



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0007258
(43) 공개일자 2020년01월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01) G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2018.05)
G01N 33/6893 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0081140
(22) 출원일자 2018년07월12일
심사청구일자 2018년07월12일

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
(72) 발명자
홍수중
서울특별시 강남구 압구정로39길 58, 24동 902호
(압구정동, 구현대아파트)
홍상범
경기도 성남시 분당구 수내로 74, 108동 401호 (수내동, 양지마을금호1단지아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

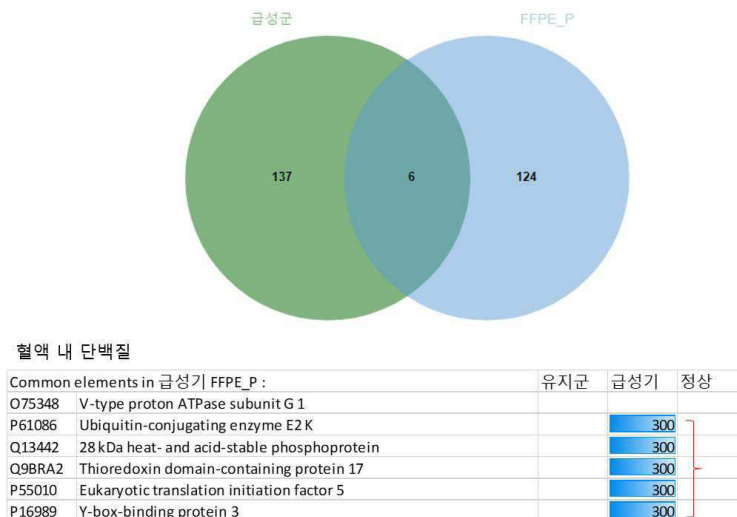
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 폐조직 내 가습기 살균제 성분 노출 여부 확인용 바이오마커 조성물 및 이를 이용한 확인 방법

(57) 요약

본 발명은 폐조직 내 가습기 살균제 성분 노출 여부 확인용 바이오마커 조성물 및 이를 이용한 확인 방법에 관한 것으로, 본 발명에서는 가습기 살균제에 노출된 급성군(증상 발생하여 내원 후 2달 이내)의 폐조직 및 가습기 살균제에 노출되지 않은 정상대조군의 폐조직을 이용하여 단백질을 분석을 수행하였으며, 이와 동시에 급성군 및 유지군(증상 발생하여 내원 후 3년 경과)의 혈액 단백질에서 특이적 양적 변화를 나타내는 단백질을 이용하여 정상대조군 및 급성군을 감별할 수 있는 단백질을 선별한 바, 상기 단백질은 가습기 살균제 성분 노출 여부를 확인용 바이오마커 조성물로 활용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/142 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2333/46 (2013.01)
G01N 2333/4703 (2013.01)
G01N 2333/82 (2013.01)
G01N 2333/9015 (2013.01)
G01N 2800/42 (2013.01)

염정훈

서울특별시 강동구 천중로16길 37, 강동리버스타운
105동 301호 (천호동)

(72) 발명자

김경곤

서울특별시 송파구 올림픽로 435, 108동 2302호

유지영

경기도 안양시 동안구 부림로 113, 1903호 (관양동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	B0080117000109
부처명	환경부
연구관리전문기관	환경보건정책과
연구사업명	유해화학물질 노출분야 서울아산병원 환경보건센터
연구과제명	유해화학물질(가습기살균제 등) 노출분야
기 여 율	1/1
주관기관	서울아산병원 환경보건센터
연구기간	2017.01.01 ~ 2017.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

28 kDa 열- 및 산-안정 인단백질(28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein), 티오레독신 도메인-포함 단백질 17(thioredoxin domain-containing protein 17) 및 아그레칸 코어 단백질(aggrekan core protein)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질을 포함하며,

가습기 살균제 성분에 대해 급성기 단계의 노출 여부를 확인하는 것을 특징으로 하는 바이오마커 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 유비퀴틴-결합 효소 E2 K(ubiquitin-conjugating enzyme E2 K), 진핵생물 번역 개시 인자 5(eukaryotic translation initiation factor 5), Y-box-결합 단백질(Y-box-binding protein 3) 및 스타스민 동형 2(isoform 2 of stathmin)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 바이오마커 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 가습기 살균제 성분은 PHMG(polyhexamethylene guanidine), PGH(oligo-[2-(2-ethoxy)-ethoxyethyl]-guanidinium-chlorid) 및 PHMB(polyhexamethylene biguanide)로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 바이오마커 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 급성기 단계는 가습기 살균제 성분 노출 후 증상 발생하여 내원 직후부터 2개월 이내의 기간인 것을 특징으로 하는 바이오마커 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 급성기 단계의 노출 여부는 폐조직 시료에서 측정하는 것을 특징으로 하는 바이오마커 조성물.

청구항 6

제 1항의 바이오마커 조성물로부터 바이오마커의 발현 수준을 검출할 수 있는 체제를 포함하며, 가습기 살균제 성분에 대해 급성기 단계의 노출 여부를 확인하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 체제는 상기 바이오마커에 특이적으로 결합하는 항체, 앵타머, 펩타이드, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 펩타이드 핵산(PNA), 리보자임, siRNA, shRNA, miRNA 또는 화합물인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 8

가습기 살균제 성분에 노출이 의심되는 대상체로부터 분리된 폐조직을 준비하는 제 1단계;

상기 폐조직으로부터 제 1항의 바이오마커 조성물 중 바이오마커의 발현 수준을 측정하는 제 2단계; 및

정상대조군과 비교하여 상기 바이오마커 중 하나 이상의 발현이 검출되는 경우, 가습기 살균제 성분 노출에 대해 급성기 단계인 것으로 판단하는 제 3단계;

를 포함하는 가습기 살균제 성분에 대한 노출 여부 확인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 폐조직 내 가습기 살균제 성분 노출 여부 확인용 바이오마커 조성물 및 이를 이용한 확인 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] PGH(oligo-[2-(2-ethoxy)-ethoxyethyl]-guanidinium-chlorid), PHMG(polyhexamethylene guanidine) 및 PHMB(polyhexamethylene biguanide)는 구아니딘(guanidine) 계열의 살균제로서 항감염, 항균제로 다양하게 사용되어 왔다. 그 중에서도 특히 PGH와 PHMG는 우리나라에서 가습기 살균제로 사용되어 오다가 현재까지 총 541명의 인명피해가 발생하였고, 이 중 144명이 사망한 것으로 추정된다. 또한, 살균제 사용자 수를 약 800만 명으로 추산하고 있어 실제 피해 규모는 더 광범위할 것으로 보이며, 피해 판정에 대한 과학적 근거가 절실한 실정이다.

[0003] PGH, PHMG 및 PHMB의 살균제 성분들은 뛰어난 살균력을 갖지만, 여러 가지 문제점을 나타낸다는 사실들이 여러 문헌에서 보고된 바 있다. 상기 살균제 성분들은 생분해성이 아니므로 환경오염을 유발하며, 수생 독성이 심각한 것으로 알려져 있는데 10 µg/L(0.000001%, 0.054 µM, 0.01 ppm)에서도 매우 높은 독성을 나타낸다. 또한, 흡입 독성이 있어 스프레이로의 사용이 금지되었으며, 규제 없이 자의적, 무차별적으로 응용되어 제품에 사용될 경우 매우 큰 위험을 초래할 수 있다. 2013년 유럽화학국은 PHMB를 "흡입하면 사망, fatal if inhaled" 물질로 규정하고 있다. 상기 성분들은 인지질 이중막을 파괴하여 살균효과를 나타내는 바, 사람 세포의 인지질을 파괴할 가능성이 있으며, 피부 장벽을 파괴할 우려가 있다. 따라서 물티슈처럼 피부에 자주 사용하면 피부염을 유발할 가능성이 크다. 또한, 살균제 성분에 의해 폐 손상을 받았음에도 살균제 노출 시점으로부터 시간이 길어질수록 인과관계를 직접 규명할 수 있는 근거로 인정되는 폐 영상에서의 흔적들이 소실되고, 폐 기능의 회복 등으로 정확한 피해 평가가 어려운 실정이다.

[0004] 이러한 문제점들에도 불구하고, 여전히 상기 살균제 성분들은 소독제, 방부제, 탈취제, 물티슈 등의 생활환경 제품에 자의적으로 광범위하게 사용될 가능성이 있고, 특히 제조업체들은 이들 성분들의 사용기준 용량을 지키지 않거나 제품에 성분명과 사용량을 표기하지 않을 가능성이 있어 소비자들은 불안은 커지고 있다.

[0005] 따라서, 살균제 성분 노출 여부 및 피해를 확인하기 위한 손쉬운 방법의 개발이 필요하며, 폐조직 시료에서 간편하게 살균제 성분의 피해 여부를 확인할 수 있는 바이오마커의 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-15036380000호 (2015.03.11 등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 따라서, 본 발명의 목적은 가습기 살균제 성분에 대한 노출 여부를 확인하는 바이오마커 조성물, 상기 바이오마커 조성물로부터 바이오마커의 발현 수준을 검출할 수 있는 제제를 포함하는 가습기 살균제 노출 여부 확인용 키트 및 상기 바이오마커 조성물을 이용한 가습기 살균제 성분에 대한 노출 여부 확인 방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 28 kDa 열- 및 산-안정 인단백질(28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein), 티오레독신 도메인-포함 단백질 17(thioredoxin domain-containing protein 17) 및 아그레칸 코어 단백질(aggrecan core protein)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질을 포함하며, 가습기 살균제 성분에 대해 급성기 단계의 노출 여부를 확인하는 것을 특징으로 하는 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 바이오마커 조성물로부터 바이오마커의 발현 수준을 검출할 수 있는 제제를 포함하며, 가습기 살균제 성분에 대해 급성기 단계의 노출 여부를 확인하는 것을 특징으로 하는 키트를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 가습기 살균제 성분에 노출이 의심되는 대상체로부터 분리된 폐조직을 준비하는 제 1단계; 상

기 폐조직로부터 상기 바이오마커 조성물 중 바이오마커의 발현 수준을 측정하는 제 2단계; 및 정상대조군과 비교하여 상기 바이오마커 중 하나 이상의 발현이 검출되는 경우, 가슴기 살균제 성분 노출에 대해 급성기 단계인 것으로 판단하는 제 3단계;를 포함하는 가슴기 살균제 성분에 대한 노출 여부 확인 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명에서는 가슴기 살균제에 노출된 급성군(증상 발생하여 내원 후 2달 이내)의 폐조직 및 가슴기 살균제에 노출되지 않은 정상대조군의 폐조직을 이용하여 단백질체 분석을 수행하였으며, 이와 동시에 급성군 및 유지군(증상 발생하여 내원 후 3년 경과)의 혈액 단백질에서 특이적 양적 변화를 나타내는 단백질을 이용하여 정상대조군 및 급성군을 감별할 수 있는 단백질을 선별한 바, 상기 단백질은 가슴기 살균제 성분 노출 여부를 확인용 바이오마커 조성물로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 가슴기 살균제에 대한 급성군 및 정상대조군의 폐조직 단백질체 분석 결과를 나타낸 것이다.
 도 2는 정상대조군의 폐조직과 비교하였을 때, 급성군 폐조직에서 더 많이 발현되거나 더 적게 발현되는 단백질의 목록을 나타낸 것이다.
 도 3은 급성군 폐조직과 급성군 혈액에서 특이적 양적 변화를 나타내는 단백질을 나타낸 것이다.
 도 4는 급성군 폐조직과 유지군 혈액에서 특이적 양적 변화를 나타내는 단백질을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명의 발명자들은 가슴기 살균제에 노출된 급성군(증상 발생하여 내원 후 2달 이내)의 폐조직 및 가슴기 살균제에 노출되지 않은 정상대조군의 폐조직을 이용하여 단백질체 분석을 수행하였으며, 이와 동시에 급성군 및 유지군(증상 발생하여 내원 후 3년 경과)의 혈액 단백질에서 특이적 양적 변화를 나타내는 단백질을 이용하여 정상대조군 및 급성군을 감별할 수 있는 단백질을 선별하였고, 상기 단백질이 가슴기 살균제 성분 노출 여부를 확인하는 분자 진단 마커로 활용이 가능함을 확인하며 본 발명을 완성하였다.

[0015] 이에, 본 발명은 28 kDa 열- 및 산-안정 인단백질(28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein)(UniProtKB/Swiss-Prot no. Q13442), 티오레독신 도메인-포함 단백질 17(thioredoxin domain-containing protein 17)(UniProtKB/Swiss-Prot no. Q9BRA2) 및 아그레칸 코어 단백질(aggrecan core protein)(UniProtKB/Swiss-Prot no. P16112)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질을 포함하며, 가슴기 살균제 성분에 대해 급성기 단계의 노출 여부를 확인하는 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0016] 상기 조성물은 유비퀴틴-결합 효소 E2 K(ubiquitin-conjugating enzyme E2 K)(UniProtKB/Swiss-Prot no. P61086), 진핵생물 번역 개시 인자 5(eukaryotic translation initiation factor 5)(UniProtKB/Swiss-Prot no. P55010), Y-box-결합 단백질(Y-box-binding protein 3)(UniProtKB/Swiss-Prot no. P16989) 및 스타스민 동형 2(isoform 2 of stathmin)(UniProtKB/Swiss-Prot no. Q93045)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질을 더 포함할 수 있다.

[0017] 상기 가슴기 살균제 성분은 PHMG(polyhexamethylene guanidine), PGH(oligo-[2-(2-ethoxy)-ethoxyethyl]-guanidinium-chlorid) 및 PHMB(polyhexamethylene biguanide)로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[0018] 상기 급성기 단계는 가슴기 살균제 성분 노출 후 증상 발생하여 내원 직후부터 2개월 이내의 기간일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[0019] 상기 급성기 단계의 노출 여부는 폐조직 시료에서 측정할 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명은 상기 바이오마커 조성물로부터 바이오마커의 발현 수준을 검출할 수 있는 제제를 포함하며, 가슴기 살균제 성분에 대해 급성기 단계의 노출 여부를 확인하는 키트를 제공한다.

[0022] 상기 제제는 상기 바이오마커에 특이적으로 결합하는 항체, 앵타머, 펩타이드, 안티센스 올리고뉴클레오타이드,

펩타이드 핵산(PNA), 리보자임, siRNA, shRNA, miRNA 또는 화합물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[0024] 또한, 본 발명은 가슴기 살균제 성분에 노출이 의심되는 대상체로부터 분리된 폐조직을 준비하는 제 1단계; 상기 폐조직으로부터 상기 바이오마커 조성물 중 바이오마커의 발현 수준을 측정하는 제 2단계; 및 정상대조군과 비교하여 상기 바이오마커 중 하나 이상의 발현이 검출되는 경우, 가슴기 살균제 성분 노출에 대해 급성기 단계인 것으로 판단하는 제 3단계;를 포함하는 가슴기 살균제 성분에 대한 노출 여부 확인 방법을 제공한다.

[0026] 이하에서는 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0028] 실시예 1: 폐조직 및 혈액 시료 준비

[0029] 실험에 사용된 폐조직 시료(formalin-fixed paraffin-embedded; FFPE, 포르말린-고정 파라핀-포매 조직 슬라이드) 또는 혈액 시료는 서울아산병원 조직세포자원센터에서 제공받았다.

[0031] 1-1. 급성군

[0032] 가슴기 살균제 성분(polyhexamethylene guanidine; PHMG)에 노출된 피해자들의 피해 정도는 심사에 따라 1 ~ 4 등급으로 나누어지며(1등급: 질병의 원인이 가슴기 살균제일 가능성이 거의 확실, 2등급: 질병의 원인이 가슴기 살균제일 가능성이 높음, 3등급: 질병의 원인이 가슴기 살균제일 가능성이 낮음, 4등급: 질병의 원인이 가슴기 살균제일 가능성이 거의 없음), 1등급 판정을 받은 환자 10명[소아 5명(여아 3명, 남아 2명), 성인 5명(여성)]으로, 소아 평균 나이는 8.2세(최소 5세 ~ 최대 12세), 성인 평균 나이는 37.6세(최소 32세 ~ 최대 44세)였다.

[0034] 1-2. 유지군

[0035] 유지군은 급성군과 동일인으로, 첫 번째 채혈 후, 평균 4.7년(최소 3.1년 ~ 최대 8.1년) 후에 채혈한 혈액을 실험에 사용하였다.

[0037] 1-3. 정상 대조군

[0038] 가슴기 살균제에 의해 발병된 폐질환이 아닌, 이외의 질환으로 폐 수술 시, 채취한 정상 폐조직을 실험에 사용하였으며, 소아 5명, 성인 5명으로, 소아 평균 나이는 11.4세(최소 7세 ~ 최대 19세), 성인 평균 나이는 53.2세(최소 46세 ~ 최대 69세)였다.

[0040] 실시예 2: FFPE 조직 슬라이드를 이용한 단백질체 분석 방법

[0041] 포르말린-고정 파라핀-포매 조직 슬라이드에서 단백질을 추출하기 위해 FFPE 단백질 추출 용액(Cat. No: 400925, Agilent)을 사용하였다. 간략하게, 바늘로 조직 슬라이드의 파라핀층을 긁어내어 e-튜브에 담고, 1 ml의 자일렌(xylene)을 첨가하여 혼합한 후 13,000 rpm으로 원심분리하여 펠렛(pellet)을 획득하였다. 상기 과정을 3회 반복한 후, 100% 에탄올 1ml로 펠렛을 2회 세척하였다. 이후 순차적으로 85%, 70% 에탄올 1ml을 이용하여 펠렛을 2회 세척하였다. 50 μ l의 FFPE 단백질 추출 용액을 첨가하고 100℃에서 20분간 가열한 후 1000 g로 1분간 원심분리하여 단백질을 추출하였다. 추출 효율을 높이기 위해, 60℃에서 30분 간격으로 볼텍싱(vortexing) 하면서 2시간 동안 반응시켰다. 이후 4℃에서 13,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 획득하고, BCA 기법으로 단백질을 정량하였다.

[0043] 추출된 단백질들은 30 kDa cutoff-filter unit를 digestion unit으로 사용하는 FASP(filter-aided sample preparation) 기법으로 펩타이드를 제조하였다. 상세하게는, 프로테아제/포스파타아제 억제제 콕테일(protease/phosphatase inhibitor cocktail)이 포함된 8 M의 요소(urea) 100 μ l를 농축된 소량 단백질 분획물에 혼합하고, 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 변성(denaturation) 시켰다. 이후, 50 mM의 디티오프레이톨(dithiothreitol)을 이용하여 37℃에서 이황화 결합(disulfide bond)을 reducing 시키고, 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 reducing을 수행하였다. 55 mM의 요오드아세트아미드(iodoacetamide)를 이용하여 빛 차단 조건에서 알킬화(alkylation) 반응을 수행한 후, 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 이후, 50 mM의 탄산수소암모늄(ammonium bicarbonate) 200 ml를 첨가한 후 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. LysS/트립신 혼합 프로테아제 100 ng을 각 시료에 처리하고, 37℃에서 밤새 digestion을 수행하였다. 그 다음 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하고, 10% 폼산(formic acid)으로 반응을 중지시킨 후 C18 역상 탈염 카트리지(reverse phase desalting cartridge)를 이용하여 탈염(desalting)을 수행하였다. 탈염된 펩타이드는 Speed Vac을 이용하여 건조한 후 0.1% 폼산에 용해하여 LC-MS 분석을 수행하였다. MS 장비는 Q-Exactive Plus BioPharm version(Thermo, USA)을, LC 장비는 UltiMate™ 3000 RSLCnano System(Thermo, USA)을 사용하였으며, 펩타이드 시료는 4 μ l씩 주입하여 300 μ l/분의 유속으로 NanoLC와 연동된 이온 트랩(ion trap) MS로 분석을 수행하였다. LC는 Solution A(5% 아세트오니트릴, 0.1% 폼산)와 solution B(95% 아세트오니트릴, 0.1% 폼산)의 농도 구배 120분을 포함하여 총 150분 동안 분리하였으며, 사용된 분석 컬럼은 AQUA C18(5 μ m, 125A)을 충전한 내직경 75 μ m, 외직경 360 μ m, 길이 50 cm의 fused silica capillary column을 사용하여 펩타이드 혼합체를 분리하였다. 분리된 펩타이드는 2000 V의 전자분무 이온화(electrospray ionization; ESI) 전압을 이용하여 이온 분사하며 이온 에미터(ion emitter)는 내직경 20 μ m 이온 스프레이 에미터(tapered ion spray emitter)를 통해 질량분석기로 주입하여 스펙트럼 데이터를 획득하였다. Orbitrap MS 분석은 400 ~ 2000 m/z 범위에 대해 이온 트랩 MS로 1번의 survey scan(해상도 30,000)을 수행한 후에 HCD(higher energy collision dissociation, 25% 에너지 레벨) 방식 및 Orbitrap MS를 이용하여 8번의 MS/MS(해상도 60,000) 분석을 수행하였다. 5분의 dynamic exclusion option을 통해 중복된 펩타이드 이온 검출을 최소화하였다. 이온 트랩의 Auto gain control target setting은 Full MS에 대해서는 3E04를, FT MS/MS에 대해서는 2E5를 사용하였다. 획득한 RAW 데이터는 Sequest algorithm 기반의 데이터베이스 분석 소프트웨어인 Proteome Discoverer(Thermo, USA, version 2.2)를 이용하여 정성 분석 및 Label free 정량 분석을 수행하였다. 펩타이드 변형은 시스테인 카바미도메틸화(cysteine carbamidomethylation), 메티오닌 산화(methionine oxidation), 탈아미드화(deamidation)로 고정된 변형으로 수행하였다. 트립신 비절단 trypsin misscleavage)은 "1" 값을 사용하였고, 서열 데이터베이스는 최신 swissprot sequence DB를 사용하였으며, Label free quantitation을 위하여 펩타이드 이온 강도를 이용한 정량 분석을 수행하였다. 동정된 단백체들을 Uniprot accession number를 query로 사용하고, Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery(DAVID) v6.7(<http://david.abcc.ncifcrf.gov>)을 이용하여, 유전자 온톨로지(gene ontology; GO)를 세포 성분(cellular component), 분자 기능(molecular function) 및 생물학적 공정(biological process)의 세 분야로 분석하였으며, Perseus(<http://www.perseus-framework.org>)를 이용하여 heat map, clustering 분석 및 Volcano plot 분석을 수행하였다.

[0045] 실험예 1: 폐조직 총 단백질체의 비교 분석

[0046] 정상대조군 및 급성군의 폐조직 내 단백질체를 동정한 결과, 도 1과 같이, 총 2,167종의 단백질체를 동정하였으며(정상대조군: 1,937종, 급성군: 2,092종), 정상대조군에서만 동정된 단백질이 75종, 급성군에서만 동정된 단백질이 230종, 정상대조군 및 급성군에서 공통적으로 동정된 단백질이 1,862종인 것을 확인하였다.

[0048] 상기 동정된 단백질 중 정상대조군보다 급성군의 폐조직에서 더 많이 발현된 상위 25종의 단백질과, 정상대조군보다 급성군 폐조직에서 더 적게 발현된 상위 27종의 단백질을 발굴하였으며, 이는 도 2에 나타내었다.

[0050] 바이오마커로서 가능성이 높은 단백질을 선별하기 위하여, 혈액 단백질과 비교하여 혈액과 폐조직 동시에 양적인 변화를 나타내는 단백질을 분석하였으며, 그 결과, 급성군의 폐조직과 급성군의 혈액에서 동시에 변화를 나타낸 단백질은 총 6종이었고, 상기 단백질들의 혈액 내 양을 분석한 결과, 도 3과 같이, 총 5종의 단백질[유비퀴틴-결합 효소 E2 K(ubiquitin-conjugating enzyme E2 K), 28 kDa 열- 및 산-안정 인단백질(28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein), 티오레독신 도메인-포함 단백질 17(thioredoxin domain-containing protein

17), 진핵생물 번역 개시 인자 5(eukaryotic translation initiation factor 5), Y-box-결합 단백질(Y-box-binding protein 3)]이 급성군에서만 특이적으로 관찰되는 것을 확인하였다.

[0052] 또한, 급성군의 폐조직과 유지군 혈액에서 동시에 변화를 나타낸 단백질은 총 6종이었고, 상기 단백질들의 혈액 내 양을 분석한 결과, 도 4와 같이, 총 2종의 단백질[스타스민 동형 2(isoform 2 of stathmin), 아그레칸 코어 단백질(aggrecan core protein)]이 정상대조군과 급성군보다 유지군에서 특이적으로 더 많이 관찰되는 것을 확인하였다.

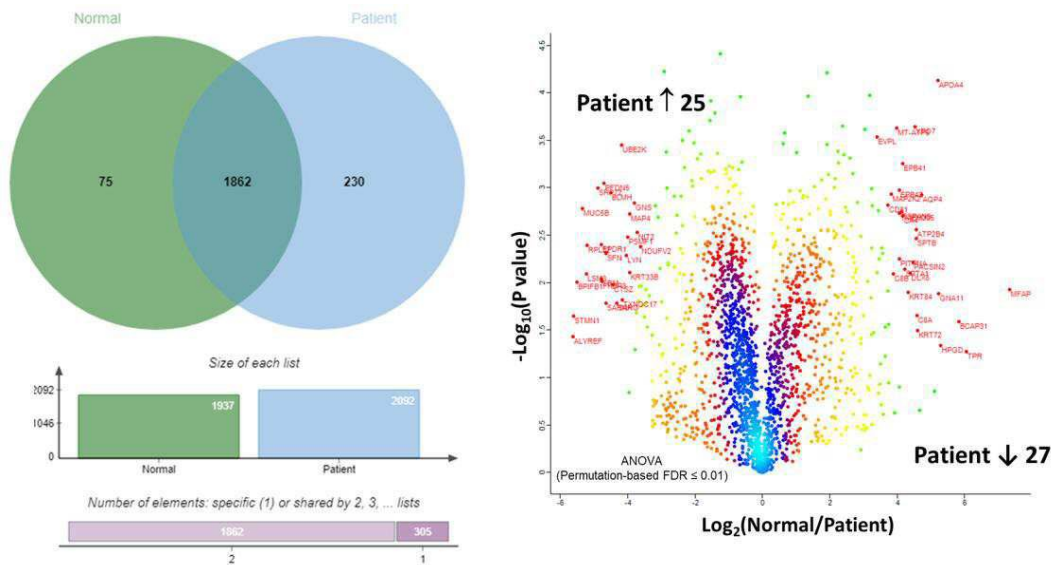
[0054] 따라서, 급성군의 폐조직과 급성군 및 유지군 혈액에서 동시에 특이적 양적 변화를 나타낸 총 6종의 단백질은 정상대조군 및 급성군을 감별하는 바이오마커로 활용될 수 있다.

[0056] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술한 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0057] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

도면1



도면2

UP-DEP in Patient (25)

Accession	Description	Gene	Ratio (Normal/Patient)
Q86V81	THO complex subunit 4	ALYREF	-5.6
P16949-2	Isoform 2 of Stathmin	STMN1	-5.6
Q8TDL5	BPI fold-containing family B member 1	BPIFB1	-5.5
Q8HC84	Mucin-5B	MUC5B	-5.3
P62310	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM3	LSM3	-5.2
P62910	60S ribosomal protein L32	RPL32	-5.2
O76094	Signal recognition particle subunit SRP72	SRP72	-4.9
P19623	Spermidine synthase	SRM	-4.8
Q9JUM2	Mammalian spermidin-related protein 1	EPOR1	-4.8
Q00688	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP3	FKBP3	-4.8
Q99471	Prefoldin subunit 5	PFND5	-4.7
P82979	SAP domain-containing ribonucleoprotein	SARNP	-4.7
P31947	14-3-3 protein sigma	SFN	-4.6
Q13867	Bleomycin hydrolase	BLMH	-4.5
Q9UBR2	Cathepsin Z	CTSZ	-4.4
Q8BV04	Specifically androgen-regulated gene protein	SARG	-4.3
P61086	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 K	UBE2K	-4.2
Q9BRA2	Thioredoxin domain-containing protein 17	TXNDC17	-4.2
P07948	Tyrosine-protein kinase Lyn	LYN	-4.0
Q92530	Proteasome inhibitor PI31 subunit	PSMF1	-4.0
P27816	Microtubule-associated protein 4	MAP4	-3.9
Q14525	Keratin, type I cuticular Ha3-II	KRT33B	-3.9
P15586	N-acetylglucosamine-6-sulfatase	GNS	-3.8
Q8NQR4	Omega-amidase NIT2	NIT2	-3.7
P19404	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 2, mitochondrial	NDUFV2	-3.6

Term	RT	Genes	Count	%	P-Value
neuron projection development	RT		3	12.0	8.2E-3
negative regulation of toll-like receptor 4 signaling pathway	RT		2	8.0	1.2E-2
positive regulation of cellular component movement	RT		2	8.0	1.4E-2
mitotic spindle organization	RT		2	8.0	4.0E-2
response to drug	RT		3	12.0	6.4E-2
mRNA 3'-end processing	RT		2	8.0	6.6E-2
RNA export from nucleus	RT		2	8.0	7.3E-2
termination of RNA polymerase II transcription	RT		2	8.0	8.4E-2

Down-DEP in Patient (27)

Accession	Description	Gene	Ratio (Normal/Patient)
P55001	Microfibrillar-associated protein 2	MFAP2	7.3
P12270	Nucleoprotein TPR	TPR	6.1
P51572-2	Isoform 2 of B-cell receptor-associated protein 31	BCAP31	5.8
P15428	15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase [NAD(+)]	HPGD	5.3
P29992	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-11	GNA11	5.2
P06727	Apolipoprotein A-IV	APOA4	5.2
F55087	Aquaporin-4	AQP4	4.7
Q14CNA-2	Isoform 2 of Keratin, type II cytoskeletal 72	KRT72	4.6
P07357	Complement component C8 alpha chain	C8A	4.6
P11277-2	Isoform 2 of Spectrin beta chain, erythrocytic	SPTB	4.6
P23634	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 4	ATP2B4	4.6
Q9UIA9	Exportin-7	XPO7	4.5
Q9UNF0	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 2	PACSIN2	4.5
P56179-3	Isoform 3 of Homeobox protein DLX-6	DLX6	4.4
Q9NSB2	Keratin, type II cuticular Hb4	KRT84	4.3
P02549	Spectrin alpha chain, erythrocytic 1	SPTA1	4.2
P11171	Protein 4.1	EPB41	4.2
P22748	Carbonic anhydrase 4	CA4	4.2
O75554	Tetraspanin-9	TSPAN9	4.1
P16452-2	Isoform Long of Erythrocyte membrane protein band 4.2	EPB42	4.1
Q6UW68	Transmembrane protein 205	TMEM205	4.1
Q00169	Phosphatidylinositol transfer protein alpha isoform	PITPNA	4.1
P00846	ATP synthase subunit a	MT-ATP6	4.0
P07358	Complement component C8 beta chain	C8B	3.9
P36507	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 2	MAP2K2	3.8
P60033	CD81 antigen	CD81	3.7
Q92817	Envoplakin	EVPL	3.4

Term	RT	Genes	Count	%	P-Value
complement activation, alternative pathway	RT		2	7.4	1.8E-2
actin filament capping	RT		2	7.4	1.8E-2
ER to Golgi vesicle-mediated transport	RT		3	11.1	2.2E-2
cytoskeleton organization	RT		3	11.1	2.2E-2
cytolysis	RT		2	7.4	3.0E-2
protein export from nucleus	RT		2	7.4	4.2E-2
regulation of complement activation	RT		2	7.4	4.2E-2
MAPK cascade	RT		3	11.1	5.3E-2
peptide cross-linking	RT		2	7.4	6.9E-2
positive regulation of protein binding	RT		2	7.4	8.4E-2
regulation of protein stability	RT		2	7.4	9.5E-2

도면3



혈액 내 단백질

Common elements in 급성기 FFPE_P :		유지군	급성기	정상
O75348	V-type proton ATPase subunit G 1			
P61086	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 K		300	
Q13442	28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein		300	
Q9BRA2	Thioredoxin domain-containing protein 17		300	
P55010	Eukaryotic translation initiation factor 5		300	
P16989	Y-box-binding protein 3		300	

도면4



Common elements in 완화기 FFPE_P :		유지군	급성기	정상
P45974	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	6.6	253	40.4
P01034	Cystatin-C	96.4	33.5	170.1
Q86VB7-2	Isoform 2 of Scavenger receptor cysteine-rich type 1 protein M130	92.7	34.8	172.5
P16949-2	Isoform 2 of Stathmin	182.4	97.2	20.4
Q9Y646	Carboxypeptidase Q	177	2.8	120.2
P16112	Aggrecan core protein	217.4	7.9	74.7