



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0149091
(43) 공개일자 2024년10월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01) A01K 67/027 (2024.01)
G01N 33/50 (2017.01) G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2022.01)
A01K 67/027 (2024.01)
(21) 출원번호 10-2023-0044583
(22) 출원일자 2023년04월05일
심사청구일자 2023년04월05일
기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
이홍
경기도 안산시 단원구 당곡로 27, 1516호
이주한
서울특별시 양천구 목동동로 53, 701호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

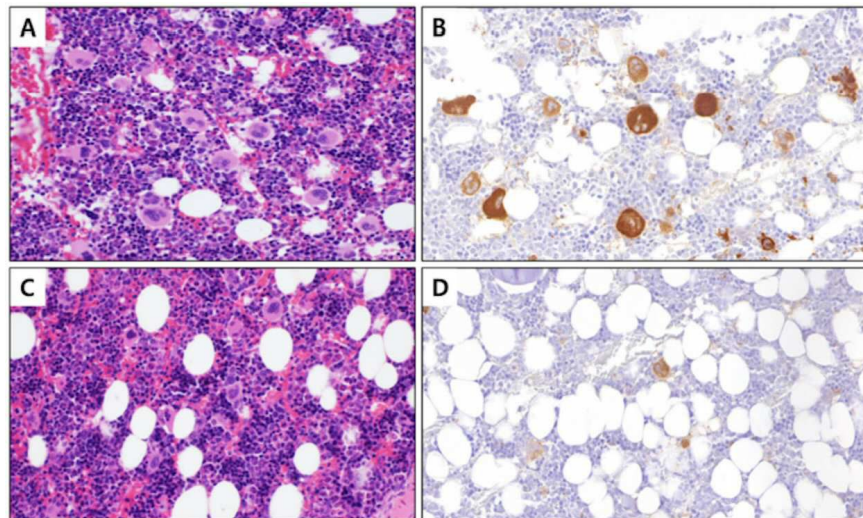
전체 청구항 수 : 총 28 항

(54) 발명의 명칭 혈액 독성 진단용 바이오마커

(57) 요약

본 발명은 가슴기 살균제 노출에 의한 혈액 독성에 특이적인 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명에 따르면, 가슴기 살균제의 호흡기 노출에 의한 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상에 특이적으로 혈액 및 골수에서 발현이 변화하는 바이오마커를 발굴하였으며, 이들을 이용하면 말초 혈액뿐만 아니라 조혈 기관 수준에서 가슴기 살균제에 의한 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상을 진단할 수 있기 때문에, 가슴기 살균제 노출에 의한 더 근본적인 혈액 독성 또는 이상에 대한 분석이 가능한 효과가 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

G01N 33/5088 (2013.01)
G01N 33/6893 (2013.01)
A01K 2207/20 (2013.01)
A01K 2267/0393 (2013.01)
C12Q 2600/142 (2013.01)
G01N 2800/22 (2013.01)

김재영

경기도 시흥시 배곧4로 106-25, 1115동 1403호

(72) 발명자

성화정

경기도 고양시 일산동구 호수로 336, 101동 901호

정상훈

서울특별시 강북구 삼양로 583, 301호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711189052
과제번호	2022R1F1A1073769
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구
연구과제명	가습기 살균제 주요성분 물질 PHMG-p의 혈액질환 발병 가능성에 대한 장기간 추적

연구

기 여 율	1/1
과제수행기관명	한국연구재단
연구기간	2022.06.01 ~ 2025.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

ATF6(Activating Transcription Factor 6), HFE(Hemochromatosis), HPGDS(Hematopoietic Prostaglandin D Synthase), TXK(TXK tyrosine kinase) 또는 TYK2(Tyrosine kinase 2)의 유전자 또는 상기 유전자로부터 발현된 단백질을 포함하는 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 진단용 바이오마커.

청구항 2

제 1항에 있어서, 가슴기 살균제 노출에 의한 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상인, 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 진단용 바이오마커.

청구항 3

제 2항에 있어서, 가슴기 살균제 노출은 호흡기를 통한 가슴기 살균제 노출인, 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 진단용 바이오마커.

청구항 4

제 2항에 있어서, 가슴기 살균제는 PGH(oligo-[2-(2-ethoxy)-ethoxyethyl]-guanidinium-chlorid), PHMG(Polyhexamethylene guanidine), CMIT/MIT(chloromethylisothiazolinone/methylisothiazolonone), BKC(Benzalkonium chloride), NaDCC(sodium dichloroisocyanurate) 또는 PHMG-p(Polyhexamethylene guanidine phosphate)인, 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 진단용 바이오마커.

청구항 5

제 1항의 바이오마커의 발현 수준을 mRNA 또는 단백질 수준에서 측정하는 제제를 포함하는, 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 진단용 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서, 가슴기 살균제 노출에 의한 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상인, 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 진단용 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서, 가슴기 살균제 노출은 호흡기를 통한 가슴기 살균제 노출인, 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 진단용 조성물.

청구항 8

제 6항에 있어서, 가슴기 살균제는 PGH, PHMG, CMIT/MIT, BKC, NaDCC 또는 PHMG-p인, 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 진단용 바이오마커.

청구항 9

제 5항에 있어서, 혈액 독성은 혈액에서 혈소판(platelets, PLT)이 감소하는 것인, 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 진단용 조성물.

청구항 10

제 5항에 있어서, 조혈 기능 이상은 골수에서 거핵구(megakaryocyte) 수, 또는 거핵구 발달 또는 성숙 정도가 감소하는 것인, 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 진단용 조성물.

청구항 11

제 5항에 있어서, 바이오마커의 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 프라미어 쌍 및 프로브인, 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 진단용 조성물.

청구항 12

제 11항에 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, 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 진단용 조성물.

청구항 13

제 5항에 있어서, 바이오마커의 발현 수준을 단백질 수준에서 측정하는 제제는, 상기 마커의 단백질 전장 또는 그 단편을 특이적으로 인식하는 항체, 항체 단편, 펩타이드, 펩타이드 핵산(PNA), 리보자임, 앵타머(aptamer), 아비머(avidity multimer) 또는 펩티도모방체(peptidomimetics)인, 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 진단용 조성물.

청구항 14

제 13항에 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, 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 진단용 조성물.

청구항 15

제 5항의 조성물을 포함하는, 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 진단용 키트.

청구항 16

- 1) 검사 대상체로부터 분리한 생물학적 시료에서 제 1항의 바이오마커의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준을 확인하는 단계; 및
- 2) 정상 대조군 시료의 해당 마커의 상응하는 결과와 비교하는 단계를 포함하는, 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 17

제 16항에 있어서, 정상 대조군 시료에 비해 ATF6 또는 HPGDS의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준이 감소하거나, HFE, TXK 및 TYK2로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준이 과발현된 경우, 검사 대상체에서 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상을 가지는 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함하는, 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 18

제 16항에 있어서, 가슴기 살균제 노출에 의한 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상인, 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 19

가슴기 살균제를 인간을 제외한 동물에 기도 점적(intratracheal instillation)하는 단계를 포함하는 가슴기 살균제 호흡기 노출 동물모델을 제조하는 방법.

청구항 20

제 19항에 있어서, 가슴기 살균제를 0.1 내지 10 mg/kg의 농도로 2주 간격으로 5회 기도 점적하는, 가슴기 살균제 호흡기 노출 동물모델을 제조하는 방법.

청구항 21

제 19항에 있어서, 가슴기 살균제는 PGH, PHMG, CMIT/MIT, BKC, NaDCC 또는 PHMG-p(Polyhexamethylene guanidine phosphate)인, 가슴기 살균제 호흡기 노출 동물모델을 제조하는 방법.

청구항 22

제 19항의 방법으로 제조된 가슴기 살균제 호흡기 노출 동물모델.

청구항 23

제 22항에 있어서, 부피 30 m³의 방에서 0.2의 환기율로 하루에 6 h 동안 5개월 동안 가슴기 살균제를 사용하는 것을 시뮬레이션한, 가슴기 살균제 호흡기 노출 동물모델.

청구항 24

제 22항에 있어서, 혈액 내 혈소판 수가 감소한, 가슴기 살균제 호흡기 노출 동물모델.

청구항 25

제 22항에 있어서, 골수에서 거핵구 수, 또는 거핵구 발달 또는 성숙 정도가 감소한, 가슴기 살균제 호흡기 노출 동물모델.

청구항 26

제 22항에 있어서, ATF6 또는 HPGDS의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준이 감소한, 가슴기 살균제 호흡기 노출 동물모델.

청구항 27

제 22항에 있어서, HFE, TXK 및 TYK2로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준이 과발현된, 가슴기 살균제 호흡기 노출 동물모델.

청구항 28

1) 피검 물질을 실험 동물에 처리하는 단계; 및

2) 피검 물질을 처리하지 않은 대조군 실험 동물에 비해 골수에서 ATF6 또는 HPGDS의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준이 감소하거나, HFE, TXK 및 TYK2로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준이 과발현된 피검 물질을 선별하는 단계를 포함하는, 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 유발 화합물의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 가슴기 살균제 노출에 의한 혈액 독성에 특이적인 바이오마커 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 종래에 가슴기 살균제로 사용되었던 물질들은 대체로 PGH(oligo-[2-(2-ethoxy)-ethoxyethyl]-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. 이 중 PGH(oligo-[2-(2-ethoxy)-ethoxyethyl]-guanidinium-chlorid), PHMG(polyhexamethylene guanidine) 및 PHMB(polyhexamethylene biguanide)는 구아니딘(guanidine) 계열의 살균제로서 항감염, 항균제로 다양하게 사

용되어 왔다.

- [0003] 2011년 서울시내 한 대학병원에서 원인미상의 폐질환으로 산모 4명이 사망한 후 정부에서 그 원인으로 가슴기살균제를 추정하는 역학조사를 발표하였다. 이 후 2013년 12월에 환경부는 가슴기살균제를 환경성 질환으로 지정하였다 (중앙일보 보도자료, <https://www.joongang.co.kr/article/25048547#home>). 그 중에서도 특히 PGH와 PHMG는 우리나라에서 가슴기 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 보고되었다 (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. 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 기능이 회복되는 경우도 있어 피해 평가가 어려운 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0004] 본 발명의 목적은 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 진단용 바이오마커를 제공하는 것이다.
- [0005] 또한, 본 발명의 목적은 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0006] 또한, 본 발명의 목적은 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 진단용 키트를 제공하는 것이다.
- [0007] 또한, 본 발명의 목적은 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0008] 또한, 본 발명의 목적은 가슴기 살균제 호흡기 노출 동물모델을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0009] 또한, 본 발명의 목적은 가슴기 살균제 호흡기 노출 동물모델을 제공하는 것이다.
- [0010] 아울러, 본 발명의 목적은 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 유발 물질의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 진단용 바이오마커를 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 상기 바이오마커 유전자의 발현 수준을 mRNA 또는 단백질 수준에서 측정하는 제제를 포함하는 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 진단용 조성물을 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 진단용 키트를 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 가슴기 살균제 호흡기 노출 동물모델을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 가슴기 살균제 호흡기 노출 동물모델을 제공한다.
- [0017] 아울러, 본 발명은 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 유발 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0018] 본 발명에 따르면, 가슴기 살균제의 호흡기 노출에 의한 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상에 특이적으로 혈액 및

골수에서 발현이 변화하는 바이오마커를 발굴하였으며, 이들을 이용하면 말초 혈액뿐만 아니라 조혈 기관 수준에서 가슴기 살균제에 의한 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상을 진단할 수 있기 때문에, 가슴기 살균제 노출에 의한 더 근본적인 혈액 독성 또는 이상에 대한 분석이 가능한 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 약물 주입 채널 및 2mm 이내의 CMOS(Complementary Metal Oxide Semiconductor) 카메라를 포함하는 소형 후두경으로 랫(rat)의 후두내강에 PHMG-p를 기도 점적하는 과정을 나타낸 도이다.

도 2는 거핵구를 염색한 골수(BM) 조직을 나타낸 도이다:

BM: 골수;

PHMG-p: poly-hexamethylene guanidine phosphate;

A: 헤마톡실린 및 에오신으로 염색한 대조군 BM;

B: 인테그린 $\beta 3$ 으로 거핵구 세포질을 면역염색한 대조군 BM;

C: 헤마톡실린 및 에오신으로 염색된 PHMG-p 호흡기 노출된 BM; 및

D: 인테그린 $\beta 3$ 으로 거핵구 세포질을 면역염색한 PHMG-p 호흡기 노출된 BM.

도 3은 IPA 프로그램을 이용하여 PHMG-p 호흡기 노출에 특이적으로 도출된 상위 신호전달 경로를 나타낸 도이다.

도 4는 PHMG-p 호흡기 노출 20주 후, 골수에서 분석된 후보 유전자와 관련된 분자들의 조혈(hematopoiesis) 관련 핵심 신호전달 경로를 도식화한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 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.

[0021] 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.

[0022] 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.

[0023] 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.

[0024] 본 발명에서 용어, "대상체" 또는 "환자"는 인간, 유인원, 원숭이, 소, 개, 기니아 피그, 랫, 토끼, 닭, 곤충 등을 포함하여 치료가 요구되는 임의의 단일 개체를 의미한다. 또한, 임의의 질병 임상 조건을 보이지 않는 임상 연구 시험에 참여한 임의의 대상 또는 역학 연구에 참여한 대상 또는 대조군으로 사용된 대상이 대상에 포함된다.

[0025] 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.

[0026] 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, 이

와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.

- [0028] 일 측면에서, 본 발명은 ATF6(Activating Transcription Factor 6), HFE(Hemochromatosis), HPGDS(Hematopoietic Prostaglandin D Synthase), TXK(TXK tyrosine kinase) 또는 TYK2(Tyrosine kinase 2)의 유전자 또는 상기 유전자로부터 발현된 단백질을 포함하는 혈액 독성(hematotoxicity) 또는 조혈 기능 이상 진단용 바이오마커에 관한 것이다.
- [0029] 일 구현예에서, 가슴기 살균제 노출에 의한 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상일 수 있으며, 가슴기 살균제 노출은 호흡기를 통한 가슴기 살균제 노출일 수 있다.
- [0030] 일 구현예에서, 가슴기 살균제는 PGH(oligo-[2-(2-ethoxy)-ethoxyethyl]-guanidinium-chlorid), PHMG(Polyhexamethylene guanidine), CMIT/MIT(chloromethylisothiazolinone/methylisothiazolonone), BKC(Benzalkonium chloride) 또는 NaDCC(sodium dichloroisocyanurate)일 수 있으며, PHMG-p(Polyhexamethylene guanidine phosphate)인 것이 더욱 바람직하다.
- [0031] 일 구현예에서, 본 발명의 바이오마커들은 호흡기를 통해 가슴기 살균제에 노출되면 특이적으로 발현이 증가 또는 감소할 수 있다.
- [0032] 일 구현예에서, 상기 바이오마커는 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 관련 질환 진단용일 수 있다.
- [0033] 일 구현예에서, 상기 바이오마커는 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 검출용일 수 있다.
- [0034] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 바이오마커의 발현 수준을 mRNA 또는 단백질 수준에서 측정하는 제제를 포함하는, 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0035] 일 구현예에서, 가슴기 살균제 노출에 의한 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상일 수 있으며, 가슴기 살균제 노출은 호흡기를 통한 가슴기 살균제 노출일 수 있다.
- [0036] 일 구현예에서, 가슴기 살균제는 PGH, PHMG, CMIT/MIT, BKC, NaDCC 또는 PHMG-p일 수 있으며, PHMG-p인 것이 더욱 바람직하다.
- [0037] 일 구현예에서, 혈액 독성은 혈액에서 혈소판(platelets, PLT)이 감소하는 것일 수 있으며, 조혈 기능 이상은 골수에서 거핵구(megakaryocyte) 발달 또는 성숙 정도가 감소하는 것 또는 거핵구 수가 감소하는 것일 수 있다.
- [0038] 일 구현예에서, 바이오마커의 발현 수준을 mRNA 수준에서 측정하는 제제는, 상기 마커의 핵산서열, 상기 핵산서열에 상보적인 핵산서열, 상기 핵산서열 및 상보적인 서열의 단편을 특이적으로 인식하는 프라이머 쌍, 프로브, 또는 프라이머 쌍 및 프로브를 포함할 수 있으며, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 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.
- [0039] 일 구현예에서, 바이오마커의 발현 수준을 단백질 수준에서 측정하는 제제는, 상기 마커의 단백질 전장 또는 그 단편을 특이적으로 인식하는 항체, 항체 단편, 펩타이드, 펩타이드 핵산(PNA), 리보자임, 앵타머(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.
- [0040] 일 구현예에서, 상기 조성물은 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 관련 질환 진단용일 수 있다.
- [0041] 일 구현예에서, 상기 조성물은 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 검출용일 수 있다.
- [0042] 본 발명에서 용어 "혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 진단용 바이오마커"란 가슴기 살균제 노출에 의해 유도된 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 상태, 또는 이로 인해 질환의 발병 여부를 진단할 수 있는 물질로, 정상 세포 또는 조직에 비하여 가슴기 살균제 노출시 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상에 특이적으로 발현이 증가 또는 감소하는 양상을 보이는 폴리펩타이드 또는 핵산(예: mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질, 당(단당류, 이당류, 올리고

당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함한다. 본 발명의 목적상, 상기 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 진단용 바이오마커는 ATF6, HPGDS, HFE, TXK 및 TYK2 유전자로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상으로서, 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상이 발생했을 때 이에 특이적으로 mRNA 발현 또는 단백질 발현 정도가 증가 또는 감소하는 유전자이다. 이러한 마커들은 유전자뿐만 아니라 어느 하나의 마커와 상보적인 DNA 또는 mRNA를 포함하며, 이들 마커들이 둘 이상 포함된 복합 마커일 수 있다.

[0043] 본 발명에서 사용된 용어 "검출" 또는 "측정"은 검출 또는 측정된 대상의 농도를 정량하는 것을 의미한다.

[0044] 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 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성이 개시할 수 있다.

[0045] 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 바이오마커와 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.

[0046] 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, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체 (예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등) 로의 변형이 있다.

[0047] 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 타겟 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.

[0048] 본 발명에서 용어, "항체"란 당해 분야에서 공지된 용어로서 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 본 발명의 바이오마커 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 상기 항체의 제조방법은 널리 공지된 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 여기에는 상기 단백질에서만 들어질 수 있는 부분 펩티드도 포함된다. 본 발명의 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.

[0049] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 진단용 조성물을 포함하는, 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 진단용 키트에 관한 것이다.

[0050] 일 구현예에서, 가슴기 살균제 노출에 의한 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상일 수 있으며, 가슴기 살균제 노출은 호흡기를 통한 가슴기 살균제 노출일 수 있다.

[0051] 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. 예

를 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 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 분석 중 용이하게 동정할 수 있다.

- [0052] 일 구현예에서, 상기 키트는 DNA 중합효소 및 dNTP(dGTP, dCTP, dATP 및 dTTP), 형광물질 등의 표지 물질을 추가로 더 함유할 수 있다.
- [0053] 본 발명에서 용어 "혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 진단용 키트"는 본 발명의 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 진단용 조성물이 포함된 키트를 의미한다. 본 명세서에서 용어 "진단"은 한 객체가 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상을 가지는지, 또는 가슴기 살균제 노출에 의해 유도된 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상을 가지는지를 판정하는 것, 한 객체가 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 관련 질환을 현재 가지고 있는 지 여부를 판정하는 것, 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상을 가지는 한 객체의 예후(prognosis)(예컨대, 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 상태의 동정, 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 관련 질환의 단계 결정 또는 치료에 대한 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 질환의 반응성 결정)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)을 포함한다.
- [0054] 일 측면에서, 본 발명은 1) 검사 대상체로부터 분리한 생물학적 시료에서 본 발명의 바이오마커의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준을 확인하는 단계; 및 2) 정상 대조군 시료의 해당 마커의 상응하는 결과와 비교하는 단계를 포함하는, 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.
- [0055] 일 구현예에서, 상기 방법은 상기 단계 2) 이후에 정상 대조군 시료에 비해 ATF6 또는 HPGDS의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준이 감소하거나, HFE, TXK 및 TYK2로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준이 과발현된 경우, 검사 대상체에서 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상을 가지는 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0056] 일 구현예에서, 정상 대조군 시료에 비해 HFE의 유전자 발현 수준이 5 내지 15배 증가할 수 있으며, TXK의 유전자 발현 수준이 8 내지 18배 증가할 수 있고, TYK2의 유전자 발현 수준이 2 내지 10배 증가할 수 있으며, HPGDS의 유전자 발현 수준이 15 내지 25배 감소할 수 있다.
- [0057] 일 구현예에서, 상기 방법은 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 관련 질환의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법일 수 있다.
- [0058] 일 구현예에서, 가슴기 살균제 노출에 의한 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상일 수 있으며, 가슴기 살균제 노출은 호흡기를 통한 가슴기 살균제 노출일 수 있다.
- [0059] 일 구현예에서, 상기 방법은 가슴기 살균제 노출에 의한 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상을 검출하는 방법일 수 있다.
- [0060] 일 구현예에서, 상기 생물학적 시료는 혈액 또는 골수일 수 있다.
- [0061] 일 측면에서, 본 발명은 가슴기 살균제를 인간을 제외한 동물에 기도 점적(intratracheal instillation)하는 단계를 포함하는 가슴기 살균제 호흡기 노출 동물모델을 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [0062] 일 구현예에서, 가슴기 살균제를 0.1 내지 10 mg/kg의 농도로 2주 간격으로 5회 기도 점적할 수 있다.
- [0063] 일 구현예에서, 가슴기 살균제는 PGH, PHMG, CMIT/MIT, BKC, NaDCC 또는 PHMG-p일 수 있다.
- [0064] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 가슴기 살균제 호흡기 노출 동물모델을 제조하는 방법으로 제조된 가슴기 살균제 호흡기 노출 동물모델에 관한 것이다.
- [0065] 일 구현예에서, 상기 동물모델은 부피 30 m^3 의 방에서 0.2의 환기율로 하루에 6 h 동안 5개월 동안 가슴기 살균제를 사용하는 것을 시뮬레이션한 것일 수 있다.
- [0066] 일 구현예에서, 상기 동물모델은 정상 대조군 동물에 비해 혈액 내 혈소판 수가 감소할 수 있다.
- [0067] 일 구현예에서, 상기 동물모델은 정상 대조군 동물에 비해 골수에서 거핵구 발달 또는 성숙 정도, 또는 거핵구 수가 감소할 수 있다.
- [0068] 일 구현예에서, 상기 동물모델은 정상 대조군 동물에 비해 ATF6 또는 HPGDS의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준이 감소할 수 있다.

[0069] 일 구현예에서, 상기 동물모델은 정상 대조군 동물에 비해 HFE, TXK 및 TYK2로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준이 과발현될 수 있다.

[0070] 일 측면에서, 본 발명은 1) 피검 물질을 실험 동물에 처리하는 단계; 및 2) 피검 물질을 처리하지 않은 대조군 실험 동물에 비해 골수에서 ATF6 또는 HPGDS의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준이 감소하거나, HFE, TXK 및 TYK2로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 mRNA 또는 단백질의 발현 수준이 과발현된 피검 물질을 선별하는 단계를 포함하는, 혈액 독성 또는 조혈 기능 이상 유발 물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

[0072] 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.

[0074] 실시예 1. PHMG-p의 호흡기 노출에 의한 혈액 조성 변화 확인

[0075] 호흡기를 통해 PHMG-p에 노출된 경우 혈액에 독성을 나타내는지 확인하기 위해, 부피 30 m³의 방에서 0.2의 환기율로 하루에 6 h 동안 5개월 동안 가습기 살균제(humidifier disinfectants, HDs)를 사용하는 것을 시뮬레이션하는 실험 조건으로서, PHMG-p를 각 기도 점적(intratracheal instillation) 농도 1 mg/kg로 총 5 mg/kg로 랫에 기도 점적하고 PHMG-p에 대한 혈액 독성을 확인하였다. 구체적으로, 30 마리의 랫을 두 개의 그룹으로 무작위로 나누고, 70% N₂O 및 30% O₂에서 2% 이소플루란으로 마취하였다. 이 후, 식염수로 0.9 mg/kg 로 희석한 PHMG-p 용액(50 μL) 또는 대조군으로 식염수를 도 1의 후두경을 이용하여 2주 간격으로 5회(0, 2, 4, 6 및 8주) 기도 점적하였으며, 모든 랫은 첫 기도 점적 후 20주차에 희생시켰다. 랫을 희생시킨 후(기도 점적 20주 후), 체중, 비장 및 간의 중량을 측정하였으며, 각 랫의 대동맥에서 혈액 약 3mL을 K2 EDTA 5.4 mg blood collection tubes (BD, Franklin Lakes, NJ, USA)에 채취하고, ADVIA 2120 (Siemens, Munich, Germany)를 이용하여 백혈구(WBCs; band neutrophils, lymphocytes, monocytes, eosinophils, and basophils), 적혈구(RBCs) 및 혈소판(platelets, PLT)을 분석하였다. 또한, 혈액 내 단백질, 알부민, 크레아티닌(creatinine), CRP(C-reactive protein) 및 BUN(blood urea nitrogen)의 수준을 자동화 기계 Cobas 6000 (Roche, Basel, Switzerland)로 분석하였다.

표 1

[0076]

혈액 검사 항목	단위	대조군		실험군		z-스코어	p-값	참조문헌 정상치
		평균	표준편차	평균	표준편차			
백혈구(WBC)	10 ³ /μL	6.50	1.46	6.70	1.91	-0.581	0.561	6.11 ± 3.11
띠호중구(Band Neutrophil)	%	32.60	18.56	41.24	21.15	-1.141	0.254	32.48 ± 13.41
림프구(Lymphocyte)	%	59.57	17.50	52.05	20.98	-0.892	0.373	63.24 ± 13.06
단핵구(Monocyte)	%	3.50	0.73	2.40	0.88	-2.970	0.003*	3.49 ± 1.46
호산구(Eosinophil)	%	2.57	1.75	2.45	1.81	-0.208	0.835	1.42 ± 1.94
호염기구(Basophil)	%	1.23	0.89	2.03	1.56	-1.746	0.081	1.16 ± 1.32
적혈구(RBC)	10 ⁶ /μL	8.94	0.44	9.83	1.43	-1.556	0.120	8.79 ± 0.39
헤모글로빈(Hemoglobin)	g/dL	15.86	0.69	17.61	2.61	-1.973	0.049*	15.69 ± 0.65
적혈구용적률(Hematocrit)	%	57.50	5.02	64.82	9.56	-2.261	0.024*	46.19 ± 3.53
혈소판(Platelet)	10 ³ /μL	928.67	142.71	703.07	179.99	-3.132	0.001*	971.45 ± 126.77

표 2

혈액 검사 항목	단위	대조군		실험군		z-스코어	p-값	참조문헌 정상치
		평균	표준편차	평균	표준편차			
총 단백질 (Total protein)	g/dL	6.25	0.51	5.79	0.31	-2.503	0.012*	6.50 ± 0.52
알부민 (Albumin)	g/dL	3.87	0.38	3.74	0.16	-0.773	0.439	3.15 ± 0.21
혈액요소질소(BUN)	mg/dL	22.07	3.73	26.40	7.60	-1.585	0.113	16.97 ± 2.78
크레아티닌(Creatinine)	mg/dL	0.59	0.14	0.67	0.13	-1.495	0.135	0.55 ± 0.07
C-반응 단백질 (CRP)	mg/dL	<0.06	-	<0.06	-	-	-	-

그 결과, 백혈구의 경우, 대조군과 PHMG-p 노출군에서 단핵구 비율이 각각 $3.50 \pm 0.73\%$ 및 $2.40 \pm 0.88\%$ 로 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다($p = 0.003$) (표 1). 전체 혈액에서 적혈구의 농도인 Hct(Hematocrit)는 PHMG-p-노출군에서 현저하게 증가하였다($p = 0.024$). 이와 같은 현상은 폐 손상에 의한 산소 교환 용량(oxygen exchange capacity) 감소를 상쇄하기 위한 보상 기전에 기인한 것일 수 있다. 또한, 말초 혈액의 총 단백질 농도는 PHMG-p 노출 그룹에서 유의적으로 감소하였으나($p = 0.012$), 처리군에서 총 단백질은 유의성 있게 감소하였으나, 총 단백질에 속한 알부민은 유의적으로 차이하지 않았다(표 2). 아울러, 평균 혈소판(platelets, PLT) 수는 대조군에서 $928.7 \pm 142.7 \times 10^3/\mu\text{L}$, PHMG-p 노출군에서 $703.1 \pm 180.0 \times 10^3/\mu\text{L}$ 로 나타나, 두 그룹 간에 PLT 수가 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다($p = 0.001$).

실시예 2. PHMG-p의 호흡기 노출에 의한 골수에서 거핵구 수 변화 확인

혈소판 감소의 기전을 밝히기 위하여, 상기 실시예 1에서 PHMG-p 노출 시 혈소판이 가장 큰 폭으로 감소한 5마리를 선별하여, PLT 수를 재분석한 뒤, 대조군과 실험군 총 10마리의 랫에서 대퇴골(femur) 및 경골(tibia)을 분리하고 이로부터 분리한 골수 조직에서 거핵구(megakaryocyte) 수 변화를 확인하였다. 구체적으로, 채취한 대퇴골 및 경골을 10% 중성으로 완충된 포르말린에 24시간 동안 고정된 뒤, 탈석회화를 위해 10% 질산을 8시간 동안 처리하였다. 이 후, 고정된 시료로부터 4- μm 두께의 파라핀 절편을 잘라 H&E(hematoxylin and eosin) 염색을 수행하였다. 면역조직화학적 염색을 위해, 각 조직 절편을 탈파라핀하고 탈수한 뒤, 20분 동안 열 전처리하고, 과산화수소수(peroxide)로 10분 동안 처리하였다. 이렇게 제조된 슬라이드를 인테그린 $\beta 3$ 에 대한 항체(clone D-11, 1:200; Santa Cruz, TX, USA)로 염색한 뒤, 상온에서 10분 동안 이차 항체를 처리하였다. 이 후, 절편을 3, 3'-diaminobenzidine로 디벨롭하고 Harris hematoxylin로 대비염색하였다. 거핵구의 수는 400배 배율(high power field, HPF)로 10개의 연속 위치에서 거핵구 수를 세어 측정하였다.

표 3

검사 항목	단위	대조군		실험군		z-스코어	p-값
		평균	표준편차	평균	표준편차		
혈소판 수 (Platelet count)	$10^3/\mu\text{L}$	1068.6	69.16	503.4	112.4	-2.611	0.009*
거핵구 수 (Megakaryocyte count)	10 HPF	204.4	33.49	133.8	40.33	-2.611	0.009*
비장 무게(Spleen weight)	g	0.962	0.344	0.710	0.152	-1.149	0.251
간 무게(Liver weight)	g	17.98	3.199	15.36	4.717	-0.940	0.347
몸무게(Body weight)	g	507.0	10.42	496.4	63.40	-0.419	0.675
비장/몸무게(Spleen/Body weight)	-	0.0019	0.0007	0.0014	0.0002	-1.149	0.251
간/몸무게 (Liver/Body weight)	-	0.0354	0.0058	0.0305	0.0059	-1.149	0.251

[0083] 선별한 대조군과 실험군 총 10마리의 랫의 혈소판 수를 다시 분석한 결과, 각 군의 평균 혈소판 수는 대조군 $1068.6 \pm 69.16 \times 10^3/\mu\text{L}$ 및 PHMG-p 노출군 $503.4 \pm 112.4 \times 10^3/\mu\text{L}$ 로 나타났으며 ($p = 0.009$) (표 3), 골수(BM)에서 각각 10개의 HPF 당 PLT-방출 거핵구의 평균 수가 대조군 및 PHMG-p 노출군에서 173.0 ± 31.99 및 151.1 ± 30.40 로 나타났다 ($p = 0.064$). 또한, 대퇴골 조직을 H&E 염색한 결과 세포충실도(cellularity)의 차이는 유의하지 않았으나, 인테그린 $\beta 3$ (integrin $\beta 3$) 면역 염색 결과, 골수 조직에 있는 거핵구(megakaryocyte)의 수가 대조군에서 204.4 ± 33.49 개, PHMG-p 노출군에서 133.8 ± 40.33 개로 나타나, PHMG-p 노출에 의해 거핵구의 수가 현저히 감소하는 것을 확인하였다 (표 3 및 도 2). 비장 및 간의 무게는 체중과 비교했을 때 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 나타나 ($p = 0.251$) (표 3), PLT 제거율(clearance)의 감소가 PLT 수의 감소에 영향을 미치는 것은 아니며, 이를 통해, PHMG-p의 호흡기 노출이 PLT-생산하는 거핵구의 발달/성숙도에 영향을 미칠 뿐만 아니라, 거핵구 자체의 수의 감소에도 영향을 미친다는 것을 확인하였다.

[0085] 실시예 3. PHMG-p의 호흡기 노출 특이적으로 골수에서 발현이 변화한 유전자 선별

[0086] PHMG-p 호흡기 노출에 의해 골수에서 거핵구가 감소된 기전을 확인하기 위해, 골수에서 RNA 시퀀싱 분석을 수행하여 관련 유전자를 조사하였다. 구체적으로, 각 군의 랫에서 채취한 대퇴골 및 경골에서 골수 조직을 획득한 뒤, TRIzol 시약을 이용하여 총 RNA를 분리하였다. RNA 품질은 Agilent 2100 Bioanalyzer with the RNA 6000 Nano Chip (Agilent Technologies, Amstelveen, The Netherlands)로 평가하고, ND-2000 spectrophotometer(Thermo Inc., Waltham, MA, USA)를 이용하여 RNA 시료를 정량화하였다. 이 후, NEBNext® Ultra™ II Directional RNA-Seq Kit (NEW ENGLAND BioLabs Inc., Ipswich, MA, USA)를 이용하여 총 RNA에서 라이브러리를 구성하였다 이를 위해, rRNA(Ribosomal RNA)를 RiboCop rRNA depletion kit (LEXOGEN Inc., Vienna, Austria)로 제거하고, cDNA를 합성한 뒤, Illumina indexes 1-12. Enrichment 를 이용하여 인덱싱하였다. PCR(polymerase chain reaction)로 증폭(Enrichment)하고, Agilent 2100 Bioanalyzer (DNA High Sensitivity Kit)를 사용하여 평균 파편(fragment) 크기를 평가함으로써 라이브러리를 검증하였다. StepOne Real-Time PCR System (Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, USA)에서 라이브러리 정량 키트로 라이브러리의 정량화를 수행하고, NovaSeq 6000 (Illumina Inc., San Diego, CA, USA)를 이용하여 paired-end 100 시퀀싱으로 QuantSeq 3' mRNA 시퀀싱을 수행하였다.

표 4

Symbol	Entrez Gene Name	Transcript ID	Fold Change	p-Value
Tsk	TXK tyrosine kinase, transcript variant X1	NM_001024255	13.712	0.049
Ctnna1	catenin alpha-like 1, transcript variant X1	NM_001106649	12.744	0.045
Ctsw	cathepsin W	NM_001024242	12.621	0.010
Hfe	hemochromatosis, transcript variant 1	NM_053301	9.440	0.044
Arhgap4	Rho GTPase-activating protein 4, transcript variant X1	NM_144740	7.775	0.038
Lactb	lactamase, beta, transcript variant X1	NM_001106833	7.416	0.021
Clcc1	chloride channel CLIC-like 1, transcript variant X1	NM_133414	5.885	0.036
Tyk2	tyrosine kinase 2, transcript variant X2	NM_001257347	5.764	0.018
Mrps23	mitochondrial ribosomal protein S23, transcript variant X1	NM_001108289	5.290	0.046
Slc11a1	solute carrier family 11 member 1, transcript variant X1	NM_001031658	4.966	0.027
Ap5z1	adaptor-related protein complex 5, zeta 1 subunit	NM_001037220	4.807	0.040
Gstz1	glutathione S-transferase zeta 1	NM_001109445	4.739	0.031
Rheb	Ras homolog enriched in brain	NM_013216	4.671	0.026
Lypd3	Ly6/Plaur domain-containing 3	NM_021759	4.667	0.046
Relt	RELT tumor necrosis factor receptor	NM_001108495	4.529	0.016
Lsm4	LSM4 homolog, U6 small nuclear RNA and mRNA degradation associated	NM_001106073	4.512	0.025
Ttpal	alpha tocopherol transfer protein like, transcript variant X1	NM_001106537	4.420	0.035
Ly6e	lymphocyte antigen 6 complex, locus E, transcript variant X4	NM_001017467	4.412	0.037
Taf1	TATA-box binding protein associated factor 1	NM_001191723	4.391	0.010
Nrros	negative regulator of reactive oxygen species, transcript variant X1	NM_001024995	4.388	0.008
Pank3	pantothenate kinase 3	NM_001108272	4.309	0.040
RGD1565784	RGD1565784	NM_001109028	4.267	0.013
Fchs2	FCH and double SH3 domains 2, transcript variant X4	NM_001107539	4.158	0.017
Ogfr	opioid growth factor receptor	NM_053340	4.141	0.047
Eif3k	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit K	NM_001106242	3.910	0.012
Mphosph6	M phase phosphoprotein 6	NM_001129881	3.820	0.046
Pnkp	polynucleotide kinase 3'-phosphatase, transcript variant X1	NM_001004259	3.714	0.016
Lgals5	lectin, galactose binding, soluble 5	NM_012976	3.688	0.035
Snx4	sorting nexin 4	NM_001127550	3.682	0.040
Fmo1	flavin-containing monooxygenase 1, transcript variant X2	NM_012792	3.622	0.035
Sik3	SIK family kinase 3	NM_001271216	3.603	0.010
Phkg2	phosphorylase kinase catalytic subunit gamma 2, transcript variant X2	NM_080584	3.537	0.047

[0087]

Pip5k1b	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase type 1 beta	NM_001012743	3.505	0.041
Pld3	phospholipase D family, member 3, transcript variant X3	NM_001012167	3.429	0.005
Limk2	LIM domain kinase 2, transcript variant X1	NM_024135	3.397	0.017
Cirbp	cold-inducible RNA-binding protein, transcript variant X4	NM_031147	3.216	0.026
Pip5k1c	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase type 1 gamma, transcript variant X1	NM_001033970	3.186	0.004
LOC501110	similar to Glutathione S-transferase A1 (GTH1) (HA subunit 1) (GST-epsilon) (GSTA1-1) (GST class-alpha)	NM_001024361	3.137	0.023
Plc2	phospholipase C-like 2	NM_001106880	3.121	0.041
Arhgap11a	Rho GTPase-activating protein 11A	NM_001168524	2.892	0.036
Polr2g	polymerase (RNA) II subunit G, transcript variant X1	NM_053948	2.867	0.042
Ptpn12	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 12	NM_057115	2.860	0.041
Emc2	ER membrane protein complex subunit 2	NM_001113785	2.845	0.014
Lrrc14	leucine-rich repeat containing 14, transcript variant X1	NM_001024354	2.834	0.001
LOC102549726	uncharacterized LOC102549726	NR_110713	2.803	0.017
Psmc9	proteasome 26S subunit, non-ATPase 9	NM_130430	2.797	0.010
Lsm2	LSM2 homolog, U6 small nuclear RNA and mRNA degradation associated, transcript variant 2	NM_001165922	2.742	0.016
Rcsd1	RCS domain containing 1, transcript variant X1	NM_001108349	2.740	0.004
Cnot1	CCR4-NOT transcription complex, subunit 1	NM_001134840	2.720	0.014
Shisa5	shisa family member 5, transcript variant X1	NM_001006989	2.701	0.017
Eif6	eukaryotic translation initiation factor 6, transcript variant X2	NM_001037352	2.546	0.023
Junb	JunB proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	NM_021836	2.518	0.045
Ube2i	ubiquitin-conjugating enzyme E2I, transcript variant X2	NM_013050	2.498	0.014
Cat6a	lysine acetyltransferase 6A	NM_001100570	2.430	0.028
Adck4	aarF domain-containing kinase 4, transcript variant X1	NM_001012065	2.429	0.006
Clqc	complement C1q C chain, transcript variant X1	NM_001008524	2.414	0.030
Zdhhc18	zinc finger, DHHC-type containing 18	NM_001039339	2.352	0.048
Snx5	sorting nexin 5	NM_001106518	2.316	0.004
Psmc3	proteasome 26S subunit, ATPase 3	NM_031595	2.252	0.002
Mmp9	matrix metalloproteinase 9	NM_031055	2.205	0.020
Abhd4	abhydrolase domain-containing 4, transcript variant X2	NM_001108866	2.162	0.008
Etfb	electron transfer flavoprotein beta subunit	NM_001004220	2.153	0.028
Cd74	CD74 molecule, transcript variant X1	NM_013069	2.132	0.005
Tor1aip2	torsin 1A interacting protein 2, transcript variant X3	NM_001165896	2.086	0.039
Ehd1	EH-domain containing 1	NM_001011939	2.082	0.048
Yipf3	Yip1 domain family, member 3, transcript variant X1	NM_001007801	2.046	0.046
Mxi1	MAX interactor 1, dimerization protein, transcript variant X1	NM_013160	2.028	0.037
Hpgds	hematopoietic prostaglandin D synthase, transcript variant X2	NM_031644	-20.212	0.036
Dr1	down-regulator of transcription 1, TBP-binding (negative cofactor 2)	NM_001011914	-19.743	0.014
Cabin1	calcineurin binding protein 1	NM_053575	-12.615	0.010
Ccnl1	cyclin L1, transcript variant X1	NM_053662	-11.615	0.009
Dtnb	dystrobrevin, beta, transcript variant X3	NM_001012191	-10.521	0.044
Tti1	TELO2 interacting protein 1, transcript variant X1	NM_001134619	-9.680	0.025
Zfp64	zinc finger protein 64	NM_001012093	-9.322	0.015

[0088]

Atp5a1	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit 1, cardiac muscle	NM_023093	-9.259	0.047
Irf7	interferon regulatory factor 7, transcript variant X2	NM_001033691	-9.214	0.047
Ergic2	ERGIC and Golgi 2	NM_001024984	-8.686	0.014
Med13	mediator complex subunit 13	NM_001107035	-8.430	0.004
Lap3	leucine aminopeptidase 3	NM_001011910	-8.196	0.049
Arhgef3	Rho guanine nucleotide exchange factor 3, transcript variant X7	NM_001106061	-7.714	0.021
Pacsin2	protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 2, transcript variant X12	NM_130740	-7.330	0.034
Rpp21	ribonuclease P/MRP 21 subunit	NM_001002831	-6.889	0.015
Tceb3	transcription elongation factor B subunit 3	NM_017103	-6.772	0.028
Ipo7	importin 7	NM_001107545	-6.583	0.041
Fam203a	family with sequence similarity 203, member A	NM_001007707	-6.267	0.032
Ascc3	activating signal cointegrator 1 complex subunit 3, transcript variant X3	NM_001277057	-6.076	0.001
Ipo13	importin 13	NM_053778	-5.873	0.003
Hsd17b1	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 1	NM_012851	-5.758	0.024
Ppib	peptidylprolyl isomerase B	NM_022536	-5.672	0.031
RGD735065	similar to GLI3385412-like protein splice form I	NM_199379	-5.650	0.023
Snx27	sorting nexin family member 27, transcript variant 1	NM_001110151	-5.484	0.020
Vat1	vesicle amine transport 1	NM_001033683	-5.279	0.031
Atp6v1e1	ATPase H+ transporting V1 subunit E1	NM_198745	-5.101	0.039
Rcor1	REST corepressor 1, transcript variant X1	NM_001305463	-5.030	0.009
Slc35c1	solute carrier family 35 member C1, transcript variant X1	NM_001107748	-4.994	0.031
Fbxo33	F-box protein 33, transcript variant X1	NM_001108023	-4.989	0.040
Tsc22d1	TSC22 domain family, member 1, transcript variant X1	NM_001109912	-4.892	0.023
Polb	polymerase (DNA) beta	NM_017141	-4.427	0.011
Tmem109	transmembrane protein 109, transcript variant X2	NM_001007736	-4.008	0.016
Klf16	Kruppel-like factor 16	NM_001127604	-3.909	0.042
Rpia	ribose 5-phosphate isomerase A	NM_001108632	-3.843	0.020
Tbce	tubulin folding cofactor C	NM_001108200	-3.836	0.023
Morf4l2	mortality factor 4 like 2	NM_001007714	-3.746	0.033
Plagl2	PLAG1 like zinc finger 2, transcript variant X1	NM_001106528	-3.733	0.020
Pde4b	phosphodiesterase 4B	NM_017031	-3.718	0.019
Atg10	autophagy related 10	NM_001109505	-3.473	0.029
Nos1ap	nitric oxide synthase 1 adaptor protein	NM_138922	-3.455	0.005
Ncor1	nuclear receptor co-repressor 1	NM_001271103	-3.368	0.007
Slmo2	slowmo homolog 2	NM_001009543	-3.319	0.020
Ino80	INO80 complex subunit	NM_001261404	-3.199	0.002
Phyh	phytanoyl-CoA 2-hydroxylase	NM_053674	-3.183	0.046
Edc4	enhancer of mRNA decapping 4	NM_001033068	-3.141	0.034
Ccar1	cell division cycle and apoptosis regulator 1	NM_001108535	-3.052	0.008
Larp7	La ribonucleoprotein domain family, member 7	NM_001044290	-3.040	0.033
Cks1b	CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B	NM_001135749	-3.020	0.026
Gps2	G protein pathway suppressor 2, transcript variant X1	NM_001017477	-3.014	0.008
Baz2a	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2A	NM_001107158	-3.006	0.027
Mrpl14	mitochondrial ribosomal protein L14, transcript variant 2	NM_001106890	-3.001	0.008
Kif2a	kinesin family member 2A	NM_053376	-2.953	0.011
Snx8	sorting nexin 8, transcript variant X1	NM_001105912	-2.936	0.030
Eif3f	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit F	NM_001277302	-2.900	0.010
Ep400	E1A binding protein p400	NM_001107149	-2.898	0.008
Baz1a	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1A	NM_001170568	-2.887	0.002
Zrsr1	zinc finger (CCCH type), RNA-binding motif and serine/arginine-rich 1	NM_001017504	-2.883	0.046
Thg1l	tRNA-histidine guanylyltransferase 1-like, transcript variant X1	NM_001013966	-2.817	0.038
LOC294154	similar to chromosome 6 open reading frame 106 isoform a, transcript variant X1	NM_001039607	-2.644	0.010
Cdca8	cell division cycle associated 8, transcript variant X1	NM_001025050	-2.599	0.012
St3gal2	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 2, transcript variant X3	NM_031695	-2.539	0.010
Psmc7	proteasome 26S subunit, non-ATPase 7	NM_001107426	-2.518	0.011
Ebf1	early B-cell factor 1, transcript variant X5	NM_053820	-2.513	0.007
Ublcp1	ubiquitin-like domain-containing CTD phosphatase 1, transcript variant X1	NM_001014117	-2.437	0.029
Zfp703	zinc finger protein 703	NM_001109425	-2.320	0.037
Luc7l3	LUC7-like 3 pre-mRNA splicing factor	NM_001108291	-2.217	0.015
Kmt2e	lysine methyltransferase 2E	NM_001100851	-2.201	0.009
Dhx15	DEAH-box helicase 15, transcript variant X1	NM_001191597	-2.189	0.029
Crebbp	CREB binding protein, transcript variant X2	NM_133381	-2.177	0.020
Metap2	methionyl aminopeptidase 2	NM_022539	-2.142	0.016
Srrm1	serine and arginine repetitive matrix 1, transcript variant X8	NM_001107986	-2.103	0.043
Dmtf1	cyclin D binding myb-like transcription factor 1, transcript variant X1	NM_053693	-2.090	0.029
RatNP-3b	defensin RatNP-3 precursor	NM_001079898	-2.074	0.032
Brd4	bromodomain containing 4	NM_001100903	-2.052	0.013
Tax1bp1	Tax1 binding protein 1, transcript variant X1	NM_001004199	-2.014	0.047

분석된 유전자들 중, 그룹 간에 2배 이상 발현이 변화하는 후보 유전자를 선정한 결과 (p-value < 0.05 및 정규화된 데이터 (log2) value ≥ 4.0), PHMG-p 호흡기 노출에 의해 골수에서 발현이 상향 조절된 67개의 유전자 및 하향 조절된 75개의 유전자를 확인하였다 (표 4). 유전자 발현이 상/하향 조절된 유전자 간의 유전자 수에는

유의한 차이는 없었으나, 이들 간의 유전자 발현 FC(fold change)의 절대값에서는 유의한 차이가 나타났다. 유의한 FC 차이의 기준을 5.0으로 설정하면 발현이 상향 조절된 유전자의 수는 9개, 하향 조절된 유전자는 27개로 나타났다 (표 4). 특히, PHMG-p 호흡기 노출에 의해, 골수에서 *Txk*, *Ctnn1*, *Ctsw*, *Hfe*, *Arhgap4*, *Lactb*, *Clcc1*, *Tyk2* 및 *Mrps23*의 발현이 유도되었으며, 이들은 IPA(Inguinity Pathway Analysis) 데이터 세트에서 조혈 신호(hematopoietic signaling)와 밀접하게 관련되어 있다. 또한, GAP(GTPase-activating protein) 코딩 유전자인, Rho GTPase-activating protein 4 (*Arhgap4*)의 발현이 PHMG-p 호흡기 노출된 그룹의 골수에서 7.775배 증가하였으며, Rho GTPase activating protein 11A (*Arhgap11a*)의 발현이 2.892배 증가하는 것으로 나타났다. 또한, 이와 일치하게, PLT 생산을 위한 거핵구의 형태 변화에서 GAP와 반대 역할을 하는 GEF(guanine nucleotide exchange factor) 단백질을 코딩하는 Rho guanine nucleotide exchange factor 3 (*arhgef3*) 유전자의 발현은 PHMG-p 호흡기 노출된 그룹의 골수에서 7.7배 감소하는 것으로 나타났다. 아울러, MEP(megakaryocytic-erythroid progenitor)-특이적 마커인 hematopoietic prostaglandin D synthase(Hpgds)가 PHMG-p 호흡기 노출된 그룹의 골수에서 가장 많이 발현이 감소한 것으로 나타났다 (FC: -20.212, *p*-value: 0.036).

[0093] 실시예 4. PHMG-p의 호흡기 노출 관련 조혈 이상 신호전달 경로 분석

[0094] IPA(Inguinity Pathway Analysis) 프로그램(Qiagen, MD, USA)을 이용하여 상기 실시예 3에서 PHMG-p의 호흡기 노출에 특이적으로 골수에서 발현이 변화한 후보 유전자들을 분석하여 가장 유의하게 변할 것으로 예상되는 상위 6개의 조혈기능 신호전달 경로를 도출하였으며, 이와 관련된 질병 및 생물학적 기능을 분석하였다. 아울러, 조혈 신호 경로 및 예측된 주요 분자의 개략도를 IPA로 도출하였다 (도 4).

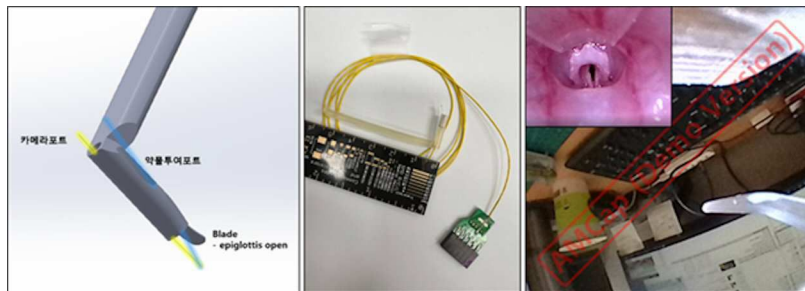
[0095] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, MED13, NCOR1, GPS2, LIMK2, TYK2, MMP9, CREBBP, PLCL2 및 ATP5F1A (*z*-score = 1.000 및 $-\log(p\text{-value}) = 3.296$)가 에스트로겐 수용체 신호전달과 관련이 있었으며, RHOGDI 및 RHOA 신호전달 경로는 PIP5K1C, LIMK2, CREBBP, ARHGEF3, ARHGAP4 및 PIP5K1B (*z*-score = -1.633 및 $-\log(p\text{-value}) = 2.818$) 및 PIP5K1C, LIMK2, ARHGAP4 및 PIP5K1B (*z*-score = 1.000 및 $-\log(p\text{-value}) = 2.28$)를 포함하였다. CREBBP, PPIB, GSTZ1, FMO1 및 JUNB (*z*-score = 0.000 및 $-\log(p\text{-value}) = 1.963$)가 NRF2-매개 산화 스트레스 반응 신호전달 경로와 관련되었다. 3-포스포티딜이노시티드(Phosphoinositide) 생합성 및 이노시톨 포스페이트 화합물의 초경로(superpathway)는 PIP5K1C, UBLCP1, PTPN12 및 PIP5K1B (각각 *z*-scores = 1.000 및 1.000, 및 $-\log(p\text{-values}) = 1.521$ 및 1.347)을 포함하였다. 또한, IPA 분석을 통해 세포 핵 속에서 주요 전사인자 역할을 하는 DDIT3, CTNNB1, RB1, BHLHE40 및 STAT6와 같은 인자들이 세포질의 ATF6와 함께 조혈 과정에 기능한다고 도출되었다. 따라서 PHMG-p 기도 점적 노출은 다양한 유전자의 발현 조절을 통해 골수 조직에서의 조혈 기능을 감소시키는 것을 확인하였다.

[0097] 실시예 5. PHMG-p의 호흡기 노출 관련 조혈 이상 마커 유전자 선발

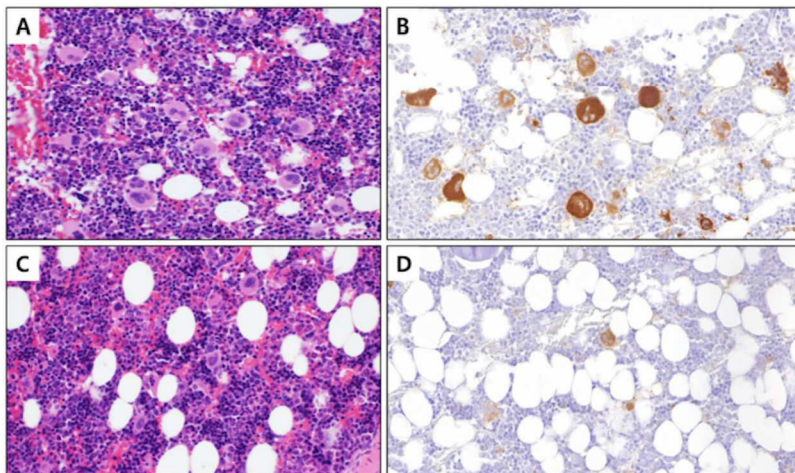
[0098] 상기 실시예 3 및 4의 분석 결과를 통해, PHMG-p 호흡기 노출 후 조혈 독성에 특이적인 마커로서, 상기 IPA 분석 결과 조혈 신호전달에 중요한 것으로 분석되고, CLCC1, TFRC, C5AR1, CD36 및 ERK1/2에 의해 비활성화될 것으로 예상되는 ATF6(Activating Transcription Factor 6); PHMG-p 호흡기 노출시 발현이 9.440배 증가하고, 상기 IPA 분석 결과 조혈 신호전달에 중요한 것으로 분석된 HFE(Hemochromatosis); PHMG-p 호흡기 노출시 발현이 20.212배로 가장 큰 폭으로 감소한 HPGDS(Hematopoietic Prostaglandin D Synthase); PHMG-p 호흡기 노출시 발현이 13.712 증가하고, 상기 IPA 분석 결과 조혈 신호전달에 중요한 것으로 분석된 TXK(TXK yrosine kinase); 및 PHMG-p 호흡기 노출시 발현이 5.764배 증가하고, 상기 IPA 분석 결과 조혈 신호전달에 중요한 것으로 분석된 TYK2(Tyrosine kinase 2)를 선정하였다.

도면

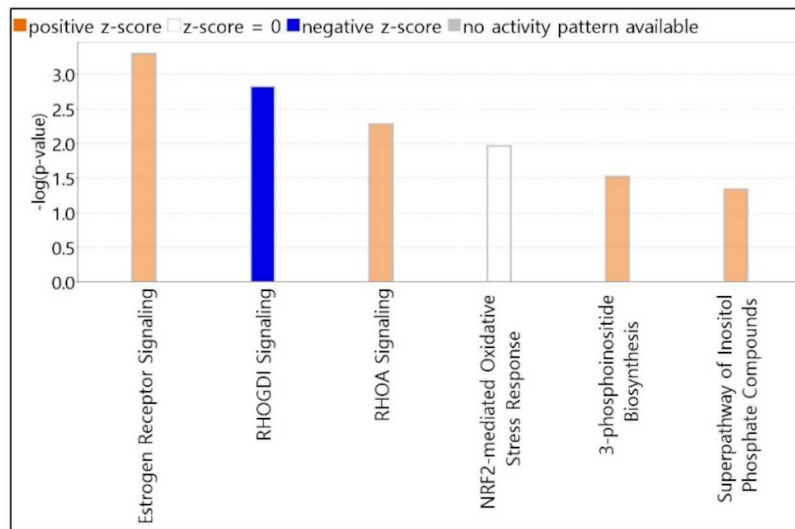
도면1



도면2



도면3



도면4

