



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년12월11일

(11) 등록번호 10-2740581

(24) 등록일자 2024년12월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/6883 (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6883 (2022.01)

C12Q 2525/205 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2024-0042094

(22) 출원일자 2024년03월27일

심사청구일자 2024년03월27일

(56) 선행기술조사문헌

Journal of Hazardous Materials (2022)
421:126760

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 9 항

(73) 특허권자

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

송대진

경기도 광명시 소하로 38, 205동 1404호 (소하동, 휴먼시아2단지아파트)

(74) 대리인

특허법인 무한

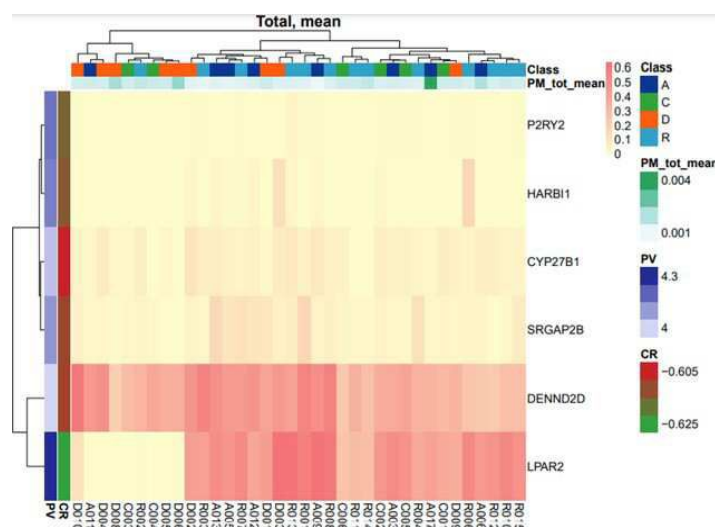
심사관 : 김승범

(54) 발명의 명칭 알레르기성 질환자의 대기 중 PM2.5 미세먼지 노출 여부 확인용 바이오마커 조성물

(57) 요약

본 발명은 알레르기성 질환을 가진 개체의 대기 중 미세먼지 노출 여부를 확인할 수 있는 바이오마커 조성물, 및 상기 바이오마커를 검출할 수 있는 제제를 포함하는 키트 등에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는, 알레르기성 질환을 가진 개체가 미세먼지가 노출되는 경우 발현이 증가하는 유전자를 확인하여 이를 바이오마커 조성물 등의 발명으로 완성한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/158 (2013.01)

C12Q 2600/178 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

Oxidative Medicine and Cellular Longevity

(2022) 2022:3618806

Journal of Cancer Prevention (2017) 22(1):6-15

Environmental Monitoring and Assessment (2019) 191:330

Atmosphere (2021) 12(8):1068*

Journal of Asthma and Allergy (2021)

14:1411-1423*

Journal of Trace Elements in Medicine and Biology (2021) 68:126826

American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine (2004) 170:898-903

Frontiers in Immunology (2023.01.11)

13:1099509

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1485019161

과제번호 ARQ202201720002

부처명 환경부

과제관리(전문)기관명 한국환경산업기술원

연구사업명 환경성질환예방관리핵심기술개발사업(예타)

연구과제명 미세먼지 유입 영향 실내공기오염물질 노출에 의한 알레르기질환 영향 규명 기술 개

발

과제수행기관명 고려대학교 산학협력단

연구기간 2023.01.01 ~ 2023.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1485018812

과제번호 ARQ202201720001

부처명 환경부

과제관리(전문)기관명 한국환경산업기술원

연구사업명 환경성질환예방관리핵심기술개발사업

연구과제명 미세먼지 유입 영향 실내공기오염물질 노출에 의한 알레르기질환 영향 규명 기술 개

발

과제수행기관명 고려대학교 산학협력단

연구기간 2022.04.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

다음으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자, 또는 해당 유전자의 발현물을 포함하는 알레르기 질환자의 대기 중 PM 2.5(2.5 μ m 이하의 Particulate Matter) 미세먼지 노출 여부 확인용 바이오마커 조성물: LPAR2(lysophosphatidic acid receptor 2, Gene ID: 9170), P2RY2(purinergic receptor P2Y2, Gene ID: 5029) 및 HARBI1(harbinger transposase derived 1, Gene ID: 283254).

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 알레르기 질환은 천식, 알레르기성 비염, 아토피 피부염, 두드러기, 약물 알레르기, 아나필락시스 및 알레르기성 결막염으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 바이오마커 조성물.

청구항 3

LPAR2, P2RY2 및 HARBI1로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자 또는 이의 발현산물인 단백질의 발현수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, 알레르기 질환자의 대기 중 PM2.5 미세먼지노출여부 확인용 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 또는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 압타머인, 알레르기 질환자의 대기 중 PM2.5 미세먼지노출여부 확인용 조성물.

청구항 5

제 3항에 있어서, 상기 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 유전자의 핵산 분자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브인, 알레르기 질환자의 대기 중 PM2.5 미세먼지노출여부 확인용 조성물.

청구항 6

알레르기성 질환자인 개체의 대기 중 PM2.5 미세먼지 노출 여부 확인에 필요한 정보를 제공하기 위한 방법으로,

- 알레르기성 질환자인 개체로부터 분리된 생물학적 시료를 수득하는 단계;
- 상기 생물학적 시료로부터 LPAR2, P2RY2 및 HARBI1로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- 상기 유전자 발현 수준과 PM2.5 미세먼지에 노출되지 않은 알레르기성 질환자의 유전자 발현 수준을 비교하는 단계;

를 포함하는, 정보제공방법.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액, 소변 및 비인두도말로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 정보제공방법.

청구항 8

제 6항에 있어서,

상기 알레르기 질환은 천식, 알레르기성 비염, 아토피 피부염, 두드러기, 약물 알레르기, 아나필락시스 및 알레르기성 결막염으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 정보제공방법.

청구항 9

하기로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자 또는 그 발현물에 특이적인 제제를 포함하는, 알레르기성 질환자의 대기 중 미세먼지 노출 여부 진단 키트:

LPAR2, P2RY2 및 HARBI1.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 알레르기성 질환을 가진 개체의 대기 중 PM 2.5 미세먼지 노출 여부를 확인할 수 있는 바이오마커 조성물, 상기 바이오마커의 발현수준을 측정하는 단계를 포함하는 정보제공 방법 및 상기 바이오마커를 검출할 수 있는 제제를 포함하는 키트 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 알레르기 반응은 특정 환경에 대한 면역체계의 과민성으로 인해 발생하는 질환으로 최근 20~30년간 환자수가 꾸준히 증가하고 있다. 현대사회에서 알레르기 질환의 발병률은 지속적으로 증가하고 있으나, 아직까지 완전한 치료법이 개발되지 않은 상태이다.

[0004] 일반적인 알레르기 항원에는 꽃가루나, 특정 음식, 약물, 금속 등이 포함되며, 알레르기성 질환을 가진 개체에 대하여 대기 중 미세한 미세먼지 입자의 노출, 즉 미세먼지 입자의 흡입이 미치는 영향에 대한 연구가 이루어지고 있다.

[0005] 특히, 질병관리청의 발표에 따르면 1998년부터 2019년까지 20년간 국내 알레르기성 비염 환자가 약 18배 증가하였으며, 그 주요원인을 대기오염의 증가로 꼽은 바 있다.

[0006] 또한, 선행기술로서 Hahn Jin Jung et al., 미세먼지가 알레르기비염에 미치는 영향과 기전(2023)은 미세먼지가 알레르기성 비염에 미치는 영향에는 면역학적 반응, 산화 스트레스, 상피 장벽 기능 장애, 알레르기 감작, 후생적 변형 등 다양한 메커니즘이 관여하며, 알레르기성 비염을 악화시킴을 개시하고 있다

[0007] 마찬가지로 Amir Zahedi et al., Effect of ambient air PM2.5-bound heavy metals on blood metal(loid)s and children's asthma and allergy pro-inflammatory (IgE, IL-4 and IL-13) biomarkers, Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, Volume 68, December 2021, 126826는 대기 중 PM2.5와 결합한 미세먼지가 염증반응에 미치는 영향에 대하여 보고하였으나 알레르기 질환자에게 미세먼지 특이적인 마커를 제안하거나 영향을 규명하는 데에는 실패하였다.

[0008] 이에 본 발명자들은 알레르기 질환자에 대한 대기 중 미세먼지 노출의 영향을 평가하여 본 바이오마커 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 알레르기 질환자의 대기 중 미세먼지(PM_{2.5} - 2.5 μ m 이하의 Particulate Matter) 노출 여부 확인용 바이오마커 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명이 이루고자 하는 또 다른 기술적 과제는 알레르기성 질환자인 개체의 대기 중 미세먼지 노출 여부에 필요한 정보를 제공하기 위한 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명이 이루고자 하는 다른 기술적 과제는 알레르기성 질환자의 대기 중 미세먼지 노출 여부 진단 키트를 제공하는 것이다.

[0013] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 다음으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자, 또는 해당 유전자의 발현물을 포함하는 알레르기 질환자의 대기 중 미세먼지(PM_{2.5} - 2.5 μ m 이하의 Particulate Matter) 노출 여부 확인용 바이오마커 조성물을 제공한다: CYP27B1(cytochrome P450 family 27 subfamily B member 1, Gene ID: 1594), SRGAP2B(SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 2B, Gene ID: 647135), DENND2D(DENN domain containing 2D, Gene ID: 79961), P2RY2(purinergic receptor P2Y2, Gene ID: 5029), HARBI1(harbinger transposase derived 1, Gene ID: 283254), LPAR2(lysophosphatidic acid receptor 2, Gene ID: 9170), MBD1(methyl-CpG binding domain protein 1, Gene ID: 4152) MTHFD1L(methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP⁺ dependent) 1 like, Gene ID: 25902), PRIM2(DNA primase subunit 2, Gene ID: 5558), TRUB2(TruB pseudouridine synthase family member 2, Gene ID: 26995), LOC101928718(Gene ID: 101928718), CNM4(cyclin and CBS domain divalent metal cation transport mediator 4, Gene ID: 26504), INTS14(integrator complex subunit 14, Gene ID: 81556), GBF1(golgi brefeldin A resistant guanine nucleotide exchange factor 1, Gene ID: 8729), DNM3(dynammin 3, Gene ID: 26052), CSAD(cysteine sulfinic acid decarboxylase, Gene ID: 51380), COL7A1(collagen type VII alpha 1 chain, Gene ID: 1294), LOC105376037(Gene ID: 105376037), FAM214A(atos homolog A, Gene ID: 56204), CDYL2(chromodomain Y like 2, Gene ID: 124359), NSL1(NSL1 component of MIS12 kinetochore complex, Gene ID: 25936), MIR1976(microRNA 1976, Gene ID: 100302190), TTC21A(tetratricopeptide repeat domain 21A, Gene ID: 199223), DRC3(dynein regulatory complex subunit 3, Gene ID: 83450), NOP9(NOP9 nucleolar protein, Gene ID: 161424), AKR7A3(aldo-keto reductase family 7 member A3, Gene ID: 22977), HPS1(HPS1 biogenesis of lysosomal organelles complex 3 subunit 1, Gene ID: 3257), TRG-TCC2-1(trRNA-Gly (anticodon TCC) 2-1, Gene ID: 100189064), DNAJC6(DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C6, Gene ID: 9829), PRUNE1(prune exopolyphosphatase 1, Gene ID: 58497) 및 ANKAR(ankyrin and armadillo repeat containing, Gene ID: 150709).

[0016] 일 측에 따르면, 상기 알레르기 질환은 천식, 알레르기성 비염, 아토피 피부염, 두드러기, 약물 알레르기, 아나필락시스 및 알레르기성 결막염으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0017] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, CYP27B1, SRGAP2B, DENND2D, P2RY2, HARBI1, LPAR2, MBD1, MTHFD1L, PRIM2, TRUB2, LOC101928718, CNM4, INTS14, GBF1, DNM3, CSAD, COL7A1, LOC105376037, FAM214A, CDYL2, NSL1, MIR1976, TTC21A, DRC3, NOP9, AKR7A3, HPS1, TRG-TCC2-1, DNAJC6, PRUNE1 및 ANKAR로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자 또는 이의 발현산물인 단백질의 발현수준을 측정할 수 있는 체제를 포함하는, 알레르기 질환자의 대기 중 미세먼지노출여부 확인용 조성물이 제공된다.

[0018] 일 측에 따르면, 상기 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있는 체제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 또는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 압타머일 수 있다.

[0019] 일 측에 따르면, 상기 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 체제는 상기 유전자의 핵산 분자에 특이적으로 결

합하는 프라이머 또는 프로브일 수 있다.

- [0020] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 알레르기성 질환자인 개체의 대기 중 미세먼지 노출 여부 확인에 필요한 정보를 제공하기 위한 방법으로서:
- [0021] a) 알레르기성 질환자인 개체로부터 생물학적 시료를 채취하는 단계;
- [0022] b) 상기 생물학적 시료로부터 CYP27B1, SRGAP2B, DENND2D, P2RY2, HARBI1, LPAR2, MBD1, MTHFD1L, PRIM2, TRUB2, LOC101928718, CNNM4, INTS14, GBF1, DNM3, CSAD, COL7A1, LOC105376037, FAM214A, CDYL2, NSL1, MIR1976, TTC21A, DRC3, NOP9, AKR7A3, HPS1, TRG-TCC2-1, DNAJC6, PRUNE1 및 ANKAR로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [0023] c) 상기 유전자 발현 수준과 미세먼지에 노출되지 않은 알레르기성 질환자의 유전자 발현 수준을 비교하는 단계;
- [0024] 를 포함하는, 정보제공방법이 제공된다.
- [0025] 일 측에 따르면, 상기 생물학적 시료는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액, 소변 및 비인두 도말로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0026] 일 측에 따르면, 상기 알레르기 질환은 천식, 알레르기성 비염, 아토피 피부염, 두드러기, 약물 알레르기, 아나필락시스 및 알레르기성 결막염으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0027] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 하기로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자 또는 그 발현물에 특이적인 제제를 포함하는, 알레르기성 질환자의 대기 중 미세먼지 노출 여부 진단 키트가 제공된다: CYP27B1, SRGAP2B, DENND2D, P2RY2, HARBI1, LPAR2, MBD1, MTHFD1L, PRIM2, TRUB2, LOC101928718, CNNM4, INTS14, GBF1, DNM3, CSAD, COL7A1, LOC105376037, FAM214A, CDYL2, NSL1, MIR1976, TTC21A, DRC3, NOP9, AKR7A3, HPS1, TRG-TCC2-1, DNAJC6, PRUNE1 및 ANKAR.

발명의 효과

- [0029] 본 발명에서 제공하는 유전자 바이오마커는 알레르기성 질환자의 대기 중 미세먼지 노출여부와 유전자 발현량증가 사이에 상당한 인과관계가 확인되었으며, 이의 발현수준을 측정하여 알레르기성 질환자의 대기 중 미세먼지 노출여부를 확인할 수 있고, 알레르기성 질환의 진단, 치료, 치료경과 및 예후의 예측에 유용하게 이용될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0032] 도 1 내지 도 6은 각각 전체/실내/실외에서 미세먼지 노출량의 전체평균 및 일일누적평균에 대한 각 바이오마커의 CR값(correlation coefficient)을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0033] 본 발명자들은 알레르기성 질환을 가진 유병군에 있어서, 대기 중 PM2.5 미세먼지에 노출되었을 때 발현량이 증가하는 유전자를 확인하여, 이를 대기 중 미세먼지 노출여부 확인용 바이오마커 발명으로 완성하여 제공하고자 한다.
- [0034] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 다음으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자, 또는 해당 유전자의 발현물을 포함하는 알레르기 질환자의 대기 중 미세먼지(PM2.5 - 2.5 μ m 이하의 Particulate Matter) 노출 여부 확인 또는 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다: CYP27B1, SRGAP2B, DENND2D, P2RY2, HARBI1, LPAR2, MBD1, MTHFD1L, PRIM2, TRUB2, LOC101928718, CNNM4, INTS14, GBF1, DNM3, CSAD, COL7A1, LOC105376037, FAM214A, CDYL2, NSL1, MIR1976, TTC21A, DRC3, NOP9, AKR7A3, HPS1, TRG-TCC2-1, DNAJC6, PRUNE1 및 ANKAR.
- [0035] 상기 미세먼지는 2.5 μ m 이하의 크기를 갖는 PM2.5 미세먼지를 의미하며, 본 명세서 전반에 걸쳐 같은 의미로 사용된다.

- [0036] 본 발명의 일 구체예에서 "진단"(diagnosis)이란, 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하거나 현재 개체의 유전자 발현량에 영향을 미치는 과거의 특정 물질 노출 여부를 판단하는 것을 의미하여, 본 발명의 목적상 진단은 알레르기 질환자에 있어서 대기 중 미세먼지 노출여부를 판단하는 것이다. 본 발명에 있어서, 알레르기 질환 진단은 검사 대상으로부터 채취한 혈액 시료에 포함된 상기 바이오마커의 발현량을 확인하여 이루어질 수 있다.
- [0037] 상기 해당 유전자의 발현물은 바람직하게는 해당 유전자의 전사 산물인 단백질을 의미한다.
- [0038] 일 측에 따르면, 상기 알레르기 질환은 천식, 알레르기성 비염, 아토피 피부염, 두드러기, 약물 알레르기, 아나필락시스 및 알레르기성 결막염으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나 이에 한정되지 않는다.
- [0039] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, CYP27B1, SRGAP2B, DENND2D, P2RY2, HARBI1, LPAR2, MBD1, MTHFD1L, PRIM2, TRUB2, LOC101928718, CNM4, INTS14, GBF1, DNM3, CSAD, COL7A1, LOC105376037, FAM214A, CDYL2, NSL1, MIR1976, TTC21A, DRC3, NOP9, AKR7A3, HPS1, TRG-TCC2-1, DNAJC6, PRUNE1 및 ANKAR로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자 또는 이의 발현산물인 단백질의 발현수준을 측정할 수 있는 체제를 포함하는, 알레르기 질환자의 대기 중 미세먼지노출여부 확인용 조성물이 제공된다.
- [0040] 일 측에 따르면, 상기 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있는 체제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편; 또는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 압타머일 수 있다.
- [0041] 본 명세서에서의 용어 "항체 (antibody)"는 당해 기술분야에 공지된 용어로서 항원성 부위에 대하여 지시되는 특이적인 면역 글로불린을 의미한다. 예를 들어 상기 항체는 CLC, TNFAIP8, EVI5L, ISG15, PIGS, SLC4A1, MYH1, CLTA, CCAR2, GRK6, ATP5F1D, ASRGL1, BST1, CYBA, ASAP1, MAP2K4, RNASE2, NIPSNAP2, MMP1, EWSR1, CCL28, LEG1, ACBP, APOM, TFF3, FOLR1, WFDC2, SERPINA1, SLURP1, DEFB4A, SLPI, IGFBP7, IGLV1-51, SERPINI1, IGLV3-9, SERPINA3, SPATS2L, APOC1, IGKV2-29 및 KALRN으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 단편에 대해 특이적으로 결합할 수 있다. 상기 단편은 상기 단백질에 대한 항체에 의해 인식될 수 있는 하나 이상의 에피토프 (epitope)를 가지고 있는 단백질 단편을 의미하며, 예를 들어 면역원성 단편일 수 있다. 상기 항체의 형태는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 또는 재조합 항체를 포함하며, 모든 면역글로불린 항체가 포함된다. 또한, 상기 항체는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함된다.
- [0042] 이러한 항체들을 이용하여 당해 기술분야에 공지된 효소 면역측정법 (enzyme linked immunosorbent assay; ELISA), 방사선면역 측정법 (radioimmunoassay; RIA), 샌드위치 측정법 (sandwich assay), 폴리아크릴 겔상의 웨스턴 블롯팅 또는 면역 블롯팅 등의 방법에 의해 생물학적 샘플 중에 상기 단백질이 발현되었는지를 확인할 수 있다.
- [0043] 본 명세서에서의 용어 "항체 단편"은 온전한 항체, 펩티드 또는 단백질의 구조를 갖지는 않지만, 항원성 부위에 대해 지시되는 특이적인 항원결합부위 또는 결합 도메인을 갖는 폴리펩티드를 의미한다. 상기 단편은 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄를 갖는 완전한 형태의 항체가 아닌 항체 분자의 기능적 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 또는 Fv일 수 있다. 상기 결합 단편은 최소한 7개 이상의 아미노산, 예를 들면 9 개 이상의 아미노산, 12개 이상의 아미노산을 포함할 수 있다.
- [0044] 상기 단백질을 검출하기 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블랏, 엘라이자(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역확산법, 로켓트(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역분석(Immunoassay), 면역화학염색분석(Immunohistochemistry Assay), 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체고정 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포분석(Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS), 단백질칩(protein chip) 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0045] 일 측에 따르면, 상기 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 체제는 상기 유전자의 핵산 분자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브일 수 있다. 분석방법으로는 예를 들어, 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Realtime RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 및 DNA 칩으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 이용한 방식이 사용될 수 있다.
- [0046] 본 명세서에서의 용어 "프라이머(primer)"는 자유 3'-말단 수산화기 (free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산

서열로 특정 염기 서열에 대해 상보적인 주형 (template)과 염기쌍을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로서 작용하는 핵산 서열을 말한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약 (즉, DNA 폴리머라제 또는 역전사효소) 및 상이한 4가지의 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. 예를 들어 CLC, TNFAIP8, EVI5L, ISG15, PIGS, SLC4A1, MYH1, CLTA, CCAR2, GRK6, ATP5F1D, ASRGL1, BST1, CYBA, ASAP1, MAP2K4, RNASE2, NIPSNAP2, MMP1, EWSR1, CCL28, LEG1, ACBP, APOM, TFF3, FOLR1, WFDC2, SERPINA1, SLURP1, DEFB4A, SLPI, IGFBP7, IGLV1-51, SERPINI1, IGLV3-9, SERPINA3, SPATS2L, APOC1, IGKV2-29 및 KALRN로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 단백질을 암호화하는 유전자 또는 mRNA에 대한 특이적인 프라이머로서 7개 내지 50개의 뉴클레오타이드 서열을 가진 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 실시하여 원하는 생성물의 생성량의 측정을 통해 개체의 미세먼지 노출여부를 확인할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 기술에 따라 적절히 선택될 수 있다. 상기 프라이머는 10 내지 100, 15 내지 100, 10 내지 80, 10 내지 50, 10 내지 30, 10 내지 20, 15 내지 80, 15 내지 50, 15 내지 30, 15 내지 20, 20 내지 100, 20 내지 80, 20 내지 50, 또는 20 내지 30 nt를 갖는 것일 수 있다.

[0047] 본 명세서에서의 용어 "프로브(probe)"는 표적 핵산 예를 들면, mRNA와 특이적으로 결합을 이룰 수 있는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 특정 mRNA의 존재 유무, 함량 및 발현량을 확인할 수 있도록 라벨링 (labeling)되어 있을 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단일가닥 DNA (single strand DNA) 프로브, 이중가닥 DNA(double strand DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 예를 들어 CLC, TNFAIP8, EVI5L, ISG15, PIGS, SLC4A1, MYH1, CLTA, CCAR2, GRK6, ATP5F1D, ASRGL1, BST1, CYBA, ASAP1, MAP2K4, RNASE2, NIPSNAP2, MMP1, EWSR1, CCL28, LEG1, ACBP, APOM, TFF3, FOLR1, WFDC2, SERPINA1, SLURP1, DEFB4A, SLPI, IGFBP7, IGLV1-51, SERPINI1, IGLV3-9, SERPINA3, SPATS2L, APOC1, IGKV2-29 및 KALRN으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 단백질을 암호화하는 유전자 또는 mRNA와 상보적인 핵산 서열을 갖는 프로브를 이용하여 혼성화를 실시하여, 혼성화 정도를 통해 mRNA의 발현량을 측정함으로써 개체의 미세먼지 노출 여부를 진단할 수 있다. 적절한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당해 기술분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택할 수 있다. 상기 프로브는 10 내지 100, 15 내지 100, 10 내지 80, 10 내지 50, 10 내지 30, 10 내지 20, 15 내지 80, 15 내지 50, 15 내지 30, 15 내지 20, 20 내지 100, 20 내지 80, 20 내지 50, 또는 20 내지 30 nt를 갖는 것일 수 있다.

[0048] 상기 프라이머 또는 프로브는 포스포아미다이트 (phosphoramidite) 고체 지지체 합성법이나 기타 널리 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성될 수 있다. 또한 이러한 핵산 서열은 당해 기술분야에 공지된 다양한 방법을 통해 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 예는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환, 또는 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체 (예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형을 포함할 수 있다. 또한 프라이머 또는 프로브는 검출 가능한 신호를 직접적으로 또는 간접적으로 제공할 수 있는 표지를 이용하여 변형될 수 있다. 상기 표지의 예는 방사성 동위원소, 형광성 분자, 또는 바이오틴을 포함할 수 있다.

[0049] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 알레르기성 질환자인 개체의 대기 중 미세먼지 노출 여부 확인에 필요한 정보를 제공하기 위한 방법으로서:

[0050] a) 알레르기성 질환자인 개체로부터 생물학적 시료를 채취하는 단계;

[0051] b) 상기 생물학적 시료로부터 CYP27B1, SRGAP2B, DENND2D, P2RY2, HARBI1, LPAR2, MBD1, MTHFD1L, PRIM2, TRUB2, LOC101928718, CNM4, INTS14, GBF1, DNM3, CSAD, COL7A1, LOC105376037, FAM214A, CDYL2, NSL1, MIR1976, TTC21A, DRC3, NOP9, AKR7A3, HPS1, TRG-TCC2-1, DNAJC6, PRUNE1 및 ANKAR로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[0052] c) 상기 유전자 발현 수준과 미세먼지에 노출되지 않은 알레르기성 질환자의 유전자 발현 수준을 비교하는 단계;

[0053] 를 포함하는, 정보제공방법이 제공된다.

[0054] 본 발명에서 용어, "개체"는 상기 알레르기성 질환의 예방, 치료, 및/또는 진단이 필요한 가축, 인간 등의 포유류라면 제한되지 아니하나, 바람직하게는 인간일 수 있다.

[0055] 상기 발현 수준을 측정하는 방법으로 단백질 수준에서는 웨스턴블롯, 단백질 칩, 효소면역분석법(ELISA), 방사

선면역분석, 면역침강법, 면역확산법, 면역 전기영동, 조직 면역염색, 보체 고정 분석법, 유세포 분석(FACS), 질량분석법 또는 조직 마이크로어레이 등을 수행할 수 있다. 핵산 수준에서는 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소연쇄반응, 경쟁적 중합효소연쇄반응, 실시간중합효소연쇄반응, 뉴클레이즈 보호 분석법, 핵산 마이크로어레이, 또는 노던블롯 등을 수행할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0056] 일 측에 따르면, 상기 생물학적 시료는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액, 소변 및 비인두 도말로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0057] 일 측에 따르면, 상기 알레르기 질환은 천식, 알레르기성 비염, 아토피 피부염, 두드러기, 약물 알레르기, 아나필락시스 및 알레르기성 결막염으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0058] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 하기로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자 또는 그 발현물에 특이적인 제제를 포함하는, 알레르기성 질환자의 대기 중 미세먼지 노출 여부 진단 키트가 제공된다: CYP27B1, SRGAP2B, DENND2D, P2RY2, HARBI1, LPAR2, MBD1, MTHFD1L, PRIM2, TRUB2, LOC101928718, CNM4, INTS14, GBF1, DNM3, CSAD, COL7A1, LOC105376037, FAM214A, CDYL2, NSL1, MIR1976, TTC21A, DRC3, NOP9, AKR7A3, HPS1, TRG-TCC2-1, DNAJC6, PRUNE1 및 ANKAR.

[0059] 본 발명에서, 상기 "유전자 또는 그 발현물에 특이적인 제제"는 단백질 또는 유전자의 발현 수준을 확인함으로써 본 발명의 바이오마커 검출에 사용될 수 있는 분자를 의미하며 구체적인 예시는 상술한 바와 같다.

[0060] 상기 키트는 예를 들어, 상기 단백질을 펩티드화하기 위한 키트일 수 있다. 펩티드화는 단백질의 질량분석 전처리를 위하여 알려진 방법이면 제한되지 않는다. 상기 키트는 단백질의 펩티드화에 요구되는 알려진 물질을 더 포함할 수 있다. 예를 들면, 키트는 디티오프레itol(Dithiothreitol: DTT), 요오드아세트아마이드(Iodoacetamide: IAA), 트리스(2-클로로에틸)인산(Tris(2-carboxyethyl)phosphine: TCEP), 메틸메타노티오설포네이트(Methyl methanethiosulfonate: MMTS), 단백질 가수분해 효소(protease), 그의 활성화에 필요한 버퍼, 보조인자, 및/또는 기질을 더 포함할 수 있다. 상기 단백질 가수분해 효소는 트립신(trypsin), 엔도 프로테이나제 Lys-C(Endoproteinase Lys-C), 엔도 프로테이나제 Glu-C(Endoproteinase Glu-C) 및 이들의 조합일 수 있다.

[0061] 또한 상기 키트는 상기 유전자를 증폭하기 위한 키트일 수 있다. 증폭방법은 핵산증폭을 위하여 알려진 방법이면 제한되지 않으며, 열순환(thermal cycling)을 필요로 하는 것 또는 등온(isothermal)에서 수행되는 것일 수 있다. 상기 증폭방법은 폴리머라제 연쇄반응(polymerase chainreaction: PCR), 핵산서열-기초증폭(nucleic acid sequence-based amplification: NASBA), 리가제연쇄반응(ligase chain reaction: LCR), 가닥치환증폭(strand displacement amplification: SDA), 롤링 서클 증폭(rolling circle amplification: RCA) 등을 포함할 수 있다. 증폭 방법은 또한, 역전사(reverse transcription: RT) 또는 역전사-PCR을 포함할 수 있다. 또한, 상기 키트는 표적핵산의 증폭에 요구되는 알려진 물질을 더 포함할 수 있다. 예를 들면, 키트는 핵산폴리머라제, 그의 활성화에 필요한 버퍼, 보조인자, 및/또는 기질을 더 포함할 수 있다. 상기 핵산폴리머라제는 DNA 폴리머라제, RNA 폴리머라제, 역전사효소(reverse transcriptase) 및 이들의 조합일 수 있다.

[0063] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 그러나, 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있어서 특허출원의 권리 범위가 이러한 실시예들에 의해 제한되거나 한정되는 것은 아니다. 실시예들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물이 권리 범위에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.

[0064] 실시예에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안 된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0066] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0068] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인

인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0069] 실시예 1: 마커 도출

[0070] 알레르기성 질환 4개(천식, 알레르기성 비염, 아토피 피부염 및 알레르기성 결막염)중 어느 하나 이상을 갖는 환자군을 선별하였다. 상기 환자군으로부터 혈액을 채취하였고, 이를 벌크-RNA 시퀀싱 하였다. 환자별 미세먼지 노출량은 개인 휴대용 미세먼지측정기를 통해 수집되었다. 구체적으로, 본 발명에서 사용된 미세먼지노출량은 개인휴대용미세먼지측정기 ‘PMM-130’ 으로 측정된 수치에 보정방법을 적용하여 도출하였다. PMM-130은 광산란 방식을 적용하고 있어, 측정환경을 고려한 측정치 보정을 거쳐야만 정확한 미세먼지노출량 도출이 가능하다. 본 발명에서 사용된 미세먼지노출량은 박신영 외(2023), "결정트리기법을 활용한 광산란기반 미세먼지 측정기의 현장평가 중심 농도 보정 방법 제안"에서 제안한 보정방법을 적용하여 도출되었다. 보정방법 개발은 기준장비(측정표준으로 인정될 수 있는 수준의 장비)로 측정된 수치와 동일한 공간에서 동일한 시점에 PMM-130로 측정된 수치의 차이를 설명하는 통계적 모형을 도출하는 과정으로 이루어진다. 본 발명에서 사용된 기준장비는 GRIMM이다. GRIMM 은 0.25 μm 에서 35.15 μm 크기의 입자를 광학적 크기에 따라 31개의 채널로 구분하고 다이오드 레이저(30 mW, 655 nm)를 사용하여 개별 입자를 계수할 수 있는 능력을 가진 고급 입자 광학 카운터이다. 보정모델 개발에서 사용된 자료는 GRIMM 장비와 PMM-130을 실내·외 동일한 공간에 동일한 간격으로 두고, 두 장비가 약 72시간 동안 1분 간격으로 측정된 미세먼지 농도이다. 보정모델은 실내/실외와 미세먼지 농도구간별로 서로 다른 회귀모형으로 개발되었다. 여기서 미세먼지 농도구간은 결정트리 기법을 적용하여 결정하였다.

[0071] 벌크-RNA 시퀀싱 방법으로 확인되는 유전자 발현 수준과 미세먼지 노출 수준과의 상관관계를 표시하였다. 인터프리터 프로그래밍 언어인 R의 라이브러리 중 cor.test 함수를 사용하여 분석하였다. 파라미터를 Spearman으로 두고, $|CR| > 0.60$ 이며 p-value < 0.001인 유전자를 확인하였다. 이 때, 미세먼지에 대한 노출량이 늘어날수록 발현량이 증가하는 유전자를 선별하여 아래 표 1에 나타내었다. 이들 마커는 측정장소를 실내와 실외로 구분하고, 전체 노출수준, 실내 노출수준, 실외 노출수준과 유전자 발현량과의 상관분석을 통해 도출되었다.

[0072] 실내/외 구분은 조사대상자가 응답한 30단위 시간활동일지의 기록을 기준으로 하였다. 시간활동일지에는 미세먼지가 측정된 장소를 ‘실외, 주거실내, 사무실, 학교 혹은 학원, 교통수단, 기타 실내’ 중 하나로 기록되어 있었다. 미세먼지노출량은 5분단위로 하루 288번 측정되어 기록하였다. Tot_mean은 연구기간 전체의 1회 측정된 평균값이다. Tot_cumu은 미세먼지노출량을 측정일자별로 합산한 값의 평균이다.

표 1

[0074]

PM_tot_mean	PM_tot_cumu	PM_ind_mean	PM_ind_cumu	PM_out_mean	PM_out_cumu
CYP27B1	MBD1	SRGAP2B	PRIM2	TTC21A	DNAJC6
SRGAP2B	MTHFD1L	CDYL2	NSL1	DRC3	PRUNE1
DENND2D	PRIM2	P2RY2	TRUB2	NOP9	ANKAR
P2RY2	TRUB2	HARBI1	MIR1976	AKR7A3	
HARBI1	LOC101928718	LPAR2	LOC101928718	HPS1	
LPAR2	CNNM4		CNNM4	TRG-TCC2-1	
	INTS14		GBF1		
	GBF1		DNM3		
	DNM3		CSAD		
	CSAD		COL7A1		
	COL7A1		LOC105376037		
	LOC105376037		FAM214A		
	FAM214A				

[0075] 상기 표 1에서 미세먼지노출에 대해 PM_ind_mean은 실내평균을, PM_ind_cumu은 실내일일누적량의 평균을, PM_out_mean은 실외평균을, PM_out_cumu은 실외일일누적량의 평균의 경우 각각의 마커를 나타낸다. 상기 각 마커들의 CR값을 비롯한 분석결과를 도 1 내지 도 6에 각각 나타내었다.

[0077] 이상으로 도출한 대기 중 미세먼지 노출과 알레르기성 질환자에서의 유전자 발현량 증가 사이의 상관관계가 높게 나타난 마커는 다음과 같으며 Genbank에서 참조가능한 Gene ID를 함께 표시하였다: CYP27B1(cytochrome P450 family 27 subfamily B member 1, Gene ID: 1594), SRGAP2B(SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 2B, Gene ID: 647135), DENND2D(DENN domain containing 2D, Gene ID: 79961), P2RY2(purinergic receptor P2Y2, Gene ID: 5029), HARBI1(harbinger transposase derived 1, Gene ID: 283254), LPAR2(lysophosphatidic

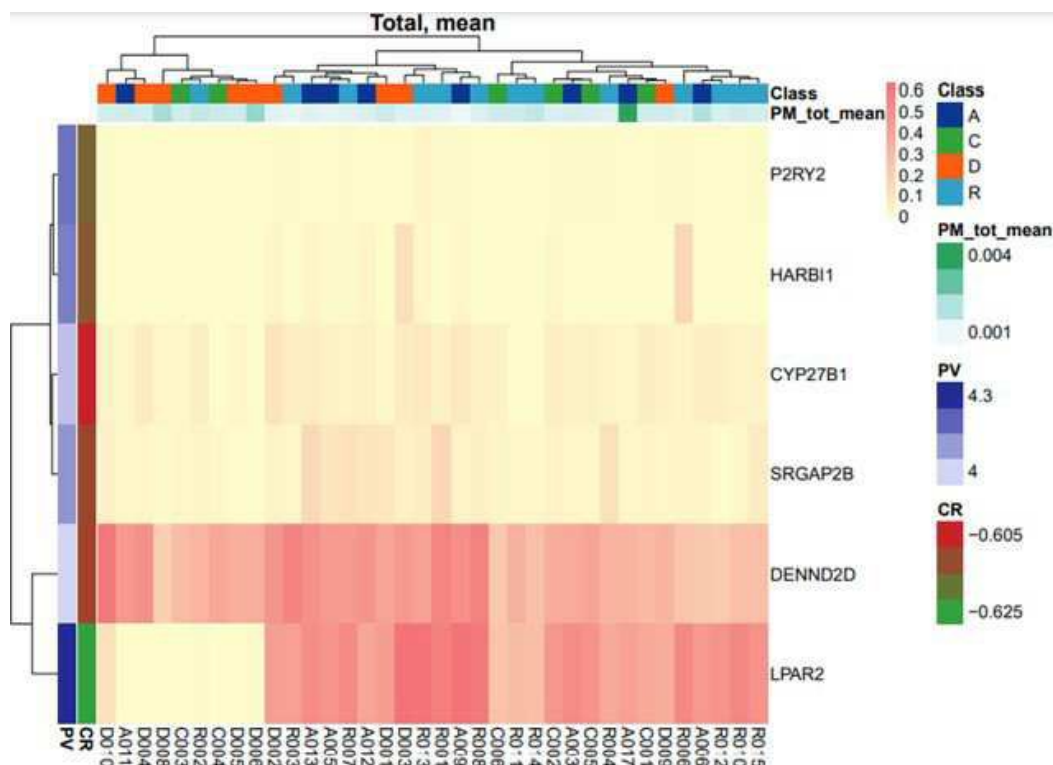
acid receptor 2, Gene ID: 9170), MBD1(methyl-CpG binding domain protein 1, Gene ID: 4152) MTHFD1L(methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 1 like, Gene ID: 25902), PRIM2(DNA primase subunit 2, Gene ID: 5558), TRUB2(TruB pseudouridine synthase family member 2, Gene ID: 26995), LOC101928718(Gene ID: 101928718), CNNM4(cyclin and CBS domain divalent metal cation transport mediator 4, Gene ID: 26504), INTS14(integrator complex subunit 14, Gene ID: 81556), GBF1(golgi brefeldin A resistant guanine nucleotide exchange factor 1, Gene ID: 8729), DNM3(dynamin 3, Gene ID: 26052), CSAD(cysteine sulfinic acid decarboxylase, Gene ID: 51380), COL7A1(collagen type VII alpha 1 chain, Gene ID: 1294), LOC105376037(Gene ID: 105376037), FAM214A(atos homolog A, Gene ID: 56204), CDYL2(chromodomain Y like 2, Gene ID: 124359), NSL1(NSL1 component of MIS12 kinetochore complex, Gene ID: 25936), MIR1976(microRNA 1976, Gene ID: 100302190), TTC21A(tetratricopeptide repeat domain 21A, Gene ID: 199223), DRC3(dynein regulatory complex subunit 3, Gene ID: 83450), NOP9(NOP9 nucleolar protein, Gene ID: 161424), AKR7A3(aldo-keto reductase family 7 member A3, Gene ID: 22977), HPS1(HPS1 biogenesis of lysosomal organelles complex 3 subunit 1, Gene ID: 3257), TRG-TCC2-1(tRNA-Gly (anticodon TCC) 2-1, Gene ID: 100189064), DNAJC6(DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C6, Gene ID: 9829), PRUNE1(prune exopolyphosphatase 1, Gene ID: 58497) 및 ANKAR(ankyrin and armadillo repeat containing, Gene ID: 150709).

[0079] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및 변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 시스템, 구조, 장치, 회로 등의 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

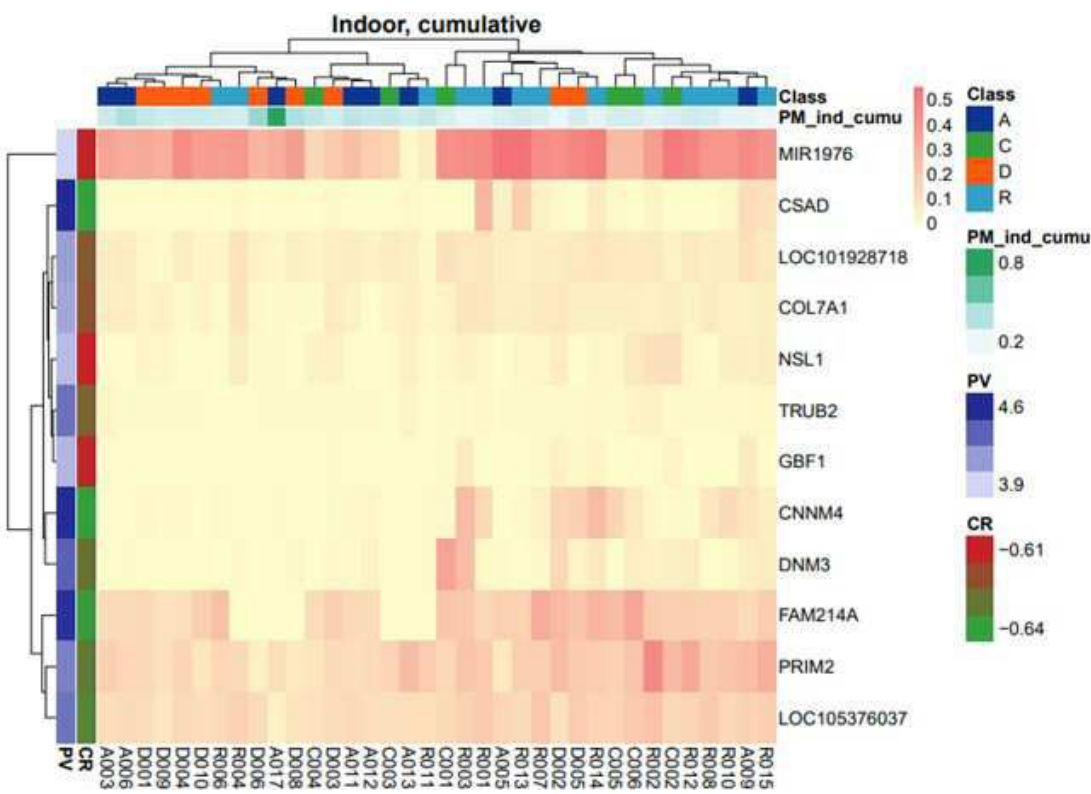
[0080] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

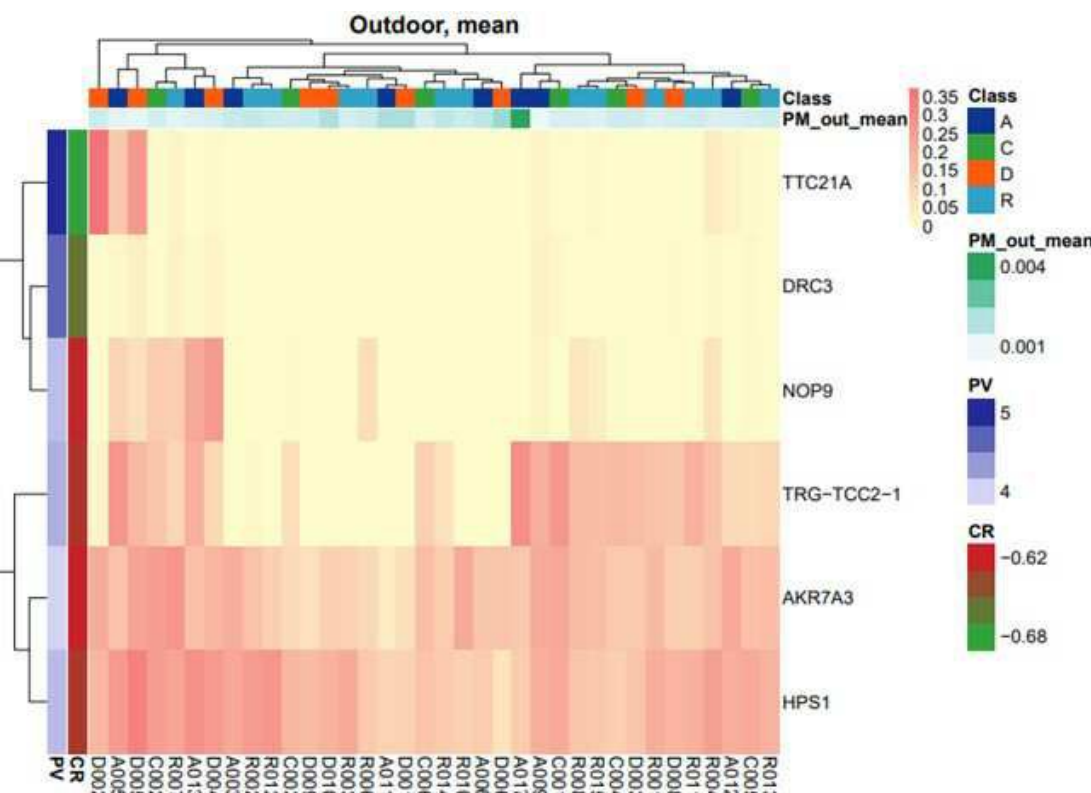
도면1



도면4



도면5



도면6

