

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015 년 11 월 5 일 (05.11.2015)



(10) 국제공개번호
WO 2015/167029 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 38/16 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01) A61P 31/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/003710
- (22) 국제출원일: 2014 년 4 월 28 일 (28.04.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (71) 출원인: 서울대학교산학협력단 (SNU R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 330-160 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 하나영 (HA, Na Young); 330-160 충청남도 천안시 동남구 충절로 42 103-1408, Chungcheongnam-do (KR). 최명식 (CHOI, Myung Sik); 135-904 서울시 강남구 압구정로 309 93-303, Seoul (KR). 김익상 (KIM, Ik Sang); 138-812 서울시 송파구 동남로 18 길 9 4-1204, Seoul (KR). 조남혁 (CHO, Nam Hyuk); 131-824 서울시 중랑구 중랑천로 20 8-810, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 태웅 (TW INTERNATIONAL PATENT AND LAW FIRM); 135-936 서울시 강남구 역삼로 114 13 층, 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 공개:
- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
 - 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: VACCINE COMPOSITION FOR *ORIENTIA TSUTSUGAMUSHI*

(54) 발명의 명칭 : 오리엔티아 쯔쯔가무시 균에 대한 백신 조성물

(57) Abstract: Disclosed is a vaccine composition for *Orientia tsutsugamushi*. Specifically, disclosed is a vaccine composition using, as an active ingredient, ScaA, which is an autotransporter protein, or the passenger domain region thereof.

(57) 요약서: 본 발명은 오리엔티아 쯔쯔가무시 균에 대한 백신 조성물을 개시한다. 구체적으로 본 발명은 활성성분으로서 자가수송단백질인 ScaA 나 그 패시저 도메인 영역을 이용한 백신 조성물을 개시한다.



WO 2015/167029 A1

명세서

발명의 명칭: 오리엔티아 쓰쓰가무시 균에 대한 백신 조성물 기술분야

- [1] 본 발명은 오리엔티아 쓰쓰가무시 균(*Orientia tsutsugamushi*)에 대한 백신 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 쓰쓰가무시병(scrub typhus)은 진드기 유충을 매개로 한 오리엔티아 쓰쓰가무시균(*Orientia tsutsugamushi*, 이하 "쓰쓰가무시균")의 인체감염으로 인하여 일어난다. 주로 러시아 연해주, 일본, 중국, 말레이시아, 태국, 베트남, 인도 등의 아시아-태평양 지역에서 발병하는 급성 열성 감염병의 한 종류이며 10억 명에 달하는 인구가 이 병에 잠재적으로 노출되어 있다.
- [3] 매해 약 백만 명 정도의 환자가 발생하는 것으로 추정되고 있으며, 1-2주간의 잠복기를 거쳐 발열, 오한, 발진, 가피 생성, 근육통, 림프절 종대 등의 증상이 나타난다. 대부분 감기와 유사한 증상에서 끝나기도 하지만, 적절한 항생제 치료를 받지 않을 경우, 30% 이상의 사망률이 보고되었다. 초기 진단을 통해 독시사이클린, 클로람페니콜 등의 적절한 항생제 처리로 쉽게 치료될 수 있으나, 여러 종류의 혈청형들에 의한 재감염 위험이 높고, 항생제가 잘 듣지 않는 경우가 종종 보고되고 있다. 그리고 아직까지 상용화된 백신은 없다.
- [4] 쓰쓰가무시균은 하나의 종으로 분류되고 있으나, 주요 막항원구조가 다른 혈청형이 다수 존재하며, 이러한 항원의 차이에 따라 현재까지는 20가지 이상의 쓰쓰가무시균 혈청형이 구별되고 있는데, 원형(prototype) 혈청형은 길리암(Gilliam), 카프(Karp) 및 카토(Kato)로 분류된다(Eisemann and Osterman 1985, Am J Trop Med Hyg. Nov;34(6):1173-8; Akira Tamura and Akiyoshi Kawamura 1991, J.CLIN.MICROBIOL. Feb.1991, Vol.29,No.2; WOO-HYUN CHANG et al. 1993, J.CLIN.MICROBIOL. Mar.1993,p.598-605). 한국에서는 보령, 길리암 및 카프 혈청형 감염이 주로 발생하고 있으며, 이중 보령 혈청형 감염이 가장 빈번하다(Chang WH et al. 1995. J Korean Med Sci 10:227-38 ;227-38 ; Lee et al. 2010, J.Trop Med Hyg 83(4):930-5 Yang et al 2011, PLoS ONE 6(8):e22731).
- [5] 사람에서의 쓰쓰가무시병에 대한 면역은 한 가지 혈청형에 특이적이기 때문에 병에 걸린 후 생기는 방어 면역 능력은 같은 혈청형에 대해서는 2-3년간 지속되나, 다른 혈청형에 대해서는 방어 능력을 보이지 않는다(No Cross-immunity). 예를 들면, 4개월 동안 관찰한 쓰쓰가무시병 환자 중에서 처음에 길리암(Gilliam) 혈청형에 감염되고 2달 후에 카프(Karp) 혈청형에 재감염된 예가 증명된 바 있다. 또한 최근에는 동남아시아, 인도 등지에서 항생제 저항균의 보고 되고 있으므로 다수의 혈청형 군주에 대해 근본적으로 예방을 할 수 있는 백신의 개발이 필요한 상황이다(Watt G, Parola P.2003. Curr Opin Infect

Dis. Oct;16(5):429-36 ; Strickman_D et al. 1995. Lancet. 1996 Jul 13;348(9020):86-9.).

- [6] 기존의 찌찌가무시병 백신의 개발은 포르말린 처리나 감마선 조사를 통한 사백신(Killed-vaccine), 56KDa(56-kDa Type-Specific Antigen Gene, TSA56)단백 및 47KDa의 외막단백질을 이용한 제조합단백질 백신(Subunit vaccine) 등이 연구되어 왔으나, 이들 백신들은 주입한 혈청형 균주에 대해서만 방어면역을 보이거나 방어면역능의 지속기간이 짧아 실용화하지 못하였다(Buckland and Dudgeon, 1945; Lancet 2, 734~737; Kawamura et al., 1940. Trop.Dis.Bull. 37, 269~270; Seong et al., 1997. Infect.Immun. 65, 1541~1545; Yu et al., 2005. Am.J.Trop.Med.Hyg. 72, 458~46).
- [7] 따라서 다양한 혈청형 균주들에 대해 공통적으로 방어 면역을 유도할 수 있는 항원물질이 필요한 상황이다. 최근 논문에서 찌찌가무시균의 Sca 단백질들은 자가수송단백으로 균의 외막에 발현하고 있는 것이 확인되었다. 이들 Sca 단백질은 ScaA, ScaB, ScaC, ScaD, ScaE의 5가지 아형으로 나누어지는데, 보령균주에서만 확인되는 ScaB을 제외한 나머지 단백질의 아미노산 서열은 혈청형간에 상동성이 비교적 높은 것으로 확인 되었다(ScaA: 65.8~81.8%, ScaC: 77.4~97.5%, ScaD:69.7~93.8%, ScaE: 62.8~85.3%) (Ha et al., 2011 Infect Immun 79:1718-27).
- [8] 본 발명은 ScaA와 ScaC가 찌찌가무시병 환자에서 항체 반응을 유도하는 것을 확인하였으며, 이 중 ScaA가 백신으로서 기능할 수 있음을 확인함으로써 완성된 것이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 본 발명의 목적은 찌찌가무시 균에 대한 백신 조성물을 제공하는 데 있다.
- [10] 본 발명의 다른 목적이나 구체적인 목적은 이하에서 제시될 것이다.

과제 해결 수단

- [11] 본 발명자들은 아래의 실시예에서 확인되는 바와 같이, 찌찌가무시 균 보령(Boryoung) 혈청형의 유전체 DNA를 분리하여, 보령 혈청형의 유전 정보(GeneBank accession numberAM494475.1)를 기초로 하여 제작된 프라이머(아래의 [표 1] 참조)로 ScaA 및 ScaC 단백질의 패신저 도메인 영역의 일부를 증폭하고([도 1]의 ScaA 및 ScaC의 구조적 모식도, 그리고 [도 2] 및 [도 3]의 증폭된 염기서열(밑줄 부분임) 및 이에 상응하는 아미노산 서열(밑줄 부분임) 참조), 증폭된 DNA 단편들을 pET28a 벡터에 삽입하여 대장균에 형질전환시켜 생산 분리한 다음에, 이들 단백질을 백신 항원으로 사용하여 면역 보강제 Alhydrogel®(Invivogen Inc. (San Diego, USA))와 함께 접종하고 1 주일 뒤 특이적 항체 생성을 확인한 결과 ScaA에 대해서 특이적인 IgM, IgG1, IgG2a 항체가 효과적으로 생성된 것을 확인할 수 있었다.

- [12] 본 발명자들은 나아가 ScaA 및 ScaC 단백질의 패신저 도메인 영역의 일부가 백신으로서 기능을 하는지 확인하기 위하여 대장균에서 생산 분리된 상기 ScaA 및 ScaC 단백질의 패신저 도메인 영역의 일부를 면역 보강제 Alhydrogel(Invivogen Inc. (San Diego, USA))와 함께 생쥐에 접종 후 1주일 뒤 찌찌가무시 균주(보령 혈청형)를 PBS로 희석시켜 감염시키고 생존율을 계산하였는데, ScaC를 접종한 시험군의 경우 보령 균주 접종 12일 이내에 모두 사망하였으나, ScaA를 접종한 시험군의 경우 보령 균주 접종 13일째 1마리가 사망하고 나머지 4마리는 모두 생존함을 확인하였다(생존율 80%). 양성대조군으로 사용한 TSA56의 경우 모두 생존하였으며(생존율 100%), 음성대조군으로 사용한 PBS의 경우는 보령 균주 접종 11일 이내에 모두 사망하였다(생존율 0%). 또한 이러한 ScaA는 보령 혈청형뿐만 아니라 카토 및 카프 혈청형에 감염된 경우에도 백신 효과를 보였으며 기존 사용되던 TSA56과 혼합 사용할 경우 더 뛰어난 백신 효과를 보였다.
- [13] 전술한 바의 실험 결과는 ScaA 단백질이 찌찌가무시 균에 대한 백신의 활성성분으로서 유용함을 보여주는 결과라 할 수 있다.
- [14] 본 발명은 이러한 실험 결과에 기초하여 제공되는 것으로서, 본 발명의 찌찌가무시 균에 대한 백신 조성물은 단리된 전장의 ScaA 단백질, 단리된 ScaA 단백질의 패신저 도메인 영역, 또는 단리된 ScaA 단백질의 패신저 도메인 영역의 실질적 일부를 활성성분으로 포함함을 특징으로 한다.
- [15] 본 명세서에서, "백신"은 숙주인 사람에게서 해당 병원체에 대한 면역 반응을 유도함으로써 해당 병원체의 감염 또는 재감염의 예방, 해당 병원체에 의한 증상의 중증도 감소 또는 증상의 제거, 또는 해당 병원체나 그 병원체 의한 질환의 실질적 또는 완전한 제거를 포함하는 의미이다. 따라서 본 발명의 백신 조성물은 해당 병원체의 감염 전에 예방적으로 사람에게 투여되거나 해당 병원체의 감염 후에 치료적으로 사람에게 투여될 수 있다. 여기서 상기 "면역 반응"은 체액성 면역 반응, 세포성 면역 반응 또는 이들을 모두 포함하는 의미이다.
- [16] 또 본 명세서에서, "단리된"은 그 대상 물질이 원래의 유기체(즉 본 발명에서는 찌찌가무시 균)에서 분리되었거나 유전자 재조합 방법에 의하여 제조될 경우 형질전환된 유기체로부터 분리되었음을 의미한다.
- [17] 또 본 명세서에서, "활성성분"은 단독으로 면역 반응을 유도하거나 또는 그 자체로는 면역 반응을 유도할 수 없는 담체와 함께 면역 반응을 유도할 수 있는 성분을 의미한다. 따라서 활성성분은 스스로가 반드시 면역원성(면역 반응을 유도할 수 있는 능력)일 필요는 없다. 본 발명에서 상기 활성성분은 필수적이지는 않지만 정제된 것이 바람직하다. 여기서 "정제된"은 그 대상 물질이 존재하는 원래의 유기체(즉 본 발명에서는 찌찌가무시 균)나 형질전환된 유기체의 세포 성분 또는 그 배양액 성분(즉 오염물)이 실질적으로 감소되었거나 제거된 상태를 의미한다. 오염물이 실질적으로 감소되었거나 제거된 상태는

순도가 50% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 더 바람직하게는 99% 이상을 의미한다. 순도는 크로마토그래피, 겔 전기영동, 면역학적 분석 등 당업계에 공지된 방법을 통하여 평가될 수 있으며, 정제 방법도 당업계에 잘 공지되어 있다.

- [18] 본 명세서에서, 상기 "ScaA"는 찌찌가무시균의 Sca 단백질 5가지 유형 중 하나인 ScaA를 가리킨다. Sca 단백질은 숙주세포의 피브로넥틴(fibronectin)과 상호작용하여 숙주세포에 침입에 관여하는 단백질로서 C-말단 부위에는 오토트랜스포터(autotransporter) 도메인을 지니고 N-말단 부위에 신호 서열(signal peptide)을 지니며 중간에는 외벽 밖으로 발현하는 부위인 패신저(passenger) 도메인을 지니는데, 찌찌가무시균의 Sca 단백질 5가지 유형 즉 ScaA, ScaB, ScaC, ScaD 및 ScaE로 나누어진다. 이들 Sca 단백질은 보령균주에서만 확인되는 ScaB을 제외한 나머지 단백질의 아미노산 서열은 혈청형간에 상동성이 비교적 높은 것으로 확인되었다(ScaA: 65.8~81.8%, ScaC: 77.4~97.5%, ScaD: 69.7~93.8%, ScaE: 62.8~85.3%)(Ha et al., 2011 Infect Immun 79:1718-27). 본 명세서에서, 상기 "ScaA"는 바람직하게는 그 전장(full-length)의 서열이 GenBank accession no. CAM79168.1 또는 서열번호 1에서 확인되는 단백질을 말한다. 이 ScaA 단백질의 유전자 서열도 GenBank accession no. CAM79168.1 또는 서열번호 3에서 확인할 수 있다.
- [19] 또 본 명세서에서, "단리된 ScaA 단백질의 패신저 도메인 영역의 실질적 일부"란 ScaA 단백질의 패신저 도메인 영역 중에서 80% 이상의 연속된 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드를 말하며, 바람직하게는 GenBank accession no. CAM79168.1 또는 서열번호 1에서 26번째 아미노산에서부터 1186번째 아미노산까지의 ScaA 단백질의 패신저 도메인 영역 중에서 80% 이상의 연속된 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드를 말한다. 아래의 실시예에서 본 발명자들은 총 1161 아미노산 서열로 이루어진 ScaA 단백질의 패신저 도메인 영역 중 30번째 아미노산 서열에서 1000번째 아미노산 서열까지 총 971개의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드를 제조하였을 때 이 폴리펩티드가 백신으로서 충분히 기능함을 확인한 바 있는데, 이 폴리펩티드는 ScaA 단백질의 패신저 도메인 영역 중에서 83.6%에 해당하는 연속된 아미노산 서열로 이루어진 것이다. 이러한 실험 결과는 80% 이상의 연속된 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드도 백신으로서 충분히 기능할 수 있음을 시사하는 것이라 할 수 있다.
- [20] 또 본 명세서에서, 상기 "찌찌가무시 균"은 오리엔티아 찌찌가무시를 의미하는 것으로 그 하위 분류인 길리엄(Gilliam) 혈청형, 카프(Karp) 혈청형, 카토(Kato) 혈청형 및 보령(Boryoung) 혈청형을 포함하는 의미이다.
- [21] 본 발명에서 상기 ScaA 단백질이나 그 패신저 도메인 영역 등은 DNA 재조합 기술에 대해 당업계에 공지된 방법으로 제조할 수 있다. 이러한 방법은 (i) 상기 분자를 암호화하는 유전자를 포함하는 발현백터를 제조하고 (ii) 이 발현백터를 숙주세포에 형질전환시키고 (iii) 형질전환된 숙주세포를 배양하고, 마지막으로

- (iv) 그 배양물로부터 원하는 분자를 분리·정제하는 단계를 포함한다.
- [22] 상기 분자를 암호화하는 유전자는 그 유전자 서열을 이용하여 쪼쪼가무시 균으로부터 얻을 수 있다. 예컨대 그 균의 게놈 DNA를 확보한 후 그 유전자 서열에 기초하여 제작된 프라이머로 증폭하여 얻을 수 있다.
- [23] 상기 발현백터는 플라스미드 또는 바이러스로부터 유래된 것일 수 있으며, 직접 제작하여 사용하거나 생명공학 회사 예컨대 노바젠(Novagen) 사, 다카라슈조 사, 키아젠(Qiagen) 사, 스트라타진(Stratagene) 사, 프로메가(Promega) 사, 로슈 다이아그노스틱스(Roche Diagnostics) 사, 인비트로젠(Invitrogen) 사, 제네틱스 인스티튜트(Genetics Institute) 사 등으로부터 상업적으로 입수하여 사용할 수 있다.
- [24] 발현백터는 원하는 분자(ScaA 또는 그 패신저 도메인 등, 이하 "목적 단백질")를 암호화하는 유전자(이하 "목적 유전자")를 포함하고 그 목적 유전자의 발현을 유도하는 서열을 포함하여 구성된다. 여기서 목적 유전자의 발현을 유도하는 서열은 프로모터 서열, 폴리아데닐화 서열 등을 말한다. 여기서 프로모터는 목적 유전자의 전사를 유도할 수 있는 서열로서, 사이토메갈로 바이러스의 즉시 초기형 프로모터, SV40의 프로모터(SV 40 후기형 프로모터 및 SV 40 초기형 프로모터), HSV(herpes simplex virus)의 tk 프로모터, 아데노바이러스 2 주요 후기형 프로모터(Adeno 2 major late promoter PAdml), 아데노 바이러스 2 초기형 프로모터(PAdE2) 등이 예시될 수 있으며, 또한 여기서 폴리아데닐화 서열은 전사 종결 서열로서 소성장 호르몬 터미네이터(Gimmi, E. R., et al., Nucleic Acids Res. 17:6983-6998(1989)), SV40 유래 폴리 아데닐화 서열(Schek, N, et al., Mol. Cell Biol. 12:5386-5393(1992)), HIV-1 polyA(Klasens, B. I. F., et al., Nucleic Acids Res. 26:1870-1876(1998)), β -글로빈 polyA(Gil, A., et al, Cell 49:399-406(1987)) 등이 예시될 수 있다.
- [25] 또한 상기 발현백터는 선택적으로 리포터(예: 루시퍼라아제, β -글루쿠로니다아제) 유전자나 선택 표지 유전자로서 항생제(예: 네오마이신, 카베니실린, 카나마이신, 스펙티노마이신, 하이그로마이신 등) 내성 유전자 등을 포함할 수 있으며, 또한 선택적으로 발현 효율을 향상시키기 위하여 인핸서 분자를 포함할 수 있다.
- [26] 형질전환될 수 있는 숙주세포로는 세균 등의 원핵 세포(예를 들면 대장균, 고초균)나, 효모(예를 들면 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*)), 곤충 세포(예를 들면 Sf 세포), 포유 동물 세포(예를 들면 COS, CHO, BHK) 등의 진핵 세포를 사용할 수 있다.
- [27] 형질전환 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 사용할 수 있으며, 그러한 방법으로서 예컨대 미세 주입법(Capecchi, M.R., Cell, 22:479(1980)), 칼슘 포스페이트 침전법(Graham, F.L. et al., Virology, 52:456(1973)), 전기천공법(Neumann, E. et al., EMBO J., 1:841(1982)), 리포솜-매개 형질감염법(Wong, T.K. et al., Gene, 10:87(1980)), DEAE-덱스트란 처리법(Gopal, Mol. Cell Biol.,

- 5:1188-1190(1985)), 유전자 밤바드먼트(Yang et al., Proc.Natl. Acad. Sci., 87:9568-9572(1990)), 초산-리튬 DMSO법(Hill et al., Nucleic Acid Res., 19, 5791(1991)) 등을 들 수 있다.
- [28] 형질전환된 숙주세포의 배양도 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다.
- [29] 세포 배양에 사용되는 배지는 형질전환된 숙주세포가 효율적으로 이용할 수 있는 탄소원, 질소원, 무기염 등을 포함한다면 천연 배지와 합성 배지 모두를 사용할 수 있다. 만일 숙주세포로서 동물세포를 사용할 경우, 예컨대 Eagles's MEM (Eagle's minimum essential medium, Eagle, H. Science 130:432(1959)), α -MEM (Stanner, C.P. et al., Nat. New Biol. 230:52(1971)), Iscove's MEM (Iscove, N. et al., J. Exp.Med.147:923(1978)), DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's medium, Dulbecco, R. et al., Virology 8:396(1959)) 등을 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 배지에 대해서 구체적인 것은 문헌 [R. Ian Freshney, Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique, Alan R. Liss, Inc., New York]를 참조할 수 있다.
- [30] 목적 단백질의 분리·정제 방법도 당업계에 공지되어 있으며, 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다. 예컨대 한외 여과, 겔 여과, 이온 교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피(표지 펩티드가 결합된 경우), HPLC, 소수성 크로마토그래피, 등전점 크로마토그래피 등의 방법이나 이들을 조합하는 방법이 사용될 수 있다.
- [31] DNA 재조합 기술에 의한 본 발명의 목적 단백질의 생산에 대해서는 본 명세서의 기재 내용 이외에 문헌[Sambrook 등, Molecular Cloning A Laboratory Mannual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, US(1989)], 문헌[DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985)], 문헌[Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait ed. 1984)], 문헌[Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)], 문헌[Transcription And Translation (B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)], 문헌[Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed. (1986))], 문헌[Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, (1986)], 문헌[B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984)], 문헌[Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Jon Willey & Sons, US(1993)], 문헌[F.M. Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (1994)], 문헌[Sambrook, J. & Russel, D., Molecular Cloning, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001년 1월 15일 발행의 제1권 7.42 내지 7.45, 제2권 8.9 내지 8.17] 등을 참조할 수 있다. 이들 문헌은 본 명세서의 일부로서 간주 된다.
- [32] 한편 아래의 실시예는 ScaA 항원을 TSA56(56-kDa Type-Specific Antigen, 56kDa) 항원과 함께 사용할 경우 백신으로서의 효과가 더 뛰어남을 보여준다.
- [33] 따라서 본 발명의 백신 조성물은 활성성분으로서 ScaA 이외에 TSA56을

추가로 포함할 수 있다. TSA56을 이용한 재조합 단백질 백신은 주입한 혈청형 균주에 대해서만 방어 면역을 보이거나 방어 면역능의 지속 기간이 짧은 문제점이 있다고 알려져 있다(Seong et al., 1997. *Infect.Immun.* 65, 1541-1545; Yu et al., 2005. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 72, 458-46).

- [34] 본 명세서에서, 상기 "TSA56"은 숙주세포의 세포 외 기질 당단백질인 피브로넥틴과 상호작용하여 균의 숙주세포 감염을 돕는 기능을 가지는 찌찌가무시 균의 세포막 단백질을 말한다(Lee et al., *J Infect Dis.* 2008;198: 250-257; Cho BA et al., *Infect Immun.* 2010 May;78(5):1915-23.). 바람직하게는 그 전장(full-length)의 서열이 GenBank accession no. CAM79668.1 또는 서열번호 2에서 확인되는 단백질을 말한다. 서열번호 2에 개시된 TSA56 단백질의 유전자 서열도 GenBank accession no CAM79668.1 또는 서열번호 4에서 확인할 수 있다.
- [35] 본 발명의 백신 조성물에 활성성분으로서 ScaA와 함께 포함될 수 있는 TSA56은 그 전장의 단백질뿐만 아니라 그것의 항원성 영역(antigenic domain)일 수 있으며 그 항원성 영역의 실질적 일부일 수 있다. 여기서 항원성 영역은 [도 1]의 모식도에 있어서 도메인 AD I에서부터 AD IV까지 연속적인 아미노산 서열로 이루어진 영역을 말하며, 서열번호 2에서는 19번째 아미노산에서 432번째 아미노산까지의 서열을 말한다. 이들 도메인은 항체 생성이 높은 도메인으로 알려져 있다(*Infect Immun.* 1999 67(11): 6194~6197).
- [36] 또 상기에서 "항원성 영역의 실질적 일부"란 도메인 AD I에서부터 AD IV까지 연속적인 아미노산 서열로 이루어진 영역에서 80% 이상의 연속된 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드를 말하며, 바람직하게는 서열번호 2에서 19번째 아미노산에서부터 432번째 아미노산까지의 TSA56 단백질의 항원성 영역 중에서 80% 이상의 연속된 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드를 말한다. 아래의 실시예에서 서열번호 2의 총 414개의 아미노산으로 서열로 이루어진 TSA56 단백질의 항원성 영역 중 85번째 아미노산에서 420번째 아미노산까지의 총 336개의 아미노산으로 이루어진 폴리펩티드를 제조하고 그 폴리펩티드가 백신으로서 충분히 기능함을 확인한 바 있는데, 이 폴리펩티드는 TSA56 단백질의 항원성 영역 중에서 81.1%에 해당하는 연속된 아미노산 서열로 이루어진 것이다. 이러한 실험 결과는 80% 이상의 연속된 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드도 백신으로서 충분히 기능할 수 있음을 시사하는 것이라 할 수 있다.
- [37] 본 발명의 백신 조성물은 임의의 적절한, 약학적으로 허용되는 제제로 제조될 수 있다. 예컨대 즉석 투여 용액 또는 현탁액 형태이거나, 투여 전 희석에 적절한 농축된 원액이거나, 또는 재구성 가능한 형태 예컨대 동결건조, 냉동-건조, 또는 냉동 제제 형태로 제조될 수 있다.
- [38] 본 발명의 백신 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 포함하여 제제화될 수 있다. 백신 조성물의 제제화를 위하여 사용될 수 있는 약학적으로 허용되는 담체는 대한민국 약전이나 제외국의 약전 특히 미국, 일본, 유럽의 약전에

열거·규정되어 있다.

- [39] 이러한 담체는 통상 희석제, 부형제, 안정화제, 방부제 등을 포함할 것이다. 적절한 희석제로서는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유, 땅콩유와 같은 식물성유 등의 비수성 용매나 염수(바람직하게는 0.8%의 염수), 완충 매질을 포함한 물(바람직하게는 0.05M의 인산염 완충액) 등의 수성 용매 등을 들 수 있고, 적절한 부형제로서는 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카 겔, 나트륨 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 활석, 나트륨 클로라이드, 무수 탈지유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등을 들 수 있으며, 적절한 안정화제로서는 소르비톨, 만니톨, 전분, 수크로스, 텍스트란, 글루타메이트, 글루코스 등의 탄수화물이나 분유, 혈청 알부민, 카제인 등의 동물성, 식물성 또는 미생물성 단백질 등의 단백질을 들 수 있다. 적절한 방부제로서는 티메로살, 메르티올레이트, 젠타마이신, 네오마이신, 니스타틴, 암포테리신 B, 테트라사이클린, 페니실린, 스트렙토마이신, 폴리믹신 B 등을 들 수 있다.
- [40] 본 발명의 백신 조성물은 항원 보조제(adjuvant)를 추가로 포함할 수 있다. 항원 보조제는 항원에 대한 면역 반응을 증강시키는 하나 이상의 물질로 이루어진 것일 수 있다. 보조제는 항원을 서서히 방출시키는 조직 저장소로서 및/또는 면역 반응을 비특이적으로 증강시키는 임파성 시스템 활성화자로서 기능할 수 있다(Hood et al., Immunology, Second Ed., 1984, benjamin/Cummings: Menlo Park, California, p.384). 항원 보조제는 예컨대 완전 프로인트(Freund), 불완전 프로인트, 사포닌, 겔 성상의 알루미늄 보조제, 표면 활성 물질(예: 리소레스틴, 플루론 글리콜, 다중 음이온, 펩티드, 오일 또는 탄화수소 에멀전 등), 식물성 오일(면실유, 땅콩유, 옥수수유 등), 비타민 E 아세테이트 등일 수 있다.
- [41] 현재 인체에 적용 가능한 항원 보조제 중에서 가장 널리 사용되고 있는 것은 알루미늄 보조제이며, 이러한 알루미늄 보조제는 인산알루미늄(Aluminum phosphate), Potassium aluminum sulfate, 수산화 알루미늄(Aluminum hydroxide) 등 알루미늄 염(Aluminium salts)의 겔 성상으로 사용되고 있다. 이러한 알루미늄 보조제는 일반적으로 Th2-type의 면역반응을 이끌어내어 백신 효과를 증강시키는 것으로 알려져 있다(Sokolovska A et al., Vaccine. 2007 Jun 6;25(23):4575-85; O'Hagan DT AND Rappuoli R., Pharm Res. 2004 Sep;21(9):1519-30.) 본 발명의 실시예에서 사용한 Invivogen사의 Alhydrogel®은 수산화 알루미늄(Aluminium hydroxide)의 겔 형태 현탁액(colloidal)이다. 이러한 알루미늄 보조제는 그 제조 방법이 당업계에 공지되어 있어(R. Bomford. Immunological Adjuvants and Vaccines. NATO ASI Series 1989;179:35-41; Vogel FR AND Powell MF. Pharm Biotechnol. 1995;6:141-228.;Derek T. O'Hagan, Methods in Molecular Medicine. 2000; April 15; 42: 65-90) 직접 제조하여 사용하거나, 상업적으로 유통되는 제품을 구입하여 사용할 수도 있다. 상업적으로 유통되는 제품으로서의 아래의 실시예에서 사용된 Invivogen사의 Alhydrogel® 2% 제품을

비롯하여 Sigma사의 Aluminum hydroxide Gel 제품, BRENNTAG사의 Alhydrogel™ 제품 등을 들 수 있다.

- [42] 본 발명의 백신 조성물은 임의적 단위 용량으로 제조될 수 있다. 단위 용량은 사람에게 1회 이상 투여되기 위한 용도로 포장된 날개의 제품에 포함된 활성성분과 약학적으로 허용되는 담체의 양을 말하는 것으로, 이러한 활성성분과 담체의 적절한 양은 본 발명의 백신 조성물이 1회 이상 접종될 때 백신으로서 기능할 수 있는 양으로 이러한 양은 당업자의 통상의 능력 범위 내에서 비임상적 및 임상적으로 결정될 수 있다.
- [43] 본 발명의 백신 조성물은 바람직하게는 비경구적으로 예컨대 직장, 경피, 정맥 내 주사, 동맥 내 주사, 근육 내 주사, 피 내 주사, 피하 주사, 복막 내 주사, 심실 내 주사 등을 통해 투여될 수 있다.
- [44] 본 발명의 백신 조성물은 조절 방출 시스템으로 투여될 수 있다. 예컨대 그러한 조절 방출 시스템으로서 리포솜, 이식 삼투성 펌프, 경피 패치 등의 방식 등을 들 수 있다. 바람직하게는 리포솜 방식으로 활성성분을 전달하는 경우이다. 리포솜 방식에 의해 활성성분을 전달하는 것과 관련해서는 문헌[Langer, Science 249: 1527-1533 (1990)], 문헌[Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989)] 등을 참조할 수 있다. 여타의 활성성분의 전달 방식과 관련해서는 문헌[Langer, supra; Sefton, CRC Crit. Rev. Biomed. Eng. 14:201 (1987)], 문헌[Buchwald et al., Surgery 88: 507 (1980)], 문헌[Saunder et al., N. Engl. J. Med. 321:574 (1989)], 문헌 [Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Press, Boca Raton, Florida (1974)], 문헌[Controlled Drug Bioavailability. Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984)], 문헌[Ranger and Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61 (1983)], 문헌[During et al., Ann. Neurol. 25:351 (1989)], 문헌[Howard et al., J. Neurosurg. 71:105 (1989)] 등을 참조할 수 있다. 이들 문헌은 본 명세서의 일부로서 간주된다.
- [45] 본 발명의 백신 조성물의 투여량은 의료인에 의해 나이, 체중, 성별, 증상, 합병증, 다른 질환의 이환 유무 등의 환자 특성을 고려하여 결정될 수 있다.
- [46] 또한 투여의 시간적 간격과 횟수는 사용되는 제형이나 활성성분의 혈중 반감기 등을 고려하여 결정될 수 있다.
- [47] 이처럼 투여량과 투여의 시간적 간격이나 횟수는 의료인의 판단에 따라 좌우되고 개인에 따라 결정되어야 하지만, 통상의 적절한 투여량은 1일 기준 개인 체중 1kg당 약 0.1 내지 10mg 범위 내에서 결정될 것이고 투여 간격은 3 내지 10일, 투여 횟수는 1 내지 5회 범위 내에서 결정될 것이다.

발명의 효과

- [48] 진술한 바와 같이, 본 발명에 따르면 ScaA 단백질이나 그 패신저 도메인 영역을

이용한 찌즈가무시균에 대한 백신 조성물을 제공할 수 있다. 활성성분인 ScaA 단백질이나 그 패신저 도메인 영역은 보다 효과적인 면역 반응을 유도하기 위하여 필요에 따라 TSA56 등 다른 항원과 함께 사용될 수 있으며 항원 보조제를 추가로 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [49] 도 1은 ScaA 및 TSA56 단백질의 구조적 모식도와 증폭된 염기서열에 상응하는 아미노산 위치를 도시한 것이다. 백신에 사용된 항원 영역을 밑줄로 표시하였다.
- [50] 도 2 내지 도 4는 각각 백신 항원으로 사용된 ScaA, ScaC 및 TSA56의 핵산 및 아미노산 서열을 나열한 것이다. 백신에 사용된 항원 영역을 밑줄로 표시하였다.
- [51] 도 5는 정제된 찌즈가무시균 항원들(TSA56, ScaA, ScaC)을 전기영동 한 후 Coomassie blue 염색과 찌즈가무시병 환자 혈청을 이용한 immunoblot을 통하여 그 반응성을 확인한 결과이다.
- [52] 도 6은 항원 접종에 의하여 생성된 항원 특이적 항체반응을 나타내는 ELISA 결과이다.
- [53] 도 7은 각기 다른 찌즈가무시병 항원(TSA56, ScaA, ScaC)을 면역한 생쥐에 보령 균주를 감염시키고 그 생존율을 관찰한 결과이다.
- [54] 도 8은 ScaA 및 TSA56 항원과 Alhydrogel을 혼합하여 면역한 생쥐에 찌즈가무시균 보령, 카프, 카토 혈청형 균주를 감염시키고 그 생존율을 관찰한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [55] 본 발명을 실시예를 참조하여 설명한다. 그러나 본 발명의 범위가 이러한 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [56] <실시예 1> 찌즈가무시균의 genomic DNA 정제 및 백신 후보 항원 항원 유전자들의 증폭과 클로닝
- [57] 실험에 사용할 ScaA, ScaC 및 TSA56 항원 유전자는 오리엔티아 보령 혈청형(GenBank accession number AM494475.1)으로부터 획득하였다.
- [58] Sca 항원 및 TSA56 항원을 제조하기 위하여 먼저 보령 균주를 L929 세포(마우스 섬유아세포주; ATCC NTCT929)에 감염시켜 증식 배양하였으며, 감염 3-4일 후 간접면역형광기술을 수행하여 감염률을 확인하고 감염률이 90% 이상이 되면 세포를 600 x g로 20분 동안 원심분리하여 침전시키고 6.5ml의 Tris-sucrose(TS) 완충액(33mM Tris-Cl[pH 7.4] and 0.25 M sucrose)에 현탁시켰다. 현탁된 세포를 Polytron homogenizer(Wheaton Inc. Millville, NJ)를 이용하여 균질화한 후 5분 동안 200 x g로 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액을 TS 완충액에 들어있는 40% Percoll (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden)과 섞은 후 2500 x g에서 60분 동안 원심분리 하였다. 침전된 세균들을 모아 7700 x g로 30분 동안 원심분리하고, 얻어진 세균들에서 RBC Genomic DNA extraction kit(RBC Bioscience Co., Taipei City, Taiwan)를 이용하여 균의 유전체 DNA를

확보하였다.

[59] 찌찌가무시균 보령 혈청형의 정보(GeneBank accession number AM494475.1)를 기초로 하여 [표 1] 과 같이 디자인된 프라이머와 상기에서 분리한 유전체 DNA를 이용하여 ScaA 유전자를 GeneAmp PCR system 9700 thermal cycler (Applied Biosystems, USA)을 이용하여 증폭하였다. 여기서 PCR의 수행 조건은 다음과 같다

[60] ScaA: 95°C(5mins)에서 pre-heating 후 95°C(30s)-58°C(30s)-68°C(4min40s)을 30cycle 반복 진행 후 68°C(5mins)의 추가 반응하였다.

[61] ScaC: 95°C(5mins)에서 pre-heating 후 95°C(30s)-60°C(30s)-72°C(60s)을 30cycle 반복 진행 후 72°C(5mins)의 추가 반응하였다.

[62] TSA56: 95°C(5mins)에서 pre-heating 후 95°C(30s)-50°C(30s)-68°C(90s)을 30cycle 반복 진행 후 72°C(5mins)의 추가 반응하였다.

[63] 그리고 ScaA 및 ScaC 유전자의 증폭된 영역은 Sca 단백질의 구조적 모식도를 도시한 [도 1]에서 청색 라인(염기 서열)과 적색 라인(아미노산 서열)으로 표시된 패신저(passenger)도메인 영역이며, 여기서 서열 위치 표기는 보령 혈청형을 기준으로 하였다.

[64] 그리고 [도 1]에서 TSA56 유전자의 증폭된 영역도 함께 표시하였으며, 마찬가지로 청색 라인은 염기 서열을 표기한 것이고 적색 라인은 아미노산 서열을 표기한 것이며 보령 혈청형을 기준으로 하였다.

[65] 참고로 [도 1]에서 SP는 signal peptide, TM은 transmembrane, AT는 autotransporter domain, AA는 아미노산을 가리킨다.

[66] 증폭된 DNA 단편들은 pET28a vector에 클로닝하고 염기서열 분석을 통해 유전자 삽입을 확인하였다([도 2] 내지 [도 4] 참조).

[67] 표 1

[Table 1]

Gene		Primer sequence(3'→5')	Size(amplified region [nt position])
ScaA	Forward	AA GAATTC GATCCATCAGCTTCATCAAGT	2913(88-3000)
	Reverse	AA CTCGAG TATATCTTCGTCCTTGCCACC	
ScaC	Forward	GGCGGATCCAAAAGTATAACTCCAGAAAAGTG	600 (97-696)
	Reverse	CGGTCGACGTTTAATTTAGCACGATTTAT	

[68] <실시예 2> 백신 후보 항원 제조합 단백질의 제조 및 정제

[69] 상기에 얻은 유전체 DNA를 이용하여 상기 [표 1]의 프라이머로 증폭한 각 유전자를 pET28a vector에 삽입하고 이 벡터를 *Escherichia coli* BL21(DE3) (Novagen, Darmstadt, Germany)에 도입한 후 카나마이신(30μg/ml)를 함유 한 LB broth에서 배양하였다. 0.1mM isopropyl β-D-thiogalactoside(IPTG; Duchefa, Zwijndrecht, Netherlands)를 16°C에서 18시간 동안 배양하여 단백질의 발현을 유도하였으며 이후 균을 10분 동안 1,000xg의 속도로 원심분리한 후 1mg/ml의 리소자임(lysozyme)을 포함하는 결합 완충액(300 mM NaCl, 50 mM sodium phosphate buffer, 10mM imidazole)에 현탁시켜 4°C에서 30분 동안 반응시켰다.

이후 얼음 위에서 5분간 음파처리를 하였으며 이를 통해 얻어진 용해물을 1,600xg의 속도로 4°C에서 20분간 원심분리하였다. 상층액을 수거하고 결합 완충액으로 미리 평형화시킨 Ni-nitrilotriacetic acid (NTA) His-결합 레진(Qiagen)에 적용한 후 용리 완충액 (300 mM NaCl, 50 mM sodium phosphate buffer, 250 mM imidazole)를 부어 단백질을 얻어냈다. 단백질의 정제 여부는 SDS-PAGE분석을 통해 확인하였다[도 3]. 자유 이미다졸을 제거하기 위하여 PBS용액(pH7.4)에 4°C/18시간 동안 투석(Dialysis)을 진행하였으며 정제된 단백질은 내독소(Endotoxin)를 제거하기 위해 Endotoxin removal resin(Pierce)을 사용하였으며, 이를 LAL(Limulus ameobocyte lysate) assay kit(Lonza)을 이용하여 EU<0.05/dose 수준으로 제거되는 것을 확인한 후 면역 반응을 이용한 실험에 사용하였다.

[70] 순수 정제된 단백질들은 [도 5]에서와 같이 SDS PAGE와 Coomassie blue 염색, 찌찌가무시병 환자 혈청을 이용한 immunoblot으로 확인하였으며, 이 단백질 용액을 백신 항원으로 사용하였다.

[71] <실시예 3> 백신 후보 항원을 이용한 면역 활성화 실험

[72] <실시예 3-1> 실험 방법

[73] 마우스의 사용 및 관리

[74] 본 발명에서 사용된 마우스는 C57BL/6 strain이며 모든 실험에서 5주령의 암컷을 사용하였다.

[75] 본 동물실험은 서울대학교 동물실험위원회의 동물사용에 관한 규정에 따라 실시하였으며, 백신제제의 면역 및 균 감염실험은 Biosafety level 3 (BL3) 실험실 내에서 모두 진행하였다.

[76] Sca 단백질 항원 백신 접종 및 혈액 내 항체 정량

[77] Sca 등 단백질 항원 면역을 위해 정제된 재조합 Sca 등의 단백질 20 μ g을 인산 완충액과 총량이 50 μ l이 되게 섞어준 후, 2% Alhydrogel®(Invivogen, Vac-alu-50) 50 μ l을 첨가하여 총량 혼합 비율(final volume ratio)이 1:1이 되게 하여 실온에서 15분간 반응시켜 주었다.

[78] 백신 제제는 1ml 용량의 인슐린 주사기를 이용하여 총량 100 μ l을 마우스의 등(Dorsal part)의 피하(Subcutaneous)로 접종하였다. 각 시험군으로서 5 마리의 C57BL/6 strain 5주령의 암컷 마우스를 사용하였고, 시험군의 구성은 아래의 [표 2]와 같이 구성하였으며, 구체적으로 인산 완충액 단독(PBS), ScaA 재조합 단백질 단독, ScaC 재조합 단백질 단독, Alhydrogel과 ScaA 재조합단백질 혼합물, Alhydrogel과 ScaC 재조합단백질 혼합물, Alhydrogel과 56KDa 재조합단백질 혼합물, Alhydrogel과 동량의 ScaA, 56KDa(TSA56) 재조합단백질 혼합물을 접종한 마우스가 사용되었다(아래 [표 2] 참조).

[79] 표 2

[Table 2]

실험 및 대조군	Formula
인산완충액(PBS)	인산완충액(100 μ l)
ScaA항원	ScaA항원(20 μ g) + 인산완충액
ScaC항원	ScaC항원(20 μ g) + 인산완충액
2%Alhydrogel + ScaA항원	2%Alhydrogel(50 μ l) + ScaA항원(20 μ g) + 인산완충액
2%Alhydrogel + ScaC항원	2%Alhydrogel(50 μ l) + ScaC항원(20 μ g) + 인산완충액
2%Alhydrogel + 56KDa항원	2%Alhydrogel(50 μ l) + 56KDa항원 (20 μ g) + 인산완충액
2%Alhydrogel + ScaA항원 + 56KDa항원	2%Alhydrogel(50 μ l) + 56KDa항원 (20 μ g) + ScaA항원(20 μ g) + 인산완충액

- [80] 각각의 시험군에서 생쥐 5마리씩 면역하였고, 2주 간격으로 총 3회 접종을 실시하였다. 매회 접종 1주일 후 안와 채혈을 통해 각 마우스에서 50 μ l씩 채취하여 2500 x g로 5분간 원심하여 혈장을 분리하였다. 분리된 혈장을 Sca 등의 단백질에 대한 특이적인 항체 측정에 사용하였다. 또한 항원을 면역하지 않은 음성대조군에서 측정된 흡광도를 기준으로 항체 역가를 결정하였다.
- [81] Sca 등의 항원 특이 항체 정량을 위한 ELISA
- [82] ELISA 방법을 이용하여 면역 후 생성된 ScaA, ScaC 및 TSA56 항원에 대한 특이 항체 정량을 수행하였다.
- [83] Immunoassay plates(96-well plates; Nunc, Rochester, NY)에 각 ScaA, ScaC 및 TSA56 항원을 0.05M bicarbonate buffer (pH 9.5)에 1 μ g/ml의 농도로 첨가한 뒤 100 μ l/well로 분주하여 4°C에서 18시간 동안 코팅하였다. 이후 세척액(0.05% Phosphate Buffered Saline Tween-20, PBST)을 이용해 항원 용액을 제거하고 3% BSA(Bovine serum albumin)로 실온에서 2시간 동안 Blocking을 실시하였다. 준비된 생쥐의 혈장을 100배 희석하고 이를 1/2 씩 단계희석(serial dilution)하여 100 μ l/well로 첨가하여 실온에서 1시간 동안 반응시켜 주었다. 각 well을 PBST로 3회 세척하고 생쥐의 IgM, IgG₁ 또는 IgG_{2a}을 인식 할 수 있는 Horseradish peroxidase(HRP)-conjugated Rat-IgM 또는 Horseradish peroxidase(HRP)-conjugated Rat-IgG 항체를 실온에서 1시간 동안 반응시켜 준 뒤 다시 PBST로 3회 세척하였다. 발색약인 TMB 용액(KPL)사용하여 상온에서 10분간 반응시키고, 반응 정지액인 1N H₂SO₄를 50 μ l씩 각 well에 첨가하였다. Microplate reader을 이용해 450nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [84] 면역한 마우스의 쯔쯔가무시균 감염실험
- [85] 쯔쯔가무시균의 Sca 재조합 단백질 백신 제제를 접종하였을 경우 보호면역 반응이 유발되는지 확인하기 위해 인산 완충액 단독, ScaA(20 μ g) 재조합 단백질 단독, ScaC(20 μ g) 재조합 단백질 단독, Alhydrogel과 ScaA(20 μ g) 재조합 단백질 혼합물, Alhydrogel과 ScaC(20 μ g) 재조합 단백질 혼합물, Alhydrogel과 TSA56(20 μ g) 재조합단백질 혼합물의 실험군으로 나누어 1차 실험을 진행하였다.
- [86] 2주일 간격으로 총 3회 면역을 실시하였으며, 동종 혈청형(Homologous serotype)에 대한 반응을 살펴보기 위해 일주일 뒤 마우스에 반 수치량(Lethal Dose 50)의 10배, 100 배의 쯔쯔가무시균 보령 균주를 PBS에 200 μ l 용량으로

- 희석시킨 후, 마우스의 복강내로 주입하였으며 생존율을 확인하였다.
- [87] 1차 동물실험을 수행한 후 Sca 등의 재조합 단백질이 이종 혈청형(Heterologous serotype)에 대한 보호 면역 효과를 보이는지 확인하기 위한 2차 실험을 진행하였다. Alhydrogel 단독, Alhydrogel과 ScaA 재조합단백질 혼합물, Alhydrogel과 TSA56 재조합단백질 혼합물, Alhydrogel과 동량의 ScaA, TSA56 재조합단백질 혼합물 투여 실험군으로 나누어 실험을 수행하였다.
- [88] 2주일 간격으로 총 3회의 면역을 실시하였으며, 일주일 뒤 마우스에 반수치량(Lethal Dose 50)의 10배, 100 배의 쯔쯔가무시균 보령 균주 이외에 카프, 카토 균주를 PBS에 200 μ l 용량으로 희석시킨 후, 마우스의 복강내로 주입하였으며 생존율을 확인하였다.
- [89] <실시에 3-2> 실험결과
- [90] Sca 특이적 항체 생성 결과
- [91] 상기 실험 방법에 제시된 대로, 항원특이적인 IgG₁과 IgG_{2a} 항체의 isotype별로 측정을 실시하였다. IgG₁과 IgG_{2a} 항체를 측정한 이유는 IgG₁과 IgG_{2a} 항체가 각각 TH₂ 및 TH₁ 반응의 활성을 반영하는 것으로 알려져 있기 때문이다. TH₁ 면역반응은 주로 세포 매개 면역반응을 촉진하고 TH₂ 면역반응은 주로 체액 면역 반응을 촉진하는 것으로 알려져 있으며, 쯔쯔가무시균에 대한 효과적인 면역반응은 TH₁ 반응인 것으로 알려져 있다.
- [92] [도 6]에 ScaA, ScaC, TSA56 단백질 항원을 접종한 후 생성된 각각의 항원에 대한 항체 역가를 측정 결과를 나타내었다. IgG₁과 IgG_{2a} 항체 뿐 아니라 초기 면역 반응에 관여하는 IgM의 수치도 확인하였다.
- [93] [도 6]의 결과를 참조하여 보면, Alhydrogel과 ScaA 재조합 단백질 혼합물 및 Alhydrogel과 동량의 ScaA, TSA56 재조합단백질 혼합물을 면역한 마우스그룹에서 ScaA 특이적인 IgM, IgG₁, IgG_{2a} 항체가 모두 효과적으로 생성되었으며 이를 통해 강력한 체액성 면역 반응을 유발되었다는 것을 알 수 있다.
- [94] 면역한 마우스의 쯔쯔가무시균 감염실험 결과
- [95] 상기 실험 방법에 제시된 대로, 상기 [표 2]의 백신 후보 물질을 3회 접종 후 1주일 뒤 반수치량(Lethal Dose 50)의 10배, 100 배의 쯔쯔가무시균 보령, 카프, 카토 균주를 PBS에 200 μ l 용량으로 희석시킨 후, 마우스의 복강 내로 주입하고 마우스의 생존율(Survival rate)을 관찰한 결과를 [도 7] 및 [도 8]에 나타내었다.
- [96] [도 7]은 반수치량(Lethal Dose 50)의 10배, 100 배의 보령 혈청형 감염에 대한 생존율을 확인한 1차 실험 결과이며, [도 8]은 보령 혈청형, 카프 혈청형 및 카토 혈청형 감염에 대한 생존율을 추가적으로 확인한 2차 실험 결과이다.
- [97] [도 7]의 결과에서 나타나듯이, ScaC를 면역한 시험군(ScaC 및 Alum+ScaC)은 항원을 면역하지 않은 음성대조군(PBS)과 비슷하게 감염 12일과 13일 이내에 모두 사망하였으나, ScaA를 면역한 시험군에서는 항원보조제인 Alhydrogel과 혼합 투여할 경우(Alum+ScaA) 보령 혈청형의 주입량을 불문하고 1마리만

사망하고 나머지 생쥐들은 모두 생존하여 80%의 생존율을 보였다. 기존에 알려진 대로, 보령 균주에서 유래한 TSA56 단백질로 면역한 시험군(TSA56/Alum)은 모두 생존하였다. 따라서 ScaA는 ScaC에 비하여 더 효과적으로 방어 면역능을 유도할 수 있는 것으로 확인되었으며, 그 효능은 기존에 알려진 TSA56 단백질과 거의 유사한 것으로 확인되었다.

- [98] 또한 [도 8]을 참조할 때, 감염시킨 혈청형과 그 주입량을 불문하고 대체로 TSA56와 ScaA의 혼합 백신 제제, ScaA 백신 제제 및 TSA56 백신 제제 순으로 효과가 높음을 알 수 있다. 특히 TSA56와 ScaA의 혼합 백신 제제는 보령 혈청형 및 카프 혈청에 대해서 실험 기간인 30일까지 100% 생존율을 보였다.

[99]

서열목록 Free Text

- [100] 서열번호 1: ScaA 단백질의 아미노산서열
 [101] 서열번호 2: TSA56 단백질의 아미노산서열
 [102] 서열번호 3: ScaA 단백질의 염기서열
 [103] 서열번호 4: TSA56 단백질의 염기서열

청구범위

- [청구항 1] 단리된 전장의 ScaA 단백질, 단리된 ScaA 단백질의 패신저 도메인 영역, 또는 단리된 ScaA 단백질의 패신저 도메인 영역의 실질적 일부를 활성성분으로 포함하는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균에 대한 백신 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 단리된 ScaA 단백질의 패신저 도메인 영역의 실질적 일부는 서열번호 1에서 26번째 아미노산에서부터 1186번째 아미노산까지의 ScaA 단백질의 패신저 도메인 영역 중에서 80% 이상의 연속된 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드인 것을 특징으로 하는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균에 대한 백신 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 단리된 ScaA 단백질의 패신저 도메인 영역의 실질적 일부는 서열번호 1에서 30번째 아미노산 서열에서 1000번째 아미노산 서열까지 총 971개의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드인 것을 특징으로 하는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균에 대한 백신 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 오리엔티아 쯔쯔가무시 균은 카프 혈청형, 카토 혈청형, 길리엄 혈청형 및 보령 혈청형에서 선택된 혈청형인 것을 특징으로 하는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균에 대한 백신 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 오리엔티아 쯔쯔가무시 균은 보령 혈청형, 카프 혈청형 및 카토 혈청형에서 선택된 혈청형인 것을 특징으로 하는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균에 대한 백신 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균에 대한 백신 조성물.
- [청구항 7] 제6항에 있어서,
상기 약학적으로 허용되는 담체는 희석제, 부형제, 안정화제 및 방부제로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균에 대한 백신 조성물.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 단리된 TSA56 단백질 또는 그것의 단리된 항원성 영역을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균에 대한 백신 조성물.
- [청구항 9] 제1항 내지 제8항에 있어서,

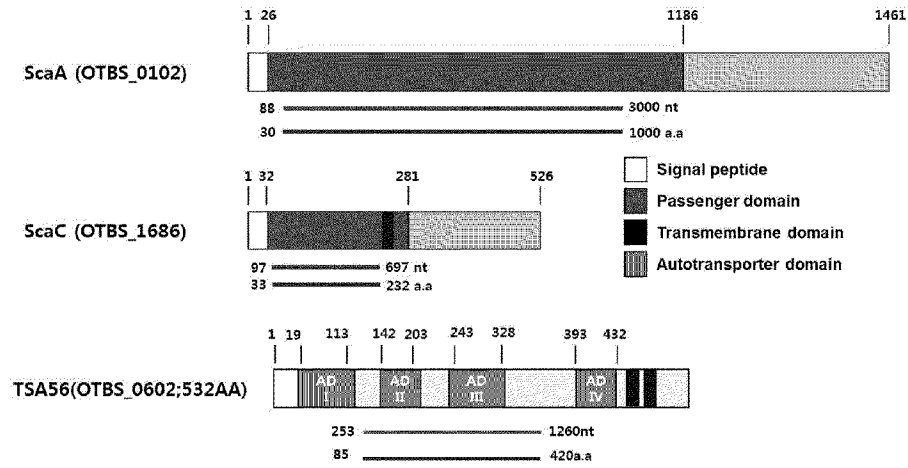
[청구항 10]

상기 조성물은 항원 보조제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균에 대한 백신 조성물.

제9항에 있어서,

상기 항원 보조제는 겔 상의 알루미늄염인 것을 특징으로 하는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균에 대한 백신 조성물.

[Fig. 1]



- Nucleotide sequences

- Amino acid sequences

[illegible]

ScaC (OTBS_1686)

- Amino acid sequences

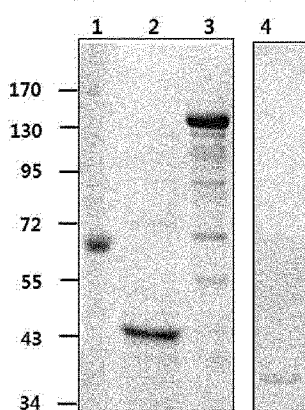
- Amino acid sequences

TSA56(OTBS_0602)
- Nucleotide sequences

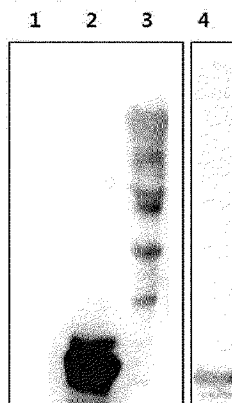
- Amino acid sequences

[illegible]

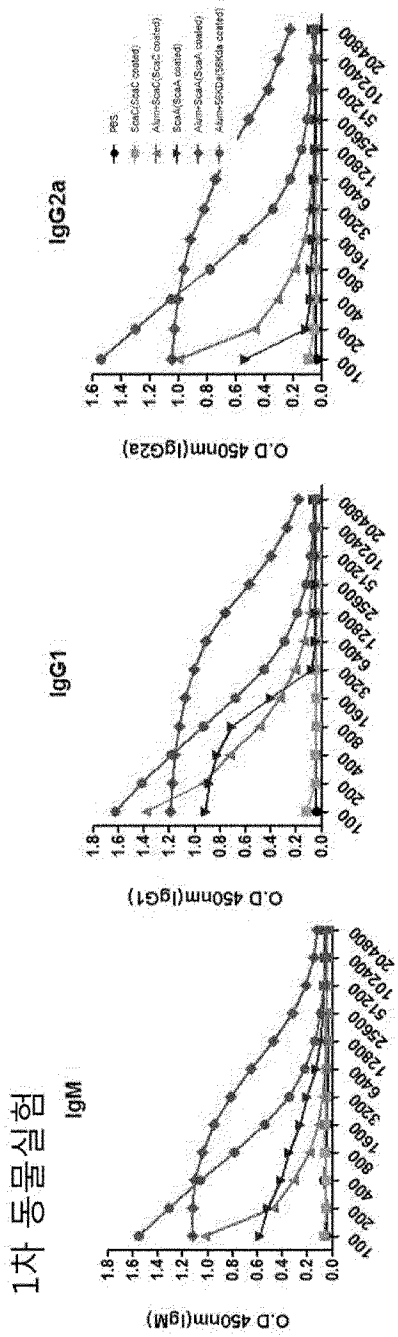
Coomasie stain



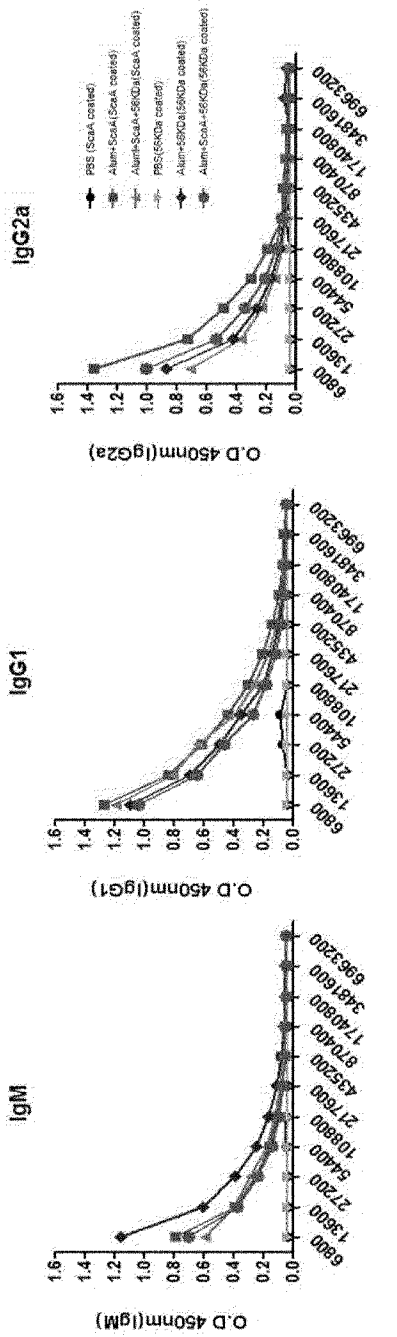
1 : BSA
2 : TSA56
3: ScaA30-1000-His
4: ScaC33-232-His



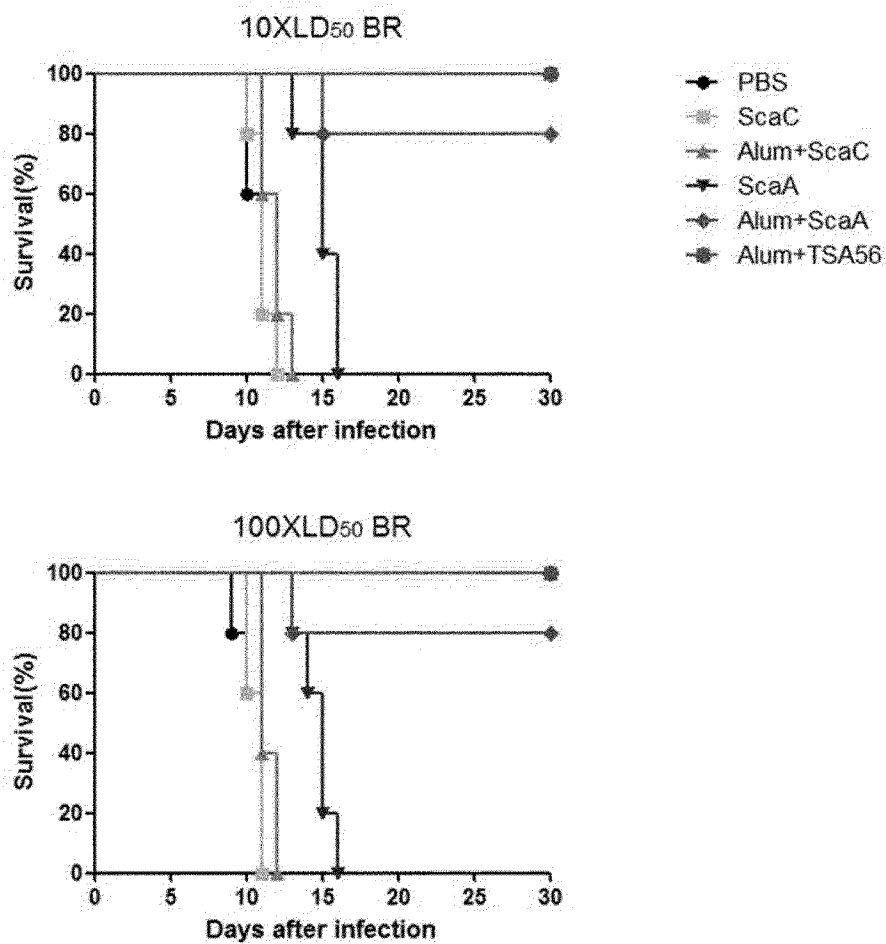
[Fig. 6]



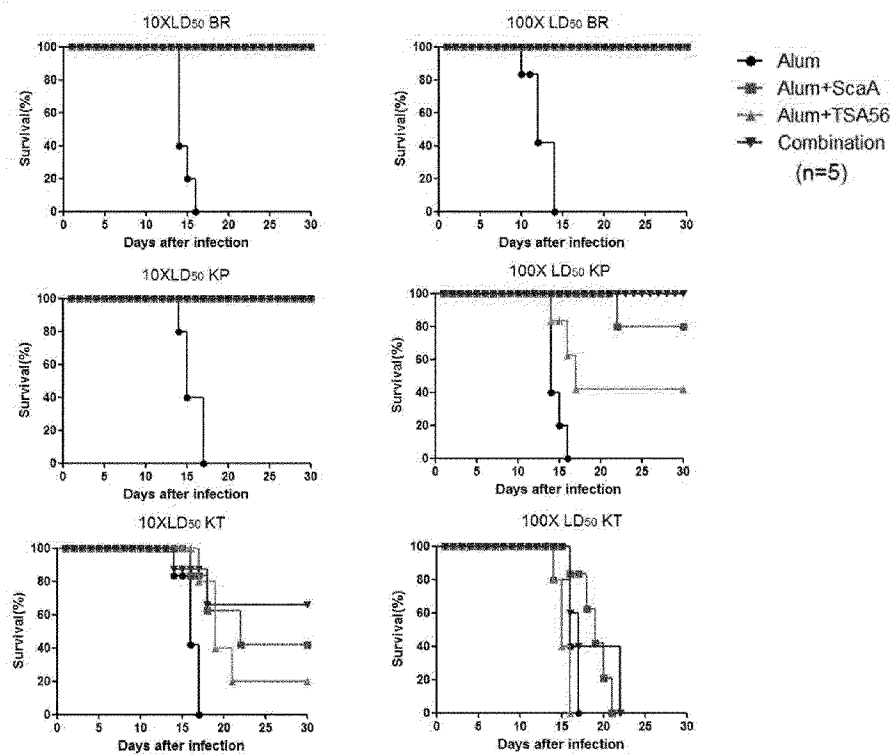
2차 동물실험



[Fig. 7]



[Fig. 8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/003710**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****A61K 38/16(2006.01)i, A61K 39/39(2006.01)i, A61K 39/00(2006.01)i, A61P 31/00(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)

A61K 38/16; A61K 39/02; A61K 39/21; G01N 33/569; A61K 39/39; A61K 39/00; A61P 31/00

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: Orientia tsutsugamushi, ScaA, passenger domain, serotype, TSA56

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HA et al., "Sea autotransporter protein of Orientia tsutsugamushi, novel vaccine target" Abstract of International Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies, P. 200, Poster Number A052 (17-18 October 2013) See the entire document.	1-8
X	HA et al., "Molecular characterization of sea genes found in Orientia tsutsugamushi genome" Journal of Bacteriology and Virology, Vol. 43, No. 2, pp. 155-158 (June 2013) See abstract; pages 155, 157; and figure 1.	1-8
A	WO 2011-108785 A1 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) 09 September 2011 See the entire document.	1-8
A	US 2006-0039920 A1 (CHING et al.) 23 February 2006 See the entire document.	1-8
A	NCBI, NCBI Reference Sequence no. YP_001248133.1 (10 June 2013) See the entire document.	1-8
A	NCBI, UniProtKB/Swiss-Prot accession no. Q02938.2 (13 November 2013) See the entire document.	1-8



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 JANUARY 2015 (19.01.2015)

Date of mailing of the international search report

19 JANUARY 2015 (19.01.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

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

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/003710**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.: **10**
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:
Claim 10 refers to claim 9 which does not comply with the requirement of PCT Rule 6.4(a), and thus claim 10 cannot be defined. Therefore, a meaningful international search cannot be carried out (PCT Article 6).

3. ☒ Claims Nos.: **9**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/003710

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2011-108785 A1	09/09/2011	KR 10-1209344 B1 KR 10-2011-0100759 A	06/12/2012 15/09/2011
US 2006-0039920 A1	23/02/2006	AU 2003-234538 A1 JP 2005-538948 A KR 10-2005-0027985 A US 2008-0044806 A1 US 7306808 B2 US 7820395 B2	02/12/2003 22/12/2005 21/03/2005 21/02/2008 11/12/2007 26/10/2010

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 38/16(2006.01)i, A61K 39/39(2006.01)i, A61K 39/00(2006.01)i, A61P 31/00(2006.01)j

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 38/16; A61K 39/02; A61K 39/21; G01N 33/569; A61K 39/39; A61K 39/00; A61P 31/00

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: 오리엔티아 쓰쓰가무시, ScaA, 패신저 도메인, 혈청형, TSA56

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	HA 외, 'Sca autotransporter protein of Orientia tsutsugamushi, novel vaccine target' 한국미생물학회연합 국제학술대회 초록집, p.200, 포스터 번호 A052 (2013.10.17-18) 전체 문헌 참조.	1-8
X	HA 외, 'Molecular characterization of sca genes found in Orientia tsutsugamushi genome' Journal of Bacteriology and Virology, Vol.43, No.2, pp.155-158 (2013.06) 요약; 페이지 155, 157; 및 도면 1 참조.	1-8
A	WO 2011-108785 A1 (서울대학교 산학협력단) 2011.09.09. 전체 문헌 참조.	1-8
A	US 2006-0039920 A1 (CHING 외) 2006.02.23. 전체 문헌 참조.	1-8
A	NCBI, NCBI Reference Sequence no. YP_001248133.1 (2013.06.10.) 전체 문헌 참조.	1-8
A	NCBI, UniProtKB/Swiss-Prot accession no. Q02938.2 (2013.11.13.) 전체 문헌 참조.	1-8

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

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

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

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

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

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2015년 01월 19일 (19.01.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 01월 19일 (19.01.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 ++82 42 472 3473

심사관

김승범

전화번호 +82-42-481-3371



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

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 아래에 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: 10
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
청구항 제10항은 PCT 규칙 6.4조(a)의 규정을 충족시키지 않는 청구항 제9항을 인용하고 있어 청구범위 해석이 곤란하므로 유효한 국제조사를 할 수 없습니다(PCT 제6조).
3. ☒ 청구항: 9
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2011-108785 A1	2011/09/09	KR 10-1209344 B1 KR 10-2011-0100759 A	2012/12/06 2011/09/15
US 2006-0039920 A1	2006/02/23	AU 2003-234538 A1 JP 2005-538948 A KR 10-2005-0027985 A US 2008-0044806 A1 US 7306808 B2 US 7820395 B2	2003/12/02 2005/12/22 2005/03/21 2008/02/21 2007/12/11 2010/10/26