(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0020881
(43) 공개일자 2011년03월03일

(51) Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 15/12* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0003716(분할)
(22) 출원일자 2011년01월13일
심사청구일자 2011년01월13일
(62) 원출원 특허 10-2008-0062532
원출원일자 2008년06월30일
심사청구일자 2008년06월30일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 궁동 220번지 충남대학교
연세대학교 산학협력단
서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교
(72) 발명자
조상래
서울특별시 서대문구 신촌동 연세대학교 의과대학 미생물학교실
신성재
대전광역시 중구 문화1동 6번지 충남대학교의과대학 미생물학교실
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

전체 청구항 수 : 총 4 항

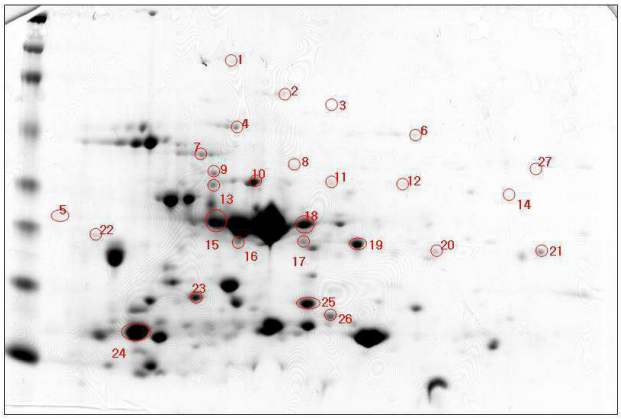
(54) 크론씨 병의 혈청학적 진단을 위한 신규한 바이오마커

(57) 요 약

본 발명은 크론씨병 환자와 사람 유래 M. paratuberculosis와의 혈청학적 관계 분석을 통하여 크론씨병의 혈청학적 진단에 이용될 수 있는 특이적인 단백질에 관한 것이다.

보다 구체적으로는 인간으로부터 분리된 마이코박테리움 아비움 아종 파라투버큘로시스 (Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis) 유래의 항원으로서, 크론씨병 환자의 혈청에 특이적으로 반응하는 크론씨병 진단용 항원의 발굴 및 동정에 관한 것이다.

대 표 도 - 도4a



(72) 발명자

김화중

대전광역시 중구 문화1동 6번지 충남대학교 의학전문대학원 미생물학교실

신아름

대전광역시 중구 문화1동 6번지 충남대학교 의과대학 미생물학교실

이승섭

대전광역시 중구 문화1동 6번지 충남대학교의과대학 미생물학교실

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A090184

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료연구개발사업

연구과제명 크론씨병의 발병기전에 관련된 마이코박테리아의 전염성 유발인자 발굴 및 발굴 인자의 기능적 특성 분석

기여율 1/1

주관기관 충남대학교 산학협력단

연구기간 2009.05.01 ~ 2011.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

인간으로부터 분리된 마이코박테리움 아비움 아종 파라투버큘로시스 (Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis)에서 유래하고, 크론씨병 혈청에 특이적으로 반응하는 항원인, TrpC (Indole-3-glycerol-phosphate synthase)로 구성된 크론씨병 진단용 마커.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 마커는 인간으로부터 분리된 마이코박테리움 아비움 아종 파라투버큘로시스에서 유래하고 크론씨병 혈청에 특이적으로 반응하는 항원인, FbpC1 (Fibronectin binding protein C1), FadB1 (Fatty oxidation protein B1), LprG (Probable conserve lipoprotein LprG), Gap (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), Tpi (Triosephosphate isomerase), Tal (Transaldorase), aconitate hydratase, ArgJ (Arginine biosynthesis bifunctional protein), FbpB (Fibronectin binding protein B), HisG (Histidine synthesis protein G), Wag31 (Conserved hypothetical protein), Mdh (Malate dehydrogenase), LppZ (Putative lipoprotein), FecB (Probable FeIII-dicitrate-binding periplasmic lipoprotein), GabD2 (Putative succinate-semialdehyde dehydrogenase [NADP+] dependant protein) 및 superoxide dismutase 로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 항원을 추가로 포함하여 이루어지는 것인 마커.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항의 마커를 포함하는 것을 특징으로 하는 크론씨병 진단용 조성물.

청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항의 마커를 포함하는 것을 특징으로 하는 크론씨병 진단 키트.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신규한 크론씨병 진단용 마커에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 인간으로부터 분리된 마이코박테리움 아비움 아종 파라투버큘로시스 (Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis)의 항원으로서, 크론씨병 환자의 혈청에 특이적으로 반응하는 크론씨병 진단용 항원에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 결핵균 (M. tuberculosis)과 나병균 (M. leprae)을 포함한 병원성 마이코박테리아 (mycobacteria)의 질병은 현재까지도 인류의 보건을 위협하는 대표적인 세균성 질병임. 최근에는 비결핵 항산균 (NTM)에 의한 감염질환이 증가함으로써 마이코박테리아에 의한 감염질환에 대한 중요성이 다시 부각되고 있다. 병원성 마이코박테리아는 일반적으로 유사한 생리적, 생화학적, 유전학적 특성, 항원의 공통성 등을 갖고 있다고 알려졌으나 병인론 및 면역현상, 숙주와의 관계가 명확하게 밝혀지지 않았음. 병원성 마이코박테리아는 예방이 어렵고 치료효과도 낮으며 면역이 떨어진 사람에게서 더욱 심각한 질병을 유발함. 최근 에이즈 환자의 증가, 새로운 바이러스의 출현, 장기이식, 세포치료, 등의 면역억제 질병의 증가에 의하여 기존의 세균성 질병들이 재활성되거나 기회감염을 통해 더욱 심각한 질병을 유발시키고 있다. 병원성 마이코박테리아로 가장 중요한 것은 M. tuberculosis complex 이며 최근에는 M. avium complex에 의한 폐질환 증가가 전 세계적으로 보고되고 있으며 WHO에서는 이미 emerging pathogen으로 규정하였다.

[0003] 마이코박테리움 아비움 아종명 파라투베르큘로시스 (Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis, 이하 M.

paratuberculosis)는 최근 후천성 면역결핍증과 관련되어 가장 중요한 M. avium, 국내에서 결핵균 다음으로 피해를 주고 있는 M. intracellulare와 같은 종에 속하는 균이다. M. paratuberculosis는 소, 양, 염소, 사슴 등의 동물에서 만성육아종성 염증으로 특징화된 요네병 (Johne's disease)을 유발시키며 사람의 크론씨병 (Crohn's disease)과도 매우 밀접하게 연관되었다는 보고가 2000년 이후 선진국을 중심으로 보고되고 있다. M.paratuberculosis가 사람에서 인수공통 전염성을 유발시킬 수 있다는 잠재성과 사람이 유제품을 떠나서 식생활이 불가능하다는 점으로 최근 미국에서는 본 균이 food safety를 위협하는 emerging pathogen으로 주목 받고 있으며 본 세균에 의한 감염을 통제하는데 많은 물적 자원을 투자하고 있다. 예를 들어 2000년도 이후 M. paratuberculosis가 크론씨병의 원인체로 부각되면서 2002년부터 2005년 동안 약 600억원이라는 막대한 자금을 투자하여 본 질병의 제어에 노력을 기울이고 있다. 과거에는 장으로부터 acid-fast staining bacilli가 관찰되면 M. tuberculosis 또는 M. bovis에 의한 장 결핵으로 판단하였으나 크론씨병은 장결핵과 면역학적, 병리적으로 매우 다르다고 알려져 있으며, 최근에는 일본에서도 크론씨병의 원인체로써 M. paratuberculosis가 중요하게 부각되고 있는 실정이다.

[0004] 크론씨병은 구강부터 항문까지 전체적인 소화기 어느 부위에서도 일어날 수 있는 질병이며 주로 회장의 말단부위에 병변을 보인다. 크론씨병은 만성 염증성 장염을 특징으로 하며 소화기 질병 중 난치성 질환으로 주로 15-30세의 어린 연령에서 발병하고, 아직까지 원인체나 치료방법에 대해서 확립된 것이 없고 일단 증상이 나타나면 항-TNF-a, 스테로이드계 약물 등 면역억제제를 사용한다. 국가에 따라 유병율은 다르나 미국에서는 750명당 1명, 캐나다에서는 500명당 1병이 크론씨병을 앓고 있다는 보고가 있으며 최근 국내에서도 본 질병이 증가하는 추세에 있다. 과거에는 자가면역질환으로 인식되었으나 최근 유전학적 소인이 있는 사람에서 미생물학적인 triggering에 의한 질병의 발병이 대세이다. 크론씨병에 감수성이 있는 환자의 유전학적 소인으로는 CDRD15의 점 돌연변이가 가장 잘 연구되어 있으며 최근에는 IL23r과 ATG16L1의 돌연변이에 대한 보고가 있었다. 하지만 이러한 유전적 소인은 크론씨병뿐만 아니라 다른 만성 염증성 질병에서도 관찰되며 병변의 병리, 생리학적 측면에서는 M. paratuberculosis에 의해서 동물에서 발병되는 만성육아종성 염증인 요네병과 가장 흡사하다는 것이 알려졌다.

[0005] 현재까지 보고된 연구 내용을 보면 사람의 크로씨병과 연관하여 Leprosy, tuberuculosis, paratuberculosis와 크론씨병을 비교하여 mycobacteria가 크론씨병의 원인체로서 갖는 의의와, 사람의 크론씨병과 미생물과의 연관성을 규명, 크론씨병의 추정적인 원인체로서 M. paratuberculosis가 갖는 공중보건의 위험성 규명, in situ hybridization법을 이용하여 크론씨병에 걸린 사람으로부터 M. paratuberculosis의 분리 동정, M. paratuberculosis의 항원인 p35와 p36 단백질을 이용하여 사람의 크론씨병에 대한 혈청학적 연구 등 많은 연구가 수행되어왔다. 그러나 많은 연구에도 불구하고 M. paratuberculosis를 크론씨병의 원인체로 확신하지 못하는 이유는 M. paratuberculosis에 대한 연구는 많은 제약이 있기 때문이다. 즉, 이 병원체가 극도로 느리게 자라는 특성 (8-10주) 과 사람에서 분리된 병원체는 주로 세포벽이 결여된 상태로 존재하기 때문에 유전자 검출은 가능하지만 균체 자체를 배양하는 것은 많은 어려움이 있다. 현재까지 크론씨병에서 분리된 M. paratuberculosis의 단백질체에 대한 연구는 전무한 실정이므로 앞으로 이러한 연구가 시급한 실정이다.

[0006] 최근까지 많은 병원성 마이코박테리아의 전체유전자 지도가 해석됨에 따라 각 국가별로 포스트 게놈 시대를 준비하고 있다. 처음 인간의 유전자 지도가 완성될 때는 모든 질병이 해결될 것처럼 보였지만 실제적으로 질병에 적용하기에는 많은 한계가 있는 것처럼 마이코박테리아 역시 유전자의 전체비교로서는 질병을 예측하고 그 방향을 제시하기란 쉽지 않음. 또한 새로운 병원성 인자의 발굴 및 기능을 이해하는 것은 백신 및 진단기법의 개발에 반드시 필요한 연구이다. 예를 들어 1998년 병원성 결핵균인 M. tuberculosis H37Rv 균주의 전체 유전자의 해석 및 지도가 완성됨에 따라 유전자 수준에서 병원성 결핵균과 M. bovis, 비병원성 M. tuberculosis H37Ra 균주 등에서 비교 연구 및 병인성(pathogenesis)과 면역에 관여할 것으로 추정되는 많은 유전자들이 밝혀지고 있으나 단백질 수준에서는 게놈 상에서 예측되는 3924 단백질 코딩 서열 (coding sequences) 중 현재까지 오직 341개의 단백질만이 확인되었다 (8.7%). 또한, 확인된 단백질 중 병원성과 관련되어 그 기능이 분석된 것은 소수에 불과하며 대부분이 hypothetical 단백질로써 그 기능을 알기 어렵다. 그러므로 크론씨병의 병인론을 세균학적으로 규명하기 위해서는 기존의 연구들을 바탕으로 병원성에 관련된 인자의 기능을 분석하고 이를 실제적으로 백신 및 진단기법의 개발에 이용하는 것이 필요하다.

[0007] 또한, M.paratuberculosis는 국제 OIE에서 정한 list B에 속하는 전염병으로 본 질병은 잠복기가 길고 병이 진행 되면서 병원체가 분변으로 배출되기 때문에 M.paratuberculosis에 한번 오염된 목장에서는 근절하기 매우 어려운 질병일 뿐만 아니라, 한국은 외국으로부터 식용 동물의 수입이 늘어가고 있어 국내에 존재하지 않았던 인수공통 전염병의 확산이 우려되고 있으며 최근 항생제 사용의 남용 및 항생제 내성 출현균이 많아짐에 따라 emerging pathogen의 확산에 대한 우려가 심각하다. 이미 M. paratuberculosis의 위험성에 대하여 WHO에 수차례 보고가 되었으며 최근 미국에서는 본 세균을 식품을 매개로 사람에 전염될 수 있는 중요한 emerging pathogen으로 규정하였다. 하지만 앞에서도 언급하였듯 본 세균에 대한 국내 연구는 전무한 실정이며 크론씨병과 관련된 연구는 지금까지 한 번도 보고된 적 없다. 그러므로 국가적으로 난치성 감염질환의 제어 측면에서도 크론씨병과 M. paratuberculosis의 관계를 연구할 필요성이 절실하다.

[0008] 현재까지 크론씨병의 확실한 원인체 및 혈청학적 진단기법에 사용될 수 있는 특이적 항원에 대해서는 보고된 것이 없다. 하지만 크론씨병은 국내외에서 꾸준히 증가를 하고 있으며 원인체로써 위에서 언급했듯 M. paratuberculosis가 가장 주목 받고 있다.

[0009] 이에 본 발명자는 크론씨병과 사람 유래 M. paratuberculosis와의 혈청학적 관계 분석을 통하여 유사한 질환을 갖고 있는 다양한 환자의 혈청과 사람유래 M. paratuberculosis의 분비항원을 이용한 2DE-immunoblot 분석을 실시하여 세균학적, 혈청학적으로 M. paratuberculosis와 크론씨병의 관계를 규명하였고, 크론씨병의 혈청학적 진단에 이용될 수 있는 특이적인 단백질을 동정하여 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 크론씨병과 사람 유래 M. paratuberculosis와의 혈청학적 관계 분석을 통하여 크론씨병의 혈청학적 진단에 이용될 수 있는 특이적인 단백질을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 크론씨병 환자와 사람 유래 M. paratuberculosis와의 혈청학적 관계 분석을 통하여 크론씨병의 혈청학적 진단에 이용될 수 있는 특이적인 단백질에 관한 것이다.

[0012] 이하, 본 발명을 자세히 설명한다.

[0013] 본 발명은 마이코박테리움 아비움 아종 파라투버큘로시스 (Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis)에서 유래된 항원으로서, 크론씨병 환자의 혈청에 특이적으로 반응하는 것을 특징으로 하는 크론씨병의 혈청학적 진단용 마커에 관한 것이다.

[0014] 바람직하게는 상기 항원은 FbpC1 (Fibronectin binding protein C1), FadB1 (Fatty oxidation protein B1), PhoS2-2 (Periplasmic phosphate-binding lipoprotein 2-2), EchA9 (Enoyl-CoA hydratase 9), LprG (Probable conserve lipoprotein LprG), Gap (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), Tpi (Triosephosphate isomerase), Tal (Transaldorase), aconitate hydratase, TrpC (Indole-3-glycerol-phosphate synthase), ArgJ (Arginine biosynthesis bifunctional protein), FbpB (Fibronectin binding protein B), HisG (Histidine synthesis protein G), Wag31(Conserved hypothetical protein), Mdh (Malate dehydrogenase), LppZ (Putative lipoprotein), FecB (Probable FeIII-dicitrate-binding periplasmic lipoprotein), GabD2 (Putative succinate-semialdehyde dehydrogenase [NADP+] dependant protein) 및 superoxide dismutase 중에서 선택될 수 있다.

[0015] 본 발명에서 사용된 용어, "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 진단은 크론씨병 발병 여부를 확인하는 것이다.

[0016] 본 발명에서 사용된 용어, "크론씨병 (Crohn's disease)"은 만성적이고 재발을 잘하는 장관계의 염증을 특징으로 하는 염증성 질환의 일종으로, 안쪽에서부터 점막, 점막하조직, 근육층, 장막의 4개의 층으로 이루어진 장의

벽 모든 층의 염증을 동반하고, 장의 모든 부분에서 생길 수가 있지만 주로 맹장과 연결되는 대장의 말단부에 가장 많이 생기며, 장의 전층의 염증으로 인해서 장의 폐쇄나 괴양을 만들며 종종 천공됨을 특징으로 하는 질병이다.

[0017] 본 발명에서는, 사람의 크론씨병 환자와 동물의 요네병 개체에서 분리된 M. paratuberuclosis의 분비항원을 중심으로, 사람의 크론씨병 (n=3)에서 유래된 혈청에는 높은 항체반응을 나타내지만 유사한 질병인 결핵, 궤양성 대장염, 음성대조군 환자의 혈청에서는 반응하지 않는 항원을 2D-immunoblot으로 분석하였다.

[0018] 또한, 동물유래 항원에는 반응하지 않고 사람 유래 항원에만 반응하는 단백질을, 2DE-immunoblot과 LC-ESI-MS 기법을 통하여 이를 분석하여, 사람유래 M. paratuberculosis의 분비항원을 동정하였다.

[0019] 또한, 크론씨병 환자 중 M. paratuberculosis가 검출되었던 환자의 pooling 혈청(n=10)과 사람에서 분리된 M. paratuberuclosis의 분비항원, cellular extract 항원을 이용하여 크론씨병 환자의 IgG에 특이적으로 반응하는 단백질을 검출하고, LC-ESI-MS 기법으로 크론씨병의 환자 혈청에 특이적으로 반응하는 단백질을 동정하였고 matching score와 bioinformatic analysis를 통해서 진단적 가치가 유용한 단백질을 분석하였다. 그 결과, 크론씨병의 환자 혈청에 특이적으로 반응하는 33개의 단백질이 LC-ESI-MS 분석에 의하여 동정되었고, 이러한 33개의 단백질에 대한 BLAST 검색으로 단백질의 가능한 기능을 예측하였고, 그 중 해독된 단백질 19개를 얻을 수 있었다.

[0020] 본 발명에 의하여, 크론씨병의 진단은, 본 발명의 진단용 항원을 혈청학적 시료에 접촉시켜 항원-항체의 특이적인 반응에 의하여 생성된 항원-항체 복합체의 형성여부를 측정함으로써 생물학적 샘플 중에서 본 발명의 진단용 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 존재여부를 확인하는 방법에 의할 수 있다. 본 발명에서 사용된 용어 "항원-항체 복합체"란 본 발명의 진단용 항원 단백질과 생물학적 샘플 중 이를 특이적으로 인지하는 항체의 결합물을 의미한다.

[0021] 본 발명에서 "항체"란 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명에 사용되는 항체는 단클론 또는 다클론 항체, 면역학적으로 활성인 단편(예를 들어, Fab 또는 $(Fab)_2$ 단편), 항체 중쇄, 인간화 항체, 항체 경쇄, 유전자 조작된 단일쇄 Fv 분자, 키메릭 항체 등일 수 있다. 가장 바람직하게는 IgG를 의미한다.

[0022] 본 발명의 크론씨병 진단용 항원 단백질은 인간으로부터 유래한 것으로서, DNA 서열을 기초로 하여 재조합 방법에 의해 제조될 수 있다. 유전자 재조합 기술을 이용할 경우 단백질을 코딩하는 핵산을 적절한 발현 벡터에 삽입하고, 재조합 발현 벡터로 형질전환된 형질전환체에서 목적으로 하는 단백질이 발현되도록 숙주 세포를 배양한 후 형질전환체로부터 목적으로 하는 단백질을 회수함으로써 수득될 수 있다.

[0023] 또한 본 발명은 상기 크론씨병 진단용 항원을 포함하는 것을 특징으로 하는 크론씨병 진단용 조성물을 제공한다.

[0024] 상기 본 발명의 진단용 조성물은 크론씨병 진단용 항원 이외에 면역학적 분석에 사용되는 당 업계에 공지된 시약을 추가로 포함할 수 있다.

[0025] 상기에서 면역학적 분석은 항원과 항체의 결합을 측정할 수 있는 있는 방법이라면 모두 포함될 수 있다. 이러한 방법들은 당 분야에 공지되어 있으며 예를 들어, 면역세포화학 및 면역조직화학, 방사선 면역 분석법(radioimmunoassays), 효소결합면역법(ELISA: Enzyme Linked Immunoabsorbent assay), 면역 블롯(immunoblotting), 파아르 분석법(Farr assay), 면역침강, 라텍스 응집, 적혈구 응집, 비탁계법, 면역확산법, 카운터-전류 전기영동법, 단일 라디칼 면역확산법, 면역크로마토그래피법, 단백질 칩 및 면역형광법이 있다.

[0026] 면역학적 분석에 사용되는 시약으로는 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지, 용해제, 세정제가 포함된다. 또한, 표지물질이 효소인 경우에는 효소활성을 측정할 수 있는 기질 및 반응 정지제를 포함할 수 있다.

[0027] 상기에서 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지는 항원-항체 복합체의 형성을 정성 또는 정량적으로 측정가능하게 하며, 이의 예로는 효소, 형광물질, 리간드, 발광물, 미소입자(microparticle), 레독스 분자 및 방사성 동위원소 등을 사용할 수 있다. 효소로는 β-글루쿠로니다제, β-D-글루코시다제, 우레아제, 퍼옥시다아제,

알칼라인 포스파타아제, 아세틸콜린에스테라아제, 글리코즈 옥시다아제, 헥소키나제, 말레이트 디하이드로게나아제, 글루코스-6-인산디하이드로게나아제, 인버타아제 등을 사용할 수 있다. 형광물질로는 플루오레신, 이소티오시아네이트, 로다민, 피코에리테린, 피코시아닌, 알로피코시아닌, 플루오르신이소티옥시아네이트 등을 사용할 수 있다. 리간드로는 바이오틴 유도체 등이 있으며, 발광물로는 아크리디늄 에스테르, 루시페린, 루시퍼라아제 등이 있다. 미소입자로는 콜로이드 금, 착색된 라텍스 등이 있고 레독스 분자로는 페로센, 루테늄 착화합물, 바이올로젠, 퀴논, Ti 이온, Cs 이온, 디이미드, 1,4-벤조퀴논, 하이드로퀴논 등이 있다. 방사성 동위원소로는 ^{3}H, ^{14}C, ^{32}P, ^{35}S, ^{36}Cl, ^{51}Cr, ^{57}Co, ^{58}Co, ^{59}Fe, ^{90}Y, ^{125}I, ^{131}I, ^{186}Re 등이 있다. 그러나 상기 예시된 것들 외에 면역학적 분석법에 사용할 수 있은 것이라면 어느 것이라도 사용할 수 있다.

[0028] 한편, 본 발명의 진단용 조성물은 진단의 신속도 및 편리성을 높이기 위해, 적합한 담체 또는 지지체상에 공지된 다양한 방법을 이용하여 고정화된 상태로 제공될 수 있다(*Antibodies*: A Labotory Manual, Harlow & Lane; Cold SpringHarbor, 1988). 적합한 담체 또는 지지체의 예로는 아가로스, 셀룰로즈, 니트로셀룰로즈, 덱스트란, 세파덱스, 세파로즈, 리포솜, 카복시메틸 셀룰로즈, 폴리아크릴아미드, 폴리스테린, 반려암, 여과지, 이온교환수지, 플라스틱 필름, 플라스틱 튜브, 유리, 폴리아민-메틸 비닐-에테르-말레산 공중합체, 아미노산 공중합체, 에틸렌-말레산 공중합체, 나일론, 컵, 플랫 팩(flat packs) 등 이 포함된다. 그 외의 다른 고체 기질로는 세포 배양 플레이트, ELISA 플레이트, 튜브 및 폴리머성 막이 있다. 상기 지지체는 임의의 가능한 형태, 예를 들어 구형(비드), 원통형(시험관 또는 웰 내면), 평면형(시트, 시험 스트립)을 가질 수 있다.

[0029] 따라서 바람직하게는, 본 발명의 크론씨병 진단용 조성물은 진단용 키트의 형태로 제공될 수 있다.

발명의 효과

[0030] 상기한 바와 같이 본 발명은, 크론씨병을 혈청학적으로 진단할 수 있는 사람유래 M. paratuberculosis의 항원을 2DE-immunoblot과 LC-ESI-MS 기법을 통하여 동정하였고 다른 유사한 질병에는 반응하지 않고 크론씨 환자의 혈청에만 특이적으로 반응하는 새로운 단백질을 밝혀내었다. 앞으로 이러한 항원은 크론씨병을 혈청학적으로 진단할 수 있는 유용한 기법에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 M. paratuberculosis의 UCF 사람 분리주 및 소 분리주의 분비항원을 이용한 개인별 항체반응을 나타낸 것이다. 단, UC: ulcerative colitis(궤양성 대장염 환자), CD: crohn's disease (크론씨병 환자), TB: tubercle bacillus (결핵균 환자)를 나타낸다.

단, S/P=(OD sample—OD negative control)/(Mean OD positive control — Mean OD negative control)

도 2는 M. paratuberculosis의 UCF 사람 분리주의 분비항원을 크론씨병 환자의 혈청과 2DE-immunoblot한 결과이다. 사람 유래 항원에만 반응하는 단백질 스팟을 확인하여 도3에서 해당 단백질을 identification하였다.

도 3 은 사람의 크론씨병 환자 (UCF-4, UCF-5)와 동물의 Johne's disease (B236, B238) 개체에서 분리된 M. paratuberuclosis의 분비항원을 중심으로, 사람의 크론씨병의 경우 그 원인체가 분리된 환자의 혈청(n=3)으로부터 특이적으로 반응하는 항체를 2D-immunoblot으로 분석하여, 동물유래 항원에는 반응하지 않고 사람 유래 항원에만 반응하는 단백질을 2DE-immunoblot과 LC-ESI-MS 기법을 통하여 이를 분석한 것이다. 도면 내 표시는 사람 유래 M. paratuberculosis의 분비항원에서 동정한 총 8개의 특이적인 M. paratuberculosis 항원을 표시한 것이다.

도 4 는 크론씨병 환자에서 분리된 M. paratuberculosis의 UCF-4 균주의 a(분비항원)과 b(세포항원)을 이용하여 크론씨병 환자의 혈청 (M. paratuberculosis가 분리된 환자, n=10)을 pooling하여 사람 IgG에 특이적으로 반응하는 단백질을 표시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예들은 본 발명을 예시하는 것으로 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0033] **<실시예 1> 개인별 항체 반응과 진단항원의 발굴**

[0034] **1-1: 분비항원의 준비**

[0035] 현재까지 결핵의 진단을 포함한 마이코박테리움의 혈청학적 진단에 유의성을 갖고 있는 단백질은 주로 분비항원에서 발견되었다. 이를 바탕으로 사람과 동물에서 유래된 M. paratuberculosis의 분비 항원을 수집한 후 각 환자의 혈청을 이용하여 ELISA를 실시하였다.

[0036] 분비항원은 Cho D et al. (Cho D, Sung N, Collins MT. Identification of proteins of potential diagnostic value for bovine paratuberculosis. Proteomics. 2006, 6(21):5785-5794)에 설명된 방법으로 준비하였다. 일단, 사람과 동물에서 유래된 M. paratuberculosis을 Mycobatin J를 포함하는 modifide Watson-Reid (WR)배지에서 키운후, 원심분리하여 (30,000 x g, 10 분) 배양액을 얻었다. 얻은 배양액은 0.2 ㎛ 크기의 필터를 통과시킨 후, Centricon Plus 80 (분자량 > 5kDa)을 사용하여 농축하였다. 최종적으로 배양액 분비항원은10mM PBS (pH 6.8)으로 투석시킨 후, 농도를 측정하여 준비하였다.

[0037] **1-2: 항체반응의 개인적인 차이 관찰**

[0038] 도 1에서 나타낸 바와 같이 M. paratuberculosis의 다양한 분리주 (표준주 VS. UCF 사람 분리주)의 분비항원을 이용하여 크론씨병, 크론씨병과 유사한 궤양성 대장염 환자, mycobacterium의 대표적인 결핵균 환자, 건강인의 혈청을 이용한 개인의 항체 반응은 사람과 동물의 분리 균주에 따라 다양하게 나타났다.

[0039] 이는 크론씨병을 혈청학적으로 진단하기 위해서 특이적인 균주 (사람유래 균주)와 특이적인 항원이 중요하다는 것을 의미하며 본 실시예는 크론씨병의 혈청학적 진단 키트를 개발하는데 중요한 항원을 동정하는데 기초 자료로 활용되었다.

[0040] **1-3: 2DE-immunoblot을 이용한 사람 유래 M. paratuberculsosis의 분비항원 중 특이적인 항원 발굴**

[0041] 도2 내지 도4에서 보이는 바와 같이, 사람의 크론씨병 환자 (UCF-4, UCF-5)와 동물의 요네병 (B236, B238) 개체에서 분리된 M. paratuberuclosis의 분비항원을 중심으로, 다른 유사한 질병의 환자 유래 혈청에는 반응하지 않고 상기 실시예 1-2에서 언급한ELISA기법에서 사람의 크론씨병 환자 중 높은 항체가를 나타낸 환자의 혈청(n=3)으로부터 특이적으로 반응하는 항체를 2D-immunoblot으로 분석하였고, 동물유래 항원에는 반응하지 않고 사람유래 항원에만 반응하는 단백질을 2DE-immunoblot과 LC-ESI-MS 기법을 통하여 이를 분석하였다.

[0042] 그 결과 총 8개의 특이적인 M. paratuberculosis 항원을 사람유래 M. paratuberculosis의 분비항원에서 동정할 수 있었다 (도 4 참고). 동정된 상기 항원의 분자량 및 기능은 하기 표와 같다.

표 1

[0043]

Identified protein	Molecular mass (kDa)	Possible function
ModD	45	Fibronectin attachment Culture filtrate glycoprotein
MAP1018c	35	Enoyl-CoA hydroratase
PepA	32	Serin protease
MAP2950c	20	Hypothetical protein
DegQ	8	Serine protease htrA-like protein
MAP1420	45	Hypothetical protein
SodA	21	Superoxide dismutase
MAP4056c	13	Hypothetical protein

[0044] **<실시예 2> 크론씨병의 혈청학적 진단을 위한 M. paratuberculosis 진단가치 인자 발굴**

[0045] 본 실시예에서는 도 4(A, B)에서 나타난 바와 같이 크론씨병 환자 중 M. paratuberculosis가 검출되었던 환자의 pooling 혈청(n=10)과 사람에서 분리된 M. paratuberuclosis의 분비항원, 세포 추출 (cellular extract) 항원을 이용하여 크론씨병의 IgG에 특이적으로 반응하는 항원을 검출하였다. 검출된 항원은 아래 표처럼 LC-ESI-MS 기법으로 동정하였고 매칭 스코어와 생물정보 분석을 통해서 진단적 가치가 유용한 항원을 분석하였다.

[0046] 본 실시예에서 사용되는 실험 방법은 다음과 같다. 최종적으로 각 조건에 따라 모아진 단백질 샘플은 2D electrophoresis와 LC-ESI-MS 기법으로 분석하였다.

[0047] 각각의 시료 200 ug (IPG strip이 7 cm일 경우) 또는 400 ug (IPG strip이 11 cm 일 경우)을 재수화 버퍼[8 M 우레아, 2% CHAPS, 80 mM DTT, 0.001% 브로모페놀 블루, 0.2% 앰포라이트(Biolyte, Bio-Rad)]에 첨가하고, IPG 스트립 (Bio-Rad)은 pH 3-10, pH 4-7, pH 3.9-5.1, pH 4.7-5.9 범위를 갖고 있으며, 그 길이가 7 cm 또는 11 cm인 것을 사용하였다. Default cell 온도가 20℃이며, 스트립당 최대전류가 50 μA의 시스템을 갖는 PROTEAN IEF cell (Bio-Rad)을 사용하였다.

[0048] 먼저 준비한 시료를 재수화 트레이 (rehydration tray)에 로딩하여 12-16시간 재수화시킨 후, 시료의 염(salt) 또는 불순물을 제거하기 위하여 3차 증류수로 미리 적신 전극 심지(electrode wick)를 전극 위에 올려놓고, 그 위에 스트립을 얹고 미네랄 오일을 충분히 덮어준 후 250 V에서 30분간 과잉의 염을 제거하였다.

[0049] 염 제거 과정 후, 스트립이 7 cm일 경우에는 2시간 동안 250 V에서 4000 V로 전압을 올려주고 4000 V에서 20,000 VHr 동안의 포커싱과정을 거쳤고, 11 cm일 경우에는 250 V에서 8000 V로, 그리고 8000 V에서 35,000 VHr동안 포커싱을 실시하였다. 포커싱이 끝난 후에는 시료의 오버 포커싱 또는 드리프팅을 방지하기 위해 500 V에서hold step을 두었다.

[0050] IEF가 종료된 후에 strip은 2차 분리 전까지 -20℃에서 보관하였고, -20℃에서 보관 중이던 IPG 스트립을 실온에서 녹이고, 스트립 안의 단백질이 SDS와 결합할 수 있도록 스트립을 평형 완충액 I [6 M 우레아, 0.375 M Tris-Cl (pH 8.8), 2% DTT (w/v), 2% SDS, 20% 글리세롤]에 넣고 20분간 반응시켰다. 1차 반응 후, 평형 완충액Ⅱ [6 M 우레아, 0.375 M Tris-Cl (pH 8.8), 2.5% iodoacetamide (w/v), 2% SDS, 20% 글리세롤]에 넣고 20분간 2차 반응을 시킨 후, 충분히 평형이 된 스트립의 양극(anode)쪽을 SDS-PAGE 겔의 왼쪽으로 (marker방향) 가도록 삽입하였다. 15% 농도의 폴리아크릴아마이드 겔(polyacrylamide gel) 또는 10-20% 농도의 겔 (Bio-Rad)을 사용하여 전기영동 하였고, 겔은 Coomassie brilliant blue R250 (Bio-Rad)으로 염색한 후, 30% methanol과 10% glacial acetic acid의 용액으로 탈색하였다.

[0051] 2-DE로 분리한 유의하게 증가되는 단백질 스팟(spot)은 LC-ESI-MS 분석을 통해 동정하였고, 동정된 단백질은 하기 표 2에 나타낸 바와 같다.

[0052] 항-인간 IgG와 반응하는 단백질 스팟이 다수 관찰되었고, 이들 단백질 스팟 중 CF(culture filtrate)에서 13개 (도 4a), CE (cellular extract)에서 4개 (도 4b)의 단백질 스팟만이 인간 IgG에 특이적으로 반응하였고, IgA-특이적 반응 스팟은 관찰되지 않았다.

[0053] 결국, 40개의 조사된 단백질 스팟 중 33개의 단백질이 LC-ESI-MS (liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry) 분석에 의하여 확인되었다. 33개의 단백질에 대한 BLAST 검색으로 단백질의 가능한 기능을 예측하였고, 그 중 14개의 ORF(Open Reading Frame)이 hypothetical protein으로 판단되며, 해독된 단백질은 19개였다.

표 2

[0054] 크론씨병 환자의 IgG에 특이적으로 반응하는 사람유래 *M. paratuberculosis*의 혈청학적 진단 마커

Protein name		spot #	M.W. (Da)	predicted function
MAP 0047c	hypothetical protein	14, 27	41100	hypothetical protein
MAP 0217	FbpC1 (Fibronectin binding protein C1)	19	30929	Putative esterase
MAP 0494	hypothetical protein	38	36215	hypothetical protein (26-301 : WcaG-Nucleoside diphosphate sugar epimerases)
MAP 0630c	hypothetical protein	15	28618	hypothetical protein
MAP 0790	FadB1 (Fatty oxidation protein B1)	28	76177	1-709 : multifunctional fatty acid oxidation complex subunit alpha
MAP 0872	PhoS2-2 (Periplasmic phosphate-binding lipoprotein 2-2)	11, 12	37211	50-358 : PstS -ABC type phosphate transport system
MAP 0948	hypothetical protein	3	61155	hypothetical protein
MAP 1018c	EchA9 (Enoyl-CoA hydratase 9)	9	36852	7-350 : enoyl-CoA hydratase
MAP 1138c	LprG (Probable conserve lipoprotein LprG)	20, 21	24721	DUF1396- This family consists of several putative lipoproteins (unknown function)
MAP 1164	Gap (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)	29	36095	2-337 : Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/erythrose-4-phosphate dehydrogenase
MAP 1166	Tpi (Triosephosphate isomerase)	17, 18	27545	Triosephosphate isomerase - the key enzymes of the glycolytic pathway
MAP 1177c	Tal (Transaldorase)	7	40338	17-359 : Transaldolase-like proteins from plants and bacteria
MAP 1210c	Aconitate hydratase	1	101546	aconitate hydratase (82-379 : Aconitase A catalytic domain)
MAP 1305	TrpC (Indole-3-glycerol-phosphate synthase)	33	28125	45-258 : Indole-3-glycerol phosphate synthase (IGPS); an enzyme in the tryptophan biosynthetic pathway, catalyzing the ring closure reaction of 1-(o-carboxyphenylamino)-1-deoxyribulose-5-phosphate (CdRP) to indole-3-glycerol phosphate (IGP), accompanied by the rel
MAP 1339	hypothetical protein	39	15437	hypothetical protein (6-143 : Usp: Universal stress protein family. Usp is a small cytoplasmic bacterial protein whose expression is enhanced when the cell is exposed to stress agents
MAP 1362	ArgJ (Arginine biosynthesis bifunctional protein)	22, 36, 37	40929	38-404 : Ornithine acetyltransferase (OAT) family; also referred to as ArgJ
MAP 1609c	FbpB (Fibronectin binding protein B)	5	34706	Fibronectin binding protein
MAP 1659	hypothetical protein	16	26333	hypothetical protein
MAP 1718c	hypothetical protein	24	15518	hypothetical protein (31-149 : DUF1942-Domain of unknown function, beta-sandwich structure)

MAP 1846c	HisG (Histidine synthesis protein G)	31	30541	48-207 : ATP phosphoribosyltransferase
MAP 1889c	Wag31 (Conserved hypothetical protein)	40	28050	4-215 : Cell division initiation protein
MAP 1981c	hypothetical protein	32	27294	hypothetical protein (3-245 : Zn-ribbon protein, possibly nucleic acid-binding)
MAP 2120c	hypothetical protein	2	61155	hypothetical protein
MAP 2121c	hypothetical protein	10	33671	hypothetical protein
MAP 2541c	Mdh (Malate dehydrogenase)	13	34631	1-326 : malate dehydrogenase
MAP 2770	hypothetical protein	23, 25, 26	19316	hypothetical protein
MAP 3041	LppZ (Putative lipoprotein)	8	41254	39-400 : Glucose/sorbosone dehydrogenases
MAP 3092	FecB (Probable FeIII-dicitrate-binding periplasmic lipoprotein)	12	36983	a protein involved in the transport of iron from ferric citrate in Escherichia coli
MAP 3567	hypothetical protein	34, 35	30184	hypothetical protein (1-271 : short chain dehydrogenase,1-229 : 3-ketoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase)
MAP 3673c	GabD2 (Putative succinate-semialdehyde dehydrogenase)	4	49979	role of the formimg an alternative pathway from alpha-ketoglutarate to succinate (in M.TB)
MAP 3956	hypothetical protein	6	45659	hypothetical protein (2-402 :dihydrolipoamide dehydrogenase)
MAP 4308c	hypothetical protein	30	33645	hypothetical protein
MAP 0187c	Superoxide dismutase	20	23030	Superoxide dismutase

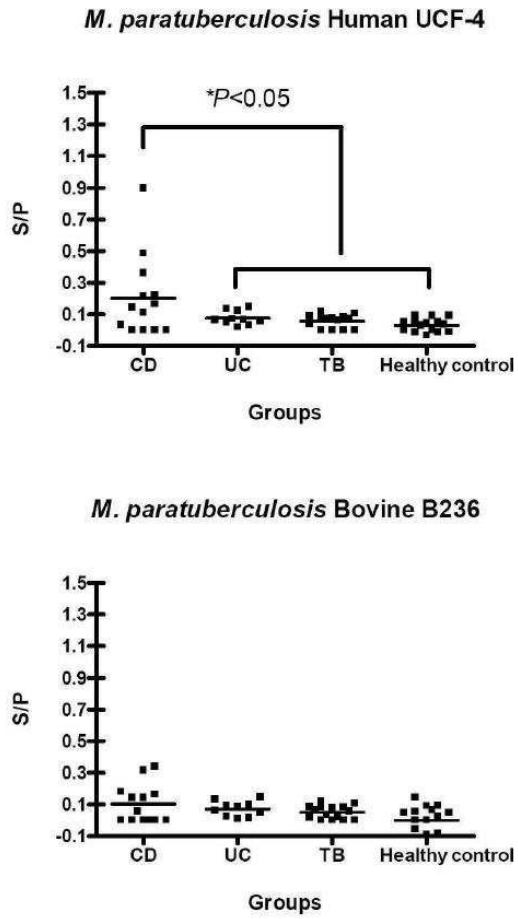
[0055] 상기에서는 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 기술하였으나, 이는 어디까지나 예시에 불과한 것으로 본 발명에 대한 다양한 변형과 변경이 가능하다. 또한 그러한 변형과 변경은 모두 본 발명의 권리범위에 속한다는 사실은 하기의 특허청구범위를 통하여 보다 분명해질 것이다.

산업상 이용가능성

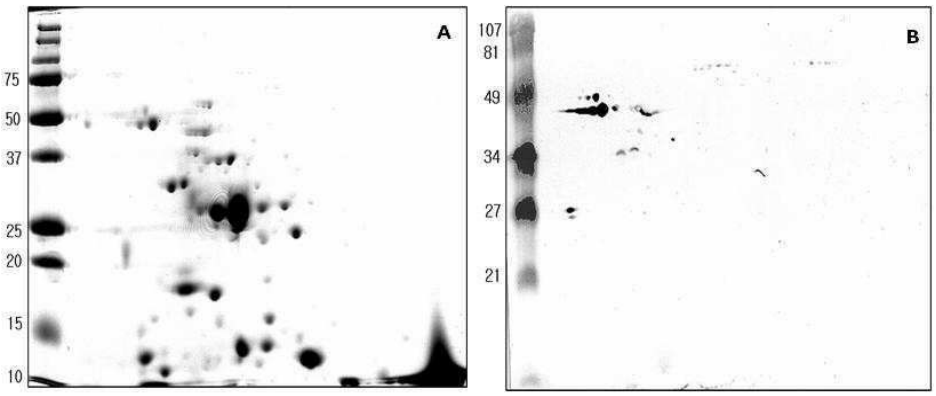
[0056] 상기에서 설명한 바와 같이 본 발명의 마이코박테리움 아비움 아종 파라투버큘로시스 (Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis) 유래의 크론씨병 진단용 항원은 크론씨병 환자의 IgG에 특이적으로 반응하여 크론씨병을 혈청학적으로 진단하는 데 유용하다. 이러한 항원은 크론씨병을 혈청학적으로 진단할 수 있는 유용한 기법에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면

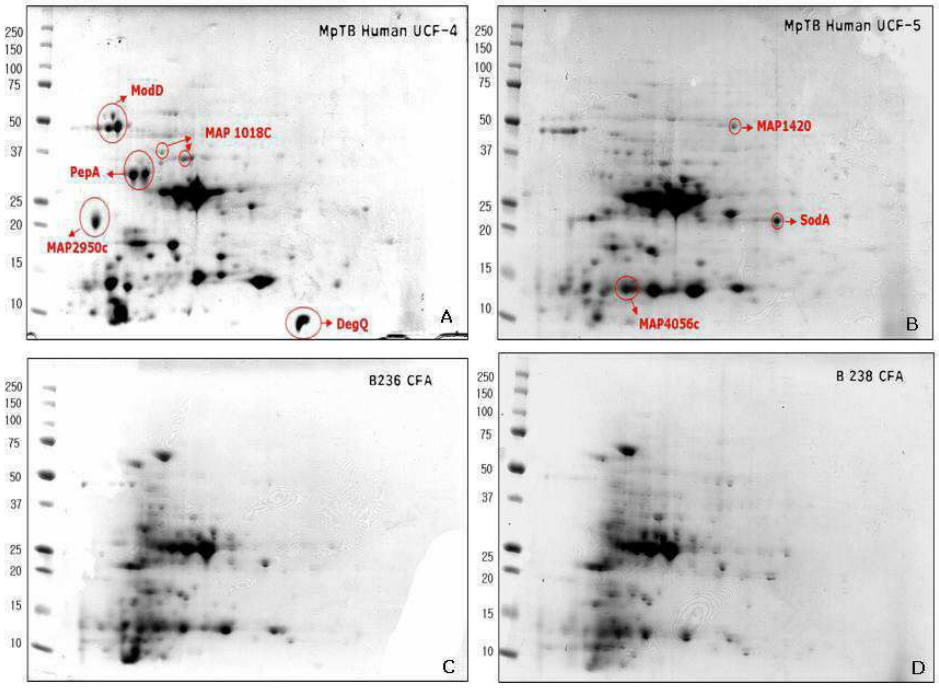
도면1


M. paratuberculosis Human UCF-4
*P<0.05
S/P
1.5
1.3
1.1
0.9
0.7
0.5
0.3
0.1
-0.1
CD
UC
TB
Healthy control
Groups
M. paratuberculosis Bovine B236
S/P
1.5
1.3
1.1
0.9
0.7
0.5
0.3
0.1
-0.1
CD
UC
TB
Healthy control
Groups

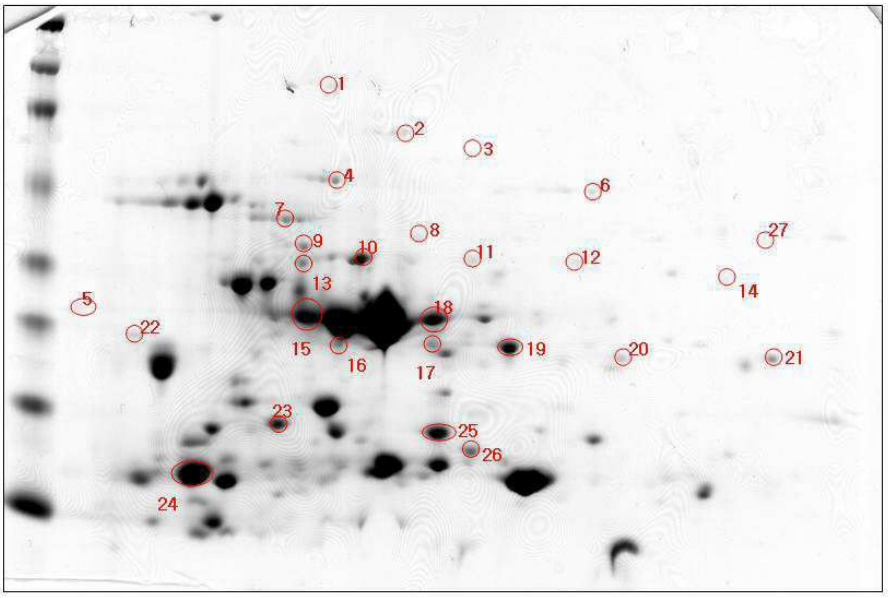
도면2


A
75
50
37
25
20
15
10
B
107
81
49
34
27
21

도면3


MpTB Human UCF-4
ModD
MAP 1018C
PepA
MAP2950c
DegQ
A
MpTB Human UCF-5
MAP1420
SodA
MAP4056c
B
B236 CFA
C
B 238 CFA
D
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10

도면4a


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27

도면4b

