

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2019년 1월 31일 (31.01.2019) **WIPO | PCT**



(10) 국제공개번호
WO 2019/022463 A2

(51) 국제특허분류:
A61K 39/12 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 35/742 (2015.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2018/008337

(22) 국제출원일: 2018년 7월 24일 (24.07.2018)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2017-0093801 2017년 7월 24일 (24.07.2017) KR

(71) 출원인: (주)제이비바이오테크 (JB BIOTECH INC.) [KR/
KR]; 08826 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).

(72) 발명자: 박현식 (PARK, Hyun Sik); 24033 강원도 철
원군 갈말읍 아랫삼성길 43, Gangwon-do (KR). 성노현
(SEONG, Rho Hyun); 13586 경기도 성남시 분당구 불
정로 397, 315동 802호, Gyeonggi-do (KR). 오상욱 (OH,
Sang Wook); 14327 경기도 광명시 충현로 20번길 3, 4층
1호, Gyeonggi-do (KR). 오승준 (OH, Seung Jun); 05632
서울시 송파구 백제고분로 48길 5, 2층 2호, Seoul (KR).
박희용 (PARK, Hee Yong); 15869 경기도 군포시 번영
로 387, 513동 201호, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 특허법인 아이피에스 (IPS PATENT FIRM);
06656 서울시 서초구 반포대로23길 14, 5층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국
내 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, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역
내 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), 유
럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
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).

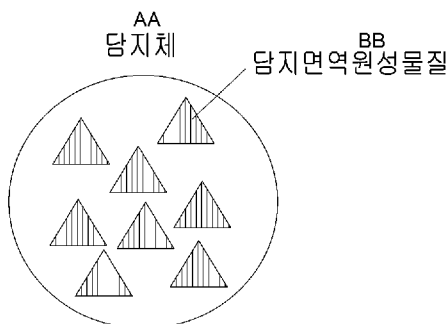
공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별
도 공개함 (규칙 48.2(g))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: IMMUNOGENIC SYSTEM AND ANIMAL VACCINE COMPRISING SAME

(54) 발명의 명칭: 면역원성시스템 및 이를 포함한 동물 백신



AA ... Support
BB ... Supported immunogenic material

(57) Abstract: The present application provides various embodiments and uses of an immunogenic material targeting pathogens of a particular animal disease, an immunogenic system, and an animal vaccine composition comprising the same immunogenic system. In a preferable embodiment, use can be effectively made in a vaccine, a medicinal drug, and a feedstuff for preventing, alleviating, and treating a porcine infectious disease.

(57) 요약서: 본 출원은 동물의 특정 질병의 병원체를 대상으로 하는 면역원성물질, 면역원성시스템 및 이를 포함한 동물 백신 조성물의 다양한 태양 및 다양한 용도를 제공한다. 바람직한 예로서, 돼지 감염 질병의 예방, 개선 및 치료를 위한 백신, 의약품 및 사료 등에 유용하게 이용할 수 있다.

WO 2019/022463 A2

명세서

발명의 명칭: 면역원성시스템 및 이를 포함한 동물 백신 기술분야

- [1] 본 출원은 동물의 특정 질병의 병원체를 대상으로 하는 면역원성물질, 면역원성시스템 및 이를 포함한 동물 백신 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 동물용 백신관련 기술은, 가축 질병의 예방뿐만 아니라 전세계적으로 이슈화되고 있는 생물무기(두창, 탄저균등), SARS(중증 급성 호흡기 증후군), AI(조류 인플루엔자)등 Pandemic zoonosis(인수공통전염병)에 대한 대응기술 개발에 많은 공헌을 하고 있으며, 국가적으로도 전략산업으로서 인식되고 있다.
- [4] 신종 질병이 발생할 경우, 원인체가 규명되고 근절이 불가능하다고 판단되면 질병의 피해를 줄이기 위해서는 백신의 신속한 개발이 요구된다. 이런 경우에는 불활화백신이 먼저 개발되어 상용화되는 것이 일반적이다. 질병 원인체의 유전자가 쉽게 변이를 일으키게 되면 기존 백신의 효과가 감소되기 때문에 지속적으로 병원체 유전자 변이 여부를 모니터링해야만 한다.
- [5] 국내 양돈장의 고질적인 숙제로 부각되고 있는 돼지 설사성 바이러스 질병인 PED(Porcine Epidemic Diarrhea) 바이러스의 경우, 국내에서 생독 · 사독 · 경구용 백신 모두가 개발되어 사용되고 있으나, 야외 바이러스가 환경에 적응하면서 계속 변이를 하기 때문에 쉽게 근절되기가 어려운 실정이다. 즉, PEDV의 병원체를 사용하는 백신은 병원체의 약독화 과정에서 단백질의 변성으로 인해 면역 효과가 낮고, PEDV의 변이주에 효과적으로 대응하지 못하는 문제가 있어 왔다. 2014년 9월경 발생한 양돈농가의 PEDV 파동은 2013년 10월경 국내에 유입된 PEDV 야외주로 인해 발생한 것으로 기존 PEDV 백신의 문제점이 드러난 대표적인 사건이다.
- [6] 돼지서코바이러스(Porcine CircoVirus, PCV)는 1991년 캐나다를 시작으로 미국, 프랑스, 스페인, 아일랜드, 덴마크, 영국, 독일 등 전 세계적으로 발생하고 있고, 아시아지역에서는 국내를 비롯한 일본과 대만에서도 발생이 확인 되었다. PCV는 감염에 의해 돼지 전신소모성 증후군(Postweaning Multi-systemic Wasting Syndrome; PMWS)을 유발하는 원인체 중 하나인 것으로 알려져 있고, 이는 양돈장에 오염되면 근절하기 힘든 바이러스이다.
- [7] 야외 변이가 심한 PRRS 바이러스 역시 고민되는 변종 질병중 하나이다. 양계 산업에서 문제가 되고 있는 ND(Newcastle Disease), IB (Infectious Bronchitis) IBD (Infectious Bronchitis Disease), AI (Avian Influenza) virus 역시 국내에서 생독 · 사독백신이 이미 개발되어 있지만, 계속적으로 바이러스의 변이가 진행됨으로써 유전형과 항원형이 새로운 subtype이 보고되고 있다. 야외 질병

원인체와 백신 항원의 동질성을 시차를 줄여서 확보하는 것이 기술개발의 관건이라 할 수 있다

- [8] 불활화 백신을 사용하여 효과가 떨어질 경우에 이를 보완하기 위해서는 생백신의 개발이 필수적이나, 병원성 야외 바이러스로부터 생백신이 가능한 마스터 씨드(master seed)를 확보하는 데는 많은 시간과 비용이 소요된다.
- [9] 이처럼, 기존의 균체 불활화 백신(Killed vaccine) 및 약독화 순화 백신 (Live attenuated vaccine)으로는 가축 질병 퇴치 과정에 있어서 여러 가지 문제점과 한계점이 있고, 또한 국가 간의 교류가 급속히 확대되고 가축전염병의 국경 개념이 더욱 희박해지는 상황에서, 국가 간의 기술개발 경쟁은 더욱 치열해지고 있고 기술 선점을 위한 지적 소유권도 더욱 강화되고 있는 것이 세계적인 추세이다.
- [10] 따라서, 기존의 전통적인 백신 제조방법과 첨단 분자생물학적 방법을 잘 조화시킴으로써 부작용을 최소화하고 효능을 극대화한 백신의 개발이 요구되고 있는 실정이다.
- [11]
- [12] 선행기술문헌
- [13] 특허문헌
- [14] (특허문헌 1) 1. 한국 등록 특허 10-0578395호
- [15] (특허문헌 2) 2. 한국 등록 특허 10-0267745호
- [16] (특허문헌 3) 3. 일본 공개 특허 2008-231063
- [17] (특허문헌 4) 4. WO 2016-140702
- [18] 비특허문헌
- [19] (비특허문헌 1) 1. Microbiol Spectr. 2014 Oct;2(5). doi: 10.1128/microbiolspec.TBS-0011-2012.
- [20] (비특허문헌 2) 2. J Bacteriol. 2001 Nov; 183(21): 6294-6301. Surface Display of Recombinant Proteins on Bacillus subtilis Spores
- [21] (비특허문헌 3) 3. Vaccine. 2004 Mar 12;22(9-10):1177-87. Display of heterologous antigens on the Bacillus subtilis spore coat using CotC as a fusion partner.
- [22] (비특허문헌 4) 4. Microbiology. 2009 Feb;155(Pt 2):338-46, Phagocytosis, germination and killing of Bacillus subtilis spores presenting heterologous antigens in human macrophages.
- [23] (비특허문헌 5) 5. Sun D et al., Identification of two novel B cell epitopes on porcine epidemic diarrhea virus spike protein. Vet Microbiol. 2008;131(1-2):73-81.
- [24] (비특허문헌 6) 6. Gallagher TM, Buchmeier MJ. Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis. Virology. 2001;279(2):371-4.
- [25] (비특허문헌 7) 7. Tsuda T. Porcine epidemic diarrhea: its diagnosis and control. Proc Jpn Pig Vet Soc. 1997;31:21-8.
- [26] (비특허문헌 8) 8. Georgiou, G. et al., Display of heterologous proteins on the

surface of microorganisms: From the screening of combinatorial libraries to live recombinant vaccines. Nature Biotechnology 15:29-34(1997)

[27]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[28] 본 출원의 목적은 동물의 특정 질병의 병원체를 대상으로 하는 면역원성물질, 면역원성시스템 및 이를 포함한 동물 백신 조성물의 다양한 태양 및 다양한 용도를 제공하고자 하는 데 있다.

[29] 일 목적은, 질병을 일으키는 병원체에 대한 동물 백신 및 이의 제조방법을 제공하는 데 있다.

[30] 다른 목적은 질병을 일으키는 병원체에 대한 면역원성 시스템을 제공하는 데 있다.

[31] 또 다른 목적은 면역원성 포자시스템을 제공하는 데 있다.

[32] 또 다른 목적은 PEDV에 대한 백신 및 이에 대한 면역원성 시스템을 제공하는 데 있다.

[33] 이 밖에도, 동물의 특정 질병의 병원체를 대상으로 하는 면역원성물질, 면역원성시스템 및 동물 백신 조성물과 관련한 모든 활용가능한 이용을 포함한다.

[34]

과제 해결 수단

[35] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 출원은

[36] i) 포자성 박테리아의 포자,

[37] ii) 상기 포자의 포자외부영역에 존재하는 포자 코트 단백질(spore coat protein),

[38] ii) 상기 포자 코트 단백질에 융합된 돼지 질병 바이러스 면역성부위

[39] 를 포함하고

[40] 이 때 상기 돼지 질병 바이러스는 돼지유행성설사바이러스(Porcine Epidemic Diarrhea Virus, PEDV) 및 돼지서코바이러스(Porcine Circovirus, PCV) 중 어느하나 이상인 면역원성 포자융합디스플레이시스템을 제공한다.

[41]

[42] 또한, 본 출원은

[43] i) 돼지유행성설사바이러스(Porcine Epidemic Diarrhea Virus, PEDV) 및 돼지서코바이러스(Porcine Circovirus, PCV) 유래 면역원성부위가 포자 코트 단백질에 융합된 것을 특징으로 하는 면역원성 포자융합디스플레이시스템,

[44] ii) 상기 면역원성 포자융합디스플레이시스템을 전달하는 담체

[45] 를 포함하고, 면역원성 포자융합디스플레이시스템의 농도가 $10^{12} \sim 10^{14}$ 개/ml 농도인 것을 특징으로 하는 백신조성물을 제공한다.

[46]

- [47] 또한, 본 출원은 돼지유행성설사바이러스(Porcine Epidemic Diarrhea Virus, PEDV) 야외주들의 면역원성부위를 수득하기 위한, 서열번호 1 내지 4 중 선택되는 2개의 프라이머 세트를 제공한다.
- [48] 또한, 본 출원은 돼지서코바이러스(Porcine Circovirus, PCV) 야외주들의 면역원성부위를 수득하기 위한, 서열번호 41 내지 46 중 선택되는 2개의 프라이머 세트를 제공한다.
- [49]
- [50] 또한, 본 출원은 포자시스템발현목적염기서열으로
- [51] i) 포자의 포자외부영역에 존재하는 포자 코트 단백질(spore coat protein), 및
- [52] ii) 상기 포자 코트 단백질에 융합된, 돼지유행성설사바이러스(Porcine Epidemic Diarrhea Virus, PEDV) 또는 돼지서코바이러스(Porcine Circovirus, PCV) 중 어느하나 이상의 면역원성 부위
- [53] 를 암호화하는 뉴클레오타이드를 포함하는 포자시스템재조합발현백터를 제공한다.
- [54]
- [55] 또한, 본 출원은 돼지유행성설사바이러스(Porcine Epidemic Diarrhea Virus, PEDV) 또는 돼지서코바이러스(Porcine Circovirus, PCV) 유래 면역원성부위가 포자 코트 단백질에 융합된 것을 특징으로 하는 면역원성 포자융합디스플레이시스템을 $10^{12} \sim 10^{14}$ 개/ml 농도로 포함하는 백신 조성물을 2ml 투여하는 것을 특징으로 하는, 인간을 제외한 PEDV 감염 동물의 치료방법을 제공한다.

[56]

발명의 효과

- [57] 면역원성이 증강된 동물 질병 유발원(항원)을 포함하는 조성물 및 그의 사용 방법에 관한 것이다. 본원에 기술된 조성물 및 방법을 통해 항원에 대한 동물, 바람직하게는 가축, 예를 들어 돼지의 면역원성 반응은 증강되고, 이로써 특정 질병 감염에 대한 동물의 보호도 증강된다
- [58] 본 출원의 기술을 이용하면 기존의 발현 시스템보다 발현율 및 획득율이 우수한 특징이 있다. 또한, 상기 재조합 세포주로부터 생산된 재조합 단백질을 항원으로 이용시 효과적으로 면역반응을 유도할 수 있어, 이를 가축(예를 들어, 돼지 등)의 질병의 예방, 개선 및 치료를 위한 백신, 의약품 및 사료 등에 유용하게 이용할 수 있다.

[59]

도면의 간단한 설명

- [60] 도 1은 병원체의 구조를 나타낸 모식도이다.
- [61] 도 2는 병원체 상에 있는 1-항원단백질과 2-항원단백질의 구조를 나타낸 모식도이다.

- [62] 도 3은 PEDV 병원체의 1-항원단백질(스파이크 단백질)의 면역원성 부위의 위치를 나타낸 그래프이다
- [63] 도 4는 면역원성부위를 포함하는 항원상동성단백질의 예시적 그래프이다.
- [64] 도 5는 면역원성부위-1부터 면역원성부위-n 중 선택된 두 개 이상을 포함하는 항원상동성단백질의 예시적 그래프이다.
- [65] 도 6은 면역원성부위를 포함하면서 비면역원성부위를 포함하는 항원상동성단백질의 예시적 그래프이다.
- [66] 도 7는 1-면역원성부위부터 m-면역원성부위 중 선택된 두 개 이상을 포함하는 항원상동성단백질의 예시적 그래프이다.
- [67] 도 8은 항원단백질과 상동성이 있는 부위와 비항원부를 포함하는 항원상동성부가단백질의 예시적 그래프이다.
- [68] 도 9는 항원단백질과 상동성이 있는 부위와 외래부를 포함하는 항원상동성부가단백질의 예시적 그래프이다.
- [69] 도 10은 항원단백질과 상동성이 있는 부위와 비항원부와 외래부를 포함하는 항원상동성부가단백질의 예시적 그래프도이다.
- [70] 도 11은 면역원성 시스템 중 면역원성 내부담지시스템의 구조를 나타낸 모식도이다.
- [71] 도 12는 면역원성 시스템 중 면역원성 융합디스플레이시스템의 구조를 나타낸 모식도이다.
- [72] 도 13은 면역원성 시스템 중 면역원성 커플링디스플레이시스템의 구조를 나타낸 모식도이다.
- [73] 도 14는 면역원성 시스템 중 면역원성 부착디스플레이시스템의 구조를 나타낸 모식도이다.
- [74] 도 15는 면역원성 시스템 중 면역원성 교차결합디스플레이시스템의 구조를 나타낸 모식도이다.
- [75] 도 16은 시스템 중 예시적으로 융합디스플레이시스템의 양태를 선택한 직렬연결시스템의 모식도이다.
- [76] 도 17은 시스템 중 예시적으로 융합디스플레이시스템의 양태를 선택한 병렬시스템의 모식도이다.
- [77] 도 18은 면역원성발현목적염기서열이 면역원성부위를 포함하는 항원상동성단백질제조합발현벡터의 예시적 모식도이다.
- [78] 도 19는 면역원성발현목적염기서열이 면역원성부위-1부터 면역원성부위-n 중 선택된 두 개 이상의 염기서열을 포함하는 항원상동성단백질제조합발현벡터의 예시적 모식도이다.
- [79] 도 20은 면역원성발현목적염기서열이 1-면역원성부위부터 m-면역원성부위 중 선택된 두 개 이상의 염기서열을 포함하는 항원상동성단백질제조합발현벡터의 예시적 모식도이다.
- [80] 도 21은 면역원성발현목적염기서열이 면역원성부위, 비항원부의 염기서열을

- 포함하는 항원상동성부가단백질재조합발현벡터의 예시인
병원체유사입자재조합발현벡터의 예시적 모식도이다.
- [81] 도 22는 면역원성발현목적염기서열이 면역원성부위, 비항원부의 염기서열을
포함하는 항원상동성부가단백질재조합발현벡터의 예시인
보조면역부가재조합발현벡터의 예시적 모식도이다.
- [82] 도 23은 면역원성발현목적염기서열이 면역원성부위, 외래부의 염기서열을
포함하는 항원상동성부가단백질재조합발현벡터의 예시인
다가면역원성재조합발현벡터의 예시적 모식도이다.
- [83] 도 24는 면역원성발현목적염기서열이 면역원성부위, 외래부의 염기서열을
포함하는 항원상동성부가단백질재조합발현벡터의 예시인
다가병원체유사입자재조합발현벡터의 예시적 모식도이다.
- [84] 도 25는 구성요소발현목적염기서열이 제x단백질과 제y연결부의 염기서열을
포함하는 면역원성직렬연결체재조합발현벡터의 예시적 모식도이다:
- [85] a-1 : 제1단백질, b-1 : 제1연결부, a-2 : 제2단백질, b-2 : 제2연결부, a-3 :
제3단백질, b-3 : 제3연결부, a-4 : 제4단백질, b-4 : 제4연결부, a-5 : 제5단백질
- [86] 도 26은 시스템 중 예시적으로 융합디스플레이시스템의 양태를 선택한
면역원성 직렬연결시스템의 시스템재조합발현벡터의 모식도로서
시스템목적염기서열이 표면개시체, 융합부, 면역원성 직렬연결체의 염기서열을
포함하는 면역원성직렬연결시스템재조합발현벡터를 의미한다.
- [87] 도 27은 도 26의 면역원성직렬연결시스템재조합발현벡터에 의하여 발현된
면역원성 직렬연결시스템의 모식도이다.
- [88] 도 28은 복수 병렬체의 시스템을 시스템발현목적염기서열로 하는 단일
면역원성병렬시스템재조합발현벡터의 예시로서, 제1병렬체는 내부담지시스템,
제2병렬체 및 제3병렬체는 융합디스플레이시스템인
면역원성병렬시스템재조합발현벡터의 모식도이다.
- [89] 도 29는 도 28의 면역원성병렬시스템재조합발현벡터에 의하여 발현된
면역원성 병렬시스템의 모식도이다.
- [90] 도 30은 포자시스템발현목적염기서열이 포자담지면역원성물질의 염기서열을
포함하는 면역원성포자내부담지시스템재조합발현벡터의 예시적 모식도이다.
- [91] 도 31은 포자시스템발현목적염기서열이 포자담지면역원성물질과 전하를 띄는
물질의 염기서열을 포함하는 면역원성포자내부담지시스템재조합발현벡터의
예시적 모식도이다.
- [92] 도 32는 포자시스템발현목적염기서열이 포자표면개시체와
포자융합면역원성물질의 염기서열을 포함하는
면역원성포자융합디스플레이시스템재조합발현벡터의 예시적 모식도이다.
- [93] 이하 도 33 내지 도 37은 도 32의 예시이다.
- [94] 도 33은 포자시스템발현목적염기서열이 복수의 포자외부상동성부위와
포자융합면역원성물질의 염기서열을 포함하는

- 면역원성포자융합디스플레이시스템제조합발현백터의 예시적 모식도이다.
- [95] 도 34는 포자시스템발현목적염기서열이 타단백질의 포자외부신호서열을 포함한 일부분, 포자외부상동성부위, 포자융합면역원성물질의 염기서열을 포함하는 면역원성포자융합디스플레이시스템제조합발현백터의 예시적 모식도이다.
- [96] 도 35는 포자시스템발현목적염기서열이 타단백질의 포자외부위치화모티프를 포함한 일부분, 포자외부상동성부위, 포자융합면역원성물질의 염기서열을 포함하는 면역원성포자융합디스플레이시스템제조합발현백터의 예시적 모식도이다.
- [97] 도 36은 포자시스템발현목적염기서열이 이중포자외부단백질의 포자외부위치화모티프를 포함한 일부분, 포자외부상동성부위, 포자융합면역원성물질의 염기서열을 포함하는 면역원성포자융합디스플레이시스템제조합발현백터의 예시적 모식도이다.
- [98] 도 37은 포자시스템발현목적염기서열이 특정 부호의 전하를 띄는 포자외래부, 포자외부상동성부위, 포자융합면역원성물질의 염기서열을 포함하는 면역원성포자융합디스플레이시스템제조합발현백터의 예시적 모식도이다.
- [99] 도 38은 포자시스템발현목적염기서열이 포자부착면역원성물질의 염기서열을 포함하는 면역원성포자부착디스플레이시스템제조합발현백터의 예시적 모식도이다.
- [100] 도 39는 포자시스템발현목적염기서열이 포자부착면역원성물질과 전하를 띄는 물질의 염기서열을 포함하는 면역원성포자부착디스플레이시스템제조합발현백터의 예시적 모식도이다.
- [101] 도 40은 다중정렬에 의한 계통수(phylogenetic tree)를 활용하여 마스터백신의 대상이 되는 백신주들을 선정하는 과정을 나타낸 시스템도이다.
- [102] 도 41은 PEDV 백신 제작시 CotG를 이용한 경우, 바실러스가 형질전환되었는지 알아보기 위한 fluorescence microscope 사진이다.
- [103] 도 42는 PEDV 백신 제작시 CotG를 이용한 경우, 바실러스가 형질전환되었는지 알아보기 위한 flow cytometry 실험 결과를 나타낸 그래프이다.
- [104] 도 43은 PEDV 백신 제작시 CotG를 이용한 경우, 바실러스가 포자로 발현되었는지 알아보기 위하여 Malachite green staining 수행 후 촬영한 바실러스의 광학 현미경 사진이다.
- [105] 도 44는 PEDV 백신 제작시 CotG를 이용한 경우, GFP가 포자 표면에 발현한 것을 확인하기 위한 Pronase 처리 실험의 결과를 나타낸 그래프이다.
- [106] 도 45는 PEDV 백신 제작시 CotG를 이용한 경우, 면역 반응 확인 실험 결과를 나타낸 그래프이다.
- [107] 도 46은 PEDV 백신 제작시 CotG를 이용한 경우, 항원 특이적 항체의 생성을 확인하기 위한 immunoblotting assay 실험 결과를 나타낸 그래프이다.

- [108] 도 47은 PEDV 백신 제작시 CotB를 이용한 경우, 바실러스가 형질전환되었는지 알아보기 위한 fluorescence microscope 사진이다.
- [109] 도 48은 PEDV 백신 제작시 CotB를 이용한 경우, 바실러스가 형질전환되었는지 알아보기 위한 flow cytometry 실험 결과를 나타낸 그래프이다.
- [110] 도 49는 PEDV 백신 제작시 CotB를 이용한 경우, 바실러스가 포자로 발현되었는지 알아보기 위하여 Malachite green staining 수행 후 촬영한 바실러스의 광학 현미경 사진이다.
- [111] 도 50은 PEDV 백신 제작시 CotB를 이용한 경우, 면역 반응 확인 실험 결과를 나타낸 그래프이다.
- [112] 도 51은 PEDV 백신 제작시 CotB를 이용한 경우, 항원 특이적 항체의 생성을 확인하기 위한 immunoblotting assay 실험 결과를 나타낸 그래프이다.
- [113] 도 52는 PEDV 백신 제작시 CotC를 이용한 경우, 바실러스가 형질전환되었는지 알아보기 위한 fluorescence microscope 사진이다.
- [114] 도 53은 PEDV 백신 제작시 CotC를 이용한 경우, 바실러스가 형질전환되었는지 알아보기 위한 flow cytometry 실험 결과를 나타낸 그래프이다.
- [115] 도 54는 PEDV 백신 제작시 CotC를 이용한 경우, 바실러스가 포자로 발현되었는지 알아보기 위하여 Malachite green staining 수행 후 촬영한 바실러스의 광학 현미경 사진이다.
- [116] 도 55는 PEDV 백신 제작시 CotC를 이용한 경우, 면역 반응 확인 실험 결과를 나타낸 그래프이다.
- [117] 도 56은 PEDV 백신 제작시 CotC를 이용한 경우, 항원 특이적 항체의 생성을 확인하기 위한 immunoblotting assay 실험 결과를 나타낸 그래프이다.
- [118] 도 57은 PCV 백신 제작시 CotG를 이용한 경우, 바실러스가 형질전환되었는지 알아보기 위한 flow cytometry 실험 결과를 나타낸 그래프이다.
- [119] 도 58은 PCV 백신 제작시 CotB를 이용한 경우, 바실러스가 형질전환되었는지 알아보기 위한 flow cytometry 실험 결과를 나타낸 그래프이다.
- [120] 도 59는 PCV 백신 제작시 CotC를 이용한 경우, 바실러스가 형질전환되었는지 알아보기 위한 flow cytometry 실험 결과를 나타낸 그래프이다.
- [121] 도 60은 PCV 백신 제작시 PCV-2A를 이용한 경우, 면역 반응 확인 실험 결과를 나타낸 그래프이다.
- [122] 도 61은 PCV 백신 제작시 PCV-2B를 이용한 경우, 면역 반응 확인 실험 결과를 나타낸 그래프이다.
- [123] 도 62는 PCV 백신 제작시 PCV-m2B를 이용한 경우, 면역 반응 확인 실험 결과를 나타낸 그래프이다.
- [124] 도 63은 PCV 백신 제작시 PCV-2A를 이용한 경우, 항원 특이적 항체의 생성을 확인하기 위한 immunoblotting assay 실험 결과를 나타낸 그래프이다.
- [125] 도 64는 PCV 백신 제작시 PCV-2B를 이용한 경우, 항원 특이적 항체의 생성을 확인하기 위한 immunoblotting assay 실험 결과를 나타낸 그래프이다.

[126] 도 65는 PCV 백신 제작시 PCV-m2B를 이용한 경우, 항원 특이적 항체의 생성을 확인하기 위한 immunoblotting assay 실험 결과를 나타낸 그래프이다.

[127]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[128] 본 출원은 면역반응에 관여하는 물질, 시스템 및 방법에 관한 것이다. 특히, 병원체에 의한 감염으로 인해 발생하는 면역반응의 메커니즘에 관여한다.

[129]

[130] 병원체에 의한 질병은 역사와 지역을 불문하고 인체와 동물을 포함한 지구상의 생체들의 주요한 사망 원인이었다.

[131] 생체가 병원체에 감염되면 병원체를 죽이거나 무력화하는 면역 과정이 일어난다. 일반적으로 면역 과정은 세포성 면역과 체액성 면역으로 진행된다. 세포성 면역은 세포독성(cytotoxic) T세포가 개별적으로 병원체에 감염된 세포를 사멸시키는 면역이다. 먼저 병원체에 감염된 세포가 MHC-I 단백질을 이용해 병원체의 항원을 세포 표면에 개시하며 세포독성 T세포가 이를 인식하여 세포 자살을 유도한다. 체액성 면역은 항원에 대한 항체를 생성하여 병원체를 사멸하는 면역이다. 먼저 병원체의 항원을 섭취한 수지상 세포, 대식 세포, B 세포가 MHC-II 단백질을 이용해 항원을 세포 표면에 개시하며, 항체는 이 때 개시된 항원에 헬퍼(Helper) T 세포가 이를 인식하여 활성화되어 사이토카인을 분비하며 사이토카인에 의해 B 세포와 T세포독성 T 세포가 활성화된다. 활성화된 B 세포는 플라즈마 세포(plasma cell)와 기억(memory) B 세포로 분화하여 항체 생성에 관여한다. 플라즈마 세포로 분화된 B 세포는 항원에 대한 항체를 생성하여 병원체를 사멸하는 기능을 한다. 기억 B 세포로 분화된 B 세포는 항체를 생성하진 않으나 체액 내에 존재하다가 병원체가 다시 침입하면 플라즈마 세포와 기억 B 세포로 다시 분화한다.

[132] 면역 반응은 생체가 병원체에 최초 감염된 때와 2차 감염된 때 1차 면역과 2차 면역이라는 특이한 양상을 보인다. 병원체에 최초 감염된 때에는 기억 B 세포가 존재하지 않기 때문에 소수의 플라즈마 세포가 생성되므로 항체의 농도가 천천히 상승하는 1차 면역이 일어난다. 하지만 1차 면역 이후에 병원체에 감염되면 1차 면역 과정에서 만들어진 기억 B 세포가 바로 플라즈마 세포로 분화하여 항체의 농도가 급격히 상승하는 2차 면역, 즉 후천 면역이 일어난다. 따라서 생체는 최초 감염에 의한 1차 면역을 거치면 후천 면역을 통해 더욱 병원체에 효율적으로 대처하게 된다. 백신은 생체가 병원체에 감염되지 않고도 이러한 기억 B 세포를 생성하여 병원체에 대한 후천 면역을 나타내도록 유도하는 기능을 한다.

[133] 병원체에 의한 질병의 위협이 획기적으로 낮아진 것은 이러한 백신의 개발과 맞물려 있다.

[134] 기존의 백신은 어떤 면역원성물질을 포함하느냐에 따라 분류될 수 있다. 첫

번째로 병원체 자체를 사용하는 형태가 있다. 최초의 백신은 야생 상태의 병원체를 용액에 희석하여 사용하는 형태였으나 질병 감염의 위험이 높은 단점이 있었다. 이를 해결하기 위해 현존하는 백신들은 병원체를 화학적 처리, 유전적 변형을 함으로써 병원성을 줄여서 사용하고 있다. 두 번째로 병원체의 항원 단백질 또는 표면 단백질을 사용하는 형태가 있다. 항원 단백질은 병원체에 비해 병원성이 낮은 장점이 있다. 항원 단백질은 병원체로부터 분리하거나 유전공학적 방법으로 생산되고 있다.

[135]

[136] 본 출원은 동물의 특정 질병의 병원체를 대상으로 하는 면역원성물질, 면역원성시스템 및 이를 포함한 동물 백신 조성물에 관한 것이다.

[137] 바람직하게는, 병원체의 항원 단백질 또는 표면 단백질을 사용하는 유전자 재조합 면역원성시스템 및 이를 포함한 유전자 재조합 동물 백신 조성물에 관한 것이다. 그러나,

[138]

[139] 본 출원의 일 태양은 백신(vaccine)에 관한 것이다.

[140] "백신(vaccine)"은 투여한 생체에게 특정 질병에 대하여 후천면역을 형성하는 물질 또는 항원을 의미한다.

[141] "후천면역(adaptive immune system)"은 생체의 세포성 면역으로서 특정 항원에 의해 분화한 기억(memory) B 세포에 존재하는 면역 상태를 의미한다.

[142] "면역원성물질(immunogen)"은 백신의 일 구성 요소로서 생체 내에서 면역을 일으키는 물질을 의미한다.

[143] "야생 상태(native)"는 물질이 인위적인 조작 없이 자연계에서 얻어진 상태를 의미한다.

[144]

[145] **[면역원성물질(immunogen)]**

[146] 본 출원의 일 구체예는 면역원성물질을 포함한 백신이다.

[147] 상기 면역원성물질은 후천면역 반응을 일으킬 수 있는 모든 물질을 포함하며, 예를 들어, 병원체, 항원 단백질, 항원 상동성 단백질, 항원 상동성 부가단백질일 수 있다.

[148]

[149] 1) 병원체(pathogen)

[150] "병원체(pathogen)"는 바이러스, 박테리아, 진균, 조류 등을 포함하는, 생체에게 질병을 일으키는 개체를 통칭하여 일컫는 말이다.

[151] "병독성 부위(virulence portion)"는 병원체의 일부로서 병독성을 나타내는 부위를 의미한다.

[152] "생존성 부위(maintenance portion)"는 병원체의 일부로서 물질대사 또는 증식에 관여하는 부위를 의미한다.

[153] 본 출원의 일 예는 병원체 자체를 면역원성물질로 포함한 백신일 수 있다.

- [154] 상기 병원체는 하나 이상의 항원 단백질을 병원체의 외막에 개시하고 있을 수 있고, 상기 항원 단백질은 한 종류에 불과할 수도 있지만 여러 종류의 단백질들이 항원 단백질로 기능할 수도 있다. 이러한 항원 단백질을 포함하고 있는 병원체 자체를 백신의 면역원성물질로 사용할 수 있다.
- [155] 일 구체예에서 병원체는 야생 상태일 수 있다.
- [156] 다른 구체예에서 병원체는 특정 부위가 결실/변형된 것일 수 있다. 이 때 특정 부위는 병독성 부위일 수 있다. 또한 특정 부위는 생존성 부위일 수 있다. 또한 특정 부위는 항원 단백질 내의 면역원성 부위일 수 있다.
- [157] 다른 구체예에서 병원체는 그 구조가 변형 또는 조작된 것일 수 있다. 상기 변형과 조작은 자연적으로 또는 인위적으로 이루어질 수 있다. 이 때 병원체의 전체적인 구조는 야생 상태의 병원체와 80%~100%의 상동성을 가질 수 있다. 바람직하게는 상기 상동성은 90~100%, 더욱 바람직하게는 95~100%이다.
- [158]
- [159] 일 실시예에서, 상기 병원체는 동일한 과(family)에 속한 바이러스일 수 있다.
- [160] 이 때 동일한 과는 코로나바이러스과(Coronaviridae)일 수 있다.
- [161] 또한 동일한 과는 아테리바이러스과(Arteriviridae)일 수 있다.
- [162] 또한 동일한 과는 서코바이러스과(Circoviridae)일 수 있다.
- [163] 또한 동일한 과는 파라믹소바이러스과(Paramyxoviridae)일 수 있다.
- [164] 일 실시예에서, 상기 병원체는 돼지 대상 질병의 병원체일 수 있다.
- [165] 이 때 돼지 대상 질병의 병원체는 돼지유행성설사바이러스(Porcine Epidemic Diarrhea Virus, PEDV), 돼지생식기호흡기증후군바이러스(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, PRRSV), 돼지서코바이러스(Porcine Circovirus, PCV)일 수 있다.
- [166] 일 실시예에서, 상기 병원체는 가금류 대상 질병의 병원체일 수 있다.
- [167] 이 때 가금류 대상 질병의 병원체는 닭전염성기관지염바이러스(Infectious Bronchitis Virus, IBV), 뉴캐슬바이러스(Newcastle Disease Virus, NDV)일 수 있다.
- [168]
- [169] 병원체의 구조
- [170] "항원 단백질(antigen protein)"은 병원체의 일부로서 생체 내에서 면역을 일으키는 단백질을 의미한다.
- [171] "비항원부"는 병원체의 구조 중 항원 단백질을 제외한 임의의 부분을 말한다.
- [172] "면역원성 부위(immunogenic portion)"는 항원 단백질 안에서 특별히 면역반응을 일으키는 부위를 말한다.
- [173] "비면역원성 부위(nonimmunogenic portion)"는 항원 단백질 안에서 면역원성 부위를 제외한 부위를 말한다.
- [174] 도 1에 나타난 것과 같이 병원체의 구조는 크게 면역을 일으키는 항원 단백질과 비항원부로 나눌 수 있다. 한 종류의 병원체 안에서 항원 단백질은 하나 이상의 종류일 수 있다.

- [175] 각각의 항원 단백질은 면역원성 부위와 비면역원성 부위로 나누어진다. 한 종류의 항원 단백질 안에서 면역원성 부위는 하나 이상의 종류일 수 있다.
- [176] 비항원부는 병원체의 전장 서열에서 항원 단백질 부분을 제외한 병원체의 염기 서열/단백질 구획을 말하며, 병원체의 표면 단백질(capsid protein)을 포함한다.
- [177]
- [178] 2) 항원 단백질
- [179] 이하 명세서에서 다음과 같은 정의를 사용한다.
- [180] "x-항원 단백질"은 항원 단백질로서 특정 병원체 안에 있는 m개 종류의 항원 단백질 중 x번째 것을 말한다.
- [181] "x-면역원성 부위-y"은 면역원성 부위로서 특정 병원체 안에 있는 m개 종류의 항원 단백질 중 x번째 항원 단백질 상에 존재하며, x번째 항원 단백질 상의 n개 종류의 면역원성 부위 중 y번째 면역원성 부위를 의미한다.
- [182] "x-비면역원성 부위"는 비면역원성 부위로서 특정 병원체 안에 있는 m개 종류의 항원 단백질 중 x번째 항원 단백질 상에 존재하는 비면역원성 부위를 의미한다.
- [183] 이때 x, y에 관한 별다른 기재가 없으면 임의의 한 개의 항원 단백질, 면역원성 부위 또는 비면역원성 부위를 의미한다.
- [184]
- [185] 본 출원의 일 예는 상기 항원 단백질을 면역원성물질로 포함한 백신일 수 있다.
- [186] 일 구체예에서 상기 항원 단백질은 한 종류의 항원 단백질일 수 있다. 이 때 상기 항원 단백질은 야생 상태일 수 있다.
- [187] 또한 상기 항원 단백질은 특정 부위가 변형 또는 조작된 것일 수 있다. 상기 변형과 조작은 자연적으로 또는 인위적으로 이루어질 수 있다. 이 때 상기 특정 부위는 면역원성 부위일 수 있다.
- [188] 다른 구체예에서 상기 항원 단백질은 1-항원 단백질부터 m-항원 단백질 중 선택된 두 개 이상을 혼합한 것일 수 있다.
- [189]
- [190] 본 출원의 일 실시예에서, 상기 항원단백질은 PEDV의 항원단백질이다.
- [191] 상기 PEDV의 항원단백질은 스파이크 단백질로 알려져있다. PEDV 스파이크 단백질은 1,388 아미노산(aa)으로 구성되는 I형 당단백질이다. 스파이크 단백질은 다른 코로나바이러스의 스파이크 단백질을 갖는 이의 상동성을 기초로 하여 S1(1-794 aa) 및 S2(794-1,388 aa) 도메인으로 나눌 수 있다. 코로나바이러스에서 스파이크 단백질은 표면 항원이고, 여기서, 바이러스 진입을 매개하기 위한 숙주 세포 수용체 당단백질과 상호작용을 조절하고, 자연 숙주에서 중화 항체의 유도를 자극하는 역할을 한다. 따라서, 스파이크 당단백질은 PEDV에 대항하는 효과적인 백신의 개발을 위한 일차 표적이다.
- [192] 서열번호1은 PEDV의 CV777 주의 스파이크 단백질의 단백질 서열이며, 앞으로 특별한 설명이 없는 한 모든 항원단백질의 서열 및 면역원성부위의 위치에 관한

설명은 CV777 주(ncbi Accession no. JN599150.1)를 기준으로 하나, 이는 기준일 뿐이므로 출원이 CV777 주에 대한 것으로만 한정되지는 않는다.

- [193] 예를 들어, 상기 스파이크1 단백질의 일부서열로 서열번호 17의 서열을 사용했다.
- [194] 예를 들어, 상기 스파이크2 단백질의 일부서열로 서열번호 18의 서열을 사용했다.
- [195] 본 출원에서는 PEDV에 관하여 설명하는 경우, 1-항원단백질은 스파이크 단백질을 일컫는다. 이외에도 PEDV의 M 단백질, N 단백질이 항원단백질이 될 수 있음이 알려져 있으며, 또한 그 외의 항원단백질이 발견될 수 있다. 이러한 경우 새로운 항원단백질은 필요에 따라 자연히 3-항원단백질 내지 x-항원단백질로 포함하면 되는 것일 뿐이지 본 출원의 대상이 아닌 것으로 보아선 안 된다.
- [196]
- [197] 본 출원의 다른 실시예에서, 상기 항원단백질은 PCV의 항원단백질이다.
- [198] 상기 항원단백질은 캡시드 단백질일 수 있다
- [199] 상기 PCV의 캡시드 단백질은 ORF1, ORF2, ORF3, ORF4 등이 포함될 수 있으나 이에 한정하지는 않는다.
- [200] 예를 들어 상기 PCV의 캡시드 단백질은 ORF2일 수 있다.
- [201] 예를 들어, 상기 캡시드 단백질의 서열을 서열번호 47을 사용했다.
- [202] 상기 PCV는 PCV2A, PCV2B, PCVm2B, PCV2C 및 PCV2D 등의 유전자형으로 분류될 수 있으나, 이에 한정하지는 않는다.
- [203] 예를 들어 본 출원의 상기 PCV는 PCV2A, PCV2B 및 PCVm2B 중 선택되는 어느하나 이상일 수 있다.
- [204] 또한 상기 캡시드 단백질 이외의 항원단백질이 발견될 수 있다. 이러한 경우도 본 출원의 대상으로 포함하는 것으로 한다.
- [205]
- [206] 면역원성 부위
- [207] 도 2에 나타난 것과 같이, 항원단백질은 특별히 면역을 강하게 일으키는 부위인 면역원성 부위를 포함한다. 면역원성 부위는 항원 단백질의 특정 부위일 수 있고, 6aa부터 300aa까지 크기가 다양하다. 일반적으로 병원체의 면역원성 부위는 논문을 통해 쉽게 찾을 수 있다.
- [208] 예를 들어, PEDV의 면역원성 부위는 CV777 strain을 기준으로 504~643aa(COE), 753~760(SS2), 769~776(SS6), 1373~1379(2C10)으로 알려져 있다(도 3 참조).
- [209] 본 출원의 일 실시예에서, PEDV의 스파이크단백질의 면역원성부위는 서열번호1을 기준으로 504~643aa(COE, 1-면역원성부위-1), 753~760(SS2, 1-면역원성부위-2), 769~776(SS6, 1-면역원성부위-3), 1373~1379(2C10, 1-면역원성부위-4)으로 알려져 있다.

- [210] 이외에도, PEDV의 새로운 항원단백질이 있는 경우 새로운 항원단백질의 면역원성부위는 필요에 따라 x-면역원성부위-1 내지 x-면역원성부위-y로 포함할 수 있다.
- [211] 예를 들어, PCV의 면역원성 부위는 ORF1, ORF2, ORF3 및 ORF4 중 선택되는 어느하나 이상의 단백질 및/또는 폴리뉴클레오타드의 단편일 수 있다.
- [212] 예를 들어, 상기 ORF1, ORF2, ORF3 및 ORF4 중 선택되는 어느하나 이상의 단백질 및/또는 폴리뉴클레오타이드의 일부(절단, 치환 등)의 형태도 포함할 수 있으나 이에 제한하지는 않는다.
- [213] 이외에도, PCV의 새로운 항원단백질이 있는 경우 새로운 항원단백질의 면역원성부위는 필요에 따라 x-면역원성부위-1 내지 x-면역원성부위-y로 포함할 수 있다.
- [214]
- [215] 3) 항원 상동성 단백질(antigen homologous protein)
- [216] "항원 상동성 단백질(antigen homologous protein)"은 항원 단백질의 구조와 상동성이 있는 단백질을 의미한다.
- [217] 본 출원의 일 예는 상기 항원 상동성 단백질을 면역원성물질로 포함한 백신일 수 있다.
- [218] 일 구체예에서 상기 항원 상동성 단백질은 면역원성 부위를 포함할 수 있다.
- [219] 다른 구체예에서 상기 항원 상동성 단백질은 면역원성 부위-1부터 면역원성 부위-n 중 선택된 두 개 이상을 포함할 수 있다. 이 때 면역원성 부위의 배열 순서는 야생 상태 항원 단백질과 다를 수 있다.
- [220] 다른 구체예에서 상기 항원 상동성 단백질은 면역원성 부위를 포함하면서 비면역원성 부위를 포함할 수 있다.
- [221] 이 때 상기 비면역원성 부위는 상기 면역원성 부위의 N 말단 앞에 위치할 수 있다. 또한 상기 비면역원성 부위는 상기 면역원성 부위의 C 말단 뒤에 위치할 수 있다. 또한 상기 비면역원성 부위는 상기 면역원성 부위의 N, C 말단 모두에 위치할 수 있다. 도 4는 1-면역원성부위-1과 면역원성 부위의 N, C 말단 모두에 1-비면역원성부위를 포함하는 항원 상동성 단백질의 예시이다.
- [222] 이 때 상기 비면역원성 부위는 특정 염기 서열일 수 있다. 이때 상기 특정 염기 서열은 18bp, 22bp, 28bp, 31bp, 36bp의 크기일 수 있다. 바람직하게는 상기 특정 염기 서열은 18 내지 22bp의 크기를 갖는다.
- [223] 다른 구체예에서 상기 항원 상동성 단백질은 1-면역원성 부위부터 m-면역원성 부위 중 선택된 두 개 이상을 포함할 수 있다.
- [224] 이 때 항원 상동성 단백질은 N, C 말단 모두에 비면역원성 부위가 위치할 수 있다. 이때 상기 비면역원성 부위는 특정 염기 서열일 수 있다. 이때 상기 특정 염기 서열은 18bp, 22bp, 28bp, 31bp, 36bp의 크기일 수 있다. 바람직하게는 상기 특정 염기 서열은 18 내지 22bp의 크기를 갖는다. 도 5는 1-면역원성부위-1 및 2와 1-면역원성부위-1의 N, C 말단 모두에 1-비면역원성부위를 포함하는 항원

상동성 단백질의 예시이다.

[225] 다른 구체예에서 상기 항원 상동성 단백질은 1-면역원성 부위부터 m-면역원성 부위 중 선택된 1개 이상 및 1-비면역원성 부위부터 m-비면역원성 부위 중 선택된 1개 이상을 포함할 수 있다.

[226] 이 때 비면역원성 부위는 N, C 말단 모두에 위치할 수 있다. 이때 상기 비면역원성 부위는 특정 염기 서열일 수 있다. 이때 상기 특정 염기 서열은 18bp, 22bp, 28bp, 31bp, 36bp의 크기일 수 있다. 바람직하게는 상기 특정 염기 서열은 18 내지 22bp의 크기를 갖는다. 도 6는 1-면역원성부위-2 및 2-면역원성부위-1과 1-면역원성부위-2의 N 말단에 1-비면역원성부위, 2-면역원성부위-1의 C 말단에 2-비면역원성부위를 포함하는 항원 상동성 단백질의 예시이다. 도 7은 1-면역원성부위-1, 2-면역원성부위-1 및 2-면역원성부위-2와 1-비면역원성부위 및 2-비면역원성부위를 포함하는 항원 상동성 단백질의 예시이다.

[227]

[228] 본 출원의 일 실시예에서,

[229] 상기 면역원성부위는 PEDV의 1-면역원성부위-1 내지 4를 포함할 수 있다.

[230] 또한, PEDV의 항원상동성단백질은 COE를 포함할 수 있다.

[231] 또한, PEDV의 항원상동성단백질은 SS2 및 COE를 순서대로 포함할 수 있다.

[232] 또한, PEDV의 항원상동성단백질은 SS2 및 SS6를 포함할 수 있다.

[233] 또한, PEDV의 항원상동성단백질은 스파이크 단백질의 S1 도메인을 포함할 수 있다.

[234] 또한, PEDV의 항원상동성단백질은 스파이크 단백질의 COE와 PEDV M 단백질의 면역원성부위를 포함할 수 있다.

[235]

[236] 본 출원의 또 다른 실시예에서,

[237] 상기 면역원성부위는 PCV의 캡시드 단백질을 포함할 수 있다.

[238] 예를 들어, 상기 PCV의 캡시드 단백질은 항원상동성단백질일 수 있다.

[239] 예를 들어, 상기 PCV의 항원상동성단백질은 ORF를 포함할 수 있다.

[240] 예를 들어, 상기 PCV의 항원상동성단백질은 ORF1, ORF2, ORF3 및 ORF4 중 어느하나 이상을 포함할 수 있다.

[241] 예를 들어, 상기 PCV의 항원상동성단백질은 캡시드 단백질의 ORF2를 포함할 수 있다.

[242]

[243] 4) 항원상동성 포함 부가단백질(antigen homologous protein-contained additive body)

[244] "항원상동성 포함 부가단백질(antigen homologous protein contained additive body)"는 항원 단백질의 구조와 일부 상동성을 가지는 항원 단백질의 구조와 상동성이 없는 부위를 동시에 포함하는 단백질을 의미한다. 즉, 항원 상동성 포함 부가단백질은 항원상동성 단백질에 부가적으로 항원단백질과 상동성이

없는 부위가 포함되어 있는 형태를 말한다. "항원상동성 포함 부가단백질"이라는 용어는 "항원상동성 부가단백질"이라는 용어와 혼용하여 본 명세서에서 사용한다.

[245] "외래부(foreign portion)"는 야생 상태 원래의 병원체 내에 존재하지 않는, 외부로부터 도입된 단백질 또는 염기 서열을 말한다.

[246]

[247] 본 출원의 일 예는 항원상동성 포함 부가단백질을 면역원성물질로 포함한 백신일 수 있다.

[248] 항원상동성 포함 부가단백질은 항원 단백질과 상동성이 없는 부위를 포함하고, 이 때 상동성이 없는 부위는 병원체의 비항원부나 외래부일 수 있다.

[249]

[250] 일 구체예에서 항원 상동성 포함 부가단백질은 항원 단백질과 상동성이 있는 부위와 비항원부를 포함할 수 있다. 도 8은 1-면역원성부위-1 및 2와 1-비면역원성부위, 그리고 비항원부를 포함하는 항원 상동성 포함 부가단백질의 예시이다.

[251] 상기 비항원부는 병원체의 외막 단백질과 상동성이 있을 수 있다. 또한, 상기 항원상동성 포함 부가단백질은 병원체 유사 입자(pathogen like particle)로 기능할 수 있다. 상기 병원체 유사 입자는 바이러스 유사 입자(virus like particle)일 수 있다.

[252] 또한, 상기 비항원부는 면역보조기능을 할 수 있다. 이 때 면역보조기능은 생체에서 면역 반응에 관계하는 사이토카인의 분비를 촉진 또는 면역 반응을 저해하는 사이토카인의 분비를 억제하는 것일 수 있다. 또한, 상기 면역보조기능은 면역세포의 막을 분해하는 것일 수 있다.

[253] 본 출원의 일 실시예에서, 상기 병원체의 외막 단백질은 PEDV의 E 단백질일 수 있다.

[254]

[255] 다른 구체예에서 항원상동성 포함 부가단백질은 항원 단백질과 상동성이 있는 부위와 외래부를 포함할 수 있다. 도 9는 1-면역원성부위-1 및 2-면역원성부위-2와 1-비면역원성부위, 2-비면역원성부위, 그리고 외래부를 포함하는 항원 상동성 포함 부가단백질의 예시이다.

[256] 상기 외래부는 타 병원체의 항원 단백질 상의 면역원성 부위일 수 있다. 또한 상기 외래부는 타 병원체의 항원 단백질 상의 비면역원성 부위이거나 비항원부일 수 있다. 이 때 상기 항원 상동성 부가단백질은 타 병원체의 병원체 유사 입자로 기능할 수 있다. 상기 병원체 유사 입자는 바이러스 유사 입자일 수 있다.

[257] 또한 상기 외래부는 면역보조기능을 할 수 있다. 이 때 면역보조기능은 생체에서 면역 반응에 관계하는 사이토카인의 분비를 촉진 또는 면역 반응을 저해하는 사이토카인의 분비를 억제하는 것일 수 있다. 또한 면역보조기능은

항원인식세포의 인식을 돕는 것일 수 있다. 이 때 외래부는 항체의 Fc 가변체일 수 있다. 또한 면역보조기능은 면역세포의 막을 분해하는 것일 수 있다. 이 때 면역보조기능은 대식세포막을 분해하는 것일 수 있다. 이 때 외래부는 리스테리오리신일 수 있다.

[258]

[259] 다른 구체예에서 항원 상동성 부가단백질은 항원 단백질과 상동성이 있는 부위, 비항원부 및 외래부를 포함할 수 있다. 도 10은 1-면역원성부위-2와 2-비면역원성부위, 그리고 서로 다른 제1외래부와 제2외래부, 또한 비항원부를 포함하는 항원 상동성 포함 부가단백질의 예시이다.

[260]

[261] **[면역원성 시스템]**

[262] "시스템 구조체(system structure)"는 면역원성물질 등의 목적물질을 일정 거리 내로 위치시키면서 생체 내에서 전달하는 기능을 하는 구조체를 의미한다.

[263] "시스템(system)"은 시스템 구조체의 일정 거리 내에 위치하면서 전달되는 목적물질; 및 이를 생체 내로 전달하는 기능을 하는 시스템 구조체를 포함하는 계와, 이러한 계가 작용하는 메커니즘을 포함하는 용어이다.

[264] "면역원성 시스템(immunogenic system)"은 면역원성물질 및 시스템 구조체로 이루어지는, 면역반응을 일으키는 시스템을 의미한다.

[265]

[266] 본 출원의 일 예는 면역원성 시스템을 포함하는 백신이다.

[267] 상기 면역원성 시스템은 면역원성물질 및 면역원성물질을 생체에서 전달하는 시스템 구조체를 필수적인 구성으로 한다.

[268] 면역원성물질의 구조와 특징은 위에서 언급한 바와 같다. 면역원성물질과 시스템 구조체는 생체 내에서 서로 일정 거리 내로 위치하면서 하나의 시스템으로서 전달된다.

[269] 면역원성 시스템을 이용한 백신은 면역원성물질만을 직접적으로 이용하는 백신보다 안정성이 뛰어나며 위험성이 덜 하다. 또한, 시스템의 조절을 통해 면역을 일으키는 효과를 조절할 수 있는 장점도 있다.

[270] 상기 면역원성 시스템의 시스템 구조체에 면역원성물질 외에도 면역보조물질 등 백신의 기능에 도움을 주는 공지의 요소를 포함, 부착할 수 있다.

[271]

[272] 시스템 구조체

[273] 시스템 구조체는 면역원성물질을 일정 거리 내로 위치하면서 생체 내에서 전달하는 기능을 한다.

[274] 시스템 구조체는 면역원성물질을 생체 내에 효율적으로 전달할 수 있는 물질이면 비제한적으로, 조직공학용 담체, 고분자, 파티클, 및 미생물 등일 수 있다. 바람직한 구체예는 박테리아 등의 미생물이다. 미생물에 타 병원체의 면역원성물질을 부합시키면 훨씬 지속적이고 강력한 면역반응을 일으키는

- 장점이 있다고 알려져 있다(Georgiou et al., 1997). 또한 시스템 구조체가 병원체인 경우 면역원성물질과 함께 다가 백신으로 작용할 수 있는 장점이 있다.
- [275] 상기 시스템 구조체는 동물 체내에 투여될 수 있는 크기를 가지는 것이 바람직하고, 예를 들어 그 직경이 약 0.02 μ m 내지 5 μ m 정도의 크기일 수 있다.
- [276] 상기 시스템 구조체가 물리적 및 화학적 안정성이 뛰어나면 면역원성 시스템이 생체의 위장과 같은 극한 조건에서도 면역을 일으킬 수 있는 장점이 있다.
- [277]
- [278] 본 출원의 일 실시예에서,
- [279] 상기 시스템 구조체는 바이러스일 수 있다. 이 때 상기 바이러스는 병원체와 복합질환을 일으키는 것일 수 있다.
- [280] 상기 바이러스는 박테리오파지일 수 있다.
- [281] 상기 바이러스는 폭스바이러스 일 수 있다.
- [282] 상기 바이러스는 아데노바이러스일 수 있다.
- [283] 상기 바이러스는 헤르페스바이러스일 수 있다.
- [284] 상기 바이러스는 뉴캐슬병바이러스일 수 있다.
- [285] 상기 바이러스는 감염 동물이 가축인 바이러스일 수 있다. 바람직하게, 상기 가축은 돼지이다.
- [286] 상기 바이러스는 감염 동물이 조류인 바이러스일 수 있다. 바람직하게, 상기 조류는 닭이다.
- [287] 또한, 상기 시스템 구조체는 박테리아일 수 있다. 이 때 상기 박테리아는 병원체와 복합질환을 일으키는 것일 수 있다.
- [288] 상기 박테리아는 그람 음성균일 수 있다. 이 때 상기 그람 음성균은 위장질환균일 수 있다. 이 때 상기 위장질환균은 *E. coli*일 수 있다. 또한 상기 위장질환균은 *Salmonella*일 수 있다. 또한 상기 그람 음성균은 폐질환균일 수 있다. 이 때 상기 그람 음성균은 *Pasteurella multocida*일 수 있다.
- [289] 상기 박테리아는 그람 양성균일 수 있다. 이 때 상기 그람 양성균은 폐질환균일 수 있다. 이 때 상기 폐질환균은 *Mycoplasma hyopneumoniae*일 수 있다. 또한 상기 그람 양성균은 *Lactobacillus*일 수 있다. 또한 상기 그람 양성균은 *Bacillus*일 수 있다. 이 때 상기 *Bacillus*는 *B. subtilis*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. cereus*일 수 있다.
- [290] 또한 상기 시스템 구조체는 포자일 수 있다.
- [291] 상기 포자는 식물의 포자일 수 있다.
- [292] 상기 포자는 효모의 포자일 수 있다.
- [293] 상기 포자는 진균의 포자일 수 있다.
- [294] 상기 포자는 포자성 박테리아의 포자일 수 있다. 이 때 상기 포자성 박테리아는 *Clostridium*, 예를 들어, *C. difficile* 등일 수 있다. 상기 포자성 박테리아는 *Sporolactobacillus*일 수 있다. 상기 포자성 박테리아는 *Bacillus*일 수 있다. 이 때 상기 *Bacillus*는 예를 들어, *B. subtilis*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. cereus* 등일

수 있다.

[295] 또한 상기 시스템 구조체는 인공적 구조체일 수 있다. 이 때 상기 인공적 구조체는 파티클 또는 강체(rigid body) 등일 수 있다. 또한 상기 인공적 구조체는 외막이 인지질로 도포된 것일 수 있다.

[296]

[297] **1) 면역원성 내부담지시스템(immunogen internal-carried system)**

[298] 본 출원의 일 예는 면역원성 내부담지시스템을 포함한 백신이다.

[299] "내부담지시스템"은 시스템의 일 구체예로서 목적물질이 시스템 구조체 내에 담지된 형태를 가지는 시스템을 의미한다.

[300] "담지체(carrying structure)"는 시스템 구조체로서 면역원성물질을 내부에 담지하여 전달하는 구조체를 의미한다.

[301] "면역원성 내부담지시스템"은 면역원성 시스템의 일 구체예로서 도 11에서 보듯이 면역원성물질이 시스템 구조체 내에 담지된 것을 의미한다. 이 때 시스템 구조체는 "담지체"로 표현 가능하다. 이 때 면역원성물질은 "담지면역원성물질"로 표현 가능하다.

[302]

[303] - 담지체(carrying structure)

[304] 담지체는 면역원성 시스템의 시스템 구조체를 포괄한다.

[305] 담지체는 내부의 공간이 특정 크기 이상일 수 있다. 바람직하게는 면역반응을 일으킬 수 있는 유효량의 면역원성 물질을 포함할 수 있는 크기 이상일 수 있다.

[306] 담지체는 내부에 전하를 띄고 있을 수 있다. 이 때, 담지체 내부의 전하는 담지면역원성물질의 전하와 인력을 일으킬 수 있다.

[307] 담지체는 외부에 전하를 띄고 있을 수 있다. 이 때 담지체 외부의 전하는 담지면역원성물질의 전하와 척력을 일으킬 수 있다.

[308] 담지체는 외막이 다공성일 수 있다.

[309] 담지체는 외막이 분해성일 수 있다. 이 때 상기 외막은 특정 제한효소의 작용 부위를 포함할 수 있다. 또한 상기 외막은 야생 상태에서 전체적으로 변형 또는 조작이 일어난 상태일 수 있다.

[310]

[311] - 담지면역원성물질(interal-carried immunogen)

[312] 상기 담지면역원성물질은 앞서 설명한 면역원성물질을 포괄한다.

[313] 상기 담지면역원성물질은 특정 크기 이하일 수 있다. 바람직하게는 담지체 내에서 면역반응을 일으킬 수 있는 유효량의 담지면역원성물질이 포함될 수 있을 만큼의 크기를 가질 수 있다.

[314] 상기 담지면역원성물질은 전하를 띄고 있을 수 있다. 이때 담지면역원성물질의 전하는 담지체 내부의 전하와 반대일 수 있다.

[315] 또한 상기 담지면역원성물질은 생물인 담지체를 비활성화하는 부분을 포함할 수 있다.

[316]

[317] **2) 면역원성 융합디스플레이시스템(immunogen-fused display system)**

[318] "디스플레이시스템"은 시스템의 일 구체예로서 목적물질을 시스템 구조체 외부에 개시하는 형태를 가지는 시스템을 말한다. 상기 디스플레이시스템은 본 명세서의 융합디스플레이시스템, 커플링디스플레이시스템, 부착디스플레이 시스템을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다.

[319]

[320] 본 출원의 일 예는 면역원성 융합디스플레이시스템을 포함한 백신이다.

[321] "면역원성 디스플레이시스템"은 면역원성 시스템의 일 구체예로서 면역원성물질을 시스템 구조체 외부에 개시하는 것을 말한다. 면역원성 디스플레이시스템은 본 명세서의 면역원성 융합디스플레이시스템, 면역원성 커플링디스플레이시스템, 면역원성 부착디스플레이 시스템을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다.

[322] "융합디스플레이시스템"은 시스템의 일 구체예로서, 목적물질을 시스템 구조체 외부에 개시하는 표면개시체 및 목적물질이 융합된 형태로 나타나는 시스템을 말한다.

[323] "융합디스플레이체(fusion displaying structure)"는 시스템 구조체로서 융합면역원성물질을 외부에 융합하여 전달하는 구조체를 의미한다.

[324] "표면개시체(surface displaying substructure)"는 목적물질과 융합하여 디스플레이체 외부에 개시되는 융합디스플레이시스템의 하위 구조체를 의미한다.

[325] "융합체(fused body)"는 표면개시체와 면역원성물질이 융합한 일체를 의미한다.

[326] "융합부(fusing part)"는 융합체에서 표면개시체와 면역원성물질이 융합된 부위를 의미한다.

[327] "면역원성 융합디스플레이시스템"은 면역원성 시스템의 일 구체예로서, 도 12에서 보듯이 목적물질과 융합하여 시스템 구조체 외부에 개시되는 표면개시체; 및 면역원성물질이 융합된 형태로 나타나는 시스템을 의미한다. 이 때 "융합"은 물질의 결합 관계로서 두 물질이 직접적으로 이어진 것을 의미한다. 이 때 시스템 구조체는 "융합디스플레이체"로 정의한다. 이 때 면역원성물질은 "융합면역원성물질(fused immunogen)"로 정의한다.

[328]

[329] - 융합디스플레이체(fusion displaying structure)

[330] 융합디스플레이체는 면역원성 시스템의 시스템 구조체를 포괄한다.

[331] 융합디스플레이체는 외부에 전하를 띄고 있을 수 있다. 이 때 융합디스플레이체 외부의 전하는 표면개시체의 전하와 인력을 일으킬 수 있다. 또한 융합디스플레이체 외부의 전하는 융합체의 전하와 인력을 일으킬 수 있다.

[332] 융합디스플레이체는 외부에 전하를 띄지 않을 수도 있다.

- [333] 융합디스플레이체는 외막이 다공성일 수 있다. 이 때 외막의 구멍(pore)은 표면개시체와 크기가 비슷하거나 다소 더 클 수 있다.
- [334]
- [335] - 표면개시체(surface displaying substructure)
- [336] 표면개시체는 융합디스플레이시스템의 하위 구조로서 그 크기가 융합디스플레이체보다 작은 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는, 그 크기가 융합디스플레이체의 크기에 상응하는 미생물의 외막 단백질의 크기와 같은 것이 좋다.
- [337] 표면개시체는 융합디스플레이체가 미생물인 경우 미생물의 야생 상태 단백질일 수 있다. 이 때 상기 표면개시체는 외막 단백질일 수 있다. 또는 표면개시체는 야생 상태 단백질이 변형 또는 조작된 것일 수 있다.
- [338] 예를 들어, 융합디스플레이체가 *Bacillus*의 포자인 경우, 표면개시체는 spore exosporium protein, spore coat protein, transmembrane protein, spore appendage protein, spore associated enzyme 중 어느 하나일 수 있다.
- [339] 표면개시체는 융합디스플레이체의 야생 상태 단백질의 구조와 상동성이 있는 단백질일 수 있다.
- [340] 표면개시체는 동일한 속(genus)에 속한 융합디스플레이체의 야생 상태 단백질일 수 있다. 이 때 상기 표면개시체는 외막 단백질일 수 있다. 이 때 표면개시체는 야생 상태 외막 단백질이 변형 또는 조작된 것일 수 있다.
- [341] 표면개시체는 동일한 속(genus)에 속한 융합디스플레이체의 야생 상태 단백질의 구조와 상동성이 있는 단백질일 수 있다.
- [342] 표면개시체는 특정 제한효소의 작용 부위를 포함할 수 있다. 이 때 특정 제한효소는 예를 들어, 시그널 펩티다아제(signal peptidase)일 수 있다.
- [343] 표면개시체는 전하를 띠고 있을 수 있다. 예를 들어, 표면개시체의 전하는 융합디스플레이체 외부의 전하와 인력을 일으킬 수 있다.
- [344] 표면개시체는 동일한 서열이 반복된 구조를 포함할 수 있다. 이 때 상기 반복된 구조는 야생 상태 단백질의 구조와 상동성이 있을 수 있다. 또한 상기 반복된 구조는 전하를 띠고 있을 수 있다. 이 때 반복된 구조의 전하는 융합디스플레이체 외부의 전하와 인력을 일으킬 수 있다.
- [345]
- [346] - 융합부(fusing part)
- [347] 융합부는 표면개시체와 면역원성물질이 융합된 부위를 의미한다. 이러한 융합부는 별도의 단백질/염기서열일 수 있으나 한 개의 화학적 결합을 형성하고 있는 부위에 불과할 수도 있다.
- [348] 융합부는 특별한 기능 없이 표면개시체와 면역원성 물질 간 결합부위만을 나타낼 수도 있고, 별도로 특정한 구조적 특징 또는 면역 형성 과정에서의 특정 기능을 가질 수도 있다.
- [349] 상기 융합부는 화학적 결합일 수 있다. 이 때 상기 화학적 결합은, 예를 들어,

중합 결합일 수 있다. 상기 중합 결합은 축합 중합 결합 또는 첨가 중합 결합일 수 있다. 상기 탈수 축합 중합 결합은 예를 들어, 아미드 결합일 수 있다.

- [350] 융합부는 목적하는 기능을 위해 필요한 어느 정도의 길이를 가질 수 있다. 융합체를 구성하는 표면개시체 및 면역원성물질은 각각 적합한 3차원 구조, 예를 들어, 접힘(folding) 구조를 가지고 있으며, 이러한 올바른 접힘 구조의 형성은 단백질이 제대로 기능하도록 한다. 융합부의 길이가 너무 짧으면 표면개시체와 면역원성물질 간의 입체 장애로 인해 각 물질의 접힘 구조가 올바르게 형성되지 못할 수 있다. 따라서 표면개시체와 면역원성물질의 접힘 구조가 올바르게 형성되기 위해 필요한 상기 융합부는 어느 정도의 길이 또는 크기를 가지는 것이 바람직하다. 예를 들어, 상기 융합부는 약 10bp, 15bp, 또는 20bp 이상의 염기서열 수 있다.
- [351] 융합부는 특정 아미노산 서열/염기 서열을 포함할 수 있다. 본 출원의 일 실시예에서, 특정 염기 서열 5'-GGAGGTGGGGGTTCCTCCAG-3'을 사용하였다.
- [352] 융합부는 특정한 전하를 띠는 것일 수 있다. 상기 특정한 전하는 표면개시체와 동일한 전하적 특성을 가질 수 있다. 예를 들어, 상기 융합부는 (양전하 아미노산(아르기닌/히스티딘/리신)의 수):(전체 아미노산의 수)에 의해 양전하를 띠 수 있다.
- [353] 융합부는 절단효소에 대한 활성을 갖는 것일 수 있다. 상기 절단효소는 제한효소(restriction enzyme) 또는 제한 내부핵산 가수분해 효소 (restriction endonuclease)로 혼용하여 용어를 사용할 수 있고, 이들은 이중 가닥 DNA 분자의 특정한 염기서열을 인식하여 그 부분이나 그 주변을 절단하는 것을 촉매하는 효소를 지칭한다. 비제한적으로 프로테아제일 수 있다.
- [354]
- [355] - 융합면역원성물질(fused immunogen)
- [356] 융합면역원성물질은 상기 언급한 면역원성물질을 포괄한다.
- [357] 융합면역원성물질은 특정한 크기를 가질 수 있다. 바람직하게는 면역반응을 일으킬 수 있는 유효 크기 이상을 가질 수 있다. 이 때 상기 융합면역원성물질은 표면개시체와 특정 크기 비율을 가질 수 있다.
- [358] 융합면역원성물질은 특정한 전하를 띠는 것일 수 있다. 상기 특정한 전하는 표면개시체와 동일한 전하적 특성을 가질 수 있다.
- [359]
- [360] - 융합체(fused body)
- [361] 융합체는 특정한 전하를 띠는 것일 수 있다. 이 때, 특정한 전하는 융합디스플레이체 외부의 전하와 인력을 일으킬 수 있다. 이 때 융합체는 양전하를 띠 수 있다.
- [362] 융합체의 전하는 (양전하 아미노산(아르기닌/히스티딘/리신)의 수):(전체 아미노산의 수)에 의해 생길 것일 수 있다. (양전하 아미노산의 수):(전체

아미노산의 수)는 0.1~0.8 : 1일 수 있다. 이 때 상기 비율은 0.5 : 1, 0.6 : 1, 0.7 : 1일 수 있다.

[363]

[364] **3) 면역원성 커플링디스플레이시스템(immunogenic coupling display system)**

[365] 본 출원의 일 예는 면역원성 커플링디스플레이시스템을 포함한 백신이다.

[366] "커플링디스플레이시스템"은 시스템의 일 구체예로서, 외부에 1커플링기를 가진 시스템 구조체; 및 2커플링기를 가진 목적물질이 커플링결합을 이루는 형태의 시스템을 말한다.

[367] "커플링결합(coupling bond)"은 디스플레이체커플링기와 면역원성물질커플링기의 상호작용에 의해 형성되는 화학적 결합을 의미한다.

[368] "커플링기(coupling group)"는 2개의 동종 또는 이종 커플링기의 상호작용에 의해 커플링결합을 이루는 부위를 의미한다.

[369] "디스플레이체커플링기(coupling group on displaying structure)"는 커플링기로서 커플링디스플레이체에 위치한 것을 의미한다.

[370] "면역원성물질커플링기(coupling part on immunogen)"는 커플링기로서 커플링면역원성물질에 위치한 것을 의미한다.

[371] "커플링부(coupling part)"는 디스플레이체커플링기와 면역원성물질커플링기가 상호작용하여 만들어진 커플링된 부위를 의미한다.

[372] "커플링디스플레이체(coupling displaying structure)"는 시스템 구조체로서 커플링면역원성물질과 커플링결합하여 전달되는 구조체를 의미한다.

[373] "면역원성 커플링디스플레이시스템"은 면역원성 시스템의 일 구체예로서 도 13에서 보듯이 외부에 1커플링기를 가진 시스템 구조체; 및 2커플링기를 가진 면역원성물질이 커플링결합을 이루는 것을 말한다. 이 때 시스템 구조체는 "커플링디스플레이체"로 표현될 수 있고, 면역원성물질은 "커플링면역원성물질(coupled immunogen)"로 표현될 수 있다. 상기 1커플링기는 "디스플레이체커플링기"로 표현할 수 있고, 상기 2커플링기는 "면역원성물질커플링기"로 표현할 수 있다.

[374]

[375] - 커플링디스플레이체

[376] 커플링디스플레이체는 면역원성시스템의 시스템 구조체를 포괄한다.

[377] - 커플링결합

[378] 커플링결합은 일반적으로 두 개 이상의 작용기의 상호작용으로 인해 생기는 중합 결합으로 이해할 수 있다. 중합 결합에는 작용기의 일부가 방출되는 축합 중합, 작용기가 유지되는 첨가 중합, 라디칼에 의한 라디칼 중합이 있을 수 있다. 본 명세서에서 말하는 커플링결합은 디스플레이체커플링기와 면역원성물질커플링기의 상호작용에 의해 형성되는 화학적 결합인 것이 바람직하다. 커플링결합은 두 개 이상의 커플링기가 동일하거나 상이한 것일 수 있다.

- [379] 본 출원의 일 실시예에서,
- [380] 커플링결합은 중합 결합일 수 있다.
- [381] 중합 결합은 축합 중합일 수 있다. 예를 들어, 상기 축합 중합은 탈수 축합 중합일 수 있다.
- [382] 상기 탈수 축합 중합은 아미드 결합일 수 있다.
- [383] 상기 탈수 축합 중합은 에스테르 결합일 수 있다.
- [384] 상기 탈수 축합 중합은 에테르 결합일 수 있다.
- [385] 상기 탈수 축합 중합은 알돌 결합일 수 있다.
- [386] 상기 축합 중합은 다이설파이드 결합일 수 있다.
- [387] 중합 결합은 첨가 중합일 수 있다.
- [388] 상기 첨가 중합은 말레이미드-티올 중합일 수 있다.
- [389] 중합 결합은 라디칼 중합일 수 있다.
- [390] 상기 라디칼 중합은 클릭 화학(click chemistry)일 수 있다.
- [391] - 디스플레이체커플링기
- [392] 디스플레이체커플링기는 상기 커플링 결합을 하기 위한 1 종류 이상의 작용기를 포함할 수 있다.
- [393] 예를 들어, 커플링 결합을 하기 위한 2 종류의 작용기를 포함할 수 있다. 이 때, 디스플레이체커플링기는 상기 커플링 결합을 하기 위한 1종류의 작용기를 포함한 제1커플링기 및 다른 종류의 작용기를 포함한 제2커플링기를 가진다.
- [394] - 면역원성물질커플링기
- [395] 면역원성물질커플링기는 디스플레이체커플링기의 작용기와 다른 1 종류 이상의 작용기를 포함할 수 있다.
- [396] 예를 들어, 면역원성물질커플링기는 상기 커플링 결합을 하기 위한 2 종류의 작용기를 포함할 수 있다. 이 때, 면역원성물질커플링기는 상기 커플링 결합을 하기 위한 1 종류의 작용기를 포함한 제1커플링기와 다른 종류의 작용기를 포함한 제2커플링기일 수 있다.
- [397] - 커플링면역원성물질
- [398] 이 때 커플링면역원성물질은 상기 언급한 면역원성물질을 포괄한다.
- [399] - 커플링부
- [400] 커플링부는 커플링디스플레이체와 커플링면역원성물질이 커플링결합된 부위로서 디스플레이체커플링기와 면역원성커플링기를 포함하는 부위를 의미한다. 이러한 커플링부는 별도의 단백질/염기서열일 수 있으나, 한 개의 커플링결합에 의해 생기는 작용기를 포함하는 부위에 불과할 수 있다.
- [401] 커플링부는 특별한 기능 없이 커플링디스플레이체와 커플링면역원성물질 간 결합부위만을 나타낼 수도 있고, 별도의 구조적 특징 또는 면역 형성 과정에서의 특정 기능을 가질 수도 있다.
- [402] 커플링부는 커플링결합을 형성하는 작용기(functional group) 또는 이들의 존재하는 부위를 의미할 수 있다.

- [403] 또한 커플링부는 목적하는 기능을 위해 필요한 어느 정도의 길이를 가질 수 있다. 커플링면역원성물질은 각각 적합한 3차원 구조, 예를 들어, 접힘(folding) 구조를 가지고 있으며, 올바른 접힘 구조의 형성은 단백질이 제대로 기능하도록 한다. 커플링부의 길이가 너무 짧으면 커플링디스플레이체와 커플링면역원성물질 간의 입체 장애로 인해 각 물질의 접힘 구조가 올바르게 형성되지 못할 수 있다. 따라서 커플링면역원성물질의 접힘 구조가 올바르게 형성되기 위해 필요한 상기 융합부는 어느 정도의 길이 또는 크기를 가지는 것이 바람직하다. 예를 들어, 상기 융합부는 약 10bp, 15bp, 또는 20bp 이상의 염기서열 수 있다.
- [404] 커플링부는 특정 아미노산 서열/염기 서열을 가질 수 있다. 본 출원의 일 실시예에서, 특정 염기 서열은 5'-GGAGGTGGGGGTTCCTCCAG-3'을 사용하였다.
- [405] 또한 커플링부는 특정한 전하를 띄는 것일 수 있다. 상기 특정한 전하는 커플링디스플레이체와 동일한 전하적 특성을 가질 수 있다. 예를 들어, 상기 커플링부는 (양전하 아미노산(아르기닌/히스티딘/리신)의 수):(전체 아미노산의 수)에 의해 양전하를 띌 수 있다.
- [406] 커플링부는 절단효소에 대한 활성을 갖는 것일 수 있다. 상기 절단효소는 제한효소(restriction enzyme) 또는 제한 내부핵산 가수분해 효소 (restriction endonuclease)와 용어를 혼용하여 사용할 수 있고, 이들은 이중 가닥 DNA 분자의 특정한 염기서열을 인식하여 그 부분이나 그 주변을 절단하는 것을 촉매하는 효소를 지칭한다. 비제한적으로 프로테아제일 수 있다.
- [407]
- [408] **4) 면역원성 부착디스플레이시스템(immunogenic attached display system)**
- [409] 본 출원의 일 예는 면역원성 부착디스플레이시스템을 포함한 백신이다.
- [410] "부착디스플레이시스템"은 시스템의 일 구체예로서 시스템 구조체 외부에 목적물질이 부착된 것을 의미한다.
- [411] "부착디스플레이체(attached displaying structure)"는 시스템 구조체로서 부착면역원성물질을 외부에 부착하여 전달하는 구조체를 의미한다.
- [412] "면역원성 부착디스플레이시스템"은 면역원성 시스템의 일 구체예로서 도 14에서 보듯이 시스템 구조체 외부에 면역원성물질이 부착된 형태의 시스템을 의미한다. 이 때 "부착"은 물질의 결합 관계로서 두 물질이 간접적으로 이어진 것, 예를 들어 특정 매개체 등을 통해 이어진 것을 의미한다. 이 때 시스템 구조체는 "부착디스플레이체"로 표현할 수 있고, 면역원성물질은 "부착면역원성물질(attached immunogen)"로 표현할 수 있다.
- [413] 본 출원의 일 실시예에서,
- [414] 상기 부착은 정전기적 인력에 의한 것일 수 있고,
- [415] 상기 부착은 수소결합에 의한 것일 수 있고,
- [416] 상기 부착은 소수성 상호작용에 의한 것일 수 있다.

[417]

[418] - 부착디스플레이체(attached displaying structure)

[419] 부착디스플레이체는 면역원성 시스템의 시스템 구조체를 포괄한다.

[420] 부착디스플레이체는 내부에 전하를 띄고 있을 수 있다. 이 때 부착디스플레이체 내부의 전하는 부착면역원성물질의 전하와 척력을 일으킬 수 있다.

[421] 부착디스플레이체는 외부에 전하를 띄고 있을 수 있다. 이 때 부착디스플레이체 외부의 전하는 부착면역원성물질의 전하와 인력을 일으킬 수 있다.

[422] 부착디스플레이체는 외부에 전하를 띄고 있지 않을 수 있다.

[423] 부착디스플레이체는 외막이 다공성일 수 있다.

[424]

[425] - 부착면역원성물질(attached immunogen)

[426] 부착면역원성물질은 상기 면역원성물질을 포괄한다.

[427] 부착면역원성물질은 특정 크기 이하일 수 있다. 바람직하게는 면역반응을 일으킬 수 있는 유효량의 담지면역원성물질이 부착디스플레이체에 충분히 부착되될 수 있을 만큼의 크기를 가질 수 있다.

[428] 부착면역원성물질은 전하를 띄고 있을 수 있다. 이때 부착면역원성물질의 전하는 부착디스플레이 외부의 전하와 인력을 일으킬 수 있다.

[429]

[430] **5) 면역원성 교차결합 디스플레이시스템(immunogenic cross-linked display system)**

[431] 본 출원의 일 예는 면역원성 교차결합 디스플레이시스템을 포함한 백신이다.

[432]

[433] "교차결합 디스플레이시스템(cross-linked display system)"은 디스플레이시스템의 일 구체예로서 외부에 제1 교차결합기를 가진 목적물질; 및 2개 이상의 제2 교차결합기를 가진 중합체가 교차결합을 이루어 교차결합그물구조를 형성하고 있는 형태의 시스템을 말한다.

[434] "교차결합 디스플레이체(cross-linked displaying structure)"는 교차결합 디스플레이시스템에 사용된 시스템 구조체를 의미한다.

[435] "교차결합(cross-linking)"은 면역원성물질교차결합기와 중합체교차결합기의 상호작용에 의해 형성되는 화학적 결합을 의미한다.

[436] "교차결합기(cross-linking group)"는 2개 이상의 동종 또는 이종 교차결합기의 상호작용에 의해 교차결합을 이루는 부위를 의미한다.

[437] "교차결합그물구조(cross-linking net structure)"는 교차결합들에 의해 형성된 목적물질 및 중합체에 의한 그물구조를 의미한다.

[438] "중합부(polymerizing part)"는 교차결합그물구조에서 목적물질 간에 중합되어있는 부분 또는 결합을 의미한다.

- [439] "교차결합부(cross-linking part)"는 면역원성물질교차결합기와 중합체교차결합기가 상호작용하여 만들어진 교차결합된 부분을 의미한다.
- [440] "면역원성물질교차결합기(cross-linking group on immunogen)"는 교차결합기로서 교차결합면역원성물질에 위치한 것을 의미한다.
- [441] "중합체(polymerizing body)"는 2개 이상의 중합체교차결합기를 가지고 있어 2개 이상의 면역원성교차결합기들과 교차결합하여 중합반응을 일으킬 수 있는 물질을 말한다.
- [442] "중합체교차결합기(cross-linking group on polymerizing body)"는 교차결합기로서 중합체에 위치한 것을 의미한다.
- [443] "면역원성 교차결합 디스플레이시스템"은 면역원성 디스플레이시스템의 일 구체예로서 도 15에서 보듯이 외부에 제1 교차결합기를 가진 면역원성물질과 2개 이상의 제2 교차결합기를 가진 중합체가 교차결합을 이루어 교차결합그물구조를 형성한 것을 말한다. 면역원성 교차결합 디스플레이시스템은 교차결합그물구조에 의해 시스템의 안정성이 높은 장점이 있다. 이 때 디스플레이체는 "교차결합 디스플레이체"로 정의한다. 이 때 면역원성물질은 "교차결합면역원성물질(cross-linked immunogen)"로 정의한다. 이 때 상기 제1 교차결합기는 "면역원성물질교차결합기"로 표현할 수 있고, 제2 교차결합기는 "중합체교차결합기"로 표현할 수 있다.
- [444] 기본적으로 면역원성 교차결합 디스플레이시스템은 교차결합그물구조 자체에 특징이 있는 것이므로, 디스플레이시스템의 형태는 제한이 없다. 예를 들어, 융합디스플레이시스템, 커플링디스플레이시스템, 부착디스플레이시스템 중 선택된 어느 하나일 수 있다.
- [445]
- [446] - 교차결합 디스플레이체
- [447] 교차결합 디스플레이체는 상기 디스플레이시스템의 양태에 따라 융합디스플레이시스템 구조체, 커플링디스플레이시스템 구조체, 부착디스플레이시스템 구조체 중 선택된 어느 하나일 수 있다.
- [448] - 교차결합
- [449] 교차결합은 상기 설명한 커플링결합 등 공지의 물리적 화학적 결합의 다양한 종류를 포함한다.
- [450] - 면역원성물질교차결합기
- [451] 면역원성물질교차결합기는 상기 교차결합을 하기 위한 1 종류 이상의 작용기를 포함할 수 있다.
- [452] 예를 들어, 면역원성물질교차결합기는 상기 교차결합을 하기 위한 2 종류의 작용기일 수 있다. 상이한 작용기에 대하여 각각 제1 면역원성물질교차결합기 및 제2 면역원성물질교차결합기로 이용할 수 있다.
- [453] 면역원성물질교차결합기는 절단효소에 대한 활성 부위를 포함할 수 있다. 이 때 상기 절단효소는 프로테아제일 수 있다.

- [454] - 중합체
- [455] 중합체는 교차결합그물구조를 형성하기 위해 중합 반응을 일으키는 물질을 말한다. 이 때 중합체는 중합 반응을 일으키기 위해 2개 이상의 교차결합기를 포함하는 것이 바람직하다.
- [456] 중합체는 목적하는 기능을 위해 필요한 어느 정도의 길이를 가질 수 있다. 교차결합면역원성물질들이 중합하기 위해서는 상기 중합체가 교차결합면역원성 물질들 사이를 연결할 수 있어야 한다. 중합체의 길이가 너무 짧으면 교차결합면역원성물질과 단일한 결합만을 형성할 수 있다. 따라서 상기 중합체는 목적하는 중합반응이 일어나도록 하기 위해 필요한 어느 정도의 길이 또는 크기를 가지는 것이 바람직하다.
- [457] 또한, 중합체는 절단효소에 대한 활성 부위를 포함할 수 있다. 이 때 상기 절단효소는 프로테아제일 수 있다.
- [458] - 중합체교차결합기
- [459] 중합체교차결합기는 상기 교차결합을 하기 위한 1 종류 이상의 작용기를 포함할 수 있다.
- [460] 예를 들어, 중합체교차결합기는 상기 교차결합을 하기 위한 2종류의 작용기를 포함한 것일 수 있다. 상이한 작용기에 대하여 각각 제1 교차결합기 및 제2 교차결합기로 이용할 수 있다.
- [461] 중합체교차결합기는 절단효소에 대한 활성 부위를 포함할 수 있다. 이 때 상기 절단효소는 프로테아제일 수 있다.
- [462] - 교차결합부
- [463] 교차결합부는 교차결합에 의해 생기는 작용기(functional group) 또는 이들의 존재하는 부위를 의미할 수 있다.
- [464] 교차결합부는 절단효소에 대한 활성을 갖는 것일 수 있다. 이 때 상기 절단효소는 프로테아제일 수 있다.
- [465] - 교차결합그물구조
- [466] 교차결합그물구조는 상기 교차결합들이 형성하는 그물구조를 의미한다. 도 15를 참고하면, 상기 그물구조는 교차결합면역원성물질을 점으로 하여 점들이 중합부로 이루어진 선으로 이어진 구조를 말한다. 이 때 그물구조는 필수적으로 교차결합면역원성물질과 중합부로 이루어진다. 이러한 그물구조는 크기를 조절하여 물질을 그 내부에 가두는 담지시스템으로 기능할 수도 있다. 이 때 그물구조는 그물눈이 일정 크기여서 그보다 큰 물질이 통과할 수 없는 것일 수 있다.
- [467] 상기 물질은 하기 제x단백질을 포괄한다.
- [468] 또한 상기 물질은 교차결합 디스플레이체일 수 있다.
- [469] - 중합부
- [470] 면역원성 교차결합 디스플레이시스템에서, 중합부는 일 교차결합면역원성물질과 다른 교차결합면역원성물질 사이를 중합하는 부분을

의미한다. 이 때 중합부는 필수적으로
면역원성물질교차결합기-교차결합부-중합체-교차결합부-면역원성물질교차결합기의 구조를 갖게 된다.

- [471] 또한 중합부는 목적하는 기능을 위해 필요한 어느 정도의 길이를 가질 수 있다. 교차결합면역원성물질들이 중합하기 위해서는 중합부가 교차결합면역원성 물질들 사이를 연결할 수 있어야 한다. 중합부의 길이가 너무 짧으면 교차결합면역원성물질과 단일한 결합만을 형성할 수 있다. 따라서 목적하는 중합반응이 일어날 수 있도록 중합부의 길이는 어느 정도의 길이 또는 크기를 가지는 것이 바람직하다. 이 때, 상기 면역원성물질교차결합기, 교차결합부, 중합체의 길이는 상기 중합부의 길이를 고려하여 각각 조절될 수 있다.
- [472] 중합부는 특정한 전하를 띄는 것일 수 있다.
- [473] 상기 특정한 전하는 교차결합디스플레이체의 전하와 인력을 일으킬 수 있다.
- [474] 상기 특정한 전하는 (양전하 아미노산(아르기닌/히스티딘/리신)의 수):(전체 아미노산의 수)에 의한 것일 수 있다. 상기 면역원성물질교차결합기, 교차결합부, 중합체의 전하는 상기 중합부가 특정한 전하를 띄도록 각각 조절될 수 있다.
- [475] 또한, 중합부는 절단효소에 대한 활성부위를 포함할 수 있다. 이 때 상기 절단효소는 프로테아제일 수 있다.

[476]

[477] **6) 면역원성 직렬연결시스템(immunogenic serial-connected system)**

- [478] 본 출원의 일 예는 면역원성 직렬연결시스템을 포함한 백신이다.
- [479] "직렬연결시스템"은 시스템의 일 구체예로서 도 16에서 보듯이 목적물질의 형태가 단백질들이 직렬로 연결된 형태를 가지는 시스템을 의미한다.
- [480] "직렬연결시스템 구조체(serial-connected system structure)"는 면역원성 직렬연결시스템에 사용된 시스템 구조체를 의미한다.
- [481] "면역원성 직렬연결체(immunogenic serial-connected body)"는 면역원성 직렬연결시스템의 면역원성물질로서, n개의 단백질들이 직렬로 연결된 형태를 가진다.
- [482] "면역원성 직렬연결시스템"은 면역원성 시스템의 일 구체예로서 면역원성물질의 형태가 단백질들이 직렬로 연결된 형태인 것을 특징으로 하는 것이다. 이 때 "직렬"은 물질들의 결합 관계로서 2이상의 물질들이 직렬적으로 이어진 것을 의미한다. 면역원성물질의 형태가 직렬인 경우 백신 내에서 면역원성물질의 농도가 높아져 면역유도효과가 증대될 수 있다. 이 때, 시스템 구조체는 "직렬연결시스템 구조체"로 표현할 수 있고, 면역원성물질은 "면역원성 직렬연결체"로 표현할 수 있다.
- [483] 기본적으로 면역원성 직렬연결시스템은 그 면역원성물질의 연결 구조에 특징이 있는 것이므로, 시스템의 양태는 제한이 없다. 예를 들어, 내부담지시스템, 융합디스플레이시스템, 커플링디스플레이시스템,

부착디스플레이시스템, 교차결합디스플레이시스템 중 선택한 어느 하나일 수 있다.

[484] - 직렬연결시스템 구조체

[485] 직렬연결시스템 구조체는 상기 시스템의 양태에 따라 내부담지시스템 구조체, 융합디스플레이시스템 구조체, 커플링디스플레이시스템 구조체, 부착디스플레이시스템 구조체, 교차결합디스플레이시스템 구조체 중 선택한 어느 하나일 수 있다.

[486] - 면역원성 직렬연결체

[487] "제 x 단백질(xth protein)"은 면역원성 직렬연결체 상의 x 번째 단백질을 의미한다.

[488] "제 y 연결부(yth connecting part)"는 면역원성 직렬연결체 상의 제 y 단백질과 제 $(y+1)$ 단백질을 연결하는 부위를 의미한다.

[489] 면역원성 직렬연결체는 다음의 두 가지 특징을 가진 물질을 말한다:

[490] 먼저, 그 형태가 n 개의 단백질들이 직렬로 연결된 형태이다. 즉

제1단백질-제1연결부-제2단백질-제2연결부...제 $(n-1)$ 단백질-제 $(n-1)$ 연결부-제 n 단백질의 구조를 형성하고 있다. n 개 단백질로 이루어진 직렬연결체는 $(n-1)$ 개의 연결부를 가진다.

[491] 또한, 상기 n 개의 단백질 중 적어도 하나의 면역원성물질을 포함하여야 한다. 예를 들어, 면역 반응을 일으키는 면역원성물질만으로도 이루어질 수 있고, 또는 면역원성물질 외에 면역 반응을 향상시키는 다른 보조 요소를 포함할 수도 있다.

[492] 면역원성 직렬연결체는 x 는 1 내지 n 인 제 x 단백질 및 이를 이어주는 y 는 1 내지 $(n-1)$ 인 제 y 연결부로 구성된다.

[493] - 제 x 단백질

[494] 제 x 단백질은 상기 면역원성물질일 수 있다.

[495] 제 x 단백질은 담지면역원성물질, 융합면역원성물질, 커플링면역원성물질, 부착면역원성물질, 교차결합면역원성물질 중 선택한 하나일 수 있다.

[496] 제 x 단백질은 병원체의 비항원부일 수 있다.

[497] 이 때 상기 비항원부는 병원체의 외막 단백질과 상동성이 있을 수 있다. 이 때 상기 면역원성 직렬연결체는 병원체 유사 입자(pathogen like particle)로 기능할 수 있다. 상기 병원체 유사 입자는 바이러스 유사 입자(virus like particle)일 수 있다.

[498] 또한, 상기 비항원부는 면역보조기능을 할 수 있다. 이 때 면역보조기능은 생체에서 면역 반응에 관계하는 사이토카인의 분비를 촉진 또는 면역 반응을 저해하는 사이토카인의 분비를 억제하는 것일 수 있다. 또한, 상기 면역보조기능은 면역세포의 막을 분해하는 것일 수 있다.

[499] 제 x 단백질은 병원체의 외래부일 수 있다.

[500] 상기 외래부는 타 병원체의 항원 단백질 상의 면역원성 부위일 수 있다.

[501] 상기 외래부는 타 병원체의 항원 단백질 상의 비면역원성 부위이거나

비항원부일 수 있다. 이 때 상기 항원 상동성 부가단백질은 타 병원체의 병원체 유사 입자로 기능할 수 있다. 상기 병원체 유사 입자는 바이러스 유사 입자일 수 있다.

- [502] 상기 외래부는 면역보조기능을 할 수 있다. 이 때 면역보조기능은 생체에서 면역 반응에 관계하는 사이토카인의 분비를 촉진 또는 면역 반응을 저해하는 사이토카인의 분비를 억제하는 것일 수 있다. 또한 면역보조기능은 항원인식세포의 인식을 돕는 것일 수 있다. 또한 면역보조기능은 면역세포의 막을 분해하는 것일 수 있다.
- [503] 제1단백질 내지 제 n 단백질 중 면역원성물질들은 병원체의 다수의 면역원성부위를 포함할 수 있다.
- [504] 제1단백질 내지 제 n 단백질은 모두 동일한 면역원성물질일 수 있고, 서로 상이한 면역원성물질일 수도 있다.
- [505] 제1단백질 내지 제 n 단백질 중 적어도 어느 하나는 면역원성물질이어야 한다.
- [506] - 제 y 연결부
- [507] 제 y 연결부는 제 y 단백질과 제 $(y+1)$ 단백질을 연결하는 부위를 의미한다. 이러한 제 y 연결부는 별도의 단백질/염기서열일 수 있으나 한 개의 화학적 결합을 형성하고 있는 부위에 불과할 수도 있다.
- [508] 제 y 연결부는 특별한 기능을 하지 아니할 수 있으나, 별도의 구조적 특징 또는 면역 형성 과정에서의 특정 기능을 가질 수도 있다.
- [509] 제 y 연결부는 상기 융합부를 포괄한다.
- [510] 제 y 연결부는 상기 커플링부를 포괄한다.
- [511] 제 y 연결부는 상기 중합부를 포괄한다.
- [512] 또한, 제1연결부 내지 제 $(n-1)$ 연결부는 모두 동일한 절단효소에 대한 활성을 가지거나, 서로 상이한 절단효소에 대한 활성을 가질 수 있다. 이 때 상기 절단효소는 프로테아제일 수 있다.
- [513]
- [514] **7) 면역원성 병렬연결시스템(immunogenic parallel system)**
- [515] 본 출원의 일 예는 면역원성 병렬연결시스템을 포함한 백신이다.
- [516] "병렬시스템"은 시스템의 일 구체예로서 도 17에서 보듯이 시스템 구조체가 n 개 단백질들을 병렬적으로 전달하는 것을 특징으로 하는 것이다.
- [517] "병렬시스템 구조체(parallel system structure)"는 면역원성 병렬시스템에 사용된 시스템 구조체를 의미한다.
- [518] "병렬체(parallel body)"는 병렬시스템 구조체가 전달하는 각각의 n 개의 단백질을 의미한다. 별도의 언급이 없으면 "병렬체"는 n 개의 병렬체 중 임의의 하나를 말한다.
- [519] "면역원성 병렬시스템"은 면역원성 시스템의 일 구체예로서 시스템 구조체가 n 개 단백질들을 병렬적으로 전달하는 것을 특징으로 하는 것이다. 이 때 "병렬"은 각 단백질들이 시스템 구조체에 의해 독립적으로 전달되는 것을

의미한다. 면역원성 병렬시스템은 한 개의 시스템이 여러 개의 기능을 할 수 있는 장점이 있다. 이 때 시스템 구조체는 "병렬시스템 구조체"로 표현할 수 있고, 병렬시스템 구조체가 전달하는 각각의 단백질은 "병렬체"로 표현할 수 있다.

[520] 기본적으로 병렬시스템에서는 n 개의 병렬체의 전달이 독립적이므로, 1개의 병렬시스템은 n 개의 다른 양태의 시스템이 합쳐진 것과 유사하다. 이 때 각 시스템의 양태는 상기 내부담지시스템, 융합디스플레이시스템, 커플링디스플레이시스템, 부착디스플레이시스템, 교차결합디스플레이시스템 중 어느 하나일 수 있다.

[521] - 병렬시스템 구조체

[522] 병렬연결시스템 구조체는 내부담지시스템 구조체, 융합디스플레이시스템 구조체, 커플링디스플레이시스템 구조체, 부착디스플레이시스템 구조체, 교차결합디스플레이시스템 구조체 중 선택한 어느 하나일 수 있다.

[523] - 병렬체

[524] 병렬체는 상기 면역원성물질일 수 있다.

[525] 병렬체는 담지면역원성물질, 융합면역원성물질, 커플링면역원성물질, 부착면역원성물질, 교차결합면역원성물질 중 선택한 하나일 수 있다.

[526] 병렬체는 병원체의 비항원부일 수 있다.

[527] 이 때 상기 비항원부는 병원체의 외막 단백질과 상동성이 있을 수 있다. 이 때 상기 면역원성 병렬시스템은 병원체 유사 입자(pathogen like particle)로 기능할 수 있다. 상기 병원체 유사 입자는 바이러스 유사 입자(virus like particle)일 수 있다.

[528] 또한 상기 비항원부는 면역보조기능을 할 수 있다. 이 때 면역보조기능은 생체에서 면역 반응에 관계하는 사이토카인의 분비를 촉진 또는 면역 반응을 저해하는 사이토카인의 분비를 억제하는 것일 수 있다. 또한, 상기 면역보조기능은 면역세포의 막을 분해하는 것일 수 있다.

[529] 병렬체는 병원체의 외래부일 수 있다.

[530] 상기 외래부는 타 병원체의 항원 단백질 상의 면역원성 부위일 수 있다.

[531] 상기 외래부는 타 병원체의 항원 단백질 상의 비면역원성 부위이거나 비항원부일 수 있다. 이 때 상기 항원 상동성 부가단백질은 타 병원체의 병원체 유사 입자로 기능할 수 있다. 상기 병원체 유사 입자는 바이러스 유사 입자일 수 있다.

[532] 상기 외래부는 면역보조기능을 할 수 있다. 이 때 면역보조기능은 생체에서 면역 반응에 관계하는 사이토카인의 분비를 촉진 또는 면역 반응을 저해하는 사이토카인의 분비를 억제하는 것일 수 있다. 또한 면역보조기능은 항원인식세포의 인식을 돕는 것일 수 있다. 또한 면역보조기능은 면역세포의 막을 분해하는 것일 수 있다.

[533] 또한 n 개의 병렬체 중 적어도 어느 하나는 상기 면역원성물질이어야 한다. 예를

들어, 면역 반응을 일으키는 면역원성물질만으로도 이루어질 수 있고, 또는 면역원성물질 외에 면역 반응을 향상시키는 다른 보조 요소를 포함할 수도 있다.

[534]

[535] [면역원성 포자시스템]

[536] 8) 면역원성 포자시스템

[537] 본 출원의 일 예는 면역원성 포자시스템을 포함한 백신이다.

[538] "포자시스템(spore system)"은 시스템의 일 구체예로서 시스템 구조체가 포자이거나 포자유사입자인 것을 의미한다.

[539] "포자시스템 구조체(spore system structure)"는 포자시스템의 시스템 구조체로서 포자이거나 포자유사입자를 의미한다.

[540] "면역원성 포자시스템(immunogenic spore system)"은 면역원성시스템의 일 구체예로서 시스템 구조체가 포자인 것을 의미한다.

[541] 면역원성 포자시스템은 면역원성물질과, 면역원성물질을 생체에서 전달하는 포자시스템 구조체를 필수적인 구성으로 한다. 이 때 면역원성물질의 구조와 특징은 위에서 언급한 바와 같다. 이 때 면역원성물질과 포자시스템 구조체는 생체 내에서 일정 거리 내로 위치하면서 하나의 시스템으로서 전달된다. 포자시스템 구조체는 다른 세포, 바이러스 형태의 시스템 구조체보다 물리/화학적 안정성이 높고 병독성이 약하며 농축이 용이한 장점이 있다.

[542] 상기 면역원성 포자시스템의 포자시스템 구조체에 면역원성물질 외에도 면역보조물질 등 백신의 기능에 도움을 주는 요소를 포함, 부착할 수 있다.

[543]

[544] 포자시스템 구조체

[545] 포자시스템을 구성하는 포자시스템 구조체는 포자 또는 포자유사입자일 수 있다.

[546] 포자시스템 구조체는 면역원성물질을 일정 거리 내로 위치하면서 생체 내로 전달하는 기능을 한다. 포자시스템 구조체는 동물 체내에 투여될 수 있는 크기를 가지를 가지는 것이 바람직하고, 예를 들어 그 직경이 약 $0.02\mu\text{m}$ 내지 $5\mu\text{m}$ 정도의 크기 정도로, 일반적인 미생물 정도의 크기일 수 있다.

[547] 자연계에서 포자는 일반적으로 혹독한 물리적/화학적 환경에서 생존할 수 있을 것을 요구 받는다. 이 때문에 대부분의 포자는 고온, pH의 변화, 외부 삼투압의 변화, 외부 충격 등에 강한 특성을 가지고 있다. 이러한 포자의 특성은 면역원성 포자시스템에 다른 세포, 바이러스 형태의 시스템 구조체보다도 극한 조건에서 면역을 일으킬 수 있는 장점을 부여한다. 또한 다른 시스템 구조체와 같이 미생물과 유사한 외형으로 인해 면역을 일으키는 효과가 뛰어나고, 또한 포자가 병원체인 경우 면역원성물질과 함께 다가 백신으로 작용할 수 있는 장점이 있다.

[548]

[549] 포자시스템은 하기 설명하는 형태에 한정되지 않는다.

- [550]
- [551] - 포자(spore)
- [552] "포자"는 자연 상태에서 발견할 수 있는 포자 및 그 변형물을 포함한다.
- [553] 상기 포자는 식물의 포자일 수 있다.
- [554] 상기 포자는 효모의 포자일 수 있다.
- [555] 상기 포자는 진균의 포자일 수 있다.
- [556] 상기 포자는 포자성 박테리아의 포자일 수 있다. "포자성 박테리아"는 평상 시에는 박테리아의 형태로 성장하다가 생존이 어려운 조건이 생기면 일시적으로 포자화하여 생존성을 높이는 박테리아를 말한다.
- [557] 이 때 상기 포자성 박테리아는 *Clostridium*일 수 있다. 예를 들어, 상기 *Clostridium*는 *C. difficile*일 수 있다.
- [558] 이 때, 상기 포자성 박테리아는 *sporolactobacillus*일 수 있다.
- [559] 이 때, 상기 포자성 박테리아는 *Bacillus*일 수 있다. 상기 *Bacillus*는 예를 들어, *B. subtilis*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, 또는 *B. cereus*일 수 있다.
- [560] 상기 포자는 일부 부위가 변형 또는 조작된 것일 수 있다.
- [561] 상기 포자는 전체적인 구조가 변형 또는 조작된 것일 수 있다.
- [562] 본 출원의 바람직한 구체예로서, 포자성 박테리아의 포자는, 특히 *B. subtilis*의 포자이다.
- [563]
- [564] - 포자유사입자(spore like particle)
- [565] "포자유사입자(spore like particle)"는 인공적으로 만들어진 입자로서 포자와 구조가 비슷한 것을 의미한다. 예를 들어, 상기 포자유사입자는 입자의 구조를 형성하는 "포자유사입자 핵" 및 포자의 외막과 유사한 "포자유사막"으로 구성되어 있을 수 있다.
- [566] 상기 포자유사입자핵은 속이 비어있는 구 형태의 구조일 수 있다.
- [567] 포자유사입자핵은 다공성 구조일 수 있다.
- [568] 포자유사입자핵은 속이 차있는 강체 구조일 수 있다.
- [569] 포자유사입자핵은 유기물질로 구성될 수 있다.
- [570] 포자유사입자핵은 무기물질로 구성될 수 있다. 이 때 상기 무기물질은 예를 들어, 실리카(Si)일 수 있다.
- [571] 포자유사입자핵은 유기물질과 무기물질이 혼합되어 구성될 수 있다.
- [572] 포자유사입자핵은 직경이 자연에 존재하는 미생물의 포자와 유사할 수 있다. 예를 들어, 상기 직경은 1 ~ 50 μm 일 수 있다.
- [573] 상기 포자유사막은 인지질막일 수 있다.
- [574] 포자유사입자는 포자 외막 단백질로만 구성된 것일 수 있다.
- [575]
- [576] **8-1) 면역원성 포자내부담지시스템(immunogenic spore carrying system)**
- [577] 본 출원의 일 예는 면역원성 포자내부담지시스템을 포함한 백신이다.

[578] "포자내부담지시스템(spore carrying system)"은 포자시스템의 일 구체예로서 목적물질이 포자시스템 구조체 내에 담지된 것을 의미한다.

[579] "포자담지체(carrying spore structure)"는 포자시스템 구조체로서 포자담지면역원성물질을 내부에 담지하여 전달하는 구조체를 의미한다.

[580] "면역원성 포자내부담지시스템"은 면역원성 포자시스템의 일 구체예로서 면역원성물질이 포자시스템 구조체 내에 담지된 것을 의미한다. 이 때 포자시스템 구조체는 "포자담지체"로 표현할 수 있고, 면역원성물질은 "포자담지면역원성물질"로 표현할 수 있다.

[581]

[582] - 포자담지체(carrying spore structure)

[583] 포자담지체는 면역원성 포자시스템의 포자시스템 구조체를 포괄한다.

[584] 포자담지체는 앞서 설명한 담지체를 포괄한다.

[585] - 포자담지면역원성물질(spore carried immunogen)

[586] 상기 포자담지면역원성물질은 앞서 설명한 면역원성물질을 포괄한다.

[587] 상기 포자담지면역원성물질은 특정 크기 이하일 수 있다. 바람직하게는 면역반응을 일으킬 수 있는 유효량의 면역원성 물질을 포함할 수 있는 크기 이상일 수 있다.

[588] 상기 포자담지면역원성물질은 전하를 띠고 있을 수 있다. 이 때 포자담지면역원성물질의 전하는 포자담지체 내부의 전하와 반대일 수 있다. 예를 들어, 포자담지면역원성물질의 전하는 음전하일 수 있다.

[589] 상기 포자담지면역원성물질은 포자를 비활성화하는 부분을 포함할 수 있다.

[590] 상기 포자담지면역원성물질은 포자 내부에 존재하는 단백질과 상동성이 있을 수 있다. 이 때 상동성이 있는 부분은 그 단백질의 신호서열 부분일 수 있다. 또한 포자 내부 단백질은 포자분화과정에서 SpoI 단계에 생성되는 단백질일 수 있다. 바람직하게는 포자담지면역원성물질은 단백질의 신호서열에 의해 포자 내부로 인도되어 담지될 수 있다.

[591]

[592] **8-2) 면역원성 포자융합디스플레이시스템(immunogenic spore fused display system)**

[593] 본 출원의 일 예는 면역원성 포자융합디스플레이시스템을 포함한 백신이다.

[594] "포자디스플레이시스템(spore display system)"은 포자시스템의 일 구체예로서 목적물질을 포자시스템 구조체 외부에 개시하는 것을 말한다.

[595] "면역원성 포자디스플레이시스템(immunogenic spore display system)"은 면역원성 포자시스템의 일 구체예로서 면역원성물질을 포자시스템 구조체 외부에 개시하는 것을 말한다.

[596] "포자융합디스플레이시스템(spore fused display system)"은 시스템의 일 구체예로서 목적물질을 포자시스템 구조체 외부에 개시하는 포자표면개시체와 목적물질이 융합된 것을 말한다.

- [597] "포자융합디스플레이체(spore fusion displaying structure)"는 포자시스템 구조체로서 포자융합면역원성물질을 외부에 융합하여 전달하는 구조체를 의미한다.
- [598] "포자표면개시체(spore surface displaying substructure)"는 목적물질과 융합하여 디스플레이체 외부에 개시하는 융합디스플레이시스템의 하위 구조체를 의미한다.
- [599] "포자융합체(spore fused body)"는 포자표면개시체와 면역원성물질이 융합한 일체를 의미한다.
- [600] "포자융합부(spore fusing part)"는 포자융합체에서 포자표면개시체와 면역원성물질이 융합된 부위를 의미한다.
- [601] "면역원성 융합디스플레이시스템"은 면역원성 포자시스템의 일 구체예로서 목적물질과 융합하여 포자시스템 구조체 외부에 개시하는 포자표면개시체와 면역원성물질이 융합된 것을 의미한다. 이 때 "융합"은 물질의 결합 관계로서 두 물질이 직접적으로 이어진 것을 의미한다. 이 때 포자시스템 구조체는 "포자융합디스플레이체"로 정의한다. 이 때 면역원성물질은 "포자융합면역원성물질(spore fused immunogen)"로 정의한다.
- [602]
- [603] - 포자융합디스플레이체
- [604] 포자융합디스플레이체는 면역원성 포자시스템의 포자시스템 구조체를 포괄한다..
- [605] 포자융합디스플레이체는 외부에 전하를 띄고 있을 수 있다. 이 때 포자융합디스플레이체 외부의 전하는 포자표면개시체의 전하와 인력을 일으킬 수 있다. 또한 포자융합디스플레이체 외부의 전하는 포자융합체의 전하와 인력을 일으킬 수 있다.
- [606] 포자융합디스플레이체 외부의 전하는 야생 상태의 포자보다 강한 음전하를 띌 수 있다.
- [607] 포자융합디스플레이체는 외부에 전하를 띄지 않을 수 있다.
- [608] 포자융합디스플레이체는 외막이 다공성일 수 있다. 이 때 외막의 구멍은 포자표면개시체와 크기가 유사할 수 있다.
- [609]
- [610] - 포자표면개시체
- [611] "포자외부영역(spore outer domain)"는 포자의 이중인지질막과 포자의 최외각 사이의 공간을 의미한다.
- [612] "포자외부단백질(spore outer protein)"은 자연 상태에서 포자외부영역에 존재하는 포자의 단백질을 말한다. 예를 들어, 포자외부단백질은 포자 외막에 발현되는 단백질일 수 있다.
- [613] 포자표면개시체는 포자융합디스플레이시스템의 하위 구조로서 그 크기가 포자융합디스플레이체보다 작은 것이 바람직하다. 바람직하게는 그 크기가

포자융합디스플레이체의 크기에 상응하는 포자외부단백질의 크기와 같은 것이 좋다.

- [614] 이 때 포자표면개시체는 포자융합디스플레이체가 포자인 경우 포자의 야생 상태 단백질일 수 있다.
- [615] 포자표면개시체는 특정 제한효소의 작용 부위를 포함할 수 있다. 이 때 특정 제한 효소는 예를 들어, 시그널 펩티다아제(signal peptidase)일 수 있다.
- [616] 포자표면개시체는 전하를 띄고 있을 수 있다. 이 때 포자표면개시체의 전하는 포자융합디스플레이체 외부의 전하와 인력을 일으킬 수 있다.
- [617] 포자표면개시체는 동일한 서열이 반복된 구조를 포함할 수 있다. 이 때 상기 반복된 구조는 야생 상태 단백질의 구조와 상동성이 있을 수 있다. 또한 상기 반복된 구조는 전하를 띄고 있을 수 있다. 이 때 반복된 구조의 전하는 포자융합디스플레이체 외부의 전하와 인력을 일으킬 수 있다.
- [618]
- [619] - 포자외부단백질
- [620] 상기 포자표면개시체는 포자외부단백질일 수 있다. 일반적으로 동일한 속의 미생물들의 포자 간에는 서로의 포자외부단백질을 사용할 수 있다.
- [621] 일 구체예로서, 포자융합디스플레이체가 *Bacillus* 속의 포자인 경우, 포자외부단백질은 spore exosporium protein, spore coat protein, transmembrane protein, spore appendage protein, spore associated enzyme 중 어느 하나일 수 있다.
- [622] 상기 spore exosporium protein은 예를 들어, BclA, InhA 등일 수 있다.
- [623] 상기 spore coat protein은 예를 들어, CotC, CotD, CotB, CotE, CotF, CotG, CotN, CotS, CotT, CotV, CotW, CotX, CotY, CotZ, CotH, CotJA, CotJC, CotK, CotL, CotM 등일 수 있다.
- [624] 예를 상기 CotB, CotC, CotE 및 CotG는 자연 상태의 포자외부단백질에서 발현량이 많고 비율이 높은 단백질일 수 있다.
- [625] 상기 transmembrane protein은 예를 들어, prkC, OppA 등일 수 있다.
- [626] 상기 spore appendage protein은 예를 들어, P29a, P29b, P85 등일 수 있다.
- [627] 상기 spore associated enzyme은 예를 들어, CotA(laccase), oxD(oxalate decarboxylase), CotQ(reticuline oxidase-like protein), tgl(transglutaminase)등일 수 있다.
- [628] 포자표면개시체는 야생 상태인 포자외부단백질이 변형 또는 조작된 것일 수 있다.
- [629]
- [630] - 포자외부상동성단백질
- [631] "포자외부상동성단백질(spore outer homologous protein)"은 특정 포자외부단백질의 구조와 상동성이 있는 단백질을 의미한다. 야생 상태의 단백질과 85%~100%의 상동성을 가질 수 있다. 바람직하게는 상기 상동성은 90~100%, 더욱 바람직하게는 95~100%이다.

- [632] "신호서열(signal sequence)"은 단백질의 합성 과정에서 단백질을 세포의 특정 위치로 인도하는 기능을 하는 단백질 서열을 의미한다.
- [633] "포자외부신호서열(spore outer signal sequence)"은 포자의 단백질에 있는 신호서열로서 단백질을 포자외부영역으로 인도하는 기능을 하는 단백질 서열을 의미한다.
- [634] "포자외부위치화모티프(outer localization motif)"는 포자외부단백질을 포자외부영역에 위치하도록 하는 모티프를 의미한다.
- [635] 상기 포자표면개시체는 포자외부상동성단백질일 수 있다.
- [636] 포자외부단백질은 20개 내외 아미노산 서열로 이루어진 포자외부신호서열을 포함할 수 있다. 포자외부상동성단백질이 포함하는 포자외부신호서열은 신호서열제한효소의 작용 부위가 제거된 것일 수 있다.
- [637] 특히 포자외부단백질의 경우, 포자를 포자외부영역에 위치하도록 하는 포자외부위치화모티프를 포함할 수 있다. 이 때 포자외부위치화모티프는 포자외부단백질의 N 말단에 위치할 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 이러한 부위들에서 상동성이 있는 단백질은 포자외부영역에 발현될 수 있다.
- [638] 포자외부상동성단백질의 아미노산 서열 수는 면역원성물질로서 기능할 수 있는 단백질을 포자외부영역에 발현시키기에 충분하다면, 특별히 제한이 없다. 예를 들어, 50aa, 100aa, 150aa일 수 있다.
- [639] 포자외부상동성단백질은 포자외부위치화모티프를 포함할 수 있다.
- [640] 포자외부상동성단백질은 포자외부신호서열 및 포자외부위치화모티프를 모두 포함할 수 있다. 이 때 포자외부신호서열은 신호서열제한효소의 작용 부위가 제거된 것일 수 있다.
- [641] 또한 포자외부상동성단백질은 동일한 서열이 반복된 구조를 포함할 수 있다. 이 때 상기 반복된 구조는 포자외부단백질의 전장 서열일 수 있다. 또한 상기 반복된 구조는 포자외부위치화모티프일 수 있다.
- [642] 또한 포자외부단백질의 반복구조는 양전하를 띌 수 있다.
- [643] 예를 들어 포자외부단백질이 CotB인 경우, 반복 구조는 양전하를 띌 수 있다.
- [644] 예를 들어 포자외부단백질이 CotC인 경우, 반복 구조는 양전하를 띌 수 있다.
- [645] 예를 들어 포자외부단백질이 CotG인 경우, 반복 구조는 양전하를 띌 수 있다.
- [646]
- [647] - 포자외부상동성 포함 부가단백질(spore outer homologous protein-contained additive body)
- [648] "포자외부상동성 포함 부가단백질(pore outer homologous protein-contained additive body)" 또는 "포자외부상동성 부가단백질"은 포자외부단백질의 구조와 일부 상동성을 가지는 동시에 포자외부단백질의 구조와 상동성이 없는 부위를 함께 포함하는 단백질을 의미한다. 즉, 포자외부상동성 포함 부가단백질은 포자외부상동성 단백질에 부가적으로 상기 포자외부단백질과 상동성이 없는 부위가 포함되어 있는 형태를 말한다.

- [649] "포자외래부(spore foreign body)"는 야생 상태의 포자 내에 존재하지 않는 단백질 또는 염기 서열을 말한다.
- [650] "이종 포자(spore of another species)"는 동일한 속의 이종 미생물 포자를 의미한다. "이종포자외부단백질(spore outer protein of another species)"는 이종 포자의 포자외부단백질을 의미한다.
- [651] 포자표면개시체는 포자외부상동성 포함 부가단백질일 수 있다.
- [652] 일 구체예에서, 포자외부상동성 포함 부가단백질은 특정 포자외부단백질 외에 동일한 포자의 다른 포자외부단백질과도 상동성이 있는 것일 수 있다.
- [653] 포자외부상동성부가단백질은 타 포자외부단백질의 포자외부신호서열을 포함할 수 있다. 이 때 포자외부신호서열은 신호서열제한효소의 작용 부위가 제거된 것일 수 있다. 또한 타 포자외부단백질과의 상동성 부위는 아미노산 서열 수가 예를 들어, 50aa, 100aa, 150aa일 수 있다.
- [654] 포자외부상동성부가단백질은 타 포자외부단백질의 포자외부위치화 모티프를 포함할 수 있다.
- [655] 포자외부상동성부가단백질은 타 포자외부단백질의 포자외부신호서열과 포자외부위치화 모티프를 모두 포함할 수 있다. 이 때 포자외부신호서열은 신호서열제한효소의 작용 부위가 제거된 것일 수 있다.
- [656] 포자외부상동성부가단백질은 같은 형태로 2개 이상의 타 포자외부단백질과 상동성이 있을 수 있다.
- [657] 다른 구체예에서 포자외부상동성부가단백질은 포자외부단백질과 상동성이 있는 부위와 포자외래부를 포함할 수 있다.
- [658] 상기 외래부는 이종포자외부단백질과 상동성이 있을 수 있다.
- [659] 포자외부상동성부가단백질은 이종포자외부단백질의 포자외부신호서열을 포함할 수 있다. 이 때 포자외부신호서열은 신호서열제한효소의 작용 부위가 제거된 것일 수 있다. 또한 이종포자외부단백질과의 상동성 부위는 아미노산 서열 수가 50aa, 100aa, 150aa일 수 있다.
- [660] 포자외부상동성부가단백질은 이종포자외부단백질의 포자외부위치화모티프를 포함할 수 있다. 이 때 이종포자외부단백질과의 상동성 부위는 아미노산 서열 수가 50aa, 100aa, 150aa일 수 있다.
- [661] 포자외부상동성부가단백질은 이종포자외부단백질의 포자외부신호서열과 포자외부위치화모티프를 모두 포함할 수 있다. 이 때 포자외부신호서열은 신호서열제한효소의 작용 부위가 제거된 것일 수 있다. 또한 이종포자외부단백질과의 상동성 부위는 아미노산 서열 수가 50aa, 100aa, 150aa일 수 있다.
- [662] 포자외부상동성부가단백질은 같은 형태로 2개 이상의 이종포자외부단백질과 상동성이 있을 수 있다.
- [663] 또 다른 구체예에서 상기 외래부는 특정 부호의 전하를 띌 수 있다. 일반적으로 포자외부영역은 음전하를 띠고 있다. 따라서 포자표면개시체는 양전하를 띠는

경우에 포자외부영역과의 정전기적 인력이 더해져 더욱 안정하게 위치할 수 있을 것이다. 따라서 상기 포자외부상동성부가단백질의 전하는 양전하인 것이 바람직하다.

[664] 이 때 특정 부호의 전하는 포자융합디스플레이체 외부의 전하와 반대 부호일 수 있다.

[665] 또한 상기 외래부의 전하는 양전하일 수 있다. 이 때 외래부는 (양전하 아미노산(아르기닌/히스티딘/리신)의 수):(전체 아미노산의 수)에 의해 양전하를 띌 수 있다.

[666] 또한 이러한 외래부의 전하로 인해 포자외부상동성부가단백질은 야생 상태의 포자외부단백질보다 더욱 강한 양전하를 띌 수 있다. 이 때 포자외부상동성부가단백질에서 (양전하 아미노산의 수):(전체 아미노산의 수)는 0.1~0.8 : 1일 수 있다. 이 때 상기 비율은 0.5 : 1, 0.6 : 1, 0.7 : 1일 수 있다.

[667]

[668] - 포자융합부(spore fusing part)

[669] 포자융합부는 포자표면개시체와 포자융합면역원성물질이 융합된 부위를 의미한다. 포자융합부는 별도의 단백질/염기서열일 수 있으나 한 개의 화학적 결합을 형성하고 있는 부위에 불과할 수도 있다.

[670] 포자융합부는 특별한 기능을 하지 아니할 수 있으나, 별도의 구조적 특징 또는 면역 형성 과정에서의 특정 기능을 가질 수도 있다.

[671] 포자융합부는 앞서 설명한 융합부를 포괄한다.

[672]

[673] - 포자융합면역원성물질(spore fused immunogen)

[674] 포자융합면역원성물질은 상기 언급한 융합면역원성물질을 포괄한다.

[675] 포자융합면역원성물질은 포자외부단백질과 특정 크기 비율을 갖는 것일 수 있다. 이 때 포자외부단백질과 포자융합면역원성물질의 크기 비율은 2:1 내지 1:2일 수 있다.

[676]

[677] - 포자융합체(spore fused body)

[678] 포자융합체는 특정한 전하를 띠는 것일 수 있다. 일반적으로 포자외부영역은 음전하를 띠고 있다. 따라서 포자융합체는 양전하를 띠는 경우

포자외부영역과의 정전기적 인력이 더해져 더욱 안정하게 위치할 수 있을 것이다. 따라서 상기 포자융합체의 전하는 양전하인 것이 바람직하다.

[679] 상기 특정한 전하는 포자융합디스플레이체 외부의 전하와 인력을 일으킬 수 있다.

[680] 포자융합체는 (양전하 아미노산(아르기닌/히스티딘/리신)의 수):(전체 아미노산의 수)에 의해 양전하를 띌 수 있다. 이 때 상기 (양전하 아미노산의 수):(전체 아미노산의 수)는 0.1~0.8 : 1일 수 있다. 이 때 상기 비율은 0.5 : 1, 0.6 : 1, 0.7 : 1일 수 있다.

[681]

[682]

[683] **8-3) 면역원성 포자커플링디스플레이시스템(immunogenic spore coupling display system)**

[684] 본 출원의 일 예는 면역원성 포자커플링디스플레이시스템을 포함한 백신이다.

[685] "포자커플링디스플레이시스템"은 포자시스템의 일 구체예로서 외부에 제1커플링기를 가진 포자시스템 구조체와 제2커플링기를 가진 목적물질이 커플링결합을 이루는 형태를 가진 시스템을 말한다.

[686] "포자커플링디스플레이체(spore coupling displaying structure)"는 포자시스템 구조체로서 포자커플링면역원성물질과 커플링결합하여 전달되는 구조체를 의미한다.

[687] "포자커플링결합(spore coupling bond)"은 포자디스플레이체커플링기와 포자면역원성물질커플링기의 상호작용에 의해 형성되는 화학적 결합을 의미한다.

[688] "커플링기(coupling group)"는 2개 이상의 동종 또는 이종 커플링기의 상호작용에 의해 커플링결합을 이루는 부위를 의미한다.

[689] "포자디스플레이체커플링기(spore coupling group on displaying structure)"는 커플링기로서 커플링디스플레이체에 위치한 것을 의미한다.

[690] "포자면역원성물질커플링기(spore coupling part on immunogen)"는 커플링기로서 커플링면역원성물질에 위치한 것을 의미한다.

[691] "포자커플링부(spore coupling part)"는 디스플레이체커플링기와 면역원성물질커플링기가 상호작용하여 형성된 커플링된 부위를 의미한다.

[692] "면역원성 포자커플링디스플레이시스템"은 면역원성 시스템의 일 구체예로서 외부에 제1커플링기를 가진 포자시스템 구조체와 제2커플링기를 가진 면역원성물질이 커플링결합을 이루는 것을 말한다. 이 때 시스템 구조체는 "포자커플링디스플레이체"로 정의한다. 이 때 면역원성물질은 "포자커플링면역원성물질(spore coupled immunogen)"로 정의한다. 이 때 제1커플링기는 "포자디스플레이체커플링기"로 정의한다. 이 때 제2커플링기는 "포자면역원성물질커플링기"로 정의한다.

[693]

[694] - 포자커플링디스플레이체

[695] 포자커플링디스플레이체는 면역원성 포자시스템의 포자시스템 구조체를 포괄한다.

[696] - 포자커플링결합

[697] 포자커플링결합은 상기 언급한 커플링결합을 포괄한다.

[698] - 포자디스플레이체커플링기

[699] 포자디스플레이체커플링기는 상기 언급한 디스플레이체커플링기를 포괄한다.

[700] - 포자면역원성물질커플링기

- [701] 포자면역원성물질커플링기는 상기 언급한 면역원성물질커플링기를 포괄한다.
- [702] - 포자커플링면역원성물질
- [703] 포자커플링면역원성물질은 상기 언급한 면역원성물질을 포괄한다.
- [704] 포자커플링면역원성물질은 포자외부단백질과 상동성이 있을 수 있다. 이 때 상동성이 있는 부위는 포자외부단백질의 포자외부신호서열일 수 있다. 바람직하게는 포자커플링면역원성물질은 포자외부신호서열에 의해 포자외부로 인도되어 더 높은 효율로 포자커플링결합을 일으킬 수 있다.
- [705] - 포자커플링부
- [706] 커플링부는 커플링디스플레이체와 커플링면역원성물질이 커플링결합된 부위로서 디스플레이체커플링기와 면역원성커플링기를 포함하는 부위를 의미한다. 이러한 커플링부는 별도의 단백질/염기서열일 수 있으나 한 개의 커플링결합에 의해 생기는 작용기에 불과할 수 있다. 또한 커플링부는 특별한 기능을 하지 아니할 수 있으나 별도의 구조적 특징 또는 면역 형성 과정에서의 특정 기능을 가질 수도 있다.
- [707] 포자커플링부는 상기 언급한 커플링부를 포괄한다.
- [708]
- [709] **8-4) 면역원성 포자부착디스플레이시스템(immunogenic spore attached display system)**
- [710] 본 출원의 일 예는 면역원성 포자부착디스플레이시스템을 포함한 백신이다.
- [711] "포자부착디스플레이시스템"은 포자시스템의 일 구체예로서 포자시스템 구조체 외부에 목적물질이 부착된 것을 의미한다.
- [712] "포자부착디스플레이체(spore attached displaying structure)"는 포자시스템 구조체로서 포자부착면역원성물질을 외부에 부착하여 전달하는 구조체를 의미한다.
- [713] "면역원성 포자부착디스플레이시스템"은 포자 면역원성시스템의 일 구체예로서 포자시스템 구조체 외부에 면역원성물질이 부착된 것을 의미한다. 이 때 "부착"은 물질의 결합 관계로서 두 물질이 간접적으로 이어진 것을 의미한다. 이 때 포자시스템 구조체는 "포자부착디스플레이체"로 정의한다. 이 때 면역원성물질은 "포자부착면역원성물질(spore attached immunogen)"로 정의한다.
- [714] 상기 부착은 정전기적 인력에 의한 것일 수 있다.
- [715] 상기 부착은 수소결합에 의한 것일 수 있다.
- [716] 상기 부착은 소수성 상호작용에 의한 것일 수 있다.
- [717]
- [718] - 포자부착디스플레이체(spore attached displaying structure)
- [719] 포자부착디스플레이체는 면역원성 포자시스템의 포자시스템 구조체를 포괄한다.
- [720] 포자부착디스플레이체는 상기 부착디스플레이체를 포괄한다.

- [721] - 포자부착면역원성물질(spore attached immunogen)
- [722] 포자부착면역원성물질은 상기 면역원성물질을 포괄한다.
- [723] 포자부착면역원성물질은 상기 부착면역원성물질을 포괄한다.
- [724] 포자부착면역원성물질은 포자외부단백질과 상동성이 있을 수 있다. 이 때 상동성이 있는 부위는 포자외부단백질의 포자외부신호서열일 수 있다. 바람직하게는 포자부착면역원성물질은 포자외부신호서열에 의해 포자 외부로 인도되어 더 높은 효율로 포자부착디스플레이체에 부착될 수 있다.
- [725]
- [726] **8-5) 기타 포자시스템**
- [727] 상기 포자시스템들 외에도 목적물질을 전달하는 다른 형태의 포자 시스템을 이용할 수 있다. 본 출원의 다른 예로서, 상기 언급하지 아니한 직렬연결시스템, 병렬시스템의 양태를 가질 수 있다.
- [728]
- [729] **[단백질의 유전적 제조방법]**
- [730] 단백질의 유전적 제조방법
- [731] 본 출원의 일 예는 상기 면역원성 시스템 구축을 위한, 유전적 제조합방법으로 제조된 면역원성물질 및 이의 다양한 이용이다.
- [732]
- [733] "목적염기서열(target nucleotide sequence)"은 제조합염기서열에 포함시키려하는 염기서열을 의미한다.
- [734] "제조합단백질(recombinant protein)"은 유전적 제조 방법에서 최종적으로 제조하고자 하는 단백질을 의미한다.
- [735] "제조합염기서열(recombinant nucleotide sequence)"은 제조합단백질을 암호화하는 염기서열을 의미한다.
- [736] "제조합 벡터(recombinant vector)"는 제조합염기서열을 생체로 전달하는 기능을 하는 전달체로서, 예를 들어 플라스미드, 에피솜 벡터, 바이러스 벡터 등을 포함한다.
- [737] "제조합 발현벡터(recombinant expression vector)"는 벡터의 일 구체예로서, 벡터에 연결된 제조합염기서열이 생체 내에서 목적 물질로 발현되는 기능까지 나타내는 벡터를 의미한다. 이러한 제조합 발현벡터를 이용하여 제조합단백질의 발현 및 생성 여부까지 확인할 수 있다. 이러한 발현 벡터는 예를 들어, 플라스미드의 형태일 수 있으나 이에 한정되지 않는다.
- [738] "배양숙주세포(incubating host cell)" 제조합단백질의 제조를 위해 제조합 발현벡터로 형질전환되어 배양되는 세포를 의미한다.
- [739] 제조합 단백질의 제조 방법은 유전적 제조합 방법을 통해 단백질을 수득하는 것을 포함한다. 이 때 생산하고자 하는 단백질은 목적하는 제조합 단백질로서, 상기 목적염기서열은 이러한 제조합단백질의 서열이 될 수 있다.
- [740] 단백질의 유전적 제조방법은 일 구체예로서, 목적염기서열을 수득하는

제1단계, 상기 목적염기서열을 포함한 재조합염기서열을 가지는 벡터 또는 폴리뉴클레오타이드를 제조하는 제2단계, 상기 재조합염기서열을 배양숙주세포에 형질전환하는 제3단계, 상기 형질전환된 배양숙주세포를 배양하는 제4단계, 상기 배양숙주세포로부터 재조합단백질을 수득하는 제5단계를 포함할 수 있다.

- [741] 이하 각 단계에 대하여 설명한다.
- [742] 제1단계는 목적염기서열을 수득하는 단계이다.
- [743] 이 때 야생 상태의 단백질의 염기서열은 ncbi의 genbank를 이용하거나 직접 단백질을 스크리닝하여 수득하는 등 공지된 방법을 이용할 수 있다.
- [744] 상기 목적염기서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드는 통상의 재조합 DNA 기술로 제조할 수 있다.
- [745] 예를 들어, 상기 폴리뉴클레오타이드는 PCR 클로닝을 통해 제조할 수 있다.
- [746] PCR 클로닝을 위해서 당업자는 적절한 프라이머 설계할 수 있고, 예를 들어, 프라이머는 본 출원에서 목적하는 면역원성물질의 염기서열의 5' 말단에 존재하는 약 20개 정도의 염기서열, 3' 말단에 존재하는 20개 정도의 염기서열의 올리고뉴클레오타이드일 수 있다.
- [747] 제2단계는 상기 목적염기서열을 포함한 재조합염기서열을 가지는 벡터 또는 폴리뉴클레오타이드를 제조하는 단계이다.
- [748] 상기 벡터 또는 폴리뉴클레오타이드는 목적염기서열을 포함한 단일 가닥 또는 이중 가닥 DNA이거나 RNA 형태일 수 있다. 이하에서는 이렇게 제조된 폴리뉴클레오타이드를 재조합벡터 또는 재조합폴리뉴클레오타이드로 혼용하여 사용한다.
- [749] 상기 재조합벡터 또는 재조합폴리뉴클레오타이드 제조 방법은 목적염기서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 리가아제를 통해 연결하는 것을 포함할 수 있다.
- [750] 상기 재조합벡터 또는 재조합폴리뉴클레오타이드는 재조합염기서열의 발현을 위해 필요한 프로모터를 포함할 수 있다. 상기 프로모터는 숙주세포 유래 또는 별도로 인위적으로 도입한 것일 수 있다.
- [751] 또한, 재조합염기서열을 포함한 폴리뉴클레오타이드는 목적염기서열을 삽입한 재조합발현벡터일 수 있다. 재조합발현벡터에 목적염기서열을 삽입하는 방법은 공지의 유전자 재조합 기술을 사용할 수 있다.
- [752] 제3단계는, 제2단계에서 제조한 재조합폴리뉴클레오타이드 또는 재조합발현벡터로 배양숙주세포를 형질전환하는 단계이다.
- [753] 상기 형질전환은 그 효과에 의해, 단기적으로 재조합염기서열의 발현이 일어나는 "일시적 형질전환" 또는 재조합발현벡터에 의해 배양숙주세포의 게놈에 삽입되는 "영구적 형질전환"으로 분류될 수 있다.
- [754] 또한 형질전환은 염기서열을 세포막 또는 핵막 안으로 삽입하는 방법에 의해 "반응물에 의한 형질전환", "도구에 의한 형질전환", "바이러스에 의한

형질전환"으로 분류될 수 있다.

- [755] "반응물에 의한 형질전환"은 양전하를 띠는 형질전환 반응물과 염기서열을 혼합하여 음전하를 띠는 막을 통과하게 하는 전환법을 의미한다. 이러한 형질전환 반응물로는 Calcium phosphate, DEAE-Dextran, cationic lipid, cationic polymer, activated dendrimer, magnetic bead 등이 있다.
- [756] "도구에 의한 형질전환"은 형질전환을 위해 개발된 실험기구를 사용하는 전환법을 의미한다. 이러한 형질전환 방법으로는 전기천공법(electroporation, EP), biolistic technology, microinjection, laserfection/optoinjection 등이 있다.
- [757] "바이러스에 의한 형질전환"은 숙주에 감염되어 염기서열을 삽입하는 바이러스의 성질을 이용한 전환법을 의미한다.
- [758] 본 출원의 바람직한 구체예에서, 상기 형질전환 방법은 전기천공법의 일종인 heat shock transfection법을 활용한다. Heat shock transfection은 미리 형질전환이 용이하도록 제조한 competent cell에 열과 전기충격을 가하여 형질전환을 하는 방법을 말한다. 이 때 배양숙주세포는 형질전환에 앞서 통상의 방법을 사용해 competent cell로 변환시키는 것이 적절하다.
- [759] 이 때, 배양숙주세포는 동물 세포 또는 미생물 세포일 수 있다. 동물 세포는 통상적으로 사용되는 Vero cell, CHO cell을 이용할 수 있고, 미생물 세포를 사용할 경우 e. coli를 이용할 수 있다.
- [760] 제4단계 및 제5단계는 상기 형질전환된 배양숙주세포를 배양한 후 재조합단백질을 분리하는 단계이다.
- [761] 배양단계는 공지의 배양 조건을 이용할 수 있다.
- [762] 단백질의 분리 단계는 통상의 유전자 재조합 방법에 따라, 세포용해, 원심분리, 겔 전기영동 등의 방법으로 이루어질 수 있다.
- [763] 본 출원의 실시예에 있어서, 달리 지시되지 않는 한, 당해 기술 분야 내의 분자 생물학, 미생물학, 재조합 DNA 기술, 단백질 화학 및 면역학의 통상의 기술을 사용할 수 있다. 이러한 기술은 문헌을 통해 설명된다. 예를 들면, 하기 문헌을 참조할 수 있다[참조: Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vols. I, II and III, Second Edition (1989); DNA Cloning, Vols. I and II (D. N. Glover ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed. 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Animal Cell Culture (R. K. Freshney ed. 1986); Immobilized Cells and Enzymes (IRL press, 1986); Perbal, B., A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); the series, Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Protein purification methods - a practical approach (E.L.V. Harris and S. Angal, eds., IRL Press at Oxford University Press); and Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell eds., 1986, Blackwell Scientific Publications)]
- [764]
- [765] 재조합발현백터

- [766] 본 출원의 일 예는 목적염기서열의 발현을 위한 재조합발현벡터를 포함한다.
- [767] "발현조절요소"는 재조합발현벡터의 구성요소로서 발현목적염기서열의 발현을 조절하는 염기서열을 의미한다.
- [768] "발현목적염기서열"은 재조합발현벡터의 구성요소로서 발현하고자 하는 재조합염기서열을 의미한다.
- [769]
- [770] 단백질의 유전적 제조방법의 일 구체예는 재조합발현벡터를 제조한 뒤 배양숙주세포를 형질전환하는 것이다.
- [771] 먼저 발현벡터는 플라스미드, 에피솜 벡터, 바이러스 벡터일 수 있다. 통상적으로 이용되는 발현벡터의 형태는 플라스미드이지만 이에 한정되지는 않는다. "플라스미드"는 닫힌 원형 이중 가닥 DNA 서열로서 재조합염기서열을 삽입할 수 있는 것을 의미한다.
- [772] 재조합발현벡터에 삽입되는 재조합염기서열은 구성요소로서 발현조절요소와 발현목적염기서열을 포함할 수 있다. 이 때 발현조절요소는 선택적인 구성이지만 포함되는 것이 바람직하다.
- [773] 이 때 발현조절요소는 발현목적염기서열의 전사를 개시하는 것 외에 발현을 조절하는 요소들을 의미한다. 발현조절요소는 프로모터, 인핸서, 사일런서, 인슐레이터 등을 포괄한다. "프로모터"는 염기서열 상에서 전사가 개시되는 서열을 의미한다. "인핸서"는 원거리조절요소로서 액티베이터가 결합하는 경우 염기서열의 전사를 촉진하는 서열을 의미한다. "사일런서"는 원거리조절요소로서 리프레서가 결합하는 경우 염기서열의 전사를 억제하는 서열을 의미한다. "인슐레이터"는 인핸서와 프로모터 간의 상호작용을 차단하는 서열을 의미한다.
- [774] 발현목적염기서열은 상기 재조합염기서열로서 재조합발현벡터에 삽입된 것을 말한다.
- [775] 재조합발현벡터에서 발현조절요소는 배양숙주세포 코돈 최적화된 것이 바람직하다.
- [776] 재조합발현벡터에서 발현목적염기서열은 상기 단백질의 유전적 제조방법의 제1단계 및 제2단계를 포함한 단계로 삽입될 수 있다.
- [777] 재조합발현벡터를 이용한 방법은 유전적 제작 방법의 일 구체예에 불과하다. 따라서 특별한 언급이 없는한 이하 유전적 제조 방법에는 재조합발현벡터를 사용한 방법이 포함됨이 자명하다.
- [778]
- [779] 면역원성물질의 제조 방법
- [780] 본 출원의 일 예는 면역원성물질을 제조하는 방법이다.
- [781] 생산된 면역원성물질은 그 자체로서 백신의 구성물이 될 수 있으며 혹은 면역원성시스템을 제조하는 데 사용될 수 있다. 또한 면역원성물질의 제조 방법은 면역원성시스템의 제조 과정에서 활용될 수 있다.

[782]

[783] 면역원성물질의 유전적 제조방법

[784] "면역원성목적염기서열(immunogenic target nucleotide sequence)"은 면역원성재조합염기서열에 포함시키려하는 염기서열을 의미한다.

[785] "면역원성재조합단백질(immunogenic recombinant protein)"은 유전적 제조 방법에서 최종적으로 제조하고자 하는 면역원성단백질을 의미한다.

[786] "면역원성재조합염기서열(immunogenic recombinant nucleotide sequence)"은 면역원성재조합단백질을 암호화하는 염기서열을 의미한다.

[787] "면역원성재조합 발현벡터(immunogenic recombinant expression vector)"는 벡터의 일 구체예로서, 벡터에 연결된 면역원성재조합염기서열이 생체 내에서 발현되는 기능까지 하는 것을 의미한다. 즉 면역원성재조합 발현벡터가 삽입되면 면역원성재조합단백질의 생성까지 확인할 수 있다. 이러한 발현 벡터는 대부분 플라스미드의 형태를 하고 있으나 이에 한정되지 않는다.

[788] "면역원성배양숙주세포(immunogen incubating host cell)" 면역원성재조합단백질의 제조를 위해 면역원성재조합발현벡터로 형질전환되는 세포를 의미한다.

[789] 면역원성물질의 제조 방법의 일 구체예로서 제조 방법은 유전적 제조방법을 통해 면역원성물질을 제조하는 것을 제공한다. 이 때 생산하고자 하는 단백질은 면역원성재조합단백질이며 면역원성목적염기서열은 면역원성 부위, 비면역원성 부위, 외래부 등이 될 수 있다.

[790] 면역원성물질의 유전적 제조방법은 일 구체예로, 면역원성목적염기서열을 획득하는 제1단계, 면역원성목적염기서열을 포함한 면역원성재조합염기서열을 갖는 벡터 또는 폴리뉴클레오타이드를 제조하는 제2단계, 면역원성재조합염기서열을 면역원성배양숙주세포에 형질전환하는 제3단계, 형질전환된 면역원성배양숙주세포를 배양하는 제4단계, 면역원성배양숙주세포로부터 면역원성재조합단백질을 추출하는 제5단계를 포함할 수 있다.

[791] 제1단계는 면역원성목적염기서열을 획득하는 단계이다.

[792] 야생 상태의 면역원성물질의 염기서열은 ncbi의 genbank를 이용하거나 직접 병원균을 스크리닝하여 획득할 수 있다.

[793] 면역원성목적염기서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드는 통상의 재조합 DNA 기술로 제조할 수 있다.

[794] 예를 들어, 상기 폴리뉴클레오타이드는 PCR 클로닝을 통해 제조할 수 있다.

[795] PCR 클로닝을 위해서 당업자는 적절한 프라이머 설계할 수 있고, 예를 들어, 프라이머는 본 출원에서 목적하는 면역원성물질의 염기서열의 5' 말단에 존재하는 약 20개 정도의 염기서열, 3' 말단에 존재하는 20개 정도의 염기서열의 올리고뉴클레오타이드일 수 있다.

[796] 제2단계는, 제1단계에서 획득한 면역원성목적염기서열을 포함한

면역원성제조합염기서열을 갖는 벡터 또는 폴리뉴클레오타이드를 제조하는 단계이다.

- [797] 상기 벡터 또는 폴리뉴클레오타이드는 면역원성목적염기서열을 포함한 단일 가닥 또는 이중 가닥 DNA이거나 RNA 형태일 수 있다. 이 때 폴리뉴클레오타이드의 제조 방법은 면역원성목적염기서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 리가아제를 통해 연결하는 것일 수 있다.
- [798] 이 때 면역원성제조합염기서열은 발현을 위해 필요한 프로모터를 포함할 수 있다. 상기 프로모터는 숙주세포 유래 또는 별도로 인위적으로 도입한 것일 수 있다.
- [799] 또한 면역원성제조합염기서열을 포함한 폴리뉴클레오타이드는 면역원성목적염기서열을 삽입한 면역원성제조합발현벡터일 수 있다. 면역원성제조합발현벡터에 면역원성목적염기서열을 삽입하는 방법은 통상의 유전자 제조합 기술을 사용할 수 있다.
- [800] 제3단계는, 제2단계에서 제조한 면역원성제조합폴리뉴클레오타이드 또는 면역원성제조합발현벡터로 면역원성배양숙주세포를 형질전환하는 단계이다.
- [801] 형질전환은 그 효과에 의해, "일시적 형질전환" 또는 "영구적 형질전환"으로 분류될 수 있다. 본 출원의 일 실시예에서는 일시적 형질전환을 사용하였다.
- [802] 또한 형질전환은 수단에 따라 "반응물에 의한 형질전환", "도구에 의한 형질전환", "바이러스에 의한 형질전환"으로 분류될 수 있다. 본 출원의 일 실시예에서는 heat shock transfection법을 사용하였다.
- [803] 면역원성배양숙주세포는 상기 배양숙주세포를 포괄한다.
- [804] 제4단계 및 제5단계는 상기 형질전환된 면역원성배양숙주세포를 배양한 후 면역원성제조합단백질을 분리하는 단계이다.
- [805] 배양단계는 공지의 배양 조건을 이용할 수 있다.
- [806] 면역원성제조합단백질의 분리 단계는 통상의 유전자 제조합 방법에 의해 세포용해, 원심분리, 겔 전기영동 등의 방법으로 이루어질 수 있다.
- [807]
- [808] 면역원성제조합발현벡터
- [809] "면역원성발현조절요소"는 면역원성제조합발현벡터의 구성요소로서 면역원성발현목적염기서열의 발현을 조절하는 염기서열을 의미한다.
- [810] "면역원성발현목적염기서열"은 면역원성제조합발현벡터의 구성요소로서 발현하고자 하는 제조합염기서열을 의미한다.
- [811] 면역원성물질의 유전적 제조방법의 일 구체에는 면역원성제조합발현벡터를 제조한 뒤 면역원성배양숙주세포를 형질전환하는 것이다.
- [812] 면역원성제조합발현벡터의 형태는 플라스미드일 수 있으나 이에 한정되지는 않는다.
- [813] 면역원성제조합발현벡터에 삽입되는 제조합염기서열은 구성요소로서 면역원성발현조절요소와 면역원성발현목적염기서열을 포함할 수 있다.

- [814] 면역원성발현조절요소는 상기 발현조절요소를 포괄한다.
- [815] 면역원성발현조절요소는 면역원성배양숙주세포 코돈 최적화된 것이 바람직하다.
- [816] 면역원성발현목적염기서열은 상기 면역원성재조합염기서열로서 면역원성재조합발현벡터에 삽입된 것을 말한다.
- [817] 면역원성발현목적염기서열은 상기 면역원성물질의 염기서열이다. 이 때, 면역원성발현목적염기서열은 상기 면역원성물질의 유전적 제조방법의 제1단계 및 제2단계를 포함한 단계로 삽입될 수 있다.
- [818] 면역원성물질 재조합발현벡터를 이용한 방법은 유전적 제조 방법의 일 구체예에 불과하다. 따라서 특별한 언급이 없는한 이하 병원체, 항원 단백질, 항원 상동성 단백질, 항원 상동성 부가 단백질의 유전적 제조 방법에는 면역원성물질 재조합발현벡터를 사용한 방법이 포함됨이 자명하다.
- [819]
- [820] **[병원체 및 항원의 제조 방법]**
- [821] **병원체의 제조 방법**
- [822] 본 출원의 일 예는 백신의 면역원성물질로서 병원체를 제조하는 방법이다.
- [823] - 야생 상태 병원체
- [824] 일 구체예로서 야생 상태의 병원체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [825] 일 실시 형태에서 제조 방법은 채집 및 배양 단계를 포함한다. 일반적으로 병원체는 질병을 앓고 있는 생체의 분비물, 배설물, 사체로부터 채집 가능하다. 이들을 배양용 배지 또는 동물 세포에 배양하면 다수의 병원체로 분화한다. 충분히 병원체가 다량으로 분화하면 백신의 조성물로 제조할 수 있다. 이 때, 일부 병원체들을 보관하여 배양하면 다량의 백신을 제공할 수 있다.
- [826] 다른 실시 형태에서 제조 방법은 야생 상태 병원체의 유전적 제조 방법일 수 있다. 이 때 유전적 제조 방법은 상기 면역원성물질의 유전적 제조 방법을 포괄한다. 이 때 면역원성목적염기서열은 야생 상태 병원체의 전장 서열 또는 이의 일부 서열이 될 수 있다.
- [827]
- [828] - 특정 부위가 결실/변형된 병원체
- [829] 다른 구체예로서 특정 부위가 결실, 변형 또는 조작된 상태의 병원체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [830] 일 실시 형태에서 제조 방법은 병원체를 구성하는 아미노산/펩타이드/염기 서열을 물리적으로 결실, 변형 또는 조작하는 방법일 수 있다. 이 때 물리적인 방법은 공지의 방법을 사용할 수 있다.
- [831] 다른 실시 형태에서 제조 방법은 병원체를 구성하는 아미노산/펩타이드/염기 서열을 화학적으로 결실, 변형 또는 조작하는 방법일 수 있다. 이 때 상기 결실, 변형 또는 조작 방법은 병원체를 특정 화학물질로 처리하여 특정 부위를 결실, 변형 또는 조작하는 것일 수 있다.

- [832] 또 다른 실시 형태에서, 야생 상태 병원체를 수득 또는 제조한 후 특정 부위에 대해 반응을 일으키는 화학물질, 예를 들어 특정 시약 또는 효소를 처리할 수 있다.
- [833] 이 때 화학적인 방법은 공지的方法을 사용할 수 있다.
- [834] 또 다른 실시 형태에서 상기 제조 방법은 결실, 변형 또는 조작된 병원체의 유전적 제조 방법일 수 있다.
- [835] 유전적 제조 방법은 상기 면역원성물질의 유전적 제조 방법을 포괄한다. 이 때 면역원성목적염기서열은 야생 상태 병원체의 전장 서열 또는 이의 일부 서열이 될 수 있다. 앞서 설명한 제1단계에서 PCR을 통한 돌연변이(Point mutation)를 수행하거나, 제2단계에서 면역원성제조합염기서열 또는 면역원성제조합발현벡터에 대하여 돌연변이 키트(mutation kit)를 이용하여 특이적인 결실, 변형 또는 조작을 일으킬 수 있다.
- [836]
- [837] - 전체적인 구조가 변형된 병원체
- [838] 다른 구체예로서 전체적인 구조가 변형된 병원체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [839] 일 예로 유전적으로 제조한 병원체를 변형하는 방법이 있다.
- [840] 일 실시 형태에서 제조 방법은 물리적인 변형 방법이다. 이 때 물리적인 방법은 공지的方法을 사용할 수 있다.
- [841] 일 실시 형태에서 제조 방법은 화학적인 변형 방법이다. 이 때 화학적인 방법은 공지的方法을 사용할 수 있다.
- [842] 예를 들어 바이러스가 높은 역가로 증식되면, 바이러스를 수득한 후 이들을 포르말린, 베타프로피오락톤 (BPL), 이성분 에틸렌이민 (BEI) 또는 감마선 등으로 처리하거나, 당업자에게 공지된 기타 방법에 의해 비활성화시킨다. 이어서 비활성화된 바이러스를 제약상 허용 가능한 캐리어 (예컨대 염수 용액) 및 임의의 보조제와 함께 혼합한다. 구체적인 예로서, 최종농도 0.1% 포르말린에서 불활화한 것일 수 있다.
- [843] 다른 예로 변형된 병원체를 유전적 변형 방법(유전적 제조합 방법)으로 제조하는 방법이 있다.
- [844] 유전적 변형 방법은 상기 면역원성물질의 유전적 제조 방법을 포괄한다.
- [845] 이 때, 면역원성목적염기서열은 야생 상태 병원체의 전장 서열 또는 이의 일부 서열이 될 수 있다. 앞서 설명한 제1단계에서 돌연변이 PCR을 수행하거나, 제2단계에서 면역원성제조합염기서열 또는 면역원성제조합발현벡터에 대하여 돌연변이 키트(mutation kit)를 이용하여 전체적으로 결실, 변형 또는 조작을 일으킬 수 있다.
- [846]
- [847] 항원 단백질의 제조 방법
- [848] 본 출원의 일 예는 백신의 면역원성물질로서 항원 단백질을 제조하는 방법이다. 이 때, 한 병원체의 2개 이상의 항원 단백질을 동시에 제조 또는

혼합할 수 있다.

[849] - 야생 상태 항원 단백질

[850] 일 구체예로서 야생 상태의 항원 단백질을 제조하는 방법을 제공한다.

[851] 일 실시 형태에서 제조 방법은 야생 상태의 병원체로부터 물리적인 방법으로 항원 단백질을 분리하는 방법일 수 있다.

[852] 이 때 물리적인 방법은 원심분리법일 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 상기 물리적인 방법은 공지된 방법을 이용할 수 있다.

[853] 다른 실시 형태에서 제조 방법은 야생 상태의 병원체로부터 화학적인 방법으로 항원 단백질을 분리하는 방법일 수 있다. 상기 화학적인 방법은 공지된 방법을 이용할 수 있다.

[854] 다른 실시 형태에서 제조 방법은 야생 상태 항원 단백질의 유전적 제조 방법일 수 있다. 통상적으로 이러한 방법으로 제조된 백신은 서브유닛(subunit) 백신으로 명명된다. 이 때 유전적 제조 방법은 상기 면역원성물질의 유전적 제조 방법을 포괄한다. 상기 목적염기서열은 야생 상태 항원 단백질의 전장 서열 또는 이의 일부 서열이 될 수 있다.

[855]

[856] - 특정 부위가 변형된 항원 단백질

[857] 일 구체예로서 특정 부위가 변형 또는 조작된 항원 단백질을 제조하는 방법을 제공한다.

[858] 일 실시 형태에서 제조 방법은 야생 상태의 항원 단백질을 물리적인 방법으로 변형하는 방법일 수 있다. 상기 물리적인 방법은 공지된 방법을 이용할 수 있다.

[859] 다른 실시 형태에서 제조 방법은 야생 상태의 항원 단백질을 화학적인 방법으로 변형하는 방법일 수 있다. 상기 화학적인 방법은 공지된 방법을 이용할 수 있다.

[860] 다른 실시 형태에서 제조 방법은 특정 부위가 변형 또는 조작된 항원 단백질의 유전적 제조 방법일 수 있다. 이 때 유전적 제조 방법은 상기 면역원성물질의 유전적 제조 방법을 포괄한다.

[861] 목적염기서열은 야생 상태 항원 단백질이 될 수 있다. 앞서 설명한 제1단계에서 돌연변이 PCR을 수행하거나, 제2단계에서 면역원성재조합염기서열 또는 면역원성재조합발현벡터에 대하여 돌연변이 키트(mutation kit)를 이용하여 특정 부위가 결실, 변형 또는 조작된 항원 단백질을 수득할 수 있다.

[862]

[863] 항원 상동성 단백질(antigen homologous protein)의 제조 방법

[864] 본 출원의 일 예는 백신의 면역원성물질로서 항원 상동성 단백질을 제조하는 방법이다.

[865]

[866] - 1개의 면역원성 부위를 포함하는 항원상동성단백질

[867] 일 구체예로서 면역원성부위를 포함한 항원 상동성 단백질을 제조하는 방법을

제공한다.

- [868] 일 실시 형태에서 면역원성부위를 포함한 부분은 제조된 항원 단백질을 제한하여 만들어지는 방법일 수 있다. 항원 단백질을 제한하는 방법은 원심분리와 같은 물리적인 방법, 프로테아제 등의 화학적 시약을 사용하는 화학적 방법을 포함한다.
- [869] 바람직한 실시 형태에서 항원상동성 단백질 제조 방법은 면역원성부위를 포함한 부분의 유전적 제조 방법일 수 있다. 상기 유전적 제조 방법은 앞서 설명한 면역원성물질의 유전적 제조 방법을 포괄한다. 면역원성제조합단백질은 1개 이상의 면역원성 부위를 포함한 항원 상동성 단백질이다. 면역원성목적염기서열은 면역원성 부위를 암호화하는 염기서열이 된다.
- [870] 제1단계는 상기 면역원성 부위를 수득하는 단계를 포괄한다. 항원 단백질의 면역원성 부위의 염기서열은 ncbi의 genbank를 이용하거나 직접 병원균을 스크리닝하여 알 수 있다.
- [871] 목적염기서열을 포함한 폴리뉴클레오타이드는 통상의 재조합 DNA 기술로 제조할 수 있다.
- [872] 예를 들어, 상기 폴리뉴클레오타이드는 PCR 클로닝을 통해 제조할 수 있다.
- [873] PCR 클로닝을 위해서 당업자는 적절한 프라이머 설계할 수 있고, 예를 들어, 프라이머는 본 출원에서 목적하는 면역원성 부위의 염기서열의 5' 말단에 존재하는 약 20개 정도의 염기서열, 3' 말단에 존재하는 20개 정도의 염기서열의 올리고뉴클레오타이드일 수 있다.
- [874]
- [875] 또한, 상기 면역원성목적염기서열의 프라이머는 다중정렬을 통해 설계할 수 있다.
- [876] "다중정렬"은 다수의 단백질서열 또는 염기서열 간에 서열 비교를 진행하는 것을 의미한다.
- [877] "공통영역"은 다수의 단백질서열 또는 염기서열 간에 공통되는 서열 부분을 의미한다.
- [878] 동일 질병의 복수의 균주들 간에 다중정렬을 수행하면 동일 질병 균주들의 항원단백질 간의 공통영역을 확인할 수 있다. 병원체의 변이주가 발생할 때마다 문제가 되는 이유는, 기존 백신주와 변이주의 항원단백질에 상동성이 없어 기존의 백신으로 생성된 항체가 기능하지 않기 때문이다. 특히, 항원단백질의 면역원성부위는 변이가 활발히 일어나는 영역인 경우가 많아 특히 문제된다.
- [879] 그러므로, 이러한 문제점을 해결하기 위해서, 본 출원자들은 기존 균주들과 변이주의 항원 단백질에 존재하는 공통영역을 찾고, 찾아낸 두 개의 공통영역 사이에 면역원성부위를 포함시키는 방법으로 항원을 제작하고자 하였다.
- [880] 이 때, 두 개의 공통영역을 프라이머로 설계한다. 이러한 목적염기서열의 5' 말단의 프라이머 서열과 3' 말단의 프라이머 서열을 이용하여 PCR를 수행함으로써, 면역원성목적염기서열을 수득한다. 그리고 이를 이용하여,

변이주가 발생할 때마다 새로운 프라이머를 설계할 필요 없이 면역원성부위를 포함하는 목적염기서열을 클로닝할 수 있다. 이렇게 다중정렬을 통해 설계되고 공통영역으로 구성된 프라이머는 "공통영역 프라이머"로 정의한다.

- [881] 다중정렬을 통한 공통영역프라이머는 하기 마스터백신 및 복합질병마스터백신의 제조에 큰 강점이 될 수 있다.
- [882] 기존 백신 기술에 의하면, 특히 병원체를 면역원성물질로 사용하는 백신 기술에 의하면 기존 백신주에 대한 면역효과가 미치지 않는 변이주가 발생하는 경우 신속하게 면역원성물질을 확보하는 데 문제가 있어왔다. 면역원성물질로 병원체를 사독화하거나 약독화하여 사용하는 경우, 발생한 변이주를 계대배양하여 다량의 병원체를 확보하기 위해서 장기간이 소요된다. 이 때, 병원체가 바이러스인 경우는 배양이 힘들어 더 장기간이 소요된다. 또한, 면역원성물질로 각 변이주의 항원단백질을 사용하는 경우에도, 변이주를 수득하는 단계, 변이주를 스크리닝하는 단계, 항원단백질 말단의 프라이머를 설계하고 제작하는 단계, 제조합항원단백질을 수득하는 단계 등 수많은 단계가 필요하다.
- [883] 그러나 다중정렬에 의한 공통영역프라이머는 상기 단계 중 변이주를 스크리닝하는 단계, 프라이머를 설계하고 제작하는 단계를 생략할 수 있어 변이주에 대한 더욱 신속한 대처가 가능하다. 이는 동종 또는 이종의 병원체 및 이들의 변이주에 대한 강력한 면역력 형성을 목적으로 하는 마스터백신 및 복합질병마스터백신의 목적에 매우 부합한다.
- [884] 일 예에서 다중정렬 대상이 되는 균주들은 한 국가에서 발견되는 1종 이상의 병원체의 균주들일 수 있다.
- [885] 다중정렬 대상이 되는 균주들은 한 국가에서 발생하는 병원체의 균주들로서 서로의 종류 또는 타입이 다른 것일 수 있다. 예를 들어 대상 질병이 PRRS인 경우 다중정렬 대상이 되는 균주들은 북미형과 유럽형을 포함할 수 있다.
- [886] 다른 예에서 다중정렬 대상이 되는 균주들은 한 국가에서 발견되는 균주 외에도 외국으로부터 유입된 야외주들을 포함할 수 있다.
- [887] 상기 외국은 인접한 국가일 수 있다.
- [888] 상기 외국은 특정한 지역의 국가일 수 있다. 예를 들어, 동아시아권, 동남아시아권, 북미권, 동유럽권이 될 수 있다.
- [889] 상기 외국은 한 국가로부터 특정한 거리 내에 위치한 국가일 수 있다.
- [890] 또한 상기 외국은 교류가 활발한 국가일 수 있다. 바람직하게는 가축과 관련된 교류가 활발한 국가일 수 있다. 또한 상기 외국은 한 국가를 지나는 철새들이 경유하는 국가일 수 있다.
- [891] 다른 예에서 다중정렬 대상이 되는 균주들은 특정 균주에 대한 전체적인 상동성에 따라 선정될 수 있다.
- [892] 상기 균주들은 특정 균주에 대한 전체적인 상동성이 특정 수치 이상인 것을 선정한 것일 수 있다.

- [893] 다중정렬 대상이 되는 군주들을 선정하는 단계는 특정 백신주에 대한 전체적인 상동성에 따라 군(class)을 나누는 단계, 군주들을 군에 따라 분류하는 단계, 각 군에 속하는 군주들이 특정 비율이 되도록 선정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [894] 이 때, 상기 군은 특정 군주에 대한 상동성 범위에 따라 나누어질 수 있다.
- [895] 그밖에 군주를 선정하는 방법은 당업자들에게 자명한 방법을 당연히 포함한다.
- [896] 본 출원의 다중정렬에 의한 공통영역프라이머는 이러한 다양한 군주 및 이들의 변이주에 대하여, 백신의 면역원성물질로서 항원 상동성 단백질을 효율적으로 제조할 수 있게 한다.
- [897] 상기 공통영역프라이머는 비면역원성부위에 해당할 수 있다. 변이주의 항원 단백질들 간의 공통영역은 대부분 비면역원성부위에 해당하기 때문이다. 이러한 공통영역프라이머를 사용하여 제조되는 항원 상동성 단백질은 필연적으로 면역원성 부위를 포함하면서 비면역원성 부위를 포함하게 된다. 이 때 비면역원성부위는 항원 상동성 단백질의 N 말단과 C 말단에 존재하며, 공통영역프라이머의 서열과 같다.
- [898] 한편, 제2단계에서, 제1단계에서 수득한 면역원성목적염기서열을 삽입하여 면역원성제조합폴리뉴클레오타이드 또는 면역원성제조합발현백터를 제조할 수 있다. 이 때, 필요에 따라 면역원성 부위는 임의의 갯수만큼 삽입될 수 있다. 일 실시예에서, 이렇게 만들어진 항원상동성단백질은 직렬연결체의 형태를 가질 수 있다.
- [899]
- [900] **- 1-면역원성 부위-1...에서 선택한 2개 이상을 포함하는 항원상동성단백질의 제조 방법**
- [901] 일 구체예로서 면역원성 부위-1부터 면역원성 부위-n 중 선택된 두 개 이상을 포함하는 항원상동성단백질을 제조하는 방법을 제공한다.
- [902] 항원 단백질의 서로 다른 면역원성 부위를 2개 이상 포함하는 항원 상동성 단백질은 유전적 제조 방법에 의해 제조될 수 있다. 이 때 유전적 제조 방법은 상기 면역원성물질의 유전적 제조 방법을 포괄한다.
- [903] 면역원성제조합단백질은 면역원성 부위-1부터 면역원성 부위-n 중 두 개 이상을 포함한 항원 상동성 단백질일 수 있다. 상기 면역원성목적염기서열은 각각의 면역원성 부위-x를 암호화하는 염기서열이 될 수 있다.
- [904] 제1단계는 상기 각각의 면역원성 부위를 수득하는 단계를 포괄한다. 항원 단백질의 면역원성 부위의 염기서열은 ncbi의 genbank를 이용하거나 직접 병원균을 스크리닝하여 알 수 있다.
- [905] 면역원성목적염기서열을 포함한 폴리뉴클레오타이드는 통상의 제조합 DNA 기술로 제조할 수 있다.
- [906] 예를 들어, 상기 폴리뉴클레오타이드는 PCR 클로닝을 통해 제조할 수 있다.
- [907] PCR 클로닝을 위해서 당업자는 적절한 프라이머 설계할 수 있고, 예를 들어, 프라이머는 각각의 면역원성 부위의 염기서열의 5' 말단에 존재하는 약 20개

정도의 염기서열, 3' 말단에 존재하는 20개 정도의 염기서열의 올리고뉴클레오타이드일 수 있다.

[908] 또한 번역원성목적염기서열의 프라이머는 상기 다중정렬을 이용해 설계될 수 있다. 번역원성목적염기서열의 프라이머는 각각의 번역원성 부위에 대한 공통영역프라이머일 수 있다.

[909] 공통영역프라이머는 비번역원성부위에 해당할 수 있다. 변이주의 항원 단백질들 간의 공통영역은 대부분 비번역원성부위에 해당하기 때문이다. 이러한 공통영역프라이머를 사용하여 제조되는 항원 상동성 단백질은 필연적으로 번역원성 부위-1부터 번역원성 부위-n 중 선택된 2개 이상 및 비번역원성 부위를 포함하게 된다. 이 때 비번역원성부위는 각각의 번역원성목적염기서열의 5' 말단과 3' 말단에 존재하며, 공통영역프라이머의 서열과 같다.

[910] 또한, 제2단계는 제1단계에서 수득한 번역원성목적염기서열을 삽입하여 번역원성제조합폴리뉴클레오타이드 또는 번역원성제조합발현백터를 제조하는 단계이다.

[911] 이 때 삽입되는 번역원성 부위의 순서는 야생 상태에서 번역원성 부위의 염기서열 배열 순서와 다를 수 있다. 또한 필요에 따라 번역원성 부위는 임의의 갯수만큼 삽입될 수 있다.

[912]

[913] - 1...번역원성부위에서 선택한 2개 이상을 포함하는 항원상동성단백질

[914] 일 구체예로서 1-번역원성 부위부터 m-번역원성 부위 중 선택된 두 개 이상을 포함하는 항원 상동성 단백질을 제조하는 방법을 제공한다.

[915] 서로 다른 항원 단백질의 번역원성 부위를 2개 이상 포함하는 항원 상동성 단백질은 유전적 제조 방법에 의해 제조될 수 있다.

[916] 유전적 제조 방법은 상기 번역원성물질의 유전적 제조 방법을 포괄한다. 이 때 번역원성제조합단백질은 1-번역원성 부위부터 m-번역원성 부위 중 두 개 이상을 포함한 항원 상동성 단백질일 수 있다. 상기 번역원성목적염기서열은 각각의 y-번역원성 부위를 암호화하는 염기서열이 된다.

[917] 제1단계는 상기 각각의 번역원성 부위를 수득하는 단계를 포괄한다. 항원 단백질의 번역원성 부위의 염기서열은 ncbi의 genbank를 이용하거나 직접 병원균을 스크리닝하여 알 수 있다.

[918] 또한 번역원성목적염기서열을 포함한 폴리뉴클레오타이드는 통상의 제조합 DNA 기술로 제조할 수 있다.

[919] 예를 들어, 상기 폴리뉴클레오타이드는 PCR 클로닝을 통해 제조할 수 있다.

[920] PCR 클로닝을 위해서 당업자는 적절한 프라이머 설계할 수 있고, 예를 들어, 프라이머는 각각의 번역원성 부위의 염기서열의 5' 말단에 존재하는 약 20개 정도의 염기서열, 3' 말단에 존재하는 20개 정도의 염기서열의 올리고뉴클레오타이드일 수 있다.

- [921] 또한 면역원성목적염기서열의 프라이머는 상기 다중정렬을 이용해 설계될 수 있다. 면역원성목적염기서열의 프라이머는 각각의 면역원성 부위에 대한 공통영역프라이머일 수 있다.
- [922] 공통영역프라이머는 비면역원성부위에 해당할 수 있다. 변이주의 항원 단백질들 간의 공통영역은 대부분 비면역원성부위에 해당하기 때문이다. 이러한 공통영역프라이머를 사용하여 제조되는 항원 상동성 단백질은 필연적으로 1-면역원성 부위부터 m-면역원성 부위 중 선택된 2개 이상 및 1-비면역원성 부위부터 m-비면역원성 부위 중 선택된 2개 이상을 포함하게 된다. 이 때 비면역원성부위는 각각의 목적염기서열의 5' 말단과 3' 말단에 존재하며, 공통영역프라이머의 서열과 같다.
- [923] 제2단계는 제1단계에서 수득한 면역원성목적염기서열을 삽입하여 면역원성제조합폴리뉴클레오타이드 또는 면역원성제조합발현백터를 제조하는 단계이다.
- [924] 이 때 삽입되는 면역원성 부위의 순서는 야생 상태에서 면역원성 부위의 염기서열 배열 순서와 다를 수 있다. 또한 필요에 따라 면역원성 부위는 임의의 갯수만큼 삽입될 수 있다.
- [925] 상기 제시된 유전적 제조방법으로 다수의 항원 단백질의 다수의 면역원성부위를 포함하는 항원상동성단백질 역시 제조할 수 있음은 자명하다.
- [926]
- [927] 항원상동성단백질제조합발현백터
- [928] 일 구체예로서 항원상동성단백질을 유전적 제조하기 위한 항원상동성단백질제조합발현백터를 제공한다.
- [929] 항원상동성단백질제조합발현백터는 상기 면역원성제조합발현백터를 포괄한다.
- [930] 상기 '항원상동성단백질의 제조 방법'에 따라 만들어지는 항원상동성단백질제조합발현백터를 제공할 수 있다.
- [931] 일 실시양태에서 면역원성발현목적염기서열은 면역원성부위의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [932] 제1구성으로서 면역원성발현조절요소는 프로모터일 수 있다.
- [933] 상기 프로모터는 야생 상태의 프로모터일 수 있다.
- [934] 상기 프로모터는 면역원성배양숙주세포 코돈 최적화된 것이 바람직하다.
- [935] 상기 프로모터는 면역원성배양숙주세포 유래의 야생 상태 프로모터일 수 있고, 별도로 인위적으로 도입한 프로모터일 수도 있다.
- [936] 상기 프로모터는 야생 상태의 프로모터를 일부 부위에서 변형한 것일 수 있다. 이 때 변형된 프로모터는 개시효율이 향상된 것일 수 있다.
- [937] 제2구성으로서 면역원성발현목적염기서열은 면역원성부위의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [938] 면역원성부위의 염기서열은 5', 3' 말단에 공통영역프라이머 서열에 해당하는

비면역원성부위를 포함할 수 있다.

[939] 면역원성발현목적염기서열은 1종 이상의 면역원성부위의 염기서열을 다중으로 포함할 수 있다.

[940] 전체적인 구성의 배열은 프로모터-면역원성부위인 것이 바람직하다. 도 18은 프로모터와 1-면역원성부위-1의 염기서열을 포함하는 항원상동성단백질재조합발현벡터의 예시이다.

[941]

[942] 다른 실시양태에서 면역원성발현목적염기서열은 면역원성 부위-1부터 면역원성 부위-n 중 선택된 두 개 이상의 염기서열을 포함할 수 있다.

[943] 제1구성으로서 면역원성발현조절요소는 프로모터일 수 있다.

[944] 프로모터는 상기 언급한 프로모터를 포괄한다. 이하 "상기 프로모터"는 첫 번째 실시 양태의 프로모터를 모두 포괄한다.

[945] 제2구성으로서 면역원성발현목적염기서열은 면역원성 부위-1부터 면역원성 부위-n 중 선택된 두 개 이상의 염기서열을 포함할 수 있다.

[946] 면역원성부위의 염기서열은 5', 3' 말단에 공통영역프라이머 서열에 해당하는 비면역원성부위를 포함할 수 있다.

[947] 면역원성발현목적염기서열은 1종 이상의 면역원성부위의 염기서열을 다중으로 포함할 수 있다.

[948] 전체적인 구성의 배열은 프로모터-(면역원성부위-x)z인 것이 바람직하다. z는 벡터에 포함된 면역원성부위의 갯수를 의미한다. 도 19는 프로모터와 1-면역원성부위-1 및 1-면역원성부위-2의 염기서열을 포함하는 항원상동성단백질재조합발현벡터의 예시이다.

[949] 이 때, 면역원성 부위의 배열 순서는 야생 상태 항원 단백질과 다를 수 있다.

[950]

[951] 다른 실시양태에서 면역원성발현목적염기서열은 1-면역원성부위부터 m-면역원성부위 중 선택된 두 개 이상의 염기서열을 포함할 수 있다.

[952] 제1구성으로서 면역원성발현조절요소는 프로모터일 수 있다.

[953] 이 때 프로모터는 상기프로모터를 포괄한다.

[954] 제2구성으로서 면역원성발현목적염기서열은 1-면역원성 부위부터 m-면역원성 부위 중 선택된 두 개 이상의 염기서열을 포함할 수 있다.

[955] 면역원성부위의 염기서열은 5', 3' 말단에 공통영역프라이머 서열에 해당하는 비면역원성부위를 포함할 수 있다.

[956] 면역원성발현목적염기서열은 1종 이상의 면역원성부위의 염기서열을 다중으로 포함할 수 있다.

[957] 전체적인 구성의 배열은 프로모터-(y-면역원성부위)z인 것이 바람직하다. z는 벡터에 포함된 면역원성부위의 갯수를 의미한다. 도 20은 프로모터와 1-면역원성부위-1 및 2-면역원성부위-2의 염기서열을 포함하는 항원상동성단백질재조합발현벡터의 예시이다.

- [958] 이 때 면역원성 부위의 배열 순서는 야생 상태 항원 단백질과 다를 수 있다.
- [959] 상기 제시된 구성으로부터, 면역원성발현목적염기서열이 다수의 항원 단백질의 다수의 면역원성부위를 포함하는 항원상동성단백질제조합발현벡터 역시 제작할 수 있음은 자명하다.
- [960]
- [961] 항원 상동성 부가단백질
- [962] 본 출원의 일 예는 백신의 면역원성물질로서 항원상동성부가단백질을 제조하는 방법이다.
- [963] 이하 항원상동성부가단백질의 유전적 제조방법을 설명할 때 사용하는 용어 "면역원성부위"는 상기 "항원상동성단백질의 제조방법"에서 언급된 면역원성부위만이 아닌 항원단백질을 포괄하는 광의의 개념이다. 이하 "면역원성부위"는 y-항원단백질 또는 y-면역원성부위-x를 의미한다.
- [964]
- [965] - 면역원성부위 및 비항원부(nonantigen part)를 포함하는 항원상동성부가단백질의 제조 방법
- [966] 일 구체예로서 면역원성부위 및 비항원부를 포함하는 항원상동성부가단백질을 제조하는 방법을 제공한다.
- [967] 면역원성부위 및 비항원부를 포함하는 항원상동성부가단백질은 유전적 제조 방법에 의해 제조될 수 있다. 이 때 유전적 제조 방법은 상기 면역원성물질의 유전적 제조 방법을 포괄한다. 면역원성제조합단백질은 면역원성부위 및 비항원부를 포함한 항원상동성부가단백질이다. 면역원성목적염기서열은 면역원성부위의 염기서열 및 비항원부의 염기서열을 포함한다.
- [968] 제1단계는 상기 면역원성목적염기서열을 수득하는 단계를 포괄한다.
- [969] 면역원성부위의 염기서열은 상기 항원단백질의 유전적 제조방법 및 항원상동성단백질의 유전적 제조방법의 제1단계를 포함하는 방법으로 수득할 수 있다.
- [970] 병원체의 비항원부의 염기서열은 ncbi의 genbank를 이용하거나 직접 병원체를 스크리닝하여 알 수 있다.
- [971] 또한 면역원성목적염기서열을 포함한 폴리뉴클레오타이드는 통상의 제조합 DNA 기술로 제조할 수 있다.
- [972] 예를 들어, 상기 폴리뉴클레오타이드는 PCR 클로닝을 통해 제조할 수 있다.
- [973] PCR 클로닝을 위해서 당업자는 적절한 프라이머 설계할 수 있고, 예를 들어, 프라이머는 본 출원에서 목적하는 면역원성물질의 염기서열의 5' 말단에 존재하는 약 20개 정도의 염기서열, 3' 말단에 존재하는 20개 정도의 염기서열의 올리고뉴클레오타이드일 수 있다.
- [974] 또한 면역원성목적염기서열의 프라이머는 상기 다중정렬을 이용해 설계될 수 있다. 면역원성목적염기서열의 프라이머는 각각의 면역원성목적염기서열에 대한 공통영역프라이머일 수 있다. 면역원성목적염기서열은 5' 말단과 3' 말단에

공통영역프라이머의 서열을 가질 수 있다.

- [975] 제2단계는 제1단계에서 수득한 면역원성목적염기서열을 삽입하여 면역원성재조합염기서열 또는 면역원성재조합발현백터를 제조하는 단계이다.
- [976] 이 때 삽입되는 면역원성부위의 순서는 야생 상태에서 면역원성부위의 염기서열 배열 순서와 다를 수 있다. 또한 필요에 따라 면역원성부위 또는 비항원부는 임의의 갯수만큼 삽입될 수 있다.
- [977] 일 실시 양태에서 상기 비항원부는 병원체의 외막 단백질의 일부일 수 있다.
- [978] 다른 실시 양태에서 상기 비항원부는 면역보조기능이 있는 단백질의 일부일 수 있다.
- [979]
- [980] - 면역원성부위 및 외래부(**foreign part**)를 포함하는 항원상동성부가단백질의 제조 방법
- [981] 일 구체예로서 면역원성부위 및 외래부를 포함하는 항원상동성부가단백질을 제조하는 방법을 제공한다.
- [982] 면역원성부위 및 외래부를 포함하는 항원상동성부가단백질은 유전적 제조 방법에 의해 제조될 수 있다. 이 때 유전적 제조 방법은 상기 면역원성물질의 유전적 제조 방법을 포괄한다. 면역원성재조합단백질은 면역원성부위 및 외래부를 포함한 항원상동성부가단백질이다. 면역원성목적염기서열은 면역원성부위의 염기서열, 외래부의 염기서열이 된다. 이 때 외래부는 타병원체의 단백질에서 유래한 것 또는 전혀 별개의 외래단백질에서 유래한 것으로 크게 분류할 수 있다. 이하 편의를 위해 타병원체의 단백질에서 유래한 외래부를 "타병원체외래부"로 정의하고, 별개의 외래단백질에서 유래한 외래부를 "협의의 외래부"로 정의한다.
- [983] 제1단계는 상기 면역원성목적염기서열을 수득하는 단계를 포괄한다.
- [984] 면역원성부위의 염기서열의 수득 방법은 상기 항원단백질의 유전적 제조방법 및 항원상동성단백질의 유전적 제조방법의 제1단계를 포괄한다.
- [985] 타병원체외래부염기서열은 ncbi의 genbank를 이용하거나 직접 타 병원체를 스크리닝하여 알 수 있다. 또한 협의의 외래부의 염기서열은 ncbi의 genbank를 이용하거나 직접 단백질을 분리 정제한 후 스크리닝하여 알 수 있다.
- [986] 면역원성목적염기서열을 포함한 폴리뉴클레오타이드는 통상의 재조합 DNA 기술로 제조할 수 있다.
- [987] 예를 들어, 상기 폴리뉴클레오타이드는 PCR 클로닝을 통해 제조할 수 있다.
- [988] PCR 클로닝을 위해서 당업자는 적절한 프라이머 설계할 수 있고, 예를 들어, 프라이머는 본 출원에서 목적하는 면역원성물질의 염기서열의 5' 말단에 존재하는 약 20개 정도의 염기서열, 3' 말단에 존재하는 20개 정도의 염기서열의 올리고뉴클레오타이드일 수 있다.
- [989] 또한 면역원성목적염기서열의 프라이머는 상기 다중정렬을 이용해 설계될 수 있다. 면역원성목적염기서열의 프라이머는 각각의 면역원성목적염기서열에

대한 공통영역프라이머일 수 있다. 이 때 면역원성목적염기서열은 5' 말단과 3' 말단에 공통영역프라이머의 서열을 가질 수 있다.

- [990] 제2단계는 제1단계에서 수득한 면역원성목적염기서열을 삽입하여 면역원성제조합폴리뉴클레오타이드 또는 면역원성제조합발현벡터를 제조하는 단계이다.
- [991] 이 때 삽입되는 면역원성부위의 순서는 야생 상태에서 면역원성부위의 염기서열 배열 순서와 다를 수 있다. 또한 필요에 따라 면역원성부위 또는 외래부는 임의의 갯수만큼 삽입될 수 있다.
- [992] 일 실시 양태에서 상기 외래부는 타병원체외래부일 수 있다.
- [993] 타병원체외래부는 타병원체의 항원단백질 상의 면역원성부위일 수 있다.
- [994] 타병원체외래부는 타병원체의 비면역원성부위 또는 비항원부일 수 있다.
- [995] 다른 실시 양태에서 상기 외래부는 혐의의 외래부일 수 있다.
- [996] 상기 제시된 유전적 제조방법으로 1개 이상의 면역원성부위, 1개 이상의 비항원부, 1개 이상의 외래부를 포함하는 항원상동성부가단백질 역시 제조할 수 있음은 자명하다.
- [997]
- [998] 항원상동성부가단백질제조합발현벡터
- [999] 일 구체예로서 항원상동성부가단백질을 유전적 제조하기 위한 항원상동성부가단백질제조합발현벡터를 제공한다.
- [1000] 항원상동성부가단백질제조합발현벡터는 상기 면역원성제조합발현벡터를 포괄한다.
- [1001] 상기 '항원상동성부가단백질의 제조 방법'에 따라 만들어지는 항원상동성부가단백질제조합발현벡터를 제공할 수 있다.
- [1002] 일 실시양태에서 면역원성발현목적염기서열은 면역원성부위, 비항원부의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [1003] 제1구성으로서 면역원성발현조절요소는 프로모터일 수 있다.
- [1004] 일 양태에서 상기 프로모터는 야생 상태의 프로모터일 수 있다.
- [1005] 프로모터는 면역원성배양숙주세포 코돈 최적화된 것이 바람직하다.
- [1006] 상기 프로모터는 면역원성배양숙주세포의 야생 상태 프로모터일 수 있고, 별도로 인위적으로 도입한 프로모터일 수도 있다.
- [1007] 상기 프로모터는 야생 상태의 프로모터를 일부 부위에서 변형한 것일 수 있다. 이 때 변형된 프로모터는 개시효율이 향상된 것일 수 있다.
- [1008] 제2구성으로서 면역원성발현목적염기서열은 면역원성부위, 비항원부의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [1009] 면역원성부위의 염기서열은 상기 항원단백질의 유전적 생산방법, 항원상동성단백질의 유전적 생산방법의 제1단계에서 수득한 염기서열을 포괄한다.
- [1010] 또한 면역원성발현목적염기서열은 복수의 면역원성부위, 비항원부를 포함할

수 있다.

- [1011] 전체적인 구성의 배열은 프로모터-(면역원성부위-비항원부) z 인 것이 바람직하다. z 는 면역원성부위 및 비항원부가 임의의 갯수와 순서로 포함될 수 있다는 의미이다.
- [1012] 일 양태에서 상기 비항원부가 병원체의 외막 단백질의 일부인 경우 재조합발현백터를 "병원체유사입자재조합발현백터"로 정의한다. 도 21은 프로모터와 1-면역원성부위-1, 그리고 외막단백질의 염기서열을 포함하는 병원체유사입자재조합발현백터의 예시이다.
- [1013] 다른 양태에서 상기 비항원부가 면역보조기능이 있는 단백질의 일부인 경우 재조합발현백터를 "보조면역부가재조합발현백터"로 정의한다. 도 22는 프로모터와 1-면역원성부위-1, 그리고 면역보조기능을 갖는 비항원부의 염기서열을 포함하는 보조면역부가재조합발현백터의 예시이다.
- [1014]
- [1015] 다른 실시양태에서 면역원성발현목적염기서열은 면역원성부위, 외래부의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [1016] 제1구성으로서 면역원성발현조절요소는 프로모터일 수 있다.
- [1017] 이 때 프로모터는 상기 프로모터를 포괄한다. 이하 "상기 프로모터"는 첫 번째 실시 양태의 프로모터를 모두 포괄한다.
- [1018] 제2구성으로서 면역원성발현목적염기서열은 면역원성부위, 외래부의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [1019] 면역원성부위의 염기서열은 상기 항원단백질의 유전적 생산방법, 항원상동성단백질의 유전적 생산방법의 제1단계에서 수득한 염기서열을 포괄한다.
- [1020] 면역원성발현목적염기서열은 복수의 면역원성부위, 외래부를 포함할 수 있다.
- [1021] 전체적인 구성의 배열은 프로모터-(면역원성부위-외래부) z 인 것이 바람직하다.
- [1022] 일 양태에서 상기 외래부가 타병원체의 항원단백질 상의 면역원성부위인 경우에 재조합발현백터를 "다가면역원성재조합발현백터"로 정의한다. 도 23은 프로모터와 1-면역원성부위-1, 그리고 타병원체의 면역원성부위의 염기서열을 포함하는 다가면역원성재조합발현백터의 예시이다.
- [1023] 일 양태에서 상기 외래부가 타병원체의 비면역원성부위 또는 비항원부인 경우 재조합발현백터를 "다가병원체유사입자재조합발현백터"로 정의한다. 도 24는 프로모터와 1-면역원성부위-1, 그리고 타병원체의 비면역원성부위 및 비항원부를 포함하는 다가병원체유사입자재조합발현백터의 예시이다.
- [1024] 다른 양태에서 상기 외래부가 면역보조기능이 있는 단백질의 일부인 경우 재조합발현백터를 "보조면역부가재조합발현백터"로 정의한다.
- [1025]
- [1026] [면역원성시스템의 제조 방법]

[1027] 면역원성시스템의 제조 방법

[1028] 본 출원의 일 예는 면역원성시스템을 제조하는 방법이다.

[1029] "면역원성시스템구성요소(immunogenic system component)"는 면역원성시스템을 이루는 구성요소로서 시스템 구조체, 면역원성물질, 표면개시체, 융합체, 중합체 등을 포함한다.

[1030] 상기 면역원성시스템을 제조하는 방법으로 예를 들어, 하기와 같은 두 가지방법을 들 수 있다.

[1031] 먼저 면역원성시스템구성요소를 각각 제조하여 면역원성시스템으로 사후에 조합할 수 있다. 이는 각각의 면역원성시스템구성요소들을 별도로 만드는 단계와 이후에 면역원성시스템으로 조합하는 단계를 포함한다.

[1032] 다른 방법으로, 면역원성시스템을 전체로서 제조할 수 있다. 이 방법은 각각의 구성요소들을 제조하지 않아도 유전적 제조방법을 통해 면역원성시스템이 별도의 단계의 구분 없이 일체의 단계로 제조되는 방법이다.

[1033] 생산된 면역원성시스템은 그 자체로서 백신의 조성물이 될 수 있다.

[1034]

[1035] 면역원성시스템구성요소의 제조방법

[1036] 면역원성시스템의 제조 방법으로, 면역원성시스템구성요소를 각각 제조하여 면역원성시스템을 사후에 조합하는 방법을 사용하는 경우, 각 면역원성시스템구성요소를 먼저 제조한다.

[1037]

[1038] - 시스템 구조체의 제조방법

[1039] 일 구체예로서 시스템 구조체를 제조하는 방법을 제공한다.

[1040] 시스템 구조체가 바이러스, 박테리아, 포자인 경우 계대배양을 통해 제조할 수 있다. 또한 유전적 제조방법으로 제조할 수도 있다.

[1041] 시스템 구조체가 인공적 구조체인 경우, 통상의 방법으로 미생물과 유사한 크기의 인공적 구조체를 제조할 수 있다. 예를 들어, 인공적 구조체 제조 방법은 인지질용액에 인공적 구조체를 넣어 인지질로 도포하는 단계를 부가한 것일 수 있다.

[1042]

[1043] - 면역원성시스템구성요소의 유전적 제조방법

[1044] "구성요소목적염기서열(component target nucleotide sequence)"은 구성요소재조합염기서열에 포함시키려하는 염기서열을 의미한다.

[1045] "재조합시스템구성요소(recombinant system component)"은 유전적 제조 방법으로 제조한 면역원성시스템구성요소를 의미한다.

[1046] "구성요소재조합염기서열(component recombinant nucleotide sequence)"은 재조합시스템구성요소를 암호화하는 염기서열을 의미한다.

[1047] "구성요소 재조합 발현벡터(component recombinant expression vector)"는 구성요소재조합 벡터의 일 구체예로서, 벡터에 연결된

구성요소제조합염기서열이 생체 내에서 발현되는 기능까지 하는 것을 의미한다. 이러한 발현 벡터는 대부분 플라스미드의 형태를 하고 있으나 이에 한정되지 않는다.

- [1048] "구성요소 배양숙주세포(component incubating host cell)"는 제조합시스템구성요소의 제조를 위해 구성요소제조합 발현벡터로 형질전환되어 배양되는 세포를 의미한다.
- [1049] 일 구체예로서 면역원성시스템은 면역원성시스템구성요소를 유전적 제조방법을 통해 제조한 방법을 제공한다. 이 때 생산하고자 하는 단백질은 제조합시스템구성요소이며 구성요소목적염기서열은 제조합시스템구성요소의 염기서열이 된다. 상기 제조합시스템구성요소는 시스템 구조체, 면역원성물질, 표면개시체, 융합체, 중합체 등이 될 수 있다.
- [1050] 면역원성시스템구성요소의 유전적 제조 방법은 일 구체예로, 구성요소목적염기서열을 수득하는 제1단계, 구성요소목적염기서열을 포함한 구성요소제조합염기서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 제조하는 제2단계, 구성요소제조합염기서열을 구성요소배양숙주세포에 형질전환하는 제3단계, 형질전환된 구성요소배양숙주세포를 배양하는 제4단계, 구성요소배양숙주세포로부터 제조합시스템구성요소를 추출하는 제5단계를 포함할 수 있다.
- [1051] 제1단계는 구성요소목적염기서열을 수득하는 단계이다. 야생 상태의 면역원성시스템구성요소의 염기서열은 ncbi의 genbank를 이용하거나 직접 면역원성시스템구성요소를 스크리닝하여 알 수 있다.
- [1052] 또한 구성요소목적염기서열을 포함한 폴리뉴클레오타이드는 통상의 제조합 DNA 기술로 제조할 수 있다.
- [1053] 예를 들어, 상기 폴리뉴클레오타이드는 PCR 클로닝을 통해 제조할 수 있다.
- [1054] PCR 클로닝을 위해서 당업자는 적절한 프라이머 설계할 수 있고, 예를 들어, 프라이머는 면역원성시스템구성요소의 염기서열의 5' 말단에 존재하는 약 20개 정도의 염기서열, 3' 말단에 존재하는 20개 정도의 염기서열의 올리고뉴클레오타이드일 수 있다.
- [1055] 또한 구성요소목적염기서열의 프라이머는 다중정렬을 통해 설계할 수 있다.
- [1056] 제2단계는 제1단계에서 수득한 구성요소목적염기서열을 포함하는 구성요소제조합염기서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 제조하는 단계이다.
- [1057] 구성요소제조합염기서열을 포함한 폴리뉴클레오타이드는 구성요소목적염기서열을 포함한 단일 가닥 또는 이중 가닥 DNA이거나 RNA일 수 있다.
- [1058] 이 때 폴리뉴클레오타이드의 제조 방법은 구성요소목적염기서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 리가아제를 통해 연결하는 것일 수 있다.
- [1059] 구성요소제조합염기서열은 발현을 위해 필요한 구성요소 배양숙주세포의 프로모터를 포함할 수 있다.

- [1060] 구성요소제조합염기서열을 포함한 폴리뉴클레오타이드는 구성요소목적염기서열을 삽입한 구성요소제조합발현벡터일 수 있다. 구성요소제조합발현벡터에 구성요소목적염기서열을 삽입하는 방법은 통상의 유전자 제조합 기술을 사용할 수 있다.
- [1061] 제3단계는 제2단계에서 제조한 구성요소제조합폴리뉴클레오타이드 또는 구성요소제조합발현벡터로 구성요소배양숙주세포를 형질전환하는 단계이다.
- [1062] 형질전환은 그 효과에 의해, "일시적 형질전환" 또는 "영구적 형질전환"으로 분류될 수 있다. 본 출원의 일 실시예에서는 일시적 형질전환을 사용하였다.
- [1063] 또한 형질전환은 수단에 따라 "반응물에 의한 형질전환", "도구에 의한 형질전환", "바이러스에 의한 형질전환"으로 분류될 수 있다. 본 출원의 일 실시예에서는 heat shock transfection법을 사용하였다.
- [1064] 구성요소 배양숙주세포는 상기 배양숙주세포를 포괄한다.
- [1065] 제4단계와 제5단계는 상기 형질전환된 구성요소 배양숙주세포를 배양한 후 제조합시스템구성요소를 분리하는 단계이다.
- [1066] 배양단계는 통상의 배양조건을 통해 실시될 수 있다.
- [1067] 제조합시스템구성요소의 분리 단계는 통상의 유전자 제조합 기술에 의해 이루어질 수 있다.
- [1068]
- [1069] - 구성요소 제조합 발현벡터
- [1070] "구성요소발현조절요소"는 구성요소제조합발현벡터의 구성으로서 구성요소발현목적염기서열의 발현을 조절하는 염기서열을 의미한다.
- [1071] "구성요소발현목적염기서열"은 구성요소제조합발현벡터의 구성으로서 발현하고자 하는 구성요소제조합염기서열을 의미한다.
- [1072] 면역원성시스템구성요소의 유전적 제조방법의 일 구체예는 구성요소 제조합 발현벡터를 제조한 뒤 구성요소 배양숙주세포를 형질전환하는 것이다.
- [1073] 구성요소 제조합 발현벡터의 형태는 플라스미드일 수 있지만 이에 한정되지는 않는다..
- [1074] 구성요소 제조합 발현벡터에 삽입되는 구성요소 제조합염기서열은 구성요소발현조절요소와 구성요소발현목적염기서열을 포함할 수 있다.
- [1075] 구성요소발현조절요소는 상기 발현조절요소를 포괄한다.
- [1076] 구성요소발현목적염기서열은 상기 구성요소제조합염기서열로서 구성요소제조합발현벡터에 삽입된 것을 말한다.
- [1077] 구성요소발현조절요소는 구성요소 배양숙주세포 코돈 최적화된 것이 바람직하다.
- [1078] 면역원성발현목적염기서열은 상기 면역원성시스템구성요소의 염기서열이다.
- [1079] 이 때 발현목적염기서열은 상기 면역원성시스템구성요소의 유전적 제조방법의 제1단계 및 제2단계를 포함한 단계로 삽입될 수 있다.
- [1080] 구성요소 제조합발현벡터를 이용한 방법은 유전적 제작 방법의 일 구체예에

불과하다. 따라서 특별한 언급이 없는한 이하 언급되는 면역원성시스템구성요소의 유전적 제조 방법에는 구성요소 재조합발현벡터를 사용한 방법이 포함됨이 자명하다.

[1081]

[1082] 면역원성시스템의 유전적 제조방법

[1083] "시스템목적염기서열(system target nucleotide sequence)"은 시스템재조합염기서열에 포함시키려하는 면역원성시스템구성요소의 염기서열을 의미한다.

[1084] "면역원성시스템구성요소(immunogenic system component)"는 면역원성시스템을 이루는 구성요소로서 시스템 구조체, 면역원성물질, 표면개시체, 융합체, 중합체 등을 의미한다.

[1085] "재조합시스템(recombinant system)"은 유전적 제조 방법에서 최종적으로 제조하고자 하는 일체의 면역원성시스템을 의미한다.

[1086] "시스템재조합염기서열(system recombinant nucleotide sequence)"은 재조합시스템을 암호화하는 염기서열을 의미한다.

[1087] "시스템재조합 벡터(system recombinant vector)"는 재조합 벡터의 일 구체예로, 벡터에 연결된 재조합염기서열이 시스템재조합염기서열인 것을 의미한다.

[1088] "시스템재조합발현 벡터(system recombinant expression vector)"는 시스템재조합 벡터의 일 구체예로서, 벡터에 연결된 시스템재조합염기서열이 전시스템 구조체를 재조합시스템으로 발현하는 기능까지 하는 것을 의미한다. 즉 시스템재조합발현벡터가 삽입되면 재조합시스템의 생성까지 확인할 수 있다. 이러한 발현벡터는 대부분 플라스미드의 형태를 하고 있으나 이에 한정되지 않는다.

[1089] "전시스템 구조체(pre-system structure)" 시스템 재조합 발현벡터로 형질전환되어 재조합시스템으로 발현되는 시스템 구조체를 의미한다.

[1090] 일 구체예로서 면역원성시스템은 유전적 제조방법을 통해 제조하는 방법인 것을 제공한다. 이 때 생산하고자 하는 재조합시스템은 면역원성시스템이며 시스템목적염기서열은 면역원성시스템구성요소가 된다.

[1091] 면역원성시스템의 유전적 제조방법은 시스템목적염기서열을 수득하는 제1단계, 시스템목적염기서열을 포함한 시스템재조합염기서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 제조하는 제2단계, 시스템재조합염기서열을 전시스템 구조체에 형질전환하는 제3단계, 형질전환된 전시스템 구조체를 배양하는 제4단계, 발현되지 않은 전시스템 구조체로부터 성공적으로 발현된 재조합시스템을 추출하는 제5단계를 포함할 수 있다.

[1092] 제1단계는 시스템목적염기서열을 수득하는 단계이다.

[1093] 야생 상태의 면역원성시스템구성요소의 염기서열은 ncbi의 genbank를 이용하거나 직접 면역원성시스템구성요소를 스크리닝하여 수득할 수 있다.

[1094] 시스템목적염기서열을 포함한 폴리뉴클레오타이드는 통상의 재조합 DNA

기술로 제조할 수 있다.

[1095] 예를 들어, 상기 폴리뉴클레오타이드는 PCR 클로닝을 통해 제조할 수 있다.

[1096] PCR 클로닝을 위해서 당업자는 적절한 프라이머 설계할 수 있고, 예를 들어, 프라이머는 상기 과정에서 확인한 번역원성시스템구성요소의 염기서열의 5' 말단에 존재하는 약 20개 정도의 염기서열, 3' 말단에 존재하는 20개 정도의 염기서열의 올리고뉴클레오타이드일 수 있다.

[1097] 제2단계는 제1단계에서 수득한 시스템목적염기서열을 포함하는 시스템제조합염기서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 제조하는 단계이다.

[1098] 시스템제조합염기서열을 포함한 폴리뉴클레오타이드는 단순히 시스템목적염기서열을 포함한 단일 가닥 또는 이중 가닥 DNA이거나 RNA일 수 있다.

[1099] 이 때 폴리뉴클레오타이드의 제조 방법은 시스템목적염기서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 리가아제를 통해 연결하는 것일 수 있다.

[1100] 시스템제조합염기서열은 발현을 위해 필요한 전시스템 구조체의 프로모터를 포함할 수 있다.

[1101] 또한 시스템제조합염기서열을 포함한 폴리뉴클레오타이드는 목적염기서열을 삽입한 시스템제조합발현벡터일 수 있다. 시스템제조합발현벡터에 목적염기서열을 삽입하는 방법은 통상의 유전자 재조합 기술을 사용할 수 있다.

[1102] 제3단계는 제2단계에서 제조한 시스템제조합폴리뉴클레오타이드 또는 시스템제조합발현벡터로 전시스템 구조체를 형질전환하는 단계이다.

[1103] 형질전환은 그 효과에 의해, "일시적 형질전환" 또는 "영구적 형질전환"으로 분류될 수 있다. 본 출원의 일 실시예에서는 일시적 형질전환을 사용하였다.

[1104] 또한 형질전환은 수단에 따라 "반응물에 의한 형질전환", "도구에 의한 형질전환", "바이러스에 의한 형질전환"으로 분류된다. 본 출원의 일 실시예에서는 heat shock transfection법을 활용하였다.

[1105] 전시스템 구조체는 상기 시스템 구조체를 포괄한다.

[1106] 제4단계와 제5단계는 상기 형질전환된 전시스템 구조체를 배양하여 제조합시스템을 발현한 후 성공적으로 발현된 제조합시스템을 분리하는 단계이다.

[1107] 배양단계는 통상의 배양조건을 통해 배양할 수 있다.

[1108] 제조합시스템의 분리 단계는 통상의 유전자 재조합 방법에 의해 항생제 내성을 이용한 분류 등의 방법으로 이루어질 수 있다.

[1109]

[1110] - 시스템 제조합 발현벡터

[1111] "시스템발현조절요소"는 시스템제조합발현벡터의 구성요소로서 시스템발현목적염기서열의 발현을 조절하는 염기서열을 의미한다.

[1112] "시스템발현목적염기서열"은 시스템제조합발현벡터의 구성요소로서 발현하고자 하는 시스템제조합염기서열을 의미한다.

- [1113] 면역원성시스템의 유전적 제조방법의 일 구체예는 시스템 재조합 발현벡터를 제조한 뒤 전시스템구조체를 형질전환하는 것이다.
- [1114] 시스템재조합발현벡터의 형태는 플라스미드일 수 있지만 이에 한정되지는 않는다..
- [1115] 시스템재조합발현벡터에 삽입되는 시스템재조합염기서열은 시스템발현조절요소와 시스템발현목적염기서열을 포함할 수 있다.
- [1116] 시스템발현조절요소는 상기 발현조절요소를 포괄한다.
- [1117] 시스템발현목적염기서열은 상기 시스템재조합염기서열로서 시스템재조합발현벡터에 삽입된 것을 말한다.
- [1118] 시스템발현조절요소는 전시스템구조체 코돈 최적화된 것이 바람직하다.
- [1119] 시스템발현목적염기서열은 상기 면역원성시스템이다.
- [1120] 시스템발현목적염기서열은 상기 면역원성시스템의 유전적 제조방법의 제1단계 및 제2단계를 포함한 단계로 삽입될 수 있다.
- [1121] 시스템재조합발현벡터를 이용한 방법은 유전적 제작 방법의 일 구체예에 불과하다. 따라서 특별한 언급이 없는한 이하 면역원성시스템의 유전적 제조 방법에는 시스템재조합발현벡터를 사용한 방법이 포함됨이 자명하다.
- [1122]
- [1123] 면역원성 내부담지시스템의 제조 방법
- [1124] 본 출원의 일 예는 백신의 면역원성시스템으로서 면역원성 내부담지시스템을 제조하는 방법이다.
- [1125] 면역원성 내부담지시스템을 제조하는 방법은 예를 들어, 두 가지 방법을 들 수 있다.
- [1126] 일 방법으로, 담지체와 담지면역원성물질을 각각 제조하여 담지면역원성물질을 담지체에 담지하는 방법이 있다. 이는 각각의 구성요소들을 따로 만드는 단계와 이후에 시스템으로 조합하는 단계를 포함한다.
- [1127] 다른 방법으로, 전체로서 면역원성 내부담지시스템을 제조하는 방법이다. 이 방법은 각각의 구성요소들을 제조하지 않아도 유전적 제조방법을 통해 내부담지시스템이 단계의 구분 없이 일체의 단계로 제조되는 방법이다.
- [1128]
- [1129] - 담지체의 제조방법
- [1130] 일 구체예로서 담지체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [1131] 담지체를 제조하는 방법은 상기 시스템 구조체의 제조방법을 포괄한다.
- [1132] 일 실시 형태에서 제조 방법은 담지체 내부에 전하를 띄는 담지체의 제조 방법일 수 있다.
- [1133] 담지체 내부의 전하는 전하를 띄는 물질에 의해 생기는 것일 수 있다. 상기 전하를 띄는 물질은 유전적 방법에 의한 재조합단백질일 수 있다.
- [1134] 또한, 상기 전하를 띄는 물질은 외부에서 담지체 내부로 주입될 수 있다. 이 때

주입 방법은 미생물학에서 통상적인 방법일 수 있고, 구체적으로 예를 들어, 마이크로פק션일 수 있다.

[1135] 다른 실시 형태에서 제조 방법은 외부에 전하를 띄는 담지체의 제조 방법이다.

[1136] 상기 담지체 외부의 전하는 전하를 띄는 물질에 의해 생기는 것일 수 있다. 이 때 전하를 띄는 물질은 담지체에 흡착될 수 있다. 흡착 방법은 담지체를 전하를 띄는 물질과 혼합하여 항온상태에서 방치하는 것일 수 있다.

[1137]

[1138] - 담지면역원성 물질의 제조방법

[1139] 일 구체예로서 담지면역원성물질을 제조하는 방법을 제공한다.

[1140] 담지면역원성물질을 제조하는 방법은 상기 면역원성물질의 제조 방법을 포괄한다.

[1141] 일 실시 형태에서 제조 방법은 전하를 띄는 면역원성 물질의 제조 방법일 수 있다.

[1142] 면역원성 물질의 전하는 전하를 띄는 물질에 의한 것일 수 있다. 이 때 전하를 띄는 물질은 담지면역원성물질에 흡착될 수 있다. 흡착 방법은 담지면역원성물질을 전하를 띄는 물질과 혼합하여 항온상태에서 방치하는 것일 수 있다.

[1143]

[1144] - 담지면역원성물질의 담지방법

[1145] 일 구체예로서 담지면역원성물질을 담지체에 담지하는 방법을 제공한다.

[1146] 담지면역원성물질은 외부에서 담지체 내부로 주입될 수 있다. 이 때 주입 방법은 미생물학에서 통상적인 방법일 수 있고, 구체적 예로는 마이크로פק션일 수 있다.

[1147]

[1148] - 면역원성 내부담지시스템의 유전적 제조방법

[1149] 일 구체예로서 면역원성 내부담지시스템을 유전적 제조하는 방법을 제공한다.

[1150] 면역원성 내부담지시스템의 유전적 제조방법은 면역원성시스템의 유전적 제조방법을 포괄한다.

[1151] 시스템목적염기서열은 담지면역원성물질을 포함한다. 시스템목적염기서열은 전하를 띄는 물질을 포함할 수 있다.

[1152] 담지면역원성물질의 서열은 담지체의 내부단백질의 신호서열을 포함할 수 있다.

[1153]

[1154] - 면역원성내부담지시스템제조합발현벡터

[1155] 일 구체예로서 면역원성내부담지시스템을 유전적 제조하기 위한 면역원성내부담지시스템제조합발현벡터를 제공한다.

[1156] 면역원성내부담지시스템제조합발현벡터는 시스템제조합발현벡터를 포괄한다.

- [1157] 시스템발현목적염기서열은 담지면역원성물질을 포함한다. 이 때 시스템발현목적염기서열은 전하를 띄는 물질을 포함할 수 있다.
- [1158]
- [1159] 면역원성 융합디스플레이시스템의 제조 방법
- [1160] 본 출원의 일 예는 백신의 면역원성시스템으로서 면역원성 융합디스플레이시스템을 제조하는 방법이다.
- [1161] 면역원성 융합디스플레이시스템을 제조하는 방법은 예를 들어, 두 가지를 들 수 있다.
- [1162] 일 방법으로, 융합디스플레이체와 융합체를 각각 제조하여 융합체를 융합디스플레이체 외부에 결부하는 방법이 있다. 이는 각각의 구성요소들을 따로 만드는 단계와 이후에 시스템으로 조합하는 단계를 포함한다.
- [1163] 다른 방법으로, 전체로서 면역원성 융합디스플레이시스템을 제조하는 방법이다. 이 방법은 각각의 구성요소들을 제조하지 않아도 유전적 제조방법을 통해 융합디스플레이시스템이 단계의 구분 없이 일체의 단계로 제조되는 방법이다.
- [1164]
- [1165] - 융합디스플레이체의 제조방법
- [1166] 일 구체예로서 융합디스플레이체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [1167] 융합디스플레이체를 제조하는 방법은 상기 시스템 구조체의 제조방법을 포괄한다.
- [1168] 일 실시 형태에서 제조 방법은 융합디스플레이체 외부에 전하를 띄는 융합디스플레이체의 제조 방법일 수 있다.
- [1169] 융합디스플레이체 외부의 전하는 융합디스플레이체 외부의 전하를 띄는 물질에 의해 생기는 것일 수 있다. 이 때 전하를 띄는 물질은 융합디스플레이체에 흡착될 수 있다. 흡착 방법은 융합디스플레이체를 전하를 띄는 물질의 용액에 넣고 항온상태에서 방치하는 것일 수 있다.
- [1170]
- [1171] - 융합체의 제조방법
- [1172] 일 구체예로서 융합체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [1173] 융합체를 제조하는 방법은 상기 면역원성시스템구성요소의 제조방법을 포괄한다.
- [1174] 일 실시 양태로 융합체를 제조하는 방법은 상기 면역원성시스템구성요소의 제조방법으로 표면개시체와 융합면역원성물질을 제조하는 단계, 표면개시체와 융합면역원성물질을 커플링결합하는 단계를 포함할 수 있다.
- [1175] 표면개시체의 제조 방법은 유전적 제조방법일 수 있다.
- [1176] 융합면역원성물질의 제조 방법은 유전적 제조방법일 수 있다.
- [1177] 융합면역원성물질의 제조 방법은 상기 면역원성물질의 유전적 제조방법을 포괄한다.

- [1178] 다른 실시양태로 융합체를 제조하는 방법은 면역원성시스템구성요소의 유전적 제조방법일 수 있다.
- [1179] 유전적 제조방법에서 목적염기서열은 융합면역원성물질과 표면개시체를 포함한다. 또한 목적염기서열은 융합면역원성물질, 표면개시체 및 융합부를 포함할 수 있다.
- [1180]
- [1181] - 융합체의 융합디스플레이체 결부 방법
- [1182] 일 구체예로서 융합체를 융합디스플레이체에 결부하는 방법을 제공한다.
- [1183] 상기 결부 방법은 융합체를 융합디스플레이체와 동일한 용액에서 항온상태에서 방치하는 것일 수 있다. 바람직하게는 융합체의 표면개시체의 기능에 의해 융합체가 융합디스플레이체의 외부에 개시될 수 있다.
- [1184]
- [1185] - 면역원성 융합디스플레이시스템의 유전적 제조방법
- [1186] 일 구체예로서 면역원성 융합디스플레이시스템을 유전적 제조하는 방법을 제공한다.
- [1187] 면역원성 융합디스플레이시스템의 유전적 제조방법은 상기 면역원성시스템의 유전적 제조방법을 포괄한다. 이 때 시스템목적염기서열은 표면개시체, 융합면역원성물질을 포함한다. 이 때 시스템목적염기서열은 융합부를 포함할 수 있다.
- [1188] 표면개시체의 프로모터와 표면개시체는 일체로 시스템목적염기서열이 될 수 있다.
- [1189]
- [1190] - 면역원성융합디스플레이시스템제조합발현벡터
- [1191] 일 구체예로서 면역원성융합디스플레이시스템을 유전적 제조하기 위한 면역원성융합디스플레이시스템제조합발현벡터를 제공한다.
- [1192] 면역원성융합디스플레이시스템제조합발현벡터는 시스템제조합발현벡터를 포괄한다.
- [1193] 시스템발현조절요소는 야생 상태에서 표면개시체의 전사를 개시하는 프로모터일 수 있다.
- [1194] 시스템발현목적염기서열은 표면개시체, 융합면역원성물질을 포함한다. 이 때 시스템발현목적염기서열은 융합부를 포함할 수 있다.
- [1195] 표면개시체의 프로모터와 표면개시체는 일체로 시스템목적염기서열이 될 수 있다.
- [1196]
- [1197] 면역원성 커플링디스플레이시스템의 제조 방법
- [1198] 본 출원의 일 예는 백신의 면역원성시스템으로서 면역원성 커플링디스플레이시스템을 제조하는 방법이다.
- [1199] 면역원성 커플링디스플레이시스템을 제조하는 방법은 커플링기를 포함하는

커플링디스플레이체와 커플링면역원성물질을 각각 제조하는 단계,
커플링디스플레이체와 커플링면역원성물질 사이에 커플링결합을 일으키는
단계를 포함한다.

[1200]

[1201] - 디스플레이체커플링기를 포함한 커플링디스플레이체의 제조단계

[1202] 일 구체예로서 디스플레이체커플링기를 포함하는 커플링디스플레이체를
제조하는 방법을 제공한다.

[1203] 커플링디스플레이체의 제조 방법은 시스템구조체를 제조하는 단계와
시스템구조체에 디스플레이체커플링기를 형성하는 단계를 포함할 수 있다.

[1204] 시스템구조체는 상기 시스템구조체의 제조방법에 의해 제조될 수 있다.

[1205] 또한 디스플레이체커플링기는 단백질 간의 교차 결합(cross-link)을 일으키기
위해 사용하는 통상의 방법에 의해 형성될 수 있다. 또한
디스플레이체커플링기는 야생 상태의 시스템구조체에 포함된 것일 수 있다.
상기 디스플레이체커플링기는 시스템의 티올기일 수 있다.

[1206]

[1207] - 면역원성물질커플링기를 포함한 커플링면역원성물질의 제조방법

[1208] 일 구체예로서 면역원성물질커플링기를 포함하는 커플링면역원성물질을
제조하는 방법을 제공한다.

[1209] 커플링면역원성물질의 제조 방법은 면역원성물질을 제조하는 단계와
면역원성물질에 면역원성물질커플링기를 형성하는 단계를 포함할 수 있다.

[1210] 면역원성물질은 상기 면역원성물질의 제조방법에 의해 제조될 수 있다.

[1211] 또한 면역원성물질커플링기는 교차 결합(cross-link)을 일으키기 위해 사용하는
통상의 방법에 의해 형성될 수 있다.

[1212] 또한 면역원성물질커플링기는 야생 상태의 면역원성물질에 포함된 것일 수
있다. 상기 면역원성물질커플링기는 시스템의 티올기일 수 있다.

[1213]

[1214] - 커플링결합 단계

[1215] 일 구체예로서 커플링디스플레이체와 커플링면역원성물질 사이에
커플링결합을 일으키는 단계를 제공한다.

[1216] 이 때 커플링결합은 통상의 커플링반응 조건에 의해 일어나면 족하다.

[1217]

[1218] 면역원성 부착디스플레이시스템의 제조 방법

[1219] 본 출원의 일 예는 백신의 면역원성시스템으로서 면역원성
부착디스플레이시스템을 제조하는 방법이다.

[1220] 면역원성 부착디스플레이시스템을 제조하는 방법은 예를 들어, 다음의 두
가지를 들 수 있다.

[1221] 일 방법으로, 부착디스플레이체와 부착면역원성물질을 각각 제조하여
부착면역원성물질을 부착디스플레이체에 부착하는 방법이 있다. 이는 각각의

구성요소들을 따로 만드는 단계와 이후에 시스템으로 조합하는 단계를 포함한다.

- [1222] 다른 방법으로, 전체로서 면역원성 부착디스플레이시스템을 제조하는 방법이다. 이 방법은 각각의 구성요소들을 제조하지 않아도 유전적 제조방법을 통해 부착디스플레이시스템이 단계의 구분 없이 일체의 단계로 제조되는 방법이다.
- [1223]
- [1224] - 부착디스플레이체의 제조방법
- [1225] 일 구체예로서 부착디스플레이체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [1226] 부착디스플레이체를 제조하는 방법은 상기 시스템 구조체의 제조방법을 포괄한다.
- [1227] 일 실시 형태에서 제조 방법은 부착디스플레이체 내부에 전하를 띄는 부착디스플레이체의 제조 방법일 수 있다.
- [1228] 부착디스플레이체 내부의 전하는 부착디스플레이체 내부의 전하를 띄는 물질에 의해 생기는 것일 수 있다. 이 때 전하를 띄는 물질은 유전적 재조합에 의해 생성된 단백질일 수 있다. 또한 전하를 띄는 물질은 외부에서 부착디스플레이체 내부로 주입될 수 있다. 이 때 주입 방법은 미생물학에서 통상적인 방법일 수 있고, 구체적 예로 마이크로פק션일 수 있다.
- [1229] 다른 실시 형태에서 제조 방법은 부착디스플레이체 외부에 전하를 띄는 부착디스플레이체의 제조 방법일 수 있다.
- [1230] 이 때 부착디스플레이체 외부의 전하는 부착디스플레이체 외부의 전하를 띄는 물질에 의해 생기는 것일 수 있다. 상기 전하를 띄는 물질은 부착디스플레이체에 흡착될 수 있다. 흡착 방법은 부착디스플레이체를 전하를 띄는 물질의 용액에 넣고 항온상태에서 방치하는 것일 수 있다.
- [1231]
- [1232] - 부착면역원성물질의 제조방법
- [1233] 일 구체예로서 부착면역원성물질을 제조하는 방법을 제공한다.
- [1234] 부착면역원성물질을 제조하는 방법은 상기 면역원성물질의 제조 방법을 포괄한다.
- [1235] 일 실시 형태에서 제조 방법은 전하를 띄는 부착면역원성물질의 제조 방법일 수 있다.
- [1236] 부착면역원성물질의 전하는 전하를 띄는 물질에 의한 것일 수 있다. 상기 전하를 띄는 물질은 부착면역원성물질에 흡착될 수 있다. 흡착 방법은 부착면역원성물질을 전하를 띄는 물질의 용액에 넣고 항온상태에서 방치하는 것일 수 있다.
- [1237]
- [1238] - 부착면역원성물질의 부착 방법
- [1239] 일 구체예로서 부착면역원성물질을 부착디스플레이체에 부착하는 방법을

제공한다.

- [1240] 상기 부착 방법은 부착면역원성물질을 부착디스플레이체와 동일한 용액에 넣고 항온상태에서 방치하는 방법일 수 있다. 이 때 부착면역원성물질과 부착디스플레이체는 상호작용을 일으켜 부착면역원성물질이 부착디스플레이체에 부착된다.

[1241]

- [1242] - 면역원성 부착디스플레이시스템의 유전적 제조 방법

- [1243] 일 구체예로서 면역원성 부착디스플레이시스템을 유전적 제조하는 방법을 제공한다.

- [1244] 면역원성 부착디스플레이시스템의 유전적 제조방법은 면역원성시스템의 유전적 제조방법을 포괄한다. 이 때 시스템목적염기서열은 부착면역원성물질을 포함한다. 상기 시스템목적염기서열은 전하를 띄는 물질을 포함할 수 있다.

[1245]

- [1246] - 면역원성부착디스플레이시스템제조합발현벡터

- [1247] 일 구체예로서 면역원성부착디스플레이시스템을 유전적 제조하기 위한 면역원성부착디스플레이시스템제조합발현벡터를 제공한다.

- [1248] 면역원성부착디스플레이시스템제조합발현벡터는 시스템제조합발현벡터를 포괄한다. 이 때 시스템발현목적염기서열은 부착면역원성물질을 포함한다. 상기 시스템발현목적염기서열은 전하를 띄는 물질을 포함할 수 있다.

[1249]

- [1250] 면역원성 교차결합 디스플레이시스템의 제조 방법

- [1251] 본 출원의 일 예는 백신의 면역원성시스템으로서 면역원성 교차결합디스플레이시스템을 제조하는 방법이다.

- [1252] 면역원성 교차결합디스플레이시스템을 제조하는 방법은 교차결합면역원성물질이 개시된 디스플레이시스템을 제조하는 단계; 및 상기 디스플레이시스템에 중합체를 첨가하여 교차결합그물구조를 형성하는 단계를 포함한다.

[1253]

- [1254] - 디스플레이시스템의 제조방법

- [1255] 일 구체예로서 먼저 교차결합면역원성물질이 개시된 디스플레이시스템을 제조하는 방법을 제공한다.

- [1256] 디스플레이시스템의 제조방법은 면역원성융합디스플레이시스템의 제조 방법일 수 있다.

- [1257] 디스플레이시스템의 제조방법은 면역원성커플링디스플레이시스템의 제조 방법일 수 있다.

- [1258] 디스플레이시스템의 제조방법은 면역원성부착디스플레이시스템의 제조 방법일 수 있다.

- [1259] 디스플레이시스템의 면역원성물질은 교차결합기를 가지고 있는 것이

바람직하다. 상기 교차결합기는 야생 상태의 면역원성물질에 포함된 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 교차결합기는 히드록시기이다. 또한, 상기 교차결합기는 커플링기일 수 있다. 상기 커플링기는 단백질 간 교차결합(cross-link)을 유도하기 위해 사용되는 공지의 방법으로 형성될 수 있다.

[1260]

[1261] - 교차결합그물구조의 형성방법

[1262] 일 구체예로서 교차결합그물구조를 형성하는 방법을 제공한다.

[1263] 교차결합그물구조는 생성된 디스플레이시스템에 중합체를 첨가하여 교차결합을 일으키면 형성된다.

[1264] 상기 교차결합은 통상의 커플링반응 조건에 의해 일어날 수 있다.

[1265] 또한 중합체는 단백질 간 교차 결합(cross-link)을 일으키기 위해 사용하는 통상의 시약일 수 있다. 예를 들어, 상기 중합체는 글루타르알데하이드(glutaraldehyde)이며, 교차 결합 반응은 알돌 농축 반응(aldol condensation reaction)일 수 있다.

[1266]

[1267] 면역원성 직렬연결시스템의 제조 방법

[1268] 본 출원의 일 예는 백신의 면역원성시스템으로서 면역원성 직렬연결시스템을 제조하는 방법이다.

[1269] 면역원성 직렬연결시스템을 제조하는 방법은 예를 들어, 크게 두 가지를 들 수 있다.

[1270] 일 방법으로, 면역원성 직렬연결체를 제조하고, 직렬연결시스템구조체와 결부하는 방법이 있다. 이는 각각의 구성요소들을 따로 만드는 단계와 이후에 시스템으로 조합하는 단계를 포함한다. 이 때 직렬연결시스템은 면역원성물질의 구조에 특징이 있는 것이므로, 직렬연결시스템구조체의 종류에는 제한이 없고 이의 제조방법은 시스템의 양태에 따라 달라질 수 있다.

[1271] 다른 방법으로, 전체로서 면역원성 직렬연결시스템을 제조하는 방법이다. 이 방법은 각각의 구성요소들을 제조하지 않아도 유전적 제조방법을 통해 직렬연결시스템이 단계의 구분 없이 일체의 단계로 제조되는 방법이다.

[1272]

[1273] - 제x단백질의 제조방법

[1274] 일 구체예로, 면역원성 직렬연결체를 제조하는 방법은 제x단백질을 각각 제조한 후 제y연결부를 형성하여 결합하는 방법을 제공한다.

[1275] 제1단계로서 제x단백질을 제조하는 방법을 제공한다.

[1276] 상기 제x단백질이 면역원성물질인 경우, 제x단백질의 제조 방법은 상기 면역원성물질의 제조 방법을 포괄한다.

[1277] 제x단백질은 유전적 제조 방법으로 제조하는 것이 바람직하다.

[1278] 제x단백질이 면역원성물질인 경우, 제x단백질의 제조 방법은 상기 면역원성물질의 제조 방법을 포괄한다.

- [1279] 제x단백질이 면역원성물질이 아닌 경우, 제x단백질의 제조 방법은 상기 단백질의 유전적 제조 방법 또는 상기 면역원성시스템구성요소의 유전적 제조 방법을 포괄한다.
- [1280]
- [1281] - 제y연결부의 형성방법
- [1282] 제2단계로서 제y연결부를 형성하여 제y단백질과 제(y+1)단백질을 결합하는 방법을 제공한다.
- [1283] 단백질의 결합방법은 통상의 커플링반응에 의한 것일 수 있다.
- [1284] 단백질의 결합방법은 적절한 교차결합기와 중합체를 이용해 중합부를 형성하는 것일 수 있다.
- [1285] 제y연결부를 형성하는 방법은 제1연결부부터 제(n-1)연결부까지 순차적으로 형성하는 것일 수 있다.
- [1286]
- [1287] - 면역원성 직렬연결체의 유전적 제조 방법
- [1288] 일 구체예로서 면역원성 직렬연결체를 유전적 제조하는 방법을 제공한다.
- [1289] 면역원성 직렬연결체의 유전적 제조 방법은 상기 면역원성시스템구성요소의 유전적 제조 방법을 포괄한다.
- [1290] 면역원성 직렬연결체의 유전적 제조 방법은 면역원성직렬연결체를 구성요소제조합염기서열로 하고, 제x단백질들을 구성요소목적염기서열로 하는 유전적 제조방법이다. 이 때 구성요소목적염기서열은 제y연결부들을 선택적으로 포함할 수 있다.
- [1291] 제x단백질이 면역원성물질인 경우, 제x단백질의 염기서열을 수득하는 단계는 면역원성물질의 유전적 제조 방법의 제1단계를 포괄한다.
- [1292] 그 외에 제x단백질이 면역원성물질이 아닌 경우, 제x단백질의 염기서열을 수득하는 단계는 단백질의 유전적 제조 방법 또는 면역원성시스템구성요소의 유전적 제조 방법의 제1단계를 포괄한다.
- [1293] 폴리뉴클레오타이드를 제조하는 제2단계에서, 폴리뉴클레오타이드의 구성요소제조합염기서열은 직렬연결체의 정의 상 제1단백질-제1연결부-제2단백질-제2연결부-(.....제(n-1)연결부-제n단백질, 구성요소목적염기서열들이 오름차순으로 배열된 형태일 수 있다.
- [1294]
- [1295] - 면역원성직렬연결체제조합발현벡터
- [1296] 일 구체예로서 면역원성 직렬연결체를 유전적 제조하기 위한 면역원성 직렬연결체제조합발현벡터를 제공한다.
- [1297] 면역원성융합디스플레이체제조합발현벡터는 구성요소제조합발현벡터를 포괄한다.
- [1298] 편의상 제조합발현벡터가 제y연결부의 염기서열을 포함하는 것으로 표현했으나, 여기서 언급되는 제y연결부는 펩티드 결합에 불과할 수도 있으며

이 경우 해당하는 특정의 염기서열이 별도로 존재하지 않을 수 있다.

[1299] 제2구성으로서 구성요소발현목적염기서열은 제x단백질과 제y연결부의 염기서열을 포함할 수 있다.

[1300] 구성요소발현목적염기서열은 직렬연결체의 정의 상 제1단백질-제1연결부-제2단백질-제2연결부-(.....제(n-1)연결부-제n단백질의 오름차순으로 배열된 형태일 수 있다.

[1301] 전체적인 구성의 배열은 프로모터-제1단백질-제1연결부-제2단백질-제2연결부-(.....제(n-1)연결부-제n단백질인 것이 바람직하다. 도 25는 프로모터와 제1단백질 내지 제5단백질 및 단백질을 연결하는 제1연결부 내지 제4연결부의 염기서열을 포함하는 면역원성직렬연결체제조합발현벡터의 예시이다.

[1302]

[1303] - 면역원성 직렬연결체와 직렬연결시스템 구조체의 결부 방법

[1304] 일 구체예로서 상기 제조 방법으로 만들어진 면역원성 직렬연결체를 직렬연결시스템구조체와 결부하는 방법을 제공한다.

[1305] 직렬연결시스템은 면역원성물질의 구조에 특징이 있는 것이므로, 시스템의 종류에는 제한이 없고, 직렬연결시스템으로의 결부 방법은 시스템의 양태에 따라 달라질 수 있다.

[1306]

[1307] - 면역원성 직렬연결시스템의 유전적 제조 방법

[1308] 일 구체예로서 면역원성 직렬연결시스템을 유전적 제조하는 방법을 제공한다.

[1309] 면역원성 직렬연결시스템의 유전적 제조 방법은 상기 면역원성 시스템의 유전적 제조 방법을 포괄한다.

[1310] 면역원성 직렬연결시스템의 유전적제조 방법은, 선택적인 시스템의 양태를 시스템제조합염기서열로 하고, 면역원성 직렬연결시스템을 시스템목적염기서열로 하는 유전적 제조방법이다.

[1311] 시스템목적염기서열은 선택적인 시스템의 양태에 따라 필수적인 구성을 포함할 수 있다. 예를 들어 시스템의 양태로 면역원성 융합디스플레이시스템을 선택한 경우 시스템목적염기서열은 표면개시체의 염기서열을 필수적으로 포함할 수 있다.

[1312] 또한 시스템목적염기서열은 선택적인 시스템의 양태에 따라 선택적인 구성을 포함할 수 있다. 예를 들어 시스템의 양태로 면역원성 융합디스플레이시스템을 선택한 경우 시스템목적염기서열은 융합부의 염기서열을 선택적으로 포함할 수 있다.

[1313] 면역원성 시스템의 유전적 제조방법의 제1단계에서 면역원성 직렬연결체의 염기서열을 수득하는 방법은, 상기 면역원성 직렬연결체의 유전적 제조 방법에 의한 것일 수 있다.

[1314]

- [1315] - 면역원성직렬연결시스템제조합발현벡터
- [1316] 일 구체예로서 면역원성 직렬연결시스템을 유전적 제조하기 위한 면역원성 직렬연결시스템제조합발현벡터를 제공한다.
- [1317] 면역원성직렬연결시스템제조합발현벡터는 시스템제조합발현벡터를 포괄한다.
- [1318] 시스템발현목적염기서열은 면역원성 직렬연결체의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [1319] 시스템목적염기서열은 선택적인 시스템의 양태에 따라 필수적인 구성을 포함할 수 있다. 예를 들어 시스템의 양태로 면역원성 융합디스플레이시스템을 선택한 경우 시스템목적염기서열은 표면개시체의 염기서열을 필수적으로 포함할 수 있다. 이 때 시스템의 양태에 따라 바람직한 구성의 배열관계가 필요할 수 있다.
- [1320] 이해를 돕기 위해 도 27과 같은 면역원성 시스템을 제조한다고 가정한다. 도 27은 제1단백질 내지 제5단백질 및 단백질을 연결하는 제1연결부 내지 제4연결부의 염기서열을 포함하는 면역원성직렬연결체가 융합디스플레이시스템의 양태로 부합된 면역원성 직렬연결시스템의 예시이다.
- [1321] 위의 예의 경우 표면개시체의 염기서열은 면역원성 직렬연결체의 염기서열보다 먼저 나오는 것이 바람직하다.
- [1322] 또한 시스템목적염기서열은 선택적인 시스템의 양태에 따라 선택적인 구성을 포함할 수 있다. 예를 들어 시스템의 양태로 면역원성 융합디스플레이시스템을 선택한 경우 시스템목적염기서열은 융합부의 염기서열을 선택적으로 포함할 수 있다.
- [1323] 제2구성으로서 시스템발현목적염기서열은 직렬연결체의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [1324] 이 때 직렬연결체의 염기서열은 상기 "면역원성직렬연결체제조합발현벡터"의 구성요소발현목적염기서열을 포괄한다.
- [1325] 전체적인 구성의 배열은 프로모터-[(필수적인 구성)-(면역원성직렬연결체)-(선택적인 구성)]인 것이 바람직하다. 도 26는 프로모터와 표면개시체, 그리고 제1단백질 내지 제5단백질 및 단백질을 연결하는 제1연결부 내지 제4연결부의 염기서열을 포함하는 도 27의 면역원성 시스템을 제조하기 위한 면역원성직렬연결체제조합발현벡터의 예시이다.
- [1326]
- [1327] 면역원성 병렬시스템의 제조 방법
- [1328] 본 출원의 일 예는 백신의 면역원성시스템으로서 면역원성 병렬시스템을 제조하는 방법이다.
- [1329] 면역원성 병렬시스템을 제조하는 방법은 예를 들어, 크게 두 가지를 들 수 있다.
- [1330] 일 방법으로, 먼저 병렬체를 제조하고, 병렬시스템구조체와 결부하는 방법이 있다. 이는 각각의 구성요소들을 따로 만드는 단계와 이후에 시스템으로

조합하는 단계를 포함한다. 이 때 병렬시스템은 각 병렬체의 전달이 독립적이므로, 병렬시스템구조체의 제조방법은 시스템의 양태에 따라 달라진다.

[1331] 다른 방법으로, 전체로서 번역원성 병렬시스템을 제조하는 방법이다. 이 방법은 각각의 구성요소들을 제조하지 않아도 유전적 제조방법을 통해 번역원성 병렬시스템이 단계의 구분 없이 일체의 단계로 제조되는 방법이다.

[1332]

[1333] - 병렬체의 제조방법

[1334] 먼저 번역원성 병렬시스템을 제조하는 방법은 병렬체를 각각 제조한 후 병렬시스템구조체에 결부하는 방법을 제공한다.

[1335] 제1단계로서 병렬체를 제조하는 방법을 제공한다.

[1336] 임의의 병렬체가 번역원성물질인 경우, 병렬체의 제조 방법은 상기 번역원성물질의 제조 방법을 포괄한다. 이 때 병렬체는 유전적 제조 방법으로 제조하는 것이 바람직하다.

[1337] 임의의 병렬체가 번역원성물질이 아닌 경우, 예를 들어, 번역 반응을 보조하는 물질 등은 공지의 방법으로 제조할 수 있다.

[1338]

[1339] - 병렬체의 결부 방법

[1340] 제2단계로서 병렬체를 병렬시스템구조체에 결부하는 방법을 제공한다.

[1341] 병렬시스템은 각 병렬체의 전달이 독립적이므로, 결부 방법은 각 병렬체에 대해 선택한 시스템의 양태에 따라 달라질 수 있다. 결부 방법은 상기 내부담지시스템 내지 부착시스템에 설명한 결부 방법을 포괄한다.

[1342]

[1343] - 번역원성 병렬시스템의 유전적 제조 방법

[1344] 일 구체예로서 번역원성 병렬시스템을 유전적 제조하는 방법을 제공한다.

[1345] 번역원성 병렬시스템의 유전적 제조 방법은 상기 번역원성 시스템의 유전적 제조 방법을 포괄한다.

[1346] 번역원성 병렬시스템을 유전적 제조하는 방법은 예를 들어, 크게 두 가지를 들 수 있다.

[1347] 일 방법으로, 먼저 각 병렬체의 시스템을 시스템제조합염기서열로 하는 시스템의 유전적 제조 방법을 1회씩 수행하는 방법이 있다.

[1348] 이해를 돕기 위하여 도 29과 같은 번역원성 병렬시스템을 제조한다고 가정한다. 도 29는 3개의 병렬체가 각각 내부담지시스템, 융합디스플레이시스템, 융합디스플레이시스템으로 구성된 번역원성 병렬시스템의 예시이다.

[1349] 도 29의 번역원성 시스템은 제1병렬체 내부담지시스템의 유전적 제조 방법, 제2병렬체 융합디스플레이시스템의 유전적 제조 방법, 제3병렬체 융합디스플레이시스템의 유전적 제조 방법을 거쳐 제조할 수 있다.

- [1350] 이 때, 1개 이상의 시스템의 제조 방법은 구성요소를 결부하는 방법일 수 있다. 예를 들면, 상기 예에서 내부담지시스템의 제조 방법은 마이크로펙션(microfection)일 수 있다.
- [1351] 복수의 시스템을 제조하는 방법은 각각의 시스템을 시스템목적염기서열로 하는 1회의 유전적 제조 방법일 수 있다. 예를 들면, 상기 예에서 제2병렬체의 융합디스플레이시스템 및 제3병렬체의 융합디스플레이시스템을 제조하는 방법은 2개의 융합디스플레이시스템발현목적염기서열을 포함하는 병렬융합디스플레이시스템제조합발현벡터를 삽입하는 것일 수 있다.
- [1352] 다른 방법으로, 두 번째는 복수의 시스템을 시스템목적염기서열로 하는 유전적 제조 방법을 수행하는 방법이 있다.
- [1353] 면역원성 병렬시스템의 유전적제조 방법은 면역원성 병렬시스템을 시스템제조합염기서열로 하고, 각 병렬체의 면역원성 시스템을 시스템목적염기서열로 하는 유전적 제조방법이다. 예를 들면, 위의 예에서 제1병렬체의 시스템, 제2병렬체의 시스템, 제3병렬체의 시스템은 시스템목적염기서열에 해당하며 시스템제조합염기서열인 면역원성 병렬시스템의 일부가 된다.
- [1354] 이 때, 제1단계는 각 시스템목적염기서열을 수득하는 단계이다.
- [1355] 시스템목적염기서열을 수득하는 방법은 상기 내부담지시스템 내지 부착시스템의 유전적 제조 방법에서 시스템제조합염기서열을 수득하는 방법을 포괄한다. 예를 들면, 위의 예에서 제2병렬체의 시스템에 해당하는 시스템목적염기서열을 수득하는 방법은 상기 면역원성융합디스플레이시스템의 유전적 제조 방법의 제1단계와 제2단계를 거쳐 수득하는 것일 수 있다.
- [1356] 이 때, 제2단계는 시스템제조합염기서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 수득하는 단계이다.
- [1357] 제1단계에서 수득한 시스템목적염기서열들을 포함하는 시스템제조합염기서열을 통상의 방법으로 수득할 수 있다.
- [1358]
- [1359] - 면역원성 병렬시스템 제조합발현벡터(restriction sites)
- [1360] 일 구체예로서 면역원성 병렬시스템을 유전적 제조하기 위한 면역원성 병렬시스템제조합발현벡터를 제공한다.
- [1361] 면역원성병렬시스템제조합발현벡터는 시스템제조합발현벡터를 포괄한다.
- [1362] 시스템발현목적염기서열은 면역원성 병렬체의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [1363] 일 실시양태에서 면역원성병렬시스템제조합발현벡터는 각 병렬체의 시스템을 시스템발현목적염기서열로 하는 복수 개의 시스템제조합발현벡터일 수 있다. 예를 들면, 도 29의 면역원성시스템을 제조하기 위한 면역원성병렬시스템제조합발현벡터는 제1병렬체의 면역원성내부담지시스템제조합발현벡터, 제2병렬체의

면역원성융합디스플레이시스템제조합발현벡터, 제3병렬체의
면역원성융합디스플레이시스템제조합발현벡터일 수 있다.

[1364] 다른 실시 양태에서 면역원성병렬시스템제조합발현벡터는 복수 병렬체의
시스템을 시스템발현목적염기서열로 하는 단일 시스템제조합발현벡터일 수
있다.

[1365] 각 병렬체의 시스템 염기서열은 상기 내부담지시스템 내지 부착시스템의
시스템제조합발현벡터에서 시스템발현목적염기서열을 포괄한다. 각 병렬체의
시스템 염기서열은 각자 인슐레이트된 위치의 제한효소 사이트에 삽입된 것이
바람직하다.

[1366] 각 병렬체의 시스템 염기서열의 앞에는 프로모터의 염기서열이 있는 것이
바람직하다.

[1367] 전체적인 구성의 배열은 (제1프로모터-제1병렬체의 시스템)-(인슐레이트되는
영역)-(제2프로모터-제2병렬체의 시스템)-(인슐레이트되는
영역)-(제3프로모터-제3병렬체의 시스템)-(인슐레이트되는
영역)...제n프로모터-제n병렬체의 시스템)인 것이 바람직하다.

[1368] 도 28은 도 29의 면역원성 병렬시스템을 도 28은 (제1프로모터와 제1병렬체로
이루어진 내부담지시스템), (제2프로모터와 제1표면개시체 및 제1융합부,
그리고 제2병렬체로 이루어진 융합디스플레이시스템), (제3프로모터와
제2표면개시체 및 제2융합부, 그리고 제3병렬체로 이루어진
융합디스플레이시스템), (선택적 프로모터와 선택적요소로 이루어진 선택적
구성)의 염기서열을 포함하는, 도 29의 면역원성 시스템을 제조하기 위한
면역원성 병렬시스템 제조합발현벡터의 예시이다.

[1369]

[1370] 면역원성포자시스템의 제조 방법

[1371] 본 출원의 일 예는 백신의 면역원성시스템으로서 면역원성 포자시스템을
제조하는 방법이다.

[1372]

[1373] - 면역원성포자시스템구성요소의 제조 방법

[1374] "면역원성포자시스템구성요소(immunogenic spore system component)"는
면역원성포자시스템을 이루는 구성요소로서 포자시스템구조체, 면역원성물질,
포자표면개시체, 포자융합체 등을 의미한다.

[1375] 면역원성포자시스템의 제조 방법으로, 면역원성포자시스템구성요소를 각각
먼저 제조하고, 이들을 면역원성포자시스템으로 사후에 조합하는 방법인 경우,
면역원성포자시스템구성요소의 제조가 필수적이다.

[1376]

[1377] - 포자시스템구조체의 제조 방법

[1378] 일 구체예로서 포자시스템구조체를 제조하는 방법을 제공한다.

[1379] 포자시스템 구조체가 포자인 경우 계대배양을 통해 제조할 수 있다.

- [1380] 포자시스템 구조체가 포자인 경우 유전적 제조방법으로 제조할 수 있다. 포자시스템 구조체의 유전적 제조방법은 아래 면역원성 포자시스템구성요소의 유전적 제조방법에 기재되어 있다.
- [1381] 포자가 포자성 박테리아의 포자인 경우 포자의 제조 방법은 포자의 형성을 유도하는 단계를 포함할 수 있다. 포자성 박테리아의 포자는 박테리아의 생존이 어려운 조건에서만 형성되므로 별도의 포자 형성 유도 단계가 필요할 수 있다.
- [1382] 이 때, 포자 형성 유도 단계는 예를 들어, 쉐이퍼 배양액(Schaeffer's sporulation media)으로 배양하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 쉐이퍼 배양액의 조성은 예를 들어, 2 내지 20g/L의 Difco nutrient broth를 포함할 수 있다. 이 때 본 출원에서 바람직한 Difco nutrient broth의 조성(농도)은 7g/L일 수 있다. 통상적인 배양액은 Difco nutrient broth의 농도는 더 높은 경우가 많다.
- [1383] 일 실시예에서, 쉐이퍼 배양액의 조성은 7g/L Difco nutrient broth, 0.25g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1g/L KCl을 사용하였다. 포자 형성 유도 단계는 배양이 끝난 후 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10^{-3}M , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 10^{-2}M , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1M 용액 1ml를 첨가하는 단계를 포함할 수 있다.
- [1384] 포자의 제조 방법은 포자 비활성화 단계를 포함할 수 있다.
- [1385] 포자성 박테리아의 포자는 생존이 어려운 조건이 사라지면 다시 박테리아화 해버리므로 안정성 있는 포자 시스템을 형성하는 데 장애가 된다. 포자 비활성화 단계는 이러한 장애를 해결하고 포자의 형태를 유지하기 위한 방법이 될 수 있다.
- [1386] 포자 비활성화 단계는 물리적인 방법일 수 있다.
- [1387] 이 때 물리적인 방법은 예를 들어, 열을 가하여 비활성화하는 것일 수 있다. 예를 들어, 비활성화하기 위한 온도는 40 내지 300°C일 수 있다. 일 실시예에서, 바람직한 비활성화 온도는 120°C이다.
- [1388] 이 때, 비활성화하는 시간은 예를 들어, 5 내지 60분일 수 있다. 일 실시예에서, 바람직한 비활성화 시간은 15분이다.
- [1389] 포자 비활성화 단계는 화학적인 방법일 수 있다.
- [1390] 이 때 화학적인 방법은 공지의 방법을 사용할 수 있다. 예를 들어, 화학적인 방법은 pH 조건을 변경하는 방법일 수 있다. 또한 화학적인 방법은 특정한 화학물질을 사용하는 방법일 수 있다.
- [1391] 포자 비활성화 단계는 유전학적인 방법일 수 있다.
- [1392] 이 때 유전학적인 방법은 공지의 방법을 사용할 수 있다.
- [1393] 전포자시스템 구조체를 제작하고자 하는 경우, 포자의 비활성화 단계는 불필요할 수 있다.
- [1394] 포자시스템 구조체가 포자유사입자인 경우 제조 방법은 포자유사입자핵을 제조하는 단계와 포자유사입자핵에 포자유사막을 도포하는 단계를 포함할 수 있다. 이 때 포자유사입자핵은 통상의 물리/화학적 방법으로 제조할 수 있다. 또한 포자유사막은 인지질용액에 포자유사입자핵을 넣어 항온에 방치하여

도포할 수 있다.

- [1395] 포자유사입자의 제조 방법은 유전적 제조 방법을 포함할 수 있다. 이 때 포자유사입자의 제조 방법은 구성요소목적염기서열을 포자 외막 단백질로 하는 면역원성시스템구성요소의 유전적 제조 방법일 수 있다.
- [1396]
- [1397] - 면역원성 포자시스템구성요소의 유전적 제조방법
- [1398] 일 구체예로서 면역원성포자시스템은 면역원성포자시스템구성요소를 유전적 제조방법을 통해 제조한 방법을 제공한다.
- [1399] 유전적 제조방법은 상기 면역원성시스템구성요소의 유전적 제조방법을 포괄한다.
- [1400] 구성요소제조합염기서열은 면역원성포자시스템구성요소이다.
- [1401] 제조합시스템구성요소가 포자인 경우, 포자의 유전적 제조방법은 위에서 설명한 유전적 제조방법을 통해 포자를 수득하는 단계에 더하여 상기 포자 형성 유도 단계 또는 포자 비활성화 단계를 포함할 수 있다.
- [1402]
- [1403] - 면역원성포자시스템구성요소의 제조합발현벡터
- [1404] 면역원성포자시스템구성요소의 유전적 제조방법의 일 구체예는 구성요소제조합발현벡터를 제조한 뒤 구성요소 배양숙주세포를 형질전환하는 것이다.
- [1405] 면역원성포자시스템구성요소의 제조합발현벡터는 구성요소제조합발현벡터를 포괄한다. 구성요소발현목적염기서열은 면역원성포자시스템구성요소이다.
- [1406]
- [1407] - 면역원성포자시스템의 유전적 제조방법
- [1408] "포자시스템목적염기서열(spore system target nucleotide sequence)"은 포자시스템제조합염기서열에 포함시키려하는 면역원성시스템구성요소의 염기서열을 의미한다.
- [1409] "포자제조합시스템(spore recombinant system)"은 유전적 제조 방법에서 최종적으로 제조하고자 하는 일체의 면역원성포자시스템을 의미한다.
- [1410] "포자시스템제조합염기서열(spore system recombinant nucleotide sequence)"은 포자제조합시스템을 암호화하는 염기서열을 의미한다.
- [1411] "포자시스템제조합 벡터(spore system recombinant vector)"는 제조합 벡터의 일 구체예로, 벡터에 연결된 제조합염기서열이 포자시스템제조합염기서열인 것을 의미한다.
- [1412] "포자시스템제조합발현 벡터(spore system recombinant expression vector)"는 포자시스템제조합 벡터의 일 구체예로서, 벡터에 연결된 포자시스템제조합염기서열이 전포자시스템 구조체를 포자제조합시스템으로 발현하는 기능까지 하는 것을 의미한다. 즉 포자시스템제조합발현벡터가

삽입되면 포자제조합시스템의 생성까지 확인할 수 있다. 이러한 발현벡터는 대부분 플라스미드의 형태를 하고 있으나 이에 한정되지 않는다.

[1413] "전포자시스템 구조체(pre-spore system structure)"

포자시스템제조합발현벡터로 형질전환되어 포자제조합시스템으로 발현되는 포자시스템구조체를 의미한다. 이 때 포자시스템구조체는 포자이다.

[1414] 일 구체예로서 면역원성포자시스템은 유전적 제조방법을 통해 제조하는 방법인 것을 제공한다. 생산하고자 하는 제조합시스템은 면역원성포자시스템이며 포자시스템목적염기서열은 면역원성포자시스템구성요소가 된다.

[1415] 면역원성포자시스템의 유전적 제조방법은 예를 들어, 포자시스템목적염기서열을 수득하는 제1단계, 포자시스템목적염기서열을 포함한 포자시스템제조합염기서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 제조하는 제2단계, 포자시스템제조합염기서열을 전포자시스템 구조체에 형질전환하는 제3단계, 형질전환된 전포자시스템 구조체를 배양하는 제4단계, 발현되지 않은 전포자시스템 구조체로부터 성공적으로 발현된 포자제조합시스템을 추출하는 제5단계를 포함할 수 있다.

[1416] 제1단계는 포자시스템목적염기서열을 수득하는 단계이다. 야생 상태의 면역원성포자시스템구성요소의 염기서열은 ncbi의 genbank를 이용하거나 직접 면역원성포자시스템구성요소를 스크리닝하여 수득할 수 있다.

[1417] 또한 포자시스템목적염기서열을 포함한 폴리뉴클레오타이드는 통상의 제조합 DNA 기술로 제조할 수 있다.

[1418] 예를 들어, 상기 폴리뉴클레오타이드는 PCR 클로닝을 통해 제조할 수 있다.

[1419] PCR 클로닝을 위해서 당업자는 적절한 프라이머 설계할 수 있고, 예를 들어, 프라이머는 면역원성포자시스템구성요소의 염기서열의 5' 말단에 존재하는 약 20개 정도의 염기서열, 3' 말단에 존재하는 20개 정도의 염기서열의 올리고뉴클레오타이드일 수 있다.

[1420] 제2단계는 제1단계에서 수득한 포자시스템목적염기서열을 포함하는 포자시스템제조합염기서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 제조하는 단계이다.

[1421] 포자시스템제조합염기서열을 포함한 폴리뉴클레오타이드는 단순히 포자시스템목적염기서열을 포함한 단일 가닥 또는 이중 가닥 DNA이거나 RNA일 수 있다.

[1422] 이 때 폴리뉴클레오타이드의 제조 방법은 포자시스템목적염기서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 리가아제를 통해 연결하는 것일 수 있다.

[1423] 포자시스템제조합염기서열은 발현을 위해 필요한 전포자시스템 구조체, 즉 포자의 프로모터를 포함할 수 있다.

[1424] 포자시스템제조합염기서열을 포함한 폴리뉴클레오타이드는 포자시스템목적염기서열을 삽입한 포자시스템제조합발현벡터일 수 있다. 포자시스템제조합발현벡터에 포자시스템목적염기서열을 삽입하는 방법은

통상의 유전자 재조합 기술을 사용할 수 있다.

- [1425] 제3단계는 제2단계에서 제조한 포자시스템제조합폴리뉴클레오타이드 또는 포자시스템제조합발현벡터로 전포자시스템구조체를 형질전환하는 단계이다.
- [1426] 형질전환은 그 효과에 의해, "일시적 형질전환" 또는 "영구적 형질전환"으로 분류될 수 있다. 본 출원의 일 실시예에서는 일시적 형질전환을 사용하였다
- [1427] 또한 형질전환은 수단에 따라 "반응물에 의한 형질전환", "도구에 의한 형질전환", "바이러스에 의한 형질전환"으로 분류된다. 본 출원의 일 실시예에서는 heat shock transfection법을 활용하였다.
- [1428] 전포자시스템구조체는 상기 포자시스템구조체 중 포자를 의미한다.
- [1429] 제4단계와 제5단계는 상기 형질전환된 전포자시스템구조체를 배양하고 성공적으로 발현된 제조합시스템을 분리하는 단계이다.
- [1430] 배양단계는 통상의 배양조건을 통해 수행될 수 있다.
- [1431] 제5단계는 제조합시스템의 분리 단계에 앞서 상기 포자 형성 유도 단계 또는 포자 비활성화 단계를 포함할 수 있다.
- [1432] 제조합시스템의 분리 단계는 통상의 유전자 재조합 방법에 의한 것일 수 있다.
- [1433]
- [1434] - 포자시스템제조합발현벡터
- [1435] "포자시스템발현조절요소"는 포자시스템제조합발현벡터의 구성으로서 포자시스템발현목적염기서열의 발현을 조절하는 염기서열을 의미한다.
- [1436] "포자시스템발현목적염기서열"은 포자시스템제조합발현벡터의 구성으로서 발현하고자 하는 포자시스템제조합염기서열을 의미한다.
- [1437] 면역원성포자시스템의 유전적 제조방법의 일 구체에는 포자시스템제조합발현벡터를 제조한 뒤 전포자시스템구조체를 형질전환하는 것이다.
- [1438] 포자시스템제조합발현벡터의 형태는 플라스미드일 수 있지만 이에 한정되지는 않는다.
- [1439] 포자시스템제조합발현벡터에 삽입되는 포자시스템제조합염기서열은 포자시스템발현조절요소와 포자시스템발현목적염기서열을 포함 할 수 있다.
- [1440] 포자시스템발현조절요소는 상기 발현조절요소를 포괄한다.
- [1441] 상기 프로모터는 포자의 프로모터일 수 있다.
- [1442] 상기 프로모터는 포자성 미생물의 프로모터일 수 있다. 예를 들어, *Bacillus*의 프로모터일 수 있다.
- [1443] 포자시스템발현목적염기서열은 상기 포자시스템제조합염기서열로서 포자시스템제조합발현벡터에 삽입된 것을 말한다.
- [1444] 포자시스템발현조절요소 및 포자시스템발현목적염기서열은 포자 코돈 최적화된 것이 바람직하다.
- [1445] 포자시스템발현목적염기서열은 상기 면역원성포자시스템이다.
- [1446] 포자시스템발현목적염기서열은 면역원성포자시스템구성요소를 포함한다.

- [1447] 포자시스템발현목적염기서열은 상기 면역원성포자시스템의 유전적 제조방법의 제1단계 및 제2단계를 포함한 단계로 삽입될 수 있다.
- [1448] 포자시스템제조합발현백터를 이용한 방법은 유전적 제작 방법의 일 구체예에 불과하다. 따라서 특별한 언급이 없는한 이하 면역원성포자시스템의 유전적 제조 방법에는 포자시스템제조합발현백터를 사용한 방법이 포함됨이 자명하다.
- [1449]
- [1450] **면역원성 포자내부담지시스템의 제조 방법**
- [1451] 본 출원의 일 예는 백신의 면역원성시스템으로서 면역원성 포자내부담지시스템을 제조하는 방법이다.
- [1452] 면역원성 포자내부담지시스템을 제조하는 방법은, 예를 들어 크게 두 가지를 들 수 있다.
- [1453] 일 방법으로, 먼저 포자담지체와 담지면역원성물질을 각각 제조하여 담지면역원성물질을 담지체에 담지하는 방법이 있다. 이는 각각의 구성요소들을 따로 만드는 단계와 이후에 시스템으로 조합하는 단계를 포함한다.
- [1454] 다른 방법으로, 전체로서 면역원성 포자내부담지시스템을 제조하는 방법이 있다. 이 방법은 각각의 구성요소들을 제조하지 않아도 유전적 제조방법을 통해 포자내부담지시스템이 단계의 구분 없이 일체의 단계로 제조되는 방법이다.
- [1455]
- [1456] - 포자담지체의 제조 방법
- [1457] 일 구체예로서 포자담지체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [1458] 포자담지체를 제조하는 방법은 상기 포자시스템구조체의 제조방법을 포괄한다.
- [1459] 일 실시 형태에서 제조 방법은 내부에 전하를 띄는 포자담지체의 제조 방법일 수 있다. 상기 포자담지체 내부의 전하는 전하를 띄는 물질에 의해 생기는 것일 수 있다. 이 때 전하를 띄는 물질은 외부에서 담지체 내부로 주입될 수 있다. 주입 방법은 미생물학에서 통상적인 방법일 수 있고, 구체적 예로는 마이크로젝션일 수 있다.
- [1460] 또는 전하를 띄는 물질은 유전적 방법에 의한 제조합단백질일 수 있다.
- [1461] 유전적 제조방법은 면역원성포자시스템구성요소의 유전적 제조방법을 포괄한다.
- [1462] 유전적 제조방법에서 포자목적염기서열은 전하를 띄는 물질을 포함한다. 상기 전하를 띄는 물질은 포자내부신호서열을 포함할 수 있다.
"포자내부신호서열(spore internal signal sequence)"은 포자내부단백질에 있는 신호서열로서 단백질을 포자 내부로 인도하는 기능을 하는 단백질 서열을 의미한다. 포자내부신호서열을 전하를 띄는 물질에 포함시키는 방법은, 예를 들어, 포자내부단백질에 위치한 신호서열을 포함한 부위를 수득하는 단계, 포자담지면역원성물질의 염기서열과 함께 삽입하는 단계를 포함할 수 있다.

- [1463] 제3단계는 구성요소제조합폴리뉴클레오타이드 또는 구성요소제조합발현벡터로 포자담지체를 형질전환하는 단계이다.
- [1464] 다른 실시 형태에서 제조 방법은 외부에 전하를 띄는 포자담지체의 제조 방법일 수 있다.
- [1465] 포자담지체 외부의 전하는 전하를 띄는 물질에 의해 생기는 것일 수 있다. 이 때 전하를 띄는 물질은 포자담지체에 흡착될 수 있다. 흡착 방법은 포자담지체를 전하를 띄는 물질과 혼합하여 항온상태에서 방치하는 것일 수 있다.
- [1466]
- [1467] - 포자담지면역원성물질의 제조 방법
- [1468] 일 구체예로서 포자담지면역원성물질을 제조하는 방법을 제공한다.
- [1469] 포자담지면역원성물질은 포자내부신호서열을 포함할 수 있다.
- [1470] 포자담지면역원성물질을 제조하는 방법은 상기 면역원성물질의 제조 방법을 포괄한다.
- [1471] 포자담지면역원성물질을 제조하는 방법은 상기 면역원성물질의 유전적 제조방법일 수 있다.
- [1472] 유전적 제조방법에서 면역원성목적염기서열은 포자내부신호서열을 포함할 수 있다.
- [1473] 또한 상기 제조 방법은 전하를 띄는 포자담지면역원성물질의 제조 방법일 수 있다.
- [1474] 포자담지면역원성물질의 전하는 전하를 띄는 물질에 의한 것일 수 있다. 상기 전하를 띄는 물질은 포자담지면역원성물질에 흡착될 수 있다. 흡착 방법은 포자담지면역원성물질을 전하를 띄는 물질과 혼합하여 항온상태에서 방치하는 것일 수 있다.
- [1475]
- [1476] - 포자담지면역원성물질의 담지 방법
- [1477] 일 구체예로서 포자담지면역원성물질을 포자담지체에 담지하는 방법을 제공한다.
- [1478] 포자담지면역원성물질은 외부에서 포자담지체 내부로 주입될 수 있다. 이 때 주입 방법은 미생물학에서 통상적인 방법일 수 있고, 구체적 예로는 마이크로פק션일 수 있다.
- [1479] 포자담지면역원성물질이 포자내부신호서열을 포함한다면 포자담지면역원성물질은 포자내부신호서열에 의해 포자담지체에 담지될 수 있다.
- [1480]
- [1481] - 면역원성포자내부담지시스템의 유전적 제조 방법
- [1482] 일 구체예로서 면역원성 포자내부담지시스템을 유전적 제조하는 방법을 제공한다.
- [1483] 면역원성 포자내부담지시스템의 유전적 제조방법은 상기

면역원성포자시스템의 유전적 제조방법을 포괄한다.

포자시스템목적염기서열은 포자담지면역원성물질을 포함한다.

[1484] 일 실시양태에서 포자시스템목적염기서열은 포자담지면역원성물질만을 포함할 수 있다.

[1485] 이 때, 제1단계는 포자담지면역원성물질의 염기서열을 수득하는 단계이다. 제2단계는 포자담지면역원성물질의 염기서열을 삽입하여 포자시스템제조합염기서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 제조하는 단계이다. 이 때 포자담지면역원성물질의 염기서열은 포자내부신호서열과 함께 삽입될 수 있다.

[1486] 다른 실시양태에서 포자시스템목적염기서열은 전하를 띄는 물질을 포함할 수 있다.

[1487] 이 때 제1단계는 포자담지면역원성물질, 전하를 띄는 물질의 염기서열을 수득하는 단계이다. 제2단계는 포자담지면역원성물질의 염기서열, 전하를 띄는 물질의 염기서열을 삽입하여 포자시스템제조합염기서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 제조하는 단계이다. 각각의 물질은 발현에 방해가 되지 않게 별도의 제한효소 사이트에 삽입하는 것이 바람직하다. 포자담지면역원성물질의 염기서열은 포자내부신호서열과 함께 삽입될 수 있다. 또한 전하를 띄는 물질의 염기서열은 포자내부신호서열과 함께 삽입될 수 있다.

[1488]

[1489] - 면역원성포자내부담지시스템제조합발현벡터

[1490] 일 구체예로서 면역원성포자내부담지시스템을 유전적 제조하기 위한 면역원성포자내부담지시스템제조합발현벡터를 제공한다.

[1491] 면역원성포자내부담지시스템제조합발현벡터는 포자시스템제조합발현벡터를 포괄한다. 상기 '면역원성 포자내부담지시스템의 유전적 제조 방법'에 따라 만들어지는 포자시스템제조합발현벡터를 포함한다.

[1492] 일 실시양태에서 포자시스템발현목적염기서열은 포자담지면역원성물질의 염기서열을 포함할 수 있다.

[1493] 제1구성으로서 포자시스템발현조절요소는 포자내부단백질의 프로모터일 수 있다.

[1494] 상기 프로모터는 야생 상태의 프로모터일 수 있다.

[1495] 상기 프로모터는 야생 상태의 프로모터를 일부 부위에서 변형한 것일 수 있다. 이 때 변형된 프로모터는 개시효율이 향상된 것일 수 있다.

[1496] 상기 프로모터는 포자내부신호서열을 수득할 때 사용한 포자내부단백질의 프로모터일 수 있다.

[1497] 다른 실시 양태에서 포자시스템발현조절요소는 타단백질의 프로모터일 수 있다.

[1498] 상기 프로모터는 포자시스템발현목적염기서열의 과발현 효과를 가진 것일 수 있다.

- [1499] 예를 들어, 상기 프로모터는 PCry일 수 있다. 상기 프로모터는 PSpac일 수 있다.
- [1500] 제2구성으로서 포자시스템발현목적염기서열은 포자담지면역원성물질의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [1501] 포자담지면역원성물질의 염기서열은 포자내부신호서열을 포함할 수 있다. 이 때 포자내부신호서열은 5' 말단에 위치하는 것이 바람직하다.
- [1502] 전체적인 구성의 배열은 프로모터-포자담지면역원성물질인 것이 바람직하다. 도 30은 프로모터와 포자담지면역원성물질의 염기서열을 포함하는 면역원성포자내부담지시스템제조합발현벡터의 예시이다.
- [1503]
- [1504] 다른 실시양태에서 포자시스템발현목적염기서열은 포자담지면역원성물질과 전하를 띄는 물질의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [1505] 제1구성으로서 포자시스템발현조절요소는 포자내부단백질의 프로모터일 수 있다. 포자내부단백질의 프로모터는 상기 설명한 프로모터를 포괄한다.
- [1506] 제2구성으로서 포자시스템발현목적염기서열은 포자담지면역원성물질의 염기서열과 전하를 띄는 물질의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [1507] 포자담지면역원성물질의 염기서열은 포자내부신호서열을 포함할 수 있다. 상기 포자내부신호서열은 포자담지면역원성물질의 염기서열의 5' 말단에 위치하는 것이 바람직하다.
- [1508] 전하를 띄는 물질의 염기서열은 포자내부신호서열을 포함할 수 있다. 상기 포자내부신호서열은 전하를 띄는 물질의 염기서열의 5' 말단에 위치하는 것이 바람직하다.
- [1509] 전체적인 구성의 배열은 상호 간 인슐레이트된 위치에 프로모터-포자담지면역원성물질, 프로모터-전하를 띄는 물질이 위치한 것이 바람직하다. 도 31은 제1프로모터와 포자담지면역원성물질, 제2프로모터와 전하를 띄는 물질의 염기서열을 포함하는 면역원성포자내부담지시스템제조합발현벡터의 예시이다.
- [1510]
- [1511] **면역원성 포자융합디스플레이시스템의 제조 방법**
- [1512] 본 출원의 일 예는 백신의 면역원성시스템으로서 면역원성 포자융합디스플레이시스템을 제조하는 방법이다.
- [1513] 면역원성 포자융합디스플레이시스템을 제조하는 방법은 예를 들어, 크게 두 가지를 들 수 있다.
- [1514] 일 방법으로, 먼저 포자융합디스플레이체와 포자융합체를 각각 제조하여 포자융합체를 포자융합디스플레이체에 결부하는 방법이 있다.
- [1515] 다른 방법으로, 전체로서 면역원성 포자융합디스플레이시스템을 제조하는 방법이 있다. 이 방법은 각각의 구성요소들을 제조하지 않아도 유전적 제조방법을 통해 포자융합디스플레이시스템이 단계의 구분 없이 일체의 단계로 제조되는 방법이다.

[1516]

[1517] - 포자융합디스플레이체의 제조 방법

[1518] 일 구체예로서 포자융합디스플레이체를 제조하는 방법을 제공한다.

[1519] 포자융합디스플레이체를 제조하는 방법은 상기 포자시스템구조체의 제조방법을 포괄한다.

[1520] 일 실시 형태에서 제조방법은 포자융합디스플레이체 외부에 전하를 띄는 포자융합디스플레이체의 제조 방법일 수 있다. 상기 포자융합디스플레이체 외부의 전하는 포자융합디스플레이체 외부의 전하를 띄는 물질에 의해 생기는 것일 수 있다. 이 때 전하를 띄는 물질은 융합디스플레이체에 흡착될 수 있다. 흡착 방법은 융합디스플레이체를 전하를 띄는 물질의 용액에 넣고 항온상태에서 방치하는 것일 수 있다.

[1521]

[1522] - 포자융합체의 제조 방법

[1523] 일 구체예로서 포자융합체를 제조하는 방법을 제공한다.

[1524] 포자융합체는 포자융합면역원성물질과 포자표면개시체가 융합된 것이다. 상기 포자표면개시체는 포자외부신호서열을 포함할 수 있다.

[1525] 포자융합체를 제조하는 방법은 상기 면역원성포자시스템구성요소의 제조방법을 포괄한다.

[1526] 일 실시양태로 포자융합체를 제조하는 방법은 예를 들어, 상기 면역원성포자시스템구성요소의 제조방법으로 포자표면개시체와 포자융합면역원성물질을 제조하는 단계; 및 포자표면개시체와 포자융합면역원성물질을 커플링결합하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 커플링결합 단계는 단백질의 교차 결합(cross-linking)에 통상적으로 사용되는 방법을 사용할 수 있다.

[1527] 포자표면개시체의 제조 방법은 유전적 제조방법일 수 있다.

[1528] 포자융합면역원성물질의 제조 방법은 유전적 제조방법일 수 있다.

[1529] 포자융합면역원성물질의 제조 방법은 상기 면역원성물질의 유전적 제조방법을 포괄한다.

[1530] 다른 실시양태로 포자융합체를 제조하는 방법은 유전적 제조방법일 수 있다.

[1531] 상기 유전적 제조방법은 면역원성포자시스템구성요소의 유전적 제조방법을 포괄한다. 상기 유전적 제조방법에서 포자목적염기서열은 포자융합면역원성물질과 포자표면개시체를 포함한다. 이 때 포자표면개시체는 포자외부신호서열을 포함할 수 있다.

[1532] 또한 상기 포자목적염기서열은 포자융합면역원성물질, 포자표면개시체 및 포자융합부를 포함할 수 있다.

[1533]

[1534] - 포자융합체의 포자융합디스플레이체 결부 방법

[1535] 일 구체예로서 포자융합체를 포자융합디스플레이체에 결부하는 방법을

제공한다.

[1536] 상기 결부 방법은 포자융합체를 포자융합디스플레이체와 동일한 용액에서 항온상태에서 방치하는 것일 수 있다.

[1537] 결부는 흡착, 정전기적 인력, 소수성 상호작용에 의해 생기는 것일 수 있다.

[1538] 예를 들어, 포자융합체의 포자표면개시체가 포자외부신호서열을 포함한다면 포자융합체는 포자외부신호서열에 의해 포자융합디스플레이체에 결부될 수 있다.

[1539]

[1540] - 면역원성 포자융합디스플레이시스템의 유전적 제조 방법

[1541] 일 구체예로서 면역원성 포자융합디스플레이시스템을 유전적 제조하는 방법을 제공한다.

[1542] 면역원성 포자융합디스플레이시스템의 유전적 제조방법은 상기 면역원성포자시스템의 유전적 제조방법을 포괄한다.

포자시스템목적염기서열은 포자표면개시체, 포자융합면역원성물질을 포함한다. 또한, 포자시스템목적염기서열은 포자융합부를 포함할 수 있다. 이 때, 포자표면개시체가 이중포자표면개시체로 치환될 수 있음은 자명하다.

[1543] 일 실시양태에서 포자표면개시체는 포자외부단백질일 수 있다.

[1544] 이 때 제1단계는 포자외부단백질, 포자융합면역원성물질의 염기서열을 수득하는 단계이다. 상기 수득한 포자외부단백질은 예를 들어, CotB, CotC, CotE, CotG 및 CotG 중 어느 하나이상일 수 있으며 각각의 염기서열은 공지된 것을 이용할 수 있다.

[1545] 예를 들어, CotG의 서열을 서열번호 15의 서열을 사용했다.

[1546] 예를 들어, CotB의 서열을 서열번호 49의 서열을 사용했다.

[1547] 예를 들어, CotC의 서열을 서열번호 50의 서열을 사용했다.

[1548] 예를 들어, 상기 수득한 포자외부단백질은 프로모터를 추가적으로 이용할 수 있다. 상기 프로모터는 상기 포자외부단백질과 동일한 또는 상이한 프로모터를 사용할 수 있다.

[1549]

[1550] 제2단계는 포자외부단백질의 염기서열, 포자융합면역원성물질의 염기서열을 삽입하여 시스템제조합염기서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 제조하는 단계이다.

[1551] 다른 실시양태에서 포자표면개시체는 포자외부상동성단백질일 수 있다.

[1552] 일 구체예에서 포자외부상동성단백질은 포자외부신호서열을 포함할 수 있다.

[1553] 이 때 제1단계는 포자외부단백질의 포자외부신호서열을 포함한 일부분, 포자융합면역원성물질의 염기서열을 수득하는 단계이다. 수득한 포자외부단백질의 포자외부신호서열을 포함한 일부분의 염기서열은 150 내지 450bp의 크기일 수 있다. 이 때 통상의 유전자 재조합 방법으로 신호서열제한효소의 작용 부위를 제거할 수 있다.

- [1554] 제2단계는 포자외부단백질의 포자외부신호서열을 포함한 일부분의 염기서열, 포자융합면역원성물질의 염기서열을 삽입하여 시스템제조합염기서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 제조하는 단계이다.
- [1555] 다른 구체예에서 포자외부상동성단백질은 포자외부위치화모티프를 포함할 수 있다.
- [1556] 이 때 제1단계는 포자외부위치화모티프를 포함한 일부분, 포자융합면역원성물질의 염기서열을 수득하는 단계이다.
- [1557] 제2단계는 포자외부위치화모티프를 포함한 일부분의 염기서열, 포자융합면역원성물질의 염기서열을 삽입하여 시스템제조합염기서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 제조하는 단계이다.
- [1558] 다른 구체예에서 포자외부상동성단백질은 동일한 염기서열이 반복된 구조일 수 있다.
- [1559] 상기 동일한 염기서열은 포자외부단백질의 염기서열일 수 있다.
- [1560] 이 때 제1단계는 포자외부단백질, 포자융합면역원성물질의 염기서열을 수득하는 단계이다.
- [1561] 제2단계는 포자외부단백질의 염기서열을 반복하여 삽입한 후 포자융합면역원성물질의 염기서열을 삽입하여 시스템제조합염기서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 제조하는 단계이다.
- [1562] 상기 동일한 염기서열은 포자외부위치화모티프를 포함한 일부분의 염기서열일 수 있다.
- [1563] 이 때 제1단계는 포자외부위치화모티프를 포함한 일부분, 포자융합면역원성물질의 염기서열을 수득하는 단계이다.
- [1564] 제2단계는 포자외부위치화모티프를 포함한 일부분의 염기서열을 반복하여 삽입한 후 포자융합면역원성물질의 염기서열을 삽입하여 시스템제조합염기서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 제조하는 단계이다.
- [1565] 다른 실시양태에서 포자표면개시체는 포자외부상동성부가단백질일 수 있다.
- [1566] 일 구체예에서 포자외부상동성부가단백질은 특정 포자외부단백질 외에 동일한 포자의 다른 포자외부단백질과도 상동성이 있는 것일 수 있다.
- [1567] 상기 포자외부상동성부가단백질은 타단백질의 포자외부신호서열을 포함할 수 있다.
- [1568] 이 때 제1단계는 타단백질의 포자외부신호서열을 포함한 일부분, 포자외부상동성부위, 포자융합면역원성물질의 염기서열을 수득하는 단계이다.
- [1569] 제2단계는 타단백질의 포자외부신호서열을 포함한 일부분의 염기서열, 포자외부상동성부위의 염기서열을 순서에 상관없이 임의의 갯수만큼 삽입하고 포자융합면역원성물질의 염기서열을 삽입하여 시스템제조합염기서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 제조하는 단계이다.
- [1570] 상기 포자외부상동성부가단백질은 타 포자외부단백질의 포자외부위치화모티프를 포함할 수 있다.

- [1571] 이 때 제1단계는 타단백질의 포자외부위치화모티프를 포함한 일부분, 포자외부상동성부위, 포자융합면역원성물질의 염기서열을 수득하는 단계이다.
- [1572] 또한 제2단계는 타단백질의 포자외부위치화모티프를 포함한 일부분의 염기서열, 포자외부상동성부위의 염기서열을 순서에 상관없이 임의의 갯수만큼 삽입하고 포자융합면역원성물질의 염기서열을 삽입하여 시스템제조합염기서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 제조하는 단계이다.
- [1573] 다른 구체예에서 포자외부상동성부가단백질은 포자외부단백질과 상동성이 있는 부위와 포자외래부를 포함할 수 있다..
- [1574] 예시적인 한 양태에서, 포자외래부는 이중포자외부단백질의 포자외부신호서열을 포함할 수 있다.
- [1575] 이 때 제1단계는 이중포자외부단백질의 포자외부신호서열을 포함한 일부분, 포자외부상동성부위, 포자융합면역원성물질의 염기서열을 수득하는 단계이다.
- [1576] 또한 제2단계는 이중포자외부단백질의 포자외부신호서열을 포함한 일부분의 염기서열, 포자외부상동성부위의 염기서열을 순서에 상관없이 임의의 갯수만큼 삽입하고 포자융합면역원성물질의 염기서열을 삽입하여 시스템제조합염기서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 제조하는 단계이다.
- [1577] 예시적인 다른 양태에서, 포자외래부는 이중포자외부단백질의 포자외부위치화모티프를 포함할 수 있다.
- [1578] 이 때 제1단계는 이중포자외부단백질의 포자외부위치화모티프를 포함한 일부분, 포자외부상동성부위, 포자융합면역원성물질의 염기서열을 수득하는 단계이다.
- [1579] 또한 제2단계는 이중포자외부단백질의 포자외부위치화모티프를 포함한 일부분의 염기서열, 포자외부상동성부위의 염기서열을 순서에 상관없이 임의의 갯수만큼 삽입하고 포자융합면역원성물질의 염기서열을 삽입하여 시스템제조합염기서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 제조하는 단계이다.
- [1580] 예시적인 또 다른 양태에서, 포자외래부는 특정 부호의 전하를 뺄 수 있다.
- [1581] 이 때 제1단계는 포자외부상동성부위, 포자융합면역원성물질의 염기서열을 수득하고 특정 부호의 전하를 띠는 포자외래부의 염기서열을 확보하는 단계이다. 특정 부호의 전하를 띠는 포자외래부의 염기서열은 야생 상태의 단백질을 수득하여 확보할 수 있으나, 양전하를 띠는 단백질을 설계 주문하여 확보할 수도 있다. 예를 들어, *B. subtilis*의 CotG는 특히 양전하 아미노산(아르기닌/히스티딘/리신)의 비율이 높으며, 쉽게 서열정보를 얻을 수 있고, 쉽게 확보할 수 있으므로 수득 대상으로 고려할만하다.
- [1582]
- [1583] 또한 제2단계는 특정 부호의 전하를 띠는 포자외래부의 염기서열, 포자외부상동성부위의 염기서열을 순서에 상관없이 임의의 갯수만큼 삽입하고 포자융합면역원성물질의 염기서열을 삽입하여 시스템제조합염기서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 제조하는 단계이다. 이 때 포자외래부의 염기서열의

삽입 순서를 포자외부상동성부위와 포자융합면역원성물질의 사이로 하여 포자융합체가 포자외부에 결부되는 것을 방해하지 않도록 하는 것이 바람직하다.

[1584]

[1585] - 면역원성 포자융합디스플레이시스템제조합발현벡터

[1586] 일 구체예로서 면역원성융합디스플레이시스템을 유전적 제조하기 위한 면역원성포자융합디스플레이시스템제조합발현벡터를 제공한다.

[1587] 이 때 면역원성융합디스플레이시스템제조합발현벡터는 포자시스템제조합발현벡터를 포괄한다.

[1588] 편의 상 상기 '면역원성 포자융합디스플레이시스템의 유전적 제조 방법'의 흐름에 따라 만들어지는 포자시스템제조합발현벡터를 제공한다.

[1589] 편의 상 생략했으나, 여기서 언급되는 모든 포자융합디스플레이제조합발현벡터의 포자표면개시체와 포자융합면역원성물질 사이에는 포자융합부가 포함될 수 있다.

[1590] 이 때 포자표면개시체가 이중포자표면개시체로 치환될 수 있음은 자명하다.

[1591]

[1592] 일 실시양태에서 포자시스템발현목적염기서열은 포자외부단백질과 포자융합면역원성물질의 염기서열을 포함할 수 있다.

[1593] 제1구성으로서 포자시스템발현조절요소는 포자외부단백질의 프로모터일 수 있다.

[1594] 이 때 상기 프로모터는 야생 상태의 프로모터일 수 있다.

[1595] 또한 상기 프로모터는 야생 상태의 프로모터를 일부 부위에서 변형한 것일 수 있다. 이 때 변형된 프로모터는 개시효율이 향상된 것일 수 있다.

[1596] 또는 포자시스템발현조절요소는 타단백질의 프로모터일 수 있다.

[1597] 예를 들어, 상기 프로모터는 포자외부단백질이 CotG가 아닌 경우에도 PCotG일 수 있다.

[1598] 예를 들어, 상기 프로모터는 포자외부단백질이 CotB가 아닌 경우에도 PCotB일 수 있다.

[1599] 예를 들어, 상기 프로모터는 포자외부단백질이 CotC가 아닌 경우에도 PCotC일 수 있다.

[1600] 제2구성으로서 포자시스템발현목적염기서열은 포자외부단백질과 포자융합면역원성물질의 염기서열을 포함할 수 있다.

[1601] 전체적인 구성의 배열은 프로모터-포자외부단백질-포자융합면역원성물질인 것이 바람직하다.

[1602] 다른 실시양태에서 포자시스템발현목적염기서열은 포자외부상동성단백질과 포자융합면역원성물질의 염기서열을 포함할 수 있다.

[1603] 일 구체예에서 포자외부상동성단백질은 포자외부단백질의 단백질 서열 중 포자외부신호서열을 포함한 일부분일 수 있다.

- [1604] 제1구성으로서 포자시스템발현조절요소는 포자외부단백질의 프로모터일 수 있다.
- [1605] 이 때 포자외부단백질의 프로모터는 상기 양태의 프로모터를 포괄한다. 이하 "상기 양태 프로모터"는 모두 동일한 프로모터를 포괄한다는 것을 의미한다.
- [1606] 전체적인 구성의 배열은 프로모터-포자외부단백질의 포자외부신호서열을 포함한 일부분의 염기서열-포자융합면역원성물질인 것이 바람직하다.
- [1607] 다른 구체예에서 포자외부상동성단백질은 포자외부위치화모티프를 포함한 일부분일 수 있다.
- [1608] 제1구성으로서 포자시스템발현조절요소는 포자외부단백질의 프로모터일 수 있다.
- [1609] 이 때 포자외부단백질의 프로모터는 상기 양태의 프로모터를 포괄한다.
- [1610] 제2구성으로서 포자시스템발현목적염기서열은 포자외부위치화모티프를 포함한 일부분의 염기서열과 포자융합면역원성물질의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [1611] 전체적인 구성의 배열은 프로모터-포자외부위치화모티프를 포함한 일부분의 염기서열-포자융합면역원성물질인 것이 바람직하다.
- [1612] 도 32는 프로모터와 포자표면개시체, 그리고 포자융합면역원성물질의 염기서열을 포함하는 포자융합디스플레이제조합발현백터의 예시이다.
- [1613]
- [1614] 다른 구체예에서 포자외부상동성단백질은 동일한 염기서열이 반복된 구조일 수 있다.
- [1615] 예시적인 한 양태에서, 동일한 염기서열은 포자외부단백질의 염기서열일 수 있다.
- [1616] 제1구성으로서 포자시스템발현조절요소는 포자외부단백질의 프로모터일 수 있다.
- [1617] 이 때 포자외부단백질의 프로모터는 상기 양태의 프로모터를 포괄한다.
- [1618] 제2구성으로서 포자시스템발현목적염기서열은 복수의 포자외부단백질의 염기서열과 포자융합면역원성물질의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [1619] 전체적인 구성의 배열은 프로모터-(포자외부단백질의 염기서열)_n-포자융합면역원성물질인 것이 바람직하다.
- [1620] 예시적인 다른 양태에서, 동일한 염기서열은 포자외부위치화모티프를 포함한 일부분의 염기서열일 수 있다.
- [1621] 제1구성으로서 포자시스템발현조절요소는 포자외부단백질의 프로모터일 수 있다.
- [1622] 이 때 포자외부단백질의 프로모터는 상기 양태의 프로모터를 포괄한다.
- [1623] 제2구성으로서 포자시스템발현목적염기서열은 복수의 포자외부위치화모티프를 포함한 일부분의 염기서열과 포자융합면역원성물질의 염기서열을 포함할 수 있다.

- [1624] 전체적인 구성의 배열은 프로모터-(포자외부위치화모티프를 포함한 일부분의 염기서열) n -포자융합면역원성물질인 것이 바람직하다.
- [1625] 도 33은 프로모터와, 서로 동일한 포자외부상동성부위의 염기서열이 세 번 반복된 것, 그리고 포자융합면역원성물질의 염기서열을 포함하는 포자융합디스플레이제조합발현벡터의 예시이다.
- [1626]
- [1627] 다른 실시양태에서 포자시스템발현목적염기서열은 포자외부상동성부가단백질, 포자융합면역원성물질의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [1628] 일 구체예에서 포자외부상동성부가단백질은 특정 포자외부단백질 외에 동일한 포자의 다른 포자외부단백질과도 상동성이 있는 것일 수 있다.
- [1629] 예시적인 한 양태에서, 포자외부상동성부가단백질은 타단백질의 포자외부신호서열을 포함할 수 있다.
- [1630] 제1구성으로서 포자시스템발현조절요소는 포자외부단백질의 프로모터일 수 있다.
- [1631] 이 때 포자외부단백질의 프로모터는 상기 양태의 프로모터를 포괄한다.
- [1632] 제2구성으로서 포자시스템발현목적염기서열은 타단백질의 포자외부신호서열을 포함한 일부분, 포자외부상동성부위, 포자융합면역원성물질의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [1633] 전체적인 구성의 배열은 프로모터-(타단백질의 포자외부신호서열을 포함한 일부분, 포자외부상동성부위) m,n -포자융합면역원성물질인 것이 바람직하다. m, n 은 타단백질의 포자외부신호서열을 포함한 일부분, 포자외부상동성부위가 포함된 갯수를 말한다.
- [1634] 도 34는 프로모터와, 타단백질 포자외부 신호서열, 포자외부상동성부위를 포함하는 포자외부상동성부가단백질, 그리고 포자융합면역원성물질의 염기서열을 포함하는 포자융합디스플레이제조합발현벡터의 예시이다.
- [1635] 예시적인 다른 양태에서, 포자외부상동성부가단백질은 타 포자외부단백질의 포자외부위치화모티프를 포함할 수 있다.
- [1636] 제1구성으로서 포자시스템발현조절요소는 포자외부단백질의 프로모터일 수 있다.
- [1637] 이 때 포자외부단백질의 프로모터는 상기 양태의 프로모터를 포괄한다.
- [1638] 제2구성으로서 포자시스템발현목적염기서열은 타단백질의 포자외부위치화모티프를 포함한 일부분, 포자외부상동성부위, 포자융합면역원성물질의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [1639] 전체적인 구성의 배열은 프로모터-(타단백질의 포자외부위치화모티프를 포함한 일부분, 포자외부상동성부위) m,n -포자융합면역원성물질인 것이 바람직하다. m, n 은 타단백질의 포자외부신호서열을 포함한 일부분, 포자외부상동성부위가 포함된 갯수를 말한다.

- [1640] 도 35는 프로모터와, 타단백질 포자외부위치화모티프, 포자외부상동성부위를 포함하는 포자외부상동성부가단백질, 그리고 포자융합면역원성물질의 염기서열을 포함하는 포자융합디스플레이제조합발현백터의 예시이다.
- [1641] 다른 구체예에서 포자외부상동성부가단백질은 포자외부단백질과 상동성이 있는 부위와 포자외래부를 포함할 수 있다.
- [1642] 예시적인 한 양태에서, 포자외래부는 이중포자외부단백질의 포자외부신호서열을 포함할 수 있다.
- [1643] 제1구성으로서 포자시스템발현조절요소는 포자외부단백질의 프로모터일 수 있다.
- [1644] 이 때 포자외부단백질의 프로모터는 상기 양태의 프로모터를 포괄한다.
- [1645] 제2구성으로서 포자시스템발현목적염기서열은 이중포자외부단백질의 포자외부신호서열을 포함한 일부분, 포자외부상동성부위, 포자융합면역원성물질의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [1646] 전체적인 구성의 배열은 프로모터-(이중포자외부단백질의 포자외부신호서열을 포함한 일부분, 포자외부상동성부위)m,n-포자융합면역원성물질인 것이 바람직하다.
- [1647] 예시적인 다른 양태에서, 포자외래부는 이중포자외부단백질의 포자외부위치화모티프를 포함할 수 있다.
- [1648] 제1구성으로서 포자시스템발현조절요소는 포자외부단백질의 프로모터일 수 있다.
- [1649] 이 때 포자외부단백질의 프로모터는 상기 양태의 프로모터를 포괄한다.
- [1650] 제2구성으로서 포자시스템발현목적염기서열은 이중포자외부단백질의 포자외부위치화모티프를 포함한 일부분, 포자외부상동성부위, 포자융합면역원성물질의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [1651] 전체적인 구성의 배열은 프로모터-(이중포자외부단백질의 포자외부위치화모티프를 포함한 일부분, 포자외부상동성부위)m,n-포자융합면역원성물질인 것이 바람직하다.
- [1652] 도 36은 프로모터와, 타단백질 포자외부위치화모티프, 포자외부상동성부위, 이중포자 포자외부위치화모티프를 포함하는 포자외부상동성부가단백질, 그리고 포자융합면역원성물질의 염기서열을 포함하는 포자융합디스플레이제조합발현백터의 예시이다.
- [1653]
- [1654] 예시적인 또 다른 양태에서, 포자외래부는 특정 부호의 전하를 띌 수 있다.
- [1655] 제1구성으로서 포자시스템발현조절요소는 포자외부단백질의 프로모터일 수 있다.
- [1656] 이 때 포자외부단백질의 프로모터는 상기 양태의 프로모터를 포괄한다.
- [1657] 제2구성으로서 포자시스템발현목적염기서열은 특정 부호의 전하를 띠는 포자외래부, 포자외부상동성부위, 포자융합면역원성물질의 염기서열을 포함할

수 있다.

[1658] 전체적인 구성의 배열은 프로모터-(포자외부상동성부위)m-(특정 부호의 전하를 띠는 포자외래부)-포자융합면역원성물질인 것이 바람직하다.

[1659] 도 37은 프로모터와, 포자외부상동성부위, 이중포자표면개시체의 서열, 포자표면개시체의 서열, 특정 부호의 전하를 띠는 외래부를 포함하는 포자외부상동성부가단백질, 그리고 포자융합면역원성물질의 염기서열을 포함하는 포자융합디스플레이제조합발현벡터의 예시이다.

[1660]

[1661] 면역원성 포자커플링디스플레이시스템의 제조 방법

[1662] 본 출원의 일 예는 백신의 면역원성시스템으로서 면역원성 포자커플링디스플레이시스템을 제조하는 방법이다.

[1663] 면역원성 포자커플링디스플레이시스템을 제조하는 방법은 예를 들어, 커플링기를 포함하는 포자커플링디스플레이체와 포자커플링면역원성물질을 각각 제조하는 단계; 및 포자커플링디스플레이체와 포자커플링면역원성물질 사이에 포자커플링결합을 일으키는 단계를 포함한다.

[1664]

[1665] - 포자커플링디스플레이체의 제조 방법

[1666] 일 구체예로서 포자디스플레이체커플링기를 포함하는 포자커플링디스플레이체를 제조하는 방법을 제공한다. 상기 커플링디스플레이체의 제조 방법은 상기 커플링디스플레이체의 제조 방법을 포괄한다..

[1667] - 포자커플링면역원성물질의 제조 방법

[1668] 일 구체예로서 포자면역원성물질커플링기를 포함하는 포자커플링면역원성물질을 제조하는 방법을 제공한다.

[1669] 포자커플링면역원성물질의 제조 방법은 상기 커플링면역원성물질의 제조 방법을 포괄한다.

[1670] 면역원성물질은 상기 면역원성물질의 제조방법에 의해 제조될 수 있다. 상기 면역원성물질은 포자외부신호서열을 포함할 수 있다.

포자커플링면역원성물질이 포자외부신호서열을 포함한다면

포자커플링면역원성물질은 포자외부신호서열에 의해 포자외부로 유도되어 커플링결합을 용이하게 할 수 있다.

[1671] - 커플링결합 단계

[1672] 일 구체예로서 포자커플링디스플레이체와 포자커플링면역원성물질 사이에 포자커플링결합을 일으키는 단계를 제공한다. 상기 포자커플링결합은 통상의 커플링반응 조건에 의해 일어날 수 있다.

[1673]

[1674] 면역원성 포자부착디스플레이시스템의 제조 방법

[1675] 본 출원의 일 예는 백신의 면역원성시스템으로서 면역원성

포자부착디스플레이시스템을 제조하는 방법이다.

[1676] 면역원성 포자부착디스플레이시스템을 제조하는 방법은 예를 들어, 크게 두 가지를 들 수 있다.

[1677] 일 방법으로, 먼저 포자부착디스플레이체와 부착면역원성물질을 각각 제조하여 부착면역원성물질을 포자부착디스플레이체에 부착하는 방법이 있다. 이는 각각의 구성요소들을 따로 만드는 단계와 이후에 시스템으로 조합하는 단계를 포함한다.

[1678] 다른 방법으로, 전체로서 면역원성 포자부착디스플레이시스템을 제조하는 방법이 있다. 이 방법은 각각의 구성요소들을 제조하지 않아도 유전적 제조방법을 통해 포자부착디스플레이시스템이 단계의 구분 없이 일체의 단계로 제조되는 방법이다.

[1679]

[1680] - 포자부착디스플레이체의 제조 방법

[1681] 일 구체예로서 포자부착디스플레이체를 제조하는 방법을 제공한다.

[1682] 포자부착디스플레이체를 제조하는 방법은 상기 포자시스템구조체의 제조방법을 포괄한다.

[1683] 포자부착디스플레이체를 제조하는 방법은 상기 포자담지체의 제조방법을 포괄한다. 포자부착디스플레이체는 전하를 띌 수 있다는 점에서 포자담지체와 같은 특성을 공유하는데, 이러한 특성을 공유하는 이유는 정전기적 인력에 의해 면역원성물질을 시스템에 결부하는 목적이 동일하기 때문이다.

[1684]

[1685] - 포자부착면역원성물질의 제조 방법

[1686] 일 구체예로서 포자부착면역원성물질을 제조하는 방법을 제공한다.

[1687] 포자부착면역원성물질은 포자외부신호서열을 포함할 수 있다.

[1688] 포자부착면역원성물질을 제조하는 방법은 상기 면역원성물질의 제조 방법을 포괄한다.

[1689] 포자부착면역원성물질을 제조하는 방법은 상기 면역원성물질의 유전적 제조방법일 수 있다. 상기 유전적 제조방법에서 면역원성목적염기서열은 포자외부신호서열을 포함할 수 있다.

[1690] 상기 제조 방법은 전하를 띠는 포자부착면역원성물질의 제조 방법일 수 있다. 포자부착면역원성물질의 전하는 전하를 띠는 물질에 의한 것일 수 있다. 상기 전하를 띠는 물질은 포자부착면역원성물질에 흡착될 수 있다. 흡착 방법은 포자부착면역원성물질을 전하를 띠는 물질과 혼합하여 항온상태에서 방치하는 것일 수 있다.

[1691] - 포자부착면역원성물질의 부착 방법

[1692] 일 구체예로서 포자부착면역원성물질을 포자부착디스플레이체에 부착하는 방법을 제공한다.

[1693] 부착 방법은 포자부착면역원성물질을 포자부착디스플레이체와 혼합하여

항온상태에서 방치하는 것일 수 있다.

[1694] 또한 포자부착면역원성물질이 포자내부신호서열을 포함한다면 포자담지면역원성물질은 포자내부신호서열에 의해 포자담지체에 담지될 수 있다.

[1695]

[1696] - 면역원성 포자부착디스플레이시스템의 유전적 제조 방법

[1697] 일 구체예로서 면역원성 포자부착디스플레이시스템을 유전적 제조하는 방법을 제공한다.

[1698] 면역원성 포자부착디스플레이시스템의 유전적 제조방법은 상기 면역원성포자시스템의 유전적 제조방법을 포괄한다.

포자시스템목적염기서열은 포자부착면역원성물질을 포함한다.

[1699] 일 실시양태에서 포자시스템목적염기서열은 포자부착면역원성물질만을 포함할 수 있다.

[1700] 이 때, 제1단계는 포자부착면역원성물질을 수득하는 단계이다.

[1701] 제2단계는 포자부착면역원성물질의 염기서열을 삽입하여 포자시스템제조합염기서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 제조하는 단계이다. 포자부착면역원성물질의 염기서열은 포자외부신호서열과 함께 삽입될 수 있다.

[1702] 다른 실시양태에서 포자시스템목적염기서열은 전하를 띄는 물질을 포함할 수 있다.

[1703] 이 때, 제1단계는 포자부착면역원성물질, 전하를 띄는 물질의 염기서열을 수득하는 단계이다.

[1704] 제2단계는 포자부착면역원성물질의 염기서열, 전하를 띄는 물질의 염기서열을 삽입하여 포자시스템제조합염기서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 제조하는 단계이다. 이 때 각각의 물질은 발현에 방해가 되지 않게 별도의 제한효소 사이트에 삽입하는 것이 바람직하다. 상기 포자부착면역원성물질의 염기서열은 포자외부신호서열과 함께 삽입될 수 있다. 또한 상기 전하를 띄는 물질의 염기서열은 포자내부신호서열과 함께 삽입될 수 있다.

[1705]

[1706] - 면역원성 포자부착디스플레이시스템제조합발현벡터

[1707] 일 구체예로서 면역원성포자부착디스플레이시스템을 유전적 제조하기 위한 면역원성포자부착디스플레이시스템제조합발현벡터를 제공한다.

[1708] 면역원성포자부착디스플레이시스템제조합발현벡터는 포자시스템제조합발현벡터를 포괄한다. 상기 '면역원성 포자부착디스플레이시스템의 유전적 제조 방법'에 따라 만들어지는 포자시스템제조합발현벡터를 포함한다.

[1709] 일 실시양태에서 포자시스템발현목적염기서열은 포자부착면역원성물질의 염기서열을 포함할 수 있다.

[1710] 제1구성으로서 포자시스템발현조절요소는 포자외부단백질의 프로모터일 수

있다.

[1711] 일 실시 양태에서 상기 프로모터는 야생 상태의 프로모터일 수 있다.

[1712] 상기 프로모터는 야생 상태의 프로모터를 일부 부위에서 변형 또는 조작한 것일 수 있다. 이 때 변형된 프로모터는 개시효율이 향상된 것일 수 있다. 또한 상기 프로모터는 포자외부신호서열을 수득할 때 사용한 포자외부단백질의 프로모터일 수 있다.

[1713] 다른 실시 양태에서 포자시스템발현조절요소는 타단백질의 프로모터일 수 있다.

[1714] 상기 프로모터는 포자시스템발현목적염기서열의 과발현 효과를 가진 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 프로모터는 PCry일 수 있다. 또한 상기 프로모터는 PSpac일 수 있다.

[1715] 제2구성으로서 포자시스템발현목적염기서열은 포자부착면역원성물질의 염기서열을 포함할 수 있다.

[1716] 포자부착면역원성물질의 염기서열은 포자외부신호서열을 포함할 수 있다. 이 때 포자외부신호서열은 5' 말단에 위치하는 것이 바람직하다.

[1717] 전체적인 구성의 배열은 프로모터-포자부착면역원성물질인 것이 바람직하다. 도 38은 프로모터와 포자부착면역원성물질의 염기서열을 포함하는 포자부착디스플레이시스템제조합발현백터의 예시이다.

[1718]

[1719] 다른 실시양태에서 포자시스템발현목적염기서열은 포자부착면역원성물질과 전하를 띠는 물질의 염기서열을 포함할 수 있다.

[1720] 제1구성으로서 포자시스템발현조절요소는 포자외부단백질의 프로모터일 수 있다. 포자외부단백질의 프로모터는 상기 양태의 프로모터를 포괄한다.

[1721] 제2구성으로서 포자시스템발현목적염기서열은 포자부착면역원성물질의 염기서열과 전하를 띠는 물질의 염기서열을 포함할 수 있다.

[1722] 포자부착면역원성물질의 염기서열은 포자외부신호서열을 포함할 수 있다. 이 때 포자외부신호서열은 포자부착면역원성물질의 염기서열의 5' 말단에 위치하는 것이 바람직하다.

[1723] 전하를 띠는 물질의 염기서열은 포자내부신호서열을 포함할 수 있다. 상기 포자내부신호서열은 전하를 띠는 물질의 염기서열의 5' 말단에 위치하는 것이 바람직하다.

[1724] 전체적인 구성의 배열은 상호 간 인슐레이트된 위치에 프로모터-포자부착면역원성물질, 프로모터-전하를 띠는 물질이 위치한 것이 바람직하다. 도 39는 (제1프로모터와 포자부착면역원성물질), (제2프로모터와 전하를 띠는 물질)의 염기서열을 포함하는 포자부착디스플레이시스템제조합발현백터의 예시이다.

[1725]

[1726] [백신 조성물]

- [1727] 본 출원의 일 예는 앞서 설명한 면역원성 시스템을 포함하는 백신 조성물 및 이의 다양한 용도이다.
- [1728] 백신은 면역원성성분을 필수적으로 포함하여 조성된다.
- [1729] 면역원성성분은 상기 면역원성물질 또는 면역원성시스템일 수 있다.
- [1730] 면역원성성분의 조성에 따라 백신의 양태가 달라질 수 있다. 크게 백신의 양태를 분류하자면 통상백신, 다가백신, 마스터백신, 복합질병마스터백신으로 나눌 수 있다. 하지만 이 분류는 필수적인 것은 아니며 본 출원이 이에 한정되지는 않는다.
- [1731] 일반적으로 백신의 1회 접종량은 2 ~ 5ml 정도가 적절하다. 현행 백신시장에서 대부분의 백신은 병원체 자체를 면역원성물질로 사용하고 있다.
- [1732] 백신 조성물을 피하 주사, 정맥내 주사, 진피내 주사, 비경구 주사, 근육내 주사, 무침(needle free) 주사, 전기천공, 경구 전달, 비내 전달, 구비강(oral) 전달, 또는 그의 임의의 조합에 의해 투여할 수 있다. 투여되는 조성물은 치료학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 치료학적으로 허용가능한 담체는 단백질, 완충액, 계면활성제, 및 폴리에틸렌 글리콜 중합체, 또는 그의 임의의 조합으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.
- [1733] 이 때 백신의 기능을 돕는 면역보조성분을 조성에 포함할 수 있는 것은 당업자에게 자명하다.

[1734]

[1735] 통상백신

- [1736] "통상백신"은 백신의 일 실시예로서 단일 병원체의 단일 백신주에 대한 후천면역을 형성하는 것을 목적으로 하는 양태를 말한다.
- [1737] 본 출원의 일 구체예는 상기 통상백신이다.
- [1738] 통상백신은 기존에 주로 쓰이는 백신의 양태로서, 대상 질병을 정하고 대상 질병 병원체의 백신주 중 가장 유행하는 것을 정하여 만드는 백신의 양태이다. 통상백신은 단일한 면역원성물질이나 면역원성시스템만 포함하면 되므로 원가가 저렴하고 면역원성물질의 농도가 높아 후천면역 형성 효과가 뛰어난 장점이 있다. 하지만 단일 백신주와 상동성이 높은 야외주만을 예방할 수 있어 면역의 범위가 좁은 단점이 있다. 통상백신은 야외주가 많이 발생하지 않는 질병에 대한 백신의 양태로 적합하다.

- [1739] 상기 통상백신은 단일한 면역원성물질을 포함한 것일 수 있다.
- [1740] 상기 통상백신은 단일한 면역원성시스템을 포함한 것일 수 있다.

[1741]

[1742] 다가백신

- [1743] "다가백신"은 백신의 일 실시예로서 복수의 병원체의 단일 백신주에 대한 후천면역을 형성하는 것을 목적으로 하는 양태를 말한다.
- [1744] 본 출원의 일 구체예는 상기 다가백신이다.
- [1745] 다가백신은 생체에서 여러 개의 질병에 대해 동시면역을 형성하고자 할 때

선택할 수 있는 백신의 양태이다. 이 때 다가백신의 대상이 되는 병원체들은 생체에서 복합질병을 일으키는 병원체들일 수 있으며, 이 경우 다가백신은 복합질병을 예방할 수 있는 장점이 있다. 또한 다가백신의 대상이 되는 병원체들은 생체에 가장 주요한 피해를 주는 주요질병을 일으키는 것 수 있으며, 이 경우 다가백신은 가장 위험성이 높은 질병들에 대한 면역을 형성할 수 있는 장점이 있다. 다만 다가백신의 면역원성물질 중 하나가 병원성 또는 독성이 높은 경우 백신의 위험성이 높아지는 단점도 있을 수 있으나, 본 출원의 면역원성시스템은 병원성 또는 독성이 현저히 낮으므로 다가백신을 조성하는데 유리한 장점이 있다.

- [1746] 다가백신의 대상이 되는 복수의 병원체는 복합질병을 일으키는 병원체들일 수 있다.
- [1747] 상기 복수의 병원체는 생체에서 발생하는 주요질병의 병원체일 수 있다.
- [1748] 이 때 생체는 돼지일 수 있다.
- [1749] 이 때 주요질병의 병원체는 예를 들어, porcine epidemic diarrhea virus(PEDV), porcine reproductive, respiratory syndrome virus(PRRSV), porcine circovirus(PCV)일 수 있다.
- [1750] 다가백신은 복수의 병원체를 대상으로 하는 면역원성물질을 혼합한 것일 수 있다. 또한 다가백신은 복수의 병원체를 대상으로 하는 면역원성시스템을 혼합한 것일 수 있다.
- [1751] 다가백신은 복수의 병원체를 대상으로 하는 면역원성물질과 면역원성시스템을 혼합한 것일 수 있다.
- [1752] 다가백신은 면역원성직렬연결시스템으로서, 직렬연결체가 복수의 병원체를 대상으로 하는 면역원성물질들을 포함한 것일 수 있다.
- [1753] 다가백신은 면역원성 병렬시스템으로서, 병렬체가 복수의 병원체를 대상으로 하는 면역원성물질들인 것일 수 있다.

[1754]

[1755] 마스터백신

- [1756] "마스터백신"은 백신의 일 실시예로서 단일 병원체의 복수의 백신주에 대한 후천면역을 형성하는 것을 목적으로 하는 양태를 말한다.
- [1757] 본 출원의 일 구체예는 마스터백신이다.
- [1758] 마스터백신은 단일 질병에 대한 강력하고 넓은 면역을 형성하고자 할 때 선택할 수 있는 백신의 양태이다. 마스터백신은 상동성이 다른 여러 백신주에 대해 후천면역을 형성할 수 있으므로 변이주 또는 야외주에 대한 크로스프로텍션(cross-protection)이 용이한 장점이 있다. 마스터백신은 변이주 또는 야외주가 많이 발생하는 질병에 대한 백신의 양태로 적합하다.
- [1759] 백신의 1회 접종량 안에 들어갈 수 있는 면역원성물질의 양은 한정적이므로 마스터백신의 대상이 되는 백신주의 종류 역시 한정될 수밖에 없다. 가장 바람직한 마스터백신을 만들기 위해서는 가장 넓은 크로스프로텍션 범위를

형성하는 것이 바람직하다. 그러나 현행 백신 기술로는 가장 적합한 백신주를 선택할 수 있는 방법이 마땅치 않다.

[1760] 본 출원에서, 마스터백신의 대상이 되는 백신주들을 선정하기 위하여 다중정렬에 의한 계통수(phylogenetic tree)를 활용할 수 있다. 다중정렬 과정은 1개 균주를 기준으로 균주들 간의 상동성을 조사하는 과정으로, 그 결과로 얻어진 상동성의 정도에 따라 계통수를 제작할 수 있다. 다양한 상동성을 가지는 백신주들을 혼합하면 크로스포텍션의 범위를 확장할 수 있는 장점이 있다.

[1761]

[1762] 본 출원의 일 구체예로, 마스터백신의 대상이 되는 백신주들을 선정하는 방법은 다중정렬에 의해 계통수를 제작하는 제1단계, 계통수에서 상동성기준분류군을 나누는 제2단계, 상동성기준분류에 속하는 각 1의 백신주를 선택하는 제3단계를 포함할 수 있다. 도 40은 이해를 돕기 위하여 예시적인 백신주 선정 방법을 나타낸 시스템도이다.

[1763] 제1단계는 계통수를 제작하는 단계이다. 계통수는 다중정렬에 의하여 만들어질 수 있다. 도 40의 좌측에 나타난 선들은 다중정렬에 의하여 만들어진 계통수이며, 중간에 나타난 선들은 분류된 균주들을 나타낸다.

[1764] 제2단계는 상동성기준분류군을 나누는 단계이다.

"상동성기준분류군(homology based clust)"은 상동성에 따라 계통수에서 균주들을 분류한 군으로 정의한다. 이 때 크로스포텍션이 가능한 상동성 범위를 정하여 상동성기준분류군을 나누게 된다. 일반적으로 아무리 변이가 많이 일어나는 바이러스여도 균주 간의 상동성은 85% 이상이다.

[1765] 상기 상동성기준분류군은 특정한 상동성 간격에 의해 분류될 수 있다. 일 예로 상동성기준분류군은 상동성이 100~95%인 제1군, 95~90%인 제2군, 90~85%인 제3군, 그 미만인 제4군으로 나눌 수 있다.

[1766] 도 40의 우측은 균주들을 Clust 1 내지 Clust 4의 상동성기준분류군으로 나눈 것을 보여주고 있다. 임의의 한 균주를 기준으로 Clust 1은 99~100%의 상동성, Clust 2는 95~99%의 상동성, Clust 3는 86.5~95%의 상동성, Clust 4는 50~86.5%의 상동성을 갖게 분류되었다.

[1767] 제3단계는 상동성기준분류군으로부터 각각 하나 이상의 균주를 선택하는 단계이다. 이후 선택된 백신주들의 면역원성물질 또는 면역원성시스템을 혼합하여 마스터백신으로 제조한다.

[1768] 상기 마스터백신은 각 상동성기준분류군에 따른 하나 이상의 균주를 대상으로 하는 면역원성물질을 혼합한 것일 수 있다. 예를 들어 도 40의 경우 Clust 1 내지 Clust 4에서 선택한 하나 이상의 균주를 혼합하여 마스터백신을 제조할 수 있다.

[1769] 또한 마스터백신은 각 상동성기준분류군에 따른 하나 이상의 균주를 대상으로 하는 면역원성시스템을 혼합한 것일 수 있다. 이 때 면역원성시스템은 바람직한 예로, 면역원성포자시스템일 수 있다.

[1770] 또한 마스터백신은 각 상동성기준분류군에 따른 하나 이상의 균주를 대상으로

하는 면역원성물질 및 면역원성시스템을 혼합한 것일 수 있다.

[1771] 이 외에도, 백신주를 선택하는 단계는 상기 "1개의 면역원성 부위를 포함하는 항원상동성단백질"에서 다중정렬의 대상이 되는 균주를 선정하는 기준을 포괄한다.

[1772]

[1773] **복합질병마스터백신**

[1774] "복합질병마스터백신"은 백신의 일 실시예로서 복수의 병원체의 복수의 백신주에 대한 후천면역을 형성하는 것을 목적으로 하는 양태를 말한다.

[1775] 복합질병마스터백신은 복수의 질병에 대한 마스터백신으로 기능하는 백신의 양태이다. 기존 백신기술로 복합질병마스터백신을 제조하는 경우 지나치게 1회 접종량이 많거나, 접종방법이 지나치게 복잡하고 장기간이 소요되는 문제가 있었다. 기존의 백신 기술은 면역원성물질의 농도가 한정적이었기 때문에 면역원성물질의 종류가 많아지면 접종량 역시 많아져야했기 때문이다.

[1776] 그러나 본 출원의 일 구체예인 면역원성 포자시스템에 의하면 이러한 문제를 해결할 수 있다.

[1777] 면역원성물질을 바이러스 병원체로 하는 경우 종래 사독화 또는 약독화 백신의 바이러스의 농도는 한정적이다. 바이러스는 배양하면 단일층의 플라크를 형성하기 때문에 다층의 콜로니를 형성하는 박테리아에 비해 배양이 힘들다. 계대배양으로 달성할 수 있는 바이러스의 최대 농도는 약 10^7 개/ml로 알려져 있다. 그 이상으로 바이러스 용액을 농축하면 바이러스의 병원성이 높아지고 바이러스를 불활화시키기 위한 독성물질의 농도가 높아지므로 약 10^7 개/ml를 최대 농도로 보는 것이 일반적이다.

[1778] 하지만 본 출원의 일 구체예인 면역원성포자시스템을 활용하면 위에 언급한 위험성 없이 약 10^{10} 내지 10^{12} 개/ml 정도로까지 농축할 수 있는 장점이 있다. 동일 용량에서 10^3 내지 10^5 배수의 농축 농도를 가질 수 있어서, 복수의 병원체 또는 복수의 백신주를 대상으로 하여도 1회 접종량을 약 2 ~ 3ml, 바람직하게는 2ml를 유지할 수 있게 된다. 따라서 본 출원의 면역원성포자시스템은 종래 불가능했던 상용화 복합질병마스터백신을 가능하게 하는 현저한 효과를 가질 수 있다.

[1779] 바람직한 예로서, 상기 복합질병마스터백신은 각 질병 및 각 백신주를 대상으로 하는 면역원성포자시스템을 혼합한 것일 수 있다.

[1780] 이 때 복합질병마스터백신의 대상이 되는 복수의 병원체는 복합질병을 일으키는 병원체들일 수 있다.

[1781] 또한 복합질병마스터백신의 대상이 되는 복수의 병원체는 생체에서 발생하는 주요질병의 병원체일 수 있다.

[1782] 또한 복합질병마스터백신의 대상이 되는 복수의 백신주는 "마스터백신"에서 백신주를 선정하는 기준을 포괄한다.

[1783]

발명의 실시를 위한 형태

- [1784] 이하, 실시예를 통하여 본 출원을 더욱 상세히 설명하고자 한다.
- [1785] 본 출원의 하기 일 실시예는 PEDV에 대한 항원, 항체 및 백신 제조에 관한 것이다.
- [1786] 본 출원의 하기 또 다른 실시예는 PCV에 대한 항원, 항체 및 백신 제조에 관한 것이다.
- [1787] 이들 실시예는 오로지 본 출원을 예시하기 위한 것으로, 본 출원의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명할 것이다.
- [1788]
- [1789] **[PEDV 백신 제작]**
- [1790] **실시예 1 : 공통영역 프라이머 제작**
- [1791] 실험에 필요한 재료는 다음을 이용하였다:
- [1792] 가검물(동물 조직): 부흥농장
- [1793] 0.2마이크론 시린지 필터: Millipore
- [1794] nPFU-forte(enzymomics 社)
- [1795] nTaq polymerase(enzymomics 社)
- [1796] 제한 효소 SacI, PstI, 및 BamHI(enzymomics 社)
- [1797] pGEM T easy vector system: (Promega 社)
- [1798] PCR 기계: (BioRad 社)
- [1799]
- [1800] 한국 부흥농장에서 설사 증세를 나타내는 돼지로부터의 조직을 획득하였다. 이 조직으로부터 쇠균액(Homogenates)를 생성하고, 0.2마이크론 시린지 필터 여과를 통해 여과물을 획득하였다.
- [1801] 약 18종의 NCBI의 GenBank를 통해 획득한 PEDV의 스파이크 단백질을 암호화하는 염기서열들(서열번호 19 내지 서열번호 36)을 다중정렬하여 비교하였고, 분석을 통해 다음과 같은 변이가 일어나지 않는 공통영역들을 수득하였다(Strain, GenBank accession no. 서열번호 19 : 83P-5 p34th, AB548619, 서열번호 20 : 83P-5 p61st, AB548620, 서열번호 21 : 83P-5 p100th, AB548621, 서열번호 22 : 83P-5 parent, AB548618, 서열번호 23 : Br1/87, Z25483, 서열번호 24 : Chinju99, AY167585, 서열번호 25 : DR13 attenuated, DQ462404, 서열번호 26 : DR13 parent, DQ862099, 서열번호 27 : JS-2004-2, AY653204, 서열번호 28 : KNU-0801, GU180142, 서열번호 29 : KNU-0802, GU180143, 서열번호 30 : KNU-0901, GU180144, 서열번호 31 : KNU-0902, GU180145, 서열번호 32 : KNU-0903, GU180146, 서열번호 33 : KNU-0904, GU180147, 서열번호 34 : KNU-0905, GU180148, 서열번호 35 : LJB_03, DQ985739, 서열번호 36 : Spk1, AF500215).

- [1802]
- [1803] Spike 1 over forward : CCATTCAGCGTATTCTTTATTGTGATGA (서열번호 1)
- [1804] Spike 1 over reverse: CCTATGTTACTATAACCAACACAGGCTCTG (서열번호 2)
- [1805] Spike 2 over forward: CTGTTAATGATTACCTGTCTTTAGCAAATTTTGTG (서열번호 3)
- [1806] Spike 2 over reverse: CAATCAACACTAACAGGCGTGTGTAAAGC (서열번호 4)
- [1807]
- [1808] 이 중 3'말단과 가장 가까운 프라이머 서열번호 4를 이용하여 Accuscript Hi-Fi Reverse transcriptase (Ailgent)를 이용해 PEDV의 cDNA를 만들었다.
- [1809] 만들어진 cDNA를 이용하여 프라이머 서열번호 1과 2 그리고 프라이머 서열번호 3와 4를 이용하여 다음과 같은 PCR 조건으로 면역결정부위를 클로닝하였다.
- [1810] Step 1: 90°C 10min,
- [1811] Step 2: 90°C 30sec,
- [1812] Step 3: 62°C 30sec,
- [1813] Step 4: 72°C 2min,
- [1814] Step 5: go to Step 2 (x39),
- [1815] Step 6: 72°C 10min,
- [1816] Step 7: 12°C hold.
- [1817] 클로닝된 면역결정부위를 유전자재조합 벡터로 삽입시키기 위하여 다음과 같은 프라이머들을 이용하여 5'말단에 PstI 제한 효소 부위(restriction enzyme site)를, 3'말단에 BamHI 제한 효소 부위를 부착하여 절단 후 라이게이션(ligation)시켰다.
- [1818]
- [1819] Spike 1 forward PstI: CTGCAGATTCAGCGTATTCTTTATTGTGA (서열번호 5)
- [1820] Spike 1 reverse BamHI: GCGCGGATCCTTATATGTTACTATAACACC (서열번호 6)
- [1821] Spike 2 forward PstI: GGCTGCAGGTTAATGATTACCTGTCTTT (서열번호 7)
- [1822] Spike 2 reverse BamHI: GGATCCTTAATCAACACTAACAGGCGT (서열번호 8)
- [1823]
- [1824] 이를 위한 PCR 조건은 상기 조건과 동일하게 하였다.
- [1825]
- [1826] 실시예 2 : 벡터 제작
- [1827] *Bacillus subtilis* 168 strain(KCTC 1327)을 이용하였다. *B. subtilis*의 포자 표면에 면역결정부위를 발현하기 위한 벡터제작은 pHT-01 벡터(BioSharp, Inc.)를 SacI과 BamHI으로 자르고, 이부분을 5'말단에 SacI 제한 효소 부위, 3'말단에 BamHI

제한 효소 부위를 부착한 PCotG-CotG-linker-MCS, PCotB-CotB-linker-MCS 및 PCotC-CotC-linker-MCS 각각으로 치환하였다.

- [1828] PCotG-CotG, PCotB-CotB 및 PCotC-CotC 각각의 *B. subtilis*의 게놈 DNA에서 다음과 같은 프라이머 (서열번호 9, 10, 37, 38, 39, 40) 각각을 5'말단에 SacI 제한 효소 부위를 부착하고 3'말단에 BamHI 제한 효소 부위 및 융합부로서 링커(linker)를 부착하였다. 이 때 링커 시퀀스는 서열번호 16을 공통적으로 사용하였다.

- [1829] [표1]

Linker sequence		GGAGGTGGGGGTTCACTCCAG (서열번호 16)
CotG	forward	GAGCTCAGTGTCCTAGCTCCGAG (서열번호 9)
	Liker reverse	CTGCAGTGAACCCCCACCTCCTTTGTATTTCTTTTGGACT A (서열번호 10)
CotB	forward	ATAGAGCTCCTTCCAATCTCTT (서열번호 37)
	Liker reverse	TATCTGCAGTGAACCCCCACCTCCTTAAAATTTACGTTTC (서열번호 38)
CotC	forward	ATAGAGCTCTGTAGGATAAATCGT (서열번호 39)
	Liker reverse	TATCTGCAGTGAACCCCCACCTCCTTAGTAGTGTT (서열번호 40)

- [1830]

- [1831] 링커의 3'말단에 PstI 제한 효소 부위를 부착하여 향후 번역결정부위로 치환하였다.

- [1832] 클로닝된 번역결정부위를 유전자재조합 벡터로 이동시키기 위하여 상기 서열번호 5, 6, 7, 8의 프라이머를 이용하여 5'말단에 PstI 제한 효소 부위를, 3'말단에 BamHI 제한 효소 부위를 부착하였다. 이를 위한 PCR 조건은 상기 조건과 동일하게 하였다.

- [1833]

- [1834] 실시예 3 : 바실러스 형질전환

- [1835] 바실러스 형질전환은 상기 언급된 방법 중 전기천공법(electroporation, EP)(BIO-RAD Gene Pulser II)을 이용하여 통상적인 방법으로 진행하였다.

- [1836] 구체적으로는 Growth medium (LB medium plus 0.5M sorbitol(Sigma-Aldrich Inc))으로 키운 *B. subtilis* DB104 strain을 electroporation medium (LB medium plus 0.5M sorbitol, 0.5M mannitol(Sigma-Aldrich Inc), 10% glycerol(Sigma-Aldrich))으로 희석하였다. 이 때 희석 농도는 E.Coli Pulser Cuvett (BIO-RAD) 0.1cm electrode에 60μl를 분주하여 Gene Pulser II (BIO-RAD) 200Ω2.1kV, 0.25μF으로 주었을 때 constant time이 5 msec가 되도록 희석하였다. 희석된 competent cell은 -80℃에

보관하였다.

[1837] 형질전환은 만들어진 competent cell에 10 ng의 DNA plasmid를 넣고 상기 조건으로 수행하였다.

[1838] 전기충격 직후 1 ml의 outgrowth medium (LB medium plus 0.5M sorbitol and 0.38M mannitol)을 넣어주어 37°C shaker incubator에서 3시간 배양하였다. 이후 chloramphenicol(Sigma-Aldrich Inc) LB plate에서 형질전환된 바실러스 콜로니를 수득하였다.

[1839]

[1840] 실시예 4 : 바실러스 스포어 디스플레이 시스템 제작

[1841] 자체 제작한 유전자재조합 벡터의 확인을 위해, 서열번호 11, 12의 프라이머 세트로 5'말단에 PstI 제한 효소 부위, 3'말단에 BamHI 제한 효소 부위를 부착한 GFP 염기서열을 유전자재조합 벡터로 이동하였다.

[1842]

[1843] eGFP forward PstI: CTGCAGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG (서열번호 11)

[1844] eGFP reverse BamHI: CCATGGGGATCCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG (서열번호 12)

[1845]

[1846] 만들어진 유전자재조합 벡터를 이용하여 상기 제시된 형질전환 방법으로 형질전환 바실러스를 확보하였다.

[1847] 형질전환된 바실러스의 경우 포자형성 과정에서 GFP 신호를 나타낸다. 이를 확인하기 위해 형질전환된 바실러스를 Schaeffer's sporulation medium에 키우면서 24시간, 48시간, 72시간에 fluorescence microscope, flow cytometry 등으로 GFP 신호를 확인하였다. 또한, 스포어 발현을 Malachite green staining로 확인하였다.

[1848] CotG를 이용한 경우, fluorescence microscope, flow cytometry, Malachite green staining는 도 41, 도 42, 도 43에 각각 도시하였다.

[1849] CotB를 이용한 경우, fluorescence microscope, flow cytometry, Malachite green staining는 도 47, 도 48, 도 49에 각각 도시하였다.

[1850] CotC를 이용한 경우, fluorescence microscope, flow cytometry, Malachite green staining는 도 52, 도 53, 도 54에 각각 도시하였다.

[1851] 또한 항원의포자표면 발현을 확인하기 위해 Pronase(Sigma-Aldrich, Inc.)를 처리하여 표면 단백질을 제거하는 실험을 수행하였을 때, GFP 신호가 감소하는 것을 통해 GFP 단백질이 포자표면에 발현되고 있음을 확인하였다.

[1852] CotG를 이용한 경우, GFP가 포자 표면에 발현한 것을 확인하기 위한 Pronase 처리 실험의 결과를 도 44에 도시하였다.

[1853] 이를 통해 linker를 통해 CotG에 연결된 항원이 포자 표면에 제시됨을 알 수 있었다.

[1854]

[1855] 실시예 5: 백신 제조방법

- [1856] 형질전환된 *B. subtilis*를 LB medium 2 ml에 3시간 배양 후, Schaeffer's sporulation medium 1 L당 500 ul를 넣어주어 포자형성을 48시간 유도하였다.
- [1857] 상기 언급된 malachite green staining을 통해 90% 이상의 포자가 형성되면 포자비활성화 단계로 넘어가고, 포자형성이 충분하지 않으면 6시간~12시간 추가 배양후 포자비활성화 단계로 넘어간다.
- [1858] 포자비활성화는 120°C 15 min의 멸균과정을 통해 진행되었다. 포자비활성화는 획득된 sample의 일부를 LB plate 또는 LB medium에 넣고, 각각 37°C shaker incubator, 37°C에 overnight culture하여 colony 또는 증식 여부로 판별하였다.
- [1859] 대조군으로 비활성화되지 않은 포자를 같이 배양하였다. 또한 이때 serial dilution을 하여 포자의 수를 확인하였다. 포자비활성화가 확인되면 멸균된 cold distilled water (D.W.)로 5회 washing 및 centrifugation을 수행하여 부유물이 없도록 하였다. Washing 과정이 끝난 포자는 PBS를 이용하여 마우스 10⁸개/200ul, 돼지 10¹²개/ml의 농도로 분주하여 사용전까지 -80°C냉장고에 보관한다.
- [1860]
- [1861] **실시예 6 : 마스터 백신**
- [1862] 현재 국내에 전파된 PEDV 는 크게 국내토착형, 중국유래형, 유럽형 세 종류로 구분된다. 이 세 종류의 PEDV 백신간 교차방어력은 우수하지 않은 것으로 알려져 있다. 그 이유는 면역결정부위에 돌연변이가 생겨 각 종류의 PEDV 바이러스마다 면역결정부위가 다르기 때문으로 알려진다. 따라서 세 종류의 PEDV 바이러스의 면역결정부위를 상기 제시된 유전자제조합백터에 클로닝하면 국내에 전파된 PEDV에 대한 방어력이 생성되는 백신을 제조할 수 있었다.
- [1863]
- [1864] **실시예 7 : 면역 반응 확인**
- [1865] 제작된 유전자제조합백신의 면역반응 확인은 다음과 같이 확인하였다. 마우스 c57BL/6 strain에 10⁸개/200ul 농도의 유전자제조합백신을 복강으로 2주 간격으로 주사하였고, 매 주사 전 또는 첫 주사후 40일 제에 체중변화 및 혈액내 IgG 농도의 변화를 측정하였다.
- [1866] CotG, CotB, CotC를 이용한 면역 반응 확인 실험 결과는 도 45, 도 50, 도55에 각각 도시하였다.
- [1867]
- [1868] 유전자제조합백신이 접종된 마우스는 비접종 마우스와 비교하여 체중변화 없이 혈액내 IgG의 농도가 증가하여야 한다. 또한, 항원 특이적인 항체의 생성을 확인하기 위해, Spike2 항원을 하기의 서열번호 13, 14의 프라이머 세트로 클로닝하여 pET28a vector에 넣고 AKTA pure L1을 이용하여 정제하였고, 유전자제조합백신 접종 후 40일 제 되는 마우스에서 확보한 혈액을 이용하여 immunoblotting assay를 수행하였다.
- [1869]

- [1870] forward: GCTAGCATTTCAGCGTATTCTTTATTGTGA (서열번호 13)
- [1871] reverse: GGATCCTTATATGTTACTATACACCAACACAGG (서열번호 14)
- [1872]
- [1873] 항원을 정제하고 검증하기 위해 항원의 N-말단에 His-tagging을 하였다. 항원 특이적 항체의 확인은 immunoblotting assay를 수행하였을 때 anti-His antibody와 동일한 위치에서 band가 검출되는 것으로 확인할 수 있다.
- [1874] CotG, CotB, CotC를 이용한 면역 반응 확인 실험 결과는 도 46, 도 51, 도 56에 각각 도시하였다.
- [1875]
- [1876] Materials
- [1877] pET28a vector: Addgene
- [1878] AKTA pure L1: GE Healthcare
- [1879] Anti-His antibody: Santa-Cruz
- [1880]
- [1881] 실시예 8 : 중화항체가
- [1882] 유전자재조합백신의 효과를 검증하는 방식은 상기 제시된 면역반응확인 방법에서 획득한 혈액 내의 IgG 농도의 변화를 확인하여 실시하였다. 혈액 내의 IgG의 농도는 통상적인 ELISA 측정 방식을 사용하였다. 이 때, ELISA kit(고마 바이오텍)를 이용하였다
- [1883] 유전자재조합백신을 접종한 마우스의 혈액에서 비접종한 마우스의 혈액보다 높은 수준의 IgG가 생성되는 것을 확인 할 수 있다.
- [1884] 본 출원의 유전자재조합백신이 접종된 돼지를 PEDV로부터 보호하는지 확인하기 위하여, 총 8마리의 돼지(D-1에 4~5주령)를 무작위로 두 그룹으로 배정하여 각각 위약 또는 유전자재조합백신을 D0, 14, 및 28에 근육내로 접종하였다.
- [1885] D40까지 임상적 징후를 매일 모니터링하였다. 주사부위 및 체중변화를 측정하였다. 각 주사전 수집한 혈청 샘플을 이용하여 ELISA를 수행하여 IgG 값의 변화를 측정하였다.
- [1886]
- [1887] [PCV 백신 제작]
- [1888] 하기는 또 다른 실시예로 PCV에 대한 항원, 항체 및 백신 제조에 관한 것이다.
- [1889] 실시예 9 : 공통영역 프라이머 제작
- [1890] 실험에 필요한 재료는 다음을 이용하였다:
- [1891] 가검물(동물 조직): 부흥농장
- [1892] 0.2마이크론 시린지 필터: Millipore
- [1893] nPFU-forte(enzygnomics 社)
- [1894] nTaq polymerase(enzygnomics 社)
- [1895] 제한 효소 SacI, PstI, 및 BamHI(enzygnomics 社)

[1896] pGEM T easy vector system: (Promega 社)

[1897] PCR 기계: (BioRad 社)

[1898]

[1899] 한국 부흥농장에서 설사 증세를 나타내는 돼지로부터의 조직을 획득하였다. 이 조직으로부터 쇄균액(Homogenates)를 생성하고, 0.2마이크론 시린지 필터 여과를 통해 여과물을 획득하였다.

[1900] NCBI의 GenBank를 통해 획득한 PCV 아형 3종(PCV-2A, PCV-2B, PCV-m2B)을 다중정렬하여 비교하였다. 상기 3종의 분석을 통해 유용한 항원을 수득할 수 있는 하기의 서열번호 41 내지 46의 캡시드 프라이머 3종을 수득하였다.

[1901] [표2]

PCV-2AC apsid	forward	CTGCAGACGTATCCAAGGAG (서열번호 41)
	reverse	CCATGGGGATCCTTAGGGTTTAAGT (서열번호 42)
PCV-2BC apsid	forward	CTGCAGACGTATCCAAGGAG (서열번호 43)
	Liker reverse	CCATGGGGATCCTTAAGGGTTAA (서열번호 44)
PCV-m2B Capsid	forward	CTGCAGACGTATCCAAGGAG (서열번호 45)
	Liker reverse	CCATGGGGATCCTCACTTAGGGT (서열번호 46)

[1902] 상기 캡시드 프라이머 3종 중 선택되는 어느하나 이상으로 PCV의 항원단백질인 ORF2 항원을 생성하였다.

[1903] 그래서 상기 캡시드 프라이머 3종 중 어느하나 이상을 캡시드 단백질을 코딩하고 있는 유전자의 종결코돈 말단의 5'

CCCCCCCATGCCCTGAATTTCATA 3'(서열번호 48)를 이용하여 Accuscript Hi-Fi Reverse transcriptase (Ailgent)를 이용해 PCV의 cDNA를 만들었다.

[1904] 만들어진 cDNA를 이용하여 서열번호 41 내지 서열번호 46를 이용하여 다음과 같은 PCR 조건으로 번역결정부위를 클로닝하였다.

[1905] Step 1: 90°C 10min,

[1906] Step 2: 90°C 30sec,

[1907] Step 3: 62°C 30sec,

[1908] Step 4: 72°C 2min,

[1909] Step 5: go to Step 2 (x39),

[1910] Step 6: 72°C 10min,

[1911] Step 7: 12°C hold.

[1912] 클로닝된 번역결정부위를 유전자재조합 벡터로 삽입시키기 위하여 다음과 같은 프라이머들을 이용하여 5'말단에 PstI 제한 효소 부위(restriction enzyme site)를, 3'말단에 BamHI 제한 효소 부위를 부착하여 절단 후 라이게이션(ligation)

시켰다.

[1913]

[1914] forward PstI: CTGCAGATTCAGCGTATTCTTTATTGTGA (서열번호 5)

[1915] reverse BamHI: GCGCGGATCCTTATATGTTACTATACACC (서열번호 6)

[1916]

[1917] 이를 위한 PCR 조건은 상기 조건과 동일하게 하였다.

[1918]

[1919] 실시예 10 : 벡터 제작

[1920] *Bacillus subtilis* 168 strain(KCTC 1327)을 이용하였다. *B. subtilis*의 포자 표면에 면역결정부위를 발현하기 위한 벡터제작은 pHT-01 벡터(BioSharp, Inc.)를 SacI과 BamHI으로 자르고, 이부분을 5'말단에 SacI 제한 효소 부위, 3'말단에 BamHI 제한 효소 부위를 부착한 PCotG-CotG-linker-MCS, PCotB-CotC-linker-MCS 및 PCotC-CotC-linker-MCS 각각으로 치환하였다.

[1921] PCotG-CotG, PCotB-CotB 및 PCotC-CotGC 각각의 *B. subtilis*의 게놈 DNA에서 다음과 같은 프라이머 (서열번호 9, 10, 37, 38, 39, 40) 각각을 5'말단에 SacI 제한 효소 부위를 부착하고 3'말단에 BamHI 제한 효소 부위 및 융합부로서 링커(linker)를 부착하였다. 이 때 링커 시퀀스는 서열번호 16을 공통적으로 사용하였다.

[1922] [표3]

Linker sequence		GGAGGTGGGGGTTCACTCCAG (서열번호 16)
CotG	forward	GAGCTCAGTGTCCCTAGCTCCGAG (서열번호 9)
	Liker reverse	CTGCAGTGAACCCCCACCTCCTTTGTATTTCTTTTTGACT A (서열번호 10)
CotB	forward	ATAGAGCTCCTTCCAATCTCTT (서열번호 37)
	Liker reverse	TATCTGCAGTGAACCCCCACCTCCTTAAAATTTACGTTTC (서열번호 38)
CotC	forward	ATAGAGCTCTGTAGGATAAATCGT (서열번호 39)
	Liker reverse	TATCTGCAGTGAACCCCCACCTCCTTAGTAGTGTT (서열번호 40)

[1923]

[1924] 링커의 3'말단에 PstI 제한 효소 부위를 부착하여 향후 면역결정부위로 치환하였다.

[1925] 클로닝된 면역결정부위를 유전자재조합 벡터로 이동시키기 위하여 상기 서열번호 5, 6의 프라이머를 이용하여 5'말단에 PstI 제한 효소 부위를, 3'말단에 BamHI 제한 효소 부위를 부착하였다. 이를 위한 PCR 조건은 상기 조건과

동일하게 하였다.

[1926]

[1927] 실시예 11 : 바실러스 형질전환

[1928] 바실러스 형질전환은 상기 언급된 방법 중 전기천공법(electroporation, EP)(BIO-RAD Gene Pulser II)을 이용하여 통상적인 방법으로 진행하였다.

[1929] 구체적으로는 Growth medium (LB medium plus 0.5M sorbitol(Sigma-Aldrich Inc))으로 키운 *B. subtilis* DB104 strain을 electroporation medium (LB medium plus 0.5M sorbitol, 0.5M mannitol(Sigma-Aldrich Inc), 10% glycerol(Sigma-Aldrich))으로 희석하였다. 이 때 희석 농도는 E.Coli Pulser Cuvett (BIO-RAD) 0.1cm electrode에 60 μ l를 분주하여 Gene Pulser II (BIO-RAD) 200 Ω 2.1kV, 0.25 μ F으로 주었을 때 constant time이 5 msec가 되도록 희석하였다. 희석된 competent cell은 -80°C에 보관하였다.

[1930] 형질전환은 만들어진 competent cell에 10 ng의 DNA plasmid를 넣고 상기 조건으로 수행하였다.

[1931] 전기충격 직후 1 ml의 outgrowth medium (LB medium plus 0.5M sorbitol and 0.38M mannitol)을 넣어주어 37°C shaker incubator에서 3시간 배양하였다. 이후 chloramphenicol(Sigma-Aldrich Inc) LB plate에서 형질전환된 바실러스 콜로니를 수득하였다.

[1932]

[1933] 실시예 12 : 바실러스 스포어 디스플레이 시스템 제작

[1934] 자체 제작한 유전자재조합 벡터의 확인을 위해, 서열번호 11, 12의 프라이머 세트로 5'말단에 PstI 제한 효소 부위, 3'말단에 BamHI 제한 효소 부위를 부착한 GFP 염기서열을 유전자재조합 벡터로 이동하였다.

[1935]

[1936] eGFP forward PstI: CTGCAGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG (서열번호 11)

[1937] eGFP reverse BamHI: CCATGGGGATCCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG (서열번호 12)

[1938]

[1939] 만들어진 유전자재조합 벡터를 이용하여 상기 제시된 형질전환 방법으로 형질전환 바실러스를 확보하였다.

[1940] 형질전환된 바실러스의 경우 포자형성 과정에서 GFP 신호를 나타낸다. 이를 확인하기 위해 형질전환된 바실러스를 Schaeffer's sporulation medium에 키우면서 24시간, 48시간, 72시간에 fluorescence microscope, flow cytometry 등으로 GFP 신호를 확인하였다. 또한, 스포어 발현을 Malachite green staining로 확인하였다.

[1941] CotG, CotB, CotC를 이용한 Malachite green staining 실험 결과는 도 57, 도 58, 도 59에 각각 도시하였다.

[1942]

[1943] 실시예 13 : 백신 제조방법

- [1944] 형질전환된 *B. subtilis*를 LB medium 2 ml에 3시간 배양 후, Schaeffer's sporulation medium 1 L당 500 ul를 넣어주어 포자형성을 48시간 유도하였다.
- [1945] 상기 언급된 malachite green staining을 통해 90% 이상의 포자가 형성되면 포자비활성화 단계로 넘어가고, 포자형성이 충분하지 않으면 6시간~12시간 추가 배양후 포자비활성화 단계로 넘어간다.
- [1946] 포자비활성화는 120°C 15 min의 멸균과정을 통해 진행되었다. 포자비활성화는 획득된 sample의 일부를 LB plate 또는 LB medium에 넣고, 각각 37°C shaker incubator, 37°C에 overnight culture하여 colony 또는 증식 여부로 판별하였다.
- [1947] 대조군으로 비활성화되지 않은 포자를 같이 배양하였다. 또한 이때 serial dilution을 하여 포자의 수를 확인하였다. 포자비활성화가 확인되면 멸균된 cold distilled water (D.W.)로 5회 washing 및 centrifugation을 수행하여 부유물이 없도록 하였다. Washing 과정이 끝난 포자는 PBS를 이용하여 마우스 10⁸개/200ul, 돼지 10¹²개/ml의 농도로 분주하여 사용전까지 -80°C냉장고에 보관한다.
- [1948]
- [1949] 실시예 14 : 면역 반응 확인
- [1950] 제작된 유전자재조합백신의 면역반응 확인은 다음과 같이 확인하였다. 마우스 c57BL/6 strain에 10⁸개/200ul 농도의 유전자재조합백신을 복강으로 2주 간격으로 주사하였고, 매 주사 전 또는 첫 주사후 40일 쯤에 체중변화 및 혈액내 IgG 농도의 변화를 측정하였다.
- [1951] CotG, CotB, CotC를 이용한 면역 반응 확인 실험 결과는 도 60, 도 61, 도 62에 각각 도시하였다.
- [1952]
- [1953] 유전자재조합백신이 접종된 마우스는 비접종 마우스와 비교하여 체중변화 없이 혈액내 IgG의 농도가 증가하여야 한다. 또한, 항원 특이적인 항체의 생성을 확인하기 위해, PCV-2A, PCV-2B, PCV-m2B 항원을 하기의 서열번호 13, 14의 프라이머 세트로 클로닝하여 pET28a vector에 넣고 AKTA pure L1을 이용하여 정제하였고, 유전자재조합백신 접종 후 40일 쯤 되는 마우스에서 확보한 혈액을 이용하여 immunoblotting assay를 수행하였다.
- [1954] forward: GCTAGCATTTCAGCGTATTCTTTATTGTGA (서열번호 13)
- [1955] reverse: GGATCCTTATATGTTACTATACACCAACACAGG (서열번호 14)
- [1956]
- [1957] 항원을 정제하고 검증하기 위해 항원의 N-말단에 His-tagging을 하였다. 항원 특이적 항체의 확인은 immunoblotting assay를 수행하였을 때 anti-His antibody와 동일한 위치에서 band가 검출되는 것으로 확인할 수 있다.
- [1958] CotG, CotB, CotC를 이용한 면역 반응 확인 실험 결과는 도 63, 도 64, 도 65에 각각 도시하였다.
- [1959]
- [1960] Materials

- [1961] pET28a vector: Addgene
- [1962] AKTA pure L1: GE Healthcare
- [1963] Anti-His antibody: Santa-Cruz
- [1964]
- [1965] 실시예 15 : 중화항체가
- [1966] 유전자재조합백신의 효과를 검증하는 방식은 상기 제시된 면역반응확인 방법에서 획득한 혈액 내의 IgG 농도의 변화를 확인하여 실시하였다. 혈액 내의 IgG의 농도는 통상적인 ELISA 측정 방식을 사용하였다. 이 때, ELISA kit(고마 바이오텍)를 이용하였다
- [1967] 유전자재조합백신을 접종한 마우스의 혈액에서 비접종한 마우스의 혈액보다 높은 수준의 IgG가 생성되는 것을 확인 할 수 있다.
- [1968] 본 출원의 유전자재조합백신이 접종된 돼지를 PEDV로부터 보호하는지 확인하기 위하여, 총 8마리의 돼지(D-1에 4~5주령)를 무작위로 두 그룹으로 배정하여 각각 위약 또는 유전자재조합백신을 D0, 14, 및 28에 근육내로 접종하였다.
- [1969] D40까지 임상적 징후를 매일 모니터링하였다. 주사부위 및 체중변화를 측정하였다. 각 주사전 수집한 혈청 샘플을 이용하여 ELISA를 수행하여 IgG 값의 변화를 측정하였다.

[1970]

산업상 이용가능성

- [1971] 본 출원은 동물의 특정 질병의 병원체를 대상으로 하는 면역원성물질, 면역원성시스템 및 이를 포함한 동물 백신 조성물의 다양한 태양 및 다양한 용도를 제공한다.
- [1972] 바람직한 예로서, 돼지 감염 질병의 예방, 개선 및 치료를 위한 백신, 의약품 및 사료 등에 유용하게 이용할 수 있다.

[1973]

서열목록 Free Text

- [1974] 서열번호 1번 내지 4번은 PEDV 백신 제조를 위한 면역원성 부위의 프라이머 서열이다.
- [1975] 서열번호 5번 내지 8번은 면역결정부위를 벡터로 삽입시키기 위해 사용되는 프라이머 서열이다.
- [1976] 서열번호 9번 및 10번은 CotG의 프라이머 서열이다.
- [1977] 서열번호 11번 및 12번은 GFP 프라이머 서열이다.
- [1978] 서열번호 13번 및 14번은 항체 생성 확인을 위한 프라이머 서열이다.
- [1979] 서열번호 16번은 링커 서열이다.
- [1980] 서열번호 17번 및 18번 각각은 spike 1 및 spike 2 단백질의 일부 서열들이다.
- [1981] 서열번호 19번 내지 36번은 스파이트 단백질을 암호화하는 염기서열들이다.

- [1982] 서열번호 37번 및 38번은 CotB의 프라이머 서열이다.
- [1983] 서열번호 39번 및 40번은 CotC의 프라이머 서열이다.
- [1984] 서열번호 41번 내지 46번은 PCV 백신 제조를 위한 면역원성 부위의 프라이머 서열이다.
- [1985] 서열번호 47번은 ORF2의 서열이다.
- [1986] 서열번호 48번은 PCV 백신 제조시 cDNA 합성을 위한 서열이다.
- [1987] 서열번호 49번 및 서열목록 50은 CotB 및 Cot C의 서열이다.

청구범위

- [청구항 1] i) 포자성 박테리아의 포자,
 ii) 상기 포자의 포자외부영역에 존재하는 포자 코트 단백질(spore coat protein),
 ii) 상기 포자 코트 단백질에 융합된 돼지 질병 바이러스 면역성부위를 포함하고
 이 때 상기 돼지 질병 바이러스는 돼지유행성설사바이러스(Porcine Epidemic Diarrhea Virus, PEDV) 및 돼지서코바이러스(Porcine Circovirus, PCV) 중 어느하나 이상인 면역원성 포자융합디스플레이시스템.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
 포자성 박테리아는 *Clostridium*, *Sporolactobacillus*, *Bacillus* 속에 속하는 박테리아인 것을 특징으로 하는 면역원성 포자융합디스플레이시스템.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,
 포자성 박테리아는 *Bacillus subtilis*인 것을 특징으로 하는 면역원성 포자융합디스플레이시스템.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
 상기 돼지유행성설사바이러스(Porcine Epidemic Diarrhea Virus, PEDV)의 면역원성부위는 15종 이상의 야외주들의 공통서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 포자융합디스플레이시스템.
- [청구항 5] 제4항에 있어서,
 상기 돼지유행성설사바이러스(Porcine Epidemic Diarrhea Virus, PEDV)의 공통서열은 서열번호 1 내지 4 중 어느 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는 포자융합디스플레이시스템.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
 상기 돼지서코바이러스(Porcine Circovirus, PCV)의 면역원성부위는 3종 이상의 야외주들의 공통서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 포자융합디스플레이시스템.
- [청구항 7] 제6항에 있어서,
 상기 돼지서코바이러스(Porcine Circovirus, PCV)의 공통서열은 서열번호 41내지 46 중 어느 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는 포자융합디스플레이시스템.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
 iv) 포자 코트 단백질과 면역원성부위 사이를 융합하는 융합부를 추가로 포함하는 포자융합디스플레이시스템.
- [청구항 9] 제8항에 있어서,
 상기 융합부는 서열번호 16이 암호화하는 펩타이드인 것을 특징으로 하는 포자융합디스플레이시스템.

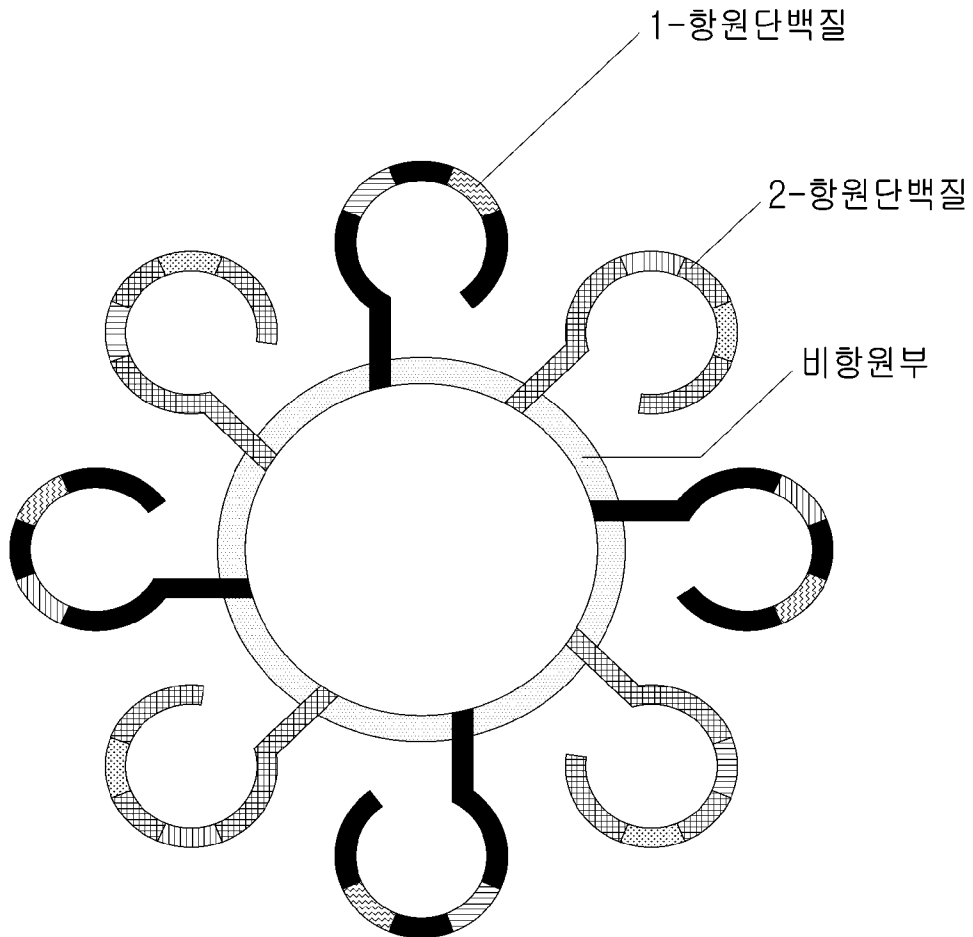
- [청구항 10] 제1항에 있어서,
상기 포자 코트 단백질은 CotC, CotD, CotB, CotE, CotF, CotG, CotN, CotS, CotT, CotV, CotW, CotX, CotY, CotZ, CotH, CotJA, CotJC, CotK, CotL, CotM 중 선택한 어느 하나인 것을 특징으로 하는 면역원성 포자융합디스플레이시스템.
- [청구항 11] 제10항에 있어서,
상기 포자 코트 단백질은 CotB, CotC 및 CotG 중 어느 하나이상인 것을 특징으로 하는 면역원성 포자융합디스플레이시스템.
- [청구항 12] 제1항에 있어서,
돼지유행성설사바이러스(Porcine Epidemic Diarrhea Virus, PEDV)의 면역원성부위는 스파이크 단백질의 일부 또는 전체인 것을 특징으로 하는 면역원성 포자융합디스플레이시스템.
- [청구항 13] 제12항에 있어서,
상기 돼지유행성설사바이러스(Porcine Epidemic Diarrhea Virus, PEDV)의 스파이크 단백질은 서열번호 19 내지 서열번호 36이 암호화하는 스파이크 단백질 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 면역원성 포자융합디스플레이시스템.
- [청구항 14] 제1항에 있어서,
돼지서코바이러스(Porcine Circovirus, PCV)의 면역원성부위는 캡시드 단백질의 일부 또는 전체인 것을 특징으로 하는 면역원성 포자융합디스플레이시스템.
- [청구항 15] 제14항에 있어서,
상기 돼지서코바이러스(Porcine Circovirus, PCV)의 캡시드 단백질은 서열번호 47을 암호화하는 캡시드 단백질인 것을 특징으로 하는 면역원성 포자융합디스플레이시스템.
- [청구항 16] i) 제1항의 포자융합디스플레이시스템,
ii) 상기 면역원성 포자융합디스플레이시스템을 전달하는 담체를 포함하고, 면역원성 포자융합디스플레이시스템의 농도가 $10^{12} \sim 10^{14}$ 개/ml 농도인 것을 특징으로 하는 백신조성물.
- [청구항 17] 제16항에 있어서,
상기 담체는 PBS 완충액을 포함하는 것을 특징으로 하는 백신조성물.
- [청구항 18] 돼지유행성설사바이러스(Porcine Epidemic Diarrhea Virus, PEDV) 야외주들의 면역원성부위를 수득하기 위한,
서열번호 1 및 2;
서열번호 3 및 4;
중 선택되는 하나 이상의 프라이머 세트.
- [청구항 19] 돼지서코바이러스(Porcine Circovirus, PCV) 야외주들의 면역원성부위를 수득하기 위한,

서열번호 41 및 42;
 서열번호 43 및 44;
 서열번호 45 및 46;
 중 선택되는 하나 이상의 프라이머 세트.

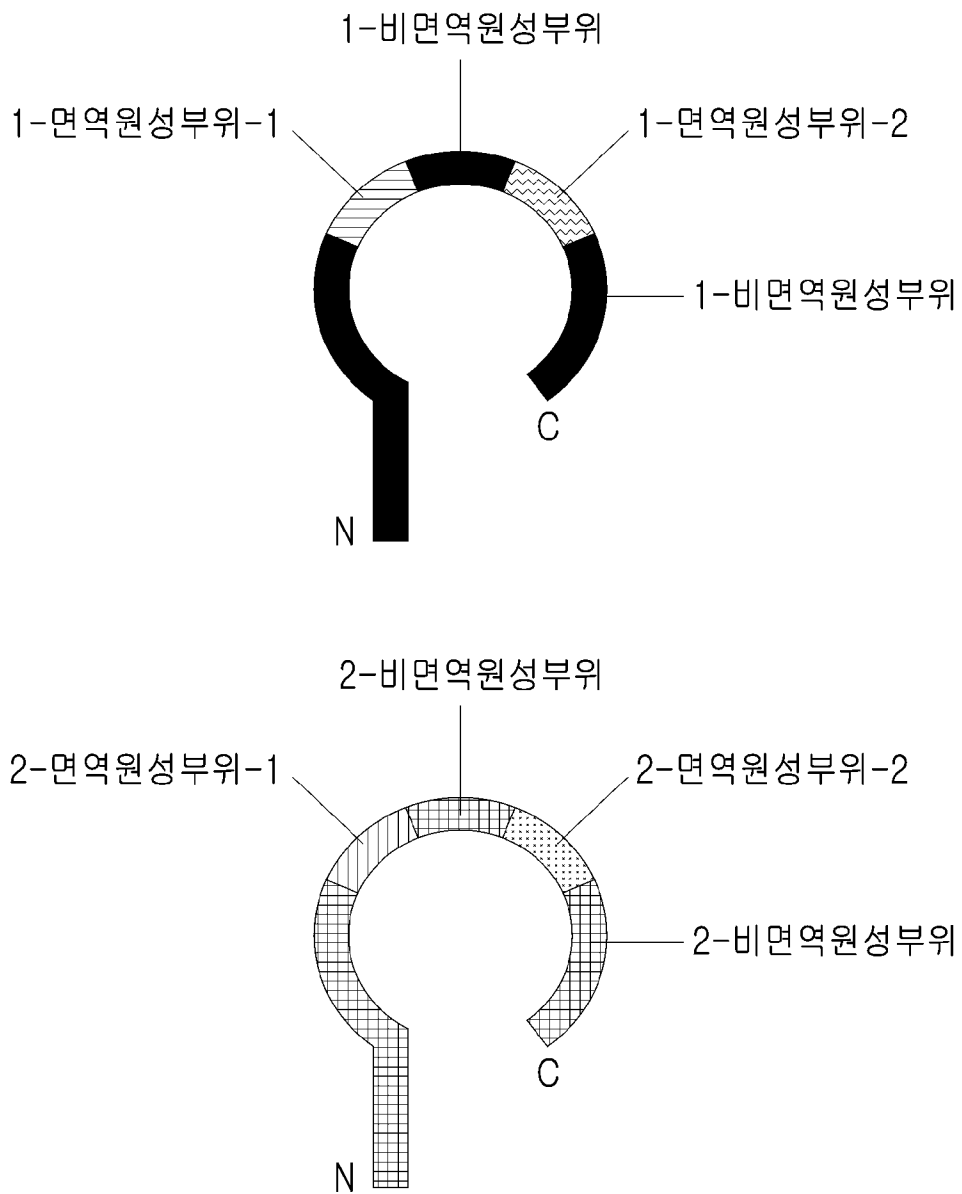
- [청구항 20] i) 포자의 포자외부영역에 존재하는 포자 코트 단백질(spore coat protein), 및
 ii) 상기 포자 코트 단백질에 융합된, 돼지유행성설사바이러스(Porcine Epidemic Diarrhea Virus, PEDV) 또는 돼지서코바이러스(Porcine Circovirus, PCV) 중 어느하나 이상의 면역원성 부위를 암호화하는 뉴클레오타이드를 포함하는 포자시스템제조합발현벡터.
- [청구항 21] 제20항에 있어서,
 상기 돼지유행성설사바이러스(Porcine Epidemic Diarrhea Virus, PEDV)의 면역원성부위를 암호화하는 염기서열은 15종 이상의 야외주들의 공통서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 포자시스템제조합발현벡터.
- [청구항 22] 제21항에 있어서,
 상기 돼지유행성설사바이러스(Porcine Epidemic Diarrhea Virus, PEDV)의 공통서열은 서열번호 1 내지 4 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 포자시스템제조합발현벡터.
- [청구항 23] 제20항에 있어서,
 상기 돼지서코바이러스(Porcine Circovirus, PCV)의 면역원성부위를 암호화하는 염기서열은 3종 이상의 야외주들의 공통서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 포자시스템제조합발현벡터.
- [청구항 24] 제23항에 있어서,
 상기 돼지서코바이러스(Porcine Circovirus, PCV)의 공통서열은 서열번호 41 내지 46 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 포자시스템제조합발현벡터.
- [청구항 25] 제20항에 있어서,
 포자시스템발현목적염기서열은
 iv) 포자 코트 단백질과 면역원성부위 사이를 융합하는 융합부를 암호화하는 염기서열을 포함하는 포자시스템제조합발현벡터.
- [청구항 26] 제25항에 있어서,
 상기 융합부를 암호화하는 염기서열은 서열번호 16의 염기서열인 것을 특징으로 하는 포자시스템제조합발현벡터.
- [청구항 27] 제20항에 있어서,
 상기 포자 코트 단백질을 암호화하는 염기서열은 CotC, CotD, CotB, CotE, CotF, CotG, CotN, CotS, CotT, CotV, CotW, CotX, CotY, CotZ, CotH, CotJA, CotJC, CotK, CotL, CotM 중 선택한 어느 하나를 암호화하는 염기서열인 포자시스템제조합발현벡터.

- [청구항 28] 제27항에 있어서,
상기 포자 코트 단백질을 암호화하는 염기서열은 CotB, CotC 및 CotG 중 어느 하나 이상을 암호화하는 염기서열인 것을 특징으로 하는 포자시스템제조합발현백터.
- [청구항 29] 제20항에 있어서,
상기 돼지유행성설사바이러스(Porcine Epidemic Diarrhea Virus, PEDV)의 면역원성부위를 암호화하는 염기서열은 스파이크 단백질의 일부 또는 전체를 암호화하는 염기서열이며,
상기 돼지서코바이러스(Porcine Circovirus, PCV)의 면역원성부위를 암호화하는 염기서열은 캡시드 단백질의 일부 또는 전체를 암호화하는 염기서열인 것을 특징으로 하는 포자시스템제조합발현백터.
- [청구항 30] 제29항에 있어서,
상기 돼지유행성설사바이러스(Porcine Epidemic Diarrhea Virus, PEDV)의 스파이크 단백질은 서열번호 19 내지 서열번호 36이 암호화하는 스파이크 단백질 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 면역원성 포자시스템제조합발현백터.
- [청구항 31] 제29항에 있어서,
상기 돼지서코바이러스(Porcine Circovirus, PCV)의 캡시드 단백질은 서열번호 47을 암호화하는 캡시드 단백질 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 면역원성 포자시스템제조합발현백터.
- [청구항 32] 돼지유행성설사바이러스(Porcine Epidemic Diarrhea Virus, PEDV) 또는 돼지서코바이러스(Porcine Circovirus, PCV) 유래 면역원성부위가 포자 코트 단백질에 융합된 것을 특징으로 하는 면역원성 포자융합디스플레이시스템을 $10^{12} \sim 10^{14}$ 개/ml 농도로 포함하는 백신 조성물을 2ml 투여하는 것을 특징으로 하는, 인간을 제외한 PEDV 감염 동물의 치료방법.
- [청구항 33] 제32항에 있어서, PEDV 또는 PCV 감염 동물은 돼지인 것을 특징으로 하는 PEDV 감염 동물의 치료방법.

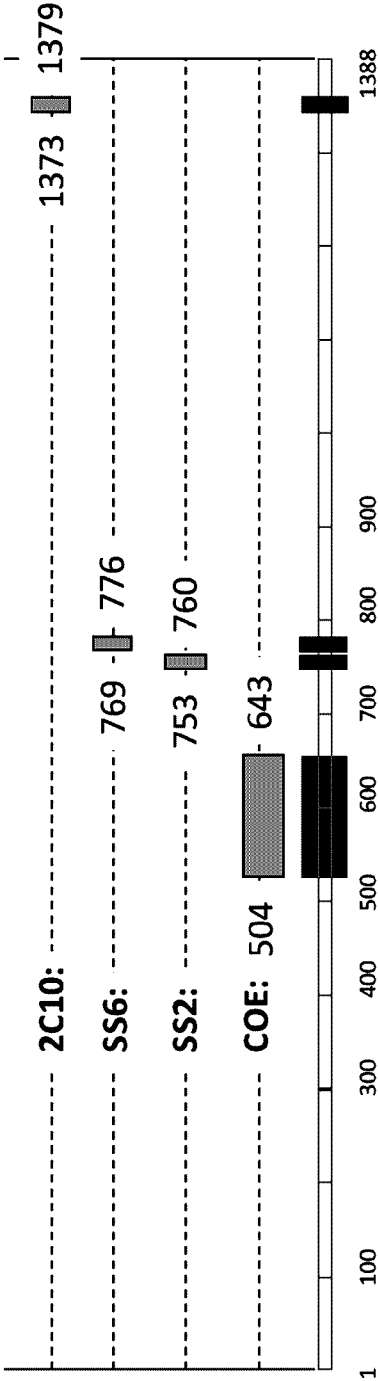
[도1]



[도2]



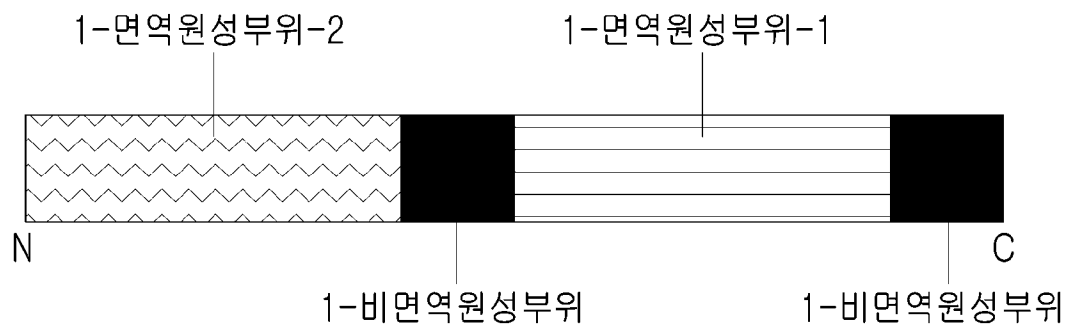
[도3]



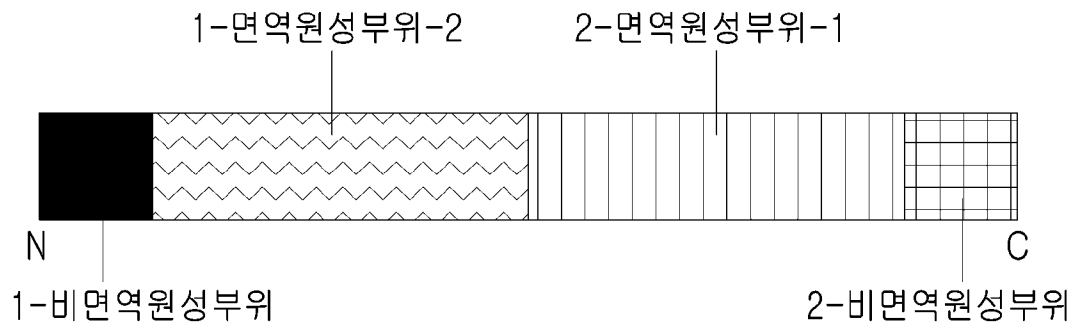
[도4]



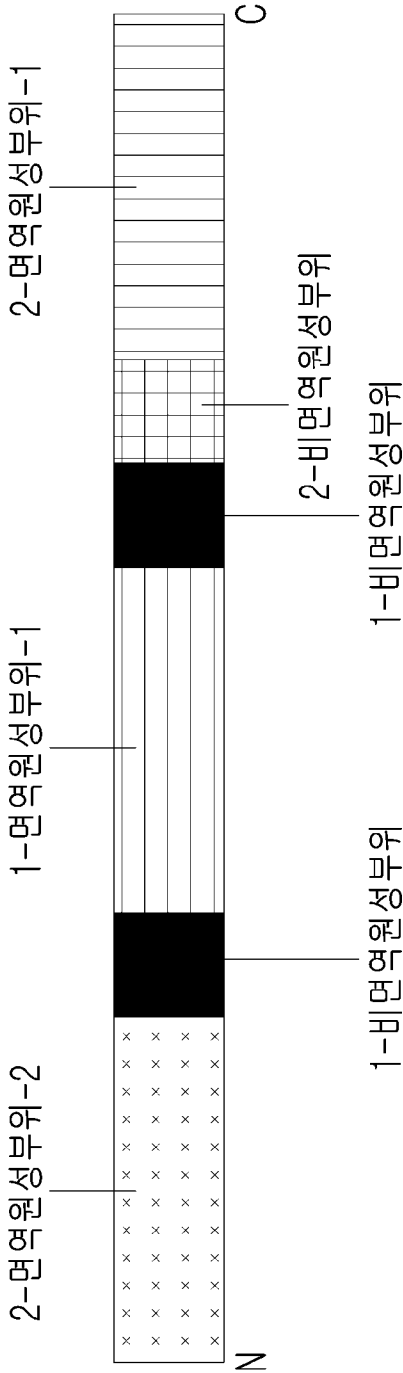
[도5]



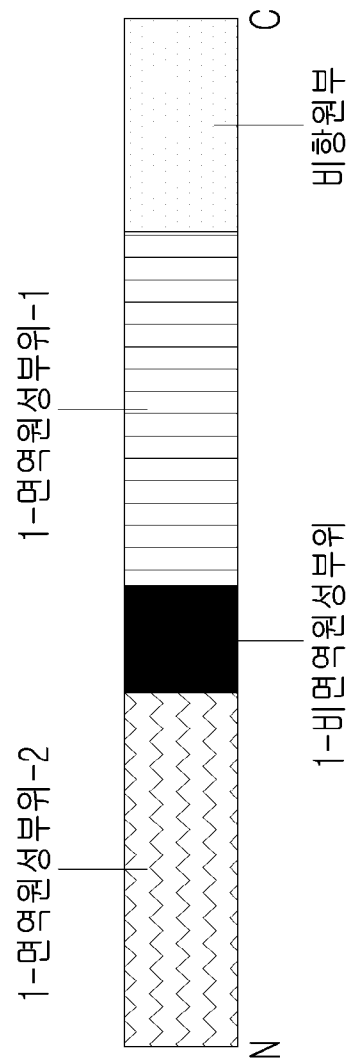
[도6]



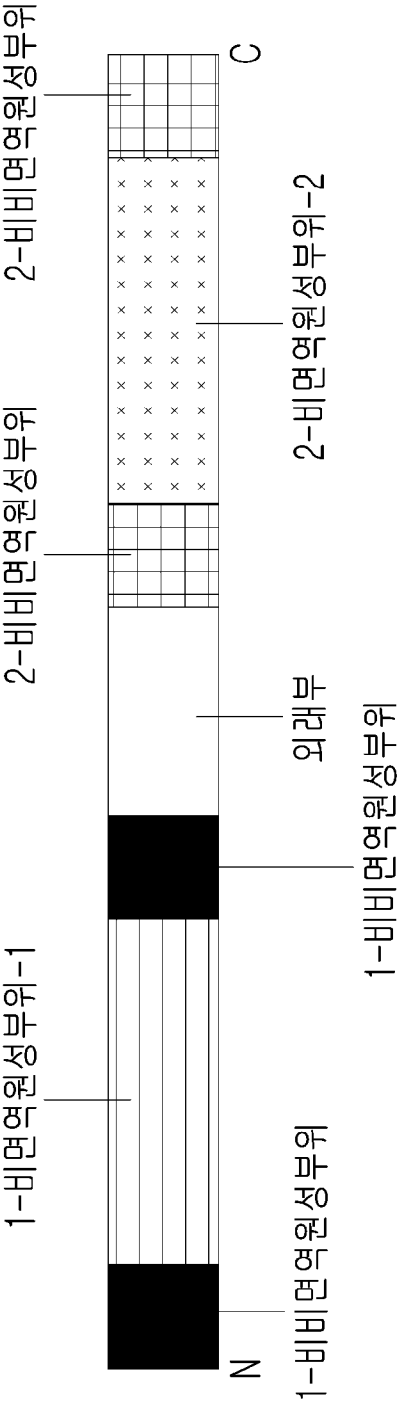
[도7]



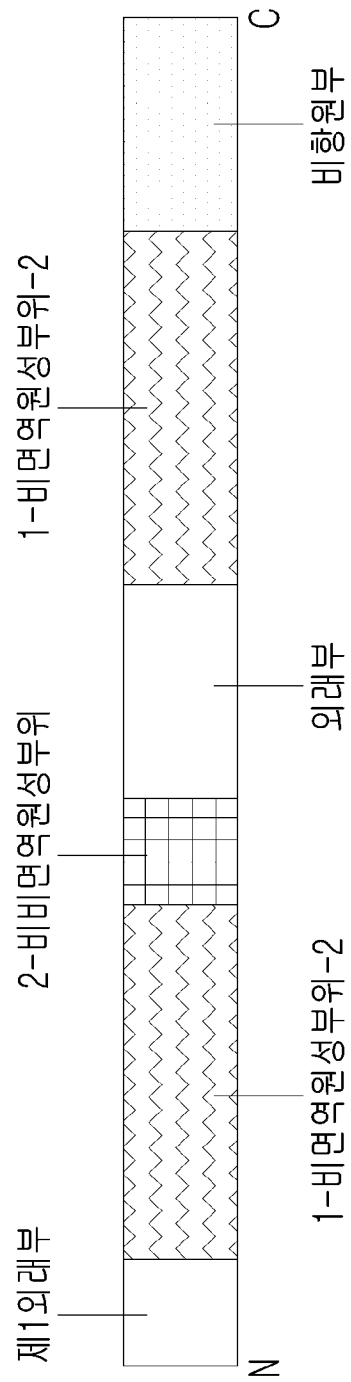
[도8]



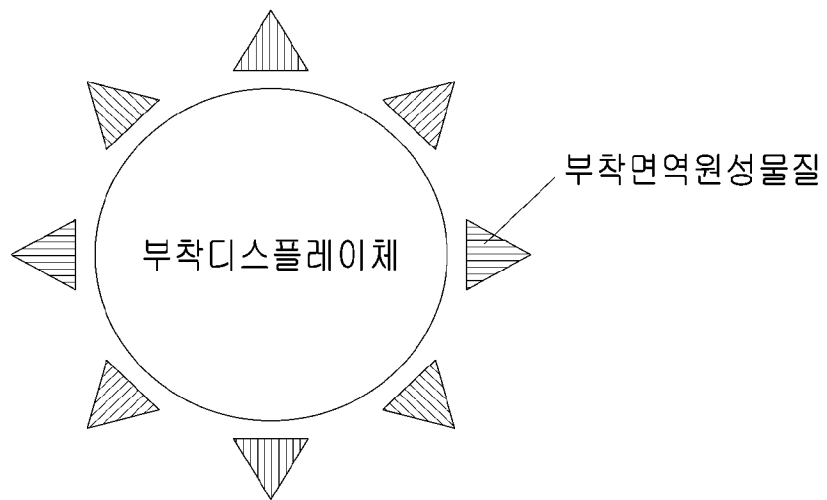
[도9]



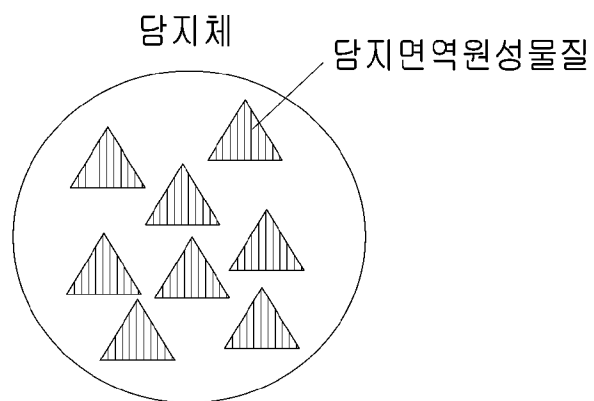
[도10]



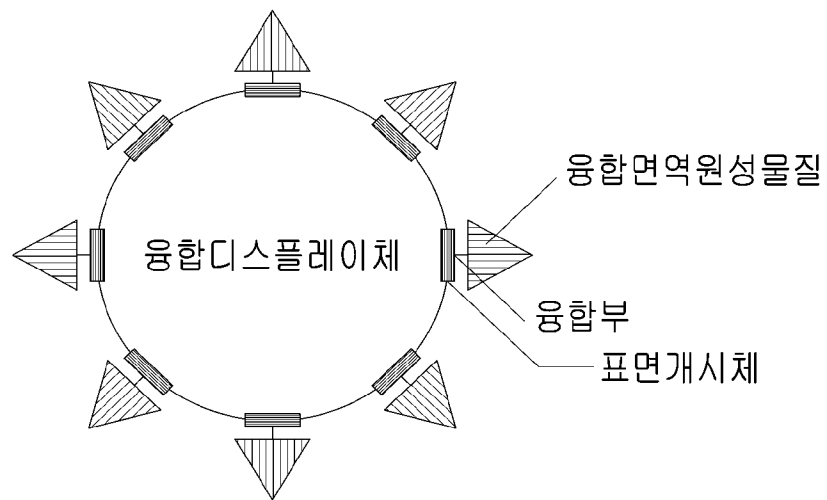
[도11]



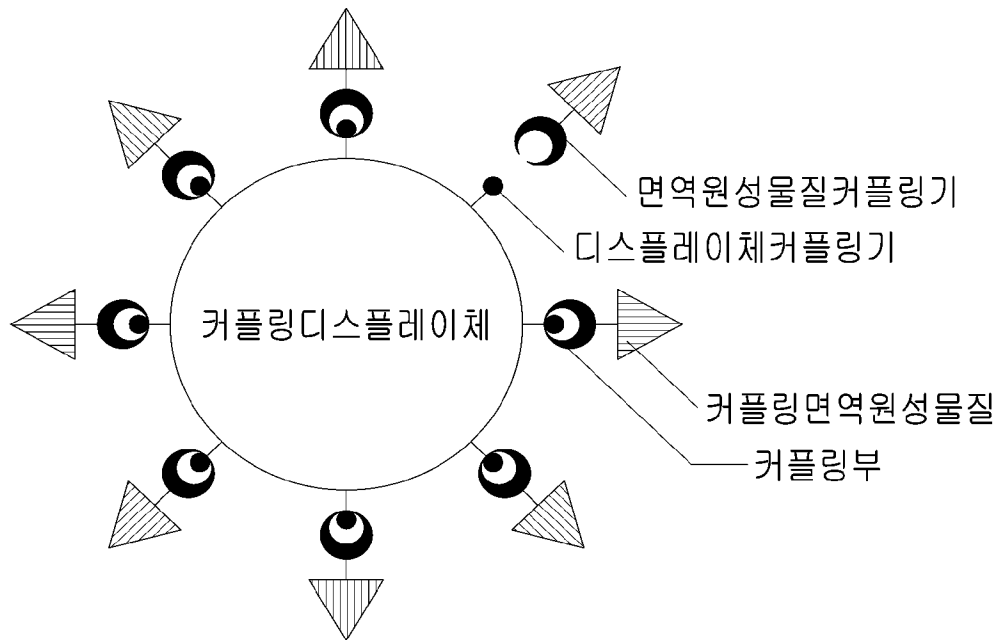
[도12]



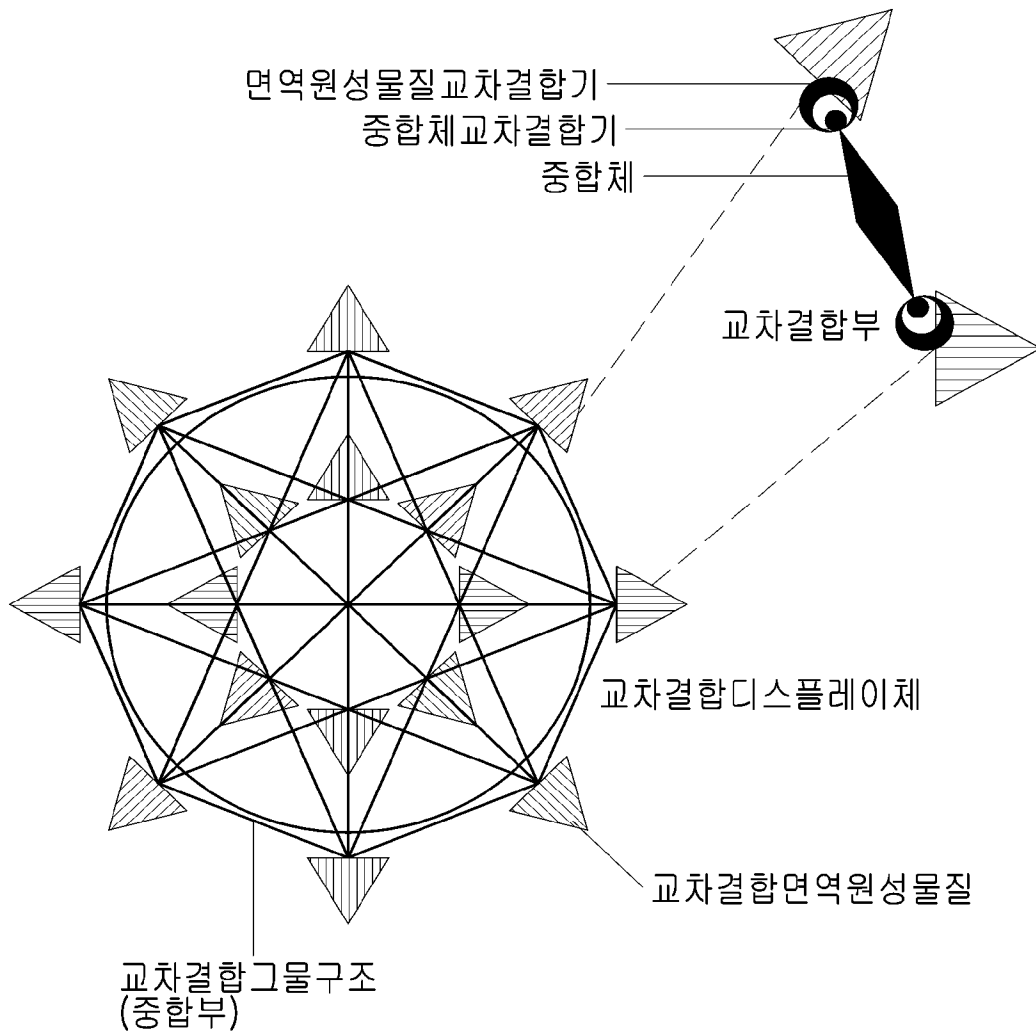
[도13]



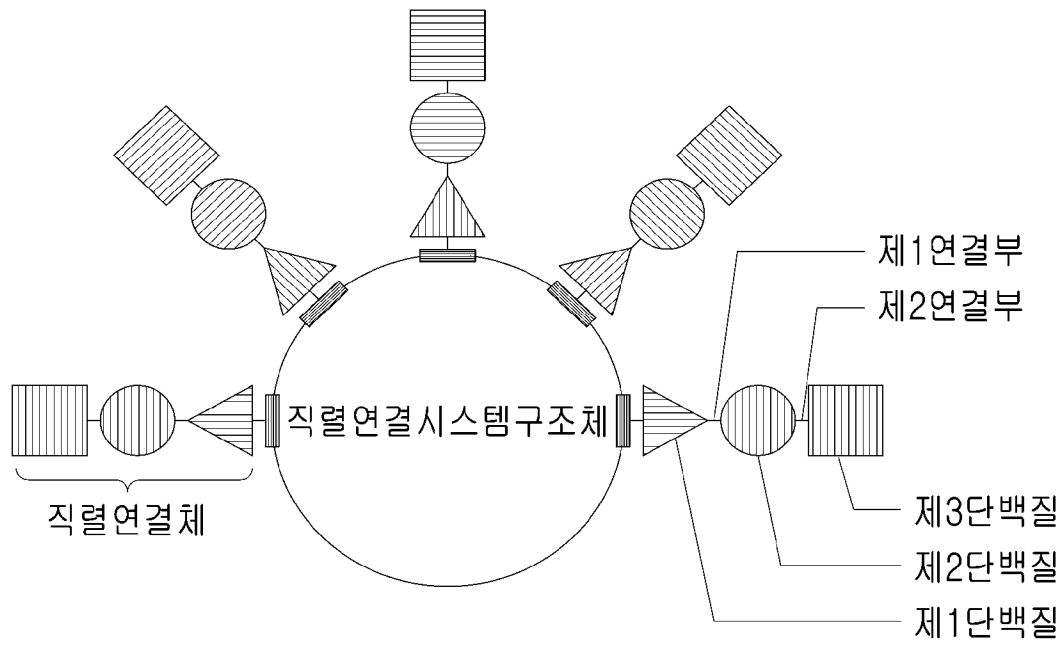
[도14]



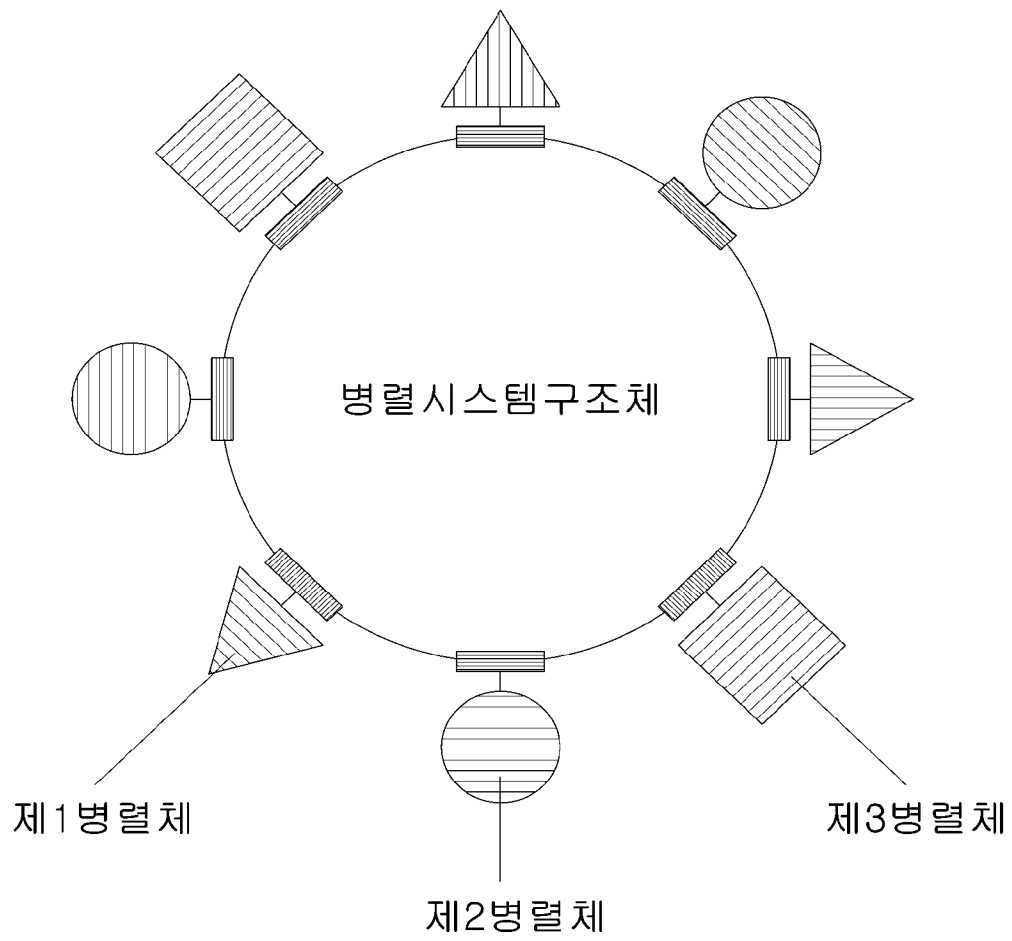
[도15]



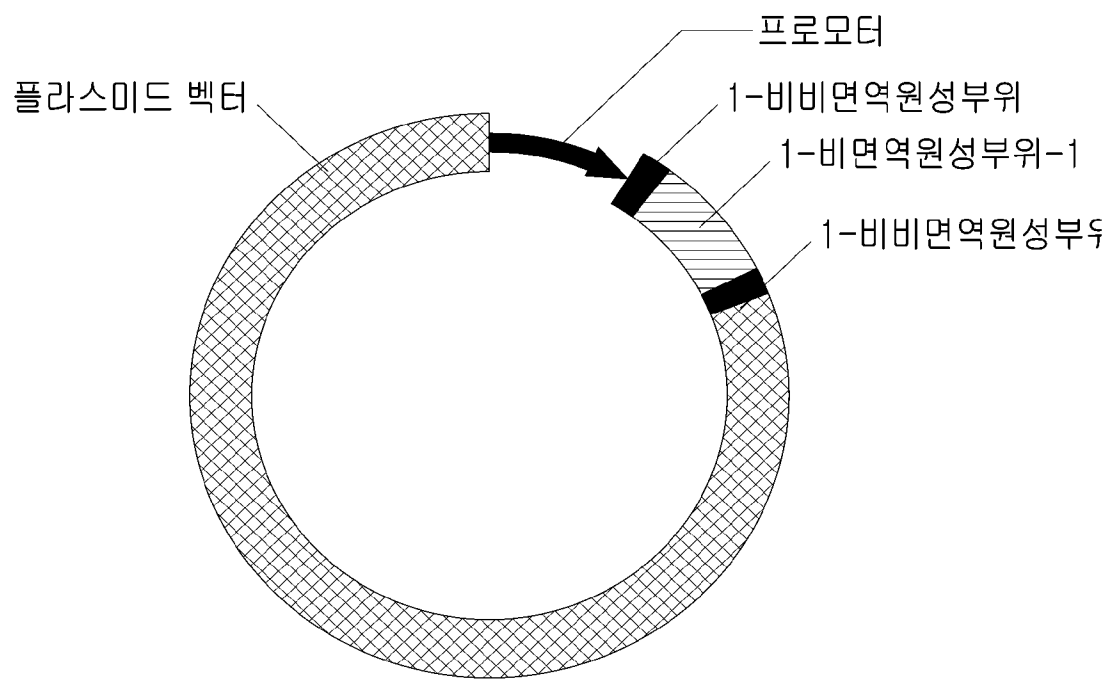
[도16]



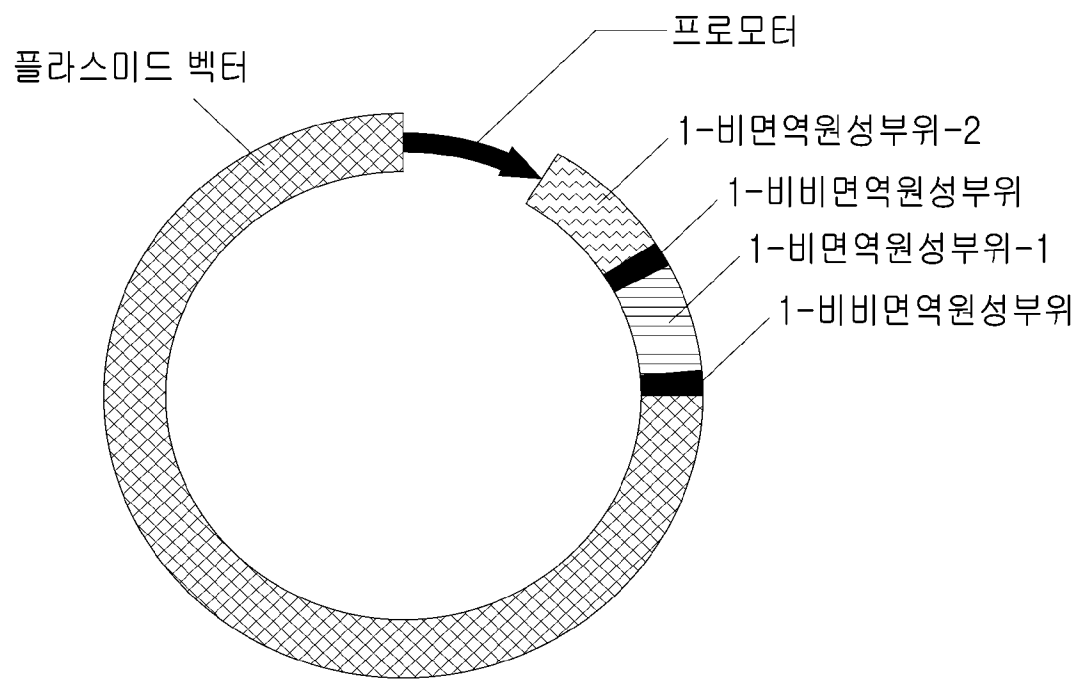
[도17]



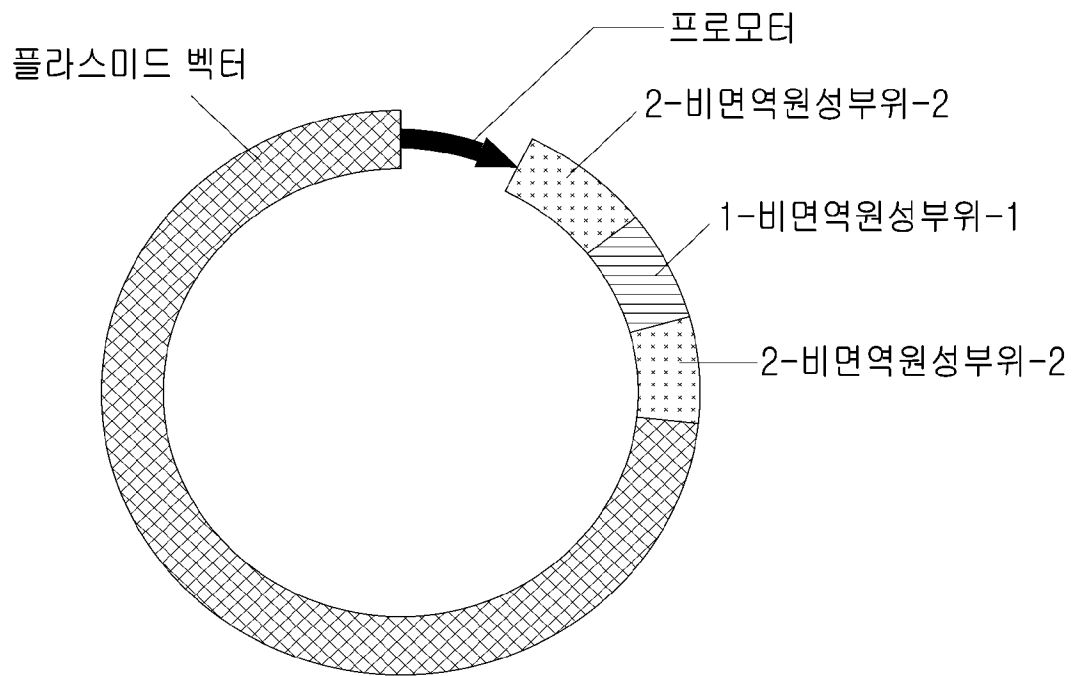
[도18]



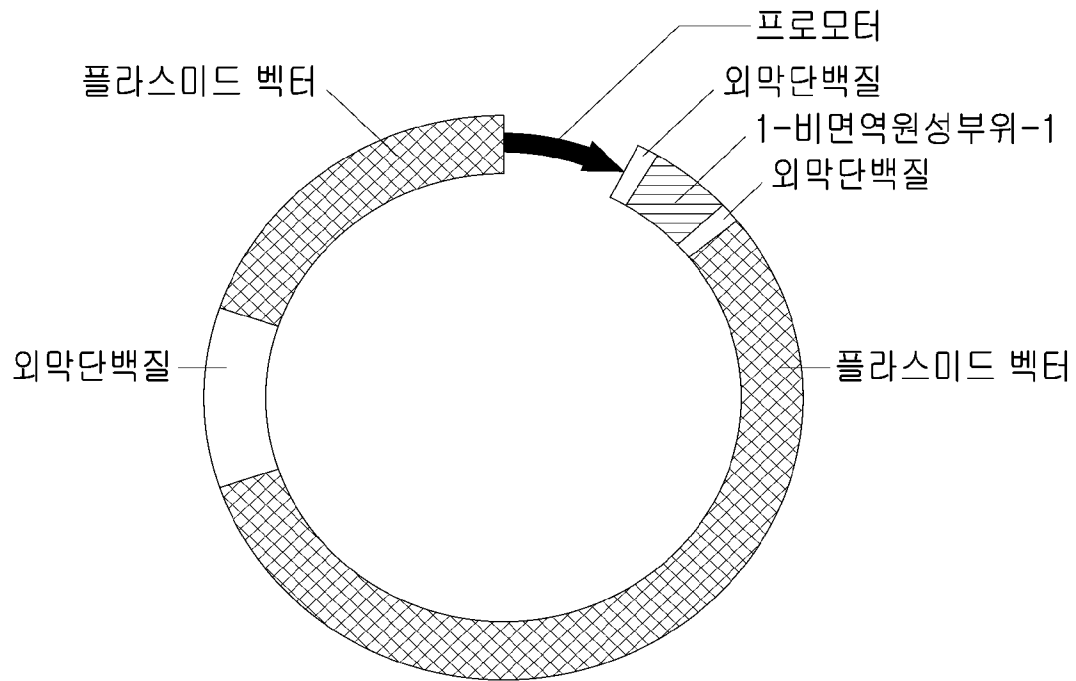
[도19]



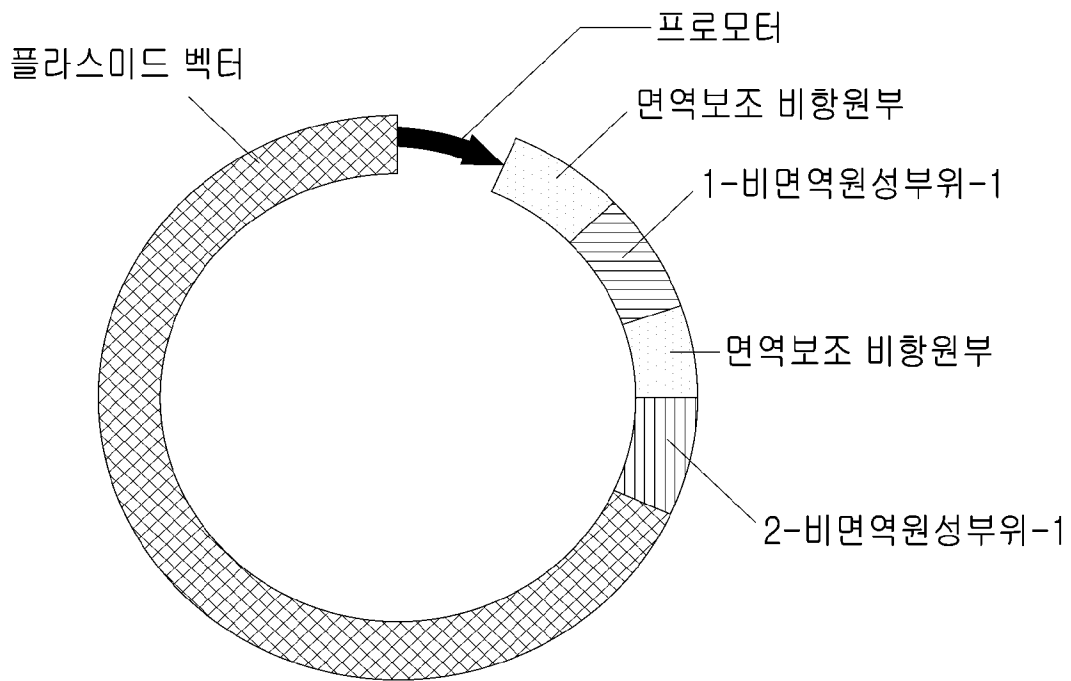
[도20]



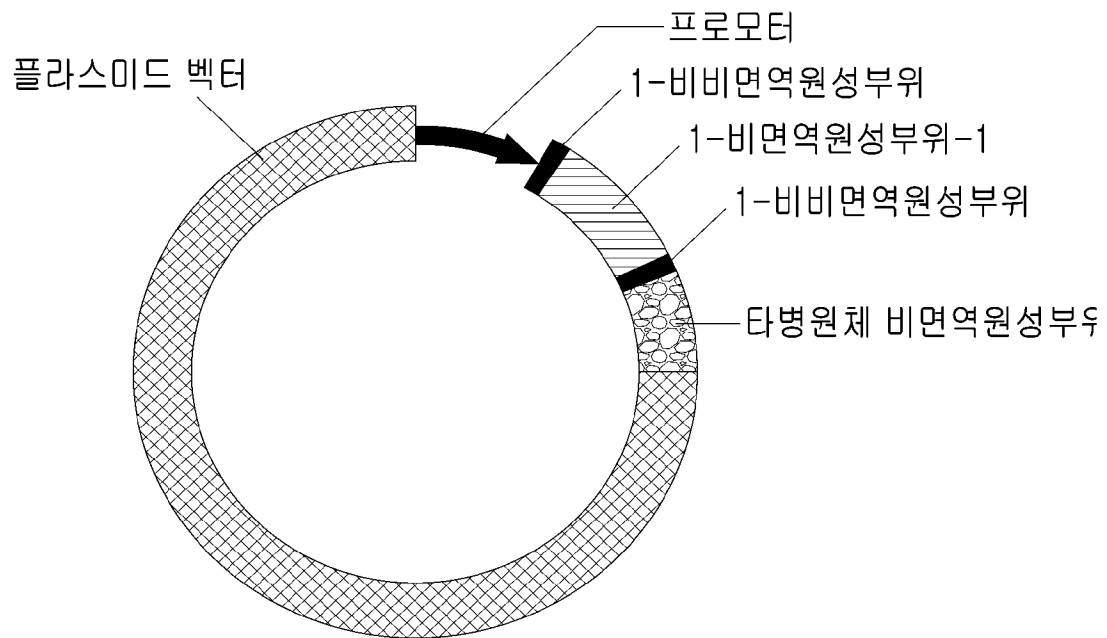
[도21]



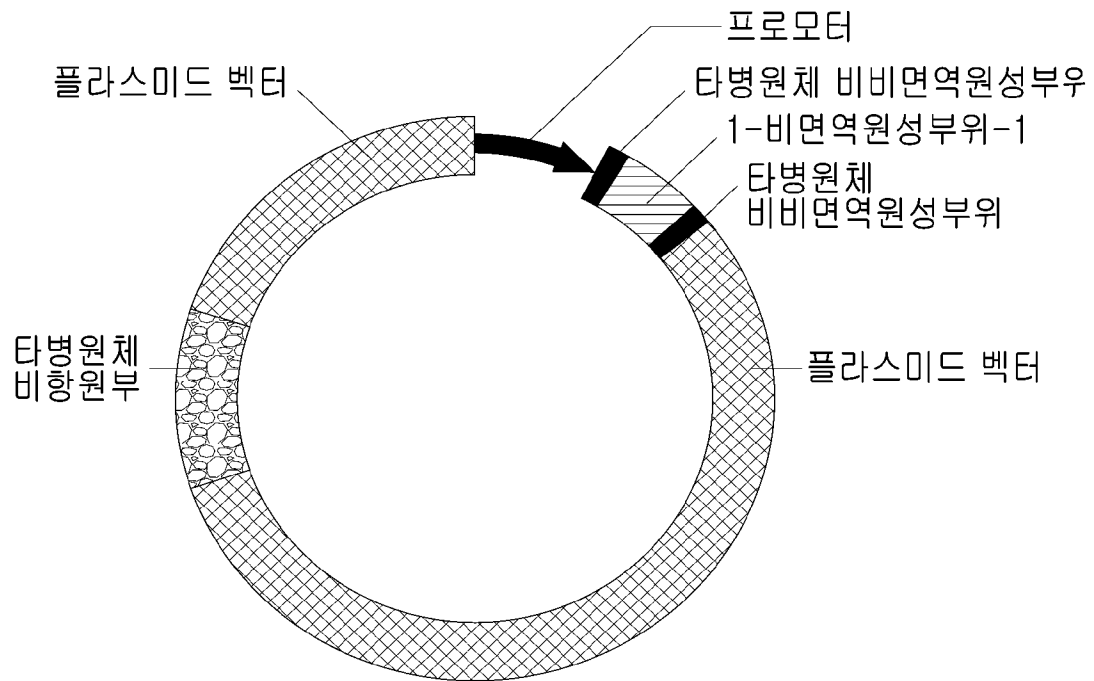
[도22]



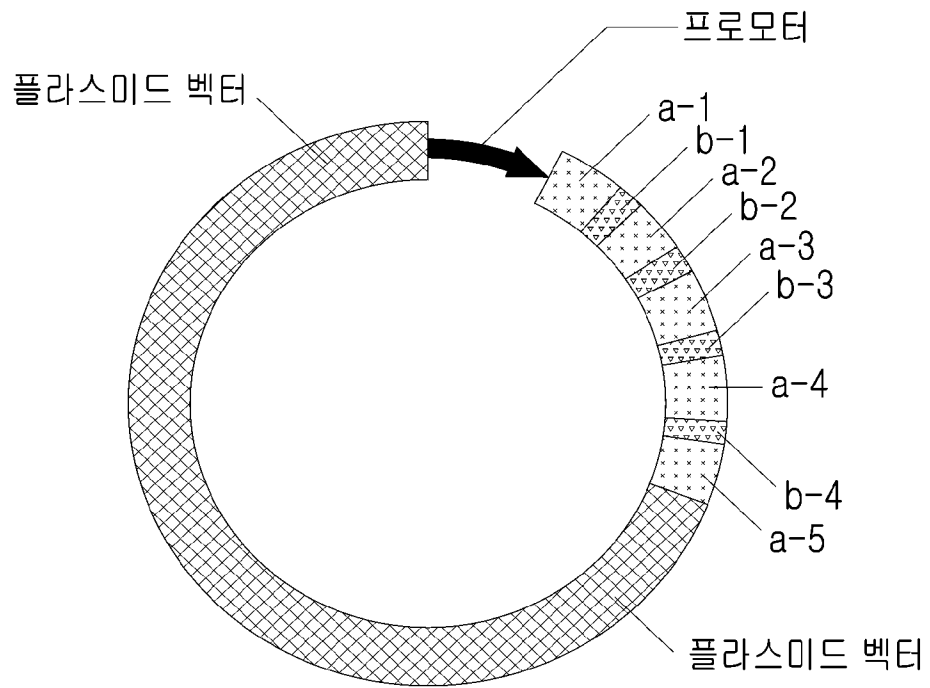
[도23]



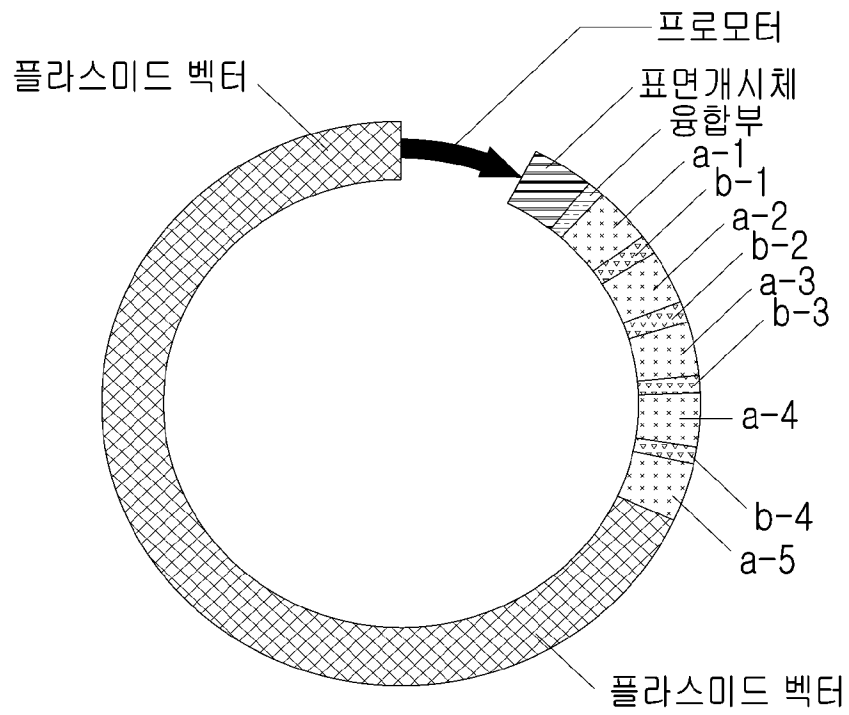
[도24]



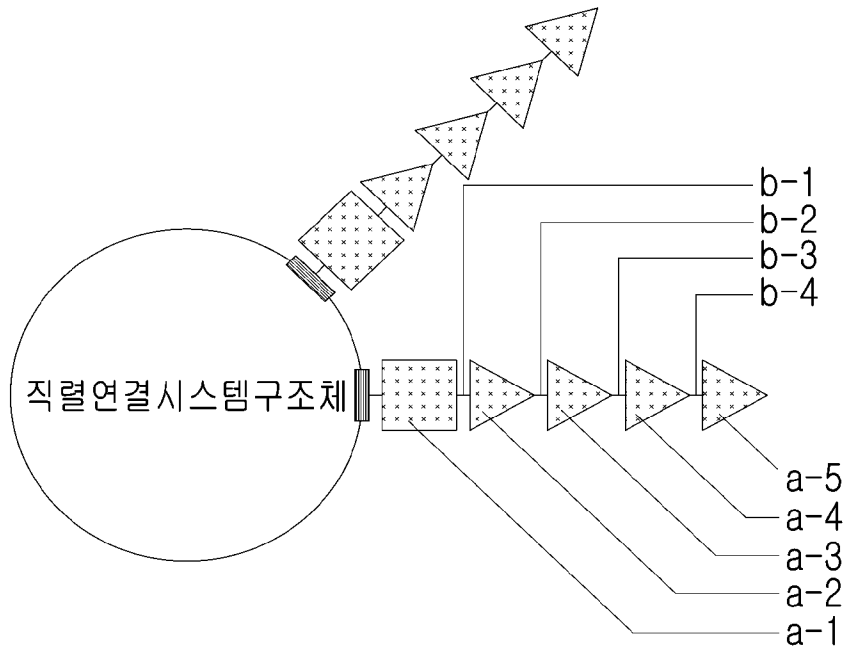
[도25]



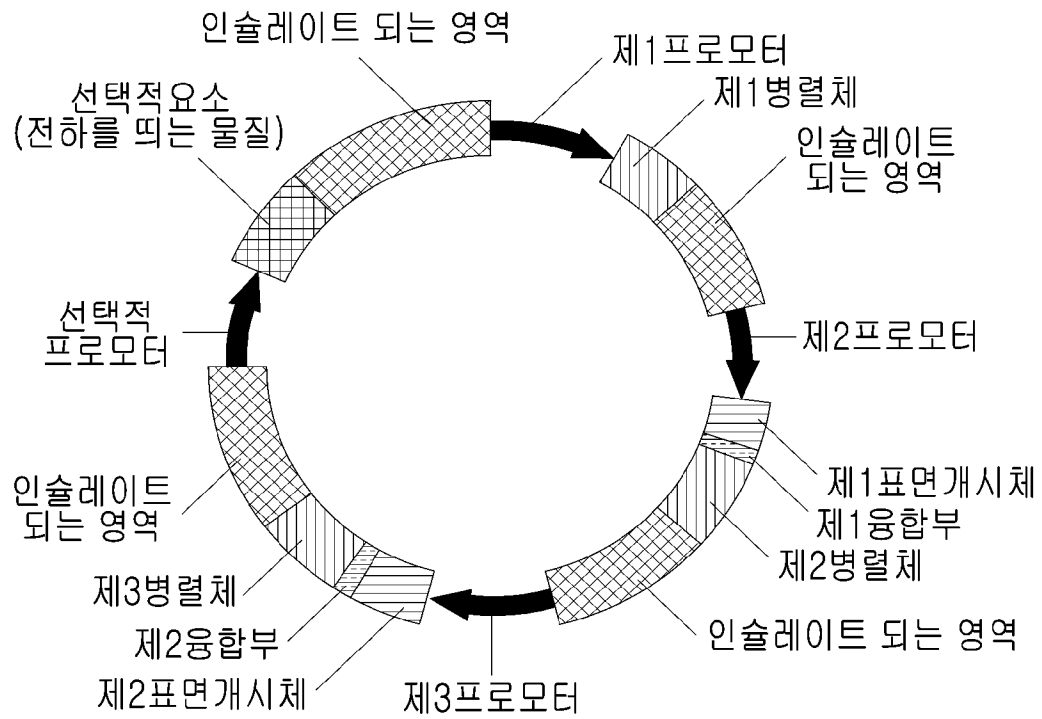
[도26]



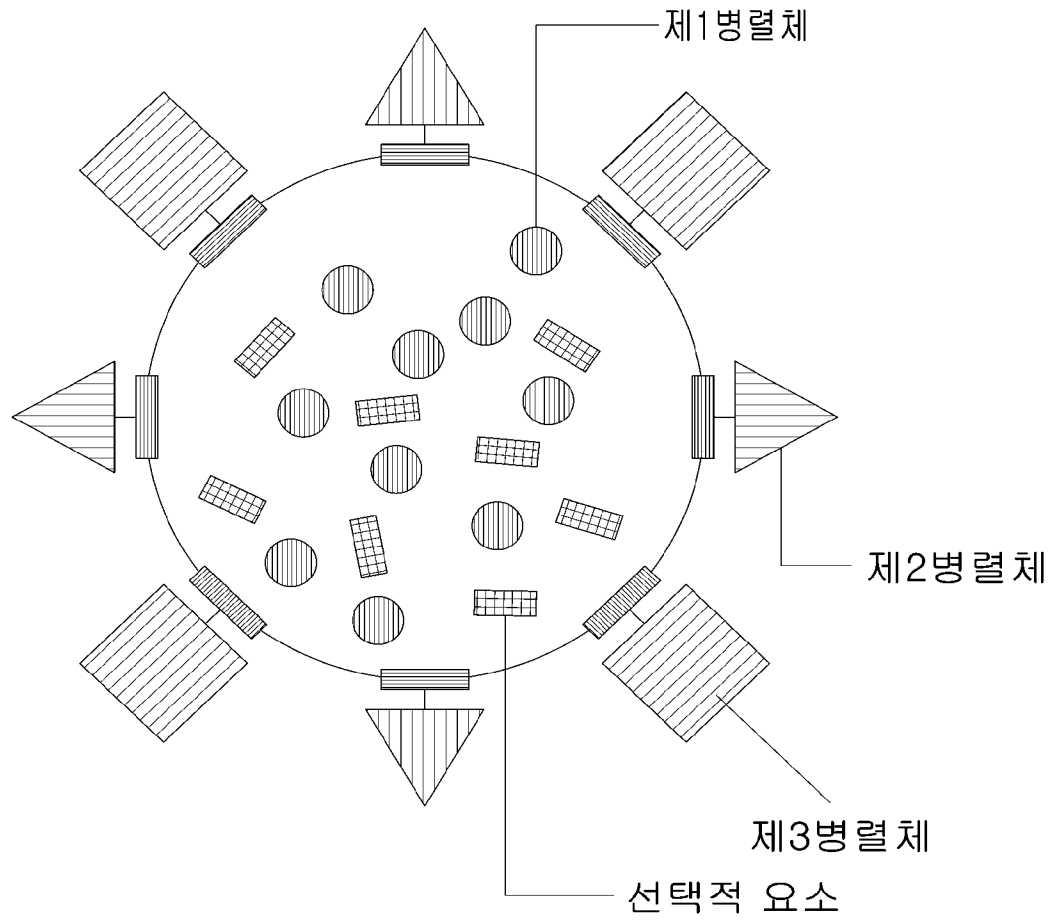
[도27]



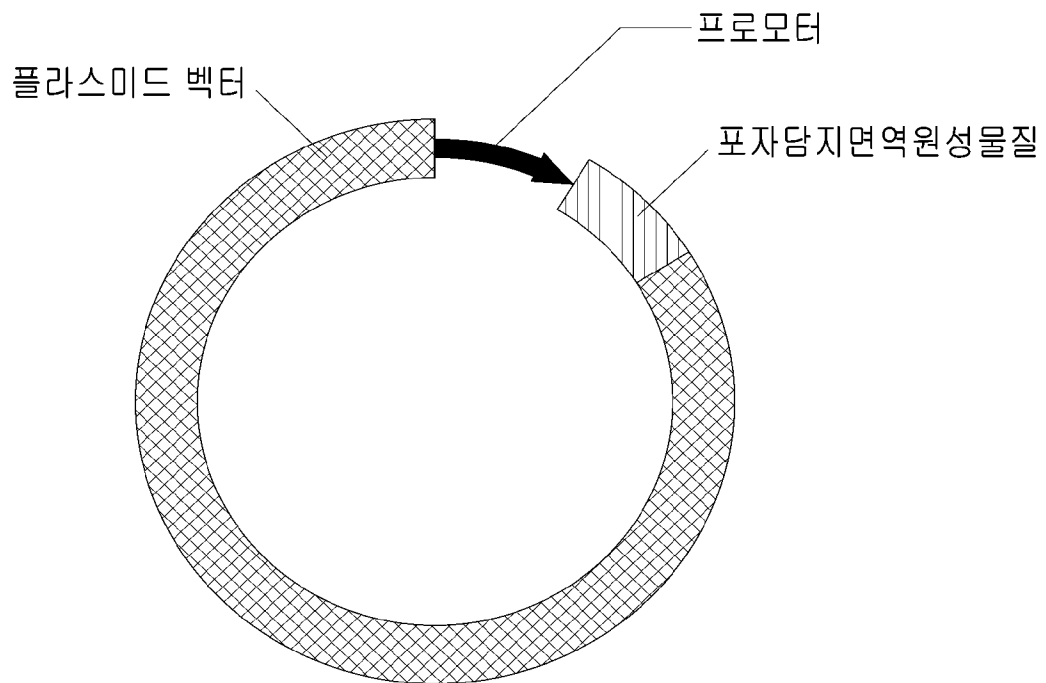
[도28]



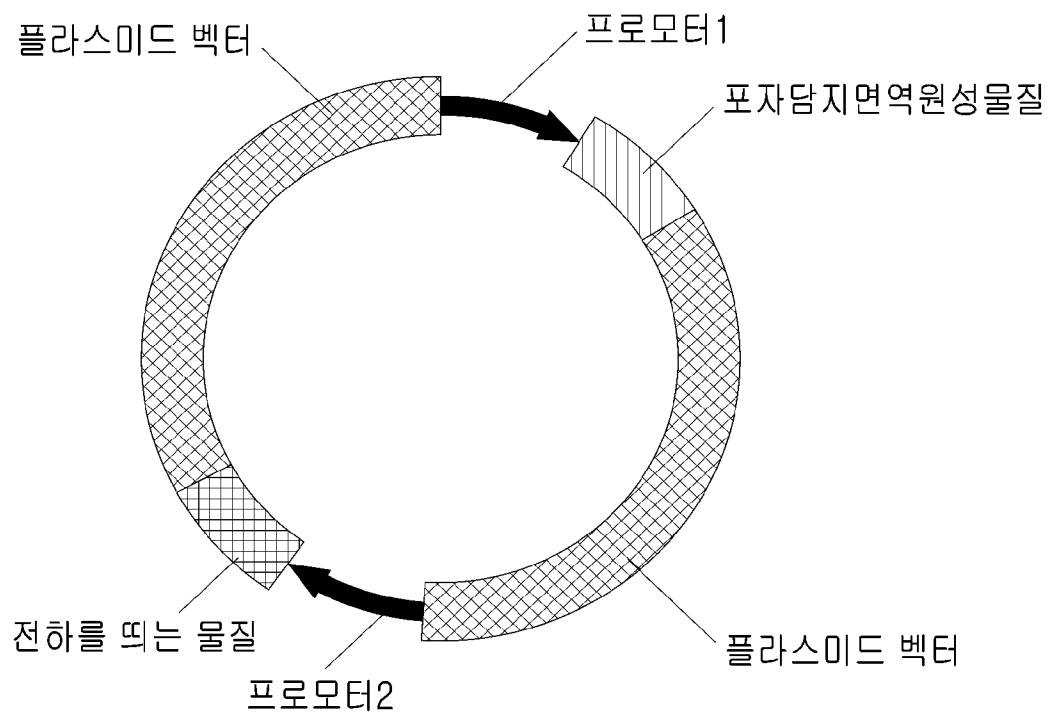
[도29]



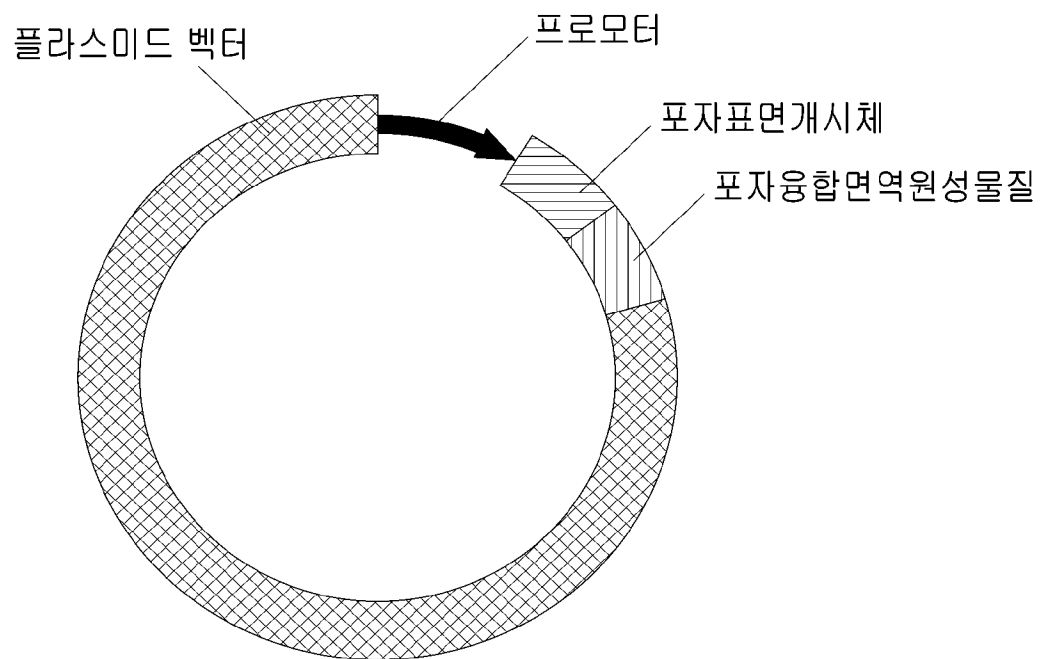
[도30]



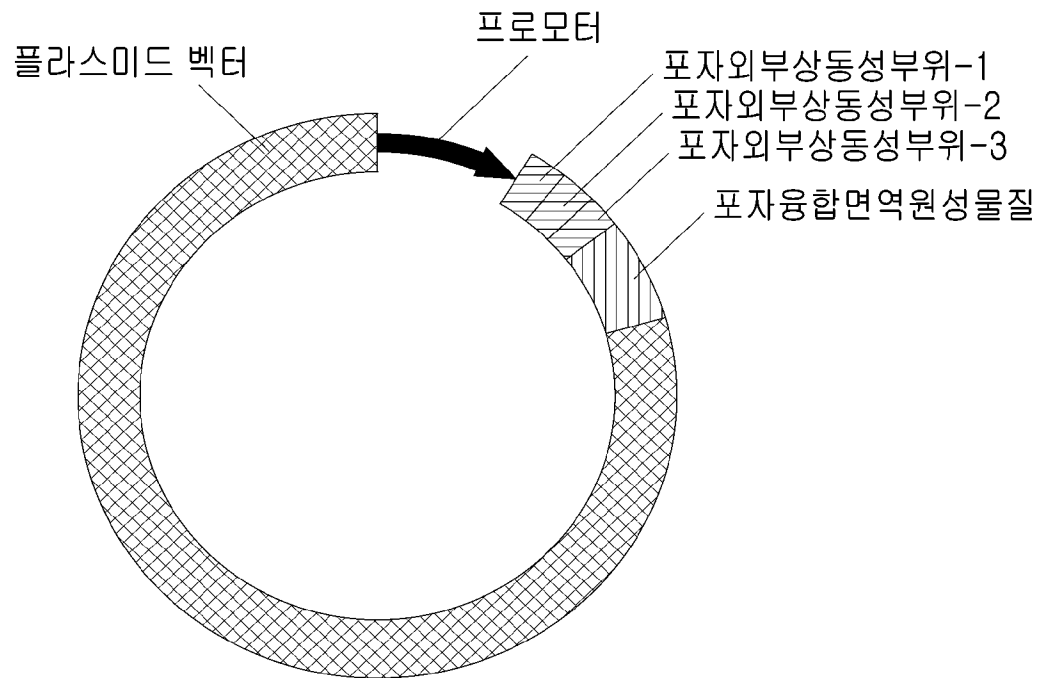
[도31]



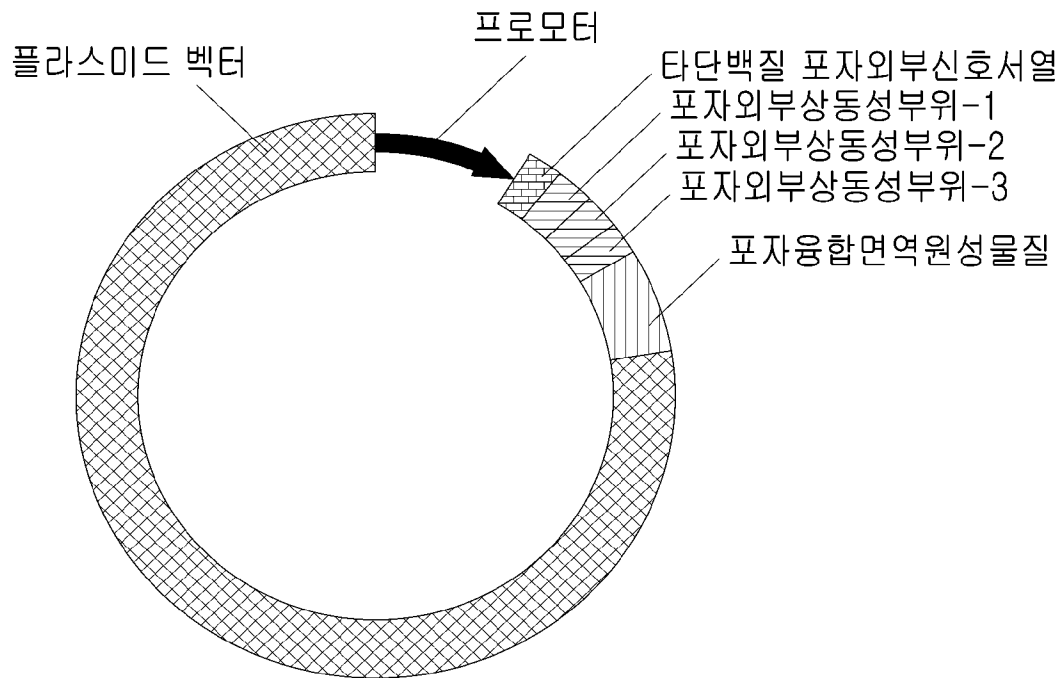
[도32]



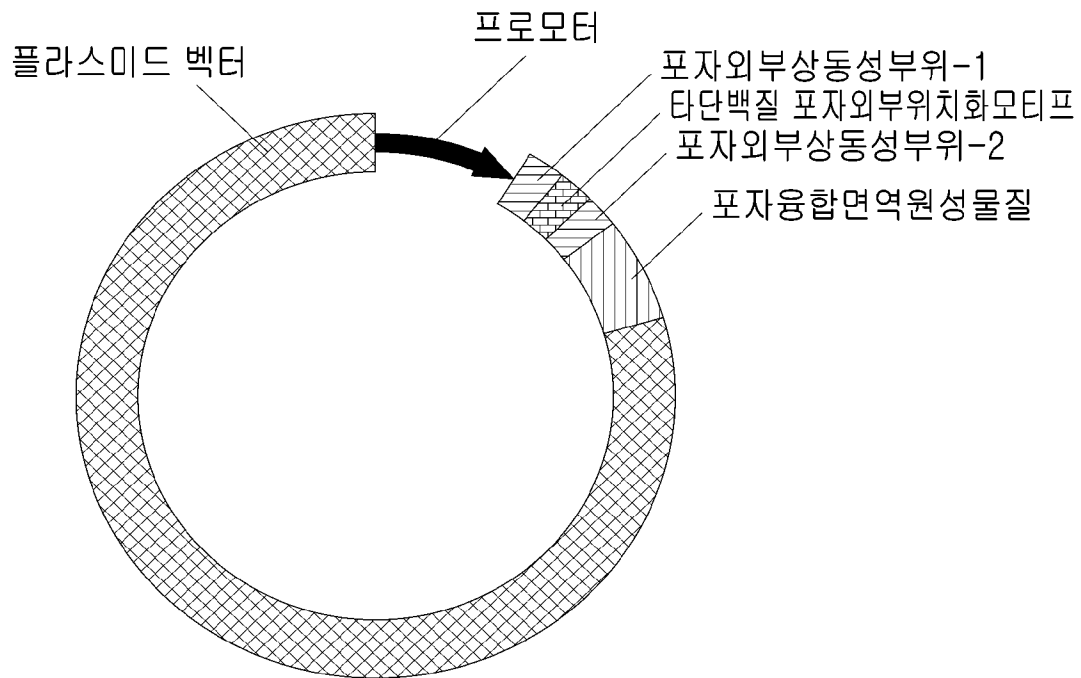
[도33]



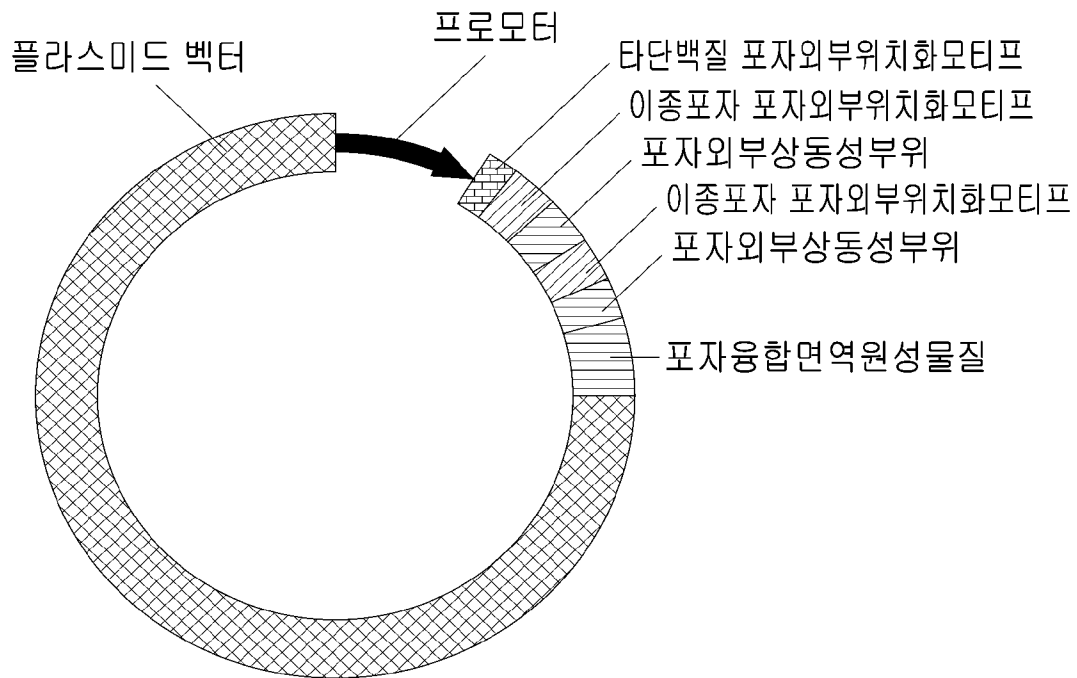
[도34]



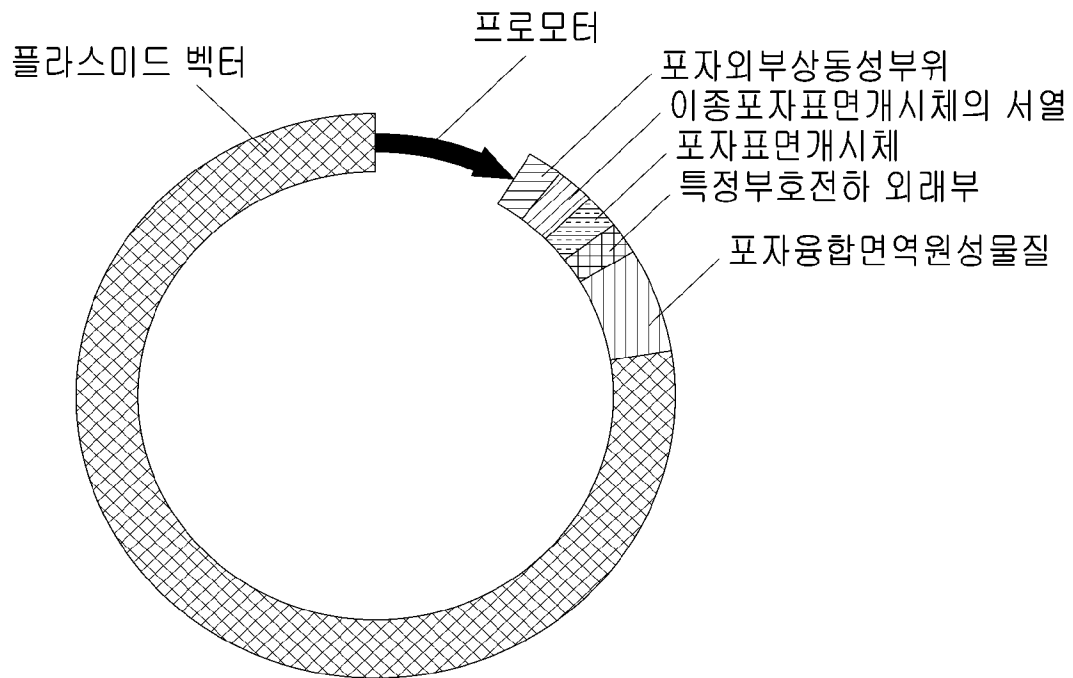
[도35]



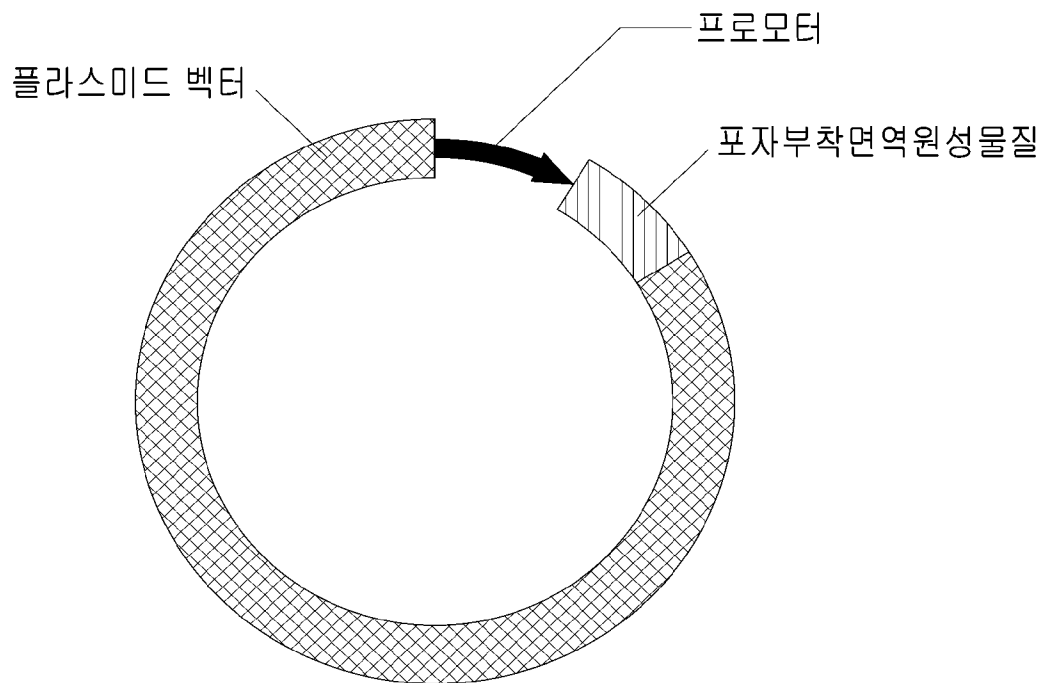
[도36]



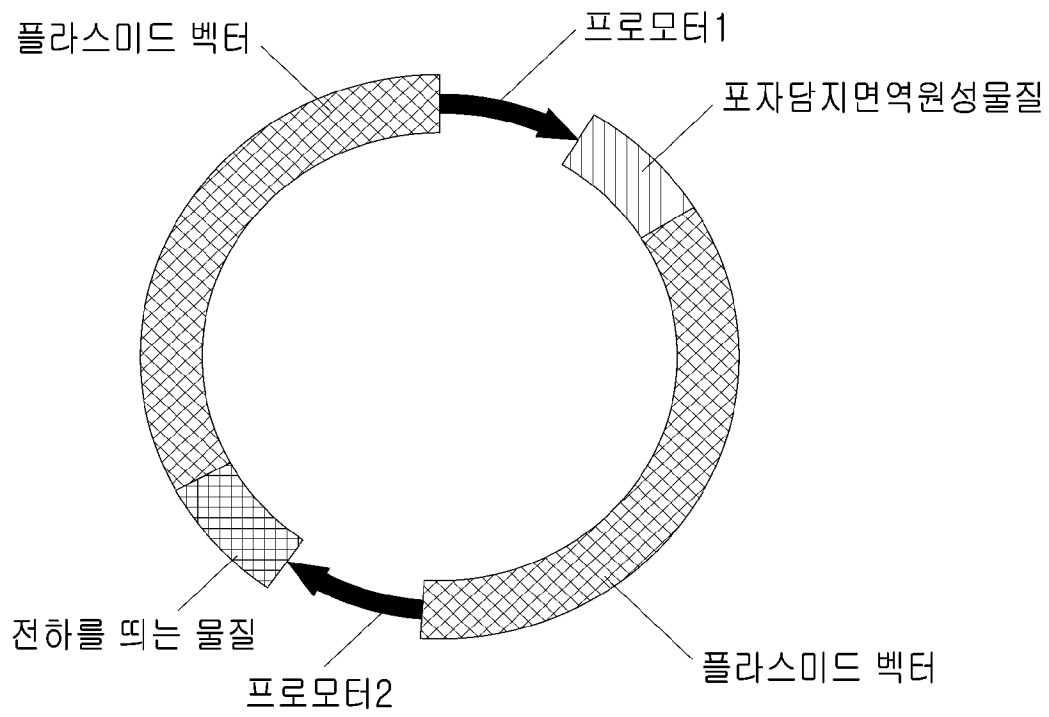
[도37]



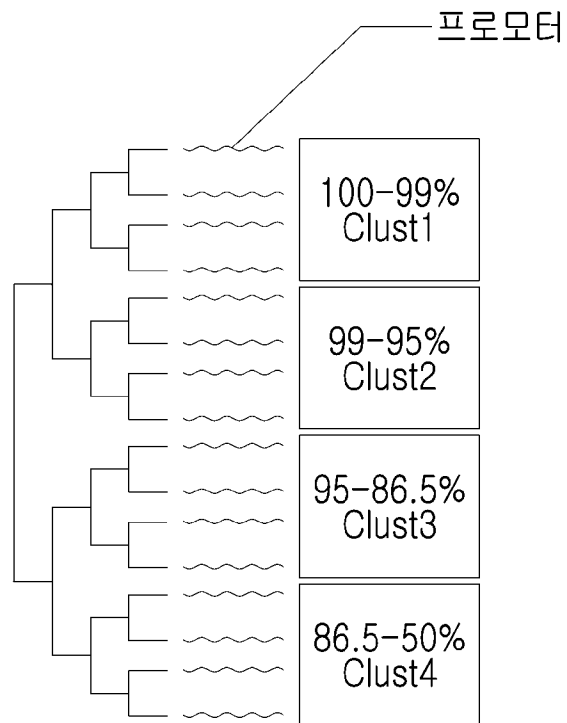
[도38]



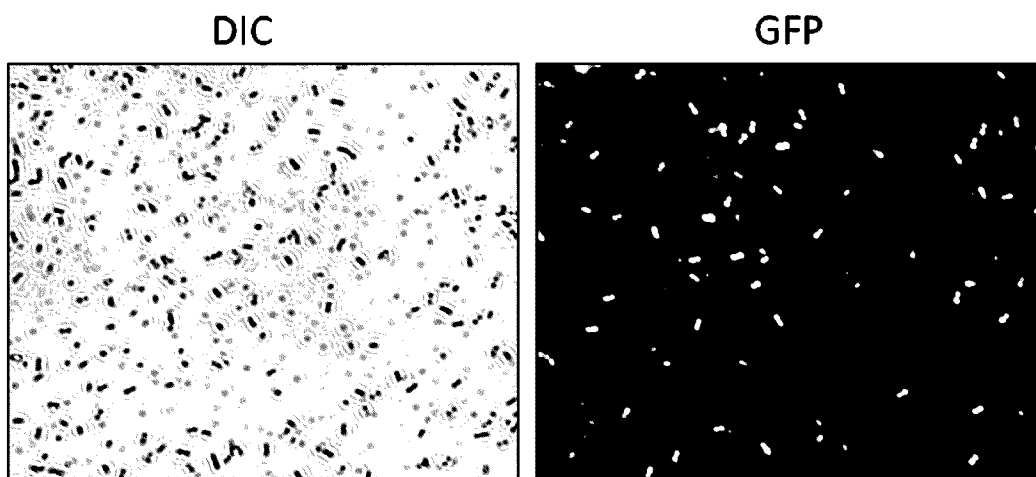
[도39]



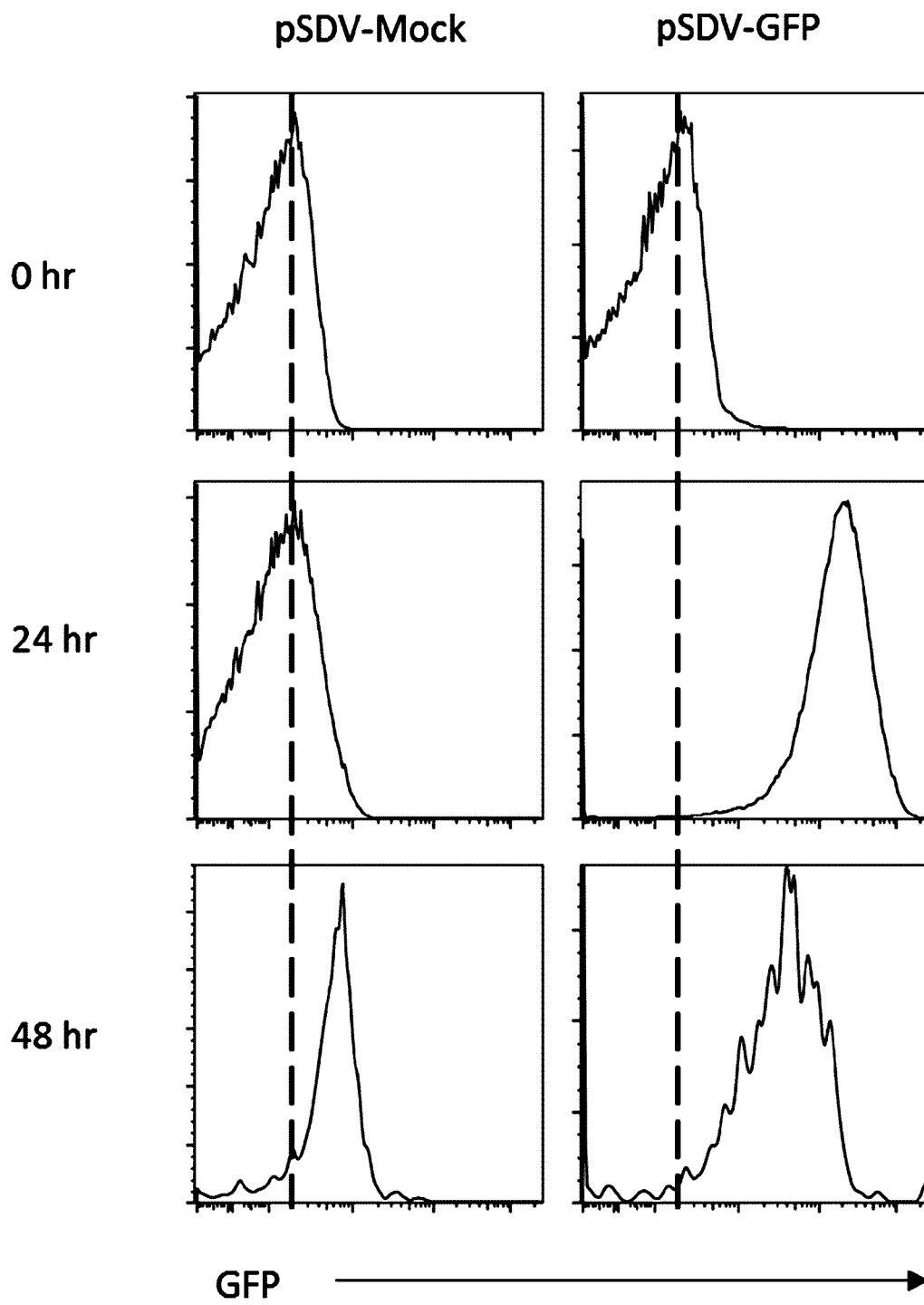
[도40]



[도41]



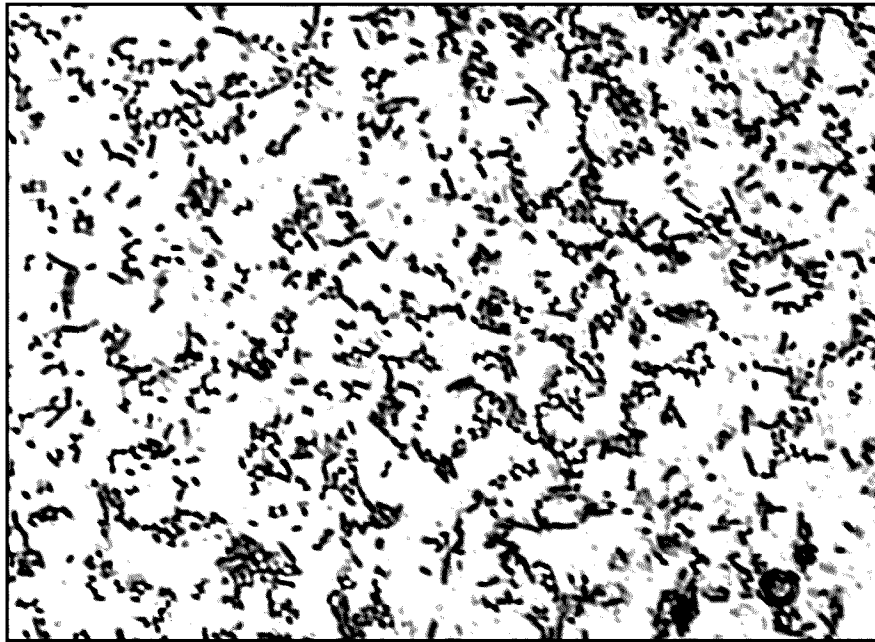
[도42]



[도43]

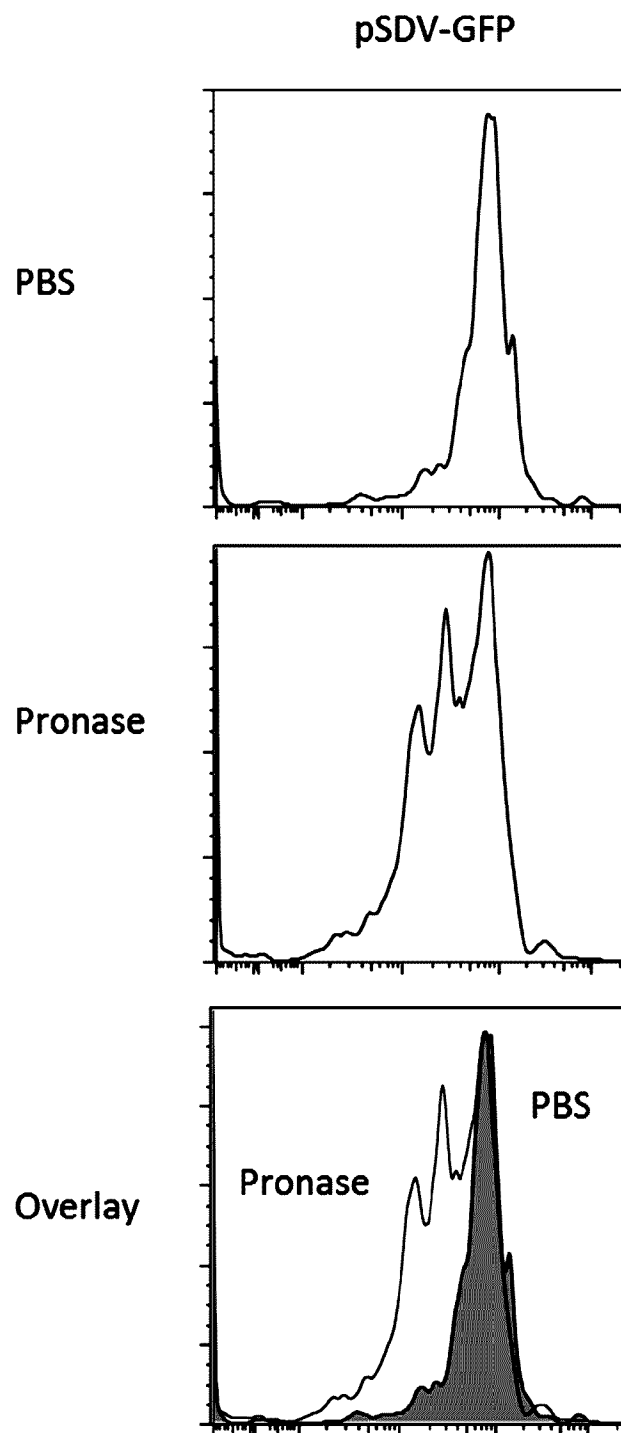
Malachite green staining

24 hr

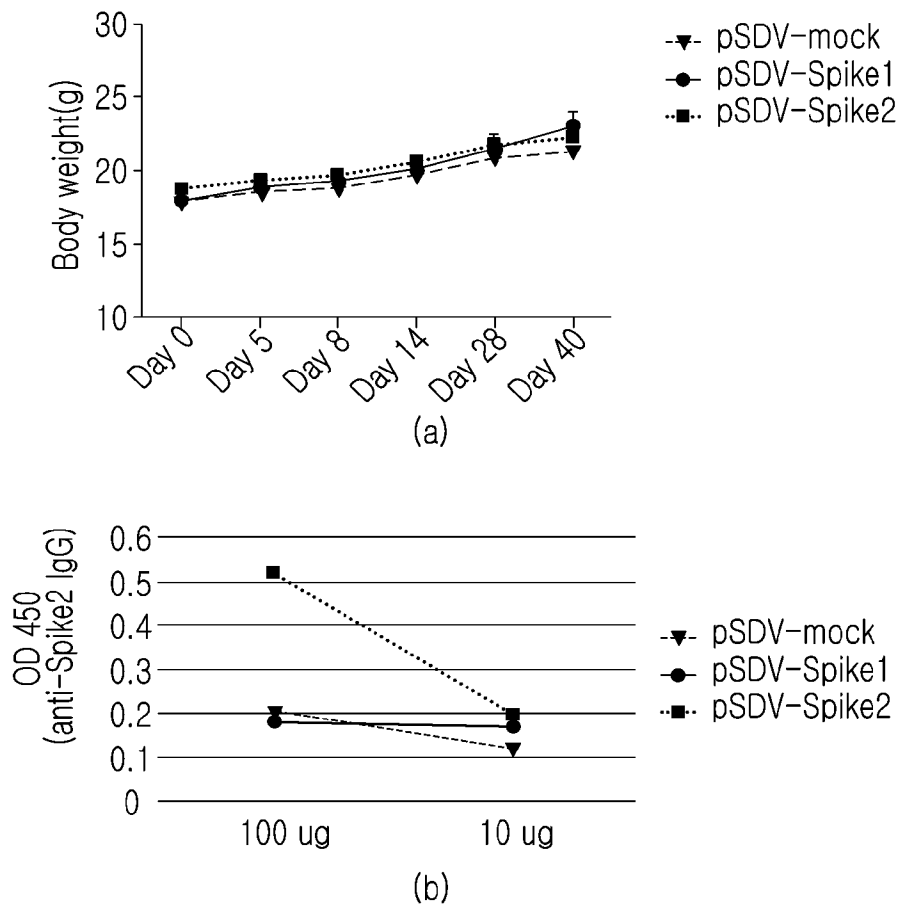


- Pink: Vegetative cells
- Green: spores

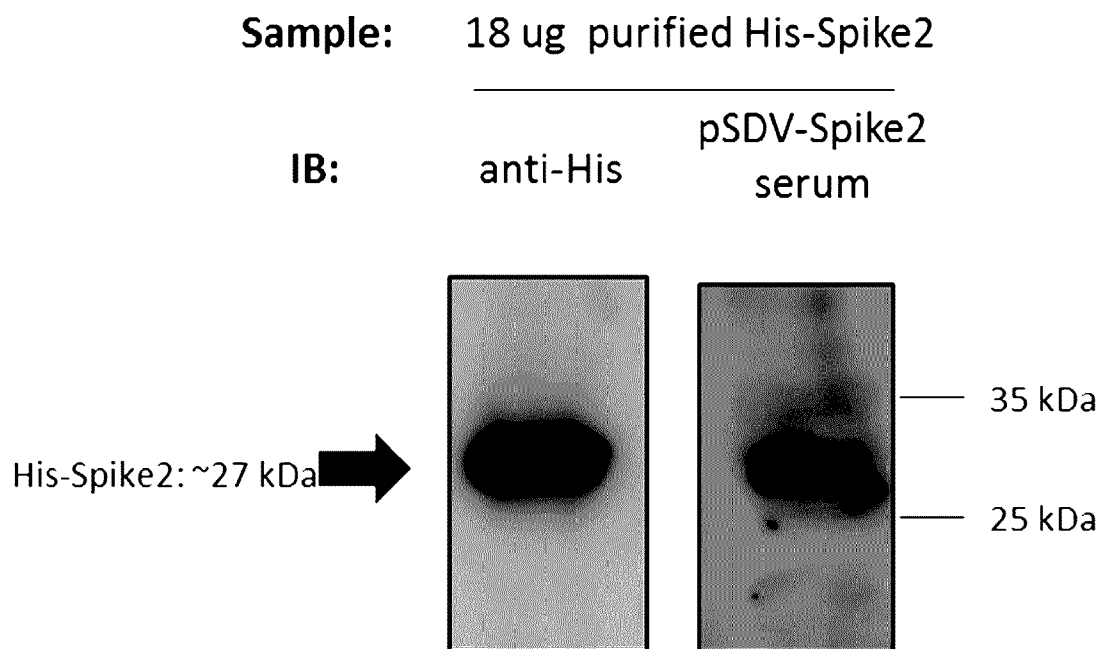
[도44]



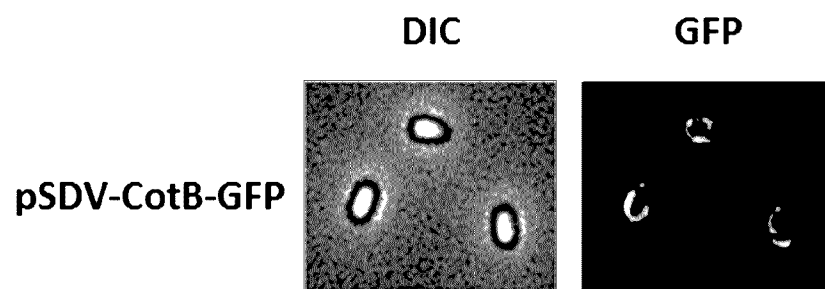
[도45]



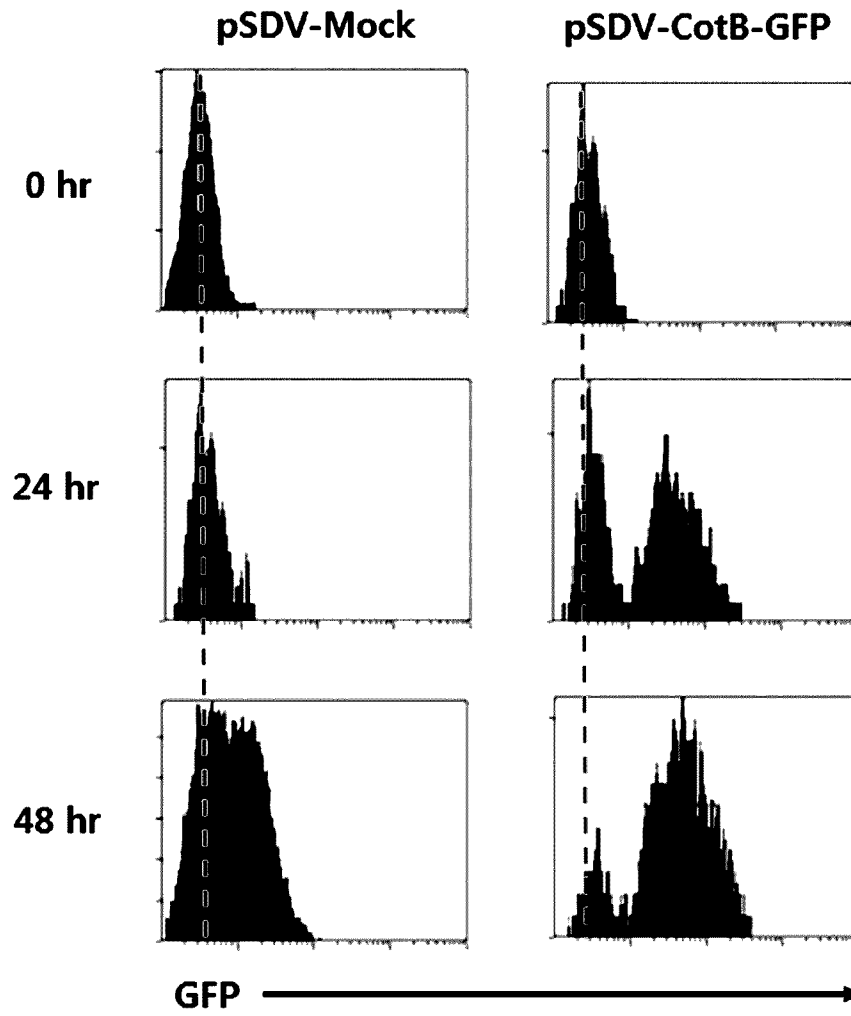
[도46]



[도47]



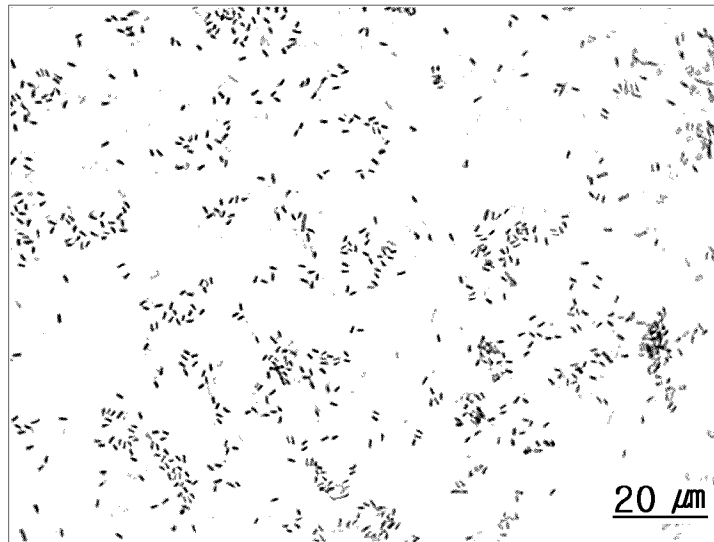
[도48]



[도49]

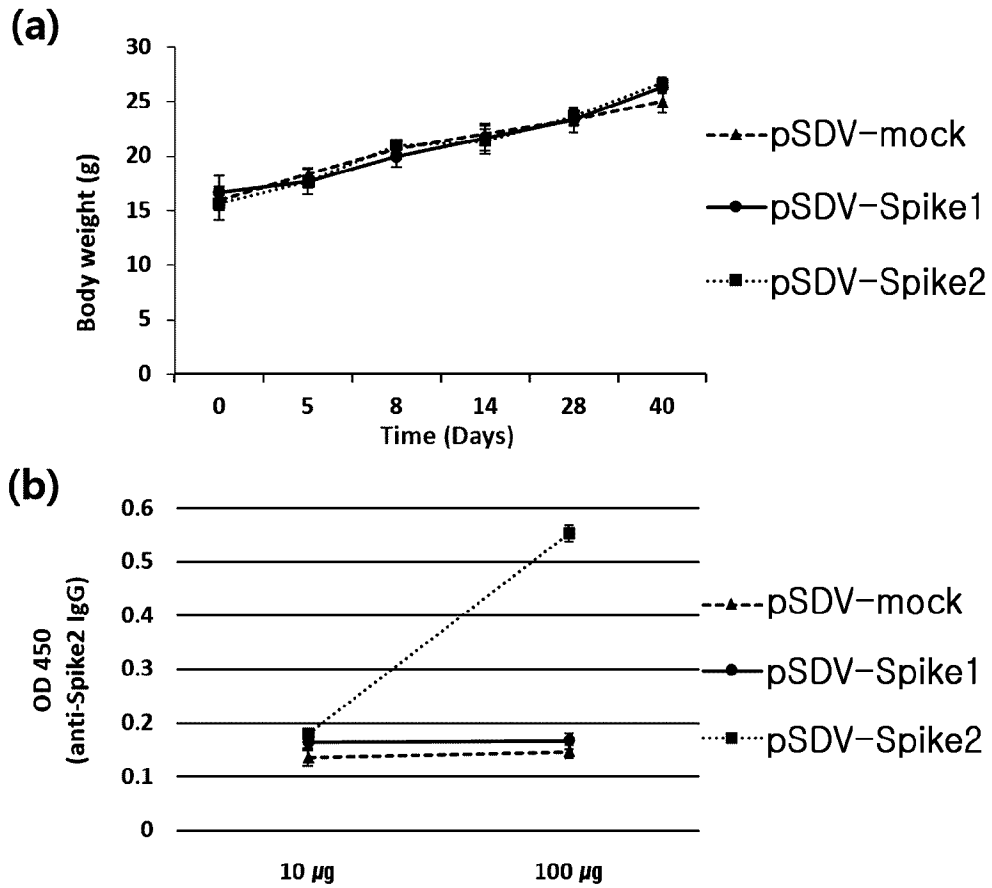
Malachite green staining

24 hr

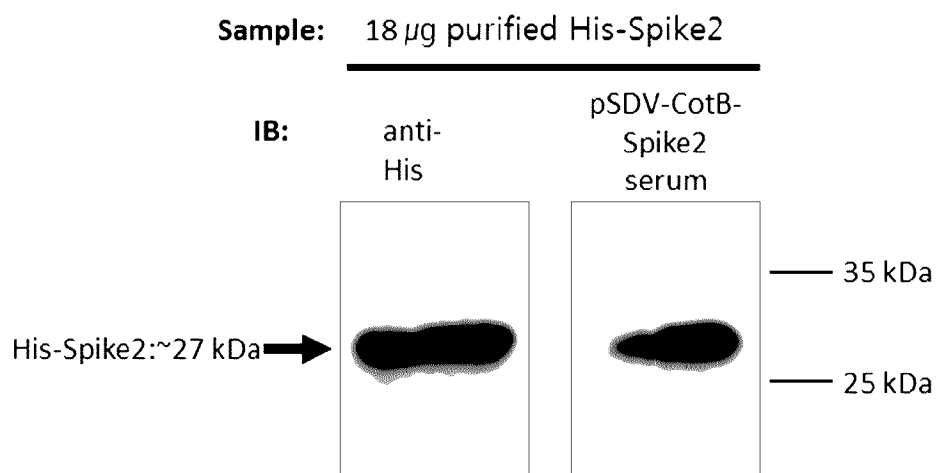


- Pink: Vegetative cells
- Green: spores

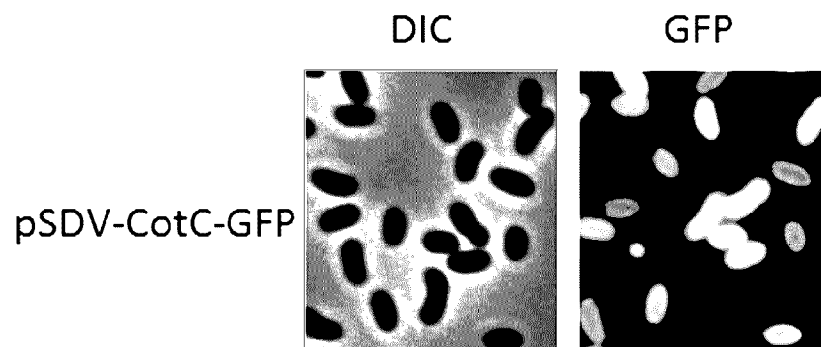
[도50]



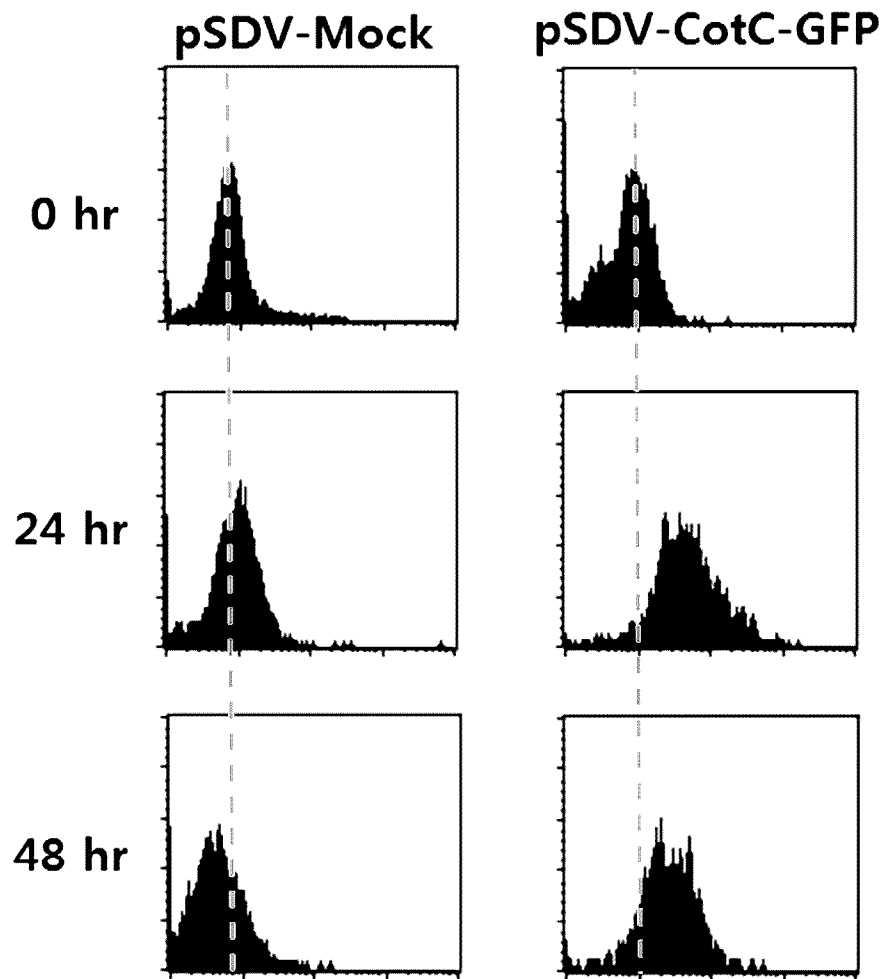
[도51]



[도52]



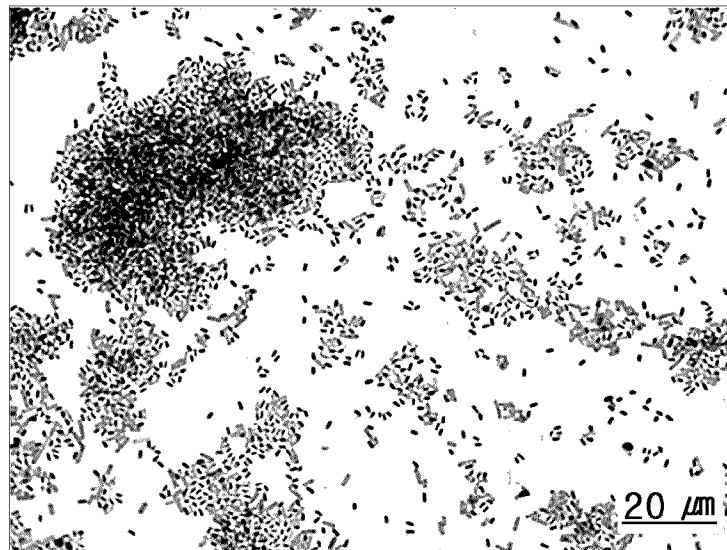
[도53]



[도54]

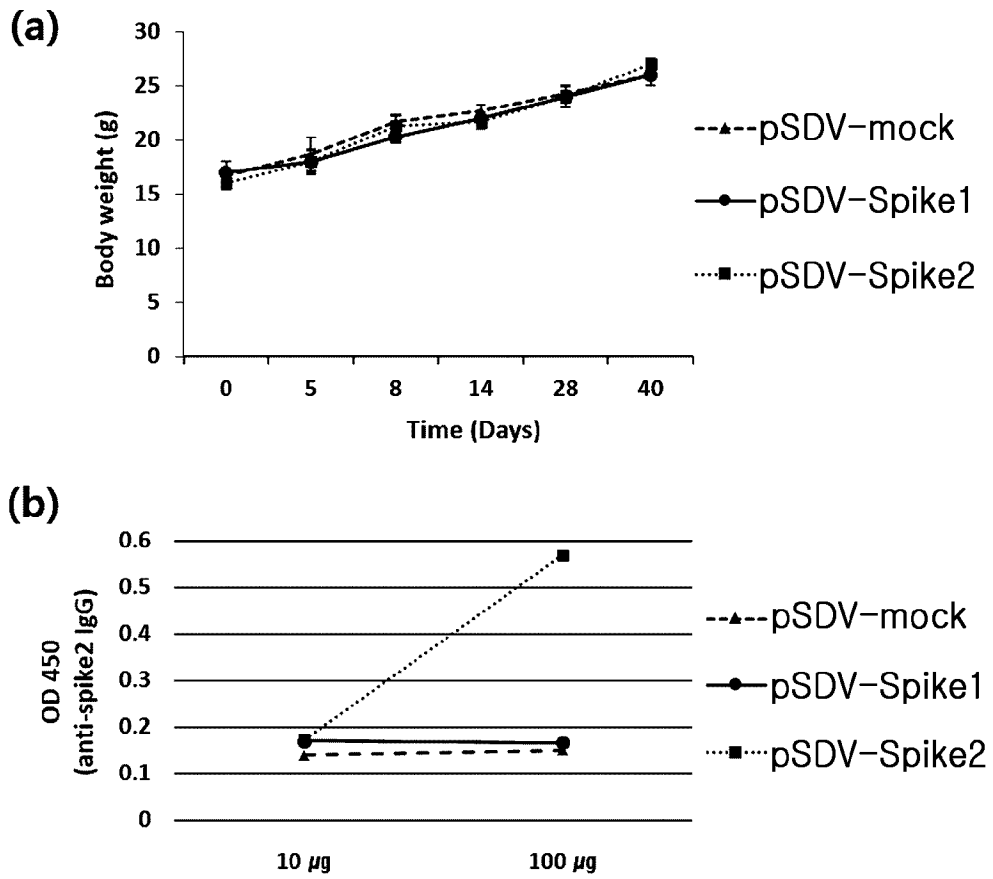
Malachite green staining

24 hr

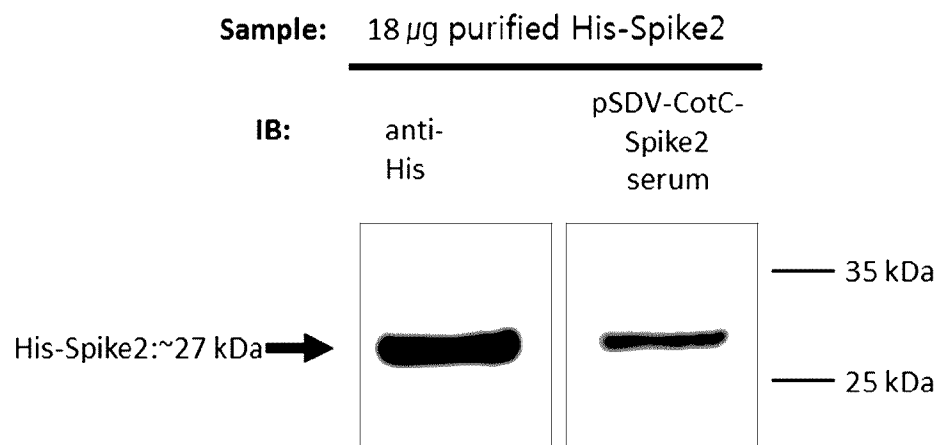


- Pink: Vegetative cells
- Green: spores

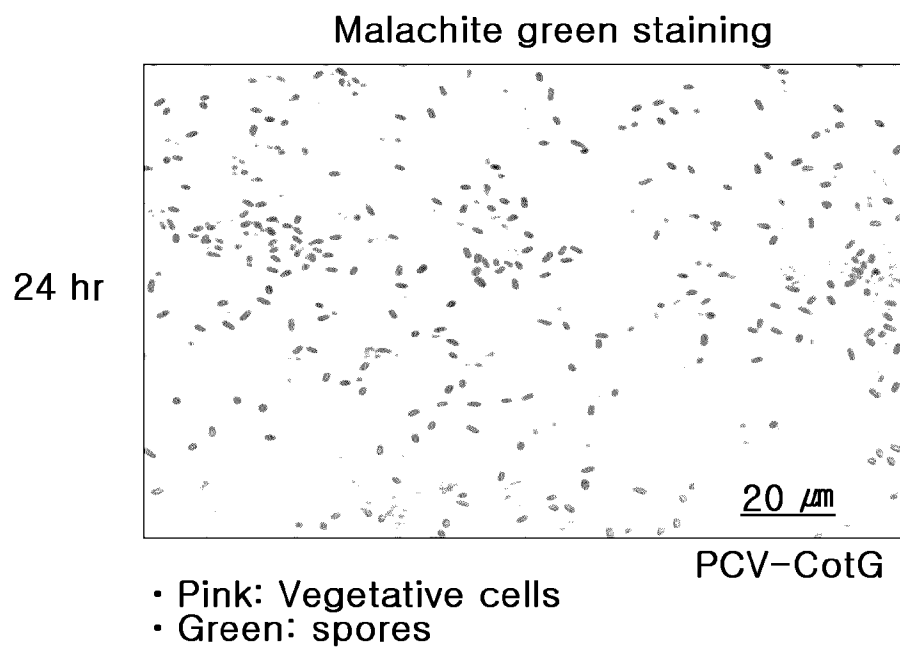
[도55]



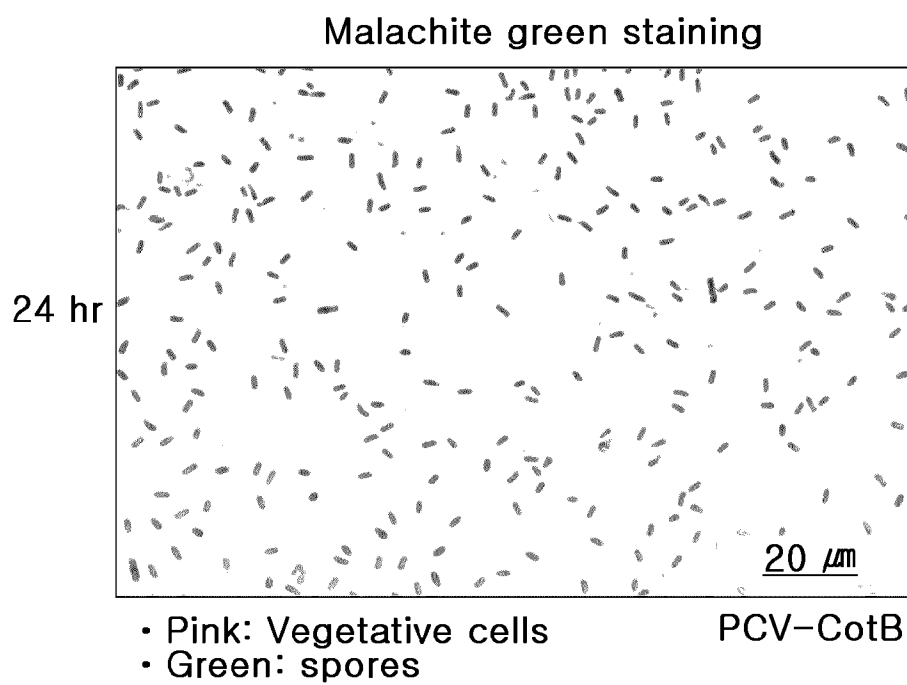
[도56]



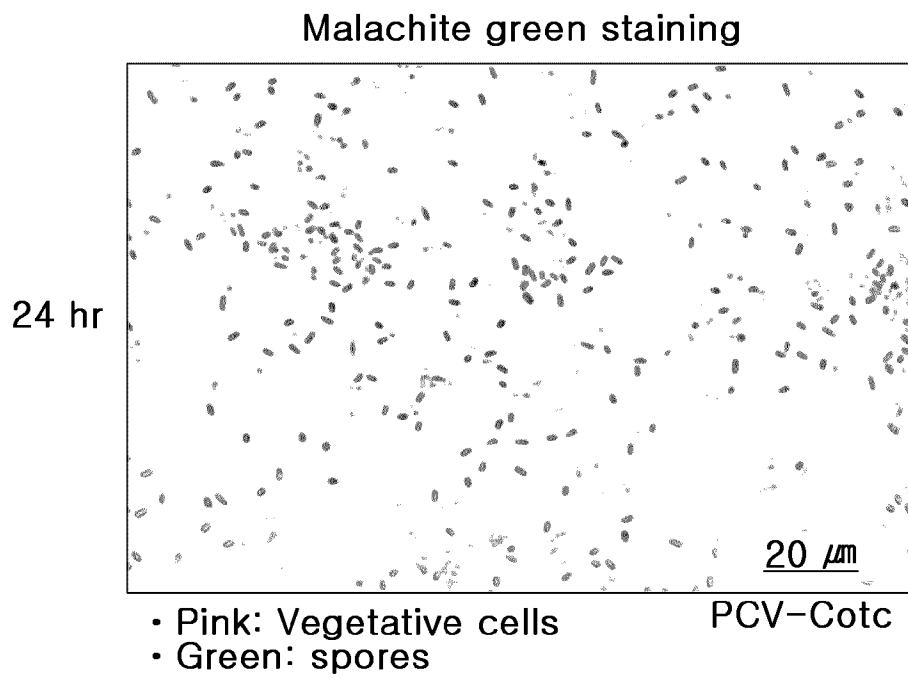
[도57]



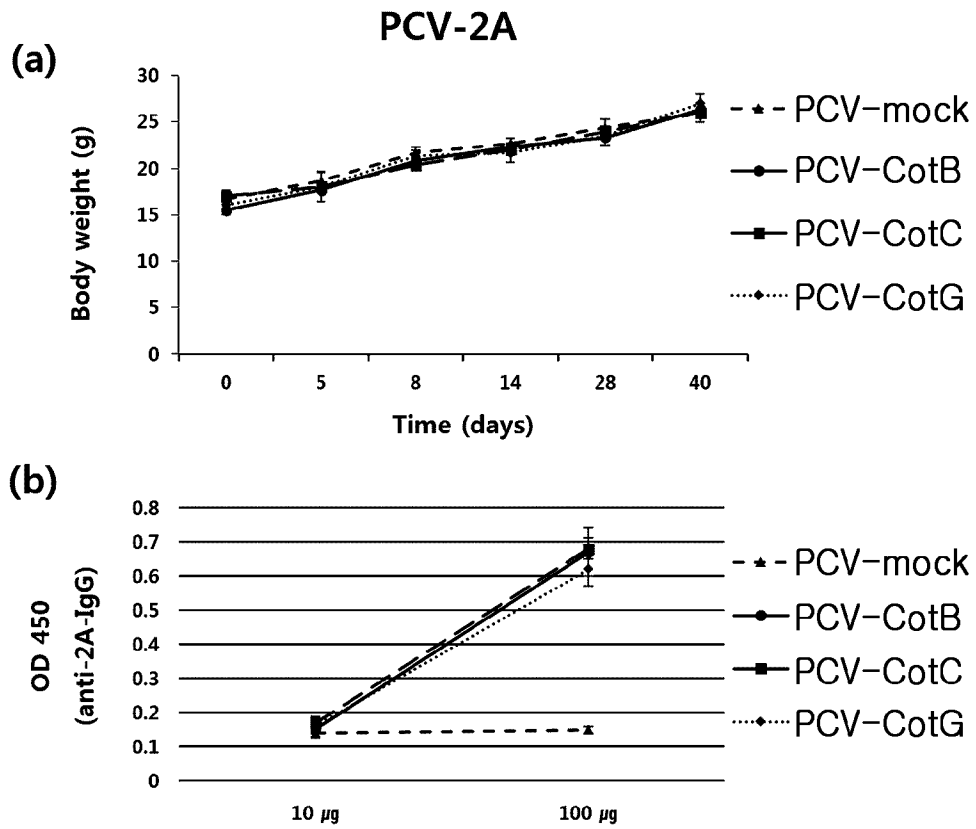
[도58]



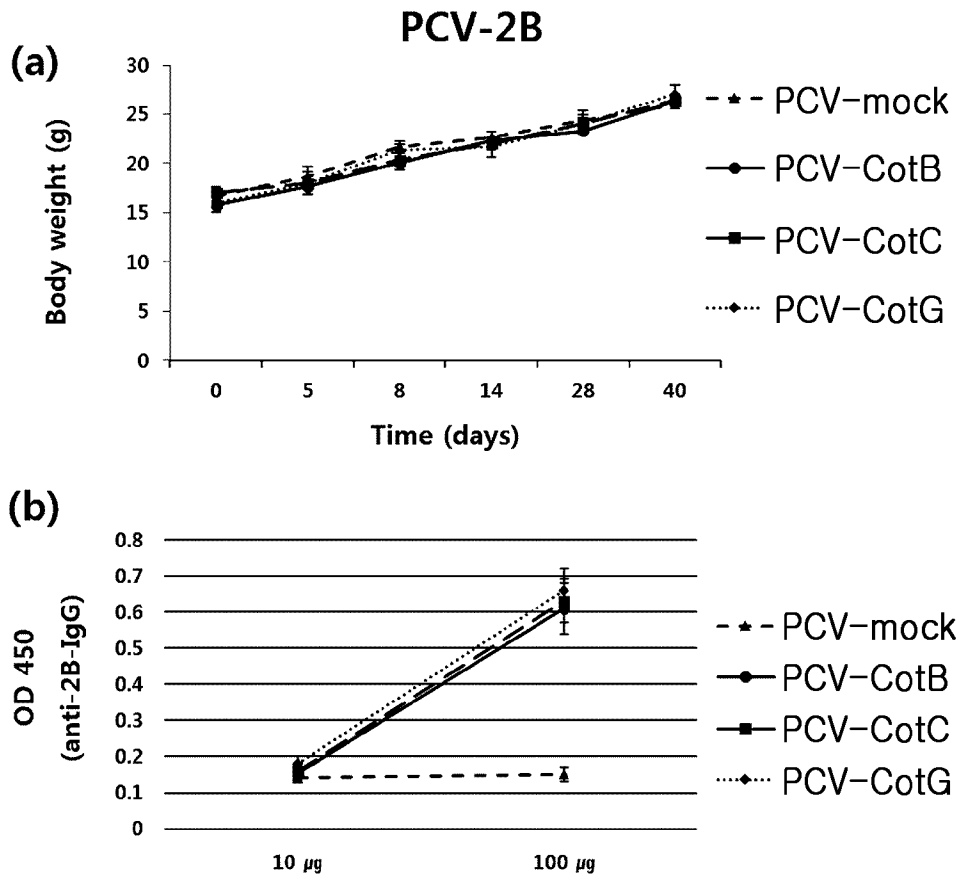
[도59]



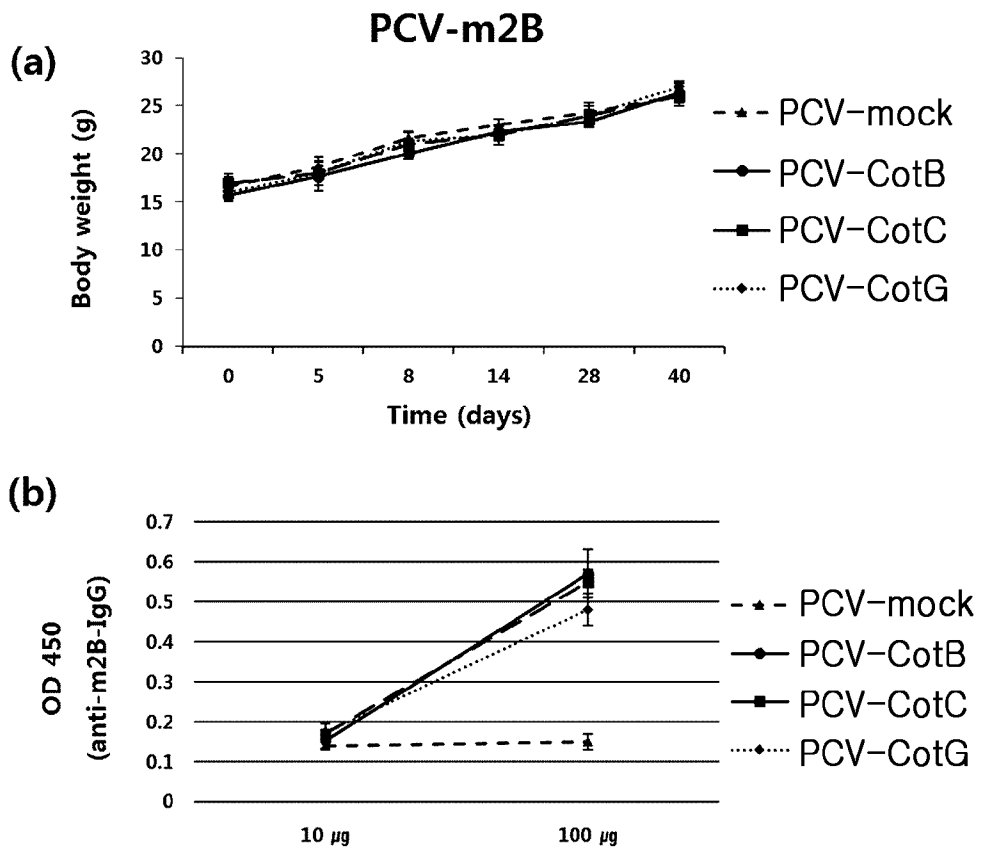
[도60]



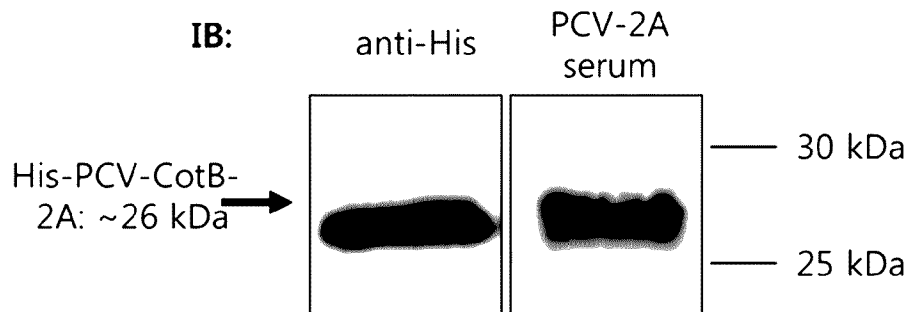
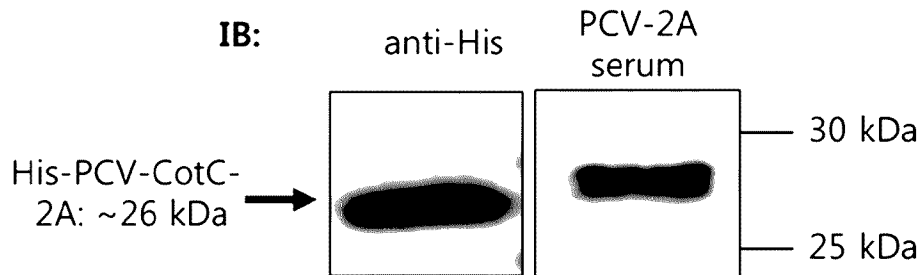
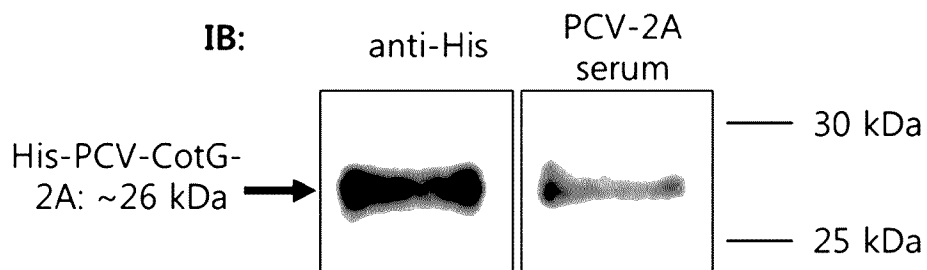
[도61]



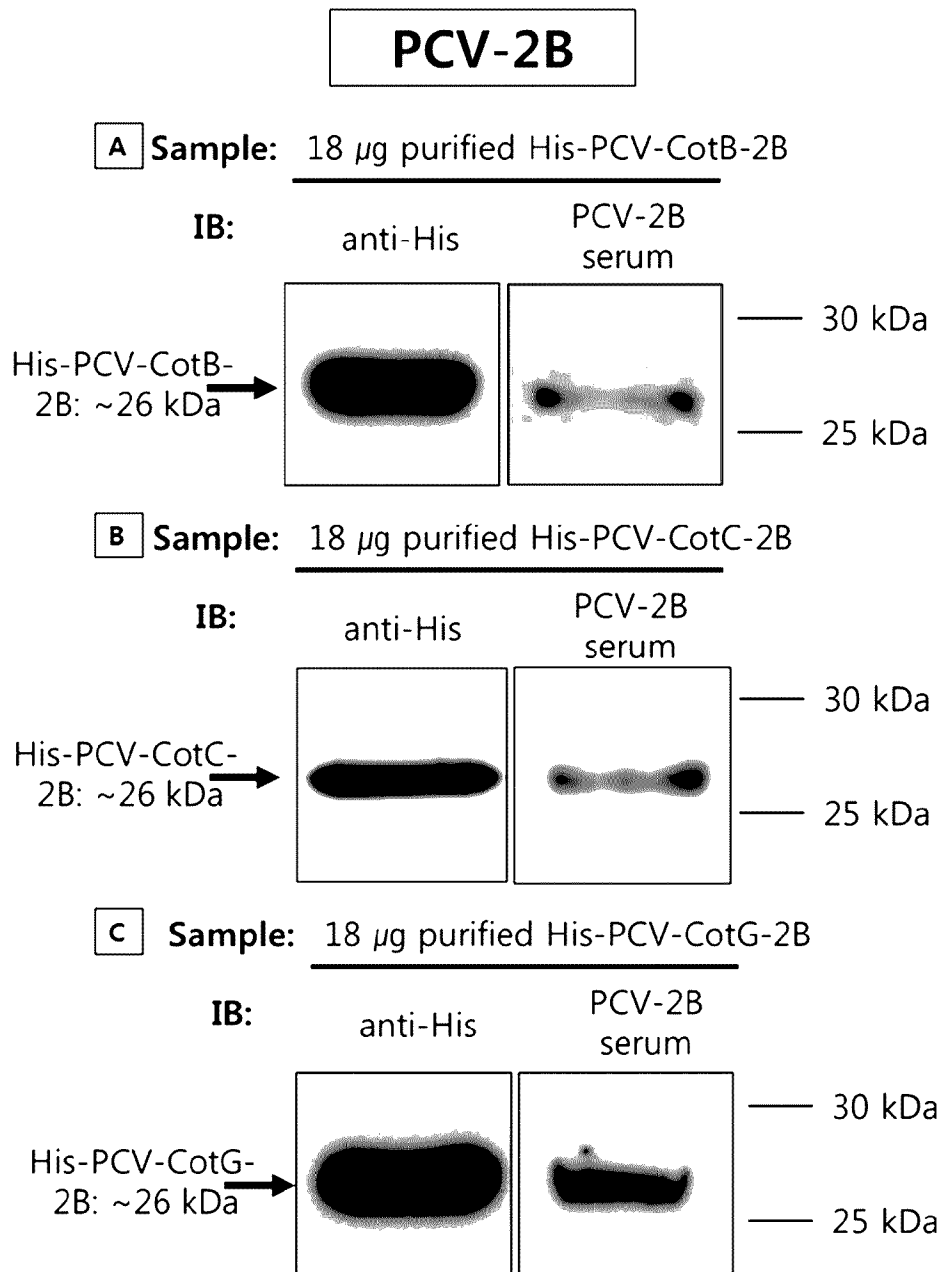
[도62]



[도63]

PCV-2A**A** **Sample:** 18 μ g purified His-PCV-CotB-2A**B** **Sample:** 18 μ g purified His-PCV-CotC-2A**C** **Sample:** 18 μ g purified His-PCV-CotG-2A

[도64]



[도65]

