(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0007257
(43) 공개일자 2020년01월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01) *G01N 33/68* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2018.05)
G01N 33/6893 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0081139
(22) 출원일자 2018년07월12일
심사청구일자 2018년07월12일

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
(72) 발명자
홍수종
서울특별시 강남구 압구정로39길 58, 24동 902호 (압구정동, 구현대아파트)
김경곤
서울특별시 송파구 올림픽로 435, 108동 2302호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **혈액 내 가습기 살균제 성분 노출 여부 확인용 바이오마커 패널 및 이를 이용한 확인 방법**

(57) 요 약

본 발명은 혈액 내 가습기 살균제 성분 노출 여부 확인용 바이오마커 패널 및 이를 이용한 확인 방법에 관한 것으로, 본 발명에서는 가습기 살균제에 노출된 급성군(증상 발생하여 내원 후 2달 이내), 가습기 살균제에 노출된 이후 유지군(증상 발생하여 내원 후 3년 경과) 및 가습기 살균제에 노출되지 않은 정상대조군의 혈액을 이용하여 혈액 단백질체 분석을 수행하였으며, 정상대조군과 급성군, 또는 정상대조군과 유지군을 각각 감별할 수 있는 다중 단백질 패널을 구축하였고, 상기 다중 단백질 패널은 우수한 민감도, 특이도 및 AUC 값을 나타내는 바, 가습기 살균제 성분 노출 여부 확인용 바이오마커 패널로 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도3

정상군 vs 급성기

Protein name	AUC
Defensin	0.559
Alpha-1B-glycoprotein	0.589
Fibronectin receptor subunit beta	0.510
Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]	0.723
Gamma-enolase	0.501
poliovirus receptor	0.719
Collagen alpha-1(V) chain	0.623
Proteasome subunit alpha type-2	0.626
Amyloid-like protein 1	0.576
Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	0.544
UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	0.609
Proteoglycan 4	0.679
Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1	0.510
Neurotrimin	0.669
Calcium-regulated heat-stable protein 1	0.567

정상군 vs 유지기

Protein name	AUC
Defensin	0.738
Alpha-1B-glycoprotein	0.872
Fibronectin receptor subunit beta	0.632
Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]	0.525
Gamma-enolase	0.715
poliovirus receptor	0.526
Collagen alpha-1(V) chain	0.702
Proteasome subunit alpha type-2	0.569
Amyloid-like protein 1	0.570
Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	0.831
UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	0.677
Proteoglycan 4	0.789
Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1	0.781
Neurotrimin	0.873
Calcium-regulated heat-stable protein 1	0.588

(52) CPC특허분류
C12Q 2600/142 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2333/46 (2013.01)
G01N 2333/4722 (2013.01)
G01N 2333/4728 (2013.01)
G01N 2333/705 (2013.01)
G01N 2333/902 (2013.01)
G01N 2570/00 (2013.01)
G01N 2800/60 (2013.01)

(72) 발명자
유지영
경기도 안양시 동안구 부림로 113, 1903호 (관양동)

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

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

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

명 세 서

청구범위

청구항 1

세포외 슈퍼옥사이드 디스뮤타제(extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]), 프로테오글리칸 4(proteoglycan 4) 및 뉴로트리민(neurotrimin)을 포함하며,

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

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 바이오마커 패널은 폴리오바이러스 수용체(poliovirus receptor)를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 바이오마커 패널.

청구항 3

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

청구항 4

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

청구항 5

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

청구항 6

알파-1B-당단백질(alpha-1B-glycoprotein), 저밀도 지질단백 수용체-관련 단백질 1(prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1) 및 프로테오글리칸 4(proteoglycan 4)를 포함하며,

가습기 살균제 성분에 대해 유지기 단계의 노출 여부를 확인하는 것을 특징으로 하는 바이오마커 패널.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 바이오마커 패널은 골지-관련 식물 발병-관련 단백질 1(golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1) 및 뉴로트리민(neurotrimin)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 바이오마커 패널.

청구항 8

제 6항에 있어서, 상기 가습기 살균제 성분은 PHMG(polyhexamethylene guanidine), PGH(oligo-[2-(2-ethoxy)-ethoxyeth-yl)-guanidinium-chlorid) 및 PHMB(polyhexamethylene biguanide)로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 바이오마커 패널.

청구항 9

제 6항에 있어서, 상기 유지기 단계는 가습기 살균제 성분 노출 후 증상 발생하여 내원 후 1 내지 100년의 기간인 것을 특징으로 하는 바이오마커 패널.

청구항 10

제 6항에 있어서, 상기 유지기 단계의 노출 여부는 혈액 시료에서 측정하는 것을 특징으로 하는 바이오마커 패

널.

청구항 11

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

청구항 12

제 6항의 바이오마커 패널로부터 바이오마커의 발현 수준을 검출할 수 있는 제제를 포함하며, 가습기 살균제 성분에 대해 유기지 단계의 노출 여부를 확인하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 13

제 11항 또는 제 12항에 있어서, 상기 제제는 상기 바이오마커에 특이적으로 결합하는 항체, 앱타머, 펩타이드, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 펩타이드 핵산(PNA), 리보자임, siRNA, shRNA, miRNA 또는 화합물인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 14

가습기 살균제 성분에 노출이 의심되는 대상체로부터 분리된 혈액 시료에서 혈장을 분리하는 제 1단계;

상기 혈장으로부터 제 1항의 바이오마커 패널 중 바이오마커의 발현 수준을 측정하는 제 2단계; 및

정상대조군과 비교하여 상기 바이오마커의 발현 수준이 증가하고, 사후확률(posterior probability) 수치가 0.5193을 초과하는 경우, 가습기 살균제 성분 노출에 대해 급성기 단계인 것으로 판단하는 제 3단계;

를 포함하는 가습기 살균제 성분에 대한 노출 여부 확인 방법.

청구항 15

가습기 살균제 성분에 노출이 의심되는 대상체로부터 분리된 혈액 시료에서 혈장을 분리하는 제 1단계;

상기 혈장으로부터 제 6항의 바이오마커 패널 중 바이오마커의 발현 수준을 측정하는 제 2단계; 및

정상대조군과 비교하여 상기 바이오마커의 발현 수준이 증가하고, 사후확률(posterior probability) 수치가 0.5605를 초과하는 경우, 가습기 살균제 성분 노출에 대해 유지기 단계인 것으로 판단하는 제 3단계;

를 포함하는 가습기 살균제 성분에 대한 노출 여부 확인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

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

배 경 기 술

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

[0003] PGH, PHMG 및 PHMB의 살균제 성분들은 뛰어난 살균력을 갖지만, 여러 가지 문제점을 나타낸다는 사실들이 여러 문헌에서 보고된 바 있다. 상기 살균제 성분들은 생분해성이 아니므로 환경오염을 유발하며, 수생 독성이 심각한 것으로 알려져 있는데 10 μg/L(0.000001%, 0.054 μM, 0.01 ppm)에서도 매우 높은 독성을 나타낸다. 또한, 흡입 독성이 있어 스프레이로의 사용이 금지되었으며, 규제 없이 자의적, 무차별적으로 응용되어 제품에 사용될 경우 매우 큰 위험을 초래할 수 있다. 2013년 유럽화학국은 PHMB를 "흡입하면 사망, fatal if inhaled" 물질로

규정하고 있다. 상기 성분들은 인지질 이중막을 파괴하여 살균효과를 나타내는 바, 사람 세포의 인지질을 파괴할 가능성이 있으며, 피부 장벽을 파괴할 우려가 있다. 따라서 물티슈처럼 피부에 자주 사용한다면 피부염을 유발할 가능성이 크다. 또한, 살균제 성분에 의해 폐 손상을 받았음에도 살균제 노출 시점으로부터 시간이 길어질수록 인과관계를 직접 규명할 수 있는 근거로 인정되는 폐 영상에서의 흔적들이 소실되고, 폐 기능의 회복 등으로 정확한 피해 평가가 어려운 실정이다.

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

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

선행기술문헌

특허문헌

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

발명의 내용

해결하려는 과제

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

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 세포외 슈퍼옥사이드 디스뮤타제(extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]), 프로테오글리칸 4(proteoglycan 4) 및 뉴로트리민(neurotrimin)을 포함하며, 가습기 살균제 성분에 대해 급성기 단계의 노출 여부를 확인하는 바이오마커 패널을 제공한다.

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

[0010] 또한, 본 발명은 가습기 살균제 성분에 노출이 의심되는 대상체로부터 분리된 혈액 시료에서 혈장을 분리하는 제 1단계; 상기 혈장으로부터 상기 바이오마커 패널 중 바이오마커의 발현 수준을 측정하는 제 2단계; 및 정상 대조군과 비교하여 상기 바이오마커의 발현 수준이 증가하고, 사후확률(posterior probability) 수치가 0.5193을 초과하는 경우, 가습기 살균제 성분 노출에 대해 급성기 단계인 것으로 판단하는 제 3단계;를 포함하는 가습기 살균제 성분에 대한 노출 여부 확인 방법을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 알파-1B-당단백질(alpha-1B-glycoprotein), 저밀도 지질단백 수용체-관련 단백질 1(prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1) 및 프로테오글리칸 4(proteoglycan 4)를 포함하며, 가습기 살균제 성분에 대해 유지기 단계의 노출 여부를 확인하는 바이오마커 패널을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 바이오마커 패널로부터 바이오마커의 발현 수준을 검출할 수 있는 제제를 포함하며, 가습기 살균제 성분에 대해 유기지 단계의 노출 여부를 확인하는 키트를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 가습기 살균제 성분에 노출이 의심되는 대상체로부터 분리된 혈액 시료에서 혈장을 분리하는 제 1단계; 상기 혈장으로부터 상기 바이오마커 패널 중 바이오마커의 발현 수준을 측정하는 제 2단계; 및 정상 대조군과 비교하여 상기 바이오마커의 발현 수준이 증가하고, 사후확률(posterior probability) 수치가 0.5605를 초과하는 경우, 가습기 살균제 성분 노출에 대해 유지기 단계인 것으로 판단하는 제 3단계;를 포함하는 가습기 살균제 성분에 대한 노출 여부 확인 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에서는 가습기 살균제에 노출된 급성군(증상 발생하여 내원 후 2달 이내), 가습기 살균제에 노출된 이후 유지군(증상 발생하여 내원 후 3년 경과) 및 가습기 살균제에 노출되지 않은 정상대조군의 혈액을 이용하여 혈액 단백질체 분석을 수행하였으며, 정상대조군과 급성군, 또는 정상대조군과 유지군을 각각 감별할 수 있는 다중 단백질 패널을 구축하였고, 상기 다중 단백질 패널은 우수한 민감도, 특이도 및 AUC 값을 나타내는 바, 가습기 살균제 성분 노출 여부 확인용 바이오마커 패널로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 가습기 살균제에 대한 급성군, 유지군 및 정상대조군의 혈액 단백질체 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 다중 반응 모니터링(multiple reaction monitoring; MRM)을 이용하여 개별 혈액 시료에서의 단백질 상대 정량값 및 AUC 값을 나타낸 것이다.

도 3은 정상대조군과 급성군, 또는 정상대조군과 유지군을 감별할 수 있는 다중 단백질 패널을 나타낸 것이다.

도 4 내지 도 6은 정상대조군과 급성군을 감별할 수 있는 다중 단백질 패널 모델의 구축 방법을 나타낸 것이다.

도 7 내지 도 9는 정상대조군과 유지군을 감별할 수 있는 다중 단백질 패널 모델의 구축 방법을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 본 발명의 발명자들은 가습기 살균제에 노출된 급성군(증상 발생하여 내원 후 2달 이내), 가습기 살균제에 노출된 이후 유지군(증상 발생하여 내원 후 3년 경과) 및 가습기 살균제에 노출되지 않은 정상대조군의 혈액을 이용하여 혈액 단백질체 분석을 수행하였으며, 정상대조군과 급성군, 또는 정상대조군과 유지군을 감별할 수 있는 다중 단백질 패널을 구축하였고, 상기 다중 단백질 패널이 가습기 살균제 성분 노출 여부를 확인하는 분자 진단 마커로 활용이 가능함을 확인하며 본 발명을 완성하였다.

[0018] 이에, 본 발명은 세포외 슈퍼옥사이드 디스뮤타제(extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn])(UniProtKB/Swiss-Prot no. P08294), 프로테오글리칸 4(proteoglycan 4) (UniProtKB/Swiss-Prot no. Q92954) 및 뉴로트리민(neurotrimin) (UniProtKB/Swiss-Prot no. Q9P121)을 포함하며, 가습기 살균제 성분에 대해 급성기 단계의 노출 여부를 확인하는 바이오마커 패널을 제공한다.

[0019] 상기 바이오마커 패널은 폴리오바이러스 수용체(poliovirus receptor)(UniProtKB/Swiss-Prot no. P15151)를 더 포함할 수 있다.

[0020] 상기 가습기 살균제 성분은 PHMG(polyhexamethylene guanidine), PGH(oligo-[2-(2-ethoxy)-ethoxyeth-yl)-guanidinium-chlorid) 및 PHMB(polyhexamethylene biguanide)로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[0021] 상기 급성기 단계는 가습기 살균제 성분 노출 후 증상 발생하여 내원 직후부터 2개월 이내의 기간일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[0022] 상기 급성기 단계의 노출 여부는 혈액 시료에서 측정할 수 있다.

[0024] 또한, 본 발명은 상기 바이오마커 패널로부터 바이오마커의 발현 수준을 검출할 수 있는 제제를 포함하며, 가습기 살균제 성분에 대해 급성기 단계의 노출 여부를 확인하는 키트를 제공한다.

[0025] 상기 제제는 상기 바이오마커에 특이적으로 결합하는 항체, 앱타머, 펩타이드, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 펩타이드 핵산(PNA), 리보자임, siRNA, shRNA, miRNA 또는 화합물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[0027] 또한, 본 발명은 가습기 살균제 성분에 노출이 의심되는 대상체로부터 분리된 혈액 시료에서 혈장을 분리하는 제 1단계; 상기 혈장으로부터 상기 바이오마커 패널 중 바이오마커의 발현 수준을 측정하는 제 2단계; 및 정상대조군과 비교하여 상기 바이오마커의 발현 수준이 증가하고, 사후확률(posterior probability) 수치가 0.5193을 초과하는 경우, 가습기 살균제 성분 노출에 대해 급성기 단계인 것으로 판단하는 제 3단계;를 포함하는 가습

기 살균제 성분에 대한 노출 여부 확인 방법을 제공한다.

[0029] 다음으로, 본 발명은 알파-1B-당단백질(alpha-1B-glycoprotein)(UniProtKB/Swiss-Prot no. P04217), 저밀도 지질단백 수용체-관련 단백질 1(prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1)(UniProtKB/Swiss-Prot no. Q07954) 및 프로테오글리칸 4(proteoglycan 4)(UniProtKB/Swiss-Prot no. Q92954)를 포함하며, 가습기 살균제 성분에 대해 유지기 단계의 노출 여부를 확인하는 바이오마커 패널을 제공한다.

[0030] 상기 바이오마커 패널은 골지-관련 식물 발병-관련 단백질 1(golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1) (UniProtKB/Swiss-Prot no. Q9H4G4) 및 뉴로트리민(neurotrimin)(UniProtKB/Swiss-Prot no. Q9P121)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 단백질을 더 포함할 수 있다.

[0031] 상기 가습기 살균제 성분은 PHMG(polyhexamethylene guanidine), PGH(oligo-[2-(2-ethoxy)-ethoxyeth-yl)-guanidinium-chlorid) 및 PHMB(polyhexamethylene biguanide)로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[0032] 상기 유지기 단계는 가습기 살균제 성분 노출 후 증상 발생하여 내원 후 1 내지 100년의 기간일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[0033] 상기 유지기 단계의 노출 여부는 혈액 시료에서 측정할 수 있다.

[0035] 또한, 본 발명은 상기 바이오마커 패널로부터 바이오마커의 발현 수준을 검출할 수 있는 제제를 포함하며, 가습기 살균제 성분에 대해 유기지 단계의 노출 여부를 확인하는 키트를 제공한다.

[0036] 상기 제제는 상기 바이오마커에 특이적으로 결합하는 항체, 앱타머, 펩타이드, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 펩타이드 핵산(PNA), 리보자임, siRNA, shRNA, miRNA 또는 화합물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[0038] 또한, 본 발명은 가습기 살균제 성분에 노출이 의심되는 대상체로부터 분리된 혈액 시료에서 혈장을 분리하는 제 1단계; 상기 혈장으로부터 상기 바이오마커 패널 중 바이오마커의 발현 수준을 측정하는 제 2단계; 및 정상 대조군과 비교하여 상기 바이오마커의 발현 수준이 증가하고, 사후확률(posterior probability) 수치가 0.5605를 초과하는 경우, 가습기 살균제 성분 노출에 대해 유지기 단계인 것으로 판단하는 제 3단계;를 포함하는 가습기 살균제 성분에 대한 노출 여부 확인 방법을 제공한다.

[0040] 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.

[0042] **실시예 1: 혈액 시료 준비**

[0043] 실험에 사용된 혈액 시료는 서울아산병원 환경보건센터에서 제공받았으며, 원심분리하여 혈장으로 사용하였다.

[0045] 1-1. 급성군

[0046] 가습기 살균제 성분(polyhexamethylene guanidine; PHMG)에 노출된 피해자들의 피해 정도는 심사에 따라 1 ~ 4등급으로 나누어지며(1등급: 질병의 원인이 가습기 살균제일 가능성이 거의 확실, 2등급: 질병의 원인이 가습기 살균제일 가능성이 높음, 3등급: 질병의 원인이 가습기 살균제일 가능성이 낮음, 4등급: 질병의 원인이 가습기 살균제일 가능성이 거의 없음), 급성군은 소아과 중환자실에 입원했었던 대상군이며, 1등급 판정을 받은 소아 환자 9명으로, 성별은 여아 5명, 남아 4명, 평균 나이는 2.5세(최소 1세 ~ 최대 5세)였다. 증상 발생 후, 2006년도 ~ 2011년도 사이에 내원하여 2달 이내에 채혈한 혈액을 실험에 사용하였다.

[0048] 1-2. 유지군

[0049] 유지군은 급성군과 동일인으로, 첫 번째 채혈 후, 평균 4.7년(최소 3.1년 ~ 최대 8.1년) 후에 채혈한 혈액을 실험에 사용하였다.

[0051] 1-3. 정상 대조군

[0052] 국내 천식 등 호흡기·알레르기 질환 연구를 위한 출생코호트에서 선별하였으며, 출생 후 가습기 살균제에 한 번도 노출되지 않은 소아 10명으로, 여아 6명, 남아 4명, 평균 나이는 3세였다.

[0054] **실시예 2: 혈액 단백질체 분석 방법**

[0055] 혈액 단백질체 분석을 위하여, 혈장 내 다량 존재하는 14종의 단백질(high abundant protein)을 제거하는 depletion 과정을 수행한 후 펩타이드를 제조하였으며, 고분해능 질량분석기를 이용하여 상기 펩타이드의 스펙트럼 강도(spectrum intensity)를 통계적으로 분석하는 비표지 정량법(label free quantitation; LFQ)으로 정량을 수행하였다.

[0057] 혈장 내 다량 존재하는 14종의 단백질[알부민(albumin), IgG, 항-트립신(anti-trypsin), IgA, 트랜스페린(transferrin), 합토글로빈(haptoglobin), 피브리노겐(fibrinogen), 알파2-매크로글로불린(alpha2-macroglobulin), 알파1-산성 당단백질(alpha1-acid glycoprotein), IgM, 아포지질단백질 AI(apolipoprotein AI), 아포지질단백질 AII(apolipoprotein AII), 보체 C3(complement C3) 및 트랜스티레틴(transthyretin)]을 depletion 시키기 위해, 혈장 시료 40 μl를 버퍼 A 120 μl로 희석하고, Agilent MARS h14 컬럼 및 HPLC 시스템 이용하여 하기와 같이 혈장 내 소량 존재하는 단백질(low abundant protein)을 분획하였다.

[0059] 농축된 소량 단백질들은 30 kDa cut-off filter unit를 digestion unit으로 사용하는 FASP(filter-aided sample preparation) 기법으로 펩타이드를 제조하였다. 상세하게는, 프로테아제/포스파타아제 억제제 칵테일(protease/phosphatase inhibitor cocktail)이 포함된 8 M의 요소(urea) 100 μl를 농축된 소량 단백질 분획물에 혼합하고, 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 변성(denaturation) 시켰다. 이후, 50 mM의 디티오트레이톨(dithiothreitol)을 이용하여 37℃에서 이황화 결합(disulfide bond)을 reducing 시키고, 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 reducing을 수행하였다. 55 mM의 요오드아세트아미드(iodoacetamide)를 이용하여 빛 차단 조건에서 알킬화(alkylation) 반응을 수행한 후, 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 이후, 50 mM의 탄산수소암모늄(ammonium bicarbonate) 200 ml를 첨가한 후 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. LysS/트립신 혼합 프로테아제 100 ng을 각 시료에 처리하고, 37℃에서 밤새 digestion을 수행하였다. 그 다음 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하고, 10% 폼산(formic acid)으로 반응을 중지시킨 후 C18 역상 탈염 카트리지(reverse phase desalting cartridge)를 이용하여 탈염(desalting)을 수행하였다. 탈염된 펩타이드는 Speed Vac을 이용하여 건조한 후 0.1% 폼산에 용해하여 LC-MS 분석을 수행하였다. MS 장비는 Q-Exactive Plus BioPharm version(Thermo, USA)을, LC 장비는 UltiMate™ 3000 RSLCnano System(Thermo, USA)을 사용하였으며, 펩타이드 시료는 4 μl씩 주입하여 300 μl/분의 유속으로 NanoLC와 연동된 이온 트랩(ion trap) MS로 분석을 수행하였다. LC는 Solution A(5% 아세토니트릴, 0.1% 폼산)와 solution B(95% 아세토니트릴, 0.1% 폼산)의 농도 구배 120분을 포함하여 총 150분 동안 분리하였으며, 사용된 분석 컬럼은 AQUA C18(5 μm, 125A)을 충진한 내직경 75 μm, 외직경 360 μm, 길이 50 cm의 fused silica capillary column을 사용하여 펩타이드 혼합체를 분리하였다. 분리된 펩타이드는 2000 V의 전자분무 이온화(electrospray ionization; ESI) 전압을 이용하여 이온 분사하며 이온 에미터(ion emitter)는 내직경 20 μm 이온 스프레이 에미터(tappered ion spray emitter)를 통해 질량분석기로 주입하여 스펙트럼 데이터를 획득하였다. Orbitrap MS 분석은 400 ~ 2000 m/z 범위에 대해 이온 트랩 MS로 1번의 survey scan(해상도 30,000)을 수행한 후에 HCD(higher energy collision dissociation, 25% 에너지 레벨) 방식 및 Orbitrap MS를 이용하여 8번의 MS/MS(해상도 60,000) 분석을 수행하였다. 5분의 dynamic exclusion option을 통해 중복된 펩타이드 이온 검출을 최소화하였다. 이온 트랩의 Auto gain control target setting은 Full MS에 대해서는 3E04를, FT MS/MS에 대해서는 2E5을 사용하였다. 획득한 RAW 데이터는

Sequest algorithm 기반의 데이터베이스 분석 소프트웨어인 Proteome Discoverer(Thermo, USA, version 2.2)를 이용하여 정성 분석 및 Label free 정량 분석을 수행하였다. 펩타이드 변형은 시스테인 카바미도메틸화(cysteine carbamidomethylation), 메티오닌 산화(methionine oxidation), 탈아미드화(deamidation)로 고정된 변형으로 수행하였다. 트립신 비절단 trypsin misscleavage)은 "1" 값을 사용하였고, 서열 데이터베이스는 최신 swissprot sequence DB를 사용하였으며, Label free quantitation을 위하여 펩타이드 이온 강도를 이용한 정량 분석을 수행하였다. 동정된 단백체들을 Uniprot accession number를 query로 사용하고, Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery(DAVID) v6.7(http://david.abcc.ncifcrf.gov)을 이용하여, 유전자 온톨로지(gene ontology; GO)를 세포 성분(cellular component), 분자 기능(molecular function) 및 생물학적 공정(biological process)의 세 분야로 분석하였으며, Pereseus(http://www.perseus-framework.org)를 이용하여 heat map, clustering 분석 및 Volcano plot 분석을 수행하였다.

[0061] **실시예 3: 다중 반응 모니터링(multiple reaction monitoring; MRM)을 이용한 개별 혈액 시료에서의 단백질 상대 정량**

[0062] 가습기 살균제 급성군(9명), 유지군(9명) 및 정상대조군(10명)의 혈장 시료 전처리는 "Label free quantitation 분석을 통한 혈액 단백질체 분석 방법"의 시료 전처리와 동일하게 혈장 내 다량 존재하는 단백질을 제거하는 depletion 과정을 수행한 후 펩타이드를 제조하였다. 각 표적 단백질들의 대표 펩타이드는 SRM Atlas(http://www.srmatlas.org/)에서 observance number가 가장 많은 트립신 분해 펩타이드(tryptic peptide)를 선정하고, 이에 대한 MS/MS 스펙트럼으로부터 transition 정보를 추출하였다. 추출된 transition 정보를 이용하여 Triple quadruple(QQQ) MS의 MRM 방법을 작성하여 예비 MRM을 수행한 후 재현성이 15% 미만이고 강도가 높은 순으로 최적화된 최종 transition을 선정하였다. 최종 Transition 방법으로 가습기 살균제 급성군(9명), 유지군(9명) 및 정상대조군(10명)의 시료를 분석하였으며, raw 데이터는 Skyline Targeted Mass Spec Environment(Washington University)로 피크(peak)를 추출하고, 피크 면적 계산 등의 분석을 수행하였다.

[0064] **실시예 4: 로지스틱 회귀분석(logistic regression)을 이용한 모델구축 방법**

[0065] 가습기 살균제 급성군, 유지군 및 정상대조군에서의 각 단백질들의 민감도(sensitivity)와 특이도(specificity)는 MedCalc(version 18.5, MedCalc Software bvba)의 ROC(receiver operating characteristics) curve 분석과 interactive plot 분석을 통해 확인하였다. 각 단백질들의 ACU(Area Under Curve)를 분석하여 가장 높은 ACU를 보이는 단백질부터 그 다음 AUC(Area under an ROC curve) 값을 보이는 단백질을 추가하는 방식으로 로지스틱 회귀분석 모델을 구성하였다. 로지스틱 회귀분석에서 종속 변수(dependent variable)는 정상대조군과 가습기 살균제 급성군 또는 정상대조군과 유지군을 적용하였으며, 독립 변수(independent variable)는 MRM 분석 결과 도출된 각 단백질들의 정량값을 사용하였다. 회귀분석 방법은 "Enter" 방법을 사용하였고, 분류표 임계값은 0.5로 설정하였으며, 최종 모델의 유의 수준($P < 0.01$)을 확인하였다.

[0067] **실험예 1: 혈액 총 단백질체의 비교 분석**

[0068] 급성군, 유지군 및 정상대조군의 혈액 내 단백질체를 동정한 결과, 도 1과 같이, 총 916종의 단백질체를 동정하였으며(급성군: 867종, 유지군: 694종, 정상대조군: 769종), 급성군에서만 동정된 단백질이 113종, 유지군에서만 동정된 단백질이 9종, 급성군 및 유지군에서 공통적으로 동정된 단백질이 25종인 것을 확인하였다.

[0070] 급성군에서만 특이적으로 동정된 단백질군, 유지군에서만 특이적으로 동정된 단백질군, 및 급성군과 유지군에서 공통적으로 동정된 단백질군에 대하여 PPD(plasma proteome database)의 단백질 정량 정보를 기준으로 하여 높은 농도를 보이는 상위 6개의 단백질들(총 18종)을 선별하였으며, transition을 결정한 결과, 검출 가능한 범위 내에 있으며 바이오마커로서 가능성이 높은 총 15종의 단백질들을 선별하였다.

[0071] 도 2와 같이, 정상대조군, 급성군 및 유지군 환자의 혈액에서, 15종의 단백질 중 SODE 단백질의 농도를 MRM 기법으로 상대 정량하였으며(왼쪽 패널), 정상대조군과 비교하였을 때, 급성군에서의 SODE의 농도를 ROC curve로 분석한 결과, AUC 값이 0.723임을 도출하였다(오른쪽 패널).

[0073] 도 3 내지 도 6과 같이, AUC 값이 가장 높은 단백질을 시작으로 하여 순차적으로 단백질을 추가하여 패널을 구축하였으며, AUC 값이 높은 상위 4종의 단백질(AUC > 0.66) 이후, p value가 좋지 않은 단백질들은 패널 모델에서 제외하였다. 이에, 세포외 슈퍼옥사이드 디스뮤타제(extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]), 폴리오바이러스 수용체(poliovirus receptor), 프로테오글리칸 4(proteoglycan 4) 및 뉴로트리민(neurotrimin)](ACU > 0.66)을 조합하여 패널을 구축한 결과, 민감도가 70.4%, 특이도가 100%, AUC 값이 0.811로 확인되었다. 상기 단백질 패널은 정상대조군으로부터 가습기 살균제 노출군을 감별하는 바이오마커로 활용될 수 있다.

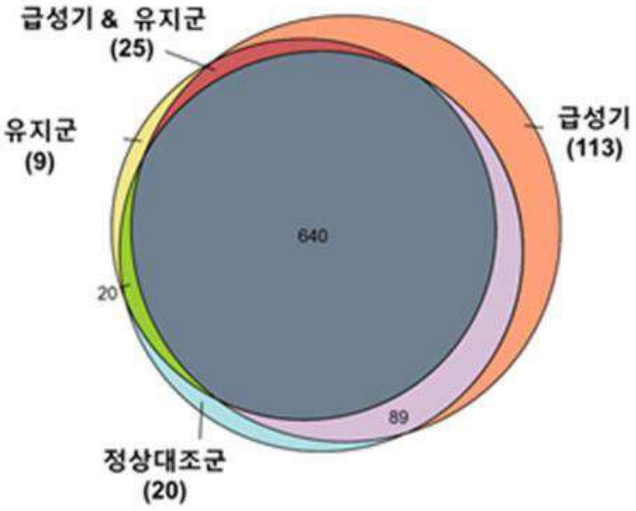
[0075] 또한, 도 3, 도 7 내지 도 9와 같이, AUC 값이 가장 높은 단백질을 시작으로 하여 순차적으로 단백질을 추가하여 패널을 구축하였으며, AUC 값이 높은 상위 5종의 단백질(AUC > >0.78) 이후, p value가 좋지 않은 단백질들은 패널 모델에서 제외하였다. 이에, 정상대조군과 유지군을 구분하는 단백질 중에서 민감도와 특이도가 우수한 5종의 단백질[알파-1B-당단백질(alpha-1B-glycoprotein), 저밀도 지질단백 수용체-관련 단백질 1(prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1), 프로테오글리칸 4(proteoglycan 4), 골지-관련 식물 발병-관련 단백질 1(golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1) 및 뉴로트리민(neurotrimin)](ACU > 0.78)을 조합하여 패널을 구축한 결과, 민감도가 95.1%, 특이도가 100%, AUC 값이 0.994로 확인되었다. 상기 단백질 패널은 정상대조군으로부터 가습기 살균제 유지군을 감별하는 바이오마커로 활용될 수 있다.

[0077] 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.

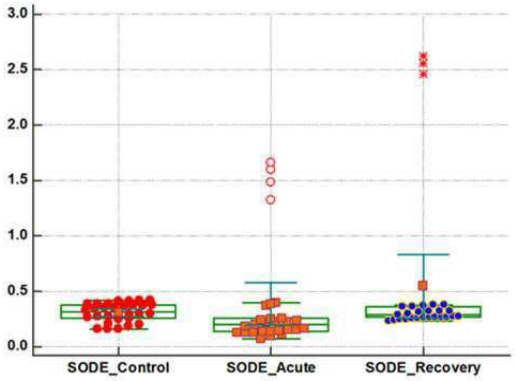
[0078] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

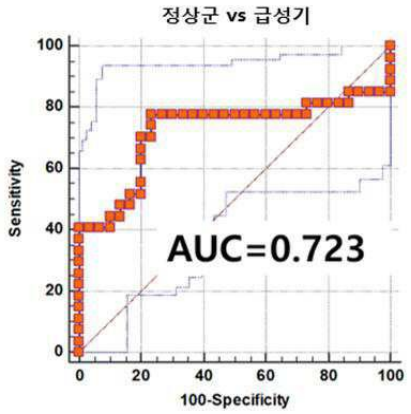
도면

도면1



도면2





도면3

정상군 vs 급성기	
Protein name	AUC
Defensin	0.559
Alpha-1B-glycoprotein	0.589
Fibronectin receptor subunit beta	0.510
Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]	0.723
Gamma-enolase	0.501
poliovirus receptor	0.719
Collagen alpha-1(V) chain	0.623
Proteasome subunit alpha type-2	0.626
Amyloid-like protein 1	0.576
Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	0.544
UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	0.609
Proteoglycan 4	0.679
Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1	0.510
Neurotrimin	0.669
Calcium-regulated heat-stable protein 1	0.567

정상군 vs 유지기	
Protein name	AUC
Defensin	0.738
Alpha-1B-glycoprotein	0.872
Fibronectin receptor subunit beta	0.632
Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]	0.525
Gamma-enolase	0.715
poliovirus receptor	0.526
Collagen alpha-1(V) chain	0.702
Proteasome subunit alpha type-2	0.569
Amyloid-like protein 1	0.570
Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	0.831
UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	0.677
Proteoglycan 4	0.789
Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1	0.781
Neurotrimin	0.873
Calcium-regulated heat-stable protein 1	0.588

도면4

정상군 vs 급성기	
Protein name	AUC
Defensin	0.559
Alpha-1B-glycoprotein	0.589
Fibronectin receptor subunit beta	0.510
Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]	0.723
Gamma-enolase	0.501
poliovirus receptor	0.719
Collagen alpha-1(V) chain	0.623
Proteasome subunit alpha type-2	0.626
Amyloid-like protein 1	0.576
Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	0.544
UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	0.609
Proteoglycan 4	0.679
Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1	0.510
Neurotrimin	0.669
Calcium-regulated heat-stable protein 1	0.567

Overall Model Fit

Null model -2 Log Likelihood	78.861
Full model -2 Log Likelihood	55.944
Chi-squared	22.917
DF	4
Significance level	P = 0.0001
Cox & Snell R^2	0.3311
Nagelkerke R^2	0.4418

Coefficients and Standard Errors

Variable	Coefficient	Std. Error	Wald	P
NTRI	1.10508	1.29079	0.7329	0.3919
PRG4	4.08640	4.06754	1.0093	0.3151
PVR	2.37296	1.33779	3.1463	0.0761
SODE	1.89255	1.11901	2.8604	0.0908
Constant	-3.75255	1.16520	10.3718	0.0013

Odds Ratios and 95% Confidence Intervals

Variable	Odds ratio	95% CI
NTRI	3.0195	0.2405 to 37.9031
PRG4	59.5250	0.0205 to 172608.5960
PVR	10.7291	0.7795 to 147.6764
SODE	6.6363	0.7403 to 59.4905

도면5

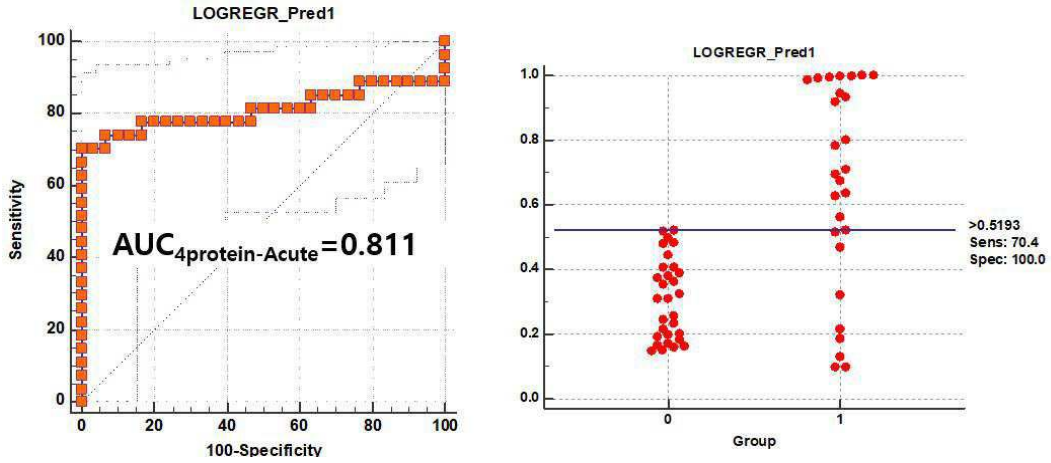
Classification table (cut-off value p=0.5)

Actual group	Predicted group		Percent correct
	0	1	
Y = 0	28	2	93.33%
Y = 1	7	20	74.07%
Percent of cases correctly classified			84.21%

ROC curve analysis

Area under the ROC curve (AUC)	0.811
Standard Error	0.0681
95% Confidence interval	0.686 to 0.903

도면6



도면7

정상군 vs 유지기	
Protein name	AUC
Defensin	0.738
Alpha-1B-glycoprotein	0.872
Fibronectin receptor subunit beta	0.632
Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]	0.525
Gamma-enolase	0.715
poliovirus receptor	0.526
Collagen alpha-1(V) chain	0.702
Proteasome subunit alpha type-2	0.569
Amyloid-like protein 1	0.570
Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	0.831
UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	0.677
Proteoglycan 4	0.789
Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1	0.781
Neurotrimin	0.873
Calcium-regulated heat-stable protein 1	0.588

Null model -2 Log Likelihood	62.183
Full model -2 Log Likelihood	9.183
Chi-squared	53.000
DF	5
Significance level	P < 0.0001
Cox & Snell R^2	0.6920
Nagelkerke R^2	0.9241

Coefficients and Standard Errors

Variable	Coefficient	Std. Error	Wald	P
NTRI	9.36477	5.61857	2.7781	0.0956
GAPR1	4.51358	26.42768	0.02917	0.8644
PRG4	-5.73839	7.95081	0.5209	0.4705
LRP1	-2.65109	14.30566	0.03434	0.8530
A1BG	2.06663	1.18245	3.0547	0.0805
Constant	-39.10902	21.09396	3.4375	0.0637

Odds Ratios and 95% Confidence Intervals

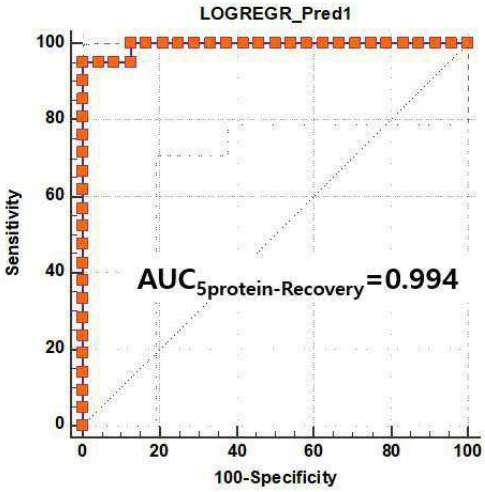
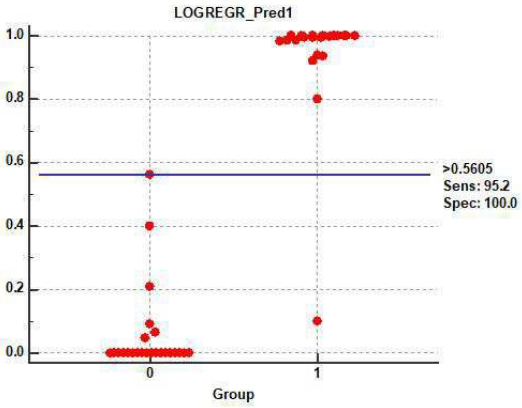
Variable	Odds ratio	95% CI
NTRI	11669.9529	0.1925 to 707441393.5610
GAPR1	91.2481	2.9142E-021 to 2.8571E+024
PRG4	0.0032	5.4952E-010 to 18867.3709
LRP1	0.0706	4.6927E-014 to 106E+009
A1BG	7.8982	0.7781 to 80.1764

도면8

Classification table (cut-off value p=0.5)

Actual group	Predicted group		Percent correct
	0	1	
Y = 0	23	1	95.83%
Y = 1	1	20	95.24%
Percent of cases correctly classified			95.56%

ROC curve analysis

Area under the ROC curve (AUC)	0.994
Standard Error	0.00734
95% Confidence interval	0.910 to 1.000

도면9