

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2023-0143737
(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 10-2022-0042739
(22) 출원일자 2022년04월06일
심사청구일자 2022년04월06일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
문은경
서울특별시 동대문구 경희대로 26, 경희대학교 의과대학 124호
김민정
서울특별시 동대문구 경희대로 26, 경희대학교 의과대학 126호
(74) 대리인
김순용

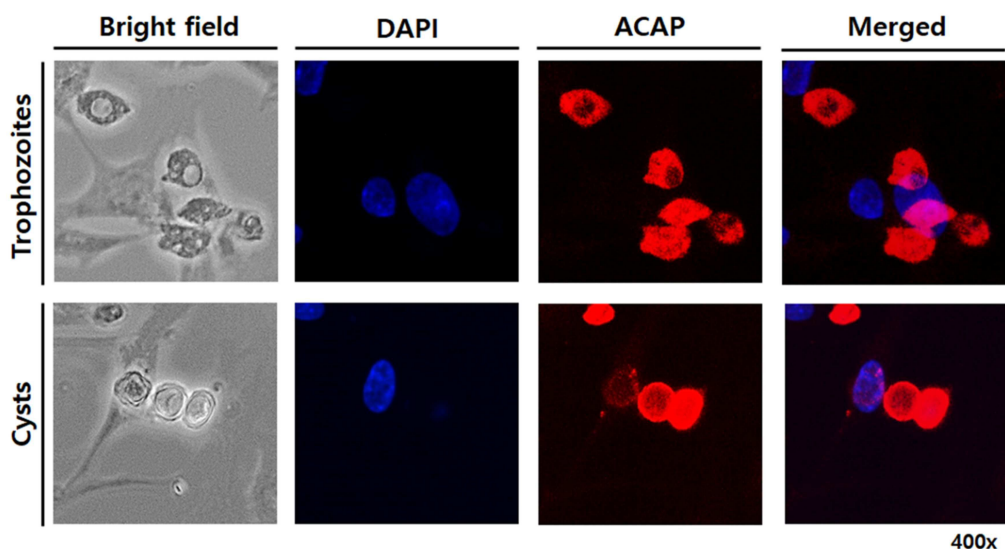
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 아데닐산 고리화효소 관련 단백질을 포함하는 가시아메바 중 검출용 조성물

(57) 요약

본 발명은 병원성 가시아메바가 분비하는 ACAP(Adenylyl cyclase-associated protein) 단백질을 기반으로 제작한 항체에 대한 것으로, 본 발명에 따른 ACAP 항체는 가시아메바의 영양형 및 포낭형을 검출할 수 있을 뿐만 아니라 다양한 가시아메바 종에 대해서 특이적으로 검출할 수 있는 것을 확인한 바, 이를 가시아메바 중 검출용 조성물, 가시아메바 중 감염에 의한 각막염의 진단용 조성물, 키트 등으로 유용하게 활용할 수 있다. 특히 본 발명에 따른 ACAP 항체를 사용하여 가시아메바 중 감염에 의한 각막염을 진단할 시 조직검체를 채취하고 배양하는 단계가 필요하지 않아 신속하고 정확하게 조기에 진단할 수 있다.

대표도 - 도8



(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 아데닐산 고리화효소 관련 단백질(Adenylyl cyclase-associated 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 아데닐산 고리화효소 관련 단백질(Adenylyl cyclase-associated 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 아데닐산 고리화효소 관련 단백질(Adenylyl cyclase-associated protein)에 특이적으로 결합하는

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

청구항 8

제 7항에 있어서,

상기 아데닐산 고리화효소 관련 단백질(Adenylyl cyclase-associated 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 아데닐산 고리화효소 관련 단백질(Adenylyl cyclase-associated protein)에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는, 가시아메바 종(*Acanthamoeba* spp.) 감염에 의한 각막염 진단용 키트.

청구항 11

가시아메바의 아데닐산 고리화효소 관련 단백질(Adenylyl cyclase-associated 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 아데닐산 고리화효소 관련 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 아데닐산 고리화효소 관련 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 아데닐산 고리화효소 관련 단백질(Adenylyl cyclase-associated protein)에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는, 가시아메바 종(*Acanthamoeba* spp.) 검출용 조성물을 제공한다.
- [0017] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 가시아메바의 아데닐산 고리화효소 관련 단백질(Adenylyl cyclase-associated 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 아데닐산 고리화효소 관련 단백질(Adenylyl cyclase-associated 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 아데닐산 고리화효소 관련 단백질(Adenylyl cyclase-associated 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 ACAP(Adenylyl cyclase-associated protein) 단백질의 높은 항원성을 보이는 부위를 기반으로 제작한 항체는 다양한 가시아메바 종(*Acanthamoeba* spp.)의 영양형 및 포낭형을

검출할 수 있을 뿐만 아니라 가시아메바에 대해서만 특이적으로 검출할 수 있는 것을 확인한 바, 이를 가시아메바 중 검출용 조성물, 가시아메바 중 감염에 의한 각막염의 진단용 조성물, 키트 등으로 유용하게 활용할 수 있다. 특히 본 발명에 따른 ACAP 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 ACAP(Adenylyl cyclase-associated protein)의 ORF를 나타낸 것으로, 도 1 중 A는 ACAP의 뉴클레오타이드 서열을 나타낸 것이고, 도 1 중 B는 ACAP의 아미노산 서열을 나타낸 것이다.

도 2는 ACAP 단백질의 2차 구조를 나타낸 결과이다.

도 3은 ACAP 단백질의 구조 중 항원성이 높은 부위를 나타낸 것이다.

도 4는 병원성 가시아메바의 ACAP의 항원성이 높은 부위에 대해 다른 각막염의 원인균의 ACAP와의 유사성을 확인한 결과이다.

도 5는 본 발명에 따른 ACAP 항체의 가시아메바에 대한 특이적인 검출 효과를 확인한 결과이다.

도 6은 본 발명에 따른 ACAP 항체의 희석에 따른 민감도를 확인한 결과로, 도 6 중 A는 항(anti)-가시아메바 IgG 항체 반응을 확인한 결과이고, 도 6 중 B는 항-가시아메바 IgA 항체 반응을 확인한 결과이다(** $P < 0.01$ 및 *** $P < 0.001$).

도 7은 본 발명에 따른 ACAP 항체의 분석 시료(가시아메바 용해물)의 희석에 따른 민감도를 확인한 결과로, 도 7 중 A는 항-가시아메바 IgG 항체 반응을 확인한 결과이고, 도 6 중 B는 항-가시아메바 IgA 항체 반응을 확인한 결과이다(*** $P < 0.001$).

도 8은 본 발명에 따른 ACAP 항체의 가시아메바의 영양형(trophozoite) 및 포낭형(cyst)에 대한 검출 효과를 확인한 결과이다.

도 9는 본 발명에 따른 ACAP 항체의 5종 가시아메바의 검출 효과를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024]

이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

[0025]

본 발명은 가시아메바의 아데닐산 고리화효소 관련 단백질(Adenylyl cyclase-associated 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 "아데닐산 고리화효소 관련 단백질(Adenylyl cyclase-associated protein, ACAP)"은 여러 구조적 도메인을 포함하는 다기능성 단백질로, 액틴 결합(actin binding), 아데닐산 고리화효소 결합 등의 기능을 가지고 있으며, 아데닐산 고리화효소의 활성화 및 조절, cAMP(Cathelicidin Antimicrobial Peptide) 매개 신호전달, 세포 형태 형성, 세포 골격 조직, 세포 극성의 확립 및 유지 등에 관여하는 것으로 알려져 있다. 본 발명에 있어서, 상기 ACAP는 바람직하게는 가시아메바로부터 분비되는 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 분비되는 단백질일 수 있다.

[0028]

상기 아데닐산 고리화효소 관련 단백질은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다. 특히 상기 아데닐산 고리화효소 관련 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 아데닐산 고리화효소 관련 단백질일 수도 있지만 아미노산 서열에 있어 임의의 변이를 야

기하여 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 아데닐산 고리화효소 관련 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 아데닐산 고리화효소 관련 단백질에 특이적으로 결합하는 항체는 아데닐산 고리화효소 관련 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 2에 해당되는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열 부위에 특이적으로 결합하는 것일 수 있다. 상기에 기술한 바와 같이, 본 발명에 따른 아데닐산 고리화효소 관련 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 아데닐산 고리화효소 관련 단백질에 특이적으로 결합하는 항체는 인체 각막세포 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 아데닐산 고리화효소 관련 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 아데닐산 고리화효소 관련 단백질(Adenylyl cyclase-associated protein)에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는, 가시아메바 종(*Acanthamoeba* spp.) 감염에 의한 각막염 진단용 조성물을 제공한다.
- [0036] 또한 본 발명은 가시아메바의 아데닐산 고리화효소 관련 단백질(Adenylyl cyclase-associated 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 아데닐산 고리화효소 관련 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 하

나 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 아데닐산 고리화효소 관련 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-항체 반응을 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 아데닐산 고리화효소 관련 단백질(Adenylyl cyclase-associated 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 임상학적 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 ACAP(Adenylyl cyclase-associated protein) 확보**

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

[0051] 병원성 가시아메바(ATCC 30868, 아칸토아메바 카스텔란(*Acanthamoeba castellanii*))에 해당)의 분비 단백질 중 ACAP 단백질의 ORF를 확보하여 도 1에 나타내었다. 그 결과 도 1 중 A에 나타낸 바 같이, ACAP의 1,458 bp 뉴클레오타이드를, 도 1 중 B에 나타낸 바와 같이 ACAP 단백질의 485 아미노산을 확인하였다.

[0053] **1-2. ACAP의 2차 구조 분석 및 항원성 확인**

[0054] 실시예 1-1에 의해 확보된 ACAP 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 ACAP 단백질로부터 항원성이 높은 6개의 예측(prediction) 부위를 확인하였다(prediction 1 내지 prediction 6).

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

[0058] 인체에 존재하는 두 종류의 ACAP(*Homo sapiens*; GeneBank accession No. NP_006358.2, 및 GeneBank accession No. NP_001317431.2)와, 각막염의 원인이 될 수 있는 푸사리움 옥시스포럼(*Fusarium oxysporum*; GeneBank accession No. EWY80337.1), 스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*; GeneBank accession No. CRL33834.1) 및 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*; GeneBank accession No. OHQ71188.1)에 존재

하는 ACAP 단백질에 대한 아미노산 정보를 병원성 가시아메바의 ACAP 단백질의 아미노산 정보와 CLUSTAL_X version 2.1을 사용하여 비교하였다.

[0059] 그 결과 도 4에 나타난 바와 같이, 병원성 가시아메바의 ACAP는 다른 각막염의 원인균들의 ACAP와 유사성이 낮았다(도 4 중 가시아메바의 ACAP: Ac_ACAP, *Homo sapiens*; GeneBank accession No. NP_006358.2: Hs_ACAP1, *Homo sapiens*; GeneBank accession No. 001317431.2: Hs_ACAP2, 푸사리움 옥시스포럼의 ACAP: Fo_ACAP, 스타필로코쿠스 아우레우스의 ACAP: Sa_ACAP, 슈도모나스 에루지노사의 ACAP: Pa_ACAP). 구체적으로, 가시아메바의 ACAP의 아미노산 서열은 2개의 인체각막세포 (Hs_ACAP1 및 Hs_ACAP2) 및 각막염의 원인균 각각(Fo_ACAP, Sa_ACAP, 및 Pa_ACAP)에 대해 40.6%, 40.2%, 15.5%, 24.3%, 및 19.2%의 유사성을 보였다.

[0060] 이에 있어, N-말단(N-terminal) 또는 C-말단(C-terminal)에 가까운 부위를 선택하여 항체를 제작하는 것이 높은 항원성을 예측할 수 있다. 따라서 이를 기반으로 상기 실시예 1-2에서 확인된 병원성 가시아메바의 ACAP 단백질 중 항원성이 높은 6개의 예측 부위에 있어서, prediction 2(QRELLYKASQSKKPDATTFG)를 항체 생성 부위로 선택하였다.

[0062] 실시예 2. 가시아메바 유래 ACAP에 대한 항체 생성

[0063] 상기 실시예 1에서 확인한 바를 기반으로 병원성 가시아메바의 ACAP 단백질 중 prediction 2에 대한 합성 펩타이드를 제작하였다(AbFRONTIER(AbFRONTIER, Seoul, Korea) 사에 의뢰하여 제작). 합성된 펩타이드(ACAP-Ab; NH₂-QRELLYKASQSKKPDATTFG-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 ACAP에 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 인체각막세포 (Human corneal epithelial cells; PCS-700-010), 각막염의 원인이 될 수 있는 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*; NCCP 32678), 스타필로코쿠스 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 ACAP 단백질과 상기 실시예 2에서 제조한 가시아메바 ACAP 특이적 항체의 항원-항체 반응을 확인하였다. 이를 위해 상기 인체 각막세포는 ATCC(American Type Culture Collection)에서 구입하였고, 푸사리움 솔라니, 스타필로코쿠스 아우레우스 및 슈도모나스 에루지노사는 질병관리본부 국가병원체자원은행(NCP)에서 구입하였다. 각 세포를 용해시킨 용해물을 10% SDS gel에 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 ACAP 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 ACAP 항체는 병원성 가시아메바(ATCC 30868)만 특이적으로 검출하는 것을 확인하였다.

[0070] 3-2. 본 발명에 따른 ACAP 항체의 민감도 확인

[0071] 3-2-1. 항체의 희석에 따른 민감도 확인

[0072] 본 발명에 따른 ACAP 항체를 연속 희석한 후 희석에 따른 민감도를 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)를 통해 확인하였다.

- [0073] 먼저, 가시아메바(ATCC 30868)를 용해한 용해물을 96 웰 플레이트에 10 µg/ml 농도로 분주한 후 4℃에서 밤새 코팅하였다.
- [0074] 다음날 PBST(0.05% 트윈 20(Tween 20)을 포함하는 PBS(phosphate buffer saline) 버퍼)로 세정하고 200 µl의 0.2% 젤라틴(gelatin)을 분주하여 37℃에서 2시간 동안 반응시켰다. 그런 후 본 발명에 따른 ACAP 항체를 PBS를 이용해 연속으로 희석(1:5, 1:50, 1:500, 1:5,000 또는 1:50,000)하고 각 웰에 100 µl씩 분주한 후 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 PBST로 3회 세척하여 HRP가 결합된 항-토끼 IgG 또는 IgA(Sigma-Aldrich(St.Louis, Mo, USA)에서 구입)를 PBS를 이용해 1:1,000으로 희석하고 100 µl씩 분주하여 37℃도에서 1시간 동안 반응시켰다. PBST로 3회 세척한 후 100 µl의 O-페닐렌디아민 기질(O-phenylenediamine substrate (Zymed, San Francisco, CA, USA))과 H₂O₂가 함유된 ?트레이트-포스페이트 버퍼(citrate-phosphate buffer)를 넣어 반응시켰다. OD(Optical density) 450 nm에서 측정하여 결과를 확인하였다.
- [0075] 그 결과, 도 6 중 A에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 ACAP 항체는 1:5,000까지 희석되었음에도 항-가시아메바 IgG 항체 반응을 나타내었다. 더불어 도 6 중 B와 같이, 본 발명에 따른 ACAP 항체는 1:50까지 희석되었음에도 항-가시아메바 IgA 항체 반응을 나타내었다.
- [0077] **3-2-2. 분석 시료의 희석에 따른 민감도 확인**
- [0078] 더불어 본 발명에 따른 ACAP 항체의 분석 시료의 희석에 따른 민감도를 확인하였다.
- [0079] 상기 실시예 3-2-1과 동일하게 ELISA를 수행하였으며, 이때 항원인 가시아메바 균주(ATCC 30868)를 용해한 용해물을 96 웰 플레이트에 연속으로 희석하여 분주($10^2 \sim 10^{-3}$ µg/µl)한 후 4℃에서 밤새 코팅하여 수행하였다. 더불어 본 발명에 따른 ACAP 항체는 1:50으로 희석한 후 각 웰에 동일하게 처리하여 항원-항체 반응을 확인하였다.
- [0080] 그 결과 도 7 중 A에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 ACAP 항체는 10^2 부터 10^{-2} µg/µl까지 희석된 가시아메바 용해물에 대하여 특이적인 IgG 검출이 가능하였다. 더불어 도 7 중 B에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 ACAP 항체는 10^2 부터 10 µg/µl까지 희석된 가시아메바 용해물에 대하여 특이적인 IgA 검출이 가능하였다.
- [0082] **3-3. 가시아메바 영양형 및 포낭형에 대한 검출 효과 확인**
- [0083] 인체 각막세포(Human corneal epithelial cells; PCS-700-010)와 가시아메바의 영양형(trophozoite), 인간 각막세포와 가시아메바의 포낭형(cyst)에 대한 본 발명에 따른 ACAP 항체의 검출 효과를 ICC(Immunocytochemistry)를 수행하여 확인하였다. 상기 가시아메바(ATCC 30868)의 포낭형은 영양형을 포낭형성 배지 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 포낭을 유도하여 준비하였다.
- [0084] ICC를 수행하기 위하여 먼저, 6웰 플레이트에 멸균된 커버 글라스를 올려 인체 각막세포(3×10^5 cells)를 배양하였다. 다음 날, 가시아메바 영양형(5×10^5 cells) 또는 포낭형(5×10^5 cells)을 인체 각막세포에 첨가하여 37℃의 5% CO₂ 인큐베이터에서 5시간 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 ACAP 항체(1:200으로 희석)와 함께 4℃에서 밤새 반응시키고, CruzFluorTM 555가 결합된 항-토끼 IgG((CFL-555 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 벡터섀드 마운팅(VECTASHIELD mounting) 배지(Abcam, Burlingame, CA, USA)로 염색하여 형광 현미경(Leica DMI8, Wetzlar, Germany)으로 관찰하였다.
- [0085] 그 결과 도 8에 나타난 바와 같이, 인체 각막세포의 핵은 DAPI(파란색)로 염색되었고, 가시아메바의 영양형과 포낭형은 본 발명에 따른 ACAP 항체(빨간색)와 강한 상호작용을 나타냄을 확인하였다.

[0087] 3-4. 5종 가시아메바에 대한 검출 효과 확인

[0088] 본 발명에 따른 ACAP 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 쿨버트슨(*Acanthamoeba culbertsoni*, *A. culbertsoni*) 및 아칸토아메바 로이레바(*Acanthamoeba royreba*, *A. royreba*))도 검출할 수 있는지 상기 실시예 3-3에 기재된 동일한 방법으로 ICC를 수행하여 확인하였다(상기 가시아메바 종은 아주대학교 의과대학 미생물학교실에서 분양받았음). 이때 인체 각막세포와 공동배양은 하지 않았다.

[0089] 그 결과 도 9에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 ACAP 항체는 5 종의 가시아메바(*A. castellanii* Neff, *A. hatchetti*, *A. polyphaga*, *A. culbertsoni* 그리고 *A. royreba*)들의 영양형 및 포낭형에 대해 모두 검출할 수 있음을 확인하였다.

[0091] 종합적으로 본 발명은 병원성 가시아메바가 분비하는 ACAP 단백질을 기반으로 제작한 항체에 대한 것으로, 본 발명에 따른 ACAP 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.

ATGCTCTGACGCCGCGATTACCCAGCTCCTGAGCAGGCTTGAAGCCGTTGCCGCTCGCTCGAGTCGGTCGAGAAGCAGCTCCAGT
CGGGCGGTGGTGCCGCTGGTGCCGCTTCGTCGGCCCGGCTGCCTCTGGTGAGGTGACCAAGGCTGTGTCCGAATTCGACGCCCT
GGTGGCCACTTACATCGACGAGTACGTGAACGTCTCGGCCAAGATCGACCCCTGGTCAAGCAGCAGGCCGACCTTGTCAAGCAG
GCCGCTCTGGCCAGAGGGAGCTCCTCTACAAGGCTCGCAGAGCAAGAAGCCGACGCCACCACCTTCGGCAACCTGTGAAGC
CCACCTCTGACCTCATGGGCAAGATCGTCGCCATCAGGGATGCCAACCGTGCCAGCAAGGTCTTCGGTCATCTCTCTACCATCAG
CGAGGGTATCACCGCTCTCGGTTGGGTTGCCAGCCCCCTACCCCGGCCCCCTTCGTTGATGAGGCCCGGCCCTCGTCCGAGTTC
TACTCGAACAAGCTGTCTATGCAGTACCGCAAGGACGAGTCGGCCGAGGGTAAGACCCAGGTGCGGTGGGTCACTGCCTGGAACA
CCTTCTCAAGGAGCTCCGCGCTTTCATCAAGACCTACCACACCCGACCTCACCTGGAACGCTCAGGGCGGTGATGTGTCCAA
GGTGGCTTCCGCCGCTGCTCCCCCGCCAGCTCGGTTGGTGTCTCCCTCCCGGCTGCCGGCCCCCTCTCCCCCGCTCGTC
GACCTCTCCGCCGCTCCAGCGGTGGTGGTCCACGCTGCTCTTTCGCTGAGATCAACGCCGTCAAGGAGCGTCAGGCTGGTG
GCAAGACTGCTGGTCTTAAGCACGTGACCAAGGACATGAAGACCAAGAATCGAGAAGACCGCCGCCCGGTTCCCGCGTTGT
CCCCGTCGCAAGCCCGGCTGCCGCTGCCGCTGCCGCAAGCTTGGCCCGCCCAAGTTTCGAGCTCGATGGCCAGAAGTGAAGATTGAG
AACCAAGTCGGCAACAAGAATCATCATCGAGAACCCGAGGTCAGGCAGACTGTCTACATCTACAAGTGCCACGACTCTGTCA
TCCAGATCAAGGGCAAGGTCAACTCGATCATGCTCGACTCGTGCAAGAAGACCGGTCTCGTCTTCGAGAAGCCCATCTCCGTGGC
CGAGGTGCTGAAGTGGCCAGCGCTCAGGTGACGGCAAGGTCCCCTCCGTCGCCATCGACAAGCCTCTGGTTGCCAG
GTCTTCTCTCTGCGGAGGCTTCGACACTGAGATCGTCACCTCCAAGTCCGACGAGATGAACGTCGTGCTGCCGGCCTCAACC
CCAACGACGACATCATCGAGATCCCATCCCCGAGCAGTTCGCGACGCTCATCAAGGACCGCAAGCTCGTCAACGAGGCTGTGCG
CCTCTCGGGAATAA

B.

MSDAAITQLLSRLEAVALLESVEKQLQSGGGAAGAASSAPAASGEVTKAVSEFDALVATYIDEYVNSAKIDPLVKQADLVKQ
AVLAQRELLYKASQSKKPDATTFGNLLKPTSDLMGKIVAIRDANRASKVFGHLSTISEGITALGWVASPPTPGPFVDEARASSEF
YSNKLQMQRKDESAEGKTQVAWVTAWNTFLKELRAFIKTYHTDLTWNAGGDDVSKVASAAAPPASSGGASPPPAAGPPPPV
DLAASSGGGAHAALFAEINAVKERQAGGKTAGLKHVTKDMKTKNIEKTAAPVPAVVPVRKPAAAAAPKLGPFPKFLDGGQKWKIE
NQVGNKNIIENPEVRQTIVYIKCHDSVIQIKGVNSIMLDSCKTKGLVFENASISVAEVVNCASVQVQVTGKVPSVAIDKTSGCCQ
VFLSAEGFDTEIVTSKSDMMNVLPGLNPNDIIIEIPIPEQFRTLKDRKLVTEAVAHSG.

도면2

Prediction 1

MSDAITQLLSRLAEVAARLESVEKQLQSGGGAAGAASSAPAAASGEVTKAVSEFDALVATYIDDEVNVSA
cchhhhhhhh hhhhhhhhhhhhhhhhh cccccccccccccccccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh

Prediction 2 Prediction 3

KIDPLVKQQADLVKQAVLAQRELLYKASQSCKPDATTFGNLLKPTSDLMGKIVAIRDANRASKVFGHLST
hhcccchhhhhhhhhhhhhhh hhhhheeehhcccccccchhhh hhhhhhhhhhhhhhtccccchhhhhhh

Prediction 4

ISEGITAGWASPPTPGPFVDEARASSEFYSNKLLMQYRKDESAGEKTQVAWVTAWNTFLKELRAFIKT
hhhhhhhhheeeecccccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhccccccccchhhhhhhhhhhhhhhhhht

YHTTDLTWNAQGGSVDKVASAAAPPASSGGASPPPAAGPPPPVVDLSAASSGGGAHAALFAEINAVKER
tccchhhhhhhhttc

Prediction 5

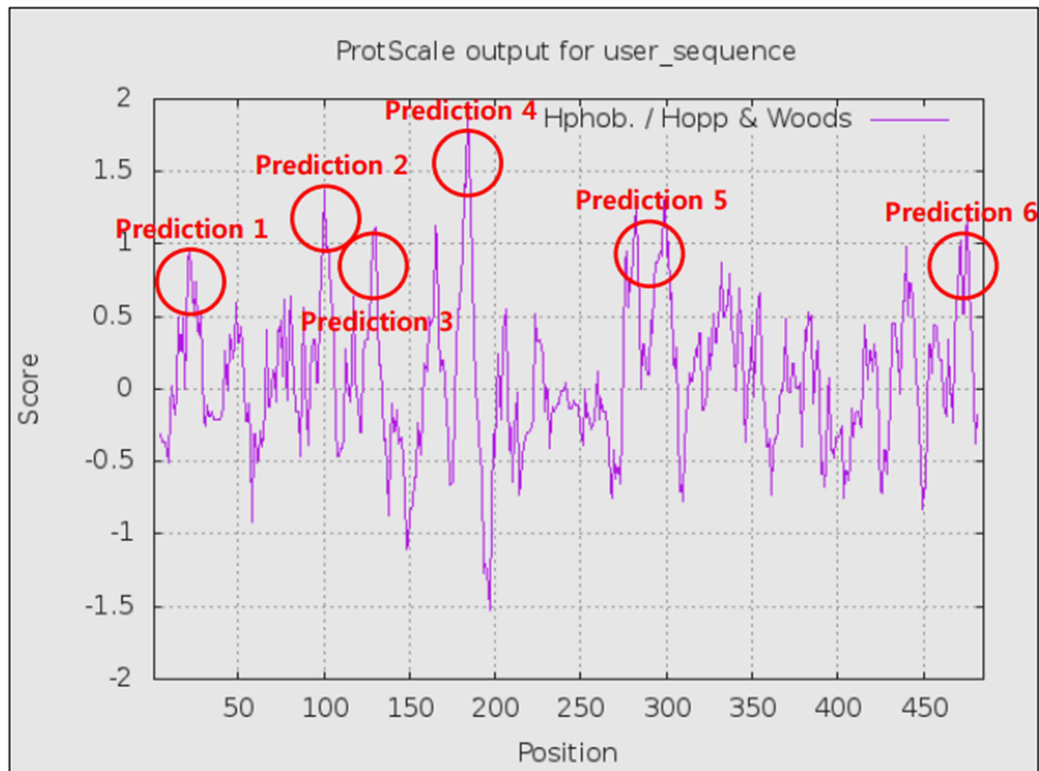
QAGGKTAGLKHVTKDMKTKNIEKTAAPVPVAVPVRKPAAAAAPKLGPPELDGQKWKIENQVGKNKII
cttchhhhhhhhhhhhhhh cccccccccccccccccccccccccccccceettceeeeeecttccceee

ENPEVRQTYYIKCHDSVIQIKGVNSIMLDCKKTGLVFENAISVAEVVNCAVSQVQVTGKVPSVAIDK
eccccceeeeeettceeeettceeeettceeeehhhhhhhheeeccccceeeccccceeecc

Prediction 6

TSGCQVFLSAGFDTETVTSKSDEMNVVLPGLPNDIIEIPPEQFRTLIKDRKLVTEAVAHS
ttceeeeeecccccheeecccccheeecccccccccecccc chhhheettteeeeeccct

도면3



도면4

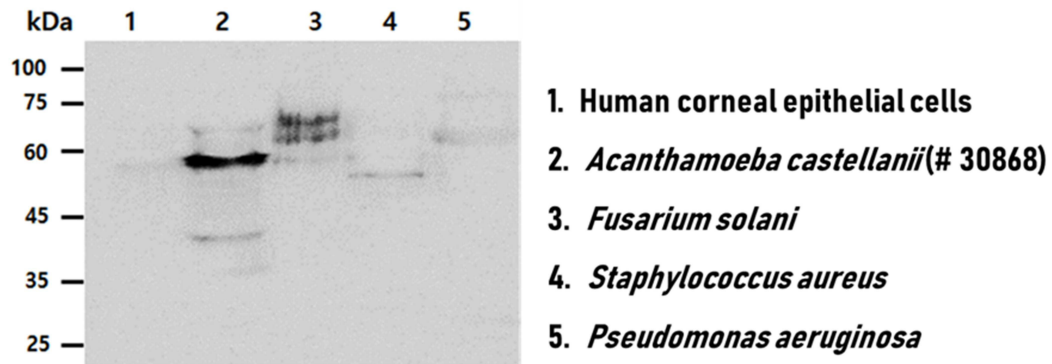
```

*      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
20      40      60      80      100      120
Ac_ACAP : MSDAAITGILLSLEAVAAKLESEVKQLQSGGGAGAGASAPASGEVTKA1SEF2DA3LVATYID4EV5NVSA6DE7LVQGD8NI9QOA10VL11CRE12LYASGSK13QDATT14FG15NLAP16TS17DL18MGKIVAI19 : 125
Hs_ACAP1 : --MADNVLVERLERAVGLEAVLEAVSHTS20DMHGYADSP21AKA22AP23-----YVQ24FS25U26LIAG27PAEY28Y29IS30SE31GG32GVKHA33EN34HTG35--IK36ERAL37IVTAS38CCO39PAEN40RLSD41LAP42IS43EQ44IREVIT45 : 118
Hs_ACAP2 : --MADNVLVERLERAVGLEAVLEAVSHTS46DMHGYADSP47AKA48AP49-----YVQ50FS51U52LIAG53PAEY54Y55IS56SE57GG58GVKHA59EN60HTG61--IK62ERAL63IVTAS64CCO65PAEN66RLSD67LAP68IS69EQ70IREVIT71 : 117
Fo_ACAP : -----MFGSD72KEND73GH74IEV75SD76SD77KSP78PD79GS80PL81RS-----K82W83CG84KL85RV86PS87AS88YN89PE90AT91US92DS93DE94EN95WK96EQ97DA98DE99U100DE101DE102DE103IM104CS105RI106AS107IS108LS109LE110RF111FN112 : 114
Sa_ACAP : -----ME113LD114CH115RV116SN117ATA118Q119PG120LL121RP122AD123Q124AR125AL126Q127DL128FA129CG130VG-----Y131PE132HA133LM134Q135AV136AR137CT138N139TV140FC141RP142VER143IV144TV145TL146EEG147--F148PK149GF150S151AK152GS153N154MG155AG156CF157IC158VD159Q160LS161SR162ED163DT164AEI165 : 116
Pa_ACAP :

*      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
140      160      180      200      220      240
Ac_ACAP : RD166NR167ASKV168---F169GL170ST171IS172EC173IT174AL175GW176SP177PT178PG179FD180ER181AS182SE183YS184NR185LM186KK187DES188ACK189TV190AW191TW192AN193FF194KE195LR196AF197IK198TV199HT200TD201LT202WN203AG204GV205SR206VA207SA208AA209P210ASS211GS212GP213PA214AG215 : 249
Hs_ACAP1 : RE216NR217GS218KL219---F220N221LS222AV223SE224SI225Q226AL227GW228AP229PG230FD231ER232AS233SE234YS235NR236LM237KK238DES239ACK240TV241AW242TW243AN244FF245KE246LR247AF248IK249TV250HT251TD252LT253WN254AG255GV256SR257VA258SA259AA260P261ASS262GS263GP264PA265AG266 : 237
Hs_ACAP2 : RE267NR268GS269KL270---F271N272LS273AV274SE275SI276Q277AL278GW279AP280PG281FD282ER283AS284SE285YS286NR287LM288KK289DES290ACK291TV292AW293TW294AN295FF296KE297LR298AF299IK300TV301HT302TD303LT304WN305AG306GV307SR308VA309SA310AA311P312ASS313GS314GP315PA316AG317 : 236
Fo_ACAP : AR318IC319LR320NS321---IE322Q323DL324SA325LA326ET327HE328DI329DE330Y331DN332LS333HR334KE335DEL336TNI337--T338S339DL340SN341IK342-----K343W344CG345KL346RV347PS348AS349YN350PE351AT352US353DS354DE355EN356WK357EQ358DA359DE360U361DE362DE363IM364CS365RI366AS367IS368LS369LE370RF371FN372 : 170
Sa_ACAP : -----K373W374CG375KL376RV377PS378AS379YN380PE381AT382US383DS384DE385EN386WK387EQ388DA389DE390U391DE392DE393IM394CS395RI396AS397IS398LS399LE400RF401FN402 : 29
Pa_ACAP : BK403IL404LA405VAK406MD407GG408AY409T410OT411DL412RI413SR414Q415RL416AE417VR418N419FL420VAD421CG422GP423VL424TAG425GS426SK427RY428FE429AR430----- : 179

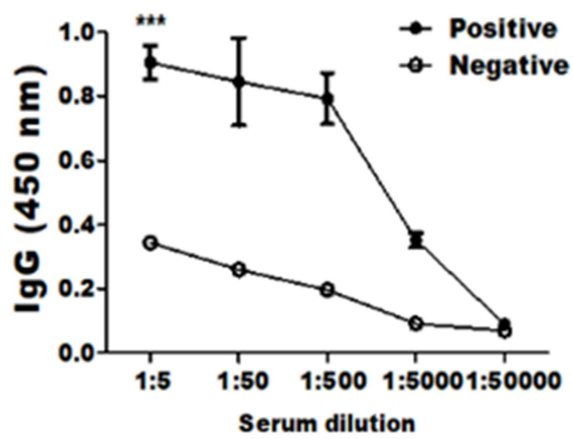
*      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
260      280      300      320      340      360      380
Ac_ACAP : PP431VP432VL433SA434SS435GG436AA437AA438AA439AA440AA441AA442AA443AA444AA445AA446AA447AA448AA449AA450AA451AA452AA453AA454AA455AA456AA457AA458AA459AA460AA461AA462AA463AA464AA465AA466AA467AA468AA469AA470AA471AA472AA473AA474AA475AA476AA477AA478AA479AA480AA481AA482AA483AA484AA485AA486AA487AA488AA489AA490AA491AA492AA493AA494AA495AA496AA497AA498AA499AA500AA501AA502AA503AA504AA505AA506AA507AA508AA509AA510AA511AA512AA513AA514AA515AA516AA517AA518AA519AA520AA521AA522AA523AA524AA525AA526AA527AA528AA529AA530AA531AA532AA533AA534AA535AA536AA537AA538AA539AA540AA541AA542AA543AA544AA545AA546AA547AA548AA549AA550AA551AA552AA553AA554AA555AA556AA557AA558AA559AA560AA561AA562AA563AA564AA565AA566AA567AA568AA569AA570AA571AA572AA573AA574AA575AA576AA577AA578AA579AA580AA581AA582AA583AA584AA585AA586AA587AA588AA589AA590AA591AA592AA593AA594AA595AA596AA597AA598AA599AA600AA601AA602AA603AA604AA605AA606AA607AA608AA609AA610AA611AA612AA613AA614AA615AA616AA617AA618AA619AA620AA621AA622AA623AA624AA625AA626AA627AA628AA629AA630AA631AA632AA633AA634AA635AA636AA637AA638AA639AA640AA641AA642AA643AA644AA645AA646AA647AA648AA649AA650AA651AA652AA653AA654AA655AA656AA657AA658AA659AA660AA661AA662AA663AA664AA665AA666AA667AA668AA669AA670AA671AA672AA673AA674AA675AA676AA677AA678AA679AA680AA681AA682AA683AA684AA685AA686AA687AA688AA689AA690AA691AA692AA693AA694AA695AA696AA697AA698AA699AA700AA701AA702AA703AA704AA705AA706AA707AA708AA709AA710AA711AA712AA713AA714AA715AA716AA717AA718AA719AA720AA721AA722AA723AA724AA725AA726AA727AA728AA729AA730AA731AA732AA733AA734AA735AA736AA737AA738AA739AA740AA741AA742AA743AA744AA745AA746AA747AA748AA749AA750AA751AA752AA753AA754AA755AA756AA757AA758AA759AA760AA761AA762AA763AA764AA765AA766AA767AA768AA769AA770AA771AA772AA773AA774AA775AA776AA777AA778AA779AA780AA781AA782AA783AA784AA785AA786AA787AA788AA789AA790AA791AA792AA793AA794AA795AA796AA797AA798AA799AA800AA801AA802AA803AA804AA805AA806AA807AA808AA809AA810AA811AA812AA813AA814AA815AA816AA817AA818AA819AA820AA821AA822AA823AA824AA825AA826AA827AA828AA829AA830AA831AA832AA833AA834AA835AA836AA837AA838AA839AA840AA841AA842AA843AA844AA845AA846AA847AA848AA849AA850AA851AA852AA853AA854AA855AA856AA857AA858AA859AA860AA861AA862AA863AA864AA865AA866AA867AA868AA869AA870AA871AA872AA873AA874AA875AA876AA877AA878AA879AA880AA881AA882AA883AA884AA885AA886AA887AA888AA889AA890AA891AA892AA893AA894AA895AA896AA897AA898AA899AA900AA901AA902AA903AA904AA905AA906AA907AA908AA909AA910AA911AA912AA913AA914AA915AA916AA917AA918AA919AA920AA921AA922AA923AA924AA925AA926AA927AA928AA929AA930AA931AA932AA933AA934AA935AA936AA937AA938AA939AA940AA941AA942AA943AA944AA945AA946AA947AA948AA949AA950AA951AA952AA953AA954AA955AA956AA957AA958AA959AA960AA961AA962AA963AA964AA965AA966AA967AA968AA969AA970AA971AA972AA973AA974AA975AA976AA977AA978AA979AA980AA981AA982AA983AA984AA985AA986AA987AA988AA989AA990AA991AA992AA993AA994AA995AA996AA997AA998AA999AA1000AA1001AA1002AA1003AA1004AA1005AA1006AA1007AA1008AA1009AA1010AA1011AA1012AA1013AA1014AA1015AA1016AA1017AA1018AA1019AA1020AA1021AA1022AA1023AA1024AA1025AA1026AA1027AA1028AA1029AA1030AA1031AA1032AA1033AA1034AA1035AA1036AA1037AA1038AA1039AA1040AA1041AA1042AA1043AA1044AA1045AA1046AA1047AA1048AA1049AA1050AA1051AA1052AA1053AA1054AA1055AA1056AA1057AA1058AA1059AA1060AA1061AA1062AA1063AA1064AA1065AA1066AA1067AA1068AA1069AA1070AA1071AA1072AA1073AA1074AA1075AA1076AA1077AA1078AA1079AA1080AA1081AA1082AA1083AA1084AA1085AA1086AA1087AA1088AA1089AA1090AA1091AA1092AA1093AA1094AA1095AA1096AA1097AA1098AA1099AA1100AA1101AA1102AA1103AA1104AA1105AA1106AA1107AA1108AA1109AA1110AA1111AA1112AA1113AA1114AA1115AA1116AA1117AA1118AA1119AA1120AA1121AA1122AA1123AA1124AA1125AA1126AA1127AA1128AA1129AA1130AA1131AA1132AA1133AA1134AA1135AA1136AA1137AA1138AA1139AA1140AA1141AA1142AA1143AA1144AA1145AA1146AA1147AA1148AA1149AA1150AA1151AA1152AA1153AA1154AA1155AA1156AA1157AA1158AA1159AA1160AA1161AA1162AA1163AA1164AA1165AA1166AA1167AA1168AA1169AA1170AA1171AA1172AA1173AA1174
```

도면5

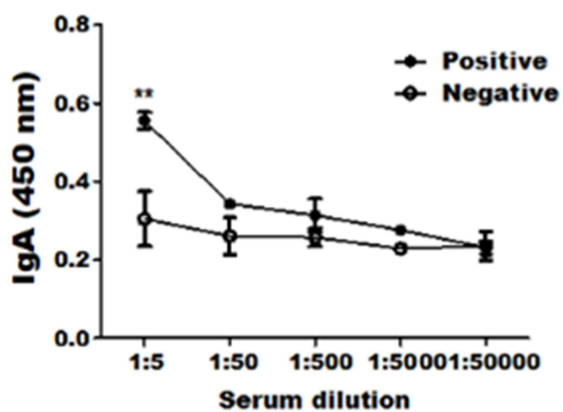


도면6

A.

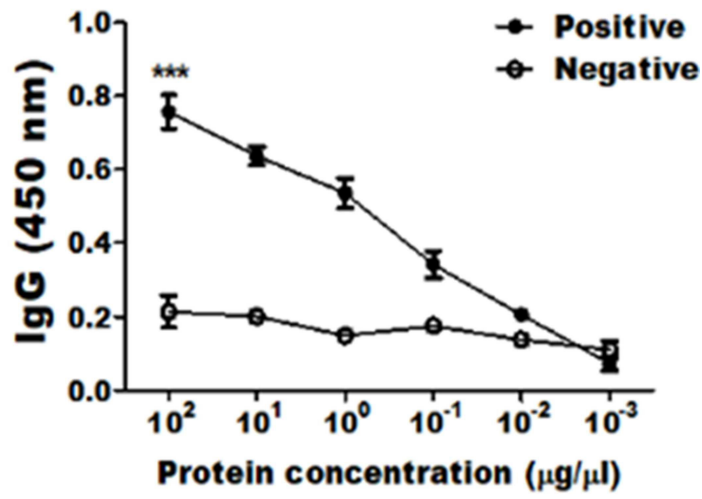


B.

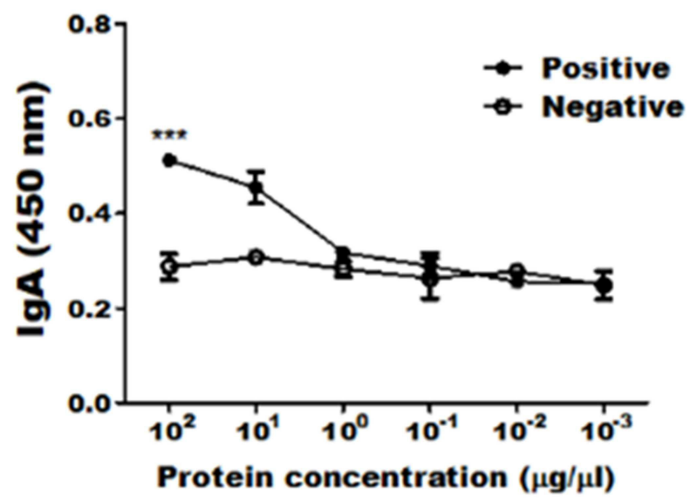


도면7

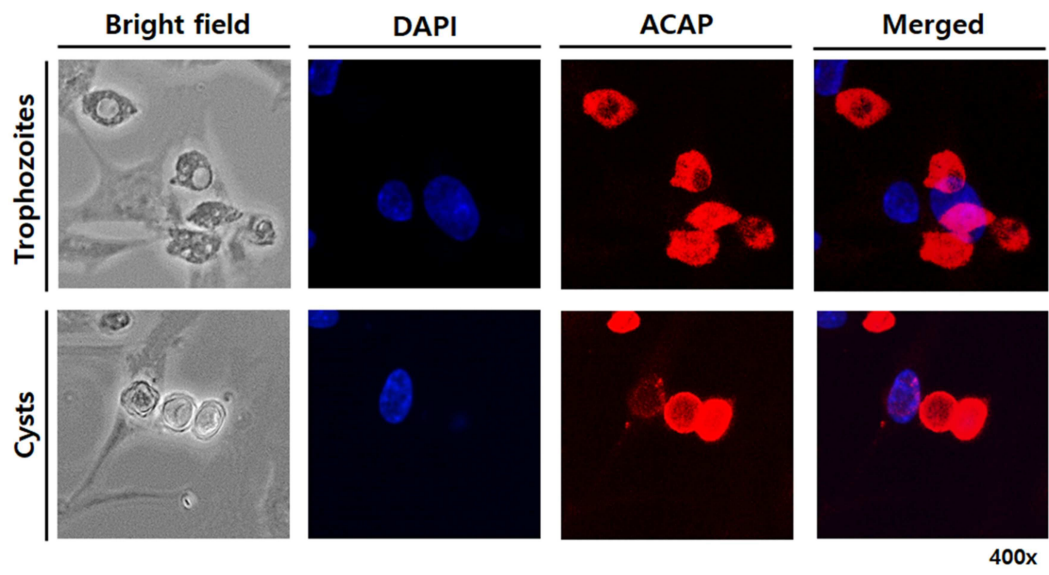
A.



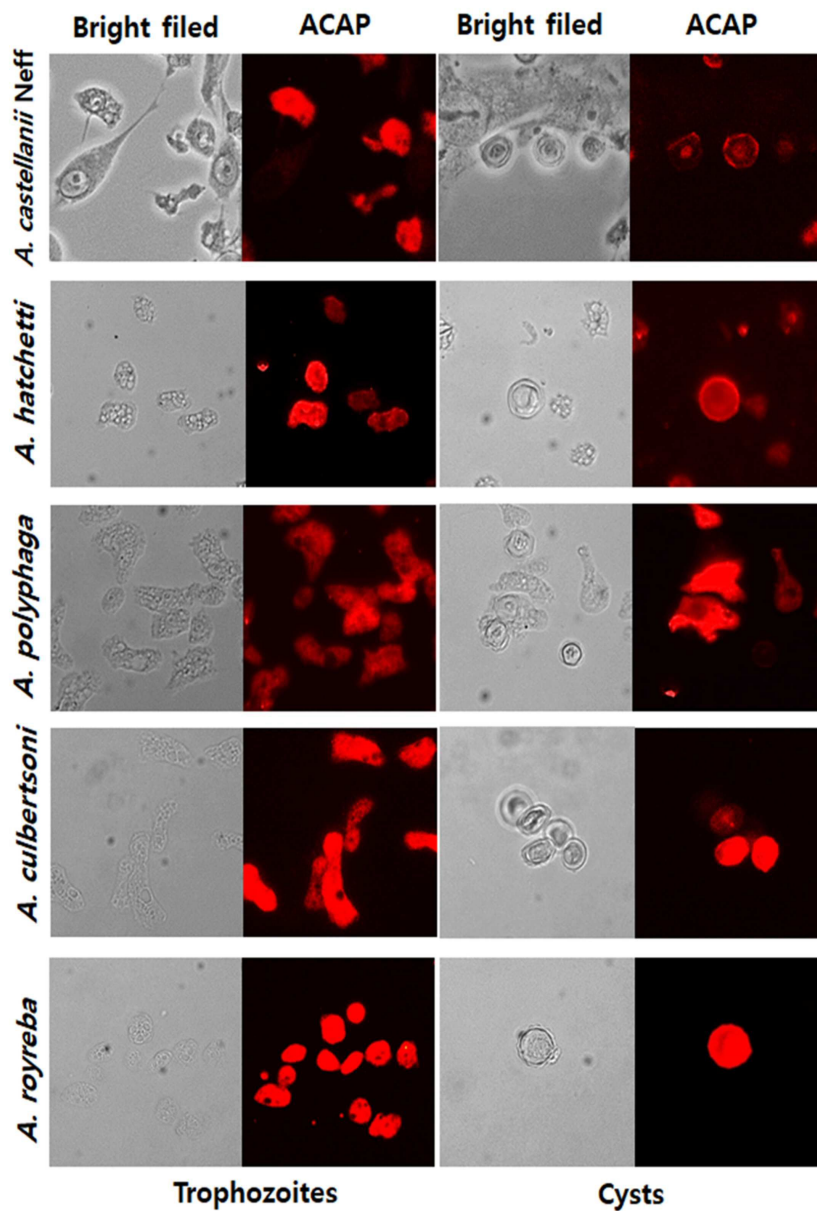
B.



도면8



도면9



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> A composition for detecting Acanthamoeba spp, comprising a novel antibody to the adenylyl cyclase associated protein
- <130> 1-90P
- <160> 2
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 485
- <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Adenylyl cyclase-associated protein

<400> 1

Met Ser Asp Ala Ala Ile Thr Gln Leu Leu Ser Arg Leu Glu Ala Val

1 5 10 15

Ala Ala Arg Leu Glu Ser Val Glu Lys Gln Leu Gln Ser Gly Gly Gly

20 25 30

Ala Ala Gly Ala Ala Ser Ser Ala Pro Ala Ala Ser Gly Glu Val Thr

35 40 45

Lys Ala Val Ser Glu Phe Asp Ala Leu Val Ala Thr Tyr Ile Asp Glu

50 55 60

Tyr Val Asn Val Ser Ala Lys Ile Asp Pro Leu Val Lys Gln Gln Ala

65 70 75 80

Asp Leu Val Lys Gln Ala Val Leu Ala Gln Arg Glu Leu Leu Tyr Lys

85 90 95

Ala Ser Gln Ser Lys Lys Pro Asp Ala Thr Thr Phe Gly Asn Leu Leu

100 105 110

Lys Pro Thr Ser Asp Leu Met Gly Lys Ile Val Ala Ile Arg Asp Ala

115 120 125

Asn Arg Ala Ser Lys Val Phe Gly His Leu Ser Thr Ile Ser Glu Gly

130 135 140

Ile Thr Ala Leu Gly Trp Val Ala Ser Pro Pro Thr Pro Gly Pro Phe

145 150 155 160

Val Asp Glu Ala Arg Ala Ser Ser Glu Phe Tyr Ser Asn Lys Leu Leu

165 170 175

Met Gln Tyr Arg Lys Asp Glu Ser Ala Glu Gly Lys Thr Gln Val Ala

180 185 190

Trp Val Thr Ala Trp Asn Thr Phe Leu Lys Glu Leu Arg Ala Phe Ile

195 200 205

Lys Thr Tyr His Thr Thr Asp Leu Thr Trp Asn Ala Gln Gly Gly Asp

210 215 220

Val Ser Lys Val Ala Ser Ala Ala Ala Pro Pro Ala Ser Ser Gly Gly

225 230 235 240

Ala Ser Pro Pro Pro Ala Ala Gly Pro Pro Pro Pro Pro Val Val Asp

245 250 255

Leu Ser Ala Ala Ser Ser Gly Gly Gly Ala His Ala Ala Leu Phe Ala

260 265 270

Glu Ile Asn Ala Val Lys Glu Arg Gln Ala Gly Gly Lys Thr Ala Gly

275 280 285

Leu Lys His Val Thr Lys Asp Met Lys Thr Lys Asn Ile Glu Lys Thr

290 295 300

Ala Ala Pro Val Pro Ala Val Val Pro Val Arg Lys Pro Ala Ala Ala

305 310 315 320

Ala Ala Pro Lys Leu Gly Pro Pro Lys Phe Glu Leu Asp Gly Gln Lys

325 330 335

Trp Lys Ile Glu Asn Gln Val Gly Asn Lys Asn Ile Ile Ile Glu Asn

340 345 350

Pro Glu Val Arg Gln Thr Val Tyr Ile Tyr Lys Cys His Asp Ser Val

355 360 365

Ile Gln Ile Lys Gly Lys Val Asn Ser Ile Met Leu Asp Ser Cys Lys

370 375 380

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

385 390 395 400

Asn Cys Ala Ser Val Gln Val Gln Val Thr Gly Lys Val Pro Ser Val

405 410 415

Ala Ile Asp Lys Thr Ser Gly Cys Gln Val Phe Leu Ser Ala Glu Gly

420 425 430

Phe Asp Thr Glu Ile Val Thr Ser Lys Ser Asp Glu Met Asn Val Val

435 440 445

Leu Pro Gly Leu Asn Pro Asn Asp Asp Ile Ile Glu Ile Pro Ile Pro

450 455 460

Glu Gln Phe Arg Thr Leu Ile Lys Asp Arg Lys Leu Val Thr Glu Ala

465 470 475 480

Val Ala His Ser Gly

485

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Antibody-producing site of Adenylyl cyclase-associated protein

<400> 2

Gln Arg Glu Leu Leu Tyr Lys Ala Ser Gln Ser Lys Lys Pro Asp Ala

1 5 10 15

Thr Thr Phe Gly

20