



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0069264
(43) 공개일자 2021년06월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/6883 (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6883 (2018.05)

C12Q 2600/158 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0158824

(22) 출원일자 2019년12월03일

심사청구일자 2019년12월03일

(71) 출원인

계명대학교 산학협력단

대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교
산학협력관 201호(신당동)

(72) 발명자

정철호

대구광역시 달서구 이곡공원로 83, 101동 1801호
(용산동, 성서2차영남우방타운)

이수연

대구광역시 달서구 상원로 142, 105동 305호 (상
인동, 상인자이)

송상훈

대구광역시 달서구 학산로50길 18-6, 502호 (송현
동, 송림아파트)

(74) 대리인

특허법인태백

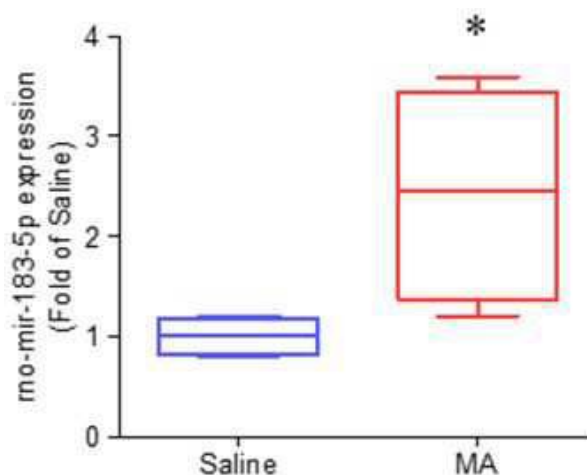
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 메스암페타민 중독 진단용 바이오마커 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 메스암페타민 중독 여부를 진단하기 위한 바이오마커 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 자가투여를 통한 메스암페타민 중독 증상이 나타난 실험동물의 선조체 조직에서 mir-183-5p의 발현 수준이 정상 대조군과 비교하여 현저하게 증가된 것이 확인됨에 따라, 상기 마이크로 RNA를 메스암페타민 중독 여부 진단용 바이오마커 조성물로 제공할 수 있으며, 상기 바이오마커 조성물은 메스암페타민 중독 진단용 키트, 메스암페타민 중독 진단을 위한 정보 제공 방법 및 메스암페타민 중독 치료용 약물 스크리닝 방법에 사용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/178 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2016R1A6A1A03011325
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중점연구소지원(이공계분야)
연구과제명	약물의존장애 핵심 진단기술 개발 및 치료전략 연구
기 여 율	50/100
과제수행기관명	계명대학교 산학협력단
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2015M3A9E1028327
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오·의료기술개발사업(바이오기반법과학원천기술개발)
연구과제명	포렌직 독시코믹스 기반 개인 맞춤형 약물중독 검사법 개발
기 여 율	50/100
과제수행기관명	가톨릭대학교 산학협력단
연구기간	2019.02.01 ~ 2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

mir-183-5p 마이크로 RNA를 유효성분으로 함유하는 메스암페타민 중독 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 mir-183-5p는 메스암페타민 노출시 선조체 (striatum) 조직에서 발현이 증가되는 것을 특징으로 하는 메스암페타민 중독 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 3

메스암페타민에 노출된 개체로부터 분리된 시료에서 mir-183-5p 마이크로 RNA의 발현 수준을 확인하는 단계; 및
상기 확인된 mir-183-5p 마이크로 RNA의 발현 수준을 정상 대조군과 비교하는 것을 특징으로 하는 메스암페타민 중독 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 시료는 혈액, 소변, 조직, 세포 및 모발로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 메스암페타민 중독 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 5

청구항 3에 있어서, 상기 mir-183-5p 마이크로 RNA의 발현 수준은 정상대조군과 비교하여 증가되는 것을 특징으로 하는 메스암페타민 중독 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 6

mir-183-5p 마이크로 RNA에 특이적으로 결합하는 제제를 유효성분으로 함유하는 메스암페타민 중독 진단용 키트.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 제제는 프라이머 및 프로브로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 메스암페타민 중독 진단용 키트.

청구항 8

메스암페타민에 노출된 개체로부터 분리된 시료에 후보 약물을 처리하는 단계;

상기 후보 약물이 처리된 시료에서 mir-183-5p 마이크로 RNA의 발현 수준을 확인하는 단계; 및

상기 mir-183-5p 마이크로 RNA의 발현 수준을 정상 대조군과 비교하는 것을 특징으로 하는 메스암페타민 중독 치료용 약물 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 메스암페타민 중독 여부를 진단하기 위한 바이오마커 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 약물 중독(drug addiction)은 중독성 약물의 남용으로 약물에 대한 의존성이 생기고, 사용할 때마다 양을 늘려야 효과가 나타나는 내성이 생기며, 사용하지 않는 경우, 온몸에 건디기 힘든 이상을 일으키는 금단증상이 생기는 현상을 의미한다. 메스암페타민, 아편, 대마, 코카인 등과 같은 많은 약물들이 쾌락, 불안 해소, 기분 전환

을 위해 남용되고 있는 가운데, 최근에는 상기 종류뿐만 아니라 진정제, 각성제, 흡입제, 호르몬제 등의 다양한 물질이 남용되고 있다.

[0003] 이들 물질의 반복적인 사용은 뇌의 장기적인 변화를 초래하는 심각한 질환을 야기시켜 개인과 사회 모두에게 해를 끼치며, 이러한 약물의 남용은 특정 사회, 경제적 집단에 한정된 것이 아니라 사회 전체에 널리 영향을 미치기 때문에 국가적으로 이들 약물의 사용을 규제하고 있다.

[0004] 메스암페타민(methamphetamine; MA)은 암페타민의 유도체로서 중추 신경을 흥분시키는 마약으로 분류되고 있다. 메스암페타민으로 인한 신체 부작용으로는 서맥 혹은 빈맥, 동공 산대, 혈압 증가 혹은 감소, 땀이나 오한, 구역과 구토, 체중감소, 정신 운동성 지체, 초조, 근육 약화, 호흡 억제, 흉통, 심장 부정맥, 혼미, 간질, 운동 이상증, 혼수 등이 있으며, 더 심각해질 경우 고혈압, 부정맥, 심부전, 뇌허혈, 의식 혼수 등이 나타날 수 있다. 메스암페타민의 금단 현상으로는 피로감, 불면 혹은 과수면, 식욕 증가, 암페타민 유도성 정신장애로 편집증 등이 있다.

[0005] 선조체(striatum)는 뇌 기저핵(Basal ganglia)의 한 영역으로 대뇌피질 (Cerebral cortex) 및 시상(Thalamus)와의 신경망 연결을 통해 자발적인 움직임의 선택과 시작(Selection and initiation of willed movement)에 중요한 역할을 한다. 이러한 선조체 내 유전자 발현의 변화는 중독과 관련된 행동 변화를 중재할 수 있다. 또한, 최근 모발과 같은 대체 표본이 신경계의 변화를 반영할 수 있다는 연구 결과로부터 약물 사용 진단에 사용 가능성이 대두되고 있으나 현재까지 선조체 또는 모발 내의 근본적인 생물학적 변화에 대한 대규모 분석은 연구된 바가 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2017-0008491호(2017.01.24. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 메스암페타민 중독 여부를 보다 직접적이고 정확하게 진단하기 위해 메스암페타민이 자가투여된 개체로부터 분리된 선조체 조직에서 발현 수준이 변화된 마이크로 RNA를 확인하고 이를 메스암페타민 중독 진단용 바이오마커 조성물로 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 mir-183-5p 마이크로 RNA를 유효성분으로 함유하는 메스암페타민 중독 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0009] 본 발명은 메스암페타민에 노출된 개체로부터 분리된 시료에서 mir-183-5p 마이크로 RNA의 발현 수준을 확인하는 단계; 및 상기 확인된 mir-183-5p 마이크로 RNA의 발현 수준을 정상 대조군과 비교하는 것을 특징으로 하는 메스암페타민 중독 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

[0010] 본 발명은 mir-183-5p 마이크로 RNA에 특이적으로 결합하는 제제를 유효성분으로 함유하는 메스암페타민 중독 진단용 키트를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 메스암페타민에 노출된 개체로부터 분리된 시료에 후보 약물을 처리하는 단계; 상기 후보 약물이 처리된 시료에서 mir-183-5p 마이크로 RNA의 발현 수준을 확인하는 단계; 및 상기 mir-183-5p 마이크로 RNA의 발현 수준을 정상 대조군과 비교하는 것을 특징으로 하는 메스암페타민 중독 치료용 약물 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따르면, 자가투여를 통한 메스암페타민 중독 증상이 나타난 실험동물의 선조체 조직에서 mir-183-5p의 발현 수준이 정상 대조군과 비교하여 현저하게 증가된 것이 확인됨에 따라, 상기 마이크로 RNA를 메스암페

타민 중독 여부 진단용 바이오마커 조성물로 제공할 수 있으며, 상기 바이오마커 조성물은 메스암페타민 중독 진단용 키트, 메스암페타민 중독 진단을 위한 정보 제공 방법 및 메스암페타민 중독 치료용 약물 스크리닝 방법에 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 메스암페타민 자가 투여 동물모델 구축 과정을 나타낸 모식도 및 선조체 (striatum)에서 microRNA (miRNA) 발현 변화를 확인한 결과로, 도 1a는 16일간 메스암페타민 (METH)에 대한 랫드의 자가투여 (self-administration)를 통한 동물모델 구축과정을 나타낸 모식도이며, 도 1b는 Saline 투여군과 METH 투여군에서 microRNA 발현 차이를 확인한 결과로, 빨간 그래프와 파란 그래프의 차이가 statistical significance ($p < 0.0001$)가 나타남에 따라 자가투여 실험 결과가 성공적임이 확인되었다.

도 2는 small RNA-Sequencing (small RNA-Seq)을 통해 miRNA에 대한 군 별 집단의 특성 차이 확인 및 유의성 있는 expression abundance를 보이는 miRNA 선별한 결과로, 도 2a는 saline군과 METH군에서 각각 4마리씩, striatum을 sampling하여 총 2개의 군에서 각 군당 4개의 sample을 획득하였으며, 도 2b 및 도 2c는 small RNA-Seq을 통해 752개의 miRNA를 획득하였고, statistical analysis (fisher's exact test: $p < 0.05$)을 통해 36개 miRNA를 선별하였으며, 도 2d는 post-hoc analysis (FDR value: $p < 0.05$)를 통해 유의적으로 변화한 miRNA 최종 선별한 과정을 나타낸 모식도이다.

도 3은 최종 선별된 miRNA의 재현성을 확인한 결과로, rno-mir-183-5p가 METH 군에서 유의적으로 증가(student t-test: $p < 0.05$)한 것을 확인한 real-time qPCR 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0015] 메스암페타민은 매우 강력한 중추신경 흥분제로 각성을 일으키는 합성 화합물질로, 투여 시 졸음과 피로감이 사라지며, 육체적 활동이 증가하는 효과를 나타낼 수 있으나, 중단 시 금단증상이 유발되며 미국인보다 한국인에 게서는 강한 중독성이 나타나 국내에서는 의약품으로 사용되지 않는 향정신성 의약품으로 분류된다. 본 발명의 발명자들은 메스암페타민 중독 여부를 보다 직접적이고 정확하게 진단하기 위한 바이오마커 조성물을 제공하기 위해 메스암페타민 자가투여 동물(랫드) 모델의 선조체에서 메스암페타민 중독을 진단하는 바이오마커를 규명하고, 이를 메스암페타민 중독에 대한 분자적 이해 및 약물 치료의 타겟으로 제공하고자 본 발명을 완성하였다.

[0017] 본 발명은 mir-183-5p 마이크로 RNA를 유효성분으로 함유하는 메스암페타민 중독 진단용 바이오마커 조성물을 제공할 수 있다.

[0018] 상기 mir-183-5p는 메스암페타민 노출시 선조체(striatum) 조직에서 발현이 증가되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0019] 본 발명은 메스암페타민에 노출된 개체로부터 분리된 시료에서 mir-183-5p 마이크로 RNA의 발현 수준을 확인하는 단계; 및 상기 확인된 mir-183-5p 마이크로 RNA의 발현 수준을 정상 대조군과 비교하는 것을 특징으로 하는 메스암페타민 중독 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공할 수 있다.

[0020] 상기 시료는 혈액, 소변, 조직, 세포 및 모발로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.

[0021] 상기 mir-183-5p 마이크로 RNA의 발현 수준은 정상대조군과 비교하여 증가되는 것일 수 있다.

[0022] 본 발명은 mir-183-5p 마이크로 RNA에 특이적으로 결합하는 제제를 유효성분으로 함유하는 메스암페타민 중독 진단용 키트를 제공할 수 있다.

[0023] 상기 제제는 프라이머 및 프로브로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.

[0024] 또한, 본 발명은 메스암페타민에 노출된 개체로부터 분리된 시료에 후보 약물을 처리하는 단계; 상기 후보 약물이 처리된 시료에서 mir-183-5p 마이크로 RNA의 발현 수준을 확인하는 단계; 및 상기 mir-183-5p 마이크로 RNA의 발현 수준을 정상 대조군과 비교하는 것을 특징으로 하는 메스암페타민 중독 치료용 약물 스크리닝 방법을 제공할 수 있다.

[0025] 상기 마이크로 RNA의 발현 수준은 마이크로어레이(microarray), 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse

transcriptase-polymerase chain reaction), 실시간 중합효소 연쇄반응(real time-polymerase chain reaction), 웨스턴 블롯, 노던 블롯, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion) 및 면역침전분석법(immunoprecipitation assay)으로 이루어진 군에서 선택되는 방법으로 수행되는 것일 수 있다.

[0026] 본 발명의 "바이오마커"는 메스암페타민 중독이 발생한 대상체의 조직 또는 세포를 정상 대조군의 조직 또는 세포와 구분하여 진단할 수 있는 물질로, 정상 대조군에 비하여 중독이 발생한 대상체의 조직 또는 세포에서 증가 또는 감소 양상을 보이는 단백질 또는 핵산, 지질, 당지질, 당단백질 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함한다.

[0027] 본 발명의 "프라이머"는 짧은 자유 3 말단 수산화기를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 중합효소 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. 또한, 프라이머는 7개 내지 50 개의 뉴클레오타이드 서열을 가진 센스 및 안티센스 핵산으로서, DNA 합성의 개시점으로 작용하는 프라이머의 기본 성질을 변화시키지 않는 추가의 특징을 혼입할 수 있다.

[0028] 또한, 본 발명의 "프로브"는 mRNA의 특이적으로 결합을 이룰 수 있는 짧게는 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무, 발현양을 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single strand DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double strand DNA)프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 적절한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당해 기술 분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택할 수 있다.

[0030] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0032] <실시예 1> 메스암페타민 자가 투여 동물모델 구축

[0033] 도 1A와 같은 과정으로 SD 랫드 (Sprague Dawley rat; SD rat)를 수입 후 적응과정을 거친 다음, 3일간의 먹이 섭취 훈련을 수행하였다. 그 후, 정맥 내 카테터 삽입 수술을 진행하였으며, 7일간의 회복 기간을 거친 후 메스암페타민 또는 식염수를 16일 동안 자가 투여 하였다.

[0034] 상기 자가투여법은 케이지 내에 레버 스위치를 누르면 카테터를 통해 약물이 체내에 주입되는 방법으로, 메스암페타민은 한 번의 자가 투여 당 0.05mg/kg에 해당하는 양이 주입되며 매일 2시간 씩 진행되었다. 레버를 한번 누를 때 마다 약물이 한번 씩 주입되는 FR(fixed ratio)-1이 적용되었으며 약물이 한번 주입되면 20초의 타임아웃이 적용되어 약물의 급격한 주입을 통제하였다.

[0035] SD 랫드의 메스암페타민 자가 투여 정도를 확인하기 위하여, 약물이 투여되는 레버를 누른 횟수를 측정하였다.

[0036] 그 결과, 도 1B와 같이 메스암페타민 투여군 (MA)과 식염수 투여군 (Saline)을 비교하였을 때, 메스암페타민 투여군에서 약물 투여 레버를 누르는 횟수가 현저히 증가한 것이 확인되었으며, Two-way ANOVA를 사용한 통계 분석결과에서도 메스암페타민 투여군에서 자가 투여 횟수가 유의적으로($p < 0.0001$) 증가한 것을 확인할 수 있었다. 상기 결과로부터 메스암페타민 투여군에서 중독성 유사 행동을 유발되는 것이 확인되었다.

[0038] <실시예 2> small RNA sequencing을 통한 microRNA 선별

[0039] 상기 실시예 1의 메스암페타민 투여군과 식염수 투여군의 자가 투여 SD 랫드로부터 전체 뇌를 적출하고, 차가운 PBS에 2분간 세척한 후 선조체에 해당하는 부위를 커팅하여 분리하였다. 분리된 선조체 조직을 액체질소에서 동결시키고, 전체 RNA 분리를 실시하기 전까지 -80°C 에 보관하였다. RNA extraction kit(Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 메뉴얼에 따라 전체 RNA 분리하였으며, 분리된 RNA는 정량 후 -80°C 에 보관하였다.

[0040] 두 투여군의 전체 RNA를 이용하여 도 2와 같은 과정으로 메스암페타민에 의해 발현 차이를 나타내는 microRNA를 선별하였다.

- [0041] 상기 과정으로 획득한 두 투여군의 전체 RNA에서 각각 500ng의 RNA를 사용하여, small RNA sequencing (Life Sci Alliance. 2018 Sep 30;1(5):e201800018.)을 수행하여 752개의 microRNA를 획득하고, statistical analysis (fisher's exact test: $p < 0.05$)을 통해 36개 miRNA를 선별하였다.
- [0042] 다음으로 post-hoc analysis (FDR value: $p < 0.05$)(J Parkinsons Dis. 2017;7(1):95-101. doi: 10.3233/JPD-160911.)를 수행하여 선별된 36개 miRNA 중 유의적으로 변화한 miRNA 최종 선별하였다.
- [0043] 그 결과, 선조체에서 식염수 투여군과 대비하여 메스암페타민 투여군에서 유의적으로 발현이 증가된 rno-mir-183-5p가 확인되었다.

표 1

[0044]

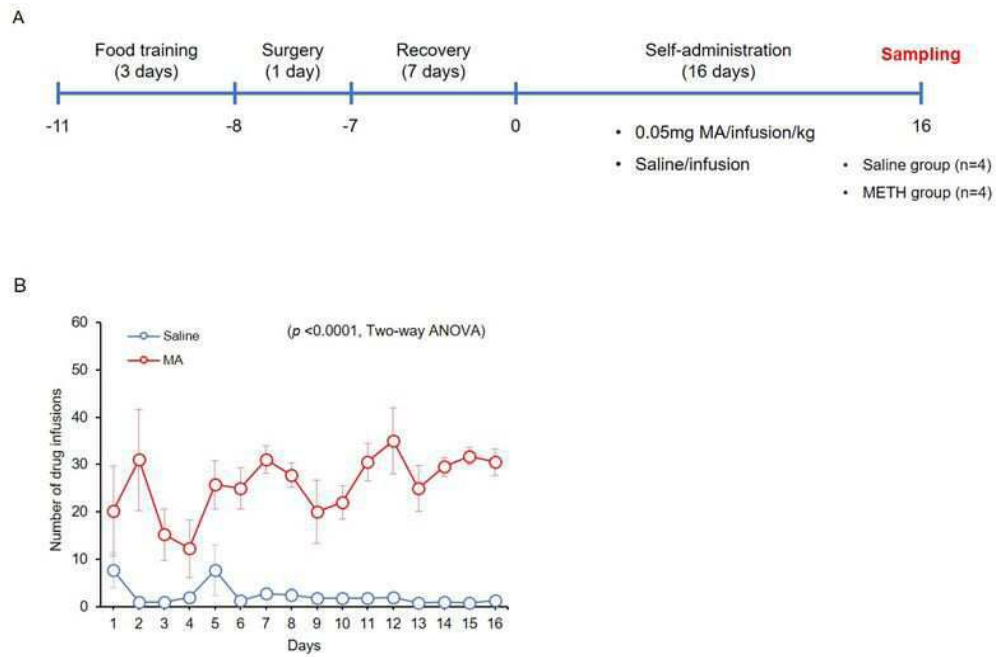
No.	MicroRNA	Accession	Log2FC	p-value	FDR (adjusted p-value)
1	rno-mir-183-5p	MIMAT0000860	4.23	0.000	0.00

[0046] <실시예 3> microRNA 발현 수준 확인

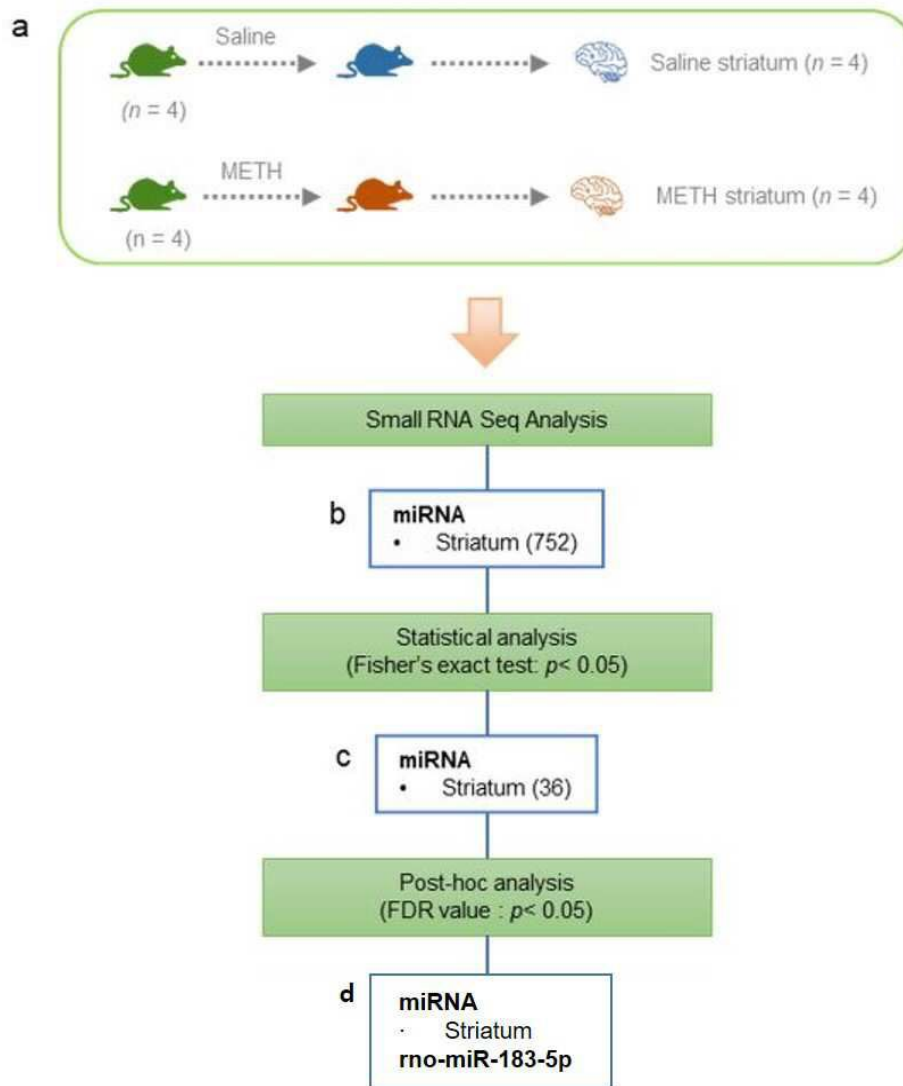
- [0047] 앞선 실험에서 유의적으로 선별된 rno-mir-183-5p에 대한 발현 수준을 확인하기 위해 qRT-PCR 수행하였다. microRNA의 역전사 (reverse transcription)를 위해 miRCURY LNA RT Kit(Qiagen, Hilden, Germany)를 사용되었으며, 만들어진 cDNA는 miRCURY LNA miRNA PCR Assays(Qiagen, Hilden, Germany)의 메뉴얼에 따라 PCR을 수행하였으며, microRNA의 qRT-PCR은 LighrCycler 480 II(Roche, Basel, Switzerland)를 사용하여 수행되었다.
- [0048] 그 결과, 도 3과 같이 rno-mir-183-5p의 발현 수준은 식염수 투여군보다 메스암페타민 자가투여군에서 현저하게 증가되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0049] 상기 결과로부터 rno-mir-183-5p는 메스암페타민 중독 시 유의적인 발현패턴을 나타내는 것으로 확인됨에 따라, 상기 rno-mir-183-5p는 메스암페타민 중독여부를 진단하기 위한 바이오마커로 사용될 수 있다.
- [0051] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1



도면2



도면3

