(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

정정판

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020 년 11 월 26 일 (26.11.2020)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2020/235767 A9

(51) 국제특허분류:
C12Q 1/6883 (2018.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2020/000767

(22) 국제출원일: 2020 년 1 월 16 일 (16.01.2020)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2019-0058902 2019 년 5 월 20 일 (20.05.2019) KR

(71) 출원인: 이화여자대학교 산학협력단 (**EWHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION**) [KR/KR]; 03760 서울시 서대문구 이화여대길 52, Seoul (KR). 중앙대학교 산학협력단 (**CHUNG ANG UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION**) [KR/KR]; 06974 서울시 동작구 흑석로 84, Seoul (KR). 건국대학교 산학협력단 (**KONKUK UNIVERSITY INDUSTRIAL COOPERATION CORPORATION**) [KR/KR]; 05029 서울시 광진구 능동로 120, 건국대학교 내, Seoul (KR).

(72) 발명자: 류인균 (**LYOO, In Kyoon**); 06501 서울시 서초구 신반포로 9, 94동 309호, Seoul (KR). 김정윤 (**KIM, Jung Yoon**); 06320 서울시 강남구 개포로 303, 101동 606호, Seoul (KR). 윤수정 (**YOON, Su Jung**); 05572 서울시 송파구 올림픽로4길 15, 9동 301호, Seoul (KR). 강효정 (**KANG, Hyo Jung**); 06975 서울시 동작구 서달로 91, 103동 602호, Seoul (KR). 한정수 (**HAN, Jung Soo**); 04713 서울시 성동구 행당로 79, 110동 1306호, Seoul (KR).

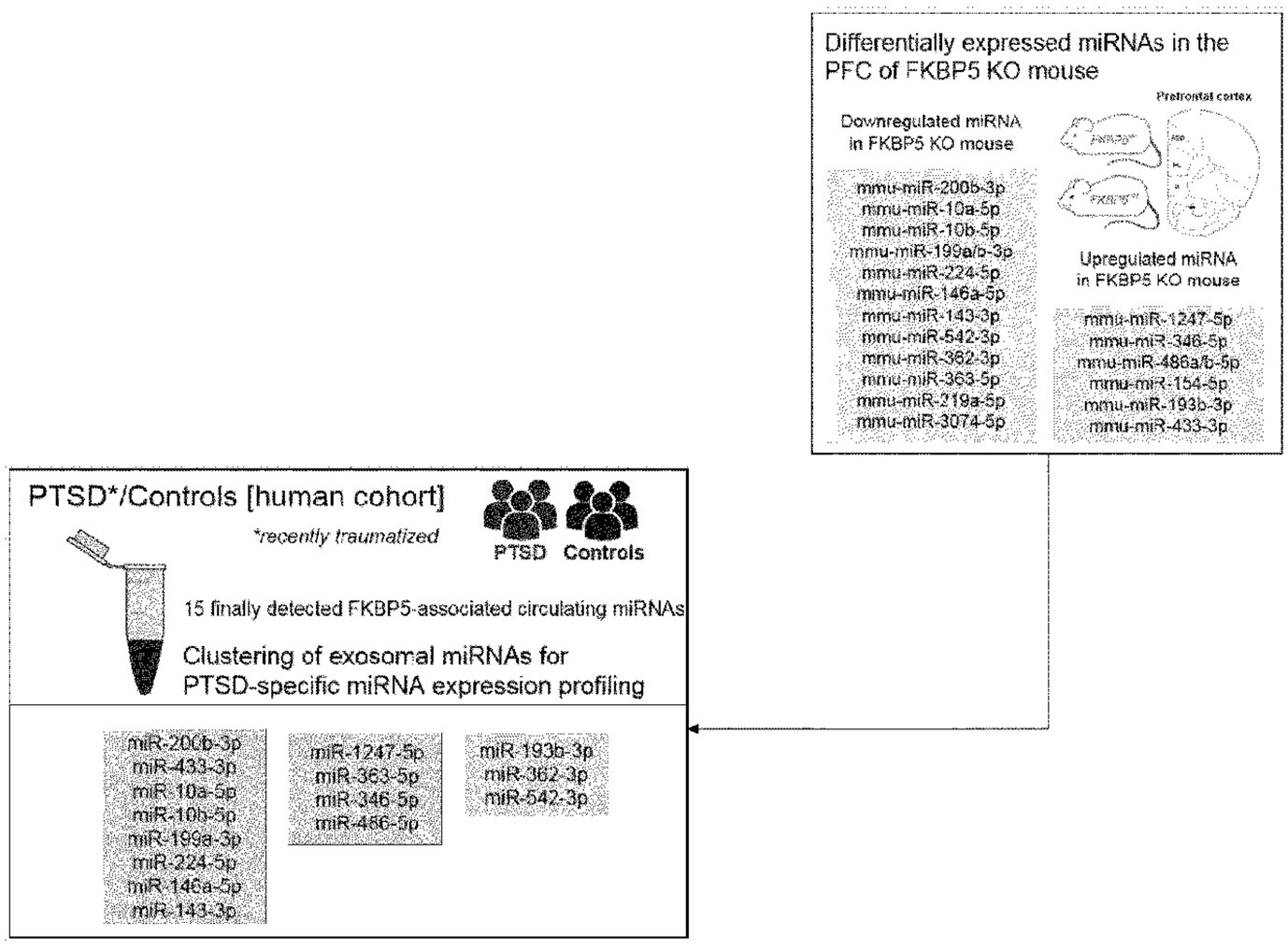
(74) 대리인: 특허법인 무한 (**MUHANN PATENT & LAW FIRM**); 06144 서울시 강남구 언주로 560, 8층 (역삼동, 화물재단빌딩), Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC,

(54) **Title:** BIOMARKER FOR DIAGNOSIS OR PREDICTION OF POST-TRAUMATIC STRESS DISORDER, AND USE THEREOF

(54) **발명의 명칭:** 외상 후 스트레스 장애 진단 또는 예측용 바이오마커 및 그의 용도

[도1]



(57) **Abstract:** The present invention relates to a biomarker for diagnosis or prediction of post-traumatic stress disorder, and a use thereof and, more particularly, to a method of providing information for diagnosis or prediction of post-traumatic stress disorder by using the biomarker.

(57) **요약서:** 본 발명은 외상 후 스트레스 장애의 진단 또는 예측용 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 상기 바이오마커를 이용한 외상 후 스트레스 장애의 진단 또는 예측을 위한 정보제공방법에 관한 것이다.

[다음 쪽 계속]

WO 2020/235767 A9

EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 규칙 91.3(b) 규정에 의한 명백한 잘못의 정정 허가에 관한 정보와 함께 (규칙 48.2(i))

(88) 국제조사보고서 공개일:
2021 년 4 월 29 일 (29.04.2021)

(48) 본 정정판 공개일:
2021 년 6 월 3 일 (03.06.2021)

(15) 정정사항에 관한 정보:
2021 년 6 월 3 일 (03.06.2021) 자 공지 참조

명세서

발명의 명칭: 외상 후 스트레스 장애 진단 또는 예측용 바이오마커 및 그의 용도

기술분야

[1] 본 발명은 외상 후 스트레스 장애의 진단 또는 예측용 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 상기 바이오마커를 이용한 외상 후 스트레스 장애의 진단 또는 예측용 조성물, 외상 후 스트레스 장애의 진단 또는 예측을 위한 정보제공방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 현대 사회는 급격히 발전되고 다변화됨에 따라 현대인들에게 여러 가지 역할을 요구하며, 이에 따라 각종 스트레스로 인한 범불안 장애 및 정신질환을 호소하는 사람들이 증가하고 있다. 보건복지부가 발표한 「2016년도 정 신질환실태 역학조사」에 따르면, 2016년 1년간 한가지 이상의 정신질환 경험 인구비율인 '정신질환 일년유병율'은 18세 이상 64세 이하의 성인 약 8명 중 1명인 12.1%로 나타났다. 또한, 2016년 현재 평생 동안 한 가지 이상의 정신질환 경험 인구비율인 '정신질환 평생유병율'도 성인 약 4명 중 1명인 26.6%로 나타났다. 아울러, 최근 과도한 학구열 또는 각종 스트레스로 인해 청소년 정신질환이 증가하는 추세를 감안한다면, 전체 인구의 유병률은 더욱더 높다고 할 수 있다. 이러한 스트레스는 일상에 만연되어 있는 요인으로 인해 유발되고, 이에 적절히 대처하지 못하는 경우 우울, 불안, 피로, 분노, 기분 변화와 같은 심리 반응 및 뇌파 중 α-파 감소, 혈압과 맥박수의 증가 등의 생리 반응을 초래할 수 있다.

[3] 특히, 스트레스가 병적인 상태까지 발전하는 외상 후 스트레스 장애(PTSD, Post Traumatic Stress Disorder, 이하, 'PTSD'라 한다)는 극심한 외상성 사건에 노출된 후 뒤따라서 나타나는 외상의 재경험, 외상관련 자극 회피, 증가된 각성반응, 감정과 인지 변화 등의 증상이 나타나는 것을 의미한다. 여기에서, 외상성 사건이라 함은 전쟁, 폭행, 유괴, 인질, 사고 등 생명의 위협을 느낄 정도의 큰 사건들이 해당된다.

[4] 최근에 큰 재앙과 같은 사건들을 직접 또는 간접 경험한 사람들에서 PTSD가 나타날 수 있는데, 특히, 소방공무원, 경찰공무원 등 직업상 일반적인 스트레스에 노출될 뿐만 아니라, 많은 사건 사고들을 접할 수밖에 없기 때문에 PTSD에 이환될 확률이 높다. 이러한 PTSD는 다른 정신 장애와 동반되기 쉽고 다른 정신 장애와 증상이 유사할 수 있기 때문에 외상성 사건을 경험한 특정 사람이 실제 PTSD에 이환되고 타 정신 장애가 아닌 PTSD를 가질 가능성 및 진단 정확도를 수치로 제시해 주고, 전문가가 이 수치를 기반으로 PTSD를 정확하게 진단하는 것이 필요하다.

[5] 또한, 현재까지는 PTSD의 진단에 있어 주로 증상에 대한 자가보고형 설문조사

및 면담 조사 등이 활용되었기 때문에 PTSD의 예측과 진단에 대하여 객관적이고 과학적인 지표를 사용하면서 개인적 특성을 고려한 체계가 부재한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[6] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 외상 후 스트레스 장애를 객관적이고 과학적으로 진단, 예측할 수 있는 바이오마커를 발굴하고자 노력하였다. 그 결과, 15개의 microRNA가 외상 후 스트레스 장애를 객관적으로 진단 또는 예측하는 마커로 이용될 수 있음을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

[7] 본 발명의 목적은 microRNA를 이용한 외상 후 스트레스 장애의 진단 또는 예측용 조성물을 제공하는 것이다.

[8] 본 발명의 다른 목적은 microRNA를 이용한 외상 후 스트레스 장애의 진단 또는 예측을 위한 정보제공방법을 제공하는 것이다.

[9] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

[10] 본 발명의 일 실시예에 따르면, miR-200b-3p, miR-433-3p, miR-10a-5p, miR-10b-5p, miR-199a-3p, miR-224-5p, miR-146a-5p, miR-143-3p, miR-1247-5p, miR-363-5p, miR-346-5p, miR-486-5p, miR-193b-3p, miR-362-3p, miR-542-3p으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 microRNA 또는 이의 상보적인 염기서열에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는, 외상 후 스트레스 장애의 진단 또는 예측용 조성물이 제공된다.

[11] 본 발명의 따른 일 실시예에 따르면, 상기 조성물을 포함하는, 외상 후 스트레스 장애 진단용 키트가 제공된다.

[12] 일 측에 따르면, 상기 키트는 역전사 중합효소연쇄 반응(reverse transcriptase PCR) 키트, 정량적 실시간 중합효소반응(quantitative real time PCR) 키트, RNA 칩 키트, DNA 칩 키트, ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트일 수 있다.

[13] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, i) 분리된 생물학적 시료로부터 miR-200b-3p, miR-433-3p, miR-10a-5p, miR-10b-5p, miR-199a-3p, miR-224-5p, miR-146a-5p, miR-143-3p, miR-1247-5p, miR-363-5p, miR-346-5p, miR-486-5p, miR-193b-3p, miR-362-3p, miR-542-3p으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 microRNA의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[14] ii) 상기 단계 i)에서 측정된 microRNA의 발현 수준을 정상 대조군의 대응하는 microRNA의 발현 수준을 비교하는 단계를 포함하는, 외상 후 스트레스 장애의 진단 또는 예측을 위한 정보제공방법이 제공된다.

[15] 일 측에 따르면, 상기 단계 i)에서 측정된 microRNA의 발현 수준이 정상

대조군과 비교하여 유의하게 증가 또는 감소된 경우 외상 후 스트레스 장애 고위험군인 것으로 판단할 수 있다.

[16] 일 측에 따르면, microRNA의 발현 수준은 역전사 중합효소연쇄 반응(reverse transcriptase PCR), 정량적 실시간 중합효소반응(quantitative real time PCR), 마이크로칩, DNA 마이크로어레이, 비드 분석법(Bead assay) 및 SAGE(serial analysis gene expression), RNA sequencing으로 구성된 군으로부터 선택되는 방법에 의하여 측정될 수 있다.

[17] 일 측에 따르면, 상기 생물학적 시료는 말초혈액 시료일 수 있다.

발명의 효과

[18] 본 발명의 15개 microRNA는 *FKBP5* 유전자 녹아웃 마우스에서 발현이 유의한 변화를 보임과 더불어 외상 후 스트레스 장애로 진단된 환자에 적용 가능함이 확인되었으므로, 이들은 외상 후 스트레스 장애의 진단 및 예측에 있어 과학적이고 객관적인 마커로 이용될 수 있다.

[19] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[20] 도 1은 외상 후 스트레스 장애 진단 또는 예측용 바이오마커의 발굴 과정을 도식화하여 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[21] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 그러나, 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있어서 특허출원의 권리 범위가 이러한 실시예들에 의해 제한되거나 한정되는 것은 아니다. 실시예들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물이 권리 범위에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.

[22] 실시예에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[23] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[24] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[25] 본 명세서에서 사용된 용어 "외상 후 스트레스 장애(Post-traumatic stress disorder; PTSD)"는 외상 및 스트레스 관련 장애로 재분류된 불안 장애로서, 생명을 위협하는 상황에 반응하여 야기될 수 있는 정신 질환 중 하나를 의미한다.

[26] 본 명세서에서 사용된 용어, "microRNA(마이크로 RNA, miRNA)"는 생물의 유전자 발현을 제어하는 역할을 하는 작은 RNA를 의미하며, 타겟 messenger RNA (이하 mRNA)의 3'UTR(untranslated region)과의 상보적인 염기쌍 배열에 의한 타겟 mRNA 번역의 억제를 통해, 유전자 발현 과정에서 중요한 조절 역할을 할 수 있는 20~25개의 뉴클레오티드를 포함하는 RNA를 의미한다. 이러한 microRNA는 증식, 분화, 세포사멸 등을 포함하는 세포 기능에 있어서 중요한 역할을 하며, 모든 동물에 존재하는 진화적으로 보존된 조절 물질로서, 일부 microRNA는 그 프로모터 부위와 관련된 후성유전학적 조절 기전(히스톤 변형, DNA 메틸화 등)을 통해 유전자 발현 조절을 일으킨다고 알려져 있다.

[27] 본 발명에서 용어 "마커"란 외상 후 스트레스 장애가 발생한 개체와 정상 개체를 구분하여 판정할 수 있는 물질로, 정상 개체에 비하여 외상 후 스트레스 장애를 가지는 개체에서 정상 대조군에 비해 증가 또는 감소 양상을 보이는 폴리펩타이드 또는 핵산(예: mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질, 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함한다. 본 발명의 목적상, 본 발명의 외상 후 스트레스 장애 진단 또는 예측용 바이오 마커는 microRNA로서, 특히 말초혈액에서 발현이 증가 또는 감소하는 microRNA이다.

[28] 본 명세서에서 사용된 용어, "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는 지 여부를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)을 포함한다. 본 발명의 목적상, 진단은 외상 후 스트레스 장애의 발병 여부를 확인하는 것과 관련된다.

[29] 본 명세서에서 사용된 용어, "예측"이란 환자가 자연재해, 전쟁, 교통사고, 범죄 피해 등의 외상성 사건에 노출된 후 외상 후 스트레스 장애로 진단될 지 여부에 대한 가능성과 관련된다.

[30] 본 명세서에서 사용된 용어, "프로브"란 microRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧게는 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링 되어 있어서 특정 microRNA의 존재 유무를 확인할 수 있다.

[31] 본 명세서에서 사용된 용어, "프라이머"는 짧은 자유 3말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 갖는 핵산 서열로 상보적인 템플릿(template)과 염기쌍을 형성할 수 있고 템플릿 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다.

[32] 본 발명자들은 *FKBP5* 유전자 녹아웃 마우스에서 발현이 유의하게 변화한 15개의 mircro RNA를 발견하고, 외상 후 스트레스 장애(이하, "PTSD")로 진단된 환자군 48명과 정상 대조군 47명의 말초혈액을 채취하고, 이 혈액으로부터 분리된 엑소좀(exosome)의 exosomal microRNA를 분석하여 두 군간에 차이가 있으며, 이를 PTSD의 진단 또는 예측에 적용 가능함 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[33] 따라서, 본 발명의 일 실시예에 따르면, miR-200b-3p, miR-433-3p, miR-10a-5p, miR-10b-5p, miR-199a-3p, miR-224-5p, miR-146a-5p, miR-143-3p, miR-1247-5p, miR-363-5p, miR-346-5p, miR-486-5p, miR-193b-3p, miR-362-3p, miR-542-3p으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 microRNA 또는 이의 상보적인 염기서열에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는, 외상 후 스트레스 장애의 진단 또는 예측용 조성물이 제공된다.

[34] 여기에서, 프라이머 또는 프로브는 상기 microRNA를 검출하기 위해 사용되는 것으로, 검출이란 정량 및/또는 정성 분석을 포함하여 존재, 부존재의 검출 및 발현량의 검출을 포함하는 것을 의미한다.

[35] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 상기 조성물을 포함하는, 외상 후 스트레스 장애 진단용 키트가 제공된다.

[36] 이러한 키트로는 해당 기술 분야에서 공지된 다양한 키트를 사용할 수 있고, 역전사 중합효소연쇄 반응(reverse transcriptase PCR) 키트, RNA 칩 키트, DNA 칩 키트, ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트를 예로 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[37] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, i) 분리된 생물학적 시료로부터 miR-200b-3p, miR-433-3p, miR-10a-5p, miR-10b-5p, miR-199a-3p, miR-224-5p, miR-146a-5p, miR-143-3p, miR-1247-5p, miR-363-5p, miR-346-5p, miR-486-5p, miR-193b-3p, miR-362-3p, miR-542-3p으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 microRNA의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[38] ii) 상기 단계 i)에서 측정된 microRNA의 발현 수준을 정상 대조군의 대응하는 microRNA의 발현 수준과 비교하는 단계; 를 포함하는, 외상 후 스트레스 장애의 진단 또는 예측을 위한 정보제공방법이 제공된다.

[39] 상기 정보제공방법에서, 상기 단계 i)에서 측정된 microRNA의 발현 수준이 정상 대조군에 비해 유의하게 증가 또는 감소하는 경우, 외상 후 스트레스 장애 고위험군인 것으로 판단할 수 있다.

[40] 여기에서, 생물학적 시료란 바이오마커 검출이 가능한 하나 이상의 성분을

포함하는 물질 또는 물질의 혼합물을 일컫는 것으로, 생물체, 특히 인간 유래의 세포, 조직 또는 체액, 예를 들면 전혈, 뇨, 혈장, 및 혈청 등을 의미한다.

[41] 구체적으로, 본 발명의 정보제공방법에서는 말초혈액을 생물학적 시료로 이용하는 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니며, 예를 들어 타액, 뇨, 혈청, 혈장 등이 사용될 수 있다.

[42] 본 발명의 정보제공방법에서 microRNA의 발현 수준은 역전사 중합효소반응연쇄 반응(reverse transcriptase PCR), 정량적 실시간 역전사 중합효소반응(quantitative real time PCR), 마이크로칩, DNA 마이크로어레이, 비드 분석법(Bead assay) 및 SAGE(serial analysis gene expression), RNA sequencing으로 구성된 군으로부터 선택되는 방법에 의하여 측정될 수 있다.

[43] 한편, 외상 후 스트레스 장애는 외상성 사건 노출된 이후 증상이 나타나는 시기가 개인에 따라 다르기 때문에 외상성 사건 노출 직후에 발병하지 않고 수개월 또는 수년이 지난 이후에 발병할 수도 있다. 따라서, 본 발명의 정보제공방법을 이용한 외상 후 스트레스 장애의 진단 또는 예측은 특정 기간, 예를 들어 1년에 걸쳐 수차례 수행될 수 있으며, 발현 패턴의 변화를 모니터링하는 데에 사용될 수 있다.

[44] 또한, PTSD를 가진 환자들은 우울증, 불안 장애와 같은 다른 공존 정신 질환이 많은 편이므로, 본 발명의 microRNA들을 우울증, 불안 장애 등의 다른 정신과적 질환의 진단 또는 예측을 위한 바이오 마커로 사용하는 것도 가능하다.

[45] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하기로 한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 목적으로 기술된 것으로서, 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.

[46]

[47] **실시예 1: microRNA의 발굴**

[48] *FKBP5* 유전자 녹아웃 마우스와 야생형 C57BL/6마우스를 준비하고, 두 마우스 뇌의 내측 전전두피질 (medial prefrontal cortex) 안에 있는 microRNA를 추출 및 정제 후 cDNA 활용한 역전사 중합효소반응연쇄 반응(reverse transcriptase PCR)을 실시하여 염기서열을 분석(시퀀싱, sequencing)하였다. 다음으로, 각 RNA 조각을 마우스 참조 염기서열을 활용하여 각 유전자의 발현량을 야생형 C57BL/6 마우스의 발현 수준 대비 *FKBP5* 유전자 녹아웃 마우스의 발현 수준을 배수(fold change)로 계산한 후 두 마우스 간에 차이가 있는 microRNA를 분류하였다. 그 결과, 41개의 microRNA가 두 mouse간 유의한 차이가 있는 것으로 확인되었고, 41개의 microRNA 중에서 인간에 적용 가능한 microRNA는 15개였다.

[49]

[50] **실시예 2: 말초혈액에서의 exosomal microRNA 발현량 확인 및 비교**

[51] 실시예 1에서 선별된 15가지 microRNA가 실제 인간에 적용 가능함을 확인하기 위해, 외상 후 스트레스 장애로 진단된 48명의 환자와, 정상 대조군 47명의

말초혈액을 채취하고, 혈액으로부터 exosomal microRNA를 분리하였다. 분리된 microRNA의 발현 수준은 하기 표1에 명기된 15개 microRNA의 염기서열(sequence)에 대한 정량적 실시간 역전사 중합효소반응(quantitative real time PCR)을 이용하여 측정하였다.

[52] 그 다음, 외상 후 스트레스 장애 환자군과 정상 대조군 혈액에서의 발현 수준을 비교하기 위하여, 정상 대조군 혈액에서의 발현 수준 대비 외상 후 스트레스 장애 환자군 혈액에서의 발현 수준을 배수(fold change)로 계산한 후 로그 변환(log 2 transformation)한 값을 구하여 로지스틱 회귀 분석으로 두 군의 유의미한 차이가 있는 miRNA를 확인하였다. 두 군간의 상대적인 발현량을 비교하기 위하여 정상 대조군의 값의 평균(mean) 과 표준편차(SD)를 이용하여 z 표준화 값을 (z score) 산출하였다.

[53] 그 결과, 하기 표 1에 나타낸 바와 같이 15개의 miRNA의 발현량을 측정하여 확인할 수 있었으며, miR-10a-5p, miR-10b-5p, miR-199a-3p, miR-224-5p, miR-146a-5p, miR-143-3p, miR-363-5p, miR-346-5p, miR-486-5p, miR-193b-3p는 외상 후 스트레스 장애 환자군과 정상대조군 간에 유의한 증가가 있는 것으로 확인되었다($P<0.05$).

[54]

[표1]

miRNAs	Sequence	Standardized relative expression in PTSDz scores, mean (SD)	*z*	*P* values
miR-200b-3p	UAAUACUGCCUGGUAAUGAUGA	-0.335 (1.240)	-1.43	0.15
miR-433-3p	AUCAUGAUGGGCUCCUCGGUGU	0.150 (1.015)	0.73	0.47
miR-10a-5p	UACCCUGUAGAUCCGAAUUUGUG	0.687 (0.846)	3.27	0.001
miR-10b-5p	UACCCUGUAGAACCGAAUUUGUG	0.515 (0.674)	2.74	0.006
miR-199a-3p	ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA	0.598 (0.929)	2.79	0.005
miR-224-5p	UCAAGUCACUAGUGGUUCCGUUUAG	0.575 (1.004)	2.64	0.008
miR-146a-5p	UGAGAACUGAAUUCCAUGGGUU	0.562 (1.009)	2.57	0.01
miR-143-3p	UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC	0.501 (0.915)	2.42	0.02
miR-1247-5p	ACCCGUCCCGUUCGUCCCCGGA	0.333 (1.052)	1.56	0.12
miR-363-5p	CGGGUGGAUCACGAUGCAAUUU	0.506 (1.051)	2.30	0.02
miR-346-5p	UGUCUGCCCGCAUGCCUGCCUCU	0.560 (0.866)	2.71	0.007
miR-486-5p	UCCUGUACUGAGCUGCCCCGAG	0.420 (0.856)	2.11	0.04
miR-193b-3p	AACUGGCCCUCAAAGUCCCGCU	0.395 (0.791)	2.06	0.04
miR-362-3p	AACACACCUAUUCAAGGAUUCA	0.074 (0.904)	0.38	0.70
miR-542-3p	UGUGACAGAUUGAUAACUGAAA	0.244 (1.180)	1.08	0.28

[55] 따라서, 본 발명에서 miR-200b-3p, miR-433-3p, miR-10a-5p, miR-10b-5p, miR-199a-3p, miR-224-5p, miR-146a-5p, miR-143-3p, miR-1247-5p, miR-363-5p, miR-346-5p, miR-486-5p, miR-193b-3p, miR-362-3p, miR-542-3p은 마우스 모델에서 유의한 발현량 차이가 발견되었을 뿐만 아니라 외상 후 스트레스 장애 환자에서도 측정 가능함이 확인 되었으므로, 외상 후 스트레스 장애 고위험군을 판별하기 위한 바이오 마커로 사용될 수 있다.

[56] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및 변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

[57] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

청구범위

[청구항 1] miR-200b-3p, miR-433-3p, miR-10a-5p, miR-10b-5p, miR-199a-3p, miR-224-5p, miR-146a-5p, miR-143-3p, miR-1247-5p, miR-363-5p, miR-346-5p, miR-486-5p, miR-193b-3p, miR-362-3p, miR-542-3p으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 microRNA 또는 이의 상보적인 염기서열에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는, 외상 후 스트레스 장애의 진단 또는 예측용 조성물.

[청구항 2] 제1항의 조성물을 포함하는, 외상 후 스트레스 장애 진단용 키트.

[청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 키트는 역전사 중합효소연쇄 반응(reverse transcriptase PCR) 키트, 정량적 실시간 중합효소반응(quantitative real time PCR) 키트, RNA 칩 키트, DNA 칩 키트, ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 키트, 단백질 칩 키트, 래피드(rapid) 키트 또는 MRM(Multiple reaction monitoring) 키트인, 외상 후 스트레스 장애 진단용 키트.

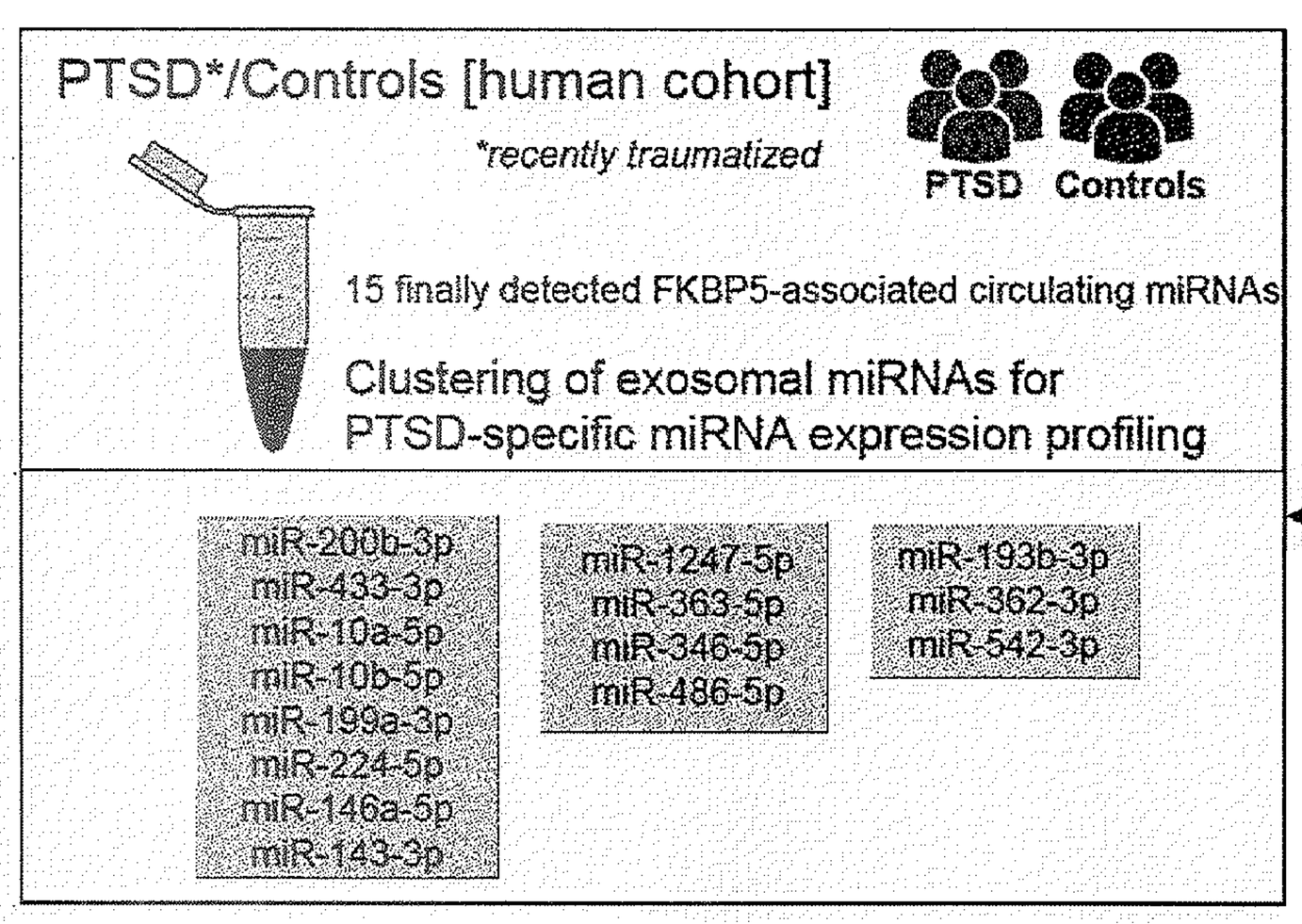
[청구항 4] i) 분리된 생물학적 시료로부터 miR-200b-3p, miR-433-3p, miR-10a-5p, miR-10b-5p, miR-199a-3p, miR-224-5p, miR-146a-5p, miR-143-3p, miR-1247-5p, miR-363-5p, miR-346-5p, miR-486-5p, miR-193b-3p, miR-362-3p, miR-542-3p으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 microRNA의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
ii) 상기 단계 i)에서 측정된 microRNA의 발현 수준을 정상 대조군의 대응하는 microRNA의 발현 수준과 비교하는 단계; 를 포함하는, 외상 후 스트레스 장애의 진단 또는 예측을 위한 정보제공방법.

[청구항 5] 제4항에 있어서,
상기 단계 i)에서 측정된 microRNA의 발현 수준이 정상 대조군과 비교하여 유의하게 증가 또는 감소한 경우 외상 후 스트레스 장애 고위험군인 것으로 판단하는, 정보제공방법.

[청구항 6] 제4항에 있어서,
microRNA의 발현 수준은 역전사 중합반응연쇄 반응(reverse transcriptase PCR), 정량적 실시간 역전사 중합효소반응(quantitative real time PCR), 마이크로칩, DNA 마이크로어레이, 비드 분석법(Bead assay) 및 SAGE(serial analysis gene expression), RNA sequencing으로 구성된 군으로부터 선택되는 방법에 의하여 측정되는, 정보제공방법.

[청구항 7] 제4항에 있어서,
상기 생물학적 시료는 말초혈액 시료인, 정보제공방법.

도 1



정정용지 (규칙 제91조) ISA/KR

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2020/000767

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/6883(2018.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q 1/6883; C12Q 1/68; C12Q 1/6851; G01N 33/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 외상 후 스트레스 장애(post traumatic stress disorder,PTSD), miR(microRNA), 진단(diangosis), 예방(prevent), 키트(kit)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2017-0247761 A1 (THE HENRY M. JACKSON FOUNDATION FOR THE ADVANCEMENT OF MILITARY MEDICINE, INC.) 31 August 2017. See claims 1, 11-12, 24 and 32, and paragraphs [0014]-[0015] and [0030].	1-7
X	JP 2018-522558 A (THE HENRY M. JACKSON FOUNDATION FOR THE ADVANCEMENT OF MILITARY MEDICINE, INC.) 16 August 2018. See claims 1, 2 and 4, and paragraph [0007].	1-7
A	US 2014-0073524 A1 (INSTITUTE FOR SYSTEMS BIOLOGY) 13 March 2014. See entire document.	1-7
A	MARTIN, C. G. et al. Circulating miRNA associated with posttraumatic stress disorder in a cohort of military combat veterans. Psychiatry Research. electronic publication : 31 January 2017, vol. 251, pp. 261-265. See entire document.	1-7

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
16 March 2021	**16 March 2021**
Name and mailing address of the ISA/KR **Korean Intellectual Property Office** **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208** Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2020/000767

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2018-0118670 A (THE UNIVERSITY OF BIRMINGHAM) 31 October 2018. See entire document.	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2020/000767

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
US 2017-0247761 A1	31 August 2017	EP 3198013 A1	02 August 2017
		EP 3198013 B1	12 June 2019
		US 10358679 B2	23 July 2019
		WO 2016-049429 A1	31 March 2016
JP 2018-522558 A	16 August 2018	EP 3329005 A2	06 June 2018
		US 2018-0216187 A1	02 August 2018
		WO 2017-019976 A2	02 February 2017
		WO 2017-019976 A3	23 March 2017
US 2014-0073524 A1	13 March 2014	EP 2893039 A1	15 July 2015
		EP 2893039 B1	09 May 2018
		US 9856532 B2	02 January 2018
		US 2014-0073516 A1	13 March 2014
		WO 2014-039893 A1	13 March 2014
KR 10-2018-0118670 A	31 October 2018	CN 110291210 A	27 September 2019
		CN 109415769 A	01 March 2019
		EP 3426796 A1	16 January 2019
		EP 3574117 A1	04 December 2019
		JP 2019-509044 A	04 April 2019
		KR 10-2019-0111967 A	02 October 2019
		US 2019-0085395 A1	21 March 2019
		US 2018-0127828 A1	10 May 2018
		US 10563262 B2	18 February 2020
		WO 2017-153710 A1	14 September 2017
		WO 2018-138468 A1	02 August 2018

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2020/000767

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/6883(2018.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12Q 1/6883; C12Q 1/68; C12Q 1/6851; G01N 33/68

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드:외상 후 스트레스 장애(post traumatic stress disorder,PTSD), miR(microRNA), 진단(diangosis), 예방(prevent), 키트(kit)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	US 2017-0247761 A1 (THE HENRY M. JACKSON FOUNDATION FOR THE ADVANCEMENT OF MILITARY MEDICINE, INC.) 2017.08.31 청구항 1, 11-12, 24, 32, 단락 [0014]-[0015], [0030]	1-7
X	JP 2018-522558 A (THE HENRY M. JACKSON FOUNDATION FOR THE ADVANCEMENT OF MILITARY MEDICINE, INC.) 2018.08.16 청구항 1, 2, 4, 단락 [0007]	1-7
A	US 2014-0073524 A1 (INSTITUTE FOR SYSTEMS BIOLOGY) 2014.03.13 전체 문헌	1-7
A	MARTIN, C. G. 등, “Circulating miRNA associated with posttraumatic stress disorder in a cohort of military combat veterans”, Psychiatry Research, 전자공개 : 2017.01.31, 제251권, 페이지 261-265 전체 문헌	1-7
A	KR 10-2018-0118670 A (더 유니버시티 오브 버밍험) 2018.10.31 전체 문헌	1-7

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2021년 03월 16일 (16.03.2021)	2021년 03월 16일 (16.03.2021)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
허주형
전화번호 +82-42-481-8150

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2020/000767

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2017-0247761 A1	2017/08/31	EP 3198013 A1	2017/08/02
		EP 3198013 B1	2019/06/12
		US 10358679 B2	2019/07/23
		WO 2016-049429 A1	2016/03/31
JP 2018-522558 A	2018/08/16	EP 3329005 A2	2018/06/06
		US 2018-0216187 A1	2018/08/02
		WO 2017-019976 A2	2017/02/02
		WO 2017-019976 A3	2017/03/23
US 2014-0073524 A1	2014/03/13	EP 2893039 A1	2015/07/15
		EP 2893039 B1	2018/05/09
		US 2014-0073516 A1	2014/03/13
		US 9856532 B2	2018/01/02
		WO 2014-039893 A1	2014/03/13
KR 10-2018-0118670 A	2018/10/31	CN 109415769 A	2019/03/01
		CN 110291210 A	2019/09/27
		EP 3426796 A1	2019/01/16
		EP 3574117 A1	2019/12/04
		JP 2019-509044 A	2019/04/04
		KR 10-2019-0111967 A	2019/10/02
		US 10563262 B2	2020/02/18
		US 2018-0127828 A1	2018/05/10
		US 2019-0085395 A1	2019/03/21
		WO 2017-153710 A1	2017/09/14
		WO 2018-138468 A1	2018/08/02