



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년07월07일
(11) 등록번호 10-1754756
(24) 등록일자 2017년06월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/12 (2006.01) A61K 39/285 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) C12N 15/86 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0140964
(22) 출원일자 2014년10월17일
심사청구일자 2014년10월17일
(65) 공개번호 10-2016-0045435
(43) 공개일자 2016년04월27일
(56) 선행기술조사문헌
PNAS, Vol 107, Pages 18091-18096(2010)*
W02010031837 A1*
GenBank: CP008854.1(2014.09.03.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
대한민국
(72) 발명자
이기은
서울특별시 서초구 태봉로2길 10, 701동 1103호(우면동, 서초네이처힐7단지)
전정훈
대전광역시 서구 둔산남로 127 목련아파트 305동 503호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 다해

전체 청구항 수 : 총 13 항

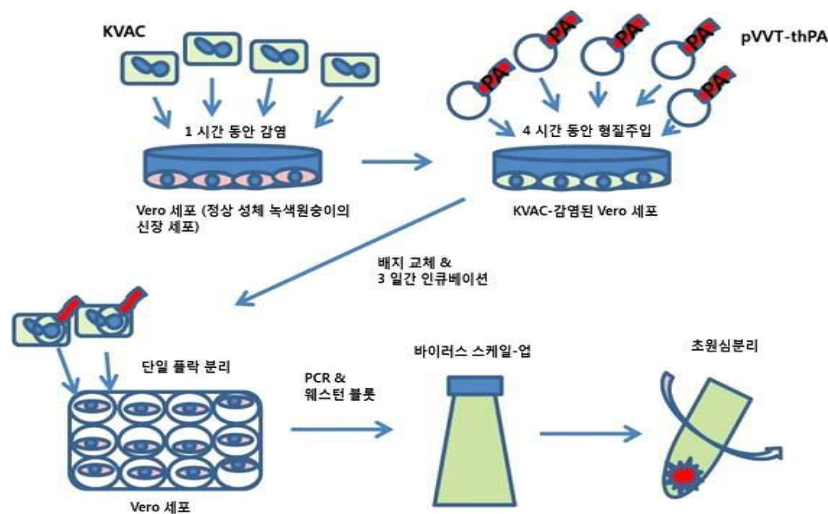
심사관 : 김영수

(54) 발명의 명칭 **제조합 백시니아바이러스를 이용한 탄저/두창 2가 백신후보주**

(57) 요약

백시니아 바이러스를 이용한 탄저 및 두창 백신 조성물, 이의 제조 방법 및 이를 이용한 탄저병 및 두창의 예방 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

이가영

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 연제길 4-10, 105호

이상원

서울특별시 동작구 사당로13길 31 두산위브트레지움아파트 103동 2603호

손호선

대전광역시 유성구 배울2로 42 신동아파밀리에 509호 1402호

여상구

서울특별시 송파구 올림픽로32길 42-11, 301호 (방이동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465014579

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 질병관리본부

연구사업명 감염병관리기술개발연구(구. 질병관리연구지원)

연구과제명 백시니아 바이러스를 이용한 탄저/두창 2가 백신개발

기 여 율 1/1

주관기관 질병관리본부

연구기간 2013.01.01 ~ 2015.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

탄저균 방어항원 유전자를 함유하는 KVAC103 유래의 재조합 백시니아 바이러스를 포함하며, 상기 탄저균 방어항원 유전자의 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 1의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인, 백신 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1 항에 있어서,

약학적으로 허용가능한 담체 및 면역보조제 중 하나 이상을 추가 포함하는 것인, 백신 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 백신 조성물에 포함된 재조합 백시니아 바이러스는 생체 내에 주입된 후 생체 내에서 탄저균 방어항원 단백질을 생산하는 것인, 백신 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

생체 내에 주입되어 탄저병 및 두창 중 하나 이상의 질병에 대한 면역을 유도하는 것인, 백신 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 탄저균 방어항원 유전자의 상류 또는 하류에 시그널 펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드를 추가 포함 하는 것인, 백신 조성물.

청구항 7

(a) 탄저균 방어항원 유전자를 전달 벡터에 삽입하고,

(b) 상기 전달 벡터를 백시니아 바이러스 KVAC103에 삽입하는 것

을 포함하는, 탄저균 방어항원 유전자를 함유하며, 상기 탄저균 방어항원 유전자의 서열은 서열목록 1의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 재조합 백시니아 바이러스의 제조 방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 전달 벡터를 백시니아 바이러스에 삽입한 후에, 제조된 재조합 백시니아 바이러스로부터 탄저균 방어항원 단백질의 생성을 확인하는 것을 추가 포함하는 재조합 백시니아 바이러스의 제조 방법.

청구항 9

제 7 항에 있어서,

상기 단계 (a)의 상기 전달벡터는 pVVT1-GFP 유래의 전달벡터이며, 상기 pVVT1-GFP 유래의 전달벡터는 도 1a에 기재된 개열지도를 갖는 벡터인 pVVT1-GFP-C7L, 도 1b에 기재된 개열지도를 갖는 벡터인 pVVT1-GFP-K1L 또는 도

1c에 기재된 개열지도를 갖는 벡터인 pVVT1-GFP-K1L-C7L인, 재조합 백시니아 바이러스의 제조 방법.

청구항 10

삭제

청구항 11

제 7 항에 있어서,

상기 탄저균 방어항원 유전자의 상류 또는 하류에 시그널 펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드를 추가 포함하는, 재조합 백시니아 바이러스의 제조 방법.

청구항 12

제 7 항 내지 제 9항 및 제 11 항 중 어느 한 항의 방법에 의하여 제조된, 재조합 백시니아 바이러스.

청구항 13

제 1 항, 제 3항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 따른 백신 조성물을 인간을 제외한 동물에 투여하는 것을 포함하는, 탄저병 또는 두창의 예방 방법.

청구항 14

제 13 항에 있어서,

상기 투여는 근육주사, 피하주사, 또는 복강주사를 통한 투여인 것인, 방법.

청구항 15

제 13 항에 있어서,

상기 백신 조성물이 2 회 이상 투여되는 것인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본원은 백시니아 바이러스를 이용한 탄저 및 두창 백신 조성물, 이의 제조 방법 및 이를 이용한 탄저병 및 두창의 예방 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 탄저병은 그람양성의 포자 형성균인 탄저균(*Bacillus anthracis*)에 의해 발병되는 인수공통 전염병이다. 탄저병은 피부탄저, 호흡기탄저, 장탄저로 구분되며, 피부탄저는 치료시 사망자는 거의 없지만, 치료하지 않을 경우 사망률은 24% 정도이다. 호흡기 탄저는 호흡기를 통하여 포자를 흡입할 경우 발생하며, 치료를 하더라도 75% 이상의 치사율을 보이며, 치료하지 않을 경우 100%의 치사율을 보인다. 장탄저는 드물게 발생하며, 오염된 고기를 섭취할 경우 발생되며, 치료하지 않을 경우 25-60%의 치사율을 보인다. 이와 같이 탄저는 높은 치사율과 포자를 형성하는 특성으로 생물학적 테러나, 실제 전투 상황에서 생물무기로 사용될 가능성이 매우 높은 병원체 중 하나이다. 탄저균의 병원성은 탄저균이 생산하는 외독소와 협막에 기인하며 이들은 각각 pX01과 pX02라는 플라스미드에 그 유전자가 암호화되어 있다. 탄저균이 생산하는 외독소는 3종류의 단백질, 즉 보호 항원(PA), 부종 인자(EF), 치사 인자(LF)로 이루어지며 이들은 각각 독립적으로는 세포 독성이 없으나 PA와 LF가 결합하면 치사 독소를 형성하여 마우스 등에 치사작용을, 그리고 PA와 EF가 결합하면 부종 독소로 작용하는 것으로 알려져 있다. 이들 독소유전자의 염기서열 분석이 완료됨에 따라 이들 유전자의 조절기전, 기능 등에 관한 연구가 활발하게 이루어졌으며, 이를 통하여 PA성분이 탄저 감염에 있어 강력한 방어효과를 유발하는 항원성분인 것으로 확인되었다. 현재 인간을 대상으로 사용되는 탄저백신의 경우, 방어항원 (PA)을 주성분으로 한 무세포 성분백신으로 미국과 영국에서 각각 개발되어 사용되고 있고 생균 백신의 경우 중국과 구소련에서 생산되고 있다. 미국, 영국, 구소련과 중국에서 사용되는 탄저백신의 경우 사용범위가 매우 제한적이며 대부분의 경우 탄저균인

Bacillus anthracis 균을 직접 이용하여 배양하고 배양액으로 분리되는 항원을 분리정제하거나 세포 멸균과정을 거쳐 백신을 제조하고 있다.

[0003] 탄저백신으로서 1881년 루이스 파스테르가 개발한 가축용 약독화 생백신과 1954년 여과한 무세포배양액을 사람용 백신으로 사용하고 있다. 최초의 사람용 탄저 백신은 러시아, 미국, 영국에서 개발되었고 이후 중국과 이스라엘에서도 개발되었다. 이 백신은 약독화한 탄저 포자를 이용한 생백신 또는 탄저의 pX02 플라스미드가 결여된 변이주의 배양액을 정제하여 사용한 성분 백신으로 그 유효성은 높았으나 미량의 부종인자와 치사인자 섞여 있어 부작용을 나타내고 있다. 현재 판매되고 있는 탄저 백신은 1970년대 미국에서 승인 받은 AVA 백신 (Anthrax Vaccine Absorbed)으로 pX02 플라스미드가 없어 치사인자, 부종인자, 방어항원은 발현한다. 협막을 생성하지 않는 비병원성 탄저균인 B. anthracis V770-NR-R의 배양액을 정제하여 제조되며, 그 주성분은 방어항원이지만 정제 과정에서 치사인자와 부종인자가 미량 포함되는 것으로 알려져 있다. 현재의 백신은 3회 이상의 연속적인 접종이 필요하며, 면역력을 유지하기 위해서는 매년 재접종을 필요로 한다. 통증이나 부종 등을 수반하는 부작용의 우려가 있으며, 모든 병원성 탄저균에 대해서 동일한 방어력을 나타내지는 않는 것으로 알려져 있다. 우리나라에서도 1997년 탄저백신에 관한 연구를 시작하여 1998년 백신후보 물질과 생산균주를 자체개발하였으며, 2002년부터 학술용역사업을 통해 민간기업과 공동으로 생산공정 개발 및 비임상시험 등 제품화연구를 수행하였고 현재 임상2상 시험이 진행 중이다. 대한민국 특허등록공보 제0974485호 등에서 탄저병의 치료제, 조성물 및 그의 관련 방법에 대해 개시하고 있으나, 접종횟수가 감소되고 생산 공정이 단순화된 탄저병 2가 백신의 개발이 추가적으로 요구되고 있는 실정이다.

[0004] 백시니아 바이러스의 게놈상에 외래 유전자를 삽입하고 세포에 감염시키면 외래 유전자를 과발현하여 유전자를 전달할 수 있기 때문에 유전자 전달 벡터로 이용된다. 최근에는 외래항원을 삽입한 재조합 백시니아 바이러스가 백신 개발 전달체로 각광받고 있다.

[0005] 본 발명에 사용된 백시니아 바이러스 KVAC103 (기탁번호 KCCM11574P)가 사용되었다. 이 바이러스는 천연두 예방백신으로 사용되는 Lister 주를 Vero 세포에서 100회 이상 계대하여 얻은 약독화 바이러스로 배양세포에서 작은 플라크를 형성하며, 동물모델에 적용하였을때 독성이 적으면서도 효과가 우수하였다. 전체 게놈의 염기서열 분석결과 약독화 과정에서 두곳에서 약19.5kb, 2.5kb의 삭제영역을 가지고 있어서 숙주영역유전자인 C7L 및 K1L 유전자가 삭제되어 있다. 이들 숙주영역유전자가 결손된 KVAC103 바이러스는 모바이러스인 Lister주에 비해 증식가능한 숙주세포가 적어서 제한된 숙주영역을 가진다.

[0006] 대한민국특허 (출원번호 10-2014-0140151)의 선행연구에서는 외래 유전자 GFP를 가진 플라스미드 전달벡터에 결손된 숙주영역유전자 C7L 또는 K1L을 삽입하여 KVAC103 유래의 재조합 백시니아를 쉽게 만들수 있는 방법이 제시되었다. 약독화된 백시니아 바이러스 KVAC103을 감염시킨 Vero 세포에 상기 플라스미드 전달벡터를 transfection 하여 손쉽게 재조합 백시니아 바이러스 주를 제작할수 있었다. 그리고 결손된 유전자중 일부의 숙주영역유전자를 복원함으로써 재조합 바이러스의 증식 및 복제 능력이 향상되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본원은 탄저균의 주요 단백질 중 하나인 방어항원 (protective antigen)을 주성분으로 한 유전자 재조합 백신으로서, 기존 약독화 탄저백신의 부작용 등 문제점을 해결한 2세대 백신 조성물, 이의 제조 방법 및 이를 이용한 탄저병 및 두창의 예방 방법을 제공하고자 한다.

[0008] 그러나, 본원이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 기술한 과제로 제한되지 않으며, 기술되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본원의 제 1 측면은, 탄저균 방어항원 유전자를 함유하는 재조합 백시니아 바이러스를 포함하는 백신 조성물을 제공한다.

[0010] 본원의 제 2 측면은, (a) 탄저균 방어항원 유전자를 전달 벡터에 삽입하고, (b) 상기 전달 벡터를 백시니아 바이러스에 삽입하는 것을 포함하는, 탄저균 방어항원 유전자를 함유하는 재조합 백시니아 바이러스의 제조 방법을 제공한다.

- [0011] 본원의 제 3 측면은, 본원의 제 2 측면의 방법에 의하여 제조된 재조합 백시니아 바이러스를 제공한다.
- [0012] 본원의 제 4 측면은, 본원의 제 1 측면의 백신 조성물을 인간을 제외한 동물에 투여하는 것을 포함하는, 탄저병 또는 두창의 예방 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0013] 탄저병은 포자-형성 박테리아인 탄저균(*Bacillus anthracis*)에 의해 유발되며, 생화학 무기로서도 사용되어 온 바 있다. 탄저병에 대한 최근의 백신들도 효과적이거나, 이들은 오랜 기간 동안 연속 면역이 요구되며 종종 부작용을 유발하기도 한다. 따라서, 높은 치사율을 가지는 탄저병에 대한 향상된 백신의 개발이 최우선적으로 요구된다. 특히, 백신은 효능의 극대화와 부작용의 최소화를 위한 노력이 필요하며, 또한 접종방법과 접종횟수도 고려되어야 한다. 본원에서는 백시니아 바이러스를 이용한 탄저/두창 2가 백신을 개발하여 접종횟수 감소 및 생산 공정의 단순화를 통해 국가 생물테러 대비 물자비축 비용의 절감에 기여하고자 한다.

도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1a 내지 도 1c는 본원의 일 실시예에 따라 제조된 방어항원 유전자를 포함하는 벡터의 구조를 나타내는 개략도이다.
- 도 2는 본원의 일 구현예에 따른 재조합 백시니아 바이러스 제조 과정을 나타내는 개략도이다.
- 도 3은 본원의 일 실시예에 따라 제조된 방어항원 유전자를 포함하는 벡터의 구조를 나타내는 개략도이다.
- 도 4는 본원의 일 실시예에 따른 백신 조성물을 Vero 세포에 감염시킨 후 생성된 플락의 형광현미경 이미지이다.
- 도 5는 본원의 일 실시예에 따른 백신 조성물을 Vero 세포에 감염시킨 후 그 배양액을 PCR 분석한 결과이다.
- 도 6은 본원의 일 실시예에 따른 백신 조성물을 Vero 세포에 감염시킨 후 세포 용해물 및 그 배양액을 웨스턴 블롯 분석한 결과이다.
- 도 7은 본원의 일 실시예에 따른 백신 조성물을 마우스에 투여하여 역가를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 8은 본원의 일 실시예에 따른 백신 조성물을 이용하여 면역화한 마우스에 대한 탄저균 포자 공격 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 9는 본원의 일 실시예에 따른 백신 조성물을 이용하여 면역화한 마우스의 세포매개성 면역도를 조사한 그래프이다.
- 도 10은 본원의 일 실시예에 따른 백신 조성물을 이용하여 면역화한 마우스의 혈청을 이용하여 백시니아 바이러스에 대한 중화항체가를 측정한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 이하, 첨부한 도면을 참조하여 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본원의 구현예 및 실시예를 상세히 설명한다.
- [0016] 그러나 본원은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 구현예 및 실시예에 한정되지 않는다. 그리고 도면에서 본 발명을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.
- [0017] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 "포함" 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0018] 본원 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 "약", "실질적으로" 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용 오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로 사용되고, 본원의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대적인 수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위해 사용된다. 본원 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 "~(하는) 단계" 또는 "~의 단계"는 "~를 위한 단계"를 의미하지

않는다.

- [0019] 본원 명세서 전체에서, 마쿠시 형식의 표현에 포함된 "이들의 조합"의 용어는 마쿠시 형식의 표현에 기재된 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 혼합 또는 조합을 의미하는 것으로서, 상기 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 의미한다.
- [0020] 본원 명세서 전체에서, "백터"라는 용어는 백터가 복제될 수 있는 세포 속으로 도입시키기 위한 외인성 뉴클레오타이드 서열을 삽입시킬 수 있는 운반체 핵산 분자를 말하는데 사용된다. 뉴클레오타이드 서열은 "외인성"일 수 있고, 이는 백터를 도입시키는 세포에 대해 외부의 것이라는 의미이거나, 서열이 세포 내의 서열에 대해 상동이지만 서열이 통상적으로 발견되지 않는 숙주 세포 내의 위치에 핵산이 위치하는 것을 의미한다. 백터에는 플라스미드, 코스미드, 바이러스 (박테리오파지, 동물 바이러스 및 식물 바이러스) 및 인공 염색체 (예: YAC)가 포함될 수 있다.
- [0021] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본원의 구현에 및 실시예를 상세히 설명한다. 그러나, 본원이 이러한 구현에 및 실시예와 도면에 제한되지 않을 수 있다.
- [0022] 백시니아 바이러스는 약 190Kbp의 선형 이분체 DNA 유전체를 가지며 약 250 개의 유전자를 암호화하는 복합적 거대 외피 바이러스이다. 백시니아 바이러스는 천연두(두창)용 백신으로서의 역할 때문에 널리 알려져 있다. 천연두의 박멸 후, 유전자 치료 및 유전자 조작 등을 위하여 과학자들은 유전자를 생물학적 조직으로 전달하기 위한 도구로서의 백시니아 바이러스의 용도를 연구해 왔다. 백시니아 바이러스는 숙주 세포의 세포질 내에서만 복제하는 독특한 특성을 가지고 있다. 복제 동안에, 백시니아 바이러스의 외막은 세포 내 성숙한 비리온(IMV), 세포내 외피 비리온(IEV), 세포 관련 외피 비리온(CEV) 및 세포의 외피 비리온(EEV)과 같은 상이한 다양한 감염성 형태를 생성한다.
- [0023] IMV는 가장 풍부한 감염성 형태이고 숙주간 확산에 관여하는 것으로 사료된다. 한편, CEV는 세포 대 세포 확산에서 역할을 하는 것으로 사료되고 EEV는 숙주 유기체 내에서 오랜 범위의 파종을 위해 중요한 것으로 사료된다.
- [0024] 백시니아 바이러스는 우두를 유발하는 바이러스와 밀접하게 관련되어 있다. 백시니아의 정확한 기원은 알려져 있지 않지만 대부분의 공통된 견해는 백시니아 바이러스, 우두 바이러스 및 바리올라 바이러스(천연두의 발병제)가 모두 공통된 선조 바이러스로부터 유래되었다는 것이다. 백시니아 바이러스 감염은 경증이고 통상적으로 건강한 개체에서는 증상이 없지만 때때로 약한 발진 및 열을 유발할 수 있고 치사율은 매우 낮다. 백시니아 바이러스 감염에 대해 생성된 면역 반응은 사람을 치명적인 천연두 감염으로부터 보호한다. 이러한 이유 때문에, 백시니아 바이러스는 천연두에 대한 생바이러스 백신으로서 사용되어 온 바 있다.
- [0025] 본원의 제 1 측면은, 탄저균 방어항원 유전자를 함유하는 재조합 백시니아 바이러스를 포함하는 백신 조성물을 제공할 수 있다. 예를 들어, 상기 백시니아 바이러스는 KVAC103 바이러스를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있으며, 당업계에 알려진 모든 백시니아 바이러스 중 중에서 선택될 수 있다.
- [0026] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 탄저균 방어항원 유전자의 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 1의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 예를 들어, 상기 탄저균 방어항원 유전자는 당업계에 알려진 모든 탄저균 방어항원 유전자 중에서 선택될 수 있다.
- [0027] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 백신 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체 및 면역보조제 중 하나 이상을 추가 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0028] 예를 들어, 상기 면역보조제는 수산화알루미늄을 포함하는 것일 수 있으며, 알하이드로겔(alhydrogel)을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0029] 예를 들어, 상기 담체는 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및/또는 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이의 적당한 혼합물 및/또는 식물성 오일을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅의 사용, 분산액의 경우에 요구되는 입자 크기의 유지, 및 계면활성제의 사용에 의해 적당한 유동성을 유지시킬 수 있다. 미생물 작용의 방지는 다양한 항세균제 및 항진

균제, 예를 들면, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산, 티메로살 등에 의해 달성될 수 있다. 많은 경우에, 등장제, 예를 들면, 당 또는 염화나트륨을 포함시키는 것이 바람직할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

- [0030] 예를 들어, 상기 담체에는 임의의 그리고 모든 용매, 분산 매질, 비히클, 제피, 희석제, 항세균제, 항진균제, 등장화제, 흡수 지연제, 완충제, 담체 용액, 현탁액, 및/또는 콜로이드 등이 포함될 수 있다. 약제학적 활성 물질에 대한 이러한 매질 및 약제의 사용은 당업계에 익히 공지되어 있다.
- [0031] "약학적으로 허용가능한" 담체 및/또는 면역보조제는 사람 또는 동물에게 투여하는 경우 알레르기 또는 유사한 부적당한 반응을 일으키지 않는 것을 의미하나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 활성 성분으로서 단백질을 함유하는 수성 조성물의 제조는 당업계에 널리 알려진 바 있다. 통상적으로, 이러한 조성물은 액체 용액 또는 현탁액으로서, 주사가능물질로서 제조될 수 있으며, 액체 중의 용액 또는 현탁액에 대해 적당한 주사 전의 고체 형태를 제조할 수도 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0032] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 백신 조성물에 포함된 재조합 백시니아 바이러스는 생체 내에 주입된 후 생체 내에서 탄저균 방어항원 단백질을 생산하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 예를 들어, 상기 백신 조성물에 포함된 재조합 백시니아 바이러스는 생체 내에 주입된 후 생체 내에서 탄저균 방어항원 단백질을 생산하여 세포 밖으로 분비하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 예를 들어, 상기 방어항원 단백질은 세포 내에서 생산된 후 시그널 펩타이드에 의하여 세포 바깥으로 이송되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 예를 들어, 상기 탄저균 방어항원 단백질에 의하여 생체의 면역반응이 유도되는 것일 수 있으며, 상기 면역반응에 의하여 생체 내에 탄저균에 대한 항체가 생성되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0033] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 백신 조성물은 생체 내에 주입되어 탄저병 및 두창 중 하나 이상의 질병에 대한 면역을 유도하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0034] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 백신 조성물은 상기 탄저균 방어항원 유전자의 상류 또는 하류에 시그널 펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드를 추가 포함 하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 예를 들어, 상기 시그널 펩타이드는 세포 내에서 생산된 단백질을 세포 외로 이송시키는 역할을 하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0035] 본원의 제 2 측면은, (a) 탄저균 방어항원 유전자를 전달 벡터에 삽입하고, (b) 상기 전달 벡터를 백시니아 바이러스에 삽입하는 것을 포함하는, 탄저균 방어항원 유전자를 함유하는 재조합 백시니아 바이러스의 제조 방법을 제공할 수 있다.
- [0036] 상기 탄저균 방어항원 유전자를 상기 전달 벡터에 삽입하는 것은, 당업계에 알려진 모든 유전자 재조합 방법 중에서 선택되는 방법에 의해 수행되는 것일 수 있으며, 상기 전달 벡터를 상기 백시니아 바이러스에 삽입하는 것은 당업계에 알려진 모든 형질주입(transfection) 방법 중에서 선택되는 방법에 의해 수행되는 것일 수 있다.
- [0037] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 방법은 상기 전달 벡터를 백시니아 바이러스에 삽입한 후에, 제조된 재조합 백시니아 바이러스로부터 탄저균 방어항원 단백질의 생성을 확인하는 것을 추가 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 예를 들어, 상기 재조합 백시니아 바이러스로부터 탄저균 방어항원 단백질의 생성을 확인하는 것은 당업계에 알려진 모든 단백질 검출 및/또는 검정 방법에 의하여 수행되는 것일 수 있으며, 예를 들어, 면역학적 방법에 의한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 예를 들어, 웨스턴 블롯, 방사성면역검정, ELISA(효소 결합 면역흡착 검정), "샌드위치(sandwich)" 면역검정, 면역침전 검정, 침전 반응, 겔 확산 침전 반응, 면역확산 검정, 응집반응 검정, 보체-고정 검정, 면역방사측정 검정, 형광성 면역검정, 또는 단백질 A 면역검정 등에 의하여 탄저균 방어항원 단백질의 생성을 확인할 수 있으며, 또는 상기 탄저균 방어항원에 연결된 형광 단백질을 이용하여 형광 검출을 이용하여 단백질의 생성을 확인할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0038] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 전달 벡터는 pVVT 벡터를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 상기 전달 벡터는 pVVT-GFP, 예를 들어, pVVT1-GFP-C7L, pVVT1-GFP-K1L, 및/또는 pVVT1-GFP-C7L-K1L를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0039] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 탄저균 방어항원 유전자의 서열은 서열목록 1의 뉴클레오타이드 서열을 포함하

는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

- [0040] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 탄저균 방어항원 유전자의 상류 또는 하류에 시그널 펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드를 추가 포함 하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0041] 본원의 제 3 측면은, 본원의 제 2 측면의 방법에 의하여 제조된, 재조합 백신이나 바이러스를 제공할 수 있다. 본원의 제 1 측면 및 본원의 제 2 측면과 중복되는 부분들에 대해서는 상세한 설명을 생략하였으나, 본원의 제 1 측면 및 제 2 측면에 대해 설명한 내용은 본원의 제 3 측면에서 그 설명이 생략되었더라도 동일하게 적용될 수 있다.
- [0042] 본원의 제 4 측면은, 본원의 제 1 측면의 백신 조성물을 인간을 제외한 동물에 투여하는 것을 포함하는, 탄저병 또는 두창의 예방 방법을 제공할 수 있다. 본원의 제 1 측면 및 본원의 제 2 측면과 중복되는 부분들에 대해서는 상세한 설명을 생략하였으나, 본원의 제 1 측면 및 제 2 측면에 대해 설명한 내용은 본원의 제 4 측면에서 그 설명이 생략되었더라도 동일하게 적용될 수 있다.
- [0043] 예를 들어, 상기 예방 방법은 예방을 위한 치료 방법을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0044] 본원의 백신 조성물은 투여를 위하여 약학적으로 수용할 수 있는 담체 및/또는 면역 보조제를 포함하여 인간 또는 수의학적 용도로 제형화 할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 경구 투여 시, 예를 들어 캡슐제 또는 정제; 분말제 또는 과립제; 용제(solution), 시럽 또는 현탁제(suspension)(수성 또는 비수성 액상물 중; 식용 발포제(edible foam) 또는 휘 제형(whip formulation); 또는 유탁액제(emulsion)) 같은 별개의 단위로서 상기 백신 조성물을 제시할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0045] 예를 들어 비경구(parental) 투여 시, 상기 백신 조성물은 산화방지제, 완충제, 정균제, 및 의도한 수용자의 혈액과 등장액 상태가 되도록 한 용질 등을 포함하는 수성 및 비수성 멸균 주사 용제를 포함할 수 있으며, 수성 및 비수성 멸균 현탁제는 현탁제 및 증점제를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 주사용 용제로 이용하기에 유용한 첨가제는 예를 들어 물, 알코올, 폴리올(polyol), 글리세린 및 식물성 오일 등을 포함하나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 상기 조성물은 단위 용량(1 회분) 또는 다중 용량(수 회분) 용기로 나타낼 수 있다. 예를 들어, 밀봉된 앰플(ampoule) 및 바이알(vial)에 제시될 수 있고, 사용직전에 멸균성 액상 담체, 예를 들면 주사액을 만들시 필요한 물의 첨가만을 필요로 하는 동결건조 조건 하에 저장할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 즉석의 주사 용제 및 현탁제는 멸균 분말제, 과립제 및 정제로부터 제조할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0046] 예를 들어, 시험체에 2×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} , 5×10^{11} , 1×10^{12} , 또는 5×10^{12} 이상의 바이러스 입자 또는 플라크 형성 단위(pfu)가 투여될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 상기 투여는 0.1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 ml 이상의 양으로 투여될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 하나의 측면에서, 상기 용량은 시험체의 혈청 내에서 검출가능한 수준의 탄저병 항체 및/또는 두창 항체를 생성시키기에 충분한 정도의 양일 수 있다.
- [0047] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 투여는 근육주사, 피하주사, 또는 복강주사를 통한 투여인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0048] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 백신 조성물이 약 2 회 이상 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 예를 들어, 상기 백신 조성물은 약 2 회 이상, 약 3 회 이상, 약 4 회 이상, 약 5 회 이상, 약 6 회 이상, 약 7 회 이상, 약 8 회 이상, 약 9 회 이상, 또는 약 10 회 이상 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 예를 들어, 상기 백신 조성물은 약 1 일, 약 2 일, 약 3 일, 약 4 일, 약 5 일, 약 6 일 또는 약 7 일에 걸쳐서, 또는 수 주 또는 수 개월 또는 수 년에 걸쳐서 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0049] 이하, 본원의 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명하며, 본 실시예에 의하여 본원의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0050] [실시예]

[0051] **탄저 방어항원 (PA) 유전자합성**

[0052] 전달 벡터에 삽입될 탄저 방어항원의 참조 유전자 서열을 이용해 Bioneer 사에 의뢰하여 인간 코돈-최적화(human codon-optimization) 하였다. 각각의 유전자 앞부분에는 인간 조직-특이적 활성화자(human tissue-specific activator, tPA)의 시그널 펩타이드를 붙였다. 합성된 유전자들을 pVVT-GFP 벡터에 삽입한 후에 벡터 내 서열을 이용하여 만든 VVK-F와 VVK-R 프라이머를 사용하여 유전자 서열확인을 하였다. thPA의 경우 유전자 가운데 서열에서 프라이머를 작성하여 전체 서열을 확인하였다. 시퀀싱 프라이머 서열은 하기 표 1에 나타나 있다.

[0053] [표 1]

프라이머	서열
VVK-F	5'-TTTGAAGCATTGGAAGCAACT-3'
VVK-R	5'-ACGTTGAAAATGTCCCATCGAGT-3'
hPA-698-S	5'- GAGAAGAAAGGCCTCACCAAA -3'

[0054]

[0055] **탄저 방어항원(PA) 유전자를 함유한 재조합 백시니아 바이러스 제조 및 생산**

[0056] 약독화된 재조합바이러스를 제조하기 위해 pVVT1-GFP-K1L 벡터, pVVT1-GFP-C7L 벡터, 및 pVVT1-GFP-K1L-C7L 벡터에 있는 두 개의 독특한 제한효소 SfiI(A)와 SfiI(B) 사이트를 이용하여 탄저 항원을 방향성 있게 삽입하였다. 합성된 유전자의 양측말단에 SfiI 사이트가 포함하여, SfiI 절단된 각 벡터에 라이게이션하여 방향성 있게 삽입하였다. VVK-F와 VVK-R 프라이머를 이용하여 시퀀싱 분석하여 삽입된 유전자에 변이가 없음을 확인하여 총 4 종의 벡터를 제작하였다. 제작된 벡터들의 구조는 도 1a 내지 도 1c에 나타나 있다.

[0057] **재조합 백시니아 바이러스의 제조**

[0058] 12 웰(well) 플레이트에 있는 Vero 세포에 백시니아 바이러스인 KVAC103 바이러스 0.01 MOI로 감염시키고 37℃에 두었다. 한 시간 후 4 종의 전달벡터 플라스미드를 형질주입(transfection)하여 37℃에서 4 시간동안 보관하였다. 각각의 전달벡터 플라스미드와 약독화 백시니아 바이러스 KVAC103을 상동재조합 방법으로 Vero 세포에서 결합하였다. 세포 배양액을 바꿔주고 3 일동안 37℃에서 바이러스가 성장하도록 하였다. 4 종의 바이러스가 감염된 웰에서 플라크(plaque)이 형성된 것을 확인하고, PCR과 웨스턴 블롯으로 탄저 방어항원의 발현을 확인하였다. 본 실시예의 재조합 백시니아 바이러스 제조 과정의 개략도는 도 2에 나타나 있다.

[0059] **재조합 백신주의 대량 생산**

[0060] 4 종의 재조합 백시니아 바이러스가 감염된 Vero 세포에서 하나의 플라크를 획득하여 다시 단일 플라크 분리(single plaque isolation)를 실시하였다. 각 재조합 백시니아 바이러스 당 6 개 플라크를 따서 12 웰 플레이트의 Vero 세포에 감염시켰다. 후보주들 중 PCR과 웨스턴 블롯을 통하여 탄저 방어항원이 발현되는 후보주들을 확인하여 항원이 발현되는 바이러스를 선정하여 해당 바이러스를 대량 생산하였다. 후보 백신주를 T175 플라스크에 대량 배양하여 동결과 해동을 3 회 반복하여 세포를 깨고 배양액만을 얻었다. 이후 2,000 rpm에서 10 분 동안 원심분리하여 세포 잔존물을 제거하고, 다시 10,000 g로 90 분 동안 초원심분리(ultra-centrifugation)하여 바이러스 입자를 얻었다. 상층액을 제거하고 남은 바이러스는 PBS에 풀어 -20℃ 혹은 -70℃에서 저온 보관하였다.

[0061] **재조합 방어항원(PA) 항원 확보 및 백신후보물질의 면역원성 분석**

[0062] 1) 재조합 방어항원의 생산

- [0063] 재조합방어항원은 국립보건연구원에서 *Bacillus brevis* system을 이용하여 수행 중인 재조합탄저백신 개발사업에서 정제된 항원을 사용하였다.
- [0064] 2) 균주 및 동물
- [0065] 백신효능 평가를 위해 탄저백신의 공격균주인 탄저균 H9401을 사용하였으며, 면역동물은 5 주령의 Balb/c 마우스를 사용하였다.
- [0066] 3) 공격용 탄저포자 제조
- [0067] 탄저포자의 분리는 Ivins 등(1995)의 방법을 변형하여 사용하였고, 탄저균의 포자유도는 Leighton-Doi 배지(broth)를 사용하여 유도하였다(Leighton 등 1971). 5% 혈액배지에 탄저균을 접종하여 37℃에서 하룻밤 배양한 다음 200ml의 Leighton-Doi 배지에 접종하여 37℃에서 24 시간 진탕 배양하였다. 배양액에 멸균증류수 800 ml을 첨가한 후 37℃에서 40~48 시간 더 진탕 배양한 다음 포자염색을 실시하여 포자의 형성여부를 확인하고, 0.1% 젤라틴-PBS 용액을 사용하여 포자를 분리한 후 60℃의 항온수조에서 45 분간 열처리하였다. 열처리가 완료된 포자 용액은 0.1% 젤라틴-PBS 용액으로 세척한 다음 Renografin-76을 58%가 되도록 혼합한 후 12,000 x g로 100 분간 원심분리하고 상층부의 세포부산물을 제거하고 펠렛을 0.1% 젤라틴-PBS 용액으로 3 회 세척하여 순수한 정제포자를 수득하였다.
- [0068] 4) LD₅₀ 확인
- [0069] Balb/c 마우스에서 탄저포자 LD₅₀ 값 측정을 위해 탄저균 H9401의 탄저포자를 사용하였다. 각 실험군은 Balb/c 마우스 5 수를 한 개의 군으로 하여 총 5 개 군을 구성하여 정제된 포자를 투여용량(log 값) 당 200(2.3), 100(2.0), 50(1.7), 25(1.4), 12.5(1.1)가 되도록 희석한 후 마우스 뒷다리 안쪽 근육에 0.1ml씩 주사하고 14 일간 관찰하였다. LD₅₀의 계산은 Reed-Muench 방법을 이용하였으며 계산하였으며, 2 회 반복 실험한 결과의 평균값으로 표기하였다.
- [0070] 5) 재조합방어항원의 면역
- [0071] 탄저/두창 2가백신 후보주의 면역원성을 확인하기 위해 제작된 4 종의 재조합백시니아 바이러스 중 KVAC-C7L-thPA를 선정하였다. 선정된 백시니아 바이러스를 배양하여 5 x 10⁶ PFU/dose (1 dose = 100μl)로 PBS로 희석하여 순화된 6 주령의 Balb/c 마우스에 면역하였다. 면역경로는 근육주사, 피하주사, 및 복강주사로 하였다. 대조군으로 재조합방어항원백신(방어항원: 2.5 μg, alum-hydrigel: 25 μg)을 4 배 희석하여 사용하였다. 각 실험군은 6 수를 1 개 그룹으로 하여 2 주 간격으로 2 회 면역하였고, 마지막 면역 후 4 주째 탄저포자를 10LD₅₀ (540 포자/마우스)로 근육 주사 하였고, 14 일간 관찰하였다. 면역 역가 측정은 매주 채혈한 혈청으로 anti-PA ELISA titer와 J774A.1 세포에 대한 중화항체가로 확인하였다.
- [0072] **면역역가 분석**
- [0073] 1) 항-PA ELISA
- [0074] 재조합 방어 항원을 1 μg/ml의 농도로 50 mM 카보네이트 버퍼(pH 9.6)에 희석하여 100 μl씩 96 웰 플레이트에 분주하여 4?에서 16 시간 이상 코팅하였다. 코팅된 96 웰 플레이트에서 재조합 방어 항원을 제거하고 1 시간동안 3% BSA가 함유된 PBST에서 블로킹(blocking) 하였다. 그리고 rPA 동물 면역실험에서 매주 두 마리씩 심장 채혈하여 얻은 혈청을 1/100을 희석한 후 1/2씩 단계희석(serial dilution)하여 1/204800까지 희석하였다. 블로킹한 플레이트를 세척하고 희석된 혈청 첨가하여 37℃에서 1 시간 동안 반응시키고, 항-마우스-IgG 페록시다아제 컨쥬게이트 (1:5,000)를 37℃에서 1 시간 동안 반응시켰다. 다시 세척한 후 OPD로 30 분 동안 어두운 상태에서 반응시키고 2 M H2SO4로 반응을 정지시켰다. 발색 반응을 492 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0075] 2) 중화항체가시험
- [0076] 대식구-유사 세포(Macrophage-like cell)인 J774.1 세포를 1 x 10⁶ 세포/ml로 희석하여 96 웰 플레이트에 150 μl씩 분주하여 37℃에서 2 시간 동안 배양하였다. 플레이트 상에 세포가 부착되는 동안 96 웰 플레이트에서 면역된 항혈청을 1:5로 희석한 후 2 배씩 12 단계로 희석하였다. 치사독소(0.5 μg/ml 방어항원 + 0.1 μg/ml)를 70 μl씩 동일한 비율로 희석된 혈청에 혼합하고 37?에서 1 시간 동안 중화시켰다. J774.1 세포의 배양액을 제

거하고 중화된 샘플을 100 μ l 넣고 37℃에서 4 시간 더 배양하였다. MTT 0.5 mg/ml로 배양액에 첨가하여 1 시간 동안 배양 하고 0.5% SDS, 25 mM HCl이 첨가된 90% 이소프로필 알코올을 100 μ l 가하여 암냉소에서 30 분간 흔들어 주었다. 반응이 끝난 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0077] 3) PRNT

[0078] Balb/C 마우스에 접종한 후 일정간격으로 마우스 혈청을 채취하고 PRNT(plaque reduction neutralizing titer)법을 이용하여 약독화 백신주와 원 백신주에 대한 중화항체 역가를 측정하였다. 실험에 사용하는 혈청을 56℃에서 30 분 동안 비동화 시킨 후 중화반응을 위해 사용하고 사용 전까지 냉장 보관하였다. 중화반응을 위해 24 웰 플레이트 FBS를 2% 첨가한 DMEM 배지에서 배양한 BSC-40 (Africa green monkey kidney cells) 세포를 미리 준비하였다. 혈청을 1:4 또는 1:8부터 2 배씩 희석하여 1:128 또는 1:256까지 희석하였다. 희석한 혈청에 30-50 PFU의 약독화 두창바이러스 혹은 원 두창백신주를 섞어 37℃ 5% CO₂ 인큐베이터에서 2 시간 동안 중화 반응 시킨 후 미리 준비한 24 웰 플레이트에 접종하였다. 상기 접종한 바이러스/혈청 중화액을 비운 후 CMC overlay 용액을 웰 당 1 ml씩 채운 후, 37℃ CO₂ 인큐베이터에 넣고 매일 확인하였다. 접종한 플레이트를 37℃ CO₂ 인큐베이터에 넣고 매일 세포변성 여부를 확인하였다. 2 일 후 플라크 충분히 생긴 것을 확인한 후 10% 포르말린으로 고정하였다. 10 분 정도 포르말린 고정을 시킨 후 크리스탈-바이올렛을 사용하여 염색하였다. 충분히 염색이 완료되면 염색액을 제거 한 후 상온에서 플레이트의 뚜껑을 제거한 채로 건조시킨 후 각 웰의 플라크 수를 계산하여 바이러스 중화역가를 계산하였다. 항체역가는 약독화 두창바이러스를 접종한 웰과 비교하여 플라크 숫자를 50%이상 감소시키는 혈청의 희석 배수의 역수를 선택하였다.

[0079] 4) 세포매개성 면역도 조사

[0080] 채혈이 끝난 마우스에 대해 곧바로 비장을 적출한 후 24 웰 플레이트에 웰당 2×10^6 개의 비장세포와 바이러스 0.1 M.O.I로 자극해주고 37℃ CO₂ 배양기에서 하룻밤 동안 배양하였다. 다음날 Golgi stop을 넣은 후 4~6시간 동안 37℃에서 배양한 다음 비장세포 혼합물을 1500 rpm에서 5 분간 원심분리하였다. 남은 비장세포에 FITC가 붙어있는 항-CD4 항체와 APC가 붙어있는 항-CD8 항체를 튜브당 2 μ l씩 넣고 30 분간 4℃에 보관하였다. 이후 1500rpm에 5 분간 원심분리한 후 남은 펠렛을 Cytofix/cytoperm solution에서 부유시켜 4℃에 20 분간 보관하였다. 세척 후 PE가 붙어있는 항-IFN- γ 항체를 넣고 4℃에 1 시간 동안 보관하였다. 세척한 후 세포만 분리하여 FACScan flow cytometer로 판독하였다

[0081] 탄저/두창 2가 백신 후보주 확보

[0082] 제조된 약독화 백신니아 벡터 4 종류에 각각 인간 조직-특이적 활성화자(human tissue-specific activator, tPA)의 시그널 펩타이드가 붙어 있는 인간 코돈-최적화(human codon-optimized) PA항원을 삽입하였다. 인간 코돈 최적화는 Bioneer 사에 의뢰하여 Bacillus brevis의 방어항원 DNA 서열을 분석하여 수행하였다. 변형한 DNA 서열대로 Bioneer 사에 의뢰하여 유전자 합성을 하여 hPA 유전자를 수득하였다. 삽입된 탄저균 방어항원 유전자의 뉴클레오티드 서열은 하기 표 2에 나타나 있다. 합성된 유전자와 pVVT1-GFP 벡터에 SfiI 제한효소를 처리한 후 SfiI(A)와 SfiI(B) 사이트를 이용하여 방향성있게 pVVT1-GFP 벡터에 삽입하였다. 유전자가 삽입된 벡터의 구조도는 도 3에 나타나 있다.

[0083] [표 2]

유전자	서열
탄저 방어항원 (M22589; human codon optimization)	ATGGATGCCATGAAGAGAGGCGCTCTGCTGCGTGTGCTGCTGCTGTGGAGCAGTCTTCGT TTCTCCAGCGAAGTCAAAACAGGAGAACCGTTATTAAACGAATCAGAGTCAAGTTCCC AGGGTTACGGATACTATTTTAGTGATTTGAATTTTCAAGCCCCATGGTGGTGACCG CTCTCAACACAGGGGACTTATCTATTCCTAGTTCTGAGCTGGAAAACATACCATCCGAAA ACCAATATTTTCAGTCTCATTJGGTCAAGGCTTCATCAAAGTGAAGAAGAGTGACGAATA TACCTTTGCTACTTCGCTGATAACCACTAACCAATGTGGTGGACGACCAAGAAAGTGA TTAATAAGGCTAGTAATTTCTAACAAAATAGATTAGAGAAGGGAAGCCTATACCAATAAA AATCCAGTATCAACGAGAAAATCCTACTGAGAAAGGCTTGGACTTCAAGTTGTACTGGA CGATTTCTCAAAATAAAAAGGAAGTGATTAGCTCGAACTTACAGCTCCAGAGCTCAA ACAAAAGTCTTCCAACTCAAGAAAAAAGCGATCCAAGTGTGGACCTACGGTGCCGA CGGTGACAATGACGAATCCCTGACTCATTAGAGGTTGAAGTTAACGGTTGATGTCAAA AATAAAGAACCTTTCTTACCTTGGATTTCTAATATTCATGAGAAGAAAAGGCTCAC CAAAATATAATCCAGCCCTGAAAATGGAGCACGGCTTCTGATCCTTAAGTATTGAG AAGGTTACAGGCCGATTTGATAAGAAATGTTTACCAGAGGCAAGACACCCCTTGTGGC AGCCTATCCGATTGTACACGTGGATATGGAGAAATATTCTCTCAAAAAATGAGACCA ATCAACCGAACAATGATAGTCAAAAGAAATAGTAAATAATACCTCTACAAGTAG GACACACACTAGTGAAGTCCATGGAATGCAGAAAGTGCACGCTCCTCTTGTGACATTG GTGGCGTGTCTCGCAGGTTTATGTAATTCGAATAGCAGCACGGTCCGAATTGACCAAG CCTGTCTCTGGCAGGGGAGAGAACTTGGCTGAAACCATGGTTTAAATACCGCTGACA CAGCAAGATTGAAGCAATATAGATACGTCAATCTGGCAGGCTCCAATCTACAACGT GTTACCCACTACCTGCTGCTAGGAAAAAATCAAACTCGCAACAATTAAGGCTAA GGAAAACCAATTAAGTCAAACTGGCCCAATAATTAATCCCTCTAAGAACTTGGCG CCAATCGCATTAACGCAACAAGATGATTCTAGTTCTACCCCAATTACAATGAATTACAA CCAGTTCTTGTAGCTGAAAAACGAAGAACTGAGACTGATACAGATCAAGTCTATGGG AATATAGCAACTTACAACTCGAAAAATGGCGGGTGAGGGTGGACACAGGCCCAACTG GTCTGAAGTGTTACCGCAGATTCAAGAAACCACTGCCGTATCATCTTAATGGAAGAT TTAAATCTGGTAGAGCGCGGATCGCGCGGTTAATCCTAGTGACCCACTTGAAACCA TAAACCCGACATGACTTTAAAGAGCCCTTAAATCGCATTTGATTCAACGAACCAAT GGCAACTTACAATACCAAGGGAAGACATAACCGAGTTGATTTTAATTTGATCAACA AATCTCTCAAAACATCAAGAACCAATTAGCGGAGTTAAACGTAACATAACACTGT ACTAGAAAAATCAAACTGAATGCAAAATGAATATTTAATTCGGGACAAGCGCTTCA TTATGATAGGAATAACATAGCAGTTGGGGCGGATGAGTCACTAGTGAGGAGGCCATC GGAAGTGATTAATCTCAACAGAGGCTTATTGTTAAACATTGATAAGGATATTAGAAA AATATTACAGTTATATTGTAGAGATTGAAGATCTGAAGGGCTTAAAGAGGTGATAA ACGACAGATCGATATGTTGAATATTCTAGTTTACGCAAGATGGTAAAAATTATAGA TTTCAAAAAATATAATGATAAGTTACCGTTATATAAAGTAATCCCAATTATAAGGTCA ATGTATATGCTGTCACAAGGAGAACACTATTATAATCTAGTGAGAACGGCGATACCTAG TACCAACGGGATCAAGAAAAATTTAATCTTCTAAAAAGGCTATGAGATAGGATGA

[0084]

[0085] 제조합된 4 종의 백신 후보주와 면역보조제를 포함하는 전달 벡터는 Vero 세포에 감염시켜 각각의 플락의 형태를 비교하였고 음성 대조군으로서 GFP 형광 신호가 보이지 않는 플락을 분리하였다. 형광 현미경을 사용하여 수득한 플락의 이미지는 도 4에 나타나 있다.

[0086] PA 항원 혹은 면역보조제의 발현은 웨스턴 블롯과 PCR로 확인하였다. 시그널 펩타이드가 달려 있으므로 배양된 세포의 배양액에서 PA 단백질 발현을 확인하였다. PCR 분석의 결과는 도 5에 나타나 있다.

[0087] PA 항원을 포함하는 제조합 백신니아 바이러스에서 KVAC-thPA-K1L-C7L를 제외하고 양성 밴드(positive band)를 확인하였다. KVAC-thPA-K1L-C7L의 경우 유전자의 크기가 커서 PCR이 되지 않을 것으로 추측되었다. 웨스턴 블롯을 통해 확인한 방어항원 단백질 발현이 확인된 경우 모든 제조합 백신니아 바이러스에서 탄저 방어 항원이 배양액에서 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 반면, 대조군으로 제작된 시그널 펩타이드가 달려 있지 않은 KVAC-bPA- C7L는 세포에서만 발현되고 있는 것을 확인하였다. 웨스턴 블롯 결과는 도 6에 나타나 있다.

[0088] **제조합 백신니아 바이러스의 면역효능 확인**

[0089] Balb/c 마우스에 면역한 제조합백신니아 바이러스백신의 효능을 측정하였다. 대조군인 탄저백신과 제조합 백신니아 바이러스 백신은 모두 2 번째 백신면역 이후인 3 주차부터 역가가 상승하는 것으로 확인하였다. 복강면역 경로가 3 주차에 가장 높은 역가를 보였으나 4 주차에 다시 감소함을 보였다. 생존율과 비교했을 때 복강 주사로 면역을 한 경우 3 주차에 rPA 역가가 가장 높은 것은 일치하는 결과로 볼 수 있었다. 대조군인 제조합 방어항원을 면역한 경우에 비해 제조합 백신니아 바이러스를 면역한 경우 rPA 역가가 현저히 떨어져 있는 것을 확인하였다. PA 항체가 측정 결과를 나타낸 그래프는 도 7에 나타나 있다.

[0090] 탄저균 H9401 포자로 공격한 결과, 각 실험군은 4 일째부터 죽기 시작하여 각각 양성 대조군은 33.3 %, 근육 주사(IM)한 군은 50.0 %, 피하 주사(SC)한 군은 62.5%, 복강 주사(IP) 실험군은 80.0%, 음성 대조군은 0% 생존하

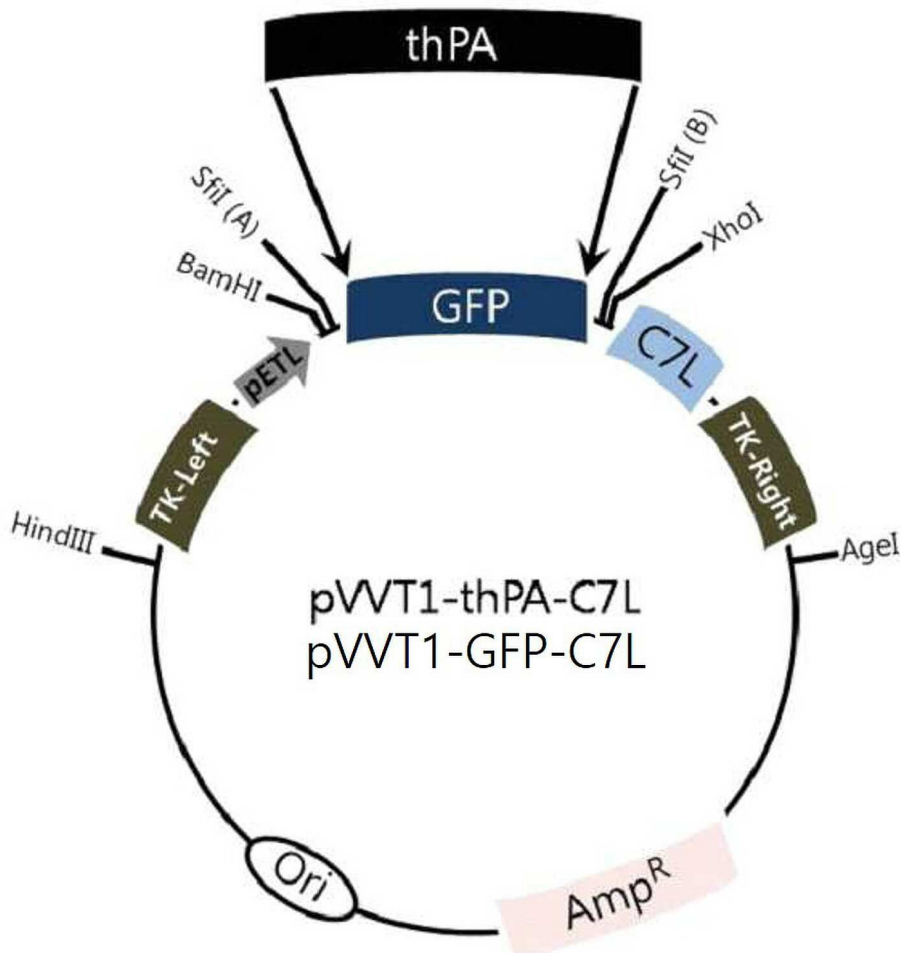
였다. 재조합 백시니아 바이러스에 대한 생존률 그래프는 도 8에 나타나 있다. 백신후보주의 투여량이 증가할 수록 백시니아바이러스에 대한 IFN- γ 발현 양과 중화항체가가 증가함을 확인하였다. IFN- γ 발현 양 측정 결과를 나타낸 그래프는 도 9에 나타나 있다. 중화항체가를 측정한 결과를 나타낸 그래프는 도 10에 나타나 있다.

[0091] 진술한 본원의 설명은 예시를 위한 것이며, 본원이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본원의 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. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

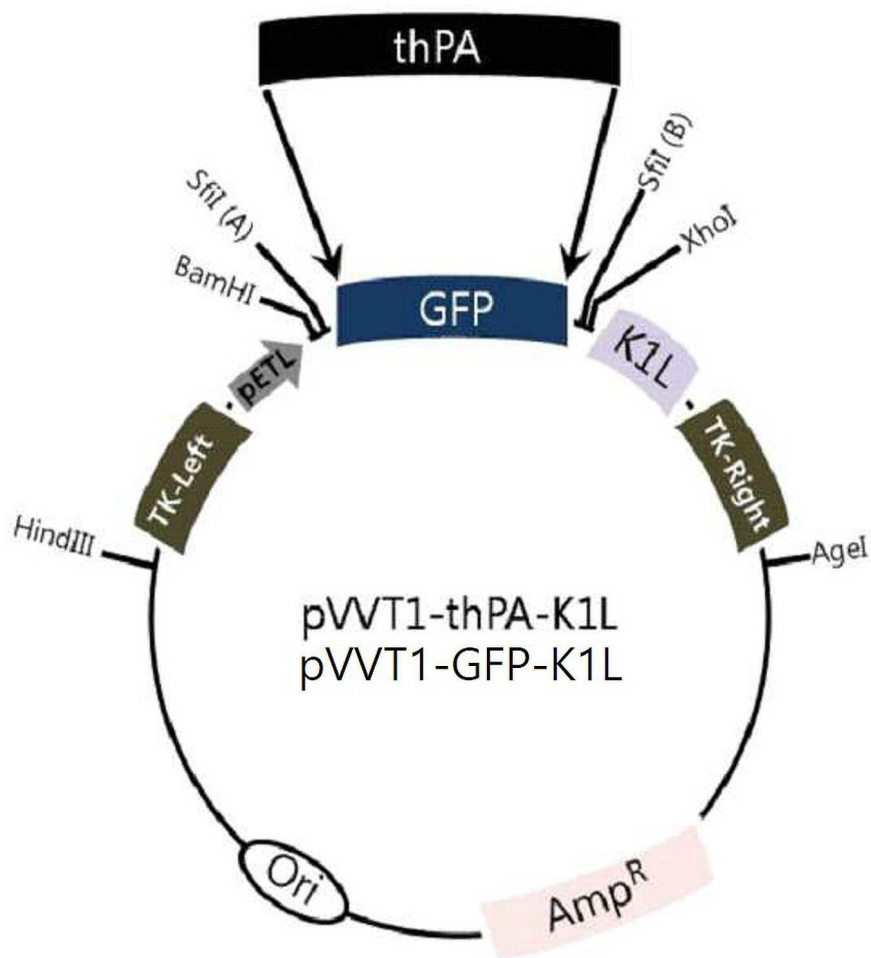
[0092] 본원의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위, 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본원의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

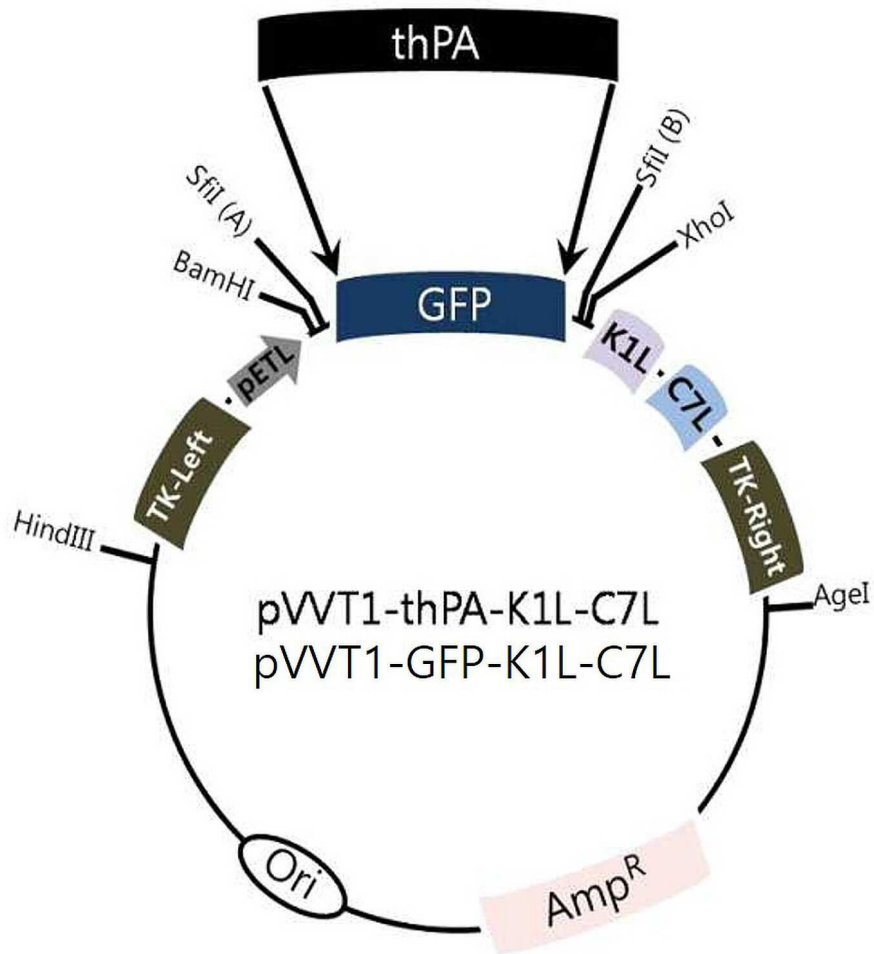
도면1a



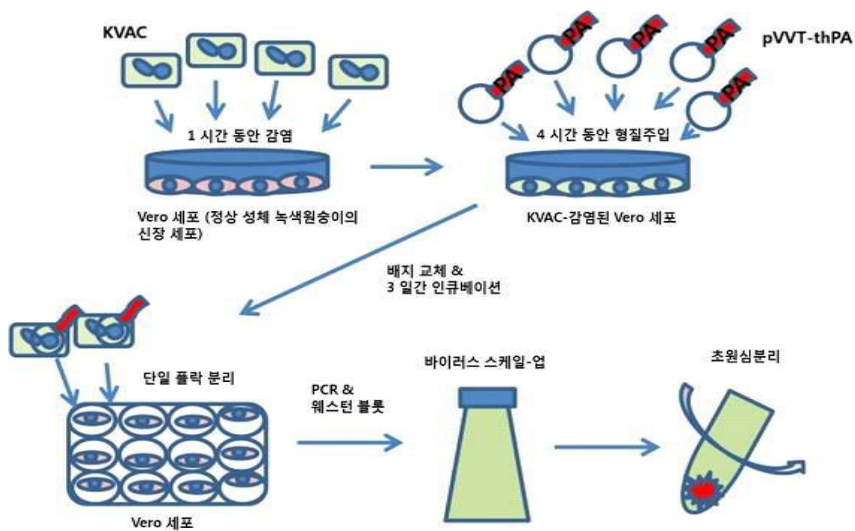
도면1b



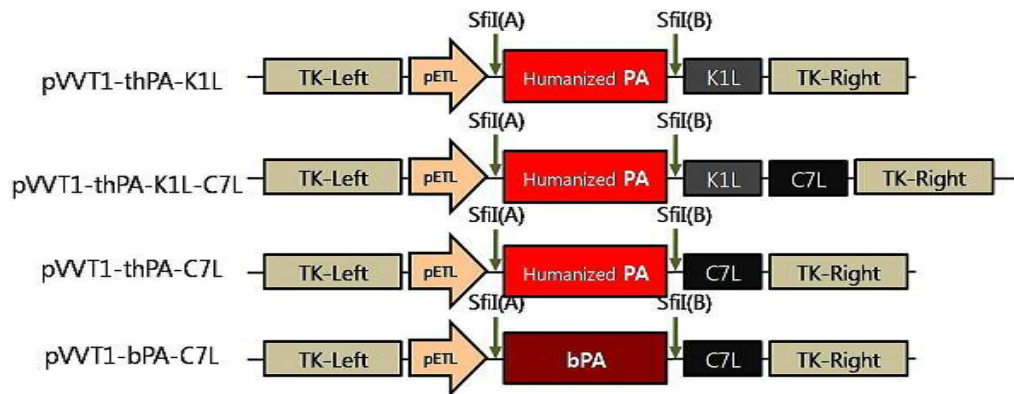
도면1c



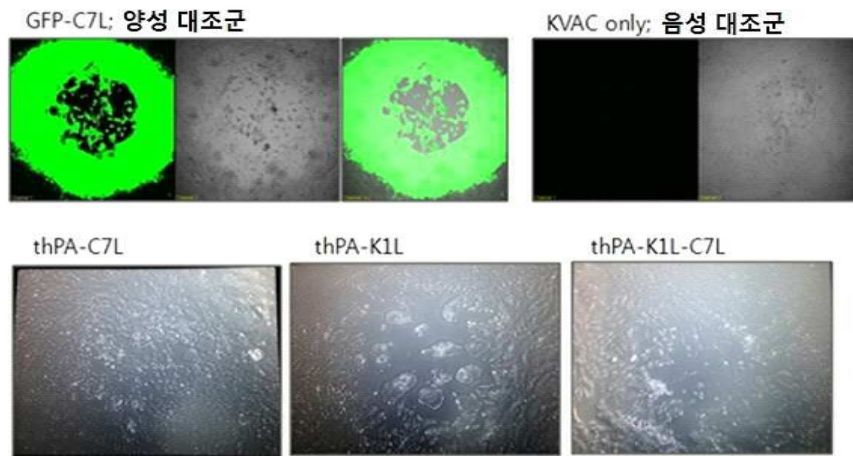
도면2



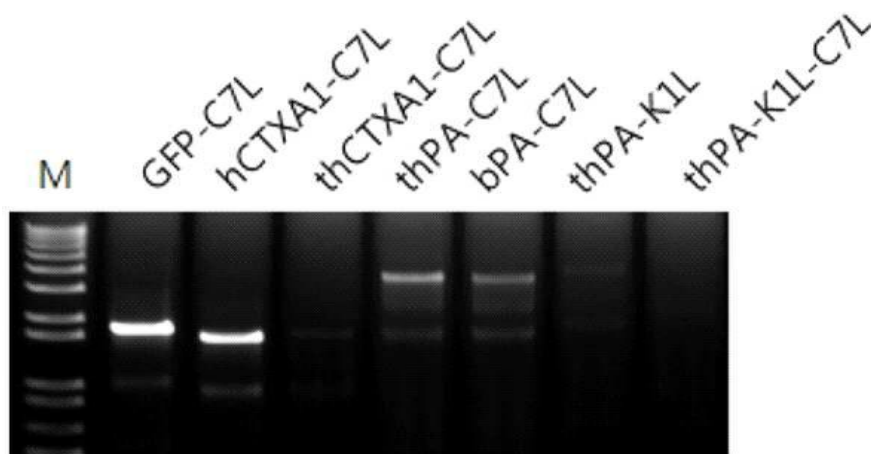
도면3



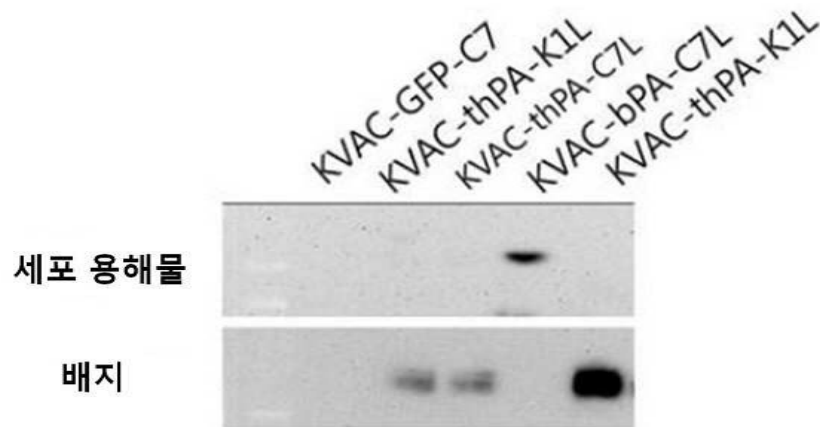
도면4



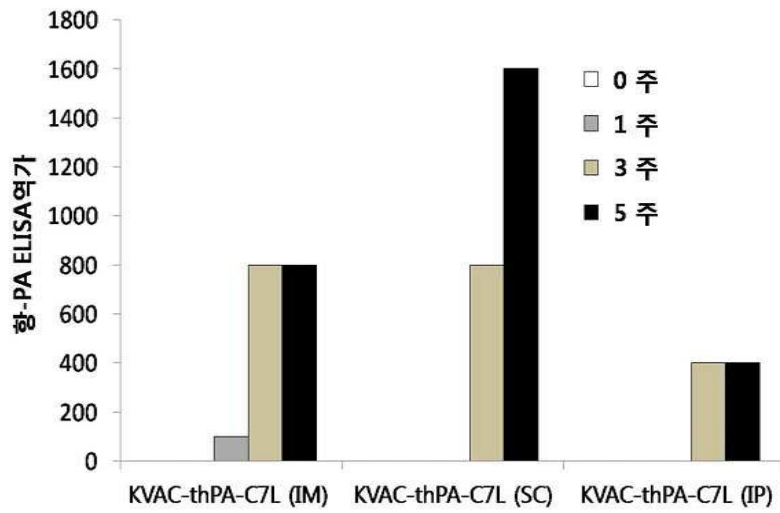
도면5



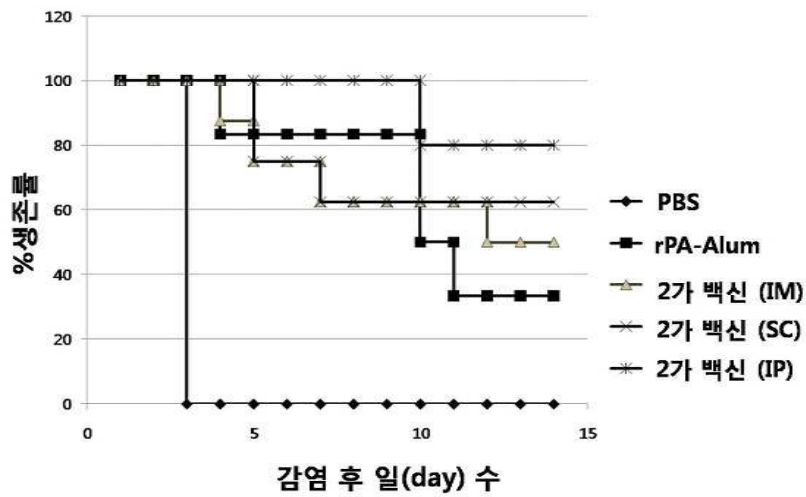
도면6



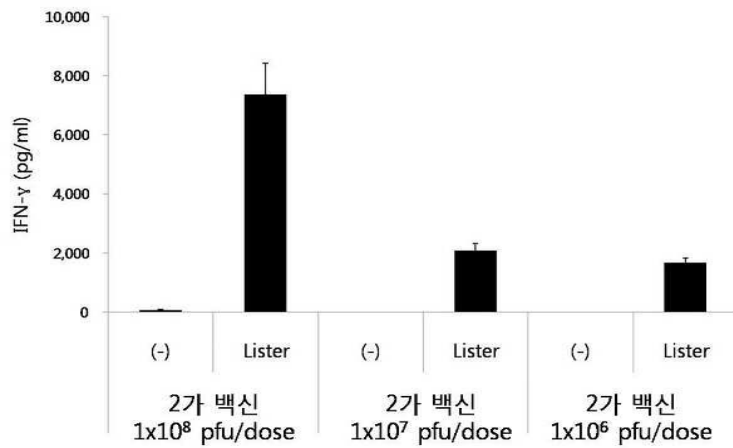
도면7



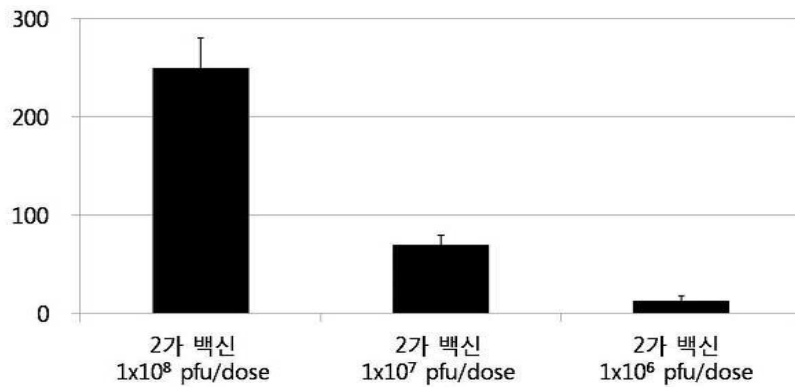
도면8



도면9



도면10



서열 목록

- <110> KOREA CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION GREEN CROSS CORPORATION
- <120> PHAMACEUTICAL COMPOSITION FOR PREVENTION OR TREATMENT OF ANTHRAX
- <130> 0000
- <160> 5
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 564
- <212> DNA
- <213> Bacillus anthracis
- <400> 1

atgttattaa tcggcacaga agtaaaaccg tttaaagcta atgtttacca taatggagaa 60

tttatccaag ttactgacga aagtttaaaa ggaaaaatgga gtgtagtttg tttctaccca 120

gctgacttca cattcgtttg cccaactgaa ctggaagact tacaaaacca atatgcaact 180

cttaaagagt taggcgttga agtatactct gtatctacag acactcactt cactcacaaa 240

gcatggcatg atagctcaga aactatcggg aaaatcgagt acatcatgat tggtagacca 300

actcgacaaa tactacaaa cttcaacgtt ttaatggaag aagaaggtct tgctgctcgt 360

ggtacattca tcatcgatcc agacgggtgt atccaatcta tggaaatcaa tgctgacggg 420

atcgcccggt acgcaagcat tcttgttaac aaaattaaag cagctcaata cgtacgtaac 480

aaccaggtg aagtttgccc agctaaatgg caagagggtt ctgctacact taaaccaagc 540

cttgaccttg taggcaaaaat ctaa 564

<210> 2

<211> 945

<212> DNA

<213> Bacillus anthracis

<400> 2

atgggaaaac tagcatttct ttttccgggc caaggttcac aggcagttgg aatgggtaaa 60

cagttagcag agaataataa agaggttgca aatgtatttg caaaagcaga tgaagtgttg 120

caagattcac tttcagaagt gatTTTTGAA gggtcgagg aaaagcttac gttaacgaca 180

aatgcgcaac cggctttatt aacaacgagt ttgctatTTT tgacagcttt aaaagagtat 240

gatattacac cagactttgt cgcagggcat agtttaggtg agtatagcgc tctttagca 300

gcgggtgcat taacttttga ggatgcagta tatgctgtaa ggaaacgtgg ggaatatatg 360

gaagaagctg ttcttgccgg agaaggtgca atggcggcta ttttaggtgc tgatccacat 420

atgctgaaac gatttacaga agaggttaaca ggtgaagggt atgcagtaca aatcgctaat 480

atgaatagta cgaagcaaat tgtaatttct ggaacaaagc aagggtcga gattgcttct 540

caaagagcga aagaaaatgg tgcaaagaga gcgattccgc ttaaagtaag tggaccgttc 600

cactctgcgc ttatgaagcc agcagcggag aaattccaaa gtgtcttaaa tgaaattaca 660

attcaagata caaatattcc ggtaatcgca aatgtaacag cagacgttat tacaagtggg 720

gcgcatattc aagaaaagct aatcgaacag ctctactcgc ctgtcttatg gtacctatcc 780

attgaatata tggatgaatca aggggtcgat acattttattg aaattggacc tgggaaagta 840

cttgctggac ttatgaagtc aattgattca tcagtgaag catacgcgat atacgatgaa 900

gagacattaa aagataccat ttcaaatttg agaggagaaa actga 945

<210> 3

<211> 764

<212> PRT

<213> Bacillus anthracis

<400> 3

Met Lys Lys Arg Lys Val Leu Ile Pro Leu Met Ala Leu Ser Thr Ile

1 5 10 15

Leu Val Ser Ser Thr Gly Asn Leu Glu Val Ile Gln Ala Glu Val Lys

20 25 30

Gln Glu Asn Arg Leu Leu Asn Glu Ser Glu Ser Ser Ser Gln Gly Leu

35 40 45

Leu Gly Tyr Tyr Phe Ser Asp Leu Asn Phe Gln Ala Pro Met Val Val

50 55 60

Thr Ser Ser Thr Thr Gly Asp Leu Ser Ile Pro Ser Ser Glu Leu Glu

65 70 75 80

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

85 90 95

Phe Ile Lys Val Lys Lys Ser Asp Glu Tyr Thr Phe Ala Thr Ser Ala

100 105 110

Asp Asn His Val Thr Met Trp Val Asp Asp Gln Glu Val Ile Asn Lys

115 120 125

Ala Ser Asn Ser Asn Lys Ile Arg Leu Glu Lys Gly Arg Leu Tyr Gln

130 135 140

Ile Lys Ile Gln Tyr Gln Arg Glu Asn Pro Thr Glu Lys Gly Leu Asp

145 150 155 160

Phe Lys Leu Tyr Trp Thr Asp Ser Gln Asn Lys Lys Glu Val Ile Ser

165 170 175

Ser Asp Asn Leu Gln Leu Pro Glu Leu Lys Gln Lys Ser Ser Asn Ser

180 185 190

Arg Lys Lys Arg Ser Thr Ser Ala Gly Pro Thr Val Pro Asp Arg Asp

195 200 205

Asn Asp Gly Ile Pro Asp Ser Leu Glu Val Glu Gly Tyr Thr Val Asp

210 215 220

Val Lys Asn Lys Arg Thr Phe Leu Ser Pro Trp Ile Ser Asn Ile His

225 230 235 240
 Glu Lys Lys Gly Leu Thr Lys Tyr Lys Ser Ser Pro Glu Lys Trp Ser
 245 250 255
 Thr Ala Ser Asp Pro Tyr Ser Asp Phe Glu Lys Val Thr Gly Arg Ile
 260 265 270
 Asp Lys Asn Val Ser Pro Glu Ala Arg His Pro Leu Val Ala Ala Tyr
 275 280 285
 Pro Ile Val His Val Asp Met Glu Asn Ile Ile Leu Ser Lys Asn Glu
 290 295 300
 Asp Gln Ser Thr Gln Asn Thr Asp Ser Gln Thr Arg Thr Ile Ser Lys

 305 310 315 320
 Asn Thr Ser Thr Ser Arg Thr His Thr Ser Glu Val His Gly Asn Ala
 325 330 335
 Glu Val His Ala Ser Phe Phe Asp Ile Gly Gly Ser Val Ser Ala Gly
 340 345 350
 Phe Ser Asn Ser Asn Ser Ser Thr Val Ala Ile Asp His Ser Leu Ser
 355 360 365
 Leu Ala Gly Glu Arg Thr Trp Ala Glu Thr Met Gly Leu Asn Thr Ala
 370 375 380

 Asp Thr Ala Arg Leu Asn Ala Asn Ile Arg Tyr Val Asn Thr Gly Thr
 385 390 395 400
 Ala Pro Ile Tyr Asn Val Leu Pro Thr Thr Ser Leu Val Leu Gly Lys
 405 410 415
 Asn Gln Thr Leu Ala Thr Ile Lys Ala Lys Glu Asn Gln Leu Ser Gln
 420 425 430
 Ile Leu Ala Pro Asn Asn Tyr Tyr Pro Ser Lys Asn Leu Ala Pro Ile
 435 440 445
 Ala Leu Asn Ala Gln Asp Asp Phe Ser Ser Thr Pro Ile Thr Met Asn

 450 455 460
 Tyr Asn Gln Phe Leu Glu Leu Glu Lys Thr Lys Gln Leu Arg Leu Asp
 465 470 475 480

Thr Asp Gln Val Tyr Gly Asn Ile Ala Thr Tyr Asn Phe Glu Asn Gly
485 490 495

Arg Val Arg Val Asp Thr Gly Ser Asn Trp Ser Glu Val Leu Pro Gln
500 505 510

Ile Gln Glu Thr Thr Ala Arg Ile Ile Phe Asn Gly Lys Asp Leu Asn
515 520 525

Leu Val Glu Arg Arg Ile Ala Ala Val Asn Pro Ser Asp Pro Leu Glu
530 535 540

Thr Thr Lys Pro Asp Met Thr Leu Lys Glu Ala Leu Lys Ile Ala Phe
545 550 555 560

Gly Phe Asn Glu Pro Asn Gly Asn Leu Gln Tyr Gln Gly Lys Asp Ile
565 570 575

Thr Glu Phe Asp Phe Asn Phe Asp Gln Gln Thr Ser Gln Asn Ile Lys
580 585 590

Asn Gln Leu Ala Glu Leu Asn Ala Thr Asn Ile Tyr Thr Val Leu Asp
595 600 605

Lys Ile Lys Leu Asn Ala Lys Met Asn Ile Leu Ile Arg Asp Lys Arg
610 615 620

Phe His Tyr Asp Arg Asn Asn Ile Ala Val Gly Ala Asp Glu Ser Val
625 630 635 640

Val Lys Glu Ala His Arg Glu Val Ile Asn Ser Ser Thr Glu Gly Leu
645 650 655

Leu Leu Asn Ile Asp Lys Asp Ile Arg Lys Ile Leu Ser Gly Tyr Ile
660 665 670

Val Glu Ile Glu Asp Thr Glu Gly Leu Lys Glu Val Ile Asn Asp Arg
675 680 685

Tyr Asp Met Leu Asn Ile Ser Ser Leu Arg Gln Asp Gly Lys Thr Phe
690 695 700

Ile Asp Phe Lys Lys Tyr Asn Asp Lys Leu Pro Leu Tyr Ile Ser Asn
705 710 715 720

Pro Asn Tyr Lys Val Asn Val Tyr Ala Val Thr Lys Glu Asn Thr Ile
725 730 735

Ile Asn Pro Ser Glu Asn Gly Asp Thr Ser Thr Asn Gly Ile Lys Lys

740 745 750

Ile Leu Ile Phe Ser Lys Lys Gly Tyr Glu Ile Gly

755 760

<210> 4

<211> 187

<212> PRT

<213> Bacillus anthracis

<400> 4

Met Leu Leu Ile Gly Thr Glu Val Lys Pro Phe Lys Ala Asn Ala Tyr

1 5 10 15

His Asn Gly Glu Phe Ile Gln Val Thr Asp Glu Ser Leu Lys Gly Lys

20 25 30

Trp Ser Val Val Cys Phe Tyr Pro Ala Asp Phe Thr Phe Val Cys Pro

35 40 45

Thr Glu Leu Glu Asp Leu Gln Asn Gln Tyr Ala Thr Leu Lys Glu Leu

50 55 60

Gly Val Glu Val Tyr Ser Val Ser Thr Asp Thr His Phe Thr His Lys

65 70 75 80

Ala Trp His Asp Ser Ser Glu Thr Ile Gly Lys Ile Glu Tyr Ile Met

85 90 95

Ile Gly Asp Pro Thr Arg Thr Ile Thr Thr Asn Phe Asn Val Leu Met

100 105 110

Glu Glu Glu Gly Leu Ala Ala Arg Gly Thr Phe Ile Ile Asp Pro Asp

115 120 125

Gly Val Ile Gln Ser Met Glu Ile Asn Ala Asp Gly Ile Gly Arg Asp

130 135 140

Ala Ser Ile Leu Val Asn Lys Ile Lys Ala Ala Gln Tyr Val Arg Asn

145 150 155 160

Asn Pro Gly Glu Val Cys Pro Ala Lys Trp Gln Glu Gly Ser Ala Thr

165 170 175

Leu Lys Pro Ser Leu Asp Leu Val Gly Lys Ile

180 185
 <210> 5
 <211> 314
 <212> PRT
 <213> Bacillus anthracis
 <400> 5

Met Gly Lys Leu Ala Phe Leu Phe Pro Gly Gln Gly Ser Gln Ala Val

1 5 10 15

Gly Met Gly Lys Gln Leu Ala Glu Asn Asn Lys Glu Val Ala Asn Val

20 25 30

Phe Ala Lys Ala Asp Glu Val Leu Gln Asp Ser Leu Ser Glu Val Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ala Leu Leu Thr Thr Ser Phe Ala Ile Leu Thr Ala Leu Lys Glu Tyr

65 70 75 80

Asp Ile Thr Pro Asp Phe Val Ala Gly His Ser Leu Gly Glu Tyr Ser

85 90 95

Ala Leu Val Ala Ala Gly Ala Leu Thr Phe Glu Asp Ala Val Tyr Ala

100 105 110

Val Arg Lys Arg Gly Glu Tyr Met Glu Glu Ala Val Pro Gly Gly Glu

115 120 125

Gly Ala Met Ala Ala Ile Leu Gly Ala Asp Pro His Met Leu Lys Arg

130 135 140

Val Thr Glu Glu Val Thr Gly Glu Gly Tyr Ala Val Gln Ile Ala Asn

145 150 155 160

Met Asn Ser Thr Lys Gln Ile Val Ile Ser Gly Thr Lys Gln Gly Val

165 170 175

Glu Ile Ala Ser Gln Arg Ala Lys Glu Asn Gly Ala Lys Arg Ala Ile

180 185 190

Pro Leu Lys Val Ser Gly Pro Phe His Ser Ala Leu Met Lys Pro Ala

195

200

205

Ala Glu Lys Phe Gln Ser Val Leu Asn Glu Ile Thr Ile Gln Asp Thr

210

215

220

Asn Ile Pro Val Ile Ala Asn Val Thr Ala Asp Val Ile Thr Ser Gly

225

230

235

240

Ala His Ile Gln Glu Lys Leu Ile Glu Gln Leu Tyr Ser Pro Val Leu

245

250

255

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

260

265

270

Ile Glu Ile Gly Pro Gly Lys Val Leu Ala Gly Leu Met Lys Ser Ile

275

280

285

Asp Ser Ser Val Lys Ala Tyr Ala Ile Tyr Asp Glu Glu Thr Leu Lys

290

295

300

Asp Thr Ile Ser Asn Leu Arg Gly Glu Asn

305

310