



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년03월20일
(11) 등록번호 10-1960384
(24) 등록일자 2019년03월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/94 (2006.01)

(52) CPC특허분류
G01N 33/5308 (2013.01)
G01N 33/946 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0088587

(22) 출원일자 2018년07월30일

심사청구일자 2018년07월30일

(56) 선행기술조사문헌

도파민성 보상회로의 뇌 대사체 분석을 통한 중독성 질환 제어 및 질환 마커 발굴, 정부과제최종보고서, 2016, pp 1-75.

US20050129710 A1

KR1020170008491 A

KR1020140113021 A

(73) 특허권자

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

백자현

서울특별시 강남구 선릉로 221, 201동 1904호 (도곡동, 도곡렉슬아파트)

강병준

서울특별시 도봉구 덕릉로66길 17, 1708동 702호 (창동, 주공17단지아파트)

김보경

경기도 시흥시 매화로 50, 101동 703호 (매화동, 삼화아파트)

(74) 대리인

이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 5 항

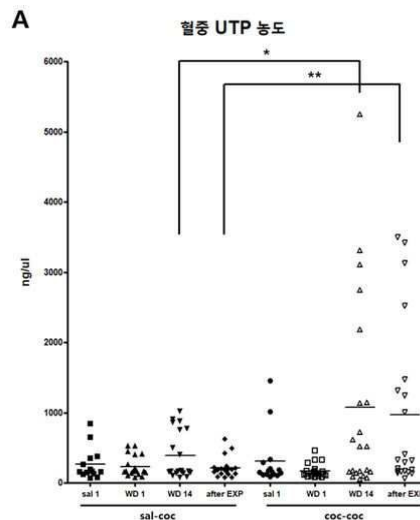
심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 유리딘삼인산을 유효성분으로 포함하는 코카인 중독 확인용 바이오마커

(57) 요약

본 발명은 유리딘삼인산(uridine triphosphate, UTP)을 유효성분으로 포함하는 코카인 중독 확인용 바이오마커 조성물 및 대상체의 시료로부터 유리딘삼인산의 농도를 측정하는 단계를 포함하는 코카인 중독 확인을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것으로, 코카인 중독 의심 대상체로부터 수득된 시료에 존재하는 유리딘삼인산을 이용하여 간단하고 정확하며 코카인 중독을 조기에 확인함으로써 중독성 약물의 오남용을 예방하고 코카인 중독 치료제의 효능을 확인하기 위해 유용하게 활용될 것이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

G01N 2800/307 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013M3C7A1056101

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (원천)뇌과학원천기술개발사업

연구과제명 도파민성 보상회로의 뇌 대사체 분석을 통한 중독성 질환 제어 및 질환 마커 발굴

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교

연구기간 2013.08.01 ~ 2018.07.31

명세서

청구범위

청구항 1

유리딘삼인산(uridine triphosphate, UTP)의 농도를 측정할 수 있는 리간드를 포함하는, 코카인 중독 확인용 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 키트.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 유리딘삼인산의 농도는 혈액, 혈청 또는 혈장으로부터 측정하는 것을 특징으로 하는 코카인 중독 확인용 ELISA 키트.

청구항 4

다음 단계를 포함하는 코카인 중독 확인을 위한 정보를 제공하는 방법:

- (a) 대상체의 시료로부터 유리딘삼인산의 농도를 측정하는 단계; 및
- (b) 상기 측정된 유리딘삼인산의 농도가 정상 대조군에 비하여 증가된 경우, 코카인 중독이거나 중독일 가능성이 있는 것으로 확인하는 단계.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 시료는 혈액, 혈청 또는 혈장인 것을 특징으로 하는 코카인 중독 확인을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 유리딘삼인산의 농도를 측정하는 단계는 제1항의 ELISA 키트에 의해 수행하는 것을 특징으로 하는 코카인 중독 확인을 위한 정보를 제공하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 코카인 중독 확인용 바이오마커 조성물 및 코카인 중독 확인을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 유리딘삼인산(uridine triphosphate, UTP)을 유효성분으로 포함하는 코카인 중독 확인용 바이오마커 조성물과 대상체의 시료로부터 유리딘삼인산의 농도를 측정하는 단계를 포함하는 코카인 중독 확인을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 약물 중독(Drug Addiction)은 중독성 약물의 남용으로 약물에 대한 의존성(dependence)이 생기고, 사용할 때마다 양을 늘려야 효과가 생기는 내성(tolerance)이 생기고, 사용하지 않으면 온 몸에 건디기 힘든 이상을 일으키

는 금단증상(withdrawal symptoms)이 생기는 현상이다. 약물 중독은 중독성 약물을 사용하지 않으면 정상적인 생활을 할 수 없는 상태로서 중독자의 경우 어느 특정부분에 몰입하게 되는 성향을 보이는 외에 편집성정신분열증, 심장장애, 혈압상승, 구토, 호흡곤란, 감각능력상실, 의식상실, 악몽, 착란 상태 등의 증세를 보인다. 약물 중독은 현대 사회의 큰 사회적 문제로, 유엔마약범죄사무국(UNODC)에 따르면 2014년 전 세계 성인인구(15 ~ 65세)의 5 %인 2,500만 명이 한 가지 이상의 마약을 사용하였으며, 마약 중독으로 사망한 사람 수는 2014년에 207,000명으로 집계되었다고 밝혔다. 그 중에서도, 코카인의 사용은 다수의 질병 및 중독과 같은 정신질환 합병증의 원인이다. 따라서, 코카인에 대한 중독은 증가하기만 하는 심각한 공중 보건 문제이다. 따라서, 많은 연구자들이 약물 중독 문제를 해결하기 위하여 노력하고 있으며, 현재까지 코카인에 대한 약물 중독을 판단하는 방법으로는 외형 및 행동 분석과 소변, 혈액 검사를 들 수 있다.

[0004] 약물 중독 관련 바이오마커는 중독성 약물 사용에 따라 약물 중독 대상체의 체내에서 변화하는 생체 지표를 의미하며, 약물 중독 여부를 판단하는 기준이 될 수 있는 물질을 일컫는다. 종래, 뇌의 중뇌변연로(mesolimbic pathway)에 주요 부위인 선조(Striatum), 해마(hippocampus), 측 중격핵(nucleus accumbens), 대상엽(cingulate cortex), 전두엽(prefrontal cortex), 측두엽(temporal cortex), 소뇌(cerebellum)에서 추출한 단백질의 발현정도(대한민국 등록특허 10-0779664) 또는 뇌의 중뇌변연로(mesolimbic pathway)에 주요 부위인 선조(Striatum), 해마(hippocampus), 측 중격핵, 대상엽에서 추출한 RNA로부터 베타-아레스틴 2(β -Arrestin 2) 유전자의 발현정도(대한민국 등록특허 10-0686691)를 측정하여 코카인 중독을 확인하는 방법이 있었다. 그러나, 상기 선행기술은 코카인 중독을 확인하기 위하여 수득하기 어려운 뇌 내부의 조직이 요구된다는 단점이 있었다.

[0005] 유리딘삼인산(uridine triphosphate, UTP)은 뉴클레오사이드(nucleoside) 삼인산의 하나로, 세포 대사 및 조절에 여러 역할을 갖는 물질이며 일반적으로 에너지화나 인산화 반응을 위한 인산기 제공 역할을 갖는다. 기존 연구를 통해 약물 중독 모델에서 유리딘의 뇌 내 주입을 통해 중독성 약물에 대한 반응을 감소시킬 수 있음이 밝혀진 바 있다.(Liu., et al., Uridine decreases morphine-induced behavioral sensitization by decreasing dorsal striatal dopamine release possibly via agonistic effects at GABAA receptors., Eur Neuropsychopharmacol., 2014).

[0006] 이에, 본 발명자들은 코카인 중독 의심 대상체로부터 수득된 시료를 통해 간단하고 정확하게 코카인 중독을 확인하기 위한 바이오마커 및 정보를 제공하는 방법을 개발하기 위해 예의 노력한 결과, 코카인 중독 대상체의 혈액을 수득하여 혈중 대사체 분석과 효소 결합 면역 흡착 분석(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)을 진행하여 유리딘삼인산의 혈중 농도가 증가하는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은, 코카인 중독 의심 대상체로부터 수득된 시료를 통해 간단하고 정확하게 코카인 중독을 확인하기 위한 바이오마커 조성물을 제공하는데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은, 코카인 중독 의심 대상체로부터 수득된 시료를 통해 간단하고 정확하게 코카인 중독을 확인하기 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 유리딘삼인산(uridine triphosphate, UTP)을 유효성분으로 포함하는 코카인 중독 확인용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한, 대상체의 시료로부터 유리딘삼인산의 농도를 측정하는 단계를 포함하는 코카인 중독 확인을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따른 코카인 중독 확인용 바이오마커 조성물 및 코카인 중독 확인을 위한 정보를 제공하는 방법은 코카인 중독 의심 대상체로부터 수득된 시료에 존재하는 유리딘삼인산(uridine triphosphate, UTP)을 유효성분으로 포함하고, 이의 농도를 측정하는 단계로 이루어져 간단하고 정확하므로 코카인 중독을 조기에 확인함으로써 중독성 약물의 오남용을 예방하고 코카인 중독 치료제의 효능을 확인하기 위해 유용하게 활용될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 코카인 중독 쥐 모델의 혈중 유리딘삼인산(uridine triphosphate, UTP) 농도 변화 분석을 위하여, 코카인 중독 쥐 모델의 코카인 주입에 따른 운동량 변화를 측정된 결과를 나타낸 것으로, A는 코카인 중독 쥐 모델에 대한 코카인 주입 및 채혈을 수행한 시기를 나타내며(sal: 생리 식염수, coc: 코카인, WD: 중단 기간), B는 코카인 중독 쥐 모델에 대한 코카인 주입에 따른 운동량 변화를 측정된 결과를 나타내는 도면이다(sal-coc: 코카인 중독이 유도되지 않은 그룹, coc-coc: 코카인 중독 모델 그룹).

도 2는 코카인 중독 쥐 모델의 혈중 유리딘삼인산(uridine triphosphate, UTP) 농도 변화 분석 결과를 나타내는 도면이다(sal 1: 생리 식염수 주입 첫째날 혈장 시료, WD 1: 코카인 투여 중단 기간 첫째날 혈장 시료, WD 14: 코카인 투여 중단 기간 14일째 혈장 시료, after EXP: 코카인 투여 중단 기간 15일째에 코카인을 재투여하고 24시간 경과 후 혈액).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0019] 코카인 중독을 확인하기 위한 바이오마커 또는 정보를 제공하는 방법은 대상체의 약물 중독을 조기에 확인하여 중독성 약물의 오남용을 예방하고, 약물 중독의 예방 내지 치료 약물을 개발에 있어서 후보 약물을 대상체에 투여하거나 처치한 경우 나타나는 변화를 확인하기 위하여 요구된다.

[0020] 뇌의 중뇌변연로(mesolimbic pathway)에 주요 부위인 선조(Striatum), 해마(hippocampus), 측 중격핵(nucleus accumbens), 대상엽(cingulate cortex), 전두엽(prefrontal cortex), 측두엽(temporal cortex), 소뇌(cerebellum)에서 추출한 단백질의 발현정도(대한민국 등록특허 10-0779664) 또는 뇌의 중뇌변연로에 주요 부위인 선조, 해마, 측 중격핵, 대상엽에서 추출한 RNA로부터 베타-아레스틴 2(β -Arrestin 2) 유전자의 발현정도(대한민국 등록특허 10-0686691)를 측정하여 코카인 중독을 확인하는 방법이 알려져 있다. 그러나, 상기 선행기술은 코카인 중독을 확인하기 위해 수득하기 어려운 뇌 내부의 조직이 요구된다는 단점이 있으며 대상체로부터 코카인 중독을 확인하기 위하여 유리딘삼인산(uridine triphosphate, UTP)의 농도를 측정하는 방법에 대해서는 전혀 알려진 바가 없으며, 본 발명을 통해 처음 규명되었다.

[0021] 이에, 본 발명에서는 코카인 중독 의심 대상체로부터 수득된 시료로부터 간단하고 정확하게 코카인 중독을 확인하기 위한 바이오마커 및 정보를 제공하는 방법을 개발하고자, 코카인 중독 대상체의 시료를 수득하여 혈중 대상체 분석과 효소 결합 면역 흡착 분석(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)을 진행하였다. 그 결과, 대상체의 혈중 유리딘삼인산(uridine triphosphate, UTP)의 농도가 정상 대상체에 비하여 증가하는 것을 확인하였다(도 2).

[0022] 따라서, 본 발명은 일 관점에서 유리딘삼인산(uridine triphosphate, UTP)을 유효성분으로 포함하는 코카인 중독 확인용 바이오마커 조성물에 관한 것이다.

[0023] 본 발명에서, 용어 "코카인 중독"은 코카인 남용, 코카인 금단 증후군 및 재발로 인한 갈망, 약물 탐색, 자가 투여를 포함하며, 급성 또는 만성 모두 해당된다. 여기서 코카인은 코카 잎, 코카 페이스트, 코카인으로부터 크랙(crack)에 이르는 약물의 형태를 포함한다.

[0024] 본 발명에서 용어 "중독"은 개인의 건강, 정신 상태, 또는 사회생활에 미치는 해로운 결과에도 불구하고, 어떤 특정 활동에 몰두하도록 개인에 의해 다시 강제되는 것을 말한다. 중독은 좁게는 '제한되지 않은, 강박적 사용'으로 정의된다. 그로 인해 해로움이 없거나, 또는 환자 또는 다른 집단에 손해를 끼치는 바가 없으면, 그것이 임상적으로는 강박적이라고 간주될 가능성이 있으나, 정의에 따르면 그것은 중독의 범주에 속할 수가 없다. 실제로, 중독의 두 종류(육체적 의존 및 심리적 의존)는 구별하기가 항상 쉽지만은 않다. 중독은 종종 육체적 요소 및 심리적 요소 모두를 가진다. 육체적 의존(또는 약물 의존)은 약물의 습관적 사용으로 인한 상태를 말한다. 이때 부정적 육체적 금단 증상은 급작스런 중단으로 인한 것이다. 코카인 부류의 약물과 같은 일반적으로 남용되는 자극제들은 현저한 육체적 의존도를 초래하는것으로 간주되지는 않는다. 그러나 극단적인 육체적 중독이 될 잠재력이 사용자에게 육체적으로 손상을 일으킬 정도의 양을 소비하도록 강요할 수도 있다. 다만 생활을 위협하는 금단의 효과는 관찰되지 않았다.

- [0025] 본 발명의 용어 "바이오마커"는 생물학적 현상의 존재와 정량적 또는 정성적으로 연관된 분자를 의미하여, 본 발명의 마커는 코카인에 중독된 대상체를 예측해내는 기준이 되는 물질을 의미한다.
- [0026] 본 발명에 있어서, 코카인 중독 확인용 바이오마커 조성물은 대상체의 약물 중독을 확인하기 위한 것 뿐만 아니라 약물 중독의 예방 내지 치료 약물을 개발하기 위하여 후보 약물을 대상체에 투여하거나 처치한 경우 나타나는 바이오마커들의 변화를 확인하기 위한 코카인 중독의 정도 내지 변화의 확인을 포함한다.
- [0027] 유리딘삼인산(uridine triphosphate, UTP)은 뉴클레오사이드 삼인산의 일종으로, 인산기의 운반을 담당하고 RNA 합성의 직접적인 전구체이다. 당류의 대사에 깊게 관여하며, UTP와 포도당-1-인산에서 효소적으로 UDP-포도당과 피로인산을 생성한다.
- [0028] 본 발명의 구체적인 일 실시예에 있어서, 정상 대상체에 비하여 코카인 중독 대상체의 혈액에서 코카인 투여 중단 기간 또는 코카인 투여 중단 기간 후 재투여한 경우에 유리딘삼인산의 혈중 농도가 증가되어 있는 것을 확인하였다(도 2).
- [0029] 따라서, 본 발명에 있어서, 상기 유리딘삼인산의 농도가 정상 대상체에 비하여 코카인 중독 대상체의 시료에서 증가되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0030] 본 발명에 있어서, 상기 시료는 혈액, 혈청 또는 혈장이며, 바람직하게는 혈장인 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0032] 본 발명은 다른 관점에서, 대상체의 시료로부터 유리딘삼인산의 농도를 측정하는 단계를 포함하는 코카인 중독 확인을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.
- [0033] 본 발명에 있어서, 상기 시료는 혈액, 혈청 또는 혈장이며, 바람직하게는 혈장인 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0034] 본 발명에 있어서, 상기 유리딘삼인산의 농도를 측정하는 단계는 효소 결합 면역 흡착 분석(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)에 의해 수행하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0035] ELISA는 액체 시료에 들어 있는 분석물을 검출하는 생화학적 방법 중의 하나이다. 일반적으로 분석 물질은 리간드라고 불리는 검출 시약에 특이적으로 결합한다. 리간드는 고정된 고체상(예: 홈 또는 well)의 바닥 및 때로는 측벽에 코팅되고 건조된다. 이처럼 특별한 결합 특성을 갖도록 리간드로 처리한 홈에 분석물이 들어 있는 액체 시료를 첨가하고 배양한다. 반응이 끝나면 액체 시료를 제거하고 세척한 후 순차적으로 다른 다양한 시약을 첨가하여 몇 가지 광학적 변화를 일으키도록 유도한다. 이러한 모든 반응들은 홈 내에서 일어날 수 있으며 홈 내에서 투과광 또는 흡광도를 측정하여 분석물의 양까지 검사할 수 있다. 탐지의 민감도는 신호의 증폭 여부에 달려 있다.
- [0037] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예 1

[0039] 코카인 중독 쥐 모델의 혈중 대사체 분석을 위한 혈액 시료의 준비

- [0040] 코카인에 대한 약물 중독 모델은 정상 쥐에 코카인 민감화 실험을 통해 준비하였다. 실험군 쥐는 복강내 주사를 통하여 식염수를 3일 동안 주입하고 이후 15 mg/kg의 코카인을 5일 동안 주입하여 코카인 중독을 유도하였다. 대조군 쥐는 8일 동안 복강내 주사로 식염수를 주입하였다. 이후 14일 동안의 금단기간을 두고, 15일째에 복강내 주사로 10 mg/kg의 코카인을 다시 주입하였다. 16일째에 실험군 쥐와 대조군 쥐에 동물용 마취제인 1.6 μ l/g의 조레틸(zoletil)과 0.005 μ l/g의 자일라진(xylazine)을 복강내 주사하여 마취하였다. 마취한 쥐들을 개복하고 주사를 사용하여 좌심실에서 채혈하였다. 채혈한 혈액을 9 mM 에틸렌디아민사아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)을 함유하는 인산 완충 생리식염수(phosphate buffered saline, PBS)와 혼합하고 4 °C에서 12,000 rpm의 속도로 원심분리 하여 혈장을 수득하였으며, 혈장은 -80 °C에서 보관하였다.

실시예 2

[0042] 코카인 중독 바이오마커 후보군 선정에 위한 코카인 중독 쥐 모델의 혈중 대사체 분석

[0043] 코카인에 대한 약물 중독을 나타내는 바이오마커 후보군을 선정하기 위하여, 실시예 1에서 유도한 약물 중독 쥐 모델의 혈장을 채취하여 2회의 혈중 대사체 분석을 진행하였다. 혈장 시료는 Metabolone사에 의뢰하여 582개의 대사체에 대하여 분석을 진행하였다. 그 결과 코카인 중독 쥐 모델의 혈장에서 감소한 대사체 45개(표 1)와 증가한 대사체 10개(표 2)를 발견하고, 하기의 표 1 및 2에 기재하였다.

표 1

Biochemical Name	C-C	Super Pathway	Sub Pathway
	S-C		
1,2-dipalmitoyl-GPC (16:0/16:0)	0.92	Lipid	Phospholipid Metabolism
retinol (Vitamin A)	0.85	Cofactors and Vitamins	Vitamin A Metabolism
N-acetyl-1-methylhistidine*	0.81	Amino Acid	Histidine Metabolism
guanidinoacetate	0.8	Amino Acid	Creatine Metabolism
1-(1-enyl-palmitoyl)-2-arachidonoyl-GPC (P-16:0/20:4)*	0.8	Lipid	Plasma/ogen
cysteine	0.79	Amino Acid	Methionine, Cysteine, SAM and Taurine Metabolism
3-methoxytyrosine	0.77	Amino Acid	Phenylalanine and Tyrosine Metabolism
bilirubin (E.E)*	0.75	Cofactors and Vitamins	Hemoglobin and Porphyrin Metabolism
beta-muricholate	0.7	Lipid	Primary Bile Acid Metabolism
4-imidazoleacetate	0.7	Amino Acid	Histidine Metabolism
trimethylamine N-oxide	0.69	Lipid	Phospholipid Metabolism
allantoin	0.68	Nucleotide	Purine Metabolism, (Hypo)Xanthine/Inosine containing
N-acetylalanine	0.67	Amino Acid	Alanine and Aspartate Metabolism
putrescine	0.66	Amino Acid	Polyamine Metabolism
O-sulfo-L-tyrosine	0.65	Xenobiotics	Chemical
2-oxoadipate	0.61	Amino Acid	Lysine Metabolism
N-acetylisoleucine	0.61	Amino Acid	Leucine, Isoleucine and Valine Metabolism
N6-succinyladenosine	0.58	Nucleotide	Purine Metabolism, Adenine containing
o-cresol sulfate	0.55	Amino Acid	Phenylalanine and Tyrosine Metabolism
argininosuccinate	0.54	Amino Acid	Urea cycle; Arginine and Proline Metabolism
gamma-glutamylthreonine*	0.5	Peptide	Gamma-glutamyl Amino Acid
O-methylcatechol sulfate	0.5	Xenobiotics	Benzoate Metabolism
cystathionine	0.49	Amino Acid	Methionine, Cysteine, SAM and Taurine Metabolism
pyruvate	0.45	Carbohydrate	Glycolysis, Gluconeogenesis, and Pyruvate Metabolism
Biochemical Name	C-C	Super Pathway	Sub Pathway
	S-C		
kynurenine	0.9	Amino Acid	Tryptophan Metabolism
glucose	0.87	Carbohydrate	Glycolysis, Gluconeogenesis, and Pyruvate Metabolism
erythronate*	0.83	Carbohydrate	Aminosugar Metabolism
alanine	0.8	Amino Acid	Alanine and Aspartate Metabolism
flavin adenine dinucleotide (FAD)	0.83	Cofactors and Vitamins	Riboflavin Metabolism
dimethylarginine (SDMA + ADMA)	0.82	Amino Acid	Urea cycle; Arginine and Proline Metabolism
ethylmalonate	0.78	Amino Acid	Leucine, Isoleucine and Valine Metabolism
biopterin	0.76	Cofactors and Vitamins	Tetrahydrobiopterin Metabolism
biopterin	0.76	Cofactors and Vitamins	Tetrahydrobiopterin Metabolism
myo-inositol	0.72	Lipid	Inositol Metabolism
5-hydroxyindoleacetate	0.7	Amino Acid	Tryptophan Metabolism
citrate	0.69	Energy	TCA Cycle
gamma-glutamylglutamate	0.65	Peptide	Gamma-glutamyl Amino Acid
kynurenate	0.63	Amino Acid	Tryptophan Metabolism
N-acetylserine	0.62	Amino Acid	Glycine, Serine and Threonine Metabolism
2-hydroxyhippurate (salicylurate)	0.59	Xenobiotics	Benzoate Metabolism
N-methylpipecolate	0.57	Xenobiotics	Chemical
gamma-glutamylmethionine	0.52	Peptide	Gamma-glutamyl Amino Acid
2-methylcitrate/homocitrate	0.51	Energy	TCA Cycle
glutarate (pentanedioate)	0.49	Amino Acid	Lysine Metabolism
4-ethylphenylsulfate	0.3	Xenobiotics	Benzoate Metabolism
indoleacetyl glycine	0.3	Amino Acid	Tryptophan Metabolism

[0045]

표 2

Biochemical Name	C-C	Super Pathway	Sub Pathway
	S-C		
15-methylpalmitate	1.47	Lipid	Fatty Acid, Branched
3-hydroxysebacate	1.31	Lipid	Fatty Acid, Monohydroxy
1-oleoyl-GPI (18:1)*	2.97	Lipid	Lysolipid
hyodeoxycholate	3.52	Lipid	Secondary Bile Acid Metabolism
uridine 5'-monophosphate (UMP)	1.82	Nucleotide	Pyrimidine Metabolism, Uracil containing
Biochemical Name	C-C	Super Pathway	Sub Pathway
	S-C		
thioprolin	9.72	Amino Acid	Tryptophan Metabolism
S-methylmethionine	2.83	Amino Acid	Methionine, Cysteine, SAM and Taurine Metabolism
10-undecenoate (11:1n1)	1.79	Lipid	Medium Chain Fatty Acid
10-nonadecenoate (19:1n9)	1.54	Lipid	Long Chain Fatty Acid
deoxycholate	1.93	Lipid	Secondary Bile Acid Metabolism

[0046]

[0048]

또한, 독립적인 코카인 중독 쥐 모델의 혈장 분석을 대구경북과학기술원의 뇌신경세포 대사질환 및 뇌대사체학 연구실(김은경 교수님)에 의뢰하였다. 그 결과, 코카인 중독 쥐 모델의 혈장에서 감소하는 대사체 10개와 증가하는 대사체 5개를 발견하고, 하기의 표 3에 기재하였다.

표 3

	Control	Mode	Name	Formula	Score	Mass	Regulation
Coc WT	Sal WT	Pos	Tributyl phosphate	C12 H27 O4 P	97.01	266.1648	UP
			7-Methoxychromone	C10 H8 O3	94.97	176.0471	DOWN
			cholest-5,24-dien-3beta-ol 3-O-beta-D-glucopyranoside	C33 H54 O6	93.36	546.3911	DOWN
			2-Chloro-4-biphenylol	C12 H9 Cl O	92.79	204.0346	DOWN
			Pyridinium Bis-Retinoids	C42 H58 N O	89.43	592.4522	DOWN
			Uridine	C9 H12 N2 O6	85.58	244.0713	DOWN
			Thalassemine	C8 H19 N4 O6 P	83.71	298.1037	DOWN
			N'-arachidonoyl-N"-diethylethylenediamine	C26 H46 N2 O	80.49	402.3607	DOWN
			alpha-curcumen	C15 H22	72.63	202.1707	DOWN
			2-n-Tetrahydrothiophenecarboxylic acid	C5 H8 O2 S	71.96	132.024	UP
		Neg	Gly Lys Val	C13 H26 N4 O4	70.19	302.1939	DOWN
			Phenylpropionylglycine	C11 H13 N O3	96.16	207.0892	UP
			Methylone	C11 H13 N O3	91.19	207.0886	DOWN
			Methyl acetyl ricinoleate	C21 H38 O4	81.26	354.276	UP
			4-Hydroxycyclohexylacetic acid	C8 H14 O3	74.31	158.0935	UP
Sal Tg	Sal WT	Pos	7-Methoxychromone	C10 H8 O3	94.97	176.0471	DOWN
			Pyridinium Bis-Retinoids	C42 H58 N O	89.43	592.4522	DOWN
			Triethylamine	C6 H15 N	87.49	101.1206	DOWN
			Thalassemine	C8 H19 N4 O6 P	83.71	298.1037	DOWN
			N'-arachidonoyl-N"-diethylethylenediamine	C26 H46 N2 O	80.49	402.3607	DOWN
			Diethyl phthalate	C12 H14 O4	77.51	222.0884	DOWN
			Mundulone	C26 H26 O6	74.11	434.1729	UP
			Gly Lys Val	C13 H26 N4 O4	70.19	302.1939	DOWN
Coc Tg	Coc WT	Pos	Z'-Aminobiphenyl-2,3-diol	C12 H11 N O2	63.95	201.0805	DOWN
Coc Tg	Sal Tg	Pos	15(R)-17-phenyl trinar PGF2α isopropyl ester	C26 H38 O5	75.69	430.2689	UP
			Arachidonoyl Serotonin	C30 H42 N2 O2	75.58	462.3235	UP
		Neg	(1R,2R)-3-oxo-2-pentyl-cyclopentanehexanoic acid	C16 H28 O3	76.77	268.2025	UP

[0049]

[0051]

위와 같은 두 번의 코카인 중독 쥐 모델의 혈중 대사체 분석 실험에서 공통적으로 코카인 중독에 의해 유리딘(Uridine) 대사체가 변화하는 것을 찾아낼 수 있었다.

실시예 3

[0053]

코카인 중독 쥐 모델의 혈중 유리딘삼인산(uridine triphosphate, UTP) 농도 변화 분석을 위한 혈액 시료의 준비

[0054]

코카인 중독 쥐 모델의 혈중 유리딘삼인산의 농도를 측정하기 위해, 실험군 쥐는 실험 첫째날 채혈을 수행하고, 복강내 주사를 통하여 식염수를 주입하였다. 식염수 주입은 3일 동안 진행하였으며, 이후 15 mg/kg의 코카인을 5일 동안 주입하여 중독을 유도하였다. 대조군 쥐는 실험 첫째날 채혈을 수행하고, 8일 동안 복강내 주사를 통

하여 식염수를 주입하였다. 9일째에 실험군 쥐와 대조군 쥐 모두 채혈을 수행하였다. 이후 14일 동안의 금단기간을 두고, 금단기간의 마지막 날에 채혈을 수행하였다. 15일째에 복강내 주사로 10 mg/kg의 코카인을 다시 주입하였으며, 16일째에 마지막 채혈을 수행하였다. 채혈한 혈액은 30분 동안 상온 처리하고, 4 °C에서 12,000 rpm의 속도로 원심분리 하여 혈장을 수득하였으며, 혈장은 -80 °C에서 보관하였다.

[0055] 또한, 모든 실험군 쥐의 복강내 주사 직후 30분 동안 운동량 측정 실험(locomotor counts)을 통해 코카인에 대한 반응을 관찰하였다.

실시예 4

[0057] 코카인 중독 쥐 모델의 혈중 유리딘삼인산(uridine triphosphate, UTP) 농도 변화 분석을 위한 효소 결합 면역흡착 분석(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

[0058] 실시예 3에서 수득한 혈장을 Uridine triphosphate ELISA kit (MBS2025220, MyBiosource)를 사용하여 유리딘삼인산의 농도를 측정하는데 사용하였다.

[0059] ELISA kit의 모든 시약은 10분 동안 상온 처리한 후 실험에 사용하였다. 총 6개의 튜브에 600 μ l의 standard diluent를 넣어 준비한 후, Stock standard 300 μ l를 6개의 튜브 중 첫번째 튜브에 첨가하고 거품이 생기지 않도록 부드럽게 튜브를 4 ~ 5회 전복하여 혼합하였다. 첫번째 튜브의 혼합된 용액 중 300 μ l를 두번째 튜브에 첨가하고 거품이 생기지 않도록 부드럽게 튜브를 4 ~ 5회 전복하여 혼합하였다. 동일한 과정을 6번째 튜브까지 반복하여 standard 용액을 준비하였다. Detection Reagent A와 Detection Reagent B는 각각 Reagent Diluent 용액에 1:100으로 희석하여 준비하고, Washing solution은 3차 증류수에 1:30으로 희석하여 준비하였다.

[0060] 실험 준비를 마친 후 혈장은 5분 동안 상온 처리하여 해동한 후, PBS 용액에 1:8 농도로 희석하였다. Uridine triphosphate ELISA kit의 96 well plate에 앞서 준비한 6개의 standard와 혈장 시료를 50 μ l씩 2개 well에 소분하였다. 그리고 나서, Detection Reagent A를 50 μ l씩 첨가하고 plate를 가볍게 좌우로 흔들어서 섞고, Plate sealer로 plate를 덮고 37 °C에서 1시간 동안 방치하였다. 1시간 경과한 후에, plate를 뒤집어서 well에서 solution을 제거하고, washing solution을 well당 350 μ l씩 첨가하고 1 ~ 2분 동안 처리하였다. washing solution을 제거한 후에, 동일한 washing solution 처리하여 2회 반복하였다. 그리고 나서, 100 μ l의 Detection Reagent B를 넣고, Plate sealer로 plate를 덮고 37 °C에서 1시간 동안 방치하였다. 1시간 경과한 후에, plate를 뒤집어서 well에서 solution을 제거하고, washing solution을 well당 350 μ l씩 첨가하고 1 ~ 2분 동안 처리하였다. washing solution을 제거한 후에, 동일한 washing solution 처리하여 4회 반복하였다. 마지막 washing solution 제거 후에, 90 μ l의 Substrate solution을 넣고 새로운 Plate sealer로 plate를 덮고 37 °C에서 10 ~ 20분 동안 처리하였다.

[0061] 다음 과정부터 plate는 빛으로부터 차단하여 실험을 진행하였다. 이후 50 μ l의 Stop solution을 넣어준 후 plate 옆면을 가볍게 두드려 섞어주었다. plate 하단의 이물질을 제거하고 SpectraMAX 13x(Molecular Devices)기기를 사용하여 450nm 파장에서 흡광도를 측정하여 혈장 시료 내의 유리딘삼인산의 농도를 측정하였다.

실시예 5

[0063] 코카인 중독 쥐 모델의 혈중 유리딘삼인산(uridine triphosphate, UTP) 농도 변화 분석 실험 결과

[0064] 실시예 3에서 코카인 복강내 주사를 통한 코카인 중독 유발 실험 결과, 도 1에 나타난 바와 같이 코카인 중독 쥐 모델은 코카인 주입에 따른 운동량 증가를 나타냈으며 반복 주입에 따라 그 증가량이 커지는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 코카인 민감도가 정상적으로 이루어졌음을 알 수 있었으며, 금단기간 이후 코카인에 다시 노출 되었을 때에도 대조군 쥐 대비 실험군 쥐에서 코카인에 대한 반응이 더 크게 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

[0065] 코카인 중독 쥐 모델의 혈중 유리딘삼인산(uridine triphosphate, UTP) 농도 변화 분석을 위한 효소 결합 면역흡착 분석 실험 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 코카인에 반복 노출되었던 실험군 쥐의 금단기간 이후의 혈장 시료(금단기간 14일 및 코카인 재노출 다음날 혈장 시료)에서 유리딘삼인산의 혈중 농도가 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

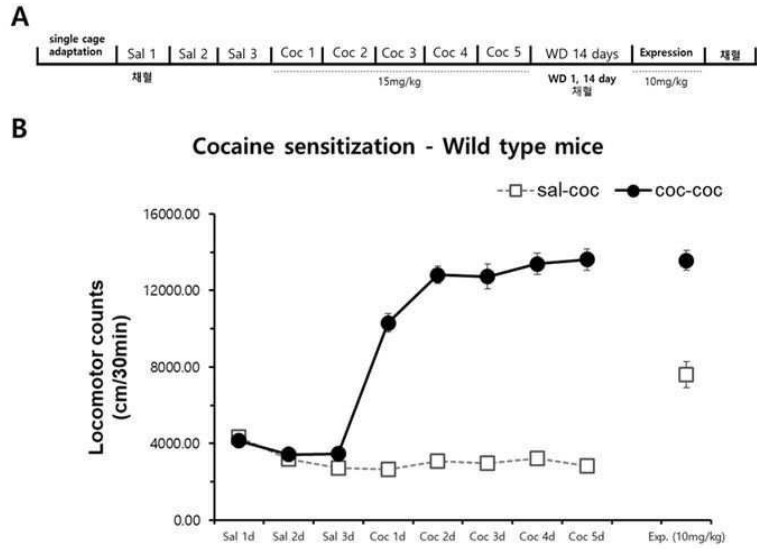
[0066] 실시예 2의 혈중 대사체 분석과 실시예 4의 효소 결합 면역흡착 분석 실험 결과를 통해 혈중 유리딘삼인산이 코카인 약물 중독의 여부를 판단할 수 있는 바이오마커임을 알 수 있었다.

[0068] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이

러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 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

