



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년08월12일
 (11) 등록번호 10-2009737
 (24) 등록일자 2019년08월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 G01N 33/68 (2006.01) G01N 33/548 (2006.01)
 G01N 33/569 (2017.01)
 (52) CPC특허분류
 G01N 33/6854 (2013.01)
 G01N 33/548 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2018-0055052
 (22) 출원일자 2018년05월14일
 심사청구일자 2018년05월14일
 (56) 선행기술조사문헌
 AAPS Journal, (2018.03.14.), Vol. 20, pp
 1-11.
 KR1020130075972 A
 KR1020160114412 A

(73) 특허권자
 한국 한의학 연구원
 대전광역시 유성구 유성대로 1672 (전민동)
 (72) 발명자
 유수성
 대전광역시 유성구 유성대로1679번길 18-10, 304
 호
 이호영
 대전광역시 서구 월평북로 11, 208동, 606호(월평
 동, 주공아파트)
 심은형
 대전광역시 유성구 대덕대로577번길 51, 한전원자
 력연료사원아파트 3동 501호
 (74) 대리인
 김충호, 박희영

전체 청구항 수 : 총 3 항

심사관 : 차명훈

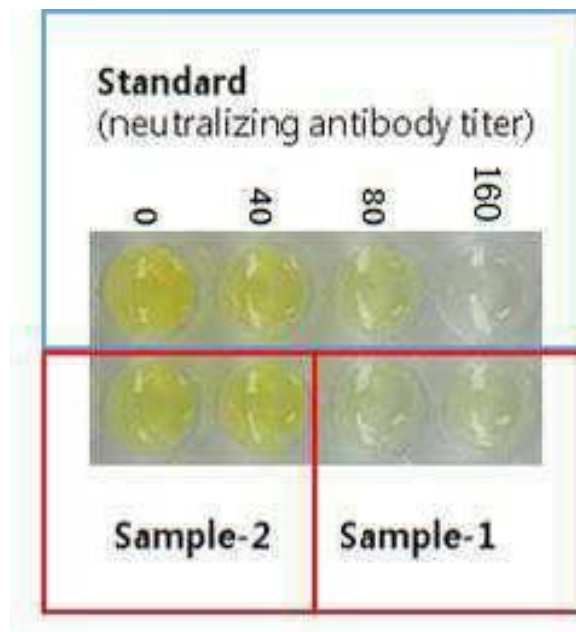
(54) 발명의 명칭 독감 바이러스에 대한 중화 항체 검출 방법

(57) 요약

본 발명은 독감 바이러스에 대한 중화 항체 검출 방법에 관한 것으로서, 좀 더 구체적으로는 Hamagglutinin(HA) 단백질의 결합부인 시알릴락토오스를 웰 표면에 코팅하고, 중화 항체를 알고 있는 스탠다드와 채혈 시료를 HA를 포함한 단백질과 반응시켜 스탠다드 웰의 값으로부터 채혈 시료의 중화 항체 값을 신속 정확하게 측정함으로

(뒷면에 계속)

대표도



써 추가 집중이 필요한 독감 바이러스 주(strain)를 결정할 수 있도록 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 중화 항체의 검출 방법은 종래의 적혈구응집억제검사를 대체할 수 있는 것으로서 시알릴락토오스를 고상 지지체의 웰 표면에 코팅하고 채혈된 시료의 중화 항체가 HA 함유 단백질에 결합하여 HA와 시알릴락토오스의 결합을 억제하는 것을 이용하여 진단함으로써 적혈구를 사용하지 않고 15시간 이상 소요되는 혈청 전처리 시간을 생략하여 한 웰에서 동시에 모든 바이러스 주에 대한 중화 항체가 분석 결과를 30분 내외로 제공할 수 있다. 또한, 종래의 적혈구응집억제검사는 생 바이러스를 사용하지만, 본 발명의 방법은 HA 함유 단백질을 사용함으로써 감염의 위험이 없고, 조류 사육 및 채혈이 필요하지 않아 공간적 제한 없이 의원급 병원에서도 쉽게 진단 또는 검출을 실시할 수 있다. 또한, 종래 검사는 적혈구응집억제 유무를 검사자의 판단에 의존하여 중화 항체를 계산하지만, 본 발명은 중화 항체를 기계적으로 계산된 수치로 제시하기 때문에 검사자에 따른 편차가 적다는 이점이 있다. 이를 기초로 중화 항체를 30분 이내에 측정할 수 있는 진단 키트를 개발할 수 있고 더 나아가 백신 접종 전후에 실제 예방 능력을 평가하고 개개인의 예방 능력에 맞는 맞춤형 예방 접종을 제시함으로써 새로운 백신 접종 가이드라인을 제공할 수 있을 것이다.

(52) CPC특허분류

G01N 33/56983 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

- a) 진단 대상의 인체로부터 채혈하여 시료를 준비하는 단계;
- b) 중화 항체를 알고 있는 시료를 단계별로 희석하여 복수의 스탠다드 시료들을 준비하는 단계;
- c) 시알릴락토오스 분자가 고정된 고상 지지체의 웰에 HA 함유 단백질이 포함된 용액을 가하는 단계;
- d) 상기 웰의 일부에는 스탠다드 시료를 가하고, 다른 웰의 일부에는 채혈된 시료를 가하는 단계;
- e) 상기 HA 함유 단백질에 결합하는 표지물질을 포함한 항체를 상기 각 웰에 가한 후 반응시키는 단계;
- f) 상기 웰을 세척 후 전처리하는 단계; 및
- g) 상기 웰을 판독하는 단계;를 포함하는 독감 바이러스에 대한 중화 항체의 검출 방법.

청구항 2

- a) 진단 대상의 인체로부터 채혈하여 시료를 준비하는 단계;
- b) 중화 항체를 알고 있는 시료를 단계별로 희석하여 복수의 스탠다드 시료들을 준비하는 단계;
- c) 시알릴락토오스 분자가 고정된 고상 지지체의 웰에 표지물질이 결합된 HA 함유 단백질이 포함된 용액을 가하는 단계;
- d) 상기 웰의 일부에는 스탠다드 시료를 가하고, 다른 웰의 일부에는 채혈된 시료를 가한 후 반응시키는 단계;
- e) 상기 웰을 세척 후 전처리하는 단계; 및
- f) 상기 웰을 판독하는 단계;를 포함하는 독감 바이러스에 대한 중화 항체의 검출 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

추가로, 판독 결과로부터 얻은 독감 바이러스에 대한 중화 항체로부터 추가 접종이 필요한 독감 바이러스 주(strain)를 결정하는 것을 특징으로 하는 중화 항체의 검출 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 독감 바이러스에 대한 중화 항체 검출 방법에 관한 것으로서, 좀 더 구체적으로는 Hamagglutinin(HA) 단백질의 결합부인 시알릴락토오스를 고상 지지체의 (웰) 표면에 코팅하고, 중화 항체를 알고 있는 스탠다드와 채혈 시료를 HA를 포함한 단백질과 반응시켜 스탠다드 웰의 값으로부터 채혈 시료의 중화 항체 값을 신속 정확하게 측정함으로써 추가 접종이 필요한 독감 바이러스 주(strain)를 결정할 수 있도록 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 독감 바이러스는 Orthomyxovirus 과에 속하는 단쇄, 나선형 RNA 바이러스로, 핵산 구성에 따라 A, B, C형(type)으로 분류된다. A형 독감 바이러스는 표면 항원인 hemagglutinin(HA)과 neuraminidase(NA)에 의해서 아형(subtype)이 결정되는데, HA는 18가지 아형(H1~H18)이 있고, NA는 11가지 아형(N1~N11)이 있다. B형은 항원형에 따라 B/Victoria와 B/Yamagata 두 가지 계통으로 나뉜다. A형 독감 바이러스는 중등도 내지 중증 경과를 나타내고 모든 연령에서 발생하며, B형은 A형보다 경한 증상을 나타내며 항원변이가 적다. C형은 대부분 증상이 없으므로 사람에서 감염된 사례 보고는 거의 없다.

- [0003] 독감 바이러스가 유행하면 보통 인구의 10~20%가 감염되는 것으로 알려져 있으며, 노인, 만성질환자, 영유아, 임신부 등의 고위험군이 감염될 경우 이환율 및 사망률을 증가시키게 된다. 우리나라의 독감 질병부담 연구 결과, 매년 독감으로 인해 2,900명의 초과사망이 발생하는 것으로 추정되었다. 또한, 전 세계적으로는 매년 독감으로 사망하는 인구가 25~50만 명에 이르는 것으로 보고되었다. 이에 따라 세계보건기구(WHO)에서는 1978년부터 다음 절기에 유행이 예상되는 2종의 A형 바이러스 주(H1N1, H3N2)와 1종의 B형 바이러스 주에 대한 예방 백신을 매년 권고하고 있다.
- [0004] 하지만 최근 매년 접종되는 3가(trivalent) 백신의 제한된 예방 효과에 문제를 제기하는 다수의 연구 결과들이 보고되고 있다. 첫째, 노인 및 만성질환자의 경우 백신 접종 후 실제로 독감을 예방할 수 있는 유효 항체 생성율(중화 항체가 40 이상)이 50% 내외로 낮고 실제 예방율도 낮은 것이 보고되었다. 이러한 면역력 저하 인구는 접종 후 유효 항체 생성 여부를 평가하고 필요한 경우 추가 접종이 이루어져야 한다. 둘째, 2004-2015년까지 백신 효과를 측정하기 위해 수행된 모든 임상연구들을 분석한 결과 H1N1과 B에는 각각 67%와 54%의 예방 효과를 보였지만, H3N2에는 33%로 현저히 감소된 효과를 보였다. 즉, 아형에 따라 다른 예방 효과가 있다는 것이며 이를 극복하기 위해서는 아형별로 차별적인 접종이 이루어져야 한다. 셋째, 작년에만 독감 백신을 접종한 군과 작년과 올해 모두 접종한 군의 백신 효과를 비교한 결과 2년 연속으로 접종한 군의 H1N1과 B에 대한 효과는 통계적으로 유의하게 증가했지만 H3N2는 유의한 증가가 없었다. 또한, 백신 접종시 생성된 유효 항체가 18개월 이상 유지된다는 사실이 보고되었다. 따라서 기 획득된 독감 바이러스에 대한 면역력이 1년 이상 유지될 뿐만 아니라 다음 예방 접종에 영향을 준다는 것을 알 수 있다.
- [0005] 지금까지는 3가 백신을 획일적으로 접종하였지만 예방효과의 한계가 보고되고 있다. 심지어, 접종시 항원간의 면역 경쟁이 유발되기 때문에 불필요한 추가 접종은 오히려 면역 증진이 필요한 항원에 대한 면역반응을 억제할 수도 있다. 따라서 최대의 백신효과를 유지하기 위해서는 백신 접종 전에 기 획득한 독감 바이러스에 대한 중화 항체가를 바이러스 주별로 측정하고 유효 중화 항체가보다 낮은 바이러스 주에 대한 추가 접종이 필요하다.
- [0006] 종래, 백신 접종 후 유효한 항체가 형성되었는지를 검사하는 방법으로는 적혈구응집억제 검사법(Hemagglutination inhibition test)이 있는데, 이 방법은 독감 바이러스 표면의 HA 함유 단백질이 세포 표면의 시알릴락토오스에 결합하면서 세포내 감염이 이루어지는 원리를 이용한 것이다. 도 1 및 2에 나타낸 바와 같이 바이러스의 HA가 적혈구 표면의 시알릴락토오스에 결합하게 되면 적혈구 응집이 이루어지고, HA에 결합하여 시알릴락토오스와의 결합을 억제하는 중화 항체가 존재하게 되면 적혈구 응집이 억제된다. 40배 이상 희석한 접종자의 혈청에서 적혈구 응집을 억제한 경우 독감 바이러스를 예방할 수 있는 유효 항체가 생성되었다고 판정한다.
- [0007] 그러나 이러한 방법은 비특이적인 적혈구 응집을 억제하기 위한 혈청 전처리에 15시간 이상이 소요되고, 실질적인 적혈구응집억제 검사에도 4시간 이상 소요되는 시간적 제한이 있다. 또한, 생 바이러스를 사용하는 감염의 위험이 있고 채혈한지 3일 이내의 조류 적혈구가 사용되기 때문에 필요 시설을 갖춘 실험실에서만 가능하다는 공간적 제한이 있다. 더욱이 육안으로 응집 유무를 판단해야 하므로 결과의 해석이 다소 부정확할 수 있고 수행자간의 차이가 클 수 있다는 문제점이 있다.
- [0008] 따라서, 백신 접종 전에 기 획득한 바이러스 주에 대한 중화 항체가를 측정하고 추가 접종 바이러스 주를 선택하여 임상적으로 적용하기 위해서는 더 신속하고 정확하며 안전한 측정 방법이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 한국 등록특허 제10-1342240호(2013년 12월 10일)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명자들은 위와 같은 종래 기술에 수반된 기술적 문제점들을 극복하기 위한 독감 바이러스에 대한 중화 항체가의 간단하고도 신속한 검출 방안을 개발하기 위하여 예의 연구한 결과, 시알릴락토오스를 고상 지지체의 웰 표면에 코팅하고 (정량화된 중화 항체가를 갖는) 스탠다드와 HA 함유 단백질을 이용한 새로운 방식이 종래의 시

간적 공간적 제한을 해결할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0011] 따라서, 본 발명의 목적은 독감 바이러스에 대한 중화 항체의 형성 유무를 신속하고 정확하게 검출할 수 있는 방법에 관련된 일련의 방법, 장치 등을 제공하는데에 있다.
- [0012] 위와 같은 본 발명의 목적은, 일면에 있어서,
- [0013] a) 진단 대상의 인체로부터 채혈하여 시료를 준비하는 단계;
- [0014] b) 중화 항체를 알고 있는 시료를 단계별로 희석하여 복수의 스탠다드 시료들을 준비하는 단계;
- [0015] c) 시알릴락토오스 분자가 표면에 고정된 반응부를 포함하는 고상 지지체의 웰에 HA 함유 단백질이 포함된 용액을 가하는 단계;
- [0016] d) 상기 웰의 일부에는 스탠다드 시료를 가하고, 다른 웰의 일부에는 채혈된 시료를 가하는 단계;
- [0017] e) 상기 HA 함유 단백질에 결합하는 표지물질들을 포함한 항체를 상기 각 웰에 가한 후 반응시키는 단계;
- [0018] f) 상기 웰을 세척 후 전처리하는 단계; 및
- [0019] g) 상기 웰을 판독하는 단계;를 포함하는 독감 바이러스에 대한 중화 항체의 검출 방법에 의해 달성될 수 있다.
- [0020] 본 발명의 목적은, 다른 일면에 있어서,
- [0021] a) 진단 대상의 인체로부터 채혈하여 시료를 준비하는 단계;
- [0022] b) 중화 항체를 알고 있는 시료를 단계별로 희석하여 복수의 스탠다드 시료들을 준비하는 단계;
- [0023] c) 시알릴락토오스 분자가 표면에 고정된 반응부를 포함하는 고상 지지체의 웰에 표지물질이 결합된 HA 함유 단백질이 포함된 용액을 가하는 단계;
- [0024] d) 상기 웰의 일부에는 스탠다드 시료를 가하고, 다른 웰의 일부에는 채혈된 시료를 가한 후 반응시키는 단계;
- [0025] e) 상기 웰을 세척 후 전처리하는 단계; 및
- [0026] f) 상기 웰을 판독하는 단계;를 포함하는 독감 바이러스에 대한 중화 항체의 검출 방법에 의해 달성될 수 있다.

발명의 효과

[0027] 본 발명에 따른 중화 항체의 검출 방법은 종래의 적혈구응집억제검사를 대체할 수 있는 것으로서 정량화된 중화 항체를 갖는 스탠다드와 시알릴락토오스가 웰 표면에 코팅된 고상 지지체를 이용하고 채혈된 시료의 중화 항체가 HA 함유 단백질에 결합하여 HA와 시알릴락토오스의 결합을 억제하는 것을 이용하여 진단함으로써 적혈구를 사용하지 않고 15시간 이상 소요되는 혈청 전처리 시간을 생략하여 한 웰에서 동시에 모든 바이러스 주에 대한 중화 항체가 분석 결과를 30분 내외로 제공할 수 있다. 또한, 종래의 적혈구응집억제검사는 생 바이러스를 사용하지만, 본 발명의 방법은 HA 함유 단백질을 사용함으로써 감염의 위험이 없고, 조류 사육 및 채혈이 필요하지 않아 공간적 제한 없이 의원급 병원에서도 쉽게 진단 또는 검출을 실시할 수 있다. 또한, 종래 검사는 적혈구응집억제 유무를 검사자의 판단에 의존하여 중화 항체를 계산하지만, 본 발명은 중화 항체를 기계적으로 계산된 수치로 제시하기 때문에 검사자에 따른 편차가 적다는 이점이 있다. 이를 기초로 중화 항체를 30분 이내에 측정할 수 있는 진단 키트를 개발할 수 있고 더 나아가 백신 접종 전후에 실제 예방 능력을 평가하고 개 개인의 예방 능력에 맞는 맞춤형 예방 접종을 제시함으로써 새로운 백신 접종 가이드라인을 제공할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0028] 도 1 및 2는 종래의 적혈구 응집억제 방법에 의한 중화 항체 형성 확인 방법을 나타내는 설명도이다.
- 도 3은 본 발명에 따른 시알릴락토오스 코팅 스킴을 나타내는 도면이다.
- 도 4는 시험된 웰의 발색 반응을 나타내는 사진이다.
- 도 5는 시험된 웰의 450nm에서 흡광도를 스탠다드 값에 비교하여 환산한 값을 나타내는 그래프도이다.
- 도 6은 본 발명의 다른 실시 형태에 따른 중화 항체의 형성 유무를 검출하는 스킴을 나타내는 도면이다.

도 7은 시험된 웰의 발색 반응을 나타내는 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 본 발명은, 일면에 있어서,
- [0030] a) 진단 대상의 인체로부터 채혈하여 시료를 준비하는 단계;
- [0031] b) 중화 항체가 알고 있는 시료를 단계별로 희석하여 복수의 스탠다드 시료들을 준비하는 단계;
- [0032] c) 시알릴락토오스 분자가 고정된 반응부를 포함한 웰에 HA 함유 단백질이 포함된 용액을 가하는 단계;
- [0033] d) 상기 웰의 일부에는 스탠다드 시료를 가하고, 다른 웰의 일부에는 채혈된 시료를 가하는 단계;
- [0034] e) 상기 HA 함유 단백질에 결합하는 표지물질을 포함한 항체를 상기 각 웰에 가한 후 반응시키는 단계;
- [0035] f) 상기 웰을 세척 후 전처리하는 단계; 및
- [0036] g) 상기 웰을 판독하는 단계;를 포함하는 독감 바이러스에 대한 중화 항체의 검출 방법을 제공한다.
- [0037] 본 발명은, 추가의 일면에 있어서,
- [0038] a) 진단 대상의 인체로부터 채혈하여 시료를 준비하는 단계;
- [0039] b) 중화 항체가 알고 있는 시료를 단계별로 희석하여 복수의 스탠다드 시료들을 준비하는 단계;
- [0040] c) 시알릴락토오스 분자가 고정된 반응부를 포함한 웰에 표지물질이 결합된 HA 함유 단백질이 포함된 용액을 가하는 단계;
- [0041] d) 상기 웰의 일부에는 스탠다드 시료를 가하고, 다른 웰의 일부에는 채혈된 시료를 가한 후 반응시키는 단계;
- [0042] e) 상기 웰을 세척 후 전처리하는 단계; 및
- [0043] f) 상기 웰을 판독하는 단계;를 포함하는 독감 바이러스에 대한 중화 항체의 검출 방법을 제공한다.
- [0044] 본 발명은 다른 추가의 일면에 있어서
- [0045] 상기 판독 결과로부터 얻은 독감 바이러스에 대한 중화 항체로부터 추가 접종이 필요한 독감 바이러스 주 (strain)를 결정하는 것을 특징으로 하는 중화 항체의 검출 방법을 제공한다.
- [0046] 이하에서 본 발명의 바람직한 실시를 위한 구체적인 내용을 첨부된 도면에 의하여 상세히 설명하면 다음과 같다.
- [0047] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 첨부되는 도면과 함께 상세하게 후술되는 실시예를 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 여기서 설명되는 실시예들에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 실시예들은 개시된 내용이 철저하고 완전해질 수 있도록 그리고 당업자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 제공되는 것이다.
- [0048] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미가 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥상 가지는 의미와 일치하는 의미가 있는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [0049] 본 발명에서 사용된 용어, "중화 항체"는 높은 중화 능력(neutralizing potency)을 가지는 것으로서, 중화 항체가 40 이상은 40배 이상 희석한 시험자 또는 접종자의 혈청이 적혈구 응집을 억제하여 독감 바이러스의 감염을 예방, 방지, 억제, 감소, 방해 및/또는 저해할 수 있는 유효 항체를 의미한다.
- [0050] 현재까지 중화 항체를 측정하는 방법은 실험실에서 수행되고 있는 적혈구응집검사가 유일하나 이 방법은 시간이 오래 걸리고, 진단 비용 역시 과도하게 수반된다.
- [0051] 바이러스의 감염은 바이러스의 HA가 시알릴락토오스에 결합하여 감염이 이루어지는데 백신 접종 후 생성된 항체 중에서 바이러스의 HA에 결합해서 HA와 시알릴락토오스의 결합을 억제하는 항체가 감염을 막는 중화 항체가 된다.

- [0052] 본 발명에 따른 중화 항체의 검출 방법에 있어서 구성상 특징은 종래의 적혈구응집억제검사를 대체할 수 있는 것으로서 미리 준비하여 정량화된 중화 항체를 갖는 스탠다드와 시알릴락토오스가 웰 표면에 코팅된 고상 지지체(예, 96웰 플레이트)를 이용하고 채혈된 시료의 중화 항체가 HA 함유 단백질에 결합하여 HA와 시알릴락토오스의 결합을 억제하는 것을 이용하여 진단함으로써 간단하고 신속하게 중화 항체가 분석 결과를 제공할 수 있다. 중화 항체가 많은 경우 시알릴락토오스에 결합하는 HA 함유 단백질이 감소하고 따라서 표지물질(예, HRP)에 의한 발색이 낮아지게 된다.
- [0053] 전술한 바와 같이 백신 접종 후에도 개개인마다 다른 중화 항체를 갖기 때문에 예방 능력도 다르다. 때문에 간단하고 신속하게 중화 항체의 존재 유무를 파악할 필요가 있고, 본 발명은 이러한 점들을 개선한 것에 특징이 있으며, 본 발명에 기초하여 30분 이내 독감 중화 항체가 측정 진단 키트 개발이 가능하며, 이를 이용하여 개개인의 독감 예방 능력을 평가하고 결과에 따른 맞춤형 접종을 제공한다면 현재의 미충족 의료 수요 해결을 통한 신시장 창출이 가능하다.
- [0054] 본 발명에 따른 독감 바이러스에 대한 중화 항체의 검출 방법은 스탠다드의 제조, 시알릴락토오스 분자를 고상 지지체의 웰에 고정시키는 과정, HA 함유 단백질, 및 특정 표지물질을 포함하는 항체의 준비를 필요로 하며, 이들의 준비는 통상의 방법에 의해 가능하다.
- [0055] 스탠다드의 제조는 중화 항체가 알려진 표준 혈청(reference serum)을 희석하여 스탠다드를 만들 수 있다. 적혈구응집억제검사를 통해서 중화 항체를 확인한 사람의 혈청을 이용해서 스탠다드를 만들 수도 있고 이를 이용해서 대상의 중화 항체를 측정할 수 있다. 예를 들면, 4개의 튜브에 중화 항체가 160인 reference serum을 2배씩 희석수(예, PBS)에 단계별 희석하여 중화 항체가 0, 40, 80, 및 160인 샘플을 만든다.
- [0056] 따라서, 상기 스탠다드 시료들을 준비하는 단계에서 사용되는 "복수의 시료들"은 단계별 희석에 의해 얻어진 것들 중, 중화 항체가 상이한 것을 여러 개를 포함하는 것으로서, 예를 들면 중화 항체가 0, 40, 80, 및 160인 것을 사용하는 경우에는 적어도 4개 이상의 시료를 검출에 사용할 수 있다.
- [0057] 필요에 따라서, 중화 항체가 40을 기준으로 볼 때, 임계적 의의를 갖는 영역을 참고하여 중화 항체가 20이나 60 등의 경계선 영역을 더 구비하여 시료를 준비할 수 있으며, 바람직하게는 10 개 이하의 시료를 사용할 수 있다.
- [0058] 본 발명에서는 편의상 스탠다드 시료의 값으로부터 대상의 중화 항체를 측정하고 40미만인 경우 유효 항체 생성에 실패했다고 판정한다.
- [0059] 시험하고자 하는 시료는 채혈한 혈청 시료를 사용할 수 있고, 채혈 후 원심분리기를 이용하여 분리한 혈청 또는 혈장을 사용할 수 있다. 한편, 상기 시료는 더욱 정밀하게 검출하고자 하는 경우에는 필요에 따라 일정 배수로 희석하여 사용할 수도 있다.
- [0060] 본 발명에 따른 독감 바이러스에 대한 중화 항체의 검출 방법은 시알릴락토오스 분자가 표면에 고정된 고상 지지체를 필요로 한다.
- [0061] 이러한 고상 지지체는 항원-효소 또는 항원-항체의 반응 공간을 제공하는 반응부를 포함한 것이면 제한 없이 사용될 수 있고, 시알릴락토오스가 표면에 고정되고 복수의 웰을 갖는 다양한 고상 지지체가 본 발명의 검출 방법에 바람직하게 사용될 수 있다. 본 명세서에 있어서 상기 반응부는 편의상 웰과 상호 교환적으로 사용 된다.
- [0062] 상기 고상 지지체로서 적합한 물질들은, 이에 제한되지 않고, 스티렌 또는 스티렌 유도체들, 디비닐벤젠, 아크릴아미드들, 아크릴레이트 에스테르류, 메타크릴레이트 에스테르류, 비닐 에스테르류, 비닐 아미드류를 포함하는 교차-연결된 합성 폴리머들; 아가로오스, 알기네이트, 카라기난(carrageenan), 젤라틴, 셀룰로오스 같은 천연 폴리머; 또는 셀룰로오스 아세테이트 또는 니트로셀룰로오스 및 실리카, 유리, 특히 유리 섬유들 같은 유도체화된 천연 폴리머;를 포함할 수 있다.
- [0063] 상기 천연 폴리머들은 냉각 또는 2가의 금속 이온들의 첨가 하에서 물리적으로 교차-연결된 네트워크를 자발적으로 형성하는 것으로 알려져 있고, 필요에 따라 화학적 교차-연결자들이 첨가될 수 있다.
- [0064] 상기 지지체는 스트립, 스피어, 막대, 튜브 및 마이크로에세이 또는 마이크로타이터 플레이트의 형태를 취할 수 있다. 페이퍼 스트립, 작은 플레이트 및 막 같은 시트-형 구조들도 마찬가지로 적합하다. 지지체의 표면은 수용성 용액에 대해 투과 가능할 수 있고 통과가능하지 않을 수 있다.
- [0065] 따라서, 요약하면, 상기 지지체 물질은 원칙적으로 본 발명의 시알릴락토오스 분자에 공유결합적 커플링을 허용하는 어떠한 물질일 수 있다[참조문헌: Lee M, Shin I, et al. 2005, Org. Lett. 7: 4269-4272; Fukui S,

Feizi T, Galustian C, Lawson AM, Chai WG, et al. 2002, Nat. Biotechnol. 20: 1011-1017)].

- [0066] 상기 고상 지지체 상에 고정될 수 있는 "시알릴락토오스(sialyllactose)"는 시알산 모이어티에 결합된 락토오스 모이어티(β -D-갈락토피라노실-(1 \rightarrow 4)-D-글루코오스)를 포함하는 분자를 포함할 수 있다. 상기 시알산은 시알산 내 어떠한 가능한 위치에 의해 락토오스와 커플링되고 상기 락토오스 분자 내 어떤 가능한 위치에 커플링될 수 있다. 좀 더 바람직한 형태에 있어서, 상기 시알산은 시알산의 2번째 위치의 하이드록시기를 통해 상기 락토오스에 결합된다(상기 시알산 구조의 넘버링은 하이드록시기를 가지는 탄소에서 시작하여 상기 체인을 돌리서 지속된다). 다른 바람직한 형태에 있어서, 상기 시알산은 상기 락토오스 분자 내 3번째 또는 6번째 위치의 하이드록시기에 의해 상기 락토오스에 결합된다. 보다 바람직한 형태에 있어서, 상기 "시알릴락토오스"는 α 2,3-시알릴-락토오스 또는 α 2,6-시알릴-락토오스이다. 시알릴락토오스는 진핵세포 또는 원핵세포 기원일 수 있다. 바람직하게는 시알릴락토오스는 진핵세포 기원이다. 상기 진핵세포 또는 원핵세포는 병원성이거나 또는 비-병원성일 수 있다. 예를 들어, NeuAca2-3Galb1-3GalNAc, NeuAca2-3Galb1-3(4)GlcNAc, 또는 NeuAca2-6Galb1-4GlcNAc) 내에 시알산을 포함하도록 유도체화 되었던 인간 적혈구들에 결합하는 고정화된 시알로어드히신의 능력에 기반된 고체상(solid phase) 분석에 의해 동정될 수 있다[참조문헌: Vinson M, et al, J. Biol. Chem. 1996; 271:9267-9272].
- [0067] 상기 시알릴락토오스의 더욱 바람직한 예로는, 이에 제한되지 않고, 시알릴올리고당(sialyloligosaccharide), 3'-시알릴락토오스(3'-Sialyllactose), 6'-시알릴락토오스(6'-Sialyllactose), 시알릴락토-N-테트라오스(sialyl lacto-N-tetraose), 디시알릴락토-N-테트라오스(disialyl lacto-N-tetraose) 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 화합물일 수 있다.
- [0068] 시알릴락토오스 분자를 고상 지지체의 웰에 고정시키는 방법은 통상의 표면화학 방법(surface chemistry)을 통하여 수행할 수 있다. 예를 들면 Hartnell A, et al, Blood 2001;97:288-296에 기재된 방법을 이용할 수 있거나 또는 대한민국 특허 제10-1101375호(2011년12월26일)에 기재된 방법을 이용하여도 좋다.
- [0069] 보다 바람직하게는 유리 슬라이드와 같은 고체 기판 상에 다양한 종류의 탄수화물들을 공유결합으로 특정한 위치에 고정화시키는 효율적인 고정화 방법이 사용될 수 있다.
- [0070] 유리기판, 실리콘, 금속기판, 플라스틱 등의 기판 표면에 생체물질을 효율적으로 고정화하기 위한 여러 방법들이 제시되어 왔고 이 중에서도 자기조립 단분자층(self assembled monolayer)을 사용하여 생체분자를 고정화하는 방법이 가장 잘 알려져 있다(참조문헌: Love, J. C. Estroff, L. A. Kriebel, J. K. Nuzzo, R. G. and Whitesides, G. M. Chem. Rev. 2005, 105, 1103).
- [0071] 본 발명의 실시예에서는 대표적인 예로서 독감 바이러스의 HA가 결합하는 시알릴락토오스 분자를 폴리스티렌 플레이트 상의 웰에 고정된 것을 예들 들어 설명하였으나, 본 발명은 이에 제한되지 않는다.
- [0072] 상기 HA 함유 단백질은 독감 바이러스의 HA 서열을 가지고 있는 플라즈미드를 이용해서 E. coli나 세포에서 HA 함유 단백질을 합성하여 준비할 수 있다. 이는 일반적으로 특정 단백질을 합성할 때 사용하는 통상의 방법에 의해 제조할 수 있고, 타겟 단백질에 HRP 등의 서열을 추가하여 합성할 수 있다.
- [0073] HA 함유 단백질의 예로는 his tag conjugated HA, HRP conjugated HA, fluorescence conjugated HA을 들 수 있고, 이들은 상업적으로 입수가능하다. 일례로 his tag conjugated HA는 Sino Biological(제품번호: 11085-V08H-100)에서 상업적으로 구매할 수 있다.
- [0074] 상기 HA 함유 단백질에 결합하는 표지물질을 포함한 항체는 예를 들면, HRP conjugated anti-his tag antibody, 또는 fluorescence conjugated anti-his tag antibody를 들 수 있다. 마찬가지로, 간단하게 합성하거나 상업적으로 구입하거나 이를 변경하여 사용할 수 있다. 또한, 형광을 이용하는 경우 하나의 웰에서 다수의 바이러스 주에 대한 중화 항체를 동시에 측정할 수 있다.
- [0075] 중화 항체의 검출을 위하여 검출하고자 하는 시료를 고상 지지체의 웰 상에 반응시킨 후, 상기 지지체는 어떠한 비결합 항체 등을 실질적으로 제거하기 위해 광범위하게 세척 등의 처리를 하게 된다.
- [0076] 이 때 사용되는 세척액으로는 정제수 또는 PBS 등의 통상의 완충액이 바람직하게 이용될 수 있다. 상기 세척액은 더욱 바람직하게는 폴리소르베이트 20이 0.2% 첨가된 인산염생리식염 완충액(pH 7.2)으로 제조할 수도 있다.
- [0077] 세척 후 웰을 전처리하는 과정을 수행하게 되는데 이러한 전처리 과정은, 예를 들면, TMB 발색 반응액을 처리하는 것을 포함할 수 있다. 특히 발색성 기질인 3,3', 5, 5'-테트라메틸벤지딘(TMB), OPD, 또는 ABTS와 함께 이

용하는 것이 더욱 바람직할 수 있다.

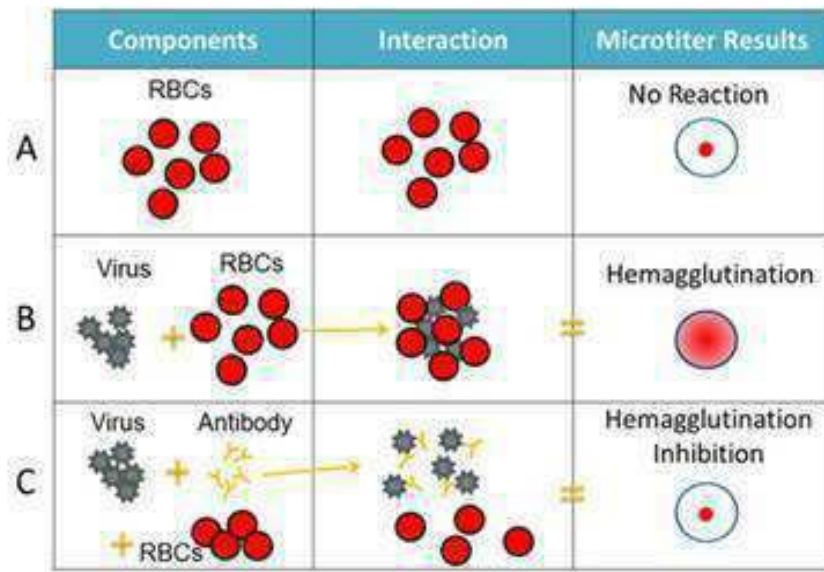
- [0078] 상기 웰을 판독하는 단계에서는 반응의 결과를 육안으로도 관찰할 수 있으나, 결과에 대한 오류를 방지하기 위하여 측정기를 사용하는 것이 더욱 바람직할 수 있다. 위와 같은 반응에 대한 결과 값을 정량화할 수 있는 측정기의 대표적인 예로는 효소면역측정법(ELISA)에 통상적으로 사용되는 판독기(또는 리더기)를 들 수 있다.
- [0079] 본 발명의 방법은 필요에 따라 효소면역측정법에 사용되는 당 업계에 공지된 시약을 추가로 사용할 수도 있다.
- [0080] 이러한 시약의 예로서는 음성대조혈청, 양성대조혈청, 효소활성을 측정할 수 있는 기질액 및 반응 정지액을 포함할 수 있다. 상기 기질액은 사용한 효소의 종류에 따라 달라질 수 있으며, 일례로서는 HRP에 대한 기질액으로서 테트라메틸벤지딘(8mg/ml)과 과산화수소수(20~32%, 0.331ml)를 혼합하여 제조할 수 있다. 상기 반응정지액은 0.5~3N 염산 또는 황산일 수 있다.
- [0081] 표지 물질은 항원항체 복합체의 형성을 정성 또는 정량적으로 측정가능하도록 하기 위한 표지물질로서, 예를 들면, 이에 한정되지는 않으나 β-글루쿠로니다제, β-D-글루코시다제, 우레아제, 퍼옥시다아제, 알칼라인 포스파타아제, 아세틸콜린에스테라아제, 글리코즈 옥시다아제, 핵소키나제, 말레이트 디하이드로게나아제, 글루코스-6-인산디하이드로게나아제, 인버타아제 등을 사용할 수 있다. 바람직하게는 호스 래디쉬 퍼록시다제를 사용할 수 있다.
- [0082] 효소로서 퍼록시다제와 함께 항체들을 표지하는 경우에, 페리오데이트 기술 또는 이중이작용성(heterobifunctional) 시약을 이용하는 것이 가능하다[참조문헌: Nakane P, 등, J. Histochem. Cytochem. 1974; 22:1084-1090 및 Ishikawa E, 등, J. Immunoassay. 1983; 49(3):209-327].
- [0083] <실시예>
- [0084] 이하, 본 발명은 다음의 대표적인 실시예에 의하여 더욱 구체적으로 설명되나, 본 발명이 이들 실시예에 의해 어떤 식으로든 제한되는 것은 아니다.
- [0085] **실시예 1: 플레이트 웰 표면에 대한 시알릴락토오스 분자 고정화**
- [0086] 도 3에 나타난 바와 같이, 96 well PS plate(100)를 O₂ plasma 발생기(100w)에 넣고 5분 동안 처리하여(S100) 수산기(-OH)를 형성시켰다(101). 수산기(-OH)가 형성된 well plate(101)에 0.1% APTES(3-aminopropyltriethoxysilane) 에탄올을 넣고 1시간 동안 실온에서 incubation하고 염산(1M HCl)으로 pH 3~4 맞추어(S102), amino-well plate(102)를 제작하였다. 제작된 amino-well plate(102)에 0.1mM sialyllactose(acetic acid)[6'-sialyllactose sodium salt: Tokyo chemical industry, S0886]를 제조하여 60℃에서 90분 동안 incubation(S103)하여 sialyllactose가 코팅된 96 well plate(103, 104)를 제작하였다.
- [0087] **실시예 2: 스탠다드 샘플 및 타겟 샘플 제작**
- [0088] 먼저, 4개의 튜브에 중화 항체가 160인 reference serum(NIBSC, 10/202)을 2배씩 PBS에 희석해서 항체가 0, 40, 80, 160인 샘플을 제조하였다. 별도로, 시험 대상의 인체로부터 혈액을 채혈 후 원심분리하여 serum을 분리하여 2개의 튜브에 중화 항체를 확인하고자 하는 시료 serum 2개를 준비하였다.
- [0089] **실시예 3: 중화 항체 검출 시험 1**
- [0090] 실시예 1에서 제작된 플레이트의 8개의 well에 재조합 HA-his 단백질(H1N1, A/california/07/2009 virus의 HA-his protein: Sino Biological, 11085-V08H-100)(100ng/ml)을 50μl씩 분주한 후, 4개의 well에는 항체가 상이한 스탠다드 샘플을 50μl씩 분주하고, 4개의 well에는 중화 항체를 확인하고자 하는 시료 2개를 각각 2개의 well에 50μl씩 분주하였다. 그 후, 상기 8개 well에 1:5000으로 희석된 HRP conjugated anti-his tag antibody(abcam, ab1187, Cambridge, UK)를 100μl씩 분주하고, 상온에서 20-30분 인큐베이션하였다.
- [0091] 이어서, PBS 세척액으로 상기 플레이트를 5회 세척하고, 8개 well에 TMB(abcam, ab142042, Cambridge, UK) 100 μl씩 분주한 후 상온에서 발색시켰다. 발색 5-10 분째에 2M H₂SO₄를 100μl씩 분주하여 발색 반응을 멈추었다.
- [0092] ELISA 리더기를 사용하여 450nm에서 흡광도를 측정하여 상기 플레이트를 판독하고, 그 결과를 도 4 및 5에 나타내었다.
- [0093] 도 4는 시험된 웰의 발색 반응을 나타내는 사진이고, 도 5은 시험된 웰의 450nm에서 흡광도를 스탠다드 값에 비교하여 환산한 값을 나타내는 그래프도이다. 도 4 및 5의 결과로부터 sample-1은 중화 항체가 107.5로 나타

났고, sample-2는 중화 항체가가 35.6으로 나타났다.

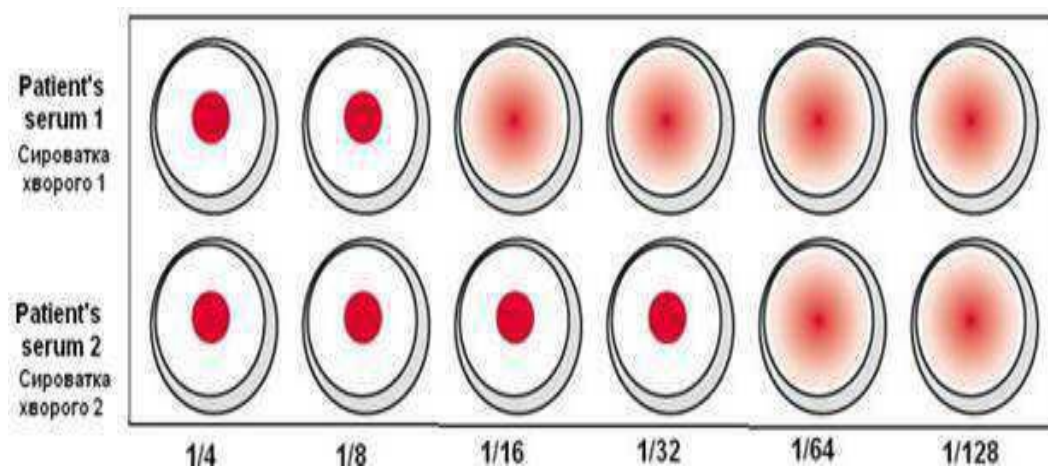
- [0094] 중화 항체가는 40을 기준으로 하여 중화 항체 형성 유무를 판정하므로 시료 1은 중화 항체가가 40 이상이므로 H1N1 influenza virus에 대한 예방 능력이 있고 따라서 백신 접종이 필요 없다. 한편, sample-2는 중화 항체가가 35.6으로 40 미만이므로 H1N1 influenza virus에 대한 예방 능력이 없고 따라서 백신 접종이 필요하다. 이상과 같이, 스탠다드 샘플을 이용해서 타겟 샘플의 중화 항체가를 간단하고 신속하게 측정하는 것이 가능하다.
- [0095] **실시예 4: 중화 항체 검출 시험 2**
- [0096] 도 6에 나타난 바와 같이 다른 바이얼(ep tube) 2개(S1, S2)에 각각 100ng/mL 재조합 HA-발색효소(recombinant hemagglutinin-HRP)를 50 μ l씩 각각 넣고 S1 바이알에는 50 μ l PBS 버퍼만 넣고 S2에는 스탠다드 면역항체가 포함된 혈청(serum)을 50 μ l을 넣어 10분 동안 인큐베이션(incubation)시켰다.
- [0097] 앞서 진행한 시알리락토오스(sialylactose)분자가 고정화된 96well plate 2줄에 인큐베이션(incubation)된 S1 바이알 안에 넣은 혼합용액을 넣고, 또 다른 96 well plate 2줄에 인큐베이션(incubation)된 S2 바이알 안에 넣은 혼합 용액을 넣고 10분 동안 인큐베이션(incubation)하였다. 96well plate S1, S2를 증류수로 여러 번 씻어 주고 TMB 100 μ l를 분주하여 반응시킨 후 질소로 건조하였다. 엘라이자(ELISA) 리더기로 96well plate S1, S2를 측정하였다.
- [0098] 컬럼 S1, S2를 ELISA 리더기로 광학활성 값(optical density)을 확인하고 그 결과를 도 7에 나타내었다. 그 결과 S1은 대략 0.5이고 S2는 0.07정도이어서 독감 백신 접종 후에 중화 항체의 생성 유무를 정량적으로 확인할 수 있다.
- [0099]
- [0100] 이상 설명한 바와 같이 본 발명이 갖는 기술적 차이점은 종래의 적혈구응집억제검사는 생 바이러스를 사용하지만, 본 발명의 검출 방법은 재조합 HA 함유 단백질을 사용함으로써 감염의 위험이 없고, 혈구응집억제검사는 HA binding site로 조류 적혈구를 사용하지만, 본 발명의 방법은 시알릴락토오스를 표면에 코팅해서 사용함으로써 조류 사육 및 채혈이 필요하지 않다. 또한, 혈구응집억제검사는 24시간 이상 소요되지만, 본 발명의 방법은 혈청 전처리 단계가 없기 때문에 항체 형성의 확인에 총 소요 시간을 30분 이내로 단축할 수 있다. 또한, 적혈구응집억제 유무를 검사자의 판단에 의존하여 중화 항체가를 계산하지만, 본 발명의 검사법은 중화 항체가를 기계적으로 계산된 수치로 제시하기 때문에 검사자에 따른 편차가 적다는 이점이 있다.
- [0101] 독감 백신시장은 지속적으로 증가하는 추세이지만 중화 항체를 검사하는 시제품 및 시장은 없기 때문에 본 발명에 의해 새로운 시장을 창출하고 선점할 수 있다.
- [0102] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

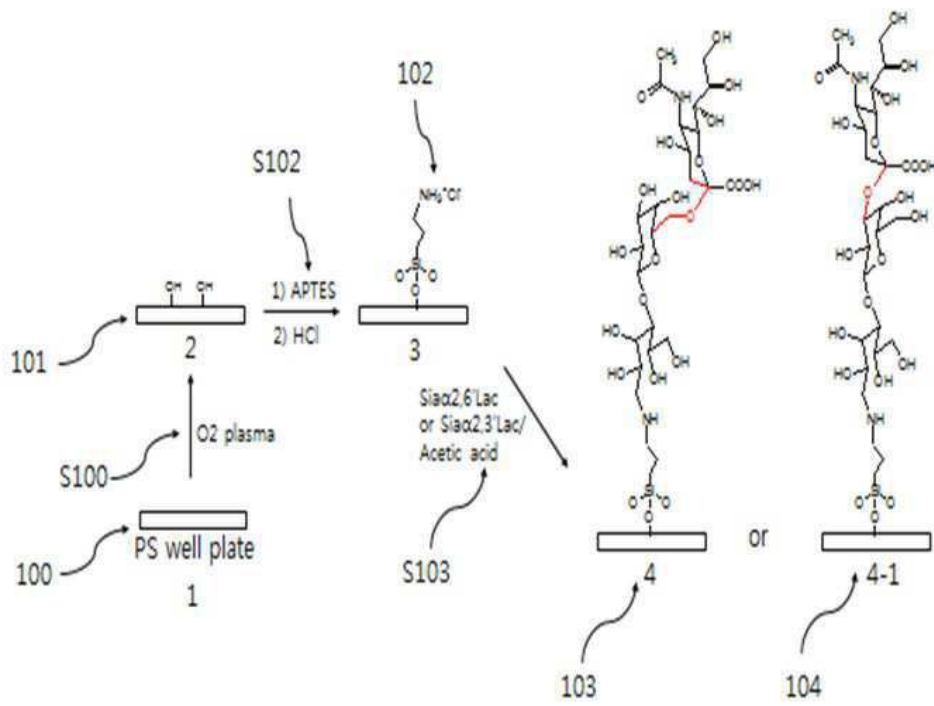
도면1



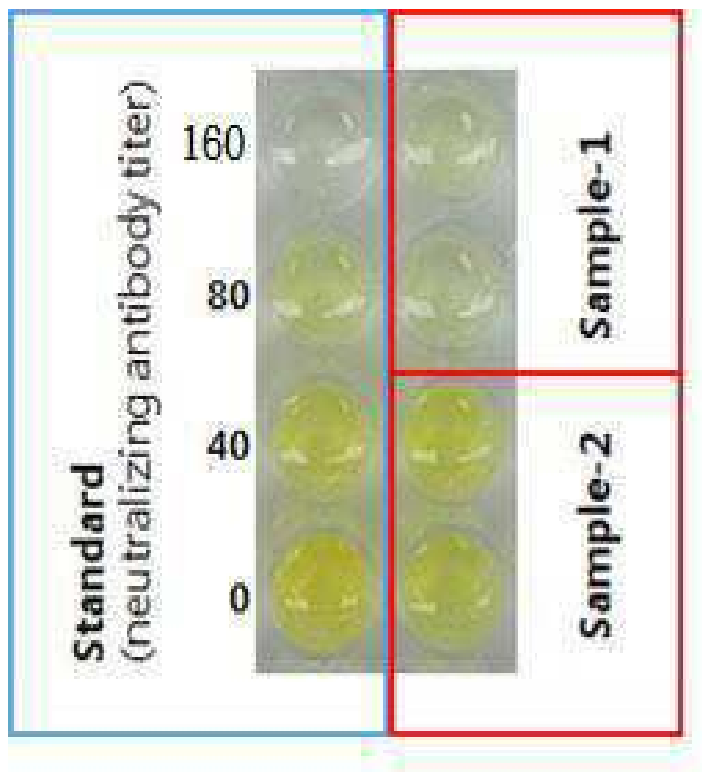
도면2



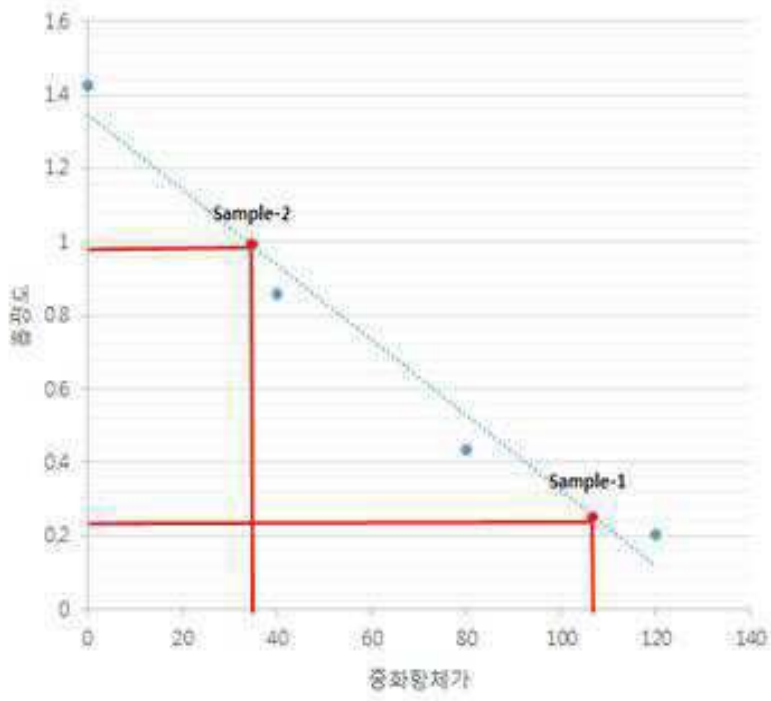
도면3



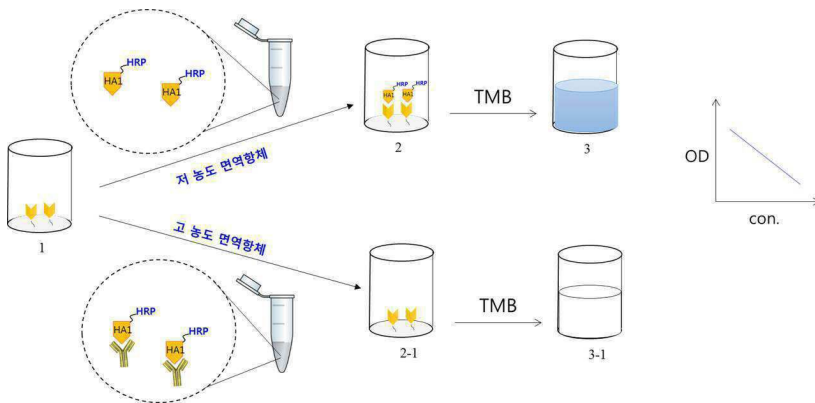
도면4



도면5



도면6



도면7

