



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0139726
(43) 공개일자 2022년10월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/569 (2017.01) C07K 7/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/56911 (2013.01)
C07K 7/08 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0046069
(22) 출원일자 2021년04월08일
심사청구일자 2021년04월08일

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
대한민국(농림축산식품부 농림축산검역본부장)
경상북도 김천시 혁신8로 177 (울곡동)
(72) 발명자
김현진
경상남도 진주시 초북로 77, 301동 903호(초전동,
진주 초장 엠코타운 더 이스턴파크)
김석
경상남도 진주시 천수로 30, 102동 802호(주약동,
한보은빛마을아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

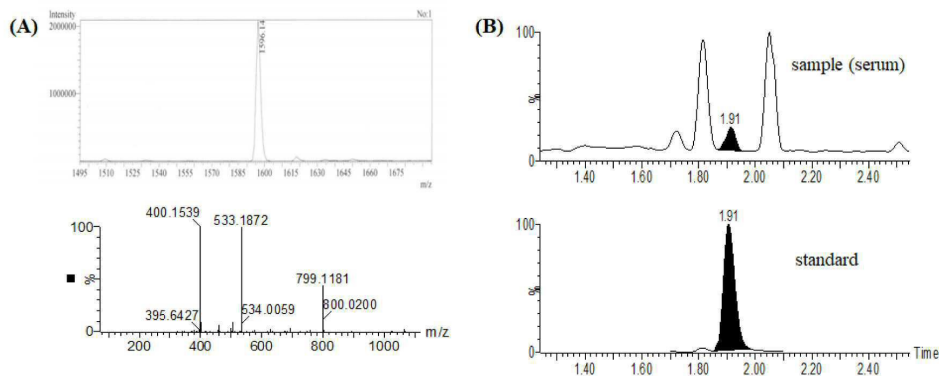
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 브루셀라 감염증 진단용 펩타이드 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 브루셀라 감염증 진단용 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 GNU-B1 및 GNU-B2 펩타이드는 소 브루셀라병에 대한 음성 또는 양성 반응을 진단할 수 있고, 소 브루셀라병 유사 질병에 대해 교차면역반응성이 없으므로 브루셀라 감염증의 진단에 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

G01N 2333/23 (2013.01)

(72) 발명자

최정수

경상북도 김천시 남면 천동길 303-53, 306동 101호

이진주

경상북도 김천시 혁신4로 46, 102동 1601호(울곡동, 한신더휴 퍼스트리움)

윤순식

경상북도 김천시 남면 서원길 116

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호

1545021733

과제번호

Z-1543061-2019-20-0102

부처명

농림축산식품부

과제관리(전문)기관명

농림축산검역본부

연구사업명

농림축산검역검사기술개발(R&D)

연구과제명

대사체 분석을 통한 브루셀라병 biomarker 발굴 및 이를 이용한 고민감도 진단기법

개발

기 여 율

1/1

과제수행기관명

경상대학교 산학협력단

연구기간

2020.01.02 ~ 2020.11.15

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 GNU-B1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 GNU-B2 펩타이드의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 브루셀라 감염증(Brucellosis) 진단용 조성물.

청구항 2

제1항이 있어서, 상기 펩타이드 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 단백질에 특이적인 항체 또는 압타머를 포함하는 것인 브루셀라 감염증 진단용 조성물.

청구항 3

- (1) 브루셀라 감염 의심 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 GNU-B1 또는 GNU-B2 펩타이드의 발현 수준을 측정하는 단계;
- (2) 상기 측정된 GNU-B1 또는 GNU-B2 펩타이드의 발현 수준을 정상 대조군 시료의 GNU-B1 또는 GNU-B2 펩타이드의 발현 수준과 비교하는 단계; 및
- (3) 상기 측정된 GNU-B1 또는 GNU-B2 펩타이드의 발현 수준이 정상 대조군 시료의 GNU-B1 또는 GNU-B2 펩타이드의 발현 수준보다 높을 경우에 브루셀라 감염증으로 판단하는 단계;를 포함하는, 브루셀라 감염증(Brucellosis)을 진단하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 GNU-B1 및 GNU-B2 펩타이드는 각각 서열번호 1 및 2의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 GNU-B1 또는 GNU-B2 펩타이드의 발현 수준을 측정하는 단계는 질량 분석법(mass spectrometry), 효소 결합 면역흡착 분석법(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), 단백질 칩, 면역침강, 마이크로어레이 또는 전자현미경법(electron microscopy)을 통해 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 혈청, 혈장, 뇨, 흉수 및 타액으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 GNU-B1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 GNU-B2 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 브루셀라 감염증(Brucellosis) 진단용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 브루셀라 감염증 진단용 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 브루셀라 감염증은 브루셀라균의 감염으로 발생하는 인수 공통 전염병으로 소 브루셀라균(*Brucella abortus*), 산양 브루셀라균(*B. melitensis*), 돼지 브루셀라균(*B. suis*) 등이 원인체이며, 국내에서는 브루셀라 여보투스가 높은 비율을 차지하는 것으로 알려져 있다. 브루셀라균에 감염된 가축의 경우 암컷의 생식기관과 태막(胎膜)에

염증을 수반하여 태반염, 자궁 내막염 등으로 인한 유산과 불임증이 유발될 수 있고, 수컷에서는 고환염, 기형 정자 등으로 인한 불임이 유발될 수 있다. 사람에게 브루셀라균이 감염되면 3주 정도의 잠복기를 거쳐 부정형의 발열, 피로, 권태감, 두통 등의 전신 증세가 나타난다. 우리나라에서도 사람에게 브루셀라병이 발생한 바 있으며 주로 경구 및 접촉 감염으로 전파되었고, 멸균처리하지 않은 유제품을 섭취하여 전염된 사례가 있다. 브루셀라병의 효과적인 치료법은 없고 백신 접종으로 예방이 가능하나, 일단 감염된 가축이 발견되면 법에 따라 도살 처분해야 한다. 사람의 경우 테트라사이클린(tetracycline), 스트렙토마이신(streptomycin), 클로람페니콜(chloramphenicol) 등이 쓰일 수 있으나, 약제 투여를 중지하면 재발 가능성이 높고 내균성이 나타나기 때문에 치료가 쉽지 않다. 치사율은 2% 이하이지만 치료하지 않고 방치할 경우에는 척추염, 골수염 등이 유발될 수 있다.

[0003] 소에서 브루셀라 감염증이 발병된 경우 소의 신체 각 부위(특히 간, 비장, 임파절, 혈액 등)에서 브루셀라균이 높은 농도로 존재하게 되며, 우리나라의 식문화 특성상 육회, 간, 비장, 위 등을 날것으로 섭취하는 경향이 높아 브루셀라균에 대하여 심각하게 노출될 수 있으므로, 이에 대한 국가적 대책 마련이 시급한 실정이다. 그러나, 브루셀라균에 감염된 소에서는 특별한 증상이 나타나지 않아 장기간 동안 보균우로 유지하면서 지속적으로 브루셀라균을 외부로 배출하기 때문에 조기진단에 어려움이 있을 뿐만 아니라, 브루셀라균의 세포 내 탐식 기전 및 세포 내 증식 기전에 대한 연구결과가 많지 않아 상기 질환의 근절이 어렵다는 문제가 있다. 또한, 브루셀라균이 체내에 감염된 경우에도 면역원성이 낮아서 면역세포가 형성되기 어렵기 때문에 백신 개발에 대한 연구도 성과가 미미한 실정이다.

[0004] 한편, 한국등록특허 제1795784호에 '브루셀라 어보투스 균주 유래의 다중 제조합 외막단백질을 유효성분으로 포함하는 브루셀라 감염증 진단용 조성물 및 이의 용도'가 개시되어 있고, 한국공개특허 제2020-0004500호에 '브루셀라 어보투스 유래의 제조합 Ohr 단백질을 유효성분으로 포함하는 브루셀라 감염증 진단용 조성물 및 이의 용도'가 개시되어 있으나, 본 발명의 브루셀라 감염증 진단용 펩타이드 및 이의 용도에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 브루셀라 감염증에 대해 음성(negative) 또는 양성(positive) 반응을 보이는 소 혈청 시료 간에 뚜렷한 함량 차이를 보이는 대사물질 GNU-1 내지 GNU-10을 분리한 후, 상기 대사물질들이 브루셀라 감염증에서 음성 반응을 보이는 소 혈청 시료 보다 양성 반응을 나타내는 소 혈청 시료에서 높은 함량으로 존재하는 것을 확인하였고, 기존의 브루셀라병 혈청학적 진단법으로 사용되고 있는 STAT, C-ELISA 또는 I-ELISA에 비해 브루셀라 감염에 대한 음성 또는 양성 반응을 더 효율적으로 진단할 수 있음을 확인하였다. 또한, 상기 대사물질 중 GNU-5, GNU-7 및 GNU-10은 1,596 kDa의 단일 펩타이드에서 유래된 물질이고, GNU-3, GNU-6 및 GNU-9는 1,509 kDa의 단일 펩타이드에서 유래된 물질임을 확인한 후 상기 단일 펩타이드를 각각 GNU-B1 및 GNU-B2로 분리·동정하였고, 상기 GNU-B1 및 GNU-B2 펩타이드가 소 브루셀라병과 유사한 병증을 유발하는 결핵균(*Mycobacterium bovis*), 대장균(*E. coli*) 및 예르시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica* 09) 병원균과의 교차면역반응성이 없음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 GNU-B1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 GNU-B2 펩타이드의 발현 수준을 측정하는 체제를 포함하는 브루셀라 감염증(Brucellosis) 진단용 조성물을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 (1) 브루셀라 감염 의심 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 GNU-B1 또는 GNU-B2 펩타이드의 발현 수준을 측정하는 단계; (2) 상기 측정된 GNU-B1 또는 GNU-B2 펩타이드의 발현 수준을 정상 대조군 시료의 GNU-B1 또는 GNU-B2 펩타이드의 발현 수준과 비교하는 단계; 및 (3) 상기 측정된 GNU-B1 또는 GNU-B2 펩타이드의 발현 수준이 정상 대조군 시료의 GNU-B1 또는 GNU-B2 펩타이드의 발현 수준보다 높을 경우에 브루셀라 감염증으로 판단하는 단계;를 포함하는, 브루셀라 감염증을 진단하는 방법을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 GNU-B1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 GNU-B2 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 브루셀라 감염증 진단용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명의 GNU-B1 및 GNU-B2 펩타이드는 소 브루셀라병에 대한 음성 또는 양성 반응을 진단할 수 있고, 소 브루셀라병 유사 질병에 대해 교차면역반응성이 없으므로 브루셀라 감염증의 진단에 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1A는 브루셀라 감염증에 대해 음성(negative) 또는 양성(positive) 반응을 보이는 소 혈청의 추출물을 대상으로 UPLC-Q-TOF MS(ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry) 분석을 수행한 결과이고, 도 1B는 상기 MS 데이터를 다변량 통계분석(multivariate statistical analysis)하여 시각화한 PLS-DA(Partial least squares discriminant analysis) 스코어 플롯이다. 도 1A에서 빨간색 네모는 소의 혈청 내 대사물질 GNU-1 내지 GNU-10을 의미한다.

도 2 및 도 3은 브루셀라 감염증에 대해 음성(negative, NEG) 또는 양성(positive, POS) 반응을 보이는 소 혈청의 추출물을 대상으로 UPLC-Q-TOF-MS를 수행하여 얻어진 크로마토그램에서 GNU-1 내지 GNU-10의 피크(peak) 강도(intensity)를 나타낸 막대 그래프(도 2) 및 박스 플롯(box plot; 도 3)이다.

도 4는 브루셀라 감염증에 대해 음성 또는 양성 반응을 보이는 소 혈청의 추출물을 대상으로 UPLC-Q-TOF-MS 분석을 수행하여, 브루셀라 음성군 또는 양성군 간에 뚜렷한 함량 차이를 보이는 GNU-1 내지 GNU-10의 질량 대 전하의 비(m/z)를 측정된 결과이다.

도 5는 브루셀라 감염증에 대해 음성 또는 양성 반응을 보이는 소의 혈청 내 대사물질 GNU-2, GNU-3, GNU-4, GNU-5, GNU-6, GNU-7, GNU-8 및 GNU-10의 함량을 측정된 결과이다.

도 6은 본 발명의 후보 지표물질(GNU-4, GNU-5, GNU-7, GNU-8 및 GNU-10) 함량 측정 방법과 종래의 브루셀라 감염증 진단방법인 RBT(Rose-bengal test), STAT(Standard tube agglutination test), C-ELISA(competitive-enzyme linked immunosorbent assay) 및 I-ELISA(Indirect-ELISA)을 수행한 결과이다. +: 양성 반응, -: 음성 반응.

도 7은 소 혈청 추출물을 이용하여 TOF MS 분석을 통해 펩타이드 피크를 확인한 후 펩타이드 질량 데이터를 이용하여 *De novo* 시퀀싱을 수행을 통해 GNU-B1(A) 및 GNU-B2(B) 펩타이드를 동정한 결과이다. A는 각각 4가, 3가, 2가 전하를 띤 분자량 1,596 kDa의 GNU-5, GNU-7 및 GNU-10로부터 동정 및 합성된 GNU-B1 펩타이드이고, B는 각각 4가, 3가, 2가 전하를 띤 분자량 1,509 kDa의 GNU-3, GNU-6 및 GNU-9로부터 동정 및 합성된 GNU-B2 펩타이드이다.

도 8은 합성된 GNU-B1 펩타이드(standard)와 소 혈청 시료(serum sample)를 이용하여 UPLC-Q-TOF MS를 수행한 결과이다.

도 9는 브루셀라(*Brucella abortus*), 결핵(*Mycobacterium bovis*), 대장균(*E. coli*) 또는 예르시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica* 09)에 감염된 소 혈청을 대상으로 본 발명의 GNU-B1 및 B2 펩타이드의 함량(intensity)을 측정하여 교차반응성을 평가한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 GNU-B1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 GNU-B2 펩타이드의 발현 수준을 측정하는 체제를 포함하는 브루셀라 감염증(Brucellosis) 진단용 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명에서, 용어 '브루셀라 감염증'은 다양한 브루셀라균의 감염에 의하여 발병되는 전염병을 의미하며, 용어 '진단(diagnosis)'은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 상기 진단은 브루셀라 감염증의 발병 여부를 확인하는 것이다.

[0013] 본 발명의 조성물에 있어서, 상기 브루셀라 감염증은 브루셀라 아보투스(*Brucella abortus*), 브루셀라 멜리텐시스(*B. melitensis*), 브루셀라 카니스(*B. canis*), 브루셀라 오비스(*B. ovis*), 브루셀라 수이스(*B. suis*) 또는 브루셀라 핀니페디알리스(*B. pinnipedialis*) 균주에 의해 유발되는 것일 수 있고, 바람직하게는 브루셀라 아보투스에 의해 유발되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0014] 본 발명에서 '단백질의 발현 수준 측정'은, 브루셀라 감염증 진단을 위해 의심 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서의 GNU-B1 또는 GNU-B2 펩타이드의 발현 정도를 확인하는 과정으로, 이를 위한 분석 방법으로는 질량 분석법(Mass spectrometry), ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent Assay), 웨스턴 블랏(Western blot), 방사선면역분석(Radioimmunoassay, RIA), 방사 면역 확산법(Radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓트(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), FACS(Fluorescence Activated Cell Sorting) 및 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0015] 본 발명에서 펩타이드의 발현 수준을 측정하는 제제는 이에 한정되지는 않으나, 바람직하게는 GNU-B1 또는 GNU-B2 펩타이드에 대하여 특이적으로 결합하는 항체 또는 애포타머일 수 있다.
- [0016] 본 발명에서, 용어 '항체'는 당해 분야에서 공지된 용어로서 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 본 발명의 GNU-B1 또는 GNU-B2 펩타이드에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 이러한 항체는, GNU-B1 또는 GNU-B2 펩타이드 코딩 유전자의 전장 혹은 일부를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 GNU-B1 또는 GNU-B2 펩타이드 코딩 유전자의 전장 혹은 일부에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질을 면역원(항원)으로 사용하여 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 본 발명의 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 기능적인 단편도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역글로불린 항체가 포함된다. 상기 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며 Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 ScFv 등이 있다.
- [0017] 본 발명에서, 용어 '애포타머(aptamer)'는 안정된 삼차구조를 유지하면서 특정 분자에 특이적으로 강하게 결합할 수 있는 핵산을 의미한다. 특이적 결합을 하는 기능 때문에 항체와 비교되며 항체의 대체 기술로 평가되고 있다.
- [0018] 본 발명은 또한,
- [0019] (1) 브루셀라 감염 의심 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 GNU-B1 또는 GNU-B2 펩타이드의 발현 수준을 측정하는 단계;
- [0020] (2) 상기 측정된 GNU-B1 또는 GNU-B2 펩타이드의 발현 수준을 정상 대조군 시료의 GNU-B1 또는 GNU-B2 펩타이드의 발현 수준과 비교하는 단계; 및
- [0021] (3) 상기 측정된 GNU-B1 또는 GNU-B2 펩타이드의 발현 수준이 정상 대조군 시료의 GNU-B1 또는 GNU-B2 펩타이드의 발현 수준보다 높을 경우에 브루셀라 감염증으로 판단하는 단계;를 포함하는, 브루셀라 감염증을 진단하는 방법을 제공한다.
- [0022] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에 있어서, 상기 GNU-B1 및 GNU-B2 펩타이드는 각각 서열번호 1 및 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0023] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에 있어서, 상기 생물학적 시료로부터 GNU-B1 또는 GNU-B2 펩타이드의 발현 수준을 측정하는 방법으로는, 질량 분석법, 단백질 칩, 면역침강, 마이크로어레이 또는 전자현미경법(electron microscopy) 등일 수 있고, 바람직하게는 액상 크로마토그래피-질량분석법(liquid chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS) 방법일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0024] 본 발명에서, 용어 '생물학적 시료'란 혈청, 혈장, 뇨, 흉수 또는 타액과 같은 시료 등을 포함하나, 이에 제한되지 않으며, 상기 생물학적 시료는 조작하거나 조작하지 않은 상태로 사용될 수 있다.
- [0025] 본 발명은 또한, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 GNU-B1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 GNU-B2 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 브루셀라 감염증 진단용 조성물을 제공한다.
- [0027] 이하, 본 발명의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0029] **재료 및 방법**
- [0030] **1. 소 혈청 및 물질 추출**

- [0031] 브루셀라 감염증에 대해 음성(negative) 또는 양성(positive) 반응을 나타내는 소의 혈청을 농림축산검역본부에서 제공받아 실험에 사용하였다. 소 혈청 200 μ l에 차가운 메탄올 400 μ l를 혼합한 후 4℃에서 30분간 방치한 후 14,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 상등액을 수득하여 소 혈청 추출물로 사용하였다.
- [0033] **2. 대사체 분석**
- [0034] 소 혈청 추출물은 Waters Acquity UPLC-Q-TOF-MS(ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry)를 이용하여 분석하였다. 구체적으로 추출물은 BioResolve™ RP mAb Polyphenyl 컬럼(450Å, 2.1 mm×100 mm, 2.7 μ m; Waters)에 주입하였으며 이동상은 0.1% 포름산(formic acid)을 함유하고 있는 물(A)과 0.1% 포름산을 함유하고 있는 아세토나이트릴(acetonitrile, B)로 유속은 0.4 mL/min이며 컬럼온도는 40℃이다. 컬럼으로 통과하여 나온 용리제(eluent)는 ESI(positive electrospray ionization) 모드를 갖고 있는 Q-TOF MS로 분석하였다. TOF MS 데이터의 스캔 범위(scan range)는 100~4,000 m/z(질량 대 전하비), 스캔 시간(scan time)은 0.2 s, 모세관(capillary)과 샘플의 콘 전압(sampling cone voltages)은 3 kV와 30 V, 탈용매화 유속(desolvation flow rate)은 800 L/h, desolvation 온도는 400℃, source 온도는 100℃이다. 로이신-엔케팔린(Leucine-enkephalin [M+H]⁺ = 556.2771)은 록 매스(lock mass)를 위한 표준 물질(reference compound)로 사용되었으며 10 s 당 분석되었다. 모든 시료들을 혼합하여 만들어진 QC(quality control) 시료는 매 5개 분석하였다. MS/MS 스펙트럼은 collision energy ramp(10 to 30 eV), m/z 100~4,000 조건하에서 얻었다. m/z, 보유 시간(retention time), 이온 신호세기(ion intensity)를 포함하는 질량 분석 데이터(mass spectrometry data) 프로세싱은 MakerLynx software (Waters)을 사용하여 진행하였다. UPLC-Q-TOF MS를 이용하여 얻어진 LC-MS data의 collection, normalization, alignment는 UNIFI version 1.8.2 프로그램(Waters)을 이용하여 진행하였다. Peak-to-peak baseline noise (1), noise elimination (6), peak-width(5% height of 1 s), intensity threshold(10,000)를 이용하여 피크를 얻었으며 mass window(0.05 Da)와 retention time window(0.2 min)를 이용하여 대사체 데이터(tabolite data)를 정렬하였다. 모든 데이터는 표준물질을 이용하여 정규화하였다. 대사물질들은 UNIFI version 1.8.2.169(Waters), ChemSpider(www.chemspider.com), human metabolome databases(www.hmdb.ca), METLIN database(metlin.scripps.edu)을 사용하여 동정하였다. SIMCA-P+ version 12.0.1(Umetrics, Umea, Sweden)는 UNIFI를 통해 프로세싱된 LC/MS 데이터의 통계분석을 위해 사용되었다. 특히 PLS-DA(Partial least squares discriminant analysis)는 분석한 결과를 시각화하기 위하여 사용되었다.
- [0036] **3. 펩타이드 드 노보 시퀀싱(*de novo* sequencing)**
- [0037] 펩타이드 *de novo* sequencing을 위해 소 혈청 추출물을 대상으로 위에서 언급한 UPLC-Xevo-Q-TOF MS(CID mode) 방법 및 UPLC-SYNAPT G2-Si-Q-TOF MS(ETD mode) 방법을 이용하여 펩타이드 피크(peptide peak)를 확보하였다. TOF MS 분석 조건은 위에서 언급한 대사체 분석 조건과 유사하며 다음 조건만 다르다. 사용한 컬럼은 ACQUITY® BEH300 C18 Column(1.7 μ m, 2.1×100 mm)이며 TOF MS 데이터의 scan range는 50-15000 m/z, scan time은 0.2 s, capillary와 sampling cone voltages는 2.5 kV와 40 V, desolvation flow rate는 800 L/h, cone gas flow는 50L/h, desolvation 온도는 600° C, source 온도는 120℃이다. MS 데이터는 MassLynx를 이용하여 펩타이드 Mass data를 수집하였으며 펩타이드 *de novo* 시퀀싱은 BioLynx를 사용하여 수행하였다.
- [0039] **4. 펩타이드 합성 및 확인**
- [0040] 펩타이드 합성은 펩트론에 의뢰하여 수행하였으며, 합성된 펩타이드는 상기 UPLC-Q-TOF MS 조건으로 분석하여 mass spectrum, retention time, spike test를 이용하여 확인하였다.
- [0042] **실시예 1. 소 혈청 유래 대사체 분석**
- [0043] 브루셀라 감염증에 대해 음성(negative) 또는 양성(positive) 반응을 보이는 소 혈청의 추출물을 대상으로 UPLC-Q-TOF MS로 블라인드 테스트한 후 상기 MS 데이터(도 1A)를 다변량 통계분석(multivariate statistical analysis)하여 나타난 PLS-DA 스코어 스캐터 플롯 상에서 음성 실험군과 양성 실험군 간의 대사 물질의 함량을

확인한 결과, 도 1B에 나타난 바와 같이 t(1)과 t(2)를 기준으로 음성군과 양성군 간의 대사 물질이 뚜렷하게 구별되는 것을 확인하였다. 상기 분석된 대사 물질들 중에서 브루셀라 감염증의 음성군과 양성군 간에 뚜렷한 차이를 보이는 10개의 후보 지표물질을 선별하여 각각 GNU-1 내지 GNU-10으로 명명하였다.

[0044] 또한, 브루셀라 감염증에 대해 음성 또는 양성 반응을 보이는 소 혈청의 추출물 내 GNU-1 내지 GNU-10의 함량을 측정된 결과, 평균적으로 음성 시료에 비해 양성 시료에서 GNU-1 내지 GNU-10의 함량이 더 높게 나타났으며, 특히 GNU-4, GNU-5, GNU-7, GNU-8 및 GNU-10은 브루셀라 음성 시료에 비해 양성 시료에서 약 10배 이상의 높은 함량을 보여 브루셀라 감염증의 지표물질로 사용될 수 있을 것으로 예상되었다(도 2 및 도 3).

[0045] 또한, 상기 GNU-1 내지 GNU-10의 m/z(질량 대 전하비)를 분석한 결과, GNU-1은 m/z 369, GNU-2은 m/z 373, GNU-3은 m/z 378, GNU-4은 m/z 391, GNU-5은 m/z 399, GNU-6은 m/z 503, GNU-7은 m/z 532, GNU-8은 m/z 561, GNU-9은 m/z 755, GNU-10은 m/z 798인 것으로 확인되었다(도 4).

[0047] **실시예 2. 브루셀라 감염증 진단을 위한 후보 지표물질을 이용한 브루셀라 감염증에 대한 음성 및 양성 반응 분석**

[0048] 브루셀라 음성 또는 양성을 보이는 소 혈청의 추출물을 대상으로 후보 지표물질의 함량을 측정한 결과, 음성 시료에 비해 양성 시료에서 후보 물질의 함량이 현저히 높음을 확인하였고, 특히 대부분의 양성 시료에서 GNU-2(m/z 373), GNU-3(m/z 378), GNU-4(m/z 391), GNU-5(m/z 399), GNU-6(m/z 503) 및 GNU-7(m/z 532)의 함량은 음성 시료 보다 약 2배 이상인 것을 확인하였다(도 5).

[0050] **실시예 3. 기존의 브루셀라 감염증 진단 방법과의 비교**

[0051] 기존 브루셀라병 혈청학적 진단법에는 1차 검사법으로 RBT 등이 이용되고 있고, 2차 검사법으로 STAT 또는 ELISA 등이 이용되고 있다(*Korean J Vet Serv*, 2013, 35(4), 269-273). 이에 본 발명에서는 브루셀라 감염증에 대해 음성 또는 양성을 나타내는 소 혈청을 대상으로 RBT(Rose-bengal test), STAT(Standard tube agglutination test), C-ELISA(competitive-enzyme linked immunosorbent assay) 및 I-ELISA(Indirect-ELISA)를 수행하였고, 각 시료에서 본 발명의 후보 지표물질(GNU-4, GNU-5, GNU-7, GNU-8 및 GNU-10)의 함량을 측정하였다.

[0052] 그 결과, RBT 방법을 이용한 경우에는 브루셀라 감염증의 음성 또는 양성 시료를 정확하게 진단할 수 있었으나, STAT 또는 ELISA 방법을 이용한 경우에는 일부 양성 시료에서 정확하게 진단되지 않음을 확인하였다. 반면, 본 발명의 후보 지표물질들은 브루셀라 감염증의 음성 시료에 비해 모든 양성 시료에서 현저히 높은 함량을 나타냄으로써, 기존 진단방법으로도 진단하지 못하였던 양성 시료도 정확하게 판별할 수 있음을 확인하였다(도 6). 이를 통해, 본 발명의 후보 지표물질들이 기존의 브루셀라 감염증 진단방법에 비해 더 효율적으로 브루셀라 감염증을 진단하기 위해 사용될 수 있을 것으로 예상되었다.

[0054] **실시예 4. 브루셀라 감염증 진단을 위한 후보 지표물질의 동정 및 합성**

[0055] 소 혈청 추출물을 대상으로 UPLC-Q-TOF MS 분석을 통해 확인된 브루셀라 감염증 진단을 위한 후보 지표물질인 GNU-1 내지 GNU-10 중에서, 소 혈청 추출물 내 함량이 높은 GNU-5(m/z 399), GNU-7(m/z 532) 및 GNU-10(m/z 798)은 각각 4가, 3가, 2가 전하를 띤 분자량 1,596 kDa의 단일 펩타이드에서 유래된 물질인 것으로 확인되었다. 또한 GNU-3(m/z 378), GNU-6(m/z 503) 및 GNU-9(m/z 755)도 각각 4가, 3가, 2가 전하를 띤 분자량 1,509 kDa의 단일 펩타이드에서 유래된 물질인 것으로 확인되었으며(*Nat Protoc.*, 2008, 3(11), 1709-1717), 이들 펩타이드를 각각 GNU-B1과 GNU-B2로 명명하였다.

[0056] 상기 GNU-B1과 GNU-B2를 Waters Xevo CID와 Waters SYNAPT G2-Si ETD를 이용하여 분석한 후 BioLynx를 이용하여 *De novo* 시퀀싱한 결과, GNU-B1 펩타이드는 13개의 아미노산(서열번호 1-SEETKENERFTVK; Ser-Glu-Glu-Thr-Lys-Glu-Asn-Glu-Arg-Phe-Thr-Val-Lys)이 결합한 올리고펩타이드(1,596 kDa)인 것으로 동정되었다(도 7A).

[0057] 또한, GNU-B2 펩타이드는 GNU-B1의 아미노산 서열에서 첫번째 Ser이 떨어져나간 12개의 아미노산(서열번호 2-EETKENERFTVK; Glu-Glu-Thr-Lys-Glu-Asn-Glu-Arg-Phe-Thr-Val-Lys)이 결합한 올리고펩타이드(1,509 kDa)인 것으로 동정되었다(도 7B). NCBI Blast에서 확인한 결과, 본 발명의 GNU-B1 및 GNU-B2 펩타이드는 소의 간과 혈액

에 있는 Chanin A, Complement component 3 단백질에서 유래된 것임을 알 수 있었다.

[0058] 게다가, 상기 동정된 펩타이드들 중 GNU-B1을 합성한 후 UPLC-Q-TOF MS로 분석한 결과, GNU-B1 펩타이드가 m/z 399(4가 전하), m/z 32(3가 전하), m/z 798(2가 전하)를 갖는 분자량 1,596 kDa의 올리고펩타이드인 것을 확인하였고(도 8A), GNU-B1 펩타이드(standard)와 소 혈청 시료(serum sample)가 동일한 시간에서 분리되어 나오는 것을 확인하였다(도 8B). 이를 통해, 동정된 GNU-B1 펩타이드가 분자량 1,596 kDa의 올리고펩타이드인 것을 최종적으로 확인하였다.

[0060] 실시예 5. GNU-B1 및 GNU-B2 펩타이드의 민감도, 특이도 및 정확도 분석

[0061] 본 발명의 GNU-B1 및 GNU-B2 펩타이드를 이용하여 브루셀라 감염증의 양성 또는 음성 시료를 대상으로 RBT(Rose-bengal test) 및 STAT(Standard tube agglutination test)를 수행하여 민감도(sensitivity), 특이도(specificity) 및 정확도(accuracy)를 분석하였다. 이때, 브루셀라 감염증의 양성 또는 음성 시료는 소 혈청 추출물 내 GNU-B1 및 GNU-B2 펩타이드 함량을 측정하여 평균 음성값의 3배보다 높으면 브루셀라 감염증에 대한 양성으로 판단하였고, 평균 음성값의 3배보다 낮으면 브루셀라 감염증에 대한 음성으로 판단하였다. 평균 음성값은 LC-MS 분석을 통해 확인된 음성 시료들의 펩타이드 인텐시티(intensity) 값들의 평균을 의미한다.

[0062] 그 결과, 하기 표 1에 나타난 바와 같이 GNU-B1 펩타이드의 경우 GNU-5, GNU-7 및 GNU-1의 민감도, 특이도, 정확도 값이 모두 100%로 매우 높은 것을 확인하였다. 또한, GNU-B2 펩타이드인 경우 GNU-6의 민감도, 특이도 및 정확도가 각각 100%, 91.43%, 96.88%로 높게 나타났기 때문에 본 발명의 GNU-B1 및 GNU-B2 펩타이드 모두 진단 키트 기준을 충분히 넘는 것으로 확인되었다.

표 1

[0063] GNU-B1 및 GNU-B2 펩타이드의 민감도, 특이도 및 정확도 분석

펩타이드	반응성	Rose Bengal(No.)		STAT(No.)		민감도	특이도	정확도
		양성(61)	음성(35)	양성(61)	음성(35)			
GNU-B1	양성	61	0	61	0	100%	100%	100%
	음성	0	35	0	35			
GNU-B2	양성	61	3	61	3	100%	91.43%	96.88%
	음성	0	32	0	32			

[0064] 민감도=TP(True Positive)/{TP+FN(False Negative)}

[0065] 특이도=TN(True Negative)/{FP(False Positive)+TN}

[0066] 정확도=(TP+TN)/(TP+TN+FP+FN)

[0068] 실시예 6. GNU-B1 및 GNU-B2 펩타이드의 교차반응 검증

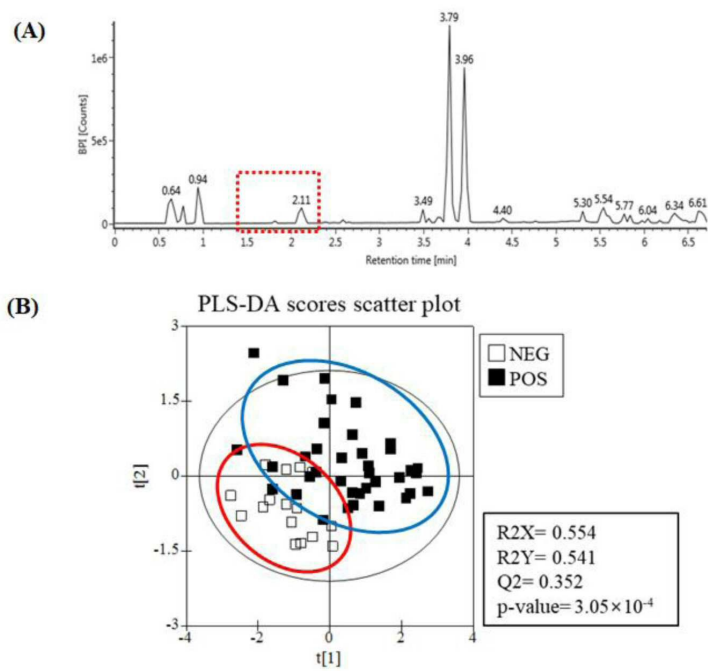
[0069] 본 발명의 GNU-B1 및 B2 펩타이드를 대상으로 다른 질병균과의 교차반응성 평가를 위해서 결핵균(*Mycobacterium bovis*), 대장균(*E. coli*) 및 예르시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica* 09)에 감염된 소 혈청 내 GNU-B1 및 GNU-B2 펩타이드의 함량을 측정하였다.

[0070] 그 결과, 결핵, 대장균 또는 예르시니아에 감염된 소 혈청에서는 GNU-B1 및 GNU-B2 펩타이드의 함량이 정상 대조군(브루셀라 음성)과 큰 차이가 없는 반면, 브루셀라가 감염된 소의 혈청에서는 GNU-B1 및 GNU-B2 펩타이드의 함량이 결핵, *E. coli* 또는 *Yersinia*에 감염된 소 혈청에 비해 현저히 높은 것을 확인하였다(도 9).

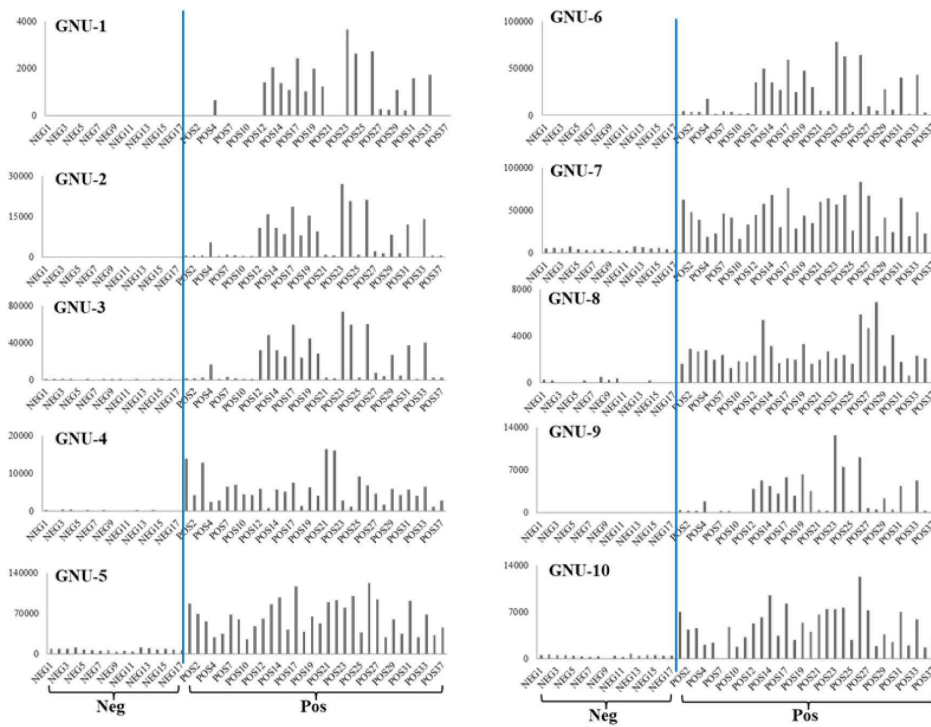
[0071] 이를 통해, 본 발명의 GNU-B1 및 GNU-B2 펩타이드는 소 브루셀라 감염증 진단을 위한 지표물질로 사용될 수 있으므로, 상기 펩타이드를 활용하여 항원-항체를 이용한 진단키트 개발 및 PCR 분석이 가능할 것으로 사료되었다.

도면

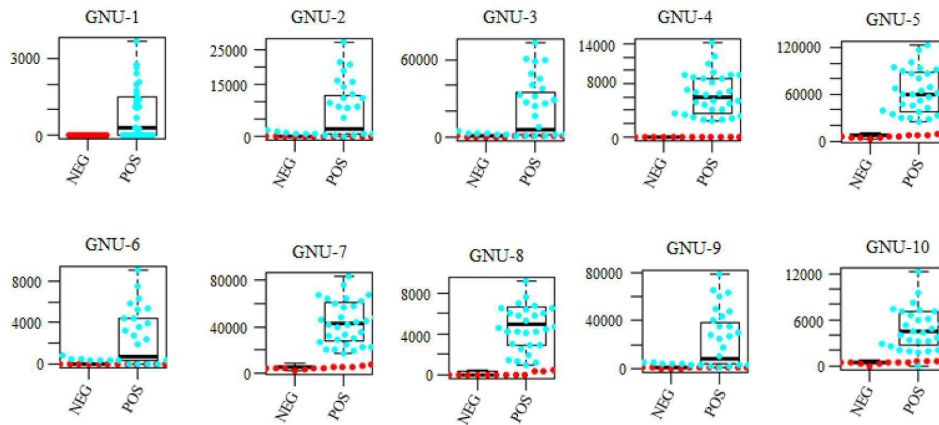
도면1



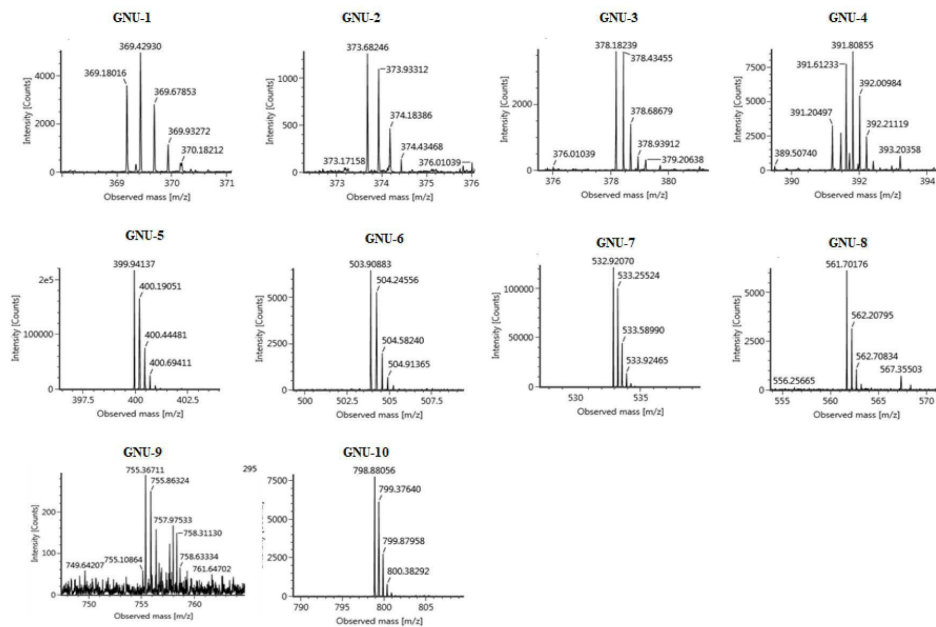
도면2



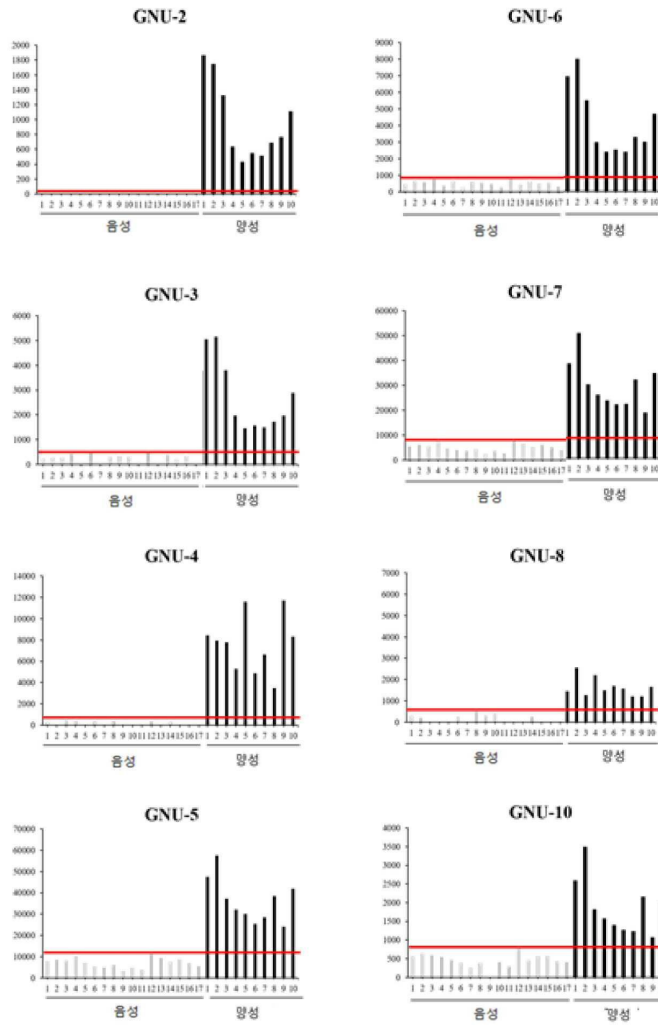
도면3



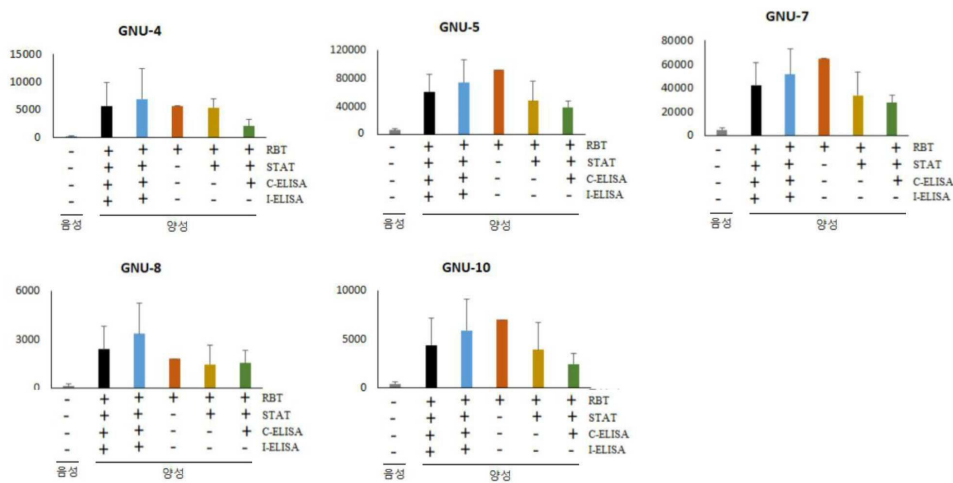
도면4



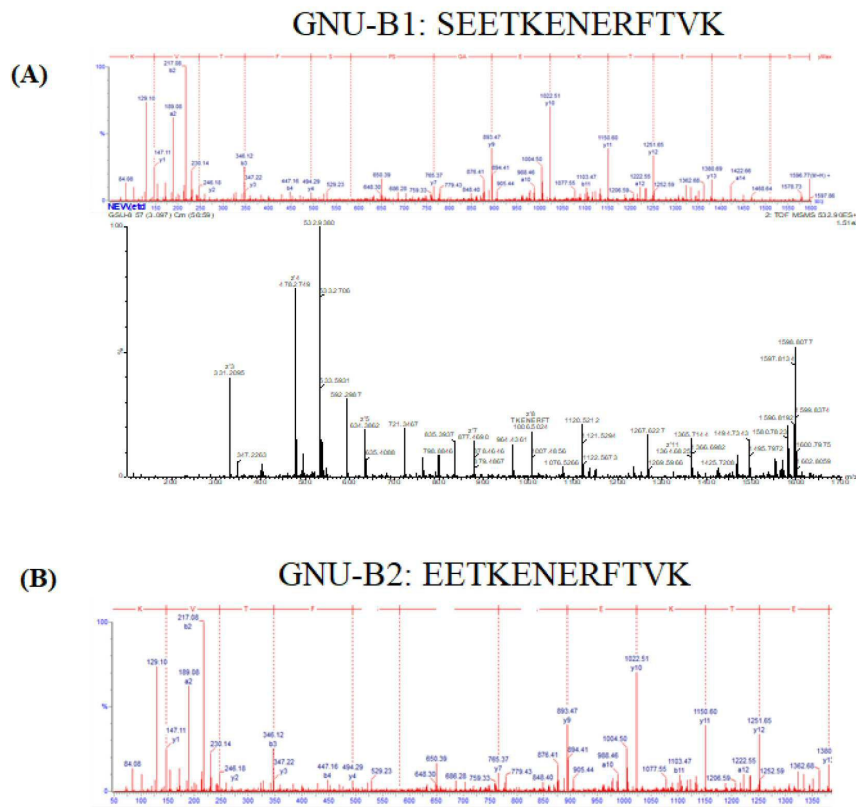
도면5



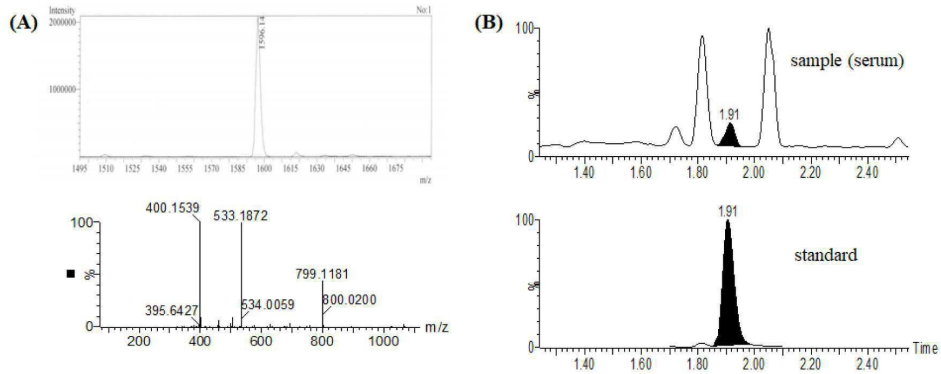
도면6



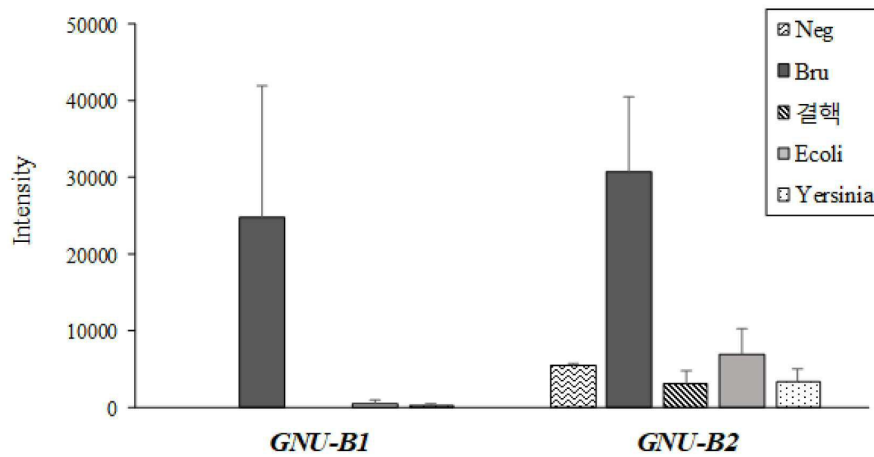
도면7



도면8



도면9



서열목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

REPUBLIC OF KOREA(Animal and Plant Quarantine Agency)

<120> Peptide for diagnosis of Brucellosis and uses thereof

<130> PN20257

<160> 2

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GNU-B1

<400> 1

Ser Glu Glu Thr Lys Glu Asn Glu Arg Phe Thr Val Lys

1 5 10

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GNU-B2

<400> 2

Glu Glu Thr Lys Glu Asn Glu Arg Phe Thr Val Lys

1

5

10