(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0008083
(43) 공개일자 2024년01월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01) *G01N 33/68* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2022.01)
G01N 33/6893 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0085011
(22) 출원일자 2022년07월11일
심사청구일자 2022년07월11일
기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
정상훈
서울특별시 강북구 삼양로 583, 3층(우이동)
이주한
서울특별시 강남구 언주로30길 13, A동 1004호(도곡동, 대림아크로빌, 대림아크로텔)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

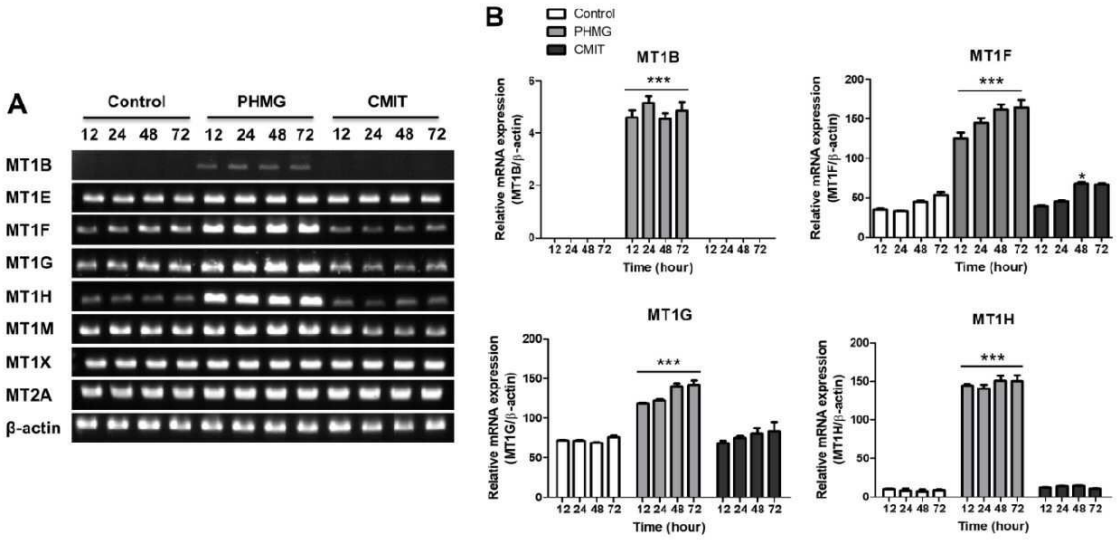
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **PHMG 노출 여부 확인용 바이오마커**

(57) 요 약

본 발명은 PHMG 노출 여부 확인용 바이오마커들에 관한 것으로, 본 발명에 따르면, 가습기 살균제 중 특히 PHMG에 특이적으로 발현이 변화하는 유전자로서 MT1을 발굴하였으며, 이의 아형들 중 MT1B, MT1F, MT1G 및 MT1H만이 특이적으로 PHMG 노출에 특이적으로 발현이 증가하는 것을 확인하였고, 이와 같은 발현 변화가 MTF1에 의해 매개되는 것을 확인하였으므로, 이들을 가습기 살균제 관련 질환의 원인물질인 PHMG에의 노출 여부 확인, PHMG의 검출 또는 PHMG 노출 관련 질환의 진단용 바이오마커로서 이용할 수 있다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/142 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
(72) 발명자
이홍
경기도 안산시 단원구 당곡로 27, 고잔리슈빌s 1516호(고잔동)
남윤정
경기도 안산시 단원구 신촌1길 16, 301호(초지동)
김재영
경기도 시흥시 배곧4로 106-25, 1115동 1403호(배곧동, 호반베르디움 센트로하임아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2022040300
과제번호	NIER-2022-04-03-001
부처명	환경부 국립환경과학원
과제관리(전문)기관명	가습기살균제보건센터
연구사업명	가습기살균제 피해자 지원
연구과제명	가습기살균제 보건센터 독성영향 조가평가 사업 (2022년도)
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

MT1(metallothionein 1)의 유전자 또는 상기 유전자로부터 발현된 단백질을 포함하는 PHMG(Polyhexamethylene guanidine) 노출 여부 확인용 바이오마커.

청구항 2

제 1항에 있어서, MT1의 아형인 MT1B, MT1F, MT1G 및 MT1H로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자 또는 상기 유전자로부터 발현된 단백질을 포함하는, PHMG 노출 여부 확인용 바이오마커.

청구항 3

제 1항에 있어서, MTF1(metal regulatory transcription factor 1)의 유전자 또는 상기 유전자로부터 발현된 단백질을 추가로 포함하는, PHMG 노출 여부 확인용 바이오마커.

청구항 4

제 1항의 바이오마커 유전자의 발현 수준을 mRNA 또는 단백질 수준에서 측정하는 제제를 포함하는, PHMG 노출 여부 확인용 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 바이오마커 유전자의 발현 수준을 mRNA 수준에서 측정하는 제제는, 상기 마커의 핵산서열, 상기 핵산서열에 상보적인 핵산서열, 상기 핵산서열 및 상보적인 서열의 단편을 특이적으로 인식하는 프라미어 쌍, 프로브, 또는 프라이머 쌍 및 프로브인, PHMG 노출 여부 확인용 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서, 측정은 중합효소연쇄반응, 실시간 RT-PCR (Real-time RT-PCR), 역전사 중합효소연쇄반응, 경쟁적 중합효소연쇄반응(Competitive RT-PCR), Nuclease 보호 분석(RNase, S1 nuclease assay), in situ 교잡법, 핵산 마이크로어레이, 노던블랏 또는 DNA 칩으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법으로 수행되는, PHMG 노출 여부 확인용 조성물.

청구항 7

제 4항에 있어서, 바이오마커 유전자의 발현 수준을 단백질 수준에서 측정하는 제제는, 상기 마커의 단백질 전장 또는 그 단편을 특이적으로 인식하는 항체, 항체 단편, 펩타이드, 펩타이드 핵산(PNA), 리보자임, 앱타머(aptamer), 아비머(avidity multimer) 또는 펩티도모방체(peptidomimetics)인, PHMG 노출 여부 확인용 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서, 측정은 웨스턴블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 면역 전기영동, 조직면역염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS, 질량분석 또는 단백질 마이크로어레이로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법으로 수행되는, PHMG 노출 여부 확인용 조성물.

청구항 9

제 4항의 조성물을 포함하는, PHMG 노출 여부 확인용 키트.

청구항 10

제 1항의 바이오마커 유전자의 발현 수준을 mRNA 또는 단백질 수준에서 측정하는 제제를 포함하는, PHMG 검출용 조성물.

청구항 11

제 10항의 조성물을 포함하는, PHMG 검출용 키트.

청구항 12

1) 검사 대상체로부터 분리한 생물학적 시료에서 제 1항의 바이오마커 발현 수준을 확인하는 단계;

2) 정상 대조군 시료의 해당 마커의 상응하는 결과와 비교하는 단계; 및

3) 1) 단계에서의 바이오마커 유전자의 발현 수준이 2) 단계에서의 바이오마커 유전자의 발현 수준에 비해 높은 경우, 상기 검사 대상체가 PHMG에 노출된 것으로 판단하는 단계를 포함하는, PHMG 노출 여부 확인 방법.

청구항 13

제 12항에 있어서, 노출 여부 확인 방법은 PHMG 노출 관련 질환의 진단에 사용되는, PHMG 노출 여부 확인 방법.

청구항 14

제 13항에 있어서, PHMG 노출 관련 질환은 폐 섬유증인, PHMG 노출 여부 확인 방법.

청구항 15

1) 세포 또는 조직에서 제 1항의 바이오마커의 발현 수준을 확인하는 단계;

2) 세포 또는 조직에 시료를 처리하고 상기 바이오마커의 발현 수준을 확인하는 단계; 및

3) 1) 단계에서의 바이오마커의 발현 수준과 2) 단계에서의 바이오마커의 발현 수준을 비교하는 단계를 포함하는, PHMG의 검출 방법.

청구항 16

제 15항에 있어서, 시료 처리 후 바이오마커의 발현 수준이 증가된 경우 PHMG가 시료에 존재하는 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함하는, PHMG의 검출 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 PHMG 노출 여부 확인용 바이오마커들에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 종래에 가습기 살균제로 사용되었던 원인물질들은 대체로 PGH (oligo-[2-(2-ethoxy)-ethoxyeth-yl)-guanidinium-chlorid), PHMG (Polyhexamethyleneguanidine phosphate), CMIT/MIT(chloromethylisothiazolinone/methylisothiazolonone), BKC(Benzalkonium chloride) 및 NaDCC(sodium dichloroisocyanurate)이며, 이들은 생물살균(biocidal) 및 항 생물 부착(anti-biofouling) 효과가 있어 항감염, 항균제 뿐만 아니라 용기 및 표면용 세제 및 부식 방지 페인트에도 다양하게 사용되어 왔다.

[0003] 2011년 서울시내 한 대학병원에서 원인미상의 폐질환으로 산모 4명이 사망한 수 정부에서 그 원인으로 가습기살균제를 추정하는 역학조사를 발표하였다. 이 후 2013년 12월에 환경부는 가습기살균제를 환경성 질환으로 지정하였다 (중앙일보 보도자료, https://www.joongang.co.kr/article/25048547#home).

[0004] 그 중에서도 특히 PGH와 PHMG는 우리나라에서 가습기 살균제로 사용되어 오다가 현재까지 총 541명의 인명피해가 발생하여, 유독물로 지정되었다. 이들의 여러 가지 문제점이 여러 문헌에서 보고된 바 있다. PHMG 및 PGH의 지속적인 노출에 따라 인간에서 심각한 동맥경화, 세포 독성 및 노화를 일으킬 수 있다고 보고되었으며 (J. of Nanosci. & Tech. 16:11191-111200] Materials Science and Engineering: C 29:1776-1780), MIT은 알레르기 반응을 일으킨다고 보고되었다 (Contact Dermatitis 67:334-341). 또한, 이들 살균제 및 소독제가 기관지와 폐에 직접 진입할 수 있어 천식, 비염, 기관지 또는 폐렴과 같은 호흡기 질환에 악영향을 미칠 수 있다고 보고되

었다 (J Korean Medical Science 31:817-821; Journal of Toxicologic Pathology 29:95-102; 및 Environmental Health and Toxicology 31:e2016014-2016010). 아울러, 이들은 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 있어, 2013년 유럽화학국이 PHMB를 "흡입하면 사망, fatal if inhaled" 물질로 규정하였다.

[0005] 그러나 여전히 소독제, 방부제, 탈취제, 물티슈 등의 생활 환경 제품에 자의적으로 광범위하게 사용될 수 있는 가능성이 크고, 특히 제조업체들은 이들 성분들의 사용기준 용량을 지키지 않을 수 있고, 제품에 성분명과 사용량을 표기하지 않으므로 소비자들은 불안해하고 있다. 따라서 살균제 성분들의 오남용을 막기 위해서는 이들 성분의 손쉬운 검출 방법이 필요하지만, 미지의 시료에서 특정 구조의 화학물질이 존재하는지를 파악하는 것은 매우 어렵고 시간과 경비의 소모가 많은 문제점이 있다. 또한, 가습기살균제에 노출된 피해자들 중 실제 노출된 피해자들을 판별하기란 사실상 폐 CT 영상을 검증하는 것 외에는 없는 실정이나, 실제 노출로 인한 폐질환인지 기존의 선천적 혹은 다른 원인으로 인해 발생한 폐질환인지를 구별하는 것은 어려우며, 특히, 여러 가습기살균제 원인 물질 중 폐 질환을 일으키는 정도가 각각 달라 어떠한 제품을 썼는지에 대한 검증이 필요하나 이를 검증할 방법은 사실상 사용자들의 기억에 의존하는 것에 불과해 많은 한계가 있어 왔다. 이에, 간편하게 특정 살균제 성분의 노출 여부를 확인할 수 있는 바이오마커의 개발이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 PHMG 노출 여부 확인용 바이오마커를 제공하는 것이다.

[0007] 또한, 본 발명의 목적은 PHMG 노출 여부 확인용 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 또한, 본 발명의 목적은 PHMG 검출용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 또한, 본 발명의 목적은 PHMG 노출 여부 확인용 키트를 제공하는 것이다.

[0010] 또한, 본 발명의 목적은 PHMG 검출용 키트를 제공하는 것이다.

[0011] 또한, 본 발명의 목적은 PHMG 노출 여부 확인 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 아울러, 본 발명의 목적은 PHMG의 검출 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 MT1의 유전자 또는 상기 유전자로부터 발현된 단백질을 포함하는 PHMG 노출 여부 확인용 바이오마커를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 바이오마커 유전자의 발현 수준을 mRNA 또는 단백질 수준에서 측정하는 제제를 포함하는 PHMG 노출 여부 확인용 조성물을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 바이오마커 유전자의 발현 수준을 mRNA 또는 단백질 수준에서 측정하는 제제를 포함하는 PHMG 검출용 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 키트를 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 PHMG 노출 여부 확인 방법을 제공한다.

[0018] 아울러, 본 발명은 PHMG의 검출 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명에 따르면, 가습기 살균제 중 특히 PHMG에 특이적으로 발현이 변화하는 유전자로서 MT1을 발굴하였으며, 이의 아형들 중 MT1B, MT1F, MT1G 및 MT1H만이 특이적으로 PHMG 노출에 특이적으로 발현이 증가하는 것을 확인하였고, 이와 같은 발현 변화가 MTF1에 의해 매개되는 것을 확인하였으므로, 이들을 가습기 살균제 관련 질환의 원인물질인 PHMG에의 노출 여부 확인, PHMG의 검출 또는 PHMG 노출 관련 질환의 진단용 바이오마커로서 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 PHMG 및 CMIT에 대한 HPAEpiCs의 세포생존율을 나타낸 도이다:

A: 다양한 용량의 PHMG에 24, 48 및 72 h 동안 노출된 HPAEpiCs의 세포생존율; 및

B: 다양한 용량의 CMIT에 24, 48 및 72 h 동안 노출된 HPAEpiCs의 세포생존율.

도 2는 PHMG 및 CMIT 처리에 의한 유전자 발현 변화 효과를 확인한 도이다:

A: 2 μg/mL의 PHMG 또는 CMIT를 24시간 동안 처리한 후 선택된 유전자 (3-배 이상; $p < 0.05$)의 히트맵:

B: 2 μg/mL의 PHMG 또는 CMIT를 48시간 동안 처리한 후 선택된 유전자 (3-배 이상; $p < 0.05$)의 히트맵:

C: PHMG 또는 CMIT를 24시간 동안 처리한 후 선택된 유전자에 대한 상위 10개 생물학적 프로세스의 GO 증폭 분석(Gene ontology enrichment analysis); 및

D: PHMG 또는 CMIT를 48시간 동안 처리한 후 선택된 유전자에 대한 상위 10개 생물학적 프로세스의 GO 증폭 분석.

도 3은 PHMG 및 CMIT 노출에 의한 유전자 발현 변화를 확인한 도이다:

A: 2 μg/mL의 PHMG 또는 CMIT를 처리한 후 선택된 유전자 (3-배 이상; $p < 0.05$)의 히트맵; 및

B: 선택된 유전자에 대한 상위 10개의 생물학적 프로세스의 GO 증폭 분석.

도 4는 PHMG 및 CMIT 처리에 의한 MT1의 mRNA 발현 변화를 확인한 도이다:

A: 2 μg/mL의 PHMG 또는 CMIT 처리에 의한 MT1B, MT1E, MT1F, MT1G, MT1H, MT1M, MT1X 및 MT2A의 mRNA 발현 수준; 및

B: mRNA 발현의 정량 분석.

도 5는 PHMG 및 CMIT 처리 (0, 0.5, 1, 2 및 4시간)에 의한 MTF1, EGR1 및 NR3C1의 발현 수준 변화를 확인한 도이다:

A: MTF1, EGR1 및 NR3C1의 단백질 수준; 및

B: MTF1, EGR1 및 NR3C1의 단백질 수준의 정량적 분석.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0022] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0023] 달리 지시되지 않는 한, 핵산은 좌측에서 우측으로 5'→3' 배향으로 기록된다. 명세서 내에서 열거된 수치 범위는 범위를 정의하는 숫자를 포함하고, 정의된 범위 내의 각각의 정수 또는 임의의 비-정수 분획을 포함한다.

[0024] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자가 통상적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기술된 것들과 유사하거나 등가인 임의의 방법 및 재료가 본 발명을 테스트하기 위한 실행에서 사용될 수 있지만, 바람직한 재료 및 방법이 본원에서 기술된다.

[0025] 본 발명에서 용어, "대상체" 또는 "환자"는 인간, 유인원, 원숭이, 소, 개, 기니아 피그, 토끼, 닭, 곤충 등을 포함하여 치료가 요구되는 임의의 단일 개체를 의미한다. 또한, 임의의 질병 임상 소견을 보이지 않는 임상 연

구 시험에 참여한 임의의 대상 또는 역학 연구에 참여한 대상 또는 대조군으로 사용된 대상이 대상에 포함된다.

[0026] 본 발명에서 용어, "생물학적 시료(샘플)"는 대상 또는 환자로부터 얻은 생물학적 시료를 의미한다. 생물학적 시료의 공급원은 신선한, 동결된 및/또는 보존된 장기 또는 조직 샘플 또는 생검 또는 흡인물로부터의 고형 조직; 혈액 또는 임의의 혈액 구성분; 대상의 임신 또는 발생의 임의의 시점의 세포일 수 있다.

[0027] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.

[0029] 일 측면에서, 본 발명은 MT1(metallothionein 1)의 유전자 또는 상기 유전자로부터 발현된 단백질을 포함하는 PHMG(Polyhexamethylene guanidine) 노출 여부 확인용 바이오마커에 관한 것이다.

[0030] 일 구현예에서, 상기 바이오마커는 MT1의 아형인 MT1B (GENBANK NO. NM_005947.2), MT1F (GENBANK NO. NM_005949.3), MT1G(GENBANK NO. NM_005950.2) 및 MT1H (GENBANK NO. NM_005951.2)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자 또는 상기 유전자로부터 발현된 단백질일 수 있다.

[0031] 일 구현예에서, 상기 바이오마커는 MTF1(metal regulatory transcription factor 1) (GENBANK NO. NM_005955.2)의 유전자 또는 상기 유전자로부터 발현된 단백질을 포함할 수 있고, 핵으로 이동된 MTF1 단백질의 수준 (즉, 핵에서의 MTF1의 단백질 발현 수준)인 것이 더욱 바람직하다.

[0032] 일 구현예에서, 본 발명의 바이오 마커 유전자들은 PHMG 노출시 특이적으로 발현이 증가할 수 있다.

[0033] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 바이오마커 유전자의 발현 수준을 mRNA 또는 단백질 수준에서 측정하는 제제를 포함하는, PHMG 노출 여부 확인용 조성물에 관한 것이다.

[0034] 일 구현예에서, 바이오마커 유전자의 발현 수준을 mRNA 수준에서 측정하는 제제는, 상기 마커의 핵산서열, 상기 핵산서열에 상보적인 핵산서열, 상기 핵산서열 및 상보적인 서열의 단편을 특이적으로 인식하는 프라미어 쌍, 프로브, 또는 프라이머 쌍 및 프로브를 포함할 수 있으며, 안티센스 올리고뉴클레오티드, siRNA, shRNA 또는 miRNA일 수 있고, 이의 측정은 중합효소연쇄반응, 실시간 RT-PCR (Real-time RT-PCR), 역전사 중합효소연쇄반응, 경쟁적 중합효소연쇄반응(Competitive RT-PCR), Nuclease 보호 분석(RNase, S1 nuclease assay), in situ 교잡법, 핵산 마이크로어레이, 노던블랏 또는 DNA 칩으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법으로 수행될 수 있다.

[0035] 일 구현예에서, 바이오마커 유전자의 발현 수준을 단백질 수준에서 측정하는 제제는, 상기 마커의 단백질 전장 또는 그 단편을 특이적으로 인식하는 항체, 항체 단편, 펩타이드, 펩타이드 핵산(PNA), 리보자임, 앱타머(aptamer), 아비머(avidity multimer) 또는 펩티도모방체(peptidomimetics)를 포함할 수 있으며, 이의 측정은 웨스턴블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 면역 전기영동, 조직면역염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS, 질량분석 또는 단백질 마이크로어레이로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법으로 수행될 수 있다.

[0036] 본 발명에서 사용된 용어 "검출" 또는 "측정"은 검출 또는 측정된 대상의 농도를 정량하는 것을 의미한다.

[0037] 본 발명에서 용어, "프라이머"는 짧은 자유 3말단 수산화기 (free 3 hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍 (base pair)를 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응 (즉, DNA 폴리머레이트 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성이 개시할 수 있다.

[0038] 본 발명에서 용어, "프로브"란 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧게는 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링 되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고 뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 본 발명에서는 상기 바이오마커 유전자와 상보적인 프로브를 이용하여 혼성화를 실시하여, 혼성화 여부를 통해 상기 유전자 발현 정도를 진단할

수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 통상의 기술분야에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있으므로 본 발명에서는 이에 대해 특별히 한정하지 않는다.

[0039] 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 비-제한적인 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체 (예: 메틸 포스포네이트, 포스소트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체 (예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.

[0040] 본 발명에서, 프로브를 cDNA 분자와 혼성화시키는 적합한 조건은 최적화 절차에 의하여 일련의 과정으로 결정될 수 있다. 이런 절차는 연구실에서 사용을 위한 프로토콜을 수립하기 위하여 당업자에 의하여 일련의 과정으로 실시된다. 예를 들어, 온도, 성분의 농도, 혼성화 및 세척 시간, 완충액 성분 및 이들의 pH 및 이온세기 등의 조건은 프로브의 길이 및 GC 양 및 타깃 뉴클레오타이드 서열 등의 다양한 인자에 의존한다. 혼성화를 위한 상세한 조건은 Joseph Sambrook, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001); 및 M.L.M. Anderson, NucleicAcidHybridization, Springer-Verlag New York Inc. N.Y.(1999)에서 확인할 수 있다. 예를 들어, 상기 엄격조건 중에서 고 엄격조건은 0.5 M NaHPO4, 7% SDS(sodium dodecyl sulfate),1mM EDTA에서 65℃ 조건으로 혼성화하고, 0.1 x SSC(standard saline citrate)/0.1% SDS에서 68℃ 조건으로 세척하는 것을 의미한다. 또는, 고 엄격조건은 6 x SSC/0.05% 소듐 파이로포스페이트에서 48℃ 조건으로 세척하는 것을 의미한다. 저 엄격조건은 예를 들어, 0.2 x SSC/0.1% SDS에서 42℃ 조건으로 세척하는 것을 의미한다.

[0041] 본 발명에서 용어, "항체"란 당해 분야에서 공지된 용어로서 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 본 발명의 바이오마커 유전자에서 발현되는 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 상기 항체의 제조방법은 널리 공지된 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 여기에는 상기 단백질에서 만들어질 수 있는 부분 펩티드도 포함된다. 본발명의 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그것의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역 글로불린 항체가 포함된다. 나아가, 본 발명의 항체에는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함된다.

[0042] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 PHMG 노출 여부 확인용 조성물을 포함하는, PHMG 노출 여부 확인용 키트에 관한 것이다.

[0043] 일 구현예에서, 상기 키트는 대상체 또는 환자로부터 생체 시료를 수집하기 위한 도구 및/또는 시약 뿐 아니라 그 시료로부터 게놈 DNA, cDNA, RNA 또는 단백질을 준비하기 위한 도구 및/또는 시약을 더 포함할 수 있다. 예를 들면, 게놈 DNA의 관련 영역을 증폭하기 위한 PCR 프라이머를 포함할 수 있다. 상기 키트는 약리게놈학적 프로파일링에 유용한 유전 인자의 프로브를 포함할 수 있다. 또한, 이러한 키트의 사용에 있어서, 표지화된 올리고뉴클레오티드를 사용하여 분석 중 용이하게 동정할 수 있다.

[0044] 일 구현예에서, 상기 키트는 DNA 중합효소 및 dNTP(dGTP, dCTP, dATP 및 dTTP), 형광물질 등의 표지 물질을 추가로 더 함유할 수 있다.

[0045] 본 발명에서 용어 "PHMG 노출 여부 확인용 키트"는 본 발명의 PHMG 노출 여부 확인용 조성물이 포함된 키트를 의미하며, "PHMG 노출 여부 확인"은 "PHMG 노출 여부 진단"과 서로 교차 또는 혼용하여 사용이 가능하다. 본 명세서에서 용어 "진단"은 PHMG 노출 또는 PHMG 노출에 의해 유도된 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 PHMG에 노출되었는지 또는 PHMG 노출에 의해 유도된 질환을 현재 가지고 있는 지 여부를 판정하는 것, PHMG 노출에 의해 유도된 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)(예컨대, 폐 섬유증 상태의 동정, 폐 섬유증의 단계 결정 또는 치료에 대한 폐 섬유증의 반응성 결정)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)을 포함한다.

[0046] 본 발명에서 용어 "PHMG 노출 여부 확인용 바이오 마커 또는 PHMG 노출에 의해 유도된 질환을 진단하기 위한 바이오 마커"란 PHMG 노출 여부 또는 PHMG에 의해 유도된 질환의 발병 여부를 진단할 수 있는 물질로, PHMG 노출되지 않은 정상 세포 또는 조직에 비하여 PHMG 노출시 발현이 증가 또는 감소하는 양상을 보이는 폴리펩타이드 또는 핵산(예: mRNA 등), 지질 , 당지질, 당단백질, 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함한다. 본 발명의 목적상, 상기 PHMG 노출 여부 확인용 바이오마커는 유전자 MT1B, MT1F, MT1G 및

MT1H로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상으로서, PHMG 노출시 특이적으로 mRNA 발현 또는 단백질 발현 정도가 증가하는 유전자이며, MTF1 (핵에서 발현 수준 증가)을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 마커들은 유전자뿐만 아니라 어느 하나의 마커와 상보적인 DNA 또는 mRNA을 포함하며, 이들 마커들이 둘 이상 포함된 복합 마커일 수 있다.

[0047] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 바이오마커 유전자의 발현 수준을 mRNA 또는 단백질 수준에서 측정하는 제제를 포함하는, PHMG 검출용 조성물에 관한 것이다.

[0048] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 PHMG 검출용 조성물을 포함하는, PHMG 검출용 키트에 관한 것이다.

[0049] 일 측면에서, 본 발명은 1) 검사 대상체로부터 분리한 생물학적 시료에서 본 발명의 바이오마커 발현 수준을 확인하는 단계; 2) 정상 대조군 시료의 해당 마커의 상응하는 결과와 비교하는 단계; 및 3) 1) 단계에서의 바이오마커 유전자의 발현 수준이 2) 단계에서의 바이오마커 유전자의 발현 수준에 비해 높은 경우, 상기 검사 대상체가 PHMG에 노출된 것으로 판단하는 단계를 포함하는, PHMG 노출 여부 확인 방법에 관한 것이다.

[0050] 일 구현예에서, 노출 여부 확인 방법은 PHMG 노출 관련 질환의 진단에 사용될 수 있으며, PHMG 노출 관련 질환은 가습기 살균제 관련 질환일 수 있고, 폐 섬유증일 수 있으며, 폐의 혈관 주위, 세기관지 주위, 흉막 아래, 및 폐의 간질(interstitial) 내로 이루어진 군에서 선택된 1 이상의 폐의 실질(parenchyma)에 섬유증이 유발된 폐 섬유증인 것이 더욱 바람직하다.

[0051] 일 측면에서, 본 발명은 1) 세포 또는 조직에서 본 발명의 바이오마커의 발현 수준을 확인하는 단계; 2) 세포 또는 조직에 시료를 처리하고 상기 바이오마커의 발현 수준을 확인하는 단계; 및 3) 1) 단계에서의 바이오마커의 발현 수준과 2) 단계에서의 바이오마커의 발현 수준을 비교하는 단계를 포함하는, PHMG의 검출 방법에 관한 것이다.

[0052] 일 구현예에서, 시료 처리 후 바이오마커의 발현 수준이 증가된 경우 PHMG가 시료에 존재하는 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0054] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0056] **실시예 1. 세포 생존율 측정**

[0057] 가습기 살균제인 PHMG(Polyhexamethylene guanidine) 및 CMIT(chloromethylisothiazolinone)의 세포독성을 확인하기 위해, 인간 폐포 상피세포(human pulmonary alveolar epithelial cells)인 HPAEpiCs (ScienCell, Carlsbad, CA, USA) 1×10^4 개를 96-웰 플레이트 (SPL Life Science, Gyeonggi, Korea)에 분주한 뒤 1% 페니실린/스트렙토마이신 및 10% FBS(fetal bovine serum)를 포함하는 폐포 상피 세포 배지(alveolar epithelial cell) (ScienCell)에서 37℃ 및 5% CO^2의 조건으로 배양하였다. PHMG (CAS No. 89697-78-9) (BOC Sciences, Shirley, NY, USA) 및 CMIT (CAS No. 26172-55-4) (Key Organics-Bionet Research, Camelford, UK)를 각각 다양한 농도로 처리하고 12, 24 및 48 h 후 Cell Counting Kit-8 (CCK-8; Dojindo, Kumamoto, Japan)의 CCK-8 시약을 2시간 동안 처리하고 마이크로플레이트 리더기 (SpectraMax M2e; Bucher Biotec, Basel, Switzerland)로 450 nm에서 흡광도를 측정함으로써 세포 생존율을 확인하였다.

[0058] 그 결과, PHMG 및 CMIT를 각각 3 μg/mL 처리한 경우부터 세포 생존율이 현저히 감소하는 것으로 나타났다 (도 1). 또한, CMIT 노출시 처리 시간과 관계없이 세포 생존율이 현저히 감소한 반면, PHMG 노출시 시간-의존적으로 세포 생존율이 감소하는 것으로 나타났다. 이에, PHMG 또는 CMIT 노출에 의한 세포 및 분자 반응을 조사하기 위해, 2 μg/mL의 농도를 선택하였다.

[0060] **실시예 2. PHMG 및 CMIT 노출에 따른 유전자 발현 변화 분석**

[0061] PHMG 및 CMIT 노출에 따른 유전자 발현 변화를 확인하기 위해 RNA-Seq를 수행하기 위해, 추출된 RNA의 품질을 Agilent 2100 Bioanalyzer 및 RNA 6000 Nano Chip (Agilent Technologies, Amstelveen, The Netherlands)을 이용하여 확인하고, RNA 정량은 ND-2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Inc., Wilmington,

DE, USA)를 이용하여 수행하였으며, QuantSeq 3 0 mRNA-Seq Library Prep Kit (Lexogen, Inc., Vienna, Austria)를 이용하여 대조군 및 실험군 RNA에 대한 라이브러리 컨스트럭션(library construction)을 수행하였다. 구체적으로, PHMG 및 CMIT를 각각 HPAEpiCs 세포에 2 μg/mL로 처리한 뒤, 12, 24 및 48 h 후, 이로부터 총 RNA를 추출하고 (500 ng), 이를 역전사하기 위해 5'-말단에 Illumina-compatible 서열을 포함하는 oligo-dT 프라이머와 혼성화시켰다. RNA 주형 분해 후, 5'-말단에 Illumina-compatible 링커 서열을 포함하는 랜덤 프라이머를 이용하여 두 번째 가닥 합성을 시작하였다. 자기 구슬(magnetic beads)를 이용하여 이중 가닥 라이브러리를 정제한 뒤, 라이브러리를 증폭하여 클러스터 생성에 필요한 전체 아답터 서열을 추가하였다. 완성된 라이브러리를 다른 PCR 구성 요소들로부터 정제한 뒤 NextSeq 500 (Illumina, San Diego, CA, USA)를 이용하여 High-throughput 시퀀싱을 single-end 75 시퀀싱으로 수행하였다. 그 후, QuantSeq 3 mRNA-Seq reads를 Bowtie2를 이용하여 정렬하였다. 구체적으로, QuantSeq 3 mRNA-Seq reads를 게놈 및 전사체(transcriptome) 각각에 정렬하기 위해, Bowtie2 인덱스들을 게놈 어셈블리 서열 또는 대표적인 전사체 서열로부터 생성하였다. 정렬 파일을 사용하여 전사체를 어셈블하고, 그 어번던스(abundance)를 추정하고 유전자 차등 발현을 확인하였다. BEDtools coverage를 이용하여 차등 발현된 유전자들을 결정하였다. 결정된 유전자들을 DAVID(Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery) (http://david.abcc.ncifcrf.gov/ (accessed on 21 November 2018)) 및 Medline database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ (accessed on 21 November 2018))를 이용하여 분류하였다.

[0062] 그 결과, PHMG 및 CMIT에 노출된 후 발현이 변화한 유전자의 수는 24시간 동안 노출되었을 때 시간이 지남에 따라 하루 주기 리듬에 의해 현저히 증가하였으며 (도 2A 및 B), 48시간 동안 노출되었을 때 DNA 복제 및 수선에 의해 감소하였다 (도 2C 및 D). 또한, CMIT에 노출 후에 비해 PHMG 노출 후 현저히 (3-배 이상) 상향 또는 하향 조절된 총 34개의 유전자들을 선택하였다 ($p < 0.05$). 이 중 상당한 비율이 미네랄 흡수 및 미토콘드리아 리보좀 RNA과 관련되어 있었다 (도 3A). 또한, gene ontology enrichment 분석을 통해, PHMG-처리된 HPAEpiCs에서 Zn^{2+}에 대한 세포 반응성(cellular responsiveness)과 관련된 유전자들이 현저히 상향 조절되었음을 확인하였다 (도 3B). 특히, MT1(metallothionein-1) 유전자의 아형들 중 MT1B, MT1E, MT1F, MT1G, MT1H, MT1M 및 MT1X의 발현 수준이 CMIT가 처리된 HPAEpiCs에서와 달리 PHMG 처리된 HPAEpiCs에서 현저하게 증가된 것을 확인하였다 (도 3A).

[0064] **실시예 3. MT1 아형들의 mRNA 발현 확인**

[0065] 상기 실시예 2에서 PHMG 노출시에만 발현이 증가하는 것으로 확인된 MT1B, MT1E, MT1F, MT1G, MT1H, MT1M 및 MT1X의 mRNA 발현 수준 변화를 확인하기 위해, HPAEpiCs에 PHMG 또는 CMIT를 12, 24, 48 및 72 h 동안 처리한 후 mRNA 발현 수준을 RT-PCR로 확인하였다. 구체적으로, HPAEpiCs에 PHMG 또는 CMIT 2 μg/mL를 12, 24, 48 및 72 h 동안 처리한 후, TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 총 RNA를 추출한 뒤, amfiRivert cDNA Synthesis Platinum Master Mix (GenDEPOT, Baker, TX, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 그 후, 하기 표 1의 프라이머들을 이용하여 thermal cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany)로 증폭하고 Gel Doc EZ imager (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)를 이용하여 DNA 밴드를 시각화하였다.

표 1

[0066]

		서열 (5'->3')
MT1B	sense	GATCCCAACTGCTCCTGCACCACA
	antisense	AAGAATGTAGCAAACCGGTCAGGGTAGTT
MT1E	sense	CACTGGTGTGAGCTCCAGCATCC
	antisense	AATGCAGCAAATGGCTCAGTGTTGTATTT
MT1F	sense	GAATGTAGCAAATGGGTCAAGGTG
	antisense	TCTCCTGCACCTGCGCTGGT
MT1G	sense	CAACTGCTCCTGTGCCGCTGG
	antisense	TGTAGCAAAGGGGTCAAGATTGTAGC
MT1H	sense	ATCTGCAAAGGGGCGTCAG
	antisense	GAATGTAGCAAATGAGTCGGAGTT
MT1M	sense	TCCGGGTGGGCCTAGCAGTCG
	antisense	AATGCAGCAAATGGCTCAGTATCGTATTG
MT1X	sense	GACCCCAACTGCTCCTGCTCG
	antisense	GATGTAGCAAACGGGTCAGGGTTGTAC

[0067] 그 결과, MT1의 아형 중 MT1B, MT1F, MT1G 및 MT1H의 mRNA 발현 수준이 현저히 증가하였으며, 를 처리한 경우에는 그렇지 않은 것으로 나타났으며, MT1E, MT1M 및 MT1X는 PHMG-처리된 세포 및 CMIT-처리된 세포 모두에서 상향 조절되지 않는 것으로 나타났다 (도 4). 또한, MT2의 발현도 확인하였으나, PHMG-처리된 세포 및 CMIT-처리된 세포 간에 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다 (도 4). 이를 통해, CMIT와 달리 PHMG가 세포 내 MT1B, MT1F, MT1G 및 MT1H를 특이적으로 유도하는 것을 확인하였다.

[0069] **실시예 4. MT1B, MT1F, MT1G 및 MT1H의 유도 기전 확인**

[0070] 4-1. MTF1의 전사 조절

[0071] 상기 실시예 3에서 PHMG의 노출에 특이적으로 MT1B, MT1F, MT1G 및 MT1H의 발현이 증가되는 기전을 확인하기 위해, 세포 내 금속 항상성을 조절하는 MTF1(metal regulatory transcription factor 1) 단백질의 핵으로의 이동을 웨스턴 블롯 분석으로 확인하였다. 구체적으로, HPAEpiCs에 2 μg/mL의 PHMG 또는 CMIT를 0, 0.5, 1, 2 또는 4 h 처리한 후 RIPA 파쇄 버퍼 (ATTO, Tokyo, Japan)로 세포를 파쇄하고 단백질 추출물을 SDS-PAGE 젤 전기영동으로 분리하고 PVDF 멤브레인 (ATTO)으로 트랜스퍼하였다. 5% 스킴밀크로 1 h 동안 블로킹한 뒤, 항-MTF1 항체 (1:1000; Abcam, Cambridge, UK), 항-Lamin B1 (1:1000; Abcam) 및 항-α-tubulin 항체 (1:1000; Santa Cruz)들과 각각 반응시켰다. 그 후 HRP-컨쥬게이트된 2차 항체 (1:2000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)로 반응시키고 단백질 밴드를 ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad Laboratories)로 시각화하였다.

[0072] 그 결과, 핵으로 이동된 MTF1의 발현 수준은 PHMG를 처리하고 4시간 후에 최대로 나타났다 (도 5). 이와 대조적으로 CMIT를 처리한 세포에서는 핵으로의 이동이 관찰되지 않아, PHMG 또는 CMIT 노출 후 MT1B, MT1F, MT1G 및 MT1H의 발현 차이는 MTF1의 전사 조절의 차이로 인한 것임을 유추할 수 있었다.

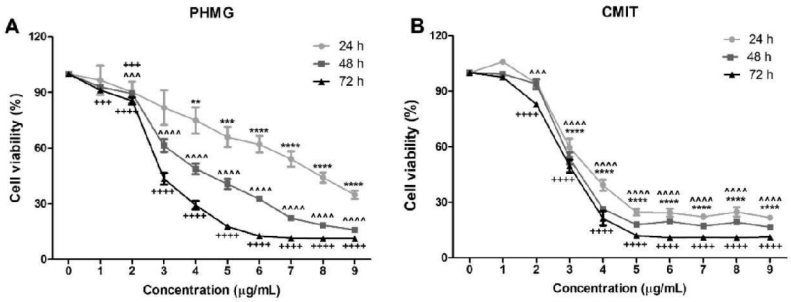
[0074] 4-2. MTF1의 활성화 기전

[0075] MT1F에는 EGR1(early growth response 1) 결합 부위만 있고, MT1B 및 MT1H에는 NR3C1(nuclear receptor superfamily 3, group C, member 1) 결합 부위만 있으며, MT1G는 EGR1 또는 NR3C1에 대한 결합 부위가 없으므로, 특정 MT1 아형의 발현을 조절하는 MTF1의 활성화가 EGR1 및 NR3C1의 전사 활성을 필요로 하는지 확인하기 위해, HPAEpiCs를 PHMG 및 CMIT로 각각 처리하고 EGR1 및 NR3C1의 단백질 발현 수준 및 핵으로의 이동을 항-EGR1 항체 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA), 항-NR3C1 항체 (1:1000; Santa Cruz), 항-Lamin B1 및 항-α-tubulin 항체들을 이용한 웨스턴 블롯 분석으로 확인하였다.

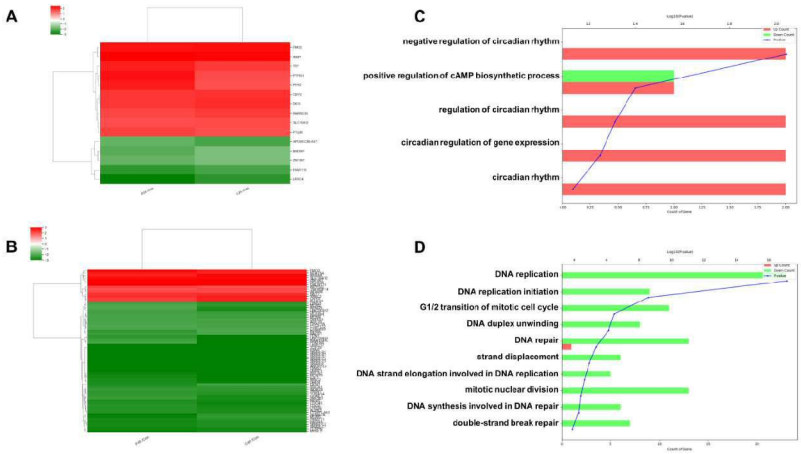
[0076] 그 결과, HPAEpiCs에서 PHMG 및 CMIT 처리 1 h 후 및 2 h 후에 EGR1의 핵으로의 이동이 현저히 증가한 것으로 나타났다 (도 5). 또한, NR3C1의 핵으로의 이동 또한 PHMG 처리에 의해 시간 의존적으로 현저히 증가한 것으로 나타났으나, CMIT를 처리한 경우에는 4 h에 약간 증가한 것에 그쳤다 (도 5). 따라서, PHMG 및 CMIT 노출 후 MT1B, MT1F 및 MT1H의 발현 차이는 EGR1 및 NR3C1의 전사 조절에 기본적으로 필요한 인자임으로 PHMG 및 CMIT 노출에 의한 발현차이를 유도하는 특이적 인자는 아니며, MT1G는 EGR1 또는 NR3C1에 대한 결합 부위가 없으므로, MT1G의 발현은 MTF1에 의해 조절될 수 있고, 종합적으로, MTF1이 MTF1이 PHMG 노출 후 MT1B, MT1F, MT1G 및 MT1H의 유도를 위한 필수적인 전사인자임을 알 수 있었다.

도면

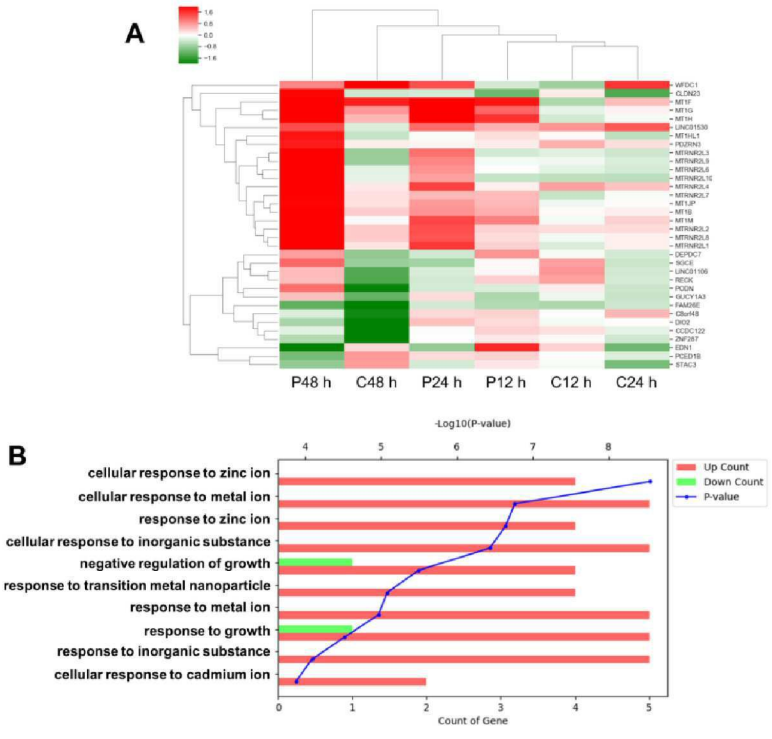
도면1



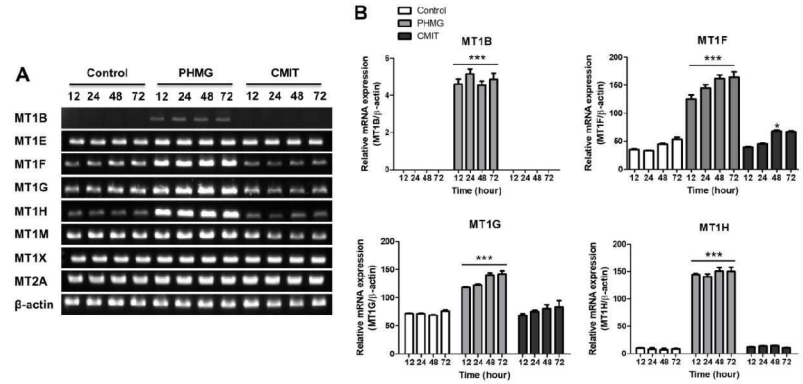
도면2



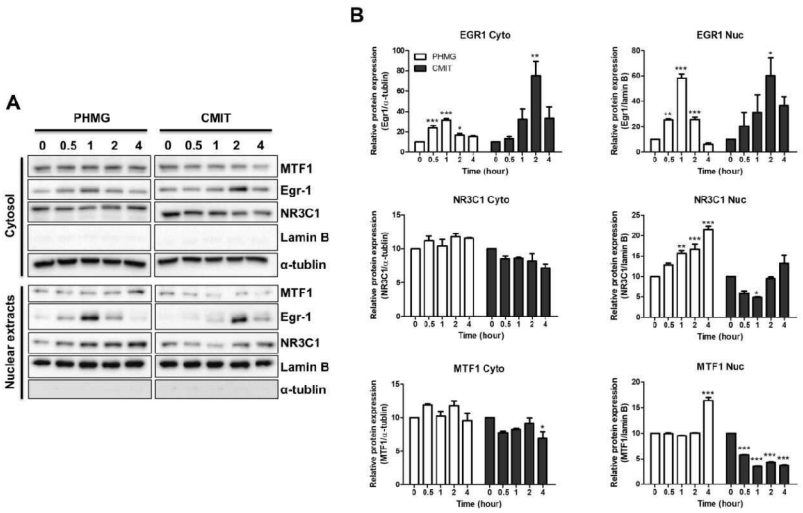
도면3



도면4


A
Control
PHMG
CMIT
12 24 48 72 12 24 48 72 12 24 48 72
MT1B
MT1E
MT1F
MT1G
MT1H
MT1M
MT1X
MT2A
β-actin
B
Control
PHMG
CMIT
MT1B
MT1F
MT1G
MT1H
Relative mRNA expression
Time (hour)

도면5


A
PHMG
CMIT
0 0.5 1 2 4 0 0.5 1 2 4
Cytosol
Nuclear extracts
MTF1
Egr-1
NR3C1
Lamin B
α-tublin
B
EGR1 Cyto
EGR1 Nuc
NR3C1 Cyto
NR3C1 Nuc
MTF1 Cyto
MTF1 Nuc
PHMG
CMIT
Time (hour)