



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0059164
(43) 공개일자 2023년05월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/569 (2017.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/56911 (2013.01)

G01N 2333/195 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0137899

(22) 출원일자 2022년10월25일

심사청구일자 2022년10월25일

(30) 우선권주장

1020210142685 2021년10월25일 대한민국(KR)

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)

(72) 발명자

이진수

인천광역시 연수구 해돋이로 107, 4동 2401호(송도동, 송도 더샵 퍼스트월드)

(74) 대리인

특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 바르토넬라 헨셀라이 유래 세포의 소포체를 이용한 바르토넬라 감염증 진단 방법

(57) 요약

본 발명은 바르토넬라 유래 세포의 소포체의 바르토넬라 감염증 진단 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로 바르토넬라 유래 세포의 소포체 항원을 포함하는 바르토넬라 감염증 진단용 바이오마커 조성물, 진단용 조성물 및 진단 키트에 관한 것이다. 본 발명에 따른 바르토넬라 감염증(*Bartonella* infection)의 진단 방법은 비침습적인 방법으로 대상체 유래 생물학적 시료를 이용해 바르토넬라 유래 세포의 소포체를 특이적으로 검출함으로써 상기 균주의 감염 여부를 확인함으로써 바르토넬라 감염증을 간편하면서도 높은 민감도와 정확도로 바르토넬라 감염증을 조기 진단하는 진단용 바이오마커 조성물, 진단용 조성물 및 진단 키트에 활용할 수 있다.

대 표 도 - 도1



명세서

청구범위

청구항 1

바르토넬라 헨셀라이(*Bartonella henselae*) 유래 세포외 소포체(extracellular vesicle)를 포함하는 바르토넬라 감염증 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 세포외 소포체는 혈액한천 배지 또는 세포에서 배양하여 수득한 것을 특징으로 하는 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 3

바르토넬라 헨셀라이(*Bartonella henselae*) 유래 세포외 소포체(extracellular vesicle)에 특이적으로 결합하는 제제를 유효성분으로 하는 바르토넬라 감염증 진단용 조성물.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 제제는 항체, 펩타이드, 앵타머 및 화합물로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 바르토넬라 감염증 진단용 조성물.

청구항 5

청구항 3의 조성물을 포함하는 바르토넬라 감염증 진단용 키트.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 키트는 바르토넬라 헨셀라이(*Bartonella henselae*) 유래 세포외 소포체(extracellular vesicle)가 코팅된 기판; 상기 세포외 소포체(extracellular vesicle)에 특이적으로 결합하는 생체 시료를 주입하고 반응시키는 반응부; 및 상기 반응부에서 일어나는 항원-항체 결합을 확인할 수 있는 발색부를 포함하는 바르토넬라 감염증 진단용 키트.

청구항 7

청구항 6에 있어서,

상기 발색부는 HRP(horseradish peroxidase), 염기성 탈인산화효소(alkaline phosphatase), 콜로이드(colloid), 형광물질(fluorescein), 방사성 동위원소 및 색소(dye)로 이루어진 군으로부터 선택된 발색물질을 포함하는 것을 특징으로 하는 진단용 키트.

청구항 8

(1) 바르토넬라 감염증이 의심되는 대상체로부터 분리된 생물학적 시료를 준비하는 단계; 및

(2) 바르토넬라 헨셀라이(*Bartonella henselae*) 유래 세포외 소포체(extracellular vesicle)와 상기 준비된 생물학적 시료를 접촉시켜 항원-항체 반응을 수행하는 단계;

를 포함하는 바르토넬라 감염증 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 (1) 단계는 바르토넬라 감염증이 의심되는 대상체로부터 분리된 생물학적 시료를 혈액한천 배지 또는 세포 배양하여 준비하는 것을 특징으로 하는 바르토넬라 감염증 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 10

청구항 8에 있어서,

상기 (2) 단계의 항원-항체 반응은 효소면역분석법(enzyme linked immunosorbent assay; ELISA), 방사능면역분석법(radioimmunoassay; RIA), 샌드위치면역분석법(sandwich ELISA), 면역형광분석법(Immuno-fluorence Assay; IFA), 면역발광분석법 (Immunochemiluminescence Assay) 또는 면역조직화학염색법(Immunohistochemical staining)을 통해 수행하는 것을 특징으로 하는 정보 제공 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 바르토넬라 헨셀라이 유래 세포외 소포체를 이용한 바르토넬라 감염증 진단 방법을 제공한다.

배경 기술

[0002] 바르토넬라 헨셀라이(*Bartonella henselae*) 세균 감염은 가장 흔한 인수공통 감염병으로, 주로 고양이, 개와 같은 반려동물과 관련되어 감염이 일어난다. 이는 고양이 급히병, 임파선 종대, 불명열, 심내막염, 발진, 관절통 등을 유발한다.

[0003] 바르토넬라 헨셀라이는 세포내 기생 미생물로서 일반적인 배지보다는 살아있는 세포에 기반한 세포배양을 이용하여 배양 증식하게 된다. 바르토넬라 헨셀라이는 혈액천배지에서도 배양이 되는 특성을 가지고 있어 여러 배양 방법을 이용하여 증식할 수 있다.

[0004] 한편, 세균, 진균 및 진핵생물을 포함한 모든 세포는 엑소좀(exosome), 외막 소포(outer membrane vesicle; OMV) 등의 세포외 구조를 가진 세포외 소포체(extracellular vesicle)를 생성하며, 이러한 소포체는 세포에서 유래하여 생성되었기에 세포 유래의 핵산, 단백질 등 다양한 물질을 포함하고 있어 각종 질환의 조기 진단을 위한 표적으로 주목받고 있다. 본 발명자들은 이전 연구를 통해 바르토넬라 역시 외막 소포체를 세포 밖으로 분비하는 것을 확인하였고 바르토넬라 균주에서 분비된 외막 소포체를 바르토넬라의 감염 진단에 이용하고자 하였다.

[0005] 종래에는 바르토넬라 감염증을 진단하기 위해, 혈액의 간접면역형광 항체검사법, 임파선 조직과 같은 생검을 통해 조직병리학적 검사나 핵산검사 또는 상기 균을 배양하는 방법이 시행되고 있다. 그러나 혈액의 간접면역형광 항체검사법은 위음성이나 위양성이 많고, 특히 고양이 급히병 환자에서 항체가 낮게 나올수 있는 제한점이 있으며, 조직병리학적 검사는 조직을 얻는 데 있어 침습적인 과정을 거쳐야하고, 또한 검사의 민감도와 특이도가 매우 낮아 바르토넬라 감염증의 진단에 통상적으로 시행되지 않는다. 이런 제한점으로 인해 기존 검사법은 정밀도, 민감도 등이 낮아 초기 진단과 치료의 시작에 제한점이 된다. 따라서 바르토넬라 감염에 의한 바르토넬라 감염증을 더 민감하고 높은 정확도로 보다 조기에 진단할 수 있는 검사법의 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) 1. International Journal of Infectious Diseases Volume 17, Issue 10, October 2013, Pages e811-e819

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 바르토넬라 헨셀라이(*Bartonella henselae*) 유래 세포외 소포체(extracellular vesicle)를 유효성분으로 하는 바르토넬라 감염증 진단용 바이오마커 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 바르토넬라 헨셀라이(*Bartonella henselae*) 유래 세포외 소포체(extracellular vesicle)에 특이적으로 결합하는 제제를 유효성분으로 하는 바르토넬라 감염증 진단용 조성물을 제공하는 데에

있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 바르토넬라 감염증 진단용 키트를 제공하는 데에 있다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 (1) 바르토넬라 감염증이 의심되는 대상체로부터 분리된 생물학적 시료를 준비하는 단계; 및 (2) 바르토넬라 헨셀라이(*Bartonella henselae*) 유래 세포외 소포체(extracellular vesicle)와 상기 준비된 생물학적 시료를 접촉시켜 항원-항체 반응을 수행하는 단계;를 포함하는 바르토넬라 감염증 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 바르토넬라 헨셀라이(*Bartonella henselae*) 유래 세포외 소포체(extracellular vesicle)를 유효성분으로 하는 바르토넬라 감염증 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 바르토넬라 헨셀라이(*Bartonella henselae*) 유래 세포외 소포체(extracellular vesicle)에 특이적으로 결합하는 제제를 유효성분으로 하는 바르토넬라 감염증 진단용 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 바르토넬라 감염증 진단용 키트 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 (1) 바르토넬라 감염증이 의심되는 대상체로부터 분리된 생물학적 시료를 준비하는 단계; 및 (2) 바르토넬라 헨셀라이(*Bartonella henselae*) 유래 세포외 소포체(extracellular vesicle)와 상기 준비된 생물학적 시료를 접촉시켜 항원-항체 반응을 수행하는 단계;를 포함하는 바르토넬라 감염증 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명은 바르토넬라 헨셀라이 유래 세포외 소포체를 이용한 바르토넬라 감염증 진단 방법에 관한 것으로, 바르토넬라 감염증(*Bartonella* infection)의 진단 방법은 비침습적인 방법으로 대상체 유래 생물학적 시료를 이용해 바르토넬라 헨셀라이 항체를 특이적으로 검출함으로써 상기 균주의 감염 여부를 확인할 수 있는바, 간편하면서도 높은 민감도와 정확도로 바르토넬라 감염증을 조기 진단하는 진단용 바이오마커 조성물, 진단용 조성물 및 진단 키트에 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 바르토넬라 헨셀라이 유래 소포체를 배양 방법과 제작 방법에 따른 소포체의 항원 차이를 웨스턴 블롯으로 분석한 결과이다. (S; 크기 마커 1; 바르토넬라 헨셀라이 용해물 2; 혈액한천배지로 배양한 바르토넬라 헨셀라이균의 세포외 소포체 3; 배로세포로 배양한 바르토넬라 헨셀라이균의 세포외 소포체)

도 2는 다양한 방법의 배양을 이용하여 수득한 바르토넬라 헨셀라이 유래 세포외 소포체(extracellular vesicles, 이하 EVs라 함.)를 이용하여 플레이트에 처리하고, 바르토넬라 감염이 확진된 환자의 혈액을 이용하여 ELISA를 실시한 결과이다. (BT bEV: 환자혈액을 이용한 검사, NS_BT bEV: 음성 혈청을 이용한 검사)

도 3은 세포배양에서 수득한 소포체(cell culture base *Bartonella henselae* EVs, 이하 EVs라 함.)와 혈액한천 배지를 이용하여 수득한 바르토넬라 유래 소포체(blood agar culture base *Bartonella henselae* EVs, 이하 bEVs라 함.)의 진단 성능을 비교한 결과이다. (BT bEV: 환자혈액을 이용한 bEV항원 ELISA 검사, NS_BT bEV: 음성 혈청을 이용한 bEV항원 ELISA 검사, BT EV: 환자혈액을 이용한 EV항원 ELISA 검사, NS_BT EV: 음성 혈청을 이용한 EV항원 ELISA 검사)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0019] 본 발명은 바르토넬라 헨셀라이(*Bartonella henselae*) 유래 세포외 소포체(extracellular vesicle)를 유효성분으로 하는 바르토넬라 감염증 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0020] 상기 세포외 소포체는 혈액한천 배지 또는 세포에서 배양하여 수득할 수 있다.

[0021] 본 발명의 "바이오마커"는 바르토넬라 감염증이 발생한 대상체의 체액, 조직 또는 세포를 정상 대조군과 구분하

여 진단할 수 있는 물질로, 정상 대조군에 비하여 질환이 발생한 대상체의 체액, 조직 또는 세포에서 증가 또는 감소 양상을 보이는 항체 또는 단백질, 핵산, 지질, 당지질, 당단백질 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함한다.

[0022] 본 발명의 "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 개체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 개체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 개체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 개체의 상태를 모니터링하는 것)을 포함한다.

[0024] 또한, 본 발명은 바르토넬라 헨셀라이(*Bartonella henselae*) 유래 세포외 소포체(extracellular vesicle)에 특이적으로 결합하는 제제를 유효성분으로 하는 바르토넬라 감염증 진단용 조성물을 제공한다.

[0025] 상기 제제는 항체, 펩타이드, 앵타머 및 화합물로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0026] 본 발명에서 사용된 용어 “항체”는 당해 기술분야에 공지된 용어로서 항원성 부위에 대하여 지시되는 특이적인 면역 글로불린을 의미한다. 본 발명에서의 항체는 본 발명의 바르토넬라 헨셀라이(*Bartonella henselae*) 유래 세포외 소포체(extracellular vesicle) 항원에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 당해 기술분야의 통상적인 방법에 따라 항체를 제조할 수 있다. 상기 항체의 형태는 폴리클로날 항체 또는 모노클로날 항체를 포함하며, 모든 면역글로불린 항체가 포함된다. 상기 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 갖는 완전한 형태를 의미한다. 또한, 상기 항체는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함된다.

[0027] 본 발명에서 사용된 용어 “펩타이드”는 표적 물질에 대한 결합력 높은 장점이 있으며, 열/화학 처리시에도 변성이 일어나지 않는다. 또한, 분자 크기가 작기 때문에 다른 단백질에 붙어서 융합 단백질로의 이용이 가능하다. 구체적으로 고분자 단백질 체인에 붙어서 이용이 가능하므로 진단 키트 및 약물전달 물질로 이용될 수 있다.

[0028] 본 발명에서 사용된 용어 “앵타머”는 그 자체로 안정된 삼차 구조를 가지면서 표적 분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 특별한종류의 단일 가닥 핵산(DNA, RNA 또는 변형핵산)으로 구성된 폴리뉴클레오티드의 일종을 의미한다. 상술한 바와 같이, 앵타머는 항체와 동일하게 항원성 물질에 특이적으로 결합할 수 있으면서도, 단백질보다 안정성이 높고, 구조가 간단하며, 합성이 용이한 폴리뉴클레오티드로 구성되어 있으므로, 항체를 대체하여 사용될 수 있다.

[0030] 또한, 상기 조성물을 포함하는 바르토넬라 감염증 진단용 키트를 제공한다.

[0031] 상기 키트는 바르토넬라 헨셀라이(*Bartonella henselae*) 유래 세포외 소포체(extracellular vesicle)가 코팅된 기관; 상기 세포외 소포체(extracellular vesicle)에 특이적으로 결합하는 생체 시료를 주입하고 반응시키는 반응부; 및 상기 반응부에서 일어나는 항원-항체 결합을 확인할 수 있는 발색부를 포함할 수 있다.

[0032] 상기 발색부는 HRP(horseradish peroxidase), 염기성 탈인산화효소(alkaline phosphatase), 콜로이드(colloid), 형광물질(fluorescein), 방사성 동위원소 및 색소(dye)로 이루어진 군으로부터 선택된 발색물질을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0033] 본 발명의 “키트”는 바이오마커 성분에 특이적으로 결합하는 항체, 기질과의 반응에 의해서 발색하는 표지체가 접합된 2차 항체 접합체(conjugate), 상기 표지체와 발색 반응할 발색 기질 용액, 세척액 및 효소 반응 정지액 등을 포함할 수 있으며, 사용되는 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.

[0035] 또한, 본 발명은 (1) 바르토넬라 감염증이 의심되는 대상체로부터 분리된 생물학적 시료를 준비하는 단계; 및 (2) 바르토넬라 헨셀라이(*Bartonella henselae*) 유래 세포외 소포체(extracellular vesicle)와 상기 준비된 생물학적 시료를 접촉시켜 항원-항체 반응을 수행하는 단계;를 포함하는 바르토넬라 감염증 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

[0036] 상기 (1) 단계는 바르토넬라 감염증이 의심되는 대상체로부터 분리된 생물학적 시료를 혈액한천 배지 또는 세포 배양하여 준비할 수 있다.

[0037] 상기 (2) 단계는 효소면역분석법(enzyme linked immunosorbent assay; ELISA), 방사능면역분석법(radioimmunoassay; RIA), 샌드위치면역분석법(sandwich ELISA), 면역형광분석법(Immuno-fluorence Assay; IFA), 면역발광분석법(Immunochemiluminescence Assay) 또는 면역조직화학염색법(Immunohistochemical staining)을 통해 수행될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0039] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예 등을 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예 등은 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예 등에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예 등은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0041] <실험 예 1> 세포배양방법

[0042] 바르토넬라 헨셀라이(*Bartonella henselae*, 환자분리균주)를 베로세포(원숭이신장세포, 한국세포주은행)에 접종한 후, 37℃에서 7일 동안 배양하여 균의 증식을 유도하였다. 바르토넬라 헨셀라이에 감염된 베로세포는 5%(v/v) 우태아혈청(fetal bovine serum, SERANA 제품)을 포함하는 DMEM(한국 웰진 제품) 배양배지(culture medium)를 이용하여 배양하였다.

[0043] 상기 감염된 베로세포의 배양 정도는 간접면역형광법(immunofluorescence assay; IFA)으로 측정하였고, 90% 이상의 감염률이 확인되면 10개의 150mm 조직 배양 접시(tissue culture dish, 한국 SPL사 제품)의 베로세포에 다시 감염시키고 위의 방법으로 감염이 확인된 세포는 배지가 있는 상태에서 스크래퍼로 긁어 15mL 원심분리 관에 넣고 적당량의 직경 1mm의 유리구슬을 이용하여 보텍싱을 3분 강하게 세포를 갈아서 세포 내에 있는 바르토넬라 헨셀라이가 세포 밖으로 나오도록 유도하였다. 이후 4℃, 500xg로 5분 원심분리를 하여 베로세포 찌꺼기를 제거하고 상층액을 마이크로 튜브에 걸어서 13000rpm으로 1분 원심분리하였다. 상층액은 조심히 버리고 세포가 제거된 바르토넬라 헨셀라이 펠렛을 인산완충식염수(Phosphate buffered saline; PBS, Lonza 제품) 250 μL 넣어 바르토넬라 헨셀라이 현탁액을 수득하였다.

[0045] <실험 예 2> 바르토넬라 간접면역형광검사법

[0046] 간접면역형광법(immunofluorescence assay; IFA)을 이용하여 면역원성을 확인하였다. 베로세포에서 키운 바르토넬라 헨셀라이를 도말하여 항원 슬라이드를 준비하였다. 슬라이드에 바르토넬라 래빗 폴리 항체(엡클론 제작)를 20 μL씩 분주하고, FITC-결합 항-래빗 IgG 항체(잭슨 제품)와 반응시켰다. 유리판 위에 도말되어 있는 균 항원/항-바르토넬라 헨셀라이 래빗 폴리 항체/FITC표지 항-래빗 면역글로불린 복합체가 형성되어 형광현미경(Excitation 470-490nm, emission 520-560nm) 상에서 스폿 형태의 녹색형광이 관찰되면 바르토넬라 헨셀라이의 감염을 확인할 수 있었다.

[0048] <실험 예 3> 혈액한천배지 배양방법

[0049] 바르토넬라 헨셀라이 세포외 소포체의 대량생산을 위하여 Blood agar plate(BAP, HANGANG 제품) 100장에 바르토넬라 헨셀라이 현탁액을 100 μL 넣고 스프리딩을 하였다. 37℃에서 7일 동안 배양하여 바르토넬라 헨셀라이의 증식을 유도하였다.

[0051] <실험 예 4> 혈액한천 배지(BAP, blood agar plate)에서 배양한 바르토넬라 헨셀라이의 EVs 추출방법

[0052] BAP에서 콜로니가 확인되면 PBS 1mL을 넣고 스프레더로 모은 후 3000rpm에서 30분 원심분리하였다. 그 후 상층액을 0.45 μm 진공 필터(vacuum filtration device, mdi 제품)로 여과 진행한 후 0.2 μm 진공 필터(vacuum filtration device, mdi 제품)로 다시 여과를 하였다. 그리고 4℃, 37000rpm에서 2시간 30분 동안 초원심분리기(Ultra centrifuge)로 원심분리하여 BAP에서 배양된 바르토넬라 헨셀라이 세포외 소포체 펠렛(*B. henselae* outer membrane vesicle pellet)을 수득하였다. 펠렛 양에 따라 PBS 1~2mL 넣고 부유시켰다. 부유한 BAP에서

배양 된 바르토넬라 OMV 펠렛은 Pierce® BCA 단백질 어세이 시약(Pierce® BCA protein assay reagents, Thermo 제품)을 사용하여 정량한 다음, -70℃에서 보관하였다.

[0054] <실험 예 5> 세포에서 배양한 바르토넬라 헨셀라이의 EVs 추출방법

[0055] 바르토넬라 헨셀라이가 베로세포에 감염, 증식이 확인되면 배양 상청액 900mL을 0.45μm 진공 필터(vacuum filtration device, mdi 제품)로 여과 진행한 후 0.2μm 진공 필터(vacuum filtration device, mdi 제품)로 다시 여과를 하였다. 그리고 4℃, 37000rpm에서 2시간 30분 동안 초원심분리기(Ultra centrifuge)로 원심분리하여 BAP에서 배양된 바르토넬라 헨셀라이 세포외소포 펠렛(*B. henselae* outer membrane vesicle pellet)을 수득하였다. 펠렛 양에 따라 PBS 1~2mL 넣고 부유시켰다. 부유한 BAP에서 배양된 바르토넬라 OMV 펠렛은 Pierce® BCA 단백질 어세이 시약(Pierce® BCA protein assay reagents, Thermo 제품)을 사용하여 정량한 다음, -70℃에서 보관하였다.

[0057] <실시 예 1> 웨스턴 블롯을 이용한 바르토넬라 헨셀라이 유래 세포의 소포체의 특성 확인

[0058] 바르토넬라 헨셀라이를 단순 용해시킨 것, 혈액한천배지에서 배양시킨 바르토넬라 헨셀라이의 EVs 및 베로세포에서 배양시킨 바르토넬라 헨셀라이의 EVs를 각각 웨스턴 블롯하여 단백질양성을 비교해보았다. 이때 항 바르토넬라 IgG 레빗 항체를 이용하여 분석하였다.

[0059] 그 결과, 도 1에 따르면, 혈액한천 배지에서 배양하여 수득한 세포의 소포체가 가장 다양한 밴드의 존재를 보여 주었고 다음이 베로세포 배양에서 얻은 세포의 소포체이며, 바르토넬라 헨셀라이를 직접 과쇄하여 분석한 부분이 가장 적은 밴드 수를 보여주었다.

[0060] 따라서, 이는 혈액한천 배지에서 배양하여 수득한 세포의 소포체의 항원성이 가장 풍부하여 진단적 유용성이 가장 우수할 것임을 확인할 수 있다.

[0062] <실시 예 2> ELISA를 이용한 바르토넬라 헨셀라이 진단 확인

[0063] 바르토넬라 헨셀라이에서 분리된 세포의 소포체를 PBS와 혼합하여 농도별로 희석한 샘플을 제조한 다음, ELISA를 수행하여 상기 균주의 감염 여부의 진단이 가능한지를 확인하고자 하였다. ELISA 수행 시, 기관에 코팅된 항원은 바르토넬라 헨셀라이에서 유래한 EVs를 이용하였고, 발색반응을 위한 2차 항체는 시판되는 Human-HRP IgG 항체(잭슨 제품)를 구입하여 사용하였다.

[0064] 혈액에서 바르토넬라 헨셀라이가 분리 동정되어 확진한 4명의 환자 혈액을 이용하여 혈액배지 배양 바르토넬라 헨셀라이 유래 소포체(bEV)의 진단능을 평가하였다. 통상적인 바르토넬라의 혈청진단 검사법인 간접면역형광 검사법(바르토넬라 헨셀라이 IgG IFA)과 비교하였다. 바르토넬라의 혈청진단 검사법인 간접면역형광 검사법의 결과 해석은 환자의 혈청에서 1:256 희석배수 이상인 경우 양성으로 판독하고, 1:64 이상이거나 1:256 미만인 경우 감염의 가능성을 의심하는 것으로 하고 추적항체 검사를 권장하고 있다.

[0065] 그 결과, 도 2에 따르면 4명의 환자 중 1명(B1)만이 통상적인 실험실 진단법인 간접면역형광 항체검사법에서 IgG 역가가 320으로 양성이었고, 나머지 3명(B2, B3, B4)은 각각 1:160, 1:80, 비반응(non-reactive)으로 감염을 의심할 수 있는 정도의 수치 또는 음성의 결과였다. 그러나, 4명의 환자 혈액을 bEV를 항원으로 이용한 ELISA 검사에서 모두 양성반응을 보였다.

[0066] 이는 현재 기본 진단법으로 사용되는 간접면역형광법에서 1:256 미만의 결과를 보인 3명의 환자 모두에서도 양성 결과를 확인할 수 있었기에, bEV를 이용한 진단법이 더 우수한 결과를 도출한다는 것을 입증한다.

[0067] 나아가, 바르토넬라 유래 세포의 소포체를 항원으로 이용한 바르토넬라 감염증 진단의 유용성을 조사하기 위해 고양이와 접촉력을 갖고 임파선 종대와 같은 고양이 급히병의 증상을 명확히 가지고 있어 감염내과학 전문의가 바르토넬라 감염으로 임상적으로 진단한 환자의 혈액을 대상으로 검사하였다.

[0068] 바르토넬라 유래 세포의 소포체를 항원은 혈액배양배지 배양 또는 베로세포 배양에서 수득한 항원을 사용하여, ELISA 검사를 시행하였다.

[0069] 검사를 수행한 바르토넬라 감염 환자는 바르토넬라 간접면역형광검사(IFA) IgG 검사가 반응하지 않았던 검사 음

성군(그룹1) 11명 혈액, 간접면역형광 검사 IgG의 양성 희석배수가 1:64≤ 이면서 <1:256인 검사 의심군(그룹2) 8명이었다.

[0070] 혈청의 바르토넬라 간접면역형광검사(IFA)에서 감염이 의심되는 (64≤IgG titer <256) 환자의 혈액을 대상으로 실험하였다. 이때, 검체는 1:100 희석에서, 음성 대조군의 평균+2SD 보다 OD값이 큰 경우를 양성으로 하였다.

표 1

그룹 (검체수)	혈액한천배지 배양 세포의 소포체 (양성 검체수 (양성률%))	세포배양 세포의 소포체 (양성 검체수 (양성률%))
그룹1 (11)	6 (54.5)	7 (63.6)
그룹2 (8)	6 (75)	4 (50)
합 (19)	12 (63.2)	11 (57.9)

[0072] 그 결과, 상기 표 1에 따르면, 바르토넬라 감염의 표준검사법인 간접면역형광검사법에서 음성이었던 환자에서 혈액배양 유래와 세포배양 유래의 세포의 소포체를 항원으로 적용하여 진단한 경우 각각 54%, 63% 그리고, 실험실적으로 의심되는 환자에서 각각 75%, 50%의 실험실적인 진단을 추가로 할 수 있었고, 전체적으로는 각각 63.2%, 57.9%의 실험실적 추가진단을 할 수 있었다.

[0073] 따라서, 세포의 소포체를 항원으로 사용한 경우 기존 검사법인 간접면역형광검사법으로 진단할 수 없었던 경우에서 각각 50~75%의 추가적인 진단을 할 수 있어 기존 검사법보다 월등한 진단성능을 관찰하였다.

[0075] <실시 예 3> 세포배양에서 수득한 소포체와 혈액한천배지를 이용하여 수득한 바르토넬라 유래 소포체(bEVs)의 진단성능 비교

[0076] 세포배양에서 수득한 소포체(EVs)와 혈액한천배지를 이용하여 수득한 바르토넬라 유래 소포체(bEVs)의 진단성능을 비교하기 위해, 위에서 실험한 B3의 환자 혈청을 이용하였다. 배로세포 배양에서 수득한 소포체와 혈액한천배지를 이용하여 수득한 바르토넬라 유래 소포체를 1μg/mL 농도로 항원으로 이용하여 ELISA 검사를 시행하였다.

[0077] 그 결과, 도 3에 따르면, B3의 경우, bEVs를 이용한 ELISA 검사법에서 월등히 높은 OD 값을 관찰되었다.

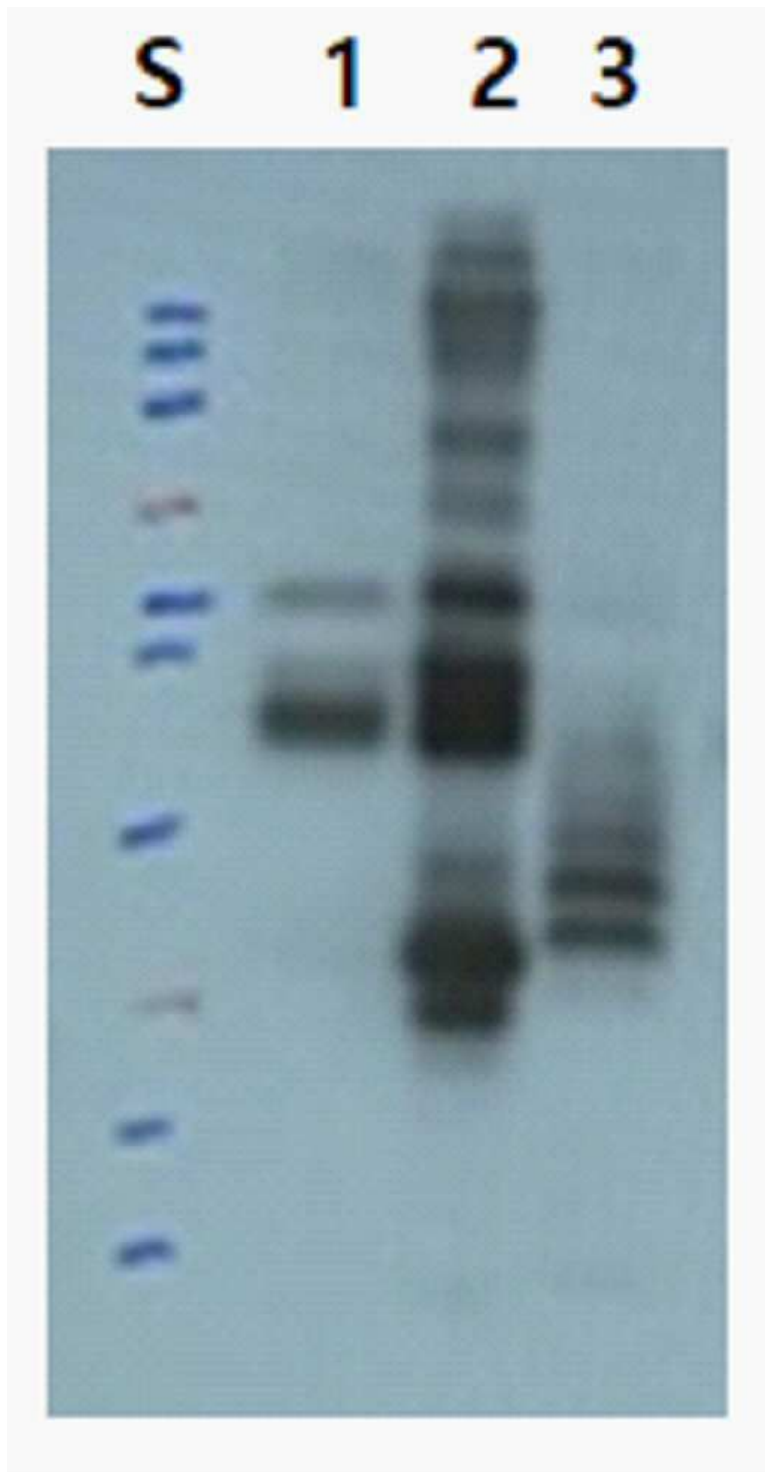
[0078] 따라서, 혈액한천배지에서 배양한 바르토넬라 헨셀라이의 소포체 항원을 이용하여 ELISA 수행 시 우수하게 바르토넬라 헨셀라이의 감염 여부를 진단할 수 있음을 알 수 있었다.

[0080] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

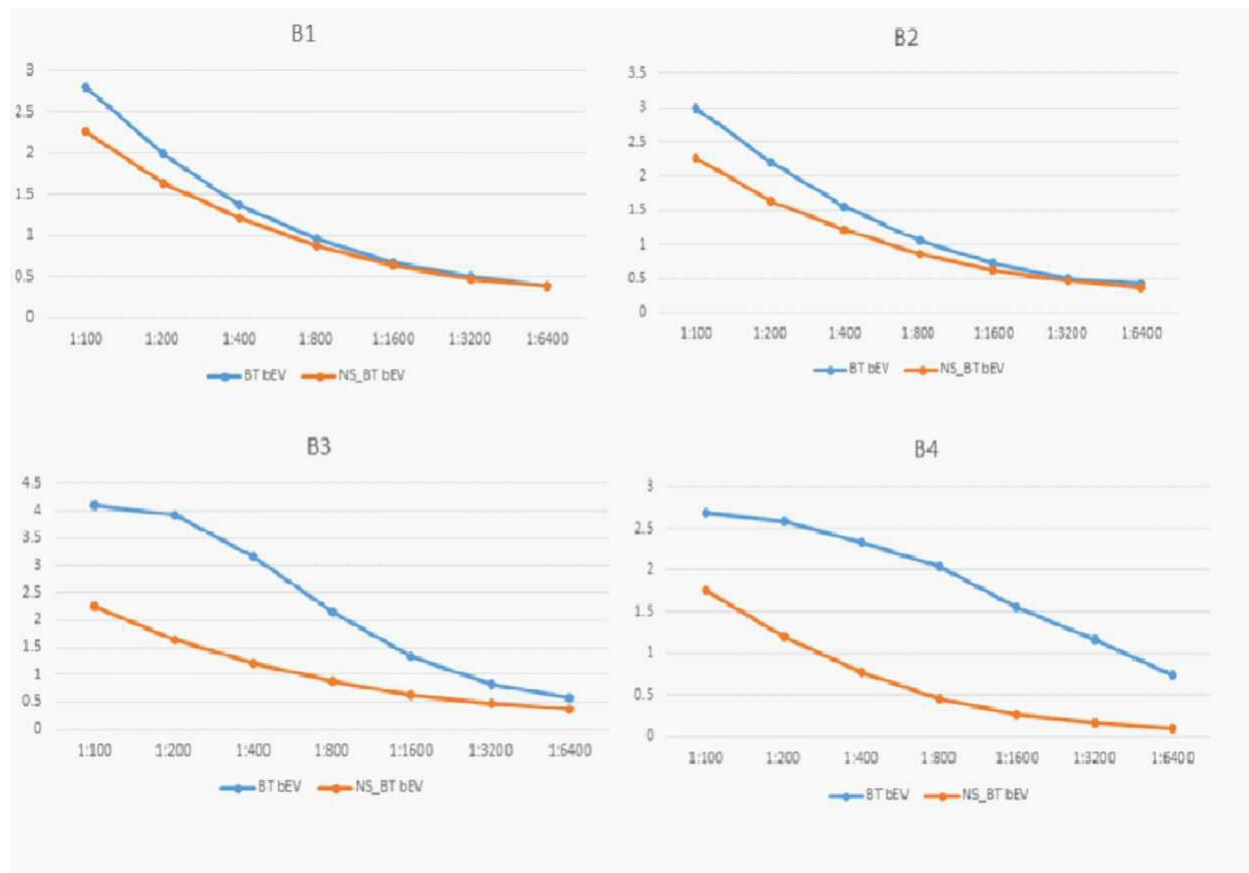
[0081] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

도면1



도면2



도면3

