



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0139888  
(43) 공개일자 2016년12월07일

- |   |   |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/> <i>G01N 33/569</i> (2006.01) <i>G01N 33/532</i> (2006.01)<br/> <i>G01N 33/543</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류<br/> <i>G01N 33/56933</i> (2013.01)<br/> <i>G01N 33/532</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2015-0075766<br/> (22) 출원일자 2015년05월29일<br/> 심사청구일자 2015년05월29일</p> | <p>(71) 출원인<br/> <b>연세대학교 산학협력단</b><br/> 서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)</p> <p>(72) 발명자<br/> <b>조상래</b><br/> 서울특별시 양천구 목동동로 430<br/> <b>허윤경</b><br/> 경기도 수원시 영통구 매영로 310번길 12<br/> (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인<br/> <b>박원미</b></p> |
|---|---|

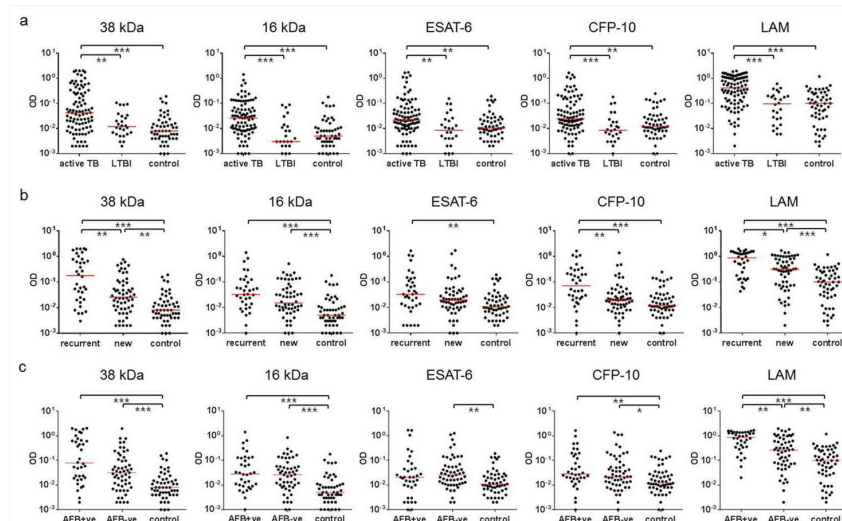
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **결핵 특이적 항원에 대한 항체반응검사를 이용한 결핵 진단 방법**

### (57) 요약

본원은 38 kDa, 16 kDa, ESAT-6, CFP-10, 및 LAM 항원에서 선택되는 항원의 조합에 대한 검체의 특이적 반응을 이용하여 활동성, 잠복성 또는 재발성 결핵인지를 구별하고, 특히 객담도말검사에서 음성으로 판단된 검체가 활동성 결핵인지 여부를 진단 또는 검출하는 방법 및 키트를 개시한다. 본원에 따른 방법 또는 키트는 기존의 방법으로는 진단이 어려운 객담도말 음성의 검체가 활동성 결핵, 잠복성 결핵 또는 재발성 결핵인지 여부를 높은 민감도와 특이성으로 진단할 수 있어, 단독으로, 또는 기존의 도말 방법과 함께 결핵을 정확하게 신속하게 판별할 수 있다.

### 대표도



(52) CPC특허분류

**G01N 33/54306** (2013.01)

**G01N 2800/26** (2013.01)

(72) 발명자

**김아름**

서울특별시 서대문구 통일로 279-75

**김대연**

전라남도 광주 남구 제석로 80번안길 11

**김안식**

전라남도 목포시 원산주택로 25

**강영애**

서울특별시 서초구 방배선행길 1

**김연**

강원도 원주시 흥업면 세동길 13

**이혜준**

서울특별시 강남구 언주로 203

**이혜영**

강원도 원주시 시청로 92

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI14C1324

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 연구중심병원육성 R&D

연구과제명 결핵퇴치 가속화를 위한 DNA결핵백신 및 저비용 신속 진단기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 연세대학교 세브란스병원

연구기간 2015.04.01 ~ 2016.01.31

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

검체가 활동성 결핵, 잠복성 결핵 또는 재발성 결핵인지를 진단하기 위한 정보를 제공하기 위하여,

38 kDa, 16 kDa, ESAT-6, CFP-10, 및 LAM 항원을 제공하는 단계;

상기 각 항원을 검체와 접촉하는 단계로 상기 접촉에 의해 상기 각 항원에 대하여 항원-항체 복합체가 형성되고;

상기 항원-항체 복합체를 검출하는 단계; 및

상기 검출결과 i) 상기 38 kDa, 16 kDa, ESAT-6, CFP-10 및 LAM 항원에 대한 항원-항체 복합체의 형성이 정상 대조군의 결과와 비교하여 높은 경우 상기 검체를 활동성 결핵으로, ii) 상기 38 kDa, 16 kDa, ESAT-6, CFP-10, 및 LAM 항원에 대한 항원-항체 복합체 형성이 정상 대조군의 결과와 동일하거나 높지만 상기 i)의 활동성 결핵으로 판단된 경우보다 낮은 경우 상기 검체를 잠복성 결핵으로, 그리고 iii) 상기 38 kDa, CFP-10, 및 LAM 항원에 대한 항원-항체 복합체 형성이 정상 대조군 및 신환자 대조군과 비교하여 높은 경우 상기 검체를 재발성 결핵으로 판단하는 단계를 포함하는, 결핵 항원 특이적 항체 반응을 이용한 결핵감염 여부 판단 방법.

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 검체는 객담도말검사 음성으로 판단된 검체로, 이 경우 상기 판단하는 단계에서, 상기 38 kDa 및 16 kDa 항원에 대한 항원-항체 복합체 형성이 정상대조군의 결과와 비교하여 높은 경우, 상기 검체를 활동성 결핵으로 조기 판단하는 단계를 포함하는, 결핵 항원 특이적 항체 반응을 이용한 결핵감염 여부 판단 방법.

#### 청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 검체는 전혈, 혈청, 혈장, 가래, 소변, 흉수, 복수액, 뇌척수액 또는 기관지 폐포 세척액(brocho alveolar lavage)인, 방법.

#### 청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 항원-항체 복합체 검출은 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 IgG에 특이적으로 결합하며, 상기 검출 항체는 발색단; 알칼라인 포스파타제, 바이오틴, 베타-갈락토시다제 또는 펴옥시다제를 포함하는 효소; 방사선물질; 또는 콜로이드성 금입자 또는 칼라 라텍스입자를 포함하는 칼라 입자를 포함하는 물질로 표지된 것인, 방법.

## 청구항 6

제 4 항에 있어서, 상기 방법은 덤스틱, ELISA 또는 측방유동분석방법으로 수행되는, 방법.

## 청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 방법은 도말검사 방법과 함께 사용되는, 방법.

## 청구항 8

제 1 항에 따른 방법에 사용되는, 38 kDa, 16 kDa, ESAT-6, CFP-10 및 LAM 항원이 흡착된 지지체 및 검출항체를 포함하며,

상기 검출 항체는 인간 IgG에 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, 인비트로에서 활동성 결핵, 잠복성 결핵, 또는 재발성 결핵 감염 검출 또는 진단용 키트.

## 청구항 9

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

## 청구항 10

제 7 항에 있어서, 상기 키트는 덤스틱, ELISA, 또는 측방유동분석용인, 키트.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 결핵특이항원에 대한 항체반응검사를 이용하여 활동성 결핵, 잠복성 결핵, 또는 재발성 결핵을 감별 진단하고, 특히 객담도말 음성인 결핵을 조기 진단하는 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 결핵(TB)은 *미코박테리아 튜버클레로시스(M. tb)*에 의한 감염성 질병으로, 전 세계적으로 사망의 주요 원인이다. 세계 인구의 약 3분의 1이 결핵균에 잠재적으로 감염되었으며, 2012년에는 약 8백6십 만 건이 새로 발병한 것으로 WHO에 보고되었다.

[0003] 현재 결핵을 진단하는 방법으로 널리 사용되는 것이 결핵균 (항산균(acid-fast bacillus = AFB)) 도말염색 또는 배양으로 결핵균을 임상적으로 분리하여 확인하는 방법이 있다. 상기 도말 염색은 결핵균을 빠르게 탐지하여 전염력이 높은 환자를 신속하게 선별할 수 있다는 장점이 있지만, 배양검사와 비교 시 20-80%정도로 민감성이 낮아서 어린이, 노인 또는 후천성면역결핍환자와 같이 면역시스템이 손상된 환자에서는 실패율이 높다. 국내에서 비결핵 항산균의 분리 빈도가 증가하는 추세여서 도말검사만으로는 활동성 결핵을 진단하기에 불충분하다. 또한 배양 방법은 도말 염색보다는 민감성이 높지만, 결과가 나오기까지 2-6주 정도 걸리고 실험 시설을 필요로 하여 개발도상국 등에서는 적용할 수 없는 문제가 있다.

[0004] 다른 방법으로 사용되는 것이 투베르쿨린시험(TST) 및 IGRA(IFN- $\gamma$  release assay)와 같은 면역학적 방법으로 잠복성 결핵 감염(latent TB infection = LTBI)을 탐지하는 것이다. 상기 방법은 특이성이 높지만, 우리나라와 같이 결핵빈도가 높은 지역에서는 TST 및 IGRA 모두 활동성 결핵과 잠복결핵을 구별하지 못하는 문제점이 있다.

이는 현재 활동성 결핵 및 잠복결핵을 서로 구분할 수 있는 진단법 기준이 없다는 것을 말한다.

- [0005] 또 다른 방법인 혈청학적 진단방법은 간단하고도 비용에 저렴하나 나라, 인종 및 사용한 항원에 따라 일관되지 않은 결과들을 보여주었다 (Steingart KR., 2011. PLoS Med. 8:e1001062).
- [0006] 하지만 전 세계적으로 결핵의 발병률이 증가하고 있어, 민감도와 특이성이 높으면서도 현장에서 간편하게 활용될 수 있는 정확하고 보편적인 결핵 진단검사가 필요한 상황이다. 특히 객담도말 음성인 경우는 정확도가 더욱 떨어지므로, 이에 대한 보완책이 있다면 빠르고도 정확한 결과를 얻을 수 있을 것이다.
- [0007] 대한민국 등록특허 제0361345호에는 결핵균의 항원조성물에 대하여 기재되어 있지만, 객담도말 음성인 경우에는 기재되어 있지 않다.
- [0008] 미국등록 특허 제8,906,388호에는 결핵균 항원을 탐지하는 방법에 대하여 기재되어 있지만 이 역시 객담도말 음성인 경우에는 기재되어 있지 않다.
- [0009] 따라서 객담도말 음성인 경우에도 높은 민감도와 특이도를 지니면서 간편하게 활용될 수 있는 결핵 진단법이 필요하다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0010] 본 발명은 선별적 항원특이항체 검사를 이용하여 활동성 결핵, 잠복성 결핵 또는 재발성 결핵을 구별하고, 특히 객담도말 검사에서 음성을 보인 환자의 결핵감염 여부를 진단하고자 한다.

### 과제의 해결 수단

- [0011] 한 양태에서 본원은 검체가 활동성 결핵, 잠복성 결핵 또는 재발성 결핵인지를 진단하기 위한 정보를 제공하기 위하여, 38 kDa, 16 kDa, ESAT-6, CFP-10, 및 LAM 각 항원을 제공하는 단계; 상기 각 항원을 검체와 접촉하는 단계로 상기 접촉에 의해 각 항원에 대한 항원-항체 복합체가 형성되고; 상기 항원-항체 복합체를 검출하는 단계; 및 상기 검출 결과를 판단하는 단계를 포함하며, 상기 검출 결과를 판단 또는 해석하는 단계에서 상기 검출 결과 i) 상기 38 kDa, 16 kDa, ESAT-6, CFP-10, 및 LAM 항원에 대하여 정상 대조군의 결과와 비교하여 항원-항체 복합체의 형성이 높은 경우 활동성 결핵으로, ii) 상기 38 kDa, 16 kDa, ESAT-6, CFP-10, 및 LAM 항원에 대하여 정상 대조군의 결과와 동일하거나 높지만 상기 활동성 결핵의 경우보다 낮은 경우, 잠복성 결핵으로 iii) 상기 38 kDa, CFP-10, 및 LAM 항원에 대하여 정상 대조군 및/또는 신환자 대조군과 비교하여 항원-항체 복합체 형성이 높은 경우 재발성 결핵으로 판단하는 단계를 포함하는, 결핵 항원 특이적 항체 반응을 이용한 결핵감염 여부 판단 방법을 제공한다.
- [0012] 일구현예에서 본원에 따른 방법에 사용되는 검체는 객담도말검사에서 음성으로 판단된 검체이며, 이 경우, 상기 판단하는 단계에서, 상기 38 kDa 및 16 kDa 항원에 대한 항체 형성이 정상 대조군과 비교하여 높은 경우, 상기 검체를 활동성 결핵으로 조기 판단하는 단계를 포함한다.
- [0013] 일구현예에서 본원에 따른 방법에 사용될 수 있는 검체는 전혈, 혈청, 혈장, 가래, 소변, 흉수, 복수액, 뇌척수액 또는 기관지 폐포 세척액(brocho alveolar lavage)을 포함하나, 이로 제한하는 것은 아니다.
- [0014] 본원에 따른 방법에서 항원-항체 복합체 검출은 기존에 공지된 방법을 이용하여 수행될 수 있으며, 이로 제한하는 것은 아니나, 방사상 면역확산 (Radial Immunodiffusion), 면역전기영동 또는 역전류 전기영동을 포함하는 면역침전분석, RIA (Radioimmunoassay) 또는 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)를 포함하는 방법 중 하나 이상을 이용하여 수행될 수 있다.
- [0015] 본원에 따른 방법에서 항원-항체 복합체 검출은 검출 항체의 사용을 추가로 포함할 수 있으며, 이러한 검출 항체는 인간 IgG에 특이적으로 결합하며 발색단; 알칼라인 포스파타제, 바이오틴, 베타-갈락토시다제 또는 퍼옥시다제를 포함하는 효소; 방사선물질; 또는 콜로이드성 금입자 또는 칼라 라텍스입자를 포함하는 칼라 입자를 포함하는 물질로 표지될 수 있다.

- [0016] 본원에 따른 방법은 덤스틱, ELISA 또는 측방유동분석방법의 형태로 수행될 수 있다.
- [0017] 본원에 따른 방법은 또한 객담 도말검사 방법과 함께 사용될 수 있으나, 특별히 순서를 제한하는 것은 아니며, 도말검사 전, 후 또는 함께 사용될 수 있다.
- [0018] 다른 양태에서 본원은 또한 본원에 개시된 방법에 사용되는, 38 kDa, 16 kDa, ESAT-6, CFP-10 및 LAM 항원이 흡착된 지지체 및 검출항체를 포함하며, 상기 검출 항체는 인간 IgG에 특이적으로 결합하고, 발색단; 알칼라인 포스파타제, 바이오틴, 베타-갈락토시다제 또는 퍼옥시다제를 포함하는 효소; 방사선물질; 또는 콜로이드성 금 입자 또는 칼라 라텍스입자를 포함하는 칼라 입자를 포함하는 물질로 표지된 것인, 인비트로에서 활동성 결핵, 잠복성 결핵, 또는 재발성 결핵 감염 검출 또는 진단용 키트를 제공한다.
- [0019] 일구현예에서 지지체는 고상지지체로 예를 들면 마이크로플레이트, 마이크로어레이, 칩, 유리, 비드 또는 입자, 또는 멤브레인을 포함하나 이로 제한하는 것은 아니다.
- [0020] 본원에 따른 키트는 덤스틱, ELISA, 또는 측방유동분석용으로 사용될 수 있으나, 이로 제한하는 것은 아니다.

### 발명의 효과

- [0021] 본원은 38 kDa, 16 kDa, ESAT-6, CFP-10, 및 LAM 항원에서 선택되는 항원의 조합에 대한 검체의 특이적 반응을 이용하여 활동성, 잠복성 또는 재발성 결핵을 구별하고 객담도말검사서 음성으로 판단된 검체가 활동성 결핵 인지 여부를 진단 또는 검출하는 방법 및 키트를 개시한다. 본원에 따른 방법 또는 키트는 기존의 방법으로는 진단이 어려운 객담도말 음성의 검체가 활동성 결핵인지 잠복성 결핵인지를 진단하고, 결핵감염자가 처음 발병한 결핵인지 재발성 결핵인지 여부를 높은 민감도와 특이성으로 진단할 수 있어, 단독으로, 또는 기존의 도말 방법과 함께 결핵을 정확하게 신속하게 판별할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 본원에서 실시한 실험에 참여한 인원을 나타낸다. 총, 159명의 활동성 TB 환자, 51명의 TB 접촉군, 및 133명의 건강한 대조군을 국립목포병원 및 세브란스병원에서 모집하였다. 이들 중에서, 94명의 결핵환자에서 감염된 결핵균주의 유전자형이 확인되었다. QFT-IT 테스트 및 TST에 근거하여, 26명의 접촉군은 LTBI로, 그리고 54명은 정상의 건강한 대조군인 것으로 확인되었다. 총 94명의 결핵환자 중 객담도말 검사를 받은 91명의 환자 가운데 55명의 환자가 객담도말검사서 음성을 보였고, 36명의 환자가 양성을 나타냈다.

도 2는 감염 상태 및 TB 재발에 따른 결핵항원-특이적 IgG 반응을 나타낸 것이다. (a) 결핵환자(n=94)는, LTBI(n=26) 및 대조군(n=54)과 비교하여, 테스트한 모든 항원에 대한 IgG 반응이 유의하게 더 높았으며, 반면 LTBI 및 대조군 사이에는 IgG 반응에 유의한 차이점이 없었다. (b) 결핵 항원-특이적 IgG 반응을 재발 결핵(n=36) 및 새로 발병한 경우(n=58) 간의 비교결과이다. 재발한 경우엔 새로 발병한 경우와 비교하여 38 kDa, CFP-10, 및 LAM에 대한 IgG 반응이 유의하게 더 높게 나타났다. 38 kDa 및 LAM에 대한 IgG 반응 또한 새로 발병한 경우와 대조군 사이가 서로 달랐으며, 반면 ESAT-6 및 CFP-10은 상기 그룹 사이에 차이가 없었다. IgG 반응의 중간 레벨을 붉은색 수평바로 표시하였다(\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001). (c) LAM에 대한 중간 IgG 반응은 AFB-도말 검사결과 음성인 환자(AFB-ve, n=55)보다는 양성인 환자(AFB+ve, n=36)에게서 유의하게 더 높았다. 그러나, AFB-도말 음성인 환자 모두는 테스트한 모든 항원에 대한 반응에서 대조군보다 IgG 반응이 유의하게 더 높았다.

도 3은 결핵 환자에서의 항원-특이적 IgG 반응에 대한 성별의 영향을 나타낸 것이다. 결핵균 항원 특이적 IgG 반응을 남성 결핵환자(n=64) 및 여성 결핵환자(n=30) 사이에 비교하였다. ESAT-6항원을 제외한 모든 항원에 대한 반응에서, 남성 환자에서 IgG 반응이 유의하게 더 높게 나타났다. 반응의 중간레벨은 붉은색 수평 바로 표시하였다(\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001).

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 본원은 38 kDa, 16 kDa, ESAT-6, CFP-10, 및 LAM 항원에서 선택되는 항원의 조합에 대한 검체의 특이적 반응을 이용하여 활동성, 잠복성 또는 재발성 결핵을 구분하고 특히 객담도말검사서 음성을 보인 환자에 대하여 결핵

의 감염여부를 진단할 수 있다는 발견에 근거한 것이다.

- [0024] 한 양태에서 본원은 객담도말 음성인 결핵이 활동성 결핵, 잠복성 결핵 또는 재발성 결핵인지를 진단하기 위한 정보를 제공하기 위하여 항원-특이적 혈청 내 항체(IgG) 반응을 이용하여 38kDa, 16kDa, ESAT-6, CFP-10, 및 LAM 항원으로 선택되는 항원의 조합을 검출하는 방법에 관한 것이다.
- [0025] 일 구현예에서 본원에 따른 방법은 검체가 활동성 결핵, 잠복성 결핵 또는 재발성 결핵인지를 진단하기 위한 정보를 제공하기 위하여, 38 kDa, 16 kDa, ESAT-6, CFP-10, 및 LAM 항원을 제공하는 단계; 상기 항원을 검체와 접촉하는 단계로 상기 접촉에 의해 항원-항체 복합체가 형성되고; 및 상기 항원-항체 복합체를 검출하는 단계를 포함하며, 상기 검출결과 i) 상기 38 kDa, 16 kDa, ESAT-6, CFP-10, 및 LAM 항원에 대하여 정상 대조군의 결과와 비교하여 항원-항체 복합체의 형성이 높은 경우 활동성 결핵으로, ii) 상기 38 kDa, 16 kDa, ESAT-6, CFP-10, 및 LAM 항원에 대하여 정상 대조군의 결과와 동일하거나 높지만 상기 활동성 결핵의 경우보다 낮은 경우, 잠복성 결핵으로 iii) 상기 38 kDa, CFP-10, 및 LAM 항원에 대하여 정상 대조군 및/또는 신환자군과 비교하여 항원-항체 복합체 형성이 높은 경우 재발성 결핵으로 판단하는, 결핵 항원 특이적 항체 반응을 이용한 결핵감염 여부 판단 방법에 관한 것이다.
- [0026] 본원에 따른 방법에 의하면 객담도말검사와 상관없이 선별적 항원특이항체반응 검사를 통해 검체가 활동성 결핵, 잠복결핵, 재발환자의 결핵을 구별할 수 있다 (표 1, 도2a, 2b 등 참고).
- [0027] 본원의 ‘객담도말 검사’는 결핵균을 검출하기 위한 결핵 진단 방법으로 검사 대상의 객담(sputum)을 슬라이드에 얇게 발라 결핵균만을 선택적으로 염색해 현미경으로 관찰하는 방법을 말한다. 결핵균은 붉은색을 띠는 푸크신(fuchsin)으로 염색되고 나면 강산에 의해서도 탈색되지 않아, 항산균(acid-fast bacilli)’ 이라고 하므로 항산균(AFB)-도말검사라고도 한다. 질넬슨(Ziehl-Neelsen)법, 형광 염색법 등으로 도말 결과를 확인한다. 상기 객담도말검사 결과 결핵균이 확인되면 결핵 양성, 확인되지 않으면 음성이라 진단하지만, 정확도가 떨어져 결핵균이 있어도 음성으로 진단될 수 있다. 상기 음성인 경우에는 결핵균이 없는 경우뿐만 아니라 어린이 등과 같이 객담을 내뱉지 못하는 경우도 포함된다.
- [0028] 본원의 ‘활동성 결핵’은 결핵을 유발할 수 있는 결핵균이 잠복기가 아닌 활발한 증식을 일으키는 상태로, 객담검사(도말검사, 배양검사, 핵산증폭검사(PCR))등에서 양성이 나올 수 있거나, 영상의학 검사(흉부엑스선검사 또는 CT 등) 상 활동성 병변이 관찰된 결핵을 말한다.
- [0029] 본원에서 ‘잠복성 결핵감염(latent TB infection)’은 결핵균에 감염은 되었으나 임상적으로 결핵 증상이 없으며 결핵 세균학적, 방사선상 등의 결핵검사에서 음성이며 타인에게 전파를 할 수 없는 상태를 말한다.
- [0030] 본원에서 ‘재발성 결핵’은 이전에 결핵을 앓았던 사람이 치료 후 다시 결핵에 걸리는 경우를 의미하며 억제내성으로 인해 재발 하는 경우와 환자가 임의대로 투약을 중단하여 재발하는 경우 모두를 포함한다. 즉 현재 결핵 진단을 받았지만 이전에 한번 이상 결핵 발병력이 있는 결핵환자로, 재발성 여부에 따라 결핵 치료시 약물의 사용기간 등이 달라지기 때문에 재발여부를 판단하는 것이 필요하다.
- [0031] 본원에서 ‘신환자’ 또는 ‘신환자 대조군’은 활동성 결핵 환자 중에서 생애최초로 결핵진단을 받은 사람으로 이전에 결핵 발병 내력이 없는 환자를 의미한다.
- [0032] 아울러 본 발명의 방법에 의하면 객담도말 검사에서 음성으로 판단된 경우에도 결핵의 조기진단이 가능하며, 특히 이러한 결핵이 활동성인지, 잠복성인지 또는 재발성인지 진단하는 것이 가능하다 (도 2c 참고).
- [0033] 따라서 다른 구현예에서 본원은 검체가 객담도말검사 음성으로 판단된 경우에, 항원-항체 복합체를 검출하는 단계에서 상기 38 kDa 및 16 kDa 항원에 정상 대조군과 비교하여 상기 항원-항체 복합체 형성이 높은 경우, 상기 검체를 활동성 결핵으로 조기 판단하는 단계를 포함하는, 결핵 항원 특이적 항체 반응을 이용한 결핵감염 여부 판단 방법에 관한 것이다.
- [0034] 본원의 상기 38 kDa, 16 kDa, ESAT-6, CFP-10, 및 LAM 항원은 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)의 주요 항원인 단백질을 말한다. ‘38 kDa’ 항원은 결핵균의 면역원성이 강한 지질 단백질로 인 결합 단백질이다. ‘16 kDa’ 항원은 저분자량 열충격 단백질 중  $\alpha$ -크리스탈린 패밀리에 관계되는 단백질이다. ‘ESAT-6(early secreted antigen target 6 kDa)’ 항원은 결핵균이 생산하는, 강력한 T 세포 항원인 분비 단백질이다. ‘CFP-10 (culture filtrate protein 10 kDa)’ 항원 역시 결핵균이 분비하는 단백질이다. ‘LAM (lipoarabinomannan)’ 항원은 숙주의 식포 성숙을 저지하고 T 세포 증식을 억제하여 결핵균이 병원성을 가지도록 하는 주요 세포벽 요소이다. 이러한 단백질 항원은 공지된 것으로, 유전자 재조합 방법을 통해 합성 분리 및

정제될 수 있으며, 예를 들면 본원에 개시된 방법을 참고할 수 있다.

- [0035] 본원에 따른 검체는 결핵이 의심되는 사람유래의 시료로, 예를 들면 전혈, 혈청, 혈장, 가래, 소변, 흉수, 복수액, 뇌척수액 또는 기관지 폐포 세척액(brocho alveolar lavage)을 포함하나, 이로 제한하는 것은 아니다. 본원에 따른 일 구현 예에서는 혈액, 특히 혈청이 사용된다.
- [0036] 본원에서 대조군은 임상적으로 결핵증상이 없고 흉부 엑스선 검사에서 활동성 병변이 발견되지 않은 정상 대조군 즉 건강인으로서 TST와 IGRA (QuantiferON-TB Gold In-Tube; QFT-IT) 검사에서 모두 음성을 보인 건강한 사람 또는 그 유래의 시료이다.
- [0037] 또한 잠복결핵군은 대조군과 마찬가지로 임상적으로 결핵증상이 없는 건강인으로서 흉부 엑스선 검사에서 활동성 병변이 발견되지 않으나 IGRA 검사에서 양성반응을 보인 건강한 사람 또는 그 유래의 시료이다.
- [0038] 또한 본원에서 ‘신환자 대조군’은 활동성 결핵 환자 중에서 생애최초로 결핵진단을 받은 사람으로 이전에 결핵 발병 내력이 없는 환자 또는 그 유래의 시료이다.
- [0039] 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 면역침전분석, RIA (Radioimmunoassay) 또는 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)로 검출될 수 있다. 본원에 따른 일 구현예에서는 ELISA 방법, 특히 샌드위치 방식의 ELISA가 사용되며, 이 경우 후술하는 검출항체가 또한 사용된다.
- [0040] 항원-항체 복합체 검출 과정을 통해 검체의 최종적인 시그널의 세기를 분석하고 이를 정상 대조군의 시료의 시그널과 비교하여, 이 보다 높은 경우 상술한 바와 같이 활동성, 재발성 또는 잠복성 결핵으로 진단할 수 있다.
- [0041] 본원에 따른 일 구현 예에서, 항원-항체 복합체의 검출을 위해, 항원이 후술하는 표지물질로 표지되거나 또는 검출항체 또는 2차 항체가 사용된다.
- [0042] 본원에 따른 방법에 사용될 수 있는 검출 항체는 인간 IgG에 특이적으로 결합하며, 상기 검출항체는 시각적 또는 다양한 이미지 검출 장비를 이용하여 검출할 수 있는 물질로 표지될 수 있다.
- [0043] 본원에 따른 일 구현 예에서 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 디하이드로지나아제(malate dehydrogenase), 스타필로코칼 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 표지될 수 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0044] 다른 구현 예에서, 본원에 따른 항원 또는 검출항체는 광의 조사에 의해 조사된 광과 상이한 파장의 광을 방출하는 바이로루미네스스, 케미루미네스스, 일렉트로루미네스스, 일렉트로케미루미네스스 및 포토루미네스에 사용되는 발색단으로 예를 들면 단백질로서 그린형광단백질; 유기화합물로서 플루오르세인 이소티오시아네이트(fluorescein isothiocyanate), 로다민(rhodamine), 파이코에리쓰린(phycoerythrin), 파이코시아닌(phyocyanin), 알로파이코시아닌(allophycocyanin), 그리고 플루오르카민(flourecamine)을 포함하나 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0045] 또 다른 구현 예에서, 본원에 따른 항원 또는 검출항체는 다양한 방사선 동위원소 물질로 표지될 수 있다.
- [0046] 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 표지된 경우, 적절한 기질의 존재 하에서 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.
- [0047] 일 구현 예에서 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.

- [0048] 다른 양태에서 본원은 또한 상기한 본원에 따른 방법에 사용되는, 38 kDa, 16 kDa, ESAT-6, CFP-10, 및 LAM 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 표시된 것인, 객담도말 음성 결핵의 활동성 결핵, 잠복성 결핵, 또는 재발성 결핵 검출 또는 진단용 키트에 관한 것이다.
- [0049] 본원에 따른 키트에 포함되는 구성 중 상술한 바와 중복되는 것은 위의 기재를 참고할 수 있다.
- [0050] 본원에 따른 키트에서 본원에 따른 항원은 96웰 마이크로웰 플레이트와 같은 마이크로 웰플레이트, 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 실시 예에 기재된 것을 참고할 수 있다.
- [0051] 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), 폴리사카라이드, 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  $^3\text{H}$  또는  $^{125}\text{I}$ 와 같은 방사성 물질, 형광물질, 화학발광물질, 햅텐, 바이오틴, 디옥시제닌 등으로 표지되거나 또는 기질과의 작용을 통해 발색 또는 발광이 가능한 호스래디쉬 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 컨쥬게이트됨) 등과 같은 상술한 물질로 표시된 2차 검출항체 및 검출에 사용되는 기질 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0052] 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.
- [0053] 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.
- [0054] 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.
- [0055] 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.
- [0056] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

- [0057] **실 시 예**
- [0058] **실험 재료 및 방법**
- [0059] **실험 대상자:** 대한민국에 있는 두 개의 병원에서 159명의 폐결핵 환자, 51명의 최근 결핵 감염환자, 및 133명의 건강한 사람을 모집하였다. 2011년 2월부터 2012년 12월까지의 기간 동안, 73명의 결핵환자(평균 연령 : 46)를 국립목포병원에서 모집하여 등록하였고, 2010년 11월부터 2013년 12월까지의 기간 동안 86명의 결핵환자(평균 연령 : 32세), 51명의 증상이 없는 결핵환자 접촉 개체(평균 연령 : 44세), 및 133명의 건강한 개체(평균 연령 : 31세)를 세브란스 병원에서 모집하여 등록하였다(도 1). 모든 참가인에게서 문진 및, 진단 및 면역 실험에 대한 정보제공 동의서를 받았다. 활동성 폐결핵은 객담 도말/배양에서 결핵균을 동정하고 흉부 X-선을 검사하여 진단하였고(American Thoracic Society, 2000. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 161:1376-1395), 94명 환자의 감염성 결핵균주 유전자형은 분자적 유전자형 확정법(Warren RM et al., 2004. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 169(5):610-614)으로 확인하였다. LTBI 및 대조군 그룹은 TST 및 QFT-IT 테스트(American Thoracic Society, 2000. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 161:1376-1395; Pai M et al., 2004. Lancet Infect. Dis. 4:761-776) 결과에 근거하여 분류하였다. 51명의 결핵 접촉군 중에서, 26명에서는 QFT-IT 테스트에서 양성의 IFN- $\gamma$  반응이 나타났고; 26명 중 19에게서 TST( $\geq 10$  mm) 및 QFT-IT 테스트에서 이중 양성 반응이 나타난 반면 26명중 7명에게서는 TST에서 음성(<10 mm)의 결과가 나타났다. 결핵환자와 접촉한 적이 없는 133명의 건강한 개체 중에서, TST (<10 mm) 및 QFT-IT 테스트에서 이중 음성 반응이 나타난 54명의 개체를 대조군으로 하였다. 면역 억제제를 복용한 개체 또는 암, 당뇨, 또는 신장 질환이 있는 개체는 제외하였다. 본원 실험에는 최종적으로는 94명의 결핵 환자, 잠재성 결핵 감염(LTBI) 환자와 접촉한 26명의 개체, 및 54명의 건강한 대조군 개체로 실험군이 구성되었다(도 1). 국립목포병원 윤리심의위원회(승인 번호 2010-001) 및 세브란스 병원 윤리심의위원회(승인 번호 4-2010-0213)에서 윤리 승인을 받았다.
- [0060] **TST:** 투베르쿨린 PPD 용액(0.1 ml의 RT-23, Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark)을 모든 참가자에게 피내주사하였다. 경결(Induration) 크기를 48 및 72시간에 측정하였고, 10 mm 이상으로 측정된 것은 양성으로 분류하였다.
- [0061] **혈액 샘플의 제조:** 4 ml의 혈액(VACUETTE<sup>®</sup> serum tube, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany)을 원심분리하여 혈청 샘플을 분리하였다. QFT-IT 테스트에서, 총 3 ml의 혈액을 세 개의 QFT-IT 튜브[Nil, *M. tb* Ag tube (ESAT-6, CFP-10, 및 TB7.7 peptide antigens), 및 미토젠 (PHA), Cellestis, CA, USA] 각각에 직접 모았다. 24시간동안 37°C에서 배양한 후 혈장을 수집하여, IFN- $\gamma$  ELISA를 매뉴얼에 따라 수행하였다(QuantIFERON-TB Gold, Cellestis).
- [0062] **결핵균의 분자 유전형질 분석:** LSP 분석(large-sequence polymorphism analysis)에 근거하여 MTB/Beijing genotyping<sup>®</sup> (Optipham-M&D, Wonju, South Korea)으로 결핵균 유전형질을 결정하였다(Warren RM et al., 2004. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 169(5):610-614). 구체적으로 400  $\mu$ l 버퍼(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA)에서 로벤슈타인-엔젠 배지 슬랜트(Becton Dickinson and Company, MD, USA)에서 굵어낸 미코박테리아 현탁액을 끓여 게놈 DNA를 추출하였다. Veriti<sup>®</sup> 96-웰 Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems<sup>®</sup>, Life technologies, CA, USA)를 사용한 유전자 증폭에서 주형으로 상기 DNA를 사용하였고, 생산물은 아가로스 겔 전기영동으로 분석하였다.
- [0063] **제조합 단백질 항원 제조:** 38 kDa 및 16 kDa 항원은 Standardia Diagnostics, Inc. (Suwon, South Korea)에서 입수하였으며 LAM은 Mycobacteria Research Laboratory, Colorado State University (Fort Collins, Colorado, USA)에서 얻었다. 제조합 ESAT-6 및 CFP-10의 발현을 위한 벡터 구축은 pET11a-KB의 *NdeI* 및 *BamHI* (New England Biolabs, USA)를 사용하여 수행하였고, 유전자는 *M. tb* H37Rv 유전체 DNA (Colorado State University, USA)를 이용하여 증폭하였다. 단백질을 과발현시키기 위해 ESAT-6 및 CFP-10을 코딩하는 플라스미드를 *E. coli*로 형질전환시켰고, 제조합 단백질은 Ni-NTA 레진(Qiagen, CA, USA) 및 MonoQ 음이온 교환 컬럼(GE Healthcare Life Sciences)을 지닌 고속 단백질 액체 크로마토그래피(AKTA FPLC, GE Healthcare Life Sciences, PA, USA)를 제조자의 방법대로 사용하여 정제하였다.
- [0064] **항원에 대한 혈청 내 항체(IgG) 반응 측정:** 카보네이트-비카보네이트 버퍼(0.5 M)를 포함하는 96-웰 마이크로플레이트(Corning Inc., NY, USA)에 2  $\mu$ g/mL (38 kDa, 16 kDa, ESAT-6, CFP-10) 또는 0.1  $\mu$ g/mL (LAM) 농도의 결핵균 항원을 4°C에서 18시간 동안 코팅하였다. 0.05% Tween 20이 포함된 PBS(phosphate-buffered saline)(PBST)로 플레이트를 세 번 세척하였고, 37°C에서 1시간동안 5% NGS(normal goat serum)을 함유한

PBST(PBST-NGS)로 블락하였다. 블락된 플레이트를 인체 혈청 샘플(1:300 dilution in PBST-NGS)로 37℃에서 2 시간동안 배양한 후 TBST로 다시 세척하고, 퍼옥시다아제가 컨쥬게이션된 항-인간 IgG 항체(1:10,000 dilution in PBST-NGS, Calbiochem, CA, USA)와 같이 37℃에서 1시간동안 배양하였다. 플레이트를 TBST로 다시 세척하고, 테트라메틸벤지딘(KPL, MD, USA)을 첨가하였다. 상기 반응을 2.5N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 정지시키고, ELISA 마이크로플레이트 리더(Molecular Devices, CA, USA)를 사용하여 450nm에서 흡광도(OD)를 측정하였다.

**통계 분석:** 활동성 결핵 환자군(active TB), 결핵환자와의 접촉군(잠복결핵군; LTBI), 및 건강한 대조군(control)에서 측정된 결핵항원 특이적 IgG 항체반응값을 Kruskal-Wallis 및 Dunn 다중비교 테스트로 분석하였다. 결핵 재발에 근거한 그룹사이의 IgG 항체 반응, 약물 내성, AFB 염색, 결핵 유전자형, 및 환자의 BMI 및 성별을 Mann-Whitney 테스트로 분석하였다.

**실시에 1. 활동성 결핵, 잠복결핵 및 대조군에서의 결핵 항원-특이적 혈청 내 항체(IgG) 반응에 대한 ROC(receiver operating characteristic) 커브 분석**

환자군에서 결핵항원 특이적 IgG 반응에 대한 ROC 커브를 분석하였다. AUC, 민감도, 특이도 및 절단값(cut-off value)은 시험한 서로 다른 시험군의 ROC 커브를 분석하여 계산하였다. 결과는 표 1 및 2에 기재되어 있다.

[표 1] 서로 다른 환자군에서 결핵항원 특이적 IgG 반응에 대한 ROC 커브의 분석

	AUC (p value)	% sensitivity	% specificity	cut-off (OD)
<b>active TB vs control</b>				
38 kDa	0.7695 (< 0.001)	73.4	70.4	> 0.015
16 kDa	0.7535 (< 0.001)	71.3	70.4	> 0.010
ESAT-6	0.6544 (< 0.01)	55.3	70.4	> 0.021
CFP-10	0.6643 (< 0.001)	51.1	70.4	> 0.024
LAM	0.7655 (< 0.001)	68.1	70.4	> 0.189
<b>active TB vs LTBI</b>				
38 kDa	0.7064 (< 0.01)	58.5	73.1	> 0.027
16 kDa	0.7535 (< 0.001)	64.9	73.1	> 0.012
ESAT-6	0.6966 (< 0.01)	55.3	73.1	> 0.021
CFP-10	0.7398 (< 0.001)	64.9	76.9	> 0.019
LAM	0.7756 (< 0.001)	67.0	80.8	> 0.210
<b>recurrent case vs control</b>				
38 kDa	0.8593 (< 0.001)	80.6	77.8	> 0.019
16 kDa	0.8027 (< 0.001)	75.0	77.8	> 0.012
ESAT-6	0.6965 (< 0.01)	63.9	74.1	> 0.024
CFP-10	0.7744 (< 0.001)	72.2	72.2	> 0.025
LAM	0.8498 (< 0.001)	72.2	74.1	> 0.237
<b>new case vs control</b>				
38 kDa	0.7138 (< 0.001)	67.2	70.4	> 0.015
16 kDa	0.7230 (< 0.001)	67.2	70.4	> 0.010
ESAT-6	0.6282 (< 0.05)	50.0	70.4	> 0.021
CFP-10	0.5959 (> 0.05)	36.2	70.4	> 0.024
LAM	0.7131 (< 0.001)	65.5	70.4	> 0.189

38 kDa, 16 kDa, 및 LAM 혈청에 대한 IgG 반응은 활동성 결핵 또는 잠복성 결핵을 진단할 수 있기에 충분한 정도로 민감도와 특이성이 높았다. 아울러 새로 발병한 군보다 재발군에서 AUC, 민감도 및 특이성이 더 높은 것으로 나타났다.

[0071] [표 2] 남성 및 여성 환자에서의 특징

	male (n=64)	female (n=30)	fold difference*
mean age	43	32	1.3
mean BMI	20	19	1.0
% recurrence in TB	47	20	2.4
% drug resistance	32	14	2.3
% AFB-smear+ve	54	10	5.4
% Beijing strain	81	80	1.0

[0072]

[0073] 여성 환자보다 남성환자가 결핵 재발, 약물 내성 및 AFB-도말검사 양성(% AFB-smear+ve)인 퍼센트가 더 높았다. 그러나 나이 및 BMI는 상기 군사이에 유의하게 다른 점은 없었다. \* 배율 차이(Fold difference)는 남성 환자의 수치를 여성 환자의 수치로 나누어 계산하였다.

[0074] 실시예 2. 활동성 TB, LTBI 및 대조군에서의 결핵 항원-특이적 혈청 내 항체(IgG) 반응 확인

[0075] 감염 상태에 따른 결핵항원-특이적 혈청 내 항체(IgG) 반응을 결정하기 위하여, IgG 반응을 활동성 TB, LTBI 및 TST와 QFT-IT 검사에서 모두 음성을 보인 건강한 대조군 그룹에서 평가하였다. 그 결과 대조군보다는 활동성 TB 환자가 테스트한 모든 항원에 유의하게 더 높은 IgG 반응이 나타났다는 것을 밝혔다( $P<0.001$  또는  $P<0.01$ , Fig. 2a). 38 kDa-특이성 IgG 반응에 대한 AUC(area under the ROC curve)가 다른 다섯 항원 중에서 가장 높았으며 ( $AUC=0.7695$ ,  $P<0.001$ ), 그 다음이 LAM 및 16 kDa이다(표 1). 비록 ESAT-6- 및 CFP-10-특이성 IgG 반응은 활동성 TB 및 대조군 사이에 서로 달랐지만(도 2a), 상기 반응은  $AUC(<0.7)$  및 감수성(각각 55.3% 및 51.1%)이 낮아서 임상적 의의(diagnostic value)가 없었다(표 1). 테스트한 모든 항원에 대한 IgG 반응으로 활동성 TB 및 LTBI를 구분하였는데( $P<0.01$ , 도 2a), 특히 LAM-특이성 반응에서 가장 높은  $AUC(0.7756)$ ,  $P<0.001$ ), 민감성(67.0%), 및 특이성(80.8%)을 보여주었다(표 1). 이는 LAM 특이성 IgG 반응은 신뢰할 수 있을 정도로 LTBI 및 활동성 결핵을 구별하여 진단할 수 있는 바이오마커일 수 있는 것을 말한다.

[0076] 실시예 3. 결핵 환자의 병력에 근거한 결핵항원-특이적 혈청 내 항체(IgG) 반응 확인

[0077] 94명의 활동성 TB 환자 중에서, 58명은 새로 진단받았고, 36명은 이전에 결핵에 걸렸었다. 이들 36명의 환자를 재발군으로 정의하였는데, 이에는 치료에 성공한 후에 결핵에 재발한 사람들과, 자발적으로 약복용을 중단하거나 약물 내성이 생겨 초기 치료에 실패한 사람들이 포함된다. 테스트된 모든 항원에 대한 IgG 반응은 대조군보다 재발군에서 유의하게 더 높았으며, AUC, 내성, 및 특이성 수치는 대조군 대비 새로 발병한 경우보다 재발한 경우에 더 높았다(표 1). 특히 CFP-10-특이적 IgG 반응의 민감성은 재발군(72.2%)과 새로 발병한 군(36.2%) 사이에서 거의 두배 정도 차이가 나타났다(표 1). 또한 38 kDa의 진단 수치가 높게 나타나고( $AUC=0.8593$ ,  $P<0.001$ ) 민감성 및 특이성(각각 81% 및 78%)이 높아져, 재발한 경우에 IgG 반응이 높았다. 16 kDa 및 LAM에 대한 IgG 반응은 재발군과 새로 발병한신환자군에서 유의성 있는 차이가 없거나 아주 작은 차이를 보였지만 새로 발병한 군과 대조군 사이에는 차별이 있었다(도 2b).

[0078] 실시예 4. 혈청 내 항체(IgG) 반응에 대한 약물 내성의 효과 확인

[0079] 약물 감수성을 테스트한 88명 중 총 23명의 환자가 약물 내성 결핵군으로 분류되었는데, 이중 두 명은 광범위한 약물-내성(XDR) 그리고 세 명은 MDR(multi drug resistance) 환자였다. 테스트한 모든 항원에 대한 혈청 내 항체(IgG)반응은, 약물-민감성 결핵군과 비교하면( $P>0.05$ , data not shown), 상기 환자들에서는 유의하게 다르지 않았다. 결핵항원-특이적 IgG 반응 또한 BMI<18.5인 24명의 환자 및 정상범위의 BMI( $18.5<BMI<25$ )를 가진 64명의 환자에게서도 변하지 않았다(data not shown).

[0080] 실시예 5. 결핵항원-특이적 혈청 내 항체(IgG) 반응 및 분리 결핵균 사이의 상관관계 분석

[0081] AFB-도말 염색결과에 따른 결핵항원-특이적 혈청 내 항체(IgG) 반응을 분석하였다(도 2c). AFB-도말 양성 환자의 ROC 커브(AUC=0.8909,  $P<0.001$ )와 음성 환자의 커브(AUC=0.6857,  $P<0.001$ ) 분석결과, AFB-도말 양성 환자에서는 음성인 환자와 비교하여, LAM에 대한 IgG 반응이 유의하게 더 높게 나타났다( $P<0.01$ , 도 2c). 이런 LAM-특이성 IgG 반응이 AFB-도말 양성 및 음성 결핵환자 사이에 차이가 있는 것은( $P<0.01$ ), 테스트한 다른 항원과 비교하여보면 세균로드(bacillary load)와 더 관련이 있다는 것을 말한다.

[0082] 그러나 8 kDa- 및 16 kDa-특이적 IgG 반응에서는 활동성 결핵환자군 가운데 도말검사 결과에 따른 IgG 반응의 차이를 보이지 않았으나 대조군에 비해 도말음성 환자의 IgG 레벨이 유의하게 더 높은 것으로 나타났다(AUC>0.7,  $P<0.001$ ). 상기 38kDa 항원은 이전의 결핵 혈청학적진단(Abebe F et al., 2007 Scand. J. Immunol. 66(2-3):176-191)에서는 민감성 및 특이성이 각각 40-89% 및 44-100%의 범위인 것으로, 실험 대상 및 실험한 연구소에 따라 그 결과에 차이를 보이는 실정이다. 하지만 본 발명에서 AFB-도말 음성 환자 사이에서 38kDa 항원에 대해 대략 70% 민감성 및 특이성이라는 높은 진단 수치를 가진 것으로 관찰하였다(AUC>0.7,  $P<0.001$ ). 이러한 데이터는 38kDa에 대한 IgG 반응을 측정하는 것이 결핵의 조기 진단, 특히 객담-도말 음성 환자 또는 객담을 뱉지 못하는 이들에게서 결핵을 조기에 진단할 수 있을 것이라는 것을 말해준다.

[0083] 그 외에, 항원-특이적 IgG 반응은 결핵균주 유전형질에 따라 달라지지 않았다(data not shown). 베이징 균주에 감염된 환자의 비율이 비-베이징 균주에 감염된 환자보다 약 4배정도 더 높았으나 (81% vs. 19.1%), 이는 결핵 항원-특이적 IgG 반응과 상관이 없고, 아마도 본원의 약물 내성 코호트에서 XDR/MDR 환자의 수가 제한된 것에 기인하는 것으로 판단된다.

#### [0084] 실시예 6. IgG 반응에 대한 성별 영향 분석

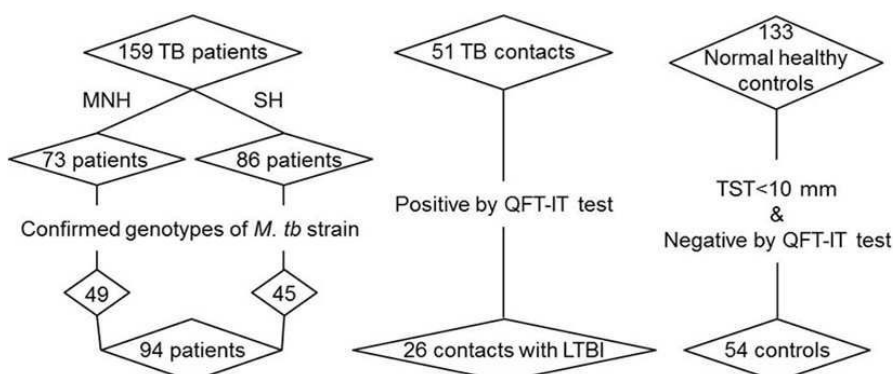
[0085] 본 발명자는, ESAT-6를 제외한 모든 항원에 대한 반응에서 여성 환자(n=30)보다는 남성 환자(n=64)에게서 유의하게 더 높은 항원-특이적 IgG 반응이 나타났다는 것을 밝혔다(도 3). 이러한 차이점은 부분적으로는 38 kDa- 및 LAM-특이적 IgG 반응 때문이었다( $P<0.001$ ). 재발성 결핵인 경우, 약물 내성 및 AFB-도말 양성일때 여성 환자보다 남성 환자가 각각 다 2배 이상 더 높은 반면, 평균 연령, BMI, 및 결핵균 유전형질의 비율은 두 그룹 사이에 유사하였다(표 2).

[0086] 성별이 항체-특이적 IgG 반응에 영향을 미치는 것은 어느 일부분은 남성 및 여성 환자에서의 결핵의 빈도 및 심각성이 다르기 때문인 것으로 추정된다. 결핵 유병율은 여성보다 남성이 대략 2배정도 더 높은데, 이는 남성이 결핵에 더 민감하다는 것을 의미한다. 남성이 결핵에 더 자주 노출되는 것과 다른 성별 특이적 요소가 결핵항원-특이적 항체 반응에 영향을 미칠 수 있다.

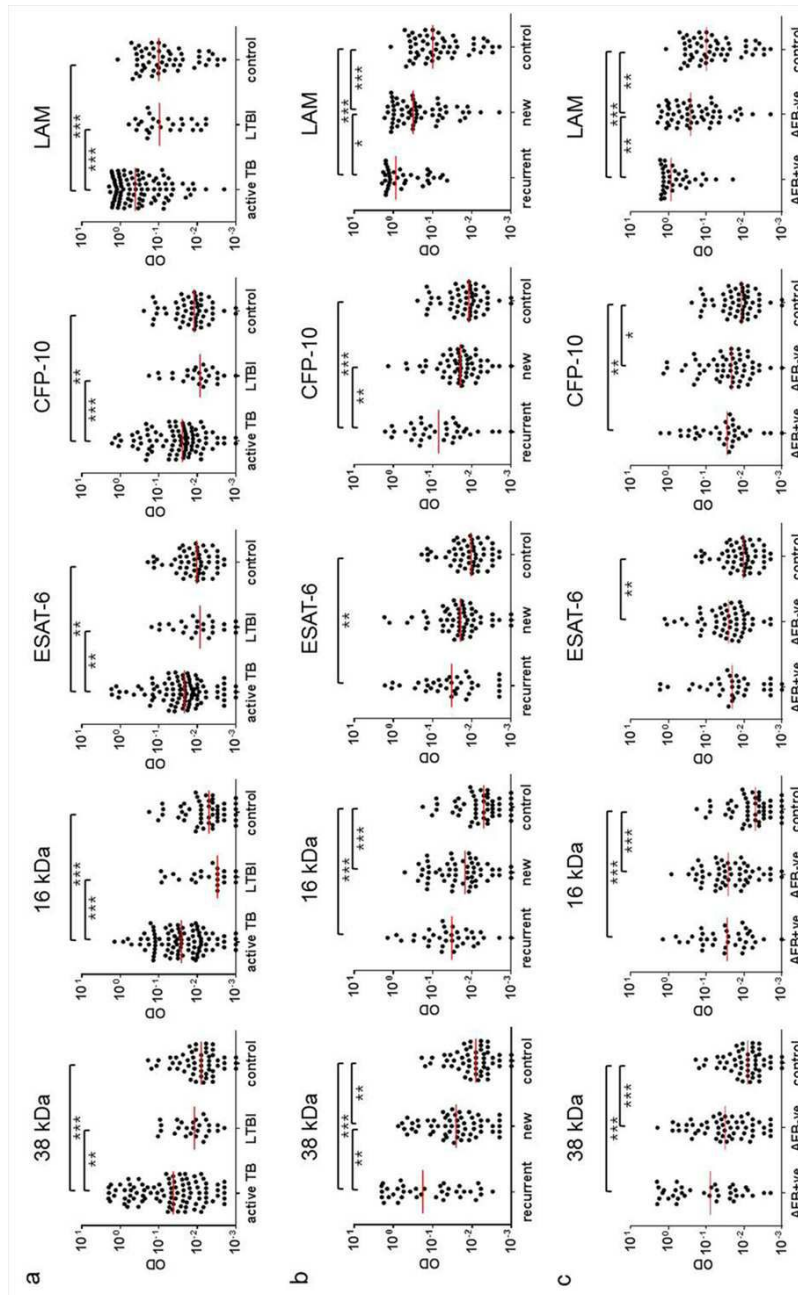
[0087] 따라서, 38 kDa, 16 kDa, ESAT-6, CFP-10, 및 LAM으로 구성되는 항원의 조합의 검출을 통한 결핵의 혈청학적 진단법 테스트는 자원이 제한적인 환경에서 빠르고 경제적인 현장현시검사(point-of-care test)로 개발가능하며, 활동성 결핵과 잠복결핵을 구별하고 재발환자를 구분 진단하는데 유용하며 특히 객담-도말 음성 경우에 재발 결핵의 조기 진단에 중요한 기여를 할 것으로 보인다.

### 도면

#### 도면1



도면2



도면3

