(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0022262
(43) 공개일자 2015년03월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01) *G01N 33/48* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0099875
(22) 출원일자 2013년08월22일
심사청구일자 2014년03월17일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
설동근
서울 중구 동호로10길 30, 111동 106호 (신당동, 약수하이츠아파트)
(74) 대리인
특허법인다나

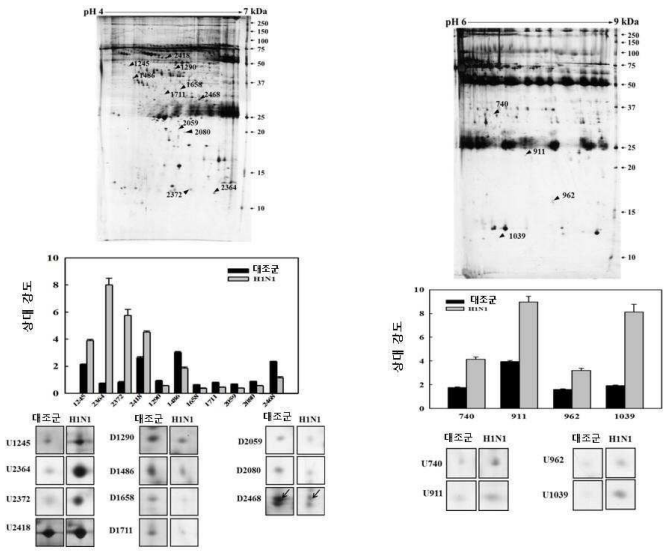
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **인플루엔자 바이러스 A 감염 여부 판별용 키트**

(57) 요 약

본 출원은 인플루엔자 바이러스 A 감염 여부 판별용 키트 및 인플루엔자 바이러스 A 감염 여부를 판별하는 방법에 관한 것이다. 본 출원에 따르면, 인플루엔자 바이러스 A의 감염 여부를 판별할 수 있는 단백질 마커를 제공함으로써, 신속하고 정확하게 인플루엔자 바이러스 A 감염 여부를 판별할 수 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 A103001-1011-123010
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 환경보건산업진흥원
연구사업명 신종플루 범부처 사업
연구과제명 인플루엔자 바이러스 감염 인간 혈장 단백체 지표 발굴
기 여 율 1/1
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2011.05.01 ~ 2013.10.31

특허청구의 범위

청구항 1

혈청 아밀로이드 단백질 A, LRG (leucine rich alpha 2 glycoprotein) 및 DUOX1 (dual oxidase 1)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질에 각각 특이적으로 결합하거나, 상기 각각의 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 결합하는 결합물질을 포함하는 인플루엔자 바이러스 A 감염 여부 판별용 단백질 어레이.

청구항 2

제1항에 있어서,

결합물질은 올리고펩타이드, 항체, 리간드, PNA(peptide nucleic acid), 앱타머, 프라이머 및 프로브로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 인플루엔자 바이러스 A 감염 여부 판별용 단백질 어레이.

청구항 3

제1항에 있어서,

결합물질은 표지물질로 표지되어 있는 인플루엔자 바이러스 A 감염 여부 판별용 단백질 어레이.

청구항 4

제3항에 있어서,

표지물질은 효소, 형광물질, 리간드, 발광물질, 미소입자, 레독스 분자 및 동위원소로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 인플루엔자 바이러스 A 감염 여부 판별용 단백질 어레이.

청구항 5

제1항에 있어서,

인플루엔자 바이러스 A 서브타입 H1N1 또는 H3N2 감염 여부 판별용 단백질 어레이.

청구항 6

제1항에 있어서,

항체는 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체 또는 키메릭(chimeric) 항체인 인플루엔자 바이러스 A 감염 여부 판별용 단백질 어레이.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 단백질 어레이를 포함하는 인플루엔자 바이러스 A 감염 여부 판별용 키트.

청구항 8

제7항에 있어서,

키트는 루미넥스 분석 키트, 단백질 마이크로어레이 키트 또는 ELISA 키트인 인플루엔자 바이러스 A 감염 여부 판별용 키트.

청구항 9

인플루엔자 바이러스 A 감염 여부를 판별하기 위하여 피검체의 단백질 시료 내, 혈청 아밀로이드 단백질 A, LRG (leucine rich alpha 2 glycoprotein) 및 DUOX1 (dual oxidase 1) 로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질의 발현량을 측정하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

항원-항체 반응을 이용하여 단백질의 발현량을 측정하는 방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

단백질 시료는 피검체의 체세포 또는 혈액으로부터 분리한 것인 단백질의 발현량을 측정하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

피검체의 체세포는 폐세포인 단백질의 발현량을 측정하는 방법.

청구항 13

제11항에 있어서,

피검체의 혈액은 혈장인 단백질의 발현량을 측정하는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 출원은 인플루엔자 바이러스 A 감염 여부 판별용 키트 및 인플루엔자 바이러스 A 감염 여부를 판별하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 인플루엔자 바이러스는 오소믹소바이러스에 속하며 음성의 단일가닥 RNA 절편 8개를 게놈으로 갖는 바이러스로서, 바이러스성 호흡기 질환의 주요 원인 병원체이다. 상기 8개의 RNA 절편으로부터 혈구응집 단백질(hemagglutinin; HA), 뉴라미니다제(neuraminidase, NA), 뉴클레오캡시드 단백질(nucleocapsid protein; NP), 매트릭스 단백질 1 및 2(matrix, M1, M2), 중합효소 단위체 A, B1 및 B2(polymerase subunit A, B1, B2; 각각 PA, PB1, PB2), 및 비구조 단백질 1 및 2(nonstructural protein 1, 2; 각각 NS1, NS2)가 만들어진다. 인플루엔자 바이러스는 뉴클레오캡시드 단백질(nucleocapsid protein)과 매트릭스 단백질(matrix protein)의 항원성에 따라 A형, B형 및 C형 바이러스로 분류되며, 같은 A형 바이러스는 뉴클레오캡시드 단백질이나 매트릭스 단백질

의 항원성이 같다. 이 중 A형은 다시 HA(hemagglutinin) 단백질의 항원 특성에 따라 H1형에서 H15형까지, NA 단백질 항원 특성에 따라 N1형에서 N9형의 아형으로 분류된다.

[0003] 인플루엔자 바이러스 A는 감염된 사람의 기침이나 재채기에 의하여 주로 호흡기를 통하여 빠르게 전파된다. 2009년 인플루엔자 바이러스 A의 일종인 신종 인플루엔자로 인하여, 국내에서 보고된 환자 사례만 763,752명이었으며, 이 중 2370명이 사망한 바 있다.

[0004] 따라서, 급속한 질병의 확산을 방지하기 위해 인플루엔자 바이러스 A의 감염 여부를 신속하고 경제적으로 확인할 수 있는 방법이 요구된다.

[0005] 인플루엔자 바이러스의 매트릭스 유전자, 헤마글루티닌 유전자 등에 대한 프라이머를 이용하여 인플루엔자 바이러스의 검출을 통하여, 인플루엔자 바이러스 감염 여부를 진단하는 방법이 보고된 바 있다.

[0006] 그러나, 아직까지 인플루엔자 A 바이러스 감염 여부를 판별할 수 있는 단백질 마커에 대해서는 보고된 바 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 특허 공개 제2012-0099816호

(특허문헌 0002) 2. 대한민국 특허 공개 제 2013-0081948호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 출원은 인플루엔자 바이러스 A 감염 여부 판별용 키트 및 인플루엔자 바이러스 A 감염 여부를 판별하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 출원은 혈청 아밀로이드 단백질 A, LRG (leucine rich alpha 2 glycoprotein) 및 DUOX1 (dual oxidase 1)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질에 각각 특이적으로 결합하거나, 상기 각각의 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 결합하는 결합물질을 포함하는 인플루엔자 바이러스 A 감염 여부 판별용 단백질 어레이를 제공한다.

[0010] 본 출원은 또한, 상기 단백질 어레이를 포함하는 인플루엔자 바이러스 A 감염 여부 판별용 키트를 제공한다.

[0011] 본 출원은 또한, 인플루엔자 바이러스 A 감염 여부를 판별하기 위하여 피검체의 단백질 시료 내, 혈청 아밀로이드 단백질 A, LRG (leucine rich alpha 2 glycoprotein) 및 DUOX1 (dual oxidase 1) 로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질의 발현량을 측정하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 출원에 따르면, 인플루엔자 바이러스 A의 감염 여부를 판별할 수 있는 단백질 마커를 제공함으로써, 신속하고 정확하게 인플루엔자 바이러스 A 감염 여부를 판별할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 IEF(isoelectric focusing) 스트립 및 라지 젤 시스템을 이용하여 인플루엔자 바이러스에 감염된 인간 혈장 단백질의 2차원 전기영동 패턴을 도시한 것이다.

도 2는 웨스턴 블랏 분석에 의한 인플루엔자 바이러스에 감염된 인간 혈장 단백질의 SAA 발현 패턴을 도시한 것이다.

도 3은 웨스턴 블랏 분석에 의한 인플루엔자 바이러스에 감염된 인간 혈장 단백질의 LRG 발현 패턴을 도시한 것이다.

도 4는 웨스턴 블랏 분석에 의한 인플루엔자 바이러스에 감염된 인간 혈장 단백질의 DUOX1 발현 패턴을 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 출원의 발명자들은 신속하고 정확하게 인플루엔자 바이러스 A 감염 여부를 진단할 수 있는 수단에 대해서 다각도로 연구한 결과, 인플루엔자 바이러스에 대한 단백질 마커를 발굴하였다(도 1).

[0015] 즉, 혈청 아밀로이드 단백질 A (serum amyloid protein A), LRG (leucine rich alpha 2 glycoprotein) 및 DUOX1 (dual oxidase 1)가 인플루엔자 바이러스 A의 감염 여부를 판별할 수 있는 단백질 마커임을 확인하였다.

[0016] 본 출원의 인플루엔자 바이러스 A 감염 여부 확인용 단백질 마커는 인플루엔자 바이러스 A에 감염된 인간 혈액에서 발현빈도에 차이를 보이는 단백질을 의미한다. 상기 단백체의 발현 빈도의 차이는 인플루엔자 바이러스 A에 감염된 생체에서의 발현 증가 또는 저하로 이해될 수 있다. 구체적으로, 아밀로이드 단백질 A (serum amyloid protein A) 및 LRG (leucine rich alpha 2 glycoprotein)는 인플루엔자 바이러스 A 감염 시 발현이 증가되는 단백질이고, DUOX1 (dual oxidase 1)는 인플루엔자 바이러스 A 감염 시 발현이 감소되는 단백질이다.

[0017] 따라서, 본 출원은 인플루엔자 바이러스 A 감염 여부 판별을 위한 단백질 마커로서 아밀로이드 단백질 A (serum amyloid protein A), LRG (leucine rich alpha 2 glycoprotein) 및 DUOX1 (dual oxidase 1)을 이용한 인플루엔자 바이러스 A 감염 여부 판별용 단백질 어레이, 인플루엔자 바이러스 A 감염 여부 판별용 키트 및 인플루엔자 바이러스 A 감염 여부 판별을 위하여 상기 단백질의 발현량을 측정하는 방법을 제공한다.

[0018] 본 출원은 혈청 아밀로이드 단백질 A, LRG (leucine rich alpha 2 glycoprotein) 및 DUOX1 (dual oxidase 1)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질에 각각 특이적으로 결합하거나, 상기 각각의 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 결합하는 결합물질을 포함하는 인플루엔자 바이러스 A 감염 여부 판별용 단백질 어레이를 제공한다.

[0019] 한 구체예에서, 결합물질은 올리고펩타이드, 항체, 리간드, PNA(peptide nucleic acid), 앱타머, 프라이머 및 프로브로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택되는 것일 수 있다.

[0020] 본 출원에서, 상기 단백질 어레이는 혈청 아밀로이드 단백질 A, LRG (leucine rich alpha 2 glycoprotein) 또는 DUOX1 (dual oxidase 1)을 각각의 마커로 하여 하나의 단백질 어레이에 하나의 마커에 대한 결합물질을 포함할 수도 있고; 두 가지의 마커를 조합하여, 하나의 단백질 어레이에 두 가지의 마커 각각에 대한 결합물질을 함께 포함할 수도 있으며; 세 가지 마커를 조합하여, 하나의 단백질 어레이에 세 가지의 마커에 각각에 대한 결합물질을 모두 포함할 수도 있다. 세 가지 단백질 마커를 모두 조합하는 경우에는 단백질 어레이의 검출 민감도 및 신뢰도를 높일 수 있다.

[0021] 본 출원에서 사용된 용어 "어레이"는 고형 지지체 상 및/또는 용기 배열중에 존재하는 원소배열(예컨대 폴리펩티드)이다. 어레이는 가장 흔히 특정 공간-물리적 관계를 갖는 물리적 원소로 생각되며, 본 발명은 직선 공간 조직을 갖지 않는 "로지칼" 어레이를 사용할 수 있다. 예컨대, 컴퓨터 시스템을 이용하여 물리적으로 상이한 성분 중 또는 물리적으로 상이한 성분 상에 존재하는 하나 또는 몇 개의 해당 성분의 위치를 추적하기 위해 사용될 수 있다. 컴퓨터 시스템은 어레이 구성원의 물리적 위치의 "색인" 표를 제공하는 것에 의해 로지칼 어레이를 창제한다. 따라서, 이동중인 성분도 어레이의 구성원이 특정되고 위치가 확인될 수 있는 한, 로지칼 어레이의 일부일 수 있다. 이것은 본 발명의 어레이가 유동 마이크로스케일 시스템으로 존재하는 경우 또는 하나 이상의 미소적정 트레이로 존재할 때 적절하다.

[0022] 특정 어레이 포맷은 때때로 "칩" 또는 "바이오칩"으로도 불린다. 어레이는 예컨대 2 내지 약 10개의 번지지정 위치(addressable location)인 저밀도, 약 100개 이상의 위치인 중밀도, 또는 예컨대 1000개 이상의 고밀도 수를 포함할 수 있다. 전형적으로, 칩 어레이 포맷은 용이한 조립, 취급, 배치, 스택, 시약 도입, 검출 및 저장을 허용하는 기하학적으로 일정한 형상이다. 그러나 불규칙적일 수도 있다. 하나의 전형적인 포맷으로서, 어레이는 종횡 포맷으로 구조화되며, 어레이 상의 구성원 세트의 각각의 위치 사이에는 규칙적인 간극이 존재한다. 다르

게는, 상기 위치는 균등한 처리 또는 샘플링을 위해 번들화, 혼합화 또는 균질 배합될 수 있다. 어레이는 각 위치가 시약의 고처리량 취급, 자동적 전달, 마스킹 또는 샘플링이 공간적으로 번지지정되도록 구조화된 복수의 번지지정 위치를 포함할 수 있다. 어레이는 레이저 조사에 의한 주사, 공초점 또는 편향 광 수집, CCD 검출 및 화학 발광을 비롯한 특정 수단에 의한 검출 또는 정량을 용이하게 할 수 있으며, 상기 예로 든 것에 한정되지 않는다. 본 명세서에 기재한 바와 같은 "어레이" 포맷은 어레이(즉, 복수 칩의 어레이), 마이크로칩, 마이크로어레이, 단일 칩상에 조립된 마이크로어레이, 마이크로웰 플레이트에 부착된 유생분자의 어레이 또는 해당 시스템과 사용하기 위한 다른 적합한 포맷을 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다.

[0023] 인플루엔자 바이러스 A 감염 여부 판별용 단백질 어레이는 당업자에게 알려진 방법에 의해 제작할 수 있다.

[0024] 구체적으로, 상기 탐색된 단백질 마커에 특이적으로 결합하는 항체를 탐침 분자(프로브)를 이용하여 단백질 어레이의 기판상에 고정화시키기 위해 파이조일렉트릭(piezoelectric) 방식을 이용한 마이크로피펫팅(micropipetting)법 또는 핀(pin) 형태의 스폿터(spotter)를 이용한 방법 등을 사용하는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 단백질 어레이의 기판은 아미노-실란(amino-silane), 폴리-L-라이신(poly-L-lysine), 또는 알데히드(aldehyde) 등에서 선택되는 하나의 활성기가 코팅된 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 기판은 슬라이드 글래스, 플라스틱, 금속, 실리콘, 나일론 막, 또는 니트로셀룰로스 막 등을 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0025] 본 출원에서 "올리고펩타이드"는 2 내지 20 개의 아미노산으로 이루어진 디펩타이드(dipeptide), 트리펩타이드(tripeptide) 등으로, 단백질 마커에 대해 특이적으로 결합하는 펩타이드를 의미한다.

[0026] 본 출원에서 "항체"는 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자로, 단백질 마커에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미한다.

[0027] 본 출원에서 "PNA (peptide nucleic acid)"는 DNA 또는 RNA와 유사한 합성 폴리머를 의미한다.

[0028] 본 출원에서 "앱타머"는 표적 분자에 결합하는 올리고핵산 또는 펩타이드 분자를 의미한다.

[0029] 본 출원에서 "프라이머"는 짧은 자유 3말단 수산화기를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 중합효소 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. 프라이머는, 각 마커 단백질에 특이적인 프라이머로 7개 내지 50개의 뉴클레오타이드 서열을 가진 센스 및 안티센스 핵산일 수 있다. 프라이머는 DNA 합성의 개시점으로 작용하는 프라이머의 기본 성질을 변화시키지 않는 추가의 특징을 혼입할 수 있다. 프라이머의 제조방법은 업계에 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다.

[0030] 본 출원에서 “프로브”는 자연의 또는 변형된 모노머 또는 연쇄(linkages)의 선형 올리고머를 의미하며, 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하고 타깃 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화 할 수 있으며, 자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성된 것이다.

[0031] 상기 단백질 마커에 특이적으로 결합하는 결합물질은 효소, 형광물질, 리간드, 발광물질, 미소입자(microparticle), 레독스 분자 및 방사선 동위원소 등의 표지물질로 표지되어 있을 수 있다. 표지 물질로 효소가 사용되는 경우 이용 가능한 효소에는 β-글루쿠로니다제, β-D-글루코시다제, β-D-갈락토시다제, 우레아제, 퍼옥시다아제, 알칼라인 포스파타아제, 아세틸콜린에스테라제, 글루코즈 옥시다제, 헥소키나제, GDPase, RNase, 글루코즈 옥시다제, 루시페라제, 포스포프럭토키나제, 포스포에놀피루베이트 카복실라제, 아스파르테이트 아미노트랜스페라제, 포스페놀피루베이트 데카복실라제, β-라타마제 등이 있으며 이에 제한되지 않는다. 형광물질에는 플루오레신, 이소티오시아네이트, 로다민, 피코에리테린, 피코시아닌, 알로피코시아닌, 플루오레스카민 등이 있으며 이에 제한되지 않는다. 리간드에는 바이오틴 유도체 등이 있으며, 발광물질에는 아크리디늄 에스테르, 루시페린, 루시퍼라아제 등이 있으며 이에 제한되지 않는다. 미소입자에는 콜로이드 금, 착색된 라텍스 등이 있으며 이에 제한되지 않는다. 레독스 분자에는 페로센, 루테늄 착화합물, 바이올로젠, 퀴논, Ti 이온, Cs 이온, 디이미드, 1,4-벤조퀴논, 하이드로퀴논 등이 포함되며 이에 제한되지 않는다. 방사선동위원소에는 3H, 14C, 32P, 35S, 36Cl, 51Cr, 57Co, 58Co, 59Fe, 90Y, 125I, 131I 및 186Re 등이 포함되며 이에 제한되지 않는다.

[0032] 혈청 아밀로이드 단백질 A는 공지된 인간 유래의 혈청 아밀로이드 단백질 A 아미노산 서열이라면 특별히 제한하지는 않으나, http://www.uniprot.org/ 에 등록된 assession no. E9PQD6에 기재된 아미노산 서열을 사용할 수

있다.

[0033] LRG (leucine rich alpha 2 glycoprotein)는 공지된 인간 유래의 LRG 아미노산 서열이라면 특별히 제한하지는 않으나, http://www.uniprot.org/ 에 등록된 assession no. P02750에 기재된 아미노산 서열을 사용할 수 있다.

[0034] DUOX1 (dual oxidase 1)은 공지된 인간 유래의 DUOX1 아미노산 서열이라면 특별히 제한하지는 않으나, http://www.uniprot.org/ 에 등록된 assession no. Q9NRD9에 기재된 아미노산 서열을 사용할 수 있다.

[0035] 한 구체예에서, 인플루엔자 바이러스 A는, H1N1 또는 H3N2일 수 있다.

[0036] 한 구체예에서, 항체는 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체 또는 키메릭(chimeric) 항체일 수 있다. 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 키메릭 항체는 통상의 제조방법에 의해 제조된 항체를 제한 없이 사용할 수 있으며, 이를 제조하는 방법은 업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 폴리클로날 항체는 상기한 인플루엔자 바이러스 A 감염 여부 판별용 마커 단백질 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 폴리클로날 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소 개 등의 임의의 동물 종 숙주로부터 제조 가능하다.

[0037] 모노클로날 항체는 업계에 널리 공지된 하이브리도마 방법(hybridoma method)(Kohler 및 Milstein (1976) European Jounral of Immunology 6:511-519 참조), 또는 파지 항체 라이브러리(Clackson et al, Nature, 352:624-628, 1991; Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597, 1991) 기술을 이용하여 제조할 수 있다. 상기 방법으로 제조된 항체는 겔 전지영동, 투석, 염 침전, 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등의 방법을 이용하여 분리, 정제할 수 있다.

[0038] 또한 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab') 2 및 Fv 등이 있다.

[0039] 본 출원은 또한, 상기의 단백질 어레이를 포함하는 인플루엔자 바이러스 A 감염 여부 판별용 키트를 제공한다. 한 구체예에서, 키트는 루미넥스 분석 키트, 단백질 마이크로어레이 키트 또는 ELISA 키트일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0040] 본 출원의 키트는 하나 이상의 단백질 마커에 대한 항체를 포함하여, 시료의 단백질을 정량 분석함으로써, 인플루엔자 바이러스 A에 대한 감염 여부를 판별할 수 있다. 예를 들어, 본 출원의 키트는 항원-항체 결합 반응을 통하여 항-아밀로이드 단백질 A (serum amyloid protein A) 항체, 항-LRG (leucine rich alpha 2 glycoprotein) 항체 및 항-DUOX1 (dual oxidase 1) 항체에 대한 항원을 분석함으로써 인플루엔자 바이러스 A 감염 여부를 판별할 수 있으며, 상기 항원 항체 결합 반응은 통상의 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay), RIA(Radioimmnoassay), 샌드위치 측정법(Sandwich assay), 폴리아크릴아미드 겔 상의 웨스턴 블롯(Western Blot), 면역블롯 분석(Immunoblot assay) 및 면역조직화학염색 방법(Immnohistochemical staining)으로 이루어지는 군에서 선택될 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0041] 본 출원의 키트는 결합된 포장 물질(어레이를 포장하기 위한 물질), 지시자료(예컨대 어레이와 상호작용 하는 하나 이상의 시약 또는 샘플을 검출하기 위해 어레이를 사용하는 지시사항), 대조 시약(어레이에 도포된 공지 활성의 시약), 샘플 등과 같은 부가적인 키트 특징과 함께 본 출원의 단백질 어레이를 포함한다.

[0042] 본 출원은 또한, 인플루엔자 바이러스 A 감염 여부를 판별하기 위하여 피검체의 단백질 시료 내, 혈청 아밀로이드 단백질 A, LRG (leucine rich alpha 2 glycoprotein) 및 DUOX1 (dual oxidase 1) 로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질의 발현량을 측정하는 방법을 제공한다.

[0043] 한 구체예에서, 인플루엔자 바이러스 A는 H1N1 또는 H3N2일 수 있다.

[0044] 한 구체예에서, 단백질의 발현량은 항원-항체 반응을 이용하여 측정할 수 있다. 항원-항체 반응에 대해서는 후술하는 바와 같다.

[0045] 한 구체예에서, 단백질 시료는 피검체의 체세포 또는 혈액으로부터 분리한 것일 수 있으나, 이에 제한 되는 것은 아니다. 예를 들어, 피검체의 체세포는 폐세포일 수 있고, 피검체의 혈액은 혈장일 수 있다.

[0046] 이하에서, 인플루엔자 바이러스 A 감염 여부를 판별하기 위하여 상기의 단백질 마커의 발현량을 측정하는 방법

을 예를 들어 설명한다. 피검체의 단백질 시료 내 표적 단백질의 발현량을 측정하기 위해서, 먼저 피검체로부터 분리한 혈액 시료로부터 단백질을 분리한다. 분리된 상기 단백질 시료를 표지된 상기 단백질에 대한 항체와 접촉한 후, 상기 접촉에 따른 단백질 발현 정도를 측정한다. 그리고, 측정된 단백질의 발현 정도를 대조군과 비교함으로써 인플루엔자 바이러스 A 감염 여부를 판별할 수 있다. 여기에서, 피검체란 인플루엔자 바이러스 A 감염 여부가 의심되거나, 감염 여부의 확인이 필요한 대상군을 말하며 대조군이란 인플루엔자 바이러스 A에 감염되지 않은 것이 명백한 정상 개체군을 의미한다. 혈액 시료로부터 단백질을 분리하는 방법은 업계에 잘 알려져 있으며, 통상의 단백질 추출법을 제한 없이 사용할 수 있다.

[0047] 단백질의 발현량을 확인하는 방법은 업계에 공지된 방법을 제한 없이 사용할 수 있다. 한 구체예에서, 단백질의 발현량은 항원-항체 반응을 이용하여 측정할 수 있다. 위에서 언급한 바와 같이, 혈청 아밀로이드 단백질 A, LRG (leucine rich alpha 2 glycoprotein) 또는 DUOX1 (dual oxidase 1)에 각각 특이적으로 결합하는 항체는 각각 혈청 아밀로이드 단백질 A, LRG 또는 DUOX1와 특이적으로 결합하기 때문에, 결합된 항원-항체 복합체를 정량하여 상기 단백질의 발현량을 측정할 수 있다. 또한, 표적 단백질의 농도를 계산하기 위하여 단백질과 함께 수득되는 이온 세기를 이용할 수 있다. 표적 단백질은 특징적인 하나의 이온 쌍(또는 수개의 이온 쌍)을 이용하여 식별되며, 수득되는 이온 세기는 표적 단백질의 알고 있는 농도와 관련 있어 상응하는 표적 단백질의 정량이 가능하다. 표적 단백질은 사전에 공지되어 있으며, 미리-주석을 달아둘 수 있다. 따라서, 검출 및 정량된 단백질에는 이미 주석이 달려, 빠르고 직접적인 해석이 가능하다.

[0048] 표적 단백질의 질량 측정은 이온 종들을 구별하기 위해 MSMS 분석이 가능한 질량 측정기를 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0049] 상기 결과로부터 단백질의 정량분석에 의한 이온 세기의 증가를 비교하여 인플루엔자 바이러스 A의 감염 여부를 판별할 수 있는 것이다.

[0050] 한 구체예에서, 시료에서 ETFB(Isoform 1 of electron transfer flavoprotein subunit beta), 또는 ITIH-2(Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2)의 이온 세기 증가 또는 감소가 관찰된다면, 인플루엔자 바이러스 A에 감염되었음을 판정할 수 있는 것이다.

[0051] 예를 들어, 혈청 아밀로이드 단백질 A, LRG (leucine rich alpha 2 glycoprotein)의 발현량이 정상인(대조군)보다 높거나(도 2 및 도 3) DUOX1 (dual oxidase 1) 발현량이 정상인(대조군)보다 낮은 경우(도 4)를 인플루엔자 바이러스 A 감염군으로 판별할 수 있다.

[0052] 예를 들어, 혈청 아밀로이드 단백질 A 및 LRG (leucine rich alpha 2 glycoprotein)의 발현량이 정상인(대조군)보다 높고 DUOX1 (dual oxidase 1) 발현량이 정상인(대조군)보다 낮은 경우를 인플루엔자 바이러스 A 감염군으로 판별할 수 있다. 세 가지 마커를 조합하여 판별하는 경우, 인플루엔자 바이러스 A 감염 여부 판별의 신뢰도 및 민감도를 높일 수 있다.

[0053] 본 출원은 또한, (a) 혈청 아밀로이드 단백질 A, LRG (leucine rich alpha 2 glycoprotein) 및 DUOX1 (dual oxidase 1)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질을 포함하는 세포 또는 조직에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계; 및 상기 단계 (a) 에서의 하나 이상의 단백질 또는 이들을 코딩하는 각각의 폴리뉴클레오티드의 발현량을 측정하는 것을 포함하는 인플루엔자 바이러스 A 감염 예방 또는 치료용 물질의 스크리닝 방법을 제공한다. 인플루엔자 바이러스 A에 감염된 경우 혈청 아밀로이드 단백질 A 및 LRG (leucine rich alpha 2 glycoprotein)의 발현량이 증가하며, DUOX1의 발현량은 감소하므로, 분석하고자 하는 시료가 혈청 아밀로이드 단백질 A 또는 LRG (leucine rich alpha 2 glycoprotein)의 발현량을 감소시키거나 DUOX1의 발현량을 증가시키는 경우에, 상기 시료를 인플루엔자 바이러스 A의 예방 또는 치료용 물질로 판정할 수 있다.

[0054] 이하, 본 출원을 실시예를 통해 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 출원을 예시하는 것일 뿐 본 출원의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0055] [실시예 1] 인간 혈장 단백질에서의 인플루엔자 바이러스에 대한 단백체 지표 발굴

[0056] 인간 혈장단백질에서 인플루엔자 바이러스에 대한 단백체 지표 발굴을 위해, 상기 단백질 시료를 고정된 pH에서 좁은 범위의 임모빌린 드라이 스트립 (narrow range immobiline dry strips; pH 4-7, pH 6-9, 24cm)을 이용하

여 1차원 전기영동을 실시하였다.

[0057] 다음으로, 2-DE 분석 (12% SDS-PAGE, 34×45cm, OWL)을 통하여 인간 혈장단백체를 분리하고, 은 염색 후 이미지 분석(Progenesis SameSpots(Nonlinear))을 통하여 인플루엔자 바이러스에 대한 단백질 마커를 발굴하였다(도 1).

[0058] 다음으로, ESI-MS/MS(LCQ Deca XP-Plus, Thermo Finnigan, USA) 및 웨스턴 블랏을 사용하여 EBI (European Bioinformatics Institute)의 IPI 휴먼 데이터베이스를 통한 정확한 단백체 동정을 수행하였다. ESI-MS/MS 분석에 따른 과발현 및 저발현 단백질 리스트를 하기 표 1에 나타내었다.

[0059] [표 1]

[0060]

	Spot no.	Accession no.	Protein name	Matched Peptides no.	Theoretical Peptides	mW (Da)	pI (pH)	Coverage (%)
Up	740	C9JC47	Putative protein FAM157A	4	37	42869	11.6629	13.577
	911	B4DXQ2	Coiled coil domain containing protein 30	5	55	35923	5.0312	18.9103
	962	P03979	T cell receptor gamma chain V region PT gamma 1/2	3	10	15677	9.6015	36.7647
	1039	P05109	Protein S100 A8 (MRP-8)	3	13	10827	6.6165	23.6559
	1245	P02750	Leucine rich alpha 2 glycoprotein	8	24	38154	6.4955	20.7493
	2364	E9PQD6	Serum amyloid A protein	5	12	13537	6.349	25.4098
	2372	F5H715	Axin interactor dorsalization associated protein	5	30	32000	6.5182	21.6312
	2418	D6RAK8	Vitamin D binding protein	36	46	55041	5.3194	49.0872
Down	1290	G3XAE9	KIAA0423 isoform CRA (FAM179B)	14	140	195140	8.3928	6.881
	1486	E7ETA7	Clusterin	6	24	37173	5.79	21.3376
	1658	E9PIE3	Protein kinase C delta binding protein	4	17	31069	6.3812	22.1843
	1711	B4DJS3	Transporter	5	30	65933	8.1471	18.9329
	2059	Q9NRD9	Dual oxidase 1	17	136	177121	7.726	17.0213
	2080	C9JY17	SWI SNF related matrix associated actin dependent regulator of chromatin subfamily D member 3	2	12	15131	11.8618	29.4964
	2468	A2AB10	Flotillin 1	4	25	28147	8.2275	10.7143

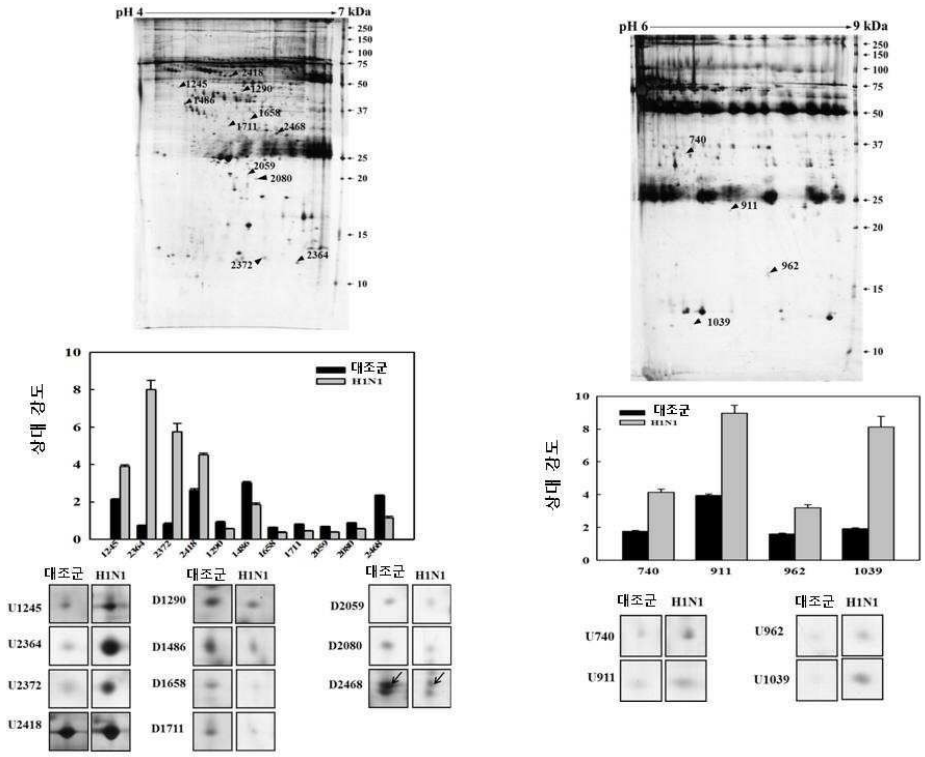
[0061] 표1에 도시한 바와 같이 인플루엔자 바이러스 A 감염된 시료에서 혈청 아밀로이드 단백질 A(serum amyloid protein A; SAA) 및 LRG(leucine rich alpha 2 glycoprotein)의 발현이 증가되고, DUOX1 (dual oxidase 1)의 발현이 감소되었음을 알 수 있었다.

[0062] 또한, 웨스턴 블랏 분석 결과, 인플루엔자 바이러스 H1N1 및 H3N2에 감염된 경우, SAA(도 2) 및 LRG (도 3)의 발현이 증가되고, DUOX1 (도 4)의 발현이 감소되었음을 알 수 있었다.

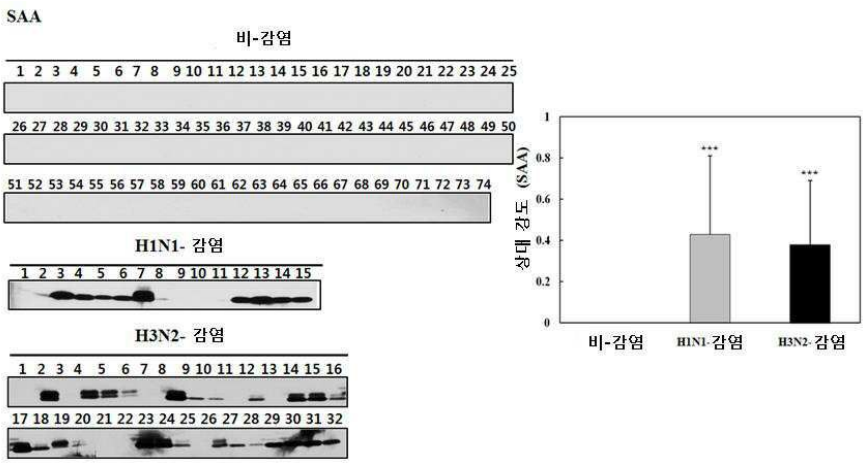
[0063] 따라서, 인플루엔자 바이러스 A 감염 여부를 판별하기 위한 지표로 혈청 아밀로이드 단백질 A, LRG, 및 DUOX1을 사용할 수 있는 것으로 확인하였다.

도면

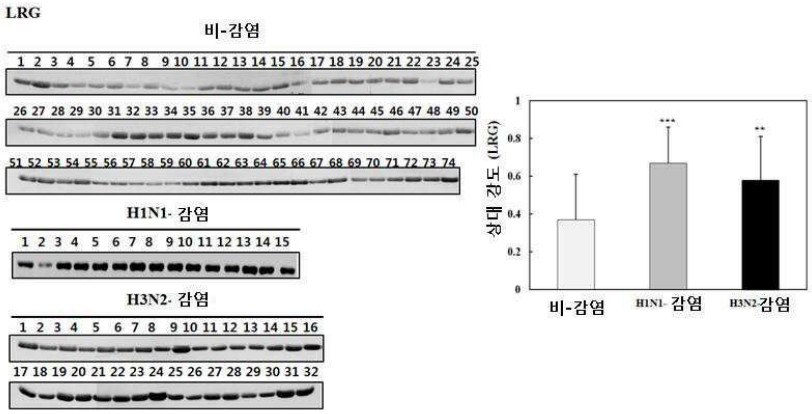
도면1


pH 4
7 kDa
pH 6
9 kDa
대조군
H1N1
상대 강도
U1245
U2364
U2372
U2418
D1290
D1486
D1658
D1711
D2059
D2080
D2468
U740
U911
U962
U1039

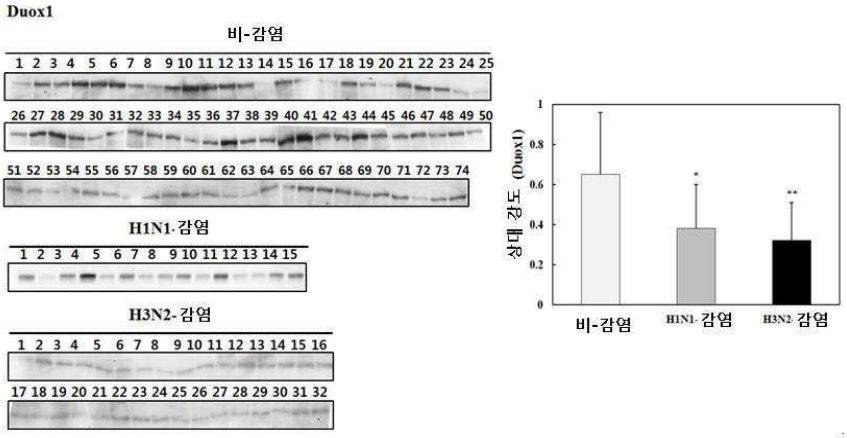
도면2


SAA
비-감염
H1N1- 감염
H3N2- 감염
상대 강도 (SAA)
비-감염
H1N1-감염
H3N2-감염

도면3


LRG
비-감염
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 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50
51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74
H1N1- 감염
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
H3N2- 감염
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 28 29 30 31 32
상대 강도 (LRG)
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
***
**
비-감염
H1N1- 감염
H3N2 감염

도면4


Duox1
비-감염
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 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50
51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74
H1N1-감염
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
H3N2-감염
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 28 29 30 31 32
상대 강도 (Duox1)
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
*
**
비-감염
H1N1- 감염
H3N2 감염