	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2009-0082807 (43) 공개일자 2009년07월31일
(51) Int. Cl.		(71) 출원인
	<i>C07K 14/28</i> (2006.01) <i>C12N 15/10</i> (2006.01)	연세대학교 산학협력단
(21) 출원번호	10-2008-0008770	서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교
(22) 출원일자	2008년01월28일	(72) 발명자
심사청구일자	2008년01월28일	박순정
		서울 송파구 잠실동 101-1 우성아파트 17-303
		구성영
		경기 양주시 백석읍 가업리 동화아파트 509-501
		(74) 대리인
		특허법인다나

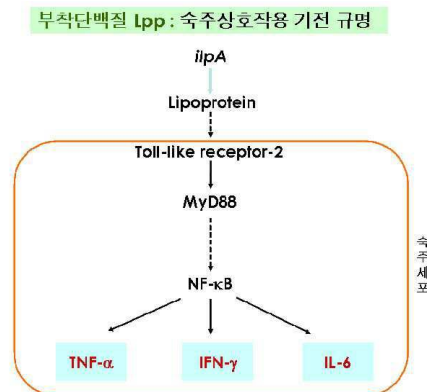
전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 신규한 패혈증 비브리오균 유래의 면역촉진활성을 갖는지질단백질 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 신규한 패혈증 비브리오균 유래의 면역촉진활성을 갖는 지질단백질 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 패혈증 비브리오균의 외막에서 인체세포의 수용체인 TLR2를 매개로 하여 숙주세포에서 면역물질의 생산을 유도하는 신규한 지질단백질을 분리 동정하고, 그 특성을 규명함으로써 패혈증 비브리오균 감염에 따른 패혈증 예방용 백신뿐만 아니라 면역촉진제 개발에 사용할 수 있는 패혈증 비브리오균 외막 유래의 지질단백질 및 이의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도12



(72) 발명자

이규호

서울 송파구 잠실동 101-1 우성아파트 17-303

한양수

서울 강동구 성내동 444-7 대진주택 A-301

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 M105KK000020-07K1101-02011

부처명 과학기술부(미생물유전체활용기술개발사업단)

연구사업명 미생물유전체활용기술개발사업

연구과제명 상호작용 모델 미생물에 의한 숙주세포신호전달체계의 규명

주관기관 한국외국어대학교 산학협력단

연구기간 2006년 4월 1일 ~ 2007년 3월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

폐혈증 비브리오균(*Vibrio vulnificus*) 유래의 서열목록 서열번호 1에 기재된 염기서열을 갖는 면역성 지질단백질 코딩 유전자.

청구항 2

제1항 기재의 유전자에 의해 코딩되는 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 갖는 면역성 지질단백질.

청구항 3

제1항 기재의 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 4

제1항 기재의 유전자 또는 제3항 기재의 재조합 벡터에 의해 형질전환된 형질전환체.

청구항 5

제4항 기재의 형질전환체를 배양하여 면역성 지질단백질을 제조하는 방법.

청구항 6

제2항 기재의 단백질에 특이적으로 결합하는 다클론성 항체.

청구항 7

서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 갖는 폐혈증 비브리오균(*Vibrio vulnificus*) 유래의 면역성 지질단백질, 또는 서열번호 1에 기재된 염기서열을 갖는 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 폐혈증 예방용 백신 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 유전자는 발현 벡터에 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는 폐혈증 예방용 백신 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

발현벡터가 도 3의 개열지도를 갖는 pET1lpA인 것을 특징으로 하는 폐혈증 예방용 백신 조성물.

청구항 10

제7항에 있어서,

폐혈증이 폐혈증 비브리오균(*Vibrio vulnificus*)의 감염에 의해 유발되는 것을 특징으로 하는 폐혈증 예방용 백신 조성물.

청구항 11

제7항에 있어서,

약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 폐혈증 예방용 백신 조성물.

청구항 12

제7항에 있어서,

아주반트를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 폐혈증 예방용 백신 조성물.

청구항 13

서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 갖는 패혈증 비브리오균(*Vibrio vulnificus*) 유래의 면역성 지질단백질, 또는 서열번호 1에 기재된 염기서열을 갖는 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 면역증강용 약학적 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 유전자는 발현 벡터에 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는 면역증강용 약학적 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서,

발현 벡터가 도 3의 개열지도를 갖는 pET1lpA인 것을 특징으로 하는 면역증강용 약학적 조성물.

청구항 16

제13항에 있어서,

약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 면역증강용 약학적 조성물.

청구항 17

제13항에 있어서,

아주반트를 추가로 포함하는 면역증강용 약학적 조성물.

청구항 18

i) 패혈증 비브리오균(*Vibrio vulnificus*)의 게놈 DNA를 주형으로 하고, 서열번호 6 및 7의 프라이머 세트를 이용하여 면역성 지질단백질을 코딩하는 유전자의 전체 ORF를 포함하도록 PCR 증폭하는 단계;

ii) 상기 PCR 산물을 포함하는 형질전환체를 제조하여 재조합 면역성 지질단백질을 얻는 단계; 및

iii) 상기 재조합 단백질을 숙주세포와 반응시켜 사이토카인을 생산하는 단계를 포함하는 사이토카인 생산방법.

청구항 19

제18항에 있어서,

형질전환체는 상기 PCR 산물이 삽입되어 있는 도 3에 기재된 개열지도를 갖는 재조합 벡터에 의해 형질전환된 것임을 특징으로 하는 사이토카인 생산방법.

청구항 20

제18항에 있어서,

재조합 단백질이 서열번호 5에 기재된 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 사이토카인 생산방법.

청구항 21

제18항에 있어서,

재조합 단백질을 숙주세포와 반응시키기 전에 지질화시키는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 사이토카인 생산방법.

청구항 22

제21항에 있어서,

지질화는 형질전환체를 [3 H]-팔미트산을 첨가한 배지에서 배양하여 실시하는 것을 특징으로 하는 사이토카인 생

산방법.

청구항 23

제18항에 있어서,

숙주세포가 TLR2(Toll-like Receptor 2)를 포함하는 인체세포인 것을 특징으로 하는 사이토카인 생산방법.

청구항 24

제23항에 있어서,

숙주세포가 인간 말초 혈액 단핵세포(human peripheral mononuclear cell), 단핵구(monocyte) 및 HEK 293 세포(human embryonic kidney 293 cell)로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 사이토카인 생산방법.

청구항 25

제18항에 있어서,

사이토카인이 TNF- α (tumor necrosis factor- α), 인터페론-감마(interferon- γ), 인터루킨-1(interleukin-1, IL-1) 및 IL-6로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는 사이토카인 생산방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 신규한 패혈증 비브리오균 유래의 면역촉진활성을 갖는 지질단백질 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 패혈증 비브리오균의 외막에서 인체세포의 수용체인 TLR2를 매개로 하여 숙주세포에서 면역물질의 생산을 유도하는 신규한 지질단백질을 분리 동정하고, 그 특성을 규명함으로써 패혈증 비브리오균 감염에 따른 패혈증 예방용 백신뿐만 아니라 면역촉진제 개발에 사용할 수 있는 패혈증 비브리오균 외막 유래의 지질단백질 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

<2> 패혈증 비브리오균(*Vibrio vulnificus*)은 일반적으로 하구역에서 발견되는 그람 음성균으로, 압도적인 염증성 사이토카인 반응을 포함하는 전형적인 패혈성 쇼크 경로를 따르는, 오염된 조개의 섭취로 인한 원발성 패혈증(primary septicemia)을 유발하는 병원균이다. 패혈증 비브리오균(*Vibrio vulnificus*)에 의해 유발되는 원발성 패혈증 환자의 50% 이상은 빠른 진행성 쇼크 신드롬(progressive shock syndrome)으로 인해 다장기 기능부전(multiorgan failure)으로 사망하였다. 패혈증 비브리오균(*Vibrio vulnificus*)이 생산하는 세포외 물질, 예를 들어, 용혈성 사이토틀라신(hemolytic cytolysin) 및 엘라스타아제(elastase)는 발병기전(pathogenesis)에 관련된 독성인자 후보물질로서 널리 연구되어 왔다. 표면구조, 예를 들어, 지다당류(lipopolysaccharide, LPS) 및 외막단백질(outer membrane protein) 역시 패혈증 비브리오균(*Vibrio vulnificus*) 독성인자의 후보물질로 연구되었다. 캡슐이 없는 돌연변이 패혈증 비브리오균(*Vibrio vulnificus*)에 의한 약독 마우스 치사(attenuated mouse lethality)에 따르면, 캡슐의 다당류 또한 패혈증 비브리오균(*Vibrio vulnificus*)의 발병기전에 중요하다고 입증되었다. IV형 필린(pilin)은 *pilD* 또는 *pilA* 유전자가 유전적으로 결실되어 패혈증 비브리오균(*Vibrio vulnificus*)의 독성에 관련되는 것으로 확인되었다. 게다가, 패혈증 비브리오균(*Vibrio vulnificus*)의 독성 결정요소로서 이동성(motility)이 발견되었다.

<3> 패혈증 비브리오균(*Vibrio vulnificus*) 병원성의 결정적인 특성 중 하나는 빠르게 진행되는 패혈성 쇼크 신드롬이라는 것이다. 패혈성 쇼크는 보통 미생물 침입에 대한 반응 시 숙주 사이토카인의 과다생산 및 조절부전(dysregulation)으로부터 일어난다. 염증-관련 사이토카인, 예를 들어, TNF- α (tumor necrosis factor- α), 인터페론-감마(interferon- γ), 인터루킨-1(interleukin-1, IL-1) 및 IL-6는 감염에 대한 숙주 면역 반응에서 중추적 역할을 담당한다. LPS, 캡슐 다당류, 펩티도글리칸, 리포아라비노만난(lipoarabinomannans) 및 포린(porin)을 포함하여 다양한 세균성 물질들이 생체내(*in vivo*) 및 시험관내(*in vitro*) 모델 둘 다에서 숙주세포로부터 사이토카인의 방출을 유도하거나 조절하는 것으로 규명되었다. 예를 들어, 임균(*Neisseria gonorrhoea*

e)과 점막상피세포의 초기 상호작용은 IL-6 및 IL-8을 포함하여 염증성 사이토카인의 방출을 유발하여 감염부위에서 다른 면역세포를 보충하고 활성화한다.

- <4> 따라서, 숙주세포와 상호작용 시 패혈증 비브리오균(*Vibrio vulnificus*)의 표면 물질의 관련성이 주장될 수 있다. 즉, 면역세포가 상기 물질을 인식하여 사이토카인 생산을 유도한다는 것이다. 패혈증 비브리오균(*Vibrio vulnificus*)의 표면물질과 면역세포 간의 상호작용은 면역세포에 있는 수용체에 의한 특이 인지에 의해 일어날 것이다. 다양한 숙주세포 수용체들은 세균 또는 그들이 함유하는 성분들의 인지에 관여하여 왔다. 그들 중 하나가 Toll-like receptor(TLR) 패밀리로, 고유의 면역적 방어에 중추적 역할을 담당한다. 사람의 TLR 패밀리는 적어도 10개의 특징적인 수용체들로 나눌 수 있으며, 상기 수용체들은 NF- κ B(Nuclear Factor- κ B), 전염증성 사이토카인의 발현에 관여하는 전사 인자, 케모카인 및 결합분자들을 활성화시키는 다양한 미세성분들에 대한 반응 시 정보를 전달한다. 각각의 TLR에 의해 인식되는 리간드들은 광대한 범주의 병원체들이 공유하는 보존분자 패턴(conserved molecular patterns)을 가지고 있다. 예를 들어, TLR4는 LPS 인식 시 주요 신호전달물질이다. TLR2는 다양한 세균성 화합물, 예를 들어, 세균성 리포단백질, 리포아라비노만난, 리포테코산 및 펩티도글리칸에 대한 반응성을 부여한다.
- <5> 이길수 등의 연구(*FEMS Microbiol Lett.* 2007 (267)121-8)에 따르면, 결핵과 나병에 관련이 있다고 알려진 마이코박테리아(*Mycobacterium tuberculosis*)의 세포외벽의 지질단백질이 인체세포에서 면역반응을 일으키는데 중요한 역할을 한다는 보고를 하였다. George Hajishengallis 등의 연구(*J. Biol. Chem.* 2005 (280)38902-13)에 따르면, 치주염의 원인균으로 알려진 포피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)로부터 밝혀진 단백질 중 하나인 펴브리에(fimbriae)가 TLR2를 통하여 인체 대식세포의 활성화에 기여한다. 이때 펴브리에의 실질적 기능에 관여하는 부분을 정확히 유전자적 지도화(mapping) 즉, 표적화하였다. 또한, Charles E. Cowles 등의 연구(*Mol. Microbiol.* 2004 (54)464-77)에 따르면, 곤충병원세균인 제노랍두스 네마토퍼라(*Xenorhabdus nematophila*)의 지질단백질의 특성 및 특징을 밝혀냄으로써 이 병원균과 곤충 사이에 일어나는 현상에 대한 이해를 돕는다.
- <6> 그러나, 아직까지 패혈증 비브리오균의 외막에서 숙주세포의 면역물질 생산 유도과 관련된 지질단백질은 밝혀진 바 없다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <7> 본 발명의 목적은 패혈증 비브리오균의 외막에서 면역촉진활성을 갖는 지질단백질을 분리 동정하고자 한다.
- <8> 본 발명의 다른 목적은 재조합기술을 이용하여 상기 외막단백질의 재조합 단백질을 제조하여 단백질의 특성을 규명하고자 한다.
- <9> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 단백질을 포함하는 패혈증 예방 용 백신 또는 면역촉진제를 제공하고자 한다.

과제 해결수단

- <10> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- <11> 패혈증 비브리오균(*Vibrio vulnificus*) 유래의 서열목록 서열번호 1에 기재된 염기서열을 갖는 면역성 지질단백질 코딩 유전자를 제공한다.
- <12> 본 발명은 또한 상기 유전자에 의해 코딩되는 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 갖는 면역성 지질단백질을 제공한다.
- <13> 본 발명은 또한 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- <14> 본 발명은 또한 상기 유전자 또는 상기 재조합 벡터에 의해 형질전환된 형질전환체를 제공한다.
- <15> 본 발명은 또한 상기 형질전환체를 배양하여 면역성 지질단백질을 제조하는 방법을 제공한다.
- <16> 본 발명은 또한 본 발명의 단백질에 특이적으로 결합하는 다클론성 항체를 제공한다.
- <17> 본 발명은 또한 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 갖는 패혈증 비브리오균(*Vibrio vulnificus*) 유래의 면역성 지질단백질, 또는 서열번호 1에 기재된 염기서열을 갖는 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포

합하는 패혈증 예방용 백신 조성물, 또는 면역증강용 약학적 조성물을 제공한다.

<18> 본 발명은 또한

<19> i) 패혈증 비브리오균(*Vibrio vulnificus*)의 게놈 DNA를 주형으로 하고, 서열번호 6 및 7의 프라이머 세트를 이용하여 면역성 지질단백질을 코딩하는 유전자의 전체 ORF를 포함하도록 PCR 증폭하는 단계;

<20> ii) 상기 PCR 산물을 포함하는 형질전환체를 제조하여 재조합 면역성 지질단백질을 얻는 단계; 및

<21> iii) 상기 재조합 단백질을 숙주세포와 반응시켜 사이토카인을 생산하는 단계를 포함하는 사이토카인 생산방법을 제공한다.

효 과

<22> 본 발명의 패혈증 비브리오균의 외막에서 분리한 신규한 지질단백질은 인체세포의 표면에 존재하는 수용체인 TLR2를 매개로 하여 인체세포에서 사이토카인의 분비를 유도함을 확인함으로써 패혈증 비브리오균의 감염에 따른 패혈증 예방을 위한 백신뿐만 아니라 면역촉진제 개발에도 사용할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<23> 이하, 본 발명의 구성을 상세하게 설명한다.

<24> 본 발명은 패혈증 비브리오균(*Vibrio vulnificus*) 유래의 서열목록 서열번호 1에 기재된 염기서열을 갖는 면역성 지질단백질 코딩 유전자에 관한 것이다.

<25> 상기 유전자는 통상의 유전자 분리 동정방법에 따라 분리·동정 되므로 특별히 제한하지는 않으나, 다음의 방법에 따라 분리하는 것이 바람직하다.

<26> 패혈증 비브리오균(*V. vulnificus*)의 cDNA 라이브러리로부터 얻은 클론을 외막단백질에 특이적인 항체와 반응시켜 상기 항체에 반응하는 단백질을 발현하는 클론을 분리한다. 표면항원을 발현하는 플라스미드를 선별하고, 플라스미드 내 인서트 DNA를 파지미드에 도입하고, 시퀀싱을 통해 파지미드의 인서트를 동정한다. 상기 파지미드를 포함하는 형질전환체의 파쇄물과 항-외막 혈청을 반응시켜 약 30 kDa 크기의 면역반응성 밴드를 확인하고, 이 면역반응성 단백질의 크기와 인서트 내 단백질 코딩 서열과 비교하여 이 단백질을 코딩하는 오픈 리딩 프레임(Open Reading Frame, ORF) 서열을 확인한다.

<27> 본 발명자들은 상기 유전자의 뉴클레오타이드 서열을 GenBank database에 등록번호 DQ177330로 등록하였다.

<28> 본 발명은 또한 상기 유전자에 의해 코딩되는 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 갖는 면역성 지질단백질에 관한 것이다.

<29> 본 발명의 단백질은 약 30kDa의 분자량을 가지며, 비브리오 콜레라에(*V. cholerae*), 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*), 대장균(*E. coli*), 및 헤모필러스 인플루엔자에(*Haemophilus influenzae*)의 지질단백질에 대해 각각 84%, 68%, 53%, 및 59%의 동일성(identity)을 갖는다. 따라서, 본 발명자들은 이 단백질을 IlpA(immunogenic lipoprotein A)로 명명하였다.

<30> 상기 단백질의 N-말단부에는 지질화를 위한 컨센서스 리포박스 시퀀스인 Leu-Ala-Gly-Cys(서열번호 3)을 포함하고 있음을 특징으로 한다. 상기 서열로 인해 본 발명의 단백질은 지질화될 수 있으며, 지질화된 본 발명의 단백질은 숙주세포의 사이토카인 생성을 촉진한다.

<31> 상기 단백질은 숙주세포와 반응하여 사이토카인, 예를 들어, TNF- α (tumor necrosis factor- α), 인터페론- γ (interferon- γ), 인터루킨-1(interleukin-1, IL-1), 또는 IL-6 등의 생성을 촉진하는 특징이 있다.

<32> 상기 단백질은 숙주세포 특히 TLR2(Toll-like Receptor 2)를 포함하는 인체세포, 예를 들어, 인간 말초 혈액 단핵세포(human peripheral mononuclear cell), 단핵구(monocyte), 또는 HEK 293 세포(human embryonic kidney 293 cell)의 사이토카인 생성을 촉진한다.

<33> 본 발명은 또한 면역성 지질단백질을 코딩하는 본 발명의 유전자를 포함하는 재조합 벡터에 관한 것이다.

<34> 본 발명에서 "재조합 벡터"란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다.

<35> 상기 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한

되지 않는다. 적합한 발현 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며, 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한, 발현벡터는 벡터를 함유하는 숙주세포를 선택하기 위한 선택마커를 포함하고, 복제가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함한다.

<36> 본 발명의 재조합 벡터는 바람직하게는 일반적인 대장균 균주 발현용 벡터에 상기 서열번호 2로 기재되는 단백질을 코딩하는 핵산을 삽입함으로써 제조될 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 대장균 발현용 벡터로 pET28b를 사용하였지만 반드시 이에 한정되는 것은 아니며, 일반적으로 사용할 수 있는 모든 대장균주 발현용 벡터가 제한없이 사용될 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 대장균 균주 발현용 벡터인 pET28b 벡터를 사용하여 본 발명의 *ilpA* 유전자를 포함하는 DNA 절편을 삽입하여 재조합 벡터를 제조하였으며, 이를 "pETilpA"라 명명하였다(도 3 참조).

<37> 본 발명은 또한 면역성 지질단백질을 코딩하는 본 발명의 유전자 또는 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터에 의해 형질전환된 형질전환체에 관한 것이다.

<38> 형질전환은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이런 방법에는 전기충격유전자전달법(electroporation), 원형질 융합, 인산 칼슘(CaPO_4) 침전, 염화 칼슘(CaCl_2) 침전, 실리콘 카바이드 섬유 이용한 교반, 아그로박테리아 매개된 형질전환, PEG, 텍스트란 설페이트, 리포펙타민 등이 포함되나 이로 제한되지 않는다.

<39> 또한, 숙주세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 목적에 가장 적합한 숙주세포를 선택하여 사용하면 된다.

<40> 숙주세포로는 대장균(*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 또는 스태필로코쿠스(*Staphylococcus*)와 같은 원핵 숙주 세포가 있으나 이로 제한되는 것은 아니다. 또한, 진균(예를 들어, 아스페르길러스(*Aspergillus*)), 효모(예를 들어, 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세르비시애(*Saccharomyces cerevisiae*), 쉬조사카로마세스(*Schizosaccharomyces*), 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*)) 등과 같은 하등 진핵 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 포유동물 등을 포함하는 고등 진핵생물 유래의 세포를 숙주세포로 사용할 수 있다.

<41> 상기 형질전환체는 상기 재조합 벡터를 임의의 숙주세포에 도입시킴으로써 용이하게 제조될 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 재조합 벡터 pETilpA를 대장균 균주 BL21(DE3)에 도입하여 형질전환체를 제조하였다.

<42> 본 발명은 또한 본 발명의 유전자 또는 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터에 의해 형질전환된 형질전환체를 배양하여 면역성 지질단백질을 제조하는 방법에 관한 것이다.

<43> 상기 면역성 지질단백질은 통상의 배양방법에 따라 형질전환체를 배양하여 정제하는 것이 바람직하다.

<44> 상기 면역성 지질단백질은 재조합 벡터에 도입되는 인서트 즉, 코딩 유전자의 염기서열에 따라 사이토킨 생성능에 영향을 주지 않을 정도로 아미노산 서열의 일부에 얼마든지 변형이 있을 수 있다. 상기 변형은 결실, 삽입 또는 치환에 의한 변형을 의미한다. 바람직하게는, 서열번호 2 또는 5에 기재된 아미노산 서열을 갖는 것이 좋다.

<45> 본 발명은 또한 본 발명의 단백질에 특이적으로 결합하는 다클론성 항체에 관한 것이다.

<46> 상기 다클론성 항체의 제조방법은 특별히 제한하지는 않으나, 다음의 방법에 따라 제조하는 것이 바람직하다. 본 발명의 면역성 지질단백질을 SPF(specific pathogen free)동물에 1 내지 수회 주사하여 면역화시킨다. 최종 면역 후 일정 시간이 지난 뒤에 전혈하여 혈청만 취해 본 발명의 단백질에 대한 다클론성 항체를 얻는다.

<47> 상기 면역화 동물은 통상 면역화에 사용되는 동물이면 특별히 제한하지 않으나, 랫트인 것이 바람직하다.

<48> 상기 면역화를 위한 주사 횟수, 기간 및 투여방법은 당업자 수준에서 변형 또는 변경가능하므로 특별히 제한하지 않는다.

<49> 본 발명은 또한 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 갖는 패혈증 비브리오균(*Vibrio vulnificus*) 유래의 면역성 지질단백질, 또는 서열번호 1에 기재된 염기서열을 갖는 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포

합하는 패혈증 예방용 백신 조성물, 또는 면역증강용 약학적 조성물에 관한 것이다.

- <50> 상기 면역성 지질단백질 코딩 유전자는 발현 벡터에 삽입되어 있는 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는, 도 3의 개열지도를 갖는 pETilpA 인 것이 좋다.
- <51> 상기 패혈증은 패혈증 비브리오균(*Vibrio vulnificus*)의 감염에 의해 유발된 것임을 특징으로 한다.
- <52> 또한, 상기 백신 또는 면역증강용 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체 또는 아쥘반트를 추가로 포함할 수 있다.
- <53> 상기 약학적으로 허용되는 담체는 면역원의 보관 및 환자에 대한 면역원의 투여를 용이하게 한다. 약학적으로 허용되는 담체는 완충액, 주사용 멸균수, 일반 식염수 또는 인산염 완충 식염수, 슈크로스, 히스티딘, 염 및 폴리솔베이트 등과 같은 여러 성분을 함유할 수 있다.
- <54> 본 발명에서 "아쥘반트"는 면역 반응 형성에서 면역원을 보조할 수 있는 물질로, 항원의 생물학적 또는 면역학적 반감기 증가; 항원 제공 서열로의 항원 전달 개선; 항원 제공 세포에 의한 항원 프로세싱 및 제공의 개선; 및 면역조절성 사이토카인의 생산 유도를 포함하는 하나 이상의 기작과 같은 여러 기작을 통해 작용할 수 있다.
- <55> 상기 아쥘반트로 수산화알루미늄, 인산알루미늄 또는 기타 다른 알루미늄 염, 인산칼슘, DNA CpG 모티프, 모노포스포릴 지질 A, 콜레라 독소, 대장균 열불활화 독소, 백일해 독소, 뮤라밀 디캡타이드, 프로인트 불완전 아쥘반트, MF59, SAF, 면역자극성 복합체, 리포솜, 생체분해성 미소구, 사포닌, 비이온성 블록 공중합체, 뮤라밀 펩타이드 유사체, 폴리포스파젠, 합성 폴리뉴클레오타이드, IFN- γ , IL-2, IL-12, 또는 ISCOMS 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다.
- <56> 또한, 본 발명의 면역성 지질단백질 또는 코딩 유전자를 유효성분으로 함유하고, 아쥘반트 또는 약학적으로 허용가능한 담체를 첨가한 약학적 조성물은 주사 형태로 투여할 수 있다. 주사용 조성물은 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하고, 상기 조성물은 멸균되고/되거나 보조제(예를 들면, 방부제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제 용액 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제)를 함유한다. 또한, 이들은 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있다.
- <57> 상기 약학적 조성물의 투여량은 환자의 연령, 체중 및 질환의 정도에 따라 차이가 있으나, 통상 성인(체중 60kg 기준)의 경우 비경구로 1일 1회 20~52mg으로 투여하는 것이 바람직하며, 본 발명의 분야에서 통상의 지식을 가진 자의 경험에 의하여 적절히 결정될 수도 있다.
- <58> 본 발명은 또한
- <59> i) 패혈증 비브리오균(*Vibrio vulnificus*)의 게놈 DNA를 주형으로 하고, 서열번호 6 및 7의 프라이머 세트를 이용하여 면역성 지질단백질을 코딩하는 유전자의 전체 ORF를 포함하도록 PCR 증폭하는 단계;
- <60> ii) 상기 PCR 산물을 포함하는 형질전환체를 제조하여 재조합 면역성 지질단백질을 얻는 단계; 및
- <61> iii) 상기 재조합 단백질을 숙주세포와 반응시켜 사이토카인을 생산하는 단계를 포함하는 사이토카인 생산방법에 관한 것이다.
- <62> 상기 i) 단계는 PCR을 이용하여 본 발명의 면역성 지질단백질 코딩 유전자의 전체 ORF를 포함하는 DNA 단편을 증폭하는 단계이다.
- <63> 상기 DNA 단편은 발현 벡터로의 삽입을 용이하게 하기 위해 서열 일부가 변형될 수 있다. 상기 변형은 제한효소 절단부위를 포함하도록 프라이머 세트를 디자인하여 PCR 증폭과정을 통해 일어나며, 삽입과정에서 일부 서열이 결실될 수도 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 프라이머 세트는 바람직하게는 서열번호 6(*NcoI*: ccatgg를 포함하도록 고안됨) 및 7(*HindIII*: aagctt를 포함하도록 고안됨)에 기재된 것이 좋으나, 발현 벡터의 종류에 따라 프라이머 서열은 얼마든지 변형가능하여 특별히 제한하지는 않는다. 상기 PCR 증폭 결과로 얻은 본 발명의 면역성 지질단백질 코딩 유전자의 전체 ORF는 서열번호 4에 기재된 염기서열을 갖게 된다.
- <64> 상기 ii) 단계는 PCR 산물을 포함하는 형질전환체를 제조하여 재조합 면역성 지질단백질을 얻는 단계이다.
- <65> 상기 형질전환체는 PCR 산물을 대장균 균주 발현용 벡터에 삽입하여 제조한 재조합 벡터 pETilpA를 대장균 균주 BL21(DE3)에 도입하여 제조하는 것이 바람직하다.
- <66> 상기 형질전환체로부터 얻는 재조합 단백질은 일부가 변형된 아미노산 서열을 가질 수 있다. 바람직하게는, 서

열번호 5에 기재된 아미노산 서열을 갖는다.

- <67> 또한, 상기 재조합 단백질은 숙주세포에서 사이토카인의 생산을 촉진하기 위해 지질화 단계를 추가로 거칠 수 있다.
- <68> 상기 지질화는 형질전환체를 배양하여 재조합 단백질을 과다발현시키는 과정에서 상기 형질전환체를 중간 지수기($OD_{600} = 0.6 \sim 0.8$)까지 배양하고, 배지에 $[^3H]$ -팔미트산을 첨가하여 추가로 배양하여 *in vivo* labeling을 실시함으로써 이루어진다.
- <69> 상기 팔미트산의 함량과 첨가 후 추가 배양시간은 형질전환 미생물의 종류, 배양조건 등에 따라 당업자의 수준에서 얼마든지 변형이 가능하므로 특별히 제한하지는 않는다.
- <70> 상기 iii) 단계는 재조합 단백질을 숙주세포와 반응시켜 사이토카인을 생산하는 단계이다.
- <71> 상기 숙주세포는 TLR2(Toll-like Receptor 2)를 포함하는 인체세포라면 특별히 제한하지는 않으며, 인간 말초 혈액 단핵세포(human peripheral mononuclear cell), 단핵구(monocyte), 또는 HEK 293 세포(human embryonic kidney 293 cell) 등을 사용할 수 있다.
- <72> 또한, 상기 재조합 단백질과 숙주세포의 반응으로 생성되는 사이토카인으로는 TNF- α (tumor necrosis factor- α), 인터페론-감마(interferon- γ), 인터루킨-1(interleukin-1, IL-1), 또는 IL-6 등이 있다.
- <73> 이하 실시예에서 표시한 실험결과는 최소 3회 독립실험을 통해 평균 \pm 표준편차 값을 나타낸 것이다. 상기 결과의 통계적 유의성을 평가하기 위해 스튜던트 t-테스트(SYSTAT program, SigmaPlot version 9; Systat Software Inc.)를 사용하였다.
- <74> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.
- <75> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- <76> <실시예 1> 면역적 스크리닝을 이용하여 패혈증 비브리오균(*Vibrio vulnificus*)에서 외막단백질의 분리 및 동정
- <77> 패혈증 비브리오균(*V. vulnificus*) ATCC 29307 균주를 테트라사이클린($2\mu\text{g/mL}$)을 첨가한 LBS 브로스[1% (w/v) 트립톤, 0.5% (w/v) 효모 추출물, 2% (w/v) NaCl, pH 7.5]에서 30℃의 온도 조건에서 배양하여 외막단백질(Outer membrane proteins, OMPs)을 준비하고, Lee, J.H. 등의 방법(2004. *Infect. Immun.* 72, 4905-4910)에 따른 토끼의 정맥내 면역화에 사용하였다. 상기로부터 생성된 외막단백질에 특이적인 다클론성 항체들은 면역적 스크리닝 실험에 사용하였다.
- <78> 패혈증 비브리오균(*V. vulnificus*) 발현 라이브러리는 제한효소 *Sau3AI*를 이용하여 게놈 DNA를 부분적으로 절단하여 λ ZAP[®] II 벡터(스트라타진)에 클로닝하여 구축하였다. 재조합 파지 DNA를 스트라타진 제조업체 설명서의 지시에 따라 Gigapack Gold를 이용하여 인 비트로(*in vitro*)에서 패키징하였다. 일차적으로 증폭된 라이브러리(타이터: 9×10^6 plaque forming units/mL)로부터 얻은 약 3만 개의 플라그를 스크리닝하여, 패혈증 비브리오균 외막에 대한 토끼 항체(1:2,000의 희석비율)와 반응하는 단백질을 발현하는 클론을 분리하였다. 추가로 2차, 3차 스크리닝하여 필터에 결합한 배경 정도의 항체와는 구별되는 플라그를 정제하였다. 표면항원을 발현하는 12개의 후보 플라그들을 분리하고, 분리한 플라그 내 인서트 DNA를 제조업체(스트라타진)의 설명서에 따라 pBK-CMV phagemid에 삽입하였다. 파지미드 인서트의 동정은 이중 가닥 플라스미드의 자동 시퀀싱을 통해 확인하였다.
- <79> 도 1a에 나타난 바와 같이, 분리한 12개 클론 중 3개, 즉 pEX3, pEX19 및 pEX21에는 동일한 3.66 kb DNA 단편이 있었다. pEX3의 DNA 인서트는 ABC 퍼미아제, 예상 지질단백질, 가상 단백질(hypothetical protein), SecY-인터랙팅 단백질(SecY-interacting protein, Syd)을 코딩하는 4개의 전체 ORF, 및 다른 가상 단백질을 코딩하는 일부 ORF를 포함하고 있는 것으로 나타났다.
- <80> 어느 유전자 산물이 항-외막 혈청과의 면역 반응에 관여하는지 시험하기 위해, pEX3를 포함하는 대장균(*E. coli*) XL0LR의 파쇄물에 대해 항-외막 혈청을 이용하여 웨스턴 블랏 분석을 실시하였다. 대조군으로, 어떠한 종류의 플라스미드도 포함하지 않는 대장균(*E. coli*) XL0LR 파쇄물을 상기와 같은 혈청과 반응시켰다.
- <81> 도 1b에 나타난 바와 같이, pEX3를 포함하는 대장균(*E. coli*) XL0LR의 파쇄물에서만 약 30 kDa의 강력한 면역반

응성 밴드가 검출되었다. 이 면역반응성 단백질의 분자량, 약 30 kDa은 pEX3에서 두 번째 ORF에 의해 코딩되는, 지질단백질을 코딩하는 시험 단백질과 동일한 크기이다. 따라서, 상기 예상 지질단백질은 면역적 스크리닝 분석에서 발견되는 패혈증 비브리오균의 항원분자일 것으로 추정된다.

- <82> 상기 예상 지질단백질에 대한 블라스트 검색 결과, 다른 병원성 그람-음성균에서 발견되는 몇몇 단백질들과 상동성을 나타냈다(도 2). 상기 패혈증 비브리오균의 추정된 아미노산 서열(GenBank accession no. DQ_177330)은 비브리오 콜레라에(*V. cholerae*, GenBank accession no. NP_230552), 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*, GenBank accession no. NP_459249), 대장균(*E. coli*, GenBank accession no. YP_859264), 및 헤모필러스 인플루엔자에(*Haemophilus influenzae*, GenBank accession no. P_317282)에 대해 각각 84%, 68%, 53% 및 59%의 동일성(identity)을 갖는다. 이들 단백질 중 어느 것도 아직까지 그들의 기능적 역할에 대해서는 보고된 바 없다. 그러나, 5개 단백질에는 보존된 시그널 시퀀스 및 지질화에 필요한 것으로 알려진 시스테인 잔기가 있다.
- <83> 따라서, 본 발명자들은 이 단백질을 IlpA(immunogenic lipoprotein A)로 명명하고, GenBank database에 등록번호 DQ177330로 등록하였다.
- <84> <실시예 2> 재조합 IlpA 단백질의 제조 및 지질화 측정
- <85> 상기 염기서열로부터 추정되는 아미노산 서열은 N-말단에 지질 변형을 위한 컨센서스 리포박스 시퀀스, 즉 Leu-Ala-Gly(Ala)-Cys을 포함하고 있다. 대장균에서 재조합 rIlpA 단백질 발현 시스템을 이용하여, IlpA 단백질이 그것의 아미노산 서열이 암시하는 것처럼 지질화에 따라 변형될 것인지를 조사하였다.
- <86> 이를 위해, 재조합 rIlpA 단백질은 발현 벡터 pET28b 및 재조합 벡터 pETilpA를 이용하여 카르복시-말단에 히스티딘 태그가 붙어있는 대장균(*E. coli*) BL21(DE3)에서 발현시켰다. 이때, 재조합 단백질의 발현은 IPTG에 의해 유도된다. 대조군으로, 재조합 rIlpA 단백질의 발현이 IPTG에 의해 유도되지 않는 대장균(*E. coli*) DH5α를 사용하였다.
- <87> 구체적으로 설명하면, 2 종류의 올리고뉴클레오타이드, lipo-F (서열번호 6: 5'-CATGCCATGGCTATGAAATTTAGCCTTAAAGG-3'; 밑줄 부분은 *NcoI* 제한효소 부위를 나타낸다) 및 lipo-R (서열번호 7: 5'-CCCAGCTTCCAGCCTTTTACTACGCC-3'; 밑줄 부분은 *HindIII* 제한효소 부위를 나타낸다)를 사용하여, 패혈증 비브리오균의 게놈 DNA로부터 *ilpA* 유전자의 전체 ORF를 포함하는 810 bp DNA 단편을 증폭하였다.
- <88> 상기로부터 얻은 *ilpA* DNA의 양쪽 말단에 위치한 *NcoI* 및 *HindIII* 사이트를 이용하여, 상기 DNA를 pET28b 발현 벡터(노바젠)에 클로닝하여 재조합 벡터 pETilpA를 제조하였다(도 3). 상기 재조합 벡터 pETilpA를 대장균(*E. coli*) BL21 (DE3)에 형질전환시킨 다음, 카나마이신이 포함된 LB(1% (w/v) 트립톤, 0.5% (w/v) 효모 추출물, 1% (w/v) NaCl, pH 7.5) 배지에서 37°C의 온도로 OD₆₀₀=0.7까지 배양하였다. 그 후 1.0mM의 IPTG를 넣어준 후 3시간을 더 배양하였다. 배양한 세포를 수거하고, 10mM의 이미다졸이 포함된 라이시스 버퍼에 용해시킨 후, 충분히 초음파분해(sonication)한다. 다음으로 고속으로 원심분리하여 얻은 상등액을 0.22μm의 포어 사이즈(pore size)를 가진 필터에 통과시켰다. 상기로부터 준비된 시료를 제조업체(Qiagen)의 설명서에 따라 Ni⁺-nitrilotriacetic acid affinity column을 이용하여 Ni⁺-NTA 레진에 결합시킨 다음 이미다졸의 농도를 변화시켜 정제하였다.
- <89> 또한, 프라이머 세트, mlipo-F (서열번호 8: 5'-CATGCCATGGATGGGCGAAAAAGCGACTGAC-3'; 밑줄 부분은 *NcoI* 제한효소 부위를 나타낸다) 및 lipoR(서열번호 7)를 이용하여, 지질화를 위한 컨센서스 시퀀스(consensus sequence)를 포함하는 DNA 단편의 5' 말단(69 bp)이 결실되어 있는 *ilpA* 결실 유전자를 제조하였다. 상기과 같은 방법으로 741 bp의 *ilpA'* DNA 단편을 pET28b에 클로닝하였다. 결실된 재조합 rIlpA 단백질은 pETilpA가 탑재된 대장균(*E. coli*) BL21 (DE3)에서 과발현시키고, 전체 재조합 rIlpA 단백질과 같은 방법으로 분리정제하였다.
- <90> 또한, 4개의 다른 대장균 균주들, pET28b를 포함하는 DH5α, pET28b를 포함하는 BL21(DE3), pETilpA를 포함하는 DH5α 및 pETilpA를 포함하는 BL21(DE3)을 [³H]-팔미트산 하에서 배양하고, 방사성 표지된 단백질의 존재 여부를 실험하였다. 특히, 4개 균주 중 2개의 균주, pETilpA를 포함하는 DH5α 및 pETilpA를 포함하는 BL21(DE3)은 1mM IPTG를 넣거나 그렇지 않은 상태에서 배양하고, IPTG-유도 단백질이 [³H]-팔미트산으로 표지되는 지를 실험하기 위해 나란히 비교하였다.
- <91> 지질화를 위한 [³H]-팔미트산을 이용한 재조합 rIlpA 단백질의 *in vivo* labeling은 Theisen, M. 등의 방법

(1992) *Infect. Immun.* 60, 826-831)에 따라 실시하였다. 간단히 말해, pET28b가 탑재된 대장균(*E. coli*) DH5 α, pETilpA가 탑재된 대장균(*E. coli*) DH5 α, pET28b가 탑재된 대장균(*E. coli*) BL21(DE3), 및 pETilpA가 탑재된 대장균(*E. coli*) BL21(DE3) 균주들을 중간 지수기(OD₆₀₀= 0.6~0.8)까지 배양하고, IPTG를 넣거나 넣지 않은 채로 50 μCi [³H]-팔미트산(애머샴)을 첨가하여 12시간 동안 배양하였다. 10% 트리클로로아세트산(w/v)을 첨가하여 표지화를 중단시킨 다음, 표지된 세균 세포를 10분 동안 끓인 보일링 버퍼(boiling buffer)[2%(w/v) SDS, 50mM Tris-Cl, pH8.0]에서 재현탁하고 나서, 소니케이션하여 세포를 분쇄하였다. 다음으로, 지질화에 따라 변형된 단백질들은 세제(detergent)에 용해되는 특성을 가지고 있기 때문에, 각 배양액의 파쇄물들은 트리톤 X-114에서의 용해도에 따라 수용성 분획, 세제 분획 및 펠렛 분획으로 나누었다. 즉, 37℃에서 5% 트리톤 X-114를 첨가하여 세균 추출물을 수용층과 용매(세제)층으로 상분리하였다. 펠렛 분획은 방사성-면역침전용 완충액[1%(v/v) 노니벳 P-40, 0.5%(w/v) 디옥시콜산, 0.1%(w/v) SDS, 50mM Tris-Cl, pH8.0]으로 3번 세척한 다음, SDS-폴리아크릴아미드 젤 일렉트로포레시스(PAGE)용 샘플 버퍼로 재현탁하였다. 각 분획별로 1μg을 10%(w/v) SDS-PAGE에 로딩하고, PVDF 멤브레인에 트랜스퍼하였다. 상기 멤브레인에 증폭 용액(Amplify solution, 애머샴)을 처리하고, -70℃에서 preflashed Hyperfilm-MP (애머샴)에 2주 동안 노출시켰다. 도 4에서 A는 수용층(aqueous phase), D는 세제층(detergent phase), P는 펠렛(pellet)을 나타낸다.

- <92> 도 4에 나타난 바와 같이, 약 30 kDa 크기의 [³H]-팔미트산으로 표지된 단백질은 IPTG 하에서 배양된 pETilpA를 포함하는 대장균 BL21 (DE3)의 파쇄물에서만 검출되었다.
- <93> 이는 재조합 rIlpA 단백질이 아미노산 서열에서 제시하고 있는 것처럼 지질화된다는 것을 의미한다. 또한, 재조합 rIlpA 단백질의 지질 함유 특성은 pETilpA를 포함하는 IPTG-유도 대장균 BL21(DE3) 세균의 용매(세제)층에서 가장 강력한 방사능을 관찰함으로써 확인하였다.
- <94> <실시예 3> 패혈증 비브리오균의 IlpA 단백질의 기능 조사
- <95> 패혈증 비브리오균에서 상기 단백질의 기능적 역할을 실험하기 위해 야생형 패혈증 비브리오균 ATCC 29307에서 *ilpA* 유전자를 결실시킨 돌연변이 패혈증 비브리오균을 구축하였다. Nick-out 돌연변이를 구축하기 위해 2개의 프라이머 세트를 사용하였다. 즉, 첫 번째 프라이머 세트는 *ilpA* 유전자의 업스트림 영역(*ilpA*-upF 및 *ilpA*-upR)에 특이적이고, 두 번째 프라이머 세트는 다운스트림 영역(*ilpA*-downF 및 *ilpA*-downR)에 특이적이다(도 1a).
- <96> 구체적으로 설명하면, 패혈증 비브리오균(*V. vulnificus*) ATCC 29307의 게놈 DNA로부터 프라이머 세트, 즉 *ilpA*-upF (서열번호 9: 5'-GTCCGAGCTCGCGGAGTGAAGTTTGGC-3'; 밑줄 부분은 *SacI* 제한효소 부위를 나타낸다) 및 *ilpA*-upR (서열번호 10: 5'-GCGAGGATCCAGTAAATCTCCTTATTATTTTGAC-3'; 밑줄 부분은 *BamHI* 제한효소 부위를 나타낸다)를 이용하여 *ilpA*의 ORF의 업스트림 부분의 840 bp를 증폭하였다.
- <97> 다음으로, PCR 산물을 pBluescript SKII(+)에 클로닝하여 pYS1를 제조하였다. 프라이머 세트, 즉 *ilpA*-downF (서열번호 11: 5'-GGACGGATCCCAAGGCGCGTAGTAAAAG-3'; 밑줄 부분을 *BamHI* 제한효소 부위를 나타낸다) 및 *ilpA*-downR (서열번호 12: 5'-CTGGGGTACCGATTGGGCACTTCTCAGCG-3'; 밑줄 부분은 *KpnI* 제한효소 부위를 나타낸다)를 이용하여 *ilpA* ORF의 다운스트림 쪽 1,010 bp를 포함하는 DNA 단편을 생성하였다.
- <98> 상기 DNA 단편을 pYS1의 해당 사이트에 클로닝하여 pYS2를 제조하였다. 제한효소 *SacI* 및 *KpnI*를 이용하여 절단된 pYS2로부터 약 1.85 kb의 DNA를 얻고, 자살벡터(suicide vector) pDM4(Milton, D. L. et al. (1992) *J. Bacteriol.* 174, 7235-7244)와 라이게이션시켜 pYS3를 제조하였다.
- <99> pYS3이 탑재된 대장균(*E. coli*) SM10 λpir 균주를 패혈증 비브리오균(*V. vulnificus*) ATCC 29307과 접합시키고 나서, 클로람페니콜을 첨가한 티오설파이트 시트레이트 바일 수크로오스(thiosulfate citrate bile sucrose (TCBS) 배지에서 접합전달체(exconjugants)를 선별하였다.
- <100> 다음으로, 이중 상동성 재조합 이벤트(5% 수크로오스에 대한 내성 및 클로람페니콜 감수성)를 나타내는 특성을 가진 콜로니들은 프라이머 세트(*ilpA*-upF(서열번호 9) 및 *ilpA*-downR(서열번호 12))를 이용하여 PCR에 따라 확인하고, YS101로 명명하였다.
- <101> 또한, 다음의 프라이머 세트를 이용한 PCR을 통해 야생형 패혈증 비브리오균(*V. vulnificus*) ATCC 29307의 게놈 DNA로부터 *ilpA* 전체 유전자를 증폭하였다: *ilpA*-comF (서열번호 13: 5'-GGTTGGATCCATTGGTGAGCT-3'; 밑줄 부분은 *BamHI* 제한효소 부위를 나타낸다) 및 *ilpA*-comR (서열번호 14: 5'-TATCAAGCTTCTCTTGGGATCATTGAAA-3'; 밑줄

부분은 *Hind*III 제한효소 부위를 나타낸다).

- <102> 증폭된 *ilpA* DNA 단편 1,159 bps는 제한효소 *Bam*HI 및 *Hind*III를 이용하여 절단하고, 플라스미드 pLAFR5(Keen, N. T. *et al.* (1988) *Gene* 70, 191-197)에 클로닝하여, pLAFR5의 lac 프로모터의 다운스트림 쪽에 *ilpA* ORF가 위치하게 하였다. 도 5a에서 레인 1은 DNA 사이즈 마커(*Hind*III-digested λ phage DNA), 레인 2는 야생형 균주의 PCR 산물, 레인 3은 돌연변이 균주의 PCR 산물, 레인 4는 DNA 사이즈 마커(100 bp 래더)를 나타낸 것이다.
- <103> 도 5a에 나타난 바와 같이, 결과적으로 생긴 돌연변이 YS101는 *ilpA* 유전자의 전체 ORF가 없었다. 돌연변이 패혈증 비브리오균의 염색체에서 *ilpA* 유전자의 결실은 *ilpA*-upF 및 *ilpA*-downR 프라이머 세트를 이용한 PCR을 통해 확인하였다. *ilpA* 유전자 돌연변이 패혈증 비브리오균의 최종 PCR 산물은 1,855 bp인 반면, 원래의 *ilpA* 유전자를 갖는 야생형 패혈증 비브리오균은 보다 큰 2,665 bp의 PCR 산물을 생성하였다.
- <104> 또한, 재조합 rIlpA 단백질에 대한 다클론성 항체를 이용한 웨스턴 블랏 분석을 통해 야생형 및 Δ ilpA 돌연변이 패혈증 비브리오균에서 IlpA 단백질의 세포 내 수준을 실험하였다.
- <105> 이를 위해, 정제된 재조합 rIlpA 단백질(100 μ g)과 0.5mL의 complete Freund's adjuvant(시그마)를 혼합하고, 특이 비병원성 랫트(CrjBgi:CD[SD]IGS, 7 주령된 암컷)에 복강내 주사하였다.
- <106> 또한, 상기와 동량의 재조합 rIlpA 단백질을 incomplete Freund's adjuvant(시그마)와 혼합하여 1차 면역 후 2주, 4주째에 2차 면역화하였다. 3차 면역화 후 1주째에, 면역화된 랫트에서 혈청을 얻고 웨스턴 블랏 분석을 하였다.
- <107> 라이시스 버퍼[50mM Tris-HCl, pH 6.8, 100mM 디티오쓰레이톨, 2%(w/v) SDS, 0.1%(w/v) 브로모페놀 블루, 및 20%(v/v) 글리세롤]에서 패혈증 비브리오균 야생형 ATCC 29307, YS101 및 pLAFRilpA를 포함하는 YS101의 파쇄물을 준비하고, 10%(w/v) SDS-PAGE에서 분리하고, 니트로셀룰로오스 멤브레인(밀리포어)로 트랜스퍼하였다. IlpA 항혈청(1:20,000)을 포함하는 블로킹 용액[5%(w/v) 스킴밀크 및 0.05%(v/v) 트윈 20을 포함한 PBS]에서 상기 멤브레인을 인큐베이션하고, 0.1%(v/v) 트윈 20을 포함하는 PBS로 3회 세척하고, 알칼라인 포스파타아제-컨쥬게이트드 항-랫트 이뮤노글로불린 G를 넣고 함께 배양하였다. 니트로블루 테트라졸리움 및 5-브로모-4-클로로-3-인돌일 포스페이트 시스템(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate system, 프로메가)를 이용하여 면역반응성 밴드를 시각화하였다. 도 5b에서 레인 1은 야생형 균주 파쇄물, 레인 2는 돌연변이 균주 파쇄물, 레인 3은 pLAFR5에 탑재된 원래의 *ilpA* 유전자를 포함하는 돌연변이 균주에 대한 결과를 나타낸 것이다.
- <108> 도 5b에 나타난 바와 같이, 약 30 kDa의 강력한 면역반응성 밴드는 야생형 파쇄물에서만 검출되었다. 또한, 패혈증 비브리오균의 원래의 *ilpA* 유전자를 pLAFR5에 클로닝하여 제조한 pLAFRilpA를 포함하는 Δ ilpA 돌연변이 패혈증 비브리오균은 면역반응성 단백질을 형성함을 확인하였다.
- <109> <실시예 4> 패혈증 비브리오균의 IlpA 단백질에 의해 유도된 인간 말초혈액단핵세포(PBMCs)에서 사이토카인 생성 조사
- <110> 패혈증 비브리오균의 IlpA 단백질이 인체세포에서 사이토카인 생성을 유도하기 위한 면역촉진제로 작용하는지를 실험하기 위해 패혈증 비브리오균 발현 라이브러리의 면역적 스크리닝으로부터 *ilpA* 함유 클론들과 항-외막 혈청을 반복 분리하였다. 그리하여, Δ ilpA 돌연변이 YS101를 이용하여 IlpA 단백질이 없는 패혈증 비브리오균 파쇄물을 제조하고, 사이토카인 생산을 유도할 수 있는 활성에 대해 야생형 패혈증 비브리오균과 비교하였다.
- <111> 이를 위해, Ficol1(애머샴)을 이용한 밀도-구배 원심분리법을 통해 사람의 말초혈액단핵세포(PBMCs)를 준비하고, 10% 열-불활성 우태아혈청(heat-inactivated fetal bovine serum), 100U/mL 페니실린, 100 μ g/mL 스트렙토마이신 및 2mM L-글루타민이 첨가된 RPMI-1640 배지로 재현탁하였다. 준비된 PBMCs(세포수: 1×10^5)를 96-웰 플레이트에서 배양하였다. 단핵구(>95%)는 Erik, S. C. 등의 방법(2006, *J. Infect. Dis.* 193, 849-859)에 따라 말초 혈액으로부터 역전류세정(counter-current elutriation)을 통해 분리하였다. 1×10^5 또는 5×10^5 의 단핵구를 각각 96-웰 또는 24-웰 플랫-바텀 마이크로타이터 플레이트에서 배양하였다. 패혈증 비브리오균 파쇄물, rIlpA 단백질, 콘카나발린 A, 또는 LPS를 첨가하거나 그렇지 않고 상기 세포들을 배양하였다.
- <112> 생성된 사이토카인을 측정하기 위해, 96-웰 플레이트에서 배양한 PBMCs 및 단핵구(웰당 1×10^5 세포)를 일정 농도(0.5~10.0 μ g/mL)에서 18시간 동안 배양배지, 세균파쇄물 또는 재조합 rIlpA 단백질과 공동배양하였다. 또한, 비교를 위해, 상업적으로 이용할 수 있는 대장균(*E. coli*)의 LPS(시그마)를 세포에 처리하였다. 원심분리하여 무세포 상등액을 수거하고, 새로운 튜브로 옮긴 다음 분석 때까지 -70℃에서 저장하였다. 상기 상등액에서 각

사이토카인의 수준은 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assays, BD 바이오사이언스)를 이용하여 측정하였다. 각 사이토카인의 농도는 분리정제된 상업적으로 이용가능한 해당 사이토카인(IFN- γ , BD 바이오사이언스; TNF- α 및 IL-6, 바이오소스사 제품)의 표준곡선에 따라 측정하였다.

- <113> 도 6에 나타난 바와 같이, 인간의 PBMCs에 야생형 파쇄물을 농도별로(0.5~10.0 μ g/mL) 처리하면, PBMCs에서 IFN- γ 농도의존적으로 1,310pg/mL까지 분비되었다. 반대로, $\Delta ilpA$ 돌연변이 패혈증 비브리오균 파쇄물을 PBMCs에 처리하면, 훨씬 낮은 수준의 IFN- γ (41pg/mL)를 생산하였다. 이는 PBMCs에 배지만 처리하거나, BSA를 처리한 대조군에 비견할만한 수치이다(각각 13 또는 32pg/mL).
- <114> pLAFRilpA 을 포함하는 $\Delta ilpA$ 돌연변이 패혈증 비브리오균 파쇄물을 PBMCs에 처리하면, IFN- γ 생산은 야생형 패혈증 비브리오균 파쇄물의 동량의 농도에서 유도된 수준으로 회복되었다.
- <115> 상기 결과로부터 패혈증 비브리오균 IlpA 단백질이 인체세포에서 면역반응을 촉진하는 것을 알 수 있었다.
- <116> <실시예 5> 재조합 rIlpA 단백질에 의해 유도된 인간 PBMCs 및 단핵구의 사이토카인 생성 조사
- <117> 야생형 및 $\Delta ilpA$ 돌연변이 패혈증 비브리오균 파쇄물들은 면역촉진활성에서 크게 차이가 나므로, IlpA 단백질 자체가 PBMCs에서 IFN- γ 생성을 유도할 수 있는지를 확인하였다.
- <118> 도 7a에 나타난 바와 같이, PBMCs에 1.0 μ g/mL의 재조합 rIlpA 단백질을 첨가하였을 때, IFN- γ 1,080pg/mL까지 증가하였다. 이는 양성 대조군의 IFN- γ 수준에 해당한다(1,320pg/mL). 이때, PBMCs에 IFN- γ 의 생성을 유도하는 분자로 잘 알려져 있는 콘카나발린 A를 1.0 μ g/mL로 처리하였다.
- <119> 다음으로, 단핵구에서 사이토카인 생성을 유도하기 위해 재조합 rIlpA 단백질의 능력을 실험하였다. 인간 PBMCs로부터 준비한 단핵구에 재조합 rIlpA 단백질을 농도별로 처리하고(0.01~1.0 μ g/mL), TNF- α (도 7b) 및 IL-6(도 7c) 생성을 분석하였다. 양성 대조군으로, 단핵구에 의한 사이토카인 생성을 촉진하기 위해 대장균(*E. coli*)의 LPS를 사용하였다.
- <120> 후-자극 18시간째에 이들 재조합 rIlpA 단백질을 처리한 단핵구들을 분석하면, 두 종류의 사이토카인의 함량이 재조합 rIlpA 단백질의 농도의존적으로 증가하는 것을 검출하였다(TNF- α 는 14,500pg/mL, IL-6는 10,200pg/mL까지 증가함).
- <121> LPS 함량이 증가함에 따라, 단핵구에서 이들 2 종류의 사이토카인 형성은 증가하였다(TNF- α 는 8,050pg/mL, IL-6는 7,220pg/mL).
- <122> 상기 결과로부터 패혈증 비브리오균의 재조합 rIlpA 단백질이 단핵구에 의한 사이토카인 생성을 유도함에 있어 대장균의 LPS 만큼 강력한 것임을 알 수 있었다.
- <123> <실시예 6> 폴리마이신 B를 이용한 재조합 rIlpA 단백질의 기능 확인
- <124> 그람 음성 세균의 LPS는 강력한 면역촉진제로 알려져 있고, 상기 실시예에서 사용된 재조합 rIlpA 단백질은 그람 음성 세균인 대장균(*E. coli*) BL21(DE3)로부터 제조하였다. 따라서, 재조합 rIlpA 단백질로 자극시킨 단핵구에서 생성된 사이토카인이 재조합 rIlpA 단백질의 정제분획에 있는 LPS의 잔여 오염때문일 가능성을 시험하였다. 이 가능성을 배제하기 위해, LPS의 기능을 중화하기 위해 양친매성(amphipathic) LPS-결합 물질인 폴리마이신 B를 사용하였다. 단핵구를 자극하기 위해 폴리마이신 B를 처리한 재조합 rIlpA 단백질을 사용하여 TNF- α (도 8a) 및 IL-6(도 8b) 생성을 측정하였다. 폴리마이신 B의 적절한 기능을 확인하기 위한 양성대조군으로, 단핵구 활성화 전에 폴리마이신 B로 LPS를 전처리하였다.
- <125> 구체적으로 설명하면, 단핵구를 10 μ g/mL의 사람의 TLR2 단클론성 항체(바이오레전드) 또는 그것의 아이소타입 대조군 IgG(바이오레전드)를 포함하는 배지에서 1시간 동안 전배양하였다. 단핵구에 의한 사이토카인 생성에 대한 준비된 rIlpA 단백질 분획에 남아있는 LPS의 역할을 시험하기 위해, 준비된 단핵구와 배양하기 전에 20 μ g/mL의 폴리마이신 B(시그마)를 재조합 rIlpA 단백질에 첨가하였다.
- <126> 예상했던 대로, 단핵구에서 사이토카인 생성을 자극하기 위한 폴리마이신 B 처리된 LPS의 능력은 무처리 LPS-자극 단핵구의 능력과 비교하여 극적으로 감소되었다. 반대로, 폴리마이신 B로 재조합 rIlpA 단백질을 전배양한 경우, 단핵구에서 사이토카인 생성을 유도하기 위한 재조합 rIlpA 단백질의 능력에 영향을 주지 않았다. 이러한 결과는 이 실험에 이용된 재조합 rIlpA 단백질이 LPS 오염과는 상관이 없으며, 재조합 rIlpA 단백질에 노출된 단핵구에 의한 사이토카인 생성은 패혈증 비브리오균의 IlpA 단백질의 면역원 활성으로부터 유래한 것임을 명백하게 입증하는 것이다.

- <127> <실시예 7> 단핵구에서 사이토카인 생성에 대한 IlpA 단백질의 지질 족(moiety)의 역할
- <128> 패혈증 비브리오균의 IlpA 단백질의 아미노산 서열이 지질 변형을 위한 추정 서열을 가지고 있고, 재조합 rIlpA 단백질의 지질화는 *in vivo* labeling 분석(도 4)에서 확인하였다. 따라서, 단핵구에 의한 사이토카인 생성 시 IlpA 단백질의 지질 족의 역할을 실험하기 위해, 23개의 N-말단 잔기들이 결실된 rIlpA 결실 단백질을 합성하였다. 돌연변이 재조합 rIlpA 단백질의 결실 영역은 지질화에 필요한 중요한 아미노산을 포함하고 있기 때문에, 다른 지질단백질에 나타난 바와 같이, 이 단백질은 지질화에 의해 변형될 것으로 기대되지 않았다. 돌연변이 재조합 rIlpA 단백질을 농도별(0.001~1.0 μ g/mL)로 처리하여 단핵구를 자극하고 나서, TNF- α (도 9a) 및 IL-6(도 9b) 생산을 분석하였다. 대조군으로, 다른 단핵구 세트에 원래의 IlpA 단백질을 상기와 같은 농도로 처리하고, 사이토카인 생산을 분석하였다. 또한, TNF- α 및 IL-6 생산 유도를 위해 대조군으로 0.1 μ g/mL LPS에 노출된 단핵구를 실험하였다
- <129> 도 9에 나타난 바와 같이, 저농도(0.1 μ g/mL 미만)의 돌연변이 재조합 rIlpA 단백질을 처리한 단핵구는 기초 수준의 사이토카인만을 검출하였다. 상대적으로 고농도(0.1 및 1.0 μ g/mL)의 돌연변이 재조합 rIlpA 단백질로 자극 시킨 단핵구에서는 유의적인 농도로 사이토카인을 형성하였다. 반면, 원래의 IlpA 단백질을 단핵구에 최소 농도로 처리할 경우에도 TNF- α 및 IL-6 둘 다 상당량이 형성되었으며, 사이토카인 생산은 IlpA 농도에 비례적으로 증가하였다(도 7).
- <130> 상기 결과로부터 원래 지질화된 IlpA 단백질의 능력과 비교하여, 지질화되지 않은 돌연변이 재조합 rIlpA 단백질의 단핵구에서 사이토카인의 생산을 유도할 수 있는 능력이 유의적으로 감소함을 알 수 있었다.
- <131> <실시예 8> 패혈증 비브리오균의 IlpA단백질의 자극을 받은 단핵구의 사이토카인 생성에 대한 TLR2의 역할 조사
- <132> 패혈증 비브리오균의 IlpA 단백질이 어떻게 사람 단핵구를 인식하여 사이토카인을 생산하는지 조사하였다. 특히, IlpA 단백질 유도에 의한 사이토카인 생산이 TLR 패밀리, 특히 TLR2에 의해 매개되어 인간의 단핵구를 활성화하는 지를 실험하였다.
- <133> 이를 위해, 재조합 rIlpA 단백질로 자극하기 전에 단핵구에 TLR2 특이 항체로 전처리하였다. 대조군으로, 다른 단핵구에 TLR2 항체 대신에 아이소타입 IgG를 전처리하고, 동일한 방법으로 재조합 rIlpA 단백질로 자극하였다. 이후, 상기 재조합 rIlpA 단백질이 처리된 단핵구에 대해 TNF- α (도 10a) 및 IL-6(도 10b)의 생산을 분석하였다.
- <134> 상기 실시예들에서 나타난 결과들과 같이, 재조합 rIlpA 단백질을 처리한 단핵구에서 TNF- α 및 IL-6 둘 다 생산되었다. IgG를 전처리한 대조군 단핵구의 경우, 재조합 rIlpA 단백질에 의한 이들 2종류의 사이토카인 형성에 영향을 미치지 않았다. 반대로, TLR2 항체를 전처리한 세포는 아이소타입 IgG를 처리한 단핵구와 비교하여 TNF- α 및 IL-6 둘 다 생산에 유의적인 감소를 나타냈다($p < 0.02$, Student *t*-test).
- <135> 또한, LPS는 다른 종류의 TLR, 특히 TLR4에 의해 인식되는 것으로 알려져 있다. 따라서, 항-TLR2 항체의 중화활성이 LPS-처리 세포에서는 일어나지 않고, 단지 rIlpA-처리 세포에서만 일어나는지를 측정하기 위해 재조합 rIlpA 단백질 대신에 LPS를 처리한 다른 단핵구를 준비하였다.
- <136> 도 10에 나타난 바와 같이, 아이소타입 IgG 및 항-TLR2 항체 둘 다 LPS-자극 단핵구에서 사이토카인 생산을 억제하는데 효과가 없었다. 이 결과는 패혈증 비브리오균의 IlpA 단백질이 TLR2에 의해 인식되어 단핵구에 면역촉진제로 작용할 것임을 암시하는 것이다.
- <137> 또한, 인간 단핵구에서 IlpA 단백질의 유도에 의한 사이토카인 생산에 있어서, TLR2의 기능을 조사하기 위해 HEK 293 세포를 이용하여 인 비트로 시스템을 재구성하였다. 이때, TLR2 또는 TLR4는 어댑터 단백질인 MyD88과 함께 발현된다. 대조군으로, pFLAG-TLR2 (TLR2-발현 플라스미드) 또는 pFLAG-TLR4 (TLR4-발현 플라스미드)(Takashi, S. *et al.* (2005) *J. Immunol.* 175, 4641-4646)를 위한 빈 벡터인 pFLAG-CMV1를 다른 HEK 293 세포 세트에 감염시켰다. 리포터 유전자를 이용하여 사이토카인 생산을 조사하기 위해, 이 시스템은 NF- κ B 활성을 위한 루시페라아제 리포터, p(IL6 κ B)₃50hu, IL6P-luc+(Vanden Berghe, W., *et al.* (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 3285-3290)를 포함하고 있다. 사이토카인 생산을 유도하기 위한 재조합 rIlpA 단백질의 능력은 TLR2를 발현하는 HEK 293 세포, TLR4를 발현하는 HEK 293 세포, 및 대조군 HEK 293 세포의 루시페라아제 활성을 측정하여 조사하였다(도 10c).
- <138> 구체적으로 설명하면, 리포펙타민(Lipofectamine, 인비트로젠)을 이용하여, 24-웰 플레이트에서 1.0 μ g pFLAG-

TLR2(Takashi, S., *et al.* (2005) *J. Immunol.* 175, 4641-4646), 1.0 μ g p(IL6 κ B)₃50hu.IL6P-luc+, (Vanden Berghe, W. *et al.* (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 3285-3290) 및 0.5 μ g pCH110(파마시아)을 5×10^5 의 인간 배아 신장 293 세포(human embryonic kidney 293 cells, HEK 293)에 트랜스펙션시켰다. 대조군으로, 플라스미드 pFLAG-TLR2 대신 pFLAG-CMV (인비트로젠)을 트랜스펙션시켰다. HEK 293 세포를 트랜스펙션시키기 위해 p(IL6 κ B)₃50hu.IL6P-luc+ 및 pCH110과 더불어 pFLAG-TLR4를 이용하였다. 24시간 후, 트랜스펙션된 세포에 재조합 rIIPa 단백질 또는 LPS를 처리하여 자극시켰다. 추가로 20시간을 더 배양한 후, 상기 세포들을 파쇄시키고 루시퍼라아제 리포터 분석 시스템(프로메가)을 이용하여 루시퍼라아제 활성을 분석하였다. 표준화된 리포터 활성은 p(IL6 κ B)₃50hu.IL6P-luc+의 루시퍼라아제 활성을 동일한 트랜스펙션된 세포의 pCH110의 β -갈락토시다아제의 활성으로 나눈 값으로 표현된다.

- <139> 도 10c에 나타난 바와 같이, 재조합 rIIPa 단백질이 없는 경우, 모든 HEK 293 세포들은 기초량의 루시퍼라아제 활성을 나타냈다. 재조합 rIIPa 단백질로 자극하면, 3종류의 HEK 293 세포 모두 루시퍼라아제 활성이 증가하였다. 홍미롭게도, pFLAG-TLR2로 형질감염된 HEK 293 세포들은 NF- κ B 활성이 극적으로 증가하였다. 반대로, 루시퍼라아제 활성의 증가는 TLR2를 발현하는 HEK 293 세포와 비교하여 TLR4를 발현하는 세포와 대조군 HEK 293 세포에서 유의적으로 감소되었다.
- <140> <실시예 9> 패혈증 비브리오균의 IIPa 단백질을 처리한 인간 PBMC 및 293 세포주에서 TLR2 전사의 유도
- <141> TLR가 패혈증 비브리오균의 IIPa 단백질에 대한 반응으로 발현되는 지를 측정하기 위해, RT-PCR을 통해 IIPa 단백질을 처리한 세포에서 TLR2 및 TLR4의 mRNA 수준을 측정하였다.
- <142> 이를 위해, TRIzol 제제(인비트로젠)를 이용하여, 1.0 μ g/mL의 재조합 rIIPa 단백질 또는 대장균(*E. coli*)의 LPS(시그마)로 자극시킨 인간 PBMCs(2×10^6)에서 총 RNA를 분리하였다. 대조군으로, 같은 세포수의 무 자극 PBMCs에서 총 RNA를 분리하였다. 또한, HEK293-hTLR2/CD14(또는 293-hTLR2) 및 HEK293-hTLR4/MD2-CD14(또는 293-hTLR4) 세포주에 재조합 rIIPa 단백질 또는 LPS를 처리하고, 총 RNA를 분리하였다.
- <143> oligo-dT 프라이머를 이용하여 역전사 증합효소에 의해 2 μ g의 각 RNA를 cDNA로 전환하고, 특이 프라이머 세트를 이용하여 22 사이클 동안 증폭하였다. 즉, TLR2에 대한 프라이머인, TLR2-F (서열번호: 15: 5'-GCCAAAGCTTGTGATTGATTGG-3') 및 TLR2-R (서열번호 16: 5'-TTGAAGTTCTCCAGCTCCTG-3') 프라이머는 인간 TLR2 (GenBank accession number, NM003264)의 뉴클레오티드 서열에서 디자인하였고, 반면, TLR4-특이 프라이머인, TLR4-F (서열번호 17: 5'-TGC GGGTTCATCAAAA-3') 및 TLR4-R (서열번호 18: 5'-CCATCCGAAATTATAAGAAAAGTC-3')는 사람의 TLR4 (GenBank accession number, U88880)의 뉴클레오티드 서열에 따라 제조하였다.
- <144> 사람의 TLR4(GenBank accession number, U88880)의 서열을 이용하여 2 μ g의 각 RNA를 cDNA로 전환하였다. 대조군 RNA를 증폭하기 위해 GAPDH 서열 (서열번호 19: 5'-GTCATCCCTGAGCTGAACG-3' 및 서열번호 20: 5'-CCGTTGTCATACCAGGAAAT-3') 유래의 올리고뉴클레오티드를 사용하였다.
- <145> PCR의 상기 사이클의 실시조건은 다음과 같다:
- <146> 변성단계(denaturation step): 94 $^{\circ}$ C, 30초
- <147> 어닐링 단계(annealing step): 52 $^{\circ}$ C, 30초
- <148> 연장단계(elongation step): 72 $^{\circ}$ C, 30 초
- <149> PCR 산물은 1.8% 아가로우즈 젤에서 전기영동하였다.
- <150> 도 11a에 나타난 바와 같이, 인간 PBMC에 1.0 μ g/mL의 재조합 rIIPa단백질을 1시간 동안 처리하면, TLR2 mRNA의 수준은 유의적으로 증가하였다. 또한, LPS를 처리한 PBMC는 후-자극 후 5시간째에 TLR4 mRNA 수준이 증가함을 입증하였다. IIPa단백질은 TLR4 mRNA의 수준에 영향을 미치지 않으며, LPS는 PBMC에서 TLR2 mRNA에 영향을 미치지 않았다.
- <151> 또한 각각 TLR2 또는 TLR4를 발현하는 2종류의 293-hTLRs 세포주들에서 RT-PCR을 통해 IIPa 단백질에 대한 그들의 반응을 실험하였다. RNA 함량에 대한 대조군으로서 GAPDH mRNA 수준을 실험하였다.
- <152> 도 11b에 나타난 바와 같이, TLR2의 발현은 재조합 rIIPa 단백질에 1시간 노출 시 293-hTLR2 세포에서 증가하였

다. 반면, LPS 자극에 의해서는 전혀 영향을 받지 않았다. TLR4 mRNA의 함량은 293-hTLR4 세포에서 LPS 자극 후 5시간째에 극적으로 증가하였다. 한편, TLR4 mRNA 수준은 293-hTLR4 세포에서 재조합 rIlpA 처리 후 5시간째에 약간 증가할 뿐이었다.

<153> <실시예 10> 마우스에 대한 패혈증 비브리오균의 치사율에 있어서 IlpA 단백질의 역할

<154> 마우스 감염 모델을 이용하여 패혈증 비브리오균의 발병기전(pathogenesis)에서 IlpA 단백질의 역할을 실험하였다. 여러 세균세포들을 마우스에 피하주사(intraperitoneal injection) 시, 주사 후 24시간째에 사망한 마우스의 수를 측정하였다(표 1). 2개의 실험군 중 하나를 대표 실험으로 나타내었다.

<155> 반수치사량(LD₅₀)을 측정하기 위해, 철-덱스트란(iron-dextran)을 전처리하지 않은 특정 병원균이 없는 7주령 암컷 ICR 마우스를 사용하였다. LBS 배지에서 오버나이트 동안 배양한 세균 균주 배양액을 신선한 동일조성의 배지에서 OD₆₀₀=0.7까지 배양하여 수거하고 PBS로 한 번 세척한 다음 PBS로 재현탁하였다. 다음으로, 연속희석시킨(serial dilutions) 세균 현탁액을 100μl을 복강내(intraperitoneally)로 각 희석군별로 6마리의 마우스에 주사하였다. 주사 후 24시간째에 사망한 마우스 수를 측정하고, Reed 및 Muench의 식((1938) *Am. J. Hyg.* 27, 493-497)에 따라 LD₅₀을 계산하였다.

표 1

<156> 마우스에 대한 패혈증 비브리오균 균주의 치사량

균주	유전자형	비브리오균을 주사한 마우스에서, 사망한 마우스 수/총 마우스 수				LD ₅₀ (CFU)
		3.0×10^3	3.0×10^4	3.0×10^5	3.0×10^6	
ATCC29307	wildtype	0/6	1/6	5/6	6/6	9.5×10^4
YS101	$\Delta ilpA$	0/6	0/6	1/6	6/6	7.5×10^5

<157> * CFU: colony-forming units

<158> 표 1에 나타난 바와 같이, 야생형에 의해 감염된 마우스의 LD₅₀는 9.5×10^4 세포를 나타내는 반면, $\Delta ilpA$ 돌연변이로 감염된 마우스는 LD₅₀는 8배 더 높았다(7.5×10^5 세포).

<159> 상기 결과들을 종합하여 패혈증 비브리오균의 외막에서 분리한 지질단백질 IlpA와 숙주세포의 상호작용 기전은 도 12에 간략하게 도시하였다.

도면의 간단한 설명

<160> 도 1은 플라스미드 pEX3에 삽입된 인서트 DNA의 유전자지도(1a) 및 항-외막 항체와 반응하는 단백질을 코딩하는 유전자 동정 결과를 나타낸 젤 사진도이다(1b).

<161> 도 2는 본 발명의 패혈증 비브리오균에서 분리한 지질단백질의 추정 아미노산 서열과 다른 그람 음성 세균들의 지질단백질의 아미노산 서열을 비교한 것이다.

<162> 도 3은 본 발명의 패혈증 비브리오균 유래의 지질단백질을 코딩하는 유전자 서열이 삽입되어 있는 재조합 벡터의 개열지도를 나타낸 것이다.

<163> 도 4는 [³H]-팔미트산을 이용한 재조합 rIlpA 단백질의 *in vivo* labeling 결과를 나타낸 것이다.

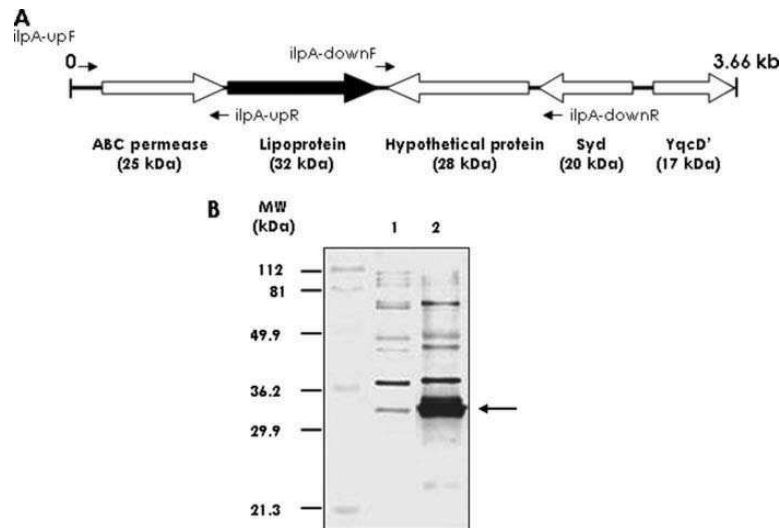
<164> 도 5는 $\Delta ilpA$ 결핍 돌연변이 균주(YS101) 및 *ilpA* 전체 유전자를 함유한 패혈증 비브리오균주 제조여부를 확인한 결과를 나타낸 사진도로, 5a는 PCR 증폭 후 젤 사진도를, 5b는 다클론성 항체를 이용한 다양한 패혈증 비브리오균주의 웨스턴 블랏 결과를 나타낸 사진도이다.

<165> 도 6은 패혈증 비브리오균의 세포 파쇄물에 의해 유도된 인간 PBMCs에서 사이토카인 생성을 나타내는 그래프이다.

- <166> 도 7은 패혈증 비브리오균의 재조합 rIlpA 단백질에 의해 유도된 사이토카인 생성을 나타낸 그래프이다.
- <167> 도 8은 재조합 rIlpA 단백질을 처리한 단핵수에서 사이토카인 생성에 대한 폴리마이신 B의 효과를 나타낸 그래프이다.
- <168> 도 9는 단핵구에서 사이토카인 생성 시 재조합 rIlpA 단백질의 지질족의 역할을 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.
- <169> 도 10은 재조합 rIlpA 단백질에 의해 자극을 받은 단핵구에서 사이토카인 생성 시 TLR2의 역할을 나타낸 그래프이다.
- <170> 도 11은 인간 PBMCs, 293-hTLR2 및 293-hTLR4에서 Toll-like receptor mRNAs의 유도를 나타낸 젤 사진도이다.
- <171> 도 12는 본 발명의 패혈증 비브리오균의 외막에서 분리한 지질단백질 IlpA와 숙주세포의 상호작용 기전을 도식화한 것이다.

도면

도면1



도면2

↓ ↓ ↓

V. vulnificus ATCC 29307 — MKFSLKQLLT-I-IAASTLVLAGQGEK — ATDTSKVKVGVWGAEGAEQVAEV

Vibrio cholerae — MNKEFIMKFSLSLT-IAAAASTLVLAGQGEK — AVDNKNKVIQWVWGAEGAEQVAEV

Escherichia coli APEC 01 — MKLTTHLRAGAALLAGVLVLAGQDQS — SSDEKHLKVGVIAGAEQDVAEV

Salmonella typhimurium — MAFKFTKFAA-VGALIGSLALAGQGDQ — EKDPHNLKVGVIAGAEQDVAEV

Haemophilus influenzae — MKIKQLFA-ITAIASALVLTGCKDEKKPEAAAPLKKVGVWSSGPEHVAEIV

.....*

V. vulnificus ATCC 29307 AAKVAKEYGLDVELVFTFTDYVTPNAALDQGSIDINAFQHKPYLDQREVDRGYK-IITAG

Vibrio cholerae AAKVAKEYNLDELVLFTFDYVTPNAALDQGSIDANAFQHKPYLDQKIDRGYK-LAVAG

Escherichia coli APEC 01 AKKVAKEYGLDVELVFGSSSLPNDAITHGELDANVFGHPRLPEQDQAHGYK-LVAVG

Salmonella typhimurium AAKVAKEYGLDVELVTFNDVLPNEALSKQIDANAFQHKPYLDQKIDRGYK-LVSVG

Haemophilus influenzae AAKVAKEYGLDVQVFENFDALPNEAVSKGLDANAMHGKPYLDEDAKAKNLNLVIVG

V. vulnificus ATCC 29307 NTFVYPVAGYSGKVSVEELADGVRIVPNPDNTLGRSLLLQGGGLIKLRPEVGLLATV

Vibrio cholerae NTFVYPVAGYSGKIKSVDELQDGRIVPNPDNTLGRSLLLQGGGLIKLRDVGLLATV

Escherichia coli APEC 01 NTFVFPNAGYSGKIKTVAGIKEGATVAPNDNTLGRLLLLQGGGLIKLKEGKGLPTA

Salmonella typhimurium KTFVYPVAGYSGKIKSLDELQGSQVAVPNPDNTLGRSLLLQGGGLIKLQGVGLLPTS

Haemophilus influenzae NTFVYPVLAGYSGKIKVNLQEGAKVVPNDNTNIGRALILEKGSLIKLDANILLSTV

V. vulnificus ATCC 29307 RDIVENPKNFTVELDAAGLPRSLDD-VALSIDNTTYASSINLTPKDGVFVEDKESPY

Vibrio cholerae RDIVENPKXLELELDAAGLPRSLDD-VALSIDNTTYASSINLTPKDGIVFENKESPY

Escherichia coli APEC 01 LDITDNPRLGLINELGAGLPRVLDDPKVDVAISTTYIQGTGLSPVNDVSFIEDKNISPY

Salmonella typhimurium LDIVENPKNLKIVLEAPOLPRSLDDAQALAVINNTYASSDGLTPAKDGIVFEDKDSPY

Haemophilus influenzae LDIVENPKXNLITVEDTSSVAARALDD-VSLAVVNTTYAGGVGLNAGDDGVFVEDKDSPY

V. vulnificus ATCC 29307 VNLIVARGDNVQNEVQNFVKAYOTEVYTAKEIFKGGVYNGW

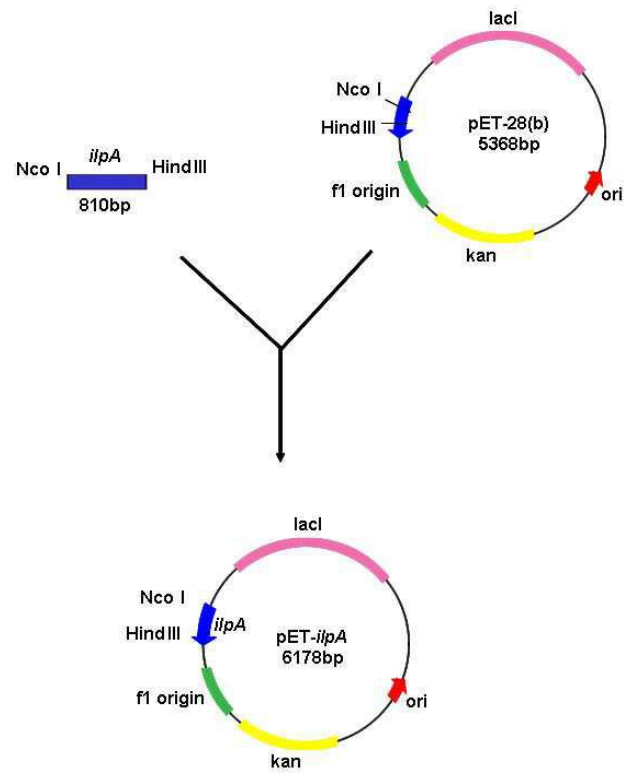
Vibrio cholerae VNLIVARCANVNAENVQNFVKAYOTDEVAKAASEIFGGAV-KGW

Escherichia coli 0157 VNLIVAREDKMAENVKFLOSQSPVAKAAETIFNGGAV-PGW

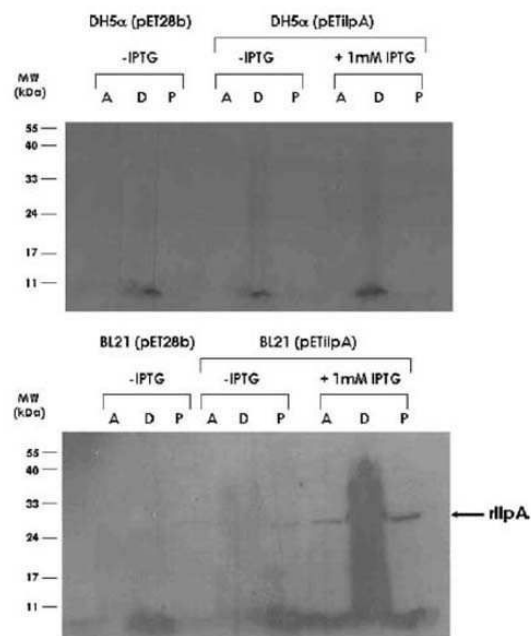
Salmonella typhimurium VNLIVTREDNKDAENVKQFVAYQSDVEVYEAANKVFNAGV-KGW

Haemophilus influenzae VNLIVSRIDDKOSKAVGDFIKSYOTEVYVQAGHFKDGVV-KGW

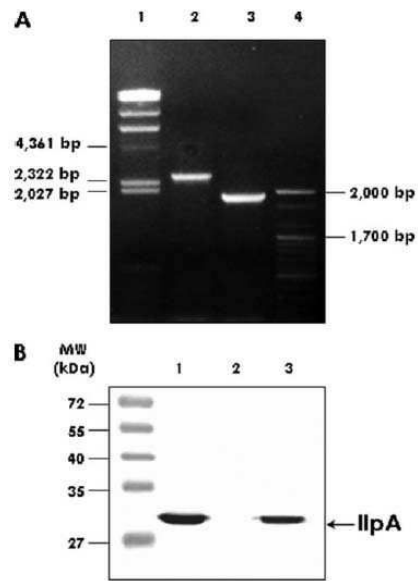
도면3



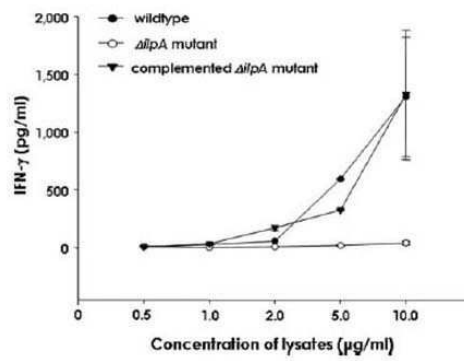
도면4



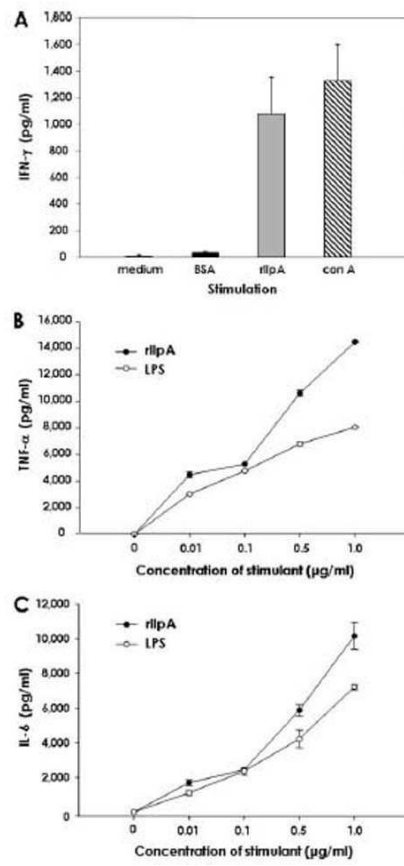
도면5



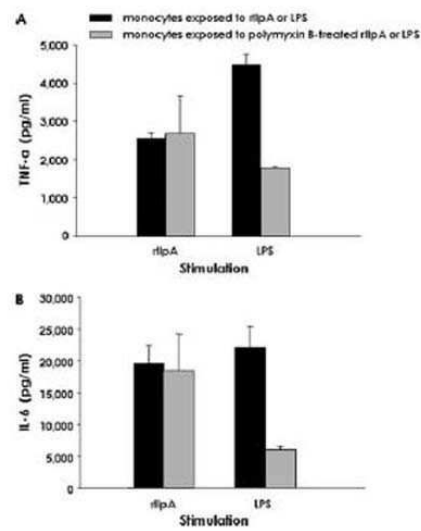
도면6



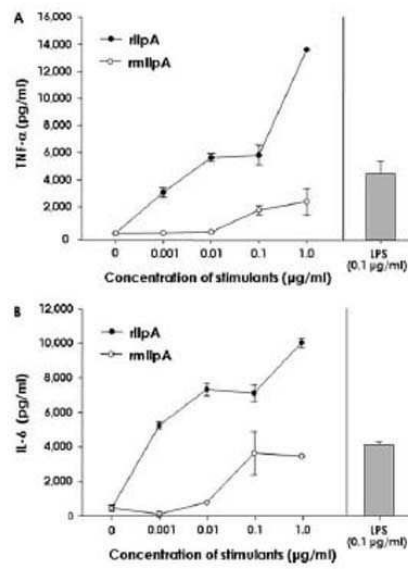
도면7



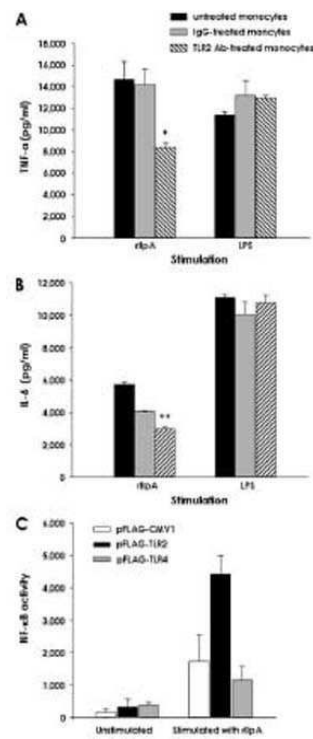
도면8



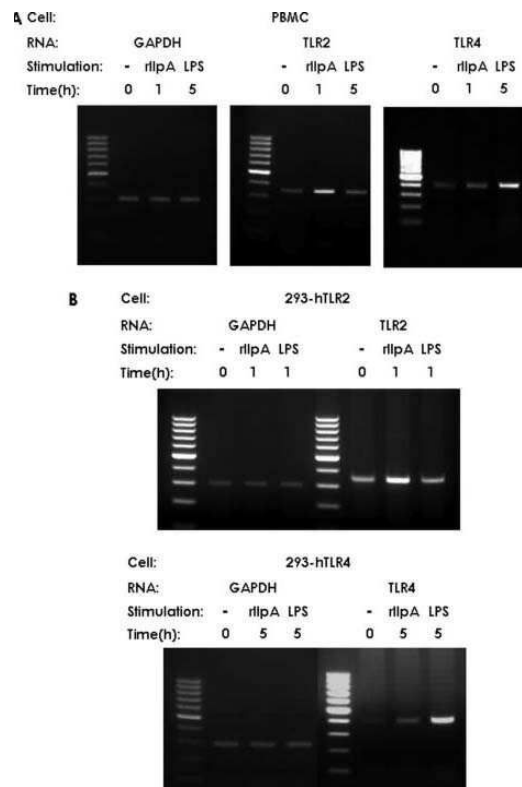
도면9



도면10

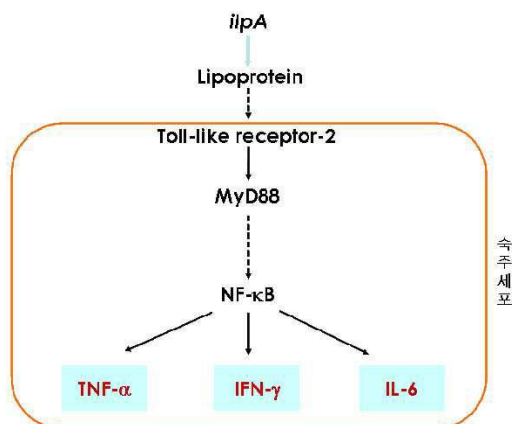


도면11



도면12

부착단백질 lpp: 숙주상호작용 기전 규명



서열목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> Novel lipoprotein from *Vibrio vulnificus* having immunostimulating activity and the use thereof

<160> 20

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 810

<212> DNA

<213> *Vibrio vulnificus*

<400> 1

atgaaattta gccttaaagg ttactgacc attattgctg ctgcctcaac attggtattg 60

gctggttgtg gcgaaaaagc gactgacacg agcaaagtaa aagttggcgt tatggcgggt 120

gccgaagcac aagttgccg agtcgctgcg aaagtagcca aagaaaaata cggccttgac 180

gtggaattgg tcaccttcac tgactacgtg acaccaaagc cggcattgga tgacggttct 240

atcgatatca acgcttcca acacaaacca tacctagatc gtcaagtgga agaccgtggc 300

tacaaactga ccacgctgg caacactttt gtataccta tcgcaggcta ctcaaaacaa 360

gtgaaatcgg ttgaagagtt ggctgacggc gtgcgtattg cagiaccaaa cgatccaacc 420

aaccttgcc gtctcttct gcttcttgag caacaagggt tgatcaaact acgtccagaa 480

gtgggcctac ttgcgaccgt tcgagacatc gttgagaatc caaagaactt cactattgtc 540

gagctgatg ctgctcagct tccacgtca cttgacgacg tggctctgtc tatcatcaac 600

accacttacg cgagctctat caacctaaact cgggaaaaag acggcgtatt tgttgaagac 660

aaagaatctc catacgtgaa cctgattgtg gctcgccaag acaacgttca aaacgaagta 720

cagaactttg ttaaagcgta ccaaaactgaa gaagtctaca cggcagcaaa agaaatcttc 780

aaaggcggcg tagtaaataa aggctggtaa 810

<210> 2

<211> 269

<212> PRT
<213> *Vibrio vulnificus*

<220>
<221> LIPID
<222> (20)..(23)
<223> Consensus lipobox for N-terminal di- or tri-acylation

<400> 2
Met Lys Phe Ser Leu Lys Gly Leu Leu Thr Ile Ile Ala Ala Ala Ser
1 5 10 15

Thr Leu Val Leu Ala Gly Cys Gly Glu Lys Ala Thr Asp Thr Ser Lys
20 25 30

Val Lys Val Gly Val Met Ala Gly Ala Glu Ala Gln Val Ala Glu Val
35 40 45

Ala Ala Lys Val Ala Lys Glu Lys Tyr Gly Leu Asp Val Glu Leu Val
50 55 60

Thr Phe Thr Asp Tyr Val Thr Pro Asn Ala Ala Leu Asp Asp Gly Ser
65 70 75 80

Ile Asp Ile Asn Ala Phe Gln His Lys Pro Tyr Leu Asp Arg Gln Val
85 90 95

Glu Asp Arg Gly Tyr Lys Leu Thr Ile Ala Gly Asn Thr Phe Val Tyr
100 105 110

Pro Ile Ala Gly Tyr Ser Lys Gln Val Lys Ser Val Glu Glu Leu Ala
115 120 125

Asp Gly Val Arg Ile Ala Val Pro Asn Asp Pro Thr Asn Leu Gly Arg
130 135 140

Ser Leu Leu Leu Leu Glu Gln Gln Gly Leu Ile Lys Leu Arg Pro Glu
145 150 155 160

Val Gly Leu Leu Ala Thr Val Arg Asp Ile Val Glu Asn Pro Lys Asn
165 170 175

Phe Thr Ile Val Glu Leu Asp Ala Ala Gln Leu Pro Arg Ser Leu Asp

180 185 190
 Asp Val Ala Leu Ser Ile Ile Asn Thr Thr Tyr Ala Ser Ser Ile Asn
 195 200 205

Leu Thr Pro Glu Lys Asp Gly Val Phe Val Glu Asp Lys Glu Ser Pro
 210 215 220

Tyr Val Asn Leu Ile Val Ala Arg Gln Asp Asn Val Gln Asn Glu Val
 225 230 235 240

Gln Asn Phe Val Lys Ala Tyr Gln Thr Glu Glu Val Tyr Thr Ala Ala
 245 250 255

Lys Glu Ile Phe Lys Gly Gly Val Val Asn Lys Gly Trp
 260 265

<210> 3
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Vibrio vulnificus

<400> 3
 Leu Ala Gly Cys
 1

<210> 4
 <211> 810
 <212> DNA
 <213> Vibrio vulnificus

<220>
 <221> variation
 <222> (504)
 <223> a is substituted with n.

<400> 4
 atgaaattta gccttaaagg tttactgacc attattgctg ctgcctcaac attggtattg 60

gctggttgtg gcgaaaaagc gactgacacg agcaaagtaa aagttggcgt tatggcgggt 120

gccgaagcac aagtigccga agtcgctgcg aaagtagcca aagaaaaata cggccttgac 180

gtggaattgg tcaccttcac tgactacgtg acaccaaacg cggcattgga tgacggttct 240

atcgatatca acgcgttcca acacaaacca tacctagatc gtcaagtgga agaccgtggc 300

tacaaactga ccatcgctgg caacactttt gtataccta tcgcaggcta ctcaaaacaa 360

gtgaaatcgg ttgaagagtt ggctgacggc gtgcgtattg cagtaccaa cgatccaacc 420

aaccttggcc gtctcttct gcttcttgag caacaagggt tgatcaaact acgtccagaa 480

gtgggcctac ttgcgaccgt tcgngacatc gttgagaatc caaagaactt cactattgtc 540

gagctcgatg ctgctcagct tccacgtca cttgacgacg tggctctgtc tatcatcaac 600

accacttacg cgagctctat caacctaaact ccggaaaaag acggcgtatt tgttgaagac 660

aaagaatctc catacgtgaa cctgattgtg gctcgccaag acaacgttca aaacgaagta 720

cagaactttg ttaaagcgta ccaaactgaa gaagtctaca cggcagcaaa agaaatcttc 780

aaaggcggcg tagtaaataa aggctggtaa 810

<210> 5
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> Vibrio vulnificus

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (168)
 <223> R is substituted with X.

<400> 5
 Met Lys Phe Ser Leu Lys Gly Leu Leu Thr Ile Ile Ala Ala Ala Ser
 1 5 10 15

Thr Leu Val Leu Ala Gly Cys Gly Glu Lys Ala Thr Asp Thr Ser Lys
 20 25 30

Val Lys Val Gly Val Met Ala Gly Ala Glu Ala Gln Val Ala Glu Val
35 40 45

Ala Ala Lys Val Ala Lys Glu Lys Tyr Gly Leu Asp Val Glu Leu Val
50 55 60

Thr Phe Thr Asp Tyr Val Thr Pro Asn Ala Ala Leu Asp Asp Gly Ser
65 70 75 80

Ile Asp Ile Asn Ala Phe Gln His Lys Pro Tyr Leu Asp Arg Gln Val
85 90 95

Glu Asp Arg Gly Tyr Lys Leu Thr Ile Ala Gly Asn Thr Phe Val Tyr
100 105 110

Pro Ile Ala Gly Tyr Ser Lys Gln Val Lys Ser Val Glu Glu Leu Ala
115 120 125

Asp Gly Val Arg Ile Ala Val Pro Asn Asp Pro Thr Asn Leu Gly Arg
130 135 140

Ser Leu Leu Leu Leu Glu Gln Gln Gly Leu Ile Lys Leu Arg Pro Glu
145 150 155 160

Val Gly Leu Leu Ala Thr Val Xaa Asp Ile Val Glu Asn Pro Lys Asn
165 170 175

Phe Thr Ile Val Glu Leu Asp Ala Ala Gln Leu Pro Arg Ser Leu Asp
180 185 190

Asp Val Ala Leu Ser Ile Ile Asn Thr Thr Tyr Ala Ser Ser Ile Asn
195 200 205

Leu Thr Pro Glu Lys Asp Gly Val Phe Val Glu Asp Lys Glu Ser Pro
210 215 220

Tyr Val Asn Leu Ile Val Ala Arg Gln Asp Asn Val Gln Asn Glu Val
225 230 235 240

Gln Asn Phe Val Lys Ala Tyr Gln Thr Glu Glu Val Tyr Thr Ala Ala
245 250 255

Lys Glu Ile Phe Lys Gly Gly Val Val Asn Lys Gly Trp

260 265

<210> 6
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> lipo-F

<400> 6
 catgccatgg ctatgaaatt tagccttaaa gg 32

<210> 7
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> lipo-R

<400> 7
 cccaagcttc cagccttta ctacgcc 27

<210> 8
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mlipo-F

<400> 8
 catgccatgg atgggcgaaa aagcgactga c 31

<210> 9
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> ilpA-upF

<400> 9
gtccgagctc ggcggagtga agtttggc

28

<210> 10
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ilpA-upR

<400> 10
gcgaggatcc agtaaatttc cttattattt tgac

34

<210> 11
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ilpA-downF

<400> 11
ggacggatcc caaaggcggc gtagtaaaag

30

<210> 12
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ilpA-downR

<400> 12

ctggggtacc gattgggcac ttctcagcg

29

<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ilpA-comF

<400> 13
ggttgatcc attgtgagc t

21

<210> 14
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ilpA-comR

<400> 14
tatcaagctt ctcttgggat cattgaaa

29

<210> 15
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> TLR2-F

<400> 15
gccaaagctt tgattgattg g

21

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TLR2-R

<400> 16

ttgaagttct ccagtcctg

20

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TLR4-F

<400> 17

tgcgggttct acatcaa

18

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TLR4-R

<400> 18

ccatccgaaa ttataagaaa agtc

24

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Forward primer to amplify GAPDH

<400> 19

ggtcacccct gagctgaacg

20

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer to amplify GAPDH

<400> 20

tccgttgta taccaggaaa t

21