



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0033868
(43) 공개일자 2010년03월31일

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/48 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0092934

(22) 출원일자 2008년09월22일

심사청구일자 2008년09월22일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 공동 220번지 충남대학교

연세대학교 산학협력단

서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교

(72) 발명자

조상래

서울특별시 서대문구 신촌동 134번지 연세대학교
의과대학 미생물학교실

신성재

대전광역시 중구 문화1동 6번지 충남대학교의과대
학 미생물학 교실

전보영

서울특별시 서대문구 신촌동 134번지 연세대학교
의과대학 미생물학교실

(74) 대리인

김순웅

전체 청구항 수 : 총 12 항

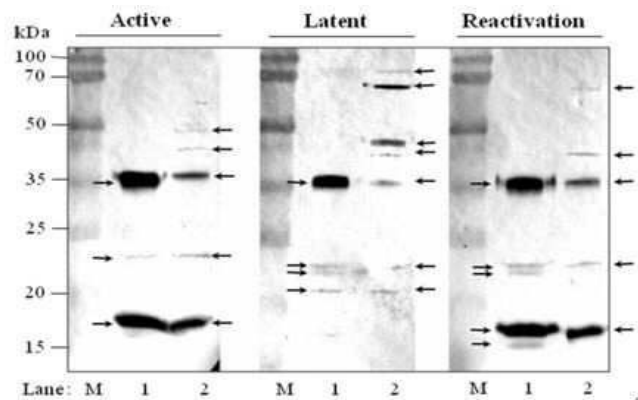
(54) 결핵의 단계 진단용 마커의 스크리닝 방법 및 발굴된 단백질 항원

(57) 요약

본 발명은 결핵균으로 감염된 동물로부터 결핵의 활성기, 잠복기 및 재활성기별로 분리된 혈청에서 각 단계에 특이적으로 발현되는 결핵균 유래의 단백질 항원을 검출하는 결핵의 단계 진단용 마커의 스크리닝 방법 및 상기 스크리닝 방법에 의해 발굴된, 결핵균으로 감염된 동물의 활성기, 잠복기 및 재활성기 각각의 단계별 혈청에 특이적으로 반응하는 결핵의 단계 진단용 항원에 관한 것이다.

본 발명의 마커에 의해 결핵의 조기 진단과 효과적인 치료 방향 제시, 예후를 예측할 있다.

대 표 도 - 도3



특허청구의 범위

청구항 1

결핵균으로 감염된 동물로부터 결핵의 활성화, 잠복기 및 재활성기별로 분리된 혈청에서 각 단계에 특이적으로 발현되는 결핵균 유래의 단백질 항원을 검출하는 결핵의 단계 진단용 마커의 스크리닝 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,

동물은 마우스를 포함한 실험동물인 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 3

제 2항에 있어서,

활성기는 결핵균 감염 후부터 결핵 치료 전인 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 4

제 2항에 있어서,

잠복기는 결핵 치료 후부터 면역 억제제 투여 전인 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 5

제 2항에 있어서,

재활성기는 면역 억제제 투여 후인 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 6

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

검출은 2차원 전기영동(2-dimensional electrophoresis)과 면역블롯(immunoblot) 및 LC-ESI-MS(liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry) 기법을 이용하는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 7

결핵균으로 감염된 동물의 활성화, 잠복기 또는 재활성기 각 단계별 혈청에 특이적으로 반응하는 결핵의 단계 진단용 항원.

청구항 8

제 7항에 있어서,

활성기 단계의 혈청에 특이적으로 반응하는 항원은 KatG 또는 Adenylate kinase 것을 특징으로 하는 항원.

청구항 9

제 7항에 있어서,

잠복기 단계의 혈청에 특이적으로 반응하는 항원은 KatG, Malate synthase G, GroEL, Cytidylate kinase, CFP-10 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 항원.

청구항 10

제 7항에 있어서,

재활성기 단계의 혈청에 특이적으로 반응하는 항원은 KatG, PstS3, Enoyl-CoA hydratase, Adenylate kinase, Cytidylate kinase, CFP-10 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 항원.

청구항 11

제 7항 내지 제 10항 중 어느 한 항에 따른 항원을 포함하는 결핵의 단계 진단용 조성물.

청구항 12

제 7항 내지 제 10항 중 어느 한 항에 따른 항원을 포함하는 결핵의 단계 진단용 키트.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 결핵의 단계 진단용 마커의 스크리닝 방법 및 발굴된 단백질 항원에 관한 것으로, 보다 자세하게는 결핵균으로 감염된 동물로부터 결핵의 활성기, 잠복기 및 재활성기별로 분리된 혈청에서 각 단계에 특이적으로 발현되는 결핵균 유래의 단백질 항원을 검출하는 결핵의 단계 진단용 마커의 스크리닝 방법 및 상기 스크리닝 방법에 의해 발굴된, 결핵균으로 감염된 동물의 활성기, 잠복기 및 재활성기 각각의 단계별 혈청에 특이적으로 반응하는 결핵의 단계 진단용 항원에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 결핵을 유발하는 병원체인 결핵균 (*Mycobacterium tuberculosis*)는 일차적으로 호흡기를 통하여 감염이 이루어지며, 세계적으로 매년 약 200만 명의 사람들이 결핵에 의하여 사망하고 800만 명 정도의 새로운 결핵환자가 발생하고 있다. 결핵은 세계 10대 사망원인의 하나로 우리나라는 OECD 가입 30개국 중 결핵사망률 1위로 인구 10만명 당 5.5명 (하루 평균 7.4명)이 사망하고 있으며 (2005년도 사망 통계), 이는 일본의 3.9배, 미국의 23.3배이다. 우리나라는 최근 들어 결핵신환자 발생률이 더 이상 감소하지 않고 있으며, 매년 10~20대 청소년에서 집단결핵이 유발되어 사회문제가 되고 있다. 결핵균에 감염된 사람들 중에서 단지 5~10%만이 결핵으로 발병한다고 알려져 있으나, 지난 50년간 국가결핵관리사업 추진결과로 결핵에 의한 사망률이 많이 감소하였지만, 2000년대에 들어 신환자수의 감소 추세가 둔화되고 있으며, 최근 3년간 결핵환자의 수는 점차 증가하고 있는 추세이다. 또한 최근에는 두 가지 이상의 약제에 대해 내성을 갖는 다제내성결핵(Multidrug resistant tuberculosis)의 증가와 HIV와 결핵의 동시 감염으로 인한 결핵의 증가로 인해 보다 효과적인 진단기법의 개발 및 치료제 개발이 시급한 실정이다.

[0003] 결핵에 일단 감염되면 정상인의 90% 이상은 잠복감염의 형태로 질병이 진행되지만 시간이 지나면서 10% 이상이 활동성 결핵으로 재활성화된다. 하지만 아직까지 결핵균의 재활성 기전 및 잠복감염에 대한 정확한 기전이나 학문적 연구가 미비한 실정이다. 그러므로 결핵의 효과적인 제어를 위해서는 활동성 결핵, 잠복감염, 재활성화를 구분할 수 있는 바이오마커의 개발연구가 반드시 필요하다. 이러한 연구는 결핵의 조기 진단과 효과적인 치료 방향 제시, 예후를 예측할 수 있는 진단기법의 개발에 결정적인 단서를 제공할 수 있다. 또한, 발굴된 특이적인 바이오마커를 이용한 진단기법은 장기이식, 세포치료, 항암치료 등 현대의학의 발달과 더불어 증가하고 있는 결핵의 병인론 및 치료효과를 예측하게 함으로써 결핵의 제어 및 국민건강 보전에 이바지 할 것이다.

[0004] 병원성 마이코박테리아의 대표적인 균인 결핵균은 대식세포내에서 살아가는 숙주내 기생세균이다. 현재까지 결핵균의 지속 감염 및 잠복 감염으로의 유도과 재활성화 되는 기전은 거의 알려져 있지 않다. 최근에 in vitro 에서 대사성 기아상태, 숙주의 면역환경 등에 의하여 결핵균이 대식세포내에서 잠복감염 및 지속감염을 유지한다고 알려져 있으며 이러한 잠복기 상태에서 결핵균의 특성은 다음과 같다(도 1 참조).

[0005] 첫째, 잠복상태의 결핵균은 여러 항생제의 치료에 반응하지 않아 지속적인 항생제 치료를 요하지만 효과가 미미하다. 특히, 세균의 복제 (DNA replication)를 타겟으로 하는 항생제들 (Ciprofloxacin 등)은 세균의 복제가 이루어지지 않으므로 잠복 감염시에 효과가 없을 것으로 추정되며, 또한 다제내성 결핵균의 출현으로 항생제 사용이 제한을 받고 있다.

[0006] 둘째, 잠복 감염이나 지속 감염시의 결핵균은 그 숫자가 매우 적고, 숙주의 여러 인자에 의하여 세균의 복제가 조절되기 때문에 세포외로 분비되는 결핵균의 단백질항원도 매우 미량으로 존재한다. 그러므로 조직으로부터 결핵균 자체를 분리, 동정하는 것뿐만 아니라 DNA를 검출하는 PCR 방법 등을 사용하더라도 결핵균을 분리 및 검출하는 것이 용이하지 않다.

- [0007] 셋째, 잠복감염 상태에서의 결핵균은 숙주의 면역 반응을 피해서 생존하며 암 환자, AIDS환자, 다른 바이러스 감염 등, 숙주의 면역이 억제되었을 때, 보다 심각하게 직접 또는 간접적으로 질병을 유발시킨다고 알려져 있다.
- [0008] 넷째, 숙주 면역 반응의 다양성 때문에 아직까지 잠복감염 및 재활성화된 결핵을 효과적으로 진단할 수 있는 혈청학적, 세포매개성 진단 방법이 확립되지 않았다.
- [0009] 다섯째, 결핵의 진단은 세균학적 진단과 임상적 진단으로 구분할 수 있으며, 세균학적 진단이 결핵의 유일한 확진방법이다. 세균학적 진단은 도말검사나 균배양, 분자생물학적 검사 (PCR법) 등을 통해 결핵균을 동정하는 것이다. 세균학적 진단을 위한 검체로는 객담이나 기관지 세척액, 위세척액 (소아), 조직 (폐, 림프절 등), 혈액, 소변, 뇌척수액, 늑막액 등이 있다. 하지만, 이러한 진단법으로는 잠복 결핵 및 조기 진단의 방법으로는 한계가 있다. 현재까지 결핵의 조기 진단 및 활동성 결핵과 비활동성 결핵, 그리고 재발결핵의 진단을 구분할 수 있는 진단기법은 개발되어 있지 않다. 이는 이러한 단계를 구분할 수 있는 바이오마커가 발굴되어있지 않았기 때문이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0010] 이에, 본 발명자들은 결핵에 걸린 실험동물을 활성기, 잠복기 또는 재활성기로 유도하고, 각 단계별로 분리된 혈청에 각 단계별로 특이적으로 발현되는 결핵균 유래의 단백질 항원을 검출하고, 본 발명을 완성하기에 이르렀다.
- [0011] 본 발명은 결핵균으로 감염된 동물로부터 결핵의 활성기, 잠복기 및 재활성기별로 분리된 혈청에서 각 단계에 특이적으로 발현되는 결핵균 유래의 단백질 항원을 검출하는 결핵의 단계 진단용 마커의 스크리닝 방법을 제공하고자 한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 상기 스크리닝 방법에 의해 발굴된, 결핵균으로 감염된 동물의 활성기, 잠복기 및 재활성기 각각의 단계별 혈청에 특이적으로 반응하는 결핵의 단계 진단용 항원을 제공하고자 한다.

과제 해결수단

- [0013] 본 발명은 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)으로 감염된 동물로부터 결핵의 활성기, 잠복기 및 재활성기별로 분리된 혈청에서 각 단계에 특이적으로 발현되는 결핵균 유래의 단백질 항원을 검출하는 결핵의 단계 진단용 마커의 스크리닝 방법에 관한 것이다.
- [0014] 여기서, 동물은 마우스를 포함한 실험동물이 바람직하다. 숙주의 면역반응을 조절하고, 결핵의 활성기, 잠복기 및 재활성기를 제어할 수 있기 때문이다.
- [0015] '활성기(active phase)'는 결핵균이 활발하게 증식하는 단계를 말한다. 통상적으로 결핵에 걸린 동물의 혈청으로부터 다량의 결핵균이 검출되는 시기이다. 본 발명에서 실험동물의 경우 활성기는 결핵균 감염 후부터 결핵을 치료하기 전까지를 의미한다.
- [0016] '잠복기(latent phase)'또는 비활성기는 결핵균으로 감염되어 있으나, 이의 증식이 억제되어 결핵균이 검출되지 않는 단계를 말한다. 일반적으로 결핵균은 정상 동물에 감염될 경우에 활성기 없이 잠복기에 들어간다. 숙주의 면역반응 또는 항생제 등의 치료에 의하여 결핵균의 증식이 억제되고, 숙주의 면역 상태 또는 치료 정도에 따라 잠복기는 매우 다양한 기간 동안 지속될 수 있다. 본 발명에서 실험동물의 경우 잠복기는 결핵 치료 후부터 (후술되는) 면역 억제제 투여 전까지를 의미한다. 이 때, 결핵균이 검출되지 않거나, 미비한 양이 검출된다.
- [0017] '재활성기(reactive phase)'는 잠복기에 있던 결핵균이 활성화되어 다시 활발하게 증식하는 단계를 말한다. 일반적으로 활성기와 유사하게 혈청으로부터 다량의 결핵균이 검출된다. 본 발명에서 실험동물의 경우 텍사메타손을 포함한 코르티코이드(corticoid)와 같은 면역 억제제를 투여하여 재활성기를 유도할 수 있다. 이 경우에 재활성기는 면역 억제제 투여 후를 의미한다.
- [0018] 본 발명에서 각 단계별로 특이적으로 발현되는 결핵균 유래의 단백질 항원의 검출은 2차원 전기영동(2-dimensional electrophoresis)과 면역블롯(immunoblot) 및 LC-ESI-MS(liquid

chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry) 기법을 이용하는 것이 바람직하다.

- [0019] 본 발명은 전술된 스크리닝 방법에 의해 발굴된, 결핵의 단계 진단용 항원에 관한 것이다. 구체적으로 결핵균으로 감염된 동물의 활성기, 잠복기 및 재활성기 각각의 단계별 혈청에 특이적으로 반응하는 결핵의 단계 진단용 항원에 관한 것이다.
- [0020] 상기 항원은 Malate synthase G, GroEL, KatG, PstS3, Enoyl-CoA hydratase, Adenylate kinase, Cytidylate kinase, CFP-10 중에서 선택되는 항원일 수 있다. 본 발명에 의하면, KatG는 활성기를 비롯한 모든 단계를 진단할 수 있는 항원이고, Malate synthase G, GroE은 잠복기를 진단할 수 있는 항원이며, Cytidylate kinase, CFP-10은 잠복기와 재활성기를 진단할 수 있는 항원이고, PstS-3 및 Enoyl-CoA hydratase는 재활성기를 진단할 수 있는 항원이며, Adenylate kinase는 활성기와 재활성기를 진단할 수 있는 항원이다.
- [0021] 즉, 본 발명에서 활성기 단계의 혈청에 특이적으로 반응하는 항원은 KatG 또는 Adenylate kinase이고, 잠복기 단계의 혈청에 특이적으로 반응하는 항원은 KatG, Malate synthase G, GroEL, Cytidylate kinase, CFP-10 중에서 선택되며, 재활성기 단계의 혈청에 특이적으로 반응하는 항원은 KatG, PstS3, Enoyl-CoA hydratase, Adenylate kinase, Cytidylate kinase, CFP-10 중에서 선택될 수 있다.
- [0022] 본 발명에 의하여, 결핵의 단계 진단은 본 발명의 진단용 항원을 혈청학적 시료에 접촉시켜 항원-항체 복합체의 형성여부를 측정함으로써 생물학적 샘플 중에서 본 발명의 진단용 항원에 특이적으로 결합하는 항체의 존재 여부를 확인하는 방법에 의할 수 있다. 본 발명에서 사용된 용어 '항원-항체 복합체'란 본 발명의 항원 단백질과 생물학적 샘플 중 이를 특이적으로 인지하는 항체의 결합물을 의미한다.
- [0023] 본 발명의 항원 단백질은 결핵균으로부터 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 획득될 수 있다.
- [0024] 또한 본 발명은 상기 결핵의 단계 진단용 항원을 포함하는 것을 특징으로 하는 결핵의 단계 진단용 조성물을 제공한다.
- [0025] 상기 본 발명의 진단용 조성물은 결핵의 단계 진단용 항원 이외에 면역학적 분석에 사용되는 당업계에 공지된 시약을 추가로 포함할 수 있다.
- [0026] 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 면역분석법(radioimmunoassays), 효소결합면역법(ELISA: Enzyme Linked Immunoabsorbent assay), 면역블롯(immunoblotting), 파아르 분석법(Farr assay), 면역침강, 라텍스 응집, 적혈구 응집, 비탁계법, 면역확산법, 카운터-전류 전기영동법, 단일 라디칼 면역확산법, 면역크로마토그래피법, 단백질 칩 및 면역형광법이 있다.
- [0027] 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.
- [0028] 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, 피코에티레틴, 피코시아닌, 알로피코시아닌, 플루오르신이소티오시아네이트 등을 사용할 수 있다. 리간드로는 바이오틴 유도체 등이 있으며, 발광물로는 아크리디늄 에스테르, 루시페린, 루시페라아제 등이 있다. 미소입자로는 콜로이드 금, 착색된 라텍스 등이 있고 레독스 분자로는 페로센, 루테튬 착화합물, 바이올로젠, 퀴논, Ti 이온, Cs 이온, 디이미드, 1,4-벤조퀴논, 하이드로퀴논 등이 있다. 방사성 동위원소로는 ^3H , ^{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 있는 것이라면 어느 것이라도 사용할 수 있다.
- [0029] 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 Laboratory Manual, Harlow & Lane;

Cold Spring Harbor, 1988). 적합한 담체 또는 지지체의 예로는 아가로스, 셀룰로즈, 니트로셀룰로즈, 텍스트란, 세파텍스, 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) 등이 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.

[0030] 따라서 바람직하게는, 본 발명의 결핵의 단계 진단용 조성물은 진단용 키트의 형태로 제공될 수 있다.

효 과

[0031] 본 발명의 결핵 단계 진단용 항원에 의하여 결핵의 단계 즉, 진행 상태를 진단할 수 있다. 특히, 종래에는 진단이 어려웠던 잠복기, 재활성기 단계의 결핵을 진단할 수 있다. 따라서, 결핵의 조기 진단과 효과적인 치료 방향 제시, 예후를 예측할 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0032] 이하, 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0033] 실시예 1: 결핵균의 배양과 배양액 수거

[0034] 우리나라의 폐결핵 환자로부터 분리한 결핵균들 중에서 가장 유행하는 K 균주 (M. tuberculosis K-strain)를 이용하여 본 실시예에서 사용하였다. 결핵균 K 균주는 일반 균주에 비해 강한 병원성을 나타내고, 2001년도 보고에 의하면 우리나라 고등학교 학생들의 폐결핵 환자로부터 분리해낸 결핵균의 RFLP (restriction fragment length polymorphism) 프로파일에서 가장 빈번하게 발견되는 균주이며, 이것은 이전에 전국적으로 시행한 한국인들의 결핵균 조사에서 임상적으로 분리한 균주 중 가장 우세하게 나타났던 균주로 밝혀졌다. 항원은 결핵균의 분비 항원을 이용하였다. 이는 죽은 균보다 살아있는 결핵균이 보다 효과적으로 방어면역을 유도한다는 보고에 기초하여 결핵균 세포질 항원 보다는 결핵균이 분비하는 항원에 초점을 맞추어 실험하였다. 시험관 내에서 결핵균을 배양하면 배양액내 세포외로 단백질을 분비하는데 이를 CFP (Culture filtrate protein)라 하고 이러한 단백질은 세포질 단백질과 구별되는 특징을 나타내며 살아있는 세균의 빠른 인지가 가능한 항원으로 작용한다.

[0035] 우선 결핵균 K 균주와 표준 결핵균주인 마이코박테리움 투버쿨로시스 H37R을 7H9-OADC 배지에 접종하여 37℃에서 1달간 배양하였다. 배양된 각 균주는 글래스 비드 비터(glass bead beater)로 교반한 후 단일 결핵균이 존재하는 상층액을 수거하였고, 이를 7H10-OADC 아가 플레이트에 분주하여 오염 여부 확인과 함께 CFU(colony forming unit)를 계산하였다. 이렇게 만든 결핵균의 초기 배양액(seed lot)은 1ml씩 분주하여 -80℃에서 사용 전까지 보관하였다.

[0036] 배양 항원 (CFP 항원)은 1×10^9 /ml의 각 균주의 초기 배양액 중 100 μ l를 35ml의 변형된 Watson-Reid 브로스 (mWR 배지) 또는 Sauton's 합성 배지에 접종 후 37℃에서 6주간 배양함으로써 얻었다. 배양 후 0.2 μ m 여과를 통해 균을 제거하여 배양액을 얻었고, 이를 3-kDa 분자량 컷오프(cutoff)를 통해 농축하였다. 농축한 각 균주의 배양 항원은 BCA 단백질 농도 측정방법에 따라 농도를 측정하였다.

[0037] 실시예 2: 마우스 감염실험과 결핵의 각 질병 단계별 혈청 수집

[0038] 현재 결핵균의 잠복감염의 동물모델은 1950년대 코넬 대학의 McDermott 등에 의해 고안된 코넬 모델이 대표적이다. 마우스에 마이코박테리움 투버쿨로시스를 감염시키고 INH와 PZA로 12주 동안 치료하면 마우스의 폐와 비장의 조직에서 균이 배양되지 않았다. 그러나 수 개월 후에 고농도의 코르티코이드로 처리하면 결핵균이 재활성화되었다고 보고되었다. 본 발명에서는 잠재결핵 모델인 코넬 모델을 이용하여 활동성 결핵, 잠복 결핵, 재활성 결핵에 따른 마우스의 혈청을 수집하였다.

[0039] 5-6주령의 특이 병원성 배제 암컷 C57BL/6 마우스를 구입하여 연세대의 BL-3 biozard room에서 사육하였다. 결핵균을 마우스의 미정맥을 통하여 마우스 당 2×10^5 cfu를 감염시켰고, 감염 후 2, 4, 16, 28주 후에 마우스를 5마리씩 희생시켜 각 장기의 결핵균수를 측정하였다. 생균수를 측정하기 위하여 폐, 간, 비장을 분쇄하여

단계 회식하여 Middlebrook 7H11 아가에 37℃에서 3-4주간 배양한 후 집락수를 측정함으로써 결정하였다. 각 장기의 생균수와 병리조직학적 분석을 바탕으로, 활동성 결핵, 잠복 결핵 및 재활성 결핵으로 3단계로 분류하였고, 각 단계에 마우스의 혈청을 수집하였다(도 2 참조).

[0040] 활동성 결핵은 감염 후 결핵균이 많이 검출되는 감염 후 4주에 마우스를 희생시켜 혈청을 수집하였고, 잠복 결핵은 감염된 마우스에 항생제(INH와 PZA)를 사용하여 치료하여 균이 검출되지 않는 수준에 도달하였을 때인 약 14주와 16주 사이에서 혈청을 수집하였다. 추후 재활성 결핵은 텍사메타손 등의 면역억제제를 사용하여 다시 결핵균이 재활성된 마우스에서 혈청을 수집하였다.

[0041] **실시예 3: 2DE-immunoblot와 LC-ESI-MS 기법을 이용하여 결핵의 각 질병 단계에 특이적으로 반응하는 항원의 발굴**

[0042] 실시예 2에서 언급된 것과 같이 결핵을 질병의 3 단계, 활동성 결핵, 잠복 결핵, 재활성 결핵으로 분류하였고, 각 단계의 마우스 혈청을 이용하여 1차원 전기영동과 면역블롯(1-dimensional electrophoresis-immunoblot) (도 3)과 2차원 전기영동과 면역블롯(2-dimensional electrophoresis-immunoblot) (도 4a 및 4b)을 실시하였다. 각 질병 단계에 특이적으로 반응하는 단백질을 항원을 발굴하여 (도 5)검출된 항원은 아래 표처럼 LC-ESI-MS 기법으로 동정하였고 (표 1) 매칭 스코어(matching score)와 생물정보학 분석(bioinformatic analysis)을 통해 각 질병 단계에 따라 진단적 가치가 유용한 항원을 분석하였다(표 2).

[0043] 본 실시예에서 이용된 실험 방법은 다음과 같다. 최종적으로 각 조건에 따라 모아진 단백질 샘플은 2D 전기영동과 LC-ESI-MS 기법으로 분석하였다.

[0044] 각각의 시료 200 μ g (IPG 스트립이 7cm일 경우) 또는 400 μ g(IPG strip이 11cm일 경우) 재수화 완충용액[8 M Urea, 2% CHAPS, 80 mM DTT, 0.001% bromophenol blue, 0.2% ampholyte (Biolyte, Bio-Rad)]에 첨가하였다. 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 7cm 또는 11cm인 것을 사용하였다. 디폴트(Default) 온도가 20℃이며, 스트립당 최대전류가 50 μ A의 시스템을 갖는 PROTEAN IEF cell (Bio-Rad)을 사용하였다. 먼저 준비한 시료를 재수화 트레이에 로딩하여 12-16시간 재수화시킨 후, 시료의 염(salt) 또는 불순물을 제거하기 위하여 3차 증류수로 미리 적신 전극 심지(wick)를 전극 위에 올려놓았다. 그 위에 스트립을 얹고 광질유를 충분히 덮어준 후 250 V에서 30분간 과잉의 염을 제거하였다. 염 제거 과정 후, 스트립이 7 cm일 경우에는 2시간 동안 250 V에서 4000 V로 전압을 올려주고 4000 V에서 20,000 Vhr 동안의 focusing 과정을 거쳤고, 11 cm일 경우에는 250 V에서 8000 V로, 그리고 8000 V에서 35,000 Vhr동안 focusing을 실시하였다. Focusing이 끝난 후에는 시료의 over-focusing 또는 drifting을 방지하기 위해 500 V에서 hold step을 두었고, IEF가 종료된 후에 스트립은 2차 분리 전까지 -20℃에서 보관하였다. -20℃에서 보관 중이던 IPG 스트립을 실온에서 녹이고, 스트립 안의 단백질이 SDS와 결합할 수 있도록 스트립을 평형 완충용액 I [6 M Urea, 0.375 M Tris-Cl (pH 8.8), 2% DTT (w/v), 2% SDS, 20% glycerol]에 넣고 20분간 반응시켰다. 1차 반응 후, 평형 완충용액 II [6 M Urea, 0.375 M Tris-Cl (pH 8.8), 2.5% iodoacetamide (w/v), 2% SDS, 20% glycerol]에 넣고 20분간 2차 반응을 시킨 후, 충분히 평형된 스트립의 양극(anode)쪽을 SDS-PAGE 겔의 왼쪽으로 (marker 방향) 가도록 삽입하였다. 15% 농도의 폴리아크릴아미드 겔 또는 10-20% 구배 겔 (Bio-Rad)을 사용하여 전기영동하고, 겔은 Coomassie brilliant blue R250 (Bio-Rad)으로 염색한 후, 30% 메탄올과 10% 빙초산의 용액으로 탈색하였다. 2-DE로 분리한 유의하게 증가되는 단백질 스팟들은 LC-ESI-MS 분석을 통해 동정하였다.

표 1

[0045] 혈청학적으로 반응하는 단백질의 동정

스팟 번호	단백질 명칭	유전자 명칭	Rv No.	분자량	pi 값
1	Malate synthase G	<i>glcB</i>	Rv1837c	80.402	5.03
2	GroEL	<i>GroEL</i>	Rv4317c	55.891	5.02
3	KatG	<i>KatG</i>	Rv1908c	50.594	5.56
4	PstS3	<i>pstS-3</i>	Rv0928	39.838	6.16
5	Hypothetical protein	-	Rv3075c	33.100	4.73
6	Enoyl-CoA hydratase	<i>echA8</i>	Rv1070c	27.273	4.93
7, 8	Adenylate kinase	<i>adk</i>	Rv0733	20.125	5.02
9	Cytidylate kinase	<i>cmk</i>	Rv1712	20.250	4.72

10	CFP-10	<i>cfp10</i>	Rv3874	10.794	4.59
----	--------	--------------	--------	--------	------

표 2

단계별로 동정된 단백질

단백질	단계	성질	Cogs
KatG	모두	: 카탈라제-퍼옥시다제/퍼옥시다제군에 속함 -KatG 유전자에서의 결실은 INH 내성을 유발함	Catalase (peroxidaseI)
Malate synthase G	잠재	: 글리옥실레이트 바이패스에 관여함-(두번째 단계) -글리옥실레이트 및 아세틴-CoA로부터 말레이트의 형성	Malate Synthase
GroEL	잠재	: 샤페론 I 형과 유사한 GroEL 60kDa 샤페론군 -단백질의 생산적인 폴딩에 관여함	해독후 수식, 단백질 턴오버, 샤페론
Cytidylate kinase	잠재 & 재활성	: ATP로부터 CMP 또는 UMP로 인산기의 전달하여 CDP 또는 UDP 및 ADP 형성을 촉매함 [촉매 활성: L ATP+CMP = ADP+CDP]	시티딜레이트 키나제
CFP-10	잠재 & 재활성	: ESX-1 시스템에 의해 분비 -강력한 T 세포 반응을 유도함	
PstS-3	재활성	: 인산 ABC의 운반체-멤브레인을 관통한 무기 인산의 능동 운반에 관여함(유입 운반체)	ABC-형 인산 운반 시스템
Enoyl-CoA hydratase	재활성	: 불포화 지방 아실-CoA의 베타-하이드록시아실-CoA로의 가역적 수화를 촉매함	Enoyl-CoA/ 카르니틴 라세마제
Adenylate kinase	활성 & 재활성	: 활성 세포에서 AMP를 재활용하는데 필수적인 효소-ATP와 AMP를 두 분자의 ADP로 전환함	아데닐레이트 키나제 및 관련 키나제

[0047] 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.

도면의 간단한 설명

[0048] 도 1은 결핵균의 감염 경로 및 활성화, 잠복기 또는 재활성기로의 진행 상태를 나타낸 것이다(레인 1: 마이코박테리움 투버쿨로시스 H37Rv 균주, 레인 2: 마이코박테리움 투버쿨로시스 K 균주).

[0049] 도 2는 본 발명의 스크리닝 방법을 간략하게 나타낸 것이다.

[0050] 도 3은 결핵의 활성화, 잠복기, 재활성기 단계의 마우스 혈청에 대한 1차원 전기영동과 면역블롯 결과를 나타낸 것이다.

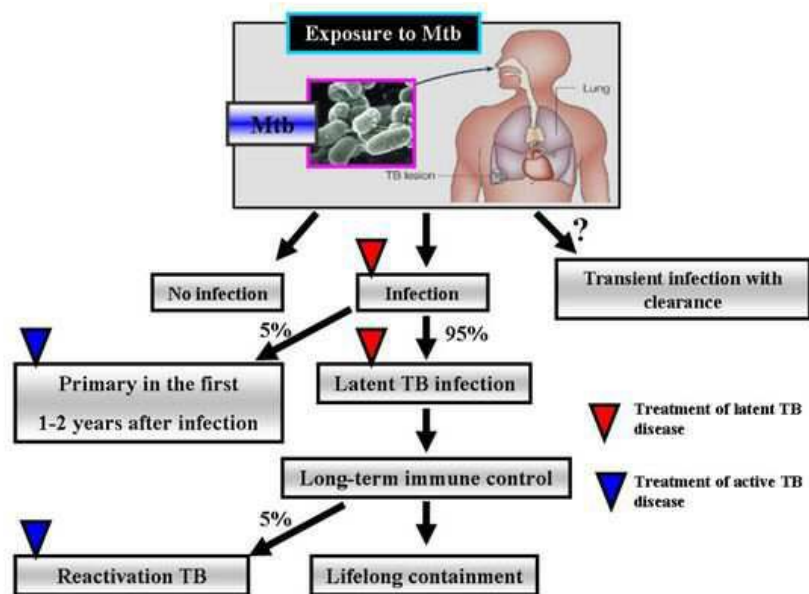
[0051] 도 4a는 결핵의 활성화, 잠복기, 재활성기 단계의 마우스 혈청에 대한 2차원 전기영동과 면역블롯 결과를 나타낸 것이다.

[0052] 도 4b는 결핵의 활성화, 잠복기, 재활성기 단계별 마우스 혈청에 대한 2차원 전기영동과 면역블롯 결과를 나타낸 것이다.

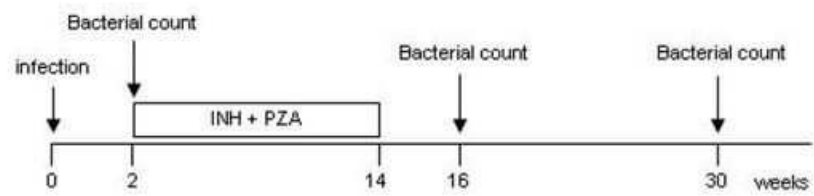
[0053] 도 5는 결핵의 활성화, 잠복기, 재활성기 단계의 마우스 혈청에 단계별로 특이적으로 발현되는 단백질 항원을 나타낸 것이다.

도면

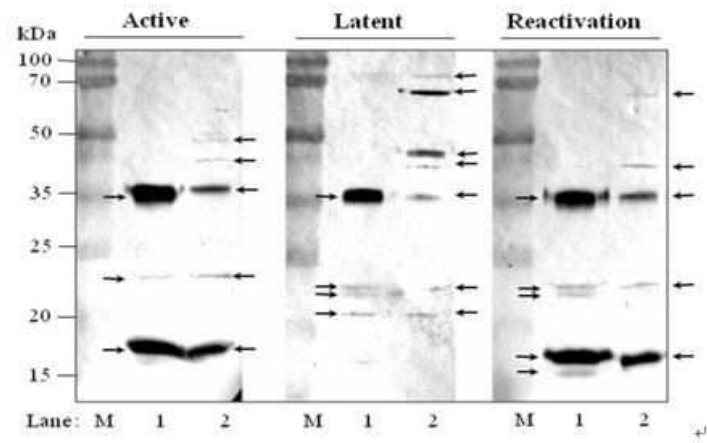
도면1



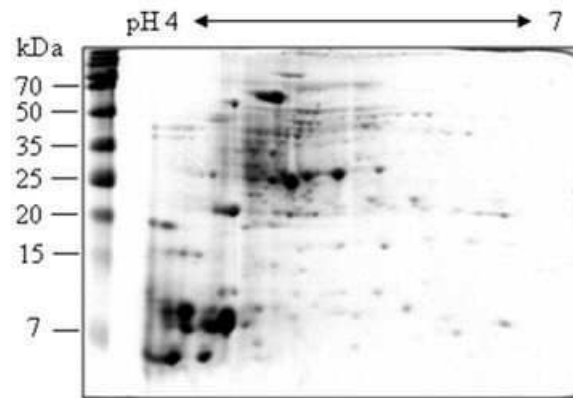
도면2



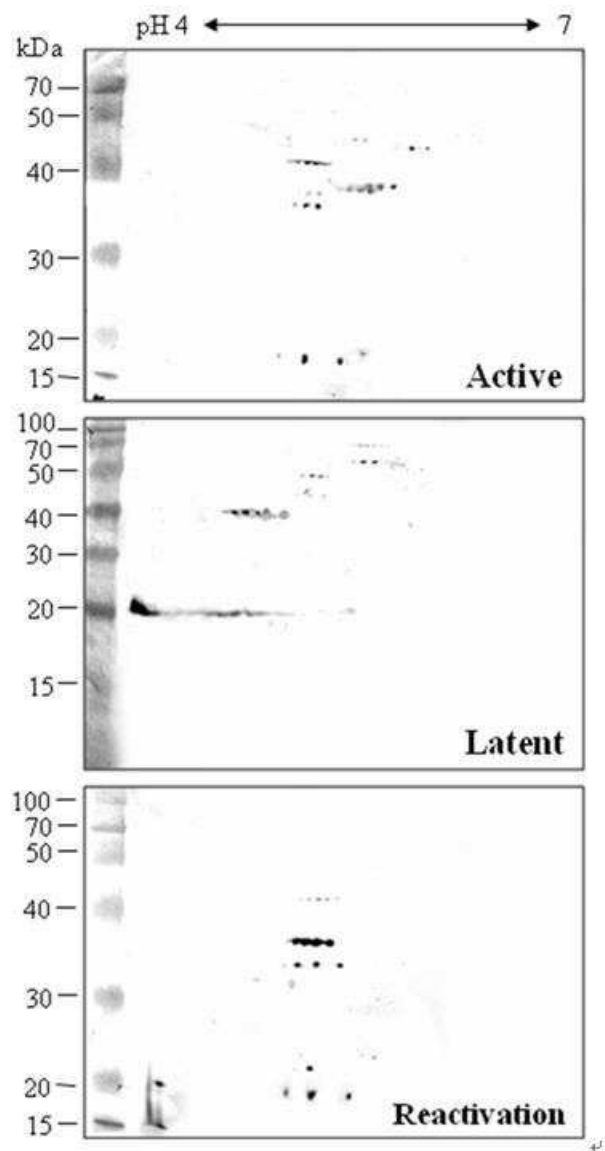
도면3



도면4a



도면4b



도면5

