

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2021년 9월 23일 (23.09.2021) WIPO | PCT



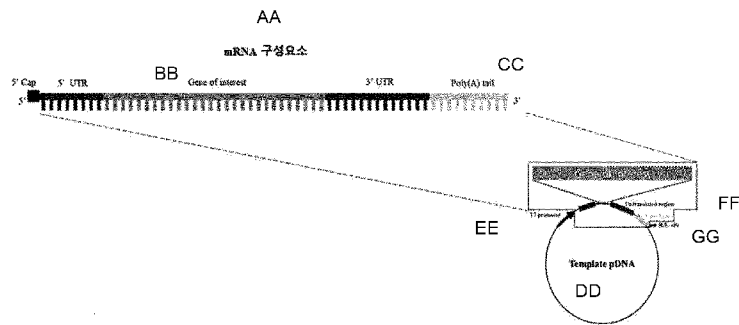
(10) 국제공개번호
WO 2021/187883 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 15/85 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2021/003281
- (22) 국제출원일: 2021년 3월 17일 (17.03.2021)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2020-0032466 2020년 3월 17일 (17.03.2020) KR
- (71) 출원인: 에이비온 주식회사 (ABION INC.) [KR/KR]; 08394 서울시 구로구 디지털로 242 #915, Seoul (KR). 서울대학교산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 08826 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 신영기 (SHIN, Young Key); 06279 서울시 강남구 도곡로 78길 22 #114-130, Seoul (KR). 최준영 (CHOI, Jun Young); 14247 경기도 광명시 하안로

- 320 #1011-1001, Gyeonggi-do (KR). 김나영 (KIM, Na Young); 13989 경기도 안양시 만안구 안양로 406번길 15-3 #103, Gyeonggi-do (KR). 손원락 (SON, Wonrak); 14597 경기도 부천시 장말로 102 #1828-305, Gyeonggi-do (KR). 이용진 (LEE, Yong Jin); 03464 서울시 은평구 응암로 318 #102-704, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 이처영 (LEE, Cheo Young); 06210 서울시 강남구 언주로 430 16층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,

(54) Title: IN-VITRO TRANSCRIPT MRNA AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING SAME

(54) 발명의 명칭: 인비트로 트랜스크립트 mRNA 및 이를 함유하는 약학조성물



AA ... mRNA component
BB ... Gene of interest
CC ... Poly(A) tail
DD ... Template pDNA
EE ... T7 promoter
FF ... Untranslated region
GG ... R. E. site

(57) Abstract: The present invention relates to an RNA in-vitro transcript mRNA for intracellular expression of a gene of interest and a pharmaceutical composition comprising same for vaccines. When injected into animal cells, the in-vitro transcript mRNA including the gene of interest according to the present invention allows the protein of interest to be expressed in the animal cell in large quantities, and, as such, can be used as a gene vaccine against autoimmune diseases, infectious diseases, cancer- or tumor-related diseases, inflammatory diseases, and so on.

[다음 쪽 계속]



WO 2021/187883 A1

SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역
내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE,
LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유
럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,
MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 본 발명은 목적유전자의 세포 내 발현을 위한 RNA 인비트로 트랜스크립트 mRNA 및 이를 함유하는 백신
용 약학조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 목적유전자를 포함하는 인비트로 트랜스크립트(in vitro transcript) mRNA
를 동물세포에 주입하는 경우, 다량의 목적단백질을 동물세포에서 발현시킬 수 있어, 자가면역질환, 감염성 질환, 암
또는 종양 관련 질환, 염증성 질환 등에 대한 유전자 백신으로 사용할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 인비트로 트랜스크립트 mRNA 및 이를 함유하는 약학조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 목적유전자의 세포 내 발현을 위한 인비트로 트랜스크립트 mRNA에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 목적유전자의 세포 내 발현을 위한 RNA 인비트로 트랜스크립트 mRNA 및 이를 함유하는 백신용 약학조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 유전자 치료법 및 유전자 백신은 의약 분야에서 이미 증명되고 일반에 적용되는 기술로, 유전적 질환뿐만 아니라 자가면역질환, 감염성 질환, 암 또는 종양 관련 질환, 염증성 질환 등도 치료대상이 될 수 있다.
- [4] 유전자 백신은 타겟 유전자를 코딩하는 DNA 및 RNA를 직접 동물에 주입하면, 타겟 유전자가 살아있는 동물에서 발현하고, 이 발현에 의해 면역이 가능하다는 것이 보고되면서부터 개발되기 시작하였다(Wolff JA et al. Science, 247:1465-8, 1990).
- [5] 유전자 치료 또는 유전적 백신 접종에서 DNA와 DNA가 유전자 투여를 위한 핵산 분자로서 사용될 수 있으며, DNA가 RNA에 비해 상대적으로 안정하고 다루기 쉬운 것으로 알려져 있다. 그러나, DNA의 경우, 환자의 유전체 내로 투여된 DNA-절편이 원하지 않은 위치에 삽입되어, 유전자가 손상되는 경우, 잠재적인 위험이 발생할 수 있다. 추가적으로, 원하지 않는 항-DNA 항체가 나타낼 수 있으며, 또 다른 문제점은, DNA 투여 및 이의 이후의 전사/번역에 의해 발현되는 펩타이드 또는 단백질의 발현 수준이 한정적이라는 점이다. DNA 전사를 조절하는 특정 전사 인자의 존재 여부가 투여된 DNA의 발현 수준에 주요한 영향을 미치며, 특정 전사 인자가 없는 경우에는 DNA 전사에 의해 충분한 양의 RNA가 생성되지 않아, 결과적으로, 번역되어 생성되는 펩타이드 또는 단백질의 수준도 한정된다.
- [6] 반면, RNA를 유전자 투여를 위한 도구로 사용할 경우, RNA는 전사가 필요하지 않아 DNA처럼 핵으로 들어가야 할 필요없이 세포질 내에서 바로 단백질을 합성할 수 있어, 세포 염색체 내로 끼어들어가 원치 않는 유전자 손상을 일으킬 염려가 없다. 또한, DNA에 비해 반감기가 짧아 장기 유전자 변형을 유도하지 않는다(Sayour EJ, et al., *J Immunother Cancer* 2015;3:13, 2015). 일반적인 RNA 백신은 세포 안에 전달하게 되면 단기간 만 활성화 되어 타겟 단백질을 발현하게 되고, 수일 안에 효소학적 반응으로 인해 파괴되고, 발현한 타겟 항원(단백질)에 대한 특이적인 면역 반응은 남아있게 된다.
- [7] 또한, 유전자 투여를 위한 도구로 RNA를 사용의 경우, 핵막을 통과할 필요가

없이 세포막만을 통과하면 작용하기 때문에, DNA 보다 적은 양을 사용하여도, DNA 와 같은 양의 타겟 단백질을 발현할 수 있다. 또한, RNA는 자체가 면역 보강원성을 가지고 있어, DNA에 비해 소량만 투여하여도 동일한 면역효과를 볼 수 있다.

- [8] 아울러, RNA의 경우, 시험관 내에서 대량 생산이 가능하여 소규모 GMP 생산시설에서도 안전하게 생산할 수 있으며, 바이러스나 미생물의 중화항체 유도관련 에피토프의 유전자만을 합성한 후 그 부분만을 시험관 내에서 전사하여 RNA 트랜스크립트(transcript, 전사체)를 생산할 수 있다. 과거에는 이런 방식으로 대량의 RNA를 생산하는데 많은 경비와 고난이도의 기술이 필요하였으나 현재는 시험관내 전사반응의 관련 시약, 특히 DNA-의존 RNA 중합효소의 개선을 통해 소량의 DNA 주형을 이용하여 대량의 RNA를 1~2주 안에 생산할 수 있게 되었다.
- [9] 유전자 백신은 기본적으로 발현하고자 하는 단백질의 유전자(DNA 혹은 RNA)를 다양한 벡터를 사용하여 동물에 접종하여 타겟 항원을 발현하는 시스템이다. 흥미로운 점은 유전자로부터 발현되는 단백질의 양은 실제로 면역원성과 직접적인 비례 관계에 있지는 않다는 점이다. 즉, 발현되는 항원이 많다고 하여 반드시 그 항원의 면역원성 또한 비례하여 증가한다는 것은 아니다. 일반적으로 유전자 백신을 동물에 주사하게 되면, 유전자 백신(DNA 혹은 RNA)이 동물 근육 세포에 다양한 방식으로 전달 감염된다. 이렇게 전달 감염된 근육 세포는 항원 특이적인 T 세포에 의해서 용해(lysis)되기 때문에 실제로 항원이 발현되는 기간이나 항원의 양은 시험관 외 세포 배양 실험에서 예측한 정도가 아니다. 따라서 어떻게 유전자 백신이 제한된 발현 양과 기간을 통해 면역 반응을 유도하는지를 정확히 이해하기 위한 추가적인 연구가 필요하다. 실제로 시험관 외 세포 배양 연구를 통해 얻어진 결과는 생체 내 동물 실험의 결과와 일치하지 않는 경우가 많다. 그 이유는 유전자 백신이 투여된 후 면역 반응에 수반되는 선천성 면역 수용체의 종 특이적 발현과 항원 인식 패턴 차이, 세포 종류별로 선천성 면역 수용체 발현양의 차이가 있기 때문이다. 알파 바이러스를 기본으로 하여 활용한 self-replicon RNA 백신이 단순히 항원 발현의 양이 많기 때문에 항원에 대한 면역원성이 높다고 설명하기 보다는 또 다른 요인의 영향일 수도 있음을 시사하고 있다(Park, JH *et al.*, *J. Bacteriol & Virol.*, 46:115, 2016).
- [10] 따라서, 목적유전자에 의한 우수한 면역반응을 유도하기 위해서는 투여되는 RNA에 의해 동물 세포에서 발현되는 단백질의 양과, 투여되는 RNA 전사체의 구성 및 면역에 필요한 적합한 RNA 투여량, protamine 같은 화합물을 활용한 최적의 RNA의 변형 등이 중요하다(Park, JH *et al.*, *J. Bacteriol & Virol.*, 46:115, 2016).
- [11] 이에, 본 발명자들은 목적 유전자를 동물세포에서 안정적으로 발현시키는 방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, 목적유전자와 상기 목적유전자의 양

말단에 연결되는 5'-UTR과 3'-UTR, 5'-UTR에 연결되는 5' 캡(cap) 및 상기 3'-UTR에 연결되는 20~400개의 아데닌으로 구성되어 있는 폴리 A 테일을 포함하는 인비트로 트랜스크립트(in vitro transcript) mRNA를 사용하여 목적 유전자를 동물세포로 전달하는 경우, 상기 동물세포가 우수한 발현효율로 목적 단백질을 생성하는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

[12]

[13] **발명의 요약**

[14] 본 발명의 목적은 목적 유전자를 동물세포에서 안정적으로 발현시키기 위한 인비트로 트랜스크립트 mRNA를 제공하는데 있다.

[15] 본 발명의 다른 목적은 상기 인비트로 트랜스크립트 mRNA를 제작하기 위한 DNA 주형을 제공하는데 있다.

[16] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 인비트로 트랜스크립트(in vitro transcript) mRNA를 포함하는 백신용 약학조성물을 제공하는데 있다.

[17]

[18] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 목적 펩타이드 또는 목적 단백질을 암호화하는 RNA 서열 삽입 부분; (b) 상기 목적 펩타이드 또는 목적 단백질을 암호화하는 RNA 서열의 양 말단에 연결되는 5'-UTR과 3'-UTR; (c) 5'-UTR에 연결되는 5' 캡(cap); 및 (d) 3'-UTR에 연결되는 20~400개의 아데닌을 함유하는 폴리 A 테일을 포함하는 인비트로 트랜스크립트(in vitro transcript) mRNA를 제공한다.

[19] 본 발명은 또한, (a) 상기 RNA 인비트로 트랜스크립트(in vitro transcript) mRNA에 대응하는 DNA 서열을 가지는 부분; 및 (b) 상기 인비트로 트랜스크립트(in vitro transcript) mRNA에 대응하는 DNA 서열의 전사를 위하여 RNA 중합효소가 결합하는 프로모터를 포함하는 인비트로 트랜스크립트(in vitro transcript) mRNA 제작을 위한 주형 DNA를 제공한다.

[20] 본 발명은 또한, 상기 인비트로 트랜스크립트(in vitro transcript) mRNA를 포함하는 백신용 약학조성물을 제공한다.

[21] 본 발명은 또한, 상기 인비트로 트랜스크립트(in vitro transcript) mRNA를 투여하는 단계를 포함하는 질병의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[22] 본 발명은 또한, 질병의 예방 또는 치료를 위한, 상기 인비트로 트랜스크립트(in vitro transcript) mRNA의 용도를 제공한다.

[23] 본 발명은 또한, 질병의 예방 또는 치료를 위한, 상기 인비트로 트랜스크립트(in vitro transcript) mRNA의 사용을 제공한다.

[24]

도면의 간단한 설명

[25] 도 1은 본 발명에 따른 인비트로 트랜스크립트 mRNA와 주형 DNA의 구성을 나타낸 것이다.

- [26] 도 2는 본 발명에 따른 주형 플라스미드 DNA로부터 *in vitro* transcription을 통해 인비트로 트랜스크립트 mRNA를 합성하는 과정을 나타낸 것이다.
- [27] 도 3은 인비트로 트랜스크립트 mRNA의 폴리 A 테일의 길이에 따른 목적 단백질의 발현 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [28] 도 4는 인비트로 트랜스크립트 mRNA의 폴리 A 테일의 말단의 모양에 따른 목적 단백질의 발현 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [29] 도 5는 인비트로 트랜스크립트 mRNA의 폴리 A 테일의 non-A residue 혼합에 따른 목적 단백질의 발현 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [30] 도 6은 인비트로 트랜스크립트 mRNA의 캡(cap) 종류에 따른 목적 단백질의 발현 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [31] 도 7 A는 인비트로 트랜스크립트 mRNA의 뉴클레오티드를 변형 뉴클레오티드로 치환하여 목적 단백질의 발현 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이고, B는 non-A residue 혼합 폴리 A 테일의 non-A residue를 변형 뉴클레오티드로 치환하여 목적 단백질의 발현 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

[32]

[33] 발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예

- [34] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[35]

- [36] 종래 유전자 치료기술 등이 이미 향상된 mRNA 안정화 및 번역활성을 위한 수단 등을 제공하고 있지만, RNA 기반 플랫폼의 낮은 안정성에 대한 문제가 아직 남아있다. 따라서, 생체 내에서 암호화된 단백질의 더 나은 발현율을 제공하게 하는 향상된 mRNA 안정성 및 번역활성을 위한 플랫폼 개발이 필요하며, 본 발명에서는 발명은 (a) 목적 펩타이드 또는 목적 단백질을 암호화하는 RNA 서열 삽입 부분; (b) 상기 목적 펩타이드 또는 목적 단백질을 암호화하는 RNA 서열의 양 말단에 연결되는 5'-UTR과 3'-UTR; (c) 5'-UTR에 연결되는 5' 캡(cap); 및 (d) 3'-UTR에 연결되는 20~400개의 아데닌을 함유하는 폴리 A 테일 을 포함하는 인비트로 트랜스크립트(*in vitro* transcript) mRNA를 개발하였다(도 1). 본 발명의 방법으로 제작한, 아데닌을 120개 포함하는 폴리 A 테일(A120)을 가지는 인비트로 트랜스크립트 mRNA의 경우, A33C18, A0, A30 테일을 가지는 mRNA에 비하여, 투여된 동물세포 내에서 안정적으로 높은 목적 단백질을 발현율을 나타내었다.

- [37] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 본 발명은 발명은 (a) 목적 펩타이드 또는 목적 단백질을 암호화하는 RNA 서열 삽입 부분; (b) 상기 목적 펩타이드 또는 목적 단백질을 암호화하는 RNA 서열의 양 말단에 연결되는 5'-UTR과 3'-UTR;

- [38] (c) 5'-UTR에 연결되는 5' 캡(cap); 및 (d) 3'-UTR에 연결되는 20~400개의 아데닌을 함유하는 폴리 A 테일을 포함하는 인비트로 트랜스크립트(in vitro transcript) mRNA에 관한 것이다.
- [39] 본 발명에 있어서, 상기 목적유전자는 치료적으로 활성인 단백질 또는 펩타이드, 애췌반트 단백질, 항원, 종양 항원, 병원성 항원, 동물 항원, 바이러스성 항원, 원생동물성 항원, 박테리아성 항원, 알레르기성 항원, 자가면역 항원, 알레르겐, 항체, 면역자극성 단백질 또는 펩타이드 또는 항원-특이적 T-세포 수용체를 암호화하는 유전자인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [40] 본 발명에 있어서, 상기 5' 캡(cap)은 mRNA의 5' 시작 부위에 위치한 구성요소이다. 상기 Cap 구조는 단백질을 합성을 개시하고 핵산분해효소의 작용으로부터 mRNA를 보호하는 역할을 한다. 또한 5'Cap은 번역에도 영향을 준다. 번역 시작 과정에서 5' 캡(cap)은 eIF4E(eukaryote translation initiation factor 4 E)와 결합하여 40S 리보솜 서브유닛을 mRNA에 결합시킨다.
- [41] 본 발명에 있어서, 상기 5' 캡(cap)은 Cap-1 또는 ARCA(anti-reverse cap analog)인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [42] 본 발명에서는 캡핑(capping)과 전사를 동시에 수행하는 코-트랜스크립셔널 캡핑 방법을 사용하여 트랜스크립트(전사체)를 제작하는 경우, mMMESSAGE mMACHINETM T7 ULTRA Transcription kit (ThermoFisher Scientific)를 사용하여 ARCA-RNA를 합성하였다.
- [43] 아울러, 전사 후 캡핑(Post-transcriptional capping) 방법을 사용하는 경우는 MEGAscriptTM T7 transcription kit(ThermoFisher Scientific)를 사용하여 uncapped-RNA를 합성하였다.
- [44] 본 발명에서는 동물세포로의 목적유전자의 전달 및 발현을 위한 인비트로 트랜스크립트 mRNA의 플랫폼에 최적화된 5'Cap을 결정하고자 uncapped, Cap-0, Cap-1, ARCA를 가진 인비트로 트랜스크립트 mRNA를 합성하여, 293T 세포에서의 목적 단백질의 발현 정도를 비교하였으며, ARCA 및 Cap-1의 발현효율이 가장 우수한 것을 확인할 수 있었다(도 6). 그러나, ARCA와 같이 GTP 비율을 낮추고 cap 아날로그 비율을 높여 in vitro transcription과 동시에 캐핑(capping)을 하는 방법의 경우, uncapped RNA가 합성될 수 있다. 이는 선천성 면역(innate immunity)을 유발할 수 있기 때문에, 인비트로 트랜스크립트 mRNA의 플랫폼에는 효소를 이용한 전사 후 캡핑 시스템인 Cap-1이 더 적합한 것으로 판단하였다.
- [45] 본 발명에 있어서, 상기 목적유전자의 시작코돈의 상부에는 코작(Kozak) 서열이 추가되는 것이 바람직하며, 상기 목적유전자는 숙주세포에 대하여 코돈 최적화(codon optimization)된 서열을 가지는 것이 바람직하다.
- [46] 상기 폴리 (A) 테일(poly(A) tail)은 본 발명의 인비트로 트랜스크립트 mRNA의 3' 말단에 위치하는 구성요소이다. 5'-Cap과 함께 mRNA를 효소분해로부터 보호하는 역할을 하며, 그 길이가 충분하지 않을 경우 mRNA의 안정성이

떨어진다고 알려져있다. 폴리 A 테일은 번역(translation)에도 영향을 준다. 폴리 A 테일에 결합하는 단백질인 PABP(Poly(A) binding protein)는 번역의 시작과정에서 eIF4G(eukaryote translation initiation factor 4 G)와 결합하여 40S 리보솜 서브유닛을 mRNA에 부착시킨다.

- [47] 본 발명에 있어서, 상기 폴리 A 테일은 20~400개의 아데닌으로 구성되어 있는 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 30~200개의 아데닌으로 구성될 수 있으며, 더욱 바람직하게는 60~150개의 아데닌으로 구성될 수 있으며, 더더욱 바람직하게는 100~130개의 아데닌으로 구성될 수 있다.
- [48] 본 발명의 일 양태에서는 폴리 A 테일의 다양한 길이에 따른 mRNA의 번역 효율을 비교하기 위해, 기존 A33C18을 포함하여 아데닌을 각각 0개, 30개, 120개 포함하는 A0, A30 및 A120 테일을 갖는 주형 DNA를 제작한 후, 인비트로 트랜스크립션을 통해 생성된 mRNA를 293T 세포에 도입하여 목적 단백질의 발현 정도를 비교하였다. 그 결과, A0 테일에서는 IgM-D4 발현이 확인되지 않았고, A120 테일, A30 테일, A33C18 테일 순으로 발현이 잘 되는 것을 확인할 수 있었다(도 3).
- [49] 본 발명에 있어서, 상기 폴리 A 테일은 우라실(U), 시토신(C) 및 구아닌(G)으로 구성되는 군에서 선택되는 아데닌 이외의 하나 이상의 뉴클레오티드가 복수개의 아데닌 사이에 삽입되어 있는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 삽입되는 아데닌 이외의 뉴클레오티드는 2 내지 20개, 바람직하게는 4 내지 15개, 더욱 바람직하게는 6 내지 12개, 가장 바람직하게는 8 내지 10개의 아데닌 사이에 삽입되는 것을 특징으로 할 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [50] 본 발명의 일 양태에서는 non-A residue가 섞인 혼합 테일의 번역 효율을 비교하기 위해, 오리지널 A120 테일, A120-G 혼합 테일, A120-C 혼합 테일, A120-U 혼합 테일을 주형 DNA를 제작하였다. 각 주형을 바탕으로 인비트로 트랜스크립트 mRNA를 합성하고, 실시예 3과 동일한 방법으로, 293T 세포에서의 목적 단백질의 발현 정도를 비교하였다. 그 결과, U 혼합 테일의 mRNA의 발현 효율이 가장 우수한 것을 확인할 수 있었다.
- [51] 본 발명에 있어서, 상기 폴리 A 테일의 말단은 아데닌인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [52] in vitro transcription시 선형화된 DNA 주형을 사용하기 때문에, 주형 플라스미드 DNA 선형화를 위해 사용되는 제한효소에 따라 만들어진 mRNA의 폴리 A 테일 말단이 A 잔기로 끝날 수도 있고, 제한효소 인식부위를 포함할 수도 있다.

[53]



- [54] 폴리(A) 테일의 말단 모양에 따른 번역 정도를 비교하기 위해, *NheI* 또는 *SapI* 제한효소로 선형화시킨 주형을 바탕으로 non-complete, complete end mRNA를 합성하여, 목적 단백질의 발현 정도를 비교하였다. 그 결과, 말단이 온전히 A로 끝나는 테일을 갖는 mRNA의 발현 능력이 더 우수한 것을 확인할 수 있었다(도 4).
- [55] 본 발명에 있어서, 상기 인비트로 트랜스크립트(in vitro transcript) mRNA 서열의 우라실(U)의 전체 또는 일부가 변형된 U(modified U)로 치환되어 있는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 변형된 UTP는 pseudo UTP 또는 N1-methylpseudo UTP인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [56] 본 발명에 있어서, 상기 폴리 A 테일은 변형된 U(modified U)가 복수개의 아데닌 사이에 삽입되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [57] 본 발명의 일 양태에서는 동물세포로의 목적유전자의 전달 및 발현을 위한 인비트로 트랜스크립트 mRNA의 플랫폼에 적합한 변형 뉴클레오티드를 정하기 위해, modified CTP, UTP를 포함하는 인비트로 트랜스크립트 mRNA를 합성하여, 293T 세포에서의 목적 단백질의 발현 정도를 비교하였다.
- [58] 그 결과, modified UTP를 단일로 사용하여 mRNA의 U를 modified U로 100% 치환한 mRNA의 단백질 발현율이 가장 높은 것을 확인할 수 있었다(도 7). 아울러, 단백질 발현률이 우수하였던 U 혼합 테일과 접목시킨다면 시너지 효과를 나타낼 수 있을 것으로 판단되어, 추가적으로 modified UTP를 사용하여 mixed tail을 비교하였고 그 결과, U-mixed tail에서의 단백질 발현이 가장 우수한 것을 확인할 수 있었다.
- [59] 다른 관점에서, 본 발명은 (a) 상기 RNA 인비트로 트랜스크립트(in vitro transcript) mRNA에 대응하는 DNA 서열을 가지는 부분; 및 (b) 상기 인비트로 트랜스크립트(in vitro transcript) mRNA에 대응하는 DNA 서열의 전사를 위하여 RNA 중합효소가 결합하는 프로모터를 포함하는 인비트로 트랜스크립트(in vitro transcript) mRNA 제작을 위한 주형 DNA에 관한 것이다.
- [60] 본 발명에 있어서, 상기 프로모터는 T7 프로모터, T3 프로모터 및 SP6 프로모터로 구성되는 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [61] 본 발명에 있어서, 상기 주형 DNA는 폴리 A 테일과 연결되는 제한효소 인식 부위를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [62] 상기 제한효소 인식부위는 제한효소 처리 시 인비트로 트랜스크립트 mRNA 폴리 A 테일의 말단을 아데닌(A)으로 끝나도록 하는 서열인 것이 바람직하며, 상기 제한효소는 바람직하게는 *Nhe I* 또는 *SapI*인 것이 바람직하다.
- [63] 본 발명의 인비트로 트랜스크립트 mRNA를 제작하기 위해서는 일반적인 시험관내 전사반응을 통해 mRNA를 생산하기 때문에 모든 제작 공정을 시험관내(in vitro)에서 수행하게 된다. 즉, 효소적으로 말단이 절단되어 선형화된 DNA를 주형으로 이용하여 T7, SP6, 혹은 T3 RNA polymerase에 의해서 RNA를 시험관에서 합성하기 때문에 일반적인 생백신이나 사백신 제조에 사용하는

살아 있는 바이러스나 미생물을 직접 다룰 필요가 없다. 더구나 제조합 백신(제조합 단백질) 생산을 위해 반드시 사용해야 하는 효모, 대장균, 곤충 세포 배양 등이 불필요하다.

[64] 또 다른 관점에서, 본 발명은 상기 인비트로 트랜스크립트(in vitro transcript) mRNA를 포함하는 백신용 약학조성물에 관한 것이다.

[65] 본 발명의 인비트로 트랜스크립트(in vitro transcript) mRNA에는 목적유전자로 치료적으로 활성인 단백질 또는 펩타이드, 애췌반트 단백질, 항원, 종양 항원, 병원성 항원, 동물 항원, 바이러스성 항원, 원생동물성 항원, 박테리아성 항원, 알레르기성 항원, 자가면역 항원, 알레르겐, 항체, 면역자극성 단백질 또는 펩타이드 또는 항원-특이적 T-세포 수용체를 암호화하는 유전자 등이 삽입될 수 있으며, 상기 삽입된 유전자의 종류에 따라, 자가면역질환, 감염성 질환, 암 또는 종양 관련 질환, 염증성 질환 등에 대한 유전자 백신으로 사용할 수 있다.

[66] 또 다른 관점에서, 본 발명은 상기 인비트로 트랜스크립트(in vitro transcript) mRNA를 투여하는 단계를 포함하는 질병의 예방 또는 치료방법에 관한 것이다.

[67] 또 다른 관점에서, 본 발명은 또한, 질병의 예방 또는 치료를 위한, 상기 인비트로 트랜스크립트(in vitro transcript) mRNA의 용도에 관한 것이다.

[68] 또 다른 관점에서, 본 발명은 또한, 질병의 예방 또는 치료를 위한, 상기 인비트로 트랜스크립트(in vitro transcript) mRNA의 사용을 관한 것이다.

[69]

[70] 인비트로 트랜스크립트(in vitro transcript) mRNA 플랫폼은 현재의 백신 생산법을 완전히 새롭게 변화시킬 혁신적인 백신 생산 기술이다. 최근 들어 메르스 바이러스, 코로나-19 같은 신변종 바이러스나 지카 바이러스 같이 과거부터 존재하였으나 갑자기 문제를 야기하는 바이러스들이 새롭게 발생하는 경우가 많다. 하지만 이러한 모든 감염원에 대해서 항상 백신을 준비하는 것은 현실적으로 불가능한 일이다. 이러한 위기 대응 백신 조건에 가장 부합하는 생산 플랫폼은 인비트로 트랜스크립트(in vitro transcript) mRNA가 유일하다. mRNA의 생산은 매우 소량의 주형 DNA 만을 가지고 있으면 1~2주 안으로 국가 필수 필요량인 30만 도스를 생산할 수 있다. mRNA의 인비트로 생산에는 생물학적 반응기가 불필요하며, 감염원을 직접 다룰 필요가 없이 모든 관련 유전자를 합성으로 처리하여 백신을 생산할 수 있는 유일한 백신 생산 플랫폼이기 때문이다.

[71]

[72] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[73]

[74] 실시예 1: 주형 DNA의 제작

- [75] 인비트로 트랜스크립트 mRNA 제작을 위하여 주형으로 필요한 주형 플라스미드 DNA(주형 pDNA)를 제작하였다. 목적단백질 유전자는 토마토 형광 단백질 유전자를 사용하였다.
- [76] 주형 pDNA에 목적 단백질 유전자를 삽입하기 위해, 토마토 형광 단백질 유전자(서열번호 1)를 포함하는 pTdTomato-N1 벡터를 주형으로 하여 목적 단백질 유전자를 PCR로 증폭시켰다.
- [77] 프라이머 디자인 시 목적 단백질 유전자의 양 끝 20 bp를 annealing site로 사용하며, 양 끝에 EcoRI 인식서열-Kozak 서열, HindIII 인식서열이 추가되도록 디자인된 PCR용 프라이머를 사용하였다.
- [78] - forward primer : 5' at gaattc gccacc atggtgagcaaggcgagga 3'(서열번호 3)
- [79] reverse primer : 5' at aagctt ttactgtacagctcgcca 3'(서열번호 4)
- [80] PCR 반응을 수행 후, 전기영동으로 증폭된 tomato 형광단백질 유전자를 확인하고, MEGAquick-spin™ plus Fragment DNA Purification Kit(iNtRON)을 사용하여 정제하였다. 그 다음, in vitro transcription template pDNA(서열번호 2)와 해당 tomato 형광단백질 DNA를 제한효소 EcoRI와 HindIII (Thermofisher)을 사용하여 절단 한 후, MEGAquick-spin™ plus Fragment DNA Purification Kit로 정제한 다음 T4 ligase(Enzymomics)를 이용하여 라이게이션 반응을 진행하였다.
- [81] 라이게이션 후, 플라스미드를 DH5α 컴피던트 셀에 트랜스포메이션 후, 37 °C에서 하룻밤 배양 후, 배양된 콜로니에서 pDNA 분리하여, 염기서열 분석(sequencing service, 코스모진텍)을 통해 주형 pDNA 서열을 확인하였다.
- [82]
- [83] 실시예 2: mRNA의 인비트로(in vitro) 합성
- [84] 인비트로 트랜스크립트 mRNA(전사체 mRNA)는 실시예 1에서 제작한 주형 플라스미드 DNA를 주형으로 사용하여 T7 RNA 중합효소를 통해서 in vitro에서 합성하였다.
- [85] 먼저 주형 플라스미드 DNA를 NheI 또는 SapI 제한효소(Thermofisher Scientific)를 사용하여 폴리 (A) 테일 직후를 잘라 선형화하고, MEGAquick-Spin™ plus Fragment DNA Purification Kit(Intron)를 사용하여 정제하여, 주형 DNA를 수득하고, 상기 수득된 주형 DNA를 이용하여 인비트로 트랜스크립션(In vitro transcription)을 수행하였다(도 2).
- [86] 먼저, 캡핑(capping)과 전사를 동시에 수행하는 코-트랜스크립셔널 캡핑 방법을 사용하여 트랜스크립트(전사체)를 제작하는 경우, mMESSAGE mMACHINETM T7 ULTRA Transcription kit (Thermofisher Scientific)를 사용하여 ARCA-RNA를 합성하였다.
- [87] 전사 후 캡핑(Post-transcriptional capping) 방법을 사용하는 경우는 MEGAscript™ T7 transcription kit(Thermofisher Scientific)를 사용하여 uncapped-RNA를 합성하였다. 키트의 프로토콜을 따라 실험을 진행하였으며, 실험 방법은 다음과 같다.

[88] 선형화한 주형 DNA 1 μ g에 키트별 용액들을 표 1 또는 표 2와 같이 넣고 최종 부피를 20 μ L의 혼합용액(mixed solution)을 제조하였다. 5-methyl-CTP, pseudo-UTP, and N1-methylpseudo-UTP (TriLink)와 같은 변형 뉴클레오티드를 사용할 경우, 농도를 고려하여 해당 뉴클레오티드를 변형 뉴클레오티드로 100% 치환하여 사용하였다.

[89]

[90] [표1]

ARCA-RNA 합성을 위한 mMESSAGE mMACHINETM T7 ULTRA Transcription kit 반응용 혼합용액 조성

linear template DNA	1 μ L
T7 enzyme mix	2 μ L
10X T7 Reaction buffer	2 μ L
T7 2X NTP/ARCA	10 μ L
Nuclease free water	Upto 20 μ L

[91]

[92] [표2]

Uncapped-RNA 합성을 위한 MEGAscriptTM T7 transcription kit - 반응용 혼합용액 조성

linear template DNA	1 μ g
T7 enzyme mix	2 μ L
10X Reaction buffer	2 μ L
Enzyme mix	2 μ L
75 mM ATP solution	2 μ L
75 mM CTP solution	2 μ L
75 mM GTP solution	2 μ L
75 mM UTP solution	10 μ L
Nuclease free water	Upto 20 μ L

[93] 상기 제조된 혼합 용액을 37 °C에서 하룻밤 반응시킨 후, DNase 1 μ L를 첨가하여 37 °C에서 15분 반응시키고, 끝으로, Lithium chloride*를 이용하여 합성된 인비트로 트랜스크립트 RNA(서열번호 5)를 정제하였다.

[94] 합성된 uncapped-RNA에 Cap-0, Cap-1를 캡핑(capping)할 경우, 각각 ScriptCapTM M7G Capping System kit(CELLSCRIPT)와 ScriptCapTM Cap-1 Capping System kit (CELLSCRIPT)를 사용하였으며, 제조사의 프로토콜을 따라 실험을 진행하였다. 실험 방법은 다음과 같다.

[95] Uncapped-RNA 55 μ g을 최종 부피 68.5 μ L 또는 67 μ L로 희석하여 65°C 10 분간 반응시키고, 반응 후 얼음에서 냉각시키고, 표 3 및 표 4와 같이 프리믹스를 제조하였다.

[96]

[97] [표3]

Cap-0 캡핑용 ScriptCap™ M7G Capping System kit 프리믹스

10X ScriptCap Capping Buffer	10 μ L
10 mM GTP	10 μ L
2 mM SAM	5 μ L
ScriptGuard RNase inhibitor	2.5 μ L
ScriptCap Capping Enzyme (10 U/mL)	4 μ L
Total volume	31.5 uL

[98]

[99] [표4]

Cap-1 캡핑용 ScriptCap™ Cap-1 Capping System kit 프리믹스

10X ScriptCap Capping Buffer	10 μ L
10 mM GTP	10 μ L
20 mM SAM	2.5 μ L
ScriptGuard RNase inhibitor	2.5 uL
ScriptCap 2'-O-Methyltransferase (100 U/mL)	4 μ L
ScriptCap Capping Enzyme (10 U/mL)	4 μ L
Total volume	33 μ L

[100]

[101] 상기 제조한 프리믹스 용액에 uncapped-RNA를 넣고 37°C에서 30분간 반응을 진행한 후, 리튬클로라이드(LiCl)을 이용하여 Cap-0, Cap-1-RNA를 정제하였다.

[102] LiCl 정제방법은 다음과 같다: 7.5 M LiCl 용액 (Thermofisher) 및 뉴클레이즈-프리 정제수를 RNA 용액과 1:1:1로 혼합한 혼합액을 -20°C에서 30분간 반응시킨 후, 13000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상등액을 제거하고, 70% 에탄올을 첨가한 후 13000 rpm에서 5분간 원심분리하고, 상등액을 제거한 후, RNA 펠렛을 뉴클레이즈-프리 정제수에 녹여, 정제된 RNA를 수득하였다.

[103]

[104] 실시예 3: 포유동물 세포로의 mRNA 도입 및 목적 단백질 발현 확인

[105] 293T 세포(ATCC CRL-3216)를 6웰 플레이트에 70~80% 컨플루언트하게 시딩한 다음, DMEM/HIGH GLUCOSE (HyClone™) 배지에서 하룻밤 배양하였다. 실시예 2에서 수득한 인비트로 트랜스크립트 mRNA 2.5 μ g과 5 μ L의

Lipofectamine TM2000 (Thermofisher scientific, USA)을 각각 Opti-MEMTM(Thermofisher scientific, USA) 200 μ L에 섞고 10분간 실온에서 반응시킨 후, 두 용액을 혼합하여 혼합용액을 만든 후, 실온에서 5분간 반응시켰다.

- [106] 상기 6웰 플레이트에 배양된 293T 세포의 세포 배양액을 serum과 항생제가 첨가되지 않은 DMEM/HIGH GLUCOSE (HyCloneTM) 배지로 갈아준 다음, 상기 혼합 용액을 첨가하였다. 4시간 후, 배양액을 10% Fetal Bovine Serum(HyCloneTM)와 1% antibiotics(HyCloneTM)를 첨가한 배지로 갈아준 다음 24시간 배양하였다. 24시간 배양 후, 세포들을 DPBS로 세척한 다음, 프로테이즈 저해제(Roche, Basel, Swiss)를 포함하는 RIPA buffer(Biosesang, 한국)를 첨가하고 4 °C에서 30분간 세포를 용해시켰다. 세포 용해 후, 13000 rpm에서 30분 원심분리하여 상등액을 분리하고, BCA 어세이를 통해 단백질을 정량하였다. 정량한 각 용해물 샘플에 5X SDS-PAGE 샘플버퍼를 넣고 100 °C에서 10분간 끓였다. SDS-PAGE를 통해 단백질을 크기별로 분리한 다음 PVDF 막으로 트랜스퍼하고, 5% BSA + 5% skim milk (in phosphate-buffer containing 0.1% Tween-20) 10 mL 첨가하고 4°C에서 하룻밤 반응시켰다. 그 후, anti PA-D4 항체 (ABION, Seoul, South Korea, in dilution buffer, 5% skim milk in phosphate buffer containing 0.1% Tween-20)의 1:5000 희석용액 10 mL를 넣고 실온에서 3시간 반응시켰다. 0.1% Tween-20 인산버퍼로 세척한 다음, 막에 HRP conjugated goat anti-mouse IgG (H+L)(Thermofisher scientific, MA, USA)을 넣고 실온에서 1시간 반응시켰다. 마지막으로, 세척 후 EZ-Western Lumi Femto(DOGEN, Seoul, South Korea) 용액을 통해 현상하여 인비트로 트랜스크립트 mRNA로부터 발현된 목적 단백질을 확인하였다.

[107]

- [108] 실시예 4: 리얼타임 형광 분석을 이용한 발현 확인 방법

- [109] 293T 세포(ATCC CRL-3216)를 6웰 플레이트에 70~80% 컨플루언트하게 시딩한 다음, 하룻밤 배양하였다. 실시예 2에서 수득한 인비트로 트랜스크립트 mRNA 2.5 μ g과 5 μ L의 Lipofectamine TM2000 (Thermofisher scientific, USA)을 각각 Opti-MEMTM(Thermofisher scientific, USA) 200 μ L에 섞고 10분간 실온에서 반응시킨 후, 두 용액을 혼합하여 혼합용액을 만든 후, 실온에서 5분간 반응시켰다.

- [110] 상기 6웰 플레이트에 배양된 293T 세포의 세포 배양액을 serum과 항생제가 첨가되지 않은 DMEM/HIGH GLUCOSE (HyCloneTM) 배지로 갈아준 다음, 상기 혼합 용액을 첨가하였다. 세포 배양 플레이트를 IncuCyteTM(Sartorius, Germany)에 넣고 1시간 마다 적색 형광을 측정하였다. 4시간 후, 배양액을 10% Fetal Bovine Serum(HyCloneTM)와 1% antibiotics(HyCloneTM)를 첨가한 배지로 갈아준 다음 48시간 배양하였다.

[111]

- [112] 실시예 5: 인비트로 트랜스크립트 mRNA의 폴리 A 테일의 최적화
- [113] 폴리 (A) 테일(poly(A) tail)은 본 발명의 인비트로 트랜스크립트 mRNA의 3' 말단에 위치하는 구성요소이다. 5'-Cap과 함께 mRNA를 효소분해로부터 보호하는 역할을 하며, 그 길이가 충분하지 않을 경우 mRNA의 안정성이 떨어진다고 알려져있다. 폴리 A 테일은 번역(translation)에도 영향을 준다. 폴리 A 테일에 결합하는 단백질인 PABP(Poly(A) binding protein)는 번역의 시작과정에서 eIF4G(eukaryote translation initiation factor 4 G)와 결합하여 40S 리보솜 서브유닛을 mRNA에 부착시킨다.
- [114] 동물세포로의 목적유전자의 전달 및 발현을 위한 인비트로 트랜스크립트 mRNA의 플랫폼에 최적화된 폴리 A 테일을 결정하고자, 1) 폴리 A 테일의 길이, 2) 말단의 모양, 3) A가 아닌 잔기의 혼합 유무에 따른 다양한 mRNA를 *in vitro* transcription을 통해 생산하여 목적 단백질의 발현 수준을 비교하였다.
- [115] 1) 폴리 A 테일의 길이
- [116] 다양한 길이에 따른 mRNA의 번역 효율을 비교하기 위해, 기존 A₃₃C₁₈을 포함하여 아데닌을 각각 0개, 30개, 120개 포함하는 A₀, A₃₀ 및 A₁₂₀ 테일을 갖는 주형 DNA를 제작하였다. 각 주형 DNA를 바탕으로 실시예 2와 동일한 방법으로 인비트로 트랜스크립션 및 Cap-1 캡핑을 수행하여 mRNA를 합성하고, 실시예 3과 동일한 방법으로, 293T 세포에서의 목적 단백질의 발현 정도를 비교하였다.
- [117] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, A₀ 테일에서는 IgM-D4 발현이 확인되지 않았고, A₁₂₀ 테일, A₃₀ 테일, A₃₃C₁₈ 테일 순으로 발현이 잘 되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 테일의 길이가 길수록 디아데닐레이션(deadenylation)으로 인해 A 테일이 사라지는 시간이 오래 걸려 비교적 안정성이 높고, 길이가 길어짐에 따라 PABP 단백질이 더 잘 결합하여, 번역 효율이 증가되기 때문이라고 판단된다.
- [118] 2) 말단 모양
- [119] *in vitro* transcription시 선형화된 DNA 주형을 사용하기 때문에, 주형 플라스미드 DNA 선형화를 위해 사용되는 제한효소에 따라 만들어진 mRNA의 폴리 A 테일 말단이 A 잔기로 끝날수도, 제한효소 인식부위를 포함할수도 있다.
- [120]



- [121] 폴리(A) 테일의 말단 모양에 따른 번역 정도를 비교하기 위해, NheI 또는 SapI 제한효소로 선형화시킨 주형을 바탕으로 non-complete, complete end mRNA를 합성하여, 실시예 3과 동일한 방법으로, 293T 세포에서의 목적 단백질의 발현 정도를 비교하였다.
- [122] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 말단이 온전히 A로 끝나는 테일을 갖는 mRNA의 발현 능력이 더 우수한 것을 확인할 수 있었다. 제한효소 인식부위의

일부를 포함하는 non-complete 테일은 complete 폴리 A 테일과 달리 3'→5'엑소뉴클레이즈를 제대로 막지 못하기 때문이라고 판단된다.

[123] 3) 아데닌이 아닌 NT(non-A residue)의 혼합

[124] TENT4A, 4B에 의해 A 테일에 생긴 non-A residue가 디아데닐레이즈 작용을 방해한다는 논문을 참고하여, non-A residue가 섞인 혼합 테일의 번역 효율을 비교하기 위해, 오리지널 A₁₂₀ 테일, A₁₂₀-G 혼합 테일, A₁₂₀-C 혼합 테일, A₁₂₀-U 혼합 테일을 주형 DNA를 제작하였다. 각 주형을 바탕으로 인비트로 트랜스크립트 mRNA를 합성하고, 실시예 3과 동일한 방법으로, 293T 세포에서의 목적 단백질의 발현 정도를 비교하였다.

[125] 그 결과, U 혼합 테일 mRNA의 발현 효율이 가장 우수한 것을 확인할 수 있었다. G, C 혼합 테일과 오리지널 테일의 경우는 리얼타임 형광 검출 결과에서는 일관적으로 오리지널 테일의 발현효율이 가장 안좋은 것으로 나타났으나, 웨스턴 블롯 결과에서는 일관적으로 나타나지 않았다. 그러나, 모든 실험에서 A₁₂₀-U 혼합 테일의 발현 효율이 가장 우수하게 나타나, 폴리 A 테일에 non-A residue가 존재할 경우 디아데닐레이즈 작용이 저해되며 U가 가장 잘 저해하는 것으로 판단된다.

[126]

[127] 실시예 6: 인비트로 트랜스크립트 mRNA의 5'-Cap의 최적화

[128] 5'Cap은 mRNA의 5'시작부위에 위치한 구성요소이다. 폴리 A 테일과 마찬가지로 mRNA 분해를 방지하는 역할을 한다고 알려져 있다. 또한 5'Cap은 번역에도 영향을 준다. 번역 시작 과정에서 5'Cap은 eIF4E(eukaryote translation initiation factor 4 E)와 결합하여 40S 리보솜 서브유닛을 mRNA에 결합시킨다.

[129] 동물세포로의 목적유전자의 전달 및 발현을 위한 인비트로 트랜스크립트 mRNA의 플랫폼에 최적화된 5'Cap을 결정하고자 uncapped, Cap-0, Cap-1, ARCA를 가진 인비트로 트랜스크립트 mRNA를 합성하여, 실시예 3과 동일한 방법으로, 293T 세포에서의 목적 단백질의 발현 정도를 비교하였다.

[130] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, ACRA 및 Cap-1의 발현효율이 가장 우수한 것을 확인할 수 있었다. 그러나, ARCA와 같이 GTP 비율을 낮추고 cap 아날로그 비율을 높여 *in vitro* transcription과 동시에 캐핑(capping)을 하는 방법의 경우, uncapped RNA가 합성될 수 있다. 이는 선천성 면역(*innate immunity*)을 유발할 수 있기 때문에, 인비트로 트랜스크립트 mRNA의 플랫폼에는 효소를 이용한 전사 후 캐핑 시스템인 Cap-1이 더 적합한 것으로 판단하였다.

[131]

[132] 실시예 6: 인비트로 트랜스크립트 mRNA 최적화를 위한 변형 뉴클레오티드(modified nucleotide)치환

[133] 변형 뉴클레오티드를 사용하는 것은 호스트 내의 선천성 면역 센서(*innate immune sensor*)를 피할 수 있으며 번역 활성을 향상시킨다고 알려져있다.

[134] 동물세포로의 목적유전자의 전달 및 발현을 위한 인비트로 트랜스크립트

mRNA의 플랫폼에 적합한 변형 뉴클레오티드를 정하기 위해, modified CTP((5-Methylcytidine-5'-Triphosphate (TriLink biotechnologies)), modified UTP((Pseudouridine-5'-Triphosphate (TriLink biotechnologies) 및 N1-Methylpseudouridine-5'-Triphosphate (TriLink biotechnologies))를 포함하는 인비트로 트랜스크립트 mRNA를 합성하여, 실시예 3과 동일한 방법으로, 293T 세포에서의 목적 단백질의 발현 정도를 비교하였다.

- [135] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, modified UTP를 단일로 사용하여 mRNA의 U를 modified U로 100% 치환한 mRNA의 단백질 발현율이 가장 높은 것을 확인할 수 있었다. 아울러, 실시예 4의 혼합 테일(mixed tail)에서, 단백질 발현률이 우수하였던 U 혼합 테일과 접목시킨다면 시너지 효과를 나타낼 수 있을 것으로 판단되어, 추가적으로 modified UTP를 사용하여 mixed tail을 비교하였고 그 결과, 예상대로 modified U를 사용한 U-mixed tail에서의 단백질 발현이 가장 우수한 것을 확인할 수 있었다. modified-UTP가 mRNA 구조를 안정화시키는데 우수한 역할을 하는 것으로 추정된다.

[136]

산업상 이용가능성

- [137] 본 발명에 따른 목적유전자를 포함하는 인비트로 트랜스크립트(in vitro transcript) mRNA를 동물세포에 주입하는 경우, 다량의 목적단백질을 동물세포에서 발현시킬 수 있어, 자가면역질환, 감염성 질환, 암 또는 종양 관련 질환, 염증성 질환 등에 대한 유전자 백신으로 사용할 수 있다.

[138]

- [139] 이상으로 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다. 본 발명의 단순한 변형 내지 변경은 이 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의하여 용이하게 이용될 수 있으며, 이러한 변형이나 변경은 모두 본 발명의 영역에 포함되는 것으로 볼 수 있다.

[140]

서열목록 Free Text

- [141] 전자파일 첨부하였음.

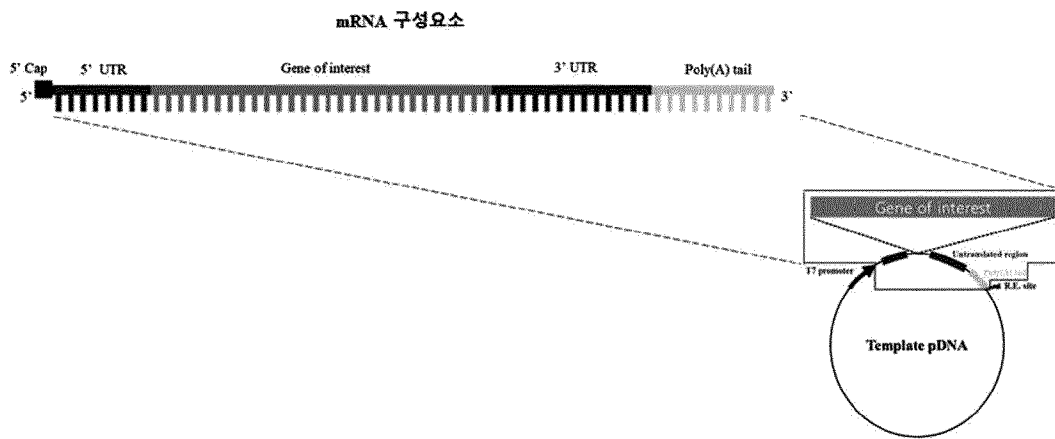
청구범위

- [청구항 1] 다음을 포함하는 인비트로 트랜스크립트(in vitro transcript) mRNA;
 (a) 목적 펩타이드 또는 목적 단백질을 암호화하는 RNA 서열 삽입 부분;
 (b) 상기 목적 펩타이드 또는 목적 단백질을 암호화하는 RNA 서열의 양 말단에 연결되는 5'-UTR과 3'-UTR;
 (c) 5'-UTR에 연결되는 5' 캡(cap); 및
 (d) 3'-UTR에 연결되는 20~400개의 아데닌을 함유하는 폴리 A 테일.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 폴리 A 테일은 30~200개의 아데닌을 함유하는 것을 특징으로 하는 인비트로 트랜스크립트(in vitro transcript) mRNA.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 폴리 A 테일은 우라실(U), 시토신(C) 및 구아닌(G)으로 구성되는 군에서 선택되는 아데닌 이외의 하나 이상의 뉴클레오티드가 복수개의 아데닌 사이에 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는 인비트로 트랜스크립트(in vitro transcript) mRNA.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 삽입되는 아데닌 이외의 뉴클레오티드는 2 내지 20개의 아데닌 사이에 삽입되는 것을 특징으로 하는 인비트로 트랜스크립트(in vitro transcript) mRNA.
- [청구항 5] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 폴리 A 테일의 말단은 아데닌인 것을 특징으로 하는 인비트로 트랜스크립트(in vitro transcript) mRNA.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 5' 캡(cap)은 Cap-1 또는 ARCA(anti-reverse cap analog)인 것을 특징으로 하는 인비트로 트랜스크립트(in vitro transcript) mRNA.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 인비트로 트랜스크립트(in vitro transcript) mRNA 서열의 우라실(U)의 전체 또는 일부가 변형된 U(modified U)로 치환되어 있는 것을 특징으로 하는 인비트로 트랜스크립트(in vitro transcript) mRNA.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 변형된 UTP는 pseudo UTP 또는 N1-methylpseudo UTP인 것을 특징으로 하는 인비트로 트랜스크립트(in vitro transcript) mRNA.
- [청구항 9] 제3항에 있어서, 상기 폴리 A 테일은 변형된 U(modified U)가 복수개의 아데닌 사이에 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는 인비트로 트랜스크립트(in vitro transcript) mRNA.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 변형된 UTP는 pseudo UTP 또는 N1-methylpseudo UTP인 것을 특징으로 하는 인비트로 트랜스크립트(in vitro transcript) mRNA.
- [청구항 11] 제1항에 있어서, 상기 목적 펩타이드 또는 목적 단백질은 치료적으로 활성인 단백질 또는 펩타이드, 애주반트 단백질, 항원, 종양 항원, 병원성

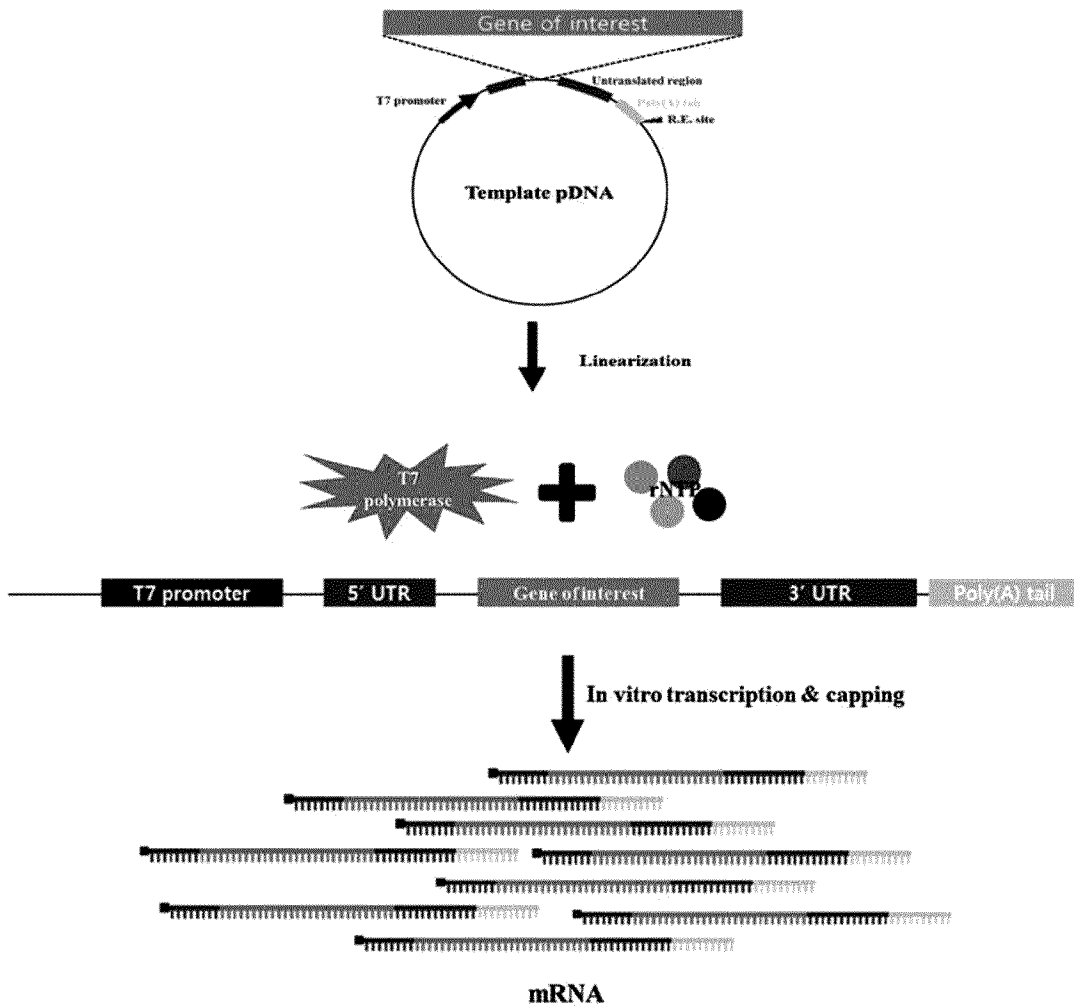
항원, 동물 항원, 바이러스성 항원, 원생동물성 항원, 박테리아성 항원, 알레르기성 항원, 자가면역 항원, 알레르겐, 항체, 면역자극성 단백질 또는 펩타이드 또는 항원-특이적 T-세포 수용체인 것을 특징으로 하는 인비트로 트랜스크립트(in vitro transcript) mRNA.

- [청구항 12] 다음을 포함하는 인비트로 트랜스크립트(in vitro transcript) mRNA 제작을 위한 주형 DNA;
- (a) 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 RNA 인비트로 트랜스크립트(in vitro transcript) mRNA에 대응하는 DNA 서열을 가지는 부분; 및
- (b) 상기 인비트로 트랜스크립트(in vitro transcript) mRNA에 대응하는 DNA 서열의 전사를 위하여 RNA 중합효소가 결합하는 프로모터.
- [청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 프로모터는 T7 프로모터, T3 프로모터 및 SP6 프로모터로 구성되는 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 주형 DNA.
- [청구항 14] 제12항에 있어서, 상기 인비트로 트랜스크립트(in vitro transcript) mRNA에 대응하는 DNA 서열을 가지는 부분에 포함된 폴리 A 테일과 연결되는 제한효소 인식 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는 주형 DNA.
- [청구항 15] 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 인비트로 트랜스크립트(in vitro transcript) mRNA를 포함하는 백신용 약학조성물.

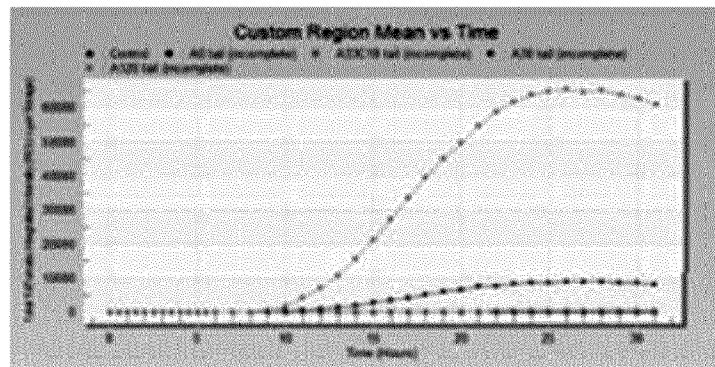
[도1]



[도2]



a



b

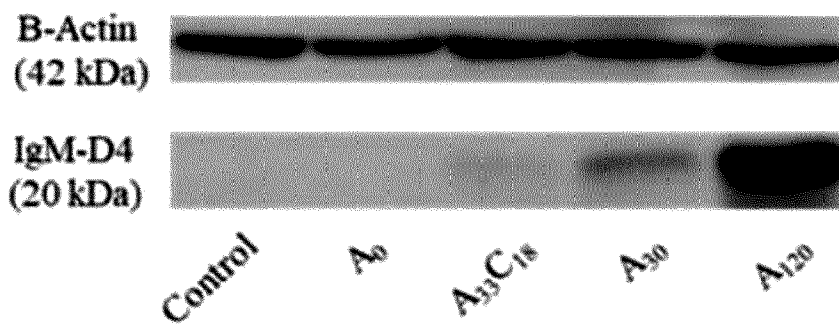


Figure 1 is a line graph titled "Custom Region Mean vs Time". The x-axis represents "Time (hours)" from 0 to 40. The y-axis represents the "Custom Region Mean" from 0 to 50,000. Three data series are plotted: "A12Z test (dashed line)", "Control 2.1 µg/ml" (solid line with dots), and "A12Z test (complete)" (dotted line). The "A12Z test (dashed line)" shows a sharp increase starting around 10 hours, peaking at approximately 50,000 at 25 hours, and then gradually decreasing. The "Control 2.1 µg/ml" and "A12Z test (complete)" remain relatively flat and low, near zero, throughout the 40-hour period.

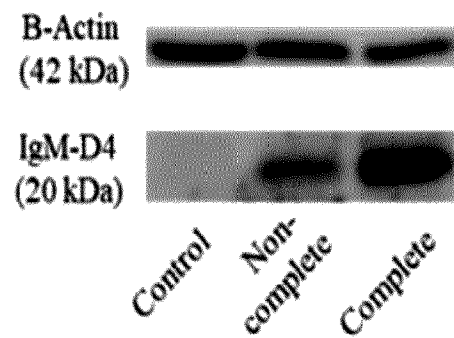
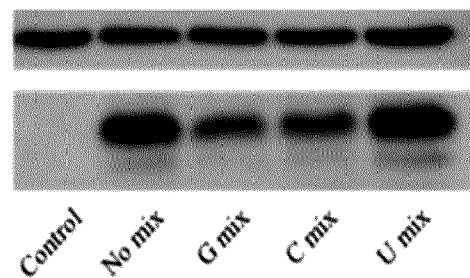


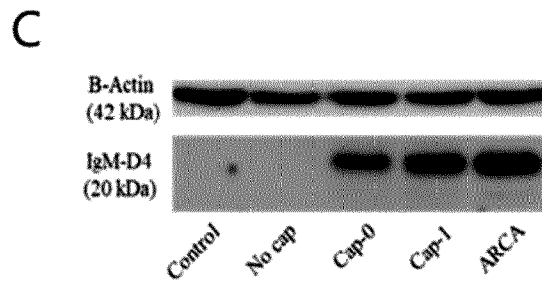
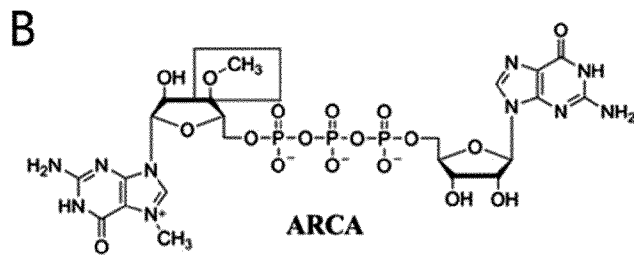
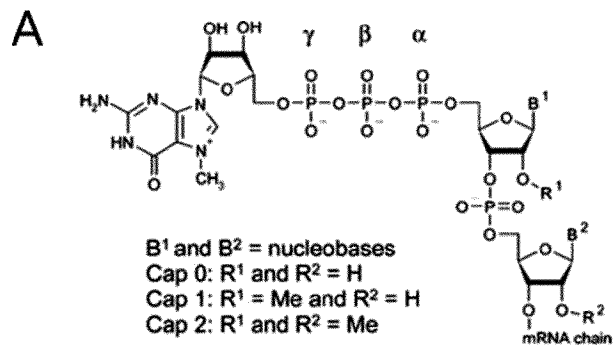
Figure 1 is a line graph titled "Custom Region Mean vs Time". The x-axis is labeled "Time (Hours)" and ranges from 0 to 20. The y-axis ranges from 0 to 1500. There are four data series:

- Control**: Represented by a solid line with filled circles. It remains very close to the x-axis (y=0) throughout the 20-hour period.
- A1000 cal (open circles)**: This series rises sharply from 0 at 5 hours to a peak of approximately 1200 at 12 hours, then gradually declines to about 800 by 20 hours.
- A1000 cal (open squares)**: This series rises sharply from 0 at 5 hours to a peak of approximately 1500 at 12 hours, then gradually declines to about 900 by 20 hours.
- A1000 cal (open triangles)**: This series rises sharply from 0 at 5 hours to a peak of approximately 1300 at 12 hours, then gradually declines to about 850 by 20 hours.

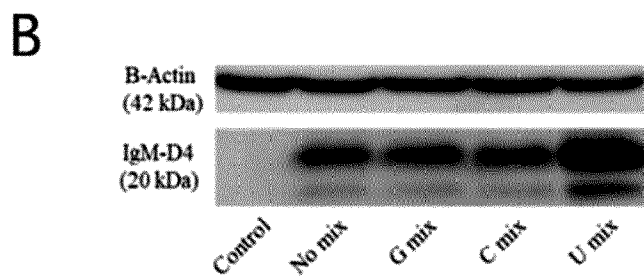
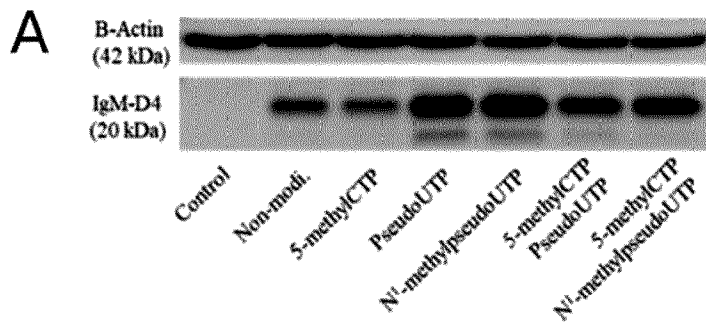
 The legend at the top of the graph identifies these four series.



[도6]



[도7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/003281

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 15/85(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 15/85(2006.01); C12N 15/10(2006.01); C12N 15/11(2006.01); C12N 15/67(2006.01); C12N 15/86(2006.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 인비트로 트랜스크립트(in vitro transcript), mRNA, 백신(vaccine), 폴리 A 테일 (poly A tail), 아데닌(adenine)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019-121803 A1 (BASECLICK GMBH) 27 June 2019 (2019-06-27) See abstract; figure 6; pages 17-18; and claims 1 and 3-6.	1-10
Y		11
Y	PARDI, N. et al. mRNA vaccines-a new era in vaccinology. Nature reviews Drug discovery. 2018, vol. 17, pp. 261-279. See boxes 2 and 4; and pages 11, 13 and 15.	11
A	KR 10-2018-0127360 A (BIONTECH RNA PHARMACEUTICALS GMBH et al.) 28 November 2018 (2018-11-28) See abstract; and claims 1-7 and 22.	1-11
A	WO 2013-071047 A1 (CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION) 16 May 2013 (2013-05-16) See abstract; and claims 1-23.	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 "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 06 July 2021		Date of mailing of the international search report 06 July 2021
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/003281**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	STEINLE, H. et al. Generation of iPSCs by nonintegrative RNA-based reprogramming techniques: Benefits of self-replicating RNA versus synthetic mRNA. Stem cells international. 2019, vol. 2019, thesis no.: 7641767, pp. 1-16. See abstract; figure 1; and page 6.	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/003281

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/003281

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: **13-14**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 13-14 refer to multiple dependent claims not meeting the requirement of PCT Rule 6.4(a).
3. ☒ Claims Nos.: **12,15**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/003281

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2019-121803	A1	27 June 2019	AU	2018-391796	A1	09 July 2020
				BR	112020012538	A2	24 November 2020
				CA	3086237	A1	27 June 2019
				CN	112673106	A	16 April 2021
				EP	3502258	A1	26 June 2019
				EP	3728602	A1	28 October 2020
				JP	2021-511016	A	06 May 2021
				KR	10-2020-0103750	A	02 September 2020
				US	2021-0069232	A1	11 March 2021
KR	10-2018-0127360	A	28 November 2018	AU	2017-236240	A1	20 September 2018
				BR	112018068391	A2	15 January 2019
				CA	3017285	A1	28 September 2017
				CN	109328233	A	12 February 2019
				EP	3433368	A1	30 January 2019
				JP	2019-509048	A	04 April 2019
				MX	2018011384	A	13 February 2019
				RU	2018131783	A	22 April 2020
				RU	2018131783	A3	14 July 2020
				SG	11201807378	A	30 October 2018
				US	2020-0299724	A1	24 September 2020
				WO	2017-162265	A1	28 September 2017
				WO	2017-162461	A1	28 September 2017
				ZA	201805520	B	27 November 2019
WO	2013-071047	A1	16 May 2013	None			

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 15/85(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 15/85(2006.01); C12N 15/10(2006.01); C12N 15/11(2006.01); C12N 15/67(2006.01); C12N 15/86(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 인비트로 트랜스크립트(in vitro transcript), mRNA, 백신(vaccine), 폴리 A 테일(poly A tail), 아데닌(adenine)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	WO 2019-121803 A1 (BASECLICK GMBH) 2019.06.27 요약; 도면 6; 페이지 17-18; 청구항 1, 3-6	1-10
Y		11
Y	PARDI, N. 등, mRNA vaccines-a new era in vaccinology. Nature reviews Drug discovery, 2018, 17권, 페이지 261-279 박스 2, 4; 페이지 11, 13, 15	11
A	KR 10-2018-0127360 A (비온테크 알엔에이 파마슈티컬스 게엠베하 등) 2018.11.28 요약; 청구항 1-7, 22	1-11
A	WO 2013-071047 A1 (CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION) 2013.05.16 요약; 청구항 1-23	1-11
A	STEINLE, H. 등, Generation of iPSCs by nonintegrative RNA-based reprogramming techniques: Benefits of self-replicating RNA versus synthetic mRNA, Stem cells international, 2019, 2019권, 논문번호:7641767, 페이지 1-16 초록; 도면 1; 페이지 6	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 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2021년07월06일(06.07.2021)		국제조사보고서 발송일 2021년07월06일(06.07.2021)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 정다원 전화번호 +82-42-481-5373

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

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

- a. ☒ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - ☒ 부록 C/ST.25 텍스트 파일
 - ☐ 서면 혹은 이미지 파일
- b. ☐ PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록
- c. ☐ 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록
 - ☐ 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))
 - ☐ 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).

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

3. 추가 의견:

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

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

1. ☐ 청구항:
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,

2. ☒ 청구항: **13-14**
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
청구항 13-14는 PCT 규칙 제 6.4조(a)의 규정을 충족시키지 않는 다수 종속청구항을 인용하고 있습니다.

3. ☒ 청구항: **12,15**
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2019-121803 A1	2019/06/27	AU 2018-391796 A1	2020/07/09
		BR 112020012538 A2	2020/11/24
		CA 3086237 A1	2019/06/27
		CN 112673106 A	2021/04/16
		EP 3502258 A1	2019/06/26
		EP 3728602 A1	2020/10/28
		JP 2021-511016 A	2021/05/06
		KR 10-2020-0103750 A	2020/09/02
		US 2021-0069232 A1	2021/03/11
KR 10-2018-0127360 A	2018/11/28	AU 2017-236240 A1	2018/09/20
		BR 112018068391 A2	2019/01/15
		CA 3017285 A1	2017/09/28
		CN 109328233 A	2019/02/12
		EP 3433368 A1	2019/01/30
		JP 2019-509048 A	2019/04/04
		MX 2018011384 A	2019/02/13
		RU 2018131783 A	2020/04/22
		RU 2018131783 A3	2020/07/14
		SG 11201807378 A	2018/10/30
		US 2020-0299724 A1	2020/09/24
		WO 2017-162265 A1	2017/09/28
		WO 2017-162461 A1	2017/09/28
		ZA 201805520 B	2019/11/27
WO 2013-071047 A1	2013/05/16	없음	