PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

01 11966
2000-3

FORMULARIO ÚNI[illegible]D

SOLICITUD DE REGISTRO DE:

(1) [X] Patente de Invención. [ ] Patente de Modelo de Utilidad.

(2) **SOLICITANTE 71**	Nombre: LG CHEMICAL LTD. Dirección: 20, Yoido-dong, Youngdungpo-ku, Teléfono: 82-02-3773-3105 Fax: 82-02-3773-3289 E-mail: Domicilio: Seoul 150-721, KOREA	**IDENTIFICACIÓN** C.C. [ ] NIT [ ] C.E. [ ] Otro [X] Número 110111-0003543
(3) **REPRESENTANTE O APODERADO 74**	Nombre: DRA.MARGARITA CASTELLANOS A. Dirección: CARRERA 9 No. 93-09 Teléfono: 610 74 80 Fax: E-mail: acastell@impsat.net.co	**IDENTIFICACIÓN** C.C. [X] NIT [ ] C.E. [ ] Otro [ ] Número 39'779.654 TP 70819
(4) **INVENTOR (ES) 72**	Nombre: (VER ANEXO No. 1) (Fol 3) Dirección: Teléfono: Fax: E-mail: Domicilio:	**IDENTIFICACIÓN** C.C. [ ] NIT [ ] C.E. [ ] Otro [ ] Número

(5) **TITULO (54)** " INMUNOENSAYO Y REACTIVO DIAGNÓSTICO PARA LA DETECCIÓN DE LA MALARIA ".

(6) **Clasificación Internacional (51)** A 61 K 39/395 // C 12 N 15/09

(7) **Prioridad**	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
SI [X] NO [ ]	(VER ANEXO No.2) (Fol 4)		

(8) **Para publicar a partir de la fecha de la presente solicitud a los:**
6 meses [ ] 12 meses [ ] 18 meses [X] Otro [ ]

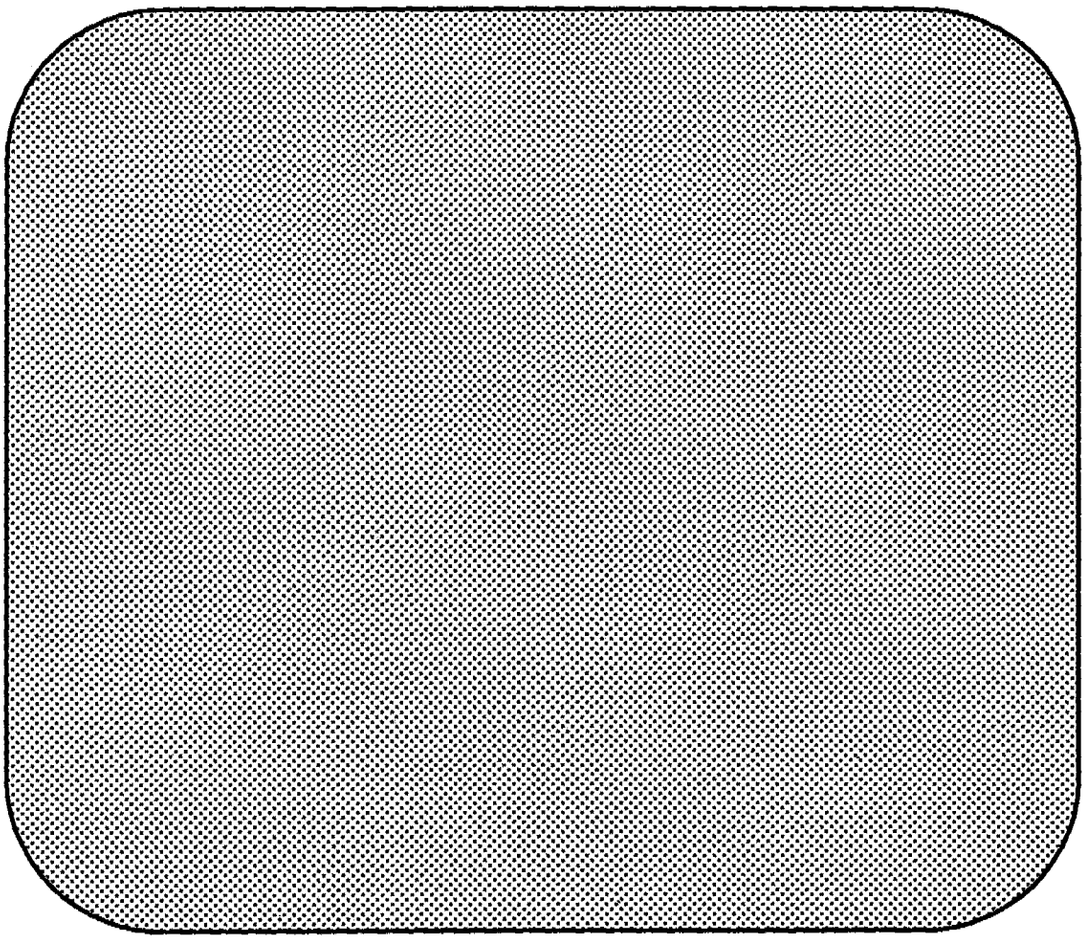
(9) **Comprobante de pago No.** 4.132 y 8.673 **Fecha** 26/01/2001 - 13/02/2001

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

(10) Anexos

- [X] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- [ ] Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicaión
- [X] Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- [X] Certificado de existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- [X] Poderes, si fuere el caso
- [X] Copia certificada de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- [X] Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- [ ] Documento de cesion del inventor al solicitante o a su causante
- [X] Descripción de la invención
- [X] Una o más reivindicaciones
- [X] Dibujos y/o planos necesarios
- [ ] De ser el caso copia del contrato de acceso
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indigenas
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- [ ] Artes finales 12 x 12 cm, 2 ejemplares

(11) FIGURA CARACTERISTICA:



(12)

NOMBRE: MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

15 FEB 2011

FIRMA: Margarita Castellanos

C.C. 39 779 654 Usq. T.P. 70819 del Cons. Sup. Jud.

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

ANEXO No. 1

LISTA DE INVENTORES

NOMBRE	DIRECCION
1. KOOK- JIN LIM	Eunbitmaeul # 521-1807, 870 Hwajong-dong, Deokyang-ku, Koyang-si, Kyungki-do - KOREA.
2. MI-JIN SHON	Hanbit APT No. 125-505, 99 Eoeun-dong, Yoosung-ku, Daejeon-si, KOREA.
3. SEUNG-BUM YOO	Hanuri APT No. 104-601, 763 Tanbang-dong, Seo-ku, Daejeon-si, KOREA.
4. SANG-IK LEE	Narae APT No. 104-1303, 462-4 Jeonmin-dong, Yoosung-ku, Daejeon-si, KOREA.
5. JAE-HOON OH	Chungsol APT No. 102-306, 8-2 Songang-dong, Yoosung-ku, Daejeon-si, KOREA.
6. SEUNG-WON LEE	Limaechon No. 206-1804, 124 Limaedong, Bundang-ku, Sungnam-si, KOREA.
7. HYUNG-CHEOL KIM	No. 37, 266 Jung reung-dong, Sung buk-ku, Seoul, KOREA.

ANEXO No. 2

P R I O R I D A D E S

	(33) PAÍS DE ORIGEN	(32) FECHA	(31) NÙMERO DE SOLICITUD
1.	KOREA	17/02/2000	2000-7650
2.	KOREA	17/02/2000	2000-7649
3.	KOREA	17/02/2000	2000-7648
4.	KOREA	10/03/2000	2000-12172
5.	KOREA	8/08/2000	2000-45806

55

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO Folios: 386
Radicacion : 01011966 00000000
Fecha (AMD): 2001-02-15 15:35:36
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRES-NTAL
Dependencia: 2000 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 900176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 01 4,132
FECHA : ENERO 26 DE 2001

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ALEJANDRO MESA GONZALEZ	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	3032185	26/01/2001	2,809,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	CENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	90005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	608,000.00
		TOTAL :	608,000.00

VR: SEISCIENTOS OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador: 382 0840
Fax: 350 5220
e-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE COMERCIO
RADICACION : 01011000 [illegible] Folios: 300
Fecha radic: 2001-02-13 10:30:36
Tramite : 000 PRIMERO D A REGISTRO VIA PRECEDENTE
DEPENDENCIA: 2000 DIVISION DE NUEVAS SOCIEDADES

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 01 - 8,673
FECHA : FEBRERO 13 DE 2001

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
[redacted]A ESPINOSA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	3143029	12/02/2001	2,145,120.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS	248,640.00
		TOTAL : $	248,640.00

SON: DOSCIENTOS CUARENTA Y OCHO MIL SEISCIENTOS CUARENTA PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador: 382 0840
Fax: 350 5220
e-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

77

ALVARO CASTELLANOS M. & CIA.
A B O G A D O S
Carrera 9 No. 93-09
Apartado 6349
Bogotá - COLOMBIA

Señor

Jefe de la División de Nuevas Creaciones

Superintendencia de Industria y Comercio

Ministerio de Desarrollo Económico

E. S. D.

Re.: **PODER** conferido por la sociedad LG CHEMICAL LTD.

Yo, **XIMENA CASTELLANOS ABONDANO,** mayor de edad, identificada y domiciliada como aparece al pié de mi firma, atentamente manifiesto a Uds. que sustituyo en la Dra.: **MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO,** el poder que me confirió la sociedad LG CHEMICAL LTD, en Seoul - KOREA, el 18 de Diciembre de 2000.

Debidamente legalizado por el Ministerio de Relaciones Exteriores el día 27 de .Diciembre del 2.000 bajo el No. 615178 , con las mismas facultades que me fueron conferidas, para tramitar la solicitud de Patente de Invención titulada :

" **INMUNOENSAYO Y REACTIVO DIAGNÓSTICO PARA LA DETECCION DE LA MALARIA** ".

Del Señor Jefe,

Acepto :

Ximena Castellanos Abondano
C.C. No. **39.773.330** de Usaquén
T.P.A. No. **58.236** de Del Cons. Sup. de la Judicatura
Carrera 9 No. 93-09 - Santafé de Bogotá
Teléfono: 6107420 - 6107480

Margarita Castellanos Abondano
C.C. No. **39'779.654** de Usaquén
T.P.A. No. **70819** del Cons. Sup. de la Judicatura
Carrera 9 No. 93-09 - Santafé de Bogotá
Teléfono: 6107420 - 6107480

Santafé de Bogotá,

DILIGENCIA DE AUTENTICACION DE FIRMA
CON PRESENTACION PERSONAL
(Art. 1ro. del decreto 22 82 de 1989)

Ante el Notario Cuarenta y uno (41) del Circulo de esta ciudad compareció el Doctor Ximena Castellanos Abondano

quien Exhibió la cédula de ciudadanía número 39 77 330

expedida en Usaquen y la tarjeta profesional número 58236 C.S.J. con el presente documento [illegible] y declaró que la firma que aparece en él es suya

FIRMA AUTOGRAFA DEL DECLARANTE

Santa Fé de Bogotá D.C. 16 ENE 2001

AUTORIZO LA ANTERIOR

REPUBLICA DE COLOMBIA Círculo de Santafé de Bogotá, D.C. OFCAU NOTARIA 41 Carrera 12 Nº 93-26 AGUSTIN MORALES RIVEIRA

DILIGENCIA DE AUTENTICACION DE FIRMA
CON PRESENTACION PERSONAL
(Art. 1ro. del decreto 22 82 de 1989)

Ante el Notario Cuarenta y uno (41) del Circulo de esta ciudad compareció el Doctor Margarita Castellanos

quien Exhibió la cédula de ciudadanía número 39779654

expedida en Usaquen y la tarjeta profesional número 70819 C.S.J. con el presente documento [illegible] y declaró que la firma que aparece en él es suya

FIRMA AUTOGRAFA DEL DECLARANTE

Santa Fé de Bogotá D.C. 16 ENE 2001

AUTORIZO LA ANTERIOR

REPUBLICA DE COLOMBIA Círculo de Santafé de Bogotá, D.C. OFCAU NOTARIA 41 Carrera 12 Nº 93-26 AGUSTIN MORALES RIVEIRA

4806

PODER

El (los) suscrito (s) en representación de LG CHEMICAL LTD.

domiciliado (s) en 20, Yoido-dong, Youngdungpo-ku, SEOUL 150-721, República de Corea

nombra(n) por el presente a **XIMENA CASTELLANOS A.** y/o **MARGARITA CASTELLANOS A.** abogadas con oficinas en la Carrera 9 No. 93-09, Bogotá - Colombia para

y para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y con este fin autorizamos a dichos apoderados para que nos representen ante cualesquiera autoridades o personas de los órdenes administrativo, contencioso-administrativo y judicial en todo lo relacionado con los siguientes actos y gestiones:

a) Obtención de patentes de invención , modelos y dibujos industriales; registro de marcas de fábrica, de servicio, colectivas o defensivas y de denominaciones de origen; depósito de nombres y enseñas comerciales; su renovación prórroga, inscripción de traspaso y cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Para la obtención de Registros Sanitarios; c) Acciones de oposición, observación, cancelación, nulidad, medidas cautelares y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos que promovamos o se nos promuevan, pudiendo en todos los actos y gestiones arriba determinados sustituir éste mandato, transigir, desistir, recibir, cancelar, renunciar, aceptar notificaciones y nombrar apoderados judiciales y extrajudiciales.

Dado y firmado hoy Diciembre 18, 2000

en Seoul, Corea

Por LG CHEMICAL LTD.

(Notary should execute on other side)
(Consular legalization necessary)

POWER OF ATTORNEY

The undersigned LG CHEMICAL LTD.

of 20, Yoido-dong, Youngdungpo-ku, Seoul 150-721, Republic of Korea

hereby grant(s) Power of Attorney to **XIMENA CASTELLANOS A.** and/or **MARGARITA CASTELLANOS A.** attorneys residing at Carrera 9 No. 93-09 Bogotá - COLOMBIA to

and to obtain the protection of my (our) industrial property, for which purpose we authorize the said attorneys to represent us before any authorities or persons , specially those, administrative contentious and judicial, in all matters concerning the following :

a) Obtention of patents, models and designs; registration of trademarks, service, collective and defensive marks, and of designations of origin; the deposit of commercial names and ensigns; its renewal , extension, recordal of assignments, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rigths; b) For de obtention of Sanitary Registrations; c) Actions of opposition, cancellation, nullity, infringement, granting of licenses; and in general the civil, criminal and administrative suits related to those rigths; actions and suits instituted by us or against us; and that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, desist, cancel, receive, renounce, accept notifications and appoint attorneys in fact, in or out of Court .

Given and signed this December, 2000

in Seoul, Korea

By Jae Kap SUNG, Vice Chairman

Jae Kap Sung

(Notary should execute on other side)
(Consular legalization necessary)

ALVARO CASTELLANOS M. & CIA.
ABOGADOS COLOMBIA
Carrera 9 No. 93-09 - P.O. Box 6349 - Bogotá, Colombia
Tels. (571) 610 7420 760 / 80 - Fax (571) 610 0706 - e-mail acastellanos@impsat.net.co

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista. Santa fé de Bogotá
22 ENE 2001
AGUSTIN MORALES RIVEIRA
NOTARIO CUARENTA Y UNO

CERTIFICADO NOTARIAL (Sociedad)

Hoy, 18 de Diciembre de 19 2000
compareció (eron) personalmente Jae Kap SUNG

a quien (es) conozco como la (s) persona (s) que firma (n) este documento en representación de la Sociedad / Compañía denominada
LG CHEMICAL LTD.

Certifico:

a) Que LG CHEMICAL LTD.
es una Sociedad / Compañía legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes de la República de Corea

b) Que el domicilio de dicha Sociedad / Compañía es
20,Yoido-dong, Youngdungpo-ku,
Seúl 150-721, Rep. de Corea

c) Que el objeto u objetos para los cuales se otorga el presente poder están comprendidos dentro del objeto social de la mencionada Sociedad / Compañía.

d) Que el Sr. Jae Kap SUNG
está autorizado para otorgar el presente poder. Lo anterior está probado por medio de los siguientes documentos, que certifico he visto*:
Poder con sello registrado y documento certificando que el sello es auténtico

(Ciudad) Seúl
(Estado) Corea
Hoy: 18 de Dic. de 19 2000
(Notario Público)

*Los documentos deben identificarse con fecha y origen.

NOTARIAL (Corporation)

On this 18th day of December 2000
personally appeared Jae Kap SUNG

whom I know to be the person (s) who signed this document as representative(s) of the Corporation / Company named
LG CHEMICAL LTD.

I Certify:

a) That LG CHEMICAL LTD.
is a Corporation / Company legally constituted and in existence in accordance with the laws of Republic of Korea

b) That the domicile of said Corporation / Company is
20, Yoido-dong, Youngdungpo-ku
Seoul 150-721, Republic of Korea

c) That the purpose or purposes for which the present Power of Attorney is granted are comprised within the object set forth in the charter of the mentioned Corporation / Company.

d) That Mr. Jae Kap SUNG
is (are) authorized to grant the present Power of Attorney. The aforementioned was duly proven through the following documents and I duly certify having seen them*: Power of Attorney with a registered seal and a document certifying that a seal is registered

(City)
(State)
this 18th day of December 2000
(Notary Public)

*Documents must be identified with date and origin.

AGUSTIN MORALES RIVEIRA
NOTARIO CUARENTA Y UNO
22 ENE 2001
Esta copia coincide con el original que tuve a la vista. Santa Fe de Bogotá

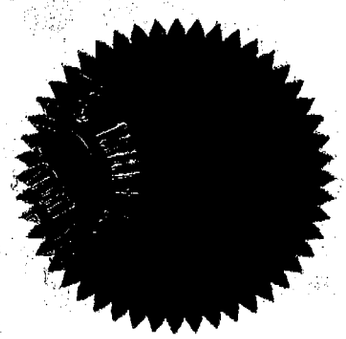
서울중구을지로2가6
내외빌딩 1503호

공증인가
법무법인 을지합동법률사무소

대표전화 : 756-1221
공 증 부 : 756-0312/3

Registered No. 2000 - 3433

NOTARIAL CERTIFICATE



ULCHI LAW FIRM
& NOTARY OFFICE
#6, Ulchiro 2-ka, chung-ku,
Seoul, KOREA



· 변호사 이종원 · 변호사 이재원 · 변호사 차승권 · 변호사 김시력
전화 : 756-1221~3, 757-1891~2 FAX : 756-3151, 757-1893

La presente copia coincide con el original que tuve a la vista. Santa fé de Bogotá
22 ENE 2001
AGUSTIN MORALES RIVEIRA
NOTARIO CUARENTA Y UNO

210mm×297mm
백상지70g/m²

10 10

서울중구을지로2가6
내외빌딩1503호

공증인가
법무법인 을지합동법률사무소

대표전화:756-1221
공 증 부:756-0312/3

동부 2000 년 제 3433 호

Registered No. 2000 - 3433

인 증

NOTARIAL CERTIFICATE

위 위임장 에 기재된

No Chul Kwag

attorney-in-fact of

주식회사 엘지화학
대표이사 성재갑의

Jae Kap Sung, Vice chairman of LG CHEMICAL LTD.

대리인 곽노철은

본직의 면전에서 위 본인이 서명날인한 것임을 자인하였다.

appeared before me and admitted said principal's subscription to the attached POWER OF ATTORNEY.

2000 년 12 월 18 일 이 사무소에서 위 인증한다.

This is hereby attested on this 18th day of DEC., 2000 at this office.

공증인가 법무법인
을지합동법률사무소

서울특별시 중구 을지로2가 6 번지

Attorney-at-Law
Lee Jae - Won

ULCHI LAW FIRM
& NOTARY OFFICE
#6, Ulchiro 2-ka, Chung-ku
Seoul, KOREA

공증담당변호사

This office has been authorized by the Minister of Justice, the Republic of Korea, to act as Notary Public since 1st day of Feb., 1986 under Law No. 3594.

Esta copia concuerda con el original que tuve a la vista. Santa fe de Bogotá
02 ENE 2001
AGUSTIN MORALES OLIVEIRA
NOTARIO CUARENTA

11-11

대 한 상 공 회 의 소
THE KOREA CHAMBER OF COMMERCE & INDUSTRY

대 한 민 국
Republic of Korea

MEMBERSHIP CERTIFICATE

TO: Colombian Consul
1312Ho, Kyobo Bldg., 13F,1GA, Jongro
Jongro-ku, Seoul 110-121, Korea

Dear Sirs
We hereby certify that the undermentioned firm is a member of Seoul Chamber of Commerce & Industry in the Republic of Korea.

Name of Firm	:	LG Chemical Ltd.
Address	:	20, Yoido-dong, Youngdungpo-ku Seoul 150-721, Korea
Representative	:	Jae Kap Sung
Business Lines	:	
Remarks	:	112568
For the use of	:	Patent application, 2000

THE KOREA CHAMBER OF COMMERCE & INDUSTRY
Executive Director Kang, Seung-Yil
The Republic of Korea

Signature of authorized signatory
THE KOREA CHAMBER OF COMMERCE &INDUSTRY

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista. Santa Fé de Bogotá
22 ENE 2001
AGUSTIN MORALES RIVEIRA
NOTARIO CUARENTA Y UNO

12+2

CONSULADO DE COLOMBIA

No. 2050

DEC 18 20

El suscrito Cónsul de Colombia en Seúl, Corea, vistos los documentos presentados por los interesados, CERTIFICA :

Que el señor Lee Jae Won quien como Notario Público de Seúl, Corea autenticó la firma del signatario del poder precedente, ejercía en la fecha las funciones indicadas y su firma corresponde a la registrada en este Consulado; Que la compañía LG CHEMICAL, LTD. es una Sociedad constituida de acuerdo con las leyes de la República de Corea y cumple su objeto conforme a las mismas; Que el señor Jae Kap Sung quien en su caracter de Vice-chairman de la citada compañía confiere el poder precedente y cuya firma fue autenticada ante el Notario arriba citado, es su representante legal en este país.

El Cónsul no asume responsabilidad por el contenido del documento.

Esta certificación es válida para un documento de (TRES)páginas.

PAGADOS IMPUESTOS DE TIMBRE Y DERECHOS CONSULARES.
Valor: 22.oo dólares americanos

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD POR EL CONTENIDO DEL TEXTO

2000 DIC 21 A 10:21

JEFE DE LEGALIZACIONES SANTAFE DE BOGOTA D.C.

ALVARO ENRIQUE AYALA MELENDEZ
Primer Secretario
Encargado de las Funciones Consulares

CONSULADO DE COLOMBIA SEUL

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista, Santa fé de Bogotá

22 ENE 2001

AGUSTIN MORALES RIVEIRA
NOTARIO CUARENTA Y UNO

13+3

----------TRADUCCION OFICIAL No. 01-0103----------

de un documento escrito en INGLES, el cual para su identificación lleva el sello de la Traductora e Intérprete Oficial , según Resoluciones 2755/68 y 01144/97 del Ministerio de Justicia.

(Anexos a un poder otorogado por LG CHEMICAL LTD.)

Registro No. 2000-3433

CERTIFICADO NOTARIAL

UCHI OFICINA LEGAL & NOTARIAL

#6, Ulchiro 2-ka, chung-ku, Seoul, Corea

Registro No. 2000 – 3433

CERTIFICADO NOTARIAL

No Chul Kwag, apoderado de Jae Kap Sung, Vicepresidente de LG Chemical Ltd. compareció ante mí y admitió que su representado suscribió el poder adjunto.

Esto se certifica por el presente hoy día 18 de Diciembre de 2000 en esta oficina.

(fdo) ilegible

Apoderado

Lee Jae-Won

UCHI FIRMA LEGAL Y OFICINA NOTARIAL

#6, Ulchiro 2-ka, Chung-ka

Seoul, Corea

DOY FE

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista. Santa Fe de Bogotá

22 ENE 2001

AGUSTIN MORALES RIVERA
NOTARIO CUARENTA Y UNO

14-19

Esta oficina ha sido autorizada por el Ministerio de Justicia de la República de Corea, para actuar como Notario Público desde el 1º de Febrero de 1986 bajo la ley No. 3594.

CERTIFICADO DE MEMBRECIA

Al Consul Colombiano

1312Ho, Kyobo Bldg., 13F, 1GA, Jongro

Jongro-ku, Seoul 110-121, Corea

Señores:

Certificamos por medio del presente que la firma antes mencionada es miembro de la Cámara de Comercio e Industria de Seoul, en la República de Corea.

Nombre de la firma:	LG Chemical Ltd.
Dirección:	20, Yoido-dong, Youngdungpo-ku
	Seoul 150-721, Corea
Represenante:	Jae Kap Sung
Linea de negocios:	
Observaciones:	en blanco
Para el uso de:	solicitud de patente.

Firma de funcionario autorizado

CAMARA DE COMERCIO E INDUSTRIA DE COREA

(Sello) 112568

EN ESPAÑOL, la legalización de la firma anterior por el Consulado de Colombia en Seúl, Corea, No. 2050 de Dic. 18, 2000, y autenticación de la

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista. Santa fe de Bogotá
22 ENE 2001
AGUSTIN MORALES RIVERA
NOTARIO CUARENTA Y UNO

15 15

firma consular de Alvaro Enrique Ayala Melendez por el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia bajo el No. 615178 de Diciembre 27, 2000.

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, a la cual me remito,

Bogotá, Enero 3,2001.

DORA DU[illegible]
TRADUCTORE[illegible]
RES. 0275[illegible]

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista. Santa fe de Bogotá

22 ENE 2001

AGUSTIN MORALES RIVEIRA
NOTARIO CUARENTA Y UNO

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

100732

SU FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

MD DE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2001 JAN -4 P 12:44

JEFE DOCUMENTALIZACIONES SANTAFE DE BOGOTA D.C.

AUSTIN MORALES RIVEIRA
NOTARIO CUARENTA Y UNO

4 ENE 2001

Esta copia coincide con el original que tuve a la vista de Bogotá

Abstrac 10/16

대 한 민 국 특 허 청
KOREAN INDUSTRIAL PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Industrial Property Office.

출 원 번 호 : 특허출원 2000년 제 12172 호
Application Number

출 원 년 월 일 : 2000년 03월 10일
Date of Application

출 원 인 : 주식회사 엘지화학
Applicant(s)

2000 년 12 월 13 일

특 허 청
COMMISSIONER

1020000012172 2000/12/1

【서류명】 특허출원서
【권리구분】 특허
【수신처】 특허청장
【제출일자】 2000.03.10
【발명의 명칭】 말라리아의 효소 면역학적 측정방법 및 이에 사용되는 진단시약
【발명의 영문명칭】 Enzyme immuno assay for malaria and reagent used therefor

【출원인】
【명칭】 주식회사 엘지화학
【출원인코드】 1-1998-001275-0

【대리인】
【성명】 이원희
【대리인코드】 9-1998-000385-9
【포괄위임등록번호】 1999-012836-2

【발명자】
【성명의 국문표기】 임국진
【성명의 영문표기】 LIM,KookJin
【주민등록번호】 611117-1482719
【우편번호】 305-390
【주소】 대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 404동 1104호
【국적】 KR

【발명자】
【성명의 국문표기】 손미진
【성명의 영문표기】 SOHN,Mi jin
【주민등록번호】 650325-2929420
【우편번호】 305-333
【주소】 대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 125동 505호
【국적】 KR

【발명자】
【성명의 국문표기】 박재원
【성명의 영문표기】 PARK,Jae-won
【주민등록번호】 670506-1550819

【우편번호】 135-110
【주소】 서울특별시 강남구 압구정동 현대아파트 91동 808호
【국적】 KR
【우선권주장】
【출원국명】 KR
【출원종류】 특허
【출원번호】 10-2000-0007648
【출원일자】 2000.02.17
【증명서류】 첨부
【심사청구】 청구
【미생물기탁】
【기탁기관명】 생명공학연구소 유전자은행
【수탁번호】 KCTC 8976P
【수탁일자】 1999.12.18
【미생물기탁】
【기탁기관명】 생명공학연구소 유전자은행
【수탁번호】 KCTC 8977P
【수탁일자】 1999.12.18
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】
【서열개수】 001
【서열목록의 전자문서】 첨부
【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사 를 청구합니다. 대리인
이원희 (인)
【수수료】
【기본출원료】 20 면 29,000 원
【가산출원료】 8 면 8,000 원
【우선권주장료】 1 건 26,000 원
【심사청구료】 14 항 557,000 원
【합계】 620,000 원
【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통 2.미생물기탁증명서_2통 3.우선권증명서류 및 동 번역문_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 말라리아를 혈청학적으로 측정하는 방법 및 이에 사용되는 진단 시약에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 말라리아 원충 *플라스모듐 비박스(Plasmodium vivax)*의 메로조이트 표면 단백질(Merozoit surface protein)을 항원으로 사용하여 혈장시료 내에 존재하는 말라리아 특이 항체를 측정하는 효소 면역학적 측정방법(enzyme immuno assay) 및 상기 말라리아 표면 단백질을 항원으로 포함하는 말라리아 진단시약에 관한 것이다. 본 발명은 IgG 또는 IgM 등의 항 인간항체를 사용하는 간접 효소 면역학적 측정방법(indirect enzyme immuno assay)과 말라리아의 메로조이트 표면 단백질의 일부 또는 전체를 항체로 사용하는 항원 샌드위치 효소 면역학적 측정방법(antigen sandwich enzyme immuno assay)으로 구성된다. 본 발명의 말라리아 측정방법은 혈장 내 말라리아 특이 항체를 검출하는 방법으로 말라리아에 대한 민감성과 특이성이 높아 잠복기가 길고 원충수가 적은 말라리아를 진단하는데 유용하게 사용될 수 있다.

【명세서】

【발명의 명칭】

말라리아의 효소 면역학적 측정방법 및 이에 사용되는 진단시약{Enzyme immuno assay for malaria and reagent used therefor}

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<1> 본 발명은 말라리아의 혈청학적인 측정방법 및 진단시약에 관한 것으로서, 상세하게는 말라리아 원충 *플라스모듐 비박스(Plasmidium vivax)*의 메로조이트 표면 단백질(Merozoit surface protein, 이하 'MSP'로 약칭함)을 항원으로 사용하여 혈장 내 존재하는 말라리아 특이 항체를 측정하는 효소 면역학적 측정방법(enzyme immuno assay) 및 상기 표면 단백질을 항원으로 이용하여 제조되는 말라리아 진단시약에 관한 것이다.

<2> 말라리아는 모기를 매개로 하여 말라리아의 원충이 인간의 적혈구 내에 감염되어 발생하는 질병으로 전 세계 10 억명의 인구가 말라리아 위험지역에 거주하고 있으며, 매년 5억명 이상이 말라리아에 감염되고 2 백명 이상이 목숨을 잃는 질병중의 하나이다. 말라리아는 전 세계적인 분포를 보이고 있으나 일부 지역에서는 효과적인 방제로 인하여 1960년대 이후 발생이 중지되거나 감소되었다. 그러나 최근의 엘리뇨 현상과 같은 이상기온 및 약제 내성 균주의 증가, 살충제에 대한 저항성 증가 등으로 인해 전 세계적으

로 다시 확산되고 있는 추세이다.

<3> 말라리아는 크게 아프리카형, 중남미를 중심으로 한 아메리카형 및 인도와 동남아시아를 중심으로 한 아시아형으로 나누어 지는데, 각각은 지리적 분포에 있어서의 차이뿐만 아니라 원충이 나타내는 종적 특성과 유전적 성향에 있어서도 크게 다르다.

<4> 말라리아의 생활사는 사람 숙주 내에서의 생활사인 분열생식기(Schizogony)와 모기 숙주 내에서의 생활사인 포자기(Sporogony)로 나누어 지는데, 처음에 모기가 사람을 물면 말라리아 포자낭충이 감염되어 사람의 혈관을 따라 간으로 이동한 후 간세포에서 증식을 실시하거나 휴면상태로 존재하다가 일정한 기간이 지나면 혈중으로 나오게 되어 본격적인 증식을 하게 된다. 말라리아 포자낭충은 혈중 적혈구 내에서 영양체인 고리형에서 증식형으로 존재하다가, 분열체 과정을 거치면서 형성된 분열체가 수십개의 분열소체를 방출하게 되고 이 분열소체들이 각각의 적혈구에 들어가 동일한 생식주기를 반복한다. 이중 일부가 생식모세포 형태로 존재하는데, 모기가 이런 상태의 사람을 흡혈하면 상기의 생식모세포가 모기로 감염되어 증식하고 다시 모기의 증식과정을 통해 위와 침샘에 존재하다가 사람에게 감염되는 과정을 반복하게 된다.

<5> 말라리아의 치료에는 크로로콰인(chroroquine), 프리마콰인(primaquine) 등의 항생제가 사용되어 왔으나, 최근에 이러한 항생제들에 대해 저항성을 갖는 말라리아의 출현으로 그 치료에 어려움을 겪고 있다.

<6> 말라리아의 진단에는 혈액 도말법이 가장 많이 사용되고 있는데, 이는 말라리아가 감염된 혈구를 염색하여 현미경으로 관찰하는 고전적인 방법이다. 그러나 이 방법은 시간이

많이 걸리고 검사자의 전문 교육이 필요하다는 단점을 갖고 있다. 최근 말라이아 항원을 검사하는 시약이 시판되고 있기는 하나, 민감도가 낮은 이유로 혈액 도말법과 동시에 사용할 것을 권하고 있다. 말라리아 유전자를 검사하는 또 다른 방법으로 PCR(polymerase chain reaction) 방법이 있는데, 이는 민감도는 높지만 아직 실험실에서만 행해지고 있는 실정이다.

<7> 한국에서 말라리아는 학질이라는 명칭의 질병으로 오래 전부터 알려져 왔는데, 1960년대부터 시작된 말라리아 박멸사업으로 인해 1970년대에 들어서는 말라리아의 발병이 거의 보고되지 않았다. 그러나, 최근 1993년에 휴전선 부근에서 환자가 발생한 이후 급속히 확산되어 1998년에는 말라리아 환자수가 3800 명으로 보고되고 있다.

<8> 말라리아 포자낭충에는 *플라스모듐 비박스(Plasmodium vivax)*, *플라스모듐 팔시파룸(Plasmodium falciparum)*, *플라스모듐 말라리아(Plasmodium malariae)* 및 *플라스모듐 오발(Plasmodium ovale)* 등 4 종류가 알려져 있다. 그 가운데 한국에서 발병하는 말라리아는 *플라스모듐 비박스(Plasmodium vivax)*에 의한 것인데, 이는 잠복기가 길고 혈액 내에 존재하는 원충의 수가 적어 그 진단이 어려운 것이 특징이다. 현재, 외국에서 수입되고 있는 말라리아 진단시약은 말라리아의 젖산 탈수소효소(Lactate Dehydrogenase) 등의 항원을 검출하는 방식으로, 그 민감도가 50% 수준에 머물러 있어 상기와 같이 잠복기가 길고 혈액 내에 존재하는 항원 및 원충수가 적은 한국형 말라리아의 진단에는 어려움이 있다.

<9> 이에 본 발명자들은 말라리아 환자의 혈액 내에 존재하는 말라리아 원충에 대한 특이 항체을 측정하여 말라리아를 진단하는 효소 면역학적 측정방법을 개발하였다. 구체적으로, 본 발명은 IgG 또는 IgM 등의 항 인간항체를 사용하는 간접 효소 면역학적 측정방법(indirect enzyme immuno assay)과 말라리아의 메로조이트 표면 단백질의 일부 또는 전체를 항체로 사용하는 항원 샌드위치 효소 면역학적 측정방법(antigen sandwich enzyme immuno assay)을 제공한다. 본 발명의 말라리아 측정방은 종래의 특정 항체를 측정하는 방법에 비하여 민감도가 높아 말라리아 환자 뿐 아니라 말라리아 보균자의 진단이 가능하며, 잠복기가 길고 혈액 내에 존재하는 항원 및 원충의 수가 적은 한국형 말라리아의 진단에 유용함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<10> 본 발명의 목적은 말라리아 원충의 표면 단백질을 항원으로 사용하여 혈액 내에 존재하는 말라리아 특이 항체를 측정하는 말라리아 효소 면역학적 측정방법을 제공하는 것이다.

<11> 구체적으로, 본 발명의 목적은 IgG 또는 IgM 등의 항 인간항체를 사용하는 간접 효소 면역학적 측정방법(indirect enzyme immuno assay)을 제공하는 것이다.

<12> 또한, 본 발명의 목적은 말라리아의 메로조이트 표면 단백질의 일부 또는 전체를 항체로 사용하는 항원 샌드위치 효소 면역학적 측정방법(antigen sandwich enzyme immuno assay)을 제공하는 것이다.

<13> 아울러, 본 발명의 목적은 말라리아 원충의 메로조이트 표면 단백질의 일부 또는 전체

를 항원으로 사용하는 민감성과 특이성이 향상된 말라리아 진단시약을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

<14> 상기 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 말라리아 원충의 표면 단백질을 항원으로 사용하여 혈액 내에 존재하는 말라리아의 특이 항체를 측정하는 말라리아 효소 면역학적 측정방법을 제공한다.

<15> 구체적으로, 본 발명은 IgG 또는 IgM 등의 항 인간항체를 사용하는 간접 효소 면역학적 측정방법을 제공한다.

<16> 또한, 본 발명은 말라리아의 메로조이트 표면 단백질의 일부 또는 전체를 항체로 사용하는 항원 샌드위치 효소 면역학적 측정방법을 제공한다.

<17> 이를 위하여, 본 발명은 말라리아 원충의 메로조이트 표면 단백질 MSP의 C-말단 부위 PV200C 폴리펩타이드를 항원으로 제공한다.

<18> 또한, 본 발명은 상기 표면항원 단백질을 발현하는 재조합 형질전환체를 제공한다.

<19> 아울러, 본 발명은 재조합 형질전환체로부터 생산된 표면항원, 상기 표면항원이 코팅된 고정체, 상기 표면항원에 결합하는 효소 표시체가 부착된 2차 표시항원 접합체 및 발색을 유도하는 기질용액을 포함하는 말라리아 진단시약을 제공한다.

<20> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<21> 본 발명은 혈액 내에 존재하는 말라리아의 특이 항체를 측정하기 위하여 말라리아

원충 표면 단백질을 항원으로 제공한다.

<22> 본 발명은 항원-항체반응을 이용하여 혈액 내에 존재하는 말라리아 특이 항체를 측정하기 위하여 삼일열 말라리아 원충의 표면 단백질 MSP의 C-말단 부위를 말라리아 항원으로 제공한다. 상기 C-말단 부위는 삼일열 말라리아 원충의 아종 사이에 공통적으로 존재하는 아미노산 서열을 포함하고 있으며, 특히 서열번호 1로 기재되고 삼일열 말라리아 원충의 아종들 사이에서도 100% 상동성을 보이는 108 개의 아미노산으로 이루어지는 폴리펩타이드(이하 'PV200C'라 약칭함)를 포함한다.

<23> 따라서, 본 발명에서는 말라리아 원충의 표면 단백질 MSP의 전부 또는 일부를 항원으로 이용하며, 바람직하게는 삼일열 말라리아 원충의 MSP C-말단 부위를 항원으로 이용한다. 좀 더 바람직하게는 MSP C-말단 부위의 PV200C 폴리펩타이드를 항원으로 이용한다. 상기 단백질은 재조합 형질전환체로부터 대량발현시켜 얻을 수 있으며, 본 발명자들은 PV200C 폴리펩타이드를 발현시키는 효모 형질전환체 및 대장균 형질전환체를 제작하여 12월 18일자로 생명공학연구소 유전자은행에 기탁하였다(수탁번호: KCTC 8977P, KCTC 8976P). 본 발명은 상기 재조합 형질전환체로부터 발현시켜 분리·정제된 말라리아 표면항원 PV200C를 99% 이상의 고순도로 분리하여 말라리아를 진단하기 위한 측정방법 및 진단시약의 항원으로 제공한다.

<24> 본 발명은 말라리아 표면항원이 코팅된 고정체를 이용한 말라리아의 간접 효소 면역학적 측정방법(indirect enayme immuno assay)을 제공한다.

<25> 이를 위하여, 본 발명은 말라리아의 진단을 위해 사용될 고정체로 형질전환체로부

터 분리·정제된 말라리아 표면항원을 코팅한 96-웰 플레이트를 제공한다. 또한, 본 발명은 웰 플레이트에 코팅된 표면항원을 검출하기 위하여 염소에서 제조한 IgG와 IgM에 대한 2차 항체에 각각 고추냉이 과산화효소(horse radish peroxidase, 이하 'HRP'로 약칭함)를 결합시켜 만든 2차 표시항원 접합체를 제공한다.

<26> 말라리아 진단을 위한 간접 효소 면역학적 측정방법(indirect enzyme immuno assay)은

<27> (1) 재조합 표면항원이 코팅된 플레이트의 각 웰에 혈장시료를 첨가하여 반응시키는 단계;

<28> (2) HRP가 접합된 염소의 IgG와 IgM 2차 표시항원 접합체를 웰에 첨가하여 표면항원에 접합된 항체와 반응시키는 단계;

<29> (3) 웰 플레이트를 세척하는 단계;

<30> (4) 발색제와 완충용액으로 구성된 기질용액을 첨가하여 발색시키는 단계; 및,

<31> (5) 96 웰 플레이트 판독기를 이용하여 흡광도를 측정하는 단계로 구성된다.

<32> 상기 말라리아 측정방법은 고정체에 부착된 말라리아 표면항원에 환자의 혈액 내 존재하는 말라리아 특이 항체가 결합하게 되고, 이러한 항원-항체 결합체에 2차 표시항원 접합체인 HRP-항 IgM 또는 HRP-항 IgG가 결합하면 기질용액 내 포함되어 있는 발색제가 2차 표시항원 접합체의 HRP에 의해 분해되어 발색반응을 일으키게 된다. 따라서, 이러한 발색정도를 96 웰 플레이트 판독기를 이용하여 흡광도로 측정함으로써 말라리아 항체의 존재 유무 및 항체량을 검출하는 말라리아 측정방법이다.

<33> 상기의 방법으로 말라리아 양성시료(말라리아 환자의 혈장)와 음성시료(정상인의

혈장)를 대상으로 말라리아를 진단한 결과, 약 90%의 민감도와 95.8%의 특이도를 보였다.

<34> 또한, 본 발명은 HRP-표면항원 접합체를 이용한 말라리아의 항원 샌드위치 효소 면역학적 측정방법(antigen sandwich immuno assay)을 제공한다.

<35> 이를 위하여, 본 발명은 HRP-표면항원 접합체를 제공한다.

<36> 구체적으로, 본 발명은 재조합 형질전환체로부터 분리·정제된 말라리아 표면항원에 산화시킨 HRP 반응용액을 혼합하여 제조한 HRP-표면항원 접합체를 제공한다. HRP-표면항원 접합체를 이용한 항원 샌드위치 효소 면역학적 측정방법은

<37> (1) 재조합 표면항원이 코팅된 플레이트의 각 웰에 혈장시료를 첨가하여 반응시키는 단계;

<38> (2) HRP-표면항원 접합체를 첨가하여 표면항원에 결합된 항체에 접합시키는 단계;

<39> (3) 웰 플레이트를 세척하는 단계;

<40> (4) 발색제와 완충용액으로 구성된 기질용액을 첨가하여 발색시키는 단계; 및,

<41> (5) 96 웰 플레이트 판독기를 이용하여 흡광도를 측정하는 단계로 구성된다.

<42> 본 발명의 말라리아 항원 샌드위치 면역학적 측정방법 고정체에 부착된 말라리아 표면항원에 환자의 혈액 내 존재하는 말라리아 특이 항체가 결합하게 되고, 이러한 항원-항체 결합체에 2차 표시항원 접합체인 HRP-표면항원이 결합하면 기질용액 내 포함되어 있는 발색제가 2차 표시항원 접합체의 HRP에 의해 분해되어 발색반응을 일으키게 된다. 따라서, 이러한 발색정도를 96 웰 플레이트 판독기를 이용하여 흡광도를 측정함으로써

말라리아 항체의 존재 유무 및 항체량을 검출하는 말라리아 측정방법이다. 상기한 말라리아 간접 효소 면역학적 측정방법은 2차 표시항원 접합체로 염소의 IgM 또는 IgG와 같은 항 인간항체를 사용하여 간접적으로 환자의 혈액 내 존재하는 말라리아 특이 항체를 검출하는 방법인 반면, 항원 샌드위치 면역학적 측정방법은 말라리아 유래의 표면항원 자체를 2차 표시항원 접합체로 사용함으로써 환자의 혈액 내 존재하는 모든 말라리아 특이 항체를 검출할 수 있어 말라리아 환자뿐 아니라 잠복기에 있는 말라리아 환자까지 진단할 수 있는 민감도와 특이성이 향상된 측정방법이다.

<43> 상기의 방법으로 말라리아 양성시료(말라리아 환자의 혈장)와 음성시료(정상인의 혈장)를 대상으로 말라리아를 진단한 결과, 98.5%의 민감도와 99.6%의 특이도를 보였다.

<44> 결론적으로, 본 발명의 말라리아 효소 면역학적 측정방법은 말라리아 원충의 항원 단백질을 코딩하는 유전자를 삽입하여 제작한 발현벡터에 의해 형질전환된-재조합 효모 또는 재조합 대장균으로부터 발현시켜 정제한 항원 단백질 및 상기 항원 단백질이 코팅된 고정체를 제공한다. 따라서, 상기 말라리아 항원이 코팅된 고정체에 말라리아 감염 여부를 알고자 하는 사람의 혈장을 첨가하면 혈장 내에 존재하는 상기 항원에 대한 항체는 웰에 코팅된 말라리아 표면항원에 특이적으로 결합하게 된다. 여기에 말라리아 표면항원에 대한 2차 표시항원 접합체를 첨가하면 2차 표시항원 접합체는 웰에 코팅된 말라리아 표면항원에 결합한 환자 항체의 Fc(fragment crystalization) 부위를 인식하여 결합한다. 이와 같이 결합한 2차 표시항원 접합체는 기질용액 내 발색제를 분해하여 발색을 유도하게 되고 그 흡광도를 측정함으로써 간접적으로 시료혈장 내 항체의 존재 유무와 항체량을 검출하여 말라리아의 감염 여부를 진단한다. 본 발명의 간접 효소 면역학

적 측정방법은 염소 유래의 IgG 또는 IgM 동의 항 인간 항체를 이용한 HRP-항 IgG 또는 HRP-항 IgM 접합체로 표면항원에 결합된 말라리아 특이 항체를 검출하는 방법이고 항원 샌드위치 효소 면역학적 측정방법은 말라리아 표면 단백질의 일부 또는 전체를 이용한 HRP-표면항원 접합체로 표면항원에 결합된 말라리아 특이 항체를 검출하는 방법이다. 상기의 측정방법을 이용하여 말라리아 환자의 혈장과 정상인의 혈장을 대상으로 말라리아를 진단한 결과, 모두 90% 이상의 민감도와 특이도를 나타내었으며, 특히 항원 샌드위치 효소 면역학적 측정방법은 혈액 내 모든 말라리아 특이 항체를 측정하기 때문에 월등히 향상된 민감도와 특이도를 나타내었다.

<45> 한편, 본 발명은 말라리아 표면단백질을 이용하는 항원, 상기 표면항원이 코팅된 고정체, 표시체가 접합된 2차 표시항원 접합체 및 발색제를 포함하는 기질용액으로 구성되는 특이성과 민감도가 향상된 말라리아 진단시약을 제공한다.

<46> 본 발명의 말라리아 진단시약에 사용되는 항원은 말라리아 원충의 MSP 전부 또는 일부를 포함하는데, 바람직한 예로서 본 발명에서는 삼일열 말라리아 원충 *플라스모듐 비박스*의 특이한 표면 단백질로서 *플라스모듐 비박스*의 아종들에 공통적으로 존재하며 서열번호 1로 기재되는 PV200C 폴리펩타이드의 전부 또는 일부로 구성된 단백질을 항원으로 이용한다.

<47> 또한, 본 발명의 말라리아 진단시약은 2차 표시항원 접합체를 포함하는데, 바람직한 접합체로는 HRP, 염기성 탈인산화효소(alkaline phosphatase), 콜로이드 골드(coloide gold), 형광물질(fluorescein) 및 색소(dye) 등의 표시체가 사용될 수 있으며, 본 발명에서는 표면항원의 접합체로서 HRP를 사용한다. 상기 2차 표시항원 접합체는 변

이가 거의 없는 말라리아 특이 항체의 Fc(fragment crystallizable) 부분에 결합하여 말라리아 항체의 존재 유무를 검출한다. 아울러, 바람직한 2차 표시항원 접합체로서 본 발명은 염소에서 제조한 IgG와 IgM에 대한 항체에 각각 HRP를 접합시켜 만든 HRP-항 IgG 또는 HRP-항 IgM 접합체와 말라리아 표면 단백질의 일부 또는 전체를 항체로 이용하여 HRP를 접합시켜 만든 HRP-표면항원 접합체를 제공한다.

<48> 마지막으로, 본 발명의 말라리아 진단시약은 2차 표시항원 접합체와 반응하여 발색반응이 유도되는 기질 용액을 포함하는데, 바람직하게는 2차 표시항원 접합체의 표시체와 반응하여 발색을 유발하는 테트라메틸 벤지딘(tetrametyl benzidin) 등의 발색제와 완충용액으로 구성된 기질 용액을 사용한다. 상기 기질용액 내 테트라메틸 벤지딘과 같은 발색제는 2차 표시항원 접합체의 바람직한 표시체로 사용된 HRP에 의하여 분해되어 발색반응이 유도되고 그 발색정도를 흡광도로 측정함으로써 항체의 존재 유무 및 항체량을 검출한다.

<49> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<50> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<51> <실시예 1> 효모 형질전환체부터 말라리아 원충 표면항원의 발현 및 정제

<52> (단계 1) 효모 형질전환체의 제작 및 말라리아 원충 표면항원의 발현

<53> 말라리아 양성 혈액에서 정제된 RNA로부터 역전사반응을 통해 합성된 cDNA를 주형

으로 증폭시켜 얻은 말라리아 표면항원 PV200C 폴리펩타이드와 pYES-2 벡터를 각각 제한효소 HindIII와 XhoI으로 처리한 후 T4 라이게이즈(T4 ligase, Promega)로 연결시켜 재조합 발현벡터 pYLJ-MSP를 제작하였다. 상기 재조합 발현벡터 pYLJ-MSP를 힌넨(, U.S.A. 75, 1929-1933, 1978)의 방법으로 효모 *사카로마이세스 세레비세* INVSC1(*Sacharomyces cerevisiae* INVSC1)에 형질전환시켜 효모 형질전환체 pYLJ-MSP/*S. cerevisiae* INVSC1을 확보하고, 상기의 효모 형질전환체는 생명공학연구소 유전자은행에 1999년 12월 18일자로 기탁하였다(수탁번호 : KCTC 8977P).

<54> 상기와 같이 제작된 말라리아 원충의 표면항원 PV200C 폴리펩타이드를 발현하는 재조합 효모 pYLJ-MSP/*S. cerevisiae* INVSC1(KCTC 8977P)를 2% 글루코오스를 포함하는 YEPD 배지에서 37℃로 배양한 후, 배지를 1% 글루코오스 및 1% 갈락토오스를 포함하는 YEP 배지로 바꾸어 배양함으로써, 글루코오스가 고갈되도록 하여 재조합 효모로부터 표면항원의 발현을 유도하였다. 이때, 재조합 효모로부터 발현된 표면 단백질 PV200C 폴리펩타이드는 N-말단에 결합되어 있는 α-인자 리더 펩타이드(α-factor leader peptide)에 의해 세포 밖으로 분비되고, 상기 표면 단백질이 분비된 후 N-말단에 결합되어 있던 α-인자 리더 펩타이드는 세포막에 존재하는 펩티다아제(peptidase)에 의해 제거됨으로써 목적하는 단백질만이 배양액 내로 분비되었다.

<55> (단계 2) 효모 형질전환체로부터 발현된 표면항원의 정제

<56> 단계 1에서와 같이 배양액 내로 분비된 표면 단백질 PV200C 폴리펩타이드를 얻기 위하여, 2일간 배양한 배양액을 원심 분리하여 균체를 제거한 후 배양액만을 취하여 한외 여

과기(Amicon)로 농축하였다. 상기 농축된 배양액을 간단하게 정제하기 위하여 재조합 효모로부터 발현된 표면 단백질 PV200C 폴리펩타이드의 C-말단에 붙인 6개의 히스티딘(histidine) 잔기를 이용하여 양이온인 히스티딘이 결합된 표면 단백질을 음이온인 니켈이 부착된 프로본드(Probond, Invitrogen) 칼럼에 흡착시켰다. 칼럼에 흡착되지 않은 불순물은 10 mM 이미다졸(imidazol)이 용해된 인산염 완충용액으로로 제거하고, 칼럼에 흡착되어 있는 표면 단백질은 500 mM 이미다졸이 용해된 인산염 완충액으로 탈착시켜 분리하였다. 상기 과정에서 표면 단백질은 거의 90% 이상 순수하게 분리되었고, 상기 분리용액을 농축하여 세파크릴(Sephacryl) S-200 젤 여과 크로마토그라피를 수행하면 표면 단백질이 거의 99% 이상의 고순도로 분리되었다.

<57> 본 발명은 상기와 같이 효모 형질전환체로부터 고순도로 분리·정제된 말라리아 분열소체의 표면항원을 말라리아를 진단하기 위한 측정방법 및 진단시약의 항원으로 사용하였다.

<58> <실시예 2> 대장균 형질전환체로부터 말라리아 원충 표면항원의 발현 및 정제

<59> (단계 1) 대장균 형질전환체의 제작 및 말라리아 원충 표면항원의 발현

<60> 실시예 1에서와 같은 방법으로 얻어진 MSP PV200C의 DNA 절편을 페놀/클로로포름(phenol/chloroform) 혼합 용액으로 정제한 후, 말라리아 표면항원 PV200C 폴리펩타이드와 pET-19b(Novagen) 벡터를 제한효소 NdeI과 BamHI으로 처리한 후 T4 라이게이즈로 연결시켜 재조합 발현벡터 pELK-MSP를 얻었다. 제조된 발현벡터 pELK-MSP를 염화칼슘 방법으로 대장균

BL21(DE3)lysS 에 형질전환시켜 대장균 형질전환체 pELK-MSP/BL21을 확보하고, 상기 대장균 형질전환체를 생명공학연구소 유전자은행에 1999년 12월 18일자로 기탁하였다(수탁번호 KCTC 8976P).

<61> 상기와 같이 제작된 대장균 형질전환체 pELK-MSP/BL21(KCTC 8976P)를 암피실린(100 ㎍/㎖)과 클로람페니콜(50 ㎍/㎖)이 첨가된 LB 배지에서 12시간 동안 배양하였다. 상기 배양액 50 ㎖을 다시 1 L LB 배지에 접종하여 37℃에서 2시간 정도 배양한 후 흡광도(OD600)가 0.3이 되었을 때 최종농도가 0.2 mM이 되도록 IPTG(Isopropyl β-D-Thiogalactopyranoside)를 첨가하고 7시간 더 배양하였다.

<62> (단계 2) 대장균 형질전환체로부터 발현된 표면항원의 정제

<63> 단계 1에서와 같이 배양한 배양액을 원심분리하여 세포만을 분리한 후, 분리된 세포를 인산염 완충용액 30 ㎖에 현탁시켜 초음파 파쇄기(Sonicator; Sonifier 450; Branson)를 사용하여 파쇄한 다음 5000 rpm에서 원심분리하였다. 대장균 형질전환체로부터 발현된 MSP 단백질은 일부는 상등액에, 나머지는 원심분리한 침전물에 각각 존재하므로 상등액과 침전물을 4 M 요소 완충용액(인산염 완충용액에 4 M 우레아를 용해시킨 완충용액, pH 7.5)에 완전히 현탁시킨 후 다시 원심분리하여 상등액만을 모았다.

<64> 대장균 형질전환체로부터 발현된 표면 단백질을 정제하기 위하여, 상기 단백질의 N-말단에 표지된 10개의 히스티딘 잔기를 이용하여 프로본드

칼럼(Invitrogen)에 흡착시켰다. 칼럼에 흡착되지 않은 불순물은 10 mM 이미다졸(imidazol)이 용해된 인산염 완충용액으로 제거하고, 칼럼에 흡착되어 있는 표면 단백질은 500 mM 이미다졸이 용해된 인산염 완충액으로 탈착시켜 분리하였다. 상기 과정에서 표면 단백질은 거의 90% 이상 순수하게 분리되었고, 상기 분리용액을 농축하여 세파크릴(Sephacryl) S-200 젤 여과 크로마토그라피를 수행하면 표면 단백질이 거의 99%의 고순도로 분리되었다.

<65> 본 발명은 상기와 같은 방법으로 말라리아 분열소체의 표면 단백질인 MSP PV200C 폴리펩타이드를 대장균 형질전환체로부터 고순도로 분리·정제하여 본 발명의 말라리아 측정방법 및 진단시약에 이용되는 항원으로 사용하였다.

<66> <실시예 3> 말라리아 표면항원이 코팅된 웰 플레이트의 제작

<67> 본 발명은 말라리아의 진단을 위해 사용될 고정체를 제공하기 위하여, 96-웰 플레이트(Nunc)에 실시예 1 또는 실시예 2에서 분리·정제한 말라리아 표면항원 용액을 0.5 ㎍/㎖의 농도로 0.1 M 탄산염 완충용액(pH 9.5)에 희석하여 100 ul씩 분주한 후 웰에 분주된 항원이 웰 플레이트에 부착되도록 플레이트를 밀봉하여 4℃에서 18시간 동안 방치하였다. 웰 플레이트에 부착되지 않고 남아있는 표면항원은 5% 일반 염소 혈청(Goat serum)을 함유한 인산염 완충용액을 웰당 300 ㎕씩 분주한 후 4℃에서 18시간 동안 방치하여 제거하였다. 웰에 남은 용액을 제거하고 상온에서 1시간 동안 방치하여 수분을 건조시킨 후 제습제와 함께 밀봉용기에 넣어 4℃ 저은 냉장고에 보관하였다.

<68> 본 발명은 상기와 같이 제작된 말라리아 표면항원이 코팅된 웰 플레이트를 말라리

아 진단을 위한 측정방법 및 진단시약의 고정체로 사용하였다.

<69> <실시예 4> 간접 효소 면역학적 측정방법(indirect enzyne immuno assay)을 통한 말라리아의 진단

<70> 본 발명은 간접 효소 면역학적 측정방법을 통해 말라리아를 진단하기 위하여, 실시예 1 또는 실시예 2의 방법으로부터 분리·정제된 재조합 표면항원을 실시예 3과 같은 방법으로 96-웰 플레이트에 코팅하여 제작된 고정체와 염소에서 제조한 IgG 및 IgM에 대한 항체에 각각 고추냉이 과산화효소(HRP)를 접합시켜 만든 2차 표시항원 접합체를 사용하였다.

<71> 구체적으로, 재조합 표면항원이 코팅된 플레이트의 각 웰에 NaOH(1.15 mg/㎖), KH2PO4(0.2 mg/㎖), KCl(0.2 mg/㎖), NaCl(8 mg/㎖), 소혈청(300 ㎕/㎖) 및 치메로살(0.2 mg/㎖) 등을 포함하는 시료 희석액 100 ㎕를 첨가하고 항체 음성 혈장시료와 항체 양성 혈장시료를 각각 10 ul씩 첨가하여 잘 혼합한 후, 37℃의 반응기에 넣고 60분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 0.05% 트윈 20(Tween 20)을 함유한 인산염 완충용액(300 ㎕)을 사용하여 웰 플레이트를 5 회에 걸쳐 세척하였다. HRP가 접합된 염소의 IgG(Cappel)와 IgM(Bethyl)에 대한 2차 항체는 Tris(10mM), NaCl(0.5M), CaCl2(1mM), 글리세롤(0.5%), 소혈청(0.2 ㎖/㎖), 염소혈청(100 ㎕/㎖), 트윈 20(0.05%), 치메로살(0.2 mg/㎖) 및 페놀레드(50 ㎍/㎖)를 포함하는 희석액을 사용하여 1 : 40,000의 비율로 각각 희석한 후 희석된 2차 효소 접합체 100 ㎕씩을 상기 웰에 첨가하여 37℃에서 60분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 웰 플레이트를 0.05% 트윈 20/인산염 완충용액으로 5회 세척하고, 테트라메틸 벤지딘(tetrametyl benzidine) 100 ㎍/㎖, 과산화수소(hydrogen

peroxide) 0.006% 및 구연산 인산염 완충용액(pH 4.5)을 포함하는 기질용액을 100 ㎕씩 첨가하여 30분간 암소에서 발색시켰다. 적당하게 발색이 이루어진 후 반응정지액(2N 황산용액) 100 ㎕를 각 웰에 첨가하여 발색반응을 종결시킨 후 96 웰 플레이트 판독기(Molecular Devices)로 650 nm를 보조(referance) 파장으로 하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 기질용액 내 발색제인 테트라메틸 벤지딘은 IgG 및 IgM에 대한 항체에 결합된 HRP에 의해 분해되어 발색반응을 일으키고, 그 발색정도를 흡광도로 측정함으로써 말라리아 특이 항체의 존재 유무 및 항체량을 검출하였다.

<72> 상기의 방법으로 20 개의 말라리아 양성시료(말라리아 환자의 혈장)와 98 개의 음성시료(정상인의 혈장)를 대상으로 말라리아를 진단하였다. 그 결과, 본 발명의 재조합 말라리아 표면항원을 이용한 간접 효소 면역 검사(indirect enzyme immuno assay)는 양성 진단 수치(cut-off)를 음성 시료 평균치에 0.5를 더한 값으로 정하여 판단할 경우, 정상인의 혈장시료 48 개중 46 개를 음성으로 판정하였고 말라리아 환자의 혈장시료 20 개중 18 개를 양성으로 판정하여 90%의 민감도와 95.8%의 특이도를 보였다.

<73> <실시예 5> HRP가 접합된 말라리아 표면항원의 제조

<74> 본 발명은 말라리아 항원 샌드위치 효소 면역학적 측정방법에 사용하기 위하여 2차 표시항원 접합체를 제조하였다.

<75> 구체적으로,

실시예 1 또는 실시예 2의 방법으로 분리·정제된 재조합 말라리아 분열소체 표면항원은 4℃에서 1 L의 0.01 M 탄산 소다 완충용액(sodium carbonate buffer, pH 9.6)을 사용하여 완충용액을 3 회 교환해 주면서 1일간 투석하였다. 또한, 상기 표면항원에 접합될 HRP는 0.5 ml의 증류수에 5 mg HRP를 용해시킨 후, 100 μl의 42 mg/ml 요오드산 나트륨(NaIO4)을 상기 HRP 용액에 첨가하여 호일로 튜브를 감싼 상태에서 상온에서 30분간 흔들면서 반응시켜 HRP를 산화시켰다. HRP가 충분히 산화되면, 1M 글리세롤 60 μl를 상기 반응용액에 첨가한 후 튜브를 호일로 감싼 상태에서 상온에서 30분간 흔들면서 반응시켜 산화 반응을 종결시켰다.

<76> HRP와 표면항원의 접합반응을 위하여 상기 HRP 반응용액을 0.01 M 탄산소다 완충용액(pH 9.6)으로 포화된 PD10 칼럼(Pharmacia)을 이용하여 염을 제거하였다. 이렇게 산화된 HRP 반응용액에 상기의 표면항원 용액을 첨가한 후 튜브를 호일로 감싼 상태에서 상온에서 하룻밤 동안 흔들면서 반응시켜 HRP-표면항원 접합체를 제조하였다. HRP와 표면항원의 접합반응이 종결된 후 HRP-표면항원 접합체를 안정화시키기 위하여, 40.8 μl의 4 mg/ml NaBH4를 첨가하여 튜브를 호일로 감싼 상태에서 4 ℃에서 2 시간동안 흔들면서 반응시켰다. 또한, HRP가 결합된 HRP-표면항원 접합체로부터 결합되지 않고 남아있는 반응액 내 HRP를 제거하기 위하여, HRP에 접합된 표면항원의 C-말단에 존재하는 히스티딘 잔기를 이용하여 인산염 완충용액으로 평형화시킨 프로본드 칼럼에 흡착시킨 후 결합되지 않은 HRP를 인산염 완충용액으로 제거하였다. 프로본드 칼럼에 흡착된 HRP-표면항원 접합체는 1 M 이미다졸 인산염 완충용액으로 처리하여 탈착시켜 단백질을 모으고, HRP-표면항원 접합체의 단백질 농도를 BSA(bovine serum albumine) 단백질 정량 키트를 이용하여 측정한 후 최종 농도 1% 의 BSA를 첨가하여 냉장고에 보관하였다. 본 발명은 말

라리아 항원 샌드위치 효소 면역학적 측정방법 및 진단시약에 사용될 2차 표시항원 접합체로서 상기와 같은 방법으로 제조된 HRP-표면항원 접합체를 이용하였다.

<77> <실시예 6> HRP-표면항원 접합체를 이용한 말라리아 항원 샌드위치 효소 면역학적 측정방법(antigen sandwich enzyme immuno assay)

<78> 본 발명은 실시예 5와 같은 방법으로 HRP를 재조합 표면항원에 접합시켜 제조한 HRP-표면항원 접합체를 사용하여 말라리아 표면항원의 항체에 대한 항원 샌드위치 효소 면역학적 측정방법을 수행하였다.

<79> 구체적으로, 재조합 표면항원이 코팅된 플레이드의 각 웰에 HRP-표면항원 접합체 용액을 30 ㎕씩 첨가하고 말라리아 양성시료(말라리아 환자의 혈장)와 음성시료(정상인의 혈장)를 100 ㎕씩 첨가하여 잘 혼합한 후 37℃ 반응기에 넣고 90분간 반응 시켰다. 트윈 20을 함유한 인산염 완충용액을 300 ㎕씩 5회 처리하여 웰을 세척한 후 테트라메틸 벤지딘 100 ㎍/㎖, 과산화수소 0.006% 및 구연산 인산염 완충용액(pH 4.5)을 포함하는 기질용액을 100 ㎕ 첨가하였다. 기질용액이 첨가된 플레이트를 30분간 암소에서 발색시킨 후 100 ㎕ 2 N 황산용액을 각 웰에 첨가하여 반응을 정지시켜 96 웰 플레이트 판독기(Molecular Devices)로 650 nm를 보조(referance) 파장으로 하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 기질용액 내 발색제인 테트라메틸 벤지딘은 HRP-표면항원 접합체의 HRP에 의해 분해되어 발색반응을 일으키는데, 그 발색정도를 흡광도로 측정함으로써 항체의 존재 유무 및 항체량을 검출하였다.

<80> 상기의 방법으로 202 개의 말라리아 양성시료(말라리아 환자의 혈장)와 400 개의 음성

시료(정상인의 혈장)를 대상으로 말라리아를 진단하였다. 그 결과, 본 발명의 HRP-표면항원 접합체를 이용한 항원 샌드위치 효소 면역학적 측정방법은 양성 진단 수치(cut-off)를 음성 시료 평균치에 0.5를 더한 값으로 정하여 판단할 경우, 정상인의 혈장 시료 202 개 중 199 개를 음성으로 판정하였고 말라리아 환자의 혈장시료 400 개중 398 개를 양성으로 판정하여 98.5%의 민감도와 99.6%의 특이도를 보였다.

<81> 따라서, 본 발명의 염소 유래의 IgG 및 IgM 등의 항 인간 항체를 이용하여 검출하는 간접 효소 면역학적 측정방법 및 HRP-표면항원 접합체를 이용한 항원 샌드위치 효소 면역학적 분석방법은 혈액 내 존재하는 말라리아 특이 항체를 검출하는 방법이기 때문에 말라리아 보균자까지도 고감도로 진단할 수 있는 민감도와 특이도가 월등히 향상된 말라리아 측정방법이다.

【발명의 효과】

<82> 본 발명의 말라리아 진단을 위한 IgG 및 IgM 등의 항 인간항체를 이용하는 간접 효소 면역학적 측정방법 및 HRP-표면항원 접합체를 이용하는 항원 샌드위치 효소 면역학적 분석방법은 말라리아에 특이적인 항체를 검출하는 방법이기 때문에 말라리아 보균자까지도 고감도로 진단할 수 있으며 혈장시료와 항원 접합체를 동시에 반응시키기 때문에 분석을 간소화할 수 있다. 또한, 말라리아 표면 단백질을 이용한 항원, 상기 표면항원이 코팅된 고정체, 2차 표시항원 접합체 및 발색제를 포함하는 기질용액으로 구성되는 본 발명의 말라리아 진단시약은 보다 간편하고 정확하게 혈액 내 존재하는 말라리아 특이 항체의 존재 유무 및 항체량을 검출할 수 있다.

<83> 따라서, 본 발명의 말라리아 효소 면역학적 측정방법 및 진단시약은 한국에서 발견되는 잠복기가 길고 혈액 내 적은 원충수가 존재하며 재발 가능성이 높은 말라리아를 진단하는데 매우 효과적으로 사용될 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

말라리아 원충의 표면항원을 이용하여 혈액 내에 존재하는 말라리아 특이 항체를 검출하는 효소 면역학적 측정방법(enzyme immuno assay).

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 표면항원은 *플라스모듐 비박스(Plasmodium vivax)*의 메로조이트 표면 단백질(Merozoit surface protein)의 C-말단 부위인 것을 특징으로 하는 효소 면역학적 측정방법.

【청구항 3】

제 2항에 있어서, 상기 표면항원은 메로조이트 표면 단백질의 C-말단 부위에 존재하는 PV200C 폴리펩타이드의 전부 또는 일부인 것을 특징으로 하는 효소 면역학적 측정방법.

【청구항 4】

제 3항에 있어서, 상기 PV200C 폴리펩타이드는 아미노산 서열이 서열번호 1로 기재되는 효소 면역학적 측정방법.

【청구항 5】

(i) *플라스모듐 비박스*의 메로조이트 표면항원을 형질전환체로부터 발현시켜 정제하는 단계;

(ii) 정제된 상기 표면항원을 고정체에 부착시키는 단계;

(iii) 상기 표면항원이 코팅된 고정체에 혈장시료를 처리하여 항체를 결합시키는 단계;

(iv) 2차 표시항원 접합체를 첨가하여 고정체에 부착된 표면항원에 결합한 항체를 인식하는 단계;

(v) 표면항원에 결합한 2차 표시항원 접합체의 표시체를 분해하여 발색을 유도하는 단계; 및,

(vi) 96 웰 플레이트 판독기로 흡광도를 측정하는 단계로 구성되는 효소 면역학적 측정방법.

【청구항 6】

제 5항에 있어서, 단계 (iv)의 2차 표시항원 접합체는 IgG, IgM 또는 IgG 및 IgM에 대한 항 인간항체인 것을 특징으로 하는 간접(indirect) 효소 면역학적 측정방법

【청구항 7】

제 5항에 있어서, 단계 (iv)의 2차 표시항원 접합체는 제 2항의 말라리아 메로조이트 표면 단백질 C-말단 부위의 일부 또는 전체인 것을 특징으로 하는 항원 샌드위치

(antigen sandwich) 효소 면역학적 측정방법.

【청구항 8】

말라리아 원충의 표면항원을 이용하여 혈액 내에 존재하는 말라리아 특이 항체를 검출하는 말라리아 진단시약.

【청구항 9】

제 8항에 있어서, 말라리아 원충 *플라스모듐 비박스*의 메로조이트 표면 단백질의 전부 또는 일부로 이루어진 항원, 상기 표면항원이 코팅된 고정체, 표시체가 접합된 2차 표시항원 접합체 및 발색제를 포함한 기질용액으로 구성되는 말라리아 진단시약.

【청구항 10】

제 8항에 있어서, 항원은 서열번호 1로 기재되는 말라리아 표면 단백질 PV200C 폴리펩타이드의 전부 또는 일부로 구성된 단백질인 것을 특징으로 하는 말라리아 진단시약.

【청구항 11】

제 8항에 있어서, 2차 표시항원 접합체는 고추냉이 과산화수소(horse radish peroxidase, HRP), 염기성 탈인산화효소(alkaline phosphatase), 콜로이드 골드(coloide gold), 형광물질(fluorescein) 또는 색소(dye) 등의 표시체를 접합시키는 말라리아 진단

시약.

【청구항 12】

제 8항에 있어서, 기질 용액은 2차 표시항원 접합체의 표시체와 반응하여 발색을 유발하는 발색제와 완충용액으로 구성되는 말라리아 진단시약.

【청구항 13】

제 8항에 있어서, 2차 표시항원 접합체는 IgG, IgM 또는 IgG 및 IgM을 항체로 사용하는 말라리아 진단시약.

【청구항 14】

제 8항에 있어서, 2차 표시항원 접합체는 제 2항의 말라리아 메로조이트 표면 단백질 C-말단 부위의 일부 또는 전체를 항체로 사용하는 말라리아 진단시약.

【서열목록】

<110> LG CHEMICAL LTD. <120> Enzyme immuno assay for malaria and reagent used therefor <130> 0p-02-35 <150> KR 2000-7648 <151&gt 2000-02-17 <160> 1 <170> KOPATIN 1.5 <210> 1 <211>

108 <212> PRT <213> Plasmodium vivax <400> 1 Asn Glu Ser

Lys Glu Ile Leu Ser Gln Leu Leu Asn Val Gln Thr Gln 1 5

10 15 Leu Leu Thr Met Ser Ser Glu His Thr Cys Ile Asp Thr Asn

Val Pro 20 25 30 Asp Asn Ala

Ala Cys Tyr Arg Tyr Leu Asp Gly Thr Glu Glu Trp Arg 35 40

45 Cys Leu Leu Thr Phe Lys Glu Glu Gly Gly Lys Cys Val Pro Ala Ser

50 55 60 Asn Val Thr Cys Lys Asp

Asn Asn Gly Gly Cys Ala Pro Glu Ala Glu 65 70 75

80 Cys Lys Met Thr Asp Ser Asn Lys Ile Val Cys Lys Cys Thr Lys Glu

85 90 95 Gly Ser Glu Pro Leu Phe Glu Gly Val

Phe Cys Ser 100 105

ABSTRACT

ABSTRACT

The present invention relates to an enzyme immunoassay and diagnostic reagent for malaria. More preferably, the present invention relates to an enzyme immunoassay and diagnostic reagent comprising Merozoite Surface Protein as antigen for malaria which detect malaria-specific antibodies in serum sample by using Merozoite Surface Protein of *Plasmodium vivax* as antigen. The present invention comprises an indirect enzyme immunoassay using anti-human IgG antibody and/or anti-human IgM antibody, and an antigen sandwich enzyme immunoassay using a part or whole of malarial Merozoite Surface Protein. The immunoassays detecting malaria-specific antibodies in serum according to the present invention have high specificity and sensitivity, and are useful in diagnosing a type of malaria where latent period is long and number of Protozoa in blood is few.

TITLE OF THE INVENTION

ENZYME IMMUNOASSAY FOR MALAIA AND REAGENT USED THEREFOR

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTON

OBJECT OF THE INVENTON

FIELD OF THE INVENTION AND ITS PRIOR ART

The present invention relates to an enzyme immunoassay and diagnostic reagent for malaria. Particularly, the present invention relates to an enzyme immunoassay for malaria which detects malaria-specific antibodies in plasma by using antigens of Merozoite Surface Protein(MSP) of *Plasmodium vivax* of malarial Protozoa and diagnostic reagent for malaria prepared by using antigen of the above surface protein.

Malaria is a disease caused by malarial Protozoa that infects within human erythrocytes and is carried by mosquitoes. Billion people in the world reside in

antibiotics. Therefore, acquired drug resistance poses a serious difficulty on treatment of malaria.

A blood smear method has been used in the diagnosis of malaria most frequently. This method is a classical method wherein blood cells infected with malaria Protozoa are stained and the stained sample is then observed through a microscope. However, this method takes a longer time, and technical education of the examiner is required to judge blood cells infected with malaria Protozoa. Recently, a diagnostic reagent detecting malarial antigens has been commercially available. However, the concurrent use of the diagnostic reagent and the blood smear method is recommended because the sensitivity of the diagnostic reagent is low. Another method to examine genes of malaria Protozoa is Polymerase Chain Reaction method. This method has high sensitivity, however, there is used only on laboratory scale.

In Korea, malaria has been known as Hakjil. From the 1960s, attempts to eradicate this disease begun, and in the 1970s, cases of malaria were rarely reported. However, after a patient infected with malaria Protozoa was reported near DMZ in 1993, malaria begun to spread rapidly, and it was reported that the number of patients infected with malaria Protozoa was 3,800 in 1998.

Human malaria can be caused by one of four known parasites: *Plasmodium vivax, Plasmodium falciparum, Plasmodium malariae and Plasmodium ovale.* Among them, malaria which occurrs in Korea is caused by *Plasmodium vivax* (Chom. S.Y., Korean J Parasit., 32(4), 281-284). *Plasmodium vivax* is characterized in that diagnosis thereof is difficult because latent period is long, and number of Protozoa in blood is few. The imported diagnostic reagent for malaria detects malarial antigens such as Lactate Dehydrogenase of malaria. However, the imported diagnostic reagent has a difficulty in diagnosing malaria of Korean type where latent period is long, and numbers of Protozoa and antigen in blood are few, because sensitivity of the diagnostic

reagent is only 50%.

The present inventors have developed an enzyme immunoassay for malaria by detecting malaria-specific antibodies in blood of malaria patients. More particularly, the present invention provides an indirect enzyme immunoassay using anti-human IgG antibody or anti-human IgM antibody, and an antigen sandwich enzyme immunoassay using a part or whole of malarial Merozoite Surface Protein. The immunoassays for malaria of the present invention are more sensitive than the prior art immunoassay detecting specific antibodys, and can diagnose malarial carriers as well as malaria patients, and are useful in diagnosing malaria of Korean type where latent period is long and numbers of Protozoa and antigen in blood are few.

TECHNICAL OBJECT OF THE INVENTION

It is the object of the present invention to provide an enzyme immunoassay for malaria which detects malaria-specific antibodies in blood by using antigens of of surface protein of malarial Protozoa.

Particularly, it is object of the present invention to provide an indirect enzyme immunoassay using anti-human IgG antibody and/or anti-human IgM antibody.

It is object of the present invention to provide an antigen sandwich enzyme immunoassay using a part or whole of malarial Merozoite Surface Protein.

Further, it is object of the present invention to provide the diagnostic reagent for malaria having enhanced sensitivity and specificity by using antigens of a part or whole of Merozoite Surface Protein of malarial Protozoa.

CONSTRUCTION OF THE INVENTION

To solve the above-mentioned problems, the present invention provides an enzyme immunoassay for malaria which detects malaria-specific antibodies in blood by using antigens of of surface protein of malarial Protozoa.

Particularly, the present invention provides an indirect enzyme immunoassay

using anti-human IgG antibody and/or anti-human IgM antibody.

Also, the present invention provides an antigen sandwich enzyme immunoassay using a part or whole of malarial Merozoite Surface Protein.

The present invention provides antigens of PV200C polypeptide in C-terminus of Merozoite Surface Protein of malarial Protozoa.

Also, the present invention provides the recombinant tranformant expressing said surface antigen protein.

Further, the present invention provides a diagnostic reagent for malaria comprising the surface antigens produced from the recombinant tranformant, a solid support coated with said surface antigens, the second labeled antigen conjugates combined with enzyme markers bound to said surface antigen, and a substrate solution containing a color fixing agent.

The present invention will hereinafter be described in more detail.

The invention provides antigens of surface protein of malarial Protozoa in order to detect malaria-specific antibodies in blood.

The invention provides antigens of C-terminus of Merozoite Surface Protein of malarial Protozoa in order to detect malaria-specific antibodies in blood using antigen-antibody reaction. The above C-terminus comprises amino acid sequences that are common to subspecies of *Plasmodium Vivax*, and especially comprises a polypeptide consisting of 108 amino acids (referred as "PV200C" hereafter) which exhibit 100% homology among subspecies of *Plasmodium Vivax*, as shown in SEQ. ID NO : 1.

Therefore, the present invention uses antigens of a part or whole of Merozoite Surface Protein of malarial Protozoa. Preferably, the present invention uses antigens of C-terminus of Merozoite Surface Protein of malarial Protozoa. More preferably, the present invention uses antigens of PV200C polypeptide in C-terminus of Merozoite Surface Protein of malarial Protozoa. The above protein can be expressed in a large

amount from recombinant transformants. The present inventors prepared a yeast transformant and E.Coli transformant which express PV200C polypeptide, and deposited them in Korean Collection for Type Cultures of Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology on December 18, 1999 (Deposit No. KCTC 8977P, KCTC 8976P). The prevent invention provides PV200C, surface antigen of malarial Protozoa having 99% or more of high purity expressed by the above recombinant transformant and then separated and purified as antigens of immunoassay and diagnostic reagent for malaria.

The present invention provides an indirect enzyme immunoassay for malaria using a solid support coated with surface antigens of malarial Protozoa.

The present invention provides a 96-well plate coated with surface antigen of malarial Protozoa separated and purified from transformant as a solid support for diagnosing malaria. In order to detect the surface antigen coated in well plate, the above immunoassay uses the second anti-human IgG antibody and/or the second anti-human IgM antibody derived from goat combined with horse radish peroxidase(HRP) as the second labeled antigen conjugate.

Indirect enzyme immunoassay for diagnosing malaria comprises (1) pouring plasma sample into each well of the well plate coated with recombinant surface antigen; (2) adding the second labeled antigen conjugate consisting of HRP and the IgG and IgM derived from goat to combine the second labeled antigen conjugate with the antibody bound to the surface antigen; (3) washing the well plate; (4) adding a substrate solution consisting of a buffer solution and a color fixing agent to induce color development; and (5) measuring the absorbance by using a 96-well plate reader.

In the above indirect enzyme immunoassay for malaria, malaria-specific antibodies in blood of the patient are combined with the surface antigens of malarial Protozoa immobilized on the solid support and then HRP-anti-human IgG antibody or

HRP-anti-human IgM antibody which is the second labeled antigen conjugate is combined with the antigen-antibody complex. Thereafter, a color fixing agent that is included in the substrate solution added is decomposed by HRP of the second labeled antigen conjugate to induce a color development, and then absorbance is measured by using a 96-well plate reader to detect existence of malaria-specific antibodies and amount of the antibodies.

In the above indirect immunoassay, malaria-positive samples(plasma of the malaria patients) and malaria-negative samples(plasma of normal people) were diagnosed. As a result, the above method exhibited approximately 90% of sensitivity and 95.8% of specificity.

The present invention provides an antigen sandwich enzyme immunoassay for malaria using HRP-surface antigen conjugates.

The present invention provides HRP-surface antigen conjugates.

Particularly, the present invention provides HRP-surface antigen conjugates prepared by mixing surface antigen of malarial Protozoa separated and purified from recombinant transformant with HRP reaction solution oxidized. An antigen sandwich enzyme immunoassay using HRP-surface antigen conjugate comprises (1) pouring plasma sample into each well of the well plate coated with recombinant surface antigen; (2) adding HRP-surface antigen conjugate to combine HRP-surface antigen conjugate with the antibody bound to the surface antigen; (3) washing the well plate; (4) adding a substrate solution consisting of a buffer solution and a color fixing agent to induce color development; and (5) measuring the absorbance by using a 96-well plate reader.

In the malarial antigen sandwich enzyme immunoassay of the prevent invention, malaria-specific antibodies in blood of the patient are combined with the surface antigens of malarial Protozoa immobilized on the solid support and then HRP-

anti-human IgG antibody or HRP-anti-human IgM antibody which is the second labeled antigen conjugate is combined with the antigen-antibody complex. Thereafter, a color fixing agent that is included in the substrate solution added is decomposed by HRP of the second labeled antigen conjugate to induce a color development, and then absorbance is measured by using a 96-well plate reader to detect existence of malaria-specific antibodies and amount of the antibodies. The above indirect enzyme immunoassay indirectly detects malaria-specific antibodies in blood of the patient, by using anti-human IgG antibody and/or anti-human IgM antibody derived from goat as an antigen of the second labeled antigen conjugate. In the meantime, the above antigen sandwich enzyme immunoassay can detect all malaria-specific antibodies in blood of the patient, by using a surface antigen itself derived from malarial Protozoa as an antigen of the labeled antigen conjugate. Therefore, the above antigen sandwich enzyme immunoassay is an immunoassay having enhanced sensitivity and specificity, which can diagnose malaria patients in the latent period as well as malaria patients.

In the above indirect enzyme immunoassay, malaria-positive samples(plasma of the malaria patients) and malaria-negative samples(plasma of normal people) were diagnosed. As a result, the above method exhibited approximately 98.5% of sensitivity and 99.6% of specificity.

The enzyme immunoassay for malaria of the present invention provides the antigen protein expressed from the recombinant yeast or E.Coli which is transformed with the expression vector prepared by insertion of genes encoding antigen proteins of *Plasmodium vivax,* and purified and a solid support coated with said antigen protein. When the blood sample of man who is suspected to be a malaria patient is poured into the solid support, malaria-specific antibodies in blood become specifically combined with the antigens immobilized on the solid support. After the second labeled antigen conjugate is added to this, the second labeled antigen conjugate becomes combined

with malaria-specific antibodies by recognizing Fc (fragment crystallization) region of the malaria-specific antibodies combined with the antigens immobilized on the solid support. Then, the marker of the second labeled antigen conjugate decomposes the color fixing agent in the substrate solution to induce a color development. The indirect enzyme immunoassay of the present invention detects malaria-specific antibodies bound to the antigen by using HRP-anti IgG or HRP-anti IgM conjugate using anti-human IgG antibody and/or anti-human IgM antibody wherein anti-human IgG antibody and/or HRP-anti-human IgM antibody is/are derived from goat. Also, the above antigen sandwich enzyme immunoassay of the present invention detects malaria-specific antibodies combined with the antigen by using HRP-surface antigen conjugate using a part or whole of surface protein of Malaria Protozoa. In above two methods, plasma of the malaria patients and plasma of normal people were diagnosed for malaria. As a result, both methods exhibited more than 90 % of sensitivity and specificity. Especially, the antigen sandwich immunoassay of the present invention exhibited markedly enhanced sensitivity and specificity because it detects all malaria-specific antibodies in blood.

The present invention provides a diagnostic reagent for malaria having enhanced sensitivity and specificity, comprising an antigen using the surface protein of malarial Protozoa; a solid support coated with surface antigens of malarial Protozoa; the second labeled antigen conjugates combined with the marker; and a substrate solution containing a color fixing agent.

Preferably, in the above diagnostic reagents of the present invention, an antigen includes a part or whole of Merozoite Surface Protein of malarial Protozoa, and a preferable example includes a part or whole of PV200C polypeptide of specific surface protein of *Plasmodium Vivax*, which exist commonly among subspecies of *Plasmodium Vivax*, as shown in SEQ. ID NO : 1.

The marker of the second labeled antigen conjugate for the diagnostic reagent of the present invention includes, but is not limited to, for example, an enzyme such as horse radish peroxidase(HRP) and alkaline phosphatase, colloidal gold, fluorescent materials, dyes or the like. In the above diagnostic reagent of the present invention, the second labeled antigen conjugate detects existence of malaria-specific antibodies by binding to Fc (fragment crystallization) region of the malaria-specific antibodies in which there is little variation. Preferably, As the second labeled antigen conjugate, the present invention provides HRP-anti-human IgG antibody and/or HRP-anti-human IgM antibody wherein anti-human IgG antibody and/or HRP-anti-human IgM antibody is/are derived from goat. Also, as a preferable labeled antigen conjugate, the present invention provides HRP-surface antigen conjugate wherein the surface antigen is a part or whole of surface protein of Malaria Protozoa.

Finally, the diagnostic reagent of the present invention comprises a substrate solution inducing color development when reacted with the marker of the second labeled antigen conjugate. Preferably, the substrate solution consists of a buffer solution and a color fixing agent, tetramethylbenzidine which induces color development when reacted with the marker of the labeled antigen conjugate. The color fixing agent such as tetramethylbenzidine in the substrate solution is decomposed by HRP which is a preferable marker of the second labeled antigen conjugate to induce color development. Then, existence of the IgM and amount of the IgM are detected by measuring the absorbance.

The invention will be further illustrated by the following examples. It will be apparent to those skilled in the art that these examples are given only to illustrate the present invention in more detail, but the invention is not limited to the examples given.

Example 1. Expression and purification of surface antigen of malarial Protozoa from the yeast transformant

(Step 1) Preparation of the yeast transformant and expression of surface antigen of malarial Protozoa

The above-amplified α-Pv200-19 and pYES-2 vectors were cleavaged with restriction enzymes, HindIII and Xho I, respectively. Then, α-Pv200-19 and pYES-2 vector were linked by T4 ligase to be a recombinant expression vector that is referred as "pYLJ-MSP". Yeast *Saccharomyces cerevisiae* INVSC1 was transformed with pYLJ-MSP according to Hinnen method(*Proc. Natl. Acad. Sci.*, U.S.A 75, 1929-1933, 1978), and then the yeast transformants pYLJ-MSP/*S. cerevisiae* INVSC1 were obtained. The yeast transformants were deposited in Korean Collection for Type Cultures of Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology deposited on December 18, 1999 (Deposit No. KCTC 8977P)

In order to produce the surface protein MSP from yeast, the transformants pYLJ-MSP/*S. cerevisiae* INVSC1 were inoculated in 100 ml of YEPD medium containing 2% glucose and cultivated at 37 overnight. Then, the culture medium was transferred to 2L of YEP medium containing 1% glucose and 1% galactose, respectively, and cultivated for 72 hours at 30 . The yeast transformants expressed PV200C polypeptide, exhausting glucose. The expressed PV200C polypeptide was secreted into out of cell by the α-factor leader peptide linked with N-terminus of PV200C polypeptide. Thereafter, the α-factor leader peptide was removed by peptidase existing in cell membrane. Accordingly, only the desired protein was secreted into culture medium.

(Step 2) Purification of surface antigen expressed from the yeast transformant

In order to obtain the PV200C polypeptide secreted into culture medium, the

biomass was removed by centrifuging the culture medium that was cultivated for 2 days. Then, only the fluid of culture medium was taken and concentrated by ultrafiltrating apparatus(Amicon, U.S.A.). For easily purifying the concentrated fluid, the surface proteins linked with cationic histidine residues were adsorbed on Probond column(Invitrogen) to which anionic nickels were coupled by using six histidine residues linked with C-terminus of the above-amplified Pv200 expressed from the recombinant yeast. The contaminants which were not adsorbed on column were removed by phosphate buffer containing 10mM imidazol, and then the surface proteins adsorbed on column were desorbed and separated by 500 mM imidazol and phosphate buffer. The surface proteins having approximately 90% or more of purity were separated by the process. The surface proteins having approximately 99% or more of high purity were obtained by concentrating the separated solution and performing Sephacryl S-200 gel filtration chromatography with the concentrate.

The prevent invention used the surface antigen of malarial gametocyte having high purity separated and purified from yeast transformant as antigens of immunoassay and diagnostic reagent for malaria.

Example 2. Expression and purification of surface antigen of malarial Protozoa from the E.coli transformant

(Step 1) Preparation of the E.coli transformant and expression of surface antigen of malarial Protozoa

The amplified DNA fragments were purified with phenol/chloroform mixture to produce DNA fragments with high purity. The DNA fragment and vector, pET-19b (Novagen) were cleavaged with NdeI and BamHI and were ligased with T4 ligase and then recombinant expressiong vector, pELK-MSP were obtained. E. coli strain

BL21(DE3)lysS was transformed with pELK-MSPs by the treatment with $CaCl_2$. The E.coli transformants pELK-MSP/BL21 were obtained. The transformants were deposited in Korean Collection for Type Cultures of Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology deposited on December 18, 1999 (Deposit No. KCTC 8976P)

The transformants pELK-MSP/strain BL21 (KCTC 8976P) were cultivated for 12 hours in LB medium containing 50 μg/ml of chloramphenicol and 100 μg/ml of amphiciline. Then, 50 ml of the resulting cultures were again inoculated in 1L of LB medium and were cultivated for about 2 hours at 37 . When absorbance(OD 600) of the cultures became 0.3, IPTG (Isopropyl β-D-Thiogalactopyranoside) was added to the medium to a final concentration of 0.2 mM. Then, the cultures were cultivated further for 7 hours.

(Step 2) Purification of surface antigen expressed from the E.coli transformant

After the cultivation, only the cells were isolated by centrifugation. The obtained cells were suspended in 30 ml of Phosphate Buffered Saline(PBS). Then, E. Coli in the suspension was crushed with Sonicator(Branson, Sonifier 450) and centrifuged at 5000 rpm. Because a part of expressed MSP proteins was in the supernatant and the remainder was in the pellet, both the supernatant and the pellet were completely suspended in 4M urea buffer(pH 7.5) where 4M urea was dissolved in PBS, and then were centrifuged, by which only the supernatant was collected.

Because the overexpressed surface protein has His marker consisting of 10 histidines in N-terminus thereof, the protein was adsorbed on Probond column(Invitrogen) for purification. The contaminants which were not adsorbed on column were removed repeatedly with a washing buffer in which 10mM imidazol was dissolved in PBS. Then, the surface proteins adsorbed on column were desorbed and separated with an elution buffer in which 500 mM imidazol was dissolved in PBS. It

was confirmed that the surface proteins having approximately 90% or more of purity were separated by the process. Then, it was confirmed that PV200C polypeptide having approximately 99% or more of high purity were obtained from recombinant E.Coli by concentrating the separated solution and performing Sephacryl S-200 (Pharmacia Co., Sweden) gel filtration chromatography with the concentrate.

The prevent invention used PV200C polypeptide of MSP of malarial gametocyte having high purity separated and purified from E.coli transformant as antigens of immunoassay and diagnostic reagent for malaria.

Example 3. Preparation of well plate coated with the surface antigens of malarial Protozoa

To provide a solid support to be used for the diagnosis of malaria, the solution of recombinant surface antigens of malarial Protozoa prepared in Example 1 or 2 was diluted with 0.1M carbonate buffer (pH 9.5) to 0.5 μg/ml, and 100 μl of the solution was added to each well of 96-well plate. To adsorb the surface antigens on the well, the well plate was sealed tightly and left for 18 hours at 4 . Then, the surface antigens which were not adsorbed on the well were removed by adding 300 μl of phosphate buffer solution containing 5% general goat serum to each well and leaving it for 18 hours at 4 . After the solution that remained in the well was discarded, moisture was removed by leaving the well plate for 1 hour at ambient temperature. Then, the well plate was transferred to a hermetic container with a dehumidifying agent and stored in a refrigerator at 4 .

In the embodiment of the present invention, the above-prepared well plate coated with the surface antigens of malarial Protozoa was used as a solid support in a diagnostic reagent and immunoassay for malaria.

Example 4. Diagnosis of malaria by indirect enzyme immunoassay

To diagnose malaria by indirect enzyme immunoassay, the solid support

prepared by coating 96-well plate(Nunc) with recombinant surface antigens prepared in Example 1 or 2 according to the method of Example 3, and the labeled antigen conjugate consisting of HRP and anti-human IgM antibody or anti-human IgG antibody derived from goat were used.

100 μl of a sample dilution solution containing 1.15 mg/ml NaOH, 0.2 mg/ml of KH_2PO_4, 0.2 mg/ml KCl, 8 mg/ml NaCl, 300 μl/ml bovine serum, 0.2 mg/ml thimerosal and the like was added to each well of 96-well plate(Nunc) coated with recombinant surface antigens. Then, 10 μl of antibody-negative plasma sample or 10 μl of antibody-positive plasma sample was added to the wells, and the resulting mixtures were well mixed. The well plate was incubated for 60 minutes in a reactor at 37 . After the reaction terminated, the well plate was washed 5 times with 300 μl of a phosphate buffer solution containing 0.05% Tween 20. The second anti-human IgG antibody(Cappel) or the second anti-human IgM antibody(Bethyl) derived from goat to which HRP was conjugated was diluted to 1/40,000 with a dilution solution containing 10mM Tris, 0.5M NaCl, 1mM $CaCl_2$, 0.5% glycerol, 0.2 ml/ml bovine serum, 100 μl/ml goat serum, 0.05% Tween 20, 0.2 mg/ml thimerosal and 50 μg/ml phenol red. 100 μl of the second diluted enzyme conjugate was added to each well of the 96-well plate and the well plate was incubated for 60 minutes at 37 . After the reaction terminated, the well plate was washed 5 times with 0.05% Tween 20/phosphate buffer solution. 100 μl of a substrate solution containing 100 μg/ml tetramethylbenzidine, 0.006% hydrogen peroxide and citrate-phosphate buffer solution(pH 4.5) was added to each well. After color development in a dark place for 30 minutes, 100 μl of the reaction-stopping solution (2N sulfuric acid solution) was added to each well to terminate the color development reaction. Then, the absorbance was measured at 450 nm (reference wavelength, 650 nm)

by using the 96 well plate reader (Molecular Devices, USA). Tetramethylbenzidine that is a color fixing agent in the substrate solution was decomposed by HRP conjugated to anti-human IgG antibody or anti-human IgM antibody, to induce the color development. Then, existence of malaria-specific antibodies and amount of the antibodies were detected by measuring the absorbance.

According to the above method, 20 malaria–positive samples(plasma of the malaria patients) and 98 malaria-negative samples(plasma of normal people) were diagnosed for malaria. When positive cut-off value was determined by adding 0.5 to the mean of the negative samples, according to the indirect enzyme immunoassay using the recombinant surface antigens of malarial Protozoa according to the present invention, 18 out of the 20 malaria patients' samples were judged to be positive and 46 out of 48 normal people's samples were judged to be negative. Therefore, the indirect enzyme immunoassay of the present invention exhibited 90% of sensitivity and 95.8% of specificity.

Example 5. Preparation of the surface antigen of malarial Protozoa conjugated to HRP

The labeled antigen conjugates to be used for antigen sandwich enzyme immunoassay were prepared.

The recombinant surface antigens of malarial Protozoa prepared in Example 1 or 2 was dialyzed for 1 day at 4 against 1 L of 0.01 M sodium carbonate buffer solution(pH 9.6). The buffer solution was exchanged 3 times during the dialysis. Also, 5 mg of HRP was dissolved in 0.5 ml of distilled water in a tube, and then 100 μl of 42 mg/ml $NaIO_4$ was added to the HRP solution. After the tube was wrapped with foil, it was shaken for 30 minutes at ambient temperature for the oxidation reaction. After

HRP was oxidized enough, 60 μl of 1M glycerol was added to the reaction solution. Thereafter, the tube wrapped with foil was shaken for 30 minutes at ambient temperature to terminate the oxidation reaction.

For a conjugation reaction of HRP and the surface antigen, salts were removed from the HRP reaction solution by PD10 column (Pharmacia) saturated with 0.01 M sodium carbonate buffer (pH 9.6). The above solution of the surface antigens was added to the oxidized HRP reaction solution. Then, the tube was wrapped with foil and shaken overnight at ambient temperature to prepare conjugates of HRPs and the surface antigens. After the conjugation reaction of HRP and the surface antigen was terminated, in order to stabilize the HRP-surface antigen conjugates, 40.8 μl of 4 mg/ml $NaBH_4$ solution was added to the tube, and the tube wrapped with foil was shaken at 4 °C for 2 hours for the reaction.

To remove HRPs in the reaction solution which were not conjugated, the surface proteins conjugated to HRPs were adsorbed on Probond column that was equilibrated with phosphate buffer solution by utilizing histidine residues linked with C-terminus of the surface protein. Then, HRPs which were not conjugated were removed by phosphate buffer solution. The HRP-surface antigen conjugates adsorbed on Probond column were desorbed by phosphate buffer solution containing 1M imidazol. The conjugates were collected. The protein concentration of the collected HRP-surface antigen conjugates was determined by using commercially available BSA protein quantitative test kit. The sample was stored in a refrigerator after addition of bovine serum albumin (BSA) of final concentration of 1 % . The above-prepared HRP-surface antigen conjugates were used as labeled antigen conjugates in an antigen sandwich enzyme immunoassay and diagnostic reagent for malaria.

Example 6. Diagnosis of malaria by antigen sandwich enzyme immunoassay using HRP-surface antigen conjugates

Antigen sandwich enzyme immunoassay for antibody of suface antigen of malarial was performed by using the HRP-surface antigen conjugates prepared by combining HRP with recombinant surface antigen as prepared in Example 5.

30 μl of the solution of the HRP-surface antigen conjugates was added to each well of 96-well plate(Nunc) coated with recombinant surface antigens. Then, 100 μl of malaria–positive samples(plasmas of malaria patients) or 100 μl of malaria-negative samples(plasmas of normal people) was added to the wells, and the resulting mixtures were well mixed. The well plate was incubated for 90 minutes in a reactor at 37 . After the reaction terminated, the well plate was washed 5 times with each 300 μl of a phosphate buffer solution containing Tween 20. 100 μl of a substrate solution containing 100 μg/ml tetramethylbenzidine, 0.006% hydrogen peroxide and citrate-phosphate buffer solution(pH 4.5) was added to each well of the well plate. After color development of the plate in a dark place for 30 minutes, 100 μl of the reaction-stopping solution (2N sulfuric acid solution) was added to each well to terminate the color development reaction. Then, the absorbance was measured at 450 nm (reference wavelength, 650 nm) by using the 96 well plate reader (Molecular Devices, USA). Tetramethylbenzidine that is a color fixing agent in the substrate solution was decomposed by HRP conjugated to the surface antigen, to induce the color development. Then, existence of malaria-specific antibodies and amount of the antibodies were detected by measuring the absorbance.

According to the above method, 202 malaria–positive samples(plasmas of malaria patients) and 400 malaria-negative samples(plasmas of normal people) were diagnosed for malaria. When positive cut-off value was determined by adding 0.5 to the mean of the negative samples, according to the antigen sandwich enzyme

immunoassay using the HRP-surface antigen conjugates according to the present invention, 398 out of the 400 malaria patients' samples were judged to be positive and 199 out of 202 normal people's samples were judged to be negative. Therefore, the antigen sandwich enzyme immunoassay of the present invention exhibited 98.5% of sensitivity and 99.6% of specificity.

An indirect enzyme immunoassay using anti-human IgG antibody and/or anti-human IgM antibody derived from goat, and an antigen sandwich enzyme immunoassay using HRP-surface antigen conjugates detect malarial specific-antibody in blood. Therefore, they are immunoassays having enhanced sensitivity and specificity, which can diagnose malarial carriers as well as malarial pateins.

EFFECTS OF THE INVENTION

An indirect enzyme immunoassay using anti-human IgG antibody and/or anti-human IgM antibody, and an antigen sandwich enzyme immunoassay using HRP-surface antigen conjugates detect malarial specific-antibody. Therefore, they can diagnose malarial carriers as well as malarial patients. Also, they can simplify the immunoassay beacuase of reacting plasma sample and antigen conjugates at the same time. A diagnostic reagent for malaria comprising antigens of the surface protein of malarial Protozoa, a solid support coated with said surface antigens, the second labeled antigen conjugates, and a substrate solution containing a color fixing agent can detect existence of malaria-specific antibodies and amount of the antibodies more simply and exactly.

Therefore, an enzyme immunoassay and diagnostic reagent for malaria. according to the present invention are useful in diagnosing malaria of Korean type where latent period is long and numbers of Protozoa and antigen in blood are few and the possibility of reccurrence is high.

What is claimed is;

1. An enzyme immunoassay for malaria detecting malaria-specific antibodies in blood by using surface antigens of malarial Protozoa.

2. The enzyme immunoassay for malaria according to Claim 1, wherein said surface antigens is C-terminus of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax.*

3. The enzyme immunoassay for malaria according to Claim 2, wherein said surface antigens is a part or whole of PV200C polypeptide in the C-terminus of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax.*

4. The enzyme immunoassay for malaria according to Claim 3, wherein amino acid sequences of the PV200C polypeptide are amino acid sequences as shown in SEQ. ID NO : 1.

5. The enzyme immunoassay for malaria, comprising :

(i) expressing Merozoite surface antigens of *Plasmodium Vivax* from transformants and purifying it;

(ii) immobilizing the purified surface antigens on a solid support;

(iii) pouring plasma sample to combine malaria-specific antibodies with the surface antigens immobilized on the solid support;

(iv) adding the second labeled antigen conjugates to recognize the antibody bound to the surface antigens immobilized on the solid support;

(v) inducing color development by using the markers of the second labeled antigen conjugates bound to the surface antigens; and

(vi) measuring the absorbance by using a 96-well plate reader.

6. An indirect enzyme immunoassay for malaria according to Claim 5, wherein the antigen of the second labeled antigen conjugate in the step (iv) is anti-human IgG antibody, anti-human IgM antibody or anti-human IgG and IgM antibody.

7. An antigen sandwich enzyme immunoassay according to Claim 5, wherein the antigen of the second labeled antigen conjugate in the step (iv) is a part or whole in the C-terminus of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax* of Claim 2.

8. A diagnostic reagent for malaria detecting malaria-specific antibodies in blood, comprising surface antigens of malarial Protozoa.

9. A diagnostic reagent for malaria according to Claim 8, comprising :

an antigen consisting of a part or whole of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax;*

a solid support coated with said surface antigens;

the second labeled antigen conjugates combined with markers; and

a substrate solution containing a color fixing agent.

10. A diagnostic reagent for malaria according to Claim 8, the antigen is protein consisting of a part or whole of the PV200C polypeptide of the surface protein of malarial Protozoa as shown in SEQ. ID NO : 1.

11. The diagnostic reagent for malaria according to Claim 8, wherein the marker of the second labeled antigen conjugate is horse radish peroxidase, alkaline phosphatase, colloidal gold, fluorescent materials, dyes or the like.

12. The diagnostic reagent for malaria according to Claim 8, wherein the substrate solution consists of a buffer solution and a color fixing agent which induces color development when reacted with the marker of the second labeled antigen conjugate.

13. The diagnostic reagent for malaria according to Claim 8, wherein the second labeled antigen conjugate usr anti-human IgG antibody, anti-human IgM antibody or anti-human IgG and IgM antibody as antibody.

14. The diagnostic reagent for malaria according to Claim 8, wherein the second labeled antigen conjugate use a part or whole in C-terminus of Merozoite Surface Protein according to Claim 2 as antibody.

67 68

SEQUENCE LIST

SEQ ID NO.:1
Asn Glu Ser Lys Glu Ile Leu Ser Gln Leu Leu Asn Val Gln Thr Gln Leu Leu Thr Met Ser Ser Glu His Thr Cys Ile Asp Thr Asn Val Pro Asp Asn Ala Ala Cys Tyr Arg Tyr Leu Asp Gly Thr Glu Glu Trp Arg Cys Leu Leu Thr Phe Lys Glu Glu Gly Gly Lys Cys Val Pro Ala Ser Asn Val Thr Cys Lys Asp Asn Asn Gly Gly Cys Ala Pro Glu Ala Glu Cys Lys Met Thr Asp Ser Asn Lys Ile Val Cys Lys Cys Thr Lys Glu Gly Ser Glu Pro Leu Phe Glu Gly Val Phe Cys Ser

LA OFICINA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL COREANA

Por la presente se certifica que la siguiente solicitud que obra anexo a ésta es copia fiel de los registros en la Oficina de Propiedad Industrial Coreana

Número de Solicitud: **2000 12172**

Fecha de Presentación: **10 de Marzo de 2000**

Solicitante: **LG CHEMICAL LTD**

2000 **12** **13**

Funcionario certificante

reinv. 70

69

REIVINDICACIONES

1. Un inmunoensayo de enzima para la detección de malaria identificando anticuerpos específicos contra malaria en la sangre, mediante el empleo de antígenos de superficie de protozoarios tipo malaria.

2. El inmunoensayo de enzima para detectar la malaria de acuerdo con la reivindidcación No.1, caracterizado en que dichos antígenos de superficie está en la porción C terminal de la proteína de superficie del merozoito del Plasmodium Vivax.

3. El inmunoensayo de enzima para detectar la malaria de acuerdo con la reivindicación No.2, donde dichos antígenos de superficie constituye una parte o la totalidad del polipéptido PV200C en la porción C terminal de la proteína de superficie del merozoito del Plasmodium Vivax.

4. El inmunoensayo de enzima para detectar la malaria de acuerdo con la reivindicación No.3, donde la secuencia de los aminoácidos del polipéptido PV200C son secuencias de aminoácidos como se muestra en la SEQ. ID NO: 1.

5 El inmunoensayo de enzima, que comprende:

(i). Expresar los antígenos de superficie del merozoito del Plasmodium Vivax a partir de transformados y su purificación;

(ii) Inmovilización de los antígenos de superficie purificados sobre un medio sólido.

(iii) Vaciamiento de la muestra plasmática para combinar los anticuerpos específicamente contra malaria con los antígenos de superficie inmovilizados sobre el soporte sólido;

(iv) Agregar conjugados segundos antígenicos marcados para reconocer el enlace del anticuerpo a los antígenos de superficie inmovilizados sobre el soporte sólido.

(v) Inducción de desarrollo de color usando marcadores de conjugados segundos antigénicos rotulados ligados a los antígenos de superficie;

(vi) Medición de la absorbancia utilizando el disco de 96 pozos y su lector.

6. Un inmunoensayo de enzyma indirecto para malaria de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado en que el antígeno del conjugado antigénico segundo marcado en el paso (iv) es anticuerpo IgG anti-humano, anticuerpo IgM antihumano y/o anticuerpo IgM, IgG anti-humana.

7. Un inmunoensayo de enzyma sandwich antigénico de acuerdo con la reivindicación No.5, caracterizado en que el antígeno del conjugado antigénico segundo en el paso (iv) es una parte o la totalidad en la porción C terminal de la proteína de superficie del merozoito del *Plasmodium Vivax* de la reivindicación 2.

8. Un reactivo diagnóstico para malaria que detecta anticuerpos específicos para malaria en sangre, que comprende antígenos de protozoario de tipo malaria.

9. El reactivo diagnóstico para malaria de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende:

Un soporte sólido recubierto con antígenos de superficie

Conjugados antigénicos de segunda marcación que se combinan con marcadores; y solución de substrato que contiene un agente de color fijador de color.

10. El reactivo diagnóstico para la malaria de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado en que dicho antígeno constituye una parte o la totalidad del polipeptido PV200C de la proteína de superficie del merozoito del protozoario tipo malaria como se muestra en la SEQ ID NO:1.

11. El reactivo diagnóstico para la malaria de acuerdo a la reivindicación 8, caracterizado en que el marcador del conjugado antigénico de segundo marcado es una peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, orocoliodeo, materiales fluoroscentes, colorantes o sustancias análogas.

12. El reactivo diagnóstico para malaria de acuerdo a la reivindicación 8, caracterizado en que la solución sustrato consiste en una solución buffer y un agente fijador de color que induce desarrollo de color cuando reacciona con el marcador del conjugado antigénico de segundo marcado.

13. El reactivo diagnóstico para malaria de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado en que el segundo conjugado antigénico marcado es un anticuerpo IgG anti-humano, anticuerpo IgM antihumano y/o anticuerpo IgM anti-humano.

14. El reactivo diagnóstico para malaria de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado en que el segundo conjugado antigénico marcado utiliza una parte o la totalidad de la porción C terminal de la proteína de superficie del merozoito de acuerdo con la reivindicación 2.

Abstract 1 75 72

대 한 민 국 특 허 청
KOREAN INDUSTRIAL PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Industrial Property Office.

출 원 번 호 : 특허출원 2000년 제 45806 호
Application Number

출 원 년 월 일 : 2000년 08월 08일
Date of Application

출 원 인 : 주식회사 엘지화학
Applicant(s)

2000 년 12 월 13 일

특 허 청
COMMISSIONER

1020000045806 2000/12/1

【서류명】 특허출원서

【권리구분】 특허

【수신처】 특허청장

【제출일자】 2000.08.08

【발명의 명칭】 말라리아 특이 면역글로불린 엠의 검출에 의한 말라리아의 면역학적 측정방법, 진단시약 및 진단방법

【발명의 영문명칭】 IMMUNOASSAY, A DIAGNOSTIC REAGENT AND A DIAGNOSTIC METHOD FOR MALARIA BY DETECTION OF MALARIA-SPECIFIC Ig

【출원인】

【명칭】 주식회사 엘지화학

【출원인코드】 1-1998-001275-0

【대리인】

【성명】 신영무

【대리인코드】 9-1998-000265-6

【포괄위임등록번호】 1999-067126-3

【대리인】

【성명】 최승민

【대리인코드】 9-1998-000560-9

【포괄위임등록번호】 1999-067124-9

【대리인】

【성명】 조인제

【대리인코드】 9-1999-000606-6

【포괄위임등록번호】 1999-067127-1

【발명자】

【성명의 국문표기】 임국진

【성명의 영문표기】 LIM,Kook-Jin

【주민등록번호】 611117-1482719

【우편번호】 305-390

【주소】 대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 404동 1104호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 유승범

【성명의 영문표기】 YOO,Seung-Bum

【주민등록번호】 670427-1024310

【우편번호】 302-223
【주소】 대전광역시 서구 탄방동 765 한우리아파트 104동 601호
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 손미진
【성명의 영문표기】 SOHN,Mi-Jin
【주민등록번호】 650325-2929420
【우편번호】 305-333
【주소】 대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 125동 505호
【국적】 KR
【우선권주장】
【출원국명】 KR
【출원종류】 특허
【출원번호】 10-2000-0007648
【출원일자】 2000.02.17
【증명서류】 첨부
【심사청구】 청구
【미생물기탁】
【기탁기관명】 생명공학연구소 유전자은행
【수탁번호】 KCTC 8976P
【수탁일자】 1999.12.18
【미생물기탁】
【기탁기관명】 생명공학연구소 유전자은행
【수탁번호】 KCTC 8977P
【수탁일자】 1999.12.18
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】
【서열개수】 001
【서열목록의 전자문서】 첨부
【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사 를 청구합니다. 대리인
신영무 (인) 대리인
최승민 (인) 대리인
조인제 (인)

75 76

1020000045806 2000/12/1

【수수료】

【기본출원료】	20	면	29,000 원
【가산출원료】	18	면	18,000 원
【우선권주장료】	1	건	26,000 원
【심사청구료】	30	항	1,069,000 원
【합계】	1,142,000 원		

【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통 2.미생물기탁증명서_2통 3.우선권증명서류 및 동 번역문_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 말라리아를 혈청학적으로 진단하기 위한 면역학적 측정방법, 진단시약 및 진단방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 말라리아 원충에 대한 IgM 를 검출하는 말라리아의 면역학적 측정방법, 진단시약 및 진단방법에 관한 것이다. 본 발명의 말라리아의 면역학적 측정방법, 진단시약 및 진단방법은 혈액내 말라리아 특이 IgM를 검출하는 것을 이용하여 말라리아를 조기에 진단하는 데에 유용하며, 현재의 말라리아 환자와 과거 병력자를 구별하여 말라리아를 진단하는 데에 유용하게 사용될 수 있다.

【대표도】

도 1

【색인어】

말라리아, 진단시약, 말라리아 특이 IgM

1020000045806 2000/12/1

【명세서】

【발명의 명칭】

말라리아 특이 면역글로불린 엠의 검출에 의한 말라리아의 면역학적 측정방법, 진단 시약 및 진단방법{IMMUNOASSAY, A DIAGNOSTIC REAGENT AND A DIAGNOSTIC METHOD FOR MALARIA BY DETECTION OF MALARIA-SPECIFIC IgM}

【도면의 간단한 설명】

도 1는 말라리아 IgM 포획 효소 면역학적 측정방법(IgM capture enzyme immunoassay)에 의해 말라리아 양성 시료 216개와 음성 시료 353개를 진단한 결과이다.

도 2는 말라리아 IgM 포획 효소 면역학적 측정방법(IgM capture enzyme immunoassay) 및 간접 효소 면역학적 측정방법(indirect enzyme immunoassay)에 의해 말라리아 양성 시료 75개와 음성 시료 92개를 진단한 결과를 비교한 것이다.

도 3는 말라리아 IgM 포획 효소 면역학적 측정방법(IgM capture enzyme immunoassay) 및 항원 샌드위치 효소 면역학적 측정방법(antigen sandwich enzyme immunoassay)에 의해 연령별 말라리아 음성 시료 129개를 진단한 결과를 비교한 것이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<4> 본 발명은 말라리아의 혈청학적인 측정방법, 진단시약 및 진단방법에 관한 것으로서, 상세하게는 혈장 혹은 혈청내의 말라리아 원충의 항원에 대한 IgM 을 검출하는 말라리아의 면역학적 측정방법, 말라리아 진단시약 및 진단방법에 관한 것이다.

<5> 말라리아는 모기를 매개로 하여 말라리아의 원충이 인간의 적혈구 내에 감염되어 발생하는 질병으로 전 세계 10 억명의 인구가 말라리아 위험지역에 거주하고 있으며, 매년 5 억명 이상이 말라리아에 감염되고 2 백만명 이상이 목숨을 잃는 질병 중의 하나이다. 말라리아는 전 세계적인 분포를 보이고 있으나 일부 지역에서는 효과적인 방제로 인하여 1960년대 이후 발생이 중지되거나 감소되었다. 그러나 최근의 엘리뇨 현상과 같은 이상 기온 및 약제 내성 균주의 증가, 살충제에 대한 저항성 증가 등으로 인해 전 세계적으로 다시 확산되고 있는 추세이다.

<6> 말라리아는 크게 아프리카형, 중남미를 중심으로 한 아메리카형 및 인도와 동남아시아를 중심으로 한 아시아형으로 나누어지는데, 각각은 지리적 분포에 있어서의 차이뿐만 아니라 원충이 나타내는 종적 특성과 유전적 성향에 있어서도 크게 다르다.

<7> 말라리아의 생활사는 사람 숙주 내에서의 생활사인 분열생식기(Schizogony)와 모기 숙주 내에서의 생활사인 포자기(Sporogony)로 나누어지는데, 처음에 모기가 사람을 물면 말라리아 포자낭충이 감염되어 사람의 혈관을 따라 간으로 이동한 후 간세포에서 증식을 실시하거나 휴면상태로 존재하다가 일정한 기간이 지나면 혈중으로 나오게 되어 본격적

인 증식을 하게 된다. 말라리아 포자낭충은 혈중 적혈구 내에서 영양체인 고리형에서 증식형으로 존재하다가, 분열체 과정을 거치면서 형성된 분열체가 수십개의 분열소체를 방출하게 되고 이 분열소체들이 각각의 적혈구에 들어가 동일한 생식주기를 반복한다. 이중 일부가 생식모세포 형태로 존재하는데, 모기가 이런 상태의 사람을 흡혈하면 상기의 생식모세포가 모기로 감염되어증식하고 다시 모기의 증식과정을 통해 위와 침샘에 존재하다가 사람에게 감염되는 과정을 반복하게 된다.

<8> 말라리아의 치료에는 클로로콰인(chloroquine), 프리마콰인(Primaquine) 등의 항생제가 사용되어 왔으나, 최근에 이러한 항생제들에 대해 저항성을 갖는 말라리아의 출현으로 그 치료에 어려움을 겪고 있다.

<9> 말라리아의 진단에는 혈액 도말법이 가장 많이 사용되고 있는데, 이는 말라리아가 감염된 혈구를 염색하여 현미경으로 관찰하는 고전적인 방법이다. 그러나 이 방법은 시간이 많이 걸리고 검사자의 전문 교육이 필요하다는 단점을 갖고 있다. 최근 말라리아 항원을 검사하는 시약이 시판되고 있기는 하나, 민감도가 낮은 이유로 혈액 도말법과 동시에 사용할 것을 권하고 있다. 말라리아 유전자를 검사하는 또 다른 방법으로 PCR(polymerase chain reaction) 방법이 있는데, 이는 민감도는 높지만 아직 실험실에서만 행해지고 있는 실정이다.

<10> 한국에서 말라리아는 학질이라는 명칭의 질병으로 오래 전부터 알려져 왔는데, 1960년대부터 시작된 말라리아 박멸사업으로 인해 1970년대에 들어서는 말라리아의 발병이 거의 보고되지 않았다. 그러나, 최근 1993년에 휴전선 부근에서 환자가 발생한 이후 급속히 확산되어 1998년에는 말라리아 환자수가 3800 명으로 보고되고 있다.

<11> 말라리아 포자낭충에는 *플라스모듐 비박스(Plasmodium vivax), 플라스모듐 팔시파*

룸(Plasmodium falciparum), 플라스모듐 말라리아(Plasmodium malariae), 플라스모듐 오발(Plasmodium ovale) 등 4 종류가 알려져 있다. 그 가운데 한국에서 발병하는 말라리아는 *플라스모듐 비박스(Plasmodium vivax)*에 의한 것인데, 이는 잠복기가 길고 혈액 내에 존재하는 원충의 수가 적어 그 진단이 어려운 것이 특징이다. 현재, 외국에서 수입되고 있는 말라리아 진단시약은 말라리아의 젖산 탈수소효소(Lactate Dehydrogenase) 등의 항원을 검출하는 방식으로, 그 민감도가 50% 수준에 머물러 있어 상기와 같이 잠복기가 길고 혈액 내에 존재하는 항원 및 원충수가 적은 한국형 말라리아의 진단에는 어려움이 있다. 본 발명자들은 최근에 말라리아 항체를 검출하는 방법으로 삼일열 말라리아를 비롯한 말라리아를 진단하는 방법을 발명하여 출원하였었다. 이 방법은 말라리아 항원을 이용하여 말라리아 항체를 검사하는 진단방법으로 종래 기술에 비해 높은 민감도로 말라리아 환자 혹은 과거 병력자를 검출할 수 있다. 그러나 말라리아 항체중 IgG는 말라리아 경험후 수년간 혹은 수십년간 지속될 수 있기 때문에 장기간 말라리아가 유행한 지역에서 말라리아 항체검사에서 IgG를 포함하는 식으로 검사하는 방법은 많은 양성 반응을 가져와 혼돈을 야기시킬 수 있다. 본 발명자들이 항원 샌드위치 면역학적 측정방법으로 실험한 결과 말라리아 환자가 아닌 정상인의 경우 10~30세에서는 말라리아 항체 양성 반응이 거의 없었으나 40대 이후에서는 양성반응이 5% 이상 나타났다. 이것은 40세 이상의 연령에서는 말라리아가 유행하였던 1960년대 이전에 말라리아 모기에 노출되었을 가능성이 크므로 상대적으로 높은 IgG 양성율을 나타내는 것으로 추측된다. 마찬가지로 말라리아가 유행하는 지역에서도 말라리아에 감염된 후 완치된 사람의 체내에는 아직 말라리아 특이 IgG가 남아있어 말라리아 항체 검사에서 상대적으로 높은 양성율을 나타내게 될 것이고 말라리아를 진단하기 위한 말라리아 항체 검사의 효용성이 그만큼

떨어질 것이다.

<12> 따라서 40세 이상의 연령이나 말라리아 유행 지역에서 말라리아를 진단하기 위해서는 말라리아 치료 후에도 계속적으로 역가가 남아있는 IgG 보다 치료후 일정기간이 경과하면 역가가 사라지는 IgM을 검사하는 방법이 더 효과적이라고 할 수 있을 것이다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<13> 본 발명의 목적은 말라리아 원충의 항원을 사용하여 혈액내에 존재하는 말라리아 특이 IgM 을 검출하는 말라리아의 면역학적 측정방법을 제공하는 것이다.

<14> 본 발명의 다른 목적은 말라리아 특이 IgM 을 검출하는 IgM 포획 면역학적 측정방법(IgM capture immunoassay)을 제공하는 것이다.

<15> 본 발명의 또다른 목적은 말라리아 원충의 항원을 포함하는, 민감도와 특이도가 향상된 말라리아 진단시약을 제공하는 것이다.

<16> 본 발명의 또다른 목적은 말라리아 원충의 항원을 이용하여 혈액 내에 존재하는 말라리아 특이 IgM 을 검출하는 단계를 포함하는 말라리아 환자의 진단방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

<17> 상기 목적을 달성하기 위해서, 본 발명자들은 말라리아 환자의 혈액 내에 존재하는 말라리아 원충에 대한 특이 항체중 말라리아에 대한 IgM 만을 검출하는 방식으로 말라리아를 진단하는 면역학적 측정방법을 개발하였다. 한 구체예로서 본 발명은, 고정체에

항-인간 IgM 항체를 사용하는 IgM 포획 면역학적 측정방법(IgM capture immunoassay)을 제공한다. 본 발명의 말라리아 측정 방법은 종래 기술의 특정 항원을 측정하는 방법에 비하여 민감도가 높아 말라리아 환자의 조기진단이 가능하며, 또한 과거에 말라리아에 감염되었으나 치유된 정상인을 환자와 구분할 수 있는 특징을 가지고 있다. 장기간 말라리아 유행지역에서 말라리아 경험이 있었던 과거 병력자도 모두 양성으로 검사되는 대한민국 특허출원 번호 제2000-7648호 및 제2000-12172호의 말라리아 항체 검사와는 달리, 본 발명의 방법 및 진단시약에 의하면 말라리아 환자와 과거 병력자를 구분할 수 있으며, 대한민국 특허출원 번호 제2000-12172호의 간접 효소 면역학적 측정에 의한 항체 검사 방법보다 크게 향상된 특이도와 민감도를 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

<18> 본 발명은 말라리아 원충의 항원을 이용하여 혈액 내에 존재하는 말라리아 특이 IgM 을 검출하는 말라리아의 면역학적 측정방법을 제공한다.

<19> 구체적으로, 본 발명은 말라리아 특이 IgM을 검출하는 IgM 포획 면역학적 측정방법(IgM capture immunoassay)을 제공한다. 바람직하게는, 본 발명은 IgM 포획 효소 면역학적 측정방법을 제공한다. 바람직하게는, 본 발명은 항-인간 IgM 항체를 사용하여 혈액 내에 존재하는 말라리아 특이 IgM 을 검출하는 말라리아의 면역학적 측정방법을 제공한다.

<20> 본 발명의 말라리아 특이 IgM 의 검출을 위한 IgM 포획 면역학적 측정방법(IgM capture immunoassay)은,

<21> 항-인간 IgM 항체를 고정체에 부착시키는 단계;

<22> 상기 항체가 코팅된 고정체에 혈청 또는 혈장 시료를 처리하여 IgM를 결합시키는

단계;

<23> 상기에 표지항원 접합체를 첨가하여 고정체에 부착된 항체에 결합한 IgM 과 반응시키는 단계; 및

<24> IgM 에 결합한 표지항원 접합체의 표지체를 이용하여 분석하는 단계를 포함한다.

<25> 본 발명은 말라리아 원충의 항원을 포함하며 혈액 내에 존재하는 말라리아 특이 IgM 을 검출하는, 말라리아 진단 시약을 제공한다. 바람직하게는, 항-인간 IgM 항체가 코팅된 고정체; 표지항원 접합체; 및 발색제를 함유한 기질용액을 포함하는 말라리아 진단시약을 제공한다. 상기 표지항원 접합체의 바람직한 예는 재조합 형질전환체로부터 생산된 말라리아 표면항원에 효소표지체를 부착시킨 것이다.

<26> 또한 본 발명은 말라리아 원충의 항원을 이용하여 혈액 내에 존재하는 말라리아 특이 IgM 을 검출하는 단계를 포함하는 말라리아 환자의 진단방법을 제공한다.

<27> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<28> 본 발명은 혈액 내에 존재하는 말라리아 특이 IgM 을 검출하기 위하여 말라리아 원충의 항원, 바람직하게는 말라리아 원충의 표면 항원, 더 바람직하게는 본 발명자들의 대한민국 특허출원 번호 제2000-7648호 에서 사용되었던 말라리아 원충의 단백질을 이용한다.

<29> 바람직하게는, 본 발명은 항원-항체반응을 이용하여 혈액 내에 존재하는 말라리아 특이 IgM 을 측정하기 위하여 삼일열 말라리아 원충의 표면 단백질 MSP (Merozoit surface protein)의 C-말단 부위를 이용한다. 상기 C-말단 부위는 삼일열 말라리아 원충의 아종 사이에 공통적으로 존재하는 아미노산 서열을 포함하고 있으며, 특히 서열번호

1로 기재되고 삼일열 말라리아 원충의 아종들 사이에서도 100% 상동성을 보이는 108 개의 아미노산으로 이루어지는 폴리펩타이드(이하 'PV200C'라 약칭함)를 포함한다.

<30> 따라서 본 발명에서는 바람직하게는 본 발명자들의 대한민국 특허출원 번호 제 2000-7648호에서 사용하였던 말라리아 원충의 표면 단백질 MSP의 전부 또는 일부를 이용하며, 더 바람직하게는 삼일열 말라리아 원충 *플라스모듐 비박스(Plasmodium vivax)*의 메로조이트 표면 단백질(Merozoit surface protein)의 C-말단 부위를 이용한다. 더욱더 바람직하게는 아미노산 서열이 서열번호 1로 기재되는 상기 MSP의 C- 말단 부위의 PV200C 폴리펩타이드의 전부 또는 일부를 이용한다. 상기 단백질은 재조합 형질전환체로부터 대량발현시켜 얻을 수 있으며, 본 발명자들은 PV200C 폴리펩타이드를 발현시키는 효모 형질전환체 및 대장균 형질전환체를 제작하여 1999년 12월 18일자로 생명공학연구소 유전자은행에 기탁하였다(수탁번호 : KCTC 8977P, KCTC 8976P). 본 발명은 바람직하게는 상기 재조합 형질전환체로부터 발현시켜 분리 및 정제된 말라리아 표면항원 PV200C를 99% 이상의 고순도로 분리하여 말라리아를 진단하기 위한 측정방법 및 진단시약에 제공한다.

<31> 본 발명은 한 면으로서, 말라리아의 특이 IgM을 검출하는 IgM 포획 면역학적 측정방법(IgM capture immunoassay)을 제공한다. 바람직하게는 본 발명은 항-인간 IgM 항체를 사용하여 혈액 내에 존재하는 말라리아 특이 IgM 을 검출하는 말라리아의 면역학적 측정방법을 제공한다.

<32> 이를 위하여, 본 발명은 말라리아의 진단을 위해 사용될 고정체로서 바람직하게는 염소 유래의 항-인간 IgM 항체를 코팅한 96-웰 플레이트를 제공한다. 또한, 본 발명은 말라리아 특이 IgM 을 검출하기 위하여 말라리아 원충의 항원과 표지체를 결합시킨 표지

항원 접합체를 제공한다. 본 발명의 표지항원 접합체는 항원과 표지체로 구성되며, 상기 항원은 바람직하게는 말라리아 특이 IgM 을 검출하기 위하여 형질전환된 효모나 대장균에서 정제한 재조합 말라리아 표면항원이다. 상기 표지항원 접합체의 표지체의 예로서는 고추냉이 과산화효소(horseradish peroxidase, 이하 'HRP'로 약칭함) 및 염기성 포스파타아제(alkaline phosphatase)와 같은 효소, 콜로이드 골드(colloidal gold), 형광물질(fluorescein) 및 색소(dye) 등을 들 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니며, 바람직하게는 효소, 더 바람직하게는 고추냉이 과산화효소(HRP)이다.

<33> 본 발명의 말라리아 특이 IgM 의 검출을 위한 IgM 포획 면역학적 측정방법(IgM capture immunoassay)의 바람직한 예는, 항-인간 IgM 항체를 고정체에 부착시키는 단계; 상기 항체가 코팅된 고정체에 혈청 또는 혈장 시료를 처리하여 IgM를 결합시키는 단계; 상기에 표지항원 접합체를 첨가하여 고정체에 부착된 항체에 결합한 IgM 과 반응시키는 단계; 및 IgM 에 결합한 표지항원 접합체의 표지체를 이용하여 분석하는 단계를 포함한다.

<34> 말라리아 특이 IgM 의 검출을 위한 IgM 포획 면역학적 측정방법(IgM capture immunoassay)의 더 바람직한 예는,

<35> (1) 염소 유래의 항-인간 IgM 항체가 코팅된 플레이트의 각 웰에 혈청 또는 혈장 시료를 첨가하여 반응시키는 단계;

<36> (2) 웰 플레이트를 세척하는 단계;

<37> (3) 재조합 표면항원과 HRP 로 구성된 표지항원 접합체로 상기 항-인간 IgM 항체에 부착된 IgM과 반응시키는 단계;

<38> (4) 웰 플레이트를 세척하는 단계;

<39> (5) 발색제와 완충용액으로 구성된 기질용액을 첨가하여 발색시키는 단계; 및

<40> (6) 96 웰 플레이트 판독기를 이용하여 흡광도를 측정하는 단계를 포함한다.

<41> 바람직한 구체예로서, 본 발명의 말라리아의 면역학적 측정방법은 염소유래 항-인간 IgM 항체가 코팅된 고정체를 제공하며, 삼일열 말라리아 원충의 항원 단백질을 코딩하는 유전자를 삽입하여 제작한 발현벡터에 의해 형질전환된 재조합 효모 또는 재조합 대장균으로부터 발현시켜 정제한 항원 단백질을 하기 실시예 1에 기재된 방법으로 HRP와 접합시킨 효소표지항원 접합체를 제공한다. 상기 염소유래 항-인간 IgM 항체가 코팅된 고정체에 말라리아 감염여부를 알고자 하는 사람의 혈청이나 혈장을 첨가하면 혈청이나 혈장 내에 존재하는 인간 IgM 은 웰에 코팅된 항-인간 IgM 항체에 결합되게 된다. 여기에 말라리아 표면항원과 HRP의 접합체를 첨가하면, 접합체는 웰에 코팅된 항-인간 IgM 항체에 결합한 IgM 중 말라리아 환자의 IgM 을 인식하여 결합한다. 이와 같이 결합한 접합체의 HRP는 기질용액 내 발색제를 분해하여 발색을 유도하게 되고 그 흡광도를 측정함으로써 간접적으로 시료혈장내 IgM의 존재 유무와 항체량을 검출하여 말라리아의 감염여부를 진단한다. 본 발명의 상기 측정방법을 이용하여 말라리아 환자의 혈장과 정상인의 혈장을 대상으로 말라리아를 진단한 결과, 98% 이상의 민감도와 99% 이상의 특이도를 나타내었으며, 특히 과거 말라리아에 감염되어 말라리아에 대한 IgG를 보유하고 있을 것으로 추정되는 40대 이상의 정상인의 혈장에 대해서는 모두 음성으로 처리되었다. 즉, 본 발명의 말라리아의 면역학적 측정방법은 대한민국 특허출원 번호 제2000-12172호의 항원 샌드위치 효소 면역학적 측정방법보다 개선된 특이도를 보여주었으며, 상기의 간접 효소 면역학적 측정방법에 비해 민감도 및 특이도가 크게 개선되었다.

<42> 또한 본 발명은 말라리아 원충의 항원을 포함하며 혈액 내에 존재하는 말라리아 특이 IgM 을 검출하는, 말라리아 진단 시약을 제공한다. 바람직하게는 본 발명은, 항-인간 IgM 항체가 코팅된 고정체; 표지항원 접합체; 및 발색제를 함유하는 기질용액을 포함하는, 말라리아 진단시약을 제공한다.

<43> 본 발명의 말라리아 진단시약에 사용되는 항-인간 IgM 항체의 예로는 염소 유래의 항-인간 IgM 항체를 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 항-인간 IgM 항체는 바람직하게는 IgM의 mu 사슬에 특이적인 것으로 항원-항체의 친화력에 의해 정제되고 IgG 나 기타 다른 면역 글로블린과 교차 반응이 없는 것을 사용한다.

<44> 본 발명의 말라리아 진단시약에 사용되는 표지항원 접합체의 항원은 말라리아 원충의 항원을 이용하는데, 바람직한 예로서는 삼일열 말라리아 원충 *플라스모듐 비박스*의 특이한 표면 단백질을 이용하며, 더 바람직한 예로서는 *플라스모듐 비박스(Plasmodium vivax)*의 MSP의 C-말단 부위를 이용하고, 더욱더 바람직한 예로서는 서열번호 1로 기재되는 *플라스모듐 비박스*의 아종들에 공통적으로 존재하는 PV200C 폴리펩타이드의 전부 또는 일부로 구성된 단백질을 이용한다.

<45> 본 발명의 말라리아 진단시약에 사용되는 표지항원 접합체의 표지체의 예로서는 고추냉이 과산화효소(HRP), 염기성 포스파타아제(alkaline phosphatase), 콜로이드 골드(colloidal gold), 형광물질(fluorescein) 및 색소(dye) 등을 들 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명에서 바람직한 표지체로서 고추냉이 과산화효소(HRP)를 사용한다.

<46> 또한, 본 발명의 말라리아 진단시약은 표지항원 접합체와 반응하여 발색반응이 유도되는 기질 용액을 포함하는데, 바람직하게는 표지항원 접합체의 표지체와 반응하여 발

색을 유발하는 테트라메틸벤지딘(tetramethylbenzidine) 등의 발색제와 완충용액으로 구성된 기질 용액을 사용한다. 상기 기질용액내 테트라메틸벤지딘과 같은 발색제는 표지 항원 접합체의 바람직한 표지체로 사용된 고추냉이 과산화효소(HRP)에 의하여 분해되어 발색반응이 유도되고 그 발색정도를 흡광도로 측정함으로써 IgM 의 존재 유무 및 항체량을 검출한다.

<47> 또한 본 발명은 말라리아 원충의 항원을 이용하여 혈액 내에 존재하는 말라리아 특이 IgM 을 검출하는 단계를 포함하는 말라리아 환자의 진단방법을 제공한다. 바람직하게는 항-인간 IgM 항체를 사용하여 혈액 내에 존재하는 말라리아 특이 IgM 을 검출하는 말라리아 환자의 진단방법을 제공한다. 바람직하게는 말라리아 원충의 표면 단백질 MSP의 전부 또는 일부를 이용하며, 더 바람직하게는 삼일열 말라리아 원충 *플라스모듐 비박스 (Plasmodium vivax)*의 메로조이트 표면 단백질(Merozoit surface protein)의 C-말단 부위를 이용한다. 더욱더 바람직하게는 아미노산 서열이 서열번호 1로 기재되는 상기 MSP의 C- 말단 부위의 PV200C 폴리펩타이드의 전부 또는 일부를 이용한다.

<48> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<49> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<50> <제조예 1> 효모 형질전환체로부터 말라리아 원충 표면항원의 발현 및 정제

<51> (단계 1) 효모 형질전환체의 제작 및 말라리아 원충 표면항원의 발현

<52> 말라리아 양성 혈액에서 정제된 RNA로부터 역전사반응을 통해 합성된 cDNA를 주형

으로 증폭시켜 얻은 말라리아 표면항원 PV200C 폴리펩타이드와 pYES-2 벡터를 각각 제한효소 HindIII와 XhoI으로 처리한 후 T4 리가아제(T4 ligase, Promega)로 연결시켜 재조합 발현벡터 pYLJ-MSP를 제작하였다. 상기 재조합 발현벡터 pYLJ-MSP를 힌넨(, U.S.A 75: 1929-1933, 1978)의 방법으로 효모 *사카로마이세스 세레비세* INVSC1(*Sacharomyces cerevisiae* INVSC1)에 형질전환시켜 효모 형질전환체 pYLJ-MSP/*S. cerevisiae* INVSC1을 확보하고, 상기의 효모 형질전환체는 생명공학연구소 유전자은행에 1999년 12월 18일자로 기탁하였다(수탁번호 : KCTC 8977P)

<53> 상기와 같이 제작된 말라리아 원충의 표면항원 PV200C 폴리펩타이드를 발현하는 재조합 효모 pYLJ-MSP/*S. cerevisiae* INVSC1 (KCTC 8977P)를 2% 글루코오스를 포함하는 YEPD 배지에서 37℃로 배양한 후, 배지를 1% 글루코오스 및 1% 갈락토오스를 포함하는 YEP 배지로 바꾸어 배양함으로써, 글루코오스가 고갈되도록 하여 재조합 효모로부터 표면항원의 발현을 유도하였다. 이때, 재조합 효모로부터 발현된 표면 단백질 PV200C 폴리펩타이드는 N-말단에 결합되어 있는 α- 인자 리더 펩타이드(α-factor leader paptide)에 의해 세포 밖으로 분비되고, 상기 표면 단백질이 분비된 후 N-말단에 결합되어 있던 α-인자 리더 펩타이드는 세포막에 존재하는 펩티다아제(peptidase)에 의해 제거됨으로써 목적하는 단백질만이 배양액 내로 분비되었다.

<54> (단계 2) 효모 형질전환체로부터 발현된 표면항원의 정제

<55> 단계 1에서와 같이 배양액 내로 분비된 표면 단백질 PV200C 폴리펩타이드를 얻기 위하여, 2일간 배양한 배양액을 원심 분리하여 균체를 제거한 후 배양액만을 취하여 한외 여과기(미국의 Amicon사 제품)로 농축하였다. 상기 농축된 배양액을 간단하게 정제하기 위하여 효모 형질전환체로부터 발현된 표면 단백질 PV200C 폴리펩타이드의 C-말단에

붙인 6개의 히스티딘(histidine) 잔기를 이용하여 양이온인 히스티딘이 결합된 표면 단백질을 음이온인 니켈이 부착된 프로본드(Probond, Invitrogen) 칼럼에 흡착시켰다. 칼럼에 흡착되지 않은 불순물은 10 mM 이미다졸 (imidazol)이 용해된 인산염 완충용액으로 제거하고, 칼럼에 흡착되어 있는 표면 단백질은 500 mM 이미다졸이 용해된 인산염 완충액으로 탈착시켜 분리하였다. 상기 과정에서 표면 단백질은 거의 90% 이상 순수하게 분리되었고, 상기 분리용액을 농축하여 세파크릴(Sephacryl) S-200 겔(gel) 여과 크로마토그라피를 수행하면 표면 단백질이 거의 99% 이상의 고순도로 분리되었다.

<56> 본 발명의 구체예에서는 상기와 같은 방법으로 말라리아 분열소체의 표면 항원을 효모 형질전환체로부터 고순도로 분리 및 정제하여 본 발명의 말라리아의 면역학적 측정 방법, 진단시약 및 진단방법에 사용하였다.

<57> <제조예 2> 대장균 형질전환체로부터 말라리아 원충 표면항원의 발현 및 정제

<58> (단계 1) 대장균 형질전환체의 제작 및 말라리아 원충 표면항원의 발현

<59> 제조예 1에서와 같은 방법으로 수득한 MSP PV200C의 DNA 절편을 페놀/클로로포름(phenol/chloroform) 혼합 용액으로 정제한 후, 말라리아 표면항원 PV200C 폴리펩타이드와 pET-19b (Novagen) 벡터를 제한효소 NdeI과 BamHI으로 처리한 후 T4 리가아제로 연결시켜 재조합 발현벡터 pELK-MSP를 얻었다. 제조된 발현벡터 pELK-MSP를 염화칼슘 방법으로 대장균 BL21(DE3)lysS 에 형질전환시켜 대장균 형질전환체 pELK-MSP/BL21을 확보하고, 상기 대장균 형질전환체를 생명공학연구소 유전자은행에 1999년 12월 18일자로 기탁하였다(수탁번호 KCTC 8976P).

<60> 상기와 같이 제작된 대장균 형질전환체 pELK-MSP/BL21(KCTC 8976P)를 암피실린(100 ㎍/㎖)과 클로람페니콜(50 ㎍/㎖)이 첨가된 LB 배지에서 12시간 동안 배양하였다. 상기 배양액 50 ㎖을 다시 1 L의 LB 배지에 접종하여 37℃에서 2시간 정도 배양한 후 흡광도(OD600)가 0.3이 되었을 때 최종농도가 0.2 mM이 되도록 IPTG(Isopropyl β-D-Thiogalactopyranoside)를 첨가하고 7시간 더 배양하였다.

<61> (단계 2) 대장균 형질전환체로부터 발현된 표면항원의 정제

<62> 단계 1에서와 같이 배양한 배양액을 원심분리하여 세포만을 분리한 후, 분리된 세포를 인산염 완충용액 30 ㎖에 현탁시켜 초음파 파쇄기(Sonicator; Sonifier 450, Branson)를 사용하여 파쇄한 다음 5000 rpm에서 원심분리하였다. 대장균 형질전환체로부터 발현된 MSP 단백질은 일부는 상등액에, 나머지는 원심분리한 침전물에 각각 존재하므로 상등액과 침전물을 4 M 요소 완충용액(인산염 완충용액에 4 M 우레아를 용해시킨 완충용액, pH 7.5)에 완전히 현탁시킨 후 다시 원심분리하여 상등액만을 모았다.

<63> 대장균 형질전환체로부터 발현된 표면 단백질을 정제하기 위하여, 상기 단백질의 N-말단에 표지된 10개의 히스티딘 잔기를 이용하여 프로본드 칼럼(Invitrogen)에 흡착시켰다. 칼럼에 흡착되지 않은 불순물은 10 mM 이미다졸(imidazol)이 용해된 인산염 완충용액으로 제거하고, 칼럼에 흡착되어 있는 표면 단백질은 500 mM 이미다졸이 용해된 인산염 완충액으로 탈착시켜 분리하였다. 상기 과정에서 표면 단백질은 거의 90% 이상 순수하게 분리되었고, 상기 분리용액을 농축하여 세파크릴(Sephacryl) S-200 겔 여과 크로마토그라피를 수행하면 표면 단백질이 거의 99%의 고순도로 분리되었다.

<64> 본 발명의 구체예에서는 상기와 같은 방법으로 말라리아 분열소체의 표면 항원을 대장균 형질전환체로부터 고순도로 분리 및 정제하여 본 발명의 말라리아의 면역학적 측

정방법, 진단시약 및 진단방법에 사용하였다.

<65> <실시예 1> IgM 포획 효소 면역학적 측정방법(IgM capture enzyme immunoassay)을 통한 말라리아의 진단

<66> 본 발명의 실시예에서는 IgM 포획 면역학적 측정방법을 통해 말라리아를 진단하기 위하여, 염소유래 항-인간 IgM 항체를 고정체에 코팅하여 사용하였으며 형질전환된 효모나 대장균으로부터 정제한 재조합 표면항원을 고추냉이 과산화효소(HRP)와 접합시켜 만든 효소표지항원 접합체를 사용하였다.

<67> 본 발명에서 사용한 플레이트는 다음과 같이 제조하였다. 염소 유래 항-인간 IgM 항체(Bethyl 사의 anti-human IgM mu chain-specific, affinity purified, 미국)를 인산염 완충용액(pH 7.0)에 1 ~ 10 ㎍/㎖ 이 되도록 희석한 후 폴리스티렌 플레이트에 100 ~ 200 ㎕ 씩 각 웰에 첨가하여 12 ~ 18시간 정도 상온에 방치한 후 웰에 남아 있는 용액을 흡입하여 제거하고 0.1% 젤라틴이나 0.1% 카제인을 인산염 완충용액에 녹여 250㎕ 씩 각 웰에 가하여 2시간 동안 상온에 방치시킨 후 용액을 흡입하여 제거하였고 저온실에서 18시간 동안 건조시킨 후 사용하였다.

<68> 본 발명을 구체적으로 설명하면, 염소 유래 항-인간 IgM 항체로 코팅된 플레이트의 각 웰에 0.1% 소혈청 알부민이 함유된 인산염 완충용액을 시료 희석액으로 하여 각 웰에 100 ㎕ 씩 첨가하고 항체 음성 혈장시료와 항체 양성 혈장시료를 각각 2 ~ 20 ㎕ 씩 첨가하여 잘 혼합한 후, 37℃의 반응기에 넣고 60분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 0.05% 트윈 20(Tween 20)을 함유한 인산염 완충용액(300 ㎕)을 사용하여 웰 플레이트를 5 회에

걸쳐 세척하였다. 효모나 대장균으로부터 정제한 말라리아 표면항원(상기 제조예 1 또는 2의 방법으로 제조함)과 HRP의 접합체를 다음과 같이 제조하였다.

<69> 구체적으로, 제조예 1 또는 제조예 2의 방법으로 분리 및 정제된 재조합 말라리아 분열소체 표면항원은 4℃에서 1 L의 0.01 M 탄산소다 완충용액(sodium carbonate buffer, pH 9.6)을 사용하여 완충용액을 3 회 교환해 주면서 1일간 투석하였다. 또한, 상기 표면항원에 접합될 HRP는 우선, 0.5 ml의 증류수에 5 mg의 HRP를 용해시킨 후, 100 μl의 42 mg/ml 요오드산 나트륨(NaIO4)을 상기 HRP 용액에 첨가하여 호일로 튜브를 감싼 상태에서 상온에서 30분간 흔들면서 반응시켜 HRP를 산화시켰다. HRP가 충분히 산화되면, 1M 글리세롤 60 μl를 상기 반응용액에 첨가한 후 튜브를 호일로 감싼 상태에서 상온에서 30분간 흔들면서 반응시켜 산화 반응을 종결시켰다.

<70> HRP와 표면항원의 접합반응을 위하여 상기 HRP 반응용액을 0.01 M 탄산소다 완충용액(pH 9.6)으로 포화된 PD10 칼럼(Pharmacia)을 이용하여 염을 제거하였다. 이렇게 산화된 HRP 반응용액에 상기의 표면항원 용액을 첨가한 후 튜브를 호일로 감싼 상태에서 상온에서 하룻밤 동안 흔들면서 반응시켜 HRP-표면항원 접합체를 제조하였다. HRP와 표면항원의 접합반응이 종결된 후 HRP-표면항원 접합체를 안정화 시키기 위하여, 40.8 μl의 4 mg/ml NaBH4를 첨가하여 튜브를 호일로 감싼 상태에서 4℃에서 2 시간동안 흔들면서 반응시켰다. 또한 HRP가 결합된 HRP-표면항원 접합체로부터 결합되지 않고 남아있는 반응액 내 HRP를 제거하기 위하여, HRP에 접합 된 표면항원의 C-말단에 존재하는 히스티딘 잔기를 이용하여 인산염 완충용액으로 평형화시킨 프로본드 칼럼에 흡착시킨 후 결합되지 않은 HRP를 인산염 완충용액으로 제거하였다. 프로본드 칼럼에 흡착된 HRP-표면항원 접합체는 1 M 이미다졸 인산염 완충용액으로 처리하여 탈착시켜 단백질을 모으고, HRP-

표면항원 접합체의 단백질 농도를 BSA(bovine serum albumin) 단백질 정량 키트를 이용하여 측정한 후 최종 농도 1% 의 BSA를 첨가하여 냉장고에 보관하였다.

<71> 상기와 같이 제조된 말라리아 표면항원과 HRP의 접합체를 1% BSA와 0.05% 트윈 20(Tween 20)이 포함된 인산염 완충용액(pH 7.0)을 희석액으로 사용하여 1:100 ~ 1:1000 의 비율로 희석한 후 효소표지항원 접합체 100 ㎕씩을 상기 웰에 첨가하여 37℃에서 30 분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 웰 플레이트를 0.05% 트윈 20 이 포함된 인산염 완충용액으로 5회 세척하고, 테트라메틸벤지딘(tetramethylbenzidine) 100 ㎍/㎖, 과산화수소(hydrogen peroxide) 0.006% 및 구연산 인산염 완충용액(pH 4.5)을 포함하는 기질용액을 100 ㎕ 씩 첨가하여 30분간 암소에서 발색시켰다. 적당하게 발색이 이루어진 후 반응정지액(1N 황산용액) 100 ㎕를 각 웰에 첨가하여 발색반응을 종결시킨 후 96 웰 플레이트 판독기(Molecular Devices)로 650 ㎚를 보조(reference) 파장으로 하여 450 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. 기질용액내 발색제인 테트라메틸벤지딘은 인간 IgM에 결합된 효소표지항원 접합체의 HRP 에 의해 분해되어 발색반응을 일으키고, 그 발색정도를 흡광도로 측정함으로써 말라리아 특이 IgM 의 존재 유무 및 항체량을 검출하였다.

<72> 상기의 방법으로 216 개의 말라리아 양성시료(말라리아 환자의 혈장)와 353개의 음성시료(정상인의 혈장)를 대상으로 말라리아를 진단하였다. 그 결과, 본 발명의 재조합 말라리아 표면항원을 이용한 IgM 포획 효소 면역학적 검사(IgM capture enzyme immunoassay)는 양성 진단 수치(cut-off)를 음성 시료 평균치에 0.05를 더한 값으로 정하여 판단할 경우, 말라리아 환자의 혈장시료 216 개중 212개를 양성으로 판정하였고 정상인의 혈장시료 353 개중 351 개를 음성으로 판정하여 98.1%의 민감도와 99.4%의 특이도를 보였다(도 1 참조).

<73> <비교 실시예 1> IgM 포획 효소 면역학적 측정방법(IgM capture enzyme immunoassay)과 간접 효소 면역학적 측정방법(indirect enzyme immunoassay)의 비교

<74> 본 발명은 IgM 포획 면역학적 측정방법을 통해 말라리아를 진단하기 위하여, 염소 유래 항-인간 IgM 항체를 고정체에 코팅하여 사용하였다. 또한 형질전환된 효모나 대장균으로부터 정제한 재조합 표면항원을 고추냉이 과산화효소(HRP)와 접합시켜 만든 효소 표지항원 접합체를 사용하였다.

<75> 본 발명자들의 대한민국 특허출원 번호 제2000-12172 호에서 사용된 간접 효소 면역학적 측정방법의 바람직한 구체예는 다음과 같다. 우선, 96-웰 플레이트(Nunc)에 제조예 1 또는 제조예 2에서 분리 및 정제된 말라리아의 재조합 표면항원 용액을 0.5 ㎍/㎖의 농도로 0.1 M 탄산염 완충용액(pH 9.5)에 희석하여 100 ㎕씩 분주한 후 웰에 분주된 항원이 웰 플레이트에 부착되도록 플레이트를 밀봉하여 4℃ 에서 18시간동안 방치하였다. 웰 플레이트에 부착되지 않고 남아있는 표면항원은 5% 일반 염소 혈청(Goat serum)을 함유한 인산염 완충용액을 웰당 300 ㎕씩 분주한 후 4℃ 에서 18 시간 동안 방치하여 제거하였다. 웰에 남은 용액을 제거하고 상온에서 1 시간동안 방치하여 수분을 건조시킨 후 제습제와 함께 밀봉용기에 넣어 4℃ 저온 냉장고에서 보관하였다. 상기와 같이 제작된 말라리아의 재조합 표면항원이 코팅된 96-웰 플레이트의 각 웰에 NaOH(1.15 mg/㎖), KH2PO4(0.2 mg/㎖), KCl(0.2 mg/㎖), NaCl(8 mg/㎖), 소혈청(300 ㎕/㎖) 및 치메로살(0.2 mg/㎖) 등을 포함하는 시료 희석액 100 ㎕를 첨가하고 항체 음성 혈장시료와 항체 양성 혈장시료를 각각 10 ㎕씩 첨가하여 잘 혼합한 후, 37℃의 반응기에 넣고 60분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 0.05% 트윈 20(Tween 20)을 함유한 인산염 완충용액(300 ㎕)

을 사용하여 웰 플레이트를 5 회에 걸쳐 세척하였다. HRP가 접합된 염소 유래의 항-인간 IgG 항체(Cappel) 및 항-인간 IgM 항체(Bethyl)는 Tris(10 mM), NaCl(0.5M), $CaCl_2$ (1mM), 글리세롤(0.5%), 소혈청(0.2 ㎖/㎖), 염소혈청(100 ㎕/㎖), 트윈 20(0.05%), 치메로살(0.2 ㎎/㎖) 및 페놀레드(50 ㎍/㎖)를 포함하는 희석액을 사용하여 1 : 40,000의 비율로 각각 희석한 후 희석된 접합체 100㎕씩을 상기 웰에 첨가하여 37℃에서 60분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 웰 플레이트를 0.05% 트윈 20/인산염 완충용액으로 5회 세척하고, 테트라메틸벤지딘(tetrametylbenzidine) 100 ㎍/㎖, 과산화수소(hydrogen peroxide) 0.006% 및 구연산 인산염 완충용액(pH 4.5)을 포함하는 기질용액을 100 ㎕ 씩 첨가하여 30 분간 암소에서 발색시켰다. 적당하게 발색이 이루어진 후 반응정지액(2N 황산용액) 100 ㎕를 각 웰에 첨가하여 발색반응을 종결시킨 후 96 웰 플레이트 판독기(Molecular Devices)로 650 ㎚를 보조(reference) 파장으로 하여 450 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. 기질용액 내 발색제인 테트라메틸 벤지딘은 항-인간 IgG 항체 및 항-인간 IgM 항체에 결합된 HRP 에 의해 분해되어 발색반응을 일으키고, 그 발색정도를 흡광도로 측정함으로써 말라리아 특이 항체의 존재 유무 및 항체량을 검출하였다.

<76> 본 발명에서 사용한 방법과 본 발명자들의 대한민국 특허출원 번호 제2000-12172호에서 사용된 간접 효소 면역학적 측정방법의 차이를 비교하기 위해 75개의 말라리아 양성시료(말라리아 환자의 혈장)와 92 개의 음성시료(정상인의 혈장)를 대상으로 말라리아를 진단하였다. 그 결과, 본 발명의 재조합 말라리아 표면항원을 이용한 IgM 포획 효소 면역학적 검사(IgM capture enzyme immunoassay)는 양성

진단 수치(cut-off)를 음성 시료 평균치에 0.05를 더한 값으로 정하여 판단할 경우, 말라리아 환자의 혈장시료 75개 중 73개를 양성으로 판정하였고 정상인의 혈장시료 92개 중 92개를 음성으로 판정하여 97.3%의 민감도와 100%의 특이도를 보였다.

<77> 이에 비해 본 발명자들의 대한민국 특허출원 번호 제2000-12172 호에서 사용된 간접 효소 면역학적 측정 방법은 동일한 혈장에 대해서, 양성 진단 수치(cut-off)를 음성 시료 평균치에 0.2를 더한 값으로 정하여 판단할 경우, 말라리아 환자의 혈장시료 75개 중 59개를 양성으로 판정하였고 정상인의 혈장시료 92개중 85개를 음성으로 판정하여 78.6%의 민감도와 92.4%의 특이도를 보였다(도 2 참조).

<78> <비교 실시예 2> 연령별 정상인에 대한 IgM 포획 효소 면역학적 측정방법(IgM capture enzyme immunoassay)과 항원 샌드위치 효소 면역학적 측정방법(antigen sandwich enzyme immunoassay)의 비교

<79> 본 발명은 IgM 포획 면역학적 측정방법을 통해 말라리아를 진단하기 위하여, 염소 유래 항-인간 IgM 항체를 고정체에 코팅하여 사용하였으며 형질전환된 효모나 대장균으로부터 정제한 재조합 표면항원을 고추냉이 과산화효소(HRP)와 접합시켜 만든 효소표지 항원 접합체를 사용하였다(상기 비교실시예 1의 방법 참조).

<80> 본 발명자들의 대한민국 특허출원 번호 제2000-12172호에서 사용된 항원 샌드위치 효소 면역학적 측정방법의 바람직한 구체예는, 비교실시예 1의 간접 효소 면역학적 측정방법의 바람직한 구체예와 같은 방법으로 제작된 말라리아 재조합 표

면항원이 코팅된 플레이트의 각 웰에 HRP-표면항원 접합체 용액을 30 ㎕씩 첨가하고 말라리아 양성시료(말라리아 환자의 혈장)와 음성시료(정상인의 혈장)를 100 ㎕씩 첨가하여 잘 혼합한 후 37℃ 반응기에 넣고 90 분간 반응시켰다. 트윈 20을 함유한 인산염 완충용액을 300 ㎕씩 5회 처리하여 웰을 세척한 후 테트라메틸벤지딘 100 ㎍/ml, 과산화수소 0.006% 및 구연산 인산염 완충용액(pH 4.5)을 포함하는 기질용액을 100 ㎕ 첨가하였다. 기질용액이 첨가된 플레이트를 30분간 암소에서 발색시킨 후 100 ㎕의 2 N 황산용액을 각 웰에 첨가하여 반응을 정지시켜 96 웰 플레이트 판독기(Molecular Devices)로 650 nm를 보조(reference) 파장으로 하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 기질용액 내 발색제인 테트라메틸벤지딘은 HRP-표면항원 접합체의 HRP에 의해 분해되어 발색반응을 일으키는데, 그 발색정도를 흡광도로 측정함으로써 항체의 존재 유무 및 항체량을 검출하였다.

<81> 본 발명에서 사용한 방법과 본 발명자들의 대한민국 특허출원 번호 제2000-12172호에서 사용된 항원 샌드위치 효소 면역학적 측정방법의 차이를 비교하기 위해 129명의 정상인의 혈장을 대상으로 진단하였다. 129명의 정상인은 10대 26명, 20대 43명, 30대 33명, 40대 27명으로 구성되었다. 진단 결과, 본 발명의 재조합 말라리아 표면 항원을 이용한 IgM 포획 효소 면역학적 검사(IgM capture enzyme immunoassay)는 양성 진단 수치(cut-off)를 음성 시료 평균치에 0.05를 더한 값으로 정하여 판단할 경우, 정상인의 혈장시료 129개 중 129 개를 음성으로 판정하여 100% 특이도를 나타내었다. 반면에, 본 발명자들의 대한민국 특허출원 번호 제2000-12172호에서 사용된 항원 샌드위치 효소 면역학적 측정 방법은 동일한 혈장

에 대해 양성 진단 수치(cut-off)를 음성 시료 평균치에 0.05를 더한 값으로 정하여 판단할 경우, 정상인의 혈장시료 129개 중 127개를 음성으로 판정하여 98.4%의 특이도를 보였다. 특히 말라리아 유행시기 이후에 출생한 30대 이하의 경우 100% 특이도를 나타내었지만 말라리아 유행시기에 출생한 40대의 경우 27 개의 시료중 2개가 양성으로 판정되어 92.6%의 특이도를 나타내어 상대적으로 특정 연령층에서 특이도가 떨어지는 양상을 나타내었다(도 3 참조).

【발명의 효과】

<82> 본 발명의 말라리아 원충의 항원을 이용하여 혈액 내에 존재하는 말라리아 특이 IgM 을 검출하는 말라리아의 면역학적 측정방법, 진단시약 및 진단방법에 의하면, 말라리아 특이 IgM 만을 검출하기 때문에 현재의 말라리아 환자와 과거 병력자를 구분하여 말라리아를 진단할 수 있다.

<83> 따라서, 본 발명의 말라리아의 면역학적 측정방법, 진단시약 및 진단방법은 한국에서 발병하는 말라리아인 *플라스모듐 비박스(Plasmodium vivax)*처럼 혈액내 존재하는 원충수가 적어 항원 검사로는 진단이 어렵고, 또한 항원검사와는 달리 잠복기 상태에서도 진단이 가능하므로 잠복기 상태에서 재발가능성이 높은 말라리아를 진단하는데 매우 효과적으로 사용될 수 있다. 또한 본 발명의 말라리아의 면역학적 측정방법, 진단시약 및 진단방법은 말라리아를 조기에 진단하는 데에 유용하다. 더구나, 나이든 연령층 및 장기간 동안의 말라리아 유행 지역에서도 효과적으로 말라리아를 진단할 수 있다.

<84> 추가로, 본 발명의 말라리아 면역학적 측정방법 및 진단시약은 본 발명자들의 대한

민국 특허출원 번호 제2000-12172호에서 사용된 간접 효소 면역학적 측정방법 및 진단시약보다 크게 향상된 특이도 및 민감도를 지니며, 또한 항원 샌드위치 효소 면역학적 측정 방법 및 진단시약보다 향상된 특이도를 지닌다.

<85> 상기에서 본 발명은 기재된 구체예를 중심으로 상세히 설명되었지만, 본 발명의 범주 및 기술사상 범위 내에서 다양한 변형 및 수정이 가능함은 당업자에게 있어서 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속하는 것도 당연한 것이다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

말라리아 원충의 항원을 이용하여 혈액 내에 존재하는 말라리아 특이 IgM 을 검출하는 말라리아의 면역학적 측정방법.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 IgM을 검출하는 면역학적 측정방법이 IgM 포획 면역학적 측정방법(IgM capture immunoassay)인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 3】

제2항에 있어서, 상기 IgM을 검출하는 면역학적 측정방법이 IgM 포획 효소 면역학적 측정방법(IgM capture enzyme immunoassay)인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 4】

제1항에 있어서, 항-인간 IgM 항체를 사용하여 혈액 내에 존재하는 말라리아 특이 IgM 을 검출하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 5】

【청구항 9】

제8항에 있어서, 상기 PV200C 폴리펩타이드의 아미노산 서열은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열인 것을 특징으로 하는 면역학적 측정방법.

【청구항 9】

【청구항 10】

제1항에 있어서, 상기 말라리아 원충의 항원은 재조합 항원인 것을 특징으로 하는 면역학적 측정방법.

【청구항 11】

(i) 항-인간 IgM 항체를 고정체에 부착시키는 단계;

(ii) 상기 항체가 코팅된 고정체에 혈청 또는 혈장시료를 처리하여 IgM를 결합시키는 단계;

(iii) 상기에 표지항원 접합체를 첨가하여 고정체에 부착된 항체에 결합한 IgM 과 반응시키는 단계; 및

(iv) IgM 에 결합한 표지항원 접합체의 표지체를 이용하여 분석하는 단계

를 포함하는, IgM 포획 면역학적 측정방법.

【청구항 12】

제11항에 있어서, 상기 단계 (iii)의 표지항원 접합체의 항원은

는 말라리아 진단시약.

【청구항 17】

제16항에 있어서, 상기 항원은 상기 메로조이트 표면 단백질의 C-말단 부위에 존재하는 PV200C 폴리펩타이드의 전부 또는 일부인 것을 특징으로 하는 말라리아 진단시약.

【청구항 18】

제17항에 있어서, 상기 PV200C 폴리펩타이드의 아미노산 서열은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열인 것을 특징으로 하는 말라리아 진단시약.

【청구항 19】

항-인간 IgM 항체가 코팅된 고정체; 표지항원 접합체; 및 발색제를 함유한 기질용액을 포함하는 말라리아 진단시약.

【청구항 20】

제19항에 있어서, 상기 표지항원 접합체의 항원이 말라리아 원충 *플라스모듐 비박스*의 메로조이트 표면 단백질의 전부 또는 일부인 것을 특징으로 하는, 말라리아 진단시약.

【청구항 21】

제20항에 있어서, 상기 표지항원 접합체의 항원이 말라리아 원충

*플라스모듐 비박스*의 메로조이트 표면 단백질의 C-말단 부위의 전부 또는 일부인 것을 특징으로 하는, 말라리아 진단시약.

【청구항 22】

제19항에 있어서, 상기 표지항원 접합체의 표지체가 고추냉이 과산화효소(horseradish peroxidase), 염기성 포스파타아제(alkaline phosphatase), 콜로이드 골드, 형광물질 또는 색소 등을 포함하는, 말라리아 진단시약.

【청구항 23】

제19항에 있어서, 상기 기질 용액은 표지항원 접합체의 표지체와 반응하여 발색을 유발하는 발색제와 완충용액으로 구성되는, 말라리아 진단시약.

【청구항 24】

말라리아 원충의 항원을 이용하여 혈액 내에 존재하는 말라리아 특이 IgM 을 검출하는 단계를 포함하는 말라리아 환자의 진단방법.

【청구항 25】

제24항에 있어서, 항-인간 IgM 항체를 사용하여 혈액 내에 존재하는 말라리아 특이 IgM 을 검출하는 것을 특징으로 하는 말라리아 환자의 진단방법.

【청구항 26】

제24항에 있어서, 상기 말라리아 원충의 항원은 말라리아 원충의 표면 항원인 것을 특징으로 하는 말라리아 환자의 진단방법.

【청구항 27】

제24항에 있어서, 상기 말라리아 원충의 항원은 *플라스모듐 비박스(Plasmodium vivax)*의 메로조이트 표면 단백질(Merozoit surface protein)의 전부 또는 일부인 것을 특징으로 하는 말라리아 환자의 진단방법.

【청구항 28】

제27항에 있어서, 상기 말라리아 원충의 항원은 *플라스모듐 비박스(Plasmodium vivax)*의 메로조이트 표면 단백질의 C-말단 부위인 것을 특징으로 하는 말라리아 환자의 진단방법.

【청구항 29】

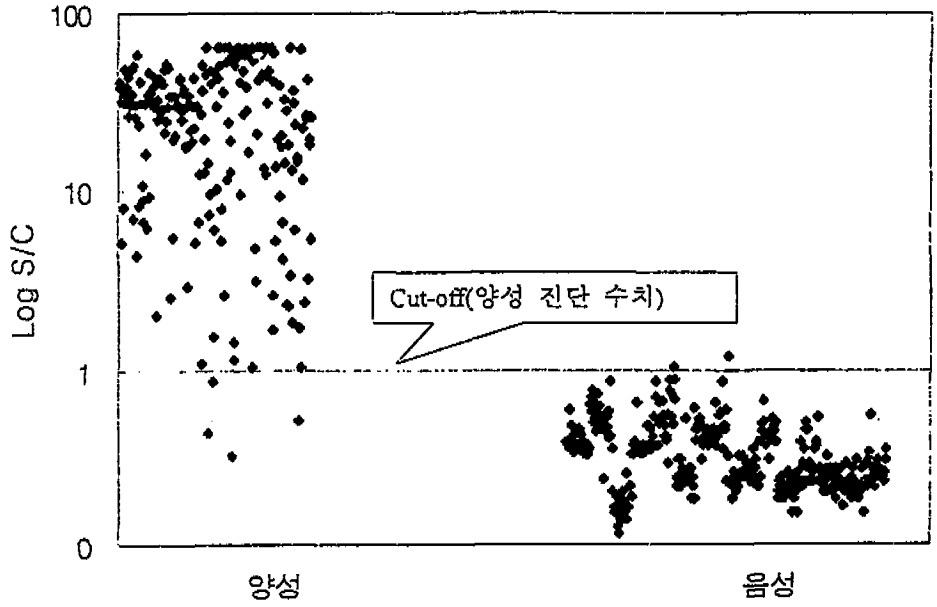
제28항에 있어서, 상기 항원은 상기 메로조이트 표면 단백질의 C-말단 부위에 존재하는 PV200C 폴리펩타이드의 전부 또는 일부인 것을 특징으로 하는 말라리아 환자의 진단방법.

【청구항 30】

제29항에 있어서, 상기 PV200C 폴리펩타이드의 아미노산 서열은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열인 것을 특징으로 하는 말라리아 환자의 진단방법.

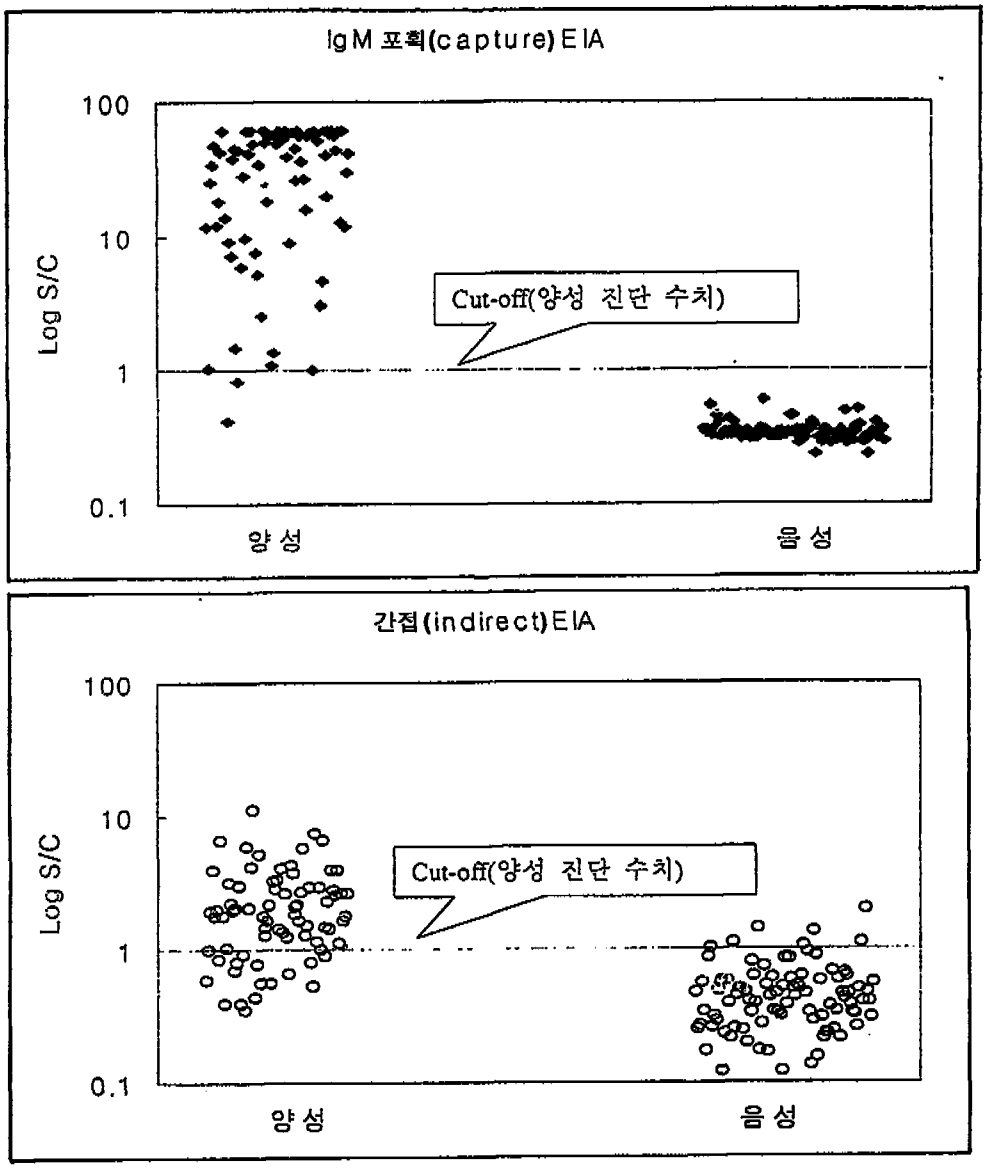
【도면】

【도 1】

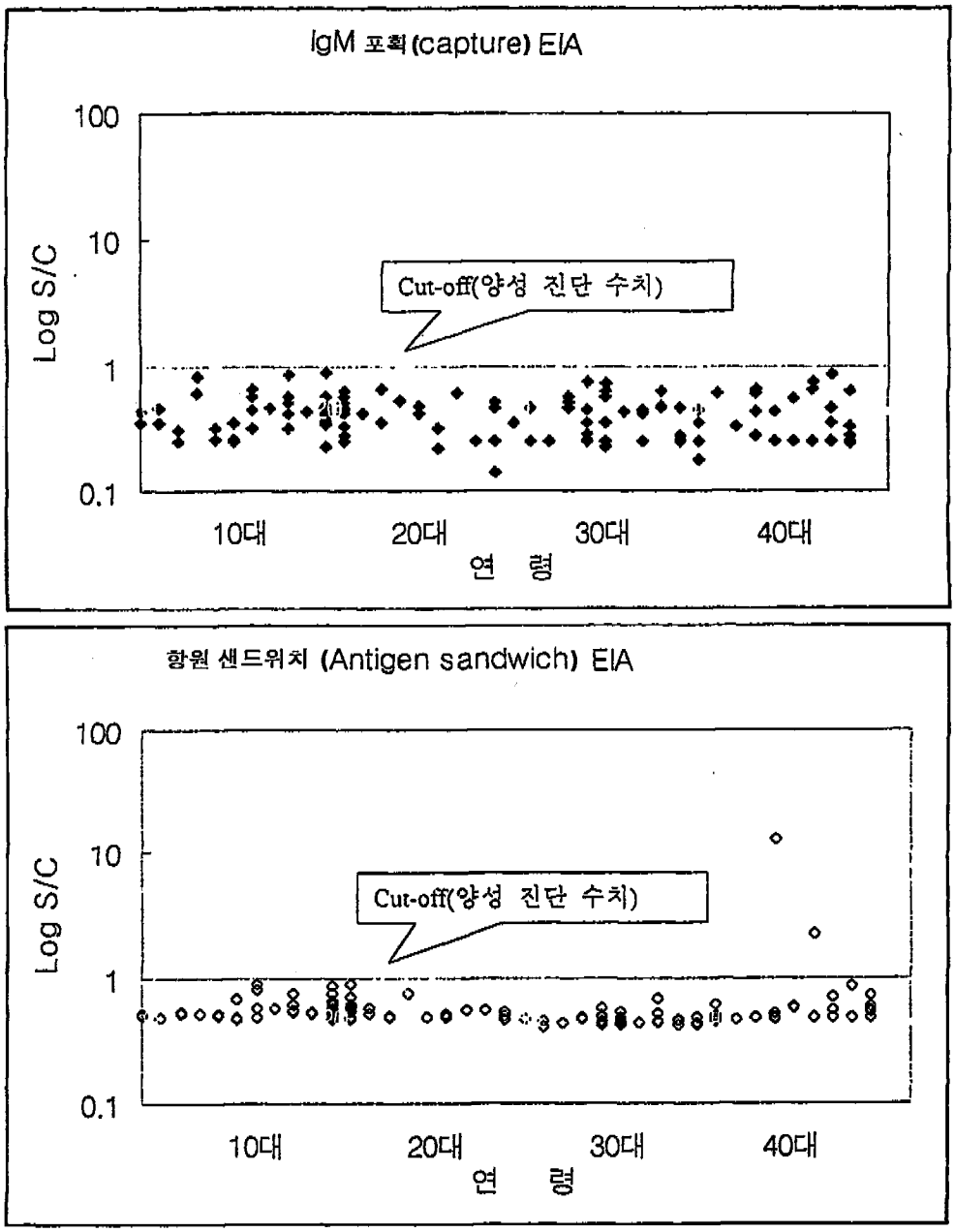


S/C(Specimen absorbance/cut-off ratio) : 시료 흡광도/양성 진단 수치 비

【도 2】


IgM 포획(capture) EIA
100
10
1
0.1
Log S/C
Cut-off(양성 진단 수치)
양성
음성
간접(indirect) EIA
100
10
1
0.1
Log S/C
Cut-off(양성 진단 수치)
양성
음성

【도 3】



【서열목록】

<110> LG CHEMICAL LTD. <120> IMMUNOASSAY, A DIAGNOSTIC REAGENT AND A DIAGNOSTIC METHOD FOR MAL ARIA BY DETECTION OF MALARIA-SPECIFIC IgM

<130> Pn007005 <150> KR 10-2000-0007648 <151> 2000-02-17

<160> 1 <170> KOPATIN 1.5 <210> 1 <211> 108

<212> PRT <213> Plasmodium vivax <400> 1 Asn Glu Ser Lys

Glu Ile Leu Ser Gln Leu Leu Asn Val Gln Thr Gln 1 5

10 15 Leu Leu Thr Met Ser Ser Glu His Thr Cys Ile Asp Thr Asn

Val Pro 20 25 30 Asp Asn Ala

Ala Cys Tyr Arg Tyr Leu Asp Gly Thr Glu Glu Trp Arg 35 40

45 Cys Leu Leu Thr Phe Lys Glu Glu Gly Gly Lys Cys Val Pro Ala Ser

50 55 60 Asn Val Thr Cys Lys Asp

Asn Asn Gly Gly Cys Ala Pro Glu Ala Glu 65 70 75

80 Cys Lys Met Thr Asp Ser Asn Lys Ile Val Cys Lys Cys Thr Lys Glu

85 90 95 Gly Ser Glu Pro Leu Phe Glu Gly Val

Phe Cys Ser 100 105

1020000045806 출력 일자: 2000/12/15

【서류명】 명세서 등 보정서
【수신처】 특허청장
【제출일자】 2000.11.30
【제출인】
【명칭】 주식회사 엘지화학
【출원인코드】 1-1998-001275-0
【사건과의 관계】 출원인
【대리인】
【성명】 신영무
【대리인코드】 9-1998-000265-6
【포괄위임등록번호】 1999-067126-3
【대리인】
【성명】 최승민
【대리인코드】 9-1998-000560-9
【포괄위임등록번호】 1999-067124-9
【대리인】
【성명】 조인제
【대리인코드】 9-1999-000606-6
【포괄위임등록번호】 1999-067127-1
【사건의 표시】
【출원번호】 10-2000-0045806
【출원일자】 2000.08.08
【심사청구일자】 2000.08.08
【발명의 명칭】 말라리아 특이 면역글로불린 엠의 검출에 의한 말라리아의 면 역학적 측정방법, 진단시약 및 진단방법
【제출원인】
【접수번호】 1-1-00-0166020-43
【접수일자】 2000.08.08
【보정할 서류】 명세서등
【보정할 사항】
【보정대상 항목】 별지와 같음
【보정방법】 별지와 같음
【보정내용】 별지와 같음

+15
114

1020000045806 출력 일자: 2000/12/15

【취지】 특허법시행규칙 제13조의 규정에 의하여 위와 같이 제출합니다. 대리인
신영무 (인) 대리인
최승민 (인) 대리인
조인제 (인)

【수수료】

【보정료】	0 원
【추가심사청구료】	0 원
【기타 수수료】	0 원
【합계】	0 원

【첨부서류】 1. 기타첨부서류_1통[명세서]

【보정대상항목】 요약

【보정방법】 정정

【보정내용】

본 발명은 말라리아를 혈청학적으로 진단하기 위한 면역학적 측정방법, 진단시약 및 진단방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 말라리아 원충 항원에 대한 IgM 를 검출하는 말라리아의 면역학적 측정방법, 진단시약 및 진단방법에 관한 것이다. 본 발명의 말라리아의 면역학적 측정방법, 진단시약 및 진단방법은 혈액내 말라리아 특이 IgM를 검출하는 것을 이용하여 말라리아를 조기에 진단하는 데에 유용하며, 현재의 말라리아 환자와 과거 병력자를 구별하여 말라리아를 진단하는 데에 유용하게 사용될 수 있다.

【보정대상항목】 식별번호 4

【보정방법】 정정

【보정내용】

본 발명은 말라리아의 혈청학적인 측정방법, 진단시약 및 진단방법에 관한 것으로서, 상세하게는 혈장 혹은 혈청내의 말라리아 원충 항원에 대한 IgM 을 검출하는 말라리아의 면역학적 측정방법, 말라리아 진단시약 및 진단방법에 관한 것이다.

【보정대상항목】 식별번호 5

【보정방법】 정정

【보정내용】

말라리아는 모기를 매개로 하여 말라리아의 원충이 인간의 적혈구 내에 감염되어 발생하는 질병으로 전 세계 10 억명의 인구가 말라리아 위험지역에 거주하고 있으며, 매

년 5 억명 이상이 말라리아에 감염되고 2 백만명 이상이 목숨을 잃는 질병 중의 하나이다. 말라리아는 전세계적인 분포를 보이고 있으나 일부 지역에서는 효과적인 방제로 인하여 1960년대 이후 발생이 중지되거나 감소되었다. 그러나 최근의 엘리뇨 현상과 같은 이상 기온 및 약제 내성 균주의 증가, 살충제에 대한 저항성 증가 등으로 인해 전 세계적으로 다시 확산되고 있는 추세이다.

【보정대상항목】 식별번호 6

【보정방법】 정정

【보정내용】

말라리아는 크게 아프리카형, 중남미를 중심으로 한 아메리카형 및 인도와 동남아시아를 중심으로 한 아시아형으로 나누어지는데, 각각은 지리적 분포에 있어서의 차이뿐만 아니라 원충이 나타내는 종적 특성과 유전적 성향에 있어서도 크게 다르다.

【보정대상항목】 식별번호 7

【보정방법】 정정

【보정내용】

말라리아의 생활사는 사람 숙주 내에서의 생활사인 분열생식기(Schizogony)와 모기 숙주 내에서의 생활사인 포자기(Sporogony)로 나누어지는데, 처음에 모기가 사람을 물면 말라리아 포자낭충이 감염되어 사람의 혈관을 따라 간으로 이동한 후 간세포에서 증식을 실시하거나 휴면 상태로 존재하다가 일정한 기간이 지나면 혈중으로 나오게 되어 본격적인 증식을 하게 된다. 말라리아 포자낭충은 혈중 적혈구 내에서 영양체인 고리형에서 증식형으로 존재하다가, 분열체 과정을 거치면서 형성된 분열체가 수십개의 분열소체를

방출하게 되고 이 분열소체들이 각각의 적혈구에 들어가 동일한 생식주기를 반복한다. 이중 일부가 생식모세포 형태로 존재하는데, 모기가 이런 상태의 사람을 흡혈하면 상기의 생식모세포가 모기로 감염되어증식하고 다시 모기의 증식과정을 통해 위와 침샘에 존재하다가 사람에게 감염되는 과정을 반복하게 된다.

【보정대상항목】 식별번호 8

【보정방법】 정정

【보정내용】

말라리아의 치료에는 클로로퀴인(chloroquine), 프리마퀴인(Primaquine) 등의 항생제가 사용되어 왔으나, 최근에 이러한 항생제들에 대해 저항성을 갖는 말라리아의 출현으로 그 치료에 어려움을 겪고 있다.

【보정대상항목】 식별번호 9

【보정방법】 정정

【보정내용】

말라리아의 진단에는 혈액 도말법이 가장 많이 사용되고 있는데, 이는 말라리아가 감염된 혈구를 염색하여 현미경으로 관찰하는 고전적인 방법이다. 그러나 이 방법은 시간이 많이 걸리고 검사자의 전문 교육이 필요하다는 단점을 갖고 있다. 최근 말라리아 항원을 검사하는 시약이 시판되고 있기는 하나, 민감도가 낮은 이유로 혈액 도말법과 동시에 사용할 것을 권하고 있다. 말라리아 유전자를 검사하는 또 다른 방법으로는 PCR(polymerase chain reaction) 방법이 있는데, 이는 민감도는 높지만 아직 실험실에서만 행해지고 있는 실정이다.

1020000045806 출력 일자: 2000/12/15

【보정대상항목】 식별번호 10

【보정방법】 정정

【보정내용】

한국에서 말라리아는 학질이라는 명칭의 질병으로 오래 전부터 알려져 왔는데, 1960 년대부터 시작된 말라리아 박멸사업으로 인해 1970 년대에 들어서는 말라리아의 발병이 거의 보고되지 않았다. 그러나, 최근 1993년에 휴전선 부근에서 환자가 발생한 이후 급속히 확산되어 1998년에는 말라리아 환자수가 3800 명으로 보고되고 있다.

【보정대상항목】 식별번호 11

【보정방법】 정정

【보정내용】

말라리아 포자낭충에는 *플라스모듐 비박스(Plasmodium vivax), 플라스모듐 팔시파룸(Plasmodium falciparum), 플라스모듐 말라리아(Plasmodium malariae), 플라스모듐 오발(Plasmodium ovale)* 등 4 종류가 알려져 있다. 그 가운데 한국에서 발병하는 말라리아는 *플라스모듐 비박스(Plasmodium vivax)*에 의한 것인데, 이는 잠복기가 길고 혈액 내에 존재하는 원충의 수가 적어 그 진단이 어려운 것이 특징이다. 현재, 외국에서 수입되고 있는 말라리아 진단시약은 말라리아의 젖산 탈수소효소(Lactate Dehydrogenase) 등의 항원을 검출하는 방식으로, 그 민감도가 50% 수준에 머물러 있어 상기와 같이 잠복기가 길고 혈액 내에 존재하는 항원 및 원충수가 적은 한국형 말라리아의 진단에는 어려움이 있다.

【보정대상항목】 식별번호 12

【보정방법】 삭제

【보정대상항목】 식별번호 17

【보정방법】 정정

【보정내용】

상기 목적을 달성하기 위해서, 본 발명자들은 말라리아 환자의 혈액 내에 존재하는 말라리아 원충에 대한 특이 항체중 말라리아에 대한 IgM 만을 검출하는 방식으로 말라리아를 진단하는 면역학적 측정방법을 개발하였다. 본 발명자들은 최근에 말라리아 항체를 검출하는 방법으로 삼일열 말라리아를 비롯한 말라리아를 진단하는 방법을 발명하여 출원하였었다. 이 방법은 말라리아 항원을 이용하여 말라리아 항체를 검출하는 방법으로 종래 기술에 비해 높은 민감도로 말라리아 환자 혹은 과거 병력자를 검출할 수 있다. 그러나 말라리아 항체중 IgG는 말라리아 경험후 수년간 혹은 수십년간 지속될 수 있기 때문에 장기간 말라리아가 유행한 지역에서 말라리아 항체검사에서 IgG를 포함하는 식으로 검사하는 방법은 많은 양성 반응을 가져와 혼돈을 야기시킬 수 있다. 본 발명자들이 항원 샌드위치 면역학적 측정방법으로 실험한 결과 말라리아 환자가 아닌 정상인의 경우 10~30세에서는 말라리아 항체 양성 반응이 거의 없었으나 40대 이후에서는 양성 반응이 5% 이상 나타났다. 이것은 40세 이상의 연령에서는 말라리아가 유행하였던 1960년대 이전에 말라리아 모기에 노출되었을 가능성이 크므로 상대적으로 높은 IgG 양성율을 나타내는 것으로 추측된다. 마찬가지로 말라리아가 유행하는 지역에서도 말라리아에

감염된 후 완치된 사람의 체내에는 아직 말라리아 특이 IgG가 남아있어 말라리아 항체 검사에서 상대적으로 높은 양성율을 나타내게 될 것이고 말라리아를 진단하기 위한 말라리아 항체 검사의 효용성이 그만큼 떨어질 것이다. 따라서 40세 이상의 연령이나 말라리아 유행 지역에서 말라리아를 진단하기 위해서는 말라리아 치료 후에도 계속적으로 역가가 남아있는 IgG 보다 치료후 일정기간이 경과하면 역가가 사라지는 IgM을 검사하는 방법이 더 효과적이라고 할 수 있을 것이다.

【보정대상항목】 식별번호 18

【보정방법】 정정

【보정내용】

본 발명은 말라리아 원충의 항원을 이용하여 혈액 내에 존재하는 말라리아 특이 IgM 을 검출하는 말라리아의 면역학적 측정방법을 제공한다. 한 구체예로서 본 발명은, 고정체에 항-인간 IgM 항체를 사용하는 IgM 포획 면역학적 측정방법(IgM capture immunoassay)을 제공한다. 본 발명의 말라리아 측정 방법은 종래 기술의 특정 항원을 측정하는 방법에 비하여 민감도가 높아 말라리아 환자의 조기진단이 가능하며, 또한 과거에 말라리아에 감염되었으나 치유된 정상인을 환자와 구분할 수 있는 특징을 가지고 있다. 장기간 말라리아 유행지역에서 말라리아 경험이 있었던 과거 병력자도 모두 양성으로 검사되는 말라리아 원충의 표면 항원을 이용하여 혈액내에 존재하는 말라리아 특이 항체를 검출하는 말라리아의 면역학적 측정방법 및 진단시약과는 달리, 본 발명의 방법 및 진단시약에 의하면 말라리아 환자와 과거 병력자를 구분할 수 있으며, 하기 비교실시예 1에 기재된 간접 효소 면역학적 측정에 의한 항체 검사 방법보다 크게 향상된 특이도와 민감도를 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

【보정대상항목】 식별번호 19

【보정방법】 정정

【보정내용】

본 발명은 말라리아 원충의 항원을 이용하여 혈액 내에 존재하는 말라리아 특이 IgM 을 검출하는 말라리아의 면역학적 측정방법을 제공한다. 바람직하게는, 본 발명은 말라리아 특이 IgM을 검출하는 IgM 포획 면역학적 측정방법(IgM capture immunoassay)을 제공한다. 바람직하게는, 본 발명은 IgM 포획 효소 면역학적 측정방법을 제공한다. 바람직하게는, 본 발명은 항-인간 IgM 항체를 사용하여 혈액 내에 존재하는 말라리아 특이 IgM 을 검출하는 말라리아의 면역학적 측정방법을 제공한다.

【보정대상항목】 식별번호 25

【보정방법】 정정

【보정내용】

본 발명은 말라리아 원충의 항원을 포함하며 혈액 내에 존재하는 말라리아 특이 IgM 을 검출하는, 말라리아 진단 시약을 제공한다. 바람직하게는, 항-인간 IgM 항체가 코팅된 고정체; 표지항원 접합체; 및 발색제를 함유한 기질용액을 포함하는 말라리아 진단시약을 제공한다. 상기 표지항원 접합체의 바람직한 예는 재조합 형질전환체로부터 생산된 말라리아 표면항원에 효소표지체를 부착시킨 것이다.

【보정대상항목】 식별번호 26

【보정방법】 정정

【보정내용】

또한 본 발명은 말라리아 원충의 항원을 이용하여 혈액 내에 존재하는 말라리아 특이 IgM을 검출하는 단계를 포함하는 말라리아 환자의 진단방법을 제공한다.

【보정대상항목】 식별번호 27

【보정방법】 정정

【보정내용】

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

【보정대상항목】 식별번호 28

【보정방법】 정정

【보정내용】

본 발명은 말라리아 원충의 항원을 이용하여 혈액 내에 존재하는 말라리아 특이 IgM 을 검출하는 말라리아의 면역학적 측정방법을 제공한다. 상기 방법에 있어서, 상기 말라리아 원충의 항원으로서 바람직하게는 말라리아 원충의 표면 항원을 이용한다. 또한 상기 방법에 있어서, 상기 말라리아 원충의 항원으로서 바람직하게는 재조합 항원을 이용한다.

【보정대상항목】 식별번호 29

【보정방법】 정정

【보정내용】

항원-항체반응을 이용하여 혈액 내에 존재하는 말라리아 특이 IgM 을 검출하기 위하여, 본 발명은 말라리아 원충의 항원으로서 바람직하게는 *플라스모듐 비박스(Plasmodium vivax)*의 메로조이트 표면 단백질(Merozoit surface protein:이하 MSP로 약칭함)의 전부 또는 일부를 이용하여 혈액 내에 존재하는 말라리아 특이 IgM 을 검출하는 말라리아의 면역학적 측정방법을 제공하며, 더 바람직하게는 *플라스모듐 비박스(Plasmodium vivax)*의 메로조이트 표면 단백질(MSP)의 C-말단 부위를 이용하여 혈액 내에 존재하는 말라리아 특이 IgM 을 검출하는 말라리아의 면역학적 측정방법을 제공한다. 상기 C-말단 부위는 삼일열 말라리아 원충의 아종들 사이에 공통적으로 존재하는 아미노산 서열을 포함하고 있으며, 특히 서열번호 1로 기재되고 삼일열 말라리아 원충의 아종들 사이에서도 100% 상동성을 보이는 108 개의 아미노산으로 이루어지는 폴리펩타이드(이하 'PV200C'라 약칭함)를 포함한다.

【보정대상항목】 식별번호 30

【보정방법】 정정

【보정내용】

본 발명은 바람직하게는 *플라스모듐 비박스(Plasmodium vivax)*의 메로조이트 표면 단백질(Merozoit surface protein)의 전부 또는 일부를 이용하여 혈액 내에 존재하는 말라리아 특이 IgM 을 검출하는 말라리아의 면역학적 측정방법을 제공하며, 더 바람직하게

는 *플라스모듐 비박스*의 메로조이트 표면 단백질(MSP)의 C-말단 부위를 이용하여 혈액 내에 존재하는 말라리아 특이 IgM 을 검출하는 말라리아의 면역학적 측정방법을 제공한다. 또한 본 발명은 바람직하게는 *플라스모듐 비박스*의 메로조이트 표면 단백질(MSP)의 C-말단 부위에 존재하는 PV200C 폴리펩타이드의 전부 또는 일부를 이용하여 혈액 내에 존재하는 말라리아 특이 IgM 을 검출하는 말라리아의 면역학적 측정방법을 제공하며, 더 바람직하게는 상기 PV200C 폴리펩타이드의 아미노산 서열이 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 이용하여 혈액 내에 존재하는 말라리아 특이 IgM 을 검출하는 말라리아의 면역학적 측정방법을 제공한다. 상기 단백질은 재조합 형질전환체로부터 대량발현시켜 얻을 수 있으며, 본 발명자들은 PV200C 폴리펩타이드를 발현시키는 효모 형질전환체 및 대장균 형질전환체를 제작하여 1999년 12월 18일자로 생명공학연구소 유전자은행에 기탁하였다(수탁번호 : KCTC 8977P, KCTC 8976P). 본 발명은 바람직하게는 상기 재조합 형질전환체로부터 발현시켜 분리 및 정제된 말라리아 표면항원 PV200C를 99% 이상의 고순도로 분리하여 말라리아를 진단하기 위한 측정방법 및 진단시약에 제공한다.

【보정대상항목】 식별번호 31

【보정방법】 정정

【보정내용】

본 발명은 말라리아 원충의 항원을 이용하여 혈액 내에 존재하는 말라리아 특이 IgM 을 검출하는 말라리아의 면역학적 측정방법을 제공한다. 상기 방법에 있어서 상기 IgM을 검출하는 면역학적 측정방법으로서 바람직하게는 IgM 포획 면역학적 측정방법(IgM capture immunoassay)을 제공하며, 더 바람직하게는 IgM 포획 효소 면역학적 측정방법(IgM capture enzyme immunoassay)을 제공한다. 상기 방법에 있어서, 본 발명은 바람직

하게는 항-인간 IgM 항체를 사용하여 혈액 내에 존재하는 말라리아 특이 IgM 을 검출하는 말라리아의 면역학적 측정방법을 제공한다.

【보정대상항목】 식별번호 32

【보정방법】 정정

【보정내용】

이를 위하여, 본 발명은 말라리아의 진단을 위해 사용될 고정체로서 바람직하게는 염소 유래의 항-인간 IgM 항체를 코팅한 96-웰 플레이트를 제공한다. 또한, 본 발명은 말라리아 특이 IgM 을 검출하기 위하여 말라리아 원충의 항원과 표지체를 결합시킨 표지항원 접합체를 제공한다. 본 발명의 표지항원 접합체는 항원과 표지체로 구성되며, 상기 항원은 바람직하게는 말라리아 특이 IgM 을 검출하기 위하여 형질전환된 효모나 대장균에서 정제한 재조합 말라리아 표면항원이다. 상기 표지항원 접합체의 표지체의 예로서는 고추냉이 과산화효소(horseradish peroxidase, 이하 'HRP'로 약칭함) 및 염기성 포스파타아제(alkaline phosphatase)와 같은 효소, 콜로이드 골드(colloidal gold), 형광물질(fluorescein) 및 색소(dye) 등을 들 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니며, 바람직하게는 효소, 더 바람직하게는 고추냉이 과산화효소(HRP)이다.

【보정대상항목】 식별번호 33

【보정방법】 정정

【보정내용】

본 발명의 말라리아 특이 IgM 의 검출을 위한 IgM 포획 면역학적 측정방법(IgM capture immunoassay)의 바람직한 예는, (i) 항-인간 IgM 항체를 고정체에 부착시키는

단계; (ii) 상기 항체가 코팅된 고정체에 혈청 또는 혈장 시료를 처리하여 IgM를 결합시키는 단계; (iii) 상기에 표지항원 접합체를 첨가하여 고정체에 부착된 항체에 결합한 IgM 과 반응시키는 단계; 및 (iv) IgM 에 결합한 표지항원 접합체의 표지체를 이용하여 분석하는 단계를 포함한다. 더 바람직하게는, 상기 IgM 포획 면역학적 측정방법에서 상기 단계 (iii)의 표지항원 접합체의 항원으로서 말라리아 원충의 표면 항원을 사용한다. 더욱 더 바람직하게는 상기 IgM 포획 면역학적 측정방법에서 상기 단계 (iii)의 표지항원 접합체의 항원으로서 *플라스모듐 비박스*(*Plasmodium vivax*)의 메로조이트 표면 단백질(Merozoit surface protein)의 C-말단 부위의 전부 또는 일부를 사용한다.

【보정대상항목】 식별번호 41

【보정방법】 정정

【보정내용】

바람직한 구체예로서, 본 발명의 말라리아의 면역학적 측정방법은 염소유래 항-인간 IgM 항체가 코팅된 고정체를 제공하며, 삼일열 말라리아 원충의 항원 단백질을 코딩하는 유전자를 삽입하여 제작한 발현벡터에 의해 형질전환된 재조합 효모 또는 재조합 대장균으로부터 발현시켜 정제한 항원 단백질을 하기 실시예 1에 기재된 방법으로 HRP와 접합시킨 효소표지항원 접합체를 제공한다. 상기 염소유래 항-인간 IgM 항체가 코팅된 고정체에 말라리아 감염여부를 알고자 하는 사람의 혈청이나 혈장을 첨가하면 혈청이나 혈장 내에 존재하는 인간 IgM 은 웰에 코팅된 항-인간 IgM 항체에 결합되게 된다. 여기에 말라리아 표면항원과 HRP의 접합체를 첨가하면, 접합체는 웰에 코팅된 항-인간 IgM 항체에 결합한 IgM 중 말라리아 환자의 IgM 을 인식하여 결합한다. 이와 같이 결합한 접합체의 HRP는 기질용액 내 발색제를 분해하여 발색을 유도하게 되고 그 흡광도를 측정

함으로써 간접적으로 시료혈장내 IgM의 존재 유무와 항체량을 검출하여 말라리아의 감염 여부를 진단한다. 본 발명의 상기 측정방법을 이용하여 말라리아 환자의 혈장과 정상인의 혈장을 대상으로 말라리아를 진단한 결과, 98% 이상의 민감도와 99% 이상의 특이도를 나타내었으며, 특히 과거 말라리아에 감염되어 말라리아에 대한 IgG를 보유하고 있을 것으로 추정되는 40대 이상의 정상인의 혈장에 대해서는 모두 음성으로 처리되었다. 즉, 본 발명의 말라리아의 면역학적 측정방법은 하기 비교실시예 2에 기재된 항원 샌드위치 효소 면역학적 측정방법보다 개선된 특이도를 보여주었으며, 하기 비교실시예 1에 기재된 간접 효소 면역학적 측정방법에 비해 민감도 및 특이도가 크게 개선되었다.

【보정대상항목】 식별번호 42

【보정방법】 정정

【보정내용】

또한 본 발명은 말라리아 원충의 항원을 포함하며 혈액 내에 존재하는 말라리아 특이 IgM 을 검출하는, 말라리아 진단 시약을 제공한다.

【보정대상항목】 식별번호 43

【보정방법】 정정

【보정내용】

본 발명의 말라리아 진단시약에 사용되는 항-인간 IgM 항체의 예로는 염소 유래의 항-인간 IgM 항체를 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 항-인간 IgM 항체는 바람직하게는 IgM의 mu 사슬에 특이적인 것으로 항원-항체의 친화력에 의해 정제되고 IgG 나 기타 다른 면역 글로불린과 교차 반응이 없는 것을 사용한다.

【보정대상항목】 식별번호 44

【보정방법】 정정

【보정내용】

본 발명은 말라리아 원충의 항원을 포함하며 혈액 내에 존재하는 말라리아 특이 IgM 을 검출하는, 말라리아 진단 시약을 제공한다. 바람직하게는 본 발명은 말라리아 원충의 표면 항원을 포함하며 혈액 내에 존재하는 말라리아 특이 IgM 을 검출하는, 말라리아 진단 시약을 제공한다. 본 발명의 상기 말라리아 진단시약에서 상기 말라리아 원충의 항원으로서 바람직하게는 *플라스모듐 비박스*(*Plasmodium vivax*)의 메로조이트 표면 단백질(Merozoit surface protein)의 전부 또는 일부를 이용하며 더 바람직하게는 *플라스모듐 비박스*의 메로조이트 표면 단백질의 C-말단 부위를 이용한다. 또한 본 발명의 상기 말라리아 진단시약에서 상기 말라리아 원충의 항원으로서 바람직하게는 *플라스모듐 비박스*의 메로조이트 표면 단백질의 C-말단 부위에 존재하는 PV200C 폴리펩타이드의 전부 또는 일부를 이용하고, 더 바람직하게는 상기 PV200C 폴리펩타이드의 아미노산 서열이 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열인 것을 이용한다.

또한 바람직한 구체예로서 본 발명은 항-인간 IgM 항체가 코팅된 고정체; 표지항원 접합체; 및 발색제를 함유하는 기질용액을 포함하는, 말라리아 진단시약을 제공한다. 상기 말라리아 진단시약에서 표지항원 접합체의 항원으로서 바람직하게는 말라리아 원충 *플라스모듐 비박스*의 메로조이트 표면 단백질의 전부 또는 일부를 이용하며, 더 바람직하게는 말라리아 원충 *플라스모듐 비박스*의 메로조이트 표면 단백질의 C-말단 부위의 전부 또는 일부를 이용한다.

1020000045806 출력 일자: 2000/12/15

【보정대상항목】 식별번호 45

【보정방법】 정정

【보정내용】

상기 본 발명의 말라리아 진단시약에 사용되는 표지항원 접합체의 표지체의 예로서는 고추냉이 과산화효소(HRP), 염기성 포스파타아제(alkaline phosphatase), 콜로이드 골드(colloidal gold), 형광물질(fluorescein) 및 색소(dye) 등을 들 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명에서 바람직한 표지체로서 고추냉이 과산화효소(HRP)를 사용한다.

【보정대상항목】 식별번호 46

【보정방법】 정정

【보정내용】

또한, 상기 본 발명의 말라리아 진단시약은 표지항원 접합체의 표지체와 반응하여 발색반응이 유도되는 기질 용액을 포함하는데, 바람직하게는 표지항원 접합체의 표지체와 반응하여 발색을 유발하는 발색제와 완충용액으로 구성된 기질 용액을 사용한다. 상기 발색제의 예로서는 테트라메틸벤지딘(tetramethylbenzidine) 등이 있다. 상기 기질용액내 테트라메틸벤지딘과 같은 발색제는 표지항원 접합체의 바람직한 표지체로 사용된 고추냉이 과산화효소(HRP)에 의하여 분해되어 발색반응이 유도되고 그 발색정도를 흡광도로 측정함으로써 IgM 의 존재 유무 및 항체량을 검출한다.

【보정대상항목】 식별번호 47

【보정방법】 정정

【보정내용】

또한 본 발명은 말라리아 원충의 항원을 이용하여 혈액 내에 존재하는 말라리아 특이 IgM 을 검출하는 단계를 포함하는 말라리아 환자의 진단방법을 제공한다. 상기 진단방법에 있어서, 바람직하게는 항-인간 IgM 항체를 사용하여 혈액 내에 존재하는 말라리아 특이 IgM 을 검출하는 말라리아 환자의 진단방법을 제공한다. 상기 진단방법에 있어서, 말라리아 원충의 항원으로서 바람직하게는 말라리아 원충의 표면 항원을 이용하며, 더 바람직하게는 *플라스모듐 비박스*의 메로조이트 표면 단백질(Merozoit surface protein)의 전부 또는 일부를 이용한다. 또한 상기 진단방법에 있어서, 상기 말라리아 원충의 항원으로서 바람직하게는 *플라스모듐 비박스*(*Plasmodium vivax*)의 메로조이트 표면 단백질의 C-말단 부위를 이용하며, 더 바람직하게는 *플라스모듐 비박스*의 메로조이트 표면 단백질(Merozoit surface protein)의 C-말단 부위에 존재하는 PV200C 폴리펩타이드의 전부 또는 일부를 이용하고, 더욱더 바람직하게는 상기 PV200C 폴리펩타이드의 아미노산 서열이 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열인 것을 이용한다.

【보정대상항목】 식별번호 74

【보정방법】 정정

【보정내용】

본 발명의 구체예에서는 IgM 포획 면역학적 측정방법을 통해 말라리아를 진단하기 위하여, 염소유래 항-인간 IgM 항체를 고정체에 코팅하여 사용하였다. 또한 형질전환된

효모나 대장균으로부터 정제한 재조합 표면항원을 고추냉이 과산화효소(HRP)와 접합시켜 만든 효소표지항원 접합체를 사용하였다(상기 실시예 1의 방법 참조).

【보정대상항목】 식별번호 75

【보정방법】 정정

【보정내용】

비교를 위한, 본 발명자들의 간접 효소 면역학적 측정방법의 바람직한 구체예는 다음과 같다. 우선, 96-웰 플레이트(Nunc)에 제조예 1 또는 제조예 2에서 분리 및 정제된 말라리아의 재조합 표면항원 용액을 0.5 ㎍/㎖ 의 농도로 0.1 M 탄산염 완충용액(pH 9.5)에 희석하여 100 ㎕씩 분주한 후 웰에 분주된 항원이 웰 플레이트에 부착되도록 플레이트를 밀봉하여 4℃ 에서 18시간동안 방치하였다. 웰 플레이트에 부착되지 않고 남아 있는 표면항원은 5% 일반 염소 혈청(Goat serum)을 함유한 인산염 완충용액을 웰당 300 ㎕씩 분주한 후 4℃ 에서 18 시간 동안 방치하여 제거하였다. 웰에 남은 용액을 제거하고 상온에서 1 시간동안 방치하여 수분을 건조시킨 후 제습제와 함께 밀봉용기에 넣어 4℃ 저온 냉장고에서 보관하였다. 상기와 같이 제작된 말라리아의 재조합 표면항원이 코팅된 96-웰 플레이트의 각 웰에 NaOH(1.15 mg/㎖), KH2PO4(0.2 mg/㎖), KCl(0.2 mg/㎖), NaCl(8 mg/㎖), 소혈청(300 ㎕/㎖) 및 치메로살(0.2 mg/㎖) 등을 포함하는 시료 희석액 100 ㎕를 첨가하고 항체 음성 혈장시료와 항체 양성 혈장시료를 각각 10 ㎕씩 첨가하여 잘 혼합한 후, 37℃의 반응기에 넣고 60분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 0.05% 트윈 20(Tween 20)을 함유한 인산염 완충용액(300 ㎕)을 사용하여 웰 플레이트를 5 회에 걸쳐 세척하였다. HRP가 접합된 염소 유래의 항-인간 IgG 항체(Cappel) 및 항-인간 IgM 항체(Bethyl)는 Tris(10 mM), NaCl(0.5M), CaCl

$_2$(1mM), 글리세롤(0.5%), 소혈청(0.2 ㎖/㎖), 염소혈청(100 ㎕/㎖), 트윈 20(0.05%), 치메로살(0.2 ㎎/㎖) 및 페놀레드(50 ㎍/㎖)를 포함하는 희석액을 사용하여 1 : 40,000의 비율로 각각 희석한 후 희석된 접합체 100㎕씩을 상기 웰에 첨가하여 37℃에서 60분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 웰 플레이트를 0.05% 트윈 20/인산염 완충용액으로 5회 세척하고, 테트라메틸벤지딘(tetrametylbenzidine) 100 ㎍/㎖, 과산화수소(hydrogen peroxide) 0.006% 및 구연산 인산염 완충용액(pH 4.5)을 포함하는 기질용액을 100 ㎕ 씩 첨가하여 30 분간 암소에서 발색시켰다. 적당하게 발색이 이루어진 후 반응정지액(2N 황산용액) 100 ㎕를 각 웰에 첨가하여 발색반응을 종결시킨 후 96 웰 플레이트 판독기(Molecular Devices)로 650 ㎚를 보조(reference) 파장으로 하여 450 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. 기질용액 내 발색제인 테트라메틸 벤지딘은 항-인간 IgG 항체 및 항-인간 IgM 항체에 결합된 HRP 에 의해 분해되어 발색반응을 일으키고, 그 발색정도를 흡광도로 측정함으로써 말라리아 특이 항체의 존재 유무 및 항체량을 검출하였다.

【보정대상항목】 식별번호 76

【보정방법】 정정

【보정내용】

본 발명에서 사용한 방법과 상기에 기재된 간접 효소 면역학적 측정방법의 차이를 비교하기 위해 75개의 말라리아 양성시료(말라리아 환자의 혈장)와 92 개의 음성시료(정상인의 혈장)를 대상으로 말라리아를 진단하였다. 그 결과, 본 발명의 재조합 말라리아 표면항원을 이용한 IgM 포획 효소 면역학적 검사(IgM capture enzyme immunoassay)는 양성 진단 수치(cut-off)를 음성 시료 평균치에 0.05를 더한 값으로 정하여 판단할 경우, 말라리아 환자의 혈장시료 75개 중 73개를 양성으로 판정하였고 정상인의 혈장시료 92

개 중 92개를 음성으로 판정하여 97.3%의 민감도와 100%의 특이도를 보였다.

【보정대상항목】 식별번호 77

【보정방법】 정정

【보정내용】

이에 비해 상기에 기재된 간접 효소 면역학적 측정 방법은 동일한 혈장에 대해서, 양성 진단 수치(cut-off)를 음성 시료 평균치에 0.2를 더한 값으로 정하여 판단할 경우, 말라리아 환자의 혈장시료 75개중 59개를 양성으로 판정하였고 정상인의 혈장시료 92개 중 85개를 음성으로 판정하여 78.6%의 민감도와 92.4%의 특이도를 보였다(도 2 참조).

【보정대상항목】 식별번호 79

【보정방법】 정정

【보정내용】

본 발명의 구체예에서는 IgM 포획 면역학적 측정방법을 통해 말라리아를 진단하기 위하여, 염소유래 항-인간 IgM 항체를 고정체에 코팅하여 사용하였으며 형질전환된 효모나 대장균으로부터 정제한 재조합 표면항원을 고추냉이 과산화효소(HRP)와 접합시켜 만든 효소표지항원 접합체를 사용하였다(상기 실시예 1의 방법 참조).

【보정대상항목】 식별번호 80

【보정방법】 정정

【보정내용】

비교를 위한, 본 발명자들의 항원 샌드위치 효소 면역학적 측정방법의 바람직한 구체예는, 비교실시예 1의 간접 효소 면역학적 측정방법의 바람직한 구체예와 같은 방법으

로 제작된 말라리아 재조합 표면항원이 코팅된 플레이트의 각 웰에 HRP-표면항원 접합체 용액을 30 ㎕씩 첨가하고 말라리아 양성시료(말라리아 환자의 혈장)와 음성시료(정상인의 혈장)를 100 ㎕씩 첨가하여 잘 혼합한 후 37℃ 반응기에 넣고 90 분간 반응시켰다. 트윈 20을 함유한 인산염 완충용액을 300 ㎕씩 5회 처리하여 웰을 세척한 후 테트라메틸벤지딘 100 ㎍/ml, 과산화수소 0.006% 및 구연산 인산염 완충용액(pH 4.5)을 포함하는 기질용액을 100 ㎕ 첨가하였다. 기질용액이 첨가된 플레이트를 30분간 암소에서 발색시킨 후 100 ㎕의 2 N 황산용액을 각 웰에 첨가하여 반응을 정지시켜 96 웰 플레이트 판독기(Molecular Devices)로 650 nm를 보조(reference) 파장으로 하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 기질용액 내 발색제인 테트라메틸벤지딘은 HRP-표면항원 접합체의 HRP에 의해 분해되어 발색반응을 일으키는데, 그 발색정도를 흡광도로 측정함으로써 항체의 존재 유무 및 항체량을 검출하였다.

【보정대상항목】 식별번호 81

【보정방법】 정정

【보정내용】

본 발명에서 사용한 방법과 상기에 기재된 항원 샌드위치 효소 면역학적 측정방법의 차이를 비교하기 위해 129명의 정상인의 혈장을 대상으로 진단하였다. 129명의 정상인은 10대 26명, 20대 43명, 30대 33명, 40대 27명으로 구성되었다. 진단 결과, 본 발명의 재조합 말라리아 표면 항원을 이용한 IgM 포획 효소 면역학적 검사(IgM capture enzyme immunoassay)는 양성 진단 수치(cut-off)를 음성 시료 평균치에 0.05를 더한 값으로 정하여 판단할 경우, 정상인의 혈장시료 129개 중 129 개를 음성으로 판정하여 100% 특이도를 나타내었다. 반면에, 상기에 기재된 항원 샌드위치 효소 면역학적 측정

방법은 동일한 혈장에 대해 양성 진단 수치(cut-off)를 음성 시료 평균치에 0.05를 더한 값으로 정하여 판단할 경우, 정상인의 혈장시료 129개 중 127개를 음성으로 판정하여 98.4%의 특이도를 보였다. 특히 말라리아 유행시기 이후에 출생한 30대 이하의 경우 100% 특이도를 나타내었지만 말라리아 유행시기에 출생한 40대의 경우 27 개의 시료중 2 개가 양성으로 판정되어 92.6%의 특이도를 나타내어 상대적으로 특정 연령층에서 특이도가 떨어지는 양상을 나타내었다(도 3 참조).

【보정대상항목】 식별번호 82

【보정방법】 정정

【보정내용】

본 발명의 말라리아 원충의 항원을 이용하여 혈액 내에 존재하는 말라리아 특이 IgM 을 검출하는 말라리아의 면역학적 측정방법, 진단시약 및 진단방법에 의하면, 말라리아 특이 IgM 만을 검출하기 때문에 현재의 말라리아 환자와 과거 병력자를 구분하여 말라리아를 진단할 수 있다.

【보정대상항목】 식별번호 83

【보정방법】 정정

【보정내용】

따라서, 본 발명의 말라리아의 면역학적 측정방법, 진단시약 및 진단방법은 한국에서 발병하는 말라리아인

*플라스모듐 비박스(Plasmodium vivax)*처럼 혈액내 존재하는 원충수가 적어 항원 검사로는 진단이 어렵고, 또한 항원검사와는 달리 잠복기 상태에서도 진단이 가능하므로 잠복기 상태에서 재발가능성이 높은 말라리아를 진단하는데 매우 효과적으로 사용될 수 있다. 또한 본 발명의 말라리아의 면역학적 측정방법, 진단시약 및 진단방법은 말라리아를 조기에 진단하는 데에 유용하다. 더구나, 나이든 연령층 및 장기간 동안의 말라리아 유행 지역에서도 효과적으로 말라리아를 진단할 수 있다.

【보정대상항목】 식별번호 84

【보정방법】 정정

【보정내용】

추가로, 본 발명의 말라리아의 면역학적 측정방법 및 진단시약은 상기 비교실시예 1에 기재된 간접 효소 면역학적 측정방법 및 진단시약보다 크게 향상된 특이도 및 민감도를 지니며, 또한 상기 비교실시예 2에 기재된 항원 샌드위치 효소 면역학적 측정 방법 및 진단시약보다 향상된 특이도를 지닌다.

ABSTRACT

ABSTRACT

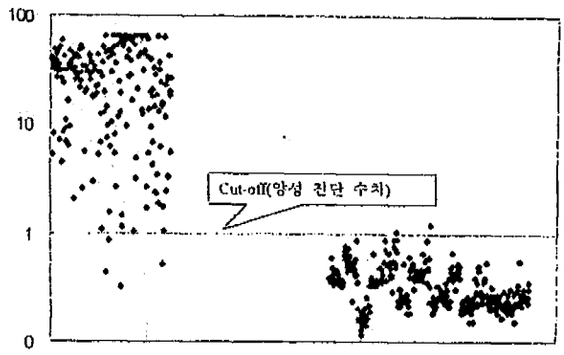
The present invention relates to an immunoassay, diagnostic reagent and diagnostic method for malaria by using antigens of malarial Protozoa. Particularly, the present invention relates to an immunoassay, diagnostic reagent and diagnostic method for malaria which detect malaria Protozoa antigen-specific IgM in blood. The immunoassay, diagnostic reagent and diagnostic method detecting malaria-specific IgM in blood according to the present invention can distinguish malaria patients from normal people who completely recover from malaria, and makes an early diagnosis of malaria patient possible.

REPRESENTATIVE FIGURE

Figure 1

KEY WORD

Malaria, Diagnostic Reagent, malaria-specific IgM



TITLE OF THE INVENTION

IMMUNOASSAY, A DIAGNOSTIC REAGENT AND A DIAGNOSTIC METHOD FOR MALARIA BY DETECTION OF MALARIA-SPECIFIC IgM

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWING

Figure 1 is a graph showing a result of diagnosing 216 malaria–positive samples and 353 malaria-negative samples for malaria, according to malaria-specific IgM capture enzyme immunoassay.

Figure 2 is a graph showing results of diagnosing 75 malaria–positive samples and 92 malaria-negative samples for malaria, according to malaria-specific IgM capture enzyme immunoassay and indirect enzyme immunoassay.

Figure 3 is a graph showing results of diagnosing 129 malaria-negative samples classified by age for malaria, according to malaria-specific IgM capture enzyme immunoassay and antigen sandwich enzyme immunoassay.

DETAILED DESCRIPTION

PURPOSE OF THE INVENTION

FIELD OF THE INVENTION AND THE PRIOR ART THEREOF

The present invention relates to an immunoassay, diagnostic reagent and diagnostic method for malaria. Particularly, the present invention relates to an immunoassay, diagnostic reagent and diagnostic method for malaria which detects IgM against antigens of malarial Protozoa.

Malaria is a disease caused by malarial Protozoa that infects within human erythrocytes and is carried by mosquitoes. Billion people in the world reside in malaria-risk area and over 500 million people become infected by malaria each year. Malaria causes more than 2 million death each year. Malaria widely spreads all over the world, however, in some regions, malarial infection was eradicated or decreased since 1960's due to effective controls. However, recently, incidence of malaria increases all over the world again, due to increase of drug-resistant strain, increase in

resistance to insecticide, abnormal weather such as El nino, etc.

Malaria can be categorized into African type, American type and Asian type. Each type differs in geographical distribution as well as characteristics in species and genetic inclination which Protozoa exhibit.

Life cycle of malaria is divided into Schizogony and Sporogony. Schizogony is the life cycle in human host, and Sporogony is the life cycle in mosquito host. Human is infected by sporozoites by the bite of infected mosquitoes. The sporozoites transfer to human liver through blood vessels, and they exist as a dormant state or multiply and develop into schizonts in hepatic cells. After a definite time, the schizonts enter the blood circulation, and multiply in full-scale. When the schizont matures, it ruptures and releases thousands of merozoites into the blood stream. Merozoites invade erythrocytes, and most merozoites go through another round of asexual reproduction, again forming schizonts. Some of the merozoites change into gametocytes. The gametocytes circulate in human bloodstream. When a mosquito bites the infected person, the mosquito sucks up gametocytes along with blood. Then, male gametocyte and female gametocyte in the gut of the mosquito fuse to form zygote. The zygote, which develops in the gut wall as an oocyte, eventually gives rise to the infective sporozoite, which invades the salivary glands and stomach of the mosquito. The mosquito then can infect another human host.

Antibiotics such as chloroquine and primaquine have been used in treatment of malaria. However, recently, malaria Protozoa have developed drug resistance to such antibiotics. Therefore, acquired drug resistance poses a serious difficulty on treatment of malaria.

A blood smear method has been used in the diagnosis of malaria most frequently. This method is a classical method wherein blood cells infected with malaria Protozoa are stained and the stained sample is then observed through a microscope. However, this method takes a longer time, and technical education of the examiner is required to judge blood cells infected with malaria Protozoa.

Recently, a diagnostic reagent detecting malarial antigens has been commercially available. However, the concurrent use of the diagnostic reagent and the blood smear method is recommended because the sensitivity of the diagnostic reagent is low. Another method to examine genes of malaria Protozoa is Polymerase Chain Reaction method. This method has high sensitivity, however, is used only on laboratory scale.

In Korea, malaria has been known as Hakjil. From the 1960s, attempts to eradicate this disease begun, and in the 1970s, cases of malaria were rarely reported. However, after a patient infected with malaria Protozoa was reported near DMZ in 1993, malaria begun to spread rapidly, and it was reported that the number of patients infected with malaria Protozoa was 3,800 in 1998.

Human malaria can be caused by one of four known parasites: *Plasmodium vivax, Plasmodium falciparum, Plasmodium malariae and Plasmodium ovale.* Among them, malaria which occurrs in Korea is caused by *Plasmodium vivax. Plasmodium vivax* is characterized in that diagnosis thereof is difficult because latent period is long, and number of Protozoa in blood is few. The imported diagnostic reagent for malaria detects malarial antigens such as Lactate Dehydrogenase of malaria. However, the imported diagnostic reagent has a difficulty in diagnosing malaria of Korean type where latent period is long, and numbers of Protozoa and antigen in blood are few, because sensitivity of the diagnostic reagent is only 50%.

TECHNICAL OBJECT OF THE INVENTION

It is the first object of the present invention to provide an immunoassay for malaria which detects malaria-specific IgM in blood by using antigens of malarial Protozoa.

It is the second object of the present invention to provide an IgM capture immunoassay for malaria which detects malaria-specific IgM in blood

It is the third object of the present invention to provide a diagnostic reagent for malaria with elevated specificity and sensitivity which comprises antigens of malaria Protozoa.

It is the forth object of the present invention to provide a diagnostic method for malaria which detects malaria-specific IgM in blood by using antigens of malaria Protozoa.

CONSTITUTION OF THE INVENTION

To achieve the above-mentioned objects, the present inventors have developed an immunoassay for malaria which detects only malaria-specific IgM in blood of malaria patients among antibodies against malarial Protozoa. The present inventors have developed a diagnostic method for malaria by detecting antibodies for malaria. This method can distinguish with high sensitivity malaria patients from normal people who completely recover from malaria. However, among antibodies against malaria, IgG can last for several years or several tens of years after experience of malaria. Therefore, a method of examining antibodies including IgG against malaria in the area where malaria was prevalent for a long time results in many pseudo-positive signals, which can cause confusion. In the antigen sandwich immunoassay of the present invention, few malarial antibody–positive responses have been found in teens to thirties, however, 5% or more of malarial antibody–positive responses have been found in forties or more, in case of normal people uninfected with malaria. That is, relatively high IgG pseudo-positive signals occur in forties or more. This is because probability that people over forties were exposed to mosquitoes infected with malaria before 1960s is high. Similarly, in the area where malaria is prevalent, malaria-specific IgGs remain in the body of man who completely recovers from malaria, and relatively high pseudo-positive signals appear in the assay for antibody to malaria. Therefore, effectiveness of the assay for antibody against

malaria to diagnose malaria will decrease. Accordingly, for diagnosing malaria in people over forties or the area where malaria is prevalent, a method of examining IgM of which titer disappears with time after the treatment of malaria will be more effective than a method of examining IgG of which titer remains even after the treatment of malaria.

The present invention provides an immunoassay for malaria which detects malaria-specific IgM in blood by using antigens of malarial Protozoa. As a embodiments, the present invention provides an IgM capture immunoassay for malaria that uses anti-human IgM antibody on a solid support. The immunoassay for malaria according to the present invention is more sensitive than the prior art immunoassay detecting specific antigens, and makes an early diagnosis of malaria patient possible. Also, the immunoassay for malaria according to the present invention can distinguish malaria patients from normal people who completely recover from malaria.

The present invention provides an immunoassay for malaria detecting malaria-specific IgM in blood by using antigens of malarial Protozoa. Preferably, the present invention provides an IgM capture immunoassay detecting malaria-specific IgM, and more preferably, the present invention provides an IgM capture enzyme immunoassay. Also, preferably, the present invention provides an immunoassay detecting malaria-specific IgM in blood by using anti-human IgM antibody.

An IgM capture immunoassay for malaria detecting malaria-specific IgM in blood according to the present invention, comprises (i) immobilizing anti-human IgM antibodies on a solid support; (ii) pouring blood serum or plasma sample to combine malaria-specific IgM with the anti-human IgM antibodies immobilized on the solid support; (iii) adding labeled antigen conjugates to combine the labeled antigen conjugates with the malaria-specific IgM bound to the anti-human IgM antibodies immobilized on the solid support; and (iv) analyzing by using the markers of the labeled antigen conjugates bound to the malaria-specific IgM.

The present invention provides a diagnostic reagent for malaria detecting malaria-specific IgM in blood, comprising antigens of malarial Protozoa. Preferably, the present invention provides a diagnostic reagent for malaria, comprising a solid support coated with anti-human IgM antibodies; labeled antigen conjugates; and a substrate solution containing a color fixing agent. As a preferable example of the above-mentioned labeled antigen conjugates, there is a labeled enzyme bounded to malaria surface antigen prepared from recombinant transformants. Also, the present invention provides a diagnostic method for malaria which detects malaria-specific IgM in blood by using antigens of malaria Protozoa.

The present invention will hereinafter be described in more detail.

The present invention provides an immunoassay for malaria detecting malaria-specific IgM in blood by using antigens of malarial Protozoa,

In the above immunoassay, a surface antigen of malarial Protozoa may be used as the antigen of malarial Protozoa. Also, in the above immunoassay, a recombinant antigen may be used as the antigen of malarial Protozoa.

A preferable example of the surface antigen of malarial Protozoa includes a part or whole of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax*, and a more preferable example includes C-terminus of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax*. The above C-terminus of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax* comprises amino acid sequences that are common to subspecies of *Plasmodium Vivax*, and especially comprises a polypeptide consisting of 108 amino acids (referred as "PV200C" hereafter) which exhibit 100% homology among subspecies of *Plasmodium Vivax,* as shown in SEQ. ID NO : 1. A preferable example of the C-terminus of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax* includes a part or whole of PV200C polypeptide in the C-terminus of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax*. Also, a preferable example of amino acid sequences of the PV200C polypeptide includes amino acid sequences as shown in SEQ. ID NO : 1.

The PV200C polypeptide can be expressed in a large amount from recombinant transformants. The present inventors prepared a yeast transformant and E.Coli transformant which express PV200C polypeptide, and deposited them in Korean Collection for Type Cultures of Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology on December 18, 1999 (Deposit No. KCTC 8977P, KCTC 8976P). The present invention provides an immunoassay and diagnostic reagent for malaria which detecting malaria-specific antibodies by using the above PV200C polypeptide purified with 99% purity and expressed from recombinant transformants.

The present invention provides an immunoassay for malaria detecting malaria-specific IgM in blood by using antigens of malarial Protozoa. Preferably, the present invention provides an IgM capture immunoassay detecting malaria-specific IgM, and more preferably, the present invention provides an IgM capture enzyme immunoassay. Also, preferably, the present invention provides an immunoassay detecting malaria-specific IgM in blood by using anti-human IgM antibody.

The present invention provides an immunoassay for malaria detecting malaria-specific IgM in blood by using antigens of malarial Protozoa. Preferably, the present invention provides an IgM capture immunoassay detecting malaria-specific IgM in blood by using antigens of malarial Protozoa, and more preferably, the present invention provides an IgM capture enzyme immunoassay detecting malaria-specific IgM in blood by using antigens of malarial Protozoa. Also, preferably, the present invention provides an immunoassay detecting malaria-specific IgM in blood by using antigens of malarial Protozoa and anti-human IgM antibody.

The present invention provides a 96-well plate coated with anti-human IgM antibody derived from goat as a preferable solid support for diagnosing malaria. Also, the present invention provides a labeled antigen conjugate consisting of a marker and an antigen of malarial Protozoa to detect malaria-specific IgM. The labeled antigen conjugate of the present invention consists of a marker and an antigen, and the antigen maybe preferably a recombinant surface antigen of malarial Protozoa purified

from yeast or E.Coli transformant to detect malaria-specific IgM. The marker of the labeled antigen conjugate includes, but is not limited to, for example, an enzyme such as horse radish peroxidase(HRP) and alkaline phosphatase, colloidal gold, fluorescent materials, dyes or the like. Preferably, the marker of the labeled antigen conjugate is an enzyme, and more preferably, horse radish peroxidase(HRP).

A preferable example of IgM capture immunoassay for malaria detecting malaria-specific IgM in blood according to the present invention, comprises (i) immobilizing anti-human IgM antibodies on a solid support; (ii) pouring blood serum or plasma sample to combine malaria-specific IgM with the anti-human IgM antibodies immobilized on the solid support; (iii) adding labeled antigen conjugates consisting of markers and antigens of malarial Protozoa to combine the labeled antigen conjugates with the malaria-specific IgM; and (iv) analyzing by using the markers of the labeled antigen conjugates bound to the malaria-specific IgM.

Preferably, in the above IgM capture immunoassay, the present invention may utilize a surface antigen of malarial Protozoa as the antigen of the labeled antigen conjugate in the step (iii). A preferable example of the surface antigen includes a part or whole of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax*.

A more preferable example of IgM capture immunoassay for malaria detecting malaria-specific IgM in blood according to the present invention, comprises (1) pouring blood serum or plasma sample into each well of the well plate coated with anti-human IgM antibody derived from goat; (2) washing the well plate; (3) adding the labeled antigen conjugate consisting of HRP and the recombinant surface antigen to combine the labeled antigen conjugate with the IgM bound to the anti-human IgM antibody; (4) washing the well plate; (5) adding a substrate solution consisting of a buffer solution and a color fixing agent to induce color development; and (6) measuring the absorbance by using a 96-well plate reader.

As a preferable embodiment, the immunoassay for malaria of the present invention provides a solid support coated with anti-human IgM antibody derived from

goat. Also, as a preferable embodiment, the immunoassay for malaria of the present invention provides a labeled antigen conjugate wherein an antigen protein is bound to HRP as described in the example 1 below. The antigen protein is expressed from the recombinant yeast or E.Coli which is transformed with the expression vector prepared by insertion of genes encoding antigen proteins of *Plasmodium vivax*, and purified.

When the blood sample of man who is suspected to be a malaria patient is poured into the solid support coated with anti-human IgM antibody derived from goat, human IgM in blood becomes combined with the anti-human IgM antibody immobilized on the solid support. After the labeled antigen conjugate consisting of HRP and surface antigen of malarial Protozoa is added to the solid support, the conjugate becomes combined with IgM of the malaria patient among IgMs bound to the anti-human IgM antibodies immobilized on the solid support. The HRP of the conjugate bounded to IgM of the malaria patient decomposes the color fixing agent in the substrate solution to induce color development. Finally, the immunoassay for malaria of the present invention diagnoses the infection of malaria by detecting existence of the IgM in blood and amount of the IgM by measuring the absorbance.

In the above immunoassay of the present invention, plasmas of the malaria patients and plasmas of normal people were diagnosed for malaria. As a result, the above method exhibited more than 98% of sensitivity and more than 99% of specificity. Particularly, all the plasmas of normal people in forties or more who were infected with malaria in the past and are suspected to have IgG against malaria were diagnosed to be negative. The immunoassay detecting malaria-specific IgM according to the present invention has more improved specificity than the above antigen sandwich enzyme immunoassay does, and much more improved sensitivity and specificity than the above indirect enzyme immunoassay does.

Also, the present invention provides a diagnostic reagent for malaria detecting malaria-specific IgM in blood, comprising antigens of malarial Protozoa.

Anti-human IgM antibody for the diagnostic reagent of the present invention includes, but is not limited to, for example, anti-human IgM antibody derived from goat. Preferably, the anti-human IgM antibody is specific to mu chain of IgM, purified by affinity between antigen and antibody, and does not cross-react with IgG or other immunoglobulin.

The present invention provides a diagnostic reagent for malaria detecting malaria-specific IgM in blood, comprising antigens of malarial Protozoa. Preferably, the present invention provides a diagnostic reagent for malaria detecting malaria-specific IgM in blood, comprising surface antigens of malarial Protozoa. In the above diagnostic reagent according to the present invention, a preferable example of the surface antigen of malarial Protozoa includes a part or whole of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax*, and a more preferable example includes C-terminus of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax.* A preferable example of the C-terminus of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax* includes a part or whole of PV200C polypeptide in the C-terminus of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax.* Also, a preferable example of amino acid sequences of the PV200C polypeptide includes amino acid sequences as shown in SEQ. ID NO : 1.

Also preferably, the present invention provides a diagnostic reagent for malaria detecting malaria-specific IgM in blood, comprising a solid support coated with anti-human IgM antibodies; labeled antigen conjugates; and a substrate solution containing a color fixing agent. Preferably, in the above diagnostic reagent, the present invention may utilize a surface antigen of malarial Protozoa as the antigen of the labeled antigen conjugate. A preferable example of the surface antigen of malarial Protozoa includes a part or whole of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax*, and a more preferable example includes C-terminus of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax*.

The marker of the labeled antigen conjugate for the diagnostic reagent of the present invention includes, but is not limited to, for example, an enzyme such as

horse radish peroxidase(HRP) and alkaline phosphatase, colloidal gold, fluorescent materials, dyes or the like. Preferably, the marker of the labeled antigen conjugate is horse radish peroxidase(HRP).

Also, the diagnostic reagent of the present invention comprises a substrate solution inducing color development when reacted with the marker of the labeled antigen conjugate. Preferably, the substrate solution consists of a buffer solution and a color fixing agent which induces color development when reacted with the marker of the labeled antigen conjugate. A preferable example of the color fixing agent includes tetramethylbenzidine and the like. The color fixing agent such as tetramethylbenzidine in the substrate solution is decomposed by HRP which is a preferable marker of the labeled antigen conjugate to induce color development. Then, existence of the IgM and amount of the IgM are detected by measuring the absorbance.

Also, The present invention provides a diagnostic method for malaria comprising detection of malaria-specific IgM in blood, using antigens of malarial Protozoa. In the above diagnostic method, preferably The present invention provides a diagnostic method for malaria comprising detection of malaria-specific IgM in blood, using anti-human IgM antibody. In the above diagnostic method according to the present invention, a example of the antigen of malarial Protozoa includes a surface antigen of malarial Protozoa, and a preferable example includes a part or whole of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax*, and a more preferable example includes C-terminus of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax*. A preferable example of the C-terminus of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax* includes a part or whole of PV200C polypeptide in the C-terminus of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax*. Also, a preferable example of amino acid sequences of the PV200C polypeptide includes amino acid sequences as shown in SEQ. ID NO : 1.

The invention will be further illustrated by the following examples. It will be apparent to those skilled in the art that these examples are given only to illustrate the present invention in more detail, but the invention is not limited to the examples given.

Example 1. Expression and purification of a surface antigen of malarial Protozoa from yeast transformants

Example 1-1. Preparation of yeast transformants and expression of a surface antigen of malarial Protozoa

The DNA coding PV200C is amplified using cDNA as template reverstranscripted from RNA purified from malaria-positive blood. The DNA coding PV200C and pYES-2 vectors were cleavaged with restriction enzymes, HindIII and Xho I, respectively. Then, DNA coding PV200C and pYES-2 vector were linked by T4 ligase(Promega) to be a recombinant expression vector that is referred as "pYLJ-MSP". Yeast *Saccharomyces cerevisiae* INVSC1 was transformed with pYLJ-MSP according to Hinnen method(*Proc. Natl. Acad. Sci.*, U.S.A 75, 1929-1933, 1978). The yeast transformants were deposited in Korean Collection for Type Cultures of Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology deposited on December 18, 1999 (Deposit No. KCTC 8977P)

The transformants pYLJ-MSP/*S. cerevisiae* INVSC1 were inoculated in YEPD medium containing 2% glucose at 37□. Then, the culture medium was transferred to YEP medium containing 1% glucose and 1% galactose, respectively, and cultivated. The yeast transformants expressed PV200C polypeptide, exhausting glucose. The expressed PV200C polypeptide was secreted into out of cell by the α-factor leader peptide linked with N-terminus of PV200C polypeptide. Thereafter, the α-factor leader peptide was removed by peptidase existing in cell membrane. Accordingly,

only the PV200C polypeptide was secreted into culture medium.

Eaxample 1-2.Purification of a surface antigen of malarial Protozoa from yeast transformants.

In order to obtain the PV200C polypeptide secreted into culture medium, the biomass was removed by centrifuging the culture medium that was cultivated for 2 days. Then, only the fluid of culture medium was taken and concentrated by ultrafiltrating apparatus(Amicon, U.S.A.). For easily purifying the concentrated fluid, the surface proteins linked with cationic histidine residues were adsorbed on Probond column(Invitrogen) to which anionic nickels were coupled by using six histidine residues linked with C-terminus of the above-amplified Pv200-19.

The contaminants which were not adsorbed on column were removed by phosphate buffer containing 10mM imidazol, and then the surface proteins adsorbed on column were desorbed and separated by 500 mM imidazol and phosphate buffer. The surface proteins having approximately 90% or more of purity were separated by the above process. Then, the surface proteins having approximately 99% or more of high purity were obtained by concentrating the separated solution and performing Sephacryl S-200 gel filtration chromatography with the concentrate.

Example 2. Expression and purification of a surface antigen of malarial Protozoa from E, coli transformants.

Example 2-1. Preparation of E, coli transformants and expression of a surface antigen of malarial Protozoa.

The amplified DNA fragments coding MSP PV200C prepared in the same way of Example 1-1, were purified with phenol/chloroform mixture to produce DNA fragments with high purity. The DNA fragment and vector, pET-19b (Novagen) were

cleavaged with NdeI and BamHI. Then, the DNA fragment was inserted into pET-19b to prepare an expression vector, pELK-MSP

E. coli strain BL21(DE3)lysS was transformed with pELK-MSPs by the treatment with $CaCl_2$. The transformants were deposited in Korean Collection for Type Cultures of Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology on December 18, 1999 (Deposit No. KCTC 8976P)

The transformants pELK-MSP/strain BL21 (KCTC 8976P) were cultivated for 12 hours in LB medium containing 50 μg/ml of chloramphenicol and 100 μg/ml of amphiciline. Then, 50 ml of the resulting cultures were again inoculated in 1L of LB medium and were cultivated for about 2 hours at 37□. When absorbance(OD 600) of the cultures became 0.3, IPTG (Isopropyl thio-β-D-galactoside) was added to the medium to a final concentration of 0.2 mM. Then, the cultures were cultivated further for 7 hours.

Example 2-2. Purification of a surface antigen of malarial Protozoa from E, coli transformants.

After the cultivation, only the cells were isolated by centrifugation. The obtained cells were suspended in 30 ml of Phosphate Buffered Saline(PBS). Then, E. Coli in the suspension was crushed with Sonicator(Branson, Sonifier 450) and centrifuged at 5000 rpm. Because a part of expressed MSP proteins was in the supernatant and the remainder was in the pellet, both the supernatant and the pellet were completely suspended in 4M urea buffer(pH 7.5) where 4M urea was dissolved in PBS, and then were centrifuged, by which only the supernatant was collected.

Because the overexpressed surface protein has His marker consisting of 10 histidines in N-terminus thereof, the protein was adsorbed on histidine affinity column(Invitrogen) for purification. The contaminants which were not adsorbed on column were removed repeatedly with a washing buffer in which 10mM imidazol and 0.1M NaCl were dissolved in PBS. Then, the surface proteins adsorbed on column

were desorbed and separated with an elution buffer in which 500mM imidazol and 0.1M NaCl were dissolved in PBS. It was confirmed that the surface proteins having approximately 90% or more of purity were separated by the above process.

Then, it was confirmed that PV200C polypeptide having approximately 99% or more of high purity were obtained from recombinant E.Coli by concentrating the separated solution and performing Sephacryl S-200 gel filtration chromatography with the concentrate.

Example 3. Diagnosis of malaria by IgM capture enzyme immunoassay

To diagnose malaria by IgM capture enzyme immunoassay, a solid support coated with anti-human IgM antibodies derived from goat, and the labeled antigen conjugates consisting of HRP and recombinant surface antigens purified from yeast or E.Coli transformant were used.

The plate was prepared as follows: anti-human IgM antibodies (anti-human IgM mu chain-specific, affinity purified, Bethyl Co., USA) derived from goat were diluted with phosphate buffer solution (pH 7.0) to 1~10 μg/ml and then 100~200 μl of the mixture was added to each well of the polystyrene plate. The well plate was left for approximately 12~18 hours at ambient temperature, and the solution that remained in the well was removed by suction. 250 μl of 0.1% gelatin or 0.1% casein dissolved in phosphate buffer solution was added to each well, and the well plate was left for 2 hours at ambient temperature. Then, the solution that remained in the well was removed by suction. The well plate was dried for 18 hours in a cold room and used.

100 μl of a sample dilution solution that is a phosphate buffer solution containing 0.1% bovine serum albumin was added to each well of the well plate coated with anti-human IgM antibodies derived from goat. Then, 2~20 μl of antibody-negative plasma sample or 2~20 μl of antibody-positive plasma sample was added to the wells, and the resulting mixtures were well mixed. The well

plate was incubated for 60 minutes in a reactor at 37 □. After the reaction terminated, the well plate was washed 5 times with 300 μl of a phosphate buffer solution containing 0.05% Tween 20.

The surface antigens of malarial Protozoa purified from yeast or E.Coli transformant which were prepared in Example 1 or 2 were conjugated with HRPs according to the following method.

The recombinant surface antigens of malarial Protozoa prepared in Example 1 or 2 was dialyzed for 1 day at 4 □ against 1 L of 0.01 M sodium carbonate buffer solution(pH 9.6). The buffer solution was exchanged 3 times during the dialysis. Also, 5 mg of HRP was dissolved in 0.5 ml of distilled water in a tube, and then 100 μl of 42 mg/ml $NaIO_4$ was added to the HRP solution. After the tube was wrapped with foil, it was shaken for 30 minutes at ambient temperature for the oxidation reaction. After HRP was oxidized enough, 60 μl of 1M glycerol was added to the reaction solution. Thereafter, the tube wrapped with foil was shaken for 30 minutes at ambient temperature to terminate the oxidation reaction.

For a conjugation reaction of HRP and the surface antigen, salts were removed from the HRP reaction solution by PD10 column (Pharmacia) saturated with 0.01 M sodium carbonate buffer (pH 9.6). The above solution of the surface antigens was added to the oxidized HRP reaction solution. Then, the tube was wrapped with foil and shaken overnight at ambient temperature to prepare conjugates of HRPs and the surface antigens. After the conjugation reaction of HRP and the surface antigen was terminated, in order to stabilize the HRP-surface antigen conjugates, 40.8 μl of 4 mg/ml $NaBH_4$ solution was added to the tube, and the tube wrapped with foil was shaken at 4 °C for 2 hours for the reaction. To remove HRPs in the reaction solution which were not conjugated, the surface proteins conjugated to HRPs were adsorbed on Probond column that was equilibrated with phosphate buffer solution by utilizing histidine residues linked with C-terminus of the surface protein. Then, HRPs which were not conjugated were removed by phosphate buffer solution. The HRP-surface

antigen conjugates adsorbed on Probond column were desorbed by phosphate buffer solution containing 1M imidazol . The conjugates were collected. The protein concentration of the collected HRP-surface antigen conjugates was determined by using commercially available BSA protein quantitative test kit. The sample was stored in a refrigerator after addition of bovine serum albumin (BSA) of final concentration of 1 % .

The above-prepared conjugates consisting of HRPs and the surface antigens were diluted to 1:100 to 1:1,000 with phosphate buffer solution (pH 7.0) containing 1% BSA and 0.05% Tween 20. Then, 100 μl of the solution of the HRP-surface antigen conjugates was added to each well of the well plate. The well plate was incubated for 30 minutes at 37 □. After the reaction terminated, the well plate was washed 5 times with phosphate buffer solution containing 0.05% Tween 20. 100 μl of a substrate solution containing 100 μg/ml tetramethylbenzidine, 0.006% hydrogen peroxide and citrate-phosphate buffer solution(pH 4.5) was added to each well of the plate. After color development in a dark place for 30 minutes, 100 μl of the reaction-stopping solution (1N sulfuric acid solution) was added to each well to terminate the color development reaction. Then, the absorbance was measured at 450 nm (reference wavelength, 650 nm) by using the 96 well plate reader (Molecular Devices, USA). Tetramethylbenzidine that is a color fixing agent in the substrate solution was decomposed by HRP of the labeled antigen conjugate, to induce the color development. Then, existence of malaria-specific IgM and amount of the IgM were detected by measuring the absorbance.

According to the above method, 216 malaria-positive samples(plasmas of malaria patients) and 353 malaria-negative samples(plasmas of normal people) were diagnosed for malaria. When positive cut-off value was determined by adding 0.05 to the mean of the negative samples, according to IgM capture enzyme immunoassay using the recombinant surface antigen of

malarial Protozoa according to the present invention, 212 out of 216 malaria patients' samples were judged to be positive and 351 of 353 normal people's samples were judged to be negative. Therefore, the IgM capture enzyme immunoassay of the present invention exhibited 98.1% of sensitivity and 99.4% of specificity (Refer to Figure 1).

Example 4. Comparison of IgM capture enzyme immunoassay with indirect enzyme immunoassay

In the IgM capture enzyme immunoassay, a solid support coated with anti-human IgM antibodies derived from goat, and the labeled antigen conjugates consisting of HRPs and the recombinant surface antigens purified from yeast or E.Coli transformant were used. The IgM capture enzyme immunoassay was performed according to the method of Example 3.

Also, the indirect enzyme immunoassay was performed according to the following method for comparison with IgM capture enzyme immunoassay.

The solution of recombinant surface antigens of malarial Protozoa prepared in Example 1 or 2 was diluted with 0.1M carbonate buffer (pH 9.5) to 0.5 μg/ml, and 100 μl of the solution was added to each well of 96-well plate. To adsorb the surface antigens on the well, the well plate was sealed tightly and left for 18 hours at 4 □. Then, the surface antigens which were not adsorbed on the well were removed by adding 300 μl of phosphate buffer solution containing 5% general goat serum to each well and leaving it for 18 hours at 4 □. After the solution that remained in the well was discarded, moisture was removed by leaving the well plate for 1 hour at ambient temperature. Then, the well plate was transferred to a hermetic container with a dehumidifying agent and stored in a refrigerator at 4 □.

100 μl of a sample dilution solution containing 1.15 mg/ml NaOH, 0.2 mg/ml of KH_2PO_4, 0.2 mg/ml KCl, 8 mg/ml NaCl, 300 μl/ml bovine serum, 0.2 mg/ml thimerosal and the like was added to each well of 96-well plate(Nunc) coated with recombinant

surface antigens according to the above method. Then, 10 μl of antibody-negative plasma sample or 10 μl of antibody-positive plasma sample was added to the wells, and the resulting mixtures were well mixed. The well plate was incubated for 60 minutes in a reactor at 37 □. After the reaction terminated, the well plate was washed 5 times with 300 μl of a phosphate buffer solution containing 0.05% Tween 20. Anti-human IgG antibody(Cappel) or anti-human IgM antibody(Bethyl) derived from goat to which HRP was conjugated was diluted to 1/40,000 with a dilution solution containing 10mM Tris, 0.5M NaCl, 1mM $CaCl_2$, 0.5% glycerol, 0.2 ml/ml bovine serum, 100 μl/ml goat serum, 0.05% Tween 20, 0.2 mg/ml thimerosal and 50 μg/ml phenol red. 100 μl of the diluted conjugate was added to each well of the 96-well plate and the well plate was incubated for 60 minutes at 37 □. After the reaction terminated, the well plate was washed 5 times with 0.05% Tween 20/phosphate buffer solution. 100 μl of a substrate solution containing 100 μg/ml tetramethylbenzidine, 0.006% hydrogen peroxide and citrate-phosphate buffer solution(pH 4.5) was added to each well. After color development in a dark place for 30 minutes, 100 μl of the reaction-stopping solution (2N sulfuric acid solution) was added to each well to terminate the color development reaction. Then, the absorbance was measured at 450 nm (reference wavelength, 650 nm) by using the 96 well plate reader (Molecular Devices, USA). Tetramethylbenzidine that is a color fixing agent in the substrate solution was decomposed by HRP conjugated to anti-human IgG antibody or anti-human IgM antibody, to induce the color development. Then, existence of malaria-specific antibodies and amount of the antibodies were detected by measuring the absorbance.

To compare the IgM capture enzyme immunoassay with the indirect enzyme immunoassay, 75 malaria–positive samples(plasmas of malaria patients) and 92 malaria-negative samples(plasmas of normal people) were diagnosed for malaria. When positive cut-off value was determined by adding 0.05 to the mean of the negative samples, according to the IgM capture enzyme

immunoassay using the recombinant surface antigens of malarial Protozoa according to the present invention, 73 out of 75 malaria patients' samples were judged to be positive and 92 of 92 normal people's samples were judged to be negative. Therefore, the IgM capture enzyme immunoassay of the present invention exhibited 97.3% of sensitivity and 100% of specificity.

In the meantime, when positive cut-off value was determined by adding 0.2 to the mean of the negative samples, according to the indirect enzyme immunoassay of the present invention, 59 out of 75 malaria patients' samples were judged to be positive and 85 of 92 normal people's samples were judged to be negative. Therefore, the indirect enzyme immunoassay of the present invention exhibited 78.6% of sensitivity and 92.4% of specificity. (Refer to Figure 2).

Example 5. Comparison of IgM capture enzyme immunoassay with antigen sandwich enzyme immunoassay in normal people classified by age

In the IgM capture enzyme immunoassay, a solid support coated with anti-human IgM antibodies derived from goat, and the labeled antigen conjugates consisting of HRPs and the recombinant surface antigens purified from yeast or E.Coli transformant were used. The IgM capture enzyme immunoassay was performed according to the method of Example 3.

Also, the antigen sandwich enzyme immunoassay was performed according to the following method for comparison with IgM capture enzyme immunoassay.

30 μl of the solution of the HRP-surface antigen conjugates was added to each well of 96-well plate(Nunc) coated with recombinant surface antigens according to the method of Example 4. Then, 100 μl of malaria–positive samples(plasmas of malaria patients) or 100 μl of malaria-negative samples(plasmas of normal people) was added to the wells, and the resulting mixtures were well mixed. The well plate was incubated for 90 minutes in a reactor at 37 □. After the reaction terminated, the well

plate was washed 5 times with each 300 μl of a phosphate buffer solution containing Tween 20. 100 μl of a substrate solution containing 100 μg/ml tetramethylbenzidine, 0.006% hydrogen peroxide and citrate-phosphate buffer solution(pH 4.5) was added to each well of the well plate. After color development of the plate in a dark place for 30 minutes, 100 μl of the reaction-stopping solution (2N sulfuric acid solution) was added to each well to terminate the color development reaction. Then, the absorbance was measured at 450 nm (reference wavelength, 650 nm) by using the 96 well plate reader (Molecular Devices, USA). Tetramethylbenzidine that is a color fixing agent in the substrate solution was decomposed by HRP conjugated to the surface antigen, to induce the color development. Then, existence of malaria-specific antibodies and amount of the antibodies were detected by measuring the absorbance.

To compare the IgM capture enzyme immunoassay with the antigen sandwich enzyme immunoassay, plasma samples of 129 normal people were diagnosed for malaria. The 129 normal people consisted of 26 people in teen, 43 people in twenties, 33 in thirties and 27 in forties.

When positive cut-off value was determined by adding 0.05 to the mean of the negative samples, according to the IgM capture enzyme immunoassay using the recombinant surface antigens of malarial Protozoa according to the present invention, 129 of 129 normal people's samples were judged to be negative. Therefore, the IgM capture enzyme immunoassay of the present invention exhibited 100% of specificity.

In the meantime, when positive cut-off value was determined by adding 0.05 to the mean of the negative samples, according to the antigen sandwich enzyme immunoassay of the present invention, 127 of 129 normal people's samples were judged to be negative. Therefore, the antigen sandwich enzyme immunoassay of the present invention exhibited 98.4% of specificity.

Especially, when plasma samples of normal people in thirties or less who were born after the prevalence period of malaria were diagnosed for malaria, the antigen sandwich enzyme immunoassay of the present invention exhibited 100% of specificity. However, when plasma samples of normal people in forties who were born in the prevalence period of malaria were diagnosed for malaria, 2 of 27 normal people's samples were judged to be positive and the antigen sandwich enzyme immunoassay of the present invention exhibited 92.6% of specificity. Therefore, the specificity of the antigen sandwich enzyme immunoassay of the present invention decreased in specific ages (Refer to Figure 3).

EFFECT OF THE INVENTION

The immunoassay, diagnostic reagent and diagnostic method for malaria detecting malaria-specific IgM in blood by using antigens of malarial Protozoa according to the present invention can distinguish malaria patients from normal people who completely recover from malaria, because they detect only malaria-specific IgM in blood. Therefore, malaria can be diagnosed effectively in older people and in the area where malaria was prevalent for a long time.

Also, the immunoassay, diagnostic reagent and diagnostic method for malaria detecting malaria-specific IgM in blood according to the present invention are very effective in diagnosing malaria where latent period is long, numbers of Protozoa and the antigen in blood are few, and the probability of recurrence is high, because they can diagnose malaria in a latent period. Further, the immunoassay, diagnostic reagent and diagnostic method for malaria detecting malaria-specific IgM in blood according to the present invention are useful in an early diagnosis of the malaria patient. In addition, the immunoassay and diagnostic reagent for malaria detecting malaria-specific IgM in blood according to the present invention exhibited more enhanced specificity and sensitivity than the indirect enzyme immunoassay and

diagnostic reagent in the above examples, and more enhanced specificity than the antigen sandwich enzyme immunoassay and diagnostic reagent in the above examples.

The invention will be further illustrated by the following examples. It will be apparent to those skilled in the art that these examples are given only to illustrate the present invention in more detail, but the invention is not limited to the examples given.

What is claimed is;

1. An immunoassay for malaria detecting malaria-specific IgM in blood by using antigens of malarial Protozoa.

2. The immunoassay for malaria according to Claim 1, wherein said immunoassay detecting malaria-specific IgM in blood is an IgM capture immunoassay.

3. The immunoassay for malaria according to Claim 2, wherein said IgM capture immunoassay is an IgM capture enzyme immunoassay.

4. The immunoassay for malaria according to Claim 1, wherein said malaria-specific IgM in blood is detected by using anti-human IgM antibody.

6. The immunoassay for malaria according to Claim 1, wherein said immunoassay detecting malaria-specific antibodies in blood is an enzyme immunoassay.

5. The immunoassay for malaria according to Claim 1, wherein said antigen of malarial Protozoa is a surface antigen of malarial Protozoa.

6. The immunoassay for malaria according to Claim 1, wherein said surface antigen of malarial Protozoa is a part or whole of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax.*

7. The immunoassay for malaria according to Claim 6, wherein said part or whole of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax* is C-terminus of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax.*

8. The immunoassay for malaria according to Claim 7, wherein said C-terminus of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax* is a part or whole of PV200C polypeptide in the C-terminus of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax.*

9. The immunoassay for malaria according to Claim 8, wherein amino acid sequences of the PV200C polypeptide are amino acid sequences as shown in SEQ. ID NO : 1.

10. The immunoassay for malaria according to Claim 1, wherein said antigen of malarial Protozoa is a recombinant antigen.

11. An IgM capture immunoassay, comprising :

(i) immobilizing anti-human IgM antibodies on a solid support;

(ii) pouring blood serum or plasma sample to combine malaria-specific IgM with the anti-human IgM antibodies immobilized on the solid support;

(iii) adding labeled antigen conjugates to combine the labeled antigen conjugates with the malaria-specific IgM; and

(iv) analyzing by using the markers of the labeled antigen conjugates bound to the malaria-specific IgM.

12. The immunoassay according to Claim 11, wherein the antigen of the labeled antigen conjugate in the step (iii) is a part or whole of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax.*

13. A diagnostic reagent for malaria detecting malaria-specific IgM in blood, comprising antigens of malarial Protozoa.

14. The diagnostic reagent for malaria according to Claim 13, wherein said antigen of malarial Protozoa is a surface antigen of malarial Protozoa.

15. The diagnostic reagent for malaria according to Claim 13, wherein said surface antigen of malarial Protozoa is a part or whole of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax.*

16. The diagnostic reagent for malaria according to Claim 15, wherein said part or whole of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax* is C-terminus of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax.*

17. The diagnostic reagent for malaria according to Claim 16, wherein said C-terminus of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax* is a part or whole of PV200C polypeptide in the C-terminus of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax.*

18. The diagnostic reagent for malaria according to Claim 17, wherein amino acid sequences of the PV200C polypeptide are amino acid sequences as shown in SEQ. ID NO : 1.

19. A diagnostic reagent for malaria comprising :

a solid support coated with anti-humane-IgM antibody;

labeled antigen conjugates; and

a substrate solution containing a color fixing agent.

20. The diagnostic reagent for malaria according to Claim 19, wherein said surface antigen of malarial Protozoa is a part or whole of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax.*

21. The diagnostic reagent for malaria according to Claim 20, wherein the antigen of the labeled antigen conjugates surface is a part or whole of C-terminus of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax.*

22. The diagnostic reagent for malaria according to Claim 19, wherein the marker of the labeled antigen conjugate is horse radish peroxidase, alkaline phosphatase, colloidal gold, fluorescent materials, dyes or the like.

23. The diagnostic reagent for malaria according to Claim 19, wherein the substrate solution consists of a buffer solution and a color fixing agent which induces color development when reacted with the marker of the labeled antigen conjugate.

24. An diagnostic method for malaria detecting malaria-specific IgM in blood by using antigens of malarial Protozoa.

25. The diagnostic method for malaria according to Claim 24, wherein said malaria-specific IgM in blood is detected by using anti-human IgM antibody.

26. The immunoassay for malaria according to Claim 24, wherein said antigen of malarial Protozoa is a surface antigen of malarial Protozoa.

27. The immunoassay for malaria according to Claim 24, wherein said surface antigen of malarial Protozoa is a part or whole of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax.*

28. The immunoassay for malaria according to Claim 27, wherein said part or whole of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax* is C-terminus of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax.*

29. The immunoassay for malaria according to Claim 28, wherein said C-terminus of

Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax* is a part or whole of PV200C polypeptide in the C-terminus of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax*.

30. The immunoassay for malaria according to Claim 10, wherein amino acid sequences of the PV200C polypeptide are amino acid sequences as shown in SEQ. ID NO : 1.

LA OFICINA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL COREANA

Por la presente se certifica que la siguiente solicitud que obra anexo a ésta es copia fiel de los registros en la Oficina de Propiedad Industrial Coreana

Número de Solicitud: **2000 45806**

Fecha de Presentación: **8 de Agosto de 2000**

Solicitante: **LG CHEMICAL LTD**

2000 **12** **13**

Funcionario certificante

Reivn1. 167

166

REIVINDICACIONES

1. Un inmunoensayo para la detección de malaria identificando IgM específicos contra malaria en la sangre, mediante el empleo de antígenos de protozoarios tipo malaria.
2. El inmunoensayo para detectar la malaria de acuerdo con la reivindidcación No.1, caracterizado en que el inmunoensayo que detecta IgM específicos contra malaria en la sangre es un inmunoensayo que captura el IgM.
3. El inmunoensayo para malaria de acuerdo con la reivindicación No. 2, caracterizado en que dicho inmunoensayo que captura el IgM es un inmunoensayo de captura de IgM.
4. El inmunoensayo para malaria de acuerdo con la reivindicación No. 1, caracterizado en que dicho inmunoensayo IgM específico de malaria en sangre se detecta mediante el uso del anticuerpo IgM antihumano.
5. El inmunoensayo para malaria de acuerdo a la reivindicación No. 1, caracterizado en que el mencionado inmunoensayo que detecta los anticuerpos específicos de la malaria en sangre es un inmunoensayo de enzima
5. El inmunoensayo para malaria de acuerdo a la reivindicación No. 1, caracterizado en que dicho antígeno del protozoario tipo malaria es un antígeno de superficie protozoario tipo malaria.
6. El inmunoensayo para malaria de acuerdo con la reivindicación No.1, caracterizado en que dicho antígeno de superficie del protozoario tipo malaria es una parte o la totalidad de la proteína de superficie del merozoito del *Plasmodium Vivax*.

7. El inmunoensayo para malaria de acuerdo con la reivindicación No.6, caracterizado en que dicha parte o la totalidad de la proteína de superficie del merozoito del Plasmodium Vivax es la porción C-terminal de la proteína de superficie del Merozoito del Plasmodium Vivax.

8. El inmunoensayo para malaria de acuerdo con la reivindicación No.7, caracterizado en que dicha porción C-terminal de la proteína de superficie del Merozoito del Plasmodium Vivax es una parte o una totalidad del polipéptido PV200C en la fracción C terminal de la proteína de superficie del Merozoito del Plasmodium Vivax.

9. El inmunoensayo para la malaria de acuerdo con la reivindicación No.8, caracterizado en que las secuencias del aminoácido del polipéptido PV200C son secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ. ID NO.:1.

10. El inmunoensayo para la malaria de acuerdo con la reivindicación No.1, caracterizado en que dicho antígeno del protozoario tipo malaria es un antígeno recombinante.

11. El inmunoensayo de captura IgM, que comprende lo siguiente:

(i) Inmovilizar anticuerpos IgM antihumanos sobre un soporte sólido.

(ii) Vaciar el suero o la muestra de plasma para combinarse el IgM específico de malaria con anticuerpos IgM antihumanos inmovilizados sobre el medio sólido.

(iii) Agregar conjugados antigénicos marcados para combinar los conjugados antigénicos marcados con IgM específicos contra malaria; y

(iv) Analizar usando los marcadores de los conjugados antigénicos marcados ligados a IgM específicos contra la malaria.

12. El inmunoensayo de acuerdo con la reivindicación 11, caracterizado en que el antígeno del conjugado antigénico marcado en el paso c es una parte o la totalidad de la proteína de superficie del merozoito del Plasmodium Vivax.

13. El reactivo de diagnóstico para la detección de la malaria, IgM malaria específica en la sangre, que comprende antígenos del protozoario tipo malaria.

14. El reactivo diagnóstico para malaria de acuerdo con la reivindicación 13, caracterizado porque dichos antígenos del protozoario tipo malaria es un antígeno de superficie del protozoario tipo malaria.

15. Reactivo diagnóstico para malaria de acuerdo con la reivindicación 13, caracterizado en que dicho antígeno de superficie protozoario de tipo malaria es un parte o totalidad de la proteína de superficie Merozoito del Plasmodium Vivax.

16. El reactivo de diagnóstico para malaria de acuerdo con la reivindicación 15, caracterizado en que dicha parte o la totalidad de la proteína de superficie del merozoito del Plasmodium Vivax es una porción C- terminal de la proteína de superficie del Plasmodium Vivax.

17.. El reactivo diagnóstico para malaria de acuerdo con la reivindicación 16, caracterizado en que dicha porción C- terminal de la proteína de superficie del merozoito del Plasmodium Vivax es una parte o totalidad del polipéptido PV200C y está en la porción C terminal de la ptoteína de superficie del merozoito del Plasmodium Vivax.

18. El reactivo diagnóstico para malaria de acuerdo con la reivindicación 17, caracterizado en que las secuencias de aminoácidos del polipéptido PV200C

son secuencias de aminoácidos como se muestra en la secuencia SEQ ID NO.1

19 Un reactivo diagnóstico para la malaria que comprende lo siguiente:

Soporte sólido recubierto con conjugados antígenos marcados, anticuerpos IgM- antihumano; y

una solución de substrato que contiene un agente de fijación de color.

20. El reactivo diagnóstico para la malaria de acuerdo con la reivindicación 19, caracterizado en que dicho antígeno de superficie del protozoario de tipo malaria constituye una parte o la totalidad de la proteína de superficie del merozoito del Plasmodium Vivax.

21. El reactivo diagnóstico para la malaria de acuerdo a la reivindicación 20, caracterizado en que el antígeno del marcador del conjugado antigénico es una parte o una totalidad de la porción C terminal de la proteína de superficie del Plasmodium Vivax.

22. El reactivo de diagnóstico para la malaria de acuerdo con la reivindicación 19, caracterizado porque el marcador del conjugado antigénico es una peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, orocoliodeo, materiales fluoroscentes, colorantes o sustancias análogas.

23. El reactivo diagnóstico para malaria de acuerdo a la reivindicación 19, caracterizado en que la solución sustrato consiste en una solución buffer y un agente fijador de color que induce desarrollo de color cuando reacciona con el marcador del conjugado antigénico marcado.

24. El método de diagnóstico para detectar la malaria del IgM específico de malaria en sangre mediante el uso de antígenos de protozoario tipo malaria.

Abstract 2.

Tomo 2/4 172
Exp. 11966/01 121

대 한 민 국 특 허 청
KOREAN INDUSTRIAL PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Industrial Property Office.

출 원 번 호 : 특허출원 2000년 제 7648 호
Application Number

출 원 년 월 일 : 2000년 02월 17일
Date of Application

출 원 인 : 주식회사 엘지화학
Applicant(s)

2000 년 12 월 13 일

특 허 청
COMMISSIONER

1020000007648 2000/12/1

【서류명】 특허출원서
【권리구분】 특허
【수신처】 특허청장
【참조번호】 0001
【제출일자】 2000.02.17
【발명의 명칭】 삼일열 말라리아의 진단 방법 및 이에 이용되는 진단 시약
【발명의 영문명칭】 Diagnosis for malaria and reagent used therefor
【출원인】
【명칭】 주식회사 엘지화학
【출원인코드】 1-1998-001275-0
【대리인】
【성명】 이원희
【대리인코드】 9-1998-000385-9
【포괄위임등록번호】 1999-012836-2
【발명자】
【성명의 국문표기】 임국진
【성명의 영문표기】 LIM,Kook-Jin
【주민등록번호】 611117-1482719
【우편번호】 305-343
【주소】 대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 404동 1104호
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 손미진
【성명의 영문표기】 SOHN,Mi-Jin
【주민등록번호】 650325-2929420
【우편번호】 305-333
【주소】 대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 125동 505호
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 이상익
【성명의 영문표기】 LEE,Sang-Ik
【주민등록번호】 710313-1405318

【우편번호】 305-390
【주소】 대전광역시 유성구 전민동 나래아파트 104동 1303호
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 유승범
【성명의 영문표기】 YOO,Seung-Bum
【주민등록번호】 670427-1024310
【우편번호】 302-223
【주소】 대전광역시 서구 탄방동 한우리아파트 104동 601호
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 박재원
【성명의 영문표기】 PARK,Jae-Won
【주민등록번호】 670506-1550819
【우편번호】 135-110
【주소】 서울특별시 강남구 압구정동 현대아파트 91동 808호
【국적】 KR
【심사청구】 청구
【미생물기탁】
【기탁기관명】 생명공학연구소 유전자은행
【수탁번호】 KCTC 8976P
【수탁일자】 1999.12.18
【미생물기탁】
【기탁기관명】 생명공학연구소 유전자은행
【수탁번호】 KCTC 8977P
【수탁일자】 1999.12.18
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】
【서열개수】 001
【서열목록의 전자문서】 첨부
【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사 를 청구합니다. 대리인
이원희 (인)

1020000007648 2000/12/1

【요약서】

【요약】

본 발명은 삼일열 말라리아를 혈청학적으로 진단하는 방법 및 이에 이용하는 진단 시약 제조에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 삼일열 말라리아 원충 *플라스모듐 비박스* (*Plasmodium vivax*) 메로조이트 표면 단백질(Merozoit surface protein) 을 항원으로 시료 혈장내에 존재하는 항체를 측정하는 방법 및 상기 말라리아 표면 단백질을 항원으로 포함하는 말라리아 진단 시약의 제조로 구성되며, 상기 항체를 측정하는 방법은 잠복기가 길고 원충 수가 적은 삼일열 말라리아를 진단하는데 유용한 방법이다.

【대표도】

도 1

【명세서】

【발명의 명칭】

삼일열 말라리아의 진단 방법 및 이에 이용되는 진단 시약{Diagnosis for malaria and reagent used therefor}

【도면의 간단한 설명】

도 1 은 말라리아 환자(●)와 정상인(○)의 혈장을 시료로 하여 IgG와 IgM을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<2> 본 발명은 삼일열 말라리아의 혈청학적인 진단방법 및 진단 시약 제조에 관한 것으로서, 상세하게는 삼일열 말라리아 원충 *플라스모듐 비박스(Plasmidium vivax)*의 메로조이트 표면 단백질(Merozoit surface protein, 이하 'MSP'로 약칭함)을 항원으로 혈장내 존재하는 항체를 측정하는 방법 및 상기 표면 단백질을 항원으로 이용하여 제조되는 말라리아 진단 시약에 관한 것이다.

<3> 말라리아는 모기를 매개로 하여 말라리아의 원충이 인간의 적혈구내에 감염되어 발생하는 질병이다. 전세계의 10 억명의 인구가 말라리아 위험지역에 거주하고 있으며,

매년 5 억명 이상이 말라리아에 감염되고 2 백명 이상이 목숨을 잃는 질병중의 하나이다. 말라리아는 전세계적인 분포를 보이고 있으나 일부 지역에서는 효과적인 방제로 인하여 1960년대 이후 발생이 중지되거나 감소되었다. 그러나 최근의 엘리뇨 현상과 같은 이상 기온 및 약제 내성 균주의 증가, 살충제에 대한 저항성 증가 등으로 인해 전세계적으로 다시 확산되고 있는 추세이다.

<4> 말라리아는 크게 아프리카형, 중남미를 중심으로 한 아메리카형 그리고 인도와 동남아시아를 중심으로 한 아시아형으로 나누어 지는데 각각은 지리적 분포에 있어서의 차이뿐만 아니라 원충이 나타내는 종적 특성과 유전적 성향에 있어서도 크게 다르다.

<5> 말라리아의 생활사는 사람 숙주내에서의 생활사인 분열생식기(Schizogony)와 모기 숙주내에서의 생활사인 포자기(Sporogony)로 나누어 지는데, 처음 모기가 사람을 물면 혈관을 따라 간으로 이동하며 간세포에서 증식을 실시하거나 휴면상태로 존재하다가 일정한 기간이 지나면 혈중으로 나오게 되고 본격적인 증식을 하게 된다. 혈중 적혈구내에서 영양체인 고리형에서 증식형, 분열체 과정을 거치며 분열체가 수십개의 분열소체를 방출하게 되면 각각의 적혈구에 들어가 같은 생식주기를 반복한다. 이중 일부가 생식모세포 형태로 존재하는데, 모기가 이런 상태의 사람을 흡혈하면 상기의 생식모세포가 모기로 넘어가 증식하고 다시 모기의 증식과정을 통해 위와 침샘에 존재하다가 사람에게 넘어오는 과정을 반복하게 된다.

<6> 말라리아의 치료에는 크로로콰인(chroroquine), 프리마콰인(primaquine) 등이 사용되어 왔다. 그러나, 최근 저항성을 갖는 말라리아의 출현으로 그 치료에 어려움을 겪고 있다.

<7> 말라리아의 진단에는 혈액도말법이 가장 많이 사용되고 있는데,이는 고전적인 방법

으로서 염색된 혈구를 현미경으로 관찰하는 방법이다. 그러나 이 방법은 시간이 많이 걸리고 검사자의 전문 교육이 필요하다는 단점을 갖고 있다. 최근 말라이아 항원을 검사하는 시약이 시판되고 있기는 하나, 민감도가 낮은 이유로 혈액도말법과 동시에 사용할 것을 권하고 있다. 말라리아 유전자를 검사하는 또다른 방법으로 PCR방법이 있는데, 이는 민감도가 높으나 아직 실험실에서만 행해지고 있는 실정이다.

<8> 한국에서 말라리아는 학질이라는 명칭의 질병으로 오래 전부터 알려져 왔는데 1960년대에 말라리아 박멸사업으로 인해 1970년에 와서는 말라리아 발병이 거의 보고되지 않았다. 그러나, 최근 1993년에 휴전선 부근에서 환자가 발생한 이후 급속히 확산되어 1998 년에는 말라리아 환자수가 3800 명으로 보고되고 있다.

<9> 말라리아 포자낭충에는 *플라스모듐 비박스(Plasmodium vivax)*, *플라스모듐 팔시파룸(Plasmodium falciparum)*, *플라스모듐 말라리아(Plasmodium malariae)*, *플라스모듐 오발(Plasmodium ovale)* 등 4 종류가 알려져 있다. 그 가운데 한국에서 유행되고 있는 말라리아는 *플라스모듐 비박스(Plasmodium vivax)*로 인한 것인데, 이는 잠복기가 길고 혈액내에 존재하는 원충의 수가 적어 그 진단이 어려운 것이 특징이다. 현재, 외국에서 수입되고 있는 말라리아 진단 시약은 말라리아의 젖산 탈수소효소(Lactate Dehydrogenase) 등의 항원을 검출하는 방식으로, 그 민감도가 50% 수준에 머물러 있어 상기와 같이 잠복기가 길고 혈액내에 존재하는 항원 및 원충수가 적은 삼일열 말라리아 진단에는 어려움이 있다.

<10> 이에 본 발명자들은 말라리아 환자의 혈장에 삼일열 말라리아 원충(*Plasmodium vivax*)의 여러 아종의 공통적인 표면 항원에 대한 항체가 존재함을 확인하고, 상기 항체를 측정하는 진단시약이 종래의 항원을 측정하는 방법에 비하여 민감도가 높고 특히 말라리아 보균자의 진단이 가능하며, 잠복기가 길고 혈액내에 존재하는 항원 및 원충의 수가 적은 삼일열 말라리아의 진단에 유용함을 발견하고 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<11> 본 발명의 목적은 삼일열 말라리아를 진단하기 위하여 혈액내의 삼일열 말라리아의 항체를 측정하는 방법을 제공하는 것이다.

<12> 본 발명의 또다른 목적은 삼일열 말라리아의 진단에 이용할 수 있는 진단 시약을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

<13> 상기 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 삼일열 말라리아 원충의 여러 아종에 공통으로 존재하는 메로조이트 표면 단백질을 항원으로 이용하여 혈액내에 존재하는 항체를 측정하는 방법을 제공한다.

<14> 또한 본 발명은 삼일열 말라리아 원충의 MSP를 포함하는 삼일열 말라리아 진단 시약을 제공한다.

<15> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<16> 본 발명은 삼일열 말라리아를 진단하기 위하여 혈액내에 존재하는 삼일열 말라리아의 표면단백질에 대한 항체를 측정하는 방법을 제공한다.

<17> 삼일열 말라리아를 일으키는 플라스모듐 비박스에는 여러 아종이 있으며, 이 아종들은 인체에 감염시 모두 삼일열 말라리아를 일으킨다. 이들에 의한 삼일열 말라리아는 잠복기가 길고 혈액내 원충의 수가 적어서 항원을 검출하는 방식으로 삼일열 말라리아를 진단하는 데에는 어려움이 있다. 이에 본 발명에서는 플라스모듐 비박스에 의해 감염이 되면 생기는 혈액내 항체를 측정하여 삼일열 말라리아를 진단한다.

<18> 먼저, 본 발명에서는 항원을 제조한 후 항원 항체 반응을 이용하여 혈액내에 존재하는 항체를 측정한다. 삼일열 말라리아 원충의 표면 단백질 MSP에는 C-말단 부위에 삼일열 말라리아 원충의 아종들간에 공통적으로 존재하는 아미노산 서열을 포함하고 있으며, 특히 서열번호 1로 표시되는 108 개의 아미노산으로 이루어지는 폴리펩타이드(이하 'PV200C'라 약칭함)는 삼일열 말라리아 원충의 아종들간에 100% 동일하다.

<19> 이에 본 발명에서는 삼일열 말라리아 원충의 표면 단백질 MSP의 전부 또는 일부를 이용하며, 바람직하게는 삼일열 말라리아 원충의 MSP의 C-말단 부위를 항원으로 이용한다. 좀 더 바람직하게는 MSP의 C-말단 부위의 PV200C를 항원으로 이용한다.

<20> 본 발명은 삼일열 말라리아를 진단하는 진단 시약을 제공한다.

<21> 본 발명의 진단 시약은 항원으로서 삼일열 말라리아 원충의 MSP의 전부 또는 일부, 2차 항원 접합체로서 고추냉이 과산화효소 등의 표시체를 접합시켜 제작된 IgG와 IgM,

그리고 상기 표시체와의 반응으로 발색을 유도하는 물질을 포함하는 기질 용액으로 구성된다.

<22> 항원으로 이용하는 단백질은 삼일열 말라리아 원충 *플라스모듐 비박스*의 특이한 표면 단백질로서 *플라스모듐 비박스*의 아종들에 공통하는 서열번호 1에 기재된 폴리펩타이드의 전부 또는 일부로 구성된다. 상기 단백질은 재조합 효모나 대장균에서 대량발현시켜 얻을 수 있으며, 본 발명자들은 PV200C 폴리펩티드를 발현시키는 형질전환체를 제작하여 12월 18일자로 생명공학연구소 유전자은행에 기탁하였다(수탁번호: KCTC 8977P, KCTC 8976P).

<23> 2차 항원 접합체로 이용하는 IgG와 IgM은 표시체가 접합되어 있으며, 표시체로는 고추냉이 과산화효소(HRP), 알칼라인 인산화효소(Alkaline phophatase) 등이 사용될 수 있다. 상기 2차 항원 접합체는 항체의 변이가 거의 없는 부분인 Fc(fragment crystallizable)에 결합하므로써 항체의 존재를 측정할 수 있게 한다.

<24> 상기 2차 항원 접합체의 표시체와 반응하여 발색을 유발하는 기질용액은 테트라메틸벤지딘 등의 발색제와 완충용액으로 구성된다. 기질용액은 IgG 또는 IgM에 접합된 표시체를 분해하여 발색시키고 그 정도를 측정하므로써 항체의 존재 및 항체의 양을 확인할 수 있게 한다.

<25> 구체적으로 삼일열 말라리아 원충 MSP의 C-말단 부위 PV200C 폴리펩타이드를 코딩하는 유전자를 삽입하여 제작한 발현벡터에 의해 형질전환된 재조합 효모 및 재조합 대장균으로부터 발현시켜 상기 폴리펩타이드를 정제하고, 상기 PV200C 폴리펩타이드로 코

팅한 웰 플레이트를 제조한다. 이에 말라리아 감염여부를 알고자 하는 사람의 혈장을 첨가하면 혈장내에 존재하는 상기 항원 PV200C에 대한 항체는 웰에 코팅된 항원에 특이적으로 결합하게 된다. 여기에 상기 2차 항원 접합체를 첨가하여 항원에 결합된 항체의 Fc를 인식하고 결합하게 된다. 결합한 2차 항원 접합체의 표시체를 분해하여 발색을 유도하고 이에 따른 흡광도를 측정함으로써 간접적으로 시료 혈장내에 어느 정도의 항체가 존재하는지 확인하고, 그 결과 항체의 존재 유무로 말라리아 감염 여부를 진단한다.

<26> 말라리아 환자로부터 얻은 시료 혈장을 상기 항원에 첨가한 경우 주로 IgG, IgM 또은 IgG+IgM이 항원과 반응하는 것을 확인할 수 있으며, 말라리아 환자 20 명의 혈장으로 상기 항체 검사를 수행한 결과 정상인의 혈장과 비교하여 모두 양성 반응을 확인하였다. 그러므로 말라리아 환자의 혈장에는 말라리아 항원에 대한 항체가 높은 수준으로 존재함을 알 수 있으며, 이 항체를 측정하는 방법으로 말라리아 감염여부를 진단할 수 있다.

<27> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<28> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<29> <실시예 1> 재조합 효모로부터 삼일열 말라리아 원충의 표면 항원의 발현 및 정제

.

<30> (단계 1) 재조합 효모의 제작 및 삼일열 말라리아 원충의 표면 항원의 발현

<31> 말라리아 양성 혈액에서 정제된 RNA로부터 역전사반응을 통해 합성된 cDNA를 주형으로 하여 증폭시켜 얻은 삼일열 말라리아 표면 항원 PV200C 폴리펩타이드와 pYES-2 벡터를 각각 제한효소 Hind III와 Xho I으로 처리하고 T4 라이게이즈로 연결시켜 pYLJ-MSP라고 명명하였고, 재조합 발현벡터 pYLJ-MSP를 힌넨(*Proc. Natl. Acad. Sci.*, U.S.A. 75, 1929-1933, 1978)의 방법으로 효모 *사카로마이세스 세레비세* INVSC1 (*Sacharomyces cerevisiae* INVSC1)에 형질전환 시킨 후, 효모 형질전환체를 우라실(uracil)이 들어있지 않은 최소 배지에서 하루 밤 배양하였다. 상기의 효모 형질전환체는 생명공학연구소 유전자은행에 1999년 12월 18일자로 기탁하였다(수탁번호 : KCTC 8977P).

<32> 상기와 같이 제작된 삼일열 말라리아 원충의 표면 항원 PV200C 폴리펩타이드를 발현하는 재조합 효모 pYLJ-MSP(KCTC 8977P)를 2% 글루코오스 YEPD 배지에서 37℃로 배양한 후, 배지를 1% 글루코오스, 1% 갈락토오스 YEP 배지로 바꾸어 배양함으로써, 글루코오스가 고갈되도록 하여 효모에서 표면항원을 발현시켰다. 발현되는 표면항원은 배양액으로 분비되었다.

<33> (단계 2) 발현된 표면 항원의 정제

<34> 단계 1에서와 같이 2 일간 배양한 후 배양액을 원심 분리하여 균체는 버리고 배양액만을 취하여 농축기(amicon, 미국)로 농축한 후, 간단한 정제를 위해 표면 항원 카르복실 말단에 표지된 6 개의 His 잔기를 이용하여 프로본드(Probond, Invitrogen) 칼럼에 흡착시켰다. 흡착 되지 않는 불순물은 10 mM 이미다졸(imidazol)이 들어있는 인산염 완충액(PBS)으로 제거하고, 흡착되어 있던 표면 항원은 500 mM 이미다졸을 포함하는 PBS로 탈착시켜 분리하였다.

<35> 이 과정에서 표면 항원은 거의 90% 이상 순수 분리되었고, 이 분리 용액을 농축하여 세파크릴(Sephacryl) S-200 겔 여과 크로마토그래피를 수행하였으며, 이를 통해 재조합 효모로부터 삼일열 말라리아 분열소체의 표면 항원을 순수 분리 정제 하였다. 정제된 상기 표면 항원을 진단 시약의 항원으로 사용하였다.

<36> <실시예 2> 재조합 대장균으로부터 삼일열 말라리아 원충의 표면 항원의 발현 및 정제

<37> (단계 1) 재조합 대장균의 제작 및 삼일열 말라리아 원충의 표면 항원 의 발현

<38> 실시예 1에서와 같은 방법으로 얻어진 MSP PV200C의 DNA 절편을 페놀/클로로포름(phenol/chloroform) 혼합 용액으로 정제하여 순도가 높은 DNA 절편을 얻어, 제한효소 NdeI과 BamHI으로 처리하고, 같은 제한효소로 처리한 벡터 pET-19b(Novagen) 에 삽입하여 6.0 kb 크기의 발현 벡터 pELK-MSP을 얻었다.

<39> 제조된 플라스미드 pELK-MSP는 염화칼슘 방법으로 대장균 BL21(DE3)lysS 에 형질전환시켰고, 얻어진 형질전환체는 생명공학연구소내 유전자은행에 1999년 12월 18일자로 기탁하였다(수탁번호 KCTC 8976P).

<40> 상기와 같이 제작된 형질전환체 pELK-MSP/BL21 균주(KCTC 8976P)는 암피실린(100 ㎍/㎖)과 클로람페니콜(50 ㎍/㎖)이 첨가된 LB 배지에서 12시간 동안 배양하였다. 얻어진 배양액 50 ㎖을 다시 LB 배지 1 ℓ에 접종하고 37℃에서 2시간 정도 배양한 다음 흡광도(OD_{600})가 0.3이 되었을 때 최종농도가 0.2 mM이 되도록 IPTG(Isopropyl β-D-Thiogalactopyranoside)를 첨가하고 7시간 더 배양하였다.

<41> (단계 2) 발현된 표면 항원의 정제

<42> 단계 1에서와 같이 배양한 후 원심분리하여 세포만을 분리한 다음 얻어진 세포를 인산염 완충용액 30 mℓ에 현탁시켜 초음파파쇄기(Sonicator; Sonifier 450, Branson)를 사용하여 상기 현탁액내의 대장균을 파쇄한 다음 5000 rpm에서 원심분리하였다. 발현된 MSP단백질의 일부는 상등액에, 나머지는 원심분리한 침전물에 각각 존재하므로 상등액과 펠렛을 4M 요소완충액(PBS에 4M urea를 녹인 완충액, pH 7.5)에 완전히 현탁시킨 다음 다시 원심분리하여 상등액만을 모았다.

<43> 발현된 표면 단백질은 정제를 위해 상기 단백질의 N- 말단에 표지된 10개의 히스티딘을 이용하여 Probond 칼럼(Invitrogen)에 흡착시켰다. 흡착되지 않는 불순물은 세척완충액(10 mM imidazol 및 0.1 M NaCl을 PBS에 용해시킨 완충액)으로 반복 세척하여 제거하고, 흡착된 표면 단백질은 용출완충액(1 M imidazol 및 0.1 M NaCl을 PBS에 용해시킨 완충액)으로 탈착시켜 분리하였는데, 분리된 단백질이 포함된 용액을 농축하여 다시 Sephacryl S-200(Pharmacia co. Sweden) 젤여과 크로마토그라피를 수행함으로써 재조합 대장균으로부터 삼일열 말라리아 분열소체의 표면 단백질인 MSP PV200C 폴리펩타이드를 거의 순도 99%로 얻었다.

<44> <실시예 3> 삼일열 말라리아 표면 항체 검사용 웰 플레이트 제작.

<45> EIA(Enzyme Immuno Assay) 용 96-웰 플레이트(Nunc사, 미국)에 실시예 1 또는 실시예 2에서 정제한 말라리아 표면 항원 용액을 0.5 ug/ml의 농도로 0.1 M 탄산 염화 완

충용액(pH 9.5)에 희석하여 100 ul씩 분주하였다. 분주 후 플레이트를 밀봉하고 4℃에서 18시간 동안 방치하여 항원이 웰에 부착되게 하였다. 이 후 항원용액을 제거하고 5% 일반 염소 혈청(Goat serum)을 함유한 PBS를 웰당 300 ul씩 분주하고 4℃에서 18시간 동안 방치하였다. 웰에 남은 용액을 제거하고 상온에서 1시간 동안 방치하여 수분을 건조시킨 후 제습제와 함께 밀봉용기에 넣어 4℃ 저온 냉장고에 보관하였다.

<46> <실시예 4> 삼일열 말라리아 표면 항원의 항체에 대한 간접 효소 면역 검사 (Indirect Enzyme Immuno Assay).

<47> 실시예 1 또는 실시예 2의 방법으로부터 얻어진 재조합 표면항원을 실시예 3과 같은 방법으로 96-웰 플레이트에 단백질을 코팅하여 검사에 사용하고, 접합체로는 염소에서 제조한 IgG와 IgM에 각각 고추냉이 과산화효소를 접합시켜 만든 2차 항원 접합체 (Cappel사, 미국)를 검사에 사용하였다.

<48> 제조된 플레이트의 각 웰에 인산일수소나트륨(1.15mg/ml), 인산이수소 칼륨 (0.2mg/ml), 염화칼륨(0.2mg/ml), 염화나트륨(8mg/ml), 소혈청(300ul/ml), 치메로살 (0.2mg/ml) 조성의 시료희석액 100 ul를 첨가한 후, 항체 음성 혈장시료와 항체 양성 혈장시료를 10 ul씩 첨가하여 잘 혼합하여, 37℃의 반응기에 넣고 60분간 반응시켰다.

<49> 반응 후 0.05% 트윈 20(Tween 20)을 함유한 PBS 300 ul씩으로 5 회에 걸쳐 웰을 세정한 후 고추냉이 과산화효소가 접합된 염소의 IgG(Cappel,미국)와 IgM (Bethyl사, 미국) 2차 항체를 다음과 같은 조성의 희석액 [Tris(10mM), NaCl(0.5M), 칼슘클로라이드 (1mM), glycerol(0.5%),소혈청 (0.2ml/ml), 염소혈청 (100ul/ml), Tween20(0.05%), 치메

로살 (0.2mg/ml), 페놀레드(50ug/ml)] 을 사용하여 1 : 40,000 의 비율로 각각 희석하고, 각각의 희석된 2차 효소 접합체 100 ul씩을 웰에 넣고 37℃에서 60분간 반응시켰다.

<50> 반응이 끝난 후 0.05% 트윈 20/PBS 용액으로 5회 세척하고, 기질용액(테트라메틸 벤지딘 100 ug/ml, 과산화수소 0.006%, 구연산 인산염 완충용액 pH 4.5)을 100 ul씩 첨가하였다. 30분간 암소에서 발색시킨 후 반응정지액(2N 황산용액) 100ul를 각 웰에 첨가하고 96 플레이트 판독기(Molecular Devices 사, 미국)를 이용하여 650 nm를 보조(referance) 파장으로 하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

<51> 위의 방법으로 20 개의 말라리아 양성시료와 2 개의 음성시료를 실험한 결과 도 1과 같은 결과를 얻었다. 말라리아 환자에서는 PV200C에 대한 IgG와 IgM이 검출되었으며, IgG와 IgM을 동시에 측정하였을때는 보다 높은 수치로 검출되었다.

【발명의 효과】

<52> 본 발명에 의한 말라리아 항체를 측정하여 말라리아를 진단하는 방법은 기존 항원 진단 방법에 비하여 높은 민감도를 보이며, 특히 항체 진단 방법이기 때문에 말라리아 보균자까지도 고감도로 진단할 수 있다는 장점이 있다. 특히 한국에서 발견되는 말라리아는 잠복기가 길고 재발가능성이 높은 삼일열 말라리아(P.vivax) 종으로 본 방법에 의한 진단이 더욱 효과적으로 사용될 수 있다

호 1인 것을 특징으로 하는 *플라스모듐 비박스*에 대한 항체를 측정하는 방법.

【청구항 5】

제 1항에 있어서, 상기 표면 항원에 부착하는 항체가 IgG인 것을 특징으로 하는 *플라스모듐 비박스*에 대한 항체를 측정하는 방법.

【청구항 5】

【청구항 6】

제 1항에 있어서, 상기 표면 항원에 부착하는 항체가 IgM인 것을 특징으로 하는 *플라스모듐 비박스*에 대한 항체를 측정하는 방법.

【청구항 7】

제 1항에 있어서, 상기 표면 항원에 부착하는 항체가 IgG 및 IgM인 것을 특징으로 하는 *플라스모듐 비박스*에 대한 항체를 측정하는 방법.

【청구항 8】

1) *플라스모듐 비박스*의 메로조이트 표면 항원을 재조합 효모 또는 대장균으로부터 발현시켜 정제하는 단계;

2) 정제된 상기 표면 항원을 웰 플레이트에 부착시키는 단계; 및,

3) 상기 웰 플레이트에 표본 혈청을 적용하여 상기 항원에 부착된 항체를 측정하는 단계로 구성되는 삼일열 말라리아 원충 *플라스모듐 비박스*의 진단 방법

【청구항 9】

삼일열 말라리아 원충

*플라스모듐 비박스*의 메로조이트 표면 단백질의 전부 또는 일부로 이루어진 항원, 표시체가 접합된 2차 항원 접합체 및 발색제를 포함한 기질용액으로 구성되는 삼일열 말라리아 진단 시약.

【청구항 10】

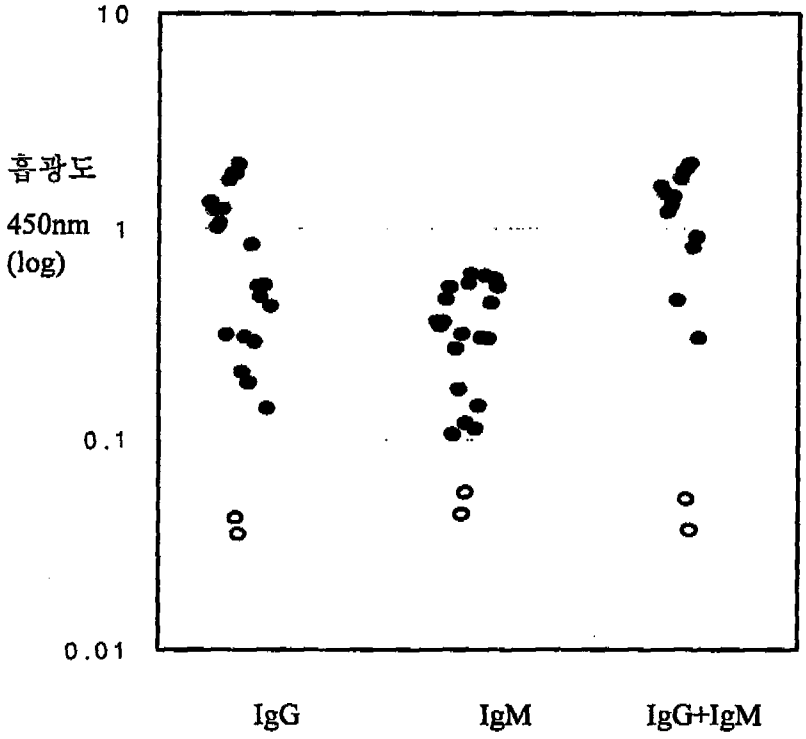
제 9항에 있어서, 상기 항원이 PV200C 폴리펩타이드의 전부 또는 일부로 이루어지는 것을 특징으로 하는 삼일열 말라리아 진단 시약.

【청구항 11】

제 9항에 있어서, 상기 항원의 아미노산 서열이 서열번호 1인 것을 특징으로 하는 삼일열 말라리아 진단 시약.

【도면】

【도 1】



【서열목록】

<110> LG CHEMICAL LTD. <120> Diagnosis for malaria and reagent use therefor <130> Op-01-20 <160> 1 <170> KOPATIN 1.5 <210> 1 <211> 108 <212> PRT <213> Plasmodium vivax <220> <221> PEPTIDE <222> (1)..(108) <223> Carboxy-terminal polypeptide of Merozoit surface protein of Plasm odium vivax <400> 1 Asn Glu Ser Lys Glu Ile Leu Ser Gln Leu Leu Asn Val Gln Thr Gln 1 5 10 15 Leu Leu Thr Met Ser Ser Glu His Thr Cys Ile Asp Thr Asn Val Pro 20 25 30 Asp Asn Ala Ala Cys Tyr Arg Tyr Leu Asp Gly Thr Glu Glu Trp Arg 35 40 45 Cys Leu Leu Thr Phe Lys Glu

Glu Gly Gly Lys Cys Val Pro Ala Ser 50 55 60

Asn Val Thr Cys Lys Asp Asn Asn Gly Gly Cys Ala Pro Glu Ala Glu 65

70 75 80 Cys Lys Met Thr Asp Ser Asn Lys Ile Val

Cys Lys Cys Thr Lys Glu 85 90 95

Gly Ser Glu Pro Leu Phe Glu Gly Val Phe Cys Ser 100 105

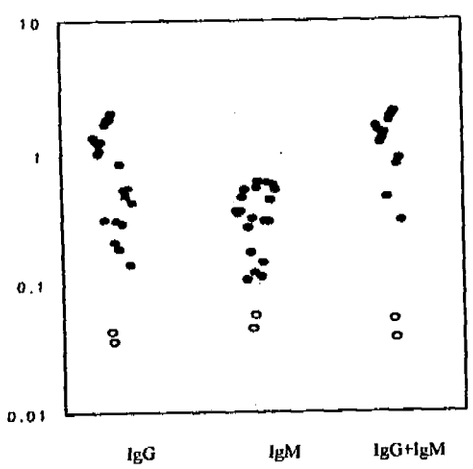
ABSTRCT

ABSTRACT

The present invention relates to a serological diagnostic method and diagnostic reagent for malaria. Particularly, the present invention relates to a method measuring antibodies against malaria in blood by using Merozoit surface protein(hereinafter refer to "MSP") of *Plasmodium Vivax* of malarial Protozoa as a antigen. Also, the present invention relates to diagnostic reagent for malaria prepared by using the above MSP as antigens. The above serological diagnostic method according to the present invention are very effective in diagnosing malaria of which latent period is long, and the probability of recurrence is high.

REPRESENTITIVE FIRURE

FIGURE 1



TITLE OF THE INVENTION

DIAGNOSIS FOR MALARIA AND REAGENT THEREFOR

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWING

Figure 1 shows the result of measuring IgG and IgM by using malaria-patient' blood plasma(•)and normal people' blood plasma(o)as samples.

DETAILED DESCRIPTION

PURPOSE OF THE INVENTION

FIELD OF THE INVENTION AND THE PRIOR ART THEREOF

The present invention relates to a serological diagnostic method and diagnostic reagent for malaria. Particularly, the present invention relates to a method of measuring antibodies against malaria in blood by using Merozoit surface protein(hereinafter refer to "MSP") of *Plasmodium Vivax* of malarial Protozoa as antigens. Also, the present invention relates to diagnostic reagent for malaria prepared by using the above MSP as antigens.

Malaria is a disease caused by malarial Protozoa that infects within human erythrocytes and is carried by mosquitoes. Billion people in the world reside in malaria-risk area and over 500 million people become infected by malaria each year. Malaria causes more than 2 million death each year. Malaria widely spreads all over the world, however, in some regions, malarial infection was eradicated or decreased since 1960's due to effective controls. However, recently, incidence of malaria increases all over the world again, due to increase of drug-resistant strain, increase in resistance to insecticide, abnormal weather such as El nino, etc.

Malaria can be categorized into African type, American type and Asian type. Each type differs in geographical distribution as well as characteristics in species and genetic inclination which Protozoa exhibit.

Life cycle of malaria is divided into Schizogony and Sporogony. Schizogony is the life cycle in human host, and Sporogony is the life cycle in mosquito host. Human is infected by sporozoites by the bite of infected mosquitoes. The sporozoites transfer to human liver through blood vessels, and they exist as a dormant state or multiply and develop into schizonts in hepatic cells. After a definite time, the schizonts enter the blood circulation, and multiply in full-scale. When the schizont

matures, it ruptures and releases thousands of merozoites into the blood stream. Merozoites invade erythrocytes, and most merozoites go through another round of asexual reproduction, again forming schizonts. Some of the merozoites change into gametocytes. The gametocytes circulate in human bloodstream. When a mosquito bites the infected person, the mosquito sucks up gametocytes along with blood. Then, male gametocyte and female gametocyte in the gut of the mosquito fuse to form zygote. The zygote, which develops in the gut wall as an oocyte, eventually gives rise to the infective sporozoite, which invades the salivary glands and stomach of the mosquito. The mosquito then can infect another human host.

Antibiotics such as chloroquine and primaquine have been used in treatment of malaria. However, recently, malaria Protozoa have developed drug resistance to such antibiotics. Therefore, acquired drug resistance poses a serious difficulty on treatment of malaria.

A blood smear method has been used in the diagnosis of malaria most frequently. This method is a classical method wherein blood cells infected with malaria Protozoa are stained and the stained sample is then observed through a microscope. However, this method takes a longer time, and technical education of the examiner is required to judge blood cells infected with malaria Protozoa. Recently, a diagnostic reagent detecting malarial antigens has been commercially available. However, the concurrent use of the diagnostic reagent and the blood smear method is recommended because the sensitivity of the diagnostic reagent is low. Another method to examine genes of malaria Protozoa is Polymerase Chain Reaction method. This method has high sensitivity, however, is used only on laboratory scale.

In Korea, malaria has been known as Hakjil. From the 1960s, attempts to eradicate this disease begun, and in the 1970s, cases of malaria were rarely reported. However, after a patient infected with malaria Protozoa was reported near DMZ in 1993, malaria begun to spread rapidly, and it was reported that the number of

patients infected with malaria Protozoa was 3,800 in 1998.

Human malaria can be caused by one of four known parasites: *Plasmodium vivax, Plasmodium falciparum, Plasmodium malariae and Plasmodium ovale.* Among them, malaria which occurrs in Korea is caused by *Plasmodium vivax. Plasmodium vivax* is characterized in that diagnosis thereof is difficult because latent period is long, and number of Protozoa in blood is few. The imported diagnostic reagent for malaria detects malarial antigens such as Lactate Dehydrogenase of malaria. However, the imported diagnostic reagent has a difficulty in diagnosing malaria of Korean type where latent period is long, and numbers of Protozoa and antigen in blood are few, because sensitivity of the diagnostic reagent is only 50%.

TECHNICAL OBJECT OF THE INVENTION

It is the first object of the present invention to provide a method of measuring antibodies against malaria in blood, in order to diagnose malaria.

It is the second object of the present invention to provide a diagnostic reagent for malaria, useful in diagnosing malaria.

CONSTITUTION OF THE INVENTION

To achieve the above objects, the present invention provides a method of measuring antibodies in blood by using MSP that is common to subspecies of malarial Protozoa as a antigen. Also, the present invention relates to diagnostic reagent for malaria, comprising the above MSP.

The present invention will hereinafter be described in more detail.

The present invention provides a method of measuring antibodies against

malaria in blood, in order to diagnose malaria.

There are many subspecies of *Plasmodium Vivax* that generate malaria. These subspecies generate malaria without exception, if a humane body was infected. Because the latent period of malaria generated by the above subspecies is long and the number of Protozoa in blood is few, there are difficulties in diagnosing malaria by detecting antigen. Therefore, in the present invention, malaria is diagnosed by measuring antibodies generated in blood by infection of *Plasmodium Vivax.*

First, in the present invention, antigens are prepared and antibodies in blood are measured by antigen-antibody reaction. The above C-terminus of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax* comprises amino acid sequences that are common to subspecies of *Plasmodium Vivax*, and especially comprises a polypeptide consisting of 108 amino acids (referred as "PV200C" hereafter) which exhibit 100% homology among subspecies of *Plasmodium Vivax,* as shown in SEQ. ID NO : 1.

Therefore, a part or whole of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax* are appropriate as a antigen according to the present invention. The C-terminus of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax* is preferable as an antigen according to the present invention, and PV200C polypeptide in the C-terminus of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax* is more preferable as an antigen according to the present invention.

The present invention provides a diagnostic reagent for malaria, comprising a part or whole of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax* as a antigen; labeled antigen conjugates consisting of markers such as horse radish peroxidase and IgM or/and IgG; and a substrate solution containing a color fixing agent.

A preferable example of the above antigen is a part or whole of PV200C that is common to subspecies of *Plasmodium Vivax,* as shown in SEQ. ID NO : 1. The PV200C polypeptide can be expressed in a large amount from recombinant yeast

transformants or E, coli transformants. The present inventors prepared a yeast transformant and E.Coli transformant which express PV200C polypeptide, and deposited them in Korean Collection for Type Cultures of Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology on December 18, 1999 (Deposit No. KCTC 8977P, KCTC 8976P).

The present invention may utilize an enzyme such as horse radish peroxidase(HRP) and alkaline phosphatase or the like as the marker of the labeled antigen conjugate. In the above diagnostic reagent according to the present invention, the labeled antigen conjugate detects existence of malaria-specific antibodies by binding to Fc (fragment crystallization) region of the malaria-specific antibodies in which there is little variation.

The substrate solution consists of a buffer solution and a color fixing agent which induces color development when reacted with the marker of the labeled antigen conjugate. The color fixing agent in the substrate solution is decomposed by the marker of the labeled antigen conjugate to induce a color development. Then, existence of malaria-specific antibodies and amount of the antibodies are detected by measuring the absorbance.

The DNA fragment coding PV200C was inserted into a vector to prepare an expression vector. PV200C was expressed from Yeast and E. coli transformed with the expression vector and is purified. Well-plate coated the above PV200C was prepared. When humane plasma was added to the above well-plate, antibodies in the humane plasma were bound to PV200C on the well-plate specifically. Then, the labeled antigen conjugates were bounded to the above antibodies by recognizing Fc of the anibodies. When the substrate solution was added, the color fixing agent in the substrate solution was decomposed by the marker of the labeled antigen conjugate to induce a color development. Then, existence of malaria-specific antibodies and

amount of the antibodies were detected by measuring the absorbance. It was confirmed that IgG, IgM or IgG+IgM reacted with the above antigens in the case that malaria patient' blood plasma sample was added to the antigens. As a result of the above reaction with 20 malaria patient' blood plasma samples, all the samples were judged to be positive. Therefore, it is confirmed that the number of antibodies against the above antigens is large and a diagnosis for malaria is possible by measuring the antibodies.

The invention will be further illustrated by the following examples. It will be apparent to those skilled in the art that these examples are given only to illustrate the present invention in more detail, but the invention is not limited to the examples given.

Example 1. Expression and purification of a surface antigen of malaria Protozoa from recombinant yeast

Example 1-1. Preparation of recombinant yeast and expression of a surface antigen of malaria Protozoa

The DNA coding PV200C is amplified using cDNA as template ,reverstranscripted from RNA purified from malaria-positive blood. The DNA coding PV200C and pYES-2 vectors were cleavaged with restriction enzymes, HindIII and Xho I, respectively. Then, DNA coding PV200C and pYES-2 vector were linked by T4 ligase(Promega) to be a recombinant expression vector that is referred as "pYLJ-MSP". Yeast *Saccharomyces cerevisiae* INVSC1 was transformed with pYLJ-MSP according to Hinnen method(*Proc. Natl. Acad. Sci.*, U.S.A 75, 1929-1933, 1978). The yeast transformants were deposited in Korean Collection for Type Cultures of Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology deposited on December 18, 1999

(Deposit No. KCTC 8977P)

The transformants pYLJ-MSP/*S. cerevisiae* INVSC1 were inoculated in YEPD medium containing 2% glucose at 37°C. Then, the culture medium was transferred to YEP medium containing 1% glucose and 1% galactose, respectively, and cultivated. The yeast transformants expressed PV200C polypeptide, exhausting glucose. The expressed PV200C polypeptide was secreted into into culture medium.

Eaxample 1-2. Purification of a surface antigen of malarial Protozoa from yeast transformants.

In order to obtain the PV200C polypeptide secreted into culture medium, the biomass was removed by centrifuging the culture medium that was cultivated for 2 days. Then, only the fluid of culture medium was taken and concentrated by ultrafiltrating apparatus(Amicon, U.S.A.). For easily purifying the concentrated fluid, the surface proteins linked with cationic histidine residues were adsorbed on Probond column(Invitrogen)

The contaminants which were not adsorbed on column were removed by phosphate buffer containing 10mM imidazol, and then the surface proteins adsorbed on column were desorbed and separated by phosphate buffer containing 500mM imidazol. The surface proteins having approximately 90% or more of purity were separated by the above process. Then, the surface proteins having approximately 99% or more of high purity were obtained by concentrating the separated solution and performing Sephacryl S-200 gel filtration chromatography with the concentrate.

Example 2. Expression and purification of a surface antigen of malarial Protozoa from recombinant E, coli.

Example 2-1. Preparation of E, coli transformants and expression of a surface

antigen of malarial Protozoa.

The amplified DNA fragments coding MSP PV200C prepared in the same way of Example 1, were purified with phenol/chloroform mixture to produce DNA fragments with high purity. The DNA fragment and vector, pET-19b (Novagen) were cleavaged with NdeI and BamHI. Then, the DNA fragment was inserted into pET-19b to prepare an expression vector, pELK-MSP

E. coli strain BL21(DE3)lysS was transformed with pELK-MSPs by the treatment with $CaCl_2$. The transformants were deposited in Korean Collection for Type Cultures of Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology on December 18, 1999 (Deposit No. KCTC 8976P)

The transformants pELK-MSP/strain BL21 (KCTC 8976P) were cultivated for 12 hours in LB medium containing 50 μg/ml of chloramphenicol and 100 μg/ml of amphiciline. Then, 50 ml of the resulting cultures were again inoculated in 1L of LB medium and were cultivated for about 2 hours at 37°C. When absorbance(OD 600) of the cultures became 0.3, IPTG (Isopropyl thio-β-D-galactoside) was added to the medium to a final concentration of 0.2 mM. Then, the cultures were cultivated further for 7 hours.

Example 2-2. Purification of a surface antigen of malarial Protozoa from E, coli transformants.

After the cultivation, only the cells were isolated by centrifugation. The obtained cells were suspended in 30 ml of Phosphate Buffered Saline(PBS). Then, E. Coli in the suspension was crushed with Sonicator(Branson, Sonifier 450) and centrifuged at 5000 rpm. Because a part of expressed MSP proteins was in the supernatant and the remainder was in the pellet, both the supernatant and the pellet were completely suspended in 4M urea buffer(pH 7.5) where 4M urea was dissolved

in PBS, and then were centrifuged, by which only the supernatant was collected. Because the overexpressed surface protein has His marker consisting of 10 histidines in N-terminus thereof, the protein was adsorbed on Probond column(Invitrogen) for purification. The contaminants which were not adsorbed on column were removed repeatedly with a washing buffer in which 10mM imidazol and 0.1M NaCl were dissolved in PBS. Then, the surface proteins adsorbed on column were desorbed and separated with an elution buffer in which 500mM imidazol and 0.1M NaCl were dissolved in PBS. It was confirmed that the surface proteins having approximately 90% or more of purity were separated by the above process. Then, it was confirmed that PV200C polypeptide having approximately 99% or more of high purity were obtained from recombinant E.Coli by concentrating the separated solution and performing Sephacryl S-200 gel filtration chromatography with the concentrate.

Example 3. Preparation of well plate for measuring of the surface antibody

The solution of recombinant surface antigens of malarial Protozoa prepared in Example 1 or 2 was diluted with 0.1M carbonate buffer (pH 9.5) to 0.5 μg/ml, and 100 μl of the solution was added to each well of 96-well plate for EIA. To adsorb the surface antigens on the well, the well plate was sealed tightly and left for 18 hours at 4 °C. Then, the surface antigens which were not adsorbed on the well were removed by adding 300 μl of phosphate buffer solution containing 5% general goat serum to each well and leaving it for 18 hours at 4 °C. After the solution that remained in the well was discarded, moisture was removed by leaving the well plate for 1 hour at ambient temperature. Then, the well plate was transferred to a hermetic container with a dehumidifying agent and stored in a refrigerator at 4 °C.

Example 4. Indirect enzyme immunoassay for antibodies against surface

264
203

antigen of malaria

To diagnose malaria by indirect enzyme immunoassay, the solid support prepared by coating 96-well plate(Nunc) with recombinant surface antigens prepared in Example 1 or 2 according to the method of Example 3, and the labeled antigen conjugate consisting of HRP and anti-human IgM antibody or anti-human IgG antibody derived from goat were used.

100 μl of a sample dilution solution containing 1.15 mg/ml NaOH, 0.2 mg/ml of KH_2PO_4, 0.2 mg/ml KCl, 8 mg/ml NaCl, 300 μl/ml bovine serum, 0.2 mg/ml thimerosal and the like was added to each well of 96-well plate(Nunc) coated with recombinant surface antigens. Then, 10 μl of antibody-negative plasma sample or 10 μl of antibody-positive plasma sample was added to the wells, and the resulting mixtures were well mixed. The well plate was incubated for 60 minutes in a reactor at 37 °C.

After the reaction terminated, the well plate was washed 5 times with 300 μl of a phosphate buffer solution containing 0.05% Tween 20. Anti-human IgG antibody(Cappel) or anti-human IgM antibody(Bethyl) derived from goat to which HRP was conjugated was diluted to 1/40,000 with a dilution solution containing 10mM Tris, 0.5M NaCl, 1mM $CaCl_2$, 0.5% glycerol, 0.2 ml/ml bovine serum, 100 μl/ml goat serum, 0.05% Tween 20, 0.2 mg/ml thimerosal and 50 μg/ml phenol red. 100 μl of the diluted conjugate was added to each well of the 96-well plate and the well plate was incubated for 60 minutes at 37 °C.

After the reaction terminated, the well plate was washed 5 times with 0.05% Tween 20/phosphate buffer solution. 100 μl of a substrate solution containing 100 μg/ml tetramethylbenzidine, 0.006% hydrogen peroxide and citrate-phosphate buffer solution(pH 4.5) was added to each well. After color development in a dark place for 30 minutes, 100 μl of the reaction-stopping solution (2N sulfuric acid solution) was added to each well to terminate the color development reaction. Then, the

absorbance was measured at 450 nm (reference wavelength, 650 nm) by using the 96 well plate reader (Molecular Devices, USA).

The result of testing 20 malaria-positive sample and 2 malaria-negative sample is shown in Figure 1. In malaria patient' sample, IgG and IgM was detected, and IgG and IgM were detected at high value when IgG and IgM was tested at the same time.

EFFECT OF THE INVENTION

The diagnostic method for malaria that measures antibodies against malaria according to the present invention is more enhanced sensitivity than the prior arts that measure antigens. Particularly, The diagnostic method according to the present invention that measures antibodies against malaria is very effective in diagnosing malaria carrier. Also, the diagnostic method for malaria according to the present invention are very effective in diagnosing malaria of Korean type of which latent period is long, and the probability of recurrence is high.

What is claimed is;

1. An method of measuring *Plasmodium Vivax*-specific antibodies in blood by using Merozoit surface protein of *Plasmodium Vivax* of malaria Protozoa as antigens.

2. The method of measuring *Plasmodium Vivax*-specific antibodies according to Claim 1, wherein said antigens are C-terminus of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax.*

3. The method of measuring *Plasmodium Vivax*-specific antibodies according to Claim 1, wherein said antigens are a part or whole of PV200C polypeptide in the C-terminus of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax.*

4. The method of measuring *Plasmodium Vivax*-specific antibodies according to Claim 3, wherein amino acid sequences of the said PV200C polypeptide are amino acid sequences as shown in SEQ. ID NO : 1.

5. The method of measuring *Plasmodium Vivax*-specific antibodies according to Claim 1, wherein antibodies binding to said surface antigens of malarial Protozoa is IgG.

6. The method of measuring *Plasmodium Vivax*-specific antibodies according to Claim 1, wherein antibodies binding to said surface antigens of malarial Protozoa is IgM.

7. The method of measuring *Plasmodium Vivax*-specific antibodies according to Claim 1, wherein antibody binding to said surface antigen of malarial Protozoa is IgG and IgM

8. A diagnostic method for *Plasmodium Vivax* of malaria Protozoa comprising :

(1) expressing Merozoite surface antigens of *Plasmodium Vivax* from transformants yeast or E, coli and purifying it;

(2) immobilizing the purified surface antigens on a well plate;

(3) pouring blood serum sample to measuring the antibodies bound to the said surface antigens immobilized on the said well plate;

9. A diagnostic reagent for malaria comprising a part or whole of Merozoite Surface

Protein of *Plasmodium Vivax* as a antigen; labeled antigen conjugates; and a substrate solution containing a color fixing agent.

10. The diagnostic reagent for malaria according to Claim 9, wherein said Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax* is a part or whole of PV200C polypeptide

11. The diagnostic reagent for malaria according to Claim 9, wherein amino acid sequences of the PV200C polypeptide are amino acid sequences as shown in SEQ. ID NO : 1.

Abr 2

~~208~~
207

LA OFICINA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL COREANA

Por la presente se certifica que la siguiente solicitud que obra anexo a ésta es copia fiel de los registros en la Oficina de Propiedad Industrial Coreana

Número de Solicitud: **2000 7648**

Fecha de Presentación: **17 de Febrero de 2000**

Solicitante: **LG CHEMICAL LTD**

2000 **12** **13**

Funcionario certificante

REIVINDICACIONES

1. Un método de medición de los anticuerpos específicos *Plasmodium Vivax* en la sangre, mediante el empleo de antígenos de protozoarios tipo malaria de la proteína de superficie del merozoito del Plasmodium Vivax.

2. El método de medición de los anticuerpos específicos *Plasmodium Vivax* de acuerdo con la reivindicación No.1, caracterizados porque dichos antígenos están en la porción C terminal de la proteína de superficie del merozoito del Plasmodium Vivax.

3. El método de medición de los anticuerpos específicos *Plasmodium Vivax* de acuerdo con la reivindicación No.1, caracterizado porque dichos antígenos son una parte o un todo del polipéptido PV200C en el terminal C de la proteína de superficie merozoito del Plasmodium Vivax.

4. El método de medición de los anticuerpos específicos *Plasmodium Vivax* de acuerdo con la reivindicación No.3, caracterizado porque las secuencias de los aminoácidos del mencionado polipéptido PV200C son secuencias de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ. ID No.:1.

5. El método de medición de los anticuerpos específicos *Plasmodium Vivax* de acuerdo con la reivindicación No.1, caracterizado porque los anticuerpos se unen a dichos antígenos de superficie del protozoario tipo malaria IgG.

6. El método de medición de los anticuerpos específicos *Plasmodium Vivax* de acuerdo con la reivindicación No.1, caracterizado porque los anticuerpos se unen a dichos antígenos de superficie del protozoario tipo malaria IgM.

7. El método de medición de los anticuerpos específicos *Plasmodium Vivax* de acuerdo con la reivindicación No.1, caracterizado porque los anticuerpos se unen a dichos antígenos de superficie del protozoario tipo malaria IgG y IgM.

8. Un método de diagnóstico para el protozoario tipo malaria *Plasmodium Vivax* que comprende:

(1). Expresar los antígenos de superficie del merozoito del Plasmodium Vivax a partir de transformados de levadura o E, coli y su purificación;

(2) Inmovilización de los antígenos de superficie purificados sobre un disco profundo.

(3) Vaciamiento de la muestra sérica de sangre para medir los anticuerpos unidos a dichos antígenos de superficie inmobilizados sobre dicho disco profundo;

9. Un reactivo de diagnóstico para la malaria que comprende una parte o un todo de la proteína de superficie del merozoito de *Plasmodium Vivax* como un antígeno; conjugados antígenicos marcados; y una solución de substrato que contiene un agente fijador de color.

10. El reactivo de diagnóstico para la malaria de acuerdo con la reivindicación No.9, caracterizado porque dicha proteína de superficie merozoito de *Plasmodium Vivax* es una parte o un todo del polipéptido PV200C

11. El reactivo de diagnóstico para la malaria de acuerdo con la reivindicación No.9, caracterizado porque las secuencias de aminoácidos del polipéptido PV200C son secuencias de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO:1.

Abstract 3. 2H

910

대 한 민 국 특 허 청
KOREAN INDUSTRIAL PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Industrial Property Office.

출 원 번 호 : 특허출원 2000년 제 7649 호
Application Number

출 원 년 월 일 : 2000년 02월 17일
Date of Application

출 원 인 : 주식회사 엘지화학
Applicant(s)

2000 년 12 월 13 일

특 허 청
COMMISSIONER

1020000007649 2000/12/1

【서류명】 특허출원서

【권리구분】 특허

【수신처】 특허청장

【참조번호】 0002

【제출일자】 2000.02.17

【발명의 명칭】 효모를 이용한 삼일열 말라리아 원충 표면 단백질의 제조 방법

【발명의 영문명칭】 Method for producing the recombinant malaria surface antigen protein from yeast

【출원인】

【명칭】 주식회사 엘지화학

【출원인코드】 1-1998-001275-0

【대리인】

【성명】 이원희

【대리인코드】 9-1998-000385-9

【포괄위임등록번호】 1999-012836-2

【발명자】

【성명의 국문표기】 임국진

【성명의 영문표기】 LIM,Kook-Jin

【주민등록번호】 611117-1482719

【우편번호】 305-390

【주소】 대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 404-1104

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 손미진

【성명의 영문표기】 SOHN,Mi-Jin

【주민등록번호】 650325-2929420

【우편번호】 305-333

【주소】 대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 125동 505호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 이승원

【성명의 영문표기】 LEE,Seungwon

【주민등록번호】 640824-1068214

【우편번호】 463-060
【주소】 경기도 성남시 분당구 이매동 한신아파트 206-1804
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 오재훈
【성명의 영문표기】 OH,jaehoon
【주민등록번호】 720629-1168020
【우편번호】 305-503
【주소】 대전광역시 유성구 송강동 8-2 청솔아파트 102-306
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 김형철
【성명의 영문표기】 KIM,Hyung-Cheol
【주민등록번호】 730724-1024411
【우편번호】 136-104
【주소】 서울특별시 성북구 정릉4동 266-37 301호
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 황병갑
【성명의 영문표기】 HWANG,Byung Gap
【주민등록번호】 550612-1552314
【우편번호】 120-093
【주소】 서울특별시 서대문구 홍제3동 문화론 현대아파트 101-110
【국적】 KR
【심사청구】 청구
【미생물기탁】
【기탁기관명】 생명공학연구소 유전자은행
【수탁번호】 KCTC 8977P
【수탁일자】 1999.12.18
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】
【서열개수】 008
【서열목록의 전자문서】 첨부

2-4
213

1020000007649 2000/12/1

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사 를 청구합니다. 대리인
이원희 (인)

【수수료】

【기본출원료】	20	면	29,000 원
【가산출원료】	6	면	6,000 원
【우선권주장료】	0	건	0 원
【심사청구료】	10	항	429,000 원
【합계】	464,000 원		

【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통 2.미생물기탁증명서_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 효모를 이용한 삼일열 말라리아 원충 표면 단백질의 제조방법에 관한 것으로, 구체적으로 삼일열 말라리아 원충의 표면중 원충의 아종 사이에서 아미노산 서열이 100% 일치하는 표면 단백질 MSP(merozoit surface protein)의 C-말단부위 PV200C 유전자를 당쇄를 가진 활성형 단백질의 형태로 제조하여 목적 단백질만의 세포 내 분비되게 발현을 유도하고, 표면의 C-말단에 6개 히스티딘 잔기를 붙여서 발현시킨 후 히스티딘-친화 칼럼과 겔 여과 크로마토그라피 과정을 통해 분리·정제하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 제조방법에 의해 효모로부터 제조한 삼일열 말라리아 원충 표면 PV200C 폴리펩타이드는 말라리아 항원에 대한 민감도 및 특이성이 높아 위반응의 확률이 현저히 낮으므로 한국형 말라리아의 진단에 효율적으로 사용할 수 있다.

【대표도】

도 1

【명세서】

【발명의 명칭】

효모를 이용한 삼일열 말라리아 원충 표면 단백질의 제조방법 (Method for producing the recombinant malaria surface antigen protein from yeast)

【도면의 간단한 설명】

도 1은 효모에서 말라리아 표면을 발현하는 발현벡터 pYLJ-MSP의 제조과정을 나타낸 것이고,

도 2는 프로본드 흡착수지를 이용하여 정제된 표면을 SDS-폴리아크릴아마이드 젤에 전기영동한 결과를 나타낸 것이고,

레인 1 : 세포배양액을 원심분리한 침전물

레인 2 : 세포배양액을 원심분리한 상등액을 농축한 것

레인 3 : 농축한 상등액을 프로본드 칼럼으로 정제한 것

도 3은 항원성 검증을 위해 말라리아 환자혈청을 이용하여 웨스턴 블러팅을 수행하여 항원성을 검정한 결과를 나타낸 것이다.

레인 1 : 농축한 내양액

레인 2 : 정제된 MSP 단백질

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<9> 본 발명은 효모를 이용하여 삼일열 말라리아 원충의 표면 단백질을 제조하는 방법에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명은 삼일열 말라리아 원충의 표면 단백질 중 아미노 산 서열이 원충의 아종사이에서 100% 일치하는 표면 단백질 메로조이트 표면 단백질 (merozoit surface protein, 이하 'MSP'라 약칭함)을 목적 단백질로 하여, 상기 목적 단백질의 C-말단부위에 존재하는 PV200C 폴리펩타이드의 N-말단에 효모의 α-인자 리더 펩타이드(α-factor leader peptide)를 융합시켜 당쇄를 가진 활성형 단백질의 형태로 발현되도록 제조하여 상기 목적 단백질만이 세포 밖으로 분비되게 발현을 유도하는 제조방법에 관한 것이다.

<10> 또한 본 발명은 상기 표면 단백질 MSP의 C-말단에 6개 히스티딘 잔기를 붙여 발현시킴으로써 세포밖으로 분비되어 배양액내에 존재하는 표면 단백질을 히스티딘-친화 칼럼과 겔 여과 크로마토그라피를 거쳐 분리·정제하는 제조방법에 관한 것이다.

<11> 말라리아는 모기를 매개로 하여 발생하는 질병으로 원인균인 말라리아 원충이 적혈구내에 감염되어 발생한다. 현재 전세계 인구 중 10억명의 인구가 말라리아 감염 가능지역에 거주하고 있으며, 매년 5억명 이상이 말라리아에 감염되고 그 중 2 백명 이상이 목숨을 잃는 무서운 질병중의 하나이다. 이러한 말라리아는 전 세계적인 분포를 보이고 있으나 1960년대 이후로는 효과적인 방제로 인하여 그 발생율이 꾸준히 감소되어

왔으며 일부 지역에서는 소멸되기도 하였으나, 최근 엘리뇨 현상과 같은 이상 기온 현상, 약제 내성 균주의 증가 및 살충제에 대한 저항성 증가 등의 요인으로 인해 전 세계적으로 말라리아가 다시 확산되고 있는 추세이다.

말라리아는 말라리아 원충이 모기로부터 사람의 적혈구로 이동함으로써 발생하게 되며, 말라리아 원충의 생활사는 사람에서의 분열생식기(Schizogony)와 모기에서의 포자생식기(Sporogony)로 나누어지는데, 처음 모기가 사람을 물면 말라리아 원충은 혈관을 따라 간으로 이동하여 간세포에서 증식하거나 휴면상태로 존재하다가, 일정한 기간이 지난 후 혈중으로 나와 본격적인 증식을 한다. 혈중에서는 적혈구를 숙주 세포로 하여 영양체인 고리형에서 증식형을 거쳐 분열체를 생성하며, 생성된 분열체가 수십개의 분열소체를 방출하면 각각 다시 다른 적혈구로 침입하여 동일한 생활사를 반복하게 된다. 이 중 일부가 생식모세포 형태로 존재하게 되는데, 모기가 이런 상태의 사람을 흡혈하게 되면 생식모세포가 모기로 유입되어 증식되고 모기의 위와 침샘에 포자상태로 존재하다가 다시 모기에 의해 사람에게 감염되는 과정을 반복하게 된다.

<13> 말라리아는 그 원충의 지리적 분포의 차이, 원충간의 종적 특성 및 유전적 성향에 따라 크게 중남미를 중심으로 한 아메리카형, 아프리카 대륙 전체를 중심으로 한 아프리카형, 그리고 인도와 동남아시아를 중심으로 한 아시아형으로 나뉜다. 국내에서 발병하는 한국형 말라리아는

*플라스모디움 비백스(Plasmodium vivax)*라는 말라리아 원충에 의해서만 감염된다(Chom. S. Y., *Korean J Parasit.*, 32(4), 281-284)고 알려져 있는데, 국내에서 유행되고 있는 *플라스모디움 비백스*는 오랜 잠복기를 거치고 혈액내 적은 원충수가 존재하는 특징을 가지고 있어 진단에 어려움을 초래한다. 국내에서 말라리아는 학질이라는 질병으로 오래 전부터 알려져 왔는데, 1960년대부터 시작된 말라리아 박멸사업으로 1970년대에 대부분 거의 박멸되어 보고 되지 않았다. 하지만, 최근 1993년에 휴전선 부근에서 1명의 말라리아 환자가 발생한 이후 말라리아가 급속히 확산되어 1998년에는 300명에 이르는 환자가 발생된 것으로 보고되었다. 이러한 말라리아의 급속한 증가 추세에도 불구하고 국내에서는 말라리아의 감염을 진단하는 진단시약이나 진단방법이 아직까지 자체 개발되지 못하고 있기 때문에 대부분의 말라리아 진단은 수입된 진단시약에 의존하고 있다. 하지만, 외국에서 수입된 진단시약은 말라리아의 젖산 환원효소(Lactate Dehydrogenase) 등의 항원를 검출하는 방식으로 진단하는 것이므로, 혈액내 적은 원충수가 존재하여 상대적으로 항원 생성이 적은 한국형 말라리아를 진단하기에는 그 민감도가 약 50% 수준에 머물고 있는 실정이므로 한국형 말라리아를 진단할 수 있는 진단시약의 자체 개발에 대한 요구가 증가되고 있다.

말라리아의 진단 방법으로는 고전적 방법인 혈액 도말법이 가장 많이 사용되고 있는데, 이 진단방법은 현미경으로 염색된 말라리아 감염 혈구를 관찰하는 방법이다. 그러나 이 진단방법은 시간이 많이 소요되고 말라리아에 감염된 혈구를 판별해내기 위하여 검사자의 전문교육이 요구된다는 문제점이 있다. 최근에는 이러한 문제점을 해결하기 위해 말라이아의 항원을 검출하는 시약이 시판 되고 있으나,

이들 시약들 역시 민감도가 낮기 때문에 상기 혈액 도말법과 동시에 사용하도록 권고되고 있다. 또 다른 진단방법으로서 말라리아 원충의 유전자를 검사하는 PCR 방법은 민감도는 높지만 과정상의 어려움으로 아직 실용화되지 못하고 실험실에서만 행하여 지고 있는 실정이다. 또한, 이와 같은 종래의 진단방법은 특히 *플라스모디움 비박스*에 의해 감염되어 잠복기가 길고 혈액내 원충수가 적은 한국형 말라리아를 진단하는데는 어려움이 있다.

<15> 이에 상기 문제점을 극복하기 위하여 본 발명자들은 삼일열 말라리아 원충인 *플라스모디움 비박스*의 특이한 표면 단백질 MSP의 C-말단을 항원으로 이용하여 환자의 혈액내에 존재하는 항체를 검출하여 말라리아를 진단하는 방법을 개발하였다.

<16> MSP는 말라리아 원충 *플라스모디움 비박스*의 표면에 특이적으로 존재하는 표면 항원 단백질로서, 특히 MSP의 C-말단 부위를 코딩하는 PV200C 폴리펩타이드는 그 서열이 108개 아미노산으로 구성되며 *플라스모디움 비박스* 원충들의 아종 사이에서 100 %의 상동성을 보이는 것으로 알려져 있어서, PV200C 폴리펩타이드를 말라리아 진단을 위한 목적 항원 단백질로 사용할 경우 한국형 삼일열 말라리아를 진단하는데 매우 유용하다.

<17> 현재 말라리아 항원 자체의 발현에 관한 연구는 많이 이루어지지 않은 상태이며, 일반적으로 항원 단백질을 코딩하는 유전자를 과발현시켜 단백질을 얻는 방법이 많이 연구되었는데, 제조된 대부분의 항원들은 혈액응고인자 Xa (Ellinger et

al., *Virol.* 180, 81, 1991)나 *스타필로코커스(Staphylococcus)*의 단백질 A (Marczinovits et al., *J. Biochem.*, 31, 225, 1993) 또는 β-갈락토시데이즈(β-galactosidase) 등과 같은 단백질에 융합시켜 발현한 것이었다. 그 결과 이렇게 융합 벡터에 의해 얻은 항원 단백질의 발현양은 증가하였지만, 항원 단백질로부터 융합된 단백질을 제거하기 위해서는 더욱 여러 번의 정제 과정이 많아져 수율이 감소하고 제조원가가 상승하는 문제점을 야기하였으며, 또한 단시약으로 사용 시 융합 파트너로 사용된 단백질에 의해 정상인을 환자로 오진하게 되는 위양성(pseudo-positive signal)율도 증가하는 문제점을 나타내었다.

<18> 이에 본 발명자들은 상기 방법들의 문제점을 극복하면서 한국형 말라리아 진단에 적합한 말라리아 진단시약을 개발하기 위한 연구의 일환으로, 국내 말라리아 환자의 혈액으로부터 *플라스모디움 비박스* 표면 단백질 MSP중 원충의 아종 사이에서 100% 상동성을 보이는 108개 아미노산으로 구성되고, MSP의 C-말단에 존재하는 PV200C 폴리펩타이드를 클로닝(cloning)하여 이를 효모로부터 절단없이 발현·정제하는 제조방법을 개발하였다. 본 발명의 제조방법은 말라리아 표면의 재조합 폴리펩타이드를 효모로부터 발현시켜 간단하게 분리·정제하게 함으로써, 상기 항원 단백질에 대한 항체 유무를 조사하여 말라리아 환자를 판별하는 진단시약으로써 뿐 만 아니라 백신으로서도 유요하게 사용될 수 있다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<19> 본 발명의 목적은 한국형 삼일열 말라리아 원충의 표면 단백질 유전자를 클로닝한 재조

합 발현벡터를 제작하여 이를 효모에 형질전환시키고, 상기 재조합 발현벡터가 형질전환된 효모 형질전환체로부터 발현된 표면 단백질을 고순도로 분리·정제하는 제조방법을 제공하는 것이다.

<20> 또한, 본 발명은 상기의 제조방법을 통해 민감도 및 특이성이 높아 위반응의 확률이 현저하게 낮은 삼일열 말라리아 진단용 항원을 대량생산하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

【발명의 구성 및 작용】

<21> 상기 목적을 달성하기 의하여, 본 발명은 삼일열 말라리아 원충*(Plasmodium vivax)*의 표면 단백질 MSP 유전자, 히스티딘 잔기 및 효모의 α-인자 리더 펩타이드를 포함하는 발현벡터, 상기 발현벡터로 형질전환된 형질전환체 및 상기 형질전환체를 이용하여 표면 단백질 MSP를 제조하는 방법을 제공한다.

<22> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<23> 본 발명은 삼일열 말라리아 원충 표면 단백질 MSP의 C-말단에 위치하는 PV200C 폴리펩타이드의 N-말단에는 효모의 α-인자 리더 펩타이드를 결합시키고, C-말단에는 6개의 히스티딘 잔기를 결합시킨 융합 단백질의 발현벡터 pYLJ-MSP 및 상기 발현벡터를 효모에 형질전환시킨 형질전환체 pYLJ-MSP/*S. cerevisiae* INVSC1(수탁번호 : KCTC 8977P)를 제공한다.

<24> 본 발명의 표면 단백질 MSP 유전자는 그 유전자의 전부 또는 일부를 사용할 수 있

으며, 바람직하기로는 *플라스모디움 비박스*의 여러 종에서 아미노산 서열이 비교적 일정하다고 알려진 말라리아 원충 표면 단백질 MSP의 C-말단 부위 유전자인 PV200C 유전자를 사용하는 것이 바람직하다. 따라서 본 발명에서는 *플라스모디움 비박스* 원충의 아종 사이에서도 아미노산 서열이 100% 상동성을 보이는 108개 아미노산으로 구성된 상기 말라리아 원충 표면 단백질 MSP의 C-말단 부위에 위치하는 PV200C 유전자를 사용하였다.

<25> 상기 폴리펩타이드 PV200C를 클로닝하기 위하여 본 발명자들은 말라리아 양성 혈액에서 RNA를 정제하여 이로부터 cDNA를 만들고, 상기 cDNA를 주형으로 PV200C에 특이적인 프라이머 쌍을 사용하여 중합효소 연쇄반응(이하 'PCR' 이라 약칭함)을 수행함으로써 증폭된 PV200C DNA 절편을 얻었다.

<26> 한편, 효모내에서 발현된 PV200C 폴리펩타이드를 세포밖으로 분비되도록 발현을 유도하여 당쇄화 된 활성형 형태의 단백질을 얻기 위해서 PV200C 폴리펩타이드의 N-말단에 효모의 α-인자 리더 펩타이드 서열을 결합시켰다. 이처럼 PV200C 폴리펩타이드의 N-말단에 결합될 효모의 α-인자 리더 펩타이드 서열은 상기 서열을 함유하는 플라스미드로부터 PCR을 수행함으로써 효모의 증폭된 상기 DNA 절편을 얻을 수 있다.

<27> 상기와 같이 얻은 PV200C 유전자와 효모 α-인자 리더 펩타이드 DNA 절편을 연결하기 위하여, 이들 두 PCR 산물들을 주형으로 오버랩핑(overlapping) PCR 을 수행하였다. 그 결과, 상기 유전자는 서열번호 8로 기재되는 108개 아미노산을 코딩하는 유전자로 구성되어 있었다. 본 발명자들은 상기 유전자 절편을 pYES-2 벡터에 삽입하여 재조합 발현벡터 pYLJ-MSP를 얻었다(도 3 참조).

<28> 또한 본 발명자들은 상기의 재조합 발현벡터 pYLJ-MSP를 효모에 형질전환시켜 형질전환체 pYLJ-MSP/

S. cerevisiae INVSC1를 얻었고 이를 생명공학 연구소 유전자은행에 1999년 12월 18일자로 기탁하였다(수탁번호 : KCTC 8977P).

<29> 또한, 본발명은 상기의 형질전환체를 이용하여 활성형의 말라리아 항원 PV200C 폴리펩타이드를 제조하는 방법을 제공한다.

<30> 상기 형질전환체로부터 발현된 말라리아 표면 PV200C 폴리펩타이드는 N-말단에 붙어있던 α-인자 리더 펩타이드에 의해 세포 밖으로 분비되고, 분비된 후에 N-말단에 붙어있던 α-인자 리더 펩타이드는 세포막에 존재하는 펩티데아제(peptidase)에 의해 제거됨으로써, 표면 단백질만이 배양액으로 분비됨을 확인하였다.

<31> 상기와 같이 효모 형질전환체로부터 발현된 표면 단백질은 배양액내로 분비되기때문에, 본 발명자들은 이의 분리·정제를 위해 표면 단백질 C-말단에 붙인 6개 히스티딘 잔기를 이용하여 프로본드 칼럼에 흡착시켜 분리한 후 겔 여과 크로마토그래피를 수행하여 정제함으로써, 99% 이상의 고순도로 분리·정제된 표면 MSP를 얻었다. 이렇게 분리·정제된 표면 MSP는 약 18 KDa이었으며, N-말단의 아미노산 서열 분석에 의해 상기에서 발현된 표면단백질이 말라리아 항원 PV200C 폴리펩타이드임을 확인하였다.

<32> 한편, 상기의 효모 형질전환체로부터 분리·정제된 말라리아 표면의 항원성을 결정하기 위하여 말라리아 환자의 혈청으로 웨스턴 블러팅(Western blotting)을 수행하였다. 그 결과 18 KDa 위치의 표면 단백질 MSP PV200C 만이 검출되었고, 따라서 본 발명의 제조방법에 따라 효모 형질전환체로부터 분리·정제된 단백질이 매우 민감하고 특이성이 높은 항원임을 입증하였다.

<33> 이상에서 본 바와 같이 본 발명의 제조방법에 의해 재조합 효모 형질전환체로부터 발현된 말라리아 표면 단백질을 히스티딘-친화 칼럼과 젤 여과 크로마토그라피 방법을 수행하여 분리·정제하면 항체에 대한 민감도 및 특이성이 높고 위반응의 확률이 현저히 적은 고순도의 표면 단백질을 얻을 수 있어, 이를 한국형 말라리아를 진단하는 진단시약의 항원 뿐만 아니라 백신으로 효율적으로 사용할 수 있다.

<34> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<35> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<36> <실시예 1> 말라리아 양성 혈액에서의 cDNA 제조

<37> 말라리아 양성혈액에서 RNA를 정제하기 위하여 TRI 시약 TM(Sigma)을 사용하였다. 정제 방법은 시약 제조사가 제시하는 하기의 방법을 사용하였다. 말라리아 양성혈액 0.1 ml에 TRI 시약 TM 0.1 ml을 혼합하고 상온에서 5분간 방치하였다. 상기 반응용액에 BCP 20 ㎕를 혼합하고 상온에서 5분간 방치한 후, 4℃, 12,000 rpm 조건으로 15분간 원심분리를 하였다. 이때, 원심분리를 하면 3개의 층이 형성되는데 이 중 RNA가 포함된 상층액만을 새 튜브로 옮기고, 여기에 이소프로판올(isopropanol) 50 ㎕를 혼합하여 상온에서 5분간 방치하였다. 상기 반응액을 4℃, 12,000 rpm 조건에서 다시 10분간 원심분리하여 상층액은 버리고 침전물은 75% 에탄올로 세척한 후 증류수 20 ㎕에 녹여서 cDNA 제

조에 사용하였다.

<38> 상기에서 정제한 RNA 9 ㎕와 N6 무작위 프라이머(random primer, Genotech) 1 ㎕를 혼합하여 65℃에서 5분간 반응시킨 후 얼음에 옮겨 냉각시켰다. 상기 혼합용액에 RT 완충용액 4 ㎕, 0.1 M DTT 2 ㎕, 10 mM dNTP 1 ㎕, 역전사 효소(Reverse transcriptase, Gibco) 1 ㎕, 역전사 저해제(RT inhibitor, Promega) 1 ㎕, D.W. 1 ㎕를 넣어 42℃에서 1시간 반응시키고 이어서 70℃에서 10분간 반응시켜 cDNA를 제조하였다.

<39> <실시예 2> PV200C 코딩 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드의 제작

<40> 실시예 1에서 제조한 cDNA를 주형으로 하고 서열번호 1과 서열번호 3으로 기재되는 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 실시하였다. PCR 반응은 PCR 완충용액 5 ㎕, 2.5 mM dNTP 5 ㎕, 순방향 프라이머 1 ㎕, 역방향 프라이머 1 ㎕, 주형 DNA 2 ㎕, 탈이온수 35 ㎕를 혼합한 반응용액을 94℃에서 30초간 반응시킨 후, 상기 반응용액에 벤트 중합효소(Vent polymerase, BioLab) 1 ㎕를 넣고 94℃ 30초, 55℃ 30초, 72℃ 30초로 진행되는 반응을 36회 반복하여 수행하였다.

<41> 상기에서 증폭된 DNA를 주형으로 하고 서열번호 2와 서열번호 3으로 기재되는 프라이머 쌍을 이용하여 다시 PCR을 실시하였다. PCR 반응은 상기와 동일한 반응조건에서 실시하였고, 증폭된 DNA는 1% 아가로즈 젤에서 전기 영동을 실시하여 확인하였다. 증폭된 DNA('Pv200-ct657' 로 명명함)를 제한효소 EcoR V로 처리한 pBluscript KS(+)(Stratagene) 벡터에 T4 DNA 라이게이즈(ligase,Promega)를 이용하여 삽입('pBC-Pv200-ct657' 로 명명함)한 후 대장균 JM 109 균주에 형질전환 시켰다.

<42> <실시예 3> 발현벡터 PYLJ-MSP의 제작

<43> 상기 실시예 2에서 제작한 재조합 플라스미드 pBC-Pv200-ct657를 주형으로 하고 서열번호 4와 서열번호 5로 기재되는 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 실시하였다. PCR 반응은 상기와 동일한 반응조건에서 실시하였고, 증폭된 DNA('Pv200-19' 로 명명함)는 1% 아가로즈 젤에서 전기 영동을 실시하여 확인하였다.

<44> PV200C 폴리펩타이드의 N-말단에 결합될 효모의 α-인자 리더 펩타이드 서열을 얻기 위하여, 효모 α-인자 리더 펩타이드가 포함된 플라스미드인 α-IFN pYLBC(수탁번호 : KCTC 0051BP)를 주형으로 하고 서열번호 6과 서열번호 7로 기재되는 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 실시하였다. PCR 반응은 상기와 동일한 반응조건에서 실시하였고, 증폭된 DNA('효모 α-리더' 로 명명함)는 1% 아가로즈 젤에서 전기 영동을 실시하여 확인하였다.

<45> 상기 과정에서 증폭된 Pv200-19와 효모 α-인자 리더 펩타이드를 연결하기 위하여, 이 두가지 PCR 산물을 주형으로 하고 서열번호 5와 서열번호 6으로 기재되는 프라이머 쌍을 이용하여 오버랩핑(overlapping) PCR을 실시하였다. PCR 반응은 PCR 완충용액 5 ㎕, 2.5 mM dNTP 5 ㎕, 순방향 프라이머 1 ㎕, 역방향 프라이머 1 ㎕, Pv200-19 PCR 산물 1 ㎕, 효모 α-인자 리더 펩타이드 PCR 산물 1 ㎕, 탈이온수 35 ㎕를 혼합한 반응용액을 94℃에서 30초간 반응시킨 후, 상기 반응용액에 벤트 중합효소 1 ㎕를 넣고 94℃ 30초, 55℃ 30초, 72℃ 30초로 진행되는 반응을 36회 반복하여 수행하였다. 증폭된 DNA('α-Pv200-19' 라 명명함)는 1% 아가로즈 젤에서 전기 영동을 실시하여 확인하였다.

<46> 상기 과정에서 증폭된 α-Pv-200-19와 pYES-2 벡터를 각각 제한효소 Hind III와 Xho I으로 처리하고 T4 라이게이즈로 연결시켜 pYLJ-MSP라고 명명하였고(도 3), 상기의 α-Pv200-19 염기 배열을 조사한 결과 서열번호 8로 기재되는 108개의 아미노산을 코딩하는 유전자로 구성되어 있음을 확인하였다. 재조합 발현벡터 pYLK-MSP를 헨넬(*Proc. Natl. Acad. Sci.*, U.S.A. 75, 1929-1933, 1978)의 방법으로 효모 *사카로마이세스세레비세* INVSC1 (*Sacharomyces cerevisiae* INVSC1)에 형질전환 시킨 후, 효모 형질전환체를 우라실(uracil)이 들어있지 않은 최소 배지에서 하루 밤 배양하였다. 상기의 효모 형질전환체를 생명공학연구소 유전자은행에 1999년 12월 18일자로 기탁하였다(수탁번호 : KCTC 8977P)

<47> <실시예 4> 효모에서 MSP 단백질의 발현 및 정제

<48> 효모로부터 표면 단백질 MSP를 발현시키기 위하여 재조합 효모 형질전환체 pYLJ-MSP/*S. cerevisiae* INVSC1를 2% 글루코즈(glucose)가 들어있는 YEPD 배지 100 ml에 접종하여 하룻밤 배양한 후, 상기 배양액을 글루코즈와 갈락토즈(galactose)가 각각 1%씩 포함된 YEP 배지 2 L에 옮겨 30℃에서 72 시간 동안 배양하였다. 재조합 효모는 글루코즈를 고갈시키면서 PV200C 폴리펩타이드를 발현하였는데 이때, 발현된 표면 단백질 PV200C 폴리펩타이드는 N-말단에 결합되어 있는 α-인자 리더 펩타이드에 의해 세포 밖으로 분비되고, 상기 표면 단백질이 분비된 후 N-말단에 결합되어 있던 α-인자 리더 펩타이드는 세포막에 존재하는 펩티다아제(peptidase)에 의해 제거됨으로써 목적하는 단백질만이 배양액내로 분비되었다.

<49> 이렇게 배양액내로 분비된 표면 단백질 PV200C 폴리펩타이드를 얻기 위하여 2일간 배양

한 배양액을 원심 분리하여 균체를 제거한 후 배양액만을 취하여 한외 여과기(Amicon)로 농축하였다. 상기 농축된 배양액을 간단하게 정제하기 위하여 실시예 4에서 증폭된 Pv200-19의 C-말단에 붙인 6개의 히스티딘 잔기를 이용하여 양이온인 히스티딘이 결합된 표면 단백질을 음이온인 니켈이 부착된 프로본드(Probond, Invitrogen) 칼럼에 흡착시켰다. 칼럼에 흡착 되지않은 불순물은 10 mM 이미다졸(imidazol)이 들어있는 인산염 완충 용액으로로 제거하고, 칼럼에 흡착되어 있는 표면 단백질은 500 mM 이미다졸과 인산염 완충액으로 탈착시켜 분리하였다. 도 2에서 보듯이, 이 과정에서 표면 단백질은 거의 90% 이상 순수하게 분리되었고, 상기 분리용액을 농축하여 세파크릴(Sephacryl) S-200 겔 여과 크로마토그라피를 수행하면 표면 단백질이 거의 99%의 고순도로 분리되었다.

<50> <실시예 5> 효모에서 정제된 말라리아 표면 단백질의 항원성 검정

<51> 상기 실시예 4에서 분리·정제된 표면 단백질 PV200C 폴리펩타이드를 12% SDS-PAGE로 분석한 결과 18KDa 위치에서 검출되었고, N-말단의 아미노산 서열 분석을 통해 본 발명의 목적 단백질임이 확인되었다.

<52> 또한, 상기 효모에서 정제된 말라리아 표면 단백질의 항원성을 검정하기 위하여, 말라리아 환자혈청으로 웨스턴 블러팅(Western blotting)을 수행하였다. 웨스턴 블러팅은 토우빈 등의 방법(Towbin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 76, 4350-4354, 1979)에 의해 수행하였다. 전기영동이 끝난 겔을 25 mM 트리스 완충용액, 190 mM 글리신(glycine, pH 8.3), 20% 메탄올(methanol)을 혼합한 완충용액에 30분 동안 담구어 둔 후, 동일한 완충용액을 이용하여 나이트로셀룰로즈 막(nitrocellulose membrane)으로 전기

영동하여 단백질을 옮겼다. 단백질이 옮겨진 나이트로셀룰로즈 막을 3% Skim milk가 포함된 pH 7.4의 인산염 완충용액으로 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후, 1/100로 희석한 말라리아 환자의 혈청을 첨가하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝나면 0.05% Tween 20/인산염 완충용액으로 상기의 나이트로셀룰로즈 막을 5분 간격으로 5회 세척한 후 염소에서 만든 고추냉이 과산화효소가 접합된 2차 항체(Vector Labs)를 1/2000로 희석하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝나면 다시 나이트로셀룰로즈 막을 상기의 용액으로 세척한 후 4-클로로-나프톨(4-chloro-naphthol)과 과산화수소로 발색을 유도하였다. 그 결과 18 KDa 위치의 표면 단백질 MSP PV200C 만이 검출됨을 확인하였으며, 이로써 본 발명의 제조방법에 의해 발현·정제된 표면 단백질 MSP의 PV200C 폴리펩타이드가 높은 특이성을 가진 항원임을 확인할 수 있었다.

【발명의 효과】

본 발명은 말라리아 원충의 표면 단백질인 MSP의 C-말단부위에 존재하는 PV200C 폴리펩타이드를 N-말단에는 효모의 α-인자 리더 펩타이드와 같은 당쇄를 활성형 단백질의 형태로 제조하여 목적 단백질만이 세포 밖으로 분비되게 발현을 유도하고, C-말단에 6개 히스티딘 잔기를 붙여서 발현시킨 후 히스티딘 잔기가 결합된 목적 단백질을 히스티딘-친화 칼럼과 젤 여과 크로마토그라피 과정을 통해 분리·정제하는 방법에 관한 것으로, 본 발명의 제조방법에 의하면 유전자 재조합 기술에 의해 효모로부터 발현된 말라리아 표면 단백질 MSP를 활성형 형태의 단백질로 발현시켜 종래보다 훨씬 손쉽고 신속하게 고순도의 표면 단백질을 정제할 수 있으며, 또한 본 발명의 제조방법에 의해 정제된 표면 단백질은 항체에 대한 민감도와 특이성이 높아 진단 시약과 백신의 좋은 재료로 사용될

【특허청구범위】

【청구항 1】

삼일열 말라리아 원충 *플라스모디움 비박스(Plasmodium vivax)*의 표면 단백질 MSP(merozoit surface protein) 유전자, 효모의 α-인자 리더 펩타이드(α-factor leader peptide) 및 히스티딘(histidine) 잔기를 포함하는 발현벡터.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, MSP 유전자는 그 유전자의 전부 또는 일부를 포함하는 것을 특징으로 하는 발현벡터.

【청구항 3】

제 2항에 있어서, 유전자는 표면 단백질 MSP의 C-말단에 위치하는 PV200C 폴리펩타이드인 것을 특징으로 하는 발현벡터.

【청구항 4】

제 3항에 있어서, PV200C 폴리펩타이드는 서열번호 8로 기재되는 것을 특징으로 하는 발현벡터.

【청구항 5】

제 4항에 있어서, 도 1로 기재되는 개열지도를 갖는 pYLJ-MSP인 것을 특징으로 하는 발

【청구항 5】
현벡터.

【청구항 6】

제 5항의 발현벡터로 형질전환된 효모 형질전환체 pYLJ-MSP/*S. cerevisiae* INVSC1(수탁번호 : KCTC 8977P).

【청구항 7】

효모 형질전환체를 이용한 말라리아 원충 표면 단백질 MSP 제조방법.

【청구항 8】

제 7항에 있어서,

i) 말라리아 원충 표면 단백질 MSP의 발현벡터를 제조하는 단계;

ii) 상기 발현벡터를 효모에 형질전환시켜 효모 형질전환체를 얻는 단계;

iii) 상기 효모 형질전환체로를 배양하여 표면 단백질을 얻는 단계; 및,

iv) 상기 표면 단백질을 분리·정제하는 단계로 구성되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

【청구항 9】

제 8항에 있어서, 단계 iv)는 히스티딘-친화 칼럼 및 젤 여과 크로마토그라피 방법을 이용하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

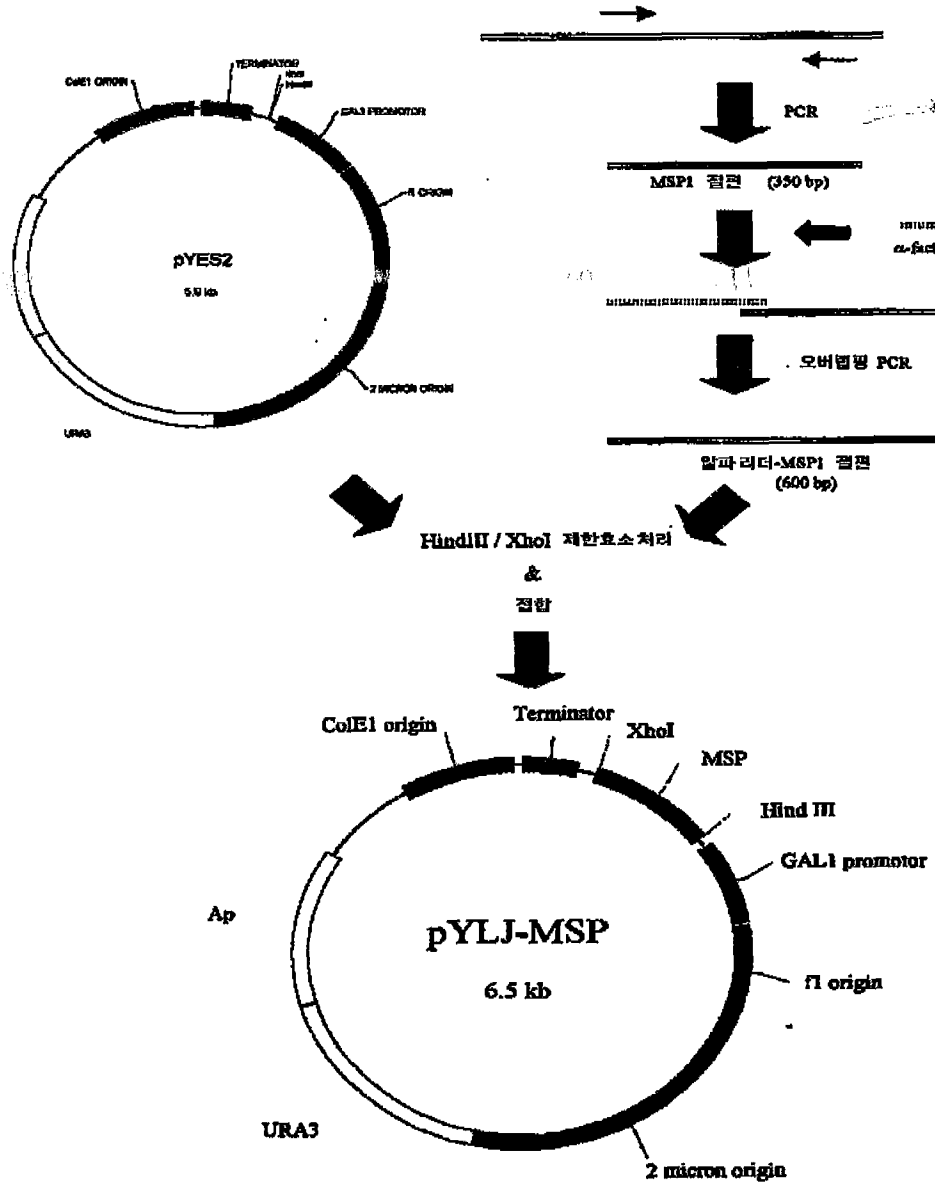
【청구항 9】

【청구항 10】

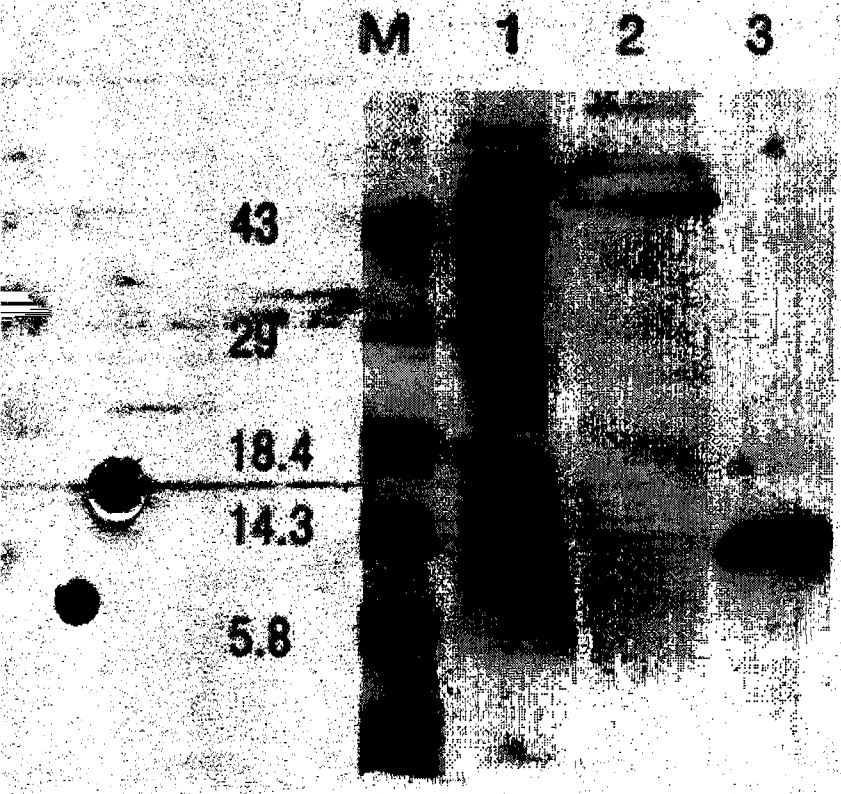
제 7항의 제조방법으로 제조되는 표면 단백질을 포함하는 [illegible]

【도면】

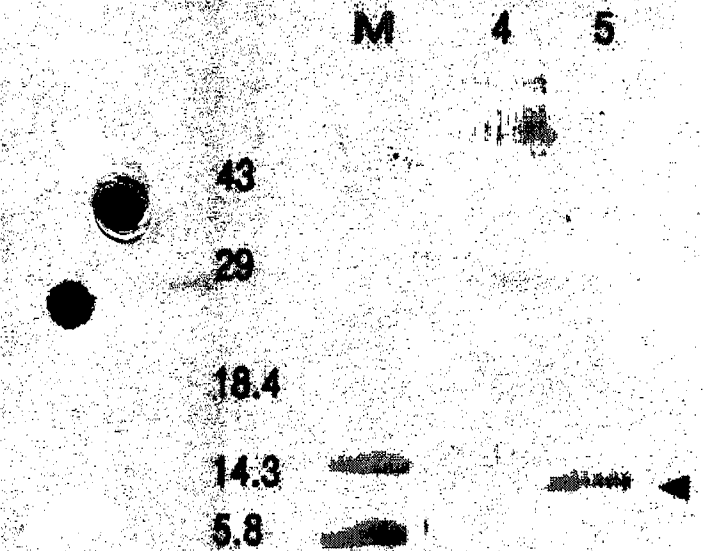
【도 1】


pYES2
PCR
MSP1 절편 (350 bp)
α-factor leader sequence
(260 bp)
. 오버랩핑 PCR
알파리더-MSP1 절편
(600 bp)
HindIII / XhoI 제한효소처리
&
접합
ColE1 origin
Terminator
XhoI
MSP
Hind III
GAL1 promotor
Ap
pYLJ-MSP
6.5 kb
f1 origin
URA3
2 micron origin

【도 2】



【도 3】



【서열목록】

<110> LG CHEMICAL LTD. <120> Method for producing the recombinant malaria surface protein from yeast <130> Op-01-21 <160> <170> KOPATIN 1.5 <210> 1 <211> 31 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> specific PCR primer MS protein <400> 1 aaaaaagtcg acgccaaaaa ggccgagctg g 31 <210> 2 <211> 31 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> specific PCR primer for MSP protein <400> 2 aaaaaagtcg acgagaagta cctcccgttc c 31 <210> 3 <211> 31 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> specific PCR primer fpr MSP protein <400> 3 aaaaaaatcg atttaaagct ccatgcacag g 31 <210> 4 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> specific PCR primer for MSP protein <400> 4 tctctagata agagaaacga gtccaaggaa 30 <210> 5 <211> 45 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> specific PCR primer for MSP protein <400> 5 aaactcgagt cagtggtggt ggtggtggtg gctacagaaa actcc 45 <210> 6 <211> 24 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> specific PCR primer for MSP pretein <400> 6 aaaaagctta tgagatttcc ttca 24

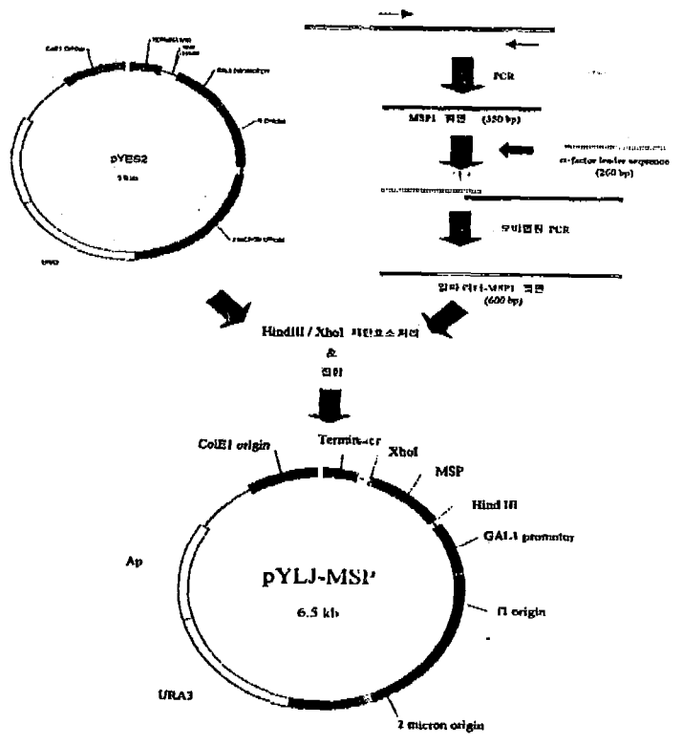
ABSTRACT

ABSTRACT

The present invention relates to a preparation method of the surface protein of malarial Protozoa using Yeast. Preferably, the present invention relates to a preparation method wherein the PV200C gene in C-terminus of Merozoit Surface Protein(MSP), which exhibit 100% homology among subspecies of malarial Protozoa is prepared in form of proteins glycosylated in an active form and only the object proteins are secreted into out of cell and the protein is expressed by utilizing six histidine residues linked with C-terminus of the surface protein and then separated and purified by using a column having an affinity for histidine and gel filtration chromatography. The surface protein PV200C polypeptide prepared from yeast by the preparation method of the present invention has sensitivity and specificity to malarial antigen, and markedly low pseudo-positive signals, and useful in the diagnostic reagent for malaria.

REPRESENTATIVE FIGURE

Figure 1



240
239

TITLE OF THE INVENTION

METHOD FOR PRODUCING THE RECOMBINANT MALARIA SURFACE ANTIGEN PROTEIN FROM YEAST

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWING

Figure 1 shows a preparation method of expression vector pYLJ-MSP expressing the surface antigen of malarial Protozoa from yeast.

Figure 2 is a photograph showing a result of electrophoresis of the surface antigen purified by using Probond adsorption resin on SDS-polyacrylamide gel.

Lane 1 is the pellet after centrifugation of the cell culture;

Lane 2 is the supernatant that was concentrated after centrifugation of the cell culture; and

Lane 3 is the concentrated supernatant that was purified on Probond column.

Figure 3 is a photograph showing an assay result of the antigenicity by performing Western Blotting using the serum of the malaria patient.

Lane 1 is the cell culture that was concentrated; and

Lane 2 is the purified Merozoite Surface Protein.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

PURPOSE OF THE INVENTON

FIELD OF THE INVENTION AND PRIOR ART THEREOF

The present invention relates to a method for preparing the surface protein of malarial Protozoa using Yeast. Particularly, the present invention relates to a

preparation method wherein α-factor leader peptide of yeast is fused with N-terminus of PV200C polypeptide which exist in C-terminus of Merozoit Surface Protein(MSP), which exhibit 100% homology of amino acid sequence among subspecies of *Plasmodium Vivax* and is prepared in form of proteins glycosylated in an active form and only the object proteins are secreted into out of cell.

The present invention relates to a preparation method wherein the protein is expressed by utilizing six histidine residues linked with C-terminus of the surface protein MSP and then separated and purified by using a column having an affinity for histidine and gel filtration chromatography.

Malaria is a disease caused by malarial Protozoa that infects from mosquitoes within human erythrocytes and is carried by mosquitoes. Billion people in the world reside in malaria-risk area and over 500 million people become infected by malaria each year. Malaria causes more than 2 million death each year . Malaria widely spreads all over the world, however, in some regions, malarial infection was eradicated or decreased since 1960's due to effective controls. However, recently, incidence of malaria increases all over the world again, due to increase of drug-resistant strain, increase in resistance to insecticide, abnormal weather such as El nino, etc.

Malaria is a disease caused by malarial Protozoa that infects within human erythrocytes. Life cycle of malaria is divided into Schizogony and Sporogony. Schizogony is the life cycle in human host, and Sporogony is the life cycle in mosquito host. Human is infected by sporozoites by the bite of infected mosquitoes. The sporozoites transfer to human liver through blood vessels, and they exist as a dormant state or multiply and develop into schizonts in hepatic cells. After a definite time, the schizonts enter the blood circulation, and multiply in full-scale. When the schizont matures, it ruptures and releases thousands of merozoites into the blood stream. Merozoites invade erythrocytes, and most merozoites go through another round of

asexual reproduction, again forming schizonts. Some of the merozoites change into gametocytes. The gametocytes circulate in human bloodstream. When a mosquito bites the infected person, the mosquito sucks up gametocytes along with blood. Then, male gametocyte and female gametocyte in the gut of the mosquito fuse to form zygote. The zygote, which develops in the gut wall as an oocyte, eventually gives rise to the infective sporozoite, which invades the salivary glands and stomach of the mosquito. The mosquito then can infect another human host.

Malaria can be categorized into African type, American type and Asian type. Each type differs in geographical distribution as well as characteristics in species and genetic inclination which Protozoa exhibit. Malaria which occurrs in Korea is caused by *Plasmodium vivax* (Chom. S.Y., Korean J Parasit., 32(4), 281-284). *Plasmodium vivax* is characterized in that diagnosis thereof is difficult because latent period is long, and number of Protozoa in blood is few. In Korea, malaria has been known as Hakjil. From the 1960s, attempts to eradicate this disease begun, and in the 1970s, cases of malaria were rarely reported. However, after a patient infected with malaria Protozoa was reported near DMZ in 1993, malaria begun to spread rapidly, and it was reported that the number of patients infected with malaria Protozoa was 3,800 in 1998. Though incidence of malaria increases, diagnostic method or reagent for malaria have rarely developed in Korea and the most diagnostic reagent are imported. However, the imported diagnostic reagent for malaria detects malarial antigens such as Lactate Dehydrogenase of malaria. However, the imported diagnostic reagent has a difficulty in diagnosing malaria of Korean type where latent period is long, and numbers of Protozoa and antigen in blood are few, because sensitivity of the diagnostic reagent is only 50%. Therefore, the diagnostic reagent capable of diagnosing malaria of Korean type is required increasingly.

A blood smear method has been used in the diagnosis of malaria most

frequently. This method is a classical method wherein blood cells infected with malaria Protozoa are stained and the stained sample is then observed through a microscope. However, this method takes a longer time, and technical education of the examiner is required to judge blood cells infected with malaria Protozoa. Recently, a diagnostic reagent detecting malarial antigens has been commercially available. However, the concurrent use of the diagnostic reagent and the blood smear method is recommended because the sensitivity of the diagnostic reagent is low. Another method to examine genes of malaria Protozoa is Polymerase Chain Reaction method. This method has high sensitivity, however, there is a difficulty in processes thereof. Therefore, it is not put to practical use and is used only on laboratory scale. Also, such conventional diagnostic methods has a difficulty in diagnosing malaria of Korean type where latent period is long, and number of Protozoa in blood is few.

To solve the above-mentioned problems, the present inventors have developed the method for diagnosing malaria which detects malaria-specific antibodies in blood by using antigens of C-terminus of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium vivax* as antigen.

Merozoite Surface Protein is the surface antigen protein which exists specifically in surface of *Plasmodium Vivax.* Especially, PV200C polypeptide encoding C-terminus of MSP consists of 108 amino acids and is known to exhibit 100% homology among subspecies of *Plasmodium Vivax.* Therefore, PV200C polypeptide is useful in diagnosing malaria of Korean type, if it is used in the object antigen protein for diagnosing malaria.

Hitherto studies on expression of malarial antigen itself have been few, and methods for obtaining proteins by overexpressing genes encoding antigen proteins have been developed. Most antigens were expressed after they were fused with proteins such as blood coagulation factor Xa (Ellinger et al., Virol. 180, 81, 1991),

214
213

protein A of Staphylococcus(Marczinovits et al., J. Biochem., 31, 225, 1993) and ß–galactosidase. As a result, expression amount of fused antigens increased. However, because purification process become complex to remove the fused proteins from the antigen protein, it cause the yield of the object protein to decrease and production cost to rise. Also, when they are used as diagnostic reagents, pseudo-positive signals increased due to the proteins that were partners of fusion.

To overcome the above-mentioned problems and develop diagnostic reagent for malaria which is suitable for diagnosing malaria of Korean type, the present inventors have developed a preparation method wherein PV200C polypeptide, which consist of 108 amino acids which exhibit 100% homology among subspecies of *Plasmodium Vivax* and exist in C-terminus of MSP is cloned from blood of domestic malaria patients, and then is expressed from yeast and purified without cutting. The preparation method of the present invention can express the recombinant polypeptide from yeast and then separate and purify it in a simple method. Such produced antigens are useful in diagnostic reagents as well as vaccine judging malaria patients by detecting antibody against malarial antigens. In addition, such produced antigens can be used as a vaccine.

TECHNICAL OBJECT OF THE INVENTION

It is the object of the present invention to provide a preparation method wherein a recombinant expression vector is prepared by means of cloning genes of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium vivax*, and is transformed into yeast and then surface protein expressed from the yeast transformant is separated and purified to have a high purity.

It is the object of the present invention to provide a method of producing antigens in a large amount for diagnosing *Plasmodium vivax*, which have high

145
214

sensitivity and specificity and markedly low pseudo-positive signals by means of the above-mentioned preparation method.

CONSTRUCTION OF THE INVENTION

To achieve the above objects, the present invention provides an expression vector comprising genes of Merozoite Surface Protein of malarial Protozoa, α-factor leader peptide of yeast, and histidine residues, the transformant transformed with the above expression vector, and the method for preparing MSP by using the above transformant.

The present invention will hereinafter be described in more detail.

The present invention provides the expression vector of fusion protein, pYLJ-MSP comprising α-factor leader peptide of yeast linked with N-terminus of PV200C polypeptide which exist in C-terminus of MSP of malarial Protozoa and six histidine residues linked with C-terminus of PV200C polypeptide, and a yeast transformant pYLJ-MSP/S. *cerevisiae* INVSC1 (Deposit No. KCTC 8977P) transformed with the above expression vector.

The gene of Merozoite Surface Protein of the prevent invention includes a part or whole of the gene, and a more preferable example includes PV200C gene in C-terminus of Merozoite Surface Protein of malarial Protozoa which the sequence of amino acid is known to be constant considerably among various species of *Plasmodium Vivax*. The gene of the prevent invention comprises PV200C gene in C-terminus of the above Merozoite Surface Protein of malarial Protozoa consisting of 108 amino acids which exhibit 100% homology among subspecies of *Plasmodium Vivax*.

To clone the PV200C polypeptide, the present inventors purified RNA from malaria-positive blood, and prepared cDNA from the above RNA. Thereafter, the present inventors obtained amplified DNA fragments of PV200C by performing

polymerase chain reaction(PCR) by using a pair of primers specific to PV200C and using the above cDNAs as a template.

In the meantime, to obtain proteins glycosylated in an active form by making PV200C polypeptide expressed in the yeast to be secreted into out of cell, α-factor leader peptide sequence of yeast was linked with N-terminus of PV200C polypeptide. Amplified DNA fragments of the α-factor leader peptide sequence of yeast could be obtained by performing polymerase chain reaction(PCR) using plasmids containing the α-factor leader peptide sequence of yeast.

To link the DNA fragments of the α-factor leader peptide of yeast with genes of PV200C polypeptide obtained as described above, an overlapping PCR was performed using the two PCR products as templates. As a result, it was found that the genes consisted of genes encoding 108 amino acids, as shown in SEQ. ID NO : 1. The present inventors obtained pYLJ-MSP which is a recombinant expression vector by inserting fragments of the genes into pYES-2 vector (refer to Figure 3).

Also, the present inventors obtained a transformant pYLJ-MSP/S. *cerevisiae* INVSC1 by transforming a yeast with the recombinant expression vector pYLJ-MSP, and deposited the transformant in Korean Collection for Type Cultures of Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology deposited on December 18, 1999 (Deposit No. KCTC 8977P).

Also, the present invention provides a method for preparing Merozoite Surface Protein of malarial Protozoa by using a yeast transformant.

The PV200C polypeptide expressed from the above transformant was secreted into out of cell by the α-factor leader peptide coupled with N-terminus of PV200C. After secretion, the α-factor leader peptide was removed by peptidase existing in the cell membrane. Accordingly, it was confirmed that only the surface protein was

secreted into culture medium.

Because the surface protein expressed from the yeast transformant was secreted into culture medium, the present inventors separated the surface protein by adsorbing the surface protein on Probond column by utilizing six histidine residues linked with C-terminus of the surface protein. Then, Merozoite Surface Protein having 99% or more of high purity was obtained by purifying through a gel filtration chromatography. The separated and purified Merozoite Surface Protein has approximately 18 KDa, and it was confirmed that the expressed surface protein was PV200C polypeptide of malarial Protozoa by analysis of amino acid sequences in N-terminus of the surface protein.

In the meantime, Western Blotting was performed with the serum of malaria patients to assay antigenicity of the surface protein separated and purified from the yeast transformant. As a result, only MSP PV200C polypeptide having 18 KDa was detected. Therefore, it was proved that the protein separated and purified from the yeast transformant according to the preparation method of the present invention was an antigen having high sensitivity and specificity.

As the above-described, when the surface protein of malarial Protozoa expressed from recombinant yeast transformant by the preparation method of the prevent invention is separated and purified by using a column having an affinity for histidine and gel filtration chromatography, we can obtain the surface proteins of high purity which have high sensitivity and specificity to antibody and markedly low pseudo-positive signals. Therefore, the proteins can be used in a diagnostic reagent for diagnosing malaria of Korean type as well as a vaccine.

The invention will be further illustrated by the following examples. It will be apparent to those skilled in the art that these examples are given only to illustrate the present invention in more detail, but the invention is not limited to the examples given.

Example 1. Preparation of cDNA from malaria-positive blood

TRI reagent TM (Sigma Co.) was used to purify RNA from malaria-positive blood. The purification method is the following method provided by Sigma Co. A mixture of 0.1 ml of TRI reagent TM and 0.1 ml of malaria-positive blood was left for 5 minutes at ambient temperature. 20 μl of BCP was mixed with the mixture, and the resulting mixture was left for 5 minutes at ambient temperature and then was centrifuged for 15 minutes at 12,000 rpm and 4 . As a result of centrifugation, three layers were formed. Only the upper layer in which RNAs were contained was transferred to a new tube, and then 50 μl of isopropanol was added to the tube. The tube was left for 5 minutes at ambient temperature. The resulting mixture was centrifuged for 10 minutes at 12,000 rpm and 4 . The supernatant was discarded. The pellet was washed with 75% ethanol and dissolved in 20 μl of deionized distilled water, which was used to prepare cDNA.

9 μl of the above-purified RNA and 1 μl of N6 random primer (Genotech) were mixed and reacted for 5 minutes at 65 and then transferred to ice for cooling. 4 μl of RT buffer, 2 μl of 0.1M DTT, 1 μl of 10mM dNTP, 1 μl of Reverse Transcriptase(Gibco Co.), 1 μl of RNase inhibitor(Promega) and 1 μl of deionized distilled water were added to the above mixture, and the resulting mixture was reacted for 1 hour at 42 and then reacted for 10 minutes at 70 to prepare cDNA.

Example 2. preparation of recombinant plasmids comprising genes encoding PV200C.

Polymerase chain reaction was performed using cDNAs prepared in Example 1 as a template and a pair of primers, SEQ. ID. NO:1 and SEQ. ID. NO:3, as follows.

The reaction mixture containing 5 μl of PCR buffer, 5 μl of 2.5 mM dNTP, 1 μl of sense primer, 1 μl of anti-sense primer, 2 μl of template DNA and 35 μl of deionized distilled water was reacted for 30 seconds at 94 . Thereafter, 1 μl of Vent polymerase(BioLab) was added to the mixture. Then, the reaction having the following cycle was repeated 36 times:

Denaturation 94 , 30 sec

Primer annealing 55 , 30 sec

Extension 72 , 30 sec

Again, polymerase chain reaction was performed using the above-amplified DNAs as a template and a pair of primers, SEQ. ID. NO:2 and SEQ. ID. NO:3. The PCR was performed in the same condition as the above condition. The amplified DNAs were confirmed through electrophoresis in 1% agarose gel. The amplifed DNAs(referred as "Pv200-ct657" hereafter) and pBluscript KS(+)(Stratagene) vector were cleavaged with restriction enzyme, EcoR V, and Pv200-ct657 was inserted into pBluscript KS(+) vector by using T4 DNA ligase(Promega). As a result, recombinant plasmids(referred as "pBC-Pv200-ct657" hereafter) were produced. Then, E. coli strain JM 109 was transformed with pBC-Pv200-ct657.

Example 3. preparation of expression vector pYLJ-MSP

Polymerase chain reaction was performed using pBC-Pv200-ct657 prepared in Example 2 as a template and a pair of primers, SEQ. ID. NO:4 and SEQ. ID. NO:5. The PCR was performed in the same condition as the above reaction condition. The amplified DNAs(referred as "Pv200-19" hereafter) were confirmed through electrophoresis in 1% agarose gel.

In order to obtain α-factor leader peptide sequence of yeast to be linked with N-

terminus of PV200C polypeptide, PCR was performed using the α-IFN pYLBC(deposit No. KCTC 0051BP) comprising the sequence encoding α-factor leader peptide of yeast as a template and a pair of primers, SEQ. ID. NO:6 and SEQ. ID. NO:7. The PCR was performed in the same condition as the above reaction condition. The amplified DNAs(referred as "α-leader of yeast" hereafter) were confirmed through electrophoresis in 1% agarose gel.

To link the above-amplified Pv200-19 with α-factor leader peptide sequence of yeast, an overlapping PCR was performed using the above two PCR products as templates and a pair of primers, SEQ. ID. NO:5 and SEQ. ID. NO:6. A reaction mixture containing 5 μl of PCR buffer, 5 μl of 2.5 mM dNTP, 1 μl of sense primer, 1 μl of anti-sense primer, 1 μl of PCR products of Pv200-19, 1 μl of PCR products of α-factor leader peptide of yeast and 35 μl of deionized distilled water, was reacted for 30 seconds at 94 . Thereafter, 1 μl of Vent polymerase(BioLab) was added to the mixture. Then, the reaction having the following cycle was repeated 36 times:

Denaturation 94 , 30 sec

Primer annealing 55 , 30 sec

Extension 72 , 30 sec

The amplified DNAs(referred as "α-Pv200-19" hereafter) were confirmed through electrophoresis in 1% agarose gel.

The above-amplified α-Pv200-19 and pYES-2 vectors were cleavaged with restriction enzymes, HindIII and Xho I, respectively. Then, α-Pv200-19 and pYES-2 vector were linked by T4 ligase to be a recombinant expression vector that is referred as "pYLJ-MSP"(Refer to Figure 3). As a result of analyzing α-Pv200-19 sequence in pYLJ-MSP, it was confirmed that α-Pv200-19 consisted of the genes encoding 108 amino acids as shown SEQ. ID. NO:8. Yeast *Saccharomyces cerevisiae* INVSC1 was

transformed with pYLJ-MSP according to Hinnen method(*Proc. Natl. Acad. Sci.*, U.S.A 75, 1929-1933, 1978), and then the yeast transformants were cultivated overnight in minimal medium lacking uracil. The yeast transformants were deposited in Korean Collection for Type Cultures of Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology deposited on December 18, 1999 (Deposit No. KCTC 8977P)

Example 4. expression and purification of MSP from yeast

In order to produce the surface protein MSP from yeast, the transformants pYLJ-MSP/*S. cerevisiae* INVSC1 were inoculated in 100 ml of YEPD medium containing 2% glucose and cultivated overnight. Then, the culture medium was transferred to 2L of YEP medium containing 1% glucose and 1% galactose, respectively, and cultivated for 72 hours at 30 . The yeast transformants expressed PV200C polypeptide, exhausting glucose. The expressed PV200C polypeptide was secreted into out of cell by the α-factor leader peptide linked with N-terminus of PV200C polypeptide. Thereafter, the α-factor leader peptide was removed by peptidase existing in cell membrane. Accordingly, only the PV200C polypeptide was secreted into culture medium.

In order to obtain the PV200C polypeptide secreted into culture medium, the biomass was removed by centrifuging the culture medium that was cultivated for 2 days. Then, only the fluid of culture medium was taken and concentrated by ultrafiltrating apparatus(Amicon, U.S.A.). For easily purifying the concentrated fluid, the surface proteins linked with cationic histidine residues were adsorbed on Probond column(Invitrogen) to which anionic nickels were coupled by using six histidine residues linked with C-terminus of the above-amplified Pv200-19. The contaminants which were not adsorbed on column were removed by phosphate buffer containing

10mM imidazol, and then the surface proteins adsorbed on column were desorbed and separated by 500 mM imidazol and phosphate buffer. As shown in Figure 2, the surface proteins having approximately 90% or more of purity were separated by the process. Then, the surface proteins having approximately 99% or more of high purity were obtained by concentrating the separated solution and performing Sephacryl S-200 gel filtration chromatography with the concentrate.

Example 5. assay of antigenicity of the surface protein of malarial Protozoa purified from yeast

The surface protein PV200C polypeptide obtained in Example 4 was analyzed with 12% SDS-PAGE. As a result, it was detected in 18 kDa position, and it was identified as the object protein of the present invention by sequencing amino acids of N-terminus thereof.

In addition, Western Blotting was performed with the serum of the malaria patient to assay antigenicity of the surface protein of malarial Protozoa purified from yeast. Western Blotting was performed according to the method suggested by Towbin et al.(*Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 76, 4350-4354, 1979). After the electrophoresed gel was immersed in a buffer solution containing 25 mM Tris buffer, 190 mM glycine(pH 8.3) and 20% methanol for 30 minutes, the protein was transferred to nitrocellulose membrane by electrophoresis using the same buffer. Then, the protein-bound nitrocellulose membrane was incubated for 1 hour at ambient temperature in a phosphate buffer(pH 7.4) containing 3% Skim milk. The serum of the malaria patient diluted to 1/100 was added to the membrane and was incubated for 1 hour at ambient temperature. Thereafter, the nitrocellulose membrane was washed 5 times at 5 minute-intervals with 0.05% Tween 20/phosphate buffer solution, and then the second antibody(Vector Labs) to which HRP was conjugated was diluted to 1/2000, added to

the membrane and incubated for 1 hour at ambient temperature. After the incubation, the nitrocellulose membrane was washed with the above solution, and then both 4-chloro-naphthol and hydrogen peroxide were added to the membrane to induce color development. As a result, it was confirmed that only the PV200C polypeptide was detected at 18 kDa position. Therefore, it was confirmed that the surface protein PV200C polypeptide expressed and purified by the preparation method of the present invention was an antigen having high specificity.

EFFECTS OF THE INVENTION

The present invention relates to a preparation method wherein α-factor leader peptide of yeast is fused with N-terminus of PV200C polypeptide in C-terminus of Merozoit Surface Protein of malarial Protozoa and is prepared in form of proteins glycosylated in an active form and only the object proteins are secreted into out of cell and the protein is expressed by utilizing six histidine residues linked with C-terminus of the surface protein and then the protein bound to histidine residue is separated and purified by using a column having an affinity for histidine and gel filtration chromatography. In accordance with the preparation method of the present invention, by expressing the surface protein of malarial Protozoa expressed from yeast in an active form by gene recombinant technique, the surface protein with high purity can be produced more easily and rapidly than the prior art method does. The surface protein purified by the preparation method of the present invention has high sensitivity and specificity to antibody, and useful in the diagnostic reagent for malaria and vaccine.

What is claimed is;

1. An expression vector comprising genes of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax* , α-factor leader peptide of yeast and histidine residues.

2. The expression vector according to Claim 1, wherein the genes of Merozoite Surface Protein comprise a part or whole of genes of Merozoite Surface Protein of *Plasmodium Vivax.*

3. The expression vector according to Claim 2, wherein the genes of Merozoite Surface Protein are genes of PV200C polypeptide in the C-terminus of Merozoite Surface Protein.

4. The expression vector according to Claim 3, wherein amino acid sequences of the PV200C polypeptide are amino acid sequences as shown in SEQ. ID NO : 8.

5. The expression vector according to Claim 4, wherein the expression vector is pYLJ-MSP having a cleavage map as shown in Fig.1.

6. A yeast transformant pYLJ-MSP/S. *cerevisiae* INVSC1 (Deposit No. KCTC 8977P) transformed with the expression vector according to claim 5.

7. A method for preparing Merozoite Surface Protein of malarial Protozoa by using a yeast transformant.

8. The method according to Claim 7, comprising

(i) preparing an expression vector of Merozoite Surface Protein of malarial Protozoa;

(ii) transforming the expression vector into a yeast to obtain a yeast transformant;

(iii) culturing the yeast transformant to obtain surface proteins; and

(iv) separating and purifying the surface proteins.

9. The method according to Claim 8, wherein the step (iv) uses a column having an affinity for histidine and gel filtration chromatography.

10. A diagnostic reagent for malaria, comprising the surface proteins produced by the preparation method according to Claim 7.

5