(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0030804
(43) 공개일자 2020년03월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) *C12Q 1/6883* (2018.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
C12Q 1/6883 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2018-0109493
(22) 출원일자 2018년09월13일
심사청구일자 2018년09월13일

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
(72) 발명자
이상욱
서울특별시 송파구 양재대로 1218, 104동 1104호 (방이동, 올림픽선수기자촌아파트)
김경곤
서울특별시 송파구 올림픽로 435, 113동 3401호 (신천동, 파크리오)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

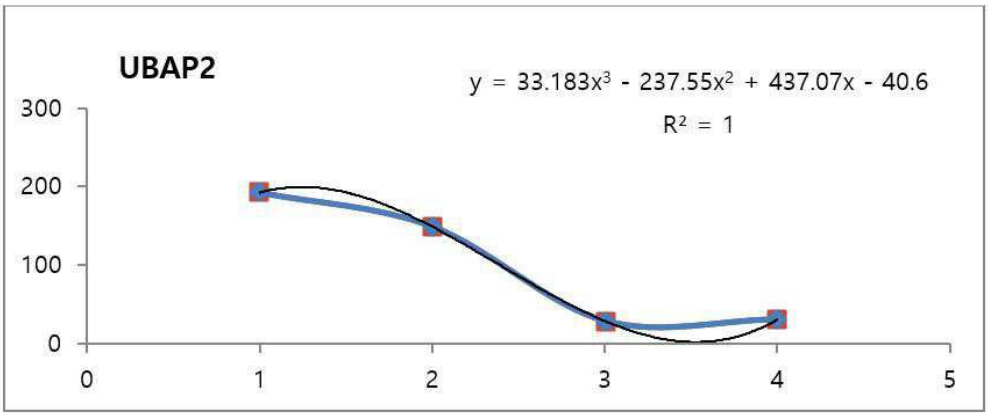
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **UBAP2를 포함하는 방사선 피폭 진단용 바이오마커 조성물 및 이를 이용한 진단방법**

(57) 요 약

본 발명은 UBAP2를 포함하는 방사선 피폭 진단용 바이오마커 조성물 및 이를 이용한 진단방법에 관한 것으로, 본 발명에서는 방사선에 대해 높은 감수성을 가지는 UBAP2가 방사선 선량 및 노출 시간에 의존적으로 발현량이 유의하게 감소되는 것을 확인한 바, 상기 UBAP2는 혈액 등의 시료로부터 발현 수준을 측정하여 신속하고 정확하게 방사선 피폭을 진단하는데 활용될 수 있으며, 생체 방사선 피폭 선량을 예측하는데 활용될 수 있다. 또한, 상기 UBAP2를 타깃으로 하여 방사선 민감성을 높이는 약물을 개발함으로써 방사선 치료 효과를 증진시킬 수 있고, 방사선 관련 종사자 및 자연 방사선 노출로부터 방사선 피폭 정도를 예측하거나 진단하는데 유용하게 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/106 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2800/40 (2013.01)
G01N 2800/52 (2013.01)

(72) 발명자
하창훈
서울특별시 강동구 고덕로 131, 103동 1002호 (암사동, 강동 롯데캐슬퍼스트아파트)
염정훈
서울특별시 강동구 천중로16길 37, 강동리버스타운 105동 301호 (천호동)
박은영
서울특별시 강동구 성안로3길 117, 광윤베네스트 501호 (성내동)
유재원
서울특별시 송파구 풍성로22길 20, 201호 (풍납동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2017M2A2A7A02020204
부처명	과학기술정보통신부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	방사선기술개발사업
연구과제명	방사선 치료 반응예측 및 생체피폭 모니터링 기술개발
기 여 율	1/1
주관기관	서울아산병원
연구기간	2017.05.02 ~ 2020.01.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

UBAP2(ubiquitin associated protein 2) 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질을 포함하는 방사선 피폭 진단용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 UBAP2 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질은 방사선 피폭 시 발현이 감소되는 것을 특징으로 하는 방사선 피폭 진단용 조성물.

청구항 3

방사선 피폭이 의심되는 인간으로부터 분리된 시료에서 UBAP2 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 제 1단계;

상기 UBAP2 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 정상 대조구 시료와 비교하는 제 2단계; 및

상기 UBAP2 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준이 정상 대조구 시료보다 감소된 경우 방사선에 피폭된 것으로 판단하는 제 3단계;를 포함하는 방사선 피폭 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 시료는 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액, 뇨, 조직 및 세포로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 방사선 피폭 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 5

UBAP2 유전자를 바이오마커로 포함하는 방사선 피폭 진단용 DNA 칩.

청구항 6

UBAP2 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 방사선 피폭 진단용 키트.

청구항 7

UBAP2 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질을 포함하는 암 환자의 방사선 치료 예후 예측용 바이오마커 조성물.

청구항 8

UBAP2 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 암 환자의 방사선 치료 예후 예측용 키트.

청구항 9

제 6항 또는 제 8항에 있어서, 상기 제제는 UBAP2 유전자에 특이적으로 프라이머 또는 프로브, 상기 UBAP2 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드, 앱타머 또는 화합물에서 선택된 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 10

방사선 피폭이 의심되는 인간으로부터 분리된 시료에서 UBAP2 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 제 1단계;

상기 UBAP2 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 정상 대조구 시료와 비교하는 제 2단계;

및

상기 UBAP2 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준이 정상 대조구 시료보다 감소된 경우 방사선 치료 예후가 좋은 것으로 판단하는 제 3단계;를 포함하는 암 환자의 방사선 치료 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 유비퀴틴 관련 단백질 2(ubiquitin associated protein 2; UBAP2)를 포함하는 방사선 피폭 진단용 바이오마커 조성물 및 이를 이용한 진단방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 방사선(ionizing radiation; IR)은 1967년 헬스퍼(Helsper)에 의해 암 치료 목적으로 처음 사용되었다. 현재, 방사선 및 방사선 동위원소는 각종 산업적 이용뿐만 아니라 진단 및 치료, 우주항공, 반도체, 생명공학 및 식품 생산 등 다각도로 이용되고 있으며, 우리 생활과 밀접하게 자리 잡고 있다. 특히, 우리나라의 경우 전력 생산의 상당 부분을 원자력 발전에 의존하고 있을 뿐만 아니라, 건축물의 비파괴적 구조 진단 등을 위하여 소형의 방사선 조사 기기들이 산업현장에서 사용되고 있으며, 이에 따라 방사선 관련 작업 종사자(원전 종사자, 핵연료 가공 종사자, 비파괴 검사자, 항공기 승무원, 동위원소 생산·공급자, 연구원, 의사, 간호사, 진단방사선사, 핵의학 및 치료 방사선사 등의 의료진 등)의 수가 증가하고 있다. 이렇게 생활 속에 밀접하게 자리 잡은 방사선 사용의 증가는 인체 피폭도 증가시키고 있다.

[0003] 또한, 1999년 발생한 월성 원전의 중수 누출 사고나 일본 토카이무라 우라늄 공장 사고 등과 같이 지난 수십 년간 여러 나라에서 비의도적으로 방사선이 노출되는 경우가 증가하고 있다. 방사선 피폭은 DNA 수선, 세포 순환 이상, 세포 죽음을 유발하여 세포사멸(apoptosis)을 일으키고, 말초 혈액 림프구(peripheral blood lymphocyte; PBL)에서의 염색체 이상, 조직 및 장기 손상, 기형 출산 및 암을 유발하는 것으로 알려져 있다. 그러나 아직까지 방사선 피폭에 의한 인체 영향을 모니터링 하거나 원전사고 등 불의의 사고 발생 시, 방사선 장해를 신속하게 예측할 수 있는 방법이 개발되어 있지 않다.

[0004] 방사선 피폭 시 발생하는 생물학적 부작용으로는 신체적 부작용 및 유전적 부작용이 있다. 신체적 부작용은 인체를 구성하는 체세포 손상에서 비롯되며, 상기 부작용의 영향은 피폭 받은 사람에게 한정된다. 급성 부작용은 방사선 노출 후 약 1달 이내에 발생하고, 조혈조직 손상, 소화기계통 손상, 중추신경계 손상 및 피부손상 등을 유발하며 심각한 경우 사망에 이르기도 한다. 만성 부작용은 방사선 노출 후 약 3달 이후에 발생하며, 백내장, 종양 발생, 생식력 저하 등의 증상을 유발한다. 유전적 부작용은 염색체 이상으로 발생되는 생식세포 손상에서 비롯되며, 유전자 돌연변이 또는 염색체 돌연변이 등으로 인해 부작용의 영향이 몇 세대 후에도 발생할 수 있다.

[0005] 인체 정상 장기가 한계 선량 이상의 방사선에 피폭되면 고유의 기능을 부분적으로 상실하거나 또는 영구적으로 상실하여 만성적인 부작용을 초래한다. 방사선치료 시 발생하는 방사선 섬유증은 부종이나 동통을 유발하여 환자들의 고통을 가중시킬 뿐만 아니라 정상 장기의 기능을 현저하게 감소시켜 심각한 경우 사망에 이르기도 한다. 이에, 방사선 피폭에 의한 정상조직의 손상을 모니터링 할 수 있는 바이오마커의 개발은 환자의 적절한 방사선 치료에 활용될 수 있으며, 항암 치료 시, 방사선 치료의 예후를 예측할 수 있는 바이오마커의 개발은 방사선 치료의 종말점(end point)을 제시할 수 있는 중요한 표지자가 될 수 있다.

[0006] 즉, 방사선에 피폭된 환자가 발생할 경우, 환자가 받은 방사선량을 조속한 시일 내에 정확히 파악하는 것은 환자의 치료 방침을 결정하고 예후를 판단하는데 필수적이다. 또한, 방사선 피폭량을 확인하는 것은 향후 발생할 수 있는 방사선의 만성 효과에 대한 예측과 방사선 피폭이 원인일 가능성이 있는 질환의 발생 시 이의 원인 규명에 중요한 역할을 할 것이다.

[0007] 방사선 피폭 후 환자의 증상 및 징후를 이용하여 임상적으로 선량 범위를 추정할 수 있으나 더 객관적이고 정확한 방법으로는 물리학적 방법 및 생물학적 방법이 있다. 물리학적 방법으로는 패용한 선량계를 이용하거나 피폭 상황을 재구성하여 방사선량을 계산하는 방법이 있으나 간접 측정 또는 이론적 측정으로 인해 개인별 인체에 미치는 방사선 선량을 측정하는데 신뢰도가 떨어진다는 단점이 있다. 생물학적 방법으로는 소핵 형성도 측정, 적혈구의 글리코포린 A(glycophorin A)의 돌연변이 측정, DNA 절단 정도, 및 치아의 에나멜(enamel)을 이용한

EST(Electron Spin Resonance) 등이 있으나 개인차에 따라 지표들의 오차 범위가 매우 커서 방사선 선량 측정이 거의 불가능하다는 단점이 있다.

[0008] 방사선에 피폭된 환자의 피폭 선량을 측정하기 위해, 염색체 이상(chromosome aberration) 측정법으로 피폭 환자의 말초혈액을 채취하여 림프구를 배양하고, 림프구 내에 형성된 염색체 이상인 이동원체(dicentrics)와 환(ring)의 발생 빈도를 광학현미경 및 미세구조 관찰 장비를 통해 판별할 수 있는 절대적 표준(gold standard) 방법이 정확도는 높으나, 많은 시간 및 비용이 소요되며, 소수의 전문가들만이 진단할 수 있는 한계가 있어 거의 활용되지 못하고 있다.

[0009] 방사선 피폭은 DNA 손상을 비롯한 유전자 발현 시스템 및 전반적인 세포의 기전 변화와 기능 손상을 유발하고, 이러한 현상은 특정 단백질들의 발현 증가, 활성화 및 연관된 단백질들과 결합 변화를 초래한다. 이들 단백질들의 변화는 방사선 피폭 시 방사선량 및 시간에 따라 민감하게 발생한다. 이에, 방사선에 피폭된 환자의 장기 조직 시료가 아닌 생체 시료(혈액, 타액, 객담, 소변 등)에서 방사선 피폭에 예민하게 변화되는 단백질을 분석하여 신속하고 정확하게 방사선 피폭을 진단하고, 방사선 피폭 선량을 예측할 수 있는 바이오마커 개발이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-0525157호 (2005.10.24 등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 방사선 피폭 진단용 조성물 또는 방사선 피폭 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 데에 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 방사선 피폭 진단용 DNA 칩 또는 방사선 피폭 진단용 키트를 제공하는 데에 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 암 환자의 방사선 치료 예후 예측용 바이오마커 조성물, 암 환자의 방사선 치료 예후 예측용 키트, 또는 암 환자의 방사선 치료 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 UBAP2(ubiquitin associated protein 2) 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질을 포함하는 방사선 피폭 진단용 조성물을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 방사선 피폭이 의심되는 인간으로부터 분리된 시료에서 UBAP2 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 제 1단계; 상기 UBAP2 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 정상 대조구 시료와 비교하는 제 2단계; 및 상기 UBAP2 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준이 정상 대조구 시료보다 감소된 경우 방사선에 피폭된 것으로 판단하는 제 3단계;를 포함하는 방사선 피폭 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 UBAP2 유전자를 바이오마커로 포함하는 방사선 피폭 진단용 DNA 칩을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 UBAP2 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 방사선 피폭 진단용 키트를 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 UBAP2 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질을 포함하는 암 환자의 방사선 치료 예후 예측용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 UBAP2 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 암 환자의 방사선 치료 예후 예측용 키트를 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명은 방사선 피폭이 의심되는 인간으로부터 분리된 시료에서 UBAP2 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 제 1단계; 상기 UBAP2 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현

수준을 정상 대조구 시료와 비교하는 제 2단계; 및 상기 UBAP2 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준이 정상 대조구 시료보다 감소된 경우 방사선 치료 예후가 좋은 것으로 판단하는 제 3단계;를 포함하는 암 환자의 방사선 치료 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0021] 본 발명에서는 방사선에 대해 높은 감수성을 가지는 UBAP2가 방사선 선량 및 노출 시간에 의존적으로 발현량이 유의하게 감소되는 것을 확인한 바, 상기 UBAP2는 혈액 등의 시료로부터 발현 수준을 측정하여 신속하고 정확하게 방사선 피폭을 진단하는데 활용될 수 있으며, 생체 방사선 피폭 선량을 예측하는데 활용될 수 있다. 또한, 상기 UBAP2를 타깃으로 하여 방사선 민감성을 높이는 약물을 개발함으로써 방사선 치료 효과를 증진시킬 수 있고, 방사선 관련 종사자 및 자연 방사선 노출로부터 방사선 피폭 정도를 예측하거나 진단하는데 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 림프아구성 세포주에 방사선을 조사한 후 질량분석기술 기반의 프로테옴 프로파일링 방법 및 비표지 정량법을 이용하여 정량값에 따라 단백질들을 6개의 클러스터로 분류하여 나타낸 결과이다.

도 2는 방사선 조사 후 시간 의존적으로 감소하는 UBAP2 단백질의 발현을 기울기 그래프로 나타낸 결과이다.

도 3은 림프아구성 세포주에 2 Gy 선량의 X선을 조사한 후 0, 4, 9시간 후의 UBAP2 mRNA 발현 변화를 PCR로 확인한 결과이다.

도 4는 림프아구성 세포주에 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 Gy 선량의 X선을 조사한 후 9시간 UBAP2 mRNA 발현 변화를 PCR로 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 유비퀴틴 관련 단백질 2(ubiquitin associated protein 2; UBAP2)는 유비퀴틴 관련 도메인을 포함하는 단백질로 유비퀴틴 신호전달 경로에서 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. 방사선 피폭에 의한 세포의 기능 손상 회복, 세포의 성장 및 생존에 대한 방어기전에 있어서 유비퀴틴은 중요한 역할을 수행한다. 또한, UBAP2는 저산소 스트레스 상태에서 전사 및 스플라이싱(splicing)의 조절을 받아 다양한 전사인자 변이를 생성하여 세포 기능을 조절할 수 있다. 방사선 피폭 시, UBAP2는 발현 변화가 매우 민감한 단백질로, 이는 UBAP2가 방사선 피폭 시, 세포 기본 활성 변화에 민감한 단백질이며, 방사선량에 따른 세포반응 예측 단백질 개발에 적합한 단백질임을 의미한다. UBAP2 단백질은 주로 혈액세포에서 발현되는 바, 혈액에서 UBAP2의 발현 및 기능 측정이 용이하다.

[0024] 이에, 본 발명의 발명자들은 UBAP2 발현의 정량적 분석값 및 UBAP2의 활성도 변화를 측정함으로써 방사선 피폭을 정량적으로 측정할 수 있는 바이오마커를 개발하며 본 발명을 완성하였다.

[0026] 본 발명에서 사용된 용어 "방사선 조사"는 예를 들면 X-선, 자외선, 알파 입자 및 감마선을 포함한 전자석 방사 또는 알파 또는 베타 입자의 작용에 대한 노출을 의미한다. 방사선은 암세포와 정상세포 모두에 영향을 줄 수 있으나 여러 가지 방법과 기술을 이용하여 정상세포에는 영향을 덜 주면서 암세포를 많이 파괴하여 암을 치료한다. 이는 암세포를 즉각 죽이지는 못하나 암세포가 분열, 증식하는 기능을 파괴하여 새로운 암세포가 분열, 생성되지 못하게 하고 더 이상 분열하지 않는 암세포는 수명이 다해 죽게 된다. 매 치료마다 더 많은 세포가 죽고, 죽은 세포는 분해되어 혈액으로 운반되어 몸 밖으로 배출되어 종양의 크기는 줄어든다. 정상세포의 대부분은 회복되지만 일부 정상세포는 회복되지 않아 방사선 치료의 부작용이 생긴다. 부작용으로 인해 야기될 수 있는 세포, 조직 등의 변화는 세포분열시기의 변화, 세포사멸 및 괴사억제, 조직손상 및 면역기능저하 등이 있다.

[0027] 본 발명에서 사용된 용어 "그레이(Gy)"는 1 kg의 생물학적 조직에서 1 줄(Joule)을 방출시킬 수 있는 방사선 조사량을 의미한다.

[0028] 본 발명에서 사용된 용어 "측정"은 세포에서 방사선 피폭 또는 조사 정도를 확인하는 것이다. 하나의 양태로서, 본 발명은 개체로부터 얻어진 생물학적 시료로부터 상기 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 이의 단백질의 발현 수준을 측정하고, 이를 정상 대조구 시료의 발현 수준과 비교하여 방사선 피폭 또는 조사 정도를 확인할 수 있다.

[0029] 본 발명에서 사용된 용어 "프라이머"는 짧은 자유 3말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로, 상보적인 주형과 염기쌍을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. 본 발명의 프라이머는, 상기 유전자 특이적인 프라이머로 7개 내지 50개의 뉴클레오타이드 서열을 가진 센스 및 안티센스 핵산일 수 있고, DNA 합성의 개시점으로 작용하는 프라이머의 기본 성질을 변화시키지 않는 한, 추가의 특징을 혼입할 수 있다.

[0030] 본 발명에서 사용된 용어 "프로브"는 mRNA외 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, 발현량을 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.

[0031] 본 발명에서 사용된 용어 "항체"는 당해 기술분야에 공지된 용어로서 항원성 부위에 대하여 지시되는 특이적인 면역글로불린을 의미한다. 본 발명에서의 항체는 본 발명의 UBAP2에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 당해 기술분야의 통상적인 방법에 따라 항체를 제조할 수 있다. 상기 항체의 형태는 폴리클로날 항체 또는 모노클로날 항체를 포함하며, 모든 면역글로불린 항체가 포함된다. 상기 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2 개의 전체 길이의 중쇄를 갖는 완전한 형태를 의미한다. 또한, 상기 항체는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함된다.

[0032] 본 발명에서 사용된 용어 "펩타이드"는 표적 물질에 대한 결합력 높은 장점이 있으며, 열/화학 처리시에도 변성이 일어나지 않는다. 또한 분자 크기가 작기 때문에 다른 단백질에 붙여서 융합 단백질로의 이용이 가능하다. 구체적으로 고분자 단백질 체인에 붙여서 이용이 가능하므로 진단 키트 및 약물전달 물질로 이용될 수 있다.

[0033] 본 발명에서 사용된 용어 "앱타머(aptamer)"란, 그 자체로 안정된 삼차 구조를 가지면서 표적 분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 특별한 종류의 단일가닥 핵산(DNA, RNA 또는 변형핵산)으로 구성된 폴리뉴클레오티드의 일종을 의미한다. 상술한 바와 같이, 앱타머는 항체와 동일하게 항원성 물질에 특이적으로 결합할 수 있으면서도, 단백질보다 안정성이 높고, 구조가 간단하며, 합성이 용이한 폴리뉴클레오티드로 구성되어 있으므로, 항체를 대체하여 사용될 수 있다.

[0034] 본 발명에서 사용된 용어 "예후 예측"은 질환의 경과 및 결과를 미리 예측하는 행위를 의미한다. 보다 구체적으로, 예후 예측이란 질환의 치료 후 경과는 환자의 생리적 또는 환경적 상태에 따라 달라질 수 있으며, 이러한 환자의 상태를 종합적으로 고려하여 치료 후 병의 경과를 예측하는 모든 행위를 의미하는 것으로 해석될 수 있다.

[0035] 본 발명의 목적상 상기 예후 예측은 암 환자의 방사선 치료 후, 질환의 경과 및 완치 여부를 미리 예상하여 암 환자의 무병생존율 또는 생존율을 예측하는 행위로 해석될 수 있다. 예를 들어, "예후가 좋다"라고 예측하는 것은 방사선 치료 후 암 환자의 무병생존율 또는 생존율이 높은 수준을 나타내어, 암 환자가 치료될 가능성이 높다는 것을 의미하고, "예후가 나쁘다"라고 예측하는 것은 방사선 치료 후 암 환자의 무병생존율 또는 생존율이 낮은 수준을 나타내어, 암 환자로부터 암이 재발하거나 또는 암으로 인하여 사망할 가능성이 높다는 것을 의미한다.

[0037] 이에, 본 발명은 UBAP2(ubiquitin associated protein 2) 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질을 포함하는 방사선 피폭 진단용 조성물을 제공한다. UBAP2 단백질은 AD-012 단백질 또는 KIAA1419로 표시될 수 있다.

[0038] 상기 UBAP2 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질은 방사선 피폭 시 발현이 감소될 수 있다.

[0040] 또한, 본 발명은 방사선 피폭이 의심되는 인간으로부터 분리된 시료에서 UBAP2 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 제 1단계; 상기 UBAP2 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 정상 대조구 시료와 비교하는 제 2단계; 및 상기 UBAP2 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준이 정상 대조구 시료보다 감소된 경우 방사선에 피폭된 것으로 판단하는 제 3단계;를 포함하는 방사선 피폭 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0041] 상기 시료는 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액, 뇨, 조직 및 세포로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[0042] 상기 유전자의 발현 수준은 실시간 중합효소 연쇄반응(real-time polymerase chain reaction; realtime PCR), 역전사 중합효소 연쇄반응(revers transcription PCR; RT-PCR), 경쟁적 중합효소 연쇄반응(competitive PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection assay; RPA), 노던 블랏팅 (northern blotting) 및 DNA 칩으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 방법으로 측정할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[0043] 상기 단백질의 발현 수준은 웨스턴 블랏, 효소결합 면역흡착 분석법(enzyme linked immunosorbent assay; ELISA), 방사선면역분석(radioimmunoassay; RIA), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역확산법, 로케이트(rocket) 면역전기영동, 조직면역염색, 면역침전법(immunoprecipitation assay), 보체고정분석법 (Complement Fixation Assay), 형광 활성화 세포 분류기(fluorescence activated cell sorter; FACS)를 이용한 분석법 및 단백질 칩을 이용한 분석법으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 방법으로 측정할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[0045] 또한, 본 발명은 UBAP2 유전자를 바이오마커로 포함하는 방사선 피폭 진단용 DNA 칩을 제공한다.

[0047] 또한, 본 발명은 UBAP2 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 방사선 피폭 진단용 키트를 제공한다.

[0048] 상기 제제는 UBAP2 유전자에 특이적으로 프라이머 또는 프로브, 상기 UBAP2 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드, 앱타머 또는 화합물에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[0050] 또한, 본 발명은 UBAP2 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질을 포함하는 암 환자의 방사선 치료 예후 예측용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0052] 또한, 본 발명은 UBAP2 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 암 환자의 방사선 치료 예후 예측용 키트를 제공한다.

[0053] 상기 제제는 UBAP2 유전자에 특이적으로 프라이머 또는 프로브, 상기 UBAP2 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드, 앱타머 또는 화합물에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[0055] 또한, 본 발명은 방사선 피폭이 의심되는 인간으로부터 분리된 시료에서 UBAP2 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 제 1단계; 상기 UBAP2 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 정상 대조구 시료와 비교하는 제 2단계; 및 상기 UBAP2 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준이 정상 대조구 시료보다 감소된 경우 방사선 치료 예후가 좋은 것으로 판단하는 제 3단계;를 포함하는 암 환자의 방사선 치료 예후 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0057] 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.

[0059] **실시예 1: 방사선 피폭에 따른 UBAP2 단백질의 발현 변화 분석**

[0060] 방사선 피폭에 따른 UBAP2 단백질의 발현 변화를 분석하기 위해, 림프아구성 세포주(lymphoblastoid cell line)에 방사선을 조사한 후, 각 시료를 질량분석기술 기반의 프로테옴 프로파일링 방법과 고분해능 질량분석기를 이용하여 펩타이드들의 스펙트럼 강도를 통계적으로 분석하는 비표지 정량법(label free quantitation: LFQ)을

이용하여 바이오마커 후보를 선별하고 정량하였다.

[0062] 1-1. 바이오마커 선별

[0063] Molt 4 세포주(T-lymphoblast cell line; ATCC-CRL-1582, USA)에 2 Gy의 방사선을 조사하고, 도 1과 같이 0, 1, 5, 24시간 후 단백질 발현의 패턴 변화를 비표지 정량법을 이용하여 단백질을 정량하고, 상기 정량값에 따라 단백질들을 6개의 클러스터(cluster)로 분류하였다.

[0064] 6개의 클러스터 중 시간 경과에 따라 발현량이 일관적으로 감소하는 클러스터 4에 속하는 123개의 단백질 중 하기 표 1과 같이 방사선 피폭 후 24시간이 지난 후에도 발현량이 지속적으로 감소하는 단백질인 UBAP2를 바이오마커로 선별하였다.

표 1

[0065]

2 Gy 조사 후 시간	0시간	1시간	5시간	24시간
UBAP2 단백질 발현 정량값	192.1	148.8	28.6	30.6

[0067] 또한, 도 2와 같이, 방사선 조사 후 시간 의존적으로 감소하는 UBAP2 단백질의 발현을 기울기로 나타내어 통계적 유의성을 검증하였다($p < 0.001$).

[0069] 1-2. 정량 방법

[0070] 프로테아제/포스파타아제 저해제 칵테일이 추가된 8 M 우레아 100 μl를 이용하여 1 X 10^6의 세포를 용해시킨 후 50 mM 디티오트레이톨(dithiothreitol)을 이용하여 37℃에서 이황화 결합을 환원시켰다. 이후 55 mM 요오드아세트아미드(iodoacetamide)로 차광 하에 알킬레이션을 수행한 후 55 mM 디티오트레이톨로 담금질(quenching)을 수행하였다. 50 mM 탄산수소 암모늄(ammonium bicarbonate)을 800 ml까지 추가하여 단백질:프로테아제를 25:1의 비율로 처리하고, 37℃에서 밤새 반응시켜 분해를 수행하였다. 분해 후 10% 포름산으로 반응을 중지시키고, C18 역상 탈염 카트리지(reverse phase desalting cartridge)를 이용하여 탈염을 수행하였다. 탈염된 펩타이드는 진공 건조기(Speed Vac)를 이용하여 건조시킨 후 0.1% 포름산에 용해하여 LC-MS 분석을 수행하였다.

[0071] MS 장비는 Q-Exactive Plus BioPharm version(Thermo, USA)을, LC 장비는 UltiMate™ 3000 RSLCnano System(Thermo, USA)를 사용하였으며, 펩타이드 시료는 4 μl씩 주입하여 300 μl/분의 유속으로 NanoLC와 연동된 이온 트랩 질량 분석기(ion trap mass spectrometer)로 분석을 수행하였다. LC는 용액 A(5% 아세토니트릴, 0.1% 포름산)와 용액 B(95% 아세토니트릴, 0.1% 포름산)의 농도 구배 120분을 포함하여 총 150분 동안 분리하였으며, 분석에는 AQUA C18(5 μm, 125 A)을 충진한 내직경 75 μm, 외직경 360 μm, 길이 50 cm의 용융 실리카 모세관 컬럼(fused silica capillary column)을 사용하여 펩타이드 혼합체를 분리하였다. 분리된 펩타이드는 2000 V의 전기분무 이온화 전압(electrospray ionization voltage)을 이용하여 이온 분사하며 이온 방출기는 내직경 20 μm 트랩 이온 스프레이 방출기(tappered ion spray emitter)를 통해 질량분석기로 주입하여 스펙트럼 데이터를 획득하였다.

[0072] 오비트랩(orbitrap) MS 분석은 400~2000 m/z 범위에 대해 이온 트랩 MS로 1번의 서베이 스캔(survey scan) (분해능 30,000) 후에 고 에너지 충돌 분리(higher energy collision dissociation; HCD, 25% 에너지 레벨) 방식을 이용하여 오비트랩 MS를 이용, 8번의 MS/MS(분해능 60,000) 분석을 수행하였다. 5분의 동적 배제 옵션(dynamic exclusion option)을 통해 중복되는 펩타이드 이온 검출을 최소화하였다. 이온 트랩의 Auto gain control target setting은 Full MS에 대해서는 3E04를, FT MS/MS에 대해서는 2E5를 사용하였다.

[0073] 획득한 RAW 파일은 Sequest 알고리즘 기반의 데이터베이스 분석 소프트웨어인 Proteome Discoverer(Thermo, USA, version 2.2)를 사용하여 정성 분석 및 비표지 정량 분석을 수행하였다. 시스테인(cysteine)에는 시스테인 carbamidomethylation을 고정값(fixed modification)으로 처리하고, 메티오닌 (methionine)에는 산화를 변이값(variable modification)으로 처리하였다. 트립신 오절단(trypsin misscleavage)은 “1” 값을 사용하고, 서열

데이터베이스는 최신 swissprot sequence DB를 사용하였으며, 비표지 정량을 위하여 펩타이드 이온 강도를 이용한 정량분석을 수행하였다. 동정된 단백체들을 uniprot accession number를 query로 사용하여 Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery(DAVID) v6.7(http://david.abcc.ncifcrf.gov)을 이용, 유전자 온톨로지(gene ontology; GO)를 세포 성분, 분자 기능 및 생물학적 공정의 세 분야를 대상으로 분석하였으며, Perseus(http://www.perseus-framework.org)를 이용하여 히트 맵(heat map) 및 클러스터링 분석과 Volcano plot 분석을 수행하였다.

[0075] **실시예 2: 방사선 피폭에 따른 UBAP2 mRNA의 발현 변화 분석**

[0076] 림프아구성 세포주에 방사선을 조사한 후 UBAP2의 mRNA 발현 변화를 중합효소 연쇄반응(PCR)을 통해 분석하였으며, 방사선 피폭의 바이오마커로 기능하는지 여부를 확인하였다.

[0078] 2-1. 세포 배양

[0079] 림프아구성 세포주(lymphoblastoid cell line) GM10833, GM10834 및 GM10860은 Coriell Cell Repositories(NJ, USA)에서 분양 받았으며, 2 mM L-글루타민 및 열 처리하지 않은 15% 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS)이 함유된 RPMI 1640 배지에 부유시켜 T75 플라스크에서 배양하였다.

[0081] 2-2. 방사선 조사 및 시료 준비

[0082] GM10833 및 GM10834 림프아구성 세포주에 X-RAD 320 Biological X-Ray Irradiator(Precision X-Ray, Inc. CT, USA)를 이용하여 2 Gy 선량의 X선을 조사한 후, 0, 4, 9시간 후에 세포를 회수하였다. 또한, GM10833, GM10834 및 GM10860 림프아구성 세포주에 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 Gy 선량의 X선을 조사한 후 9시간 후에 세포를 회수하였다.

[0084] 2-3. 총 RNA 추출 및 cDNA 합성

[0085] 상기 회수된 림프아구성 세포주로부터 총 RNA를 추출하였으며, 260/280 nm에서 1.95 이상, 260/230 nm에서 1.2 이상의 순도로 정제하였다. High Capacity RNA-to-cDNA Kit(Applied Biosystems, USA)에서 제공하는 프로토콜을 참조하여 정제된 mRNA 1 μg으로부터 20 μl의 cDNA를 합성하였다. 간략하게, 10 μl의 2X RT 버퍼, 1 μl의 20X 효소 혼합액, 1 μg 총 RNA를 9 μl까지 혼합하여 반응물 조성을 구성하고 최종 부피가 20 μl가 되도록 nuclease-free H_2O를 첨가하였다. 이후 37℃에서 60분간 효소 반응 후 95℃에서 5분간 반응 정지와 동시에 4℃에서 합성된 cDNA합성을 종료하였다. PCR 수행에 사용하기 전까지 완성된 cDNA는 -15 내지 -25℃ 구간의 냉동고에 저장하였다.

[0087] 2-4. 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)

[0088] cDNA 합성 후, UBAP2(NM_018449.3)의 프라이머 쌍(정방향: 5'-tctcctcagagcctgtcatc-3', 역방향: 5'-ccgcttagcaagtttgatgt-3'; 484bp)을 사용하여 94℃, 4분의 1 사이클; 94℃, 30초 및 58℃, 50초 및 72℃, 1분의 27 사이클; 72℃, 10분의 1 사이클로 PCR을 수행하였다. PCR을 통해 얻어진 PCR 산물을 2% 아가로오스 겔에서 전기영동하여 mRNA의 발현을 확인하였다.

[0090] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 림프아구성 세포주 GM10833 및 GM10834에 2 Gy 선량의 X선을 조사한 후, 0, 4, 9시간 후의 UBAP2 mRNA 발현을 PCR로 분석한 결과, 시간 경과에 비례하여 mRNA의 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[0092] 또한, 도 4에 나타낸 바와 같이, 림프아구성 세포주 GM010833, GM10834 및 GM10860에 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 Gy 선량의 X선을 조사한 후 9시간 후의 UBAP2 mRNA 발현을 PCR로 분석한 결과, 방사선 조사 선량에 비례하여

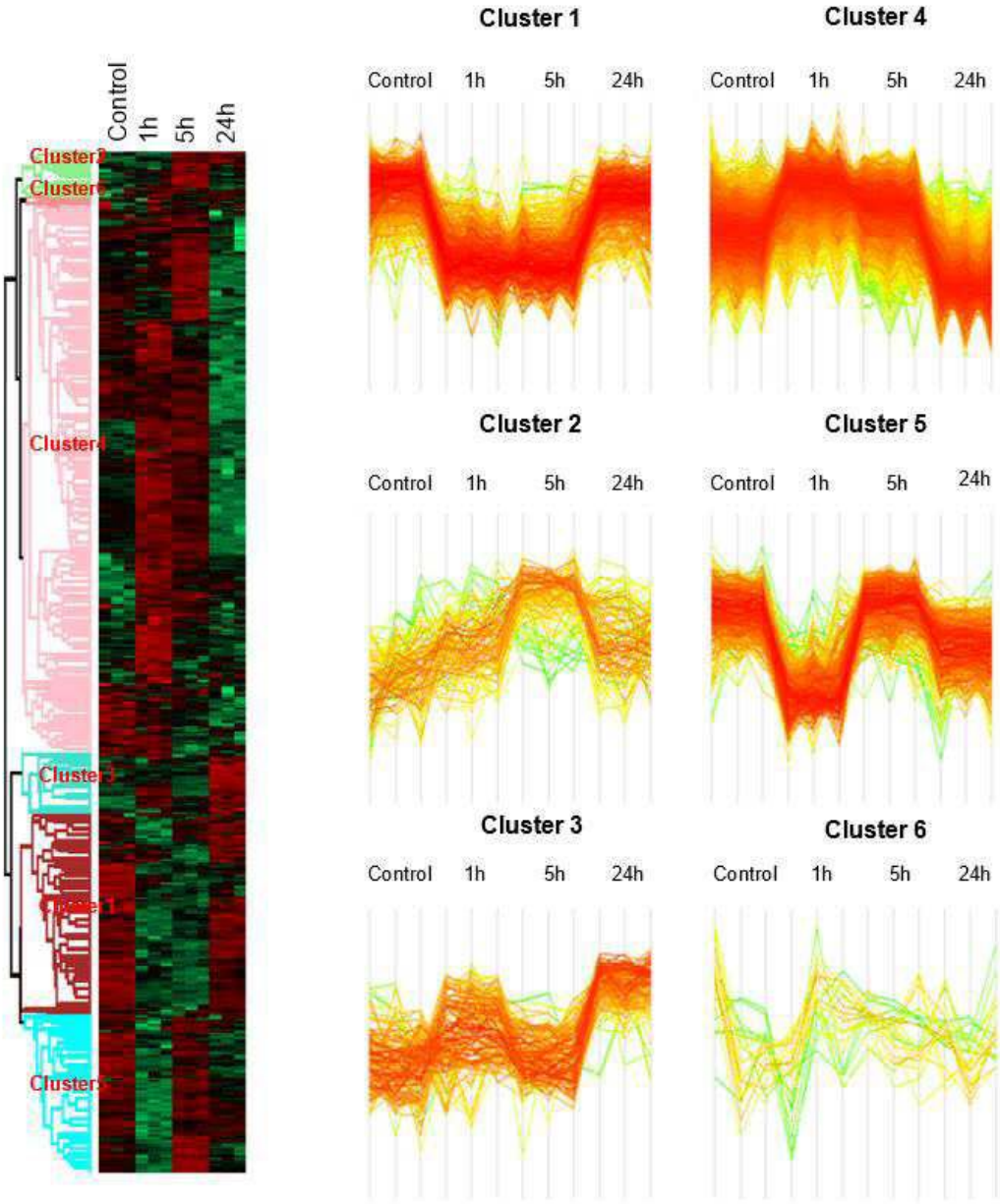
mRNA의 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[0094] 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.

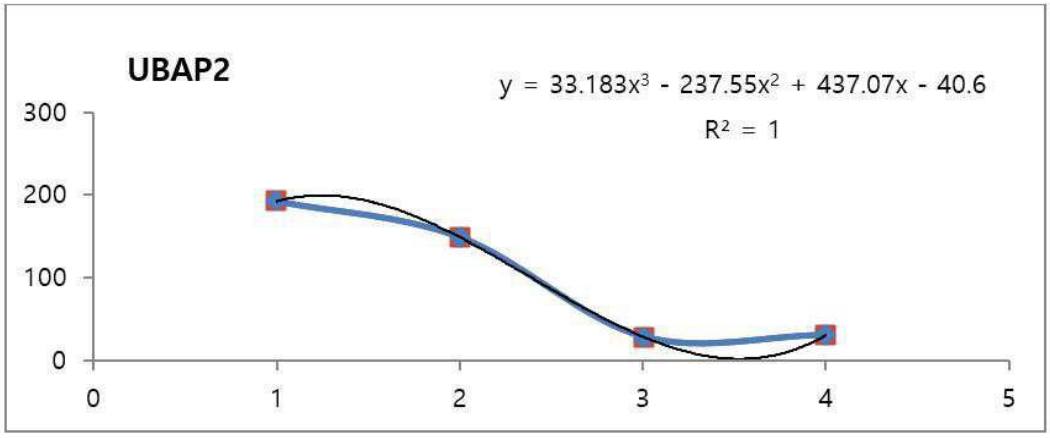
[0095] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

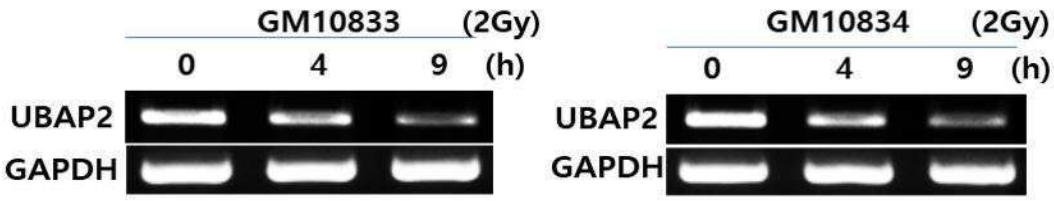
도면1



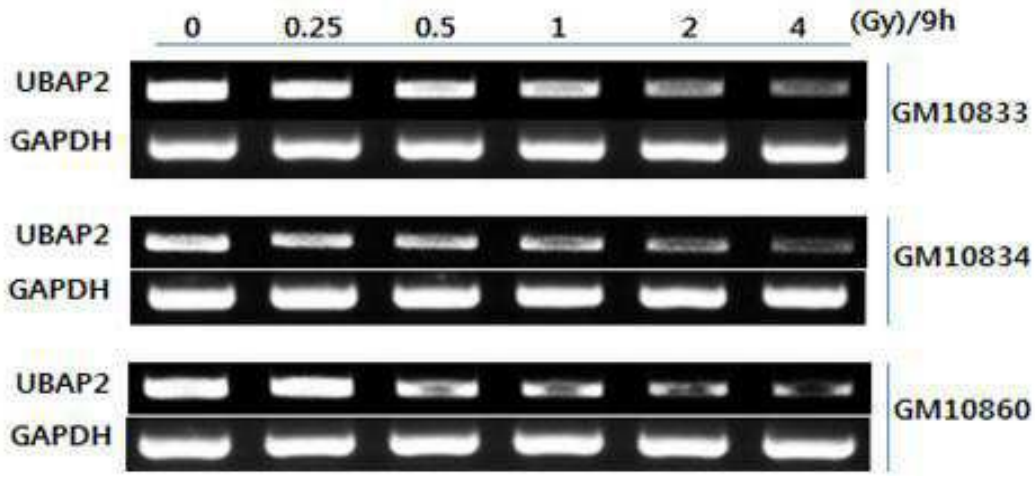
도면2


UBAP2
y = 33.183x³ - 237.55x² + 437.07x - 40.6
R² = 1
300
200
100
0
0
1
2
3
4
5

도면3


GM10833 (2Gy)
0 4 9 (h)
UBAP2
GAPDH
GM10834 (2Gy)
0 4 9 (h)
UBAP2
GAPDH

도면4


0 0.25 0.5 1 2 4 (Gy)/9h
UBAP2
GAPDH
GM10833
UBAP2
GAPDH
GM10834
UBAP2
GAPDH
GM10860