(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017 년 1 월 19 일 (19.01.2017)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2017/010789 A1

(51) 국제특허분류:
C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2016/007560

(22) 국제출원일: 2016 년 7 월 12 일 (12.07.2016)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2015-0099743 2015 년 7 월 14 일 (14.07.2015) KR

(71) 출원인: **한국과학기술연구원 (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)** [KR/KR]; 02792 서울시 성북구 화랑로 14 길 5, Seoul (KR).

(72) 발명자: **임혜인 (IM, Heh-In)**; 02792 서울시 성북구 화랑로 14 길 5, Seoul (KR).

(74) 대리인: **특허법인 충현 (CHUNG HYUN PATENT & LAW FIRM)**; 06779 서울시 서초구 동산로 23 베델회관 8 층, Seoul (KR).

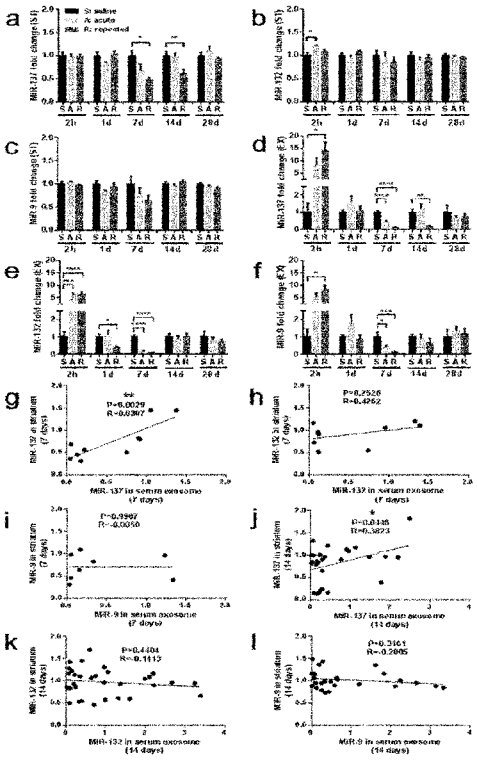
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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).

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: BIOMARKER FOR DIAGNOSIS DRUG ADDICTION AND KIT FOR DIAGNOSIS OF DRUG ADDICTION

(54) **발명의 명칭** : 마약 중독 여부 진단용 바이오마커 및 마약 중독 여부 진단용 키트



(57) **Abstract**: The present invention relates to a biomarker for diagnosis of drug addiction and a kit for diagnosis of drug addiction. The biomarker for diagnosis of drug addiction and the kit for diagnosis of drug addiction according to the present invention can determine drug addition by using a molecular biological method. Especially, it was molecular biologically established how microRNA functions in the human brain due to drug addiction, and it was established that the microRNA is delivered to blood or serum using exosomes as a delivery unit. Therefore, the problem, in which even though the change in the microRNA expression aspect in the brain is confirmed, only the change in the expression aspect in the brain was difficult to directly and simply apply in the clinical trials, was solved.

(57) **요약서**: 본 발명은 마약 중독 여부 진단용 바이오마커 및 마약 중독 여부 진단용 키트에 관한 것이다. 본 발명에 따른 마약 중독 여부 진단용 바이오마커 및 마약 중독 여부 진단용 키트는 분자생물학적인 방법을 동원하여 마약 중독 여부를 판별하는 것이 가능하다. 특히 마이크로 RNA 가 마약 중독으로 인해 인체의 뇌에서 어떻게 기능하는지를 분자생물학적으로 규명하고, 상기 마이크로 RNA 가 엑소좀을 이동 수단으로 하여 혈액 또는 혈청까지 이동하는 양상을 규명하였다. 그리하여 뇌에서 마이크로 RNA 의 발현 양상 변화를 확인하더라도, 뇌에서 발현 양상 변화만을 가지고는 임상에 직접적이면서 간단하게 적용하기 어려웠던 문제점 해결하였다.

WO 2017/010789 A1

규칙 4.17 에 의한 선언서:

— 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 마약 중독 여부 진단용 바이오마커 및 마약 중독 여부 진단용 키트

기술분야

[1] 본 발명은 마약 중독 여부 진단용 바이오마커 및 마약 중독 여부 진단용 키트에 관한 것이다.

배경기술

[2] 일반적으로 "마약(narcotics)"은 아편 및 이의 유도체와 유사한 효과를 가지는 화합물을 의미하고, 사전적으로는 모르핀, 코케인, 노스카핀, 파파베린, 테바인, 헤로인 등의 습관성 또는 중독성 약물을 포함하는 양귀비 식물로부터 유래된 자연 배합물인 아편성 약물 또는 아편 유사 약물로 정의된다. 어떠한 화합물이 마약으로 분류되기 위해서는 "감정 및 행동의 중대한 변화"를 유발할 수 있어야 하고, "혼수의 무통"의 상태를 유발할 수 있어야 하며, 의존성, 내성 및 중독과 같은 심각한 위험을 나타낼 수 있음을 입증하여야 한다.

[3] 대부분의 마약 중독자들은 처음에는 유희, 오락, 또는 진통을 목적으로 마약성 물질을 투여하게 되지만, 점차적으로 마약성 물질에 중독되면서 좀 더 강력한 마약을 찾게 된다. 이들 마약중독자들의 공통적인 병리학적 증세로는 피로, 정서적 불안정, 반-혼수 상태, 구토 등을 들 수 있고, 전기 증세가 심화되면 반사회적, 반윤리적인 행동을 취하게 되어, 결과적으로는 사회적인 문제를 발생시키기 때문에, 마약 중독 여부를 진단하는 것은 대단히 중요한 문제가 되었다.

[4] 또한, 이러한 병리학적인 증상을 보이는 원인을 규명하기 위해 여러 연구들이 수행되고 있는 실정이다. 하지만 이러한 연구들 중 마약 중독으로 인한 정서적 불안 등의 원인을 분자생물학적으로 규명한 후, 이러한 원인의 해결 및 마약 중독 여부를 진단하기 위한 노력은 많이 부족한 것이 현실이다.

[5] 한편 마이크로 RNA는 생물의 유전자 발현을 제어하는 역할을 하는 작은 RNA로서, mRNA와 상보적으로 결합해 세포 내 유전자 발현과정에서 중추적인 조절인자로 작용한다는 사실이 밝혀지면서 새롭게 주목을 끌기 시작했다.

[6] 하지만, 선행 연구들은 이러한 마이크로 RNA가 마약 중독에 있어서 어떻게 작용하는지를 분자생물학적으로 규명하고, 이를 바탕으로 마약 중독 여부를 판별하는 바이오마커 또는 마약 중독 치료제를 개발하기 위한 연구는 많이 이뤄지지 않은 문제점이 있다.

[7] 특히 마약 중독으로 인해 뇌에서 발현 양상이 변화하는 마이크로 RNA의 경우에는, 뇌에서의 발현 양상이 변화하는 상기 마이크로 RNA가 마약 중독 여부를 판별하는 중요한 단서가 될 수 있음에도, 뇌에서 이를 직접 추출하여 판별한다는 것이 상당히 제한적이고 어렵다는 이유로 임상에서 직접적이면서

간편하게 적용되기 어렵다는 문제점이 있었다.

[8] 한편, 본원발명과 관련된 선행기술문헌으로는 대한민국 등록특허 제10-0715939호(특허문헌 1)가 있으며, 상기 특허문헌 1은 황금추출물, 베타인 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 하고, 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 마약 중독 치료제에 관한 것이다. 하지만, 이러한 특허문헌 1에서도 분자생물학적인 방법을 동원하여 마약 중독 여부를 판별하는 바이오마커나 마약 중독 진단용키트에 관하여는 어떠한 개시 또는 암시조차 되어 있지 않다.

[9] [선행기술문헌]

[10] [특허문헌]

[11] 대한민국 등록특허 제10-0715939호

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[12] 본 발명은 상술한 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 마약 중독 여부를 판별하는 바이오마커 및 마약 중독 여부 진단용 키트를 제공하는 것이다. 특히 이러한 마약 중독으로 인한 이상 행동의 원인 및 기작을 분자생물학적으로 규명하고, 이를 바탕으로 마약 중독 여부를 판별하는 바이오마커를 제공하고자 한다. 이때 상기 바이오마커는 마이크로 RNA를 이용하여 제공하고자 하며, 상기 마이크로 RNA를 이용함에 있어서 임상에서 보다 직접적이면서 간편한 방법으로 적용할 수 있는 바이오마커를 제공하는 것이다. 또한 이러한 바이오마커가 포함된 마약 중독 여부 진단용 키트를 제공하고자 하는 것이다.

과제 해결 수단

[13] 위와 같은 과제를 해결하기 위한 본 발명의 한 특징에 따른 마약 중독 여부 진단용 바이오마커는 서열번호 1로 표시되는 마이크로 RNA-137 또는 서열번호 2로 표시되는 이의 상보적 염기서열인 것을 특징으로 한다.

[14] 또한 상기 마이크로 RNA-137은 중독이 발병한 뇌에서 발현 양상이 변화한 것으로서, 상기 뇌에서 발현 양상이 변화한 마이크로 RNA-137은 엑소좀에 포함되어 혈액 또는 혈청으로 이동하며, 상기 엑소좀에 포함되어 혈액 또는 혈청으로 이동한 마이크로 RNA-137을 추출하여 마약 중독 여부를 진단하는 것을 특징으로 한다.

[15] 본 발명의 또 다른 특징에 따른 마약 중독 여부 진단용 키트는 상기 바이오마커에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브, 또는 상기 서열번호 1 또는 이의 상보적 염기서열에 코딩되는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함한다.

발명의 효과

[16] 본 발명에 따른 마약 중독 여부 진단용 바이오마커 및 마약 중독 여부 진단용 키트는 분자생물학적인 방법을 동원하여 마약 중독 여부를 판별하는 것이

가능하다. 특히 마이크로 RNA가 마약 중독으로 인해 인체의 뇌에서 어떻게 기능하는지를 분자생물학적으로 규명하고, 상기 마이크로 RNA가 엑소좀을 이동 수단으로 하여 혈액 또는 혈청까지 이동하는 양상을 규명하였다. 그리하여 뇌에서 마이크로 RNA의 발현 양상 변화를 확인하더라도, 뇌에서 발현 양상 변화만을 가지고는 임상에 직접적이면서 간단하게 적용하기 어려웠던 문제점 해결하였다.

도면의 간단한 설명

[17] 도 1은 정상 상태의 생쥐 뇌에서 miRNAs, miR-137, -132, -9의 발현 정도를 조사하기 위해 형광직접보합법을 실시한 결과이다.

[18] 도 2는 코케인을 반복적으로 주입한 생쥐 뇌에서 miRNAs, miR-137, -132, -9의 발현 양상 변화를 측정한 결과이다.

[19] 도 3은 메스암페타민에 중독된 환자 혈청 엑소좀에서의 miR-137, -132, -9의 변화와 이러한 변화를 반영하는 민감도와 특이도를 보여주는 그래프이다.

[20] 도 4는 혈청의 엑소좀이 전달하는 마이크로 RNA가 뇌에서 유래한다는 것을 증명하기 위한 그래프이다.

[21] 도 5는 마지막 코케인 주입 후, 소뇌에서의 마이크로 RNA-137, -132, -9 의 변화를 나타내는 그래프이다.

[22] 도 6은 마지막 코케인 주입 후, Exosome deplecated serum (EDS)에서 엑소좀 마이크로 RNA-137, -132, -9 의 변화를 나타내는 그래프이다.

[23] 도 7은 상기 도 2의 추가 실험으로서, 코케인을 반복적으로 주입한 생쥐 뇌에서 miRNAs, miR-137, -132, -9의 발현 양상 변화를 측정한 결과이다.

[24] 도 8은 메스암페타민에 중독된 환자 혈청 엑소좀을 메스암페타민을 중단한 시간(1년이하 vs 1년이상)별로 나누어 대조군의 혈청 엑소좀과 세 가지 마이크로 RNA(miR-137, -132, -9)의 발현양상을 비교한 그래프이다.

[25] 도 9는 다양한 조건에서의 엑소좀에 쌓여진 마이크로 RNA의 안정성을 비교하는 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[26] 이에 본 발명자들은 마약 중독으로 인한 이상 행동의 원인을 분자생물학적으로 규명하여 마약 중독 여부를 진단하는 바이오마커와 이를 포함하는 마약 중독 여부 진단용 키트를 개발하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 본 발명에 따른 마약 중독 여부 진단용 바이오마커 및 마약 중독 여부 진단용 키트를 발견하여 본 발명을 완성하였다.

[27] 일반적으로 약물 중독을 비롯한 신경정신질환의 조기 진단은 효과적인 치료를 위해 매우 중요하다. 특히 마약과 같은 약물이 투여되는 경우 뇌에서 가장 먼저 반응하며, 이러한 반응으로서 뇌에서 특정 유전자 발현 양상의 변화나 호르몬 발현 변화 등이 일어나게 된다. 한편, 마이크로 RNA(microRNAs, miRNAs)는 18-23 개의 뉴클레오티드들로 구성된 짧은 비암호화 RNA(non-coding RNA)로

세포 내에서 전달 RNA(messenger RNA, mRNA)의 번역과 분해를 조절하는 기능을 한다. 최근 많은 miRNA들이 조직 특이성이 있어 혈액 기반 생체지표가 될 수 있음이 보고되었다. 많은 양의 miRNA들이 혈장이나 혈청에서 자유롭게 혹은 엑소좀(exosome)에 싸인 채로 순환하고 있는데, 엑소좀은 세포 내에 존재하는 다소포체(multi-vesicular body)로부터 유래한 작은 소포(40-100 nm)들로 세포 밖으로 분비된다. miRNA들은 주로 세포 자신을 조절하지만 엑소좀 같은 소포에 싸인 miRNA들은 세포 간 신호전달에 관여할 것으로 예상된다.

[28] 그리하여 이러한 연구 결과를 기반으로 본 발명자들은, 마약 중독시 뇌에서 유의성 있게 발현 양상이 변화하는 특정 마이크로 RNA가 존재할 것이라고 예상하였다. 결과적으로, 본 발명자들은 본 발명에서 개시된 miR-137이 마약중독시 뇌에서 유의성 있게 발현이 감소됨을 관찰하였다(이하 본 발명의 '평가예' 참고). 하지만, 이렇게 뇌에서 마약 중독으로 인해 특정 마이크로 RNA 발현 양상이 유의하게 변화한다 하더라도, 뇌 조직에서 이러한 마이크로 RNA를 직접 추출하여 마약 중독 여부를 진단하거나 치료하는데 이용한다는 것이 매우 어렵다는 문제점이 있다. 그리하여 본 발명자들은 마약 중독으로 인해 뇌 조직에서 발현 양상이 변화하는 특정 마이크로 RNA(miR-137)를 발견하였을 뿐만 아니라, 이러한 특정 마이크로 RNA(miR-137)는 뇌에서 엑소좀에 의해 혈액 또는 혈청으로 보내지고, 이러한 혈액 또는 혈청을 통해 직접 추출하는 것이 가능하여 임상에서도 직접적이면서 간편하게 상기 특정 마이크로 RNA를 추출하는 것이 가능함을 실험적으로 구현함에 성공하였다. 그리하여 이러한 특정 마이크로 RNA(엑소좀내 miR-137; exosomal miR-137)를 이용하여 마약 중독 여부를 판별하는데 활용할 수 있게 되었다. 이하 이러한 본 발명에 대해 보다 구체적으로 살펴보기로 한다.

[29] 구체적으로 본 발명에 따른 마약 중독 여부 진단용 바이오마커는 서열번호 1로 표시되어 이루어지는 마이크로 RNA-137 또는 서열번호 2로 표시되는 이의 상보적 염기서열인 것을 특징으로 한다.

[30] 한편, 상기 마이크로 RNA-137은 인간의 뇌에서 마약 중독으로 인해 발현 양상이 변화한다. 또한 이렇게 뇌에서 발현 양상이 변화한 마이크로 RNA-137은 엑소좀에 둘러싸인 상태로 혈액 또는 혈청으로 이동하게 된다. 이렇게 엑소좀에 둘러싸인 상태로 혈액 또는 혈청으로 이동하게 되면, 뇌에서 발현 양상이 변화한 마이크로 RNA-137을 혈액 또는 혈청에서 추출하는 것이 가능하게 된다. 그리하여 뇌에서 마아크로 RNA-137을 추출하여 발현 양상을 확인할 필요 없이, 혈액 또는 혈청에서 마이크로 RNA-137을 추출하여 마약 중독 여부를 진단하는 바이오마커로 활용하는 것이 가능하게 된다. 결국, 본 발명에 따른 바이오마커는 마이크로 RNA-137을 활용하면서도, 신경전달물질인 엑소좀에 둘러싸인 상태로 마이크로 RNA-137이 혈액 또는 혈청으로 이동한다는 사실을 발견하여 이를 바이오마커로 활용하는 것으로서, 임상에서 직접적이면서 간편하게 마약 중독

여부를 진단할 수 있는 바이오마커에 해당한다.

[31] 상기 마이크로 RNA-137이 뇌에서 보이는 발현 양상의 변화는 특별한 제한이 있는 것은 아니지만, 통계적으로 유의성 있는 차이를 보일 정도로 발현 양상이 변화하는 것으로서, 상기 통계적으로 유의한 차이를 보이는 기준은 $P < 0.05$일 수 있다. 또한 상기 발현 양상의 변화는 발현이 증가 또는 감소하는 것일 수 있다.

[32] 즉, 이러한 본 발명에 따른 마약 중독 여부 진단용 바이오마커는 뇌에서 발현 양상이 변화하는 마이크로 RNA를 가지고 마약 중독 여부를 판별하는데 있어, 뇌에서 직접적으로 추출하지 않는 한 마이크로 RNA를 가지고 마약 여부를 판별하는데 활용하기 어렵다는 문제점을 해결하였다. 또한 마약 중독 여부를 분자생물학적으로 판별하여 진단하는 것에 관한 발명이다.

[33] 본 발명의 또 다른 특징에 따른 마약 중독 여부 진단용 키트는 본 발명에 따른 상기 바이오마커를 포함하는 것으로서,

[34] 서열번호 1로 표시되는 마이크로 RNA-137 또는 서열번호 2로 표시되는 이의 상보적 염기서열, 또는 이들의 단편, 또는 이들에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브, 또는 이들에 의해 코딩되는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 마약 중독 여부 진단용 키트이다.

[35] 상기 서열번호 1로 표시되는 마이크로 RNA-137에 특이적으로 결합하는 프로브는 서열번호 2로 표시되는 cDNA서열일 수 있다.

[36] 한편, 이렇게 특별한 제한 없이 당업계에 공지된 모든 진단용 키트가 포함되는 마약 중독 여부 진단용 키트의 바람직한 일실시예는 상기 서열번호 1로 표시되는 마이크로 RNA-137를 특이적으로 증폭시키는 것이 가능한 프라이머가 사용될 수 있으며, 상기 증폭은 PCR을 통해 이뤄질 수 있다. 이러한 프라이머로는 예를 들어 Applied Biosystems의 Cat. #: 4427975 (TaqMan MicroRNA Assay), Assay ID: 001129을 이용할 수 있다. 또한 이러한 PCR에는 dNTP, DNA 중합효소 및 완충용액으로 구성된 PCR 혼합물이 사용될 수 있다. 또한 각종의 표지효소가 상기 키트에 사용될 수 있다. 또한 상기 PCR 후의 세척용 완충용액 및 표지효소 반응 후의 세척용 완충용액이 사용될 수 있다.

[37] 이러한 마약 중독 여부 진단용 키트는 마이크로 RNA-137이 포함된 시료를 마약 중독 여부 진단용 키트의 고상 지지체에 PCR 혼합물과 함께 가하여 첫 번째 중합효소연쇄반응(PCR)을 수행할 수 있다. 그 후, 곧바로 부가의 프라이머를 가하여 두 번째 PCR을 수행할 수 있다. 그 후, 지지체를 PCR 후의 세척용 완충용액으로 세척할 수 있다. 그 후, 각종 표지효소 등을 사용하여 마이크로 RNA-137을 분석할 수 있으며, 이러한 과정을 통하여 마약 중독 여부를 진단할 수 있다.

[38] 한편, 이러한 마약 중독 여부 진단용 키트는 당업계에 공지된 모든 키트를 포함하는 것으로서, 당업계에 공지된 키트의 구성을 모두 포함할 수 있는 것이나, 이의 바람직한 일구성은 하기와 같다.

[39] 시료로부터 채취한 상기 바이오마커를 증폭시키는 프라이머;

[40] 중합효소 연쇄반응용 완충용액 및 효소;

[41] 중합효소 연쇄반응에 의한 증폭 산물을 마이크로 모세관 전기영동법에 의해 크기에 따라 이동분리시키는 이동분리수단을 포함한다.

[42] 상기 이동분리수단은 유리, 플라스틱 또는 실리콘 기판 위에 ㎛ 단위의 채널과 용기가 형성되어 있는 마이크로 모세관전기영동칩; 및 상기 마이크로 모세관전기영동칩 내의 상기 마이크로 RNA-137의 이동을 전기장에 의해 제어할 수 있는 이동제어수단을 포함할 수 있다. 또한 상기 이동분리수단에 의해 이동분리된 마이크로 RNA-137에는 형광물질이 부착되어 이동위치를 나타낼 수 있다. 상기한 구성에 의하면, 수 cm 크기의 칩 위에 여러 개의 시료를 분석할 수 있기 때문에 진단장치의 소형화 및 제조단가의 절감에 기여할 수 있다. 또한, PCR, 분리, 검출까지를 하나의 칩 위에서 수행하는 랩-온-어-칩(lab-on-a-chip) 개념이 도입되어 진단장치의 자동화 가능성도 크다. 또한 소량의 시료만으로도 진단이 가능하다는 장점이 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[43] 이하 본 발명을 바람직한 실시예를 참고로 하여 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[44]

[45] 실시예

[46] 코케인 등의 마약에 반복적으로 노출된 생쥐를 통해 뇌에서 중독에 관련된 부위인 선조체를 중심으로 마이크로 RNA의 변화 양상을 관찰하고, 이러한 변화의 양상이 엑소좀에 싸인 마이크로 RNA를 중심으로 혈액이나 혈청에서 관찰되는지 여부를 확인하였다. 더 나아가 이렇게 관찰된 엑소좀에 싸인 마이크로 RNA가 중독된 뇌 부위(선조체)로부터 말초로 이동한것인지 여부도 관찰하였다. 또한 이러한 엑소좀에 싸인 마이크로 RNA가 말초에서 뇌 부위의 변화를 그대로 반영한다면 중독이라는 뇌질환을 판단하는 biomarker로서 신뢰할 수 있을지 여부를 검증하였다. 구체적인 실험은 다음과 같이 진행하였다.

[47] 생쥐는 생리식염수 또는 코케인을 복강내로 처리하였다. 그리고 코케인 마지막 주입 후 뇌조직(등쪽, 배쪽 선조체, 소뇌)와 혈청 엑소좀을 서로 다른 시점에서 수집하였다. 뇌와 엑소좀 안에서의 마이크로 RNA-137의 변화는 qRT-PCR에 의해 분석되었다. 본 발명자들은 혈청 내에 엑소좀에 둘러싸인 마이크로 RNA가 뇌 조직에서 기원한 것인지를 결정하기 위해 WPRE와 copGFP절편을 포함한 렌티바이러스를 사용하였다.

[48] 그 결과 본 발명자들은, 코케인 등이 반복적으로 주입된 그룹에서 마지막으로 코케인에 노출된 후 7~28일이 경과한 시점에 dST(dorsal striatum) 및 혈청에 존재하는 엑소좀 안에서 마이크로 RNA-137이 현저히 감소하는 것을

확인하였다. 게다가 dST(dorsal striatum) 및 혈청에 존재하는 엑소좀의 발현 양상 변화에 강력한 상관관계가 있음을 확인하였다. 또한, 코케인과 같은 psychostimulant의 한 종류인 메스암페타민 중독자의 혈청내 엑소좀을 분석해본 결과 메스암페타민 사용을 중지한지 평균 2.4년이 된 후에도 엑소좀안의 마이크로 RNA-137만이 메스암페타민 중독환자를 구별해 낼 수 있음을 확인하였고, 이와 같은 결과는 biomarker의 신뢰도를 결정하는 AUC수치의 0.8 이상으로 상당히 유의미한 신뢰도를 보임을 관찰하였다. 이러한 엑소좀 안의 마이크로 RNA-137가 뇌내 선조체 유래 변화양상을 반영하는 것인지 검증해 보기 위해 체내에는 존재하지 않는 WPRE와 copGFP를 뇌내 선조체에 주입하고 혈청에 존재하는 엑소좀내에서 관찰되는지를 살펴보았다. 흥미롭게도 WPRE와 copGFO는 혈청에 존재하는 엑소좀 내에서 발견되었으며, 선조체(striatum)에서 WPRE와 copGFP는 주입후 30분부터 24시간까지 꾸준히 관찰되었고, 혈청에 존재하는 엑소좀에서 발견된 WPRE와 copGFP는 주입후 12시간이 경과한 시점부터 관찰되는 양이 유의미하게 증가하기 시작하였다. 이와더불어 본 발명자들은 마이크로 RNA-137을 포함하는 엑소좀 마이크로 RNAs는 혈청 내 엑소좀이 둘러싸이지 않은 마이크로 RNA와 비교하여 극단적인 온도 및 화학적 처리에도 안정한 것임을 확인하였다.

[49] 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 혈청내 존재하는 엑소좀 마이크로 RNA-137이 코케인 등 psychostimulant류 마약 중독 여부를 민감하게 진단하는 바이오마커로서 활용하는 것이 가능함을 확인하였다. 또한 이러한 결과를 통해 마약 중독 여부를 진단하기 위해 상기 마이크로 RNA를 추출함에 있어서, 뇌에서 직접 추출할 필요 없이 혈청에서 추출하여 간단히 진단하는 것이 가능함을 확인하였다. 그리하여 임상에서 보다 직접적이면서 간단한 방법으로 마약 중독 여부를 진단할 수 있게 되었다. 이하 이러한 결과를 도출하게 된 경위를 보다 구체적으로 살펴보기로 한다.

[50] **<실험에 쓰일 생쥐의 선정>**

[51] 무게가 21-24 g에 해당하는 C57BL/6J 수컷 생쥐(대한 바이오 링크, 대한민국)를 이하의 모든 실험에 사용하였다. 이들 생쥐는 철조망 격자무늬 뚜껑과 함께 투명한 플라스틱 우리들 안에 몇 개의 그룹(우리당 3-5 마리)으로 사육하였다. 그리고 12 시간을 주기로 하여 명암(오전 7시를 기준으로 빛 차단)을 조절하고, 음식 및 물의 공급 등을 유지하였다. 생쥐를 이용한 모든 실험의 사용 및 조절과 관련된 모든 절차는 한국과학기술연구원 동물실험윤리위원회 (Institution Animal Care and Use Committee serving the Korea Institute of Science and Technology)를 준수하여 진행되었다.

[52] **<형광직접보합법 (Fluorescence in situ hybridization(FISH)>**

[53] RNase의 활성을 막고, 조직을 함수 및 세척하기 위해 DEPC-PBS 용액에 5분 동안 넣었다. RNase를 비활성화시키고 RNA를 포함하는 조직 성분들을 재고정하기 위하여 4 % buffered paraformaldehyde 용액으로 약 10 분 동안 고정.

조직 내 단백질을 분해하기 위해 proteinase K 용액으로 상온에서 20 분 동안 배양하였다. 0.1 M TEA solution+0.25 % acetic acid에서 10 분 동안 acetylation. Hybridization solution 을 50℃ 수조에 충분히 녹인다. Hybridization solution에 DIG labeled RNA probe 를 섞었다. 절편 위에 RNA probe mixture를 놓고 Hybrislip(PGC, 62-6504-04, Frederick, MD, U.S.A.) 또는 plastic cover로 덮는다. 약 55 ℃ heat plate에서 하루 정도 배양하였다. 습윤실은 slide를 열판에 놓고 gauze에 물을 묻혀 슬라이드 주위에 충분히 놓은 후 큰 그릇으로 덮어서 밀폐하였다. 다음날, 배양기에서 꺼낸 후에 2X SSC-50% formamide 용액을 사용하여 50 ℃ 수조에서 10 분 동안 배양하였다. 배양 후 Hybrid slip을 제거하였고, 그 후 다시 2X SSC-50 % formamide 용액으로 50 ℃ 수조에서 20 분 동안 배양하였다. 2X SSC 용액을 50 ℃ 수조에서 10 분 동안 배양한 후에 상온 에서 10 분간 배양하였다. miRNA 발현이 충분히 많을 것으로 예상되는 경우에는 RNase/NTE buffer로 37 ℃ 수조에서 20 분간 배양하였다. anti-DIG antibody(1:1000 dilution in DIG 1 solution, Roche, 1-093-274, Mannheim, Germany)로 실온에서 2 시간 동안 배양하였다. 그 후, TSA plus kit를 사용하여 Dig이 바인딩한 시그널을 증폭시켜 현미경으로 확인하였다.

[54] <u><약물 및 코케인의 처리></u>

[55] 코케인 하이드로클로라이드(Macfarlan Smith Ltcl, UK)는 -생리식염수(saline, 0.9 % w/v)에 용해되었다. 반복적으로 투여된 코케인 그룹 (repeated group)은 20 mg/kg의 코케인을 매일 한 번씩 7 일 동안 복강 내로 주입하였다. 대조군(saline group)은 생리식염수를 매일 한 번씩 7일 동안 복강 내로 주입하였으며, 급성으로 투여된 코케인 그룹(acute group)6일 동안 생리식염수를 복강 내로 주입하고 마지막 7 일에 이루어졌다.

[56] <u><마약중독환자 혈액 샘플 채집></u>

[57] 을지대학교 서울강남을지병원 중독브레인센터에서 메스암페타민 중독 환자 혈액 샘플을 공급받았다. 또한 흡연의 경험이 없는 비슷한 연령대의 사람이 대조군으로 선정되었다. 모든 실험은 본인의 동의의사를 받아 진행하였으며, 한국과학기술연구원과 국립 부곡병원의 승인 하에 진행되었다.

[58] 한편, 상기 메스암페타민 중독 환자에 대한 정보는 하기 표 1(CTL; age-matched controls)과 같다.

[59] [표1]

Group	Gender	Age	Duration (year)	Abstinence (year)
Patients (n=20)	Male	48.9 ± 1.8	21.4 ± 1.8	2.4 ± 0.6
CTL (n=11)	Male	47.1 ± 2.3	-	-

[60] **<혈청과 뇌 조직의 준비>**

[61] 생쥐는 약물을 마지막으로 주입한 후 2 시간, 24 시간, 7 일, 14 일 그리고 28 일이 경과한 뒤에 경추탈골하여 희생시켰다. 전혈을 정맥 천자로부터 수집하였고 그리고 methamphetamine 중독 환자의 혈액샘플을 받아와 같은 방법으로 이후 실험이 진행되었다. 상온에서 45 분 동안 정처하여 혈청을 분리하였다. 그 후, 1,500 xg의 속도로 4 ℃에서 20 분 동안 원심분리하였다. 그 후 각각의 혈청 표본은 1.5 ㎖ 튜브로 옮겨 담았다. 그리고 즉각 엑소좀 분리 또는 RNA 추출에 사용하였다. 뇌 조직은 동물 희생 직후 분리하여 영하 80 ℃에서 얼렸고, 이후 영하 20 ℃ 냉동절편기(cryostat microtome, CM3050S, Leica)를 이용하여 100 ㎛의 두께로 잘라 등쪽 선조체(dorsal striatum, dST), 배쪽 선조체(ventral striatum, vST), 그리고 소뇌(cerebellum, Cbl) 절편을 수집하였다.

[62] **<엑소좀 분리-Exosome Isolation>**

[63] 시판되는 엑소좀 분리 시약인 ExoQuick™(System Biosciences Inc., Mountain View, CA, USA)을 이용하여 혈청 100 ㎕ 로부터 엑소좀을 분리하였으며 제조사가 추천하는 조작법을 따랐다. 요약하면, 시료의 1/4에 해당하는 부피의 ExoQuick Solution을 시료에 추가하여 혼합물을 만들어 4 ℃로 냉장보관 하였다. 다음 날 이 혼합물을 1,500 x g의 속도로 30 분 동안 원심분리 한 후 상청액을 제거하여 엑소좀을 얻었다. 이렇게 얻어진 엑소좀은 RNA 추출, 단백질 발현 분석(western blot), 또는 투과전자현미경(Transmission electron microscopy, TEM) 분석에 사용하였다. RNA 추출과 단백질 발현 분석을 위해서는 각각 10 ㎕의 차가운 인산염 완충 식염수(phosphate buffered saline, PBS)에, 투과전자현미경 분석을 위해서는 100 ㎕의 차가운 인산염 완충 식염수에 섞어 사용하였다.

[64] **<TEM-Transmission electron microscopy>**

[65] 분리된 엑소좀은 상온 (room temperature, RT)에서 1 시간 동안 1 %(v/v) 글루타알데하이드로 고정시키고 formvar formvar-coated 200 mesh copper grids (ProSciTech, Queensland, Australia)에 놓아두었다. 그리고 이들을 RT에서 마른 상태로 남겨뒀다. 격자무늬는 5 분 동안 물로 두 번 세척되었다. 그리고 10 분 동안 물로 1 %(v/v) 우라닐 아세테이트 1 %와 함께 얼룩이 남게 하였다. 이러한

이미지는 Gatan Ultra Scan 1000 (2 x 2k) CCD (charge-coupled device) camera coupled to a Tecnai F30 (FEI, Netherlands) electron microscope를 사용하여 200 kV의 전압을 가함으로써 가속화시켰다. 격자에서 10 가지 다른 지역에 나타난 얼룩은 각각 캡쳐되었다. 그리고 이러한 과정은 Image J software 1.43u(http://rsbweb.nih.gov/ij)을 사용하여 컴퓨터 이미지 분석을 통해 수행되었다. 이미지 스케일 세팅 후에, 이미지 안에서 소포의 양적이면서 개별적인 사이즈는 Image J as diameter에 의해 나타나는 것으로 측정되었다. 한편, 이미지의 가장자리에 위치하면서 완성되지 않은 소포는 제외하였다.

[66] <qRT-PCR에 의해 성숙한 마이크로 RNA의 양자화- Quantification of mature miRNA by qRT-PCR>

[67] 성숙한 마이크로 RNA의 발현은 특이 RT 프라이머(TaqMan MicroRNA Assay, Applied Biosystem, Cheshire, UK)를 사용하여 역전사 효소 작용 후에 수행되었다. 또한 샘플로부터 전체 RNA의 RT 50 ng는 cDNA의 준비에 사용되었다. 이러한 cDNA는 제조사의 프로토콜에 따라 Universal TaqMan Mix (with no Amperase Ung) 및 miRNA-specific primers(ABI)를 사용하여 quantitative real-time polymerase chain reaction(qRT-PCR)에 의해 증폭하였다. 이러한 반응은 CFX connect(BioRad, Reinach, Switzerland)에서 진행되었다. 모든 반응은 3 배로 수행되었다. 그리고 각 타켓의 상대적인 존재비는 뇌 조직용 작은 뉴클리오 RNA 및 정규화를 위한 혈청용 miRNA-16와 함께 계산되었다. 두 개의 그룹은 그들의 2-ddCt 가치에 의해 비교되었고, 유의성은 one-way analysis of variance(ANOVA)를 사용하여 계산되었다. 또한 $P<0.05$을 통계적 유의성의 기준으로 삼고 Dunnett's post hoc tests에 의해 진행되었다.

[68] 한편, LNA(Locked nucleic acid) 프로브 시퀀스 및 DNA thermalmelting temperatures™에 대한 정보는 하기 표 2와 같다.

[69] [표2]

LNA probe	Sequence (5'-3')	T_m (°C)
miR-137	CTACGCGTATTCTTAAGCAATAA	67
miR-132	CGACCATGGCTGTAGACTGTTA	76
miR-9	TCATACAGCTAGATAACCAAAGA	74
miR-122	AAACACCATTGTCACACTCCA	76
Scrambled	GTGTAACACGTCTATACGCCCA	78

[70] **<WPRE lenti-viral constructs>**

[71] pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP는 System Biosciences사로부터 구입하였다. 그리고 이는 사이토메갈로바이러스 프로모터의 조절 아래 WPRE(woodchuck posttranscriptional regulatory element)와 a copGFP reporter를 포함한다.

[72] **<Intrastriatal injection 절차>**

[73] Lenti-바이러스 벡터의 intra-striatal 관리를 위하여, 생쥐는 ip. 관리된 케타민-실라진(120 and 6 mg/kg)과 함께 마취시켰다. 그리고 생쥐를 뇌고정틀(Kopf Instruments, USA)에 위치시켰다. 세개의 바이러스성 서스펜션 주입(0.5 uL per injection; viral suspension concentrations ranged from 2.5x107 to 3.0x107 infectious units (IFU) per ml) 생쥐당 여섯 선조의 산출을 위해 선조체의 각 면에 전달되었다. 뇌고정을 준수하여 이루어진 주입은 1.10 mm from Bregma; mediolateral(ML), ㅁ1.00 mm from midline; dorsoventral(DV), -3.0, -2.5 and -2.0 mm below dura로 조직화되었다.

[74] **<Exosomal miRNA stability>**

[75] 24 시간 동안 4 ℃와 37 ℃의 상태인 RT 안에서 샘플들은 저장 상태로 전화되어 연구되었다. 엑소좀의 완전한 분열을 위하여 Triton X-100(Sigma)이 1 % 최종 농도로 추가되었다. 그리고 엑소좀들은 10 μg/Ml의 최종 농도 아래 RNase A (Sigma, St. Louis, MO, USA)와 함께 30 분 동안 RT에서 배양되었다.

[76] **<통계적 분석-Statistical Analysis>**

[77] 통계는 GraphPad Prism (V6.0, GraphPad, San Diego, CA, USA)에 의해 유의성의 차이에 접근하기 위하여 Dunnett post hoc test와 함께 unpaired t-test or one-way analysis of variance(ANOVA) 사용하여 계산되었다. 상관관계를 증명하기 위하여 Pearson coefficient는 계산되었다. 또한 모든 테스트에서 $P < 0.05$가 유의성을 보이는 수치로 고려되었다.

[78]

[79] **평가예**

[80] **<정상 생쥐 뇌에서의 마이크로 RNA 발현에 대한** 형광직접보합법의 관찰 결과>

[81] 정상상태의 뇌에서 마이크로 RNA의 발현 정도를 조사하기 위해 형광직접보합법을 실시하였다. 이의 결과는 하기 도1 과 같다. 뇌에 다량분포한다고 알려진 miR-137, -132, -9 와 뇌에 거의 발현이 안된다고 알려진 miR-122를 이용하여 형광직접보합법을 실시하였고, 특히 약물 중독에 관련이 있다고 알려진 striatum(ST)을 중점적으로 관찰하였다. miR-137은 dorsal striatum (dST) 에서 보통 정도로 발현이 되었고, ventral striatum (vST)에서 강하게 발현되었다(도 1 a). miR-132는 dST, vST 모두 강하게 발현되었다(도 1 b). miR-9는 상대적으로 약하게 발현되는 것으로 관찰되었으며, olfactory bulb, 해마, 소뇌등에서 vST가 dST보다 더 강하게 발현되는것으로 관찰되었다(도 1 c). 간에서 다량 발현되고 뇌에서는 거의 발현되지 않는다고 알려진 miR-122는 역시 뇌에서 거의 발현되지 않은 것을 확인하였다(도 1 d). 음성대조군으로 사용된 scramble은 뇌에서 발현되지 않았다(도 1 e).

[82]

[83] **<반복적인** 코케인 주입시 뇌와 엑소좀에서의 MiRNA-137 발현 양상 변화 측정

결과>

[84] 코케인을 반복적으로 주입한 후, 뇌에서 miRNAs, miR-137, -132, 및 -9의 발현 양상 변화를 측정하였다. 이의 결과는 하기 도 2와 같다.

[85] 하기 도 2에서 확인할 수 있는 바와 같이 7-28일이 경과한 후에는 miR-137의 경우 ST 에서 유의성(도 2의 그래프에서 에서 유의성 있는 변화를 보이는 경우는 '*'로 표시함) 있는 변화가 확인되었다(도 2 a). 하지만 2 시간 혹은 24 시간이 경과한 후에는 miR-137의 경우 유의성 있는 변화가 확인되지 않았다(도 2 a). 또한, miR-132의 경우 코케인 투여 후 2 시간 후에 유의성 있는 변화가 관찰되었다. miR-9의 경우는 어떠한 경우에도 유의성 있는 결과가 확인되지 않았다. 추가적으로 실시한 동일한 조건 하의 ST 부위별(dst, vst) miR-137 발현량 측정에서는 dST에서는 마지막 코케인 투여 후 7, 14, 28일에 유의성 있게 감소했지만, vST에서는 2 시간 후에 반복 투여군 에서만 증가한 결과를 보여준다(도 7 a, b). 이러한 결과를 통해 다른 miRNA 들에 비해 miR-137의 경우 코케인의 반복적 투여시 뇌에서 발현 양상이 유의하게 변화하는 miRNA 임을 확인할 수 있었다. 하지만, 추가적으로 실시한 소뇌 (cereblellum)에서의 miR-137, -132, -9의 발현량의 측정 결과 이러한 변화는 중독에 특별히 관련되어 있는 ST에 특이적인 것임을 되었다(도 5). 또한, 혈액을 구성하는 부분별로 마이크로 RNA의 발현 양상을 비교하기 위해 혈청을 exosomes(EX)와 exosome depleted serum(EDS)로 나누었다. 성숙한 miR-137, -132, and -9의 양은 qRT-PCR에 의해 Ct value로 계산하여 비교되었다. 놀랄만할 정도로, 뇌 조직에서 상당한 양으로 확인되던 miR-137, -132, -9는 코케인 노출 (Ct values of between 25~35, data not shown)에 대한 반응으로 볼 수 있을 정도로 EX에서 발견되었다(도 2 d-f). miR-137, -132, -9 모두 코케인 투여 2 시간 후에 현저하게 증가하고, miR-132의 경우 1 일 후부터 7 일까지 유의미하게 감소하는 양상을 보였다. 이와는 다르게 miR-137의 경우 코케인 투여 7 일후부터 28 일까지 현저하게 감소하는 양상을 보여주었다. miR-9의 경우 코케인 투여 7 일에서만 유의한 감소양상을 보였다(도 2 d-f). 결론적으로, miR-137의 경우 마지막 주입후 7-28 일이 경과하여도 반복적투여 그룹에서 유의미하게 감소하는 양상을 관찰할 수 있었지만, miR -132 또는 miR-9는 마지막 주입 후 14 일이후에는 발현의 유의적인 차이가 없었다(도 2 e-f). 하지만 EDS에서는 이러한 변화가 발견되지 않았다(도 6). 추가적으로, 본 발견자들은 EX와 EDS의 miRNA전달의 안정성을 다양한 조건에서 비교하였을 때, EX에서의 miRNA가 더욱 안정한 것을 확인하였다(도 9).

[86] 위 결과를 바탕으로, ST와 EX에서의 miR 발현의 연관성을 조사하였다(도 2 g-l). 그 결과 오직 miR-137의 발현이 ST의변화와 관련이 있는 것으로 밝혀졌다(도 2 g, j).

[87]

[88] **<메스암페타민 중독 환자 혈청에서의 miR-137의 변화>**

[89] 앞서 관찰된 마약성 물질에 대한 miR-137의 변화가 중독 환자의 혈청에서분리된 엑소좀에서도 재현되는지 여부를 보기 위해서 메스암페타민 중독 환자에서의 혈청샘플을 조사하였다(도 3). 그 결과, 메스암페타민 중독환자의 엑소좀에서 miR-137의 발현이 현저하게 줄어든 것을 관찰 하였다(도 3 a). 하지만, miR132와 miR-9에서는 변화가 관찰되지 않음이 확인되었다(도 3b, c). 또한, 이러한 변화가 동일한 연령의 대조군과 비교했을 때, miR-137만이 강한 민감도와 특이성을 보인다는 것을 증명하였다(도 3 d-f). 이러한 결과를 바탕으로, miR-137은 마약성물질 중독 여부를 판단하기 위한 매우 신뢰할만한 indicator라는 것이 증명되었다.

[90]

[91] **<u><뇌로부터 유래한 엑소좀 마이크로 RNA-137은 혈청에서 발견할 수 있음></u>**

[92] 본 발명자들은 혈청에서 추출한 엑소좀의 진위를 평가하기 위해 TEM과 엑소좀 마커들을 이용하여 본 발명에 사용된 엑소좀을 확인하였다(도 4 a, b). 또한 위에서 확인된 혈청에서의 엑소좀이 뇌조직으로부터 이동할 수 있는 것인지를 조사하기 위해, 본 발명자들은 dST에 WPRE fragment를 전달하기 위해 lenti-viral 이용하였다. 그리고 뇌고정 장비에 의해 dST WPRE and copGFP 리포터를 포함하여 lenti-virus vectors를 주입하였다. 그 결과 dST 부위에 주입된 coGFP가 발현되는 것을 조직화학적인 방법을 통해 확인하였다(도 4 c). lenti-viral infusion 후 12, 24 시간 후에에 뇌 조직과 엑소좀에서 WPRE와 copGFP의 발현이 상승하였다(도 4 d, e). 또한, 엑소좀에 존재하는 WPRE가 6 시간 6 주까지도 안정적으로 발현하고 있음을 관찰할 수 있었다(도 4 f). 흥미롭게도, WPRE는 자연적으로 포유동물에서 일어나지 않는다. 그러므로 혈청에서 WPRE의 발견은 엑소좀의 기원이 뇌 조직으로부터 유래한 것임을 가리킬 수 있다. 이러한 결과는 뇌 조직으로부터 마이크로 RNA와 같은 바이오분자가 엑소좀을 통하여 혈액으로 전달되었음을 확인한 것이다.

[93] 상기에서는 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 설명하였지만, 본 발명은 이에 한정되는 것은 아니고, 본 발명의 기술 사상 범위 내에서 여러 가지로 변형하여 실시하는 것이 가능하고, 이 또한 첨부된 특허 청구 범위에 속하는 것은 당연하다.

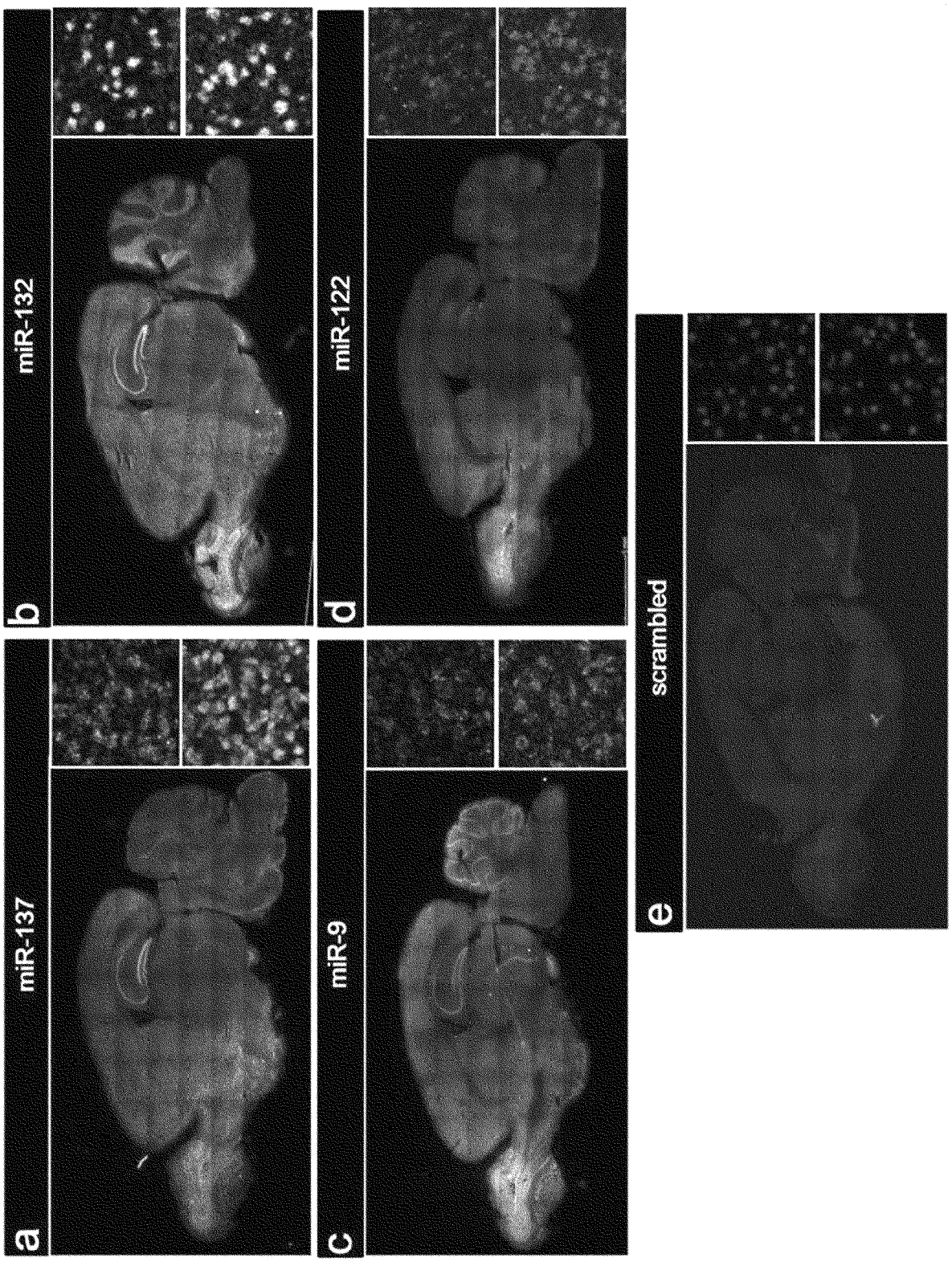
청구범위

[청구항 1] 서열번호 1로 표시되는 마이크로 RNA-137 또는 서열번호 2로 표시되는 상보적 염기서열인 것을 특징으로 하는 마약 중독 여부 진단용 바이오마커.

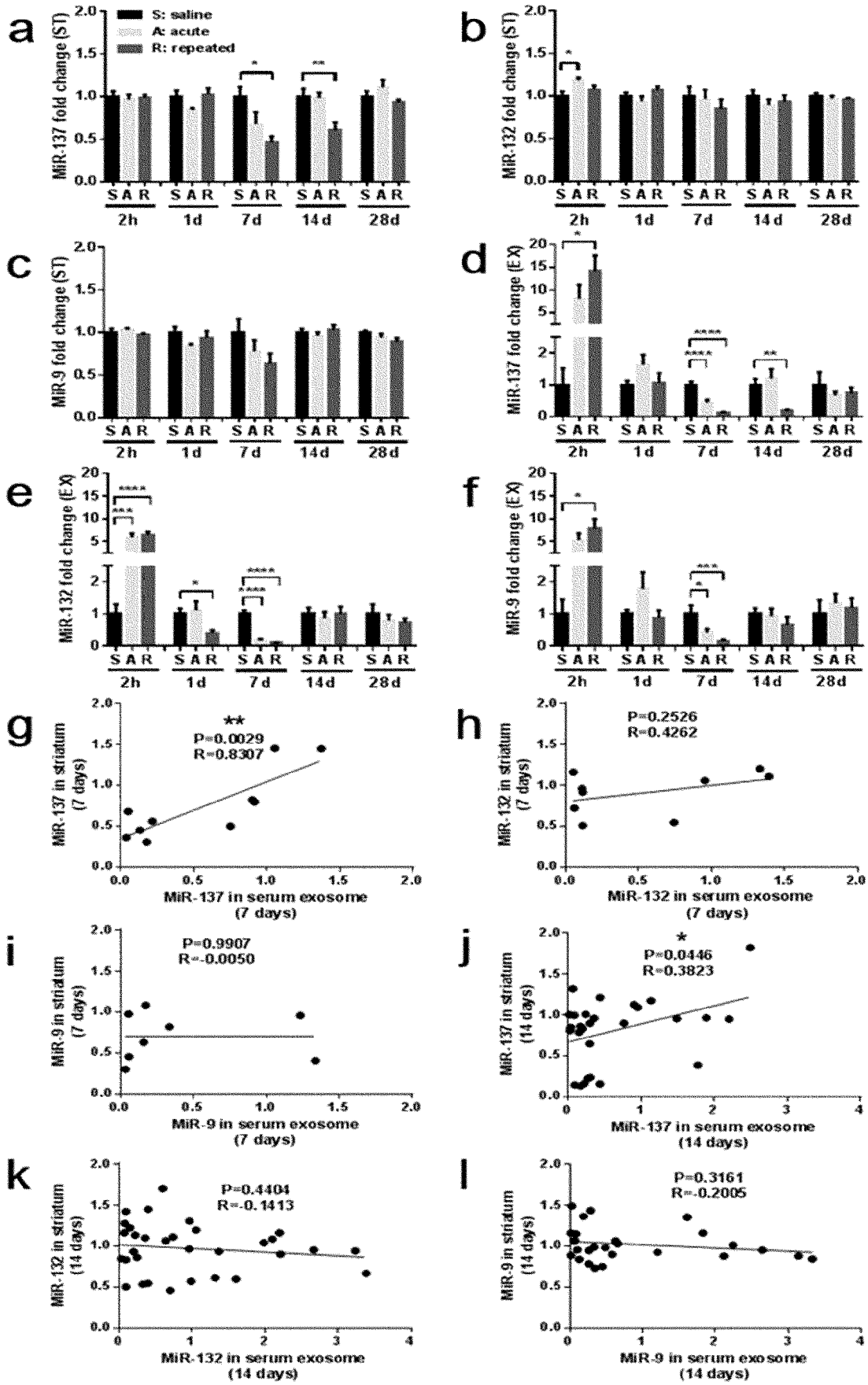
[청구항 2] 제 1항에 있어서,
상기 마이크로 RNA-137은 인간의 뇌에서 마약 중독으로 인해 발현 양상이 변화한 것으로서,
상기 뇌에서 발현 양상이 변화한 마이크로 RNA-137은 엑소좀에 포함되어 혈액 또는 혈청으로 이동하며,
상기 엑소좀에 포함되어 혈액 또는 혈청으로 이동한 마이크로 RNA-137을 추출하여 마약 중독 여부를 진단하는 것을 특징으로 하는 마약 중독 여부 진단용 바이오마커.

[청구항 3] 서열번호 1로 표시되는 마이크로 RNA-137 또는 서열번호 2로 표시되는 이의 상보적 염기서열, 또는 이들의 단편, 또는 이들에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브, 또는 이들에 의해 코딩되는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 마약 중독 여부 진단용 키트.

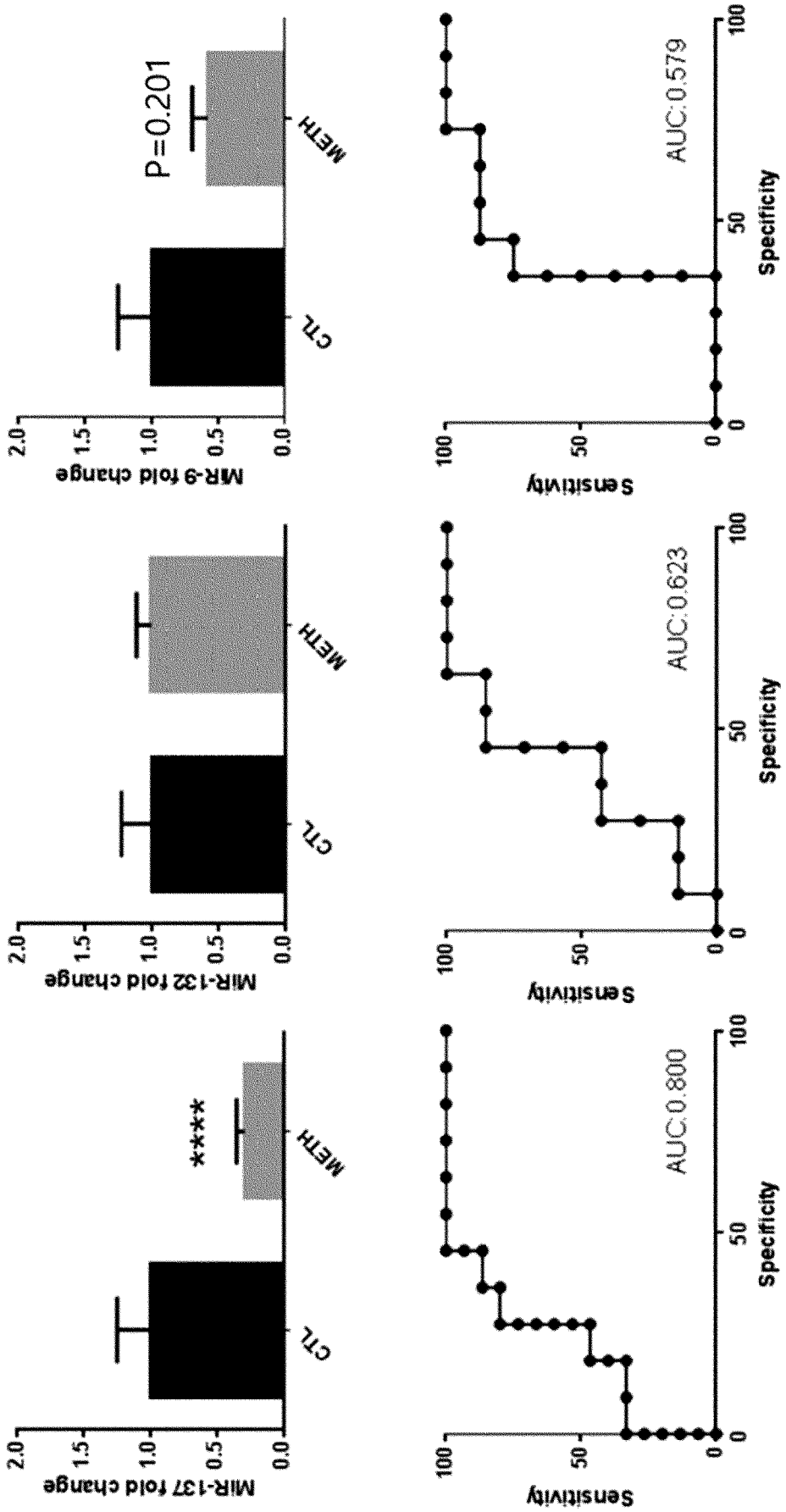
[도1]



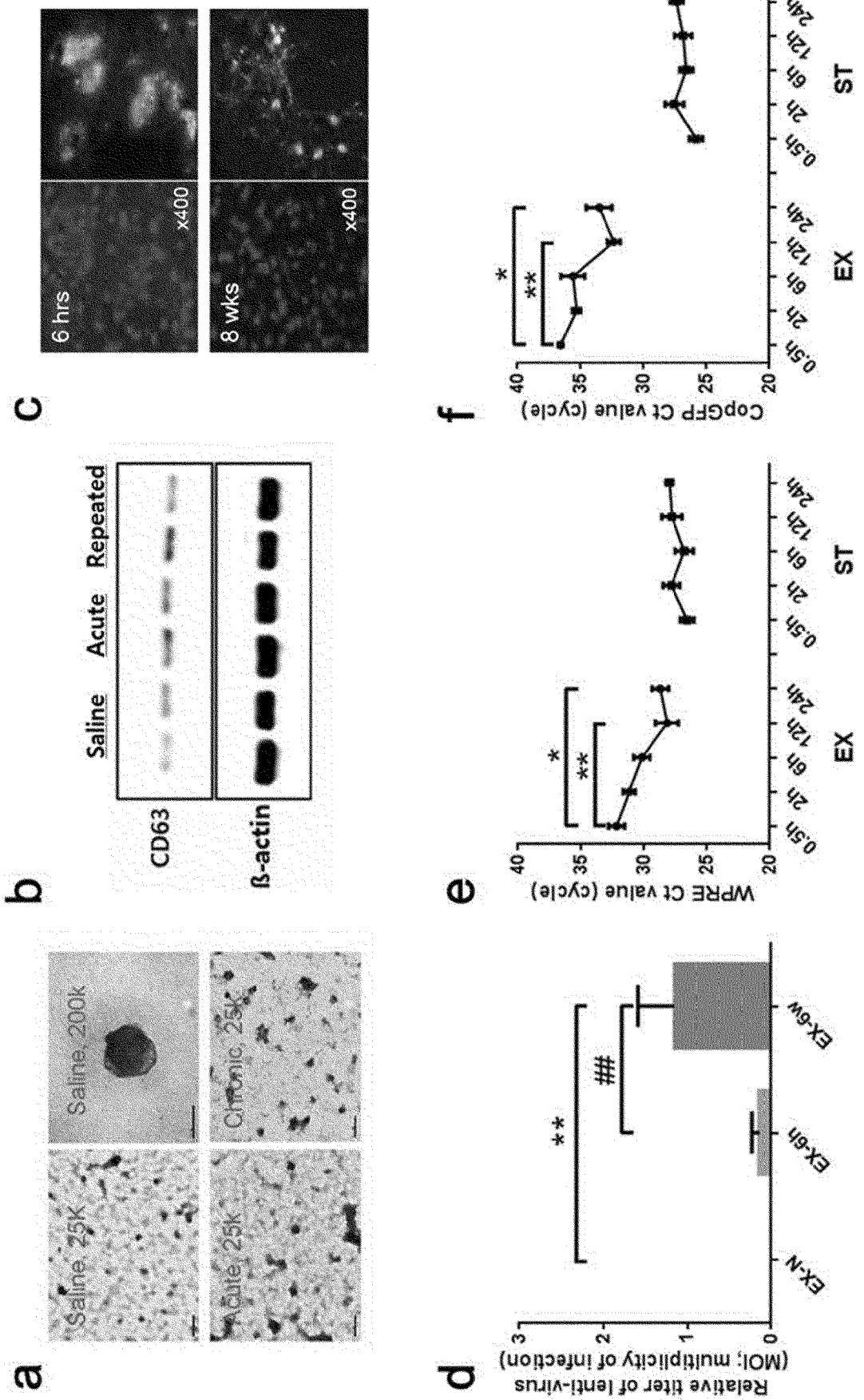
[도2]


a
S: saline
A: acute
R: repeated
MiR-137 fold change (ST)
S A R
2h
1d
7d
14d
28d
b
MiR-132 fold change (ST)
c
MiR-9 fold change (ST)
d
MiR-137 fold change (EX)
e
MiR-132 fold change (EX)
f
MiR-9 fold change (EX)
g
**
P=0.0029
R=0.8307
MiR-137 in striatum (7 days)
MiR-137 in serum exosome (7 days)
h
P=0.2526
R=0.4262
MiR-132 in striatum (7 days)
MiR-132 in serum exosome (7 days)
i
P=0.9907
R=-0.0050
MiR-9 in striatum (7 days)
MiR-9 in serum exosome (7 days)
j
*
P=0.0446
R=0.3823
MiR-137 in striatum (14 days)
MiR-137 in serum exosome (14 days)
k
P=0.4404
R=-0.1413
MiR-132 in striatum (14 days)
MiR-132 in serum exosome (14 days)
l
P=0.3161
R=-0.2005
MiR-9 in striatum (14 days)
MiR-9 in serum exosome (14 days)

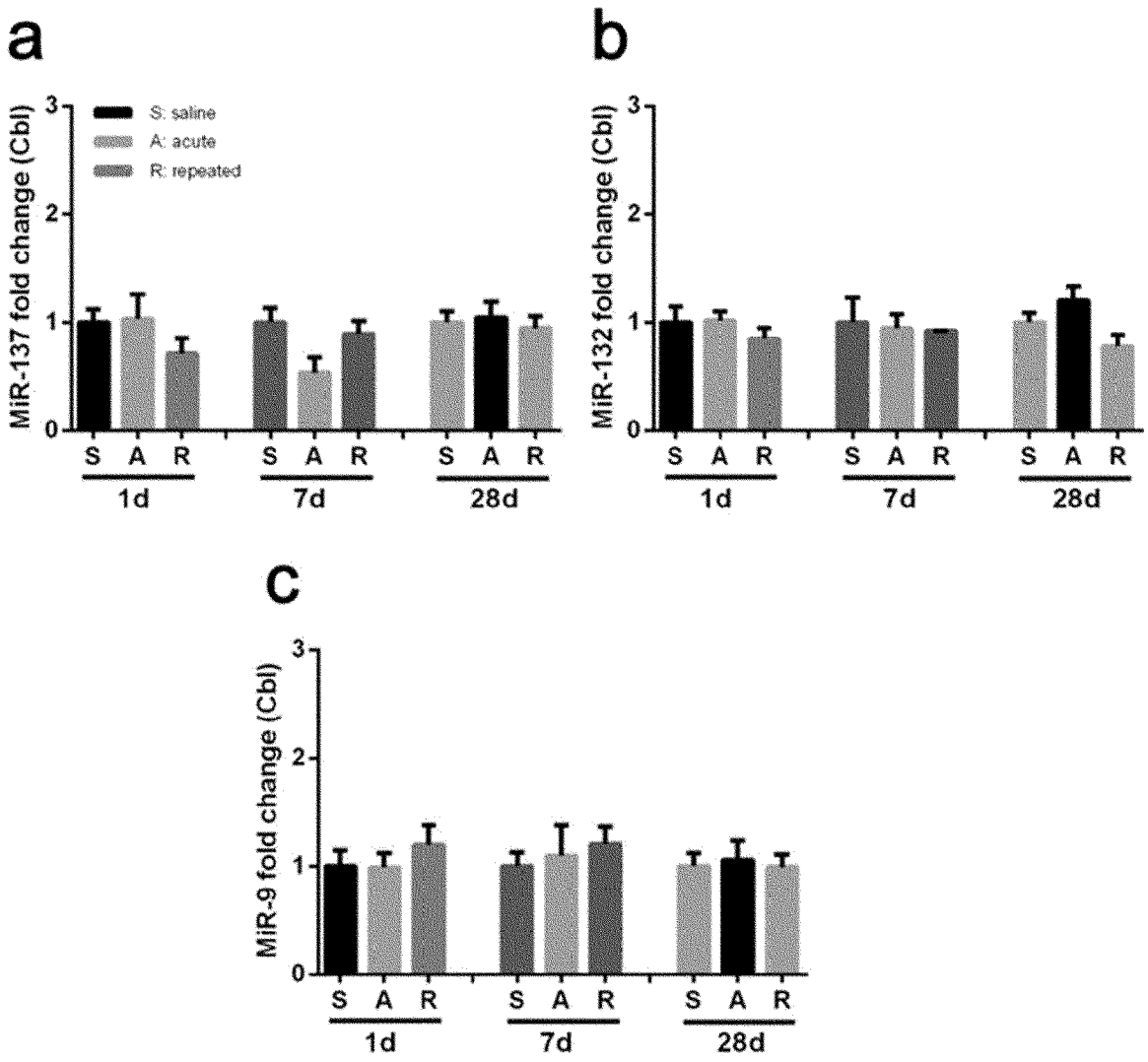
[도3]


MiR-137 fold change
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
****
CTL
METH
Sensitivity
100
50
0
0
50
100
Specificity
AUC:0.800
MiR-132 fold change
P=0.201
AUC:0.623
MiR-9 fold change
AUC:0.579

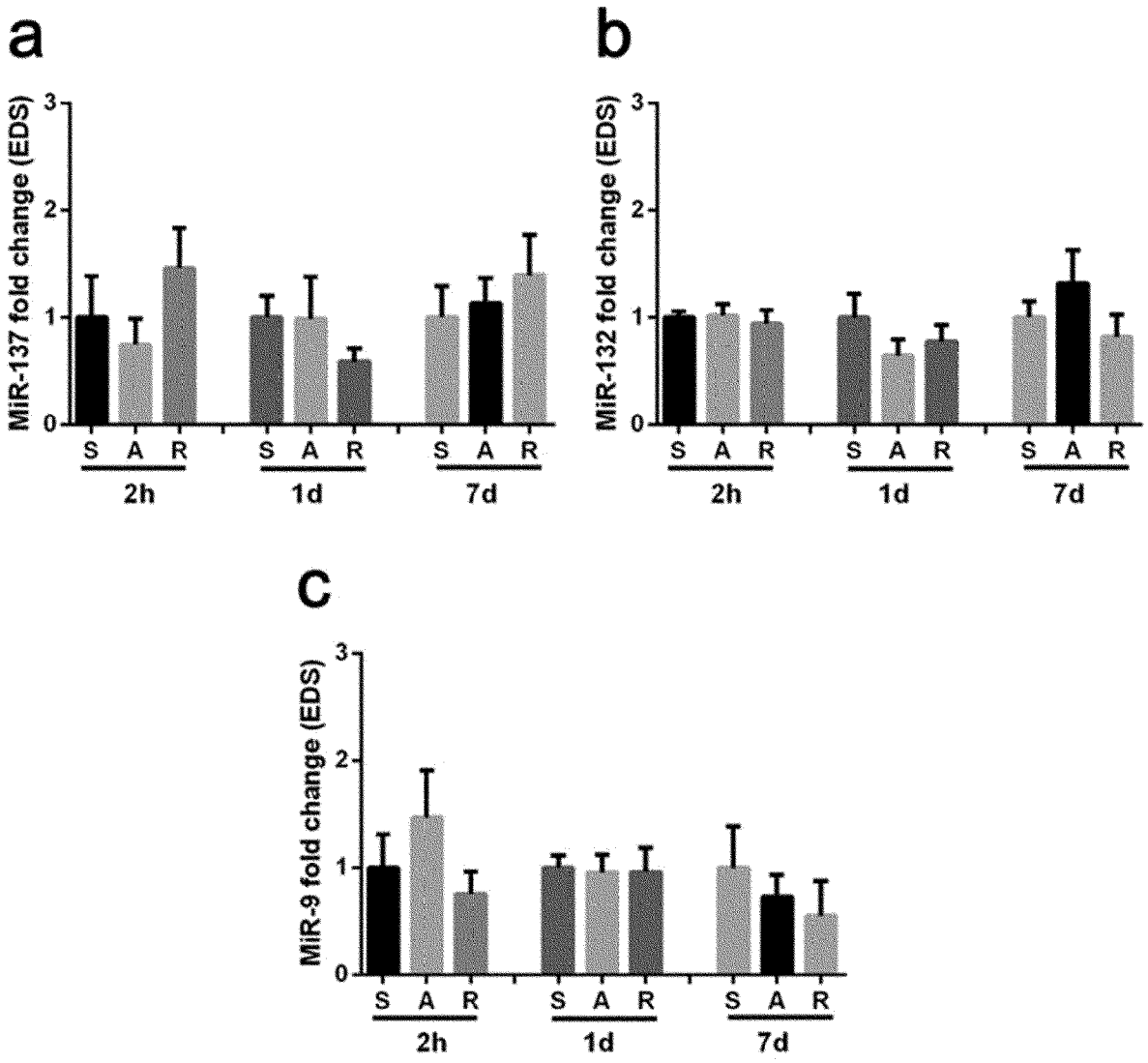
[도4]


a
Saline, 200k
Saline, 25K
Chronic, 25k
Acute, 25k
b
Saline
Acute
Repeated
CD63
ß-actin
c
6 hrs
8 wks
x400
x400
d
Relative titer of lenti-virus
(MOI; multiplicity of infection)
**
##
EX-N
EX-6h
EX-6w
e
WPRE Ct value (cycle)
*
**
0.5h
2h
6h
12h
24h
EX
ST
f
CopGFP Ct value (cycle)
*
**
0.5h
2h
6h
12h
24h
EX
ST

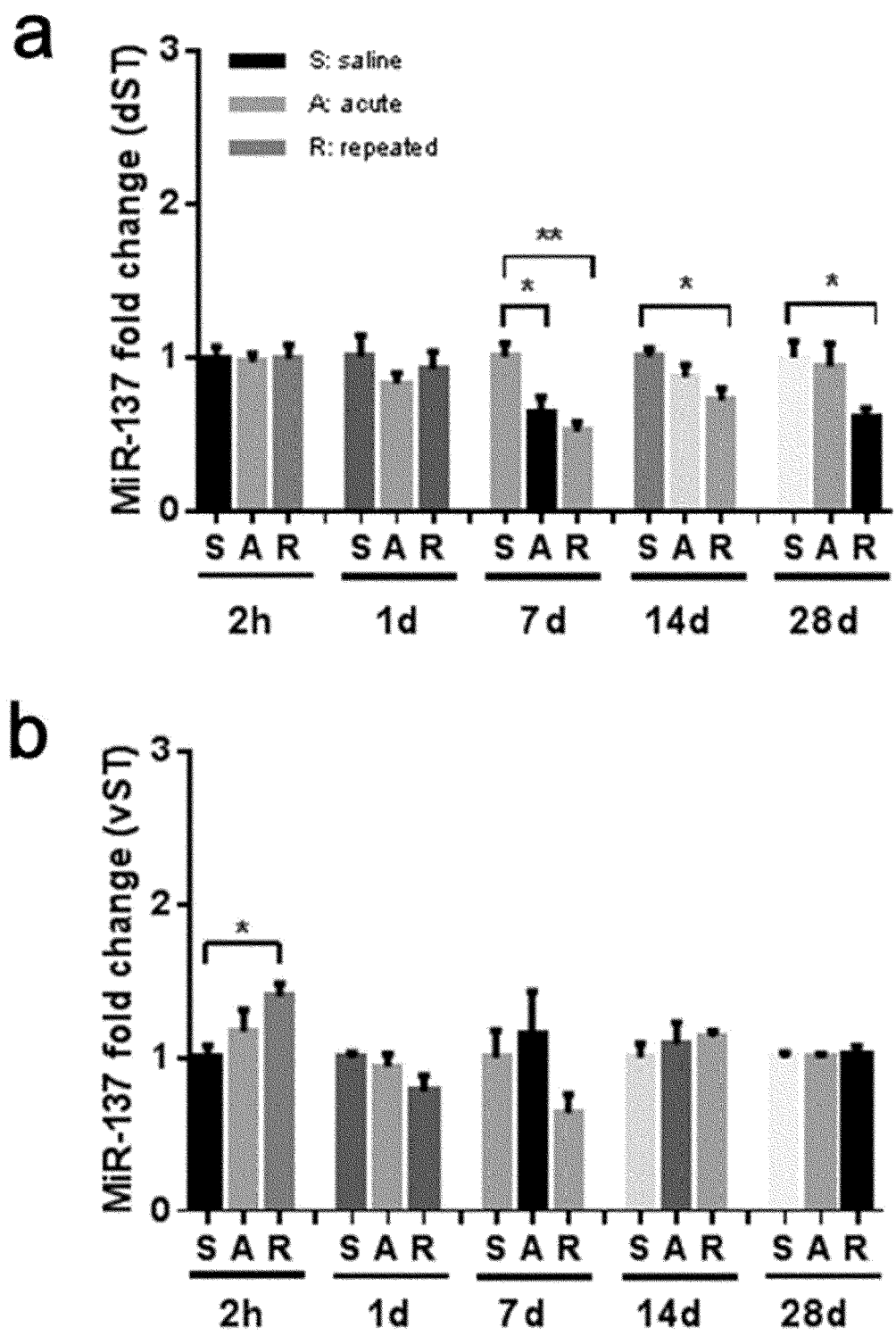
[도5]


a
b
c
S: saline
A: acute
R: repeated
MiR-137 fold change (Cbl)
MiR-132 fold change (Cbl)
MiR-9 fold change (Cbl)
0
1
2
3
S A R
1d
7d
28d

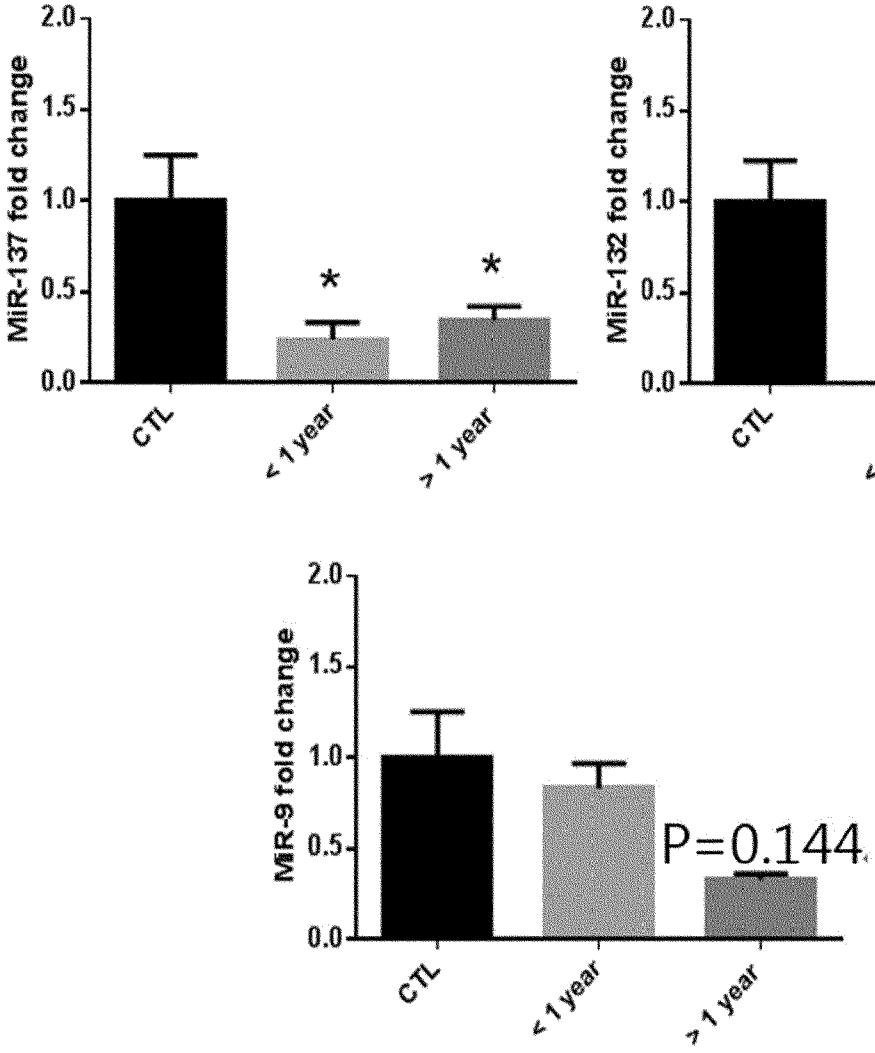
[도6]


a
MiR-137 fold change (EDS)
0
1
2
3
S A R
2h
S A R
1d
S A R
7d
b
MiR-132 fold change (EDS)
0
1
2
3
S A R
2h
S A R
1d
S A R
7d
c
MiR-9 fold change (EDS)
0
1
2
3
S A R
2h
S A R
1d
S A R
7d

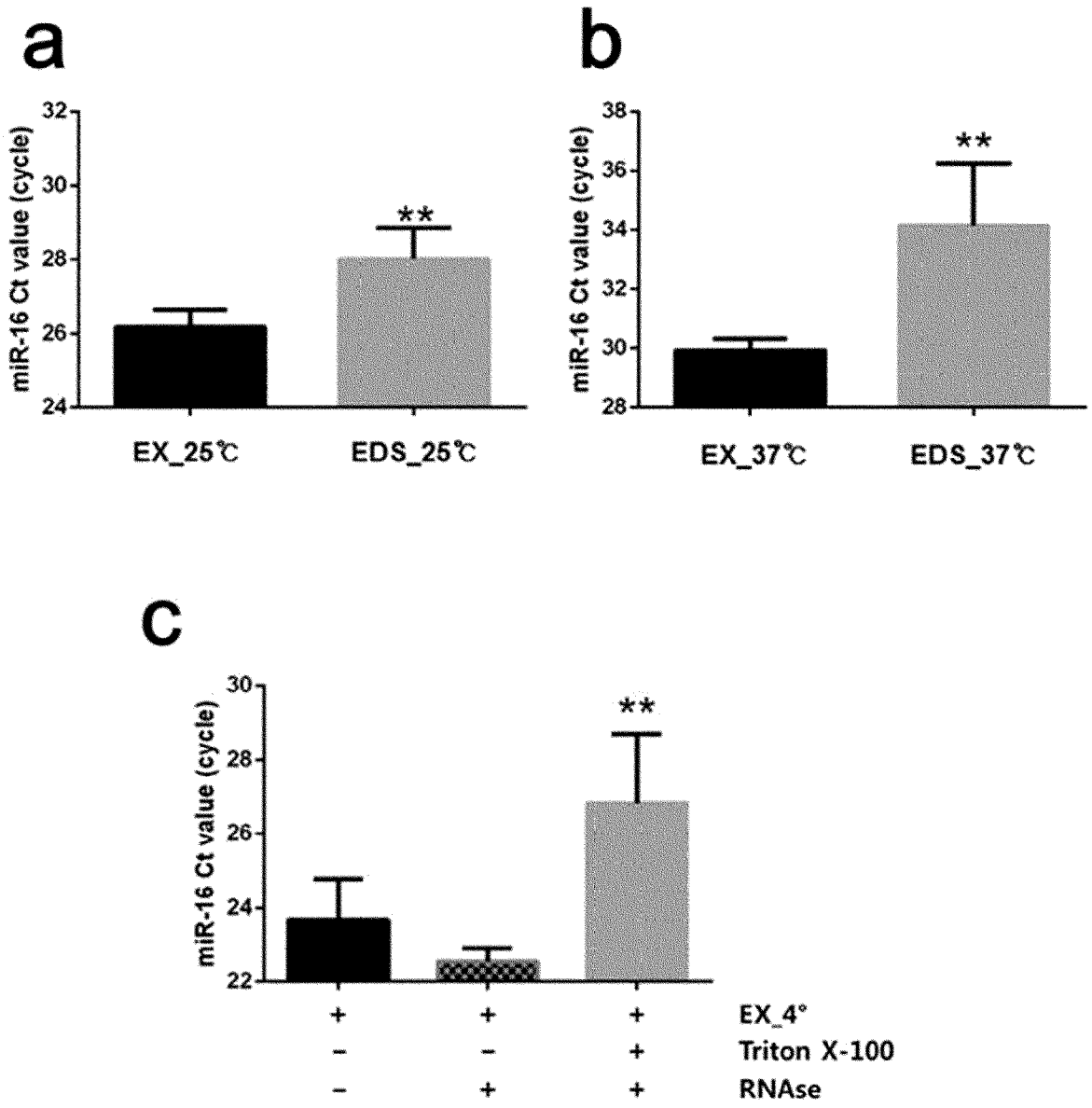
[도7]


a
MiR-137 fold change (dST)
S: saline
A: acute
R: repeated
**
*
*
*
S A R
2h
1d
7d
14d
28d
b
MiR-137 fold change (vST)
*
S A R
2h
1d
7d
14d
28d

[도8]


MiR-137 fold change
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
*
CTL
< 1 year
> 1 year
MiR-132 fold change
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
CTL
< 1 year
> 1 year
MiR-9 fold change
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
P=0.144
CTL
< 1 year
> 1 year

[도9]


a
miR-16 Ct value (cycle)
32
30
28
26
24
**
EX_25℃
EDS_25℃
b
miR-16 Ct value (cycle)
38
36
34
32
30
28
**
EX_37℃
EDS_37℃
c
miR-16 Ct value (cycle)
30
28
26
24
22
**
+ + + EX_4°
- - + Triton X-100
- + + RNAse

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2016/007560

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/53(2006.01)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 1/68; C12M 1/34; G01N 33/53

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: micro RNA-137, narcotic intoxication, diagnosis, biomarker, revelation aspect, exosome

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LI et al., "MicroRNA-137 Down-regulates KIT and Inhibits Small Cell Lung Cancer Cell Proliferation", Biomedicine & Pharmacotherapy, vol. 68, pages 7-12 (2014) See abstract and table 1.	1-2
A		3
A	BALI et al., "MicroRNAs and Drug Addiction", Frontiers in Genetics, vol. 4, document 43, pages 1-8 (May 2013) See abstract; figure 2.	1-3
A	DREYER, "New Insights into the Roles of MicroRNAs in Drug Addiction and Neuroplasticity", Genome Medicine, vol. 2, document 92, pages 1-7 (23 December 2010) See abstract; figure 1.	1-3
A	CN 103740852 A (ZHONGSHAN HOSPITAL XIAMEN UNIVERSITY) 23 April 2014 See abstract; claim 1.	1-3
A	TANAKA et al., "Clinical Impact of Serum Exosomal MicroRNA-21 as a Clinical Biomarker in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma", Cancer, vol. 119, pages 1159-1167 (15 March 2013) See abstract.	1-3

☒ 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
"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
12 OCTOBER 2016 (12.10.2016)	**12 OCTOBER 2016 (12.10.2016)**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2016/007560

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	KIM et al., "Serum Exosomal MicroRNA-137 Predicts Repeated Psychostimulant Exposure after Prolonged Abstinence", In: the 1st International Conference on Emotion and Sensibility (ICES 2015), Republic of Korea, Jeju, pages 84-85 (18 November 2015) See the entire document.	1-3
X	NAM et al., "Serum Exosomal MicroRNA-137 as Potential Biomarker for Repeated Cocaine Exposure in Mice", In: WISET 2014 Return to R&D Conference, Republic of Korea, Seoul, pages 1-18 (22 August 2014) See the entire document. ※ The above document is a document declaring exceptions to lack of novelty by the applicant.	1-3
X	NAM et al., "Detection of MicroRNA-137 Expression as a Potential Screening Marker for Psychostimulant Use", In: the 26th International Conference of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology, Republic of Korea, Seoul, Poster (21 October 2014) See the entire document. ※ The above document is a document declaring exceptions to lack of novelty by the applicant.	1-3
X	NAM et al., "Detection of MicroRNA-137 Expression as a Potential Screening Marker for Psychostimulant Use", In: Neuroscience 2014, United States, Washington DC, Poster (15 November 2014) See the entire document. ※ The above document is a document declaring exceptions to lack of novelty by the applicant.	1-3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2016/007560

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
CN 103740852 A	23/04/2014	CN 103740852 B	13/04/2016

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2016/007560

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/53(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12Q 1/68; C12M 1/34; G01N 33/53

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: 마이크로 RNA-137, 마약 중독, 진단, 바이오마커, 발현 양상, 엑소좀

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	LI 등, `MicroRNA-137 down-regulates KIT and inhibits small cell lung cancer cell proliferation`, Biomedicine & Pharmacotherapy, 68권, 페이지 7-12 (2014) 초록 및 표 1 참조.	1-2
A		3
A	BALI 등, `MicroRNAs and drug addiction`, Frontiers in Genetics, 4권, 문헌 43, 페이지 1-8 (2013.05) 초록; 도면 2 참조.	1-3
A	DREYER, `New insights into the roles of microRNAs in drug addiction and neuroplasticity`, Genome Medicine, 2권, 문헌 92, 페이지 1-7 (2010.12.23) 초록; 도면 1 참조.	1-3
A	CN 103740852 A (ZHONGSHAN HOSPITAL XIAMEN UNIVERSITY) 2014.04.23 요약; 청구항 1 참조.	1-3
A	TANAKA 등, `Clinical impact of serum exosomal microRNA-21 as a clinical biomarker in human esophageal squamous cell carcinoma`, Cancer, 119권, 페이지 1159-1167 (2013.03.15) 초록 참조.	1-3

☒ 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

"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
2016년 10월 12일 (12.10.2016)	2016년 10월 12일 (12.10.2016)

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

심사관
김승범
전화번호 +82-42-481-3371

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2016/007560

C (계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	KIM 등, `Serum exosomal microRNA-137 predicts repeated psychostimulant exposure after prolonged abstinence`, In: the 1st International Conference on Emotion and Sensibility(ICES 2015), 대한민국 제주, 페이지 84-85 (2015.11.18) 전체 문헌 참조.	1-3
X	NAM 등, `Serum exosomal microRNA-137 as potential biomarker for repeated cocaine exposure in mice`, In: WISET 2014 Return to R&D Conference, 대한민국 서울, 페이지 1-18 (2014.08.22) 전체 문헌 참조. ※ 위 문헌은 출원인이 신규성 상실의 예외로서 선언한 공지문헌임	1-3
X	NAM 등, `Detection of microRNA-137 expression as a potential screening marker for psychostimulant use`, In: the 26th International Conference of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology, 대한민국, 서울, 포스터 (2014.10.21) 전체 문헌 참조. ※ 위 문헌은 출원인이 신규성 상실의 예외로서 선언한 공지문헌임	1-3
X	NAM 등, `Detection of microRNA-137 expression as a potential screening marker for psychostimulant use`, In: Neuroscience 2014, 미국 워싱턴 DC, 포스터 (2014.11.15) 전체 문헌 참조. ※ 위 문헌은 출원인이 신규성 상실의 예외로서 선언한 공지문헌임	1-3

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2016/007560

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
CN 103740852 A	2014/04/23	CN 103740852 B	2016/04/13