



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0015276
(43) 공개일자 2020년02월12일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) G01N 33/569 (2017.01)
- (52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
G01N 33/56911 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-0090897
- (22) 출원일자 2018년08월03일
심사청구일자 2018년08월03일

- (71) 출원인
이진수
인천광역시 연수구 해송로 143, 113동 1002호 (송도동, 송도웰카운티1단지APT)
- (72) 발명자
이진수
인천광역시 연수구 해돋이로 107, 4동 2401 (송도동, 송도더샵퍼스트월드)
- (74) 대리인
이처영, 장제한

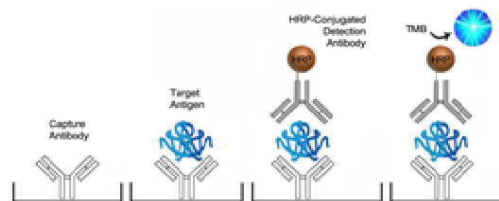
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **쯔쯔가무시균 유래 엑소솜을 이용한 쯔쯔가무시병의 진단방법**

(57) 요약

본 발명은 쯔쯔가무시균 유래 엑소솜 항원에 결합하는 항체를 포함하는 쯔쯔가무시병의 진단키트 및 상기 키트를 이용한 쯔쯔가무시병의 진단방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 쯔쯔가무시병의 진단방법은 항체 또는 유전자를 이용하지 않고 엑소솜 항원을 혈액에서 직접 측정하여 진단할 수 있으므로, 매우 간편하고 민감도 및 특이도가 우수하여 효과적으로 쯔쯔가무시병을 진단할 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류
G01N 2333/29 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

쯔쯔가무시균 (*Orientia Tsutsugamushi*) 유래 엑소솜 (exosome) 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 쯔쯔가무시병 (Scrub typhus) 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 엑소솜 항원은 쯔쯔가무시균의 TSA56 (56-kDa type-specific antigen), 47kDa 항원, ScaA 또는 샤페로닌 (chaperonin; 60kDa 항원)인 것을 특징으로 하는 쯔쯔가무시병 진단용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 TSA56은 서열번호 5의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 쯔쯔가무시병 진단용 조성물.

청구항 4

쯔쯔가무시균 (*Orientia Tsutsugamushi*) 유래 엑소솜 (exosome) 항원에 특이적으로 결합하고 기관 (substrate)에 부착되어 있는 포획항체 (capture antibody: c-Ab); 및

쯔쯔가무시균 유래 엑소솜 항원에 특이적으로 결합하고 표지물질이 접합된 검출항체 (detection antibody: d-Ab)를 포함하는 쯔쯔가무시병 (Scrub typhus) 진단용 키트.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 엑소솜 항원은 쯔쯔가무시균의 TSA56 (56-kDa type-specific antigen), 47kDa 항원, ScaA 또는 샤페로닌 (chaperonin; 60kDa 항원)인 것을 특징으로 하는 쯔쯔가무시병 진단용 키트.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 TSA56은 서열번호 5의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 쯔쯔가무시병 진단용 키트.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 표지물질은 HRP (horseradish peroxidase), 염기성 탈인산화효소 (alkaline phosphatase), 콜로이드 (colloid), 형광물질 (fluorescein), 방사성 동위원소 및 색소 (dye)로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 쯔쯔가무시병 진단용 키트.

청구항 8

제4항에 있어서, 효소면역분석법 (enzyme linked immunosorbent assay; ELISA), 방사능면역분석법 (radioimmunoassay; RIA), 샌드위치면역분석법 (sandwich ELISA), 면역형광분석법 (Immuno-fluorescence Assay,

IFA), 면역발광분석법 (Immunochemiluminescence Assay) 또는 면역조직화학염색법 (Immunohistochemical staining)을 통해 수행하는 것을 특징으로 하는 쯔쯔가무시병 진단용 키트.

청구항 9

다음 단계를 포함하는 쯔쯔가무시병 (Scrub typhus) 진단에 필요한 정보제공 방법:

- (a) 쯔쯔가무시균 (*Orientia Tsutsugamushi*) 유래 엑소좀 (exosome) 항원에 특이적으로 결합하는 포획항체 (capture antibody: c-Ab)에 대상체의 생물학적 시료를 접촉시켜 시료내 항원과 포획항체를 결합시키는 단계;
- (b) 상기 포획항체와 결합한 항원에 쯔쯔가무시균 유래 엑소좀 항원에 특이적으로 결합하고 표지물질이 결합된 검출항체 (detection antibody: d-Ab)를 접촉시켜 항원과 검출항체를 결합시키는 단계; 및
- (c) 상기 검출항체에 결합된 표지물질의 수준을 측정하여 대조군의 수준과 비교하는 단계.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 (c) 단계의 표지물질의 수준이 대조군에 비해 높은 경우 쯔쯔가무시병으로 판단하는 것을 특징으로 하는 쯔쯔가무시병 진단에 필요한 정보제공 방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 표지물질은 HRP (horseradish peroxidase), 염기성 탈인산화효소 (alkaline phosphatase), 콜로이드 (colloid), 형광물질 (fluorescein), 방사성 동위원소 및 색소 (dye)로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 쯔쯔가무시병 진단에 필요한 정보제공 방법.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 (c) 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 수행하는 것을 특징으로 하는 쯔쯔가무시병 진단에 필요한 정보제공 방법.

청구항 13

제9항에 있어서, 상기 포획항체는 기관 (substrate)에 부착되어 있는 것을 특징으로 하는 쯔쯔가무시병 진단에 필요한 정보제공 방법.

청구항 14

제9항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 포유동물로부터 취득된 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담 또는 소변인 것을 특징으로 하는 쯔쯔가무시병 진단에 필요한 정보제공 방법.

청구항 15

제9항에 있어서, 상기 엑소좀 항원은 쯔쯔가무시균의 TSA56 (56-kDa type-specific antigen), 47kDa 항원, ScaA 또는 샤페로닌 (chaperonin; 60kDa 항원)인 것을 특징으로 하는 쯔쯔가무시병 진단에 필요한 정보제공 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 TSA56은 서열번호 5의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 쯔쯔가무시병 진단에 필요한 정보제공 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 쯔쯔가무시균 (*O. tsutsugamushi*) 유래 엑소솜을 이용한 쯔쯔가무시병 (Scrub typhus)의 진단방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 쯔쯔가무시균 유래 엑소솜 항원에 결합하는 항체를 포함하는 쯔쯔가무시병의 진단키트 및 상기 키트를 이용한 쯔쯔가무시병의 진단방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 쯔쯔가무시병 (Scrub typhus)은 국내뿐 아니라 아시아 지역에 걸친 중요한 열성질환으로, *O. tsutsugamushi* 감염에 의한 발열성 질환이다. 환자 발생은 연중 보고되고 있지만 국내에서는 주로 가을철을 중심으로 환자가 발생하며, 급성, 만성 감염으로 폐렴, 뇌염, 발진, 발열 및 두통 등을 유발한다. 지역적으로 북쪽으로는 일본, 남쪽으로는 호주, 서쪽으로는 아라비아반도에 이르는 넓은 지역이 쯔쯔가무시병의 발생지역이며, 최근에는 인도, 중국, 러시아 지역으로 확대되어 환자 발생이 보고되고 있다. 최근 쯔쯔가무시병의 발생이 증가하고 있어 공중보건학적으로 중요성이 더욱 커지고 있다. 국내에서는 2004년 이후 환자 발생이 급격히 증가해 2006년 6,480명, 2010년 5,671명, 2012년 8,604명, 2013년 10,365명의 환자가 보고되었고, 인구 10만 명당 10.4~20.0명의 높은 발생률을 나타낸다 (질병관리본부 감염병포털 <http://www.cdc.go.kr/npt/>). 가을철 환자의 발생규모는 그해 여름의 기온, 습도와 관련이 있으며, 온난화로 쯔쯔가무시병 유행지역의 확산과 발생수가 증가할 것으로 예상된다. 또한, 보균 털진드기의 밀도변화, 친환경농법이나 저농약 사용, 생활습관 변화 등으로 인한 감염 노출기회 증가로 쯔쯔가무시병에 의한 질병부담이 더욱 커질 것으로 예상된다.

[0004] 쯔쯔가무시병은 항균제 치료를 하지 않으면 사망률이 60%에 이르고, 효과적인 항균제 치료로 사망률은 개선되었으나, 치료 시작이 늦거나 고령자에서는 쇼크, 호흡부전, 뇌염 등의 중증 합병증으로 인해 사망할 수도 있다. 치료 후에는 만성감염, 전신권태감, 근육통이 수개월간 지속되기도 한다 (Rajapakse S *et al.*, *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1;111(2):43-54, 2017).

[0005] 따라서, 쯔쯔가무시병을 조기에 정확히 진단하는 것이 중요하다. 쯔쯔가무시병 임상진단의 중요한 소견은 진드기에 물린 부위에 직경 5-10mm 가량의 가피가 형성되는 것이다. 하지만 가피의 보고율은 지역마다 차이가 크고, 강원지역에서는 46%, 충청도 이남에서는 80%로 가피 발생률을 보고하고 있다. 또한, 가피는 쯔쯔가무시병 이외의 다른 리케치아 질환에서도 발생하기에 질병특이적인 소견이 아니고, 쯔쯔가무시병 환자에서 특징적인 가피가 없는 경우도 50%에 달하므로, 발진이 동반되지 않거나 질병 초기인 경우 실험적 진단이 꼭 필요하다.

[0006] 기존의 대표적인 진단법들은 쯔쯔가무시균에 감염된 후 면역반응으로 생성된 항체를 혈액에서 측정하는 방법 (IFA, ELISA), 세균의 유전자를 혈액이나 기타 조직에서 증폭하여 확인하는 방법 (PCR) 또는 직접 세균을 배양하는 방법 등이 사용되고 있다.

[0007] 항체검사는 진단을 위해 추적 항체검사가 필요하고, 수동혈구 응집검사 (HA, hemagglutination test)는 민감도가 낮으며, 면역형광항체검사 시행에는 숙련된 검사 기술과 고가의 형광 현미경이 필요하다. 또한, 표준화된 검사로써 민감도의 문제가 제기되는데, 대만의 연구에서 특징적인 가피와 *O. tsutsugamushi* PCR 양성인 환자의 15%에서 IFA가 음성으로 나타났다 (Saisongkorn W *et al.*, *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98: 360-366). 항체가의 4배 이상 상승까지 확인하여도 최대 80% 정도에서만 확진이 가능하였다.

[0008] PCR 검사는 비용이 많이 소요되며 대상 검체와 적절한 PCR 표적 유전자 부위가 명확하지 않다는 문제가 있다. 혈액을 이용한 PCR은 리케치아혈증이 있는 경우에만 진단이 가능하다. PCR에 사용하는 프라이머에 따른 검사법의 민감도, 특이도 차이가 크며, 항체법과는 달리 항생제 투여에 민감도가 영향을 받는다. 항생제 투여 3일 이

내 혈액 PCR의 민감도는 60%이고, 4일 이후에는 10%까지 감소한다고 알려져 있다 (Kim DM *et al.* *Clin Microbiol Infect.* 16:447-51, 2010).

- [0009] 배양검사가 감염진단에 사용될 수 있으나, 혈액이나 조직의 배양을 위해서는 BSL-3의 안전시설을 갖춘 실험실 세포배양시스템을 갖추어야 하며, 경험 있는 실험자가 요구되고, 균을 확인하는 데는 한 달 이상이 소요되어 환자의 진료에 실제로 도움이 되기는 어려운 실정이다.
- [0010] 최근 쓰쓰가무시균 감염으로 인해 만성감염이 유발될 수 있다는 새로운 병인론이 밝혀졌으나 (Chung MH *et al.*, *J Korean Med Sci.* 27(3):231-5, 2012), 만성감염을 입증할 수 있는 진단법은 배양검사 등으로 매우 한정적이고 어렵다.
- [0011] 이렇게 기존 쓰쓰가무시병의 진단법은 어느 한가지 방법도 충분한 진단을 제공하지 못하고 있고 여러가지 제한점이 있기 때문에 새로운 진단법이 필요하다.
- [0012] 이에, 본 발명자들은 기존 진단법의 제한점을 극복할 수 있는 간편하고 민감도가 우수한 쓰쓰가무시병의 진단방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, *O. tsutsugamushi* 균이 분비하는 엑소좀 (exosome) 즉, 외막소포 (outer membrane vesicle)의 항원을 포유동물 유래 시료에서 측정하여 쓰쓰가무시병을 진단할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0014] 본 발명의 목적은 쓰쓰가무시병을 혈액을 이용하여 보다 간편하고 정확하게 진단할 수 있는 쓰쓰가무시균 (*Orientia Tsutsugamushi*) 유래 엑소좀 (exosome) 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 쓰쓰가무시병 (Scrub typhus) 진단용 조성물, 진단용 키트 및 상기 키트를 이용한 쓰쓰가무시병 진단에 필요한 정보제공 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0016] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 쓰쓰가무시균 (*Orientia Tsutsugamushi*) 유래 엑소좀 (exosome) 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 쓰쓰가무시병 (Scrub typhus) 진단용 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명은 또한, 쓰쓰가무시균 유래 엑소좀 항원에 특이적으로 결합하고 기관 (substrate)에 부착되어 있는 포획항체 (capture antibody: c-Ab); 및 쓰쓰가무시균 유래 엑소좀 항원에 특이적으로 결합하고 표지물질이 접합된 검출항체 (detection antibody: d-Ab)를 포함하는 쓰쓰가무시병 진단용 키트를 제공한다.
- [0018] 본 발명은 또한, (a) 쓰쓰가무시균 유래 엑소좀 항원에 특이적으로 결합하는 포획항체에 대상체의 생물학적 시료를 접촉시켜 시료내 항원과 포획항체를 결합시키는 단계; (b) 상기 포획항체와 결합한 항원에 쓰쓰가무시균 유래 엑소좀 항원에 특이적으로 결합하고 표지물질이 접합된 검출항체를 접촉시켜 항원과 검출항체를 결합시키는 단계; 및 (c) 상기 검출항체에 접합된 표지물질의 수준을 측정하여 대조군의 수준과 비교하는 단계를 포함하는 쓰쓰가무시병 진단에 필요한 정보제공 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명에 따른 쓰쓰가무시병의 진단방법은 항체 또는 유전자를 이용하지 않고 엑소좀 항원을 혈액에서 직접 측정하여 진단할 수 있으므로, 매우 간편하고 민감도 및 특이도가 우수하여 효과적으로 쓰쓰가무시병을 진단할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 엑소좀 농도에 따른 ELISA (OT-Exo ELISA; *O. tsutsugamushi* derived exosome ELISA)의 OD 값을 나타낸

것이다.

도 2는 ELISA OD 값이 엑소좀 농도 증가에 따라 유의한 선형 증가의 상관관계를 나타냄을 보여주는 것이다.

도 3은 IFA와 OT-Exo ELISA 검사법의 ROC 분석 그래프를 나타낸 것이다.

도 4는 샌드위치 ELISA에 대한 모식도를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0025] 상술한 바와 같이, 쯔쯔가무시병의 특징적인 소견이 없는 경우에는 렙토스피라증, 발진열 및 신증후출혈열 등의 급성열성질환과의 감별 진단이 어려우며, 적절한 치료가 지연되거나 초기에 치료받지 못한 경우, 환자는 폐렴, 수막염, 신부전 및 다중기관 부전(multi-organ failure) 및 사망에 이르게 되고, 감염자 중의 일부는 만성감염을 앓게 되어 합병증을 유발하기에 쯔쯔가무시병을 효과적으로 진단할 수 있는 방법의 개발이 요구되고 있다.
- [0026] 본 발명에서는 쯔쯔가무시균 (*Orientia Tsutsugamushi*)에 감염된 환자의 시료, 바람직하게는 혈액을 채취하여, 쯔쯔가무시균이 분비하는 엑소좀의 항원을 측정함으로써 쯔쯔가무시병을 진단하였다. 쯔쯔가무시균이 분비하는 엑소좀의 항원을 측정하기 위해 쯔쯔가무시의 엑소좀 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 ELISA를 수행하였다. 이는 종래의 쯔쯔가무시병을 진단하는 간접면역형광법(IFA) 및 유전형 분석을 위한 PCR 분석과 비교하여 진단의 정확도가 현저하게 향상되어, 종래의 진단방법을 완전히 대체할 수 있을 뿐만 아니라 진단 결과에 대한 신뢰도를 현저히 향상시킨다.
- [0027] 따라서, 본 발명은 일관점에서 쯔쯔가무시균 (*Orientia tsutsugamushi*) 유래 엑소좀 (exosome) 항원에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 쯔쯔가무시병 (Scrub typhus) 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 상기 엑소좀 항원은 쯔쯔가무시균의 TSA56 (56-kDa type-specific antigen), 47kDa 항원, ScaA 또는 샤페로닌 (chaperonin; 60kDa 항원)인 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 TSA56 (56-kDa type-specific antigen)인 것이며, 상기 TSA56 항원은 OMV (outer membrane vesicle)에 포함되어 있는 다양한 항원 중 하나로, 가장 바람직하게는 상기 TSA56는 서열번호 5의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0029] 47-kDa 단백질은 *O. tsutsugamushi*의 외막 (outer membrane)에 위치한 중요한 표면 항원이다. 균의 균 특이적인 특징을 지니며 B 림프구 세포의 에피토프를 활성화 시킨다 (Choi *et al.*, *Am J Trop Med Hyg*, 7(1):30-37, 2017).
- [0030] Sca 단백질은 오토트랜스포터 단백질 (autotransporter proteins)로 세균이 세포에 부착하는데 관여하며, 숙주에 면역을 유발한다 (Ha *et al.*, *Clin Vaccine Immunol*. 19(9):1442-51, 2012).
- [0031] 60 kDa chaperonin 단백질은 groEL 유전자에서 발현하며 세균의 스트레스 상황에서 분비되어 균의 형태가 잘 유지되도록 유도하는 역할을 한다 (D H Paris *et al.*, *Clin Microbiol Infect*. 15(5): 488-495, 2009).
- [0032] 본 발명의 용어 엑소좀 (exosome)은 OMV (outer membrane vesicle)을 포함하거나 동일한 것으로 이해될 수 있다.
- [0033] 상기 엑소좀은 평균 직경이 20 내지 200nm인 것일 수 있다. 또한, 상기 쯔쯔가무시균 엑소좀은 쯔쯔가무시균의 주요 항원을 포함하고 있다.
- [0034] 세균은 성장하면서 세포 외피 (outer membrane)로부터 20~250nm 직경의 작은 물방울과 같은 소포체를 분비한다. 세균이 분비한 소포체를 엑소좀 (exosome) 또는 외막에서 유래하였다는 의미로 외막소포체 (outer membrane vesicle, OMV)라고 명한다. *Escherichia coli*, *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus* 등 여러 균주에서 외막소포체를 만드는 것이 확인되었다. 세균이 만드는 엑소좀은 물질 수송과 세균간의 상호작용, 세균의 생존이나 병인 등의 여러 역할에 관여한다. 엑소좀은 세균의 외피가 주머니처럼 들출되면서 만들어지므로 외막에 위치한 외막단백질, 지질다당질 (LPS), 인산화지질, 원형질막물질 (periplasma contents) 등을 포함하게 된다. 즉, 엑소좀은 세균의 세포막에서 유래하기 때문에 엑소좀의 막에는 세균의 다양하고 중요한 항원 물질 등을

함유하고 있다.

- [0035] 최근 *O. tsutsugamushi* 균도 엑소솜을 생성하고 분비하는 것이 밝혀졌고, *O. tsutsugamushi*의 엑소솜에도 마찬가지로 세균의 고유한 여러 항원을 함유하고 있다. (Lee et al., *J Korean Med Sci.* 30(7):866-70, 2015).
- [0036] 본 발명에서 항체는 전체 형태의 항체(이하 "전항체"라고 함) 또는 그의 기능적인 단편일 수 있다. 상기 전항체는 단량체 또는 2 이상의 전항체가 결합되어 있는 다량체의 형태일 수 있다. 상기 항체의 기능적인 단편은 전항체의 중쇄 및 경쇄 가변영역을 갖는 항체로서, 실질적으로 전항체가 인식하는 것과 동일한 항원결합부위(epitope)를 인식하는 것을 의미한다. 상기 항체의 기능적인 단편에는 단일쇄 가변영역 단편(scFv), (scFv)₂, Fab, Fab' 및 F(ab')₂ 등이 포함되나, 이에 한정되지 않는다. 상기 단일쇄 가변영역(scFv)은 중쇄 가변영역과 경쇄 가변영역이 링커 펩타이드를 통해 연결되어 단일쇄 폴리펩티드 형태를 취하는 항체 단편을 의미한다.
- [0037] 상기 항체는 효소, 형광 물질, 방사선 물질 및 단백질 등과 같은 다양한 분자와 결합하여 변형될 수 있다. 변형된 항체는 화학적으로 항체를 변형하여 획득할 수 있다. 이러한 변형 방법은 당업계에서 통상적으로 사용된다. 또한, 상기 항체는 비인간 항체로부터 유래한 변형 부위(variable region)와 인간 항체로부터 유래한 불변 부위(constant region)가 결합된 키메라 항체(chimeric antibody)로 획득되거나, 또는 인간이 아닌 항체로부터 유도된 상보성 결정 부위를 포함하여 인간 항체로부터 유도된 구조 부위(frame work region, FR)와 불변부위가 결합된 인간화 항체(humanized antibody)로 획득될 수 있다. 이러한 항체는 당업계에 알려져 있는 방법을 이용하여 제조될 수 있다.
- [0038] 본 발명의 상기 쯔쯔가무시균은 학명 *O. tsutsugamushi*로 기재되는 균일 수 있으며, 바람직하게는 쯔쯔가무시균 보령 항원형(NCCP NO. 14794)일 수 있다.
- [0040] 본 발명은 다른 관점에서, 쯔쯔가무시균 (*Orientia Tsutsugamushi*) 유래 엑소솜 (exosome) 항원에 특이적으로 결합하고 기관 (substrate)에 부착되어 있는 포획항체 (capture antibody: c-Ab); 및 쯔쯔가무시균 유래 엑소솜 항원에 특이적으로 결합하고 표지물질이 결합된 검출항체 (detection antibody: d-Ab)를 포함하는 쯔쯔가무시병 (Scrub typhus) 진단용 키트에 관한 것이다.
- [0041] 본원에서 사용된 용어 "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체 즉 검사 대상자가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것을 의미한다.
- [0042] 본 발명에 있어서, 상기 엑소솜 항원은 쯔쯔가무시균의 TSA56 (56-kDa type-specific antigen), 47kDa 항원, ScaA 또는 샤페로닌 (chaperonin; 60kDa 항원)인 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 TSA56 (56-kDa type-specific antigen)인 것이며, 상기 TSA56 항원은 OMV (outer membrane vesicle)에 포함되어 있는 다양한 항원 중 하나로, 가장 바람직하게는 상기 TSA56는 서열번호 5의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0043] 상기 포획항체와 검출항체는 검출 대상 항원에 특이적으로 결합하도록 만들어진 모노클로날항체 또는 폴리클로날항체일 수 있다. 상기 포획항체와 검출항체는 동일한 항원에 결합하지만 항원의 서로 다른 부위에 결합하도록 제작하여, 포획항체와 검출항체가 항원에 결합하여 포획항체-항원-검출항체 접합체를 형성할 수 있도록 하는 것이 좋다.
- [0044] 본 발명의 포획항체는 폴리클로날 항체로 쯔쯔가무시균 엑소솜의 여러 epitope에 결합할 수 있으며, 검출항체는 모노클로날 항체로 쯔쯔가무시균 엑소솜의 TSA56 (56-kDa type-specific antigen)에 결합하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 용어 "검출"이란, 정량 및/또는 정성 분석을 포함하는 것으로, 존재, 부존재의 검출 및 발현량 검출을 포함하는 것으로 이러한 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 당업자라면 본원의 실시를 위해 적절한 방법을 선택할 수 있을 것이다.
- [0046] 상기 기관은 고체(solid) 기반의 면역분석 방법에 통상적으로 사용되는 것은 모든 고체 기관일 수 있으며, 기존의 ELISA 방법에서 널리 사용되어지는 마이크로티터 (microtiter) 플레이트 (plate)의 웰 (well)을 사용할 수 있고, 예컨대, 모양에 따라 플랫 바텀 플레이트(Flat bottom plate), U자형 바텀 플레이트(U bottom plate); 리간드 혹은 단백질의 코팅 유무에 따라 아비딘 코팅 플레이트(avidin-coated plate), 스트렙타비딘 코팅 플레이트(streptavidin-coated plate), 글루타치온 코팅 플레이트(glutathione coated plate), 항-GST 코팅 플레이트(anti-GST coated plate); 기관 재질에 따라 폴리스티렌 플레이트(polystyrene plate), 폴리프로필렌 플레이트

트(polypropylene plate) 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 포획항체를 기판에 고정시키는 방법은 특별한 제한은 없으며 면역분석 방법에 통상적으로 사용되는 모든 방법이 가능하며, 예컨대, 본 발명의 일 구체예에서는 기판에 포획항체를 코팅하는 방법으로 고정시킬 수 있다.

- [0047] 이와 같이, 항원-항체 결합쌍의 한쪽을 고체상에 고정화하여 진행되는 방법은 체액 등의 액체 시료를 이용하는 진단에 적용시 특히 효과적일 수 있다. 항체를 고체 기판에 붙여놓고 체액 내의 항원을 검출할 시에는 항체와 항원이 결합하게 한 후 나머지 붙지 않은 체액 및 체액 내 분석에 방해되는 물질들을 세척에 의해 모두 제거한 이후에 신호를 얻기 때문에, false-positive 신호가 나올 위험이 현저히 감소하게 되는 이점이 있다.
- [0048] 본 명세서에서 '항원 검출'은 항원 존재 판단뿐 아니라 항원의 정량적 분석도 포함하는 의미로 사용된다.
- [0049] 본 발명에 있어서, 상기 키트는 다양한 검출방법을 사용하여 시료 중의 쯔쯔가무시균 유래 엑소좀을 분석할 수 있다. 본원의 키트와 사용될 수 있는 정성적/정량적 분석 방법에는 예를 들면 항원- 항체 반응을 기본으로 하는 효소면역분석법 (enzyme linked immunosorbent assay; ELISA), 방사능면역분석법 (radioimmunoassay; RIA), 샌드위치면역분석법 (sandwich ELISA), 면역형광분석법 (Immuno-fluorescence Assay, IFA), 면역발광분석법 (Immunochemiluminescence Assay) 또는 면역조직화학염색법 (Immunohistochemical staining)이 사용될 수 있다.
- [0050] 이러한 방법은 공지된 것으로 예를 들면 Enzyme Immunoassay, E. T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1980; Gaastra, W., Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), in Methods in Molecular Biology, Vol. 1, Walker, J.M. ed., Humana Press, NJ, 1984; mass spectroscopy: Petricoin et al. 2002. Lancet 359: 572-77; eTag systems: Chan-Hui et al. 2004. Clinical Immunology 111:162-174; microparticle-enhanced nephelometric immunoassay: Montagne et al. 1992. Eur J Clin Chem Clin Biochem. 30:217-22 등을 참조할 수 있다.
- [0051] 본 발명에서는 샌드위치면역분석법 (sandwich ELISA)를 사용하는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 *O. tsutsugamushi* 유래의 엑소좀에 대한 ELISA인 OT-Exo ELISA (*O. tsutsugamushi* derived exosome ELISA)를 사용하는 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0052] 상기 키트는 쯔쯔가무시균 유래 엑소좀 항원에 특이적으로 결합하는 항체 이외에도 효소면역측정법에 사용되는 당업계에 공지된 시약을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들면, 이러한 시약으로는 음성대조혈청, 양성대조혈청, 세척액, 효소활성을 측정할 수 있는 기질액 및 반응 정지액을 포함할 수 있다. 특히, 항체에 접합된 표지물질과 반응할 발색 기질 용액, 세척용액 및 효소반응 정지용액 등을 포함할 수 있다.
- [0053] 상기 항체 접합체의 표지물질은 발색반응을 하는 통상의 발색제가 바람직하며, HRP (horseradish peroxidase), 염기성 탈인산화효소 (alkaline phosphatase), 콜로이드 (colloid), 형광물질 (fluorescein), 방사성 동위원소 및 색소 (dye)로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0054] 상기 발색 기질 용액은 표지물질에 따라 사용하는 것이 바람직하며, TMB (3,3',5,5'-tetramethyl bezidine), ABTS[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)], OPD(o-phenylenediamine) 등을 사용할 수 있다. 이때, 발색 기질은 완충용액(0.1M NaOAc, pH 5.5)에 용해된 상태로 제공되는 것이 더욱 바람직하다.
- [0056] 본 발명에서는 쯔쯔가무시병 환자 및 정상인으로부터 시료, 바람직하게는 혈액을 채취하여 엑소좀 농도를 확인한 결과, 쯔쯔가무시병 환자의 혈액에서 엑소좀의 농도가 통계적으로 현저하게 증가해 있음을 최초로 확인하고, 이러한 사실에 착안하여 혈중 쯔쯔가무시 유래 엑소좀 (OMV)을 측정함으로써 쯔쯔가무시병을 진단하는, 일종의 생체의 분석방법을 제공한다.
- [0057] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) 쯔쯔가무시균 (*Orientia Tsutsugamushi*) 유래 엑소좀 (exosome) 항원에 특이적으로 결합하는 포획항체 (capture antibody: c-Ab)에 대상체의 생물학적 시료를 접촉시켜 시료내 항원과 포획항체를 결합시키는 단계; (b) 상기 포획항체와 결합한 항원에 쯔쯔가무시균 유래 엑소좀 항원에 특이적으로 결합하고 표지물질이 접합된 검출항체 (detection antibody: d-Ab)를 접촉시켜 항원과 검출항체를 결합시키는 단계; 및 (c) 상기 검출항체에 접합된 표지물질의 수준을 측정하여 대조군의 수준과 비교하는 단계를 포함하는 쯔쯔가무시병 (Scrub typhus) 진단에 필요한 정보제공 방법에 관한 것이다.
- [0058] 본 발명에 있어서, 상기 (c) 단계의 표지물질의 수준이 대조군에 비해 높은 경우 쯔쯔가무시병으로 판단하는 것을 특징으로 할 수 있다.

- [0059] 본 발명에 있어서, 상기 포획항체는 기관 (substrate)에 부착되어 있는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0060] 본 발명의 일 실시예에서는, 일반적으로 찌뜨가무시병 진단을 위한 절대적 표준도구(gold standard tool)인 것으로 알려진 간접면역형광법(Indirect Immunofluorescence Assay; IFA) 및 PCR 측정법을 찌뜨가무시 엑소좀 측정을 이용한 진단 방법을 비교하기 위해 찌뜨가무시균 감염에 대한 전형적인 임상특징을 보이는 환자와 비감염인을 대상으로 분석을 수행하였다.
- [0061] 그 결과, 찌뜨가무시병환자를 대상으로 분석하였을 때, IFA 검사로 진단했던 환자 9명에서 OT-Exo ELISA는 100% 양성으로 일치하였으며, 또한, PCR에서 양성이고 IFA 음성 환자 14명은 OT-Exo ELISA 57.1%가 양성으로 나타났으며, OT-Exo ELISA 양성 환자 19명은 PCR 양성 42.1%, 및 IFA 양성 47.3%였다. 기존 진단법은 모두 음성이고 임상상만으로 진단된 환자 2명은 OT-Exo ELISA에서 양성으로 진단할 수 있었다. 즉, 25명 찌뜨가무시병 환자에 대한 검사방법의 비교에서 OT-Exo ELISA 방법이 가장 우수하였으며, 특히 현재 진단의 gold standard인 IFA 검사보다 월등히 우수한 성적을 나타냈으며, 최근 도입된 PCR 검사보다도 진단 성능이 우수하였다. 기존 IFA 검사법의 민감도는 36.0%, 특이도는 85.7%, 양성예측도는 81.8%, 음성예측도는 42.9%으로 나타났으나, OT-Exo ELISA검사법의 민감도는 76.0%, 특이도는 100%, 양성예측도는 100.0%, 음성 예측도는 70.0%으로 나타났다. OT-Exo ELISA검사법은 기존 IFA검사보다 민감도, 특이도에서 모두 우수함을 알 수 있었다.
- [0062] 본원에서 "생물학적 시료"란 바이오마커 검출이 가능한 하나 이상의 성분을 포함하는 물질 또는 물질의 혼합물을 일컫는 것으로 생물체, 특히 인간 유래의 세포, 조직 또는 체액, 예를 들면 전혈, 뇨, 혈장, 혈청, 타액, 객담 및 소변을 포함하나 이로 제한하는 것은 아니다. 또한 생물체에서 직접적으로 유래된 것은 물론 인비트로에서 배양된 세포 또는 조직을 포함한다. 본원에 따른 찌뜨가무시 유래 엑소좀의 검출을 위해 다양한 시료가 사용될 수 있으나, 이로 제한하는 것은 아니다. 상기 시료는 사용하기 전에 여과, 증류, 추출, 농축, 방해 성분의 불활성화, 시약의 첨가 등으로 전처리할 수 있다.
- [0063] 본원에 따른 한 구현예에서는 혈액 시료가 사용된다. 본원에서 사용되는 혈액 시료는 환자 및 정상인을 포함하는 대상체의 혈액으로부터 얻은 유사한 세포의 집합체를 의미한다. 혈액 시료의 공급원은 신선한, 동결된 및/또는 보존된 혈액 또는 임의의 혈액 구성분일 수 있으며, 혈액, 혈장 또는 혈청을 포함한다.
- [0064] 본원에서 사용된 용어, "대상체"는 포유류, 예를 들면 인간, 소, 개, 기니아 피그, 토끼 등을 포함하여 치료가 요구되는 임의의 단일 개체를 의미한다. 또한, 임의의 질병 임상 소견을 보이지 않는 임상 연구 시험에 참여한 참여한 임의의 대상 또는 역학 연구에 참여한 대상 또는 대조군으로 사용된 대상이 대상에 포함된다.
- [0065] 상기 "비감염인" 또는 "정상인"이라 함은 의료기관에서 찌뜨가무시병의 진단을 받은 기왕력이 없으며, 찌뜨가무시병을 의심할 만한 가피나 발진을 동반한 발열 질환을 앓았던 병력이 없는 정상 건강 성인을 의미한다.
- [0066] 이러한 본원에 따른 방법은 단독으로 또는 공지된 방법과 함께 사용될 수 있다. 예를 들면 상기와 같은 진단, 모니터링 또는 예후에 관한 정보를 제공하기 위해, 혈액 시료 분석 결과에 추가하여, 환자의 혈액 시료 이외의 임상정보를 추가로 사용할 수 있다.
- [0067] 본 발명에 있어서, 상기 측정은 당업계에 알려진 사이토카인 농도 측정법을 제한 없이 사용할 수 있으나, 바람직하게는 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 수행하여 측정할 수 있다.
- [0068] 본 발명에서는 샌드위치면역분석법 (sandwich ELISA)를 사용하는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 *O. tsutsugamushi* 유래의 엑소좀에 대한 ELISA인 OT-Exo ELISA (*O. tsutsugamushi* derived exosome ELISA)를 사용하는 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0069] 상기 ELISA는 효소를 표식자로 하여 항원항체반응(抗原抗體反應)을 이용한 항원(抗原) 또는 항체량(抗體量) 측정 방법을 일반적으로 효소면역분석법으로 총칭한다. 일반적으로 항체에 효소(퍼옥시다아제, peroxidase 등)를 결합시켜 놓고 그 반응을 이용하여 정량을 수행하며, 보통 마이크로플레이트의 웰 안에서 반응이 완결하므로 미량분석이 가능하다.
- [0070] 본 발명에 있어서, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지물질로는 효소, 형광물질, 발광물질 및 방사성 물질 등을 사용할 수 있다. 특히, HRP (horseradish peroxidase), 염기성 탈인산화효소 (alkaline phosphatase), 콜

로이드 (colloid), 형광물질 (fluorescein), 방사성 동위원소 및 색소 (dye)로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 사용할 수 있다. 그러나, 상기 예시된 것들 외에 면역학적 분석법에 사용할 수 있는 것이라면 어느 것이라도 사용할 수 있다.

[0071] 본 발명에 있어서, 상기 엑소좀 항원은 찌뜨가무시균의 TSA56 (56-kDa type-specific antigen), 47kDa 항원, ScaA 또는 샤페로닌 (chaperonin; 60kDa 항원)인 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 TSA56 (56-kDa type-specific antigen)인 것이며, 상기 TSA56 항원은 OMV (outer membrane vesicle)에 포함되어 있는 다양한 항원 중 하나로, 가장 바람직하게는 상기 TSA56는 서열번호 5의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0073] **[실시예]**

[0074] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0076] **대상환자**

[0077] 찌뜨가무시병 진단을 위해 찌뜨가무시병 감염으로 의심되는 환자를 선별하여 혈액을 채취하였다. 모든 프로토콜은 인하 대학 병원의 임상시험 심사위원회 (Institutional Review Board; IRB)에 검토 및 승인을 받았으며, 본 연구에 포함된 모든 환자로부터 동의서를 받았다.

[0078] 찌뜨가무시병의 전형적인 임상특성은 발열, 발진, 가피 (eschar) 등을 보이는 경우이며, 감염내과 전문의의 진단을 근거로 하였다. IFA 검사 또는 PCR 검사에서 보령 혈청형 (Boryong serotype)으로 진단된 환자의 자료를 분석하였으며, 총 25명의 환자와 찌뜨가무시병이 없는 14명의 대조군 혈액을 분석하였다.

[0080] **항체**

[0081] 보령 혈청형 찌뜨가무시균에 대한 폴리클로날 항체인 anti-*O. tsutsugamushi* serotype Boryong polyclonal antibody를 제작 (앵클론, 대한민국)하여 포획항체 (capture Ab)로 사용하였다.

[0082] 검출항체 (detection antibody)로 사용하기 위한 모노클로날 항체는 보령 혈청형 찌뜨가무시균을 마우스 복강에 감염시켜 공지의 방법 (Kim *et al.*, *Journal of Bacteriology and Virology* 38(1):11-17, 2008)에 따라 찌뜨가무시균 TSA56 (56-kDa type-specific antigen)에 대한 FS-15 모노클로날 항체를 제작하였다. 본 발명에서 사용한 FS-15 모노클로날 항체는 인하대학교 의과대학 미생물학교실 (강재승 교수)로부터 입수하였다.

[0084] **실시예 1: 간접면역형광법(Indirect Immunofluorescence Assay; IFA)를 이용한 찌뜨가무시균 감염 여부 확인**

[0085] 환자에서 보령(Boryong), 카와사키(Kawasaki), 길리엄(Gilliam) 및 카프(Karp) 혈청형에 대한 IFA 분석을 수행하였다.

[0086] 먼저, 환자의 혈청은 전체 혈액 (whole blood)에 EDTA를 처리하여 수득하였다. 각 혈청은 PBS (phosphate buffered saline, pH=7.4)로 2배 순차희석하여 1:40 에서부터 1:1280까지 마이크로플레이트(U-bottomed microplates)에 희석하여 준비하였다.

[0087] 혈청 샘플의 희석액은 보령(Boryong), 카와사키(Kawasaki), 길리엄(Gilliam) 및 카프(Karp) 혈청형의 오리엔티아 찌뜨가무시 (*O. tsutsugamushi*)가 배양된 세포를 부착한 슬라이드의 각 원형 항원 스팟 (each prototype antigen spots)에 처리하였으며, 습실 (moist chamber)에서 37°C 조건으로 30분 동안 슬라이드를 반응시켰다. 반응이 완료된 슬라이드 0.05% tween 20이 포함된 PBS (PBST)를 이용하여 3번 세척한 다음, 형광이 컨쥬게이트된 goat anti-human IgG (Jackson laborotory, 미국)를 처리하여 습실에서 37°C 조건으로 30분 동안 반응시켰다. 상기과 같은 방법으로 3번 세척한 다음, 건조하여 anti-fainting mounting media (Vectashild, Vector, CA)로 고정하였다. 그 다음 형광 현미경 (fluorescence microscope; Axioskop 2, CarlZeiss, 독일)에서 X200

배율로 관찰하였다.

[0088] 보령(Boryong) 혈청형의 IFA를 통한 쯔쯔가무시병 진단의 경우, 이전에 인하대학교 병원에서 장기간 수집된 데이터 및 실험 데이터를 바탕으로 IgG 항혈청 (antiserum) 역가가 혈청의 1:160 희석 이상일 때 양성인 것으로 판단하였다.

[0089] 그 결과는 하기 표 4에 나타냈다.

[0091] **실시예 2: PCR 분석을 이용한 감염된 쯔쯔가무시균 유전형 분석**

[0092] 버피코트 (Buffy coat)를 쯔쯔가무시 감염 의심 환자 각각의 전체 혈액으로부터 획득하였다. DNA 추출은 QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, 독일)을 이용하여 상기 키트에 포함된 매뉴얼에 따라 수행하였다. DNA는 50 μ l의 멸균된 증류수에 희석하였으며, 오리엔티아 쯔쯔가무시균의 56-kDa형 특정 항원을 검출하기 위해 네스티드 PCR (nested PCR; nPCR)을 수행하였다.

[0093] nPCR 수행을 위해 2개의 프라이머 세트를 제조하였다 (제노텍). 1차 PCR 수행을 위한 프라이머 세트는 56-kDa형 특이적 항원 유전자를 코딩하는 보령주 (Bryong strain, Genbank accession number:L04956), 카프주 (Karp strain, Genbank accession number:M33004), 길리암주 (Gilliam strain, Genbank accession number:M33267) 및 카와사키주 (Kawasaki strain, Genbank accession number:M63383) 유래 보존 DNA 서열에 기초하여 제작하였으며, 프라이머 서열 정보는 하기와 같다. 1차 프라이머 세트에 의해 증폭되는 증폭산물의 크기는 1900bp이다.

[0094] 1차 프라이머 세트

[0095] [서열번호 1] 1F : 5'-ATAATTAATGTATTTTCGAACG-3'

[0096] [서열번호 2] 2R : 5'-CCTKCAAAGGACTTTTAGCT-3'

[0097] 2차 PCR 수행을 위한 프라이머 세트는 하기와 같으며, 2차 프라이머 세트에 의해 증폭되는 증폭산물의 크기는 1600 bp이다.

[0098] 2차 프라이머 세트

[0099] [서열번호 3] 1Fn : 5'-AACACAGTGTTTTATAGATTGTTA-3'

[0100] [서열번호 4] 2Rn : 5'-RCATTAATTGCTACACCAAGT- 3'

[0101] 56-kDa 항원 유전자의 첫번째 PCR 증폭은 1F 및 2R 프라이머 세트를 이용하였으며, 두번째 PCR 증폭은 1Fn 및 2Rn 프라이머 세트를 이용하였다. 상기 두번째 PCR 증폭으로 생성된 증폭산물은 NCBI (National center for Biotechnology Information) 블라스트 프로그램을 통해 서열확인 및 동정하였다.

[0102] 그 결과는 하기 표 4에 나타냈다.

[0104] **실시예 3: 쯔쯔가무시균 엑소좀 준비**

[0105] 대조군 실험을 위해 쯔쯔가무시균으로부터 엑소좀 (OMV)을 분리하여 정제하였다.

[0106] 쯔쯔가무시균 감염 세포 배양, 정제 및 쯔쯔가무시균의 엑소좀, 즉 OMV (outer membrane vesicle)의 분리, 정제는 대한민국 등록특허 10-1742236의 방법에 따라 수행하였다.

[0108] **실시예 4: ELISA 방법을 이용한 쯔쯔가무시 유래 엑소좀 (OT-Exo) 농도 측정**

[0109] 효소면역 측정법(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)을 수행하기 위해, 먼저, 폴리스틸렌 재질의 96-웰 플레이트(NUNC, Thermo Scientific, 미국)에 3 μ g/ml 농도로 0.1M 인산나트륨 버퍼(sodium phosphate buffer(pH=9.0)에 녹아있는 anti-*O. tustusgamushi* serotype Boryong polyclonal antibody 검출항체를 1:40으로 희석 처리하여 코팅하였다.

[0110] 그 다음, 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 동안 반응시킨 후, 플레이트에 남아있는 용액을 제거하였다. 각 웰에 1% BSA (GA biochem, Georgia, USA)가 녹아 있는 PBS 용액 200 μ l를 채운 다음 상온에서 2시간 동안 정치시킨 후, 0.05% 트

윈20 (tween 20; USB, ohio, USA)이 포함된 PBS 버퍼로 3회 세척하였다. 각각의 웰에 대상 시료 100 μ l를 넣어 주고 상온에서 2시간 동안 반응시킨 후, 상기와 동일한 방법으로 3회 세척하였으며, 2차 검출항체로는 FS-15 monoclonal Ab를 3 μ g/mL농도로 처리하고 1시간 동안 반응시켰다.

[0111] 그 후, 다시 0.05% 트윈20이 포함된 PBS 버퍼로 3회 세척한 다음, 각 웰에 아비딘 컨주게이션된 horseradish peroxidase (BD Biosciences, USA)을 처리하여 1 시간 동안 반응시키고, 0.05% 트윈20이 포함된 PBS 버퍼로 3 회 세척하고, 100 μ l 기질(TMB, KPL, MD, USA)을 처리하여 반응시켰다. 발색이 충분히 나타나면, 정지용액(stop solution)으로 1M 황산(H₂SO₄)을 100 μ l를 첨가하여 반응을 정지시켰다.

[0112] 그 다음, ELISA 리더기 (BioTek Instruments, 미국)를 이용하여 450nm에서 광학밀도 (optical densities; OD)를 측정하였다.

[0113] 상기 대상 시료로 상기 실시예 3에서 정제한 쯔쯔가무시 유래 엑소좀 및 정상인의 혈액을 이용하여 비교하였다. 정상인의 혈액검사 평균수치의 OD값은 0.1999 (표 1)인 것으로 나타났으며, 실시예 3에서 정제한 쯔쯔가무시 유래 엑소좀을 농도별로 대조군으로 사용하여 ELISA의 표준값을 얻었다 (도 1).

표 1

[0114]

번호	OD값
1	0.2025
2	0.1995
평균	0.1999

[0115] 쯔쯔가무시균에서 유래한 OMV를 PBS에 단계별로 희석하여 측정된 결과, OMV 농도에 따라 ELISA의 OD 값이 증가하였으며 (표 2), OD 값은 OMV 농도 증가에 따라 상관계수 R²=0.995, 유의확률은 0.000으로 유의한 선형 증가의 상관관계를 나타냈다 (도 2). 또한, OMV 농도 0, 0.5, 1, 2, 4 μ g/mL로 실험하였을 때도 이변량 상관계수 값은 R²=0.965, 유의확률은 0.008로 OMV농도와 OD값은 상관성이 높은 것으로 나타났다.

표 2

[0116]

농도 (μ g/ml)	O.D
0	0.156
10	0.16
20	0.176
40	0.22
80	0.303
160	0.4165
320	0.6445

[0118] 실시예 4: ELISA 방법을 이용한 쯔쯔가무시 환자의 쯔쯔가무시 유래 엑소좀 검출

[0119] 실시예 3과 동일한 방법으로 쯔쯔가무시 환자의 혈액을 이용하여 ELISA OD 값을 측정하였다.

[0120] 그 결과, 환자에서의 측정치 OD값은 정상인 혈액검사수치 평균인 0.1999를 모두 초과하는 수치를 나타냈다 (표 3).

표 3

[0121]

번호	OD값
1	0.504
2	0.469
3	0.585
4	0.5585
5	0.591
6	0.4805

7	0.637
8	0.5265
9	0.478
평균	0.537

[0122] 또한, 실시예 1의 IFA 및 2의 PCR 방법과 OT-Exo ELISA 방법을 비교하였다 (표 4).

표 4

[0123]

일련번호	IFA	PCR	진단	New test (OT-Exo ELISA)
1	음성	양성	PCR	음성
2	음성	양성	PCR	음성
3	음성	양성	PCR	음성
4	음성	양성	PCR	양성
5	음성	양성	PCR	양성
6	음성	양성	PCR	양성
7	음성	양성	PCR	양성
8	음성	양성	PCR	음성
9	음성	양성	PCR	음성
10	음성	양성	PCR	음성
11	음성	양성	PCR	양성
12	음성	양성	PCR	양성
13	음성	미시행	임상진단	양성
14	음성	양성	PCR	양성
15	음성	음성	임상진단	양성
16	음성	양성	PCR	양성
17	양성	음성	IFA	양성
18	양성	음성	IFA	양성
19	양성	음성	IFA	양성
20	양성	음성	IFA	양성
21	양성	음성	IFA	양성
22	양성	음성	IFA	양성
23	양성	음성	IFA	양성
24	양성	음성	IFA	양성
25	양성	음성	IFA	양성
26	음성	미시행	해당없음	음성
27	음성	미시행	해당없음	음성
28	음성	미시행	해당없음	음성
29	양성	미시행	해당없음	음성
30	양성	미시행	해당없음	음성
31	음성	미시행	해당없음	음성
32	음성	미시행	해당없음	음성
33	음성	미시행	해당없음	음성
34	음성	미시행	해당없음	음성
35	음성	미시행	해당없음	음성
36	음성	미시행	해당없음	음성
37	음성	미시행	해당없음	음성
38	음성	미시행	해당없음	음성
39	음성	미시행	해당없음	음성

[0124] (1~25: 찌꺼가무시 환자, 26~39: 찌꺼가무시병이 아닌 다른 질병 환자, 임상진단 - 감염내과 전문의의 임상소견으로 진단한 경우)

[0125] 그 결과, 찌꺼가무시병환자를 대상으로 분석하였을 때 IFA검사로 진단했던 환자 9명에서에서 OT-Exo ELISA는 100% 양성으로 일치하였다. 또한, PCR에서 양성이고 IFA 음성 환자 14명은 OT-Exo OT-Exo ELISA 57.1%가 양성으로 나타났으며, OT-Exo ELISA 양성 환자 19명은 PCR 양성 42.1%, 및 IFA 양성 47.3%였다. 기존 진단법은 모

두 음성이고 임상상만으로 진단된 환자 2명은 OT-Exo ELISA에서 양성으로 진단할 수 있었다.

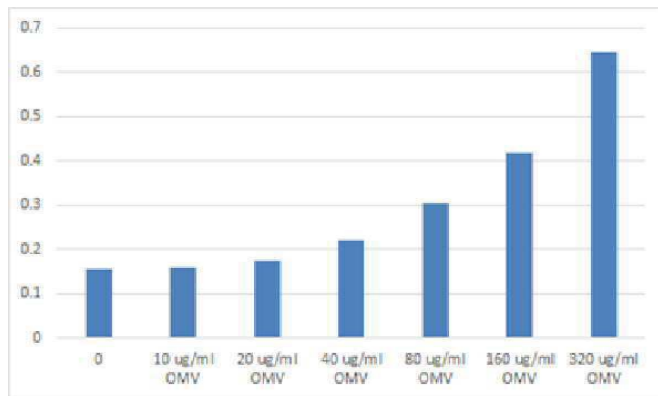
[0126] 즉, 25명 쯤쯤가무시병 환자에 대한 검사방법의 비교에서 OT-Exo ELISA 방법이 가장 우수하였으며, 특히 현재 진단의 gold standard인 IFA 검사보다 월등히 우수한 성적을 나타냈으며, 최근 도입된 PCR 검사보다도 진단 성능이 우수하였다. 기존 IFA 검사법의 민감도는 36.0%, 특이도는 85.7%, 양성예측도는 81.8%, 음성예측도는 42.9%으로 나타났으나, OT-Exo ELISA검사법의 민감도는 76.0%, 특이도는 100%, 양성예측도는 100.0%, 음성예측도는 70.0%으로 나타났다. OT-Exo ELISA검사법은 기존 IFA검사보다 민감도, 특이도에서 모두 우수함을 알 수 있었다.

[0127] 이에, ROC 분석을 시행하였고, AUC 값은 기존 IFA는 0.609, OT-Exo ELISA는 0.880이었고, p-value는 0.0007로 유의한 차이를 보였다. 즉, OT-Exo ELISA가 기존의 IFA검사보다 우수한 진단 능력을 보인다는 것을 알 수 있었다 (도 3).

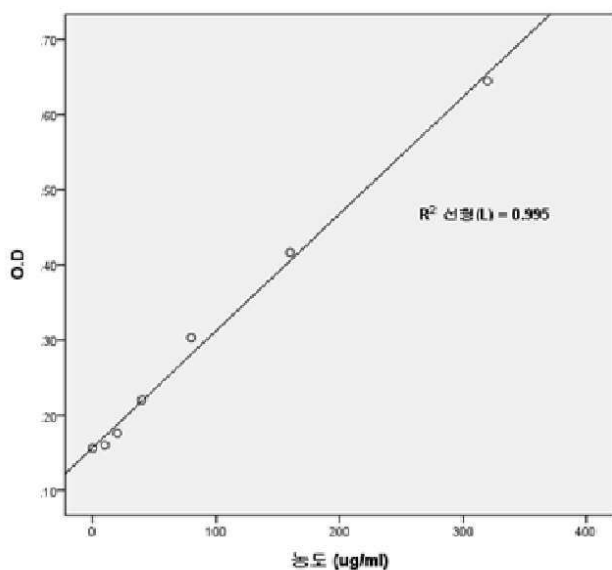
[0129] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

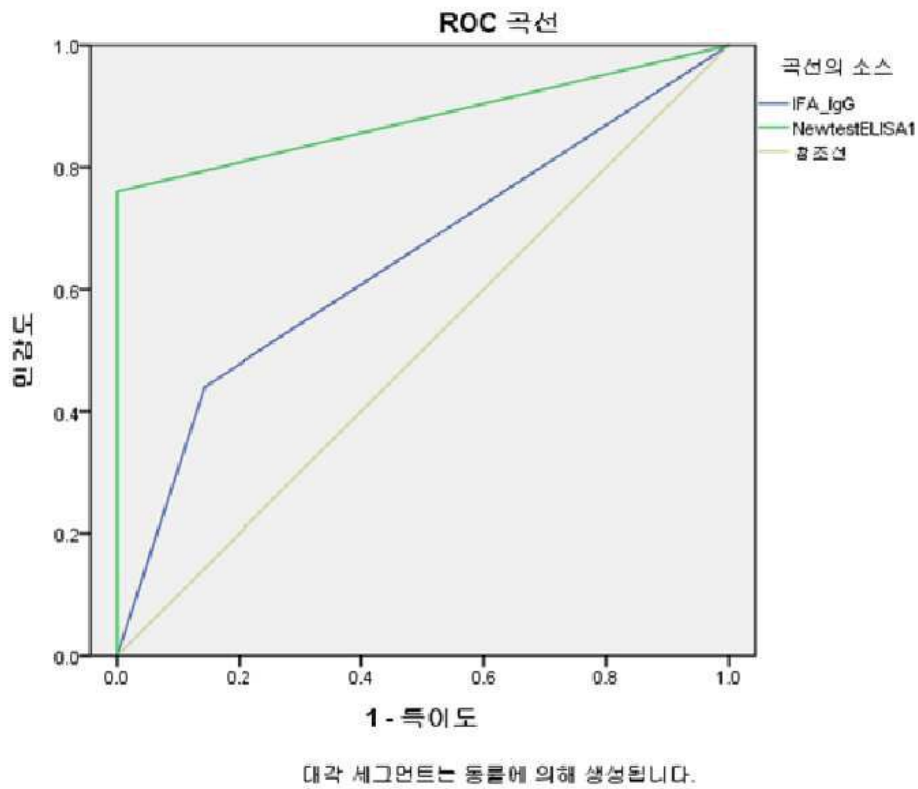
도면1



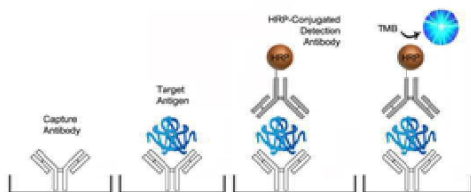
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> Inha University Research and Business Foundation
- <120> Method for Diagnosing Scrub Typhus Using Exosome derived from Orientia tsutsugamushi
- <130> P18-B038
- <160> 5
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 22
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> primer 1F
 <400> 1
 ataattaatg tattttcgaa cg 22
 <210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer 2R

 <400> 2
 cctkcaaagg acttttagct 20
 <210> 3
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer 1Fn
 <400> 3
 aacacagtgt tttatagatt gttta 25
 <210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer 2Rn
 <400> 4
 rcattaattg ctacaccaag t 21
 <210> 5
 <211> 488
 <212> PRT

 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TSA56
 <400> 5
 Met Ile Thr Gly Ala Glu Ser Thr Arg Leu Asp Ser Thr Asp Ser Glu
 1 5 10 15
 Gly Lys Lys His Leu Ser Leu Thr Thr Gly Leu Pro Phe Gly Gly Thr

Ser Phe Asp Gly Tyr Ile Asn Asn Ala Phe Val Asn Gln Ile His Leu
 275 280 285
 Asn Phe Val Met Pro Pro Gln Ala Gln Gln Gln Gln Gly Gln Gly Gln
 290 295 300
 Gln Gln Gln Ala Gln Ala Thr Ala Gln Glu Ala Val Ala Ala Ala Ala
 305 310 315 320
 Val Arg Leu Leu Asn Gly Ser Asp Gln Ile Ala Gln Leu Tyr Lys Asp
 325 330 335
 Leu Val Lys Leu Gln Arg His Ala Gly Ile Arg Lys Ala Met Glu Lys
 340 345 350
 Leu Ala Ala Gln Gln Glu Glu Asp Ala Lys Asn Gln Gly Lys Gly Asp
 355 360 365
 Cys Lys Gln Gln Gln Gly Ala Ser Glu Lys Ser Lys Glu Gly Lys Val
 370 375 380
 Lys Glu Thr Glu Phe Asp Leu Ser Met Val Val Gly Gln Val Lys Leu
 385 390 395 400
 Tyr Ala Asp Leu Val Thr Thr Glu Ser Phe Ser Ile Tyr Gly Gly Val
 405 410 415
 Gly Ala Gly Leu Ala Tyr Thr Tyr Gly Lys Ile Asp Asn Lys Asp Val
 420 425 430
 Lys Gly Tyr Thr Gly Met Val Ala Ser Gly Ala Leu Gly Val Ala Ile
 435 440 445
 Asn Ala Ala Glu Gly Val Cys Val Asp Leu Glu Ala Gly Tyr Met His
 450 455 460
 Ser Phe Ser Lys Val Glu Asp Lys Tyr Gln Val Asn Ala Phe Ile Ala
 465 470 475 480
 Ser Ala Cys Val Arg Tyr Asn Phe
 485