(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년10월02일
(11) 등록번호 10-2027816
(24) 등록일자 2019년09월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/195 (2006.01) *G01N 33/569* (2017.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/195 (2013.01)
G01N 33/56977 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0149836
(22) 출원일자 2017년11월10일
심사청구일자 2017년11월10일
(65) 공개번호 10-2019-0053696
(43) 공개일자 2019년05월20일
(56) 선행기술조사문헌
PLOS: neglected tropical disease, (2015.03.13.), DOI:10.1371/journal.pntd.0003585. 1부.*
(뒷면에 계속)
전체 청구항 수 : 총 5 항

(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

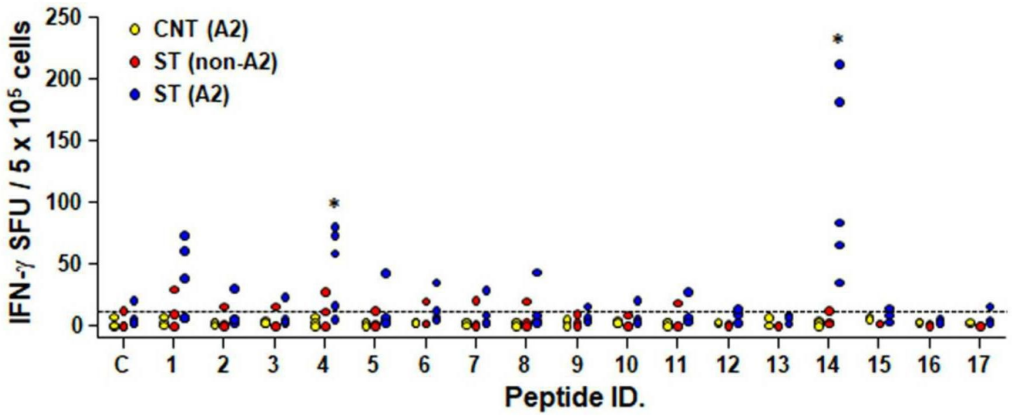
심사관 : 손영희

(54) 발명의 명칭 **오리엔티아 쯔쯔가무시 균의 TSA56 항원의 에피톱 항원 및 그 용도**

(57) 요 약

본 발명은 오리엔티아 쯔쯔가무시균의 TSA56 항원 특이적 CD8 T 세포에 대한 에피톱 항원과 그것을 이용한 TSA56 항원 특이적 CD8 T 세포의 정량 분석 방법 등의 용도를 개시한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
G01N 2333/29 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌
PLOS: neglected tropical disease, (2015.03.13), DOI:10.1371/journal.pntd.0003585. 1부.*
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

QLYKDLVKL의 아미노산 서열로 이루어진 TSA56 항원의 에피톱(epitope) 항원.

청구항 2

삭제

청구항 3

(a) 제1항 기재의 에피톱 항원을 준비하는 단계,

(b) TSA56 항원 특이적 CD8 T 세포를 준비하는 단계, 및

(c) 상기 에피톱 항원과 TSA56 항원 특이적 CD8 T 세포를 반응시켜 에피톱 항원과 결합한 TSA56 항원 특이적 CD8 T 세포를 계수하는 단계를 포함하는

TSA56 항원 특이적 CD8 T 세포의 정량 분석 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 (a) 단계의 에피톱 항원은 화학적으로 합성된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 (b) 단계는 HLA-A2형을 가진 사람으로부터 혈액 시료를 얻고 그 혈액 시료에서 말초혈액 단핵세포를 분리하여 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제3항에 있어서,

상기 방법은

(i) TSA56 항원 백신 접종이 면역 방어능을 유도하였는가를 확인하는데 사용되거나,

(ii) 오리엔티아 쯔쯔가무시 균의 감염 후 회복한 사람이 면역 방어능을 획득하였는가를 확인하는데 사용되거나,

(iii) 오리엔티아 쯔쯔가무시 균의 감염 여부 진단에 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 오리엔티아 쯔쯔가무시 균의 TSA56 항원의 에피톱 항원 및 그 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 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. 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 진단할 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.).

[0003] 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.

[0004] 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).

[0005] 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 알려졌다(Seong SY et al., Vaccine 1997 Nov; 15(16):1741-1747.; Ha NY et al., PLoS Negl Trop Dis 2015 Mar; 9(3): e0003585). 또한 최근 쯔쯔가무시균 감염 동물모델에서 CD8 T 세포가 치사율을 억제하는데 중요한 역할을 한다는 연구 결과들이 알려졌으나(Hauptmann M et al., PLoS Negl Trop Dis 2016 Sep; 10(9): e0004991; Xu G et al., PLoS Negl Trop Dis 2017 Jul; 11(7): e0005763), 아직까지 그 에피톱(항원결정기)에 대한 구체적인 연구는 수행되지 않았다.

[0006] 본 발명에서는 쯔쯔가무시균의 TSA56 항원 특이적 CD8 T 세포에 대한 에피톱 항원과 그것의 용도를 개시한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 쯔쯔가무시균의 TSA56 항원 특이적 CD8 T 세포에 대한 에피톱 항원을 제공하는 데 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적이나 구체적인 목적은 이하에서 제시될 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 오리엔티아 쯔쯔가무시 균의 주요 막단백질인 TSA56은 백신 항원으로 사용되어 오고 있다. 이에 더불어 최근 CD8 T 세포가 오리엔티아 쯔쯔가무시 균 감염에 대한 방어능을 제공한다는 것이 보고되었다. 따라서 사람에서 면역방어능을 확인하는데 있어, 오리엔티아 쯔쯔가무시 균에 특이적인 CD8 T 세포 반응을 확인하는 것은 매우 중요하지만, 아직 구체적인 시험방법이 존재하지 않는다.

[0010] 이에 본 발명자들은 오리엔티아 쯔쯔가무시 균에 특이적인 CD8 T 세포 반응을 측정하기 위한 도구로, TSA56 항원 내 MHC class I 제한 에피톱을 확인하기 위하여 아래 [표 2]의 네 개의 인터넷 기반 프로그램을 사용하여, 쯔쯔가무시병이 유행하는 동아시아 지역에서 가장 흔한 HLA 대립유전자인 HLA-A*0201에 결합할 수 있는 CD8 T 세포의 에피톱 후보 17가지 펩티드를 선별하고, 이 17가지 에피톱 후보 펩티드에 대해서 ELISPOT 분석(Enzyme-Linked ImmunoSpot assay)을 실시한 결과, HLA-A2형을 가진 회복된 환자의 말초혈액 단핵세포(PBMCs, peripheral blood mononuclear cells;PBMCs)에서 세 가지 항원결정인자 펩티드(MLIASAMSA의 아미노산 서열로

이루어진 펩티드, YLRNISAEV의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드, QLYKDLVKL의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드)가 HLA-A2형 대조군(쯔쯔가무시병을 앓은 적인 없는 군) 혹은 비 HLA-A2형을 가진 회복된 환자와 비교할 때 유의하게 많은 IFN-γ 양성 면역점(immunospot)들을 유도함을 확인하였다. 이러한 결과는 상기 펩티드들이 HLA-A2형을 가진 사람들에서 TSA56 항원 특이적 CD8 T 세포의 정량 분석을 가능하게 함으로써 TSA56 항원 백신 접종이 면역 방어능을 유도하였는가 등을 확인하는데 유용하게 사용될 수 있음을 의미한다.

[0011] 전술한 바를 고려할 때, 본 발명은 일 측면에 있어서, YLRNISAEV의 서열로 이루어진 TSA56 항원의 에피톱 항원 또는 QLYKDLVKL의 서열로 이루어진 TSA56 항원의 에피톱 항원에 관한 것이다.

[0012] 본 발명의 에피톱 항원은 재조합 DNA 기술을 이용하여 유전공학적으로 제조되거나 화학적 합성 방법으로 제조될 수 있다.

[0013] 유전공학적인 제조 방법은 펩티드를 코딩하는 유전자가 포함된 재조합 DNA를 숙주세포에 형질전환시켜 발현시키는 기술인데, 이러한 재조합 DNA는 숙주세포에서 발현될 수 있도록 프로모터, 활성인자(activator), 인핸서, 작동인자(operator), 리보솜 결합 부위, 개시 신호, 정지 신호, 캡 신호(cap signal), 폴리아데닐화 신호, 등을 포함하며, 숙주세포는 *E. coli* 등의 박테리아, 사카로미세스(Saccharomyces sp.) 속 효모, 곤충 세포, 포유동물 세포 등이 사용될 수 있다. 재조합 DNA의 제작 기술, 형질전환 기술, 숙주세포의 적절한 배양 기술은 등은 모두 당업계에 공지되어 있다.

[0014] 화학적 합성 방법도 당업계에 잘 공지되어 있는데, 예컨대 고체상 합성 기술, 용액상 합성 기술, 효소 합성법 등을 사용할 수 있으며 구체적인 것은 문헌[Stewart J.M. and Young J.D. (1984) “Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd edition”], 문헌[Bodanzsky M. and Bodanzsky A. (1984) “The practice of Peptide Synthesis”], 문헌[Lloyd-Williams, P., Albericio, F. and Giralt, E. (1997) “Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins”], 문헌[Kullmann W. (1980) “Proteases as catalysts for enzymic syntheses of opioid Peptides” J.Biol.Chem. 255, 8234-8238] 등을 참조할 수 있다. 이러한 화학적 합성 기술은 아미노산의 수가 적은 소형 펩티드인 본 발명의 에피톱 항원의 제조에 특히 유용할 것이다.

[0015] 다른 측면에 있어서, 본 발명은 상기 에피톱 항원들을 이용한 TSA56 항원 특이적 CD8 T 세포의 정량 분석 방법에 관한 것이다.

[0016] 본 발명의 TSA56 항원 특이적 CD8 T 세포의 정량 분석 방법은, 전술하였듯이 TSA56 항원 백신 접종이 면역 방어능을 유도하였는가를 확인하는데 사용될 수 있고, 나아가 오리엔티아 쯔쯔가무시 균의 감염 후 회복한 개체(사람)가 면역 방어능을 획득하였는가를 확인하는데 사용될 수 있으며, 또한 오리엔티아 쯔쯔가무시 균의 감염 여부 진단 등에도 유용하게 사용될 수 있다. 또한 상기 에피톱 항원들은 다양한 유전형(Boryong, Gilliam, Ikeda, Karp, Kato, Kawasaki, Saitama, Shimokoshi, 및 TA763)의 TSA56 단백질 내에서 비교적 그 아미노산 서열이 잘 보존되어 있는 구간에 위치하고 있기 때문에(도 6 및 도 7 참조), 본 발명의 방법은 쯔쯔가무시균의 원형 혈청형인 카프, 카토, 길리엄 등을 포함한 보령, 카와사키 등 다양한 균주에 대해서도 적용될 수 있다.

[0017] 본 발명의 방법은 (a) 상기 에피톱 항원을 준비하는 단계, (b) TSA56 항원 특이적 CD8 T 세포를 준비하는 단계, 및 (c) 상기 에피톱 항원과 TSA56 항원 특이적 CD8 T 세포를 반응시켜 에피톱 항원과 결합한 TSA56 항원 특이적 CD8 T 세포를 계수하는 단계를 포함하여 구성된다.

[0018] 본 발명의 방법에서, 상기 (a) 단계는 전술한 바와 같이 유전공학적 제조 방법 또는 화학적 합성 방법에 의하여 이루어질 수 있다.

[0019] 또 본 발명의 방법에서, 상기 (b) 단계는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균의 감염 여부가 의심되는 개체(사람)나 오리엔티아 쯔쯔가무시 균의 감염 후 회복한 개체, 유효성분이 TSA56 항원인 백신이 면역 방어능을 유도하였는가의 확인이 필요한 개체 등에서 혈액 시료를 얻고 원심분리 등의 방법을 통하여 CD8 T 세포를 포함하는 PBMC 세포를 분리함으로써 이루어질 수 있다. 상기 개체들은 상기 에피톱 항원이 HLA-A2형에 특이적인 것임으로 고려할 때 HLA-A2형을 가진 개체인 것이 바람직하며, TSA56 항원 특이적 CD8 T 세포는 이를 포함하는 IFN-γ-양성 PBMC 세포인 것이 바람직하다.

[0020] 또 본 발명의 방법에서, 상기 (c) 단계는 본 발명의 아래의 실시예에서처럼 ELISPOT 분석(Enzyme-Linked ImmunoSpot assay) 등 공지된 방법을 통하여 이루어질 수 있다.

발명의 효과

[0021] 전술한 바와 같이, 본 발명에 따르면 쯔쯔가무시균의 TSA56 항원 특이적 CD8 T 세포에 대한 에피톱 항원과 그것을 이용한 TSA56 항원 특이적 CD8 T 세포의 정량 분석 방법 등의 용도를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 쯔쯔가무시 항원에 대한 항체 반응을 ELISA와 IFA 방법을 이용하여 확인한 결과이다.

도 2는 쯔쯔가무시 항원에 대한 IgG 서브클래스 반응을 ELISA 방법을 이용하여 확인한 결과이다.

도 3은 쯔쯔가무시 항원 특이적인 세포면역 반응(IFN-γ 및 IL-4)을 ELISPOT assay를 이용하여 확인한 결과이다.

도 4는 쯔쯔가무시 항원에 특이적인 CD4 및 CD8 T 세포 반응을 flow cytometry를 이용하여 확인한 결과이다.

도 5는 PBMC 세포에서 IFN-γ- 양성세포를 확인하기 위하여 ELISPOT assay를 수행한 결과이다.

도 6은 9가지 유전형(Boryong, Gilliam, Ikeda, Karp, Kato, Kawasaki, Saitama, Shimokoshi 및 TA763)의 TSA56 항원의 서열을 정렬하고 그 정렬된 서열에서 17가지 에피톱 후보 항원 위치(적색 박스)를 표시한 것이다(각 정렬된 서열 상단에 표시된 아미노산 서열은 9가지 유전형에서 가장 높은 빈도수로 나타난 아미노산 서열이다).

도 7서열 도 6에서 TSA56 항원 특이적 CD8 T 세포와 반응성이 높은 4번 및 14번 에피톱 항원의 정렬된 서열을 확대하여 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 이하 본 발명을 실시예를 참조하여 설명한다. 그러나 본 발명의 범위가 이러한 실시예에 의해 제한되는 것을 아니다.

[0024] **<실시예 1> 시료 준비**

[0025] **<실시예 1-1> 샘플 수집**

[0026] 본 발명의 실험은 서울대학교병원(IRB No. 1308-058-513) 및 충남대학교병원(IRB No. 2014-12-006)의 생명윤리위원회(Institutional Review Board)의 승인하에 이루어졌다. 본 발명 실시예의 환자 및 건강한 사람의 임상 샘플은 모두 사전에 서면으로 수집 동의되었다.

[0027] 건강한 사람(n=29)과 쯔쯔가무시병에서 회복된 환자(n=64)의 말초 혈액은 충남대학교병원(대전, 한국)에서 수집되었다. 체액성 및 세포성 면역 반응을 분석하기 위하여 쯔쯔가무시병 환자들은 병에서 회복된 기간에 따라 4그룹(Y0: 회복 후 2주 이내, Y1 ~ Y3: 회복 후 1 내지 3년)으로 분류되었다. 쯔쯔가무시병의 확진은 임상적인 증상 및 혈청학적 검사를 통하여 이루어졌다. 구체적으로 입원 중 쯔쯔가무시균 항원에 대한 간접면역형광항체법(indirect immunofluorescence antibody assay;IFA) 검사 또는 수동적혈구응집법(passive hemagglutination assay;PHA) 결과 IgM 항체에 대한 single titer cutoff가 1:160 이상이거나 또는 한 쌍의 플라즈마 값(titer of paired plasma)이 4배 이상인 경우 쯔쯔가무시병으로 확진하였다.

[0028] 쯔쯔가무시 환자의 평균 연령은 60.1세(17~88세) 이었으며, 건강한 사람의 평균 연령은 60.5세(52-71세)였다. 검사에 참여한 쯔쯔가무시 환자의 성비는 남성대 여성의 비율이 45대 55 이었으며 건강한 사람의 경우 32대 68 이었다.

[0029] **<실시예 1-2> 말초혈액 단핵세포 및 혈장 시료 준비**

[0030] 혈액 시료는 헤파린이 첨가된 튜브에 수집되었으며 800xg로 20분 동안 원심분리 하였다. 혈장을 포함하고 있는 튜브의 상층액은 쯔쯔가무시 항원에 대한 항체를 적정(titrate)하기 위하여 동결보관 되었다. 말초혈액 단핵세포(PBMCs, peripheral blood mononuclear cells;PBMCs)는 Histopaque(GE Healthcare)를 이용한 밀도기울기 원심분리(standard density centrifugation)를 통하여 분리하였다. 갓 채취한 PBMCs는 단일세포 수준에서 사이토카인 생성세포를 확인하고 측정하기 위한 Enzyme-Linked ImmunoSpot (ELISPOT) assay에 사용되었으며, 남은 PBMCs는 추후 유동 혈구 계산 분석(flow cytometric analysis)에 사용하기 위하여 동결보관 되었다.

[0031] **<실시예 1-3> 재조합 ScaA 및 TSA56 단백질 준비**

[0032] 쯔쯔가무시 보령균주로부터 획득한 gDNA(GenBank accession no. AM494475.1)를 이용하여 ScaA 또는 TSA56의 유

전자를 증폭하였다. 이때 사용한 프라이머는 [표 1]에 기재하였다.

표 1

[0033] 프라이머

유전자	프라이머 서열*	서열 번호	Product size(bp) (amplified region in nt position)
ScaA	Forward: CGGGATCCGATCCATCAGCTTCATCA	1	2,913
	Reverse: CGGTCGACTATATCTTCGTCTTTGCC	2	(88-3000)
Tsa56	Forward: CGGAATCCGCACCAGGATTTAGAGCA	3	981
	Reverse: CGGTCGACTTTACCTTGATTCTTTGC	4	(250-1230)
*Restriction enzyme sites are underlined **O. tsutsugamushi Boryong strain served as the template			

[0034] PCR 산물을 pET-28a에 삽입하였으며 서열확인을 위하여 시퀀싱을 수행하였다. 해당 재조합 플라스미드를 대장균(*E.coli* BL21 (DE3))에 도입하여 재조합 ScaA 또는 TSA56 단백질을 획득하였다. 구체적으로, 대장균 배양액에 isopropyl β-D-thiogalactoside (IPTG, 0.1 mM, Duchefa, Zwijndrecht, Netherlands)를 16℃에서 16시간 동안 처리하여 단백질 발현을 유도하였으며 Ni-nitrilotriacetic acid (NTA) His-레진(Qiagen)을 이용하여 프로토콜에 따라 정제하였다. 정제된 단백질은 Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes(Thermo scientific)와 인산완충생리식염수(phosphate-buffered saline ; PBS)를 이용하여 4℃에서 하룻밤 동안 투석하였다. 획득한 재조합 단백질의 동정 및 순도 확인은 일반적인 웨스턴 블로팅과 쿠마시 블루 염색(Coomassie blue staining)법을 통하여 이루어졌다.

[0035] **<실시예 1-4 > $CD8^+$ T 세포의 항원결정기 예측 및 HLA 타이핑(typing)**

[0036] 오리엔티아 쯔쯔가무시균의 TSA56 항원의 HLA-A*0201 하플로타입(haplotype) $CD8^+$ T 세포 항원결정인자(epitope)를 예측하기 위하여 4가지 웹(Web)-기반 프로그램을 사용하였다[표 2].

표 2

[0037]

일련번호	프로그램	참고문헌
1	BIMAS(https://www-bimas.cit.nih.gov/)	Parker KC et al.,J Immunol 1994 152(1): 163-175.
2	SYFPEITHI(http://www.syfpeithi.de/)	Rammensee H et al., Immunogenetics; 50(3-4): 213-219.
3	IEDB (http://tools.immuneepitope.org/)	
4	NetMHCpan(www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCpan/)	Andreatta M and Nielsen M.Bioinformatics 2016; 32(4): 511-517.

[0038] 상기 [표 2]에 기재된 4개 프로그램 중 최소 3개 이상에서 상위 1% 스코어 또는 백분위점수(percentile ranks)를 나타내는 17개의 잠재적 펩티드 항원결정인자를 선정하였다. 항원결정인자 펩티드의 서열 및 HLA-A*0201에 대한 친화도는 NetMHCpan 프로그램에 의하여 예측되었으며 [표 3]에 기재하였다. [표 3]의 TSA56 서열 아미노산 시작 위치는 GeneBank accession no. CAM79668에 기반하여 이루어졌으며 펩티드의 친화도(IC_{50})는 NetMHCpan 3.0 Server를 이용하여 예측하였다(Andreatta M and Nielsen M. Bioinformatics 2016; 32(4): 511- 517). [표 3]에 기재된 서열은 서열목록에서 그 일련번호 순서에 따라 서열번호 5 내지 21로 지정되어 있다.

[0039] HLA 타이핑은, HLA-A2 타입을 스크리닝하기 위하여 PE-labelled HLA-A2 항체(MBL, Nagoya, Japan)을 이용한 유동혈구 계산분석법(flow cytometric analysis)으로 이루어졌다.

표 3

[0040]

일련번호	TSA56의 시작 위치	펩티드 서열	M.W.	IC50(nM)
1	5	MLIASAMSA	893.11	42.25
2	6	LIASAMSAL	875.07	508.87
3	93	VMYLRNISA	1065.28	260.18

4	95	YLRNISAEV	1063.19	21.60
5	133	KLTPPQPTM	1011.22	1249.17
6	145	SIADRDFGI	992.07	110.68
7	201	HMMVNPVLL	1052.35	87.23
8	203	MVNPVLLNI	1011.27	95.12
9	242	SLVVGLAAL	841.03	110.68
10	263	VLSDKIIQI	1027.24	13.28
11	303	KIQELGDTL	1015.14	1785.20
12	306	ELGDTLEEL	1017.07	1376.93
13	366	RLLNGSDQI	1014.12	109.48
14	376	QLYKDLVKL	1118.35	124.66
15	436	SMVVGQVKL	959.19	631.81
16	443	KLYADLVTT	1022.18	42.25
17	482	MVASGALGV	802.96	91.09

[0041] **<실시예 2> 실험방법**

[0042] **<실시예 2-1> 면역형광검사법(Immunofluorescence assay;IFA)**

[0043] 면역형광검사법은 쯔쯔가무시균에 대한 전체 IgG 항체 역가를 측정하기 위하여 사용되었다. 세 가지 쯔쯔가무시균주(Boryong, Karp, Gilliam strain)를 감염한 L929 세포를 수집하였으며 동량을 혼합한 후 면역형광검사법을 위한 항원으로 사용하였다(Ha NY et al., Clin Vaccine Immunol 2012 19(9):1442-1451). 구체적으로, 쯔쯔가무시병에 감염된 L929 세포를 모은 후 PBS를 이용하여 세척하고 테플론(teflon) 코팅된 슬라이드에 스폿 형태로 올렸다. 이후 차가운 아세톤 용액을 이용하여 10분간 고정화 작업을 수행하였으며 사용 전까지 -70℃에 보관하였다. 2배씩 순차적으로 PBS에 희석한(1:40 에서 1:5,120까지) 환자의 혈청을 항체가 고정된 슬라이드의 스폿에 올리고 상온의 습실(moist chamber)에서 30분 동안 인큐베이션 하였다. 2차 항체로 Alexa Fluor 488이 부착된 goat anti-human IgG 항체(Molecular Probes)를 사용하였으며 PBS에 1:1,000의 비율로 희석하였다. 염색된 슬라이드는 올림푸스 FV1000 공초점 레이저주사현미경(Olympus)을 이용하여 관찰하였다. 면역형광검사법의 종말점 역가는 배경(background) 상에서 형광 신호를 나타내는 가장 높은 역가로 정의되었다.

[0044] **<실시예 2-2> 효소결합면역흡착측정법(enzyme-linked immunospecific assay; ELISA)**

[0045] ScaA 또는 TSA56 특이적 항체 반응이 나타나는지 확인하기 위하여, 96 웰 immunoassay 플레이트(Nunc)에 1㎍/ml의 농도의 정제된 항체 100㎕를 이용하여 4℃에서 하룻밤 동안 코팅하였다. 그 후 5% skim milk(탈지유) 첨가 PBS 용액을 이용하여 상온에서 2시간 동안 플레이트를 블로킹하였다. 0.05% Tween20가 포함된 PSB(0.05% PBST)를 이용하여 플레이트를 세척하였으며 horseradish peroxidase (HRP)가 부착된 마우스 anti-human IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, 또는 IgG 항체 (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA)를 첨가하여 한시간 동안 상온에서 인큐베이션 하였다. 그 다음으로 0.05% PBST를 이용하여 세척하였으며 3,3′ ,5,5′ -tetramethylbenzidine (TMB) peroxidase 기질용액(KPL, Gaithersburg, MD, USA)을 첨가한 후 10분 동안 인큐베이션 하였다. 해당 반응은 1M의 인산용액(phosphoric acid solution)을 이용하여 종료하였다. 450nm의 파장을 이용하여 microplate reader(Beckman Coulter Inc)로 흡광도를 측정하였으며 ELISA의 종말점 역가는 19개 대조군 혈청(1:100배로 희석)에서 획득한 평균 OD와 3x 표준편차(standard deviation; SD)를 포함하는 optical density (OD)의 가장 낮은 역가로 결정하였다.

[0046] **<실시예 2-3> 유동 혈구 계산 분석법(Flow cytometric analysis)**

[0047] 10% 열처리된 비활성화 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS), 50 nM의 베타-메르캅토에탄올, 100units/ml의 페니실린/스트렙토마이신 및 2mM 글루타민(Welgene, South Korea)이 포함된 RPMI 1640 배양액(Gibco)에 정제된 ScaA 또는 TSA56 항체를 첨가(10㎍/ml)하여 flat-bottomed 배양 플레이트 24 웰에서 18-20시간 동안 인간 PBMCs를 배양(5×10^6 cells/well)하였다. 세포 내부의 사이토카인 염색을 위하여, GolgiPlug (BD Biosciences)를 세포 배양액에 첨가하였으며 추가적으로 6시간 동안 배양하였다. 그 후 얼음에서 냉각시킨 FACS 완충액 (1% 우혈청 알부민 및 1 mM EDTA이 포함된 PBS)로 3회 세포를 세척하였으며 ultra-block용액(10% 래트 혈청, 10% 햄스터 혈청, 10% 마우스 혈청 및 2.4G2 단일클론항체 10㎍/ml)을 이용하여 얼음 위에서 30분간 블로킹을 수행하였다. 이후 PBMC 세포에 Pacific blue-접합된 CD4와 FITC-접합된 CD8 항체(BD Pharmingen)를 4℃에서 30분간 처리하였다. 세포 표면의 CD4 또는 CD8을 염색한 후 얼음으로 냉각한 FACS 완충액으로 3회 세척하였으며, 세포

내부의 사이토카인을 분석하기 위하여 제조사의 프로토콜에 따라 Cytofix/Cyxtoperm kit(BD Biosciences)를 이용한 염색을 진행하였다. 또한 APC 접합된 IFN-γ 항체(BD Pharmingen)를 이용하여 30분 동안 4℃에서 염색을 수행하였으며 염색된 세포를 FACS LSRII flow cytometer(BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA)로 분석하였다. 확보한 데이터는 FlowJo 소프트웨어(Tree Star, Ashland, OR, USA)를 이용하여 분석하였다.

[0048] **<실시예 2-4> 효소결합 면역점 방법(Enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay)**

[0049] 인간 IFN-γ/IL-4 dual color ELISPOT 방법(Abcam, Cambridge, UK)은 해당 키트의 제조사 프로토콜에 따라서 이루어졌다. 구체적으로, polyvinylidene difluoride backed microtiter 플레이트(MSIP, Millipore)에 25㎕의 35% 메탄올을 30초간 처리하고 살균한 PBS로 3회 세척하였다. 그 후 플레이트를 IFN-γ/IL-4 포착 항체로 4℃로 하룻밤 동안 코팅하였다. 공동자극분자(co-stimulatory moleculs)인 anti-CD28 및 anti-CD49d 단일클론 항체(BD Pharmingen)가 있는 가운데 ScaA, TSA56 또는 본 발명의 9-mer의 항원결정기 펩티드들(1μM)를 첨가하여 37℃에서 8시간 동안 인간 PBMCs(5×10^5cell/well)를 자극하였다. anti-IL-4 항체를 1시간 30분 동안 상온에서 반응시켰으며 그 후 anti-FITC HRP와 스트렙토피딘-알칼리성 인산가수분해 효소(alkaline phosphatase; AP) 접합체를 한시간 동안 반응시켰다. 면역점(immunospot)은 AEC 또는 BCIP/NBT 기질과 순차적으로 인큐베이션 한 후 디벨롭하였으며 CTL ImmunoSpot 리더기(Cellular Technology Limited, Cleveland, OH, USA)을 이용하여 결과를 측정하였다. 해당 결과는 맨눈을 이용하여 재확인하였다.

[0050] **<실시예 2-5> 통계처리**

[0051] 데이터는 GraphPad Prism 5.01 소프트웨어(GraphPad Software, Inc., LaJolla, CA, USA)를 이용하여 분석하였다. 통계분석은 95% confidence interval 또는 one-way analysis of variance (ANOVA)과 two-tailed 스튜던트 t 검정법을 통하여 수행하였다. 또한, 각각 다른 그룹간의 비교를 위하여 뉴먼-쿨스 t 검정(Newman-Keuls t-test)을 수행하였다. $p < 0.05$일 경우 통계학적으로 유의한 것으로 고려되었다.

[0052] **<실시예 3> 실험 결과**

[0053] **<실시예 3-1> 쯔쯔가무시병 환자에 대한 anti-ScaA 및 anti-TSA56 항체의 반응성**

[0054] IFA 방법을 수행한 결과, 회복 후 2주 내의 21명 환자(Y0)의 혈청에서 쯔쯔가무시균 특이적 IgG 반응의 평균 역가(titer)는 2,194이었으며, 그 범위는 320에서 5120(S.D.:±1,825)이었다[도 1a]. 항체의 역가는 회복 1년 후 환자에서 유의미하게 감소하였으며 유사한 기준선 수준을 3년까지 유지하였다(평균 역가: Y1=204, Y2=272, Y3=120).

[0055] 특정 단백질 항원(ScaA, TSA56)에 대한 항체 반응은 박테리아 항원을 이용하여 ELISA 방법으로 측정되었으며 IgG와 같이, 순차적으로 감소하는 경향을 나타내었다[도 1b]. 각 항원에 대한 항체의 역가는 감염 이후 2년 이후에 유의미하게 감소하였다. 특히 anti-ScaA 반응(평균 역가: Y0=14,421; Y1=1,460; Y2=473; 및 Y3=325)은 anti-TSA56(평균 역가:Y0=12,011; Y1=4,500; Y2=1,000; 및 Y3=642)에 비하여 매우 급격하게 감소하였으며 이를 통하여 anti-TSA56 항체의 반응이 anti-ScaA 반응보다 지속된다는 것을 알 수 있다. ELISA를 이용하여 측정한 ScaA와 TSA56 항체 반응의 결과는 전체 박테리아에 대하여 IFA를 수행한 결과와 유사한 양상을 나타내었다[도 1C].

[0056] **<실시예 3-2> ScaA 및 TSA56에 대한 IgG isotype의 반응성**

[0057] ScaA와 TSA56에 대한 IgG 서브클래스 반응을 확인하기 위하여 ELISA를 수행하였다. [도 2]에 나타낸 바와 같이, TSA56 특이적 IgG1과 IgG3 서브클래스는 Y0 환자에게서 우세한 경향을 나타내었으며 이 후 두 서브클래스는 환자(Y1~Y3) 환자에서 순차적으로 감소하였다. 반면에, ScaA 항원 특이적인 IgG3 반응은 회복된 환자에서 거의 검출되지 않았으며 IgG1의 isotype만 막 회복된 환자군(Y0)에서 다소 우세한 경향을 나타내었다. 그러나 ScaA 특이적인 IgG1 반응은 회복 후 1년 환자군(Y1)에서는 급격하게 감소하였다. 박테리아 항원에 특이적인 IgG2와 IgG4 서브클래스는 쯔쯔가무시병에서 회복된 환자에서 유의미하게 검출되지 않았다. 결론적으로 TSA56 항원에 특이적인 IgG isotype은 IgG1 및 IgG3 서브클래스이며 이들의 반응은 회복 후 점차적으로 감소하였다. 또한 Scal 항원에 대한 IgG1 isotype의 반응은 감염 후 1년 이내에 기저 수준까지 감소하였다.

[0058] **<실시예 3-3> 항원 특이적인 T 세포의 반응성 확인**

[0059] 항원 특이적인 세포성 면역 반응을 확인하기 위하여, TSA56 또는 ScaA 항원 자극 처리한 PBMCs 세포를 이용하여 ELISPOT과 유동혈구 계산 분석법을 수행하였다.

[0060] 두 종류의 항원으로 자극된 IFN-γ-양성 반응의 PBMCs의 세포 숫자는 대조군(평균 숫자:98 for ScaA and 71 for TSA56 / 5 × 10^5 PBMCs)에 비하여 Y0 환자(평균 숫자:196 for ScaA and 145 for TSA56 / 5 × 10^5 PBMCs)와 Y1 환자(평균 숫자: 167 for ScaA and 102 for TSA56 / 5 × 10^5 PBMCs) 에서 급격하게 증가되었다[도 3].

[0061] Y0 환자 그룹에서 ScaA와 TSA56로 자극되었을 경우 각각 53%(3 out of 15)와 67%(10 out of 15)의 회복된 환자가 ELISPOT 양성 반응을 나타내었다(counts over the mean plus 3 × SD of 19 control samples). 항원으로 자극된 IFN-γ-양성반응의 PBMCs의 숫자는 이후 점차적으로 감소하였으며 Y2 그룹에서는 통계적으로 유의한 숫자를 나타내지 않았다. 추가적으로, 항원으로 자극시켰을 경우 IL-4 양성반응의 PBMCs 세포 숫자는 환자 및 대조군에서 유의미한 차이를 나타내지 않았다. 상기 사실들로부터 쯔쯔가무시병 환자는 Th1에 기반한 세포 반응이 우세하다는 것을 알 수 있다.

[0062] 항원 특이적인 T 세포 반응을 보다 자세하게 살펴보기 위하여, 항원 자극 시에 IFN-γ를 분비하는 CD4 T 세포와 CD8 T 세포를 유동혈구 계산 분석법을 사용하여 살펴보았으며 그 결과를 [도 4]에 나타내었다.

[0063] ScaA 또는 TSA56 자극에 의해서, PBMCs 중 IFN-γ 양성반응의 CD4 T 세포는 Y0 환자 그룹의 샘플에서 대조군(쯔쯔가무시병을 앓지 않은 군)보다 급격하게 증가하였다. 그러나 Y1 및 Y2 환자 그룹의 샘플에서 증가되었던 IFN-γ 양성반응의 CD4 T 세포가 다시 급격하게 감소하는 경향을 나타내었다. CD8 T 세포의 경우, IFN-γ을 분비하는 비율이 항원을 처리한 Y0 그룹에서 급격하게 증가하였다. ScaA 항원에 특이적인, IFN-γ 양성반응의 CD8 T 세포는 Y1과 Y2 그룹에서 순차적으로 감소하였으나 통계적으로 유의하지 않았으며 TSA56 항원에 특이적인 IFN-γ 양성반응의 CD8 T 세포는 감염 1년 이후 유의하게 감소하였다.

[0064] **<실시예 3-4> CD8 T 세포에 대한 TSA56항원의 항원결정기(epitope) 결정**

[0065] TSA56은, 쯔쯔가무시균의 주요한 외막 단백질 중 하나로 백신 개발에 있어서 주요한 타겟으로 여겨졌다. 또한 최근에는 CD8 T 세포가 쯔쯔가무시균 감염에 대한 주요 면역 방어 작용과 연관되어 있다는 보고가 있다(Hauptmann M et al. PLoS Negl Trop Dis 2016 Sep; 10(9): e0004991; Xu G et al., PLoS Negl Trop Dis 2017 Jul; 11(7): e0005763). 이에 따라 항체반응 뿐 아니라, 쯔쯔가무시균 특이적인 CD8 T 세포의 반응을 추적하는 것은 사람의 보호 면역능을 확인하는데 있어서 중요하다.

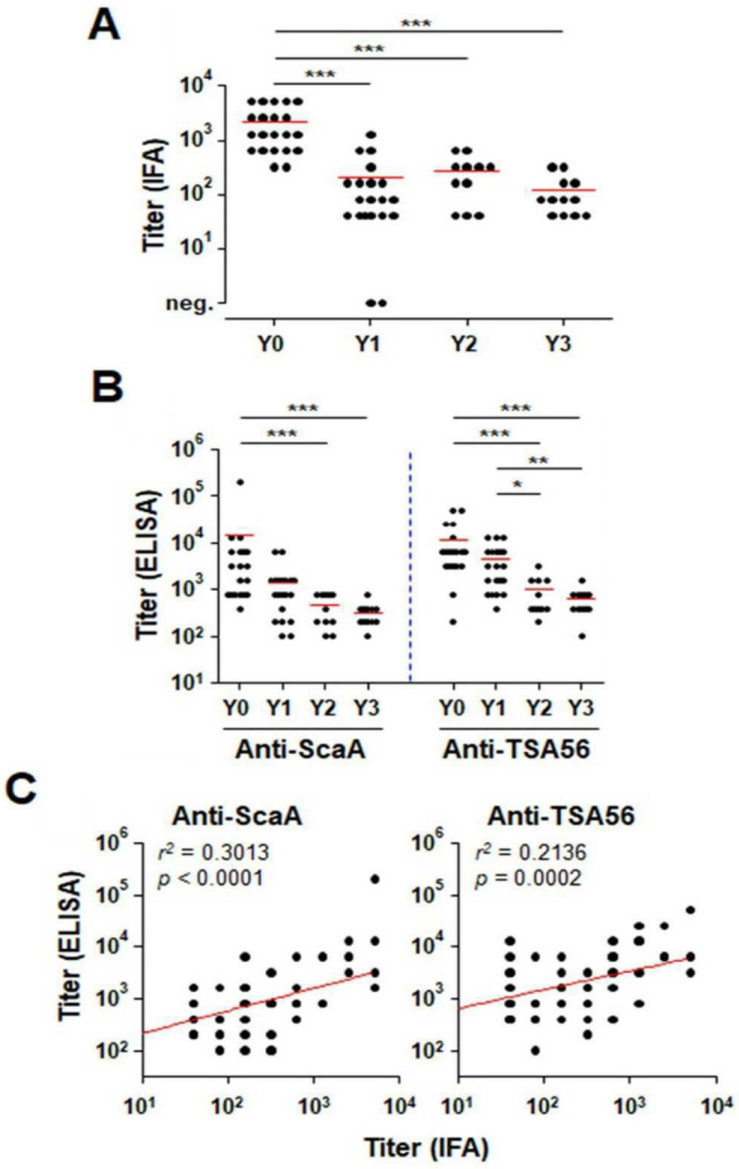
[0066] CD8 T 세포 반응 측정을 위하여, TSA56 항원 중 MHC class I에 제한된 항원결정기를 스크리닝 하였다. 특히 TSA56의, HLA-A*0201형에 국한된 CD8 T 세포에 대한 항원결정기를 확보하기 위하여 4개의 웹 기반 프로그램(표 2)을 사용하여 스크리닝하였다. HLA-A*0201형은 쯔쯔가무시병이 유행하는 동아시아 지역에서 가장 흔한 HLA 대립 유전자로 알려져 있다.

[0067] 17개의 후보군 가운데 ELISPOT 방법을 이용하여 확인한 결과, 2개의 항원결정기 펩티드(YLRNISAEV(일련번호 4) 및 QLYKDLVKL(일련번호 14))가 대조군에 비하여 많은 수의 IFN-γ-양성 PBMCs 세포 spot을 유도하였다. 이러한 결과는 HLA-A2형의 회복된 환자에서 나타났으며, HLA-A2형의 대조군(쯔쯔가무시병을 앓지 않은 군)이나 HLA-A2형이 아닌 회복된 환자보다 우수하게 나타났다[도 5]. T 세포 항원결정기의 예측 서열들은 다양한 유전형의 TSA56 단백질 내에서 비교적 그 아미노산 서열이 잘 보존되어 있는 구간에 위치하고 있다([도 6] 및 [도 7] 참조).

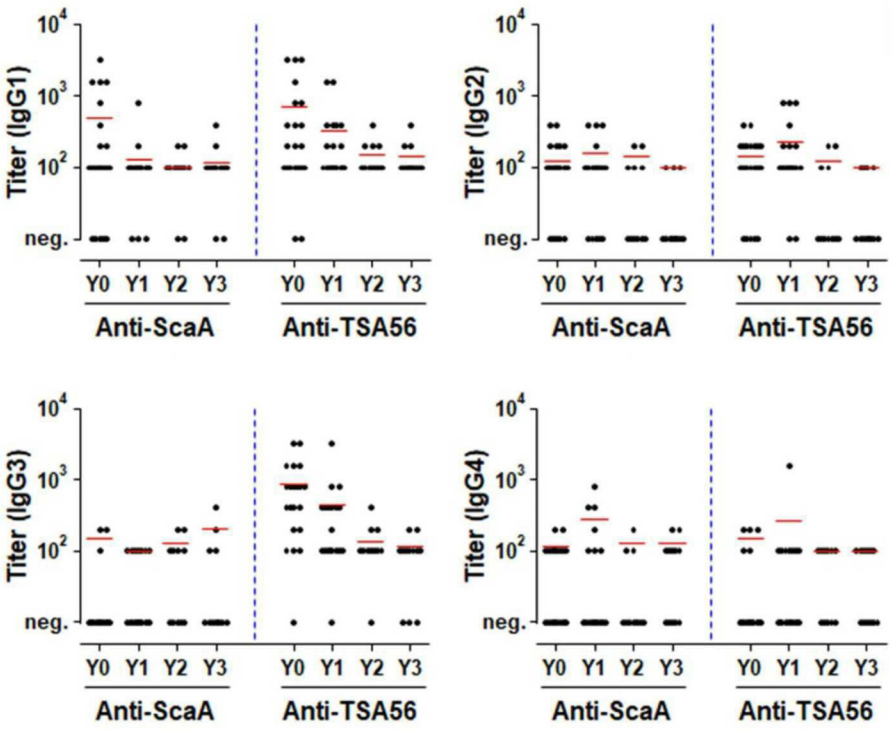
[0068] 상기 결과를 통하여 확보한 항원결정기는, 쯔쯔가무시병에서 회복된 환자의 항원 특이적인 CD8 세포 면역 반응 모니터링을 위하여 유용하게 사용될 수 있으며 향후 다양한 유전형의 쯔쯔가무시균에 대한 공통 백신 개발에도 이용될 수 있다.

도면

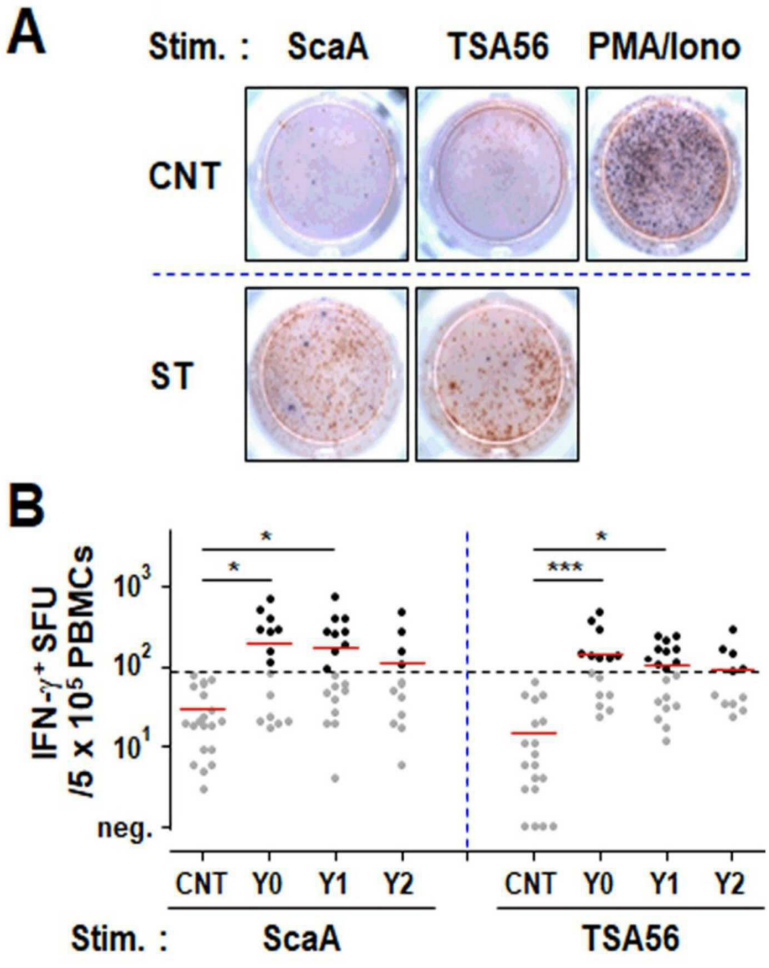
도면1


A
***
***
***
Titer (IFA)
neg.
Y0
Y1
Y2
Y3
B
Titer (ELISA)
Anti-ScaA
Anti-TSA56
C
Anti-ScaA
r² = 0.3013
p < 0.0001
Anti-TSA56
r² = 0.2136
p = 0.0002
Titer (ELISA)
Titer (IFA)

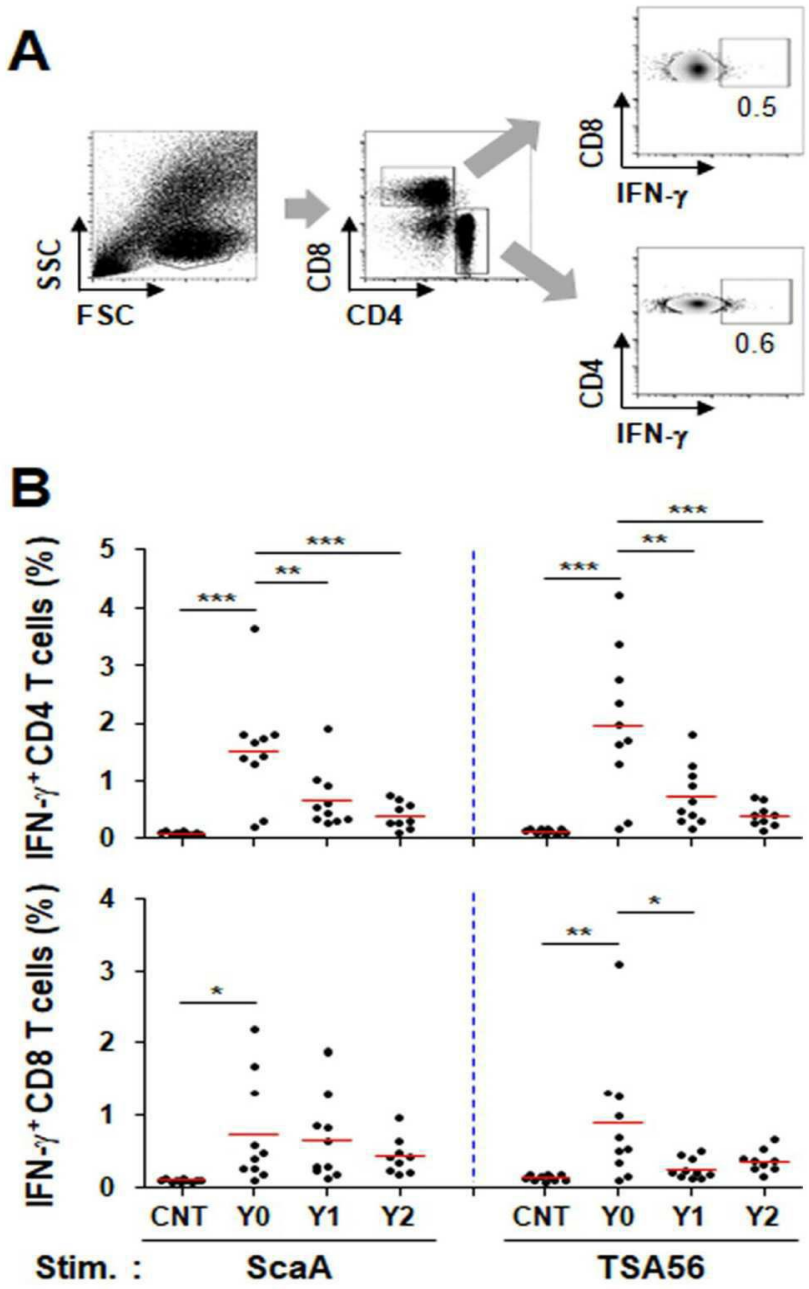
도면2


Titer (IgG1)
Titer (IgG2)
Titer (IgG3)
Titer (IgG4)
10^4
10^3
10^2
neg.
Y0 Y1 Y2 Y3
Anti-ScaA
Anti-TSA56

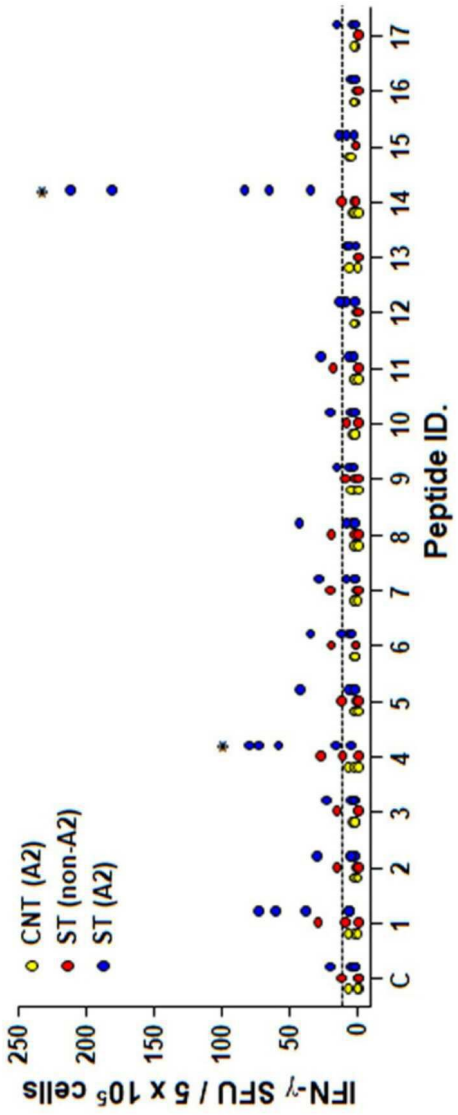
도면3


A
Stim. : ScaA TSA56 PMA/Iono
CNT
ST
B
IFN-γ+ SFU /5 x 10^5 PBMCs
10^3
10^2
10^1
neg.
*
***
CNT Y0 Y1 Y2
Stim. : ScaA
TSA56

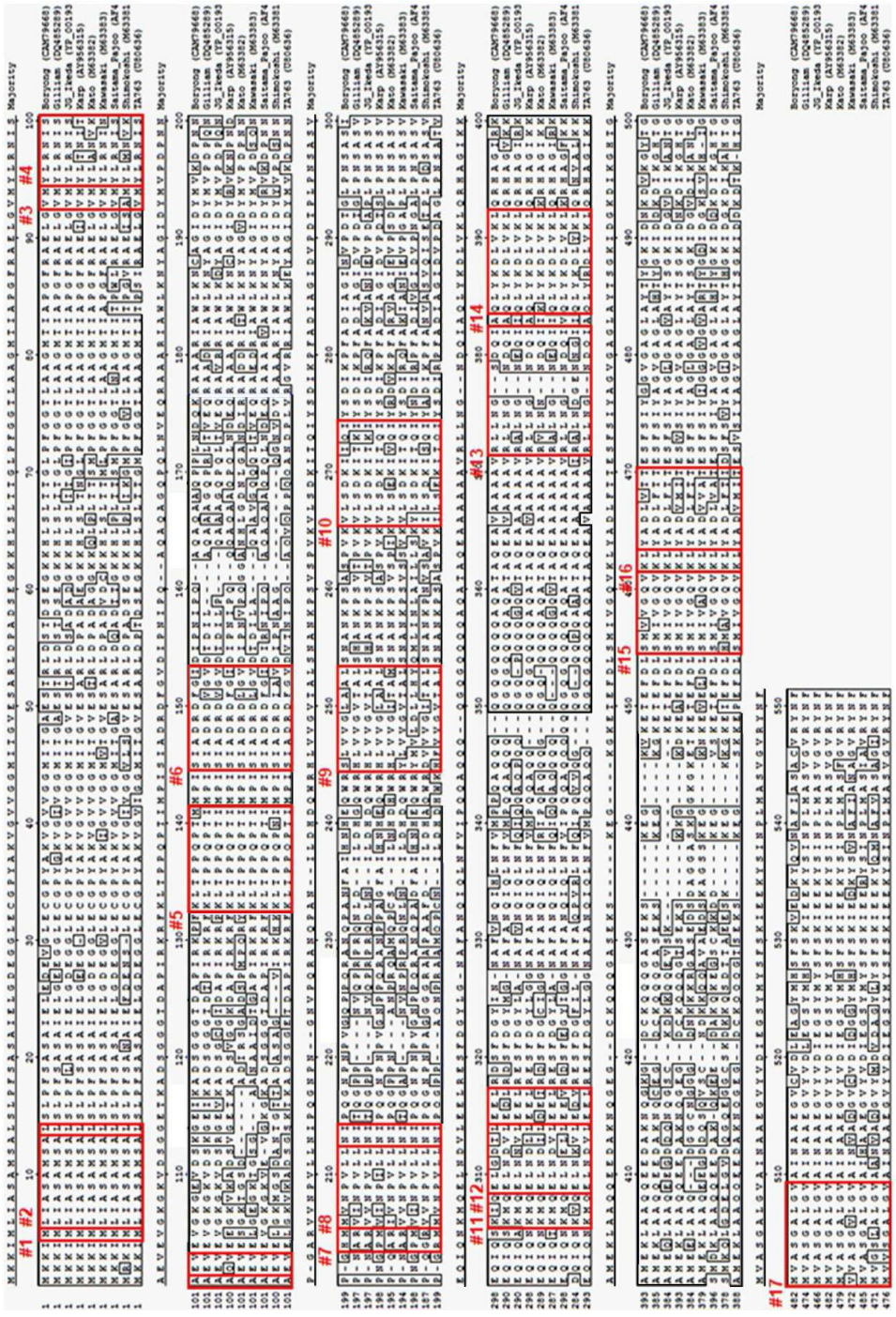
도면4


A
SSC
FSC
CD8
CD4
0.5
IFN-γ
0.6
B
IFN-γ+ CD4 T cells (%)
IFN-γ+ CD8 T cells (%)
CNT
Y0
Y1
Y2
Stim. :
ScaA
TSA56

도면5


IFN-γ SFU / 5 x 10⁵ cells
250
200
150
100
50
0
CNT (A2)
ST (non-A2)
ST (A2)
C 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
Peptide ID.

도면6



도면7



서 열 목 록

<110> TW, patent

<120> Epitope Antigens of TSA56 Antigens of Orientia tsutsugamushi and the Use Thereof

<130> PP17-467

<160> 21

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ScaA-F

<400> 1

cgggatccga tccatcagct tcatca 26

<210> 2

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ScaA-R

<400> 2

cggtcgacta tatcttcgtc tttgcc 26

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tsa56-F

<400> 3

cggaatccgc accaggattt agagca 26

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tsa56-R

<400> 4

cggtcgactt taccttgatt ctttgc 26

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide-1

<400> 5

Met Leu Ile Ala Ser Ala Met Ser Ala

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide-2

<400> 6

Leu Ile Ala Ser Ala Met Ser Ala Leu

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide-3

<400> 7

Val Met Tyr Leu Arg Asn Ile Ser Ala

1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide-4

<400

> 8

Tyr Leu Arg Asn Ile Ser Ala Glu Val

1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide-5

<400> 9

Lys Leu Thr Pro Pro Gln Pro Thr Met

1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide-6

<400> 10

Ser Ile Ala Asp Arg Asp Phe Gly Ile

1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide-7

<400> 11

His Met Met Val Asn Pro Val Leu Leu

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide-8

<400> 12

Met Val Asn Pro Val Leu Leu Asn Ile

1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide-9

<400> 13

Ser Leu Val Val Gly Leu Ala Ala Leu

1 5

<210> 14

<211>

9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide-10

<400> 14

Val Leu Ser Asp Lys Ile Ile Gln Ile

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide-11

<400> 15

Lys Ile Gln Glu Leu Gly Asp Thr Leu

1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide-12

<400> 16

Glu Leu Gly Asp Thr Leu Glu Glu Leu

1 5

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide-13

<400> 17

Arg Leu Leu Asn Gly Ser Asp Gln Ile

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide-14

<400> 18

Gln Leu Tyr Lys Asp Leu Val Lys Leu

1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide-15

<400> 19

Ser Met Val Val Gly Gln Val Lys Leu
1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide-16

<400> 20

Lys Leu Tyr Ala Asp Leu Val Thr Thr
1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide-17

<400> 21

Met Val Ala Ser Gly Ala Leu Gly Val
1 5