

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2021년 8월 12일 (12.08.2021) WIPO | PCT

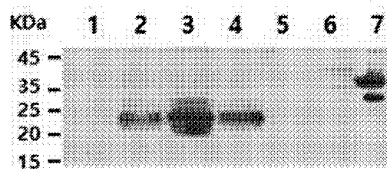


(10) 국제공개번호
WO 2021/157907 A1

- (51) 국제특허분류: *G01N 33/573* (2006.01) *G01N 33/569* (2006.01) 암 (LEE, Hae Ahm); 02442 서울시 동대문구 이문로12길 3-10, 108동 303호, Seoul (KR).
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2021/000727 (74) 대리인: 특허법인 아이시스 (ISIS IP LAW LLC); 06160 서울시 강남구 테헤란로63길 14, 8층, Seoul (KR).
- (22) 국제출원일: 2021년 1월 19일 (19.01.2021)
- (25) 출원언어: 한국어 (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2020-0014563 2020년 2월 6일 (06.02.2020) KR
- (71) 출원인: 경희대학교 산학협력단 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) [KR/KR]; 17104 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 문은경 (MOON, Eun Kyung); 02442 서울시 동대문구 이문로12길 3-10, 108동 303호, Seoul (KR). 이해 (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,

(54) Title: COMPOSITION FOR DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF ACANTHAMOEBA KERATITIS COMPRISING CHORISMATE MUTASE PROTEIN ANTIBODIES, AND ACANTHAMOEBA KERATITIS DIAGNOSIS KIT USING SAME

(54) 발명의 명칭: 코리스메이트 뮤테이즈 단백질 항체를 포함하는 가시아메바성 각막염의 감별 진단용 조성물 및 이를 이용한 가시아메바성 각막염 진단 키트



1. Human corneal epithelial cells
2. *Acanthamoeba castellanii* (#30011-nonpathogenic)
3. *Acanthamoeba castellanii* (#30868-pathogenic)
4. Clinical isolate (*Acanthamoeba* spp.)
5. *Fusarium solani*
6. *Pseudomonas aeruginosa*
7. *Staphylococcus aureus*

(57) Abstract: The present invention relates to: a composition for differentially diagnosing acanthamoeba keratitis, the composition comprising chorismate mutase antibodies; and an acanthamoeba keratitis diagnosis kit using same. The composition comprising chorismate mutase antibodies according to the present invention causes an antigen-antibody reaction only specific to chorismate mutase secreted from acanthamoeba, thus making it possible to diagnose and identify the cause of acanthamoeba keratitis more rapidly and accurately than existing methods for diagnosing acanthamoeba keratitis. The composition is expected to be widely applicable to the production of acanthamoeba keratitis diagnosis kits, therapeutic agents, contact lens disinfecting agents, etc.

(57) 요약서: 본 발명은 코리스메이트 뮤테이즈(chorismate mutase) 항체를 포함하는 가시아메바성 각막염의 감별 진단용 조성물, 및 이를 이용한 가시아메바성 각막염 진단 키트에 관한 것으로, 본 발명의 코리스메이트 뮤테이즈 단백질 항체를 포함하는 조성물은 가시아메바에서 분비되는 코리스메이트 뮤테이즈에서만 특이적으로 항원-항체반응을 일으켜 기존의 가시아메바성 각막염 진단방법에 비해 신속하고 정확한 진단 및 각막염의 원인 감별이 가능하고, 상기 조성물을 이용하여 가시아메바성 각막염 진단 키트, 치료제 및 콘택트렌즈 소독제 제조 등에 활용도가 높을 것으로 기대된다.

[다음 쪽 계속]

ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 코리스메이트 뮤테이즈 단백질 항체를 포함하는 가시아메바성 각막염의 감별 진단용 조성물 및 이를 이용한 가시아메바성 각막염 진단 키트

기술분야

- [1] 본 발명은 코리스메이트 뮤테이즈(chorismate mutase) 항체를 포함하는 가시아메바성 각막염의 감별 진단용 조성물, 및 이를 이용한 가시아메바성 각막염 진단 키트에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 각막(Cornea)이란 안구 외막의 약 1/6을 차지하며 빛을 굴절시켜주는 주된 막 중의 하나인 안구의 가장 바깥쪽 표면으로서 눈에서 제일 먼저 빛이 통과하고 혈관이 없는 것이 특징이며, 조직학적으로 5~6개의 세포층으로 이루어진 각막상피(corneal epithelium), 세포가 없는 아교질 섬유로 이루어진 보우만층(Bowman's layer), 각막의 90%의 두께를 차지하는 각막기질(Corneal stroma), 두아층(Dua's layer), 3~4층의 세포로 이루어진 데스메막(Descemet's membrane) 및 세포의 수가 정해져 있으며 재생이 극히 제한적인 각막내피(Corneal endothelium) 6개의 층으로 구별된다.
- [3] 각막은 눈의 맨 앞에 위치함으로써 외상, 감염 및 기타 면역반응에 의한 손상을 많이 입을 수 있고 그 결과 투명한 각막의 특성을 잃게 되어 혼탁이 남게 되거나 신생혈관 등이 생겨서 심각한 시력 상실을 초래할 수 있다. 가장 흔한 각막 질병으로는 각막 찰과상, 각막 이상증, 각막궤양, 각막 신혈관 형성, 후치쓰시 근육이영양증, 각막염, 원추각막 등이 있으며, 각막 질환중 90% 이상을 차지하는 것이 각막에 염증이 발생하는 각막염이다.
- [4] 인체 각막염은 각막에 세균이나 바이러스가 침입해 염증이 생기는 질환으로 포도상구균 (*Staphylococcus sp.*), 녹농균 (*Pseudomonas sp.*), 진균 (*Fusarium*) 및 가시아메바 (*Acanthamoeba sp.*) 등에 의해 유발될 수 있는데, 염증 발생 이후 제대로 치료하지 않으면 통증성 궤양을 야기하고 심한 경우 안구 천공이 발생하거나 이로 인해 실명에 이를 수도 있다. 이러한 증상을 막으려면 빠른 시간 내에 각막염의 원인을 찾아내는 것이 중요하다. 각막염 중에서도 가시아메바 감염에 의한 각막염은 충혈, 과잉눈물생성, 이물감, 빛에 노출될 경우 통증 유발 등의 증상을 나타내고 콘택트렌즈를 착용하는 사람들에게서 보통 발생되지만 세균 및 곰팡이에 의한 각막염과 감별진단이 쉽지 않다.
- [5] 아메바성 각막염의 진단은 각막염이 발생한 환자의 각막에서 조직검체를 채취하여 검사하는데, 현재 진단방법으로는 현미경 관찰 및 PCR 등의 방법을 통해 진단이 이뤄지기 때문에, 확진을 위해서는 조직 배양이 필요하므로 약 1주일의 진단시간이 필요하다. 이로 인해 조기진단이 어렵고 치료시간도 더욱

길어지고 있는 실정이다. 따라서 신속한 조기 치료를 위하여, 신규한 가시아메바성 각막염 감별진단법이 절실히 필요한 상황이다.

- [6] 한편, 가시아메바 검출용 프라이머 세트 및 이를 이용한 각막염 유발 가시아메바 검출방법(한국 등록특허 제 10-1308516호) 등이 연구되고 있으나 이는 프라이머 세트를 이용하여 가시아메바를 검출하는 방법일 뿐, 가시아메바가 분비하는 특정 단백질에 대한 항체를 이용하여 가시아메바성 각막염을 감별 진단하는 기술은 전무한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 상기와 같은 문제를 해결하기 위하여, 본 발명은 코리스메이트 뮤테이즈(chorismate mutase) 단백질에 특이적인 항체를 포함하는, 가시아메바성 각막염 감별 진단용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [8] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 가시아메바성 각막염 감별 진단용 키트를 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.
- [9] 또한, 본 발명은 피검자 유래의 생물학적 시료에 대하여, 코리스메이트 뮤테이즈(chorismate mutase) 단백질에 특이적인 항체의 항원-항체 반응을 측정하는 단계를 포함하는, 가시아메바성 각막염 환자의 각막염 감별 진단을 위한 정보제공방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.
- [10] 또한, 본 발명은 가시아메바성 각막염 감별 진단용 조성물의 제조를 위한 코리스메이트 뮤테이즈(chorismate mutase) 단백질에 특이적인 항체의 용도를 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

과제 해결 수단

- [11] 이에, 코리스메이트 뮤테이즈(chorismate mutase) 단백질에 특이적인 항체를 포함하는, 가시아메바성 각막염 감별 진단용 조성물을 제공한다.
- [12] 본 발명의 일 구현예에서 상기 코리스메이트 뮤테이즈(chorismate mutase) 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열일 수 있다.
- [13] 본 발명의 다른 구현예에서 상기 코리스메이트 뮤테이즈(chorismate mutase) 단백질은 병원성 가시아메바에서 분비된 것일 수 있다.
- [14] 본 발명의 또 다른 구현예에서 상기 항체는 상기 코리스메이트 뮤테이즈(chorismate mutase) 단백질의 서열번호 2의 아미노산 서열 부위에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [15] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는, 가시아메바성 각막염 감별 진단용 키트를 제공한다.
- [16] 또한, 본 발명은 피검자 유래의 생물학적 시료에 대하여, 코리스메이트 뮤테이즈(chorismate mutase) 단백질에 특이적인 항체의 항원-항체 반응을 측정하는 단계를 포함하는, 가시아메바성 각막염 환자의 각막염 감별 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.

- [17] 또한, 본 발명은 가시아메바성 각막염 감별 진단용 조성물의 제조를 위한 코리스메이트 뮤테이즈(chorismate mutase) 단백질에 특이적인 항체의 용도를 제공한다.

발명의 효과

- [18] 본 발명의 코리스메이트 뮤테이즈(chorismate mutase) 단백질 항체를 포함하는 조성물은 가시아메바에서 분비되는 코리스메이트 뮤테이즈(chorismate mutase)에서만 특이적으로 항원-항체반응을 일으켜 기존의 가시아메바성 각막염 진단방법에 비해 신속하고 정확한 진단 및 각막염의 원인 감별이 가능하고, 상기 조성물을 이용하여 가시아메바성 각막염 진단 키트, 치료제 및 콘택트렌즈 소독제 제조 등에 활용도가 높을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [19] 도 1a는 가시아메바 분비 단백질 중 코리스메이트 뮤테이즈(chorismate mutase)의 뉴클레오티드를 나타낸 것이다.
- [20] 도 1b는 가시아메바 분비 단백질 중 코리스메이트 뮤테이즈(chorismate mutase)의 아미노산을 나타낸 것이다.
- [21] 도 2a는 코리스메이트 뮤테이즈의 아미노산 서열에 따른 2차 구조를 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- [22] 도 2b는 코리스메이트 뮤테이즈의 단백질 구조 중 항원성이 높은 부분을 나타낸 것이다.
- [23] 도 3은 코리스메이트 뮤테이즈(chorismate mutase)의 단백질 구조 중 항원성이 높은 부분에 대해 각막염 원인균들의 코리스메이트 뮤테이즈와 유사성을 비교한 결과를 나타낸 것이다.
- [24] 도 4는 가시아메바 세포 용해물에서 검출되는 코리스메이트 뮤테이즈(chorismate mutase)를 나타낸 것이다.
- [25] 도 5는 가시아메바 배양액에서 검출되는 코리스메이트 뮤테이즈(chorismate mutase)를 나타낸 것이다.
- [26] 도 6은 가시아메바가 감염된 인체각막세포에서 코리스메이트 뮤테이즈 항체를 사용하여 가시아메바를 특이적으로 검출해 낸 결과를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [27] 본 발명자들은 병원성 가시아메바가 분비하는 단백질 중 코리스메이트 뮤테이즈에 대해 예의 연구하여 이에 대응하는 항체를 제작하고, 상기 항체가 인체 각막세포와 각막염의 원인이 될 수 있는 *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Fusarium solani*, *Acanthamoeba castellanii* 및 임상분리주 *Acanthamoeba spp.*의 세포 용해액 및 배양액 중에서 가시아메바에만 특이적으로 항원-항체반응을 일으키는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [28] 이에, 본 발명은 코리스메이트 뮤테이즈(chorismate mutase) 단백질에 특이적인 항체를 포함하는, 가시아메바성 각막염 감별 진단용 조성물을 제공한다.

- [29] 본 발명에서 사용되는 용어, "항체"는 면역학적으로 특정 항원과 반응성을 갖는 면역글로불린 분자를 포함하며, 단클론(monoclonal) 항체 및 다클론(polyclonal) 항체를 모두 포함한다. 또한, 상기 항체는 키메라성 항체(예를 들면, 인간화 무린 항체) 및 이중결합항체(예를 들면, 양특이성 항체)와 같은 유전공학에 의해 생산된 형태를 포함한다.
- [30] 본 발명에서 사용되는 용어 "코리스메이트 뮤테이즈"는 페닐알라닌 및 티로신 생산경로에서 코리스메이트를 프리페네이트로 전환하기 위한 화학반응을 촉매하는 효소로서, 본 발명의 코리스메이트 뮤테이즈는 다양한 미생물에서 분비되는 코리스메이트 뮤테이즈에 제한되지 않으나, *Fusarium solani*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* 및 *Acanthamoeba castellanii*에서 분비되는 코리스메이트 뮤테이즈인 것이 바람직하고, 구체적으로 병원성 가시아메바 *Acanthamoeba castellanii*에서 분비되는 코리스메이트 뮤테이즈인 것이 더욱 바람직하다.
- [31] 본 발명에 따른 코리스메이트 뮤테이즈(chorismate mutase)는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있고, 서열번호 1과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [32] 본 발명의 다른 구체예로서, 본 발명에 따른 항체는 코리스메이트 뮤테이즈 단백질에서 2차 구조분석을 통해 확인된 랜덤 코일(Random coil) 부분으로 이루어진 항원성이 높은 서열번호 2의 아미노산 서열 부위에 특이적으로 결합하는 것일 수 있으며, 서열번호 2와 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열로 이루어진 부위에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [33] 본 발명자들은 상기 코리스메이트 뮤테이즈(chorismate mutase) 단백질에 특이적인 항체를 포함하는 조성물을 이용하여 각막염 환자의 감별 및 진단에 대한 유효성을 확인하였다.
- [34] 본 발명의 일 실시예에서는, 가시아메바 코리스메이트 뮤테이즈 항체를 이용하여 인체 각막세포(Human corneal epithelial cell, HCE), 비병원성 가시아메바(*Acanthamoeba castellanii* #30011-nonpathogenic), 병원성 가시아메바(*Acanthamoeba castellanii* #30868-pathogenic), 임상분리주 가시아메바(Clinical isolate, *Acanthamoebas spp.*) *F.solani*, *P.aeruginosa* 및 *S.aureus*의 세포 배양물에 대해 웨스턴블랏을 수행한 결과 가시아메바에서만 특이적으로 코리스메이트 뮤테이즈가 검출되는 것을 확인하였으며(실시예 3 참조), 또한 실시예 3에서 사용된 각 샘플에서 배양액을 확보하여 웨스턴블랏을 수행한 결과 가시아메바에서만 특이적으로 코리스메이트 뮤테이즈가 검출되는 것을 확인하였다(실시예 4 참조).
- [35] 상기 결과를 통해 본 발명의 코리스메이트 뮤테이즈 항체를 포함하는 조성물을

이용하여 가시아메바성 각막염 환자의 각막염 감별진단에 유용하게 사용할 수 있음을 확인하였다.

- [36] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 가시아메바성 각막염 감별 진단용 키트를 제공한다.
- [37] 본 발명의 일 구체예로서, 상기 가시아메바성 각막염 감별 진단용 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액 또는 장치로 구성될 수 있다.
- [38] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 피검자 유래의 생물학적 시료에 대하여, 코리스메이트 뮤테이즈(chorismate mutase) 단백질에 특이적인 항체의 항원-항체 반응을 측정하는 단계를 포함하는, 가시아메바성 각막염 환자의 각막염 감별 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [39] 본 발명에서 사용되는 용어 "각막염 환자의 각막염 감별 진단을 위한 정보제공방법"이란 진단 또는 감별 단계로써 각막염 질환 진단을 위하여 필요한 객관적인 정보를 제공하는 것이며, 의사의 임상학적 판단 또는 소견은 제외된다. 상기 피검자 유래의 생물학적 시료는 이에 제한 되는 것은 아니지만, 예를 들면 조직, 세포 등일 수 있고, 각막염 환자 유래 조직 또는 세포인 것이 바람직하다.
- [40] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 가시아메바성 각막염 감별 진단용 조성물의 제조를 위한 코리스메이트 뮤테이즈(chorismate mutase) 단백질에 특이적인 항체의 용도를 제공한다.
- [41] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진자에게 있어서 자명할 것이다.

[42]

[43] [실시예]

[44] 실시예 1. 가시아메바 분비 단백질 중 코리스메이트 뮤테이즈 확보

[45] 1-1.코리스메이트 뮤테이즈 ORF 확보

[46] 병원성 가시아메바(ATCC#30868)의 분비단백질 중 코리스메이트 뮤테이즈의 ORF를 확보하여, 도 1a에 나타낸 바와 같이 코리스메이트 뮤테이즈의 585bp 뉴클레오티드를, 도 1b에 나타낸 바와 같이 코리스메이트 뮤테이즈의 194 아미노산을 확인하였다.

[47]

[48] 1-2.코리스메이트 뮤테이즈의 2차구조 분석 및 항원성 확인

[49] 실시예 1-1에 의해 확보된 코리스메이트 뮤테이즈 단백질의 2차 구조분석 및 항원성을 확인한 결과, 도 2a에 나타낸 바와 같이 2차 구조가 분석되었고, 도 2b에 나타낸 바와 같이 항원성이 높은 2개의 부분 prediction 1(GQDVLDSSRESVVLNAR) 및 prediction 2(RLQVETLNSEFNAGLPVPVQHAD)을 확인하였다.

[50]

[51] 실시예 2. 각막염 원인균에서 코리스메이트 뮤테이즈의 항원성 비교

[52] 실시예 1-2에서 도출된 항원성이 높은 부분(prediction 1 및 prediction 2)에 대해 각막염의 원인이 될 수 있는 *Fusarium solani*, *Staphylococcus aureus*, 및 *Pseudomonas aeruginosa*의 코리스메이트 뮤테이즈들과의 유사성을 비교한 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 코리스메이트 뮤테이즈의 차이를 나타내는 결과를 도출하였고 비교적 항원성이 높은 부분인 Prediction 2(RLQVETLNSEFNAGLPVPVQHAD)를 항체결합부위로 선택하였다.

[53]

[54] 실시예 3. 세포 용해물에서의 코리스메이트 뮤테이즈 단백질 항체 검출 확인

[55] 실시예 2에서 선택된 가시아메바 코리스메이트 뮤테이즈의 단백질 항체결합부위에 특이적으로 결합하는 항체를 공지된 방법에 의해 수득하고, 수득된 항체를 이용하여 인체각막세포(Human corneal epithelial cell, HCE), 비병원성 가시아메바(*Acanthamoeba castellanii* #30011-nonpathogenic), 병원성 가시아메바(*Acanthamoeba castellanii* #30868-pathogenic), 임상분리주 가시아메바(Clinical isolate, *Acanthamoebas spp.*), *F.solani*, *P.aeruginosa* 및 *S.aureus*의 세포 용해물에 대해 웨스턴 블랏을 수행한 결과, 도 4에 나타난 바와 같이 가시아메바 종류의 세포 용해물(2, 3 및 4 라인)에서만 특이적으로 코리스메이트 뮤테이즈가 검출되는 것을 확인하였다.

[56]

[57] 실시예 4. 세포 배양액에서의 코리스메이트 뮤테이즈 단백질 항체 검출 확인

[58] 실시예 2에서 선택된 가시아메바 코리스메이트 뮤테이즈의 단백질 항체결합부위에 특이적으로 결합하는 항체를 공지된 방법에 의해 수득하고, 수득된 항체를 이용하여 인체각막세포(Human corneal epithelial cell, HCE), 비병원성 가시아메바(*Acanthamoeba castellanii* #30011-nonpathogenic), 병원성 가시아메바(*Acanthamoeba castellanii* #30868-pathogenic), 임상분리주 가시아메바(Clinical isolate, *Acanthamoebas spp.*), *F.solani*, *P.aeruginosa* 및 *S.aureus*의 배양액에서 웨스턴 블랏을 수행한 결과, 도 5에 나타난 바와 같이 가시아메바 종류의 세포배양액 (2, 3 및 4라인)에서만 특이적으로 코리스메이트 뮤테이즈가 검출되는 것을 확인하였다.

[59] 상기 결과로부터, 본 발명의 항체가 가시아메바에서만 특이적으로 결합한다는 것을 확인할 수 있었다.

[60]

[61] 실시예 5. 가시아메바가 감염된 각막세포에서 가시아메바 검출 확인

[62] 인체각막세포(Human corneal epithelial cells, HCE)에 가시아메바 (*Acanthamoeba castellanii* #30868-pathogenic)를 감염시킨 후 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)로 염색하여 세포 존재를 확인하고 (도 6의 b), 실시예 2에서 선택된 가시아메바 코리스메이트 뮤테이즈의 단백질

항체결합부위에 특이적으로 결합하는 항체와 반응시켰다.

[63] 그 결과, 도 6의 C에서 나타낸 바와 같이 가시아메바만 특이적으로 검출되는 것을 확인하였다.

[64]

[65] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

산업상 이용가능성

[66] 본 발명의 조성물은 가시아메바에서 분비되는 코리스메이트 뮤테이즈(chorismate mutase)에서만 특이적으로 항원-항체반응을 일으킬 수 있어 기존의 가시아메바성 각막염 진단방법에 비해 신속하고 정확한 진단 및 각막염의 원인 감별이 가능한바, 가시아메바성 각막염 진단 키트, 치료제 및 콘택트렌즈 소독제 제조 등에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

청구범위

- [청구항 1] 코리스메이트 뮤테이즈(chorismate mutase) 단백질에 특이적인 항체를 포함하는, 가시아메바성 각막염 감별 진단용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 코리스메이트 뮤테이즈(chorismate mutase) 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 코리스메이트 뮤테이즈(chorismate mutase) 단백질은 병원성 가시아메바에서 분리된 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 항체는 상기 코리스메이트 뮤테이즈(chorismate mutase) 단백질에서 서열번호 2의 아미노산 서열 부위에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 5] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 가시아메바성 각막염 감별 진단용 키트.
- [청구항 6] 피검자 유래의 생물학적 시료에 대하여, 코리스메이트 뮤테이즈(chorismate mutase) 단백질에 특이적인 항체의 항원-항체 반응을 측정하는 단계를 포함하는, 가시아메바성 각막염 환자의 각막염 감별 진단을 위한 정보제공방법.
- [청구항 7] 가시아메바성 각막염 감별 진단용 조성물의 제조를 위한 코리스메이트 뮤테이즈(chorismate mutase) 단백질에 특이적인 항체의 용도.

[도 1a]

ATGCGCTTCCTGCTGECCTTCGTCTTTCATGTTTGGCTCTCGCCAGGCGGCGCTCGGCCAACAATAACGCCAACAACTGGAGGAGCTGATCGCCAACGGCCCTG
CCGGCCAACTACGGCCAGCTCAAGGCCCGAGCTGGCCGCCCTCCAGGCCAACCTCGACGGCCGCGAGATCAACGCCCTCCAGGAGTCCCTCGCCGCGGTGGCGGCC
AACGTGCGCTACATCAAGTGGCTCGAGCCAGCTGGCCAACTGCTGACGCGCTCCACCTGCACCAACCTCCGACTGCGTCCGCGCGCCCATCAACCCAGCTCGAC
GAGTCTCTCATGCAAGCTCTACGCCACGCGCCCTCTCGTTGCGCCCTCCAGGCCGCGCTACATCAAGTACGCCCGCGGCCAGGACGTGCTGGACTCCAGCGCGGAG
TCGGTGTGTGCTGGCCAAAGCCCGCGGAGCGCGCTGTCGCCAACGGCCCTGCGGAGTACGTTGGGCGAGGTCTCTACGCCAACTACTGCAATGCTCTAGGTCTCC
AAGCGCCTTCAGGTGGAGACCCCTCAACTCCGAGTTCAACGCCCGGCTCCCGCTCCAGCCAGCCGATTCG

[도 1b]

MSFLLAFFVFMALASAAATNNANL EELIANALPAKYGQKAGVAAALQANLTAGI NAYQSSLAAYAAVRYI KELEQLGNLPDASTCTNLDQVRAPINQLD
ELLMLLVATRLSFALGAGYIKYAAGQDVLDSRRSVVLNARASAVANGLP EYVGQQLYGNVCM LVSKRLQVETLNSEFNAGLPVPVQHAD

[2a]

MRFLAFVFMALASASATNNIMLEELIANALPAKYQLKAQVAALQANLTAQINAVQESLAAVAANV

[illegible]

redox

RYIKSLEQLGNLPDASTCINLDCVRAPINQLDELLMQLYATRLSFALQAGYIKYAAQQDVLDSRESVVL

hhhhhhhhcccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc

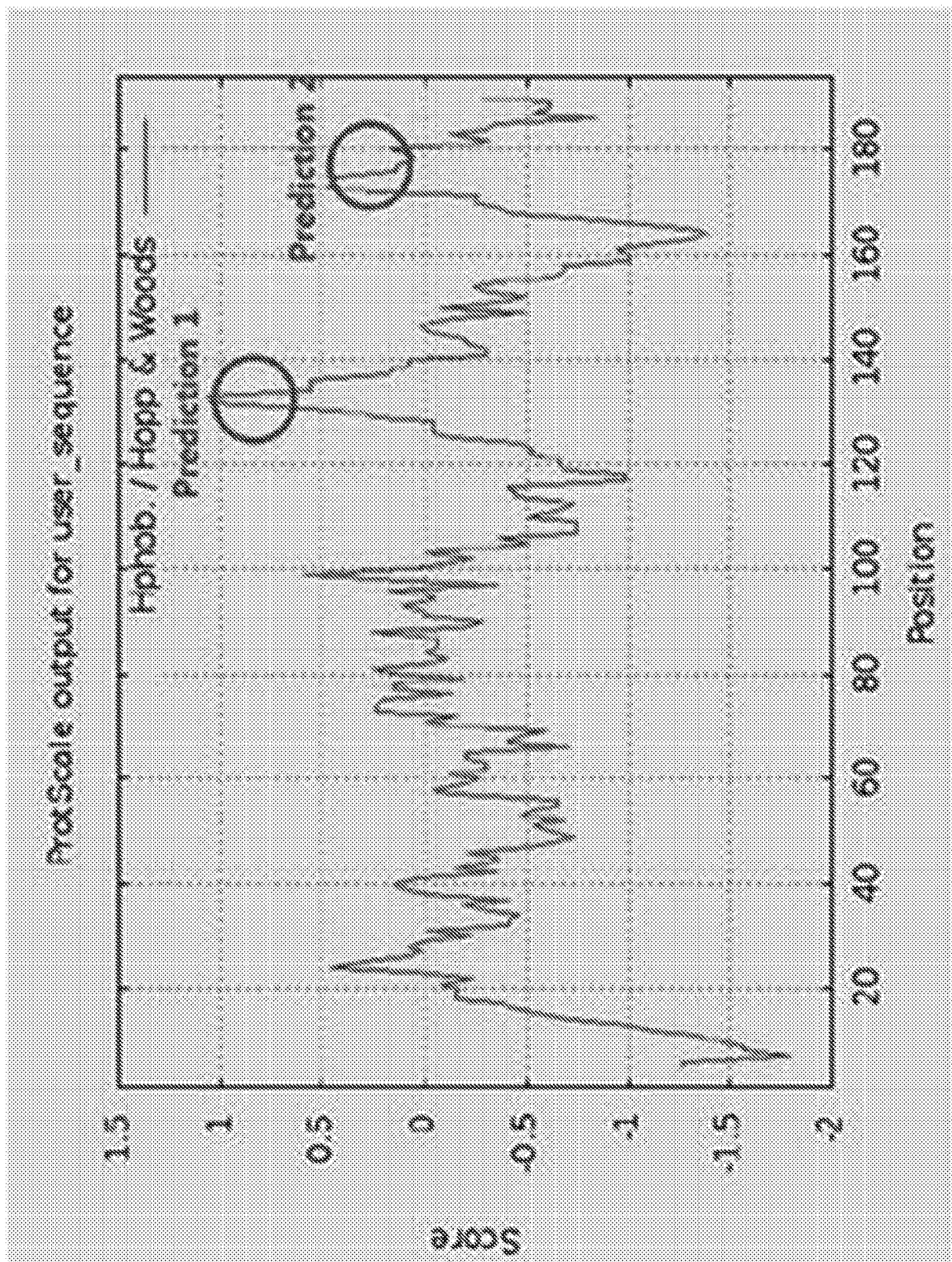


2-10308-2

ANARASAVANGLPEYVGQVLYGNYCMLYVSKRLQVETLNSEFNAGLPVPVQVHAD

hhhhhhhhhtccccchheettccccchhhhhhbbbbbttcccccc

[도2b]

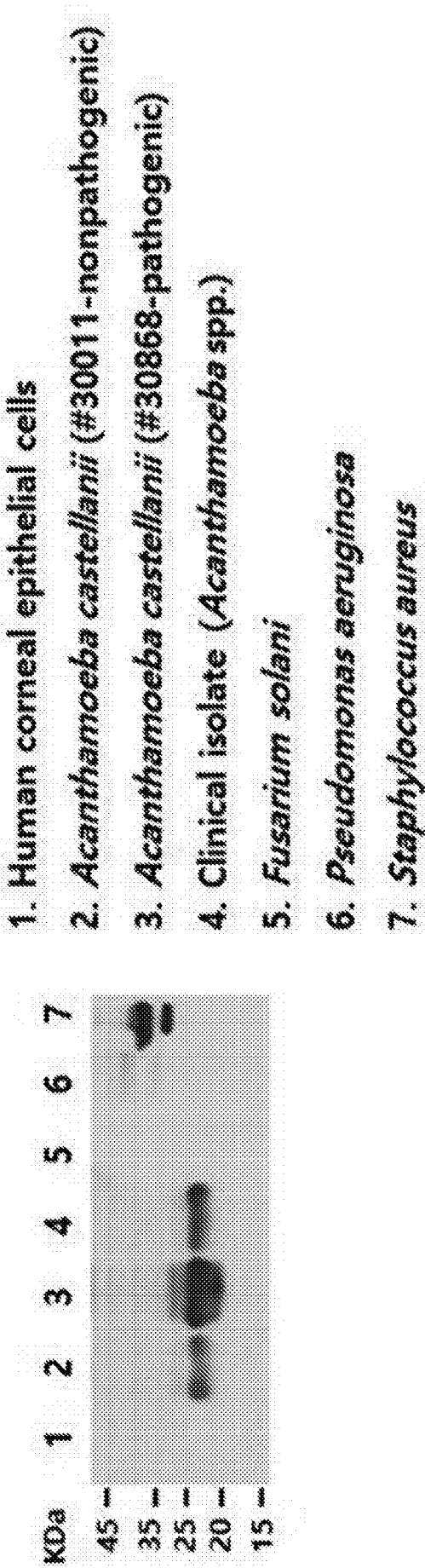


[도3]

Fusarium	:	-----	* 20	40	*	60	*	80	*	100		73
FUSARIUM	:	-----	* 20	40	*	60	*	80	*	100		73
Staphyloco	:	-----	* 20	40	*	60	*	80	*	100		93
Pseudomona	:	-----	* 20	40	*	60	*	80	*	100		100
Acanthamoe	:	-----	* 20	40	*	60	*	80	*	100		73
Fusarium	:	-----	* 120	140	*	160	*	180	*	200		155
FUSARIUM	:	-----	* 120	140	*	160	*	180	*	200		155
Staphyloco	:	-----	* 120	140	*	160	*	180	*	200		194
Pseudomona	:	-----	* 120	140	*	160	*	180	*	200		190
Acanthamoe	:	-----	* 120	140	*	160	*	180	*	200		150
Fusarium	:	-----	* 220	240	*	260	*	280	*	300		213
FUSARIUM	:	-----	* 220	240	*	260	*	280	*	300		213
Staphyloco	:	-----	* 220	240	*	260	*	280	*	300		295
Pseudomona	:	-----	* 220	240	*	260	*	280	*	300		282
Acanthamoe	:	-----	* 220	240	*	260	*	280	*	300		194
Fusarium	:	-----	* 320	340	*	360	*	380				223
FUSARIUM	:	-----	* 320	340	*	360	*	380				266
Staphyloco	:	-----	* 320	340	*	360	*	380				363
Pseudomona	:	-----	* 320	340	*	360	*	380				365
Acanthamoe	:	-----	* 320	340	*	360	*	380				-

Prediction 2

[도4]

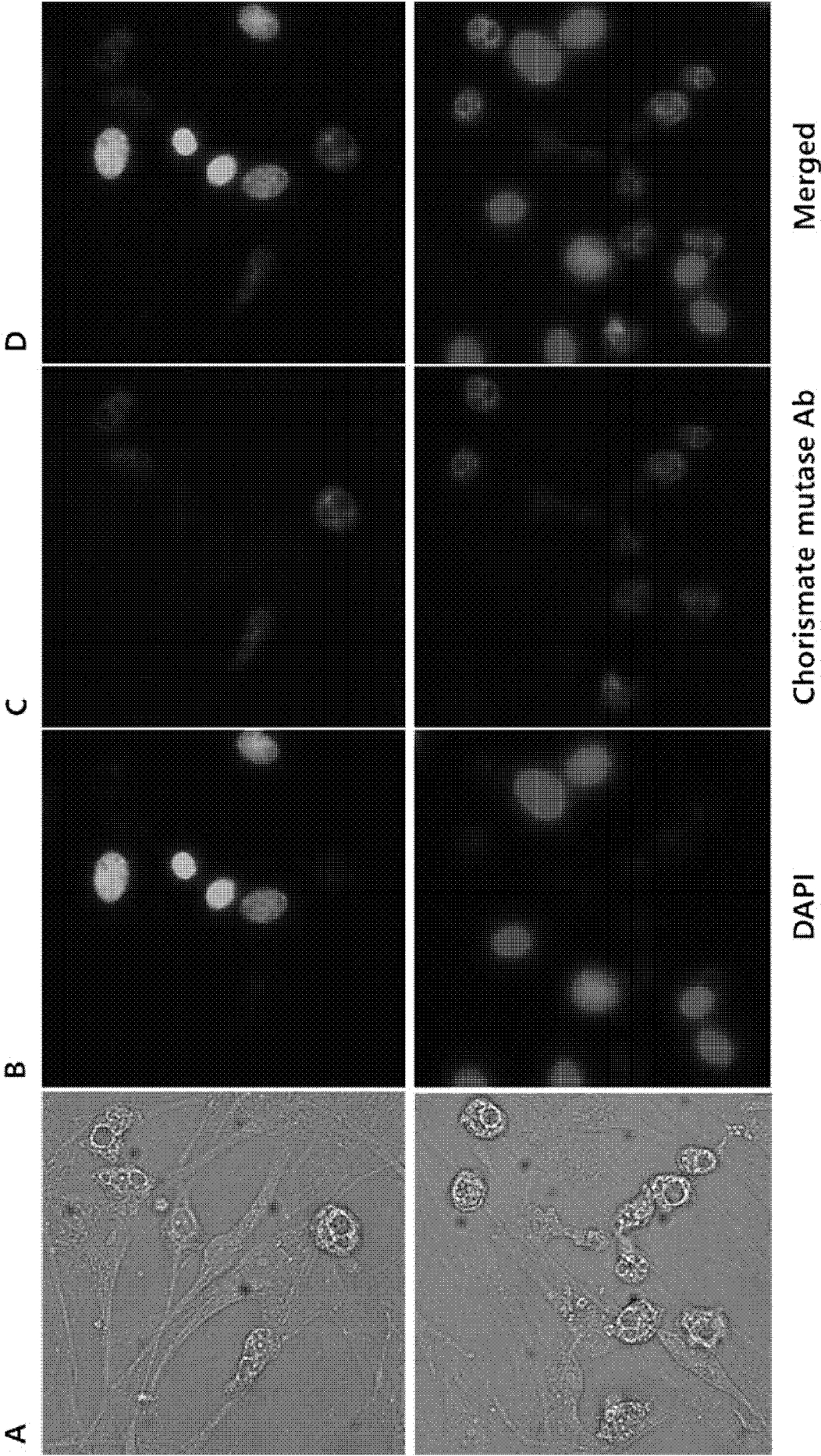


[도5]

- 1. Human corneal epithelial cells
- 2. *Acanthamoeba castellanii* (#30011-nonpathogenic)
- 3. *Acanthamoeba castellanii* (#30868-pathogenic)
- 4. Clinical isolate (*Acanthamoeba* spp.)
- 5. *Fusarium solani*
- 6. *Pseudomonas aeruginosa*
- 7. *Staphylococcus aureus*



[도6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/000727

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N 33/573(2006.01)i; G01N 33/569(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N 33/573(2006.01); C07K 14/44(2006.01); C12N 15/11(2006.01); C12N 15/30(2006.01); C12Q 1/68(2006.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 코리스메이트 뮤테이즈(chorismate mutase), 항체(antibody), 가시아메바 (Acanthamoeba), 각막염(keratitis)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MOON, E.-K. et al. Comparison of Proteins Secreted into Extracellular Space of Pathogenic and Non-pathogenic Acanthamoeba castellanii. Korean J. Parasitol. 2018, vol. 56, no. 6, pp. 553-558. See abstract; and page 557.	1-7
A	KR 10-1308516 B1 (KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 17 September 2013 (2013-09-17) See claims 1-2, 4-5 and 7-8.	1-7
A	KR 10-1521409 B1 (KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 18 May 2015 (2015-05-18) See entire document.	1-7
A	CN 107501404 A (JINLIN MEDICAL UNIVERSITY) 22 December 2017 (2017-12-22) See entire document.	1-7
A	KR 10-2010-0044736 A (COUNCIL OF SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH) 30 April 2010 (2010-04-30) See entire document.	1-7
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 April 2021		Date of mailing of the international search report 28 April 2021
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/000727

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/000727

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
KR	10-1308516	B1	17 September 2013	KR 10-2012-0117154	A	24 October 2012	
KR	10-1521409	B1	18 May 2015	None			
CN	107501404	A	22 December 2017	CN	107501404	B	23 October 2020
KR	10-2010-0044736	A	30 April 2010	AU	2008-256216	A1	04 December 2008
				AU	2008-256216	B2	31 July 2014
				CA	2689306	A1	04 December 2008
				CA	2689306	C	15 January 2019
				CN	101541979	A	23 September 2009
				CN	101541979	B	05 November 2014
				CN	104313180	A	28 January 2015
				EP	2155909	A2	24 February 2010
				EP	2155909	B1	07 March 2018
				HK	1206396	A1	08 January 2016
				IL	202459	A	01 August 2011
				JP	2010-528599	A	26 August 2010
				JP	2014-223077	A	04 December 2014
				JP	5718049	B2	13 May 2015
				JP	5927243	B2	01 June 2016
				MY	150954	A	31 March 2014
				NZ	582232	A	25 May 2012
				TW	200907057	A	16 February 2009
				US	2011-0111969	A1	12 May 2011
				US	2013-0310279	A1	21 November 2013
				US	2017-0275710	A1	28 September 2017
				US	584392	B2	10 March 2020
				US	8465951	B2	18 June 2013
US	9777339	B2	03 October 2017				
WO	2008-146306	A2	04 December 2008				
WO	2008-146306	A3	15 January 2009				

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) G01N 33/573(2006.01)i; G01N 33/569(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) G01N 33/573(2006.01); C07K 14/44(2006.01); C12N 15/11(2006.01); C12N 15/30(2006.01); C12Q 1/68(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 코리스메이트 뮤테이즈(chorismate mutase), 항체(antibody), 가시아메바(Acanthamoeba), 각막염(keratitis)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	MOON, E.-K. 등, 'Comparison of Proteins Secreted into Extracellular Space of Pathogenic and Non-pathogenic Acanthamoeba castellanii', Korean J. Parasitol., 2018, 56권, 6호, 페이지 553-558 초록; 페이지 557	1-7
A	KR 10-1308516 B1 (경북대학교 산학협력단) 2013.09.17 청구항 1-2, 4-5, 7-8	1-7
A	KR 10-1521409 B1 (경북대학교 산학협력단) 2015.05.18 전체 문헌	1-7
A	CN 107501404 A (JINLIN MEDICAL UNIVERSITY) 2017.12.22 전체 문헌	1-7
A	KR 10-2010-0044736 A (카운실 오브 사이언티픽 엔드 인더스트리얼 리서치) 2010.04.30 전체 문헌	1-7
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2021년04월28일(28.04.2021)		국제조사보고서 발송일 2021년04월28일(28.04.2021)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 정다원 전화번호 +82-42-481-5373

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

- a. ☒ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - ☒ 부록 C/ST.25 텍스트 파일
 - ☐ 서면 혹은 이미지 파일
- b. ☐ PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록
- c. ☐ 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록
 - ☐ 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))
 - ☐ 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1308516 B1	2013/09/17	KR 10-2012-0117154 A	2012/10/24
KR 10-1521409 B1	2015/05/18	없음	
CN 107501404 A	2017/12/22	CN 107501404 B	2020/10/23
KR 10-2010-0044736 A	2010/04/30	AU 2008-256216 A1	2008/12/04
		AU 2008-256216 B2	2014/07/31
		CA 2689306 A1	2008/12/04
		CA 2689306 C	2019/01/15
		CN 101541979 A	2009/09/23
		CN 101541979 B	2014/11/05
		CN 104313180 A	2015/01/28
		EP 2155909 A2	2010/02/24
		EP 2155909 B1	2018/03/07
		HK 1206396 A1	2016/01/08
		IL 202459 A	2011/08/01
		JP 2010-528599 A	2010/08/26
		JP 2014-223077 A	2014/12/04
		JP 5718049 B2	2015/05/13
		JP 5927243 B2	2016/06/01
		MY 150954 A	2014/03/31
		NZ 582232 A	2012/05/25
		TW 200907057 A	2009/02/16
		US 2011-0111969 A1	2011/05/12
		US 2013-0310279 A1	2013/11/21
		US 2017-0275710 A1	2017/09/28
		US 584392 B2	2020/03/10
		US 8465951 B2	2013/06/18
		US 9777339 B2	2017/10/03
		WO 2008-146306 A2	2008/12/04
		WO 2008-146306 A3	2009/01/15