

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2023-0143734
(43) 공개일자 2023년10월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/569 (2017.01) C07K 14/44 (2006.01)
C07K 16/20 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/56905 (2013.01)
C07K 14/44 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0042727
(22) 출원일자 2022년04월06일
심사청구일자 2022년04월06일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경
희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
문은경
서울특별시 동대문구 경희대로 26, 경희대학교 의
과대학 124호
김민정
서울특별시 동대문구 경희대로 26, 경희대학교 의
과대학 126호
(74) 대리인
김순웅

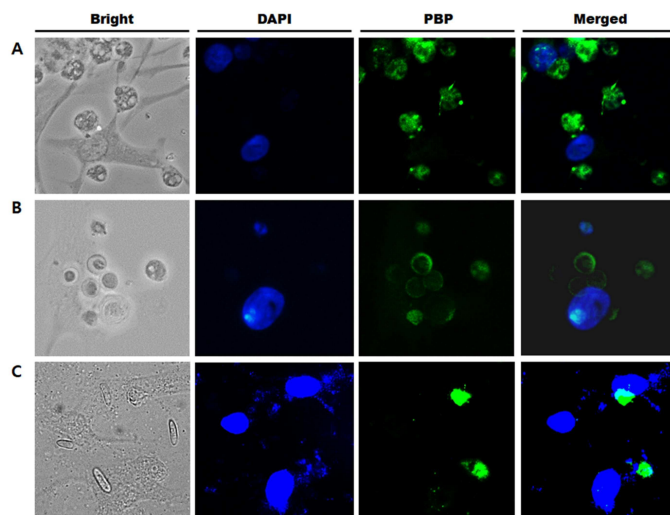
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 주변세포질 결합 단백질에 대한 신규한 항체를 포함하는 가시아메바 중 검출용 조성물

(57) 요약

본 발명은 병원성 가시아메바가 분비하는 주변세포질 결합 단백질(Periplasmic binding protein)을 기반으로 제
작한 항체에 대한 것으로, 본 발명에 따른 PBP 항체는 가시아메바의 영양형 및 포낭형을 검출할 수 있을 뿐만 아
니라 다양한 가시아메바 종에 대해서 특이적으로 검출할 수 있는 것을 확인한 바, 이를 가시아메바 중 검출용 조
성물, 가시아메바 중 감염에 의한 각막염의 진단용 조성물, 키트 등으로 유용하게 활용할 수 있다. 특히 본 발명
에 따른 PBP 항체를 사용하여 가시아메바 감염에 의한 각막염을 진단할 시 조직검체를 채취하고 배양하는 단계가
필요하지 않아 신속하고 정확하게 조기에 진단할 수 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

C07K 16/20 (2013.01)

G01N 33/6893 (2013.01)

G01N 2333/44 (2013.01)

G01N 2800/162 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711148111
과제번호	2020R1A2C1005345
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	분비단백질 항체를 이용한 아메바성 각막염의 감별진단법 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

가시아메바의 주변세포질 결합 단백질(Periplasmic binding protein)에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는, 가시아메바 종(*Acanthamoeba* spp.) 검출용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 가시아메바는 병원성 가시아메바인 것을 특징으로 하는, 검출용 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 주변세포질 결합 단백질(Periplasmic binding protein)은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 검출용 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 항체는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열 중 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열 부위에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는, 검출용 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 가시아메바 종(*Acanthamoeba* spp.)은 아칸토아메바 카스텔란(*Acanthamoeba castellanii*), 아칸토아메바 하체티(*Acanthamoeba hatchetti*), 아칸토아메바 폴리파가(*Acanthamoeba polyphaga*), 아칸토아메바 쿨버트슨(*Acanthamoeba culbertsoni*) 및 아칸토아메바 로이레바(*Acanthamoeba royreba*), 아칸토아메바 힐리(*Acanthamoeba healyi*), 아칸토아메바 룩두넨시스(*Acanthamoeba lugdunensis*), 아칸토아메바 퀴나(*Acanthamoeba quina*), 아칸토아메바 리조데스(*Acanthamoeba rhysodes*) 및 아칸토아메바 트리앵글라리스(*Acanthamoeba triangularis*)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 검출용 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 가시아메바 종(*Acanthamoeba* spp.)은 영양형(trophozoite) 및 포낭형(cyst)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 검출용 조성물.

청구항 7

가시아메바의 주변세포질 결합 단백질(Periplasmic binding protein)에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는,

가시아메바 종(*Acanthamoeba* spp.) 감염에 의한 각막염 진단용 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서,

상기 주변세포질 결합 단백질(Periplasmic binding protein)은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 각막염 진단용 조성물.

청구항 9

제 7항에 있어서,

상기 항체는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열 중 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열 부위에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는, 각막염 진단용 조성물.

청구항 10

가시아메바의 주변세포질 결합 단백질(Periplasmic binding protein)에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는, 가시아메바 종(*Acanthamoeba* spp.) 감염에 의한 각막염 진단용 키트.

청구항 11

가시아메바의 주변세포질 결합 단백질(Periplasmic binding protein)에 특이적으로 결합하는 항체를 시료에 처리하는 단계; 및 시료의 반응을 검출하는 단계;를 포함하는, 가시아메바 종(*Acanthamoeba* spp.) 감염에 의한 각막염 진단을 위한 정보 제공 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 주변세포질 결합 단백질에 대한 신규한 항체를 포함하는 가시아메바 종(*Acanthamoeba* spp.) 검출용 조성물 및 상기 가시아메바 종 감염에 의한 각막염 진단용 조성물에 대한 것으로, 상기 항체를 포함하는 조성물은 가시아메바에서 분비되는 주변세포질 결합 단백질에 대해서만 특이적으로 항원-항체반응을 일으키므로 기존의 가시아메바성 각막염 진단방법에 비해 신속하고 정확하게 각막염의 원인을 진단할 수 있다.

배경 기술

[0003] 각막(Cornea)이란 안구의 가장 바깥쪽에 존재하는 외막 중 앞쪽의 약 1/6을 차지하고 눈으로 들어오는 빛을 굴절시키는 역할을 하며 혈관이 없는 것이 특징이다. 각막은 조직학적으로 여섯 개의 층으로 이루어져 있다. 상기 각막은 앞쪽에서부터 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)로 구별된다.

[0004] 각막은 눈의 맨 앞에 위치함으로써 외상, 감염 및 기타 면역반응 등에 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.

[0005] 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.

- [0006] 인체 각막염은 각막에 세균이나 바이러스가 침입해 염증이 생기는 질환으로 포도상구균 (*Staphylococcus* spp.), 녹농균 (*Pseudomonas* spp.), 진균 (*Fusarium* spp.) 및 가시아메바 종(*Acanthamoeba* spp.) 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 눈부심, 통증 유발 등의 증상을 나타내고 콘택트렌즈를 착용하는 사람들에게서 주로 발생되며 세균 및 곰팡이에 의한 각막염과 감별진단이 쉽지 않다.
- [0007] 아메바성 각막염의 진단은 각막염이 발생한 환자의 각막에서 조직검체를 채취하여 검사하는데, 현재 진단방법으로는 현미경 관찰 및 PCR 등의 방법을 통해 진단이 이뤄진다. 하지만 상기 방법을 통한 확진을 위해서는 조직 배양이 필요하므로 약 1주일의 진단시간이 필요하다. 이로 인해 조기진단이 어렵고 치료시간도 더욱 길어지고 있는 실정이다.
- [0008] 따라서 신속한 진단을 위하여, 신규한 가시아메바성 각막염 감별진단법이 절실히 필요한 상황이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명자들은 가시아메바 종을 신속하고 정확하게 검출할 수 있는 방법에 대하여 연구하던 중, 가시아메바가 분비하는 특정 단백질에 대한 신규한 항체를 제작하고 이의 가시아메바 종에 대한 특이적 검출 효과를 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0011] 따라서 본 발명의 목적은 가시아메바 종 검출용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적은 가시아메바 종 감염에 의한 각막염 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 가시아메바 종 감염에 의한 각막염 진단용 키트를 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 가시아메바 종 감염에 의한 각막염 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0016] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 가시아메바의 주변세포질 결합 단백질(Periplasmic binding protein)에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는, 가시아메바 종(*Acanthamoeba* spp.) 검출용 조성물을 제공한다.
- [0017] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 가시아메바의 주변세포질 결합 단백질(Periplasmic binding protein)에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는, 가시아메바 종(*Acanthamoeba* spp.) 감염에 의한 각막염 진단용 조성물을 제공한다.
- [0018] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 가시아메바의 주변세포질 결합 단백질(Periplasmic binding protein)에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는, 가시아메바 종(*Acanthamoeba* spp.) 감염에 의한 각막염 진단용 키트를 제공한다.
- [0019] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 가시아메바의 주변세포질 결합 단백질(Periplasmic binding protein)에 특이적으로 결합하는 항체를 시료에 처리하는 단계; 및 시료의 반응을 검출하는 단계;를 포함하는, 가시아메바 종(*Acanthamoeba* spp.) 감염에 의한 각막염 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0021] 본 발명에 따른 병원성 가시아메바가 분비하는 주변세포질 결합 단백질(Periplasmic binding protein)의 높은 항원성을 보이는 부위를 기반으로 제작한 항체는 가시아메바의 영양형 및 포낭형을 검출할 수 있을 뿐만 아니라 가시아메바에 대해서만 특이적으로 검출할 수 있는 것을 확인한 바, 이를 가시아메바 검출용 조성물, 가시아메바 종(*Acanthamoeba* spp.) 감염에 의한 각막염의 진단용 조성물, 키트 등으로 유용하게 활용할 수 있다. 특히

본 발명에 따른 PBP 항체를 사용하여 가시아메바 중 감염에 의한 각막염을 진단할 시 조직 검체를 채취하고 배양하는 단계가 필요하지 않아 신속하고 정확하게 조기에 진단할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 병원성 가시아메바 분비 단백질 중 PBP(Periplasmic binding protein)의 ORF를 나타낸 것으로, 도 1 중 A는 PBP의 뉴클레오타이드 서열을 나타낸 것이고, 도 1 중 B는 PBP의 아미노산 서열을 나타낸 것이다.
- 도 2는 PBP 단백질의 2차 구조를 나타낸 결과이다.
- 도 3은 PBP 단백질의 구조 중 항원성이 높은 부위를 나타낸 것이다.
- 도 4는 병원성 가시아메바 PBP의 항원성이 높은 부위에 대해 다른 각막염의 원인균의 PBP와의 유사성을 확인한 결과이다.
- 도 5는 본 발명에 따른 PBP 항체의 가시아메바에 대한 특이적인 검출 효과를 확인한 결과이다.
- 도 6은 본 발명에 따른 PBP 항체의 가시아메바에 대한 검출 효과를 확인한 결과로, 도 6 중 A는 가시아메바의 영양형(trophozoite)에 대한 검출 효과를 확인한 결과이고, 도 6 중 B는 가시아메바의 포낭형(cyst)에 대한 검출 효과를 확인한 결과이며, 도 6 중 C는 가시아메바와 다른 각막염 원인균의 공동배양에 있어서, 가시아메바에 대한 특이적인 검출 효과를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [0025] 본 발명은 가시아메바의 주변세포질 결합 단백질(Periplasmic binding protein)에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는, 가시아메바 중(*Acanthamoeba* spp.) 검출용 조성물을 제공한다.
- [0026] 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.
- [0027] 본 발명에 있어서, 상기 "주변세포질 결합 단백질(Periplasmic binding protein)"은 세포질 막과 외부 세포막 사이의 공간에서 기능하는 단백질로, 수송(transport), 주화성(chemotaxis) 및 정족수 감지(quorum sensing)를 포함하는 다양한 기본 과정을 매개한다. 본 발명에 있어서, 상기 PBP는 바람직하게는 가시아메바로부터 분리되는 단백질일 수 있다. 바람직하게는 상기 가시아메바는 병원성일 수 있으며, 상기 병원성은 비병원성을 제외한 저병원성 및 고병원성을 모두 포함하는 것일 수 있다. 보다 바람직하게는 아칸토아메바 카스텔란(*Acanthamoeba castellanii*)으로부터 분리되는 단백질일 수 있다.
- [0028] 상기 주변세포질 결합 단백질은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다. 특히 상기 주변세포질 결합 단백질은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열뿐만 아니라 이와 균등한 생물학적 활성을 발휘하는 아미노산 서열의 변이를 포함하는 데에 한정될 것이라는 것은 당업자에게 명확하다. 즉, 가시아메바가 분비하는 주변세포질 결합 단백질일 수도 있지만 아미노산 서열에 있어 임의의 변이를 야기하여 합성한 단백질도 본 발명에 해당될 수 있다.
- [0029] 이러한 아미노산 변이는 아미노산 결사슬 치환체의 상대적 유사성, 예컨대, 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초하여 이루어진다. 아미노산 결사슬 치환체의 크기, 모양 및 종류에 대한 분석에 의하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘은 모두 양전하를 띤 잔기이고; 알라닌, 글라이신과 세린은 유사한 크기를 가지며; 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 유사한 모양을 갖는다는 것을 알 수 있다. 따라서 이러한 고려 사항에 기초하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘; 알라닌, 글라이신과 세린; 그리고 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 생물학적으로 기능 균등물이라 할 수 있다.
- [0030] 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있으며, 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다.

- [0031] 따라서 본 발명에 따른 주변세포질 결합 단백질은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있고, 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더욱더 바람직하게는 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [0032] 바람직하게는 본 발명에 따른 주변세포질 결합 단백질에 특이적으로 결합하는 항체는 주변세포질 결합 단백질에서 2차 구조분석을 통해 확인된 항원성이 높은 부위에 결합하는 것일 수 있으며, 항원성이 높은 부위는 도 2의 prediction 1 내지 6 부위 중 어느 하나일 수 있다. 바람직하게 상기 항원성이 높은 부위 중 prediction 5에 해당되는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열 부위에 특이적으로 결합하는 것일 수 있다. 상기에 기술한 바와 같이, 본 발명에 따른 주변세포질 결합 단백질에 특이적으로 결합하는 항체는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더욱더 바람직하게는 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열로 이루어진 부위에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 일실시예에 있어서, 본 발명에 따른 주변세포질 결합 단백질에 특이적으로 결합하는 항체는 인체 각 막세포 및 각막염을 야기하는 다른 원인균에 대해서는 검출 효과를 보이지 않았지만 가시아메바의 영양형(trophozoite) 및 포낭형(cyst) 모두에 대해 특이적인 검출 효과를 보임을 확인하였다.
- [0034] 따라서 본 발명에 따른 주변세포질 결합 단백질에 특이적으로 결합하는 항체는 가시아메바 종(*Acanthamoeba* spp.)을 검출할 수 있으며, 상기 가시아메바 종은 아칸토아메바 카스텔란(*Acanthamoeba castellanii*), 아칸토아메바 하체티(*Acanthamoeba hatchetti*), 아칸토아메바 폴리파가(*Acanthamoeba polyphaga*), 아칸토아메바 쿨버트슨(*Acanthamoeba culbertsoni*) 및 아칸토아메바 로이레바(*Acanthamoeba royreba*), 아칸토아메바 힐리(*Acanthamoeba healyi*), 아칸토아메바 룩두넨시스(*Acanthamoeba lugdunensis*), 아칸토아메바 퀴나(*Acanthamoeba quina*), 아칸토아메바 리조데스(*Acanthamoeba rhyodes*) 및 아칸토아메바 트리앵글라리스(*Acanthamoeba triangularis*)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 더불어 본 발명은 가시아메바의 주변세포질 결합 단백질(Periplasmic binding protein)에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는, 가시아메바 종(*Acanthamoeba* spp.) 감염에 의한 각막염 진단용 조성물을 제공한다.
- [0036] 또한 본 발명은 가시아메바의 주변세포질 결합 단백질(Periplasmic binding protein)에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는, 가시아메바 종(*Acanthamoeba* spp.) 감염에 의한 각막염 진단용 키트를 제공한다.
- [0037] 본 발명의 진단용 조성물 또는 진단용 키트에 있어서, 상기 주변세포질 결합 단백질에 특이적으로 결합하는 항체는 앞서 기술한 바와 같다.
- [0038] 본 발명에 있어서, 상기 "진단"은 특정 질병 또는 질환, 또는 이의 원인에 대한 한 개체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 개체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는 지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 개체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 개체의 상태를 모니터링 하는 것)를 포함한다.
- [0039] 본 발명의 가시아메바 종 감염에 의한 각막염 진단용 키트에는 가시아메바 종 감염 여부 분석 방법에 적합한 하나 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물 또는 장치가 포함될 수 있고, 항체의 구조 또는 생리 활성을 안정하게 유지시키는 완충액 또는 반응액이 추가로 포함될 수 있다. 또한, 안정성을 유지하기 위해, 4℃로 유지된 상태로 제공될 수 있다.
- [0040] 가시아메바 종이 분비하는 주변세포질 결합 단백질에 결합한 본 발명의 항체의 확인, 검출 및 정량을 용이하게 하기 위하여, 본 발명의 키트는 시험관 내 또는 생체 내에서 시료내의 항원-항체 반응을 확인하기 위한 성분을 추가로 포함할 수 있다. 상기 성분은 본 발명의 항체의 표지를 위한 공지의 화합물이거나, 항원-항체반응을 통한 탐색을 위하여 본 발명의 항체 또는 본 발명의 항체와 결합하는 특정 수용체에 대한 항체 또는 이들에 대한 2차 항체 및 이의 검출을 위한 시약일 수 있다.
- [0041] 또한 본 발명은 가시아메바의 주변세포질 결합 단백질(Periplasmic binding protein)에 특이적으로 결합하는 항체를 시료에 처리하는 단계; 및 시료의 반응을 검출하는 단계;를 포함하는, 가시아메바 종(*Acanthamoeba* spp.) 감염에 의한 각막염 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.
- [0042] 본 발명에 있어서, 상기 "가시아메바 종(*Acanthamoeba* spp.) 감염에 의한 각막염 진단을 위한 정보 제공 방법"이란 진단 또는 감별 단계로써 각막염 질환 진단을 위하여 필요한 객관적인 정보를 제공하는 것이며, 의사의 임

상학적 판단 또는 소견은 제외된다.

[0043] 상기 시료는 생물학적 시료 또는 비생물학적 시료일 수 있으며, 상기 생물학적 시료는 피검자 유래 시료일 수 있다. 바람직하게는 눈물, 조직, 세포, 세포 추출물, 세포 배양액 및 무세포상등액(Cell Free Supernatant)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에 있어서, 상기 "무세포 상등액(Cell Free Supernatant)"은 세포를 배양한 후 이를 원심분리하고 필터를 이용하여 여과한 세포를 제거한 순수 액체를 지칭한다. 상기 무세포 상등액은 세포를 배양한 후 이를 원심분리하고 필터를 이용하여 여과한 액체를 지칭한다. 또한 상기 비생물학적 시료는 화학적으로 합성된 PNA를 포함하는 것일 수 있다.

[0045] 상술한 본 발명의 내용은 상호 모순되지 않는 한, 서로 동일하게 적용되며, 당해 기술분야의 통상의 기술자가 적절한 변경을 가해 실시하는 것 또한 본 발명의 범주에 포함된다.

[0047] 이하 본 발명을 실시예를 통해 상세하게 설명하나 본 발명의 범위가 하기 실시예로만 한정되는 것은 아니다.

[0049] 실시예 1. 병원성 가시아메바 분비 단백질 중 PBP(Periplasmic binding protein) 확보

[0050] 1-1. PBP ORF(Open reading frame) 확인

[0051] 병원성 가시아메바(ATCC 30868, 아칸토아메바 카스텔란(*Acanthamoeba castellanii*))에 해당)의 분비 단백질 중 PBP 단백질의 ORF를 확보하여 도 1에 나타내었다. 그 결과 도 1 중 A에 나타낸 바 같이, PBP의 1,761 bp 뉴클레오타이드를, 도 1 중 B에 나타낸 바와 같이 PBP 단백질의 586 아미노산을 확인하였다.

[0053] 1-2. PBP의 2차 구조 분석 및 항원성 확인

[0054] 실시예 1-1에 의해 확보된 PBP 단백질의 2차 구조분석 및 항원성을 AbFRONTIER (AbFRONTIER, Seoul, Korea) 업체에 의뢰하여 확인하였다.

[0055] 그 결과 도 2 및 도 3에 나타낸 바와 같이, 병원성 가시아메바의 PBP 단백질로부터 항원성이 높은 6개의 예측(prediction) 부위를 확인하였다(prediction 1 내지 prediction 6). 특히 도 3과 같이, prediction 5가 항원성이 가장 높은 예측 부위를 확인하였다.

[0057] 1-3. 다른 각막염 원인균들의 PBP 아미노산 서열의 유사성 확인

[0058] 각막염의 원인이 될 수 있는 푸사리움 알보수시니움(*Fusarium albosuccineum*; GeneBank accession No. KAF4442825.1), 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*, GeneBank accession No. BBA23260.1) 및 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*, GeneBank accession No. KJJ10303.1)의 PBP 단백질에 대한 아미노산 정보들과 가시아메바 PBP 단백질의 아미노산 정보를 CLUSTAL_X version 2.1을 사용하여 비교하였다.

[0059] 그 결과 도 4에 나타낸 바와 같이, 병원성 가시아메바의 PBP는 다른 각막염의 원인균들의 PBP와 유사성이 현저히 낮았다(도 4 중 가시아메바의 PBP: Ac_PBP, 푸사리움 알보수시니움의 PBP: Fa_PBP, 스태필로코쿠스 아우레우스의 PBP: Sa_PBP, 슈도모나스 에루지노사의 PBP: Pa_PBP). 보다 구체적으로, 가시아메바 PBP의 아미노산 서열은 상기 원인균 각각에 대해 21.5%, 203% 및 26.4%의 유사성을 보였다.

[0060] 따라서 상기 실시예 1-2에서 확인된 바와 같이 병원성 가시아메바의 PBP 단백질 중 항원성이 높은 6개의 예측 부위에 있어서, 항원성이 가장 높은 부위인 prediction 5(EGDNRKRSVDVRSELLRPRADSD)를 항체 생성 부위로 선택하였다.

[0062] 실시예 2. 가시아메바 유래 PBP에 대한 항체 생성

[0063] 상기 실시예 1에서 확인한 바를 기반으로 병원성 가시아메바의 PBP 단백질 중 prediction 5에 대한 합성 펩타이드를 제작하였다(AbFRONTIER(AbFRONTIER, Seoul, Korea) 사에 의뢰하여 제작). 합성된 펩타이드(PBP-Ab; NH₂-

C-EGDNRKRSDVRSELLRPADSD-COOH) 1 mg을 CFA(complete Freund's adjuvant)와 동량 혼합한 혼합물을 NZW 토끼에게 1차 피내 주사하였다. 그 후 0.5 mg의 합성된 펩타이드와 IFA(incomplete Freund's adjuvant)와 동량 혼합한 혼합물을 3주, 2주 간격으로 2차, 3차 피내 주사하여 항체 생성을 유도하였다. 최종 부스팅(boosting) 1주 후 토끼를 희생하고 혈청을 확보하여 가시아메바 PBP에 특이적인 항체를 제조하였다.

[0065] 실시예 3. 본 발명에 따른 항체의 가시아메바에 대한 검출 효과 확인

[0066] 3-1. 각막염 원인균들 중 가시아메바에 대한 특이성 확인

[0067] 가시아메바와 더불어 인체 각막세포 (Human corneal epithelial cells; PCS-700-010), 각막염의 원인이 될 수 있는 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*; NCCP 32678), 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*; NCCP 15920) 및 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*; NCCP 16091)를 이용해 다음과 같은 방법으로 웨스턴 블롯(Western blot)을 수행하여 각 병원균의 PBP 단백질과 상기 실시예 2에서 제조한 가시아메바 PBP 특이적 항체의 항원-항체 반응을 확인하였다. 이를 위해 상기 인체 각막세포는 ATCC(American Type Culture Collection)에서 구입하였고, 푸사리움 솔라니, 스태필로코쿠스 아우레우스 및 슈도모나스 에루지노사는 질병관리본부 국가병원체지원은행(NCPB)에서 구입하였다. 각 세포를 용해시킨 용해물을 10% SDS-PAGE 전기영동(Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis)한 후, 니트로셀룰로오스 멤브레인(nitrocellulose)으로 옮겼다. 멤브레인을 5% 탈지유(skim milk)/TBST(Tris-buffered saline-트윈 20(Tween 20))로 1시간 동안 블로킹(blocking)한 후 본 발명에 따른 PBP 항체(1:1,000으로 희석)와 함께 4℃에서 밤새 반응시켰다. 다음 날, 멤브레인을 TBST로 3회 세척하고 2차 항체로 HRP(horseradish peroxidase)가 결합된 항-토끼 IgG(anti-rabbit IgG (Sigma-Aldrich(St.Louis, Mo, USA)에서 구입) (1:5,000으로 희석))와 함께 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 암실에서 x-선 필름과 발광 시약(Clarify Enhanced Chemiluminescence 시약(Thermo Fisher Waltham, MA, USA))를 사용하여 항체-항원 반응 밴드를 검출하였다.

[0068] 그 결과 도 5에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 PBP 항체는 병원성 가시아메바(ATCC 30868)만 특이적으로 검출하는 것을 확인하였다.

[0070] 3-2. 가시아메바 영양형 및 포낭형에 대한 검출 효과 확인

[0071] 인체 각막세포와 가시아메바의 영양형(trophozoite), 인체 각막세포와 가시아메바의 포낭형(cyst) 및 가시아메바의 영양형, 푸사리움 솔라니, 스태필로코쿠스 아우레우스 및 슈도모나스 에루지노사의 공동배양 실험군에 대하여 본 발명에 따른 PBP 항체의 검출 효과를 ICC(Immunocytochemistry)를 수행하여 확인하였다. 상기 가시아메바(ATCC 30868)의 포낭형은 영양형을 포낭형성배지 배지(95 mM NaCl, 5 mM KCl, 8 mM MgSO₄, 0.4 mM CaCl₂, 1 mM NaHCO₃ 및 20 mM Tris-HCl, pH9.0)에 접종하여 25℃에서 2일동안 배양하여 포낭으로 유도하여 준비하였다.

[0072] ICC를 수행하기 위하여 먼저, 6웰 플레이트에 멸균된 커버 글라스를 올려 인체 각막세포(3×10⁵ cells)를 배양하였다. 다음 날, 가시아메바 영양형(5×10⁵ cells) 또는 포낭형(5×10⁵ cells)을 인체 각막세포에 첨가하여 37℃의 5% CO₂ 인큐베이터에서 5시간 동안 공동배양하였다. 그 후, 가시아메바 영양형에 대해서 푸사리움 솔라니, 스태필로코쿠스 아우레우스 및 슈도모나스 에루지노사를 OD 600nm=0.5 값으로 첨가한 후 1시간 동안 공동배양하였다. 배지를 제거하고 PBS로 세척한 후, 100% 메탄올을 이용하여 실온에서 5분 동안 고정하였다. 다시 PBS로 세척한 후 실온에서 10분 동안 PBST로 투과시켰다. 그 후 블로킹 버퍼(1% BSA(bovine serum albumin), 22.52 mg/ml의 PBST)를 사용하여 실온에서 30분 동안 블로킹하였다. 본 발명에 따른 PBP 항체(1:200으로 희석)와 함께 4℃에서 밤새 반응시키고, CruzFluorTM 488이 결합된 항-토끼 IgG((CFL-488 conjugated anti-rabbit secondary IgG antibody) (Santa Cruz, Dallas, TX, USA))를 2차 항체(1:400으로 희석)로 사용하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이를 세척한 후 벡터실드 마운팅(VECTASHIELD mounting) 배지(Abcam, Burlingame, CA, USA)로 염색하여 형광 현미경(Leica DMI8, Wetzlar, Germany)으로 관찰하였다.

[0073] 그 결과 도 6에 나타난 바와 같이, 인체 각막세포의 핵은 DAPI(파란색)로 염색되었고, 가시아메바의 영양형과 포낭형은 본 발명에 따른 PBP 항체(초록색)와 강한 상호작용을 나타냄을 확인하였다. 즉, 본 발명에 따른 PBP 항체는 가시아메바의 영양형(도 6 중 A)과 포낭형(도 6 중 B)에 대해서만 특이적으로 항원-항체 반응하였다. 반면 각막염의 다른 원인으로 알려진 푸사리움 솔라니, 스태필로코쿠스 아우레우스 및 슈도모나스 에루지노사에

대해서는 반응하지 않고, 가시아메바 영양형에 대해서만 강한 상호작용을 보임을 확인하였다(도 6 중 C).

[0075] 3-3. 6종 가시아메바에 대한 검출 효과 확인

[0076] 본 발명에 따른 PBP 항체가 환경분리주 가시아메바(아칸토아메바 카스텔란(*Acanthamoeba castellanii* Neff, *A. castellanii* Neff)와 각막염을 일으킬 수 있는 4종의 가시아메바((아칸토아메바 하체티(*Acanthamoeba hatchetti*, *A. hatchetti*), 아칸토아메바 폴리파가(*Acanthamoeba polyphaga*, *A. polyphaga*), 아칸토아메바 쿨버트손(*Acanthamoeba culbertsoni*, *A. culbertsoni*) 및 아칸토아메바 로이레바(*Acanthamoeba royreba*, *A. royreba*)) 및 뇌염을 일으킬 수 있는 1개의 가시아메바 종인 아칸토아메바 힐리(*Acanthamoeba healyi*, *A. healyi*)도 검출할 수 있는지 상기 실시예 3-2에 기재된 동일한 방법으로 ICC를 수행하여 확인하였다(상기 가시아메바 종은 아주대학교 의과대학 미생물학교실에서 분양받았음). 그 결과는 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0077]

아칸토아메바 종 (<i>Acanthamoeba</i> spp.)	ICC(Immunocytochemistry)	
	영양형	포낭형
<i>A. castellanii</i> Neff	P	P
<i>A. polyphaga</i>	P/N*	P/N*
<i>A. hatchetti</i>	P	P
<i>A. culbertsoni</i>	P	P
<i>A. royreba</i>	P	P
<i>A. healyi</i>	P	P

[0078] 그 결과 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 PBP 항체는 모든 종류의 가시아메바의 영양형 및 포낭형을 검출할 수 있음을 확인하였다.

[0080] 종합적으로 본 발명은 병원성 가시아메바가 분비하는 PBP 단백질을 기반으로 제작한 항체에 대한 것으로, 본 발명에 따른 PBP 항체는 가시아메바의 영양형 및 포낭형을 검출할 수 있을 뿐만 아니라 다양한 가시아메바 종에 대한 높은 특이성을 가짐을 확인한 바, 이를 가시아메바 종 검출용 조성물, 가시아메바 종 감염에 의한 각막염의 진단용 조성물, 키트 등으로 유용하게 활용할 수 있다.

도면

도면1

A.

ATGTACCAACCAAGGCGTGGAGCCTCGCTCTTACGCTGGCCCTGTTCTGTTTGCCGGGGCCACCAGTGC GAATAAAGCCAAGATAGTGCTCA
CCGCCGAGGAGACTGAAGGCCCTGGGATTCTACTCGACCGATGGCGAACTGCTGGGCAAGGCCAAGGTCGGCCTCCTGCCGACGAGGCCAT
CGTCTCCAAGGACGGCACCCTGCTGTCCTCAACTTTGGCCTGCACGACTTCGACTCGCCCTACGGCGACGCGGGCCTCTATCTGTCCGG
ATCAACATCCCGCTGCTCTGAGGACAAGCTGTCTACACCTTCCCAAGGGCGCCCGGCCCACTCGGCCAGCGCGCCCCACGGGGTGA
AGTTCAACACGACGAGACCAAGCTCTACGTCAACACCGAGTGGACCTCGTCCGACGGCACCGCCAAGCCCTCCATTCTGGTCTACGACCTCAC
CGACGGCTCCGAGGAGCGGGCCAGGTGTGGACCTCGGCAACAACCAACAAGTGGCCACAACCTCGTCTTTTGAACGACGGCCGTACCGTG
TGGTGCAGCTTGGCCGCGAGGCGATCGCGGCAATGGACGCGCTCACGGCGAGGTCAAGACGCGCTTCTCTGGGCACACGATCGTGGGCG
TGGCGGGCTCACTTGGTCCACGGTCCGAGCCGGCGTGTCTCATCTGTCAGCGGCATCGCCGAGCTGTGGGCCATCAACACCACCGCCGCTACCC
GCCGCCCGTGGTGGCCACTACGCCGGCTACGGCACCGCCAGTTCTTTATTGGCCGTCTCGCCGACGGCAAGTACATCGTCTCGTCCCGCC
GTGTGGAACAGTCAGGTGCTCATCATCGACTACTGGACCAACAAGTCTGTGGCGCGCTGTCTGTCGATATCGACCCGGTCCGATCGCCATCT
CCGACGACTCCCGCTACGCCACCGCCGGCGCGGAGCCAGCCTAACCAAGATAGACCTCAGGAAGTTCACCACCGAGGTCAATCCAC
CGGCTCGCCACGGGACCCAATGGAGTCACCTTCGCACCAAGACCAACTCGTACAAGACACCGAATTCACGTCGGCGTGGTGATCTCGCTC
ACCGGGCGGGCAACGCCAACGCTACGAGTTCAGTCCGGCCTCGCCATCTGGAAGGAGCGGATCAACGACACCGCGGCGATCGCCCTGGCCA
ACAACAAGGCGCCTTCGTGGCCTCGTGTCTCGATGACCTGAGCGACAGCACCAGCAGCCGACTCTGCGGGAGCTGGTGGACGAGCA
CGGTGCCGACGCGCTGGTGGTGGCGTGGCGGGTTACACCGGACAGGCGCTGTTGCGCACCTGGACAGGAGGAGCTGCCCTGTGTGCG
CTGTTCCAGGTGAAGGCGACAACCGGAAGAGGAGCGAGTGGCAGCGAGCTTCTCAGGCGAGGGCGACAGCGAGTGTGGGCCACGACA
GGTGGTGCAGCCTCACCCGCTACTCAGCGACTTTGCCAGCGGTACTCCCGCAACGCTACGACGGTGAACGCCCAAGCGACGGCGCGGGCAT
CATCATCGAGCAGGCTGCCGTGAGATCGGGCCGAGTTCGGGCAAGAAGCTGGTGAAGCGATCGCCGCCACGGACACCGTCTCTTCTCGGGT
GCCGTCAAGTTCGACGCCCAAGGCAACAACATCTACGGCGACGACGCGCTGTGCTGATTCTGGGTGA

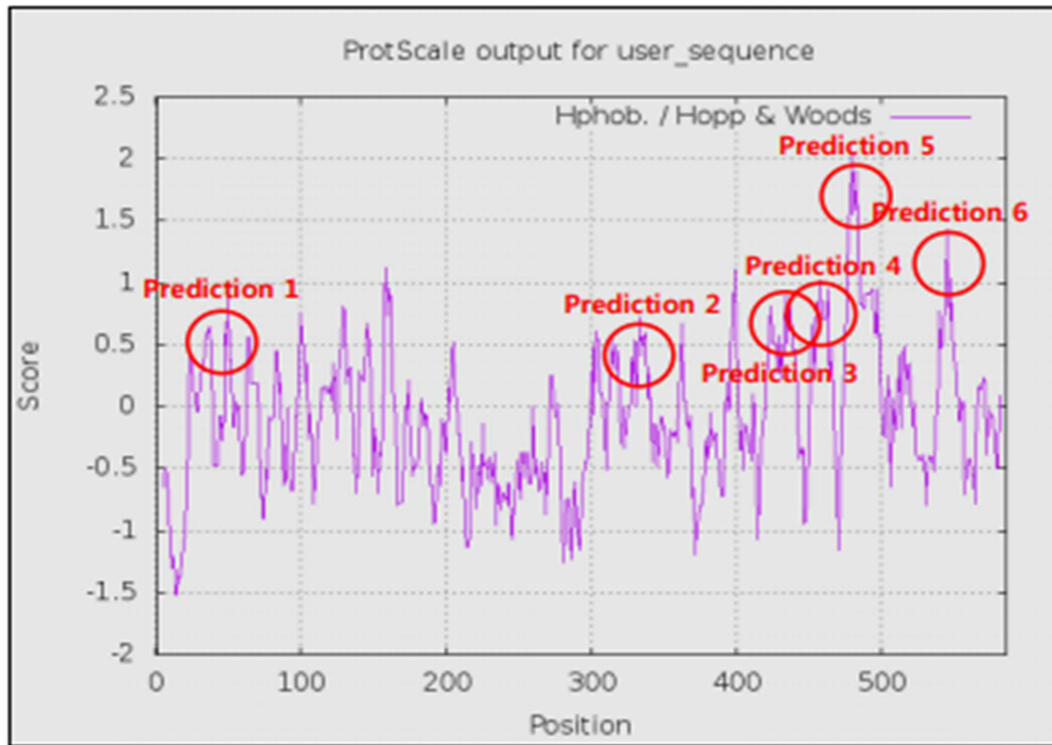
B.

MYQPKAWSLALTLALFLFAATSANKAKIVLTAEETEGALGFYSTDGELLGKAKVGLLPHEAIVSKDGTIAIVSNFGLHDFDSPYDAGLYLSR
INIPRLLEDKLFYTFPGAPAHSAQRAPHGVKFNHDETKLYNTEWTS SDGTAKPSILVYDLTDGSEEPQVWTLGNNTNKKCNFVFSNDGRIV
WLQLGPQGIAMDAVTGEVKTPFLLGTTIVGVRLTWSTVEPGVLI VSGIAELWAINTTAAYPPPVVRHYAGYGTQFLYSVSPDGKYIVAPA
VWNSQVLIIIDYWTTKVVARLSSDIDPVAIAISDDSRAYATGGRGASLTKIDLRKFTTEVIPTGSATGPNGVTFAPKINSYKITEFTVGVVISL
TGAGNANAYEFQSLAIWKERINDTGGIALANNKAFFVRLVFLDDLSDSTSTSRLLRELVDHGADALVVASAGFTPDRLLRLTDQEDVPLLS
LFQVEGDNKRKSDVRSELLRPRADSDVLGHDRCWCSLTRYSDFAQRYSRNATTVNAQATAAGIIIEQAAVRSGRSSGKRLVEAIAATD TVLFSG
AVKFDAQGNNIYGDSTPVLIRG.

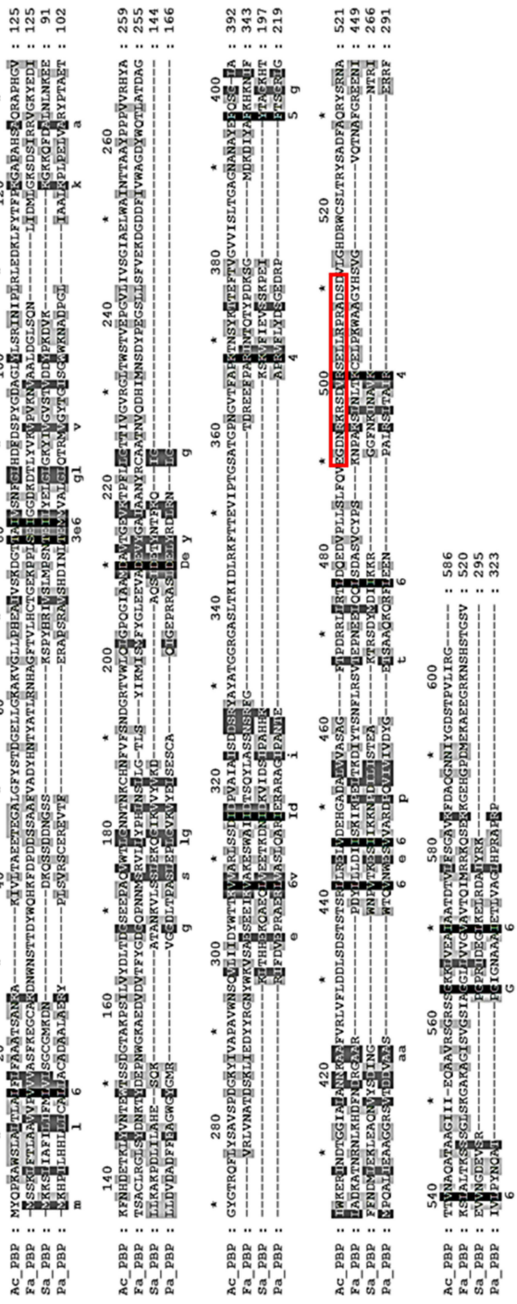
도면2

[illegible]

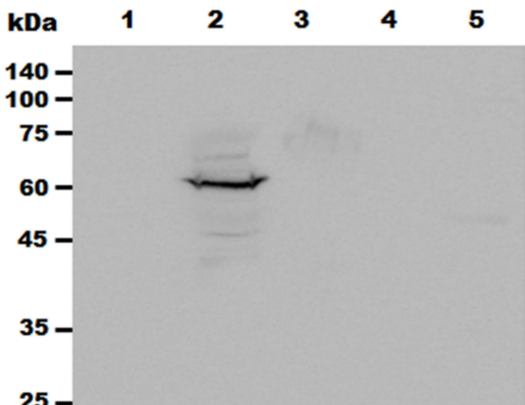
도면3



도면4

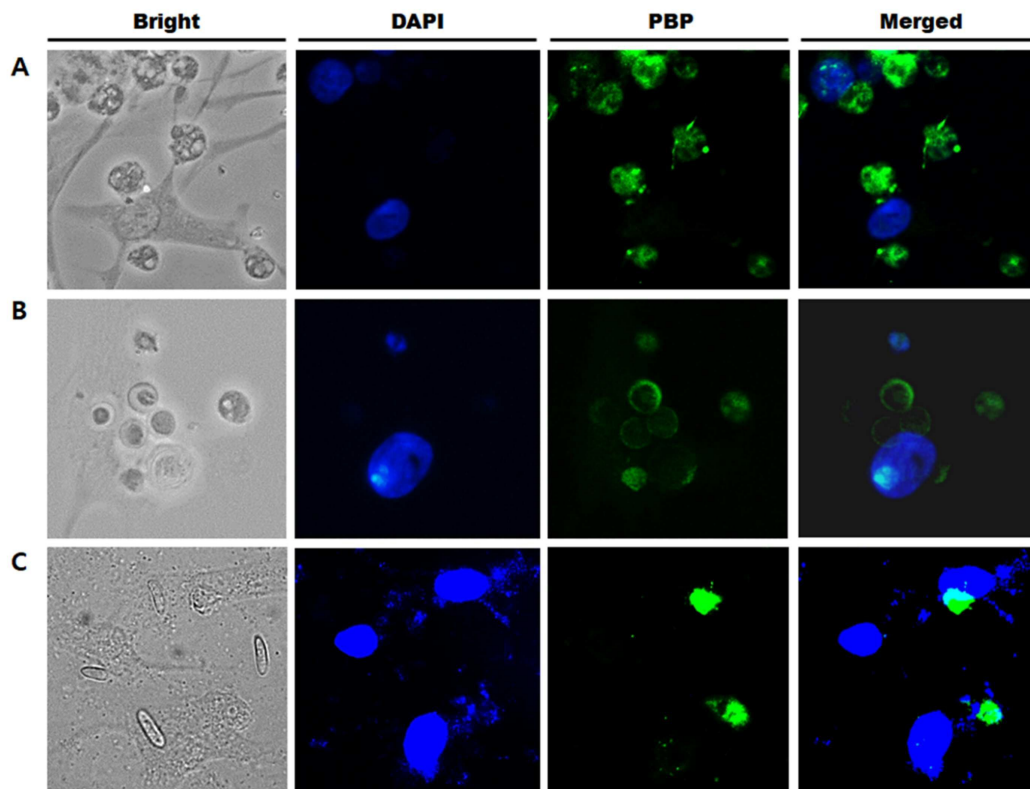


도면5



- Lane 1: Human corneal epithelial cells
- Lane 2: *Acanthamoeba castellanii* (ATCC 30868)
- Lane 3: *Fusarium solani*
- Lane 4: *Staphylococcus aureus*
- Lane 5: *Pseudomonas aeruginosa*

도면6



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> A composition for detecting Acanthamoeba spp, comprising a novel antibody to the periplasmic binding protein
- <130> 1-89P
- <160> 2
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 586
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Periplasmic binding protein
- <400> 1

Met Tyr Gln Pro Lys Ala Trp Ser Leu Ala Leu Thr Leu Ala Leu Phe
1 5 10 15

Leu Phe Ala Ala Ala Thr Ser Ala Asn Lys Ala Lys Ile Val Leu Thr

20 25 30
 Ala Glu Glu Thr Glu Gly Ala Leu Gly Phe Tyr Ser Thr Asp Gly Glu
 35 40 45
 Leu Leu Gly Lys Ala Lys Val Gly Leu Leu Pro His Glu Ala Ile Val
 50 55 60
 Ser Lys Asp Gly Thr Thr Ala Ile Val Ser Asn Phe Gly Leu His Asp
 65 70 75 80
 Phe Asp Ser Pro Tyr Gly Asp Ala Gly Leu Tyr Leu Ser Arg Ile Asn
 85 90 95
 Ile Pro Leu Arg Leu Glu Asp Lys Leu Phe Tyr Thr Phe Pro Lys Gly
 100 105 110
 Ala Pro Ala His Ser Ala Gln Arg Ala Pro His Gly Val Lys Phe Asn
 115 120 125
 His Asp Glu Thr Lys Leu Tyr Val Asn Thr Glu Trp Thr Ser Ser Asp
 130 135 140
 Gly Thr Ala Lys Pro Ser Ile Leu Val Tyr Asp Leu Thr Asp Gly Ser
 145 150 155 160
 Glu Glu Pro Ala Gln Val Trp Thr Leu Gly Asn Asn Thr Asn Lys Cys
 165 170 175
 His Asn Phe Val Phe Ser Asn Asp Gly Arg Thr Val Trp Leu Gln Leu
 180 185 190
 Gly Pro Gln Gly Ile Ala Ala Met Asp Ala Val Thr Gly Glu Val Lys
 195 200 205
 Thr Pro Phe Leu Leu Gly Thr Thr Ile Val Gly Val Arg Gly Leu Thr
 210 215 220
 Trp Ser Thr Val Glu Pro Gly Val Leu Ile Val Ser Gly Ile Ala Glu
 225 230 235 240
 Leu Trp Ala Ile Asn Thr Thr Ala Ala Tyr Pro Pro Pro Val Val Arg
 245 250 255
 His Tyr Ala Gly Tyr Gly Thr Arg Gln Phe Leu Tyr Ser Ala Val Ser
 260 265 270
 Pro Asp Gly Lys Tyr Ile Val Ala Pro Ala Val Trp Asn Ser Gln Val

275 280 285
 Leu Ile Ile Asp Tyr Trp Thr Thr Lys Val Val Ala Arg Leu Ser Ser
 290 295 300

 Asp Ile Asp Pro Val Ala Ile Ala Ile Ser Asp Asp Ser Arg Tyr Ala
 305 310 315 320
 Tyr Ala Thr Gly Gly Arg Gly Ala Ser Leu Thr Lys Ile Asp Leu Arg
 325 330 335
 Lys Phe Thr Thr Glu Val Ile Pro Thr Gly Ser Ala Thr Gly Pro Asn
 340 345 350
 Gly Val Thr Phe Ala Pro Lys Thr Asn Ser Tyr Lys Thr Thr Glu Phe
 355 360 365
 Thr Val Gly Val Val Ile Ser Leu Thr Gly Ala Gly Asn Ala Asn Ala

 370 375 380
 Tyr Glu Phe Gln Ser Gly Leu Ala Ile Trp Lys Glu Arg Ile Asn Asp
 385 390 395 400
 Thr Gly Gly Ile Ala Leu Ala Asn Asn Lys Ala Ala Phe Val Arg Leu
 405 410 415
 Val Phe Leu Asp Asp Leu Ser Asp Ser Thr Ser Thr Ser Arg Leu Leu
 420 425 430
 Arg Glu Leu Val Asp Glu His Gly Ala Asp Ala Leu Val Val Ala Ser
 435 440 445

 Ala Gly Phe Thr Pro Asp Arg Arg Leu Leu Arg Thr Leu Asp Gln Glu
 450 455 460
 Asp Val Pro Leu Leu Ser Leu Phe Gln Val Glu Gly Asp Asn Arg Lys
 465 470 475 480
 Arg Ser Asp Val Arg Ser Glu Leu Leu Arg Pro Arg Ala Asp Ser Asp
 485 490 495
 Val Leu Gly His Asp Arg Trp Cys Ser Leu Thr Arg Tyr Ser Ala Asp
 500 505 510
 Phe Ala Gln Arg Tyr Ser Arg Asn Ala Thr Thr Val Asn Ala Gln Ala

 515 520 525

Thr Ala Ala Gly Ile Ile Ile Glu Gln Ala Ala Val Arg Ser Gly Arg
530 535 540
Ser Ser Gly Lys Lys Leu Val Glu Ala Ile Ala Ala Thr Asp Thr Val
545 550 555 560
Leu Phe Ser Gly Ala Val Lys Phe Asp Ala Gln Gly Asn Asn Ile Tyr
565 570 575
Gly Asp Ser Thr Pro Val Leu Ile Arg Gly
580 585

<210> 2
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Antibody-producing site of periplasmic binding protein
<400> 2

Glu Gly Asp Asn Arg Lys Arg Ser Asp Val Arg Ser Glu Leu Leu Arg
1 5 10 15
Pro Arg Ala Asp Ser Asp
20