



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년11월06일
 (11) 등록번호 10-1794403
 (24) 등록일자 2017년10월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) *G01N 33/533* (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01) *G01N 33/543* (2006.01)

(52) CPC특허분류
G01N 33/6854 (2013.01)
G01N 33/533 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0060344
 (22) 출원일자 2015년04월29일
 심사청구일자 2015년04월29일

(65) 공개번호 10-2016-0128647
 (43) 공개일자 2016년11월08일

(56) 선행기술조사문헌
 WO2013057599 A1*
 NIKOLOV et al., 'Autoantibodies against aquaporins in primary Sjogren's syndrome(pSS)', American College of Rheumatology; 2008 Annual Scientific Meeting (24-29 Oct.)*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
 서울대학교산학협력단
 서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

(72) 발명자
 최영남
 서울특별시 종로구 새문안로3길 23
 알람자한
 (110-460) 서울특별시 종로구 율곡로 189-15

(74) 대리인
 박원미

전체 청구항 수 : 총 11 항

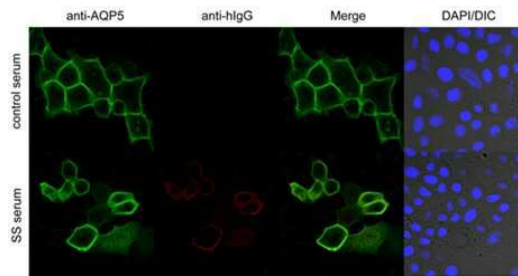
심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 **쇼그렌증후군 특이적 항체반응 검사를 이용한 쇼그렌증후군 진단방법**

(57) 요약

본원은 아쿠아포린 5에 대한 검체의 특이적 반응을 이용하여 쇼그렌증후군을 검출 또는 진단하는 방법 및 키트를 개시한다. 본원에 따른 방법 또는 키트는 기존의 방법으로는 진단이 어려운 쇼그렌증후군을 정확하고 신속하게 진단할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

- G01N 33/535 (2013.01)
- G01N 33/54306 (2013.01)
- G01N 2800/16 (2013.01)
- G01N 2800/18 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI13C0016040014

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 질환극복기술개발사업

연구과제명 쇼그렌 증후군에서 구강세균 특이적 체액성 면역 반응을 표적으로 하는 진단 및 치료제 개

발

기여율 1/2

주관기관 서울대학교 산학협력단

연구기간 2014.06.01 ~ 2015.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014050477

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구사업

연구과제명 구강 면역기능 장애 연구

기여율 1/2

주관기관 서울대학교

연구기간 2014.09.01 ~ 2015.08.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

쇼그렌증후군을 진단하기 위한 정보를 제공하기 위하여,

서열번호 1의 아쿠아포린 5 항원을 제공하는 단계;

상기 항원을 검체와 접촉하는 단계로 상기 접촉에 의해 항원-항체 복합체가 형성되고; 그리고

상기 항원-항체 복합체를 검출하는 단계를 포함하며,

상기 항원-항체 복합체 검출결과가 대조군의 결과와 비교하여 양성인 경우 쇼그렌증후군으로 진단하는, 쇼그렌 증후군 특이적 항체 반응을 이용한 항-아쿠아포린 5 자가항체의 검출방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 검체는 전혈, 혈청, 혈장, 눈물 또는 타액인, 방법.

청구항 3

제 1 항에서 있어서, 상기 항원은 이를 발현하는 세포의 형태로 제공되는 것인, 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 항원-항체 복합체 검출은 FACS (Fluorescence-activated cell sorting), 세포면역염색 방법, 방사상 면역확산 (Radial Immunodiffusion), 면역전기영동 또는 역전류 전기영동을 포함하는 면역침전분석, RIA (Radioimmunoassay) 또는 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)로 수행되는 것인, 방법.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항원-항체 복합체 검출은 검출 항체의 사용을 포함하며, 상기 검출 항체는 인간 IgG 또는 IgA에 특이적으로 결합하며, 상기 검출 항체는 발색단; 알칼라인 포스파타제, 바이오틴, 베타-갈락토시다제 또는 퍼옥시다제를 포함하는 효소; 방사선물질; 또는 콜로이드성 금입자 또는 칼라 라텍스입자를 포함하는 칼라 입자를 포함하는 물질로 표지된 것인, 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 방법은 FACS, 세포면역염색, 덤스틱, ELISA 또는 측방유동분석방법으로 수행되는 것인, 방법.

청구항 7

서열번호 1의 아쿠아포린 5 항원 및 검출항체를 포함하며,

상기 검출 항체는 인간 IgG 또는 IgA에 특이적으로 결합하고, 발색단; 알칼라인 포스파타제, 바이오틴, 베타-갈

락토시다제 또는 퍼옥시다제를 포함하는 효소; 방사선물질; 또는 콜로이드성 금입자 또는 칼라 라텍스입자를 포함하는 칼라 입자를 포함하는 물질로 표지된 것인, 쇼그렌증후군 검출 또는 진단용 키트.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 아쿠아포린 5 항원은 고상지지체에 결합된 것인, 키트.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 고상지지체는 마이크로플레이트, 마이크로어레이, 칩, 유리, 비드 또는 입자, 또는 멤브레인인, 키트.

청구항 10

제 7 항에 있어서, 상기 항원은 세포의 형태로 제공되는 것인, 키트.

청구항 11

서열번호 1의 아쿠아포린 5 단백질 또는 상기 단백질을 발현하는 세포를 포함하는 쇼그렌증후군 검출용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본원은 쇼그렌증후군 특이적 항체반응 검사를 이용한 쇼그렌증후군의 진단과 관련된 기술이다.

배경 기술

[0002] 쇼그렌증후군은 입마름증과 안구건조증을 주 증상으로 하는 질병으로 자가면역반응에 의해 침샘과 눈물샘의 기능저하가 발생한다. 현재 쇼그렌증후군의 진단기준은 1) 입마름증과 안구건조증 측정을 위한 침샘스캔, Schirmer test, 2) 항-Ro, 항-La 자가항체 유무 및 3) 조직 검사에 의한 침샘 내 림프구 침착을 포함한다.

[0003] 미국특허 제8,765,378호는 쇼그렌증후군의 진단방법에 관한 것으로, SP-I, PSP, 및 CA6에 대한 항체의 검사를 통해 쇼그렌증후군을 진단하는 방법을 개시하고 있다.

[0004] 그러나 이러한 진단기준 중 침샘과 눈물샘 기능저하의 원인을 설명하고 질병활성도와 연관된 진단지표가 없는 것이 실정이며, 기타 진단지표에 대한 생물학적 마커의 개발이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본원에서는 쇼그렌증후군의 병인을 설명하고 질병의 활성을 반영하는 마커 및 그 용도를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 한 양태에서 본원은 쇼그렌증후군을 진단하기 위한 정보를 제공하기 위하여, 검체에 포함된 아쿠아포린 5에 대한 자가항체를 검출하는 방법을 제공한다.

[0007] 일 구현 예에서 상기 방법은 아쿠아포린 5 항원을 제공하는 단계; 상기 항원을 검체와 접촉하는 단계로 상기 접

촉에 의해 항원-항체 복합체가 형성되고; 그리고 상기 항원-항체 복합체를 검출하는 단계를 포함하며, 상기 항원-항체 복합체 검출결과가 대조군의 결과와 비교하여 양성인 경우 쇼그렌증후군으로 진단하는 쇼그렌증후군 특이적 항체 반응을 이용하는 것이다.

- [0008] 다른 양태에서 본원은 또한 아쿠아포린 5 항원 및 검출항체를 포함하며, 상기 검출 항체는 인간 IgG 또는 IgA에 특이적으로 결합하고, 발색단; 알칼라인 포스파타제, 바이오틴, 베타-갈락토시다제 또는 퍼옥시다제를 포함하는 효소; 방사선물질; 또는 콜로이드성 금입자 또는 칼라 라텍스입자를 포함하는 칼라 입자를 포함하는 물질로 표지된 것인, 쇼그렌증후군 검출 또는 진단용 키트를 제공한다.
- [0009] 또 다른 양태에서 본원은 또한 아쿠아포린 5 단백질 또는 그 단편 또는 상기 단백질을 발현하는 세포를 포함하는 쇼그렌증후군 검출용 조성물을 제공한다.
- [0010] 본원에 따른 방법, 키트 또는 조성물은 항원-항체 복합체 검출을 포함하며, 이는 예를 들면 FACS ((Fluorescence-activated cell sorting), 세포면역염색방법, 방사상 면역확산 (Radial Immunodiffusion), 면역전기영동 또는 역전류 전기영동을 포함하는 면역침전분석, RIA (Radioimmunoassay) 또는 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)로 수행될 수 있다.
- [0011] 일 구현예에서 본원의 항원-항체 복합체 검출은 검출 항체의 사용을 포함하며, 상기 검출 항체는 인간 IgG 또는 IgA에 특이적으로 결합하며, 상기 검출 항체는 발색단; 알칼라인 포스파타제, 바이오틴, 베타-갈락토시다제 또는 퍼옥시다제를 포함하는 효소; 방사선물질; 또는 콜로이드성 금입자 또는 칼라 라텍스입자를 포함하는 칼라 입자를 포함하는 물질로 표지된 것인, 방법.
- [0012] 본원에 따른 방법, 조성물 또는 키트에서 항원은 아쿠아포린 5 전장 또는 그 단편 또는 상기 단백질을 발현하는 세포의 형태로 제공될 수 있다.
- [0013] 본원에 사용되는 검체는 전혈, 혈청, 혈장, 눈물 또는 타액일 수 있다.

발명의 효과

- [0014] 본원은 아쿠아포린 5에 대한 검체의 특이적 항체 반응을 이용하여 쇼그렌증후군을 검출 또는 진단하는 방법 및 키트를 개시한다. 본원에 따른 방법 또는 키트는 기존의 방법으로는 진단이 어려운 쇼그렌증후군을 정확하고 신속하게 진단할 수 있음은 물론, 질병의 병인을 설명하고 질병의 활성을 반영하여 치료 후 치료효과를 평가하는데 중요한 기능을 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0015] 도 1은 본원의 일 구현예에 따라 사람의 아쿠아포린 5 (AQP5) 단백질을 코딩하는 cDNA 벡터를 MDCK 세포주에 전달하여 발현 시킨 후 대조군 및 환자의 혈청과 반응시킨 후 이를 형광물질로 표지된 2차 항체를 이용하여 염색한 후 주사형광현미경으로 관찰한 결과이다. 대조군으로는 건강한 사람의 혈청을 사용하였으며, 대조군 2차 항체로는 항-hIgG 항체를 사용하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 본원은 쇼그렌증후군 환자에서 아쿠아포린 5 자가항체가 특이적으로 생성되고, 질병활성을 반영하는 주요한 진단마커로 활용될 수 있다는 발견에 근거한 것이다.
- [0017] 따라서 한 양태에서 본원은 쇼그렌증후군을 진단하기 위한 정보를 제공하기 위하여, 아쿠아포린 5 항원을 제공하는 단계; 상기 항원을 검체 또는 생물학적 시료와 접촉하는 단계로 상기 접촉에 의해 항원-항체 복합체가 형성되고; 및 상기 항원-항체 복합체를 검출하는 단계를 포함하며, 상기 검출결과 항원-항체 복합체 검출결과가 양성인 경우 쇼그렌증후군으로 진단하는, 쇼그렌증후군 특이적 항체 반응을 이용한 항-아쿠아포린 5 자가항체의 검출방법에 관한 것이다.
- [0018] 또 다른 양태에서 본원은 아쿠아포린 5를 포함하는 쇼그렌증후군 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0019] 본원에 따른 방법 또는 조성물은 쇼그렌증후군의 발병, 질환의 진행, 질환의 진단 또는 예후에 이용될 수 있다.

- [0020] 쇼그렌증후군은 입마름증과 안구건조증을 주 증상으로 하는 질병으로 자가면역반응에 의해 침샘과 눈물샘의 기능저하가 발생한다. 아쿠아포린 5는 침샘과 눈물샘의 선세포(acinar cell) 및 도관세포(duct cell)에 발현하는 물통로단백질로 물분자가 지질성분인 세포막을 통과하는 통로를 제공한다.
- [0021] 본원에 따른 방법, 조성물 또는 키트는 쇼그렌증후군의 진단에 유용하게 사용될 수 있다. 본 발명의 명세서에서 용어 “진단”은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체 즉 검사 대상자의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는 지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)(예컨대, 진행 단계 결정 또는 치료에 대한 질환의 반응성 결정)를 판정하는 것 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)을 포함한다.
- [0022] 본원에서 검출이란, 정량 및/또는 정성 분석을 포함하는 것으로, 존재, 부존재의 검출 및 농도 측정을 포함하는 것으로 이러한 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 당업자라면 본원의 실시를 위해 적절한 방법을 선택할 수 있을 것이다.
- [0023] 본원에 따른 방법, 조성물 또는 키트는 대상체 또는 검체에 존재하는 아쿠아포린 5에 대한 자가항체를 검출하는 것으로, 항원으로 기능하는 아쿠아포린 5 항원은 공지된 것으로, 유전자 재조합 방법을 통해 합성 분리 및 정제될 수 있으며 예를 들면 상기 항원은 포유류, 특히 인간 유래의 서열로 예를 들면 (GenBank Accession NO: NM_001651.3 (mRNA); NP_001642.1 (단백질)) 이로 한정하는 것은 아니며, 이의 전장 또는 단편이 사용될 수 있으며, 이의 기능적 동등체를 포함하는 것이다. 상기 NP_001642.1 (단백질)은 서열번호 1로 표시된다.
- [0024] 본원에 따른 일 구현예에서 특히 아쿠아포린 5 항원은 이를 발현하는 세포의 형태로 제공될 수 있으며, 특히 이러한 세포는 일 구현예에서 아쿠아포린 5를 포함 모든 아쿠아포린을 발현하지 않는 세포가 사용될 수 있다. 아쿠아포린 5를 발현하지 않는 세포의 경우 아쿠아포린 5를 발현하는 플라스미드를 해당 세포에 전달이입하여, 이를 발현시켜 사용할 수 있다. 예를 들면 본원 실시예에 기재된 것과 같은 MDCK 세포가 사용될 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다. 아쿠아포린 5는 세포막에 존재하는 막관통단백질(transmembrane protein)로 지질막이 아닌 수용액에 존재할 때는 본래의 구조(conformation or folding structure)를 유지하기가 어려워 실제로 침샘이나 눈물샘에 발현하는 아쿠아포린 5에 결합하는 항체의 검출이 어려울 수 있다.
- [0025] 다른 구현예에서 가용성(soluble) 형태로 사용되는 경우에는 아쿠아포린 5의 세포외영역이 사용된다.
- [0026] 본원에 따른 검체 또는 생물학적 시료는 쇼그렌증후군이 의심되는 사람 또는 쇼그렌증후군에 걸린 사람 또는 쇼그렌증후군으로 진단 후 치료를 받고 있는 사람 유래의 검체이다.
- [0027] 이러한 검체는 아쿠아포린 5 자가항체를 검출 할 수 있는 것이면 특별히 제한되지 않으며 검출이 가능한 하나 이상의 성분을 포함하는 물질 또는 물질의 혼합물을 일컫는 것으로 생물체, 특히 인간 유래의 세포, 조직 또는 체액, 예를 들면 타액, 눈물과 같은 체액, 전혈, 혈장, 및 혈청을 포함하나 이로 제한하는 것은 아니다. 본원에 따른 일 구현 예에서는 혈액, 특히 혈청이 사용된다.
- [0028] 본원에 따른 방법에서 항원-항체 복합체는 공지된 다양한 방법을 이용하여 검출될 수 있다. 예를 들면 항원-항체 복합체는 방사상 면역확산 (Radial Immunodiffusion), 면역전기영동 또는 역전류 전기영동을 포함하는 면역 침전분석, RIA (Radioimmunoassay) 또는 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)로 검출될 수 있다. 이런 방식의 검출은 특히 항원이 가용성 단백질로 제공되는 경우에 유리하며, 일 구현예에서는 아쿠아포린 5의 세포 외영역 단백질 부분이 항원으로 제공될 수 있다. 본원에 따른 일구현예에서는 ELISA 방법, 특히 샌드위치 방식의 ELISA가 사용되며, 이 경우 후술하는 검출항체가 또한 사용된다.
- [0029] 다른 구현예에서 항원이 세포의 형태로 제공되는 경우에는 세포기반 분석 방법 예를 들면 FACS(Fluorescence-activated cell sorting) 분석법, 항체를 이용한 세포면역염색방법 예를 들면 본원 실시예에 기재된 바와 같은 면역형광세포염색(immunofluorescence cell staining)이 사용될 수 있다.
- [0030] 항원-항체 복합체 검출 과정을 통해 검체의 최종적인 시그널의 세기를 분석하고 이를 정상 대조군의 시료의 시그널과 비교하여, 이 보다 높은 경우 쇼그렌증후군으로 진단하거나, 치료 경과에 대한 판단을 할 수 있다.
- [0031] 본원에 따른 일 구현예에서, 항원-항체 복합체의 검출을 위해, 항원이 후술하는 표지물질로 표지되거나 또는 검출항체 또는 2차 항체가 사용된다.
- [0032] 본원에 따른 방법에 사용될 수 있는 검출 항체는 인간 IgG 또는 IgA에 특이적으로 결합하며, 상기 검출항체는

시각적 또는 다양한 이미지 검출 장비를 이용하여 검출할 수 있는 물질로 표시될 수 있다.

- [0033] 본원에 따른 일 구현예에서 본원에 따른 항원 또는 검출항체는 표지물질로서 호스라디쉬 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase)와 같은 퍼옥시다제, 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase), 글루코오스 옥시다아제(glucose oxidase), 베타-갈락토시다아제(beta-galactosidase), 유레아제(urease), 카탈라아제(catalase), 아스파르기나아제(asparaginase), 리보뉴클레아제(ribonuclease), 말레이트 데하이드로지나아제(malate dehydrogenase), 스태필로코칼 뉴클레아제(staphylococcal nuclease), 트리오스 포스페이트 이소머라아제(triose phosphate isomerase), 글루코오스-6-포스페이트 데하이드로지나아제(glucose-6-phosphate dehydrogenase), 글루코아밀라아제(glucoamylase), 그리고 아세틸콜린 에스터라아제(acetylcholine esterase)와 같이 특정 기질(substrate)의 존재하에서 화학반응을 촉매하여 검출가능한 발색반응 또는 광을 방출할 수 있는 효소로 표시될 수 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 다른 구현예에서, 본원에 따른 항원 또는 검출항체는 광의 조사에 의해 조사된 광과 상이한 파장의 광을 방출하는 바이로루미네스스, 케미루미네스스, 일렉트로루미네스스, 일렉트로케미루미네스스 및 포토루미네스스에 사용되는 발색단으로 예를 들면 단백질로서 그린형광단백질; 유기화합물로서 플루오르세인 이소티오시아네이트(fluorescein isothiocyanate), 로다민(rhodamine), 파이코에리쓰린(phycoerythrin), 파이코시아닌(phycoyanin), 알로파이코시아닌(allophycocyanin), 그리고 플루오르카민(fluorecamine)을 포함하나 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 또 다른 구현예에서, 본원에 따른 항원 또는 검출항체는 다양한 방사선 동위원소 물질로 표시될 수 있다.
- [0036] 본원에서 표지물질의 검출은 예를 들어 방사선동위원소인 경우 신틸레이션 카운터(scintillation counter)에 의해 수행할 수 있으며, 예를 들어 표지물질이 형광물질인 경우, 스펙트로스코피, 포스포이미징 장치 또는 형광계측기 등과 같은 방법에 의해 수행할 수 있다. 효소로 표시된 경우, 적절한 기질의 존재하에서 효소에 의한 발색성 기질의 변환에 의해 나타나는 발색 산물을 계측을 함으로써 수행할 수 있다. 또한, 적당한 표준 혹은 대조군과의 비교를 통해 효소반응에 의해 나타나는 발색 산물의 색 비교로서 탐지할 수 있다.
- [0037] 일 구현예에서 본원에 따른 항원 또는 검출항체는 예를 들면 발색단; 알칼라인 포스파타제, 바이오틴, 베타-갈락토시다제 또는 퍼옥시다제를 포함하는 효소; 방사선물질; 또는 콜로이드성 금입자 또는 착색 라텍스입자 등과 같은 나노입자를 포함하는 물질을 포함하나, 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0038] 다른 양태에서 본원은 또한 상기한 본원에 따른 방법에 사용되는, 아쿠아포린 5 항원이 흡착된 고상지지체 및 검출항체를 포함하며, 상기 검출 항체는 인간 IgG에 특이적으로 결합하고, 상기 항원 또는 검출 항체는 발색단; 알칼라인 포스파타제, 바이오틴, 베타-갈락토시다제 또는 퍼옥시다제를 포함하는 효소; 방사선물질; 또는 콜로이드성 금입자 또는 착색 라텍스입자를 포함하는 나노입자를 포함하는 물질로 표시되는 것인 쇼그렌증후군 검출 또는 진단용 키트를 제공한다.
- [0039] 본원에 따른 키트에 포함되는 구성 중 상술한 바와 중복되는 것은 위의 기재를 참고할 수 있다.
- [0040] 본원에 따른 키트에서 본원에 따른 항원은 96웰 마이크로웰플레이트와 같은 마이크로웰플레이트, 콜로이드성 금입자 또는 착색 라텍스 입자를 포함하는 비드 또는 입자 또는 셀룰로스, 나이트로셀룰로스, 폴리에테르셀론, 폴리비닐리딘, 플루오라이드, 나일론, 하전나일론 및 폴리테트라플루오로에틸렌 등과 같은 멤브레인에 부착될 수 있다. 부착 또는 코팅하는 방법은 공지된 방법을 사용할 수 있으며, 예를 들면 본원 실시예에 기재된 것을 참고할 수 있다.
- [0041] 일 구현예에서 본원에 따른 방법 또는 키트는 ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), RIA (Radio Immuno Assay) 등과 같은 샌드위치 방식의 면역분석방식으로 사용될 수 있다. 이러한 방법은 고상의 기질 예를 들면 글라스, 플라스틱 (예를 들면 폴리스티렌), 폴리카라이드, 나일론 또는 나이트로셀룰로스로 제작된 비드, 멤브레인, 슬라이드 또는 마이크로웰플레이트에 결합된 항원에 검체를 추가한 후, 직접 또는 간접 검출이 가능한 표지물질 예를 들면 상술한 바와 같은 3H 또는 125I와 같은 방사성 물질, 형광물질, 화학발광물질, 햅텐, 바이오틴, 디그옥시제닌 등으로 표시되거나 또는 기질과의 작용을 통해 발색 또는 발광이 가능한 호스라디쉬 퍼옥시다제, 알칼라인 포스파타제, 말레이트 데하이드로게나아제와 같은 효소와 컨쥬게이션된 항체와의 결합을 통해 정성 또는 정량적으로 검출 할 수 있다. 또한 면역분석 방법은 Enzyme Immunoassay, E. T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1980; Gastra, W., Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), in Methods in Molecular Biology, Vol. 1, Walker, J.M. ed., Humana Press, NJ, 1984 등에 기재되어 있다. ELISA 키트는 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 발색단(chromophores), 효소(예: 항체와 컨쥬게

이트됨) 등과 같은 상술한 물질로 표지된 2차 검출항체 및 검출에 사용되는 기질 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0042] 다른 구현예에서, 본원에 따른 방법 또는 키트는 마이크로어레이를 포함하는 어레이 또는 칩의 형태로 사용될 수 있다. 유리 또는 나이트로셀룰로스와 같은 지지체의 표면에 항원이 부착될 수 있으며, 어레이 제조 기술은 예를 들면 Schena et al., 1996, Proc Natl Acad Sci USA. 93(20):10614-9; Schena et al., 1995, Science 270(5235):467-70; 및 U.S. Pat. Nos. 5,599,695, 5,556,752 또는 5,631,734를 참조할 수 있다. 형광 광도는 스캐닝 콘포칼 현미경이 사용될 수 있으며, 예를 들면 Affymetrix, Inc. 또는 Agilent Technologies, Inc 등에서 입수할 수 있다.

[0043] 또한 본원에 따른 방법 또는 키트는 분석양태에 따라 딥스틱 래피드(dip stick rapid kit) 형태로 사용된다. 딥스틱의 경우, POCT (Point of Care Treatment) 분야에서 널리 이용되는 기술로, 본원에 따른 항원이 나이트로셀룰로스와 같은 기질에 결합되어 있고, 이를 혈청과 같은 시료와 접촉시 예를 들면 딥스틱의 일 말단을 혈청시료에 담그면, 시료가 모세관 현상에 의해 기질을 이동하여, 기질 중의 항체와 결합시 발색하는 방식으로, 검출하는 것이다.

[0044] 또한 본원의 키트는 분석양태에 따라 측방유동분석에 사용될 수 있다. 측방유동 분석(lateral flow assay)은 검체에 포함된 특정 물질, 예를 들면 특정 핵산 또는 단백질을 정량 또는 정성적으로 측정하는 방법으로, 예를 들면 항원이 특정 위치에 결합되어 있는 나이트로셀룰로스 멤브레인(전개용 매질)을 이용하여 크로마토그래피 방법으로 분석물을 이동시켜 항원 항체 반응을 통해 시료 중의 특정 핵산 또는 단백질을 검출하는 방법이다.

[0045] 또한 본원의 키트는 본원에 따른 바이오 마커의 사용법에 관한 안내서를 포함할 수 있다. 또한 대조군에 특이적인 항체 또는 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0046] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위해서 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 본 발명이 하기의 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0047]

실시예

[0049] 실시예 1 아쿠아포린 5 (AQP5)를 과발현하는 MDCK 세포주 (MDCK-AQP5) 제조

[0050] AQP5를 코딩하는 cDNA (GenBank No: NM_001651)를 수득한 후 (서울대학교 치의학대학원 박경표 교수), 이를 pcDNA3.1 벡터 (Invitrogen, USA)에 클로닝하여 pcDNA3.1-AQP5 플라스미드를 수득하였다.

[0051] 이어 이를 MDCK 세포 (Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells, 한국세포주은행)에 칼슘포스페이트 방법을 이용하여 전달입한 후 이를 G418(Sigma)을 함유하는 MEM (Minimum Essential) 배지에서 5% CO₂, 37도의 조건에서 배양하여 아쿠아포린 5를 특이적으로 발현하는 세포를 선별하였다.

[0052] 실시예 2 면역형광염색

[0053] 실시예 1에서 준비한 MDCK-AQP5 세포를 커버슬립 위에 배양하였다. 이어 상기 MDCK-AQP5 세포를 400 μM cAMP (Sigma)로 24시간 자극하여 AQP5가 세포질에서 세포막으로 이동하도록 유도하였다.

[0054] 이어 배양한 세포를 4% 파라포름알데하이드로 0.5 시간 동안 고정하고, 상기 고정된 세포에서 항원복구 (antigen retrieval)를 위해 소디움사이트레이트 완충액 (10 mM Sodium citrate, 0.05% Tween-20, pH 6.0)를 첨가해 105도에서 20분간 가열하였다.

[0055] 이어 상기 세포에 일차항체를 첨가해 밤새 4도에서 배양하였다. 일차항체로는 1:100으로 희석한 염소 유래 AQP5-특이 항체 (Santa Cruz), 그리고 1:200으로 희석한 환자 (미국 및 유럽 류마티스 학회 기준에 따라 침샘스캔, Schimer's test, anti-Ro/anti-La 자가항체, 조직검사를 통해 진단) 또는 정상 대조군의 혈청을 함께 사용하였다. 총 검체로 대조군 혈청 35개와 환자 혈청 100개를 분석하였다. 이어 일차항체와 배양한 세포에서 결합하지 않은 일차항체를 PBS로 3회 세척하였다. 이어 2차항체로 Alexa Fluor 488이 결합된 donkey anti-goat IgG 항체 (Santa Cruz)와 CF-594가 결합된 anti-인간 IgG 항체 (Sigma)를 첨가해 상온에서 두 시간 배양한 후 결합하지 않은 2차항체를 증류수로 3회 세척하였다. 세포는 주사형광현미경(Carl Zeiss, 400배)으로 관찰하였다.

[0056] 결과는 도 1에 기재되어 있다. 이에 나타난 바와 같이 AQP5 특이 항체 염색결과 AQP5가 주로 세포막에 위치해 있고 일부 세포질에도 발현되어 있는 것을 잘 보여준다. 또한 대조군 혈청은 MDCK-AQP5 세포를 염색하지 못하는 반면 쇼그렌환자 혈청 중 항-AQP5 자가항체가 존재하는 혈청은 AQP5를 발현하는 MDCK 세포만 염색하며 염색 시그널이 AQP5-특이 항체에 의한 시그널과 잘 겹치는 것을 알 수 있다.

[0057] 또한 대조군 혈청 35개와 환자 혈청 100개를 검색했을 때 기준점 설정에 따라 다음 표 1과 같은 검출 결과를 얻었다. 표 1은 대조군과 쇼그렌증후군 환자에서 항-아쿠아포린5 자가항체 검출빈도이고, 검출빈도는 증례수 (%)로 표시하였다.

[0058] [표 1]

	대조군 (n=35)	쇼그렌증후군 (n=100)
기준점 1	0 (0)	31 (31%)
기준점 2	3 (8.7%)	46 (46%)
기준점 3	5 (14.3%)	55 (55%)

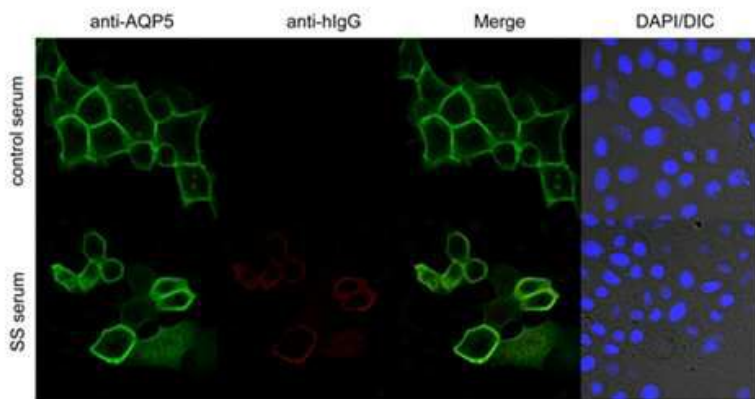
[0059]

[0060] 이상에서 본원의 예시적인 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본원의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본원의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본원의 권리범위에 속하는 것이다.

[0061] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.

도면

도면1



서열목록

- <110> Seoul National University R&DB Foundation
- <120> Method and kit for diagnosing Sjogren syndrome based on antigen-specific antibody detection
- <130> DP201504007P

<160> 1
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 265
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220><221> PEPTIDE
 <222> (1)..(265)
 <223> Aquaporin 5
 <400> 1

Met Lys Lys Glu Val Cys Ser Val Ala Phe Leu Lys Ala Val Phe Ala
 1 5 10 15
 Glu Phe Leu Ala Thr Leu Ile Phe Val Phe Phe Gly Leu Gly Ser Ala
 20 25 30
 Leu Lys Trp Pro Ser Ala Leu Pro Thr Ile Leu Gln Ile Ala Leu Ala
 35 40 45
 Phe Gly Leu Ala Ile Gly Thr Leu Ala Gln Ala Leu Gly Pro Val Ser
 50 55 60
 Gly Gly His Ile Asn Pro Ala Ile Thr Leu Ala Leu Leu Val Gly Asn
 65 70 75 80
 Gln Ile Ser Leu Leu Arg Ala Phe Phe Tyr Val Ala Ala Gln Leu Val
 85 90 95
 Gly Ala Ile Ala Gly Ala Gly Ile Leu Tyr Gly Val Ala Pro Leu Asn
 100 105 110
 Ala Arg Gly Asn Leu Ala Val Asn Ala Leu Asn Asn Asn Thr Thr Gln
 115 120 125
 Gly Gln Ala Met Val Val Glu Leu Ile Leu Thr Phe Gln Leu Ala Leu
 130 135 140
 Cys Ile Phe Ala Ser Thr Asp Ser Arg Arg Thr Ser Pro Val Gly Ser
 145 150 155 160
 Pro Ala Leu Ser Ile Gly Leu Ser Val Thr Leu Gly His Leu Val Gly
 165 170 175

Ile Tyr Phe Thr Gly Cys Ser Met Asn Pro Ala Arg Ser Phe Gly Pro
 180 185 190
 Ala Val Val Met Asn Arg Phe Ser Pro Ala His Trp Val Phe Trp Val
 195 200 205
 Gly Pro Ile Val Gly Ala Val Leu Ala Ala Ile Leu Tyr Phe Tyr Leu
 210 215 220
 Leu Phe Pro Asn Ser Leu Ser Leu Ser Glu Arg Val Ala Ile Ile Lys
 225 230 235 240

 Gly Thr Tyr Glu Pro Asp Glu Asp Trp Glu Glu Gln Arg Glu Glu Arg
 245 250 255
 Lys Lys Thr Met Glu Leu Thr Thr Arg
 260 265