(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년10월02일
(11) 등록번호 10-2027817
(24) 등록일자 2019년09월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*C07K 14/195* (2006.01) *A61K 39/02* (2006.01)
*A61K 39/39* (2006.01) *G01N 33/535* (2006.01)
*G01N 33/569* (2017.01)
(52) CPC특허분류
*C07K 14/195* (2013.01)
*A61K 39/02* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0149837
(22) 출원일자 2017년11월10일
심사청구일자 2017년11월10일
(65) 공개번호 10-2019-0053697
(43) 공개일자 2019년05월20일
(56) 선행기술조사문헌
PLOS: neglected tropical disease, (2015.03.13), DOI:10.1371/journal.pntd.0003585. 1부.*
*(뒷면에 계속)*

(73) 특허권자
**서울대학교산학협력단**
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
(72) 발명자
**조남혁**
서울특별시 노원구 노원로 214, 6동 102호(하계동, 삼익선경아파트)
**하나영**
서울특별시 성북구 동소문로17길 18, 612호(동소문동6가)
(74) 대리인
**특허법인 태웅**

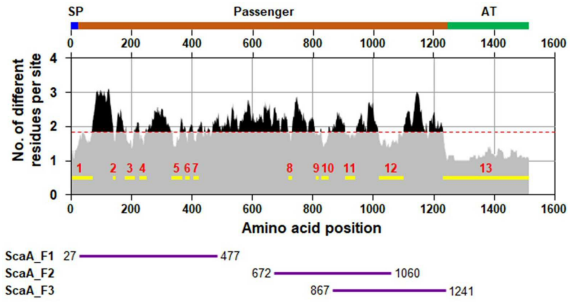
전체 청구항 수 : 총 20 항 심사관 : 손영희

(54) 발명의 명칭 **오리엔티아 쯔쯔가무시 균의 신규 재조합 단백질 항원 및 이를 이용한 백신 조성물**

## (57) 요 약

본 발명은 쯔쯔가무시 균 감염 여부 등의 진단과 그 쯔쯔가무시 균에 대한 백신으로 유용하게 사용할 수 있는, ScaA 항원의 보존 부위 서열로부터 도출한 신규 재조합 단백질 항원과 이를 이용한 이를 이용한 백신 조성물을 개시한다.

*대 표 도* - 도1



(52) CPC특허분류
*A61K 39/39* (2013.01)
*G01N 33/535* (2013.01)
*G01N 33/56911* (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌
KR1020150123356 A
NCBI, GenBank Accession No. AJC11312.1, 'ScaA, partial [Orientia tsutsugamushi str. Karp]', 2015.03.24
KR1020140100263 A
US20090311722 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 HI16C0472010016
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 보건복지부
연구사업명 감염병위기대응기술개발사업
연구과제명 ScaA 기반 쯔쯔가무시병 백신 개발
기 여 율 1/1
주관기관 서울대학교 산학협력단
연구기간 2016.04.01 ~ 2016.12.31

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

서열번호 14의 아미노산 서열로 이루어진 오리엔티아 쯔쯔가무시 균 유래 재조합 단백질 항원.

### 청구항 2

삭제

### 청구항 3

삭제

### 청구항 4

서열번호 14의 아미노산 서열로 이루어진 단백질 항원을 포함하는 융합 재조합 단백질 항원.

### 청구항 5

제1항 또는 제4항 기재의 재조합 단백질 항원을 암호화하는 유전자.

### 청구항 6

(i) 제1항 또는 제4항 기재의 재조합 단백질 항원을 암호화하는 유전자 포함하는 발현벡터를 제조하는 단계, (ii) 이 발현벡터를 숙주세포에 형질전환시키는 단계, (iii) 형질전환된 숙주세포를 배양하는 단계, 및 (iv) 그 배양물로부터 제1항 또는 제4항 기재의 재조합 단백질 항원을 분리·정제하는 단계를 포함하는, 제1항 또는 제4항 기재의 재조합 단백질 항원을의 제조 방법.

### 청구항 7

제1항 또는 제4항 기재의 재조합 단백질 항원을 활성성분으로 포함하는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균에 대한 백신 조성물.

### 청구항 8

제7항에 있어서,

상기 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균에 대한 백신 조성물.

### 청구항 9

제8항에 있어서,

상기 약학적으로 허용되는 담체는 희석제, 부형제, 안정화제 및 방부제로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균에 대한 백신 조성물.

**청구항 10**

제7항에 있어서,

상기 조성물은 항원 보조제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균에 대한 백신 조성물.

**청구항 11**

제10항에 있어서,

상기 항원 보조제는 겔 상의 알루미늄염인 것을 특징으로 하는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균에 대한 백신 조성물.

**청구항 12**

제1항 또는 제4항 기재의 재조합 단백질 항원을 포함하는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균의 특이 항체 검출용 조성물.

**청구항 13**

제12항에 있어서,

상기 쯔쯔가무시 균의 특이 항체는 ScaA 항원에 대한 특이 항체인 것을 특징으로 하는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균의 특이 항체 검출용 조성물.

**청구항 14**

제12항에 있어서,

상기 조성물은 생체 시료로서 혈청과 접촉되어 사용되는 것을 특징으로 하는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균의 특이 항체 검출용 조성물.

**청구항 15**

제1항 또는 제4항 기재의 재조합 단백질 항원을 포함하는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균 특이 항체의 검출용 키트.

**청구항 16**

제15항에 있어서,

상기 키트는 생체 시료 중의 쯔쯔가무시 균 특이 항체와 이 특이 항체에 특이적으로 결합하는 상기 제1항 또는 제4항 기재의 재조합 단백질 항원의 결합체를 검출하기 위한 검출제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균의 특이 항체 검출용 키트.

**청구항 17**

제15항에 있어서,

상기 검출제는 표지 또는 효소와 결합된 2차 항체인 것을 특징으로 하는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균의 특이 항체

검출용 키트.

**청구항 18**

제15항에 있어서,

상기 키트는 담체, 세정 버퍼, 시료 희석액, 효소 기질, 반응 정지액 및 사용 방법을 교시하는 설명서 중에서 하나 이상을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균의 특이 항체 검출용 키트.

**청구항 19**

(a) 생체 시료와, 제1항 또는 제4항 기재의 재조합 단백질 항원을 포함하는 쯔쯔가무시 균의 특이 항체 검출용 조성물과 반응시켜, 생체 시료 중의 쯔쯔가무시 균의 특이 항체와 이 특이 항체에 특이적으로 결합하는 제1항 또는 제4항 기재의 재조합 단백질 항원의 결합체를 형성시키는 단계, 및 (b) 그 결합체를 검출하는 단계를 포함하는 생체 시료 중의 오리엔티아 쯔쯔가무시 균의 특이 항체의 검출 방법.

**청구항 20**

제19항에 있어서,

상기 쯔쯔가무시 균의 특이 항체는 ScaA 항원에 대한 특이 항체인 것을 특징으로 하는 생체 시료 중의 오리엔티아 쯔쯔가무시 균의 특이 항체의 검출 방법.

**청구항 21**

제19항에 있어서,

상기 생체 시료는 혈청인 것을 특징으로 하는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균의 특이 항체의 검출 방법.

**청구항 22**

제19항에 있어서,

상기 (b) 단계의 결합체를 검출하는 단계는 검출 시그널을 제공할 수 있는 표지나 효소로 접합된 이차 항체를 상기 결합체와 반응시키는 단계, 및 상기 결합체와의 반응 정도를 측정하는 단계를 포함하여 수행되는 것을 특징으로 하는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균의 특이 항체의 검출 방법.

## *발명의 설명*

### *기 술 분 야*

[0001] 본 발명은 오리엔티아 쯔쯔가무시 균의 신규 재조합 단백질 항원 및 이를 이용한 백신 조성물에 관한 것이다.

### *배 경 기 술*

[0003] 쯔쯔가무시병 (scrub typhus)은 오리엔티아 쯔쯔가무시균(Orientia tsutsugamushi, 이하 "쯔쯔가무시균")에 감염된 털진드기 유충이 사람을 물었을 때 발생하는 절지동물 매개 감염질환으로서, 러시아 연해주, 한국, 일본, 중국, 및 동남아시아 지역, 호주 북부 등, 주로 아시아-태평양 지역에서 매년 백만명 이상의 환자들이 발생하고 있는 것으로 추정되고 있다. 우리나라에서는 전국에 걸쳐 발생하고 있으며 특히 가을철 야외 활동이 증가하는 시기에 빈번하다. 감염된 털진드기 유충에 물린 환자는 1-2주간의 잠복기를 거쳐 발열, 오한, 가피 생성, 발진, 근육통, 림프절 종대 등의 증상을 나타낸다. 감염 초기에 진단되면 적절한 항생제 처방을 통하여 치료가 가능하지만, 초기 임상증상이 다른 열성감염질환과 유사하여 감별진단이 어렵고, 임상현장에서 간편하고 빠르게 진단

할 수 있는 방법이 없기 때문에 중증의 전신성 열성질환으로 발전하는 경우가 많으며, 매년 적지 않은 사망자가 발생하고 있다. 발병 지역 및 환자의 연령에 따라, 치료받지 않은 환자의 사망률은 6% 가량으로 파악되고 있다(Taylor AJ et al., PLoS Negl Trop Dis 2015 Aug; 9(8): e0003971.).

[0004] 쯔쯔가무시균은 100종 이상의 다양한 혈청형(serotype) 또는 유전형(genotype)이 존재하고 있는 것으로 알려져 있는데, 전통적으로 알려진 길리엄(Gilliam), 카프(Karp) 및 카토(Kato) 등의 원형(prototype)을 포함하여 수십여 가지의 아형(strain)들로 분류되고 있다(Eisemann ans Osterman 1985, Am J Trop Med Hyg. Nov;34(6):1173-8; Akira Tamura and Akiyoshi Kawamura 1991, J.CLIN.MICROBIOL. Feb.1991, Vol.29,No.2; WOO-HYUN CHANG et al. 1993, J.CLIN.MICROBIOL. Mar.1993,p.598-605). 쯔쯔가무시균의 유전형은 이 세균의 주요 막단백질인 56kDa Type specific antigen (TSA56)을 암호화하는 유전자에 의해 분류된다. 한국에서는 카프형과 유사한 보령 유전형에 의한 감염이 주로 발생하고 있지만, 쯔쯔가무시병이 발생하고 있는 국가들에서 발견되고 있는 쯔쯔가무시균의 유전형의 종류와 빈도는 매우 다양한 것으로 알려져 있다.

[0005] 쯔쯔가무시병은 한번 앓고 나도 보호면역이 수년 내에 사라지기 때문에 유행지역에서의 재감염이 적지않게 발생하고 있는 것으로 알려져있다. 또한, 다양한 유전형의 쯔쯔가무시균에 대한 교차 반응성이 낮기 때문에 2차 세계대전 이후 지속된 백신개발 노력에도 불구하고, 아직까지 쯔쯔가무시병에 보편적으로 유효한 백신은 개발되어 있지 않다. 현재 태국과 인도에서 항생제 내성 쯔쯔가무시의 출현 등이 문제가 되고 있으며 백신 개발 연구의 필요성은 더욱 증가하고 있다.

[0006] 초기 쯔쯔가무시병 백신은 포르말린 처리나 감마선 조사를 통한 사백신(Killed-vaccine)이었으나 사람에게서 효과적인 보호 면역을 제공하지 못하는 것으로 확인되었다. 또한, 재조합 단백질 백신(Subunit vaccine), DNA 백신 등이 연구되어 왔으나 이들 백신들은 일부 유전자형의 쯔쯔가무시 감염 환자에만 방어면역을 유도하는 것으로 보고되었다(Buckland and Dudgeon, 1945; Lancet 2, 734~737; Kawamura et al., 1940. Trop.Dis.Bull. 37, 269~270; Seong et al., 1997. Infect.Immun. 65, 1541~1545; Yu et al., 2005. Am.J.Trop.Med.Hyg. 72, 458~46).

[0007] 현재 쯔쯔가무시균의 주요 막단백질인 56kDa Type specific antigen (TSA56)과 surface cell antigen A(ScaA)가 인비트로(*in vitro*) 및 인비보(*in vivo*) 실험에서 숙주세포(host cell)의 면역 반응을 일으키는 것으로 알려졌으나(Seong SY et al., Vaccine 1997 Nov; 15(16):1741-1747.; Ha NY et al., PLoS Negl Trop Dis 2015 Mar; 9(3): e0003585) 백신 실용화 단계에는 미치지 않고 있다.

[0008] 본 발명에서는 기후변화에 따라 지속적으로 확산되는 쯔쯔가무시균 피해를 억제하기 위한 백신 조성물을 개시하였다. 본 발명의 조성물은 여러 유전자형에서 보존된 부위를 항원으로 이용하였기 때문에 쯔쯔가무시균의 유전적 차이를 극복하고 보편적인 보호면역을 제공할 수 있다.

## *발명의 내용*

### *해결하려는 과제*

[0010] 본 발명은 오리엔티아 쯔쯔가무시 균의 신규 재조합 단백질 항원을 제공하는 데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 재조합 단백질 항원을 이용하는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균에 대한 백신 조성물을 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 재조합 단백질 항원을 이용하는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균에 대한 진단용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0013] 본 발명의 기타 다른 목적이나 구체적인 목적은 이하에서 제시될 것이다.

### *과제의 해결 수단*

[0015] 본 발명자들은 아래의 실시예에서 확인되는 바와 같이, 미국립생물정보학센터(National Center for Biotechnology Information)의 유전자서열 데이터베이스에서 2017년 10월 20일까지 발표된 다양한 유전자형의 쯔쯔가무시균 유래의 15개 scaA 유전자 아미노산서열을 수집하였으며 이들 중에서 전체 아미노산 서열 변이의 평균값보다 낮은 아미노산 서열이 10개 이상 이어진 13개 보존블럭을 규정(CB1~CB13)하였다. 이 중 autotransporter domain을 제외한 12개 보존 블록의 서열 중 2개 이상의 보존 블럭을 포함하는 3개의 ScaA 재조합 단백질 서열을 결정하였으며 이들의 항원성을 확인하였다. 상기 ScaA 재조합 단백질들을 마우스에 면역하였

을 때 항체 생산이 유도되었으며 이들의 항혈청은 쯔쯔가무시균 감염을 억제하는 효과를 나타내었다. 또한 본 발명의 ScaA 재조합 단백질 항원은 세포성 면역에 관계하는 CD4 T 세포 및 CD8 T 세포 반응을 활성화 하였으며 여러 유전자형의 쯔쯔가무시(보령 및 카프) 감염에 의한 마우스의 생존율을 증가시켰다. 특히 CB8 내지 CB11의 서열로 이루어진 ScaA 재조합 단백질 항원(ScaA_F2; 서열번호 14)과 CB11 및 CB12 서열로 이루어진 ScaA 재조합 단백질 항원(ScaA_F3; 서열번호 15)의 효과가 높게 나타났으며 이에 따라 CB8 내지 CB12의 보존 블럭이 항원성에 중요한 역할을 끼칠 것으로 예측되었다.

[0016] 전술한 바의 실험 결과는 본 발명의 ScaA 재조합 단백질 항원이 쯔쯔가무시 균에 대한 백신의 활성성분으로서 유용함을 보여주는 결과라 할 수 있다.

[0017] 본 발명은 이러한 실험 결과에 기초하여 제공되는 것으로서, 15개의 쯔쯔가무시 유전자형 분석을 통하여 확보한, CB1 내지 CB13에 해당하는 13개 ScaA 보존 블럭(영역) 서열 중 <표 2>의 서열번호 1 내지에 12에 해당하는 ScaA 보존 블럭 서열이 2개 이상 포함된 재조합 항원 단백질에 관한 것이다. 상기 보존 블럭의 서열은 각 유전형 사이에 100%의 상동성을 보일 필요는 없으며, 80% 이상의 상동성을 보이는 것이 바람직하나, 더 바람직하게는 90% 이상의 서열 상동성을 보이는 부위인 것이 바람직할 것이다.

[0018] 또한 바람직하게는 <도 1>에 나타낸 바와 같이, ScaA 보존 블럭 서열 중 <표 2>의 CB1 일부 내지 CB7 서열 전장이 순서대로 포함된 <표 3>의 서열번호 13과, CB8의 서열 내지 CB11의 서열 전장과 CB12 서열의 일부가 순서대로 포함된 <표 3>의 서열번호 14, CB11 및 CB12 서열 전장을 순서대로 포함하는 <표 3>의 서열번호 15 중 어느 하나의 서열로 이루어진 재조합 항원 단백질에 관한 것임이 바람직하다. 상기 재조합 항원 단백질의 서열은 보존 영역의 서열과 그 사이를 연결하는 서열로 이루어져 있으며 각 유전형 사이에 100%의 상동성을 보일 필요는 없으며 70% 이상의 상동성을 보이더라도 충분하나, 바람직하게는 80% 이상의 상동성, 더욱 바람직하게는 90% 이상의 서열 상동성을 보이는 서열인 것이 바람직할 것이다.

[0019] 본 발명에서, 상기 "ScaA"는 쯔쯔가무시균의 ScaA 단백질(surface cell antigen A)은 Genbank accession no. WP_011944269 등으로 확인되는 단백질을 말한다. 모든 혈청형 또는 유전자형의 쯔쯔가무시 균의 ScaA 서열이 사용가능하며 본 실시예에서 사용된 바와 같이 보령 혈청형 ScaA 를 사용하는 것이 바람직하다.

[0020] 다른 측면에 있어서, 본 발명은 상기 재조합 단백질 항원을 암호화하는 유전자에 관한 것이고, 또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 이러한 유전자를 이용하여 재조합 단백질 항원을 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0021] 본 발명의 제조 방법은 상기 재조합 단백질 항원을 암호화하는 유전자를 이용하여 당업계에 공지된 DNA 재조합 기술 등으로 제조할 수 있다. 이러한 방법은 (i) 상기 재조합 단백질 항원을 암호화하는 유전자를 포함하는 발현벡터를 제조하고 (ii) 이 발현벡터를 숙주세포에 형질전환시키고 (iii) 형질전환된 숙주세포를 배양하고, 마지막으로 (iv) 그 배양물로부터 상기 재조합 단백질 항원을 분리·정제하는 단계를 포함하여 구성된다.

[0022] 상기 재조합 단백질 항원인 목적 단백질(생산하고자 하는 단백질임)을 암호화하는 목적 유전자는 그 유전자가 암호화하는 목적 단백질 서열을 기초로 화학적으로 합성될 수 있다. 이러한 화학적 합성 방법은 당업계에 주지되어 있는데, 예컨대 고체상 합성 기술, 용액상 합성 기술 등을 이용할 수 있고, 이들 기술을 응용하여 자동화한 시판되는 유전자 합성기(DNA synthesizers) 등을 이용할 수 있다. 구체적인 사항들은 문헌[Nucl. Acid Res. 14:5399-5467, 1986] 문헌[Tet. Lett. 27:5575-5578, 1986], 문헌[Nucl. Acid Res. 4:2557, 1977], 문헌[Lett., 28:2449, 1978] 등을 참조할 수 있다.

[0023] 본 발명에서 발현벡터는 플라스미드, 코스미드, 파지미드, 파지 등 형태의 핵산일 수 있으며, 숙주 미생물에 따라 적합한 벡터를 상용화된 벡터 중에서 구입하여 사용하거나 구입·개조하여 사용할 수 있다. 예컨대 숙주 미생물로서 대장균을 사용할 경우 pUC19, pSTV28, pBBR1MCS, pBluscriptII, pBAD, pTrc99A, pET, pACYC184, pBR322, pJE101, pJE102,, pJE103 등을 사용할 수 있다.

[0024] 재조합 DNA 기술을 포함한 발현벡터 구성에 대해서는 당업계에 상당한 양의 문헌이 축적되어 있으며, 예컨대 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2001)], 문헌[F M Ausubel et al, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley amp; Sons, Inc. (1994)], 문헌 [Marston, F (1987) DNA Cloning Techniques] 등을 참조할 수 있다. 본 명세서에서 인용되는 모든 문헌은 명시적인 언급이 없더라도 본 명세서의 일부로서 간주 된다.

[0025] 발현벡터는 상기 재조합 단백질 항원을 암호화하는 목적 유전자 이외에, 그 목적 유전자와 작동 가능하게 연결됨으로써 상기 목적 유전자의 전사와 번역에 영향을 미치는 조절서열을 포함한다.

[0026] 이러한 조절서열에는 통상적으로 프로모터 서열, 전사종결 신호 서열(polyadenylation signal) 등이 포함된다. 여기서 "작동가능하게 연결된다"는 의미는 어떤 유전자의 전사 및/또는 번역이 영향을 받도록 연결된다는 의미이다. 예컨대 어떠한 프로모터가 그것에 연결된 어떤 유전자의 전사에 영향을 준다면 그 프로모터와 그 유전자는 작동가능하게 연결된 것이다.

[0027] 본 명세서에서 "프로모터"는 당업계에 알려진 통상의 의미를 따르는데, 구체적으로는 어떤 유전자의 전사 개시점을 기준으로 상위(5'쪽)에 위치하고, DNA-의존 RNA 중합효소에 대한 결합 부위, 전사 개시점, 전사 인자 결합 부위 등을 포함하는, 하나 이상의 유전자의 전사를 제어하는 기능을 갖는 핵산 서열을 의미한다. 이러한 프로모터는 그것이 원핵생물 유래일 경우 전사 개시점 상위에 있는 Prib-now box(통상 전사 개시점(+1) -10 부근 위치), Hogness box(통상 전사 개시점(+1) -35 부근 위치)를 포함하며, 그것이 진핵생물 유래일 경우 전사 개시점 상위에 있는 TATA 박스(통상 전사 개시점(+1) -20 내지 -30 위치에 존재), CAAT 박스(통상 전사 개시 부위와 비교하여 대략 -75 위치에 존재), 인핸서, 전사 억제 인자 등을 포함한다.

[0028] 프로모터는 그것에 연결된 목적유전자를 발현시킬 수 있는 프로모터라면 구성적 프로모터(특정 유기체에서 상시적으로 발현을 유도하는 프로모터), 유도성 프로모터(특정 외부 자극에 반응하여 목적 유전자의 발현을 유도하는 프로모터) 모두 사용 가능하며, 바람직하게는 특정 숙주 미생물에 적합한 프로모터를 사용하는 경우이다. 예컨대 대장균을 숙주 미생물로 사용할 경우 T7A1, T7A2, T7A3, λpL, λpR, lac, lacUV5, trp, tac, trc, phoA, rrnB, 1PL 등의 프로모터, 숙주 미생물로서 효모를 사용할 경우 GAL1, GAL10, ADH1, TDH3, PGK 등의 프로모터를 사용하는 것이 바람직할 수 있다.

[0029] 상기 발현벡터는 프로모터 이외에 전사 종결 서열인 터미네이터 서열을 포함하여 구성되는데, 터미네이터 서열은 poly(A) 첨가 신호(polyadenylation signal)로 작용하는 서열로서 전사의 완결성 및 효율성을 높이기 위한 것이다. 숙주 미생물에 따라 적합한 터미네이터 서열은 당업계에 공지되어 있으며, 예컨대 숙주 미생물이 대장균일 경우 tac 터미네이터 서열, rrnB 터미네이터 서열 등을 사용할 수 있고, 숙주 미생물이 효모일 경우 ADH1 터미네이터 서열 등을 사용할 수 있다.

[0030] 상기 발현벡터는 선별 마커 유전자를 추가로 포함할 수 있다. 선별 마커 유전자는 그러한 마커 유전자를 포함하는 숙주 미생물의 선별을 가능하게 하는 형질을 암호화하는 유전자로서 일반적으로는 항생물질 내성 유전자이다. 사용 가능한 항생물질 내성 유전자의 예로는 퓨로마이신 내성 유전자(예컨대 *Streptomyces alboniger*로부터 유래된 퓨로마이신 N-아세틸 트랜스퍼라제 유전자), 네오마이신 내성 유전자(예컨대 *Streptomyces fradiae*로부터 유래된 아미노글리코사이드 포스포트랜스퍼라제 유전자), 하이그로마이신 내성 유전자(*Streptomyces hygroscopicus* 로부터 유래된 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라제 유전자), 블레오마이신 내성 유전자(Streptomyces verticillus로부터 유래된 블레오마이신 결합 단백질), 블라스티시딘 내성 유전자(예컨대 *Streptomyces verticillum*로부터 유래된 블라스티시딘 S-아세틸트랜스퍼라제 유전자), 하이그로마이신 내성 유전자(예컨대 *Escherichia coli*로부터 유래된 아미노사이클리톨 포스포트랜스퍼라제 유전자), 암피실린 내성 유전자(β-락타마제 유전자) 등을 들 수 있다.

[0031] 본 발명의 방법에 있어서, 발현벡터는 또한 목적유전자의 용이한 클로닝을 위해서 제한효소 인식 부위(restriction enzyme recognition site)를 포함할 수 있다.

[0032] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 (a) 단계의 발현벡터를 제작한 후에는 이를 숙주 미생물에 형질전환시키는 (b) 단계가 수행되게 된다.

[0033] 형질전환은 목적 유전자가 도입됨에 의한 숙주 미생물의 유전자형의 변형을 의미하는데, 그 도입된 왜래 유전자는 숙주 미생물의 게놈과 독립적으로 존재하거나 숙주 유기체의 게놈에 통합되어 존재할 수 있다.

[0034] 상기 발현벡터를 숙주 미생물에 형질전환시키는 방법도 당업계에 공지되어 있으며, 공지된 방법 중 임의의 방법을 선택하여 사용할 수 있는데, 예컨대 숙주 미생물이 대장균 등 원핵세포인 경우, 형질전환은 $CaCl_2$ 방법, 하나한 방법, 전기 천공 방법, 칼슘 포스페이트 침전법 등을 사용할 수 있고, 숙주 미생물이 효모 등 진핵세포인 경우에, 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기 천공법, 리포좀-매개 형질감염법, DEAE-덱스트란 처리법, 유전자 밤바드먼트 등을 사용할 수 있다. 형질전환 방법과 관련하여 구체적인 사항은 문헌(Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acac. Sci. USA, 9:2110-2114(1973)), 문헌(Hanahan, D., J. Mol. Biol., 166:557-580(1983)), 문헌(Dower, W.J. et al., Nucleic. Acids Res., 16:6127-6145(1988)) (Capecchi, M.R., Cell, 22:479(1980)), 문헌(Graham, F.L. et al., Virology, 52:456(1973)), 문헌(Neumann, E. et al., EMBO J., 1:841(1982)), 문헌(Wong, T.K. et al., Gene, 10:87(1980)), 문헌(Gopal, Mol. Cell Biol., 5:1188-

1190(1985)), 문헌(Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 87:9568-9572(1990)) 문헌(Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Har

[0035] bor Laboratory (1982)) 문헌(Hitzeman et al., J. Biol. Chem., 255, 12073-12080 (1980)), 문헌(Luchansky et al Mol. Microbiol. 2, 637-646 (1988)) 등을 참조할 수 있다.

[0036] 본 발명의 방법에서 형질전환에 사용될 수 있는 숙주 미생물은 원핵세포 또는 진핵세포일 수 있다. 원핵세포로서는 그람-양성 세균과 그람-음성 세균 모두 사용할 수 있다. 구체적으로 에세리키아(Escherichia) 속 세균을 포함하여 살모넬라(Salmonella) 속 세균, 쉬겔라(Shigella) 속 세균, 엔테로박터(Enterobacter) 속 세균, 세라티아(Serratia) 속 세균, 에르위니아(Erwinia) 속 세균, 세라티아(Serratia) 속 세균, 슈도모나스(Pseudomonas) 속 세균, 카울로박터(Caulobacter) 속 세균, 시네코시스티스(Synechocystis) 속 세균(예컨대 시네코시스티스 종 PCC 6803 또는 시네코콕코스 종 PCC 6301), 시네코콕코스(Synechococcus) 속의 세균, 바실러스 속의 세균(예컨대 *Bacillus brevis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringienesis* 등), 락토콕코스(Lactococcus) 속의 세균(예컨대 *Lactococcus lactis*), 스트렙토마이세스(Streptomyces) 속 세균(예컨대 *Streptomyces lividans, Streptomyces ambofaciens, Streptomyces fradiae, Streptomyces griseofuscus*), 로도콕코스(Rhodococcus) 속 세균(예컨대 *Rhodococcus erythropolis*), 코리네박테리움(Corynebacterium)속 세균(예컨대 *Corynebacterium gluamicum*), 미코박테리움(Mycobacterium) 속 세균(예컨대 *Mycobacterium smegmatis*) 등을 사용할 수 있다.

[0037] 진핵세포로서는 효모세포, 예컨대 피키아 속 효모(예컨대 *Pichia pastoris*), 사카로마이세스 속 효모(예컨대 *Saccharomyces cerevisiae*), 한세눌라 속 효모(예컨대 *Hansenula polymorpha*), 클루이베로마이세스 속 효모(예컨대 *Kluyveromyces lactis*), 스키조사카로마이세스 속 효모(예컨대 *Schizosaccharomyces pombe*) 등을 사용할 수 있다.

[0038] 바람직하게는 대장균(*Escherichia coli*)을 사용하는 경우이다. 대장균에서의 발현은 다른 발현 숙주 미생물에 비해 비용, 수율 측면에서 여러 가지 장점을 제공할 수 있다. 목적유전자의 고수율의 발현을 위해 적합한 대장균으로서 대장균 W3110, 대장균 BL21, BL21(DE3), DH1, DH4I, DH5, DH5I, DH5IF', DH5IMCR, DH10B, DH10B/p3, DH1 IS, C600, HB101, JM101, JM105, JM109, JM110, K38, RR1, Y1088, Y1089, CSH18, ER1451, ER1647, NovaBlue, DH5α, K12 RV308, K12 C600, K-12, MG1655, HB101 균주 등을 들 수 있다. 보다 자세한 것은 문헌(Brown, Molecular Biology Labfax, Academic Press (1991))을 참조할 수 있으며, 이 문헌도 마찬가지로 본 명세서의 일부로서 간주 된다.

[0039] 대장균에서 목적 단백질 기능 발휘·유지를 위해서는 단백분해효소 활성이 손상된 대장균을 숙주 미생물로 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 구체적인 사항은 문헌(Gottesman, S., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California, 119-128 (1990))을 참조할 수 있다.

[0040] 또 대장균에서 목적유전자의 고수율의 발현을 위해서는 목적유전자의 서열을 대장균에서 선호되는 코돈으로 최적화시켜 이용할 수도 있다. 이와 관련해서는 문헌(Wada et al., Nucleic Acids Res. 20:2111-2118 (1992))을 참조할 수 있다.

[0041] 본 발명의 방법에 있어서, 전술한 바와 같이 형질전환된 숙주 미생물이 얻어지면 이 숙주 미생물을 배양하여 상기 재조합 단백질 항원을 생산하게 된다.

[0042] 형질전환된 숙주 미생물의 배양도 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다.

[0043] 세포 배양에 사용되는 배지는 형질전환된 숙주 미생물이 효율적으로 이용할 수 있는 탄소원, 질소원, 미량원소 등을 포함하는 한, 천연 배지와 합성 배지 모두를 사용할 수 있다. 만일 숙주세포로서 동물세포를 사용할 경우, 예컨대 Eagles's MEM (Eagle's minimum essential medium, Eagle, H. Science 130:432(1959)), α-MEM (Stanner, C.P. et al., Nat. New Biol. 230:52(1971)), Iscove's MEM (Iscove, N. et al., J. Exp.Med.147:923(1978)), DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's medium, Dulbecco, R. et al., Virology 8:396(1959)) 등을 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 배지에 대해서 구체적인 것은 문헌 [R. Ian Freshney, Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique, Alan R. Liss, Inc., New York]를 참조할 수 있다.

[0044] 목적 단백질의 분리·정제 방법도 당업계에 공지되어 있으며, 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다. 예컨대 한외 여과, 겔 여과, 이온 교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피(표지 펩티드가 결합된 경우), HPLC, 소수성 크로마토그래피, 등전점 크로마토그래피 등의 방법이나 이들을 조합하는 방법이 사용될 수 있다.

[0045] DNA 재조합 기술에 의한 본 발명의 목적 단백질의 생산에 대해서는 본 명세서의 기재 내용 이외에 문헌[Sambrook 등, Molecular Cloning A Laboratory Mannual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, US(1989)], 문헌[Ausubel 등, Current Protocols in Molecular Biology, Jon Willey & Sons, US(1993)], 문헌[Sambrook, J. & Russel, D. 저, Molecular Cloning, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001년 1월 15일 발행의 제1권 7.42 내지 7.45, 제2권 8.9 내지 8.17] 등을 참조할 수 있다.

[0046] 다른 측면에 있어서, 본 발명은 상기 재조합 단백질 항원을 활성성분으로 포함하는 백신 조성물에 관한 것이다.

[0047] 본 명세서에서, "백신"은 숙주인 사람에게서 해당 병원체에 대한 면역 반응을 유도함으로써 해당 병원체의 감염 또는 재감염의 예방, 해당 병원체에 의한 증상의 중증도 감소 또는 증상의 제거, 또는 해당 병원체나 그 병원체 의한 질환의 실질적 또는 완전한 제거를 포함하는 의미이다. 따라서 본 발명의 백신 조성물은 해당 병원체의 감염 전에 예방적으로 사람에게 투여되거나 해당 병원체의 감염 후에 치료적으로 사람에게 투여될 수 있다. 여기서 상기 "면역 반응"은 체액성 면역 반응, 세포성 면역 반응 또는 이들을 모두 포함하는 의미이다.

[0048] 또 본 명세서에서, "활성성분"은 단독으로 면역 반응을 유도하거나 또는 그 자체로는 면역 반응을 유도할 수 없는 담체와 함께 면역 반응을 유도할 수 있는 성분을 의미한다. 따라서 활성성분은 스스로가 반드시 면역원성(면역 반응을 유도할 수 있는 능력)을 가질 필요는 없다. 본 발명에서 상기 활성성분은 필수적이지는 않지만 정제된 것이 바람직하다. 여기서 "정제된"은 그 대상 물질이 존재하는 원래의 유기체(즉 본 발명에서는 형질전환된 미생물)의 세포 성분 또는 그 배상액 성분 등(오염물임)이 실질적으로 감소되었거나 제거된 상태를 의미한다. 오염물이 실질적으로 감소되었거나 제거된 상태는 순도가 50% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 더 바람직하게는 99% 이상을 의미한다. 순도는 크로마토그래피, 겔 전기영동, 면역학적 분석 등 당업계에 공지된 방법을 통하여 평가될 수 있으며, 정제 방법도 후수하는 바와 같이 당업계에 공지된 방법을 이용할 수 있다.

[0049] 또 본 명세서에서, 상기 "쯔쯔가무시 균"은 오리엔티아 쯔쯔가무시로 분류·동정된 모든 미생물을 포함하는 의미이다. 구체적으로는 길리엄(Gilliam) 혈청형, 카프(Karp) 혈청형, 카토(Kato) 혈청형 및 보령(Boryoung) 혈청형을 포함하는 의미이다.

[0050] 본 발명의 백신 조성물은 임의의 적절한, 약학적으로 허용되는 제제로 제조될 수 있다. 예컨대 즉석 투여 용액 또는 현탁액 형태이거나, 투여 전 희석에 적절한 농축된 원액이거나, 또는 재구성 가능한 형태 예컨대 동결건조, 냉동-건조, 또는 냉동 제제 형태로 제조될 수 있다.

[0051] 본 발명의 백신 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 포함하여 제제화될 수 있다. 백신 조성물의 제제화를 위하여 사용될 수 있는 약학적으로 허용되는 담체는 대한민국 약전이나 제외국의 약전 특히 미국, 일본, 유럽의 약전에 열거·규정되어 있으며, 이들 약전을 참조할 수 있다.

[0052] 이러한 담체는 통상 희석제, 부형제, 안정화제, 방부제 등을 포함할 것이다. 적절한 희석제로서는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유, 땅콩유와 같은 식물성유 등의 비수성 용매나 염수(바람직하게는 0.8%의 염수), 완충 매질을 포함한 물(바람직하게는 0.05M의 인산염 완충액) 등의 수성 용매 등을 들 수 있고, 적절한 부형제로서는 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카 겔, 나트륨 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 활석, 나트륨 클로라이드, 무수 탈지유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등을 들 수 있으며, 적절한 안정화제로서는 소르비톨, 만니톨, 전분, 수크로스, 덱스트란, 글루타메이트, 글루코스 등의 탄수화물이나 분유, 혈청 알부민, 카제인 등의 동물성, 식물성 또는 미생물성 단백질 등의 단백질을 들 수 있다. 적절한 방부제로서는 티메로살, 메르티올레이트, 젠타마이신, 네오마이신, 니스타틴, 암포테리신 B, 테트라사이클린, 페니실린, 스트렙토마이신, 폴리믹신 B 등을 들 수 있다.

[0053] 본 발명의 백신 조성물은 항원 보조제(adjuvant)를 추가로 포함할 수 있다. 항원 보조제는 항원에 대한 면역 반응을 증강시키는 하나 이상의 물질로 이루어진 것일 수 있다. 보조제는 항원을 서서히 방출시키는 조직 저장소로서 및/또는 면역 반응을 비특이적으로 증강시키는 임파성 시스템 활성자로서 기능할 수 있다(Hood et al., Immunology, Second Ed., 1984, benjamin/Cummings: Menlo Park, California, p.384). 항원 보조제는 예컨대 완전 프로인트(Freund), 불완전 프로인트, 사포닌, 겔 성상의 알루미늄 보조제, 표면 활성 물질(예: 리소레시틴, 플루론 글리콜, 다중 음이온, 펩티드, 오일 또는 탄화수소 에멀젼 등), 식물성 오일(면실유, 땅콩유, 옥수수유 등), 비타민 E 아세테이트 등일 수 있다.

[0054] 현재 인체에 적용 가능한 항원 보조제 중에서 가장 널리 사용되고 있는 것은 알루미늄 보조제이며, 이러한 알루미늄 보조제는 인산알루미늄(Aluminum phosphate), Potassium aluminum sulfate, 수산화 알루미늄(Aluminum hydroxide) 등 알루미늄 염(Aluminium salts)의 겔 성상으로 사용되고 있다. 이러한 알루미늄 보조제는 일반적

으로 Th2-type의 면역반응을 이끌어내어 백신 효과를 증강시키는 것으로 알려져 있다(Sokolovska A et al., Vaccine. 2007 Jun 6;25(23):4575-85; O'Hagan DT AND Rappuoli R., Pharm Res. 2004 Sep;21(9):1519-30.) 본 발명의 실시예에서 사용한 Invivogen사의 Alhydrogel®은 수산화 알루미늄(Aluminium hydroxide)의 겔 형태 현탁액(colloidal)이다. 이러한 알루미늄 보조제는 그 제조 방법이 당업계에 공지되어 있어(R. Bomford. Immunological Adjuvants and Vaccines. NATO ASI Series 1989;179:35-41; Vogel FR AND Powell MF. Pharm Biotechnol. 1995;6:141-228.;Derek T. O'Hagan, Methods in Molecular Medicine. 2000; April 15; 42: 65-90) 직접 제조하여 사용하거나, 상업적으로 유통되는 제품을 구입하여 사용할 수도 있다. 상업적으로 유통되는 제품으로서는 아래의 실시예에서 사용된 Invivogen사의 Alhydrogel® 2% 제품을 비롯하여 Sigma사의 Aluminum hydroxide Gel 제품, BRENNTAG사의 Alhydrogel™ 제품 등을 들 수 있다.

[0055] 본 발명의 백신 조성물은 임의적 단위 용량으로 제조될 수 있다. 단위 용량은 사람에 1회 이상 투여되기 위한 용도로 포장된 낱개의 제품에 포함된 활성성분과 약학적으로 허용되는 담체의 양을 말하는 것으로, 이러한 활성성분과 담체의 적절한 양은 본 발명의 백신 조성물이 1회 이상 접종될 때 백신으로서 기능할 수 있는 양으로 이러한 양은 당업자의 통상의 능력 범위 내에서 비임상적 및 임상적으로 결정될 수 있다.

[0056] 본 발명의 백신 조성물은 바람직하게는 비경구적으로 예컨대 직장, 경피, 정맥 내 주사, 동맥 내 주사, 근육 내 주사, 피 내 주사, 피하 주사, 복막 내 주사, 심실 내 주사 등을 통해 투여될 수 있다.

[0057] 본 발명의 백신 조성물은 조절 방출 시스템으로 투여될 수 있다. 예컨대 그러한 조절 방출 시스템으로서는 리포좀, 이식 삼투성 펌프, 경피 패치 등의 방식 등을 들 수 있다. 바람직하게는 리포좀 방식으로 활성성분을 전달하는 경우이다. 리포좀 방식에 의해 활성성분을 전달하는 것과 관련해서는 문헌[Langer, Science 249: 1527-1533 (1990)], 문헌[Treat at al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (des.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989)] 등을 참조할 수 있다. 여타의 활성성분의 전달 방식과 관련해서는 문헌 [Langer, supra; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987)], 문헌[Buchwald et al., Surgery 88: 507 (1980)], 문헌[Saudek et al., N. Engl. J. Med. 321:574 (1989)], 문헌[Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974)], 문헌[Controlled Drug Bioavailability. Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984)], 문헌[Ranger and Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61 (1983)], 문헌[During et al., Ann. Neurol. 25:351 (1989)], 문헌[Howard et al., J. Neurosurg. 71:105 (1989)] 등을 참조할 수 있다. 이들 문헌은 본 명세서의 일부로서 간주된다.

[0058] 본 발명의 백신 조성물의 투여량은 의료인에 의해 나이, 체중, 성별, 증상, 합병증, 다른 질환의 이환 유무 등의 환자 특성을 고려하여 결정될 수 있다.

[0059] 또한 투여의 시간적 간격과 횟수는 사용되는 제형이나 활성성분의 혈중 반감기 등을 고려하여 결정될 수 있다.

[0060] 이처럼 투여량과 투여의 시간적 간격이나 횟수는 의료인의 판단에 따라 좌우되고 개인에 따라 결정되어야 하지만, 통상의 적절한 투여량은 1일 기준 개인 체중 1kg당 약 0.1 내지 10mg 범위 내에서 결정될 것이고 투여 간격은 3 내지 10일, 투여 횟수는 1 내지 5회 범위 내에서 결정될 것이다.

[0061] 다른 측면에 있어서, 본 발명은 상기 재조합 단백질 항원을 포함하는 쯔쯔가무시 균의 특이 항체 검출용 조성물에 관한 것이다.

[0062] 본 발명의 검출용 조성물은 생체 시료 중의 쯔쯔가무시 균의 특이 항체, 특히 ScaA 항원 대한 특이 항체를 검출하기 위한 것으로, 본 발명의 조성물은 생체 시료와 접촉하여 그 반응 정도를 측정함으로써 쯔쯔가무시 균의 감염자와 비감염자를 구분하기 위한 용도로 사용될 수 있다. 특히 쯔쯔가무시병의 발병 위험 기간 동안 쯔쯔가무시병과 동일·유사한 증상을 보이는 환자가 쯔쯔가무시 균의 감염자인지 또는 비감염자인지를 구분하기 위한 용도로 유용하게 사용될 수 있다.

[0063] 본 명세서에서, "특이적 결합"이란 쯔쯔가무시 균에 대한 특이 항체, 특히 ScaA 항원 대한 특이 항체에 특이적으로 결합하는 상기 재조합 단백질 항원이 그 항체와만 결합하고 다른 단백질과는 실질적으로 결합하지 않는 경우를 의미한다. 여기서 "실질적으로"란 정도는 낮지만 비특이적인 결합체는 형성될 수 있다는 것을 의미하는데, 이러한 비특이적 결합은 후술하는 바와 같이 특이적 결합의 검출 이전에 세척 용액에 의하여 세척·제거될 수 있다.

[0064] 또 본 명세서에서, "생체 시료"는 쯔쯔가무시 균에 대한 특이 항체, 특히 ScaA 항원 대한 특이 항체가 존재할 수 있는 시료로서 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 눈물, 점액, 콧물, 질 분비물 등을 포함하며, 바람직하게는 혈청이

다. 그것은 항체는 혈청 중에 높은 농도로 존재한다는 것이 당업계에 알려져 있기 때문이다.

[0065] 본 발명의 조성물은 상기 재조합 단백질 항원이 그 가용성 용액 예컨대 탄산염 완충용액 또는 중탄산염 완충용액에 용해된 형태이거나 동결건조된 형태일 수 있다.

[0066] 한편 본 발명의 조성물은 지지체에 고정되어 사용될 수 있으며, 사용될 수 있는 고체 지지체로는 예컨대 입자(수지 비드, 자기 비드, 금속 미립자, 금 콜로이드 등), 기판(마이크로 타이터 플레이트, 유리 기판, 실리콘 기판, 수지제 기판, 전극 기판, 막 등) 등을 들 수 있으나 이에 한정되는 것은 않는다. 지지체의 재료로서는 (i) 유리, 석영 유리, 알루미나, 사파이어, 포스테라이트(forsterite), 산화규소 등의 무기 재료나 (ii) 폴리에틸렌, 폴리비닐아세탈, 아크릴 수지, 폴리카보네이트, 페놀 수지, 우레아 수지, 에폭시 수지, 멜라민 수지, 실리콘 수지, 폴리페닐렌옥시드, 폴리술폰, 폴리에틸렌글리콜, 아가로스, 아크릴아미드, 니트로셀룰로오스, 나일론, 라텍스 등의 유기 재료가 사용될 수 있다.

[0067] 본 발명의 조성물을 지지체에 고정하는 방법은 흡착(예컨대 코팅)에 의해서 직접적으로 고정될 수 있으며, 단백질과 지지체 모두에 결합하는 링커 등을 사용하여 간접적으로 고정될 수도 있다.

[0068] 본 발명의 조성물을 지지체에 흡착시켜 사용할 경우, 이러한 흡착은 예컨대 pH 9.5인 0.06M 탄산염 완충용액 또는 중탄산염 완충용액으로 본 발명의 조성물을 희석하고 그 희석액을 지지체에 일정온도에서 일정시간 접촉시킴으로써 이루어질 수 있다. 여기서 흡착에 필요한 시간과 온도는 충분한 흡착이 이루어지는 한 특별한 제한이 없는데, 예컨대 4℃에서 흡착이 이루어질 경우 72시간 동안 수행될 수 있으며, 또한 예컨대 37℃에서 흡착이 이루어질 경우 2시간 동안 수행될 수 있다. 흡착된 후에는 증류수나 에탄올 등으로 세척할 수 있으며, PBS 등의 용액에 함유된 소 혈청 알부민(BSA) 등의 차단제로 코팅할 수도 있다. 차단제로 코팅한 후에는 증류수나 차단제를 함유하지 아니한 완충용액 등으로 세척할 수도 있다.

[0069] 지지체에 흡착된 본 발명의 조성물(구체적으로 그 조성물에 포함된 상기 재조합 단백질 항원을 말함)은 지지체에 생체 시료를 처리할 경우 그 생체 시료 중의 쯔쯔가무시 균에 대한 특이 항체 특히 ScaA에 대한 특이 항체와 결합체를 형성하게 된다. 결합체를 형성을 유도한 후에는 비특이적으로 결합된 항체 등을 제거하거나 오염물질 등을 제거하기 위하여 Tween 20과 같은 세척 완충액이나 증류수 등의 세척제로 세척하는 것이 바람직할 수 있다.

[0070] 상기 결합체는 다양한 방법을 통하여 검출함으로써 생체 시료 중의 쯔쯔가무시 균에 대한 특이 항체 특히 ScaA에 대한 특이 항체 존재 유무 및/또는 존재 정도를 정성적·정량적으로 확인할 수 있다. 이는 결과적으로 피검자가 쯔쯔가무시 균에 감염되었는지에 대해 유용한 정보를 제공하게 될 것이다.

[0071] 상기 결합체는 검출제를 사용하여 검출할 수 있는데, 검출제는 예컨대 쯔쯔가무시 균에 대한 특이 항체 특히 ScaA에 대한 특이 항체와 결합하는 2차 항체일 수 있다. 2차 항체의 예로서는 항체(일차 항체)의 Fc 부분을 인식하는 것일 수 있으며, 이러한 2차 항체는 Fc 부분을 조류(예를 들면, 닭 등), 포유 동물(예를 들면, 토끼, 염소, 말, 양, 쥐 등) 등의 동물에 면역화시켜 그 동물의 혈액으로부터 분리·정제하여 얻어질 수 있다.

[0072] 2차 항체는 검출 시그널을 제공하는 표지(label)나 효소와 접합됨으로써 검출을 편리하게 할 수 있다.

[0073] 표지 접합은 검출 시그널을 제공할 수 있는 임의의 표지를 항체에 결합시키는 것이다. 그러한 표지로서는 트리티움, 요오드($^{131}I$, $^{125}I$, $^{123}I$, $^{121}I$), 인($^{32}P$), 황($^{35}S$), 금속류(예를 들면, $^{68}Ga$, $^{67}Ga$, $^{68}Ge$, $^{54}Mn$, $^{99}Mo$, $^{99}Tc$, $^{133}Xe$ 등) 등의 방사성 동위원소, 플루오레세인이소티오시아네이트, 테트라메틸로다민이소티오시아네이트, 치환 로다민이소티오시아네이트, 디클로로트리아진이소티오시아네이트, 알렉사(Alexa) 또는 알렉사플루오로(AlexaFluoro) 등의 형광성 물질 또는 형광단 등을 들 수 있다.

[0074] 효소 접합은 항체에 퍼옥시다제(POD), 알칼리포스파타제, β-갈락토시다제, 우레아제, 카탈라제, 글루코스옥시다제, 락트산 탈수소 효소, 아밀라제 또는 비오틴-아비딘 복합체 등의 효소 등을 결합시키는 것으로, 이들 효소는 특정 기질과 반응할 경우 특정 검출 시그널을 제공한다. 예컨대 퍼옥시다제는 아미노살리실산과 과산화수소 또는 p-페닐렌디아민과 과산화수소와 반응하는 경우 자주색을 나타내며, 알칼리성 포스파타제는 디니트로페닐포스페이트와 반응하는 경우 황색을 나타내고, β-갈락토시다제는 O-니트로페닐-베타-D-갈락토피라노사이드와 반응하여 자주색을 나타낸다.

[0075] 상기 표지나 효소는 바람직하게는 항체와 공유결합된다.

[0076] 이들 2차 항체 등의 검출제를 사용하여 검출할 경우, 이들 2차 항체의 상기 결합체와의 반응 정도를 효소 면역

측정법, 형광 면역 측정법, 방사 면역 측정법, 발광 면역 측정법 등 다양한 당업계의 공지·관용된 면역학적 측정 방법을 사용하여 측정할 수 있다. 바람직하게는 효소 면역 측정법, 가장 바람직하게는 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)를 사용하는 경우이다.

[0077] 본 발명은 다른 측면에 있어서, 쯔쯔가무시 균 특이 항체 특히 ScaA 항원에 대한 특이 항체의 검출용 키트에 관한 것이다.

[0078] 본 발명의 검출용 키트는 상기 재조합 단백질 항원을 포함함을 특징으로 한다.

[0079] 본 발명의 키트에 포함되는 상기 재조합 단백질 항원은 지지체 결합되어 있거나 유리된 형태일 수 있으며, 가용성 용액에 용해된 형태이거나 동결건조된 형태일 수 있다.

[0080] 본 발명의 키트는 생체 시료 중의 쯔쯔가무시 균 특이 항체 특히 ScaA 항원에 대한 특이 항체와 이 특이 항체에 특이적으로 결합하는 상기 재조합 단백질 항원의 결합체를 검출하기 위한 검출제를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 검출제는 전술한 바의 표지 또는 효소와 결합된 2차 항체일 수 있다.

[0081] 또한 본 발명의 키트는 담체, 세정 버퍼, 시료 희석액, 효소 기질, 반응 정지액 등을 추가로 포함할 수도 있으며, 결과의 해석 방법 등을 포함한 사용 방법을 교시하는 설명서를 추가로 포함할 수도 있다.

[0082] 본 발명의 또 다른 측면에 있어서, 생체 시료 중의 쯔쯔가무시 균의 특이 항체, 특히 ScaA 항원 대한 특이 항체의 검출 방법에 관한 것이다.

[0083] 본 발명의 방법은 (a) 생체 시료와, 상기 재조합 단백질 항원을 포함하는 쯔쯔가무시 균의 특이 항체 검출용 조성물과 결합시켜, 생체 시료 중의 쯔쯔가무시 균의 특이 항체, 특히 ScaA 항원 대한 특이 항체와 이 특이 항체에 특이적으로 결합하는 상기 재조합 단백질 항원의 결합체를 형성시키는 단계, 및 (b) 그 결합체를 검출하는 단계를 포함하여 구성된다.

[0084] 본 발명의 방법에서 상기 (a) 단계의 생체 시료는 전술한 바의 이유에서 바람직하게는 혈청이다.

[0085] 또 본 발명의 방법에서, 상기 (b) 단계의 결합체를 검출하는 단계는 검출 시그널을 제공할 수 있는 표지나 효소로 접합된 이차 항체를 상기 결합체와 반응시키는 단계 및 상기 결합체와의 반응 정도를 측정하는 단계를 포함하여 구성된다. 여기서 2차 항체의 결합체와의 반응 정도는 전술한 바와 같이 효소 면역 측정법, 형광 면역 측정법, 방사 면역 측정법, 발광 면역 측정법 등에 의하여 가능하며, 바람직하게는 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)를 사용하는 경우이다.

[0086] 본 발명의 또 다른 측면에 있어서, 쯔쯔가무시 균 감염 여부 진단에 유용한 정보를 제공하기 위한 방법에 관한 것이다.

[0087] 본 발명의 방법은 전술한 바의 생체 시료 중에 있는 쯔쯔가무시 균 특이 항체의 검출 방법과 동일한 단계를 포함하여 구성되며, 따라서 그 검출 방법에 대한 설명이 본 발명의 방법에 그대로 유효하다.

## *발명의 효과*

[0089] 본 발명은 전술한 바와 같이, 쯔쯔가무시 균 감염 여부 등의 진단과 그 쯔쯔가무시 균에 대한 백신으로 유용하게 사용할 수 있는, ScaA 항원의 보존 부위 서열로부터 도출한 신규 재조합 단백질 항원을 제공할 수 있다.

[0090] 본 발명의 신규 재조합 단백질 항원은 유전형 차이에 따른 방어 면역 유도능의 차이와 진단력의 차이를 극복할 수 있는 백신 조성물과 진단 조성물을 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

## *도면의 간단한 설명*

[0092] 도 1은 15개의 ScaA 단백질의 보존부위(CB1~CB13, 붉은색 표기) 및 이를 포함하는 ScaA 단편(ScaA_F1~F3)을 나타낸 그림이다(SP: signal peptide, AT: autotransporter domain).

도 2는 ScaA 단편(ScaA_F1~F3)의 발현물의 정제 결과를 쿠마시 블루 염색과 웨스턴 블럿을 통하여 확인한 그림이다.

도 3은 생쥐에 ScaA 단편 재조합 단백질(ScaA_F1~F3)을 3회 면역한 후 생성된 ScaA 특이적인 IgG 항체의 역가를 확인한 그림이다(ScaA1=ScaA_F1, ScaA4=ScaA_F2, ScaA4=ScaA_F3).

도 4는 ScaA 단편(ScaA_F1~F3) 단백질 면역 혈청의 세균감염 중화효과를 확인한 결과이다.

도 5는 재조합 단백질(ScaA_F1~F3)을 면역한 생쥐들의 비장에서 추출한 CD4 및 CD8 T 세포에서 항원 특이적 IFN-γ 분비를 측정한 시험 결과이다.

도 6은 ScaA 단편(ScaA_F1~F3) 단백질 면역된 생쥐들의 쯔쯔가무시균 감염생존율 분석결과이다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0093] 이하 본 발명을 실시예를 참조하여 설명한다. 그러나 본 발명의 범위가 이러한 실시예에 의해 제한되는 것을 아니다.

[0095] **<실시예 1> 시료 준비**

[0096] **<실시예 1-1> ScaA의 보존블럭(conserved blocks) 동정**

[0097] 미국립생물정보학센터(National Center for Biotechnology Information)의 유전자서열 데이터베이스에서 2017년 10월 20일까지 발표된 15개의 *scaA* 유전자 아미노산서열을 수집하였다[표 1]. 수집된 서열정보를 단백정렬 프로그램(Muscle program embedded in MEGA7 software)을 이용하여 정렬(Align) 하였다. 분류에 사용된 유전그룹 및 유전자형(genogroups, genotypes)은 tsa56 유전자 정보에 기반하여 결정되었다(Kim G et al., Plos Neglect Trop D 2017; 11).

*표 1*

[0098]

| *Orientia tsutsugamushi* strain | Genogroup/genotype* | ScaA accession no. |
|---|---|---|
| Karp | Karp/Karp_C | KJV54873 |
| Karp | Karp/Karp_C | AJC11312 |
| AFSC7 | Karp/Karp_A | WP_064643993 |
| UT76 | Karp/Karp_A | KJV88528, KJV78065 |
| Boryong | Karp/Boryong | WP_011944269 |
| UT144 | Gilliam/JG_C | KJW06660 |
| Ikeda | Gilliam/JG_A | BAG40673 |
| Gilliam | Gilliam/Gilliam | AJC11311 |
| AFSC4 | TA763/TA763_A | WP_064591600 |
| TA763 | TA763/TA763_A | KJV74865 |
| Kato PP | Kato/Kato_B | KJV53825 |
| Kato | Kato/Kato_B | AJC11313 |
| TA716 | Kato/Kato_A | KJV77089 |
| Sido | not determined | KJW03745 |

[0099] [표 1]에 나타낸 15개 유전자들이 공통으로 보유하는 아미노산 서열이 보존된 구간을 정의하기 위하여 각 아미노산 서열위치에서 나타나는 변이의 수와 연속된 10개의 아미노산구간 서열에 나타나는 유전자간 변이의 평균값을 계산하였다. 그리고 전체 아미노산 서열 변이의 평균값보다 낮은 아미노산 서열이 10개 이상 이어진 13개의 보존블럭들(Conserved blocks;CB)을 규정하였다[도 1]. 15개 유전자에서 확인된 13개 보존블럭 중 보존부위 13은 autotransporter domain을 포함하므로 제외하였으며 나머지 12개의 보존서열(consensus sequences)들의 위치와 아미노산 서열은 [표 2]에 나타내었다.

*표 2*

[0100]

| Conserved Blocks (CB) | Amino acid position | Amino acid sequence | 서열번호 |
|---|---|---|---|
| CB1 | 1 - 74 | MKNSRKISLIFFTTLFTISNITITQTADNDPSASSSSSGGFTGSGASQSNN TTESSNDNQGDTGSGATSNPSNP | 서열번호 1 |
| CB2 | 139 -149 | SNPSNPIEGAS | 서열번호 2 |
| CB3 | 179 - 214 | GKKPKKSPFKKLKEFGSTLSLSGHTKPEEPSEGATG | 서열번호 3 |
| CB4 | 228 - 252 | KQLASSTLSLSSTTPEEPKAPIVLS | 서열번호 4 |
| CB5 | 333 - 370 | SDLKPTSPITSSVSMPNLSDTDVSSSSSPPTRRSSSII | 서열번호 5 |
| CB6 | 378 - 393 | FDLSFFSSTTHGGKTE | 서열번호 6 |
| CB7 | 406 - 424 | FVVQSPTIVSSDLKICGNI | 서열번호 7 |
| CB8 | 720 - 733 | GGKIIVRNNGTLTH | 서열번호 8 |
| CB9 | 810 - 819 | SQGSYSGNIG | 서열번호 9 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| CB10 | 830 - 854 | LLPKSKRPSLIEVEGSVHTNQCSIS | 서열번호 10 |
| CB11 | 909 - 941 | KSKKGSSTNPEKFKKKPVTVFSINYTTNSDGTV | 서열번호 11 |
| CB12 | 1019 - 1103 | FAGLVDKKKKDKGDDGASSSSGSSSVAPSARVSPEVSDDEEGGKGEDIQAS TVSHLHSKDSAHSEQSQDKDHTEDPEDPTEAAIE | 서열번호 12 |

[0101] 쯔쯔가무시균 보령균주의 ScaA 단백질(Genbank accession no. WP_011944269)에서 보존블럭 1 ~7(CB1~ 7)을 포함하는 ScaA_F1, 보존블럭 8 ~ 12(CB8 ~12)을 포함하는 ScaA_F2, 보존블럭 11 ~ 12 (CB11 ~ 12)과 autotransporter domain 직전 서열까지를 포함하는 ScaA_F3의 아미노산 서열 정보는 [표 3]에 나타내었다. 해당 서열들은 백신 항원으로 사용되었다.

*표 3*

[0102]

| ScaA fragment | Amino acid position | Amino acid sequence |
|---|---|---|
| ScaA_F1 (서열번호13) | 27 ~ 477 | ADNDPSASSSSSGGFTGSGASQSNNTTESSNDNQGDTGSGATSNPSNPIEGASGTSPA TGASNATGDSDATGNKEADGDDSVTDSGASQSNNATEGSNDDQGDTSSGAASNPSNPS NPIEGASGTTPATGASDATGVTETTGGSATGGEVTDGKKPKKSPFKKLKEFGSTLSLS GHTKPEEPSEGATGGKGSSTSTLKRIRKQLASSTLSLSSTTPEEPKAPIVLSDPTNKQ VEVKQNKGSGVQKVIVKQPEVAFEKMEGKNNSIEISVETDAKVTVKGDDCSKIKLVNL NLSDSEFIVNNTSHSNSDLKPTSPITSSVSMPNLSDTDVSSSSSPPTRRSSSIIQPTG PQPFDLSFFSSTTHGGKTEGTDRSKFTGIGPFVVQSPTIVSSDLKICGNINVNKPLQL ITVPPVMLKTLTVERSKLVPKKSGVLKLQSALTANIEGKDATIVT |
| ScaA_F2 (서열번호14) | 672 ~ 1060 | TNWFVSYDKSTNKSTIFCSDIIFSHPEDTINILGNTDIKGNIGTKGNSGGKIIVRNNG TLTHSGGDIGNNKTSNPNSLQALHLCENASFISKPDSNIIPHTCNIKEITADKNSNIE LNSNADWKTNIIPVGTGAKVTMSQGSYSGNIGTKEKPMANVTLLPKSKRPSLIEVEGS VHTNQCSISDKSSAKGEMMLLGDYTITAQTSDGSGSINVGNAKVNLGCNTLTLASDNI SILGHKSKKGSSTNPEKFKKKPVTVFSINYTTNSDGTVKTQGKLKLSKYQDPNNKIIV NVNHQGDLRDLSKHGTQTIIQPVDIADTGGLNINNLVYICDGKCKWQPVPGSDGKFVF AGLVDKKKKDKGDDGASSSSGSSSVAPSARVSPEVSDDEEG |
| ScaA_F3 (서열번호15) | 867 ~ 1241 | GDYTITAQTSDGSGSINVGNAKVNLGCNTLTLASDNISILGHKSKKGSSTNPEKFKKK PVTVFSINYTTNSDGTVKTQGKLKLSKYQDPNNKIIVNVNHQGDLRDLSKHGTQTIIQ PVDIADTGGLNINNLVYICDGKCKWQPVPGSDGKFVFAGLVDKKKKDKGDDGASSSSG SSSVAPSARVSPEVSDDEEGGKGEDIQASTVSHLHSKDSAHSEQSQDKDHTEDPEDPT EAAIEALARLLDDPAPPPQPADEQPQPDPDEHVQPVVAQPIAAGAGQQQQQQQQQQQQ QQQQQQQQQQQQQQQHTSSPSSDDQEQSSEPEPALQPILPKISDAHLKSGVHATVAAIS SIVESRASNNKSGSDIVSSGSNINKQ |

[0103] **<실시예 1-2> ScaA의 재조합 단백질 항원 제조**

[0104] 상기 <실시예 1-1>의 ScaA_F1, ScaA_F2 및 ScaA_F3 재조합 단백질 단편들의 항원성과 백신 항원으로서의 효능을 확인하고 다른 쯔쯔가무시균 유전형에 대하여 보호면역을 제공할 수 있는지 검증하기 위하여, 재조합 단백질 항원을 제조하였다.

[0105] 각 단편을 암호화하는 핵산서열을 PCR로 증폭한 후 대장균 발현벡터인 pET-28a(+)플라즈미드에 클로닝하고, *Escherichia coli* BL21(DE3)에 도입하였다. 이 재조합 대장균을 Kanamicin(50㎍/ml)이 함유 된 LB broth에서 OD600nm (Optical Density 600nm)의 값이 0.6-0.8에 도달 할 때까지 배양하였다. 이후, 0.1mM isopropyl β-D-thiogalactoside(IPTG)을 첨가 후, 16℃에서 18시간 동안 배양하여 단백질의 발현을 유도 하였다. 발현 유도가 끝난 균은, 10분 동안 1,000 x g의 속도로 원심분리 한 후 1mg/ml의 리소자임(lysozyme)을 포함하는 Ni-nitrilotriacetic acid (NTA) His-결합 완충액(300mM NaCl, 50 mM sodium phosphate buffer, 10mM imidazole)에 현탁 시켜 4℃에서 30분 동안 반응시켰다. 이후 얼음 위에서 5분간 초음파처리를 하였으며 이를 통해 얻어진 용해물을 1,600 x g로 4℃에서 20분간 원심 분리 하였다. 상층액을 수거하고 결합 완충액으로 미리 평형화시킨 Ni-nitrilotriacetic acid (NTA) His-결합 레진(Resin)과 4℃에서 60분 동안 반응시켰다. 레진은 50mM imidazole이 포함 된 결합 완충액으로 세척 후, 250mM imidazole이 포함된 결합 완충액으로 단백질을 정제하였다. 이후, Free imidazole을 제거하기 위하여 인산완충액(pH7.4)에 4℃에서 18시간동안 투석 (Dialysis)을 진행하였으며, 정제된 단백질의 내독소(Endotoxin)을 제거하기 위해 Endotoxin removal resin을 사용하였다. 정제된 단백질 용액의 내독소 농도가 EU<0.05/dose 수준으로 제거되는 것을 LAL(Limulus amebocyte lysate) assay을 통해 확인 하였다. 추출한 단백질은 쿠마시 블루 염색(Coomasie blue stain) 및 쯔쯔가무시병 환자 혈청과 항-His 항체, 항-ScaA 항체를 이용한 western blot기법으로 정제 여부를 확인 하였으며 그 결과를 [도 2]에 나타내었다.

[0106] **<실시예 2> ScaA 재조합 단백질 항원을 이용한 면역원성 및 백신 효능 검증**

[0107] **<실시예 2-1> 재조합 단백질 항원 면역**

[0108] 정제된 ScaA_F1, F2 및 F3 재조합 단백질 20㎍과 ScaA (양성 대조군으로서 보령 유전형 ScaA 단백질의 passenger domain(amino acid position 30 ~ 1000)에 해당하는 세포외 부위;Ha NY et al., PLoS Negl Trop Dis 2015; 9:e0003585; Ha NY et al. J Nanobiotechnol 2016; 14:76) 20㎍, 음성 대조군으로 인산완충액을 면역하였다. 각각의 백신 제제는 인산완충액과 총량이 80㎕이 되게 섞어준 후, 2% Alhydrogel 20㎕을 첨가하여 총량 혼합비율(final volume ratio)이 4:1(항원:면역 보강제)이 되게 한 후 실온에서 15분간 반응시켜 주었다. 혼합한 백신 제제는 C57BL/6(6-8주령,암컷) 생쥐들에 피하(Subcutaneous) 주사하여, 2주 간격으로 총 3회 면역 하였다. 마지막 3차 면역 7일 후, 안와채혈을 통해 혈액을 획득하였으며, 2500 x g로 5분간 원침하여 혈청을 분리하였다.

[0109] **<실시예 2-2> 항체 생산 확인 및 정량**

[0110] ScaA 유래 재조합 단백질(ScaA_F1~F3)의 면역으로 인한 항체 생산을 확인하기 위하여 ELISA를 수행하였다.

[0111] 구체적으로, 0.05M bicarbonate buffer (pH 9.5)에 정제된 ScaA 단백질을 1㎍/㎖의 농도로 희석한 뒤 Immunoassay plate에 100㎕/well씩 4℃에서 18시간 동안 코팅하였다. 세척액(0.05% Phosphatate Buffered Sakine Tween-20, PBST)을 이용해 코팅된 well들을 세척하고, 3% BSA(Bovine serum albumin) 용액으로 실온에서 2시간 동안 Blocking하였다. 상기 <실시예 2-1>에서 획득한 마우스 혈청의 100배 희석액을 2배씩 단계희석(serial dilution)하여 100㎕/well씩 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 반응시켜 주었다. 세척액(0.05% Phosphatate Buffered Sakine Tween-20, PBST)을 이용해 세척 한 후, 10000배 희석한 anti-mouse-IgG HRP conjugate를 100㎕/well로 첨가하여 실온에서 1시간동안 반응시켜 주었다. 세척액(0.05% Phosphatate Buffered Sakine Tween-20, PBST)을 이용해 세척 한 후, 발색제인 3,3′ ,5,5′ -Tetramethylbenzidine (TMB) 용액을 100 ㎕/well씩 첨가하여 실온에서 7분간 반응 시켜 주었다. 반응정지용액(1N H2SO4)을 100㎕/well로 첨가한 후, Microplate reader을 이용해 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성대조군인 인산완충액군(CNT)을 제외한 세개의 ScaA 단편 단백질 면역 실험군에서 ScaA에 대한 특이적 항체 역가가 모두 105이상으로 검출되었다[도 3].

[0112] **<실시예 2-3> ScaA 단편 단백질 면역 혈청의 세균감염 중화효과 확인**

[0113] ScaA 단편 항원들에 대한 항체가 쯔쯔가무시균의 세포 감염을 억제할 수 있는지 알아보기 위하여 쯔쯔가무시균 보령 균주를 L929 세포(마우스 섬유아세포주; ATCC NTCT929) 내에서 증식시켜 정제하였다.

[0114] 구체적으로, 감염 3-4일 후 간접면역형광기술을 수행하여 감염률을 확인하고 감염률이 90% 이상이 되면 L929 세포를 600 x g의 속도에 20분 동안 원심 분리하여 펠렛을 모은 후 6.5 ml의 Tris-sucrose(TS) 완충액(33mMTris-Cl[pH 7.4] and 0.25 M sucrose)에 현탁 시켰다. 현탁 된 세포를 Polytron homogenizer (Wheaton Inc. Millville, NJ)를 이용하여(10 stroke) 균질화 한 후 5분 동안 200 x g로 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액을 TS 완충액에 들어있는 40% Percoll (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden)과 섞은 후 2500 x g에서 60 분동안 원심분리하고 원심분리 후 나타나는 균 층을 모은 후 다시 7700 x g로 30분 동 안 원심분리 하여 쯔쯔가무시균들을 정제하였다.

[0115] 정제된 세균들을 ScaA 단편 항원들에 대한 항혈청과 4℃에서 한시간 동안 반응시키고 MOI(multiplicity of infection)가 10이 되도록 L929 세포에 감염시켰다. 음성대조군으로 인산완충용액만 면역 후 얻은 혈청(CNT군), 양성대조군으로 ScaA 단백질을 면역 후 얻은 혈청을 사용하였다. 세포를 간접면역형광법으로 염색하여 세포당 감염된 세균의 수를 측정하였으며, 혈청과 반응시키지 않은 세균감염 시험군 대비 숙주세포당 감염세균의 비율을 계산하여 억제율을 평가하였으며 그 결과를 [도 4]에 나타내었다.

[0116] 그 결과, ScaA_F2에 대한 항혈청은 1:100 또는 1:1000 희석한 시료에서 ScaA_F1이나 ScaA_F3를 면역하여 얻은 항혈청들 보다 세균감염을 억제하는 효과가 더 탁월한 것으로 확인되었으며, ScaA를 면역하여 얻은 항혈청과 유사한 정도의 감염억제 효율이 관찰되었다. 따라서 ScaA_F2는 세균감염을 중화할 수 있는 항체를 유도하는 항원임이 확인되었다.

[0117] **<실시예 2-4> ScaA 단편 단백질 면역에 의한 T 세포 반응 확인**

[0118] 정제된 ScaA_F1, ScaA_F2, ScaA_F3 재조합 단백질 또는 ScaA 항원을 2주 간격으로 3회 면역한 C57BL/6 생쥐들에서 비장을 적출하고, Histopaque density gradient 원심분리법을 이용하여 말초단핵구를 분리하였다. 음성대

조군으로는 인산완충용액만 면역한 군(CNT군)을 사용하였다. 분리된 세포들(5 x $10^6$ cells)을 10 ㎍의 ScaA항원과 함께 배양하고 18시간 후 GolgiPlug를 첨가하고 6시간 더 배양하였다. 세포들은 FACS 버퍼 (PBS containing 1% bovine serum albumin and 1 mM EDTA)로 세척하고 ultra-block solution (Sigma)을 첨가하여 30분간 더 반응시키 뒤 FITC-conjugated CD4 또는 PE.cy7-conjugated CD8 antibody (BD Pharmingen)와 30 분간 반응시켰다. Cytofix/Cytoperm kit (BD Pharmingen)를 이용하여 염색된 세포들을 고정하고 막투과 과정을 실시한 후 세포내 생성된 인터페론-감마(IFN-γ) 사이토카인을 APC-conjugated anti-IFN-γ 항체(BD Pharmingen)를 이용하여 30분간 염색하였다. 형광 염색된 세포들은 FACS LSRII flow cytometer (BD Biosciences)로 검사하여 항원특이적 세포면역반응 유도 정도를 측정하여 [도 5]에 나타내었다.

[0119] ScaA 단편 단백질(ScaA_F1, ScaA_F2, ScaA_F3)을 면역한 생쥐들에서 항원특이적 T 세포 반응이 ScaA를 면역한 생쥐에서와 거의 유사하게 유도됨을 확인하였으며, 이를 통해 각 단편 항원들이 CD4 및 CD8 T 세포 반응을 유도하는 항원성을 보유하고 있음을 알 수 있다.

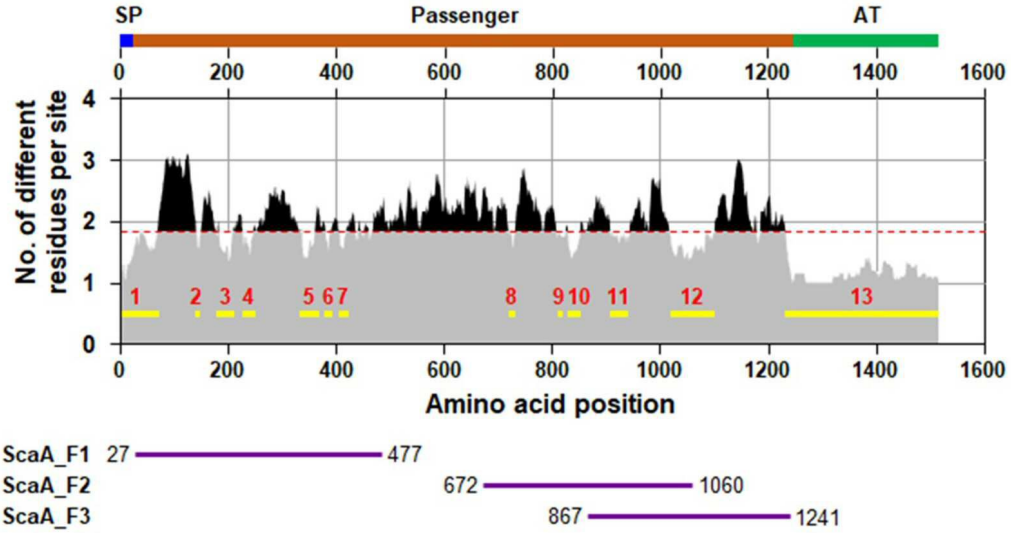
[0120] **<실시예 2-5> 마우스 보호면역 효과 확인**

[0121] 생쥐들을 3회 면역하고 최종 면역 7일 후, 반수치량 100배(100 X $LD_{50}$)에 해당하는 보령 또는 카프 유전형 쯔쯔가무시균을 복강내(Intraperitoneal) 경로로 감염시켰다. 감염 후, 30일동안 마우스의 생존률을 관찰하였으며 해당 결과를 [도 6]에 나타내었다.

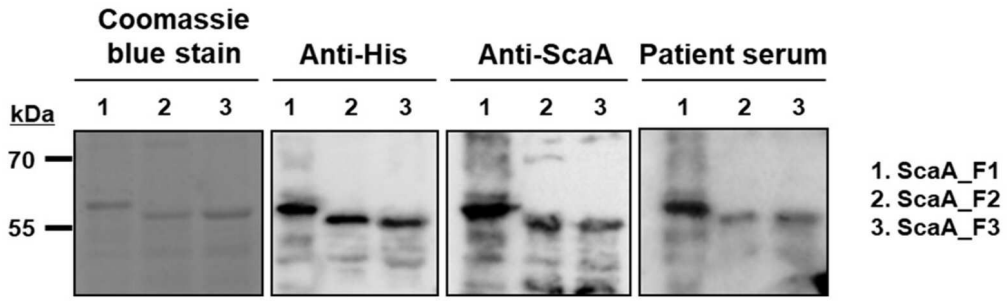
[0122] ScaA 단편들이나 ScaA 재조합 단백질을 면역한 생쥐들은 보령 유전형 감염 후 항원을 면역하지 않은 대조군에 비하여 모두 유의한 생존률을 보였다. 하지만 카프 유전형을 감염시킨 생쥐들 중에서는 ScaA_F1을 면역한 실험군은 85.7% (7 마리 중 6마리)가 사망한 반면, ScaA_F2, ScaA_F3, ScaA를 면역한 실험군들은 각각 100% (7/7), 85.7% (6/7), 71.4% (5/7)이 생존하여 항원을 면역하지 않은 대조군(CNT)에 비하여 유의한 생존율이 관찰되었다. 항원을 면역하지 않은 음성대조군에서는 보령형과 카프형을 감염시킨 모든 생쥐들이 사망하였다. 따라서 ScaA_F2와 ScaA_F3 재조합 단백질 면역을 통해 동일 유전형에 대한 보호면역이 유도될 수 있을 뿐만 아니라, 다른 혈청형에 대해서도 보다 향상된 보호면역이 제공될 수 있음을 확인하였다.

## 도면

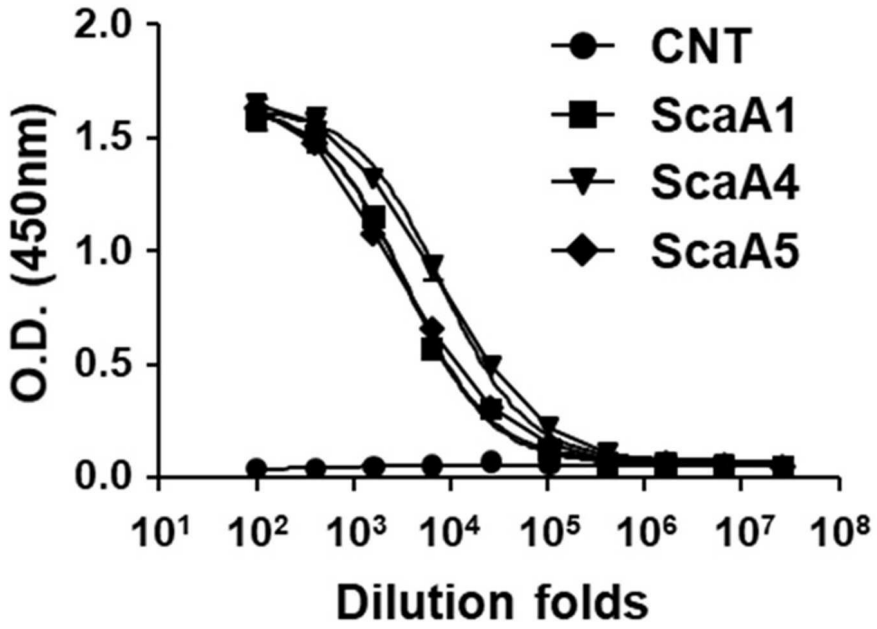
### 도면1



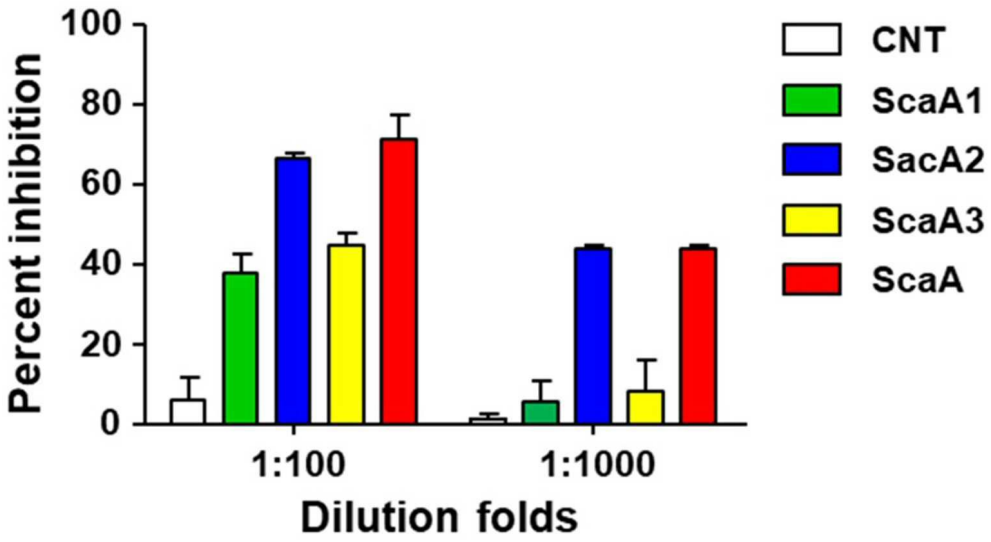
도면2


Coomassie blue stain
Anti-His
Anti-ScaA
Patient serum
kDa
1 2 3 1 2 3 1 2 3 1 2 3
70
55
1. ScaA_F1
2. ScaA_F2
3. ScaA_F3

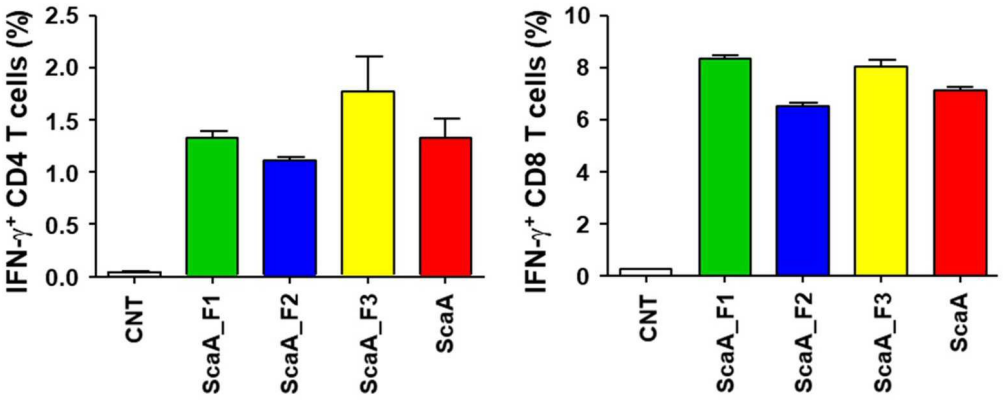
도면3


2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
O.D. (450nm)
CNT
ScaA1
ScaA4
ScaA5
10¹ 10² 10³ 10⁴ 10⁵ 10⁶ 10⁷ 10⁸
Dilution folds

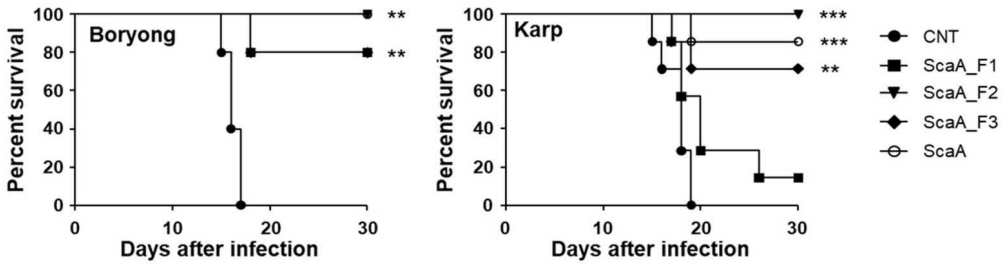
도면4


100
80
60
40
20
0
Percent inhibition
CNT
ScaA1
SacA2
ScaA3
ScaA
1:100
1:1000
Dilution folds

도면5




도면6




**: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

서 열 목 록

<110> TW, patent

<120> Novel Recombinant Protein Antigens of Orientia tsutsugamushi and the Vaccine Composition Using the Same

<130> PP17-477

<160> 15

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 74

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CB1

<400> 1

Met Lys Asn Ser Arg Lys Ile Ser Leu Ile Phe Phe Thr Thr Leu Phe
1 5 10 15

Thr Ile Ser Asn Ile Thr Ile Thr Gln Thr Ala Asp Asn Asp Pro Ser

20 25 30

Ala Ser Ser Ser Ser Ser Gly Gly Phe Thr Gly Ser Gly Ala Ser Gln
35 40 45
Ser Asn Asn Thr Thr Glu Ser Ser Asn Asp Asn Gln Gly Asp Thr Gly
50 55 60
Ser Gly Ala Thr Ser Asn Pro Ser Asn Pro
65 70

<210> 2
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> CB2
<400> 2
Ser Asn Pro Ser Asn Pro Ile Glu Gly Ala Ser
1 5 10

<210> 3
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> CB3
<400> 3
Gly Lys Lys Pro Lys Lys Ser Pro Phe Lys Lys Leu Lys Glu Phe Gly
1 5 10 15
Ser Thr Leu Ser Leu Ser Gly His Thr Lys Pro Glu Glu Pro Ser Glu
20 25 30
Gly Ala Thr Gly
35

<210> 4
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> CB4
<400> 4

Lys Gln Leu Ala Ser Ser Thr Leu Ser Leu Ser Ser Thr Thr Pro Glu

1 5 10 15

Glu Pro Lys Ala Pro Ile Val Leu Ser

20 25

<210> 5

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CB5

<400> 5

Ser Asp Leu Lys Pro Thr Ser Pro Ile Thr Ser Ser Val Ser Met Pro

1 5 10 15

Asn Leu Ser Asp Thr Asp Val Ser Ser Ser Ser Ser Pro Pro Thr Arg

20 25 30

Arg Ser Ser Ser Ile Ile

35

<210> 6

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CB6

<400> 6

Phe Asp Leu Ser Phe Phe Ser Ser Thr Thr His Gly Gly Lys Thr Glu

1 5 10 15

<210> 7

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CB7

<400> 7

Phe Val Val Gln Ser Pro Thr Ile Val Ser Ser Asp Leu Lys Ile Cys

1 5 10 15

Gly Asn Ile

<210> 8

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CB8

<400> 8

Gly Gly Lys Ile Ile Val Arg Asn Asn Gly Thr Leu Thr His

1 5 10

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CB9

<400> 9

Ser Gln Gly Ser Tyr Ser Gly Asn Ile Gly

1 5 10

<210> 10

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CB10

<400> 10

Leu Leu Pro Lys Ser Lys Arg Pro Ser Leu Ile Glu Val Glu Gly Ser

1 5 10 15

Val His Thr Asn Gln Cys Ser Ile Ser

20 25

<210> 11

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CB11

<400> 11

Lys Ser Lys Lys Gly Ser Ser Thr Asn Pro Glu Lys Phe Lys Lys Lys
1 5 10 15
Pro Val Thr Val Phe Ser Ile Asn Tyr Thr Thr Asn Ser Asp Gly Thr
20 25 30

Val

<210> 12
<211> 85
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> CB12
<400> 12
Phe Ala Gly Leu Val Asp Lys Lys Lys Lys Asp Lys Gly Asp Asp Gly
1 5 10 15
Ala Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Val Ala Pro Ser Ala Arg Val
20 25 30
Ser Pro Glu Val Ser Asp Asp Glu Glu Gly Gly Lys Gly Glu Asp Ile
35 40 45
Gln Ala Ser Thr Val Ser His Leu His Ser Lys Asp Ser Ala His Ser

50 55 60
Glu Gln Ser Gln Asp Lys Asp His Thr Glu Asp Pro Glu Asp Pro Thr
65 70 75 80
Glu Ala Ala Ile Glu
85
<210> 13
<211> 451
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> ScaA_F1
<400> 13
Ala Asp Asn Asp Pro Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ser Gly Gly Phe Thr
1 5 10 15

Gly Ser Gly Ala Ser Gln Ser Asn Asn Thr Thr Glu Ser Ser Asn Asp

20 25 30

Asn Gln Gly Asp Thr Gly Ser Gly Ala Thr Ser Asn Pro Ser Asn Pro

35 40 45

Ile Glu Gly Ala Ser Gly Thr Ser Pro Ala Thr Gly Ala Ser Asn Ala

50 55 60

Thr Gly Asp Ser Asp Ala Thr Gly Asn Lys Glu Ala Asp Gly Asp Asp

65 70 75 80

Ser Val Thr Asp Ser Gly Ala Ser Gln Ser Asn Asn Ala Thr Glu Gly

85 90 95

Ser Asn Asp Asp Gln Gly Asp Thr Ser Ser Gly Ala Ala Ser Asn Pro

100 105 110

Ser Asn Pro Ser Asn Pro Ile Glu Gly Ala Ser Gly Thr Thr Pro Ala

115 120 125

Thr Gly Ala Ser Asp Ala Thr Gly Val Thr Glu Thr Thr Gly Gly Ser

130 135 140

Ala Thr Gly Gly Glu Val Thr Asp Gly Lys Lys Pro Lys Lys Ser Pro

145 150 155 160

Phe Lys Lys Leu Lys Glu Phe Gly Ser Thr Leu Ser Leu Ser Gly His

165 170 175

Thr Lys Pro Glu Glu Pro Ser Glu Gly Ala Thr Gly Gly Lys Gly Ser

180 185 190

Ser Thr Ser Thr Leu Lys Arg Ile Arg Lys Gln Leu Ala Ser Ser Thr

195 200 205

Leu Ser Leu Ser Ser Thr Thr Pro Glu Glu Pro Lys Ala Pro Ile Val

210 215 220

Leu Ser Asp Pro Thr Asn Lys Gln Val Glu Val Lys Gln Asn Lys Gly

225 230 235 240

Ser Gly Val Gln Lys Val Ile Val Lys Gln Pro Glu Val Ala Phe Glu

245 250 255

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

260 265 270

Ala Lys Val Thr Val Lys Gly Asp Asp Cys Ser Lys Ile Lys Leu Val

275 280 285

Asn Leu Asn Leu Ser Asp Ser Glu Phe Ile Val Asn Asn Thr Ser His

290 295 300

Ser Asn Ser Asp Leu Lys Pro Thr Ser Pro Ile Thr Ser Ser Val Ser

305 310 315 320

Met Pro Asn Leu Ser Asp Thr Asp Val Ser Ser Ser Ser Ser Pro Pro

325 330 335

Thr Arg Arg Ser Ser Ser Ile Ile Gln Pro Thr Gly Pro Gln Pro Phe

340 345 350

Asp Leu Ser Phe Phe Ser Ser Thr Thr His Gly Gly Lys Thr Glu Gly

355 360 365

Thr Asp Arg Ser Lys Phe Thr Gly Ile Gly Pro Phe Val Val Gln Ser

370 375 380

Pro Thr Ile Val Ser Ser Asp Leu Lys Ile Cys Gly Asn Ile Asn Val

385 390 395 400

Asn Lys Pro Leu Gln Leu Ile Thr Val Pro Pro Val Met Leu Lys Thr

405 410 415

Leu Thr Val Glu Arg Ser Lys Leu Val Pro Lys Lys Ser Gly Val Leu

420 425 430

Lys Leu Gln Ser Ala Leu Thr Ala Asn Ile Glu Gly Lys Asp Ala Thr

435 440 445

Ile Val Thr

450

<210> 14

<211> 389

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ScaA_F2

<400> 14

Thr Asn Trp Phe Val Ser Tyr Asp Lys Ser Thr Asn Lys Ser Thr Ile

1 5 10 15

Phe Cys Ser Asp Ile Ile Phe Ser His Pro Glu Asp Thr Ile Asn Ile

20 25 30

Leu Gly Asn Thr Asp Ile Lys Gly Asn Ile Gly Thr Lys Gly Asn Ser

35 40 45

Gly Gly Lys Ile Ile Val Arg Asn Asn Gly Thr Leu Thr His Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu His Leu Cys Glu Asn Ala Ser Phe Ile Ser Lys Pro Asp Ser Asn

85 90 95

Ile Ile Pro His Thr Cys Asn Ile Lys Glu Ile Thr Ala Asp Lys Asn

100 105 110

Ser Asn Ile Glu Leu Asn Ser Asn Ala Asp Trp Lys Thr Asn Ile Ile

115 120 125

Pro Val Gly Thr Gly Ala Lys Val Thr Met Ser Gln Gly Ser Tyr Ser

130 135 140

Gly Asn Ile Gly Thr Lys Glu Lys Pro Met Ala Asn Val Thr Leu Leu

145 150 155 160

Pro Lys Ser Lys Arg Pro Ser Leu Ile Glu Val Glu Gly Ser Val His

165 170 175

Thr Asn Gln Cys Ser Ile Ser Asp Lys Ser Ser Ala Lys Gly Glu Met

180 185 190

Met Leu Leu Gly Asp Tyr Thr Ile Thr Ala Gln Thr Ser Asp Gly Ser

195 200 205

Gly Ser Ile Asn Val Gly Asn Ala Lys Val Asn Leu Gly Cys Asn Thr

210 215 220

Leu Thr Leu Ala Ser Asp Asn Ile Ser Ile Leu Gly His Lys Ser Lys

225 230 235 240

Lys Gly Ser Ser Thr Asn Pro Glu Lys Phe Lys Lys Lys Pro Val Thr

245 250 255

Val Phe Ser Ile Asn Tyr Thr Thr Asn Ser Asp Gly Thr Val Lys Thr

260 265 270

Gln Gly Lys Leu Lys Leu Ser Lys Tyr Gln Asp Pro Asn Asn Lys Ile
275 280 285
Ile Val Asn Val Asn His Gln Gly Asp Leu Arg Asp Leu Ser Lys His
290 295 300
Gly Thr Gln Thr Ile Ile Gln Pro Val Asp Ile Ala Asp Thr Gly Gly
305 310 315 320
Leu Asn Ile Asn Asn Leu Val Tyr Ile Cys Asp Gly Lys Cys Lys Trp
325 330 335
Gln Pro Val Pro Gly Ser Asp Gly Lys Phe Val Phe Ala Gly Leu Val

340 345 350
Asp Lys Lys Lys Lys Asp Lys Gly Asp Asp Gly Ala Ser Ser Ser Ser
355 360 365
Gly Ser Ser Ser Val Ala Pro Ser Ala Arg Val Ser Pro Glu Val Ser
370 375 380
Asp Asp Glu Glu Gly
385

<210> 15
<211> 374
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> ScaA_F3
<400> 15
Gly Asp Tyr Thr Ile Thr Ala Gln Thr Ser Asp Gly Ser Gly Ser Ile

1 5 10 15
Asn Val Gly Asn Ala Lys Val Asn Leu Gly Cys Asn Thr Leu Thr Leu
20 25 30
Ala Ser Asp Asn Ile Ser Ile Leu Gly His Lys Ser Lys Lys Gly Ser
35 40 45
Ser Thr Asn Pro Glu Lys Phe Lys Lys Lys Pro Val Thr Val Phe Ser
50 55 60
Ile Asn Tyr Thr Thr Asn Ser Asp Gly Thr Val Lys Thr Gln Gly Lys

65 70 75 80

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

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

Thr Glu Asp Pro Glu Asp Pro Thr Glu Ala Ala Ile Glu Ala Leu Ala
225 230 235 240
Arg Leu Leu Asp Asp Pro Ala Pro Pro Pro Gln Pro Ala Asp Glu Gln
245 250 255
Pro Gln Pro Asp Pro Asp Glu His Val Gln Pro Val Val Ala Gln Pro
260 265 270
Ile Ala Ala Gly Ala Gly Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln
275 280 285
Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln

290 295 300
His Thr Ser Ser Pro Ser Ser Asp Asp Gln Glu Gln Ser Ser Glu Pro
305 310 315 320

Glu Pro Ala Leu Gln Pro Ile Leu Pro Lys Ile Ser Asp Ala His Leu
325 330 335

Lys Ser Gly Val His Ala Thr Val Ala Ala Ile Ser Ser Ile Val Glu
340 345 350

Ser Arg Ala Ser Asn Asn Lys Ser Gly Ser Asp Ile Val Ser Ser Gly
355 360 365

Ser Asn Ile Asn Lys Gln
370