

(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. <sup>7</sup> A61K 39/245 A61K 48/00		(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2005년09월27일 10-0517058 2005년09월16일
(21) 출원번호 (22) 출원일자	10-2003-0009875 2003년02월17일	(65) 공개번호 (43) 공개일자	10-2004-0074190 2004년08월23일

(73) 특허권자      주식회사 제넥신  
서울특별시 영등포구 여의도동 43 미원빌딩 1403호

학교법인 포항공과대학교  
경북 포항시 남구 효자동 산31번지

주식회사 대웅  
경기 성남시 중원구 상대원동 223-23

학교법인연세대학교  
서울 서대문구 신촌동 134번지

(72) 발명자      성영철  
경상북도포항시남구대잠동현대이동홈타운101-601

조상래  
서울특별시양천구목6동한신APT111-602

하상준  
경상북도포항시남구지곡동110-4낙원APT1-505

전보영  
서울특별시서대문구북가좌1동115-84201호

김승철  
서울특별시서초구방배4동방배2차현대홈타운206-901

김두진  
경상북도포항시남구지곡동756기숙사(석박사)1-1103

송만기  
전라북도김제시용지면장신리2구3반

(74) 대리인      이원희

심사관 : 김경미

(54) 결핵 치료용 DNA 백신 및 이를 함유하는 약학적 조성물

## 요약

본 발명은 결핵 항원 DNA를 포함하는 결핵 DNA 백신 및 상기 DNA 백신을 유효성분으로 함유하는 결핵 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 헤르페스 심플렉스 바이러스 타입 I 당단백질 D(gD)의 신호 서열 및 Ag85A 유전자를 포함하는 결핵 DNA 백신 및 상기 DNA 백신 및 결핵치료제를 유효성분으로 함유하는 결핵 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 DNA 백신은 지속적인 면역반응 유도도 결핵 재발 가능성을 감소시킬 뿐만 아니라 기존의 화학요법과 병용시 치료기간 단축의 효과를 기대할 수 있어 이에 따른 경제적 비용이 절감되므로 결핵의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

## 대표도

도 4

## 명세서

### 도면의 간단한 설명

도 1은 pGX10-Ag85A 벡터를 COS7 세포에 형질도입한 후의 Ag85A 단백질의 발현 여부를 면역침전으로 분석한 전기영동 사진이다.

도 2는 결핵의 잠복 감염 생쥐 모델에서 에어로졸 감염 후 여러 기간에서 관찰한 폐의 조직병리학 사진이다.

A : 에어로졸 감염 4주 후,

B : 에어로졸 감염 18주 후,

C : 에어로졸 감염 42주 후

도 3은 결핵의 잠복 감염 생쥐 모델에 있어서 에어로졸 감염 후 화학요법(INH 및 PZA 처리) 시기, DNA 백신 처리시기 및 박테리아 계수 시기를 나타낸 모식도(A) 및 결핵의 잠복 감염 생쥐 모델에서 에어로졸 감염 후 30주째, 즉 DNA 백신과 화학요법 병용 치료 종료 후 14주째에 생쥐의 비장세포에 의한 CF(culture filtrate) 특이적 IFN- $\gamma$  생산 여부(B) 및 Ag85A 단백질 특이적 IFN- $\gamma$  생산 여부(C)를 나타낸 그래프이다.

도 4는 결핵의 잠복 감염 모델에서 화학요법과 DNA 백신을 병용하여 치료하였을 때의 면역치료 효과를 박테리아 계수를 통해 나타낸 그래프이다.

A : 에어로졸 감염 후 30주째 생쥐의 폐,

B : 에어로졸 감염 후 30주째 생쥐의 비장,

C : 에어로졸 감염 후 42주째 생쥐의 폐,

D : 에어로졸 감염 후 42주째 생쥐의 비장

### 발명의 상세한 설명

#### 발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 결핵 백신 및 이를 함유하는 결핵 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로는 결핵 항원 DNA를 포함하는 결핵 DNA 백신 및 이를 포함하는 결핵 치료용 조성물에 관한 것이다.

전세계 인구의 1/3(약 19억명)이 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)에 감염되어 있으며, 매년 약 800만명 내지 1,000만명의 새로운 환자가 발생하고 있고, 연간 약 300만명이 결핵으로 사망하는 것으로 추정되고 있다. 또한 선진국에서도 HIV 감염의 확산으로 결핵환자가 확산되고 있는 추세이다. 결핵으로 인한 사망률은 90년대 이후 다시 증가하고 있으며 이는 다약제내성 결핵균에 의한 감염 증가와 HIV 감염 확산으로 인한 결핵 빈도 증가가 주원인으로 판단되고 있다. 현재 전 세계적으로 약 5000 만명의 다약제내성 결핵(multi-drug resistant tuberculosis; MDR-TB) 환자가 있지만, 이에 대한 치료효율은 50% 정도 밖에 되지 않는다. 또한, 현재 전 세계적으로 약 600 만명의 HIV/TB 동시 감염환자가 있으며 대부분이 결핵환자로 이환되어 사망하는 것으로 추정되고 있다.

결핵균은 증식속도가 매우 느린 막대 모양의 간균으로 건조상태, 강산 또는 알칼리에도 잘 견디는 항산성균이다. 결핵의 감염경로는 결핵환자의 객담 방울 속에 섞여 나온 균이 공기 중에 떠다니다가 숨을 쉴 때 들어 마셔 폐 속에 들어가 감염되는 것이다. 대부분은 자연 치유되지만 감염자 중 5-10%는 결핵환자로 발전하여 과로, 영양부족, 당뇨병 등과 같은 합병증으로 몸의 면역력이 떨어졌을 때 발병하게 된다(Kochi *et al.*, *Lancet* 1997, **350**:142; Toossi and Ellner, Pathogenesis of tuberculosis. In: Friedman LN (ed). Tuberculosis: current concepts and treatment. CRC Press: New York, 2001, pp.19-47). 따라서, 결핵에 감염되지 않거나 결핵에 감염된 사람을 보호하는 예방용 및 치료용 백신을 개발하는 것은 매우 중요한 일이다.

결핵에 대한 현재의 치료 및 예방 방법으로는 화학요법(Chemotherapy)과 BCG 접종이 있다(Rieder HL, International Union Against Tuberculosis and Lung Disease: Paris, 2002). 화학요법으로 특히 DOTS (directly observed therapy, short course)라고 하는 요법은 약 85% 정도의 결핵 치료율을 나타내는 매우 효과적인 결핵 치료 방법임에도 불구하고, 6개월 이상 지속적인 투여가 필요하고, 상당한 부작용을 초래하며, 비용이 많이 들 뿐만 아니라 다약제내성 결핵에 대해서는 효능이 불투명하고, 지속적인 면역력 획득이 불투명하여 재발의 가능성을 배제하지 못하는 단점으로 인해, 활성 질병을 갖는 환자의 12%에게만 이용되고 있다(Broekmans JE, Control strategies and programme management. In: Porter JDH, McAdam KPWJ (ed). Tuberculosis: Back to the Future. John Wiley and Sons: New York, 1994, pp. 171-192; Chaulk *et al.*, *J Am Med Assoc*, 1998, **279**: 943-948; Mitchison DA, *Tubercle*, 1985, **66**: 219-225).

BCG는 마이코박테리움 보비스(*Mycobacterium bovis*)라는 세균의 병독성을 약화시킨 약독화 생백신으로 전세계적으로 가장 많이 사용되고 있으며, 널리 퍼져 있는 결핵으로부터 어린이들을 보호하는데 효과적인 것으로 보이지만, 성인에게는 치료 효능이 거의 없는 것으로 알려져 있다. 또한 잠복해 있는 M. 투베르클로시스(*M. tuberculosis*)의 내재적 재활동에 대해서도 효과적이지 않다. 또한, 불규칙적으로 행해지는 화학요법은 다약제내성 결핵의 주요한 원인이 될 수 있기 때문에, 새로운 약물 또는 치료 백신으로 화학요법의 기간을 줄이는 것이야말로 결핵의 치료에 매우 중요한 요소라 할 수 있다.

현재까지 새로운 예방용 결핵 백신으로 DNA 백신이 시도되어 왔고, 동물 모델에서 유용한 것으로 나타났다. 최근 M. 투베르클로시스 항원 또는 사이토카인을 발현하는 예방용 DNA 백신은 동물모델에서 그들의 효율성 및 장기적인 지속 효과로 인해 매우 각광받고 있다. 예를 들어, 항원 85A, 85B, 65 kDa heat shock protein 또는 PstS-3을 발현하는 예방용 DNA 백신은 생쥐에서 M. 투베르클로시스의 성장을 제한하는데 효과적인 것으로 밝혀졌다(Denis O *et al.* *Infect Immun* 1998; **66**: 1527-1533; Huygen K *et al.* *Nat Med* 1996; **2**: 893-898; Lozes E *et al.* *Vaccine* 1997; **15**: 830-833; Kamath AT *et al.* *Infect Immun* 1999; **67**: 1702-1707; Tascon RE *et al.* *Nat Med* 1996; **2**: 888-892; Lowrie DB *et al.* *Vaccine* 1997; **15**: 834-838; Tanghe A *et al.* *J Immunol* 1999; **162**: 1113-1119). 또한, DNA 예방접종은 생쥐 및 인간에서 효과적인 항-마이코박테리아 면역성(anti-mycobacterial immunity)을 획득하는데 필수적이라고 알려진 CTL(cytotoxic T lymphocyte) 및 Th1 반응을 포함한 세포 면역 반응을 확립하는데 매우 효과적임이 증명되었다(Bonato VL *et al.*, *Infect Immun*, 1998, **66**: 169-175).

그러나, 이러한 효과적인 예방용 백신 후보들에 비하여 결핵에 감염된 환자에게 필요한 치료용 백신 후보는 매우 드문 실정이다. M. 바카에(*M. vaccae*) 및 사이토카인 IFN- $\gamma$  또는 IL-12는 M. 투베르클로시스 잠복 감염의 코넬 모델(Cornell model)에서 연구되어져 왔으나, 후보 백신의 효과는 결핵의 재발을 막는데 충분치 않은 것으로 나타났다(Corlan E *et al.*, *Respir Med*, 1997, **91**: 21-29; Holland SM, Dorman SE., *J Invest Med*, 1998, **46**(Suppl.) 218A; Holland SM *et al.*, *N Engl J Med*, 1994, **330**: 1348-1355). 치료용 결핵 백신으로 DNA 백신이 최근 활발히 연구되어 지고 있는데, 그 효과는 미미한 것으로 보고되었다(Turner J. *et al.*, *Infect. Immun.*, 2000, **68**: 1706-1709; Repique CJ *et al.*, *Infect.*

*Immun.*, 2002, **70**: 3318-3323). 하지만, 최근 hsp65를 발현하는 치료용 DNA 백신을 화학요법 수행 후 사용하게 되면 M. 투베르클로시스의 재활동을 막는데 매우 효과적인 것으로 알려졌다(Lowrie DB *et al.*, *Vaccine*, 2000, **18**: 1712-1716; Lowrie DB *et al.*, *Nature*, 1999, **400**: 269-271).

결핵 환자에서 M. 투베르클로시스에 감염된 마크로파지(macrophages)는 활성화 T 세포로 둘러싸여 있다(Andersen P, *Trends Immunol* 2001; **22**: 160-168). CD4+ 및 CD8+ T 세포 둘다 마이코박테리아 항원을 발현하는 감염된 마크로파지를 용해하는 것으로 알려져 있다(Boom *et al.*, *Infect Immun*, 1991, **59**: 2737-2743; Kaufmann SH., *Annu Rev Immunol*, 1993, **11**: 129-163; Tan JS *et al.*, *J Immunol*, 1997, **159**: 290-297). 특히, 면역학적 메커니즘의 분석에 의하면 IFN- $\gamma$ 를 생산하는 항원-특이 CD8+/CD4-/CD44<sup>high</sup> 메모리 타입 CTL에 의해 유도되는 면역반응 및 Th1 면역 반응이 결핵 치료 백신의 작용에 필요한 것으로 밝혀졌다(Bonato VL *et al.*, *Infect Immun*, 1998, **66**: 169-175). 따라서, 감염 환자에서 면역 시스템의 효능을 증가시킬수 있는 면역치료법은 항박테리아 화학요법을 효과적으로 수행하기 위한 중요한 보조자(adjunct)가 될 수 있다. 몇몇 선도적인 연구 결과, 항박테리아 약물과 조합된 재조합 IL-12 단백질이 사이토카인 또는 약물 단독으로 치료한 것에 비하여 레이시마니아 메이저(*Leishmania major*) 감염 또는 M. 아비움(*M. avium*) 감염의 제거를 유도하는 것으로 나타났다(Nabors *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 3142-3146.1; Doherty TM, Sher A., *J Immunol*, 1998, **160**: 5428-5435). 그러나, 이러한 사이토카인 치료법은 임상에 적용하였을 때 매우 독성이 높다. 따라서, 결핵에 대하여 효과적이면서도 비독성인 병용 치료 방법을 개발하는 것이 매우 중요하다.

이에, 본 발명자들은 결핵의 예방 또는 치료에 효과적이면서도 화학요법과 동시에 적용하였을 때 면역 효능을 증가시키고 화학요법의 치료 기간을 줄일 수 있는 DNA 백신을 개발하기 위해 노력하던 중, 화학요법과 동시에 Ag85A DNA 백신을 처리하면 잠복중인 M. 투베르클로시스의 재활동을 감소시킬 뿐만 아니라 INF- $\gamma$ 의 생산이 급증한다는 것을 알아내어 상기 DNA 백신이 결핵의 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

### 발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 Ag85A 유전자를 포함하는 결핵 DNA 백신 및 상기 DNA 백신과 결핵치료제를 유효성분으로 함유하는 결핵 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

### 발명의 구성 및 작용

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 헤르페스 심플렉스 바이러스 타입 I 당단백질 D(gD)의 신호 서열 및 Ag85A 유전자를 포함하는 결핵 DNA 백신을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 결핵 DNA 백신과 결핵치료제를 유효성분으로 함유하는 결핵 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 헤르페스 심플렉스 바이러스 타입 I 당단백질 D(gD)의 신호 서열 및 Ag85A 유전자를 포함하는 결핵 DNA 백신을 제공한다.

상기 헤르페스 심플렉스 바이러스 타입 I 당단백질 D(gD)의 신호 서열은 서열번호 1로 기재되는 것이 바람직하고, Ag85A 유전자는 서열번호 2로 기재되는 것이 바람직하다.

본 발명의 결핵 DNA 백신은 상기 헤르페스 심플렉스 바이러스 타입 I 당단백질 D(gD)의 신호 서열 및 Ag85A 유전자를 포함하는 DNA 백신으로, 상기 유전자들이 DNA 백신 벡터에 삽입된 것이 바람직하다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 DNA 백신 벡터로 pGX10 벡터를 사용하였으며, pGX10 벡터는 CMV 프로모터, TPL(tripartite leader sequence), 시미안(simian) 바이러스 40(SV40) 후 폴리A 꼬리, SV40 인핸서(enhancer)가 직렬로 연결된 구조이다. 상기 pGX10 벡터에 서열번호 1로 기재되는 헤르페스 심플렉스 바이러스 타입 I 당단백질 D(gD)의 신호 서열 및 서열번호 2로 기재되는 Ag85A 유전자를 삽입한 발현벡터를 제조하여 이를 "pGX10-Ag85A"라 명명한 후 2003년 2월 3일자로 한국생명공학연구원 유전자은행에 기탁하였다(수탁번호 ; KCTC 10418BP).

또한, 본 발명은 상기 DNA 백신 및 결핵치료제를 유효성분으로 함유하는 결핵 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

상기에서, 결핵치료제는 이소니아지드(isoniazid, INH), 피라진아미드(pyrazinamide, PZA), 리팜핀(rifampin), 스트렙토마이신(streptomycin) 및 에탐부톨(ethambutol)로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 바람직하며, INH 또는 PZA인 것이 더욱 바람직하다.

M. 투베르클로시스의 감염 동안에 IFN- $\gamma$ 를 생산하는 항원-특이 T 세포의 수는 매우 감소하는 것으로 보고되었다(Orme *et al.*, *J Immunol*, 1993, **151**: 518-525; Zhang M *et al.*, *Infect Immun*, 1995, **63**: 3231-3234). 본 발명의 바람직한 실시예에서는 생쥐의 잠복 감염 모델에서 결핵균 감염 30주 후, INH 및 PZA를 이용한 화학요법과 함께 IL-12 변형 DNA 벡터, DNA 벡터 자체 또는 Ag85A DNA 벡터를 처리한 생쥐의 비장 세포를 CF(culture filtrate) 또는 Ag85A 단백질로 자극한 후 IFN- $\gamma$  생산을 확인하였다. 그 결과, INH 및 PZA를 이용한 화학요법과 함께 IL-12 변형 DNA 벡터를 병용 처리하였을 때에는 INH 및 PZA를 이용한 화학요법과 함께 Ag85A DNA 또는 DNA 벡터 자체로 병용 처리한 대조군에 비해 IFN- $\gamma$ 의 생산이 높았다(도 3의 B 참조). CF에 의한 자극의 경우에는 본 발명의 Ag85A DNA-처리 생쥐 군에서 높은 수준의 IFN- $\gamma$  유도가 보이지 않았다. 반면, Ag85A 단백질에 의한 자극의 경우에는 Ag85A DNA로 면역된 생쥐군에서 DNA 벡터 자체 또는 IL-12 변형 DNA로 면역된 생쥐군에 비해 높은 수준의 IFN- $\gamma$  생산을 나타냈다(도 3의 C 참조). 상기 결과는 Ag85A-특이 Th1 면역 반응이 Ag85A DNA 면역에 의해 생성될 수 있다는 것을 나타내며 M. 투베르클로시스의 재활동을 억제할 가능성이 있음을 의미한다. 또한 IL-12 변형 DNA로 면역화된 생쥐군에서는 CF-특이적 IFN- $\gamma$  생산 뿐 아니라 Ag85A-특이적 IFN- $\gamma$  생산도 DNA 벡터 자체로 면역화된 생쥐군에 비해 높았는데, 이는 IL-12 변형 DNA의 면역에 의해 Ag85-특이 IFN- $\gamma$  유도가 증가하고, 결핵 감염 후에 생성되는 항원-특이 T-헬퍼 면역 반응이 IL-12 변형 DNA 면역에 의해 Th1 반응으로 편향된 타입으로 전환된 것을 의미하는 동시에 M. 투베르클로시스의 재활동을 억제할 가능성이 있음을 의미한다.

본 발명에서는 3달동안 INH 및 PZA의 치료와 함께 병용 치료로 수행한 Ag85A DNA 또는 IL-12 변형 DNA 백신의 결핵 치료 효과를 알아보았다. 결핵균인 M. 투베르클로시스를 감염시킨 후 30주째에 DNA 면역없이 INH 및 PZA로만 처리한 생쥐는 폐 및 비장에서 각각 80% 및 100%로 결핵균이 발견된 반면, IL-12 변형 DNA 백신을 병용 치료한 경우는 생쥐의 20%가 폐에서, 생쥐의 40%가 비장에서 결핵균이 발견되었다(도 4의 A 및 도 4의 B 참조). 앞서 기술하였듯이 본 발명의 IL-12 변형 DNA의 동시 주입은 Th1 면역 반응을 유도하는데 효과적이다. 따라서, IL-12N220L DNA에 의한 M. 투베르클로시스 항원에 대한 면역 세포의 효과적인 기폭 및 IL-12N220L DNA에 의한 Th1으로의 전환이 M. 투베르클로시스의 재활동을 감소시킬 수 있음을 알 수 있다. 또한, Ag85A DNA 백신으로 처리한 경우에는 폐에서 생존 생물체는 발견되지 않았고, 비장에서는 생쥐의 20%에서만 M. 투베르클로시스가 발견되었다(도 4의 A 및 도 4의 B 참조). 상기과 같은 결과를 통해, INH 및 PZA의 병용 화학요법에서 Ag85A 또는 IL-12 변형 단백질을 발현하는 DNA 백신이 결핵의 잠복 감염 모델에서 활성이 없는 M. 투베르클로시스의 재활동을 억제하는 유전적 어쥬반트(adjuvant)로 사용될 수 있다는 것을 알 수 있다.

본 발명의 DNA 백신이 M. 투베르클로시스의 재활동 억제에 지속적으로 영향을 미치는지 알아보기 위해 결핵균 감염 42주째에 박테리아를 계수한 결과, INH 및 PZA로만 처리한 생쥐 폐와 비장의 각각 80% 및 60%에서 M. 투베르클로시스가 발견되었다(도 4의 C 및 도 4의 D, 표 1 참조). DNA 벡터 자체만 처리된 것은 폐 및 비장에서 60%의 재활동을 나타내었다. 반면, 본 발명의 IL-12 변형 DNA로 처리한 것 중에서 생쥐 40%의 폐 및 비장에서 M. 투베르클로시스가 발견되었고, 이는 이전에 보고된 바와 같이 방어 면역반응에서 IL-12 변형 DNA가 지속적인 효과를 나타낸다는 것을 의미한다(Ha SJ *et al.*, *Nat Biotechnol*, 2002, **20**: 381-386). 감염 후 30주에서 보여진 양상과 유사하게, Ag85A DNA 백신으로 처리된 생쥐는 20%의 폐 및 비장에서만 M. 투베르클로시스의 재활동을 보였다.

따라서, 본 발명의 화학요법과 병행된 결핵 DNA 백신은 화학요법 자체보다도 지속적으로 결핵균을 억제할 수 있으므로 결핵의 치료에 유용하게 사용될 수 있으며, 동시에 화학요법의 치료 기간을 단축함으로써 결핵의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

본 발명의 약학적 조성물의 "면역학적 유효" 용량은 면역반응 도출에 적당한 용량이다. 특정 용량은 치료하고자 하는 포유동물의 연령, 체중 및 의학적 증상과, 투여방법에 좌우된다. 적정용량은 당업자에 의해 용이하게 결정될 것이다. 백신 조성물은 생리 식염수 또는 포스페이트 완충 식염수 또는 글리세롤이나 프로필렌 글리콜 같은 에탄올 폴리올 같이 약학적으로 또는 생리학적으로 허용되는 베히클(vehicle)로 임의로 투여될 수 있다. 소량의 세제도 백신 안정성 증강을 위해 포함시킬 수 있다. 본 발명의 조성물은 식물성 오일 또는 이의 에멀션, 계면활성제, 예를 들면 헥사데실아민, 옥타데실 아미노산 에스테르, 옥타데실아민, 라이소레시틴, 디메틸-디옥타데실아민 브로마이드, N,N-디옥타데실-N'-N'비스(2-하이드록시에틸-프로판디아민), 메톡시헥사데실글리세롤, 및 플루로닉 폴리올; 폴리아민, 예를 들면, 피란, 텍스트라닐페이트, 폴리 IC, 카보폴; 펩타이드, 예를 들면, 뮤라밀 디펩타이드, 디메틸글라이신, 터프트신; 면역 자극 복합체; 오일 에멀션; 리포폴리사카라이드, 예를 들면 MPLR(3-O-탈아실화 모노포스포릴 리피드 A; RIBI ImmunoChem Research, Inc.,

Hamilton, Montana); 및 미네랄 겔 같은 부가적인 보조제를 임의로 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 또한 리포솜, 와우상(cochleates), 생분해성 중합체, 예를 들면 폴리-락타이드, 폴리-글리콜라이드 및 폴리-락타이드-코-글리콜라이드, 또는 ISCOMS(면역자극 복합체) 중으로 혼입될 수 있고, 보충성 활성성분이 또한 사용될 수 있다.

또한, 본 발명의 약학적 조성물은 비경구로 투여될 수 있으며, 비경구 투여는 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식 등의 통상적인 방식에 따라 행해질 수 있다. 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위해서는 상기 DNA 백신 및 결핵치료제를 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고 이를 앰플 또는 바이알의 단위 투여형으로 제제한다.

본 발명에 따른 유효성분의 투여량은 체내에서 활성성분의 흡수도, 불활성화를 및 배설속도, 환자의 연령, 성별 및 상태, 치료할 질병의 중증 정도에 따라 적절히 선택되나, 일반적으로 성인에게 1일에 체중 1 kg당 DNA 백신을 0.1~0.2 mg의 양으로 1회 내지 수회 나누어 투여할 수 있으며 바람직하기로는 0.02~0.1 mg이다.

이하, 본 발명을 실시예에 의해 더욱 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

## <실시예 1> DNA 백신의 제조

### <1-1> Ag85A DNA 백신 제조용 발현벡터의 제조

본 발명자들은 효과적인 결핵 DNA 백신을 제조하기 위하여, 서열번호 1로 기재되는 헤르페스 심플렉스 바이러스 타입 1 당단백질 D(gD)의 신호 서열을 서열번호 2로 기재되는 Ag85A 유전자와 연결시킨 융합 카셋트를 제조하였다.

본 발명자들은 상기와 같이 제조된 융합 카셋트를 삽입하기 위한 벡터로서 pTV2 벡터(Lee et al., *J Virol* 1998; **72**: 8430-8436)의 앰피실린 저항 유전자를 카나마이신 저항 유전자로 치환한 벡터를 제조한 후 "pGX10"이라 명명하였다. 상기 pGX10 벡터에 상기에서 제조한 융합 카셋트를 삽입한 발현 벡터를 제조한 후 이를 "pGX10-Ag85A"라 명명하고 2003년 2월 3일자로 한국생명공학연구원 유전자은행에 기탁하였다(수탁번호: KCTC 10418BP).

Ag85A 유전자가 단백질로 발현되는지 여부를 확인하기 위해, pGX10-Ag85A DNA 벡터를 COS7 세포에 일반적인 방법으로 트랜스펙션한 후 통상적인 방법에 따라 Ag85A 단백질을 이용하여 제조된 생쥐 항-Ag85A 혈청을 이용하여 방사선-면역침전 분석을 수행하였다.

그 결과, Ag85A 유전자가 포함되지 않은 빈 벡터(empty vector)인 pGX10 벡터를 형질도입한 세포에서는 Ag85A 단백질이 발현되지 않은 반면 Ag85A 유전자를 삽입한 pGX10-Ag85A 벡터를 형질도입한 세포에서는 Ag85A 단백질의 밴드가 확인되었다(도 1 참조).

### <1-2> IL-12 변형 DNA 백신 제조용 발현 벡터의 제조

IL-12의 p40 소단위체의 Asn-222를 암호화하는 코돈이 Leu-222로 돌연변이되면 IL-12의 자연 길항제인 IL-12p40 소단위체의 적은 분비가 유도되며(Ha SJ *et al.*, *Nat Biotechnol*, 2002, **20**: 381-386), 또한 HCV(hepatitis C virus) E2 DNA와 함께 상기 IL-12 변형 DNA를 면역화시키면 정상 IL-12 DNA에 비하여 지속적인 E2-특이 CTL 반응 및 IFN- $\gamma$ -생산 CD8<sup>+</sup> T 세포 반응을 촉진하는 것으로 보고되었다(Ha SJ *et al.*, *Nat Biotechnol*, 2002, **20**: 381-386). 이에, 본 발명자들은 또 다른 결핵 DNA 백신을 제조하기 위해 IL-12의 DNA를 변형시킨 DNA 컨스트럭트(construct)를 제조하였다. 구체적으로, IL-12 DNA 컨스트럭트의 제조는 다음과 같다. 쥐의 IL-12p35(mp35), 엔세팔로마यो카디티스 바이러스(encephalomyocarditis virus; EMCV)의 IRES(internal ribosomal entry site) 및 쥐의 IL-12p40(mp40) cDNA를 단일 방향으로 직렬 연결시키고, 이를 상기 실시예 <1-1>의 pGX10 벡터에 삽입하여 발현벡터를 제조하고 이를 "pGX10-mp35/IRES/mp40(pGX10-IL-12)"이라 명명하였다. 다음으로, 상기에서 제조한 IL-12 DNA 컨스트럭트가 포함된 벡터로부터 IL-12p40(mp40)의 Asn-220 N-글리코실레이션 위치를 돌연변이시키기 위하여, PCR 방법을 이용하여 Asn-220을 Leu-220으로 아미노산 치환을 실시하였다(Holland SM *et al.*, *N Engl J Med*, 1994, **330**: 1348-1355). 그 결과, pGX10-IL-12에서 상기 mp40 부위의 Asn-220을 Leu-220으로 대체한 IL-12 변형 DNA 발현벡터를 제조하였고, 이를 "pGX10-mp35/IRES/mp40-N220L(pGX10-IL-12N220L)"이라 명명하였다.

## <실시예 2> 잠복 감염 모델(Latent infection model)의 확립

### <2-1> 항원의 준비

잠복 감염 모델에 사용할 감염용 항원은 결핵균인 마이코박테리움 투베르클로시스(*M. tuberculosis*)를 이용하여 제조하였다. 구체적으로, M. 투베르클로시스 H37Rv(ATCC 27294)를 사우톤 배지(Sauton medium) 위의 표면 균막(pellicles)으로 10일 동안 성장시켰고, 표면 균막을 수집하여 3 mm 글래스 비드로 천천히 흔들어서 파쇄하였다. 응집이 정착된 후 상층액을 수집하고, 분주액을 -70℃에 보관하였다. 상기 보관된 분주액을 용해시킨 후, 생존 생물체를 미들브룩(Middlebrook) 7H11 아가(Difco, Detroit, Mich.)에서 연속 희석 플레이팅으로 계산하였다. M. 투베르클로시스를 생쥐에 접종하기 위하여, 상기 과정으로 준비한 균주의 현탁액을 간단히 초음파 처리하고 PBS를 이용하여 250,000 pfu/ml로 희석하였다.

### <2-2> 잠복 감염 실시

본 발명자들은 코넬 모델(Cornell model)(McCune et al., *J Exp Med* 1966; **123**: 445-468)에 약간의 변형을 하여 결핵균을 잠복 감염시켰다. 구체적으로, 5-6주령의 암컷 C57BL/6J 생쥐(SLC 사, Shizuoka, Japan)를 공수 감염 기구의 흡입 챔버(Glas-Col, Terre Haute, Ind.)에 놓아둔 후 상기 실시예 <2-1>에서 준비한 M. 투베르클로시스 H37Rv 250,000 pfu/ml로 10 ml을 60분 동안 노출시켰다. 상기와 같은 과정을 수행하면 공기를 통하여 인간 결핵균이 자연적으로 동물에게 전달된다.

결핵균이 생쥐에게 감염되었는지 확인하기 위해 결핵균의 노출 하루 뒤에 하기와 같은 방법으로 M. 투베르클로시스를 계수하였다. 이산화탄소를 이용하여 생쥐를 안락사시킨 후, 0.05% Tween 90이 용해된 식염수에서 폐 및 비장을 균질화시켰다. 조직 현탁액을 10배 희석하여 각각의 희석액 100  $\mu$ l를 M7H11 아가 플레이트(Difco, Detroit, Mich.)에 도말한 후 37℃에서 3-4주 동안 배양하였다. 각각의 플레이트에서 M. 투베르클로시스 콜로니를 계수한 후, 그 결과를  $\log_{10}$  CFU(colony forming unit)/기관으로 나타내었다.

그 결과 약 200개의 M. 투베르클로시스가 폐로 전달되는 것을 확인하였다.

또한, 상기에서 확인한 M. 투베르클로시스의 폐로의 전달이 조직의 변화를 가져오는지를 확인하기 위해 조직병리학적 검사를 수행하였다. 구체적으로, M. 투베르클로시스의 에어로졸 감염 4주 후 폐 조직을 적출한 후 10% 포르말린에 고정한 후, 여러 시간에 걸쳐 파라핀을 삽입하였다. 파라핀-삽입 조직 블록으로부터 2 내지 3  $\mu$ m 절편을 만든 후, 헤마톡실린(haematoxylin) 및 에오신(eosin)으로 염색하였다.

그 결과, 폐의 대부분의 공기 구역은 모노사이트(monocytes)로 채워져 있었으며(도 2의 A), 이 시점에서 감염된 생쥐의 폐 및 비장으로부터 생존한 결핵균을 계수한 결과, 각각  $6.69 \pm 0.20$  cfu( $\log_{10}$ ) 및  $5.17 \pm 0.11$  cfu( $\log_{10}$ )이 검출되었다.

### <2-3> 잠복 감염에서의 화학 요법 실시

상기 실시예 <2-2>를 통해 잠복 감염이 성공적으로 수행됨을 확인한 후, 본 발명의 잠복 감염 모델에 대한 화학 요법을 실시하였다. 상기 실시예 <2-2>와 같은 방법으로 생쥐에 에어로졸 감염을 수행한 후 4주 후에 음식안에 25 mg/kg/day의 이소니아지드(isoniazid, 이하 "INH"이라 칭함)(Sigma-Aldrich, Co., MO, USA) 및 1,000 mg/kg/day의 피라진아미드(pyrazinamide, 이하 "PZA"라 칭함)(Sigma-Aldrich, Co., MO, USA)를 첨가하여 생쥐에게 3달 동안 처리하였다. INH 및 PZA로 처리를 완전히 마치고 난 후 생쥐에 감염된 결핵이 치료되었는지 확인하기 위해 상기 실시예 <2-2>에 기재된 조직 병리학적 검사 방법을 수행하고, 결핵균을 계수하였다.

그 결과, INH 및 PZA로 3달간 처리를 완전히 마치고 난 후 2주 지난 후에는(에어로졸 감염 후 18주 후), 대부분의 침윤된 세포는 사라지고 깨끗한 공기 구역만이 남아 있었으며(도 2의 B), 생존하는 M. 투베르클로시스는 관찰되지 않았다. 그러나 감염 42주 후, 즉 INH 및 PZA의 처리를 중단한 후 26주 후에 림프구 침윤의 흔적이 있었다(도 2의 C). 또한, 감염 후 30주에 5마리의 생쥐 중에서 4마리 생쥐(80%)의 폐 또는 5마리 생쥐 모두(100%)의 비장에서 대부분의 M. 투베르클로시스가 재활동되었다. 이와 유사하게 감염 후 42주에서 대부분의 생쥐에서 생존 결핵균이 검출되었다(표 1). 상기 결과로부터, 이러한 공기로 운반되어 확립된 감염 모델이 기존의 코넬 모델 결과를 반영함을 알 수 있다(McCune et al., *J Exp Med* 1966; **123**: 445-468). 반면, INH 및 PZA로 6개월 동안 생쥐에 처리하면, 감염 후 30주 및 42주에서 감지할 만한 수의 박테리아가 관찰되지 않았다(표 1).



표 1.

치료 부위 및 기간	폐			비장		
	30주	42주	전체	30주	42주	전체
INH + PZA (6개월)	0/5 <sup>a</sup>	0/5	0/10	0/5	0/5	0/10
INH + PZA (3개월)	4/5	4/5	8/10	5/5	3/5	8/10
INH + PZA (3개월)+ 대조 DNA	3/5	3/5	6/10	3/5	3/5	6/10
INH+PZA (3개월)+IL-12N220L DNA	1/5	2/5	3/10	2/5	2/5	4/10
INH + PZA (3개월)+ Ag85A DNA	0/5	1/5	1/10	1/5	1/5	2/10

a : M. 투베르클로시스의 재성장인 생쥐수/ H37Rv M. 투베르클로시스로 감염된 생쥐수

### <실시예 3> IL-12N220L 또는 Ag85A DNA 백신에 의한 항원-특이 IFN- $\gamma$ 생산

본 발명자들은 생쥐의 잠복 감염 모델에서 화학치료를 수행하는 동안에 DNA 백신이 치료 효과를 가지는지 여부를 관찰하기 위하여, 상기 실시예 2에서 실시한 방법과 같이 에어로졸 감염 후 4주 후에 INH 및 PZA로 3달 동안 처리하면서, 그 동안 생쥐에 상기 실시예 1에서 제조한 pGX10, pGX10-IL-12N220L 또는 pGX10-Ag85A DNA 벡터 50  $\mu$ g을 생쥐에 4주 간격으로 3회 근육내 주사하였다. 이후 결핵균 감염 후 18주, 30주, 42주째 즉, 치료 완료 후 2주, 14주, 26주에 각각 생쥐의 조직에서 생존하는 박테리아의 수를 계수하였다(도 3의 A).

또한, 감염 후 30주 후에 각 군의 생쥐의 비장 세포를 배양투과 단백질인 CF(J.T. Belisle, Colorado State University, Fort Collins, Colo.) 또는 재조합 Ag85A 단백질(Standardia Inc., Suwon, Korea)과 함께 배양한 후, 배양액에서 IFN- $\gamma$  생산 수준을 검출하였다. IFN- $\gamma$  생산 수준 결정은 다음과 같이 수행하였다. 생쥐로부터 비장 세포를 취한 후,  $2 \times 10^5$  림프구를 200  $\mu$ l RPMI에서 10  $\mu$ g/ml 농도의 CF 또는 재조합 Ag85A 단백질의 존재하에 6일 동안 배양하였다. 배양 상층액을 수집하여 IFN- $\gamma$  검출에 사용하였고, IFN- $\gamma$  검출은 생쥐 IFN- $\gamma$  OptEIA<sup>TM</sup> 키트(Pharmingen, San Diego, Calif.)를 사용하여 제조회사의 지침에 따라 결정하였다.

그 결과, INH 및 PZA로 처리한 생쥐는 CF 또는 Ag85A에 특이적인 IFN- $\gamma$ 가 생산된 반면 INH 및 PZA로 처리하지 않은 생쥐는 CF 또는 Ag85A에 특이적인 IFN- $\gamma$ 가 감지할 만한 수준으로 검출되지 못하였다. DNA 면역 없이 INH 및 PZA로 처리한 대조군 생쥐의 경우 CF에 의한 자극 후에 IFN- $\gamma$  생산이 유도되었는데(도 3의 B 및 도 3의 C), 이는 호스트 Th1 면역 반응이 박테리아 감염 후 INH 및 PZA 처리에 의해 생산된다는 것을 나타낸다. 상기 결과는 결핵 환자가 화학 치료를 받은 후에 서로 다른 항원 펩타이드에 특이적인 IFN- $\gamma$  생산의 증가를 초래한다는 이전의 연구와 일치한다(Dieli F *et al.*, *Scand J Immunol*, 2000, **52**: 96-102; Wilkinson RJ *et al.*, *J Infect Dis*, 1998, **178**: 760-768). 화학치료 동안에 대조 DNA(pGX10 벡터)로 처리된 생쥐는 화학치료만을 받는 대조군 생쥐에 비하여 CF 및 Ag85A 단백질에 대한 반응에서 높은 수준의 IFN- $\gamma$  유도를 보였으며(도 3의 B 및 도 3의 C), 이는 이전에 보고된 것처럼 DNA 벡터에서 CpG 모티프가 Th1 면역 반응의 유도자로 작용할 수 있다는 것을 나타낸다(Krieg AM. *Vaccine* 2000; **19**: 618-622). IL-12N220L DNA로 처리한 생쥐는 대조 DNA 또는 Ag85A DNA로 처리한 생쥐에 비하여 CF에 대한 반응에서 IFN- $\gamma$ 에 대하여 더 높은 반응을 나타내었다(도 3의 B, 각각  $p < 0.03$  및  $p < 0.04$ ). Ag85A DNA-처리 생쥐는 CF에 의한 자극의 경우에 높은 수준의 IFN- $\gamma$  유도를 보이지 않지만(도 3의 B), 대조 DNA 또는 IL-12N220L DNA-면역된 생쥐에서 보다 더 높은 Ag85A 단백질 특이적인 IFN- $\gamma$  생산을 유도하였다(도 3의 C, 각각  $p < 0.01$  및  $p < 0.04$ ). 상기와 같은 결과는 Ag85A-특이 Th1 면역 반응이 Ag85A DNA 면역에 의해 생성될 수 있다는 것을 나타낸다. IL-12N220L DNA 면역에 의해서도 대조 DNA 면역 생쥐에 비하여 Ag85-특이 IFN- $\gamma$ 의 유도가 증가하였는데(도 3의 C,  $p < 0.04$ ), 이는 결핵 감염 후에 생성되는 항원-특이 T-헬퍼 면역 반응이 IL-12N220L DNA 면역에 의해 Th1-편향된 타입으로 전환된다는 것을 나타낸다.

### <실시예 4> IL-12N220L DNA 또는 Ag85A DNA 백신의 치료 효과

#### <4-1> 화학요법과 병행된 IL-12N220L DNA 또는 Ag85A DNA 백신의 결핵 치료 효과

본 발명자들은 화학요법과 병행된 IL-12N220L DNA 또는 Ag85A DNA 백신의 결핵 치료 효과를 박테리아 계수를 통해 알아보았다. 박테리아 계수는 결핵균 감염 30주째 즉, 3달 동안 INH 및 PZA로 처리가 완료된 후 14주째에 생쥐의 조직으로부터 결정하였다(도 4의 A 및 도 4의 B).



그 결과, DNA 면역 없이 INH 및 PZA로 처리한 생쥐는 폐 및 비장(각각 80% 및 100%)에서 가장 높은 박테리아의 재활동을 보였다. 특이할 만한 것은 대조 DNA(pGX10)로 처리한 5마리 생쥐의 폐 및 비장 중에서 3마리 생쥐(60%)에서만 생존 M. 투베르클로시스가 발견되었는데, 이는 DNA 벡터에서 CpG 모티프가 Th1 면역 반응을 유도하여 M. 투베르클로시스 재활동의 저해 역할을 한다는 것을 나타낸다.

또한, 3달 동안 INH 및 PZA의 병용 치료에서 IL-12N220L DNA 컨스트럭트로 처리된 생쥐의 경우, 5마리 생쥐 중에서 각각 1마리(20%) 및 2마리 생쥐(40%)의 폐 및 비장에서 M. 투베르클로시스가 발견되어(도 4의 A 및 도 4의 B, 표 1) IL-12N220L DNA의 동시 주입이 Th1 면역 반응을 유도하는데 효과적인 것으로 나타났다(Ha SJ *et al.*, *Nat Biotechnol.* 2002, **20**: 381-386). 따라서, IL-12N220L 주입에 의하여 M. 투베르클로시스 항원에 대한 면역 세포를 효과적으로 기폭시키고 또한 Th1 반응으로 전환시킴으로써 잠복 감염 모델에서 M. 투베르클로시스의 재활동을 감소시키는 것이 가능하다는 것을 알 수 있다.

또한, Ag85A DNA 백신으로 처리한 5마리 생쥐 모두의 폐에서는 생존 M. 투베르클로시스가 발견되지 않았고, 5마리 생쥐 중 1마리 생쥐(20%)의 비장에서만 상기 결핵균이 발견되었다(도 4의 A 및 도 4의 B, 표 1). 이와 같은 결과는 INH 및 PZA의 병용 화학요법에서 IL-12N220L 또는 Ag85A를 발현하는 DNA 백신은 결핵의 잠복 감염 모델에서 활성이 없는 M. 투베르클로시스의 재활동을 억제하는 유전적 어쥬번트(adjuvant)로 사용될 수 있다는 것을 나타낸다.

#### <4-2> 화학요법과 병행시 DNA 백신의 결핵 치료 효과의 유지

잠복 감염 모델에서 M. 투베르클로시스의 재활동에 DNA 백신이 미치는 지속적인 영향을 관찰하기 위하여, 결핵균 감염 후 42주째 즉, 3달 동안 INH 및 PZA로 처리가 완료된 후 26주째에 생쥐의 폐와 비장에서 각각 박테리아를 계수하였다.

그 결과, INH 및 PZA로만 처리한 5마리의 대조군 생쥐중에서 각각 4마리(80%) 및 3마리 생쥐(60%)의 폐 및 비장에서 M. 투베르클로시스가 발견되었고, 대조 DNA가 처리된 생쥐는 폐 및 비장에서 60%의 재활동율을 나타내었다. 반면, IL-12N220L DNA로 처리한 5마리 생쥐 중에서 2마리 생쥐(40%)의 폐 및 비장에서 생존 M. 투베르클로시스가 발견되었다(표 1). 상기 결과는 이전에 보고된 바와 같이 방어 면역반응에서 IL-12N220L DNA가 지속적인 효과를 나타낸다는 것을 의미한다(Ha SJ *et al.* *Nat Biotechnol* 2002; **20**: 381-386).

또한, 감염 후 30주에서 보여진 바와 같이 Ag85A DNA 백신으로 처리된 생쥐는 5 생쥐 중에서 1 생쥐(20%)의 폐 및 비장에서만 M. 투베르클로시스의 재활동율을 보였다(도 4의 C, 도 4의 D 및 표 1). 상기 결과로부터, IL-12N220L DNA 백신( $p < 0.05$ , Chi-square 테스트) 및 Ag85A DNA 백신( $p < 0.01$ , Chi-square 테스트)으로 처리한 생쥐의 폐에서 잠복 M. 투베르클로시스의 재활동율이 상당히 감소함을 알 수 있다. Ag85A DNA로 처리된 생쥐는 비장에서 상당한 수준의 면역 방어를 주는 반면 ( $p < 0.05$ , Chi-square 테스트), IL-12N220L DNA로 처리된 생쥐에서의 방어 수준은 통계학적으로 의미가 있지 않았다. 폐 및 비장에서의 재활동율은 Ag85A-특이 IFN- $\gamma$  유도 수준과 역관계가 있는 것으로 나타났지만, CF-특이 IFN- $\gamma$  수준과는 관련이 있지 않았다. 이는 Ag85A-특이 Th1 면역성이 치료 백신에서 잠재 M. 투베르클로시스의 방어에 더 중요한 역할을 할 것이라는 것을 나타낸다.

#### 발명의 효과

상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 헤르페스 심플렉스 바이러스 타입 I 당단백질 D(gD)의 신호 서열 및 Ag85A 유전자를 포함하는 결핵 DNA 백신은 결핵 치료에 필수적인 것으로 알려진 체액성 면역 반응 유도하고, 지속적인 면역반응 유도로 결핵 재발 가능성을 감소시킬 뿐만 아니라, 기존의 화학요법과 병용시에 치료기간을 단축시킬 가능성을 가지며 또한 이로 인한 비용 절감의 효과를 얻을 수 있으므로, 결핵의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

#### (57) 청구의 범위

##### 청구항 1.

삭제

##### 청구항 2.

삭제

### 청구항 3.

삭제

### 청구항 4.

삭제

### 청구항 5.

헤르페스 심플렉스 바이러스 타입 I 당단백질 D(gD)의 신호 서열 및 Ag85A 유전자를 포함하는 결핵 DNA 백신 및 결핵 치료제를 유효성분으로 함유하는 결핵 치료용 약학적 조성물.

### 청구항 6.

제 5항에 있어서, 헤르페스 심플렉스 바이러스 타입 I 당단백질 D(gD)의 신호 서열은 서열번호 1로 기재되는 것을 특징으로 하는 조성물.

### 청구항 7.

제 5항에 있어서, Ag85A 유전자는 서열번호 2로 기재되는 것을 특징으로 하는 조성물.

### 청구항 8.

제 5항에 있어서, 상기 결핵 DNA 백신은 서열번호 1로 기재되는 헤르페스 심플렉스 바이러스 타입 I 당단백질 D(gD)의 신호 서열 및 서열번호 2로 기재되는 Ag85A 유전자가 pGX10 벡터에 삽입된 pGX10-Ag85A(수탁번호; KCTC 10418BP)인 것을 특징으로 조성물.

### 청구항 9.

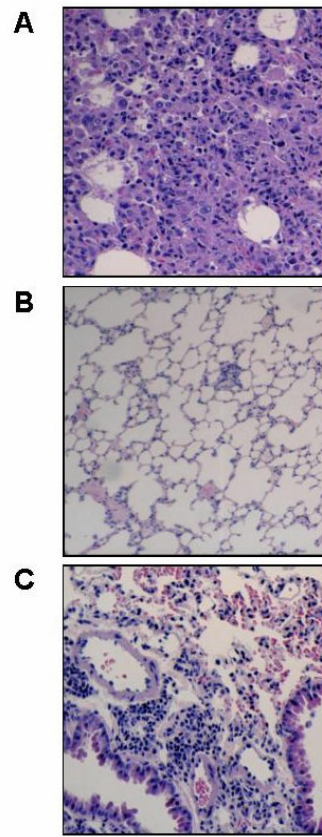
제 5항에 있어서, 상기 결핵치료제는 이소니아지드(INH), 피라진아미드(PZA), 리파핀(rifampin), 스트렙토마이신(streptomycin) 및 에탐부톨(ethambutol)로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

### 청구항 10.

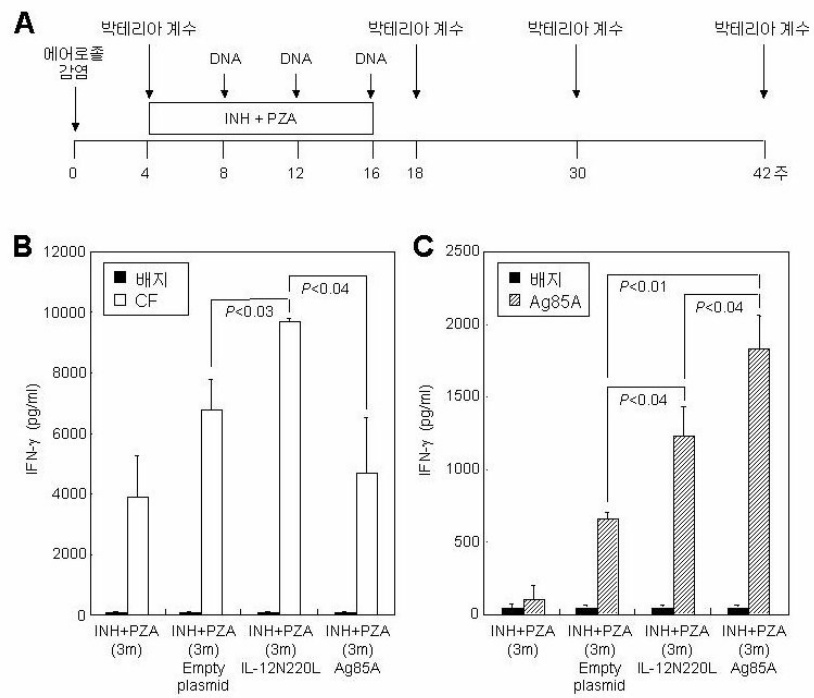
제 5항에 있어서, 상기 결핵치료제는 이소니아지드 또는 피라진아미드인 것을 특징으로 하는 조성물.

도면

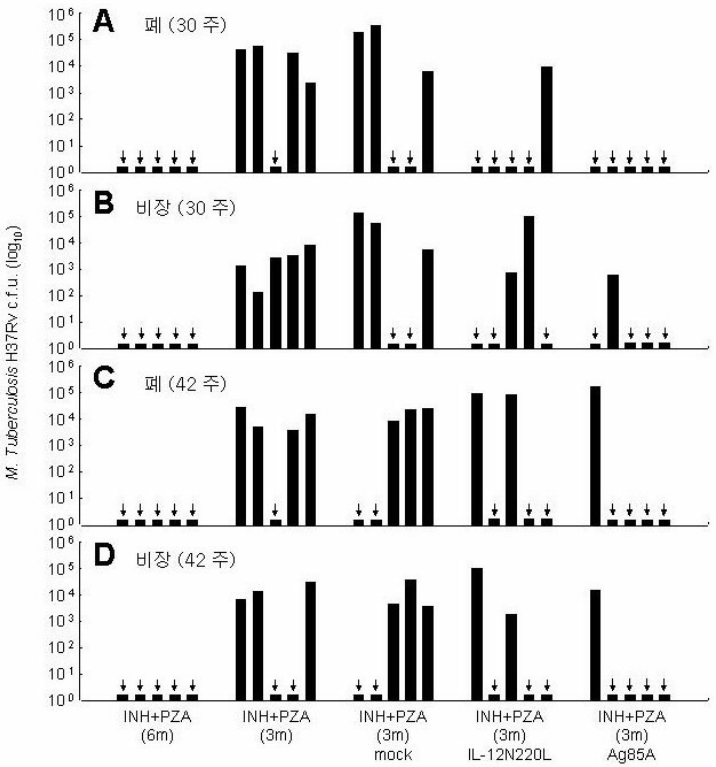
도면1



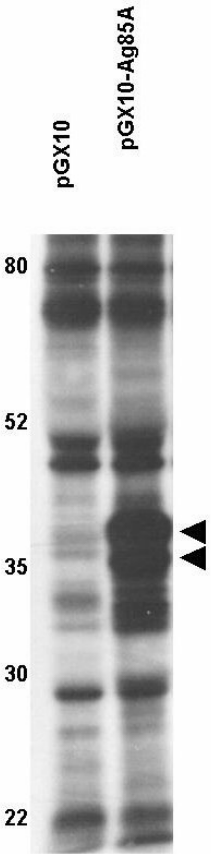
도면2



도면3



도면4



YONSEI UNIVERSITY MEDICAL CENTER

<120> Therapeutic DNA vaccine for tuberculosis and pharmaceutical composition containing the same

<130> 2p-11-29B

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 60

<212> DNA

<213> herpes simplex virus 7

<400> 1

atgagggggg ctgccgccag gttggggggc gtgattttgt ttgtcgtcat agtgggcctc 60

<210> 2

<211> 1017

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atgcagcttg ttgacagggt tcgtggcgcc gtcacgggta tgctcgctcg actcgtggtc 60

ggggccgtcg gcgcggccct agtgctgggt ctggtcggcg ccgtcgggtg cacggcgacc 120

gcgggggcat tttcccgcc gggcttgccg gtggagtacc tgcagggtgc gtcgccgtcg 180

atgggccgtg acatcaaggt ccaattccaa agtgggtgtg ccaactcgcc cgccctgtac 240

ctgctcgacg gcctgcgcgc gcaggacgac ttcagcggct gggacatcaa caccgccgcg 300

ttcgagtggg acgaccagtc gggcctgtcg gtggatcatgc cgggtgggtgg ccagtcaagc 360

ttctactccg actggtacca gcccgcctgc ggcaaggccg gttgccagac ttacaagtgg 420

gagaccttcc tgaccagcga gctgccgggg tggtgcagg ccaacaggca cgtcaagccc 480

accggaagcg ccgtcgtcgg tctttcgatg gctgcttctt cggcgctgac gctggcgatc 540

tatcaccccc agcagttcgt ctacgcggga gcgatgtcgg gcctgttgga cccctcccag 600

gcgatgggtc ccaccctgat cggcctggcg atgggtgacg ctggcgggta caaggcctcc 660

gacatgtggg gcccgaagga ggaccggcg tggcagcgca acgaccgct gttgaacgtc 720

gggaagctga tcgccaacaa caccgcgctc tgggtgtact gcggcaacgg caagccgtcg 780

gatctgggtg gcaacaacct gccggccaag ttctctgagg gcttcgtgcg gaccagcaac 840

atcaagttcc aagacgccta caacgccggg ggcgggcaca acggcgtgtt cgacttcccg 900

gacagcggta cgcacagctg ggagtactgg ggcgcgcagc tcaacgctat gaagcccagc 960

ctgcaacggg cactgggtgc cacgccccaa accggggccc cgccccaggg cgcctag 1017