



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0089951
(43) 공개일자 2022년06월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/02 (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)
C07K 14/195 (2006.01) *C12N 15/113* (2010.01)

(52) CPC특허분류

A61K 39/0208 (2013.01)
A61P 31/04 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2020-0180649

(22) 출원일자 2020년12월22일

심사청구일자 2020년12월22일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김민자

서울특별시 동대문구 청계천로 471, 대성스카이렉스2 101-303

(74) 대리인

특허법인 피씨알

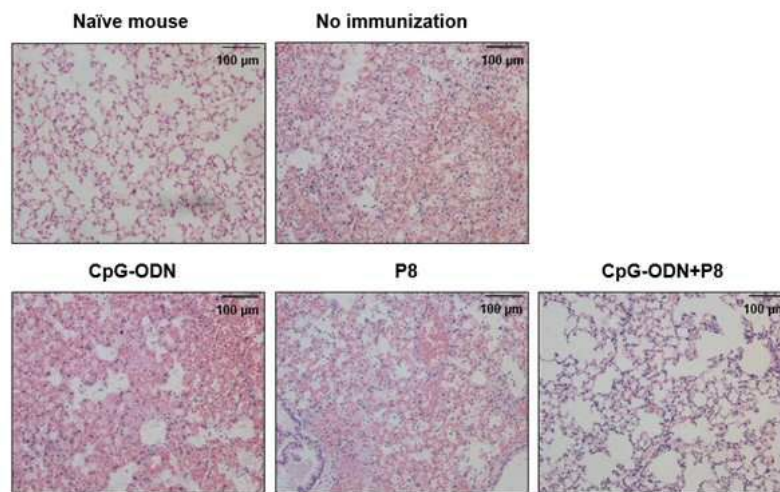
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 레지오넬라속 균주 유래 펩티도글리칸 관련 지질단백질 (PAL) 펩타이드를 포함하는 면역원성 조성물

(57) 요약

본 발명은 레지오넬라속 균주 유래 펩티도글리칸 관련 지질단백질 (PAL) 펩타이드를 포함하는 면역원성 조성물 및 서열번호 1로 표시되는 펩타이드를 포함하는 레지오넬라 속 세균 감염 예방용 조성물에 관한 것이고, 서열번호 1로 표시되는 펩타이드가 클래스 I 주조직 복합체(Class I MHC (Major Histocompatibility))에 결합하여 CD8+ T 세포의 세포면역반응을 유도함으로써 레지오넬라 속 세균 감염을 예방할 수 있고, CpG-올리고디옥시뉴클레오타이드 (oligodeoxynucleotides, ODN)과 병합하여 투여하였을 때 더욱 우수한 세균 감염 예방 효과를 제공할 수 있다.

대 표 도 - 도15



(52) CPC특허분류

C07K 14/195 (2013.01)

C07K 7/06 (2013.01)

C12N 15/113 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345293389

과제번호 2017R1D1A1B03034363

부처명 교육부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(교육부)(R&D)

연구과제명 레지오넬라 뉴모필라 세균의 펩티도글리칸 관련 지질단백항원 유래 T 세포 항원결정
기 갖는 합성 펩타이드 기반 백신 개발

기 여 율 1/3

과제수행기관명 고려대학교

연구기간 2019.03.01 ~ 2019.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345276137

과제번호 2017R1D1A1B03034363

부처명 교육부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(교육부)(R&D)

연구과제명 레지오넬라 뉴모필라 세균의 펩티도글리칸 관련 지질단백항원 유래 T 세포 항원결정
기 갖는 합성 펩타이드 기반 백신 개발

기 여 율 1/3

과제수행기관명 고려대학교

연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345264929

과제번호 2017R1D1A1B03034363

부처명 교육부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(교육부)

연구과제명 레지오넬라 뉴모필라 세균의 펩티도글리칸 관련 지질단백항원 유래 T 세포 항원결정
기 갖는 합성 펩타이드 기반 백신 개발

기 여 율 1/3

과제수행기관명 고려대학교

연구기간 2017.06.01 ~ 2018.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 펩타이드를 포함하는 면역원성 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 서열번호 1로 표시되는 펩타이드는 레지오넬라 뉴모필라 (*L. pneumophila*)의 펩티도글리칸 관련 지질단백질(Peptidoglycan-associated lipoprotein, PAL) 유래인 면역원성 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 서열번호 1로 표시되는 펩타이드는 클래스 I 주조직 복합체(Class I MHC (Major Histocompatibility))에 결합하여 CD8+ T 세포의 세포면역반응을 유도하는 면역원성 조성물.

청구항 4

서열번호 1로 표시되는 펩타이드를 포함하는 레지오넬라 속 세균 감염 예방용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 서열번호 1로 표시되는 펩타이드는 레지오넬라 뉴모필라 (*L. pneumophila*)의 펩티도글리칸 관련 지질단백질(Peptidoglycan-associated lipoprotein, PAL) 유래인 레지오넬라 속 세균 감염 예방용 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 서열번호 1로 표시되는 펩타이드는 클래스 I 주조직 복합체(Class I MHC (Major Histocompatibility))에 결합하여 CD8+ T 세포의 세포면역반응을 유도하는 레지오넬라 속 세균 감염 예방용 조성물.

청구항 7

제4항에 있어서,

상기 레지오넬라 속 세균 감염 예방용 조성물은 CpG-올리고디옥시뉴클레오타이드 (oligodeoxynucleotides, ODN)를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 레지오넬라 속 세균 감염 예방용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 CpG-올리고디옥시뉴클레오타이드 (oligodeoxynucleotides, ODN)는 서열번호 2인 레지오넬라 속 세균 감염 예방용 조성물.

청구항 9

제4항에 있어서,

상기 레지오넬라 속 세균은 레지오넬라 뉴모필라 (*L. pneumophila*)인 레지오넬라 속 세균 감염 예방용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 레지오넬라속 균주 유래 펩티도글리칸 관련 지질단백질 (PAL) 펩타이드를 포함하는 면역원성 조성물 및 서열번호 1로 표시되는 펩타이드를 포함하는 레지오넬라 속 세균 감염 예방용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 레지오넬라 균종(*Legionella* species)은 자연환경 내에 널리 분포하고 있는 친수성 그람 음성 간균으로 지금까지 약 70여 종의 혈청형(serogroup)이 알려져 있으며, 약 반수가 인체 감염을 유발한다. 레지오넬라 균종 중 *Legionella pneumophila* serogroup은 1형부터 16형까지 밝혀져 있으며, 나머지는 non-pneumophila serogroup으로 분류된다. 레지오넬라균은 특히 환경수, 병원이나 호텔 등의 대형 건물의 냉각탑수, 급수시설, 냉방장치 관련 시설 등에 오염이 되어 있는 경우 비말 형태로 인체로 흡입되어 집단적으로 또는 산발적으로 급성 호흡기 질환을 유발하며, 지역사회 획득성 폐렴과 면역기능저하 환자들에서 발생하는 치명적인 원내폐렴을 유발하는 주요 병원균 중의 하나로 부각되고 있다. 레지오넬라 폐렴은 급성 세균성 폐렴의 일차적 항생제 치료제로 흔히 사용되는 베타락탐계열, 아미노글리코사이드 계열 등에 효과가 없으며 정확한 진단 하에 레지오넬라 폐렴의 선택적 치료제인 respiratory quinolone 또는 macrolide 제제를 투여하여야 한다.

[0004] 이에 대한민국 공개특허 제10-2006-0039145호에서는 레지오넬라 균종의 공통 지질단백항원 및 이를 이용한 레지오넬라 검출용 진단 시약을 개시하고, 대한민국 공개특허 제 10-2010-0101276호에서는 인체 병원성을 유발하는 레지오넬라 속을 검출하기 위해 제작한 항체 및 이를 사용한 레지오넬라 속 세균 검출능을 확인하는 방법을 개시하나, 이들은 레지오넬라 검출에 관한 내용만을 개시할 뿐이고 이들의 치료, 예방 방법에 대한 수요가 꾸준히 있어왔다.

[0005] 레지오넬라 세균 감염의 치료 물질로서 에리스로마이신(Erythromycin), 아지트로마이신(Azithromycin) 등 매크로라이드(Macrolide)계나 퀴놀론(Quinolone)계 등의 항생제가 알려져 있으며 임상에서 레지오넬라 폐렴의 치료에 사용되고 있다. 그러나 장기이식수여자나 면역억제제 투여환자, 항암치료 환자 등 세포성 면역기능이 저하된 환자들에서 발생하는 원내 레지오넬라 폐렴은 임상 경과 악화가 매우 급격히 진행하여, 중증 폐렴을 유발하며, 효과적인 항생제를 투여할지라도 종종 사망을 초래할 수 있다. 그러므로 이들 위험군을 위한 레지오넬라 폐렴에 효과적인 예방 백신을 개발하는 것이 필요하다.

[0006] 이에 본 발명의 발명자는 레지오넬라균의 지질단백항원에 대한 후속 연구를 통해 레지오넬라 뉴모필라의 펩티도글리칸 관련 지질단백질 유래 펩타이드가 CD8+T 세포의 세포면역반응을 유도하는 것을 확인하였고, 이를 통해 레지오넬라 속 세균 감염을 예방할 수 펩타이드 기반 백신 항원임을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2006-0039145호
(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허 제10-2010-0101276호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 하나의 목적은 서열번호 1로 표시되는 펩타이드를 포함하는 면역원성 조성물을 제공하는 것이다.
[0010] 본 발명의 다른 하나의 목적은 서열번호 1로 표시되는 펩타이드를 포함하는 레지오넬라 속 세균 감염 예방용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명의 일 양상은 서열번호 1로 표시되는 펩타이드를 포함하는 면역원성 조성물을 제공한다.
[0013] 구체적으로 상기 서열번호 1로 표시되는 펩타이드는 레지오넬라 뉴모필라 (*L. pneumophila*)의 펩티도글리칸 관련 지질단백질(Peptidoglycan-associated lipoprotein, PAL)로부터 유래인 것이고,
[0014] 상기 서열번호 1로 표시되는 펩타이드는 클래스 I 주조직 복합체(Class I MHC (Major Histocompatibility))에 결합하여 CD8+ T 세포의 세포면역반응을 유도하는 것이다.
[0015] 본 발명에서 사용되는 용어 '펩타이드'는, 펩타이드 결합에 의해 아미노산 잔기들이 서로 결합되어 형성된 선형 분자를 의미한다. "펩타이드"란 용어는 넓게는 "폴리펩타이드" 또는 '단백질'과 동일한 의미로 사용된다.
[0016] 본 발명에서 사용되는 용어 '면역원성 조성물'은 대상에게 투여된 후, 상기 대상의 면역 반응에 긍정적으로 영향을 주는 조성물을 의미하는 가장 광범위한 의미로 사용된다. 면역원성 조성물은 대상에게 세포성 면역 반응, 예를 들어 세포독성 림프구 또는 체액성 면역 반응, 예를 들어 항체 유발에 의한 향상된 전신적 또는 국소적 면역 반응을 제공한다.
[0017] 상기한 서열번호 1로 표시되는 펩타이드는 19-kDa 크기의 레지오넬라 뉴모필라 (*L. pneumophila*)의 펩티도글리칸 관련 지질단백질(Peptidoglycan-associated lipoprotein, PAL) 중 일부일 수 있고, 구체적으로는 PAL₉₂₋₁₀₀ 위치의 지질단백질로서 다른 위치의 지질단백질에 비해 우수한 면역원성 효과가 있고, 이를 통해 후술되는 바와 같이 레지오넬라 속 세균 감염 예방용 조성물로 활용될 수 있다.
[0018] 상기 레지오넬라 뉴모필라 (*L. pneumophila*)의 펩티도글리칸 관련 지질단백질(Peptidoglycan-associated lipoprotein, PAL)은 19-kDa 크기의 외부 세포막에 위치한 물질로서 레지오넬라 뉴모필라 (*L. pneumophila*) 혈청균에 속하는 균주 외에도 다양한 레지오넬라 속 즉 non-pneumophila 혈청균에 속하는 레지오넬라 균들의 세포막에서 확인되는 레지오넬라 종 (*Legionella* species)의 공통 면역항원이다. 이는 레지오넬라 표면항원 중 가장 풍부한 조성 성분으로, 균 표면항원이 용해되어 혈액 속에 순환을 하게 되며, 감염된 환자의 소변에서 확인될 수 있으므로 레지오넬라 속 세균 감염 진단을 위한 표적 물질로 사용될 수 있다 (대한민국 공개특허 제10-2006-0039145호).
[0019] 상기 클래스 I 주조직 복합체(Class I MHC (Major Histocompatibility))는 면역반응에서 자기/비자기 (self/non-self)를 구별하게 하는 것으로서 대부분의 유핵세포에 분포하며 세포질에서 생성된 단백질(항원)을 제시함으로써 자기/비자기(self/non-self)를 구별하게 한다. 특히 세포독성 T 세포에게 제시하는 경우, CD8+ T 세포는 T 세포 수용체를 가지고 있어, 모든 세포의 표면에 위치한 클래스 I MHC 분자에 붙어있는 특정한 항원의 펩타이드를 인식할 수 있다. 그리고, CD8+ T 세포는 항원을 제시하는 세포에 의해서 제시된 항원을 인식하여 활성화될 수 있다. 즉, 본 발명의 서열번호 1로 표시되는 펩타이드는 클래스 I 주조직 복합체(Class I MHC (Major Histocompatibility))에 결합하여 CD8+ T 세포에 제시됨으로써 비자기성 물질을 인식하게 되고 세포면역반응을 유도한다. 이러한 세포면역반응은 후술되는 레지오넬라 속 세균 감염 예방적으로 투여한 이후 개체의 면역이 저하된 경우에 있어서도 유도가 되므로, 레지오넬라 속 세균 감염에 대하여 예방 효과를 낼 수 있다.

- [0021] 본 발명의 서열번호 1로 표시되는 펩타이드를 포함하는 레지오넬라 속 세균 감염 예방용 조성물을 제공한다. 구체적으로, 상기 서열번호 1로 표시되는 펩타이드는 레지오넬라 뉴모필라 (*L. pneumophila*)의 펩티도글리칸 관련 지질단백질(Peptidoglycan-associated lipoprotein, PAL)에서 유래되었다.
- [0022] 또한, 상기 서열번호 1로 표시되는 펩타이드는 클래스 I 주조직 복합체(Class I MHC (Major Histocompatibility))에 결합하여 CD8+ T 세포의 세포면역반응을 유도할 수 있다.
- [0023] 그리고, 상기 레지오넬라 속 세균 감염 예방용 조성물은 CpG-올리고디옥시뉴클레오타이드 1826 (oligodeoxynucleotides, ODN)를 더 포함할 수 있고, 상기한 CpG-올리고디옥시뉴클레오타이드 1826 (oligodeoxynucleotides, ODN)는 서열번호 2일 수 있다.
- [0024] 또한, 상기 레지오넬라 속 균주는 레지오넬라 뉴모필라 (*L. pneumophila*)가 대표적인 균주에 해당한다.
- [0025] 본 발명에서 사용되는 용어 '레지오넬라 속 세균'은 *Legionella* 속에 포함되는 세균들을 총칭하며, 레지오넬라 감염을 일으키는 세균들을 의미한다.
- [0026] 본 발명에서 사용되는 용어 '세균 감염'이란 외부로부터 유해 세균이 침투하여 증식하는 것을 의미하고, 구체적으로는 인체에 침투하여 증식하는 것을 의미한다. 한편, 레지오넬라 속 세균 감염에 의한 폐렴의 방어면역 기전이 항체 매개 방어면역기전인지 세포 매개 방어면역 기전에 의한 것인지 명확하게 밝혀진 바 없었다. 그러나, 본 발명의 발명자는 PAL DNA 면역화 및 레지오넬라 폐렴의 방어면역실험을 통하여 세포매개면역 기전이 레지오넬라 폐렴의 주요 방어면역기전에 관여됨을 처음으로 확인하였다 (실험예 1 및 도 2 참조).
- [0027] 본 발명에서 사용되는 용어, '예방'이란 세균 감염에 따른 질병의 발병을 억제하거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 구체적으로 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 레지오넬라 속 세균 감염을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0028] 상기 CpG-올리고디옥시뉴클레오타이드 (oligodeoxynucleotides, ODN)는 비메틸화된 CpG 모티프를 포함하는 짧은 합성 DNA로서 박테리아의 DNA에 널리 분포하며, TLR9에 의해 인식되는 TLR9 작용제이다. CpG-올리고디옥시뉴클레오타이드 (oligodeoxynucleotides, ODN)는 또한 면역반응 유도 물질로서, 사이토카인과 인터페론의 생산, B 세포 단세포의 성숙, NK세포와 수지상 세포의 활성화를 유도한다. 본 발명의 CpG-올리고디옥시뉴클레오타이드 1826 (oligodeoxynucleotides, ODN)는 서열번호 2로 이루어진 것일 수 있고, 전술한 서열번호 1의 펩타이드와 병용 투여하였을 때 레지오넬라 속 세균 감염에 대하여 우수한 예방효과를 나타냄을 확인하였다.
- [0029] 상기 레지오넬라 속 균주는 레지오넬라 속에 해당되는 어떠한 균종도 해당될 수 있고, 구체적으로는 서열번호 1의 펩타이드를 펩티도글리칸 관련 지질단백질로 가지고 있어, 서열번호 1의 펩타이드에 의한 면역항원성질에 의하여 예방이 될 수 있는 레지오넬라 속 균종에 속하는 레지오넬라 균주는 *L. pneumophila*, *L. sainthelens*, *L. parisiensis*, *L. moravica*, *L. shakespearei*, *L. gratiana*, *L. longbeachae* serogroup 1, *L. dumoffii*, *L. wadsworthii*, *L. gormanii*, *L. anisa*, *L. bozemanii* serogroup 1, *L. bozemanii* serogroup 2, *L. longbeachae* serogroup 2, *L. maceachemii*, *L. jordanis*, *L. heckeliea* serogroup 2, *L. heckeliea* serogroup 1 중 어느 하나 이상 일 수 있고, 더욱 구체적으로는 레지오넬라 뉴모필라 (*L. pneumophila*)의 16종의 혈청형에 속하는 레지오넬라 균종 중 레지오넬라 뉴모필라 제일 혈청형 (*L. pneumophila* serogroup 1)를 포함한다.
- [0030] 본 발명에 따른 예방용 조성물은 서열번호 1로 표시되는 펩타이드를 유효성분으로 포함하며, 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 사이클로덱스트린, 텍스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포솜 등을 포함하지만 이에 한정되지 않으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액 등 다른 통상의 첨가제를 더 포함할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제, 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형으로 제제화 할 수 있다. 또한, nanoparticles를 사용하여 peptide amphiphilic micelles로 제제화 할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제화에 관해서는 레밍턴의 문헌에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 제형에 특별한 제한은 없으나 주사제 (근육 주사, 피하 주사, 피내 주사)와 흡입제 등으로 제제화 할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 예방용 조성물은 목적하는 방법에 따라 비경구투여 (예를 들어, 정맥 내, 피하, 피부, 비강, 기도에 적용)할 수 있으며, 투여량은 접종 대상자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로, 투여 횟수 등에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[0032] 본 발명에 따른 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 예방에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 예방하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 접종 대상자의 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 투여 횟수, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 따른 예방용 조성물은 단일 제제로 투여하거나 다른 예방 백신 제제와 병용하여 투여될 수 있고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0033] 구체적으로, 본 발명에 따른 조성물의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg 당 0.001 내지 150 mg, 바람직하게는 0.01 내지 100 mg을 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0034] 본 발명의 예방용 조성물은 인체면역반응의 실험적 연구에 가장 많이 대체 사용하고 있는 전임상 모델(preclinical models)로서 마우스의 면역반응 실험을 통하여 발명한 것으로, 레지오넬라 감염에 대한 인체의 방어적 면역반응 유도에 확대 적용할 수 있을 것으로 기대된다. 다만, 클래스 I 주조직 복합체(Class I MHC (Major Histocompatibility))는 마우스와 인간 사이에 차이가 알려져 있으므로 인간 Class I MHC에 결합하여 CD8+ T 림프구 반응을 유도할 수 있는 레지오넬라 지질단백항원의 펩타이드 리간드 아미노산 서열은 유사하거나 일부 차이를 보일 수 있다.

발명의 효과

[0036] 본 발명의 서열번호 1로 표시되는 펩타이드를 포함하는 면역원성 조성물 및 서열번호 1로 표시되는 펩타이드를 포함하는 레지오넬라 속 세균 감염 예방용 조성물은 서열번호 1로 표시되는 펩타이드가 클래스 I 주조직 복합체(Class I MHC (Major Histocompatibility))에 결합하여 CD8+ T 세포의 세포면역반응을 유도함으로써 레지오넬라 속 세균 감염을 예방할 수 있고, CpG-올리고디옥시뉴클레오타이드 1826 (oligodeoxynucleotides, ODN)과 병합하여 투여하였을 때 더욱 우수한 세균 감염 예방 효과를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도 1은 실험에 1의 도식도이다. 구체적으로 PAL DNA 면역화(vaccination), CD8+T세포의 고갈(Anti-CD8 IgGs) 및 레지오넬라 뉴모필라(*L. pneumophila*) 감염(2×10^7 CFU, i.v.)의 투여 순서와 투여 시점을 나타낸다.

도 2는 실험에 1에 따른 결과를 나타내는 도면으로, 각각의 실험조건에 따른 세균 감염에 따른 생존율(%)을 나타낸다. DNA 백신(pcDNA-PAL)을 투여한 실험군은 50% 생존율을 보이고, CD8+T세포 고갈시킨 실험군은 0% 생존율을 보이므로 레지오넬라 뉴모필라 세균의 PAL 지질단백이 CD8+T세포 면역기전을 통하여 방어면역효과를 유도하는 것을 증명한다.

도 3은 레지오넬라 뉴모필라 균종의 펩티도글리칸 지질단백으로부터 유래된 13개의 펩타이드 항원결정기(epitope) 후보들에 의한 PAL-특이적 비장 세포의 IFN- γ 의 인터페론-감마 분비 능력을 비교한 실험에 결과를 나타내는 도면으로, P8 펩타이드가 여러 펩타이드들 중에서 가장 높게 PAL-특이적 IFN- γ 의 생산을 유도함을 나타낸다.

도 4는 도 3에서 확인된 P8 펩타이드의 농도 증가에 따른 IFN- γ 분비능을 확인하는 실험에 결과를 나타내는 도면으로, P10(대조군)과 P8의 농도 별(1, 100, 1,000 또는 10,000 ng/ml) IFN- γ 의 농도를 측정된 결과를 나타낸 것이다. P10(대조군)에 비하여 P8은 농도 의존성(dose-dependent) 양상으로 뚜렷하게 IFN- γ 의 분비를 증가시킴을 확인한 것이다.

도 5는 실험에 2에 따른 결과를 나타내는 도면으로 도3의 실험결과를 바탕으로 선정된 P8 펩타이드 항원에 의한 CTL 용해 수준을 도면으로 나타내었다. 구체적으로, 전술한 면역화된 마우스 및 이로부터 회수한 비장을 주효세포로 이용하고, P8 펩타이드 또는 rPAL로 처리된 동계의 타겟 세포를 이용하여 *in vitro* 상 용해 활성을 확인하였다.

도 6 은 실험예 2에 따른 결과를 나타내는 도면으로, 도3의 실험결과를 바탕으로 선정된 P8 펩타이드 항원에 의한 CTL 용해 수준을 *in vivo* 상에서 용해 활성을 측정하기 위해 수행한 CFSE-based cytotoxicity assay의 flow cytometry 결과를 나타낸다.

도 7은 실험예 2에 따른 결과를 나타내는 도면으로, 도 6에서 나타난 *in vivo* CTL 용해 수준 (%)를 도식화하여 나타낸 것이다. 대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 경우 * ($p < 0.05$) 표시함.

도 8은 실험예 3에 따른 결과를 나타내는 도면으로, 각각의 다른 면역화 실험군들과 대조군에서 면역억제제 cyclophosphamide 75 mg/kg 처리하여 면역저하를 유발하고, 레지오넬라 균을 감염시킨 후 시점별 생존한 마우스를 확인한 것이다.

도 9 및 10은 실험예 3에 따른 결과를 나타내는 도면으로, 각각의 다른 면역화 실험군들과 대조군에서 면역억제제 cyclophosphamide 150 mg/kg 처리하여 면역저하를 유발하고, 레지오넬라 균을 감염시킨 후 시점 별 생존율을 확인하였다.

도 11은 실험예 4에 따른 결과를 나타내는 도면으로, 각각의 다른 면역화 실험군들과 대조군에서 레지오넬라 균을 정맥투여로 감염시킨 후 폐 조직에서 분리되는 폐조직 그람 단위당 세균 수를 정량한 결과를 나타낸다.

도 12는 실험예 4에 따른 결과를 나타내는 도면으로, 각각의 다른 면역화 실험군들과 대조군에서 면역억제제 cyclophosphamide 150 mg/kg 전처리하여 면역저하를 유발하고, 레지오넬라 균을 비강 경로로 감염시킨 후 면역저하된 마우스의 폐 조직에서 분리되는 폐조직 그람 단위당 세균 수를 정량한 결과를 나타낸다. 레지오넬라 감염은 특히 장기 이식환자나 면역억제제를 투여하는 환자들에서 발생위험이 높으므로 본 실험에서 면역억제제 cyclophosphamide 를 전처리하여 면역억제를 유도한 상태에서 방어면역 효과가 있음을 확인하였다.

도 13 및 14는 실험예 4에 따른 결과를 나타내는 도면으로, 도 12에서와 동일한 조건 하에서 비장세포 배양 상층액을 취하여 IFN- γ (도 13) 및 TNF- α (도 14) 유리 농도를 측정한 것이다. 대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 경우 * ($p < 0.05$) 표시함.

도 15는 실험예 5의 결과를 나타내는 도면으로, 각각의 다른 면역화 실험군들과 대조군에서 면역억제제 cyclophosphamide 150 mg/kg 전처리하여 면역저하를 유발하고, 레지오넬라 균을 비강 경로로 감염시킨 후 적출한 폐조직의 병리조직의 염증성 부위 발생 양상을 각 군 사이에 비교하는 대표적인 사진을 나타낸다 (200 배율).

도 16은 실험예 6의 실험과정을 나타내는 것으로, P8의 치료 효과를 평가하기 위하여 면역억제제 투여 및 레지오넬라 균 감염 시킨후 P8 및 CpG-ODN로 투여 평가 시점을 나타내었다.

도 17은 실험예 6에 따른 결과를 나타내는 것으로, P8의 치료 효과를 평가하기 위하여 면역억제제 투여 및 레지오넬라 균 감염 시킨 후 P8 및 CpG-ODN로 투여하여 생존율을 확인하여 치료 효과를 평가한 것이다.

도 18은 실험예 7에 따른 결과를 나타내는 것으로, 20종의 레지오넬라 (*Legionella*) 속의 PAL 단백질의 아미노산 서열 (위치 61에서 120까지)을 동시에 나열하여 비교하였을 때, 18개의 균종에서 동일한 PAL₉₂₋₁₀₀ 펩타이드 서열(EYLKTHPGA)을 보존하고 있음을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039]

이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0041]

실험방법

[0042]

클래스 I MHC 분자의 펩타이드 리간드의 예측

[0043]

레지오넬라 뉴모필라(*L. pneumophila* serogroup 1)의 펩티도글리칸 관련 지질단백질(Peptidoglycan-associated lipoprotein, PAL) 유래 펩타이드가 세 종류의 클래스 I MHC 결합 분자 예측 프로그램, RANKPEP (<http://bio.dfci.harvard.edu/RANKPEP>), BIMAS (<http://bimas.cit.nih.gov>), 및 SYFPEITHI (<http://syfpeithi.de>)에 사용되었다. 상기 프로그램들은 BALB/c마우스 유래 클래스 I MHC에 대한 각 펩타이드의 결합 활성을 예측하기 위해 사용된다. 다음의 선정 기준이 사용되었다. 첫째, 전장 레지오넬라 (*Legionell*

a)의 PAL 서열에서 높은 클래스 I MHC 결합 점수를 가진 8-11 mer 길이의 펩타이드 리간드 를 포함할 수 있는 서열들을 선정하되, 최적 길이는 정의하지 않았다. 다음으로, 전체 서열 내에서 가장 높은 클래스 I MHC 결합 점수를 가진 상기 펩타이드들을 선택하였다.

[0044] 합성 펩타이드 준비

[0045] PAL 펩타이드들은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) 및 PEPTRON (대전, 한국)에서 합성하였다. 펩타이드의 순도는 90% 이상이다. 상기 합성 펩타이드 아미노산 서열은 다음과 같다: PAL₁₋₉ (MKAGSFYKL: P1), PAL₄₋₂₄ (GSFYKLGLLVASAVLVAACS: P2), PAL₃₇₋₄₇ (DGDATAQGL: P3), PAL₅₅₋₆₃ (EPGESYTTQ: P4), PAL₆₅₋₇₃ (PHNQLYLFA: P5), P₇₆₋₈₄ (DSTLASKYL: P6), PAL₈₆₋₉₄ (SVNAQAEYL: P7), PAL₉₂₋₁₀₀ (EYLKTHPGA: P8), PAL₉₇₋₁₀₅ (HPGARVMIA: P9), PAL₁₁₂₋₁₁₉ (GSREYNVA: P10), PAL₁₂₄₋₁₃₂ (RADTVAEIL: P11), PAL₁₃₅₋₁₄₇ (AGVSRQQIRVVSYS: P12), PAL₁₆₃₋₁₇₁ (AQNRREVEFI: P13) (표 1 참조).

표 1

펩타이드번호	PAL에서의 위치	아미노산 서열	반수체(Haplotype)
P1	PAL ₁₋₉	MKAGSFYKL (서열번호 3)	H-2L ^d
P2	PAL ₄₋₂₄	GSFYKLGLLVASAVLVAACSK (서열번호 4)	H-2L ^d
P3	PAL ₃₇₋₄₅	DGDATAQGL (서열번호 5)	H-2D ^d
P4	PAL ₅₅₋₆₃	EPGESYTTQ (서열번호 6)	H-2D ^d
P5	PAL ₆₅₋₇₃	PHNQLYLFA (서열번호 7)	H-2L ^d
P6	PAL ₇₆₋₈₄	DSTLASKYL (서열번호 8)	H-2L ^d
P7	PAL ₈₆₋₉₄	SVNAQAEYL (서열번호 9)	H-2L ^d
P8	PAL ₉₂₋₁₀₀	EYLKTHPGA (서열번호 1)	H-2K ^d
P9	PAL ₉₇₋₁₀₅	HPGARVMIA (서열번호 10)	H-2L ^d
P10	PAL ₁₁₂₋₁₁₉	GSREYNVA (서열번호 11)	H-2L ^d
P11	PAL ₁₂₄₋₁₃₂	RADTVAEIL (서열번호 12)	H-2K ^d
P12	PAL ₁₃₅₋₁₄₇	AGVSRQQIRVVSYS (서열번호 13)	H-2K ^d
P13	PAL ₁₆₃₋₁₇₁	AQNRREVEFI (서열번호 14)	H-2D ^d

[0048] 균주

[0049] 레지오넬라 뉴모필라 (*L. pneumophila*) 균주 Philadelphia-1 (ATCC 33152)는 펜실베이니아, 필라델피아의 레지오넬라 세균 감염 (Legionnaires' disease) 환자의 폐 조직으로부터 분리된 균으로 ATCC로부터 분양을 받아 감염에 사용되기 전까지 -80° C에서 보존하였다. 냉동 보관된 상기 균주들을 L-시스테인, 피로인산 제2철 (ferric pyrophosphate), 알파-케토글루타르산이 첨가된 BCYE- α (buffered charcoal yeast extract- α) agar배지에서 37° C, 5% CO₂ 조건에서 72시간 동안 배양하여 감염에 사용하였다.

[0051] 실험동물(Experimental animals)

[0052] 6 내지 8주령 암컷 BALB/c (H-2^d) 마우스를 Oriental Bio Inc. (충북, 한국)에서 구매하였다. 모든 실험은 고려대학교 실험동물 윤리 위원회의 승인을 받은 운영 규칙에 따라 수행하였다.

[0054] **마우스 면역화(Immunization of mice)**

[0055] 마우스들은 PAL 플라스미드 DNA (pcDNA3-PAL) 또는 합성 PAL 펩타이드로 면역화 하였다. DNA 면역화를 위해 100 mg의 pcDNA3-PAL를 양 다리의 전경골근 (tibialis anterior muscle)에 주입하였고, 일주일 간격을 두고 마우스에 동일한 양으로 2회 부스터 주입하였다. 합성 PAL 펩타이드 면역화를 위해, 마우스들은 20 mg 의 PAL 펩타이드 및 20 mg의 CpG-올리고디옥시뉴클레오타이드 (oligodeoxynucleotide, ODN) 가 용해된 100 ml 의 PBS를 피하에 (subcutaneously, s.c.) 주입하여 면역화 하였다. 그리고 1주일 간격을 두고 마우스에 동일한 양으로 부스터 주입하였다. 상기 CpG-ODN 1826 (5'-TCCATGACGTTCTGACGTT-3', 서열번호 2) 은 phosphorothioate backbone을 가진 synthetic DNA molecule adjuvant로서 GenoTech (대전, 한국)에서 주문 구입하였다.

[0057] ***In vivo*에서의 CD8⁺ T 세포 고갈 (*In vivo* depletion of CD8⁺ T cells)**

[0058] 항-CD8 IgG(100 mg)들을 레지오넬라 균 감염 유발 실험 개시 3일전에 면역화 한 마우스 복강 내로 주입하였다 (도 1 참조). 하이브리도마 셀 라인 (clone 2.43)은 American Type Culture Collection (Manassas, VA) 에서 구입하였고, 항-CD8 IgG항체는 Clin Exp Vaccine Res. 2018;7(2):119-28에서 개시된 바와 같이 분리하였다. 대조군 IgG항체는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)에서 구매하였다. 항-CD8 IgG의 투여는 항체 치료 전 3-5일 시점에서 98%이상의 CD8⁺ T 세포가 고갈된 것을 확인하였다.

[0060] **사이토카인 생성의 측정 (Measurement of cytokine production)**

[0061] 사이토카인 (IFN- γ 과TNF- α) 농도는 ELISA법으로 측정하였다. 비장세포는 항원과 함께 또는 항원 없이 37°C에서 배양하였다. 세포 상층액의 사이토카인 농도는 IFN- γ (BD Biosciences, San Jose, CA) and TNF- α (BioLegend, San Diego, CA) ELISA kits 를 이용하여 측정하였다. 상기 측정은 3회 반복하여 이루어졌고, 사이토카인의 농도는 표준곡선의 회귀 분석을 통해 계산하였다.

[0063] ***In vitro* CTL 분석(*In vitro* CTL assay)**

[0064] 비장세포는 최종 면역화 후 일주일 시점에서 회수하였고, mitomycin C 처리되고 P8 펩타이드 (5 μ g/ml)를 가한 24-well 플레이트에서 5일동안 37°C에서 배양된 2x 10⁶ 의 동종의 순수한 비장세포와 혼합하였다. 상기 세포들은 RPMI 1640로 2회 세척하였고, 주효세포 (effector cells)로 사용하였다. 동종 (syngenic)의 비장세포를 37°C에서 3일간 P8 펩타이드 (5 μ g/ml) 및 rPAL (5 mg/ml)로 흡수하여 제조한 후, RPMI 1640으로 3회 세척하고, 타겟 세포로서 사용하기 위해 5 x 10⁶/ml의 농도로 재현탁 하였다.

[0065] 펄스된 타겟 세포 (pulsed target cell, T) (1 x 10⁴ /well) 은 96-well 플레이트에 추가하였고, 주효세포 (effector cells, E) 는 E:T 의 비율이 50:1, 30:1 또는 10:1이 되도록 첨가하였다. 4시간 배양 후, 세포접체의 지침에 따라 CytoTox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxic Assay (Promega, Madison, WI)를 사용하여 항원-특이적 용해도를 측정하였다. 특이적 용해도의 퍼센트는 다음과 같이 계산하였다: % 특이적 용해도 (specific lysis) = 100 x (experimental - spontaneous)/(maximal - spontaneous)

[0067] ***In vivo* CTL 분석 (*In vivo* CTL assay)**

[0068] 순수한 마우스로부터 비장세포를 얻어 90분간 37°C에서 5 μ g/ml 의 P8 펩타이드와 함께 배양하였다. 이는 2.5% FBS 및 RPMI-1640에서 2 x 10⁷/ml을 포함하도록 두 개 튜브로 나누어 준비하였고, 형광 CFSE (carboxylfluorescein diacetate succinimidyl ester) 염료 (BD Bioscience)를 2.5 μ M (CFSE^{low}) 또는 20 μ M (CFSE^{high}) 첨가하였다. 그리고, 세포들을 재현탁하였고 40분간 37°C에서 배양하였다. 염색된 세포들은 PBS로 2회 세척하였다. 각각 마우스는 혈청 없이 1 x 10⁷ CFSE^{low} 및 1 x 10⁷ CFSE^{high} 세포들을 전체 부피 200 ml 의

RPMI 1640 로 정맥투여 되었다. 18시간 후, 마우스는 CO₂챔버에서 희생되었고, 비장을 제거하였고, 유동 세포측정법(flow cytometry)으로 처리하였다. 용해 퍼센트는 다음과 같이 계산하였다: $[100 \times (1 - [\gamma_{unprimed} / \gamma_{primed}])]$. γ (ratio) 는 다음과 같이 계산하였다: $\%CFSE^{low} / \%CFSE^{high}$.

[0070] 정맥투여 및 비강을 통한 *L. pneumophila* 감염 (Intravenous and intranasal challenges with *L. pneumophila*)

[0071] 마우스는 2×10^7 CFU 의 *L. pneumophila*가 포함된 100 μ l의 세균 현탁액을 정맥투여하여 (intravenously, i.v.) 감염시켰다. 마우스는 또한 (intranasally, i.n.) 1×10^9 CFU 의 *L. pneumophila*를 포함하는 40 μ l의 세균 현탁액으로 비강을 통해 감염시켰다. 이 때 마우스는 비강을 통한 감염 3일 전에 cyclophosphamide (75 mg/kg or 150 mg/kg)를 매일 투여하였다. 대략적인 세균 수는 600nm에서의 흡광도를 측정 (600 nm에서의 1 OD 값을 1×10^9 CFU/ml로 가정)하여 예측하였다. 감염된 마우스의 생존은 투여한 후 10-14일 동안 매일 평가되었다. 생존율은 다음으로 계산하였다: [죽은 마우스의 수/실험 마우스의 수 x100].

[0073] 세균 부담 측정 (Bacterial burden assay)

[0074] *L. pneumophila* 가 비강으로 감염된 마우스를 감염 후 48시간 뒤에 희생시키고, 폐를 적출하고 이를 멸균된 PBS에 조직 균질화기계 (tissue homogenizer (Pyrex Corning, Greencastle, PA))를 이용하여 균질화 하였다. 폐 균질화물을 10배 계열 희석하였고, 세파만돌(cefamandole), 폴리마이신 B (polymyxin B), 및 반코마이신 (vancomycin)을 함유하는 BCYE- α 아가에 위치하였다. 상기 세균은 살아있는 레지오넬라 뉴모필라(*L. pneumophila*) 수를 확인하기 위해 73 내지 96시간동안 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

[0076] 조직 검사 (Histological analyses)

[0077] 레지오넬라 뉴모필라 (*L. pneumophila*)의 비강 감염 이후, 마우스들을 희생하였고, 조직 검사를 위해 폐를 채취하였다. 마우스의 폐는 4%파라포름알데히드에서 48시간 고정하였고, 탈수하고 파라핀에서 위치시켰다. 여기에서 폐 절편 (3 μ m)을 채취하고 이 절편에서 폐에 침투한 염증성 세포를 시각화 하기 위해 hematoxylin and eosin (H&E) 으로 염색하였다.

[0079] 통계학적 분석 (Statistical analyses)

[0080] 모든 통계학적 분석은 one-way analysis of variance (ANOVA) 및 post-hoc Dunnett's test 와 chi-square test (Fisher's exact test) (SPSS10.0 program)을 통해 이루어졌다. 실험 그룹의 측정 값은 대조군과의 비교되었고, p values < 0.05 인 것들은 유의적인 것으로 판단하였다.

[0083] 실험 결과

[0084] 실험예 1: 레지오넬라 뉴모필라 (*L. pneumophila*)감염으로부터 CD8+ T세포의 보호 효과 및 클래스 I MHC 에피토프 확인

[0085] 치명적인 레지오넬라 뉴모필라 (*L. pneumophila*) 감염에 대한 CD8+ T 세포의 역할을 확인하였다.

[0086] 이를 위해, CD8+T 세포가 고갈된 마우스들을 PAL DNA로 면역화 하고, 레지오넬라 뉴모필라 (*L. pneumophila*) 를 정맥투여 하여 감염시켰다. 구체적으로 각 마우스들은 100 mg 의 pcDNA3-PAL 를 0, 1 및 2주차에 근육에 투여하여 면역화하였다. 3주차에 마우스들 각각에 2×10^7 CFU 의 레지오넬라 뉴모필라 (*L. pneumophila*)를 정맥으로 (intravenously, i.v.) 투여, 감염 시켰다. CD8+T세포 의 고갈을 위해 100 mg 의 항-CD8 항체 및 대조군 IgG를 세균 감염 3일 전 및 감염 당일에 마우스에 투여하였다 (도 1 참조).

- [0087] 그 결과, 감염 이후 PAL DNA 로 면역화 된 대조군 마우스들은 50%의 생존율을 확인할 수 있었다. 그러나, CD8+ T세포가 고갈된 마우스들의 생존율은 0%이고, 단순 대조군 마우스들 또한 같았다 (도 2 참조).
- [0088] 이러한 결과를 통해 CD8+ T세포는 실질적으로 레지오넬라 뉴모필라 (*L. pneumophila*)의 감염에 대항하는 보호역을 하는 것을 알 수 있다.
- [0090] 또한, 상기 PAL 펩타이드들이 CD8+ T세포에게 PAL-특이적 인식이 가능한지 확인하였다.
- [0091] 이를 위해 레지오넬라 뉴모필라 (*L. pneumophila*)의 *pal* 유전자 전장의 176개의 아미노산잔기로부터 CD8+ T 세포-특이적 에피톱을 예측하기 위한 클래스 I MHC 결합 분자 분석 프로그램 (RANKPEP, BIMAS, and SYFPEITHI software)을 사용하였다. BALB/C 마우스의 클래스 I MHC 반수체(H-2L^d, H-2D^d, H-2K^d)에 대한 친화도 및 펩타이드 길이 (9-mer)에 기초하여 선정하였다.
- [0092] 그 결과 13종의 높은 클래스 I MHC 결합 점수를 가진 펩타이드를 얻었고, 그 중 11 종의 펩타이드가 9-mer의 길이를 가지는 반면 2 종의 펩타이드, PAL₄₋₂₄ (P2) 및 PAL₁₃₅₋₁₄₇ (P12)는 9-mer 보다 긴 것을 확인하였다 (표 1 참조).
- [0093] 그리고 이들 중 PAL-특이적 CD8+ T세포에 의해 인식되는 펩타이드를 선별하기 위해, 동물실험을 수행하였다. 구체적으로, 마우스들은 cDNA3-PAL로 0, 1 및 2주차에 면역화 하였고, 3주차에, 마우스들을 희생하였다. 그리고 비장을 채취하였다. 6×10^6 비장세포들이 13종의 펩타이드 (P1-P13) 각각으로 처리되었고, 37°C에서 2일간 배양하였다. 그리고 세포 배양 상등액을 회수하여 IFN- γ 의 농도를 측정하여 결과를 나타내었다.
- [0094] 그 결과 도 3에서 확인되는 바와 같이 P8 펩타이드가 가장 높은 IFN- γ 농도를 발현하였다. 다른 12 펩타이드들을 유사한 수준의 IFN- γ 발현을 나타내었다.
- [0095] 이러한 결과를 다시 확인하기 위해 면역세포를 농도별 P8 펩타이드로 처리하였고, P10을 대조군으로 사용하였다. 그 결과 도 4에서 확인되는 바와 같이 P8 펩타이드는 농도 의존적으로 증가되는 IFN- γ 발현을 나타내었고, 반대로 P10은 적은 양의 IFN- γ 발현을 나타내었다. 이를 통해 PAL-특이적 CD8+ T세포는 P8 (PAL₉₂₋₁₀₀)펩타이드를 BALB/c 마우스 유래 세포에서 제시되는 클래스 I MHC분자 (에피톱)로 인식하는 것을 알 수 있다.
- [0097] **실험예 2: P8 펩타이드에 대한 *in vitro* 및 *in vivo* CTL 반응 결과확인**
- [0098] P8 (PAL₉₂₋₁₀₀) 펩타이드가 PAL-특이적 CTL 수를 증가시키는 지 확인하였다.
- [0099] 구체적으로, 마우스를 PAL DNA로 면역화 하고, 비장세포를 수확하였다. 이들은 *in vitro* 상에서 P8 펩타이드로 처리하였다. 이 세포들은 *in vitro* CTL 검사에서 P8 펩타이드 또는 rPAL로 처리된 타겟 세포에 대한 주효세포로 사용되었다.
- [0100] 그 결과 도 5에서 확인되는 바와 같이, P8과 rPAL로 처리된 타겟 세포에 대해 유의적으로 높은 수준의 CTL 활성도가 확인되었고, 이는 처리되지 않은 대조군 타겟 세포에 비해서도 높은 것이다. 특히 주효세포: 타겟 세포의 비율이 50:1인 경우(51% for P8 vs. 40% for rPAL)에서 P8 로 처리된 타겟 세포에 대한 CTL 활성은 rPAL로 처리된 타겟 세포를 사용할 때 비해 11% 높은 것이 확인되었다.
- [0101] 이러한 결과는 항원으로서 P8 (PAL₉₂₋₁₀₀) 펩타이드는 PAL-특이적 CD8+CTL 세포 수준을 증가시키고 이를 통해 *in vitro*에서 타겟 세포 사멸 효과를 높일 수 있음을 알 수 있게 한다.
- [0103] 그리고, P8 펩타이드가 항원-특이적 CTL 반응을 *in vivo* 상에서도 유도할 수 있는지를 확인하였는데, 그 결과 도 6 및 7에서 확인되는 바와 같이, P8 및 CpG-ODN으로 면역화된 마우스 그룹은 P8 펩타이드 또는 CpG-ODN만으로 면역화된 마우스보다 CTL 용해활성에 비해 두드러지게 우수한 것을 확인할 수 있었다. 구체적으로, P8 및 CpG-ODN으로 면역화된 마우스는 98%의 용해 활성을 나타내었다. 그러나, 대조군 마우스 및 P8 또는 CpG-ODN 단독으로 면역화된 마우스들은 비슷한 용해 활성을 나타내었다 (도 6 및 7참조).

- [0104] 종합적으로, 이러한 결과를 통해 P8 (PAL₉₂₋₁₀₀) 펩타이드는 항원-특이적 CD8+CTL 반응을 *in vitro* 및 *in vivo*에서 유도할 수 있음을 알 수 있다.
- [0106] **실험예 3: 레지오넬라 뉴모필라 (*L. pneumophila*)의 정맥 또는 비강 감염 후 P8 및 CpG-ODN으로 면역화된 마우스의 생존율 확인**
- [0107] P8 (PAL₉₂₋₁₀₀) 펩타이드가 레지오넬라 감염 후 생존율을 높이는 것을 확인하였다.
- [0108] 구체적으로, 각각의 마우스 그룹 ($n = 4/\text{그룹}$)에 P8 및 CpG-ODN을 0, 1 및 2 주차에 피하 투여하여 면역화 하였다. 3주차에 마우스별로 2×10^7 CFU의 레지오넬라 뉴모필라 (*L. pneumophila*)를 정맥 투여하여 감염시켰다.
- [0109] 도 8에서 확인되는 바와 같이, P8 및 CpG-ODN으로 면역화된 마우스는 감염에도 100% 생존율을 나타내었고, P8 또는 CpG-ODN 단독으로 면역화된 마우스 그룹뿐만 아니라 대조군은 감염 이후 3일 후에 모두 죽었다.
- [0111] 레지오넬라 뉴모필라 (*L. pneumophila*)은 인간에게 호흡기를 통해 감염되고 면역 저하 환자에서 가장 많이 발생하는 점을 고려하여, 면역 억제된 마우스가 레지오넬라 뉴모필라 (*L. pneumophila*)에 감염되었을 때 감염에 대한 P8 펩타이드의 보호 효과를 평가하였다.
- [0112] 이를 위해, 사이클로포스파마이드 (Cyclophosphamide)는 마우스의 면역 억제를 위해 사용하였고, 레지오넬라 뉴모필라 (*L. pneumophila*)의 감염에 더욱 취약하게 되었다. 사이클로포스파마이드 (Cyclophosphamide)는 알킬 레이팅 화학요법 치료제이고, 세포 독성물질로서 면역 억제효과가 있다 (Nat Rev Cancer. 2005;5(5):397-405 및 Semin Immunopathol. 2011;33(4):369-83). 추가적으로, 림프구의 수치는 사이클로포스파마이드 (150mg/kg)를 투여한 후 4일만에 최저치에 도달한 것을 확인하였다. 이러한 결과를 고려하여, 각각의 마우스 그룹 ($n = 7/\text{그룹}$)은 상기한 바와 같이 면역화 하였고, 3주차에 면역화된 마우스에 사이클로포스파마이드를 저용량 (75 mg/kg of body weight, 도 9) 또는 고용량 (150 mg/kg of body weight, 도 10)으로 3일 동안 매일 투여하였다. 그리고 다음 날 마우스들은 각각 비강으로 1×10^9 CFU 레지오넬라 뉴모필라 (*L. pneumophila*) 감염시켰다.
- [0113] 그 결과 P8 및 CpG-ODN으로 면역화된 마우스 그룹에 사이클로포스파마이드를 저용량 투여하였을 때, 85.7%의 마우스 그룹은 비강 감염 이후 14일간 생존한 것을 확인하였다 (1×10^9 CFU/마우스, 도 9 참조). 그러나 P8 또는 CpG-ODN 단독으로 면역화된 마우스 그룹뿐만 아니라 대조군은 감염 후 6일 뒤에 모두 사망한 것을 확인하였다. P8 및 CpG-ODN으로 면역화된 마우스 그룹에 사이클로포스파마이드를 고용량 투여하였을 때, 75%의 마우스가 비강 감염 후 14일까지 생존한 것을 확인하였다 (도 10 참조). 그러나 P8 또는 CpG-ODN 단독으로 면역화된 마우스 그룹뿐만 아니라 대조군은 감염 후 4일 뒤에 모두 사망한 것을 확인하였다.
- [0114] 이를 종합하면, 면역 억제된 마우스라 하더라도 레지오넬라 뉴모필라 감염 이후에 P8 (PAL₉₂₋₁₀₀) 펩타이드는 레지오넬라 감염에 대한 저항성을 유발하여 75-100%의 생존율을 확인하였다.
- [0116] **실험예 4: 레지오넬라 뉴모필라 (*L. pneumophila*) 감염 후 P8 및 CpG-ODN으로 면역화된 마우스의 폐의 세균 부담 및 비장 세포에서의 사이토카인 발현 확인**
- [0117] P8 (PAL₉₂₋₁₀₀) 펩타이드가 레지오넬라 감염 후 폐에서의 세균 부담을 경감시킬 수 있는 지 확인하였다.
- [0118] 이를 위해 각각의 마우스 그룹 ($n = 6/\text{그룹}$)은 P8 및 CpG-ODN 으로 0, 1 및 2주차에 피하 투여하여 면역화 하였다. 3주차에, 마우스들은 각각 정맥으로 2×10^7 CFU 레지오넬라 뉴모필라 (*L. pneumophila*) 감염시켰다. 감염 48시간 후 마우스들을 희생하였고, 폐를 채취하였다. 그리고 폐 조직에서의 세균 수를 확인하였다. 또한, 면역 저하된 마우스에서의 결과를 확인하기 위해 각각의 마우스 그룹 ($n = 6/\text{그룹}$)은 상기한 바와 같이 면역화 하였다. 3주차에, 마우스들은 각각 사이클로포스파마이드를 복강 내로 3일동안 매일 투여 (150 mg/kg)하였다. 그리고 다음 날 비강으로 1×10^9 CFU 레지오넬라 뉴모필라 (*L. pneumophila*) 감염시켰다. 감염 48시간 후 마우스들을 희생하였고, 폐를 채취하였다. 그리고 폐 조직에서의 세균 수를 확인하였다.

- [0119] 그 결과, 도 11에서 확인되는 바와 같이, P8 및 CpG-OND으로 면역화된 마우스의 폐 조직에서 세균 수는 대조군 (단순 대조군 및 P8 또는 CpG-OND으로 면역화된 마우스)에 비해 약 200배 저감 된 것을 확인 할 수 있다. 유사한 결과가 사이클로포스파마이드 투여 (150 mg/kg)를 통해 면역이 억제된 마우스를 비강으로 레지오넬라 뉴모필라 (*L. pneumophila*) 감염시켰을 때도 확인되었다 (도 12참조).
- [0120] 세균 수 감소는 P8 및 CpG-OND으로 면역화 함으로써 발생하는 항원-특이적 CD8+ CTL에 의해 매개되는 것임을 유추할 수 있다.
- [0122] 또한, 사이클로포스파마이드를 투여한 (150 mg/kg) 면역화된 마우스의 비장 세포에서 IFN- γ 및 TNF- α 의 발현을 확인하였다.
- [0123] 이를 위해 각각의 마우스 그룹 ($n = 3/\text{그룹}$) 전술한 바와 같이 면역화 하고 사이클로포스파마이드를 투여하였다. 상기 마우스들은 비강 감염 16시간 뒤 희생하였고, 비장을 제거하였다. 상기 비장 세포들은 *in vitro*로 48-72시간동안 37°C에서 CpG-OND, P8 및 P8 및 CpG-OND 처리하였고, 이후 세포 배양 상등액을 회수하여 IFN- γ (도 13) 및 TNF- α (도 14) 농도를 측정하였다.
- [0124] 그 결과 도 13 및 14에서 확인되는 바와 같이, P8 및 CpG-OND으로 면역화된 마우스의 비장세포는 P8 또는 CpG-OND로 면역화된 마우스의 세포에 비해 유의적으로 높은 IFN- γ (도 13) 및 TNF- α (도 14) 발현량을 확인하였고, 음성 대조군 마우스는 가장 낮은 수준의 사이토카인을 발현하였다.
- [0125] 이러한 사이토카인의 생산은 *in vitro*에서의 다른 항원의 가능성이 없는 상황에서 측정된 것이어서, 레지오넬라 뉴모필라 (*L. pneumophila*) 의 비강 노출 전에 P8(PAL₉₂₋₁₀₀)-특이적 비장 세포의 자극에 의해 사이토카인이 발현된 것을 유추할 수 있다. 결국 P8 (PAL₉₂₋₁₀₀) 펩타이드는 면역 억제된 마우스에서도 사이토카인 반응을 유도할 수 있다.
- [0127] **실험예 5: 레지오넬라 뉴모필라 (*L. pneumophila*) 감염 후 마우스 폐 조직의 조직 검사**
- [0128] P8 및 CpG-OND의 면역화 이후 레지오넬라 뉴모필라 (*L. pneumophila*)가 감염된 마우스의 폐의 조직적 변화를 확인하였다.
- [0129] 이를 위해 각각의 마우스 그룹 ($n = 3/\text{그룹}$) 은 P8 및 CpG-OND 를 0, 1 및 2 주차에 복강 내 투여하여 면역화 하였다. 3주차에 마우스들 각각은 150mg/kg의 사이클로포스파마이드를 3일동안 매일 복강 투여하였다. 그리고 다음날 마우스들은 각각 1×10^9 CFU 레지오넬라 뉴모필라 (*L. pneumophila*)를 비강 투여하여 감염시켰다. 감염 후 마우스가 죽은 뒤 마우스로부터 폐를 채취하여 폐조직 절편을 얻은 뒤 hematoxylin-eosin으로 염색하였다. 세포 핵은 짙은 파란색, 세포질은 분홍색으로 염색되었다.
- [0130] 그 결과 도 15에서 확인되는 바와 같이 P8 또는 CpG-OND만으로 면역화된 마우스 및 대조군의 폐조직은 폐 조직에서 출혈 (Hemorrhage), 폐포 조직의 파괴 (destruction of alveolar tissue), 폐포 벽의 과생성 (hyperplasia of alveolar wall), 간질성 부종 (interstitial edema) 및 수많은 염증성 세포들의 침투가 확인되었다. 그러나, P8 및 CpG-OND으로 면역화 된 그룹에서는 폐포 및 간질 공간 (interstitial space)에 있어서 유의적인 감소를 확인할 수 있다.
- [0131] 이러한 결과를 통해 P8 (PAL₉₂₋₁₀₀)-특이적 CD8+CTL이 레지오넬라 뉴모필라 (*L. pneumophila*)의 감염으로부터 폐 조직 손상을 보호할 수 있음을 알 수 있다.
- [0133] **실험예 6: 레지오넬라 뉴모필라 (*L. pneumophila*) 감염에 대한 P8 (PAL₉₂₋₁₀₀)의 치료효과 확인**
- [0134] P8 (PAL₉₂₋₁₀₀) 펩타이드의 레지오넬라 뉴모필라 (*L. pneumophila*) 감염에 대한 치료 효과를 확인하였다.
- [0135] 이를 위해 각각의 마우스 그룹 ($n = 6/\text{group}$) 은 마우스 별로 1×10^9 CFU 의 레지오넬라 뉴모필라 (*L. pneumophila*)를 비강 투여하여 감염시켰다. 상기 감염 2일 전에 마우스들은 80 mg/kg 의 사이클로포스파마이드를 복강내로 투여되었다. 이후 마우스들은 감염 당일 및 2일 후에 P8 및 CpG-OND을 피하로 투여되었다 (도 16

참조).

[0136] 그 결과, 도 17에서 확인되는 바와 같이, 감염 이후 P8 및 CpG-ODN의 투여에도 레지오넬라 뉴모필라 (*L. pneumophila*)의 감염으로 인해 감염 4일 후 마우스들이 죽는 것을 확인할 수 있다.

[0137] 이를 통해 P8 (PAL₉₂₋₁₀₀) 펩타이드는 감염 이후에 투여되었을 때 레지오넬라 감염에 대한 면역 활성화에 효과적이지 않음을 알 수 있다.

[0139] 실험예 7: 레지오넬라 속 (*Legionella* sp.)의 PAL에서 보존적인 P8펩타이드의 확인

[0140] 20종의 레지오넬라 속 균주들에서 PAL 단백질 내 P8 (PAL₉₂₋₁₀₀) 펩타이드 서열이 있는지를 확인하였다. 이를 위해 CLUSTALW 프로그램을 사용하였다.

[0141] 그 결과 도 18에서 확인되는 바와 같이 P8 (PAL₉₂₋₁₀₀) 펩타이드는 레지오넬라 뉴모필라 (*L. pneumophila*) 및 다른 *Legionella*속 에서도 보존적인 PAL 영역으로 위치하는 것을 확인할 수 있다.

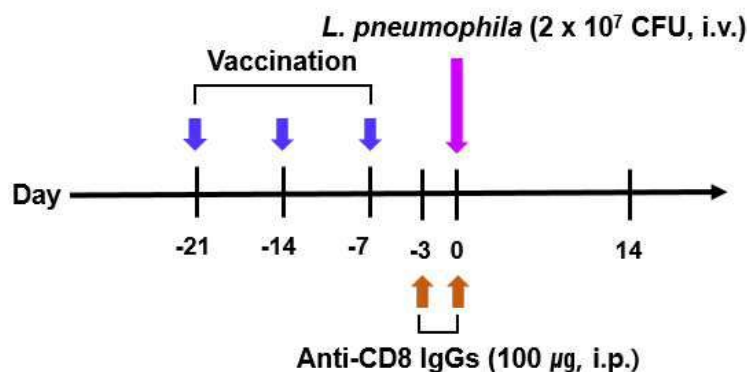
[0142] 구체적으로 *Legionella* 속 균주는 다음과 같다: *L. pneumophila* (ATCC 33152), *L. sainthelensi* (ATCC 33152), *L. parisiensis* (ATCC 35299), *L. moravica* (ATCC 43877), *L. shakespearei* (ATCC 49655), *L. gratiana* (ATCC 49413), *L. longbeachae* serogroup 1 (ATCC 33462), *L. dumoffii* (ATCC 33279), *L. wadsworthii* (ATCC 33877), *L. gormanii* (ATCC 33297), *L. anisa* (ATCC 35292), *L. bozemanii* serogroup 1 (ATCC 33217), *L. bozemanii* serogroup 2 (ATCC 35745), *L. longbeachae* serogroup 2 (ATCC 33484), *L. maceachemii* (ATCC 35300), *L. jordanis* (ATCC 33623), *L. heckelia* serogroup 2 (ATCC 35999), *L. heckelia* serogroup 1 (ATCC 35250), *L. lansingensis* (ATCC 49751) 및 *L. nautarum* (ATCC 49506).

[0143] 이러한 결과를 통해 P8 (PAL₉₂₋₁₀₀) 펩타이드는 *L. pneumophila* serogroup 1 과 다른 *Legionella* 속 균주에서도 확인이 되었으나, *L. lansingensis* 및 *L. nautarum* 에서는 확인되지 않았다.

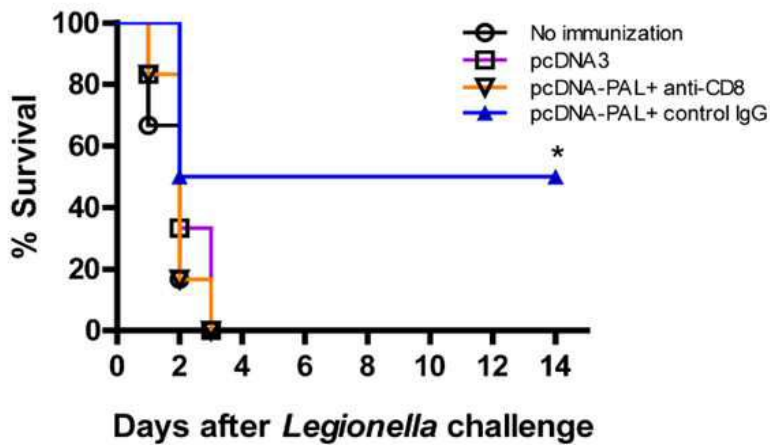
[0145] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

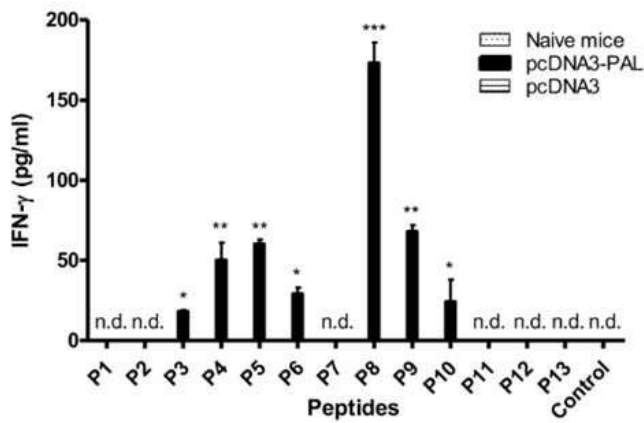
도면1



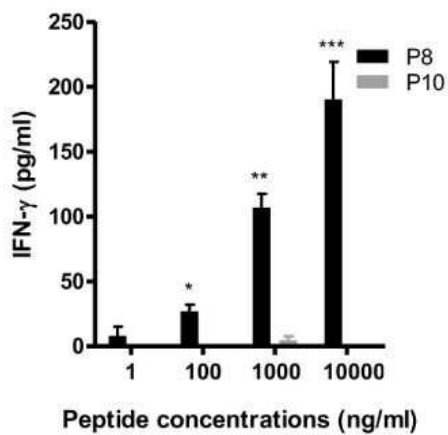
도면2



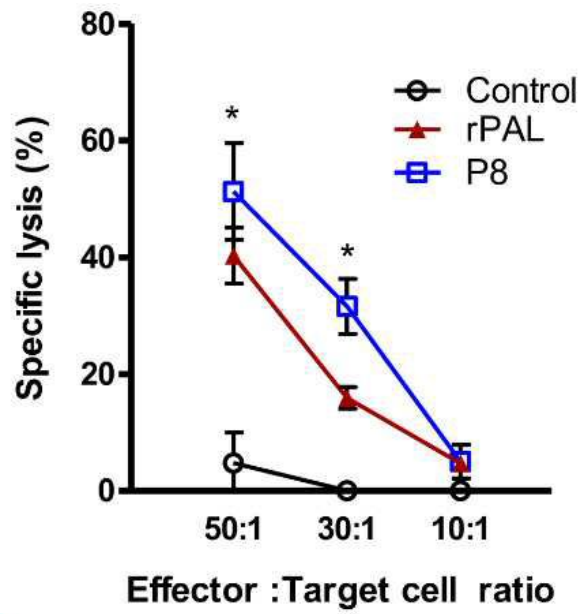
도면3



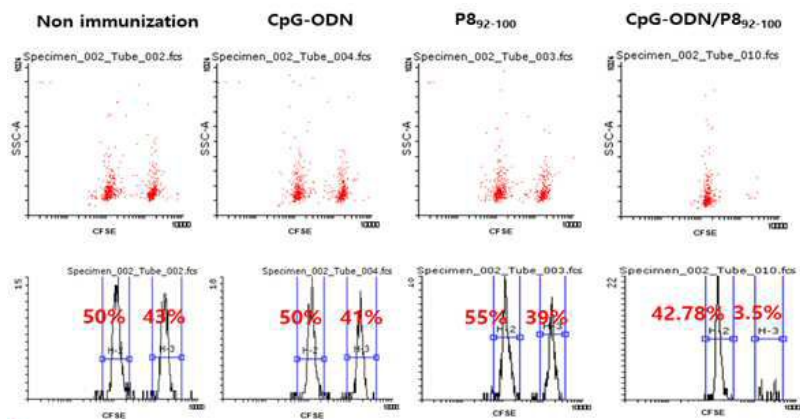
도면4



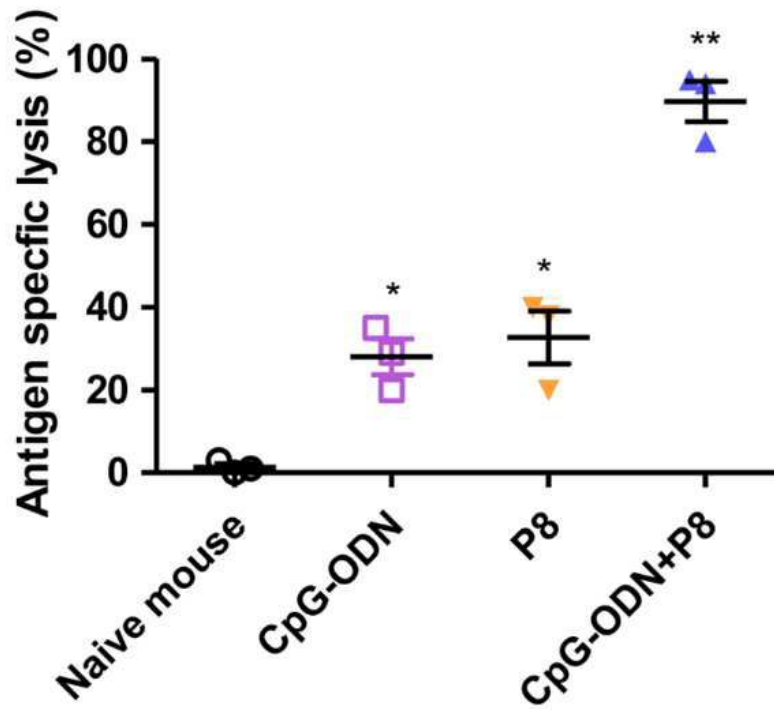
도면5



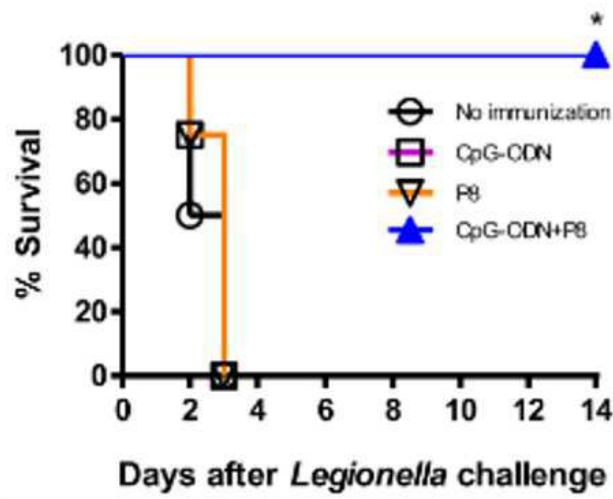
도면6



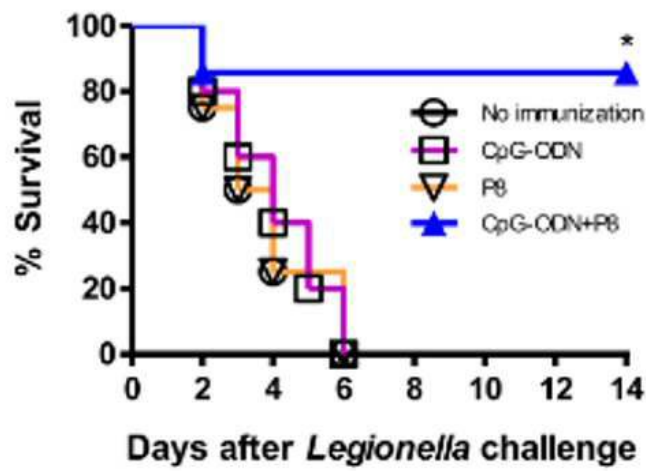
도면7



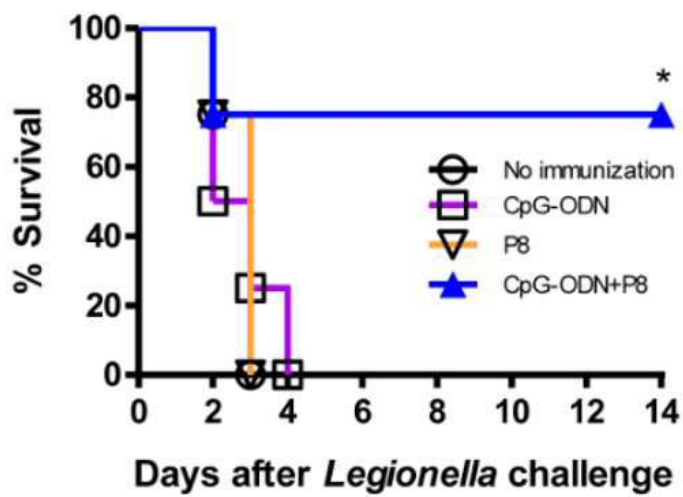
도면8



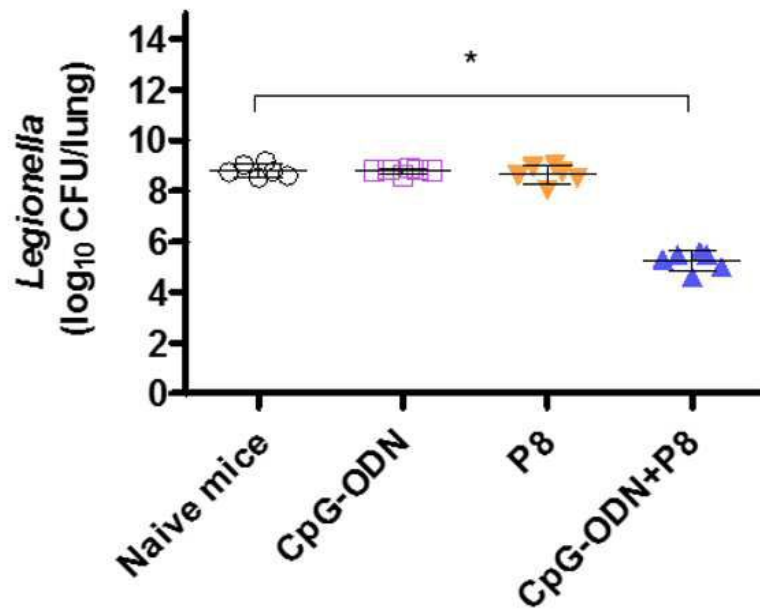
도면9



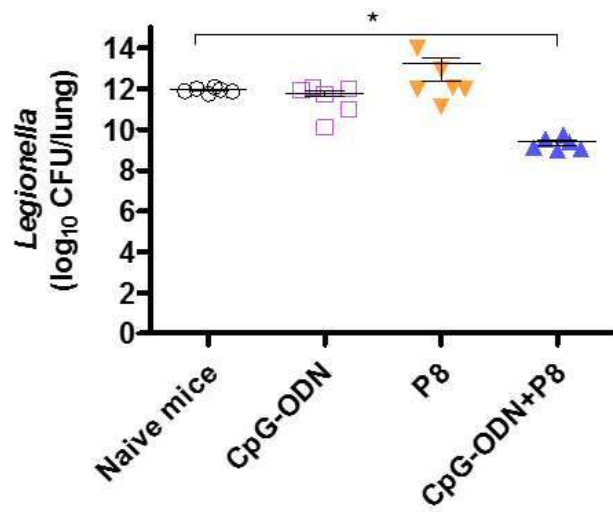
도면10



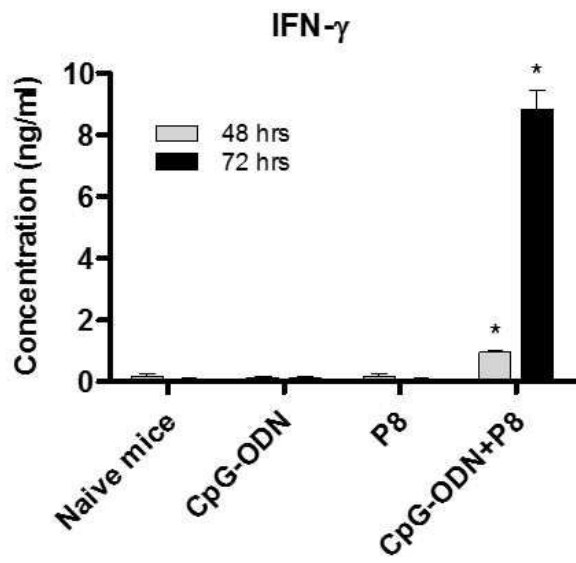
도면11



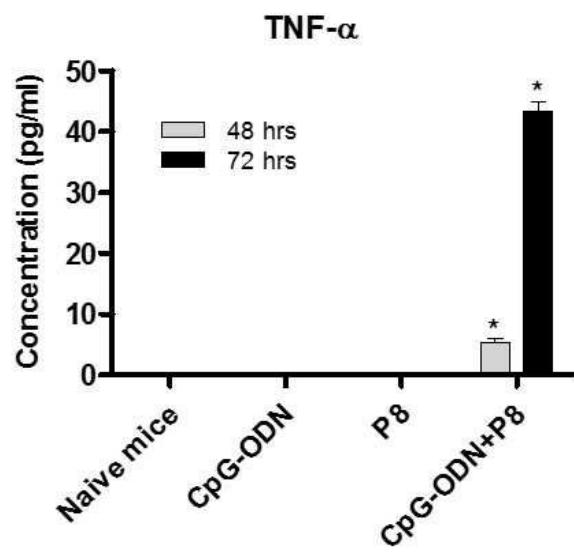
도면12



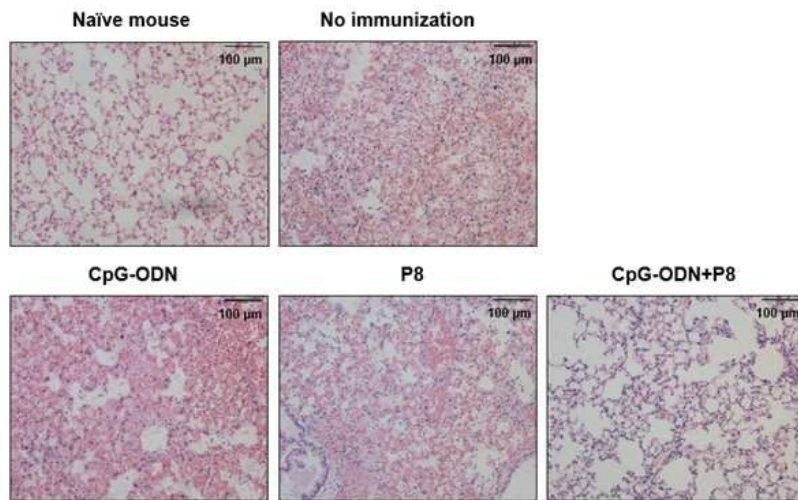
도면13



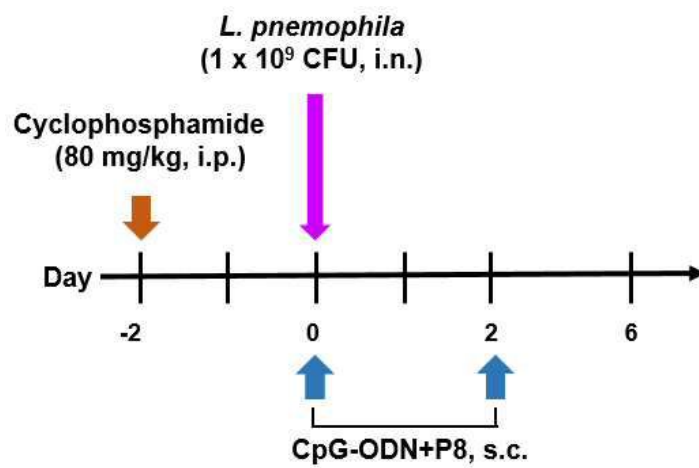
도면14



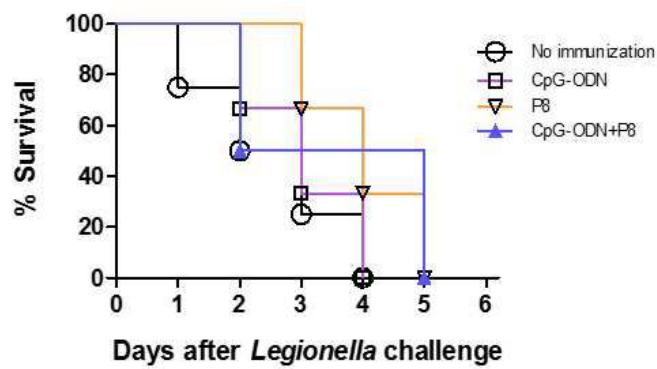
도면15



도면16



도면17



도면18

	65	75	85	95	105	115
1. <i>L. pneumophila</i>	TTQAPHNQLY	LFAYDDSTLA	SKYLPSVNAQ	AEYLKTHPGA	RVMIAGHTDE	RGSREYNVAL
2. <i>L. sainthelensi</i>	TTQAPHNQLY	LFAYDDSTLA	SKYLPSVNAQ	AEYLKTHPGA	RVMIAGHTDE	RGSREYNVAL
3. <i>L. paristensis</i>	TTQAPHNQLY	LFAYDDSTLA	SKYLPSVNAQ	AEYLKTHPGA	RVMIAGHTDE	RGSREYNVAL
4. <i>L. moravica</i>	TTQAPHNQLY	LFAYDDSTLA	SKYLPSVNAQ	AEYLKTHPGA	RVLLAGHTDE	RGSREYNVAL
5. <i>L. shakespearei</i>	TTQAPHNQLY	LFAYDDSTLA	SKYLPSVNAQ	AEYLKTHPGA	RVLLAGHTDE	RGSREYNVAL
6. <i>L. gratiana</i>	TTQAPHNQLY	LFAYDDSTLA	SKYLPSVNAQ	AEYLKTHPGA	RVLLAGHTDE	RGSREYNVAL
7. <i>L. lognbeschae</i> S61	TTQAPHNQLY	LFAYDDSTLA	SKYLPSVNAQ	AEYLKTHPGA	RVLLAGHTDE	RGSREYNVAL
8. <i>L. dumoffii</i>	TTQAPHNQLY	LFAYDDSTLA	SKYLPSVNAQ	AEYLKTHPGA	RVLLAGHTDE	RGSREYNVAL
9. <i>L. wadsworthii</i>	TTQAPHNQLY	LFAYDDSTLA	SKYLPSVNAQ	AEYLKTHPGA	RVLLAGHTDE	RGSREYNVAL
10. <i>L. gormanii</i>	TTQAPHNQLY	LFAYDDSTLA	SKYLPSVNAQ	AEYLKTHPGA	RVLLAGHTDE	RGSREYNVAL
11. <i>L. anisa</i>	TTQAPHNQLY	LFAYDDSTLA	SKYLPSVNAQ	AEYLKTHPGA	RVLLAGHTDE	RGSREYNVAL
12. <i>L. bozemani</i> S61	TTQAPHNQLY	LFAYDDSTLA	SKYLPSVNAQ	AEYLKTHPGA	RVLLAGHTDE	RGSREYNVAL
13. <i>L. bozemani</i> S62	TTQAPHNQLY	LFAYDDSTLA	SKYLPSVNAQ	AEYLKTHPGA	RVLLAGHTDE	RGSREYNVAL
14. <i>L. lognbeschae</i> S62	TTQAPHNQLY	LFAYDDSTLA	SKYLPSVNAQ	AEYLKTHPGA	RVLLAGHTDE	RGSREYNVAL
15. <i>L. maceachemii</i>	TTQAPHNQLY	LFAYDDSTLA	SKYLPSVNAQ	AEYLKTHPGA	RVLLAGHTDE	RGSREYNVAL
16. <i>L. jordanis</i>	TTQAPHNQLY	LFAYDDSTLA	SKYLPSVNAQ	AEYLKTHPGA	RVLLAGHTDE	RGSREYNVAL
17. <i>L. heckelica</i> S62	TTQAPHNQLY	LFAYDDSTLA	SKYLPSVNAQ	AEYLKTHPGA	RVLLAGHTDE	RGSREYNVAL
18. <i>L. heckelica</i> S61	TTQAPHNQLY	LFAYDDSTLA	SKYLPSVNAQ	AEYLKTHPGA	RVLLAGHTDE	RGSREYNVAL
19. <i>L. Lansingensis</i>	TTQAPHNQRY	LFAYDDSTFA	PKYKPSLMAQ	ADYLQSHPGA	RVLLAGHTDE	RGSREYNVAL
20. <i>L. navlarum</i>	TTQAPHNQRY	LFAYDDSTFA	PKYKPSLMAQ	ADYLVAHPGA	RVLLAGHTDE	RGSREYNVAL
PAL-02-190				-EYLKTHPGA		

서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> IMMUNOGENIC COMPOSITION COMPRISING PEPTIDE DERIVED FROM PEPTIDOGLICAN-ASSOCIATED LIPOPROTEIN OF LEGIONELLA sp.
- <130> PN200116
- <160> 14
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 9
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> P8
- <400> 1

Glu Tyr Leu Lys Thr His Pro Gly Ala

- 1 5
- <210> 2
- <211> 20

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><
 223> CpG-ODN
 <400> 2
 Thr Cys Cys Ala Thr Gly Ala Cys Gly Thr Thr Cys Cys Thr Gly Ala
 1 5 10 15
 Cys Gly Thr Thr
 20

<210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> P1
 <400> 3

Met Lys Ala Gly Ser Phe Tyr Lys Leu
 1 5

<210> 4
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> P2
 <400> 4

Gly Ser Phe Tyr Lys Leu Gly Leu Leu Val Ala Ser Ala Val Leu Val

1 5 10 15
 Ala Ala Cys Ser Lys
 20

<210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> P3
 <400> 5

Asp Gly Asp Ala Thr Ala Gln Gly Leu

1 5
 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> P4
 <400> 6
 Glu Pro Gly Glu Ser Tyr Thr Thr Gln

1 5
 <210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> P5
 <400> 7
 Pro His Asn Gln Leu Tyr Leu Phe Ala

1 5
 <210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> P6
 <400> 8
 Asp Ser Thr Leu Ala Ser Lys Tyr Leu

1 5
 <210> 9
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> P7
 <400> 9
 Ser Val Asn Ala Gln Ala Glu Tyr Leu

1 5
 <210> 10

<211> 9
 <212> PRT
 <213>
 > Artificial Sequence
 <220><223> P9
 <400> 10
 His Pro Gly Ala Arg Val Met Ile Ala
 1 5
 <210> 11
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> P10
 <400> 11
 Gly Ser Arg Glu Tyr Asn Val Ala
 1 5
 <210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> P11
 <400> 12
 Arg Ala Asp Thr Val Ala Glu Ile Leu
 1 5
 <210> 13
 <211>
 13
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> P12
 <400> 13
 Ala Gly Val Ser Arg Gln Gln Ile Arg Val Val Ser Tyr
 1 5 10
 <210> 14
 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> P13

<400> 14

Ala Gln Asn Arg Arg Val Glu Phe Ile

1

5