(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2021 년 4 월 29 일 (29.04.2021)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2021/080373 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 39/04 (2006.01) *C07K 14/35* (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2020/014572

(22) 국제출원일: 2020 년 10 월 23 일 (23.10.2020)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2019-0132952 2019 년 10 월 24 일 (24.10.2019) KR

(71) 출원인: 충남대학교 산학협력단 (**THE INDUSTRY & ACADEMIC COOPERATION IN CHUNGNAM NATIONAL UNIVERSITY (IAC)**) [KR/KR]; 34134 대전시 유성구 대학로 99, Daejeon (KR). 연세대학교 산학협력단 (**INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY**) [KR/KR]; 03722 서울시 서대문구 연세로 50, Seoul (KR).

(72) 발명자: 김화중 (**KIM, Hwa Jung**); 34961 대전시 중구 서문로 95, 101동 302호, Daejeon (KR). 최한규 (**CHOI, Han Gyu**); 35359 대전시 서구 관저북로 52, 107동 1304호, Daejeon (KR). 신성재 (**SHIN, Sung Jae**); 03722 서울시 서대문구 연세로 50-1, 에비슨의생명연구센터동304호, Seoul (KR). 권기웅 (**KWON, Kee Woong**); 03722 서울시 서대문구 연세로 50-1, 에비슨의생명연구센터동307호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인 공간 (**GHONG-GAN INTER-NATIONAL PATENT LAW FIRM**); 35209 대전시 서구 둔산서로 137, 5층, Daejeon (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,

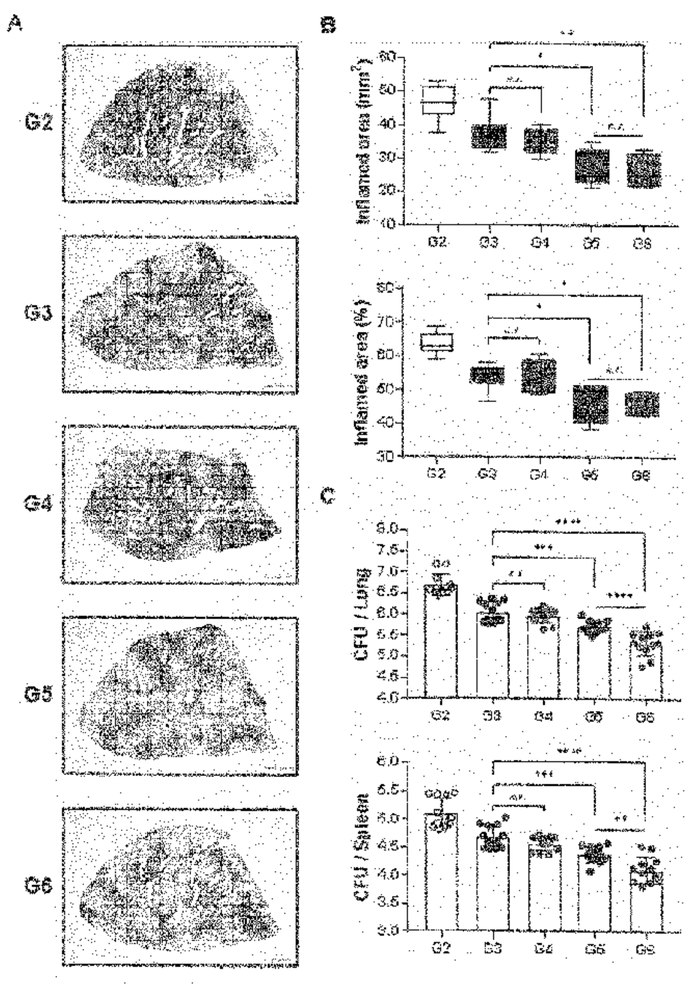
(54) **Title:** RV2299C-ESAT6-HSPX-RIPA FUSION PROTEIN COMPOSITION FOR BOOSTING BCG VACCINE

(54) 발명의 명칭: Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합단백질의 BCG 백신 booster용 조성물

(57) **Abstract:** The present invention relates to a BCG boosting composition and a BCG boosting method and, more specifically, to a BCG boosting composition comprising as an active ingredient a fusion protein of Rv2299c, ESAT6, HspX, and RipA, which are derived from *M. tuberculosis* and a BCG boosting method. The composition and method of the present invention boosts conventional BCG vaccines to augment immune responses in the human body.

(57) 요약서: 본 발명은 BCG boosting시키는 조성물 및 BCG boosting 방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 결핵균(*M. tuberculosis*) 유래의 Rv2299c, ESAT6, HspX 및 RipA를 융합한 단백질을 유효성분으로 포함하는 BCG boosting 조성물 및 BCG boosting 방법에 관한 것이며, 본 발명의 조성물 및 방법에 의하여 기존의 BCG 백신을 boosting 함으로써 신체의 면역 반응을 증강시킬 수 있다

[도6]



[다음 쪽 계속]

FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합단백질의 BCG 백신 booster용 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 결핵 유래 단백의 융합을 통해 기존의 BCG booster백신보다 성능이 좋은 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는 결핵균(*M. tuberculosis*)유래의 Rv2299c, ESAT6, HspX, RipA단백질을 융합한 융합단백질로 BCG백신을 boosting시킬 수 있는, 고위험 결핵균 방어에 효과적인 조성물 및 이를 이용한 BCG백신의 boosting 방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 결핵(TB)의 감염 원인인 *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb)는 전 세계적으로 높은 이환율과 사망률로 주요 공중 보건 문제를 일으키는 주요 병원체이다. TB는 매년 약 8백만 명의 신규 감염자가 발생되며 2백만 명의 목숨을 앗아가는 개발도상국의 주요 질병이며, 선진국에서도 문제점으로 부각되고 있다. 또한 전 세계 인구의 23%인 약 17억 명의 사람들이 잠복성 결핵 감염(Latent TB infection, LTBI)을 앓고 있으며 평생 활동성 결핵에 걸릴 위험이 있는 것으로 추정된다.

[3] 현재, *Mycobacterium* bovis Bacillus Calmette-Guerin (BCG) 백신이 유일하게 결핵예방 백신으로 사용되고 있지만 BCG가 TB에 대해 제공하는 폐 보호 기능이 충분하지 않고, 특히 BCG는 성인결핵 예방효과는 없다고 알려져 있기 때문에 효과적인 신규 백신의 개발이 시급히 필요하다(PMID: 11796598). 이러한 이유로, 결핵백신을 개선시키기 위해 다양한 유형의 보조제, 항원(antigen, Ag) 표적 및 백신 플랫폼이 개발되었다. 그 중에서도 BCG 프라이밍(priming)과 관련하여 이종의 프라임 서브 유닛 백신 부스트 요법(adjuvanted subunit boost)이 Mtb 감염에 대한 유망한 백신 전략으로 제안되었고(PMID: 23257069), 이 이종 프라임 부스트 전략은 강력한 예방 접종 방식으로 입증되었다.

[4] 본 발명자 그룹은 이전 연구에서 MPL/DDA에 보강된 Rv2299c과 융합된 ESAT6의 서브 유닛 백신 접종이 고병원성균주인 Mtb HN878 베이징 임상 분리균에 대해 높은 수준의 강력한 보호를 제공한다는 것을 입증했다(PMID : 28193909). 이 백신으로 개선된 보호는 BCG 또는 ESAT6 단독과 표준 마우스 모델에서 Rv2299c-ESAT6 백신의 비교에서 폐에서 내구성이 강하고 강력한 Th1 분극화 다기능 $CD4^+$ T 세포 면역 반응이 강하게 증가되는 것을 확인하였다(PMID: 28193909).

[5] 또한 최근에는, IL-17 및 Th17 반응은 TB에 대한 방어 면역에 중요한 것으로 나타났다(20679438, 18209095, 20212094, 22003199, 23721367, 24831696, 25448107, 17351619). Th17 반응중 하나는 $CD4^+IL\text{-}17^+$ T 세포가 감염된 Mtb의 폐에 $CD4^+IFN\text{-}\gamma^+$ T 세포보다 빠르게 모집을 촉진하는 것으로, 이는 백신 매개

면역(17351619, 21933877)에서 특히 중요하다. 그러나, Mtb에 대한 보호에서 IL-17의 기능적 역할은 명확하지 않으며, 특히 Mtb에 감염된 대식세포에서 상승된 IFN-γ의항결핵작용에 대한 역할이 불분명하다.

[6] 본 발명자 그룹은 선행특허인 한국등록특허 1749165호에서 미성숙 수지상세포(dendritic cells, DC)에 Rv2299c 단백질(HSP90 패밀리) 또는 Rv2299c와 ESAT6를 융합한 단백질을 처리하여 미성숙 수지상 세포(DC)의 성숙화 유도방법을 개시하였으며, 여기서 DC 성숙을 효과적으로 유도하는 Rv2299c 단백질을 확인하고, 강한 Th1 유형 반응을 이끌어내는 DC 활성화를 통하여 항-결핵면역 메커니즘을 조사하였다. 또한 Mtb HN878 임상 분리에 대한 Rv2299c 단백질 또는 RV2299c ESAT6 융합 단백질의 예방 백신 효과를 테스트함으로써, Rv2299c-성숙 DC가 항-결핵면역 활성에 대한 Th1 세포 반응을 유도하는 것을 확인하였으며, DC-활성화 단백질-기반 백신의 새로운 개념으로 Rv2299c 및 ESAT6으로 구성되는 융합 단백질을 개시하였다.

[7] 이러한 Rv2299c 및 ESAT6으로 구성되는 융합 단백질은 BCG를 부스팅하는데 유망한 백신 타켓이 될 수 있으나, 보다 강력하고 부스팅 효과를 오래 유지시킬 수 있는 이종 부스트 전략이 필요한 실정이다.

[8] 한편, 결핵의 HspX 항원은 α- 결정질 단백질 또는 Hsp16.3으로 불리는 결핵균의 열충격 단백질 중 하나로서, T 세포 반응의 좋은 항원 표적을 나타낼 수 있다. HspX는 실제로 이 단백질은 정지 성장 동안 결핵에 의해 주로 발현되거나 적은 산소 상황에서 총 단백질 발현의 최대 25 %를 차지할 수 있다. 결핵균이 육아종에 갇혀있는 경우 위에서 언급한 것과 비슷한 조건을 유발할 수 있으므로 HspX 단백질은 latency동안 중요한 항원 표적이 될 수 있다(Arshid Y., et al. 2018).

[9] RipA(Rpf-interacting protein A)는 이미 밝혀진 resuscitation-promoting factors (재활성화 촉진인자)로 알려진 Rpf단백질과 상호 작용을 하며 결핵균의 성장을 자극하는 것으로 밝혀졌다(17919286). 활발하게 성장하는 Mtb의 세포 분열에서 결정적인 역할은 엔도펩티다제인 RipA에 의해 수행된다(Chao et al., 2013; Ruggiero, Marasco et al., 2010). RipA를 코딩하는 유전자의 결실은 성장의 감소 및 박테리아로 구성된 비정상적인 표현형을 유도하기 때문에 RipA가 박테리아 성장에 미치는 영향이 크다고 볼 수 있다(Hett & Rubin, 2008).

[10] 그러나 결핵균 유래의 HspX 항원 및 RipA 항원을 Rv2299c 및 ESAT6으로 구성되는 융합 단백질 백본에 부가한 융합단백을 제조하여 이종 프라임 부스트 전략에 이용하는 연구는 전무한 상태이다. 또한 최고의 백신효능을 나타내기 위해서는 다중융합백신을 구성할 때 단백질 순서를 어떻게 배열하냐가 중요한 관건이다.

[11] 한국등록특허 제1270999호는 결핵균 유래의 Rv2299c 단백질을 이용하여 미성숙 수지상세포를 성숙 수지상 세포로 분화시키는 방법이 기재되어 있으나, 단일 단백질을 이용하여 미성숙 수지상세포의 분화를 유도하는 점에서 본 발명의 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합단백질의 BCG 백신의 부스터와는

차이가 있다.

[12] 미국등록특허 제7670609호는 하나 이상의 Mtb 항원 및 하나 이상의 Mtb 소생 또는 활성화 항원이 과발현되는 *Mycobacteria* tuberculosis (Mtb) 에 대한 백신이 기재되어 있으나, 본 발명의 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합단백질을 BCG 백신의 부스터로 사용하는 것과는 차이가 있다.

[13] [선행기술문헌]

[14] (특허문헌 1) 한국등록특허 제1270999호, 결핵균의 Rv2299c 단백질을 이용한 수지상 세포의 성숙방법, 2013.05.29. 등록

[15] (특허문헌 2) 한국등록특허 제1749165호, Rv2299c 또는 Rv2299c와 ESAT6 융합한 단백질을 포함하는 수지상 세포의 성숙화 촉진용 조성물, 2017. 06. 14. 등록.

[16] (특허문헌 3) 미국등록특허 제7670609호, Recombinant BCG tuberculosis vaccine designed to elicit immune responses to Mycobacterium tuberculosis in all physiological stages of infection and disease, 2010년 03.02. 등록

[17] (비특허문헌 1)Brandt L. et al., Failure of the Mycobacterium bovis BCG vaccine: some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis, Infection and Immunity, 70(2), 672-678, 2002.

[18] (비특허문헌 2)Jonathan M. P. et al., Vaccination against tuberculosis: How can we better BCG? Microbial Pathogenesis xxx (2012) 1-15.

[19] (비특허문헌 3)Han-Gyu C. et al., Rv2299c, a novel dendritic cell-activating antigen of Mycobacterium tuberculosis, fused-ESAT-6 subunit vaccine confers improved and durable protection against the hypervirulent strain HN878 in mice, Oncotarget. 8, 19947-19967, 2017.

[20] (비특허문헌 4)Teresa M. et al., Mycobacterium bovis BCG-Specific Th17 Cells Confer Partial Protection against Mycobacterium tuberculosis Infection in the Absence of Gamma Interferon, Infection and Immunity, 78(10), 4187-4194, 2010.

[21] (비특허문헌 5)Arshid Y. et al., HspX protein as a candidate vaccine against Mycobacterium tuberculosis: an overview, Frontiers in Biology, 13(4), 293-296, 2018.

[22] (비특허문헌 6)Michelle B. R. et al., Transcriptional Profile of Mycobacterium tuberculosis Replicating in Type II Alveolar Epithelial Cells, Plos one, 10(4), e0123745, 1-22, 2015.

[23] (비특허문헌 7)Chao M. C. et al., Protein Complexes and Proteolytic Activation of the Cell Wall Hydrolase RipA Regulate Septal Resolution in Mycobacteria, Plos one, 9(2), e1003197, 1-17, 2013.

[24] (비특허문헌 8)Ruggiero A. et al., Structure and Functional Regulation of RipA, a Mycobacterial Enzyme Essential for Daughter Cell Separation, Structure, 8(9), 1184-1190, 2010.

[25] (비특허문헌 9)Erik C. Hett, Eric J. Rubin, Bacterial Growth and Cell Division: a Mycobacterial Perspective, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 72(1), 126-156, 2008.

[26] (비특허문헌 10)Matthews K. et al., Predominance of interleukin-22 over interleukin-17 at the site of disease in human tuberculosis, Tuberculosis (Edinb), 91(6-3), 587-593, 2011.

[27] (비특허문헌 11)Okamoto Y. et al., Essential role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung, J Immunol. 184(8), 4414-22, 2010.

[28] (비특허문헌 12)Khader S. A. et al., IL-23 is required for long-term control of Mycobacterium tuberculosis and B cell follicle formation in the infected lung, J Immunol. 187(10), 5402-72011, 2011.

[29] (비특허문헌 13)Brandt L. et al., Failure of the Mycobacterium bovis BCG vaccine: some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis, Infect. Immun., 70(2), 672-8, 2002.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[30] 상기와 같이 BCG-이종 프라임 부스트 전략으로 자체의 면역 기능을 높이고, 강력한 면역 반응을 일으키는 무독성의 면역조절제의 개발과 다기능 CD4+ T 세포의 분석이 세포 면역 치료에 중요한 과제가 되고 있다.

[31] 따라서 본 발명의 목적은 BCG-이종 프라임 부스트 조성물을 제공하는 데 있다. 또한 백신효능의 극대화를 위한 다중융합단백의 단백질 배열 순서를 정하고, 최종적으로는 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 단백질을 유효성분으로 포함하는 BCG 백신 부스터용 조성물을 제공하는 데 있다.

[32] 본 발명의 또 다른 목적은 BCG를 접종하는 단계 이후에 상기 BCG 백신 부스터용 조성물을 접종하는 단계를 포함하는 BCG 백신 부스팅 방법을 제공하는 데에 있다.

과제 해결 수단

[33] 상기의 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 Rv2299c와 ESAT6 융합단백에 단백질을 추가하는 경우 ESAT6단백질의 위치를 정하기 위한 예비실험결과를 바탕으로 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 단백질을 유효성분으로 포함하는 BCG백신 booster용 조성물을 제공한다.

[34] 또한 본 발명은, 상기 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합 단백질의 Rv2299c, ESAT6, HspX 및 RipA은 각각 결핵균(*M. tuberculosis*) 유래의 단백질인 것을 특징으로 하는 BCG 백신 부스터용 조성물을 제공한다.

[35] 상기 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 단백질은 1 ㎍/㎖ 내지 20 ㎍/㎖ 양으로 포함되는 것이 바람직하다.

[36] 본 발명은 IL-17^{+}IFN-γ^{+} 다기능 T 세포 또는 IL-17^{+}IFN-γ^{+}TNF-α^{+}IL-2^{+} 다기능 T

세포를 증가시키는 것을 특징으로 하는 BCG 백신 부스터용 조성물을 제공한다.

[37] 또한 본 발명은 $CD4^+CD44^+$T 세포를 증가시키는 것을 특징으로 하는 BCG 백신 부스터용 조성물을 제공한다.

[38] 본 발명은 $CD4^+CD44^+$T 세포를 증가시키는 것을 특징으로 하는 BCG 백신 부스터용 조성물을 제공한다.

[39] 본 발명은 또한 결핵균 감염시 세균부하를 감소시키는 것을 특징으로 하는 BCG 백신 부스터용 조성물을 제공한다.

[40] 본 발명은 서열 번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 재조합 단백질을 제공하며, 상기 재조합 단밸질을 포함하는 BCG 백신 부스터용 조성물을 제공한다.

[41] 본 발명은 (가) BCG를 접종하는 단계; (나) 상기 (가) 단계의 BCG 접종 12주 후, 상기 BCG 백신 부스터용 조성물을 접종하는 단계;를 포함하는 BCG 백신 부스팅 방법을 제공한다. 상기 (나) 단계는 BCG 백신 부스터용 조성물을 3주 주기로 3회 투여하는 단계인 BCG 백신 부스팅 방법일 수 있다. 상기 BCG 백신 부스팅 방법은 $IL\text{-}17^+$ $IFN\text{-}\gamma^+$ 다기능 T 세포 또는 $IL\text{-}17^+IFN\text{-}\gamma^+TNF\text{-}\alpha^+IL\text{-}2^+$ 다기능 T 세포를 증가시키는 것을 특징으로 하는 BCG 백신 부스팅 방법일 수 있다.

[42] 상기 BCG 백신 부스팅 방법은 $CD4^+CD44^+$ T 세포를 증가시키는 것을 특징으로 하는 BCG 백신 부스팅 방법일 수 있다.

[43] 또한 본 발명은 상기 BCG 백신 부스터용 조성물을 포함하는 면역 증강용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[44] 이상과 같이 본 발명에 의하면 종래 전혀 알려져 있지 않던 재조합 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA를 활용하여 BCG-booster로써 신체의 면역 반응을 효과적으로 활성화 시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[45] 도 1은 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합단백질의 고 병원성 M2 균주에 대한 BCG프라임 부스팅 효과를 보기 위하여 실시한 마우스의 BCG, 부스터 접종 및 분석의 시간표를 도시한 것이다.

[46] 도 2는 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합 단백질 제작을 위한 cloning 전략을 도시한 모식도이다.

[47] 도 3은 RipA의 항원성을 보기 위하여 결핵균 (H37Rv와 K)을 감염시킨 후 분리한 마우스 비장세포의 ESAT6와 RipA(1 또는 5 $\mu g/m\ell$)을 처리후 사이토카인 변화를 나타낸 그래프이다.

[48] 도 4는 Rv2299c-ESAT6 융합단백질에 Rv2882c항원을 중간에 첨가하는 경우 Rv2299c-ESAT6 융합단백질의 백신효능을 증가시키지 못 한다는 결과를 나타낸 그래프이다.

[49] 도 5는 감염전 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합단백질 예방접종에 의하여 유도된 T세포 표현형의 변화를 사이토카인 염색에 의하여 평가한 그래프와

IL-17, IFN-γ, TNF-α 및 IL-2 공 발현을 나타낸 그래프이다.

[50] 도 6은 비접종, BCG만 접종 및 BCG 접종 후, ESAT6, Rv2299c-ESAT6 및 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합단백질로 부스팅 후, M2 균주 감염 시, 폐내의 세균 부하 정도를 나타내는 그래프이다. (A)는 각각의 그룹별(G2-G6)로 면역화 된 마우스의 우측 폐의 상엽이 Mtb M2 챌린지 후 10주에 H&E 염색된 사진이다(1X : 스케일 바 = 2.0 mm). (B)는 각각의 그룹별(G2-G6)로 면역화 된 마우스의 폐 염증 부위의 비율과 병변의 크기를 나타낸 그래프이다. (C)는 감염 10 주 후 각 그룹의 폐의 CFU를 측정한 것을 그래프로 나타낸 것이다 두 개의 독립적 인 실험 중 하나의 데이터가 설명된다 (지정된 각 시점에서 그룹당 7 마리의 마우스).

[51] 도 7은 감염후 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합단백질 예방접종에 의하여 유도된 T세포 표현형의 변화를 사이토카인 염색에 의하여 평가한 그래프와 IL-17, IFN-γ, TNF-α 및 IL-2의 공 발현을 나타낸 그래프이다.

[52] 도 8은 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합 단백질의 아미노산 서열을 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[53] 현재까지 면역세포에 관한 면역반응에 있어서 결핵균(*M. tuberculosis*)으로부터 유래된 단백질에 관한 많은 연구가 시행되어 왔지만, Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA에 관한 연구는 알려져 있지 않다.

[54] 이하, 본 발명을 실시 예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시 예들은 본 발명을 더욱 쉽게 이해할 수 있도록 예시하는 것으로 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것이 아니다.

[55] **<실시예 1> 재료 및 방법**

[56] **1.1 세균 균주 및 미코박테리움 속의 제조**

[57] Mtb M2는 재단법인 국제결핵연구소 (ITRC, Changwon, Gyeongsangnam-do, South Korea)으로부터 얻었다. 미코박테리움 보비스 BCG (파스퇴르 균주 1173P2)는 파스퇴르 연구소 (Paris, France)의 브로치 박사가 제공하였다. 이 연구에 사용된 모든 미코박테리아는 이전에 설명한 바와 같이 제조되었다(Cha et al., 2015).

[58] **1.2 동물, 예방 접종 및 에어로졸 감염**

[59] 5주 내지 6주령 특정 병원체 부재 암컷 C57BL/6 마우스는 잭슨 연구소 (BarHarbor, ME, USA)로부터 구입하였다. 마우스는 연세대학교 의학연구센터의 BL-3 생물재해 동물 시설에 있는 베리어 조건 하에서 일정한 온도 (24 ± 1℃와 습도(50 ± 5%)로 유지된다. 동물은 표준화된 조명 제어 조건 (12시간 빛과 12시간 어둠 주기) 하에서 물에 대한 임의 접근과 함께 멸균 상업 마우스 식단을 제공하였다. 마우스는 매일 모니터링하였으며, 이 실험 동안 어떤 마우스도 임상학적 증상이나 질병을 나타내지 않았다.

[60] 본 발명의 BCG 백신 부스팅 방법은 (가) BCG를 접종하는 단계, (나) 상기 (가) 단계의 BCG 접종 12주 후 BCG 백신 부스터용 조성물을 접종하는 단계를 포함한다. 예방 접종을 위해, 마우스는 우선 피하 주사(2×10^5 CFU /마우스)를 통해 BCG 파스퇴르 1173P2로 예방 접종 하였고, 후-BCG 면역 예방 접종 12주 후에 소단위 백신을 3주 주기로 3회을 투여하였다. 이때 소단위 백신은 표 1에서 보듯이 ESAT6, Rv2299c-ESAT6, Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 단백질을 각각 포함하여 적용하였다.

[61] [표1]

G1	Naive
G2	Infection
G3	BCG
G4	BCG + ESAT6
G5	BCG + Rv2299c-ESAT6
G6	BCG + Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA

[62] 최종 면역 예방 접종 4주 후, 비장과 폐 세포를 수확하였고 이를 사용하여 면역원성(IFN-γ 분비물의 레벨과 IFN-γ-생산 T 세포들과 Ag-특이적 T 세포들의 주기들)을 조사하였다.소단위 백신 단독의 예방 효과를 연구하기 위해, BCG 면역법 단독 및 BCG 프라이밍-소단위 백신 부스팅 그룹은 앞서 설명한 바와 같이 Mtb M2 균주와 가스가 발생하도록 챌린지되었다(Cha et al., 2015b, Lee et al., 2009). 요약하면, 마우스를 대략 150 CFU의 생존가능한 Mtb에 노출시키기 위해서 공기 감염 장치(Glas-Col, Terre Haute, IN, USA)의 흡입 챔버에 60분 동안 소정의 M2 투여양으로 노출시켰다. 후-챌린지 8주 또는 16주 시점에서, 각 그룹에서 비장과 폐 세포를 수확하였고, 유세포 분석을 사용하여 다기능 T 세포와 T 세포 아형의 주기를 평가하였다.

[63] 상기와 같은 소단위 단백질의 백신효능을 평가하기 위해 BCG백신 접종, 융합단백질 면역 주기, 고 병원성 M2 균주로 감염시기 및 분석 시간표를 도 1에 도시하였다.

[64] **1.3 항체 및 시약**

[65] IFN-γ 겨냥 PE-공액 mAb, CD90.2 겨냥 BV605-공액 mAb, CD4 겨냥 PerCP-Cy5.5-공액 mAb, CD8 겨냥 BV785-공액 mAb, CD44 겨냥 BV421-공액 mAb, CD62L 겨냥 Alexa700-공액 mAb, IL-17 겨냥 FITC-공액 mAb, IL-2 겨냥 PE-Cy7-공액 mAb, TNF-a 겨냥 APC-공액 mAb는 eBioscience (San Diego, CA, USA)로부터 구입하였다. 피코에리트린 (PE)-공액 쥐 항-IgG1, 쥐 항- IgG2a 및 쥐 항-IgG2b, APC-공액 쥐 항-IgG2a 및 쥐 항-IgG1, FITC-공액 쥐 항-anti-IgG2b, 그리고 PE-Cy7-공액 마우스 항-IgG1 및 쥐 항-IgG2b은 eBioscience에서 얻었다. 이들 항체는 이소타입 대조군으로서 사용되었다. TNF-α, IFN-γ, IL-2, IL-5, IL-10

및 IL-17F측정을 위한 ELISA 키트는 eBioscience로부터 얻었다.

[66] **1.4 재조합 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA의 생성**

[67] 재조합 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 단백질 생성을 위해 Mtb H37Rv (ATCC 27294)부터의 게놈 DNA을 주형으로 이용하고 다음의 프라이머를 이용하여 해당 유전자(frr)를 PCR로 증폭하였다.

[68] 도 2는 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합 단백질 제작을 위한 cloning 전략을 도시한 모식도이다. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv의 Genomic DNA를 template로 하여 PCR을 통해 HspX DNA와 RipA DNA를 Overlapping PCR방법을 사용하여 template를 얻고 5'말단 HindIII 와 3'말단에 NotI 제한효소가 삽입된 HspX-RipA DNA를 제작하여 pET22b vector에 삽입하였다. 동일방법을 활용하여 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv의 Genomic DNA를 template로 하여 PCR을 통해 Rv2299c와 ESAT6 유전자를 Overlapping PCR 방법을 사용해 template를 얻고 5'말단 NdeI 와 3'말단에 HindIII 제한효소가 삽입된 Rv2299c-ESAT6 DNA을 추가로 제작하여 pET22b+(HspX-RipA) 에 삽입하여 pET22b+(Rv2299c-ESAT6)+(HspX-RipA)를 완성하였다.

[69] 하기 표 2는 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 제작을 위하여 사용된 각 항원의 primer를 나타낸 것이다.

[70] [표2]

Primer	Sequence
Rv2299c-ESAT6-F	CGTCTCGCGCGTACCTTGATGACAGAGCAGCAGTGG
Rv2299c-ESAT6-R	CCACTGCTGCTCTGTCATCAAGGTACGCGCGAGACG
Rv2299c-NdeI-F	CATATGAACGCCCATGTCGAGCAGTTG
ESAT6-HindIII-R	AAGCTTTGCGAACATCCCAGTGACGTT
RipA-HindIII-F	TCCGTCGACAAGCTTGATCCACAGACGGACACC
RipA-R	GGTGGTGGCCATGTACTCGATGTATCGGAC
HspX-F	TACATCGAGTACATGGCCACCACCCTTCCC
HspX-NotI-R	GCTCGAGTGCGGCCGCGTTGGTGGACCGGATCTG

[71] 생성된 PCR 생성물을 NdeI 과 HindIII 제한효소를 사용하여 소화시킨 후 pET-22b (+) 벡터 (Novagen, Madison, WI, USA)에 삽입하였다. 재조합 단백질을 전술한 바와 같이 제조하였다. 정제된 단백질로부터 에도톡신 오염을 제거하기 위해 재조합 단백질을 4℃에서 6시간 동안 폴리믹신 B-아가로스(Sigma Chemical Co.)와 배양하였다.도 8은 서열번호 1의 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합 단백질의 아미노산 서열을 나타낸 것이다.

[72] Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 제제 내 잔류 LPS의 양은 제조사의 지침에 따라 LAL 테스트 키트 (Lonza, Basel, Switzerland) 를 사용하여 평가하였다. 정제된 에도톡신 없는 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA는 필터 소독되었으며 70℃에서 동결되었다. Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 단백질의 순도는 CB 염색과 항-His 항체를 사용한 웨스턴 블롯팅 분석에 의해 평가되었다.

[73] **1.5 사이토카인 측정**

[74] 공지된 방법에 따라 샌드위치 ELISA를 사용하여 배양 상청액에서 TNF-α, IFN-γ, IL-2, IL-5, IL-10 및 IL-17FA의 정도를 판단하였다. 이러한 사이토카인 측정은 제조사(eBioscience)에서 권고된 대로 실시되었다

[75] **1.6 유동세포분석법에 의한 세포내 사이토카인 및 표면 분자 발현분석**

[76] 세포 내 사이토카인 염색을 위해, 예방 접종된 동물(2×10^6 세포)로부터 얻은 단세포 현탁액은 ESAT6 (2 ㎍/㎖), Rv2299c-ESAT6 (2 ㎍/㎖) 또는 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA (2 ㎍/㎖)로 GolgiStop 존재 하에서 37℃에서 12시간 동안 자극되었다 (BD Biosciences). 또한, M2 챌린지 후 세포 내 사이토카인 염색을 위한 자극제로 ESAT6, Rv2299c-ESAT6 또는 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA를 사용하였다.

[77] 세포는 4℃에서 15분 동안 Fc 블록 (항-CD16/32)으로 우선 차단되고, 4℃에서 30분 동안 CD90.2 겨냥 BV605-공액 mAb, CD4 겨냥 PerCP-Cy5.5-공액 mAb, CD8 겨냥 BV785-공액 mAb, CD44 겨냥 BV421-공액 mAb, CD62L 겨냥 Alexa700-공액 mAb 항체로 염색되었다. 세포를 제조자의 지시에 따라 사용된 사이토픽스/사이토펌 키트 (BD Biosciences)로 고정시키고 투과될 수 있도록 하였다. 세포 내 IL-17, TNF-α, IL-2 및 IFN-γ는 투과 완충액에서 FITC-공액 항-IL-17, APC-공액 항-TNF-α, PE-Cy7-공액 항-IL-2 및 PE-공액 항-IFN-γ 항체를 이용하여 검출되었다. 모든 항체는 달리 명시되지 않는 한 eBioscience (San Diego, CA)에서 구입하였다. 세포는 FACSverse 유동 세포 분석법으로 시중에 구입가능한 소프트웨어 프로그램 FlowJo를 이용하여 분석되었다 (Treestar, Inc., San Carlos, CA).

[78] **1.7 세균 수 및 조직병리학적 분석**

[79] 최종 예방 접종 후 그리고 M2 챌린지 10주 후, 한 그룹 당 6 내지 7 마리의 마우스를 이산화탄소로 안락사 시키고, 그 폐와 비장을 균질화하였다. 생균 수는 장기 (왼쪽 폐 및 비장의 반) 호모게네이트의 연속 희석을 통해 미들 브룩 7H11 한천 (Difco Laboratories, Detroit, MI)에 플레이팅함으로써 결정되었으며, 이는 10% OADC (Difco Laboratories), 암포테리신 B(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 및 2 ㎍/㎖ 2-티오펜카복실 산 히드라지드(Sigma-Aldrich)로 보충되었다. 균체는 37℃에서 4주 동안 배양된 후 세어졌다. 조직병리학적 분석을 위해, 우측 폐의 상엽은 헤마톡실린 및 에오신으로 염색되었고, 염증의 심각도를 위해 평가되었다. 앞서 설명한 바와 같이(Cha et al., 2015a), 폐에서의 염증 레벨은 ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, ML) 소프트웨어 프로그램을

사용하여 평가하였다. 또한, 염증반응은 병변의 크기 및 면역 세포의 구성에 기초하여 평가하였다. CFU에 대한 데이터 및 폐 염증은 메디안 log10 CFU ± 사분범위 (IQR)로 보고되었다.

[80] **1.8 통계 분석**

[81] 각 실험은 적어도 3회 반복하여 수행하였으며 일관된 결과를 얻었다. 두 그룹 간 차이의 유의성은 독립 표본 학생 *t*-테스트에 의해 판단되었고, 세 그룹 이상 간 차이는 GraphPad Prism (version 4.03) 통계적 소프트웨어(GraphPad Software, San Diego, CA, USA)를 사용한 Tukey의 다중 비교 테스트에 따른 일방향 ANOVA로 평가되었다. 그래프 내의 데이터는 평균 ± SD로 나타내었다. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ 및 $***p < 0.001$은 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[82] **<실시예 2> 결핵균 감염 마우스의 T세포를 이용한 RipA의 항원성 분석**

[83] **2.1 실험방법**

[84] 결핵균(H37Rv와 K)을 감염시킨 마우스의 비장세포를 분리한 후, ESAT6와 RipA (1 또는 5 ㎍/㎖)을 처리후 IFN-γ, IL-2, IL-10, IL-5, TNF-α 또는 IL-17AF 사이토카인을 측정하였다. 데이터는 3번의 실험으로 얻은 평균 ± SD로 나타내고, 독립 표본 t 테스트는 유의성을 결정하기 위해 사용되었다. 각각의 그룹과 비교하여 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ 및 $***p < 0.001$ (독립 표본 t 테스트).

[85] **2.2 실험결과에 대한 분석**

[86] 도 3은 RipA의 항원성을 보기 위하여 결핵균 (H37Rv와 K)을 감염시킨 후 분리한 마우스 비장세포의 ESAT6와 RipA (1 또는 5 ㎍/㎖)을 처리후 사이토카인 변화를 나타낸 그래프이다. 현재 RipA의 항원성이 알려져 있지 않기 때문에 사이토카인을 측정하여 항원성을 분석하였다. T세포의 활성을 나타내는 IL-2와 TNF-α의 분비는 그룹 간에 차이가 없었지만 Th1 반응인 IFN-γ는 RipA에 대해 분비되지 않음을 확인하였다. 그러나 Th2 반응인 IL-5와 IL-10의 분비는 RipA에 의해 분비되고, 또한 Th17 반응인 IL-17AF의 분비가 증가된 것을 확인할 수 있었다. 즉, RipA가 Th1 반응이 아닌 Th2/Th17 반응을 팽창시킴을 확인할 수 있었다.

[87] <실시예 3> Rv2299c-ESAT6단백 사이에 Rv2882c단백질을 중간에 첨가하여 백신효능을 평가

[88] **3.1 실험방법**

[89] 다중융합단백질을 구성할 때 각각의 단백 배열의 순서는 최적의 백신효능을 나타내기위해 중요한 관점이다. 가장 우선적으로 기존에 백신효능이 알려진 Rv2882c항원을 Rv2299c-ESAT6 융합단백의 중간에 삽입한 Rv2299c-Rv2882c-ESAT6을 제작하여 백신효능을 증가하는지 평가하기 위해 도 4의 A와 같이 BCG를 접종한 후에 12주부터 각 융합단백질로 3회 면역하였다. 최종 면역후 4주 후여 고병원성 균주인 HN878 임상결핵균주로 챌린지 후 9 주에 폐조직을 H&E 염색 하여 분석하였고, 또한 감염 9 주 후 각 그룹의 폐와 비장에서 CFU를 측정하였다(지정된 각 시점에서 그룹 당 7 마리의 마우스). 일원

분산 분석에 이어 Tukey의 다중 비교 테스트를 수행하여 유의성을 평가했다. n.s.: 중요하지 않음, * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 및 **** p <0.0001.

[90] **3.2 실험결과에 대한 분석**

[91] 도 4는 Rv2299c-ESAT6융합단백질 중간에 Rv2282c를 첨가하여 연결된 융합단백의 백신효과를 분석한 결과이다. (B)는 고병원성결핵균주(HN878)로 첼린지 후 9주에 각각의 그룹별(G1-G6) 마우스의 우측 폐의 상엽을 H&E 염색한 사진이다. (C)는 감염 9 주 후 각 그룹의 폐의 CFU를 측정한 것을 그래프로 나타낸 것이다.

[92] 도 4 (B)를 보면 감염시키지 않은 마우스(G1)의 폐에 비하여 결핵균이 감염된 마우스(G2)의 폐에서 병변이 뚜렷함을 확인할 수 있고, BCG만을 접종한 마우스(G3)에 비하여 ESAT6(G4), Rv2299c-ESAT6(G5), Rv2299c-Rv2882C-ESAT6(G6)로 부스팅 한 경우 병변이 감소되었음을 확인할 수 있었으나 Rv2299c-ESAT6(G5)와 Rv2299c-Rv2882C-ESAT6(G6)로 부스팅한 그룹 간에는 뚜렷한 차이가 없었다.

[93] 또한 도 4 (C)에서 보는 바와 같이, 감염 9 주 후 각 그룹의 폐와 비장에서에서 CFU를 측정한 결과, Rv2299c-ESAT6 융합 단백질로 부스팅한 그룹(G5)이 ESAT6단독으로 부스팅한 그룹(G4) 보다 현저히 균수가 감소하였지만, Rv2299c-ESAT6와 Rv2299c-Rv2882C-ESAT6로 부스팅한 그룹 간의 균 감소는 유의한 차이가 없었다.

[94] 상기의 결과로 Rv2299c-ESAT6 융합단백질에 또 다른 항원을 첨가하여 다중융합단백을 제작하는 경우 RRv2299c-Rv2882c-ESAT6보다는 Rv2299c-ESAT6-Rv2882c와 같이 중간이 아니라 뒤에 항원을 첨가하는 것이 더 좋은 백신효능을 나타낼 것으로 기대되었다.

[95] <실시예 4> 결핵균으로 첼린지 전 BCG + ESAT6, Rv2299c-ESAT6 및 Rv2299c -ESAT6-HspX-RipA -면역화 된 마우스의 폐에서 항원 특이적 다 기능성 T 세포의 유도

[96] **4.1 실험방법**

[97] 상기의 결과를 바탕으로 HspX와 RipA항원을 Rv2299c-ESAT6뒤에 연결한 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA를 제작하여 Rv2299c-ESAT6의 면역활성능과 백신효능을 증가시키는지 분석하였다. 이를 위해 마우스의 각 그룹은 재료 및 방법에서 설명한 바와 같이 예방 접종되고 희생시켰다. 최종 예방 접종 4주 후, 마우스 (n=5)의 각 그룹은 안락사시켰고 그 폐 세포는 GolgiStop 존재 하에 37℃에서 12 시간 동안 표시된 항원으로 자극되었다. 예방 접종된 마우스의 폐로부터 분리된 세포 안의 IL-17, IFN-γ 및 / 또는 IL-2, TNF-α를 생성하는 항원 특이적인 $CD4^+$T 세포의 갯수는 다색의 유동 세포 분석법으로 CD4+CD44+림프구에 대해 게이팅하면서 분석되었다. 파이 차트는 IL-17, IFN-γ 및 / 또는 IL-2, TNF-α를 공동 발현하는 세포의 평균 개수를 나타낸다. 데이터는 각 그룹에서 5마리의 마우스에서 얻은 평균 ± SD로 나타내고, 독립 표본 t

테스트는 유의성을 결정하기 위해 사용되었다. 면역증강제 단독 그룹과 비교하여 *p < 0.05, **p < 0.01 및 ***p < 0.001 (독립 표본 t 테스트).

[98] **4.2. 실험결과에 대한 분석**

[99] 결핵 백신 개발을 위한 보호적 상관관계에 대한 합의에 도달하지 못했지만, 최근의 연구에 따르면 다기능 T 세포의 보호 기여와 동물 모델에서 Mtb 감염에 대한 Th17- 매개 면역 반응이 제안되었다. 따라서, 본 발명자들은 최종 면역화 후 ESAT6, Rv2299c-ESAT6 및 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA으로 생체 외 재 자극시 항원 특이적 IL-17, IFN-γ, TNF-α 및 IL-2- 다기능 T 세포가 생성 된 빈도를 평가하였다. ESAT6, Rv2299c-ESAT6 및 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA으로 자극 한 후, 폐의 CD4+ T 세포를 세포 내 사이토카인에 대해 염색 한 후, 반응하는 T 세포의 표현형을 유동 세포 분석법으로 분석하였다.

[100] 도 5는 감염전 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합단백질 예방접종에 의하여 유도된 T세포 표현형의 변화를 사이토카인 염색에 의하여 평가한 그래프와 IL-17, IFN-γ, TNF-α 및 IL-2 공 발현을 나타낸 그래프이다. 먼저 ESAT6로 자극시 ESAT6 (G4), Rv2299c-ESAT6 (G5) 및 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA (G6) 로 BCG 부스팅한 그룹 모두 항원 특이적인 IL-17$^+$IFN-γ$^+$ T세포 팽창이 일어났다(파이차트 밖 회색 원형). 그러나 ESAT6 (G4) 및 Rv2299c-ESAT6 (G5)로 BCG를 부스팅한 그룹에서는 CD4$^+$CD44$^+$IL-17$^+$IFN-γ$^+$TNF-α$^+$IL-2$^+$-다기능 T 세포의 팽창이 매우 적은 반면, Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA (G6) 로 부스팅한 그룹에서는 현저히 팽창되어 있음을 확인할 수 있었다. 특히 DC를 효과적으로 성숙시킬 수 있는 것으로 알려진 Rv2299c-ESAT6 융합 단백질 조성로 BCG를 부스팅한 그룹 (G5) 에서는 거의 관찰되지 않은 CD4$^+$CD44$^+$IL-17$^+$IFN-γ$^+$TNF-α$^+$ IL-2$^+$-다기능 T 세포가 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA (G6) 로 부스팅한 그룹에서 현저하게 팽창된 것은 Rv2299c-ESAT6를 포함하는 조성물의 부스팅으로는 예측할 수 없는 효과라 할 수 있다.

[101] 다음으로 Rv2299c-ESAT6로 자극시 Rv2299c-ESAT6 부스팅 그룹 (G5) 에서 IL-17$^+$IFN-γ$^+$ T세포의 팽창이 일어나지만, Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 부스팅 그룹 (G6) 에서 월등히 증가되었음을 확인할 수 있고, CD4$^+$CD44$^+$IL-17$^+$IFN-γ$^+$ TNF-α$^+$IL-2$^+$-다기능 T 세포의 팽창 또한 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 부스팅 그룹 (G6) 에서 월등히 증가되었음을 확인할 수 있었다.

[102] 마지막으로 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA로 자극시, Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA로 부스팅된 그룹 (G6) 에서 항원 특이적 IL-17$^+$IFN-γ$^+$ T세포의 팽창과 CD4$^+$CD44$^+$IL-17$^+$IFN-γ$^+$TNF-α$^+$IL-2$^+$ 다기능 T 세포의 팽창이 되었음을 확인할 수 있었다.

[103] 즉, BCG 접종 후, ESAT6 또는 Rv2299c-ESAT6 융합 단백질을 처리하는 것과 비교하여 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합 단백질로 부스팅 시킨 마우스에서 CD4$^+$CD44$^+$IL-17$^+$IFN-γ$^+$TNF-α$^+$IL-2$^+$ 다기능 T 세포의 팽창이 월등한 것을 확인함으로써, 본 발명의 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합 단백질이 BCG

백신의 부스팅으로써 ESAT6 또는 Rv2299c-ESAT6 융합 단백질 처리만으로는 예측할 수 없었던 현저한 백신 부스팅 효과를 나타내는 것을 면역학적인 분석으로 확인하였다.

[104] <실시예 5> Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합단백질의 고 병원성 M2 균주에 대한 유의한 BCG 프라임 부스팅 효과

[105] **5.1 실험방법**

[106] 상기 실시예 1-7과 같이, 마우스를 비접종, BCG만 접종 및 BCG 접종 후, ESAT6, Rv2299c-ESAT6 및 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합단백질로 부스팅 후, M2 균주 감염 시, 폐내의 세균 부하 정도를 측정하였다. ESAT6, Rv2299c-ESAT6 및 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합단백질 각각으로 면역화 된 마우스의 우측 폐의 상엽은 Mtb M2 챌린지 후 10 주에 H&E 염색을 사용하여 분석되었으며(1X : 스케일 바 = 2.0 mm), 이를 폐의 염증 부위의 비율과 병변의 크기를 나타내며 상자와 도표화 하였다. 또한 감염 10 주 후 각 그룹의 폐와 비장의 CFU를 측정 하였다. 두 개의 독립적 인 실험 중 하나의 데이터가 설명된다 (지정된 각 시점에서 그룹당 7 마리의 마우스). 일원 분산 분석에 이어 Tukey의 다중 비교 테스트를 수행하여 유의성을 평가했다. n.s .: 중요하지 않음, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 및 **** $p < 0.0001$.

[107] **5. 2 실험결과에 대한 분석**

[108] 도 6은 비접종, BCG만 접종 및 BCG 접종 후, ESAT6, Rv2299c-ESAT6 및 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합단백질로 부스팅 후, M2 균주 감염 시, 폐내의 세균 부하 정도를 나타내는 그래프이다. (A)는 각각의 그룹별(G2-G6)로 면역화 된 마우스의 우측 폐의 상엽이 고병원성 결핵균주인 M2로 챌린지 후 10주에 H&E 염색된 사진이다(1X : 스케일 바 = 2.0 mm). (B)는 각각의 그룹별(G2-G6)로 면역화 된 마우스의 폐 염증 부위의 비율과 병변의 크기를 나타낸 그래프이다. (C)는 감염 10 주 후 각 그룹의 폐와 비장의 CFU를 측정한 것을 그래프로 나타낸 것이다.

[109] 도 6 (A) 및 (B)에서 보는 바와 같이 면역화 되지 않은 마우스 (G2) 폐에서 염증부위의 비율과 병변의 크기가 가장 컸으며, BCG 단독 접종 (G3) 및 BCG 접종 후 ESAT6로 부스팅한 그룹(G4)에서 염증부위의 비율과 병변의 크기가 감소한 것을 확인하였다. 또한, Rv2299c-ESAT6 (G5) 및 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합단백질로 부스팅한 그룹 (G6)에서 M2결핵균주로 챌린지 후 염증부위의 비율과 병변의 크기가 가장 감소하였다. Rv2299c-ESAT6 (G5) 및 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합단백질로 부스팅한 그룹 (G6) 간의 염증부위의 비율과 병변의 크기에 유의한 차이는 없었다.

[110] 그러나 도 6 (C)에서 보는 바와 같이, 감염 10 주 후 각 그룹의 폐와 비장에서 CFU를 측정한 결과, Rv2299c-ESAT6 융합단백질로 부스팅한 그룹 (G5) 보다 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합단백질로 부스팅한 그룹 (G6) 에서 CFU가 현저하게 감소한 것을 확인하였다.

[111] 상기의 결과로 BCG 접종 후, 본 발명의 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합 단백질로 부스팅한 경우, 고 병원성 M2 균주 감염시 감염 마우스 폐 내의 세균 부하가 현저히 감소한다는 사실을 확인함으로써, 본 발명의 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합 단백질이 BCG 접종 효과적인 부스터로 작용하는 것을 확인하였다.

[112] <실시예 6> Mtb M2 균주 챌린지 후 BCG + ESAT6, Rv2299c-ESAT6 및 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA -면역화 된 마우스의 폐에서 항원 특이적 다 기능성 T 세포의 유도

[113] **6.1 실험방법**

[114] 마우스의 각 그룹은 재료 및 방법에서 설명한 바와 같이 예방 접종되고 희생시켰다. 최종 예방 접종 4주 후, Mtb M2 균주를 챌린지하고, 10주 후, 마우스 (n=7)의 각 그룹을 안락사시키고 그 폐 세포를 GolgiStop 존재 하에 37℃ 에서 12 시간 동안 표시된 항원으로 자극하였다. 예방 접종된 마우스의 폐로부터 분리된 세포 안의 IL-17, IFN-γ 및 / 또는 IL-2, TNF-α를 생성하는 항원 특이적인 $CD4^+$T 세포의 갯수는 다색의 유동 세포 분석법으로 $CD4^+CD44^+$림프구에 대해 게이팅하면서 분석되었다. 파이 차트는 IL-17, IFN-γ 및 / 또는 IL-2, TNF-α를 공동 발현하는 세포의 평균 개수를 나타낸다. 데이터는 각 그룹에서 5마리의 마우스에서 얻은 평균 ± SD로 나타내고, 독립 표본 t 테스트는 유의성을 결정하기 위해 사용되었다. 면역증강제 단독 그룹과 비교하여 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ 및 $***p < 0.001$ (독립 표본 t 테스트).

[115] **6.2 실험결과에 대한 분석.**

[116] 예방 접종 후 첼릴지 전 Th1 / Th17- 편향 면역 상태 (도 5) 및 강화 된 균 제어 효과 (도 6)의 면역학적 기여에 기초하여, 본 발명자들은 항원 재 자극 시 $IFN\text{-}\gamma^+$ 및 $IL\text{-}17^+$T세포 반응이 감염 후에도 지속적으로 유도되거나 확장 될 수 있다고 생각했다. Mtb M2 챌린지 10 주 후, 폐 세포를(도 6) 생체 외에서 ESAT6, Rv2299c-ESAT6 및 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA으로 자극하고 항원 특이적 $CD4^+$ T 세포의 표현형을 유동 세포 분석법을 이용하여 평가 하였다.

[117] 도 7은 감염후 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합단백질 예방접종에 의하여 유도된 T세포 표현형의 변화를 사이토카인 염색에 의하여 평가한 그래프와 IL-17, IFN-γ, TNF-α 및 IL-2의 공 발현을 나타낸 그래프이다. 감염전 데이터(도 5)와 동일하게 먼저 ESAT6로 자극시 ESAT6 (G4), Rv2299c-ESAT6 (G5) 및 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA (G6) 로 BCG를 부스팅한 그룹 모두 항원 특이적인 $CD4^+CD44^+IL\text{-}17^+IFN\text{-}\gamma^+$T세포의 팽창이 일어났다 (파이차트 밖 회색 원형). 그러나 ESAT6 (G4) 및 Rv2299c-ESAT6로 부스팅한 그룹 (G5) 에서는 $CD4^+CD44^+$ $IL\text{-}17^+IFN\text{-}\gamma^+TNF\text{-}\alpha^+IL\text{-}2^+$ 다기능 T 세포의 팽창이 매우 적은 반면, Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA로 부스팅한 그룹 (G6) 에서는 현저히 팽창되어 있음을 확인할 수 있다.

[118] 다음으로 Rv2299c-ESAT6로 자극시 Rv2299c-ESAT6 (G5) 부스팅 그룹에서

$CD4^+CD44^+IL\text{-}17^+IFN\text{-}\gamma^+$T세포의 팽창이 일어나지만, Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 부스팅 그룹 (G6)에서 $CD4^+CD44^+IL\text{-}17^+IFN\text{-}\gamma^+$ T세포가 월등히 증가되었음을 확인할 수 있고, $CD4^+CD44^+IL\text{-}17^+IFN\text{-}\gamma^+TNF\text{-}\alpha^+$ $IL\text{-}2^+$ 다기능 T 세포의 팽창 또한 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 부스팅 그룹 (G6)에서 월등히 증가되었음을 확인할 수 있다.

[119] 마지막으로 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA로 자극시에도, Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA로 부스팅된 그룹 (G6) 에서 항원 특이적 $IL\text{-}17^+IFN\text{-}\gamma^+$의 팽창과 $CD4^+CD44^+IL\text{-}17^+IFN\text{-}\gamma^+TNF\text{-}\alpha^+IL\text{-}2^+$ 다기능 T 세포의 팽창이 되었음을 확인할 수 있다.

[120] 이러한 결과는 본 발명의 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 백신 접종이 항원 특이적 다 기능성 T 세포 $CD4^+CD44^+IL\text{-}17^+IFN\text{-}\gamma^+TNF\text{-}\alpha^+IL\text{-}2^+$와 $IL\text{-}17^+IFN\text{-}\gamma^+$ T 세포의 부스트를 유도하여 Mtb 균주 감염에 대한 보호를 향상시킬 수 있음을 확인한 것이다.

[121] ESAT6, Rv2299c-ESAT6 및 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA로 자극시, Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA로 면역화 된 마우스는 항원 특이적 $CD4^+CD44^+$ 다기능 T 세포 (IL-17+ IFN-γ + TNF-α + IL-2의 공동 생성)의 팽창을 나타냈다. 이러한 결과는 BCG 접종 후, Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합단백질로 BCG접종자에게 부스팅함으로써 항원 특이적 다 기능성 T 세포, 특히 $IL\text{-}17^+IFN\text{-}\gamma^+$ T 세포의 부스트를 유도하여 Mtb 균주 감염에 대한 보호를 향상시킬 수 있음을 알 수 있었다.

[122] 백신이 결핵에 대한 보호를 유도하려면 항원 특이적 T 세포를 폐로 신속하게 모집하고 감염된 포식세포를 활성화하여 결핵균을 조절해야 한다. 또한 감염 부위에 도달한 세포는 포식세포가 가득한 환경에서 생존할 수 있어야 한다.

[123] 면역학적 기억은 증가 된 수준의 이펙터(effector) 세포 및 일차 반응 동안보다 병원체와의 두 번째 만남에 더 빠르고 강력하게 반응하는 능력을 특징으로 한다. 특히 결핵과 같은 세포내 병원체에는 강한 면역반응이 필요하다. 따라서 기억 T 세포인 $CD4^+CD44^+$ T 세포의 팽창이 결핵균과의 후속 접촉에 신속하게 반응 할 수 있는 세포의 풀을 제공한다. 또한, $CD4^+IFN\text{-}\gamma^+$ T 세포는 고전적으로 Mtb 제어에 필수적이라고 생각되지만, IFN-γ 반응의 크기는 TB에 대한 보호 효능의 최적 상관 관계를 제공하지 못한다. 또한, 최근 데이터는 IFN-γ, TNF-α 및 IL-2를 포함하여 다수의 사이토카인을 생산하는 $CD4^+$T 세포가 Mtb 감염에 대한 보호와 관련이 있음을 밝혔다. 그러므로 $CD4^+CD44^+$ T 세포에서 다수의 사이토카인을 생성하는 T 세포는 결핵제어 조절에 중요한 역할을 한다.

[124] 결핵균 감염 동안 Mtb 증식의 초기 조절을 유도하는 마우스에서 Mtb에 대한 보호에서 IL-17의 기능적 역할은 명확하지 않으며, 특히 Mtb 감염된 대식세포에서 IFN-γ와의 상승 작용이 불분명하다. 본 발명자들의 이전 연구는 시험관 내에서 나이브 CD4+ T 세포와 공 배양된 Rv2299c-ESAT6에 의해 활성화된 수지상 세포로부터 사이토카인 프로파일을 조사함으로써 Th17 반응의

가능한 관여를 제안했지만, 정확한 메카니즘은 이것의 보호 효능에 대한 명확한 설명이 필요하였다.

[125] 이 질문을 해결하기 위해, 우리는 각 요법의 보호 효능을 결정 하고 보호 $CD4^+$ T 세포 하위 집합의 표현형과 상관관계가 있는지 확인하기 위해 BCG 예방 접종 후 융합단백으로 부스팅하고 고병원성 결핵균주로 감염을 진행하였다. 현재의 연구에서 우리는 쥐 결핵감염 모델에서 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합단백질 백신이 BCG에 의해 유도된 면역반응을 증진시키고 연장시키는 능력을 처음으로 평가하였고 이와 동일하게 BCG의 방어효과를 매우 유의하게 중강시킴을 입증하였다. 또한 본 서브 유닛 백신의 최적 백신 효능을 위해 Th17 반응이 필요한 이유 및 방법을 조사했다.

[126] 본 발명자들의 데이터는 BCG- 프라이밍 된 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 부스터 백신 접종이 BCG 프라이밍 된 ESAT6와 Rv2299c-ESAT6에 비해 폐 및 비장에서 ESAT6 재 자극시 최종 면역화 후 Th1/Th17 면역 반응을 동시에 유발함을 보여준다. 또한, BCG가 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA로 증폭 된 후, ESAT6를 이용한 시험 관내 자극 후 3 개 또는 2 개의 이펙터 사이토카인을 공동 생산하는 항원 특이적 $CD4^+CD44^+IL\text{-}17^+IFN\text{-}\gamma^+$T세포의 수가 유의하게 증가함을 발견하였다. 따라서, 다기능 $CD4^+$ T 세포를 생산하는 즉시 확장 가능한 IFN-γ/IL-17의 존재 및 Rv2299c-E6-HspX-RipA 부스팅에 의해 유도된 그들의 항원 특이적 확장은 Mtb 감염에 대한 강화 된 보호에 기여할 수 있는 것으로 생각된다. 종합적으로, 본 발명은 신규한 면역 자극성 항원 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합단백질이 BCG 접종 후, 효과적으로 부스팅 할 수 있음을 확인하였다.

청구범위

[청구항 1] Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는 BCG 백신 부스터용 조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합 단백질의 Rv2299c, ESAT6, HspX 및 RipA은 각각 결핵균(*M. tuberculosis*) 유래의 단백질인 것을 특징으로 하는 BCG 백신 부스터용 조성물.

[청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 Rv2299c-ESAT6-HspX-RipA 융합 단백질은 1 ㎍/㎖ 내지 20 ㎍/㎖ 농도로 포함된 것을 특징으로 하는 BCG 백신 부스터용 조성물.

[청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 BCG 백신 부스터용 조성물은 $IL\text{-}17^{+}IFN\text{-}\gamma^{+}$ 다기능 T 세포 또는 $IL\text{-}17^{+}IFN\text{-}\gamma^{+}TNF\text{-}\alpha^{+}IL\text{-}2^{+}$ 다기능 T 세포를 증가시키는 것을 특징으로 하는 BCG 백신 부스터용 조성물

[청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 BCG 백신 부스터용 조성물은 $CD4^{+}CD44^{+}$ T 세포를 증가시키는 것을 특징으로 하는 BCG 백신 부스터용 조성물

[청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 BCG 백신 부스터용 조성물은 결핵균 감염시 세균부하를 감소시키는 것을 특징으로 하는 BCG 백신 부스터용 조성물

[청구항 7] 서열 번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 재조합 단백질

[청구항 8] 제7항의 재조합 단백질을 포함하는 단백질 BCG 백신 부스터용 조성물

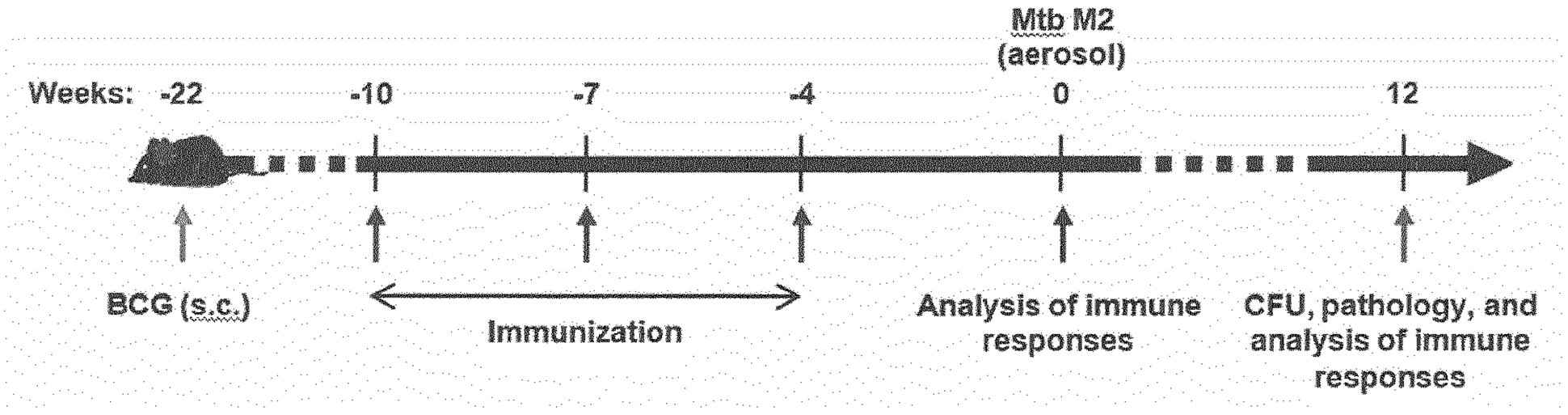
[청구항 9] (가) BCG를 접종하는 단계;
(나) 상기 (가) 단계의 BCG 접종 12주 후, 제1항 내지 6항 및 제8항 중 어느 한 항의 BCG 백신 부스터용 조성물을 접종하는 단계를 포함하는 BCG 백신 부스팅 방법.

[청구항 10] 제9항에 있어서,
상기 (나) 단계는 BCG 백신 부스터용 조성물을 3주 주기로 3회 투여하는 단계인 BCG 백신 부스팅 방법

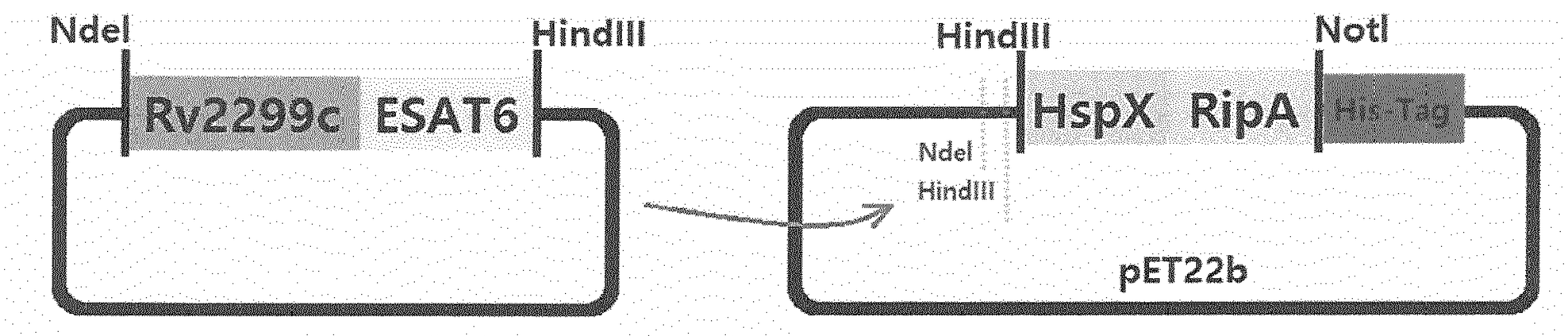
[청구항 11] 제9항에 있어서,
상기 BCG 백신 부스팅 방법은 $IL\text{-}17^{+}IFN\text{-}\gamma^{+}$ 다기능 T 세포 또는 $IL\text{-}17^{+}IFN\text{-}\gamma^{+}TNF\text{-}\alpha^{+}IL\text{-}2^{+}$ 다기능 T 세포를 증가시키는 것을 특징으로 하는 BCG 백신 부스팅 방법

[청구항 12] 제9항에 있어서,
상기 BCG 백신 부스팅 방법은 $CD4^{+}CD44^{+}$ T 세포를 증가시키는 것을 특징으로 하는 BCG 백신 부스팅 방법

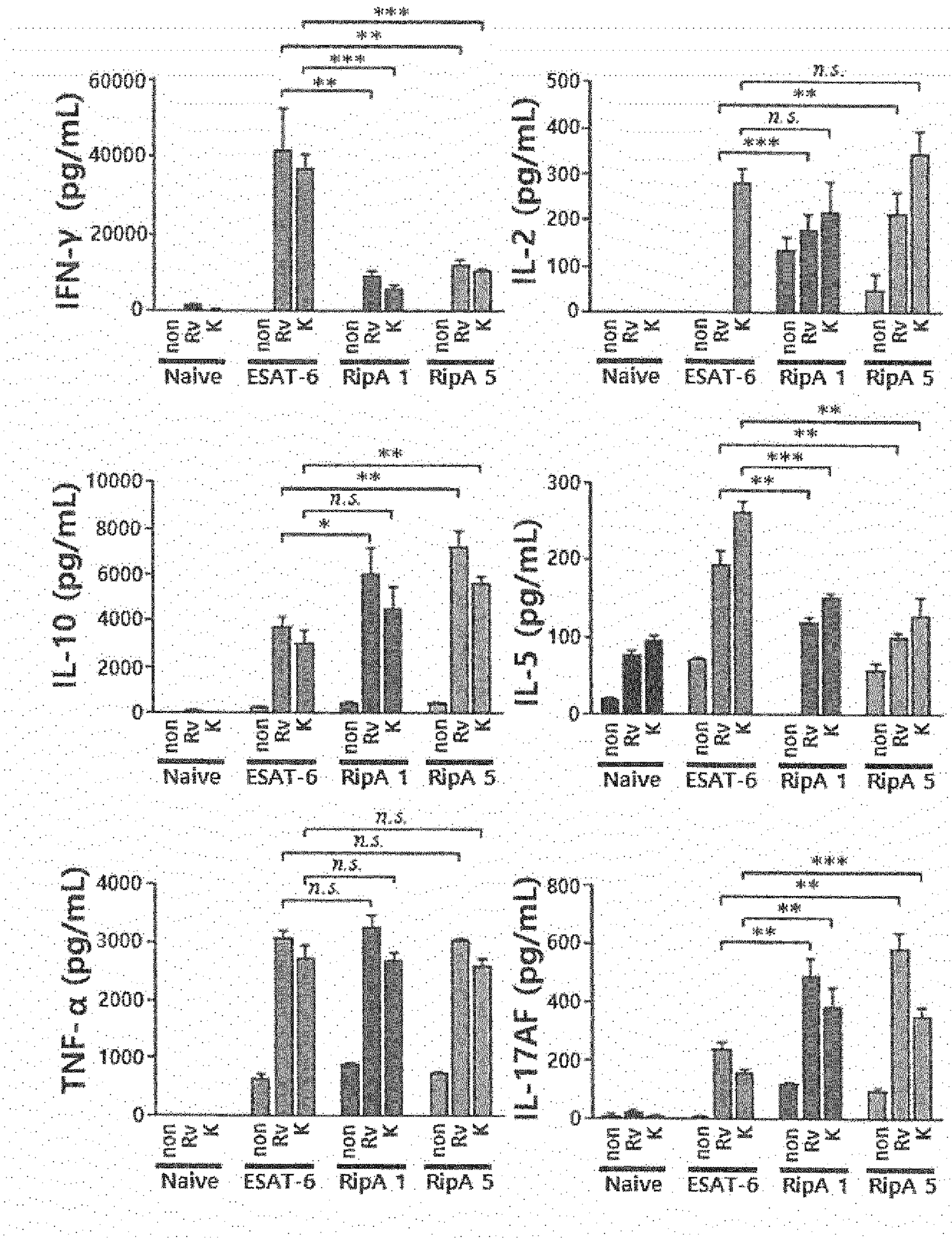
[도1]


Mtb M2
(aerosol)
Weeks: -22
-10
-7
-4
0
12
BCG (s.c.)
Immunization
Analysis of immune responses
CFU, pathology, and analysis of immune responses

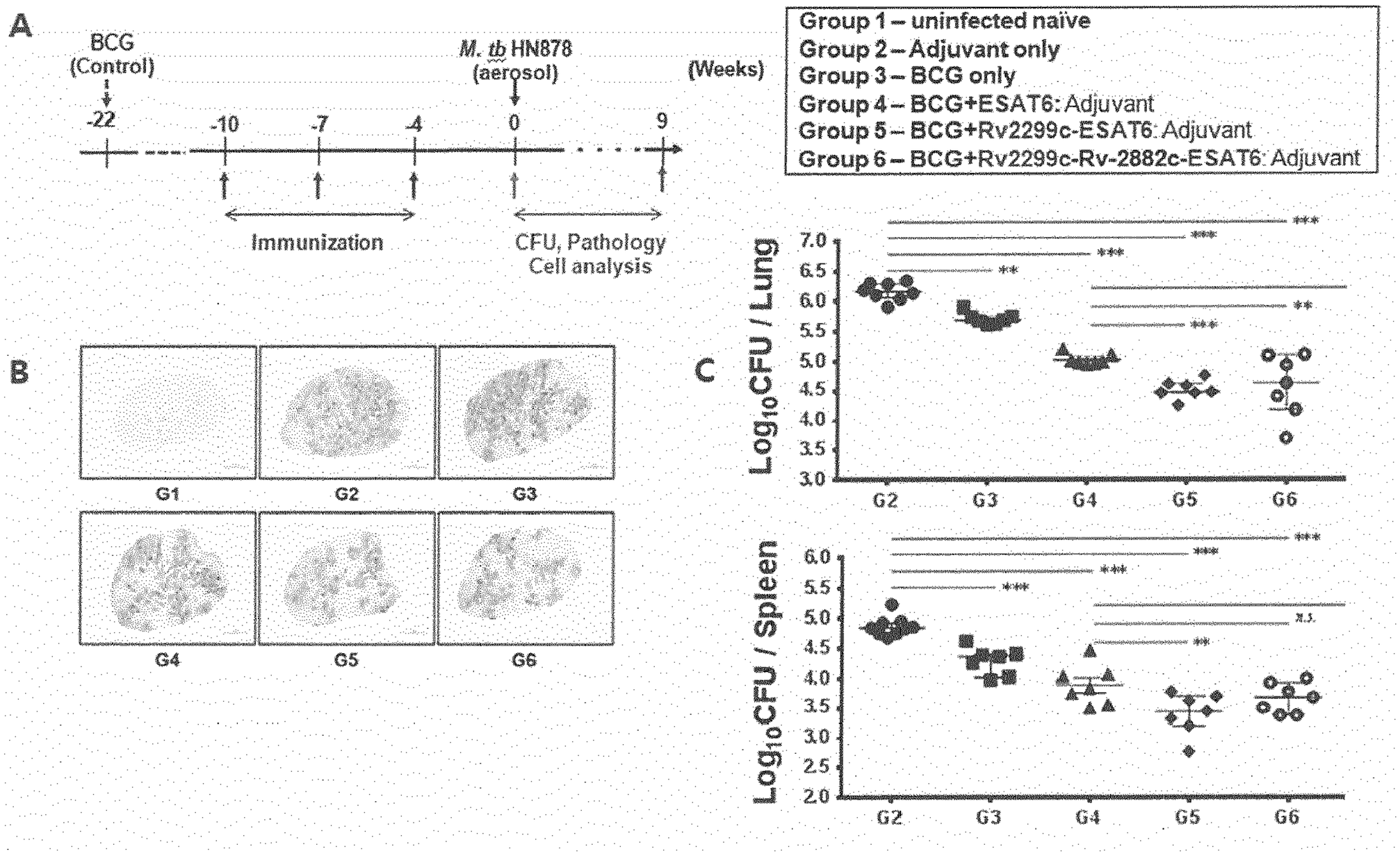
[도2]


NdeI
HindIII
Rv2299c
ESAT6
HindIII
NotI
HspX
RipA
His-Tag
NdeI
HindIII
pET22b

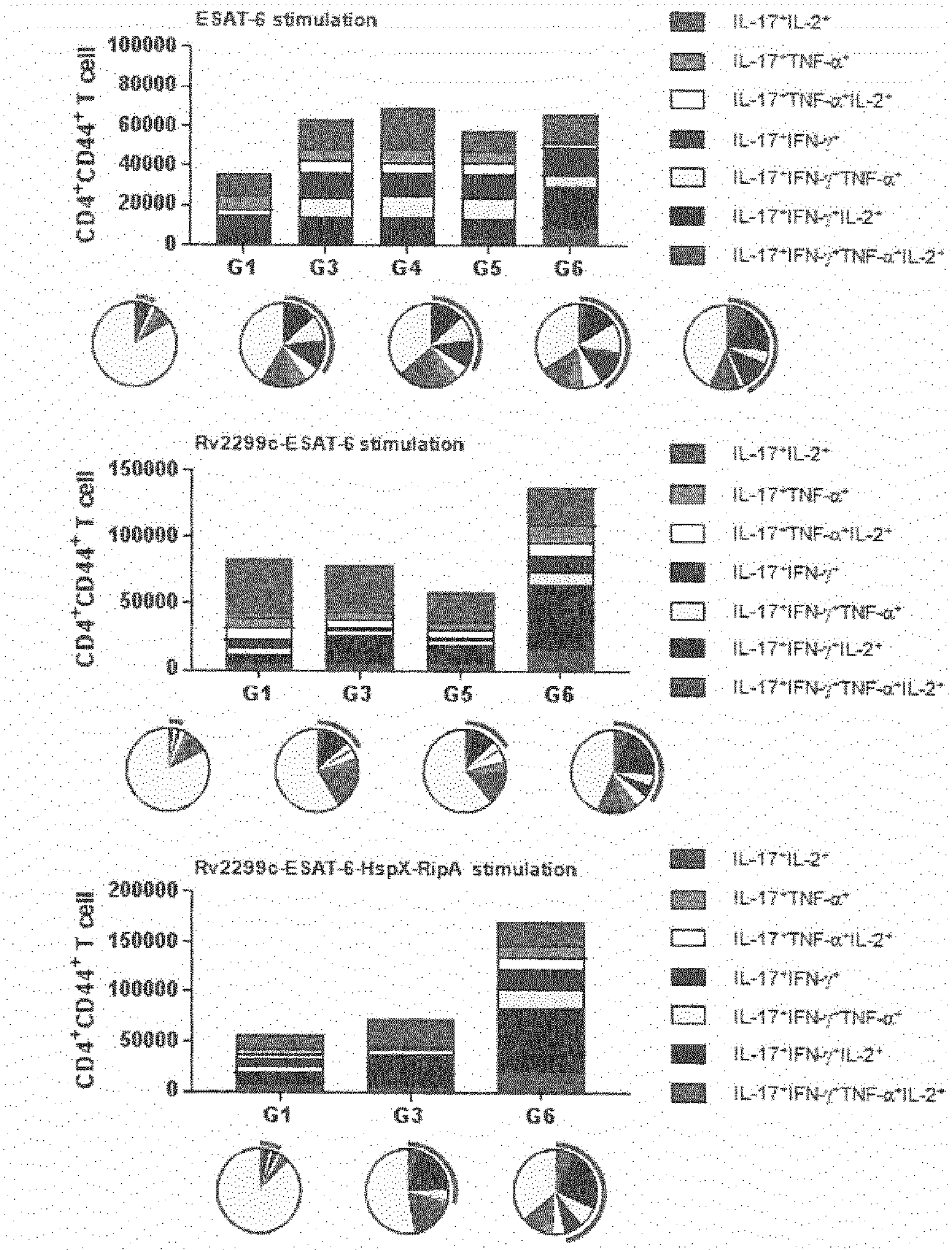
[도3]


IFN-γ (pg/mL)
IL-2 (pg/mL)
IL-10 (pg/mL)
IL-5 (pg/mL)
TNF-α (pg/mL)
IL-17AF (pg/mL)
n.s.
non
Rv
K
Naive
ESAT-6
RipA 1
RipA 5

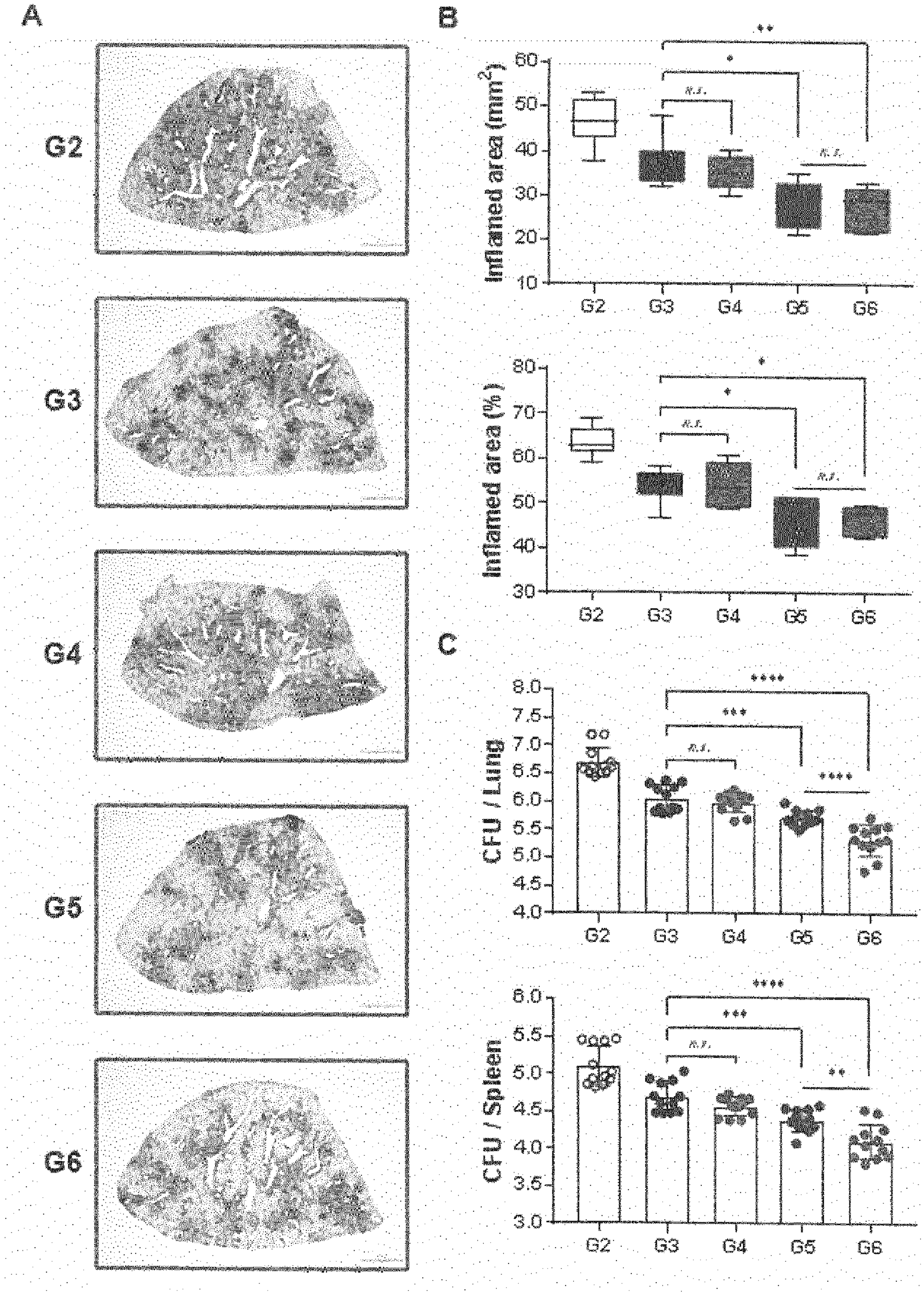
[도4]


A
BCG
(Control)
M. tb HN878
(aerosol)
(Weeks)
-22
-10
-7
-4
0
9
Immunization
CFU, Pathology
Cell analysis
Group 1 – uninfected naïve
Group 2 – Adjuvant only
Group 3 – BCG only
Group 4 – BCG+ESAT6: Adjuvant
Group 5 – BCG+Rv2299c-ESAT6: Adjuvant
Group 6 – BCG+Rv2299c-Rv-2882c-ESAT6: Adjuvant
B
G1
G2
G3
G4
G5
G6
C
Log10CFU / Lung
Log10CFU / Spleen
N.S.

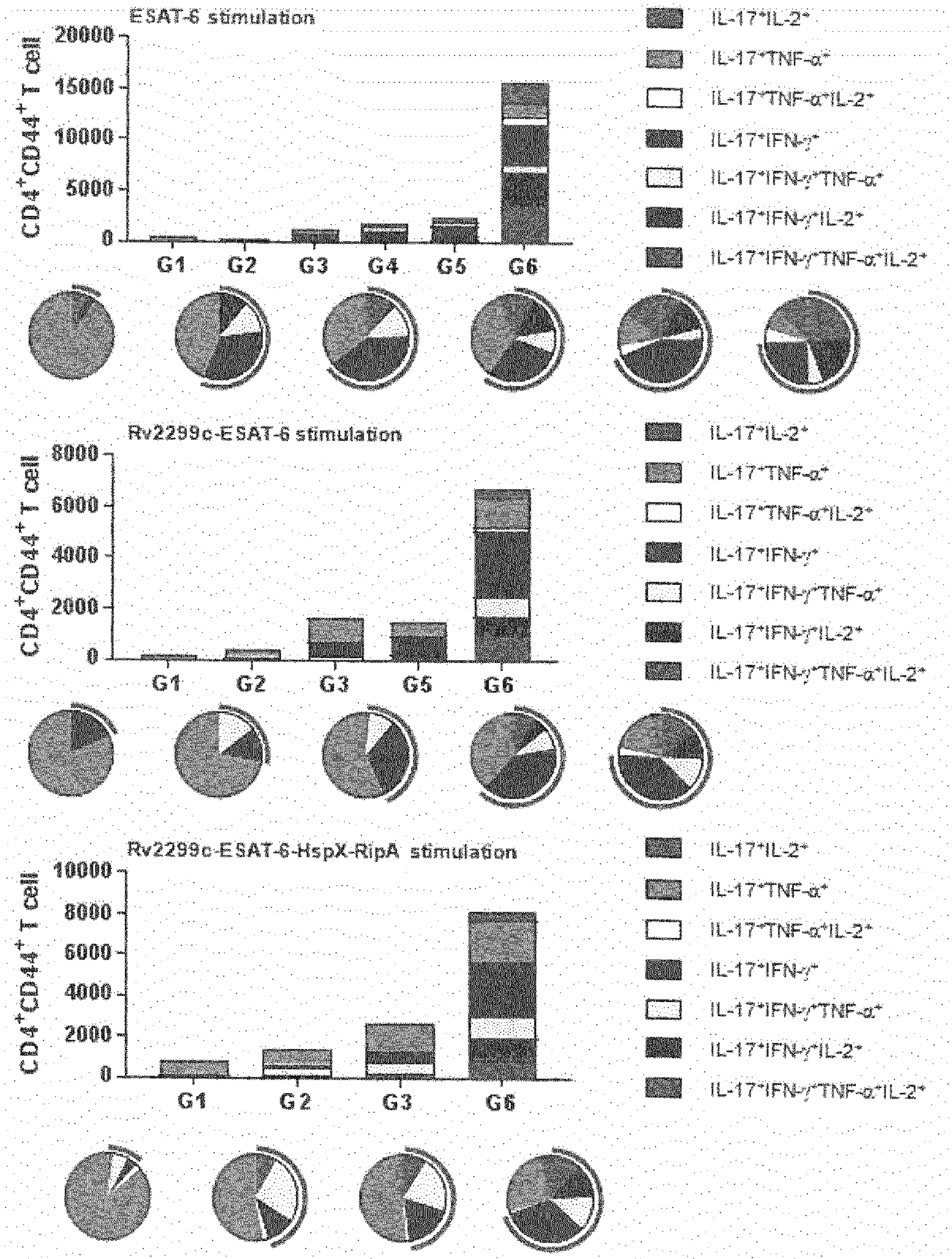
[도5]


ESAT-6 stimulation
CD4+CD44+ T cell
100000
80000
60000
40000
20000
0
G1
G3
G4
G5
G6
IL-17+IL-2+
IL-17+TNF-α+
IL-17+TNF-α+IL-2+
IL-17+IFN-γ+
IL-17+IFN-γ+TNF-α+
IL-17+IFN-γ+IL-2+
IL-17+IFN-γ+TNF-α+IL-2+
Rv2299c-ESAT-6 stimulation
CD4+CD44+ T cell
150000
100000
50000
0
G1
G3
G5
G6
IL-17+IL-2+
IL-17+TNF-α+
IL-17+TNF-α+IL-2+
IL-17+IFN-γ+
IL-17+IFN-γ+TNF-α+
IL-17+IFN-γ+IL-2+
IL-17+IFN-γ+TNF-α+IL-2+
Rv2299c-ESAT-6-HspX-RipA stimulation
CD4+CD44+ T cell
200000
150000
100000
50000
0
G1
G3
G6
IL-17+IL-2+
IL-17+TNF-α+
IL-17+TNF-α+IL-2+
IL-17+IFN-γ+
IL-17+IFN-γ+TNF-α+
IL-17+IFN-γ+IL-2+
IL-17+IFN-γ+TNF-α+IL-2+

[도6]


A
G2
G3
G4
G5
G6
B
Inflamed area (mm2)
60
50
40
30
20
10
**
*
N.S.
N.S.
G2
G3
G4
G5
G6
C
Inflamed area (%)
80
70
60
50
40
30
*
*
N.S.
N.S.
G2
G3
G4
G5
G6
CFU / Lung
8.0
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
****
***
N.S.
****
G2
G3
G4
G5
G6
CFU / Spleen
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
****
***
N.S.
**
G2
G3
G4
G5
G6

[도7]


ESAT-6 stimulation
CD4+CD44+ T cell
20000
15000
10000
5000
0
G1
G2
G3
G4
G5
G6
IL-17+IL-2+
IL-17+TNF-α+
IL-17+TNF-α+IL-2+
IL-17+IFN-γ+
IL-17+IFN-γ+TNF-α+
IL-17+IFN-γ+IL-2+
IL-17+IFN-γ+TNF-α+IL-2+
Rv2299c-ESAT-6 stimulation
CD4+CD44+ T cell
8000
6000
4000
2000
0
G1
G2
G3
G5
G6
IL-17+IL-2+
IL-17+TNF-α+
IL-17+TNF-α+IL-2+
IL-17+IFN-γ+
IL-17+IFN-γ+TNF-α+
IL-17+IFN-γ+IL-2+
IL-17+IFN-γ+TNF-α+IL-2+
Rv2299c-ESAT-6-HspX-RipA stimulation
CD4+CD44+ T cell
10000
8000
6000
4000
2000
0
G1
G2
G3
G6
IL-17+IL-2+
IL-17+TNF-α+
IL-17+TNF-α+IL-2+
IL-17+IFN-γ+
IL-17+IFN-γ+TNF-α+
IL-17+IFN-γ+IL-2+
IL-17+IFN-γ+TNF-α+IL-2+

[도8]

Rv2299c+ESAT6+HspX+RipA

MNAHVEQLEFQAEARQLLDLMVHSVYSNKDAFLRELISNASDALDKLRIEALRNKDLEVDTSDLHIEIDADKAAR
TLTVRDNGIGMAREEVVDLIGTLAKSGTAELRAQLREAKNAAASEELIGQFGIGFYSSFMVADKVQLLTRKAGESA
ATRWESSGEGTYTIESVEDAPQGTSVTLHLKPEDAEDDLHDYTSEWKIRNLVKKYSDFIAWPIRMDVERRTPASQ
EEGGEGGEETVTIETETLNSMKALWARPKEEVSEQEYKEFYKHVAHAWDDPLEIIAMKAEGTFEYQALLFIPSHAP
FDLFDRDAHVGIQLYVKRVFIMGDCDQLMPEYLRFVKGVVDAQDMSLNVSREILQQDRQIKAIRRRLTKKVLSTI
KDVQSSRPEDYRTFWTQFGRVLKEGLLSDIDNRETLLGISSFVSTYSEEEPTTLAEYVERMKDGQQQIFYATGETR
QQLLKSPHLEAFKAKGYEVLLLTDPVDEVWVGMVPEFDGKPLQSVAKGEVDLSSEEDTSEAEREERQKEFADLLT
WLQETLSDHVKEVRLSTRLTESPACLITDAFGMTPALARIYRASGQEVPVGKRILELNPSHPLVTGLRQAHQDRAD
DAEKSLAETAELLYGTALLAEGGALEDPARFAELLAERLARTLMTEQQWNFAGIEAAAASAIQGNVTSIHSLLDEGK
QSLTKLAAAWGGSGSEAYQGVQQKWDATATELNNALQNLARTISEAGQAMASTEGNVTGMFAKLMATTLPV
QRHPRSLFPEFSELFAAFPSFAGLRPTFDTRLMRLEDEMKEGRYEVRAELPGVDPDKDVDIMVRDGQLTIKAERTE
QKDFDGRSEFAYGSFVRTVSLPVGADEDDIKATYDKGILTVSVAVSEGKPTEKHIQIRSTNDPQTDTIAALIADVAK
ANQRLQDLSDEVQAEQESVNKAMVDVETARDNAAAAEDDLEVSQRAVKDANAAIAAAQHRFDTFAAATYM
NGPSVSYLSASSPDEIIATVTAAKTLSASSQAVMANLQRARTERVNTESAARLAKQKADKAAADAKASQDAAVA
ALTETRRKFDEQREEVQRLAAERDAAQARLQAARLVAWSSEGGQGAPPFRMWDPGSGPAGGRAWDGLWDP
TLPMIPSANIPGDPIAVVNQVLGISATSAQVTANMGRKFLEQLGILQPTDTGITNAPAGSAQGRIPRVYGRQASEY
VIRRGMSQIGVPYSWGGGNAAGPSKGIDSGAGTVGFDCSGLVLYSFAGVGIKLPHYSGSQYNLGRKIPSSQMRR
GDVIFYGPNGSQHVTIYLGNGQMLEAPDVGLKVRVAPVRTAGMTPYVVRYIEYAAALEHHHHHH

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2020/014572

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 39/04(2006.01)i; **A61K 39/39**(2006.01)i; **A61P 31/04**(2006.01)i; **C07K 14/35**(2006.01)i; **A61K 38/00**(2006.01)i; **A61K 39/00**(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 39/04(2006.01); A61K 39/145(2006.01); A61K 39/29(2006.01); C07K 19/00(2006.01); C12N 15/62(2006.01); C12N 5/0784(2010.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: Rv2299c, ESAT6, HspX, RipA, BCG(Bacillus Calmette-Guerin), 백신(vaccine), 부스터(booster), 결핵(tuberculosis)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
DA	KR 10-1749165 B1 (THE INDUSTRY & ACADEMIC COOPERATION IN CHUNGNAM NATIONAL UNIVERSITY (IAC) et al.) 23 June 2017 (2017-06-23) See paragraphs [0034]-[0036] and [0125]-[0159] and claims 1-3.	1-8
A	MARONGIU, Laura et al. ESAT-6 and HspX Improve the Effectiveness of BCG to Induce Human Dendritic Cells-Dependent Th1 and NK Cells Activation. PLOS One. 2013, vol. 8, no. 10, e75684, inner pp. 1-11. See abstract and inner pages 3 and 6-9.	1-8
A	연세대학교 산학협력단. 고병원성 한국형 결핵균 K 균주의 핵심 병원성 인자에 의한 병인 면역과 방어면역의 프로그램화 기전 규명. 보건의료기술연구개발사업 최종보고서. 2015, grant no. H13C0833 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY. Investigation on Programming of Immunopathogenesis and Protective Responses Induced by Key Virulence Factors of Highly Pathogenic Mycobacterium tuberculosis K-strain. Final Report of Health and Medical Technology Research and Development Project). See figures 72-79.	1-8

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
29 January 2021	**29 January 2021**
Name and mailing address of the ISA/KR **Korean Intellectual Property Office** **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208** Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2020/014572

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2012-0083899 A (IMAXIO SA et al.) 26 July 2012 (2012-07-26) See claims 1-3.	1-8
A	KR 10-2013-0081715 A (EYEGENE INC.) 17 July 2013 (2013-07-17) See claims 1-3 and 31-34.	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2020/014572

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2020/014572

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☑ Claims Nos.: **9-12**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 9-12 pertain to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, as well as a diagnostic method (PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv)).

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2020/014572

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-1749165 B1	23 June 2017	AU 2017-279377 A1	20 December 2018
		AU 2017-279377 A1	14 December 2017
		AU 2017-279377 B2	30 April 2020
		BR 112018075291 A2	30 April 2019
		CN 109415700 A	01 March 2019
		EP 3467102 A1	10 April 2019
		JP 2019-521183 A	25 July 2019
		JP 6683892 B2	22 April 2020
		MX 2018015224 A	28 March 2019
		PH 12018502533 A1	21 October 2019
		RU 2018141866 A	10 July 2020
		RU 2018141866 A3	10 July 2020
		RU 2733886 C2	07 October 2020
		US 2019-0153390 A1	23 May 2019
		WO 2017-213407 A1	14 December 2017
KR 10-2012-0083899 A	26 July 2012	AU 2010-308120 A1	03 May 2012
		AU 2010-308120 A1	21 April 2011
		AU 2010-308120 B2	22 January 2015
		BR 112012008790 A2	24 September 2019
		CA 2776001 A1	21 April 2011
		CN 102666575 A	12 September 2012
		CN 102666575 B	15 July 2015
		EA 201270517 A1	28 December 2012
		EP 2488549 A1	22 August 2012
		EP 2488549 B1	29 July 2015
		JP 2013-507907 A	07 March 2013
		NZ 599259 A	28 March 2014
		US 2012-0282290 A1	08 November 2012
		US 9181311 B2	10 November 2015
		WO 2011-045612 A1	21 April 2011
		ZA 201202363 B	30 January 2013
KR 10-2013-0081715 A	17 July 2013	CN 103384532 A	06 November 2013
		CN 104815325 A	05 August 2015
		CN 104815325 B	15 May 2018
		CN 106390109 A	15 February 2017
		EP 2664345 A2	20 November 2013
		EP 2664345 B1	30 May 2018
		ES 2685585 T3	10 October 2018
		JP 2013-545799 A	26 December 2013
		JP 2016-145224 A	12 August 2016
		JP 5894604 B2	30 March 2016
		JP 6067900 B2	25 January 2017
		KR 10-1820697 B1	24 January 2018
		KR 10-1820698 B1	24 January 2018
		KR 10-2012-0068647 A	27 June 2012
		KR 10-2014-0070600 A	10 June 2014
		KR 10-2014-0070601 A	10 June 2014
		US 2013-0273101 A1	17 October 2013
		US 9572877 B2	21 February 2017
		WO 2012-081947 A2	21 June 2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2020/014572

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		WO 2012-081947 A3	04 October 2012

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2019)

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호

PCT/KR2020/014572

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 39/04(2006.01)i; **A61K 39/39**(2006.01)i; **A61P 31/04**(2006.01)i; **C07K 14/35**(2006.01)i; **A61K 38/00**(2006.01)i; **A61K 39/00**(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 39/04(2006.01); A61K 39/145(2006.01); A61K 39/29(2006.01); C07K 19/00(2006.01); C12N 15/62(2006.01); C12N 5/0784(2010.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: Rv2299c, ESAT6, HspX, RipA, BCG(Bacillus Calmette-Guerin), 백신(vaccine), 부스터(booster), 결핵(tuberculosis)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
DA	KR 10-1749165 B1 (충남대학교산학협력단 등) 2017.06.23 단락 [0034]-[0036, [0125]-[0159] 및 청구항 1-3	1-8
A	MARONGIU, LAURA 등, ESAT-6 and HspX Improve the Effectiveness of BCG to Induce Human Dendritic Cells-Dependent Th1 and NK Cells Activation, PLOS One, 2013년, 8권, 10호, e75684, 내부페이지 1-11 요약 및 내부페이지 3, 6-9	1-8
A	연세대학교 산학협력단, 고병원성 한국형 결핵균 K 균주의 핵심 병원성 인자에 의한 병인 면역과 방어면역의 프로그램화 기전 규명, 보건의료기술연구개발사업 최종보고서, 2015년, 과제고유번호 H13C0833 그림 72-79	1-8
A	KR 10-2012-0083899 A (아이백시오 에스에이 등) 2012.07.26 청구항 1-3	1-8
A	KR 10-2013-0081715 A (아이진 주식회사) 2013.07.17 청구항 1-3, 31-34	1-8

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☑ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2021년01월29일(29.01.2021)	**2021년01월29일(29.01.2021)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 **+82-42-481-8578**

심사관

허주형

전화번호 **+82-42-481-5373**

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2020/014572

제1기재란 **핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)**

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

   a. ☑ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록

      ☑ 부록 C/ST.25 텍스트 파일

      ☐ 서면 혹은 이미지 파일

   b. ☐ PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록

   c. ☐ 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록

      ☐ 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))

      ☐ 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2020/014572

제2기재란　　일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☑ 청구항: **9-12**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,

청구항 9-12는 수술 또는 치료에 의한 사람의 처치방법 및 진단방법에 관한 것입니다(PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)).

2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2020/014572

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1749165 B1	2017/06/23	AU 2017-279377 A1	2018/12/20
		AU 2017-279377 A1	2017/12/14
		AU 2017-279377 B2	2020/04/30
		BR 112018075291 A2	2019/04/30
		CN 109415700 A	2019/03/01
		EP 3467102 A1	2019/04/10
		JP 2019-521183 A	2019/07/25
		JP 6683892 B2	2020/04/22
		MX 2018015224 A	2019/03/28
		PH 12018502533 A1	2019/10/21
		RU 2018141866 A	2020/07/10
		RU 2018141866 A3	2020/07/10
		RU 2733886 C2	2020/10/07
		US 2019-0153390 A1	2019/05/23
		WO 2017-213407 A1	2017/12/14
KR 10-2012-0083899 A	2012/07/26	AU 2010-308120 A1	2012/05/03
		AU 2010-308120 A1	2011/04/21
		AU 2010-308120 B2	2015/01/22
		BR 112012008790 A2	2019/09/24
		CA 2776001 A1	2011/04/21
		CN 102666575 A	2012/09/12
		CN 102666575 B	2015/07/15
		EA 201270517 A1	2012/12/28
		EP 2488549 A1	2012/08/22
		EP 2488549 B1	2015/07/29
		JP 2013-507907 A	2013/03/07
		NZ 599259 A	2014/03/28
		US 2012-0282290 A1	2012/11/08
		US 9181311 B2	2015/11/10
		WO 2011-045612 A1	2011/04/21
		ZA 201202363 B	2013/01/30
KR 10-2013-0081715 A	2013/07/17	CN 103384532 A	2013/11/06
		CN 104815325 A	2015/08/05
		CN 104815325 B	2018/05/15
		CN 106390109 A	2017/02/15
		EP 2664345 A2	2013/11/20
		EP 2664345 B1	2018/05/30
		ES 2685585 T3	2018/10/10
		JP 2013-545799 A	2013/12/26
		JP 2016-145224 A	2016/08/12
		JP 5894604 B2	2016/03/30
		JP 6067900 B2	2017/01/25
		KR 10-1820697 B1	2018/01/24
		KR 10-1820698 B1	2018/01/24
		KR 10-2012-0068647 A	2012/06/27
		KR 10-2014-0070600 A	2014/06/10
		KR 10-2014-0070601 A	2014/06/10
		US 2013-0273101 A1	2013/10/17
		US 9572877 B2	2017/02/21
		WO 2012-081947 A2	2012/06/21

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2020/014572

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		WO 2012-081947 A3	2012/10/04