

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0093723

(43) 공개일자 2020년08월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/04 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)

A61P 31/06 (2006.01) C07K 14/35 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 39/04 (2013.01)

A61P 31/06 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2019-0010431

(22) 출원일자 2019년01월28일

심사청구일자 2019년01월28일

(71) 출원인

주식회사 바이오애플

경상북도 포항시 남구 지곡로 394 (지곡동, 포항 테크노파크 내)

주식회사 큐라티스

서울특별시 구로구 디지털로27가길 27, 7층(구로동, 아남빌딩)

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

이용직

경상북도 포항시 남구 지곡로 394, 테크노빌101동 1001호 (지곡동, 포항테크노파크)

손은주

경상북도 포항시 남구 지곡로 394 (지곡동, 포항 테크노파크 내)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이명진

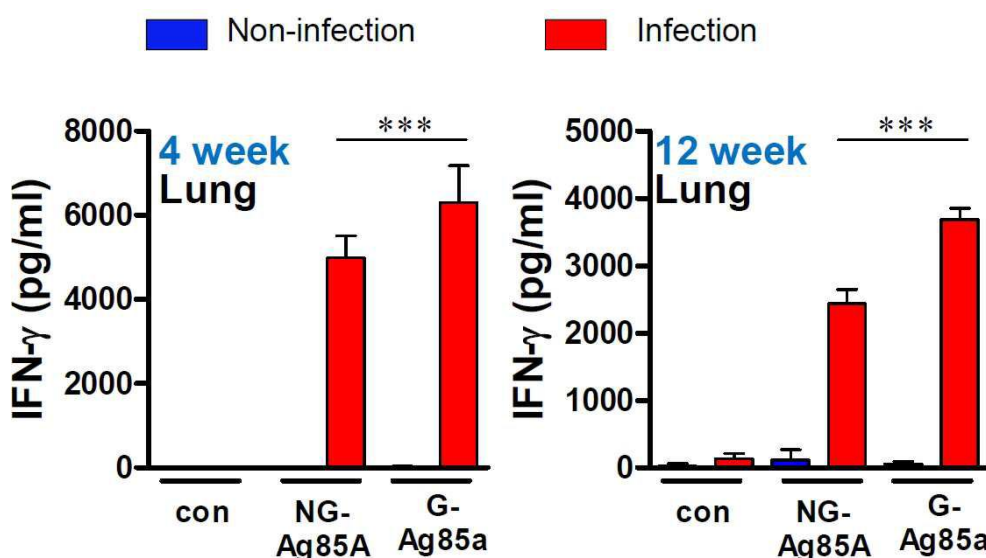
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 당화된 Ag85A 단백질을 포함하는 결핵 예방용 백신 조성물 및 이의 제조방법

## (57) 요약

본 발명은 당화된 Ag85A 단백질을 포함하는 결핵 예방용 백신 조성물, 상기 단백질의 제조를 위한 벡터, 상기 벡터를 이용한 형질전환체, 및 상기 형질전환체를 이용하여 당화된 Ag85A 단백질을 생산하는 방법 등에 관한 것으로, 본 발명의 당화된 Ag85A 단백질을 포함하는 백신 조성물은, 결핵 방어 효과에 중요한 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  및 IL-2를 동시에 분비하는 다기능성 T세포 증가를 유도하는 효과가 있어 결핵 예방용 백신으로 유용하게 이용될 수 있으며, 나아가, 상기 당화된 Ag85A 단백질은 단백질 생산에 최적화된 벡터를 이용하여 식물체에서 효과적으로 발현되고 높은 수율로 분리될 수 있어 저렴한 비용으로 대량 생산이 가능하다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

**C07K 14/35** (2013.01)  
**C12N 15/8258** (2013.01)  
**A61K 2039/57** (2013.01)  
**C07K 2319/02** (2013.01)  
**C07K 2319/50** (2013.01)

(72) 발명자

**신성재**

서울시 서대문구 50-1 연세로, 연세대학교 의과대  
 학 미생물학교실

**김홍민**

서울시 서대문구 50-1 연세로, 연세대학교 의과대  
 학 미생물학교실

**조관구**

서울시 구로구 디지털로27가길 27, 아남빌딩 7층,  
 큐라티스

**오명열**

서울시 구로구 디지털로27가길 27, 아남빌딩 7층,  
 큐라티스

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1545016825  
 부처명 농림축산식품부  
 연구관리전문기관 농림식품기술기획평가원  
 연구사업명 기술사업화지원사업  
 연구과제명 식물 발현 시스템을 이용한 반려 동물 고품질 정제 백신 개발  
 기 여 율 25/100  
 주관기관 주식회사 바이오엠플  
 연구기간 2019.01.01 ~ 2019.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2016R1A2A1A05005263  
 부처명 과학기술정보통신부  
 연구관리전문기관 한국연구재단  
 연구사업명 기초연구사업, 중견연구자지원사업, 도약연구\_도전  
 연구과제명 결핵의 질병단계 특이적 핵심병원면역 조절을 통한 면역화학 치료요법 개발  
 기 여 율 75/100  
 주관기관 연세대학교 산학협력단  
 연구기간 2016.06.01 ~ 2019.05.31

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 당화된 Ag85A 단백질을 함유하는, 결핵 예방용 백신 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 당화된 Ag85A 단백질은 결핵균에 의해 감염된 폐조직 손상 억제를 유도하는 것을 특징으로 하는, 결핵 예방용 백신 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 당화된 Ag85A 단백질은 폐에서 결핵균 수 감소를 유도하는 것을 특징으로 하는, 결핵 예방용 백신 조성물.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 당화된 Ag85A 단백질은 IFN- $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ ), TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ), 및 IL-2 (Interleukin-2)으로 이루어진 군으로부터 선택된 2 이상의 사이토카인을 동시에 분비하는 CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> T세포 증가를 유도하는 것을 특징으로 하는, 결핵 예방용 백신 조성물.

#### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 당화된 Ag85A 단백질은 IFN- $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ ), TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ), 및 IL-2 (Interleukin-2)으로 이루어진 군으로부터 선택된 2 이상의 사이토카인을 동시에 분비하는 CD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> T세포 증가를 유도하는 것을 특징으로 하는, 결핵 예방용 백신 조성물.

#### 청구항 6

서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 당화된 Ag85A 단백질을 코딩하는 유전자 및 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 셀룰로오스 바인딩 모듈 3 (cellulose binding module 3; CBM3)을 코딩하는 유전자를 포함하는, 결핵 예방용 백신 발현 벡터.

#### 청구항 7

서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 당화된 Ag85A 단백질을 코딩하는 유전자, 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 셀룰로오스 바인딩 모듈 3 (cellulose binding module 3; CBM3)을 코딩하는 유전자, 및 서열번호 3의 아미노산 서열로 표시되는 BiP 신호 펩타이드 (signal peptide)를 코딩하는 유전자를 포함하는, 결핵 예방용

백신 발현 벡터.

#### 청구항 8

서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 당화된 Ag85A 단백질을 코딩하는 유전자, 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 셀룰로오스 바인딩 모듈 3(cellulose binding module 3; CBM3)을 코딩하는 유전자, 및 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 HDEL 펩타이드를 코딩하는 유전자를 포함하는, 결핵 예방용 백신 발현 벡터.

#### 청구항 9

제6항에 있어서,

상기 벡터는 서열번호 5로 표시되는 엔테로키나제(enterokinase)에 의해 인식되어 절단되는 서열을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 결핵 예방용 백신 발현용 벡터.

#### 청구항 10

제6항에 있어서,

상기 벡터는 서열번호 6으로 표시되는 연결 펩타이드를 코딩하는 유전자를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 결핵 예방용 백신 발현용 벡터.

#### 청구항 11

제6항 내지 제10항중 어느 한 항의 벡터로 형질전환된 결핵 예방용 백신 제조용 형질전환체.

#### 청구항 12

제11항에 있어서,

상기 형질전환체는 식물체인 것을 특징으로 하는, 결핵 예방용 백신 제조용 형질전환체.

#### 청구항 13

제12항에 있어서,

상기 식물체는 애기장대, 대두, 담배, 가지, 고추, 감자, 토마토, 배추, 무, 양배추, 상추, 복숭아, 배, 딸기, 수박, 참외, 오이, 당근 및 샐러리로 이루어진 군 중에서 선택되는 쌍자엽 식물; 또는 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리 및 양파로 이루어진 군 중에서 선택되는 단자엽 식물인 것을 특징으로 하는, 결핵 예방용 백신 제조용 형질전환체.

#### 청구항 14

(a) 제11항의 형질전환체를 배양하는 단계; 및

(b) 상기 형질전환체 또는 배양액으로부터 당화된 Ag85A 단백질을 분리 및 정제하는 단계를 포함하는, 결핵 예방용 백신 조성물의 생산 방법.

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 당화된 Ag85A 단백질을 포함하는 결핵 예방용 백신 조성물, 상기 단백질의 제조를 위한 벡터, 상기 벡터를 이용한 형질전환체, 및 상기 형질전환체를 이용하여 당화된 Ag85A 단백질을 생산하는 방법 등에 관한 것이다.

## 배경 기술

[0002] 결핵은 WHO에서 규정한 3대 감염질환 중 하나로 1882년 미생물학자인 로베르트 코흐에 의해 발견되었으며, 마이코박테리움 튜버쿨로시스(Mycobacterium tuberculosis)에 의하여 유발되는 높은 발병률과 사망률을 보이는 치명적인 질병이다. 전 세계적으로 약 6천만명 환자가 활동성 결핵에 감염되어 있으며, 매년 약 5천만에서 1억여명이 새로 결핵에 감염되는 것으로 추정되고 있고, 적어도 매년 900만명 이상의 새로운 결핵 환자가 발생하며, 연간 150만명 이상이 결핵으로 사망한다고 알려졌다. 결핵 발병률은 인구 10만명당 146명, 결핵 사망률은 인구 10만명당 49명으로 단일 감염병 중에서 가장 많은 사망 원인을 차지하고 있어, 세계적으로 심각한 보건 문제로 남아 있다.

[0003] 한편, 상기와 같은 결핵 예방을 위한 백신 제조와 관련하여 동물 단백질을 대량 생산하기 위한 의료산업계의 요구는 여러가지 복잡한 단백질이나 펩타이드를 생산하기 위한 혼합 발현계의 개발이다. 기주생물(寄主生物)로는 세균에서부터 효모, 곤충, 포유동물과 식물세포와 같은 진핵생물 모두가 포함된다. 다만, 세균은 상대적으로 많은 양의 단백질을 생산할 수 있지만, 불용성 봉입체(Inclusion bodies)를 만드는 경우가 많으며, 또한 번역 후-변형공정에 한계가 있다. 반면에 진핵세포 발현계는 서로 다른 번역 후 공정으로 인해 원래 의도했던 단백질과 동일하지 않은 단백질을 만들 수도 있지만, 단백질에 당을 접합시킬 수 있고 번역 후 공정 과정을 수행할 수 있다. 식물 생산시스템은 현재 외래단백질을 합성하기 위하여 상업적으로 이용되고 있으며, 식물세포의 번역 후 변형은 동물세포에서 이루어지는 것과 매우 유사하여 정확하게 복합 단백질(Multimeric protein)을 생성할 수 있다. 식물 유래 동물단백질의 경우 당화(Glycosylation)되는 아미노산 잔기는 원래의 단백질에서와 동일하게 일어난다. 그러나 식물세포의 분비경로에 있는 N-linked glycan의 공정은 동물 발현계에서 생산된 것보다 다양한 형태의 당화를 보이지만, 당단백질의 활성은 그대로 유지되는 경우가 많다.

[0004] 현재 식물을 이용하여 개발이 시도되는 백신은 병원성인 경우 세균이나 바이러스의 점막 감염에 필수적인 부착(Adhesion)기능을 수행하는 단백질과 세균의 독성을 나타내는 독소단백질, 바이러스의 구조를 이루는 단백질들이 항원으로 주로 이용되고 있으며, 비병원성 질병의 경우 질병을 야기하는 물질이나 원인 물질을 생산하는 주된 효소가 항원으로 이용되고 있다. 지금까지의 연구결과로 식물체에서 유래된 재조합 항원단백질은 동물 유래 백신과 동일한 기능을 갖는 구조를 가지고 있음이 보고되고 있어 이를 응용한 다양하고 심도 깊은 연구가 요구되고 있다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국등록특허공보 10-1579861

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0006] 본 발명자들은 당화된 Ag85A 항원 단백질 및 당화되지 않은 Ag85A 항원 단백질을 마우스에 면역접종 하여 면역 반응 및 결핵에 대한 방어효능 등에 대한 실험을 수행한 결과, 식물 세포에서 발현되어 당화된 Ag85A의 경우 당화되지 않은 Ag85A에 비하여 결핵방어 효과가 뛰어남을 실험적으로 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0007] 이에, 본 발명의 목적은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 당화된 Ag85A 단백질을 함유하는, 결핵 예방용 백신 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0009] 상기와 같은 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 당화된 Ag85A 단백질을 함유하는, 결핵 예방용 백신 조성물을 제공한다.
- [0010] 본 발명의 일 구현예로, 상기 당화된 Ag85A 단백질은 결핵균에 의해 감염된 폐 조직 손상 억제를 유도할 수 있다.
- [0011] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 당화된 Ag85A 단백질은 폐에서 결핵균 수 감소를 유도할 수 있다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 당화된 Ag85A 단백질은 IFN- $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ ), TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ), 및 IL-2(Interleukin-2)으로 이루어진 군으로부터 선택된 2 이상의 사이토카인을 동시에 분비하는 CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> T세포 증가를 유도할 수 있다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 당화된 Ag85A 단백질은 IFN- $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ ), TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ), 및 IL-2(Interleukin-2)으로 이루어진 군으로부터 선택된 2 이상의 사이토카인을 동시에 분비하는 CD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> T세포 증가를 유도할 수 있다.
- [0014] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 당화된 Ag85A 단백질을 코딩하는 유전자 및 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 셀룰로오스 바인딩 모듈 3(cellulose binding module 3; 이하 CBM3)을 코딩하는 유전자를 포함하는, 결핵 예방용 백신 발현용 벡터를 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 당화된 Ag85A 단백질을 코딩하는 유전자, 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 셀룰로오스 바인딩 모듈 3(cellulose binding module 3; CBM3)을 코딩하는 유전자, 및 서열번호 3의 아미노산 서열로 표시되는 BiP 신호 펩타이드(signal peptide)를 코딩하는 유전자를 포함하는, 결핵 예방용 백신 발현 벡터를 제공한다.
- [0016] 또한 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 당화된 Ag85A 단백질을 코딩하는 유전자, 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 셀룰로오스 바인딩 모듈 3(cellulose binding module 3; CBM3)을 코딩하는 유전자, 및 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 HDEL 펩타이드를 코딩하는 유전자를 포함하는, 결핵 예방용 백신 발현 벡터를 제공한다.
- [0017] 본 발명의 일 구현예로, 상기 벡터는 서열번호 5로 표시되는 엔테로키나제(enterokinase)에 의해 인식되어 절단되는 서열을 추가로 포함할 수 있다.
- [0018] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 벡터는 서열번호 6으로 표시되는 연결 펩타이드를 코딩하는 유전자를 추가로 포함할 수 있다.
- [0019] 또한, 본 발명은 상기 벡터로 형질 전환된 결핵 예방용 백신 제조용 형질전환체를 제공한다.
- [0020] 본 발명의 일 구현예로, 상기 형질전환체는 식물체일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 식물체는 애기장대, 대두, 담배, 가지, 고추, 감자, 토마토, 배추, 무, 양배추, 상추, 복숭아, 배, 딸기, 수박, 참외, 오이, 당근 및 샐러리로 이루어진 군 중에서 선택되는 쌍자엽 식물; 또는 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리 및 양파로 이루어진 군 중에서 선택되는 단자엽 식물일 수 있다.
- [0022] 또한, 본 발명은 (a) 상기 형질전환체를 배양하는 단계; 및
- [0023] (b) 상기 형질전환체 또는 배양액으로부터 당화된 Ag85A 단백질을 분리 및 정제하는 단계를 포함하는, 결핵 예방용 백신 조성물의 생산 방법을 제공한다.

### 발명의 효과

- [0024] 본 발명의 당화된 Ag85A 단백질을 포함하는 백신 조성물은, 결핵 방어 효과에 중요한 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  및 IL-2를 동시에 분비하는 다기능 T세포 증가를 유도하는 효과가 있어 결핵 예방용 백신으로 유용하게 이용될 수 있으며, 나아가, 상기 당화된 Ag85A 단백질은 상기 단백질 생산에 최적화된 벡터를 이용하여 식물체에서 효과적으로 발현되고 높은 수율로 분리될 수 있어 저렴한 비용으로 대량 생산이 가능하다.

### 도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 당화된 Ag85A 단백질의 발현을 위한 유전자의 배열을 나타낸 것이다.

도 2는 식물발현 Ag85A 단백질의 당화를 확인하기 위해 웨스턴 블랏을 수행한 결과이다.

도 3은 당화된 Ag85A 단백질의 백신항원으로서 가능성을 타진하기 위해 결핵균을 마우스에 감염시킨 뒤 IFN- $\gamma$  분비를 비교한 결과이다.

도 4는 당화된 Ag85A 단백질의 면역성 조사를 위해 설계된 실험방법을 간략히 나타낸 것이다.

도 5a 내지 5c는 최종 면역접종 4주 후 마우스에서 Ag85A 단백질 등의 항원 자극에 의하여 하나 이상의 사이토카인을 분비하는 T세포의 비율을 비교한 결과이다.

도 6a는 면역된 마우스에 결핵균을 감염시킨 후 폐의 조직을 육안검사 및 H&E(hematoxylin-eosin)염색법에 의한 관찰결과를 나타낸 것이다.

도 6b는 면역된 마우스에 결핵균을 감염시킨 후 4주 및 12주후 폐와 비장에서 CFU(colony forming unit)를 측정 한 결과이다.

도 7a 내지 7c는 면역된 마우스에 결핵균을 감염시키고 4주 후 하나 이상의 사이토카인을 분비하는 T세포의 비율을 비교한 결과이다.

도 8은 본 발명에 사용된 서열번호 1의 아미노산 서열을 이용하여 당화여부 예측 프로그램을 작동시킨 결과를 나타낸 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 본 발명자들은 당화된 Ag85A 항원 단백질 및 당화되지 않은 Ag85A 항원 단백질을 마우스에 면역 접종하여 면역 반응 및 결핵에 대한 방어효능 등에 대한 실험을 수행한 결과, 식물 세포에서 발현되어 당화된 Ag85A의 경우 당화되지 않은 Ag85A에 비하여 결핵방어 효과가 뛰어나는 실험적으로 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0027] 본 발명의 일 실시예에서는, 식물에서 발현되는 Ag85A 발현 벡터를 이용하여 생산된 단백질을 분리, 정제하여 당화된 Ag85A를 식물에서 생산 가능함을 확인하였다(실시예 1 참조).
- [0028] 본 발명의 다른 실시예에서는, 식물에서 생산된 Ag85A 단백질이 당화되었는지 확인하기 위해 웨스턴 블랏을 수행하였으며 그 결과, 글리칸의 절단을 확인하여 식물발현 Ag85A 단백질이 당화 되었음을 확인하였다(실시예 2 참조).
- [0029] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 결핵균을 감염시킨 마우스를 이용하여 폐 세포에서 IFN- $\gamma$  분비를 측정한 결과, 지속적인 IFN- $\gamma$  분비를 확인하여 당화된 Ag85A의 백신항원으로서 가능성을 타진하였다(실시예 3 참조).
- [0030] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 당화된 Ag85A 단백질의 면역원성을 조사한 결과 당화된 Ag85A 단백질로 면역된 마우스의 경우 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , 및 IL-2를 동시에 분비하는 T세포의 비율이 증가함을 확인하였다(실시예 4 참조).
- [0031] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0032] 본 발명은, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 당화된 Ag85A 단백질을 제공한다.
- [0033] 본 발명에서 사용되는 용어 “Ag85A”는 광범위하게 연구되고 있는 항원중의 하나로, 단백질뿐 아니라 DNA 백신으로서도 유효한 효과를 나타내고 있다고 알려져 있다.
- [0034] 본 발명에서 사용하는 용어 “당화(glycosylation)”는 세포(진핵생물)의 단백질 번역 후 과정으로써 N-당화와 O-당화로 나뉘는데 이는 붙는 작용기에 따라 다르며 세포에서 생성된 단백질에 락토스(lactose) 등의 당이 붙는 과정을 통틀어 “당화”라고 한다. 당화 과정으로 당사슬이 단백질에 연결되면 단백질이 “폴딩”과정을 거쳐 입체적인 구조물을 형성하며 이는 단백질이 풀어지지 않고 오랫동안 유지될 수 있는 안정성을 부여한다. 또한 단백질에 붙어있는 당사슬을 세포막으로 가서 세포막 단백질이 되어 항원과 같은 효과를 내기도 한다. 상기와 같이 당화된 단백질을 당단백질이라고 하는데 대표적인 당단백질에는 면역반응에서 중요한 역할을 하는 항체 등이 있다. 본 발명에 사용된 서열번호 1의 아미노산 서열을 이용하여 당화여부 예측 프로그램(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)을 작동시켜 본 결과 203번째 Asparagine(N)에서 N-당화가 일어날 것으로 예측되었으나(도 8 참조)이에 제한되는 것은 아니고 본 발명과 동등한 효과를 갖는 범위 내에서 변형이 가능하다.
- [0035] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 당화된 Ag85A 단백질을 함유하는,

결핵 예방용 백신 조성물을 제공한다.

- [0036] 본 발명에서 사용하는 용어 “항원(antigen)”이란 체내에서 면역 반응을 일으키는 모든 물질을 총칭하며, 바람직하게는 바이러스, 화합물질, 세균, 꽃가루, 암세포, 새우 등 또는 이들의 일부 펩타이드 또는 단백질이나, 체내에서 면역 반응을 일으킬 수 있는 물질이라면 이에 제한되지 않는다.
- [0037] 본 발명에서 사용하는 용어 “백신(vaccine)”이란 생체에 면역 반응을 일으키는 항원을 함유하는 생물학적인 제제로서, 감염증의 예방을 위하여 사람이나 동물에 주사하거나 경구 투여함으로써 생체에 면역이 생기게 하는 면역원을 말한다. 상기 동물은 인간 또는 비인간 동물로서, 상기 비인간 동물은 돼지, 소, 말, 개, 염소, 양 등을 지칭하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0038] 본 발명에서 사용하는 용어 “백신 조성물”은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용되는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제할 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 레시틴 유사 유화제에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 진분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 슈크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등을 사용할 수 있으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비 경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조제제가 포함된다. 비수용성제제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 또한, 추가로 기존에 알려져 있는 “면역항원보강제(adjuvant)”를 추가로 포함할 수 있다. 상기 보강제는 당해 기술분야에 알려진 것이라면 어느 것이나 제한없이 사용할 수 있으나, 예를 들어 프로인트(Freund)의 완전 보조제 또는 불완전 보조제를 더 포함하여 그 면역성을 증가시킬 수 있다.
- [0039] 본 발명의 백신 조성물 또는 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0040] 본 발명에 따른 백신 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투하가 바람직하다. 본원에 사용된 용어 “비경구”는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골 내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 백신 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.
- [0041] 본 발명에 따른 백신 조성물 또는 약학적 조성물의 투여량은 개체의 연령, 체중, 성별, 신체 상태 등을 고려하여 선택된다. 별다른 부작용 없이 개체에 면역보호반응을 유도하기에 필요한 양은 면역원으로서 사용된 제조합 단백질 및 부형제의 임의 존재에 따라 다양할 수 있다. 일반적으로 각각의 용량은 본 발명의 제조합 단백질의 멸균용액 ml 당 0.1 내지 1000  $\mu$ g의 단백질, 바람직하게는 0.1 내지 100  $\mu$ g을 함유한다. 백신 조성물의 경우에는 필요에 따라 초기 용량에 이어 임의로 반복된 항원자극을 수행할 수 있다.
- [0042] 본 발명에서 사용하는 용어 “면역항원보강제(adjuvant)”란 일반적으로 항원에 대한 체액 및/또는 세포 면역 반응을 증가시키는 임의의 물질을 지칭한다.
- [0043] 본 발명에서 사용하는 용어 “예방(prevention)”이란 이란 본 발명에 따른 당화된 Ag85A 단백질 투여에 의해 결핵을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0044] 본 발명에서 “결핵”은 안 결핵, 피부 결핵, 부신 결핵, 신장 결핵, 부고환 결핵, 림프선 결핵, 후두 결핵, 중이 결핵, 장결핵, 다제내성 결핵, 폐결핵, 담결핵, 골결핵, 인후 결핵, 임파선 결핵, 폐허중, 유방 결핵 및 척추 결핵을 포함하며, 이에 제한되지 않는다.
- [0045] 본 명세서에 있어서, “개체(individual)”란 본 발명의 당화된 Ag85A 단백질이 투여될 수 있는 대상을 말하며, 그 대상에는 제한이 없다.
- [0046] 본 발명에서 상기 당화된 Ag85A 단백질은 결핵균에 의해 감염된 폐 조직 손상 억제를 유도할 수 있다.

- [0047] 본 발명에서 상기 당화된 Ag85A 단백질은 페에서 결핵균 수 감소를 유도할 수 있다.
- [0048] 본 발명에서 상기 당화된 Ag85A 단백질은 IFN- $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ ), TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ), 및 IL-2 (Interleukin-2)으로 이루어진 군으로부터 선택된 2 이상의 사이토카인을 동시에 분비하는 다 기능성 T세포의 증가를 유도할 수 있으며, 상기 T세포는 CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> T세포, 또는 CD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup> T세포일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0049] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 당화된 Ag85A 단백질을 코딩하는 유전자 및 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 셀룰로오스 바인딩 모듈 3(cellulose binding module 3; CBM3)을 코딩하는 유전자를 포함하는, 결핵 예방용 백신 발현용 벡터를 제공한다.
- [0050] 본 발명에서 사용하는 용어 “발현 벡터(expression vector)”란 벡터 내에 삽입된 이중의 핵산에 의해 코딩되는 펩타이드 또는 단백질을 발현할 수 있는 벡터를 지칭하는 것으로, 바람직하게는 당화된 Ag85A 단백질을 발현할 수 있도록 제조된 벡터를 의미한다. 상기 "벡터"는 시험관 내, 생체 왜 또는 생체 내에서 숙주 세포로 염기의 도입 및/또는 전이를 위한 임의의 매개물을 말하며, 다른 DNA 단편이 결합하여 결합된 단편의 복제를 가져올 수 있는 복제단위(replicon)일 수 있으며, "복제 단위"란 생체 내에서 DNA 복제의 자가 유닛으로서 기능하는, 즉, 스스로의 조절에 의해 복제 가능한, 임의의 유전적 단위(예를 들면, 플라스미드, 파지, 코스미드, 염색체, 바이러스 등)를 말한다. 본 발명의 재조합 발현 벡터는 바람직하게는 RNA 중합효소가 결합하는 전사개시인자인 프로모터(promoter), 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열과 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열, 터미네이터 등을 포함할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 단백질의 합성량을 증가시키기 위한 M17의 5' UTR 부위 유전자 등을 추가로 포함할 수 있으며, 상기 프로모터에는 일례로 pEMU 프로모터, MAS 프로모터, 히스톤 프로모터, Clp 프로모터, 꽃양배추 모자이크 바이러스(cauliflower mosaic virus) 유래 35S 프로모터, 꽃양배추 모자이크 바이러스(cauliflower mosaic virus) 유래 19S RNA 프로모터, 식물의 액틴 단백질 프로모터, 유비퀴틴 단백질 프로모터, CMV(Cytomegalovirus) 프로모터, SV40(Simian virus 40) 프로모터, RSV(Respiratory syncytial virus) 프로모터, EF-1 $\alpha$  (Elongation factor-1  $\alpha$ ) 프로모터 등이 포함될 수 있으며, 상기 터미네이터는 일례로 노팔린 신타아제(NOS), 벼 아밀라아제 RAmy1 A 터미네이터, 파세올린 터미네이터, 아그로박테리움 투마파시엔스의 옥토파인(Octopine) 유전자의 터미네이터, 대장균의 rrnB1/B2 터미네이터 등이거나, 상기 예는 예시일 뿐 이에 제한되지 않는다.
- [0051] 또한 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 당화된 Ag85A 단백질을 코딩하는 유전자, 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 셀룰로오스 바인딩 모듈 3(cellulose binding module 3; CBM3)을 코딩하는 유전자, 및 서열번호 3의 아미노산 서열로 표시되는 BiP 신호 펩타이드(signal peptide)를 코딩하는 유전자를 포함하는, 결핵 예방용 백신 발현 벡터를 제공한다.
- [0052] 또한 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 당화된 Ag85A 단백질을 코딩하는 유전자, 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 셀룰로오스 바인딩 모듈 3(cellulose binding module 3; CBM3)을 코딩하는 유전자, 및 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 HDEL 펩타이드를 코딩하는 유전자를 포함하는, 결핵 예방용 백신 발현 벡터를 제공한다.
- [0053] 본 발명에서 상기 벡터는 서열번호 5로 표시되는 엔테로키나제에 의해 인식되어 절단되는 서열을 추가로 포함할 수 있다.
- [0054] 본 발명에서 상기 벡터는 서열번호 6으로 표시되는 연결 펩타이드를 추가로 포함할 수 있다.
- [0055] 본 발명에서 상기 벡터는, CBM3를 코딩하는 유전자, 연결 펩타이드를 코딩하는 유전자, 엔테로키나제 절단 부위, 및 Ag85A 단백질을 코딩하는 유전자가 순차적으로 연결되어 구성되고, 상기 CBM3의 3' 말단에는 식물 세포에서 소포체로 목적 단백질을 타겟팅할 수 있는 BiP 신호 펩타이드(signal peptide)를 코딩하는 유전자가 연결될 수 있으며, 상기 목적 단백질 암호화 유전자의 카르복실 말단에는 벡터가 소포체에 보존(retention)되도록 하는 HDEL(His-Asp-Glu-Leu)을 코딩하는 유전자가 연결될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0056] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 당화된 Ag85A 단백질 발현 벡터로 형질전환된 결핵 예방용 백신 제조용 형질전환체를 제공한다.
- [0057] 본 발명에서 사용하는 용어 “형질전환(transformation)”이란 주입된 DNA에 의하여 생물의 유전적인 성질이 변하는 것을 총칭하며, “형질전환체(transgenic organism)”란 분자유전학적 방법으로 외부의 유전자를 주입하여 제조된 생명체로서, 바람직하게는 본 발명의 재조합 발현 벡터에 의하여 형질전환된 생명체이며, 상기 생명체는

미생물, 진핵세포, 곤충, 동물, 식물 등 생명이 있는 생물이라면 제한이 없으며, 바람직하게는 대장균, 살모넬라, 바실러스, 효모, 동물 세포, 마우스, 래트, 개, 원숭이, 돼지, 말, 소, 아크로박테리움 튜머페시언스, 식물 등이나 이에 제한되지 않는다. 상기 형질전환체는 형질전환(transformation), 형질감염(transfection), 아그로박테리움(Agrobacterium)-매개 형질전환 방법, 입자 총 충격법(particle gun bombardment), 초음파 처리법(sonication), 전기천공법(electroporation) 및 PEG(Polyethylen glycol)-매개 형질전환 방법 등의 방법으로 제조될 수 있으나, 본 발명의 벡터를 주입할 수 있는 방법이라면 제한이 없다.

[0058] 본 발명에서 형질전환체는 바람직하게는 식물체이다. 식물에서 유용물질을 생산하는 것은 여러 가지 장점이 있는데, 1)생산 단가를 과격적으로 줄일 수 있고, 2)종래 대중적 방법(동물세포나 미생물에서 합성하여 단백질을 분리 정제하는)에서 발생할 수 있는 여러 가지 오염원(바이러스, 암유전자, 장독소 등)을 원천 배제할 수 있으며, 3)상품화 단계에서도 동물세포나 미생물과는 달리 종자로 seed stock 관리가 가능하다는 점에서 유리한 점을 갖는다. 또한, 4) 해당물질의 수요가 급증할 경우 대량생산에 필요한 설비 기술이나 비용 면에서 기존의 동물세포시스템에 비해 절대적으로 유리하기 때문에 최단 기간에 높아진 수요에 따른 공급이 가능하다는 것도 장점이다. 이와 같이 식물체를 형질 전환시켜 이로부터 유용물질을 생산하는 방법이 주목을 받는 배경은 식물체의 단백질 합성경로에 있다. 포유동물의 단백질 합성에는 해독 후 수식 과정이 필수적인데, 식물체는 진핵생물 단백질의 합성 경로를 가지고 있기 때문에 포유동물에서 발현되는 단백질과 거의 유사한 단백질을 생산할 수 있다.

[0059] 본 발명에서 상기 식물체는 애기장대, 대두, 담배, 가지, 고추, 감자, 토마토, 배추, 무, 양배추, 상추, 복숭아, 배, 딸기, 수박, 참외, 오이, 당근 및 셀러리로 이루어진 군 중에서 선택되는 쌍자엽 식물; 또는 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리 및 양파로 이루어진 군 중에서 선택되는 단자엽 식물일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0060] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 (a) 상기 형질전환체를 배양하는 단계; 및

[0061] (b) 상기 형질전환체 또는 배양액으로부터 당화된 Ag85A 단백질을 분리 및 정제하는 단계를 포함하는, 결핵 예방 백신 조성물의 생산 방법을 제공한다.

[0062] 한편 하기 표 1에서 본 발명에서 이용한 서열을 정리하였다.

표 1

서열번호	서열
1(Ag85A 단백질의 아미노산 서열)	FSRPGLPVEYLQVPSMGRDIKVQFQSGGANSPALYLLDGLRAQDDFSGWDINTPAFEWYDQSGLSVVMVPGQSSSFYS DWYQPCAGKAGCQTYKWETFLTSELPQWLQANRHVKPTGSAVVGLSMAASSALTLAIYHPQQFVYAGAMSGLLDPSQAMG PTLIGLAMGDAGGYKASDMWPKEDPAWRNDPLLVNKGKLIANNTRVWVYCGNGKPSDLGGNNLPAKFLEGFVRTSNIKF QDAYNAGGGHNGVDFPDGTHSWEYWGQALNAMKPDQLRALGATPNTGPAPQGAGSGSGS
2(CBM3의 염기서열)	GTATCAGGTAACCTTAAGGTGGAGTTTACAACCTCGAACCTTCTGATACAACCTCAATAAACCCACAGTTCAAAGT TACAAACACAGGCAGCTCTGCGATCGATTGTCTAAATTAACCCCTCAGATACTATTATACGGTGTATGGACAGAAGGACC AGACTTTCTGGTGTGATCATGCAGCTATCATTTGGTTCTAACGGTAGCTACAACGGAATTACATCAAACGTGAAGGGCACT TTCGTTAAGATGTCCTCTAGCACTAACAACGACAGACATATTTGGAGATCAGTTTACGGGGGAACCCCTGAACCAGG TGCTCACGTCAGATTCAAGGAAGATTGCTAAAAACGACTGGTCGAATATACCCAAAGTAATGATTACAGTTTAAAT CCGCCTCACAAATTTGTTGAGTGGGATCAGGTCACTGCTTACCTGAACGGGGTTCTAGTGTGGGAAAGGAACCTGGT
3(BiP의 염기서열)	ATGGCTCGCTCGTTTGGAGCTAACAGTACCGTTGTGTGGCGATCATCTTCTTCGGTGAG TGATTTTCCGATCTTCTTCCGATTTAGATCTCCTCTACATTGTTGCTTAATCTCAGAA CCTTTTTCGTTGTTCTGGATCTGAATGTGTTTGTGCAATTTACGATCTTAAAGG TTAGATCTCGATTGTTGATGACGATTGGAATCTTTACGATTTACGATGTTTATTTGCG TTGTCCTCTGCAATAGAAGAGGCTACGAAGTTA
4(HDEL의 염기서열)	CACGATGAGCTC
5(엔테로키나제에 의해 인식되어 절단되는 염기서열)	GATGACGACGATAAA
6(연결캡타이드의 염기서열)	GAGGCAGCCGCTAAGGAAGCTGCAGCGAAAGCC

7(Ag85A의 염기서열)	TTTAGCCGGCCTGGCCTGCCTGTGGAATACCTGCAGGTGCCTAGCCCTAGCATGGGCCGGGACATCAAAGTGCAGTTTCA GAGCGGCGGGGCTAATAGCCCTGCTCTGTACCTGCTCGATGGCCTGCGGGCTCAGGATGATTTAGCGGCTGGGACATCA ACACCCCTGCTTTTGAATGGTACGATCAGAGCGGCCTGAGCGTCGTGATGCCTGTGGGCGGGCAGAGCAGCTTCTACAGC GATTGGTATCAGCCTGCTTGGCGCAAAGCTGGCTGCCAGACCTACAAGTGGGAAACCTTTCTGACCAGCGAACTGCCTGG CTGGCTGCAGGCTAATCGGCACGTGAAACCTACCGGCAGCGCCGTGGTGGGCTGAGCATGGCTGCTAGCTCCGCTCTGA CCCTGGCTATCTACCACCCTCAGCAGTTTGTGTACGCTGGCGCTATGAGCGGCTGCTCGATCCCTCCCAGGCTATGGGC CCTACCTGATCGGGCTCGCTATGGGGGATGCTGGGGGTACAAAGCTAGCGATATGTGGGCGCCCTAAAGAAGATCCTGC TTGGCAGCGGAATGATCCTCTGCTCAACGTGGGCAAACCTGATCGCTAATAATACCCGAGTGTGGGTGTACTGCGGCAATG GCAAACCTAGCGATCTGGGCGGGAACAATCTGCCTGCTAAATTTCTGGAAGGCTTCGTGCGGACCAGCAACATCAAGTTT CAGGATGCTTACAATGCTGGCGGGGGCACAATGGCGTATTTGATTTTCCTGATAGCGGCACCCACAGCTGGGAATACTG GGGCGCTCAGCTGAATGCTATGAAACCTGATCTGCAGCGGCTCTGGGCGCTACCCCTAATACCGGCCCTGCTCCTCAGG GCGCTGGCTCCGGATCTGGTAGT
8(CBM3의 아미노산 서열)	VSGNLKVEFYNSNPSTTNSINPQFKVINTGSSAIDL SKLTLRYYYTVDGQKDQTFWCDHAAI IGSNGSYNGITSNVKGT FVKMSSSTNNADTYLEISFTGGTLEPGAHVQIQGRFAKNDWSNYTQSNDSYFSAQSFVEWDQVTAYLNGVLVWGKEPG

[0064] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0065] **[실시예]**

[0066] **실시예 1. 식물 발현 Ag85A 발현 벡터 제작 및 단백질 분리 정제**

[0067] **1-1. CBM3 융합 Ag85A 식물 발현 벡터 제작**

[0068] 식물체에서 CBM3 융합 Ag85A를 발현시킬 수 있도록 재조합한 식물 발현 벡터를 제작하였다. 보다 자세하게는, CBM3 융합 Ag85A 단백질을 소포체로 이동시킬 수 있도록 BiP 신호 펩타이드(signal peptide)를 이용하여 목적 단백질을 소포체로 이동시킬 수 있도록 하였고, 융합 단백질이 소포체에 축적될 수 있도록 카르복실말단에 HDEL(His-Asp-Glu-Leu)을 결합하여 소포체에 보존시켰다. Ag85A를 코딩하는 유전자의 앞쪽에 융합 단백질 분리에 필요한 CBM3와 연결 펩타이드를 코딩하는 서열, 그리고 엔테로키나제에 의해 인식되어 절단되는 서열을 결합시킨 다음, 식물발현 벡터인 pCAMBIA 1300에 삽입하여 재조합 벡터를 제조하였다(도 1 참조).

[0070] **1-2. 식물 발현 벡터 일시적 발현(transient expression)**

[0071] 상기의 실시예 1-1에서 준비한 식물 발현 벡터를 아그로박테리아 균주 LBA4404에 전기충격법(Electrophoration)을 이용하여 형질전환 시켰다. 형질전환 된 아그로박테리아를 5ml의 YEP 액체 배지(효모 추출물 10 g, 펩톤 10 g, NaCl 5 g, 카나마이신 50 mg/L, 리팜피신 25 mg/L)에서 28 °C의 조건에서 16시간 동안 진탕 배양 한 후 1차 배양액 1ml을 50ml의 새 YEP 배지에 접종하여 28 °C의 조건에서 6시간 동안 진탕 배양 하였다.

[0072] 상기와 같이 배양된 아그로박테리아는 원심분리 (7,000 rpm, 4°C, 5분)하여 수집한 후, 인필트레이션(Infiltration) 버퍼 (10 mM MES (pH 5.7), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM 아세토시링곤(acetosyringone))에 600 nm의 파장에서 O.D. 1.0의 농도로 다시 현탁 시켰다. 아그로박테리아 현탁액은 주사 바늘을 제거한 주사기를 이용하여 니코티아나 벤타미아나(Nicotiana benthamiana) 잎의 뒷면에 주입하는 방법으로 아그로-인필트레이션 (Agro-infiltration)을 수행하였다.

[0074] **1-3. Ag85A 분리 정제**

[0075] 상기 실시예 1-2에서 준비한 니코티아나 벤타미아 10 g에 단백질 추출 완충용액 (50mM Tris (pH 7.2), 150mM NaCl, 0.1 % Triton X-100, 1X 단백질가수분해효소 억제제 (protease inhibitor)) 50 mL을 첨가하고 블랜더로 조직을 파쇄한 후 13,000 rpm에서 20분간 4 °C에서 원심 분리하여 단백질 추출액을 회수하였다. 단백질 추출액에 수화시킨 미세결정셀룰로오스 10g을 첨가한 후 1시간 동안 4°C에서 잘 혼합시켜 CBM3 융합 Ag85A 단백질이 미세결정셀룰로오스에 결합되도록 하였다. CBM3 융합 Ag85A 단백질이 결합된 미세결정셀룰로오스는 13,000 rpm에서 10분간 4 °C에서 원심 분리하여 회수한 후 50 mL의 세척 완충용액(50mM Tris (pH 7.2), 150mM NaCl)으로 2회 세척하고 10 mL의 엔테로키나제 반응 용액 (50mM Tris (pH 7.2), 150mM NaCl, 1mM CaCl<sub>2</sub>)에 다시 현탁 시켰다. 현탁액에 엔테로키나제를 20 단위만큼 첨가하고 28 °C에서 4시간 반응시킨 후 원심분리(14,000rpm, 4°C, 10분)를 통해 엔테로키나제와 Ag85A를 포함하는 반응액을 셀룰로오스로부터 분리하였다. 그리고 반응액에서 엔

테로키나제를 제거하기 위하여 반응액에 STI-Sepharose를 넣어 4℃에서 1시간 동안 반응시킨 후 원심분리 (14,000rpm, 4℃, 10분)를 통해 STI-Sepharose에 결합하지 않은 분리 정제된 Ag85A를 획득하였다.

#### [0077] 실시예 2. 식물발현 Ag85A 단백질의 당화 확인

[0078] Ag85A의 당화(Glycosylation) 여부를 확인하기 위하여 Endo-H(NEB, Cat. No. P0702S)와 PNGase F (NEB, Cat. No. P0704S)를 사용하였다. Endo-H 처리를 위하여 분리 정제된 Ag85A 단백질 1 ug을 1 uL의 10X(배수) 글리코 프로틴 디네이처링(Glycoprotein denaturing) 버퍼(5% SDS, 400mM DTT)와 혼합하고 증류수를 채워 최종 부피를 10uL가 되도록 제조하였다. 상기 반응액을 끓는 물에서 10분간 두어 디네이처링 시킨 뒤 얼음 위에 잠시 두어 가볍게 얼을 식힌 후, 10X 글리코버퍼(Glycobuffer) 3 (500 mM sodium acetate, pH 6) 2 uL와 Endo-H 효소 1 uL, 및 7uL의 증류수를 각각 반응액에 추가하여 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다. PNGase F의 처리는 상기 디 네이처링(denaturing) 과정의 Endo-H와 동일한 방법으로 진행하고, 10X 글리코버퍼(Glycobuffer) 2 (500 mM sodium phosphate, pH 7.5) 2uL와 10% NP-40 2 μL, PNGase F 효소 1 μL, 및 증류수 5 μL 넣어 최종 부피는 20uL로 만들어 동일하게 37℃에서 1시간 반응시켰다. 반응을 마친 단백질은 처리하지 않은 단백질과 동시에 웨 스텐 블랏을 수행하였으며, 이때 항체는 Ag85A 항체 (Abcam, Cat. No. ab193499) 를 사용하였다.

[0079] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 Endo-H 또는 PNGase F 효소를 사용한 경우 모두, 웨스텐 블랏 을 수행하였을 때 디-글리코실레이션 밴드가 나타난 바 글리칸(Glycan)들이 절단(cleave) 되었음을 확인하였다.

#### [0081] 실시예 3. G-Ag85A의 결핵 항원으로서의 잠재력 검증

[0082] 결핵균에 감염된 마우스 폐세포를 이용하여 해당 항원이 실제 결핵균 감염시 항원으로 작용하는지, 백신 후보 물질로서 가능성이 있는지를 알아보기 위해서 IFN-γ 분비(secretion) 정도를 조사하였다. 우선, Beijing strain HN878 결핵균 200 CFU(colony forming unit)를 에어로졸(aerosol) 루트로 마우스에 감염시키고 각각 4 주 또는 12주 후에 비감염 대조군과 함께 각각 마우스 6마리씩을 희생시켜 폐세포 (5X10<sup>5</sup> cells)를 분리하고 대 장균에서 생산한 논-글리코실레이트 Ag85A(non-glycosylated Ag85A, 이하 NG-Ag85A)와 식물에서 생산한 글리코 실레이트 Ag85A (glycosylated Ag85A, 이하 G-Ag85A)를 각각 5ug/ml 농도로 37℃에서 12시간 반응시킨 다음 반 응액의 상층액에 분비된 인터페론 감마를 ELISA 키트로 측정하였다.

[0083] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 식물 발현 Ag85A(G-Ag85A)는 결핵균 감염 후 4주 후 혹은 12주 후의 마우스 폐세포에 작용하여 IFN-γ를 지속적으로 분비하는 것을 확인하였으며, 대장균 발현 Ag85A(NG-Ag85A)에 비해 그 양이 유의한 수준으로 증가된 것을 확인하였다. 이는 Ag85A가 결핵균 감염에 대한 면역원성을 가지는 항원이며, NG-Ag85A와 더불어 G-Ag85A의 백신항원으로서 가능성을 타진하였다.

#### [0085] 실시예 4. G-Ag85A의 면역원성 조사

##### [0086] 4-1. 면역원성 실험 설계

[0087] 식물 발현 당화 결핵 항원 G-Ag85A의 면역성 조사를 위하여, BCG, NG-Ag85A, 및 G-Ag85A로 마우스를 2주 간격으 로 3회 면역하였다. 최종 면역접종 4주(결핵균 공격접종 2주전) 후와 공격접종 후 4주, 및 12주 후에 각각 마우 스를 희생하여(sacrificed) 면역반응 및 방어 효능을 조사하였다(도 4 참조).

##### [0089] 4-2. 면역 후 항원 특이적 다기능(multifunctional) T 세포 유도

[0090] 다기능 T 세포는 결핵균을 방어하는 데 중요한 숙주의 구성요소 중 하나로 알려져 있으며, IFN-γ, TNF-α 및 IL-2를 모두 분비하는 T 세포이다. 이와 관련하여 최종 면역접종 4주 후에 각 그룹별로 6마리의 마우스를 희생 하여 각 폐세포 (5X10<sup>5</sup> cells)를 분리하고 NG-Ag85A 또는 G-Ag85A 항원 단백질을 5ug/ml농도로 37℃에서 12시간 반응시켰다. 반응 후 IFN-γ, TNF-α, 및/또는 IL-2를 분비하는 CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> 및 CD8<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> T세포는 사이토메트리 (cytometry)로 분석하였고, 이때 CD4<sup>+</sup>와 CD8<sup>+</sup>에 대한 게이팅(gating) 결과를 확인하였다.

[0091] 그 결과, 도 5a 내지 5c에 나타난 바와 같이 G-Ag85A 면역된 경우  $CD4^{+}CD44^{+}$  T세포는 폴리-사이토카인(poly-cytokine) 분비 비율이 NG-Ag85A 그룹에 비해 유의미한 수준으로 증가했음을 확인하였다.

#### [0093] 4-3 식물 발현 항원 G-Ag85A의 결핵 방어 효능

[0094] 최종 면역접종 4주 후에 HN878 결핵균 200 CFU로 마우스를 감염시킨 다음 4주 후 및 12주 후에 마우스를 희생하여 폐조직 병변을 육안검사 하였고 폐와 비장(spleen) 세포에서 CFU(colony forming unit)을 조사하였다.

[0095] 그 결과, 도 6a에 나타난 바와 같이 육안 소견으로도 BCG 나 NG-Ag85A 군에 비해 G-Ag85A 군의 폐조직 손상 정도가 경미 하였으며, H&E(hematoxylin-eosin) 염색법에 의한 관찰에서도 G-Ag85A 군의 조직 손상 정도가 더 경미한 것을 확인하였는바 G-Ag85A의 방어효과가 더 좋은 것을 확인하였으며 특히 감염 후 12주 이후에는 방어 효과가 육안으로 확연히 확인될 정도의 효과 차이가 나타남을 확인하였다.

[0096] 또한, 폐와 비장 조직을 파쇄하여 배양하고 균을 이뉴머레이팅(enumerating)하면서 log10CFU 로 계산하여 통계 분석에 활용하였다.

[0097] 그 결과, 도 6b에 나타난 바와 같이 감염 4주 후 폐에서는 비접종군에 비해 BCG, NG-Ag85A, 및 G-Ag85A 모두에서 의미 있는 CFU 감소를 확인하였고, 비장에서 역시 상기 3종류 접종군 모두 비접종에 비해 CFU감소를 보이는 것을 확인하였다. 감염 12주 후 폐에서는 G-Ag85A 접종군이 가장 낮은 CFU를 보여 가장 높은 방어효과가 있음을 확인하였고 비장에서 역시 G-Ag85A 군이 NG-Ag85A 군에 비해 더 좋은 효과를 보임을 확인하였다.

[0098]

#### [0099] 4-4. 감염 4주 이후 항원 특이적 다기능 T세포 유도

[0100] 마우스에 결핵균을 감염시키고 폐 조직에 감염 억제를 위한 T세포 반응이 자리잡는 시점인 감염 4주 후에, 각 그룹별로 6마리의 마우스를 희생하여 각 폐 세포 ( $5 \times 10^5$  cells)를 분리하고 NG-Ag85A 또는 G-Ag85A 항원 단백질을 5ug/ml 농도로 37°C에서 12시간 반응시켰다. 반응 후  $IFN-\gamma$ ,  $TNF-\alpha$ , 및/또는 IL-2를 분비하는  $CD4^{+}CD62L^{-}$  및  $CD8^{+}CD62L^{-}$  T세포를 사이토메트리로 분석하였으며 이때  $CD4^{+}$ 와  $CD8^{+}$ 에 대한 게이팅(gating)한 결과를 확인하였다.

[0101] 그 결과, 도 7a 내지 7c에 나타난 바와 같이 G-Ag85A 면역된 경우  $CD4^{+}CD44^{+}$  T세포는 폴리-사이토카인 분비 비율이 NG-Ag85A 그룹에 비해 유의미한 수준으로 증가했음을 확인하였고, 특히 결핵방어 효과에 중요한  $IFN-\gamma$ ,  $TNF-\alpha$ , 및 IL-2를 동시에 분비하는  $CD4^{+}CD44^{+}$  다기능성 T세포가 유의미한 수준으로 증가하였음을 확인하였다.

[0102]

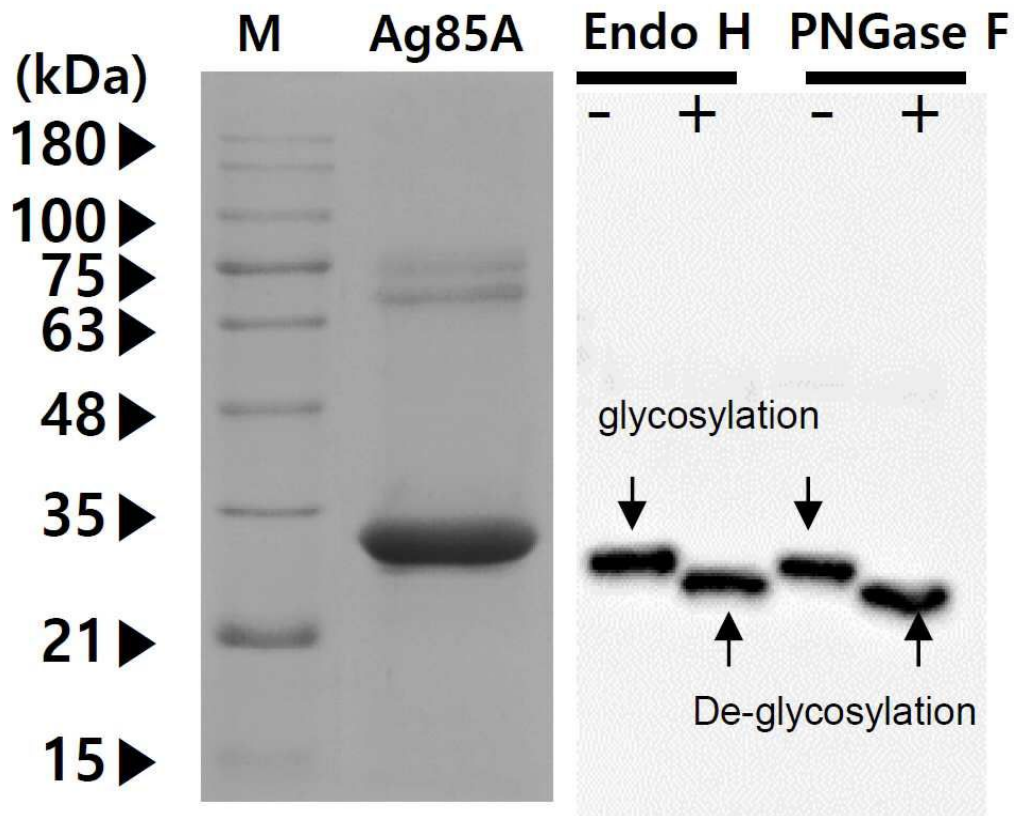
[0103] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

## 도면

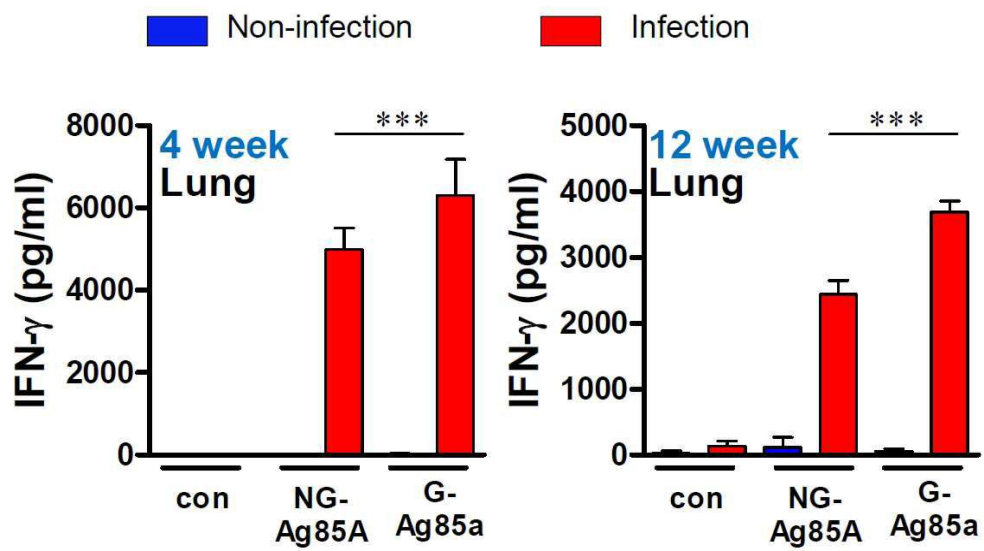
### 도면1



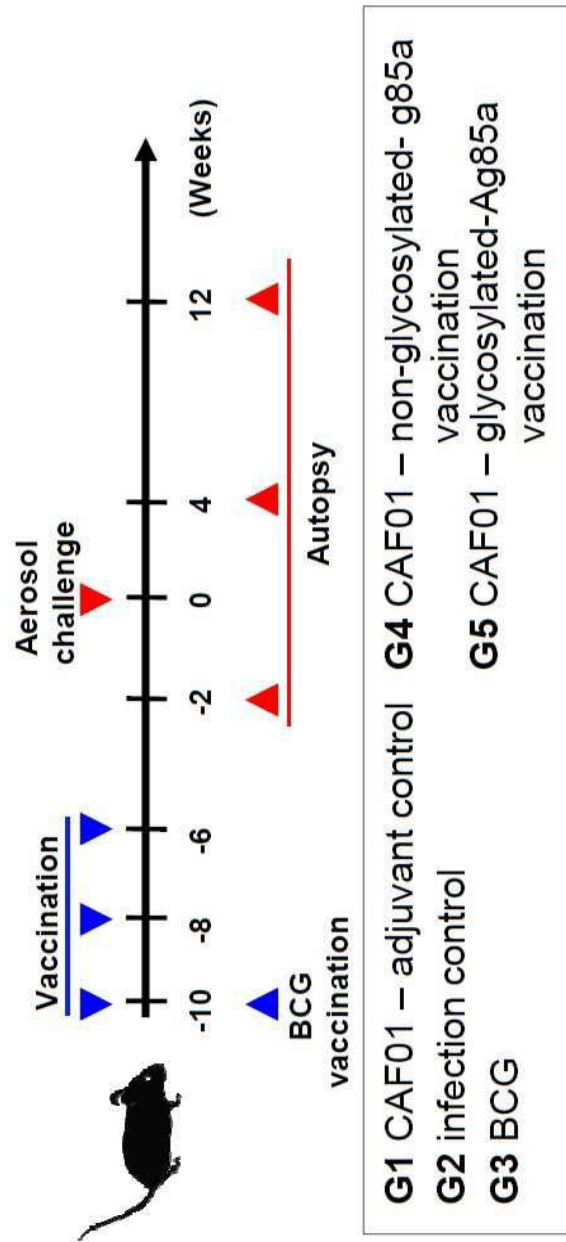
도면2



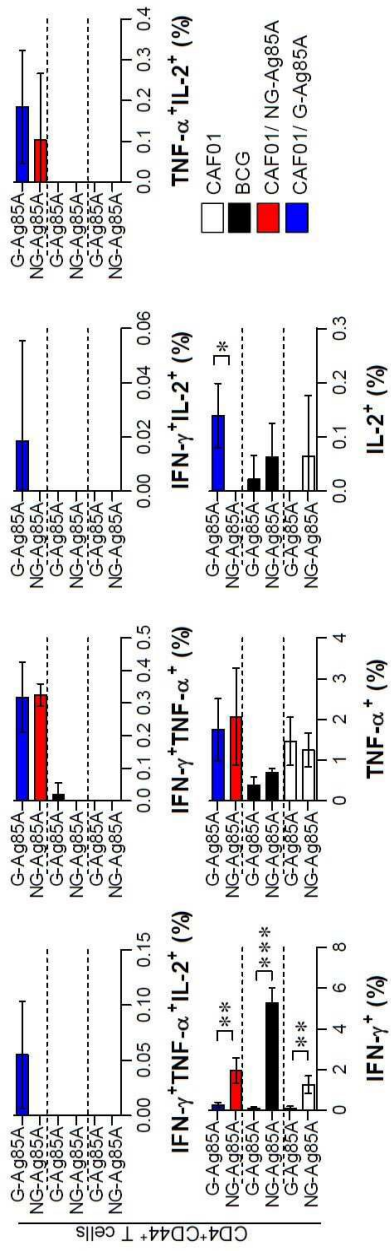
도면3



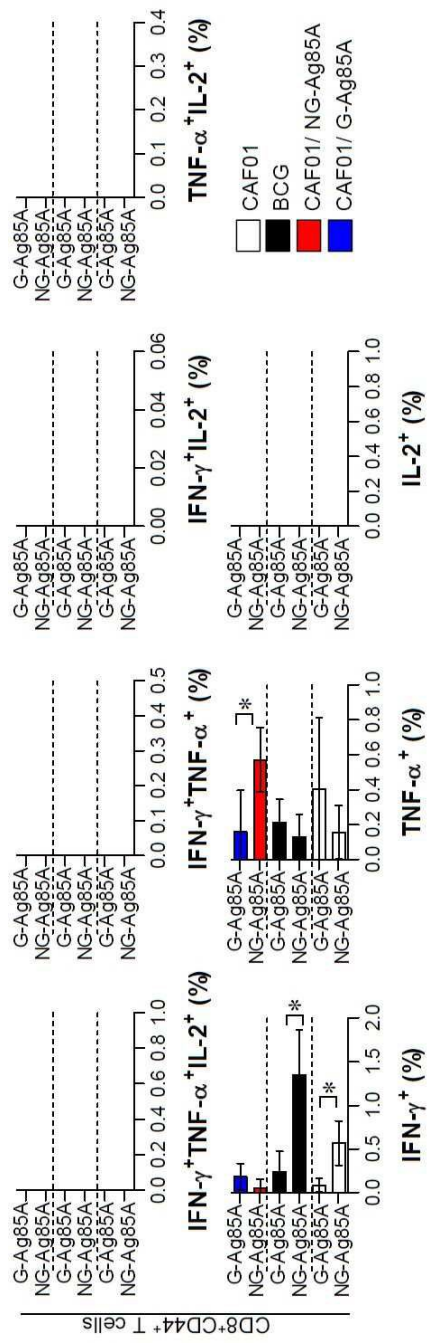
도면4



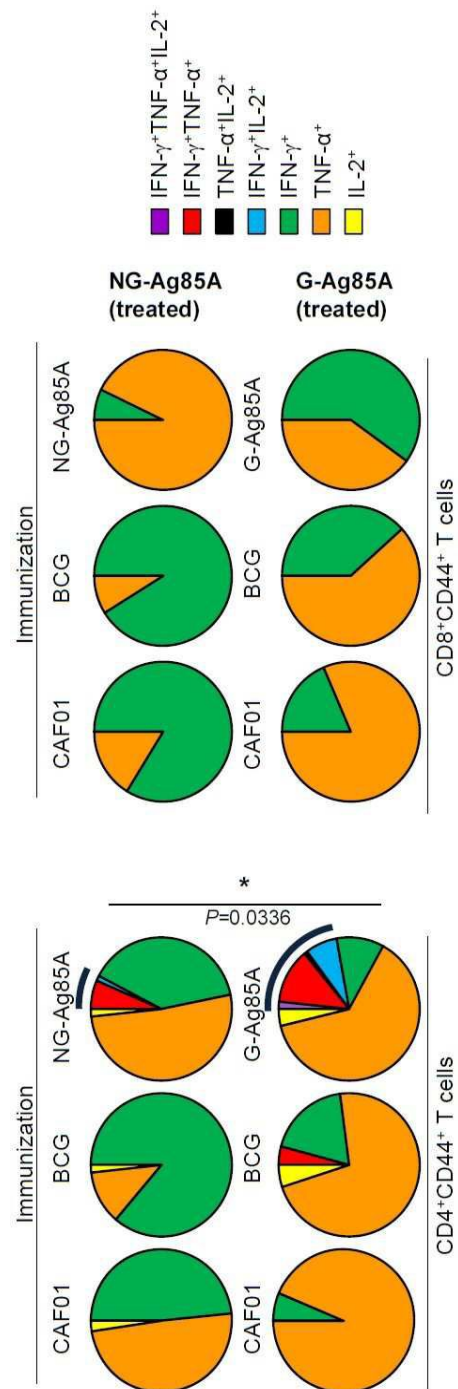
도면5a



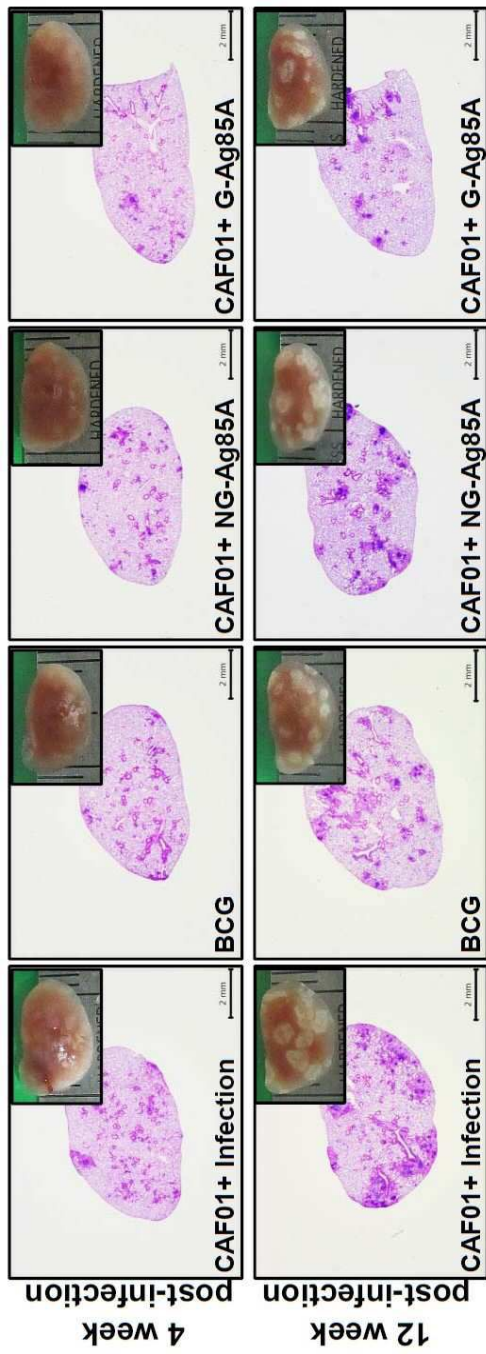
도면5b



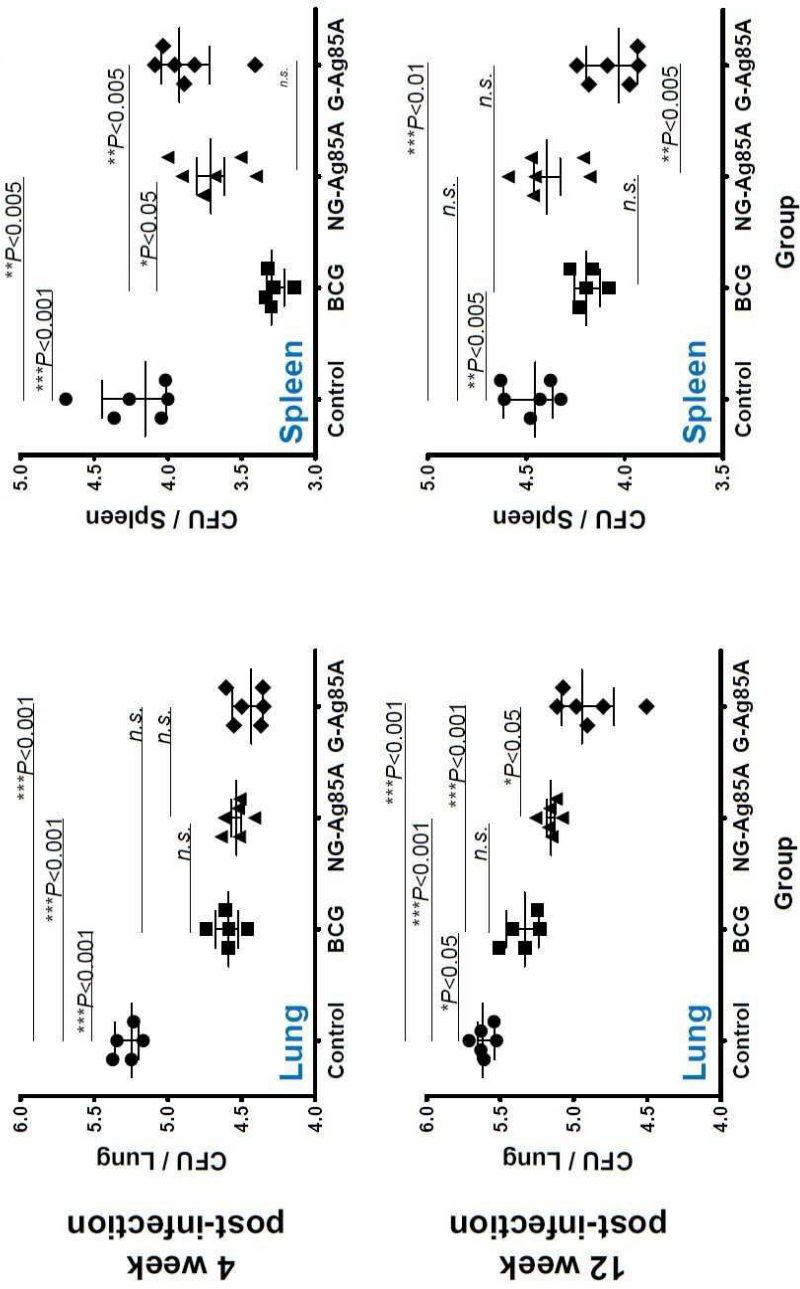
도면5c



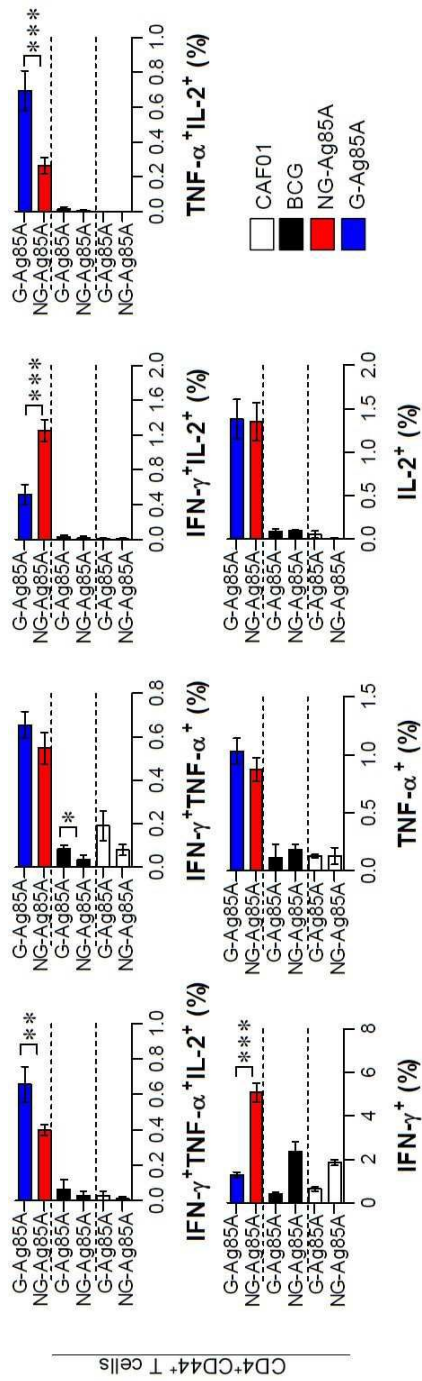
도면6a



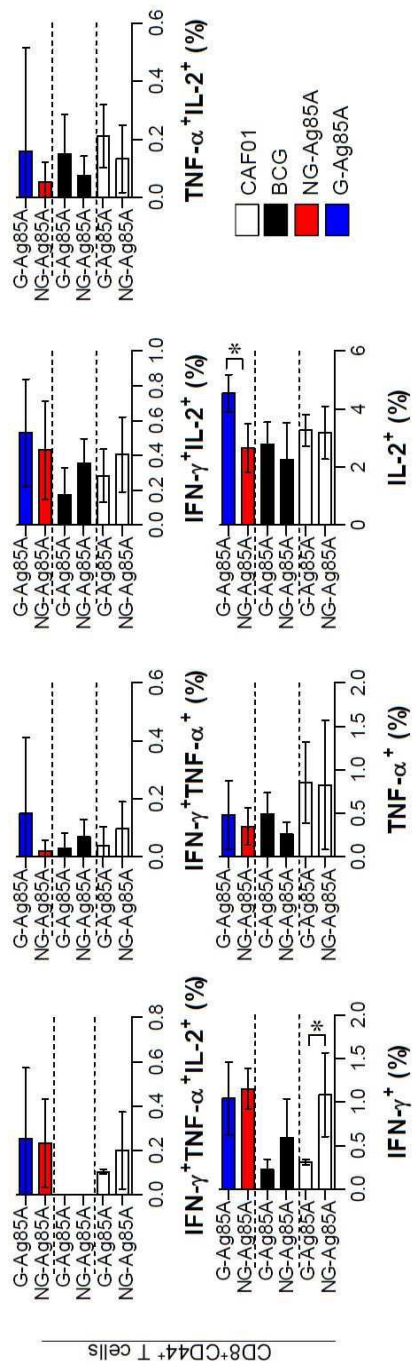
도면6b



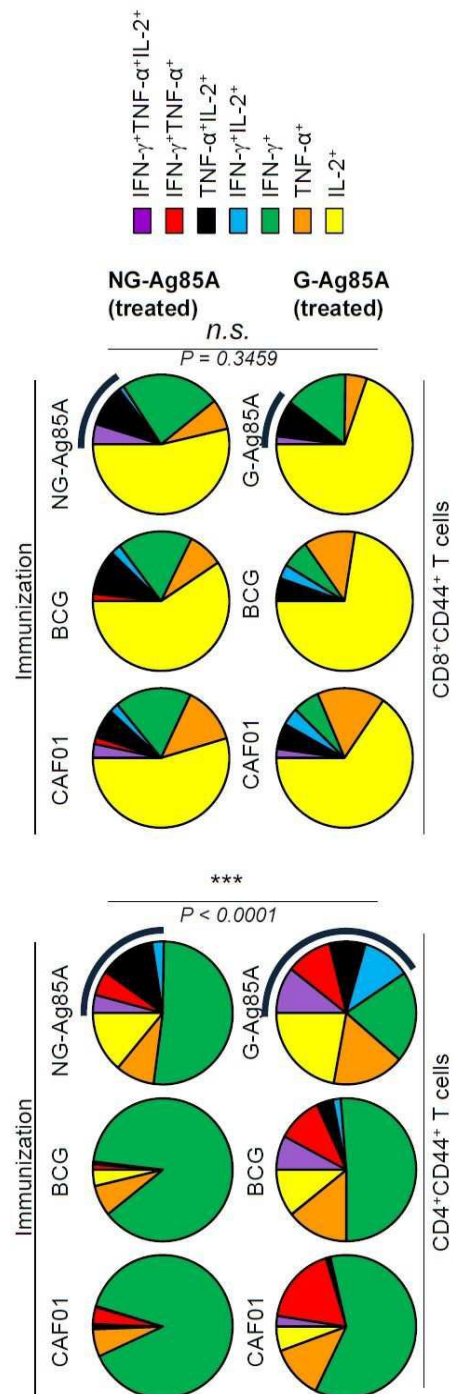
도면7a



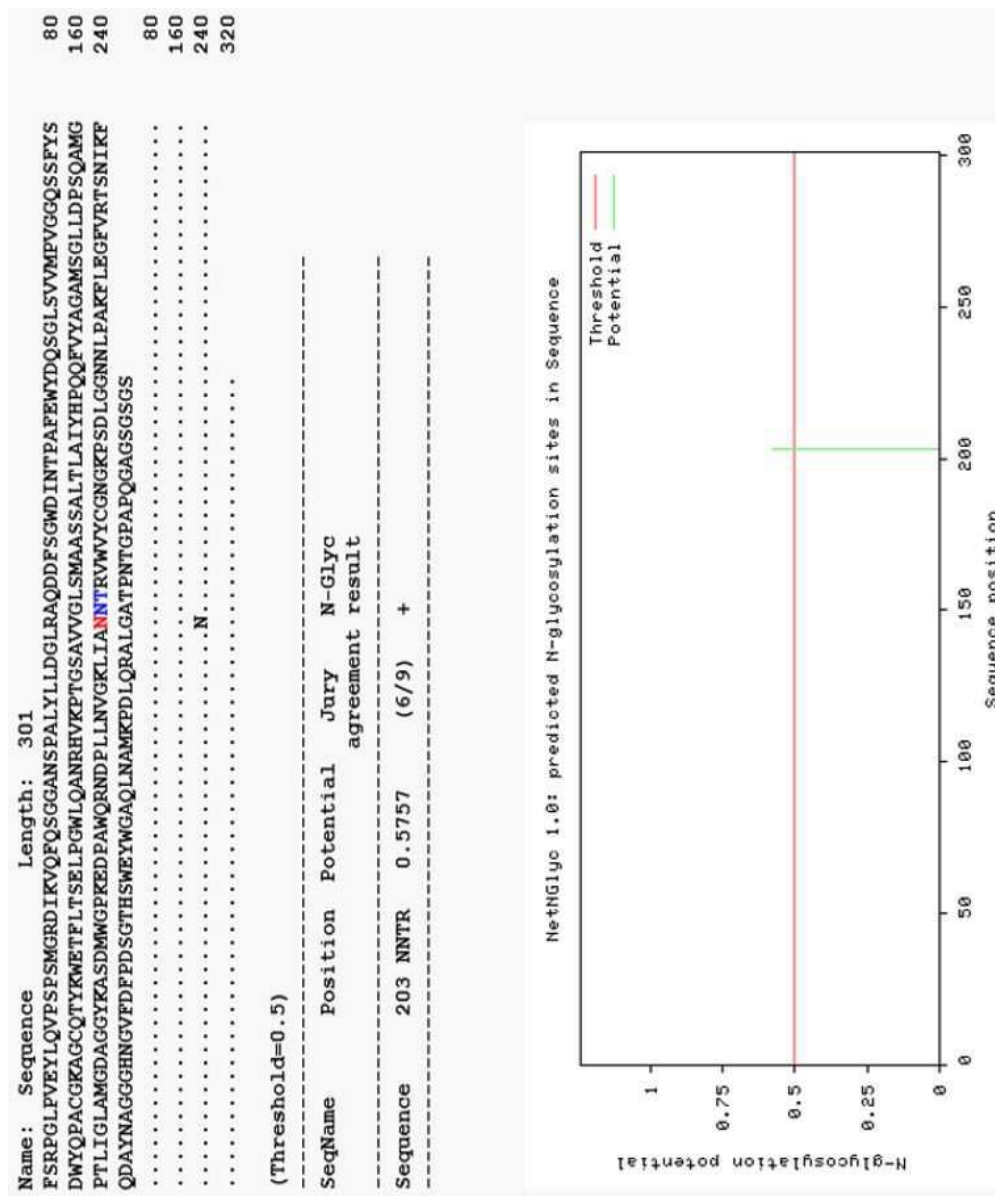
도면7b



도면7c



도면8



서열 목록

- <110> BioApplications Inc.  
 Industry-Academic Cooperation Foundation Yonsei University  
 Quratis Inc.
- <120> Vaccine composition for preventing tuberculosis containing a  
 glycosylated Ag85A protein and method for producing the vaccine  
 composition
- <130> MP18-281
- <160> 8
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1

<211> 301

<212> PRT

<213> Ag85A

<400> 1

Phe Ser Arg Pro Gly Leu Pro Val Glu Tyr Leu Gln Val Pro Ser Pro

1 5 10 15

Ser Met Gly Arg Asp Ile Lys Val Gln Phe Gln Ser Gly Gly Ala Asn

20 25 30

Ser Pro Ala Leu Tyr Leu Leu Asp Gly Leu Arg Ala Gln Asp Asp Phe

35 40 45

Ser Gly Trp Asp Ile Asn Thr Pro Ala Phe Glu Trp Tyr Asp Gln Ser

50 55 60

Gly Leu Ser Val Val Met Pro Val Gly Gly Gln Ser Ser Phe Tyr Ser

65 70 75 80

Asp Trp Tyr Gln Pro Ala Cys Gly Lys Ala Gly Cys Gln Thr Tyr Lys

85 90 95

Trp Glu Thr Phe Leu Thr Ser Glu Leu Pro Gly Trp Leu Gln Ala Asn

100 105 110

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

115 120 125

Ala Ser Ser Ala Leu Thr Leu Ala Ile Tyr His Pro Gln Gln Phe Val

130 135 140

Tyr Ala Gly Ala Met Ser Gly Leu Leu Asp Pro Ser Gln Ala Met Gly

145 150 155 160

Pro Thr Leu Ile Gly Leu Ala Met Gly Asp Ala Gly Gly Tyr Lys Ala

165 170 175

Ser Asp Met Trp Gly Pro Lys Glu Asp Pro Ala Trp Gln Arg Asn Asp

180 185 190

Pro Leu Leu Asn Val Gly Lys Leu Ile Ala Asn Asn Thr Arg Val Trp

195 200 205

Val Tyr Cys Gly Asn Gly Lys Pro Ser Asp Leu Gly Gly Asn Asn Leu

210 215 220

Pro Ala Lys Phe Leu Glu Gly Phe Val Arg Thr Ser Asn Ile Lys Phe

225 230 235 240

Gln Asp Ala Tyr Asn Ala Gly Gly Gly His Asn Gly Val Phe Asp Phe

245 250 255

Pro Asp Ser Gly Thr His Ser Trp Glu Tyr Trp Gly Ala Gln Leu Asn

260 265 270

Ala Met Lys Pro Asp Leu Gln Arg Ala Leu Gly Ala Thr Pro Asn Thr

275 280 285

Gly Pro Ala Pro Gln Gly Ala Gly Ser Gly Ser Gly Ser

290 295 300

<210> 2

<211> 477

<212> DNA

<213> CBM3

<400> 2

gtatcaggta accttaaggt ggagttttac aactcgaacc cttctgatac aactaactca 60  
ataaaccac agttcaaagt tacaacaca ggcagctctg cgatcgattt gtctaaatta 120  
accctcagat actattatac ggttgatgga cagaaggacc agactttctg gtgtgatcat 180  
gcagctatca ttggttctaa cggtagctac aacggaatta catcaaact gaagggcact 240  
ttcgtttaaga tgcctctag cactaacaac gcagacacat atttgagat cagttttacg 300  
gggggaacc ttgaaccagg tgctcacgtc cagattcaag gaagattcgc taaaaacgac 360

tggtcgaact atacccaaag taatgattac agttttaaat cgcctcaca atttgttgag 420  
tgggatcagg tctactgctta cctgaacggg gtcttagtgt ggggaaagga acctggt 477

<210> 3

<211> 272

<212> DNA

<213> BiP

<400> 3

atggctcgct cgittggagc taacagtacc gttgtgttgg cgatcatctt cttcggtgag 60  
tgattttccg atcttcttct ccgatttaga tctctctac attgttgctt aatctcagaa 120  
ccttttttcg ttgttcttgg atctgaatgt gtttgtttgc aatttcacga tcttaaaagg 180

ttagatctcg attggtattg acgattggaa tctttacgat ttcaggatgt ttatttgcgt	240
tgctcctctgc aatagaagag gctacgaagt ta	272
<210> 4	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> HDEL	
<400> 4	
cacgatgagc tc	12
<210> 5	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> nucleotide sequence recognized and cleaved by enterokinase	
<400> 5	
gatgacgacg ataaa	15
<210> 6	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> linker peptide	
<400> 6	
gaggcagccg ctaaggaagc tgcagcgaaa gcc	33
<210> 7	
<211> 903	
<212> DNA	
<213> Ag85A	
<400> 7	
tttagccggc ctggcctgcc tgtggaatac ctgcaggtgc ctagccctag catgggccgg	60
gacatcaaag tgcagtttca gacggcgagg gctaatagcc ctgctctgta cctgctcgat	120
ggcctgcggg ctcaggatga ttttagccggc tgggacatca acacccctgc ttttgaatgg	180
tacgatcaga gcggcctgag cgctcgtgat cctgtgggcg ggacagagcag cttctacagc	240
gattggtatc agcctgcttg cggcaaagct ggctgccaga cctacaagtg ggaaaccttt	300
ctgaccagcg aactgcctgg ctggctgcag gctaatcggc acgtgaaacc taccggcagc	360
gccgtggtgg gcctgagcat ggctgctagc tccgctctga ccctggctat ctaccacct	420

cagcagtttg tgiacgctgg cgctatgagc ggccctgctcg atccctccca ggctatgggc 480  
 cctaccctga tgggctcgc tatgggggat gctggggggt acaaagctag cgatatgtgg 540  
 ggccctaaag aagatcctgc ttggcagcgg aatgatcctc tgctcaacgt gggcaaactg 600  
 atcgctaata ataccgagtg gtgggtgtac tgcggcaatg gcaaacctag cgatctgggc 660  
 gggaacaatc tgctgctaa atttctggaa ggcttcgtgc ggaccagcaa catcaagttt 720

caggatgctt acaatgctgg cgggggccac aatggcgtat ttgatattcc tgatagcggc 780  
 acccacagct ggggaatactg gggcgctcag ctgaatgcta tgaaacctga tctgcagcgg 840  
 gctctgggcg ctaccctaa taccggcct gctcctcagg gcgctggctc cggatctggt 900  
 agt 903

<210> 8  
 <211> 159  
 <212> PRT  
 <213> CBM3  
 <400> 8

Val Ser Gly Asn Leu Lys Val Glu Phe Tyr Asn Ser Asn Pro Ser Asp  
 1 5 10 15

Thr Thr Asn Ser Ile Asn Pro Gln Phe Lys Val Thr Asn Thr Gly Ser  
 20 25 30

Ser Ala Ile Asp Leu Ser Lys Leu Thr Leu Arg Tyr Tyr Tyr Thr Val  
 35 40 45

Asp Gly Gln Lys Asp Gln Thr Phe Trp Cys Asp His Ala Ala Ile Ile  
 50 55 60

Gly Ser Asn Gly Ser Tyr Asn Gly Ile Thr Ser Asn Val Lys Gly Thr  
 65 70 75 80

Phe Val Lys Met Ser Ser Ser Thr Asn Asn Ala Asp Thr Tyr Leu Glu  
 85 90 95

Ile Ser Phe Thr Gly Gly Thr Leu Glu Pro Gly Ala His Val Gln Ile  
 100 105 110

Gln Gly Arg Phe Ala Lys Asn Asp Trp Ser Asn Tyr Thr Gln Ser Asn  
 115 120 125

Asp Tyr Ser Phe Lys Ser Ala Ser Gln Phe Val Glu Trp Asp Gln Val  
 130 135 140

Thr Ala Tyr Leu Asn Gly Val Leu Val Trp Gly Lys Glu Pro Gly  
145 150 155