(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
A61K 39/02
A61K 39/40
C07K 16/12
C07K 16/40

(45) 공고일자 2003년04월11일
(11) 등록번호 10-0368475
(24) 등록일자 2003년01월06일

(21) 출원번호	10-1996-0706972	(65) 공개번호	특1997-0703164
(22) 출원일자	1996년12월06일	(43) 공개일자	1997년07월03일
번역문제출일자	1996년12월06일		
(86) 국제출원번호	PCT/AU1995/00335	(87) 국제공개번호	WO 1995/33482
(86) 국제출원일자	1995년06월08일	(87) 국제공개일자	1995년12월14일

(30) 우선권주장 PM 6124 1994년06월08일 오스트레일리아(AU)

(73) 특허권자 시에스엘 리미티드
오스트레일리아 빅토리아 3052 파크빌 포플러 로드 45더 유니버시티 오브 뉴 사우스 웨일즈

(72) 발명자 오스트레일리아 뉴사우스웨일즈 2033 켄싱톤 안작크 퍼레이드
크리스토퍼 빈센트 도이지

오스트레일리아, 빅토리아 3128, 박스 힐, 마가렛 스트리트 72
에이드리언 리

오스트레일리아, 뉴 사우스 웨일즈 2066, 레인 코브, 오스틴 스트리트 68
피오나 제인 래드클리프

오스트레일리아, 뉴 사우스 웨일즈 2006, 시드니, 인터내쇼날 하우스, 더 유니버시티 오브 뉴 사우스 웨일즈
스튜어트 로이드 하젤

오스트레일리아, 뉴 사우스 웨일즈 2167, 글렌필드,트래팰거 스트리트 42

(74) 대리인 신정건, 양재관, 이상섭

심사관 : 조성신

(54) 헬리코박터감염의치료및예방용항원제제

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 보호성 헬리코박터류 항원, 구체적으로 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 항원 및 인체에서 헬리코박터 파이로리 감염과 관련된 십이지장 질환의 치료 및 예방용으로서의 이들 항원의 용도에 관한 것이다.

배경기술

<2> 헬리코박터 파이로리는 위 벽(또는 위 점막)을 감염시키는 박테리아이며, 전세계 인구의 절반 정도가 상기 박테리아에 감염되어 있다. 나신형 유기체가 인체 위 점막에서 1906년에 최초로 현미경으로 관찰되었다. 그러나, 헬리코박터 파이로리는 1982년까지 성공적으로 배양되지 못했다. 상기 유기체의 감염은 통상 만성적이며, 감염 결과는 위 점막의 계속적인 염증으로 나타난다. 상기 감염은 종종 징후를 동반하지 않는다. 그러나, 기타 보조 인자와 연합하여 감염된 사람의 일부분은 위 또는 십이지장의 소화성 궤양, 위의 선암 및 위 임파종을 포함하는 속발증(續發症)으로 진전된다. 소화성 궤양 치료법의 연구 결과, 헬리코박터 파이로리 감염의 치료와 통상 만성인 이러한 질환의 재발률의 현저한 감소는 관련이 있는 것으로 확인되었다. 헬리코박터 파이로리에 의한 장기간 감염은 만성 위축성 위염으로 진전되며, 이는 위암으로의 진전에서 전구 병변으로 오래동안 인식되어 왔다. 따라서, 현재 진행되고 있는 많은 연구는 헬리코박터 파이로리 감염과 위암으로의 진전이라는 증가된 위험과의 관련성을 규명하는데 초점을 두고 있다. 현재 진행되고 있는 감염의 근절과 상기 유기체에 의한 새로운 감염의 예방은 상당한 이환율과 사망률을 초래하는 질병의 발병을 현저히 감소시킬 수 있다(참고문헌 1 및 2).

<3> 헬리코박터 파이로리 감염은 치료가 어렵다. 상기 감염을 치료하기 위해 현재 사용되고 있는 실험적인 치료법은 그 효능에 문제점이 있으며, 사용에 따른 부작용도 현저하게 나타난다. 현재 사용할 수 있는 상기 감염에 대한 예방법은 존재하지 않는다. 헬리코박터 파이로리 감염의 예방 및 치료에 대한 한 가지 해결책은 면역 요법제로서 이미 이루어진 감염을 치료하고, 백신으로서 새로운 또는 재발성 감염을 예방하는 면역원성 제제를 개발하는 것이다. 이런 제재는 보호성 항원에 대한 유효 면역 반응을 유도하면서, 자가항원에 대한 반응 또는 유해할 수 있는 면역반응의 유도를 회피하는 것이 필요하다. 이는 특이적

인 보호성 성분(들)을 동정하고, 이들 성분(들)을 포함하는 면역요법 제제 또는 백신 제제를 제형화하므로써 수행할 수 있다.

<4> 임의 유기체의 이러한 보호성 성분의 동정은 종종 상기 감염의 동물 모델을 이용하여 수행하였다. 실험실 동물들은 헬리코박터 파이로리에 자연적으로 감염되진 않는다. 그러나, 인간 헬리코박터 파이로리 감염의 동물 모델은 밀접한 관련이 있는 유기체, 즉 헬리코박터 펠리스(*Helicobacter felis*)와 특이 병원체를 보유하지 않는(specific pathogen free: SPF) 마우스를 이용하여 개발되어 왔다(참고문헌 3). 이들 유기체는 SPF 마우스의 위 점막에 전이 증식할 수 있으며, 인체 내에서 헬리코박터 파이로리 감염의 여러 특징을 나타내는 만성 감염을 일으킨다. 상기 마우스에서 헬리코박터 펠리스 감염은 만성 위염을 유도하며, 면역 반응을 증가시킨다. 인체의 경우와 같이, 상기 반응은 감염 치료에 효과적이지 못하다.

<5> 상기 모델을 사용하여, 파괴된 헬리코박터 파이로리 세포 및 콜레라 독소를 점막 보조제로서 함유하는 제제를 사용하여 헬리코박터 펠리스 감염된 마우스를 경구적으로 치료하면 상당한 비율의 감염된 마우스를 치료할 수 있음을 입증하여 왔다(참고문헌 4). 상기 효과는 밀접하게 관련된 각각의 종이 보유하고 있는 교차-반응성 항원에 대한 면역 반응을 통해 중재되는 것 같다.

<6> 본 발명자들이 연구한 바에 따르면, 이들 교차 반응성 항원은 항원으로시 헬리코박터 파이로리의 파괴된 세포를 이용하여 웨스턴 블로트를 수행하고, 헬리코박터 펠리스 및 콜레라 독소 보조제를 이용하여 면역화한 마우스로부터 취한 혈청으로 상기 블로트를 탐침처리함으로씨 확인하였다. 교차-반응성으로 확인된 단백질을 함유하는 막 절편을 상기 막으로부터 제거하고, 상기 막 부분에 결합된 단백질을 용리하고, 그들의 N-말단 아미노산 서열을 미세서열결정법으로 결정한다.

<7> 서열 자료를 성공적으로 얻은 두 개의 단백질중 하나의 N-말단 아미노산 서열은 미생물 효소인 우레아제의 이미 밝혀진 서열과 매우 일치하였다(참고문헌 5). 상기 효소는 감염 예방용 백신에 사용되는 경우, 보호성 항원인 것으로 이미 확인되어 왔다.

<8> 다른 단백질의 N-말단 아미노산 서열은 미생물 효소인 카탈라아제의 이미 밝혀진 N-말단 서열과 매우 일치하였다(참고문헌 6). 상기 효소가 헬리코박터 파이로리의 보호성 항원인지는 이전에 밝혀진바 없다.

발명의 상세한 설명

<9> 한 관점에서, 본 발명은 헬리코박터류 감염을 치료 또는 예방하는데 사용하는 항원 제제를 제공하는데, 이 제제는 헬리코박터류 박테리아의 카탈라아제의 적어도 부분 정재된 제제를 포함한다.

<10> 본 명세서에서 사용한 용어 "적어도 부분 정제된"은 카탈라아제 함량이 헬리코박터류 박테리아의 전체 세포 초음파처리물의 카탈라아제 함량 보다 큰, 바람직하게는 30% 이상 및 더 바람직하게는 50% 이상인 제제를 의미하는 것이다. 상기 제제는 카탈리아제가 "실질적으로 순수한" 것이 바람직한데, 이는 카탈라아제 함량이 제제내 총 헬리코박터류 항원의 80% 이상, 더 바람직하게는 90% 이상임을 의미한다.

<11> 본 발명은 헬리코박터류 박테리아의 카탈라아제를 포함하는 항원 제제 뿐만아니라 포유동물 숙주내에서 특이 보호성 면역 반응을 유도할 수 있는 상기 카탈라아제의 면역원성 단편을 함유하는 항원 제제에도 미치는 것으로 이해하여야 한다. 또한, 상기 면역원성 단편은 헬리코박터류-특히 항체, 구체적으로 헬리코박터류 감염과 관련하여 보호 또는 치료 효과를 보유하는 모노클로날 항체 또는 헬리코박터류 감염에 대해 백신 접종된 포유동물 숙주로부터 취한 면역 혈청내에 포함된 폴리클로날 항체에 의해 인지된다.

<12> 다른 관점에서, 본 발명은 포유동물 숙주에서 헬리코박터류 감염을 치료 또는 예방하기 위한 백신 조성물을 제공하는데, 이 조성물은 상기한 바와 같은 면역학적 유효량의 항원 제제, 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제 및 필요에 따라 보조제를 포함한다.

<13> 또 다른 관점에서, 본 발명은 포유동물 숙주에서 헬리코박터류 감염의 치료 또는 예방 방법을 제공하는데, 이 방법은 상기한 바와 같은 면역학적 유효량의 항원 제제와 함께 필요에 따라 보조제를 숙주에게 투여하는 단계를 포함한다.

<14> 상기 관점과 관련하여, 본 발명은 포유동물 숙주에서 헬리코박터류 감염의 치료 또는 예방을 위해 면역학적 유효량의 항원 제제와 함께 필요에 따라 보조제를 포함하는 백신 조성물의 용도를 제공한다.

<15> 또 다른 관점에서, 본 발명은 포유동물 숙주에서 헬리코박터류 감염을 치료 또는 예방하기 위한 백신 조성물의 제조에 상기한 바와 같은 항원 제제와 함께 필요에 따라 보조제를 이용하는 방법을 제공한다.

<16> 본 발명의 항원 제제는 숙주에 경구 투여하는 것이 바람직하나 필수직인 것은 아니며, 점막 보조제와 함께 투여한다. 그러나, 본 발명은 상기 항원 제제의 비경구적 투여법도 포함한다.

<17> 또한, 본 발명은 헬리코박터류 박테리아의 카탈라아제 또는 이의 면역원성 단편을 발현하는 벡터를 이용하여 본 발명의 항원 제제를 숙주에게 전달하는 방법에도 미친다. 따라서, 추가의 관점에서 본 발명은 포유동물 숙주 내에서 헬리코박터류 감염을 치료 또는 예방하기 위한 제제를 제공하는데, 이 제제는 헬리코박터류 박테리아의 카탈라아제 또는 이의 면역원성 단편을 발현하는 벡터를 포함한다.

<18> 상기 관점에서, 본 발명은 포유동물 숙주 내에서 헬리코박터류 감염의 치료 또는 예방 방법에도 미치는데, 이 방법은 헬리코박터류 박테리아의 카탈라아제 또는 이의 면역원성 단편을 발현하는 벡터를 상기 숙주에게 투여하는 단계를 포함한다.

<19> 또한, 본 발명은 포유동물 숙주에서의 헬리코박터류 감염의 치료 또는 예방을 위한, 헬리코박터류 박테리아의 카탈라아제 또는 이것의 면역원성 단편을 발현시키는 벡터의 용도에도 미친다.

<20> 본 발명은 또한 상기한 바와 같은 항원 제제에 특이적인, 모노클로날 또는 폴리클로날 항체일 수

있는 항체에도 미친다.

<21> 상기 관점에서, 본 발명은 포유동물 숙주에서 헬리코박터류 감염의 치료 또는 예방 방법도 제공하는데, 이 방법은 상기한 바와 같이 항원 제제에 특이적인 면역학적 유효량의 항체, 특히 모노클로날 항체를 투여하므로써 상기 숙주를 수동 면역화하는 단계를 포함한다.

<22> 본 명세서중 헬리코박터류 감염의 치료 부분에서 사용한 용어 "면역학적 유효량"은 감염된 개개의 숙주에 상기 양을 단일 투여 또는 일련의 투여중 한 부분으로 투여시 헬리코박터류 감염의 치료에 효과가 있는 양을 의미한다. 본 명세서중 헬리코박터류 감염의 예방 부분에서 사용한 용어 "면역학적 유효량"은 개개의 숙주에 상기 양을 단일 투여 또는 일련의 투여중 한 부분으로 투여시 헬리코박터류 감염의 지연, 억제 또는 예방에 효과적인 양을 의미한다. 유효량은 치료하려는 개체의 건강 및 신체적 상태, 치료하려는 개체의 생물분류학적 균, 상기 개체의 면역체계의 항체 합성 능력, 목적하는 보호 수준, 백신의 조성, 의학적 상태의 평가 및 기타 관련 인자에 따라 달라진다. 상기 양의 범위는 비교적 넓을 것이며, 일반적인 실험을 통해 결정할 수 있다.

<23> 특별한 언급이 없는 한, 본 명세서 전반에 걸쳐 사용한 용어 "포함한다(comprise)", 또는 그 변형어, 예컨대, "포함한다(comprises)" 또는 "포함하는(comprising)"은 언급된 정수 또는 정수군을 포함하나, 임의의 기타 정수 또는 정수군을 배제하지는 않는 것으로 이해해야 한다.

<24> 본 발명의 항원 제제는 헬리코박터 파이로리 또는 헬리코박터 펠리스의 카탈라아제, 가장 바람직하게는 헬리코박터 파이로리 카탈라아제 제제를 포함한다. 또한, 상기 항원 제제는 점막 보조제를 포함하는 경구 투여용 백신 조성물에 사용된다.

<25> 본 발명의 특히 바람직한 관점에서, 점막 보조제와 함께 적어도 부분 정제된 헬리코박터 파이로리 카탈라아제의 항원 제제를 포함하는 경구 백신 조성물은 숙주인 인간 내에서 헬리코박터 파이로리 감염의 치료 또는 예방에 사용된다.

<26> 감염된 숙주에 적어도 부분적으로 정제된 헬리코박터류 카탈라아제 제제와 함께 임의로, 바람직하게 투여되는 점막 보조제는 콜레라 독소가 바람직하다. 본 발명에 사용될 수 있는 콜레라 독소 이외의 점막 보조제로는 B 서브유니트(CTB), 화학적으로 변형된 콜레라 독소 또는 콜레라 독소 아미노산 서열의 변경에 의해 제조된 관련 단백질 같은 콜레라 독소의 비독성 유도체를 들 수 있다. 이들은 헬리코박터 카탈라아제 제제에 첨가되거나, 이와 배합할 수 있다. 동일한 기법은 에스케리치아 콜리(*Escherichia coli*) 열 불안정 독소 같은 점막 보조제 또는 전달 특성을 이용하여 기타 분자에 적용할 수 있다. 점막 보조제 또는 전달 활성을 보유하는 기타 화합물, 예를 들어 담즙; DEAE-덱스트란과 폴리오르니틴 같은 다가 양이온; 나트륨 도데실 벤젠 설페이트 같은 세정제; 지질-접합된 물질; 스트렙토마이신 같은 항생제; 비타민 A; 및 점막 표면의 구조적 또는 기능적 완전성을 변경시키는 기타 화합물을 사용할 수 있다. 기타 점막 활성 화합물로는 MDP; 아크리딘 및 시메티딘 같은 미생물 구조물질의 유도체를 들 수 있다.

<27> 본 발명에 따른 헬리코박터류 카탈라아제 제제는 ISCOMS(면역 자극 복합체), CTB를 포함하는 ISCOMS, 리포좀 형태로 전달하거나 또는 아크릴레이트 또는 폴리(DL-락티드-코-글리코시드) 같은 화합물 내에 캡슐화되어 M 세포에 의한 흡착에 적합한 크기의 미소구를 형성하여 전달할 수 있다. 대안으로, 마이크로 또는 나노입자는 특이 소화관 수용체를 보유하는 비타민 B12 같은 분자에 공유 결합할 수 있다. 또한, 헬리코박터류 카탈라아제 제재는 유상 에멀젼 내로 혼입시켜 경구로 전달할 수 있다. 보조제의 다양한 예는 Cox 및 Coulter의 문헌(참고 문헌 7)에서 찾아볼 수 있다.

<28> 통상적인 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 완충액 또는 희석제 뿐만 아니라 기타 보조제도 본 발명의 치료 또는 예방용 백신 조성물 내에 포함될 수 있다. 예를 들어, 백신 조성물은 헬리코박터류 카탈라아제 제제 및 콜레라 독소 점막 보조제와 함께 중탄산 나트륨 완충액을 포함하는 장 피복된 젤라틴 캡슐로 제형화할 수 있다.

<29> 상기 치료 조성물의 조성은 당업자에게 널리 알려져 있다. 적합한 약학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제는 임의의 모든 통상적인 용매, 분산 매질, 충전제, 고형 담체, 수용액, 피막, 항균제 및 항진균제, 등장제 및 흡수 지연제 등과 같은 것들을 포함한다. 약학적 활성 물질용으로 상기 매질 및 시약을 사용하는 것은 당업자에게 공지되어 있으며, 문헌(참조: Remington's Pharmaceutical Sciences, 18판, 미국, 펜실베니아주 소재의 맥 퍼블리싱 컴퍼니)에도 기술되어 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 시약이 활성 성분과 비상용성인 경우를 제외하고, 본 발명의 약학 조성물 내에 이들의 사용을 고려해 볼 수 있다. 또한, 보조 활성 성분도 상기 조성물에 포함될 수 있다.

<30> 치료 또는 예방용 경구 백신 조성물의 형태로 헬리코박터류 카탈라아제 제제를 전달하는 방법의 대안으로서 카탈라아제 또는 이의 면역원성 단편은 외래 항원으로서 카탈라아제 또는 이의 면역원성 단편의 발현에 필요한 유전 물질을 함유하는 생 백신 벡터, 구체적으로 생 재조합 박테리아, 비루스 또는 기타 생 제제를 이용하여 숙주에 전달할 수 있다. 구체적으로, 위장관에 전이 증식하는 박테리아, 예를 들어 살모넬라, 예르시니아, 비브리오, 에스케치아 및 BCG가 백신 벡터로서 개발되어 왔으며, 이들 및 기타 예는 Holmgren 등(참고문헌 8) 및 McGhee 등(참고 문헌 9)의 문헌에 논의되어 있다.

<31> 본 발명의 헬리코박터류 카탈라아제 제제는 백신 조성물내 단독 활성 면역원으로 투여하거나, 생 벡터에 의해 발현시킬 수 있다. 그러나, 대안으로 백신 조성물은 기타 활성 면역원, 예를 들어 헬리코박터류 박테리아의 우레아제 또는 지다당류(LPS) 같은 기타 헬리코박터류 항원(참조: 국제 특허 출원 PCT/AU95/00077) 뿐만아니라 기타 병원체 종에 대한 면역학적 활성 항원을 포함하거나 또는 상기 생 벡터가 그러한 상기 활성 면역원 또는 항원을 발현시킬 수 있다.

<32> 본 발명의 조성물은 투여의 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 단위 제형으로 제형화하는 것이 매우 유익하다. 본 명세서에서 사용한 용어 "단위 제형(dosage unit form)"는 치료하려는 인간을 위한 단위 투여체로서 적합한 물리적으로 분리된 단위를 의미한다. 상기한 각각의 단위 제형은 필요한 약학적 담체 및/또는 희석제와 함께 목적하는 치료 효과를 나타내기 위해 계산된 활성 성분의 기결정된 양을 함유한다. 본 발명의 신규한 단위 제형에 대한 상세한 사항은 (a) 활성 성분의 독특한 특성 및 얻고자 하는

특정 치료 효과 및 (b) 특정 치료를 위한 활성 성분을 화합하는데 따른 업계의 본질적인 한계에 의해 그리고 그에 따라 직접적으로 지시된다.

<33> 상기한 웨스턴 블로트로부터 얻은 자료는 헬리코박터 파이로리 카탈라아제가 헬리코박터 펠리스 항원 제제(+ 콜레라 독소 보조제)로 백신 접종한 마우스의 혈청에 의해 인지된다는 것을 나타낸다. 이들 마우스는 헬리코박터 펠리스 감염에 대해 보호되는 것을 확인할 수 있다. 상기 자료는 인간 헬리코박터 파이로리 감염에서 보호성 항원으로서의 헬리코박터 파이로리 카탈라아제의 용도를 나타내고 있으며, 정제된 또는 재조합 카탈라아제는 단독으로 또는 기타 항원, 담체, 보조제, 전달 매체 또는 부형제와 배합하여 치료 또는 예방 백신의 항원 성분으로 사용될 수 있다.

<34> 단지 예시용인 하기 실시예에 의해 본 발명을 더욱 상세히 기술하고자 한다. 그러나, 하기 실시예는 본 발명을 단순히 예시하기 위한 것이며, 지금까지 기술한 본 발명의 범위를 부적절하게 제한하지 않는 것으로 이해해야 할 것이다.

실시예

<35> **실시예 1**

<36> **A. 방법**

<37> 초음파 처리한 헬리코박터 파이로리 세포는 미니-프로테인 II 장치(바이오-라드)를 이용하여 변성 조건하에서 12% 불연속(즉, 균질한) SDS-PAGE 겔 내에서 분리하였다. 단백질은 미니 트랜스블로트 시스템(바이오-라드) 내에서 CAPS 완충액 (3-(시클로헥실아미노)-1-프로판실폰산 완충액)을 이용하여 겔로부터 프로블로트(이플라이드 바이오사이언시즈 PVDF-폴리비닐리덴 디플루오라이드) 막에 이전하였다.

<38> PVDF 단부로부터 스트립을 제거하고, 헬리코박터 펠리스 + 콜레라 독소로 백신 접종한 마우스로부터 취한 면역 혈청과 반응시키며, HRP-표지된 항-마우스 혈청으로 추적하고, 표준 웨스턴 블로트 법에 따라 4-클로로-1-나프톨을 이용하여 전개하였다. PVDF의 나머지 부분은 쿠마시 블루(바이오-라드)로 염색하여 단백질 밴드를 시각화하였다. 면역 혈청에 의해 인지된 6개의 단백질을 선택하고, PVDF 상의 상응하는 쿠마시 블루 염색된 밴드를 주위깊게 절개하여 서열 결정에 사용하였다.

<39> 6 개의 절개한 PVDF 밴드를 작은 조각(길이 약 0.5 cm)으로 질단하고, 어플라이드 바이오시스템스 모델 476A 단백질 서열결정 시스템의 반응 카트리지 내에 위치시킨다. 모든 화학적 작용, HPLC 분리, 자료 정량분석 및 단백질 서열결정 기록은 상기 시스템 내에서 자동으로 수행하였다.

<40> **B. 결과**

<41> 4개의 샘플은 단백질 서열결정 시스템 내에서 신호를 나타내지 않았다. 2개의 샘플은 명백한 아미노산 서열 자료를 제공하였는데; 5번 샘플은 약 53 kD 단백질(± 10%) 이었으며, 3번 샘플은 약 66 kD 단백질(± 10%) 이었다. 이 자료를 아래에 나타낸다.

<42> (i) 3번 샘플:

<43> D D N

<44> M K K I V F K E Y V

<45> A P

<46> 주: 첫 번째 3개의 사이클은 불확실한 결과를 나타낸다.

<47> 3번 샘플의 서열 결정 자료는 효소인 우레아제에 대한 이전에 공개된 N-말단 서열과 매우 상응하였으나, 정확히 일치하지는 않았다(참고문헌 5). 상기 효소는 헬리코박터 펠리스/마우스 모델을 이용하는 연구에서 보호성 항원으로 밝혀져 왔다.

<48> (ii) 5번 샘플

<49> M V N K D V K Q T T A F G T P

<50> 5번 샘플의 서열 자료는 하나의 차이를 제외하고는 효소인 카탈라아제에 대한 이전에 밝혀진 N-말단 서열과 매우 상응하였다(참고문헌 6). 상기 효소는 이전에 보호성 항원으로 밝혀진바 없지만, 헬리코박터 펠리스 항원 제제로 백신 접종된 마우스의 면역 혈청에 의해 인지되어 헬리코박터 펠리스 감염을 예방한다는 사실과 헬리코박터 파이로리 항원 제제로 백신 접종된 마우스가 헬리코박터 펠리스 감염에 대해 보호된다는 사실로 미루어 헬리코박터 파이로리 카탈라아제가 인간의 헬리코박터 파이로리 감염에서 보호성 항원으로 작용함을 알 수 있다.

<51> **실시예 2**

<52> **1. 헬리코박터 파이로리 카탈라아제의 정제(참고문헌 10)**

<53> 약 60개의 헬리코박터 파이로리 평판(CSA)(임상 균주 921023)을 37℃, 10% CO_2 내에서 48 시간 동안 증식시켰다. 칼럼에 로딩할 때 까지의 모든 단계는 얼음위에서 수행하였다. 헬리코박터 파이로리 세포는 pHI 7.2인 0.1 M 나트륨 포스페이트 완충액 내에서 수거하였으며, 현탁액은 부드럽게 원심분리하고, 0.1 M 나트륨 포스페이트 완충액 5 ml 내에 재현탁시켰다. 그후, 상기 현탁액을 6 kHz 40%의 사용률로 5 분 동안 초음파 처리하였다. 이어서, 상기 초음파 처리물을 10,000 g에서 5 분 동안 원심분리하고, 상청액을 수거하고, 0.22 ㎛ 필터를 통해 멸균 용기로 이전하였다.

<54> 여과물은 세파크릴 S-300 HR로 이루어진 K26/100 겔 여과 칼럼상에 로딩하고, 1.0 ㎖/분의 유속으로 나트륨 포스페이트 완충액을 이용하여 용출시켰다. 용출액을 분획(100 방울/분획)으로 수거하였으며, 이들은 카탈라아제 활성에 대한 테스트에 의해 동정된 카탈라아제를 함유하는 것이었다

(H_2O_2 내에 위치한 상기 분획 1방울을 증류수 내에서 1:10으로 희석하고, 발포를 조사하였다). 그후, 카탈라아제 활성이 가장 강한 분획을 모으고, 0.01 M 나트륨 포스페이트(여과된 것) 내에서 1:10으로 희석하였다. 그후, 상기 분획을 MEMSEP 1000 cm 이온 교환 캡슐을 통해 통과시켰다. 이어서, 0.01 M 나트륨 포스페이트 완충액 100 ㎖를 상기 이온 교환 캡슐에 통과시켜 임의의 과량의 단백질을 제거하였다. 0.1 M 나트륨 포스페이프 완충액 중의 1 M 염화나트륨를 상기 이온 교환 캡슐에 통과시켜 카탈라아제를 용출시켰다. 카탈라아제 양성 분획은 그들의 진한 황색으로 확인할 수 있었으며, H_2O_2 내에서 발포 반응에 대한 테스트에 의해 확인하였다.

<55> 카탈라아제 양성 분획은 4℃에서 저장하였으며, 빛을 피해 보관하였다. 각 분획은 바이오-라드 DC 단백질 분석법을 이용하여 단백질 농도에 대해 테스트하였으며, 단백질 농도가 1.5 ㎎/㎖ 이상인 경우 마우스 면역화용으로 선택하였다. 마우스를 면역화하기 전에, 정제된 카탈라아제는 12% SDS-PAGE를 이용하여 오염원을 검사하였다. 단백질은 쿠마시 블루로 염색하여 시각화하였으며, 이는 카탈라아제 제제의 순도가 95% 이상임을 나타내는 것이다. 상 분석 결과, 카탈라아제의 분자량은 52-53 kDa 이었다. 또한, 정제된 카탈라아제는 카탈라아제 단일클론 항체에 의해 강하게 인지되었다.

<56> **2. 헬리코박터 파이로리 카탈라아제를 이용하는 면역화**

<57> 10 마리의 마우스를 면역화하기에 충분한 정제된 카탈라아제를 얻고, 한 곳에 모았다. 마우스에게 정제된 카탈라아제 0.2 ㎎ + 콜레라 독소(CT) 10 ㎍을 0, 7, 14 및 21일째에 4회 투여하였다. 대조군은 콜레라 독소 또는 PBS 완충액 만을 투여하였다. 투여량은 모든 군에 대해 150 ㎕ 였다. 각각의 면역화용 투여가 이루어진 날에 참고문헌 2에 기술된 방법에 따라 활성을 검사하고, SDS-PAGE 및 쿠마시 블루 염색을 이용하여 분해의 징후에 대해 검사하였다. 면역화 과정 전체에서 활성의 저하 또는 임의의 분해 징후는 관찰되지 않았다. 모든 군에 최종 면역화를 위한 투여가 이루어진지 3 주일이 경과한 후, ~10^8 헬리코박터 펠리스를 이용하여 항원을 2회 재투여(challenge)하였다. 3 주후에 마우스를 안락사시키고, 샘플(혈청, 타액, 담즙 및 위-1/2은 조직학적 검사에, 그리고 공동의 1/2은 직접 우레아제 테스트에 사용을 수거하였다,

<58> [표 1]

<59> **실험 개요**

시간(일)	카탈라아제 CT (마우스 10 마리)	CT 단독 (마우스 10 마리)	PBS 단독 (마우스 10 마리)
0	카탈라아제+CT	CT 단독	PBS 단독
7	카탈라아제+CT	CT 단독	PBS 단독
14	카탈라아제+CT	CT 단독	PBS 단독
21	카탈라아제+CT	CT 단독	PBS 단독
42	헬리코박터 펠리스 항원 투여	헬리코박터 펠리스 항원 투여	헬리코박터 펠리스 항원 투여
44	헬리코박터 펠리스 항원 투여	헬리코박터 펠리스 항원 투여	헬리코박터 펠리스 항원 투여
65	10 마리 수거	10 마리 수거	10 마리 수거

<61> **3. 결과**

<62> [표 2]

<63> **우레아제**

양성 우레아제 결과(%)		
카탈라아제+CT (10)	CT 단독 (10)	PBS 단독 (10)
0/10(0)	7/10(70)	10/10(100)

<65> **웨스턴 블로팅**

<66> 마우스로부터 취한 혈청의 웨스턴 블로트는 면역화된 마우스에 의해 헬리코박터 파이로리 카탈라아제의 강한 인지를 나타내지만, 기타 군에서 선택한 마우스는 약한 인지를 나타내거나 인지를 나타내지 않았다.

<67> 당업자라면, 본 발명의 사상 및 범위를 벗어남이 없이 본 명세서에 구체적으로 기재한 것 이외에도 본 명세서에 기재한 본 발명에 대해서 변형예 및 개조예를 실시할 수 있을 것이다. 본 발명은 이러한 모든 변형 실시예까지 미치는 것으로 이해해야 할 것이다.

산업상이용가능성

<68> 본 발명의 항원 제제를 이용하여 헬리코박터 파이로리 관련된 십이지장 질환을 치료 또는 예방할 수 있다.

참고문헌

1. *Helicobacter pylori* Biology and Clinical Practice (1993). Edited by C.Stewart Goodwin and Bryan W.Worsley. Published by CRC Press.

2. Halter, F., Hurlimann, S. and Inauen, W. (1992). Pathophysiology and clinical relevance of *Helicobacter pylori*. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, **65**:625-638.

3. Lee, A., Fox, J.G., Otto, G. and Murphy, J. (1990). A small animal model of human *Helicobacter pylori* active chronic gastritis. *Gastroenterology*, **99**:1316-1323.

4. Doidge, C.G., Gust, I., Lee, A., Buck, F., Hazel, S. and Mane, U. (1994). Therapeutic immunisation against *Helicobacter pylori* - The first evidence. *Lancet* **343**(i):914-915.

5. Clayton, C.L., Pallen, M.J., Kleanthous, H., Wren, B.W. and Tabaqchali, S. (1990). Nucleotide sequence of two genes from *Helicobacter pylori* encoding for urease subunits. *Nucleic Acid Res.*, **18(2)**:362

6. Westblom, T.U., Phadnis, S., Langenberg, W., Yoneda, K., Madan, E. and Midkiff, B.R. (1992). Catalase negative mutants of *Helicobacter pylori*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **11**:522-526.

7. Cox, J. and Coulter, A. (1992). Advances in adjuvant technology and application. *In* Animal Parasite Control Using Biotechnology. Edited by W.K.Yong. Published by CRC Press.

8. Holmgren, J., Czerkinsky, C., Lycke, N. and Svennerholm, A-M. (1992). Mucosal Immunity : Implications for Vaccine Development. *Immunobiol.* **184**:157-179.

9. McGhee, J.R., Mestecky, J., Dertzbaugh, M.T., Eldridge, J.H., Hirasawa, M. and Kiyono, H. (1992). The mucosal immune system . from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine* **10**(2):75-88.

10. Hazel, S.L., Evans Jr., D.J. and Graham, D.Y (1991). *Helicobacter pylori* catalase. *J. Gen. Microbiol.* **137**:57-61.

(57) 청구의 범위

청구항 1

헬리코박터류 박테리아의 카탈라아제를 포함하는, 헬리코박터 감염의 치료 또는 예방용 항원 제제.

청구항 2

제1항에 있어서, 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 또는 헬리코박터 펠리스(*Helicobacter felis*)의 카탈라아제를 포함하는 것이 특징인 헬리코박터류 감염의 치료 또는 예방용 항원 제제.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 실질적으로 순수한 전장 헬리코박터류 카탈라아제 제제(이때, 카탈라아제 함량은 상기 제제내 총 헬리코박터류 항원의 80% 이상 임)를 포함하는 것이 특징인 헬리코박터 감염의 치료 또는 예방용 항원 제제.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 하나 이상의 부가적인 활성 면역원을 추가로 포함하는 것이 특징인 헬리코박터류 감염의 치료 또는 예방용 항원 제제.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 부가적인 면역원(들)이 하나 이상의 기타 헬리코박터류 항원을 포함하는 것이 특징인 헬리코박터류 감염의 치료 또는 예방용 항원 제제.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 기타 헬리코박터류 항원이 헬리코박터류 우레아제 및 헬리로박터류 지다당류로부터 선택되는 것이 특징인 헬리코박터류 감염의 치료 또는 예방용 항원 제제.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 따른 면역학적 유효량의 항원 제제와 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제를 포함하는, 포유동물 숙주에서의 헬리코박터류 감염의 치료 또는 예방용 백신 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 보조제를 추가로 포함하는 것이 특징인 포유동물 숙주에서의 헬리코박터류 감염의 치료 또는 예방용 백신 조성물.

청구항 9

제8항에 있이시, 상기 보조제가 점막 보조제인 것이 특징인 포유동물 숙주에서의 헬리코박터류 감염의 치료 또는 예방용 백신 조성물.

청구항 10

헬리코박터류 박테리아의 카탈라아제를 발현하는 벡터를 포함하는, 포유동물 숙주에서의 헬리코박터류 감염의 치료 또는 예방용 제제.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 벡터가 포유동물 숙주의 위장관에 전이 증식하는 박테리아인 것이 특징인 포류동물 숙주에서의 헬리코박터류 감염의 치료 또는 예방용 제제.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 벡터가 살모넬라, 예르시니아, 비브리오, 에스케리치아 또는 BCG 박테리아인 것이 특징인 포유동물 숙주에서의 헬리코박터류 감염의 치료 또는 예방용 제제.

청구항 13

제1항 또는 제2항에 따른 항원 제제에 특이적인 항체.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 항체가 모노클로날 항체인 것이 특징인 항원 제제에 특이적인 항체.

청구항 15

제13항에 따른 항체와 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제를 포함하는, 포유동물 숙주에서의 헬리코박터류 감염의 치료 또는 예방용 백신 조성물.

청구항 16

제14항에 따른 항체와 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제를 포함하는, 포유동물 숙주에서의 헬리코박터류 감염의 치료 또는 예방용 백신 조성물.

요약

본 발명은 헬리코박터류 박테리아, 구체적으로 헬리코박터 파이로리 또는 헬리코박터 펠리스의 카탈라아제 효소 또는 이의 면역원성 단편을 포함하는, 포유동물 숙주 내에서 헬리코박터류 감염을 치료 또는 예방하기 위한 항원 제제에 관한 것이다.