



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0058681
(43) 공개일자 2025년04월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/39 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 39/39 (2013.01)

A61K 2039/55516 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2024-0142468

(22) 출원일자 2024년10월17일

심사청구일자 2024년10월17일

(30) 우선권주장

1020230141446 2023년10월20일 대한민국(KR)

(71) 출원인

중앙대학교 산학협력단

서울특별시 동작구 흑석로 84 (흑석동)

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

서영진

서울특별시 양천구 신목로12길 22

홍소희

서울특별시 관악구 성현로 80

이인구

서울특별시 동작구 상도로47바길 22

(74) 대리인

이원희

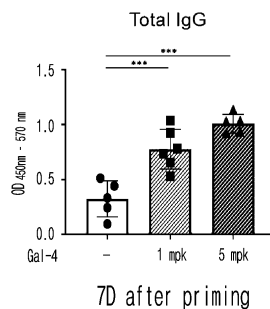
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 갈렉틴-4를 유효성분으로 하는 백신용 면역보조제 조성물

(57) 요약

본 발명은 항원과 함께 투여될 경우, 항체의 역가를 향상시키고, 세포성 면역과 체액성 면역을 증진시킬 수 있는 갈렉틴-4를 유효성분으로 포함하는 백신용 면역보조제 조성물, 상기 갈렉틴-4와 항원을 포함하는 백신 조성물, 상기 백신용 면역보조제 조성물을 백신 조성물과 함께 또는 상기 백신 조성물 투여 전후로 개체에 투여하는 단계를 포함하는 면역반응 촉진방법 및 상기 갈렉틴-4를 포함하는, 면역반응 촉진용 백신보조제 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 백신용 면역보조제 조성물은, 항원에 의해 생성된 항체의 역가를 증진시킬 뿐만 아니라, 체액성 면역반응과 세포성 면역반응을 모두 증진시킬 수 있으므로, 백신의 효율을 증대시킬 수 있을 뿐 아니라, 항원 사용량을 절감시키는 효과를 제공하여 백신의 생산 단가를 낮추고, 암 치료 백신에도 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 2039/572 (2013.01)

A61K 2039/575 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711184416
과제번호	2018R1A5A1025077
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원
연구과제명	미생물 생존 시스템 연구센터
과제수행기관명	중앙대학교
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345347335
과제번호	2021R1I1A1A01041639
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축
연구과제명	항원제시세포 활성화를 통한 Galectin-4의 면역증강 효능 확인
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

갈렉틴-4를 유효성분으로 포함하는 백신용 면역보조제(adjuvant) 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 갈렉틴-4는 서열번호 1 또는 서열번호 3의 아미노산 서열과 적어도 70% 이상 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는 것인, 백신용 면역보조제 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 갈렉틴-4는 세포성 면역과 체액성 면역을 동시에 증가시키는 것인, 백신용 면역보조제 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

IgG1 및 IgG2a의 생성량을 증대시키는, 백신용 면역보조제 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

CD8 T세포의 인터페론-감마 생성량을 증대시키는, 백신용 면역보조제 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

MHC(Major Histocompatibility Complex)-I 발현을 증가시키는 유전자인 H-2K^b, β 2m, Lmp2, 및 Tap1 로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 유전자의 발현량을 증대시키는, 백신용 면역보조제 조성물.

청구항 7

항원과 갈렉틴-4를 포함하는, 백신 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 항원은 바이러스 항원, 암 항원, 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 항원인 것인, 백신 조성

물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 바이러스 항원은 EBV(Epstein-Barr virus), HAV(hepatitis A virus), HBV(hepatitis B virus), HCV(hepatitis C virus), HDV(hepatitis D virus), HEV(hepatitis E virus), 한탄바이러스(Hantaan virus), CMV(cytomegalovirus), HIV(human immunodeficiency virus), 독감 바이러스(influenza virus), HPV(human papilloma virus), 소아마비 바이러스(poliovirus), 에볼라 바이러스(ebolavirus), 로타바이러스(rotavirus), 땡기열바이러스(dengue virus), 웨스트나일 바이러스(West Nile virus), 황열바이러스(yellow fever virus), 아데노바이러스(adenovirus), 일본 뇌염 바이러스(Japanese encephalitis virus), BK 바이러스(BK virus), 천연두 바이러스(smallpox virus), 지카 바이러스(Zika virus), 중증열성혈소판감소증후군 바이러스(SFTS virus), HSV(herpes simplex virus), 및 림프구성 맥락수막염 바이러스(Lymphocytic choriomeningitis virus, LCMV)로 구성된 군으로부터 선택되는 바이러스로부터 유래된 것이고,

상기 암 항원은 인유두종바이러스(HPV) 유래 항원, 태아성 암항원(carcinoembryonic antigen), 전립선 특이적 항원(PSA), 전립선 특이적 막항원(PSMA), Her2/neu, MUC-1, BCR/ABL, 알파-페토프로테인(AFP), 엡스타인 바 바이러스(EBV) 유래 항원, 인간간염바이러스 B(HBV) 유래 항원, 인간간염바이러스 C(HCV) 유래 항원, 암항원 125(CA-125), 암항원-72-4(CA-72-4), 암항원-15-3(CA-15-3), 암항원-19-9(CA-19-9), 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 항원인 것인, 백신 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 바이러스 항원은 독감 바이러스(influenza virus) 또는 림프구성 맥락수막염 바이러스(Lymphocytic choriomeningitis virus, LCMV)에서 유래된 것인, 백신 조성물.

청구항 11

갈락틴-4를 포함하는, 면역반응 촉진용 백신보조제 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 면역반응은 체액성 면역반응, 세포성 면역반응, 또는 상기 둘 모두인, 면역반응 촉진용 백신보조제 조성물.

청구항 13

갈락틴-4를 유효성분으로 포함하는 백신용 면역보조제 조성물의 약학적으로 유효한 양을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 면역반응 촉진 방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 면역반응은 체액성 면역반응, 세포성 면역반응, 또는 상기 둘 모두인, 면역반응 촉진 방법.

청구항 15

백신 조성물이 투여된 개체의 면역반응을 증진시키기 위한, 갈렉틴-4를 유효성분으로 포함하는 면역보조제 조성물의 용도.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 백신 조성물은 항원을 포함하고,

상기 항원은 바이러스 항원, 암 항원, 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 용도.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 바이러스 항원은 EBV(Epstein-Barr virus), HAV(hepatitis A virus), HBV(hepatitis B virus), HCV(hepatitis C virus), HDV(hepatitis D virus), HEV(hepatitis E virus), 한탄바이러스(Hantaan virus), CMV(cytomegalovirus), HIV(human immunodeficiency virus), 독감 바이러스(influenza virus), HPV(human papilloma virus), 소아마비 바이러스(poliiovirus), 에볼라 바이러스(ebolavirus), 로타바이러스(rotavirus), 땡기열바이러스(dengue virus), 웨스트나일 바이러스(West Nile virus), 황열바이러스(yellow fever virus), 아데노바이러스(adenovirus), 일본 뇌염 바이러스(Japanese encephalitis virus), BK 바이러스(BK virus), 천연두 바이러스(smallerpox virus), 지카 바이러스(Zika virus), 중증열성혈소판감소증후군 바이러스(SFTS virus), HSV(herpes simplex virus), 및 림프구성 맥락수막염 바이러스(Lymphocytic choriomeningitis virus, LCMV)로 구성된 군으로부터 선택되는 바이러스로부터 유래된 것이고,

상기 암 항원은 인유두종바이러스(HPV) 유래 항원, 태아성 암항원(carcinoembryonic antigen), 전립선 특이적 항원(PSA), 전립선 특이적 막항원(PSMA), Her2/neu, MUC-1, BCR/ABL, 알파-페토프로테인(AFP), 엡스타인 바 바이러스(EBV) 유래 항원, 인간간염바이러스 B(HBV) 유래 항원, 인간간염바이러스 C(HCV) 유래 항원, 암항원 125(CA-125), 암항원-72-4(CA-72-4), 암항원-15-3(CA-15-3), 암항원-19-9(CA-19-9), 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 항원인 것인, 용도.

청구항 18

질환을 예방 또는 치료하는 방법으로서,

질환의 예방 또는 치료를 필요로 하는 개체에서,

백신 조성물과 동시 또는 이시에 갈렉틴-4를 포함하는 면역보조제 조성물의 약학적으로 유효한 양을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 19

제18항에 있어서,

상기 질환이 바이러스성 질환, 암성 질환 또는 상기 둘 다인 것을 특징으로 하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규한 면역보조제(adjuvant)로서 갈락틴-4 단백질을 포함하는 백신용 면역보조제 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 백신 개발에 있어서 면역원성을 높여주는 면역보조제 내지 면역증강제의 중요성이 두드러지면서 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

[0003] 전 세계에서 시판된 백신들 중 면역보조제를 함유하고 있는 제제는 약 20종에 불과하며, 사용되는 면역보조제의 종류도 6종(Alum, MF59, AS01, AS03, AS04, Virosome)에 불과하다.

[0004] Alum이 1932년 첫 면역보조제로 허가되었고, 현재까지 가장 많이 백신에 사용되고 있으며, 그 다음으로 oil-in-water emulsion 형태인 MF59가 개발되어 인플루엔자 백신과 계절 인플루엔자 백신에 사용허가를 받아 활용되고 있다. 개발되고 있는 제제들은 훨씬 더 많고 종류도 다양하다.

[0005] TLR, NOD, STING과 같은 PRR을 자극하게 되면 적응면역반응을 높일 수 있음이 밝혀짐에 따라, 새로운 백신 면역보조제의 강력한 후보군으로 PRR 작용체를 사용하는 연구가 이루어지고 있다.

[0006] 정상적인 백신 효과가 나타나지 않는 영아들이나 노년층에서 충분한 백신 효과를 제공하기 위해 면역보조제를 이용한 활발한 연구들이 진행되고 있다.

[0007] 현재 사용되고 있는 면역보조제의 단점을 보완할 수 있는 면역보조제 개발연구가 다수 진행되고 있지만, 실제로 개발되어 상용화된 면역보조제는 매우 한정적이다.

[0008] 백신 접종에 의해 유도되는 면역반응은 크게 항체 면역반응과 세포성 면역반응으로 나뉜다. 대부분의 병원성 세균이나 바이러스 감염에는 항체가 기본적인 방어 작용을 하므로 항체만으로도 예방 효과가 충분하지만, 세포 내 감염을 일으키는 세균 또는 바이러스 백신은 세포성 면역반응이 방어 작용하는 경우가 많기 때문에, 세포성 면역반응을 유도하는 면역보조제를 이용한 백신 개발의 필요성이 커지고 있다.

[0009] HIV, 결핵, 말라리아에 대한 효과적인 백신은 여전히 개발에 있어 어려움을 겪고 있다. 기존의 대부분 백신은 효과적인 항체 면역반응을 유발하여 다양한 전염병으로부터 보호하지만, 앞서 언급한 질병들의 경우 항체 면역반응으로 백신의 보호 효과를 나타내기 어렵기 때문에, 백신의 보호 효과를 증강시키기 위한 면역보조제에 대한 필요성이 대두되고 있다.

[0010] 갈락틴은 베타-갈락토사이드 잔기에 강하게 결합할 수 있는 탄수화물 인식 도메인을 공통적으로 가지고 있는 렉틴 단백질이다. 갈락틴은 당에 결합하는 특징으로 인해 체내의 반응을 상당수 매개할 수 있으며, 세포 증식, 분화, 활성화, 사멸 등에 작용하는 것으로 알려져 있다. 현재까지 총 15개 종류의 갈락틴이 포유류에서 발견되었으며, 인간에서는 12개의 갈락틴이 발견되었다.

[0011] 갈락틴-4는 특히 소화관에서 많이 발현하는 갈락틴으로, 2개의 탄수화물 인식 도메인을 가지고 있는 연쇄반복 구조를 가지고 있다. 갈락틴-4는 렉틴의 특성상 세포-세포 혹은 세포-기질 사이의 반응을 매개하며, 대표적으로 세포막의 지질 뗏목에 결합하여 단백질 수송과 지질 뗏목 안정화를 유도하고, 세포 외부로의 물질 수송에 관여하는 것으로 알려져 있다. 또한, 박테리아의 혈액형 항원에 결합하여 항박테리아 효과를 나타내며, 장의 상처 회복을 촉진하고, 신경 세포의 축삭돌기 성장과 수초화를 촉진하는 것으로 알려져 있다.

[0012] 갈락틴-4의 병리학적 연구는 다양한 암종에서 수행되어 왔다. 예를 들어, 대장암에서 대장 조직의 갈락틴-4 발현 정도가 정상 대장 조직에서보다 현저히 낮은 것으로 알려져 있고, 갈락틴-4의 낮은 발현과 대장암 세포의 증식, 전이, 이동성과 관련이 있는 것으로 보고되어 있다. 대장암 세포에서 갈락틴-4는 Wnt/ β -카테닌, 인터류킨-6, NF- κ B, STAT3 신호전달체계를 조절하여 대장암 세포의 종양 형성을 억제하는 것으로 알려져 있다. 갈락틴-4의 기능은 체장암, 간세포암과도 연관이 있는 것으로 알려져 있다.

[0013] 갈락틴-4는 대장 염증 반응에서도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 갈락틴-4는 T 세포 수용체 돌연변이 대장염이 유발된 생쥐에서 CD4 T 세포에 결합하여 인터류킨-6의 생산을 유도해 대장염을 촉진하고 지속적으로 대장에서의 염증 반응을 유지해 만성 대장 질환을 유발하는 것으로 알려져 있다. 반면, 야생형 생쥐에 대장염을

유발한 경우에는 갈렉틴-4는 CD4 T 세포의 세포 사멸을 유도하여 대장에서의 염증 반응이 완화되는 것으로 보고되어 있다.

[0014] 암과 관련한 연구에 비해, CD4 T 세포 외에 갈렉틴-4가 영향을 미치는 면역 세포에 대한 연구는 거의 없다. 갈렉틴-4가 인간의 혈액 내 단핵구에 결합하여 대식세포와 유사하게 분화를 유도하고, 생쥐의 M2 대식세포에 결합하여 강한 염증 반응을 유도할 수 있음이 알려져 있다.

[0015] 그러나, 갈렉틴-4가 백신을 위한 면역보조제로써 면역반응을 증가시킬 수 있음을 입증한 연구는 전혀 없다.

[0016] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 사백신, 단백질 백신을 포함한 다양한 백신에 적용할 수 있는 면역보조제를 개발하기 위하여 부단한 연구를 수행한 결과, 갈렉틴-4를 백신용 면역보조제의 유효성분으로 사용할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0017] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 10-2016-0087244 (2016.07.21.)

(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허 10-2021-0056927 (2021.05.20.)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0018] 본 발명의 주된 목적은 갈렉틴-4를 유효성분으로 포함하는 백신용 면역보조제 조성물을 제공하는 것이다.

[0019] 본 발명의 다른 목적은 항원과 갈렉틴-4를 포함하는 백신 조성물을 제공하는 것이다.

[0020] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 백신 조성물이 투여된 개체의 면역반응을 증진시키기 위한, 갈렉틴-4를 유효성분으로 포함하는 면역보조제 조성물의 용도를 제공하는 것이다.

[0021] 본 발명의 또 다른 목적은 갈렉틴-4를 유효성분으로 포함하는 백신용 면역보조제 조성물의 약학적으로 유효한 양을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 면역반응 촉진 방법을 제공하는 것이다.

[0022] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 백신 조성물과 동시 또는 이시에 갈렉틴-4를 포함하는 면역보조제 조성물의 약학적으로 유효한 양을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

[0023] 본 발명의 또 다른 목적은 갈렉틴-4를 포함하는, 면역반응 촉진용 백신보조제 조성물을 제공하는 것이다.

[0024] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 기술한 과제로 제한되지 않으며, 기술되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0025] 상술한 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 실시형태는 갈렉틴-4를 유효성분으로 포함하는 백신용 면역보조제 조성물을 제공한다.

[0026] 본 명세서에서 용어 "갈렉틴-4"는 갈렉틴 패밀리에 속하는 단백질로서, 인간에서 *LGALS4* 유전자에 의해 코딩되는 단백질이다.

[0027] 갈렉틴-4는 그 기원에 제한은 없으며, 천연 유래의 것 또는 재조합 단백질을 사용할 수 있다.

[0028] 예를 들어, 하기의 마우스 또는 인간에서 유래된 갈렉틴-4를 사용할 수 있다.

[0029] 마우스 Gal-4 아미노산 서열 (서열번호 1)

[0030] mayvpapgyq ptynpntlpyk rpipgglsvg msvyiqgmak enmrrfhvnf avgqddgadv afhfnprfdg wdkvvfntmq sgqwgkeekk
ksmpfqkgkh felvfvmpe hykvvnngns fyeyghrlpv qmvtlqlvdg dlqlqsinfl ggqpaaapyp gamtipaypa gspgynppqm
ntlpvmtgpp vfnprvpyvg alqggltvrr tiiikgyvp tarnfvinfk vgssgdialh lnprigdsfv rnsfmngswg aeerkvaynp
fgpgqffdlis ircgmdrfkv fangqhlfdl shrfqafqmv dtleingdit lsvvqi

[0031] 마우스 gal-4 뉴클레오타이드 서열 (서열번호 2)

[0032] atggcctatg ttccagcacc gggctaccag cccacctaca atccgactct gccctacaag agacccatcc cagggtggcct
cagtgtcggg atgtccgttt acatccaagg aatggccaaa gagaacatga gacgggttcca cgtgaacttc gctgtggggc aggatgatgg
ggcggatgtt gctttccact tcaatccccg cttttagtggc tgggacaagg tggctttcaa cacgatgcaa agtggacaat ggggcaagga
agagaagaag aagagcatgc ctttccagaa gggcaagcac ttcgagctgg tgttcatggt catgcctgag cactacaagg tcgtggtgaa
cggaaattcc ttctatgaat acgggcaccg gttacctgta cagatggta cccatctgca agtggatggg gacctggaac ttcagtccat
caacttcctc ggaggccaac cagctgcagc cccatatccg ggagccatga ctattccagc ttaccctgct gggagtcctg ggtacaaccc
tccacagatg aacaccttgc ctgtcatgac aggaccccca gtcttcaatc cgcgtgtgcc atagtgtggg gctctgcagg ggggccttac
agtccgaaga accatcataa tcaagggata tgtacttcct acagccagga actttgtcat caacttcaag gtgggacgt ccggagacat
agctttacac ctaaaccccc gcataggatga cagtgtggtt cgcaacagct ttatgaatgg ctcttggggc gctgaagaga ggaaggtggc
ctacaaccca tttagccctg ggcagttctt tgatctgtca atccgctgcg gcatggatcg attcaaggtg ttgccaatg gccagcacct
tttcgacttc tcccatcggt tccaagcatt ccaaatggta gacacgtgg agatcaatgg tgacatcacc ttgtctacg tccagatctg a

[0033] 인간 Gal-4 아미노산 서열 (서열번호 3)

[0034] mayvpapgyq ptyntplpyy qpipgglnvg msvyiqgvas ehmkrrffvnf vvgqdpgsdv afhfnprfdg wdkvvfnt lq ggkgwseerk
rsmfpfkkaa felvfivlae hykvvnngnp fyeyghrlpl qmvtlhlqvd dlqlqsinfi ggqplrpqgp pmmppypgpg hchqqlnslp
tmegpptfnp pvpyfgrlqg gltartrtiii kgyvpptgks fainfkvgss gdialhinpr mngntvvrns llngswgsee kkithnpfgp
gqffdlisirc gldrfkvyvan ghlfdfahr lsafqrvtl eiqgdvtlsy vqil

[0035] 인간 Gal-4 뉴클레오타이드 서열 (서열번호 4)

[0036] atggcctatg tccagcacc gggctaccag cccacctaca acccgacgct gccttactac cagcccatcc cgggcgggct caacgtggga
atgtctgttt acatccaagg agtggccagc gagcacatga agcgggttctt cgtgaacttt gtggttgggc aggatccggg ctccagacgtc
gccttccact tcaatccgcg gtttgacggc tgggacaagg tggctttcaa cacgttgcag ggcgggaagt ggggcagcga ggagaggaag
aggagcatgc ctttcaaaa ggggtccgcc tttgagctgg tcttcatagt cctggctgag cactacaagg tgggtgtaaa tggaaatccc
ttctatgagt acgggcaccg gcttccccta cagatggta cccacctgca agtggatggg gatctgcaac tccaatcaat caacttcac
ggaggccagc ccctccggcc ccagggaccc ccgatgatgc caccttacc tgggtccgga cattgccatc aacagctgaa cagcctgccc
accatggaag gacccccaac cttcaaccg cctgtgccat atttcgggag gctgcaagga gggctcacag ctggaagaac catcatcatc
aagggtcatg tgcttccac aggaagagc tttgctatca acttcaaggt gggctcctca ggggacatag ctctgcacat taatccccgc
atgggcaacg gtaccgtgtt ccggaacagc cttctgaatg gctcgtgggg atccgaggag aagaagatca cccacaaccc atttggtccc
ggacagtctt ttgatctgtc cattcgctgt ggcttggatc gcttcaaggt ttacccaat ggccagcacc tctttgactt tgcccatcgc
ctctcggcct tccagaggtt ggacacattg gaaatccagg gtgatgtcac ctgtctctat gtccagatct tg

[0037] 갈렉틴-4는 서열번호 1 또는 3으로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 것일 수 있고, 바람직하게는 100% 동일한 것일 수 있다.

[0038] 갈렉틴-4는 서열번호 2 또는 4로 표시되는 뉴클레오타이드 서열과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있고, 바람직하게는 100% 동일한 것일 수 있다.

[0039] 본 명세서에서, 용어 "백신용 면역보조제(vaccine adjuvant)"는 백신의 면역반응을 향상시킬 목적으로 투여되는 약학적 또는 면역학적 제제(agent)를 의미한다.

[0040] 본 발명에 따른 백신용 면역보조제 조성물은 항원과 함께 투여될 경우, 항체의 역가를 향상시키고, 세포성 면역과 체액성 면역을 동시에 증진시킬 수 있다.

[0041] 갈렉틴-4는 항원제시세포인 대식 세포와 수지상 세포를 특이적으로 자극하여, 백신 활성을 증강시킬 수 있으므로, 면역보조제로서 특히 유용하다. 본 발명에 따른 백신용 면역보조제 조성물은 IgG1 및/또는 IgG2a의 생성량을 증대시킬 수 있다.

[0042] 갈렉틴-4는 MHC(Major Histocompatibility Complex)-I 발현을 증가시키는 유전자인 H-2K^b, β 2m, Lmp2, 또는 Tap1 발현량을 증대시킴으로써 수지상세포의 표면에 MHC-I 발현을 증가시킬 수 있고, 이로써 수지상세포의 항원 제시 능력을 증대시킬 수 있다.

- [0043] 본 발명에 따른 백신용 면역보조제 조성물은 CD8 T세포의 인터페론-감마 생성량을 증대시킬 수 있다.
- [0044] 본 발명의 백신용 면역보조제 조성물은 상기 갈렉틴-4 외에 약학적으로 허용가능한 담체, 보조제, 부형제, 희석제 또는 이들의 혼합물을 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 용어 "약학적으로 허용가능한"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, 칼슘실리케이트, 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.
- [0046] 본 발명의 면역보조제 조성물은 상기 면역보조제 외에 통상적으로 사용되는 백신용 면역보조제를 추가로 포함할 수 있으며, 이러한 백신용 면역보조제로는 알루미늄 하이드록사이드, 알루미늄 포스페이트, 알루미늄 셀레이트), MF59, virosome, AS04[알루미늄 하이드록사이드 및 모노포스포릴 리피드 A(MPL)의 혼합물], AS03(DL α -tocopherol, squalene 및 유화제인 polysorbate 80의 혼합물), CpG, Flagellin, Poly I:C, AS01, AS02, ISCOMs, ISCOMATRIX 등이 사용될 수 있다.
- [0047] 또한, 상기 백신용 면역보조제 조성물은 포유동물에 투여 시, 활성 성분의 신속한 방출, 또는 지속 또는 지연된 방출이 가능하도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 제형은 분말, 과립, 정제, 에멀전, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캡셀, 멸균 주사용액, 멸균 분말 형태를 포함한다.
- [0048] 본 발명의 백신용 면역보조제 조성물은 다양한 경로로 투여될 수 있으며, 예를 들면, 경구, 비경구, 예를 들면, 좌제, 경피, 정맥, 복강, 근육내, 병변내, 비강, 척추관내 투여로 투여될 수 있으며, 또한 서방형 또는 연속적 또는 반복적 방출을 위한 이식장치를 사용하여 투여될 수 있다. 투여 횟수는 원하는 범위 내에서 하루에 1회, 또는 수회로 나누어 투여할 수 있으며, 투여 기간도 특별히 한정되지 않는다.
- [0049] 본 발명의 백신용 면역보조제 조성물은 일반적인 전신성 투여 또는 국소성 투여, 예컨대, 근육내 주사 또는 정맥 주사 방식으로 투여될 수 있다.
- [0050] 본 발명의 백신용 면역보조제 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 이와 같은 투여경로는 비경구 투여, 예를 들어, 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 활막강 내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0051] 본 발명의 백신용 면역보조제 조성물은 일반적으로 사용되는 약학적으로 허용가능한 담체와 함께 적합한 형태로 제형화될 수 있다. 약학적으로 허용가능한 담체로는, 예를 들면, 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코스 및 글리콜 등과 같은 비경구 투여용 담체 등이 있으며 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다.
- [0052] 본 발명의 백신용 면역보조제 조성물은 그 투여방법이나 제형에 따라 필요한 경우, 현탁제, 용해보조제, 안정화제, 등장화제, 보존제, 흡착방지제, 계면활성화제, 희석제, 부형제, pH 조정제, 무통화제, 완충제, 산화방지제 등을 적절히 포함할 수 있다. 상기에 예시된 것들을 비롯하여 본 발명에 적합한 약학적으로 허용가능한 담체 및 제제는 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 최신판]에 상세히 기재되어 있다.
- [0053] 본 발명의 백신용 면역보조제 조성물을 개체에 투여할 경우, 투여되는 개체의 신장, 체표면적, 연령, 투여되는 특정 화합물, 성별, 투여 시간 및 경로, 일반적인 건강, 및 동시에 투여되는 다른 약물들을 포함하는 많은 요소들에 따라 투여량을 변화시킬 수 있다. 일 예로서, 100 ng/체중(kg) 내지 10 mg/체중(kg)의 양으로 투여될 수 있고, 다른 예로서, 1 내지 500 μ g/kg(체중)으로 투여될 수 있으며, 또 다른 예로서, 5 내지 50 μ g/kg(체중)으로 투여될 수 있다.
- [0054] 본 발명의 백신용 면역보조제 조성물 및 백신 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여된다.
- [0055] 본 발명의 용어 "약학적으로 유효한 양"이란, 의학적 치료에 적용가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양 및/또는 백신 효과를 나타낼 수 있을 정도의 충분한 양과 부작용이나 심각한 또는 과도한 면역반응을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 일 예로서, 0.1 mg/kg 내지 1 g/kg의 용량으로 투

여될 수 있고, 다른 예로서, 1mg/kg 내지 500 mg/kg의 투여량으로 투여될 수 있으며, 상기 투여량은 환자의 나이, 성별 및 상태에 따라 적절히 조절될 수 있다. "치료상 유효량(또는 유효용량)" 결정시 고려되는 다양한 일반적인 사항들은 당업자에게 공지되어 있으며, 예를 들어, 문헌 [Gilman et al, eds, Goodman And Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8th ed, Pergamon Press, 1990] 및 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed, Mack PublishingCo, Easton, Pa, 1990] 등에 기재되어 있다.

- [0056] 본 발명의 다른 실시형태에 따르면, 본 발명은 항원; 및 면역보조제 성분으로서 갈렉틴-4를 유효성분으로 포함하는 백신 조성물을 제공한다.
- [0057] 본 발명의 다른 실시형태에 따르면, 본 발명은 백신 조성물이 투여된 개체의 면역반응을 증진시키기 위한, 갈렉틴-4를 유효성분으로 포함하는 면역보조제 조성물의 용도를 제공한다.
- [0058] 본 명세서에서, “면역반응의 증진”은 개체에서 면역반응을 유도하거나 자극하고/하거나 원하는 생리학적, 면역학적 또는 약리학적 효과, 예컨대 질환 또는 관련 증상의 경감, 완화, 지연, 치료, 완치를 비롯하여 종양 크기 감소 및/또는 종양 전이 억제 등의 유익한 결과가 얻어지도록 면역반응을 촉진, 강화, 증대시키는 것을 의미한다. 또한, 면역반응의 증진은 바이러스의 증식을 비롯하여 암 발생 및/또는 암의 전이를 완전히 또는 부분적으로 예방하는 것도 포함하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0059] 본 명세서에서, 용어 “개체”는 인간을 포함한 포유동물을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 개체에는 본원에서 사용되는 바이러스 항원 또는 암 항원에 의해 유발되는 질환을 진단받은 개체(환자)를 포함된다. 또한 질환 또는 관련 증상이 나타나지 않았지만, 예를 들어, 가족력이 있고 질환 발생의 유전적 소인이 의심되는 개체와 같이 아직 질환이 진단되지 않은 개체도 포함된다. 따라서, 가장 넓은 의미에서, “개체”라는 용어는 이미 현재 치료가 필요한 개체뿐만 아니라, 바이러스 항원 또는 암 항원 관련 질환의 발생의 위험이 있는 개체를 포함한다.
- [0060] 본 명세서에서 사용된 용어, “항원(antigen)”은 수용자의 면역반응을 유도하는 물질이다. 따라서, 본 발명에서는 이러한 면역반응 유도 활성을 나타내는 물질을 제한 없이 사용할 수 있다.
- [0061] 항원은 펩티드, 단백질, 핵산, 당(sugar), 병원균, 약독화된 병원균, 비활성화된 병원균, 바이러스-유사 입자(VLP), 세포 또는 세포 파쇄물일 수 있다.
- [0062] 항원은 생체내에서 면역반응을 유도할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 바이러스 항원, 암항원 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0063] 바이러스 항원으로는, EBV(Epstein-Barr virus), HAV(hepatitis A virus), HBV(hepatitis B virus), HCV(hepatitis C virus), HDV(hepatitis D virus), HEV(hepatitis E virus), 한탄바이러스(Hantaan virus), CMV(cytomegalovirus), HIV(human immunodeficiency virus), HIV(Human influenza virus)를 포함하는 독감 바이러스(influenza virus), HPV(human papilloma virus), 소아마비 바이러스(poliovirus), 에볼라 바이러스(ebolavirus), 로타바이러스(rotavirus), 뎅기열바이러스(dengue virus), 웨스트나일 바이러스(West Nile virus), 황열바이러스(yellow fever virus), 아데노바이러스(adenovirus), 일본 뇌염 바이러스(Japanese encephalitis virus), BK 바이러스(BK virus), 천연두 바이러스(smallpox virus), 지카 바이러스(Zika virus), 중증열성혈소판감소증후군 바이러스(SFTS virus), HSV(herpes simplex virus), 림프구성 맥락수막염 바이러스(Lymphocytic choriomeningitis virus, LCMV) 등과 같은 다양한 바이러스로부터 유래된 바이러스 항원을 예로 들 수 있다.
- [0064] 암 항원으로는 인유두종바이러스(HPV) 유래 항원, 태아성 암항원(carcinoembryonic antigen), 전립선 특이적 항원(PSA), 전립선 특이적 막항원(PSMA), Her2/neu, MUC-1, BCR/ABL, 알파-페토프로테인(AFP), 엡스타인 바 바이러스(EBV) 유래 항원, 인간간염바이러스 B(HBV) 유래 항원, 인간간염바이러스 C(HCV) 유래 항원, 암항원-125(CA-125), 암항원-72-4(CA-72-4), 암항원-15-3(CA-15-3), 암항원-19-9(CA-19-9) 등과 같은 다양한 항원을 예로 들 수 있다.
- [0065] 본 발명의 백신 조성물은 그의 기본적인 조성, 즉 항원과 갈렉틴-4만으로도 충분한 면역반응을 유도하여 특정 질환에 대한 예방 효능을 발휘할 수 있다. 선택적으로, 본 발명의 백신 조성물은 위에서 언급한 추가의 면역보조성분을 더 포함할 수 있다.
- [0066] 백신 조성물은 살모넬라 백신, 암 백신, 독감 백신, 결핵 백신, 탄저균 백신, HAV 백신, HBV 백신, HCV 백신, HIV 백신, 단순포진 백신, 뇌수막염 백신, 디프테리아 백신, 백일해 백신, 파상풍 백신 또는 수두 백신일 수 있

다.

- [0067] 본 발명의 백신 조성물은 백신으로 투여되어 병원성 세균에 의해 감염되어 발생하는 질환에 대한 면역성을 유도할 수 있으며, 상기 백신 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체와 함께 적절하게 제제화될 수 있다.
- [0068] 약제학적으로 허용가능한 담체는 경구 투여시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소 및 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 주사제는 생리식염액 및 링겔액 등의 수성용제, 식물유, 고급 지방산 에스테르(예를 들어, 올레인산에칠 등) 및 알코올류(예를 들어, 에탄올, 벤질알코올, 프로필렌글리콜, 글리세린 등) 등의 비수성 용제 등을 이용하여 제조할 수 있고, 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장화제 및 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있다. 분사제의 경우에는 적합한 분사제, 예컨대, 압축공기, 질소, 이산화탄소, 또는 탄화수소 기반 낮은 끓는점 용매 등을 사용하여 가압팩 또는 분무기로부터 에어로졸 스프레이 제시체의 형태로 편리하게 전달될 수 있다.
- [0069] 본 발명의 백신 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용가능한 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여 시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭시르, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수 회 투약 형태로 제조할 수 있다.
- [0070] 백신 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 제한되지 아니하며, 통상적으로 이용되는 경로를 통하여 투여될 수 있다.
- [0071] 본 명세서에서, 용어 "투여"란, 어떠한 적절한 방법으로 인간 또는 동물에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 인체 또는 수의용으로 제형화되어 다양한 경로로 투여된다. 본 발명의 상기 백신 조성물은 비경구 경로, 예컨대 혈관 내, 정맥 내, 동맥 내, 근육 내 또는 피하 등의 경로로 투여될 수 있고, 경구, 비강, 직장, 경피 또는 에어로졸을 통한 흡입 경로로 투여될 수도 있으며, 볼루스로 투여하거나 또는 서서히 주입할 수도 있으나, 구체적으로는 설하, 근육 내 또는 비강 경로로 투여될 수 있으며, 보다 구체적으로는 비강 경로이나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0072] 항원과, 면역보조(adjuvant) 성분으로서 갈렉틴-4를 포함하는 본 발명의 백신 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다.
- [0073] 본 발명의 일 실시형태에 따르면, 본 발명은 갈렉틴-4를 유효성분으로 포함하는 백신용 면역보조제 조성물의 약학적으로 유효한 양을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 면역반응 촉진 방법을 제공한다.
- [0074] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 백신용 면역보조제 조성물은 항원과 함께 동시 또는 이시에 투여될 수 있다.
- [0075] 본 발명에 따른 면역반응 촉진 방법에 있어서, 상기 면역반응은 체액성 면역반응, 세포성 면역반응, 또는 둘 모두를 포함한다.
- [0076] 본 발명의 또 다른 실시형태에 따르면, 본 발명은,
- [0077] 질환을 예방 또는 치료하는 방법으로서,
- [0078] 백신 조성물과 동시 또는 이시에 갈렉틴-4를 포함하는 면역보조제 조성물의 약학적으로 유효한 양을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0079] 본 명세서에서, 용어 "동시 또는 이시"에 투여함은, 투여가 동시 또는 순차적으로 이루어질 수 있음을 의미한다. 즉, 백신 조성물과 면역보조제 조성물을 동시에 투여 또는 이의 혼합물을 투여하거나, 백신 조성물을 먼저 투여한 후 면역보조제 조성물을 투여할 수 있는 것으로 이해될 수 있으며, 본 발명에 따른 항원과 백신용 면역보조제 조성물을 동시에 투여 또는 이의 혼합물을 투여하거나, 항원을 먼저 투여한 후 백신용 면역보조제 조성물을 투여할 수 있는 것으로 이해될 것이다.
- [0080] 본 발명에 따른 면역보조제 조성물은 수회 또는 다중 투여를 하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 면역보조제 조성물은 정해진 기간에 걸쳐 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10회 이상 투여될 수 있다. 투여 간격은 약 1일 간격 내지 약 5주 간격일 수 있다. 종양 크기의 감소 및/또는 전이의 발생 감소와 같은 바람직한 치료 결과를 얻기 위해서는 주기적인 재투여가 필요할 수 있다. 또한, 통상적인 치료 과정 또는 효능 또는 면역 상태 측정 시험을 사용하여 최적의 투여 경로가 확인될 수 있음은 당업자에게 명백할 것이다. 투여 경로 및 처방은 치료될 질환의 단계 또는 중증도에 따라 달라질 수 있으며, 숙련된 의료종사자에 의해 결정될 수 있다.
- [0081] 상기 백신 조성물은 면역반응을 유발하는 항원 또는 상기 항원을 포함하는 백신 조성물일 수 있으나 이에 제한

되지 않으며, 상기 질환은 바이러스성 질환, 암성 질환 또는 상기 둘 모두일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0082] 본 발명의 또 다른 실시양태는 갈렉틴-4를 포함하는, 면역반응 촉진용 백신보조제 조성물을 제공한다.

[0083] 상술한 바와 같이, 상기 갈렉틴-4는 항원과 함께 투여될 경우, 항체의 역가를 향상시키고, 세포성 면역반응 및/또는 체액성 면역반응을 증진시킬 수 있으므로, 갈렉틴-4를 포함하는 조성물은 면역반응 촉진용 백신보조제로서 사용될 수 있다.

[0084] 본 발명에 따른 갈렉틴-4는 세포성 면역과 체액성 면역반응 둘 다를 증대시켜 사백신, 단백질 백신을 포함하는 다양한 백신의 효율을 향상시킬 수 있어, 항원 사용량을 저감시켜 백신의 생산 단가를 낮출 수 있는 장점이 있다.

발명의 효과

[0085] 본 발명의 면역보조제는 다양한 바이러스 백신의 세포성 및 체액성 면역반응을 증대시켜 백신의 효율을 증대시킬 수 있다.

[0086] 본 발명의 면역보조제는 사백신, 단백질 백신을 포함한 다양한 백신의 면역반응을 강화하여, 결과적으로 항원 절감 효과를 통한 백신의 생산 단가를 낮출 수 있다.

[0087] 본 발명의 면역보조제는 세포성 및 체액성 면역반응 증대효과를 통해 암 치료용 백신에 적용시, 암 치료 효과 또한 증대시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0088] 도 1은 야생형 Balb/c 마우스에 인플루엔자 백신(사백신, 녹십자 GC Flu)과 명시된 농도의 갈렉틴-4(마우스 기원)를 첨가 혹은 미첨가하여 접종하고, 접종 7일 후, 마우스의 혈청 내 인플루엔자 백신에 특이적인 면역글로불린의 농도를 효소 면역 측정법을 통하여 측정한 결과를 보여준다: (a) IgG, (b) IgG1, (c) IgG2a.

도 2는 야생형 C57BL/6 마우스 및 갈렉틴-4 결여 C57BL/6 마우스에 림프구성 맥락수막염 바이러스를 감염시킨 뒤, 접종 8일 후, GP33 인식 CD8 T 세포의 수(B), TNF- α 및 IFN- γ 를 생산하는 GP33 인식 활성화 CD8 T 세포의 수(C), TNF- α 및 IFN- γ 를 생산하는 NP396 인식 활성화 CD8 T 세포의 수(D), GP66 인식 CD4 T 세포의 수(E), TNF- α 및 IFN- γ 를 생산하는 GP61 인식 활성화 CD4 T 세포의 수(F)를 비교한 결과 및 P14 T 세포의 증식 정도의 변화(H)를 보여준다.

도 3은 야생형 C57BL/6 마우스에 단백질(OVA, Ovalbumin), 면역보조제(addavax)와 명시된 농도의 갈렉틴-4(마우스 기원)를 첨가 혹은 미첨가하여 접종하고, 접종 14일 후에 같은 방식으로 백신을 마우스에 2차 접종한 다음, 1차 접종 14일 후, 마우스의 혈청 내 OVA에 특이적인 면역글로불린 (A) IgG, (B) IgG1의 농도를 효소 면역 측정법을 통하여 측정한 결과와, 2차 접종 7일 후, 마우스의 혈청 내 OVA에 특이적인 면역글로불린 (C) IgG, (D) IgG1, (E) IgG2c의 농도를 효소 면역 측정법을 통하여 측정한 결과를 보여준다.

도 4는 야생형 C57BL/6 마우스에 단백질(OVA, Ovalbumin), 면역보조제(addavax)와 명시된 농도의 갈렉틴-4(마우스 기원)를 첨가 혹은 미첨가하여 접종한 다음, 2차 접종 7일 후, 마우스의 비장 세포를 분리하여 OVA 펩타이드₂₅₇₋₂₆₄로 37℃에서 12시간 자극하고, 유세포 분석기를 통하여 OVA 펩타이드₂₅₇₋₂₆₄에 특이적인 IFN- γ 를 생산하는 CD8 T 림프구의 비율을 측정한 결과를 보여준다.

도 5는 야생형 C57BL/6 마우스에 흑색종 세포주(B16/OVA)를 주사하고, 7일 후, 마우스에 단백질(OVA, Ovalbumin), 면역보조제(addavax)와 명시된 농도의 갈렉틴-4(마우스 기원)를 첨가 혹은 미첨가하여 접종(도 5a)한 다음 측정한 평균 종양 부피와 마우스 생존율을 보여준다: (b) 각 실험군의 평균 종양 부피; (c) 마우스 생존율.

도 6a 및 6b는 야생형 C57BL/6 마우스 및 갈렉틴-4 결여 C57BL/6 마우스에 비소세포폐암(NSCLC)(American Type Culture Collection, ATCC 구입) 모델 세포주(TC1)를 피하 이식하여 종양의 부피(도 6a) 및 생존율(도 6b)을 비교한 결과를 보여준다.

도 6c는 야생형 C57BL/6 마우스 및 CD8 T 세포를 제거한 갈렉틴-4 결여 C57BL/6 마우스에 비소세포폐암(NSCLC) 모델 세포주(TC1)를 피하 이식하여 생존율을 비교한 결과를 보여준다.

도 6d 및 도 6e는 야생형 C57BL/6 마우스에 흑색종 세포주(B16/OVA)를 이식하고, 단백질(OVA) 및 면역보조제

(addavax)와 명시된 농도의 갈렉틴-4를 투여한 뒤 항 PD-1 항체를 3회 투여한 마우스의 생존율을 비교한 결과를 보여준다.

도 7은 야생형 C57BL/6 마우스 또는 갈렉틴-4 결여 C57BL/6 마우스의 골수로부터 분화한 수지상세포를 톨 유사 수용체(Toll-like receptor, TLR) 및 IFN- α 를 처리하여 면역 활성을 유도한 뒤, 수지상세포에서의 MHC-I의 발현 정도를 비교(도 7a 내지 7e)한 결과 및 GP33 인식 P14 CD8 T 세포와 공배양한 경우 분화한 P14 CD8 T 세포의 비율(도 7f 및 7g)을 보여준다.

도 7h는 야생형 C57BL/6 마우스 골수 유래 수지상세포에 갈렉틴-4를 처리 또는 미처리 후, P14 CD8 T 세포와 공배양한 경우 P14 CD8 T 세포가 증식한 정도를 비교한 결과를 보여준다.

도 8a 내지 8d는 야생형 C57BL/6 마우스 또는 갈렉틴-4 결여 C57BL/6 마우스의 골수로부터 분화한 수지상세포의 MHC 관련 유전자 발현량을 RT-qPCR을 통해 측정하여 비교한 결과를 보여준다: (a) H-2K^b, (b) β 2m, (c) Lmp2, (d) Tap1.

도 8e는 야생형 C57BL/6 마우스 골수 유래 수지상세포에 갈렉틴-4를 처리 또는 미처리한 경우 수지상세포 표면의 MHC-I 발현량을 비교한 결과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0089] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0090] 재료 및 방법

[0091] 이 섹션에서는 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험 재료와 실험방법에 대한 설명을 제공한다.

[0092] 1. 동물 모델

[0093] 본 실험에 사용한 동물 모델은 (주)대한바이오링크에서 구입한 6~8 주령의 야생형 C57BL/6, Balb/c 야생형 마우스 또는 (주)젠티코를 통해 제작한 갈렉틴-4 결핍 C57BL/6 마우스를 사용하였다.

[0094] 2. 시약 및 항체

[0095] 본 실험에 사용한 인플루엔자 백신은 녹십자에서 구입하였다. 항원으로 사용한 OVA는 Sigma-Aldrich에서 구입하였고, 증류수를 용매로 사용하였다. 면역보조제로 사용한 Addavax는 Invivogen에서 구입하였다. 항체 측정을 위한 과산화효소가 결합된 2차 항체 anti-mouse IgG, anti-mouse IgG1, anti-mouse IgG2a, anti-mouse IgG2c는 Invitrogen 혹은 Southerbiotech에서 구입하였다. 과산화 효소의 반응의 촉진과 정지를 위한 TMB 기질과 황산은 각각 Biolegend, Sigma-Aldrich에서 구입하였다. CD8 T 세포의 반응을 확인하기 위한 OVA 펩타이드(257-264)는 GenScript에서 구입하였다. 생쥐의 표지 단백질 CD8, 사이토카인 IFN- γ , 세포 활성화 측정 항체를 Biolegend에서 구입하였다.

[0096] 3. 세포 배양

[0097] 본 실험에 사용한 B16/OVA(Murnie B16 melanoma expressing ovalbumin) 세포는 37°C에서 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 해당 세포주는 DMEM(Dulbecco modified essential medium, GenDepot) 배지에 10%의 태아 소혈청(Fetal Bovine Serum, GenDepot), 1%의 페니실린/스트렙토마이신(PS, Welgene)을 첨가하여 배양하였고, B16/OVA 세포주 배양시에는 추가로 0.8%의 G418 용액(Roche)을 첨가하여 배양하였다.

[0098] 4. 백신의 접종

[0099] 인플루엔자 백신(사백신, 녹십자 GC Flu)을 생리식염수에 희석하여 개체 당 0.6 μ g씩 근육 주사하였다. 단백질(OVA, Ovalbumin)을 생리식염수에 희석하여 개체 당 10 μ g씩 근육 주사하였다. 백신면역보조제(addavax, MF59과 유사한 전임상 시험 물질)는 1:1의 비율로 희석하여 해당 실험군에 백신과 함께 투여하였다. 갈렉틴-4(마우스 유래; 서열번호 1의 아미노산을 갖는 단백질)는 백신 주사 혼합물에 명시된 농도로 희석하여 백신과 함께 투여하였다.

[0100] 5. 효소 면역 측정법 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; ELISA)

- [0101] SPL 사의 96 well Immunoplate (Flat, Maxibinding)에 인플루엔자 백신(GC 녹십자) 혹은 OVA(Sigma-Aldrich)를 각각 1μg/mL 농도로 처리하여 4℃에서 밤새 코팅하였다. 다음 날, plate를 세척한 후, 1% BSA solution으로 상온에서 2시간 동안 블로킹하였다. 동일하게 세척한 후, 혈청 샘플을 넣고 상온에서 2시간 배양하였다. 이후, 세척한 plate에 HRP에 결합된 Goat Anti-Mouse IgG, IgG1, IgG2a, IgG2c (Invitrogen 혹은 SoutherBiotech)를 처리하여 상온에서 2시간 배양하였다. 세척 과정을 거친 후, TMB 기질(Biolegend)을 사용하여 발색을 진행하였고, 2N 황산을 통해 반응을 정지시켰다. 흡광도를 ELISA reader기를 이용하여 혈청 내 항체 농도를 결정하였다.
- [0102] 6. 유세포 분석
- [0103] 백신을 접종한 생쥐의 T 림프구 활성을 확인하기 위해, 형광이 표지된 항체를 사용하였다. 세포의 활성을 측정하기 위해 항체(Zombie NIR™ Fixable Viability Kit, Biolegend)를 처리하고 상온에서 30분 동안 염색하였다. 세포의 표지 단백질에 특이적인 항체 anti-mouse CD8, anti-mouse CD3 (Biolegend)를 1/200 농도로 희석 후, 세포에 처리하여 4℃에서 20분 동안 염색하였다. T 림프구 내 사이토카인 염색을 위해 세포를 고정 및 투과성을 부여하기 위해 Cyto-Fast Fix/Perm Solution (Biolegend)을 상온에서 20분 처리한 후, 1/100 농도로 희석한 anti-mouse IFN-γ (Biolegend) 항체를 세포에 처리하여 상온에서 20분 동안 염색하였다. 유세포 분석기 (Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer, Thermo Scientific)를 이용하여 결과를 분석하였다.
- [0104] 7. 종양의 증식 및 관찰
- [0105] 흑색종 세포주인 B16/OVA 세포 4×10⁵개를 야생형 C57BL/6 마우스에 피하 주사하였다. 7일 후, 종양의 부피가 0mm³ 초과, 75mm³ 미만인 개체만 선별하여 백신을 접종하였다. 해당 시점부터 2일 간격으로 종양의 부피를 전자식 캘리퍼(SAHHE)를 이용해 측정하였고, 개체의 종양 부피가 2000mm³을 초과하는 시점에서 마우스를 CO₂를 이용해 안락사시켰다.
- [0106] **[실시예 1] 인플루엔자 백신의 면역보조제로서 갈렉틴-4의 효과**
- [0107] 도 1로부터 확인되는 바와 같이, 인플루엔자 백신(사백신, 녹십자 GC Flu)에 갈렉틴-4를 혼합하여 생쥐에 주입하면, 인플루엔자 바이러스에 대한 항체 생성이 유의하게 증가하는 것으로 나타났다. 인플루엔자 백신만을 주입하였을 때에 비하여 인플루엔자 백신과 갈렉틴-4를 혼합하여 생쥐에 주입하였을 경우, 인플루엔자 바이러스 특이적인 항체 (total IgG, IgG1, IgG2) 생산량이 약 2 - 6배(O.D. 기준) 증가하는 것으로 나타났다. 이 결과는 갈렉틴-4를 사백신과 혼합하여 투여할 경우, 사백신을 단독 투여할 때보다 더 높은 체액성 면역반응을 유도할 수 있음을 보여준다.
- [0108] **[실시예 2] LCMV 백신의 면역보조제로서 갈렉틴-4의 효과**
- [0109] 1. 실험 방법
- [0110] 림프구성 맥락수막염 바이러스(Lymphocytic choriomeningitis virus, LCMV) Armstrong 아종을 야생형 및 갈렉틴-4 결여 마우스에 2×10⁵ PFU 농도로 복강 주사하였다. 감염 8일 후, 마우스를 CO₂ 가스로 안락사한 후 비장을 분리하여 면역반응을 측정하였다(도 2).
- [0111] P14 CD8 T 세포를 이식하는 경우, P14 유전자 변형 마우스의 비장으로부터 CD8 T 세포를 분리하여 감염 하루 전에 2×10⁵ PFU 농도로 정맥 주사하였다.
- [0112] CD8 T 세포의 증식은, LCMV 당단백질₃₃₋₄₁(GP33) 항원을 처리하고, 활성화시킨 수지상세포와 CFSE(Invitrogen)로 염색된 GP33 펩타이드 특이적인 T 림프구를 혼합한 후, 2일간 배양하여 T 림프구의 증식을 유세포 분석기로 분석하였다.
- [0113] 갈렉틴-4가 결여된 T 세포 자체적인 영향에 의하여 갈렉틴-4 결여 마우스에서 바이러스 특이적 면역반응이 감소하는 것인지 검증하기 위하여, 당단백질₃₃₋₄₁(GP33)을 특이적으로 인식하는 T 세포를 갖는 유전자 변형 마우스(P14)로부터 CD8 T 세포를 분리하여 야생형 마우스 및 갈렉틴-4 결여 마우스에 이식하고, LCMV를 감염시켰다. 이 후, 혈액에서 바이러스 특이적인 P14 T 세포의 비율을 분석하였다.
- [0114] 2. 실험 결과
- [0115] 도 2에 나타난 것과 같이, 갈렉틴-4가 결여된 마우스에서는, 당단백질₃₃₋₄₁(GP33)을 인식하는 CD8 T 세포의 비율

이 야생형 마우스에 비해 비율과 수 모두 현저히 낮게 나타났다.

- [0116] 바이러스 항원 당단백질₃₃₋₄₁(GP33)과 핵단백질396-404(NP396)에 특이적으로 반응하여 사이토카인 TNF- α 및 IFN- γ 를 분비하는 활성화 T 세포의 비율이 갈렉틴-4 결여 마우스에서 매우 낮은 것으로 나타났다. 이와 유사하게, 갈렉틴-4 결여 마우스에서는 바이러스에 특이적인 CD4 T 세포의 수와 활성화된 CD4 T 세포가 야생형 마우스에 비하여 감소하였다.
- [0117] 이 결과는, 갈렉틴-4 결여 마우스에서는 바이러스 특이적인 T 세포의 면역 활성이 감소하여, 갈렉틴-4가 바이러스 면역 활성화에 중요한 역할을 하고 있음을 보여준다.
- [0118] 야생형 마우스에 비해 갈렉틴-4 결여 마우스에서는 이식한 P14 T 세포의 증식이 감염 15일, 22일, 29일차에 현저하게 감소하는 것으로 나타났다. 이는 갈렉틴-4가 바이러스 감염에 대한 T 세포의 면역 활성을 증진시킴을 보여준다.
- [0119] **[실시예 3] 단백질 서브유닛 백신 면역보조제로서 갈렉틴-4의 효과**
- [0120] 실시예 1에서 갈렉틴-4가 사백신의 항체 생산 효율을 증대시킴을 밝혔으므로, 다른 종류의 백신에서도 유사한 효과를 발휘하는지 분석하였다. 도 3에서 확인되는 바와 같이, 단백질(OVA, ovalbumin)과 백신 면역보조제(addavax, MF59과 유사한 전임상 시험 물질)에 추가적으로 갈렉틴-4를 혼합하여 생쥐에 주입하였을 때, 체액성 면역반응(항체)이 증가함을 확인하였다. 이 결과는 갈렉틴-4가 기존의 면역보조제의 효율을 증대시켜 단백질 서브 유닛 백신의 면역반응을 크게 유도할 수 있음을 보여준다.
- [0121] **[실시예 4] 갈렉틴-4가 세포 독성 T 림프구 활성화에 미치는 영향**
- [0122] 갈렉틴-4에 의한 백신 면역증강 효과가 세포성 면역에서도 나타나는지 분석하였다. 도 4에서 확인되는 바와 같이, 단백질(OVA, ovalbumin)과 백신 면역보조제(addavax, MF59과 유사한 전임상 시험 물질)에 추가적으로 갈렉틴-4를 혼합하여 생쥐에 주입하였을 때, 항원에 특이적인 T 림프구 중 IFN- γ 를 생산하는 T 림프구의 비율이 증가하는 것으로 나타났다. 이 결과는 갈렉틴-4가 기존 면역보조제의 세포성 면역반응 효율을 크게 증강시킬 수 있음을 보여준다.
- [0123] **[실시예 5] 암 치료백신 면역보조제로서 갈렉틴-4의 효과**
- [0124] 실시예 3, 4를 통해 갈렉틴-4가 단백질 서브유닛 백신의 면역보조제 효율을 증대시킬 수 있음을 확인하였으므로, 실제 질병 모델에서도 위와 같은 효과가 나타나는지 여부를 추가로 확인하였다. 야생형 C57BL/6 마우스에 단백질(OVA, ovalbumin)을 발현하는 흑색종 세포주(B16/OVA)를 주사하여 종양을 형성하였다. 도 5에서 확인되는 바와 같이, 종양이 형성된 마우스에 단백질과 백신 면역보조제(addavax, MF59과 유사한 전임상 시험 물질), 추가적으로 갈렉틴-4를 혼합하여 주입하였을 때, 주입하지 않은 생쥐의 종양에 비해 종양의 크기가 약 2배 작은 것으로 나타났다. 또한, 생쥐의 생존율을 분석하였을 때, 면역보조제(addavax, MF59과 유사한 전임상 시험 물질)와 갈렉틴-4를 혼합하여 생쥐에 주입하였을 때, 생쥐의 생존율이 현저하게 증가함을 확인하였다.
- [0125] 추가적으로, 비소세포폐암(Non-small-cell lung cancer, NSCLC) 모델 세포주(TC1)를 피하 이식하여 종양 부피 성장을 관측하였다. 그 결과, 도 6a에 나타난 것과 같이, 흑색종 세포주의 경우와 유사하게 갈렉틴-4 결여 마우스에서 종양의 부피가 더 빠르게 증가하고, 이로 인해 생존율이 감소하는 것으로 나타났다.
- [0126] 이와 같은 현상이 CD8 T 세포에 의한 것인지 검증하기 위하여 야생형 및 갈렉틴-4 결여 마우스에 항 CD8 항체를 투여해 CD8 T 세포를 제거하였다. 이 후 같은 방식으로 종양을 이식하여 마우스의 생존율을 관측했을 때, CD8 T 세포가 제거된 경우에는 생존율에 유의미한 차이가 없는 것으로 나타났다(도 6c 참조). 이는 갈렉틴-4가 CD8 T 세포의 항암 면역 활성을 통하여 종양의 성장을 억제할 수 있음을 보여준다.
- [0127] 이에 착안하여, 갈렉틴-4의 항암 면역 활성 효과가 항 PD-1 항체 치료의 효율을 증가시킬 수 있는지 검증하기 위하여, 위의 흑색종 모델에서 종양 이식 후 7, 9, 11일 차에 항 PD-1 항체 (BioXcell) 200 μ g를 복강 주사하였다(도 6d).
- [0128] 그 결과, 도 6e에 나타난 것과 같이, 항 PD-1 항체 치료와 오브알부민(OVA), 면역증강제(Addavax) 및 갈렉틴-4의 혼합 투여를 병행한 경우, 항 PD-1 항체 단독 치료군에 비하여 마우스의 생존율이 크게 증가하는 것을 확인하였다. 이는 갈렉틴-4가 CD8 T 세포 활성 효과는 항암 면역을 활성화 시키고, 면역관문억제제 치료의 효율을 증가시킬 수 있음을 나타내며, 갈렉틴-4의 면역증강 효과가 실제 암 치료 백신에서도 구현될 수 있음을 나타낸

다.

[0129] **[실시예 6] 갈렉틴-4가 수지상세포의 활성화에 미치는 영향**

[0130] 1. 수지상세포의 준비

[0131] 마우스의 다리 뼈에서 골수 세포를 분리하여 20 ng/mL 농도의 과립구 대식 세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF, PEPROTECH)가 포함된 RPMI-1640 with L-glutamine(GenDEPOT) 배지에서 수지상세포로의 분화를 유도하였다. 총 6 내지 8일 동안 배양하였고, 3일차 또는 6일차에 위 배지를 10 ml씩 각각 첨가하였다. 분화된 수지상세포를 PBS로 세척하고, TLR3, TLR4 또는 TLR7 자극을 각각 5 µg/mL 농도의 Poly I:C, 100 ng/mL 농도의 LPS 및 1 µg/mL 농도의 R848을 24시간 동안 처리하여 활성을 유도하였다.

[0132] 2. 유세포 분석

[0133] 수지상세포의 항원 발현을 및 T 림프구의 증식과 활성을 확인하기 위해, 형광이 표지된 항체를 사용하였다. 세포의 표지 단백질에 특이적인 항체를 처리하여 4℃에서 20분 동안 염색하였다. 바이러스를 감염시킨 생쥐의 T 림프구 활성을 확인하기 위해, 형광이 표지된 항체를 사용하였다. 세포의 활성을 측정하기 위해 항체(Zombie NIR™ Fixable Viability Kit, Biolegend)를 처리하고 상온에서 30분 동안 염색하였다. 세포의 표지 단백질에 특이적인 항체 anti-mouse CD8, anti-mouse CD3 (Biolegend)를 1/200 농도로 희석 후, 세포에 처리하여 4℃에서 20분 동안 염색하였다. T 림프구 내 사이토카인 염색을 위해 세포를 고정 및 투과성을 부여하기 위해 Cyto-Fast Fix/Perm Solution (Biolegend)을 상온에서 20분 처리한 후, 1/100 농도로 희석한 anti-mouse IFN-γ (Biolegend) 항체를 세포에 처리하여 상온에서 20분 동안 염색하였다. 유세포 분석기(Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer, Thermo Scientific)를 이용하여 결과를 분석하였다.

[0134] 3. MHC-I의 발현 변화에 따른 항원 제시 능력의 변화

[0135] 실시예 5에서 갈렉틴-4가 CD8 T 세포의 면역 활성을 조절할 수 있음을 확인하였다. CD8 T 세포의 활성은 항원 제시 세포에 의해 크게 조절되므로 대표적인 항원 제시 세포인 수지상세포에서 갈렉틴-4가 항원 제시 능력에 미치는 영향을 탐구하였다.

[0136] 수지상세포는 야생형 및 갈렉틴-4 결여 마우스의 골수로부터 분화하였고, 분화된 수지상세포를 톨 유사 수용체 (toll-like receptor, TLR) 작용제(agonist)와 IFN-α를 처리하여 면역 활성을 유도하였다. 그 결과, 갈렉틴-4가 결여된 수지상세포에서, 자극이 없는 경우를 포함하여 TLR3(Poly I:C), TLR4(LPS), TLR7(R848) 작용제 및 IFN-α를 처리하였을 때 MHC-I(major histocompatibility complex-I)의 발현이 정상 수지상세포에 비해 현저히 감소하는 것을 확인하였다(도 7a 내지 7e).

[0137] 이러한 현상이 실제로 수지상세포의 항원 제시 능력에 영향을 미치는지 검증하기 위하여, 분화 및 면역 활성을 자극한 수지상세포에 당단백질₃₃₋₄₁(GP33)을 처리하고, 이를 특이적으로 인식하는 P14 CD8 T 세포와 공배양하였다.

[0138] 그 결과, 도 7에 나타난 것과 같이, 정상 수지상세포와 공배양한 경우와 비교하여, 갈렉틴-4 결여 수지상세포와 공배양한 경우(도 7f) 분화된 P14 CD8 T 세포의 비율이 유의미하게 감소하는 것으로 나타났다(도 7g). 또한, 갈렉틴-4를 처리한 수지상세포와 P14 CD8 T 세포를 공배양한 경우, 갈렉틴-4를 처리하지 않은 수지상세포와 공배양한 경우와 비교하여 CD8 T 세포의 증식이 크게 증가함을 확인하였다(도 7h 참조). 이는 갈렉틴-4가 수지상세포의 항원 제시 활성을 조절할 수 있음을 보여준다.

[0139] 4. 갈렉틴-4가 수지상세포의 MHC 발현에 미치는 영향 분석

[0140] 갈렉틴-4 결여 수지상세포에서 정상 수지상세포에 비해 MHC-I 발현이 감소하는 현상이 어떤 요인에 의해 발생하는지 탐구하기 위해 정상 및 갈렉틴-4 결여 수지상세포의 유전체를 RNA-sequencing을 통해 분석하였다. 유전체 분석 결과 갈렉틴-4가 결여된 수지상 세포에서 2315개 유전자의 발현량이 유의미하게 증가하였고, 2249개 유전자의 발현량이 유의미하게 감소하였다. 이러한 유전자 발현 양상을 KEGG pathway gene set enrichment analysis(GSEA)를 통해 파악한 결과, 면역반응과 관련된 pathway가 정상 수지상세포에 비해 갈렉틴-4 결여 수지상세포에서 음성적으로 조절되고 있는 것으로 파악되었다. 갈렉틴-4 결여 수지상세포에서 음성적으로 조절되는 면역반응들의 연관성을 유전자 네트워크 형성을 통해 관측한 결과, '동종 이식 거부(Allograft rejection)', '이식 편대 숙주 질환(Graft-versus host disease)', '자가면역 갑상선 질환(Autoimmune thyroid disease, AITD)' 및 '항원 처리 및 제시(Antigen processing and presentation)'의 총 4개의 pathway가 서로 밀접하게

연관되어 있는 것을 확인하였다.

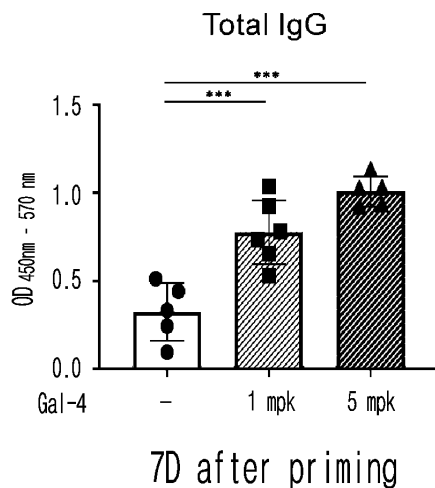
[0141] 상기 4개의 pathway의 연관성에 중요하게 기여하는 유전자를 동정하기 위하여 정상 수지상세포 대비 갈렉틴-4 결여 수지상세포에서의 유전자 변화값을 확인한 결과, 4개의 pathway 모두에서 MHC 관련 유전자의 발현이 감소하는 것을 관측하였다. 이를 유전체 분석을 통해 in vitro 상에서 검증하기 위하여 MHC 관련 유전자 발현량을 RT-qPCR을 통해 측정한 결과, H-2K^b, β 2m, Lmp2 및 Tap1 유전자의 발현량이 모두 감소하는 것으로 나타났다(도 8a 내지 8d 참조). 또한, 상기 골수 유래 수지상세포에 갈렉틴-4를 처리한 경우, 수지상세포의 표면 MHC- I 발현량이 크게 증가하는 것을 확인하였다(도 8e 참조). 이는 갈렉틴-4가 수지상세포에서 MHC 관련 유전자의 발현을 양성적으로 조절할 수 있음을 보여준다.

[0142] 종합하면, 본 발명자들은 갈렉틴-4를 기존에 알려진 백신과 백신 면역보조제와 혼합하여 투여하였을 경우, IgG1 과 IgG2 항체의 생성, CD8 T 세포의 사이토카인 분비 능력 및 수지상세포의 항원 제시 능력이 증대됨을 입증하였다. 이러한 상승 효과는 갈렉틴-4 자체에 의한 직접적인 면역반응 유도에 의한 것이 아니라, 백신에 대한 면역보조제로서 기능함에 따른 효과인 것으로 확인되었다. 따라서, 본 발명에 따른 갈렉틴-4를 유효성분으로 포함하는 백신 면역보조제 조성물은 사백신, 단백질 백신과 같은 다양한 백신의 효율을 증대시킬 수 있으므로 면역보조제로서 유용할 뿐 아니라, 항원 사용량을 절감시키는 효과를 제공하여 백신의 생산 단가를 낮추고, 암 치료 백신에도 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

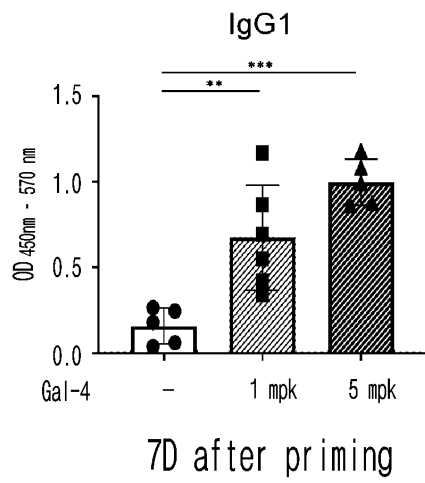
[0143] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 예시적인 구현예일뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

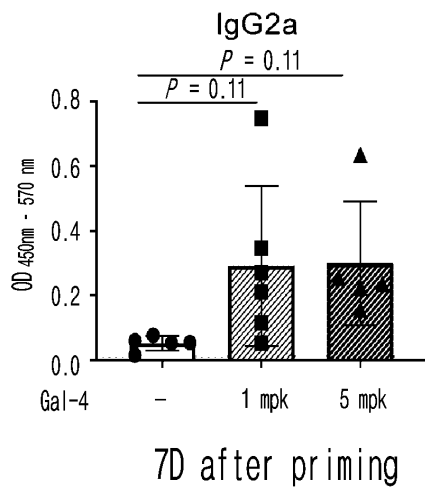
도면1a



도면1b



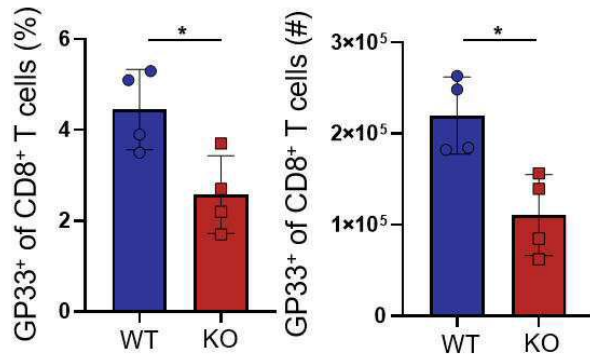
도면1c



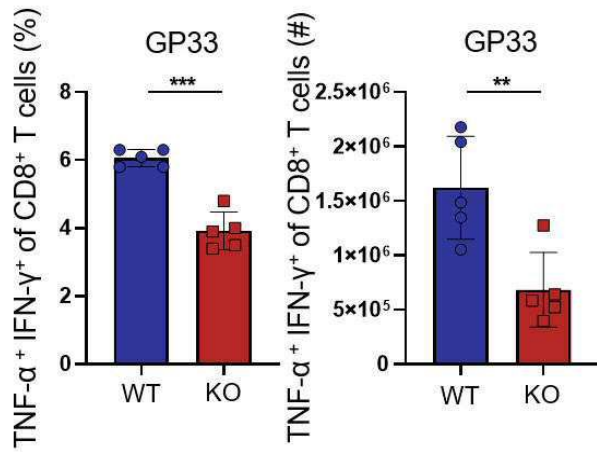
도면2a



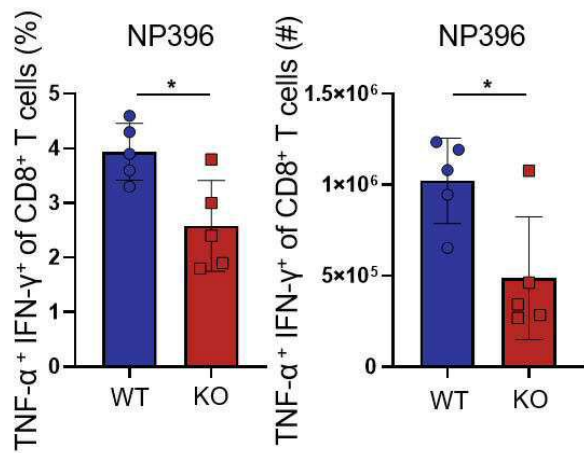
도면2b



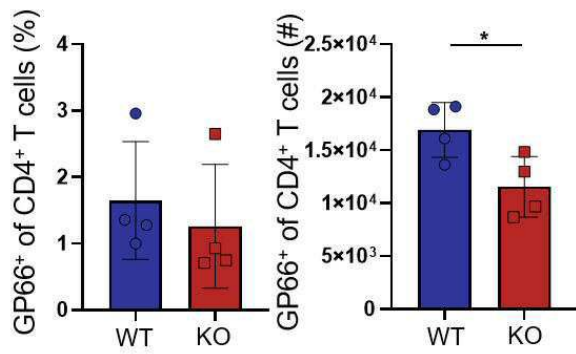
도면2c



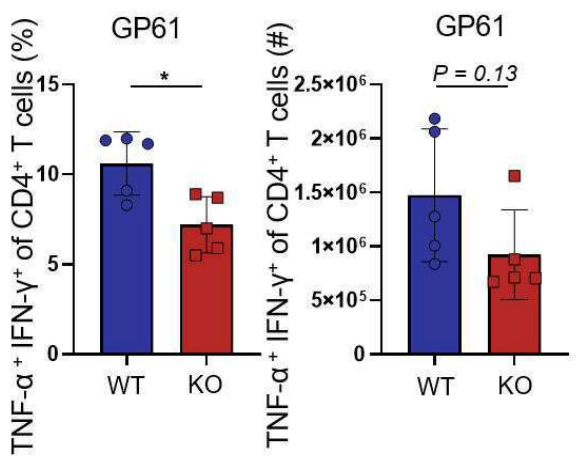
도면2d



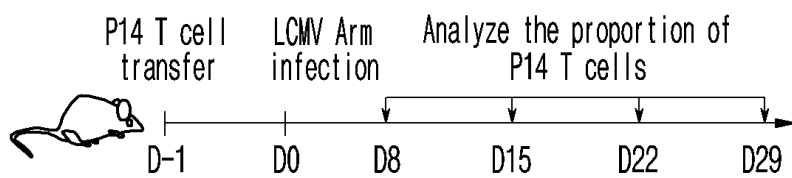
도면2e



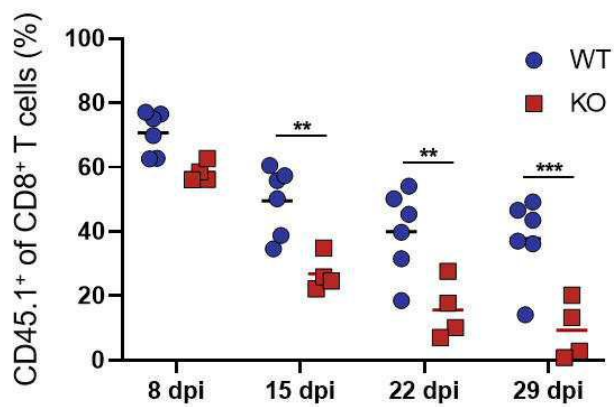
도면2f



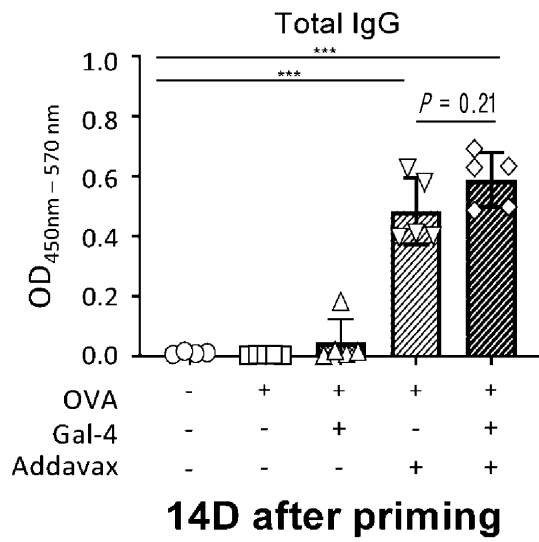
도면2g



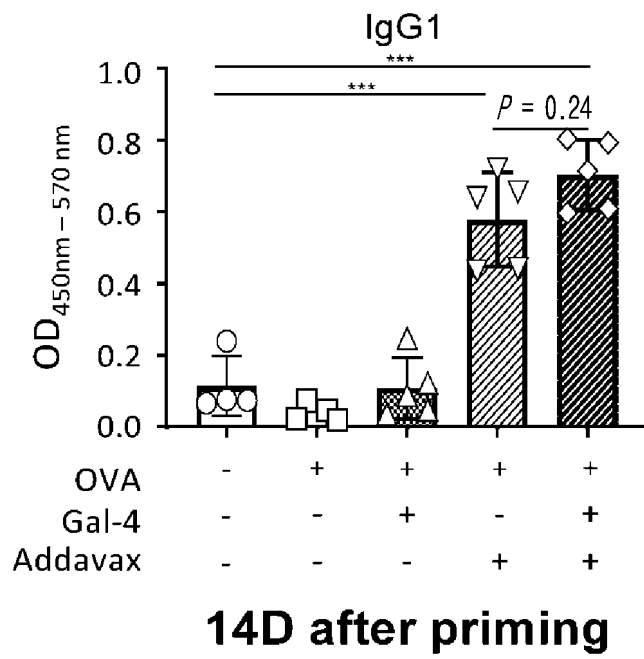
도면2h



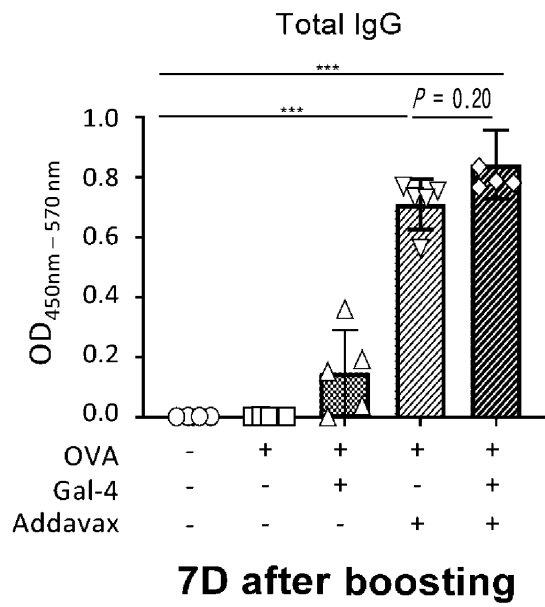
도면3a



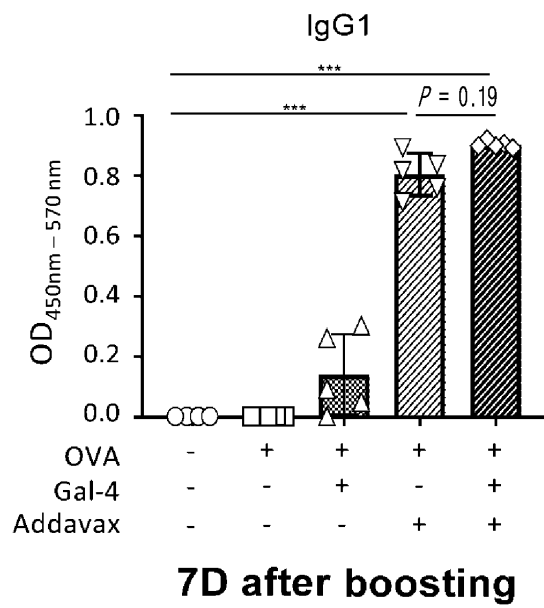
도면3b



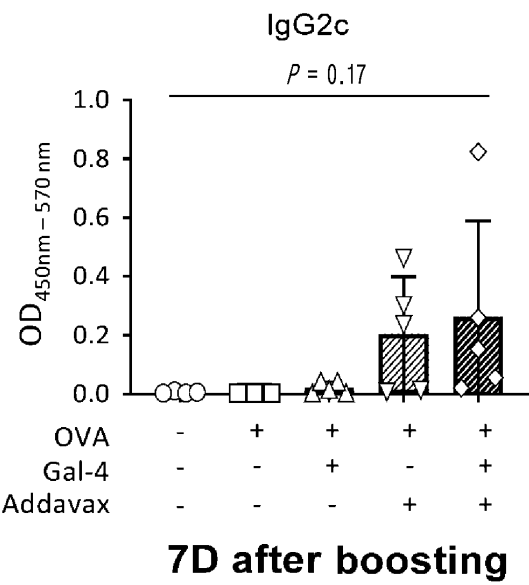
도면3c



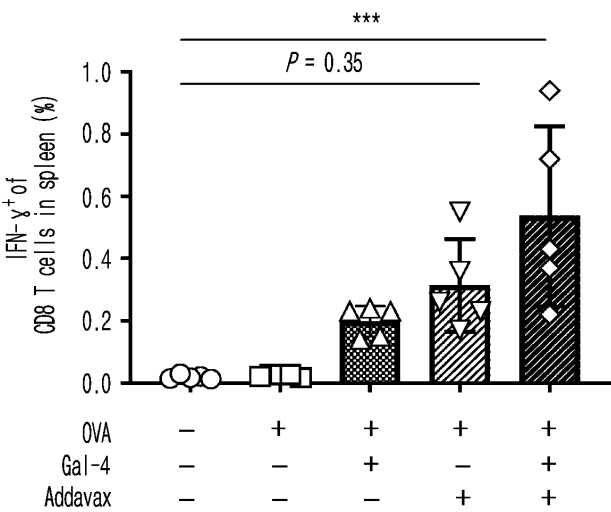
도면3d



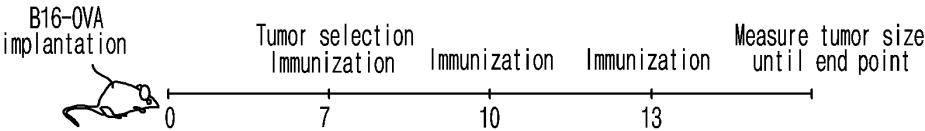
도면3e



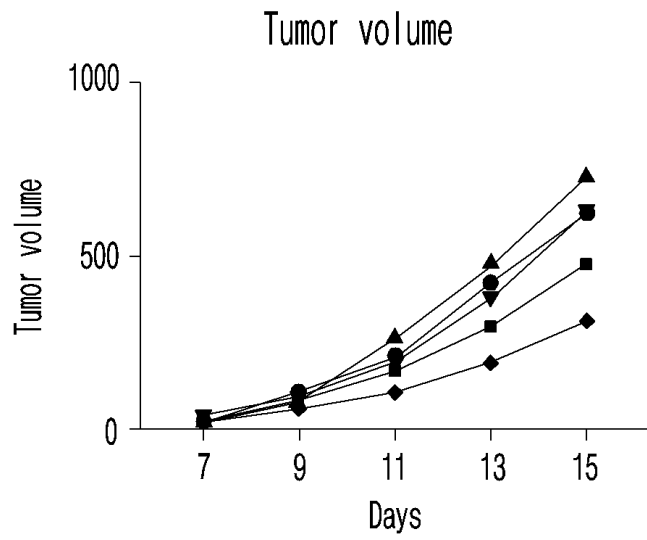
도면4



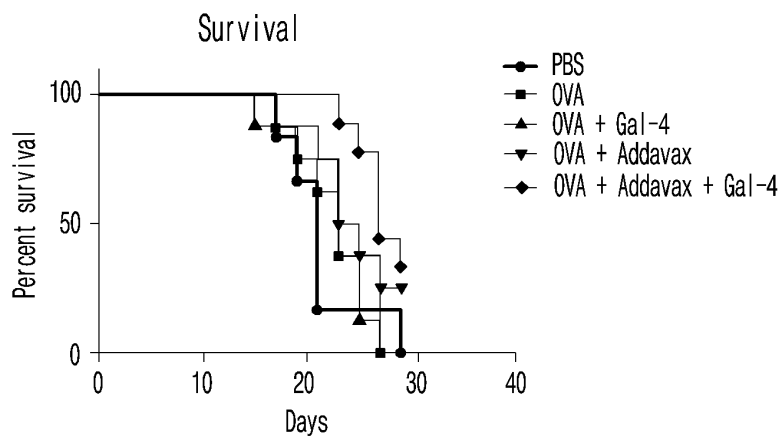
도면5a



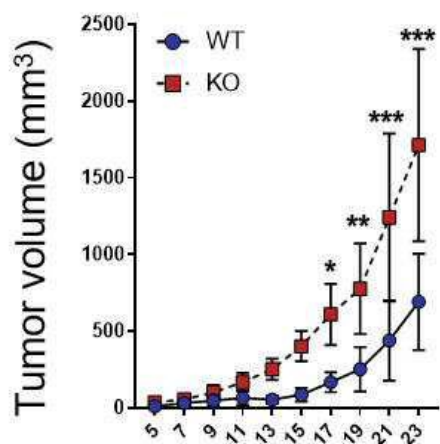
도면5b



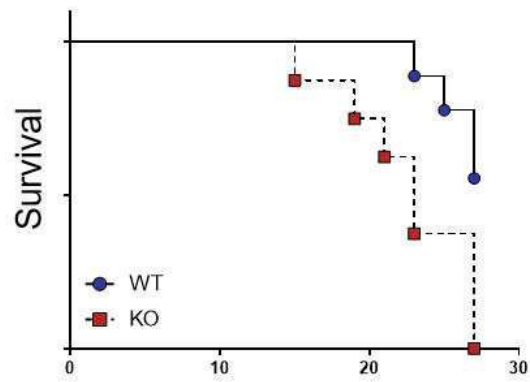
도면5c



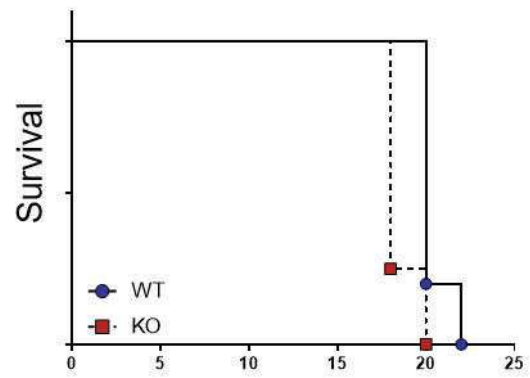
도면6a



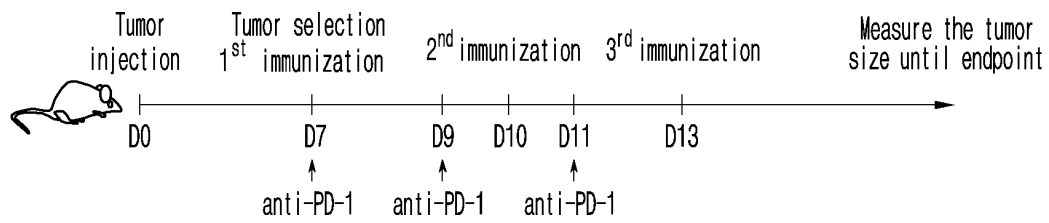
도면6b



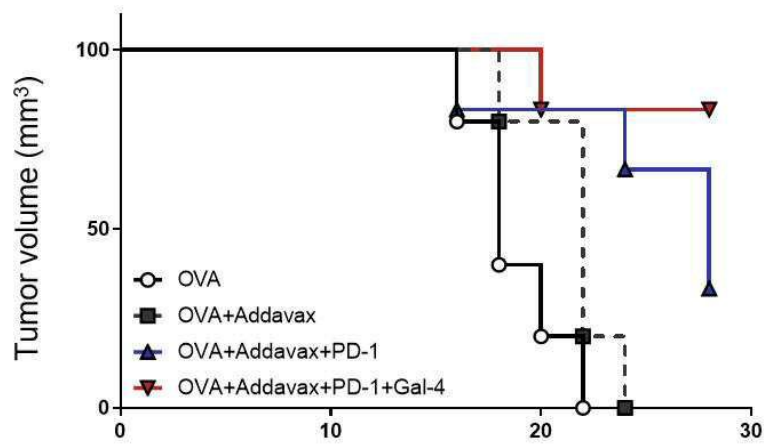
도면6c



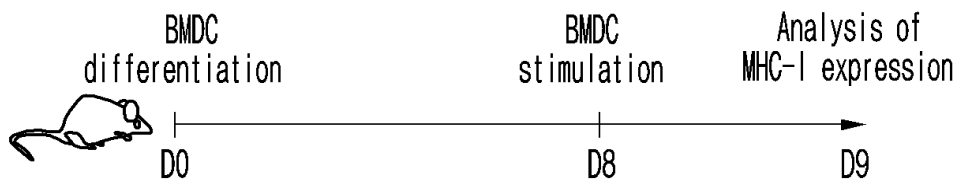
도면6d



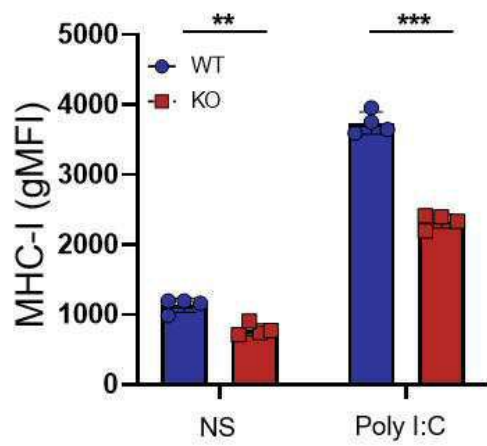
도면6e



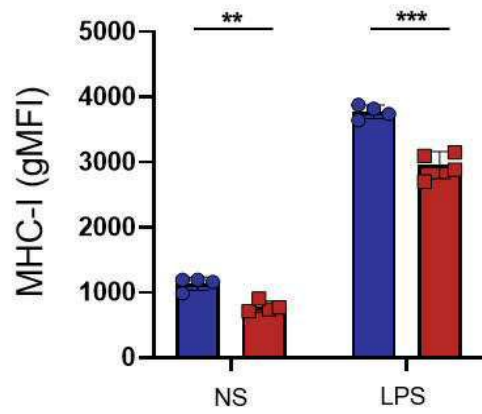
도면7a



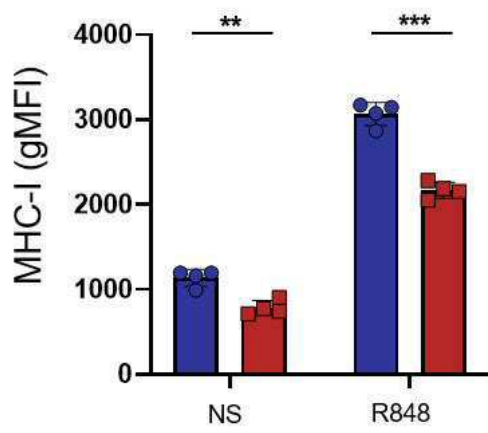
도면7b



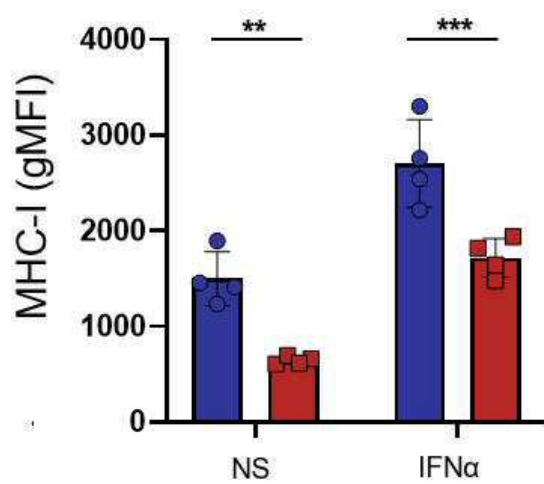
도면7c



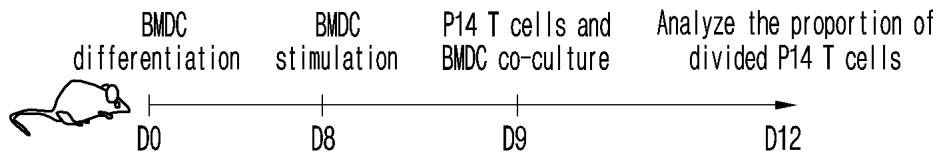
도면7d



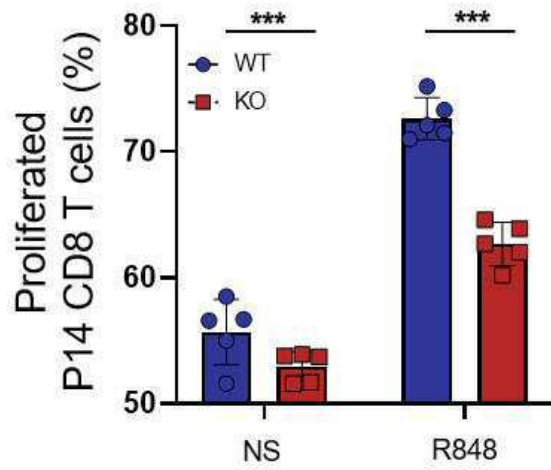
도면7e



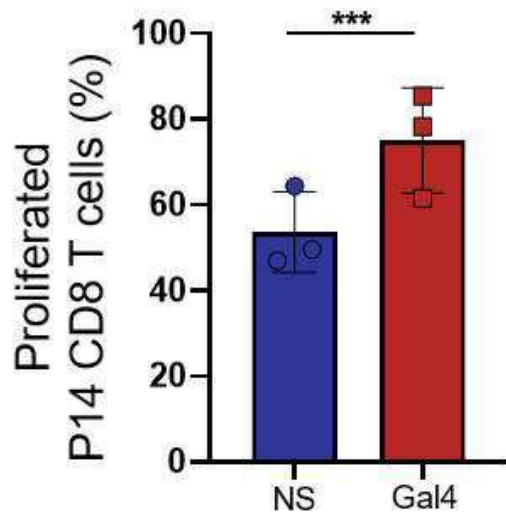
도면7f



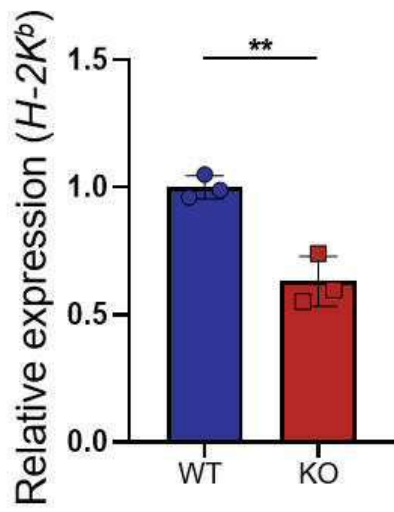
도면7g



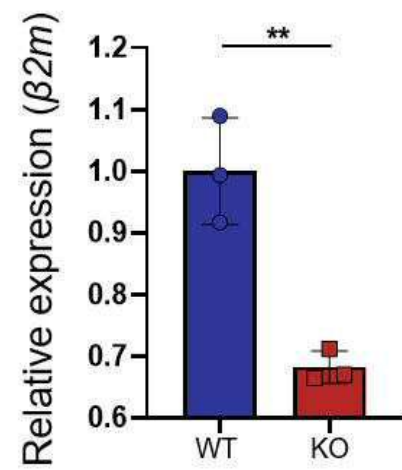
도면7h



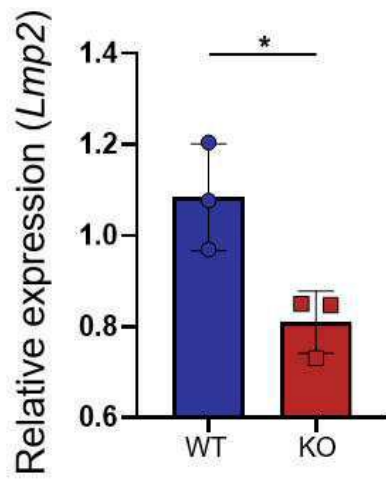
도면8a



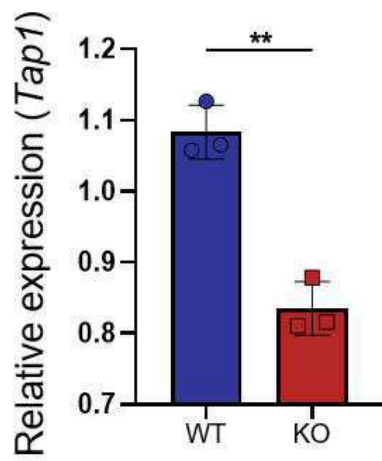
도면8b



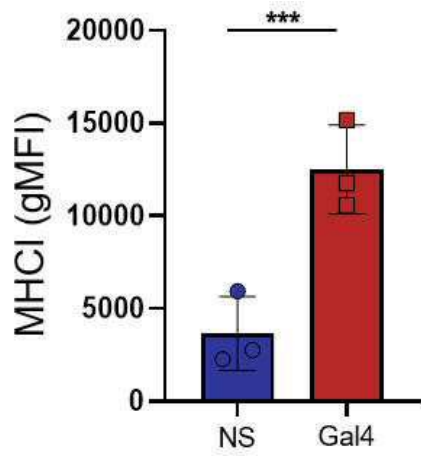
도면8c



도면8d



도면8e



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.