(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0075213
(43) 공개일자 2023년05월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2022.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0161598
(22) 출원일자 2021년11월22일
심사청구일자 2021년11월22일

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
조현경
부산광역시 부산진구 중앙대로666번길 50, C동 1904호(부전동, 더샵 센트럴스타)
(74) 대리인
최규환

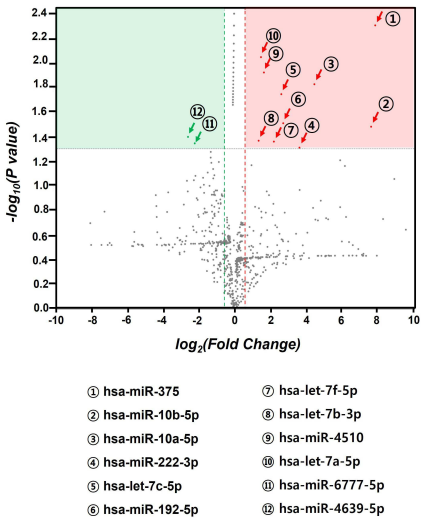
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **정상안압 녹내장 진단용 miRNA 바이오마커 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 정상안압 녹내장 진단용 miRNA 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 정상군에 대비하여 정상안압 녹내장군에서, 본 발명의 12종 miRNA 발현량이 2배 이상 상향 또는 하향 조절되므로, 이를 정상안압 녹내장 진단에서 효과적으로 활용할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/178 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711108648
과제번호	2019R1G1A100702013
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	생애첫연구사업
연구과제명	microRNA의 정상안압녹내장에서의 역할 규명 및 기전 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경상국립대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

hsa-let-7a-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7f-5p, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-375, hsa-miR-4510, hsa-miR-4639-5p, hsa-miR-6777-5p, hsa-let-7b-3p 및 hsa-miR-222-3p 중에서 선택된 하나 이상의 microRNA를 유효성분으로 포함하는 정상안압녹내장 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 hsa-let-7a-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7f-5p, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-375, hsa-miR-4510, hsa-miR-4639-5p, hsa-miR-6777-5p, hsa-let-7b-3p 및 hsa-miR-222-3p는 각각 서열번호 1 내지 12의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 정상안압녹내장 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 3

hsa-let-7a-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7f-5p, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-375, hsa-miR-4510, hsa-miR-4639-5p, hsa-miR-6777-5p, hsa-let-7b-3p 및 hsa-miR-222-3p 중에서 선택된 하나 이상의 microRNA를 검출할 수 있는 제제를 포함하는 정상안압녹내장 진단용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 hsa-let-7a-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7f-5p, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-375, hsa-miR-4510, hsa-miR-4639-5p, hsa-miR-6777-5p, hsa-let-7b-3p 및 hsa-miR-222-3p는 각각 서열번호 1 내지 12의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 정상안압녹내장 진단용 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 제제는 상기 microRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 프라이머, 또는 프로브인 것을 특징으로 하는 정상안압녹내장 진단용 조성물.

청구항 6

제3항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 정상안압녹내장 진단용 키트.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 키트는 RT-PCR, 실시간(real-time) PCR, 등온 PCR, 노던 블랏팅, RNA 보호분석법 또는 마이크로어레이 칩용인 것을 특징으로 하는 정상안압녹내장 진단용 키트.

청구항 8

전혈 또는 혈청에서, hsa-let-7a-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7f-5p, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-375, hsa-miR-4510, hsa-miR-4639-5p, hsa-miR-6777-5p, hsa-let-7b-3p 및 hsa-miR-222-3p 중에서 선택된 하나 이상의 microRNA의 발현수준을 측정하는 단계; 및

상기 miRNA 발현 수준을 정상 대조군 시료의 해당 miRNA 발현 수준과 비교하는 단계;를 포함하는 정상안압녹내장의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 발현수준은 차세대 염기서열 분석(Next generation sequencing; NGS), 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection assay; RPA), 마이크로어레이(microarray), 및 노던 블롯팅(northern blotting) 중에서 선택되는 1

종 이상의 방법으로 측정되는 것을 특징으로 하는 정상안압녹내장 진단을 위한 정보제공방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 정상안압 녹내장 진단용 miRNA 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 녹내장은 황반변성, 당뇨망막병증과 더불어 세계 3대 실명 질환의 하나이며, 비가역적인 실명을 유발하는 두 번째로 중요한 질환으로, 국민건강보험공단에 따르면 녹내장질환으로 진료를 받은 환자가 2010년 44만 4천 명에서 2015년 76만 8천 명으로 5년간 73.1%(32만 4천명) 증가했다. 녹내장 진료환자들의 전체 진료비는 2010년 877억 원에서 2015년 1,717억 원으로 증가하였다.

[0003] 원발개방각녹내장 중에서 우리나라를 비롯하여 동양인에서 다른 인종에 비해 안압이 높지 않은 정상안압녹내장(Normal tension glaucoma, NTG)의 유병율이 높은 것이 인종간의 뚜렷한 역학적 특징으로 나타났다. 우리나라 역학 조사에서 원발개방각녹내장 중에서 정상안압녹내장이 77%로 대부분을 차지하고 있으며, 전체 동양인의 역학조사에서도 정상안압녹내장의 평균 비율은 76.3%로 대부분을 차지하고 있다.

[0004] 정상안압녹내장에서 안압이 높지 않은데도 불구하고, 녹내장이 발생하는 원인은 아직 잘 알려져 있지 않으며, 특히 동양인에 왜 더 호발하는지 역시 명확하지 않다. 녹내장은 다중 인자적인 질환(multifactorial disorder)으로서 아직 발생기전이 명확히 밝혀져 있지 않다.

[0005] 안압이 가장 중요한 녹내장의 위험인자이며, 유일하게 수정 가능한 인자이므로, 안압 하강이 현재 녹내장의 일차 치료로 확립되어 있다. 안압 하강으로 녹내장의 진행 속도를 늦춤으로서 시기능을 어느 정도 유지하는 것이 목표이며, 비가역적인 시신경손상을 회복시킬 수는 없다. microRNA는 수백 가지의 다른 표적 mRNA를 조절하고, 하나의 표적은 다수의 microRNA에 의해 조절된다. 임상 양상이 다양하고, 질환 자체가 유전자의 불완전한 침투율(penetrance)을 보이는 녹내장에서 miRNA를 연구하는 것은 타당하며, 중요한 의미가 있다. 방수에는 유전자뿐 아니라 다양한 생체 조절인자 및 진단지표를 포함하고 있으며, 방수는 전안부 질환 뿐 아니라 안구 후면부인 유리체, 망막질환 및 녹내장, 시신경 질환에서도 널리 이용하는 검체이다.

[0006] 한편, 한국등록특허 제1585794호에 miRNA를 이용한 안과 질환의 예방 또는 치료에 대한 기술이 개시되어 있고, 비늘녹내장(exfoliation glaucoma) 또는 원발성 개방각 녹내장(primary open-angle glaucoma) 환자의 방수에서 발현되는 microRNA에 대하여 *Human Molecular Genetics*(2018, Vol. 27, No. 7 p1263-1275)에 개시되어 있으나, 아직까지 본 발명의 정상안압 녹내장 진단용 miRNA 바이오마커 및 이의 용도에 대해 개시된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명은 정상안압 녹내장 진단용 miRNA 바이오마커 및 이의 용도를 제공하고, 정상군에 대비하여 정상안압녹내장군에서, 본 발명의 miRNA 발현량이 2배 이상 상향 또는 하향 조절된 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 hsa-let-7a-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7f-5p, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-375, hsa-miR-4510, hsa-miR-4639-5p, hsa-miR-6777-5p, hsa-let-7b-3p 및 hsa-miR-222-3p 중에서 선택된 하나 이상의 microRNA를 유효성분으로 포함하는 정상안압녹내장 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 hsa-let-7a-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7f-5p, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-375, hsa-miR-4510, hsa-miR-4639-5p, hsa-miR-6777-5p, hsa-let-7b-3p 및 hsa-miR-222-3p 중에서 선택된 하나 이상의 microRNA를 검출할 수 있는 제제를 포함하는 정상안압녹내장 진단용 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 정상안압녹내장 진단용 키트를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 전혈 또는 혈청에서, hsa-let-7a-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7f-5p, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-375, hsa-miR-4510, hsa-miR-4639-5p, hsa-miR-6777-5p, hsa-let-7b-3p 및 hsa-miR-222-3p 중에서 선택된 하나 이상의 microRNA의 발현수준을 측정하는 단계; 및

[0012] 상기 miRNA 발현 수준을 정상 대조군 시료의 해당 miRNA 발현 수준과 비교하는 단계;를 포함하는 정상안압녹내장의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명은 정상안압 녹내장 진단용 miRNA 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 정상군에 대비하여 정상안압녹내장군에서, 본 발명의 12종 miRNA 발현량이 2배 이상 상향 또는 하향 조절되므로, 이를 정상안압 녹내장 진단에서 효과적으로 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 방수에 존재하는 miRNA 중에서 정상안압녹내장 환자군에서 발현량 변화가 큰 12종의 miRNA를 선별하기 위한 miRNA 발현량을 스크리닝한 결과이다.

도 2는 대조군(CTL) 대비 정상안압녹내장 환자군(NTG)에서 miRNA hsa-let-7c-5p의 발현량 증가를 확인한 결과이다. ***는 대조군(CTL) 대비 정상안압녹내장 환자군(NTG)에서 miRNA hsa-let-7c-5p의 발현량 증가가 통계적으로 유의미하다는 것으로 $p<0.001$이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명은 hsa-let-7a-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7f-5p, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-375, hsa-miR-4510, hsa-miR-4639-5p, hsa-miR-6777-5p, hsa-let-7b-3p 및 hsa-miR-222-3p 중에서 선택된 하나 이상의 microRNA를 유효성분으로 포함하는 정상안압녹내장 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0016] 상기 hsa-let-7a-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7f-5p, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-375, hsa-miR-4510, hsa-miR-4639-5p, hsa-miR-6777-5p, hsa-let-7b-3p 및 hsa-miR-222-3p는 각각 서열번호 1 내지 12의 염기서열로 이루어진 것이 바람직하지만 이에 한정하는 것은 아니다.

[0017] 본 발명에서, 마이크로 RNA(miRNA)는 표적 RNA의 분해(degradation)를 촉진시키거나 또는 그들의 번역을 억제시킴으로써 유전자 발현을 전사 후에 조절하는 21~23개의 비코딩 RNA를 말한다. 특정 염기서열로 나타내는 miRNA 뿐만 아니라 상기 miRNA의 전구체(pre-miRNA, pri-miRNA), 이들과 생물학적 기능이 동등한 miRNA, 예를 들면 동족체(즉, 호몰로그 또는 오솔로그), 유전자다형 등의 변이체, 및 유도체도 포함한다.

[0018] 본 발명의 '진단'은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체 즉 검사 대상자의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)를 판정하는 것 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링하는 것)을 포함하는 개념이다.

[0019] 또한, 본 발명은 hsa-let-7a-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7f-5p, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-375, hsa-miR-4510, hsa-miR-4639-5p, hsa-miR-6777-5p, hsa-let-7b-3p 및 hsa-miR-222-3p 중에서 선택된 하나 이상의 microRNA를 검출할 수 있는 제제를 포함하는 정상안압녹내장 진단용 조성물에 관한 것이다.

[0020] 상기 hsa-let-7a-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7f-5p, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-375, hsa-miR-4510, hsa-miR-4639-5p, hsa-miR-6777-5p, hsa-let-7b-3p 및 hsa-miR-222-3p는 각각 서열번호 1 내지 12의 염기서열로 이루어진 것이 바람직하지만 이에 한정하는 것은 아니다.

[0021] 상기 제제는 상기 microRNA에 상보적으로 결합하여 인식할 수 있거나, 상기 microRNA를 증폭시킬수 있는 제제로서, 구체적인 일례로는 miRNA를 특이적으로 검출할 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 프라이머 또는 프로브인 것이 바람직하지만 이에 한정하는 것은 아니다.

[0022] 상기 제제는 상기 microRNA의 발현 수준 측정을 위해 직접 또는 간접적으로 표지될 수 있다. 구체적으로, 상기 표지에는 리간드, 비드(bead), 방사성 핵종, 효소, 기질, 보조인자, 억제제, 형광물질, 화학발광물질, 자성입자, 합텐 및 염료 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이에 제한되지 않는다. 구체적인 예로,

상기 리간드에는 바이오틴, 아비딘 및 스트렙토아비딘 등이 포함되고, 상기 효소에는 루시퍼라아제, 퍼옥시다아제 및 베타 갈락토시다아제 등이 포함되며, 상기 형광물질에는 플루오레세인, 쿠마린, 로다민, 피코에리트린 및 설포로다민산 클로라이드(텍사스 레드: Texas red) 등이 포함되나, 이에 제한되지 않는다. 이러한 검출 가능한 표지물로 공지의 표지물 대부분이 사용될 수 있고, 당업자라면 발명의 목적에 맞게 적절한 표지물을 선택할 수 있을 것이다.

[0023] 본 발명에서 사용되는 용어 "마커 또는 진단 마커(diagnosis marker)"란 정상안압녹내장을 가진 개체를 정상 세포 또는 정상 개체와 구분하여 진단할 수 있는 물질로, 정상 세포에 비하여 정상안압녹내장이 진행 또는 발병된 세포 또는 개체에서 증가 또는 감소를 보이는 폴리펩티드, 단백질 또는 핵산(예: mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질 또는 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자들을 포함한다. 본 발명의 목적상, 본 발명의 정상안압녹내장 진단 마커는 정상 세포 또는 조직의 세포에 비하여, 정상안압녹내장군의 세포에서 특이적으로 발현 수준의 차이를 보이는 miRNA 또는 해당 miRNA의 단편이다.

[0024] 본 발명의 용어, "프라이머"는 짧은 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 염기서열로서, 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 서열을 의미한다. 본 발명에서, 상기 유전자의 mRNA 증폭에 사용되는 프라이머는, 적절한 버퍼 중의 적절한 조건(예를 들면, 4개의 다른 뉴클레오티드 트리포스페이트 및 DNA, RNA 폴리머라제 또는 역전사효소와 같은 중합제) 및 적당한 온도 조건에서 주형-지시 DNA 합성의 시작점으로서 작용할 수 있는 단일가닥 올리고뉴클레오티드가 될 수 있는데, 상기 프라이머의 적절한 길이는 사용 목적에 따라 달라질 수 있다. 상기 프라이머 서열은 상기 miRNA의 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드와 완전하게 상보적일 필요는 없으며, 혼성화할 정도로 충분히 상보적이면 사용가능하다.

[0025] 본 발명에서 사용되는 용어 "프로브"란, 유전자 또는 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧게는 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하는데, 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide) 프로브, 단일가닥 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중가닥 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있고, 보다 용이하게 검출하기 위하여 라벨링될 수 있다. 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산서열은 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 비-제한적인 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체 (예: 메틸 포스포네이트, 포스소트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.

[0026] 본 발명에서 이용되는 염기서열은 생물학적으로 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기 용어, '실질적인 동일성'은 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인(align)하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 60%의 상동성, 더욱 구체적으로 70%의 상동성, 더더욱 구체적으로 80%의 상동성, 가장 구체적으로 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 따라서, 상기 서열번호 1 내지 12로 표시되는 염기서열과 높은 상동성을 갖는 염기서열, 예를 들면 그 상동성이 70% 이상, 구체적으로 80% 이상, 더욱 구체적으로 90% 이상의 높은 상동성을 갖는 염기서열도 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[0027] 또한, 본 발명은 본 발명의 조성물을 포함하는 정상안압녹내장 진단용 키트에 관한 것이다.

[0028] 본 발명의 키트는 RT-PCR, 실시간(real-time) PCR, 등온 PCR, 노던 블랏팅, RNA 보호분석법 또는 마이크로어레이 칩용인 것일 수 있으나, 이에 한정하는 것은 아니다.

[0029] 본 발명의 키트는, 상기 정상안압녹내장 진단용 조성물을 이용하여 상기 hsa-let-7a-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7f-5p, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-375, hsa-miR-4510, hsa-miR-4639-5p, hsa-miR-6777-5p, hsa-let-7b-3p 및 hsa-miR-222-3p 중에서 선택된 하나 이상의 microRNA의 발현수준을 측정함으로써 정상안압녹내장을 진단할 수 있다. 구체적으로, 상기 키트는 RT-PCR 키트일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적인 예로, 상기 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. 예를 들어, RT-PCR 키트는, 상기 hsa-let-7a-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7f-5p, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-375, hsa-miR-4510, hsa-miR-4639-5p, hsa-miR-6777-5p, hsa-let-7b-3p 및 hsa-miR-222-3p 중에서 선택된 하나 이상의 microRNA에 대한 특이적인 각각의 프라이머 외에도 테스트 튜브

또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 디옥시뉴클레오티드(dNTPs), 디디옥시뉴클레오티드(ddNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNAse 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있으며, 정량 대조군으로 사용되는 DNA, RNA 또는 miRNA에 특이적인 프라이머 쌍을 포함할 수 있다.

[0030] 또한, 본 발명은 전혈 또는 혈청에서, hsa-let-7a-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-let-7f-5p, hsa-miR-192-5p, hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-375, hsa-miR-4510, hsa-miR-4639-5p, hsa-miR-6777-5p, hsa-let-7b-3p 및 hsa-miR-222-3p 중에서 선택된 하나 이상의 microRNA의 발현수준을 측정하는 단계; 및

[0031] 상기 miRNA 발현 수준을 정상 대조군 시료의 해당 miRNA 발현 수준과 비교하는 단계;를 포함하는 정상안압녹내장의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0032] 상기 발현수준은 차세대 염기서열 분석(Next generation sequencing; NGS), 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection assay; RPA), 마이크로어레이(microarray), 및 노던 블롯팅(northern blotting) 중에서 선택되는 1종 이상의 방법으로 측정되는 것이 바람직하지만 이에 한정하는 것은 아니다.

[0033] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[0034] **1. 환자 및 방수 시료의 채택**

[0035] 본 발명에서 사용한 방수 시료는 사전 동의를 얻은 후 백내장 수술을 시행한 환자 중에서 문제가 없었던 환자로부터 채취하였다.

[0036] 정상안압 녹내장(NTG) 환자 6명은 국소 약물만 사용하여 안정적으로 관리하였고, 본 발명에 참여하기로 동의한 7명의 연령대가 일치하는 대조군 피험자를 채택하였다.

[0037] 백내장 수술 전에 30 게이지 바늘을 사용하여 약 80~120㎕의 방수를 획득하였다. 방수를 획득하는 과정에서 모든 피험자들은 외상없이 수행하여 세포의 잔존물 또는 혈액에 대한 오염의 가능성을 배제시켰다. 수집한 모든 시료(방수)는 즉식 액체질소에 옮겨 급냉상태로 보관하였다.

[0038] 임상 데이터는 전자의료 기록에서 확인한 것으로 완벽하게 익명화된 방식으로 수집하였다. 수집된 임상 데이터는 연력, 성별, 눈의 좌우방향성, 기준 IOP, 사용된 국소 안약 및 안구 동반질환을 포함하였다(표 1).

[0039] 본 발명에서 실시한 임상실험은 헬싱키 선언의 원칙에 따라 수행되었으며, 경상대학교 창원병원 의과대학(GNUCH-2019-06-001-002) 기관심의위원회의 승인을 받았고, 본 발명에 등록된 모든 피실험자로부터 사전 동의서를 받았다. 모든 방법은 관련 지침과 규정에 따라 수행되었다.

표 1

[0040] 환자 및 대조군 정보

#	그룹	나이	성별	Eye Laterality	Baseline IOP, mmHg	Topical Medication
1	NTG	56	F	Left	13	Latanoprost
2	NTG	57	M	Left	13	Latanoprost
3	NTG	55	M	Left	17	Dorzolamide/timolol
4	NTG	77	F	Right	14	Dorzolamide/timolol
5	NTG	72	F	Right	15	Latanoprost
6	NTG	76	F	Right	17	Tafluprost
7	NTG	76	F	Right	14	Latanoprost
8	NTG	74	F	Left	12	Dorzolamide/timolol
9	Control	75	F	Left	14	None
10	Control	57	F	Right	14	None
11	Control	76	F	Right	15	None
12	Control	54	M	Left	18	None
13	Control	53	M	Right	16	None
14	Control	71	F	Right	17	None

15	Control	61	M	Right	19	None

[0041] IOP; 안압, NTG; 정상안압 녹내장(Normal tension glaucoma), Phaco+PCL; 수정체유화술(acoemulsification) 및 후안렌즈삽입(posterior intraocularlens insertion)

[0042] **2. RNA 분리**

[0043] 총 RNA는 제조사의 지시에 따라 트라이졸(Trizol) LS 시약(인비트로젠, 미국)을 사용하여 추출하였다. RNA의 품질은 RNA 6000 Pico Chip(애질런트 테크놀로지스, 네덜란드)을 사용하여 Agilent 2100 생물 분석기로 평가하였고, RNA의 정량화는 NanoDrop 2000 분광광도계 시스템(써모 피셔과학, 미국)을 사용하여 실시하였다.

[0044] **3. 라이브러리 준비 및 RNA 시퀀싱**

[0045] 대조군 및 환자군의 RNA를 제조사의 지침에 따라 NEBNext 다중 소형 라이브러리 준비 키트(NEBNext Multiplex Small RNA Library Prep kit)(New England BioLabs, Inc., Ipswich, MA, USA)를 이용하여 라이브러리를 준비하였다.

[0046] 각 시료의 총 RNA 180pg을 어댑터 1㎍에 라이게이션하기 위하여 사용하였고, 이후 어댑터별 특이적 프라이머 및 역전사 효소를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 라이브러리 증폭을 위해, 정상안압녹내장 환자군 및 대조군에서 채취한 방수에서 microRNA를 NGS(Next Generation Sequencing)기법인 RNA sequencing을 사용하여 발현양상을 분석하였다.

[0047] 그 결과 도 1 및 표 2에 개시한 바와 같이, 방수에 존재하는 miRNA 중에서 대조군 대비 정상안압녹내장 환자군에서의 발현량 변화가 큰 12종의 miRNA를 선별하였고, 선별된 12종의 miRNA 발현 수준이 하기 표 2에 개시한 바와 같이 대조군 대비 정상안압녹내장 환자군에서 발현량이 2배 이상 증가 또는 감소하였다는 것을 최종 확인하였다.

표 2

[0048] 정상군 대비 정상안압녹내장 환자에 발현량이 증가 또는 감소한 miRNA

miRNA	서열(5'->3')	서열 번호	Accession Number	Fold change (Log2)	p-value	발현 변화
hsa-let-7a-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	1	MIMAT0000062	2.744	0.009	up
hsa-let-7c-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU	2	MIMAT0000064	6.081	0.018	up
hsa-let-7f-5p	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU	3	MIMAT0000067	4.570	0.044	up
hsa-miR-192-5p	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC	4	MIMAT0000222	6.564	0.031	up
hsa-miR-10a-5p	UACCCUGUAGAUCCGAAUUUGUG	5	MIMAT0000253	21.733	0.015	up
hsa-miR-10b-5p	UACCCUGUAGAACCGAAUUUGUG	6	MIMAT0000254	201.495	0.033	up
hsa-miR-375	CCCCGCGACGAGCCCCUCGCACAAACCGGACCUGAGCGUUUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGAGGC	7	MI0000783	234.233	0.005	up
hsa-miR-4510	GUGUAUGUGAGGGAGUAGGAUGUAUGGUUGUUAGAUAGACAACUACAAUCUUUUCUCACAACAGACAG	8	MI0016876	3.083	0.012	up
hsa-miR-4639-5p	UUGCUAAGUAGGCUGAGAUUGA	9	MIMAT0019697	0.161	0.040	down
hsa-miR-6777-5p	ACGGGGAGUCAGGCAGUGGUGGA	10	MIMAT0027454	0.208	0.045	down
hsa-let-7b-3p	CUAUACAACCUACUGCCUUCCC	11	MIMAT0004482	2.522	0.043	up
hsa-miR-222-3p	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU	12	MIMAT0000279	12.412	0.049	up

[0049] **4. 정량적 실시간 PCR 분석**

[0050] cDNA 합성 및 실시간 PCR 분석은 miScript PCR 시스템에서 수행하였다. cDNA는 제조업체의 지침에 따라 HiSpec 버퍼가 있는 miScript II RT Kit를 사용하여 357pg의 RNA로부터 합성하였다.

[0051] 일례로, hsa-let-7c-5p(5'-UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU-3', MS00003129) 및 내부 제어 hsa-U6(Hs_RNU6-2_11, MS00033740)의 프라이머 쌍을 사용하여 증폭하였고, 실시간 PCR은 제조업체의 지침에 따라 QuantiTect SYBR Green PCR Master 믹스 및 MiScript 프라이머 어세이를 사용하여 StepOnePlus 실시간 PCR 시스템(미국, Foster

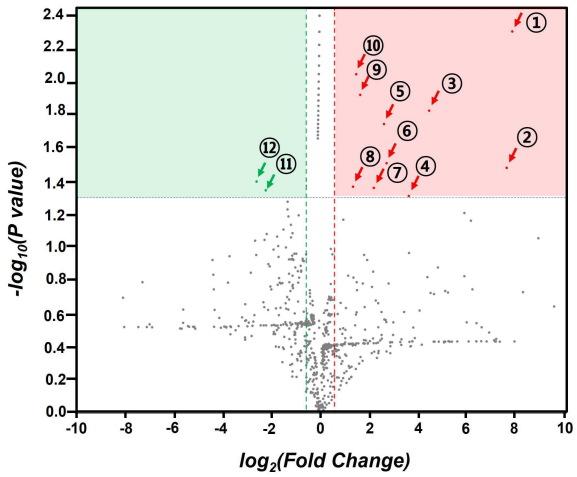
City, CA)에서 수행되었다. 조건은 95℃에서 15분, 94℃에서 15초, 55℃에서 30초, 70℃에서 30초 유지하기를 40 사이클 수행하였다. 데이터 분석은 StepOne 소프트웨어 v2.2.2(Applied Biosystems)를 사용하였다. 각 마이크로RNA의 발현수준은 중앙 Ct 값으로 정규화하였고, $2^{-\Delta\Delta CT}$ 방법으로 계산하였다.

[0052] 이와 같은 분석을 통해 최종 선정된 miRNA의 발현량 변화와 p값을 기준으로, 표 3에 개시한 miRNA를 선정하였다.

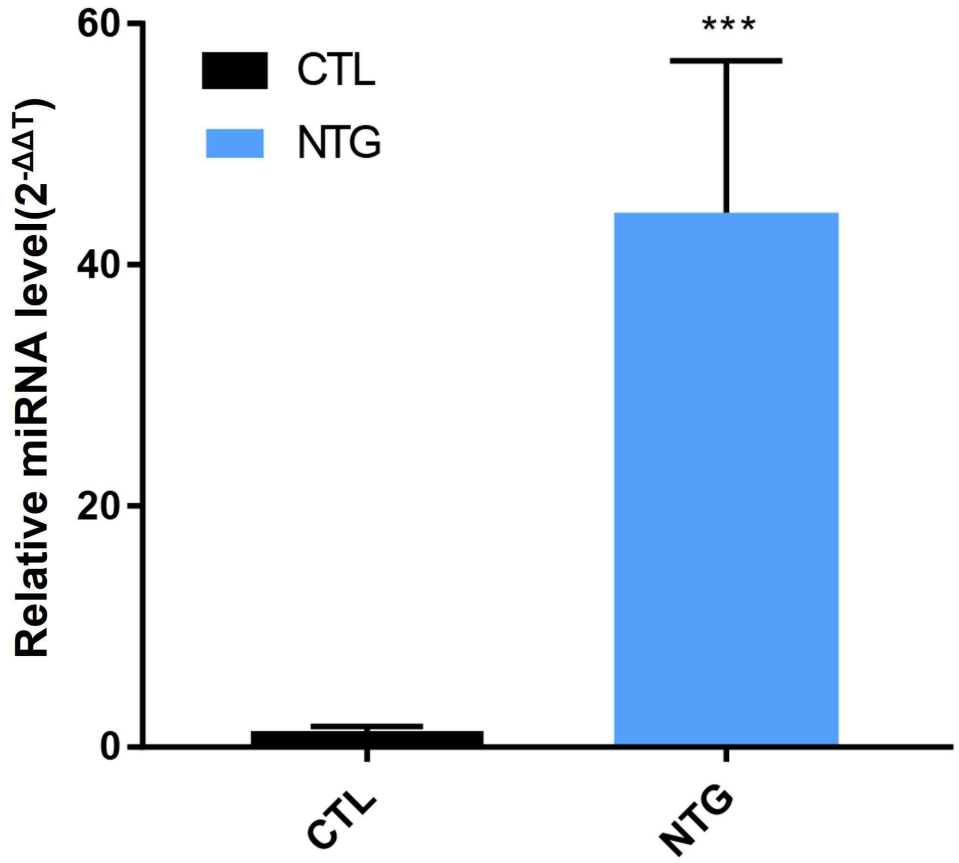
[0053] 도 2에 개시한 바와 같이, 대조군(CTL) 대비 정상안압녹내장 환자군에서의 miRNA(hsa-let-7c-5p)의 발현량이 통계적으로 유의미하게 증가하였다.

도면

도면1



도면2



서 열 목 록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> miRNA biomarker for diagnosis of normal tension glaucoma and uses thereof

<130> PN21283

<160> 12

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 22

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

ugagguagua gguuguauag uu 22

<210> 2

<211> 22

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

ugagguagua gguuguaugg uu 22

<210> 3

<211> 22

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

ugagguagua gauuguauag uu 22

<210> 4

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

cugaccuaug aauugacagc c 21

<210> 5

<211> 23

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

uacccuguag auccgaauuu gug 23

<210> 6

<211> 23

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

uacccuguag aaccgaauuu gug 23

<210> 7

<211> 64

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

ccccgcgacg agccccucgc acaaaccgga ccugagcguu uuguucguuc ggcucgcgug 60

aggc 64

<210> 8

<211> 68

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

guguauguga gggaguagga uguaugguug uuagauagac aacuacaauc uuuucucaca 60

acagacag 68

<210> 9

<211> 22

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

uugcuaagua ggcugagauu ga 22

<210> 10

<211> 23

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

acggggaguc aggcaguggu gga 23

<210> 11

<211> 22

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

cuauacaacc uacugccuuc cc 22

<210> 12

<211> 21

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

agcuacaucu ggcuacuggg u 21