



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년09월10일

(11) 등록번호 10-2154572

(24) 등록일자 2020년09월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

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

A61K 39/39 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 39/04 (2013.01)

A61K 39/39 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0172283

(22) 출원일자 2017년12월14일

심사청구일자 2018년12월28일

(65) 공개번호 10-2019-0071322

(43) 공개일자 2019년06월24일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020160133413 A\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

성균관대학교산학협력단

경기도 수원시 장안구 서부로 2066 (천천동, 성균관대학교내)

(72) 발명자

신성재

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

하상준

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이재영

전체 청구항 수 : 총 6 항

심사관 : 정혜진

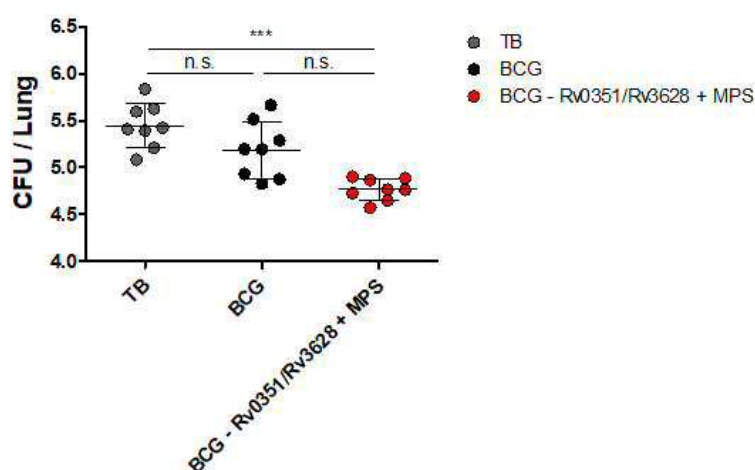
(54) 발명의 명칭 Rv3628/Rv0351을 포함하는 새로운 BCG prime booster 백신 조성물

## (57) 요약

본 발명은 Rv0351 및 Rv3628 중 적어도 1종 이상을 포함하는 항원; 및 톨 유사 수용체 4 리간드(Toll like receptor 4 ligand, TLR4 ligand), 톨 유사 수용체 3 리간드(Toll like receptor 3 ligand, TLR3 ligand) 및 스쿠알렌(squalene)을 포함하는 아주번트(adjuvant)를 유효 성분으로 포함하는 결핵 백신용 약학적 조성물에 관한 것이다.

본 발명에서 제공하는 조성물을 특히 BCG 투여 후 부스터로 사용하는 경우, 상기 BCG의 단점인 단기적 방어 효과를 극복하고, 결핵균 방어 효과에 필수적인 다기능성(multifunctional) CD4+ T 세포의 발현 수준을 현저히 높임에 따라 영유아 및 성인에서의 고병원성 결핵균의 감염을 억제하고, 만성화된 잠복 결핵균의 재활성을 억제할 수 있다.

대표도 - 도9



(52) CPC특허분류

**A61P 31/06** (2018.01)

**A61K 2039/55572** (2013.01)

(72) 발명자

**임용택**

경기도 성남시 분당구 내정로166번길 7-6, 139동  
901호(수내동, 파크타운대림아파트)

**권기웅**

서울특별시 서대문구 연세로 50-1 (신촌동)

**이아라**

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	HI14C2680
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	보건산업진흥원
연구사업명	감염병위기대응기술개발/면역백신개발 (백신 신기술개발)
연구과제명	성인용 BCG Prime Booster 백신 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2016.11.01 ~ 2017.10.31

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

Rv0351 및 Rv3628 중 적어도 1종 이상을 포함하는 항원; 및

모노포스포릴 리피드 A(Monophosphoryl Lipid A, MPLA), 폴리이노신: 폴리시티딜산(polyinosinic: polycytidylic acid, Poly (I:C)) 및 스쿠알렌(squalene)을 포함하는 아쥬번트(adjuvant)를 유효 성분으로 포함하고,

상기 아쥬번트는 나노 에멀전(nano-emulsion) 형태인, 결핵 백신용 약학적 조성물.

#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

삭제

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 아쥬번트는 양이온성 지질(cationic lipid) 및 계면활성제(surfactant) 중 1종 이상을 더 포함하는, 결핵 백신용 약학적 조성물.

#### 청구항 5

삭제

#### 청구항 6

제1항에 있어서,

상기 결핵은 안결핵, 피부 결핵, 부신 결핵, 신장결핵, 부고환 결핵, 림프선 결핵, 후두 결핵, 중이 결핵, 장결핵, 다제내성 결핵, 폐결핵, 담결핵, 골결핵, 인후결핵, 임파선 결핵, 폐허증, 유방 결핵 또는 척추 결핵을 포함하는, 결핵 백신용 약학적 조성물.

#### 청구항 7

Rv0351 및 Rv3628 중 적어도 1종 이상을 포함하는 항원; 및

모노포스포릴 리피드 A(Monophosphoryl Lipid A, MPLA), 폴리이노신: 폴리시티딜산(polyinosinic: polycytidylic acid, Poly (I:C)) 및 스쿠알렌(squalene)을 포함하는 아쥬번트(adjuvant)를 유효 성분으로 포함하고,

상기 아쥬번트는 나노 에멀전(nano-emulsion) 형태인, 프라이م 부스터 백신용 약학적 조성물.

#### 청구항 8

삭제

#### 청구항 9

삭제

#### 청구항 10

제7항에 있어서,

상기 아쥘번트는 양이온성 지질(cationic lipid) 및 계면활성제(surfactant) 중 1종 이상을 더 포함하는, 프라임 부스터 백신용 약학적 조성물.

## 청구항 11

삭제

## 청구항 12

제7항에 있어서,

상기 조성물은 바실러스 칼메트-구에린(BCG: Bacillus Calmette-Guerin) 프라임의 부스터 백신용인, 프라임 부스터 백신용 약학적 조성물.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 Rv3628 및 Rv0351의 항원과, 신규 아쥘번트(adjuvant)를 포함하는 결핵 백신용 조성물, 바람직하게는 새로운 바실러스 칼메트-구에린(BCG: Bacillus Calmette-Guerin) 프라임 부스터 백신용 조성물에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 결핵은 마이코박테리움 튜버쿨로시스(Mycobacterium tuberculosis)에 유발되며, WHO에서 정한 3대 감염질환 중 하나로, 높은 발병률과 사망률을 나타내고 있다. 전 세계적으로 약 6천만명의 활동성 결핵 환자가 있으며 매년 5천만 내지는 1억여명이 결핵에 감염되는 것으로 추정되고, 적어도 매년 900만명의 결핵 신환자가 발생하며, 150만 명 이상이 결핵으로 사망한다고 알려졌다. 결핵 발병률(incidence rate)은 인구 10만명 당 146명, 결핵 사망률은 인구 10만명 당 49명으로 단일 감염병 중에서 가장 많은 사망 원인을 차지하고 있어, 세계적으로 심각한 보건 문제로 남아 있다. 최근에는 약제 내성을 나타내는 난치 결핵 환자의 증가와 HIV 감염 증가로 인해 발병 양상은 더욱 심각해지고 추세이다. 현재 HIV 감염자의 약 50%인 1,500만 여명이 결핵균에 동시에 감염되어 있으며, 결핵균이 HIV 증식을 촉진하여 다른 기회 감염균보다 기대수명(life expectancy)을 2분의 1로 단축시켜, HIV 감염자에게는 더욱 위협이 되고 있다. 또한 HIV 양성 결핵 환자의 경우 결핵에 의한 사망률이 3배 이상 높고 치료 효과는 2배 정도 낮다고 보고되었다. 우리나라의 결핵균 감염률은 약 40%로 대략 2천만명이 결핵균에 감염되었을 것으로 추정되고 있다. 이 가운데 약 10%인 200만 명은 일생에 한번은 결핵 환자가 될 것으로 예상된다. 우리나라에서 전염병으로 사망하는 사람의 60% 가량이 결핵으로 그 심각성을 유추할 수 있으며, 이는 21세기 국가보건 및 복지에 심각한 문제로 대두되고 있다. 특히 우리나라는 고병원성인 베이징파(Beijing family)의 결핵균이 많다. 베이징 균주는 다른 결핵균과 달리 병원성과 전염력이 높으며 다제내성 결핵의 발생이나 재활성화 결핵의 발생 빈도가 매우 높다. 한국 내 결핵균의 유전자 지문을 통해 베이징파의 하나가 우점적으로 존재한 것으로 나타났으며, 이 유전자형은 총 결핵균의 18.4%를 차지하는 것으로 나타났다 (Choi et al., 2010; Kim et al., 2001; Park et al., 2000). 김 등(2001)은 베이징파에 속하며 한국에서 발생한 전염성이 강한 결핵균을 확인하였으며, 이 균을 K 균주(K strain)라 명명하였다. 한국형 고병원성 결핵균인 K 균주는 마우스 감염 시 초기 선천면역을 극복할 수 있는 특이적 병인기전을 나타내며, 이는 결핵균 표준 균주인 H37Rv 균주 감염량의 10배에 해당하는 성장속도를 나타내었다. 한국형 고병원성 결핵균인 K 균주 감염에 의한 마우스의 폐사는 결핵균 표준 균주인 H37Rv 균주 감염에 의한 마우스의 폐사보다 2배 이상 빠르며, 감염 후 폐사 시기의 균수는 거의 동일한 것으로 보아 감염 후기에는 숙주의 면역 반응에 의한 면역병리가 병인기전으로서 매우 중요할 것으로 생각되기에 선천면역보다는 예방백신 등을 통한 후천면역을 특이적으로 올려주는 것이 한국형 고병원성 결핵균인 K 균주를 방어하는 핵심 요소일 것으로 판단되었다.

[0003] 현재, 결핵은 주로 마이코박테리움 보비스(Mycobacterium bovis)의 비독성 균주인 바실러스 칼메트-구에린(BCG: Bacillus Calmette-Guerin)의 생균을 이용하여 예방하고 있다. 그러나, BCG에 대해서도 유아 결핵과 결핵성 수막염의 예방 효과는 인정되고 있지만, 성인의 폐결핵 예방에 관해서는 부정적인 견해가 존재한다. 따라서, 최근에는 이러한 결핵균 감염증에 대하는 것보다 효과적인 백신이 요구되고 있다.

### 발명의 내용

## 해결하려는 과제

- [0004] 본 발명의 일 목적은 영유아 및 성인에 대한 결핵균의 감염을 억제하고 만성 잠복 결핵균의 재활성을 억제할 수 있는, 결핵 백신용 약학적 조성물을 제공하고자 한다.
- [0005] 본 발명의 다른 목적은 기존의 대표적 결핵 백신인 바실러스 칼메트-구에린(BCG: Bacillus Calmette-Guerin)의 부스터(booster)로서, 상기 BCG의 단점인 단기적 방어 효과를 극복하고, 영유아 및 성인에 대한 결핵균의 감염을 억제하고 만성 잠복 결핵균의 재활성을 억제할 수 있는, 프라임 부스터 백신용 약학적 조성물을 제공하고자 한다.
- [0006] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

## 과제의 해결 수단

- [0007] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, Rv0351 및 Rv3628 중 적어도 1종 이상을 포함하는 항원; 및 톨 유사 수용체 4 리간드(Toll like receptor 4 ligand, TLR4 ligand), 톨 유사 수용체 3 리간드(Toll like receptor 3 ligand, TLR3 ligand) 및 스쿠알렌(squalene)을 포함하는 아쥘벤트(adjuvant)를 유효 성분으로 포함하는 결핵 백신용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0008] 본 발명에서 상기 Rv0351(GRPE protein, HSP-70 cofactor, NP\_214865.1)은 235개의 아미노산 서열로 이루어진 24-kDa 세포질 항원으로, ER 스트레스(Endoplasmic Reticulum Stress)에 의한 열 충격 단백질(heat shock protein)의 발현을 조절하는 보조인자(cofactor)의 역할을 하는 것으로 알려져 있다.
- [0009] 본 발명에서 상기 Rv0351 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시될 수 있으며, 상기 단백질의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 상기 단백질의 변이체란 Rv0351 단백질의 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 단백질을 의미한다. 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 단편에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다 (H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979).
- [0010] 본 발명에서 상기 Rv0351 단백질은 서열번호 2의 염기서열로 암호화될 수 있으며, 상기 뉴클레오티드와 기능적으로 동일한 작용을 할 수 있는 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다.
- [0011] 본 발명에서 Rv0351 단백질은 결핵균으로부터 유래한 것으로서, DNA 서열을 기초로 하여 재조합 방법에 의해 제조될 수 있다. 유전자 재조합 기술을 이용할 경우 단백질을 코딩하는 핵산을 적절한 발현 벡터에 삽입하고, 재조합 발현 벡터로 형질 전환된 형질전환체에서 목적으로 하는 단백질이 발현되도록 숙주 세포를 배양한 후 형질 전환체로부터 목적으로 하는 단백질을 회수함으로써 획득될 수 있다.
- [0012] 본 발명에서 상기 Rv3628(inorganic pyrophosphatase, NP\_218145.1)은 독특한 용해성 무기 클래스 I 피로포스파타아제(pyrophosphatase)에 해당하는 것으로, 상세하게는 피로포스페이트를 오르쏘인산염(orthophosphate)으로 전환시키는 금속-의존성 효소에 해당하며, 세포 생존을 유지하는 데에 필수 요소에 해당하는 것으로 알려져 있다.
- [0013] 본 발명에서 상기 Rv3628 단백질은 서열번호 3의 아미노산 서열로 표시될 수 있으며, 상기 단백질의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 상기 단백질의 변이체란 Rv3628 단백질의 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 단백질을 의미한다. 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 단편에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다 (H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979).
- [0014] 본 발명에서 상기 Rv3628 단백질은 서열번호 4의 염기서열로 암호화될 수 있으며, 상기 뉴클레오티드와 기능적으로 동일한 작용을 할 수 있는 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다.
- [0015] 본 발명에서 Rv3628 단백질은 결핵균으로부터 유래한 것으로서, DNA 서열을 기초로 하여 재조합 방법에 의해 제조될 수 있다. 유전자 재조합 기술을 이용할 경우 단백질을 코딩하는 핵산을 적절한 발현 벡터에 삽입하고, 재조합 발현 벡터로 형질 전환된 형질전환체에서 목적으로 하는 단백질이 발현되도록 숙주 세포를 배양한 후 형질 전환체로부터 목적으로 하는 단백질을 회수함으로써 획득될 수 있다.
- [0016] 본 발명에서 상기 아쥘벤트에 포함되는 TLR4 리간드로는 모노포스포릴 리피드 A(Monophosphoryl Lipid A, MPL A)인 것이, 결핵 감염의 예방 효과 및 잠복 결핵의 재활성화 방지에 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0017] 본 발명에서 상기 아췌번트에 포함되는 TLR3 리간드로는 폴리이노신: 폴리시티딜산(polyinosinic: polycytidylic acid, Poly (I:C))인 것이, 결핵 감염의 예방 효과 및 잠복 결핵의 재활성화 방지에 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0018] 본 발명에서 상기 아췌번트에 포함되는 스쿠알렌(squalene)은 상어간유, 올리브, 아마란스 씨, 쌀겨, 맥아 등에 많이 함유되어 있는 불포화 탄화수소( $C_{30}H_{50}$ )로서 인체의 여러 조직에도 존재한다. 식물과 인간을 포함한 거의 모든 동물들은 스쿠알렌을 생산한다. 스쿠알렌은 체내에서 스테로이드 호르몬과 비타민D, 담즙산, 콜레스테롤의 생합성에도 이용된다.
- [0019] 본 발명에서 상기 TLR4 리간드, 바람직하게는 모노포스포릴 리피드 A; 상기 TLR3 리간드, 바람직하게는 폴리이노신: 폴리시티딜산; 및 상기 스쿠알렌은 나노 에멀전(nano-emulsion) 형태를 이룰 수 있다.
- [0020] 본 발명에서는 상기 나노 에멀전 형태의 아췌번트를 제조하기 위하여, 바람직하게는 양이온성 지질(cationic lipid) 및 계면활성제(surfactant) 중 1종 이상을 포함할 수 있다. 이때 상기 양이온성 지질은 DOTMA, N-[1-(2,3-디올레옥시)프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드(N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride), DOTAP, 1,2-디올레오일옥시-3-(트리메틸암모니오)프로판(1,2-dioleoyloxy-3-(trimethylammonio)propane), DOTB, 1,2-디올레오일-3-(4'-트리메틸-암모니오)뷰타노일-sn-글리세롤 (1,2-dioleoyl-3-(4'-trimethyl-ammonio)butanoyl-sn-glycerol), 1,2-디아실-3-트리메틸암모늄-프로판(1,2-diacyl-3-trimethylammonium-propane), DAP, 1,2-디아실-3-디메틸암모늄-프로판(1,2-diacyl-3-dimethylammonium-propane), TAP, 1,2-디아실-3-트리메틸암모늄-프로판(1,2-diacyl-3-trimethylammonium-propane), 1,2-디아실-sn-글리세롤-3-에틸 포스포콜린(1,2-diacyl-sn-glycerol-3-ethyl phosphocholine),  $3\beta$ -[N',N'-디메틸미노에탄]-카바몰콜레스테롤-HCl( $3\beta$ -[N',N'-dimethylaminoethane)-carbamolcholesterol-HCl], DC-콜레스테롤(DC-Cholesterol, DC-Chol), DDAB, 또는 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드(dimethyldioctadecylammonium bromide) 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 본 발명에서 상기 계면활성제로는 PVA, 비이온성 계면활성제, 양이온성 계면활성제, 음이온성 계면활성제 및 양쪽성 계면활성제로 구성된 군에서 선택된 1종 이상을 사용할 수 있는데, 비이온성 계면활성제를 사용하는 것이 자극성 및 독성이 낮아 보다 바람직하며, 예를 들면, 케스터 오일류, 치환된 케스터 오일류, 트윈류, 스팬류, 라보라솔, 라보라필 또는 브리지(Brij)을 사용할 수 있으나, 그 외에도 상업적으로 이용되고 있는 Pluronic F-68, Hamposyl<sup>TM</sup> L30, sodium dodecyl sulfate, Aerosol 413, Aerosol 200, Lipoproteol<sup>TM</sup> LCO, Standapol<sup>TM</sup> LCO, Standapol<sup>TM</sup> SH 135, Fizul<sup>TM</sup> 10-127, Cyclopol<sup>TM</sup> SBFA 30, Deriphat<sup>TM</sup> 170, Lonzaine<sup>TM</sup> JS, Niranol<sup>TM</sup> C2N-SF, Amphoterger<sup>TM</sup> W2, Amphoterger<sup>TM</sup> 2WAS, Pluronic<sup>TM</sup> F-68, Pluronic<sup>TM</sup> F-127, Brij<sup>TM</sup> 35, Triton<sup>TM</sup> X-100, Brij<sup>TM</sup> 52, Span<sup>TM</sup> 20, Generol<sup>TM</sup> 122 ES, Triton<sup>TM</sup> N-42, Triton<sup>TM</sup> N-101, Triton<sup>TM</sup> X-405, Tween<sup>TM</sup> 80, Tween<sup>TM</sup> 85, Brij<sup>TM</sup> 56 등도 사용할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0021] 본 발명의 일 실시예에 따른 상기 아췌번트의 나노 에멀전 형태는 도 1에 도시된 바와 같다. 양이온성 지질, 계면활성제 및 TLR4 리간드(바람직하게는 모노포스포릴 리피드 A)가 교차 배치되어 마이셀(micelle) 형상을 이루고, TLR3 리간드(바람직하게는 폴리이노신: 폴리시티딜산)는 상기 마이셀의 외층에 배치되는 친수성기 또는 이온기와 결합하며 존재할 수 있다.
- [0022] 본 발명에서 상기 나노 에멀전의 구조를 제조하는 방법은 TLR4 리간드, 바람직하게는 모노포스포릴 리피드 A; 상기 TLR3 리간드, 바람직하게는 폴리이노신: 폴리시티딜산; 상기 스쿠알렌, 상기 양이온성 지질 및 상기 계면활성제를 10 내지 80 °C의 온도에서 활발히 교반하면서 혼합한 뒤 얻어진 혼합물을 바람직하게는  $6 \times 10^7$  Pa 내지  $18 \times 10^7$  Pa (고압 균질기)의 압력에서 균질화함으로써 제조할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 당해 업계에서 나노 에멀전 제조를 위한 공지된 방법, 혹은 이의 개선된 방법을 제한없이 사용할 수 있다.
- [0023] 종래에 면역보조제인 알루미늄(aluminum salt, Alum)이나 MF59(squalene emulsion) 등은 체액성 면역반응의 향상을 유도하는데 효과적이지만, 강력한 세포성 면역 반응이 요구되는 항암이나 항바이러스 예방/치료와 관련된 활용 분야에는 효과적이지 못하다는 치명적인 단점이 있다. 하지만 본 발명에서는 MyD88-의존성, 그리고 MyD88-비의존성인 양 방향의 신호전달을 통하여 면역반응을 유도하는 TLR4 리간드로 모노포스포릴 리피드 A와, MyD88-비의존성 신호전달 체계를 통하여, 염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokines)이나 I형 인터페론(interferon) 등을 유도하는 TLR3 리간드인 폴리이노신: 폴리시티딜산을 스쿠알렌과 함께 사용함으로써 다양한



면역신호전달체계를 통하여 면역기능을 보다 효과적으로 조율할 수 있다.

- [0024] 한편, 상기 폴리이노신: 폴리스티딜산은 음이온성 특성을 갖고 있어, 단독으로는 세포 내부의 엔도솜에 있는 TLR3와 반응하는 효율이 매우 낮다. 이 때문에 다양한 양이온성 물질과 결합된 형태로 사용되고 있다. 대표적인 예로, Poly-ICLC 는 Poly(I:C)와 Lysine과의 콤플렉스로 구성되어 사용되고 있다. 그럼에도 불구하고, Poly(I:C)기반 면역증강제는 MyD88-비의존성 신호전달 경로를 통하여 면역활성화를 유도하기 때문에, 다양한 면역신호전달체계를 통하여 면역기능을 조율하는 데는 여전히 한계점이 있다.
- [0025] 이에, 본 발명에서는 아쥘번트로 모노포스포릴 리피드 A, 폴리이노신: 폴리스티딜산, 및 스쿠알렌을 나노 에멀전 형상으로 제조하여 사용함으로써 상기한 면역 활성화 물질들의 세포 내 전달 효율을 높여 면역활성화 반응을 유도하고, 보다 상세하게는 다기능성(multifunctional) CD4+ T 세포의 발현 수준을 현저히 높여 결핵 감염을 효과적으로 예방하고, 잠복 결핵의 재활성화를 방지할 수 있다.
- [0026] 또한, 본 발명의 결핵 백신용 약학적 조성물은 바실러스 칼메트-구에린(BCG: Bacillus Calmette-Guerin)을 프라임(prime)으로 투여한 후 이의 부스터 백신으로도 사용될 수 있다.
- [0027] 본 발명에서 상기 "프라임 부스터 백신(prime booster vaccine)"이란 첫회 면역에 이용한 백신과는 다른 백신으로 1회 이상의 추가 면역을 하는 백신의 조합, 또는 이러한 백신 투여 방법을 의미한다.
- [0028] 본 발명에서 상기 결핵은 안결핵, 피부 결핵, 부신 결핵, 신장결핵, 부고환 결핵, 림프선 결핵, 후두 결핵, 중이 결핵, 장결핵, 다제내성 결핵, 폐결핵, 담결핵, 골결핵, 인후결핵, 임파선 결핵, 폐허중, 유방 결핵 또는 척추 결핵을 포함하며, 이에 제한되지 않는다.
- [0029] 본 발명의 결핵은 한국형 고병원성 결핵균인 K 균주 또는 베이징(Beijing) 결핵 균주에 의해 발병되는 것을 포함한다.
- [0030] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [0031] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제는 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 것을 사용하는 것이 바람직하다. 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제에는 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 조성물은 결핵의 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0033] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 상기 한정된 아쥘번트 외에도 그 외의 아쥘번트로, 예를 들어, GLA-SE, 프로인트 애쥘번트(Freund adjuvant), 알루미늄 화합물(aluminum compound), 무라밀 디펩타이드(muramyl dipeptide), 리포폴리사카라이드(LPS) 또는 쿨 A 등을 추가로 더 포함할 수 있다. 본 발명에서 상기한 아쥘번트는 본 발명의 백신 조성물과 동시에 투여되거나 시간 간격을 두고 순차적으로 투여될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 약학적 조성물은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상적으로 이용되는 방법으로 제조할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 경구형 또는 비경구형 제제로 제조할 수 있고, 바람직하게는 비경구형 제제인 주사액제로 제조하며, 진피 내, 근육 내, 복막 내, 정맥 내, 피하 내, 비강 또는 경막 외(eidural) 경로로 투여할 수 있

다.

[0035] 본 발명의 약학적 조성물은 면역학적 유효량으로 개체에 투여할 수 있다. 상기 "면역학적 유효량"이란 결핵 예방효과를 나타낼 수 있을 정도의 충분한 양과 부작용이나 심각한 또는 과도한 면역반응을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 정확한 투여 농도는 투여될 특정 면역원에 따라 달라지며, 예방 접종 대상자의 연령, 체중, 건강, 성별, 개체의 약물에 대한 민감도, 투여 경로, 투여 방법 등 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있으며, 1회 내지 수회 투여 가능하다.

### 발명의 효과

[0036] 본 발명에서 제공하는 조성물을 특히 BCG 투여 후 부스터로 사용하는 경우, 상기 BCG의 단점인 단기적 방어 효과를 극복하고, 결핵균 방어효과에 필수적인 다기능성(multifunctional) CD4+ T 세포의 발현 수준을 현저히 높임에 따라 영유아 및 성인에서의 고병원성 결핵균의 감염을 억제하고, 만성화된 잠복 결핵균의 재활성을 억제할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0037] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 상기 아주번트의 나노 에멀전 형상을 개략적으로 도시한 것이다.

도 2는 본 발명의 실시예 1의 실험 설계도를 개략적으로 도시한 것이다.

도 3은 본 발명의 실시예 1에서 생쥐에 본 발명에 따른 백신을 주입한 후 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  또는 IL-2를 분비하는 CD4+ T 세포의 분포 및 수를 측정한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 실시예 1에서 생쥐에 본 발명에 따른 백신을 주입한 후 폐에서 분리된 CD4+ T 세포 중 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  또는 IL-2를 분비하는 CD4+ T 세포의 비율을 그래프로 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 실시예 2의 실험 설계도를 개략적으로 도시한 것이다.

도 6은 본 발명의 실시예 2에서 생쥐에 BCG 프라임 후 본 발명에 따른 백신을 주입한 뒤 생쥐의 폐에서 CD4+ T 세포 또는 CD8+ T 세포 대비 CD44+CD62L- T 세포의 비율을 그래프로 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 실시예 2에서 생쥐에 BCG 프라임 후 본 발명에 따른 백신을 주입한 뒤 폐에서 분리된 CD4+ T 세포 중 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  또는 IL-2를 분비하는 CD4+ T 세포의 비율(막대 그래프)과, 사이토카인을 분비하는 CD4+ T 세포 중 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  또는 IL-2를 분비하는 CD4+ T 세포의 비율(원 그래프)을 그래프로 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명의 실시예 3의 실험 설계도를 개략적으로 도시한 것이다.

도 9는 본 발명의 실시예 3에서 생쥐에 BCG 프라임 후 본 발명에 따른 백신을 주입한 뒤 한국형 결핵균 K 균주에 감염시킨 후 폐에 감염된 결핵균의 수를 측정한 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 10은 본 발명의 실시예 3에서 생쥐에 BCG 프라임 후 본 발명에 따른 백신을 주입한 뒤 한국형 결핵균 K 균주에 감염시킨 후 폐 조직의 사진을 도시한 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

### [0040] 실시예

[0042] [제조예] BCG 프라임 부스터 백신의 제조

[0043] 항원으로는 Rv0351 0.5 $\mu$ g 및 Rv3628 0.5 $\mu$ g의 혼합물을 준비한 뒤, 아주번트로는 하기 표 1에 나타낸 조성 및 제형으로 제조하였다.



표 1

[0045]

구분	조성	제형
제조예 1(MPS)	MPLA (5ug), Poly I:C (25ug), 스쿠알렌, 양이온성 지질 및 계면활성제	나노에멀전 형태
비교예 1(MP)	MPLA (5ug), Poly I:C (25ug), 양이온성 지질 및 계면활성제	리포솜 형태
비교예 2(MPQ)	MPLA (5ug), QS21 (5ug), Poly I:C (25ug), 양이온성 지질 및 계면활성제	리포솜 형태
비교예 3(DMT)	DDA(dimethyl dioctadecyl ammonium bromide) (50ug), MPLA (5ug), TDM(trehalose dicorynomycolate) (5ug), 양이온성 지질 및 계면활성제	수중 유적 에멀전 형태(oil in water emulsion)

[0047]

[실시예 1] 본 발명의 백신의 면역반응 유도능 평가

[0048]

본 발명에 따른 백신의 면역반응 유도능을 평가하기 위하여, 도 2에 도시한 바와 같이, 생쥐의 근육 내에 상기 제조예에서 얻어진 4종의 백신 각각을 1차 주입 후 3주 경과 후 2차 주입하고 다시 3주 경과 후 3차로 주입하였다. 마지막 3차 주입 후 1주가 경과한 뒤 Rv0351 또는 Rv3628 정제 단백질로 자극하여 생쥐의 CD4+ 및 CD8+ T 세포에서 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  또는 IL-2를 발현하는 반응기 T 세포의 발현 수준과, 그 빈도를 측정하여 그 결과를 도 3 및 4에 나타내었다.

[0049]

도 3 및 4에서 보는 바와 같이, 본 발명에 따라 Rv0351 및 Rv3628의 항원과 함께, MPLA, Poly (I:C) 및 스쿠알렌을 포함하는 나노 에멀전 형태의 아조벤트를 백신으로 사용한 경우, 리포솜 형태의 아조벤트를 사용한 경우나, 혹은 DDA, MPLA 및 TDM의 나노에멀전 형태의 아조벤트를 사용한 경우에 비하여, 생쥐의 폐에서 CD4+ T 세포에서 Th1 사이토카인의 발현 수준이 증가하였고(도 3), 생쥐의 비장과 폐 모두에서 다기능성 CD4+ T 세포의 발현 수준 또한 현저히 증가한 것을 확인할 수 있었다(도 4).

[0051]

[실시예 2] 본 발명의 백신의 BCG 부스터 효과에 대한 면역학적 분석

[0052]

본 발명에 따른 백신의 BCG 프라임 부스터 효과를 평가하기 위하여, 도 5에 도시한 바와 같이, 생쥐의 피하에 BCG를 주입하여 백신화한 뒤 대략 12주 경과 후 생쥐의 근육 내에 상기 제조예에서 얻어진 4종의 백신 각각을 1차 주입 후 3주 경과 후 2차 주입하고 다시 3주 경과 후 3차로 주입하였다. 마지막 3차 주입 후 4주가 경과하였을 때 생쥐를 안락사시킨 뒤 생쥐의 폐 및 비장에서 각각 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 분리한 뒤 Rv0351 또는 Rv3628 정제 단백질로 자극하고 반응기 T 세포의 빈도를 확인하였다. 그 결과는 도 6 및 7에 나타내었다.

[0053]

도 6에서 보는 바와 같이, 반응기 T 세포의 표현형 마커로 높은 CD44 발현 및 낮은 CD62L 발현을 사용하였을 때, BCG 프라임 후 본 발명에 따른 부스터 백신을 사용한 경우, BCG 프라임만 수행된 그룹에 비하여 생쥐의 폐에서 CD4+ T 세포가 높은 수준으로 활성화되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 통하여, 본 발명에 따른 백신을 BCG 프라임에 대한 단백질 부스터로 사용하는 경우 반응기 T 세포를 다량 생성할 수 있음을 알 수 있었다.

[0054]

한편, CD4+ T 세포에서 분비되는 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  및 IL-2는 결핵균 제어에 필수적이며, 상기한 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  및 IL-2를 동시에 분비하는 다기능성 CD4+ T 세포는 결핵 제어와 양의 상관관계를 가지고 있음이 잘 알려져 있다. 이에, BCG 프라임 후 본 발명에 따른 백신으로 백신화된 생쥐의 폐에서 분리된 CD4+ T 세포를 정제된 Rv0351 및 Rv3628 항원으로 자극하자, 도 7에서 보는 바와 같이, BCG 프라임 후 본 발명에 따른 부스터 백신을 사용한 경우, BCG 프라임만 수행된 그룹에 비하여 효과체 사이토카인(effector cytokines)을 생성하는 CD4+ T 세포가 높은 수준으로 발현되었으며, 폐의 CD4+ T 세포 중에서는 다기능성 CD4+ T 세포 비율이 가장 높은 것으로 관찰되었다.

[0055]

이를 통하여, 본 발명에 따른 백신을 BCG 프라임의 단백질 부스터 백신으로 사용하는 경우 결핵항원 특이적 CD4+ T 세포의 발현 수준을 양적 및 질적으로 증진시킬 수 있음을 알 수 있었다.

[0057]

[실시예 3] 본 발명의 백신의 장기간 결핵균 감염 시의 면역반응 분석

[0058]

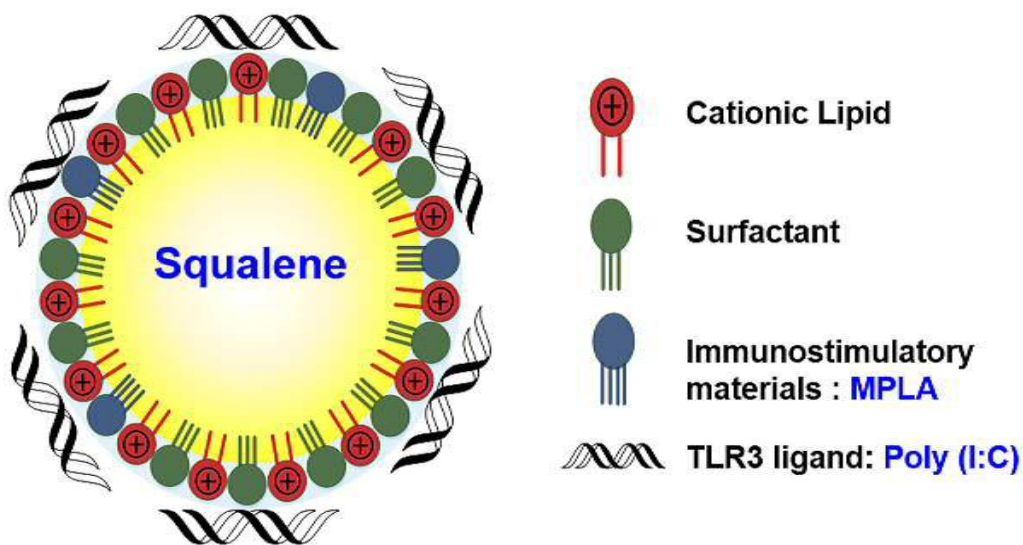
결핵균 감염 시 본 발명에 따른 백신의 면역학적 효과를 평가하기 위하여, 도 8에 도시한 바와 같이, 생쥐의 피

하에 BCG를 주입하여 백신화한 뒤 대략 12주 경과 후 생쥐의 근육 내에 상기 제조예에서 얻어진 4종의 백신 각각을 1차 주입 후 3주 경과 후 2차 주입하고 다시 3주 경과 후 3차로 주입하였다. 마지막 3차 주입 후 4주가 경과하였을 때 한국형 결핵균 K 균주(Mycobacterium tuberculosis K strain)를 공기감염 시킨 뒤 16주 경과 후 생쥐를 안락사시켰다. 이후 생쥐의 폐에 붙어있는 결핵균을 PBS로 추출하여 균질 현탁액을 획득하고, 각각의 균질 현탁액을 단계적으로 희석한 후 Middlebrook 7H11 아가(Difco, Detroit, MI, USA)에서 배양하여 감염된 결핵균의 수(전체 폐 조직 당 평균  $\log_{10}$ CFU)를 확인해 그 결과를 도 9에 나타내고, 폐 조직 사진을 도 10에 나타내었다.

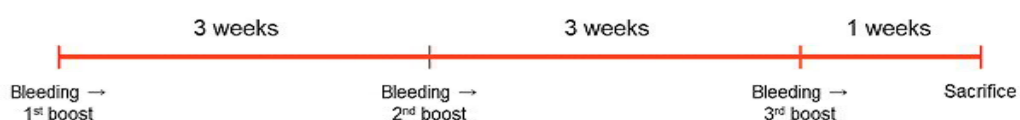
- [0059] 고병원성인 한국형 결핵균인 K 균주의 만성 감염 시에 현재 유일한 결핵 백신으로 BCG가 사용되고 있다. 하지만, 도 9에서 보는 바와 같이, BCG 프라임을 단독으로 사용한 경우는 결핵균의 감염을 효과적으로 감소시키지 못하였다. 반면, BCG 프라임 후 본 발명에 따른 부스터 백신을 사용한 경우, 폐에서 결핵균의 수가 유의미하게 감소된 것을 확인할 수 있었다. 병리학적으로도 BCG 백신만 단독으로 사용했을 때에는 폐에 부분적으로 육아종(granuloma)이 형성된 것을 확인할 수 있으나, 이후 추가적으로 본 발명에 따른 부스터 백신을 사용한 경우에는 폐에서의 병변(pathology)이 감소된 것을 확인할 수 있었다(도 10).
- [0060] 이를 통하여, 본 발명에 따른 백신을 BCG 프라임의 단백질 부스터 백신으로 사용하는 경우 결핵균을 효과적 제어하고, 병변을 감소시키는 강력한 백신으로 작용하는 것을 알 수 있었다.
- [0061] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

## 도면

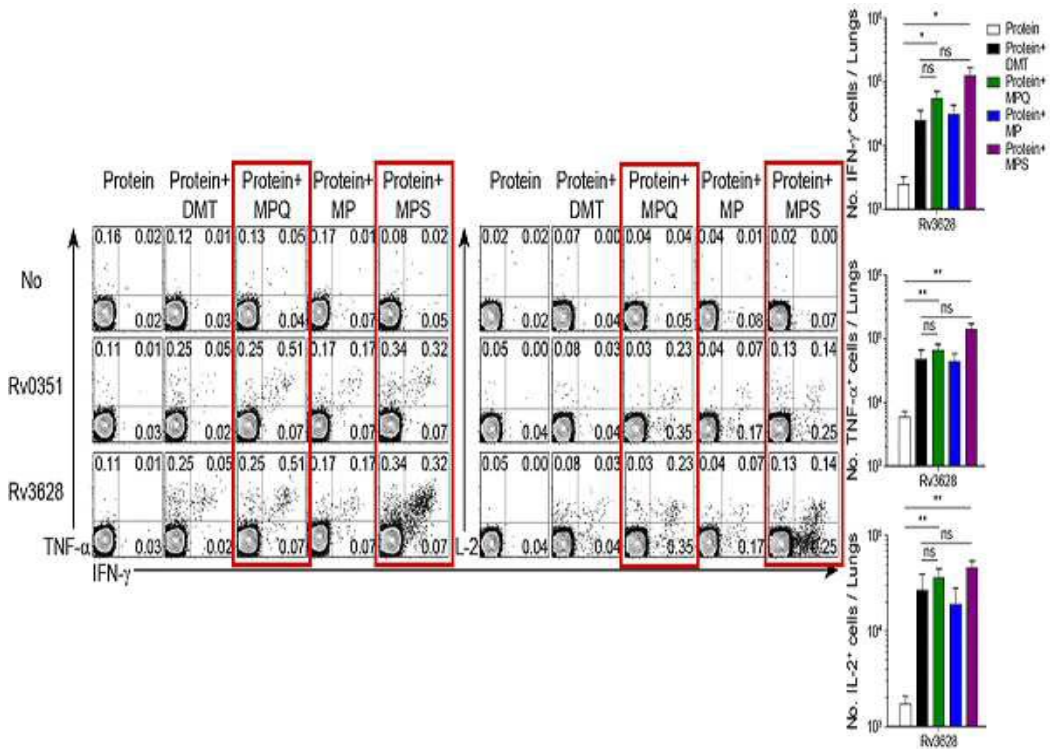
### 도면1



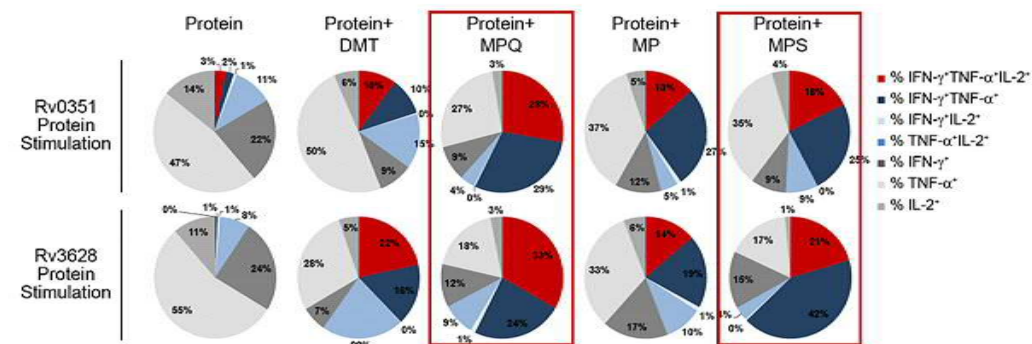
### 도면2



도면3



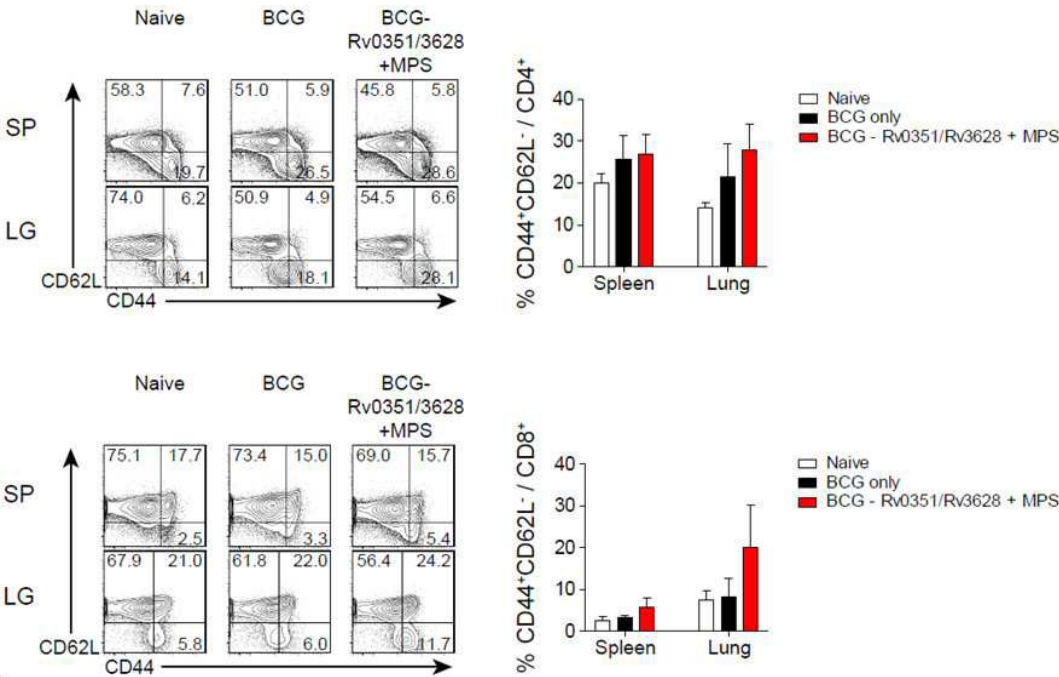
도면4



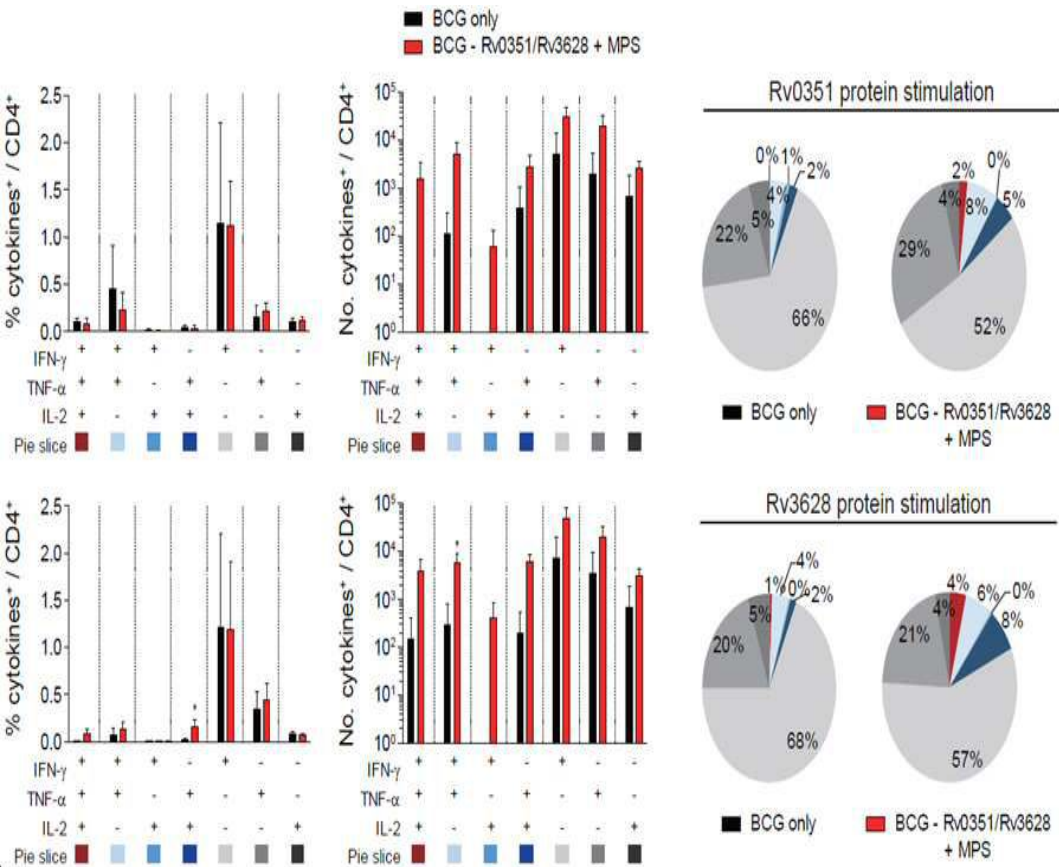
도면5



도면6

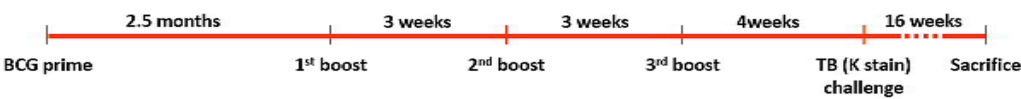


도면7

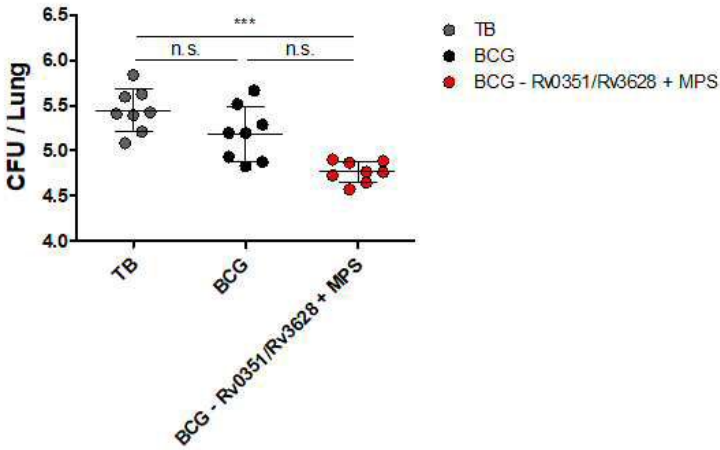




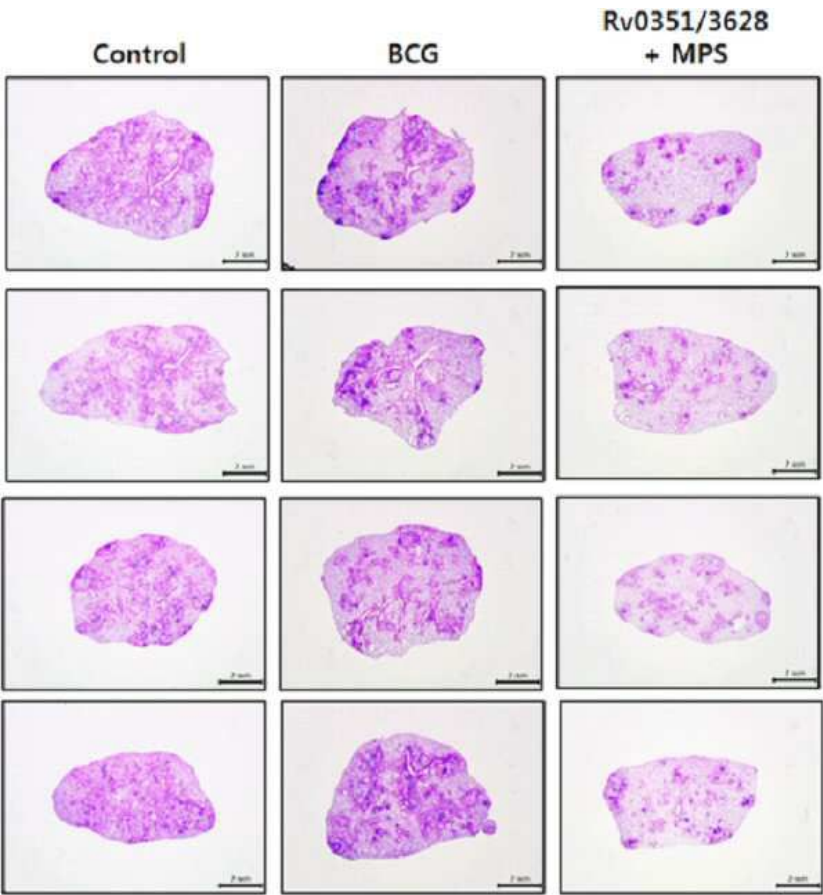
도면8



도면9



도면10



<110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University  
 Research & Business Foundation SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY  
 <120> Novel composition for BCG prime booster vaccine comprising  
 Rv3628/Rv0351  
 <130> DPB174172  
 <160> 4  
 <170> KoPatentIn 3.0  
 <210> 1  
 <211> 235  
 <212> PRT  
 <213> Mycobacterium tuberculosis  
 <400> 1

Met Thr Asp Gly Asn Gln Lys Pro Asp Gly Asn Ser Gly Glu Gln Val  
 1 5 10 15

Thr Val Thr Asp Lys Arg Arg Ile Asp Pro Glu Thr Gly Glu Val Arg  
 20 25 30

His Val Pro Pro Gly Asp Met Pro Gly Gly Thr Ala Ala Ala Asp Ala  
 35 40 45

Ala His Thr Glu Asp Lys Val Ala Glu Leu Thr Ala Asp Leu Gln Arg  
 50 55 60

Val Gln Ala Asp Phe Ala Asn Tyr Arg Lys Arg Ala Leu Arg Asp Gln  
 65 70 75 80

Gln Ala Ala Ala Asp Arg Ala Lys Ala Ser Val Val Ser Gln Leu Leu  
 85 90 95

Gly Val Leu Asp Asp Leu Glu Arg Ala Arg Lys His Gly Asp Leu Glu  
 100 105 110

Ser Gly Pro Leu Lys Ser Val Ala Asp Lys Leu Asp Ser Ala Leu Thr  
 115 120 125

Gly Leu Gly Leu Val Ala Phe Gly Ala Glu Gly Glu Asp Phe Asp Pro  
 130 135 140

Val Leu His Glu Ala Val Gln His Glu Gly Asp Gly Gly Gln Gly Ser  
 145 150 155 160



Lys Pro Val Ile Gly Thr Val Met Arg Gln Gly Tyr Gln Leu Gly Glu  
165 170 175  
Gln Val Leu Arg His Ala Leu Val Gly Val Val Asp Thr Val Val Val  
180 185 190  
Asp Ala Ala Glu Leu Glu Ser Val Asp Asp Gly Thr Ala Val Ala Asp  
195 200 205  
Thr Ala Glu Asn Asp Gln Ala Asp Gln Gly Asn Ser Ala Asp Thr Ser  
210 215 220  
Gly Glu Gln Ala Glu Ser Glu Pro Ser Gly Ser

225 230 235

<210> 2

<211> 708

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 2

gtgacggacg gaaatcaaaa gccggatggc aattcgggcg aacaggtaac cgtcactgac 60  
aagcggcgga tcgatccga gacgggtgaa gtgcggcacg tccctcccgg cgacatgccg 120  
ggagggacgg ctgcggccga tgcggcgcac accgaagaca aggtcgccga gctgaccgcc 180  
gatctgcaac gcgtgcagcg cgacttcgcc aactaccgta agcgggcggt gcgcgatcag 240  
caggcggcgg ctgaccgagc caaggccagc gttgtcagcc aattgctggg tgtactggac 300

gatctcgagc gggcgcgcaa gcacggcgat ttggagtcgg gtccactgaa gtcggtcgcc 360  
gacaagctag acagcgcggt gaccgggctg ggtctggtgg cgttcggtgc cgaggcgag 420  
gatttcgacc ccgtgtctga cgaagcgggt caacacgagg gcgacggcgg gcagggtcc 480  
aagccggtaa tcggcaccgt catgcggcag ggctaccaac tgggtgagca ggtgctgcgg 540  
cacgccttgg tcggcgctcg cgacacgggt gtcgtcgacg cggccgaact ggagtcagtc 600  
gacgacggca ctgcggtcgc agataccgcc gaaaacgata aagctgacca gggcaatagc 660  
gccgacacct cgggcgaaca ggcagaatca gaaccgtcgg gcagttaa 708

<210> 3

<211> 162

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 3

Met Gln Phe Asp Val Thr Ile Glu Ile Pro Lys Gly Gln Arg Asn Lys  
 1 5 10 15  
 Tyr Glu Val Asp His Glu Thr Gly Arg Val Arg Leu Asp Arg Tyr Leu  
 20 25 30  
 Tyr Thr Pro Met Ala Tyr Pro Thr Asp Tyr Gly Phe Ile Glu Asp Thr  
 35 40 45  
 Leu Gly Asp Asp Gly Asp Pro Leu Asp Ala Leu Val Leu Leu Pro Gln

50 55 60  
 Pro Val Phe Pro Gly Val Leu Val Ala Ala Arg Pro Val Gly Met Phe  
 65 70 75 80  
 Arg Met Val Asp Glu His Gly Gly Asp Asp Lys Val Leu Cys Val Pro  
 85 90 95  
 Ala Gly Asp Pro Arg Trp Asp His Val Gln Asp Ile Gly Asp Val Pro  
 100 105 110  
 Ala Phe Glu Leu Asp Ala Ile Lys His Phe Phe Val His Tyr Lys Asp  
 115 120 125

Leu Glu Pro Gly Lys Phe Val Lys Ala Ala Asp Trp Val Asp Arg Ala  
 130 135 140  
 Glu Ala Glu Ala Glu Val Gln Arg Ser Val Glu Arg Phe Lys Ala Gly  
 145 150 155 160  
 Thr His

<210> 4

<211> 489

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 4

gtgcaattcg acgtgaccat cgaaattccc aagggccagc gcaacaaata cgaggtcgac 60

catgagacgg ggcgggttcg tctggaccgg tacctgtaca ccccgatggc ctacccgacc 120

gactacggct tcatcgagga caccctaggt gacgatggcg acccgctgga cgcgctggtg 180

ctgctaccgc agccggtctt ccccggggtg ctggtggcgg cgcgcccggt ggggatgttc 240

cggatggtcg acgagcacgg cggcgacgac aaagtgtgt gctcccagc cggtgacccc 300

cggtagggacc acgtccaaga catcggggac gttccggctt tcgagctgga tgcgatcaag	360
catttctttg tgcactacaa ggacctggaa ccaggtaagt tcgtcaaggc ggccgactgg	420
gtcgaccgcg ccgaagccga ggcagaggtg cagcgttcag tggagcgctt caaggccggt	480
acacactga	489