

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁶
C12N 15/31
A61K 39/102
C07K 14/285
G01N 33/569

(11) 공개번호 특 1999-028423
(43) 공개일자 1999년 04월 15일

(21) 출원번호	특 1997-709739		
(22) 출원일자	1997년 12월 26일		
번역문제출일자	1997년 12월 26일		
(86) 국제출원번호	PCT/GB1996/01549	(87) 국제공개번호	WO 1997/01638
(86) 국제출원출원일자	1996년 06월 27일	(87) 국제공개일자	1997년 01월 16일
(81) 지정국	AP ARIP0특허 : 캐나다 레소토 말라위 수단 스와질랜드 케냐 EA EURASIAN특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 리히텐슈타인 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 그리스 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투칼 오스트리아 스위스 독일 덴마크 스페인 핀란드 영국 국내특허 : 아일랜드 알바니아 오스트레일리아 바베이도스 불가리아 브라질 캐나다 중국 체크 에스토니아 그루지야 헝가리 이스라엘 아이슬란드 일본 북한		
(30) 우선권주장	9513074.6 1995년 06월 27일 영국(GB)		
(71) 출원인	코르텍스 인터내셔널 리미티드 마이클 존 플린 오스트레일리아 더블유.에이. 6 페르스 세인트 조지스 테라스 220 레벨 2		
(72) 발명자	제넬 키드 오스트레일리아, 에이씨티 2617, 맥켈러, 버기 크리센트 6 알란 크립스 오스트레일리아, 에이씨티 2605, 커틴, 제닝 스트리트 25 크리스토퍼 존 스미스 영국, 클위드 웰威尔 77 0티이, 루알트, 트리미어키온 레인, 이스프린 나영환, 이상섭		
(74) 대리인			

심사청구 : 없음

(54) 해모필러스 인플루엔자로부터 유래한 오염피26 항원

요약

본 발명은 해모필러스 인플루엔자의 외막으로부터 유래한 신규의 항원성 단백질에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 단백질을 암호화하는 DNA 서열, 상기 단백질을 포함하는 백신 및 해모필러스 인플루엔자 감염에 대해 검체를 면역화하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 호흡기 질환 또는 중이염의 예방 또는 치료 방법뿐만 아니라 해모필러스 인플루엔자의 검출 방법 및 이러한 방법에 사용되는 키트에 관한 것이다.

대표도

도1

영세서

기술분야

본 발명은 해모필러스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*)의 신규한 항원, 이를 포함하는 백신 및 치료 및 진단을 위한 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

해모필러스 인플루엔자는 막대 형태이고, 그람 음성의 호기성 종속영양성 박테리아이다[참조: Krieg 및 Holt(ed), *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*, pp 563 (1984)]. 이는 급성 호흡기 감염의 병원체이며, 또한 만성 기관지염 환자 및 중이염 환자에서도 발견된다.

발명의 상세한 설명

본 발명자들은 NTHi로부터 독특한 26 kDa 외막 단백질(OMP26이라 칭함)을 동정하고, 정제하였으며, 놀랍게도 이 단백질이, 면역원으로 사용되는 경우, 동종 및 이종 균주의 NTHi에 대한 보호성 면역 반응을 유도할 수 있음을 확인하였다. 상기 단백질은 SDS-PAGE 상에서 분자량(Molecular mass)이 P5와 유사하나, 이 단백질과는 현저히 상이한 특성을 보유하고 있었다.

상기 외막 단백질 P5는 아형 해모필러스 인플루엔자에 대해 사용된 SDS-PAGE상의 두 개의 저분자량 밴드 중 하나이며, 겉보기 분자량은 25 내지 27 kDa이다. 상기 P5 단백질은 열 변형가능하며, β -메르캅토에탄올의 존재하의 100°C에서 30분 동안 열 변성한 후, 35 kDa의 명백한 분자량을 나타낸다. 현재, NTHi에 의해 발현되는 다른 단백질(핀브린(fimbrin)이라 칭함)은 특정화되어 왔으며, 유사한 분자량 특성, 열 변형성 및 이미 기술된 P5와 92%의 서열 상동성을 보유하는 것으로 확인되었다. 상기 단백질 OMP26은 상기한 P5 또는 핀브린 단백질에 대해 정의한 바와 같은 서열 상동성 또는 열 변형 특성을 나타내지 않는다.

따라서, 본원의 제 1 발명은 SDS-PAGE에 의해 결정된 바와 같이 해모필러스 인플루엔자의 외막 단백질이고, 분자량이 26 kDa인 단백질을 제공한다. 이하, 이 단백질은 OMP26이라 칭한다.

특히, 본 발명의 단백질은 도 1에 나타낸 아미노산 서열을 보유하며, 실질적으로 이와 상동성이 아미노산 서열을 보유한다. 다른 구체예에서, 본 발명의 단백질은 도 1의 24번 아미노산으로부터 시작하는 아미노산 서열 또는 이와 실질적으로 상동성이 아미노산 서열을 보유한다. 초기 23개의 아미노산은 '신호' 서열을 구성하며, 상기 신호 서열을 제외한 단백질이 동일하게 적용 가능한 것으로 생각된다. 본 발명의 단백질은 면역원이며, 따라서 해모필러스 인플루엔자 감염에 대한 보호성 면역 반응을 유도할 수 있다.

본 명세서에서, OMP26에 '실질적으로 상동성이' 단백질은 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 심지어 99% 상동성을 수 있다. 상기 단백질은 70% 이상의 상동성이 바람직하며, 80%의 상동성이 더 바람직하며, 90%의 상동성이 바람직하며, 95%의 상동성이 가장 바람직하다. 당업자에게는 상동성의 정도(%)가 단지 한 요인일 것이다. 중요한 것은 상기 단백질이 그의 항원으로서의 효과를 보유하는 것이다. 따라서, 상대적으로 낮은 정도의 상동성, 예를 들어 40%의 상동성을 보유하는 반면, 본 명세서에서 기술하는 항원 활성을 보유하는 것이 바람직하다.

또한, '보존적' 또는 '반보존적' 변화가 그의 기본적인 활성을 변경시키지 않는 단백질의 아미노산 서열에 대해 행해질 수 있음을 당업자에게 공지되어 있다. 예를 들어, 글리신, 발린, 루신 및 이소루신과 같이 모두 지방족 측쇄를 보유하고 있는 아미노산은 단백질의 생물학적 특성을 변화시키지 않으면서 기타 아미노산으로 대체할 수 있다. 유사하게, 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판과 같이 모두 방향족 측쇄를 보유하는 아미노산은 서로 치환될 수 있다. 항원 활성을 보유하는 이러한 단백질은 본 발명의 범위 내에 있다.

또한, OMP26의 항원 부분 또는 항원 영역을 이용하여 해모필러스 인플루엔자에 대한 보호 효과를 유도할 수 있다. 이러한 항원 부분 또는 항원 영역도 본 발명이 범위 내에 있다.

본원의 제 2 발명은 본 발명의 단백질, 상기한 바와 같은 이의 변이체 또는 항원 부분 또는 영역을 암호화할 수 있는 핵산 서열, 바람직하게는 DNA를 제공한다. 특히, 본 발명은 도 1에 도시한, OMP26를 암호화하는 DNA 서열을 제공한다. 당업자는 유전 암호의 퇴화에 기인하여 상기 단백질의 아미노산 서열에 변화를 초래하지 않으면서 DNA 서열에 보전적 변화를 수행할 수 있을 것이다. 따라서, 상기 DNA 서열도 본 발명의 범위 내에 있다. 본 발명의 핵산은 플라즈미드와 같은 벡터의 일부분을 형성할 수 있다.

본 명세서에서 기술한 바와 같이, 본 발명의 단백질은 해모필러스 인플루엔자에 대한 면역 반응을 자극하며, 따라서 본원의 제 3 발명은 본 명세서에서 기술한 단백질과 필요에 따라 하나 이상의 당체 및/또는 보조제를 포함하는 백신 조성물을 제공한다.

본원의 제 4 발명은 해모필러스 인플루엔자에 대한 백신의 제조를 위해 본 명세서에서 기술한 바와 같은 본 발명의 단백질을 이용하는 방법을 제공한다.

본 발명의 백신 조성물은 해모필러스 인플루엔자 감염에 대해 검체를 면역화하는데 사용할 수 있다. 따라서, 본원의 제 5 발명은 해모필러스 인플루엔자에 의한 감염에 대해 검체를 면역화하는 방법을 제공하는데, 이 방법은 상기 검체에 본 발명의 백신 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 본 발명의 백신 조성을 전신 면역성 및/또는 점막 면역성을 생성하기 위해 사용할 수 있다.

본원의 제 6 발명은 호흡기 감염 또는 종이염의 예방 또는 치료 방법을 제공하는데, 이 방법은 검체에 본 발명의 백신 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

본원의 제 7 발명은 해모필러스 인플루엔자의 진단을 위해 본 명세서에서 기술한 바와 같은 본 발명의 단백질을 사용하는 방법을 제공한다.

본원의 제 8 발명은 해모필러스 인플루엔자 감염의 진단에 사용되는 키트를 제공하는데, 이 키트는 본 명세서에서 기술한 바와 같은 단백질을 포함한다.

상기한 본원의 각 발명의 바람직한 특징은 변경을 가하여 다른 발명에도 동일하게 바람직하다.

이하, 본 발명은 하기 비제한적인 실시예로 추가 기술한다.

도면의 간단한 설명

도 1은 OMP26을 암호화하는 DNA 서열 및 이 DNA 서열로부터 유도된 아미노산 서열을 도시하는 도면이다.

도 2는 OMP26 및 분자량이 더 큰 2개의 다른 단백질의 SDS-PAGE 분석 결과를 나타내는 도면이다.

도 3은 OMP26의 초기 25개의 아미노산 잔기의 N-말단 서열 및 이 서열과 피.울토시다 및 와이.슈도투베르

콜로시스로부터 유래한 단백질의 비교를 나타내는 도면이다.

도 4는 생 박테리아를 이용한 항원 투여후 4시간이 경과한후 기관지 세척에서 회수된 NTHI-1 박테리아를 나타내는 도면이다.

도 5는 OMP26로 면역화된 쥐 혈청의 IgG 아류의 OMP26-특이성 수준을 나타내는 도면이다.

도 6은 혈청 내에서 OMP26-특이성 항체의 검출을 위한 면역블로트를 나타내는 도면이다.

도 7은 OMP26 면역화된 쥐 및 비면역 쥐의 MLN으로부터 분리된 림프구의 항원-특이성 증식을 나타내는 도면이다.

하기 실시예에서, 데이터는 평균 ± 평균의 표준 오차로 나타낸다. 폐 세정 데이터, 식세포의 총수 및 분화 세포 수 데이터는 변이의 일방향 분석, 이어서 다중-비교 분석을 위한 터키 테스트에 의해 그룹간의 통계학적 중요성에 대해 비교하였다(Macintosh Systst). 항체 데이터는 쌍을 이루지 않은 t-테스트에 의해 그룹 중요성 사이에서 분석하였으며, 림프구 증식 데이터는 변이의 완전 계승 분석으로 평가하였다(Macintosh Systst). 두 변수 사이의 선형 관계는 피어슨 상관 계수를 이용하여 결정하였다(Macintosh Systst).

실시예

실시예 1

(i) 단백질 정제

26 kDa 단백질(OMP26)은 균주 NTHI-1로부터 분취용 전기영동으로 정제하였다. 박테리아는 100 아가 평판의 하룻밤 배양한 배양물로부터 상기 평판을 스크레핑하므로써 수거하고, 4°C에서 10분 동안 10,000xg로 원심분리하여 2회 세척하였다. 조 외막 재조율은 외막 성분을 완충처리된 양극성 3-14 세정제로 추출하고, 에탄올 원심분리하여 수득하였다. 상기 외막 추출물을 동결건조하고, 소량의 증류수 내에 재현탁하고, 4배의 나트륨 도데실 살레이트(SDS) 환원 완충액(62.5 mM, 트리스(pH 6.8), 10%(v/v) 글리세롤, 2%(w/v) SDS, 5%(v/v) β-메르캅토에탄올, 1.2x10⁻³%(w/v) 브로모페로 블루) 내에 추가로 용해시켰다. SDS-제조율은 전기영동 칼럼의 충전 겔 상에 위치시키기 30분 이상전에 37°C에서 배양하였다. OMP26은 분취용 폴리아크릴아미드 전기영동(PAGE)을 이용하여 정제하였다. OMP26을 정제하기 위한 분취용 SDS-PAGE는 14 T-1.42% C 아크릴아미드/비스(N,N'-메틸렌-비스아크릴아미드) 분리겔 60mℓ와 함께 37mm(내경) 칼럼 내에 중합된 4% T-0.36% C 아크릴아미드/비스 충전 겔을 이용하는 바이오-라드 모델 491 프렙 셀(Prep Cell)을 사용하여 수행하였다. 상기 칼럼으로부터 용출된 분획은 동결건조로 농축하고, 분석용 SDS-PAGE를 이용하여 단백질 함량을 분석하였다. 이들 조건하에서 분리된 OMP26은 SDS를 함유하였는데, 이는 인산 나트륨 및 침전에 의해 후속적으로 분리하였다. OMP26을 함유하는 분획을 수집하고, 단백질 농도의 측정 이전에 투석하였다.

상기 단백질의 분석 확인은 구배 10-15% 또는 균질한 12.5% 아크릴아미드 겔을 이용하는 분석용 SDS-PAGE를 이용하여 수행하였으며, 실버 염색하였다. 단백질 농도는 피어스 마이크로 BCA 분석법을 이용하여 측정하였다. LOS의 존재는 SDS-PAGE 미니겔의 실버 염색 및 이-톡세이트(E-TOXATE) 리뮬러스 용해물 테스트를 이용하여 분석하였다.

결과

OMP26은 분자량이 26 내지 30 kDa인 3개의 단백질로 구성된 그룹으로부터 성공적으로 분리하였다. 도 2는 상기 다른 두 개의 단백질에 대한 상기 단백질의 위치를 나타내며, 상기 실버 염색된 겔은 생성되는 제조물의 높은 순도를 나타낸다. 상기 단백질의 열 변형 가능한 특성의 평가는 β-메르캅토에탄올 존재하의 100°C에서 30분 동안 상기 단백질을 가열하므로써 수행하였다. 30분후, 가열된 단백질 샘플은 여전히 동일한 분자량으로 이동하는 것으로 확인되었다(도 2). 다른 주위 단백질 밴드중 하나가 열-변형 가능한 P5 인가를 결정하기 위해, 상기 분자량 범위 내의 모두 3개의 단백질을 β-메르캅토에탄올의 존재 하에서 30분 동안 가열하였으며, 그 결과 열-변형 가능한 특성을 나타내는 단백질은 없었다(도 2). LOS 오염의 존재하에서 단백질의 평가는 이-톡세이트 분석 키트를 이용하여 수행하였으며, 0.6 µg 내독소/mg 단백질로 확인되었다.

(ii) N-말단 아미노산 서열 결정을 위한 OMP26의 제조

OMP26은 상기 단백질 밴드를 SDS-PAGE 겔로부터 PVDF 막으로 이전하므로써 N-말단 아미노산 서열 분석을 위해 제조하였다. 이 단백질 샘플은 영국, 클위드, 디사이드, 뉴텍 스케어, 테그베이스 1에 소재하는 코르텍스 디아크노스틱으로 보내 서열 분석하였다.

아미노산 서열 확인

N-말단 아미노산 서열은 PVDF에 이전된 단백질 밴드로부터 수득하였다. 최초 25개의 펩티드에 대한 아미노산 서열 분석은 도 3에 나타났다. 상기 서열 분석은 Hib P5 또는 핑브린 단백질의 N-말단 서열과 서열 상동성을 나타내지 않았다. 상기 N-말단 아미노산 서열은 파스퇴렐라 몰토시다(Pasteurella multocida)로부터 취한 21.4 kDa 단백질과 56% 상동성을 나타냈으며, 예르시니아 슈도투베르콜로시스(Yersinia pseudotuberculosis)로부터 취한 19 kDa 외막 단백질과는 44% 상동성을 나타냈다.

(iii) 면역화 및 박테리아 항원 투여(challenge)

특이성 병원체를 함유하지 않는 수컷 쥐를 대상으로 1일에 인트라 페이어 패치(IPP) 면역화를 수행하였으며, 14일에 기관내(IT) 추가 항원 자극하였으며, 21일에 최종적인 생 박테리아 항원 투여하였다. 상기 동물은 할로탄을 이용하여 진정시켜 미정맥을 통한 클로랄 하이드레이트로 정맥내 마취하였다. 중심선 복부 절개를 통해 소장을 노출시켰으며, 정막하 조직으로 27 개이지 바늘을 이용하여 각각의 페이어 패치에 항원을 주입하였다. 면역화 단백질(OMP26)은 프레온트 불완전 보조제(IF)와 인산염 완충 처리된 염수(PB

S)의 1:1 혼합액 내에 200 내지 800 μg 단백질/ mL 를 유화시켜 제조하고, 총 접종량을 각각 10 또는 40 μg 단백질로 하여 각각의 동물에게 투여하였다. 쥐의 2개의 대조용 그룹은 (i) 처리되지 않은 그룹 및 가장 면역화 그룹(IFA 및 PBS로 면역화함)의 혼합 및 (ii) 상동성 NTHI 균주의 사멸된 박테리아로 면역화한 양성 그룹으로 이루어졌다. IPP 면역화후, 쥐는 14일에 IT 추가 항원 자극하였다. OMP26-면역화된 쥐는 OMP26 10 μg 을 이용하여 IT 추가 항원 자극하였다. 비면역 그룹은 50 μl 의 PBS를 투여한 반면, 사멸된 박테리아-면역화된 그룹은 50 μl 의 사멸된 박테리아(1 mL 당 5×10^{10} 박테리아)를 투여하였다. 동물은 최초 면역화후 21에 생 박테리아(박테리아 수 5×10^8)를 이용하여 4 시간 동안 항원투여하였다. 이종 균주인 NTHI-II도 박테리아 항원 투여를 위해 사용하였다. 박테리아는 50 mL 의 피브린제거한 말 혈액/ l 한천으로 보충된 뇌 심장 주입 한천 평판 상에서 5% CO_2 , 37°C에서 하룻밤 동안 배양하고, 회수하고, 세척하고, PBS 내에 재현탁하여 기관내 캐뉼라를 통해 폐 내로 도입하고, 4시간후 쥐를 안락사시켰다. 혈액을 수집하고, 소량의 혈청은 항체 분석을 위해 -20°C에서 저장하였다. 폐는 5 \times 2 mL PBS를 이용하여 세척하고, 박테리아 수에 대해 분석하기 위해 상기 세척액(BAL)은 수집하였다. 폐 세척후, 상기 폐는 제거하고, 균질화하고, 박테리아 수에 대해 분석하였다. 폐 세척액 내의 분화 세포 수를 측정하기 위해 사이토스핀 슬라이드를 제조하였다. 상기 폐 세척액 내에 존재하는 총 세포 수는 메틸렌 블루로 염색하고, 혈구계를 이용하여 계수하였다.

결과

OMP26로 면역화하고, NTHI-I 상동 균주의 박테리아로 21일에 항원 투여한 쥐는 현저한 박테리아 세정($P < 0.005$)을 나타냈다. OMP26 10 μg 으로 면역화하고, 추가 항원 자극한 쥐는 4시간후, 비면역 그룹 보다 폐 내에서 92% 보다 낮은 박테리아를 보유한 반면, IPP 면역화에서 40 μg 의 OMP26을 투여하고, 10 μg 의 OMP26으로 추가 항원 자극한 쥐는 96% 보다 낮은 박테리아를 보유하였으며, 사멸된 박테리아 면역화된 쥐에 대해 관찰한 95% 세정과 동일하였다(도 4).

또한, OMP26으로 면역화한 쥐는 유형을 결정할 수 없는 이종 균주인 NTHI-II로부터 취한 생 박테리아로 항원투여하였다. 하기 표 1의 결과로부터 확인할 수 있는 바와 같이 OMP26 면역화는 상이한 균주에 의한 폐 항원 투여에서 박테리아를 현저하게 세정하였다($P < 0.005$). 상기 면역화된 그룹은 4시간후 BAL에서 비면역 그룹 보다 93% 보다 낮은 박테리아를 보유하였는데, 이는 박테리아 세정률이 상동 항원 투여에 대한 세정률에 필적하는 것을 나타낸 것이다. 또한, OMP26 면역화는 비면역 그룹에 비해 면역화된 그룹의 폐 균질률 내에서 박테리아의 수를 감소시켰다. NTHI-II(이종 균주)로 항원 투여한 쥐로부터 취한 폐 균질률은 비 면역 폐 보다 현저히 낮은 수의 박테리아를 보유하였다. 그러나, 상기 차이의 크기는 폐에서 89% 세정에 비해 BAL 내에서 83% 세정이었으며, NTHI-I(상동 균주)로 항원 투여한 그룹에 대한 BAL 내에서 87% 세정이었다. NTHI-I에 대한 본 실험에서 세정률은 이전 실험과는 달랐는데, 이는 일반적인 경우 보다 상당히 더 많은 박테리아(0.6 내지 1.4×10^{10} CFU/ mL)를 함유하는 생 박테리아 접종에 기인한다.

[표 1]

형을 결정할 수 없는 상동 및 이종 해모필러스 인플루엔자 박테리아에 의한 항원 투여를 이용하는 OMP26 면역화후 폐 세정

쥐 그룹 ^c		항원투여한지 4시간후 회수된	
		해모필러스 인플루엔자 (\log_{10} CFU) ^a (세정률(%))	
		해모필러스 인플루엔자의 항원 투여 균주 ^b	
비면역	BAL	NTHI-I(상동)	NTHI-II(이종)
	폐	7.01 ± 0.11	6.28 ± 0.07
OMP26	BAL	7.76 ± 0.05	6.69 ± 0.05
	폐	$6.15 \pm 0.15(87\%)^*$	$5.15 \pm 0.16(93\%)^*$
면역화	BAL	$6.81 \pm 0.17(89\%)^*$	$6.01 \pm 0.19(80\%)^*$
	폐		

a 수치는 10 μg 의 OMP26을 이용한 PP-면역화후 21일에 NTHI-I 또는 NTHI-II 균주로부터 취한 생 박테리아를 이용하여 4 시간 동안 항원 투여한 쥐에 대한 BAL 또는 폐 균질률 내에서의 평균 \pm SEM을 나타낸다. 모든 쥐는 14일에 IT-추가 항원 자극(10 μg)하였다. 비면역 쥐는 가장 처리 및 비 처리된 동물의 연합이었다.

b 항원 투여 접종 내의 생 박테리아의 농도(일련의 희석물의 평판배양에 의해 결정함)는 NTHI-I에 대해 $10.38(\log_{10})$ CFU/ mL 였으며, NTHI-II에 대해 $10.17(\log_{10})$ CFU/ mL 였다.

c NTHI-I를 이용하여 항원 투여한 그룹에 대해 n=4, 비면역에 대해 n=4 및 NTHI-II를 이용하여 항원 투여한 OMP26 면역화 그룹에 대해 n=6

* 비면역 그룹에 비해 $P < 0.001$

[표 2]

5개의 유형을 결정할 수 없는 해모필러스 인플루엔자를 이용하여 폐 항원 투여하고, 4 시간이 경과한 후 BAL내의 식세포 수

쥐 그룹	NTHI-I (상동)으로 항원 투여	NTHI-II (이종)으로 항원 투여	BAL의 사이토스핀 슬라이드 제조물로부터 계 수한 분화 세포수(%)		
	BAL내의 총 세포 수 ($\times 10^6$)	PMNs	거식세포	기타	
비면역	15.9±1.1	17.5±3.0	95.8	2.2	2
OMP26 면역화	26.1±1.1 ⁿ	28.2±1.6 ⁿ	95	2.7	2.1
n 비면역 그룹에 비해 P<0.001					

(iv) OMP26-특이성 ELISA

폴리소르브 미량역가 웰은 IgG, IgG_{2a}, IgA 및 IgM의 분석을 위해서는 1 µg/ml; IgG₁, IgG_{2b}, IgG_{2c} 및 IgE의 분석을 위해서는 10 µg/ml의 농도로 정제된 OMP26를 피복하였다. 배양 단계의 사이에, 상기 평판은 0.05% 트윈 20을 함유하는 PBS 내에서 5회 세척하였다. 상기 웰은 PBS-0.05% 트윈 20 내의 5% 탈지 우유를 이용하여 60분 동안 차단하였다. 웰은 혈청(1/25 내지 1/3200)과 함께 90분 동안 배양하거나, BAL(1/25 내지 1/6) 샘플은 분석용 차단 완충액 내에서 일련의 희석을 수행하였다. 사용한 복합된 면역 글로불린은 염소 항-쥐 IgG(1/2000), IgA(1/1000) 및 IgM(1/4000)(Fc 특이성); 생쥐 항-쥐 IgG₁(1/500), IgG_{2a}(1/1000), IgG_{2b}(1/500) 및 IgG_{2c}(1/500)이었으며, 웰은 복합된 면역글로불린과 함께 90분 동안 배양하였다. 이어서, 상기 평판은 현색시켰다.

결과

OMP26에 특이적인 항체는 혈청 및 OMP26으로 면역화된 BAL 샘플뿐만 아니라 4개의 상이한 해모필러스 인플루엔자의 상이한 균주로부터 취한 사멸 박테리아로 면역화한 쥐로부터 취한 샘플에서 측정하였다. IgG, IgA 및 IgM에 대한 높은 OMP26-특이성 항체 역가는 혈청 내에서 확인되었으며, OMP26으로 면역화된 쥐의 BAL 샘플내의 가장 높은 수준의 IgG 및 IgA는 40 µg의 더 높은 면역화 용량을 수용한 그룹에 대해 관찰되었다(표 3). 이들 그룹에 대해 관찰된 수준이 OMP26-면역화된 그룹에서 관찰된 수준보다 현저히 낮았음에도 불구하고, 혈청 내에서 검출 가능한 수준의 OMP26 특이성 IgG, IgA 및 IgM 및 BAL 내에서 검출 가능한 수준의 OMP26 특이성 IgG 및 IgA는 해모필러스 인플루엔자의 상이한 균주로 면역화한 쥐에서 확인되었다. 또한, IgE ELISA는 OMP26 쥐 그룹으로부터 취한 혈청에서 수행하였으나, OMP26-특이성 IgE의 수준은 검출 할 수 없었다(자료는 도시하지 않음).

OMP26 특이성 IgG 아류의 측정 결과, OMP26-특이성 IgG₁은 40 µg 면역화후 검출 가능한 반면, IgG_{2a} 및 IgG_{2b} 아류의 현저한 수준은 10 µg 및 40 µg 면역화 그룹 둘 다에 대해 확인되었다(도 5). IgG_{2a} 및 IgG_{2b}의 수준은 IPP 접종에서 10 µg에서 40 µg으로 OMP26 농도의 증가와 함께 현저히 증가되었다(P<0.05). 그러나, IgG_{2c}는 측정되었으나, 이 아류로부터 취한 OMP26-특이성 항체의 현저한 수준은 측정할 수 없었다(자료는 도시하지 않음).

[표 3]

해모필러스 인플루엔자로부터 취한 OMP26 또는 사멸된 박테리아를 이용하는 면역화후 혈청 및 기관지폐포 세정에서 OMP26 특이성 항체의 비교

OMP26에 대한 항체(ELISA 역가 ^a)							
그룹 ^b	n	혈청			기관지폐포 세척		
		IgG	IgA	IgM	IgG	IgA	IgM
비면역	7	nd	nd	10.5±1.6	nd	nd	nd
OMP26 (10 µg)	5	1209± 255 [*]	936±161 [*]	30.5±4 [*]	4.3±1.0 [*]	6.1±1.9 [*]	nd
OMP26 (40 µg)	5	2806± 405 [*]	2440± 410 [*]	142.5± 30.6 [*]	8.3±1.9 [*]	29.1± 7.9 [*]	nd
NTHI-I ^c	4	58±17 [*]	37±4 [*]	39.1±0.8 [*]	0.5±0.1	1.2±0.5	nd
NHTI-II ^c	4	22±4 [*]	26±5 [*]	39.3±5.0 [*]	0.6±0.1	0.4±0.1	nd
HI-CD ^c	4	18±1 [*]	20±1 [*]	42.2±3.1 [*]	0.6±0.1	0.8±0.3	nd
Hib-II ^c	4	27±4 [*]	38±3 [*]	34.4±2.3 [*]	0.6±0.1	1.6±0.4	nd

a	항체 역가는 기술된 재료 및 방법에 따라 계산하였다.
b	쥐는 0일에 PP에 의해 면역화하였으며, 14일에 IT 추가 항원 자극하였으며, 21일에 생 박테리아로 항원 투여하였다. 혈청 및 BAL 샘플은 기술된 방법 및 재료에 따라 제조하였다.
c	쥐는 제시된 해모필러스 인플루엔자 균주로부터 취한 사멸된 박테리아로 면역화하였으며, 상동 균주로부터 취한 박테리아로 생 항원 투여하였다.
d	nd는 P5-특이성 항체가 가장 낮은 샘플 희석액에서 검출될 수 없음을 의미한다.
*	비면역 그룹에 비해 $P < 0.05$

(v) 면역 블로트

SDS-PAGE에 의해 분리된 단백질은 니트로셀룰로오즈(세공 크기 $0.2 \mu\text{m}$)에 전기영동을 이용하여 이전시켰다. OMP26, NTHI-I, NTHI-II 뿐만 아니라 균주 HI-CD 및 Hib-II-면역화된 그룹으로부터 취한 쥐 혈청은 TTBS-5%(w/v) 탈지 우유 분말 내에서 10배 희석하였으며, 초기 항체로 사용하였다. 500배 희석한 호스 래디쉬 퍼옥시다제는 TTBS-5% 탈지 우유 내의 염소 항-쥐 IgG(Fc 특이성)에 접합시켰다.

결과

비면역 그룹, OMP26-면역화 그룹 및 해모필러스 인플루엔자(4가지 균주) 면역화된 쥐의 혈청 내에 존재하는 항체에 의한 OMP26 인식의 면역 블로트 분석 결과, 면역화된 각각의 그룹으로부터 취한 혈청 내에 존재하는 항체에 의해 상기 단백질이 인식되었으나, 비면역 그룹으로부터 취한 혈청 내에 존재하는 항체에 의해 상기 단백질은 인식되지 않았다(도 6). 이는 본 연구에서 사용된 해모필러스 인플루엔자 균주를 이용하는 면역화에 의해 생성된 항체-반응과 NTHI-I 균주로부터 정제된 OMP26과의 교차 반응성을 나타내는 것이다.

(vi) 항원-특이성 림프구 분석

장간막 림프 결절(MLN)로부터 수득한 림프구는 1 ml 당 10^6 세포 농도로 배양하였다. 항원(OMP26)은 배양 배지 내에서 일련의 10배 희석율로 혼탁하고, 멀균 여과하였다. 상기 세포 혼탁액 및 항원은 바닥이 평평한 다중웰 평판에 3회 첨가하여 1개의 웰 당 최종 부피를 0.2 ml 로 하였다. 림프구 증식은 4일 배양의 최종 8 시간 동안 [^3H]티미딘 흔입에 의해 산정하였다. 결과는 3개의 웰의 기하학적 평균으로부터 바탕치를 감하고, 이어서 기하학적 평균 ± 전체 처리 그룹의 표준 오차로 나타냈다.

결과

OMP26-면역화된 및 비면역화된 쥐의 MLN으로부터 취한 림프구는 항원-특이성 증식성 반응에 대해 분석하였다. OMP26-면역화된 그룹으로부터 취한 세포는 시험관 내에서 배양을 내의 OMP26에 현저하기 결합한 반면, 비면역화된 쥐로부터 취한 세포는 현저한 증식을 나타내지 않았다(도 7A). 또한, OMP26으로 면역화된 쥐로부터 취한 림프구는 4가지 해모필러스 인플루엔자 균주로부터 추출한 OMP 추출물과 함께 반응시켜 교차 반응성 반응을 평가하였다. 현저한 증식성 반응은 균주 NTHI-I, NTHI-II 및 HI-CD로부터 추출한 OMP 추출물에 대해 OMP26-면역화된 그룹으로부터 취한 림프구에서 확인되었으나, Hib-II 균주로부터 추출한 추출물에 대해서는 현저한 증식이 관찰되지 않았다(도 7B-E).

실시예 2: OMP26의 클로닝 및 서열 결정

DNA는 NTHI로부터 추출하였다. OMP26을 암호화하는 DNA 영역을 동정하고, 상기 유전자를 인식하도록 설계된 프라이머(오스트레일리아, 에씨티, 캔버라에 소재하는 존 커틴 스쿨 오브 메티칼 리서치의 바이오플레큘라 리소스 퍼실리티에서 합성함)를 이용하는 표준 PCR로 증폭하였다. 정확한 생성물의 성공적인 인식 여부를 결정하기 위한 분석을 수행한 후, 상기 PCR DNA 생성물을 추출하였다.

2개의 플라즈미드를 제조하였다. 하나의 DNA 생성물은 신호 펩티드 및 성숙 OMP26 생성물을 둘 다를 암호화하는 영역을 함유하였으며, 두 번째 DNA는 최종 성숙 OMP26을 암호화하였다(리더 신호 펩티드 없음). 상기 PCR DNA 생성물은 OMP26 + 신호 펩티드를 위해서는 엔도뉴클레아제 HindIII 및 성숙 OMP26을 위해서는 NspBIII + HindIII로 분해하였다. 분해된 DNA는 회수하고, OMP26 + 신호 펩티드 또는 OMP26 성숙 펩티드를 위해 SmaI 및 HindIII 위치에서 플라즈미드 pQE30 또는 pQE31(독일, 헬덴에 소재하는 기아젠 게엠베하)내로 각각 연결하였다. 이어서, 상기 플라즈미드를 정제하고, 침전시켰다. 서열 결정은 오스트레일리아, 에이씨티, 캔버라에 소재하는 존 커틴 스쿨 오브 메티칼 리서치의 바이오플레큘라 리소스 퍼실리티에서 염료 디데옥시-종결자법으로 수행하였다.

결과

도 1에 나타낸 서열은 성숙 OMP26 + 신호 펩티드 둘 다를 나타낸 것이다. 신호 펩티드 서열은 최초 23개의 아미노산을 포함하였다. 외막에서 NTHI에 의해 발현된 최종 생성물은 24번 아미노산에서 개시되었다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

해모필러스 인플루엔자의 외막 단백질이고, SDS-PAGE에 의해 결정된 분자량이 26 kDa인 단백질.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 도 1에 나타난 아미노산 서열 또는 이 서열에 실질적으로 상동성인 서열을 보유하는 단백질.

청구항 3

제 1 항에 있어서, N-말단 아미노산으로서 24번째 아미노산으로부터 개시되는 도 1에 나타낸 바와 같은 아미노산 서열 또는 이 서열에 실질적으로 상동성인 서열을 보유하는 단백질.

청구항 4

제 2 항 또는 제 3 항에 있어서, 도 1에 나타낸 아미노산 서열에 70% 이상 상동성인 아미노산 서열을 보유하는 단백질.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항중 어느 한 항에서 정의한 바와 같은 단백질의 항원 부분 또는 영역인 단백질 또는 펩티드.

청구항 6

제 1 항 내지 제 4 항중 어느 한 항에서 정의한 바와 같은 단백질의 항원 부분 또는 영역을 포함하는 단백질.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 융합 단백질인 단백질.

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항중 어느 한 항에서 정의한 바와 같은 단백질을 암호화하는 핵산 서열.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 핵산 서열이 DNA 서열인 핵산 서열.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 DNA 서열이 도 1에 나타낸 DNA 서열인 핵산 서열.

청구항 11

제 1 항 내지 제 7 항중 어느 한 항에서 정의한 단백질, 필요에 따라 하나 이상의 담체 및/또는 보조제를 포함하는 백신 조성을.

청구항 12

제 1 항 내지 제 7 항중 어느 한 항에서 정의한 단백질을 해모필러스 인플루엔자에 대한 백신 제조에 사용하는 방법.

청구항 13

제 11 항에서 정의한 백신을 검체에 투여하는 단계를 포함하는, 해모필러스 인플루엔자에 의한 감염에 대해 검체를 면역화하는 방법.

청구항 14

제 11 항에서 정의한 백신을 검체에 투여하는 단계를 포함하는, 호흡기 감염 또는 종이염의 예방 또는 치료 방법.

청구항 15

제 1 항 내지 제 7 항중 어느 한 항에서 정의한 단백질을 해모필러스 인플루엔자 감염의 진단에 사용하는 방법.

청구항 16

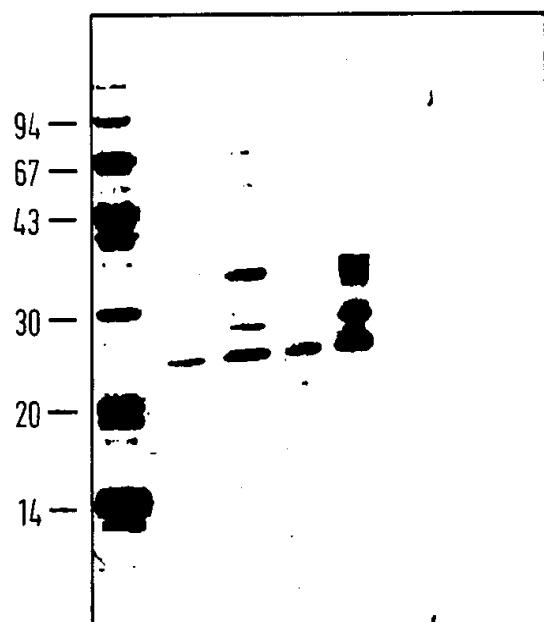
제 1 항 내지 제 7 항중 어느 한 항에서 정의한 단백질을 포함하는 해모필러스 인플루엔자 감염의 진단용 키트.

도면

도면1

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
ATGAAAAAAC	TCGCAAAAGT	AACCGCACTT	GCTTTAGGTA	TTGCACTTGC	50
M K N I	A K V	T A L	A L G	I A L A	
TTCAGGCTAT	GCTTCCGCTG	AAGAAAAAAT	TGCTTTCATT	AATGCAGGTT	100
S G Y	A S A E	E K I	A F I	N A G Y	
ATATTTTC	ACATCACCCA	GATCGCCAAG	CGGTAGCAGA	TAAACTTGAT	150
I F O	H H P	D R Q A	V A D	K L D	
GCTGAATTAA	AACCTGTAGC	TGAGAAAATTA	GCAGCAAGCA	AAAAAGAAGT	200
A E F K	P V A	E K L	A A S K	K E V	
TGATGATAAA	ATTGCTGCTG	CTCGTAAAAAA	AGTAGAAGCA	AAAGTTGCGG	250
D D K	I A A A	R K K	V E A	K V A A	
CTTTAGAAAA	AGATGCACCT	CGCTTACGTC	AAGCTGATAT	TCAAAACGC	300
L E K	D A P	R L R Q	A D I	Q K R	
CAAGAAGAAA	TTAATAAATT	AGGTGCGGCT	GAAGATGCTG	AATTACAAAA	350
Q E E I	N K L	G A A	E D A E	L Q K	
ATTAATGCAA	GAACAAGATA	AAAAAGTTCA	AGAATTCCAA	GCTAAAATG	400
L M Q	E Q D K	K V Q	E F Q	A Q N E	
AAAAACGTCA	AGCTGAAGAA	CGTGGTAAAT	TATTAGATAG	CATTCAAAC	450
K R Q	A E E	R G K L	L D S	I Q T	
GCGACAAATA	ATTTAGCAAG	AGCAAAAGGT	TATACTTATG	TGCTTGATGC	500
A T N N	L A R	A K G	Y T Y V	L D A	
AAATTCA	GTATTTGCGG	TAGAGGGTAA	AGATATTACT	GAAGAAGTAT	550
N S V	V F A V	E G K	D I T	E E V L	
TAAAATCTAT	CCCTGCTTCT	GAAAAAGCAC	AAGAGAAAAA	ATAATAGGTT	600
K S I	P A S	E K A Q	E K K	X X V	

도면2



도면3

A.

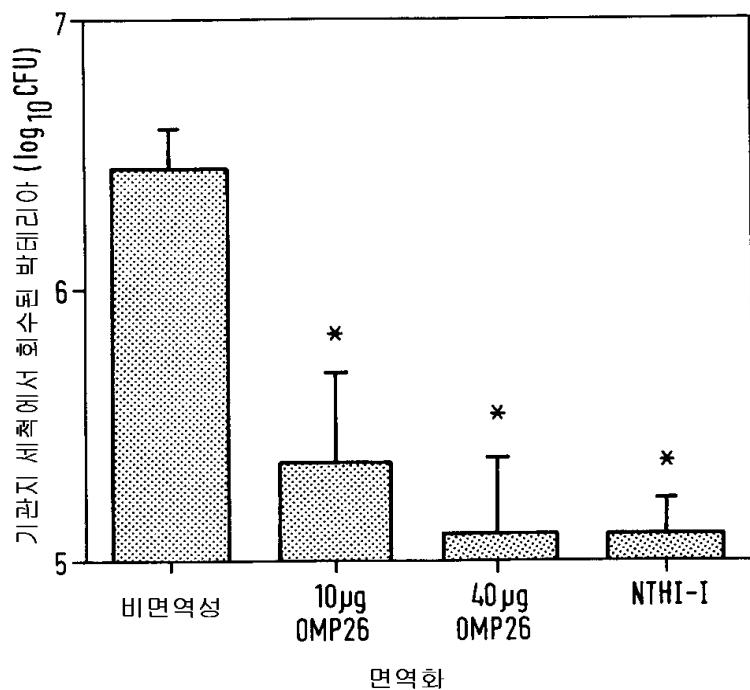
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Glu	Glu	Lys	Ile	Ala	Phe	Ile	Asn	Ala	Gly	Tyr	Ile	Phe
E	E	K	I	A	F	I	N	A	G	Y	I	F
14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
Cln	His	His	Pro	Asp	Arg	-	Ala	Val	-	-	Lys?	
Q	H	H	P	D	R		A	V			K	

B.

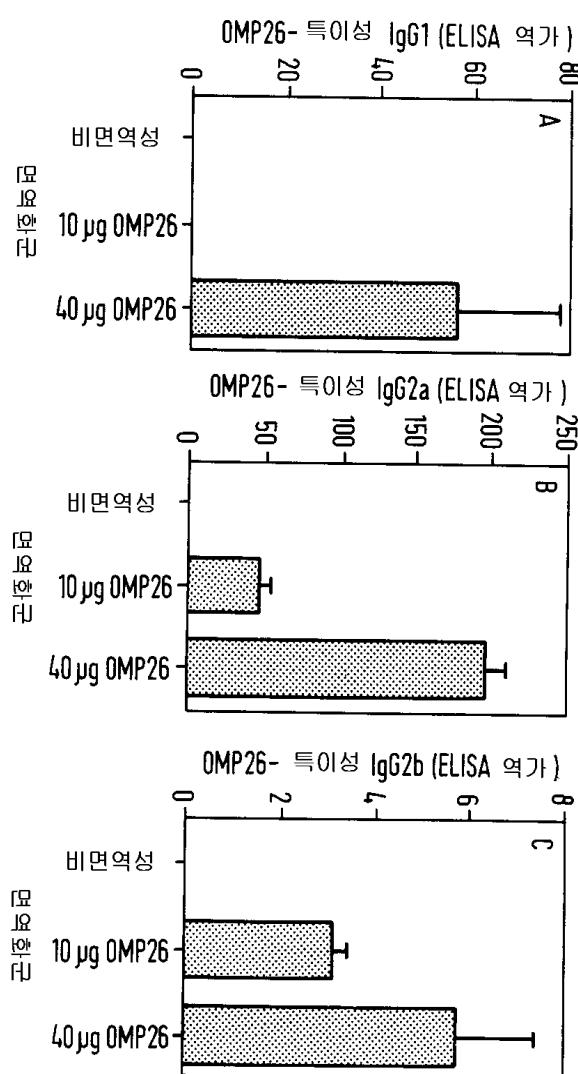
OMP26												
E	E	K	I	A	F	I	N	A	G	V	I	F
II.	U	T	S	A	F	I	S	G	D	V	L	F
skp	단백질											
와이.	슈도투베르클로시스											
OMP	PH											

Sequence alignment of OMP26 and OMPH. The alignment shows the amino acid sequence of OMP26 (top) and OMPH (bottom). The sequence starts with Glu (E), followed by Glu (E), Lys (K), Ile (I), Ala (A), Phe (F), Ile (I), Asn (N), Ala (A), Gly (G), Tyr (Y), Ile (I), and Phe (F). The sequence continues with Cln (Q) at position 14, His (H) at position 15, His (H) at position 16, Pro (P) at position 17, Asp (D) at position 18, Arg (R) at position 19, a dash at position 20, Ala (A) at position 21, Val (V) at position 22, a dash at position 23, a dash at position 24, a dash at position 25, and Lys? (K) at position 26. The sequence ends with a dash at position 27. The alignment is shown in a grid where each cell contains the amino acid at that position for both proteins. The first 13 positions are aligned, while positions 14 through 26 show significant divergence.

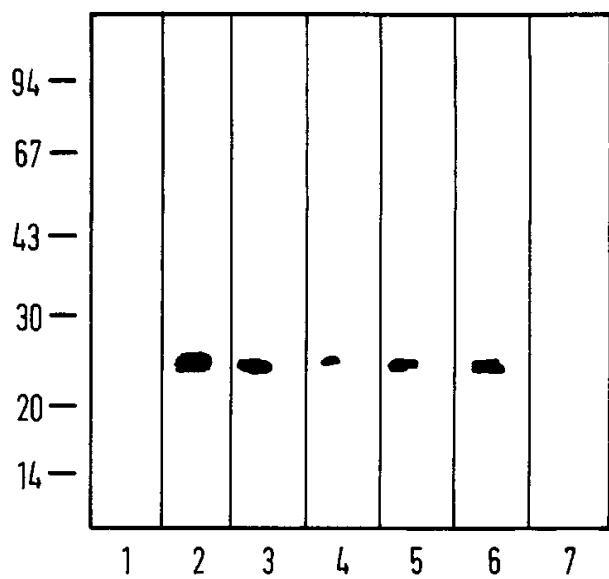
도면4



도면5



도면6



도면7

