 진단용 조성물.

청구항 5

제 2 항 또는 제 3항의 조성물을 포함하는 비결핵항산균 감염 진단용 키트.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 키트는 RT-PCR, 실시간 RT-PCR, 노던 블랏팅, RNA 보호분석법 또는 마이크로어레이 칩용인 비결핵항산균 감염 진단용 키트.

청구항 7

(A) 비결핵항산균 감염질환 의심 환자의 생체시료로부터 miRNA-144-3p의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

(B) 상기 측정된 miRNA-144-3p의 발현 수준을 정상대조구 시료로부터 측정한 miRNA-144-3p의 발현 수준과 비교하는 단계;

를 포함하는 것을 특징으로 하는 비결핵항산균 감염 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 생체시료는 혈액 또는 비결핵항산균 감염 의심 조직인 것을 특징으로 하는 비결핵항산균 감염 진단을 위한

정보 제공 방법.

청구항 9

miRNA-144-3p의 안티센스 뉴클레오타이드를 유효성분으로 하는 비결핵항산균 감염질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

상기 안티센스 뉴클레오타이드는 RNA, DNA, DNA/RNA 하이브리드, PNA 또는 LNA로 이루어진 것을 특징으로 하는 비결핵항산균 감염질환의 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 11

제 9 항 또는 제 10 항에 있어서,

상기 안티센스 뉴클레오타이드는 상기 안티센스 뉴클레오타이드를 발현하는 발현 벡터의 형태인 것을 특징으로 하는 비결핵항산균 감염질환의 예방 및 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 비결핵항산균 감염의 진단을 위한 새로운 바이오마커 조성물과 비결핵항산균 감염질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 미코박테리움 속 균종은 병원성 정도에 따라 절대병원성 균인 결핵균과 나병균을 포함하는 결핵균과 상기 균을 제외한 비결핵항산균(nontuberculous mycobacteria, NTM)의 두 그룹으로 구분된다. 비결핵항산균은 물, 토양 등 자연계에 널리 분포하며 호흡기를 통해 감염되는 기회감염성 균이다. 지금까지 약 150여 종의 비결핵항산균이 알려져 있으며 거의 매년 새로운 비결핵항산균이 발견되고 있으나, 인체 질환과 관련된 것은 대략 25종에 이른다. 균종에 따라서 질병을 일으키는 발병력의 차이도 커서 *M. kansasii*, *M. avium*, *M. abscessus* 등은 상대적으로 발병력이 크고, *M. fortuitum*은 상대적으로 발병력이 낮다. 비결핵항산균으로 인한 질환은 폐질환, 림프절염, 피부·연조직·골감염증, 파종성 질환 등 4가지 특징적인 임상 증후를 나타내며, 이 중 폐질환이 비결핵항산균으로 인한 질환의 90% 이상을 차지한다.

[0003] 비결핵항산균은 결핵균의 발견을 위한 항산균 도말검사서 결핵균과 구별되지 않는다. 비결핵항산균 폐질환의 빈도가 상대적으로 높은 국가에서는 항산균 도말 양성 객담의 30~50%까지 비결핵 항산균이 분리되고 있으며, 선진국화될수록 비결핵항산균에 의한 감염 비율이 증가하는 것으로 보고되고 있다. 우리나라의 경우 비결핵항산균 질환의 빈도가 낮다고 알려져 있기 때문에 항산균 도말 양성일 경우 대부분 결핵으로 간주하고 항결핵제 치료를 시행하는 것이 일반적이었으나, 국내에서도 항산균 도말 양성 객담의 10% 이상에서 결핵균이 아닌 비결핵항산균이 분리되고 있다. 결핵의 경우 항결핵제의 개발에 따라 90% 이상의 치료율을 나타내며 전 세계적으로 발병율과 사망률이 1990년대 이후 지속적으로 감소하는 데 반하여, 비결핵항산균은 약제내성균의 분리비율이 매우 높고 2년 이상의 장기치료를 요하는 등의 어려움이 있어 2000년 이후 가속적인 증가추세를 나타내고 있다.

[0004] 국내에서 비결핵항산균 폐질환의 원인균으로 가장 흔한 균은 *M. avium* 이다. 특히 외국에서는 상대적으로 드문 신속 성장균인 *M. abscessus*가 국내에서는 두 번째로 흔한 원인균이라는 특징이 있다. *M. abscessus* 폐질환은 중년 이상의 비흡연자 여성에게서 흔히 발생한다. 증상은 기침, 발열, 객혈, 객담 등이 흔히 동반된다. *M. abscessus*는 특히 다제 내성을 나타내며 가능한 치료들이 제한적인 효능을 나타내기 때문에 임상적으로 매우 중요하다. 항생제 치료를 받지 않은 환자에서 분리된 *M. abscessus*는 시험관 내 약제 감수성검사에서 클래리스

로마이신, 아미카신, 세폭시틴 등에 대하여 감수성을 보이지만, 일반적인 항결핵제에 모두 내성을 나타낸다. 이에 대하여 정주용 항생제를 사용하여야 하며, 균음전에 성공한 이후에도 최소 12개월 이상의 치료기간이 필요하다는 점 등 때문에 *M. abscessus* 폐질환의 치료는 매우 어렵다. 환자들은 질환으로 인한 증상 뿐 아니라 장기간 항생제 투여에 의한 신체적 부담이 추가되어 어려움을 겪게 된다. 더구나 항생제에 내성을 지니게 되면 치료는 더욱 어려워지며 정주용 항생제를 포함한 치료를 하더라도 내과적 치료만으로 완치율이 10% 미만으로 객담 균음전을 이루기는 매우 어려워 병변이 국한된 경우는 폐절제술을 고려해야 하는 어려움이 있다. *M. abscessus* 감염은 특히 면역 결핍과 연관되어 있어, 면역억제 치료를 받는 환자나 고령의 환자, 폐질환이나 전신질환의 기저질환자에게는 위험도가 더욱 증가한다. 따라서, 점점 증가하고 있는 비결핵항산균 관련 질환에 대해 결핵의 치료와 구분된 치료법이 요구된다.

[0005] miRNA(microRNA)는 소형의 비암호화(noncoding) RNA로 숙주세포에서 면역반응을 포함한 다양한 생리활성의 조절에 중요한 역할을 담당한다. 최근 들어, miRNA는 암, 심장질환, 임신, 당뇨, 정신질환, 감염질환 등 다양한 분야의 진단에서 새로운 형태의 바이오마커로서 심도 깊게 연구되고 있다. 본 발명자들도 miRNA-302f와 miRNA-17-5p를 사용하여 결핵을 조기 진단할 수 있음을 확인하고 이를 등록특허 10-1643748과 10-1476781로 각각 등록받은 바 있다. 비결핵항산균 감염질환 환자들에게서 다르게 발현되는 miRNA의 프로파일과 기능을 평가하는 것에 의해 NTM 감염에 대한 새로운 바이오마커 및 치료제를 개발할 수 있을 것으로 기대된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 등록특허 제10-2031409호
(특허문헌 0002) 등록특허 제10-2137710호
(특허문헌 0003) 등록특허 제10-1643748호
(특허문헌 0004) 등록특허 제10-1476781호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 종래기술의 문제점을 해소하기 위하여 비결핵항산균 감염질환의 조기 진단 및 빠른 진단에 유용한 비결핵항산균 감염질환 진단용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 또한 본 발명은 비결핵항산균의 진단을 위하여 상기 조성물을 포함하는 비결핵항산균 감염질환 진단용 키트를 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 비결핵항산균 감염 의심 환자의 생체시료로부터의 비결핵항산균 감염질환의 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 더 나아가 본 발명은 또한 기존 약제와는 다른 기전의 비결핵항산균 감염질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 miRNA-144-3p를 포함하는 것을 특징으로 하는 비결핵항산균 감염 진단용 바이오마커 조성물에 관한 것이다.

[0012] miRNA-144-3p는 서열번호 1의 서열을 갖는 마이크로알엔에이로, 비결핵항산균 감염에 대한 바이오마커로서 사용될 수 있음을 확인하였다. 본 발명에서 '바이오마커'란 정상이나 병적인 상태를 구분할 수 있거나 치료반응을 예측할 수 있는, 객관적으로 측정이 가능한 표지자를 말한다.

[0013] 서열번호 1 : 5'-UACAGUAUGAUGAUGUACU-3'

[0014] 비결핵항산균 감염환자의 혈액에서 정상대조군에 비해 miRNA-144-3p의 발현이 크게 증가하였으며, 마우스를 대상으로 한 *in-vivo*와 *in-vitro*의 모델실험에서 비결핵항산균의 감염은 폐조직에서의 miRNA-144-3p의 발현을 증

가시켰다. 이로부터 진단하고자 하는 개체의 생물학적 시료에서 발현량을 측정함으로써 비결핵항산균의 감염 여부를 유의적으로 진단할 수 있다.

[0015] 이에, 본 발명은 비결핵항산균 감염에 의해 발현이 증가되는 miRNA-144-3p의 발현수준을 측정하는 제제를 포함하는 것을 특징으로 하는 비결핵항산균 감염 진단용 조성물을 제공한다.

[0016] 상기 제제는 miRNA-144-3p를 특이적으로 증폭시키거나, 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브의 형태일 수 있다. miRNA-144-3p를 특이적으로 증폭시킬 수 있는 프라이머로는 서열번호 1의 서열을 갖는 프라이머를 예로 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며 공지되어 있는 miRNA-144-3p의 서열로부터 종래기술을 이용하여 이들 유전자 혹은 유전자의 특정영역을 특이적으로 증폭할 수 있도록 디자인할 수 있으며, 이러한 프라이머의 디자인은 당업자라면 용이할 것이다. 상기 프로브는 miRNA-144-3p와 특이적 결합을 이룰 수 있는 표지된 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편으로, 표지의 검출에 의해 miRNA-144-3p의 발현량을 측정할 수 있다. 프로브 역시 공지된 miRNA-144-3p의 서열로부터 종래기술을 이용하여 miRNA-144-3p와 특이적으로 결합할 수 있도록 디자인하는 것은 당업자라면 용이할 것이다.

[0017] 또한 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 비결핵항산균 감염 진단용 키트에 관한 것이다.

[0018] 본 발명의 진단 키트를 이용한 바이오마커의 동정 또는 검출에는 당업계의 모든 방법이 포함될 수 있다. 즉, RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR, 실시간 RT-PCR, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅 또는 DNA 마이크로어레이를 활용하여 상기 바이오마커의 발현량을 측정할 수 있으며 이에 한정되는 것은 아니다. 이에 본 발명의 진단 키트는 상기 분석 방법에 따라 적절한 형태로 구성되며, 각 분석 방법에 적합한 한 종류 이상의 다른 구성을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, RT-PCR용 키트는 테스트 튜브, 완충액, 데옥시 뉴클레오타이드(dNTPs), 각종 효소, 사용 매뉴얼 등을 포함할 수 있다.

[0019] 본 발명은 또한 (A) 비결핵항산균 감염질환 의심 환자의 생체시료로부터 miRNA-144-3p의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (B) 상기 측정된 miRNA-144-3p의 발현 수준을 정상대조군 시료로부터 측정한 miRNA-144-3p의 발현 수준과 비교하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 비결핵항산균 감염 진단을 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다. 상기 miRNA-144-3p의 발현수준을 측정하는 방법으로는 당업계의 모든 방법이 포함될 수 있다. 즉, RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR, 실시간 RT-PCR, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅 또는 DNA 마이크로어레이를 활용하여 상기 바이오마커의 발현량을 측정할 수 있으며 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 생체시료는 혈액 또는 비결핵항산균 감염 의심 조직일 수 있다.

[0020] miR-144-3p의 발현수준이 비결핵항산균의 감염에 의해 상향조절될 뿐 아니라, miR-144-3p의 과발현은 비결핵항산균의 증식을 촉진하고 전염증 사이토카인 및 케모카인의 발현을 증가시켜 비결핵항산균 감염질환의 진행에 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다. 이로부터 본 발명은 miRNA-144-3p의 안티센스 뉴클레오타이드를 유효성분으로 하는 비결핵항산균 감염질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0021] 본 발명에서 miRNA-144-3p의 안티센스 뉴클레오타이드는 miRNA-144-3p의 상보서열을 갖는 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 단량체의 올리고머 또는 중합체를 지칭하며, RNA는 물론 DNA, DNA/RNA 하이브리드 또는 당업계에서 공지된 방법으로 변형된 올리고머의 모방체인 펩티드핵산(PNA) 또는 고정핵산(LNA), 당 또는 백본의 전체 또는 그 일부분이 치환 또는 변형된 염기를 모두 포함한다. 또한, miRNA-144-3p의 상보서열을 갖는 뉴클레오타이드이나, 일부 영역의 서열에는 돌연변이를 포함하여도 무방하다.

[0022] 상기 비결핵항산균은 미코박테리움 칸사시(*M. kansasii*), 미코박테리움 아비움(*M. avium*) 또는 미코박테리움 압세수스(*M. abscessus*)일 수 있다. 특히 신속 성장균으로 종래 모든 항결핵제에 대해 내성을 갖는 미코박테리움 압세수스일 수 있다.

[0023] 본 발명에서 비결핵항산균 감염 질환은 비결핵항산균의 감염에 의해 나타나는 모든 임상적 증상을 포함하는 것으로, 상기 질환은 폐질환, 림프절염, 피부·연조직·골감염증 또는 파종성 질환 등을 포함한다. 본 발명의 조성물은 비결핵항산균의 감염 후 치료적 용도 뿐 아니라, 비결핵항산균의 감염 우려가 높은 군에 예방적 목적으로도 사용될 수 있다. 즉, 본 발명의 조성물은 비결핵항산균의 증식 및 성장을 억제하므로 가족력이 있거나 AIDS 환자와 같이 지속적으로 면역체계가 불안정한 환자 등 비결핵항산균 감염 우려가 높은 경우에 예방적 목적으로도 사용될 수 있음은 당연하다. 또한 상기 약학 조성물은 인간 뿐 아니라, 비결핵항산균에 의해 감염되는 다른 동/식물의 질병 치료에도 사용될 수 있다.

[0024] 한편, 본 발명의 조성물에서 상기 안티센스 뉴클레오타이드는 안티센스 뉴클레오타이드를 발현하는 발현 벡터의 형태로 제공될 수 있다. 본 발명의 안티센스 뉴클레오타이드는 다양한 형질전환 기술을 이용하여 세포 내로 도입시

킬 수 있는데, 이를 위해 상기 안티센스 뉴클레오티드는 세포 내로의 효율적인 도입을 가능하게 하는 전달체 내에 포함된 형태일 수 있다. 상기 전달체는 바람직하게는 벡터이며, 바이러스 벡터 및 비바이러스 벡터 모두 사용 가능하다. 본 발명의 조성물은 안티센스 뉴클레오티드를 세포 내로 도입시켜 비결핵항산균 감염질환의 치료에 사용될 수 있는데, 여기서 "도입"은 형질감염(transfection) 또는 형질도입(transduction)에 의해 외래 뉴클레오티드를 세포로 유입시키는 것을 의미한다.

[0025] 본 발명의 조성물은 약제학적 분야에서 공지의 방법에 의하여, 그 자체 또는 약학적 허용되는 담체(carrier), 부형제(forming agent), 희석제 등과 혼합하여 분말, 과립, 정제, 캡슐제 또는 주사제 등의 제형으로 제조되어 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 유효성분의 투여량은 체내에서 활성성분의 흡수도, 물활성화율 및 배설속도, 환자의 연령, 성별 및 상태, 치료할 질병의 중증정도 등에 따라 적절히 선택되나, 일반적으로 성인에게 1일에 체중 1kg 당 상기 화합물을 1~100mg의 양으로 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다.

발명의 효과

[0026] 이상과 같이 본 발명의 비결핵항산균 감염질환 진단용 조성물에 의하면 비결핵항산균 감염 의심 환자의 생체시료로부터 miRNA-144-3p의 발현량을 측정하는 것에 의해 환자에게 부담을 주지 않으면서 빠르고 간편하게 비결핵항산균 감염을 진단할 수 있다.

[0027] 또한 본 발명의 비결핵항산균 감염질환의 예방 또는 치료용 조성물에 의하면 새로운 기작에 의해 비결핵항산균의 성장을 촉진하는 miRNA-144-3p의 발현을 억제하고, 감염으로 인한 염증반응을 저해하기 때문에 비결핵항산균 감염질환의 예방 또는 치료에 효과적으로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 비결핵항산균 감염질환 환자에게서 차등발현되는 miRNA를 보여주는 그래프.

도 2는 miR-144-3p, miR-1-3p 및 miR-132-3p의 타겟 유전자의 PANTHER 경로를 보여주는 그래프.

도 3은 정상대조군에 비해 비결핵항산균 감염질환 환자에서 발현수준 차이가 가장 큰 세 가지 miRNA의 상대적인 발현수준을 보여주는 그래프.

도 4는 miRNA-144-3p의 과발현이 전염증 사이토카인/케모카인의 발현에 미치는 영향을 보여주는 그래프.

도 5는 mmu-miR-144-3p mimic의 형질감염에 의해 miR-144-3p의 발현이 증가함을 보여주는 그래프.

도 6은 비결핵항산균 감염 마우스의 폐조직에서 miRNA-144-3p 및 전염증 사이토카인/케모카인의 발현이 증가함을 보여주는 그래프.

도 7은 마우스의 BMDM에서 비결핵항산균의 감염에 의해 miRNA-144-3p 및 사이토카인/케모카인의 발현이 증가함을 보여주는 그래프.

도 8은 mmu-miR-144-3p mimic이 형질감염된 마우스 BMDM에서 비결핵항산균의 증식이 촉진됨을 보여주는 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 이하 첨부된 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

[0030] [실시예]

[0031] 실시예 1 : 비결핵항산균 감염환자의 miRNA 발현 분석

[0032] *Mabc* 감염환자(n =10), *Mmass* 감염환자(n=7) 및 정상대조군(HC, n=6)의 정맥혈로부터 Ficoll-Hypaque(Lymphoprep; Alere technologies, Oslo, Norway)의 정맥혈을 사용하여 miRNA의 발현을 분석하였다. 모든 실험군은 여성으로 연령대가 유사하였다(p=0.31, Kruskal-Wallis test). *Mabc* 감염환자의 평균연령은 61.1±8.0세, *Mmass* 감염환자는 59.4±8.7세이며, 정상대조군은 55.2±7.3세였다.

[0033] 해파린 처리된 정맥혈 시료로부터 Ficoll-Hypaque(Lymphoprep; Alere technologies, Oslo, Norway)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 말초혈액단핵세포(PBMCs)를 분리하였다. PBMCs로부터 QIAzol lysis reagent(Qiagen,

Hilden, Germany)와 miRNeasy Mini Kits(Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 총 RNA를 분리하여 nCounter Human miRNA expression assays를 실시하였다. nCounter Human miRNA expression assays는 PhileKorea Technology(대전, 한국)에서 실시하였다. 구체적으로는 nCounter Human miRNA Assay Kit V3 (NanoString Technologies, Inc., Seattle, WA, USA)를 사용하여 분석하였으며, nSolver, version 4.0(NanoString Technologies, Inc., Seattle, WA, USA)을 사용하여 사용자 매뉴얼에 따라 nCounter assay 데이터로부터 차등 유전자 발현을 분석하였다.

[0034] 도 1의 (a)는 그 결과를 보여주는 그래프로 *Mabc* 감염환자는 정상군에 비해 25가지의 miRNA가 차등발현되었으며, 이 중 14개는 상향조절, 11개는 하향조절되었다. *Mmass* 감염환자는 10가지 miRNA가 차등발현되었으며, 이 중 8개는 상향조절, 2개는 하향조절되었다. 도 1의 (b)는 이들 중 동일한 패턴으로 발현된 9개의 miRNA를 나타낸 것으로, 7개는 상향조절, 2개는 하향조절되었다.

[0035] 이들 차등발현된 miRNA들이 전염증반응 유전자의 발현을 조절할 수 있는 지 확인하기 위하여, TargetScan database(version 7.1)을 사용하여 잠재적인 miRNA 타겟 유전자를 스크리닝하고, miRNA에 의해 예상된 타겟 유전자의 경로가 유의적으로 증폭되는 지를 확인하였다. 그 결과 miR-144-3p, miR-1-3p 및 miR-132-3p의 타겟 유전자에 대해 각각 11, 9, 23개의 PANTHER 경로를 확인하였다. 도 2는 그 결과를 나타낸 것으로, 5가지 경로가 상기 세 가지 miRNA에 대해 공통적이었다.

[0036] 비결핵항산균 감염환자군과 정상대조군에서 발현수준 차이가 가장 큰 세 가지 miRNA를 선택하였으며, 이 중 도 3에서 확인할 수 있듯이, 세 가지 miRNA 중에서 miR-144-3p는 정상 대조군에 비해 *Mabc*군과 *Mmass*군에서 현저하게 발현수준이 높았다(도 3의 a; $p < 0.001$). 이에 반해 miR-1255a와 miR-5001-3p는 차이에 유의성을 나타내지 않았다. 이는 miR-144-3p가 *Mabc* 또는 *Mmass* 감염의 바이오마커로 사용될 수 있음을 시사한다.

[0037] **실시예 2 : miR-144-3p의 과발현이 전염증 사이토카인/케모카인의 발현에 미치는 영향 평가**

[0038] 정상인의 정맥혈로부터 분리한 PDMC를 4 ng/mL의 hCSF/대식세포자극인자(Sigma-Aldrich)를 포함하는 배지에서 4일간 배양하여 말초혈관유래대식세포(PMDM)를 제조하였다.

[0039] PMDM에 mmu-miR-144-3p mimic (Sense 5'-UACAGUAUAGAUGAUGUACU 3', Antisense 5' AGUACAUCAUCAUACUGUA 3'; Genolution, Seoul, South Korea) 또는 mimic negative control (Cat. 4464058, Invitrogen, CA, USA) 10 nM을 Lipofectamine 2000(Invitrogen)을 사용하여 사용자의 매뉴얼에 따라 24시간 형질감염시켰다. 이 후 *Mabc*(ATCC 19977) 또는 *Mmass*(KMRC-00136-13018)를 2 MOI로 3시간 감염시켰다. 이 후 세포의 비결핵항산균을 제거하기 위하여 PBS 완충액으로 세척한 후 추가적으로 6시간 배양하였다.

[0040] 배양된 세포로부터 QIAzol lysis reagent (Qiagen, Hilden, Germany)와 miRNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 제조사의 방법에 따라 전체 RNA를 분리하였다. 하기 표 1에 기재된 프라이머를 사용하여 rt-PCR에 의해 전염증 사이토카인/케모카인의 발현량을 분석하였다.

표 1

IL1B	Forward	5'-CCACAGACCTTCCAGGAGAATG-3'	서열번호 2
	Reverse	5'-GTGCAGTTCAGTGATCGTACAGG-3'	서열번호 3
TNFA	Forward	5'-GCTGCACTTTGGAGTGATCG-3'	서열번호 4
	Reverse	5'-ACAACATGGGCTACAGGCTT-3'	서열번호 5
IL6	Forward	5'-TGTGAAAGCAGCAAAGAGGCACTG-3'	서열번호 6
	Reverse	5'-ACAGCTCTGGCTTGTCCTCACTA-3'	서열번호 7
CXCL2	Forward	5'-CCGAAGTCATAGCCCACTC-3'	서열번호 8
	Reverse	5'-GGATTTGCCATTTTTCAGCA-3'	서열번호 9

[0041]

[0042] 도 4는 그 결과를 보여주는 그래프로, *Mabc*의 감염 시 miR-144-3p의 과발현에 의해 4가지 사이토카인/케모카인의 발현이 모두 유의적으로 증가하였다. *Mmass*의 감염 시에는 miR-144-3p의 과발현에 의해 IL6, TNFA, CXCL2

의 발현은 증가하였으나, IL1B의 발현에는 유의적인 차이가 없었다.

[0043] 도 5는 대조군과 실험군에서 mmu-miR-144-3p mimic의 형질감염에 의한 miR-144-3p의 발현량을 has-miR-144-3p 프라이머(MS00020328, Qoagen)를 사용하여 rt-PCR로 측정된 결과이다. 도 5로부터 *Mabc*의 감염에 의해 miRNA-144-3p의 발현이 크게 증가하며, mmu-miR-144-3p mimic의 형질감염에 의해 그 증가량이 더욱 현저함을 확인할 수 있다. *Mabc*가 감염되지 않았을 때에는 형질감염에 의한 miRNA-144-3p의 발현량의 증가는 관측되지 않았다.

[0044] 이로부터 miR-144-3p는 비결핵항산균 감염 시 전염증 사이토카인/케모카인의 발현을 증가시킴을 확인할 수 있다.

[0045] 실시예 3 : 마우스 모델에서의 miR-144-3p의 발현 평가

[0046] miR-144-3p는 사람과 마우스에서 공통적인 서열을 갖기 때문에, 마우스 모델을 사용하여 *in-vivo*와 *in-vitro*에서 *Mabc* 또는 *Mmass* 감염이 miR-144-3p의 발현에 미치는 영향을 평가하였다.

[0047] 1) *in-vivo* 시험

[0048] 마우스는 8~12주령의 웅성 C67BL/6(Samtako Bio, 경기도, 한국) 마우스를 연령 매치하여 사용하였다. 마우스들은 12시간 명암 조건의 특정 무병소 조건에서 유지하였다. 마우스는 *Mabc* 투여군, *Mmass* 투여군 및 정상 대조군 3개의 군으로 나누었으며, 각 군당 개체수는 4마리로 하였다.

[0049] C57BL/6 마우스에 *Mabc* 또는 *Mmass* 1×10⁷ CFU를 비강을 통하여 감염시키고, 감염 7일째 마우스를 희생시키고 폐를 수득하였다. 폐조직으로부터 mmu-mir-144-3p 및 전염증 사이토카인의 발현수준을 quantitative rt-PCR로 측정하여 도 6에 도시하였다. Ccl2의 정량에 사용된 프라이머는 표 2에 기재하였다. 도 6은 정상대조군에 비해 *Mabc* 또는 *Mmass* 감염 마우스의 폐에서 miR014403p 및 염증성 사이토카인과 케모카인의 발현이 증가한 것을 보여준다.

표 2

CXC2	Forward	5'-CCCCAGTCACCTGCTGTAT-3'	서열번호 10
	Reverse	5'-TGGAATCCTGAACCCACTTC-3'	서열번호 11

[0050]

[0051] 2) *in-vitro* 시험

[0052] 골수유래 대식세포(BMDMs)의 수집 및 배양

[0053] C57BL/6 마우스의 골수로부터 대식세포(macrophage)를 수집하고 10% fetal bovine serum(Lonza), penicillin(100 IU/ml) 및 streptomycin (100 µg/ml)를 포함하는 DMEM(Lonza) 배지에서 배양하였다. 배지에 대식세포 집락 인자(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF, R&D Systems)를 25 ng/ml의 농도로 첨가하여 4일간 분화하고, 37°C, 5% CO₂, 가습 조건에서 배양하였다. 분화한 대식세포가 아닌 림프구들은 기계적인 파괴로 제거하여 골수유래 대식세포(BMDMs)을 수집하였다.

[0054] 골수유래 대식세포에서 비결핵항산균의 감염

[0055] BMDMs에 *Mabc* 또는 *Mmass*를 3 MOI로 2시간 동안 감염시킨 후, 이 후 세포의 비결핵항산균을 제거하기 위하여 PBS 완충액으로 세척하고 추가적으로 18시간 배양하였다. 배양 시간별로 배양 세포로부터 quantitative rt-PCR에 의해 mmu-miR-144-3p(mmu-miR-144-3p 프라이머(MS00032326, Qoagen) 사용) 및 전염증성 사이토카인/케모카인의 발현량을 정량하였다. 도 7은 그 결과를 보여주는 것으로, *Mabc*와 *Mmass*의 감염에서 피크 시간은 달랐지만, 두 군주 모두 감염에 의해 BMDMs에서 mmu-miR-144-3p의 발현량을 현저하게 상향조절하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 *Mabc*의 감염에 의해 TNFA, IL1b 및 CXCL2의 발현도 시간 의존적으로 증가함을 나타내었다. 이에 비해 *Mmass*의 감염 시에는 감염 18시간 이후 TNFA, IL1b 및 CXCL2의 발현이 증가하였다.

[0056] 골수유래 대식세포에서 mir-144-3p가 비결핵항산균 감염에 미치는 영향 평가

[0057] BMDMs에 mmu-miR-144-3p mimic 또는 mimic negative control(Cat. 4464058, Invitrogen, CA, USA) 10 nM을 Lipofectamine 2000(Invitrogen)을 사용하여 24시간 형질감염시켰다. 이 후 *Mabc* 또는 *Mmass*를 1 MOI로 3시간

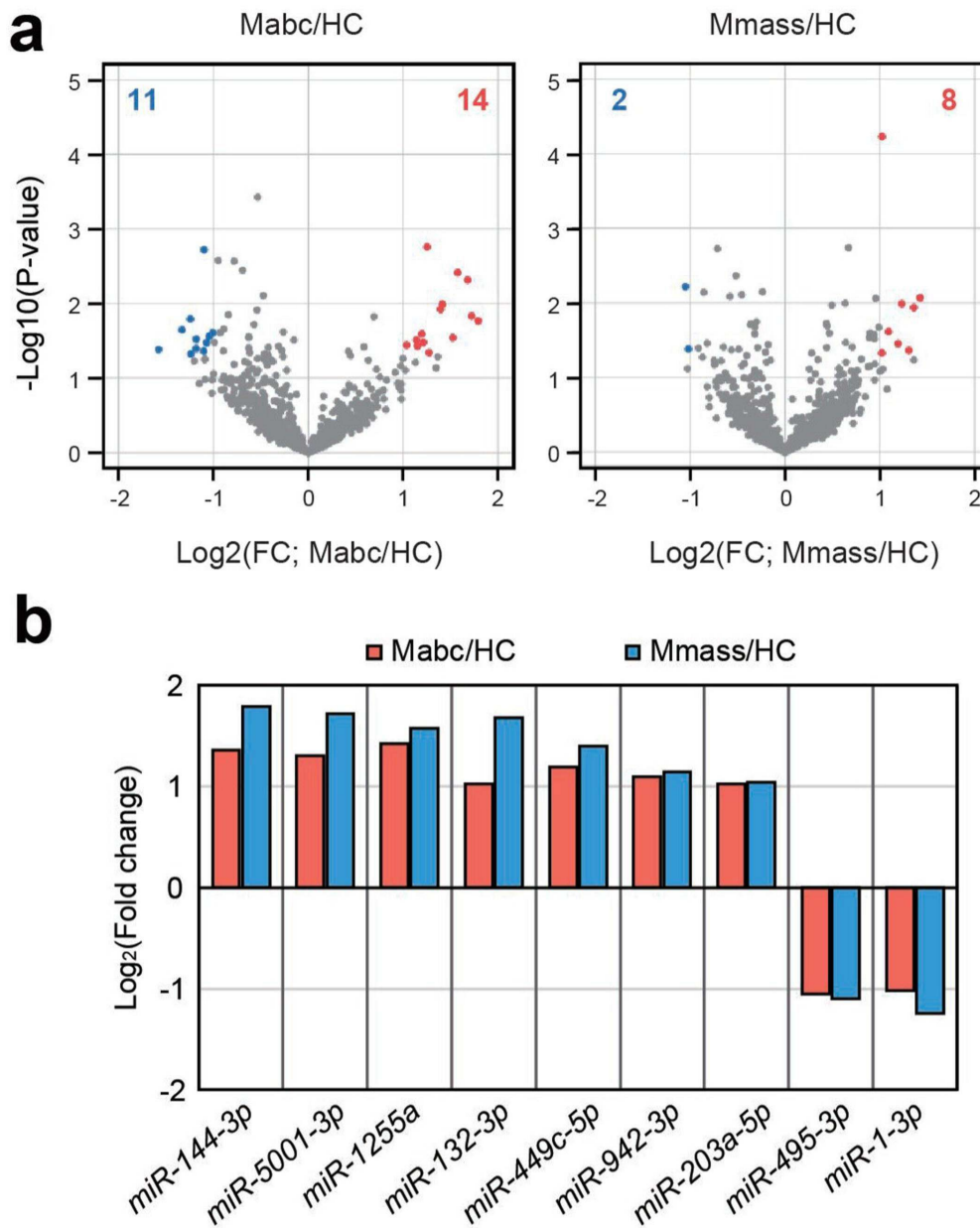
감염시켰다. 이 후 세포의 비결핵항산균을 제거하기 위하여 PBS 완충액으로 세척한 후 추가적으로 24시간 배양하였다.

[0058] 배양 후 세포내 박테리아를 방출시키기 위하여 증류수로 대식세포를 터트리고, PBS로 10배 희석하였다. 7H10 아가 플레이트에 분주하여 37℃, 5% CO₂ incubator에서 3~4일 정도 배양하고 집락형성단위(CFU)를 측정하여 세포 내 균 생존율을 확인하고 그 결과를 도 8에 각각 도시하였다. BMDMs에서 mmu-mir-144-3p 과발현은 *Mabc* 및 *Mmass*의 성장을 유의적으로 증가시킴을 확인할 수 있다.

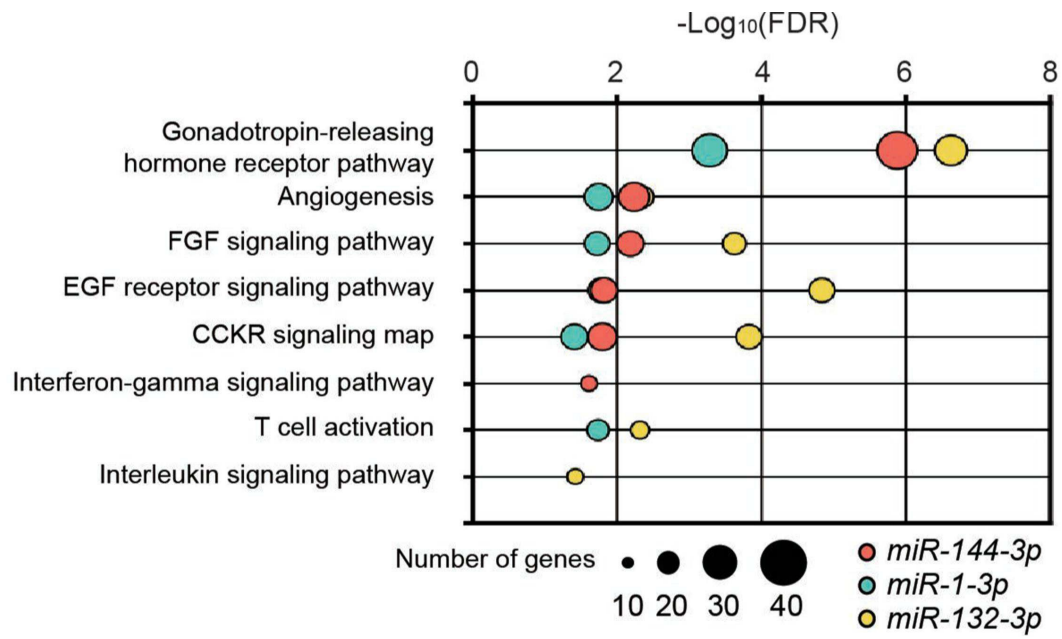
[0059] 이로부터 miR-144-3p의 발현수준은 *Mabc* 또는 *Mmass*의 감염에 의해 상향조절되며, miR-144-3p이 *Mabc* 또는 *Mmass*의 세포 내 성장을 촉진함을 알 수 있다.

도면

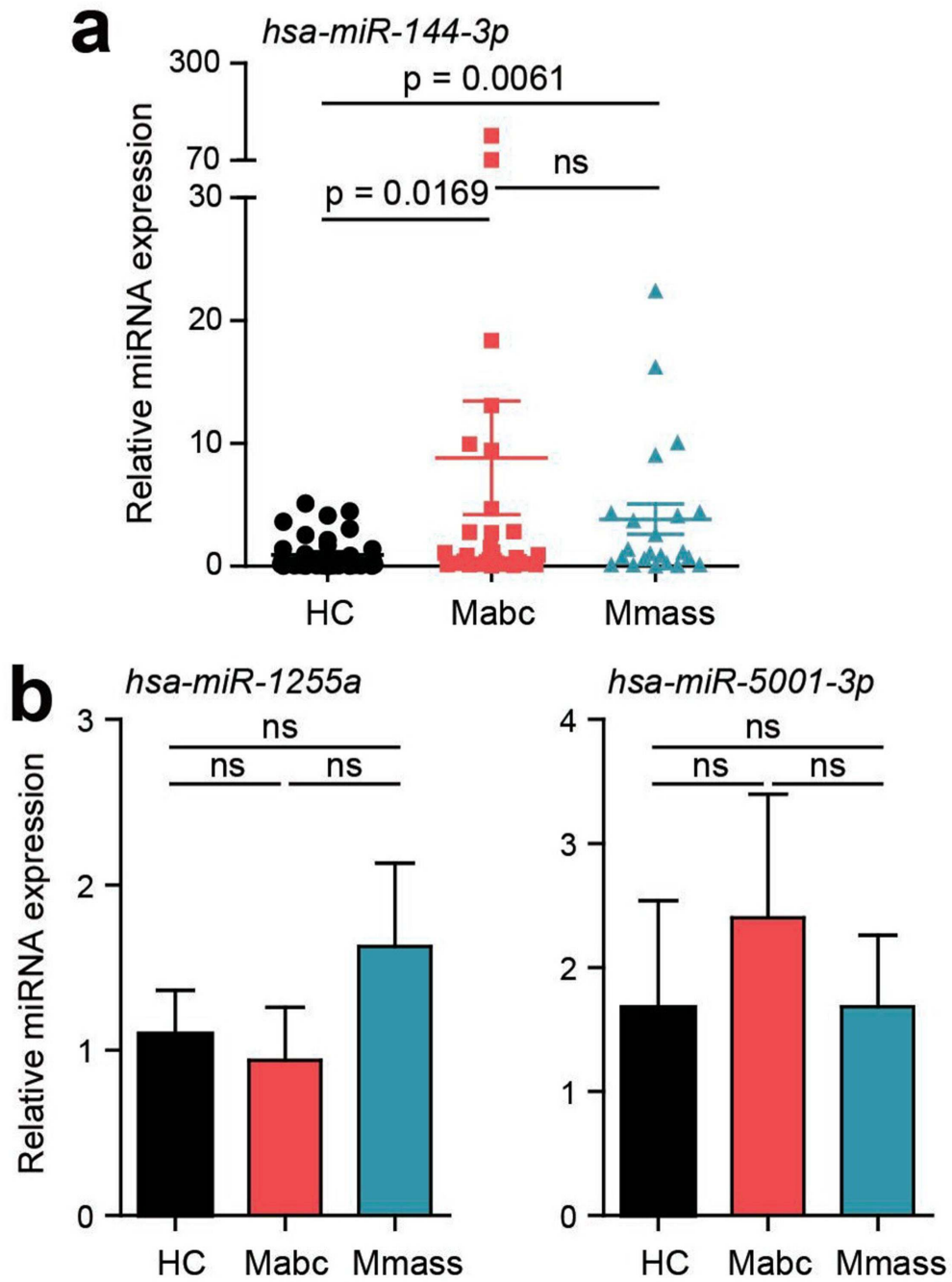
도면1



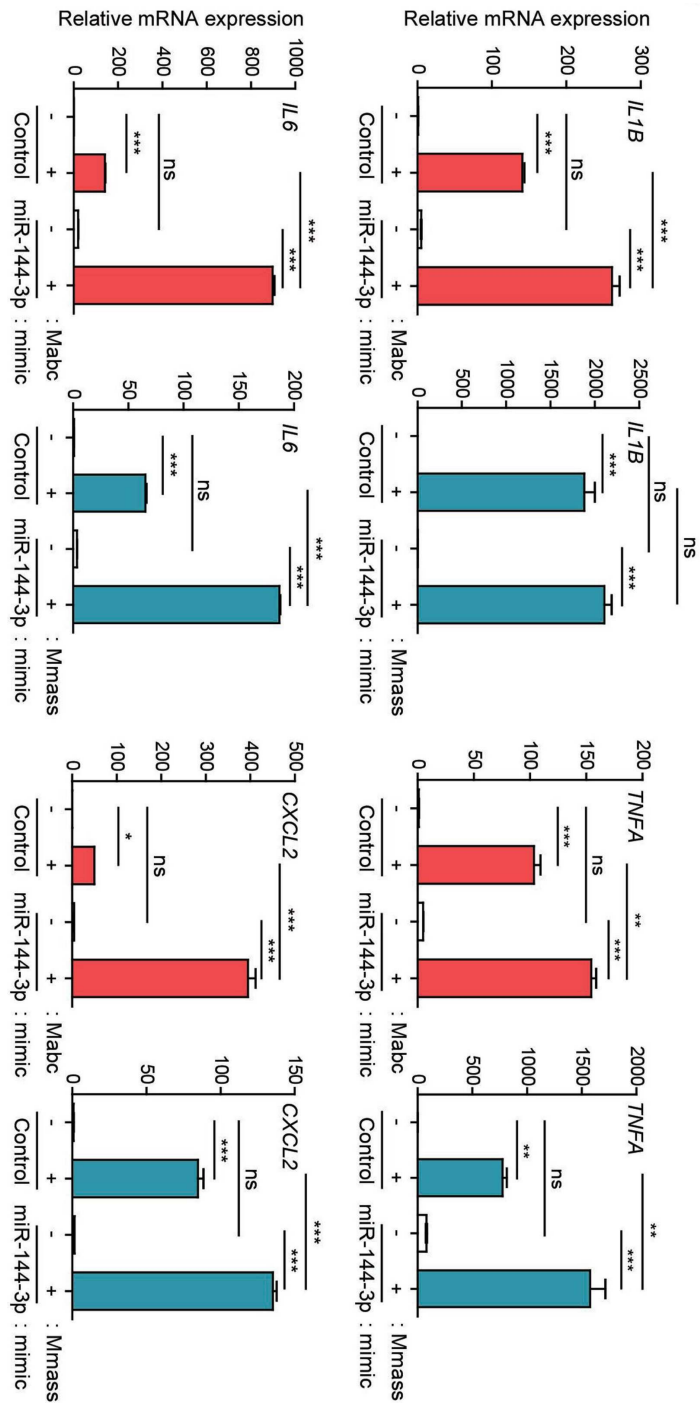
도면2



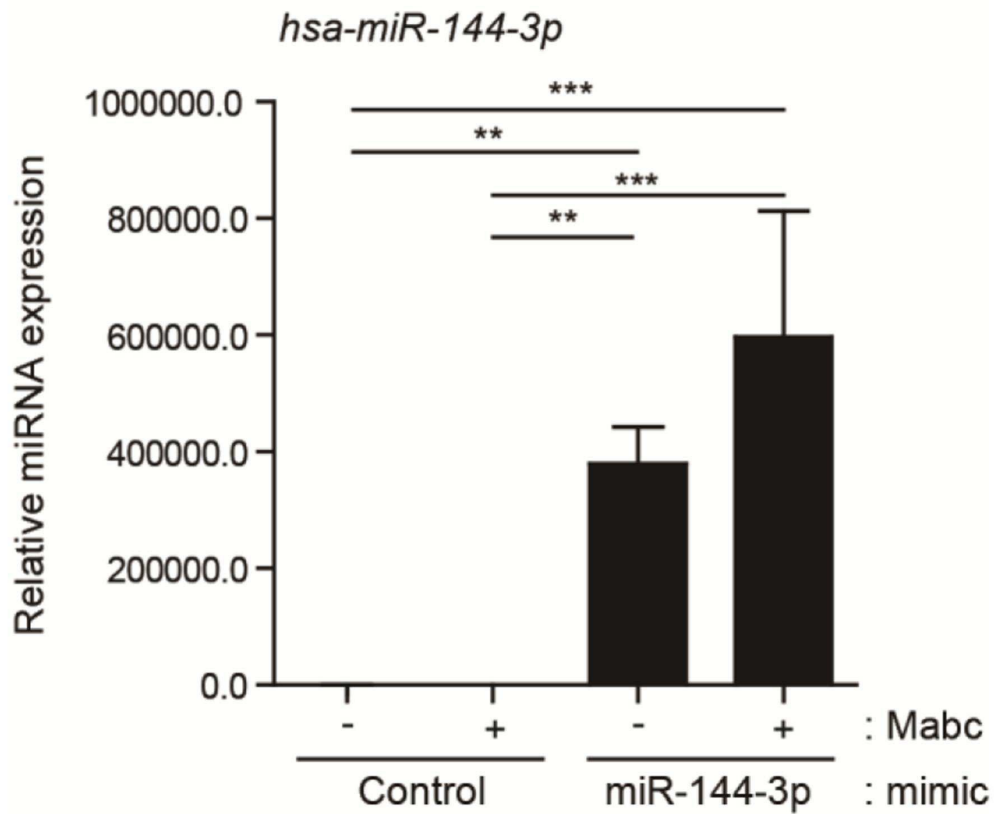
도면3



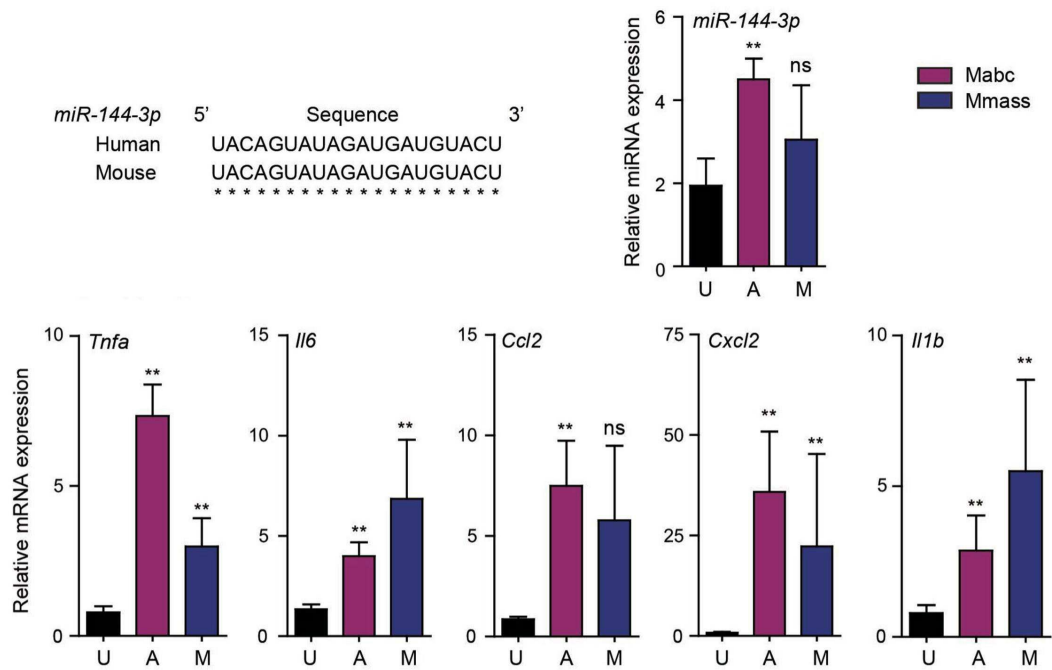
도면4



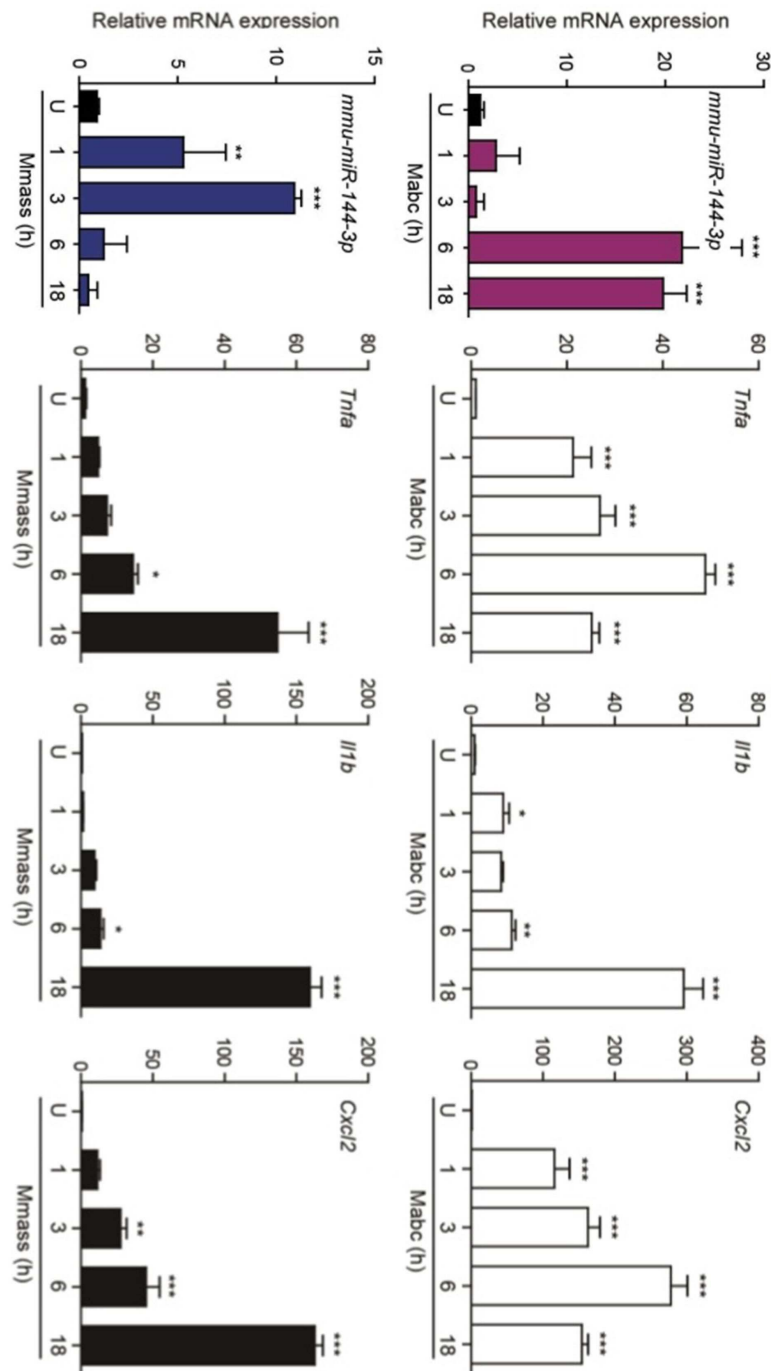
도면5



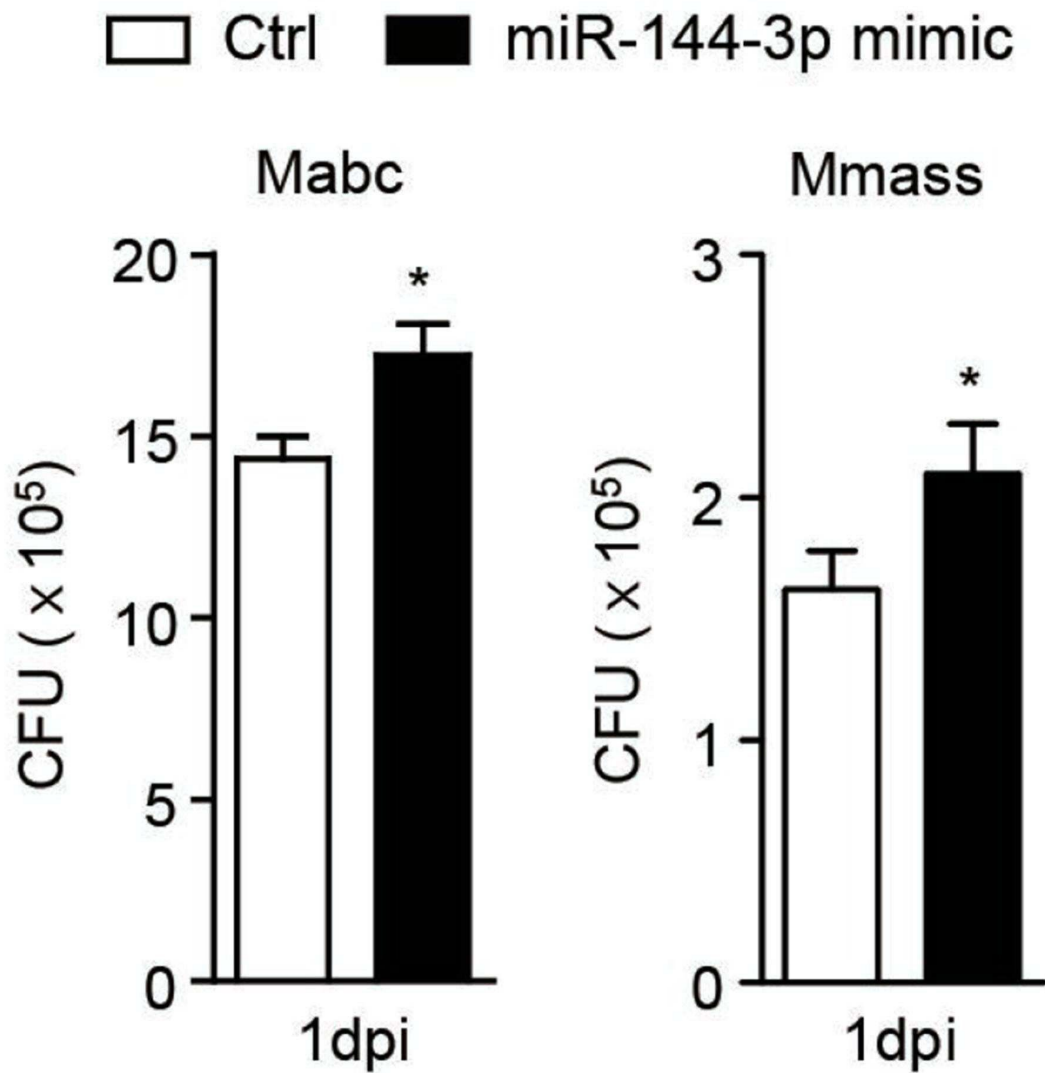
도면6



도면7



도면8



서열 목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
SAMSUNG LIFE PUBLIC WELFARE FOUNDATION
INDUSTRY FOUNDATION OF CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY
- <120> Biomarker for Diagnosing Nontuberculous Mycobacterium Infection
and Pharmaceutical Composition for Prophylaxis or Treatment of
Nontuberculous Mycobacterium Infectious Disease
- <130> P1220-474
- <160> 11
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA

<213>

Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

uacaguauag augauguacu 20

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

ccacagacct tccaggagaa tg 22

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

gtgcagttca gtgatcgtag agg 23

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

gctgcacttt ggagtgatcg 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

acaacatggg ctacaggctt 20

<210> 6

<211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 6
 tgtgaaagca gcaaagaggc actg 24

<210> 7
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 7
 acagctctgg cttgttcctc acta 24

<210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 8
 ccgaagtcac agccacactc 20

<210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 9
 ggatttgcca ttttcagca 20

<210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 10

ccccagtcac ctgctgttat	20
<210> 11	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 11	
tggaatcctg aaccacttc	20