

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2011년 10월 27일 (27.10.2011)



(10) 국제공개번호
WO 2011/132872 A2

- (51) 국제특허분류:
C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2011/002499
- (22) 국제출원일: 2011년 4월 8일 (08.04.2011)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2010-0036177 2010년 4월 20일 (20.04.2010) KR
10-2011-0021499 2011년 3월 10일 (10.03.2011) KR
- (71) 출원인 (US을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 연세대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC CO-OPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) [KR/KR]; 서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교, 120-749 Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김
- (75) 발명자/출원인 (US에 한하여): 이해영 (LEE, Hye-Young) [KR/KR]; 강원도 원주시 무실동 1645 무실주공 단지아파트 309-105, 220-150 Gangwon-do (KR). 조상래 (CHO, Sang-Nae) [KR/KR]; 서울 양천구 목 5동 911 신시가지아파트 608-406, 158-056 Seoul (KR). 김

태우 (KIM, Tae-Woo) [KR/KR]; 강원도 원주시 판부면 서곡리 874, 220-750 Gangwon-do (KR). 김성현 (KIM, Sung-hyun) [KR/KR]; 대전 서구 판저 2동 신선마을아파트 206-1001, 302-242 Daejeon (KR).

(74) 대리인: 구현서 (KOO, Hyun Seo); 서울 송파구 방이동 22 대우유토피아빌딩 1910호 특허허법률사무소, 138-050 Seoul (KR).

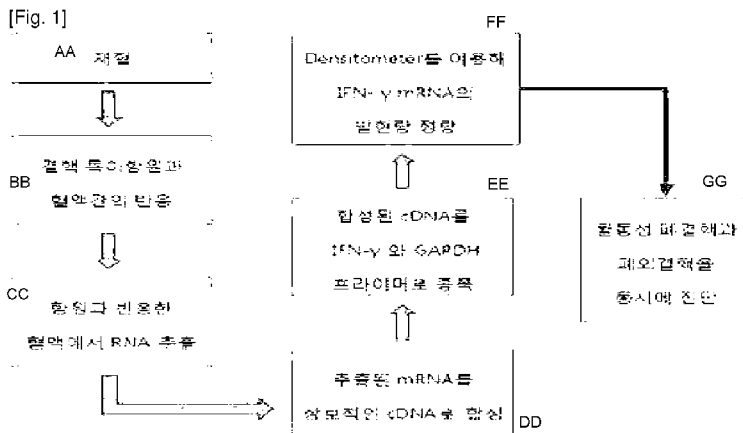
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: INFORMATION PROVIDING METHOD FOR DIAGNOSIS OF TUBERCULOSIS, AND TUBERCULOSIS DIAGNOSTIC KIT FOR SAME

(54) 발명의 명칭: 결핵의 진단을 위한 정보제공방법 및 이를 위한 결핵 진단용 키트



- AA ... Collecting blood
BB ... Reaction of tuberculosis-specific antigen and blood
CC ... Extraction of RNA from blood reacted with antigen
DD ... Synthesis of complementary cDNA from extracted mRNA
EE ... Amplification of synthesized cDNA with IFN-γ and GAPDH primer
FF ... Quantitative analysis of IFN-γ mRNA expression using densitometer
GG ... Simultaneous diagnosis of active pulmonary tuberculosis and extrapulmonary tuberculosis

(57) Abstract: The present invention relates to an information providing method for the diagnosis of tuberculosis, and a tuberculosis diagnostic kit for the same, wherein the volume of blood required and processing time are remarkably reduced when compared to conventional kits for diagnosis of tuberculosis.

(57) 요약서: 본 발명은 종래의 결핵 진단용 키트에 비하여 사용되는 혈액량 및 처리시간이 현저하게 저감된 결핵의 진단을 위한 정보제공방법 및 이를 위한 결핵 진단용 키트에 관한 것이다.



ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 결핵의 진단을 위한 정보제공방법 및 이를 위한 결핵 진단용 키트

기술분야

- [1] 본 발명은 결핵의 진단을 위한 정보제공방법 및 이를 위한 결핵 진단용 키트에 관한 것으로, 보다 상세하게는 종래의 결핵 진단용 키트에 비하여 사용되는 혈액량 및 처리시간이 현저하게 저감된 결핵의 진단을 위한 정보제공방법 및 이를 위한 결핵 진단용 키트에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 결핵은 마이코박테리움.튜베르쿨로시스(*M. tuberculosis*)로 감염되어 유발되는 만성 감염성 질병으로, 개발도상국에서 주요 질병일 뿐 아니라 세계 선진국에서도 그 심각성이 증가하고 있으며, 매년 약 8백만명의 환자가 새로 발병하며 약 3백 만명의 환자가 사망한다. 결핵은 감염되어도 상당한 시간 동안 증상이 없을 수 있지만, 이 질병은 가장 통상적으로 폐의 급성 염증으로 나타나서 열 및 비생산적 기침을 초래하며, 이를 치료하지 않으면, 통상적으로 심각한 합병증을 초래하고 사망에 이르게 된다.
- [3] 따라서, 결핵의 조기 진단 및 치료가 무엇보다도 중요하며, 종래에 결핵균 감염의 모니터링에는 투베르쿨린 피부반응검사(Tuberculin Skin Test; TST)가 전 세계적으로 통용되어 왔다. TST는 결핵균 배양액을 가열 멸균한 후 여과하여 얻은 배양액을 정제한 투베르쿨린을 주사하고 2-3일 이후에 주사부위에 나타나는 반응(지연형 과민반응)의 정도를 측정하는 항원특이 반응이다. 그러나 TST는 비결핵항산균(NTM)에 감염되었던 사람들에게서 교차반응을 보이며, 우리나라와 같이 BCG 백신접종이 보편화되어 있는 경우에는 위양성의 확률이 매우 높다. 또한, 결핵환자 중에는 음성반응을 보이는 환자들도 있어 결핵 감염을 가리는 기준으로써 신빙성이 감소하였다. 그러나 특이도는 낮지만 민감도가 높고 저렴한 비용 때문에 아직도 개발도상국이나 후진국에서는 결핵균 감염을 검출하기 위한 방법으로써 널리 사용되고 있다.
- [4] 통상적으로 많이 사용되던 방법은 배양법이다. 그러나 검사실에서 환자의 검체로부터 직접 균을 분리, 배양하여 검사를 할 경우 감염의 위험성이 매우 높으며, 결핵균이 자라는데 최소 4-6주 이상 소요되기 때문에 상당히 많은 시간과 비용이 소모되는 문제가 있었다.
- [5] 반면에, 환자의 혈액을 이용한 검출방법은 결핵균이 아닌 결핵균 감염에 의한 면역반응을 보는 것이기 때문에 보다 안전하고, 빠르며, 또한 일반적인 임상 검사 시 필요한 혈액의 일부를 사용해 검사를 진행할 수 있기 때문에 환자와 검사자 입장에서 모두 편리한 방법이다.
- [6] 현재까지 개발된 혈액을 대상으로 한 검사법에는 결핵균 항원에 대한 항체를

검출하는 혈청학적인 방법과, 결핵균 감염에 의해 분비되는 IFN- γ (NCBI ACCESSION NO : NM_000619)의 양을 검출하는 IGRA검사법이 있다. 구체적으로 혈청학적 진단법은 사용이 아주 간편하고 쉽고 빠르게 결과를 해석할 수 있다는 장점이 있으나 특이도와 민감도가 매우 낮고 정량적인 검사를 할 수 없다는 단점이 있다.

- [7] 이에 결핵균 특이항원에 의해 자극된 T세포가 분비하는 IFN- γ 단백질을 정량적으로 분석하는 방법인 IGRA검사는 IFN- γ 에 대한 단일항체를 이용한 ELISA법인 QuantiFERON과 ELISPOT법을 이용한 T-Spot.TB가 기존의 검사법에 비해 높은 특이도를 보이기 때문에 선진국을 중심으로 널리 사용되어 지고 있다. 그러나 IGRA검사는 세계적으로 상용화되기에 어려운 다음과 같은 단점들이 있다.
- [8] 첫째, IGRA검사를 위해서는 환자의 전혈이 약 3ml 정도 필요하지만 이 정도 혈액량을 얻기 위해서는 주사기를 통해 혈액을 채취하여야 하기 어려운 소아나 노인의 경우 검사에 필요한 혈액량을 얻기가 매우 어려울 뿐 아니라, 일반인들에게도 매우 번거로운 문제가 있었다.
- [9] 둘째, 검사 시, 채취한 혈액에 결핵 특이 항원을 처리하는 시간이 16-24 시간 정도 소요되기 때문에 검사결과가 나오기까지 약 이틀의 시간이 소요된다.
- [10] 셋째, 상업용 키트의 경우 전량 수입에 의존하고 있으며, 가격 역시 100테스트 당 500만원 정도로 현저하게 비싼 문제가 있다.
- [11] 넷째, ELISA방법을 이용한 IGRA검사의 경우 검사시 마다 표준검량선 (standard)을 설정해야 하기 때문에, 적은 수의 검체를 검사하기에 비용적인 부담이 있고, 한 번에 많은 수의 검체를 검사할 때에는 검사에 사용되는 발색 시약의 작용이 지연될 수 있기 때문에 일정한 결과를 얻기 어려운 문제가 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [12] 본 발명은 상술한 문제를 해결하기 위하여 안출된 것으로, 본 발명의 첫번째 해결하려는 과제는 요구되는 혈액량을 현저하게 줄이면서도 검사시간을 획기적으로 저감할 수 있는 결핵의 진단을 위한 정보제공방법을 제공하는 것이다.
- [13] 본 발명의 두번째 해결하려는 과제는 종래의 결핵 진단용 키트보다 요구되는 혈액량은 적으면서 제작비용을 획기적으로 낮출 수 있는 결핵 진단용 키트를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [14] 본 발명은 상기 첫번째 과제를 달성하기 위하여, a) 결핵 의심환자의 혈액에 결핵균 특이항원을 처리하는 단계, b) 상기 결핵균 특이항원이 처리된 혈액에서 전장 RNA를 분리하는 단계, c) 상기 분리된 전장 RNA로부터 cDNA를 합성하는 단계, d) 상기 합성된 cDNA를 IFN- γ 를 증폭할 수 있는 프라이머 및 IFN- γ 의

발현량과 대비하기 위한 대조군 유전자를 증폭시킬 수 있는 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 수행하는 단계, 및 e) 상기 증폭된 IFN- γ 의 mRNA 발현수준 및 대조군 유전자의 mRNA 발현수준을 측정하는 단계를 포함하는 결핵의 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.

- [15] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 방법에 있어서, d)단계는 상기 합성된 cDNA를 IFN- γ 를 증폭할 수 있는 제1 프라이머 쌍, 증폭된 부위에 결합할 수 있는 제1 프로브 및 IFN- γ 의 발현량과 대비하기 위한 대조군 유전자를 증폭시킬 수 있는 제2 프라이머 쌍과 증폭된 대조군 유전자 부위에 결합할 수 있는 제2 프로브를 이용하여 realtime RT-PCR을 수행하는 단계인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [16] 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따르면, 상기 혈액은 전혈일 수 있다.
- [17] 본 발명의 바람직한 다른 일 실시예에 따르면, 상기 a) 단계 이전에 결핵 의심환자의 혈액을 채혈하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [18] 본 발명의 바람직한 또 다른 일 실시예에 따르면, 상기 채혈은 1ml 이하의 혈액을 채혈하는 것일 수 있으며, 보다 바람직하게는 0.2 ~ 0.5ml, 가장 바람직하게는 0.3ml의 혈액을 채혈할 수 있으나 이에 한정되지 아니한다.
- [19] 본 발명의 바람직한 또 다른 일 실시예에 따르면, 상기 b) 단계의 결핵균 특이항원은 ESAT-6, CFP-10 및 TB7.7 중 어느 하나 이상일 수 있으나 이에 한정되지 아니한다.
- [20] 본 발명의 바람직한 또 다른 일 실시예에 따르면, 상기 대조군 유전자는 GAPDH일 수 있으나 이에 한정되지 아니한다.
- [21] 본 발명의 바람직한 또 다른 일 실시예에 따르면, 상기 GAPDH를 증폭할 수 있는 프라이머는 서열번호 4 및 5로 구성되는 프라이머쌍을 포함할 수 있다.
- [22] 본 발명의 바람직한 또 다른 일 실시예에 따르면, 상기 IFN- γ 를 증폭할 수 있는 프라이머는 서열번호 1 및 2 또는 서열번호 7 및 8로 구성되는 프라이머쌍을 포함할 수 있으나 이에 한정되지 아니한다.
- [23] 본 발명의 바람직한 또 다른 일 실시예에 따르면, 상기 제 1 프로브는 서열번호 3 또는 9로 표시되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [24] 본 발명의 바람직한 또 다른 일 실시예에 따르면, 상기 제2 프로브는 서열번호 6으로 표시되는 것일 수 있다.
- [25] 본 발명의 바람직한 또 다른 일 실시예에 따르면, 상기 e) 단계 이후, 대조군 유전자의 mRNA 발현수준을 기준으로 IFN- γ 의 mRNA 발현수준을 상대적으로 비교하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [26] 상기 두번째 과제를 달성하기 위하여, 인간 IFN- γ 유전자의 mRNA 발현수준을 측정하기 위하여 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머를 포함하는 결핵 진단용 조성물을 제공한다.
- [27] 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따르면, 상기 프라이머는 서열번호 1 및 2 또는 서열번호 7 및 8로 구성되는 프라이머쌍을 포함할 수 있다.

- [28] 본 발명의 바람직한 다른 일 실시예에 따르면, GAPDH의 mRNA 발현수준을 측정하기 위하여 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머를 더 포함할 수 있으며, 보다 바람직하게는 상기 프라이머는 서열번호 4 및 5로 구성되는 프라이머쌍을 포함할 수 있다.
- [29] 본 발명의 바람직한 또 다른 일 실시예에 따르면, 상기 결핵 진단용 조성물을 포함하는 결핵 진단용 키트 및 이를 포함하는 RT-PCR 키트를 제공한다.
- [30] 본 발명의 바람직한 또 다른 일 실시예에 따르면, 결핵의 진단을 위하여 IFN- γ 를 증폭할 수 있는 서열번호 1 및 2 또는 서열번호 7 및 8로 구성되는 프라이머쌍; 상기 증폭된 IFN- γ 에 결합할 수 있는 서열번호 3 또는 9로 표시되는 형광이 표시된 프로브, IFN- γ 의 발현량과 대비하기 위한 GAPDH를 증폭할 수 있는 서열번호 4 및 5로 구성되는 프라이머 쌍 및 상기 증폭된 GAPDH에 결합할 수 있는 서열번호 6으로 표시되는 형광이 표시된 프로브를 포함하는 결핵 진단용 조성물을 제공한다
- [31] 이하, 본 발명에 사용된 용어를 설명한다.
- [32] 용어 "진단을 위한 정보제공방법"은 진단을 위한 예비적 단계로서 결핵의 진단을 위하여 필요한 객관적인 기초정보를 제공하는 것이며 의사의 임상학적 판단 또는 소견은 제외된다.
- [33] 용어 "실시간 역전사 효소 증폭법을 이용한 결핵 진단을 위한 정보제공방법"은 진단을 위한 예비적 단계로서 결핵의 진단을 위하여 필요한 객관적인 기초정보를 제공하는 것이며 의사의 임상학적 판단 또는 소견은 제외된다.
- [34] 용어 "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 합성이 개시할 수 있다. 본 발명의 프라이머는, 각 마커 유전자 특이적인 프라이머로 7개 내지 50개의 뉴클레오타이드 서열을 가진 센스 및 안티센스 핵산이다. 프라이머는 DNA 합성의 개시점으로 작용하는 프라이머의 기본 성질을 변화시키지 않는 추가의 특징을 혼입할 수 있다.
- [35] 용어 "프로브"는 단일쇄 핵산 분자이며, 타겟 핵산 서열에 상보적인 서열을 포함한다.
- [36] 용어 mRNA 발현수준 측정이란 결핵을 진단하기 위한 정보를 제공하기 위하여 생물학적 시료에서 mRNA 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로 mRNA의 양을 측정한다.
- [37] 용어 "역전사 중합효소 반응(RT-PCR)"이라 함은 역전사효소를 이용하여 RNA를 상보적인 DNA(cDNA)로 역전사 시킨 후에 만들어진 cDNA를 주형(template) 으로하여 증폭해 내는 분자생물학적 중합방법이다.
- [38] 용어 "실시간 역전사 중합효소 반응(realtime RT-PCR)"이라 함은 역전사효소를

이용하여 RNA를 상보적인 DNA(cDNA)로 역전사 시킨 후에 만들어진 cDNA를 주형(template) 으로하여 타겟 프라이머와 표지를 포함하는 타겟 프로브를 이용해 타겟을 증폭함과 동시에 증폭된 타겟에 타겟 프로브의 표지에서 발생하는 신호를 정량적으로 검출해 내는 분자생물학적 중합방법이다.

[39]

발명의 효과

[40] 종래의 IFN- γ 단백질을 검사하는 IGRA 방법은 최소 3ml 이상의 혈액을 요구하므로 주사기를 통해 채혈하여야 하지만, 본 발명에서는 1ml(바람직하게는 0.5ml 이하)의 매우 적은 혈액만으로도 결핵검사가 가능하므로 주사기가 아닌 사혈침 등을 환자에게 찌른 후 검출되는 소량의 혈액만으로 검사가 가능하여 주사기의 부담을 현저하게 저감할 수 있다.

[41] 또한 기존의 방법(16~24시간)에 비해 줄어든 항원처리 시간(4시간 이내)으로 인해 기존 총 검사 시간을 줄일 수 있으므로, 보다 빠르게 결핵 환자를 판별해낼 수 있다.

[42] 또한, 전기영동과 EtBr염색과정이 필요 없으므로, 기존 총 검사 시간을 줄일 수 있으므로, 보다 빠르게 결핵 환자를 판별해낼 수 있다. 또한 증폭된 산물에 표지된 프로브에 의해 나오는 신호를 기계가 민감하게 읽어냄으로써, 기존 검사에 비해 보다 민감도가 좋은 검사가 될 수 있다.

[43] 나아가, 추가로 형광 등이 표지된 프로브를 사용함으로써, 프라이머쌍에 의해 증폭된 부위의 내부에 또 다른 표지 프로브가 결합할 수 있으므로, 타겟에 대한 보다 높은 특이도를 가질 수 있다.

도면의 간단한 설명

[44] 도 1은 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른 결핵의 진단을 위한 정보제공방법을 나타내는 모식도이다.

[45] 도 2는 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른 RT-PCR을 수행하기 위한 결핵균 특이항원이 포함된 튜브이다.

[46] 도 3 및 도 4는 혈액샘플에 대하여 종래의 QuantiFERON(IFN- γ ELISA) 검사결과와 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른 비교결과를 나타낸 표이다.

[47] 도 5는 결핵균 특이 항원과 혈액의 반응시간에 따라 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른 RT-PCR을 수행한 전기영동 사진이다.

[48] 도 6은 혈액을 극소량을 투입하고 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른 RT-PCR을 수행한 전기영동 사진이다.

[49] 도 7은 본 발명의 바람직한 일실시예에 따른 결핵의 진단을 위한 실시간 역전사 효소 증폭법의 정보제공방법을 나타내는 흐름도이다.

[50] 도 8 ~ 12는 결핵환자 5명의 혈액을 이용해 본 발명의 realtime RT-PCR을 수행한 결과이다.

[51] 도 13 ~ 17은 결핵이 아닌 사람 5명의 혈액을 이용해 본 발명의 realtime

RT-PCR을 수행한 결과이다.

- [52] 도 18은 기존의 IFN- γ ELISA(상업키트), RT-PCR 그리고 병원검사결과 양성
음성이 나온 결핵환자의 혈액을 가지고 실험을 수행한 결과이다.
- [53] 도 19 및 20은 동일한 검체와 조건으로 실시예 4의 (1)번 IFN- γ 프라이머 및
프로브 쌍과 (2)번의 프라이머 및 프로브 쌍의 조합에 의한 RT-PCR과 실시예 4의
IFN- γ (3)번 프라이머 및 프로브 쌍과 (2)번의 프라이머 및 프로브 쌍의 조합에
의한 RT-PCR를 수행하여 그 결과를 비교한 것이다.
- [54] 도 19 및 20에서 좌측의 그래프는 실시예 4의 (1)번 IFN- γ 프라이머 및 프로브
쌍을 이용했을때의 결과이며, 우측의 그래프는 실시예 4의 IFN- γ (3)번 프라이머
및 프로브 쌍을 이용했을 때의 결과이다.
- [55] 그 결과를 보면 실시예 4의 IFN- γ (3)번 primer와 probe를 사용했을 때 형광의
강도를 나타내는 delta Rn의 값이 현저하게 상승함을 볼 수 있다. 따라서 형광을
읽는 detector가 보다 정확하게 형광값을 읽어 수치화 할 수 있으므로, 발현량이
적은 검체의 경우 실시예 4의 IFN- γ (3)번 primer와 probe를 이용할 경우 보다
민감하고 정확한 결과를 제공할 수 있을 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [56] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.
- [57] 상술한 바와 같이 종래의 결핵의 진단을 위한 IGRA 검사는 요구되는 혈액량이
많고 검사시간이 최소 24시간 이상 소요될 뿐 아니라 제조된 키트의 가격이
현저하게 비싸 널리 활용되기 어려운 문제가 있었다.
- [58] 이에 본 발명에서는 a) 결핵 의심환자의 혈액에 결핵균 특이항원을 처리하는
단계, b) 상기 결핵균 특이항원이 처리된 혈액에서 전장 RNA를 분리하는 단계,
c) 상기 분리된 전장 RNA로부터 cDNA를 합성하는 단계, d) 상기 합성된 cDNA를
IFN- γ 를 증폭할 수 있는 프라이머 및 IFN- γ 의 발현량과 대비하기 위한 대조군
유전자를 증폭시킬 수 있는 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 수행하는 단계, 및
e) 상기 증폭된 IFN- γ 의 mRNA 발현수준 및 대조군 유전자의 mRNA 발현수준을
측정하는 단계를 포함하는 결핵의 진단을 위한 정보제공방법을 제공하여
상술한 문제의 해결을 모색하였다.
- [59] 본 발명의 다른 실시예에서는, a) 결핵 의심환자의 혈액을 채취하여 결핵균
특이항원을 처리하는 단계; b) 상기 결핵균 특이항원이 처리된 혈액에서 전장
RNA를 분리하는 단계; c) 상기 분리된 전장 RNA로부터 cDNA를 합성하는 단계;
d) 상기 합성된 cDNA를 IFN- γ 를 증폭할 수 있는 제1 프라이머 쌍, 증폭된 부위에
결합할 수 있는 제1 프로브 및 IFN- γ 의 발현량과 대비하기 위한 대조군 유전자를
증폭시킬 수 있는 제2 프라이머 쌍과 증폭된 대조군 유전자 부위에 결합할 수
있는 제2 프로브를 이용하여 realtime RT-PCR을 수행하는 단계; 및 e) 상기
증폭된 IFN- γ 의 mRNA 발현수준 및 대조군 유전자의 mRNA 발현수준을
측정하는 단계를 포함하는 결핵의 진단을 위한 정보제공방법을 제공하여

상술한 문제의 해결을 모색하였다.

- [60] 특히 IFN- γ 을 단백질 발현수준이 아닌 mRNA 발현수준에서 정량적으로 분석하기 때문에 결핵검사 시 요구되는 혈액량, 검사시간 및 검사비용을 현저하게 저감할 수 있다.
- [61] 먼저, 상기 a) 단계를 위한 예비단계로서 결핵 의심환자의 혈액을 채혈할 수 있다. 종래의 IGRA 검사에서는 필요로하는 최소한의 혈액량이 3ml 이상이며 이 정도의 혈액을 채혈하기 위해서는 주사기를 통해 결핵 의심환자로부터 혈액을 채취하여야만 하였다. 상술한 채혈의 어려움으로 인하여 노인, 어린아이 및 여성들이 결핵검사를 받기 어려운 문제가 있었다. 그러나, 본 발명의 한 특징에 따르면 요구되는 혈액량이 1ml 이하로서 바람직하게는 0.3 ~ 0.5ml를 통해 결핵여부를 판단할 수 있는 정보를 제공할 수 있으므로, 주사기가 아닌 사혈침 등을 통한 방법으로 간편하게 채혈할 수 있어 채혈의 심리적 부담감을 상당부분 해소할 수 있다. 한편, 본 발명에 사용되는 혈액은 바람직하게는 전혈일 수 있다.
- [62] 다음, a) 단계로서 상기 채혈된 결핵 의심환자의 혈액에 결핵균 특이항원을 처리한다. 이는 결핵균 특이항원에 반응한 T 세포가 분비하는 IFN- γ 의 mRNA 발현수준을 통해 결핵을 판단하는 정보를 제공하기 위한 것으로서, 본 발명에서는 IFN- γ 의 단백질의 발현수준의 정량이 아닌 IFN- γ 의 mRNA 발현수준의 정량을 통해 결핵을 진단하기 위한 정보를 제공한다. 그러므로, 상기 a) 단계에서 사용될 수 있는 결핵균 특이항원은 통상적으로 IGRA 검사에 사용될 수 있는 것으로서, 결핵균에만 특이하게 존재하며, 숙주에서 면역반응을 유도한다고 알려진 통상의 결핵균 특이항원은 모두 사용될 수 있다. 바람직하게는 결핵균 특이항원으로서 ESAT-6(NCBI ACCESSION NO : YP_178023), CFP-10(NCBI ACCESSION NO : NP_218391) 및 TB7.7(NCBI ACCESSION NO : NP_217171)를 약 4시간 이내로 단독 또는 혼합하여 처리할 수 있다.
- [63] 한편, 환자들에게 채혈 후 곧바로 전장 RNA를 분리하지 않고 상기 결핵균 특이항원을 처리하여야 하는데 이는 결핵에 노출된 환자의 경우 기억 T 세포에서 결핵에 대한 정보를 가지고 있기 때문에 결핵에 노출된 환자의 혈액에 결핵항원을 처리해주면 정상인에 비해 T cell이 기억하고 있다가 면역반응을 강하게 나타내기 때문에 더욱 많은 IFN- γ 를 발현해낼 수 있기 때문이다.
- [64] 다음, b) 단계 및 c) 단계로서 구체적으로 상기 결핵균 특이항원이 처리된 혈액에서 전장 RNA(Total RNA)를 분리하는 단계, c) 상기 분리된 전장 RNA로부터 cDNA를 합성하는 단계를 포함한다. 본 발명의 b), c) 단계는 RT-PCR 또는 실시간 RT-PCR 을 수행하기 위한 예비단계로서 일반적으로 사용되는 전장 RNA(Total RNA)를 분리하는 방법 및 이로부터 cDNA를 합성하는 방법은 공지된 방법을 통해 수행될 수 있으며, 이 과정에 대한 자세한 설명은 Joseph Sambrook 등, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001); 및 Noonan, K. F. 등에 개시되어 있어 본 발명의

참조로서 삽입될 수 있다.

- [65] 다음, d) 단계로서 상기 합성된 cDNA를 IFN- γ 를 증폭할 수 있는 프라이머 및 IFN- γ 의 발현량과 대비하기 위한 대조군 유전자를 증폭시킬 수 있는 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 수행한다.
- [66] 본 발명에서 사용되는 realtime RT-PCR은 전기영동과 EtBr염색과정이 필요 없으므로, 기존 총 검사 시간을 줄일 수 있으므로, 보다 빠르게 결핵 환자를 판별해낼 수 있다. 또한 증폭된 산물에 표지된 프로브에 의해 나오는 신호를 기계가 민감하게 읽어냄으로써, 기존 검사에 비해 보다 민감도가 좋은 검사가 될 수 있다. 나아가, 추가로 형광 등이 표지된 프로브를 사용함으로써, 프라이머쌍에 의해 증폭된 부위의 내부에 또 다른 표지 프로브가 결합할 수 있으므로, 타겟에 대한 보다 높은 특이도를 가질 수 있다.
- [67] realtime RT-PCR를 위하여, 본 발명에서는 d) 단계로서, 상기 합성된 cDNA를 IFN- γ 를 증폭할 수 있는 제1 프라이머 쌍, 증폭된 부위에 결합할 수 있는 제1 프로브 및 IFN- γ 의 발현량과 대비하기 위한 대조군 유전자를 증폭시킬 수 있는 제2 프라이머 쌍과 증폭된 대조군 유전자 부위에 결합할 수 있는 제2 프로브를 이용하여 realtime RT-PCR을 수행하여 상술한 문제를 해결하였다.
- [68] 본 발명의 프라이머는 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 비제한적인 예로는 메틸화, "캡화", 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다. 핵산은 하나 이상의 부가적인 공유 결합된 잔기, 예를 들면, 단백질(예: 뉴클레아제, 독소, 항체, 시그날 펩타이드, 폴리-L-리신 등), 삽입제(예: 아크리딘, 프소랄렌 등), 킬레이트화제(예: 금속, 방사성 금속, 철, 산화성 금속 등), 및 알킬화제를 함유할 수 있다. 본 발명의 핵산 서열은 또한 검출 가능한 시그널을 직접 또는 간접적으로 제공할 수 있는 표지를 이용하여 변형시킬 수 있다. 표지의 예로는 방사성 동위원소, 형광성 분자, 바이오틴 등이 있다.
- [69] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 증폭된 표적 서열(IFN- γ , 대조군 유전자)은 검출가능한 표지 물질로 표지될 수 있다. 일 구현예에서, 상기 표지 물질은 형광, 인광, 화학발광단 또는 방사성을 발하는 물질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, 상기 표지 물질은 루오리신(fluorescein), 피코에리트린(phycoerythrin), 로다민, 리사민(lissamine) Cy-5 또는 Cy-3일 수 있다. 표적 서열의 증폭시 프라이머의 5'-말단 및/또는 3' 말단에 Cy-5 또는 Cy-3를 표지하여 real-time RT-PCR을 수행하면 표적 서열이 검출가능한 형광 표지 물질로 표지될 수 있다.

- [70] 또한, 방사성 물질을 이용한 표지는 real-time RT-PCR 수행시 ^{32}P 또는 ^{35}S 등과 같은 방사성 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하면 증폭 산물이 합성되면서 방사성이 증폭 산물에 혼입되어 증폭 산물이 방사성으로 표지될 수 있다. 표적 서열을 증폭하기 위해 이용된 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 이용할 수 있다.
- [71] 표지는 당업계에서 통상적으로 실시되는 다양한 방법, 예컨대, 닉 트랜스레이션 (nick translation) 방법, 무작위 프라이밍 방법 (Multiprime DNA labelling systems booklet, "Amersham"(1989)) 및 카이네이션 방법 (Maxam & Gilbert, Methods in Enzymology, 65:499(1986))을 통해 실시될 수 있다. 표지는 형광, 방사능, 발색 측정, 중량 측정, X-선 회절 또는 흡수, 자기, 효소적 활성, 매스 분석, 결합 친화도, 혼성화 고주파, 나노크리스탈에 의하여 검출할 수 있는 시그널을 제공한다.
- [72] 본 발명의 한 측면에 따르면, IFN- γ 는 결핵균 특이항원에 의해 자극된 T세포가 분비하는 단백질로서 본 발명에서는 RT-PCR을 통해 이를 단백질이 아닌 mRNA 수준에서 발현수준을 측정하게 된다. 이를 위하여 상기 IFN- γ 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머가 요구되며, 본 발명에서는 전방 프라이머로서 [5' TGCAGGTCATTCAGATGTAGCGGATA 3'(서열번호 1)] 또는 5'tgaatgtccaacgcaaagca3'(서열번호 7) 그리고, 후방 프라이머로서 [5' TCATGTATTGCTTTGCGTTGGACA 3'(서열번호 2)] 또는 5'cgacctgaaacagcatctga3'(서열번호 8)인 신규한 프라이머쌍을 사용할 수 있다.
- [73] IFN- γ 의 증폭부위에 결합하는 형광표지 프로브로서 [5'-FAM-TGGAGACCATCAAGGAAGACATGA-Quen-3'(서열번호 3)] 또는 5'cgccagcagctaaaacagggaagcg3' (서열번호 9)을 사용할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, IFN- γ 에 특이적으로 결합하여 검출가능한 시그널을 제공하여 real-time RT-PCR을 수행할 수 있는 것이면, 제한 없이 사용될 수 있다. 상기에서 FAM과 Quen(Quencher)는 형광염료를 의미한다.
- [74] 본 발명의 다른 측면에 따르면, IFN- γ 의 발현량과 대비하기 위한 대조군 유전자를 증폭시킬 수 있는 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 수행할 수 있다. 이 때 본 발명에 적용될 수 있는 대조군 유전자는 IFN- γ 의 발현수준을 상대적으로 판단하기 위하여 기준이 되는 유전자로서, 본 발명에서는 상기 대조군 유전자의 일례로서 GAPDH 유전자(NCBI ACCESSION NO : NM_002046)를 사용하여 RT-PCR을 수행하여 mRNA를 발현시킬 수 있다. GAPDH 유전자는 housekeeping gene으로써 일반적으로 인체의 세포내에서 최소한의 기능을 유지하기 위해 일정한 양이 지속적으로 발현이 되고 있는 유전자로써, GAPDH 외에도 많은 유전자들이 존재하지만 정량적인 RT-PCR 또는 실시간 RT-PCR 분석에서는 GAPDH가 가장 많이 사용되고 있다. 그러므로 이에 제한되는 것은 아니며, IFN- γ 의 발현수준을 상대적으로 판단하기 위하여 기준이 될 수 있는 유전자는 본 발명에 적용될 수 있다. 한편 본 발명에서는 대조 유전자로서 GAPDH 유전자를

사용하였으므로 상기 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머가 요구되며, 본 발명에서는 전방 프라이머로서 [5'-CGGGAAGCTTGTGATCAATGG 3'(서열번호 4)] 및 후방 프라이머로서 [5'-GGCAGTGATGGCATGGACTG 3'(서열번호 5)]인 신규한 프라이머쌍 그리고 형광표지 프로브로서 [5'-FAM-ACTGGCGTCTTCACCACCAT-Quen-3'(서열번호 6)]을 사용할 수 있다.

[75] 본 발명에 적용되는 RT-PCR 방법은 당업계에서 통상적으로 사용되는 공지의 과정을 통해 수행될 수 있다.

[76] 다음, e) 단계로서 상기 증폭된 IFN- γ 의 mRNA 발현수준 및 대조군 유전자의 mRNA 발현수준을 측정한다. 본 단계는 IFN- γ 의 mRNA 및 대조군 유전자의 mRNA의 발현수준을 상대적으로 측정하기 위한 것으로서, 통상의 mRNA 발현수준을 측정할 수 있는 방법이면 제한없이 사용될 수 있으나, 바람직하게는 상기 RT-PCR을 통해 증폭된 PCR 산물을 전기영동하여 농도계(Densitometer)를 통해 IFN- γ 의 mRNA 발현수준 및 대조군 유전자의 mRNA의 발현수준을 측정하거나 전기영동하여 밴드 패턴과 밴드의 두께를 확인하는 것을 통해 IFN- γ 의 mRNA 발현수준 및 대조군 유전자의 mRNA의 발현수준을 측정할 수 있다.

[77] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, e)단계는 사용한 프로브 표지의 종류에 따라 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 증폭 산물을 검출하는 방법 중의 하나로서, 형광 측정 방법은 프라이머의 5'-말단에 Cy-5 또는 Cy-3를 표지하여 real-time RT-PCR을 수행하면 표적 서열이 검출가능한 형광 표지 물질로 표지되며, 이렇게 표지된 형광은 형광 측정기를 이용하여 측정할 수 있다. 또한, 방사성 측정 방법은 real-time RT-PCR 수행시 ^{32}P 또는 ^{35}S 등과 같은 방사성 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하여 증폭 산물을 표지한 후, 방사성 측정기구, 예를 들면, 가이거 계수기(Geiger counter) 또는 액체섬광계수기(liquid scintillation counter)를 이용하여 방사성을 측정할 수 있다.

[78] 본 발명의 바람직한 일 구현예에 따르면, 상기 realtime RT-PCR을 통해 증폭된 PCR 산물에 형광이 표지된 프로브가 붙어 특정 파장의 형광을 내게 되고, 증폭과 동시에 realtime PCR 장치의 형광 측정기에서 IFN- γ 의 mRNA 발현수준 및 대조군 유전자의 mRNA의 발현수준을 실시간으로 측정하고, 측정된 값이 계산되어 PC를 통해 시각화 되게 되어 검사자는 쉽게 그 발현정도를 확인할 수 있다.

[79] 다시 말해, 각각의 혈액 샘플(시료)마다 IFN- γ 와 GAPDH mRNA의 발현량을 계산하고, IFN- γ 의 mRNA 발현량이 GAPDH의 mRNA 발현량에 비해 얼마나 증가했고 감소하였는지의 정도를 배수로 몇배가 증가하고 감소하였는지 상대적으로 정량하는 방법을 통해 결핵환자임을 판별할 수 있는 정보를 제공할 수 있는 것이다.

[80] 본 발명의 다른 측면에 따르면 인간 IFN- γ 유전자의 mRNA 발현수준을

측정하기 위하여 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머를 포함하는 결핵 진단용 조성물을 포함한다. 구체적인 일 양태로서, 상기 진단 키트는 역전사 중합효소반응을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 결핵 진단용 키트일 수 있다. 역전사 중합효소반응 키트는 상기 인간 IFN- γ 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍을 포함할 수 있다. 프라이머는 각 마커 유전자의 핵산서열에 특이적인 서열을 가지는 뉴클레오타이드로서, 약 7 bp 내지 50 bp의 길이, 보다 바람직하게는 약 10 bp 내지 30 bp의 길이일 수 있으며 보다 바람직하게는 서열번호 1 및 2로 표시되는 신규한 프라이머 쌍 또는 서열번호 1 및 2 또는 서열번호 7 및 8로 표시되는 신규한 프라이머 쌍 및 서열번호 3 또는 서열번호 9로 표시되는 형광표지된 프로브를 포함할 수 있다.

- [81] 또한 대조군 유전자의 핵산 서열에 특이적인 프라이머를 포함할 수 있으며, 바람직하게는 GAPDH의 mRNA 발현수준을 측정하기 위하여 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머를 더 포함할 수 있으며, 보다 바람직하게는 상기 프라이머는 서열번호 4 및 5 또는 상기 신규한 프라이머 쌍 및 서열번호 6으로 표시되는 형광표지된 프로브를 포함할 수 있다.
- [82] 그 외 역전사 중합효소반응 키트는 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제 DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.
- [83] 결국, 종래의 IFN- γ 단백질을 검사하는 IGRA 방법은 최소 3ml 이상의 혈액을 요구하므로 주사기를 통해 채혈하여야 하지만, 본 발명에서는 1ml(바람직하게는 0.5ml 이하)의 매우 적은 혈액만으로도 결핵검사가 가능하므로 주사기가 아닌 사혈침 등을 환자에게 찌른 후 검출되는 소량의 혈액만으로 검사가 가능하여 주사기의 부담을 현저하게 저감할 수 있다. 또한 기존의 방법(16~24시간)에 비해 줄어든 항원처리 시간(4시간 이내)으로 인해 기존 총 검사 시간을 줄일 수 있으므로, 보다 빠르게 결핵 환자를 판별해낼 수 있다.
- [84] 이하 실시예를 통하여 본 발명의 구성을 보다 구체적으로 설명하지만, 본 발명의 범위가 하기 실시예의 내용으로 한정되는 것은 아니다.

[85]

[86] 실시예 1: 환자의 혈액(whole blood)에 결핵균 특이항원 처리

[87] 환자로부터 혈액을 채혈한 후, IGRA검사에 사용되는 항원이 포함된 튜브를 호주의 Cellestis사에서 수입하여 각 3개의 튜브에 혈액을 1 ml을 넣었다(도 2). Nil tube는 아무런 항원을 포함하지 않는 튜브로써 IGRA검사에서 음성대조군으로 사용된다. TB antigen 튜브는 결핵균에만 특이하게 존재하면서 숙주에서 면역반응을 유도한다고 알려진 3가지항원 ESAT-6, CFP-10, TB7.7이 포함된 튜브이다. TB mitogen 튜브는 mitogen 작용을 하는 phytohaemagglutinin(PHA)이 포함된 튜브로써 IGRA검사에서 양성대조로

사용하였다.

[88] 본 발명에서는 IGRA 검사의 단점을 보완하기 위해서 본 단계에서 항원처리 시간 및 혈액량을 다음과 같이 감소시켰다.

[89] 1) 항원처리시간 : 12시간, 8시간, 4시간, 2시간, 1시간, 30분

[90] 2) 혈액량 : 1 ml, 0.3 ml

[91] 실시에 2: 항원 처리된 혈액으로부터 total RNA의 분리

[92] 실시예 1에서 항원처리가 끝난 혈액을 약 5배의 RBC lysis buffer에 넣고 RBC를 모두 제거해준 후 남아있는 WBC로부터 QIAamp Blood RNA Mini kit (Qiagen)와 Easy-spin total RNA extraction kit (Intron)를 사용하여 total RNA를 분리하였다.

[93]

[94] 실시에 3: 분리된 total RNA로부터 상보적인 cDNA의 합성

[95] 분리된 total RNA 9 μ l, random primer(Invitrogen) 0.25ug, dNTP(Cosmo gene tech) 250uM, Tris-HCl(pH 8.3) 50mM, KCl 75mM, MgCl₂ 3mM, DTT 8mM 와 MMLV 역전사 중합효소 200units(Invitrogen)을 첨가하고 최종부피를 25 ul가 되도록 DEPC treated DW를 넣고 교반하였다. 그 뒤 cDNA 합성 반응액을 thermocycler(ABI)에서 25°C에서 10 분, 37°C에서 50 분, 70°C에서 15 분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

[96] 실시에 4: 합성된 cDNA를 주형으로 하여 IFN- γ 및 GAPDH 증폭

[97] 4-1: RT-PCR:

[98] RT-PCR 반응물의 조성은 KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM(pH8.3), MgCl₂ 1.5 mM, 젤라틴 0.001%(w/v), 250 uM dNTP, 1 unit TagDNA 중합효소(Solgent)와 각각의 전방 프라이머와 후방 프라이머 10 pmole이다. 여기에 합성된 cDNA 2 μ l를 넣고 최종부피가 20 μ l가 되도록 하였다. 첨가된 각각의 프라이머의 염기서열은 다음과 같다.

[99] (1) IFN- γ primer(증폭산물의 크기-287bp)

[100] Forward - 5' TGCAGGTCATTCAGATGTAGCGGATA 3'(서열번호 1)

[101] Reverse - 5' TCATGTATTGCTTTGCGTTGGACA 3'(서열번호 2)

[102] (2) GAPDH primer(증폭산물의 크기-357bp)

[103] Forward - 5' CGGGAAGCTTGTGATCAATGG 3'(서열번호 4)

[104] Reverse - 5' GGCAGTGATGGCATGGACTG 3'(서열번호 5)

[105] RT-PCR 반응(Applied Biosystems(GeneAmp PCR System 2700), MJ Research Inc.(PTC-100))은 변성 온도 95°C에서 5분 동안 1회 수행하고, 변성 온도 95°C에서 30초, 어닐링 온도 55°C에서 30초, 연장(elongation) 온도 72°C에서 30초인 사이클을 35회 반복하고 마지막으로 최종 연장 반응을 72°C에서 10분간 수행하였다.

[106] 4-2: 실시간 RT-PCR:

[107] RT-PCR 반응물의 조성은 KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM(pH8.3), MgCl₂ 1.5 mM, 젤라틴 0.001%(w/v), 250 uM dNTP, 1 unit TagDNA 중합효소(Solgent)와 각각의

전방 프라이머와 후방 프라이머 10 pmole이다. 덧붙여 형광 프로브가 표시된 올리고 프로브를 5pmole이 되게 첨가해준다. 여기에 합성된 cDNA 3 μ l를 넣고 최종부피가 20 μ l가 되도록 하였다. 첨가된 각각의 프라이머의 염기서열은 다음과 같다.

[108] 상기 실시간 RT-PCR은 하기 (1)과 (2)의 조합 또는 하기 (2)와 (3)의 조합에 의하여 수행되었다.

[109] (1) IFN- γ primer(증폭산물의 크기-140bp)

[110] Forward - 5' TGCAGGTCATTCAGATGTAGCGGATA 3'(서열번호 1)

[111] Reverse - 5' TCATGTATTGCTTTGCGTTGGACA 3'(서열번호 2)

[112] Probe - 5' FAM-TGGAGACCATCAAGGAAGACATGA-Quen 3' (서열번호 3)

[113] (2) GAPDH primer(증폭산물의 크기-91bp)

[114] Forward - 5' CGGGAAGCTTGTGATCAATGG 3'(서열번호 4)

[115] Reverse - 5' GGCAGTGATGGCATGGACTG 3'(서열번호 5)

[116] Probe - 5' FAM-ACTGGCGTCTTCACCACCAT-Quen 3' (서열번호 6)

[117] (3) 다른 IFN- γ primer 및 프로브(-110bp)

[118] IFN- γ Forward - 5'tgaatgtccaacgcaaagca3'(서열번호 7)

[119] IFN- γ Reverse - 5'cgacctcgaaacagcatctga3'(서열번호 8)

[120] Probe - 5' FAM-cgccagcagctaaaacagggaagcg-Quen 3' (서열번호 9)

[121] Real-time RT-PCR 반응 (MJ opticon real time PCR system, Bio Rad)은 변성 온도 95°C에서 5분 동안 1회 수행하고, 변성 온도 95°C에서 30초, 어닐링 온도 60°C에서 30초인 사이클을 40회 반복 수행하였다.

[122] 실시에 5: 전기영동을 통한 증폭여부 확인 및 증폭된 산물의 정량

[123] 5-1:RT-PCR

[124] RT-PCR이 끝난 후, 5 μ l의 PCR산물을 취하여 2% 아가로스 겔 전기영동을 행함으로써 IFN- γ 와 GAPDH PCR 산물의 증폭을 확인하였다. 그리고 전기영동의 결과를 densitometer를 통해 IFN- γ mRNA가 발현되었는지를 정량하였으며 비교정량을 위해 항상 일정하게 발현되는 house keeping gene인 GAPDH mRNA의 발현량으로 normalization 하였다.

[125] 한편 본 발명의 실시예에서 사용되는 세 가지 튜브인 TB mitogen 튜브, TB antigen 튜브, Nil 튜브로부터 IFN- γ 와 GAPDH의 값을 정량하고 하기 관계식 1을 통해 결핵균 감염을 진단하였다.

[126] [관계식 1]

[127] (TB antigen 튜브의 IFN- γ 발현 값 - 동일한 튜브의 GAPDH 발현 값) / (Nil 튜브의 IFN- γ 발현 값 - 동일한 튜브의 GAPDH 발현 값)

[128] 상기 관계식 1에 대입해 얻은 TB Ag/Nil 값이 1.5 이상이면 결핵양성, 1.5 이하이면 결핵음성으로 판정할 수 있다. 또한 positive control인 TB mitogen 튜브의 값과 negative control인 Nil 튜브 값의 차이를 고려하여 확실한 음성의 여부를 결정짓게 된다. 상기 관계식 1 및 그에 따른 결핵 감염의 판정은 일반적인

IGRA검사의 기준을 따랐다.

[129] 5-2:실시간 RT-PCR

[130] Realtime RT-PCR이 끝난 후, Opticon monitor 3(Bio Rad) 시스템을 통해 산물의 증폭을 확인하였다. 그리고 PCR효율 및 cT값을 통해 결과를 분석 및 정량하였다.

[131] 한편 본 발명의 실시예에서 사용되는 세 가지 튜브인 TB mitogen튜브, TB antigen 튜브, Nil튜브로부터의 cT 값을 확인하였다.

[132] [관계식 1]

[133] 주로 유전자 발현양을 분석하는 예로 비교 정량법 중 하나인 ΔC_t 법을 사용하게 되는데 관계식은 아래와 같다.

[134] $\Delta C_t \text{ TB 또는 Mitogen} = \text{TB 또는 Mitogen의 IFN-}\gamma \text{ Ct 값} - \text{TB 또는 Mitogen의 reference gene Ct 값}$

[135] $\Delta C_t \text{ Nil} = \text{Nil control의 IFN-}\gamma \text{ Ct 값} - \text{Nil control의 reference gene Ct 값}$

[136] $R = \Delta C_t \text{ TB 또는 Mitogen} - \Delta C_t \text{ Nil}$

[137] <평가에 1> 항원 처리된 혈액으로부터 분리된 IFN- γ mRNA 정량을 통한 결핵진단법의 가능성 평가

[138] 신촌 세브란스병원으로부터 약 16개의 임상검체와

QuatiFERON(IFN- γ ELISA)검사결과를 제공받아 기존의 IFN- γ 단백질을 검사하는 IGRA검사에서 쓰이는 동일한 조건(3 ml 혈액과, 16시간의 항원처리)으로 결핵 특이항원을 처리하여 본 발명의 RT-PCR based IGRA assay를 수행하고 그 결과를 비교하였다(도 3, 도 4).

[139] 구체적으로 도 3은 상업적 키트로 판매되고 있는 QuatiFERON이라는 상품으로 검사하고 그 결과가 결핵양성으로 나온 환자 검체를 기존의 IGRA검사와 동일한 조건으로 결핵특이항원을 처리하고 본 발명의 RT-PCR based IGRA assay를 수행하여 그 결과를 비교한 표이다. 그 결과, 기존의 상업적 키트와 비교했을 때, 본 발명의 RT-PCR based IGRA assay가 기존의 상업적 키트와 동일한 검사 결과를 나타내는 것을 확인할 수 있다.

[140] 도 4는 상업적 키트로 판매되고 있는 QuatiFERON이라는 상품으로 검사한 결과, 결핵음성 및 해석 불가능한 결과를 나타낸 환자 검체를 기존의 IGRA검사와 동일한 조건으로 항원처리한 후, 본 발명의 RT-PCR based IGRA assay를 수행하여 그 결과를 비교한 표이다. 그 결과, 기존의 상업적 키트에서 해석 불가능한 결과가 나왔던 검체에서 각각 양성과, 음성이 하나씩 나왔고, 나머지 결핵음성 검체는 모두 동일하게 음성이 나왔음을 알 수 있다.

[141] 도 3 및 도 4에서 알 수 있듯이 기존의 단백질을 검사하는 IGRA검사와 동일한 조건(3 ml 혈액과, 16시간의 항원처리)에서 항원처리한 후, RT-PCR based IGRA assay를 수행함으로써 IFN- γ mRNA 정량을 통한 결핵진단법의 가능성 평가해본 결과, 본 발명의 RT-PCR을 이용한 IFN- γ mRNA정량을 통한 결핵 정보제공방법이 유의성이 있음을 확인할 수 있다.

[142] 또한 실시간 RT-PCR을 수행한 평가 결과는 아래와 같다.

- [143] 연세대학교 원주기독병원으로부터 약 40개의 임상검체와 QuatiFERON(IFN- γ ELISA)검사결과를 제공받고 본 연구실에서 기존의 RT-PCR based IGRA를 통해 확인된 환자의 혈액(1ml)에 결핵 특이항원을 처리하여 본 발명의 Real time RT-PCR based IGRA assay를 수행하고 그 결과를 비교하였다(도 8 내지 도 17).
- [144] 도 8 내지 12는 결핵환자의 혈액을 이용해 새로이 개발된 realtime RT-PCR을 수행한 결과이다. 각각의 그래프는 IFN- γ mRNA의 증폭에 따른 Ct 값을 나타내며, 그래프가 상승하는 지점부터 타겟의 발현양이 증가함을 보여주며 그 지점의 값이 Ct값인 것이다. 따라서 Ct 값이 낮을수록 적은 사이클을 수행하였을 때도 발현양이 증가하였음을 보여주므로, 낮은 Ct값은 보다 높은 유전자의 발현양을 나타낸다.아래의 각각 그래프는 결핵환자 한명 한명의 결과를 나타내며, 그래프 내에서 두 라인이 존재한다. 앞에 있는 라인은 결핵균 항원을 처리했을 때의 Ct 값이고, 뒤에 있는라인은 결핵균 항원을 처리하지않은 nil control 의 값이다. 따라서 두 라인의 간격이 멀 수록, 즉 Ct 값의 차이가 클수록 결핵균 항원에 대한 반응이 많이 증가한것을 알 수 있기 때문에 결핵에 노출된 환자의 경우 두 Ct 값의 차이가 크고, 정상인의 경우 두 Ct 값의 차이가 작기 때문에 따라서 도 3에 있는 그래프들은 모두 결핵환자임을 알 수 있다.
- [145] 도 13 내지 17은 결핵이 아닌 사람의 혈액을 이용해 새로이 개발된 realtime RT-PCR을 수행한 결과이다. 각각의 그래프에 있는 두 라인의 간격이 매우 좁은 것을 알 수있다. 이는 즉 앞, 뒤 두 라인의 Ct값의 차가 작을 수록 결핵항원에대한 IFN- γ mRNA의 발현이 증가하지 않음을 나타내므로, 도 13 내지 17에 존재하는 각각의 그래프는 정상인의 나타낸다. 도 8 내지 12에 있는 그래프 내에 존재하는 두 라인간의 간격에 비해 매우 좁은 그래프 양상을 보여줌을 알 수 있다.
- [146] 표 1은 기존의 IFN- γ ELISA(상업키트), RT-PCR 그리고 병원검사결과 양성과 음성이 나온 결핵환자의 혈액을 가지고 상기 도 8 내지 12 및 도 13 내지 17과 같이 실험을 수행하여 얻은 Ct값으로 ABI사의 7500 v2.04 software 를 이용하여 비교정량한 값 즉 위의 관계식에 따른 R값을 도 18에서 그래프로 보기 쉽게 수치화하였으며, patient의 경우 결핵환자에서의 결핵균 항원에 대한 IFN- γ mRNA의 발현양을 나타내며 그래프 상에서 높은 R값을 보여주며, non-TB의 경우 그래프 상에서 낮은 R값을 보여준다. R 값은 곧 IFN- γ 의 발현양을 나타냄으로, R 값이 높게나온 좌측의 Patient군이 결핵 환자군임을 알 수 있다.
- [147] 표 1

[Table 1]

Sample	Expression rate with ABI 7500	Expression rate with RT-PCR	ELISA	Nil
TB2	17.14	13.29, +	positive	1
TB3	94.25	3.43, +	positive	1
TB4	234.82	5.38, +	positive	1
TB5	16.19	7.28, +	positive	1
Normal1	1.82	0.53, -	negative	1
Normal2	1.08	0.52, -	negative	1
Normal3	6.95	0.85, -	negative	1
Normal4	0.66	0.64, -	negative	1
Normal5	1.65	0.75, -	negative	1

[148] 상기 표 1에서 TB : 결핵환자, Normal : 결핵이 아닌 건강한 사람을 나타냄.

[149] 그 결과, 기존의 상업적 키트와 비교했을 때, 본 발명의 Real time RT-PCR based IGRA assay 가 기존의 상업적 키트 및 최근 개발된 분자생물학적 검사와 동일한 검사 결과를 나타내는 것을 확인할 수 있다.

[150] RNA 정량을 통한 결핵진단법의 가능성 평가해본 결과, 본 발명의 Real time RT-PCR을 이용한 IFN- γ mRNA정량을 통한 결핵 정보제공방법이 유의성이 있음을 확인할 수 있다.

[151] <평가예 2> 신속 검사법으로써의 RT-PCR based IGRA assay의 조건 확립

[152] 기존의 IFN- γ 단백질을 검사하는 IGRA검사의 경우 긴 결핵특이항원 처리시간 때문에 최종 검사결과를 얻는데 이들의 시간이 소요되었다. 기존의 IGRA같은 경우 타겟이 IFN- γ 단백질 이지만, 본 발명에서는 IFN- γ mRNA가 타겟이기 때문에 보다 빠른 시간에 발현을 확인할 수 있을 것이라고 가설을 세우고 신속 RT-PCR based IGRA assay의 조건확립을 위해서 기존의 IGRA 검사와 동일한 양의 혈액(총 3 ml ; mitogen(M), TB Ag, Nil(N) tube 각각 1 ml 씩 사용됨)을 사용하여 결핵균 특이 항원과 혈액의 반응시간을 각각 4시간, 8시간, 12시간으로 변화시켜 RT-PCR based IGRA assay를 수행하였다(도 5).

[153] 그 결과, 새로 개발된 RT-PCR based assay의 경우 동일한 양의 혈액으로 짧은 시간동안 항원을 처리하였을 때 약 4시간의 항원처리만으로도 의미있는 검사 결과를 얻을 수 있었다.

[154] 도 5에서 M은 TB mitogen, TB는 TB Ag, N은 Nil을 나타내며, 시간별로 이런 항원들을 처리 안한것, 4시간처리, 8시간처리, 16시간처리를 한 뒤 RT-PCR을 수행한 결과이다. 결과를 보면 4시간의 항원처리에도 IFN- γ mRNA의 발현이 되는 것을 확인하였다. 이를 통해 기존의 IFN- γ ELISA를 수행할 때

16시간~24시간 걸리던 항원처리시간을 4시간 이내로 단축할 수 있음을 알 수 있다.

[155] <평가예 3> 적은 양의 혈액을 이용하는 조건 수립

[156] 종래의 IFN- γ 단백질을 검사하는 IGRA검사의 경우, 검사를 수행하기 위해서는 3ml 혈액을 필요로 하였다. 그러나 소아와 노인과 같이 혈액채취가 어려운 환자는 3ml의 혈액을 채취하는 것이 어렵다는 단점이 있었다. 따라서 본 발명자들은 이러한 단점을 극복하고자 극소량의 혈액(0.3ml)으로 RT-PCR based IGRA assay를 수행하였다(도 6). 그 결과, 기존의 IGRA 검사에 필요한 혈액량보다 약 1/10정도 되는 소량의 혈액양으로 IFN- γ 의 발현양을 확인할 수 있었으며, 의미있는 결과를 얻을 수 있었다.

[157] 도 6에서 M은 TB mitogen, TB는 TB Ag, N은 Nil을 나타내며, 도 5에서의결과를 기반으로 실제 결핵환자의 혈액 총 1ml(각 튜브별 0.3ml)을 이용하고 항원처리시간을 4시간(본발명의 조건)으로 앞당겨 실험을 수행하였다.

[158] 도 5와 도 6의 결과를 통해서본 발명의RT-PCR based IGRA assay는 소량의 혈액(0.3ml)과 짧은 항원처리시간(4시간)으로도 IFN- γ mRNA의 발현이 유도되며 이를 RT-PCR based IGRA assay를 통해 검출할 수 있음을 확인하였다.

산업상 이용가능성

[159] 본 발명의 결핵의 진단을 위한 정보제공방법 및 이를 위한 결핵 진단용 키트는 매우 적은량의 혈액을 통해 짧은 시간내에 결핵을 진단할 수 있으므로 의료산업에 대단히 유용하다.

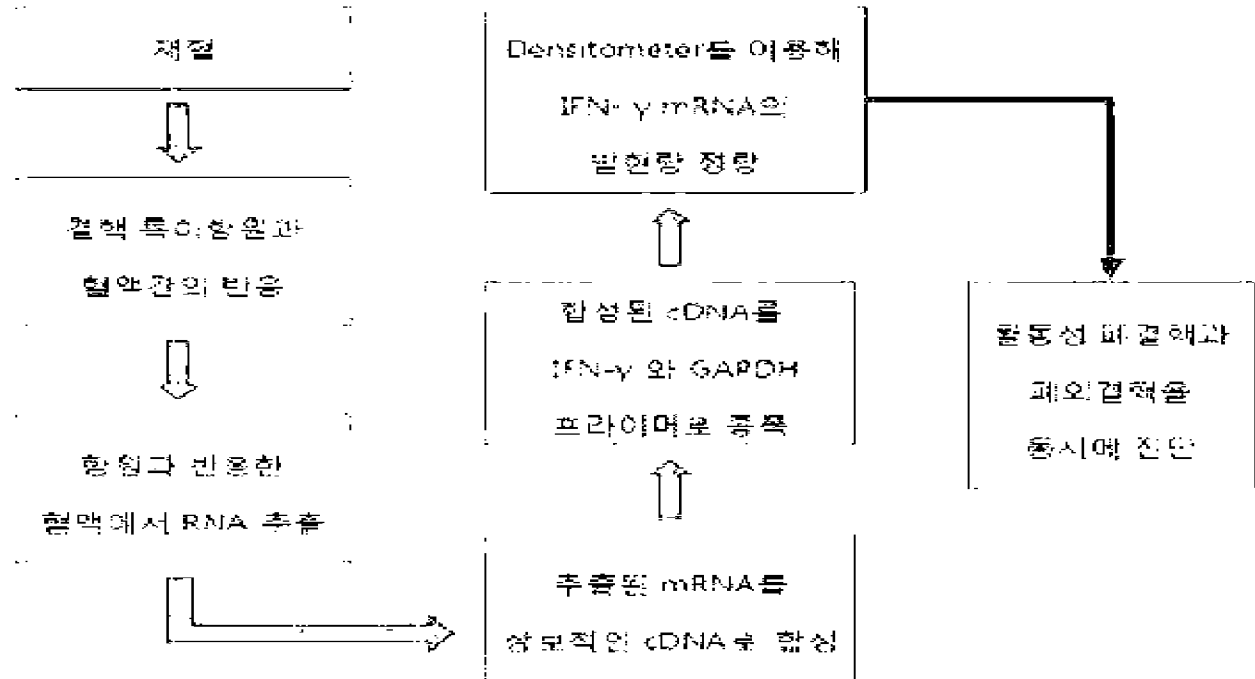
청구범위

- [청구항 1] a) 결핵 의심환자의 혈액에 결핵균 특이항원을 처리하는 단계;
b) 상기 결핵균 특이항원이 처리된 혈액에서 전장 RNA를 분리하는 단계;
c) 상기 분리된 전장 RNA로부터 cDNA를 합성하는 단계;
d) 상기 합성된 cDNA를 IFN- γ 를 증폭할 수 있는 제 1 프라이머 쌍 및 IFN- γ 의 발현량과 대비하기 위한 대조군 유전자를 증폭시킬 수 있는 제 2 프라이머 쌍을 이용하여 RT-PCR을 수행하는 단계; 및
e) 상기 증폭된 IFN- γ 의 mRNA 발현수준 및 대조군 유전자의 mRNA 발현수준을 측정하는 단계;를 포함하는 결핵의 진단을 위한 정보제공방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 d) 단계는
상기 합성된 cDNA를 IFN- γ 를 증폭할 수 있는 제1 프라이머 쌍, 증폭된 부위에 결합할 수 있는 제1 프로브 및 대조군 유전자를 증폭시킬 수 있는 제2 프라이머 쌍과 증폭된 대조군 유전자 부위에 결합할 수 있는 제2 프로브를 이용하여 realtime RT-PCR을 수행하는 것을 특징으로 하는 결핵의 진단을 위한 정보제공방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 a) 단계 이전에 결핵 의심환자의 혈액을 채혈하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 결핵의 진단을 위한 정보제공방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,상기 b) 단계의 결핵균 특이항원은 ESAT-6, CFP-10 및 TB7.7 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 결핵의 진단을 위한 정보제공방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,상기 대조군 유전자는 GAPDH인 것을 특징으로 하는 결핵의 진단을 위한 정보제공방법.
- [청구항 6] 제1항 또는 제2항에 있어서,
상기 IFN- γ 를 증폭할 수 있는 제 1 프라이머 쌍은 서열번호 1 및 2 또는 서열번호 7 및 8로 구성되는 프라이머쌍이고, 상기 대조군 유전자를 증폭할 수 있는 제 2 프라이머 쌍은 서열번호 3 및 4로 구성되는 프라이머 쌍인 것을 특징으로 하는 결핵의 진단을 위한 정보제공방법.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,상기 e) 단계 이후, 대조군 유전자의 mRNA 발현수준을 기준으로 IFN- γ 의 mRNA 발현수준을 상대적으로 비교하는 단계를 더 포함하는 결핵의 진단을 위한 정보제공방법.
- [청구항 8] 제 2항에 있어서,
상기 제 1 프로브는 서열번호 3 또는 서열번호 9로 표시된 프로브이고, 제2 프로브는 서열번호 6으로 표시된 프로브인

결핵의 진단을 위한 정보제공방법.

- [청구항 9] 인간 IFN- γ 유전자의 mRNA 발현수준을 측정하기 위하여 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍을 포함하는 결핵 진단용 조성물.
- [청구항 10] 제 9항에 있어서, 상기 프라이머 쌍은 서열번호 1 및 2 또는 서열번호 7 및 8로 구성되는 프라이머 쌍을 포함하는 결핵 진단용 조성물.
- [청구항 11] 제9항에 있어서, 상기 조성물은 대조유전자의 mRNA 발현수준을 측정하기 위하여 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍을 더욱 포함하는 결핵 진단용 조성물.
- [청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 프라이머 쌍은 서열번호 3 및 4로 구성되는 프라이머쌍인 것을 특징으로 하는 결핵 진단용 조성물.
- [청구항 13] 제9항에 있어서, 상기 조성물은 제 1 프로브 및 제 2 프로브를 더욱 포함하는 결핵 진단용 조성물.
- [청구항 14] 제 13항에 있어서, 상기 제 1 프로브는 서열번호 3 또는 9로 표시된 프로브이고, 제2 프로브는 서열번호 6으로 표시된 프로브인 결핵 진단용 조성물.

[Fig. 1]



[Fig. 2]



1. Nil (negative control)
2. TB antigen
3. TB mitogen (positive control)

[Fig. 3]

Table 3. Table 3: TB Ag/No reaction vs. 500 ng positive vs. 100 ng negative

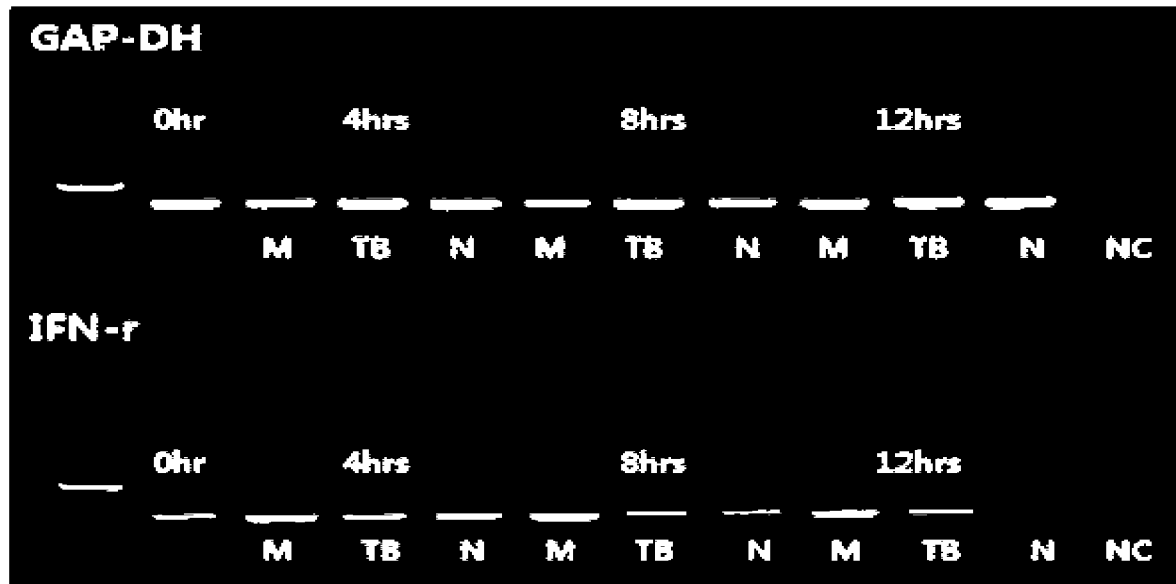
QuantIFERON (IFN- γ ELISA)					IFN- γ RT-PCR based Assay				
Sample	Mitogen	TB Ag	Nd	Result	Sample	Mitogen	TB Ag	Nd	Result
1	PPD	0.00	0.00	negative	1	PPD	0.00	1	negative
2	PPD	0.00	0.00	negative	2	PPD	0.00	1	positive
3	PPD	4.00	1.16	positive	3	PPD	1.00	1	positive
4	PPD	0.00	0.00	negative	4	PPD	0.00	1	negative
5	PPD	1.00	7.37	positive	5	PPD	10.00	1	positive
6	PPD	1.00	0.00	negative	6	PPD	0.00	1	positive
10	PPD	6.00	0.00	positive	10	PPD	1.00	1	positive
11	PPD	0.00	0.00	positive	11	PPD	1.00	1	positive

[Fig. 4]

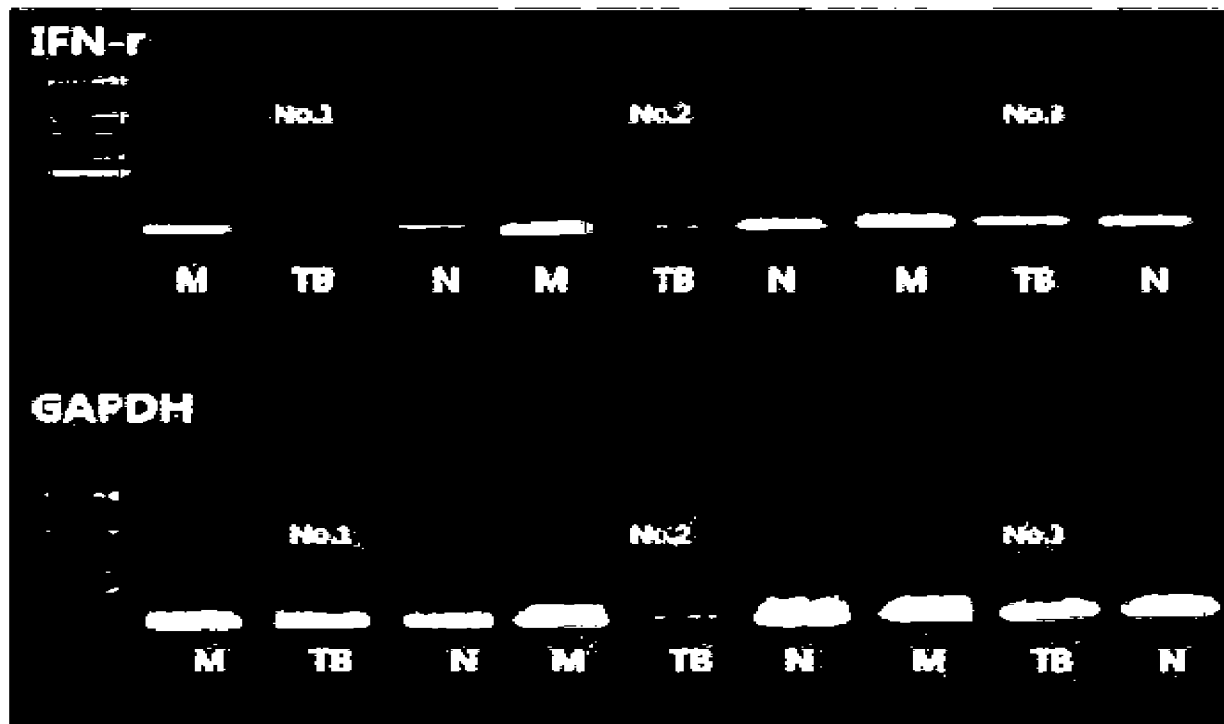
Table 4. Table 4: TB Ag/No reaction vs. 500 ng positive vs. 100 ng negative

QuantIFERON (IFN- γ ELISA)					IFN- γ RT-PCR based Assay				
Sample	Mitogen	TB Ag	Nd	Result	Sample	Mitogen	TB Ag	Nd	Result
1	PPD	0.00	0.00	indeterminate	1	PPD	0.00	1	positive
2	PPD	0.00	0.00	negative	2	PPD	0.00	1	negative
3	PPD	1.00	0.00	indeterminate	3	PPD	0.00	1	negative
10	PPD	0.00	0.00	negative	10	PPD	0.00	1	negative
11	PPD	0.00	0.00	negative	11	PPD	0.00	0	negative
12	PPD	0.00	0.00	negative	12	PPD	0.00	1	negative
13	PPD	0.00	0.00	negative	13	PPD	0.00	1	negative
14	PPD	1.00	0.00	negative	14	PPD	0.00	1	negative

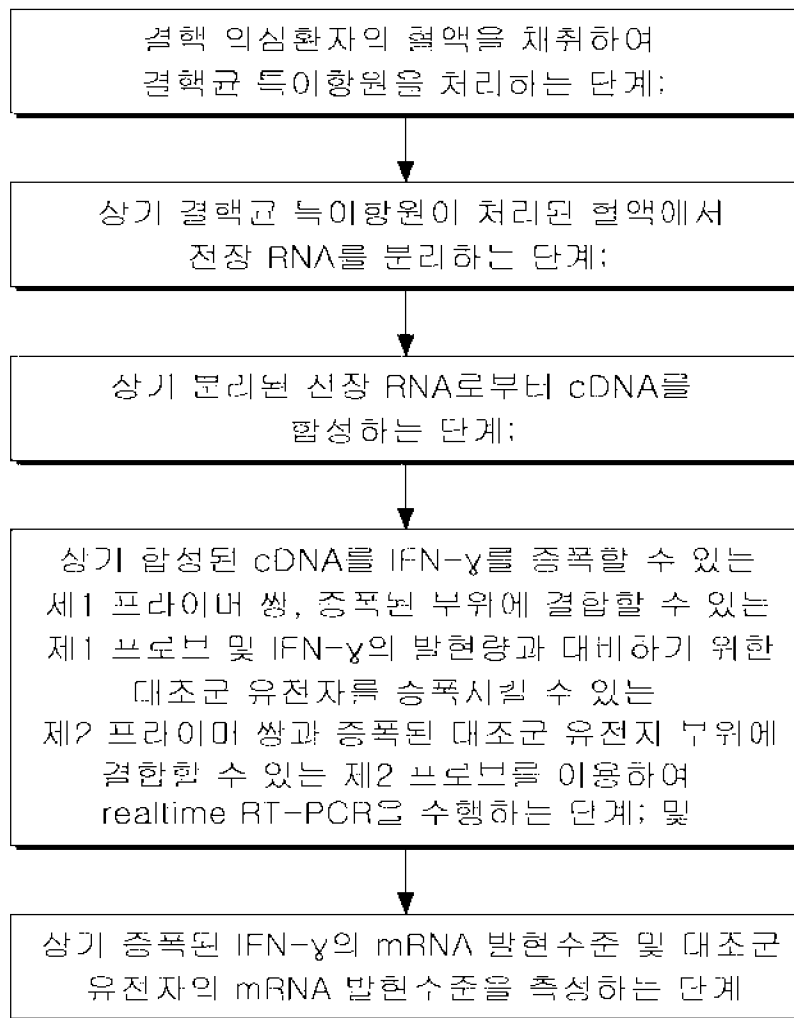
[Fig. 5]



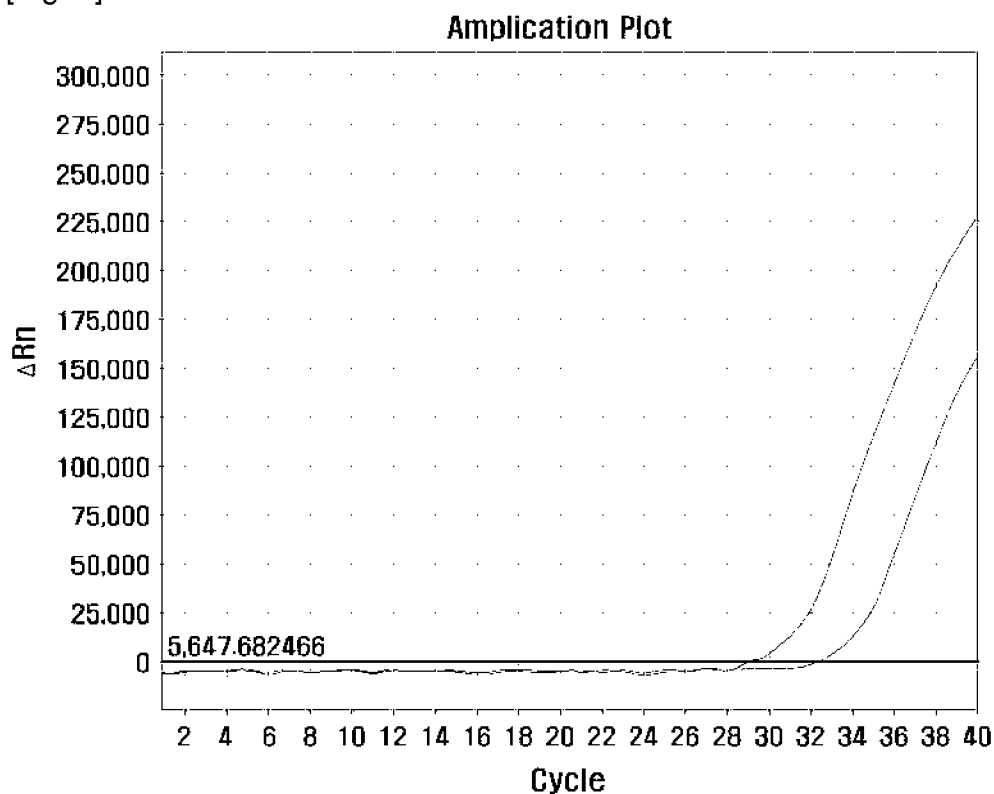
[Fig. 6]



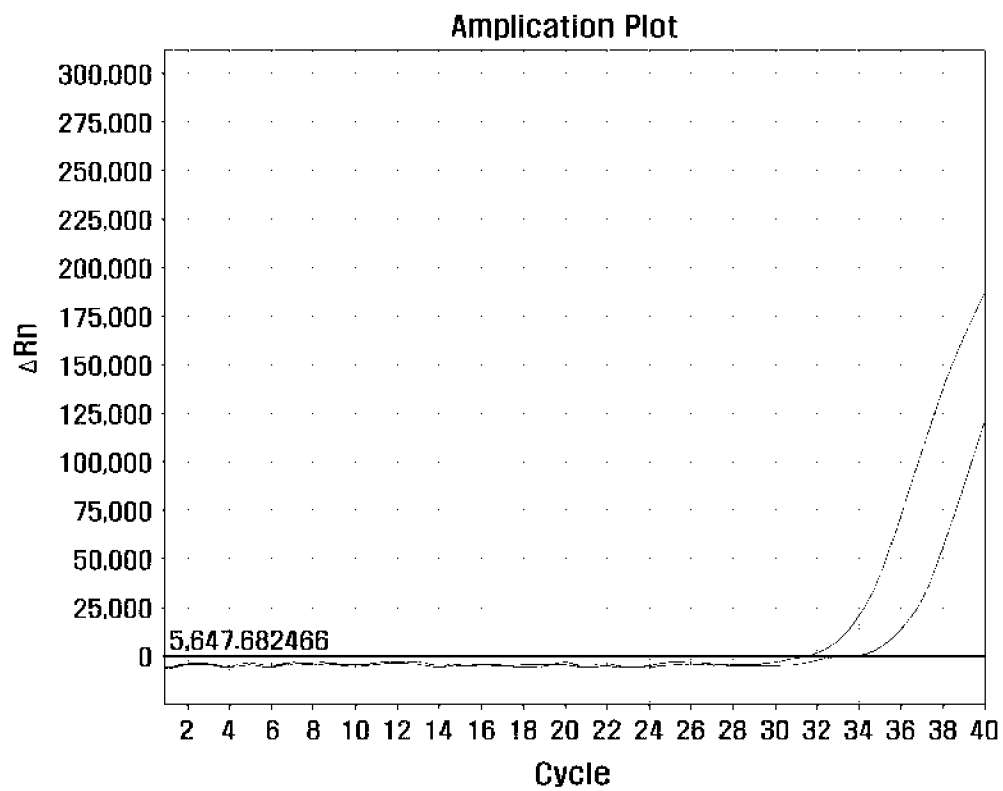
[Fig. 7]



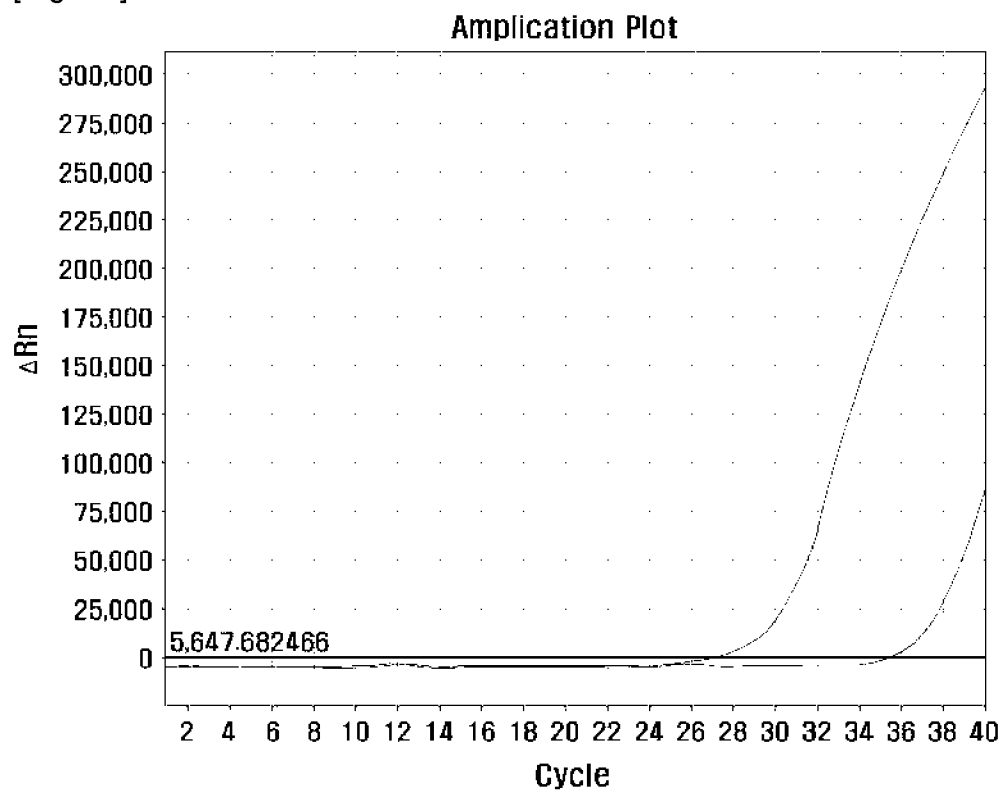
[Fig. 8]



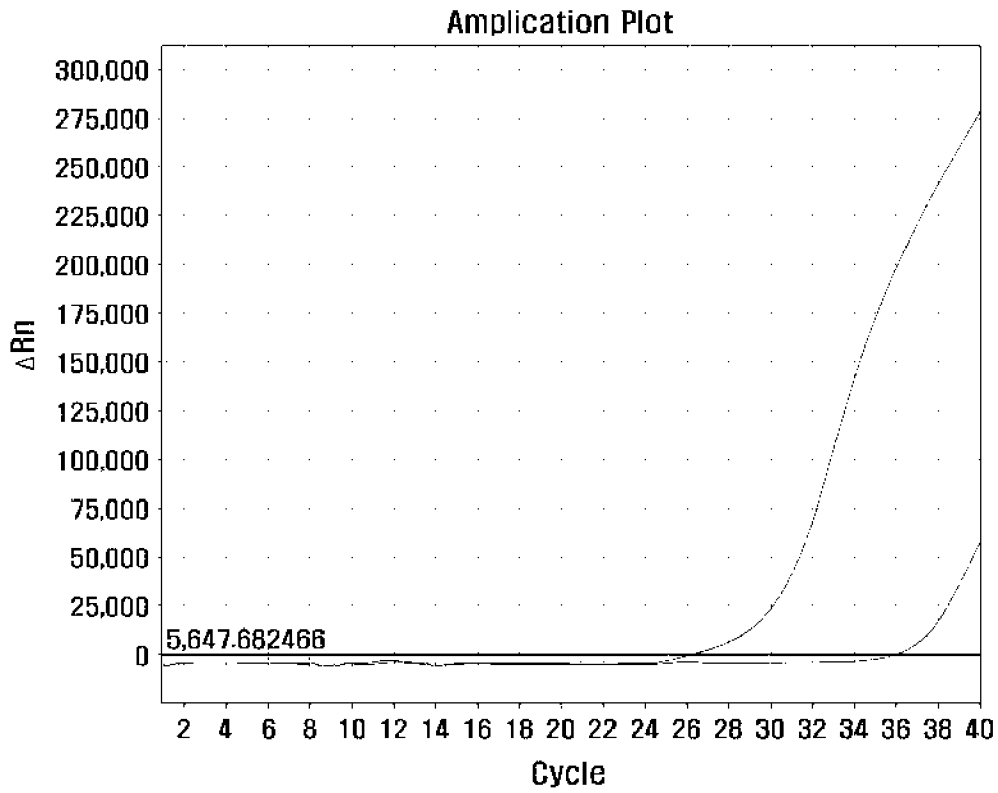
[Fig. 9]



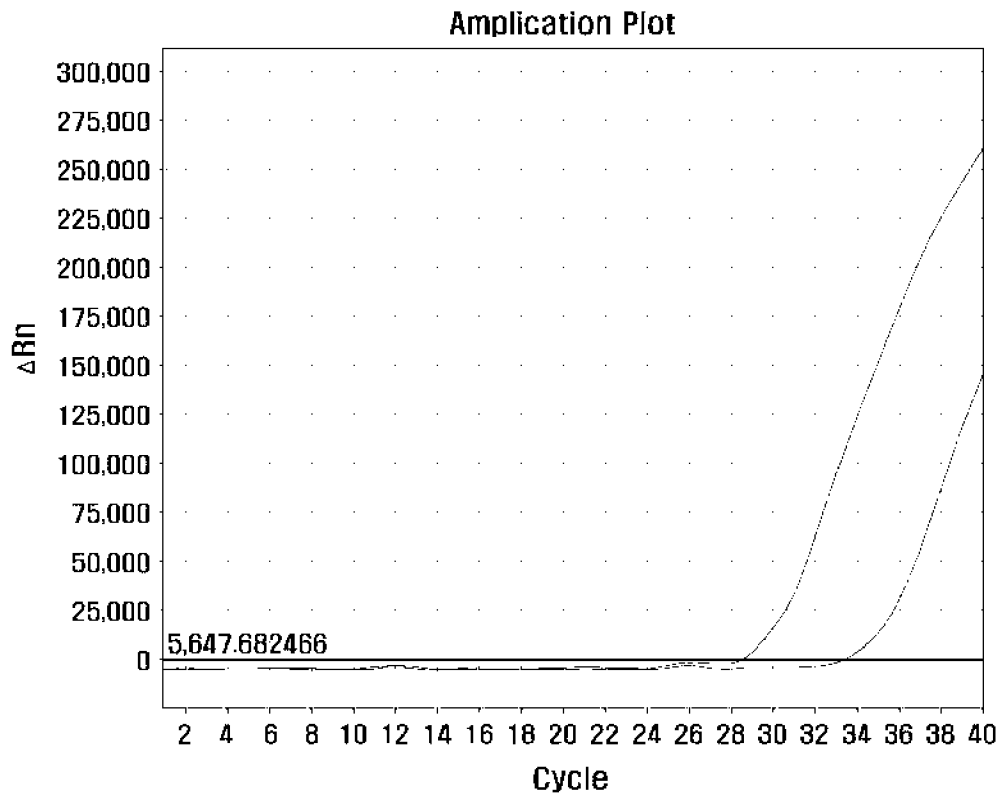
[Fig. 10]



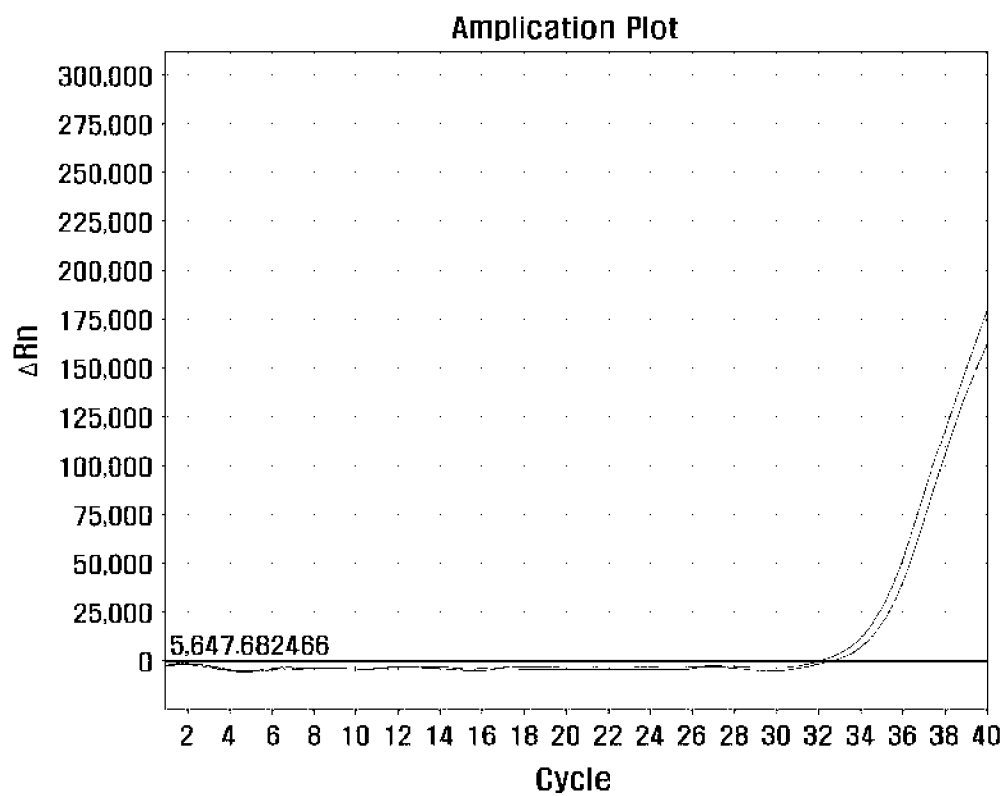
[Fig. 11]



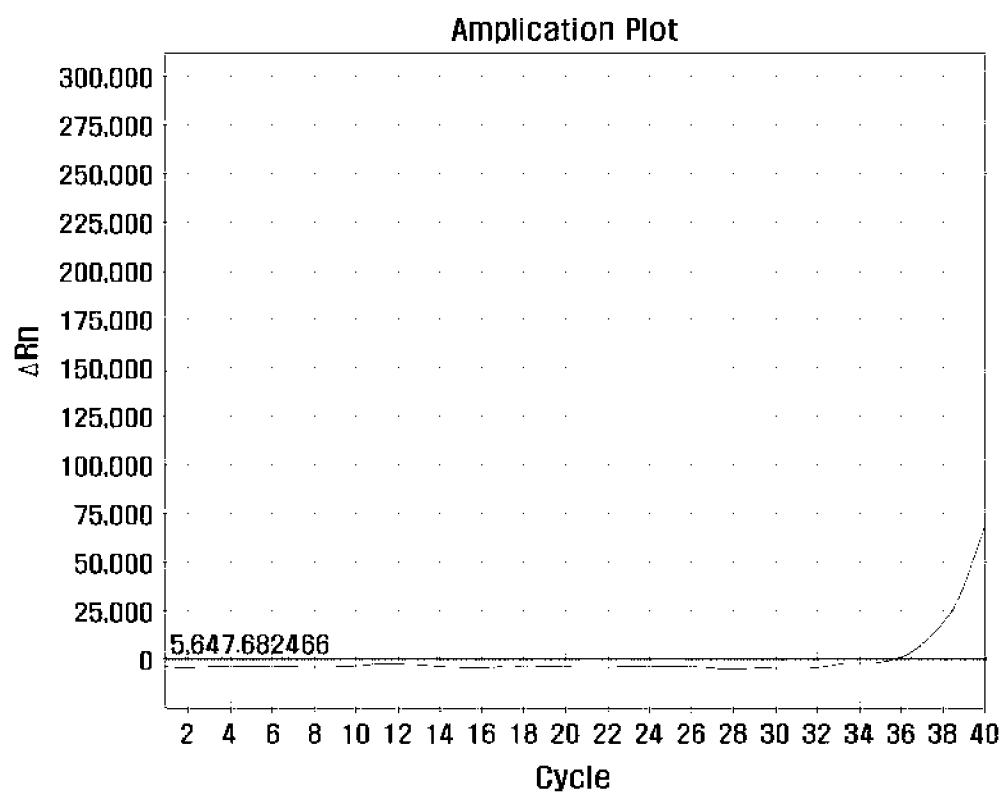
[Fig. 12]



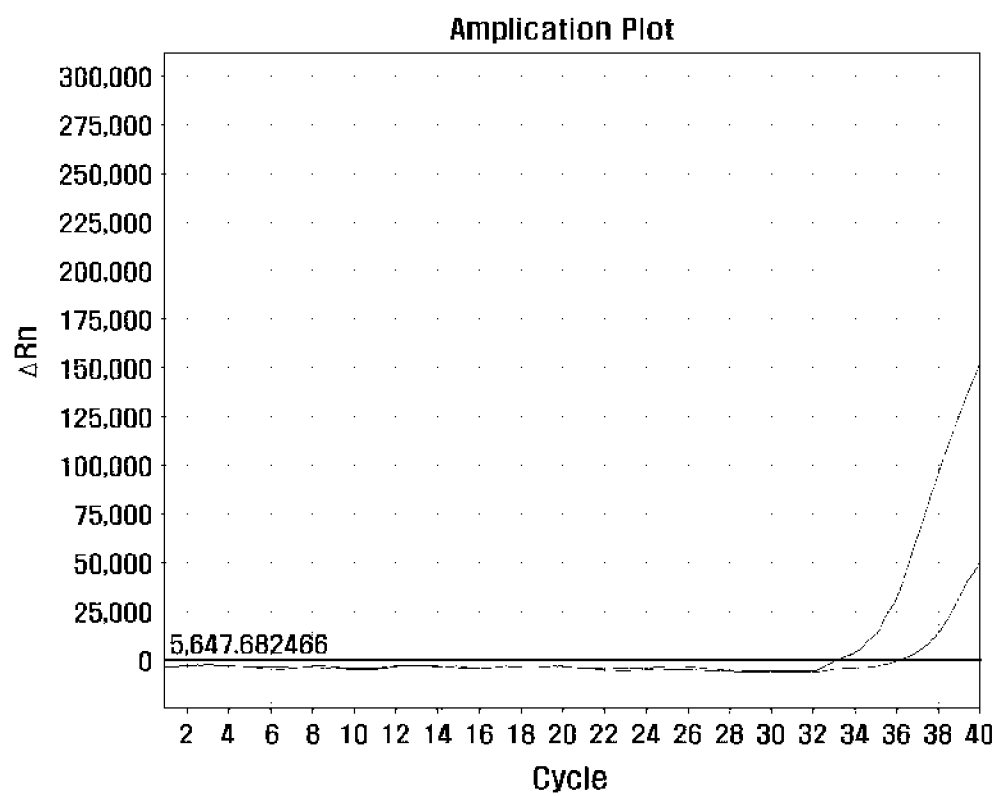
[Fig. 13]



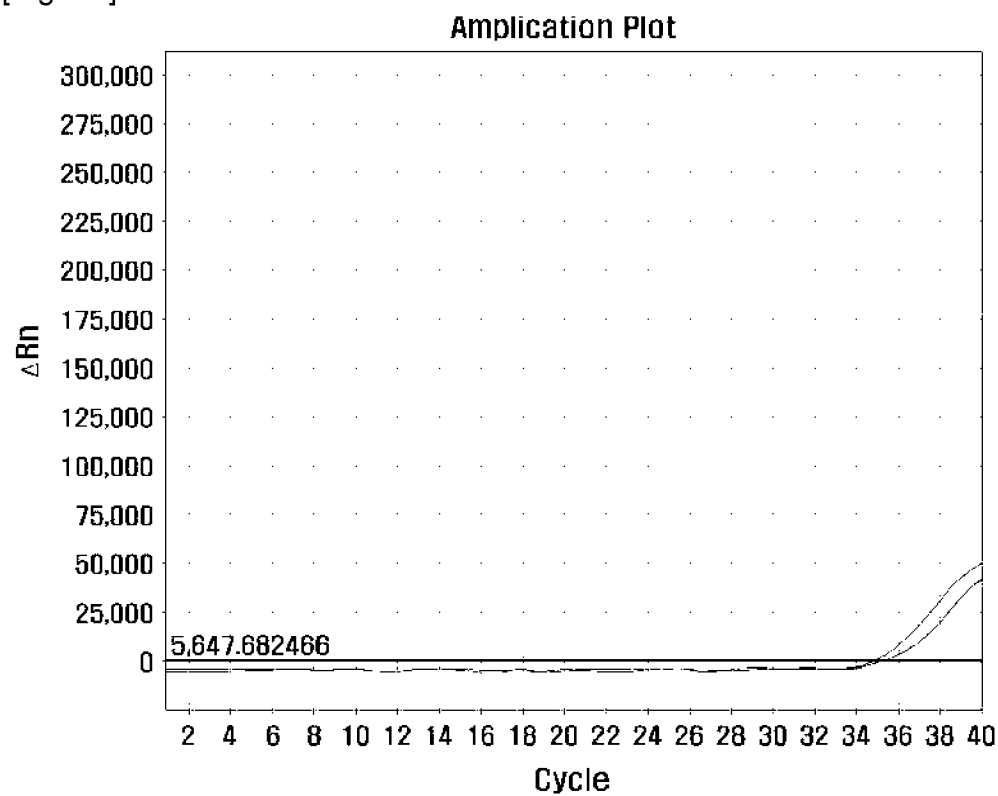
[Fig. 14]



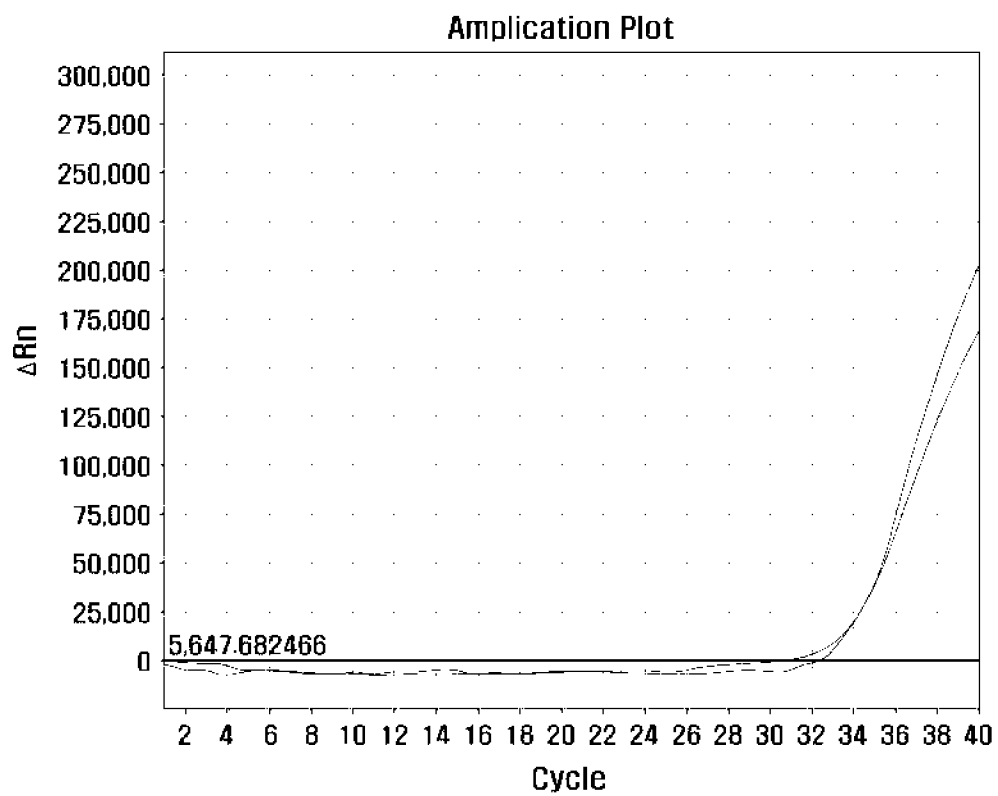
[Fig. 15]



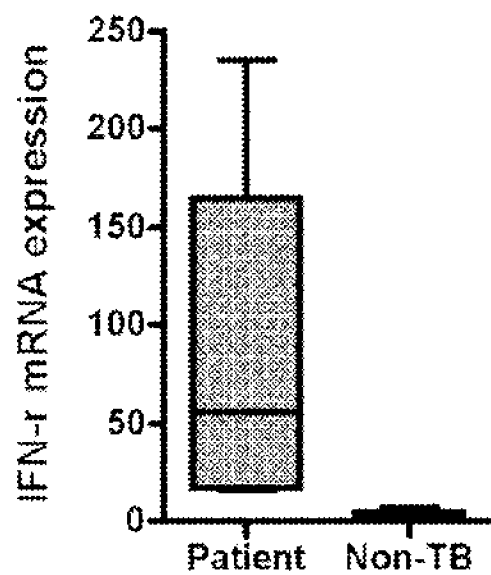
[Fig. 16]



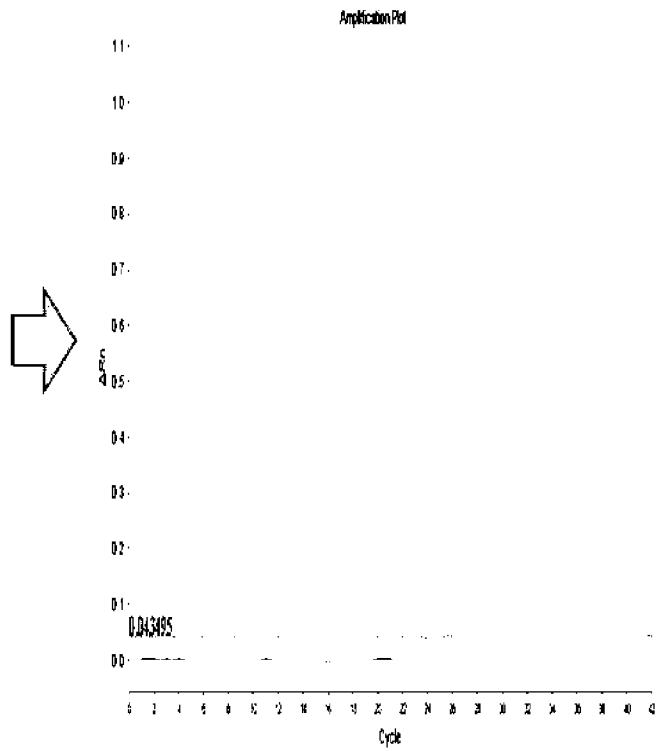
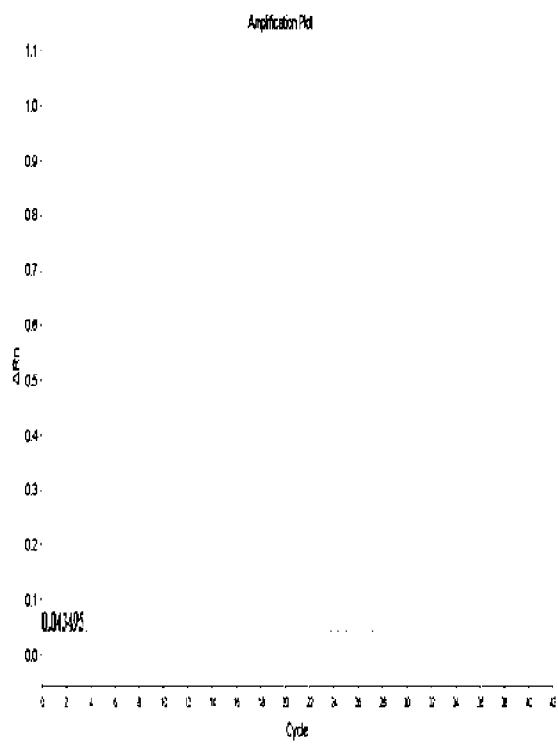
[Fig. 17]



[Fig. 18]



[Fig. 19]



[Fig. 20]

