



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년12월22일  
(11) 등록번호 10-2193304  
(24) 등록일자 2020년12월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 39/04 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)  
A61K 39/00 (2006.01) A61K 39/39 (2006.01)  
C07K 14/35 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
A61K 39/04 (2013.01)  
A61K 38/00 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2019-0132952  
(22) 출원일자 2019년10월24일  
심사청구일자 2019년10월24일  
(56) 선행기술조사문헌  
KR101749165 B1  
KR1020120083899 A  
PloS One, 제8권, 제10호, e75684, 1-11면  
(2013)

(73) 특허권자  
충남대학교산학협력단  
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)  
연세대학교 산학협력단  
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)  
(72) 발명자  
김화중  
대전광역시 중구 서문로 95, 101동 302호(문화동, 센트럴파크1단지아파트)  
최한규  
대전광역시 서구 관저북로 52, 107동 1304호(관저동, 대자연마을아파트)  
(74) 대리인  
특허법인 공간

전체 청구항 수 : 총 8 항

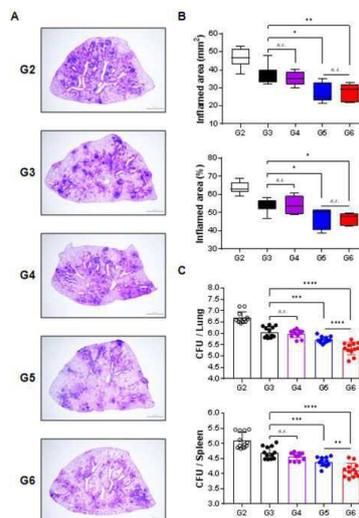
심사관 : 이수정

(54) 발명의 명칭 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합단백질의 BCG 백신 booster용 조성물

(57) 요약

본 발명은 BCG boosting시키는 조성물 및 BCG boosting 방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 결핵균(*M. tuberculosis*) 유래의 Rv2299c, ESAT6, HspX 및 RipA를 융합한 단백질을 유효성분으로 포함하는 BCG boosting 조성물 및 BCG boosting 방법에 관한 것이며, 본 발명의 조성물 및 방법에 의하여 기존의 BCG백신을 boosting함으로써 신체의 면역 반응을 증강시킬 수 있다

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

*A61K 39/39* (2013.01)  
*A61P 31/04* (2018.01)  
*C07K 14/35* (2013.01)  
*A61K 2039/55516* (2013.01)  
*A61K 2039/57* (2013.01)  
*C07K 2319/00* (2013.01)

권기웅

서울특별시 서대문구 연세로 50-1, 에비슨의생명연구센터동 307호(신촌동)

(72) 발명자

신성재

서울특별시 서대문구 연세로 50-1, 에비슨의생명연구센터동 304호(신촌동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	HI17C0175
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	보건산업진흥원
연구사업명	감염병위기대응기술개발
연구과제명	잠복결핵제어 및 BCG booster용 차세대 융합단백 백신 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2017.04.10 ~ 2021.12.31

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는 BCG 백신 부스터용 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합 단백질의 Rv2299c, ESAT6, HspX 및 RipA은 각각 결핵균(*M. tuberculosis*) 유래의 단백질인 것을 특징으로 하는 BCG 백신 부스터용 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합 단백질은 1  $\mu\text{g/ml}$  내지 20  $\mu\text{g/ml}$  농도로 포함된 것을 특징으로 하는 BCG 백신 부스터용 조성물.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 BCG 백신 부스터용 조성물은 IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> 다기능 T 세포 또는 IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup> 다기능 T 세포를 증가시키는 것을 특징으로 하는 BCG 백신 부스터용 조성물

#### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 BCG 백신 부스터용 조성물은 CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> T 세포를 증가시키는 것을 특징으로 하는 BCG 백신 부스터용 조성물

#### 청구항 6

제1항에 있어서,

상기 BCG 백신 부스터용 조성물은 결핵균 감염시 세균부하를 감소시키는 것을 특징으로 하는 BCG 백신 부스터용 조성물

#### 청구항 7

서열 번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 제조합 단백질

#### 청구항 8

제7항의 제조합 단백질을 포함하는 단백질 BCG 백신 부스터용 조성물

#### 청구항 9

삭제

#### 청구항 10

삭제

#### 청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 결핵 유래 단백질의 융합을 통해 기존의 BCG booster 백신보다 성능이 좋은 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는 결핵균(*M. tuberculosis*) 유래의 Rv2299c, ESAT6, HspX, RipA 단백질을 융합한 융합단백질로 BCG 백신을 boosting시킬 수 있는, 고위험 결핵균 방어에 효과적인 조성물 및 이를 이용한 BCG 백신의 boosting 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 결핵(TB)의 감염 원인인 *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb)는 전 세계적으로 높은 이환율과 사망률로 주요 공중 보건 문제를 일으키는 주요 병원체이다. TB는 매년 약 8백만 명의 신규 감염자가 발생되며 2백만 명의 목숨을 앗아가는 개발도상국의 주요 질병이며, 선진국에서도 문제점으로 부각되고 있다. 또한 전 세계 인구의 23%인 약 17억 명의 사람들이 잠복성 결핵 감염(Latent TB infection, LTBI)을 앓고 있으며 평생 활동성 결핵에 걸릴 위험이 있는 것으로 추정된다.

[0003] 현재, *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin (BCG) 백신은 유일하게 결핵예방 백신으로 사용하고 있지만 BCG가 TB에 대해 제공하는 폐 보호 기능이 충분하지 않고, 특히 BCG는 성인결핵 예방효과는 없다고 알려져 있기 때문에 효과적인 신규 백신의 개발이 시급히 필요하다(PMID: 11796598). 이러한 이유로, 결핵백신을 개선시키기 위해 다양한 유형의 보조제, 항원(antigen, Ag) 표적 및 백신 플랫폼이 진보되었다. 그 중에서도 BCG 프라이밍(priming)과 관련하여 이중의 프라임 서브 유닛 백신 부스트 요법(adjuvanted subunit boost)이 Mtb 감염에 대한 유망한 백신 전략으로 제안되었고(PMID: 23257069), 이 이중 프라임 부스트 전략은 강력한 예방 접종 방식으로 입증되었다.

[0004] 본 발명자 그룹은 이전 연구에서 MPL/DDA에 보강된 Rv2299c과 융합된 ESAT6의 서브 유닛 백신 접종이 고병원성 균주인 Mtb HN878 베이징 임상 분리 균에 대해 높은 수준의 강력한 보호를 제공한다는 것을 입증했다(PMID : 28193909). 이 백신으로 개선된 보호는 BCG 또는 ESAT6 단독과 표준 마우스 모델에서 Rv2299c-ESAT6 백신의 비교에서 폐에서 내구성이 강하고 강력한 Th1 분극화 다기능 CD4<sup>+</sup> T 세포 면역 반응이 강하게 증가되는 것을 확인하였다(PMID: 28193909).

[0005] 또한 최근에는, IL-17 및 Th17 반응은 TB에 대한 방어 면역에 중요한 것으로 나타났다(20679438, 18209095, 20212094, 22003199, 23721367, 24831696, 25448107, 17351619). Th17 반응의 하나의 가능한 기여는 CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> T 세포가 감염된 Mtb의 폐에 CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T 세포보다 빠른 모집을 촉진함으로써 백신 매개 면역(17351619, 21933877)에서 특히 중요하다는 것이다. 그러나, Mtb에 대한 보호에서 IL-17의 기능적 역할은 명확하지 않으며, 특히 Mtb에 감염된 대식세포에서 항결핵작용을 위한 상승된 IFN- $\gamma$ 의 역할이 불분명하다.

[0006] 본 발명자 그룹은 선행특허인 한국등록특허 1749165호에서 미성숙 수지상세포(dendritic cells, DC)에 Rv2299c 단백질(HSP90 패밀리) 또는 Rv2299c와 ESAT6를 융합한 단백질을 처리하여 미성숙 수지상 세포(DC)의 성숙화 유도방법을 개시하였다. DC 성숙을 효과적으로 유도하는 Rv2299c 단백질을 확인하고, 강한 Th1 유형 반응을 이끌어내는 DC 활성화를 통하여 항-결핵면역 메커니즘을 조사하였다. 또한 Mtb HN878 임상 분리에 대한 Rv2299c 단백질 또는 Rv2299c ESAT6 융합 단백질의 예방 백신 효과를 테스트함으로써, Rv2299c-성숙 DC가 항-결핵면역 활성화에 대한 Th1 세포 반응을 유도하며, DC-활성화 단백질-기반 백신의 새로운 개념으로 Rv2299c 및 ESAT6으로 구성되는 융합 단백질을 개시하였다.

[0007] 이러한 Rv2299c 및 ESAT6으로 구성되는 융합 단백질은 BCG를 부스팅하는데 유망한 백신 타겟이 될 수 있으나, 보다 강력하고 부스팅 효과를 오래 유지시킬 수 있는 이중 부스트 전략이 필요한 실정이다.

[0008] 한편, 결핵의 HspX 항원은  $\alpha$ -결정질 단백질 또는 Hsp16.3으로 불리는 결핵균의 열충격 단백질 중 하나로서, T 세포 반응의 좋은 항원 표적을 나타낼 수 있다. HspX는 실제로 이 단백질은 정지 성장 동안 결핵에 의해 주로 발현되거나 적은 산소 상황에서 총 단백질 발현의 최대 25 %를 차지할 수 있다. 육아중에 갇혀있는 경우 위에서

언급한 것과 비슷한 조건을 유발할 수 있으므로 HspX 단백질은 latency동안 중요한 항원 표적이 될 수 있다 (Arshid Y., et al. 2018).

- [0009] RipA(Rpf-interacting protein A)는 이미 밝혀진 resuscitation-promoting factors (재활성화 촉진인자)로 알려진 Rpf단백질과 상호 작용을 하며 결핵균의 성장을 자극하는 것으로 밝혀졌다(17919286). 활발하게 성장하는 Mtb의 세포 분열에서 결정적인 역할은 엔도펩티다제인 RipA에 의해 수행된다(Chao et al., 2013; Ruggiero, Marasco et al., 2010). RipA를 코딩하는 유전자의 결실은 성장의 감소 및 박테리아로 구성된 비정상적인 표현형을 유도하기 때문에 RipA가 박테리아 성장에 미치는 영향이 크다고 볼 수 있다(Hett & Rubin, 2008).
- [0010] 그러나 결핵균 유래의 HspX 항원 및 RipA 항원을 Rv2299c 및 ESAT6으로 구성되는 융합 단백질 백본에 추가한 융합단백을 제조하여 이중 프라이머 부스트 전략에 이용하는 연구는 전무한 상태이다. 또한 최고의 백신효능을 나타내기 위해서는 다중융합백신을 구성할 때 단백질 순서를 어떻게 배열하느냐가 중요한 관건이다.
- [0011] 한국등록특허 제1270999호는 결핵균 유래의 Rv2299c 단백질을 이용하여 미성숙 수지상세포를 성숙 수지상 세포로 분화시키는 방법이 기재되어 있으나, 단일 단백질을 이용하여 미성숙 수지상세포의 분화를 유도하는 점에서 본 발명의 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합단백질의 BCG 백신의 부스터와는 차이가 있다.
- [0012] 미국등록특허 제7670609호는 하나 이상의 Mtb 항원 및 하나 이상의 Mtb 소생 또는 활성화 항원이 과발현되는 *Mycobacteria tuberculosis* (Mtb) 에 대한 백신이 기재되어 있으나, 본 발명의 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합 단백질을 BCG 백신의 부스터로 사용하는 것과는 차이가 있다.

**선행기술문헌**

**특허문헌**

- [0013] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제1270999호, 결핵균의 Rv2299c 단백질을 이용한 수지상 세포의 성숙방법, 2013.05.29. 등록
- (특허문헌 0002) 한국등록특허 제1749165호, Rv2299c 또는 Rv2299c와 ESAT6 융합한 단백질을 포함하는 수지상 세포의 성숙화 촉진용 조성물, 2017. 06. 14. 등록.
- (특허문헌 0003) 미국등록특허 제7670609호, Recombinant BCG tuberculosis vaccine designed to elicit immune responses to Mycobacterium tuberculosis in all physiological stages of infection and disease, 2010년 03.02. 등록

**비특허문헌**

- [0014] (비특허문헌 0001) Brandt L. et al., Failure of the Mycobacterium bovis BCG vaccine: some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis, *Infection and Immunity*, 70(2), 672-678, 2002.
- (비특허문헌 0002) Jonathan M. P. et al., Vaccination against tuberculosis: How can we better BCG? *Microbial Pathogenesis* xxx (2012) 1-15.
- (비특허문헌 0003) Han-Gyu C. et al., Rv2299c, a novel dendritic cell-activating antigen of Mycobacterium tuberculosis, fused-ESAT-6 subunit vaccine confers improved and durable protection against the hypervirulent strain HN878 in mice, *Oncotarget*. 8, 19947-19967, 2017.
- (비특허문헌 0004) Teresa M. et al., Mycobacterium bovis BCG-Specific Th17 Cells Confer Partial Protection against Mycobacterium tuberculosis Infection in the Absence of Gamma Interferon, *Infection and Immunity*, 78(10), 4187-4194, 2010.
- (비특허문헌 0005) Arshid Y. et al., HspX protein as a candidate vaccine against Mycobacterium tuberculosis: an overview, *Frontiers in Biology*, 13(4), 293-296, 2018.
- (비특허문헌 0006) Michelle B. R. et al., Transcriptional Profile of Mycobacterium tuberculosis Replicating in Type II Alveolar Epithelial Cells, *Plos one*, 10(4), e0123745, 1-22, 2015.

(비특허문헌 0007) Chao M. C. et al., Protein Complexes and Proteolytic Activation of the Cell Wall Hydrolase RipA Regulate Septal Resolution in Mycobacteria, Plos one, 9(2), e1003197, 1-17, 2013.

(비특허문헌 0008) Ruggiero A. et al., Structure and Functional Regulation of RipA, a Mycobacterial Enzyme Essential for Daughter Cell Separation, Structure, 8(9), 1184-1190, 2010.

(비특허문헌 0009) Erik C. Hett, Eric J. Rubin, Bacterial Growth and Cell Division: a Mycobacterial Perspective, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 72(1), 126-156, 2008.

(비특허문헌 0010) Matthews K. et al., Predominance of interleukin-22 over interleukin-17 at the site of disease in human tuberculosis, Tuberculosis (Edinb), 91(6-3), 587-593, 2011.

(비특허문헌 0011) Okamoto Y. et al., Essential role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung, J Immunol. 184(8), 4414-22, 2010.

(비특허문헌 0012) Khader S. A. et al., IL-23 is required for long-term control of Mycobacterium tuberculosis and B cell follicle formation in the infected lung, J Immunol. 187(10), 5402-72011, 2011.

(비특허문헌 0013) Brandt L. et al., Failure of the Mycobacterium bovis BCG vaccine: some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis, Infect. Immun., 70(2), 672-8, 2002.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0015] 상기와 같이 BCG-이종 프라임 부스트 전략으로 자체의 면역 기능을 높이고, 강력한 면역 반응을 일으키는 무독성의 면역조절제의 개발과 다기능 CD4+ T 세포의 분석이 세포 면역 치료에 중요한 과제가 되고 있다.
- [0016] 따라서 본 발명의 목적은 BCG-이종 프라임 부스트 조성물을 제공하는 데 있다. 또한 백신효능의 극대화를 위한 다중융합단백의 단백질 배열 순서를 정하고, 최종적으로는 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 단백질을 유효성분으로 포함하는 BCG 백신 부스터용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 목적은 BCG를 접종하는 단계 이후에 상기 BCG 백신 부스터용 조성물을 접종하는 단계를 포함하는 BCG 백신 부스팅 방법을 제공하는 데에 있다.

### 과제의 해결 수단

- [0018] 상기의 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 Rv2299c와 ESAT6 융합단백에 단백질을 추가하는 경우 ESAT6단백질의 위치를 정하기 위한 예비실험결과를 바탕으로 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 단백질을 유효성분으로 포함하는 BCG백신 booster용 조성물을 제공한다.
- [0019] 또한 본 발명은, 상기 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합 단백질의 Rv2299c, ESAT6, HspX 및 RipA은 각각 결핵균 (*M. tuberculosis*) 유래의 단백질인 것을 특징으로 하는 BCG 백신 부스터용 조성물을 제공한다.
- [0020] 상기 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 단백질은 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  내지 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  양으로 포함되는 것이 바람직하다.
- [0021] 본 발명은 IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> 다기능 T 세포 또는 IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup> 다기능 T 세포를 증가시키는 것을 특징으로 하는 BCG 백신 부스터용 조성물을 제공한다.
- [0022] 또한 본 발명은 CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>T 세포를 증가시키는 것을 특징으로 하는 BCG 백신 부스터용 조성물을 제공한다.
- [0023] 본 발명은 CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>T 세포를 증가시키는 것을 특징으로 하는 BCG 백신 부스터용 조성물을 제공한다.
- [0024] 본 발명은 또한 결핵균 감염시 세균부하를 감소시키는 것을 특징으로 하는 BCG 백신 부스터용 조성물을 제공한다.
- [0025] 본 발명은 서열 번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 재조합 단백질을 제공하며, 상기 재조합 단백질을 포함하는

BCG 백신 부스터용 조성물을 제공한다.

[0026] 본 발명은 (가) BCG를 접종하는 단계; (나) 상기 (가) 단계의 BCG 접종 12주 후, 상기 BCG 백신 부스터용 조성물을 접종하는 단계;를 포함하는 BCG 백신 부스팅 방법을 제공한다. 상기 (나) 단계는 BCG 백신 부스터용 조성물을 3주 주기로 3회 투여하는 단계인 BCG 백신 부스팅 방법일 수 있다. 상기 BCG 백신 부스팅 방법은 IL-17<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> 다기능 T 세포 또는 IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup> 다기능 T 세포를 증가시키는 것을 특징으로 하는 BCG 백신 부스팅 방법일 수 있다.

[0027] 상기 BCG 백신 부스팅 방법은 CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> T 세포를 증가시키는 것을 특징으로 하는 BCG 백신 부스팅 방법일 수 있다.

[0028] 또한 본 발명은 상기 BCG 백신 부스터용 조성물을 포함하는 면역 증강용 조성물을 제공한다.

**발명의 효과**

[0029] 이상과 같이 본 발명에 의하면 종래 전혀 알려져 있지 않던 제조항 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA를 활용하여 BCG-booster로써 신체의 면역 반응을 효과적으로 활성화시킬 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0030] 도 1은 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합단백질의 고 병원성 M2 균주에 대한 BCG프라이머 부스팅 효과를 보기 위하여 실시한 마우스의 BCG, 부스터 접종 및 분석의 시간표를 도시한 것이다.

도 2는 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합 단백질 제작을 위한 cloning 전략을 도시한 모식도이다.

도 3은 RipA의 항원성을 보기 위하여 결핵균 (H37Rv와 K)을 감염시킨 후 분리한 마우스 비장세포의 ESAT6와 RipA(1 또는 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 처리후 사이토카인 변화를 나타낸 그래프이다.

도 4는 Rv2299c-ESAT6 융합단백질에 Rv2882c항원을 중간에 첨가하는 경우 Rv2299c-ESAT6 융합단백질의 백신효능을 증가시키지 못 한다는 결과를 나타낸 그래프이다.

도 5는 감염전 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합단백질 예방접종에 의하여 유도된 T세포 표현형의 변화를 사이토카인 염색에 의하여 평가한 그래프와 IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  및 IL-2 공 발현을 나타낸 그래프이다.

도 6은 비접종, BCG만 접종 및 BCG 접종 후, ESAT6, Rv2299c-ESAT6 및 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합단백질로 부스팅 후, M2 균주 감염 시, 폐내의 세균 부하 정도를 나타내는 그래프이다. (A)는 각각의 그룹별(G2-G6)로 면역화 된 마우스의 우측 폐의 상엽이 MtB M2 챌린지 후 10주에 H&E 염색된 사진이다(1X : 스케일 바 = 2.0 mm). (B)는 각각의 그룹별(G2-G6)로 면역화 된 마우스의 vP 염증 부위의 비율과 병변의 크기를 나타낸 그래프이다. (C)는 감염 10 주 후 각 그룹의 폐의 CFU를 측정된 것을 그래프로 나타낸 것이다 두 개의 독립적인 실험 중 하나의 데이터가 설명된다 (지정된 각 시점에서 그룹당 7 마리의 마우스).

도 7은 감염후 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합단백질 예방접종에 의하여 유도된 T세포 표현형의 변화를 사이토카인 염색에 의하여 평가한 그래프와 IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  및 IL-2의 공 발현을 나타낸 그래프이다.

도 8은 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합 단백질의 아미노산 서열을 나타낸 것이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0031] 현재까지 면역세포에 관한 면역반응에 있어서 결핵균(*M. tuberculosis*)으로부터 유래된 단백질에 관한 많은 연구가 시행되어 왔지만, Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA에 관한 연구는 알려져 있지 않다.

[0032] 이하, 본 발명을 실시 예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시 예들은 본 발명을 더욱 쉽게 이해할 수 있도록 예시하는 것으로 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것이 아니다.

[0033] <실시예 1> 재료 및 방법

[0034] 1.1 세균 균주 및 미코박테리움 속의 제조

[0035] Mtb M2는 재단법인 국제결핵연구소 (ITRC, Changwon, Gyeongsangnam-do, South Korea)으로부터 얻었다. 미코박테리움 보비스 BCG (파스퇴르 균주 1173P2)는 파스퇴르 연구소 (Paris, France)의 브로치 박사가 제공하였다.

이 연구에 사용된 모든 미코박테리아는 이전에 설명한 바와 같이 제조되었다(Cha et al., 2015).

**1.2 동물, 예방 접종 및 에어로졸 감염**

5주 내지 6주령 특정 병원체 부재 암컷 C57BL/6 마우스는 잭슨 연구소 (BarHarbor, ME, USA)로부터 구입하였다. 마우스는 연세대학교 의학연구센터의 BL-3 생물재해 동물 시설에 있는 배리어 조건 하에서 일정한 온도 (24 ± 1°C와 습도(50 ± 5%))로 유지된다. 동물은 표준화된 조명 제어 조건 (12시간 빛과 12시간 어둠 주기) 하에서 물에 대한 임의 접근과 함께 멸균 상업 마우스 식단을 제공하였다. 마우스는 매일 모니터링하였으며, 이 실험 동안 어떤 마우스도 임상학적 증상이나 질병을 나타내지 않았다.

본 발명의 BCG 백신 부스팅 방법은 (가) BCG를 접종하는 단계, (나) 상기 (가) 단계의 BCG 접종 12주 후 BCG 백신 부스터용 조성물을 접종하는 단계를 포함한다. 예방 접종을 위해, 마우스는 우선 피하 주사( $2 \times 10^5$  CFU /마우스)를 통해 BCG 파스퇴르 1173P2로 예방 접종 하였고, 후-BCG 면역 예방 접종 12주 후에 소단위 백신을 3주 주기로 3회를 투여하였다. 이때 소단위 백신은 표 1에서 보듯이 ESAT6, Rv2299c-ESAT6, Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 단백질을 각각 포함하여 적용하였다.

**표 1**

G1	Naive
G2	Infection
G3	BCG
G4	BCG + ESAT6
G5	BCG + Rv2299c-ESAT6
G6	BCG + Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA

최종 면역 예방 접종 4주 후, 비장과 폐 세포를 수확하였고 이를 사용하여 면역원성(IFN- $\gamma$  분비물의 레벨과 IFN- $\gamma$ -생산 T 세포들과 Ag-특이적 T 세포들의 주기들)을 조사하였다.

소단위 백신 단독의 예방 효과를 연구하기 위해, BCG 면역법 단독 및 BCG 프라이밍-소단위 백신 부스팅 그룹은 앞서 설명한 바와 같이 Mtb M2 균주와 가스가 발생하도록 챌린지되었다(Cha et al., 2015b, Lee et al., 2009). 요약하면, 마우스를 대략 150 CFU의 생존가능한 Mtb에 노출시키기 위해서 공기 감염 장치(Glas-Col, Terre Haute, IN, USA)의 흡입 챔버에 60분 동안 소정의 M2 투여양으로 노출시켰다. 후-챌린지 8주 또는 16주 시점에서, 각 그룹에서 비장과 폐 세포를 수확하였고, 유세포 분석을 사용하여 다기능 T 세포와 T 세포 유형의 주기를 평가하였다.

상기와 같은 소단위 단백질의 백신효능을 평가하기 위해 BCG백신 접종, 융합단백질 면역 주기, 고 병원성 M2 균주로 감염시기 및 분석 시간표를 도 1에 도시하였다.

**1.3 항체 및 시약**

IFN- $\gamma$  겨냥 PE-공액 mAb, CD90.2 겨냥 BV605-공액 mAb, CD4 겨냥 PerCP-Cy5.5-공액 mAb, CD8 겨냥 BV785-공액 mAb, CD44 겨냥 BV421-공액 mAb, CD62L 겨냥 Alexa700-공액 mAb, IL-17 겨냥 FITC-공액 mAb, IL-2 겨냥 PE-Cy7-공액 mAb, TNF- $\alpha$  겨냥 APC-공액 mAb는 eBioscience (San Diego, CA, USA)로부터 구입하였다. 피코에리트린 (PE)-공액 쥐 항-IgG1, 쥐 항-IgG2a 및 쥐 항-IgG2b, APC-공액 쥐 항-IgG2a 및 쥐 항-IgG1, FITC-공액 쥐 항-anti-IgG2b, 그리고 PE-Cy7-공액 마우스 항-IgG1 및 쥐 항-IgG2b은 eBioscience에서 얻었다. 이들 항체는 이소 타입 대조군으로서 사용되었다. TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-5, IL-10 및 IL-17F측정을 위한 ELISA 키트는 eBioscience로부터 얻었다.

**1.4 재조합 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA의 생성**

재조합 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 단백질 생성을 위해 Mtb H37Rv (ATCC 27294)부터의 게놈 DNA를 주형으로 이용하고 다음의 프라이머를 이용하여 해당 유전자(frr)를 PCR로 증폭하였다.

도 2는 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합 단백질 제작을 위한 cloning 전략을 도시한 모식도이다. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv의 Genomic DNA를 template로 하여 PCR을 통해 HspX DNA와 RipA DNA를 Overlapping PCR방법을 사용하여 template를 얻고 5'말단 HindIII 와 3'말단에 NotI 제한효소가 삽입된 HspX-RipA DNA를 제작하여 pET22b vector에 삽입하였다. 동일방법을 활용하여 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv의 Genomic DNA를

template로 하여 PCR을 통해 Rv2299c와 ESAT6 유전자를 Overlapping PCR 방법을 사용해 template를 얻고 5' 말단 NdeI 와 3' 말단에 HindIII 제한효소가 삽입된 Rv2299c-ESAT6 DNA을 추가로 제작하여 pET22b+(HspX-RipA)에 삽입하여 pET22b+(Rv2299c-ESAT6)+(HspX-RipA)를 완성하였다.

[0048] 하기 표 2는 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 제작을 위하여 사용된 각 항원의 primer를 나타낸 것이다.

표 2

Primer	Sequence
Rv2299c-ESAT6-F	CGTCTCGCGCGTACCTTGATGACAGAGCAGCAGTGG
Rv2299c-ESAT6-R	CCACTGCTGCTCTGTTCATCAAGGTACGCGGAGACG
Rv2299c-NdeI-F	CATATGAACGCCCATGTCGAGCAGTTG
ESAT6-HindIII-R	AAGCTTTGCGAACATCCCAGTGACGTT
RipA-HindIII-F	TCCGTCGACAAGCTTGATCCACAGACGGACACC
RipA-R	GGTGGTGGCCATGTACTCGATGTATCGGAC
HspX-F	TACATCGAGTACATGGCCACCACCTTCCC
HspX-NotI-R	GCTCGAGTGCGGCCGCTGGTGGACCGGATCTG

[0050] 생성된 PCR 생성물을 NdeI 과 HindIII 제한효소를 사용하여 소화시킨 후 pET-22b (+) 벡터 (Novagen, Madison, WI, USA)에 삽입하였다. 재조합 단백질을 전술한 바와 같이 제조하였다. 정제된 단백질로부터 에도톡신 오염을 제거하기 위해 재조합 단백질을 4°C에서 6시간 동안 폴리믹신 B-아가로스(Sigma Chemical Co.)와 배양하였다.

[0051] 도 8은 서열번호 1의 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합 단백질의 아미노산 서열을 나타낸 것이다.

[0052] Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 제제 내 잔류 LPS의 양은 제조사의 지침에 따라 LAL 테스트 키트 (Lonza, Basel, Switzerland) 를 사용하여 평가하였다. 정제된 에도톡신 없는 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA는 필터 소독되었으며 70°C에서 동결되었다. Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 단백질의 순도는 CB 염색과 항-His 항체를 사용한 웨스턴 블롯팅 분석에 의해 평가되었다.

[0053] 1.5 사이토카인 측정

[0054] 공지된 방법에 따라 샌드위치 ELISA를 사용하여 배양 상청액에서 TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-5, IL-10 및 IL-17FA의 정도를 판단하였다. 이러한 사이토카인 측정은 제조사(eBioscience)에서 권고된 대로 실시되었다

[0055] 1.6 유동세포분석법에 의한 세포내 사이토카인 및 표면 분자 발현분석

[0056] 세포 내 사이토카인 염색을 위해, 예방 접종된 동물( $2 \times 10^6$  세포)로부터 얻은 단세포 현탁액은 ESAT6 (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), Rv2299c-ESAT6 (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 또는 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )로 GolgiStop 존재 하에서 37°C에서 12시간 동안 자극되었다 (BD Biosciences). 또한, M2 켈린지 후 세포 내 사이토카인 염색을 위한 자극제로 ESAT6, Rv2299c-ESAT6 또는 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA를 사용하였다.

[0057] 세포는 4°C에서 15분 동안 Fc 블록 (항-CD16/32)으로 우선 차단되고, 4°C에서 30분 동안 CD90.2 겨냥 BV605-공액 mAb, CD4 겨냥 PerCP-Cy5.5-공액 mAb, CD8 겨냥 BV785-공액 mAb, CD44 겨냥 BV421-공액 mAb, CD62L 겨냥 Alexa700-공액 mAb 항체로 염색되었다. 세포를 제조사의 지침에 따라 사용된 사이토픽스/사이토펜 키트 (BD Biosciences)로 고정시키고 투과될 수 있도록 하였다. 세포 내 IL-17, TNF- $\alpha$ , IL-2 및 IFN- $\gamma$ 는 투과 완충액에서 FITC-공액 항-IL-17, APC-공액 항-TNF- $\alpha$ , PE-Cy7-공액 항-IL-2 및 PE-공액 항-IFN- $\gamma$  항체를 이용하여 검출되었다. 모든 항체는 달리 명시되지 않는 한 eBioscience (San Diego, CA)에서 구입하였다. 세포는 FACSverse 유동 세포 분석법으로 시중에 구입가능한 소프트웨어 프로그램 FlowJo를 이용하여 분석되었다 (Treestar, Inc., San Carlos, CA).

[0058] 1.7 세균 수 및 조직병리학적 분석

[0059] 최종 예방 접종 후 그리고 M2 켈린지 10주 후, 한 그룹 당 6 내지 7 마리의 마우스를 이산화탄소로 안락사 시키고, 그 폐와 비장을 균질화하였다. 세균 수는 장기 (왼쪽 폐 및 비장의 반) 호모게네이트의 연속 희석을 통해 미들 브룩 7H11 한천 (Difco Laboratories, Detroit, MI)에 플레이트함으로써 결정되었으며, 이는 10% OADC (Difco Laboratories), 암포테리신 B(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 및 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  2-티오펜카복실 산 히드라지

드(Sigma-Aldrich)로 보충되었다. 균체는 37°C에서 4주 동안 배양된 후 세어졌다. 조직병리학적 분석을 위해, 우측 폐의 상엽은 헤마톡실린 및 에오신으로 염색되었고, 염증의 심각도를 위해 평가되었다. 앞서 설명한 바와 같이(Cha et al., 2015a), 폐에서의 염증 레벨은 ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, ML) 소프트웨어 프로그램을 사용하여 평가하였다. 또한, 염증반응은 병변의 크기 및 면역 세포의 구성에 기초하여 평가하였다. CFU에 대한 데이터 및 폐 염증은 메디안 log10 CFU ± 사분범위 (IQR)로 보고되었다.

[0060] **1.8 통계 분석**

[0061] 각 실험은 적어도 3회 반복하여 수행하였으며 일관된 결과를 얻었다. 두 그룹 간 차이의 유의성은 독립 표본 학생 *t*-테스트에 의해 판단되었고, 세 그룹 이상 간 차이는 GraphPad Prism (version 4.03) 통계적 소프트웨어 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)를 사용한 Tukey의 다중 비교 테스트에 따른 일방향 ANOVA로 평가되었다. 그래프 내의 데이터는 평균 ± SD로 나타내었다. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01 및 \*\*\**p* < 0.001은 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[0062] **<실시에 2> 결핵균 감염 마우스의 T세포를 이용한 RipA의 항원성 분석**

[0063] **2.1 실험방법**

[0064] 결핵균(H37Rv와 K)을 감염시킨 마우스의 비장세포를 분리한 후, ESAT6와 RipA (1 또는 5 µg/ml)을 처리후 IFN-γ, IL-2, IL-10, IL-5, TNF-α 또는 IL-17AF 사이토카인을 측정하였다. 데이터는 3번의 실험으로 얻은 평균 ± SD로 나타내고, 독립 표본 *t* 테스트는 유의성을 결정하기 위해 사용되었다. 각각의 그룹과 비교하여 \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01 및 \*\*\**p* < 0.001 (독립 표본 *t* 테스트).

[0065] **2.2 실험결과에 대한 분석**

[0066] 도 3은 RipA의 항원성을 보기 위하여 결핵균 (H37Rv와 K)을 감염시킨 후 분리한 마우스 비장세포의 ESAT6와 RipA (1 또는 5 µg/ml)을 처리후 사이토카인 변화를 나타낸 그래프이다. 현재 RipA의 항원성이 알려져 있지 않기 때문에 사이토카인을 측정하여 항원성을 분석하였다. T세포의 활성을 나타내는 IL-2와 TNF-α의 분비는 그룹 간에 차이가 없었지만 Th1 반응인 IFN-γ는 RipA에 대해 분비되지 않음을 확인하였다. 그러나 Th2 반응인 IL-5와 IL-10의 분비는 RipA에 의해 분비되고, 또한 Th17 반응인 IL-17AF의 분비가 증가된 것을 확인할 수 있었다. 즉, RipA가 Th1 반응이 아닌 Th2/Th17 반응을 팽창시킴을 확인할 수 있었다.

[0067] **<실시에 3> Rv2299c-ESAT6단백 사이에 Rv2882c단백질을 중간에 첨가하여 백신효능을 평가**

[0068] **3.1 실험방법**

[0069] 다중융합단백질을 구성할 때 각각의 단백질 배열의 순서는 최적의 백신효능을 나타내기위해 중요한 관점이다. 가장 우선적으로 기존에 백신효능이 알려진 Rv2882c항원을 Rv2299c-ESAT6 융합단백의 중간에 삽입한 Rv2299c-Rv2882c-ESAT6을 제작하여 백신효능을 증가하는지 평가하기 위해 도 4의 A와 같이 BCG를 접종한 후에 12주부터 각 융합단백질로 3회 면역하였다. 최종 면역후 4주 후 고병원성 균주인 HN878 임상결핵균주로 챌린지 후 9주에 폐조직을 H&E 염색 하여 분석하였고, 또한 감염 9주 후 각 그룹의 폐와 비장에서 CFU를 측정하였다(지정된 각 시점에서 그룹 당 7 마리의 마우스). 일원 분산 분석에 이어 Tukey의 다중 비교 테스트를 수행하여 유의성을 평가했다. n.s. ∴ 중요하지 않음, \* *p* < 0.05, \*\* *p* < 0.01, \*\*\* *p* < 0.001 및 \*\*\*\* *p* < 0.0001.

[0070] **3.2 실험결과에 대한 분석**

[0071] 도 4는 Rv2299c-ESAT6융합단백질 중간에 Rv2882c를 첨가하여 연결된 융합단백의 백신효과를 분석한 결과이다. (B)는 고병원성결핵균주(HN878)로 챌린지 후 9주에 각각의 그룹별(G1-G6) 마우스의 우측 폐의 상엽을 H&E 염색한 사진이다. (C)는 감염 9주 후 각 그룹의 폐의 CFU를 측정한 것을 그래프로 나타낸 것이다.

[0072] 도 4 (B)를 보면 감염시키지 않은 마우스(G1)의 폐에 비하여 결핵균이 감염된 마우스(G2)의 폐에서 병변이 뚜렷함을 확인할 수 있고, BCG만을 접종한 마우스(G3)에 비하여 ESAT6(G4), Rv2299c-ESAT6(G5), Rv2299c-Rv2882C-ESAT6(G6)로 부스팅 한 경우 병변이 감소되었음을 확인할 수 있었으나 Rv2299c-ESAT6(G5)와 Rv2299c-Rv2882C-ESAT6(G6)로 부스팅한 그룹 간에는 뚜렷한 차이가 없었다.

[0073] 또한 도 4 (C)에서 보는 바와 같이, 감염 9주 후 각 그룹의 폐와 비장에서서 CFU를 측정한 결과, Rv2299c-ESAT6 융합 단백질로 부스팅한 그룹(G5)이 ESAT6단독으로 부스팅한 그룹(G4) 보다 현저히 균수가 감소하였지만, Rv2299c-ESAT6와 Rv2299c-Rv2882C-ESAT6로 부스팅한 그룹 간의 균 감소는 유의한 차이가 없었다.

[0074] 상기의 결과로 Rv2299c-ESAT6 융합단백질에 또 다른 항원을 첨가하여 다중융합단백을 제작하는 경우 RRv2299c-Rv2882c-ESAT6보다는 Rv2299c-ESAT6-Rv2882c와 같이 중간이 아니라 뒤에 항원을 첨가하는 것이 더 좋은 백신 효능을 나타낼 것으로 기대되었다.

[0075] <실시예 4> 결핵균으로 켈린지 전 BCG + ESAT6, Rv2299c-ESAT6 및 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA -면역화 된 마우스의 폐에서 항원 특이적 다 기능성 T 세포의 유도

[0076] 4.1 실험방법

[0077] 상기의 결과를 바탕으로 HspX와 RipA항원을 Rv2299c-ESAT6뒤에 연결한 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA를 제작하여 Rv2299c-ESAT6의 면역활성능과 백신효능을 증가시키는지 분석하였다. 이를 위해 마우스의 각 그룹은 재료 및 방법에서 설명한 바와 같이 예방 접종되고 희생시켰다. 최종 예방 접종 4주 후, 마우스 (n=5)의 각 그룹은 안락 사시켰고 그 폐 세포는 GolgiStop 존재 하에 37℃에서 12 시간 동안 표시된 항원으로 자극되었다. 예방 접종된 마우스의 폐로부터 분리된 세포 안의 IL-17, IFN- $\gamma$  및 / 또는 IL-2, TNF- $\alpha$ 를 생성하는 항원 특이적인 CD4<sup>+</sup>T 세포의 갯수는 다색의 유동 세포 분석법으로 CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>림프구에 대해 게이팅하면서 분석되었다. 파이 차트는 IL-17, IFN- $\gamma$  및 / 또는 IL-2, TNF- $\alpha$ 를 공동 발현하는 세포의 평균 개수를 나타낸다. 데이터는 각 그룹에서 5 마리의 마우스에서 얻은 평균  $\pm$  SD로 나타내고, 독립 표본 t 테스트는 유의성을 결정하기 위해 사용되었다. 면역증강제 단독 그룹과 비교하여 \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 및 \*\*\*p < 0.001 (독립 표본 t 테스트).

[0078] 4.2. 실험결과에 대한 분석

[0079] 결핵 백신 개발을 위한 보호적 상관관계에 대한 합의에 도달하지 못했지만, 최근의 연구에 따르면 다기능 T 세포의 보호 기여와 동물 모델에서 Mtb 감염에 대한 Th17- 매개 면역 반응이 제안되었다. 따라서, 본 발명자들은 최종 면역화 후 ESAT6, Rv2299c-ESAT6 및 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA으로 생체 외 재 자극시 항원 특이적 IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  및 IL-2- 다기능 T 세포가 생성 된 빈도를 평가 하였다. ESAT6, Rv2299c-ESAT6 및 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA으로 자극 한 후, 폐의 CD4<sup>+</sup> T 세포를 세포 내 사이토카인에 대해 염색 한 후, 반응하는 T 세포의 표현형을 유동 세포 분석법으로 분석하였다.

[0080] 도 5는 감염전 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합단백질 예방접종에 의하여 유도된 T세포 표현형의 변화를 사이토카인 염색에 의하여 평가한 그래프와 IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  및 IL-2 공 발현을 나타낸 그래프이다. 먼저 ESAT6로 자극시 ESAT6 (G4), Rv2299c-ESAT6 (G5) 및 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA (G6) 로 BCG 부스팅한 그룹 모두 항원 특이적인 IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T세포 팽창이 일어났다(파이차트 밖 회색 원형). 그러나 ESAT6 (G4) 및 Rv2299c-ESAT6 (G5)로 BCG를 부스팅한 그룹에서는 CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup>-다기능 T 세포의 팽창이 매우 적은 반면, Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA (G6) 로 부스팅한 그룹에서는 현저히 팽창되어 있음을 확인할 수 있었다. 특히 DC를 효과적으로 성숙시킬 수 있는 것으로 알려진 Rv2299c-ESAT6 융합 단백질 조성로 BCG를 부스팅한 그룹 (G5) 에서는 거의 관찰되지 않은 CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup>-다기능 T 세포가 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA (G6) 로 부스팅한 그룹에서 현저하게 팽창된 것은 Rv2299c-ESAT6를 포함하는 조성물의 부스팅으로는 예측할 수 없는 효과라 할 수 있다.

[0081] 다음으로 Rv2299c-ESAT6로 자극시 Rv2299c-ESAT6 부스팅 그룹 (G5) 에서 IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T세포의 팽창이 일어나지만, Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 부스팅 그룹 (G6) 에서 월등히 증가되었음을 확인할 수 있고, CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup>-다기능 T 세포의 팽창 또한 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 부스팅 그룹 (G6) 에서 월등히 증가되었음을 확인할 수 있었다.

[0082] 마지막으로 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA로 자극시, Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA로 부스팅된 그룹 (G6) 에서 항원 특이적 IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T세포의 팽창과 CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup> 다기능 T 세포의 팽창이 되었음을 확인할 수 있었다.

[0083] 즉, BCG 접종 후, ESAT6 또는 Rv2299c-ESAT6 융합 단백질을 처리하는 것과 비교하여 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합 단백질로 부스팅 시킨 마우스에서 CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup> 다기능 T 세포의 팽창이 월등한 것을 확인함으로써, 본 발명의 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합 단백질이 BCG 백신의 부스팅으로써 ESAT6 또는 Rv2299c-ESAT6 융합 단백질 처리만으로는 예측할 수 없었던 현저한 백신 부스팅 효과를 나타내는 것을 면역학적

인 분석으로 확인하였다.

[0084] <실시예 5> Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합단백질의 고 병원성 M2 균주에 대한 유의한 BCG 프라임 부스팅 효과

[0085] 5.1 실험방법

[0086] 상기 실시예 1-7과 같이, 마우스를 비접종, BCG만 접종 및 BCG 접종 후, ESAT6, Rv2299c-ESAT6 및 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합단백질로 부스팅 후, M2 균주 감염 시, 폐내의 세균 부하 정도를 측정하였다. ESAT6, Rv2299c-ESAT6 및 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합단백질 각각으로 면역화 된 마우스의 우측 폐의 상엽은 Mtb M2 챌린지 후 10 주에 H&E 염색을 사용하여 분석되었으며(1X : 스케일 바 = 2.0 mm), 이를 폐의 염증 부위의 비율과 병변의 크기를 나타내며 상자와 도표화 하였다. 또한 감염 10 주 후 각 그룹의 폐와 비장의 CFU를 측정 하였다. 두 개의 독립적 인 실험 중 하나의 데이터가 설명된다 (지정된 각 시점에서 그룹당 7 마리의 마우스). 일원 분산 분석에 이어 Tukey의 다중 비교 테스트를 수행하여 유의성을 평가했다. n.s. : 중요하지 않음, \* p <0.05, \*\* p <0.01, \*\*\* p <0.001 및 \*\*\*\* p <0.0001.

[0087] 5. 2 실험결과에 대한 분석

[0088] 도 6은 비접종, BCG만 접종 및 BCG 접종 후, ESAT6, Rv2299c-ESAT6 및 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합단백질로 부스팅 후, M2 균주 감염 시, 폐내의 세균 부하 정도를 나타내는 그래프이다. (A)는 각각의 그룹별(G2-G6)로 면역화 된 마우스의 우측 폐의 상엽이 고병원성 결핵균주인 M2로 챌린지 후 10주에 H&E 염색된 사진이다(1X : 스케일 바 = 2.0 mm). (B)는 각각의 그룹별(G2-G6)로 면역화 된 마우스의 vP 염증 부위의 비율과 병변의 크기를 나타낸 그래프이다. (C)는 감염 10 주 후 각 그룹의 폐와 비장의 CFU를 측정한 것을 그래프로 나타낸 것이다.

[0089] 도 6 (A) 및 (B)에서 보는 바와 같이 면역화 되지 않은 마우스 (G2) 폐에서 염증부위의 비율과 병변의 크기가 가장 컸으며, BCG 단독 접종 (G3) 및 BCG 접종 후 ESAT6로 부스팅한 그룹(G4)에서 염증부위의 비율과 병변의 크기가 감소한 것을 확인하였다. 또한, Rv2299c-ESAT6 (G5) 및 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합단백질로 부스팅한 그룹 (G6)에서 M2결핵균주로 챌린지 후 염증부위의 비율과 병변의 크기가 가장 감소하였다. Rv2299c-ESAT6 (G5) 및 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합단백질로 부스팅한 그룹 (G6) 간의 염증부위의 비율과 병변의 크기에 유의한 차이는 없었다.

[0090] 그러나 도 6 (C)에서 보는 바와 같이, 감염 10 주 후 각 그룹의 폐와 비장에서 CFU를 측정한 결과, Rv2299c-ESAT6 융합단백질로 부스팅한 그룹 (G5) 보다 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합단백질로 부스팅한 그룹 (G6) 에서 CFU가 현저하게 감소한 것을 확인하였다.

[0091] 상기의 결과로 BCG 접종 후, 본 발명의 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합 단백질로 부스팅한 경우, 고 병원성 M2 균주 감염시 감염 마우스 폐 내의 세균 부하가 현저히 감소한다는 사실을 확인함으로써, 본 발명의 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합 단백질이 BCG 접종 효과적인 부스터로 작용하는 것을 확인하였다.

[0092] <실시예 6> Mtb M2 균주 챌린지 후 BCG + ESAT6, Rv2299c-ESAT6 및 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA -면역화 된 마우스의 폐에서 항원 특이적 다 기능성 T 세포의 유도

[0093] 6.1 실험방법

[0094] 마우스의 각 그룹은 재료 및 방법에서 설명한 바와 같이 예방 접종되고 희생시켰다. 최종 예방 접종 4주 후, Mtb M2 균주를 챌린지하고, 10주 후, 마우스 (n=7)의 각 그룹을 안락사시키고 그 폐 세포를 GolgiStop 존재 하에 37°C 에서 12 시간 동안 표시된 항원으로 자극하였다. 예방 접종된 마우스의 폐로부터 분리된 세포 안의 IL-17, IFN- $\gamma$  및 / 또는 IL-2, TNF- $\alpha$ 를 생성하는 항원 특이적인 CD4<sup>+</sup>T 세포의 갯수는 다색의 유동 세포 분석법으로 CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>림프구에 대해 게이팅하면서 분석되었다. 파이 차트는 IL-17, IFN- $\gamma$  및 / 또는 IL-2, TNF- $\alpha$ 를 공동 발현하는 세포의 평균 개수를 나타낸다. 데이터는 각 그룹에서 5마리의 마우스에서 얻은 평균  $\pm$  SD로 나타내고, 독립 표본 t 테스트는 유의성을 결정하기 위해 사용되었다. 면역증강제 단독 그룹과 비교하여 \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 및 \*\*\*p < 0.001 (독립 표본 t 테스트).

[0095] 6.2 실험결과에 대한 분석.

[0096] 예방 접종 후 챌린지 전 Th1 / Th17- 편향 면역 상태 (도 5) 및 강화 된 균 제어 효과 (도 6)의 면역학적 기여에 기초하여, 본 발명자들은 항원 재 자극 시 IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> 및 IL-17<sup>+</sup>T세포 반응이 감염 후에도 지속적으로 유도되거나 확장 될 수 있다고 생각했다. Mtb M2 챌린지 10 주 후, 폐 세포를(도 6) 생체 외에서 ESAT6, Rv2299c-ESAT6

및 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA로 자극하고 항원 특이적 CD4<sup>+</sup> T 세포의 표현형을 유동 세포 분석법을 이용하여 평가 하였다.

[0097] 도 7은 감염후 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합단백질 예방접종에 의하여 유도된 T세포 표현형의 변화를 사이토카인 염색에 의하여 평가한 그래프와 IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  및 IL-2의 공 발현을 나타낸 그래프이다. 감염전 데이터(도 5)와 동일하게 먼저 ESAT6로 자극시 ESAT6 (G4), Rv2299c-ESAT6 (G5) 및 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA (G6) 로 BCG를 부스팅한 그룹 모두 항원 특이적인 CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T세포의 팽창이 일어났다 (파이차트 밖 회색 원형). 그러나 ESAT6 (G4) 및 Rv2299c-ESAT6로 부스팅한 그룹 (G5) 에서는 CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup> 다기능 T 세포의 팽창이 매우 적은 반면, Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA로 부스팅한 그룹 (G6) 에서는 현저히 팽창되어 있음을 확인할 수 있다.

[0098] 다음으로 Rv2299c-ESAT6로 자극시 Rv2299c-ESAT6 (G5) 부스팅 그룹에서 CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T세포의 팽창이 일어나지만, Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 부스팅 그룹 (G6)에서 CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T세포가 월등히 증가되었음을 확인할 수 있고, CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup> 다기능 T 세포의 팽창 또한 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 부스팅 그룹 (G6) 에서 월등히 증가되었음을 확인할 수 있다.

[0099] 마지막으로 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA로 자극시에도, Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA로 부스팅된 그룹 (G6) 에서 항원 특이적 IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>의 팽창과 CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup> 다기능 T 세포의 팽창이 되었음을 확인할 수 있다.

[0100] 이러한 결과는 본 발명의 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 백신 접종이 항원 특이적 다 기능성 T 세포 CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup>와 IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T 세포의 부스트를 유도하여 Mtb 균주 감염에 대한 보호를 향상시킬 수 있음을 확인한 것이다.

[0101] ESAT6, Rv2299c-ESAT6 및 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA로 자극시, Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA로 면역화 된 마우스는 항원 특이적 CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> 다기능 T 세포 (IL-17+ IFN- $\gamma$  + TNF- $\alpha$  + IL-2의 공동 생성)의 팽창을 나타냈다. 이러한 결과는 BCG 접종 후, Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합단백질로 BCG접종자에게 부스팅함으로써 항원 특이적 다 기능성 T 세포, 특히 IL-17<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T 세포의 부스트를 유도하여 Mtb 균주 감염에 대한 보호를 향상시킬 수 있음을 알 수 있었다.

[0102] 백신이 결핵에 대한 보호를 유도하려면 항원 특이적 T 세포를 페로 신속하게 모집하고 감염된 포식세포를 활성화하여 결핵균을 조절해야 한다. 또한 감염 부위에 도달한 세포는 포식세포가 가득한 환경에서 생존할 수 있어야 한다.

[0103] 면역학적 기억은 증가 된 수준의 이펙터(effector) 세포 및 일차 반응 동안보다 병원체와의 두 번째 만남에 더 빠르고 강력하게 반응하는 능력을 특징으로 한다. 특히 결핵과 같은 세포내 병원체에는 강한 면역반응이 필요하다. 따라서 기억 T 세포인 CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> T 세포의 팽창이 결핵균과의 후속 접촉에 신속하게 반응 할 수 있는 세포의 풀을 제공한다. 또한, CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T 세포는 고전적으로 Mtb 제어에 필수적이라고 생각되지만, IFN- $\gamma$  반응의 크기는 TB에 대한 보호 효능의 최적 상관 관계를 제공하지 못한다. 또한, 최근 데이터는 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  및 IL-2를 포함하여 다수의 사이토카인을 생산하는 CD4<sup>+</sup> T 세포가 Mtb 감염에 대한 보호와 관련이 있음을 밝혔다. 그러므로 CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> T 세포에서 다수의 사이토카인을 생성하는 T 세포는 결핵제어 조절에 중요한 역할을 한다.

[0104] 결핵균 감염 동안 Mtb 증식의 초기 조절을 유도하는 마우스에서 Mtb에 대한 보호에서 IL-17의 기능적 역할은 명확하지 않으며, 특히 Mtb 감염된 대식세포에서 IFN- $\gamma$ 와의 상승 작용이 불분명하다. 본 발명자들의 이전 연구는 시험관 내에서 나이브 CD4<sup>+</sup> T 세포와 공 배양된 Rv2299c-ESAT6에 의해 활성화된 수지상 세포로부터 사이토카인 프로파일을 조사함으로써 Th17 반응의 가능한 관여를 제안했지만, 정확한 메카니즘은 이것의 보호 효능에 대한 명확한 설명이 필요하였다.

[0105] 이 질문을 해결하기 위해, 우리는 각 요법의 보호 효능을 결정 하고 보호 CD4<sup>+</sup> T 세포 하위 집합의 표현형과 상관관계가 있는지 확인하기 위해 BCG 예방 접종 후 융합단백질로 부스팅하고 고병원성 결핵균주로 감염을 진행하

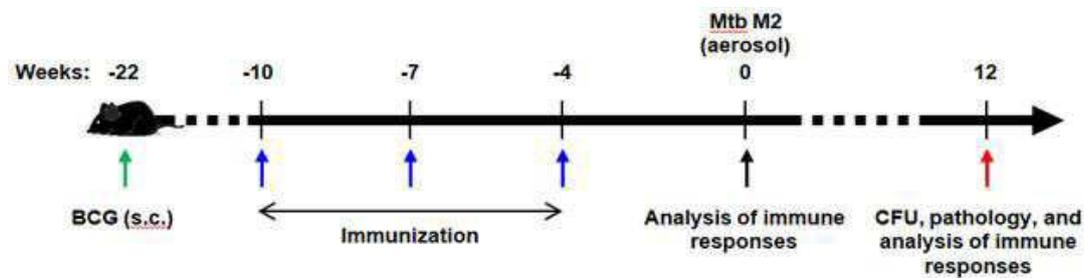
였다. 현재의 연구에서 우리는 쥐 결핵감염 모델에서 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합단백질 백신이 BCG에 의해 유도된 면역반응을 증진시키고 연장시키는 능력을 처음으로 평가하였고 이와 동일하게 BCG의 방어효과를 매우 유의하게 증강시킴을 입증하였다. 또한 본 서브 유닛 백신의 최적 백신 효능을 위해 Th17 반응이 필요한 이유 및 방법을 조사했다.

[0106]

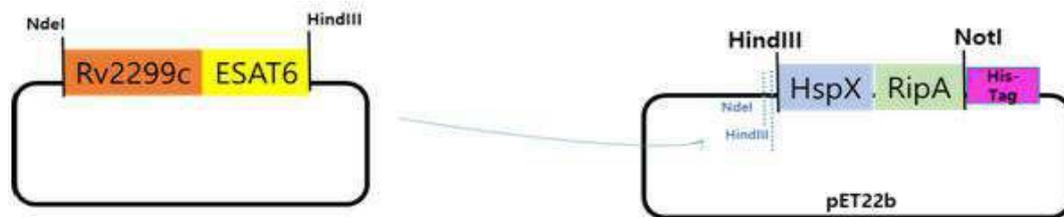
본 발명자들의 데이터는 BCG- 프라이밍 된 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 부스터 백신 접종이 BCG 프라이밍 된 ESAT6와 Rv2299c-ESAT6에 비해 폐 및 비장에서 ESAT6 재 자극시 최종 면역화 후 Th1/Th17 면역 반응을 동시에 유발함을 보여준다. 또한, BCG가 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA로 증폭 된 후, ESAT6를 이용한 시험 관내 자극 후 3 개 또는 2 개의 이펙터 사이토카인을 공동 생산하는 항원 특이적  $CD4^+CD44^+IL-17^+IFN-\gamma^+$  T세포의 수가 유의하게 증가함을 발견하였다. 따라서, 다기능  $CD4^+$  T 세포를 생산하는 즉시 확장 가능한  $IFN-\gamma/IL-17$ 의 존재 및 Rv2299c-E6-HspX-RipA 부스팅에 의해 유도된 그들의 항원 특이적 확장은 Mtb 감염에 대한 강화 된 보호에 기여할 수 있는 것으로 생각된다. 종합적으로, 본 발명은 신규한 면역 자극성 항원 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합단백질이 BCG 접종 후, 효과적으로 부스팅 할 수 있음을 확인하였다.

**도면**

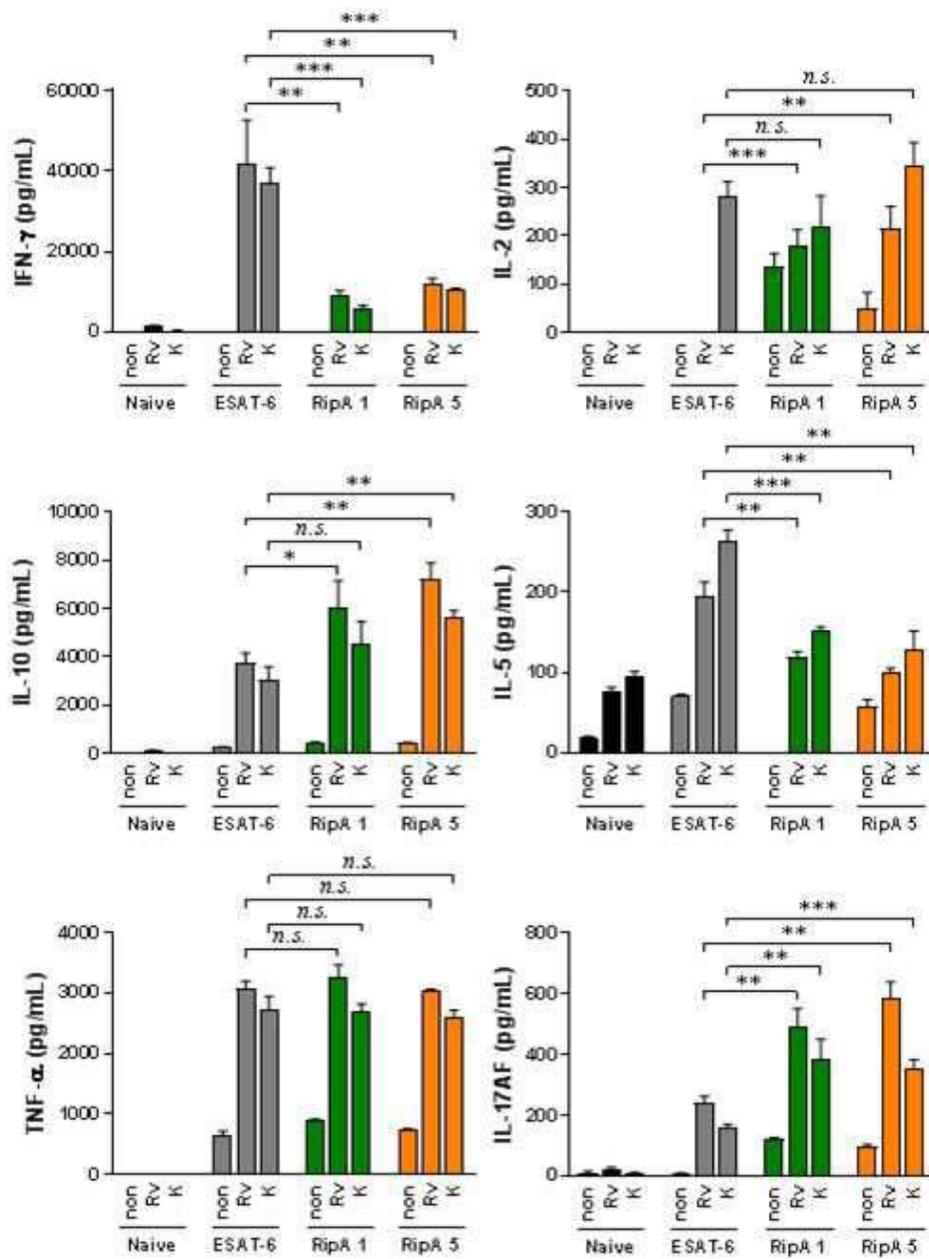
**도면1**



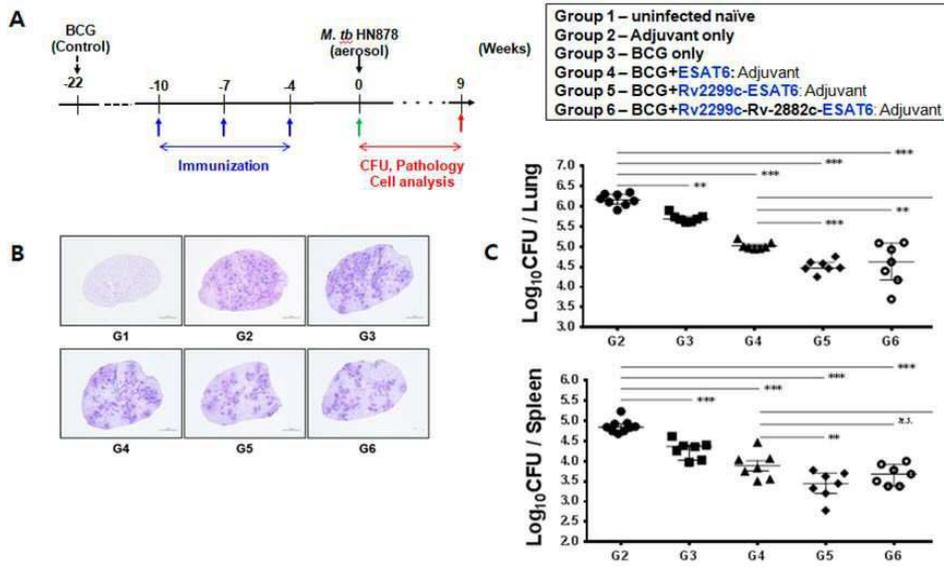
**도면2**



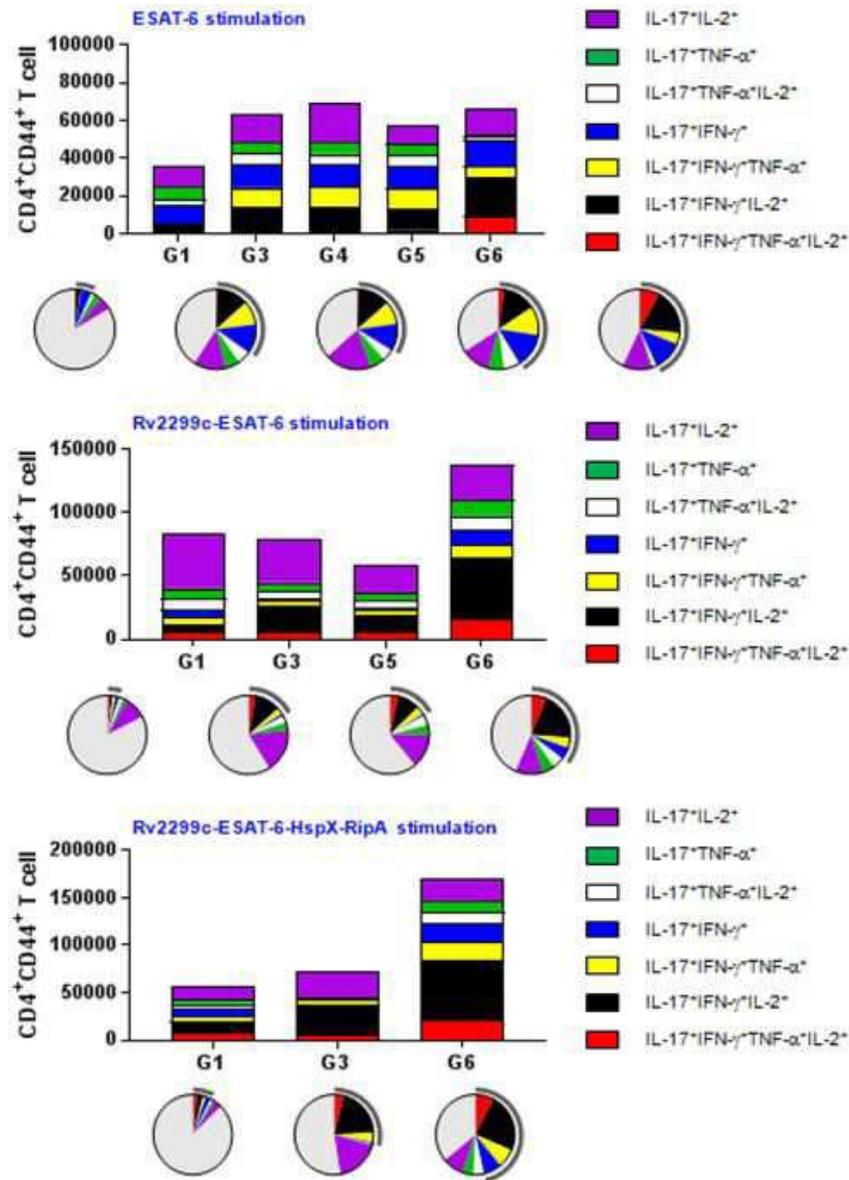
도면3



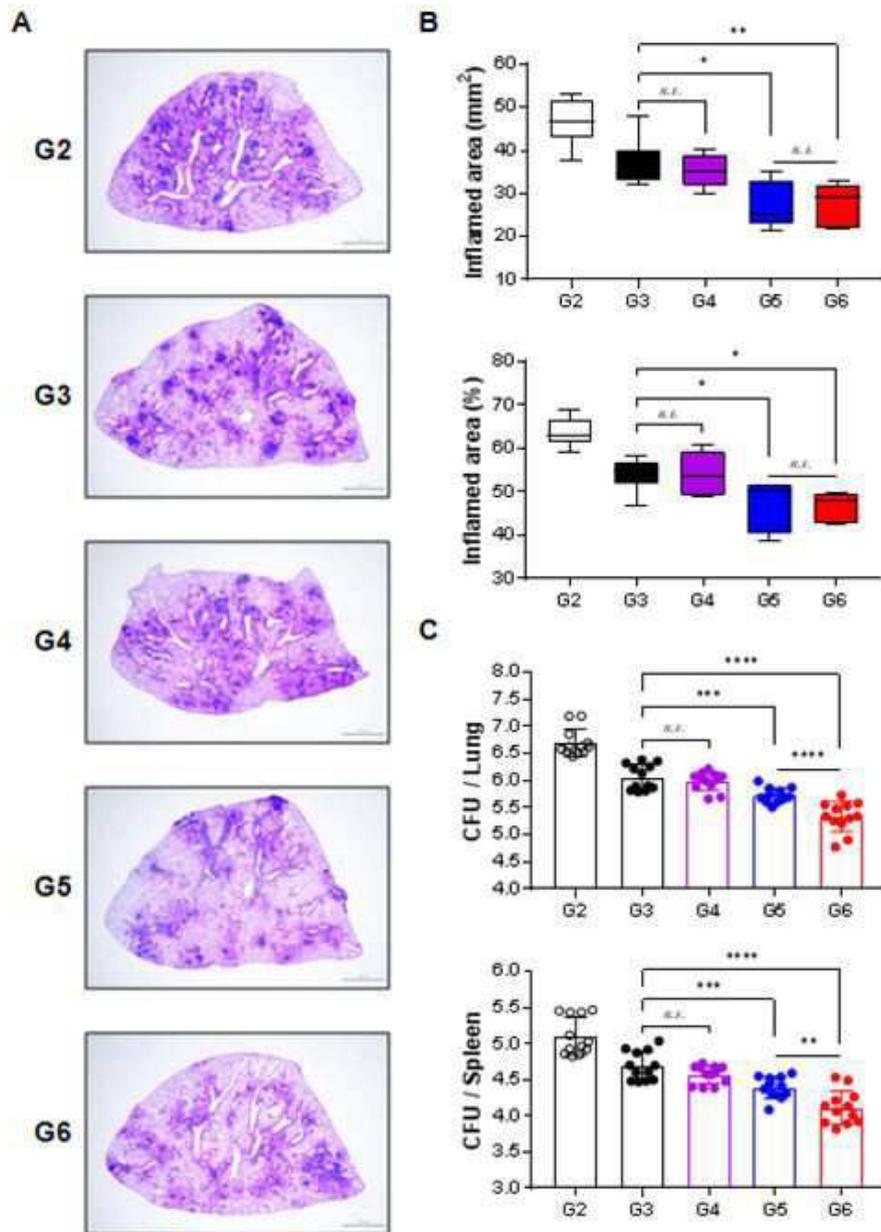
도면4



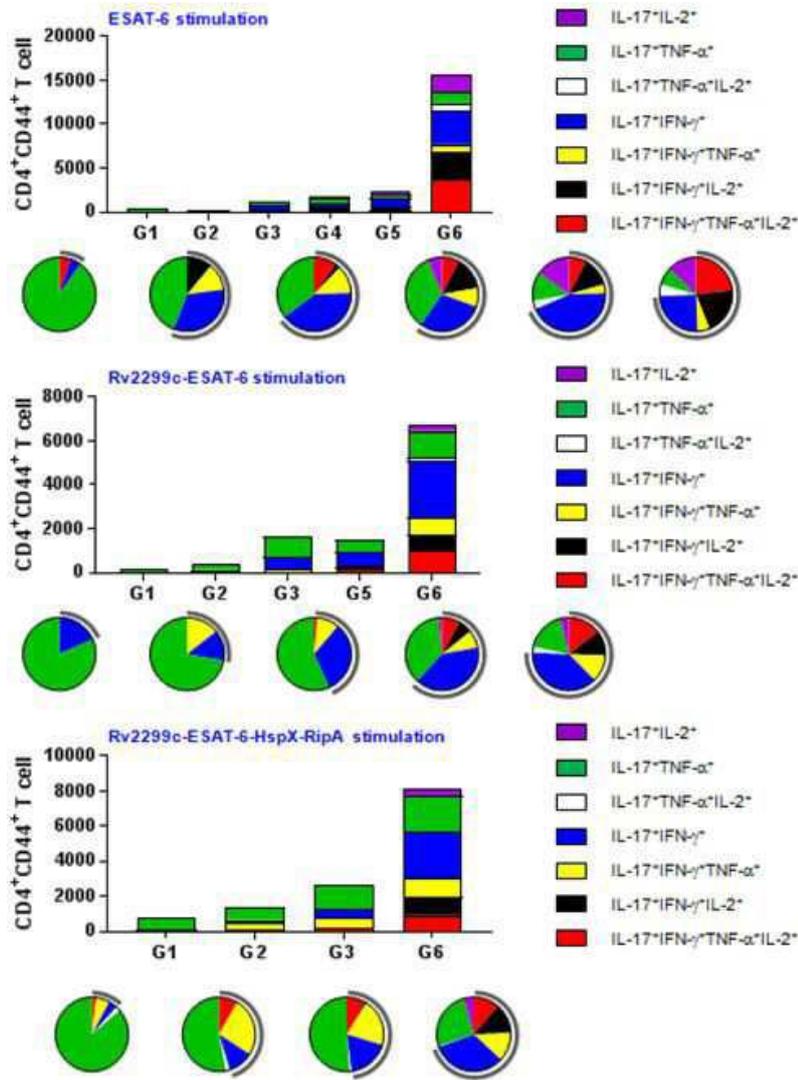
도면5



도면6



도면7



도면8

Rv2299c+ESAT6+HspX+RipA

MNAHVEQLFQAEARQLLDLMVHSVYSNKDAFLRELISNASDALDKLRIEALRNKDLEVDTSDLHIEIDADKAAR  
 TLTVRDNGIGMAREEVVDLIGTLAKSGTAEALRAQLREAKNAAASEELIGQFGIGFYSSFMVADKVQLLTRKAGESA  
 ATRWESSGEGTYTIESVEDAPQGTSVTLHLKPEDAEDDLHDYTSEWKIRNLVKKYSDFIAWPIRMDVERRTPASQ  
 EEGEGGEETVTIETETLNSMKALWARPKEEVSEQEYKEFYKHVAHAWDDPLEIIAMKAEGTFEYQALLFIPSHAP  
 FDLFDRDAHVGILQYVYKRVFIMGDCDQLMPEYLRVFKGVVDAQDMSLNVSRILQQDRQIKAIRRRRLTKKVLSTI  
 KDVQSSRPEDYRTFWTQFGRVLKEGLSDIDNRETLGISSFVSTYSEEEP TLAEYVERMKDGGQQQIFYATGETR  
 QQLLKSHPHLEAFKAKGYEVLLTDPVDEVWVGMVPEFDGKPLQSVAKGEVDLSSEEDTSEAEEREERQKEFADLLT  
 WLQETLSDHVKEVRLSTRLTESPACLITDAFGMTPALARIYRASGQEVVPGKRILELNP SHPLVTGLRQAHQDRAD  
 DAEKSLAETAELLYGTALLAEGGALEDPARFAELLAERLARTLMTEQQWNFAGIEAAASAIQGNVTSIHSLLEDEGK  
 QSLTKLAAAWGGSGSEAYQGVQKWDATATELNNALQNLARTISEAGQAMASTEGNVGTGMFAKLMATTLPV  
 QRHPRSLFPEFSELFAAFPSFAGLRPTFDTRLRLEDEMKEGRYEVRAELPGVDPDKDVIDMVRDGLTIKAERTE  
 QKDFDGRSEFAYGSFVRTVSLPVGADEDDIKATYDKGILTVSVAVSEGKPTKHIQIRSTNDPQTDTIAALIADVAK  
 ANQRLQDLSDEVQAEQESV NKAMVDVETARDNAAAAEDDLEVSQRAVKDANAIAAAQHRFDTFAAATYM  
 NGPSVSYLSASSPDEIATVTAAKTLSASSQAVMANLQRARTERVNTESAARLAKQKADKAAADAKASQDAAVA  
 ALTETRRKFDEQREEVQRLAAERDAAQARLQAARLVAWSSEGGQGAPPFRMWDPGSGPAGGRAWDGLWDP  
 TLPMIPSANIPGDPPIAVVNVVLGISATSAQVTANMGRKFLQLGILQPTDTGITNAPAGSAQGRIPRVYGRQASEY  
 VIRRGMSQIGVPYSWGGGNAAGPSKIDSGAGTVGFDCSGLVLYSFAGVGIKLPHYSQYLNLRKIPSSQMRR  
 GDVIFYGPNQSGHVTIYLGNGQMLEAPDVGLKVRVAPVRTAGMTPYVVRVIEYAAALEHHHHHHH

서열목록

- <110> YONSEI UNIVERSITY
  - <120> Boosting composition for BCG vaccine comprising  
Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA fusion protein
  - <130> 19-0068
  - <160> 1
  - <170> KoPatentIn 3.0
  - <210> 1
  - <211> 1332
  - <212> PRT
  - <213> Artificial Sequence
  - <220><223> BCG vaccine booster
  - <400> 1
- Met Asn Ala His Val Glu Gln Leu Glu Phe Gln Ala Glu Ala Arg Gln  
 1                    5                    10                    15  
 Leu Leu Asp Leu Met Val His Ser Val Tyr Ser Asn Lys Asp Ala Phe

20                    25                    30

Leu Arg Glu Leu Ile Ser Asn Ala Ser Asp Ala Leu Asp Lys Leu Arg  
 35 40 45  
 Ile Glu Ala Leu Arg Asn Lys Asp Leu Glu Val Asp Thr Ser Asp Leu  
 50 55 60  
 His Ile Glu Ile Asp Ala Asp Lys Ala Ala Arg Thr Leu Thr Val Arg  
 65 70 75 80  
 Asp Asn Gly Ile Gly Met Ala Arg Glu Glu Val Val Asp Leu Ile Gly  
 85 90 95  
  
 Thr Leu Ala Lys Ser Gly Thr Ala Glu Leu Arg Ala Gln Leu Arg Glu  
 100 105 110  
 Ala Lys Asn Ala Ala Ala Ser Glu Glu Leu Ile Gly Gln Phe Gly Ile  
 115 120 125  
 Gly Phe Tyr Ser Ser Phe Met Val Ala Asp Lys Val Gln Leu Leu Thr  
 130 135 140  
 Arg Lys Ala Gly Glu Ser Ala Ala Thr Arg Trp Glu Ser Ser Gly Glu  
 145 150 155 160  
 Gly Thr Tyr Thr Ile Glu Ser Val Glu Asp Ala Pro Gln Gly Thr Ser  
 165 170 175  
 Val Thr Leu His Leu Lys Pro Glu Asp Ala Glu Asp Asp Leu His Asp  
 180 185 190  
 Tyr Thr Ser Glu Trp Lys Ile Arg Asn Leu Val Lys Lys Tyr Ser Asp  
 195 200 205  
 Phe Ile Ala Trp Pro Ile Arg Met Asp Val Glu Arg Arg Thr Pro Ala  
 210 215 220  
 Ser Gln Glu Glu Gly Gly Glu Gly Gly Glu Glu Thr Val Thr Ile Glu  
 225 230 235 240  
  
 Thr Glu Thr Leu Asn Ser Met Lys Ala Leu Trp Ala Arg Pro Lys Glu  
 245 250 255  
 Glu Val Ser Glu Gln Glu Tyr Lys Glu Phe Tyr Lys His Val Ala His  
 260 265 270  
 Ala Trp Asp Asp Pro Leu Glu Ile Ile Ala Met Lys Ala Glu Gly Thr  
 275 280 285

Phe Glu Tyr Gln Ala Leu Leu Phe Ile Pro Ser His Ala Pro Phe Asp  
 290 295 300  
 Leu Phe Asp Arg Asp Ala His Val Gly Ile Gln Leu Tyr Val Lys Arg  
  
 305 310 315 320  
 Val Phe Ile Met Gly Asp Cys Asp Gln Leu Met Pro Glu Tyr Leu Arg  
 325 330 335  
 Phe Val Lys Gly Val Val Asp Ala Gln Asp Met Ser Leu Asn Val Ser  
 340 345 350  
 Arg Glu Ile Leu Gln Gln Asp Arg Gln Ile Lys Ala Ile Arg Arg Arg  
 355 360 365  
 Leu Thr Lys Lys Val Leu Ser Thr Ile Lys Asp Val Gln Ser Ser Arg  
 370 375 380  
  
 Pro Glu Asp Tyr Arg Thr Phe Trp Thr Gln Phe Gly Arg Val Leu Lys  
 385 390 395 400  
 Glu Gly Leu Leu Ser Asp Ile Asp Asn Arg Glu Thr Leu Leu Gly Ile  
 405 410 415  
 Ser Ser Phe Val Ser Thr Tyr Ser Glu Glu Glu Pro Thr Thr Leu Ala  
 420 425 430  
 Glu Tyr Val Glu Arg Met Lys Asp Gly Gln Gln Gln Ile Phe Tyr Ala  
 435 440 445  
 Thr Gly Glu Thr Arg Gln Gln Leu Leu Lys Ser Pro His Leu Glu Ala  
  
 450 455 460  
 Phe Lys Ala Lys Gly Tyr Glu Val Leu Leu Leu Thr Asp Pro Val Asp  
 465 470 475 480  
 Glu Val Trp Val Gly Met Val Pro Glu Phe Asp Gly Lys Pro Leu Gln  
 485 490 495  
 Ser Val Ala Lys Gly Glu Val Asp Leu Ser Ser Glu Glu Asp Thr Ser  
 500 505 510  
 Glu Ala Glu Arg Glu Glu Arg Gln Lys Glu Phe Ala Asp Leu Leu Thr  
 515 520 525  
  
 Trp Leu Gln Glu Thr Leu Ser Asp His Val Lys Glu Val Arg Leu Ser



785                    790                    795                    800  
 Leu Pro Gly Val Asp Pro Asp Lys Asp Val Asp Ile Met Val Arg Asp  
                           805                    810                    815  
  
 Gly Gln Leu Thr Ile Lys Ala Glu Arg Thr Glu Gln Lys Asp Phe Asp  
                           820                    825                    830  
 Gly Arg Ser Glu Phe Ala Tyr Gly Ser Phe Val Arg Thr Val Ser Leu  
                           835                    840                    845  
 Pro Val Gly Ala Asp Glu Asp Asp Ile Lys Ala Thr Tyr Asp Lys Gly  
                           850                    855                    860  
 Ile Leu Thr Val Ser Val Ala Val Ser Glu Gly Lys Pro Thr Glu Lys  
 865                    870                    875                    880  
 His Ile Gln Ile Arg Ser Thr Asn Asp Pro Gln Thr Asp Thr Ile Ala  
  
                           885                    890                    895  
 Ala Leu Ile Ala Asp Val Ala Lys Ala Asn Gln Arg Leu Gln Asp Leu  
                           900                    905                    910  
 Ser Asp Glu Val Gln Ala Glu Gln Glu Ser Val Asn Lys Ala Met Val  
                           915                    920                    925  
 Asp Val Glu Thr Ala Arg Asp Asn Ala Ala Ala Ala Glu Asp Asp Leu  
                           930                    935                    940  
 Glu Val Ser Gln Arg Ala Val Lys Asp Ala Asn Ala Ala Ile Ala Ala  
 945                    950                    955                    960  
  
 Ala Gln His Arg Phe Asp Thr Phe Ala Ala Ala Thr Tyr Met Asn Gly  
                           965                    970                    975  
 Pro Ser Val Ser Tyr Leu Ser Ala Ser Ser Pro Asp Glu Ile Ile Ala  
                           980                    985                    990  
 Thr Val Thr Ala Ala Lys Thr Leu Ser Ala Ser Ser Gln Ala Val Met  
                           995                    1000                    1005  
 Ala Asn Leu Gln Arg Ala Arg Thr Glu Arg Val Asn Thr Glu Ser Ala  
                           1010                    1015                    1020  
 Ala Arg Leu Ala Lys Gln Lys Ala Asp Lys Ala Ala Ala Asp Ala Lys  
  
 1025                    1030                    1035                    1040

Ala Ser Gln Asp Ala Ala Val Ala Ala Leu Thr Glu Thr Arg Arg Lys  
 1045 1050 1055

Phe Asp Glu Gln Arg Glu Glu Val Gln Arg Leu Ala Ala Glu Arg Asp  
 1060 1065 1070

Ala Ala Gln Ala Arg Leu Gln Ala Ala Arg Leu Val Ala Trp Ser Ser  
 1075 1080 1085

Glu Gly Gly Gln Gly Ala Pro Pro Phe Arg Met Trp Asp Pro Gly Ser  
 1090 1095 1100

Gly Pro Ala Gly Gly Arg Ala Trp Asp Gly Leu Trp Asp Pro Thr Leu  
 1105 1110 1115 1120

Pro Met Ile Pro Ser Ala Asn Ile Pro Gly Asp Pro Ile Ala Val Val  
 1125 1130 1135

Asn Gln Val Leu Gly Ile Ser Ala Thr Ser Ala Gln Val Thr Ala Asn  
 1140 1145 1150

Met Gly Arg Lys Phe Leu Glu Gln Leu Gly Ile Leu Gln Pro Thr Asp  
 1155 1160 1165

Thr Gly Ile Thr Asn Ala Pro Ala Gly Ser Ala Gln Gly Arg Ile Pro  
 1170 1175 1180

Arg Val Tyr Gly Arg Gln Ala Ser Glu Tyr Val Ile Arg Arg Gly Met  
 1185 1190 1195 1200

Ser Gln Ile Gly Val Pro Tyr Ser Trp Gly Gly Gly Asn Ala Ala Gly  
 1205 1210 1215

Pro Ser Lys Gly Ile Asp Ser Gly Ala Gly Thr Val Gly Phe Asp Cys  
 1220 1225 1230

Ser Gly Leu Val Leu Tyr Ser Phe Ala Gly Val Gly Ile Lys Leu Pro  
 1235 1240 1245

His Tyr Ser Gly Ser Gln Tyr Asn Leu Gly Arg Lys Ile Pro Ser Ser  
 1250 1255 1260

Gln Met Arg Arg Gly Asp Val Ile Phe Tyr Gly Pro Asn Gly Ser Gln  
 1265 1270 1275 1280

His Val Thr Ile Tyr Leu Gly Asn Gly Gln Met Leu Glu Ala Pro Asp  
 1285 1290 1295

Val Gly Leu Lys Val Arg Val Ala Pro Val Arg Thr Ala Gly Met Thr

1300

1305

1310

Pro Tyr Val Val Arg Tyr Ile Glu Tyr Ala Ala Ala Leu Glu His His

1315

1320

1325

His His His His

1330