



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년12월07일

(11) 등록번호 10-2610577

(24) 등록일자 2023년12월01일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) C12Q 1/6883 (2018.01)
- (52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
C12Q 1/6883 (2022.01)
- (21) 출원번호 10-2021-0148260
- (22) 출원일자 2021년11월01일
심사청구일자 2021년11월01일
- (65) 공개번호 10-2023-0064006
- (43) 공개일자 2023년05월10일
- (56) 선행기술조사문헌
KR101354023 B1*
Hyokyoun Won et al., Mol Cell Toxicol., 2014, Vol. 10, pp 181-195. 1부.*
Yu Ri An et al., Mol Cell Toxicol., 2011, Vol. 7, pp 399-403. 1부.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
동국대학교 산학협력단
서울특별시 중구 필동로1길 30 (필동3가, 동국대학교)
연세대학교 원주산학협력단
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1
- (72) 발명자
성정석
서울특별시 송파구 잠실로 62, 328동 404호(잠실동, 트리지움)
안연순
강원도 원주시 천사로 189, 102동 1002호(일산동, 두진하트리움시티)
김민
경기도 고양시 일산동구 위시타3로 110, 106동 1801호(식사동, 일산자이2차)
- (74) 대리인
이명진

전체 청구항 수 : 총 14 항

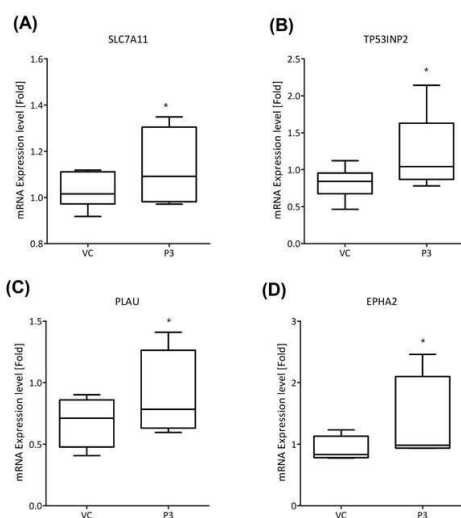
심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 페놀 노출 여부 평가용 바이오마커 및 이를 이용한 페놀 노출 여부 평가 방법

(57) 요약

본 발명은 페놀(phenol) 노출 여부 평가용 바이오마커 및 이를 이용한 페놀(phenol) 노출 여부 평가 방법 등에 관한 것으로, 본 발명에 따른 SLC7A11(Solute carrier family 7 member 11), TP53INP2(Tumor protein p53-inducible nuclear protein 2), PLAU(Plasminogen Activator, Urokinase), 및 EPHA2(EPH receptor A2) 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준을 이용하여 평가 대상의 연령에 따라 페놀 노출 여부를 높은 정확성을 가지고 간편하게 평가할 수 있으므로 페놀 노출로 인한 위해성, 그로 인한 질병 발생 가능성에 대한 구체적인 정보를 제공할 수 있어 페놀 노출에 대한 적절한 대책 및 관리를 수행하는데 유용하게 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/158 (2013.01)

G01N 2800/40 (2013.01)

G01N 2800/56 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345317411

과제번호 2017R1D1A1B03030983

부처명 교육부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(교육부)(R&D)

연구과제명 면역조절인자 케모카인 활용을 통한 인간 중간엽 줄기세포의 분화기능 촉진 치료요

법 적용 기술 연구

기 여 율 80/100

과제수행기관명 동국대학교

연구기간 2017.03.01 ~ 2020.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1485017623

과제번호 ARQ201703101005

부처명 환경부

과제관리(전문)기관명 한국환경산업기술원

연구사업명 화학사고대응환경기술개발사업(R&D)

연구과제명 화학사고 후 인체영향 평가기술 개발

기 여 율 20/100

과제수행기관명 연세대학교 원주산학협력단

연구기간 2017.04.20 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 SLC7A11(Solute carrier family 7 member 11), TP53INP2(Tumor protein p53-inducible nuclear protein 2), PLAU(Plasminogen Activator, Urokinase), 및 EPHA2(EPH receptor A2)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 SLC7A11, TP53INP2, PLAU, 또는 EPHA2 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준을 대조군과 비교하여 폐놀 노출 여부를 평가하는 단계를 포함하는, 폐놀 노출 여부 평가 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 혈액, 폐포세척액, 폐 조직, 타액(saliva), 분변 및 소변으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 (a) 단계에서, 생물학적 시료가 혈액이고,

상기 (b) 단계에서, SLC7A11, TP53INP2, PLAU, 및 EPHA2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준이 대조군과 비교하여 증가된 경우, 폐놀에 노출된 것으로 평가하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 (a) 단계에서, 상기 생물학적 시료는 폐 조직이고,

상기 피검체는 인간을 포함한 포유류로 성숙기의 개체이고,

상기 (b) 단계에서, PLAU 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준이 대조군과 비교하여 증가된 경우 폐놀에 노출된 것으로 평가하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 5

제2항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 폐 조직이고,

상기 (a) 단계에서, 상기 피검체는 인간을 포함한 포유류로 발육기의 개체이고,

상기 (b) 단계에서, TP53INP2 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준이 대조군과 비교하여 증가된 경우 폐놀 노출의 초기 단계인 것으로 평가; 또는

상기 (a) 단계에서, 피검체는 인간을 포함한 포유류로 성숙기의 개체이고,

상기 (b) 단계에서, TP53INP2 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준이 대조군과 비교하여 증가된 경우 페놀에 노출된 것으로 평가하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 6

제2항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 폐 조직이고,

상기 (a) 단계에서, 피검체는 인간을 포함한 포유류로 발육기의 개체이고,

상기 (b) 단계에서, SLC7A11 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준이 대조군과 비교하여 증가된 경우 페놀에 노출된 것으로 평가하거나; 또는

상기 (a) 단계에서, 피검체는 인간을 포함한 포유류로 성숙기의 개체이고,

상기 (b) 단계에서, SLC7A11 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준이 대조군과 비교하여 감소된 경우 페놀 노출의 초기 단계인 것으로 평가하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 7

제2항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 폐 조직이고,

상기 (a) 단계에서, 피검체는 인간을 포함한 포유류로 발육기의 개체이고,

상기 (b) 단계에서, EPHA2 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준이 대조군과 비교하여 증가된 경우 페놀 노출의 초기 단계인 것으로 평가하거나; 또는

상기 (a) 단계에서, 피검체는 인간을 포함한 포유류로 성숙기의 개체이고,

상기 (b) 단계에서, EPHA2 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준이 대조군과 비교하여 증가된 경우 페놀에 노출된 것으로 평가하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 단백질 발현 수준은 웨스턴 블랏, ELISA, 방사선면역분석, 방사선 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법 (Ouchterlony immunodiffusion), 로케트 면역전기영동(Rocket immunoelectrophoresis), 면역염색법, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, 질량분석법(Mass spectrometry), FACS, 및 단백질칩으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법으로 측정되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 mRNA 발현 수준은 PCR, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅(northern blotting), 서던 블랏팅(southern blotting), In situ 교잡법, 및 DNA 칩으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법으로 측정되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 10

SLC7A11(Solute carrier family 7 member 11), TP53INP2(Tumor protein p53-inducible nuclear protein 2),

PLAU(Plasminogen Activator, Urokinase), 및 EPHA2(EPH receptor A2)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 페놀 노출 여부 평가용 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적인 항체 또는 앵타머인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트 또는 프로브인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 13

제10항 내지 제12항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 페놀 노출 여부 평가용 키트.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 키트는 하기 단계를 포함하는 페놀 노출 여부 평가 방법이 기재된 설명서를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 페놀 노출 여부 평가용 키트:

(a) 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 SLC7A11(Solute carrier family 7 member 11), TP53INP2(Tumor protein p53-inducible nuclear protein 2), PLAU(Plasminogen Activator, Urokinase), 및 EPHA2(EPH receptor A2)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 SLC7A11, TP53INP2, PLAU, 또는 EPHA2 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준을 대조군과 비교하여 페놀 노출 여부를 평가하는 단계.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 페놀(phenol) 노출 여부 평가용 바이오마커 및 이를 이용한 페놀(phenol) 노출 여부 평가 방법 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 페놀(phenol)은 페닐기($-C_6H_5$)에 하이드록시기($-OH$)가 결합한 방향족 화합물로, 환경부에서 유해화학물질관리법 상 유독물로 지정하여 수입신고 및 영업등록을 하도록 권고하고 있으며 관리기준을 지정하고 있다. 또한, 수질 및 수생태계 보전에 관한 법률 시행규칙 제34조 별표 13 및 토양환경보전법 제4조의 2와 제16조에 따라 페놀의 배출 허용기준과 토양오염기준 등을 별도로 설정하여 관리하고 있다.

[0004] 페놀은 주로 비스페놀 A와 페놀수지의 원료로써 사용되며, 강력한 살균작용 및 소독작용을 할 수 있어 병원에서 배설물을 소독하는 용도 등으로 사용되고 있다. 비스페놀 A는 아세톤과 페놀을 합성한 것으로, CD, 주택 자재, 자동차 부품 등에 사용되는 폴리카보네이트 수지나 전기 및 전자 부품, 도료, 접착제 등에 사용되는 에폭시 수

지 등의 원료로서 사용되고, 페놀과 포름알데히드를 합성한 페놀수지는 전기 부품, 기계 부품, 자동차 부품의 주형, 목재 가공의 접착제 및 단열재 등에 사용된다. 환경 중에 존재하는 페놀은 주로 화학제품의 생산과정이나 이 물질을 함유한 제품의 사용과정에서 배출된 것으로 알려져 있으며, 이렇게 대기 및 환경에 배출된 페놀은 호흡기 및 피부접촉 등을 통해 체내로 흡수될 수 있으므로, 산업시설의 근로자들뿐만 아니라 산업단지 인근 주민들도 페놀 노출 피해가 있을 수 있다.

[0005] 우리나라에서는 페놀을 사고대비물질로 지정하여 엄격히 규제하고 있지만, 페놀이 유출되는 화학사고는 꾸준히 발생하고 있는 실정이다.

[0006] 화학사고로 페놀에 급성 노출될 경우, 주로 호흡기, 피부 및 소화기를 통하여 급속하게 페놀이 흡수되며, 호흡기를 통해 8시간 동안 페놀에 노출될 경우 페놀의 70~80%가 흡수되고, 페놀 증기에 6시간 동안 전신 노출될 경우 페놀의 70~80%가 피부를 통하여 흡수되는 것으로 알려져 있다. 체내로 흡수된 페놀은 모든 조직에 신속하게 분포되며, 쥐에게 페놀 207 mg/kg을 단회 경구 투여 했을 때 조직과 혈장 사이의 최고 농도비는 42%로 간에서 가장 높았고, 그 다음으로 비장, 신장 부신, 갑상선, 폐 순이었으며, 조직 최고 농도는 노출 30분 후였다는 연구결과가 있다. 체내 흡수된 페놀은 글루쿠론산과 결합하여 페닐글루쿠로니드가 되고 항산화 과정에서 황산 페닐이 되는 것을 주요 대사 경로로 하며, 황산염과 글루쿠론 대사산물은 간에서 생성된 후 담낭으로 전달되거나 혈액으로 돌아간 뒤, 소변이나 대변을 통해 체내 밖으로 배출되는 것으로 알려져 있다.

[0007] 현재 우리나라에서는 산업안전보건법에 의하여 페놀에 대한 특수 건강진단과 작업환경측정을 통해 사업장 및 노출근로자에 대해 관리를 하고 있지만 선별검사방법이 비특이적인 문제가 있다. 예를들어, 소변에서 페놀 농도가 정상보다 높은 경우, 페놀 또는 체내에서 페놀로 변환되는 물질에 최근에 노출되었음을 나타내는 것일 수 있으나, 소변에서 페놀 및/또는 그 대사 산물이 검출되었다고 해서 해당 노출로 인해 어떤 건강상 부작용이 발현될지는 예측할 수는 없다. 이에 따라, 장기적으로 간편하게 진단할 수 있으며, 사후 대응 및 지속적 관찰이 가능하도록 각 산업유해물질에 대한 노출로 발생하는 유전자 발현 변화를 분석할 필요가 있으며, 나아가, 산업유해물질을 다루는 근로자들로부터 저농도 만성노출에 대한 생물학적 지표를 확보하여 급성 노출뿐만 아니라 만성 노출에 의한 피해도 예방할 수 있도록 매뉴얼을 확보할 필요가 있다.

[0008] 또한, 유해화학물질 노출에 따른 반응은 연령에 따라 차이가 있으며, 특히 신경계, 호흡기계, 생식기계 및 면역계가 완전히 발달하지 않은 상태로 급속하게 신체 성장과 체내 기관이 발달하는 아동의 경우, 유해물질에 대한 위장관에서의 흡수 속도가 성인들보다 더 빠르고, 대사 체계가 발달되지 못해 체내에 들어온 오염물질들을 해독하여 체외로 배출하지 못하므로 오염물질에 대한 노출에 더 취약한 것으로 알려져 있다. 이와 같이 성인과 달리 아동 및 청소년과 같은 취약계층은 신체 특성상 유해물질 노출에 의한 건강 문제와 질병 발생에 있어 성인보다 민감하게 반응함에도 불구하고, 현재 연구되고 있는 유해물질 노출 관련 바이오마커는 대부분 성인을 대상으로 연구되고 있으며, 관련 연구가 매우 부족한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1079714호
(특허문헌 0002) 대한민국 등록특허 제10-1460529호
(특허문헌 0003) 대한민국 등록특허 제10-0967547호
(특허문헌 0004) 대한민국 등록특허 제10-0968762호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술상의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 폐 조직 또는 혈액 시료를 이용하여 SLC7A11(Solute carrier family 7 member 11), TP53INP2(Tumor protein p53-inducible nuclear protein 2), PLAU(Plasminogen Activator, Urokinase), 및/또는 EPHA2(EPH receptor A2) 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준을 확인함으로써, 페놀 노출 여부를 평가하는 방법 등을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

[0012] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 SLC7A11(Solute carrier family 7 member 11), TP53INP2(Tumor protein p53-inducible nuclear protein 2), PLAU(Plasminogen Activator, Urokinase), 및 EPHA2(EPH receptor A2)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 SLC7A11, TP53INP2, PLAU, 또는 EPHA2 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준을 대조군과 비교하여 폐놀 노출 여부를 평가하는 단계를 포함하는, 폐놀 노출 여부 평가 방법을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 생물학적 시료는 혈액, 폐포세척액, 폐 조직, 타액(saliva), 분변 및 소변으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0016] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 (a) 단계에서, 생물학적 시료가 혈액이고, 상기 (b) 단계에서, SLC7A11, TP53INP2, PLAU, 및 EPHA2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준이 대조군과 비교하여 증가된 경우, 폐놀에 노출된 것으로 평가할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 생물학적 시료는 폐 조직이고, 상기 (a) 단계에서, 상기 피검체는 인간을 포함한 포유류로 성숙기의 개체이고, 상기 (b) 단계에서, PLAU 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준이 대조군과 비교하여 증가된 경우 폐놀에 노출된 것으로 평가할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 생물학적 시료는 폐 조직이고, 상기 (a) 단계에서, 상기 피검체는 인간을 포함한 포유류로 발육기의 개체이고, 상기 (b) 단계에서, TP53INP2 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준이 대조군과 비교하여 증가된 경우 폐놀 노출의 초기 단계인 것으로 평가하거나; 또는 상기 (a) 단계에서, 피검체는 인간을 포함한 포유류로 성숙기의 개체이고, 상기 (b) 단계에서, TP53INP2 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준이 대조군과 비교하여 증가된 경우 폐놀에 노출된 것으로 평가할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 생물학적 시료는 폐 조직이고, 상기 (a) 단계에서, 피검체는 인간을 포함한 포유류로 발육기의 개체이고, 상기 (b) 단계에서, SLC7A11 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준이 대조군과 비교하여 증가된 경우 폐놀에 노출된 것으로 평가하거나; 또는 상기 (a) 단계에서, 피검체는 인간을 포함한 포유류로 성숙기의 개체이고, 상기 (b) 단계에서, SLC7A11 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준이 대조군과 비교하여 감소된 경우 폐놀 노출의 초기 단계인 것으로 평가할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 생물학적 시료는 폐 조직이고, 상기 (a) 단계에서, 피검체는 인간을 포함한 포유류로 발육기의 개체이고, 상기 (b) 단계에서, EPHA2 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준이 대조군과 비교하여 증가된 경우 폐놀 노출의 초기 단계인 것으로 평가하거나; 또는 상기 (a) 단계에서, 피검체는 인간을 포함한 포유류로 성숙기의 개체이고, 상기 (b) 단계에서, EPHA2 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준이 대조군과 비교하여 증가된 경우 폐놀에 노출된 것으로 평가할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 단백질 발현 수준은 웨스턴 블랏, ELISA, 방사선면역분석, 방사선 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법(Ouchterlony immunodiffusion), 로케트 면역전기영동(Rocket immunoelectrophoresis), 면역염색법, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, 질량분석법(Mass spectrometry), FACS, 및 단백질칩으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법으로 측정될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 mRNA 발현 수준은 PCR, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅(northern blotting), 서던 블랏팅(southern blotting), In situ 교잡법, 및 DNA 칩으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법으로 측정될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0023] 또한, 본 발명은 SLC7A11(Solute carrier family 7 member 11), TP53INP2(Tumor protein p53-inducible nuclear protein 2), PLAU(Plasminogen Activator, Urokinase), 및 EPHA2(EPH receptor A2)로 이루어진 군으

로부터 선택되는 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 페놀 노출 여부 평가용 조성물을 제공한다.

[0024] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 조성물을 포함하는, 페놀 노출 여부 평가용 키트를 제공한다.

[0025] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적인 항체 또는 앵타머일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0026] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트 또는 프로브일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0027] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 키트는 본 발명에 따른 페놀 노출 여부 평가 방법이 기재된 설명서를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

발명의 효과

[0029] 본 발명에 따른 SLC7A11(Solute carrier family 7 member 11), TP53INP2(Tumor protein p53-inducible nuclear protein 2), PLAU(Plasminogen Activator, Urokinase), 및 EPHA2(EPH receptor A2) 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준을 이용하여 평가 대상의 연령에 따라 페놀 노출 여부를 높은 정확성을 가지고 간편하게 평가할 수 있으므로 페놀 노출로 인한 위해성, 그로 인한 질병 발생 가능성에 대한 구체적인 정보를 제공할 수 있어 페놀 노출에 대한 적절한 대책 및 관리를 수행하는데 유용하게 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 페놀에 노출된 인간 폐 세포에서 발현이 유의미하게 변화한 단백질들 간의 관계를 나타낸 도면이다.

도 2는 본 발명의 일 실험예에 따른 동물 실험의 흐름도를 나타낸 도면이다.

도 3a 내지 도 3b는 페놀에 노출된 발육기 래트(a)와 성숙기 래트(b)의 폐 조직에서 SLC7A11의 유전자 mRNA 발현량을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 4a 내지 도 4b는 페놀에 노출된 발육기 래트(a)와 성숙기 래트(b)의 폐 조직에서 TP53INP2의 유전자 mRNA 발현량을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 5a 내지 도 5b는 페놀에 노출된 발육기 래트(a)와 성숙기 래트(b)의 폐 조직에서 PLAU의 유전자 mRNA 발현량을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 6a 내지 도 6b는 페놀에 노출된 발육기 래트(a)와 성숙기 래트(b)의 폐 조직에서 EPHA2의 유전자 mRNA 발현량을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 7은 페놀에 노출된 래트의 혈액에서 SLC7A11, TP53INP2, PLAU, 및 EPHA2의 유전자 mRNA 발현량을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 본 발명자들은 페놀 노출 여부를 평가 대상의 연령에 따라 간단하면서 정확하게 확인할 수 있도록 하는 유전자 마커를 개발하기 위해 연구한 결과, 페놀 노출된 발육기 래트와 성숙기 래트의 혈액 및 폐 조직에서 SLC7A11(Solute carrier family 7 member 11), TP53INP2(Tumor protein p53-inducible nuclear protein 2), PLAU(Plasminogen Activator, Urokinase), 및 EPHA2(EPH receptor A2)의 유전자 mRNA의 발현이 유의미하게 증가 또는 감소하는 것을 확인함으로써 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

[0034] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0036] 본 발명은 (a) 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 SLC7A11(Solute carrier family 7 member 11), TP53INP2(Tumor protein p53-inducible nuclear protein 2), PLAU(Plasminogen Activator, Urokinase), 및 EPHA2(EPH receptor A2)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 SLC7A11, TP53INP2, PLAU, 또는 EPHA2 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준을 대조군과 비교하여 페놀 노출 여부를 평가하는 단계를 포함하는, 페놀 노출 여부 평가 방법을 제공한다.

[0037] 본 명세서에 있어서, "피검체"는 인간을 포함한 포유류로 페놀에 노출됐거나 노출된 것으로 의심되는 발육기의

개체 또는 성숙기의 개체일 수 있으며, 본 발명의 일 실험예에 따르면, 상기 개체는 래트(Rat)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0038] 상기 "발육기의 개체"란 성장 과정에 있어 체내 기관이 완전히 발달되지 않은 상태의 개체를 의미하는 것으로, 인간의 경우, 만 19세 미만의 아동 및 청소년을 의미할 수 있으며, 본 발명의 일 실험예에 따르면, 래트의 경우 3 내지 8주령의 래트를 의미할 수 있다. 또한, 상기 "성숙기의 개체"란 성장이 완료되어 체내 기관이 모두 발달한 상태의 개체를 의미하는 것으로, 인간의 경우, 만 19세 이상의 성인을 의미할 수 있으며, 본 발명의 일 실험예에 따르면, 래트의 경우, 9 내지 14주령의 래트일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0039] 본 명세서에 있어서 "생물학적 시료(biological sample)"란, 폐놀 노출 여부 확인이 필요한 피검체로부터 채취한 것으로, 바람직하게는 혈액, 폐포세척액, 폐 조직, 타액(saliva), 분변 및 소변 등일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 혈액 및 폐 조직 등이나, SLC7A11, TP53INP2, PLAU, 및 EPHA2로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 단백질 또는 mRNA의 발현 또는 활성 수준을 측정할 수 있는 시료라면 이에 제한되지 않는다.
- [0040] 또한, 상기 생물학적 시료는 검출 또는 진단에 사용하기 전에 전처리할 수 있다. 예를 들어, 균질화(homogenization), 여과, 증류, 추출, 농축, 방해 성분의 불활성화, 시약의 첨가 등을 포함할 수 있다. 상기 시료는 단백질 마커의 탐지 감도를 증가시키도록 준비될 수 있는데, 예를 들어 피검체로부터 수득한 시료는 음이온 교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피, 크기별 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography), 액체 크로마토그래피, 연속추출(sequential extraction) 또는 젤 전기영동 등의 방법을 이용하여 전처리될 수 있다.
- [0041] 본 명세서에 있어서, "대조군(control)"은 폐놀에 노출되지 않은 건강한 발육기의 개체 또는 성숙기의 개체를 의미한다.
- [0042] 본 명세서에 있어서, "평가"는 폐놀 노출 여부를 확인하는 것을 의미하는 것으로, 본 발명의 목적상 상기 평가는 SLC7A11, TP53INP2, PLAU, 및 EPHA2로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준 정도를 확인하여 평가 대상의 연령별 및/또는 폐놀 노출 후 시간 경과별로 구분하여 폐놀 노출 여부를 확인하는 것을 포함하는 의미이다.
- [0043] 본 발명의 일 실험예에 따르면, 폐놀 노출 후 1일차의 성숙기 래트의 혈액에서 SLC7A11, TP53INP2, PLAU 및 EPHA2의 유전자 mRNA의 발현량이 증가한 것을 확인하였다 (실험예 2-3 및 도 7 참조).
- [0044] 따라서, 본 발명에 따른 폐놀 노출 여부 평가 방법에 있어서, 상기 (a) 단계에서, 생물학적 시료가 혈액이고, 상기 (b) 단계에서, SLC7A11, TP53INP2, PLAU, 및 EPHA2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준이 대조군과 비교하여 증가된 경우, 폐놀에 노출된 것으로 평가할 수 있으며, 바람직하게는, 상기 생물학적 시료는 성숙기의 개체로부터 분리된 시료일 수 있고, 상기 (b) 단계에서, SLC7A11, TP53INP2, PLAU, 및 EPHA2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준이 대조군과 비교하여 증가된 경우, 폐놀 노출의 초기 단계인 것으로 평가할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0045] 또한, 본 발명의 일 실험예에 따르면, 유전자 SLC7A11의 래트 폐 조직에서 발현량은 발육기 래트의 경우 폐놀 노출 후 1일차 및 7일차에서 증가하였고, 성숙기 래트의 경우 폐놀 노출 후 1일차에 감소한 것을 확인할 수 있었다 (실험예 2-2 및 도 3a 내지 도 3b 참조).
- [0046] 따라서, 본 발명에 있어서, 상기 방법은, 상기 생물학적 시료는 폐 조직이고,
- [0047] 상기 (a) 단계에서, 피검체는 인간을 포함한 포유류로 발육기의 개체이고, 상기 (b) 단계에서, SLC7A11 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준이 대조군과 비교하여 증가된 경우 폐놀에 노출된 것으로 평가하거나; 또는
- [0048] 상기 (a) 단계에서, 피검체는 인간을 포함한 포유류로 성숙기의 개체이고, 상기 (b) 단계에서, SLC7A11 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준이 대조군과 비교하여 감소된 경우 폐놀 노출의 초기 단계인 것으로 평가할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0049] 또한, 본 발명의 일 실험예에 따르면, 유전자 TP53INP2의 래트 폐 조직에서 발현량은 발육기 래트의 경우 폐놀 노출 후 1일차에 증가하였으나 7일차에는 유의미한 변화가 나타나지 않았고, 성숙기 래트의 경우 폐놀 노출 후 1일차 및 7일차에 증가한 것을 확인할 수 있었다 (실험예 2-2 및 도 4a 내지 도 4b 참조).

- [0050] 따라서, 본 발명에 있어서, 상기 방법은, 상기 생물학적 시료는 폐 조직이고,
- [0051] 상기 (a) 단계에서, 상기 피검체는 인간을 포함한 포유류로 발육기의 개체이고, 상기 (b) 단계에서, TP53INP2 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준이 대조군과 비교하여 증가된 경우 폐놀 노출의 초기 단계인 것으로 평가하거나; 또는
- [0052] 상기 (a) 단계에서, 피검체는 인간을 포함한 포유류로 성숙기의 개체이고,
- [0053] 상기 (b) 단계에서, TP53INP2 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준이 대조군과 비교하여 증가된 경우 폐놀에 노출된 것으로 평가할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0054] 또한, 본 발명의 일 실험예에 따르면, 유전자 PLAU의 래트 폐 조직에서 발현량은 발육기 래트의 경우 유의미한 변화를 나타내지 않았고, 성숙기 래트의 경우, 폐놀 노출 후 1일차 및 7일차에 증가한 것을 확인할 수 있었다 (실험예 2-2 및 도 5a 내지 도 5b 참조).
- [0055] 따라서, 본 발명에 있어서, 상기 방법은, 상기 생물학적 시료는 폐 조직이고,
- [0056] 상기 (a) 단계에서, 상기 피검체는 인간을 포함한 포유류로 성숙기의 개체이고, 상기 (b) 단계에서, PLAU 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준이 대조군과 비교하여 증가된 경우 폐놀에 노출된 것으로 평가할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0057] 또한, 본 발명의 일 실험예에 따르면, 유전자 EPHA2의 래트 폐 조직에서 발현량은 발육기 래트의 경우, 1일차에 증가하였고, 성숙기 래트의 경우, 폐놀 노출 후 1일차 및 7일차에 증가한 것을 확인할 수 있었다 (실험예 2-2 및 도 6a 내지 도 6b 참조).
- [0058] 따라서, 본 발명에 있어서, 상기 방법은, 상기 생물학적 시료는 폐 조직이고,
- [0059] 상기 (a) 단계에서, 피검체는 인간을 포함한 포유류로 발육기의 개체이고, 상기 (b) 단계에서, EPHA2 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준이 대조군과 비교하여 증가된 경우 폐놀 노출의 초기 단계인 것으로 평가하거나; 또는
- [0060] 상기 (a) 단계에서, 피검체는 인간을 포함한 포유류로 성숙기의 개체이고, 상기 (b) 단계에서, EPHA2 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준이 대조군과 비교하여 증가된 경우 폐놀에 노출된 것으로 평가할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0061] 상기 "폐놀 노출의 초기 단계"란 호흡기, 소화기 및 피부 등으로 흡수된 폐놀이 대사경로 등을 거쳐 체외로 모두 배출되기에는 노출 후 많은 시간이 경과되지 않아 폐놀 또는 폐놀의 대사체가 잔류하는 상태나 배출된 직후의 상태를 의미하는 것으로, 인간의 경우 폐놀 노출 후 1 내지 5일 경과된 것을 의미할 수 있으며, 본 발명의 일 실험예에 따르면, 래트의 경우 폐놀 노출의 초기 단계란 폐놀 노출 후 1 내지 3일 경과된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0062] 나아가, 본 발명의 일 실험예에 따르면, 유전자 SLC7A11, TP53INP2, PLAU, 및 EPHA2의 발현량은 폐놀 노출 후 1일차의 성숙기 래트의 폐 조직에서 저농도의 폐놀 노출(저농도 처리군, P1)에도 불구하고 유의미한 변화를 나타내는 것을 확인할 수 있었다 (실험예 2-2, 도 3b, 도 4b, 도 5b, 및 도 6b 참조). 따라서, 본 발명에 있어서, 상기 방법은 특히, 폐놀 노출 초기 단계의 성숙기 개체에 대한 폐놀 노출 여부를 평가하는데 유용하게 이용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0063] 본 발명에서 사용되는 용어 "저농도"란 폐놀에 노출되더라도 개체에서 육안으로 관찰할 수 있는 건강장애를 일으키지 않는 수준의 농도를 의미하며, "고농도"란 개체에 폐놀을 경구투여 시, 생존율이 50퍼센트(LC50)가 되는 농도를 의미하고, "중농도"란 저농도와 고농도의 중간 값으로 개체마다 상이하나, 육안으로 관찰할 수 있는 건강장애가 있을 수도, 없을 수도 있는 농도를 의미한다. 본 발명의 일 실험예에 따르면, 래트의 경우, 저농도는 100 내지 150 mg/kg, 중농도는 230 내지 270 mg/kg, 고농도는 480 내지 520 mg/kg 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0064] 본 발명에서 "단백질"은 "폴리펩타이드(polypeptide)" 또는 "펩타이드(peptide)"와 호환성 있게 사용되며, 예컨대, 자연 상태의 단백질에서 일반적으로 발견되는 바와 같이 아미노산 잔기의 중합체를 말한다. "폴리뉴클레오티드(polynucleotide)" 또는 "핵산"은 단일-또는 이중-가닥의 형태로 된 데옥시리보뉴클레오티드(DNA) 또는 리보뉴클레오티드(RNA)를 말한다. 다른 제한이 없는 한, 자연적으로 생성되는 뉴클레오티드와 비슷한 방법으로 핵산에 혼성화되는 자연적 뉴클레오티드의 공지된 아날로그도 포함된다. "mRNA"는 단백질 합성 과정에서 특정 유

전자로부터 아미노산 서열을 특정하게 되는 리보솜으로 유전 정보(유전자 특이적 염기 서열)를 전달하는 RNA를 의미한다.

- [0065] 본 발명에 있어서, 상기 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 방법은 당업계에 공지된 mRNA 측정 방법에 의한 것이라면 측정 방법에 특별한 제한은 없으나, PCR, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅(northern blotting), 서던 블랏팅(southern blotting), In situ 교잡법, 및 DNA 칩으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법으로 측정할 수 있다.
- [0066] 또한, 본 발명에 있어서, 상기 유전자의 단백질 발현 수준을 측정하는 방법은 당업계에 공지된 단백질 측정 방법에 의한 것이라면 측정 방법에 특별한 제한은 없으나, 웨스턴 블랏, ELISA, 방사선면역분석, 방사선 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법(Ouchterlony immunodiffusion), 로케트 면역전기영동(Rocket immunoelectrophoresis), 면역염색법, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, 질량분석법(Mass spectrometry), FACS, 및 단백질 칩으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법으로 측정할 수 있다.
- [0067] 또한, 본 발명은 SLC7A11(Solute carrier family 7 member 11), TP53INP2(Tumor protein p53-inducible nuclear protein 2), PLAU(Plasminogen Activator, Urokinase), 및 EPHA2(EPH receptor A2)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질 또는 이의 mRNA의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 제형 노출 여부 평가용 조성물을 제공한다.
- [0068] 본 발명의 조성물이 mRNA의 발현 수준을 측정하기 위한 것인 경우에 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제는 mRNA에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트 또는 프로브일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0069] 상기 SLC7A11, TP53INP2, PLAU, 및/또는 EPHA2의 mRNA에 특이적인 프라이머 세트 또는 프로브를 포함하는 본 발명의 조성물은 공지된 RNA를 감지하는 방법에 필요한 제제를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물을 이용하여 공지된 RNA를 감지하는 방법을 제한 없이 사용함으로써 피검체에서 상기 바이오 마커들의 mRNA의 수준을 측정할 수 있다.
- [0070] 본 발명에 있어서, 상기 프라이머 세트는 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 이루어진 SLC7A11 검출용 프라이머 세트, 서열번호 3 및 서열번호 4로 표시되는 염기서열로 이루어진 PLAU 검출용 프라이머 세트, 서열번호 5 및 서열번호 6로 표시되는 염기서열로 이루어진 TP53INP2 검출용 프라이머 세트, 서열번호 7 및 서열번호 8로 표시되는 염기서열로 이루어진 EPHA2 검출용 프라이머 세트로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0071] 본 명세서에 있어서, "프라이머(Primer)"는 짧은 자유 3말단 수산화기를 가지는 핵산 서열로 상보적인 주형(template)과 염기쌍을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 중합효소 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다.
- [0072] 본 명세서에 있어서, "프로브(Probe)"란 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧은 것은 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 표지(labeling)되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고 뉴클레오타이드 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [0073] 상기 "프라이머" 또는 "프로브"는 포스포아미다이트(phosphoramidite) 고체지지체 합성법이나 기타 널리 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 또한 프라이머 또는 프로브는 mRNA와의 혼성화를 방해하지 않는 범위에서 당해 기술 분야에 공지된 방법에 따라 다양하게 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 예로는 메틸화, 컵화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등), 그리고 형광 또는 효소를 이용한 표지물질(labeling material)의 결합 등이 있다.
- [0074] 한편, 본 발명에서 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머일 수 있다.
- [0075] 본 명세서에 있어서, "항체"는 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 마커 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합

항체를 모두 포함한다. 또한 항원-항체 결합성을 갖는 것이면 전체 항체의 일부도 본 발명의 항체에 포함되며, 본 발명 단백질에 특이적으로 결합하는 모든 종류의 면역글로불린 항체가 포함된다. 예를 들어 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 갖는 완전한 형태의 항체뿐 아니라 항체 분자의 기능적인 단편, 즉 항원 결합 기능을 갖는 Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등을 포함한다. 나아가 본 발명의 항체에는 본 발명 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 것이라면 인간화 항체, 키메라 항체 등의 특수 항체와 재조합 항체도 포함된다.

[0076] 본 명세서에 있어서, "애포머(aptamer)"는 시료 내의 검출하고자 하는 분석물질과 특이적으로 결합할 수 있는 물질로 그 자체로 안정된 삼차 구조를 가지는 단일 가닥 핵산(DNA, RNA, 또는 변형 핵산)을 의미하는 것으로, 특이적으로 시료 내의 표적 단백질의 존재를 확인할 수 있다. 애포머의 제조는 일반적인 애포머의 제조 방법에 따라, 확인하고자 하는 표적 단백질에 대해 선택적이고 높은 결합력을 가지는 올리고뉴클레오타이드의 서열을 결정하여 합성한 후, 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단이나 3' 말단을 애포머 칩의 관능기에 결합할 수 있도록, -SH, -COOH, -OH 또는 NH₂로 변형을 시킴으로써 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0077] 상기 SLC7A11, TP53INP2, PLAU, 및/또는 EPHA2의 단백질에 특이적인 항체를 포함하는 본 발명의 조성물은 공지된 단백질을 감지하는 방법에 필요한 재제를 추가적으로 포함할 수 있으며, 본 발명의 조성물을 이용하여 공지된 단백질을 감지하는 방법을 제한 없이 사용하여 피검체(본 발명에서는 피검체로부터 분리한 생물학적 시료)에서 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있다.

[0078] 본 발명에서, 상기 단백질 마커를 코딩하는 유전자는 그 핵산 서열이 유전자 은행에 등록되어 있으므로 당업자는 상기 서열을 바탕으로 이들 유전자의 특정 영역을 특이적으로 증폭하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 프라이머 세트 또는 프로브를 디자인할 수 있다.

[0079] 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있으며, 모든 기능적 등가물을 포함한다. 또한, 전술한 "프라이머" 또는 "프로브"에 관한 내용이 동일하게 적용될 수 있다.

[0080] 상기 "기능적 등가물"이라는 용어는 예를 들어, 기준(reference) 서열로부터 하나 또는 그 이상의 치환, 결실 또는 부가, 기준(reference) 서열과 실험(subject) 서열 사이의 다양한 기능적 비유사성을 낳지 않는 실제 효과(net effect) 등 변화된 돌연변이 서열의 뉴클레오타이드와 핵산서열 모두를 의미한다. 통상적으로, 그런 실질적 등가물인 서열은 단지 약 35%(즉, 실질적으로 등가적인 서열에서의 각 잔기 치환, 부가 및 결실의 숫자는 상응하는 기준 서열과 비교하고 실질적으로 등가적인 서열에서의 나머지 전체 숫자로 나누었을 때 약 0.35 또는 그 이하이다.) 정도로 본 명세서에 나열된 것에서부터 다양하다. 그런 서열은 나열된 서열과 65%의 서열 동일성을 갖는다. 본 발명에 따른 실질적 등가물인, 예를 들어 돌연변이, 아미노산 서열은 나열된 아미노산 서열과 바람직하게는 최소한 80%의 서열 동일성, 보다 바람직하게는 최소한 90%의 서열 동일성을 갖는다. 실질적 등가물인 본 발명의 뉴클레오타이드 서열은 예를 들어, 유전자 암호의 중복(redundancy) 또는 축퇴(degeneracy)를 고려할 때, 더 낮은 백분율의 서열 동일성을 가질 수 있다. 바람직하게는, 뉴클레오타이드 서열은 최소한 약 65%의 동일성, 보다 바람직하게는 최소한 약 75%의 동일성, 가장 바람직하게는 약 95%의 동일성을 가져야 한다. 본 발명의 목적을 위해서는, 실질적으로 등가적인 생물학적 활성과 실질적으로 등가적인 합성 특징을 가지는 서열들은 실질적 등가물로 취급된다. 등가물을 결정하기 위해, 성숙 서열(예를 들어, 위(spurious) 종결코돈(stop codon)을 제조하는 돌연변이를 통한)의 절단(truncation)은 무시되어야 한다.

[0082] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 페놀 노출 여부 평가용 키트를 제공할 수 있으며, 상기 키트는 본 발명에 따른 페놀 노출 여부 평가 방법이 기재된 설명서를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0083] 나아가, 본 발명의 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액 또는 장치로 구성될 수 있으며, 예를 들어, 본 발명의 키트는 PCR을 수행하기 위해, 분석하고자 하는 시료로부터 유래된 게놈 DNA, 본 발명의 바이오마커 유전자에 대해 특이적인 프라이머 세트, 적당량의 DNA 중합 효소, dNTP 혼합물, PCR 완충용액 및 물을 포함하는 키트일 수 있다. 상기 PCR 완충용액은 KCl, Tris-HCl 및 MgCl₂를 함유할 수 있다. 이외에 PCR산물의 증폭 여부를 확인할 수 있는 전기영동 수행에 필요한 구성 성분들이 본 발명의 키트에 추가로 포함될 수 있다.

[0084] 또한, 본 발명의 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. RT-PCR 키트는 본 발명의 바이오마커 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 세트 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머레이즈 및 역전사 효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한 정량 대조군으로 사용되는 유전자에 특

이적인 프라이머 세트를 포함할 수 있다.

[0085] 또한, 본 발명의 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. DNA 칩 키트는, 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA가 프로브로 부착되어 있는 기판을 포함하고, 기판은 정량구조 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 키트는 본 발명의 바이오마커 유전자가 고정화되어 있는 기판을 갖는 마이크로어레이(microarray) 형태일 수 있다.

[0086] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0088] **[실험예]**

[0090] **실험예 1. 인체 폐 세포 모델에서 Quant-seq(Quantification Sequencing of 3' mRNA)을 통한 바이오마커 선별**

[0091] **1-1. 총 RNA(total RNA) 분리 및 RNA sequencing**

[0092] 폐놀은 주로 호흡기에 노출되어 기관지 및 폐에 영향을 끼치는 것으로 알려져 있다. 이에 본 발명에서는 인간 폐 세포주인 BEAS-2B cell line을 American Type Culture Collection (VA, USA)로부터 구매하여 실험에 사용하였다. 모든 세포는 5%의 CO₂와 37℃가 유지되는 인큐베이션(incubation)에서 배양하였으며, 폐놀을 각각 저농도 (100 μM), 고농도 (250 μM)로 처리한 후 Trizol reagent(Life Technologies, CA, USA)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 각각의 RNA library 정보는 Quant-Seq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit(Lexogen, Vienna, Austria)를 이용하여 얻었으며, HTS(high throughput screening)은 NextSeq 500 instrument(Illumina, Inc., San Diego, CA, USA)를 이용하여 수행하였다.

[0094] **1-2. PPI mapping (Protein-protein interaction mapping)**

[0095] 상기 실험예 1-1의 Quant-seq 데이터로부터 얻은 정보를 기반으로 발현이 유의미하게 변화하는 인자들을 선별하였으며, 이들 간의 기능적 상호작용 관계를 PPI mapping을 통하여 확인하였다. 도 1에 나타난 바와 같이, 각각의 단백질 간 상호작용은 STRING database (<http://string-db.org/>)를 기반으로 예측하였다.

[0097] **실험예 2. 동물 모델에서 폐놀 노출에 따른 바이오마커 발현량 변화 검증**

[0098] **2-1. 폐놀 노출 동물 모델**

[0099] 폐놀 노출에 따른 바이오마커의 발현량 변화 검증을 위하여 도 2에 나타난 바와 같이 동물 실험을 진행하였다. 실험동물로는 Sprague-Dawley rat를 사용하였으며, 발육기 래트로 약 4주령의 래트, 성숙기 래트로 약 10주령의 래트를 사용하였다.

[0100] 시험물질인 폐놀은 인간의 경우 다양한 경로로 노출될 수 있으므로, 폐놀 노출 방법으로 예상 노출 경로 중 하나인 경구 투여를 선택하였으며, 대조물질과 시험물질(폐놀)은 경구 투여용 존데(Feeding needle)를 장착한 주사기를 이용하여 강제로 래트의 위 내로 경구 투여하였다. 투여 물질의 양은 가장 최근에 측정된 체중에 따라 10 ml/kg로 계산하였으며, 표 1에 기재된 바와 같이, 시험물질 처리 농도별로 실험동물을 분류하여 다양한 농도로(125 mg/kg, 250 mg/kg, 및 500 mg/kg) 시험물질을 투여하였다. 시험물질(폐놀)은 휘발성이 있으므로 자석교반기(magnetic stirrer)를 이용하지 않고 시험물질이 담겨있는 튜브를 투여 전 흔들어서 사용하였다. 폐놀은 단회 노출시켰으며, 음성 대조물질은 미세여과기와 자외선 유수살균장치를 통과한 수돗물을 사용하였다.

표 1

[0101]

동물 처리군	Concentration (mg/kg)
VC (Vehicle control)	0
P1 (저농도 처리군)	125
P2 (중농도 처리군)	250
P3 (고농도 처리군)	500

[0102] 폐놀 단회 노출 후 1일차 및 7일차에 성숙기 래트와 발육기 래트로부터 약 2 g의 폐 조직을 채취하여 미리 표시한 폴리프로필렌(polypropylene) 튜브에 옮긴 후 분석 전까지 약 -60℃이하의 디프 프리저(deep freezer)에 보관하였다.

[0103] 또한, 폐놀 단회 노출 후 1일차에 성숙기 래트로부터 혈액을 채취하였으며, 혈액 시료는 다른 조직에 비해 RNA

의 안정성이 낮으므로 RNA 분해 효소 억제제(Rnase inhibitor)가 포함된 튜브에 수집되어야 하는바 PAX gene tube에 넣고 분석 전까지 약 -80℃이하의 디프 프리저(deep freezer)에 보관하였다.

[0105] **2-2. 폐놀 노출 후 폐 조직 내 유전자의 발현 양상 확인을 통한 바이오마커 검증**

[0106] 폐놀 노출 여부를 평가할 수 있는 바이오마커의 검증을 위하여, 상기 실험에 2-1에서 냉동 보관하였던 폐 조직 으로부터 QiaCube Connect[®](QIAGEN, USA)를 사용하여 RNA를 추출하여 정제하고, 바이오 어널리라이저 (bioanalyzer)를 이용하여 퀄리티 체크(quality check)를 수행하여 분석을 수행할 수 있는 조건의 RNA임을 확인 하였다.

[0107] 폐 조직으로부터 추출한 RNA는 불안정한 물질로 보관 및 사용에 한계가 있으므로, RNA를 기반으로 상온에서도 안정한 물질인 DNA를 합성하는 역전사 과정을 수행하였다. 구체적으로, 2 µg의 총 RNA(total RNA)를 주형으로 M-MLV(Moloney Murine Leukemia Virus) Reverse Transcriptase (ELPIS-VIOTECH, KOREA)를 첨가하여 역전사 과 정을 통해 cDNA를 합성하였다.

[0108] PCR은 특정 표적 유전자를 증폭하는 방법으로서, 이를 통해 타겟 바이오마커의 상대적 및 정량적 발현 정도를 분석할 수 있으므로, 합성한 cDNA와 서열번호 1 내지 8의 타겟 유전자 프라이머(primer), SYBR Green PCR Master Mix(KAPA, MA, USA)를 이용하여 quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction(CFX Connect[™] Real-time PCR Detection System; Bio-Rad, CA, USA)을 진행하였다.

[0109] 그 결과, 도 3a에 나타낸 바와 같이, 발육기 래트에서 SLC7A11의 발현량은 폐놀 노출 후 1일차 및 7일차에서 증 가하는 경향성을 보였다. 또한, 도 3b에 나타낸 바와 같이, 성숙기 래트에서 SLC7A11의 발현량은 폐놀 노출 후 1일차에 감소하는 경향성을 보였다. 상기 결과로부터, SLC7A11를 아동과 청소년, 및 성인을 대상으로 사용할 수 있는 폐놀 노출 평가용 바이오마커로 사용할 수 있을 것으로 판단되었다.

[0110] 도 4a에 나타낸 바와 같이, TP53INP2의 발현량은 발육기 래트에서 폐놀 노출 후 1일차에 유의미하게 증가하였으 나, 노출 후 7일차에는 유의미한 변화가 없는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 도 4b에 나타낸 바와 같이, TP53INP2의 발현량은 성체 래트에서 폐놀 노출 후 1일차 및 7일차에 유의미하게 증가한 것을 확인하였다. 상기 결과로부터, TP53INP2는 아동과 청소년, 및 성인을 대상으로 사용할 수 있는 폐놀 노출 평가용 바이오마커로 사 용될 수 있을 것으로 판단되었다.

[0111] 도 5a에 나타낸 바와 같이, PLAUI의 발현량은 발육기 래트에서는 유의미한 변화를 나타내지 않았다. 반면, 도 5b 에 나타낸 바와 같이, PLAUI의 발현량은 성숙기 래트에서 폐놀 노출 후 1일차 및 7일차에 유의미하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 상기 결과로부터, PLAUI는 성인을 대상으로 사용할 수 있는 폐놀 노출 평가용 바이오마 커로 이용될 수 있을 것으로 판단되었다.

[0112] 도 6a에 나타낸 바와 같이, EPHA2의 발현량은 발육기 래트에서 폐놀 노출 후 1일 차에 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 도 6b에 나타낸 바와 같이, EPHA2의 발현량은 성숙기 래트에서 폐놀 노출 후 1일차 및 7일차에 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 상기 결과로부터, EPHA2는 아동과 청소년, 및 성인을 대상으로 사용할 수 있는 폐놀 노출 평가용 바이오마커로 이용될 수 있을 것으로 판단되었다.

[0114] **2-3. 폐놀 노출 후 혈액 내 유전자의 발현 양상 확인을 통한 바이오마커 검증**

[0115] 상기 실험에 2-1에서 냉동 보관하였던 혈액으로부터 상기 실험에 2-2의 방법으로 RNA를 추출하여 Nanodrop 2000(Thermo Fisher Scientific, USA)을 사용하여 총 RNA의 농도를 측정하였다. 추출한 총 RNA를 주형으로 M-MLV(Moloney Murine Leukemia Virus) Reverse Transcriptase (ELPIS-VIOTECH, KOREA)를 첨가하여 역전사 과 정을 통해 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA와 서열번호 1 내지 서열번호 8의 타겟 유전자 프라이머(Primer), SYBR Green PCR Master Mix를 사용하여 qRT-PCR을 수행하였다.

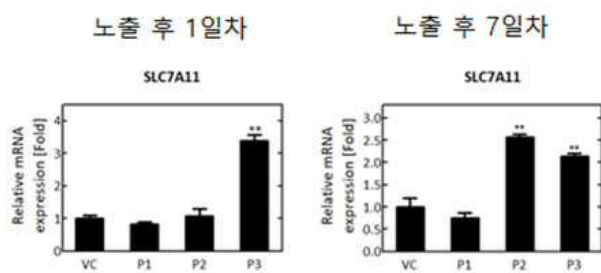
[0116] 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, 폐놀에 노출된 성숙기 래트의 혈액에서 발현되는 유전자들 중 SLC7A11, TP53INP2, PLAUI, 및 EPHA2의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 상기 결과로부터, SLC7A11, TP53INP2, PLAUI, 및 EPHA2를 혈액에서 검출 가능한 폐놀 노출 평가용 바이오마커로 활용할 수 있을 것으로 판단되었다.

[0118] 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명 의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해 할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

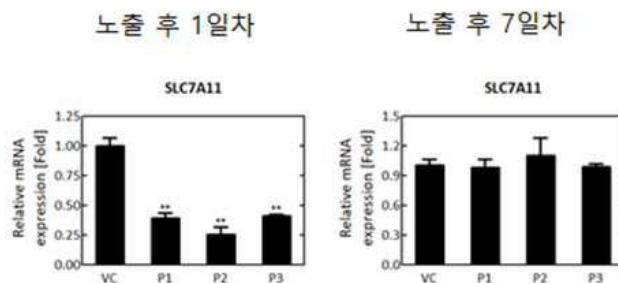
도면2



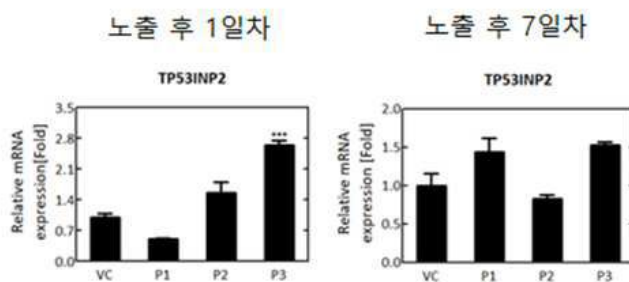
도면3a



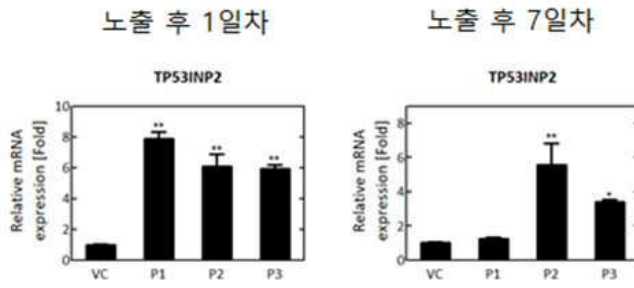
도면3b



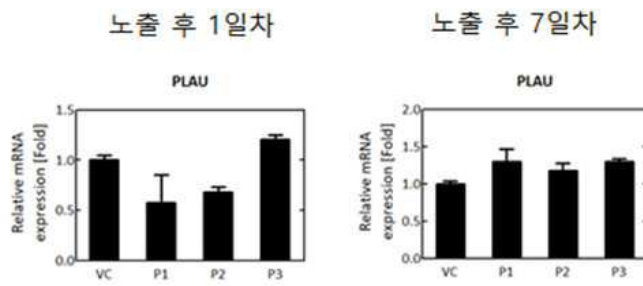
도면4a



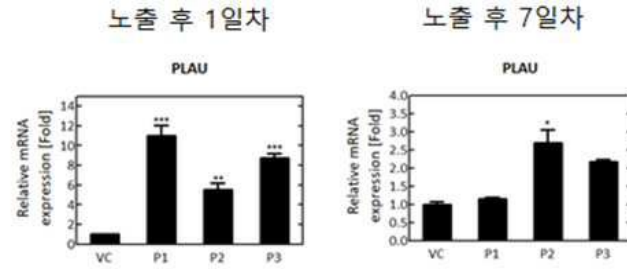
도면4b



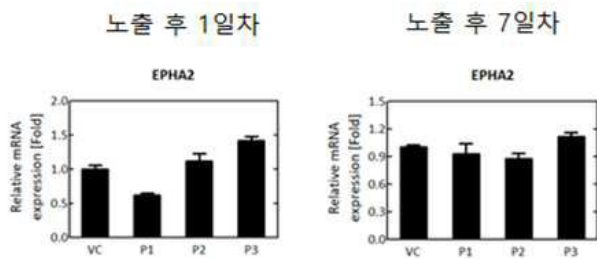
도면5a



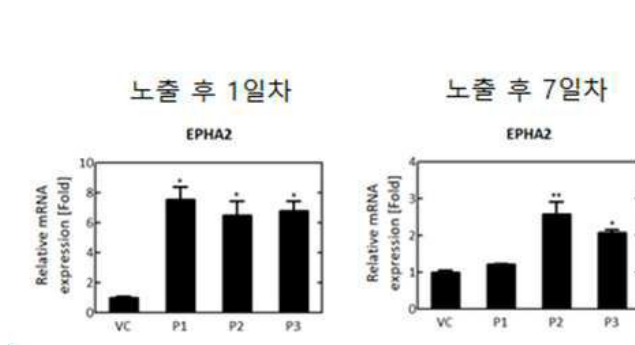
도면5b



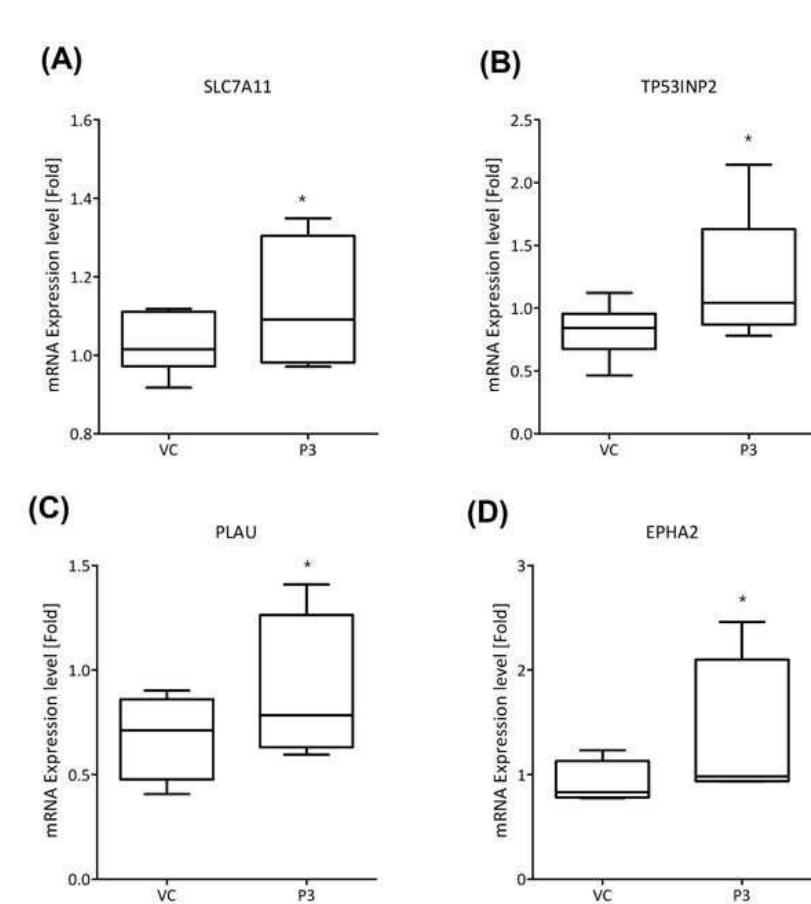
도면6a



도면6b



도면7



서열목록

- <110> Dongguk University Industry-Academic Cooperation Foundation
UNIVERSITY INDUSTRY FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY WONJU CAMPUS
- <120> Biomarker for evaluating exposure to Phenol and the evaluation
method using the same
- <130> MP21-151
- <160> 8
- <170> KoPatent In 3.0

<210> 1
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> rSLC7A11 F primer
 <400> 1
 caagcataag catcaggtat 20
 <210>
 > 2
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> rSLC7A11 R primer
 <400> 2
 ctactacac aataagaact aca 23
 <210> 3
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> rPLAU F primer
 <400> 3
 cctgactcaa gatgaataga tg 22
 <210> 4
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> rPLAU R primer
 <400> 4
 ccaactctcc tctacac 18
 <210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> rTP53INP2 F primer

<400>	5	
tcttcagtta caaccgagta		20
<210>	6	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	rTP53INP2 R primer	
<400>	6	
ggcagtgagg aatagaca		18
<210>	7	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	rEPHA2 F primer	
<400>	7	
ctgggaagaa ggagatacc		19
<210>	8	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	rEPHA2 R primer	
<400>	8	
ggcggatgat attgtgatg		19