



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0039593
(43) 공개일자 2020년04월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/005 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/29 (2006.01) A61K 39/385 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/005 (2013.01)
A61K 39/292 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0122966
(22) 출원일자 2019년10월04일
심사청구일자 2019년10월04일
(30) 우선권주장
1020180119294 2018년10월05일 대한민국(KR)

(71) 출원인
알엔에이진(주)
서울특별시 송파구 법원로6길 7, 604, 605호 (문정동, 송파유타테크밸리)
(72) 발명자
이우길
서울특별시 송파구 중대로 24, 210동 901호 (문정동, 올림픽훼밀리타운)
(74) 대리인
특허법인 남앤남

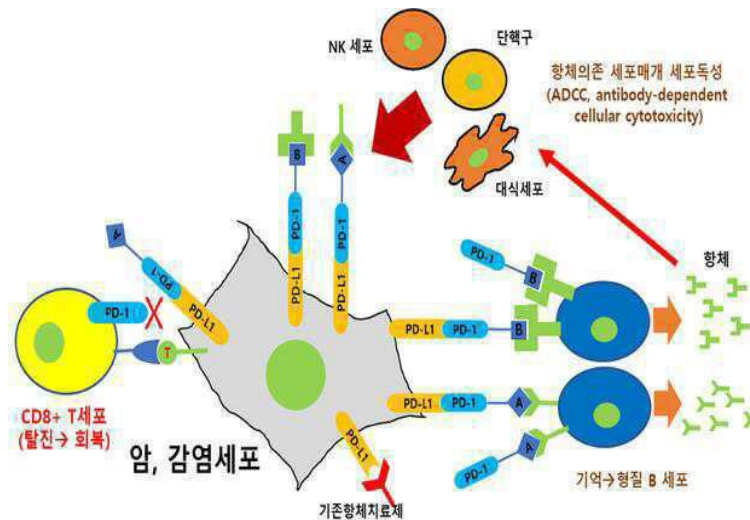
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 표적 세포 특이적으로 결합하여 다중 면역기능이 강화된 키메라항원 및 이의용도

(57) 요약

본 발명은 표적 세포 특이적으로 결합하여 다중 면역기능이 강화된 키메라항원 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명은 면역 반응 유도 영역 및 표적 세포 특이적 결합 유도 영역이 융합된 다중 면역기능이 강화된 키메라 항원; 상기 다중 면역기능이 강화된 키메라 항원을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물; 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물; 면역증강제 조성물; 및 백신 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 39/385 (2013.01)

A61P 31/12 (2018.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A61K 2039/6031 (2013.01)

C07K 2319/33 (2013.01)

C12N 2730/10132 (2013.01)

C12N 2730/10134 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

면역 반응 유도 영역; 및 표적 세포 특이적 결합 유도 영역;이 융합된, 다중 면역기능이 강화된 키메라 항원.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 면역 반응 유도 영역은, 외래 바이러스성 항원으로 상기 항원에 의해 항원-항체반응이 형성되는 것을 특징으로 하는, 다중 면역기능이 강화된 키메라 항원.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 면역 반응 유도 영역은, B형간염바이러스 항원, C형 간염바이러스 항원, A형 간염바이러스 항원, AIDS 바이러스 항원, MERS 바이러스 항원, 인플루엔자 A 바이러스 항원, 인두유종바이러스 항원, 임파구성맥락수막 바이러스(LCMV) 항원 및 단순포진 바이러스(HSV) 항원으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 다중 면역기능이 강화된 키메라 항원.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 면역 반응 유도 영역은, B형간염바이러스 항원으로 B형간염바이러스의 내피 단백질(HBc), B형간염바이러스의 e항원 (HBe) 또는 B형간염바이러스의 표면 단백질(HBs)인 것을 특징으로 하는, 다중 면역기능이 강화된 키메라 항원.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 표적 세포 특이적 결합 유도 영역은 표적 세포에 특이적으로 결합할 수 있는 세포막 단백질로서 PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA-4, CD28, ICOS, OX40, OX40L, GITR, GITRL, CD40, CD40L, 4-1BB, 4-1BBL, B7-1, B7-2, B7-H1, B7-H2, B7-DC, CD80, CD160, BTLA, HVEM, DPP-4, NTCP, CD16 및 Caveolin-1으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 다중 면역기능이 강화된 키메라 항원.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 면역 반응 유도 영역과 표적 세포 특이적 결합 유도 영역 사이는 키메라 항원의 구조적 안정성을 위해 서열번호 19 또는 서열번호 21로 표시되는 링커 펩타이드로 연결되어 있는 것을 특징으로 하는, 다중 면역기능이 강화된 키메라 항원.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 다중 면역기능이 강화된 키메라 항원은 서열번호 9 또는 서열번호 11의 펩타이드 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 다중 면역기능이 강화된 키메라 항원.

청구항 8

제1항의 다중 면역기능이 강화된 키메라 항원을 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 암은 폐암, 위암, 간암, 골암, 췌장암, 피부암, 두경부암, 피부 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 대장암, 결장암, 유방암, 자궁 육종, 나팔관 암종, 자궁내막 암종, 자궁경부 암종, 질 암종, 외음부 암종, 식도암, 후두암, 소장암, 갑상선암, 부갑상선암, 연조직의 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 유년기의 고상 종양, 분화 림프종, 방광암, 신장암, 신장 세포 암종, 신장 골반 암종, 제1 중추신경계 림프종, 척수축 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 아테노마로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 10

제1항의 다중 면역기능이 강화된 키메라 항원을 유효성분으로 포함하는, 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 감염 질환은 B형간염바이러스, C형 간염바이러스, A형 간염바이러스, AIDS바이러스, MERS 바이러스, 인플루엔자 A 바이러스, 인두유종바이러스, 임파구성백라수막 바이러스(LCMV) 또는 단순포진 바이러스(HSV) 감염성 질환인 것을 특징으로 하는, 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 12

제1항의 다중 면역기능이 강화된 키메라 항원을 유효성분으로 포함하는, 면역증강제 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 다중 면역기능이 강화된 키메라 항원은,

(i) 표적 세포인 질병 세포에 특이적으로 결합하고,

(ii) 탈진한 CD8+ T세포의 회복을 촉진하여 T세포 활성을 유도하며, 및

(iii) 항원-항체 반응을 유도하여 체액성 면역반응의 증진 및 자연살해세포(NK cell)에 의한 세포 독성 작용을 활성화시키는 것을 특징으로 하는,

면역증강제 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 (iii)의 항원-항체 반응 유도는 상기 키메라 항원의 면역 반응 유도 영역에 의해 개체의 체내에서 형성된 특이적 항원-항체반응을 증진시키는 것을 특징으로 하는, 면역증강제 조성물.

청구항 15

제1항의 다중 면역기능이 강화된 키메라 항원을 유효성분으로 포함하는, 암 또는 감염질환에 대한 백신 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 표적 세포 특이적으로 결합하여 다중 면역기능이 강화된 키메라항원 및 이의용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 외부로부터 체내에 세균이나 바이러스 같은 병원체가 침입하지 못하도록 방어하거나, 병원체가 침입하더라도 이

를 인식하고 저항할 수 있는 능력을 ‘면역’이라고 한다. 면역에는 태어날 때부터 누구나 타고나는 능력인 선천성 면역과 후천적으로 획득되는 후천성 면역이 있다. 일반적인 의미에서의 면역은 후천성 면역을 말한다. 비특이적인 면역이라 알려진 선천성 면역과 달리 후천성 면역은 특이적 면역이라고도 하는데, 침입한 병원체의 종류를 인식하고 이에 맞게 대응하는 방어 작용으로 림프구와 항체가 중요한 역할을 한다. 즉 체내를 순환하는 B 림프구와 T 림프구가 담당한다. 이들은 표면에 특정 항원을 인식하는 수용체를 갖고 있어 항원을 인식하면 각각 체액성 면역과 세포성 면역을 활성화시킨다.

[0003] 후천성 면역에는 항원과 항체가 관여하는데 항원은 병원체나 이물질, 다른 종의 장기 조직 등 비자기(non-self)로 인식되어 후천적 면역반응을 유발하는 원인이 되는 물질이고 항체는 침입한 특정 항원에 대항하기 위해 B 림프구가 만들어내는 물질로 특정 항원에 결합해 병원성을 소멸시킨다. 또한 한번 침입한 병원체의 종류를 기억하는 기능이 있어서 동일한 병원체가 2차로 침입할 때에는 이에 효과적으로 대처할 수 있다. 후천성 면역은 병원체가 몸에 완전히 침입한 후 일어나는 작용으로 선천성 면역 작용 이후에 진행되므로 ‘2차 방어’라고도 한다. 후천성 면역에는 세포성 면역과 체액성 면역이 있는데 T 림프구와 B 림프구의 표면에는 특정 항원을 인식하는 수용체를 갖고 있어 항원을 인식하면 각각 세포성 면역과 체액성 면역을 활성화시킨다. 전자는 항원을 인식한 독성 T 림프구 (Cytotoxic T lymphocyte)가 병원체에 감염된 세포나 암세포를 직접 공격하여 제거하는 반면에 후자의 체액성 면역은 항원을 인식한 보조 T 림프구(Helper T lymphocyte)가 B 림프구를 자극하여 항체를 분비하는 형질 세포 (Plasma cell)와 항원을 기억하는 기억 세포(Memory cell)로 분화 및 증식시킨다. 이로 인한 기억세포의 생성은 추후에 다시 침입한 병원성 항원에 이전보다 신속하고 강력하게 면역적 대응을 할 수 있게 한다.

[0004] 형질 세포가 혈액으로 항체를 분비하면 항체가 항원과 결합해 항원-항체 반응을 일으켜 항원을 제거한다. 한 가지 항체는 한 가지 항원과만 특이적으로 결합을 하는데, 이를 항원-항체 반응의 특이성이라고 한다. 항체는 침입한 미생물에 부착함으로써 미생물의 운동성을 없애고 체세포로 침입하는 것을 방해한다. 이밖에 항체로 둘러싸인 항원은 혈장에서 발견되는 일련의 단백질들인 보체(complement)와 화학적 연쇄반응을 일으킨다. 이 보체 반응은 침입한 미생물의 분해를 야기하거나 침입한 미생물을 먹어치우는 대식세포를 유인한다. 이러한 모든 종류의 항원과 항체의 반응 및 결합을 항원 항체 반응이라고 한다.

[0005] 체액성 면역은 단계적으로 1차·2차 면역반응으로 구분될 수 있는데 1차 면역반응 시기에는 항원이 처음 침입했을 때 림프구가 분화하여 항체를 생산하는데 이때 기억 세포가 형성된다. 2차 면역반응은 같은 항원이 다시 침입했을 때 기억 세포가 형질 세포로 빠르게 분화하고 증식하여 다량의 항체를 생산하는 과정으로 더 신속하고 강력한 면역반응을 유도한다.

[0006] T 및 B 림프구로 구성된 적응 면역계는 다양한 종양 항원에 반응하는 능력과 함께, 강력한 항암 잠재력을 지니고 있다. 추가로, 면역계는 상당한 가소성과 기억 구성요소를 갖고 있으며 이들 적응 면역계 속성들로 인해 면역요법은 모든 암 치료 방법들 중에서 보다 효과적인 방법이 될 수 있다. 그러나 암에 대한 내인성 면역반응이 전임상 모델 및 환자에게서 관찰되긴 하지만, 이러한 반응은 효과적이지 못하고, 정착된 암은 "자기"로서 간주되어 면역계에 의해 용인되기도 한다. 이러한 용인 상태에 의해, 종양은 항-종양 면역을 적극적으로 파괴하기 위하여 다른 기전들을 악용할 수 있는데, 이들 기전은 기능장애했을 일으킨 T-세포 신호전달, 저해성 조절 세포 및 면역파괴를 피하기 위해 종양에 의한 부수적 피해로부터 정상 조직을 보호하고 적응 면역반응의 강도를 하향 조정해주는 작용을 하는 내인성 "면역관문(immune checkpoint)"을 활용한다.

[0007] 인간 면역계와 만성적인 감염과 암과 같은 질환들과의 장기적인 경쟁은 숙주에게 많은 생리적 부담이 되고 이러한 결과 면역반응은 교착상태에 빠질 수 있다. T 세포는 탈진하여 불활성화되면서 바이러스 또는 세균이나 종양에 우위를 내주게 된다. 다수의 분자 데이터 베이스를 기반으로 하여, 연구자들이 만성 감염과 자가 면역, 암과의 상호작용에서 의미가 있는 탈진한 T 세포 (Tex) 9개의 종류를 규명하였다. 정상적인 T 세포들이 지치면, 세균이나 종양에 대응하는 능력에 결함이 발생한다. Tex는 중요한 생화학 경로를 멈추게 하는 억제 수용체 단백질 그 표면에 발현시켜서, 유전자 발현의 조절에 변화를 일으키고, 감염 및 종양과 싸우기 위해서 에너지를 만드는 대사를 바꾸며, 최적의 면역 기능의 발달을 억제한다. 면역요법 임상시험에서 탈진한 T 세포에 대한 이런 종류의 평가를 적용하면 특정한 조합의 면역요법의 혜택을 받게 될 가능성이 높은 환자를 확인하고, 감염이나 암에 반응하는 특정한 종류의 탈진한 T 세포들에서 근본적인 기전에 대해 이해가 가능하다.

[0008] PD-1과 CTLA-1와 같이 탈진한 T 세포 (Tex)에 의해 발현되는 억제 수용체들을 표적으로 하는 새롭고 매우 효과적인 면역요법들은 암 치료를 위한 획기적인 치료 방법이 될 수 있을 것이다.

[0009] 이와 관련하여, 최근까지도 암 면역요법은 활성화된 이펙터 세포의 적응-전이, 관련 항원에 대항한 면역화, 또

는 시토카인과 같은 비특이적 면역자극제를 제공하는 것으로 항종양 면역반응을 증가시키는 방식에 연구를 집중해 왔다. 그러나 과거 10년간, 특이적 면역관문 경로 억제제를 개발하고자 집중적으로 노력한 결과, 암을 치료하기 위한 새로운 면역요법적 접근 방식을 제공하기 시작하였는데, 이는 진행성 흑색종 환자를 치료하기 위해 세포독성 T-림프구 항원-4 (CTLA-4)와 결합하여 이를 억제하는 항체 (Ab)인 이필리무맙 (ipilimumab) 같은, 억제성 PD-1 경로를 차단하는 항체의 개발을 포함한다.

[0010] 한편, 프로그램화된 사멸-1 (programmed death-1, PD-1)은 활성화된 T 및 B 세포에 의해 발현된 주요 면역관문 수용체이고, 면역저해를 매개한다. PD-1은 55kDa의 제I형 경막 단백질로서, Ig 상과 유전자의 일부를 이루고 있으며, 면역글로불린 분자군에 속하는 T 세포의 보조저해분자로 잘 알려져 있다. PD-1은 활성화된 B 세포, T 세포 및 골수 세포 상에 발현되는 수용체들, 즉 CD28, CTLA-4, ICOS, PD-1 및 BTLA를 포함하는, CD28 계열 수용체의 한 구성원이다. PD-1에 대한 2개의 세포 표면 당단백질 리간드, 즉 프로그램화된 사멸 리간드-1 (PD-L1) 및 프로그램화된 사멸리간드-2 (PD-L2)가 확인되었는데, 이들은 항원-제시 세포뿐만 아니라 많은 인간 암 상에서 발현되고, PD-1과의 결합 시 시토카인 분비 및 T 세포 활성화를 하향조절하는 것으로 밝혀졌다 [Freeman et al., 2000]; [Latchman et al., 2001]. PD-1은 일반적인 T 세포에서는 정상 상태일 때 PD-1이 발현되지 않다가 활성화되면 발현이 증가한다고 알려져 있다. PD-L1의 경우에는 정상 상태의 T 세포에서도 어느 정도 발현하며 활성화되면 역시 그 발현이 증가한다고 보고되어 있다. PD-L1은 다수의 인간 암에서 다량 발견되며, PD-1과 PD-L1의 상호작용은 T 세포에 자극 또는 억제 신호를 전달한다. 즉, PD-1과 PD-L1 사이의 상호작용으로 인하여 종양 침습성 림프구가 줄어들고, T 세포 수용체 매개 증식이 감소하며, 암세포에 의한 면역 회피 현상이 발생하게 된다. CTLA-4와는 달리, PD-1은 활성화된 T-세포가 종양 및/또는 간질 세포에 의해 발현된 면역저해성 PD-L1 (B7-H1) 및 PD-L2 (B7-DC) 리간드를 접할 수 있는 말초조직에서 주로 기능한다[Flies et al., 2011; Topalian et al., 2012a]. 암세포의 표면에 있는 단백질인 PD-L1, PD-L2가 T세포의 표면에 있는 단백질인 PD-1과 결합하면, T세포는 암세포를 공격하지 못하게 된다.

[0011] PD-1에 의한 세포 내 신호전달은 만성 감염에서 T세포의 면역 탈진(exhaustion)을 유도하는데 필수적이다. 일례로 만성 B형, C형 간염 등을 포함한 바이러스성 질환의 만성화 과정에서 PD-1이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 따라서 PD-1/PD-L1 상호작용을 억제하면 항종양 활성을 유도할 수 있다.

[0012] 한편, 체내에 존재하는 특이적인 항원-항체반응 시스템은 대체로 독립적인 면역으로서 이해되고 다른 질병과는 상관없는 것으로 이해되어 지금까지 다른 항원 또는 질환 치료의 활용으로 잘 이루어지지 않고 있다. 오히려 같은 장기를 감염시키는 세균 또는 바이러스에 대해 형성된 면역은 다른 감염원의 항체형성을 방해하여 이를 극복하는 방법으로써 양쪽 감염원의 항원을 동시에 포함하는 키메라항원을 투여하는 방법이 시도된 바 있고, 또는 두 가지 항원의 재조합 키메라항원을 투여하여 다른 한쪽 항원의 면역반응을 향상시키려는 시도도 있었다. 그러나 아직까지 키메라항원에 의한 효과적인 약리활성을 보이는 성공적인 사례가 극히 드물다.

[0013] 이에 본 발명자들은 암 또는 감염성 질환의 효과적인 치료를 위한 방법으로서, 체내에 특이적인 항원-항체반응 시스템이 형성된 특정 외부항원에 질환과 연관된 표적단백질에 결합할 수 있는 펩타이드 도메인 키메라항원을 제조하였고, 제조된 키메라항원을 투여할 경우, 키메라항원은 표적단백질을 세포막에 표지하고 있는 암 또는 감염세포에 특이적으로 결합함과 동시에 키메라항원의 다른 도메인은 이미 체내에 형성된 항원-항체반응시스템을 유도하여 표적세포를 효과적으로 제거함으로써 암 또는 감염질환을 매우 효과적으로 치료할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0014] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2008-0056310호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 따라서 본 발명은 인비트로(in vitro)에서 전사시켜 합성한 mRNA, 즉, IVT mRNA를 이용한 융합된 키메라 항원을 이용하여 T 세포와 B 세포에 의한 세포성 면역(cellular immunity)과 체액성 면역(humoral immunity) 또는 항체-의존적 세포매개 세포독성을 동시에 활성화함으로써 면역치료 효과를 극대화할 수 있는 새로운 치료제를 개

발하였다.

- [0016] 그러므로 본 발명의 목적은 면역 반응 유도 영역; 및 표적 세포 특이적 결합 유도 영역;이 융합된, 다중 면역기능이 강화된 키메라 항원을 제공하는 것이다.
- [0017] 본 발명의 다른 목적은 본 발명의 다중 면역기능이 강화된 키메라 항원을 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 다중 면역기능이 강화된 키메라 항원을 유효성분으로 포함하는, 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 다중 면역기능이 강화된 키메라 항원을 유효성분으로 포함하는, 면역증강제 조성물을 제공하는 것이다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 다중 면역기능이 강화된 키메라 항원을 유효성분으로 포함하는, 암 또는 감염질환에 대한 백신 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0021] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해 본 발명은, 면역 반응 유도 영역; 및 표적 세포 특이적 결합 유도 영역;이 융합된, 다중 면역기능이 강화된 키메라 항원을 제공한다.
- [0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 면역 반응 유도 영역은, 외래 바이러스성 항원으로 상기 항원에 의해 항원-항체반응이 형성되는 것일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 면역 반응 유도 영역은, B형간염바이러스 항원, C형 간염바이러스 항원, A형 간염바이러스 항원, AIDS 바이러스 항원, MERS 바이러스 항원, 인플루엔자 A 바이러스 항원, 인두유종바이러스 항원, 임파구성백라수막 바이러스(LCMV) 항원 및 단순포진 바이러스(HSV) 항원으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 면역 반응 유도 영역은, B형간염바이러스 항원으로 B형간염바이러스의 내피 단백질(HBc), B형간염바이러스의 e항원 (HBe) 또는 B형간염바이러스의 표면 단백질(HBs)일 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 표적 세포 특이적 결합 유도 영역은 표적 세포에 특이적으로 결합할 수 있는 세포막 단백질로서 PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA-4, CD28, ICOS, OX40, OX40L, GITR, GITRL, CD40, CD40L, 4-1BB, 4-1BBL, B7-1, B7-2, B7-H1, B7-H2, B7-DC, CD80, CD160, BTLA, HVEM, DPP-4, NTCP, CD16 및 Caveolin-1으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것일 수 있다.
- [0026] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 면역 반응 유도 영역과 표적 세포 특이적 결합 유도 영역 사이는 키메라 항원의 구조적 안정성을 위해 서열번호 19 또는 서열번호 21로 표시되는 링커 펩타이드로 연결되어 있는 것일 수 있다.
- [0027] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 다중 면역기능이 강화된 키메라 항원은 서열번호 9 또는 서열번호 11의 펩타이드 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0028] 또한 본 발명은 본 발명의 다중 면역기능이 강화된 키메라 항원을 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0029] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 암은 폐암, 위암, 간암, 골암, 췌장암, 피부암, 두경부암, 피부 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 대장암, 결장암, 유방암, 자궁 육종, 나팔관 암종, 자궁내막 암종, 자궁경부 암종, 질암종, 외음부 암종, 식도암, 후두암, 소장암, 갑상선암, 부갑상선암, 연조직의 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 유년기의 고상 종양, 분화 림프종, 방광암, 신장암, 신장 세포 암종, 신장 골반 암종, 제1 중추신경계 림프종, 척수축 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 아테노마로 이루어진 군 중에서 선택되는 것일 수 있다.
- [0030] 또한 본 발명은 본 발명의 다중 면역기능이 강화된 키메라 항원을 유효성분으로 포함하는, 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0031] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 감염 질환은 B형간염바이러스, C형 간염바이러스, A형 간염바이러스, AIDS 바이러스, MERS 바이러스, 인플루엔자 A 바이러스, 인두유종바이러스, 임파구성백라수막 바이러스(LCMV) 또는

단순포진 바이러스(HSV) 감염성 질환일 수 있다.

- [0032] 또한 본 발명은 본 발명의 다중 면역기능이 강화된 키메라 항원을 유효성분으로 포함하는, 면역증강제 조성물을 제공한다.
- [0033] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 다중 면역기능이 강화된 키메라 항원은, (i) 표적 세포인 질병 세포에 특이적으로 결합하고, (ii) 탈진한 CD8+ T세포의 회복을 촉진하여 T세포 활성을 유도하며, 및 (iii) 항원-항체 반응을 유도하여 체액성 면역반응의 증진 및 자연살해세포(NK cell)에 의한 세포 독성 작용을 활성화시키는 것일 수 있다.
- [0034] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 (iii)의 항원-항체 반응 유도는 상기 키메라 항원의 면역 반응 유도 영역에 의해 개체의 체내에서 형성된 특이적 항원-항체반응을 증진시키는 것일 수 있다.
- [0035] 또한 본 발명은 본 발명의 다중 면역기능이 강화된 키메라 항원을 유효성분으로 포함하는, 암 또는 감염질환에 대한 백신 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0036] 본 발명은 표적 세포 특이적으로 결합하여 다중 면역기능이 강화된 키메라항원 및 이의 용도에 관한 것으로, 면역 반응 유도 영역 및 표적 세포 특이적 결합 유도 영역이 융합된 다중 면역기능이 강화된 키메라 항원의 경우, 질병세포 특이적으로 결합할 수 있고 탈진한 CD8+ T세포의 회복을 촉진하여 T세포 활성을 유도하며, 항원-항체 반응을 유도하여 체액성 면역반응 증진 및 자연살해세포(NK cell)에 의한 세포 독성 작용을 활성화시켜, 질병세포의 면역회피를 억제하고 다중의 면역기능을 강화하여 암, 감염질환 및 면역질환을 보다 효과적으로 예방 및 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0037] 도 1은 용해성 키메라항원이 체내에 형성된 항체를 유도하여 체액성면역이 작용하는 과정을 나타낸 것이고, 또한 표적 암 또는 감염세포에서 면역탈진상태의 세포 특이적인 CD8+ T세포를 회복시키고, 키메라항원의 특정 외 부항원에 특이적인 CD8+ T세포가 동시에 표적 암 또는 감염세포 부위에 유도되어 재활성화된 T세포와 항체의존 세포매개 세포독성이 동시에 작용하는 것을 나타낸 모식도이다.
- 도 2는 HBcAg, HBeAg, HBsAg의 단일 항원 및 PD-1/HBc, PD-1/HBe의 분자생물학적 다양한 구조변화가 예상되는 키메라항원을 코딩하는 융합유전자의 설계도를 나타낸 것으로, 단일항원 또는 키메라항원을 코딩하는 IVT mRNA의 생산을 위한 제조합 DNA 절편은 개방형 번역틀 (open reading frame), T7 프로모터, 5' 비해독부위(UTR, untranslated region), 3' 비해독 부위 등을 포함하도록 설계하였다.
- 도 3은 HBcAg, HBeAg, HBsAg, PD-1 단일 항원 및 PD-1/HBc, PD-1/HBe의 키메라항원을 코딩하는 DNA 절편의 생산결과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 HBcAg, HBeAg, HBsAg, PD-1 단일 항원 및 PD-1/HBc, PD-1/HBe의 키메라항원을 코딩하는 DNA 절편을 주형으로 하여 각각의 IVT mRNA를 제조한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 본 발명의 PD-1/HBc 및 PD-1/HBe 키메라항원을 코딩하는 IVT mRNA를 동물세포 293T에 삽입한 후, 세포 내에서 실제로 생성된 항원을 효소결합면역흡착검사에 의해 확인한 것이다.
- 도 6은 PD-1/HBc, PD-1/HBe 키메라항원을 코딩하는 IVT mRNA를 동물세포 293T에 삽입한 후 세포 내에서 실제로 키메라 항원의 생성을 웨스턴블롯을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 7은 세포 내에서 발현된 PD-1/HBc, PD-1/HBe 키메라 항원들이 실제로 세포의 PD-L1 리간드에 특이적으로 결합하는 것을 동시면역침강법(coimmunoprecipitation)을 이용하여 확인한 것이다.
- 도 8은 본 발명의 일실시예에서 합성된 단일항원 및 키메라 항원 IVT mRNA를 LNP 내에 봉입한 후 입자의 크기를 나노입자분석기(Zetasizer)를 이용하여 측정한 결과를 나타내는 것이다.
- 도 9는 본 발명의 일실시예에서 합성된 단일항원 및 키메라 항원 IVT mRNA를 LNP 내에 봉입한 후 실제로 mRNA가 입자내에 봉입되는 효율을 측정한 결과를 나타내는 것이다.
- 도 10은 IVT mRNA가 봉입된 LNP를 동물세포 293T에 삽입한 후 세포 내에서 실제로 키메라 항원 단백질들이 실제로 생성되는 것을 효소결합면역흡착검사에 의해 확인한 것이다.

도 11은 키메라 항원 PD-1/HBe IVT mRNA가 봉입된 LNP를 C57BL/6 마우스에 주입한 후 실제로 체내에서 주입된 IVT mRNA로부터 항원 단백질들이 생성되는 것을 효소결합면역흡착검사에 의해 확인한 것이다.

도 12는 C57BL/6 마우스에 키메라 항원을 처리하기에 앞서 단일 항원 HBcAg, HBeAg 단백질을 마우스에 사전 접종하여 마우스가 실제로 각 항원에 대한 항체가 생성된 것을 효소결합면역흡착검사로 확인한 것을 나타낸 것이다.

도 13은 HBcAg와 HBeAg 단백질을 주입함으로써 이들 단백질에 대하여 1차적으로 항체가 형성된 마우스에 마우스 Melanoma 암세포인 B16F10를 이식한 후 PD-1/HBc와 PD-1/HBe를 코딩하는 IVT mRNA가 봉입된 LNP를 마우스에 주입하여 체내 생성된 키메라 항원에 의하여 암조직의 성장이 저해된 것을 보여주는 것이다.

도 14는 HBcAg와 HBeAg에 대하여 1차적으로 항체가 형성된 C57BL/6 마우스에 Melanoma 암세포인 B16F10를 이식하여 암조직이 생성되도록 유도한 후 PD-1/HBc와 PD-1/HBe를 코딩하는 IVT mRNA가 봉입된 LNP를 마우스에 주입하였을 때 체내 생성된 키메라항원에 의하여 마우스의 생존율이 증가됨을 보여주는 것이다.

도 15는 HBcAg와 HBeAg에 대하여 1차적으로 항체가 형성된 C57BL/6 마우스에 Melanoma 암세포인 B16F10를 이식하여 암조직이 생성되도록 유도한 후 PD-1/HBc와 PD-1/HBe를 코딩하는 IVT mRNA가 봉입된 LNP를 마우스에 주입한 전후의 생존율을 비교하였을 때 키메라 항원을 처리한 이후 마우스의 생존율이 증가하였음을 보여주는 것이다.

도 16은 HBcAg 항원에 대하여 1차적으로 항체가 형성된 C57BL/6 마우스에 Melanoma 암세포인 B16F10를 이식하여 암조직이 생성되도록 유도한 후 PD-1/HBc를 코딩하는 IVT mRNA가 봉입된 LNP를 마우스에 주입한 전후의 HBcAg 항원에 대한 항체의 상대적인 양과 암조직의 크기와의 연관성을 보여주는 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0038] 본 발명은 다중 면역기능이 강화된 재조합 키메라 항원을 제공함에 특징이 있으며, 구체적으로 본 발명은 면역 반응 유도 영역 및 표적 세포 특이적 결합 유도 영역이 융합된, 다중 면역기능이 강화된 키메라 항원을 제공함에 특징이 있다.
- [0039] 특히 본 발명에서 제공하는 다중 면역기능이 강화된 키메라 항원은 체내에 특이적인 항원-항체반응 시스템이 형성된 특정 외부항원 영역(도메인)에 질환과 연관된 표적 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 영역(도메인)을 융합하여 제조한 것으로, 본 발명의 키메라 항원을 개체에 투여하면 키메라 항원은 표적 단백질을 세포막에 표지하고 있는 특정 질병세포, 예컨대 암세포 또는 감염세포에 특이적으로 결합하게 되고, 키메라항원의 다른 도메인, 즉 면역 반응 유도 영역(특정 외부항원 영역)은 이미 체내에 형성된 항원-항체반응 시스템을 유도할 수 있어 표적 질병세포를 효율적으로 제거할 수 있도록 설계하였다.
- [0040] 따라서 본 발명의 키메라 항원을 이용할 경우, 개체 내에 이미 형성되어 존재하는 특정 항원-항원 시스템에 의한 면역계(면역반응)를 재활성화시켜 대상질환을 매우 효율적으로 치료할 수 있도록 하였다.
- [0041] 본 발명의 상기 다중 면역기능이 강화된 키메라 항원의 구성요소를 살펴보면, 크게 면역 반응 유도 영역 및 표적 세포 특이적 결합 유도 영역이 융합된 형태의 융합 단백질로 형성되어 있다.
- [0042] 상기 면역 반응 유도 영역은 특정 외부항원 영역(도메인)으로서 외래 바이러스성 항원일 수 있고, 상기 면역 반응 유도 영역에 의해 키메라 항원이 투여된 개체 내에서 항원-항체반응이 안정적으로 형성될 수 있다.
- [0043] 본 발명의 키메라 항원에 포함될 수 있는 상기 면역 반응 유도 영역은 외래 항원으로 바이러스, 세균 또는 각종 전염성 질환과 관련된 생물체의 단백질, 당단백질, 외피 단백질, 내피 단백질 또는 기능성 단백질을 포함할 수 있고, 바람직하게는 이에 제한되지는 않으나, B형 간염바이러스 항원, C형 간염바이러스 항원, A형 간염바이러스 항원, AIDS 바이러스 항원, MERS 바이러스 항원, 인플루엔자 A 바이러스 항원, 인두유종바이러스 항원, 임파구성백라수막 바이러스(LCMV) 항원 및 단순포진 바이러스(HSV) 항원으로 이루어진 군 중에서 선택될 수 있으며, 보다 바람직하게는 B형간염바이러스 항원으로 B형간염바이러스의 내피 단백질(HBc) 또는 B형간염바이러스의 e항원(HBe) 또는 B형간염바이러스의 표면 단백질(HBs)일 수 있다.
- [0044] 상기 B형간염바이러스 유래 항원인 내피 단백질의 항원(HBcAg)은 서열번호 1의 펩타이드 서열로 이루어진 것이고, 상기 B형간염바이러스의 e항원(HBeAg)은 서열번호 3의 펩타이드 서열로 이루어진 것이며, 상기 B형간염바이러스의 표면 단백질 항원(HBsAg)은 서열번호 5의 펩타이드 서열로 이루어진 것일 수 있다.

- [0045] 또한 상기 서열번호 1의 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2에 나타내었고, 서열번호 3의 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 4에 나타내었으며, 서열번호 5의 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 6에 나타내었다.
- [0046] 또한, 상기 표적 세포 특이적 결합 유도 영역은 주로 체내의 정상적인 생명활동과 관련된 단백질로서 세포막에 있는 수용체나 리간드에 물리적으로 결합할 수 있는 수용성 단백질 또는 세포막 단백질일 수 있다. 상기 본 발명의 상기 표적 세포 특이적 결합 유도 영역으로는 이에 제한되지는 않으나, PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA-4, CD28, ICOS, OX40, OX40L, GITR, GITRL, CD40, CD40L, 4-1BB, 4-1BBL, B7-1, B7-2, B7-H1, B7-H2, B7-DC, CD80, CD160, BTLA, HVEM, DPP-4, NTCP, CD16 및 Caveolin-1으로 이루어진 군 중에서 선택될 수 있다.
- [0047] 본 발명의 일실시예에서는 상기 표적 세포 특이적 결합 유도 영역으로, 표적 세포에 특이적으로 결합할 수 있는 세포막 단백질인 PD-1을 사용하였는데, 세포막 단백질은 면역관문시스템에서 핵심적인 역할을 하는데, PD-1은 세포막에 부착되어 있으며 이를 세포 외로 잘 분비하는 형태로 알려져 있다(Cellular Immunology, 2005, 235:109). 이에 본 발명에서는 PD-1을 이의 수용체인 PD-L1에 견고하게 결합하는 단백질로 변환하였고, 따라서 세포 외 분비가 가능하고 수용체에 높은 결합력을 갖는 재조합 PD-1 단백질의 사용하였으며, 본 발명에서 사용한 상기 PD-1 단백질의 펩타이드 서열은 서열번호 7에 나타내었고, 상기 서열번호 7의 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 서열번호 8에 나타내었다.
- [0048] 또한 본 발명의 키메라 항원은 상기 면역 반응 유도 영역과 표적 세포 특이적 결합 유도 영역 사이를 키메라 항원의 구조적 안정성과 면역반응을 최대화하기 위해 특정 서열로 이루어진 링커 펩타이드로 연결되도록 설계하였다. 링커 펩타이드의 서열에 따라서 키메라 항원의 구조적 안정성에 차이가 있음을 확인하였고, 이를 토대로 키메라 항원의 안정성과 면역반응을 높이는 데 유효한 링커 펩타이드를 선별하였다. 본 발명에서 사용 가능한 상기 링커 펩타이드 1은 서열번호 19로 표시되는 46개의 펩타이드로 이루어져 있으며, 상기 링커 펩타이드 1을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 서열번호 20에 나타내었다. 또한 본 발명에서 사용 가능한 상기 링커 펩타이드 2는 서열번호 21로 표시되는 24개의 펩타이드로 이루어져 있으며, 상기 링커 펩타이드 2를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 서열번호 22에 나타내었다.
- [0049] 본 발명의 일실시예에서, 다중 면역기능이 강화된 키메라 항원으로서, 융해성 키메라 항원인인 PD-1/HBc 및 PD-1/HBe를 각각 제조하였는데, 이는 면역 반응 유도 영역으로 B형간염바이러스의 내피 단백질(HBcAg) 및 B형간염바이러스의 e항원 단백질(HBeAg)을 각각 사용한 것이며, 표적 세포 특이적 결합 유도 영역으로 PD-L1과 결합력이 있는 세포 외로 분비되는 수용성 PD-1을 사용한 것이다. 또한 본 발명의 일실시예에서 상기 PD-1과 HBc 도메인은 이들 사이에 서열번호 19의 링커 펩타이드 1로 연결시켰고, 상기 PD-1과 HBe 도메인은 이들 사이를 서열번호 21의 링커 펩타이드 2로 각각 연결되도록 하였다.
- [0050] 또한, HBcAg 및 HBeAg 단일항원, PD-1/HBc 및 PD-1/HBe 키메라 항원들은 항체형성을 잘 유도하는 아미노산 서열들이 대부분 포함되도록 설계하였고, 각 항원 단백질이 세포 내에서 생산된 후 세포 밖으로 잘 분비되도록 하기 위하여 각 단백질의 아미노 말단에는 시그널 펩타이드가 포함되도록 하였다. 시그널 펩타이드의 합성은 당업자들에게 잘 알려진 방법을 통해 합성하였으며(PLoS One. 2016.19:11; Mol Ther. 2005, 11(3):435; Journal of Biotechnology, 2007, 128(4):705; Trends in Cell and Molecular Biology, Improving mammalian cell factories : The selection of signal peptide has a major impact on recombinant protein synthesis and secretion in mammalian cells), 본 발명에서는 제조한 다수의 시그널 펩타이드를 대상으로 항원 단백질의 아미노 말단에 여러 종류의 시그널 펩타이드 서열들을 연결시켰고, 생산된 항원이 세포 외로 잘 분비되는지 검증과정을 거친 후, 각 항원들이 세포외로 잘 분비가 되는 시그널 펩타이드를 선별하였다.
- [0051] 본 발명에서는 상기 실험을 통해 본 발명의 키메라 항원이 세포 외 분비가 잘 되도록 하기 위해, 상기 시그널 펩타이드로서, 서열번호 23으로 표시되는 21개의 펩타이드(시그널 펩타이드 1) 또는 서열번호 25로 표시되는 17개의 펩타이드로 이루어진 시그널 펩타이드(시그널 펩타이드 2)를 사용하였고, 여기서 상기 서열번호 23의 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 서열번호 24에 나타내었으며, 상기 서열번호 25의 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 서열번호 26에 나타내었다.
- [0052] 이와 같이 본 발명에 따른 다중 면역기능이 강화된 키메라 항원은 면역 반응 유도 영역; 및 표적 세포 특이적 결합 유도 영역;이 융합된 형태를 갖는 것으로, 본 발명의 일실시예에서는 다중 면역기능이 강화된 키메라 항원으로 PD-1/HBcAg 및 PD-1/HBeAg 키메라 항원을 각각 제조하였다.
- [0053] 상기 본 발명에서 제조한 본 발명의 PD-1/HBcAg 키메라 항원에 대한 펩타이드 서열은 서열번호 9에 나타내었고,

이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 서열번호 10에 나타내었다.

- [0054] 본 발명의 PD-1/HBcAg 키메라 항원을 나타내는 서열번호 9의 폴리펩타이드는 세포 외 분비를 위한 시그널 펩타이드 1의 서열을 포함하고 있는데, 상기 시그널 펩타이드 1의 서열은 서열번호 9의 1번째 아미노산부터 21번째까지의 총 21개의 아미노산 서열로 이루어져 있다.
- [0055] 또한 상기 서열번호 9의 PD-1/HBcAg 키메라 항원을 나타내는 폴리펩타이드는 링커 펩타이드 1을 포함하고 있는데, 상기 링커 펩타이드 1은 상기 서열번호 9에서 232번째 아미노산부터 277번째 아미노산까지 총 46개의 아미노산이다.
- [0056] 또한 상기 서열번호 9의 PD-1/HBcAg 키메라 항원에 대한 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 서열번호 10에 나타내었고, 서열번호 10에서 상기 시그널 펩타이드 1을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 서열은 서열번호 10의 1번째 염기서열부터 63번째까지 총 63개의 염기서열로 이루어져 있으며, 서열번호 10에서 상기 링커 펩타이드 1을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 서열은 서열번호 10의 694번째 염기서열부터 831번째까지의 염기서열로 이루어져 있다.
- [0057] 또한 본 발명의 PD-1/HBcAg 키메라 항원의 펩타이드 서열은 서열번호 11에 나타내었고, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 서열번호 12에 나타내었다.
- [0058] 본 발명의 PD-1/HBcAg 키메라 항원을 나타내는 서열번호 11의 폴리펩타이드는 세포 외 분비를 위한 시그널 펩타이드 2의 서열을 포함하고 있는데, 상기 시그널 펩타이드 2의 서열은 서열번호 11의 1번째 아미노산부터 17번째까지 총 17개의 아미노산 서열로 이루어져 있다.
- [0059] 또한 상기 서열번호 11의 PD-1/HBcAg 키메라 항원을 나타내는 폴리펩타이드는 링커 펩타이드 2를 포함하고 있는데, 상기 링커 펩타이드 2는 상기 서열번호 11에서 228번째 아미노산부터 251번째 아미노산까지 총 24개의 아미노산 서열로 이루어져 있다.
- [0060] 또한 상기 서열번호 11의 PD-1/HBcAg 키메라 항원에 대한 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 서열번호 12에 나타내었고, 서열번호 12에서 상기 시그널 펩타이드 2를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 서열은 서열번호 12의 1번째 염기서열부터 51번째까지 총 51개의 염기서열로 이루어져 있으며, 서열번호 12에서 상기 링커 펩타이드 2를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 서열은 서열번호 12의 682번째 염기서열부터 753번째까지 총 72개의 염기서열로 이루어져 있다.
- [0061] 한편, 본 발명에 따른 다중 면역기능이 강화된 키메라 항원은 면역반응의 활성화를 통해 암 또는 감염 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 용도로 사용될 수 있다.
- [0062] 본 발명의 키메라 항원은 표적 세포 특이적 결합 유도 영역을 포함하고 있어 표적 세포인 질병 세포에 특이적으로 결합할 수 있고, 면역 반응 유도 영역을 포함하고 있어 탈진한 CD8⁺ T세포의 회복을 촉진하여 T세포의 활성을 유도함과 동시에 항원-항체 반응을 유도하여 체액성 면역반응의 증진 및 자연살해세포(NK cell)에 의한 세포독성 작용을 동시에 활성화시킴으로써 다중 면역기능을 강화시킬 수 있는 특징이 있다.
- [0063] 특히 면역 반응 유도 영역을 통한 다중 면역기능의 강화는, 외래 항원에 노출되어 상기 외래항원에 대한 특이적이고 안정적인 항원-항체 반응 시스템이 존재하는 개체를 대상으로 상기 외래항원을 포함하는 본 발명의 키메라 항원을 처리함으로써 항원-항체 반응을 재활성화 시키고 따라서 체액성 면역과 세포성 면역을 동시에 다중 활성화시키는 것을 말한다.
- [0064] 그러므로 본 발명은 본 발명의 다중 면역기능이 강화된 키메라 항원을 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공할 수 있다.
- [0065] 상기 암의 종류로는 이에 제한되지는 않으나, 폐암, 위암, 간암, 골암, 췌장암, 피부암, 두경부암, 피부 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 대장암, 결장암, 유방암, 자궁 육종, 나팔관 암종, 자궁내막 암종, 자궁경부암종, 질 암종, 외음부 암종, 식도암, 후두암, 소장암, 갑상선암, 부갑상선암, 연조직의 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 유년기의 고상 종양, 분화 림프종, 방광암, 신장암, 신장 세포 암종, 신장 골반 암종, 제1 중추신경계 림프종, 척수축 종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 아테노마일 수 있다.
- [0066] 또한, 본 발명은 본 발명의 다중 면역기능이 강화된 키메라 항원을 유효성분으로 포함하는, 감염 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공할 수 있다.
- [0067] 본 발명에서 상기 “감염질환”은 외래 바이러스, 세균, 원생생물 등을 포함하는 각종 감염원 또는 구성성분들

이 포유류의 병리상태를 야기하거나, 매개하거나 또는 기타 공헌하는 질환을 의미하며, 상기 감염 질환의 종류로는 이에 제한되지는 않으나, B형간염바이러스, C형 간염바이러스, A형 간염바이러스, AIDS바이러스, MERS 바이러스, 인플루엔자 A 바이러스, 인두유종바이러스, 임파구성맥락수막 바이러스(LCMV) 또는 단순포진 바이러스(HSV) 감염성 질환일 수 있다.

[0068] 또한 본 발명은 다중 면역기능이 강화된 키메라 항원을 유효성분으로 포함하는, 면역증강제 조성물을 제공할 수 있으며, 이러한 면역증강제 조성물은 면역기능 이상으로 유발되는 면역질환의 예방 또는 치료를 위한 약학적 조성물로 사용될 수 있다.

[0069] 본 발명에서 상기 “면역질환”은 포유류 면역계의 구성성분들이 포유류의 병리상태를 야기하거나, 매개하거나 또는 기타 공헌하는 질환을 의미하며, 면역반응의 자극 또는 중단이 그 질병의 진행에 보상적인 효과를 갖는 질환을 모두 포함할 수 있다.

[0070] 본 발명의 일실시예에서는 HBcAg와 PD-1이 융합된 PD-1/HBc 키메라항원 및 HBeAg와 PD-1이 융합된 PD-1/HBe 키메라항원을 in vitro에서 전사 과정을 통해 각각의 mRNA(IVT mRNA; in vitro transcription mRNA)를 제조한 후, 제조된 PD-1/HBc mRNA 및 PD-1/HBe mRNA를 각각 질병세포에 도입한 다음, PD-L1 리간드에 선택적으로 상기 키메라 항원이 결합하는지 확인한 결과, PD-1/HBc 및 PD-1/HBe 키메라 항원 모두 PD-L1 리간드에 특이적으로 결합하고 있음을 확인할 수 있었다.

[0071] 또한, 본 발명에서 마우스를 사전접종에 통하여 키메라 항원 PD-1/HBc 및 PD-1/HBe에 결합할 수 있는 HBcAg 및 HBeAg의 각 항체 생성을 위해 HBcAg 및 HBeAg 단백질을 각각 마우스에 주입한 후, 항체생성 여부를 분석한 결과, HBcAg 및 HBeAg에 대한 특이적인 항체가 생성되는 것을 확인하였다.

[0072] 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 본 발명의 키메라 항원을 개체에 투여할 경우, 질병세포 특이적인 타겟 부위에 본 발명의 키메라 항원이 결합할 수 있고 동시에 개체내 존재하는 항체에 결합함으로써 체액성 면역 활성을 촉진시키며 결과적으로 면역증강 작용을 통해 질병세포를 제거하여 대상질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있음을 확인하였다.

[0073] 나아가 동물실험을 통해 본 발명의 키메라 항원을 이용한 항암활성을 확인하기 위하여, HBsAg와 HBcAg을 사전접종하고, 이에 대한 1차 항체가 형성된 마우스에 PD-L1을 세포막에 표지하고 있는 마우스 암세포 B16F10 세포들을 이식하여 암 조직을 생성하게 한 뒤, 본 발명의 키메라 항원을 주입한 결과, 단독항원인 HBcAg 및 HBeAg를 각각 단독 주입한 군에서는 암세포 사멸 효과가 거의 없는 것으로 나타난 반면, 본 발명의 키메라 항원인 PD-1/HBc mRNA 및 PD-1/HBe mRNA를 주입한 군에서는 암조직의 성장이 효과적으로 저해되고 동시에 마우스의 생존율이 크게 증가함을 알 수 있었다.

[0074] 이상의 결과를 통해, 본 발명의 다중 면역기능이 강화된 키메라 항원은 암 또는 감염질환을 예방 및 치료할 수 있는 효과가 있음을 알 수 있었고, 특히 본 발명의 키메라 항원은 면역저해를 매개하는 PD-1의 신호경로 및 PD-1과 PD-L1의 결합을 차단함을 통해 암 또는 감염세포에 의한 T 세포탈진(exhaustion) 상태의 회복을 유도하며, T 세포의 사이토카인 분비 능력을 활성화시켜 면역 반응을 증진시킬 수 있음을 알 수 있었다.

[0075] 즉 체내에 기형성되었지만 T 세포탈진에 의해 불능화된 질병세포 타겟 특이적인 CD8+ T 세포의 활성을 촉진시킬 수 있음을 알 수 있었다. 게다가 외래항원에 특이적인 항체에 의해 결합하고 활성화되는 체액성 면역세포인 Natural killer (NK)세포, Macrophage (대식세포), Monocyte (단핵구)들은 항체의존적인 세포매개독성 (Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity) 활성으로 일반적인 단독 항체 치료제의 경우보다 더 신속하고 강력하게 PD-1과 PD-L1의 상호작용에 의해 유발되는 질환을 예방 또는 치료할 수 있다. PD-1과 PD-L1의 상호작용에 의해 유발되는 질환은 앞서 기술한 암 또는 감염질환일 수 있다.

[0076] 본 발명에서 상기 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양의 본 발명의 키메라 항원을 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기에서 약학적으로 유효한 양이란 암 또는 감염질환의 증상을 예방, 개선 및 치료하기에 충분한 양을 말한다.

[0077] 본 발명에 따른 키메라 항원은 환자의 몸무게 1kg당 0.1 pg에서 1g의 질량으로 포함될 수 있으며, 상기 약학적으로 유효한 양은 질환 증상의 정도, 환자의 연령, 체중, 건강상태, 성별, 투여 경로 및 치료기간 등에 따라 적절히 변화될 수 있다.

[0078] 또한, 상기에서 “약학적으로 허용되는”이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 상기 담체, 부형제

및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0079] 본 발명의 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 제형은 분말, 과립, 정제, 에멀전, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캡슐, 멸균 주사용액, 멸균 분말의 형태일 수 있다.

[0080] 또한, 본 발명에 따른 암 또는 감염질환의 예방 또는 치료용 조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있으며, 활성 성분의 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 환자의 중증도 등의 여러 인자에 따라 적절히 선택될 수 있고, 본 발명에 따른 암 또는 감염질환의 예방 또는 치료용 조성물은 암 또는 감염질환의 증상을 예방, 개선 또는 치료하는 효과를 가지는 공지의 화합물과 병행하여 투여할 수 있다.

[0081] 나아가 본 발명은 인간을 제외한 암 또는 감염질환이 유발된 개체에 상기 본 발명의 키메라항원을 투여하는 단계를 포함하는 암 또는 감염질환의 치료방법을 제공할 수 있다.

[0082] 또한, 적절한 투여 경로는, 예를 들어, 경구, 비강, 투과점막, 또는 장 투여 격막내, 직접 심실내, 복강내, 또는 안내 주사뿐만 아니라, 근육내, 피하, 정맥, 골수 주사를 포함한 비경구 전달을 포함할 수 있다.

[0083] 나아가 본 발명은 다중 면역기능이 강화된 본 발명의 키메라 항원을 유효성분으로 포함하는, 암 또는 감염질환에 대한 백신 조성물을 제공할 수 있다.

[0084] 상기 본 발명의 백신 조성물은 단독으로 투여 가능하지만 바람직하게는, 애드juv언트를 함께 포함할 수 있다. 애드juv언트는 면역세포의 초기 활성화 과정에서 비특이적으로 항원에 대한 면역 반응을 촉진하는 물질로, 숙주에게 면역원은 아니지만 면역계의 세포의 활성을 증대시킴으로써 면역을 강화하는 제제, 분자등을 의미한다(Annu.Rev.Immunol, 1986, 4:369). 본 발명의 백신 조성물과 함께 투여되어 면역 반응을 증강시킬 수 있는 애드juv언트는 임의의 다양한 애드juv언트를 포함하며, 전형적인 애드juv언트로는 프로인트 애드juv언트(Freund adjuvant), 알루미늄 화합물(aluminum compound), 무라밀 디펩타이드(muramyl dipeptide), 리포폴리싸카라이드(LPS), 모노포스포릴 리피드 A, 또는 쿨 A 등이 알려져 있다. 상기 애드juv언트는 백신 조성물과 동시에 투여되거나 시간 간격을 두고 순차적으로 투여될 수 있다.

[0085] 또한, 본 발명의 백신 조성물은 추가적으로 용매, 부형제 등을 더 포함할 수 있다. 상기 용매에는 생리식염수, 증류수 등이 포함되며, 상기 부형제에는 알루미늄 포스페이트, 알루미늄 하이드록사이드, 알루미늄 포타슘 설페이트 등이 포함되나, 이에 제한되지 않으며, 본 발명이 속하는 분야에서 통상적으로 백신 제조에 사용하는 물질을 더 포함할 수 있다.

[0086] 본 발명의 백신 조성물은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상적으로 이용되는 방법으로 제조할 수 있다. 본 발명의 백신 조성물은 경구형 또는 비경구형 제제로 제조할 수 있고, 바람직하게는 비경구형 제제인 주사액제로 제조하며, 진피 내, 근육 내, 복막 내, 정맥 내, 피하 내, 비강 또는 경막 외(eidural) 경로로 투여할 수 있다.

[0087] 본 발명의 백신 조성물은 면역학적 유효량으로 개체에 투여할 수 있다. 상기 “면역학적 유효량”이란 질병 예방 효과를 나타낼 수 있을 정도의 충분한 양과 부작용이나 심각한 또는 과도한 면역반응을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 정확한 투여 농도는 투여될 특정 면역원에 따라 달라지며, 예방 접종 대상자의 연령, 체중, 건강, 성별, 개체의 약물에 대한 민감도, 투여 경로, 투여 방법 등 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있으며, 1회 내지 수회 투여가능 하다.

[0089] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0091] <실시예 1>

[0092] HBc, HBe, HBs, PD-1/HBc 또는 PD-1/HBe의 키메라항원을 코딩하는 융합유전자의 제조

- [0093] B형간염 코어항원(HBcAg), B형간염 e항원(HBeAg), B형간염 외피항원(HBsAg), PD-1, 용해성 키메라항원 PD-1/HBc 및 PD-1/HBe의 단백질을 코딩하는 각 유전자를 인비트로(in vitro)에서 전사시켜 합성한 IVT mRNA(In vitro transcribed mRNA)를 생산하기 위한 DNA 절편의 모식도를 도 2에 나타내었다. 도 2에 나타낸 바와 같이 상기 IVT mRNA 생산을 위한 DNA 절편은 개방형 번역틀 (open reading frame), T7 프로모터 염기서열, 5' 비해독(untranslated) 염기서열(5' UTR), 3' 비해독(untranslated) 염기서열(3' UTR)을 포함하도록 미국 System Biosciences 사의 mRNAExpress mRNA Synthesis kit를 참고하여 제작하였다. DNA 절편의 설계에서 개방형 번역틀, 즉 목적 유전자는 카세트 형태로 연결시켜 삽입되도록 하였다. 이때 키메라 항원의 번역 반응 유도 영역과 표적 세포 특이적 결합 유도 영역을 코딩하는 개방형 번역틀의 순서는 고정되는 것이 아니라 양 유도 영역이 위치가 상호 바뀔 수도 있다. 즉, 도 2에서 링커로 연결된 "A gene" 및 "B gene"에는 키메라 항원의 번역 반응 유도 영역 및 표적 세포 특이적 결합 유도 영역이 각각 위치되어지며, 그 위치는 상호 바뀔 수 있다.
- [0094] 또한 B형간염 코어항원(HBcAg), B형간염 e항원(HBeAg), B형간염 외피항원(HBsAg), PD-1, 용해성 키메라항원 PD-1/HBcAg 및 PD-1/HBeAg에 대해 in vitro에서 전사시킨 각각의 IVT mRNA에 대한 DNA 염기서열을 서열번호 13(HBcAg), 14(HBeAg), 15(HBsAg), 16(PD-1), 17(PD-1/HBcAg) 및 18(PD-1/HBeAg)에 각각 나타내었다.
- [0095] 또한, 상기 서열번호 17의 염기서열은 PD-1/HBcAg IVT mRNA를 코딩하는 DNA 주형의 염기서열로서 상기 염기서열은 PD-1/HBcAg의 코딩서열 뿐만 아니라 T7 프로모터, 5' UTR 및 3' UTR의 염기서열도 포함한다.
- [0096] 서열번호 18의 염기서열 역시 PD-1/HBeAg IVT mRNA를 코딩하는 DNA 주형의 염기서열로서 상기 염기서열은 PD-1/HBeAg의 코딩서열 뿐만 아니라 T7 프로모터, 5' UTR 및 3' UTR의 염기서열도 포함한다.
- [0097] 또한, 전사가 완료된 후, 일련의 인접 "폴리아데닐산(폴리(A))테일"이 폴리에이 폴리머라제(poly A polymerase)에 의해 RNA 분자의 3' 말단에 첨가되는데 이 과정은 당업자들에 잘 알려진 방법으로 설계 시점에 최소 50개의 아데닌 서열의 폴리에이 염기서열을 삽입되도록 고안하였다. 상기 설계된 DNA 절편은 미국의 IDT사에 의뢰하여 합성하였고, IDT사에서 제작한 각 항원유전자를 포함한 벡터 DNA 10ng을 주형으로 이용하고, 하기 서열번호 27 및 28의 중합효소연쇄반응(PCR)을 위한 프라이머를 이용하여 유전자 DNA 증폭반응을 수행하였다. PCR 반응생성물은 당업자들에 잘 알려진 용리(elution)방법에 의해 정제하였고, 이후 인비트로 전사(in vitro transcription)반응을 위한 주형(Template)으로 사용하였다(도 3).
- [0099] 서열번호 27 프라이머 염기서열(프라이머 1):
- [0100] 5' -AGATCTTAATACGACTCACTATAGGGAAATAAGA-3'
- [0102] 서열번호 28 프라이머 염기서열(프라이머 2):
- [0103] 5' -TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTCTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTAAATAT TCTTCCTACT CAGGCCTTAT TCAAAGACC-3'
- [0105] <실시예 2>
- [0106] 단일 항원 또는 키메라 항원을 코딩하는 DNA 절편으로부터 IVT mRNA 합성
- [0107] 상기 실시예 1에서 제조한 주형(Template) DNA를 이용하여 인비트로 전사(IVT)를 실시하여 인공적인 mRNA를 합성하였는데, 이는 mRNA 생산용 키트인 미국 New England Biolabs 사의 하이스크라이브 티세븐 아르카 mRNA 키트(HiScribe T7 ARCA mRNA kit with tailing)를 사용하여 수행하였다. 구체적으로, 1 µg의 HBcAg, HBeAg, HBsAg, PD-1, PD-1/HBc 및 PD-1/HBe의 단일 또는 키메라항원 유전자의 염기서열을 포함하는 정제된 각각의 DNA 절편, 10 µl 2x ARCA/NTP Mix, 2 µl T7 RNA Polymerase Mix를 혼합하고 나머지는 증류수를 첨가하여 최종적으로 20 µl의 반응물을 조성한 뒤, 37℃에서 60분간 반응시킨다. 반응이 완료되면 2 µl DNase 효소를 첨가한 후 37℃에서 15분간 처리하여 잔류 DNA를 모두 제거하였다. 반응으로부터 얻어진 IVT mRNA는 당업자들에게 잘 알려진 RNA 정제 키트를 이용하여 정제한 후, 0.5x TAE 완충용액을 이용한 1.2% 아가로스 전기영동에 의해 mRNA 생산을 확인하였다(도 4).
- [0108] 상기 과정을 통해 제조된 단일항원의 mRNA로부터 발현되는 단백질인 단일 항원 HBcAg의 폴리펩티드 서열은 서열

번호 1에 나타내었고, HBeAg의 폴리펩티드 서열은 서열번호 3에 나타내었으며, HBsAg의 폴리펩티드 서열은 서열번호 5에 나타내었고, PD-1의 폴리펩티드 서열은 서열번호 7에 나타내었다. 또한, 상기 키메라 항원의 mRNA(서열번호 17)로부터 발현되는 키메라 항원 단백질인 PD-1/HBc의 폴리펩티드(아미노산) 서열은 서열번호 9에 나타내었고, 다른 키메라 항원의 mRNA(서열번호 18)로부터 발현되는 키메라 항원 단백질인 PD-1/HBe의 폴리펩티드(아미노산) 서열은 서열번호 11에 나타내었다.

[0110] <실시예 3>

[0111] 키메라 항원을 코딩하는 IVT mRNA의 인간 293T 세포에서의 발현 확인

[0112] 상기 실시예 2에서 정제한 IVT mRNA를 인간 세포주인 HEK293T (ATCC, CRL-3216)에 형질감염 시켰다. HEK293T 세포주는 인체 배아 신장(Human Embryonic Kidney)에서 기원한 암세포화된 신장세포로써 상기 세포의 배양은 T75 플라스크에서 10% FBS(Fetus Bovine Serum: GIBCO, #16000-028), 1% ABAM(GIBCO BRL, #15240-013)를 첨가한 MEM 배지(GIBCO, #11095-080)로 3일 동안 배양하였고 배양 후, 1x PBS 완충용액에 세척한 후 트립신을 처리하여 용기 바닥에서 떼어내었다. 이후 분리된 세포들을 원심분리하여 상층액은 버리고 다시 1x PBS 완충용액으로 재분산한 후 5×10^5 cells/dish가 되게 재분산하였다. 24시간 후 세포가 배양용기 표면에 잘 부착된 것을 확인한 후 Lipofectamine Messenger Max Transfection Reagent(Invitrogen, #LMRNA003), mRNA전용 형질주입 시약을 이용하여 당업자들이 제공하는 방법으로 키메라 항원을 코딩하는 IVT mRNA(PD-1/Hbc 및 PD-1/Hbe)를 상기 세포에 형질감염 시켰다. 형질감염된 세포들은 60mm 배양 용기에 분산하고 5% CO₂ 세포 배양기에서 2일간 배양하였다.

[0113] 배양 후, 24시간에 세포배양액을 수득하였고, 48시간이 지난 후에 부착된 세포들과 세포배양액을 1.5ml 튜브에 수확하였다. 수확한 세포들과 세포배양액에서 단일 또는 키메라항원이 생성되어 분비되었는지 확인하기 위하여 효소결합면역흡착검사 (ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay)를 PD-1 ELISA Kit (Arigo Biolaboratories, #ARG81342)를 사용하여 실시하였다.

[0114] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 방법으로 생산된 IVT-mRNA는 HEK293T 세포주에 형질된 후 배양액과 세포 내 양쪽에서 모두 PD-1 단백질이 검출되었다. 이를 통해 본 발명자들은 목적하는 키메라 항원들이 모두 충분히 세포 외로 분비되었음을 확인할 수 있었다. 또한 수확한 세포들에서 단백질을 추출하여 SDS-PAGE 전기영동 후 PD-1항체(R & D System, AF1021)를 이용한 웨스턴블롯을 수행한 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이, 목적하는 키메라항원이 생성되었음을 확인할 수 있었다.

[0115] 또한, 이때 수확된 세포추출물은 세포막에 존재하는 PD-L1 단백질 결합을 보여줄 수 있는 면역침강분석법(Immuno-precipitation)을 위한 샘플로도 사용하였다.

[0117] <실시예 4>

[0118] 면역침강법을 이용한 세포막에 존재하는 PD-L1 단백질과 293T에서 발현된 키메라항원의 결합여부 확인

[0119] 면역침강법(Immunoprecipitation: IP)을 이용하여 세포막에 존재하는 PD-L1과 본 발명에서 제조한 단일항원(PD-1) 및 키메라항원(PD-1/HBc 또는 HBsAg/PD-1)과의 결합여부를 확인하였다. 이를 위해 PD-L1에 대한 항체를 첨가하여 PD-L1/PD-1/anti-PD-L1항체, PD-L1/PD-1/HBc/anti-PD-L1항체, PD-L1/HBsAg/PD-1/anti-PD-L1항체의 복합 침전물을 얻었고, 이 침전물을 전기영동 후 웨스턴블롯을 통해 PD-L1과 PD-1, PD-1/HBc 또는 HBsAg/PD-1과의 상호작용을 동시면역침강법(coimmunoprecipitation, co-IP)을 통해 분석하였다.

[0120] 구체적으로, PD-L1을 세포막에 표지하고 있는 암세포에 PD-1, PD-1/HBc 또는 PD-1/HBe 유전자를 코딩하는 IVT mRNA를 전기전공 또는 Lipofectamine Messenger Max Transfection Reagent(Invitrogen, #LMRNA003) mRNA전용 형질주입 시약을 이용하여 형질 감염시키고 2일 후에 세포를 수확한 후 RIPA 완충용액으로 세포를 용해하였다. 세포 잔해물을 원심분리에 의해 제거한 후 상층액을 다른 1.5ml 시험관에 옮기고 적당량의 항PD-L1 항체 또는 특정 표지단백질 항체를 첨가하여 섞어준 다음, 1시간 동안 배양하여 항원-항체 복합체(면역 복합체)를 형성시켰다. 이 복합체에 다시 고정화된 Protein A 또는 Protein G 아가로스 겔을 혼합한 후 2시간 동안 회전시키면서 배양하여 겔에 부착되도록 하였고, 이후 침전된 복합체로부터 결합되지 않은 단백질들은 수차례 세척하여 제거하였으며, 침전 복합체를 SDS-PAGE 전기영동 후 각각의 항원-특이적 항체를 이용하여 웨스턴블롯을 수행하였다.

[0122] 그 결과, 도 7에 나타난 것처럼 본 발명에 따른 단일 또는 키메라 항원의 IVT-mRNA로 형질감염된 HEK293T 세포 주의 세포추출물을 대상으로 PD-L1에 대한 항체를 첨가하여 분석한 결과, PD-L1이 PD-1, PD-1/HBc 또는 PD-1/HBe과 상호작용한다는 것을 확인할 수 있었다.

[0124] <실시예 5>

[0125] 키메라항원을 코딩하는 IVT mRNA의 전달효율을 증가시키기 위한 지질나노입자(LNP)의 제작

[0126] mRNA의 안정성 증가 및 세포로의 전달효율을 증가시키기 위하여, 여러 지질로 이루어진 지질나노입자 (Lipid nanoparticle, LNP)를 제작하였다(Cell, 2017, 168:1). 우선, 4가지 종류의 지질인 SS-OP, DOPC, Cholesterol, PEG-lipid를 100% 에탄올에 녹인 후, 이들을 각각 50 : 10 : 38.5 : 1.5의 몰 비율로 섞었다. 50 mM 시트레이 트 완충용액(pH 3.0)에 포함된 본 발명의 상기 단일 항원 및 키메라 항원을 코딩하는 IVT mRNA와 지질 혼합액 각각을 캐나다 Precision Nanosystems 사의 Microfluidic 기기를 사용하여 LNP를 제작하였다. 제작된 LNP를 투 석 막 카세트에 옮긴 후 1x PBS 완충용액에 18시간 동안 투석하였고, 독일 Merk Millipore 사의 원심분리형 필터 (Centrifugal filter)를 이용하여 적정 농도를 맞추었다. 농도를 맞춘 후에 0.22 μ m 필터로 여과시키고 세포 내 투입 또는 마우스 주입에 사용할 때까지 4℃ 냉장보관 하였다.

[0128] <실시예 6>

[0129] 키메라항원을 코딩하는 IVT mRNA가 봉입된 LNP의 크기와 mRNA 봉입효율 측정

[0130] 상기 실시예 5에서 제작한 각 LNP를 영국 Malvern 사의 Zetasizer 나노입자분석기를 이용하여 입자의 크기 및 다분산지수 (Polydispersity Index, PDI)를 측정하였다.

[0131] 그 결과, 도 8에서 나타난 것처럼 IVT mRNA를 봉입한 LNP는 IVT mRNA를 포함하지 않은 Naked LNP에 비해 약간 큰 90~150nm의 입자 크기를 보였다. 또한 각 LNP 제작과정에서 봉입된 IVT mRNA의 LNP 내부로의 mRNA 봉입효율을 미국 Thermo Fisher Scientific 사의 Quanti-iT Ribogreen 키트를 이용한 Ribogreen assay를 수행하여 측정한 결과, 도 9에서 나타난 바와 같이, 본 발명의 단일항원 및 키메라 항원을 봉입한 LNP 제작과정에서 각 IVT mRNA의 봉입효율은 모두 약 86~94% 범위의 높은 효율을 보였다.

[0133] <실시예 7>

[0134] 키메라항원을 코딩하는 IVT mRNA가 봉입된 LNP의 세포 수준에서의 항원 발현효율 확인

[0135] 상기 실시예 5에서 제작한 LNP들이 실제로 세포 내에서 단백질을 생산할 수 있는 여부를 알기 위하여 본 발명에서 제조한 단일항원 HBcAg 및 HBeAg IVT mRNA를 봉입한 LNP를 인간 세포주인 HeLa (ATCC, CCL-2)에 각각 형질감염 시켰다. HeLa는 자궁경부암 (Cervical cancer)에서 유래한 암세포로써, 이를 배양하기 위해 T75 플라스크에서 10% FBS (Fetus Bovine Serum: GIBCO, #11095-080), 1% ABAM (GIBCO BRL, #15240-013)를 첨가한 MEM 배지 (GIBCO, #11095-080)로 3일 동안 배양한 후 1x PBS 완충용액에 세척한 후 트립신을 처리하여 용기 바닥에서 떼어내었고, 분리된 세포들을 24-well 배양 용기에 5×10^5 cells/well의 농도로 파종(seeding)한 후, 24시간 동안 5% CO₂ 농도의 세포 배양기에서 배양하였다. 다음 날, 상기 본 발명의 LNP와 아포지단백 (Apolipoprotein E4, ApoE4)을 혼합한 후 37℃에서 10분간 배양시킨 후, 세포에 형질감염 하였다. 형질감염된 세포의 배양 용액을 수확한 후, 세포에서 분비된 항원의 양을 효소결합면역침강분석법 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)를 통해 확인하였다.

[0136]

[0137] 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이, 각각 PD-1/HBc 및 PD-1/HBe IVT mRNA를 봉입한 LNP는 HeLa 세포에 투입된 후 효율적으로 각 항원이 생산된다는 것을 확인할 수 있었다.

[0139] <실시예 8>

[0140] **키메라항원을 코딩하는 IVT mRNA가 봉입된 LNP의 마우스에서의 항원 발현 확인**

[0141] 또한 본 발명자들은 실시예 7에서 세포 수준에서 확인한 항원발현 결과를 실험동물을 통해서도 확인하기로 하였다. 이를 위해 상기 실시예 5에서 제작한 LNP를 6주령의 C56BL/6 암컷 마우스에 왼쪽 전경골근 (left tibialis anterior)에 주입하여 항원의 발현효율을 확인함으로써 LNP의 동물 체내로의 IVT mRNA 전달체로서의 효율성을 분석하였다. 이를 위해 2 μ g의 본 발명의 IVT mRNA를 봉입한 LNP를 1x PBS 완충용액과 함께 총 80 μ l씩 마우스에 접종하였다. 접종 후 1일, 3일, 6일차에 심장으로부터 전혈을 수집하였고 각 항원 단백질의 생성 여부를 효소결합면역침강분석법으로 확인하였다.

[0142]

[0143] 그 결과, 도 11에 나타낸 바와 같이, PD-1/HBe 키메라 항원은 1일 차부터 생성되어 6일 차까지 생성되는 것으로 나타났고, PD-1/HBe 키메라 항원의 생성은 LNP를 이용하여 마우스에 주입하였을 때, 마우스 체내에서 충분히 단일항체 및 키메라 항체들이 실제로 생산된다는 것을 알 수 있었다.

[0145] **<실시예 9>**

[0146] **HBcAg 및 HBeAg 단백질을 사전 접종한 마우스에서 1차적으로 이들 항원에 대한 항체 형성 확인**

[0147] 1일차에 6주령의 C57BL/6 암컷 마우스에 HBcAg (미국, MyBioSource사, #MBS355629), HBeAg 단백질 (미국, MyBioSource사, #MBS355623)을 어주번트 (미국, Sigma사, #F5881)와 혼합한 후, 마우스당 2 μ g씩 왼쪽 전경골근(left tibialis anterior)에 30 μ l씩 3번에 나누어 주사하였다. 첫 번째 접종 후 11일차에 같은 양의 항원 단백질을 동일한 방법으로 각 마우스에 주사하였다. 첫 번째 접종 후 7일, 21일, 35일, 44일에 면역된 생쥐에서 혈청을 꼬리동맥으로부터 수집하여 항체의 생성 여부를 효소결합면역침강분석법으로 검색하였다.

[0148] 그 결과, 도 12에 나타낸 바와 같이, 항원이 접종된 각 마우스들은 각 HBcAg, HBeAg에 대한 각각의 항체가 형성된 것으로 나타났다.

[0150] **<실시예 10>**

[0151] **마우스 Xenograft 모델을 이용한 암세포들에서 본 발명의 키메라항원 (PD-1/HBc 또는 PD-1/HBe)의 항암활성 확인**

[0152] 항원을 사전 접종한 21일차에 실시예 9에서 HBcAg 및 HBeAg 항원 단백질 접종으로 각 항원에 대한 항체가 형성된 C57BL/6 마우스의 측면 피하에 약 1×10^6 개의 Melanoma 암세포 B16F10를 주입하였다. 암세포 투여 10일 후, 본 발명의 키메라항원인 PD-1/HBc 및 PD-1/HBe를 코딩하는 IVT mRNA-LNP를 마우스 왼쪽 전경골근에 각각 주입(본접종)하였다. 암세포 투입 후 매 3일마다 마우스의 체중 변화와 암조직 생성을 관찰하고, 암조직의 크기를 측정하였다. 이때 상기 실험에 사용한 마우스의 수는 각 시험군 별 6~7마리이다.

[0153]

[0154] 그 결과, 도 13에 나타난 것처럼 HBcAg 항원을 사전접종한 마우스에서 암조직의 성장은 본 발명의 키메라 항원 PD-1/HBc IVT mRNA-LNP를 본 접종한 경우, 대조군에 비해서 현저히 억제되는 것으로 나타났고, 마찬가지로 HBeAg 항원을 사전접종한 마우스에서의 암조직 성장은 본 발명의 키메라 항원 PD-1/HBe IVT mRNA-LNP를 본접종한 경우 효과적으로 억제되는 것으로 나타났다.

[0155] 또한, 도 14에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 키메라 항원 PD-1/HBc 및 PD-1/HBe IVT mRNA-LNP를 본 접종한 실험군은 대조군에 비해, 마우스의 사망률이 44일간의 시험기간 동안 현저히 감소하여 생존율이 2배가량 증가함을 알 수 있었다. 이러한 마우스 사망률의 감소는 본 발명의 키메라 항원의 주입에 의한 것임을 알 수 있다. 본 발명의 키메라 항원 접종 전후 마우스의 생존율을 비교한 결과, 본 발명의 키메라 항원을 접종한 실험군에서만 생존율이 크게 증가한 것을 확인할 수 있었다(도 15).

[0156] 또한, 도 16은 HBcAg 항원에 대하여 1차적으로 항체가 형성된 C57BL/6 마우스에 Melanoma 암세포인 B16F10를 이식하여 암조직이 생성되도록 유도한 후 PD-1/HBc를 코딩하는 IVT mRNA가 봉입된 LNP를 마우스에 주입한 전후의 HBcAg 항원에 대한 항체의 상대적인 양과 암조직 크기와의 연관성을 보여주는 결과로, 암조직의 크기가 많이 감소한 개체들에서 상대적으로 HBcAg 항원에 대한 항체의 양이 약간 감소된 것으로 나타났다. 이는 마우스 체내

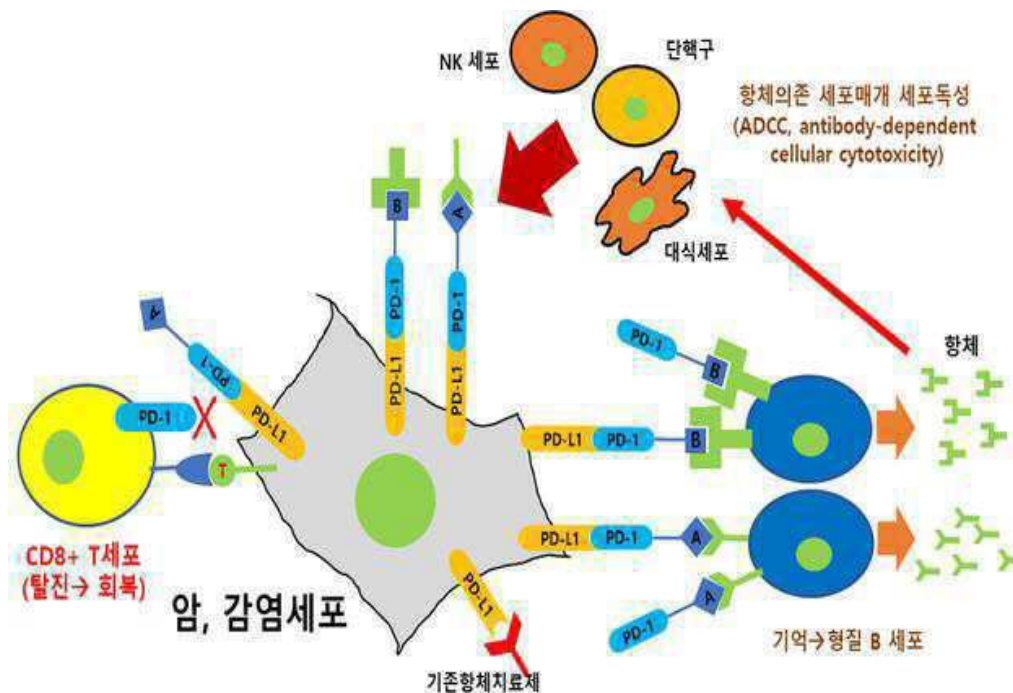
에서 HBcAg 항원에 대한 항체의 항체의존성 세포매개 세포독성(ADCC) 활성화에 의해 암조직의 성장이 저해되는 과정에서 항체가 Natural Killer 세포 부착과정에서 소모되었기 때문이라고 볼 수 있으며, 이는 본 발명자가 당초에 키메라 항원이 항체 의존성 체액성 면역에 의해 암조직이 성장이 저해될 수 있다는 예측을 증명한 결과라 할 수 있다.

[0157] 결론적으로, 본 발명자들은 체내에 특이적인 항원-항체반응시스템이 이미 형성된 특정 외부항원에 질환과 연관된 표적단백질에 결합할 수 있는 펩타이드 도메인이 결합된 키메라 항원을 투여할 경우, 키메라 항원은 표적단백질을 세포막에 표지하고 있는 암 또는 감염세포에 특이적으로 결합할 수 있고, 동시에 키메라 항원의 다른 도메인에 의해 이미 체내에 형성된 항원-항체반응시스템을 유도하여 표적 질환세포를 효과적으로 제거함으로써 암 또는 감염질환을 치료할 수 있고, 동시에 환자의 생존을 크게 증가시킬 수 있는 새로운 암 또는 바이러스 감염 질환의 치료방법을 제공할 수 있음을 알 수 있었다.

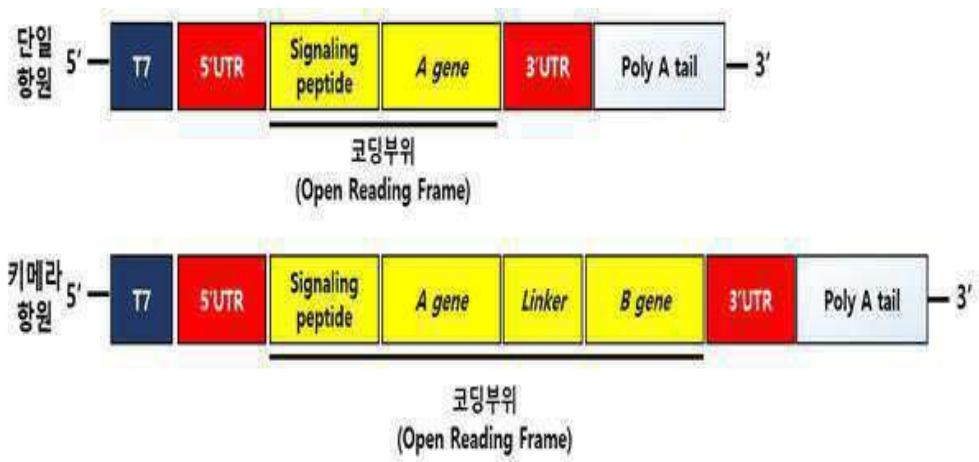
[0159] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

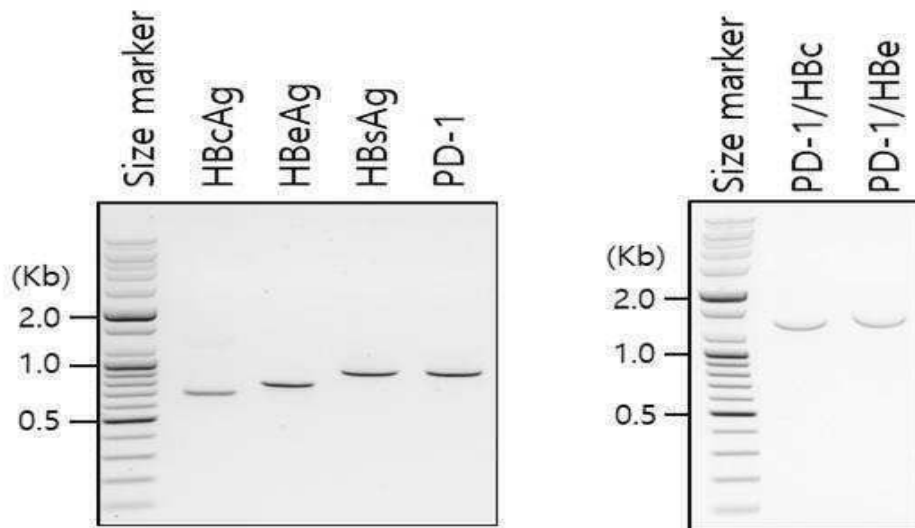
도면1



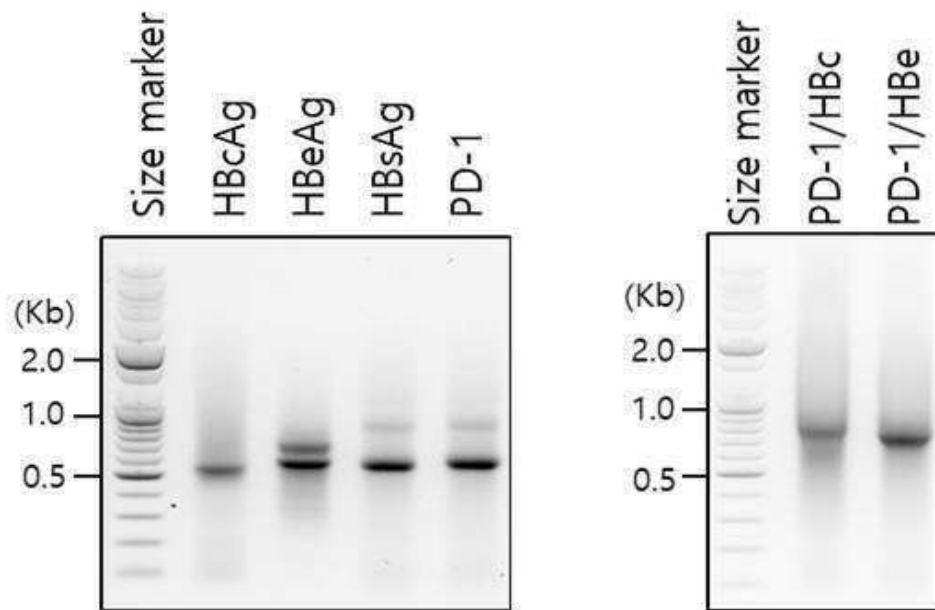
도면2



도면3

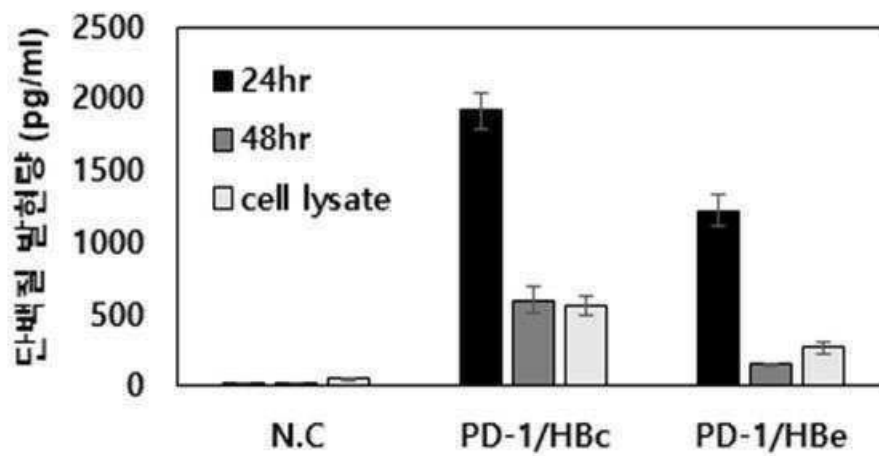


도면4

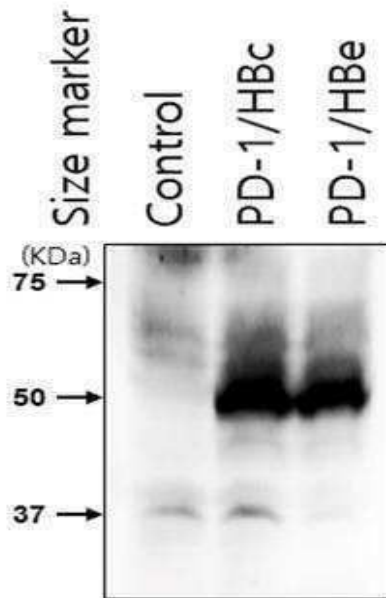


도면5

키메라항원 효소결합면역흡착검사 (PD-1 ELISA)

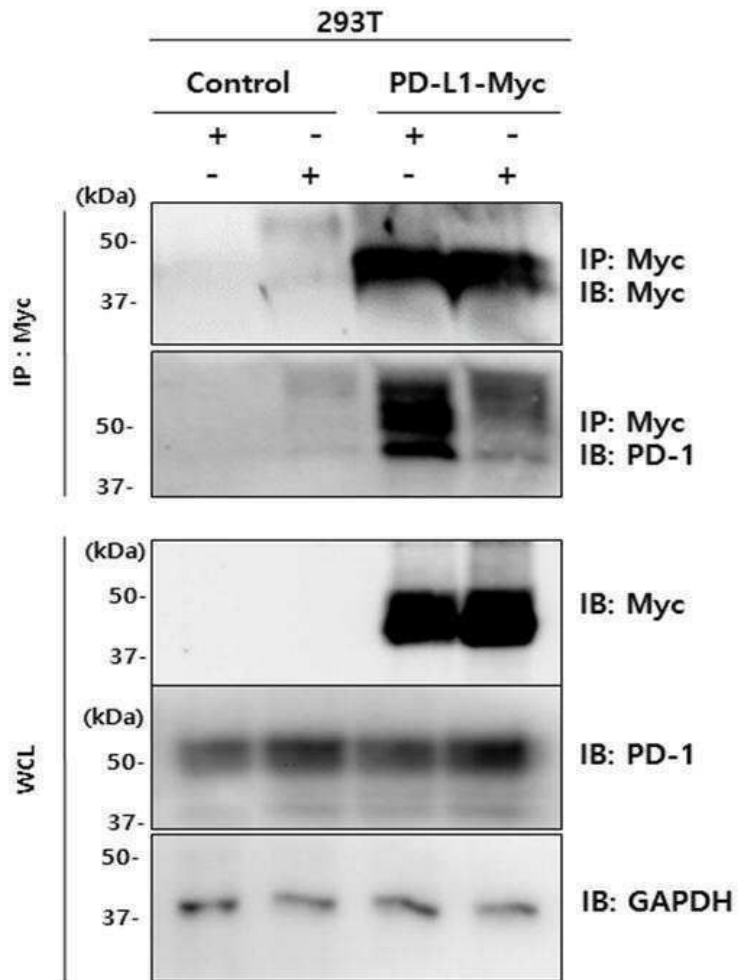


도면6

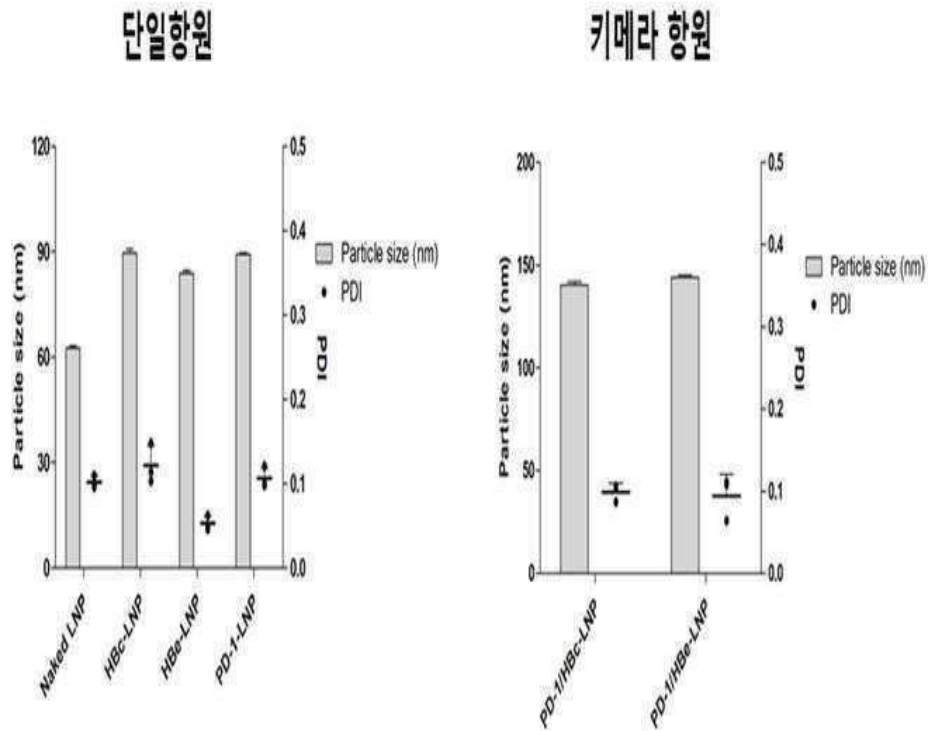


Anti-mPD-1 (R&D systems, AF1021)

도면7



도면8



도면9

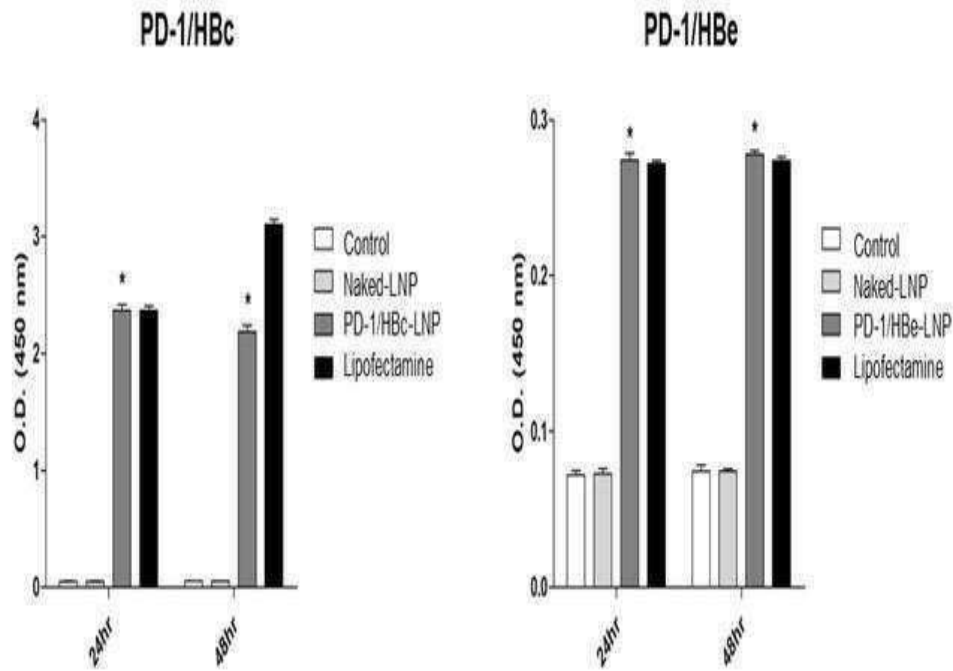
단일항원

Sample Number	Sample ID	Encapsulation Efficiency	Total mRNA Concentration	Encapsulated mRNA Concentration
		%	ug/mL	ug/mL
1	HBc-LNP	86.5	134.6	116.4
2	HBs-LNP	89.6	96.0	86.0
3	PD-1-LNP	86.8	92.7	80.4

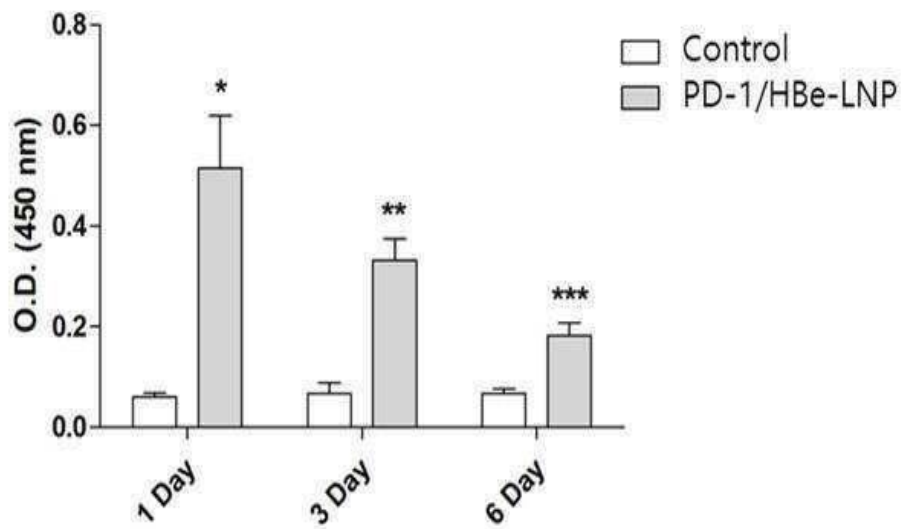
키메라 항원

Sample Number	Sample ID	Encapsulation Efficiency	Total mRNA Concentration	Encapsulated mRNA Concentration
		%	ug/mL	ug/mL
1	PD-1/HBc	93.7	58.0	54.3
2	PD-1/HBs	91.7	49.8	45.7

도면10



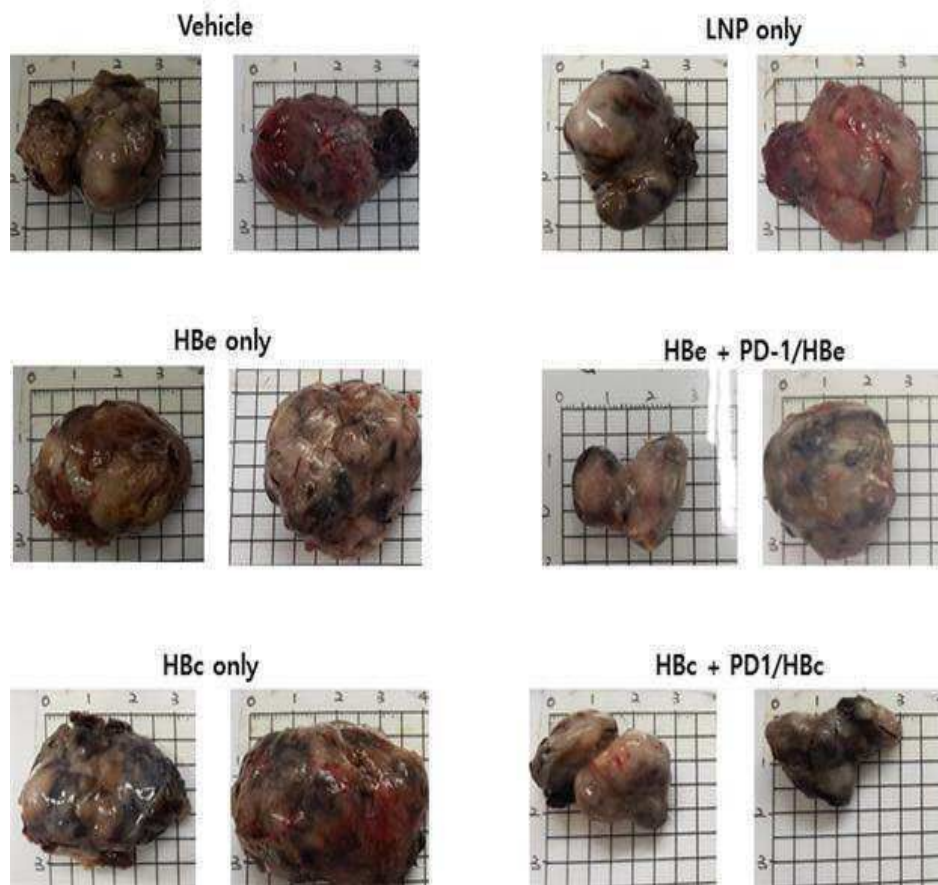
도면11



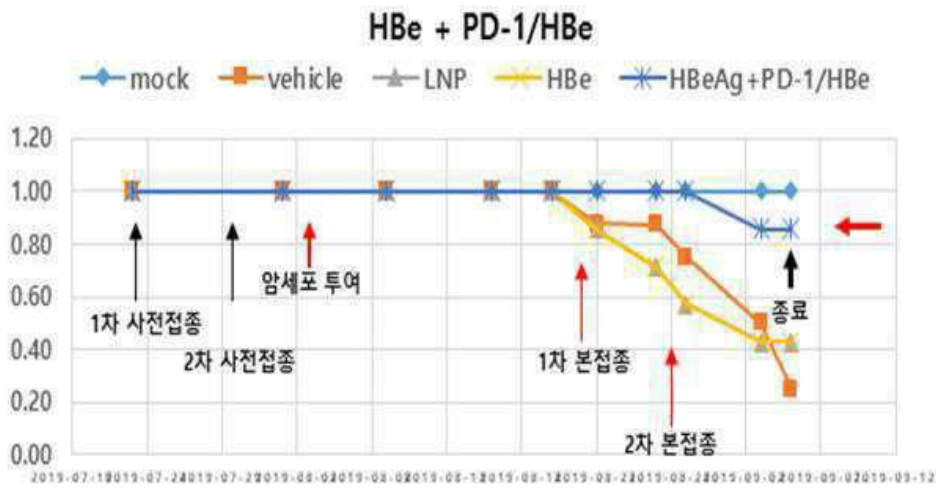
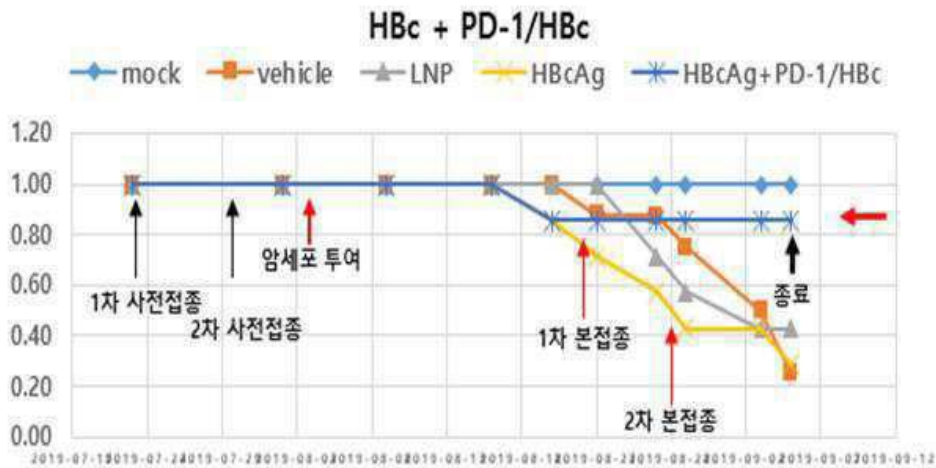
도면12



도면13



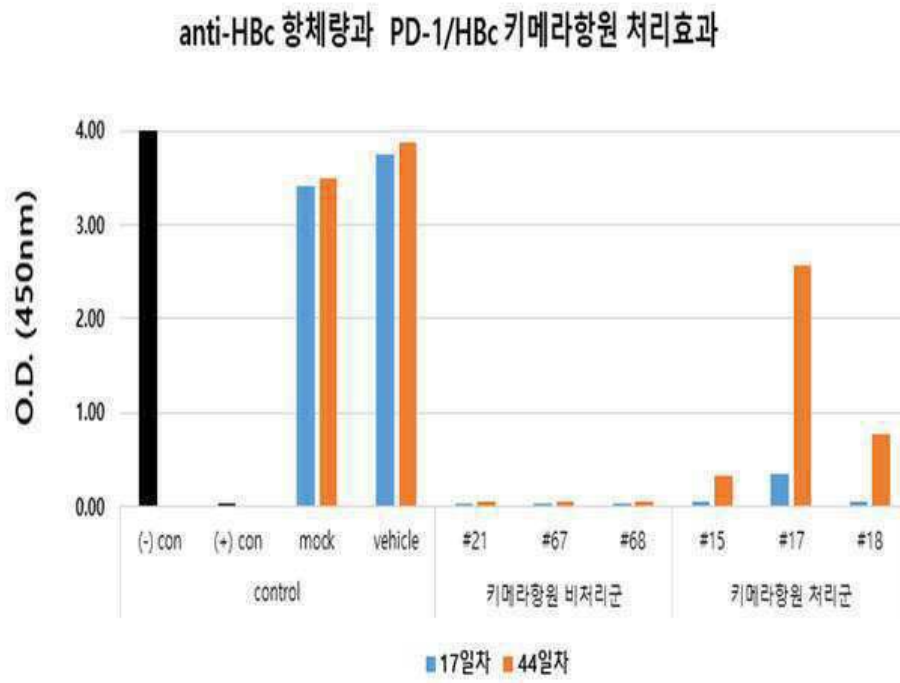
도면14



도면15



도면16



서열 목록

<110> Rnagene Inc.

<120> Chimeric antigens that specifically bind to target cells to enhance multiple immune function and uses thereof

<130> NPDC71304.01

<160> 28

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 429

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HBcAg polypeptide sequence

<400> 1

Met Glu Thr Thr Arg Pro Thr Arg Pro Ala Arg Gly Leu Glu Ala Thr

1 5 10 15

Arg Pro Thr Arg Pro Leu Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu

20 25 30

Ala Leu Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Ala Leu Glu Ala Thr Arg Pro

35 40 45
 Pro Arg Ala Met Glu Thr Val Ala Leu Thr His Arg Gly Leu Tyr Leu
 50 55 60
 Glu Ala Met Glu Thr Ala Ser Asn Leu Glu Ala Ala Leu Ala Thr His
 65 70 75 80
 Arg Thr Arg Pro Val Ala Leu Gly Leu Tyr Ser Glu Arg Ala Ser Asn
 85 90 95

 Leu Glu Ala Gly Leu Ala Ala Ser Pro Pro Arg Ala Ala Leu Ala Ser
 100 105 110
 Glu Arg Ala Arg Gly Gly Leu Ala Leu Glu Ala Val Ala Leu Val Ala
 115 120 125
 Leu Gly Leu Tyr Thr Tyr Arg Val Ala Leu Ala Ser Asn Val Ala Leu
 130 135 140
 Ala Ser Asn Met Glu Thr Gly Leu Tyr Leu Glu Ala Leu Tyr Ser Pro
 145 150 155 160
 His Glu Ala Arg Gly Gly Leu Asn Leu Glu Ala Leu Glu Ala Thr Arg

 165 170 175
 Pro Pro His Glu His Ile Ser Ile Leu Glu Ser Glu Arg Cys Tyr Ser
 180 185 190
 Leu Glu Ala Thr His Arg Pro His Glu Gly Leu Tyr Ala Arg Gly Gly
 195 200 205
 Leu Ala Thr His Arg Val Ala Leu Leu Glu Ala Gly Leu Ala Thr Tyr
 210 215 220
 Arg Leu Glu Ala Val Ala Leu Ser Glu Arg Pro His Glu Gly Leu Tyr
 225 230 235 240

 Val Ala Leu Thr Arg Pro Ile Leu Glu Ala Arg Gly Thr His Arg Pro
 245 250 255
 Arg Ala Ala Leu Ala Pro Arg Ala Thr Tyr Arg Ala Arg Gly Pro Arg
 260 265 270
 Ala Pro Arg Ala Ala Ser Asn Ala Leu Ala Pro Arg Ala Ile Leu Glu
 275 280 285
 Leu Glu Ala Ser Glu Arg Thr His Arg Leu Glu Ala Pro Arg Ala Gly

290 295 300
 Leu Ala Thr His Arg Thr His Arg Val Ala Leu Val Ala Leu Ala Arg

305 310 315 320
 Gly Gly Leu Asn Ala Arg Gly Gly Leu Tyr Ala Arg Gly Ser Glu Arg

325 330 335
 Leu Glu Ala Ala Arg Gly Ala Arg Gly Ala Arg Gly Thr His Arg Pro

340 345 350
 Arg Ala Ser Glu Arg Pro Arg Ala Ala Arg Gly Ala Arg Gly Ala Arg

355 360 365
 Gly Ala Arg Gly Ser Glu Arg Gly Leu Asn Ser Glu Arg Pro Arg Ala

370 375 380

Ala Arg Gly Ala Arg Gly Ala Arg Gly Ala Arg Gly Ser Glu Arg Leu

385 390 395 400
 Tyr Ser Ser Glu Arg Ala Arg Gly Ala Ser Pro Ser Glu Arg Gly Leu

405 410 415
 Asn Cys Tyr Ser Ser Glu Arg Thr His Arg Ser Glu Arg

420 425

<210> 2

<211> 429

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HBcAg polynucleotide sequence

<400> 2

atgtggtggc ggctctggtg gctgctcttg ctgctgttgc tgctgtggcc catggtcacc 60

ggcttgatga atcttgcgac ttgggtcggc tcaaaccttg aggaccggc gagtcgggaa 120

ctggtcgtgg gttatgtgaa tgtcaacatg ggctcaaatt tccggcagct cctctggttt 180

cacatttctt gccttacatt tggccgggaa acggttcttg aatactggt atcattcggg 240

gtgtggattc ggacgccgc tccatataga ccacctaacg caccattct tagtacgttg 300

cctgagacga ctgtagtctg gcaacgagga cgtctctca gacgcagaac cccagccca 360

agaagacgcc ggagccagtc tccccgccga agcgatcaa agtctcgca cagtcaatgc 420

tctactagt 429

<210> 3

<211> 183

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HBeAg polypeptide sequence

<400> 3

Met Trp Trp Arg Leu Trp Trp Leu Leu Leu Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Pro Met Val Thr Gly Lys Leu Cys Leu Gly Trp Leu Trp Gly Met Asp

20 25 30

Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Ser Val Glu Leu Leu Ser Phe

35 40 45

Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Ala Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala

50 55 60

Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys Ser Pro

65 70 75 80

His His Thr Ala Ile Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu Leu Met

85 90 95

Asn Leu Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu Glu Asp Pro Ala Ser Arg

100 105 110

Glu Leu Val Val Gly Tyr Val Asn Val Asn Met Gly Leu Lys Phe Arg

115 120 125

Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr

130 135 140

Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Ala

145 150 155 160

Pro Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr

165 170 175

Thr Val Val Arg Arg Thr Ser

180

<210> 4

<211> 549

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><223> HBeAg polynucleotide sequence

<400> 4

atgtggtggc ggctctggtg gctgctcttg ctgctgttg tgctgtggcc catggtcacc	60
ggcaagctgt gccttgggtg gctttggggc atggacattg acccgataa agaatttga	120
gcttctgtgg agttactctc tttttgcct tctgacttct ttccttctgc tcgggatctc	180
ctcgacaccg cctctgctct gtatcgggag gccttagagt ctccagaaca ttgttcacct	240
caccatacag caatcaggca agctattctg tgttgggggtg agttgatgaa tctggccacc	300
tgggtgggaa gtaatttga agaccagca tccaggaat tagtagtcgg ctatgtcaat	360

gttaatatgg gcctaaaatt cagacaacta ttgtggtttc acatttcctg tcttactttt	420
ggaagagaaa ctgtgctgga gtatttgggtg tcttttggag tgtggattcg cactcctgct	480
ccttacagac caccaaatgc cctatctta tcaacacttc cggaaactac tgttgtaga	540
aggactagt	549

<210> 5

<211> 226

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HBsAg polypeptide sequence

<400> 5

Met Glu Asn Thr Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln

1	5	10	15
---	---	----	----

Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu

20	25	30
----	----	----

Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Cys

35	40	45
----	----	----

Pro Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser

50	55	60
----	----	----

Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe

65	70	75	80
----	----	----	----

Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val

85	90	95
----	----	----

Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Leu Pro Gly
 100 105 110
 Thr Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Ile Pro Ala
 115 120 125
 Gln Gly Thr Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp
 130 135 140
 Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Arg
 145 150 155 160

Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu
 165 170 175
 Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu
 180 185 190
 Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Asn Ile
 195 200 205
 Leu Asn Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Tyr Leu Trp Val
 210 215 220

Tyr Ile

225

<210>

6

<211> 678

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HBsAg polynucleotide sequence

<400> 6

atggagaaca caacatcagg attcctagga cccctgctcg tggtacaggc ggggtttttc	60
ttgttgacaa gaatcctcac aataccacag agtctagact cgtggtggac ttcttcaat	120
tttctagggg gagcaccac gtgtcctggc caaaattcgc agtccccaac ctccaatcac	180
tcaccaacct cttgtcctcc aatttgctct ggtatcgcct ggatgtgtct gcggcgtttt	240
atcatattcc tcttcactct gctgctatgc ctcatcttct tgttggttct tctggactat	300
caaggtatgt tgcccgtttg tctctactt ccaggaacat caactaccag cacgggacca	360
tgcaagacct gcacgattcc tgctcaagga acctctatgt ttccctcttg ttgctgtaca	420
aaaccttcgg acggaaactg cacttgtatt cccatcccat catcttgggc ttctgcaaga	480

ttcctatggg agtgggcctc agtccgtttc tcttggtca gtttactagt gccatttgtt 540
cagtgggttc tagggcttcc cccactgtt tggctttcag ttatatggat gatgtggtat 600
tgggggccaa gtctgtacaa catcttgaat cccctttttac ctctattacc aattttcttt 660
tatctttggg tatacatt 678

<210> 7

<211> 231

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PD-1 polypeptide sequence

<400> 7

Met Trp Trp Arg Leu Trp Trp Leu Leu Leu Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Pro Met Val Thr Gly Leu Glu Val Pro Asn Gly Pro Trp Arg Ser Leu

20 25 30

Thr Phe Tyr Pro Ala Trp Leu Thr Val Ser Glu Gly Ala Asn Ala Thr

35 40 45

Phe Thr Cys Ser Leu Ser Asn Trp Ser Glu Asp Leu His Val Val Trp

50 55 60

His Leu Glu Ser Pro Ser Gly Gln Thr Glu Thr Gln Ala Ala Phe Cys

65 70 75 80

Asn Gly Leu Ser Gln Pro Val Gln Asp Ala Arg Phe Gln Ile Ile Gln

85 90 95

Leu Pro Asn Arg His Asp Phe His Met Asn Ile Leu Asp Thr Arg Arg

100 105 110

Asn Asp Ser Gly Ile Tyr Val Cys Gly Val Ile Ser Leu His Pro Lys

115 120 125

Ile Lys Ile Glu Glu Ser Pro Gly Ala Glu Leu Val Val Thr Glu Arg

130 135 140

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

145 150 155 160

Ala Pro Val Pro Ser Val Ala Tyr Glu Glu Leu Asp Phe Gln Gly Arg

165 170 175

Glu Lys Thr Pro Glu Leu Pro Thr Ala Cys Val His Thr Glu Tyr Ala
 180 185 190
 Thr Ile Val Phe Thr Glu Gly Leu Gly Ala Ser Ala Met Gly Arg Arg

195 200 205
 Gly Ser Ala Asp Gly Leu Gln Gly Pro Arg Pro Pro Arg His Glu Asp
 210 215 220
 Gly His Cys Ser Trp Pro Leu

225 230

<210> 8

<211> 693

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PD-1 polynucleotide sequence

<400> 8

atgtggtggc ggctctggtg gctgctcttg ctgctgttgc tgctgtggcc catggtcacc 60

ggcctagaag tcccaaattgg gccctggaga agcttgacat tttatcctgc atggcttaca 120

gtaagtgagg gtgcaaacgc cactttcacc tgctcattga gtaattggtc agaagacctc 180

catgtcgttt ggcacctgga gtcccccctca ggccagactg aaaccaggc cgcattttgt 240

aatggtctca gtcaacctgt gcaagatgcc aggtttcaaa tcattcagct ccccaatagg 300

catgatttcc acatgaatat cttggataca cgacgaaacg acagtggcat ttacgtgtgt 360

ggcgtcattt ctttgcacc caagatcaag atagaggagt cccctggtgc tgagctcgtc 420

gtgacagagc ggatcggagc tgggtctaag gatgacactt tgaaggaaga gccatccgca 480

gcccccgctg ccctctgtgc atacaggagaa ttggacttcc agggctcgaga aaaaacaccc 540

gagcttccaa ccgcttgtgt tcacaccgag tatgcaacca ttgtgttcac cgaagccttg 600

ggggcttctg caatggggcg aaggggttcc gccgacggcc ttcaaggccc aaggcctccc 660

cgacacgaag atggacattg cagttggccc ctt 693

<210> 9

<211> 397

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PD-1/HBcAg chimeric antigen polypeptide sequence

<400> 9

Met Trp Trp Arg Leu Trp Trp Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Pro Met Val Thr Gly Leu Glu Val Pro Asn Gly Pro Trp Arg Ser Leu
20 25 30

Thr Phe Tyr Pro Ala Trp Leu Thr Val Ser Glu Gly Ala Asn Ala Thr
35 40 45

Phe Thr Cys Ser Leu Ser Asn Trp Ser Glu Asp Leu His Val Val Trp
50 55 60

His Leu Glu Ser Pro Ser Gly Gln Thr Glu Thr Gln Ala Ala Phe Cys
65 70 75 80

Asn Gly Leu Ser Gln Pro Val Gln Asp Ala Arg Phe Gln Ile Ile Gln
85 90 95

Leu Pro Asn Arg His Asp Phe His Met Asn Ile Leu Asp Thr Arg Arg
100 105 110

Asn Asp Ser Gly Ile Tyr Val Cys Gly Val Ile Ser Leu His Pro Lys
115 120 125

Ile Lys Ile Glu Glu Ser Pro Gly Ala Glu Leu Val Val Thr Glu Arg
130 135 140

Ile Gly Ala Gly Ser Lys Asp Asp Thr Leu Lys Glu Glu Pro Ser Ala
145 150 155 160

Ala Pro Val Pro Ser Val Ala Tyr Glu Glu Leu Asp Phe Gln Gly Arg
165 170 175

Glu Lys Thr Pro Glu Leu Pro Thr Ala Cys Val His Thr Glu Tyr Ala
180 185 190

Thr Ile Val Phe Thr Glu Gly Leu Gly Ala Ser Ala Met Gly Arg Arg
195 200 205

Gly Ser Ala Asp Gly Leu Gln Gly Pro Arg Pro Pro Arg His Glu Asp
210 215 220

Gly His Cys Ser Trp Pro Leu Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala
225 230 235 240

Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala Leu Glu Ala

245	250	255	
Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu			
260	265	270	
Ala Ala Ala Lys Ala Leu Met Asn Leu Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn			
275	280	285	
Leu Glu Asp Pro Ala Ser Arg Glu Leu Val Val Gly Tyr Val Asn Val			
290	295	300	
Asn Met Gly Leu Lys Phe Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys			
305	310	315	320
Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly			
325	330	335	
Val Trp Ile Arg Thr Pro Ala Pro Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile			
340	345	350	
Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val Val Arg Gln Arg Gly Arg Ser			
355	360	365	
Leu Arg Arg Arg Thr Pro Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro			
370	375	380	
Arg Arg Arg Arg Ser Lys Ser Arg Asp Ser Gln Cys Ser			
385	390	395	
<210>	10		
<211>	1191		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	PD-1/HBcAg chimeric antigen polynucleotide sequence		
<400>	10		
atgtggtggc ggctctgggtg gctgctcttg ctgctgttgc tgctgtggcc catggtcacc		60	
ggcctagaag tcccaaatgg gccctggaga agcttgacat tttatcctgc atggcttaca		120	
gtaagtgagg gtgcaaacgc cactttcacc tgcctattga gtaattggtc agaagacctc		180	
catgtcgttt ggcacctgga gtccccctca ggccagactg aaaccaggc cgcattttgt		240	
aatggtctca gtcaacctgt gcaagatgcc aggtttcaaa tcattcagct cccaatagg		300	
catgatttcc acatgaatat cttggataca cgacgaaacg acagtggcat ttacgtgtgt		360	
ggcgtcattt ctttgcattc caagatcaag atagaggagt cccctggtgc tgagctcgtc		420	

gtgacagagc ggatcgagc tgggtctaag gatgacactt tgaaggaaga gccatccgca 480
gccccgtgc cctctgtcgc atacaggaa ttggacttcc agggtcgaga aaaaacaccc 540
gagcttccaa ccgcttgtgt tcacaccgag tatgcaacca ttgtgttcac cgaaggcttg 600

ggggcttctg caatggggcg aaggggttcc gccgacggcc ttcaaggccc aaggcctccc 660
cgacacgaag atggacattg cagttggccc ctgacagagg cagccgctaa agaggctgca 720
gctaaagaag cggcagccaa ggaagcagct gcaaaggcgt tggaagctga agctgcagca 780
aaggaggcag ctgcgaagga ggctgctgcc aaagaagccg ctgctaaagc ttgatgaat 840
cttgcgactt gggtcggctc aaaccttgag gacccggcga gtcgggaact ggtcgtgggt 900
tatgtgaatg tcaacatggg cctcaaattc cggcagctcc tctggtttca catttcttgc 960
cttacatttg gccgggaaac ggttcttgaa tacctggtat cattcggggt gtggattcgg 1020

acgcccgctc catatagacc acctaacgca ccattcttta gtacgttgcc tgagacgact 1080
gtagttcggc aacgaggacg gtctctcaga cgcagaaccc ccagcccaag aagacgccgg 1140
agccagtctc cccgccgaag gcgatcaaag tctcgcgaca gtcaatgctc t 1191

<210> 11

<211> 413

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PD-1/HBeAg chimeric antigen polypeptide sequence

<400> 11

Met Gly Val Lys Val Leu Phe Ala Leu Ile Cys Ile Ala Val Ala Glu

1 5 10 15

Ala Leu Glu Val Pro Asn Gly Pro Trp Arg Ser Leu Thr Phe Tyr Pro

20 25 30

Ala Trp Leu Thr Val Ser Glu Gly Ala Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser

35 40 45

Leu Ser Asn Trp Ser Glu Asp Leu His Val Val Trp His Leu Glu Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Gln Pro Val Gln Asp Ala Arg Phe Gln Ile Ile Gln Leu Pro Asn Arg

85 90 95

His Asp Phe His Met Asn Ile Leu Asp Thr Arg Arg Asn Asp Ser Gly
100 105 110

Ile Tyr Val Cys Gly Val Ile Ser Leu His Pro Lys Ile Lys Ile Glu
115 120 125

Glu Ser Pro Gly Ala Glu Leu Val Val Thr Glu Arg Ile Gly Ala Gly
130 135 140

Ser Lys Asp Asp Thr Leu Lys Glu Glu Pro Ser Ala Ala Pro Val Pro
145 150 155 160

Ser Val Ala Tyr Glu Glu Leu Asp Phe Gln Gly Arg Glu Lys Thr Pro
165 170 175

Glu Leu Pro Thr Ala Cys Val His Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe
180 185 190

Thr Glu Gly Leu Gly Ala Ser Ala Met Gly Arg Arg Gly Ser Ala Asp
195 200 205

Gly Leu Gln Gly Pro Arg Pro Pro Arg His Glu Asp Gly His Cys Ser
210 215 220

Trp Pro Leu Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
225 230 235 240

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Lys Leu Cys Leu Gly
245 250 255

Trp Leu Trp Gly Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Ser
260 265 270

Val Glu Leu Leu Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Ala Arg
275 280 285

Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser
290 295 300

Pro Glu His Cys Ser Pro His His Thr Ala Ile Arg Gln Ala Ile Leu
305 310 315 320

Cys Trp Gly Glu Leu Met Asn Leu Ala Thr Trp Val Gly Ser Asn Leu
325 330 335

Glu Asp Pro Ala Ser Arg Glu Leu Val Val Gly Tyr Val Asn Val Asn
340 345 350

Met Gly Leu Lys Phe Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu

355 360 365

Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val

370 375 380

Trp Ile Arg Thr Pro Ala Pro Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu

385 390 395 400

Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr Val Val Arg Arg Thr Ser

405 410

<210> 12

<211> 1239

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PD-1/HBeAg chimeric antigen polynucleotide sequence

<400> 12

atgggagtga aagtctcttt tgcccttatt tgtattgctg tggccgaggc cctagaagtc 60

ccaaatgggc cctggagaag cttgacattt taccctgcat ggcttacagt aagtgagggt 120

gcaaacgcca ctttcacctg ctcatagagt aattggtcag aagacctcca tgcgtttgg 180

cacctggagt cccctcagg ccagactgaa acccaggccg cttttgtaa tggctctagt 240

caacctgtgc aagatgccag gtttcaaatt attcagctcc ccaataggca tgattccac 300

atgaatatct tggatacag acgaaacgac agtggcattt acgtgtgtgg cgtcatttct 360

ttgcatccca agatcaagat agaggagtcc cctggtgctg agctcgtcgt gacagagcgg 420

atcggagctg ggtctaagga tgacactttg aaggaagagc catccgcagc ccccggtccc 480

tctgtcgcac acgaggaatt ggacttcag ggtcgagaaa aaacacccga gtttccaacc 540

gcttgtgttc acaccgagta tgcaaccatt gtgttcaccg aaggcttggg ggcttctgca 600

atggggcgaa ggggttccgc cgacggcctt caaggcccaa ggctccccg acacgaagat 660

ggacattgca gttggccctt tggatcagga ggtggtggtt cagggggagg agggagcggc 720

ggaggaggtt caggtggagg tggatctggt tcaaagctgt gccttgggtg gctttggggc 780

atggacattg acccgataaa agaatttgga gcttctgtgg agttactctc tttttgcct 840

tctgacttct ttccttctgc tcgggatctc ctgcacacc cctctgctct gtatcgggag 900

gccttagagt ctccagaaca ttgttcacct caccatacag caatcaggca agctattctg 960

tgttgggggtg agttgatgaa tctggccacc tgggtgggaa gtaatttgga agaccagca 1020

tccagggaat tagtagtcgg ctatgtcaat gttaatatgg gcctaaaatt cagacaacta 1080
 ttgtggtttc acatttcctg tcttactttt ggaagagaaa ctgtgctgga gtatttggtg 1140
 tcttttggag tgtggattcg cactcctgct ccttacagac caccaaatgc ccctatctta 1200
 tcaacacttc cggaaactac tggtgttaga aggactagt 1239

<210> 13
 <211> 691
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HBcAg IVT mRNA coding DNA template sequence

<400> 13
 agatcttaat acgactcact atagggaat aagagagaaa agaagagtaa gaagaaatat 60
 aagagaattc gccaccatgt ggtggcggct ctggtggctg ctcttgctgc tgttgctgct 120
 gtggcccatg gtcaccggct tgatgaatct tgcgacttgg gtcggctcaa accttgagga 180
 cccggcgagt cgggaactgg tcgtgggtta tgtgaatgac aacatgggcc tcaaattccg 240
 gcagctcctc tggtttcaca tttcttgctt tacatttggc cgggaaacgg ttcttgaata 300
 cctggtatca ttcggggigt ggattcggac gcccgctcca tatagaccac ctaacgcacc 360

cattcttagt acgttgcttg agacgactgt agttcggcaa cgaggacggt ctctcagacg 420
 cagaaccccc agccaagaa gacgccggag ccagtctccc cgccaaggc gatcaaagtc 480
 tcgcgacagt caatgctcta ctagttagtc tagataacta gggatccgct gccttctgcg 540
 gggtttgctt tctggccatg cctttcttct ctcccttgca cctgtacctc ttggtctttg 600
 aataaagcct gaggtaggaag aatattaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 660
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 691

<210> 14
 <211> 811
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HBcAg IVT mRNA coding DNA template sequence

<400> 14
 agatcttaat acgactcact atagggaat aagagagaaa agaagagtaa gaagaaatat 60
 aagagaattc gccaccatgt ggtggcggct ctggtggctg ctcttgctgc tgttgctgct 120
 gtggcccatg gtcaccggca agctgtgctt tgggtggctt tggggcatgg acattgaccc 180
 gtataaagaa ttggagctt ctgtggagtt actctctttt ttgccttctg acttctttcc 240

ttctgctcgg gatctcctcg acaccgcctc tgctctgtat cgggaggcct tagagtctcc 300
agaacattgt tcacctcacc atacagcaat caggcaagct attctgtgtt ggggtgagtt 360

gatgaatctg gccacctggg tgggaagtaa tttggaagac ccagcatcca gggaattagt 420
agtcggctat gtcaatgtta atatgggcct aaaattcaga caactattgt ggtttcacat 480
ttctgtctt acttttggaa gagaaactgt gctggagtat ttggtgtctt ttggagtgtg 540
gattcgact cctgtctctt acagaccacc aaatgccctt atcttatcaa cacttccgga 600
aactactgtt gttagaagga ctagttagtc tagataacta gggatccgct gccttctcgc 660
gggcttgcc tctggccatg cctttcttct ctcccttgca cctgtacctc ttggtctttg 720
aataaagcct gagttaggaag aatattaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaga 780

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 811

<210> 15
<211> 927
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> HBsAg IVT mRNA coding DNA template sequence
<400> 15

agatcttaat acgactcact atagggaaat aagagagaaa agaagagtaa gaagaaatat 60
aagagaattc gccaccatgg agaacacaac atcaggattc ctaggacccc tgctcgtgtt 120
acaggcgggg tttttcttgt tgacaagaat cctcacaata ccacagagtc tagactcgtg 180
gtggacttct ctcaattttc taggggggagc acccacgtgt cctggccaaa attcgcagtc 240

cccaacctcc aatcactcac caacctcttg tctccaatt tgccttggt atcgtggat 300
gtgtctgcgg cgttttatca tttctctctt cactctgctg ctatgcctca tttcttgtt 360
ggttcttctg gactatcaag gtatgttgcc cgtttgcct ctacttcag gaacatcaac 420
taccagcacg ggaccatgca agacctgcac gattcctgct caaggaacct ctatgtttcc 480
ctcttgttgc tgtacaaaac cttcggacgg aaactgcact tgtattccca tccatcctc 540
ttgggctttc gcaagattcc tatgggagtg ggcctcagtc cgtttctct ggctcagttt 600
actagtacca tttgttcagt ggttcgtagg gctttccccc actgtttggtc tttcagttat 660

atggatgatg tggatattggg ggccaagtct gtacaacatc ttgaatccct tttacctct 720
attaccaatt ttcttttacc tttgggtata catttaagga tccgtgcct tctgcggggc 780
ttgccttctg gccatgccct tttctctctc ctgacactg tacctcttgg tctttgaata 840
aagcctgagt aggaagaata ttaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaagaaaaa 900

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa

927

<210> 16

<211> 955

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PD-1 IVT mRNA coding DNA template sequence

<400> 16

agatcttaat acgactcact atagggaaat aagagagaaa agaagagtaa gaagaaatat	60
aagagaattc gccaccatgt ggtggcggct ctggtggctg ctcttgctgc tgttgctgct	120
gtggcccatg gtcaccggcc tagaagtcct aaatgggccc tggagaagct tgacatttta	180
tcctgcattg cttacagtaa gtgagggtgc aaacgccact ttcacctgct cattgagtaa	240
ttggtcagaa gacctccatg tcgtttggca cctggagtcc cctcaggcc agactgaaac	300
ccaggccgca ttttgtaatg gtctcagtca acctgtgcaa gatgccaggt ttcaaatcat	360
tcagctcccc aataggcatg atttcacat gaatatcttg gatacacgac gaaacgacag	420

tggcatttac gtgtgtggcg tcatctcttt gcatccaag atcaagatag aggagtcccc	480
tgggtgctgag ctctgtctga cagagcggat cggagctggg tctaaggatg acactttgaa	540
ggaagagcca tccgcagccc ccgtgccctc tctgcatac gaggaattgg acttccaggg	600
tcgagaaaaa acaccgagc ttccaaccgc ttgtgttcac accgagtatg caaccattgt	660
gttcaccgaa ggcttggggg cttctgcaat ggggcgaagg ggttccgccg acggccttca	720
aggcccaagg cctccccgac acgaagatgg acattgcagt tggccccctt agtctagata	780
actagggatc cgctgccttc tgcggggctt gccttctggc catgcccttc ttctctccct	840

tgcacctgta cctcttggtc tttgaataaa gcctgagtag gaagaatat aaaaaaaaaa	900
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aagaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa	955

<210> 17

<211> 1620

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PD-1/HBcAg IVT mRNA coding DNA template sequence

<400> 17

agatcttaat acgactcact atagggaaat aagagagaaa agaagagtaa gaagaaatat	60
aagagaattc gccaccatgt ggtggcggct ctggtggctg ctcttgctgc tgttgctgct	120

gtggcccatg gtcaccggcc tagaagtc cc aaatgggccc tggagaagct tgacatttta	180
tcctgcatgg cttacagtaa gtgagggtgc aaacgccact ttcacctgct cattgagtaa	240
ttggtcagaa gacctccatg tcgtttggca cctggagtcc ccctcaggcc agactgaaac	300
ccaggccgca ttttghtaat gtctcagtca acctgtgcaa gatgccaggt ttcaaatcat	360
tcagctcccc aataggcatg atttccacat gaatatcttg gatacacgac gaaacgacag	420
tggcatttac gtgtgtggcg tcatttcttt gcatccaag atcaagatag aggagtcgcc	480
tgggtctgag ctctgtgga cagagcggat cggagctggg tctaaggatg acactttgaa	540
ggaagagcca tccgcagccc ccgtgccctc tctgcatac gaggaattgg acttccaggg	600
tcgagaaaaa acacccgagc ttccaaccgc ttgtgttcac accgagtatg caaccattgt	660
gttcaccgaa ggcttggggg cttctgcaat ggggcgaagg ggttccgccg acggccttca	720
aggccaagg cctccccgac acgaagatgg acattgcagt tggcccatg gctcaggcgg	780
tggaggttca gggggcgggg gctccggttg tggcggttct ggtggaggag gctctggttg	840
aggagctcc ggcggagtg gttctggcgg tgggggtagc gggggagggg ggtccgggtc	900
tgacattgac ccgtataaag aatttggagc ttctgtggag ttactctctt ttttgccttc	960
tgacttcttt cttctgctc gagatctcct cgacaccgcc tctgctctgt atcgggaggc	1020
cttagagtct ccagaacatt gttcacctca ccatacagca atcaggcaag ctattctgtg	1080
ttggggtagg ttgatgaatc tggccacctg ggtgggaagt aatttggagg acccagcatc	1140
cagggaatta gtagtcggt atgtcaatgt taatatgggc ctaaaattca gacaactatt	1200
gtggtttcac atttctgtc ttacttttgg aagagaaact gtgctggagt atttgggtgc	1260
ttttggagtg tggattcgca ctctgtctcc ttacagacca ccaaatgccc ctatcttate	1320
aacacttccg gaaactactg ttgttagaca acgaggcagg tcccttagaa gaagaactcc	1380
ctcgcctcgc agacgaaggt ctcaatgcc gcgtcgcaga agatctaaat ctcgggactc	1440
tcaatgttaa ggatccgctg cttctgcgg ggcttgctt ctggccatgc cttcttctc	1500
tcccttgca cgttacctt tggcttttga ataaagcctg agtaggaaga atattaaaaa	1560
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaagaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1620
	1620
<210> 18	
<211> 1501	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PD-1/HBeAg IVT mRNA coding DNA template sequence	

<400> 18

agatcttaat acgactcact atagggaaat aagagagaaa agaagagtaa gaagaaatat	60
aagagaattc gccacatgg gagtgaaagt tctttttgcc cttatttgta ttgctgtggc	120
cgaggcccta gaagtcctaa atgggccctg gagaagcttg acattttatc ctgcatggct	180
tacagtaagt gaggggtgcaa acgccacttt cacctgtca ttgagtaatt ggtcagaaga	240
cctccatgtc gtttggcacc tggagtcccc ctcaggccag actgaaaccc aggccgcatt	300
ttgtaatggt ctgagtcaac ctgtgcaaga tgccaggttt caaatcattc agtccccaa	360
taggcatgat ttccacatga atatcttga tacacgacga aacgacagtg gcatttacgt	420
gtgtggcgtc atttctttgc atccaagat caagatagag ggtccccctg gtgctgagct	480
cgctgtgaca gagcggatcg gagctgggtc taaggatgac actttgaagg aagagccatc	540
cgcagccccc gtgccctctg tcgcatacga ggaattggac ttccagggtc gagaaaaaac	600
acccgagctt ccaaccgctt gtgttcacac cgagtatgca accatttgtt tcaccgaagg	660
cttgggggct tctgcaatgg ggcgaagggg ttccgccgac ggccttcaag gcccgaaggc	720
tccccgacac gaagatggac attgcagttg gccccttga tcaggaggtg gtggttcagg	780
gggaggaggg agcggcggag gaggttcagg tggaggtgga tctggttcaa agctgtgcct	840
tgggtggctt tggggcatgg acattgacct gtataaagaa tttggagctt ctgtggagtt	900
actctctttt ttgccttctg acttctttcc ttctgtcgg gatctcctcg acaccgcctc	960
tgctctgtat cgggaggcct tagagtctcc agaacattgt tcacctacc atacagcaat	1020
caggcaagct attctgtgtt ggggtgagtt gatgaatctg gccacctggg tgggaagtaa	1080
tttgaagac ccagcatcca gggaattagt agtcggctat gtcaatgtta atatggcct	1140
aaaattcaga caactattgt ggtttcacat ttctgtctt acttttgaa gagaaactgt	1200
gtcggagtat ttggtgtctt ttggagtgtg gattcgact cctgtcctt acagaccacc	1260
aatgccctt atcttatcaa cacttcgga aactactgtt gttagaagga ctagttagtc	1320
tagataacta gggatccgct gccttctgcg gggttgcct tctggccatg cccttcttct	1380
ctcccttgca ccgtacctc ttggtctttg aataaagcct gagtaggaag aatattaaaa	1440
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaga aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1500
a	1501

<210> 19

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker-1 peptide sequence

<400> 19

Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys

1 5 10 15

Glu Ala Ala Ala Lys Ala Leu Glu Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala

20 25 30

Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala

35 40 45

<210> 20

<211> 138

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker-1 polynucleotide sequence

<400> 20

gcagaggcag ccgctaaaga ggctgcagct aaagaagcgg cagccaagga agcagctgca 60

aaggcgttgg aagctgaagc tgcagcaaag gaggcagctg cgaaggaggc tgctgcaaaa 120

gaagccgctg ctaaagct 138

<210> 21

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker-2 peptide sequence

<400> 21

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser

20

<210> 22

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker-2 polynucleotide sequence

<400> 22
 ggatcaggag gtggtggttc agggggagga gggagcggcg gaggaggttc aggtggaggt 60
 ggatctggtt ca 72

<210> 23
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Signal peptide-1 polypeptide sequence
 <400> 23
 Met Trp Trp Arg Leu Trp Trp Leu Leu Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Pro Met Val Thr Gly
 20

<210> 24
 <211> 63

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Signal peptide-1 polynucleotide sequence
 <400> 24
 atgtggtggc ggctctggtg gctgctcttg ctgctgttgc tgctgtggcc catggtcacc 60
 ggc 63

<210> 25
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Signal peptide-2 polypeptide sequence
 <400> 25
 Met Gly Val Lys Val Leu Phe Ala Leu Ile Cys Ile Ala Val Ala Glu
 1 5 10 15
 Ala

<210> 26
 <211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Signal peptide-2 polynucleotide sequence

<400> 26

atgggagtga aagtctcttt tgcccttatt tgtattgctg tggccgaggc c 51

<210> 27

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer1 sequence

<400> 27

agatcttaat acgactcact atagggaaat aaga 34

<210> 28

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><223> primer2 sequence

<400> 28

tttttttttt tttttttttt tttttttttt ttcttttttt tttttttttt tttttttttt 60

tttttaatat tcttctact caggctttat tcaaagacc 99