



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년12월11일
(11) 등록번호 10-2190300
(24) 등록일자 2020년12월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/92 (2006.01) A61K 35/64 (2015.01)
A61K 38/00 (2006.01) A61P 37/08 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/92 (2013.01)
A61K 35/64 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0053905
(22) 출원일자 2019년05월08일
심사청구일자 2019년05월08일
(65) 공개번호 10-2020-0129470
(43) 공개일자 2020년11월18일
(56) 선행기술조사문헌
Jianhong Zuo et al., 'Bom m 9 from Bombyx mori is a novel protein related to asthma', Microbiol Immunol., 2015, Vol. 59, pp 410-418. 1부.*
KR1020160120404 A
US20110023154 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(주)프로테움텍
서울특별시 강서구 양천로 401, 에이동 702호(가양동, 강서한강자이타워)
(72) 발명자
정경용
서울특별시 노원구 동일로208길 19, 204동 413호 (중계동, 중계무지개아파트)
박중원
서울특별시 용산구 이촌로 174, 104동 101호(이촌동, 동부센트레빌아파트)
(74) 대리인
리앤목특허법인

전체 청구항 수 : 총 10 항

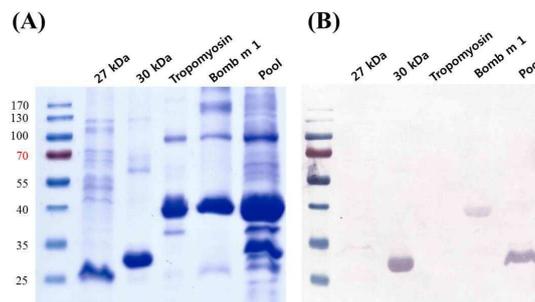
심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 누에에 대한 알레르기 질환 진단용 조성물, 누에에 대한 알레르기 진단 방법, 및 누에에 대한 알레르기 질환 면역 치료용 조성물

(57) 요약

누에에 대한 알레르기 질환 진단용 조성물 및 키트, 누에에 대한 알레르기 질환 진단 방법, 및 누에에 대한 알레르기 질환 면역 치료용 조성물에 관한 것이다. 일 양상에 따른 신규한 30kDa의 지단백질은 누에에 대한 알레르기를 진단하기 위해 이용될 수 있다. 상기 지단백질은 누에 알레르기의 주요 알레르겐이므로, 상기 단백질을 이용한 누에에 대한 알레르기를 진단한 결과는 신뢰도 및 타당도가 높다. 또한, 상기 지단백질을 누에에 대한 알레르기를 예방 또는 치료하기 위한 면역치료용 조성물로 이용할 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61K 38/00 (2013.01)
A61P 37/08 (2018.01)
G01N 33/53 (2018.05)
G01N 2333/43578 (2013.01)
G01N 2800/24 (2013.01)

(72) 발명자

이중선

경기도 김포시 유현로 215, 202동 1101호(풍무동, 풍무 센트럴 푸르지오)

김범준

서울특별시 서초구 신반포로23길 41, 111동 503호 (잠원동, 신반포2지구아파트)

입국진

서울특별시 강남구 삼성로 151, 8동 305호(대치동, 선경아파트)

이혜정

인천광역시 서구 석곶로 3, 3(가정동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	HI14C1324
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국 보건산업진흥원
연구사업명	연구중심병원 R&D
연구과제명	글로벌 의료수요 해결을 위한 전략적 기술통합의 개방형 연구 비즈니스 플랫폼 구축
기 여 율	1/1
과제수행기관명	세브란스병원
연구기간	2014.10.01 ~ 2023.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 N말단으로부터 1번 내지 238번 아미노산 서열로 이루어진 단백질 영역을 포함하는 누에의 30kDa의 지단백질(lipoprotein) 또는 상기 단백질 영역을 함유하는 누에에 대한 알레르기 질환 진단용 조성물로서, 상기 알레르기 질환은 아나필락시스(Anaphylaxis) 또는 두드러기(Urticaria)인 것인 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 지단백질은 누에 유충, 누에 번데기 또는 누에나방으로부터 분리된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 지단백질 또는 상기 단백질 영역은 재조합적으로 생산된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 지단백질은 단백질 영역의 변성에도 IgE 반응성을 유지하는 것인 조성물.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 단백질 영역의 변성은 요소에 의한 것인 조성물.

청구항 7

청구항 1 및 3 내지 6항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 누에에 대한 알레르기 질환 진단용 키트로서, 상기 알레르기 질환은 아나필락시스(Anaphylaxis) 또는 두드러기(Urticaria)인 것인 키트.

청구항 8

청구항 7의 키트는 면역분석(immunoassay)용 키트인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 9

누에에 대한 알레르기 질환의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위한 방법으로서, 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 IgE 항체와 서열번호 1의 N말단으로부터 1번 내지 238번 아미노산 서열로 이루어진 단백질 영역을 포함하는 누에의 30kDa의 지단백질(lipoprotein) 또는 상기 단백질 영역과의 결합을 검출하는 단계를 포함하는 것인 방법으로서,

상기 알레르기 질환은 아나필락시스(Anaphylaxis) 또는 두드러기(Urticaria)인 것인 방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 생물학적 시료는 혈액, 조직, 소변, 점액, 타액, 눈물, 혈장, 혈청, 객담, 척수액, 흉수, 유두 흡인물, 림프액, 기도액, 장액, 비뇨생식관액, 모유, 림프계 체액, 정액, 뇌척수액, 기관계내 체액, 복수, 낭성 종양 체액, 양수액 또는 이들의 조합인 것인 방법.

청구항 11

서열번호 1의 N말단으로부터 1번 내지 238번 아미노산 서열로 이루어진 단백질 영역을 포함하는 누에의 30kDa의

지단백질(lipoprotein) 또는 상기 단백질 영역을 함유하는 누에에 대한 알레르기질환 면역 치료용 조성물로서, 상기 알레르기 질환은 아나필락시스(Anaphylaxis) 또는 두드러기(Urticaria)인 것인 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 누에에 대한 알레르기 질환 진단용 조성물 및 키트, 누에에 대한 알레르기 질환 진단 방법, 및 누에에 대한 알레르기 질환 면역 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 누에(*Bombyx mori*)는 유충에서 번데기가 되고, 번데기의 고치로부터 실크 실을 만드는 산업적으로 유용한 곤충으로 알려져 있다. 다만, 누에 오줌, 누에나방의 비늘 및 세리신(silk gum)과 같은 누에 유래의 물질은 직업성 천식, 천식 및 알레르기성 비염과 같은 호흡기 알레르기를 일으킬 수 있다.

[0003] 또한 번데기는 식이 보충제(dietary supplement)와 의약품으로 사용되고 있고, 또한 음식물과 가축배설물 처리를 위하여 이용되고 있다. 대략적으로, 1,500-2,000종의 곤충이 음식으로서 전 세계적으로 소비되고 있다. 한국에서 번데기는 전통적 음식이다. 끓이고 양념을 처리한 번데기는 종종 스낵으로 팔리고 있다. 중국에서는 번데기 구이를 섭취하고 있으며, 번데기 건조물을 거담제로서뿐만 아니라 헛배부름과 근경련의 완화를 위하여 이용하고 있다.

[0004] 상기와 같은 식용 곤충에 대한 알레르기는 이에 취약한 개체에 심각한 영향을 끼칠 수 있으므로 주의를 요한다. 한편, 번데기는 음식 알레르기의 중요 원인으로서 인식되고 있다. 한국에서, 알레르기 환자의 9.4%가 번데기에 감작되는 것으로 알려져 있고, 피부반응 검사를 통하여 62종의 주요 음식 알레르겐 중에서 가장 빈번하게 감작되는 알레르겐으로 확인된바 있다. 이중 누에 번데기에 대한 알레르기 반응은 심각하며, 동아시아에서는 누에 번데기 알레르기가 아나필락시스의 빈번한 원인으로 지목되고 있다.

[0005] Bomb m 1(arginine kinase)이 누에 번데기 알레르기의 주요한 알레르겐 (Int Arch Allergy Immunol 2009;150:8-14) 임이 보고되었으며, 최근의 연구는 27 kDa 당단백질과 tropomyosin이 누에 번데기 알레르기의 주요 알레르겐임을 보고하였다. 다만, 상기 누에 알레르겐 외 다른 번데기 알레르겐은 보고된 바 없으며, 또한 보고된 상기 알레르겐들은 인식하는 부위가 단백질로 구성되어 있어 산 등에 쉽게 변성될 수 있으므로 음식 알레르겐으로 산 및 기타 소화효소들에 쉽게 변성되지 않는 알레르겐을 찾기 위한 노력이 지속되고 있다.

[0006] 이에 본 발명자들은 다양한 임상적인 징후를 보이는 한국인 누에 알레르기 환자에서 IgE 반응성을 분석하여, 누에 알레르기성 질환에 특이적이면서 특히 누에 알레르기에 대한 진단 용도로 유용한 30kDa의 지단백질 알레르겐을 확인함으로써 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 일 양상은 누에의 30kDa의 지단백질(lipoprotein) 또는 이의 단백질 영역을 함유하는 누에에 대한 알레르기 질환 진단용 조성물을 제공한다.

[0008] 다른 양상은 누에에 대한 알레르기 질환 진단용 키트를 제공한다.

[0009] 다른 양상은 누에에 대한 알레르기 질환 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0010] 다른 양상은 누에의 30kDa의 지단백질(lipoprotein) 또는 이의 단백질 영역을 함유하는 누에에 대한 알레르기 질환 면역 치료용 조성물을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0011] 일 양상은 누에의 30kDa의 지단백질(lipoprotein) 또는 이의 단백질 영역을 함유하는 누에에 대한 알레르기 질환 진단용 조성물을 제공한다.

- [0012] 일 양상에 따른 지단백질은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 단백질 영역을 포함할 수 있다. 상기 지단백질은 눈에 알레르기의 진단에 이용 가능한 눈에 번테기로부터 유래한 알레르겐에 관한 것으로, 눈에 알레르기 환자의 혈액 내 IgE 항체와 결합함을 확인함으로써, 상기 30 kDa 지단백질이 눈에 알레르기의 유발 원인(알레르겐)임을 확인하였다.
- [0013] 상기 눈에의 30 kDa 지단백질의 아미노산 서열은 NCBI에 GenBank accession No. NM_001044021 로 공개되어 있다. 상기 아미노산 서열은 본 명세서에 첨부된 서열목록의 제1서열에 해당한다.
- [0014] 상기 지단백질은 동물 세포 또는 박테리아를 이용하여 재조합적으로 제조되는 것일 수 있다. 상기 단백질은 추가적인 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다. 상기 단백질은 예를 들면 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드 또는 이의 단편의 N-말단 및/또는 C-말단에 추가적인 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다. 상기 추가적인 아미노산 서열은 재조합적으로 제조된 단백질을 정제하기 위해, 예를 들면 친화성 컬럼 크로마토그래피에 적용하기 위해, 추가되는 것일 수 있다. 상기 박테리아는 에스케리키아(*Escherichia*) 속 미생물인 것일 수 있으며, 예를 들면 대장균(*E. coli*)인 것일 수 있다. 상기 박테리아는 피키아(*Pichia*)인 것일 수 있다. 상기 조성물에 있어서, 상기 단백질을 박테리아에서 재조합적으로 제조 및 발현시키는 경우, 상기 서열번호의 아미노산 서열과 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 또는 이의 단편을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 박테리아에 도입하여 수득할 수 있다. 상기 뉴클레오티드 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드는 박테리아에 코돈 최적화된 것일 수 있다. 구체적인 일 양상에서 상기 지단백질 또는 이의 단백질 영역은 번역 후 변형 과정(post-translational modification)이 없는 대장균을 이용하여 재조합적으로 생산된 것일 수 있다.
- [0015] 상기 폴리뉴클레오티드를 박테리아에 도입하는 것은 예를 들면 발현 카세트(expression cassette) 형태로의 도입, 또는 상기 폴리뉴클레오티드 자체의 도입인 것일 수 있다. 상기 발현 카세트는 상기 폴리뉴클레오티드가 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소를 포함하는 것일 수 있다. 상기 발현 카세트는 상기 폴리뉴클레오티드에, 작동 가능하게 연결된 프로모터, 전사 종결 신호, 리보솜 결합 부위 및 번역 종결신호 등을 포함하는 것일 수 있다. 상기 발현 카세트는 자체 복제가 가능한 발현 벡터의 형태인 것일 수 있다. 상기 벡터는 당업계에 공지된 발현 벡터를 이용할 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드 자체의 도입은 도입된 숙주 세포에서 발현에 필요한 서열과 작동 가능하게 연결되어 있는 것일 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드가 도입된 박테리아는 형질도입된 박테리아인 것일 수 있다.
- [0016] 상기 재조합 단백질을 생산하기 위한 박테리아의 배양은 당업계에 알려진 적당한 배지와 배양 조건에 따라 이루어질 수 있다. 이러한 배양 과정은 통상의 기술자라면 선택되는 미생물에 따라 용이하게 조정하여 사용할 수 있다. 배양 방법은 회분식, 연속식 및 유가식 배양을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 미생물의 다양한 배양 방법이 예를 들면 Biochemical Engineering, James M. Lee, Prentice-Hall International Editions에 개시되어 있다.
- [0017] 상기 배지는 다양한 탄소원, 질소원 및 미량원소 성분을 포함한다. 미생물 배양용 배지에 이용 가능한 탄소원은, 포도당, 자당, 유당, 과당, 말토오스, 전분, 셀룰로오스와 같은 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유와 같은 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리셀롤 및 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 탄소원은 단독으로 또는 조합되어 사용될 수 있다. 미생물 배양용 배지에 이용 가능한 질소원은 펩톤, 효모 추출물, 육즙, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 및 대두밀과 같은 유기 질소원 및 요소, 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄과 같은 무기 질소원을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 질소원은 단독으로 또는 조합되어 사용될 수 있다. 미생물 배양용 배지는 인의 공급원으로서 인산이수소칼륨, 인산수소이칼륨 및 상응하는 소듐-함유 염을 포함하는 것일 수 있다. 또한, 황산마그네슘 또는 황산철과 같은 금속염을 포함하는 것일 수 있다. 이 외에, 아미노산, 비타민, 및 적절한 전구체 등이 배지에 포함될 수 있다. 미생물 배양용 배지 또는 개별 성분은 배양액에 회분식 또는 연속식으로 첨가될 수 있다.
- [0018] 상기 "알레르겐(allergen)"은 알레르기를 유발하는 항원, 또는 알레르기성 질환의 원인이 되는 항원을 의미하는 것일 수 있다. 알레르겐 물질을 포함하는 어떠한 종류의 물질의 섭취 또는 접촉으로 인하여 생체 내에서 항체가 만들어지면, 같은 물질의 재섭취 또는 재접촉이 일어날 경우에 항원-항체 반응이 일어날 수 있다.
- [0019] 일 양상에 따른 눈에의 30 kDa 지단백질은 눈에 알레르기를 유발하는 원인인 알레르겐이므로, 상기 지단백질 또는 이의 단백질 영역에 검사대상 생체학적 시료를 처리한 후 혈액 내 IgE와 상기 알레르겐 사이의 반응을 확인

함으로써 번데기 알레르기를 효과적으로 진단할 수 있다.

- [0020] 상기 "진단(diagnosis)"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 따라서, 상기 누에에 대한 알레르기성 질환 진단이란, 누에에 대한 알레르기성 질환을 가지는지 여부 또는 누에에 대한 알레르기성 질환을 가질 가능성을 확인하거나 그를 예측하는 것을 의미하는 것일 수 있다.
- [0021] 상기 "항체(antibody)"란 당해 분야에서 공지된 용어로서 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 폴리펩티드 또는 이의 단편을 의미한다. 상기 IgE 항체는 감작 항체로서, 알레르겐에 의해 생성되며, 형질세포에 의해 만들어지고, 비만세포 또는 호염기구 표면에 있는 수용체에 붙는다. IgE 항체는 아나필락시스(anaphylaxis, 과민증, 항원-항체 반응으로 생기는 특이적인 증상)를 일으키는 것일 수 있다.
- [0022] 일 양상에 따른 조성물은 누에의 천연형 30 kDa 지단백질, 즉 누에의 유충, 누에 번데기 또는 누에나방으로부터 직접 분리된 30 kDa 지단백질을 포함할 수 있다. 구체적인 일 실시예에서는 대장균을 이용하여 재조합적으로 제조된 30 kDa 지단백질 이의 단백질 영역을 제조하였다.
- [0023] 재조합적으로 생산한 30 kDa 지단백질에 요소를 처리하여 단백질 영역에 변성을 일으킨 경우에도 알레르기 환자의 IgE가 결합함을 확인함으로써, 30 kDa 지단백질에 대한 IgE의 반응성이 단백질 부분에 의존적이지 않음을 확인하였다. 따라서, 일 양상에 따른 지단백질은 요소의 처리에 의하여 단백질 영역의 변성이 발생한 경우에도 IgE 반응성이 나타나는 것을 확인할 수 있으므로 큰 반응성을 확인하여
- [0024] 상기 알레르겐을 박테리아 세포에서 발현시키는 경우에는 코돈 최적화 후 발현시킬 수 있다. NCBI에 공개되어 있는 누에의 30 kDa 지단백질의 오픈 리딩 프레임(GenBank accession No. NM_001044021)을 코돈 최적화 한 후, 대장균에서 성공적으로 발현 및 정제할 수 있다.
- [0025] 다른 양상은 누에에 대한 알레르기 질환 진단용 키트를 제공한다.
- [0026] 상기 키트는 상술한 누에 알레르기 진단용 조성물을 포함하기 때문에, 이 둘 사이의 공통된 내용은 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.
- [0027] 상기 누에 알레르기 진단용 키트는 공지된 다양한 종류의 키트로 제작될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 키트는 본 발명에서 동정한 누에 알레르겐과 진단대상 혈액 시료 내의 IgE 항체 사이의 반응성을 정성적 또는 정량적으로 분석할 수 있는 면역분석(immunoassay)용 키트로 제작될 수 있다.
- [0028] 상기 키트는, 누에의 30 kDa 지단백질 또는 이의 단백질 영역이 코팅 처리된 고체 기질과, 진단대상 혈액 시료 내의 IgE 항체에 결합할 수 있으며 검출 가능한 시그널을 발생시키는 레이블이 결합되어 있는 항-IgE 항체 및 기타 항원(알레르겐)-항체(IgE) 반응을 검출하는데 필요한 시약을 포함할 수 있다.
- [0029] 상기 고체 기질로 적합한 것은 예를 들면 탄화수소 폴리머(예컨대, 폴리스틸렌 및 폴리프로필렌), 유리, 금속, 젤, 또는 마이크로타이터 플레이트이다.
- [0030] 상기 검출 가능한 시그널을 발생시키는 레이블은, 예를 들면 화학물질(예컨대, 바이오틴), 효소(알칼린 포스파타아제, β -갈락토시다아제, 호스래디쉬 퍼옥시다아제 및 시토크롬 P450), 방사능물질, 형광물질(예컨대, 플루오레신), 발광물질, 화학발광물질(chemiluminescent) 및 FRET(fluorescence resonance energy transfer)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 다양한 레이블 및 레이블링 방법은 Ed Harlow and David Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999에 기재되어 있다.
- [0031] 일 양상에 따른 키트는 상기 한 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.
- [0032] 다른 양상은 누에에 대한 알레르기 질환의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위한 방법으로서, 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 IgE 항체와 30kDa의 지단백질(lipoprotein) 또는 이의 단백질 영역과의 결합을 검출하는 단계를 포함하는 것인 방법을 제공한다.
- [0033] 일 양상의 누에에 대한 알레르기 진단방법은 면역분석(항원-항체 반응) 방법에 의해 실시될 수 있다. 상기 면역분석 방법은 예를 들면 방사능 면역분석, 방사능 면역침전, 면역침전, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 캡처-ELISA, 억제 또는 경쟁 분석, 샌드위치 분석, 유세포 분석(flow cytometry), 면역형광염색 및 면역친화성 정제를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0034] 상기 생물학적 시료는 생물로부터 수득된 시료를 말한다. 상기 생물학적 시료는 예를 들면 혈액, 조직, 소변, 점액, 타액, 눈물, 혈장, 혈청, 객담, 척수액, 흉수, 유두 흡인물, 림프액, 기도액, 장액, 비뇨생식관액, 모유,

림프계 체액, 정액, 뇌척수액, 기관계내 체액, 복수, 낭성 종양 체액, 양수액 또는 이들의 조합일 수 있다.

- [0035] 상기 면역분석의 방법은 *Enzyme Immunoassay*, E. T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1980; Gaastra, W., *Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)*, in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 1, Walker, J.M. ed., Humana Press, NJ, 1984; 및 Ed Harlow and David Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999에 기재되어 있으며, 상기 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [0036] 예를 들어, 본 발명의 방법이 방사능 면역분석 방법에 따라 실시되는 경우, 방사능 동위원소(예컨대, C^{14} , I^{125} , P^{32} 및 S^{35} 등)로 레이블링 된 항체(IgE에 특이적으로 결합하는 항체)가 이용될 수 있다. 또한, 본 발명의 방법은 상술한 검출 가능한 신호를 발생시키는 레이블이 결합되어 있는 항체를 이용할 수 있다.
- [0037] 예를 들어, 본 발명의 방법이 ELISA 방식으로 실시되는 경우 본 발명의 특정 실시 예는, (i) 본 발명에서 동정한 알레르겐인 누에의 30 kDa 지단백질 또는 이의 단백질 영역을 고체 기질의 표면에 코팅하는 단계; (ii) 진단 대상 혈액 시료를 코팅 처리된 상기 고체 기질에 처리하는 단계; (iii) 상기 단계 (ii)의 결과물을 효소가 결합된 항-IgE 이차항체와 반응시키는 단계; 및 (iv) 상기 효소의 활성을 측정하는 단계를 포함한다.
- [0038] 상기 "개체"는 누에에 대한 알레르기성 질환을 가지는지 여부 또는 누에에 대한 알레르기성 질환을 가질 가능성을 확인하거나 그를 예측하고자 하는 개체를 의미한다. 상기 개체는 척추동물인 것일 수 있고, 구체적으로 포유류, 양서류, 파충류, 조류 등인 것일 수 있으며, 보다 구체적으로 포유동물인 것일 수 있고, 예를 들면 인간 (*Homo sapiens*)일 수 있다. 상기 인간은 한국인인 것일 수 있다.
- [0039] 상기 이차항체에 결합된 효소는 발색반응, 형광반응, 발광반응 또는 적외선 반응을 촉매하는 효소를 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 예를 들어, 알칼린 포스파타아제, β -갈락토시다아제, 호스레디쉬 퍼옥시다아제, 루시페라아제 및 시토크롬 P450을 포함한다. 상기 이차항체에 결합하는 효소로서 알칼린 포스파타아제가 이용되는 경우에는, 기질로서 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-AS-B1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF(enhanced chemifluorescence)와 같은 발색반응 기질이 이용되고, 호스레디쉬 퍼옥시다아제가 이용되는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine- HCl and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), o-페닐렌디아민(OPD), 나프톨/피로닌, 글루코스 옥시다아제와 t-NBT(nitroblue tetrazolium) 및 m-PMS(phenzaine methosulfate)과 같은 기질이 이용될 수 있다.
- [0040] 상기 면역분석 방법에서 최종적인 효소의 활성 측정 또는 시그널의 측정은 당 업계에 공지된 다양한 방법에 따라 실시될 수 있다. 이러한 시그널의 검출은 혈액 시료 내의 IgE가 누에의 30 kDa 지단백질 또는 이의 단백질 영역에 결합하였음을 보여주는 것이며, 이러한 정보를 번데기 알레르기의 진단에 활용할 수 있다.
- [0041] 다른 양상은 누에의 30kDa의 지단백질(lipoprotein) 또는 이의 단백질 영역을 함유하는 누에에 대한 알레르기 질환 면역 치료용 조성물을 제공한다.
- [0042] 일 양상에 따르면, 상기 누에의 30 kDa 지단백질 또는 이의 단백질 영역은 누에 알레르기의 원인물질이므로, 이를 번데기 알레르기에 대한 면역치료제로서 활용할 수 있다.
- [0043] 상기 "면역 치료(allergen immunotherapy)"란 알레르기성 질환을 일으키는 원인 물질인 알레르겐을 소량부터 서서히 증량하여 일정 기간 동안 개체에 주사로 투여함으로써, 특정 알레르겐에 대한 감수성 및 과민성을 저하시키는 치료법을 의미한다. 즉, 원인 알레르겐에 대한 경감작 요법을 의미한다. 상기 면역치료는 피하 및/또는 호흡기에 투여되는 것일 수 있다. 이러한 면역치료는 저농도에서 시작하여 알레르겐의 양을 서서히 증가해 유지용량에 이르게 하는 초기 치료(initial therapy)와 이후 3 내지 5년간 지속하는 유지 치료(maintenance therapy) 등 두 단계로 이루어진 것, 계절 직전에 1일 내지 1주 동안 고농도의 알레르겐을 투여하는 것, 또는 수년간 저농도로 알레르겐을 투여하는 것일 수 있다. 상기 지단백질, 또는 조성물을 투여하는 면역치료를 통하여, 추후 알레르겐에 노출시에 항원-항체 반응에 의한 증상의 발현을 예방 또는 억제하는 효과를 얻을 수 있다. 즉, 상기 지단백질은 누에에 대한 알레르기의 원인 물질이므로, 이를 누에에 대한 알레르기성 질환을 예방 또는 치료하기 위한 면역 치료제로서 활용할 수 있다.
- [0044] 상기 알레르기 질환 면역 치료용 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 유효 성분인, 상기 알레르겐을 0.0001 내지 50 중량% 포함하는 것일 수 있다. 상기 약학적 조성물은, 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분

이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조되는 것일 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포솜 및 이들 성분 중 하나 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있으며, 표적 기관에 특이적으로 작용할 수 있도록 표적 기관 특이적 항체 또는 기타 리간드를 상기 담체와 결합시켜 사용할 수 있다. 더 나아가 당해 기술분야의 적절한 방법으로 또는 레밍턴의 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA)에 기재되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0045] 상기 알레르기 질환 면역 치료용 조성물은 경구, 국소, 비경구, 비내, 정맥내, 근육내, 피하, 안내, 경피 등의 투여를 목적으로 제조될 수 있다. 상기 약학적 조성물은 임상 투여 시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며, 비경구 투여시 비내, 설하, 호흡기내, 복강내 주사, 직장내 주사, 피하 주사, 정맥 주사, 근육내 주사, 뇌혈관내 주사 또는 흉부내 주사에 의해 투여될 수 있다. 상기 투여 개체는 포유동물, 예를 들면, 인간, 돼지, 소, 말, 개, 고양이, 또는 실험 동물, 예를 들면, 마우스, 래트, 토끼, 기니아피그, 또는 햄스터인 것일 수 있다. 사용되는 조성물의 투여량은 다양한 파라미터, 특히 투여 방식 또는 치료 기간에 의해 조절될 수 있다. 또한, 개체의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 배설물 및 누에에 대한 알레르기 증상의 중증도 등에 따라 그 범위가 조절될 수 있다. 일일 투여량은 약 0.0001 내지 100 mg/kg, 또는 0.001 내지 10 mg/kg, 하루 1회 내지 수회 나누어 투여될 수 있다. 알레르기 반응의 진행 과정에서, 상기 알레르겐에 대한 감각 패턴 및 프로파일을 모니터링하는 것은 환자의 임상 증상을 정확하게 예측하고, 규명함으로써, 보다 정확한 진단 및 면역 요법이 가능할 수 있다.

[0046] 상기 누에 알레르기 질환은 외부 항원인 알레르겐에 의하여 불필요한 면역반응, 즉 과민반응으로서 아나필락시스(Anaphylaxis), 두드러기(Urticaria), 알레르기성 천식, 알레르기성 비염, 피부염 또는 이들의 조합인 것일 수 있다.

[0047] 일 양상의 면역 치료용 조성물의 제형은 크게 제한이 없으며, 예를 들어, 수성 또는 오일 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0048] 일 양상에 따른 신규한 30kDa의 지단백질은 누에에 대한 알레르기를 진단하기 위해 이용될 수 있다. 상기 지단백질은 누에 알레르기의 주요 알레르겐이므로, 상기 단백질을 이용한 누에에 대한 알레르기를 진단한 결과는 신뢰도 및 타당도가 높다. 또한, 상기 지단백질을 누에에 대한 알레르기를 예방 또는 치료하기 위한 면역치료용 조성물로 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0049] 도 1은 누에 번데기 추출물의 SDS-PAGE 실험 수행 결과(도 1A) 및 13개의 혈청 샘플에 대한 IgE 면역 블로팅을 수행한 결과(도 1B)를 나타낸 도이다.

도 2는 LC-MS / MS 분석에 의한 30 kDa 지단백질의 동정을 실시하여, 2D 겔 전기 영동을 수행한 결과(도 2A) 및 풀링된 혈청 샘플로부터 IgE 반응성 분자를 확인한 결과(도 2B)에 나타낸 도이다.

도 3은 4개의 재조합 단백질 알레르겐인 27kDa의 당단백질, 30kDa 지단백질, Tropomyosin, Bomb m1에 대한 SDS-PAGE를 수행한 결과(도 3A) 및 IgE 반응성에 대한 비교실험에 대한 IgE 반응성을 확인한 면역 블로팅의 결과(도 3B)를 나타낸 도이다.

도 4는 4M의 요소를 처리한 30kDa 지단백질에 대한 알레르기 환자의 혈청에 처리한 경우의 IgE 반응성을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 30kDa 지단백질 알레르겐 및 누에 추출물의 IgE 억제 면역블랏(Inhibition immunoblotting) 분석에 관한 것으로, 누에 추출물의 IgE 반응 억제 효과를 확인한 결과(도 5A), 요소 처리된 누에 추출물의 IgE 반응 억제 효과를 확인한 결과(도 5B) 및 30kDa 지단백질 알레르겐의 IgE 반응 억제 효과를 확인한 결과(도 5C)에 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0051] 실시예 1. 누에 번데기 알레르기 진단을 위한 알레르겐의 준비 및 IgE 반응성 확인을 위한 혈청 샘플의 준비

[0052] 1.1 알레르기 알레르겐 항원의 준비

[0053] 냉동 누에를 애니실크(www.anysilk.com, Boeun, Chungbuk, Korea)로부터 구입하였다. 구입한 냉동누에를 액체 질소에서 분쇄한 후, 상기 분쇄물을 에틸 에테르 및 에틸 아세테이트의 1 : 1 혼합물에 대하여 5 부피로 탈지시켰다. 이어서, 6 mM 2-메르캅토에탄올, 1 : 1000 희석 비율의 프로테아제 저해제 각테일 세트 III (Calbiochem, 샌디에이고, CA, 미국) 및 1 mg / mL의 1-페닐-3-(2-티아질)-2-유레아(Sigma-Aldrich, 세인트 루이스, MO, 미국)을 함유하는 pH 7.4 의 인산 완충 식염수(phosphate buffered saline: PBS)를 사용하여 4 °C에서 단백질을 추출하였다. 상등액을 10,000g에서 4 °C에서 30 분간 원심분리를 수행한 후 수집하고, 시린지(0.22 μm, Millipore, Bedford, MS, 미국)로 여과한 후, 사용할 때까지 -70 °C에서 유지하였다. 단백질 농도를 브래드포드 분석(Bio-rad, Hercules, CA, 미국)에 의해 결정하였다.

[0054] 1.2 피험 대상 및 혈청 샘플

[0055] 세브란스 병원 알레르기 천식 클리닉을 방문한 17 명의 누에 알레르기 환자 (연령대 24-50 세, 평균 35 세)와 알레르겐에 감각은 일어나지만 증상이 없는 위양성 환자군 11명 및 정상인 13명으로부터 혈청 샘플을 채취하였다. 누에 번데기 섭취와 피부 알레르기 증상 발현 사이의 시간적 관계와 누에 번데기 총 추출물에 대한 양성 피부 단자 검사 (prick test)를 기초로 하여 피험자들이 누에 번데기 알레르기를 나타내는지 여부를 확인하였으며, 이를 표 1에 나타내었다. 상기 알레르기 증상으로는 두드러기 및 아나필락시스가 있고, 섭취 후 30 분 이내에 발생하였다. 누에 번데기에 알레르기 반응이 없고 피부 발진 검사인 ImmunoCAP (Phadia, Uppsala, Sweden)으로 알레르기 항원에 음성 반응을 보인 13 명의 정상인(연령대 22-72 세, 평균 39 세)의 총 혈청 샘플로 총 IgE 수치 20 kU_A / L 이하의 혈청 샘플을 음성 대조군으로 사용하고 컷오프 값을 설정하였다. 아울러, 하기 표 1에서 누에 알레르기 환자군을 S군(S01 내지 S17)로 나타내었고, 상기 알레르겐에 감각은 되었으나, 증상은 없는 위양성 환자군을 A군(A01 내지 A11군)으로 나타내었다. 상기 연구는 관련 기관 검토위원회 (4-2013-0397)의 승인 하에 수행되었다.

표 1

[0056]

번호	나이	성별	SPT wheal	증상	CAP (kU _A /L)	SPT+
S01	40	M	ND	두드러기		ND
S02	25	M	ND	두드러기		ND
S03	39*	F	ND	아나필락시스	f23 (1.28), f24 (1.48)	ND
S04	35	F	3.5	두드러기	f23 (0.68), f24 (0.78)	ND
S05	36	F	ND	두드러기	f23 (0.06), f24 (0.04)	ND
S06	37	F	4.5	두드러기	f23 (6.55), f24 (6.84)	f4
S07	40	M	ND	두드러기	f23 (0.00), f24 (0.05)	ND
S08	25	M	ND	두드러기	f23 (0.02), F24 (0.05)	ND
S09	43	M	ND	아나필락시스	f23 (11.0), f24 (8.41)	ND
S10	28	F	8.5	두드러기	f23 (3.18), f24 (3.64), f4 (0.02)	번데기, f23, f24
S11	27	F	4	두드러기	d2 (1.35), i6 (0.64), f23 (0.87), f24 (1.11)	d1, i206, 번데기
S12	39	M	5.5	두드러기	f23 (3.27), f24 (3.27)	번데기
S13	50	M	ND	두드러기	d2 (1.79), i6 (2.54)	ND
S14	25	M	ND	두드러기	m6 (4.98), d2 (21.9), f23(6.02), f24 (10.4)	ND
S15	49	F	ND	두드러기	d2 (0.58)	f24 (2*2), 계(2*2)
S16	24	F	4	아나필락시스	d2 (47.0), e5 (1.17), f23 (22.1), f24 (23.2), f416 (0.06), f423 (0.07)	f23, f24, f25, f80, f84, f85, 번데기
S17	35	F	ND	두드러기	c2 (0.04), c7 (0.03)	ND
A01	48	M	3*3	번데기 위양성	ND	번데기

A02	23	M	3*3	번데기위양성	f4 (0.00), f416 (0.00), a-gal (0.00)	번데기
A03	57	F	3*3	번데기위양성	i1 (12.0), i2 (0.28), i3 (0.08), i4 (0.01), i5 (0.12), d1 (0.84), d2(1.03)	번데기
A04	22	M	3*3	번데기위양성	f3 (0.25), f24 (0.13)	f3, 폴락, 가오리, f313, 조기, 뱀장어, f290, f20, f11, 해바라기 씨, 번데기
A05	53	F	2*2	번데기위양성	t2 (44.6), t3 (69.4), t7 (40.7), w1 (9.39), w6 (0.36), f22(0.44)	f11, f17, f20, f14, f12, f256, 해바라기 씨, f35, f95, f85, f270, f204), 번데기
A06	36	M	9*5	번데기위양성	f49 (0.66)	f17, f20, f85, f214, f59, f24, f80, f26, f23, 번데기
A07	28	M	ND	번데기위양성	m6 (2.15), d2 (1.57)	ND
A08	28	M	3*3	번데기위양성	f4 (0.10), f416 (1.82)	가오리, 송어, f313, f258, 낙지, f24, f23, f290, 번데기
A09	72	F	2*2	번데기위양성	d2 (0.50), f4 (0.23), f24 (0.27), f27 (0.03)	f25, 번데기
A10	34	F	2*2	번데기위양성	ND	octopus, f24, f23, f20, f85, 번데기
A11	30	F	2*2	번데기위양성	f245 (0.04), f83 (0.02), d2 (0.65)	번데기

[0057] c1, 페니실로일G; c5, 암피실로일; c7, 세파클러; d1, 세로무늬먼지진드기 (*Dermatophagoides pteronyssinus*); d2, 큰다리먼지진드기; f4, 밀; f23, 게; f24, 새우; f206, 고등어; f290, 굴; i6, 바퀴벌레;

[0058] **1.3 30 kDa 지단백질의 동정**

[0059] 누에 번데기에서 추출한 알레르기 항원을 12 % SDS-PAGE로 분리하고 니트로셀룰로오스멤브레인 (nitrocellulose membrane)에 일렉트로블로팅 하였다. PBST (PBS 내에 0.05 % Tween 20 함유) 내에서 5 % 탈지유로 차단시킨 후, 멤브레인을 폴링된 혈청 (1:10 비율로 희석)과 함께 4 °C에서 밤새 배양하였다. IgE 반응 성분을 37 °C에서 2 시간 동안 바이오티니레이티드 항-인간 IgE (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) 및 스트렙타비딘-호스래디시 퍼옥시다제(BioLegend, San Diego, CA)로 반응시켰다. 이어서, 향상된 화학 발광 (enhanced chemiluminescence: ECL) 키트 (Pierce™ ECL Western Blotting Substrate; Pierce Biotechnology, Rockford, IL)로 불꽃을 검출 하였다. 이어서 30 kDa 알레르겐의 동정을 위해 2 차원 겔 전기 영동과 IgE 면역 블로팅을 수행한 후 LC-결합된 ESI MS / MS 분석을 수행하였다.

[0060] **1.4 재조합 30 kDa 지단백질과 Bomb m 1의 생산**

[0061] GenBank (Accession No. NM_001044021)의 서열에 기초하여 설계된 올리고 뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여 30 kDa 지단백질의 클로닝을 위한 RT-PCR을 수행하였다; 정방향 프라이머, 5'-GCCCACTTGACCAAGAAC-3', 역방향 프라이머, 5'-TTAGTAGGGGACGATGTACCATGC-3'. 야르기닌 키나아제 (Bomb m1) 또한 GenBank 서열 (Accession No. NM_001044021, 정방향 프라이머 : 5'-ATGGTCGACGCCGAACC-3', 역방향 프라이머, 5'-CTACAGAGACTTCTCGATCTTGAT-3')에 기초하여 디자인된 올리고 뉴클레오타이드 프라이머를 사용하여 클로닝하였다. PCR로 증폭된 DNA 단편을 pEXP-5NT / TOPO 벡터 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 대장균 (*Escherichia coli*)에서 발현시키고 Ni-친화성 칼럼 크로마토그래피를 이용하여 재조합 단백질을 정제한 후 정제된 단백질을 SDS-폴리아크릴아미드 겔로 환원 조건에서 분석하고 단백질 농도를 브래드포드 분석으로 결정하였다. 아울러, 누에의 27 kDa 당단백질의 오픈 리딩 프레임(NM_001043413)을 대장균에서 발현시키기 위하여 코돈 최적화하고, 합성하였다. 이후, 올리고뉴클레오타이드 프라이머(정방향 5'- ATgAtgTggAAGACTgTCTTg-3', 역방향 5'-TTAACggAAAaAaTCCgAcGg-3',)를 사용하여 PCR 증폭한 후, pEXP5NT/TOPO 벡터(Invitrogen)에 라이게이션 하였다. 대장균 BL21(DE3)에 형질전환 한 후, 재조합 단백질의 발현을 1 mM의 IPTG(isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside)를 첨가하여 유도하였다. 재조합 단백질은 6 M의 요소를 사용한 변성화 조건 하에서 Ni-NTA 아가로스(Qiagen)를 사용하여 정제하였다. 재조합 누에 트로포미오신 역시 동일한 발현 시스템을 사용하여 발현

시킨 후, 용해성 분획으로부터 Ni-레진을 사용하여 정제하였다.

[0062] 실시예 2. 누에 알레르기 진단을 위한 정제된 알레르겐의 특성의 확인

[0063] 상기 실시예 1에서 선별한 누에 알레르기 진단을 위한 알레르겐을 누에 번데기 추출물로부터 SDS-PAGE 및 IgE 면역 블로팅 분석을 통해 확인한 결과를 각각 도 1A 및 도 1B에 나타내었다. 도 1에서 확인한 바와 같이, 상기 약 30 kDa의 질량을 가지는 단백질은 알레르기 환자로부터 분리된 13개의 혈청 샘플 모두에서 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

[0064] LC-MS/MS 분석에 의하여 30 kDa 지단백질에 대한 특성을 확인하기 위한 실험을 추가적으로 수행하였으며, 단백질을 2D 겔 전기영동으로 분리하였고, 상기 단백질을 쿠마시블루로 염색한 결과를 도 2A에 나타내었으며, 환자로부터 분리한 풀링된 혈청 샘플로부터 IgE 반응성 분자를 확인한 결과를 도 2B에 나타내었다. 상기 도 2A 및 2B에서 확인한 바와 같이, 상기 단백질은 2D 겔 전기영동 및 LC-결합 ESI MS / MS를 통하여 저 분자량 30 kDa 지단백질을 확인하였다.

[0065] 실시예 3. 30 kDa 지단백질의 IgE 반응성 실험을 통한 진단능의 확인

[0066] 30 kDa 지단백질과 누에 알레르겐 사이의 IgE 반응성을 비교하기 위한 실험을 수행하였으며, 이를 SDS-PAGE로 확인한 결과를 도 3A에, IgE 면역 블로팅으로 확인한 결과를 도 3B에 나타내었다.

[0067] 도 3A 및 3B에서 확인한 바와 같이, 시험된 4 개의 알레르겐 중 오로지 30 kDa 지단백질 만 현저한 IgE 반응성이 환원 조건에서 SDS-PAGE 후 IgE 면역 블로팅에서 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

[0068] 재조합 단백질의 IgE 반응성이 단백질 변성을 야기하는 요소를 첨가한 경우에도 나타나는 지를 확인하기 위한 실험을 ELISA로 수행하였다. 재조합 단백질 (2 µg/mL)을 0.05 M 카보네이트 완충액 (pH 9.6)에서 밤새 마이크로 플레이트에 코팅시켰다. 3% 탈지유로 차단한 후, 혈청 샘플 (1 : 4 비율로 희석)을 첨가하고 플레이트를 1시간 동안 배양하였다. IgE 항체는 바이오티레이티드 염소 항-인간 IgE (1 : 1000 비율로 희석) (Vector, Burlingame, CA, USA)와 1시간 동안 인큐베이션 한 다음 1 : 1000 비율로 희석된 스트렙타비딘-퍼옥시다제 결합체(Sigma- Aldrich)로 검출되었다. 발색은 기질 3,3',5,5'-테트라메틸-벤지딘(Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, USA)을 첨가하여 확인하였다. 0.5M H₂SO₄를 가하여 효소 반응을 정지시킨 후, 450nm에서의 흡광도를 측정하였다. 건강한 대조군에서 얻은 혈청의 평균 흡광도 + 2의 표준 편차의 2배 값을 컷 오프 값으로 사용하였다. ELISA 억제 실험을 위해 누에 번데기 추출물 (10 µg/mL)을 코팅된 마이크로타이터 플레이트에 넣고 4 °C에서 밤새 배양하였다. 3 % 탈지유로 차단한 후, 여러 농도의 추출물 또는 재조합 단백질을 함유하는 용액으로 미리 인큐베이션한 재조합 단백질에 양성인 환자 2 명으로부터 수득한 혈청 샘플 (1 : 4)을 첨가한 웰을 2시간 동안 배양하였다. 이어서, IgE 항체를 기재한 바와 같이 검출하고, 재조합 30 kDa 지단백질을 비교를 위한 억제제로 사용하였으며, 약한 IgE 반응성을 ELISA로 확인하였다. 항체 상호 작용을 촉진하기 위해 혈청 샘플에 4 M 요소를 첨가하였고, 실험 결과를 도 4에 나타내었다.

[0069] 도 4에서 확인한 바와 같이, 30 kDa 지단백질은 4 M 요소가 첨가되었을 때 모든 (17개 중 17개) 혈청 시료에 의해 인식되었지만 나머지 3개의 알레르겐(Bomb m1, 27kDa 당단백질)은 17개의 혈청 샘플 중 한 개의 샘플도 반응성이 나타나지 않았으며, tropomyosin 역시 IgE 반응성이 50%이하로 매우 낮은 것을 확인할 수 있었다.

[0070] 실시예 4. 억제 분석을 통한 30kDa 지단백질에 대한 역할의 확인

[0071] 누에 알레르기에서 30kDa 지단백질에 대한 역할을 알아보기 위하여, 억제분석을 실시하였다. IgE 면역 블로팅을 위해, 재조합 단백질 5 µg을 환원 조건 하의 12 % SDS-PAGE 겔상에서 수행하였다. 분리된 단백질을 PVDF 막에 일렉트로블로팅 하였다. PBST에서 3% 탈지유로 차단시킨 후, 멤브레인을 재조합 단백질에 양성인 환자 2 명으로부터 수득한 혈청 샘플 (1 : 4)과 함께 밤새 배양하였다. 풀 혈청 샘플 (1 : 4 희석)로 IgE에 대한 반응성을 조사하였다. IgE 항체는 알칼리 포스파타제-결합된 염소 항-인간 IgE (1 : 1000) (Sigma-Aldrich)로 1 시간 동안 검출되었다. 발색을 니트로 블루 테트라졸륨 및 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴-포스페이트 (Promega, Madison, WI, USA)를 첨가하여 확인하였으며, 이를 도 5A 내지 C에 나타내었다.

[0072] 도 5A에서 확인한 바와 같이, 누에 추출물은 IgE 반응을 억제하지 못한 것을 확인하였다. 도 5B에서 확인한 바와 같이, 4 M 요소가 혈청에 포함되었을 때 누에 추출물은 최소 억제 (최대 16.1 %)가 나타나는 것을 확인하였다. 다만, 도 5C에서 확인할 수 있는 바와 같이, 93 % 이상의 30 kDa 지단백질에 대한 자체 억제(self-inhibition)가 나타난 것을 확인할 수 있었고, 상기와 같은 결과를 통하여 추출물에서 나타나는 약 30% 추출물의 억제는 추출물 내 포함된 재조합 30 kDa 지단백질에 의하여 나타나는 것임을 확인할 수 있었다. 따라서,

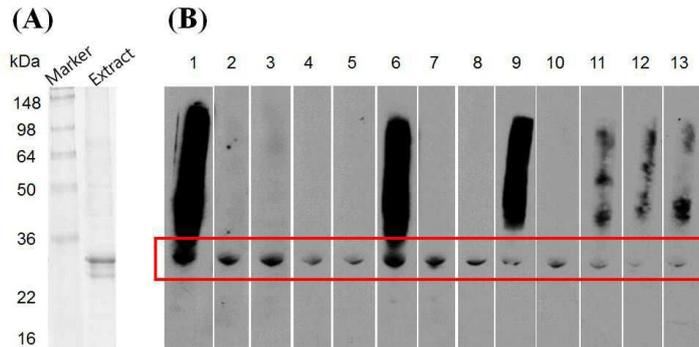
30kDa 지단백질은 누에 번데기에 대한 알레르기의 주요한 원인이며, 누에 번데기에 대한 알레르기를 진단하는데 있어서, 보다 유의미한 것을 확인하였다.

[0073]

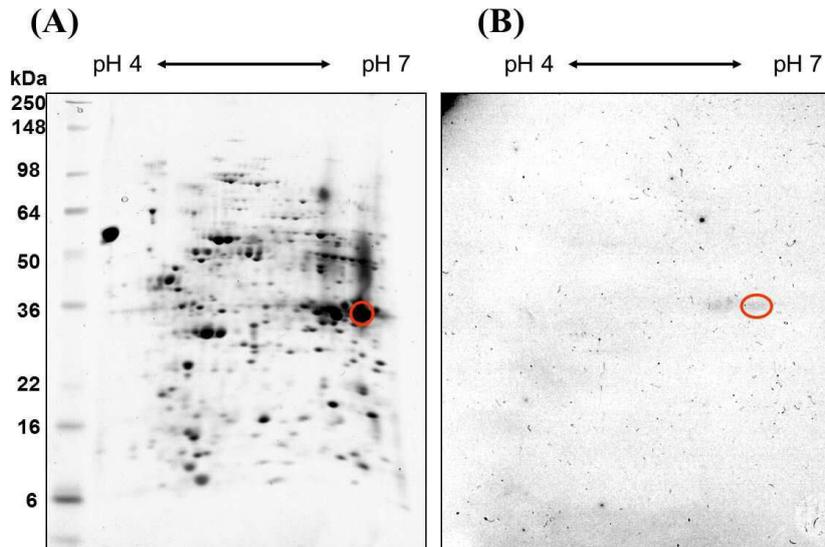
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

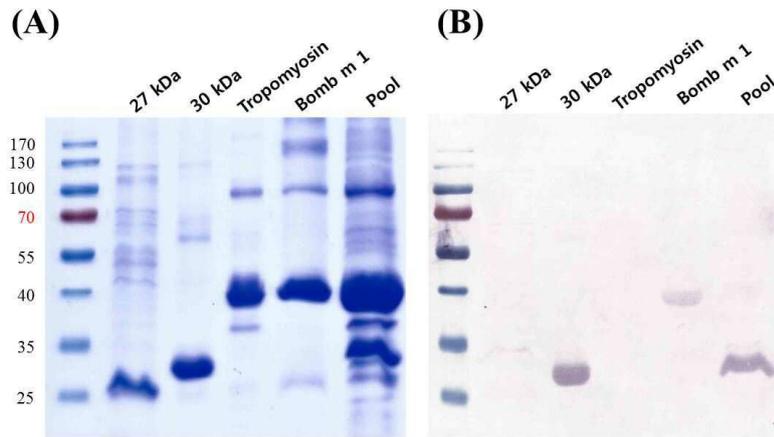
도면1



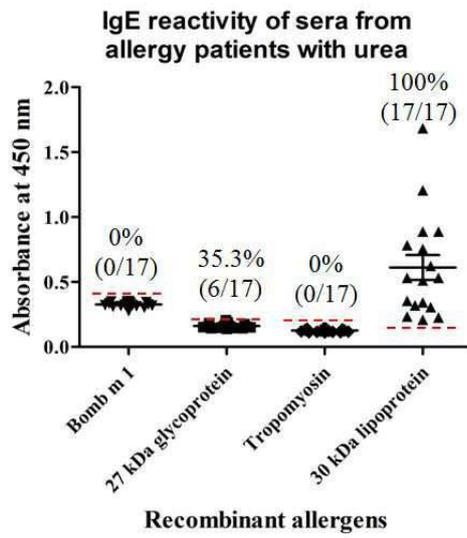
도면2



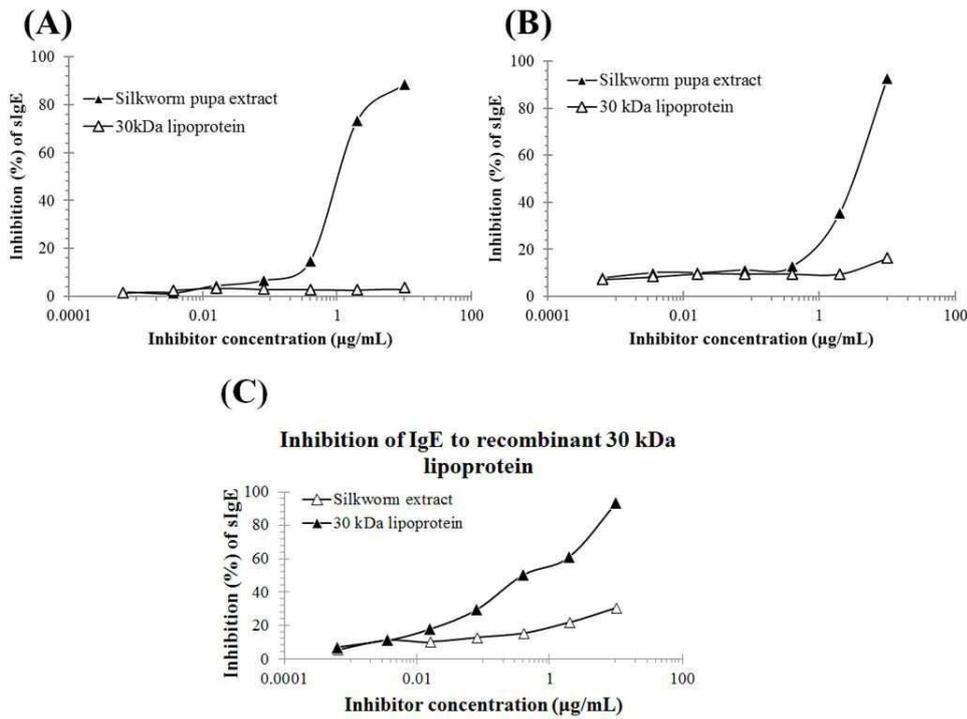
도면3



도면4



도면5



서열목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
ProteomeTech Inc.
- <120> Compositions for diagnosis of allergy disease to silkworm,
methods for diagnosing of allergy disease to silkworm, and
composition for immunotherapy of allergy disease to silkworm
- <130> PN126528
- <160> 8
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 240
- <212> PRT
- <213> Unknown
- <220><223> Recombinant 30 kDa lipoprotein
- <400> 1

Ala Thr Leu Ala Pro Arg Thr Asn Asp Val Leu Ala Glu Gln Leu Tyr

1 5 10 15

Met Ser Val Val Ile Gly Glu Tyr Glu Thr Ala Ile Ala Lys Cys Ser

20 25 30

Glu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Gly Glu Val Ile Lys Glu Ala Val Lys
 35 40 45
 Arg Leu Ile Glu Asn Gly Lys Arg Asn Thr Met Asp Phe Ala Tyr Gln
 50 55 60
 Leu Trp Thr Lys Asp Gly Lys Glu Ile Val Lys Ser Tyr Phe Pro Ile
 65 70 75 80

Gln Phe Arg Val Ile Phe Thr Glu Gln Thr Val Lys Leu Ile Asn Lys
 85 90 95
 Arg Asp His His Ala Leu Lys Leu Ile Asp Gln Gln Asn His Asn Lys
 100 105 110
 Ile Ala Phe Gly Asp Ser Lys Asp Lys Thr Ser Lys Lys Val Ser Trp
 115 120 125
 Lys Phe Thr Pro Val Leu Glu Asn Asn Arg Val Tyr Phe Lys Ile Met
 130 135 140
 Ser Thr Glu Asp Lys Gln Tyr Leu Lys Leu Asp Asn Thr Lys Gly Ser

145 150 155 160
 Ser Asp Asp Arg Ile Ile Tyr Gly Asp Ser Thr Ala Asp Thr Phe Lys
 165 170 175
 His His Trp Tyr Leu Glu Pro Ser Met Tyr Glu Ser Asp Val Met Phe
 180 185 190
 Phe Val Tyr Asn Arg Glu Tyr Asn Ser Val Met Thr Leu Asp Glu Asp
 195 200 205
 Met Ala Ala Asn Glu Asp Arg Glu Ala Leu Gly His Ser Gly Glu Val
 210 215 220

Ser Gly Tyr Pro Gln Leu Phe Ala Trp Tyr Ile Val Pro Tyr *** Ala
 225 230 235 240

<210> 2

<211> 722

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Nucleotide sequence of recombinant 30 kDa lipoprotein

<400> 2

gccacacttg caccaagaac taatgacgta ctggcggagc agctgtatat gagtgtcgtc 60
attggtgaat acgagaccgc tatecctaaa tgctctgaat atctgaagga aaagaaggga 120
gaggttatca aggaagccgt gaagcgtctg atcgaaaacg gcaagaggaa caccatggac 180

ttcgcctacc agttatggac aaaggatgga aaggaaatcg tcaaatctta cttccccatc 240
cagtttagag tgatcttcac cgagcagact gtcaagctca taaacaaaag ggaccatcac 300
gccctcaagt tgatcgacca acaaaaccac acaaaaattg cattcgggtga ctccaaagac 360
aaaaccagca agaaagtctc ctggaagttt acccccgtgt tggaaaacaa cagagtttac 420
ttcaagatca tgtccaccga ggacaaacag tacctgaagc tcgataacac gaaaggttct 480
agtgatgacc gtatcatcta cggatgatagc accgctgaca cttcaaaca cactgggtac 540
cttgagccct ccatgtacga aagcgacgtc atgttcttcg tctacaaccg agagtacaac 600

agtgttatga cacttgatga agatatggcc gccaacgaag accgtgaagc cttggggcac 660
agcggagaag tttccgggta tcccactt tttgcatggt acatcgtccc ctactaagct 720
tg 722

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Forward primer sequence of SW30kLp
<400> 3
gccacacttg caccaagaac 20
<210> 4
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer sequence of SW30kLp
<400> 4
ttagtagggg acgatgtacc atgc 24
<210> 5
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Forward primer sequence of Bomb ml

<400>	5	
	atggtcgacg ccgcaacc	18
<210>	6	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse primer sequence of Bomb m1	
<400>	6	
	ctacagagac ttctcgatct tgat	24
<210>	7	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Forward primer sequence of 27kDa glycoprotein	
<400>	7	
	atgatgtgga agactgtctt g	21
<210>	8	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse primer sequence of 27kDa glycoprotein	
<400>	8	
	ttaacggaaa gaagtccgac gg	22

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 7

【변경전】

청구항 1 내지 6항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 누에에 대한 알레르기 질환 진단용 키트로서,

상기 알레르기 질환은 아나필락시스(Anaphylaxis) 또는 두드러기(Urticaria)인 것인 키트.

【변경후】

청구항 1 및 3 내지 6항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 누에에 대한 알레르기 질환 진단용 키트로서,

상기 알레르기 질환은 아나필락시스(Anaphylaxis) 또는 두드러기(Urticaria)인 것인 키트.