



- (51) 국제특허분류:
C12N 1/21 (2006.01) A61K 31/04 (2006.01)
A61K 39/10 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/007499
- (22) 국제출원일: 2015년 7월 20일 (20.07.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2014-0092530 2014년 7월 22일 (22.07.2014) KR
- (71) 출원인: 전남대학교산학협력단 (INDUSTRY FOUNDATION OF CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY) [KR/KR]; 500-757 광주광역시 북구 용봉로 77, Gwangju (KR).
- (72) 발명자: 김태중 (KIM, Taejung); 506-870 광주광역시 광산구 임방울대로 358 번길 21 203-303, Gwangju (KR). 서자영 (SEO, Jayoung); 503-834 광주광역시 남구 서문대로 760 101-102, Gwangju (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 플러스 (PLUS INTERNATIONAL IP LAW FIRM); 35209 대전광역시 서구 한밭대로 809 10층, Daejeon (KR).

- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, 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 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

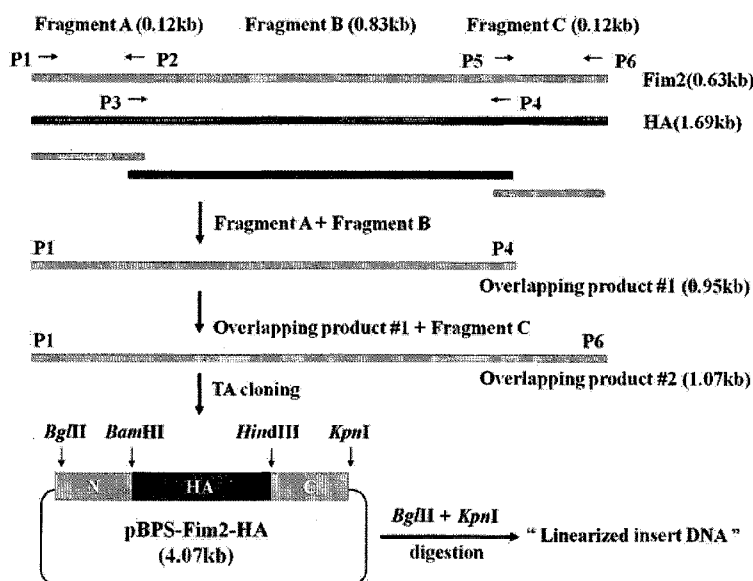
공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: BORDETELLA PERTUSSIS STRAIN FOR VIRUS-NEUTRALIZING ANTIGENIC PROTEIN EXPRESSION, AND IMMUNOLOGICAL COMPOSITION USING SAME

(54) 발명의 명칭 : 바이러스 중화항원 단백질 발현을 위한 보르데텔라 백일해 균주 및 이를 이용한 면역원성 조성물

[Fig. 2]



(57) Abstract: The present invention relates to a *Bordetella pertussis* strain for virus-neutralizing antigenic protein expression, and to an immunological composition using same. More specifically, the invention relates to: a *Bordetella pertussis* strain for expressing influenza virus hemagglutinin in the Fim2 gene; an immunological composition comprising same; and a method for producing the *Bordetella pertussis* strain. As a result of genetic modification by means of the *Bordetella pertussis* strain of the present invention, it is expected that there will be increased effects from use as a dead vaccine (killed whole cell vaccine) using a strain expressing the virus-neutralizing antigen as a dual antigenic protein, and it is expected that the invention can be used as a component vaccine (acellular vaccine) containing the dual antigenic protein via processing of a chemical drug of the *Bordetella pertussis* strain. When an immunological composition comprising the strain is administered into the human body, infection from *Bordetella pertussis* does not appear, and it is expected that said composition can be used as a virus-preventing vaccine or therapeutic strain via

virally derived dual antigenic protein expression for inducing neutralizing antibodies, while maintaining the function whereby pertussis is prevented.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



본 발명은 바이러스 중화항원 단백질 발현을 위한 보르데텔라 백일해 균주 및 이를 이용한 면역원성 조성물에 관한 것으로, 상세하게는 **Fim2** 유전자에서 인플루엔자 바이러스 헤마글루티닌을 발현하는 보르데텔라 백일해 균주, 이를 포함하는 면역원성 조성물과 상기 보르데텔라 백일해 균주를 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 보르데텔라 백일해 균주를 통한 형질전환 결과, 바이러스의 중화항원을 이종항원 단백질로 발현하는 균주를 이용한 사균백신(killed whole cell vaccine)으로 활용 효과가 높을 것으로 기대되며, 보르데텔라 백일해 균주의 화학약품의 처리를 통해 이종항원 단백질을 함유한 성분백신(acellular vaccine)으로써 활용 가능할 것으로 기대된다. 상기 균주를 포함하는 면역원성 조성물은 인체 내 투여시 보르데텔라 백일해에 대한 감염증은 나타나지 않으며, 백일해를 예방하는 기능은 유지하면서, 중화항체를 유발하는 바이러스 유래 이종항원 단백질 발현을 통해 바이러스에 대한 예방 백신 또는 치료용 균주로 사용이 가능할 것으로 기대된다.

명세서

발명의 명칭: 바이러스 중화항원 단백질 발현을 위한 보르데텔라 백일해 균주 및 이를 이용한 면역원성 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 바이러스 중화항원 단백질 발현을 위한 보르데텔라 백일해 균주 및 이를 이용한 면역원성 조성물에 관한 것으로, 상세하게는 Fim2 유전자에서 인플루엔자 헤마글루티닌을 발현하는 보르데텔라 백일해 균주, 이를 포함하는 면역원성 조성물과 상기 보르데텔라 백일해 균주를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 인플루엔자 바이러스 A(Influenzavirus A)형은 돌연변이(drift)나 유전체분절교환(shift)에 의해 새로운 항원 변이주가 출현하기 쉽고 인간 집단에 변이항원에 대한 항체보유율이 낮은 경우 바이러스 대유행을 일으킨다. 상기 바이러스는 상기도 점막에 침입하여 호흡기 질환을 일으키는 단일가닥(single strand) RNA 바이러스로 오르소믹소비리데(Orthomyxoviridae)에 속한다. 유전체는 8분절로 구성되어 있으며, 이 중 표면당단백질 중 하나인 헤마글루티닌(hemagglutinin or haemagglutinin, HA)은 인플루엔자의 구형 표면에 부착되어 뉴라미니다제(neuraminidase, NA)와 함께 아형(subtype)을 결정하는 단백질이다. 국내에서는 돼지 유래의 아형에 의한 돌연변이 발생으로 인해 신종인플루엔자 바이러스가 발병하였으며, 현재까지 해마다 유행되는 바이러스 백신주를 선정하여 혼합된 예방 백신을 접종하고 있는 실정이다. 현재 판매되는 독감백신은 유정란을 이용하여 바이러스 배양 및 불활화를 통한 제1세대 백신 생산법을 사용하고 있어 생산에 수개월이 소요되며 새로운 형태의 바이러스가 발생할 경우 예방의 의미가 없다. 또한 가격이 고가이다보니 다수의 인원이 백신 접종을 하는데 있어 경제적인 어려움이 있을 수 있다.
- [3] 백일해는 그람음성간구균인 보르데텔라 백일해(*Bordetella pertussis*, BPS)에 의해 전염되며, 주로 유아나 어린이에게 전염성이 높은 호흡기 감염질환이다. 백일해는 심한 경련성 기침이 오래 지속되는 특징이 있고, 모체로부터 수동적으로 받는 면역을 기대할 수 없어 영아에서의 발병은 중증을 나타내며, 치사율도 높아 전체 사망자의 약 80%가 생후 1년 이내의 영유아이자 90% 이상의 치사율을 나타낸다. 국내에서는 1954년 전염병 예방법에 의하여 정기적으로 예방접종을 해야 하는 질환으로 지정되었으며, 1958년부터 국내에서는 디프테리아, 파상풍, 백일해 혼합 백신(DTP)의 사용이 시작되어 현재까지 추가접종을 포함한 3회의 기본 접종이 이루어지고 있다. 기존 상용화 백신의 경우, 1960년대 중반부터 접종 후 발열, 식욕감퇴, 심한 보챔, 경련 등과 같은 전신적 부작용 및 뇌증에 의한 중증의 부작용이 점차 문제화되기 시작하였으며,

이를 극복하기 위한 여러 연구가 진행되어 1979년 성분백신이 포함된 디프테리아-무세포성 백일해(acellular Pertussis)-파상풍(DaPT) 백신이 일본에서 개발되어 국내에 도입된 후 현재까지 전국적으로 사용되고 있다. 현재 국내에서는 보르데텔라 백일해 백신에 인플루엔자를 접목하여 백신을 구성한 경우는 없는 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [4] 본 발명에서는 상기 문제점의 해결을 위해 보르데텔라 백일해의 표면구조 단백질인 Fimbriae를 이용하여 상기 단백질의 유전자좌에 다른 바이러스 병원체의 항원성 단백질을 코딩하는 유전자를 도입하여 발현시킴으로써 보르데텔라 백일해 뿐만 아니라 상기 항원성 단백질로 발현되는 해당 바이러스 병원체의 감염에 대해서도 방어효과가 있는 다가(multivalent) 생백신을 개발하고자 하였다.

과제 해결 수단

- [5] 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 갖는 보르데텔라 백일해의 Fim2 유전자의 N-말단 100 내지 140 mer와 C-말단 100 내지 140 mer, 바람직하게는 각각 120 mer, 사이에 이중 항원 단백질 유전자를 삽입한 구조를 갖는 재조합 유전자를 포함하는 약독화 또는 사독화된 보르데텔라 백일해(*Bordetella pertussis*) 균주에 관한 것이다.
- [6] 본 발명에서 상기 이중 항원 단백질 유전자는 제한되지는 않으나 인플루엔자 바이러스 유래 헤마글루티닌(HA)일 수 있다. 본 발명에서 상기 헤마글루티닌은 제한되지는 않으나 서열번호 2의 염기서열을 갖을 수 있다.
- [7] 인플루엔자 바이러스는 단편화된 음성 가닥의 RNA 바이러스이고 Orthomyxoviridae속에 속한다. 인플루엔자 A 바이러스는 9개의 단백질로 구성되고 조절 기능을 갖는 하나의 비구조적인 NS1 단백질을 추가로 암호화한다. 상기 비구조적인 NS1 단백질은 재생 주기 동안에 다량으로 합성되고 감염 세포의 세포질(cytosol) 및 핵에 집중된다. 이 바이러스 게놈의 단편화된 특성으로 인해, 여러 가지 바이러스 균주들에 의한 세포의 혼합 감염 동안에 유전자 재배열(게놈 단편들의 교환)의 기작이 일어날 수 있다. 인플루엔자 A 바이러스는 그 표면 상에 나타난 여러 가지 헤마글루티닌(HA) 및 뉴로아미니다제(NA) 바이러스 단백질에 따라 여러가지 아형들로 더욱 분류된다. 인플루엔자 A 바이러스 아형은 두 개의 바이러스 당단백질, 즉 헤마글루티닌(HA 또는 H) 및 뉴로아미니다제(NA 또는 N)에 의해 확인된다. 각각의 인플루엔자 바이러스 아형은 H 및 N 단백질의 조합에 의해 확인된다. 18종의 HA 아형 및 11 종의 NA 아형이 알려져 있다. 인플루엔자 A형 바이러스는 사람, 조류, 돼지, 말 및 기타 동물들을 감염시킬 수 있으나, 야생 조류는 이러한 바이러스에 대한 천연 숙주이다. 단지 일부 종의 인플루엔자 A 아형(즉, H1N1,

H1N2, 및 H3N2)이 오늘날 사람들 사이에 전파되고 있지만, 18 HA 및 11 NA 아형들의 모든 조합은 조류, 특히 야생 물새 및 도요새에서 확인되어 왔다. 게다가, H5 및 H7 인플루엔자 바이러스가 인간 질병을 유발할 수도 있다는 증거가 계속 확인되고 있다. 인플루엔자 A 바이러스의 HA는 두 개의 구조적으로 특이한 영역, 즉, 구형 머리 영역 및 줄기 영역을 포함한다. 구형 머리 영역은 표적 세포에의 바이러스 부착을 초래하고 HA의 헤마글루티닌화 활성화에 관여하는 수용체 결합 부위를 포함한다. 줄기 영역은 바이러스 외피(envelope)와 세포의 엔도솜 막(endosomal membrane) 사이의 막 융합에 필수적이어서 융합 활성화에 관여하는 융합 단백질을 포함한다.

[8]

[9] 또한 본 발명은 상기 보르데텔라 백일해 균주를 포함하는 감염증 치료 또는 예방용 면역원성 조성물에 관한 것이다.

[10] 본 발명에서 상기 감염증은 제한되지는 않으나 인체로의 이중 항원 병원체 감염증 또는 보르데텔라 백일해 감염증일 수 있다.

[11]

[12] 또한 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 갖는 보르데텔라 백일해의 Fim2 (fimbriae 2) 유전자의 N-말단 100 내지 140 mer와 C-말단 100 내지 140 mer, 바람직하게는 각각 120 mer, 사이에 이중 항원 단백질 유전자를 삽입하여 상동재조합용 인서트를 제조하는 단계; 및 상기 인서트를 보르데텔라 백일해에 형질전환하는 단계;를 포함하는 보르데텔라 백일해(*Bordetella pertussis*) 균주의 제조방법에 관한 것이다.

[13] 본 발명에서 상기 이중 항원 단백질 유전자는 제한되지는 않으나 인플루엔자 바이러스 유래 헤마글루티닌(HA)일 수 있다.

[14] 본 발명에서 상기 헤마글루티닌은 제한되지는 않으나 서열번호 2의 염기서열을 갖을 수 있다.

[15] 본 발명에서 상기 인서트는 제한되지는 않으나 도 2에 나타난 2개의 제한효소 (*Bgl*II+*Kpn*I)로 자른 linearized DNA를 이용할 수 있다.

[16] 본 발명의 실시예를 통해 제작한 인플루엔자 바이러스 유래 헤마글루티닌을 포함하는 재조합 단백질은 형질전환된 보르데텔라 백일해 균주를 2x 시료 완충액을 첨가하여 변성한 후 10% SDS-PAGE에서 전기영동을 실시하고 상기 전기영동 결과물을 PVDF막에 단백질을 옮긴 후, 별도로 대장균에서 발현시킨 재조합 Fim2 및 재조합 헤마글루티닌을 토끼에 접종하여 생산한 토끼-항-Fim2와 토끼 항-헤마글루티닌 다클론 항체를 1차 항체로 사용한 후 염소 항-토끼 IgG HRP 접합된 항체를 2차 항체로 사용하여 순수분리함으로써 약 37 kDa의 크기를 갖는 재조합 단백질이 형성되어 분리되었음을 확인할 수 있었다.

[17]

[18] 또한 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 갖는 보르데텔라 백일해의 Fim2 유전자의 N-말단 100 내지 140 mer와 C-말단 100 내지 140 mer, 바람직하게는

각각 120 mer, 사이에 이중 항원 단백질 유전자를 삽입하여 상동재조합용 인서트를 제조하는 단계; 상기 인서트를 보르데텔라 백일해에 형질전환하는 단계; 상기 형질전환된 보르데텔라 백일해를 배양하여 상기 이중 항원 단백질을 발현하는 단계; 및 상기 변이주를 이용하여 사균백신을 만드는 단계; 및 상기 사균백신을 동물 내로 면역 후 면역여부를 판단하는 단계; 를 포함하는 면역확인방법에 관한 것이다.

- [19] 상기 면역여부를 판단하는 단계에서 면역효과가 있음을 검증하기 위해서는 본원 발명의 일 실시예와 같이 상기 형질전환된 변이주를 이용하여 사균백신을 제조하고 이를 실험동물에 투여한 후, 혈액을 채취하여 혈청을 분리하고 ELISA 방법으로 Fim2나 헤마글루티닌에 대한 혈중의 IgG를 음성대조군과 비교하여 항체의 생성 여부를 확인하였으며, 항체가 성공적으로 형성되었음을 확인할 수 있었다.

[20]

- [21] 또한 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 갖는 보르데텔라 백일해의 Fim2 유전자의 N-말단 100 내지 140 mer와 C-말단 100 내지 140 mer, 바람직하게는 각각 120 mer, 사이에 이중 항원 단백질 유전자를 삽입하여 상동재조합용 인서트를 제조하는 단계; 상기 인서트를 보르데텔라 백일해에 형질전환하는 단계; 상기 형질전환된 보르데텔라 백일해를 배양하여 사균백신을 제조하는 단계; 상기 제조된 사균백신을 인간을 제외한 동물 내로 면역 후 면역여부를 판단하는 단계; 및 살아있는 인플루엔자 바이러스를 상기 면역된 동물 내로 투여한 후 방어여부를 판단하는 단계; 를 포함하는 방어확인방법에 관한 것이다.

- [22] 상기 방어여부를 판단하는 단계에서 인플루엔자 바이러스에 대한 방어효과가 있음을 검증하기 위해서는 본원 발명의 일 실시예와 같이 면역이 확인된 동물에게 살아있는 인플루엔자 바이러스를 감염시키고 그 동물 조직으로부터 RNA를 추출하고 cDNA를 합성하여 정량적 실시간 중합효소 연쇄반응을 시행하고 이를 음성대조군과 비교하여 상기 순수분리된 단백질을 투여한 실험군이 불활화한 인플루엔자 바이러스를 투여한 양성대조군과 비교하여 바이러스 RNA의 양이 유사하게 감소하고 음성대조군에 비해서는 월등히 감소함을 측정함으로써 효과적인 방어효과가 있음을 확인할 수 있었다.

발명의 효과

- [23] 본 발명의 보르데텔라 백일해 균주를 통한 형질전환 결과 이중 항원 단백질을 발현하는 사균백신 (killed whole cell vaccine)으로 활용 효과가 높을 것으로 기대되며, 보르데텔라 백일해 균주의 화학약품의 처리 및 충분리를 이용한 성분백신 (acellular vaccine)으로써 활용 가능할 것으로 기대된다.
- [24] 상기 균주를 포함하는 면역원성 조성물은 인체 내 투여시 보르데텔라 백일해에 대한 감염증은 나타나지 않으며, 중화항체를 유발하는 바이러스 유래 이중 항원 단백질 발현을 통해 예방 백신 또는 치료용 균주로 사용이 가능할 것으로

기대된다.

도면의 간단한 설명

- [25] 도 1은 PCR 증폭 결과로 레인 1은 헤마글루티닌의 증폭 결과, 레인 2는 Fim2 유전자의 N-말단 및 C-말단 부위의 증폭 결과, M은 100 bp 마커이다.
- [26] 도 2는 Fim2 유전자의 N-말단 120 mer와 C-말단 120 mer, 인플루엔자 바이러스의 헤마글루티닌 단백질을 코딩하는 유전자를 클로닝한 후 이를 연결하여 하나의 상동재조합용 인서트로 사용하는 것을 나타내는 모식도이다.
- [27] 도 3은 3개의 유전자좌의 치환여부 검증을 위한 PCR 모식도이다.
- [28] 도 4는 PCR 결과로, 레인 1은 Fim2 유전자의 N-말단-헤마글루티닌의 증폭 결과 (0.95 kb), 레인 2는 헤마글루티닌의 증폭 결과 (0.83 kb), 레인 3은 헤마글루티닌-Fim2 유전자의 C-말단의 증폭 결과 (0.95 kb)이며, M은 100 bp 마커이다.
- [29] 도 5는 헤마글루티닌 단백질의 발현 여부를 Fim2에 대한 다클론 항체를 이용하여 측정한 웨스턴 블롯 결과이다. 레인 1은 야생형 보르데텔라 백일해 (23 kDa), 레인 2는 본 발명의 헤마글루티닌을 발현하는 변이주 보르데텔라 백일해 (37 kDa), 레인 3은 양성대조군으로 대장균 내에서 발현된 Fim2의 재조합 항원 (30 kDa)이다.
- [30] 도 6은 헤마글루티닌 단백질의 발현 여부를 헤마글루티닌에 대한 다클론 항체를 이용하여 측정한 웨스턴 블롯 결과이다. 레인 1은 야생형 보르데텔라 백일해 (밴드가 없어야함), 레인 2는 본 발명의 헤마글루티닌을 발현하는 변이주 보르데텔라 백일해 (37 kDa), 레인 3은 양성대조군으로 대장균 내에서 발현된 헤마글루티닌의 재조합 항원 (35 kDa)이다.
- [31] 도 7은 보르데텔라 백일해 변이주에서 Fim3의 구조에 영향이 있는지를 Fim3에 대한 다클론 항체를 이용하여 측정한 웨스턴 블롯 결과이다. 레인 1은 야생형 보르데텔라 백일해 (23 kDa), 레인 2는 본 발명의 헤마글루티닌을 발현하는 변이주 보르데텔라 백일해 (23 kDa), 레인 3은 양성대조군으로 대장균 내에서 발현된 Fim3의 재조합 항원 (35 kDa)이다.
- [32] 도 8은 본 발명의 변이주 보르데텔라 백일해 균주를 포르말린처리 및 부형제와 혼합된 백신으로 면역한 그룹 (중간)의 혈중 면역글로불린G(IgG)의 항체가와 양성대조군으로 불활화시킨 H1N1 바이러스를 접종한 그룹 (회색)의 혈중 IgG 농도를 나타낸 그림이다. 음성대조군으로 PBS (검정색)만 접종한 그룹을 사용하였다.
- [33] 도 9는 면역 후 인플루엔자 바이러스에 감염되었을 때의 방어효과를 나타내는 실시간 중합효소연쇄반응(real-time PCR)의 threshold cycle (Ct)의 변화를 나타내는 결과이다.
- [34] 도 10은 도 9의 결과로부터 계산한 상대적인 바이러스의 양을 정량적으로 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [35] 이하 본 발명을 실시예를 참조하여 상세히 설명한다. 그러나 이들은 본 발명을 보다 상세하게 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 권리범위가 하기의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [36]
- [37] [실시예 1] 인플루엔자 바이러스의 헤마글루티닌(HA)을 발현하는 약독화된 보르데텔라 백일해 균주 제조
- [38] 공시 균주 및 플라스미드
- [39] 대장균(*Escherichia coli*) JM109 (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA)
- [40] pGEM-T easy 벡터 (Promega; Madison, WI, USA)
- [41] Red 헬퍼 플라스미드 pKD46 (Datsenko and Wanner, 2000): pBAD 프로모터를 이용하여 Red, Gam 단백질을 생산하는 벡터
- [42] 보르데텔라 백일해(*Bordetella pertussis*) 표준 균주 Tohama I ATCC#BAA-589)
- [43] 인플루엔자 바이러스 A/PR/8/34(H1N1) (VR1469): American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA).
- [44]
- [45] 오버래핑(overlapping) PCR
- [46] 1) Fim2 및 헤마글루티닌의 PCR을 위한 프라이머
- [47] Fim2 (GenBank #BX640414)의 N-말단, 인플루엔자 바이러스의 헤마글루티닌(GenBank #EF467821) 및 Fim2 C-말단의 증폭을 위해 하기 표 1과 같이 정방향 및 역방향 프라이머를 제작하여 사용하였다. 인플루엔자 헤마글루티닌의 클로닝을 위한 주형을 만들기 위해 바이러스로부터 TRIzol® reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 total RNA를 추출하고 SuperScript III One-step RT-PCR system (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)과 cDNA 합성용 프라이머 Uni-12-F (표 1)를 이용하여 cDNA를 합성하였고 이를 PCR 클로닝용 주형으로 사용하였다.

[48] [Table 1]

	프라이머	서열
서열번호 3	Fim2-N-F	5'-GGCAGATCTATGGTGTACCCATGCAAATCCCT-3'
서열번호 4	Fim2-N-R	5'-TAGCAAGGTCCAGTAATAGTTGGATCCGATGGT GCCGGTGATGAC-3'
서열번호 5	HA-F	5'-GTCATCACCGGCACCATCGGATCCAACCTATTACT GGACCTTGCTA-3'
서열번호 6	HA-R	5'-GCTGGTCCCACCGGTCTGAAGCTTTTTCCTCCA TCTACCTTTTCCCT-3'
서열번호 7	Fim2-C-F	5'-AGGGAAAAGGTAGATGGAGTGAAAAAGCTTCA GACCGGTGGGACCAGC-3'
서열번호 8	Fim2-C-R	5'-AATGGTACCGGGGTAGACCACGGAAAAACCCAC ATA-3'
서열번호 9	Uni-12-F	5'-AGCAAAAGCAGG-3'

[49]

[50] 각 프라이머 세트에 대해 PCR은 94 °C에서 5분간 예비변성, 94 °C에서 30초-57 °C에서 30초-72 °C에서 1분간 30 사이클을 실시하고, 최종 연장을 72 °C에서 5분간 실시하였다. 각 PCR 산물을 1.2% 아가로스 겔에 로딩하여 전기영동을 실시하였다 (도 1).

[51] 상기 증폭된 각각 유전자에 대한 PCR 산물에서, Fim2 N-말단과 헤마글루티닌 PCR 산물을 이용하여 오버래핑 PCR 산물 1을 제작하였다. PCR은 94 °C에서 30초-57 °C에서 30초-72 °C에서 1분간 15 사이클을 실시한 후, Fim2-N-F 프라이머와 HA-R 프라이머를 넣고 94 °C에서 5분간 예비변성, 94 °C에서 30초-57 °C에서 30초-72 °C에서 1분간 30 사이클을 실시하였다.

[52] 상기와 같이 제작된 오버래핑 PCR 산물 1과 Fim2 C-말단 PCR 산물을 이용하여 오버래핑 PCR 산물 1 제작과 동일한 조건으로 PCR을 실시하여 오버래핑 PCR 산물 2를 제작하였다.

[53] 상기 PCR 산물을 pGEM-T Easy 클로닝 벡터 내로 클로닝하고, 도 2에서와 같이 제한효소 *Bgl*II와 *Kpn*I을 이용하여 절단 후, 준비된 1.07 kb의 DNA를 상동재조합용 선형 DNA 인서트로 사용하였다.

[54]

[55] 상동 재조합을 통한 Fim2 유전자좌로의 삽입

[56] 보르데텔라 백일해 균주를 Bordet-Gengou blood agar (BBL™, 297876, BD,

USA)에 37°C에서 배양하고, 상기 균주 콜로니를 Stainer-Scholte(SS) 브로스(broth) 5 mL에 접종하여 OD₆₀₀ 값이 0.5가 될 때까지 37°C에서 배양하고, 얼음 위에서 20 분간 냉각한 후, 4000 x g에서 15 분간 원심분리하여 균의 펠릿(pellet)을 회수하였다. 이를 냉각된 10% 글리세롤(Sigma, USA) 100 µL로 농축하여 전기천공용 컴피턴트 세포(competent cell)를 제조하였다. 상기 균체에서 λ Red 리코비나제(recombinase)를 발현하기 위해 pKD46 플라스미드를 Gene Pulser Xcell 전기천공시스템(Bio-Rad, Hercules, CA)을 이용하여 형질전환한 후, 최종농도 10 mM의 암피실린(ampicillin; Sigma, USA)과 L-아라비노스(L-arabinose; Sigma, USA)가 첨가된 Stainer-Scholte(SS) 브로스에서 선택 후, 30 °C에서 OD₆₀₀ 값이 0.5가 될 때까지 배양하였다. 이후 다시 냉각된 10% 글리세롤(Sigma, USA) 100 µL로 농축하여, 먼저 제조된 상동 재조합용 선형 DNA를 형질전환하기 위한 일렉트로 컴피턴트 세포를 제조하였다.

- [57] 50 µL의 일렉트로 컴피턴트 세포에 1 µL의 인서트 DNA를 전기천공법으로 형질전환한 후, Bordet-Gengou blood agar에서 배양하여 이중항원으로 헤마글루티닌을 발현하는 변이주 "BPS-Fim2-HA"를 선별하였다.

[58]

- [59] [실시예 2] 헤마글루티닌 치환 확인

- [60] 상기 실시예 1을 통한 형질전환 후 선택배지에서 생존한 BPS-Fim2-HA의 검증을 위해 PCR 검증을 실시하였다. 도 3과 같이 3종류의 프라이머 세트를 이용하여, PCR 검증 1번은 Fim2-N-F 및 HA-R 프라이머, PCR 검증 2번은 HA-F 및 HA-R 프라이머, PCR 검증 3번은 HA-F 및 Fim2-C-R 프라이머를 이용하여 각각 0.95 kb, 0.83 kb 및 0.95 kb의 PCR 산물의 증폭을 얻었는지 검증하였다.

- [61] 그 결과 도 4의 결과로부터 각 PCR 검증에 기대되는 크기의 PCR 산물이 생성되었음을 확인하였다.

[62]

- [63] [실시예 3] 이중 항원 단백질인 헤마글루티닌(HA)이 포함된 단백질의 발현 확인

- [64] 변이 균주인 BPS-Fim2-HA 배양액 1 mL을 4000 x g에서 15 분간 원심분리하여 균 펠릿을 준비하고 2x 시료 완충액(0.125M Tris (pH 6.8), 4% SDS, 20% 글리세롤, 10% 2-mercaptoethanol, 0.2% bromo-phenol-blue; Sigma, USA)을 첨가하여 변성한 후 10% SDS-PAGE에서 전기영동을 실시하였다. 상기 전기영동 결과물을 PVDF막(Westeran®, Whatman™, GE Healthcare, UK)에 단백질을 옮긴 후 대장균에서 발현된 재조합 Fim2 및 대장균에서 발현한 재조합 헤마글루티닌을 토끼에 접종하여 생산한 토끼-항-Fim2와 토끼-항-헤마글루티닌 다클론 항체를 1차 항체로, 염소 항-토끼 IgG HRP 접합된 항체(Pierce, USA)를 2차 항체로 사용하여 헤마글루티닌 단백질의 발현 여부를 확인하였다.

- [65] 그 결과, 도 5 및 도 6 (각각 lane 2)으로부터 37 kDa의 단백질에 대한 밴드가 형성됨을 확인함으로써 헤마글루티닌이 포함된 단백질의 발현을 확인하였다.

[66]

[67] Fim3 (fimbriae 3)에 대한 구조적 변이 유발 여부 확인

[68] 상기 실험과 동일한 조건에서 대장균에서 발현된 재조합 Fim3를 토끼에 접종하여 생산한 토끼-항-Fim3 다클론 항체를 1차 항체로 사용한 후, 염소 항-토끼 IgG HRP 접합된 항체(Pierce, USA)를 2차 항체로 사용하여 Fim2 유전자좌의 변화로 인해 정상적인 Fim3의 발현이 영향을 받는지 알아보기 위해 Fim3의 정상적인 발현 여부를 확인한 결과 도 7과 같이 Fim3의 발현에는 영향을 주지 않았음을 알 수 있었다.

[69]

[70] [실시예 4] BPS-Fim2-HA 사균백신 제조

[71] 실험동물인 마우스 내에서의 면역 효과 검증을 위해 상기 실시예를 통해 제조한 변이주 BPS-Fim2-HA를 이용하여 사균백신을 제조하였다.

[72] 상기 실시예를 통해 제작한 균주를 Stainer-Scholte(SS) 브로스(broth)에서 배양하고, 4000 x g에서 15 분간 원심분리한 후, PBS로 재부유 후 formalin을 최종농도 0.2%가 되도록 포함하여 37°C, 48시간 이상 반응한 후 killed-bacterial cell을 준비하였다. 항원인식을 위한 아쥘반트로는 Alum®(Imject Alum, Pierce, Rockford, IL, USA)과 1:1-1:3의 비율로 혼합준비하였다. 1회 접종되는 전체 균수는 재조합 헤마글루티닌을 마우스당 50ug이 접종될 수 있도록 정량하여 상응하는 cell 수인 1×10^9 cells/마우스로 접종하였다.

[73]

[74] [실시예 5] 제조된 사균백신을 이용한 마우스에서의 면역효과 검증

[75] 5주령 ICR 마우스(DBL, 대한민국) 피하 내로 상기 실시예를 통해 준비된 사균백신을 주사하였다. 이를 위하여 실험군을 3그룹으로 나누어 상기 준비된 사균백신 접종군, 음성대조군으로 PBS 접종군 및 양성대조군으로 불활화한 인플루엔자 바이러스 접종군을 구성하였다.

[76] 항원면역은 2주 간격으로 총 3회 실시하였고, 각 마우스군의 동일 위치의 미정맥에서 혈액을 채취하여 혈청을 분리하였다. 혈액 채취는 실험 전, 면역 후 7일 간격으로 총 3회 실시하였고, 증류수로 1:100으로 희석한 후 효소면역측정법(ELISA)으로 혈청의 면역글로불린 G(IgG)를 비교하였다.

[77] 상기 IgG의 비교 결과 음성대조군과 비교하여 21일과 35일에 항체가가 유도됨을 확인하였다(도 8).

[78]

[79] [실시예 6] 사균백신을 이용한 마우스에서의 방어효과 검증

[80] 상기 실시예 5의 면역효과 확인 후 인플루엔자 바이러스 감염시 방어효과를 확인하기 위해 실시예 5에서 면역측정이 완료된 마우스에 준치사량(sublethal dose; 500 pfu/mouse, 40 LD₅₀, 10^{4.1} EID₅₀)의 인플루엔자 바이러스 A/PR/8/34(H1N1)를 비강 내로 투여하여 감염시켰다. 감염 후 5일 뒤, 마우스로부터 폐조직을 분리하고, 이로부터 TRIzol® reagent (Invitrogen, Carlsbad,

CA, USA)를 이용하여 total RNA를 추출하고 SuperScript III One-step RT-PCR system (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)과 프라이머 Uni-12-F (표 2)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 상기 cDNA를 주형으로 하고 표 2에 나오는 프라이머를 사용하여 정량적 실시간 중합효소 연쇄반응(real-time quantitative PCR; Exicycler™ 96, Bioneer, 대한민국)을 실시하였다. 바이러스의 RNA는 그에 준하는 cDNA양으로 해석되고 cDNA의 양은 바이러스의 실제농도와 비례할 것이므로 정량 PCR에서의 검출농도는 바이러스의 양으로 해석될 수 있다. 바이러스 유래 RNA, 즉 cDNA의 검출에는 헤마글루티닌 유전자 부위와 뉴라미니다제 (neuraminidase, NA), M protein 유전자 부위를 target으로 하여 실시하였다. 시료에 쓰인 조직의 양에 따라 total RNA의 양이 영향을 받기 때문에 상대적인 정량의 확인을 위한 베타-액틴 유전자의 RNA를 비교군으로 하여 검출되는 바이러스 RNA양을 간접 해석하였다.

[81]

[82] [Table 2]

	프라이머	서열
서열번호 10	HA-real-878-F	5'-CGAAGTGTCAAACACCCCTG-3'
서열번호 11	HA-real-1170-R	5'-CCCGTTAATGGCATTTTGTG-3'
서열번호 12	NA-real-187-F	5'-TCAAGATTTGAATCGGTCGC-3'
서열번호 13	NA-real-460-R	5'-CCTTCCCCTTTTCGATCTTG-3'
서열번호 14	M-217-F	5'-GGACTGCAGCGTAGACGCTT-3'
서열번호 15	M-405-R	5'-CATCCTGTTGTATATGAGGCCCAT-3'

[83]

[84] 그 결과 도 9에서 확인할 수 있는 바와 같이 threshold cycle을 통한 delta(Ct) 값이 10-13 사이클의 차이를 나타내는 것을 확인하였다. PCR에서의 1 cycle의 차이는 2배의 농도차가 나므로 10-13 사이클의 차이는 2^{10} - 2^{13} (1024배-8192배)의 농도차가 나는 것으로 해석된다. 이를 바이러스 RNA양에 대한 상대적인 정량 비교를 실시한 결과, 도 10에서 확인할 수 있는 바와 같이, 음성대조군에 비해 유의하게 감소하였음을 확인하였고, 양성대조군인 불활화한 인플루엔자 바이러스를 면역한 그룹과 유사한 값을 나타냄을 확인하였다.

[85]

[86] 상기 결과로부터, 본원 발명의 변이된 보르데텔라 백일해 균주는 본래 가지고 있던 병원체의 원형은 유지하면서 이중 항원인 인플루엔자 바이러스의 헤마글루티닌(HA) 단백질을 발현할 수 있는 균주임을 확인하였다.

[87] 또한 상기 균주에서 발현되는 이중 항원 단백질을 포함하는 사균백신을 통해 확인한 면역 및 방어효과 결과로부터, 인플루엔자 바이러스 감염에 대한 예방

또는 치료 효과를 가지며, 발명된 균주는 이러한 이중항원 단백질 운반체로 사용될 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[88]

서열목록 Free Text

[89] 서열목록은 서열목록파일로 첨부하였다.

청구범위

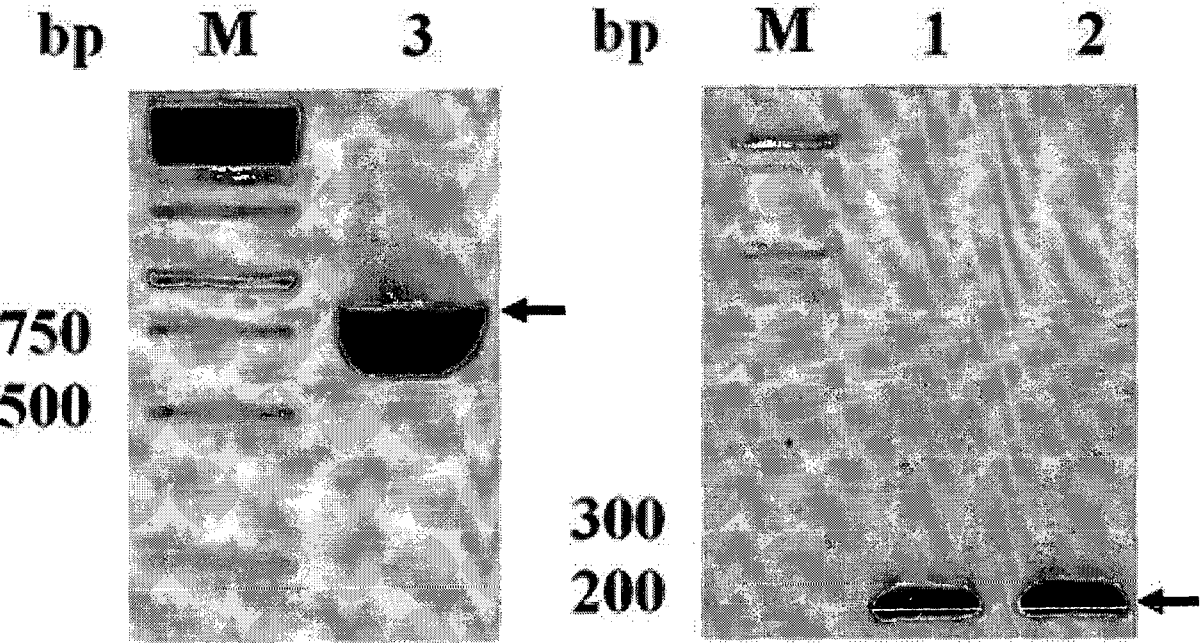
- [청구항 1] 서열번호 1의 염기서열을 갖는 보르데텔라 백일해의 Fim2 유전자의 N-말단 100 내지 140 mer와 C-말단 100 내지 140 mer 사이에 이중 항원 단백질 유전자를 삽입한 구조를 갖는 재조합 유전자를 포함하는 보르데텔라 백일해(*Bordetella pertussis*) 균주.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서,
상기 이중 항원 단백질 유전자는 인플루엔자 바이러스 유래 헤마글루티닌(HA)인 것을 특징으로 하는 보르데텔라 백일해 균주.
- [청구항 3] 제 2항에 있어서,
상기 헤마글루티닌은 서열번호 2의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 보르데텔라 백일해 균주.
- [청구항 4] 제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항의 보르데텔라 백일해 균주를 포함하는 감염증 치료 또는 예방용 면역원성 조성물.
- [청구항 5] 제 4항에 있어서,
상기 감염증은 인체로의 이중 항원 병원체 감염증 또는 보르데텔라 백일해 감염증인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 6] 서열번호 1의 염기서열을 갖는 보르데텔라 백일해의 Fim2 유전자의 N-말단 100 내지 140 mer와 C-말단 100 내지 140 mer 사이에 이중 항원 단백질 유전자를 삽입하여 상동재조합용 인서트를 제조하는 단계; 및
상기 인서트를 보르데텔라 백일해에 형질전환하는 단계;
를 포함하는 보르데텔라 백일해(*Bordetella pertussis*) 균주의 제조방법.
- [청구항 7] 제 6항에 있어서,
상기 이중 항원 단백질 유전자는 인플루엔자 바이러스 유래 헤마글루티닌(HA)인 것을 특징으로 하는 제조방법.
- [청구항 8] 제 7항에 있어서,
상기 헤마글루티닌은 서열번호 2의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 제조방법.
- [청구항 9] 제 6항에 있어서,
상기 인서트는 제한되지는 않으나 도 2에 나타난 2개의 제한효소 (*Bg*III+*Kpn*I)로 자른 linearized DNA를 이용하는 것을 특징으로 하는 제조방법.
- [청구항 10] 서열번호 1의 염기서열을 갖는 보르데텔라 백일해의 Fim2 유전자의 N-말단 100 내지 140 mer와 C-말단 100 내지 140 mer 사이에 이중 항원 단백질 유전자를 삽입하여 상동재조합용

인서트를 제조하는 단계;
 상기 인서트를 보르데텔라 백일해에 형질전환하는 단계;
 상기 형질전환된 보르데텔라 백일해를 배양하여 상기 이중 항원
 단백질을 발현하는 단계;
 상기 형질전환된 보르데텔라 백일해 균주를 이용하여 사균백신을
 제조하는 단계; 및
 상기 사균백신을 인간을 제외한 동물 내로 면역 후 면역여부를
 판단하는 단계;
 를 포함하는 면역확인방법.

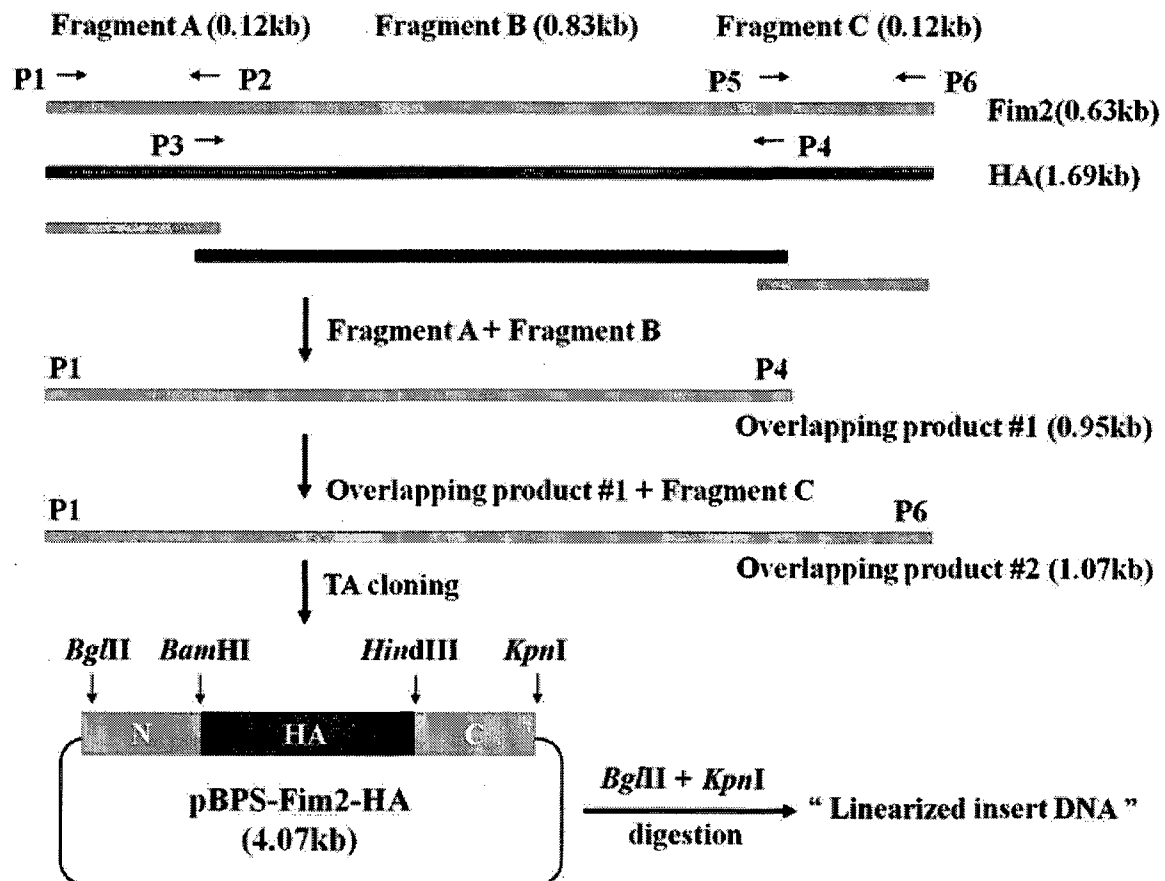
[청구항 11]

서열번호 1의 염기서열을 갖는 보르데텔라 백일해의 Fim2
 유전자의 N-말단 100 내지 140 mer와 C-말단 100 내지 140 mer
 사이에 이중 항원 단백질을 삽입하여 상동재조합용
 인서트를 제조하는 단계;
 상기 인서트를 보르데텔라 백일해에 형질전환하는 단계;
 상기 형질전환된 보르데텔라 백일해를 배양하여 상기 이중 항원
 단백질을 발현하는 단계;
 상기 형질전환된 보르데텔라 백일해 균주를 이용하여 사균백신을
 제조하는 단계;
 상기 사균백신을 인간을 제외한 동물 내로 면역 후 면역여부를
 판단하는 단계; 및
 인플루엔자 바이러스를 상기 면역된 동물 내로 투여한 후
 방어여부를 판단하는 단계;
 를 포함하는 방어확인방법.

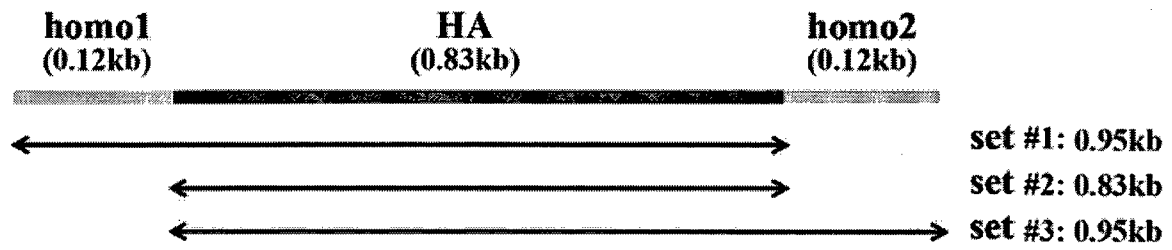
【Fig. 1】



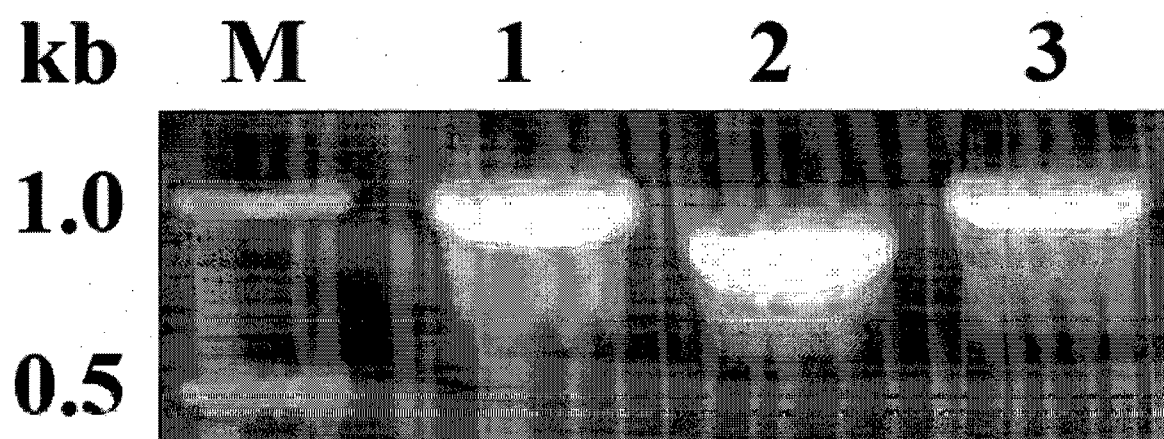
【Fig. 2】



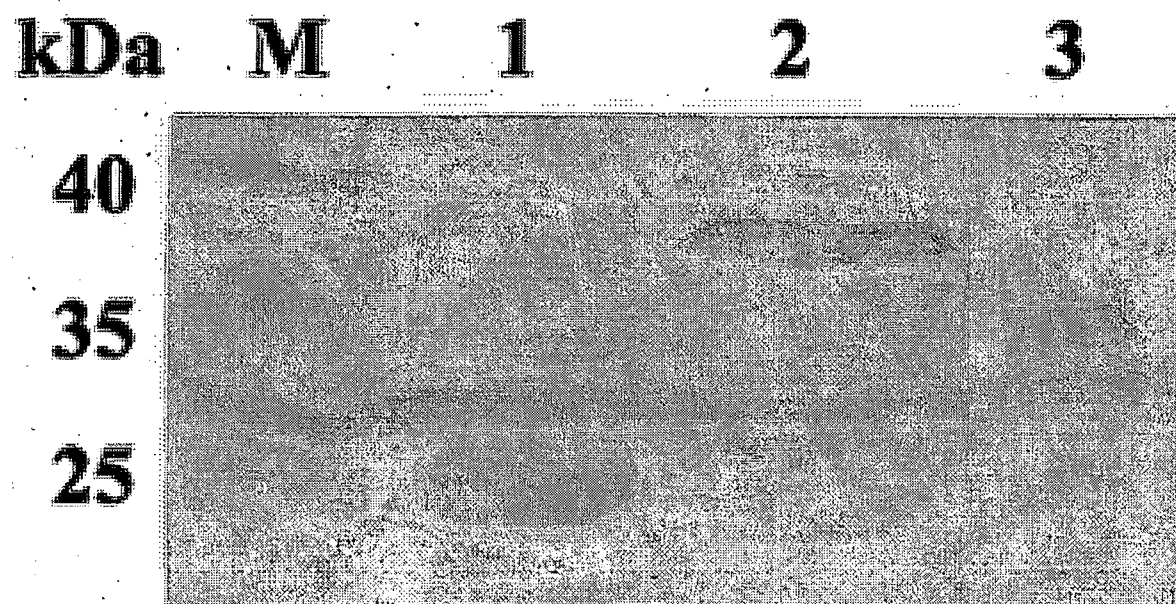
【Fig. 3】



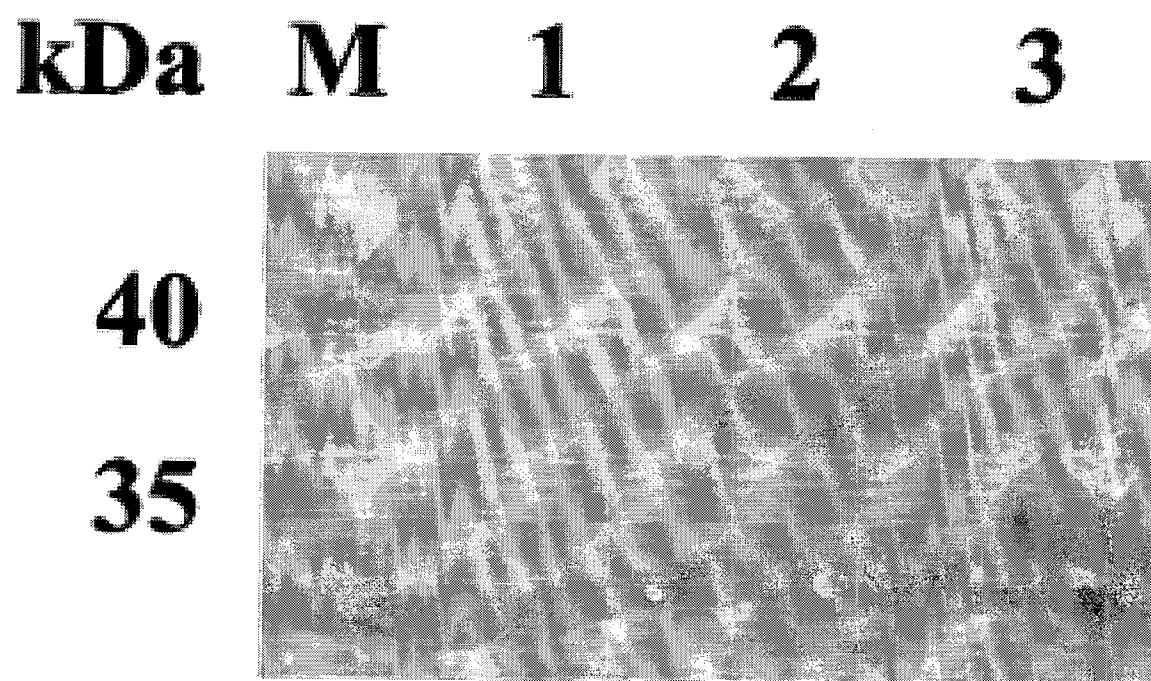
【Fig. 4】



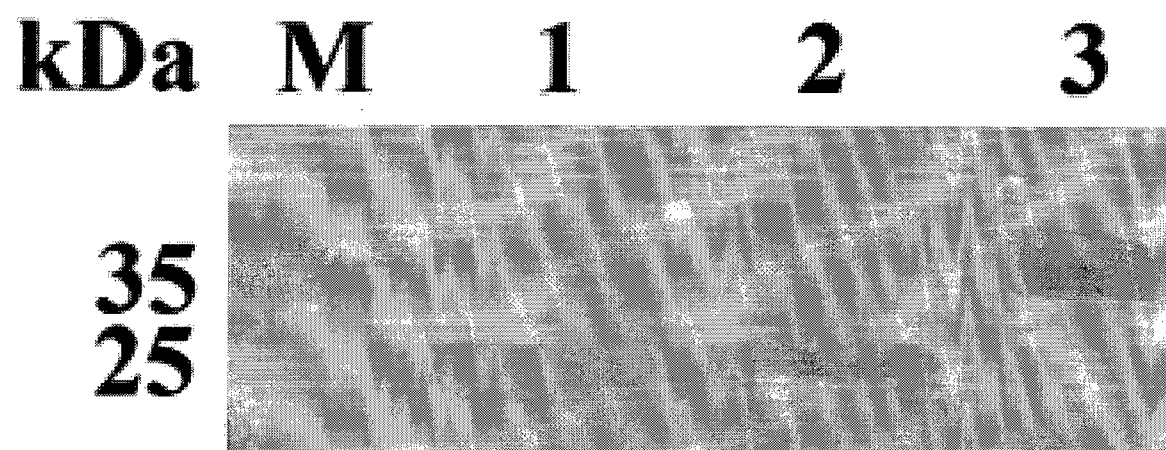
【Fig. 5】



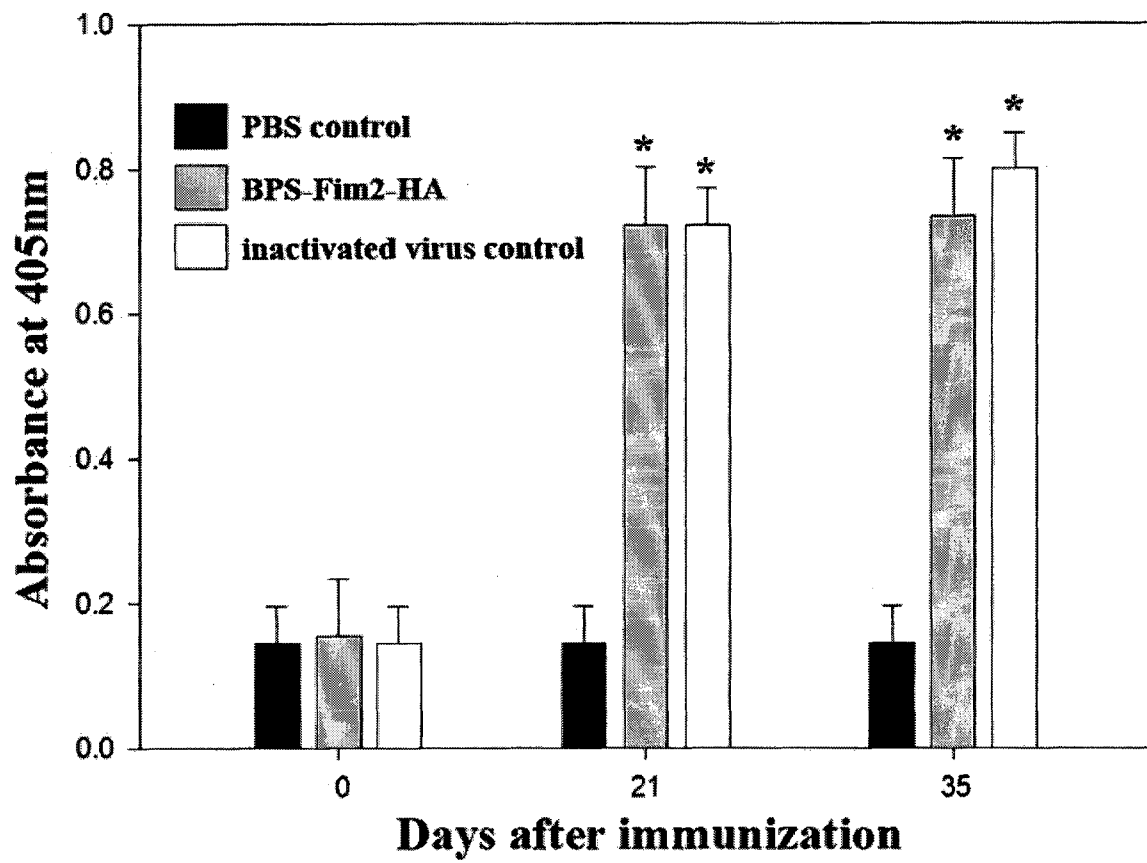
【Fig. 6】



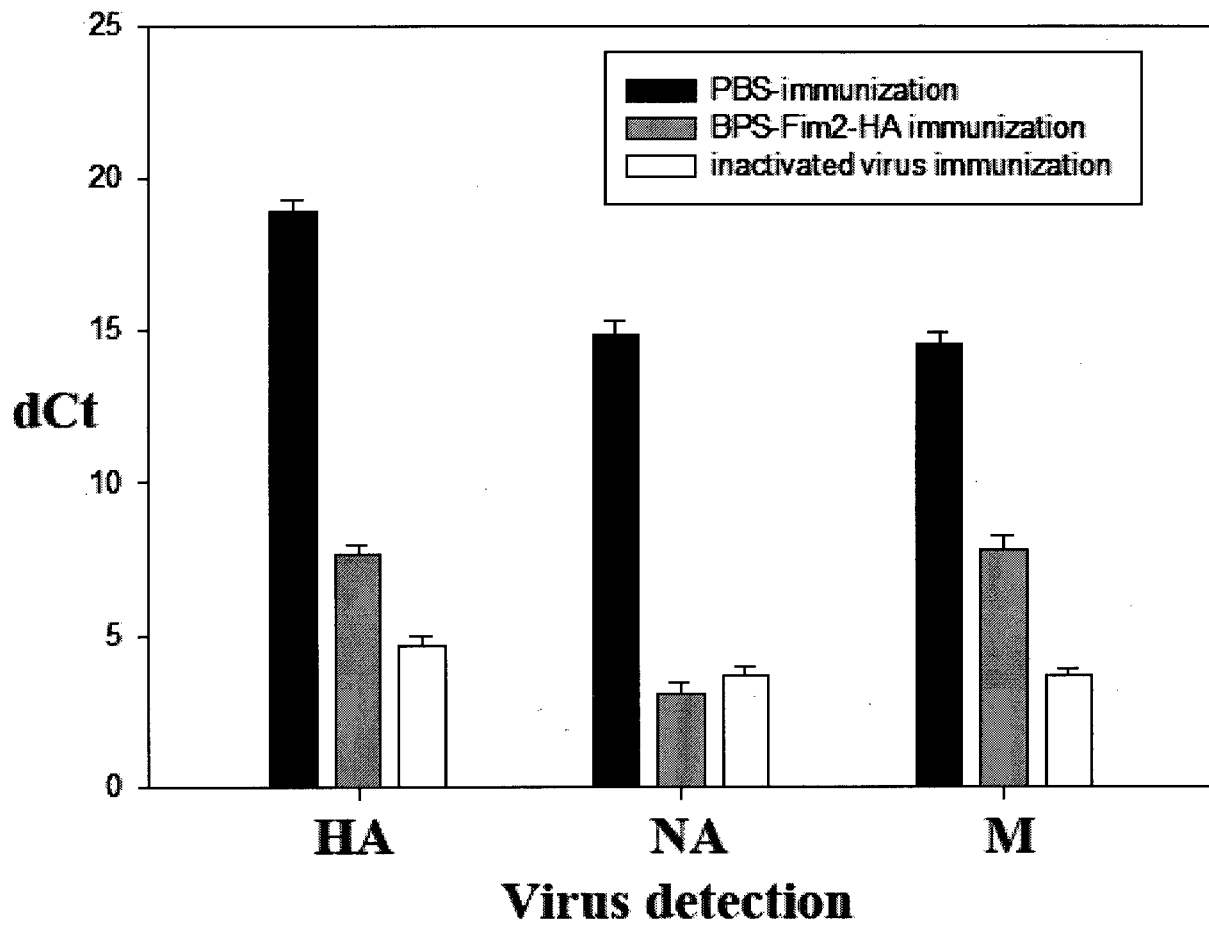
【Fig. 7】



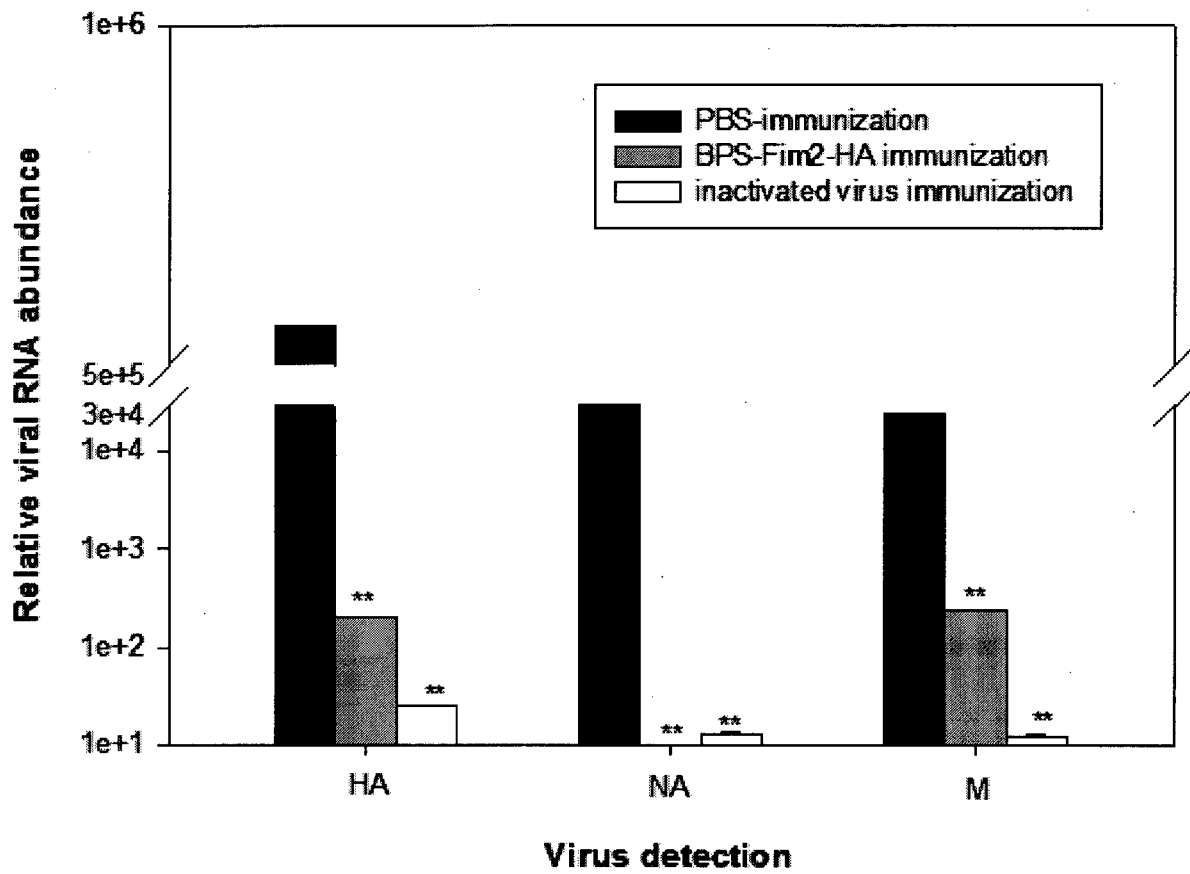
【Fig. 8】



【Fig. 9】



【Fig. 10】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/007499**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12N 1/21(2006.01)i, A61K 39/10(2006.01)i, A61K 31/04(2006.01)i***

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 1/21; C07K 14/235; C12N 1/36; A61K 39/10; A61K 31/04

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

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

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

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: Bordetella pertussis, Fim2, Influenza, HA**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TAEJUNG KIM, Korean Public Health Association Public Health Conference, vol. 2013 no. 0, page 193 (2013) See page 193 lines 5 to 13	1-11
Y	GenBank Accession No. BX640414, Bordetella pertussis (2008) See sequence	1-11
Y	GenBank Accession No., EF467821, Influenza A virus (2008) See sequence	3,8
A		1,2,4-7,9-11
A	WO 2014-060514 A1 (INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANT ET DE LA RECHERCHE MDICALE) et al.) 24 April 2014 See the entire document	1-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

08 OCTOBER 2015 (08.10.2015)

Date of mailing of the international search report

12 OCTOBER 2015 (12.10.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/007499

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2014-060514 A1	24/04/2014	AU 2013-333928 A1	09/04/2015
		CA 2887055 A1	24/04/2014
		EP 2722338 A1	23/04/2014
		US 2015-0210978 A1	30/07/2015

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 1/21(2006.01)i, A61K 39/10(2006.01)i, A61K 31/04(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 1/21; C07K 14/235; C12N 1/36; A61K 39/10; A61K 31/04

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

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

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: Bordetella pertussis, Fim2, Influenza, HA

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	TAEJUNG KIM, 대한보건협회 보건종합학술대회, 2013권 0호, 페이지 193(2013) 193페이지 5 내지 13째 줄 참조	1-11
Y	GenBank Accession No. BX640414, Bordetella pertussis(2008) 서열참조	1-11
Y	GenBank Accession No., EF467821, Influenza A virus(2008) 서열참조	3,8
A		1,2,4-7,9-11
A	WO 2014-060514 A1 (INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANT ET DE LA RECHERCHE MDICALE) 등) 2014.04.24 전체 참조	1-11

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

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

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

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

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2015년 10월 08일 (08.10.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 10월 12일 (12.10.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

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

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

김정태

전화번호 +82-42-481-5495



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2014-060514 A1	2014/04/24	AU 2013-333928 A1	2015/04/09
		CA 2887055 A1	2014/04/24
		EP 2722338 A1	2014/04/23
		US 2015-0210978 A1	2015/07/30